

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001491-01

**산육능력 향상, 식품안전성 확보 및 수정능력유지가
가능한 웅취제거기법 개발**

Development of boar taint elimination technique
to improve fattening performance, obtain food safety
and maintain fertility compared with general castration

연구기관

고려대학교 생명공학부

고려대학교 식품공학부

새원앤엘주식회사

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “산육능력향상, 식품안전성확보 및 수정능력유지가 가능한 옹취제거기법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 06 월 18 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 이 동 호

연 구 원 : 김 나 현

연 구 원 : 김 금 옥

연 구 원 : 권 재 영

연 구 원 : 차 수 정

연 구 원 : 김 선 희

연 구 원 : 정 선 아

세부연구기관명 : 고려대학교

세부연구책임자 : 김 세 헌

연 구 원 : 이 진

연 구 원 : 최 승 혜

세부연구기관명 : 고려대학교

세부연구책임자 : 홍 기 창

연 구 원 : 김 준 모

연 구 원 : 임 규 상

연 구 원 : 이 은 아

연 구 원 : 강 지 훈

협동연구기관명 : 새원앤엘주식회사

협동연구책임자 : 나 종 주

연 구 원 : 송 정 근

요 약 문

I. 제 목

산육능력향상, 식품안전성확보 및 수정능력유지가 가능한 웅취제거기법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

수태지의 거세는 식육의 품질을 극도로 저하시키는 원인인 웅취를 제거하기 위하여 현재 우리나라에서 거의 전수에 대해서 시행되고 있다. 그러나 돼지의 고환을 제거하는 외과적인 시술방법은 웅성호르몬 분비의 완전차단으로 인한 산육능력저하와 스트레스로 인한 동물복지저해 등의 문제를 발생시킨다. 이를 대체하기 위해서 호주의 화이자사는 임프로박(Improvac)이라는 제품을 개발하여 상용화하였으나, 면역적방법을 이용한 비외과적거세기법으로써 웅취를 완전히 제거해 줄 수는 있지만, 기존과 동일하게 웅성호르몬의 기능을 완전히 제거한다는 점에서, 산육능력이 충분히 발휘될 수 없으며, 백신접종으로 인한 스트레스 발생은 여전히 존재한다. 뿐만 아니라, 혈액내 백신잔류로 인한 돈육식품안전성 위협과, 접종에도 불구하고 비거세돈으로 판정받는 등의 여러 문제점들을 갖고 있다. 따라서, 이를 근본적으로 해결하기 위해서는 웅취를 발생시키는 요인들만을 효과적으로 제거시킴으로써, 기존의 외과적 거세방법과 백신접종의 문제점을 원천적으로 해결할 필요가 있다. 이에 본 과제는 웅취를 발생시키는 원인물질인 안드로스테논과 스케이톨만을 제거시키는 비외과적 비백신거세기법을 개발하고자 한다. 이를 통해 기존의 거세기법들과는 달리 웅취를 제거하면서도 웅성기능이 상실되지 않고 스트레스를 주지않게 되어, 비육돈에서는 성장과 사료효율 같은 산육능력이 더욱 향상될 뿐만 아니라, 돈육식품안전성을 확보할 수 있으며, 나아가서 종돈에서는 수정능력을 유지시킴으로써 선발강도를 증대시킬 수 있다. 궁극적으로 양돈산업현장에서 수태지의 생산성과 활용성을 극대화하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 웅취를 발생시키는 원인물질인 안드로스테논과 스케이톨만을 제거시키는 방법을 개발하고자, 우선 안드로스테논 분해활성효소(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase)의 활성을 증진시키는 물질과 스케이톨 생성을 억제하는 probiotic 균주를 선별하였다. 안드로스테논 분해활성효소의 활성을 증진시키는 물질로 갈근추출물을 선별하였고, probiotic 균주인 5GS2에서 스케이톨 감소효과를

확인하였다. 또한 동물실험에서 효능을 확인하기 위해, 이 균주를 사료첨가물로 사용하여 돼지사양 실험을 수행하였다. 응취관련 DNA 표지인자로는 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 내의 SNP22와 SNP34가 응취원인물질 중 안드로스테논 함량에 효과가 있음을 확인하였다.

따라서 연구개발의 범위는 다음과 같다.

제 1 절 간세포 내 androstenone 분해활성물질 발굴

- 제 1 항 간세포 내 androstenone 분해활성물질의 시험관 내 효능 평가
- 제 2 항 간세포 내 androstenone 분해활성물질의 소동물(생쥐) 모델에서 효능 평가
- 제 3 항 돼지모델에서 androstenone 분해활성물질의 효과 검증

제 2 절 장 내 skatole 생성 미생물의 제어기술 개발

- 제 1 항 돼지 정상균총에서의 total bacteria의 분리 및 정제
- 제 2 항 선발된 균주의 skatole 생성저하능력 In vitro 실험 및 screening
- 제 3 항 최종 선발된 prebiotic균주를 이용한 사료첨가제의 개발 및 효능 입증

제 3 절 사료첨가제 생산공정 개발

- 제 1 항 사료첨가제용 기초사료 선정
- 제 2 항 실험용 사료첨가제 개발 및 생산
- 제 3 항 응취제거용 사료첨가제 생산공정 개발

제 4 절 응취원인물질 관련 DNA표지인자 개발

- 제 1 항 응취원인물질 관련 후보유전자 분석
- 제 2 항 응취관련 DNA표지인자 개발
- 제 3 항 개발된 DNA표지인자의 실용화방안 마련

IV. 연구개발 결과 및 성과활용 계획

수태지의 거세는 식육의 품질을 극도로 저하시키는 원인인 응취를 제거하기 위하여 현재 우리나라에서 거의 전수에 대해서 시행되고 있다. 그러나 돼지의 고환을 제거하는 외과적인 시술방법은 응성호르몬 분비의 완전차단으로 인한 산육능력저하와 스트레스로 인한 동물복지저해 등의 문제를 발생시킨다. 이를 대체하기 위해서 호주의 화이자사는 임프로박(Improvac)이라는 제품을 개발하여 상용화하였으나, 면역적 방법을 이용한 비외과적거세기법으로써 응취를 완전히 제거해 줄 수는 있지만, 기존과 동일하게 응성호르몬의 기능을 완전히 제거한다는 점에서, 산육능력이 충분히 발휘될 수 없으며, 백신접종으로 인한 스트레스 발생은 여전히 존재한다. 뿐만 아니라, 혈액 내 백신잔류로 인한 돈육식품안전성 위협과, 접종에도 불구하고 비거세돈으로 판정받는 등의 여러 문제점들을 갖고 있다. 따라서 이를 근본적으로 해결하기 위해서는 응취를 발생시키는 요인들만을 효과적으로 제거시킴으로써, 기존의 외과적거세방법과 백신접종의 문제점을 원천적으로 해결할 필요가 있다. 본 연구 결과로 안드로스테논 분해활성효소의 활성을 증진시키는 물질로 갈근추출물을 선별하였고, 또한 probiotic 균주인 5GS2에서 skatole 감소 효과를 확인하였다. 응취관련 DNA 표지인자로는 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 내의 SNP22와 SNP34가 응취원인물질 중 androstenone함량에 효과가 있음을 확인하였다. 이 결과가 실용화되면 비외과적, 비백신거세기법으로 응취가 제거될 수 있고, 따라서 비육돈에서는 성장과 사료효율 같은 산육능력이 더욱 향상될 뿐만 아니라, 돈육식품안전성을 확보할 수 있으며 나아가서 종돈에서는 수정능력을 유지시킴으로써 선발강도를 증대시킬 수 있다. 결국 연구개발결과를 활용하여 양돈산업현장에서 수태지의 생산성을 극대화할 수 있는 방법이 모색 될 수 있다.

Summary

I. The Title

Development of boar taint elimination technique to improve fattening performance, obtain food safety and maintain fertility compared with general castration

II. The Necessity and the Purpose of Research & Development

The castration of boar is conducted through all part of our country because boar taint without castration gives extremely low quality of pork meat. However, surgery to remove the testicles of the pig makes several problems including the decreased amount of the male hormone secretion, sterility, stress and animal welfare problems. Recently, Pfizer Australia developed "Improvac" to remove boar taint without surgery using immunological method. However, "Improvac" also has the same problem such as sterility and stress. Therefore, new techniques are needed to developed in order to resolve this fundamental boar taint problem without sterility and stress. Current research was conducted in order to remove only causing agents of boar taint without causing side effects such as the decreased amount of the male hormone secretion, sterility, stress and animal welfare problems.

III. The Contents and the Range of Research & Development

To remove causing agents of boar taint such as androstenone and skatole, we screened natural products, probiotics and DNA markers associated with boar taints. For screening natural products, we choose the extract from natural products which increases the activity of enzyme (3β -hydroxysteroid dehydrogenase) involved in the degradation of androstenone in liver. For screening probiotics, we choose probiotics which inhibits skatole production in the intestine. For screening DNA markers associated with boar taints, we choose DNA region of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase.

IV. The Results of Research & Development

After screening natural products, we choose the extract from *Pueraria thunbergiana* *Benth* which increases the activity of enzyme (3β -hydroxysteroid dehydrogenase) involved in the

degradation of androstenone in liver. After screening natural products, we choose 5GS2 strain which inhibit skatole production in the intestine. Further study was conducted to test the effects of extract from *Pueraria thunbergiana Benth* and *porbiotics strain to reduce* androstenone and skatole production in pigs. For screening DNA markers associated with boar taints, we choose SNP22 and SNP34 within DNA region of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Further study confirmed that both SNP22 and SNP34 were associated with the contents of androstenone in pigs. These results may provide a new technology to control boar taints without the castration of boar.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	10
Chapter 2. Current research trends.....	14
Chapter 3. Results.....	16
1. Screening of natural product which reduces the content of androstenons in liver.....	16
2. Development of technique which inhibits the production of skatole using probiotics.....	32
3. Production of feed ingredients for pigs.....	44
4. Identification of DNA marker associated with boar taint.....	49
Chapter 4. Achievement and contributions.....	79
Chapter 5. Further plan.....	82
Chapter 6. Current research data in foreign country.....	84
Chapter 7. References.....	85

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	10
제 1 절	연구개발의 목적.....	10
제 2 절	연구개발의 필요성.....	11
제 3 절	연구개발의 범위.....	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	14
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과.....	16
제 1 절	간세포 내 androstenone 분해활성물질 발굴.....	16
제 1 항	간세포 내 androstenone 분해활성물질의 시험관 내 효능 평가.....	16
제 2 항	간세포 내 androstenone 분해활성물질의 소동물(생쥐) 모델에서 효능 평가.....	20
제 3 항	돼지모델에서 androstenone 분해활성물질의 효과 검증.....	25
제 2 절	장 내 skatole 생성 미생물의 제어기술 개발.....	32
제 1 항	돼지 정상균총에서의 total bacteria의 분리 및 정제.....	32
제 2 항	선발된 균주의 skatole 생성저하능력 In vitro 실험 및 screening.....	36
제 3 항	최종 선발된 prebiotic균주를 이용한 사료첨가제의 개발 및 효능 입증.....	42
제 3 절	사료첨가제 생산공정 개발.....	44
제 1 항	사료첨가제용 기초사료 선정.....	44
제 2 항	실험용 사료첨가제 개발 및 생산.....	45
제 3 항	응취제거용 사료첨가제 생산공정 개발	46
제 4 절	응취원인물질 관련 DNA표지인자 개발.....	49
제 1 항	응취원인물질 관련 후보유전자 분석.....	49
제 2 항	응취관련 DNA표지인자 개발.....	56
제 3 항	개발된 DNA표지인자의 실용화방안 마련.....	66

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	79
제 1 절	간세포 내 androstenone 분해활성물질 발굴.....	79
제 2 절	장 내 skatole 생성 미생물의 제어기술 개발.....	79
제 3 절	사료첨가제 생산공정 개발.....	80
제 4 절	응취원인물질 관련 DNA표지인자 개발.....	81
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	82
제 1 절	추가 연구의 필요성.....	82
제 2 절	타 연구에의 응용.....	83
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	84
제 7 장	참고문헌.....	85

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

수태지의 거세는 식육의 품질을 극도로 저하시키는 원인인 옹취를 제거하기 위하여 현재 우리나라에서 거의 전수에 대해서 시행되고 있다. 그러나 돼지의 고환을 제거하는 외과적인 시술방법은 옹성호르몬분비의 완전차단으로 인한 산육능력저하와 스트레스로 인한 동물복지저해 등의 문제를 발생시킨다. 이를 대체하기 위해서 호주의 화이자사는 임프로박(Improvac)이라는 제품을 개발하여 상용화하였으나, 면역적방법을 이용한 비외과적거세기법으로써 옹취를 완전히 제거해 줄 수는 있지만, 기존과 동일하게 옹성호르몬의 기능을 완전히 제거한다는 점에서, 산육능력이 충분히 발휘될 수 없으며, 백신접종으로 인한 스트레스 발생은 여전히 존재한다. 뿐만 아니라, 혈액내 백신잔류로 인한 돈육식품안전성 위협과, 접종에도 불구하고 비거세돈으로 판정받는 등의 여러 문제점들을 갖고 있다. 따라서, 이를 근본적으로 해결하기 위해서는 옹취를 발생시키는 요인들만을 효과적으로 제거시킴으로써, 기존의 외과적거세방법과 백신접종의 문제점을 원천적으로 해결할 필요가 있다.

수태지의 옹취는 2차 성성숙시 고환에서 발생하는 안드로스테논(androstenone)이라는 옹성호르몬과 장내미생물에 의해서 초기 생성되는 스키토톨(skatole)에 의해서 발생한다(Patterson 등, 1968; Vold 등, 1970). 본 과제에서는 옹취를 발생시키는 이 두가지 원인물질만을 효과적으로 제거시킬 수 있는 기술을 개발함으로써, 다양한 방법을 통해 옹취를 근본적으로 제거시키고 옹성능력을 그대로 유지시킬 수 있는 새로운 옹취제거기법을 마련코자 하며, 다음과 같은 세분화된 연구개발을 목표로 한다.

○ 간세포 내 androstenone 분해활성물질 발굴

기존에 개발된 GnRH을 표적으로 한 백신은 성성숙 호르몬 계통 전반에 영향을 줌으로써 거세와 유사한 효과를 갖는다. 따라서, 본 과제에서는 옹취를 발생시키는 원인물질인 androstenone 만을 직접적으로 차단할 수 있는 방법을 개발한다.

○ 장 내 skatole 생성 미생물의 제어기술 개발

옹취를 발생시키는 원인물질 중 장내 미생물에 의해 생기는 skatole을 줄이기 위해 돼지 정상군총에서 분리한 probiotics균주를 이용하여 사료첨가제를 개발한다. 분리된 균주에서 내산성, 항균능력, 장내부착능력, 스트레스 저항력 등의 기준으로 선발한 후 skatole 감소와의 관련여부에 대해 in vitro 실험 및 screening을 수행하여, 생균제용 균주를 최종선발한다.

○ 옹취원인물질 관련 DNA표지인자 개발

옹취를 발생시키는 원인물질인 androstenone은 유전적인 요인에 의해 발현수준이 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 따라서 이를 분자유전학적인 방법으로 제거하기 위해서, 기 개발된 표지인자들보다 효율적인 DNA 표지인자를 개발한다. 이를 위해 원인물질형성에 관여하는 metabolic pathway 상에서 주요하게 작용하는 것으로 알려진 enzyme을 coding하는 유전자를 후보유전자로 선정하고, 염기서열 및 변이를 분석하여 추정된 옹취관련 형질과의 연관성 분석을 통해 DNA 표지인자를 선

정한다. 또한, 다양한 마커들의 분석방법을 간소화하여 실용화방안을 마련한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

가. 옹취와 거세

○ 옹취(boar taint)는 수퇘지의 성성숙시 분비되는 스테로이드호르몬 종류인 안드로스테논과 스키테톨에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있으며, 식육으로서 치명적인 풍미를 유발한다. 옹취를 제거하기 위해서, 수퇘지의 성성숙이 진행되기 이전에 외과적시술을 통해서 고환을 제거하는 방법인 거세(castration)가 일반적으로 시행되어져 왔다. 이러한 외과적 거세방법은 시술이 비교적 간단하고 비용이 저렴하면서도 옹취를 효과적으로 제거할 수 있어서, 우리나라의 경우 비육돈에 대해서 대부분 이루어지고 있다.

○ 그러나, 이러한 외과적인 거세는 다음과 같은 다양한 측면에서 심각한 문제점을 드러내고 있다. 먼저, 경제적인 측면에서 보면, 무엇보다 외과적시술로 발생하는 생산력감소와 질병에 대한 저항성 약화로 인한 손실을 들 수 있다. 수퇘지의 거세로 인한 생산력감소효과연구 중 하나에서는 적육생산량을 높히는 안드로젠(androgen)의 자연적 동화작용을 막으며, 그 결과 실제로 거세돈은 비거세돈에 비해 사료효율이 약 12% 떨어지고, 적육생산량이 6.5% 저하된다고 보고된 바 있다(Jensen, 1995). 또한, 어린시기의 과도한 스트레스로 인해 체내의 면역력감소와 그에 따른 질병저항성약화를 일으켜, 실제로 폐사율을 높이는 원인을 제공하기도 한다 (English PR 등, 1975; 1984). 이러한 결과는 비외과적 거세의 활용이 돈육생산의 수익성을 30% 정도 향상시킬 것으로 판단한 연구결과와 연결지을 수 있다(de Lange 등, 1995). 현재 양돈농장에서는 바로 이러한 점을 가장 심각한 문제로 인식하고 있으며, 따라서 외과적 거세를 대체할 수 있는 기법의 개발은 시급하다.

○ 일반적으로 수퇘지는 암퇘지에 비해 도체중 및 적육생산능력 등 성장관련 능력이 우수하지만, 옹취로 인해 육질 및 식감이 저하되는 문제점이 있다. 최근들어 돈육의 육질과 식감은 소비자의 중요한 품질판단척도로 인식됨으로써, 성장관련 능력이 저하되는 것을 감수하면서 거세는 비육돈의 경우 거의 전수적으로 이루어지고 있다. 따라서, 산업적으로도 수퇘지의 우수한 적육생산능력을 활용하고, 옹취로 인한 식감저하문제점을 극복한다는 측면에서, 수퇘지의 옹성능력을 유지할 수 있는 새로운 옹취제거방법의 개발은 시급하다.

○ 더욱이 비육돈과는 별도로, 종돈개량의 경우에도 외과적인 거세로 인한 수퇘지의 능력검정두수 저하가 심각하다. 이는 검정 후 종돈으로 선발되지 않고 도축장으로 출하될 경우 도체등급하락 및 경락가격의 차이에 따른 경제적인 손실을 줄이기 위해 어릴 때 거세를 함으로써 수정능력을 상실하기 때문이다. 실제로 거세돈과 비거세돈의 경락가 차이는 올해평균 1100원/kg의 단가차이를 보였다. 이러한 능력검정두수 제한의 결과 종돈의 선발강도가 낮아져 유전적 개량량이 상대적으로 감소되며, 능력이 우수한 종돈의 선발이 어렵게 되어, 국산 종돈의 능력이 저하되고, 종돈개량을 수입종돈에 의존하게 되는 악순환이 발생하게 되었다.

○ 경제산업적인 측면과는 별도로 동물의 거세와 관련된 동물복지(animal welfare)는 선진국을 위주로 그 중요성이 높아지고 있으며, 우리나라도 이점에 대한 인식이 점차 높아지고 있어 관련법규 신설이 이루어지고 있다. 우리나라는 현재 거의 모든 비육수퐁지들에 대해서 아무런 마취도 없이 해마다 수 백만마리씩 외과적인 시술로써 고훈을 제거하는 거세가 시행되고 있다. 그러나 노르웨이나 스위스 등에서는 동물복지를 고려하여 거세를 이미 금지하고 있으며, 세계의 여러 선진국들도 이와 유사한 방법을 고려하고 있다. 우리나라도 축산의 선진화를 위해서는 시간이 문제일 뿐 예외일 수 없으며, 따라서, 경제·산업·사회적인 다양한 측면에서 고려해 볼 때, 새로운 비거세 수퐁지 옹취제거 기법 개발은 반드시 이루어져야 한다.

나. 임프로박(Improvac)의 문제점

○ 기존의 외과적 거세의 문제점을 극복하기 위해서 이미 외국은 오래전부터 연구를 진행해 왔고, 호주의 화이자社는 임프로박(Improvac)이라는 획기적인 제품을 개발한 바 있다. 외과적인 시술을 통해 고훈을 제거하는 대신에 돼지의 면역체계를 이용한 백신을 통해서 고훈의 기능을 저하시켜 거세효과를 내는 방식으로서, 이미 그 효과를 검증받고 여러나라에서 상용화되었으며, 우리나라에서도 최근 시판되고 있을 정도로 인지도가 높다. 소위 거세백신(immuno castration)이라 불리는 이 제품은 거세의 효과를 통해서 옹취를 제거시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일당증체량과 사료섭취율, 등지방층 두께 등 성장능력을 일반거세돈에 비해 증가시킬 수 있는 장점이 있는 것으로 알려져 있다 (Dunshea 등, 2001).

○ 그러나, 이 백신은 그 ‘효능’에 있어서 여러 문제가 있다. 이 백신의 원리는 성선호르몬 분비인자(GnRH)에 대한 항체를 형성시켜 거세 효과를 유발하는 것으로써, GnRH의 중화를 통해 2차적으로 성선자극 호르몬(FSH)과 황체호르몬(LH) 및 테스토스테론의 생산을 감소시켜 고훈의 성장과 기능을 차단시킨다. 이는 결과적으로 거세와 동일한 효과를 얻을 수 있어, 옹취를 제거시키는 효과는 얻을 수 있지만, 결과적으로 옹성호르몬의 분비를 막아 옹성 특이적인 우수한 성장능력을 저해시키고, GnRH 하위단계의 다른 호르몬체계에 이상을 줄 수도 있다. 더욱이, 생물에 투여한 ‘호르몬 유사 억제제’라는 점은 혈액내 잔류되었을 시 돈육식품으로써의 안전성에 있어서 심각한 문제를 초래할 수 있다(국민건강을 위한 수의사연대 뉴스, 2007; e축산뉴스, 2008). 뿐만 아니라, 화이자사가 2번에 걸쳐 등급판정소에 등급판정을 의뢰한 결과 각각 63%와 51%만이 거세판정을 받았다는 점(양돈수의 사회 심포지엄, David Hennessy, 2007)은 우리나라 현행기준에서 백신의 성공효율도 문제가 있음을 알 수 있다. 또한, 백신접종에 따른 스트레스 유발문제도 무시할 수 없다. 비육돈과는 별도로 종돈의 경우에도 옹성능력이 상실된다는 점에서 다수의 후보돈이 능력검정을 받지 못해 선발강도가 저하되는 문제가 존재한다.

○ 임프로박 백신은 ‘비용’ 면에서도 적용에 제약을 갖는다. 국내시험 결과 임프로박 접종돈은 거세돈판정으로 인한 돼지 경락가격 상승으로 일반거세돈보다 두당 약 2만 2천원 정도의 이익을 제시한 바 있지만(제3회 양돈연구포럼, 이득훈, 2008), 마리당 2회에 걸친 접종과 한 건당 5천원에 육박하는 백신비용은 생산자 측면에서 볼때, 앞서 언급한 거세판정비율과 합쳐져 다시 한 번 적용을 고려해 보게 한다. 또한, 향후 국내 양돈산업 전반에 걸친 확대적용을 고려해 보면, 외국계 제약회사의 제

품사용에 대한 로열티 지불과 그에 따른 상대적인 외화낭비는 사료수입비용과 함께 부담으로 다가온다.

○ 따라서, 이와 같은 기존의 외과적거세방법의 문제점과 상용화 된 백신의 문제점을 극복하기 위해서는 응취를 발생시키는 직접적인 요인을 찾아 이들만을 효과적으로 제거시키기 위한 연구개발이 필요하며, 세계적으로도 개발단계에 있다는 점에서 국내에서의 기술개발과 기술력선점이 시급하다.

제 3 절 연구개발의 범위

제 1 절 간세포 내 androstenone 분해활성물질 발굴

제 1 항 간세포 내 androstenone 분해활성물질의 시험관 내 효능 평가

제 2 항 간세포 내 androstenone 분해활성물질의 소동물(생쥐) 모델에서 효능 평가

제 3 항 돼지모델에서 androstenone 분해활성물질의 효과 검증

제 2 절 장 내 skatole 생성 미생물의 제어 기술 개발

제 1 항 돼지 정상균총에서의 total bacteria의 분리 및 정제

제 2 항 선발된 균주의 skatole 생성 저하능력 In vitro 실험 및 screening

제 3 항 최종 선발된 prebiotic균주를 이용한 사료첨가제의 개발 및 효능 입증

제 3 절 사료첨가제 생산공정 개발

제 1 항 사료첨가제용 기초 사료 선정

제 2 항 실험용 사료첨가제 개발 및 생산

제 3 항 응취제거용 사료첨가제 생산공정 개발

제 4 절 응취원인물질 관련 DNA표지인자 개발

제 1 항 응취원인물질 관련 후보유전자 분석

제 2 항 응취관련 DNA표지인자 개발

제 3 항 개발된 DNA표지인자의 실용화방안 마련

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1) 특허분석 측면

- 간세포 내에서 스키톨을 분해하는 효소에 대한 특허는 몇 건 있었지만, 천연물을 통한 분해효소의 활성을 조절하고자하는 부분에 대해서는 미비하고, 따라서 본 연구과제에서는 실제 천연물급여에 따른 간에서의 관련 분해 유전자의 활성과 안드로스테논의 수준을 분석하는 방향으로 연구를 추진하여 관련 특허를 국내 및 국외에 출원할 예정이다.
- 사료첨가제를 이용한 특허는 지방조성이나 금속양이온조성 연구에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 생균제를 통해 실제 돼지 장내에서 skatole을 발생하는 미생물을 제어하는 방향으로 연구를 추진하여 응취제거 사료첨가제 또는 사료에 대한 특허 등 국내 및 국외에 출원할 계획이다.
- 분자유전기술을 이용한 특허는 특정 몇가지 유전자에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 더욱 다양하고 직접적으로 영향을 줄 수 있는 후보유전자군에 대한 다형성과 실제 응취원인 물질과의 연관성 분석을 하는 방향으로 연구를 추진하여 DNA마커 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획이다.

2) 논문분석 측면

- androstenone수준과 3 β -HSD유전자의 발현량에 분석에 많이 치중되어 있으며, 유전자의 염기서열 및 변이정도는 알려져 있으나 실제 마커개발을 위한 연관성 분석 및 천연물 급여를 통한 발현량 조절에 관한 연구는 부재한 시점이며, 본 연구과제에서는 이러한 부분에 대해 보완하는 방향으로 연구를 추진하여 관련 논문을 학술지에 게재할 계획이다.
- 응취의 원인물질 중 하나인 skatole과 관련해 보고된 논문들은 응취와의 연관성 및 개체별 차이에 치중되어 있다. 사료처리를 통해 skatole의 수준을 조절하고자하는 논문이 몇 건 있지만, 본 연구과제에서는 생균제합성을 통한 장내 미생물의 활성을 조절하여 그 수준을 조절하는 방향으로 연구를 추진하여 관련 논문 등을 학술지에 게재할 계획이다.
- 분자유전기술에 대한 논문은 androstenone의 합성 및 분해경로분석에 치중되어 있고, 실제 관련 유전자에 대한 연구는 제한적으로 이루어져 있으며 그마저도 단순염기서열분석에 그치고 있다. 그러므로, 본 연구과제에서는 실제 후보유전자들의 다형성과 응취 사이의 상관분석을 하여 DNA마커 개발하는 방향으로 연구를 추진하여 관련논문 등을 학술지 등에 게재할 계획이다.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 사료첨가제 관련 특허 및 논문들은 조금씩 게재되고 있는데 반해, 실제 상품화되어 있는 것은 거의 없으며, 본 연구과제를 통해 응취의 실질적인 원인이 되는 안드로스테논과 스키테롤을 각각 천연물과 생균제를 통해 그 수준을 조절할 수 있는 사료첨가제를 개발하여 최종사료로 실용할 계획이다.
- 응취관련하여 DNA마커 개발은 지지부진한 상태이며, 연구마저도 실제 마커개발단계까지 이르지 못하고 관련유전자분석에만 그치고 있으나, 본 연구과제에서는 DNA마커개발을 통한 응취가 안나는 수컷의 유전육종에 활용도를 높이고자 한다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 간세포 내 androstenone 분해활성물질 발굴

제 1 항 간세포 내 androstenone 분해활성물질의 시험관 내 효능 평가

1. 간세포 분열촉진물질 발굴

- Androstenone은 steroid hormone으로서 정소에서 생성되며, 간세포의 3β-HSD (3β-hydroxysteroid dehydrogenase)라는 효소에 의해서 분해됨. 따라서 간세포의 활성화에 영향을 미치는 천연물 추출물을 1차적으로 선별하였다. 우선 다양한 추출물을 간세포인 HepG2에 처리한 후 간세포의 세포배양 시 MTT assay를 이용하여 간세포의 분열을 촉진할 수 있는 물질을 선별하였다. 이 때 사용된 HepG2 세포는 well 당 5×10^3 세포를 사용하였으며, 96 well plate에서 0.5% FBS를 포함한 RPMI 1640 배지 200 μ l에서 배양하였다. 이 때 각각의 천연물 추출물을 1 μ l (1:200)를 첨가하고 CO₂ incubator에서 3 일간 배양 후 마지막 4 시간에 MTT를 처리하여 상대적 인 proliferation rate를 측정하였음. 이 때 사용되어진 대조구는 0.5% DMSO를 사용하였다.
- 간세포의 proliferation rate를 측정한 결과, 그림 1과 같이 갈근, 삼칠, 오미자, 인동, 백작약, 음양곽, 적작약, 적하수오, 천련자, 구기자, 천궁, 토복령, 황기 추출물들이 선별되었다(그림 1).

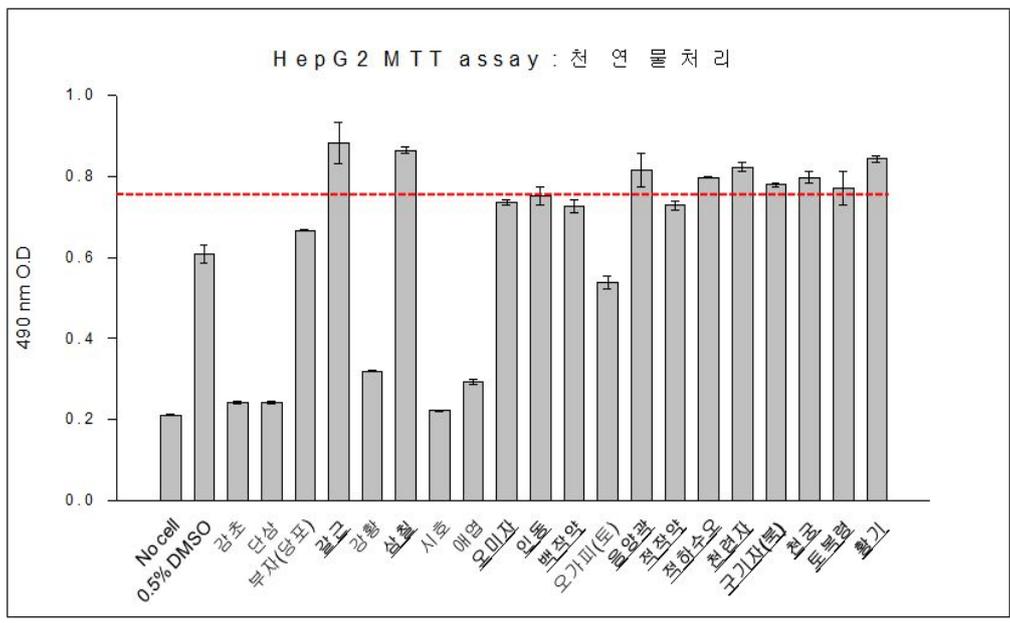


그림 1. 천연물 screening을 이용하여 간세포의 분열 촉진 물질 발굴

2. 3β-HSD (3β-hydroxysteroid dehydrogenase) 발현 촉진 물질 발굴

- 그 후 갈근, 삼철, 오미자, 인동, 백작약, 음양곽, 적작약, 적하수오, 천련자, 구기자, 천궁, 토복령, 황기 추출물들을 3β-HSD 발현 MLTC-1 세포에 처리한 후 3β-HSD 발현 정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정하였음. 우선 다양한 추출물을 3β-HSD 발현 MLTC-1 세포에 처리한 후 간세포의 세포 배양 시 MTT assay를 이용하여 간세포의 분열을 촉진할 수 있는 물질을 선별하였다. 이 때 사용되어진 MLTC-1 세포는 well 당 5×10^4 세포를 사용하였으며, 24 well plate에서 10% FBS를 포함한 RPMI 배지 500 μ l에서 배양하였음. 이 때 각 각의 천연물 추출물 100 μ g/ml를 첨가하고 CO₂ incubator에서 5 일간 배양 후 RNA와 단백질을 분리하여 semiquantitative RT-PCR과 Western blot을 진행하였음. 이 때 사용되어진 대조구는 0.5% DMSO를 사용하였다.
- RNA를 분리하기 위해 세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μ l의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고 추출한 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g의 RNA를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 database에서 얻은 유사한 유전자 염기 서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 통해 577 bp에 달하는 3β-HSD 유전자를 획득하였다. 이 때 사용한 역전사 효소는 SuperscriptIII(Invitrogen)이며, 사용한 중합효소는 Taq polymerase(Gene craft)이다.

정방향 프라이머 5'-CCAACTCGTACAAGAAGATCGTCC-3'

역방향 프라이머 5'-GACAGTGTGATCAAGTGGCGGTTA-3'

- 이상과 같이 연쇄 중합반응으로 얻은 3β-HSD 유전자는 agarose gel에 loading하였다. 그 결과 대조구 (0.5% DMSO)보다 갈근, 오미자, 천궁, 황기 추출물이 3β-HSD의 RNA level을 증가시키는 것으로 나타났다(그림 2).

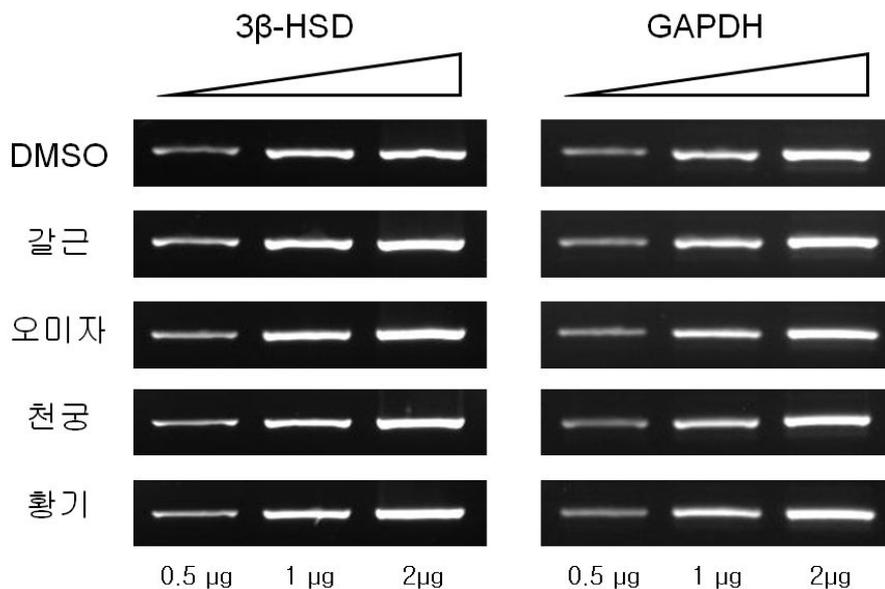


그림 2. 천연물 screening을 이용하여 3β-HSD의 RNA level을 증가시키는 물질 발굴

- RT-PCR 결과를 검증하기 위해 천연물 처리 세포에서 단백질을 분리하여 Western blot을 진행하였음. 우선 세포를 트립신 처리하여 원심분리한 후, 세포 펠렛을 PBS로 씻고, 세포용해용액 (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml leupeptin ml, 1 mg/ml pepstatin ml, 2 mg/ml aprotinin, 200 mg/ml PMSF)으로 잘 풀었음. 용해물은 Bradford assay를 통해 정량되었고 SDS 젤 전기영동에 의해 분석되었음. 그 후 임모빌론 P 멤브레인 (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 옮겨져서, 항-3 β -HSD 항체 (토끼 IgG, Santa Cruz)와 secondary antibody인 항-토끼 IgG 항체 (Santa Cruz)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 Western blot이 행해졌음. 그 결과 대조구 (0.5% DMSO)보다 갈근이 3 β -HSD의 단백질 양을 증가시키는 것으로 나타났음(그림 3).

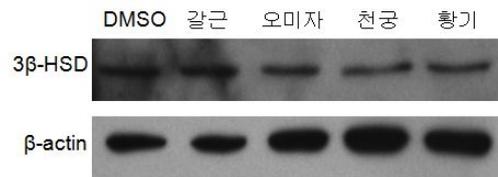
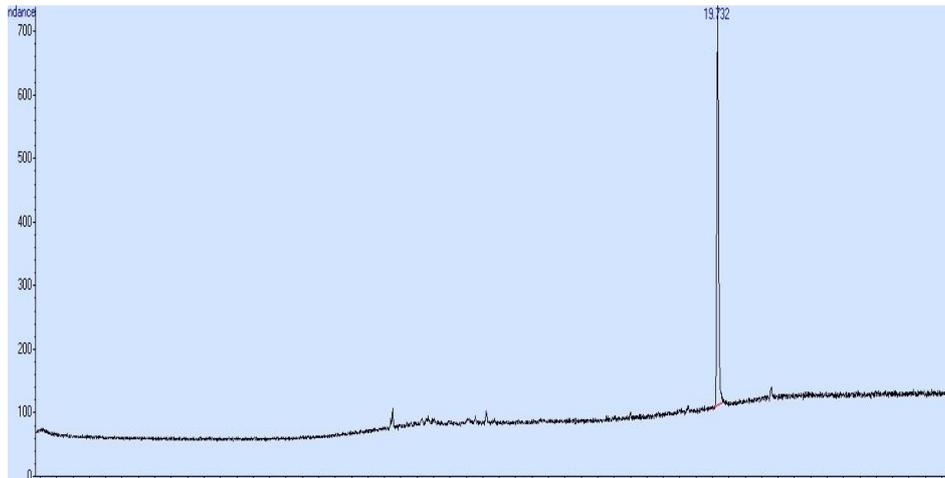


그림 3. 천연물 screening을 이용하여 3 β -HSD의 단백질 양을 증가시키는 물질 발굴

3. Androstenone 분해활성물질의 시험관 내 효능 평가

- 천연물 screening 결과 간세포의 분열을 촉진하며 3 β -HSD의 발현을 촉진하는 것으로 확인된 갈근추출물이 androstenone 분해를 촉진시키는지에 대한 시험관 내 효능평가를 실시하였다.
- 우선 GC mass를 이용한 분석 방법으로 세포배양배지 내 androstenone을 측정하는 실험을 수행하였다. 효과적인 분리 및 검정을 위해서 Agilent 7890(영인과학)의 GC mass를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 DB-1MS(30m×0.25m×0.25 μ m) Column을 사용하였고, 기체의 Flow rate는 1.0 ml/min로 하였다. 온도조건은 detector 280 $^{\circ}$ C, 주입구온도는 250 $^{\circ}$ C였으며, 오븐의 초기온도는 120 $^{\circ}$ C에서 2분간 지체한 후 15 $^{\circ}$ C/min의 속도로 250 $^{\circ}$ C까지 상승한 후 다시 5 $^{\circ}$ C/min의 속도로 300 $^{\circ}$ C까지 상승한 후 5분간 온도를 지속하였다. Androstenone을 측정하기 위해 실험구로는 배지 999 μ l와 1000ppm의 androstenone 1 μ l를 넣었고 대조구로는 배지 1ml만 넣고 GC mass로 분석하였다. 그 결과 실험구에서는 androstenone의 peak가 분석되었지만[그림 4(가)], 대조구에서는 검출되지 않았다[그림 4(나)].

(가) 실험구



(나) 대조구



그림 4. GC mass를 이용한 세포배양배지 내 androstenone 측정

- 그 후, 갈근추출물이 androstenone 분해를 촉진시키는지에 대한 시험관 내 효능평가를 실시하기 위하여, 다음과 같은 설계로 실험을 진행하였다. 모든 처리구에는 DMSO를 함유하였고, Blank 처리구와 함께 실험구는 갈근을 처리한 MLTC-1 세포로 대조구는 갈근을 처리하지 않은 MLTC-1 세포 구성하여 androstenone의 함량을 측정하고 비교하였다. 이 때 사용되어진 MLTC-1 세포는 well 당 1×10^5 세포를 사용하였으며, 24 well plate에서 10% FBS를 포함한 RPMI 배지 1 ml에서 배양하였다. 이 때 갈근추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하고 CO_2 incubator에서 12시간 또는 72시간을 배양하였다. 그 후 GC mass를 이용한 분석방법으로 androstenone을 측정한 결과 대조구인 갈근을 첨가하지 않은 배지에 비해서 갈근을 첨가한 실험구 배지가 androstenone level의 감소가 유의하게 나타나는 것으로 분석되었다. 따라서 DMSO와 MLTC-1 세포와 갈근추출물 처리가 androstenone level을 감소시키는 것으로 나타났음(표 1).

표 1. 처리구에 따른 androstenone level 비교분석 결과

Treatment	DMSO	DMSO+MLTC-1	DMSO+MLTC-1+ 갈근
Androstenone	0.182 ^a ± 0.005	0.035 ^b ± 0.005	0.012 ^c ± 0.005

^{abc} 유의수준 ($P < 0.05$)

제 2 항 간세포 내 androstenone 분해활성물질의 소동물(생쥐) 모델에서 효능 평가

1. 소동물(생쥐) 모델에서 갈근추출물의 투여 방법 모색

- Androstenone은 steroid hormone으로써 정소에서 생성되며, 간세포의 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase)라는 효소에 의해서 분해된다. 따라서 1 차년도에서는 간세포의 활성에 영향을 미치는 천연물 추출물을 1차적으로 선별하였다. 최종적으로 선발된 추출물은 갈근 추출물로 3 β -HSD의 발현을 높이며, 시험관 내에서 androstenone의 분해를 촉진하는 것을 확인하였다. 따라서 2 차년도에서는 소동물(생쥐) 모델에서 갈근추출물의 생체 내 효능을 측정하였으며 우선 소동물(생쥐) 모델에서 갈근추출물의 투여 방법 모색하였다.

- 소동물(생쥐) 모델에 사용되어진 갈근추출물은 500 mg/kg/day의 용량으로 정하였으며, 갈근추출물을 투여한 생쥐(C57BL/6)의 평균 무게는 20 g이었다. 투여기간은 4주 동안으로 하루에 한 번씩 200 ul 단위로 투여하였다. 이 때 사용되어진 갈근추출물은 물을 용매로 하여 추출한 갈근추출물 powder를 물에 녹여서 50 mg/ml 농도의 갈근용액으로 만든 후 200 ul 씩 sonde를 이용하여 경구 투여하였다. 이 때 대조구로 사용한 쥐는 용매로 사용된 물을 200 ul 씩 sonde로 경구투여하였다.

2. 소동물(생쥐) 모델에서 androstenone 투여 시, GC mass를 이용한 분석방법으로 체내 잔존량 테스트

- 생쥐에서 androstenone의 존재 여부를 측정하기 위해, 생 후 1년 된 수컷생쥐(C57BL/6)의 간과 지방 1g을 적출 한 후, GC mass를 이용하여 androstenone의 잔존량을 측정한 결과 androstenone에 해당하는 peak가 나오지 않았다(그림 5). 이 때 대조구로는 sigma에서 구입한 androstenone(cat. number: A8008)과 돼지 등지방을 사용하였다. 이 때 사용된 GC mass는 Agilent 7890(영인과학)이고, 분석조건은 DB-5MS(30m×250 μ m×0.25 μ m) Column을 사용하였고, 기체의 Flow rate는 1.0 ml/min로 하였다. 또한, 온도조건은 detector 280 $^{\circ}$ C, 주입구온도는 250 $^{\circ}$ C였으며, 오븐의 초기온도는 120 $^{\circ}$ C에서 2분간 지체한 후 15 $^{\circ}$ C/min의 속도로 240 $^{\circ}$ C까지 상승한 후 다시 10 $^{\circ}$ C/min의 속도로 260 $^{\circ}$ C까지 상승한 후 5분간 온도를 지속하였다.

- 따라서, 생쥐에 androstenone을 투여한 후, 갈근추출물의 효능을 측정하기 위해 우선 생쥐에 androstenone을 투여한 후 잔존량을 측정하였다. 생쥐에 androstenone을 투여하는 방법은 두 가지로 수행하였다. 즉, 복강 내 주사방법과 꼬리 내 정맥주사방법으로 생쥐에 androstenone을 투여한 후, 검출되는 androstenone의 양을 GC mass를 이용한 분석방법으로 측정하였다. 우선 복강 내 주사 시 세 가지 농도(고농도: 10 ug, 중농도: 1 ug, 저농도: 100 ng)의 androstenone을 주사하였고, 매일 6일간 주사한 후 간과 지방 1g을 적출한 후, GC mass를 이용하여 androstenone의 잔존량을 측정한 결과 androstenone에 해당하는 peak가 나오지 않았다(그림 6). 이러한 결과로 미루어 보아 생쥐에 투여한 androstenone은 간과 지방에서 흡수되지 못하거나, 빠른 속도로 분해되는 것으로 생각된다. 이러한 실험결과를 뒷받침하기 위해 꼬리 내 정맥에 고농도의 androstenone을 주사한 후, injection 직후, 30분 후, 1시간 후, 2시간 후, 4시간 후, 각각 생쥐의 간에서 androstenone의 잔존량을 측정하였다. 그 결과 androstenone의 잔존량을 측정하는데는 실패하였다(그림 7).

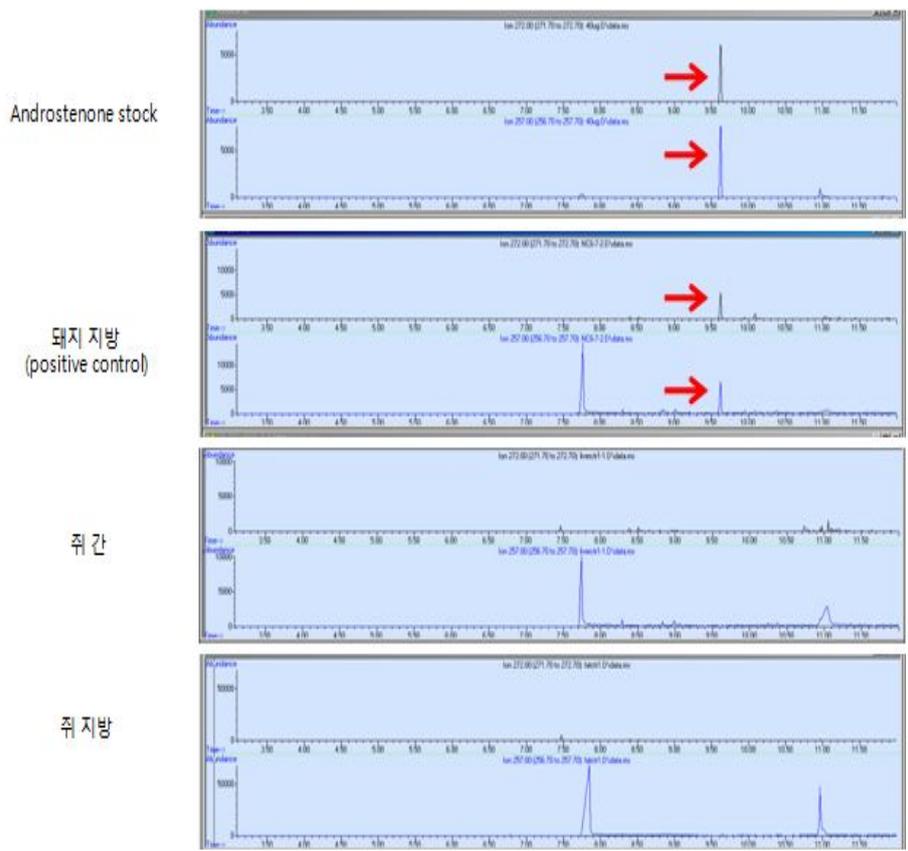


그림 5. GC mass를 이용한 생쥐의 androstenone 양 측정

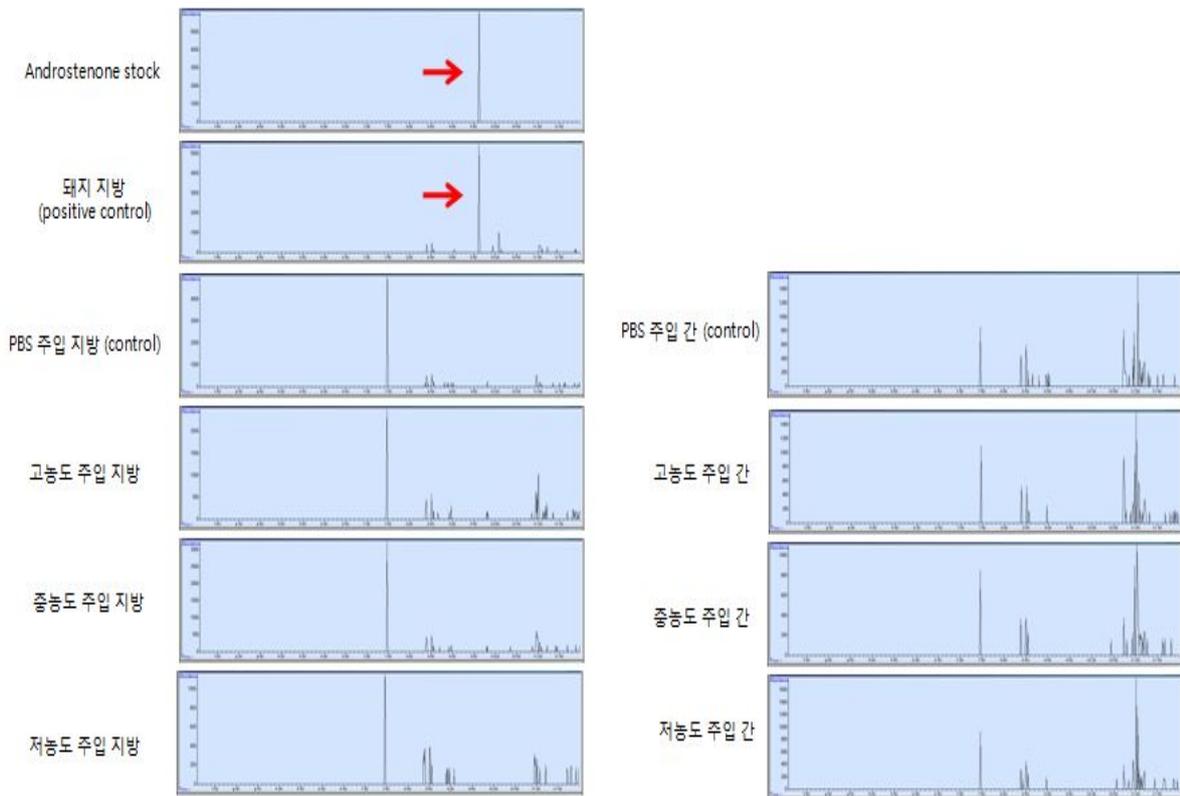


그림 6. Androstenone을 생쥐 복강 내 투여시, 생쥐의 androstenone 잔존량 측정

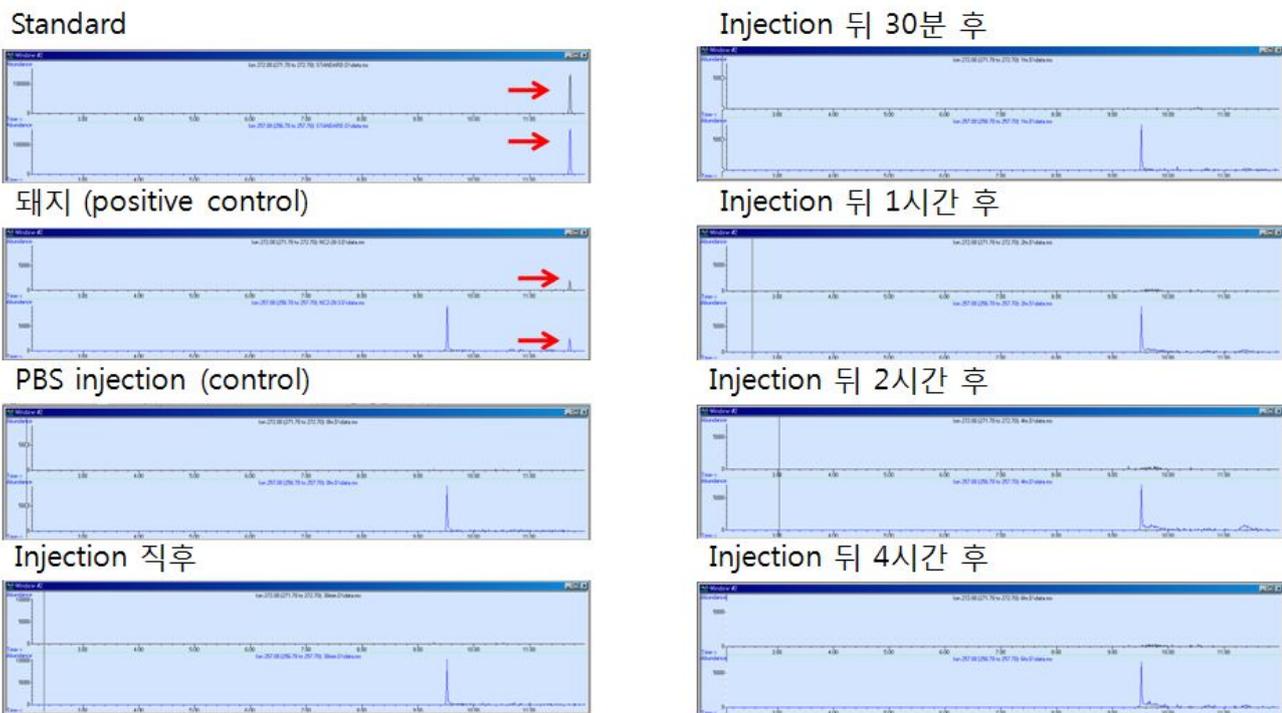


그림 7. Androstenone을 생쥐꼬리정맥 내 투여시, 생쥐의 androstenone 잔존량을 시간대별로 측정

- 생쥐에 androstenone을 투여 시, androstenone을 분해하는 효소인 3β -HSD의 발현양을 측정하기 위해, androstenone을 세 가지 농도(고농도: 10 μ g, 중농도: 1 μ g, 저농도: 100 ng)로 복강 내 투여하였다. 투여기간은 6일간 하였으며, 매일 주사하였다. 그 후 간세포를 분리하여 3β -HSD 발현정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정하였다. 우선 RNA를 분리하기 위해 세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μ l의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고 추출한 0.5 μ g, 1 μ g 2 μ g의 RNA를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 database에서 얻은 유사한 유전자염기서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 통해 577 bp에 달하는 3β -HSD 유전자를 획득하였다. 이 때 사용한 역전사효소는 SuperscriptIII(Invitrogen)이며, 사용한 중합효소는 Taq polymerase(Gene craft)이다.

정방향 프라이머 5'-CCAACTCGTACAAGAAGATCGTCC-3'

역방향 프라이머 5'-GACAGTGTGATCAAGTGGCGGTTA-3'

- 이상과 같이 연쇄중합반응으로 얻은 3β -HSD 유전자를 agarose gel에 loading하였다. 그 결과 대조구(androstenone을 투여안한 생쥐)에 비해 androstenone 투여 시 3β -HSD 유전자의 전사량이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 8). 또한, RT-PCR 결과를 검증하기 위해 간세포에서 단백질을 분리하여 Western blot을 진행하였다. 우선 세포를 트립신처리하여 원심분리한 후, 세포펠렛을 PBS로 씻고, 세포용해용액 (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml leupeptin ml, 1 mg/ml pepstatin ml, 2 mg/ml aprotinin, 200 mg/ml PMSF)으로 잘 풀었다. 용해물은 Bradford assay를 통해 정량되었고 SDS 젤 전기영동에 의해 분석되었다. 그 후 임모빌론 P 멤브레인 (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 옮겨져서, 항- 3β -HSD 항체 (토끼 IgG, Santa Cruz)와 secondary antibody인 항-토끼 IgG 항체 (Santa Cruz)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 Western blot이 행해졌다. 그 결과 대조구(androstenone을 투여하지 않은 생쥐)에 비해 androstenone 투여 시 3β -HSD의 단백질 양이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 9). 따라서 생쥐에 androstenone을 투여 시, 3β -HSD의 단백질 양이 증가하는 것으로 보아, 생쥐에서 androstenone의 분해능이 3β -HSD의 단백질 양과 비례관계가 있다는 것을 알 수 있었다.



그림 8. Androstenone의 생쥐 투여시, 생쥐의 간세포에서 3β -HSD 유전자의 전사량 증가

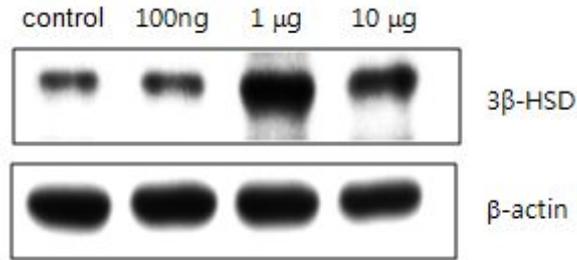


그림 9. Androstenedione의 생쥐 투여시, 생쥐의 간세포에서 3β-HSD 단백질 양 증가

3. 갈근추출물을 생쥐에 투여 시 간세포에서 3β-HSD 발현 정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정

- 그 후 소동물(생쥐) 모델에서 갈근추출물 투여 시 간세포에서 3β-HSD 발현 정도를 측정하였다. 이 때 사용되어진 갈근추출물은 500 mg/kg/day의 용량으로 정하였으며, 갈근추출물을 투여한 생쥐(C57BL/6)의 평균 무게는 20 g이었다. 투여기간은 4주 동안으로 하루에 한 번씩 200 ul 단위로 투여하였다. 이 때 사용되어진 갈근추출물은 물을 용매로 하여 추출한 갈근추출물 powder를 물에 녹여서 50 mg/ml 농도의 갈근용액으로 만든 후 200 ul 씩 sonde를 이용하여 경구투여하였다. 이 때 대조구로 사용한 쥐는 용매로 사용된 물을 200 ul 씩 sonde로 경구투여하였다. 각 실험군은 5 마리씩으로 구성되었다(N=5).

- 갈근추출물 경구투여 4주 후 간세포를 분리한 후, 3β-HSD 발현 정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정하였음. 우선 RNA를 분리하기 위해 세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μl의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리 하였고 추출한 0.5 μg, 1 μg 2μg의 RNA를 주형으로 역전사연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 database에서 얻은 유사한 유전자염기서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 통해 577 bp에 달하는 3β-HSD 유전자를 획득하였다. 이 때 사용한 역전사효소는 SuperscriptIII(Invitrogen)이며, 사용한 중합효소는 Taq polymerase(Gene craft)이다.

정방향 프라이머 5'-CCAACTCGTACAAGAAGATCGTCC-3'

역방향 프라이머 5'-GACAGTGTGATCAAGTGGCGGTTA-3'

- 이상과 같이 연쇄 중합반응으로 얻은 3β-HSD 유전자는 agarose gel에 loading했다. 그 결과 대조구 (용매인 물 주입한 생쥐)보다 갈근추출물을 투여한 생쥐에서 3β-HSD 유전자의 전사량이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 10). 또한, RT-PCR 결과를 검증하기 위해 간세포에서 단백질을 분리하여 Western blot을 진행하였다. 우선 세포를 트리핀 처리하여 원심분리한 후, 세포 펠렛을 PBS로 씻고, 세포용해용액 (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml leupeptin ml, 1 mg/ml pepstatin ml, 2 mg/ml aprotinin, 200 mg/ml PMSF)으로 잘 풀었다. 용해물은 Bradford assay를 통해 정량되었고 SDS 젤 전기영동에 의해 분석되었다. 그 후 임모빌론 P 멤브레인 (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 옮겨져서, 항-3β-HSD 항체 (토끼 IgG, Santa

Cruz)와 secondary antibody인 항-토끼 IgG 항체 (Santa Cruz)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 Western blot이 행해졌다. 그 결과 대조구(androstenone을 투여하지 않은 생쥐)에 비해 androstenone 투여 시 3 β -HSD의 단백질 양이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 11). 따라서 소동물(생쥐) 모델에서 갈근추출물의 투여 시 androstenone의 분해에 주요한 단백질인 3 β -HSD의 단백질 양을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 특허(출원번호: 10-2010-0098224, 출원명: 갈근추출물을 함유하는 안드로스테논 분해 촉진용 조성물)를 출원하였고, 3차연도에서는 대동물(돼지) 실험을 통하여 갈근추출물의 효능을 확인할 예정이다.

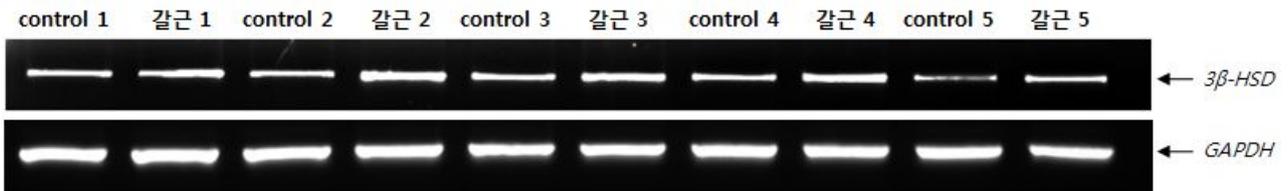


그림 10. 갈근추출물의 생쥐 투여시, 생쥐의 간세포에서 3 β -HSD 유전자의 전사량 증가

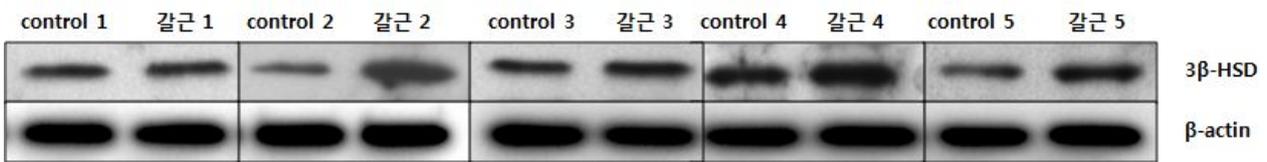


그림 11. 갈근추출물의 생쥐 투여시, 생쥐의 간세포에서 3 β -HSD 단백질 양 증가

제 3 항 돼지모델에서 androstenone 분해활성물질의 효과 검증

1. 돼지사양 시험

- 돼지사양시험은 에이투지엠(주)과의 사양시험 계약에 의해 에이투지엠(주)에서 실시하였다. 따라서, 에이투지엠(주)에서는 임신돈 선별 및 자돈생산 등의 시험돈군 조성단계부터 처리구별 사료처리 등의 사육단계, 시료채취 및 형질측정 등의 도축단계까지 비거세 수퇘지의 생애전체에 걸쳐 사양시험을 수행하였다.

- 다음은 사양시험 추진도(그림 12)이다.

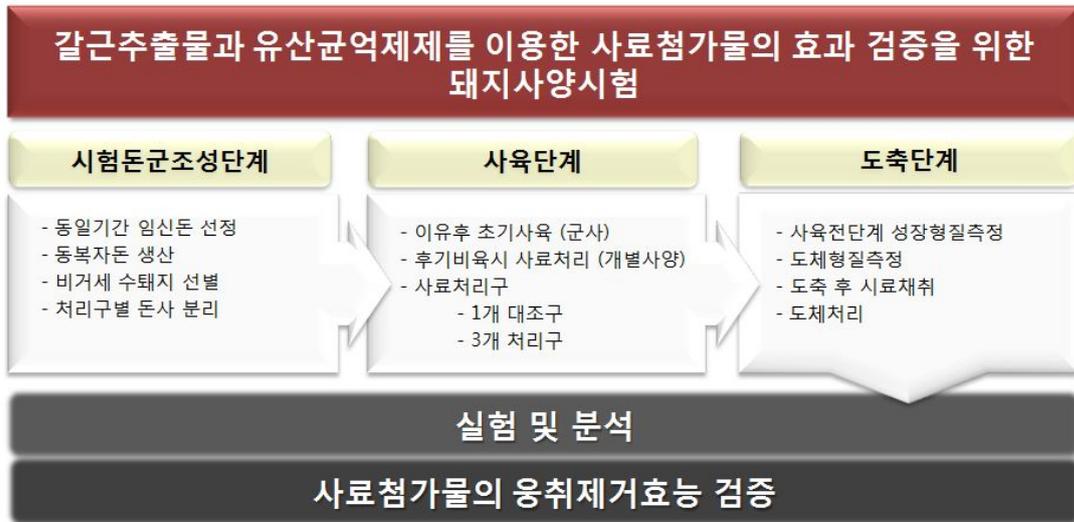


그림 12. 실험추출물과 유산균억제제를 이용한 사료첨가물의 효과검증을 위한 돼지사양 시험

- 다음은 연구내용이다.

1) 시험돈군조성단계

- 동시기에 출산할 임신돈 선정
- 자돈생산
- 비거세 이유 수태지 선별
- 처리구별 돈사 분리

2) 사육단계

- 초기사육기간(이유시부터 50kg체중도달시까지): 군사(무리사양)
- 후기비육기간(50kg체중부터 도축시까지): 개별사양(사료처리기간)

- 사료처리구

- ① 대조구 (일반사료 급여)
- ② 처리구 1 (실험추출물 함유 사료 급여)
- ③ 처리구 2 (유산균억제제 함유 사료 급여)
- ④ 처리구 3 (실험추출물 + 유산균억제제 함유 사료 급여)

가. 사료 feeding program

- 총사육기간 : 25주
- 이유 ~ 50kg : 군사, 25두

자돈사료	기간	급여량(kg/day/두)	총사료량
1	4주	0.11	$0.11_{\text{kg}} \times 28_{\text{day}} \times 25_{\text{두}} = 77\text{kg}$
2	2주	0.65	$0.65_{\text{kg}} \times 14_{\text{day}} \times 25_{\text{두}} = 228\text{kg}$
3	2주	1.00	$1.00_{\text{kg}} \times 14_{\text{day}} \times 25_{\text{두}} = 350\text{kg}$
starter	6주	1.70	$1.70_{\text{kg}} \times 42_{\text{day}} \times 25_{\text{두}} = 1,785\text{kg}$
합 계	14주		2,440kg

- 50kg ~ 110kg : 개별, 20두, 첨가물 급여

자돈사료	기간	급여량(kg/day/두)	총사료량
Grower	6주	3	$3_{\text{kg}} \times 42_{\text{day}} \times 20_{\text{두}} = 2,520\text{kg}$
Finisher	5주	3	$3_{\text{kg}} \times 35_{\text{day}} \times 20_{\text{두}} = 2,100\text{kg}$
합 계	11주		4,620kg

나. 첨가물 급여형태 및 첨가물

- ① 갈근 : 분말(건조), 0.5%
- ② 유산균 : 분말(동결건조), 0.05%

다. 처리구별 사료급여량 및 첨가물필요량

	N	총사료량(kg) ¹	갈근첨가(kg)	유산균첨가(kg)
1) 대조구	5	1,400		
2) 갈근	5	1,400	7.00	
3) 유산균	5	1,400		0.70
4) 갈 + 유	5	1,400	7.00	0.70
	20		14.00	1.40

¹돼지 50~110kg 개별, 5두 사육시 [(3x42+3x35)*5=1245kg]

- ① 갈근필요량 : $14\text{kg} \times 1.2 = 16.8\text{kg}$
- ② 유산균필요량 : 사료 1g당 10^7 농도 유산균 = 배지 35.0ℓ 동결건조
(계산근거: 유산균첨가 2kg : 50ℓ = 1.4kg : 35ℓ)

라. 주의점

- 유산균첨가물 10^7 /사료g 맞는지 확인필요
- 유산균첨가물은 carrier필요 예상
- 동결건조시 수분 10%

- 다음은 사양시험에 사용된 자돈에 대한 정보이다.

1. 이유예정일 : 10월 6일
2. 자돈전출예정 : 11월 21일 (74일령)
3. 이표현황

차례	모돈번호	분만일	이표번호	산차
1	10-84-85	9월 7일	1, 2, 3	2
2	09-25-7	9월 7일	4	4
3	07-35-35	9월 7일	5	9
4	10-40-1	9월 6일	6, 7, 8	1
5	10-41-63	9월 7일	9, 10, 11	1
6	10-42-22	9월 9일	12, 13, 14, 15	1
7	10-85-31	9월 8일	16, 17, 18, 19, 20	2
8	10-85-43	9월 8일	21, 22, 23, 24	2
9	09-45-12	9월 8일	25, 26, 27	3
10	09-128-102	9월 7일	28, 29	4
11	07-64-65	9월 7일	30	9
총 : 30두				

2. 갈근추출물과 유산균을 돼지에 투여 시 간세포에서 3β-HSD 발현 정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정

- 그 후 돼지 모델에서 갈근추출물과 유산균을 투여 시 간세포에서 3β-HSD 발현 정도를 측정하였다. 우선 간세포를 분리한 후, 3β-HSD 발현 정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정하였음. RNA를 분리하기 위해 세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μl의 chloroform(Sigma)을 넣

고 전체 RNA를 분리하였고 추출한 0.5 µg, 1 µg 2µg의 RNA를 주형으로 역전사연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 database에서 얻은 유사한 유전자 염기 서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 통해 577 bp에 달하는 3β -HSD 유전자를 획득하였다. 이 때 사용한 역전사 효소는 SuperscriptIII(Invitrogen)이며, 사용한 중합효소는 Taq polymerase(Gene craft)이다.

정방향 프라이머 5'-TTGTTGCTGGAGGAGAAGGATCTG-3'

역방향 프라이머 5'-GAGAACTTGGAGTTGTGTGTCAGG-3'

- 이상과 같이 연쇄 중합반응으로 얻은 3β -HSD 유전자는 agarose gel에 loading했다. 그 결과 대조구(control)보다 갈근추출물을 투여한 돼지에서 3β -HSD 유전자의 전사량이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 13). 또한, RT-PCR 결과를 검증하기 위해 간세포에서 단백질을 분리하여 Western blot을 진행하였다. 우선 세포를 트립신 처리하여 원심분리한 후, 세포 펠렛을 PBS로 씻고, 세포용해용액 (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml leupeptin ml, 1 mg/ml pepstatin ml, 2 mg/ml aprotinin, 200 mg/ml PMSF)으로 잘 풀었다. 용해물은 Bradford assay를 통해 정량되었고 SDS 젤 전기영동에 의해 분석되었다. 그 후 임모빌론 P 멤브레인 (Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 옮겨져서, 항- 3β -HSD 항체 (토끼 IgG, Santa Cruz)와 secondary antibody인 항-토끼 IgG 항체 (Santa Cruz)로 ECL 시스템 (GE healthcare)을 사용하여 Western blot이 행해졌다. 그 결과 대조구(control)에 비해 갈근추출물 투여 시 3β -HSD의 단백질 양이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 14).

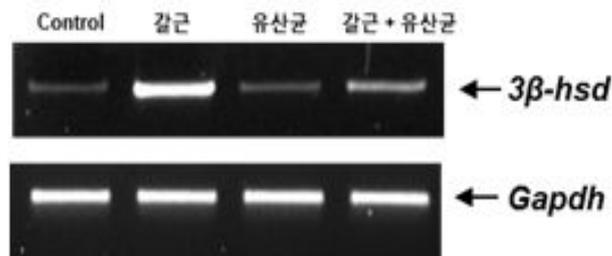
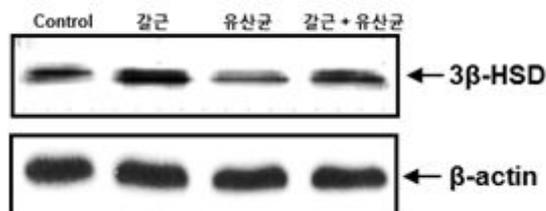
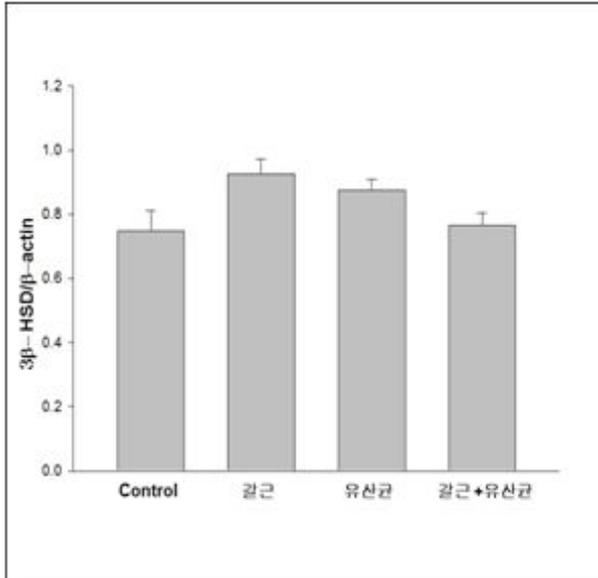


그림 13. 갈근추출물의 돼지 투여 시, 돼지의 간세포에서 3β -HSD 유전자의 전사량 증가

(가)



(나)



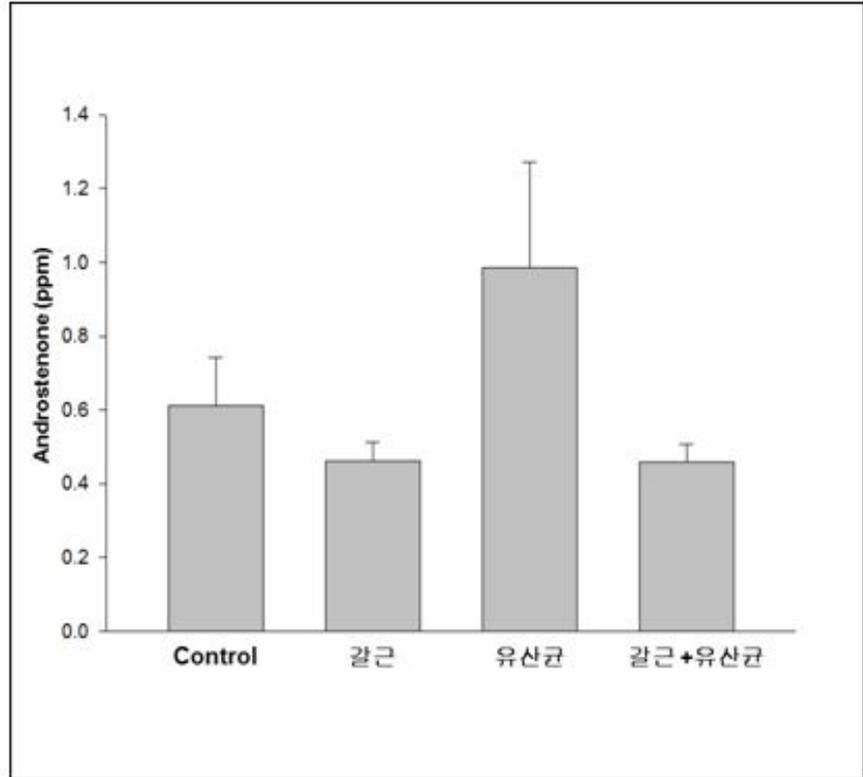
	3β-HSD/ β-actin	S.E
Control	0.748	0.063
갈근	0.927	0.044
유산균	0.874	0.036
갈근 + 유산균	0.765	0.038

그림 14. 갈근추출물의 돼지 투여 시, 돼지의 간세포에서 3β-HSD 단백질 양 증가 (가) 3β-HSD 발현양을 Western blot으로 비교해 본 그림. (나) 사양 실험에 사용된 돼지 간들에서 발현하는 3β-HSD 발현양을 Western blot으로 측정된 후 정량화한 값.

3. 갈근추출물과 유산균을 돼지 등지방에서 androstenone 측정

- 사양실험에 사용된 돼지의 등지방에서 androstenone을 측정하기 위해 1, 2차 년도에서 확립된 방법으로 androstenone을 측정하였다. 우선 돼지 등지방 1.5g을 적출한 후, GC mass를 이용하여 androstenone함량을 측정하였다. 이 때 사용된 GC mass는 Agilent 7890(영인과학)를 이용하였으며, Column은 DB-5MS (30m×250μm×0.25μm)를 사용하였고, 기체의 Flow rate는 1.0 ml/min로 하였다. 또한, 온도조건은 detector 280℃, 주입구온도는 250℃였으며, 오븐의 초기온도는 120℃에서 2분간 지체한 후 15℃/min의 속도로 240℃까지 상승한 후 다시 10℃/min의 속도로 260℃까지 상승한 후 5분간 온도를 지속하였다. 그 결과 대조구(control)에 비해 갈근추출물 투여 시 돼지 등지방에서 androstenone 양이 감소하는 것을 알 수 있었다(그림 15).

처리	Androstenone (ppm)
control	0.751
control	0.279
control	0.847
control	1.063
control	0.375
control	0.351
갈근	0.313
갈근	0.428
갈근	0.632
갈근	0.575
갈근	0.443
갈근	0.386
유산균	0.861
유산균	0.271
유산균	2.129
유산균	1.043
유산균	0.618
갈+유	0.466
갈+유	0.633
갈+유	0.411
갈+유	0.320
갈+유	0.471



	평균	S.E
Control (N=6)	0.611	0.131
갈근 (N=6)	0.463	0.049
유산균 (N=5)	0.984	0.287
갈근 + 유산균 (N=5)	0.460	0.047

그림 15. 갈근추출물의 돼지 투여 시, 돼지의 등지방에서 androstenone 양의 감소. 사양실험에 사용된 돼지의 등지방에서 발현하는 androstenone의 양을 측정한 후 정량화한 값.

제 2 절 장 내 skatole 생성 미생물의 제어 기술 개발

제 1 항 돼지 정상균총에서의 total bacteria의 분리 및 정제

1. Bifidobacterium과 lactic acid bacteria 균주의 선발

가. 유산균의 분리, 동정

- 고려대학교 식품공학과 식품미생물학실험실에 보관중인 다양한 유산균주와 돼지분변으로부터 선택배지(MRS, BCP 배지 등)를 사용하여 streak plating법으로 도말하고 37℃, 48시간동안 혐기적으로 배양한 후, colony의 형태가 상이한 균주들을 선택하여 순수 분리한 유산균주를 사용하였다. 균주의 보존을 위해 모든 균주를 MRS 배지에 3회 계대배양한 후, 원심분리한 다음 cell pellet에 skim milk 10%, glucose 3%, yeast extract 0.3%의 배지를 제조하여 혼합하고, 이것을 vial에 1ml 씩 분주하여 동결건조하여 -80℃의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

나. 내산성 측정, 내담즙성 측정 및 항균작용 조사

- 돼지분변등의 다양한 원천으로부터 형태적, 생리, 화학적 특성 등을 바탕으로 하여 수십종의 유산균주를 분리, 동정하였다. 분리, 동정된 균주들과 다양한 기관으로부터 분주받아 식품미생물실험실에 보관중인 유산균주들을 대상으로 내산성을 측정하였다. 유산균주를 MRS배지에서 37℃, 18시간동안 배양하고 원심분리하여 유산균주를 침전시켰다. 이것을 멸균 saline(0.85% NaCl)으로 2회 세척 후 균체현탁액을 MRS broth(대조구)와 인공위액에 각각 약 10⁶ cfu/ml 수준으로 접종시키고 37℃에서 배양시키면서 0, 3시간 간격으로 생존균수를 측정하였다. 인공위액의 제조는 1N HCl을 사용하여 MRS broth의 pH를 2.5로 조정한 후 pepsin을 1000 unit/ml 되도록 첨가한 다음 멸균하여 사용하였으며 KH₂PO₄, Na₂HPO, L-cystein HCl, Tween 80 등이 함유된 phosphate buffer (pH 6.8)로 희석하여 총균수를 측정하였으며 대조구와의 총균수 차이를 계산하였다. 그 결과 pH 2.5인공위액에 3시간, 37℃ 배양시킨 후 생존균수가 유지되는 내산성이 우수한 균주로는 A4, 5PS2, 5WL3, 1GS2, 5GS2, 1WL1-1 등으로 나타났다(표 2). 돼지유래균주의 결과를 도시하였으며, 생균제의 균주는 구강으로 섭취되어 장내에 도달하여 그 안에서 건강증진 활동을 하기까지 숙주 내의 환경에 접하게 되므로 내산성 측정은 이들이 거쳐야할 숙주의 환경과 유사한 조건에서 이루어지므로, 우수한 내산성의 확보는 필수적이다.

표 2. 분리한 유산균주의 내산성

strains	내산성 (Log number of CFU/ml)	
	0 hour	3 hour
7PL3	7.73	5.50
A4	6.96	6.50
5PS2	7.87	7.20
5WL3	6.61	5.86
107A	7.18	5.50
1GS2	6.72	5.94
1YL3-1	6.70	3.86
1BS	6.76	5.37
5GS2	7.53	7.42
1WL1-1	7.83	7.23
1RS1	6.72	0.00
7RS2-1	6.86	0.00

- 내담즙성 측정은 유산균을 내산성 평가에 사용되어진 인공위액 대신 oxgall이 0.3% 함유된 MRS broth에 접종시킨 후 내산성 평가방법과 동일한 방법으로 0, 24시간 간격으로 생존균수를 측정하여, 대조구와의 총균수 차이를 계산하였다. 그 결과 0.3% oxgall MRS 배지에 24시간동안 배양 후 생존균수가 유지되거나 증가하는 내담즙성이 우수한 균주로 7PL3, 5WL3, 1GS2, 1YL3-1, 1BS, 5GS2, 1RS1, 7RS2-1등으로 나타났으며 전체적으로 내담즙성이 우수한 것으로 판명되었다(표 3).

표 3. 분리한 유산균주의 내담즙성

strains	내담즙성 (Log number of CFU/ml)	
	0 hour	24 hour
7PL3	7.81	8.57
A4	7.19	5.85
5PS2	7.79	5.93
5WL3	6.79	8.74
107A	7.15	5.29
1GS2	6.49	8.25
1YL3-1	6.77	8.74
1BS	6.73	8.90
5GS2	7.64	7.89
1WL1-1	7.78	5.74
1RS1	6.67	8.61
7RS2-1	6.58	8.52

- 항균작용의 조사는 박테리옌 생산능력을 조사하고자 균주를 MRS배지에 배양시키고 균체 배양액과 원심분리(8,000×g, 10 min)하여 상등액을 회수한 다음 pH를 6.5로 조정하고 다시 micro filter(German, Ann Arbor, MI)로 여과하여 무균상태인 screw cap test tube에 주입한 것을 사용하였다. 박테리옌 용액을 지시균(Lactobacillus delbrueckii 4797)이 접종된 평판배지표면에 점적하여 37℃에서 6시간동안 배양시킨 다음 억제환의 형성여부로 박테리옌 생산유무를 판정하였

다. 그 결과 A4 균주에서 생균과 cell pellet을 제거한 후 pH를 조정 한 상등액을 접종 하였을 때 억제환을 확인할 수 있었으며 이러한 항균능력의 원인은 이들이 생산하는 박테리오신에 기인하는 것으로 조사되었다(표 4).

표 4. 분리한 유산균주의 항균작용에 따른 억제환 형성

strains	Inhibitor zone 크기/투명도(박테리오신)	
	cell	supernatant
7PL3	-	-
A4	++	++
5PS2	-	-
5WL3	-	-
107A	-	-
1GS2	-	-
1YL3-1	-	-
1BS	-	-
5GS2	-	-
1WL1-1	-	-
1RS1	-	-
7RS2-1	-	-

다. 장관내 부착능력 평가

- 한국 세포주은행 (KCLB)에서 분양받은 장상피세포인 HT-29를 이용하여 실험하였다. HT-29 세포는 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂ 존재 하에 37°C에서 배양시켰다. 부착능력 실험과 부착 억제 실험을 위하여 HT-29 세포를 well당 1.0×10⁵ cells/ml의 수가 되도록 12 well-plate에 분주하였고 격일로 배지를 교환하며 완전하게 monolayer를 형성할 때까지 배양하여 실험에 사용하였다.
- 유산균의 부착능력을 확인하기 위하여 완전 monolayer를 형성한 HT-29 세포는 25°C의 PBS buffer를 이용하여 6회 세척하고 항생제가 첨가되지 않은 RPMI 1640 배지 0.5 ml를 첨가하였다. 유산균주를 1.0×10⁹ cfu/ml의 농도가 되도록 RPMI에 현탁한 다음 0.5ml을 monolayer를 형성한 HT-29 위에 접종하고 5% CO₂ 존재 하에 37°C에서 2시간 배양을 실시하였다. 배양이 완료된 후 부착되지 않은 유산균의 제거와 세척에 따른 부착능력을 확인하기 위해 3분씩 200 rpm의 속도로 교반하면서 PBS buffer를 사용하여 6회 세척을 실시하였다. 세척이 완료된 후 0.2% Trypsin-EDTA를 분주하여 부착되어 있는 세포를 떼어내고 peptone수를 이용하여 연속희석법으로 MRS-agar에 평판 도말한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 균수를 측정하였다. 또한, 일부 부착 확인을 위하여 70% alcohol에 하루정도 담구어 완전히 살균된 cover glass를 petri-dish 바닥에 부착시킨 후 HT-29 세포를 배양하여 위와 동량의 유산균을 첨가하여 실험하였다. 세척에 의해 씻겨 내려가지 않고 HT-29 세포에 부착된 유산균주는 건조한 뒤 Gram 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

- 장관 세포에 부착능력이 높은 것으로 알려져 있는 균주인 *L. rhamnosus* GG strain을 대조구로 하여, 2시간 후에 장 부착능력은 GG strain과 비교하여 같거나 높은 부착능을 갖는 균은 우수한 부착능력을 가진 균으로 평가하였다. 그 결과 **A4, 5PS2, 5WL3, 107A, 1YL3-1, 1BS, 1WL1-1, 5GS2, 7RS2-1** 등이 유사한 부착능이 있는 것으로 나타났다. 이는 유산균이 장 상피 세포에 부착하여 병원성균과 경쟁적으로 우위를 차지하는데 중요한 요소이며 동물실험에서 실질적으로 장내에 부착되어 균주의 활성이 유지될 것으로 나타날 것으로 판단되어진다(표 5).

표 5. 분리한 유산균주의 장관내 부착능력

strains	0 hour		2 hour	
	mean	S.E.	mean	S.E.
7PL3	9.07	0.01	4.52	0.20
A4	8.93	0.05	6.90	0.13
5PS2	9.91	0.03	7.80	0.04
5WL3	8.70	0.13	6.81	0.20
107A	8.97	0.09	7.44	0.03
1GS2	8.92	0.04	5.68	0.12
1YL3-1	8.85	0.00	7.10	0.17
1BS	8.83	0.04	6.71	0.08
5GS2	9.95	0.03	7.86	0.06
1WL1-1	10.06	0.04	8.00	0.08
1RS1	8.71	0.01	4.70	0.14
7RS2-1	8.61	0.14	6.96	0.09
GG(대조구)	9.74	0.07	7.81	0.08

2. 선별된 균주 중 농축, 동결, 산소 스트레스에 저항성이 우수한 균주를 선발

가. 농축, 동결, 산소 스트레스 저항성 균주의 선별

- 대량생산과 회수를 위한 가공공정단계 중 발생가능한 농축, 동결 및 산소 접촉에 대한 활력의 변화를 조사하였다. 유산균주를 37℃, 18시간 배양한 후 MRS agar를 사용하여 생존균수를 측정한다. 그 다음 농축을 위하여 약 10ml의 배양액 채취하여 8000 rpm에서 20분동안 원심분리하여 상정액을 제거하고 skim milk 10%, lactose 2%를 첨가한 5ml의 배지에 첨가하여 현탁시킨 다음 생존균수를 측정하였다. 농축의 과정 후 같은 방법으로 생존균수를 측정한다. 다시 -78℃의 deep freezer에서 15시간동안 급속냉동시킨 다음 해동시킨 후 생존균수를 측정하며 남은 균주를 사용하여 shaking incubator(4℃)에서 100 rpm으로 5시간 동안 교반시킨 후 산소노출에 따른 생존균수를 측정한다.
- 돼지분변 유래균주 중 총 12종의 균주를 대상으로 대량생산과 회수를 위한 가공공정단계 중 발생가능한 농축, 동결 및 산소 접촉에 대한 활력의 변화를 조사하였다. 그 결과, **5WL3, 1BS** 등이 실험 후의 생존균수가 초기 생존균수와 차이가 나지 않거나 최소한의 사멸율만을 보임에 따라 우수한 회수율 및 생존율을 나타내었으며 전체적으로 농축, 동결, 산소 저항성이 우수한 것으로 조사되었다.(표 6).

표 6. 분리한 유산균주의 농축, 동결, 산소 저항성

Strains	Log number of CFU/mL			
	초기	농축	동결	산소접촉
7PL3	7.30	7.93	7.92	7.95
A4	8.80	9.22	9.19	9.15
5PS2	9.84	10.08	9.48	9.51
5WL3	8.68	8.68	8.64	8.78
107A	9.04	9.42	9.24	9.05
1GS2	8.41	8.74	8.28	8.58
1YL3-1	8.81	8.70	8.56	8.65
1BS	8.62	8.51	8.73	8.74
5GS2	9.74	10.11	9.14	9.44
1WL1-1	9.76	10.12	9.45	9.49
1RS1	8.81	8.52	8.13	8.50
7RS2-1	8.31	8.38	8.26	8.17

- 따라서, 이러한 프로바이오틱스 능력 및 균주 대량생산시 발생할 수 있는 농축, 동결, 산소 저항성 결과를 토대로 장 내 skatole 생성을 제어할 수 있는 생균제의 후보균주를 선발할 수 있었으며, A4, 5WL3, 1BS, 1GS2, 5GS2 등 5개 균주를 선발하였다. 이러한 선발된 균주를 대상으로 skatole 생성 저하능력 In vitro 실험 및 screening을 진행중에 있다.

제 2 항 선발된 균주의 skatole 생성 저하능력 In vitro 실험 및 screening

1. 선발된 균주를 이용한 In vitro skatole 분석 실험

가. Skatole 감소능력 평가

- 1차년도에서 내산성, 내담즙성, 항균작용, 장관내 부착력이 평가된 프로바이오틱스 능력 및 균주 대량 생산시 발생할 수 있는 농축, 동결, 산소 저항성의 실험 결과를 토대로 A4, 5WL3, 1GS2, 5GS2의 5개 균주가 선발되었다. 5개 균주 외에 프로바이오틱스 능력이 높고 세 가지 저항성이 강하다고 판단되는 5PS2, 1WL1-1의 2개 균주를 포함해 총 7개의 균주를 대상으로 실험하였다. 균주의 보존을 위해 모든 균주를 MRS 배지에 3회 계대배양한 후, 원심 분리한 다음 cell pellet에 skim milk 10%, glucose 3%, yeast extract 0.3%의 배지를 제조하여 혼합하고, 이것을 vial에 1ml씩 분주하여 동결 건조하여 -80℃의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

- 선발 균주의 skatole 감소능력을 평가하기 위하여 균주의 탄소원, 질소원으로써 skatole의 사용을 강화시키기 위한 modified MRS를 사용하였으며, MMRS(modified MRS)의 조성은 다음 표 7과 같다. MMRS에는 70µg/ml skatole이 포함되어 있으며, 균주는 3% 접종하여 혐기적 조건에서 배양하였고, 대조구에는 어느 균주도 접종하지 않았으며 skatole만 첨가하였다. 시료에 포함되어 있는 skatole을 측정하기 위한 전처리로 시료 1ml을 Nalge company (Rochester, NY, USA)사의 Round Centrifuge Tube에 넣고, 회석을 위해 멸균수 1ml을 첨가하였다. 4M-NaOH 10µl를 첨가하여 시료를 alkaline으로 만든 후, 마지막으로 extraction을 위해 chloroform 1ml을 첨가하였다. Emulsion을

형성시키기 위해 약 10초간 vortexing하여 mixture를 잘 혼합시킨 후, 10분간 2700 × g로 원심분리하였다. 두 층으로 분리된 시료에서 chloroform층은 gas chromatography를 위한 injection vial에 옮겨 skatole을 분석하였다. Skatole 분석을 위하여 Agilent 7890 GC-FID (gas chromatography with flame ionization detection)를, column으로는 J & W Scientific (Folsom, CA, USA)사의 DB-1 (polydimethylsiloxane; 0.25 mm i.d. × 30 m length, film thickness: 0.25 mm)을 사용하였다. Column 온도는 120°C에서 250°C까지 20°C/min의 속도로 올렸으며 5분간 머무르도록 프로그래밍하였고, injector와 detector의 온도는 300°C로 유지시켰다. 가스는 He을 사용하였고 flow rate는 2.5ml/min로 고정하였다. 시료는 Hewlett-Packard autoinjector에 의해 splitless mode로 3µl씩 주입되었다. 데이터 분석에는 Hewlett-Packard Chemstation software를 사용하였다.

표 7. Modified MRS의 조성

Ingredient	MRS 조성 (g/L)	MMRS 조성 (g/L)
Dextrose	20.0	5.0
Beef extract	10.0	0.0
Proteose peptone No.3	10.0	0.0
Yeast extract	5.0	2.0
Sodium acetate	5.0	0.0
Ammonium citrate	2.0	2.0
Dipotassium phosphate	2.0	2.0
Magnesium sulfate	0.1	0.1
Manganese sulfate	0.05	0.05
Tween 80	1.0	1.0
Skatole	0.0	70µg/ml

- 대조구와 실험구를 모두 37°C의 혐기적 조건에서 배양하였고, 168시간 후에 skatole의 감소능력을 평가하였다. 그 결과 7개의 균주 중 5WL3은 3.34%의 skatole 감소능력을 나타내어 효과가 없다고 판단되는 한편, 5GS2는 36.01%의 뛰어난 skatole 감소능력이 있는 것으로 나타났다. 선발된 균주의 skatole 감소능력은 각기 다르지만 5GS2, A4, 5PS2등에서 skatole 감소 효과를 얻었다고 판단된다.(표 8, 그림 16)

Strains	Skatole(µg/ml)	감소율(%)
5GS2	44.7899	36.01
A4	51.7536	26.07
5PS2	56.6417	19.08
1WL1-1	58.3035	16.71
1BS	59.9791	14.32
1GS2	60.1106	14.13
5WL3	67.6588	3.34

표 8. 선발된 균주의 skatole 분해능

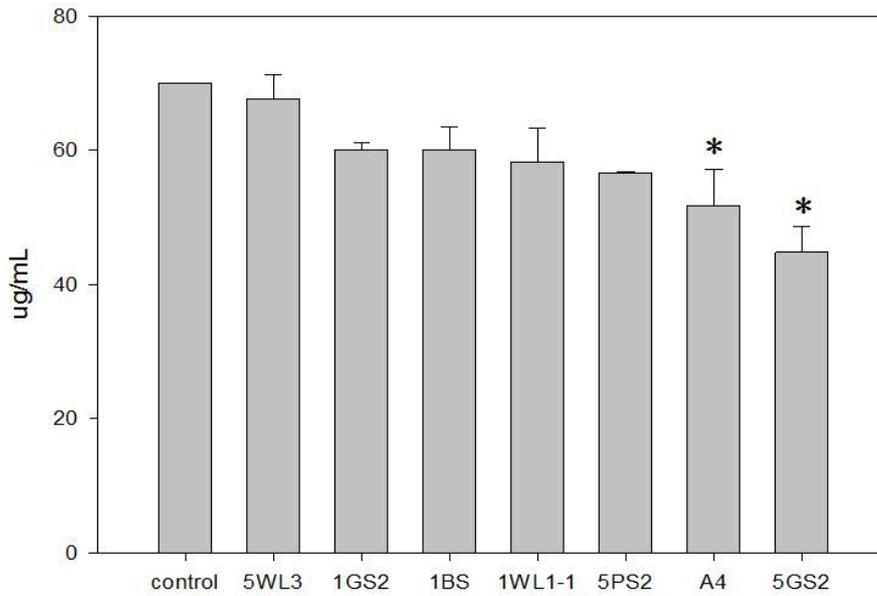


그림 16. 선발된 균주의 skatole 분해능

2. Prebiotics 물질의 선발

가. Prebiotics이용 균주의 선발

- 선발된 균주에 prebiotics를 첨가함으로써 균주의 증식을 증가시키는 효과를 보기위해 균주의 prebiotics이용 능력을 조사하였다. 선발된 7개 균주에 대한 prebiotics이용 능력을 측정하기 위해 양성대조구는 glucose, 음성대조구는 xylitol로 하여 F.O.S, tagatose를 사용하여 실험하였다. MRS배지에서 dextrose와 yeast extract, beef extract가 제외된 최소영양배지를 제조한 다음 위에 제시한 네 가지의 prebiotics 물질을 2%로 첨가하여 액체배지를 제조하고 균주를 1%로 접종한 다음 37°C에서 48시간 동안 배양시켰다. 배양시키는 동안 6시간 간격으로 각 균주를 prebiotics 별로 96-well plate에 200 μ l씩 분주하고 ELISA reader를 이용하여 흡광도 625nm에서 균주의 성장을 측정하였고 pH는 0시간, 48시간에 측정하였다.

- 1차년도에 선발된 5개 균주 외 2개 균주의 prebiotics 이용능력을 조사한 결과, **tagatose를 prebiotics로 이용하는 5GS2를 제외한 6개의 균주가 F.O.S를 양성대조구인 glucose만큼 이용**하였고, 균수가 눈에 띄게 증가했으며, 시간이 지남에 따라 젖산에 의한 pH의 감소도 확인 할 수 있었다.(그림 17, 표 9) Prebiotics를 첨가함으로써 probiotics의 증식을 증가시킬 뿐 아니라, 경제적인 효과도 있을 것으로 예상되며, skatole의 감소능력도 향상될 것으로 기대된다.

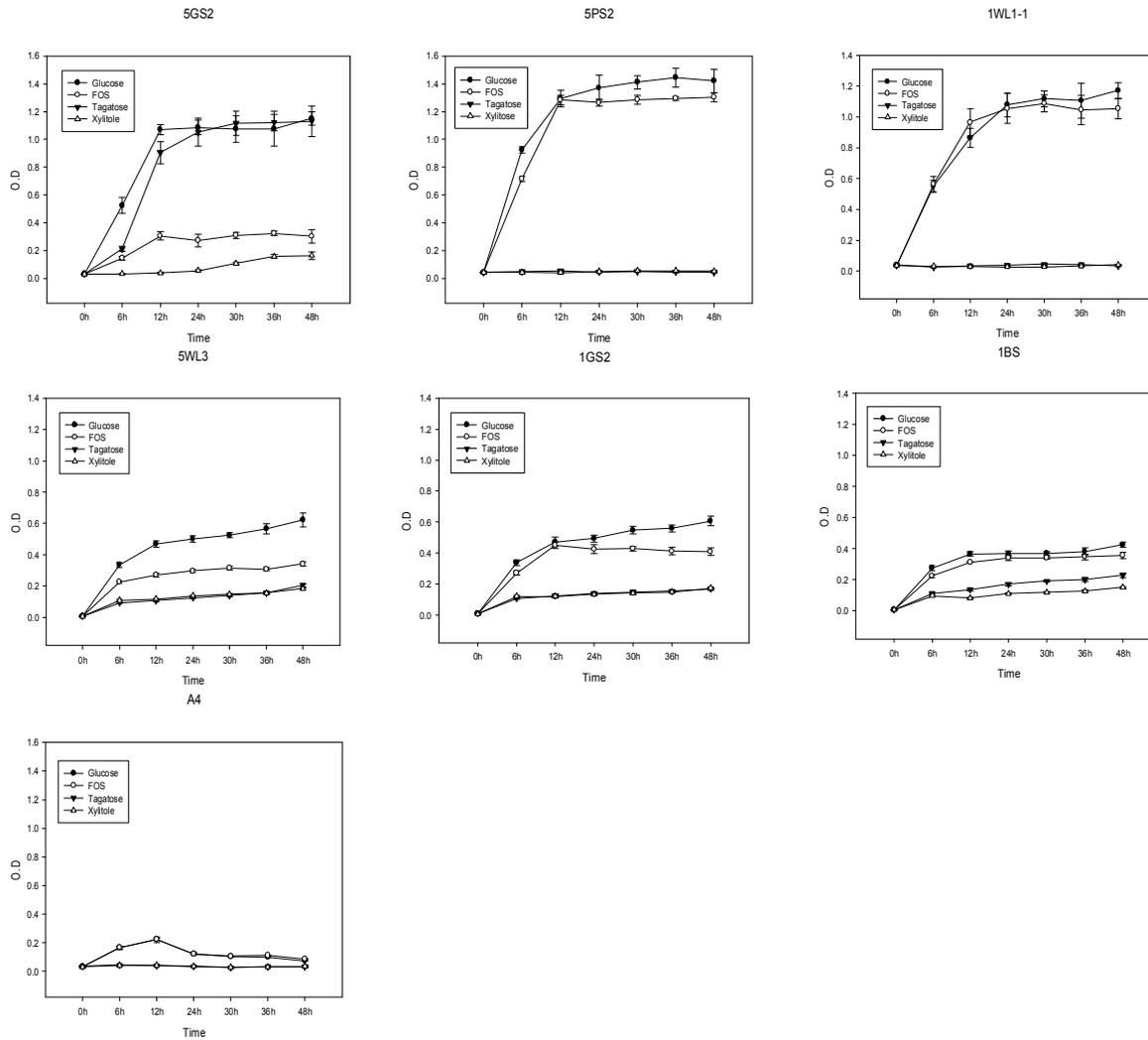


그림 17. 선발된 균주의 prebiotics이용 능력

표 9. 선발된 균주의 prebiotics에서 pH 변화

Strains	시간	Glucose	F.O.S	Tagatose	Xylitol
5GS2	0hr	6.40	6.45	6.43	6.44
	48hr	3.70	5.96	3.74	6.36
5PS2	0hr	6.39	6.42	6.43	6.44
	48hr	3.55	4.06	6.34	6.40
1WL1-1	0hr	6.37	6.40	6.45	6.44
	48hr	3.69	3.77	6.35	6.28
5WL3	0hr	6.51	6.54	6.52	6.51
	48hr	4.96	6.44	6.52	6.37
1GS2	0hr	6.46	6.51	6.49	6.53
	48hr	4.87	5.60	6.30	6.35
1BS	0hr	6.46	6.50	6.48	6.49
	48hr	4.86	5.88	6.59	6.50
A4	0hr	6.41	6.47	6.45	6.45
	48hr	5.40	5.44	6.31	6.38

나. Prebiotics이용 skatole 감소능력 평가

- 균주 별로 선발된 prebiotics를 토대로 MMRS(표 7)를 만들어 skatole 감소능력을 평가하였다. 균주가 탄소원, 질소원으로써 skatole을 이용하여 분해하는 것뿐 아니라 첨가해준 prebiotics를 이용하게 하기 위해 MMRS에서 prebiotics의 당으로써 첨가 비율을 0.5%에서 2.0%로 증가시켰다.

- 선발된 균주의 prebiotics이용 skatole 감소능력을 조사한 결과, 0.5% glucose에서 측정했던 skatole감소능력에서 탁월한 감소능력을 나타냈던 A4는 prebiotics에 의해 skatole감소능력이 증가하지 않았을 뿐만 아니라 glucose에서도 뛰어난 감소능력을 나타내지 않았다. 이는 증가한 당의 첨가로 인해 탄소원, 질소원으로써 skatole을 충분히 이용, 분해하지 못한 이유라고 사료된다. 반면 glucose에서 각각 24.02%, 23.54%의 skatole의 감소능력을 나타냈던 5GS2, 5PS2는 prebiotics로써 각각 tagatose와 F.O.S를 첨가한 결과 27.41%, 28.69%로 skatole 감소능력이 증가하였다.(표 10, 그림 18) 두 균주 외에 다른 균주들에서는 전반적으로 prebiotics의 첨가가 균주의 skatole 감소능력에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 판단된다.

표 10. 선발된 균주의 prebiotics이용 skatole 분해능

Strains (선발 prebiotics)	Skatole($\mu\text{g}/\text{ml}$)		감소율(%)	
	Glucose	Prebiotics	Glucose	Prebiotics
5PS2 (F.O.S)	53.5208	49.9172	23.54	28.69
5GS2 (Tagatose)	53.1874	50.8136	24.02	27.41
1WL1-1 (F.O.S)	48.0736	55.1877	31.32	21.16
5WL3 (F.O.S)	61.0321	60.7674	12.81	13.19
1GS2 (F.O.S)	60.9288	63.4890	12.96	9.30
1BS (F.O.S)	69.0142	67.7426	1.41	3.22
A4 (F.O.S)	62.1140	69.1015	11.27	1.28

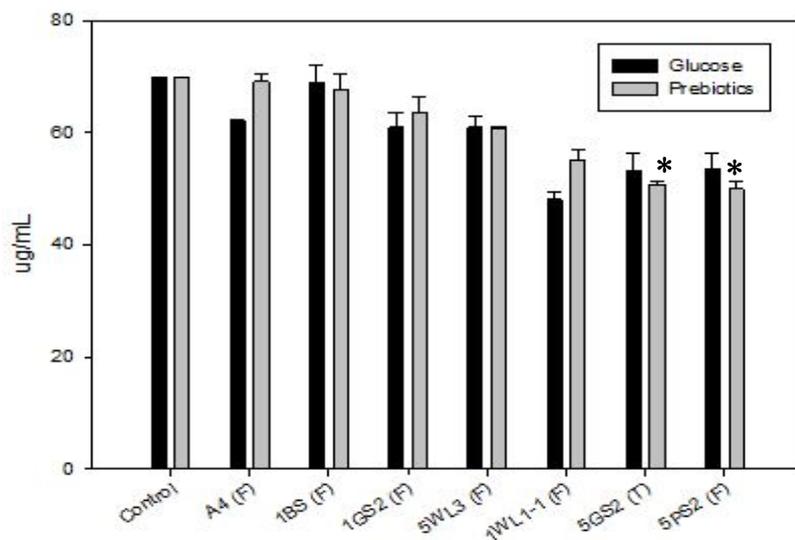


그림 18. 선발된 균주의 prebiotics이용 skatole 분해능

- 따라서, skatole의 분석과 probiotics의 이용능력을 평가한 결과 **장 내 skatole 생성을 제어할 수 있는 생균**의 후보균주를 선발 할 수 있었으며, 5GS2 균주를 선발하였다.

다. 소동물 모델(생쥐모델)에서의 효능평가

- 소동물(생쥐)에서 유산균의 skatole분해효능평가에 앞서 생쥐에서 skatole의 존재여부를 확인했다. 생후 1년 된 수컷생쥐(C57BL/6)의 지방 1g을 적출하여 GC mass를 이용하여 skatole함량을 측정했다. 대조구로는 sigma에서 구입한 skatole(cat. number: M 2127)과 돼지 등지방을 사용하였다. 이 때 사용된 GC mass는 Agilent 7890(영인과학)이고, 분석조건은 DB-1MS(30m×250 μ m×0.25 μ m) Column을 사용하였고, 기체의 Flow rate는 1.0 ml/min로 하였다. 또한, 온도조건은 detector 280 $^{\circ}$ C, 주입구온도는 250 $^{\circ}$ C였으며, 오븐의 초기온도는 120 $^{\circ}$ C에서 2분간 지체한 후 15 $^{\circ}$ C/min의 속도로 240 $^{\circ}$ C까지 상승한 후 다시 10 $^{\circ}$ C/min의 속도로 260 $^{\circ}$ C까지 상승한 후 5분간 온도를 지속하였다. 대조구에서는 5.2~5.4분에 skatole peak가 검출되었으나, 생쥐지방에서는 검출되지 않았다(그림 19).

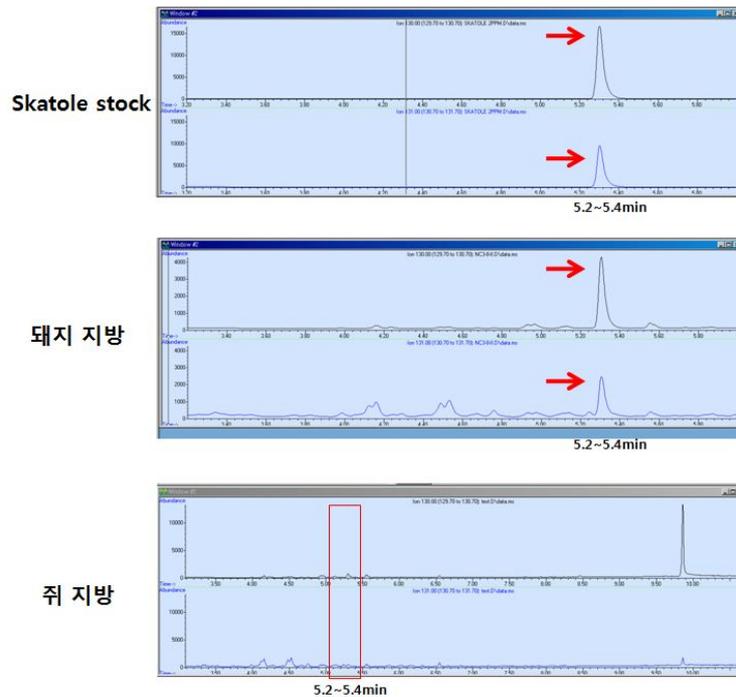


그림 19. GC mass를 이용한 생쥐의 androstenone 양 측정

- 생쥐에서는 skatole이 빠른 속도로 분해가 되거나 지방내 축적이 이루어지지 않는 것으로 생각된다. 따라서 유산균의 skatole 분해 효능확인에는 돼지모델에서 직접 확인하는 것이 필요하다고 판단되며 이를 위해 1세부 및 협동과제와 공동으로 돼지사양시험을 진행중에 있다.

- 2차년도 실험결과, skatole을 효과적으로 감소시키는 probiotics 균주를 선발하였고, skatole 감소능력을 갖는 probiotics 균주 5GS2에 대한 산업 재산권 등록을 준비중에 있다.

제 3 항 최종 선발된 probiotic균주를 이용한 사료첨가제의 개발 및 효능 입증

1. 돼지 모델에서 skatole의 축적 억제를 위한 생균제 함유 사료 제조

- 2차년도에 선발된 5GS2를 이용하여 프로바이오틱 사료첨가제를 위한 생균제를 제조하였다. 삼각 플라스크에서 균주를 MRS 배지(표 11)에 3회 계대배양한 후, 원심분리한 다음 cell pellet에 skim milk 10%, glucose 3%, yeast extract 0.3%의 배지를 제조하여 혼합하고 동결 건조하였다. 제조한 생균제는 1.3×10^{13} CFU/kg 가 되도록 제조하여 사양시험을 진행하였다.

표 11. MRS의 조성

Ingredient	MRS 조성 (g/L)
Dextrose	20.0
Beef extract	10.0
Proteose peptone No.3	10.0
Yeast extract	5.0
Sodium acetate	5.0
Ammonium citrate	2.0
Dipotassium phosphate	2.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Tween 80	1.0
Skatole	0.0

2. 돼지 등지방내 skatole 정량분석 (*In vivo*)

- 시료(등지방)에 포함되어 있는 skatole을 측정하기 위한 전처리로 시료 1ml을 Nalge company (Rochester, NY, USA)사의 Round Centrifuge Tube에 넣고, 희석을 위해 멸균수 1ml을 첨가하였다. 4M-NaOH 10 μ l를 첨가하여 시료를 alkaline으로 만든 후, 마지막으로 extraction을 위해 chloroform 1ml을 첨가하였다. Emulsion을 형성시키기 위해 약 10초간 vortexing하여 mixture를 잘 혼합시킨 후, 10분간 2700 \times g로 원심분리하였다. 두 층으로 분리된 시료에서 chloroform층은 gas chromatography를 위한 injection vial에 옮겨 skatole을 분석하였다. Skatole 분석을 위하여 Agilent 7890 GC-FID (gas chromatography with flame ionization detection)를, column으로는 J & W Scientific (Folsom, CA, USA)사의 DB-1 (polydimethylsiloxane; 0.25 mm i.d. \times 30 m length, film thickness: 0.25 mm)을 사용하였다. Column 온도는 120 $^{\circ}$ C에서 250 $^{\circ}$ C까지 20 $^{\circ}$ C/min의 속도로 올렸으며 5분간 머무르도록 프로그래밍 하였고, injector와 detector의 온도는 300 $^{\circ}$ C로 유지시켰다. 가스는 He을 사용하였고 flow rate는 2.5ml/min로 고정하였다. 시료는 Hewlett-Packard autoinjector에 의해 splitless mode로 3 μ l씩 주입되었다. 데이터 분석에는 Hewlett-Packard Chemstation software를 사용하였다.

표 12. 선발된 균주의 skatole 분해능 (ppm)

그룹	Skatole
Control	0.224 ± 0.009 ^a
갈근	0.216 ± 0.006 ^a
유산균(5GS2)	0.211 ± 0.015 ^a
갈근+유산균(5GS2)	0.219 ± 0.015 ^a

* 통계분석은 균주에 따른 그룹별 차이를 일원배치 분산분석으로 실시하였으며, 사후검정으로는 Duncan의 다중분석을 실시하였다(p<0.05).

- In vivo상에서 등지방의 skatole함량을 GC로 분석한 결과 갈근을 급여한 그룹과 갈근+유산균을 급여한 그룹에서도 등지방의 skatole 함량이 통계적으로 유의한 차이를 보이지 못한 것으로 분석되었다. 또한 5GS2를 이용한 skatole 감소능력은 통계적으로는 유의한 차이를 보이지 못하였으나 유산균을 급여한 그룹에서 돼지 등지방내의 skatole함량이 감소하는 경향성을 보였다(표 12).

3. 장내 균총 분석 (In vivo)

- 본 실험에서 프로바이오틱스 사료첨가제를 급여한 것이 장내 미생물 균총에 어떤 영향을 주었는지를 파악하기 위해 돼지 장내 미생물 균총을 분석하였다. 장내 주요 균인 *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Salmonella-shigella*, *Lactobacillus* 등의 균을 분석하기 위해 장에서 추출한 시료를 바탕으로 NN, EMB, SS, Rogosa 등의 적절한 선택배지를 사용하였다. 시료 1ml을 혐기적 조건에서 알맞게 희석하여 37°C, 48시간 혐기 배양하였다. 배양 종료 후, 각각의 평판배지에서 배양된 colony의 균수를 측정하고, 시료 1ml당 균수는 상용로그 값으로 환산하여 분석하였다.

표 13. 장내균총 분석 결과 (log CFU/ml)

그룹	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella-shigella</i>	<i>Lactobacilli</i>
Control	8.54 ± 0.065 ^a	7.00 ± 0.298 ^a	4.50 ± 0.200 ^a	8.68 ± 0.131 ^a
갈근	8.48 ± 0.155 ^a	7.23 ± 0.327 ^a	4.87 ± 0.510 ^a	8.48 ± 0.343 ^a
유산균(5GS2)	6.77 ± 0.747 ^b	6.45 ± 0.470 ^a	4.37 ± 0.331 ^a	9.18 ± 0.139 ^a
갈근+유산균(5GS2)	7.45 ± 0.550 ^{ab}	6.85 ± 0.510 ^a	4.74 ± 0.402 ^a	8.77 ± 0.208 ^a

* 통계분석은 균주에 따른 그룹별 차이를 일원배치 분산분석으로 실시하였으며, 사후검정으로는 Duncan의 다중분석을 실시하였다(p<0.05).

- In vivo상에서 장내균총을 분석한 결과 갈근, 갈근+유산균 그룹에서는 *Clostridium* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella-shigella* 그리고 *Lactobacilli*의 균총에서 control 그룹에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다(표 13). 그러나 갈근+유산균 그룹에서 control 그룹에 비해 *Clostridium* spp이 감소하는 경향성을 나타내었다. 또한 유산균 그룹에서는 다른 균총의 차이는 없었지만

Clostridium spp의 균총이 유의적으로 감소한 결과를 나타내었다.

- 종합적인 결론으로는, in vitro에서는 skatole저해 능력이 확인되어 돼지에 급여한 생균제가 응취의 원인물질인 skatole 양, skatole의 원인이 되는 clostridium의 생균수에 유의적인 영향은 미치지 못하였으나 감소하는 경향성을 보이는 것을 확인하였다. In vivo에서는 in vitro보다 영향을 줄 수 있는 요소들이 많기 때문에 확실한 효과를 보지는 못하였으나 감소하는 경향성을 보았을 때, 응취 저감화의 가능성이 있는 사료첨가제로서의 가능성을 확인하였다.

제 3 절 사료첨가제 생산공정 개발

제 1 항 사료첨가제용 기초 사료 선정

본 협동과제 연구팀은 제1, 2세부과제에서 개발되는 천연물 추출 제제와 probiotic 미생물 균주를 사료첨가제로 생산 제작할 수 있도록 제품생산공정을 마련하기 위해서 협동 연구를 진행한다. 그러기 위해서 먼저 천연추출물 및 생균제와 배합할 기초사료를 선정하였다.

돼지사료에 특정 첨가물을 배합할 때, 그 첨가물의 양이 매우 소량이기 때문에 적절히 섞이지 않는 문제가 있을 수 있다. 이를 위해 첨가물 외에 탄산칼슘이나 옥테말분 등의 부용제를 이용하고 이들을 혼합하여 보조사료를 만든다. 따라서 당 협동과제에서는 1, 2세부과제에서 응취제거와 관련하여 천연물제제 및 probiotic 미생물 균주를 탐색하는 동시에 기본적으로 급여되어질 기초 보조사료의 배합을 연구했다(표 14, 15, 16). 3가지 기초 보조사료는 번식능력 및 번식장애를 개선과 발정 및 수태율을 향상시키며, 면역강화의 기능을 할 수 있도록 배합되었다. 이들 기초 보조사료 중 향후 1, 2세부 연구진에서 선발한 응취제거용 첨가물을 혼합하여 최적의 기능을 보이는 기초 보조사료를 선발하여 이를 바탕으로 최종 보조사료를 제작할 계획이다.

표 14. 응취제거용 첨가물 혼합을 위한 기초사료 배합 A

원료명	수량	단위	비고
비타민AD3	0.5	kg	
옵티민ZMC	10	kg	
미래베이스	79.4	kg	
중탄	10	kg	
몰라스위트	0.1	kg	
계	100	kg	

표 15. 응취제거용 첨가물 혼합을 위한 기초사료 배합 B

원료명	수량	단위	비고
비타민AD3	0.5	kg	
비트렉심1.1%	0.5	kg	
미래베이스	40	kg	
중탄	58.9	kg	
몰라스위트	0.1	kg	
계	100	kg	

표 16. 응취제거용 첨가물 혼합을 위한 기초사료 배합 C

원료명	수량	단위	비고
비타민AD3	0.75	kg	
비타민 E	2.25	kg	
미래베이스	40	kg	
중탄	56.9	kg	
몰라스위트	0.1	kg	
계	100	kg	

제 2 항. 실험용 사료첨가제 개발 및 생산

1. 천연물과 생균제를 함유한 사료첨가제 개발

본 협동과제 연구팀은 제1, 2세부과제에서 개발되는 천연물 추출 제제(갈근)와 probiotic 미생물 균주(유산균)를 사료첨가제로 생산 제작할 수 있도록 제품생산공정을 마련하기 위해서 협동 연구를 진행했다.

돼지사료에 특정 첨가물을 배합할 때, 그 첨가물의 양이 매우 소량이기 때문에 적절히 섞이지 않는 문제가 있을 수 있으며, 또한 돼지에 급여시 효율적인 전달을 위해 첨가물의 투입형태를 결정해야한다. 갈근의 경우 추출물을 분말형태로 넣는 방법과 갈근 자체를 잘게 부수어 넣는 방법이 있다. 후자의 경우 첨가제 생산의 용이성이 있으나 돼지급여시 갈근의 효과를 높이기 위해 분말형태의 추출물을 배합하는 방식을 채택했다. 같은 이유로 유산균 첨가제의 경우에도 분말형태로 배합을 했다.

사료첨가물을 사료에 첨가했을 때 안전성이 있어야하며, 돼지에 해가 되거나 독성이 없어야 한다. 이와 더불어 첨가제가 돼지에서 효과적으로 작용할 수 있어야하므로 각 첨가제별로 effective dosage 설정이 반드시 선행되어야 하며, 이를 위해 1, 2세부과제와 공동으로 동물모델에 대해 연구를 진행했다. 그 결과 갈근은 기초사료 1톤 당 분말추출물 4~6kg (0.4~0.6%)가 가장 효과적으로 판단된다. 유산균은 돼지 1마리가 하루에 1g씩 섭취하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단되며, 일반 돼지의 경우 일일 사료섭취량이 약 2kg이므로 기초사료 1kg당 유산균 0.5g의 비율(0.05%)로 배합하

는 것이 가장 적합한 것으로 판단된다.

2. 1,2세부연구에 제공하기 위한 실험용 사료첨가제 생산

돼지사양시험에는 총 4개의 사료처리구가 있으므로 각각 처리구에 대한 실험용 사료를 제조했다.

[사료처리구]

- ① 대조구 (일반사료 급여)
- ② 처리구 1 (갈근추출물 함유 사료 급여)
- ③ 처리구 2 (유산균첨가제 함유 사료 급여)
- ④ 처리구 3 (갈근추출물 + 유산균첨가제 함유 사료 급여)

대조구에 급여할 일반사료는 1차년도 수행을 통해 개발한 기초사료배합B를 이용하였으며, 처리구 1, 2, 3에 필요한 사료는 기초사료배합B에 갈근 및 유산균을 혼합했다.

제 3 항 응취제거용 사료첨가제 생산공정 개발

1. 사료첨가제의 배합기술 개발

응취제거관련 사양시험을 위해 1, 2세부과제와의 연계하여, 총 4개의 처리구에 대한 첨가물의 급여형태 및 급여함량을 설정했다(표 17). 2차년 연구결과를 토대로 하여 갈근은 건조된 분말형태로 사료내 0.5%를 첨가하며, 유산균은 동결건조된 분말형태로 0.05%함량으로 제작하였다(그림 20, 그림 21). 시험돈의 총사육기간은 25주이며, 첨가물 급여시기는 돼지가 50kg~110kg일 때이다. 따라서 첨가물 급여시기에 처리구당 약 1,400kg의 사료가 요구되며, 이에 4개 처리군에 필요한 충분한 양의 갈근(17kg)과 유산균(유산균배지 35L)을 확보했다 (표 18). 1t 믹서기에 기초사료 및 첨가물을 넣고 약 10분동안 혼합하였다. 특히 유산균의 경우, 매우 소량이라 적절히 혼합이 안되므로 EP옥수수 10배 희석하여 최종 사료배합을 실시했다.

표 17. 첨가물 급여형태 및 함량

첨가물	급여형태	함량
갈근	분말(건조)	0.5%
유산균	분말(동결건조)	0.05%

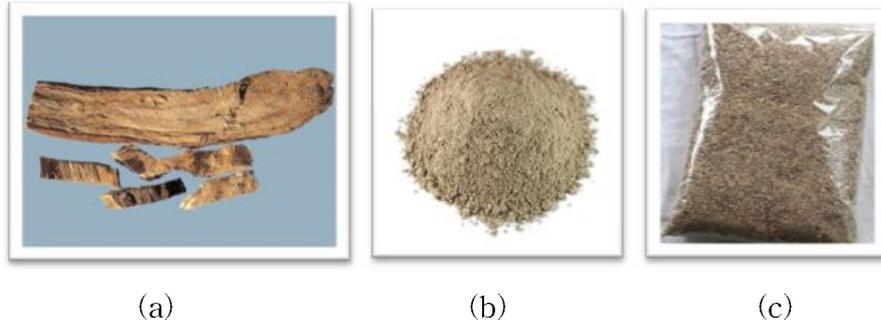


그림 20. 건조분말형태의 갈근첨가물 제작

- (a) : 분말형태 전의 갈근시료
- (b) : 건조분말제작된 갈근첨가물
- (c) : 제작이후 포장보관



그림 21. 동결건조방식을 이용한 유산균첨가물 제작

표 18. 처리구 별 사료급여량 및 첨가물 필요량

	총사료량(kg)	갈근첨가(kg)	유산균첨가(kg)
1) 대조구	1,400		
2) 갈근	1,400	7.00	
3) 유산균	1,400		0.70
4) 갈근 + 유산균	1,400	7.00	0.70
		14.00	1.40

2. 갈근추출물과 유산균첨가제를 이용한 사료첨가물의 효과 검증을 위한 돼지사양시험

3차년도에 1세부와 2세부에서 개발한 갈근추출물 및 유산균첨가제의 응취제거효능을 검증계획을 가지고 있으며 이를 위해 비거세돈군에 대한 사료급여실험이 필요하다. 실험돈은 생후 도축까지 약 5~6개월이 소요되기 때문에 2차년도과제 수행과정에서 ‘돼지사양시험’을 계획했다. 그런데 2010년 말 국내에서 발발한 구제역 파동으로 인한 양돈산업 전반에 걸친 피해로, 돈가가 급격히 상승(55만원/110kg, 발생전 대비 53% 증가)하였으며 관련사양비용이 증가함에 따라, 본 연구에서 2010년 9월에 예정되어 있던 돼지사양시험을 정상적으로 수행할 수 없었다. 따라서 불가피하게 연구기간을 6개월 연장하였으며, 2011년 9월생 자돈을 대상으로 180일간 사양시험을 실시하였다.

1) 시험돈군조성단계

- 동시기에 출산할 임신돈 선정
- 자돈생산
- 비거세 이유 수태지 선별
- 처리구별 돈사 분리

2) 사육단계

- 초기사육기간(이유시부터 50kg체중도달시까지): 군사(무리사양)
- 후기비육기간(50kg체중부터 도축시까지): 개별사양(사료처리기간)
- 사료처리구
 - ① 대조구 (일반사료 급여)
 - ② 처리구 1 (갈근추출물 함유 사료 급여)
 - ③ 처리구 2 (유산균첨가제 함유 사료 급여)
 - ④ 처리구 3 (갈근추출물 + 유산균첨가제 함유 사료 급여)

표 19. 이유 후 50kg도달까지의 사료 급여 프로그램

자돈사료	기간	급여량(kg/day/두)	총사료량
1	4주	0.11	0.11kg x 28day x 25두 = 77kg
2	2주	0.65	0.65kg x 14day x 25두 = 228kg
3	2주	1.00	1.00kg x 14day x 25두 = 350kg
starter	6주	1.70	1.70kg x 42day x 25두 = 1,785kg
합 계	14주		2,440kg

표 20. 50kg~110kg 도달까지의 첨가물 급여 프로그램

자돈사료	기간	급여량(kg/day/두)	총사료량
Grower	6주	3	3kg x 42day x 20두 = 2,520kg
Finisher	5주	3	3kg x 35day x 20두 = 2,100kg
합 계	11주		4,620kg

돼지사양시험은 임신돈선별 및 자돈생산 등의 시험돈군 조성단계, 처리구별 사료처리를 하는 사육단계, 그리고 시료채취 및 형질측정 등의 도축단계로 구분된다. 본 협동과제에서는 사육단계에서의 첨가물과 기초사료를 배합하는 역할을 했으며, 도축단계에서의 시료채취를 실시하여 각 세부과제연구팀에 제공했다. 구체적으로 시료는 응취원인물질 측정하기 위한 등지방과, 갈근에 따른 유전자발현차이를 보기위한 간조직, 그리고 장내 균총변화확인을 위한 맹장이다. 사양시험관련 세부연구내용은 표 19, 표 20에 나타나 있다.

시험자돈들의 평균 사육일령 181.6일(사양시험 70일 경과)에 도축이 이루어졌으며, 도축장소는 경기도 안성 도드람LPC 였다. 축산물 품질평가원의 등급판정에 의한 도체중과 등지방두께는 표 21에 나타나 있다. 사양집단의 평균도체중은 100kg, 표준편차 9.45kg의 분포를 보였고, 등지방두께는 평균 20.95cm, 표준편차 4.72의 분포를 보였다.

표 21. 사양집단의 도체형질

Traits	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
도체중 (kg)	22	100.27	9.45	82	116
등지방두께 (mm)	22	20.95	4.72	14	29

본 협동과제는 ‘사료첨가제 생산공정 개발’에 그 목표가 있다.

1차년 연구에서는 사료첨가제용 기초사료 선정을 하였다. 1, 2세부과제에서 응취제거와 관련된 천연물제제 및 prebiotic 미생물 균주 첨가제에 혼합되어질 기초 보조사료의 배합을 연구했다. 그 결과, 번식능력 개선과 발정, 수태율 향상, 면역강화기능이 첨가된 3가지 기초사료 배합 후보를 설정하였다.

2차년 연구를 통해 천연물과 생균제를 함유한 사료첨가제를 개발하였다. 1차년에 만들어진 기초사료 배합후보중 하나(기초사료배합B)를 최후 선정하였다. 선발된 천연물 추출 제제(갈근)와 prebiotic 미생물 균주 첨가제(유산균)가 배합될 때 그 양이 매우 소량이기 때문에 적절히 섞이도록 해주어야 했으며, 돼지에게 급여시 효율적이고 안전한 전달을 위해 첨가물의 투입형태와 effective dosage를 결정했다. 연구결과, 갈근은 추출물을 분말형태로 1톤당 4~6kg (0.4~0.6%), 유산균은 동결건조를 통한 분말형태로 1kg당 유산균 0.5g의 비율(0.05%) 배합비를 결정하였다.

3차년 연구에서는 사료첨가제 배합기술을 개발하고, 배합된 사료첨가제를 실제 사양시험에 적용하였다. 2차년 연구결과를 토대로 최종 첨가물 함량을 갈근 0.5% 함량, 유산균 0.05% 으로 결정하였다. 특히, 첨가물이 매우 소량인 유산균은 EP옥수수수에 10배 희석하여 최종 사료배합을 실시하였다. 각 처리구에 적합하게 배합된 사료를 이용하여 성공적인 사양시험을 수행할 수 있었다.

제 4 절 응취원인물질관련 DNA표지인자 개발

제 1 항 응취원인물질관련 후보유전자 분석

1. 최적후보유전자 선정

수돼지의 응취(boar taint)는 2차 성성숙시 고환에서 발생하는 androstenone이라는 옹성호르몬과 장내미생물에 의해서 초기 생성되는 skatole이 지방에 축적됨에 따라서 발생하는 것으로 알려져 있으며, 식육으로서 치명적인 풍미를 유발한다.

Androstenone은 성성숙시 고환에서 생성되는 steroid 계통의 호르몬이다. 이러한 이유로 수태지에 게 성호르몬(somatotropin) 처리를 하면 지방의 androstenone 양을 줄일 수 있다고 보고되어진 바 있다(Bonneau *et al.*, 1992). Androstenone은 생식기능을 조절하는 sex pheromone의 활성화에 변화를 주게 되는 침샘 안에 농축된다. 또한, 무극성이기 때문에 지방에 축적되어 식육의 조리시 지방이 가열되었을 때 냄새를 발생하게 된다. Skatole 은 돼지의 장내에 있는 tryptophan이 박테리아 특히 몇몇 Lactobacillus와 Clostridium에 의해 분해되어 만들어진 산물로 혈관에 흡수된다. 그 중 대부분은 간에서 대사되고 배출되는데, 암컷에 비해 수컷이 Skatole을 잘 분해하지 못하며, 남은 것이 지방에 흡수되어서 옹취를 일으키게 된다(Deslandes *et al.*, 2001).

Androstenone의 유전력은 0.25 ~ 0.87 정도로써 유전적으로 개량시 도체내 함량에 큰 영향을 줄 수 있을 것으로 연구된 바 있다(Willeke, 1993, Sellier *et al.*, 1998). 비록 androstenone이 대부분 성성숙시에 생성되지만, 유전적으로 생성 자체가 적은 돼지도 있다. 이와는 다르게, 유전적으로 성성숙자체가 늦게 일어나 도축일령(또는 체중)에 다르더라도 androstenone의 생성이 낮은 개체도 있다. 또한, androstenone의 발현수준은 품종간에서도 그 변이가 크게 나타난다(Xue *et al.*, 1996; Squires *et al.*, 1995; Willeke, 1993). 반면, skatole은 중간정도의 유전력을 가지며(Pedersen *et al.*, 1998), 유전적인 요인보다는 환경 또는 영양요인에 의해 조절되는 특징이 있다(Jensen *et al.*, 1998). 따라서 분자유전학적 기법을 이용한 개량에 skatole에 비해 androstenone이 더욱 용이할 것으로 판단된다.

Androstenone의 대사과정은 합성과 분해의 2가지 단계로 나눌 수 있으며(그림 22), 대사에 관여하는 metabolic pathway상에서 주요하게 작용하는 것으로 알려진 enzyme을 coding하는 유전자를 후보유전자로 선정하였다(표 22). 그 중 3β -HSD 유전자는 정소에서 androstenone생성에, 반대로 간에서는 분해의 대사작용에 관여하며 안드로스테논 함량에 주요하게 영향을 미칠 것으로 판단된다. 실제로 간에서의 3β -HSD 유전자발현량이 등지방에 축적되는 안드로스테논의 양과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 3세부과제 연구팀은 옹취와 관련하여 가장 주요하게 영향을 미칠 것으로 판단되는 3β -HSD 유전자를 최적후보유전자로 선정하고, 그 변이탐색을 위해 전체 유전자 염기서열을 대상으로 변이분석을 실시하였다.

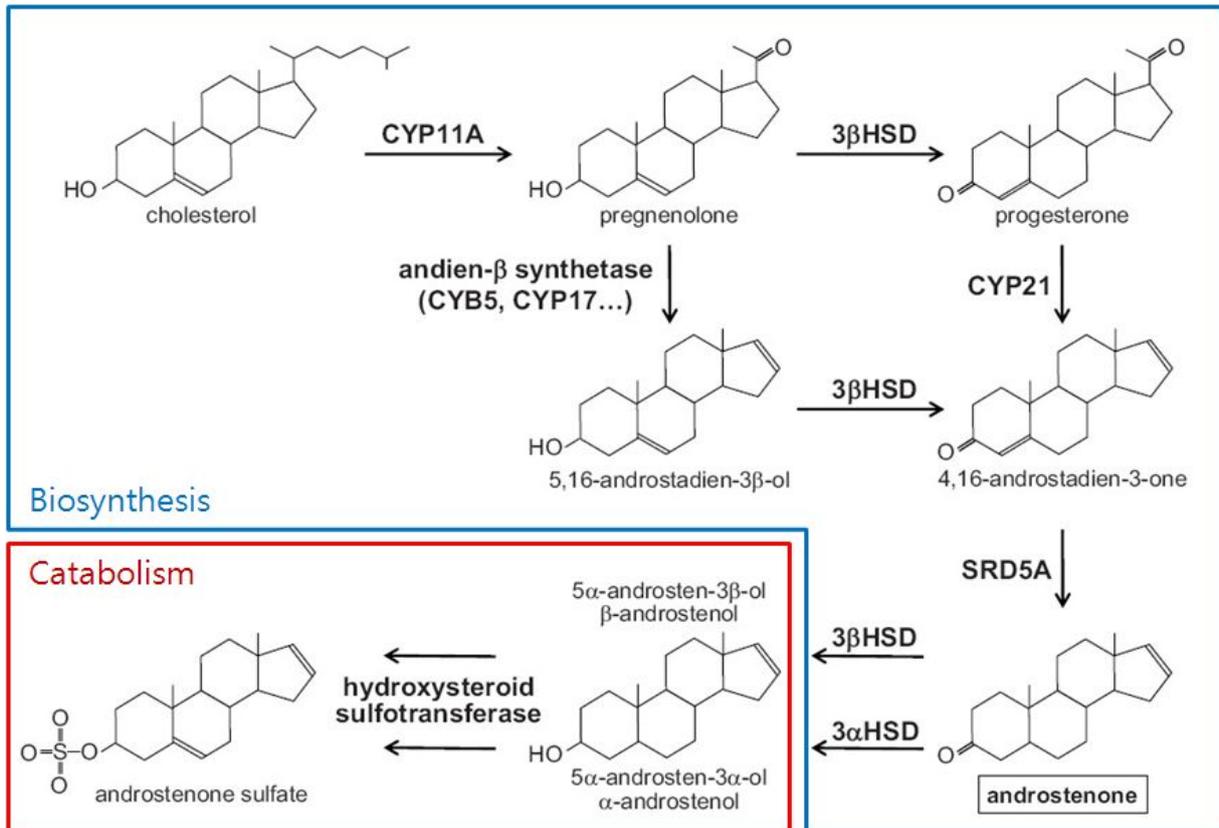


그림 22. Androtenone관련 주요 효소의 대사과정

표 22. Androstenone관련 후보유전자

Gene	Chromosome number	cDNA sequence	Studied by
<i>CYP11A</i>	7	X13768	Quintanilla <i>et al.</i> , 2003
<i>CYB5</i>	1	AF016388	Lin <i>et al.</i> , 2005
<i>3β-HSD</i>	4	AF232699	Nicolau-Solano <i>et al.</i> , 2006
<i>SULT2A</i>	6	DQ172907	Sinclair <i>et al.</i> , 2006

2. 최적후보유전자의 Full length direct sequencing

선정된 최적후보유전자의 유전자발현조절영역에 대해서만 염기서열분석을 실시하는 것이 당초 계획이었으나, *3β-HSD*의 경우 전체 genome에 대한 변이 분석이 이루어지지 않았고, 특히 코딩영역인 exon 부분들에 대해서도 그동안 염기서열상의 변이분석이 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 이 유전자의 전체 영역에 대해서 full length direct sequencing을 실시했다.

3β-HSD 유전자의 5'upstream 영역부터 3'downstream 영역을 포함하는 full length 염기서열 분석을 위해 최근에 보고된 177,720bp 크기의 clone (CH242-150C11, chromosome 4, GeneBank accession number CR938722)을 토대로 20개의 amplicon을 증폭할 수 있는 특이 primer (P1~P40)를 제작하였다(표 23).

유전자구조 분석과 동시에 품종간 및 품종내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 4개 품종 (Yorkshire, Landrace, Berkshire, Duroc)의 순종 돼지의 DNA를 각 품종별로 10두씩 혼합하여 3개 sample(총30두)을 염기서열 분석에 이용하였다. 제작된 특이 primer와 혼합된 DNA sample 이용하여 PCR 방법을 통해서 20개의 amplicon(Seq1~Seq20)을 증폭시켰으며, 이를 ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems, USA)와 ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열분석을 실시하였다.

표 23. 3β -HSD 유전자의 PCR에 이용한 primer 염기서열

Amplicon number	Primer number	Primer sequence	Binding region	Size (bp)
Seq1	P1 P2	5'-GCAGATCCCTGTTGTCAGTG-3' 5'-AGCACGGTGAAGGACACTTT-3'	5'unpsteam	769
Seq2	P3 P4	5'-AAAGTGTCTTCACCGTGCT-3' 5'-TGTGACTTGTGGCCTTATGC-3'	5'unpsteam	827
Seq3	P5 P6	5'-AGAGGCACCTGAGACTTTGG-3' 5'-CTGGGTTCTGGTCTCCTGAT-3'	Exon 1, Intron 1	783
Seq4	P7 P8	5'-AGAGGCAAGGGCACATAAAG-3' 5'-AGACGGTGCAAAGCAAGTG-3'	Exon 2	810
Seq5	P9 P10	5'-CCGGTCCTGACCAAGAACTA-3' 5'-TCCCCTGTGCCTGTATTCTC-3'	Intron 2	714
Seq6	P11 P12	5'-GCAGTGGGCTAGGTGTTTTT-3' 5'-CCTTCAGGCAACCTAGTGCT-3'	Intron 2	726
Seq7	P13 P14	5'-GAAGTGGATTTGAGGGGACA-3' 5'-AGGCCAGAGAACAGTGGAGA-3'	Intron 2	645
Seq8	P15 P16	5'-TGGCAGAGGCTTAGATGGTT-3' 5'-TCAAAGACAGCCCTCCGTAT-3'	Intron 2	679
Seq9	P17 P18	5'-TCAAGTCCATCCATCATTTCG-3' 5'-CGGGTGTGGAATTAAGGAG-3'	Intron 2	369
Seq10	P19 P20	5'-TCCTCGTGTGAAAGGTGATG-3' 5'-CGTGAACAGGACTCAGGTCA-3'	Exon 3	788
Seq11	P21 P22	5'-CCCATCCACCTGTCTTTGA-3' 5'-TTAGAGCCACGCAGAAGGTT-3'	Exon 3	708
Seq12	P23 P24	5'-CTTTTGCTGCTGTCAAGTGC-3' 5'-TGTGGTCCTAGAGGGATTGG-3'	Intron 3	687
Seq13	P25 P26	5'-CTTCCTGAATCGTGGCTTTC-3' 5'-TGCAGAGGGAGCAATGACTA-3'	Intron 3	512
Seq14	P27 P28	5'-GCACCTGAGCCTTTGAAATC-3' 5'-AGCACCTGATTGTGGGTTCT-3'	Intron 3	579
Seq15	P29 P30	5'-TCCGGGTAAACAGAGTCACA-3' 5'-AGCGCTAGTCCTTAGGCAAA-3'	Intron 3	553
Seq16	P31 P32	5'-TGGGACCTTCCACATGCT-3' 5'-CCTGTGCCTTCAATTTTGG-3'	Intron 3	900
Seq17	P33 P34	5'-AAGAAAGGAAGGGTGGGAGA-3' 5'-CATGTGGGCAAAGATGAATG-3'	Intron 3	721
Seq18	P35 P36	5'-GGCTCTTCAGAACGGTGGTA-3' 5'-GCGAGAAGCAGACAAGAAGG-3'	Exon 4	782
Seq19	P37 P38	5'-CGCTGAAAACCAAGACTCACT-3' 5'-CTGGGTAAAGCATCCTGGTC-3'	Exon 4	749
Seq20	P39 P40	5'-CAAGCACCCACTCTGTTTCA-3' 5'-GAGAAGGCCAGTGATGAAGG-3'	3' downstream	744

3. 전장염기서열분석결과를 바탕으로 한 SNP 변이 탐색

돼지 *3β-HSD* 유전자의 full length sequence 분석결과를 기존의 clone sequence와 alignment 하여 품종간 및 품종내 변이를 탐색하였다. 그 결과 총 39개의 변이를 발견하였다. 단일염기변이 (Single nucleotide polymorphism, SNP)는 총 36개였으며, 삽입 또는 결실(insertion and deletion, InDel)은 총 3개가 발견되었다 (그림 23).

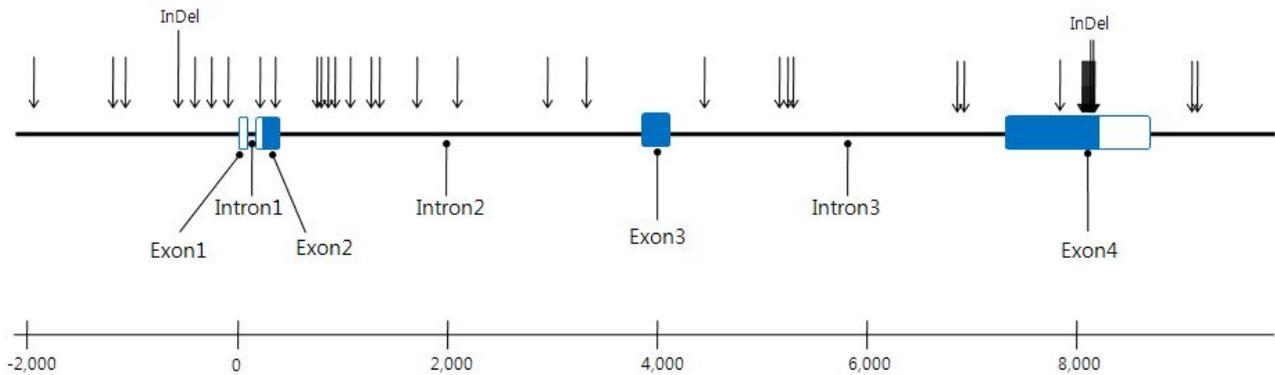


그림 23. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 구조 및 변이

5'upstream영역에서는 모두 7개의 SNP가 발견되었다. 이중 SNP3, SNP5, SNP6은 기존에 Cue 등(2007)이 보고한 SNP였으며, 나머지 3개 SNP와 1개의 InDel은 이번 연구과제를 통해 새롭게 찾았다. SNP1위치에서는 Berkshire에서만 C/T transition 변이가 나타났으며, 나머지 품종에서는 변이가 없었다. SNP4의 경우 Duroc만 특이적으로 C염기를 보인 반면 나머지 품종은 A 염기를 나타냈고, InDel1의 경우 Duroc만 C 염기 결실이 발견되었다. SNP 3, 5, 6의 경우 Duroc에서는 모두 C 염기를 나타내며 변이가 없었지만, 나머지 품종에서는 C/T transition 변이가 나타났다. 5'upstream 영역의 염기서열분석 결과, Duroc이 다른 품종에 비해 특이적인 경향을 보였다. 이는 5'upstream 영역뿐만 아니라 본 연구팀이 분석한 *3β-HSD* 유전자 전체에서 유사한 경향을 나타냈다.

Exon 1과 Intron 1에서는 변이가 발견되지 않았다. Exon 2영역에서 발견된 SNP는 2개로, SNP7는 5' UTR에 SNP8은 단백질번역부위(coding region)에 위치해있다. SNP7의 경우 Duroc은 T염기, Yorkshire는 C염기로 고정되어있었으며, Berkshire와 Landrace에서 T/C transition 변이가 나타났다. SNP8은 Berkshire에서만 T/G tranversion 변이가 나타났다. Intron2와 Intron3에서 각각 11개 (SNP9~19), 6개(SNP11~16)의 SNP가 발견되었다. SNP22는 모든 품종에서 변이가 나타났으며, SNP11, 19는 Berkshire에서만 변이가 있었고 나머지 Intron2와 Intron3 영역내 다른 SNP는 Duroc을 제외한 다른 품종에서 나타나는 경향을 보였다.

Exon4에는 9개의 SNP(SNP26~34)와 2개의 InDel(InDel2~3)이 나타났다. SNP28~31은 연관되어 있는 것으로 판단된다. 4개의 SNP순서대로 'A-C-G-T', 'G-T-C-C'의 2가지 형태로 품종특이적 변이를 나타냈다. 2개의 InDel의 경우, Duroc만 특정서열이 insertion되어 있었다. 끝으로 3'UTR에서 2개의 SNP가 발견되었다.

표 24. 3 β -HSD 유전자의 full length sequence에서 발견된 변이정보 및 제한효소

Polymorphism	Amplicon	site	Nucleotide	Restriction Enzyme
SNP 1	Seq1/ -1906	5'upstream	G-A	
SNP 2	Seq2/ -1114	5'upstream	A-G	<i>AluI</i>
InDel 1	Seq2/ -1080	5'upstream	C	
SNP 3	Seq3/ -563	5'upstream	C-T	
SNP 4	Seq3/ -445	5'upstream	C-T	<i>FatI</i>
SNP 5	Seq3/ -345	5'upstream	C-T	<i>TaqI</i>
SNP 6	Seq3/ -179	5'upstream	C-T	<i>MmeI</i>
SNP 7	Seq4/ 267	exon2	T-C	<i>HaeII</i>
SNP 8	Seq4/ 410	exon2	T-G	<i>FauI</i>
SNP 9	Seq5/ 770	intron2	G-A	
SNP 10	Seq5/ 761	intron2	C-T	<i>BCCI</i>
SNP 11	Seq5/ 776	intron2	A-G	<i>HpyCH4V</i>
SNP 12	Seq5/ 812	intron2	A-G	
SNP 13	Seq5/ 1012	intron2	G-A	
SNP 14	Seq5/ 1144	intron2	C-T	<i>BanI</i>
SNP 15	Seq6/ 1292	intron2	T-C	
SNP 16	Seq6/ 1690	intron2	C-G	<i>BstACI</i>
SNP 17	Seq7/ 2093	intron2	A-G	<i>FokI</i>
SNP 18	Seq8/ 2949	intron2	A-G	
SNP 19	Seq10/ 3319	intron2	T-C	<i>SsiI</i>
SNP 20	Seq11/4440	intron3	C-T	<i>SsiI</i>
SNP 21	Seq13/ 5119	intron3	A-T	<i>DdeI</i>
SNP 22	Seq13/ 5180	intron3	C-T	<i>BstMAI</i>
SNP 23	Seq13/ 5213	intron3	A-C	
SNP 24	Seq16/ 6882	intron3	C-T	<i>MspI</i>
SNP 25	Seq16/ 6926	intron3	A-G	<i>MnlI</i>
SNP 26	Seq18/ 7876	exon4	A-G	
SNP 27	Seq18/ 8184	exon4	C-T	
SNP 28	Seq18/ 8212	exon4	A-G	
SNP 29	Seq18/ 8216	exon4	C-T	<i>MspAII</i>
SNP 30	Seq18/ 8233	exon4	G-C	
SNP 31	Seq18/ 8238	exon4	T-C	
InDel 2	Seq18/ 8282	exon4	CACA	
InDel 3	Seq19/ 8288	exon4	long sequence	
SNP 32	Seq19/ 8353	exon4	G-A	<i>MspI</i>
SNP 33	Seq19/ 8392	exon4	A-C	<i>Hpy188I</i>
SNP 34	Seq19/ 8399	exon4	C-T	<i>FauI</i>
SNP 35	Seq20/ 9128	3'down stream	A-T	<i>MnlI</i>
SNP 36	Seq20/ 9161	3'down stream	G-A	<i>CviJI</i>

4. 유전자형 분석용 진단기법 마련

본 연구를 통해서 밝혀진 변이들에 대한 정보와 각 SNP 변이별로 존재하는 제한효소를 탐색하여 앞선 표 24에 종합하였다. SNP 변이들에 대한 효율적인 유전자형분석을 위해서 일반적으로 PCR-RFLP 방법을 이용할 수 있다. 본 연구를 통해서 발견한 염기서열 SNP 변이들 중 제한효소가 존재하는 SNP에 대해서는 그림 24과 같이 3개의 유전자형으로 분석이 가능하였으며, 이후 대량분석을 위한 손쉬운 유전자형 분석용 진단기법을 마련할 수 있었다.

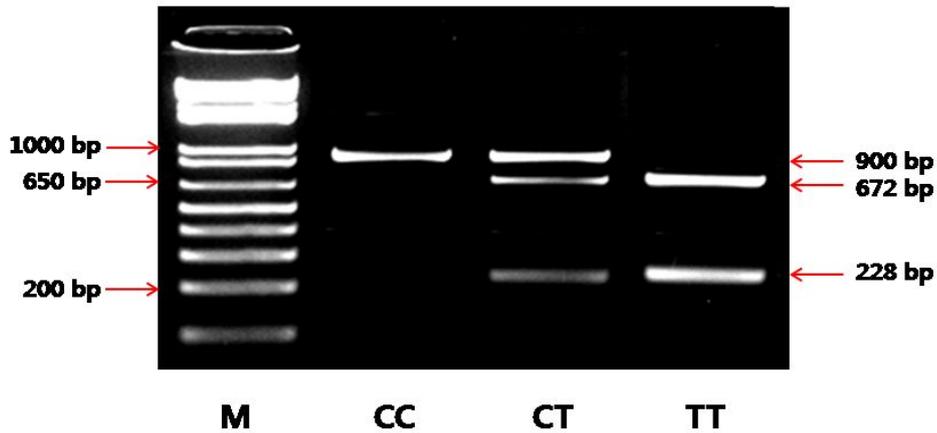


그림 24. PCR-RFLP를 이용한 유전자형 진단기법.

예) SNP24 부위에 대한 *MspI* RFLP

향후 이 SNP들에 대해서는 2차년도 연구과제를 통해서 전체 돈군에 대해서 유전자형 분석을 실시할 계획이며, 돈군내에서의 변이 분포와 실제 응취관련 측정형질, 즉 androstenone level과의 연관성 여부를 확인할 것이다. 또한, 관련기능이 밝혀진 변이좌위들에 대해서는 손쉽고 간단한 절차로 분석이 가능하도록 통합 유전자형 분석키트 개발도 진행할 계획이다.

제 2 항 응취관련 DNA표지인자 개발

1. 등지방 및 고환조직 내 androstenone과 skatole함량 분석

본 연구진은 응취의 주요형질로서 1차년도 연구에서 등지방내 androstenone 및 skatole함량을 응취관련 대상형질로 선정했다. 현재까지 등지방내 androstenone 및 skatole 함량은 다양한 방법으로 측정되었다. 하지만 이러한 기존 분석기술들은 androstenone과 skatole을 각각 다른 기법을 이용하여 따로 분석하는 경우가 대부분이었으며, 동일한 기법을 이용했다라도 전처리과정이 달라서 두 가지 물질을 분석하기 위해서는 동시에 처리하지 못하고 두 번에 걸쳐서 시행해야만 하는 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 개선하여 GC-MS를 이용한 androstenone과 skatole 동시기법을 개발했으며(그림 25), 특허출원을 완료하였다(폐지의 등지방내 안드로스테논과 스키테롤의 동시 측정 방법; 출원번호 10-2010-0122929).

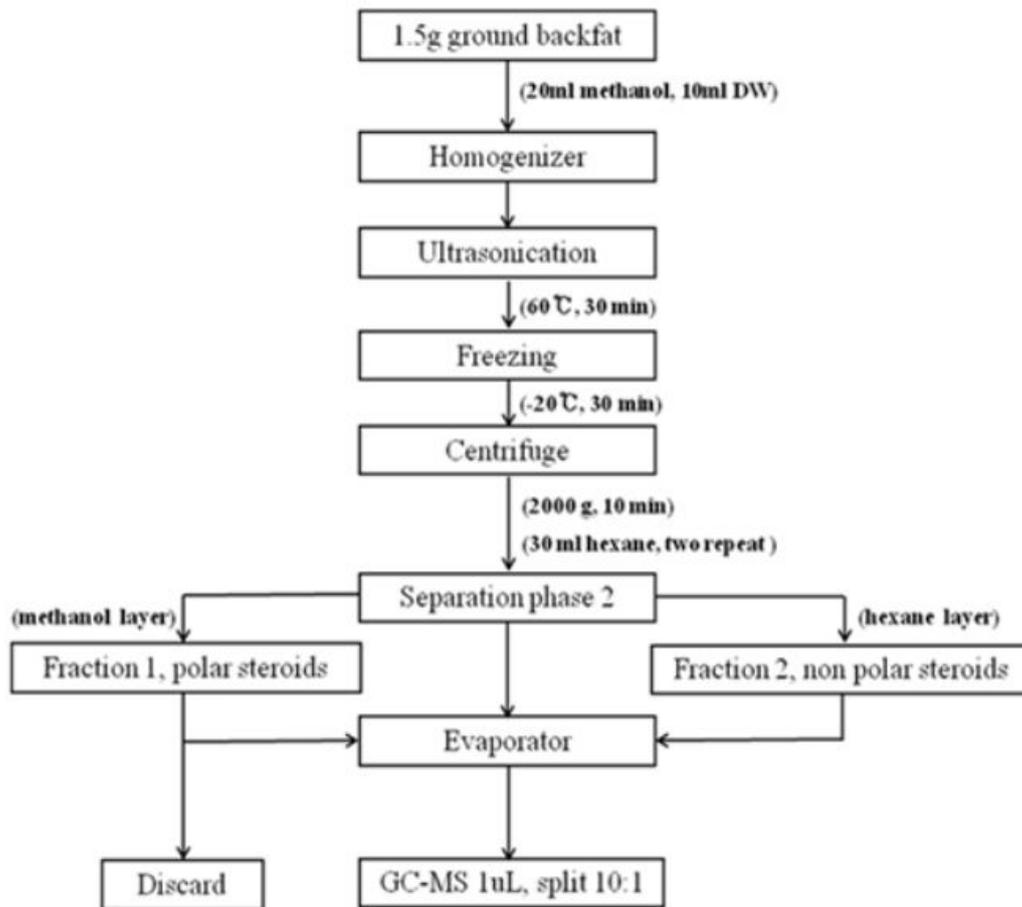


그림 25. GC-MS를 이용한 androstenone과 skatole의 동시측정을 위한 시료의 전처리과정

웅취관련 형질측정을 위하여 거세하지 않은 수탉지(비거세돈)로 구성된 실험돈군을 조성했다. 2차 성성숙이 지난 179.5±12.9일령의 비거세돈에 147두에 대해 5차례에 걸쳐 도축을 실시하였으며, 각 개체의 등지방 및 고환조직표본을 채취하였다(표 25). 본 연구에서 개발한 androstenone-skatole 동시측정법을 이용하여 웅취원인물질의 축적이 이루어지는 등지방층에 대해서 형질측정을 수행했다. 비거세돈군에 대한 기초형질분석결과는 표 26에 나타나있다. Walstra 등(1999)이 보고한 바와 유사하게 본 비거세돈군 집단에서 androstenone과 skatole의 변이가 크게 나타났다.

표 25. 실험돈군 구조

도축차수	두수
1차	27
2차	55
3차	18
4차	28
5차	19
총 합	147

표 26. 실험돈군 기초형질 자료

Traits	N	Mean	Standard error	Minimum	Maximum
Androstenone (ppm)	147	0.74	0.794	0.08	3.92
Skatole (ppm)	147	0.23	0.079	0.14	0.57
BF (mm ²)	147	18.37	4.46	8.00	33.00
CW (kg)	147	88.67	9.53	65.00	118.00

Abbreviations: BF, Backfat thickness; CW, Carcass Weight. N : number of pigs

표 27은 도체형질과 응취원인물질간의 상관관계를 보여주고 있다. 응취원인물질인 androstenone과 skatole간에는 유의적인 상관관계가 나타나지 않았다. Androstenone은 성성숙시 고환에서 생성되는 반면 skatole의 경우는 장내 미생물에 의해 생성되기 때문인 것으로 판단되며, 이 두 물질이 간에서 분해되는 대사과정에도 차이가 있을 것으로 사료된다. 등지방두께(BF)는 androstenone함량과 정의 상관관계를 나타냈으며($P < 0.05$), 도체중(CW)은 두 물질 모두와 정의 상관관계를 나타냈다($P < 0.05$). 주요 도체형질인 등지방 두께와 도체중은 강한 정의 상관관계를 나타냈으며($P < 0.001$), 일반적으로 도축일령과 정의 상관관계를 나타낸다. 따라서 성성숙이후 비육시기가 길어질수록 응취원인물질의 함량이 높아질 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 유전자형과의 연관성분석시 도체중에 의한 공분산효과를 고려했다.

표 27. 웅취원인물질 및 도체형질들의 표현형상관분석

	Traits			
	Androstenone (ppm)	Skatole (ppm)	BF (mm)	CW (kg)
Androstenone (ppm)				
Skatole (ppm)	0.10			
BF (mm ²)	0.21*	-0.02		
CW (kg)	0.24*	0.21*	0.36***	

Levels of significance: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Abbreviations: BF, Backfat thickness; CW, Carcass Weight.

2. 유전자형에 따른 대상형질과의 연관성분석

1차년도 연구에서 돼지 *3β-HSD* 유전자에 대한 전장염기서열분석(full length sequencing)을 통해 총 36개의 SNP와 3개의 InDel을 발견하였다. 또한 PCR 및 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 기법을 이용한 유전자형진단을 위해 각 변이위치에 대해 제한효소를 탐색하였다. 이 중 염기서열분석에 사용된 4가지 품종(Berkshire, Duroc, Landrace, Yorkshire)에서 변이가 나타난 SNP22를 우선 선정하였으며, 유전자발현조절영역인 5'upstream영역에 위치하고 있는 SNP2와 SNP5, 그리고 exon4에 위치하고 있는 SNP34를 선정했다(표 28).

표 28. *3β-HSD* 유전자에서 발견한 변이 중 유전자형 분석대상 선별

Polymorphism	Amplicon	site	Nucleotide	Variation within breed	Restriction Enzyme
SNP2	Seq2/ -1114	5'upstream	A-G	B, L, Y ¹	<i>AluI</i>
SNP5	Seq3/ -345	5'upstream	C-T	B, L, Y	<i>TaqI</i>
SNP22	Seq13/ 5180	intron3	C-T	B, D, L, Y	<i>BsmAI</i>
SNP34	Seq19/ 8399	exon4	C-T	B, L, Y	<i>FauI</i>

¹Abbreviations: B, Berkshire; D, Duroc; L, Landrace; Y, Yorkshire;

실험돈의 DNA는 EDTA를 처리한 혈액표본에서 Sambrook 등(1989)의 방법 또는 키트 (G-DexTMIIb, Intronbio. korea)를 통해 추출하였다. 또한 각각 SNP를 포함하는 영역을 PCR하기 위해 특이 프라이머를 제작하였다(표 29). PCR은 총 부피 20 μ l로 100ng의 돼지DNA와 각 10pmol의 primer, 0.25mM의 dNTP, 10x PCR buffer 및 1.25U의 DNA polymerase (i-MaxTM II, Intronbio., Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf Co., Germany)를 이용하여 수행했다. PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 pre-denaturation 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 denaturation 1분, 각 프라이머의 최적온도(표 5)에서 annealing 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분을 한 cycle로 하여 30 cycle을 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분으로 PCR 반응을 종료하였다. 이 PCR산물들을 SNP별로 제한효소 *AluI* (SNP2), *TaqI* (SNP5), *BsmAI* (SNP22), *FauI* (SNP34)를 처리하여 RFLP기법을 이용하여 유전자

형분석을 실시했다(그림 26, 그림 27).

표 29. 각 SNP의 유전자형분석을 위한 primer 염기서열

Primer	SNPs	Primer sequence(5' → 3')	Ann. ¹	Size (bp)
1	SNP2	F: GAGCAAGTTCCAACCTGTGA R: GGGCAACTGATTCTGGTTCT	62°C	214
2	SNP5	F: CTTTGCAAGACAGCAACAATG R: ACTCATAGCTCACGCCTCCT	60°C	627
3	SNP22	F: CTTCTGAATCGTGGCTTTC R: TGCAGAGGGAGCAATGACTA	60°C	512
4	SNP34	F: CGCTGAAAACCAAGACTCACT R: CTGGGTAAAGCATCCTGGTC	60°C	749

¹Annealing temperature

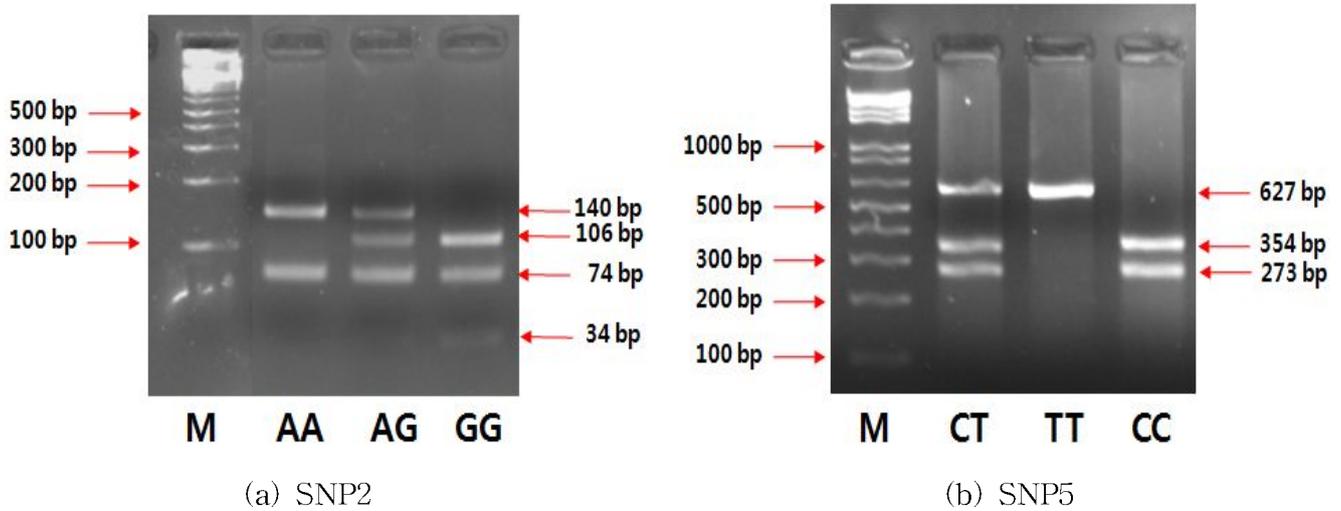


그림 26. *3β-HSD* 유전자의 promoter영역에 SNP2, SNP5에 대한 PCR-RFLP 단편

(a) SNP2 - A allele : 140bp + 74bp / G allele : 106bp + 74bp + 346bp

(b) SNP5 - T allele : 627bp / C allele : 354bp + 273bp

(M, 1kb plus ladder size marker (Invitrogen, USA))

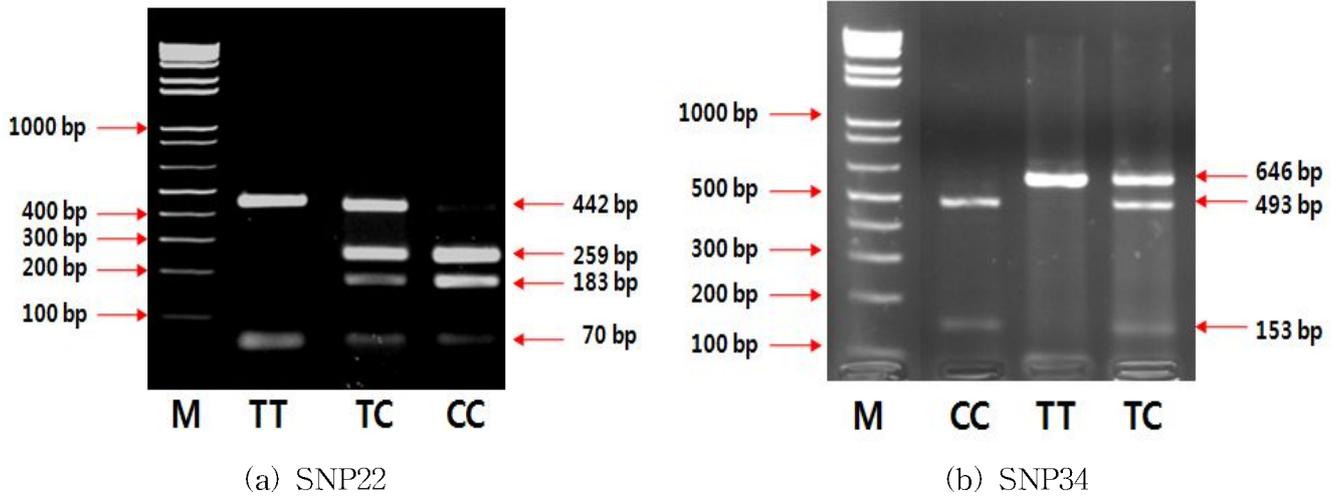


그림 27. *3β-HSD* 유전자의 promoter영역에 SNP22, SNP34에 대한 PCR-RFLP 단편

(a) SNP22 - T allele : 442bp + 70bp / C allele : 259bp + 183bp + 70bp

(b) SNP34 - T allele : 646bp + 89bp + 14bp / C allele : 493bp + 153bp + 89bp + 14bp

(M, 1kb plus ladder size marker (Invitrogen, USA))

비거세 실험돈군 147두에 대한 유전자형분석을 실시하였으며 각 SNP별 유전자형빈도 및 유전자 빈도는 표 30과 같다. SNP2에서는 AA유전자형과 AG유전자형을 가진 개체가 각각 59%, 31%로 높게 나타났으며, 그 결과 유전자빈도에서 A allele이 G allele에 비해 높게 나타났다. SNP5의 경우에도 유사하게 TT유전자형빈도(13%)가 다른 두 유전자형빈도에 비해 낮았으며, 그로 인해 T allele 빈도(23%)가 C allele(77%)빈도와 비교하여 낮게 나타났다. 반면 SNP22에서는 세 유전자형빈도가 고르게 분포되었으며, 유전자빈도도 C allele과 T allele이 각각 47%, 53%로 비슷하게 나타났다. SNP34는 TT유전자형이 다른 유전자형에 비해 적은 빈도로 나타났으며(11%), T allele빈도가 22%로 낮게 나타나 SNP2 및 SNP5와 유사한 경향을 나타냈다.

표 30. 돼지 3β -HSD 유전자 각 SNP의 유전자형 및 유전자빈도

SNPs	Restriction Enzyme	N	Genotypes			Gene	
			AA	AG	GG	A	G
SNP2	<i>AluI</i>	147	0.59 (87) ¹	0.31 (45)	0.10 (15)	0.74	0.26
SNP5	<i>TaqI</i>	147	0.66 (97)	0.21 (31)	0.13 (19)	0.77	0.23
SNP22	<i>BsmAI</i>	147	0.26 (39)	0.41 (60)	0.33 (48)	0.47	0.53
SNP34	<i>FauI</i>	147	0.66 (97)	0.23 (34)	0.11 (16)	0.78	0.22

¹number of pigs

통계패키지 프로그램 SAS 9.13 의 general linear model procedure를 이용하여 유전자형과 측정형질들과의 유전자형분석을 실시했다. 분석모델은 $y_{ijklmn} = \mu + G_i + (W_l) + e_{ijklm}$ 이며, y_{ijklmn} 는 관측치, μ 는 평균, G_i 는 유전자형효과, (W_l) 는 도체중에 따른 공분산효과, e_{ijklm} 는 잔차이다. 또한 probability difference (PDIFF) option을 이용하여 유전자형간의 통계적으로 유의한 차이가 유무를 구분하였다. 이러한 통계적 연관성분석을 통하여 유전자형에 따른 효과를 분석하였으며 이를 통해 각 SNP들의 androstenone 및 skatole 함량에 대한 기능을 확인했다.

돼지 3β -HSD 유전자의 5'upstream 영역에 위치한 SNP2와 SNP5는 각각 유전자형빈도가 낮게 나타난 GG(SNP2), TT(SNP5)를 제외하고 연관성분석을 실시했다(표 31, 표 32). 이들 두 SNP에 대한 분석결과 유전자형간의 androstenone 및 skatole 함량에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. SNP5는 Cue 등(2007)이 3β -HSD 유전자의 5'upstream 영역에서 발견한 변이와 동일한 SNP로, 이 연구에서도 등지방의 androstenone 함량과는 유의적인 관계를 나타내지 않았다.

표 31. 돼지 3β -HSD 유전자의 SNP2 유전자형과 응취원인물질과의 연관성분석

Traits	Genotypes		Significance
	AA (n=87)	AG (n=45)	
Androstenone (ppm)	0.60 (0.09)	0.63 (0.11)	NS
Skatole (ppm)	0.23 (0.01)	0.23 (0.01)	NS

Levels of significance: NS, not significant; † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$

표 32. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 SNP5 유전자형과 옹취원인물질과의 연관성분석

Traits	Genotypes		Significance
	CC (n=97)	CT (n=31)	
Androstenone (ppm)	0.64 (0.10)	0.52 (0.13)	NS
Skatole (ppm)	0.22 (0.01)	0.23 (0.02)	NS

Levels of significance: NS, not significant; † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$

염기서열분석에 사용된 4가지 품종에서 모두 변이가 발견되어 분석대상으로 선정된 SNP22와 옹취원인물질과의 연관성분석결과는 표 33에 나타나있다. 등지방내 androstenone함량에서 CC유전자형이 다른 두 유전자형(TC, TT)보다 낮게 나타났으며($P < 0.05$), skatole함량은 유전자형간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 사람은 식육내 androstenone은 0.5 ppm이상, skatole은 0.2 ppm이상 일 때 이상취(옹취)를 느낄 수 있다고 보고된 바 있다(Babol & Squires, 1995). SNP22의 CC 유전자형은 androstenone 함량이 약 0.33 ppm으로 역가치(0.5 ppm)보다 낮아 옹취제거에 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 유전자형간에 androstenone 함량의 차이확인을 통해 옹취원인물질 중 androstenone의 생성 및 분해에 관여하는 *3β-HSD* 유전자의 기능을 확인할 수 있다.

표 33. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 SNP22 유전자형과 옹취원인물질과의 연관성분석

Traits	Genotypes			Significance
	CC (n=39)	TC (n=60)	TT (n=48)	
Androstenone (ppm)	0.33 ^b (0.14)	0.74 ^a (0.10)	0.72 ^a (0.11)	*
Skatole (ppm)	0.21 (0.02)	0.23 (0.01)	0.23 (0.01)	NS

Levels of significance: NS, not significant; † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$

^{a,b}Least square means with different superscripts in the same row differ.

3β-HSD 유전자의 exon4에서 발견된 SNP34에 대해 연관성분석을 실시했다(표 34). 앞서 빈도가 고르게 나타나지 않았던 SNP들과 같은 방법으로 빈도가 현저히 적은 TT유전자형을 제외하고 두 유전자형간의 옹취원인물질함량 차이를 분석했다. 등지방내 androstenone수준에서 TC유전자형이 CC유전자형보다 낮게 나타났으며($P < 0.10$), skatole에서는 유의적인 차이가 없었다. TC유전자형은 androstenone함량이 앞선 언급한 옹취를 느끼는 역치값인 0.5ppm보다 낮은 수준으로 나타나 SNP22와 함께 옹취제거에 효과가 있을 것으로 판단된다.

돼지 *3β-HSD* 유전자의 SNP22와 SNP34가 옹취원인물질 중 androstenone함량에 영향을 주는 것을 확인하였으며, 옹취제거관련 주요한 표지인자로서의 효용성이 있다고 판단된다.

표 34. 돼지 3β -HSD 유전자의 SNP34 유전자형과 응취원인물질과의 연관성분석

Traits	Genotypes		Significance
	CC (n=97)	TC (n=34)	
Androstenone (ppm)	0.79 ^a (0.11)	0.41 ^b (0.15)	†
Skatole (ppm)	0.22 (0.01)	0.23 (0.02)	NS

Levels of significance: NS, not significant; † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$

^{a,b}Least square means with different superscripts in the same row differ.

3. 최적 유전자형 조합 선정

SNP22와 SNP34가 응취원인물질 중 androstenone함량에 효과가 있음을 확인하였으며, 최적유전자형조합을 선정하기 위해 diploid type에 대한 연관성분석을 실시했다. SNP22-34 diploid 유전자형의 빈도는 표 35에 나타나있다. 유전자형조합은 ‘SNP22+SNP34’ 형태로 구분하였다. SNP22에서 CC 유전자형을 가진 개체들은 SNP34에서 모두 CC 유전자형을 가지고 있었으며(CCCC), 이에 따라 CCTC 및 CCTT를 가진 개체들이 나타나지 않았다. 또한 TTTC 유전자조합형을 가진 개체는 단 한 마리로 나타나 빈도가 매우 낮아서 연관성분석에서 제외했다. SNP22-34 diploid 유전자형과 응취원인물질과의 연관성분석을 실시한 결과는 표 36과 같다. CCCC조합형과, TCTC유전자형은 TCCC 유전자형에 비해 androstenone함량이 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 반면 skatole함량에서는 유전자조합형간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 SNP22와 SNP34에 대한 연관성분석결과와 유사한 경향을 나타내고 있다. SNP22의 경우 CC유전자형이 응취제거에 효과가 있는 것으로 나타났는데 조합형간 비교에서도 CCCC조합형에서 androstenone함량이 낮게 나타났다. 또한 SNP34에서 응취제거에 효과가 있는 것을 나타났던 TC유전자형을 가지고 있는 TCTC유전자형이 androstenone이 낮게 나타났다. 이 두 유전자조합형의 경우 androstenone함량이 0.5ppm이하로 응취제거에 효과가 있을 것으로 판단된다. 이를 종합해 볼 때 SNP22의 CC유전자형 그리고 SNP34의 TC유전자형을 하나라도 가지고 있는 개체군에서 androstenone함량이 낮은 경향을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 비록 본 실험돈군에서는 CCTC조합형을 가진 개체들이 없었지만, 두 SNP에 대해 응취물질함량이 적게 나온 유전자형의 조합인 CCTC조합형을 가진 개체군에서 응취제거효과가 가장 클 것으로 기대된다.

표 35. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 SNP22-34 diploid 유전자형 및 유전자빈도

SNP22 \ SNP34	CC	TC	TT	합계
CC	0.26 (39) ¹	0.00 (0)	0.00 (0)	0.26 (39)
TC	0.31 (45)	0.09 (14)	0.01 (1)	0.41 (60)
TT	0.09 (13)	0.14 (20)	0.10 (15)	0.58 (161)
합계	0.66 (97)	0.23 (34)	0.11 (16)	1.00 (147)

¹number of pigs

표 36. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 SNP22-34 diploid 유전자형과 응취원인물질과의 연관성분석

Traits	Genotypes						Significance
	CCCC (n=39)	TCCC (n=45)	TCTC (n=14)	TTCC (n=13)	TTTC (n=20)	TTTT (n=15)	
Androstenone (ppm)	0.45 ^b (0.16)	0.97 ^a (0.13)	0.38 ^b (0.21)	0.77 ^{ab} (0.20)	0.59 ^{ab} (0.18)	0.68 ^{ab} (0.20)	*
Skatole (ppm)	0.20 (0.02)	0.22 (0.01)	0.23 (0.02)	0.23 (0.02)	0.25 (0.02)	0.23 (0.02)	NS

Levels of significance: NS, not significant; † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$

^{a,b}Least square means with different superscripts in the same row differ.

4. 유전자형에 따른 유전자발현 profile 구축

유전자형에 따른 mRNA 발현패턴분석을 위해서 돼지 정소조직에서 RNA를 추출하고 추출한 RNA로 cDNA를 합성하였다. *3β-HSD*의 간에서 androstenone 분해능력을 확인하기 위해서는 간조직에서 mRNA의 발현패턴분석을 확인하여야하나, 조직확보에 어려움이 있어서 정소조직에서의 *3β-HSD*의 mRNA의 발현패턴분석을 확인하였다. 우선 RNA를 분리하기 위해 세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μ l의 chloroform (Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 분리된 RNA의 순도와 농도는 Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 흡광도 A260과 A280의 비율로 측정하였다. 추출한 1.5 μ g의 RNA를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제하였다. 이 때 사용한 역전사 효소는 M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen)이다.

Real-time PCR 반응시 프라이머는 Forward(5'-CCC AGT GTT TTC TGG TTC CT-3')와 Reverse(5'-TTC TCC TCC AGC AAC AAG TG-3')로 제작하여 각각 0.5 μ l(10 pmol/ μ l)씩 첨가

하였고 그 외의 첨가물은 iQTM SYBR Super Mix (Bio-Rad) 10 μl 와 ddH₂O 8.0 μl , 앞서 추출한 cDNA 1.0 μl (약 200 ng)였다. 반응에는 CFX96 real-time PCR (Bio-Rad)를 이용하였고, 반응조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 denaturation 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 30초를 한 cycle로 하여 40cycle을 반복하였다.

Real-time PCR을 실시한 결과 SNP22의 유전자형에 따른 $3\beta\text{-HSD}$ mRNA 발현량의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 28). 이를 통해 SNP22의 유전자형에 따른 $3\beta\text{-HSD}$ 의 발현량차이가 정소에서는 나타나지 않는다는 것을 확인할 수 있으며, 유전자형에 따른 등지방내 androstenone의 감소는 간 내에서의 분해능력에 의한 것으로 판단한 수 있다.

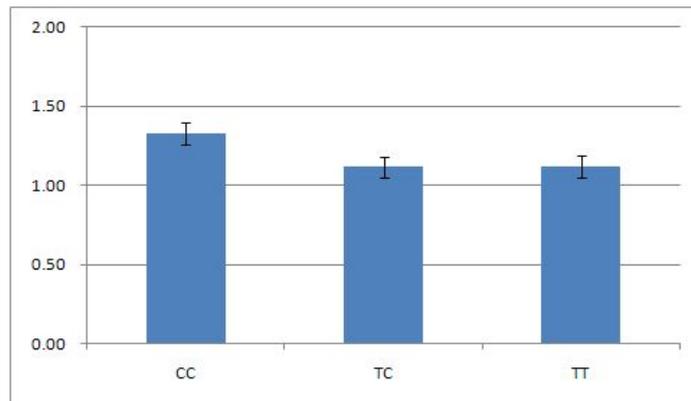


그림 28. SNP22 유전자형에 따른 정소내 $3\beta\text{-HSD}$ 의 발현량

제 3 항 개발된 DNA표지인자의 실용화 방안 마련

1. 비거세돈과 거세돈의 원인물질 함량 비교분석

성별에 따른 등지방내 응취원인물질 함량 및 도체특성의 차이를 확인하기위해 암돼지, 거세수돼지 각각 20두를 분석했다(표 37). 도체특성으로 등지방두께와 도체중을 측정하였으며, 이 두 형질은 적육생산능력을 나타내는 지표이다. 비거세수돼지의 기초형질자료(표 3-5)에서 androstenone함량은 평균 0.74 ppm에 표준편차 0.79 ppm의 분포를 보인 반면, 암돼지와 거세수돼지의 androstenone은 평균 0.05 ppm에 표준편차 0.01 ppm으로 상대적으로 적은 양과 적은 변이를 나타내고 있었다. skatole함량 역시 비거세수돼지의 측정치인 평균 0.23 ppm, 표준편차 0.08 ppm에 비해 암돼지와 거세수돼지에서는 평균 0.04 ppm, 표준편차 0.01 ppm으로 상대적으로 적은 양, 적은 변이를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

표 37. 암퇘지와 거세수퇘지로 이루어진 공시돈의 기초형질 자료

Traits	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
Androstenone (ppm)	40	0.05	0.01	0.03	0.08
Skatole (ppm)	40	0.04	0.01	0.03	0.05
BF (mm)	40	23.37	4.92	10.00	33.00
CW (kg)	40	84.70	5.28	73.00	94.00

Abbreviations: BF, Backfat thickness; CW, Carcass Weight.

성별에 따른 응취원인물질함량 및 도체특성의 차이는 표 38에 나타나있다. 암퇘지(Female)와 거세수퇘지(Castrated male)의 등지방내 androstenone 및 skatole 함량은 비거세수퇘지(Male)에 비해 현저히 낮게 나타났다($P < 0.001$). 기존 연구에 따르면 등지방내 androstenone이 0.5 ppm, skatole은 0.2 ppm 이상일 경우에 실제로 사람들이 응취를 느낄 수 있다고 보고된 바 있다 (Babol & Squires, 1995). 본 연구결과에서 비거세 수퇘지는 andrsotenone이 0.74 ppm, skatole이 0.23 ppm으로 상기 역가치를 상회한 반면, 암컷은 androstenone이 0.04 ppm, skatole이 0.04 ppm 그리고 거세돈은 androstenone이 0.05 ppm, skatole이 0.04 ppm 수준으로 두 물질함량 모두 역가치보다 낮게 나타났다. 이를 통해, 암컷과 거세돈은 응취가 나지 않고, 오직 비거세수퇘지에서만 응취가 날 것으로 판단할 수 있다. 한편, 등지방층두께는 성별에 따라 유의적으로 차이가 났다. 비거세수퇘지(평균 18 mm)가 가장 얇았으며, 암퇘지(평균 20 mm), 거세수퇘지(평균 26 mm)순으로 나타났다($P < 0.001$). 도체중은 비거세수퇘지(평균 88.68 kg)가 거세수퇘지(평균 83.7 kg)에 비하여 유의적으로 무겁게 나타났고 암퇘지(평균 85.7 kg)는 비거세수퇘지와 거세수퇘지의 중간으로 나타났다($P = 0.032$). 기존 연구결과에서 성별에 따른 도체형질의 특성으로 비거세퇘지가 등지방두께가 얇고, 도체중이 무거운 특징을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Babol and Squires, 1995; kim and Im, 2006; choi *et al.*, 2000). 본 연구에서도 동일한 결과를 얻었으며, 거세수퇘지보다 등지방두께가 얇고, 도체중이 무겁게 나타난 비거세수퇘지가 다른 성별에 비해 적육생산능력이 우수하다고 판단할 수 있다. 즉, 수퇘지에 있어서 거세로 인하여 성장 혹은 적육생산능력이 확연히 저하됨을 알 수 있다.

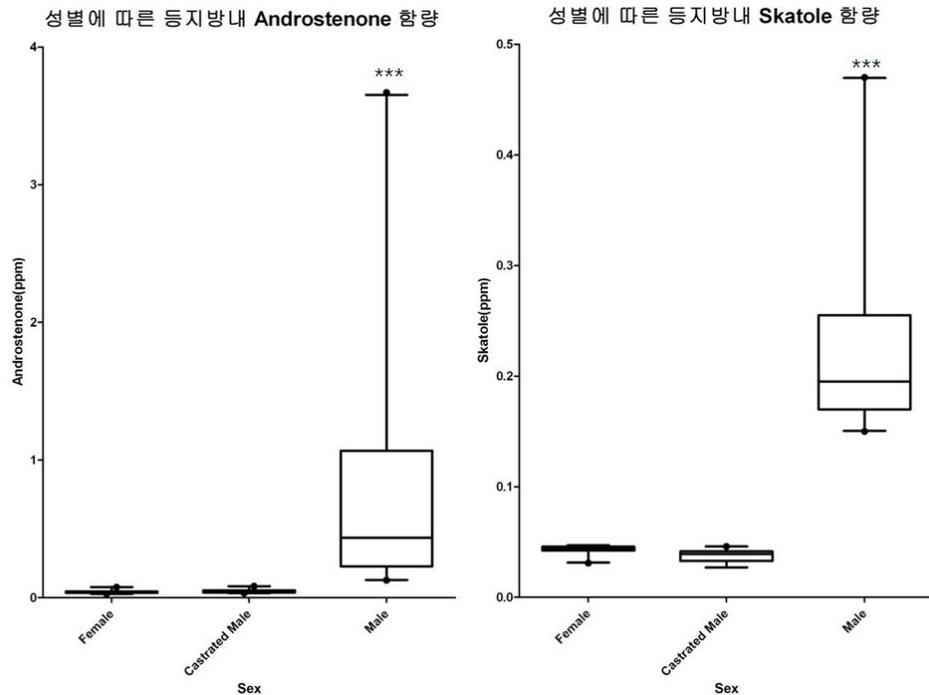
표 38. 성별에 따른 응취원인물질함량 및 도체형질특성 비교

Traits	Sex			P-value
	Female (n=20)	Castrated male (n=20)	Male (n=147)	
Androstenone (ppm)	0.04 ^b (0.16) ¹	0.05 ^b (0.16)	0.75 ^a (0.06)	<0.001
Skatole (ppm)	0.04 ^b (0.02)	0.04 ^b (0.02)	0.23 ^a (0.01)	<0.001
BF (mm)	20.5 ^b (0.98)	26.25 ^a (0.98)	18.42 ^c (0.36)	<0.001
CW (kg)	85.7 ^{ab} (1.96)	83.7 ^b (1.96)	88.68 ^a (0.72)	0.032

¹Standard error of least-square means

^{a,b}Least square means with different superscripts in the same row differ.

성별에 따른 응취원인물질 함량의 분포를 그림으로 나타내었다(그림 29). 주요응취원인물질 함량의 평균들이 암컷과 거세돈에 비해서 비거세돈이 높은 함량을 나타내고 있지만, 모든 개체에서 응취의 역가치(androstenone 0.5ppm, skatole 0.2ppm)보다 높은 수준으로 나타난 것은 아니며, 매우 낮은 개체들도 있음을 알 수 있다. 이를 통해, 수퇘지의 응취원인물질 함량은 개체별로 많은 변이를 나타내고 있으며, 모든 수퇘지에서 응취가 나는 것은 아님을 알 수 있다.



Levels of significance: NS, not significant; † P<0.10; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.01

그림 29. 성별에 따른 등지방내 Androstenone과 Skatole 함량 비교 모식도

2. 패널테스트를 통한 식육내 풍미 비교분석

본 과제에의 2차년 연구를 통해 DNA표지인자의 유전자형에 따라 등지방내 응취원인물질함량이 차이를 보이고 있음을 확인하였으며, 이러한 차이가 실제 관능특성에도 영향을 미치는지 확인하고자 패널테스트를 실시했다.

육질평가는 크게 기계적(technological) 육질평가와 관능평가로 구분할 수 있다. 기계적 육질평가는 기기 혹은 표준화된 기준 및 방법에 의해 육질을 평가하는 방법이다. 관능평가를 통한 육질평가는 사람이 인지하는 감각을 수치화한 것이다. 관능평가는 차이식별검사나 묘사관능평가와 같은 분석적인 실험실 검사와, 선호도 혹은 기호도와 같은 소비자 검사로 다시 나눌 수 있다(van der Wal *et al.*, 1997; Maltin *et al.*, 1997). 소비자 검사는 제품 혹은 식품에 대한 소비자의 기호정도, 수용가능성을 알아보기 위해 실시된다. 실험실 검사 중 묘사관능평가는 제품 혹은 식품의 특성을 항목화하고, 그것들을 평가하여 수치로서 정량화하는 방법이다. 최근에는 관능평가를 통한 품질평가가 소

비자들이 인지하게 되는 품질과 밀접한 관련이 있어, 관능평가를 중요시하는 경향이 있다. 그러나 관능평가를 통한 육질평가의 경우, 관능평가에 사용되는 시료의 부위, 패널들 간 평가기준, 관능 시료의 준비 방법 및 절차가 일정하지 않으면 변이가 크게 나타나 일정한 결과를 얻기가 힘들다. 이에 관능평가를 실시하기에 앞서 패널을 훈련시켰으며, 관능 시료의 준비 방법 및 절차, 그리고 평가 기준 및 방법을 표준화하였다.

가. 패널의 훈련

묘사적 관능평가를 위해 훈련을 통한 전문 패널을 선정하였다(Meilgaard *et al.*, 1991). 관능평가 경험이 있는 10명을 선발하고, 훈련을 실시하였다. 훈련의 실시는 패널을 통솔할 수 있는 패널지도자를 두어 패널에게 관능평가 목적 및 방법에 대해 예비교육을 실시하였다. 이를 통해 본 연구의 관능평가에 대한 이해와 함께 육질특성, 관능평가 요령 및 평가방법을 숙지하도록 교육하였다. 또한 훈련을 통하여 패널 간 차이를 줄이고, 시료 간 차이식별능력과 육질인지능력을 향상시켰으며, 개인적 선호를 배제하고 보다 객관적인 결정을 할 수 있도록 하였다.

나. 관능 시료의 준비 방법 및 절차

관능평가를 위해 비거세 수돼지 20두의 시료를 확보했다. 시료는 사후 24시에 채취하였으며, 각 개체의 동일 부위를 이용하기 위해 2분 도체 중 왼쪽도체의 배최장근을 사용하였고, 흉추(thoracic vertebra) 10~13번째 부위를 채취하였다. 채취한 시료중 소량은 유전자형 분석을 위해 따로 보관되었고, 나머지는 관능평가가 이루어질 때까지 -20 °C에서 냉동하였으며, 냉동기간은 일주일을 넘기지 않도록 하였다. 시료채취시점이 박피가 이루어진 후였기 때문에 응취원인물질 함량측정을 위한 등지방 시료는 확보하지 못하였다.

관능평가 하루 전, 냉동된 시료는 해동에 의한 변성을 방지하기 위해 냉장조건(4 °C)에서 해동시켰다. 해동된 시료는 2cm 두께로 자른 후, 예열을 통해 180 °C로 온도가 유지된 오븐(HQ-Z365AS, Samsung, Korea)에서 조리하였다. 조리 중 수분 손실을 방지하기 위해 스팀을 사용하였으며, 시료의 온도를 일정하게 맞추기 위해 온도계(TES-1300, TES Electrical Electronic Co., Taiwan)를 이용하여 시료의 심부온도를 측정하였다. 시료의 양쪽면을 골고루 익히기 위해 시료 심부온도가 약 37 °C에 도달하였을 때 시료를 뒤집어 주었으며, 심부온도가 약 72 °C에 도달할 때까지 가열하였다. 조리된 시료는 약 1분간 실온에서 냉각 후, 약 1.3 x 1.3 x 1.3 cm³의 정육면체로 준비하고, 패널들에게 제공되기 전까지 약 55 °C의 수조에서 보관하여 온도를 유지하도록 하였다(Fortin *et al.*, 2005).

관능평가는 오전, 오후로 나누어 진행하였으며, 패널의 감각 둔화와 정신적 피로를 방지하기 위해 각 관능평가 시간에 제공되는 시료의 개수는 10개로 제한하였고, 1시간 이상 진행되지 않도록 하였다. 관능평가 장소는 소음이 적고, 온도가 적당하여 패널들이 추위나 더위를 느끼지 않는 곳을 선택했으며, 조명을 너무 어둡거나 밝지 않도록 조절하였다. 관능평가 시, 시료에 대한 사전정보를 차단하기 위해 시료는 무작위로 선정된 수가 부착된 접시에 제공되었으며, 시료 간 맛과 향 등의 혼합을 방지하기 위해 물과 식빵을 제공하였다. 패널들은 하나의 시료를 평가한 후 물과 식빵을 이용하

여 남아있는 맛과 향 등을 제거하였으며, 감각의 회복을 위해 약 5분 정도의 시간을 두어 최대한 시료 간 맛의 혼입 및 객관적 평가가 가능하도록 하였다. 각 개체에 대한 관능평가는 2회 반복 실시하였다.

다. 패널테스트 척도, 항목 및 평가방법

관능평가항목은 풍미(Flavor), 이상취(Off-flavor), 전체기호도(Overall acceptability)의 3가지 항목으로 구성되었다. 풍미 및 이상취 항목은 미국식육과학협회의 지침서(American Meat Science Association guideline, 1995)에 따라 1점(매우 약함)에서 5점(매우 강함)으로 5점척도법을 적용했다. 또한 전체기호도의 경우도 1점(매우 나쁨)에서 5점(매우 좋음)으로 평가했다. 풍미는 시료를 8번 저작한 후 느껴지는 풍미의 강도를 말하고, 이상취는 시료를 저작하는 동안 풍미를 제외한 좋지 않은 풍미 혹은 맛을 의미하며, 전체기호도는 관능평가 후 종합적으로 평가한 선호도를 나타낸다(그림 30).

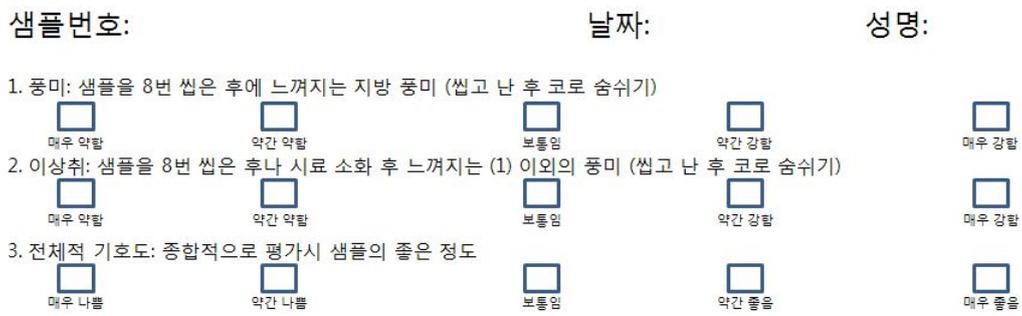


그림 30. 패널테스트문항

라. 패널테스트를 통한 식육내 풍미 및 이상취 비교

패널테스트를 통한 관능특성형질의 기초통계량은 표 39과 같다. 관능특성 중 풍미의 평균점수는 3.2점(표준편차 0.18)으로 ‘보통(3점)’ 수준으로 나타나다. 이상취 항목에서도 평균 3.03점(표준편차 0.23)으로 ‘보통’ 수준이었다. 전체기호도에서는 평균 2.77점(표준편차 0.35)으로 ‘보통’보다 낮게 나타났으며, 최소 2.17점에서 최대 3.56점으로 다른 두 관능평가항목에 비해 큰 변이를 나타냈다.

표 39. 관능특성항목에 대한 기초 통계량

Traits	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
Flavor	20	3.18	0.18	2.67	3.39
Off-flavor	20	3.03	0.23	2.61	3.44
Overall acceptability	20	2.77	0.35	2.17	3.56

Flavor intensity: no pork flavor to full pork flavor, off-flavor: none to strong off-flavor
 Overall acceptability : non acceptable to acceptable

돼지 *3β-HSD* 유전자의 intron3 영역내 SNP22에 따른 관능특성을 비교했다(표 40). SNP22의 유전자형간에 풍미, 이상취, 전체기호도점수는 유의적인 차이가 나지 않았다. 또한 돼지 *3β-HSD* 유전자의 exon4 영역내 SNP34에 따른 관능특성비교결과(표 41)역시 유전자형간에 풍미, 이상취, 전체기호도에 있어서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다.

표 40. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 intron3 영역내 SNP22에 따른 관능특성 비교

Traits	Genotype			P-value
	CC (n=7)	TC (n=11)	TT (n=2)	
Flavor	3.10 (0.08) ¹	3.21 (0.05)	3.02 (0.13)	0.276
Off-flavor	3.12 (0.09)	3.03 (0.06)	2.78 (0.16)	0.212
Overall acceptability	2.73 (0.13)	2.74 (0.10)	2.92 (0.25)	0.787

¹Standard error of least-square means

Flavor intensity: no pork flavor to full pork flavor, off-flavor: none to strong off-flavor

Overall acceptability : non acceptable to acceptable

표 41. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 exon4 영역내 SNP34에 따른 관능특성 비교

Traits	Genotype		P-value
	CC (n=11)	TC (n=7)	
Flavor	3.15 (0.04) ¹	3.24 (0.06)	0.256
Off-flavor	3.01 (0.08)	3.14 (0.10)	0.351
Overall acceptability	2.79 (0.13)	2.71 (0.17)	0.754

¹Standard error of least-square means

Flavor intensity: no pork flavor to full pork flavor, off-flavor: none to strong off-flavor

Overall acceptability : non acceptable to acceptable

본 과제의 2차년도 연구결과에서, SNP22위치에서 CC 유전자형을 가진 집단이 등지방내 Androstenedione 함량이 다른 두 유전자형을 가진 개체들에 비해 낮았고($P < 0.05$), SNP34위치에서는 TC 유전자형이 CC 유전자형보다 낮게 나타났다($P < 0.10$). 따라서, 관능특성 중 특히 이상취항목에서 유전자형간 차이를 나타낼 것으로 기대가 되었으나, 본 연구결과에서는 그러한 차이를 발견할 수 없었다. 아울러 풍미, 소비자기호에서도 유의적인 차이가 없었다.

이는 크게 3가지로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째, 관능평가에 이용한 실험돈 20두의 유전자형분포가 고르지 못하여 유전자형에 따라 충분한 시료가 확보되지 못했다는 점이다. 대부분의 수태지에 대해 거세를 실시하기 때문에(거세율 98.2%; 축산물품질평가원, 2010) 비거세한 수태지에 대한 시료

확보의 어려움으로 인해 본 과제에서는 20두에 대해만 관능평가를 실시하였으나, 추후에 더 많은 수의 실험돈에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 두 번째로 응취관련 관능평가에 있어 기존방법의 적합성여부이다. 이상취항목에서 대부분 3점에 치우친 경향을 보이는 것은 패넬들이 응취가 나는지 나지 않는지 판단하기 어려웠음을 의미한다. 즉, 기존 패넬훈련과 함께 응취를 정확히 인지할 수 있는 패넬훈련이 필요함을 알 수 있다. 세 번째, 패넬테스트에 이용된 배최장근 시료의 적절성이다. 배최장근은 근내지방함량이 매우 적으므로 축적된 응취원인물질이 매우 소량일 가능성이 있다. 이런 문제에 대한 대안으로는 전기인두법이 있을 수 있다. 전기인두법은 끝이 약 160 °C인 전기인두로 지방을 수초동안 지진 다음 냄새를 맡아 평가하는 방법이다.

이를 종합해볼 때, 다수의 실험시료 확보와 함께 응취평가에 최적화된 패넬훈련과정을 보완하고 응취원인물질이 축적되는 지방이 포함된 부위에 대한 관능평가가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

3. DNA 표지인자에 대한 유용성 검증

본 과제의 목표는 응취제거 기법을 개발을 통해 수퇘지의 거세를 대체함으로써 산육능력향상, 식품안전성확보 및 수정능력유지를 가능하게 함으로써 수퇘지의 이용성을 확대하는데 있다. 또한 본 연구진이 2차년연구에서 개발한 응취제거관련 DNA표지인자는 외과적거세의 대안으로 행해지고 있는 면역적거세를 대체할 수 있다는 점에서 식품안전성을 확보할 수 있을 것으로 사료된다. 나아가, 이러한 응취제거효과와 함께 DNA표지인자가 기존 경제형질에 미치는 영향에 대한 고찰이 필요하며 이에 3차년 연구에서 개발된 DNA표지인자가 산육능력과 수정능력에 미치는 영향을 분석하였다.

가. DNA표지인자가 산육능력에 미치는 영향 분석

본 연구에서는 산육능력평가를 위해 등지방두께와 도체중을 분석했다(표 42). 공시돈의 평균 등지방층 두께는 18.37 mm이고 평균 도체중은 88.72 kg으로 나타났다. 축산물품질평가원의 2010년 등급판정결과에서는 비거세 수퇘지의 등지방층두께는 15 mm, 평균도체중량은 82 kg이었다. 이와 비교할 때, 공시돈은 등지방층두께는 더 두껍고, 도체중은 더 무겁게 나타났다.

표 42. 공시돈의 산육능력형질 기초자료

Traits	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
Back fat thickness (mm)	147	18.37	4.64	8.00	33.00
Carcass weight (kg)	147	88.72	9.52	65.00	118.00

돼지 *3β-HSD* 유전자의 intron3번 영역내 SNP22가 산육능력형질에 미치는 영향을 분석한 결과는 표 43과 같다. 본 결과에서 SNP22의 유전자형에 따른 등지방두께 및 도체중의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. CC 유전자형은 다른 유전자형들에 비해 등지방내 androstenone함량이 낮게 나타남과 동시에, 산육형질에서도 다른 유전자형과 차이가 없음을 알 수 있다. SNP22 위치의 DNA표지

인자는 비거세 수퇘지의 산육능력을 유지하면서도 응취원인물질을 제거하는데 효과가 있는 것으로 판단된다.

표 43. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 intron3번 영역내 SNP22가 산육능력형질에 미치는 영향분석

Traits	Genotype			P-value
	CC (n=39)	TC (n=60)	TT (n=48)	
Back fat thickness (mm)	18.41 (0.75)	17.54 (0.52)	17.73 (0.58)	0.572
Carcass weight (kg)	87.14 (1.77) ¹	89.73 (1.24)	89.31 (1.38)	0.409

¹Standard error of least-square means

돼지 *3β-HSD* 유전자의 exon4번 영역내 SNP34가 산육능력형질에 미치는 영향은 표 44에 나타나 있다. 등지방층 두께에서는 유전자형간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, 도체중은 TC 유전자형이 CC 유전자형보다 가볍게 나타났다($P = 0.059$). 따라서, TC 유전자형은 CC 유전자형에 비해 산육능력이 다소 낮다고 할 수 있다. 그러나 일반 비거세 수퇘지의 도체중이 82 kg인 것과 비교해 볼 때 열등한 산육능력을 가지고 있다고는 보기 힘들다.

표 44. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 exon4 영역내 SNP34가 산육능력형질에 미치는 영향분석

Traits	Genotype		P-value
	CC (n=97)	TC (n=34)	
Back fat thickness (mm)	18.55 (0.53)	17.28 (0.75)	0.223
Carcass weight (kg)	91.14 (1.23) ¹	86.49 (1.76)	0.059

¹Standard error of least-square means

^{a,b}Different superscripts indicate significance levels within rows of SNP locus

나. DNA표지인자가 수정능력에 미치는 영향분석

기존 수퇘지의 응취문제를 해결하는 방법으로 외과적거세와 면역적거세가 있었다. 외과적거세는 곧 수퇘지의 수정능력상실을 의미하며, 면역적 거세의 경우에도 정소크기가 약 50 %까지 줄어들고 주요응성호르몬인 테스토스테론의 함량도 감소되는(2 ng/ml) 등 수정능력에 문제가 발생하고 있었다(Dunshea *et al.*, 2011). 따라서 새로 개발된 DNA표지인자와 수퇘지의 수정능력과의 관계를 확인하는 것이 필요하다.

이를 위해 비거세 수태지 20마리의 혈액과 정소를 도축 즉시 채취하였으며, 정소 외관형질과 혈청내 테스토스테론함량을 측정하였다. 채취한 정소의 무게를 측정한 후, 자연스럽게 바닥에 놓은 후 오차를 줄이기 위해 수직방향에서 사진을 찍었고, 이를 IMAGE Pro plus (Media Cybernetics, Inc.) 프로그램을 이용하여 정소의 넓이, 가로길이, 세로길이를 분석했다(그림 31).

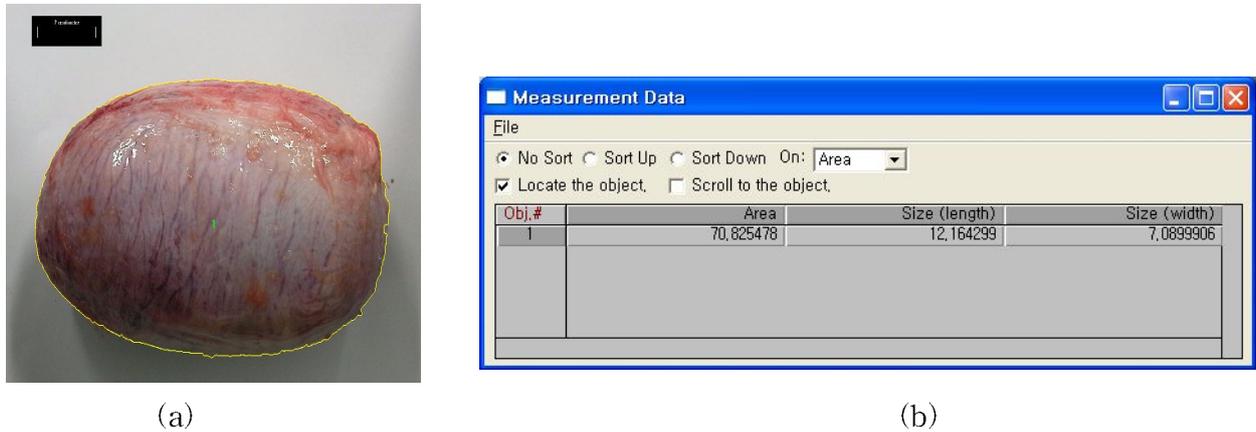


그림 31. 정소사진(a)과 이미지분석 결과(b)

혈액은 serum separaotr tube (BD Diagnostics, UK)에 채취하여 30분 정취후 2000g조건으로 10분간 원심분리를 하여 혈청을 분리하여 액체질소에 보관하였다. 채취된 혈청에 대해 ELISA방법 (enzyme-linked immunosorbent assay)을 이용하여 테스토스테론함량을 분석했다. Non-specific binding (NSB) 웰을 제외한 모든 플레이트에 1차 항체를 $50\mu\text{l}$ 투입한 후 실온에 500rpm으로 horizontal orbital microplate shaker에서 배양후, 플레이트를 워싱버퍼를 이용하여 4번에 걸쳐 씻어 주었다. NSB웰에는 정량측정을 위한 칼리브레이션 희석물질을 넣어주었다. 각 웰에 혈청을 $50\mu\text{l}$ 넣고 3시간동안 배양후 워싱버퍼를 이용하여 위와 동일한 방식을 이용하여 씻어주었다. Optical density를 microplate reader에서 450nm에 흡수되는 파장을 읽었다.

표 45에서는 정소외관형질과 테스토스테론함량의 기초통계치를 확인할 수 있다. 가장 무거운 정소가 361g, 가장 가벼운 정소가 156g이었으며, 평균 281g, 표준편차 45g의 분포를 보이고 있었다. 비거세돈의 테스토스테론함량은 면역적거세돈에 비해 크게 높은 18ng/ml 로 분석되었다.

표 45. 공시돈의 정소외관형질, 테스토스테론 함량 기초자료

Traits	N	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum
Weight (g)	20	281.17	45.10	156.29	361.53
Area (cm ²)	20	81.41	9.42	52.85	97.84
Length (cm)	20	12.69	0.73	10.48	13.85
Height (cm)	20	7.84	0.61	6.02	8.67
Testosterone (ng/ml)	20	17.52	10.15	5.17	40.76

: number of pigs

유전자형에 따른 수정능력관련 형질에 대한 차이를 분석한 결과는 아래 표 46와 표 47과 같다. 두 DNA표지인자 모두 유전자형에 따른 정소외관형질의 차이를 관찰할 수 없었다. 또한 두 DNA표지인자 모두 유전자형에 따른 테스토스테론 함량의 차이도 발견할 수 없었다. 따라서, 본 과제를 통해 개발한 DNA표지인자들은 수정능력에는 영향을 끼치지 않는다는 것을 알 수 있다. 즉, 옹취원인 물질은 제거하면서도 수퇘지의 수정능력은 유지할 수 있다는 것을 의미한다.

표 46. 돼지 *3β-HSD* 유전자의 intron3번 영역내 SNP22가 정소외관형질, 테스토스테론 함량에 미치는 영향분석

Traits	Genotype			P-value
	CC (n=7)	TC (n=11)	TT (n=2)	
Weight (g)	294.88 (19.76) ¹	274.46 (14.23)	301.90 (37.22)	0.842
Area (cm ²)	83.28 (4.06)	80.13 (2.92)	84.77 (7.64)	0.895
Length (cm)	12.98 (0.30)	12.57 (0.22)	12.87 (0.56)	0.534
Height (cm)	7.95 (0.27)	7.77 (0.19)	8.17 (0.50)	0.699
Testosterone (ng/ml)	25.07 (3.84)	15.12 (2.77)	17.77 (7.24)	0.156

¹Standard error of least-square means

^{a,b}Different superscripts indicate significance levels within rows of SNP locus

표 47. 돼지 3β -HSD 유전자의 exon4번 영역내 SNP34가 정소의관형질, 테스토스테론 함량에 미치는 영향분석

Traits	Genotype		P-value
	CC (n=11)	TC (n=7)	
Weight (g)	285.69 (12.53) ¹	285.18 (16.52)	0.982
Area (cm ²)	82.89 (2.27)	81.88 (2.99)	0.809
Length (cm)	12.91 (0.15)	12.53 (0.20)	0.193
Height (cm)	7.88 (0.15)	8.09 (0.20)	0.460
Testosterone (ng/ml)	18.21 (3.26)	19.07 (4.30)	0.887

¹Standard error of least-square means

^{a,b}Different superscripts indicate significance levels within rows of SNP locus

4. DNA 표지인자 분석키트 개발

본 연구과제를 통해 개발한 DNA표지인자는 실제 수퇘지의 응취물질제거에 효과가 있을뿐만 아니라 수퇘지의 산육능력, 수정능력에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 DNA 표지인자의 현장적용을 위해 DNA표지인자분석키트를 제작했다(그림 32). 분석키트는 응취제거용 DNA표지인자 2개 (돼지 3β -HSD 유전자의 SNP22와 SNP34)에 대해 유전자형진단을 할 수 있는 키트로서, 구성은 표 48과 같다. 또한 그림 33과 같이 유저매뉴얼을 제공한다. 이러한 DNA 표지인자 키트를 통해 향후DNA마커관련 상품화기반을 마련했다.



그림 32. 개발된 DNA표지인자 분석키트

표 48. DNA 표지인자 분석키트 구성

Cap label	Volume	Amount (#of tube)	Component
Polymerase chain reaction (PCR)			
P1	200 $\mu\ell$ (5pmol/ $\mu\ell$)	1	Primer1: CTCCTGAATCGTGGCTTTC Primer2: TGCAGAGGGAGCAATGACTA
P2	200 $\mu\ell$ (10pmol/ $\mu\ell$)	1	Primer3: CGCTGAAAACCAAGACTCACT Primer4: CTGGGTTAAGCATCCTGGTC
M	700 $\mu\ell$	4	Taq Polymerase 10X PCR buffer Loading dye Distilled water
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)			
R1	50 $\mu\ell$	1	restriction enzyme(<i>BsmA</i> I)
R2	50 $\mu\ell$	1	restriction enzyme(<i>Fau</i> I)
RB1	100 $\mu\ell$	1	10X reaction buffer
RB2	100 $\mu\ell$	1	10X reaction buffer
Electrophoresis			
L1	300 $\mu\ell$	1	Ladder
L2	300 $\mu\ell$	1	Ladder

Store at -20°C !!

For Research Use Only

Boar Taint Genotyping Kit

Cat. No. P0711



Kit components

Component parts (Cap label)	purpose	Volume	Amount (# of tbe)
Primer mixture1 (P1)	SNP1 PCR	200 µl	1
Primer mixture2 (P2)	SNP2 PCR	200 µl	1
PCR master mix(M)	SNP1&2 PCR	700 µl	4
Restriction enzyme1 (R1)	SNP1 RFLP	50 µl	1
Restriction enzyme2 (R2)	SNP2 RFLP	50 µl	1
10X Reaction buffer1 (RB1)	SNP1 RFLP	100 µl	1
10X Reaction buffer2 (RB2)	SNP2 RFLP	100 µl	1
SNP1 Ladder(L1)	SNP1 band	300 µl	1
SNP2 Ladder(L2)	SNP2 band	300 µl	1

PCR condition

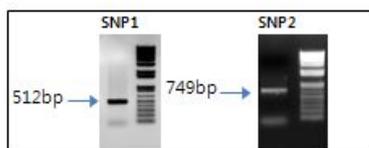
1) Reaction Mixture

composition(Cap Label)	Volume
PCR Mastermix(M)	26 µl
Primer mix (P1 or P2)	2 µl
DNA 또는 생체시료	5 µl
D.W	To Total 50 µl

2) PCR Temperature condition (SNP1,2 동일)

1. Pre-denaturation	98°C	2 min
2. Pre-denaturation2	95°C	20 min
3. Denaturation	94°C	1 min
4. Annealing	62°C	1 min
5. Extension	72°C	1 min
6.	repeat 3~5 for 29 times	
7. Last extension	72°C	10 min
8. Hold	4°C	

3) PCR 결과 예시



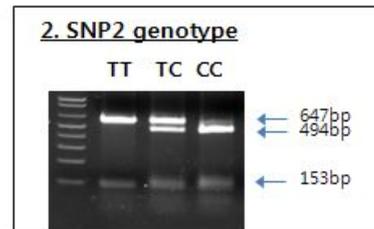
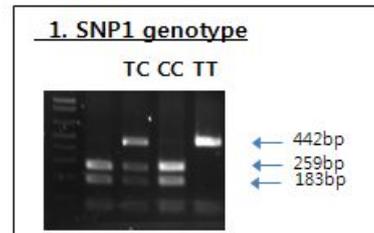
Enzyme Cut condition

1) Reaction Mixture

composition(Cap Label)	Volume
PCR product	5 µl
10X reaction buffer(RB1 or RB2)	0.7 µl
Restriction enzyme (R1 or R2)	0.5 µl
D.W	0.8 µl
Total	7 µl

위 조성으로 반응후 55°C 에서 8시간동안 배양한다

2) Enzyme cut 결과 예시



Result Decision

SNPname	Band type	Size
SNP1	PCR	512bp
	CC	259bp,183bp
	TC	442bp,259bp,183bp
	TT	442bp,
SNP2	PCR	749bp
	CC	494bp
	TC	647bp,494bp
	TT	647bp



KOGENBIOTECK Co. www.kogen.co.kr
 TEL : 82-2-2026-2150~4, FAX : 82-2-2026-2155,
 RM1203 Woolim Lions Valley C-dong,371-28 Gasan-dong
 Geumcheon-gu, Seoul, Korea 142-786

그림 33. DNA 표지인자 분석키트 유저 매뉴얼

제 4 장 목표달성 및 기여도

제 1 절 간 세포내 androstenone 분해활성물질 발굴

Androstenone은 steroid hormone으로서 정소에서 생성되며, 간세포의 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase)라는 효소에 의해서 분해된다. 따라서 간세포 활성화에 영향을 주는 물질을 우선적으로 선별하였다. 우선적으로 간세포인 HepG2의 분열을 촉진시킬 수 있는 물질선별을 위해 MTT assay를 이용하였고, 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) 효소발현정도를 RT-PCR과 Western blot으로 측정하였다. 간세포 분열 촉진과 3 β -HSD 효소 발현의 양을 증가시키는 것이 확인된 갈근추출물은 이후, androstenone의 분해를 촉진시키는 지에 대한 시험관 내 평가를 실시하였고, 소동물 모델을 통해 향후 돼지에게 적용시킬 수 있는 방법을 모색하였다.

GC mass와 Western blot의 방법을 통해 갈근추출물이 소동물 모델의 androstenone 감소에 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

갈근추출물과 유산균억제제를 이용하여 사료첨가물을 만들고 돼지사양시험을 진행한 결과 대조군에 비하여 3 β -HSD 효소발현이 증가하였고, 돼지 등지방에서의 androstenone 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 갈근추출물 및 유산균을 이용한 동물 사료첨가물이 산육능력향상과 식품안전성이 확보되는 옹취제거에 도움을 줄 수 있고 더 많은 축산업계에 활용될 수 있다고 생각한다.

제 2 절 장 내 skatole 생성 미생물의 제어 기술 개발

프로바이오틱 균주는 적당한 양을 섭취하였을 때 건강에 도움이 되는 살아있는 균(live organism)으로 장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제라 할 수 있다. 장내 skatole을 생성하는 미생물을 제어하기 위해서는 동일한 조건에서 생존할 수 있고 더 나아가 skatole 생성의 원인이 되는 균주를 줄이는 역할을 하는 유산균주를 찾아야 한다. 장내의 많은 유산균주들은 숙주동물의 소화기관의 위산과 담즙산에 의해 영향을 받는다. 선발된 유산균주 *Lactobacillus rhamnosus* 5GS2는 내산성 실험결과 약 98% 이상의 생존율을 보였다. 또한 담즙에 대한 내성측정실험 결과 103%의 높은 생존율을 보였다.

장 상피세포에 부착하여 병원성균과 경쟁적 우위를 차지하는데 중요한 요소인 장내 정착능은 이미 높은 것으로 *L. rhamnosus* GG strain을 대조구로 하여 실험을 진행하였다. 선발된 균주 5GS2는 GG strain과 비교하여 비슷한 부착능을 갖는 것으로 나타났고 이는 실질적으로 동물 장내에 부착되어 균주의 활성이 유지될 것으로 보인다.

대량생산과 회수를 위한 가공공정단계 중 발생가능한 농축, 동결 및 산소 접촉에 대한 활력의 변화

를 조사한 결과, 선발된 균주인 5GS2는 전체적으로 우수한 회수율 및 생존율을 나타냈다.

선발된 균주를 이용하여 In vitro 상에서 skatole 감소능력을 평가하였다. 유산균주의 선택배지인 MRS의 조성을 바꾼 후 skatole을 첨가하여 균의 성장과 skatole의 감소를 gas chromatography를 이용하여 분석하였다. 그 결과 대조구에 비해 5GS2는 skatole 36.01%의 감소를 나타냈다.

돼지 모델에 skatole 감소를 위한 5GS2 균주 적용을 위해 사료를 제조하였다. MRS배지에 계대배양한 후, cell pellet을 skim milk media에 접종한 후 동결 건조 하였다. 이렇게 제조된 생균제를 돼지사양시험에 적용 하였다. 그 결과 돼지 등지방의 skatole함량이 유의한 차이는 아니지만 감소하는 것으로 나타났고 장내 균총 분석 결과 *Clostridium* spp의 균총이 유의적으로 감소한 결과를 보여주었다.

본 연구는 In vitro상의 유의적인 skatole 저해 능력이 돼지에 급여한 생균제로서 옹취의 원인 물질인 skatole 양과 원인이 되는 clostridium의 생균수에 유의적인 영향은 미치지 못하였지만 감소하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었고 유산균 생균제가 기능성을 가지는 사료첨가제로 활용될 수 있음을 보여준 것으로 생각된다.

제 3 절 사료첨가제 생산공정 개발

제 1, 2세부과제에서 개발되는 천연물 추출 제제와 probiotic 미생물 균주를 사료첨가제로 생산 제작할 수 있도록 제품 생산 공정을 마련하기 위하여 진행되었다.

돼지사료에 특정 첨가물을 배합할 때 그 첨가물의 양이 매우 소량이기 때문에 적절한 배합이 이루어질 수 있도록 기초 보조사료의 배합을 연구했다. 번식능력 및 번식장애 개선과 발정 및 수태율을 향상시키는 배합을 정하고 1, 2 세부 연구진에서 선발한 옹취제거용 첨가물과 혼합하여 최적의 기능을 보이는 사료를 계산했고 그에 따라서 갈근추출물은 0.4~0.6%, 유산균은 0.05%가 함유된 사료를 생산했다.

본 협동과제는 ‘사료첨가제 생산공정 개발’에 목표가 있다. 1차년 연구에서는 사료첨가제용 기초 사료를 선정하였고, 2차년 연구를 통해 천연물 추출물과 생균제를 함유한 사료첨가제를 개발하였다. 3차년 연구에서는 사료에 첨가되는 추출물과 유산균의 최적의 배합기술을 개발한 후 실제 사양시험에 적용하였다.

이를 통하여 다양한 첨가제를 사료에 적용시킬 수 있었고 여러 기능성을 가진 사료의 적절한 배합기술을 통해 양돈산업을 넘어 축산업계에 활용이 될 것이다.

제 4 절 응취원인물질 관련 DNA표지인자 개발

3세부과제는 ‘응취원인물질관련 DNA표지인자 개발’에 그 목표가 있다.

1차년 연구수행을 통해 응취물질관련 후보유전자를 탐색하고 염기서열분석을 통해 염기변이를 발굴했다. 주요 응취 원인물질인 androstenone의 생성과 분해에 관여하는 후보유전자로 3β -HSD 유전자를 최종선정했다. 선정된 3β -HSD 유전자의 품종간 및 품종내 염기서열 변이를 발굴하기 위해 full length direct sequencing을 실시했다. 염기서열분석을 통해 36개의 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP)와 3개의 삽입/결실(InDel)을 발견했다. 염기변이에 대한 유전자형 판별을 위해 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 기법을 이용하여 유전자형진단기법을 마련하였다.

2차년 연구에서는 비거세돈으로 이루어진 147두의 실험돈군을 조성하고, 유전자형과 응취관련 형질간의 연관성을 구명하여 DNA표지인자를 개발하였다. 응취관련 대상형질인 등지방내 androstenone 및 skatole 함량측정에 있어, 기존 보고된 측정방법의 단점들을 개선하여 ‘GC-MS를 이용한 androstenone과 skatole 동시추출 및 정량기법’을 개발하였다. 모든 실험돈군에 대하여 androstenone과 skatole 함량을 측정하였으며, 1차년 연구에서 발굴한 SNP에 대한 유전자형을 분석했다. 유전자형과 androstenone 및 skatole 함량과의 연관성분석을 실시하여 DNA표지인자의 효과를 검증했다. 이를 통해 개발된 DNA표지인자 중 2개 SNP (SNP22, SNP34)가 응취물질함량 수준에 영향을 미치고 있음을 확인했다. 각 SNP의 특정 유전자형에서 androstenone 함량이 응취를 느끼게 되는 역가치인 0.5ppm 보다 낮게 나타남으로서 응취제거효과가 뚜렷할 것으로 판단된다. 더불어 정소시료에서 유전자형에 따른 mRNA발현패턴을 분석한 결과, 유전자형간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 유전자형에 따른 androstenone함량의 감소는 정소에서의 생성량의 차이가 아닌 간에서의 분해능력에 차이에 의한 것으로 판단할 수 있다.

3차년 연구에서는 개발된 DNA표지인자의 유용성을 검증을 위해 각 유전자형에 따른 관능특성 및 산육능력, 수정능력관련 형질을 분석했다. 이를 통해 개발된 DNA표지인자가 응취원인물질함량에 차이를 주면서, 수퇘지 특유의 산육능력과 수정능력을 유지할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 개발된 DNA마커의 현장적용을 위해 2가지 응취관련 DNA의 유전자형의 진단이 가능한 분석키트를 개발하였다.

따라서, 개발된 DNA표지인자는 산육능력, 수정능력을 유지하고 식품안전성을 확보하면서도, 응취를 제거할 수 있는 기법으로 큰 효용성이 있을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

본 연구는 옹취를 발생시키는 원인물질인 안드로스테논과 스퀘이톨을 제거 혹은 저감화 시키기 위해 다양한 근원의 천연물과 프로바이오틱 균주를 이용한 사료를 개발하는 것이다. 본 연구 결과로 안드로스테논 분해 활성 효소의 활성을 증진시키는 물질로 갈근추출물을 선별하였고, 또한 probiotic 균주인 5GS2에서 skatole 감소 효과를 확인하였다. 옹취관련 DNA 표지인자로는 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 내의 SNP22와 SNP34가 옹취원인물질 중 androstenone 함량에 효과가 있음을 확인하였다. 갈근추출물과 프로바이오틱 균주를 이용한 사료는 돼지의 고환을 외과적으로 제거하는 시술방법의 문제점인 옹성호르몬 분비의 완전차단으로 인한 산육능력저하와 스트레스를 막을 수 있고 또한 동물복지저해 등의 문제를 예방할 수 있다. 현재 자주 사용되는 호주의 화이자사는 임프로박(Improvac)이라는 제품은 면역적 방법을 이용한 비외과적거세기법으로써 옹취를 완전히 제거해줄 수는 있지만, 기존과 동일하게 옹성호르몬의 기능을 완전히 제거한다는 점에서, 산육능력이 충분히 발휘될 수 없으며, 백신접종으로 인한 스트레스 발생은 여전히 존재하게 된다. 뿐만 아니라, 혈액 내 백신 잔류로 인한 돈육식품안전성 위협과, 접종에도 불구하고 비거세돈으로 판정받는 등의 여러 문제점들을 갖고 있다. 따라서, 본 연구를 통해 개발된 사료를 제공함으로써 옹취를 발생시키는 요인들만을 효과적으로 제거시킬 수 있고, 기존의 외과적거세방법과 백신접종의 문제점을 원천적으로 해결할 수 있다.

장기적으로 비육돈에서는 성장과 사료효율 같은 산육능력이 더욱 향상될 뿐만 아니라, 돈육식품안전성을 확보할 수 있으며 나아가서 종돈에서는 수정능력을 유지시킴으로써 선발강도를 증대시킬 수 있다. 결국 연구개발결과를 활용하여 양돈산업현장에서 수퇘지의 생산성을 극대화 할 수 있는 방법이 될 수 있다.

선별된 갈근추출물과 프로바이오틱 균주인 5GS2의 skatole 감소 능력은 In vitro 상에서 많은 부분 입증 되었다. 하지만 사료 제조에 필요한 갈근추출물과 유산균주의 배합비가 In vitro에서의 농도로 이루어지기 힘든 현실적인 면을 감안할 필요가 있다.

관능특성 중 특히 이상취 항목에서 유전자형간 차이를 나타낼 것으로 기대가 되었으나, 본 연구결과에서는 그러한 차이를 발견할 수 없었다. 아울러 풍미, 소비자기호에서도 유의적인 차이가 없었다. 이러한 이유는 관능평가에서 이용된 실험돈 20두의 유전자형분포가 고르지 못하여 유전자형에 따라 충분한 시료가 확보되지 못했다는 점과 대부분의 수퇘지에 대해 거세를 실시하기 때문에(거세

율 98.2%; 축산물품질평가원, 2010) 비거세한 수태지에 대한 시료확보의 어려움 때문인 것으로 사료된다. 이를 극복하기 위해서 추후에 더 많은 수의 실험돈에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 두 번째로 응취관련 관능평가에 있어 기존방법의 적합성여부이다. 이상취항목에서 대부분 3점에 치우친 경향을 보이는 것은 패널들이 응취가 나는지 나지 않는지 판단하기 어려웠음을 의미한다. 즉, 기존 패널훈련과 함께 응취를 정확히 인지할 수 있는 패널훈련이 필요함을 알 수 있다. 세 번째, 패널테스트에 이용된 배최장근 시료의 적절성이다. 배최장근은 근내지방함량이 매우 적으므로 축적된 응취원인물질이 매우 소량일 가능성이 있다. 이런 문제에 대한 대안으로는 전기인두법이 있을 수 있다. 전기인두법은 끝이 약 160 ℃인 전기인두로 지방을 수초동안 지진 다음 냄새를 맡아 평가하는 방법이다.

이를 종합해볼 때, 다수의 실험시료 확보와 함께 응취평가에 최적화된 패널훈련과정을 보완하고 응취원인물질이 축적되는 지방이 포함된 부위에 대한 관능평가가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

제 2 절 타 연구에의 응용

응취(boar taint)는 수태지의 성숙숙시 분비되는 스테로이드 호르몬 종류인 안드로스테논과 스키테롤에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있으며, 식육으로써 치명적인 풍미를 유발한다. 이러한 응취 제거를 위해 외과적거세방법이 주로 시행되는데 이는 생산력 감소와 질병에 대한 저항성약화로 인한 손실을 유발한다. 동물의 거세와 관련된 동물복지(animal welfare) 또한 선진국을 필두로 지속적인 관심이 대두되고 있다. 또한 돼지의 면역체계를 백신을 통해 고환의 기능을 저하시켜 거세효과를 내는 방식 소위 거세백신(immuno castration)이라 불리는 호주의 화이자社는 임프로박(Improvac)은 거세의 효과를 통해서 응취를 제거시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일당증체량과 사료섭취율, 등지방층 두께 등 성장능력이 일반거세돈에 비해 증가시킬 수 있는 장점이 있지만 비용문제와 더불어 응성호르몬의 분비를 막아 응성 특이적인 우수한 성장능력을 저해 생물에 투여한 ‘호르몬 유사 억제제’라는 점은 혈액내 잔류되었을 시 돈육식품으로서의 안전성에 있어서 심각한 문제를 초래할 수 있다.

이러한 문제점들은 돼지에 국한된 것이 아닌 우리나라 축산업계에서 함께 논의되어지는 사항이다. 본 연구를 통해 개발된 사료는 기타 다른 가축들에게 사용되는 항생제와 호르몬제 등을 대체할 수 있는 물질 선별의 초석이 될 수 있으며, 이를 통해 다양한 기능성을 가진 천연물 추출물과 유산균 사료를 탐색하는데 활용될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

수세기 동안 옹취를 예방하기 위해 돼지에게 거세를 시행해 왔다. 오랜 기간 동안 수돼지의 거세는 생후 약 2-3 주에 실시되었다. 네덜란드, 스위스 및 노르웨이에서는 거세와 관련된 통증과 스트레스를 줄여주기 위해 전신 또는 국부 마취를 사용하는 것이 일반적이 되고 있다. 이것이 강제적 또는 자발적이라는 규칙이나, 통상 농장주나 수의사가 이러한 기술을 시행하느냐 하는 규칙은 국가마다 다르다. 마취 여부와 상관없이 거세는 최근 동물 보호 단체로부터 비난을 받아 왔다.

호주 등 일부 국가에서는 돼지를 어린 연령에 도축한다. 옹취의 원인이 되는 자연 물질인 안드로스테논 및 스카톨은 수돼지가 성적으로 성숙하게 되어야만 지방에 축적되기 시작하기 때문이다. 그러므로 조기 도살은 옹취를 감소시키는 데 도움이 될 수 있다.

옹취를 제거할 수 있는 다른 방법은 암돼지만 사육하기 위해 성 염색체와 인공수정 기반의 분류를 통해 태어나기 전에 새끼 돼지의 성을 선택하는 것이다. 이 방법은 가축 사육에서 성공적으로 사용되어 왔지만 여전히 연구 중에 있으며 돼지 생산에서는 아직 경제적이거나 실용적인 해결책은 아니라고 한다. 옹취가 적은 돼지 사육도 실험되고 있으나 큰 성공은 거두지 못하고 있다. 거세하지 않은 수돼지의 이점은 기름기가 적고 약 10% 빠르게 성장하며 거세한 수돼지나 미경산돈(암돼지)보다 살코기가 많아 효율적으로 사료를 돈육화할 수 있다는 점이다. 옹취는 수돼지의 지방에 안드로스테논 및 스케이톨이 축적되어 발생한다.

최근 들어 수돼지 거세가 비난을 받게 되자 일부 생산자와 생산자협회는 옹취 제거를 위한 대안 방법을 모색했다. 옹취예방백신 접종은 1998년부터 호주와 뉴질랜드에서 실시되어온 방법으로, 옹취 억제제를 위해 돼지의 면역계를 활용하는 안전하고 매우 효율적인 해결책으로 알려져 왔다. 백신 사용은 옹취를 제거하는데 있어 물리적 거세만큼이나 간단하고 신뢰할 수 있어서 많은 나라에서 사용되고 있다.

이 백신은 동물 친화적이고 환경적 측면에서 보다 효율적인 옹취 해결책일 뿐 아니라, 돈육 생산 전반의 이해관계자들이 자연적인 수돼지 성장이라는 성과상의 이점을 누리면서도 식감을 유지할 수 있도록 해준다.

하지만 이러한 백신은 옹성호르몬의 분비를 막아 옹성 특이적인 우수한 성장능력을 저해한다. 또한, 생물에 투여한 ‘호르몬 유사 억제제’라는 점에서 혈액 내 잔류되었을 시 돈육식품으로서의 안전성에 심각한 문제를 초래할 수 있다. 그렇기 때문에 현재 많은 나라에서는 외과적거세와 백신사용 이외의 옹취억제에 효과가 있는 육종개량과 사료개발에 관심을 갖고 연구를 진행하고 있다.

제 7 장 참고문헌

- Babol J. and E. J. Squires 1995. Quality of meat from entire male pigs. *Food research international*. 28(3): 201-212.
- Bonneau M., M. Le Denmat, et al. 1992. Contributions of fat androstenone and skatole to boar taint: I. Sensory attributes of fat and pork meat. *Live stock Production Science*. 32(1): 63-80.
- Deslandes B., C. Gariépy, et al. 2001. Review of microbiological and biochemical effects of skatole on animal production. *Live stock Production Science*. 71(2-3): 193-200.
- Fortin A., W. Robertson, et al. 2005. The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. *Meat Science*. 69(2): 297-305.
- Jensen B. and M. Jensen. 1998. Microbial production of skatole in the digestive tract of entire male pigs. *Skatole and boar taint*. 41-76.
- Lealiifano A., J. Pluske et al. 2011. Reducing the length of time between slaughter and the secondary gonadotropin-releasing factor immunization improves growth performance and clears boar taint compounds in male finishing pigs. *Journal of animal science*. 89(9): 2782-2792.
- Lin Z., Y. Lou. et al. 2005. A novel polymorphism in the 5' untranslated region of the porcine cytochrome b5 (CYB5) gene is associated with decreased fat androstenone level. *Mammalian genome*. 16(5): 367-373.
- Meilgaard M., G. V. Civille. et al. 2007. *Sensory evaluation techniques*. CRC.
- Nicolau-Solano S. I., J. D. McGivan. et al. 2006. Relationship between the expression of hepatic but not testicular 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase with androstenone deposition in pig adipose tissue. *Journal of animal science*. 84(10): 2809-2817.
- Pedersen B. 1998. Heritability of skatole in back fat. *Skatole and boar taint*. 129-136.

Quintanilla R., O. Demeure. et al. 2003. Detection of quantitative trait loci for fat androstenone levels in pigs. *Journal of animal science*. 81(2): 385-394.

Sellier P., M. Rothschild. et al. 1998. Genetics of meat and carcass traits." *The genetics of the pig*. 463-510.

Sinclair P., W. Gilmore. et al. 2006. Molecular cloning and regulation of porcine SULT2A1: relationship between SULT2A1 expression and sulfoconjugation of androstenone. *Journal of molecular endocrinology*. 36(2): 301-311.

Walstra P., C. Claudi-Magnussen. et al. 1999. An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: levels of androstenone and skatole by country and season. *Live stock Production Science*. 62(1): 15-28.

Willeke H., R. Claus. et al. 1993. Possibilities of breeding for low 5 α -androstenone content in pigs. *Pig News and Information*. 14: 31N-33.

Xue J., G. D. Dial. et al. 1996. Breed differences in boar taint: relationship between tissue levels boar taint compounds and sensory analysis of taint. *Journal of animal science*. 74(9): 2170-2177.

주 의

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