

최 중
연구보고서

신발효기법을 이용한

자돈용 대두사료의 개발에 관한 연구

Development of soybean weaning of piglets
using new fermenting method

주관연구기관 : 경상대학교

협동연구기관 : 동의대학교

협동연구기관 : 경남축산진흥연구소

위탁연구기관 : 성균관대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신발효기법을 이용한 자돈용 대두사료의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 류 충 호

세부연구책임자 : 류 충 호

연 구 원 : 이 정 옥

연 구 원 : 박 미 화

연 구 원 : 김 종 원

연 구 원 : 이 효 형

연 구 원 : 김 은 정

연 구 원 : 고 유 진

협동연구기관명 : 동의대학교

협동연구책임자 : 최 영 현

협동연구기관명 : 경남축산진흥연구소

협동연구책임자 : 김 도 경

위탁연구기관명 : 성균관대학교

위탁연구책임자 : 이 상 일

요 약 문

I. 제 목 : 신발효기법을 이용한 자돈용 대두사료의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

안전성이 입증된 발효 식품용 미생물인 유산균, 황국균, 고초균을 중심으로 사용한 multi-step 발효물 중의 미생물 유래 효소류, 1, 2차 대사산물, 균체 성분은 면역체계를 활성화시킨다. 특히, bacteriocin, diacetyl, lactic acid 등의 천연항균성 물질은 설사증 유발균인 대장균과 살모넬라 등 유해균의 장내 생육을 억제함으로써 자돈에서의 질병을 예방할 수 있을 것으로 기대된다. Multi-step 대두 발효물은 대두 중의 단백질을 저분자의 펩타이드 형태로 효율적으로 분해시킨 것으로써 각종 고기능성 물질을 다량 함유하고 있으며 섭취시 식물성 단백질의 소화·흡수능이 우수하여 고품질의 단백을 생산할 수 있으므로 국내산 축산물의 경쟁력을 강화시킬 수 있을 것이다.

이에 본 연구에서는 축산농가의 난제 중의 하나인 이유기 자돈 사망률을 낮추기 위한 방법으로 multi-step 발효 시스템을 이용하여 가공한 대두 발효물을 첨가한 고기능성 자돈 영양 사료를 생산하고자 한다.

난분해성 다당류로 인한 장내 정상 균총의 파괴 결과 발생하는 미생물성 설사증 이외에도 사료 중의 food allergen에 기인한 알레르기성 설사증도 발생할 것으로 추측되지만 아직 식품알레르기에 의한 자돈 설사증에 관한 정확한 보고가 없다. 이에 원인불명 설사증 자돈의 혈청을 인체에 알레르기를 유발하는 단백질과 면역학적으로 분석함으로써 식품알레르기의 가능성을 규명하고 대두의 품종에 따른 항원성 물질을 정량하고자 한다. Multi-step 발효 시스템에 의해 항원성 단백질이 한계 크기인 10kD이하 펩타이드로 분해됨으로써 항원성을 원천적으로 제거하여 장관흡수가 용이한 형태로 분해됨과 동시에 다량의 기능성 펩타이드도 생성되어 자돈 사망률을 현저히 감소시키고 축산 농가의 경제적 손실을 절감시키는 것이 본 연구의 최종 목표이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 식물성 고단백 자원인 대두의 효율적인 소화 분해를 위한 발효법 개발

1) 최적 발효시스템 구축을 위한 유용균주 screening

- ① 알레르기성에 따른 대두의 분류 및 선별
- ② 안전성이 확보된 전통발효 식품으로부터 유용균주 선별
- ③ 대두 자화능과 천연항균제 생산능 높은 유산균 선별
- ④ 천연 항균제 친화성 있고 단백질, 당질, 지질 등의 분해능이 강하고 GABA생산력이 우수한 황국균 선별
- ⑤ 암모니아 등의 이취 생성능 결실, 각종 protease, fibrinolytic enzyme, polyglutamic acid와 fructan 생산능이 높은 고초균 선별

2) 단일 및 multi-step 발효시스템의 확립 및 비교

- ① 단일 종균을 이용한 대두 발효물의 제조
- ② 복합 종균을 이용한 multi-step 발효물의 제조
- ③ ①②의 특성 비교
- ④ 대두 자화성 GABA생산 균주의 선별 및 발효 조건 규명
- ⑤ Multi-step 발효물에 의한 기능성 대사산물의 퓨전조건 확립
- ⑥ 황국균 발효에 의한 2차 대사산물(GABA) 생산 및 유지 조건검토
- ⑦ 최대 점질물 형성 고초균 발효공정 설정
- ⑧ multi-step 발효시스템 중 GABA의 최대 생성을 위한 발효공정 개량과 생성된 GABA의 안정화
- ⑨ 효율적인 multi-step 발효시스템 선별 및 최적발효공정 개발

3) Multi-step 발효시스템 의한 고품질 기능성 발효 자돈 사료의 대량 생산 공정 및 발효물의 효율적인 저장조건 개발

- ① 기능성 multi-step 발효물의 대량 생산 공정 확립
- ② 다른 사료성분과 혼합방안 및 시기 설정
- ③ Multi-step에 의한 기능성 발효 자돈 영양사료 첨가물의 에너지 절감 건조법 개발
- ④ 기능성 발효 자돈 영양사료용 multi-step 발효물의 장기 저장법 개발

2. 사료의 생리활성 효능에 관한 분자생물학적 기전 해석

1) 대두 및 시판 발효 대두 중의 기능성 peptide의 분리 및 항염증 효능 비교

- ① 기능성 peptide의 분리/정제 공정 확립
- ② 대두 및 시판 발효 대두 중의 기능성 peptides 비교
- ③ 염증유발 물질처리에 따른 후보 peptide의 세포독성 여부 조사
- ④ Cyclooxygenase pathway 관련 유전자의 발현에 미치는 후보 peptide의 효능 비교
- ⑤ NF-kappaB 관련 조절 유전자들의 발현에 미치는 후보 peptide의 효능 비교

2) 신경교 세포에서 β -amyloid에 의한 세포독성 보호 기전 해석

- ① 신경교세포의 성장에 미치는 β -amyloid 및 후보 peptides 영향 조사
- ② 신경교세포의 세포주기 조절 관련 유전자 발현에 미치는 후보 peptides의 영향 조사
- ③ 신경교세포에서 apoptosis 유발 관련 유전자 발현에 미치는 후보 peptides의 영향 조사
- ④ β -amyloid의 cytotoxicity에 미치는 후보 peptides의 영향 조사
- ⑤ 세포주기 관련 유전자 발현 변화에 미치는 β -amyloid 및 후보 peptides의 영향 비교
- ⑥ Apoptosis 관련 유전자 발현 변화에 미치는 β -amyloid 및 후보 peptides의 영향 비교

3) 발효물 유래 기능성 peptide의 항암/면역증강 효능에 관한 연구

- ① 인체 뇌종양세포의 성장에 미치는 후보 peptides의 영향 비교
- ② 세포주기교란에 따른 관련 유전자들의 발현에 미치는 후보 peptides의 영향 조사
- ③ 후보 peptides에 의한 뇌종양세포의 분화 여부의 확인
- ④ 후보 peptides에 의한 뇌종양세포의 apoptosis 관련 기전 해석
- ⑤ In vitro 면역활성 연관 유전자들의 발현에 미치는 후보 peptides의 역할 분석
- ⑥ 실험동물에서의 후보 peptides의 면역 활성 여부 조사

3. Piglet에의 식이에 의한 영양·병리학적 효능 평가

1) Multi-step 발효영양사료 투여 piglet의 영양학적 효과

- ① Multi-step 발효영양사료와 일반사료 급여군의 증체율 비교
- ② Multi-step 발효영양사료와 일반사료 급여군의 혈액학적 차이 비교
- ③ 급여 사료내 multi-step 발효물의 적정 조성비 확립

2) Piglet의 설사증에 의한 사망률 저감 효과 검토

- ① multi-step 발효사료와 일반사료 급여군의 설사증 발생 비교
- ② multi-step 발효사료와 일반사료 급여군에 대한 대장균 공격시험
- ③ multi-step 발효사료와 일반사료 급여군에 대한 살모넬라 공격시험

3) Multi-step 발효 사료 급여 돼지의 생산량 조사

- ① Multi-step 발효사료 급여 돼지 출하시 육질 등급 조사
- ② Multi-step 발효사료 급여 돼지 도체 병변 조사
- ③ Multi-step 발효물을 이용한 각종 사료 formulation 시험

4. 발효 시스템에 따른 대두 알레르기성 분석

1) 대두 품종별 알레르기성 비교

- ① 국산·수입산 대두의 품종별 알레르기성 비교분석
- ② 식품(대두)에 의한 동물 알레르기 발생에 관한 정보 조사 및 확보
- ③ 대두에 알레르기 반응을 일으키는 사람 및 동물의 혈청 확보

2) 발효시스템 산물의 알레르기성 분석

- ① 단일 종균을 이용한 대두 발효물의 알레르기성 분석
- ② 복합 종균을 이용한 multi-step 시스템물의 알레르기성 분석
- ③ 최적 발효 시스템에 따른 발효물의 알레르기성 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

1. 제 1 세부과제 : 식물성 고단백 자원인 대두의 효율적인 소화분해를 위한 발효법 개발

가. 발효식품에서 최적 유산 발효 시스템 구축을 위해 대두 자화능과 천연항균제인 nisin 생성능이 우수하고 산도의 하락이 완만한 유산균을 선별하였다.

나. 유산 발효 대두에서 생육이 가능하며 천연항균제 친화성이 있고 단백질, 당질, 지질 등의 분해능이 강하며 GABA 생성능이 우수한 황국균을 선별하였고 암모니아 등의 이취 생성능이 결실되고 혈전 용해, 각종 분해 효소 등의 생산능이 높은 고초균을 선별하였다.

다. 분리된 유산균, 황국균, 고초균을 이용한 대두의 단일 및 복합 발효물을 제조하여 비교하였으며 각 균주들 간의 상호 연관성과 품질특성을 고려하여 최적 multi-step 발효 조건을 탐색하였다.

라. 대두의 단일 및 multi-step 발효 중 수분, pH, 환원당, 총당, 조지방, 조단백질 등 일반성분 함량과 유리아미노산, GABA 등 영양성분 변화를 확인하여 효율적인 multi-step 발효 시스템 선별 및 최적 발효 공정을 개발하였다.

마. 기능성 multi-step 발효물의 대량 생산 공정 확립을 위하여 기존 multi-step 발효법을 개선하여 발효 시간을 단축하고 에너지를 절감할 수 있는 속성 multi-step 발효법을 개발하였다.

바. multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 수분, pH, 환원당, 조지방, 조단백질 등 일반성분 함량과 유리아미노산, GABA 등 영양성분을 비교하여 영양적인 측면에서는 차이가 없으나 경제적으로 우수한 속성 multi-step 발효법의 최적 발효 공정을 개발하였다.

사. 최적 속성 multi-step 발효 공정에 의해 생산된 발효물의 건조 방법에 따른 저장 중 영양성분 변화를 확인함으로써 건조 방법에 자돈 사료의 저장 방법을 확립하였다.

2. 제 1 협동과제 : 사료의 생리활성 효능에 관한 분자생물학적 기전 해석

가. Genistein이 처리된 SK-MEL-2 세포는 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 현저히 감소되었으며 심한 형태적 변형이 동반되었다. 이러한 SK-MEL-2 세포의 증식억제 및 형태 변형은 G2/M기의 세포주기 억제 및 apoptosis 유발과 연관성이 있는 것으로 나타났다. 이는 인체흑색종세포에서 genistein의 항암작용을 이해하는데 중요한 자료가 될 것이고 나아가 genistein을 포함한 그와 유사한 항암제 후보물질들의 연구에 있어서 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

나. Genistein이 처리된 T24 및 U937 세포는 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 현저히 감소되었으며 심한 형태적 변형이 동반되었으나, U937 세포에서 보다 높은 감수성을 보였다. 이러한 T24 및 U937 세포의 증식억제 및 형태 변형은 G2/M기의 세포주기 억제 및 apoptosis 유발과 연관성이 있는 것으로 나타났다. 이는 인체방광암 및 백혈병 세포에서 genistein의 항암작용을 이해하는데 중요한 자료가 될 것이고 나아가 genistein을 포함한 그와 유사한 항암제 후보물질들의 연구에 있어서 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

다. Genistein에 의한 AGS 인체위암세포 및 SK-MEL-2 흑색종세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, 이러한 apoptosis 유발에는 Bcl-2 family 및 IAP family의 발현 변화와 그에 따른 caspase의 활성화에 의한 표적 단백질들의 발현 저하와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다.

라. TRAIL과 genistein의 동시 처리에 의한 apoptosis 유도에 DR5, 미토콘드리아의 기능 손상 및 caspase-3의 활성이 매우 중요한 역할을 하는 것을 확인하였으며, 아울러 대두에 함유되어 있는 genistein은 TRAIL 저항성 극복을 위한 매우 훌륭한 후보물질이 될 수 있음을 알 수 있었다.

마. U937 세포에서 COX-2와 각종 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 하는

것으로 알려져 있는 PGE₂의 발현 정도는 대조구와 비교하여 고초균 단일 발효 대두(FSB) 및 multi-step 발효 대두(TFS) 처리에 의해서 강하게 억제되었다. 특히 FSB에 비하여 TFS를 전처리하였을 경우 PMA에 의하여 과발현된 COX-2 및 PGE₂ 생성의 억제정도가 더 강하게 나타났다. 이는 FSB 및 TFS의 항염증기전 해석을 위한 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 사료된다.

바. 대두 산물 등에 많이 함유되었을 것으로 추정되는 linoleic acid(LA)의 항암활성을 인체 위암세포를 대상으로 조사하였다. LA가 처리된 AGS 위암 세포는 LA 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되었으며, apoptotic body 형성, 염색질 응축 및 sub-G1 세포의 빈도를 동반하여 apoptosis가 유도되었음을 알 수 있었다. 대두 유래 LA의 항암활성 해석을 위한 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 사료된다.

3. 제 2 협동과제 : Piglet에의 식이에 의한 영양·병리학적 효능 평가

가. Multi-step 발효물의 첨가 적정 조성비 확립을 위한 실험 결과 자돈의 증체율과 사료효율 그리고 경제적인 면을 고려한 결과 5%의 첨가가 가장 효율적인 것으로 나타났다. Multi-step 발효물을 5% 첨가한 시험구와 일반사료만을 급여한 대조구의 증체율을 비교한 결과 4개월 후의 출하까지 평균체중은 8.6kg의 차이를 보였으며, 설사증의 발생은 일반사료와 차이가 없는 것으로 나타났다. 혈액학적 차이 비교시험 결과 Multi-step 발효물은 돼지 혈액 성상에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 추정되었다.

나. *Salmonella*가 감염되었을 때 Multi-step 발효물이 *Salmonella*를 억제하는 항균력이 있는 것으로 나타났다.

다. 육질조사에서는 일반사료를 급여하여 사육한 대조구에 비하여 Multi-step 발효물을 첨가한 사료를 급여하여 사육한 시험구가 조지방 함량, 풍미, 단맛 관련 및 총 아미노산 함량은 많았으며, pH, 지방의 명도, 불포화지방산, 필수지방산, 불포화지방산/포화지방산 비율, 필수지방산/불포화지방산 비율, 오메가-3 지방산, 신선육 및 가열육 관능 평가 결과 등 모든 항목에서도 결과가 높게 나타났다. 또한 대조구에 비하여 시험구가 경도, 표면경도 및 씹힘성, 포화지방산은

낮은 장점을 나타낸 반면, 가열감량은 많았고, 육 및 지방의 황색도, 오메가-6 지방산과 오메가-6/오메가-3 비율이 높았고, 수분 함량은 적은 단점을 나타내었다.

라. 도체병변조사에서는 Multi-step 발효물이 돼지 질병에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 하지만 이는 주로 호흡기 질병에만 초점이 맞추어져 도출된 결과라고 할 수 있다. 만약 현실적인 실험여건으로 소화기질병까지 확실히 조사할 수 있었다면 더욱 효율적인 차이가 인정되었을 것으로 생각된다.

마. Multi-step 발효물을 이용한 각종 사료 formulation 시험에서는 Multi-step 발효물 첨가량은 도체등급에 영향이 없는 것으로 판정되었으며 결론적으로 갓 난 돼지 사료에 첨가되는 multi-step 대두 발효물의 함량은 10%정도가 적합하며 돈기의 적정 배합비는 사료 효율과 경제적 측면도 고려하여 5% 정도가 적합하리라 사료된다.

4. 위탁과제 : 발효 시스템에 따른 대두 알레르기성 분석

가. 국내산 대두 6종과 수입산 대두 3종 그리고 유전자 재조합 대두 1종의 비정제된 항원은 15% SDS-PAGE 상에서 그 단백질띠의 분포가 유사하였으며 따라서 대두 품종들 간의 단백질 밴드 차이는 없었다.

나. 2005년 4월부터 2006년 1월까지 알레르기 질환으로 인해 삼성서울병원 알레르기 센터를 방문하여 CAP assay 결과 대두에 양성으로 판정된 소아 환자 16명을 대상으로 ELISA를 이용하여 품종별 알레르기성을 조사 하였다. 16명의 환자별 IgE 수준은 품종 간에 의미 있는 차이가 나지 않았지만 수입산 Jack에서 다소 높은 IgE 값을 확인할 수 있었다.

다. 효소면역측정법에 의한 혈청 특이 IgE 항체 측정치를 비교하여 9명 환자를 대상으로 IgE immunoblot analysis를 수행하였다. 환자마다 혈청의 IgE와 반응하는 단백질 밴드간의 차이가 있었으나, 한 환자가 품종별 IgE와 반응하는 단백질 띠에는 차이를 보이지 않았다.

라. 품종별 immunoblot을 시행한 대두에 양성 반응을 보인 환자 9명을 대상으

로 여러 다른 식품에 대한 특이 IgE 항체의 상관성을 측정한 결과 혈청 IgE는 여러 다른 식품에서도 강한 양의 상관관계를 나타내는 것을 확인하였다.

마. 국내산 대두와 단일 발효물 그리고 복합 발효물의 조항원은 12% SDS-PAGE 상에서 그 단백질 밴드의 분포가 상이한 차이를 보이며, 발효시키지 않은 정상군의 콩은 10 kDa에서 100 kDa까지 광범위한 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 반면, 단일 발효물과 단백질들은 모두 15 kDa 이하, 그리고 복합 발효물의 단백질들은 10 kDa 이하로 분해된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 복합종균으로 발효시킨 대두의 단백질들이 단일 종균보다 단백질 분해가 높음을 확인할 수 있었다.

바. 발효시키지 않은 정상대두에서는 환자마다 혈청의 IgE와 반응하는 단백질 밴드의 차이가 확인되었다. 그러나, 단일 발효물과 복합 발효물에서는 혈청 IgE와의 반응성에서 많은 차이를 보였다. 복합 발효물보다 단일 발효물에서 강한 IgE 반응성을 확인할 수 있었다. 따라서 단일 발효물보다 복합 발효물의 알레르기성이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. Multi-step 발효시스템을 응용하여 다른 난분해성 폐자원을 분해시켜 산업적 활용
2. 최적발효시스템으로 발효시킨 대두 성분을 추출하여 설사증 자돈용 영양제 개발
3. 고기능성 자돈 영양 사료를 축산농가에 보급 및 활용
4. 식물유래 기능성 발효 자돈 영양사료를 통한 고품질의 돈육 생산
5. 기능성 물질을 분리·정제하여 건강보조식품 및 의약품으로 개발
6. 얻어진 고부가가치의 사료 결과를 산업화 및 축산농가에 이전
7. 신 발효기술을 토대로 신규 벤처 기업 창업 후 이전

SUMMARY

I. Title

Development of soybean weaning of piglets using new fermenting method

II. Research Objectives and Necessity

Multi-step ferments were fermented by lactic acid bacteria, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* that was improved as a safety microorganism in food. It is not only activating the immune system by hydrolysis enzymes, primary and secondary metabolites and bacterial substances, but also restraining intestinal growth of hazardous bacteria such as *E. coli* and *Salmonella*, which cause a diarrhea remedy, by natural antibiosis of bacteriocin, diacetyl and lactic acid. As a result, it is expected to prevent and treat diseases in pigs.

The soybean ferments efficiently separated by multi-step fermentation system contained various highly functional materials. We will be improving competitiveness of stock farm products in Korea by production of high quality pork due to superior digestive activity and absorbing power of vegetable proteins.

In this study, we performed to produce high- functional pigs feeds by multi-step ferments using the methods to decrease mortality rate of pigs.

We will get a line of functionality of food allergies and determinate antigenicity substances of soybean according to cultivars by immunoassay analysis of unknown cause of diarrhea suckling pigs's serum and proteins that causes allergies to human body.

Antigenic protein is divided into less than 10kD peptides, limited to this size by multi-step. It makes it easy to absorb into the intestinal tract by

basically removing its antigenicity and simultaneously producing a considerable amount of functional peptides. In this respect, the final aim of this project, remarkably, is to decrease the mortality of pigs, and to reduce economic damages for raisers of livestock.

III. Research Scope and Contents

1. Fermentation development for efficient digestion degradation of soybean, vegetable high-protein resources.

1) Screening of producing-microorganism for optimum fermentation system

① Classification and selection of soybean by allergic character

② Isolation of useful bacteria from safety guaranteed traditional fermentation food

③ Isolation of lactic acid bacteria that is independent in soybean and, natural anti-microbial production was excellent

④ Isolation of *Aspergillus oryzae* having the natural anti-microbial compatibility, powerful resolvability of protein, sugar and fat so on, and high productivity of GABA

⑤ Isolation of bacillus subtilis with the loss of bad smell production such as ammonia, high production of various protease, fibrinolytic enzyme, polyglutamic acid and fructan.

2) A comparison and establishment of single and multi-step fermentation system

① Production of soy bean fermentation using single strains

② Production of soy bean fermentation using multi strains

③ Characteristic comparison between ①and②

④ Study on fermentation conditions and isolation of GABA producing strains

⑤ Fusion condition establishment of functional metabolites by multi-step

fermented production

⑥ Condition studies in production and maintenance of GABA secondary metabolites by *Aspergillus oryzae* fermented

⑦ Fermentation establishment of maximum viscous substance product *Bacillus subtilis*

⑧ Fermentation improvement of GABA for maximum product and safety of product GABA in multi-step fermented system

⑨ Establishment of efficient multi-step fermentation system and optimum fermentation processing

3) Mass production and efficient storage condition development of high quality functional fermented pig feed by multi-step fermentation system

① Establishment of mass production processing to functional multi-step fermented products

② Establishment of the time and the mixing plan with other ingredients

③ Development of drying methods for energy saving of high quality of functional multi-step fermented pig feed

④ Development of long storage condition on high quality of functional multi-step fermented pig feed

2. Molecular mechanism studies of physiological activity effect in feed

1) Comparison between anti-inflammatory effects and isolation of functional compounds

in soybean and commercial fermented soybean

① Establishment of isolation and purification processing of functional peptides

② Comparison study on functional peptides of soy bean and commercial fermented soybean

③ Cytotoxicity on functional peptides by treatment of inflammatory material

④ Effects of functional peptides on expression of cyclooxygenase pathway-related genes

⑤ Effects of functional peptides on expression of NF- κ B-related genes

2) Cytotoxicity protects mechanism studies of β -amyloid in glial cell

① Effects of β -amyloid and functional peptides on growth of glial cell

② Effects of functional peptides on expression of cell cycle-related genes in glial cell

③ Effects of functional peptides on expression of apoptosis-related genes in glial cell

④ Effects of functional peptides on cytotoxicity of β -amyloid

⑤ Comparison study on the effects of β -amyloid and functional peptides on expression of cell cycle-related genes

⑥ Comparison study on the effects of β -amyloid and functional peptides on expression of apoptosis-related genes

3) Anti-cancer and immunostimulating effects of functional physiological activity compound

① Effects of peptides in human brain tumor cell growth

② Effects of peptides in gene expression by cell cycle disturbance

③ Identification of brain tumor cell differentiation by peptides

④ Apoptosis mechanism studies of brain tumor cell by peptides

⑤ The role of peptides in immunity related gene expression in vitro

⑥ Immunity studies of peptides in experiment animals

3. Investigation of Nutritional and Pathological Effects on the Piglets fedb with Multi-step Fermented Product.

1) Study on the nutritional effect of piglets fed with Multi-step fermented product

① Comparison study on body weight gain in piglets fed with Multi-step fermented product

② Comparison study on outbreak of diarrhoea in piglets fed with Multi-step fermented product

③ Comparison study on the hematological difference in piglets fed with

Multi-step fermented product

2) Study on the diarrhoea prevention effect of Multi-step fermented product in Piglets

- ① Comparison of diarrhea prevention effect of multi-step fermented products and commercial pigs feed
- ② Effects of multi-step fermented products and commercial pigs feeds infected with E. coli.
- ③ Effects of multi-step fermented products and commercial pigs feeds infected with Salmonella.

3) Study on the productivity of Multi-step fermented product in pigs.

- ① Evaluation of meat quality in Pigs fed with Multi-step fermented product
- ② Evaluation of carcass check in slaughter-house on Pigs fed with Multi-step fermented product
- ③ Establishment of adequate ratio for addition of Multi-step fermented product in Pigs' feeds

4. Soybean allergenic analysis according to fermentation systems

1) Allergenic comparison of soybean according to cultivars

- ① Allergenic comparative analysis of the imported and domestic soybean according to cultivars
- ② Investigation and collection about animal allergy occurrence by foods(soybean)
- ③ Acquisition of Human and animal serum as a cause of soybean allergenic reaction

2) Allergenic analysis of fermentation system products

- ① Allergenic analysis of soybean fermentation products using single germs
- ② Allergenic analysis of Multi-step system products using composite germs
- ③ Allergenic analysis of a optimum fermentation system

IV. Research Results and Applications

1. Research Results

1) Development of efficient new fermenting method of soybean

○ On safety guaranteed traditional foods like cheese, yogurt, ham, bacon and so on, we isolated useful bacteria. Also we isolated lactic acid bacteria of excellent independence in soybean and nisin production.

○ Isolation of *Aspergillus oryzae* having the natural anti-microbial compatibility, powerful resolvability of protein, sugar and fat so on, high production of GABA. And Isolation of *Bacillus subtilis* without bad smell production such as ammonia and with high production of various protease, fibrinolytic enzyme, polyglutamic acid and fluctan.

○ Isolated lactic acid bacteria, *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* were used for the single and complex fermented manufactures of soybean, and we investigated optimum multi-step fermentation conditions.

○ We developed optimum fermentation processing of multi-step fermentation system by change of compounds contents in single-step and multi-step ferments.

○ For establishment mass production processing of functional multi-step ferments, we developed attribute multi-step fermentation method.

○ We developed optimum fermentation processing of attribute multi-step fermentation method by comparisons of compounds contents in multi-step ferments and attribute multi-step ferments.

○ We established storage methods of mass pigs' feeds according to drying

methods by confirmation of the nutrition ingredient change while storing of ferments produced by optimum attribute multi-step fermentation processing.

2) Molecular mechanism studies of physiological activity effect in feed

○ Genistein could inhibit the cell growth in a dose-dependent manner, which was associated with dendrite-like morphological change and apoptotic cell death. The present results suggest that genistein has divergent biological function, additional studies will be needed to evaluate the molecular mechanisms of the interaction between genistein and other agents.

○ Genistein significantly inhibited the cell growth and induced morphological changes, and induced the G2/M arrest of the cell cycle in both T24 and U937 cells with a relatively stronger cytotoxicity in U937. These data suggests that genistein may exert a strong anticancer effect and additional studies will be needed to evaluate the different mechanisms between T24 and U937 cells.

○ We investigated the effect of genistein on apoptosis of AGS human gastric carcinoma and SK-MEL-2 melanoma cells. Genistein treatment resulted in the inhibition of cell proliferation in a concentration-dependent manner. These findings partially provide novel insights into the possible molecular mechanism of the anti-cancer activity of genistein.

○ Caspase-3 is a key regulator of apoptosis in response to combined genistein and TRAIL in human gastric adenocarcinoma AGS cells through the activation of death receptors and mitochondrial dysfunction.

○ We examined the effects of the fermented soybeans by *Bacillus subtilis* (FSB) and the novel three-step fermented soybeans (TFS) on the expression and activity of COX-2 in human leukemic U937 cell model. Treatment of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) significantly induced pro-inflammatory mediators such as COX-2 expression and prostaglandin E₂

(PGE₂) production, whereas the levels of COX-1 remained unchanged. These findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-inflammatory activity of FSB and TFS.

○ We investigated the effects of linoleic acid (LA), a polyunsaturated fatty acid found in most vegetable oils and certain food products, on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. The present results indicate that the Fas/FasL pathway might be involved in LA-induced apoptosis of AGS cells.

3) Investigation of Nutritional and Pathological Effects on the Piglets fed with Multi-step Fermented Product.

○ In studies on nutritional effect of Multi-step fermented product in piglets, the body weight gain of piglets was highest in the Multi-step fermented products that 10% feed was added, compared with Multi-step fermented product 5%, 2.5% added, and not added with feed. Also feed efficacy was highest, compared with Multi-step fermented product 5%, 2.5% added and not added with feed. Comparison study on outbreak of diarrhoea and hematological difference was not found specifically in data.

○ Investigation of diarrhoea prevention effect was used to the 4 Piglets infected with *Salmonella*. The *Salmonella* bacterial number was decreased in feces of piglets fed with Multi-step fermented product.

○ We did the comparative analysis for the meat qualities between pork fed Multi-step fermented product and a control. The crude fat, flavorful amino acid, sweet taste amino acid and total amino acid value were rich than a control. And pH, lightness, unsaturated fatty acid, essential fatty acid, ratio of unsaturated fatty acid / saturated fatty acid, ratio of essential fatty acid / unsaturated fatty acid, omega-3 fatty acid, sensory score in fresh pork and cooked pork were higher than a control. And hardness, Brittleness, chewingness and saturated fatty acid were lower than a control. But porks

fed Multi-sep fermented product has a fault of cooking loss, meat shear force and fat shear force, omega-6 fatty acid, ratio of omega-6 / omega-3 fatty acid higher than a control. And moisture was of small quantity than a control.

In survey of carcass check for the disease lesion in slaughter-house was not significantly different.

4) Soybean allergenic analysis according to fermentation system

○ IgE levels of sera to soybean allergy patient treated by domestic soybean or imported soybean were detected by immunoblotting and ELISA. In IgE levels, treated domestic soybean and imported were not different.

○ Sera was obtained from 145 children patients suspected in food allergy diseases.

○ IgE reactivity of sera to soybean allergy patient treated by single fermented soybean was detected by immunoblotting. Treated single fermented soybean reduced IgE reactivity.

○ IgE reactivity of sera to soybean allergy patient treated by multi-step fermented soybean was detected by immunoblotting. Treated multi-step fermented soybean reduced IgE reactivity.

○ Allergy decrease was more effective in multi-step fermented soybean than in single fermented soybean.

2. Applications

○ Industrial application by fermenting different non-biodegradable waste materials in Multi-step fermentation system

○ Development of nutrients for diarrhea suckling pig using soybean component extracts fermented in optimum fermentation system

- Spreading high functional suckling pigs fed with nutritional feeds and application to livestock Farmhouses
- Production of high quality pork meat using functional fermented suckling pigs fed with nutritional feeds from plants
- Development of health supplement foods and medicines application by isolating and refining functional material
- Transfer to high value feed factory and livestock farm houses based on the obtained results
- As from foundation of venture on the basis of a new fermentation technology transfer

CONTENTS

Chapter 1. Summary of project	25
1-1. Necessity	25
1-2. Contents and objective	29
Chapter 2. Status of technical development inside and outside of nation ..	31
Chapter 3. Fermentation development for efficiently digestive degradation of soybean, vegetable high-protein resources.	34
3-1. Introduction	34
3-2. Materials and method	34
3-3. Screening of producing-microorganism for optimum fermentation system	38
3-4. A comparison and establishment of single and multi-step fermentation system	46
3-5. Mass production and efficient storage condition development of high quality functional fermented pig feed by multi-step fermentation system	61
Chapter 4. Molecular mechanism studies of physiological activity effect in feed	76
4-1. Introduction	76
4-2. Materials and method	76
4-3. Comparison of anti-inflammatory effects and isolation of functional compounds in soybean and commercial fermented soybean	83
4-4. Cytotoxicity protects mechanism studies of β -amyloid in glial cell	94
4-5. Anti-cancer and immunostimulating effects of functional physiological activity compound	112

Chapter 5. Investigation of Effects on Nutritional and Pathological to the Piglets fed Multi-step Fermented Product	130
5-1. Introduction	130
5-2. Materials and method	130
5-3. Study on the nutritional effect of Multi-step fermented product in piglets	138
5-4. Study on the diarrhoea prevention effect of Multi-step fermented product in Piglets	144
5-5. Study on the productivity of Multi-step fermented product in pigs	146
 Chapter 6. Soybean allergenic analysis according to fermentation systems	 164
6-1. Introduction	164
6-2. Materials and method	164
6-3. Allergenic comparison of soybean according cultivars	166
6-4. Allergenic analysis of fermentation system products	171
 Chapter 7. Research goals and contribution on related field	 176
 Chapter 8. Application plans of the results in this project	 180
 Chapter 9. Reference	 181

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	11
CONTENTS	21
목차	23
제 1 장 연구개발과제의 개요	25
제 1 절 연구개발의 필요성	25
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	29
제 2 장 국내의 기술개발 현황	31
제 3 장 대두의 효율적인 신발효기법 개발	34
제 1 절 서 론	34
제 2 절 재료 및 방법	34
제 3 절 최적 발효시스템 구축을 위한 유용균주 screening	38
제 4 절 단일 및 multi-step 발효시스템의 확립 및 비교	46
제 5 절 Multi-step 발효시스템에 의한 고품질 기능성 발효 자돈 사료의 대량 생산 공정 및 발효물의 효율적인 저장조건 개발	61
제 4 장 사료의 생리활성 효능에 관한 분자생물학적 기전 해석	76
제 1 절 서 론	76
제 2 절 재료 및 방법	76
제 3 절 대두 및 시판 발효 대두 중의 기능성 peptide의 분리 및 항염증성 효능 비교	83
제 4 절 신경교세포에서 β -amyloid에 의한 세포독성 보호 기전 해석	94
제 5 절 발효물 유래 기능성 peptide의 항암/면역증강 효능에 관한 연구	112

제 5 장 Piglet에의 식이에 의한 영양·병리학적 효능 평가	130
제 1 절 서 론	130
제 2 절 재료 및 방법	130
제 3 절 Multi-step 발효영양사료 급여 piglet의 영양학적 효과	138
제 4 절 Piglet의 설사증에 의한 사망을 저감 효과 검토	144
제 5 절 Multi-step 발효사료 급여 돼지의 생산량 조사	146
제 6 장 발효 시스템에 따른 대두 알레르기성 분석	164
제 1 절 서 론	164
제 2 절 재료 및 방법	164
제 3 절 대두의 품종별 알레르기성 비교	166
제 4 절 발효시스템 산물의 알레르기성 분석	171
제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	176
제 8 장 연구개발결과의 활용계획	180
제 9 장 참고문헌	181

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

양돈 사료에 널리 이용되는 대두에는 다량의 단백질이 함유되어 있어 보리, 옥수수, 밀 등에 부족한 아미노산이나 질소성분을 보급해주는 중요한 역할을 한다. 그러나 대두 중에는 단백질 분해를 방해하는 trypsin inhibitor와 난분해성인 phytate, stachyose, galactomannan, α -galactosides 등의 항영양성 인자가 다수 함유되어 있어 영양학적인 효율이 그다지 높지 않다. 단일 위장 가축의 경우 이들 다당류를 분해하는 효소가 충분하지 못하여 위장을 통과한 후 장에 도달한 후 일부 균에 의해 분해되므로 장내 균총의 급격한 변화가 유발되어 대장균, 살모넬라 등 세균성 설사증이 일어나게 된다. 또한 이유기의 어린 동물의 경우 소화기관의 발달 미숙으로 통과된 알레르기성 단백질에 감작되어 알레르기성 설사증으로 설사, 성장장애가 일어나고 심한 경우 사망하는 개체가 생겨 축산 농가에 심각한 정신적, 경제적인 피해를 유발하고 있다. 항영양성 인자에 의한 사료 효율 저하를 최소화하기 위해 cellulase, galactanase, mannanase, pectinase, galactanase, phytase 등 고가의 효소제품을 인위적으로 가축사료에 첨가하고 있으나 균일한 배합, 저장 중 효소역가의 저하, 사료가격상승 등의 문제점이 지적되고 있다. 본 연구에서는 유산균, 황국균, 고초균 등의 안전한 식품용 미생물로 대두 중의 난 소화성 물질까지도 효율적으로 분해시킨 multi-step 대두 발효물을 자돈 영양사료화하여 고부가가치의 사료산업 및 축산 농가를 활성화함으로써 경제적 효과를 극대화할 수 있다.

항영양성 인자에 의한 사료효율저하를 최소화하기 위해 고가의 효소류를 가축 사료에 인위적으로 첨가하고 있으나 균일한 배합, 저장 중 효소역가의 저하 등의 문제점이 있으므로 효소를 첨가하는 것보다는 사료의 단백질원인 대두를 발효시킴으로써 항영양물질을 분해시키는 효소를 자연스럽게 첨가하여 경제적 효과가 증대될 것으로 생각된다.

이유를 끝낸 자돈은 장관의 발달 미숙으로 소화능과 선택적 흡수능이 낮은 반면 정상 발육을 위해 다량의 영양분을 필요로 하므로 자돈에게는 대두 중의 단백질, 다당체, 전분 등을 아미노산, peptide, monosaccharide의 형태로 충분히 발효시킨 분해사료를 섭취시키는 것이 건강유지에 더욱 효과적이다.

자돈의 설사예방을 위해 가축 사료에 소량 첨가하는 항생제가 최종 섭취자인

인체에 항생제 내성을 일으켜 심각한 의료상의 문제를 야기하므로 사회적 문제점으로 지적받고 있다. 따라서 천연항균제를 생산하는 생균제(probiotics)는 다른 사료 첨가제나 항생제의 부작용이란 공포감을 해소해줄 수 있는 안전한 대체제로서 세계적으로 널리 이용되고 있고 게다가 유산균, 황국균과 고초균은 옛날부터 전통 발효식품제조에 애용되고 있어 인축에게 전혀 해가 없는 유익한 균종이며 그 발효산물인 김치(국물), 누룩, 메주 등은 소화제 등의 보조 의료식으로 널리 이용되고 있다.

사료에 영양제, 항생제, 항균물질 등의 인위적 투여를 억제하고 발효물 형태로 가공함으로써 소화율을 향상시켜 설사로 인한 자돈의 폐사를 예방하고 생존율을 높이기 위해서는 multi-step시스템에 의한 기능성 대두 발효물을 사용한 고영양 기능성 사료 생산 공정을 연구 개발하고 관련분야의 국가 경쟁력을 향상시킬 할 필요가 있다.

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

첫째, 대두의 새로운 발효법(multi-step 발효시스템)의 개발이 필요하다.

1) 대두발효식품은 단순 가공품보다 소화율이 높을 뿐만 아니라 발효 시 관여하는 미생물 유래의 각종 효소들과 발효과정 중 생성된 기능성 1, 2차 대사산물이 다량 함유되어 그 우수성이 널리 보고되어 있다.

2) 현재 통용되는 대두 발효법은 단일 종균(고초균 또는 황국균)만으로 발효시키는 방법으로 다량의 항영양물질(phytate, galactomannan, α -galactosides 등)이 분해되지 않은 상태로 잔존하여 소화율과 에너지 이용율이 낮고 자돈 설사의 원인이 되므로 효율적인 발효법을 개발할 필요가 있다.

3) 일본의 대두 발효업계는 꾸준히 독특한 기술 개발로 미국, 캐나다, 유럽 등지에 수출 또는 현지 생산공장 설립 등으로 세계시장을 넓혀가고 있으나 우리나라는 그런 노력이 부족한 실정임.

4) 국제 경쟁력과 시장의 확대, 소비증대 및 국민 건강 증진을 위해 뇌기능 증진 효과, 면역증강 등의 기능성이 있는 대두 발효물의 개발이 필요하다.

둘째, 발효대두를 첨가한 양돈 사료의 개발이 필요하다.

- 1) 다른 식물성 사료원료에 비해 그 영양학적 가치가 높은 대두는 양돈사료의 주요한 단백질 공급원으로서 옥수수과 함께 널리 사용되고 있다.
- 2) 사료에 첨가되는 미가공 대두는 난분해성 물질 함량이 높아 소화·흡수가 용이한 형태로 분해 후 사료화해야 귀중한 자원손실과 피틴산 중의 phosphorus에 의한 환경오염을 막을 수 있다.
- 3) 대장균 설사증(Colibactillosis)과 살모넬라 감염증으로 인한 돼지의 치사율을 감소시키고 항생제 첨가량이 적은 고영양 자돈 사료의 개발이 절실하다.
- 4) 축산 농가의 수입을 향상시키기 위해 자돈 설사증으로 인한 피해를 최소화하고 자돈의 생육을 촉진하는 기능성 발효대두 첨가 양돈 사료의 개발이 필요하다.

이러한 문제점을 해결해야 할 연구의 필요성을 아래와 같이 요약 정리할 수 있다.

○ 대두 중의 단백질, 다당류, 피틴산 등을 효율적으로 분해시킬 수 있는 최적의 발효시스템을 개발하고 버기능 증진, 면역부활 등의 기능성 물질의 최적 생산 조건을 고려한 발효시스템을 확립하고 기능성 물질을 확인하고 첨가 사료의 안전한 저장조건 등을 설정하여 고영양 기능성 자돈사료 formulation화.

○ 자돈의 장내균총 변화 최소화, 설사증 발생빈도 저하, 소화율을 향상 등의 목적을 충족시킬 수 있는 발효대두 첨가한 사료를 개발하고 그 효능을 본 연구를 통해 과학적으로 입증하여 고영양·고기능성의 발효 자돈 영양 사료를 개발함으로써 고품질의 돈육을 생산할 수 있을 것이다.

나. 경제·산업적 측면

□ 기능성의 발효 자돈 영양 사료의 개발로 다음과 같은 경제·산업적인 효과를 얻을 수 있다.

○ 대두를 안전한 식품용 미생물인 황국균으로 발효시켜 생산된 phytase가 난분해성 phytic acid를 분해시키면 phytate와 결합형으로 존재하여 장내로 흡수가 불가능했던 미네랄성분(칼슘, 아연, 철, 마그네슘 등)도 유리형의 미네랄로 분해되므로 인위적으로 값비싼 미네랄염을 보강하지 않고 사료성분에 함유된 양만으로도 충분히 공급가능하고 항생제나 항균물질을 첨가하지 않더라도 발효물 자체에 함유된 유용균이 생균제 역할을 하므로 사료생산의 원가를 절감할 수 있다.

○ 자돈에게 신 시스템으로 잘 분해된 고기능 사료를 섭취시키면 대두단백질이 용이하게 소화·흡수되므로 증체율이 향상되어 사료효율을 극대화할 수 있고 고품질의 돈육을 생산할 수 있다.

○ 저분자 대두 발효물이 자돈의 생체 면역 능력을 최대로 활성화하여 PMWS를 예방하거나 치료에 도움이 되고 질병으로 인한 자돈의 사망을 방지하므로 축산 농가의 수입을 증대시킬 수 있다.

○ Multi-step 발효시스템으로 가공한 대두발효물로 제조한 고기능성 발효 자돈 영양사료를 유럽, 미국 등지로 수출함으로써 원료대비 고부가가치 사료 산업의 활성화 및 수출확대로 경제적 파급 효과를 기대할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

□ 기능성의 발효 자돈 영양 사료의 개발로 다음과 같은 사회·문화적인 효과를 얻을 수 있다.

○ 뇌기능 증진 효과, 면역체계의 활성화 등의 생리 활성 효과가 높은 기능성 발효 자돈 영양사료를 투여함으로써 웰빙시대에 발맞춰 고품질의 건강한 돈육 제품을 공급하여 국민건강 증진에 기여한다.

○ 자돈의 주검을 처리할 필요가 없으며 콩 중의 피틴산이 분해되어 인이 유리되어 이용되므로 환경오염을 줄일 수 있어 양돈업자의 정신적 안정에 도움이 될 것으로 사료된다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

Multi-step 발효시스템으로 가공한 대두발효물을 첨가한 고기능성 자돈 영양사료를 생산함으로써 축산농가의 난제 중의 하나인 이유기 자돈 사망률을 낮출 수 있다.

곡류를 주성분으로 하는 사료에 부족한 아미노산을 보충하기 위해 식물성 고단백질원인 대두원료를 자돈사료의 경우 약 20% 까지 첨가하고 있다. 대두 중에는 단백질의 소화 및 분해를 방해하는 물질(trypsin inhibitor)과 가열 처리나 미생물 발효시 분해되지 않아 장내 미생물 균총을 파괴하는 stachyose 등의 다당류가 다량 함유되어 있다. 이런 난분해성 대두를 복수 균종을 이용한 정상 발효시스템으로 가공하면 고분자 영양물질이 소화흡수가 용이한 저분자 물질로 분해되고 발효 미생물의 작용으로 일부 기능성 peptide가 생성됨으로써 고영양성 자돈 사료 원료로 이용하고자 한다.

장내 정상 균총의 파괴로 인해 발생하는 미생물성 설사증 이외에도 사료 중의 food allergen에 기인한 알레르기성 설사증도 발생할 것으로 추측되지만 아직 식품알레르기에 의한 자돈 설사증에 관한 정확한 보고가 없다. 본 연구진은 사람의 식품 알레르기 연구경험이 많은 전문가를 위탁연구자로 구성하여 원인 불명 설사증 자돈의 혈청을 인체에 알레르기를 유발하는 단백질(항원: *Gly m Bd 28K*, *Gly m Bd 30K* 등)과 면역학적으로 분석함으로써 식품알레르기의 가능성 규명과 대두의 품종에 따른 항원성 물질의 정량하고자 한다. Multi-step 발효시스템으로 항원성 단백질의 한계 크기인 10kD 이하 펩타이드로 분해함으로써 항원성을 원천적으로 제거하여 장관흡수가 용이한 형태로 분해됨과 동시에 기능성 펩타이드도 생성되어 자돈 사망률을 현저히 감소시키고 축산 농가의 경제적 손실을 절감시키는 것이 본 연구의 최종 목표이다.

○ 이러한 목표를 달성하기 위해서 다음과 같은 연구를 수행할 것이다.

- ① 최적 발효 시스템을 위한 발효 종균의 선발
- ② Multi-step 발효 시스템의 구축
- ③ 국산 대두 품종별 항원성 조사
- ④ Multi-step 발효대두의 항원성 비교 조사
- ⑤ 대두 알레르겐에 의한 자돈 장염유발 가능성 확인
- ⑥ 사람과 돼지 알레르기성 장염 유발 물질의 비교

- ⑦ Multi-step 대두 발효물로부터의 기능성 peptide의 분리 및 후보 peptides의 선정
- ⑧ 후보 peptides의 항염증, 뇌세포 기능 향진, 항암 및 면역활성 여부 조사
- ⑨ Multi-step 발효물 첨가 기능성 자돈식의 개발
- ⑩ Piglet 투여 후 영양학적·병리학적 효과 조사
- ⑪ 항염증성 펩타이드의 작용기전 해명

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

최근 유럽을 비롯한 미국, 캐나다 그리고 일본 등에서 문제시되고 있는 소해면상뇌증(일명 광우병)을 비롯하여 사슴의 CWD(만성소모성질병)와 양의 스크래피와 같은 프리온 질병이 알려지기 시작한 이후 곡류는 동물의 사료로 사용하고 인간은 육류를 섭취한다는 관념이 팽대되어 있다. 한국, 일본 등과 같이 대두 등의 식물성 소재를 생체에 안전한 미생물로 발효시켜 소화율을 높여 식용하지 않아 이러한 식품의 개발이 미비한 서구에서는 이 분야의 관련 기술이 낙후되어 있는 실정이며 국내에도 알레르기를 유발할 수 있는 대두단백질의 완전한 분해법에 대한 기술은 알려져 있지 않다.

낙농사료는 국내생산이 미비하고, 주로 수입에 의존하고 있는 실정으므로, 고가로 판매되어 낙농가들이 어려움을 겪고 있다. 이에 따라 양돈사료 업체는 2005년 7월 친환경 고품질의 저단가 사료인 TMR(자연 고급 부산물 혼합사료)를 개발하여 경제 불황의 어려움 속에서도 낙농가들의 경영비를 크게 절감하여 농가소득을 증대시켜 화제가 되었으며, 다른 양돈사료 업체들도 이에 부응하기 위한 친환경 양돈사료 출시를 준비하고 있다.

국내에서는 2005년 2월부터 시행된 농장의 악취방지법 시행에 따라 각 사료회사별 대응방안 수립의 일환으로, 해외 기술제휴를 통한 친환경 관련 사료개발에 초점을 두어 환경 및 악취 저감을 고려한 사료 제품 개발이 진행 중이다. 국내 여러 양돈사료 회사들은 성장단계에 맞는 영양소 요구량을 설정하고 소화율을 높여줘 배설량을 줄일 수 있는 사료 개발에 주력하고 있으며, 첨가제를 통해 악취를 저감할 수 있는 방안도 모색하고 있다.

돼지가 섭취하는 사료 중 영양소는 사실상 100% 흡수·이용이 불가능하다. 돼지의 사료 중 아미노산 소화율이 60~90%로 비교적 높은 편이나, 인 소화율은 20~70%로 낮거나 폭이 매우 크며, 구리와 아연 같은 광물질 소화율은 5~45%에 불과하고 한다. 따라서 돼지의 배설물은 섭취한 사료와 밀접한 관련을 갖고 있음은 물론 분뇨 발생량과 악취 발생에 대한 잠재성을 가지고 있음을 알 수 있다.

과거에는 사료 효율, 생산성 개선을 목적으로 사용하여 왔으나 현재는 질소와

인 배설량 즉, 친환경 사료배합을 통하여 양돈 분뇨와 악취로 인한 환경 부담을 줄이기 위하여 효소제, 효모와 생균제 및 항생제 등과 같은 각종 물질들을 사용하고 있는 추세이고 양돈장 발생 악취조절 전략 중 가장 바람직한 방법이 영양학적 조절 즉 사료의 단백질량을 낮추고 합성 아미노산 첨가하는 방안이라는 견해도 있다. 이 방법에 의해 악취 발산은 70%까지, 질소와 인의 배설량은 50%까지, 구리와 아연의 배설은 80%까지 저감할 수 있다.

현재 일반적인 사료 급여 체계에 따른 영양소 공급수준은 사양 표준에 비하여 공급되는 사료 중의 영양소가 과잉 상태이다. 그러나 돼지의 각 단계에 맞는 영양소 공급을 통해 사료비 절감뿐만 아니라 환경친화적 양돈 시스템을 위한 기본적인 접근이 필요하다.

따라서 돼지가 섭취한 사료 중의 영양소가 돼지가 요구하는 수준과 거의 일치하게 하는 사료 배합 및 급여가 필요하다. 아울러 사료 중 단백질의 소화와 이용 효율을 높이면 배설되는 분뇨의 양과 악취를 줄이는 것이 가능해질 것이다.

세계의 사료산업은 늘어나는 인구와 소득의 증대로 성장율이 높은 산업으로 특히, 개발도상국의 성장율은 연간 8~10%에 달하고 있다. 그러나 국내 낙농사료는 생산이 미비하고, 주로 수입에 의존하고 있어 고가에 판매되므로 낙농가들이 어려움을 겪고 있다. 이에 따라 양돈사료 업체는 2005년 7월 친환경 고품질의 저단가 사료인 TMR(자연 고급 부산물 혼합사료)를 개발하여 낙농가들의 경영비를 크게 절감하여 농가소득을 증대시켜 화제가 되었으며, 다른 양돈사료 업체들도 이에 부응하기 위한 친환경 양돈사료 출시를 준비하고 있다.

돼지의 영양소 이용률은 품종, 사료의 품질과 원료의 조성, 사료 섭취량, 사료내 영양소 수준 및 사육환경 등과 같은 많은 요인에 의해 영향을 받으며, 어떠한 조건에서도 섭취한 영양소를 100% 이용할 수 없다. 따라서, 사료의 영양소 이용율을 높이는 것이 사료비를 절감하는 방법이라고 할 수 있다. 돼지의 영양소 이용성을 높이기 위해서는 소화율이 높은 원료를 선정하는 것이 무엇보다 중요하다. 한 가지 고려해야 할 점은 사료의 동일한 원료 간에도 전처리 및 가공방법에 따라 영양소의 이용성이 큰 차이를 나타낸다는 것이다. 원료사료의 전처리 및 가공방법을 개선하여 소화율을 높이는 것이 사료비 절감 및 돼지의 품질향상에 가장 적합할 것이다.

또한, 악취 및 배설물 중의 질소·인 등 오염물질을 감소시킬 수 있는 친환경 사료배합을 위한 효소제(enzymes), 효모제(yeast) 및 생균제(probiotics)와 같은 사료용 첨가제가

많이 개발 보급되고 있다. 이들은 특이적 기질에 작용하여 생체반응을 촉진시키고, 돼지 체내에서 단백질, 지방, 탄수화물, 광물질 등의 소화작용을 촉진시키며, 체내의 대사과정 활성화에 의한 생산성을 향상시키며 소화율을 향상시킨다는 연구결과를 제시하고 있어 산업현장에 활발히 적용됨은 물론 오염물질 저감 효과도 기대하고 있다. 그리고 식물체 내의 인은 피틴태인 상태로 존재하여 돼지의 내생효소에 의해 가수 분해되지 않기 때문에 이에 대한 대응기술로 phytase를 첨가하여 줌으로서 인의 이용성 증진과 배설량 감소를 기대하고 있어 국내외적으로 많은 관심을 모으고 있으며 특히 유럽에서는 상용화 추세이다.

미국 사우스다코타 주립대학 한스 스테인 박사는 '2004 국제 양돈 심포지엄'의 '양돈사료 내항생제 대체 전략'이란 주제 발표를 통해 이같이 밝히고 항생제를 줄이기 위해서는 사료 성분의 배합비가 고려돼야 한다고 주장하였다. 한스 박사는 일반적으로 합성아미노산으로 만들어진 저단백질 사료는 고단백질 사료보다 소화 문제를 줄이는 결과를 나타냈으며 자돈의 경우 이유 후 설사나 소화기관 이상을 예방하기 위해 저단백질 사료를 급여하게 되면 이유 이후 설사를 일으킬 확률이 낮다고 강조하고 사료에 항생제가 첨가되지 않는다면 저단백질 사료를 급여하는 방법이 효과적이라고 역설하였다. 축·수산업자들은 항생제가 섞인 사료를 먹이면 몸 속의 유해한 균을 죽여 질병을 예방하고 결과적으로 성장도 촉진된다고 여긴다. 하지만 사료에 섞는 항생제 상당수는 이미 내성이 생겨 질병 예방 목적을 달성하기는 힘들다. 단적으로 축·수산업에서 가장 많이 쓰이고 있는 테트라사이클린계 항생제는 내성률이 80% 이상이나 돼 사실상 사용 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 항생제 사용이 규제를 받음으로써 돼지를 효율적으로 사육할 수 있도록 사료의 영양수준이 강화되고 면역 증강 물질, 항암물질의 함량을 향상시킬 수 있는 방법이 요구된다.

제 3 장 대두의 효율적인 신발효기법 개발

제 1 절 서 론

양돈 사료에 널리 이용되는 대두에는 다량의 단백질이 함유되어 있어 보리, 옥수수, 밀 등에 부족한 아미노산이나 질소성분을 보급해주는 중요한 역할을 한다. 그러나 대두 중에는 단백질을 분해를 방해하는 trypsin inhibitor와 난분해성인 phytate, stachyose, galactomannan, α -galactosides 등의 항영양성 인자가 다수 함유되어 있어 영양학적인 효율이 그다지 높지 않다. 단일 위장 가축의 경우 이들 다당류를 분해하는 효소가 충분하지 못하여 위장을 통과한 후 장에 도달한 후 일부 균에 의해 분해되므로 장내 균총의 급격한 변화가 유발되어 대장균, 살모넬라 등 세균성 설사증이 일어나게 된다. 또한 이유기의 어린 동물의 경우 소화기관의 발달 미숙으로 통과된 알레르기성 단백질에 감작되어 알레르기성 설사증으로 설사, 성장장애가 일어나고 심한 경우 사망하는 개체가 생겨 축산 농가에 심각한 정신적, 경제적인 피해를 유발하고 있다. 항영양성 인자에 의한 사료효율저하를 최소화하기 위해 cellulase, galactanase, mannanase, pectinase, galactanase, phytase 등 고가의 효소제품을 인위적으로 가축사료에 첨가하고 있으나 균일한 배합, 저장 중 효소역가의 저하, 사료가격상승 등의 문제점이 지적되고 있다.

본 연구에서는 유산균, 황국균, 고초균 등의 안전한 식품용 미생물을 이용하여 대두 중의 난소화성 물질까지도 효율적으로 분해시킨 multi-step 대두 발효 시스템을 확립하고 multi-step 대두 발효물을 자돈 사료와 혼합하여 고기능성 영양 사료화함으로써 고부가가치의 사료산업 및 축산 농가를 활성화하여 경제적 효과를 극대화하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 발효 종균의 분리·선별

대두의 정상 발효를 유도하기 위해 항균성 물질을 생산하는 유산균을 선별하

였다. 박테리오신 생산 유산균 중 증자 대두에서 정상적으로 생육하면서 이미치취를 생성하지 않고 정상적으로 향균성 물질인 박테리오신을 생성하는 균주를 선별하였다. 황국균은 천연 향균제인 박테리오신에 친화성이 있으며 단백질, 당질, 지질 등의 분해능이 우수하며 GABA 생산력이 우수한 황국균을 선별하였다.

대두 발효시 생성되는 이미치취를 억제하고 대두의 분해능과 기능성 물질의 생산을 향상시키기 위해 된장에서 암모니아 등의 이미치취 생성능이 결실되어 있으며 각종 protease, fibrinolytic enzyme, polyglutamic acid와 fructan 생산능이 높은 균주를 선별하였다.

2. Bacteriocin(nisin) 생성능 측정

발효 대두 중의 bacteriocin(nisin)활성을 측정하기 위해 대두 5g을 0.02N HCL 45ml과 혼합 후 4℃에서 12시간 이상 진탕·용출하여 원심분리 후 상정액을 시료로 *Micrococcus luteus* KCCM 11905를 피검균주로 사용하여 agar well diffusion법으로 측정하였다.

3. Protease활성 측정

산성, 중성 및 알칼리성 protease 측정용 2% casein 기질 용액의 pH는 젖산 및 0.1N NaOH 용액으로 각각 3.0, 6.0 및 9.0을 조절하고 완충용액은 McIlvaine buffer와 Boric acid-Borex buffer(pH 9.0)를 사용하였다. 발효 대두 10g을 3차 증류수 100ml에 용해하여 4시간동안 용출시킨 후 여과지로 여과시킨 여액을 효소액으로 사용하였다.

각각의 완충용액에 2% casein 용액 1.5ml와 각 pH별 buffer 1.0 ml씩을 시험관에 넣은 다음 효소액 0.5ml을 넣고 40℃에서 60분간 반응시켰다.

반응 종료 후 0.4M Trichloroacetic acid(TCA)용액 3ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1ml에 0.4M Na₂CO₃ 용액 5ml과 5배 희석한 Folin-ciocalteu용액 1ml을 첨가하여 40℃에서 30분간 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 60분간 tyrosine 1μg을 생성하는 효소량으로 1unit로 하였다.

4. Fibrinolytic enzyme 활성 측정

혈전용해효소의 활성은 fibrin plate 법을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다. Fibrin plate는 0.06% fibrinogen을 0.01M PBS Buffer(pH 7.25)에 용해시킨 후 샤페에 10ml를 분주하고 thrombin 20unit를 가하여 균일한 두께의 fibrin clot을 형성시킨 후 실온에서 30분방치 후 혈전용해효소 활성 측정에 사용하였다. 발효시킨 대두 중의 혈전용해효소를 0.01M PBS buffer에 용출시킨 후 여과하여 여액을 조효소로 사용함. 활성 측정은 조효소액 20 μ l를 paper disc에 흡수시킨 후 제조한 fibrin plate에 올려 37 $^{\circ}$ C에서 4시간동안 반응 후 생성된 투명한 부위의 직경을 측정하였다.

5. 대두 발효

우선 대두를 수돗물로 2회 세척한 후 대두의 무게가 2.2배가 될 때까지 수침하여 1시간이상 물베기한 후 121 $^{\circ}$ C에서 가압증자하여 충분히 냉각된 대두에 선별된 종균을 접종하여 온도 수분등을 최적조건에서 발효시켰다.

6. 최적 발효조건 설정(온도, 습도, 통기량, 발효 시간 등)

선별 분리된 발효 종균의 특성과 기능성 물질 생산 등을 고려하여 대두 발효 온도와 습도 등을 설정하기 위해 대두 발효 중 샘플을 채취하여 각종 protease, fibrinolytic enzyme와 같은 효소 활성을 측정하고 GABA와 같은 기능성 물질의 최대 생산을 위해 황국균 발효 종료 후 호기.혐기조건에서 발효시간을 다양하게 함으로써 최적 조건을 설정하였다.

7. 항영양인자인 phytate의 측정

가. 시료 전처리

발효 대두를 건조하여 약 2g 정도 달아서, 125ml flask에 넣고 2.4% HCl 40ml를 첨가함. Flask를 막은 후 상온에서 자석 교반기로 3시간동안 혼합하여 whatman filter paper (No.1)로 여과한 여액을 냉장 보관하여 일주일 이내에 분석에 사용하였다.

나. phytate 함량 분석

먼저 0.5g resin(AGI-X4 resin)을 3차 증류수에 부유시켜 칼럼에 충전한 후 편

편한 resin bed에 차례대로 15ml의 0.7M NaCl과 3차 증류수 15ml를 흘려주어 칼럼을 준비하였다. 식품여과액 1ml과 Na₂EDTA-NaOH reagent 1ml을 섞고 3차 증류수로 25ml을 채운 뒤, 이를 준비된 칼럼에 흘린 후 15ml의 3차 증류수와 15ml 0.1M NaCl을 차례대로 흘려주고 0.7M NaCl 15ml로 phytate를 용출시켜 그 용출액을 받았다. 용출액 전량을 Kjeldahl flask에 옮겨 담고 8-10개 glass bead와 HNO₃ 3ml, H₂SO₄ 0.5ml을 넣고 분해시킨다. 바닥에 하얀 염이 생기면 반응을 끝냄. flask를 냉각한 후 염을 녹이기 위해 15ml 정도의 증류수를 넣고 55℃ 항온수조에 15분간 담가두었다. 염이 모두 녹으면 전량 50ml 정용 flask에 옮기고 molybdate solution 2ml과 sulfonic acid reagent 1ml을 넣고 50ml로 volume up한 후 30분간 발색반응을 시키고 640nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선에 대입하여 phytate 함량을 계산하였다.

다. 표준곡선 작성

80 µg/ml 용액을 만들어 각 단계별로 희석을 한 후 여기에 molybdate solution 2ml과 sulfonic acid reagent 1ml을 넣고 50ml로 volume up하고 잘 흔들어 준 후, 30분간 발색반응을 시켰다. 640nm에서 흡광도를 측정하였고, 각각의 농도와 흡광도로 표준곡선을 작성하였다.

8. 발효물의 유리아미노산 측정

발효 대두의 유리아미노산 함량은 일본 장류 시험법에 준하여 실험하였다. 발효 대두 50 g에 에틸 알콜을 150ml 가하여 균질화한 후 여과하였다. 이 여액을 감압농축하여 diethyl ether로 탈지시키고 3차 증류수를 첨가하여 50ml로 정용하여 엑스분으로 하였다. 유리 아미노산은 엑스분을 10ml 취하여 감압 농축하고 lithium citrate buffer(pH 2.2)로서 10ml로 정용하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

제 3 절 최적 발효시스템 구축을 위한 유용균주 screening

1. 전통 발효 식품에서의 대두 자화능과 천연항균제 생산능 우수 유산균 선별

가. 전통 발효 식품(치즈, 요구르트, 햄, 베이컨 등)에서의 유산균 분리

2005년 4월부터 6월까지 경남지역에서 시판 중인 육가공제품, 육가공제품 36건을 샘플링하여 증균 배양 후 생육한 총균수는 결과 1과 같다. 각각의 발효유제품을 현탁하여 배양한 것을 임의로 Ya~Ye, 육가공제품을 Ma~Mi, 치즈류는 Ca~Cv로 나타내었다. 결과 1에 나타난 바와 같이 발효유제품에서의 총균수 범위는 $2.0 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU/g, 육가공제품에서는 $2.0 \times 10^4 \sim 6.8 \times 10^9$ CFU/g와 치즈류에서는 $2.0 \times 10^2 \sim 8.3 \times 10^9$ CFU/g으로 나타났다. 샘플 시료 1g에 존재하는 총균수를 관찰한 결과, 육가공제품과 치즈류의 총균수는 거의 유사하게 나타났으나 발효유에서는 이보다 적은 양의 균이 관찰된 것은 유산균을 M17-GL에 증균 배양하였으므로 배지조성 중의 영양성분이 우유와 다르기 때문에 유도기가 길어질 것으로 추정된다.

1) Nisin 생성 유산균 선별

Plate counter agar에 도말하여 나타난 균들 중 배지 상에서 진한 우유색 광택을 가진 전형적인 콜로니 중 락토오스의 대부분을 유산으로 분해시킨 결과 pH가 낮아져 노란색의 콜로니를 형성하고 형태확장 gram 양성 구균으로 확인된 균주를 유산균으로 추정하여 agar well diffusion 방법으로 유산균의 nisin 생성능을 확인한 결과를 결과 2에 나타내었다. 유산균 집락을 선별하여 YA~YE, MA~MI, CA~CV로 임의로 정하였고, LL은 양성대조구로 사용한 nisin을 생성능이 있는 *Lc. lactis* 이다. 결과 2에서 보는 바와 같이 유제품, 식육가공 제품 유래의 36가지 균 중 nisin 민감 균주인 *M. luteus*의 생육을 저해하여 clear zone이 나타난 균이 11종이었다.

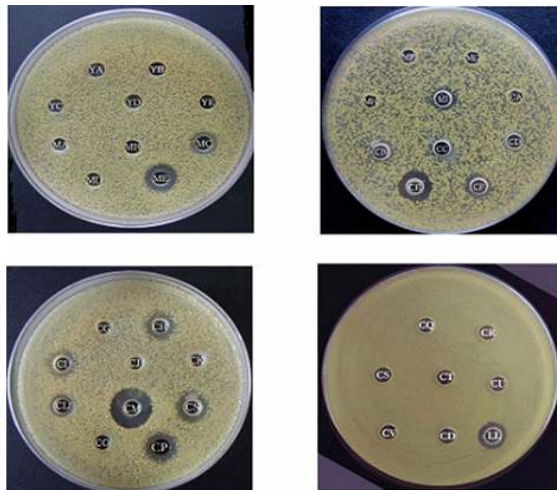
Agar well diffusion법으로 확인된 피검균주의 생육저해환 크기를 측정한 결과는 결과 3과 같다. 유산균 배양액 중의 nisin함량을 정확히 측정하기는 곤란하여 각 분리 균주 및 대조구의 상대적인 함량을 비교하였다. 치즈에서 분리된 CM균이 가장 넓은 clear zone을 형성한 점으로 미루어 양성 대조구로 사용된

*Lc. lactis*보다 nisin 생성능이 높고 발효유 유래 균인 YA~YE는 피검균인 *M. luteus*의 생육을 저해하지 않음으로 미루어 nisin 생성능이 없는 것으로 사료된다.

결과 1. 증균배양한 시판 유·육가공품의 총균수

(CFU/g)			
Sample*	Total colony count	Sample*	Total colony count
Ya	3.7×10^6	Ce	8.9×10^9
Yb	1.2×10^5	Cf	7.0×10^9
Yc	2.7×10^5	Cg	7.6×10^5
Yd	2.0×10^4	Ch	1.1×10^9
Ye	1.8×10^7	Ci	1.2×10^9
Ma	2.0×10^4	Cj	5.6×10^8
Mb	5.9×10^9	Ck	1.9×10^9
Mc	5.7×10^9	Cl	6.0×10^9
Md	2.5×10^9	Cm	2.8×10^9
Me	6.8×10^9	Cn	3.2×10^8
Mf	5.2×10^9	Co	4.4×10^6
Mg	1.0×10^9	Cp	8.0×10^2
Mh	4.1×10^9	Cq	2.0×10^2
Mi	6.0×10^9	Cr	3.0×10^6
Ca	5.7×10^9	Cs	1.2×10^9
Cb	4.0×10^7	Ct	7.9×10^9
Cc	5.4×10^9	Cu	8.3×10^9
Cd	5.2×10^9	Cv	6.4×10^6

* Ya ~ Ye : 시판 요구르트 제품
 Ma ~ Mi : 시판 육가공품 제품
 Ca ~ Cv : 시판 치즈 제품



결과 2. 시판 유·육가공품 유래 유산균의 nisin 생성균 확인

YA~YE : 요구르트에서 분리된 *Lactococcus* sp.의 삼징액
 MA~MI : 육가공품에서 분리된 *Lactococcus* sp.의 삼징액
 CA~CO : 치즈에서 분리된 *Lactococcus* sp.의 삼징액
 LL : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IFO 12007의 삼징액

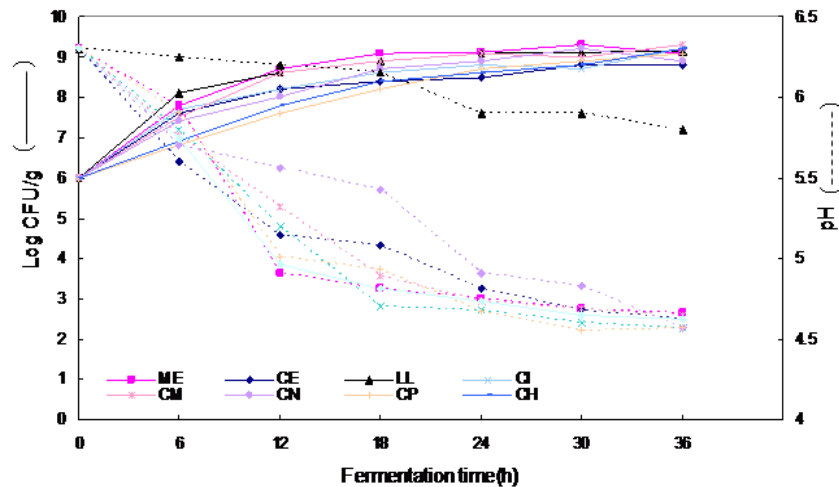
결과 3. 유·육가공품 유래의 nisin 생산균에 의한 *M. luteus* KCCM 11905의 생육저해능

Sample	MC*	ME	MI	CE	CF	CH
Diameter(mm)	9.44	13.40	9.45	12.06	9.56	11.40
Sample	CI	CL	CM	CN	CP	LL
Diameter(mm)	11.89	9.15	16.28	12.64	11.98	10.31

*See the below of Fig. 4

2) 증자 대두 중의 유산균 생육 특성

증자 대두 중 유산균의 경시적인 생육 및 pH 변화를 관찰하여 결과 4에 나타내었다. 분리된 nisin 생성균을 각각 증자 대두 1 g 당 10^6 CFU로 접종하여 30°C에서 배양한 결과 세 균주 모두 10^9 CFU/g까지 증식함을 알 수 있었다. 이 결과로 미루어 복잡한 영양요구성을 가진 유산균이 당류, 비타민, 아미노산 등을 별도로 첨가하지 않고도 증자 대두 중에서 정상적으로 생육가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 분리된 균주로 12시간 유산발효시킨 증자 대두의 pH는 4.9



결과 4. 증자대두에서 유산균의 생육에 따른 균수와 pH 변화

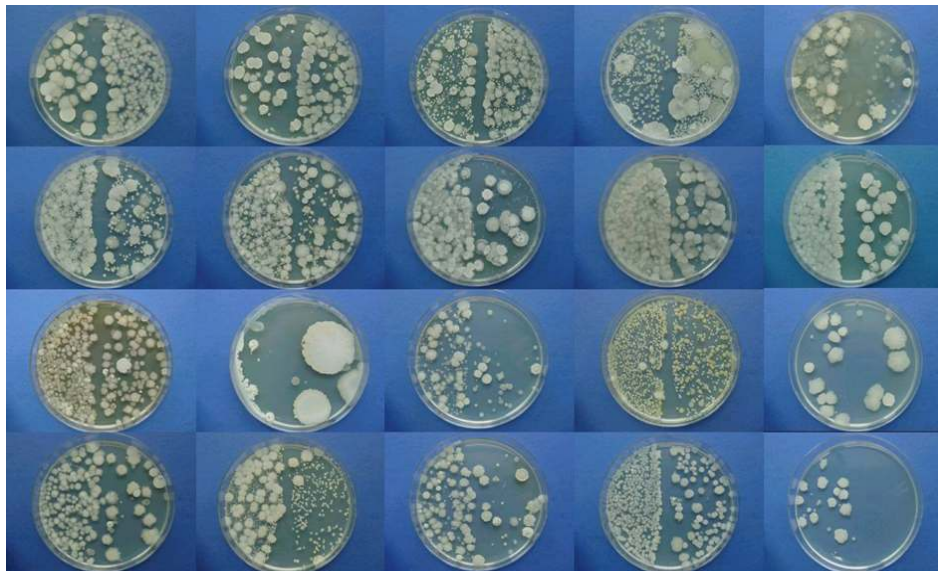
1~5.14로 급격히 감소하였으나 12007의 pH는 6.2로 pH 변화가 거의 없었다. 배양 24시간에도 12007은 급격한 pH 감소가 일어나지 않았다. 일반적으로 증자 대두 중에 유산균이 생육하면 젖산이 생성되어 급격히 산도가 증가되므로 잡균 오염을 방지하는 효과가 있지만 완숙 된장에서 강한 신맛을 내므로 기호도를 하락시킨다. 유산균을 증자대두 발효용 종균으로 사용하기 위해서는 증자 대두

중에 잘 증식하여 박테리옌을 생산하고 pH 변화가 적어야 이상적일 것으로 생각된다. 분리된 7가지 균주는 증자 대두 중에 잘 증식하지만 과도한 유산을 생산하여 급격한 pH변화를 초래하기 때문에 양성대조구로 사용한 *L. lactis* subsp. *lactis* IFO 12007는 분리된 7가지 균주 대신 12007균주를 대두 발효용 종균으로 사용할 것이다.

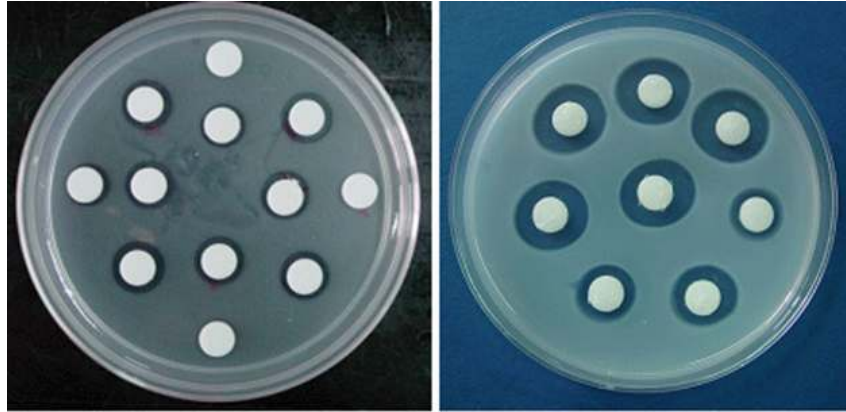
나. 전통 발효 식품(청국장, 메주, 된장)에서의 대두 발효용 우수 고초균 분리

1) 전통 대두 발효 식품에서 우수 고초균 분리 및 특성

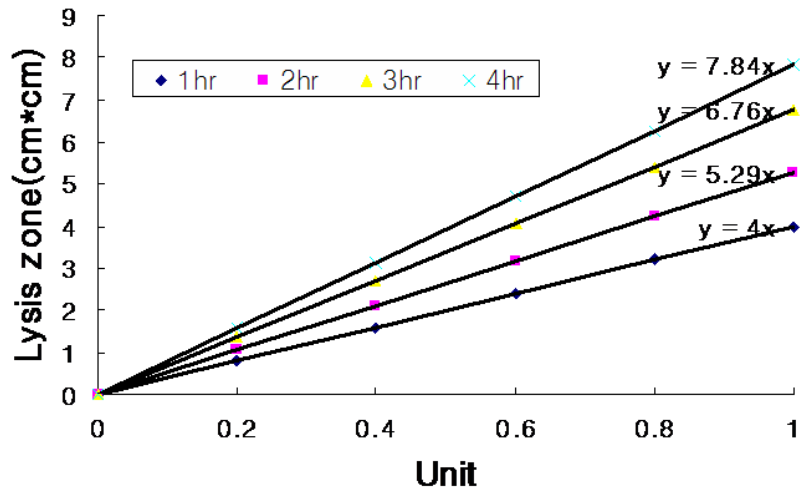
2005년 10월부터 11월까지 경남지역에서 시판 중인 청국장, 재래식 된장을 수집하여 우수 고초균 분리용 시료로 사용하였다. 각 시료를 단계희석 후 평판배지에 도말하여 59 균주의 고초균을 순수 분리하였으며(결과 5) 점질물 생성능이 강한 20 균주를 선택하여 fibrin plate법으로 혈전용해능을 조사하였다(결과 6). 20가지의 배양 균액을 원심분리하여 membrane filter 여과한 조효소액을 멸균한 paper disc에 로딩하여 미리 제조한 fibrin plate에 올려 37℃에서 4시간 반응 후 생성되는 투명환을 관찰하였다(결과 6). Plasmin 표준 곡선에 의해 환산한 이들의 혈전용해 활성은 50 unit /ml 이하가 9 균주, 50-100 unit /ml이 4균주, 100 unit/ml 이상이 7균주로 나타났다.



결과 5. 시판 청국장, 메주, 된장에서 고초균 분리



결과 6. 분리된 고초균의 혈전용해 활성

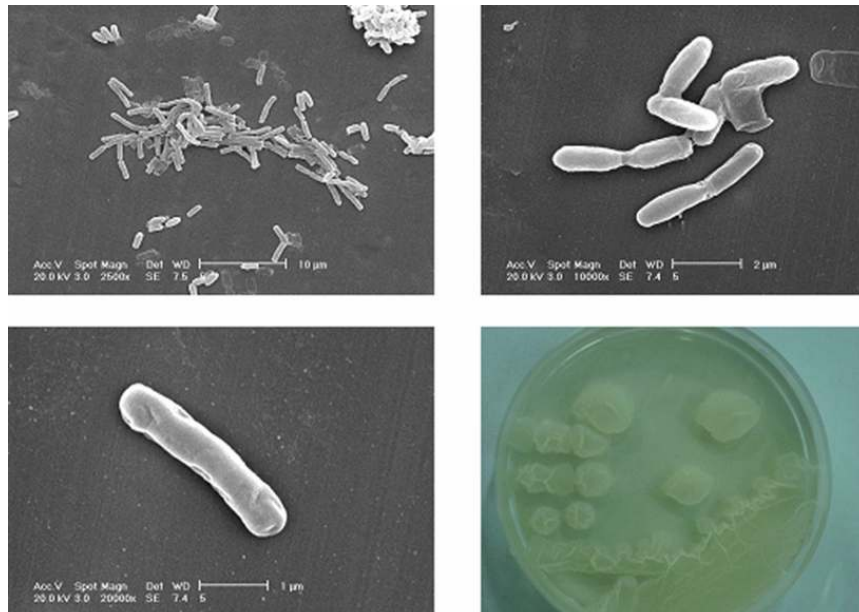


결과 7. Plasmin 표준곡선

혈전 용해효소 역가가 100 unit /ml 이상인 균주의 이취 생성능, 점질물 생성도, 선택 등을 관능평가를 통하여 조사한 결과 가장 우수한 GSB 4015균주를 선택하였다. 선발된 균주의 형태학적 특성을 조사한 결과 포자를 형성하는

Gram(+)균으로 결과 8과 같이 세포의 크기가 $0.5\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$ 의 간균이었다.

분리된 균주의 특성을 살펴본 결과, 호기성균이고 pH는 6.0-9.5, 20-65°C의 온도범위에서 잘 생육하는 특성을 보였다(결과 9). 생리학적 특성으로 casein, gelatin, starch를 분해하며 catalase, oxidase, citrate, urease 등의 활성이 관찰되었으나 nitrate reduction, indol, H₂S에 활성을 나타내지 않았다(결과 10). 또 API 50 CHB kit를 이용하여 당 이용능을 관찰한 결과, 14가지 당류 중 lactose, inositol, melibiose, xylose, rhamnose와 mannitol를 제외한 당류인 glucose, cellobiose, fructose, salicin, solbitol, sucrose, amygdlin, arabionose를 모두 이용하는 것으로 나타나 *Bacillus subtilis*와 93%의 상동성을 보였다. 형태학·생리학적 특성과 API 분석결과로 미루어 *Bacillus subtilis*로 동정하여 최종적으로 분리균을 *Bacillus subtilis* GSB 4015으로 명명하였다.



결과 8. *Bacillus subtilis* GSB 4015의 colony 형태와 전자 현미경 사진

결과 9. *Bacillus subtilis* GSB4015의 형태학적 특성

1. Morphological characteristics		2. Cultural characteristics	
Form	: rod	Growth pH	: 6.0 ~ 9.5
Mobility	: +	Growth temperature	: 20 ~ 55 °C
Gram stain	: +	Aerobic growth	: +
Spores	: +	Growth NaCl	: 0 ~ 12 %

결과 10. *Bacillus subtilis* GSB 4015의 생화학학적 특성

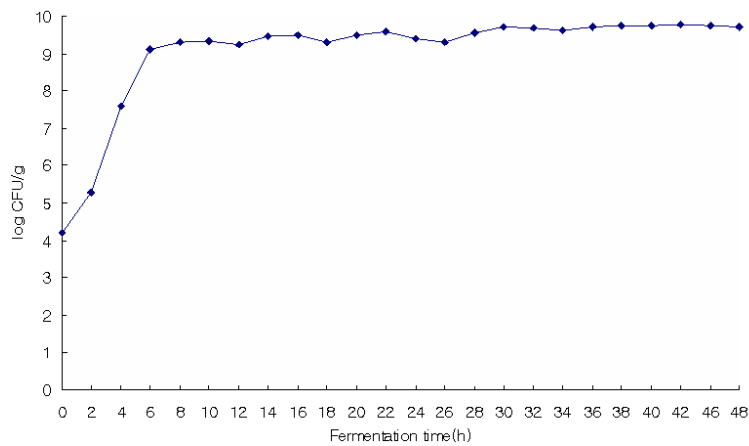
1. Physiological characteristics		2. Carbon utilization	
Starch	: +(slowly)	Glucose	: +
Casein	: +(quickly)	Cellobiose	: +
Gelatin	: +(quickly)	Fructose	: +
Pectin	: +(quickly)	Lactose	: -
Pullulan	: -	Sallicin	: +
Catalase	: +	Inositol	: -
Oxidase	: +	Sorbitol	: +
Citrate	: +	Sucrose	: +
Nitrate reduction	: -	Melibiose	: -
Urease	: +	Amygdalin	: +
Acetoin	: +	Xylose	: -
Indol	: -	Arabinose	: +
Lysine decarboxylase	: +	Rhamnose	: -
Arginine decarboxylase	: +	Mannitol	: -
Ornithine decarboxylase	: +		
H ₂ S	: -		

2) *Bacillus subtilis* GSB 4015의 증자대두에서의 생육

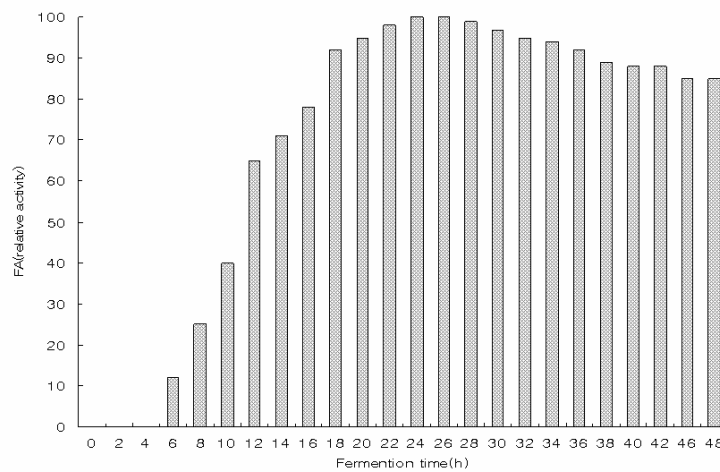
선발균주인 *B. subtilis* GSB 4015이 증자대두 중에서의 정상적인 생육 유무와 혈전용해효소 생성능을 관찰하기 위해, 증자대두에 10⁴ CFU/g되게 분리균을 접종하여 일반적인 청국장 발효온도인 37°C에서 발효 중 생균수와 혈전용해 활성의 변화를 경시적으로 측정하여 결과 11, 12에 나타내었다. 혈전용해효소활성은 발효 6시간째인 대수증식기부터 활성을 보이기 시작하여 정지기인 발효 24시간에 최대였다. 발효가 계속됨에 따라 완만하게 감소하는 추세를 보였다. 이로 미루어 혈전용해효소는 ideophase의 2차 대사생산물로 추정된다. 또 발효 30시간이후부터 후각으로 느낄 수 있을 정도의 암모니아취가 생성되었고, 발효 48

시간이후에는 자극적이어서 부패취로 인식될 만큼 증가하였다.

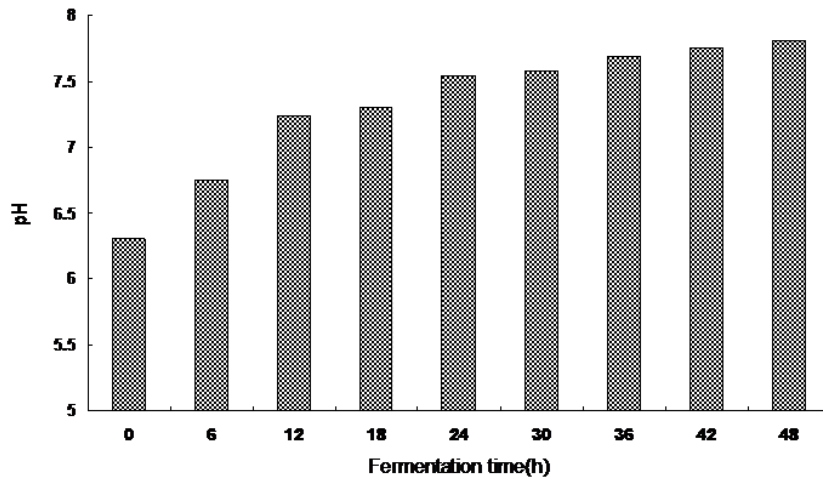
증자 대두에 10^4 CFU/g되게 분리균을 접종하여 37°C에서 발효시키면서 경시적으로 pH 변화를 측정하여 결과 13에 나타내었다. 증자 직후 대두의 pH는 6.35였으나 발효가 진행됨에 따라 높아져 *B. subtilis* GSB 4015균에 의하여 대두 단백질이 분해되어 알칼리성 화합물을 생성되어 발효 24시간에 7.4, 48시간에 7.68에 도달하였다.



결과 11. 증자대두에서 *Bacillus subtilis* GSB 4015의 생육



결과 12. 증자대두에서 *Bacillus subtilis* GSB 4015의 혈전용해효소 생성능



결과 13. 증자대두에서 *Bacillus subtilis* GSB 4015 생육에 의한 pH의 변화
 분리 균주가 증자 대두에서 혈전용해효소를 생산하는지를 확인하기 위해 *B. subtilis* GSB 4015을 접종하여 37°C에서 24시간 발효시킨 후 fibrin plate에 발효 대두를 얹어 확인한 결과 대두를 기질로 이용시에도 혈전용해효소의 생성능이 우수함을 확인하였다(결과 14). 24시간 발효 후 대두의 표면에 점질물이 생성되어 대두와 대두의 분리가 용이하지 않으면서 암모니아취는 거의 없었고, 약간의 광택을 가지면서 주름져 있음을 확인하였다. 분리된 *B. subtilis* GSB 4015으로 증자 대두 발효시 혈전용해 효소도 다량 생산할 뿐만 아니라 이취를 생성하지 않으면서 대두의 정상적인 발효를 진행함으로 대두 발효용 우수 균주로서 이용할 수 있음을 확인하였다.



결과 14. *Bacillus subtilis* GSB 4015에 의해 발효된 대두의 혈전용해능

제 4 절 단일 및 multi-step 발효시스템의 확립 및 비교

1. 유산균, 고초균의 최적 발효 조건 결정

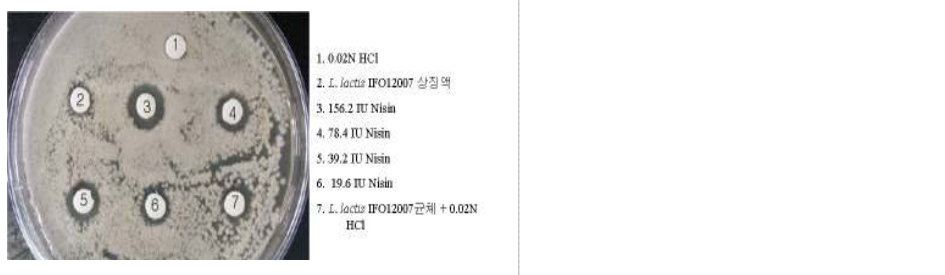
1차 년도에 선별된 대두 발효용 균주인 *L. lactis* subsp. *lactis* IFO 12007의 최적 발효시간을 설정하기 위해, 증자대두 1g당 10^6 CFU로 접종하여 최적 생육 온도인 30°C에서 발효시키면서 경시적으로 항균물질인 nisin 생성량을

Micrococcus luteus KCCM 11905를 피검균주로 사용하여 agar well diffusion 법으로 측정하였다. 시판 nisin(Sigma)으로 표준곡선(결과 1)을 작성하여 발효 시간에 따른 nisin 함량을 정량적으로 측정하였다.

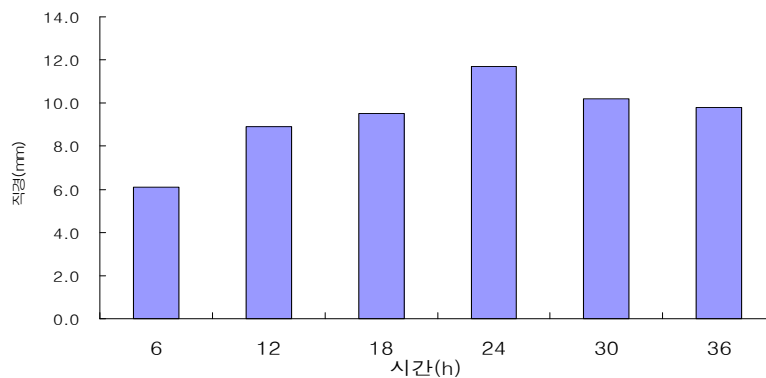
(A)

(B)

결과 1. Nisin 농도에 따른 *M. luteus*의 생육저해활성(A) 및 표준 곡선(B)



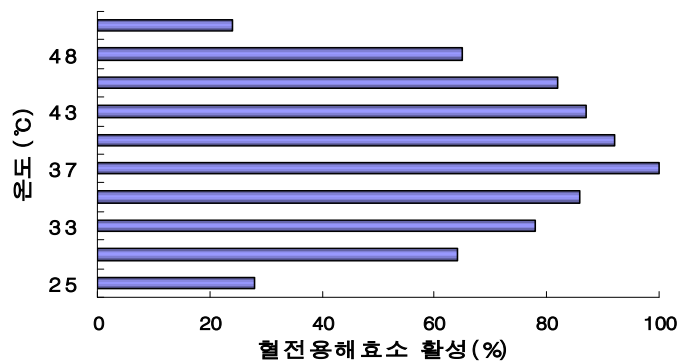
L. lactis subsp. *lactis* IFO 12007에 의해 대두 발효가 진행됨에 따라 nisin 생성량은 점차 증가하여 발효 24시간 후 생육 저해환의 직경은 11.7 mm로 최대값을 나타낸 이후 감소하는 것을 확인할 수 있었다(결과 2). 따라서, 증자대두에 nisin 생성 유산균을 접종하여 30℃에서 24시간 발효시키면 공기 유래 오염성 미생물의 생육을 억제할 수 있는 천연항균물질인 nisin의 생성량이 최대가 되며, 식미상의 신맛이나 pH 감소도 거의 없었다. 증자 대두 발효시 빈번히 발생하는 야생 Bacilli에 대한 이미이취 생성에 따른 상품성 저하 및 분해력 감소현상을 천연보존제인 nisin 생성 유산균 발효공정을 도입함으로써 사전에 봉쇄할 수 있는 기술을 확립하였다. 증자 후 적당한 온도 (33℃)로 냉각된 대두를 *L. lactis* subsp. *lactis* IFO 12007로 30℃, 24시간 유산 발효시켰다.



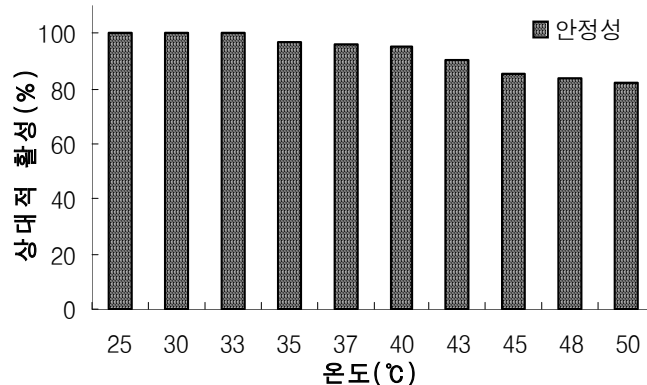
결과 2. 유산균 발효시간에 따른 증자대두 중 nisin 생성

1차년도에 선발된 *Bacillus subtilis* GSB 4015의 최적 발효 조건을 규명하기 위해, 증자대두 1g당 10^6 CFU되도록 접종하여 각각의 온도에서 24시간동안 배양

하여 발효고정 중 생성된 혈전용해효소 활성과 열안정성을 확인하였다. 25~50℃ 온도에서 발효시킨 대두 중에 함유된 혈전용해효소 활성은 50, 25, 30, 48, 33, 45, 35, 43, 40, 37℃ 순으로 높게 나타났다. 각 온도 조건에서 발효시킨 대두에 생성된 혈전용해효소의 상대적 활성은 50℃와 25℃는 30% 이하, 30℃와 48℃는 65%, 33℃는 78%였으나, 35℃와 45℃는 80%이상, 특히 40℃는 92%였고 37℃에서는 최대치에 도달했다(결과 3). 따라서 혈전용해효소의 최적 생산 온도인 37℃에서 *B. subtilis* GSB 4015를 접종한 증자 대두를 37℃에서 24시간 발효시킨 후 다양한 온도에서 10분간 처리시킨 후 혈전용해효소 활성을 fibrin plate법으로 측정하여 열안정성을 확인하였다(결과 4). 발효된 대두를 각 온도에서 10분간 처리 후의 혈전용해효소 상대 활성은 25~33℃에서 100%, 35~43℃에서 처리시 90%이상, 50℃에서는 80%이상 유지되었다. 따라서, *B. subtilis* GSB 4015는 폭넓은 온도 범위에서 대두 발효 중 혈전용해효소를 생산하고 자극적인 암모니아취를 거의 형성하지 않으며 점질물 생성량도 충분한 발효 24시간을 최적 발효 시간으로 설정하였다.



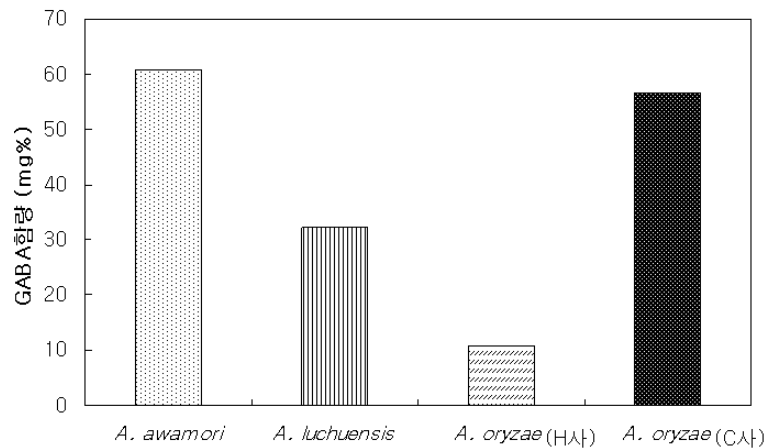
결과 3. 발효온도에 따른 혈전용해효소의 활성



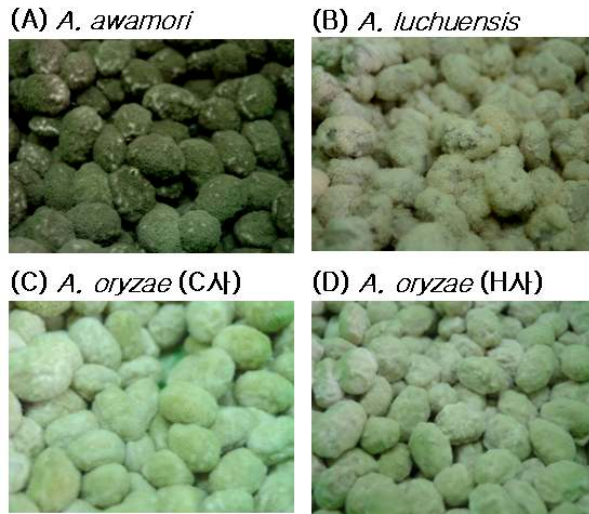
결과 4. 반응온도에 따른 혈전용해효소의 열 안정성

2. 대두 자화성 GABA 생산 균주의 선별 및 발효 조건 규명

대두 자화성 GABA 생산 균주를 선별하기 위하여 H사에서 분양받은 *A. awamori*, *A. luchuensis* 및 *A. oryzae*와 C사에서 분양받은 *A. oryzae*로 각각 대두 발효를 실시하여 GABA 함량을 측정·비교하였다(결과 5). *A. luchuensis*로 발효시킨 대두의 GABA 함량은 32.25 mg%였으며 H사에서 분양받은 *A. oryzae*로 발효시킨 대두의 GABA 함량은 10.76 mg%로 가장 낮게 나타났다. *A. awamori*와 C사에서 분양받은 *A. oryzae*로 발효시킨 대두의 GABA 함량은 각각 60.61 mg%와 56.54 mg%로 매우 높은 함량을 나타냈으므로 대두를 발효시켜 GABA 함량이 높은 우수한 발효 대두 가공품을 제조하기 위해서는 이 두 균주를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각되어진다. 그러나, *A. awamori*로 발효시킨 대두 발효물은 형성된 포자의 색상이 너무 진하여 식이하거나 장류용으로 사용하기에는 문제가 있을 것으로 예상된다(결과 6). *A. awamori*는 주류제조용 곰팡이로서 구연산 등의 유기산 생성능이 우수한 균주이므로 신맛이 강하여 맛을 손상시킨 가능성이 있어 대두 발효에 적합하지 않을 것으로 예상되어 C사에서 분양받은 GABA 생산성이 높은 *A. oryzae*를 사용하는 것이 최종생산물의 활용도가 높을 것으로 생각된다. 한편, C사와 H사의 균주간 발효능의 차이는 균주자체의 효소 역가 혹은 포자의 생산 및 저장 상태에 따른 것으로 사료된다.



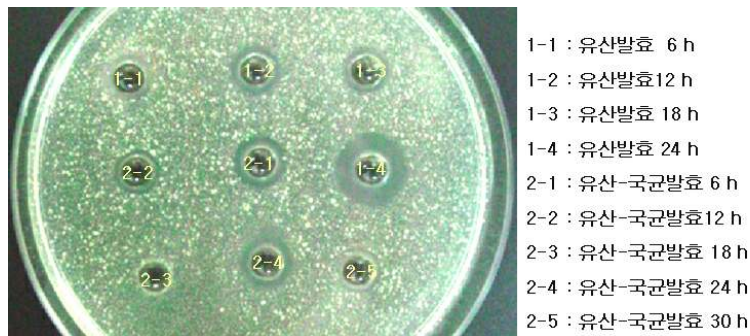
결과 5. 국균 종류에 따른 대두 발효물의 GABA 함량



결과 6. 국균 종류에 따른 대두 발효물의 형상

결과 7은 nisin 활성 측정에 널리 이용되는 피검균인 *Micrococcus luteus*를 사용하여 대두 발효물 중의 nisin 활성 변화를 나타낸 것이다. 증자된 대두의 유산발효 과정 중 생성된 nisin의 농도는 발효 시간이 경과됨에 따라 즉, 유산균의 증식이 진행될수록 nisin 활성이 높아졌다. 유산발효 24시간 후 GABA 생성 능이 우수한 *A. oryzae*로 2차 발효를 진행함에 따라 nisin 함량이 점차 감소되어 국균발효 30시간째 nisin 활성이 현저히 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한 이 시기의 국균발효 대두는 외관상 관찰한 결과 흰색 균사가 대두 전체를 감싸고 있는 상태로서 대두 중의 고분자 물질을 효과적으로 분해시키는 시기로 생각된다.

효율적인 multi-step 발효공정을 구축하기 위해 국균발효용 균주로 GABA 함량이 높은 C사에서 분양받은 *A. oryzae*를 선택하였고, 발효시간은 유산발효에 의해 생성된 nisin이 대부분 분해되고 황국균에 의한 대두 자화 및 효소 생성이 최대인 시간 즉, 발효 30시간 적합할 것으로 생각된다. 원료 대두의 품종 수확·보존상태 ; 수침·증자 등 전처리 조건 온도·습도 등의 발효조건에 따라 국균 발효에 소요되는 시간은 달라질 수 있다.



결과 7. 유산-국균에 의한 2차 발효 중 nisin 활성 변화

3. 선별된 미생물을 이용한 multi-step 발효 공정 개발

재래식 방법에 의한 증자 즉, 대두를 익히는 과정은 세척한 원료 대두를 물과 같이 솥에서 자비시키므로 대두 중의 수용성 유효 성분이 과다하게 용출되어 발효 종균의 정상적인 생육을 저해 할 뿐만 아니라 환경오염을 초래한다. 또한 재래식 방법은 선별된 발효 종균이 아니라 자연 유래의 균주로 발효되어 이미이취가 생성되어 대두 발효 가공품의 품질을 저하시킨다.

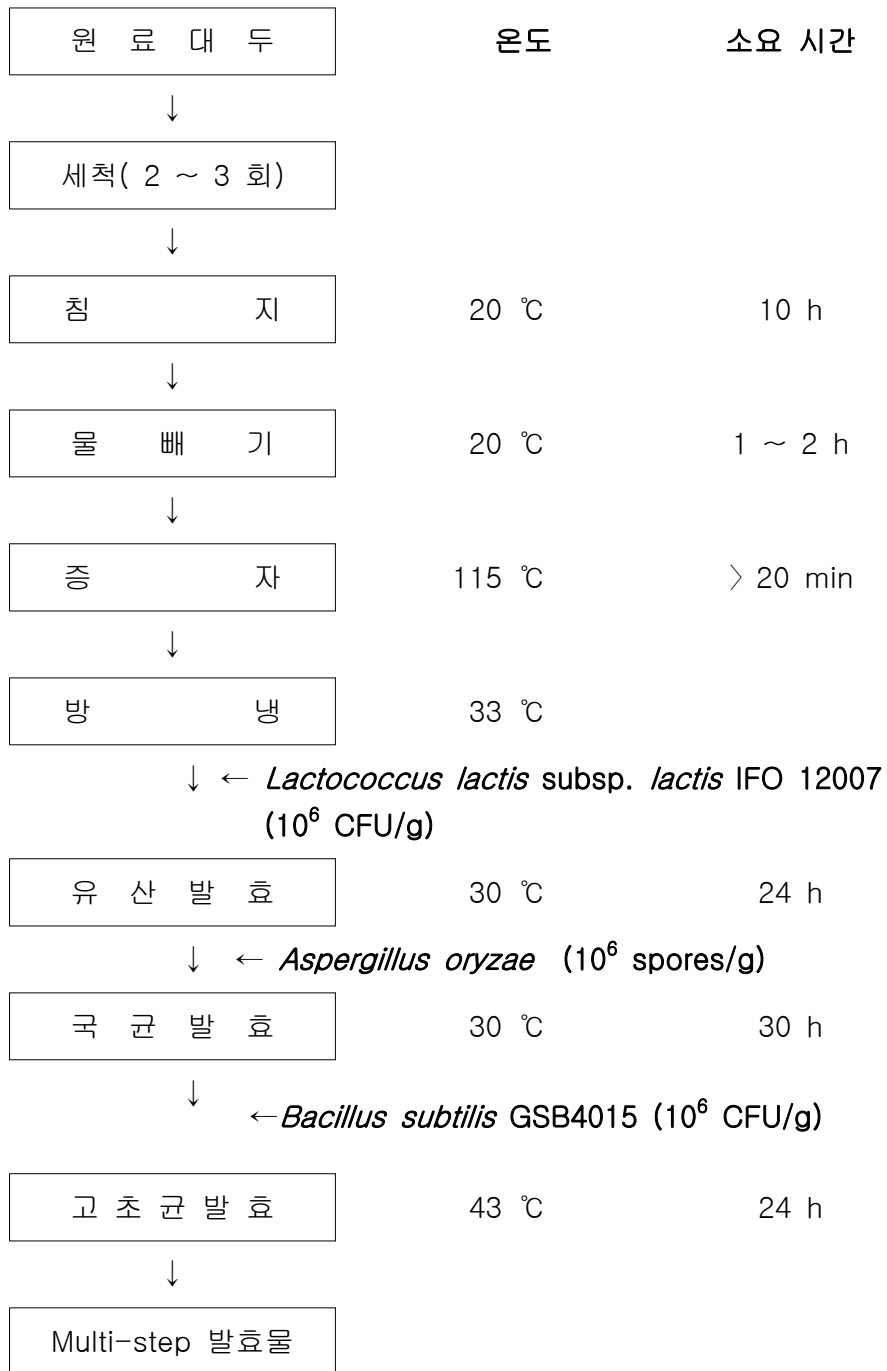
본 과제에서는 상기의 단점을 보완하기 위해, 대두를 스팀으로 증자함으로써 수용성 영양분과 미량성분의 용출을 최소화 하였으며 대두를 증자한 후 공기 중 야생 미생물에 의한 이상발효현상을 천연 항균성 물질인 nisin으로 억제하여 정상발효를 유도하고 대두 중의 난분해성 물질을 저분자 상태로 분해시켜 소화·흡수성을 향상시켰다. 기능성 자돈 사료용 발효 대두를 생산하기 위해서는 선별된 3종의 식품용 미생물을 어떤 순서에 입각해서 어느 정도 발효시킨 후 다음 미생물을 접종할 것인지를 규명하기에 앞서 우선 각 균주간의 경쟁관계를 이해해야 한다.

유산균, 황국균과 고초균은 모두 옛날부터 발효식품 제조에 널리 사용되어 식용해도 안전한 미생물로 관습적으로 인식되고 있어 대두 발효에 사용 후 살균 혹은 멸균 처리를 하지 않고 식용가능한 장점이 있다. 발효 대두 중의 잔존 미생물은 생균제로 이용되고 발효물에 분비되거나 균체 중의 효소는 효소제 역할을 하여 동물의 장관 내 미생물의 정상 균총을 유지하며 면역력을 강화시켜 질병저항성을 향상시키므로 사료로 사용시에도 동일한 작용을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

유산균은 생육 중 젖산을 분비하고 pH를 저하시키므로 발효 산물을 산성화시키는 특징이 있으나 효소학적인 문제인지 영양분 자화상의 문제인지는 알 수

없으나 식물성 원료인 대두 중의 단백질을 분해하는 효소 역가는 물론 전분 자화성이 아주 약한 단점과 유사종의 미생물 포자의 발아나 생육을 근본적으로 억제하는 항균성 물질을 생산하여 자신에게 유리한 환경을 선점하는 장점이 있다. 황국균은 전분과 식물성 단백질 분해효소의 활성과 난분해성 물질인 피틴산 분해력도 강하여 곡물발효에 널리 사용되고 있는 미생물이지만 고초균의 증식에 의해 생육이 저해되는 단점이 있다. 고초균은 일부 유산균의 박테리옌 작용에 의해 아포의 발아는 물론 증식이 치명적으로 억제되는 단점이 있으나 자연계에 널리 분포하여 식물성 자원의 분해와 식품의 부패에 관여하고 선악의 성질을 모두 가진 미생물로서 최근 박테리옌 등의 펩타이드성 물질, 세제용 효소생산은 물론 기능성 물질 생산에 활용되는 등 인간의 생활과 밀접한 관계를 가지고 있다.

이런 균주간의 상호작용과 특성을 고려하여 유산균, 황국균, 고초균 순으로 진행되는 multi-step 발효법을 고안하여 결과 8에 간략히 도식화하였다. 우선 대두를 수돗물로 2회 세척한 후 대두의 무게가 2.2배가 될 때까지 수침하여 1시간 이상 물빼기한 후 115°C에서 가압 증자하여 충분히 냉각된 대두에 전 배양한 nisin 생산 유산균(*L. lactis* subsp. *lactis* IFO 12007)을 대두 1g당 10^6 CFU 되도록 접종하여 30°C에서 24시간동안 유산 발효시켰다. 유산발효가 종료된 대두에 황국균(*A. oryzae*) 포자를 10^6 spore/g되게 접종하고 대두의 표면에 균사가 완전히 덮일 때까지 30°C에서 국균발효를 실시하였다. 유산-국균 발효 종료 후 고초균 (*B. subtilis* GSB 4015)을 대두 1g 당 10^6 CFU되게 접종하여 황국균의 생육이 억제되는 43°C에서 발효시켜 multi-step 발효물을 제조하였다(결과 9). 최종 multi-step 발효물은 고초균 증식에 의해 대두 표면에 점질물이 생성되어 주름이 관찰되었다.



결과 8. Multi-step 발효 공정도



결과 9. 단일 발효물과 multi-step 발효물

4. 대두의 단일 및 multi-step 발효물의 특성 비교

발효가 완료된 단일 발효물과 multi-step 발효물의 pH, 수분 등을 AOAC법으로 측정하였다(결과 10). 증자대두, 유산균 또는 황국균으로 발효된 단일 발효물의 pH는 6.4 정도였으나 고초균 단일 발효물과 multi-step 발효물은 7.6 정도로 약알칼리성을 나타내었다. 감미를 결정하는 대표적인 인자인 환원당 함량은 유산균, 황국균, multi-step, 고초균 순으로 높게 나타났으며 발효미생물의 영양원이 되는 당의 총함량은 multi-step 발효물에서 현저히 낮게 나타나 발효에 관여하는 미생물에 의해 효율적으로 당이 분해된 것으로 생각된다. 단일 발효물과 multi-step 발효물의 조단백 및 조지방 함량에는 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

결과 10. 단일 및 multi-step 발효물의 일반성분 함량

	증자대두	유산발효	국균발효	고초균발효	Multi-step 발효
pH	6.5	6.3	6.2	7.6	7.6
수 분(%)	60.4	60.7	57.9	54.9	57.0
환원당(%)	0.7	1.5	9.2	21.8	11.9
총 당(%)	75.5	89.5	37.5	40.0	11.5
조단백(%)	19.29	19.50	19.4	19.6	20.12
조지방(%)	10.29	10.32	8.91	8.88	10.12

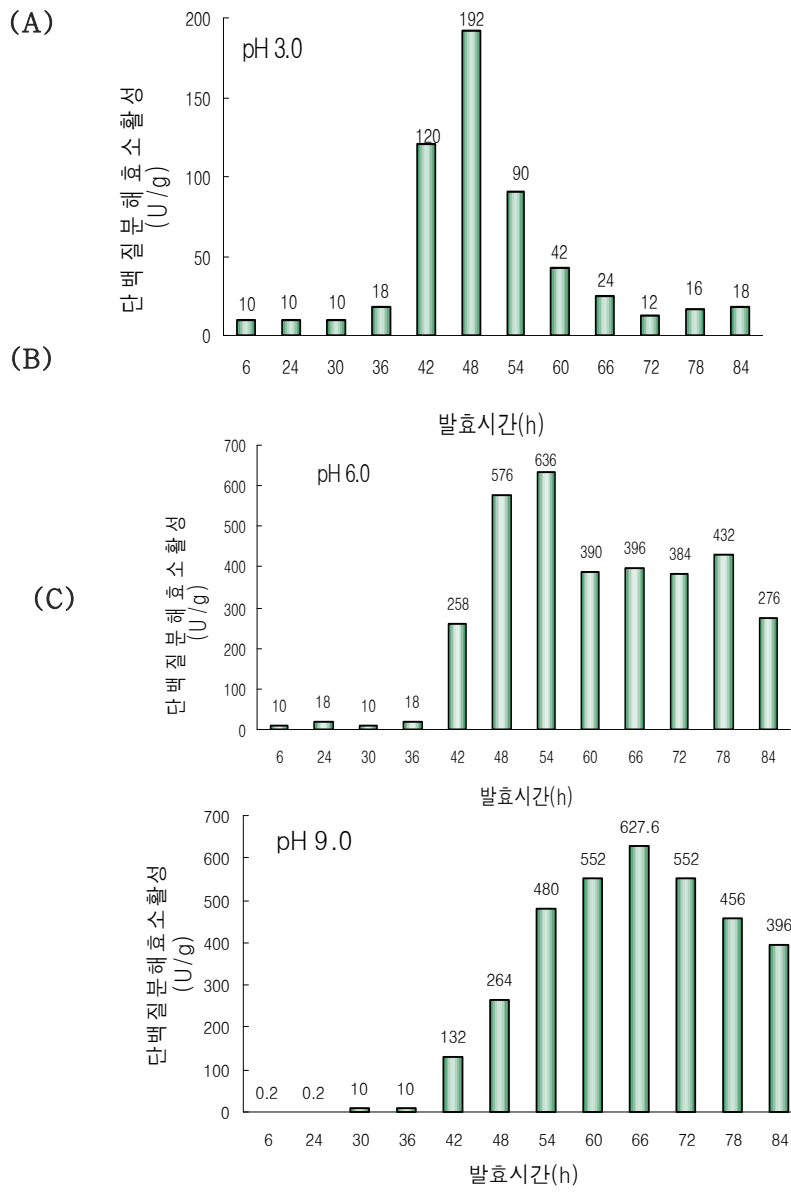
5. Multi-step 발효 중 대두의 성분 변화

단백질을 분해시켜 아미노산, peptide 등을 생성하는 단백질분해효소의 역가를 최적 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성으로 구별하여 살펴본 결과 유산 발효에서는 단백질분해효소의 활성이 거의 검출되지 않았고 국균 발효시에는 중성 단백질분해효소, 고초균 발효 중에는 알칼리성 단백질분해효소의 활성이 높게 나타났다. 결과 11 A는 발효 중 산성 단백질분해효소 활성을 경시적으로 측정한 결과이다. 발효 시간 42 ~ 54시간까지는 단백질분해효소의 활성이 90 U/g 이상이었으나 특히 발효 24시간째에 192 U/g 으로 가장 높게 나타났다. 발효 78시간 발효 후 다시 산성 단백질분해효소 활성증가가 관찰되었으며 발효 102시간까지 18 U/g로 유지되었다(data 생략).

중성 단백질분해효소 활성 변화는 결과 11 B와 같다. 발효 42시간 이후부터 급격히 증가하여 발효 시간이 54시간에는 636 U/g로 중성 단백질분해효소의 활성이 가장 높게 나타났으나 고초균 발효가 진행됨에 따라 감소하여 중성 단백질분해효소의 활성이 약 390 U/g로 유지되다가 발효 78시간에 약간 증가하여 432U/g가 되었다. 발효 중의 알칼리성 단백질분해효소 활성을 측정한 결과를 결과 11 C에 나타내었다.

알칼리성 단백질분해효소의 활성이 점차 증가하여 발효 66시간에 627.6 U/g로 최고값을 보였으며 산성이나 중성 단백질분해효소 활성과는 달리 고초균 발효 중에 알칼리성 단백질분해효소의 활성이 높게 나타났다.

발효가 완료된 대두 발효물의 유리 아미노산 함량은 결과 12에 나타내었다. 총 유리 아미노산 함량은 multi-step 발효물이 4460.61 mg%로 고초균 단일 발효물 1033.30 mg%와 황국균 단일 발효물 3362.75 mg%에 비해 각각 4.3, 1.3배 높게 나타났다. Arginine, asparagine, glutamic acid 등 몇몇 제외한 대부분의 유리아미노산 함량은 multi-step 발효물에서 높게 검출되었다. 또한 유리되어 단맛을 내는 alanine, lysine, proline, threonine과 glycine도 multi-step 발효물에서 대조구에 비해 월등히 높게 검출되었다. 즉, multi-step 발효물, 황국균 단일 발효물, 고초균 단일 발효물 순으로 좋은 맛과 관련된 유리 아미노산 함량이 높게 나타났다. 따라서 multi-step 발효물에서 유리된 우수한 맛 성분의 함량이 단일 발효물보다 월등히 높게 검출되어 본 과제에서 개발한 발효물의 우수성이 입증되었다.



결과 11. Multi-step 발효 중 단백질분해효소 활성의 변화

결과 12. Multi-step 발효물과 단일 발효물의 유리 아미노산 함량

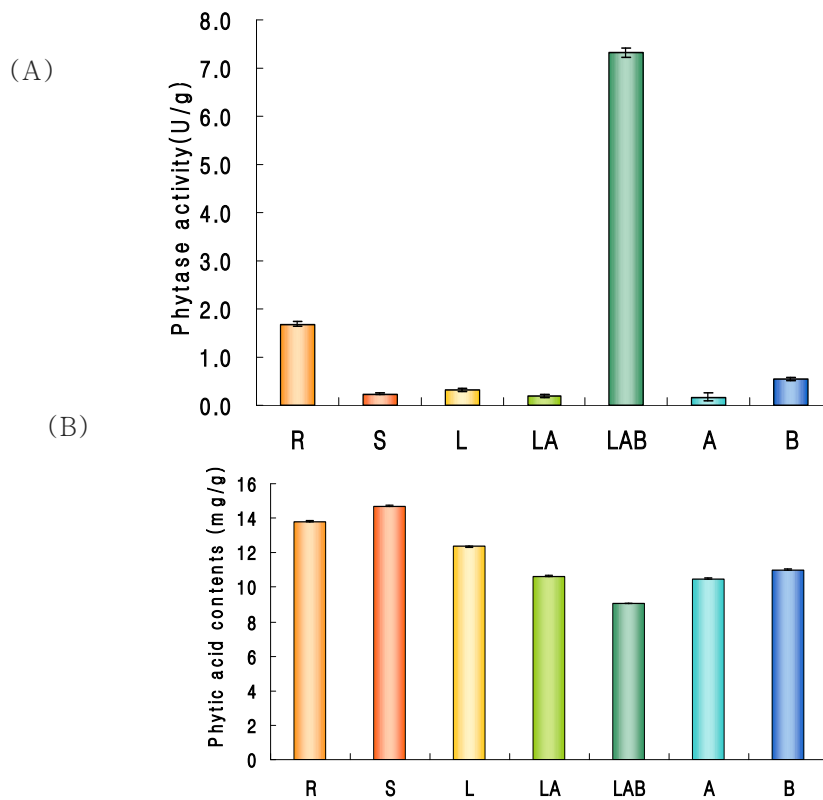
(mg/100g)

	황국균 단일 발효	고초균 단일 발효	Multi-step 발효
Threonine	156.04	20.34	183.88
Serine	161.04	27.90	100.48
Asparagine	79.39	54.05	25.62
Glutamic acid	610.61	259.13	371.18
Proline	131.09	0.00	230.55
Glycine	95.91	22.97	154.29
Alanine	225.23	48.23	238.07
Valine	220.37	100.59	519.21
Methionine	106.84	27.07	202.95
Isoleucine	148.24	31.81	391.05
Leucine	331.43	56.71	617.48
Tyrosine	210.30	121.74	87.84
Phenylalanine	309.79	128.83	489.83
Lysine	266.07	54.11	481.22
Histidine	164.53	67.55	348.80
Arginine	145.87	12.30	18.16
Total(mg%)	3362.75	1033.30	4460.61

대두 발효 과정 중 항영양인자인 phytic acid(myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakis dihydrogen phosphate)를 phosphate와 phosphate inositol로 분해하는 효소인 phytase 활성을 측정하여 결과 13에 나타내었다. 원료대두의 phytase 활성은 1.7 U/g으로 나타났으며, 증자대두에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 황국균 단일 발효물의 phytase 활성은 0.54 U/g으로 약간 증가되었으며, multi-step 발효물의 phytase 활성은 7.3 U/g으로 다른 실험구보다 매우 높게 나타나 다량의 phytic acid가 분해되었을 것으로 추측된다.

다양한 발효법에 의해 제조된 대두 발효물의 phytic acid 함량은 결과 13에 나타내었다. 원료대두의 phytic acid 함량은 13.8 mg/g이었으며, 대두를 증자하면 약간 증가하는 경향을 보였으나 원료대두와 유의적인 차이는 보이지 않았다.

또한 발효가 진행됨에 따라 phytic acid 함량은 점차 감소하여 황국균 단일 발효물과 고초균 단일 발효물에서는 각각 10.49, 11.01 mg/g이었으며, multi-step 발효물은 9.07 mg/g로 가장 낮게 나타났다. 발효시 대두 중에서 다가가 양이온과 불용성 복합체의 형태로 존재하는 phytic acid가 multi-step 발효에 관여하는 미생물에 의해 다량 분해되어 음식물로 섭취할 경우 다가가 양이온과 인의 소화·흡수율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

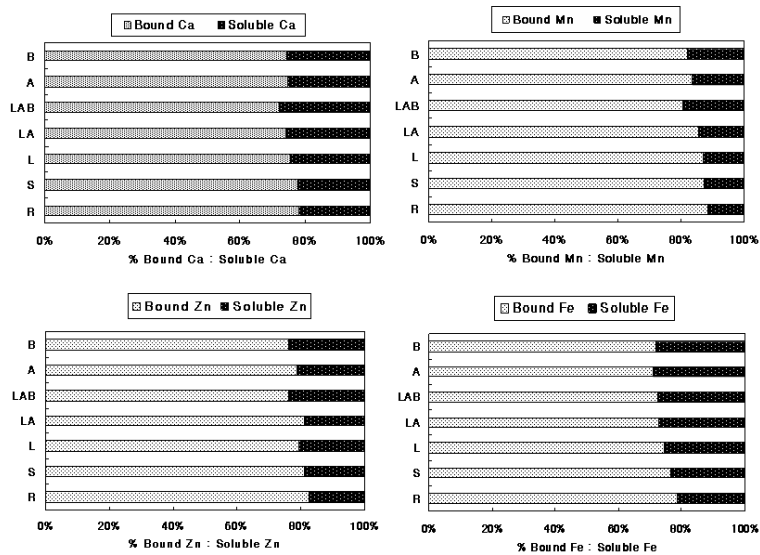


결과 13. Multi-step 발효 중 phytase와 phytic acid 함량 변화

발효 중 phytic acid의 분해에 따른 미네랄의 유리화 정도를 확인하기 위하여 칼슘, 아연, 철, 망간, 마그네슘을 중심으로 총 미네랄에 대한 가용성 미네랄의 비를 결과 14에 나타내었다. 원료대두와 증자대두의 칼슘 유리율은 거의 변화가 없었으나 multi-step 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하여 multi-step 발효물에서는 27.7%가 유리되었다. 다른 발효물에 비해 multi-step 발효물의 칼슘 유리율이 우수한 것으로 미루어 섭취시 체내 칼슘의 흡수율이 향상되어 성장기 어린이는 물론 성인의 골밀도 향상 등의 효과가 있을 것으로 기대된다. 그리고,

아연은 체내 대사조절에 관여하는 많은 금속효소들(metalloenzymes)의 구성 성분이며 인슐린 호르몬 생리와 직접적으로 관련되는 필수적인 영양소로 본 연구에서 초기 원료대두의 경우 17.4%였으나, 발효가 진행됨에 따라 증가하여 multi-step 발효물에서 27%가 유리되었다. 또한, 철은 다른 미네랄과 달리 황국균 단일 발효물에서 29.0%로 높은 유리율을 나타내 multi-step 발효물의 철 유리율보다 높게 나타났다. 이는 phytase에 의해 유리된 철이 발효 중 식이섬유, 저분자 펩타이드 등과 재결합된 것으로 사료된다. 곡류의 외피, 두류, 채소 등에 다량 함유되어 있는 망간의 유리율도 칼슘, 아연과 같이 발효가 진행됨에 따라 소폭으로 증가하였다.

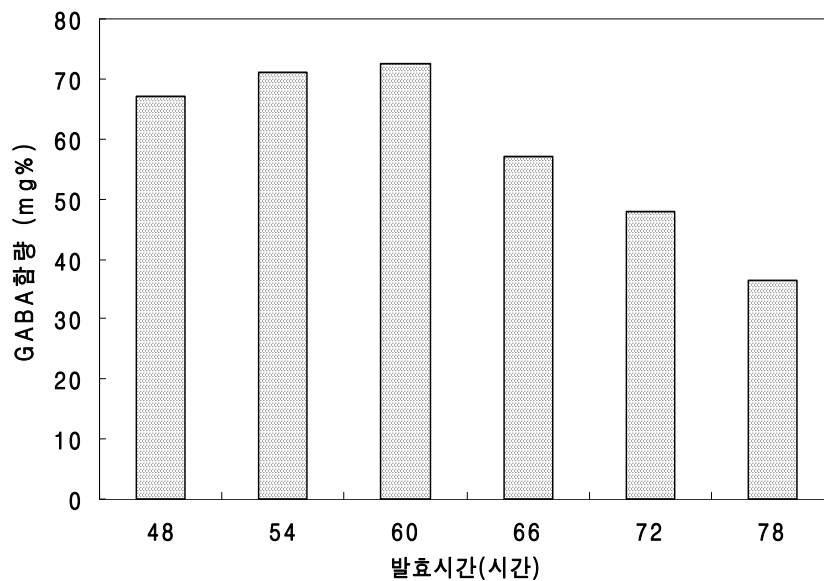
이 결과들로 미루어 보아 단일 종균을 사용하는 것보다는 복수의 종균으로 대두를 발효시키는 것이 phytic acid와 결합되어 있던 미네랄이 phytase의 작용에 의해 유리화되어 유리형태로의 전환이 더 높아짐을 확인할 수 있었다. Phytase 작용으로 인해 phytic acid와 결합되어 있던 미네랄의 유리율이 상승하고 체내에서 소화·흡수가 용이해질 것으로 사료된다. 이로써 값비싼 미네랄 보조제를 첨가하지 않고도 식품원료에 함유되어 있던 물질의 효율적인 이용이 가능할 것으로 생각된다.



결과 14. Multi-step 발효 중 미네랄의 유리율

6. 효율적인 multi-step 발효 시스템 선별 및 최적 발효 공정 개발

GABA는 중추 신경계의 신경전달 저해물질로 뇌의 기전과 기능에 필수적인 peptide이며 혈압강화, 간질환 예방 및 위기능의 활성화와 항당뇨 등의 작용을 하는 물질이다. *Lactococcus*, *Aspergillus*, *Rhizopus*에 의해 생산된 glutamate decarboxylase에 의해 혐기적 조건에서 glutamate나 aspartate가 GABA로 전환되는 것으로 보고되어 있다. Multi-step 발효시 GABA의 최대 생성시기를 확인하기 위하여, 발효 48시간(국균발효 완료)부터 발효완료시까지 경시적으로 GABA함량을 측정하였다(결과 15). 국균발효 완료시 67.09mg%였으나 고초균 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하여 발효 60시간에 72.48mg%로 최대 함량을 나타낸 이후 감소하였다. 따라서, multi-step 발효법으로 대두 발효시 60~66시간 사이에 GABA의 함량이 가장 높을 것으로 생각된다. 효율적인 multi-step 발효시스템을 확립하기 위해, 대두의 multi-step 발효시 생산되는 또 다른 기능성을 나타내는 혈전용해효소의 활성을 고려한 실험이 진행 중이다.



결과 15. Multi-step 발효 중 경시적인 GABA 함량 변화

제 5 절 Multi-step 발효시스템에 의한 고품질 기능성 발효 자돈 사료의 대량 생산 공정 및 발효물의 효율적인 저장조건 개발

1. 기능성 multi-step 발효물의 대량 생산 공정 확립

가. multi-step 발효 공정을 이용한 속성 발효법 개발

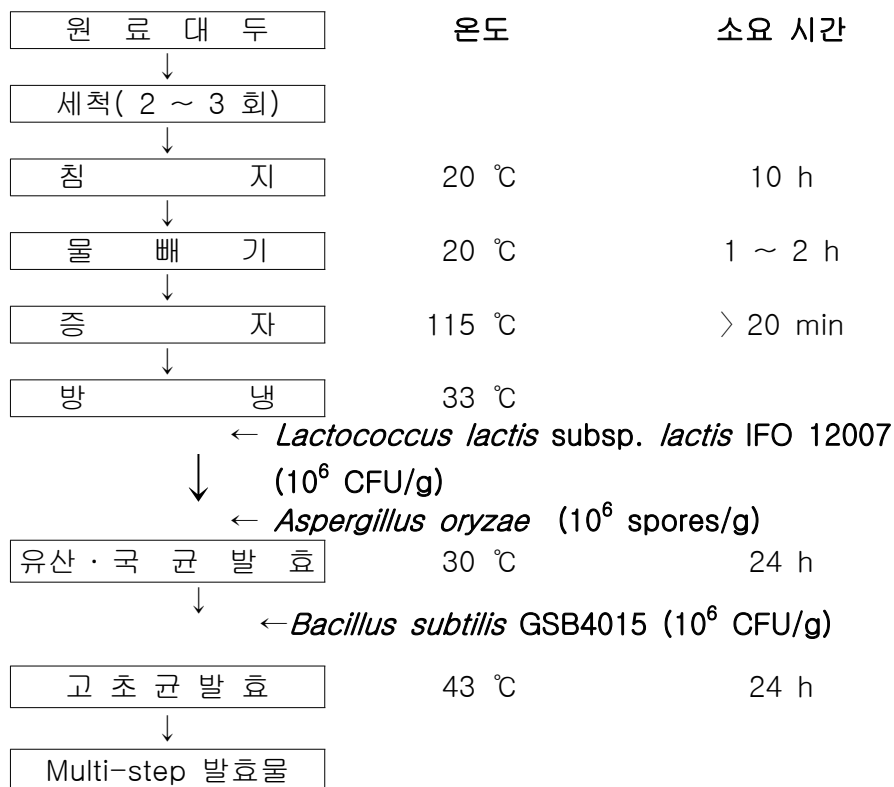
재래식 방법에 의한 대두 발효 가공품의 품질은 대두를 익히는 자비 과정에서 대두의 수용성 유효 성분이 과다하게 용출되어 발효 종균의 생육을 저해 할 뿐만 아니라 자연 유래의 균주로 연중 균일한 제품을 생산 할 수 없었다. 이에 본 연구에서는 선행 연구 결과를 통해 multi-step 발효 공정으로 연중 균일하고 그 품질이 매우 우수한 대두 가공품을 개발하였다.

Multi-step 발효법은 안전성이 입증된 발효 식품용 미생물인 유산균, 황국균, 고초균을 중심으로 미생물 유래의 각종 가수분해 효소류, 1, 2차 대사산물, 균체 내제 물질 등에 의해 면역체계가 활성화될 뿐만 아니라 bacteriocin, diacetyl, lactic acid 등의 천연 향균성에 의해 설사 유발균인 대장균과 살모넬라 등과 같은 유해균의 장내 생육을 억제할 수 있다. 또한 multi-step 대두 발효물은 대두 단백질을 저분자의 펩타이드 형태로 효율적으로 분해시킨 것으로서 각종 고기능성 물질을 다량 함유하고 있으며 섭취시 식물성 단백질의 소화·흡수능이 우수하여 자돈 사망률을 낮추고 고품질의 돈육을 생산할 수 있다.

유산균은 생육 중 젖산을 분비하고 pH를 저하시키므로 발효 산물을 산성화시키는 특징이 있으나 유사종의 미생물 포자의 발아나 생육을 근본적으로 억제하는 향균성 물질을 생산하여 자신에게 유리한 환경을 선점하는 장점이 있다. 황국균은 전분과 식물성 단백질 분해효소의 활성화와 난분해성 물질인 피틴산 분해력도 강하여 곡물발효에 널리 사용되고 있는 미생물이며 고초균은 청국장 발효균으로써 단백질 분해 효소의 활성이 매우 뛰어나 대두 단백질을 분해하여 소화·흡수되기 쉽게 하며 대두 발효물의 독특한 맛을 부여하도록 한다.

이런 균주간의 상호작용과 특성을 고려하여 유산균, 황국균, 고초균 순으로 진행되는 multi-step 발효법을 개발 하였으나 발효 완료시까지 72시간이 소요되기 때문에 에너지 소비가 크다. 또한 자돈 사료로 활용하기 위해서는 단시간에 많은 양의 제품을 생산해야 한다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 본 3년차 연

구에서는 제조시간 단축을 위한 속성 multi-step 발효법을 개발하였으며 결과 1에 간단히 도식화 하였다. 우선 대두를 수돗물로 2회 세척한 후 대두의 무게가 2.2배가 될 때까지 수침하여 1시간 이상 물빼기한 후 115℃에서 가압증자하여 충분히 냉각된 대두에 전 배양한 nisin 생산 유산균(*L. lactis* subsp. *lactis* IFO 12007)을 대두 1g당 10^6 CFU되도록 접종한 후 이어서 황국균(*A. oryzae*) 포자를 10^6 spore/g되게 접종한다. 대두의 표면에 유산발효 후 균사가 완전히 덮일 때까지 30℃에서 국균발효를 실시하였다. 유산-국균 발효 종료 후 고초균 (*B. subtilis* GSB 4015)을 대두 1g 당 10^6 CFU되게 접종하여 황국균의 생육이 억제되는 43℃에서 발효시켜 속성 multi-step 발효물을 제조하였다(결과 1). 최종 속성 multi-step 발효물은 고초균 증식에 의해 대두 표면에 점질물이 생성되어 주름이 관찰되었다.



결과 1. 속성 Multi-step 발효 공정도

Multi-step 발효물



속성 Multi-step 발효물



결과 2. multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물

나. 대두의 multi-step 발효물 및 속성 multi-step 발효물의 특성 비교

발효가 완료된 multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 pH, 수분 및 환원당 함량 등을 AOAC법으로 측정하였다(결과 3). Multi-step 발효법을 대두 발효물의 pH는 7.9 정도로 약 알칼리성을 나타내었으며 속성 multi-step 발효법을 이용한 대두 발효물은 7.3 으로 대략 중성으로 나타났다. 이는 단기간에 제조된 속성 multi-step 발효물의 유산발효에 의해 pH가 다소 떨어졌을 것이라 사료된다. 또한 장기간 발효에 의해 미생물의 이용과 증발에 의한 수분 함량은 multi-step 발효물이 속성 multi-step 발효물에 비해 다소 높게 나타났다.

대두 발효물의 감미를 결정하는 대표적인 인자인 환원당 함량은 속성 multi-step 발효물의 함량이 multi-step 발효물에 비해 높게 나타나 대두 발효물의 감미도가 다소 높을 것으로 사료된다. 또한 발효 미생물의 영양원이 되는 당의 총 함량은 multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물이 각각 10.73 %, 11.18 % 로 비슷하게 나타나 두 발효법 모두 미생물에 의해 효율적으로 당이 분해된 것으로 생각된다.

Multi-step 발효물의 조단백질 함량이 속성 multi-step 발효물에 비해 다소 높게 나타났는데 장시간 발효에 의한 protease 활성이 높았기 때문으로 사료된다. 또한 multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 조지방 함량에는 큰 차이가 나타나지 않았다.

결과 3. multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 일반성분 함량

	Muti-step 발효물	속성 Mutli-step 발효물
pH	7.90	7.30
수분(%)	58.60	63.30
환원당(%)	13.75	18.00
총당(%)	10.73	11.18
조단백질(%)	18.37	15.31
조지방(%)	7.52	5.69

다. multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 성분 변화 비교

1) 단백질 분해효소 활성

Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 단백질을 분해시켜 아미노산, peptide 등을 생성하는 단백질분해효소의 역가를 최적 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성으로 구별하여 결과 4에 나타내었다. Multi-step 발효물의 유산 발효에서는 단백질분해효소의 활성이 거의 검출되지 않았고 국균 발효시에는 중성 단백질분해효소, 고초균 발효 중에는 알칼리성 단백질분해효소의 활성이 높게 나타났으며 속성 multi-step 발효물에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

결과 4 (A)는 발효 중 산성 단백질분해효소 활성을 경시적으로 측정하여 나타내었다. Multi-step 발효물의 단백질분해효소 활성은 발효 48시간에 188 U/g, 즉 황국균 접종 후 18시간에 가장 높은 활성을 보였으며 속성 multi-step 발효물의 단백질분해효소 활성은 발효 24시간에 181 U/g으로 가장 높게 나타났다. 두 발효법 모두 산성에서는 황국균의 단백질 분해효소 활성이 높게 나타났다.

중성 단백질분해효소 활성 변화는 결과 4 (B)와 같다. Multi-step 발효물은 발효 42시간 이후부터 급격히 증가하여 54시간에는 636 U/g로 중성 단백질분해효소의 활성이 가장 높게 나타났으나 고초균 발효가 진행됨에 따라 감소하여 중성 단백질분해효소의 활성이 약 390 U/g로 유지되다가 발효 78시간에 약간 증가하여 432U/g가 되었다. 반면 속성 multi-step 발효물은 고초균 발효 이후

급속히 증가하여 발효 30시간에 620 U/g 으로 가장 높게 나타났으며 이후 점차 감소하다가 48시간 이후부터 유지하는 경향을 보였다. 따라서 두 발효법 모두 중성에서의 단백질 분해효소 활성은 황국균 및 고초균 발효법 모두에서 높게 나타났다.

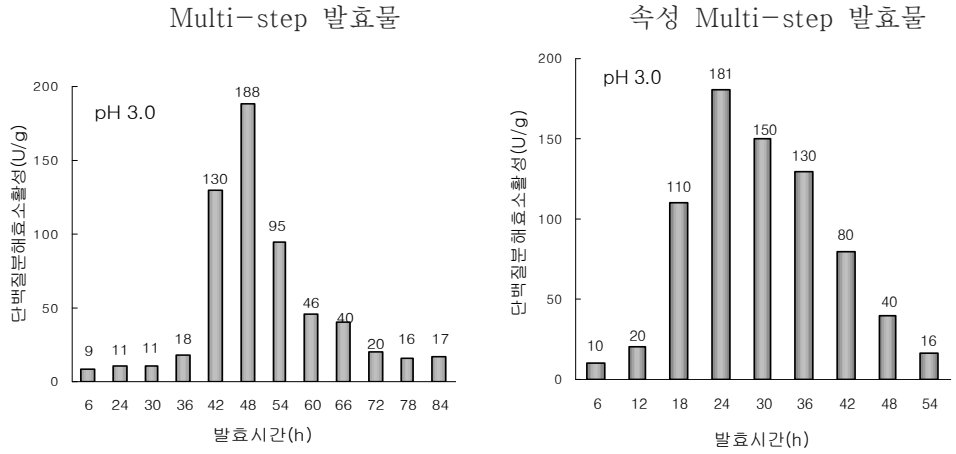
발효 중의 알칼리성 단백질분해효소 활성을 측정한 결과를 결과 4 (C)에 나타내었다. Multi-step 발효물의 알칼리성 단백질분해효소 활성은 발효 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 발효 66시간에 627.6 U/g로 최고값을 보였으며 산성이나 중성 단백질분해효소 활성과는 달리 고초균 발효 중에 알칼리성 단백질분해효소의 활성이 높게 나타났다. 또한 속성 multi-step 발효법에서도 고초균 발효시 증가하기 시작하여 발효 42시간에 590 U/g으로 가장 높았으며 단백질 분해 정도는 각 제조 방법을 비교한 결과 비슷한 경향을 나타내었다.

2) multi-step 및 속성 multi-step 완료 발효물의 유리아미노산 함량 비교

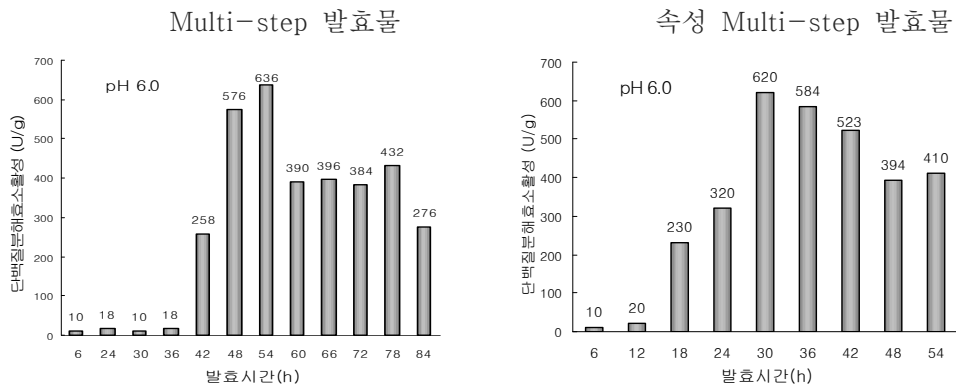
발효가 완료된 대두 발효물의 유리 아미노산 함량은 결과 5에 나타내었다. 총 유리 아미노산 함량은 multi-step 발효물이 3,511.81 mg%로 속성 multi-step 발효물 3,466.3 mg%에 비해 다소 높게 나타났다. Serine, asparagine, glycine 등 몇몇을 제외한 대부분의 유리아미노산 함량은 multi-step 발효물에서 다소 높게 검출되었으나 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한 유리되어 단맛을 내는 alanine, lysine, proline과 threonine도 multi-step 발효물에서 속성 multi-step 발효물에 비해 다소 높게 검출되었다. 반면 발효물의 감칠맛을 내는 glutamic acid는 multi-step에 비해 속성 multi-step 발효물에서 높게 나타났는데 이는 multi-step 발효법의 장기간 발효에 의한 glutamic acid가 decarboxylase에 의해 다른 유리아미노산으로 변했기 때문으로 사료된다.

Multi-step 발효법에 의한 발효물이 속성 multi-step 발효물에 비해 좋은 맛을 내는 유리아미노산의 함량이 다소 높게 나타났으나 두 발효물의 맛을 비교했을 경우 큰 차이는 없을 것으로 생각된다. 즉, 속성 multi-step 발효물은 multi-step 발효물에 비해 발효시간이 감소되었으며 영양적인 측면에서도 차이를 보이지 않아 대량 발효시 에너지 절감에 매우 큰 효과가 있을 것으로 사료된다.

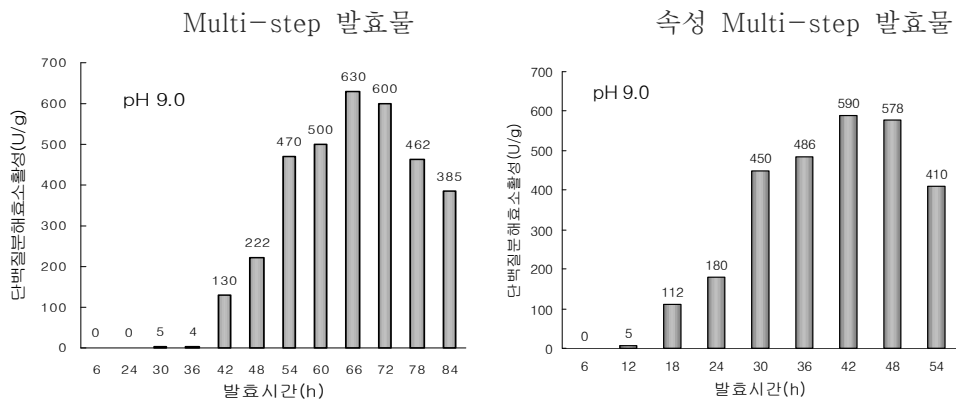
(A) pH 3.0



(B) pH 6.0



(C) pH 9.0



결과 4. Multi-step 및 속성 Multi-step 발효물의 단백질 분해효소 활성의 변화

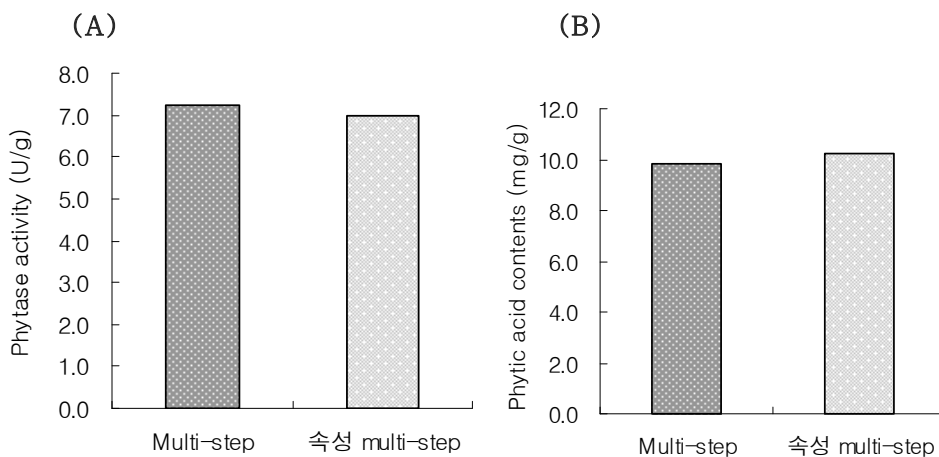
결과 5. Multi-step 발효물과 숙성 multi-step 발효물의 유리아미노산 함량
(mg/100g)

	multi-step 발효물	숙성multi-step발효물
Threonine	292.94	167.80
Serine	43.12	82.02
Asparagine	30.14	36.02
Glutamic acid	137.97	370.75
Proline	586.20	373.94
Glycine	107.52	129.25
Alanine	228.22	118.63
Valine	436.90	405.23
Methionine	60.15	16.93
Isoleucine	334.04	273.50
Leucine	554.45	506.31
Tyrosine	51.59	59.05
Phenylalanine	198.13	340.38
Lysine	384.97	384.82
Histidine	185.07	196.56
Arginine	18.37	5.11
Total(mg%)	3,511.81	3,466.3

3) Muti-step 발효물과 숙성 multi-step 발효물의 발효 중 phytase 및 phytic acid 함량 비교

대두 발효 과정 중 항영양인자인 phytic acid(myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakis dihydrogen phosphate)를 phosphate와 phosphate inositol로 분해하는 효소인 phytase 활성을 측정하여 결과 6(A)에 나타내었다. Multi-step 발효법을 이용한 발효물의 phytase 함량은 7.23 U/g으로 숙성 multi-step 발효물의 6.98

U/g에 비해 다소 높게 나타났으나 큰 차이는 보이지 않았다. 또한 multi-step 발효법에 의해 제조된 대두 발효물의 phytic acid 함량은 결과 6(B)에 나타내었다. Multi-step 발효물의 phytic acid 함량은 9.78 mg/g이었으며, 속성 multi-step 발효법을 이용한 발효물의 phytic acid 함량은 10.44 mg/g으로 multi-step 발효물에 비해 다소 높았으나 큰 차이는 보이지 않았다. 발효시 대두 중에서 다가 양이온과 불용성 복합체의 형태로 존재하는 phytic acid가 속성 multi-step 발효법을 통해서도 관여하는 미생물에 의해 다량 분해되어 음식물로 섭취할 경우 다가 양이온과 인의 소화·흡수율이 multi-step 발효물과 같이 높을 것으로 사료된다.



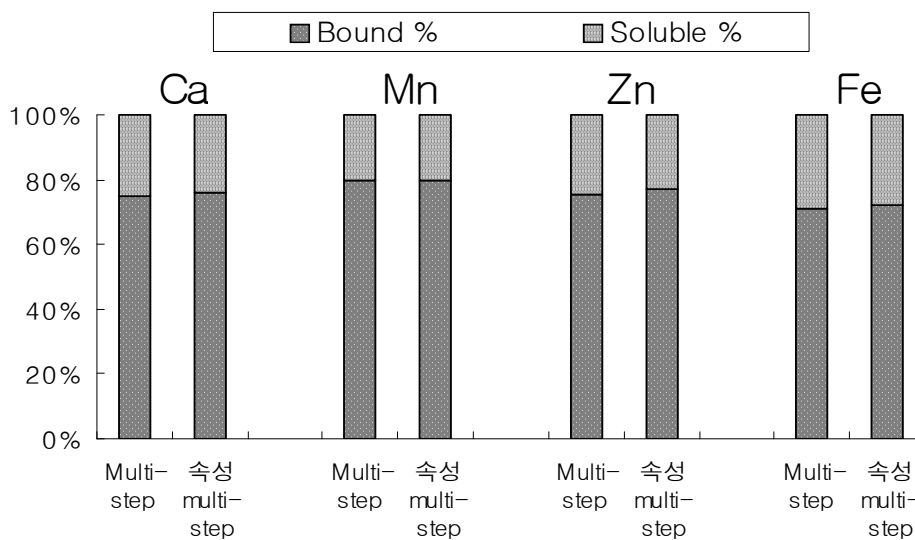
결과 6. Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 phytase 및 phytic acid 함량 변화

4) Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 미네랄 유리율 비교

발효 중 phytic acid의 분해에 따른 미네랄의 유리화 정도를 확인하기 위하여 칼슘, 아연, 철, 망간, 마그네슘을 중심으로 총 미네랄에 대한 가용성 미네랄의 비를 결과 7에 나타내었다. Multi-step 발효물의 칼슘 유리율은 25%로 속성 multi-step 발효물에 비해 다소 높게 나타났으나 큰 차이는 나타나지 않았다. 따라서 속성 multi-step 발효물도 칼슘 유리율이 우수한 것으로 미루어 섭취 시 체내 칼슘의 흡수율이 증가하여 성장기 어린 자돈의 골밀도 향상 등의 큰 효과가 있을 것으로 기대된다. 그리고 아연은 체내 대사조절에 관여하는 많은 금

속효소들(metalloenzymes)의 구성 성분이며 인슐린 호르몬 생리와 직접적으로 관련되는 필수적인 영양소로 본 연구에서 multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 아연 유리율은 20%로 차이가 없었다. 또한, 철과 곡류의 외피, 두류, 채소 등에 다량 함유되어 있는 망간의 유리율도 multi-step 발효물이 속성 multi-step 발효물에 비해 각각 24%, 29%로 약 1%씩 높게 나타났으나 큰 차이를 나타내지는 않았다.

이 결과들로 미루어 보아 속성 multi-step 발효물 또한 phytase 작용으로 인해 phytic acid와 결합되어 있던 미네랄의 유리율이 상승하고 체내에서 소화·흡수가 용이해질 것으로 생각된다. 따라서 식품원료에 함유되어 있던 물질의 이용으로 값비싼 미네랄 보조제를 첨가하지 않고도 고품질의 자돈을 생산할 수 있는 사료로 사용할 수 있을 것이다.

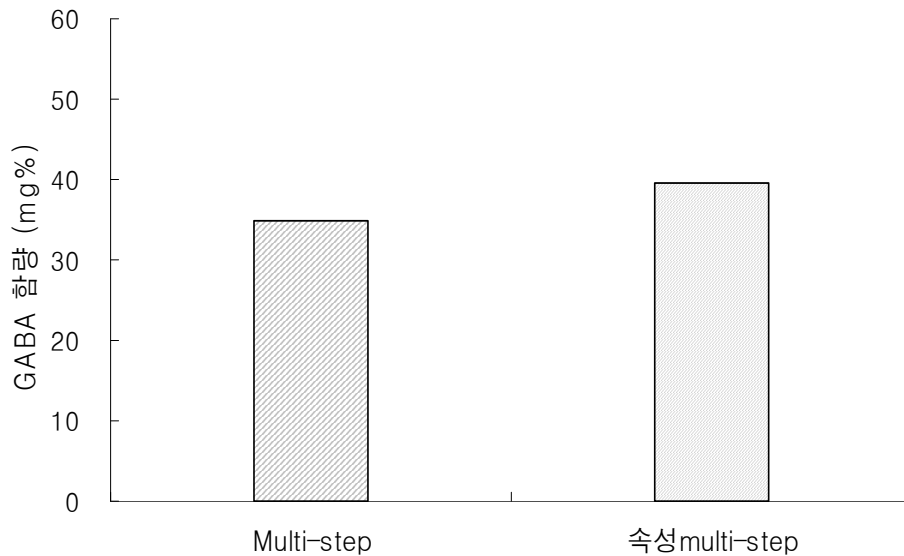


결과 7. Multi-step 및 속성 multi-step 발효 중 미네랄의 유리율

5) Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 GABA 함량

GABA는 중추 신경계의 신경전달 저해물질로 뇌의 기전과 기능에 필수적인 peptide이며 혈압강화, 간질환 예방 및 위 기능의 활성화와 항 당뇨 등의 작용을 하는 물질이다. *Lacococcus*, *Aspergillus*, *Rhizopus*에 의해 생산된 glutamate decarboxylase에 의해 혐기적 조건에서 glutamate나 aspartate가 GABA로 전환되는 것으로 보고되어 있다. 본 연구의 2년차 결과로 GABA의 최대 생성 시기

는 발효 60시간으로 보고되어 속성 multi-step 발효법을 고초균 발효 후 12시간 후 GABA 함량을 측정하여 결과 8에 나타내었다. Multi-step 발효물의 GABA 함량은 34.5 mg%이며 속성 multi-step 발효물의 GABA 함량은 39.2 mg%로 큰 차이는 나타나지 않았다.



결과 8. Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 GABA 함량

2. 다른 사료 성분과 혼합방안 및 시기 설정

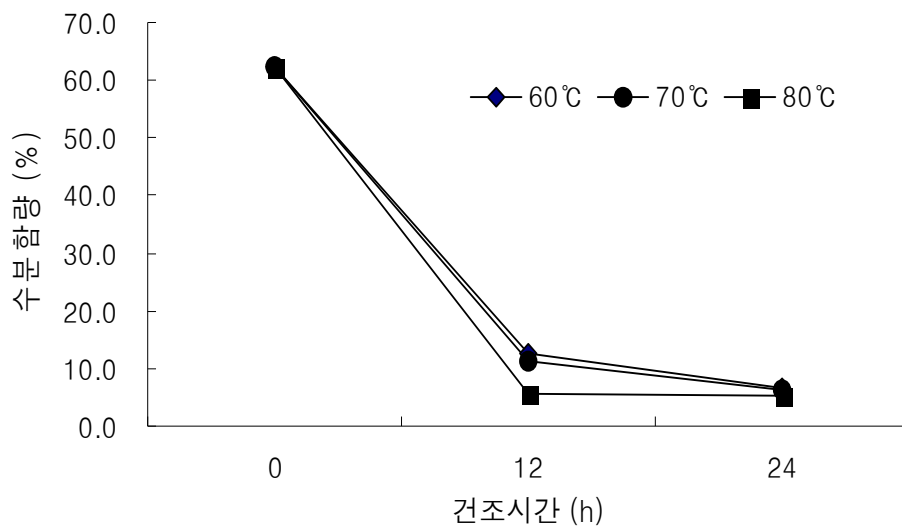
본 연구에서 개발된 자돈 영양 발효물은 사료회사 혼합기를 사용할 경우 기본적인 양이 너무 많기 때문에 현 연구 규모로는 사용 불가능 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 기존의 배합 사료에 속성 multi-step 발효물을 분쇄하여 제 2 협동과제 팀에 제공하였으며 농가에서 기존의 자돈 사료 급여시 수동으로 혼합하여 연구에 사용하였다.

3. 자돈 영양 사료의 대량 건조 및 저장 방법 탐색

가. Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 최적 건조 온도 탐색

개발된 속성 multi-step 발효물의 최적 건조 온도를 탐색하기 위하여 발효물

을 각각 60℃, 70℃, 80℃에서 24시간 건조시켜 결과 9에 나타내었다. 건조 전 속성 multi-step 발효물의 수분함량은 62.5%였으나 60℃, 70℃ 및 80℃에서 12시간 건조 후 수분 함량은 각각 12.5%, 11.4% 및 5.5%로 나타났다. 또한 60℃와 70℃에서 24시간 건조 후 수분함량은 각각 6.8%, 6.2%로 크게 감소하였으나 80℃에서 24시간 건조시킨 발효물은 5.2%로 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 에너지 절감 측면으로 볼 때 80℃에서 12시간 건조시키는 것이 가장 경제적인 것으로 생각된다.

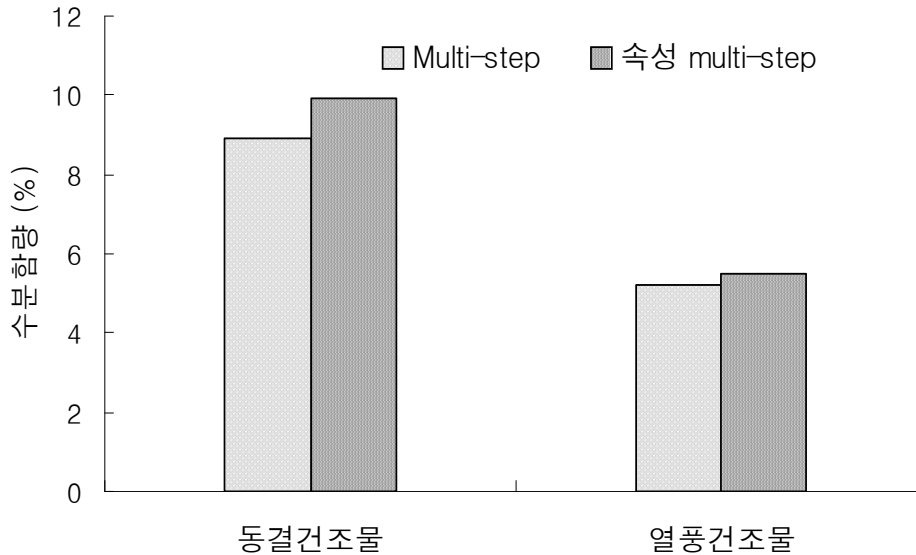


결과 9. 속성 multi-step 발효물의 온도에 따른 수분함량

나. Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 최적 건조 방법 탐색

자돈 영양 발효물의 최적 건조방법을 탐색하기 위하여 Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 동결 건조 시 수분 함량과 열풍 건조 시 수분함량을 그림 10에 나타내었다. 최적 온도 탐색 결과에 의해 80℃에서 12시간 건조시켰으며 동결 건조는 동결 건조기에서 24시간 건조시켜 수분함량을 측정하였다. Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 동결 건조 시 수분 함량은 8.9%, 9.9%로 각각 나타났으며 열풍 건조 시 발효물의 수분함량은 각각 5.7%, 5.9%로 나타나 동결 건조물의 수분 함량이 다소 높게 나타났으며 multi-step 발효물에 비해 속성 multi-step 발효물의 수분 함량이 약간 낮게 나타났다. 즉, 동결 건조법에 의한 건조는 시간과 효율 측면에서 열풍 건조에 비해 낮아 사료

의 대량 생산 시 열풍 건조법을 통한 건조가 경제적인 것으로 생각된다.



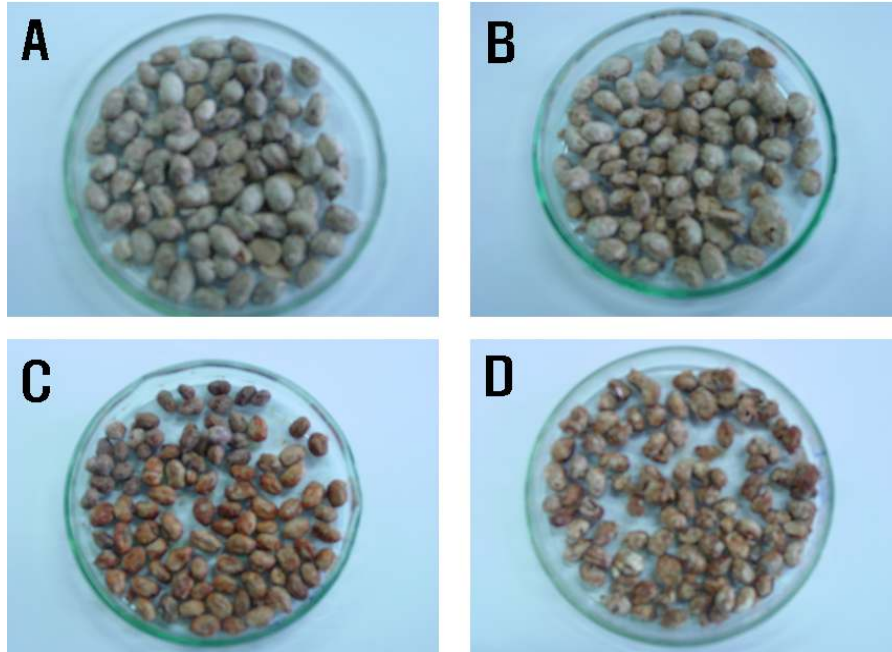
결과 10. Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 건조방법에 따른 수분함량

다. 동결 및 열풍 건조법을 통한 발효물의 유리아미노산 함량 비교

사돈 사료의 대량 건조법 개발을 위한 multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물의 동결 건조 및 열풍 건조 후 유리아미노산 함량을 결과 12와 13에 각각 나타내었다. 동결 건조는 동결 건조기를 이용하여 24시간 건조시켜 분석 시료로 사용하였으며 열풍 건조는 선행 연구 결과를 바탕으로 80℃에서 12시간 건조시켜 시료로 사용하였다(결과 11). 건조 전의 유리아미노산(결과 5)의 함량에 비해 동결 건조 및 열풍 건조 후 유리아미노산의 함량이 다소 높게 나타났는데 이는 건조 전 수분 함량이 총 시료 무게에 포함되어 측정 되었으며 건조 후 발효물은 수분이 대부분 제거되었기 때문에 높을 것으로 생각된다. 따라서 건조 전 발효물과 건조 후 발효물의 유리아미노산 함량 비율은 유사하게 나타났다.

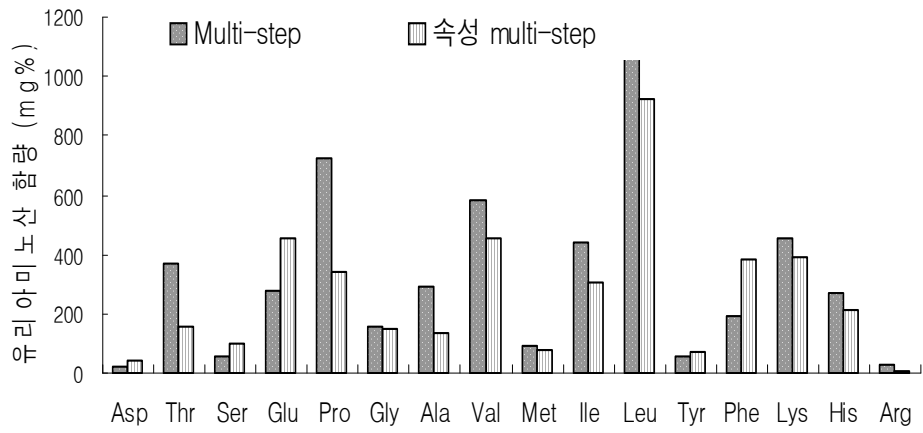
속성 multi-step 발효물의 methionine과 tyrosine 함량은 동결 건조물에 비해 열풍 건조물에서 다소 낮게 나타났다. 또한 multi-step 발효물의 동결 건조물에 비해 glutamic acid의 함량이 열풍 건조물에서 다소 감소하는 경향을 나타냈으며 phenylalanine의 함량이 증가하는 것으로 보아 열에 의해 glutamic acid가 phenylalanine으로 변했을 것으로 사료된다. 그러나 multi-step 발효물과 속성

multi step 발효물을 동결 건조시킨 유리아미노산 총 함량이 열풍 건조시킨 발효물의 유리아미노산 총 함량에 비해 약간 낮게 나타나는 경향은 있으나 이는 수분 함량에 의한 중량차이로 생각된다. 즉, 80℃에서 12시간 건조시킨 발효물과 24시간 동결 건조한 발효물은 영양적인 측면에서 큰 변화가 없었으며 동결 건조에 비해 열풍 건조를 통한 건조법은 경제적으로 우수할 것이다.

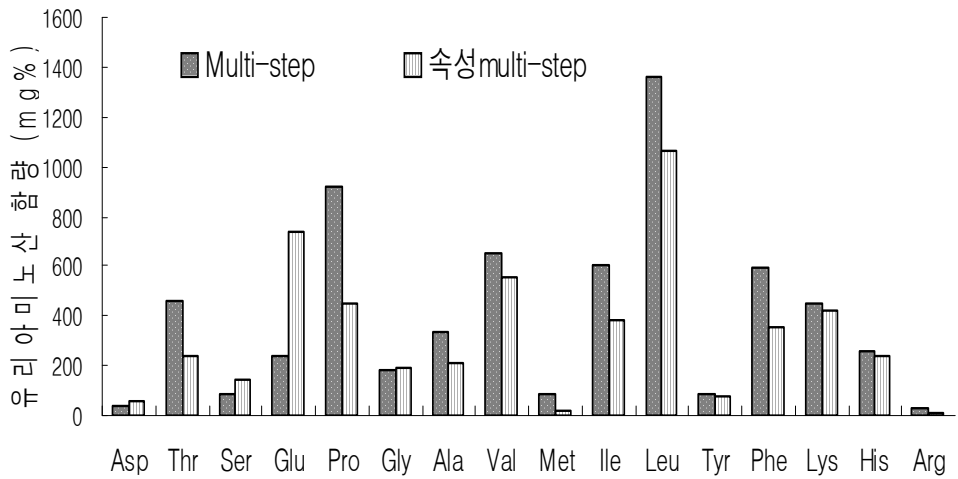


결과 11. 동결 및 열풍 건조된 multi-step 발효물과 숙성 multi-step 발효물

- A : 동결 건조한 multi-step 발효물
- B : 동결 건조한 숙성 multi-step 발효물
- C : 열풍 건조한 multi-step 발효물
- D : 열풍 건조한 숙성 multi-step 발효물



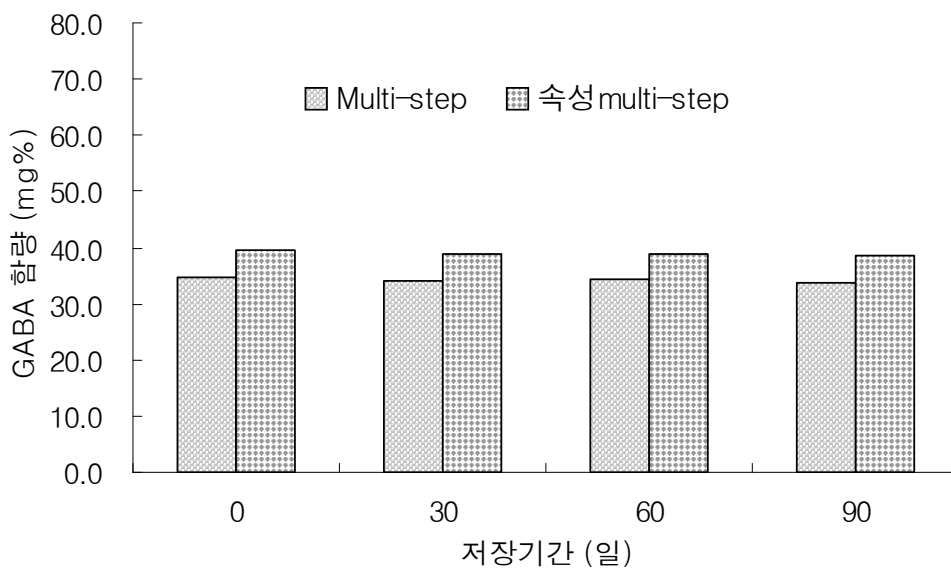
결과 12. Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 동결건조 유리아미노산 함량



결과 13. Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 열풍건조 유리아미노산 함량

라. 열풍 건조된 발효물의 저장기간에 따른 GABA 함량 비교

Multi-step 발효물과 속성 multi-step 발효물을 80℃에서 12시간 열풍건조 후 저장기간에 따른 GABA 함량을 결과 11에 나타내었다. Multi-step 열풍 건조물의 GABA 함량이 속성 multi-step 열풍 건조물에 비해 다소 낮게 나타났으나 큰 변화는 없었다. 또한 저장기간이 지남에 따라 다소 두 발효법 모두 감소하는 경향은 있으나 큰 변화는 보이지 않아 열풍 건조한 발효물의 GABA 함량은 장기 저장해도 변화가 없을 것으로 생각된다. 경제적인 multi-step 발효물의 대량생산을 위해 개발된 속성 multi-step 발효물의 성분 분석 및 저장기간을 조사함으로써 속성 multi-step 발효법은 저장기간과 에너지를 감소시켜 경제적으로 매우 효과적이며 그 성분 또한 일반 multi-step 발효법에 비해 큰 차이가 없게 나타났다.



결과 11. Multi-step 및 속성 multi-step 발효물의 저장기간에 따른 GABA 함량

제 4 장 사료의 생리활성 효능에 관한 분자생물학적 기전 해석

제 1 절 서론

한국, 일본 등과 같이 대두 등의 식물성 소재를 생체에 안전한 미생물로 발효시켜 소화율을 높여 식용하지 않아 이러한 식품의 개발이 미비한 서구에서는 이 분야의 관련 기술이 낙후되어 있는 실정이며 국내에도 알레르기를 유발할 수 있는 대두단백질의 완전한 분해법에 대한 기술은 알려져 있지 않다.

또한 대두를 첨가한 사료 중의 기능성 물질의 확인과 기전해석에 관한 연구가 미비한 실정이다.

Multi-step 발효 시스템에 의하여 가공된 대두 발효물의 생리 활성 물질에 대한 효능을 분자생물학적 수준에서 그들의 생리활성 기전을 해석함으로써 고부가·고기능성 자돈 사료의 영향을 평가하고자 한다. 이를 위하여 기존 알려진 대두 함유 기능성 생리활성 물질들에 대한 평가를 내리고 본 과제에서 도출된 후보물질들의 생리활성을 면역학적, 항염증 효능 및 항암 효능 측면에서 체계적으로 조사하여 자돈 영양 사료의 현장 적용을 위한 기능성을 평가할 것이다. 이러한 평가는 아래 제시된 다양한 방법들을 동원하여 년차별 기술 개발 목표를 달성할 것이다.

Multi-step 발효 대두를 첨가한 사료의 생리활성 효능에 관한 분자생물학적 기전을 확인으로서 고기능성 사료를 개발하고자 한다.

본 연구에서는 Multi-step 발효 대두 중 생리활성 물질을 분리·정제하고 시판 발효 대두 중의 기능성 물질과 비교한다. 또한 뇌기능 증진 펩타이드와 항염증성 펩타이드를 다량 함유한 사료를 개발함으로써 자돈의 발병으로 인한 폐사율을 감소시키고 자돈의 육질을 향상시키고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 세포배양, genistein, 대두발효 산물 및 TRAIL의 처리

본 연구에 사용된 인체 위암세포(AGS), 대장암세포(HT-1080) 및 흑색종세포

(SK-MEL-2) ; 대전의 한국세포주은행(KCLB, Taejeon, Korea)에서 분양받아 90%의 DMEM 또는 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂조건 하에서 배양하였다. 본 실험에 사용된 genistein, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 및 linoleic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며 100 µM의 농도로 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20°C에 보관하였고, 처리 전 배지에 희석하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 대두발효 산물 중, 탈지고초(fermented soybeans by *Bacillus subtilis*, FSB) 및 탈지3단(three-step fermented soybeans, TFS) 산물은 주관연구 기관인 경상대학교에서 제조된 것을 사용하였다. 또한 caspase-3 inhibitor 1 (z-DEVD-fmk) 및 caspase-9 inhibitor (z-VAD-fmk)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

2. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

Genistein 또는 대두발효 산물에 의한 세포 성장 억제 여부를 정량적으로 조사하기 위하여 준비된 세포들을 세포 배양용 6 well plate에 5×10^4 개/ml 정도로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 genistein 또는 대두발효 산물을 적정농도로 처리한 후 제시된 시간 동안 배양하였다. 적정 시간동안 처리 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 DMSO로 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램(SPSS Ins.)으로 구하였다.

3. 세포의 형태 변화

준비된 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 genistein 및 대두 발효 산물을 적정농도로 희석 처리하여 제시된 시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각

농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동 카메라용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

4. 세포핵의 형태 변화 관찰

Genistein 또는 대부발효 산물 처리에 따른 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 3.7% formaldehyde 용액을 처리하여 상온에서 10분 동안 고정하였다. PBS로 washing하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 염색하였다. 이를 PBS 및 증류수로 세척한 다음 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

5. Apoptosis 유발의 정량화 및 세포주기 변화에 미치는 영향 비교

DAPI 염색에 의한 apoptosis 유발을 재확인하고 세포주기 교란에 미치는 genistein 또는 대부발효 산물의 영향을 유세포분석기(flow cytometry)를 사용하여 정량적으로 비교·분석하였다. 이를 위하여 genistein 또는 대부발효 산물이 처리된 세포를 모아서 PBS로 충분히 씻은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포를 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol을 첨가하여 4°C에서 한 시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포들을 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실, 4°C에서 1시간 동안 염색하였다. PBS로 두 번 washing 과정을 거친 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA발현의 분석

Genistein 또는 대부발효 산물 처리에 따른 세포의 반응에 대한 기전 해석 연구를 위한 해당 유전자들의 전사 수준에서의 발현 변화를 RT-PCR 방법으로

조사하였다. 이를 위하여 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다. RT-PCR을 이용하여 분석을 시도한 유전자의 종류는 표 1에 나타낸 바와 같으며, 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다.

표 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
cyclin A	Sense	5'-TCC AAG AGG ACC AGG AGA ATA TCA-3'
	Antisense	5'-TCC TCA TGG TAG TCT GGT ACT TCA-3'
cyclin B1	Sense	5'-AAG AGC TTT AAA CTT TGG TCT GGG-3'
	Antisense	5'-CTT TGT AAG TCC TTG ATT TAC CAT G-3'
Cdc2	Sense	5'-GGG GAT TCA GAA ATT GAT CA-3'
	Antisense	5'-TGT CAG AAA GCT ACA TCT TC-3'
Cdk2	Sense	5'-GCT TTC TGC CAT TCT CAT CG-3'
	Antisense	5'-GTC CCC AGA GTC CGA AAG AT-3'
p53	Sense	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense	5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-xL	Sense	5'-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3'
	Antisense	5'-TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'

	Antisense	5'-ATG CAC CTA CCC AGC-3'
	Sense	5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3'
XIAP	Antisense	5'-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3'
	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
cIAP-1	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
cIAP-2	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3'
	Sense	5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3'
survivin	Antisense	5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3'
	Sense	5'-TCT AAC TTG GGG TGG CTT TGT CTT C-3'
Fas	Antisense	5'-GTG TCA TAC GCT TTC TTT CCA T-3'
	Sense	5'-GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA-3'
FasL	Antisense	5'-AGC CCA GTT TCA TTG ATC ACA AGG-3'
	Sense	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
COX-1	Antisense	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
	Sense	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
COX-2	Antisense	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
	Sense	5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
iNOS	Antisense	5'-CAC-AGA-GCT-GAG-GGT-ACA-3'

7. Western blot 분석에 의한 단백질 발현의 분석

정상, genistein 또는 대두발효 산물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]로 용해한 후, 고속원심분리로 세포내 잔사물을 분리시킨 다음 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및

peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

8. *In vitro* caspase-3, -8 및 -9의 활성 측정

Caspase의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 활성 측정을 위하여 정상 및 genistein이 처리된 배지에서 48 시간 배양된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 2시간동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응도를 측정하였다.

9. Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 해당 세포를 5 X 10⁴개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 genistein 또는 대부발효 산물을 적정농도로 처리하여 배양하였다. 적정 시간 처리 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시켜서 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well 당 적정량을 첨가하여 세포를 모은 다음, 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 PBS를 1 ml 첨가하여 잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞은 후 2분간 처리한 후 위상차 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다. 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

10. Prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성능 비교

Genistein 또는 대두 발효 산물 처리에 따른 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성

양의 측정을 위한 PGE₂ EIA kit는 Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며, PGE₂의 양을 측정하기 위하여 U937 세포에 다양한 농도의 FSB 및 TFS를 1시간 선 처리 후 PMA (40 nM)를 처리한 배지에서 6시간 동안 세포를 배양시킨 다음 상층액만 이용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음 ELISA reader를 이용한 420 nm의 흡광도로 반응의 정도를 측정하였다.

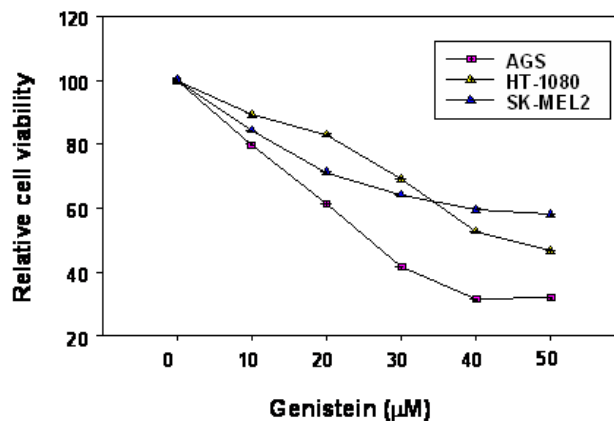
11. JC-1 dye 염색에 의한 apoptosis 유발의 정량화

다양한 조건에서 나타난 세포들의 apoptosis 유도가 mitochondrial membrane potential (MMP)의 변화를 관찰하기 위하여 정상 및 genistein이 처리된 세포를 모은 뒤 차가운 PBS로 충분히 씻은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만 버린다. 남아 있는 pellet을 10 µM 농도의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)이 들어있는 serum free medium 1 ml에 부유시켜 암실, 37 °C에서 20분 동안 염색하였다. 다시 차가운 PBS로 두 번 세척과정을 거친 후 500 µl의 PBS에 부유시켜 DNA flow cytometry에 적용시켜 분석하였다.

제 3 절 대두 및 시판 발효 대두 중의 기능성 후보물질의 분리 및 항염증성 효능 비교

1. 인체 암세포주의 증식에 미치는 genistein의 영향

몇 가지 암세포의 증식에 미치는 genistein의 영향을 분석하기 위하여 준비된 암세포들을 24시간 동안 안정화시킨 후 48시간 동안 다양한 농도(0~50 μ M)의 genistein을 처리한 후, 적정 농도를 설정하여 얻어진 결과는 결과 1과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 조사된 3가지 암세포주에서 AGS 위암세포가 genistein 처리에 대해 가장 민감함을 알 수 있었다. 따라서 본 과제외의 1년차 연구에서는 genistein의 처리에 대해 가장 민감한 반응성을 보이는 AGS 위암세포와 SK-MEL-2 흑색종 세포를 대상으로 대두의 유효 성분 표지물질로서 genistein의 생리활성 정도를 비교·분석하였다.



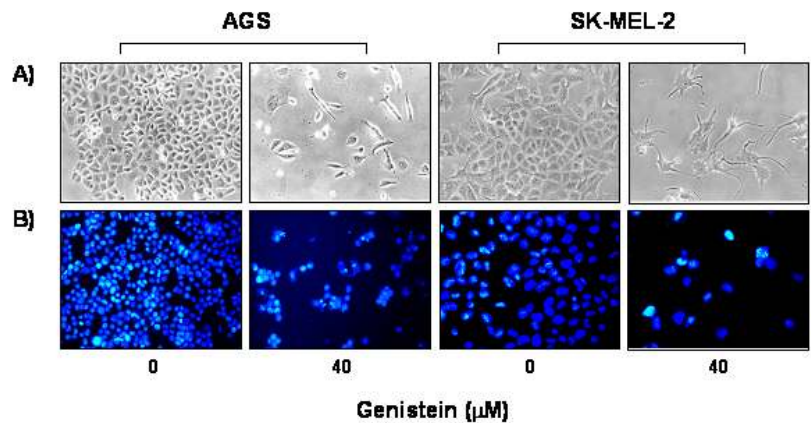
결과 1. 몇 가지 암세포의 증식에 미치는 genistein의 영향

2. Genistein 처리에 따른 암세포의 형태 변화

결과 1에서 관찰된 genistein 처리에 따른 암세포의 증식 억제 현상과 연관된 형태변화는 결과 2A에 나타낸 것과 같다. 먼저 암세포 전체적인 결과 변화에서 알 수 있듯이 genistein 처리에 따른 암세포의 성장은 genistein의 농도 의존적으로 감소되었으며, 처리 농도의 증가에 따라 암세포의 부착력이 점점 상실되어

부유됨을 관찰할 수 있었다. 그리고 genistein 처리에 따른 위와 같은 암세포의 증식억제와 형태변화가 apoptosis 유발과 관련이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 genistein을 다양한 농도로 처리한 후 암세포에서 핵의 형태변화를 조사하였다.

그림 2B에서 볼 수 있듯이 정상 조건에서 배양된 암세포 핵의 경우 DAPI 염색법을 통하여 핵의 모양이 매우 일정하며 아무런 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 genistein이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 경우 염색질의 응축에 의한 apoptotic body의 출현의 빈도가 genistein 처리 농도가 점점 증가할수록 조사된 두 암세포주 양쪽 모두에서 높아져, genistein 처리에 따른 암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 연관이 있음을 확인하였다.

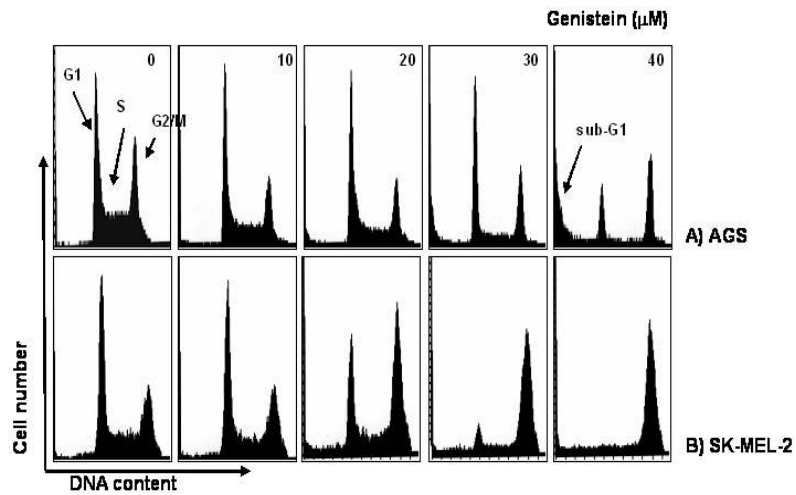


결과 2. Genistein에 의한 AGS 및 SK-MEL-2 세포의 전체적인 형태변화(A) 및 핵의 형태 변화(B)

3. 세포주기 변화에 미치는 genistein의 영향

다음은 genistein 처리에 따른 암세포의 주기 변화 여부를 조사하기 위하여 동일한 조건에서 배양된 암세포들을 대상으로 flow cytometry 분석을 실시하였다. 결과 3은 조사된 두 암세포주에서의 얻은 결과이며, 이를 정량화한 결과는 결과 4에 나타낸 바와 같다. 먼저 정상 배지에서 배양된 AGS 위암세포의 경우, G1기에 해당되는 세포의 빈도는 약 39% 정도였고, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 각각 29% 및 33% 정도였다. 그러나 genistein의 처리 농도 증가

에 따라 G1 및 S기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 감소되는 반면, G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 점차 증가되어 40 μM 처리군에서는 대조군에 비하여 약 1.8배 증가되어 58% 정도로 증가하였음을 관찰할 수 있었다. 이러한 G2/M기 세포의 증가 현상은 SK-MEL-2 세포에서 더욱 뚜렷하게 나타났는데, 결과 4에서 볼 수 있듯이 30 μM 및 40 μM 처리군에서 대조군의 31%에 비하여 2.6배 및 2.9배 증가된 80% 및 88%로 나타났다. 아울러 G1 및 S기에 해당되는 세포의 빈도는 genistein 처리 농도 증가에 따라 매우 감소함을 알 수 있었다. 즉 genistein 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 세포주기 G2/M arrest 현상과 매우 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다.



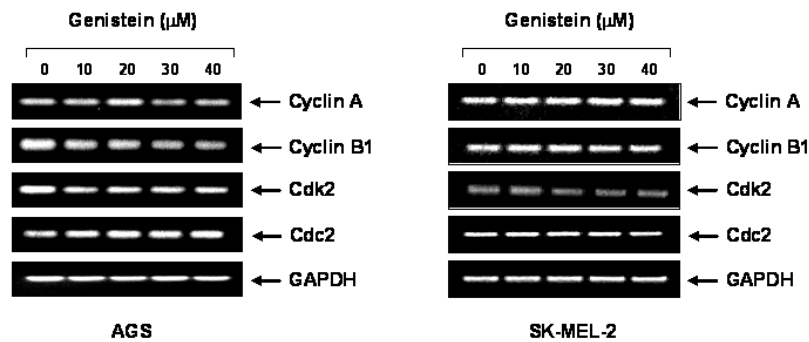
결과 3. Genistein 처리에 따른 AGS 및 SK-MEL-2 세포의 flow cytometry 분석 결과

결과 4. Genistein 처리에 따른 AGS 및 SK-MEL-2 세포의 G2/M arrest 유발

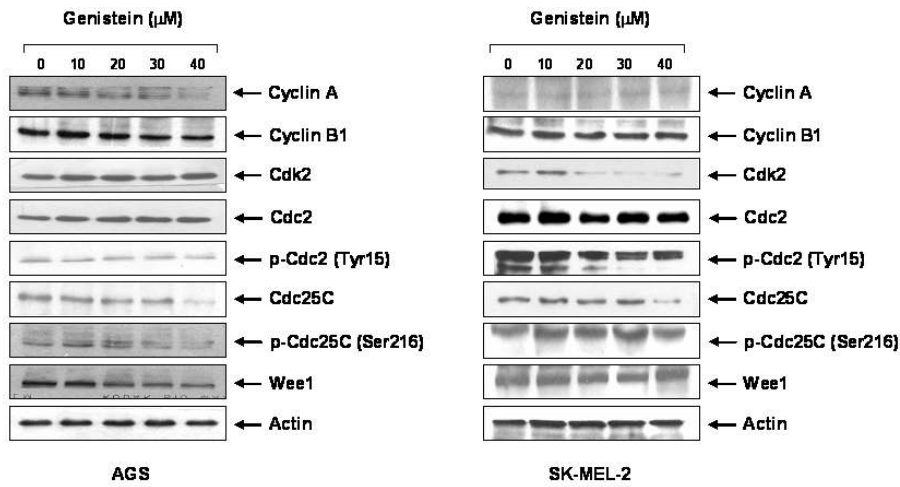
Cell line	Genistein (μM)	% of cell		
		G1	S	G2/M
AGS	0	38.69	28.50	32.81
	10	46.09	27.31	26.59
	20	48.88	23.35	27.76
	30	50.47	15.53	34.01
	40	33.13	8.95	57.91
SK-MEL-2	0	48.60	20.65	30.76
	10	47.50	18.86	33.65
	20	29.60	14.75	55.65
	30	11.24	8.59	80.17
	40	4.61	6.98	88.40

4. 세포주기 G2/M 조절 관련 유전자의 발현에 미치는 genistein의 영향

이상의 결과에서 genistein의 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 세포주기 G2/M arrest 유발과 밀접한 연관이 있음을 알았기 때문에, 이에 관한 기전 해석을 위하여 G2/M기 조절과 진행에 관련된 여러 유전자의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 결과 5는 G2/M기 조절에 가장 중요한 cyclins 및 cyclin-dependent kinases (Cdk)의 전사 수준(mRNA level)이 처리된 genistein의 영향으로 AGS 세포에서는 genistein의 처리 농도 의존적으로 cyclin A, cyclin B1 및 Cdk2의 발현이 다소 감소하였으나 SK-MEL-2 세포에서는 genistein 처리에 따른 그다지 큰 변화는 관찰할 수 없었다. 결과 6은 G2/M기 조절 및 진행과 관련된 중요한 몇 가지 유전자들의 단백질 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사한 결과로서 AGS 세포에서 cyclin A 및 cyclin B1의 발현이 다소 감소되었으며, Cdc25C와 Wee1의 발현도 다소 감소하였음을 알 수 있었다. 그러나 SK-MEL-2 세포의 경우 Cdk2의 발현이 genistein 처리 농도 의존적으로 매우 감소하였으며, Cdc2 단백질의 발현 자체는 큰 변화가 없었으나, 인산화된 Cdc2(p-Cdc2) 단백질의 발현은 다소 억제되었음을 알 수 있었다.



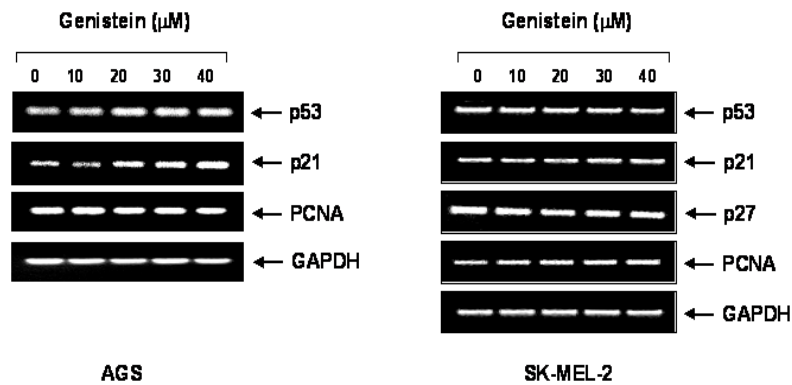
결과 5. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 G2/M 조절 관련 cyclins 및 Cdk의 전사수준 발현에 미치는 genistein의 영향



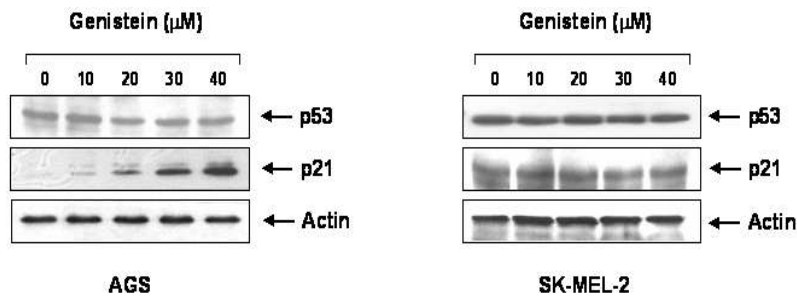
결과 6. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 G2/M 조절 관련 cyclins, Cdk2 등의 번역수준 발현에 미치는 genistein의 영향

5. 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 genistein의 영향

선행 보고된 논문들에 의하면 genistein에 의한 G2/M arrest는 종양억제 유전자 p53 비의존적인 Cdk inhibitor p21의 발현 증가와 밀접한 연관이 있을 가능성이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구의 조건에서도 이와 부합된 경로에 의한 암세포 증식억제 현상이 일어나는지를 조사하기 위하여 두 가지 암세포의 증식에 미치는 p53 및 p21의 발현을 비교 분석하였다. 먼저 RT-PCR의 결과에 의하면, AGS 세포에서는 genistein 처리에 의하여 두 유전자의 전사 수준 발현이 처리 농도 의존적으로 증가되었으나, SK-MEL-2 세포에서는 큰 변화가 없었다. 아울러 p27이나 PCNA 유전자의 전사 수준도 큰 변화는 없는 것으로 나타났다. 그러나 AGS 세포주에서 p53의 단백질 발현은 큰 변화가 없었으나, p21의 발현은 genistein 처리 농도 의존적으로 매우 증가하였음을 알 수 있었다.



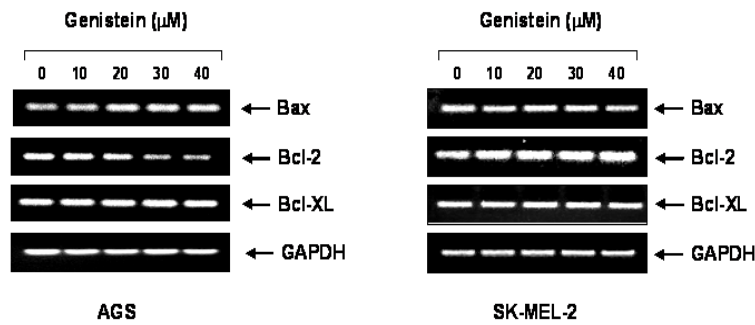
결과 7. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 p53, p21, p27 및 PCNA의 전사수준 발현에 미치는 genistein의 영향



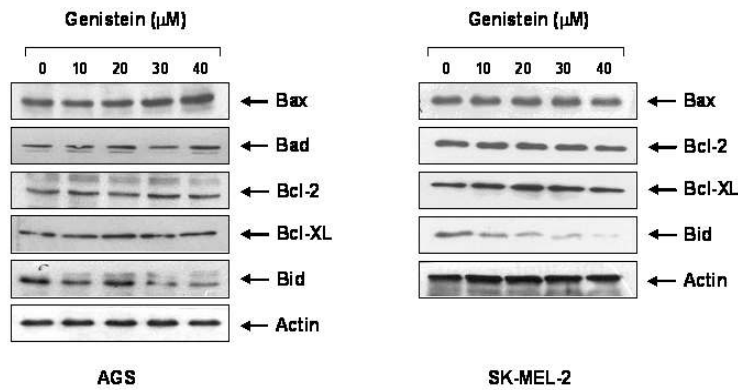
결과 8. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 p53 및 p21의 번역수준 발현에 미치는 genistein의 영향

6. Bcl-2 및 IAP family의 발현에 미치는 genistein의 영향

다음은 genistein 처리에 따른 조사된 apoptosis 유발에 어떤 경로를 통하여 일어나는지를 조사하기 위하여 먼저 apoptosis 유발에 가장 중요한 역할을 하는 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 유전자들의 발현 정도를 단백질 및 mRNA 전사 수준에서 조사하였다. 우측에 나타낸 결과(결과 9 및 10)에서 알 수 있듯이 AGS 세포에서 genistein 처리에 의하여 pro-apoptotic 인자에 속하는 Bax의 발현이 다소 증가하였으며, 특히 Bid의 단백질 발현이 두 세포주 모두에서 genistein 처리 농도 의존적으로 매우 감소하는 것을 관찰할 수 있었으나, 단편화된 형태의 band 관찰은 어려웠다.



결과 9. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 Bcl-2 family의 전사수준 발현에 미치는 genistein의 영향



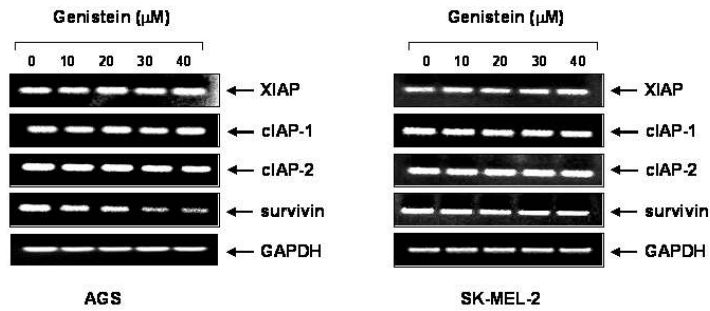
결과 10. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 Bcl-2 family의 번역수준 발현에 미치는 genistein의 영향

그리고 anti-apoptotic 유전자로 알려져 있는 IAP family에 속하는 유전자들의 발현에 미치는 영향은 결과 11 및 12에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 IAP family 유전자의 대부분이 단백질 수준에서는 발현이 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 따라서 genistein의 처리는 IAP family와 어떤 연관성이 있음을 확인할 수 있었다.

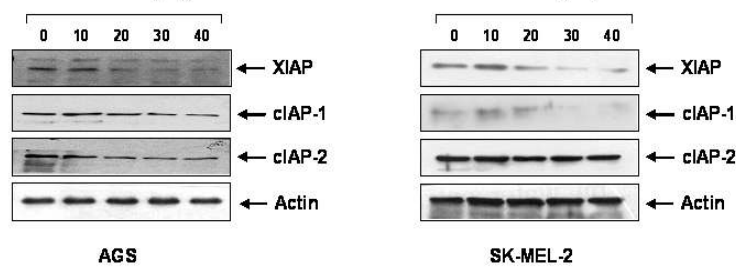
7. Fas/FasL system 발현에 미치는 genistein의 영향

다음은 세포막에 존재한 death receptor 관련 apoptosis 유발에 중요한 인자중의 하나인 Fas/FasL system 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 결과 13 및 14에 나타내었듯이, AGS 세포에서 genistein의 처리 농도 의존적으로 Fas mRNA의 발현이 다소 감소하였으나, 단백질 발현의 경우 오히려 두 암세포주 모두에서 genistein 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 알 수 있었다. 그

리고 FasL의 경우 SK-MEL-2 세포에서 다소 증가된 단백질 발현 양상을 보여 주었다.



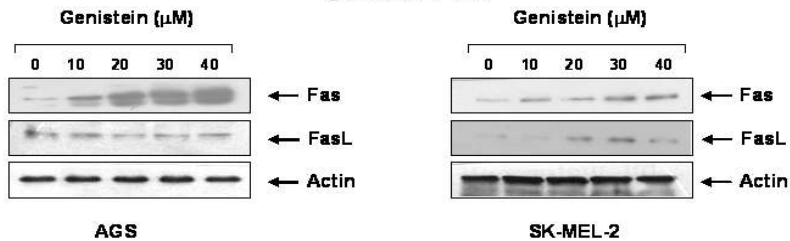
결과 11. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 IAPs family의 전사수준 발현에 미치는 genistein의 영향



결과 12. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 IAPs family의 번역수준 발현에 미치는 genistein의 영향



결과 13. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 Fas/FasL system의 전사수준 발현에 미치는 genistein의 영향

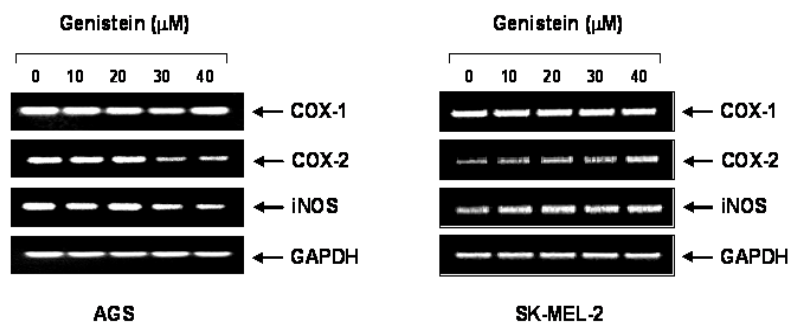


결과 14. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 Fas/FasL system의 번역수준 발현에 미치는 genistein의 영향

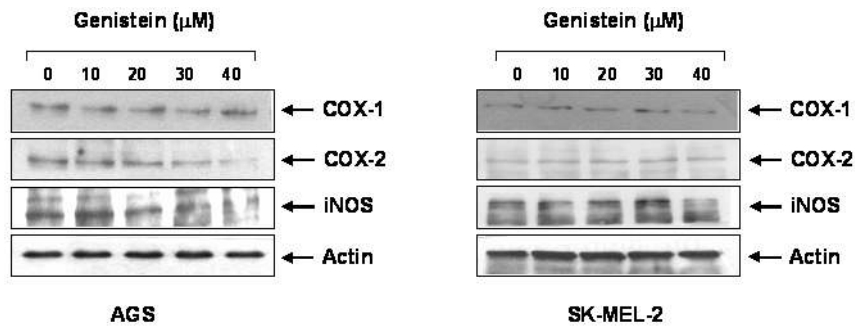
8. COXs 및 iNOS의 발현에 미치는 genistein의 영향

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포분열이나 증식에 영향을 주며, 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 한다. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행 그리고 염증 반응에서 중요한 역할을 한다. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 iNOS가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다. 따라서 genistein의 처리에 의한 암세포의 증식억제에 따른 이들 유전자들의 발현 조절 가능성을 탐색하기 위하여 COX-1, COX-2 및 iNOS의 mRNA 및 단백질 수준의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다.

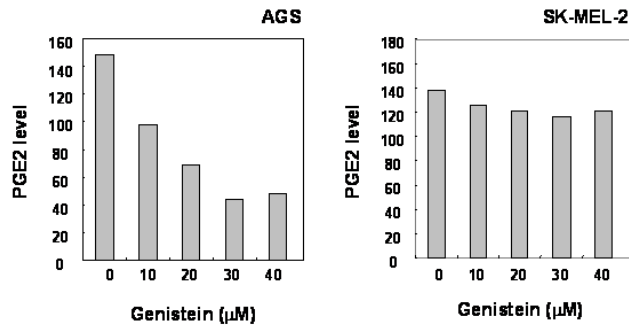
결과 15 및 16에 나타내었듯이 genistein의 처리에 따라 AGS 세포에서 COX-1의 변화는 없었으나, COX-2의 발현이 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 처리 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 그러나 SK-MEL-2 세포에서는 genistein 처리에 따라 COXs의 발현 변화는 관찰되지 않았다. 이는 PGE2 생성의 결과와도 매우 일치됨을 알 수 있었다(결과 17). 그리고 iNOS의 경우 AGS 세포에서는 genistein 처리 농도가 증가될수록 감소되었지만 SK-MEL-2 세포에서는 그다지 큰 변화가 없었다.



결과 15. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 COXs 및 iNOS의 전사수준 발현에 미치는 genistein의 영향



결과 16. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 COXs 및 iNOS의 번역수준 발현에 미치는 genistein의 영향

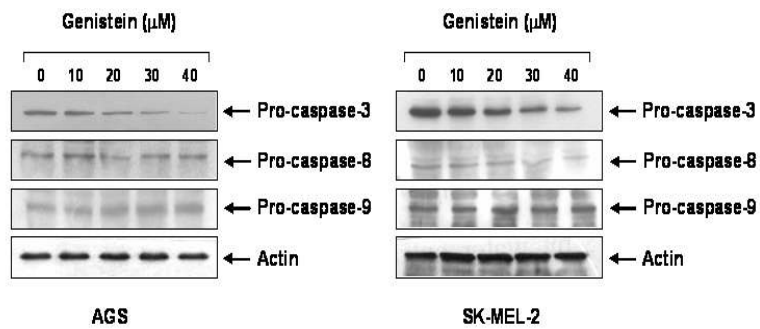


결과 17. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 PGE2의 생성에 미치는 genistein의 영향

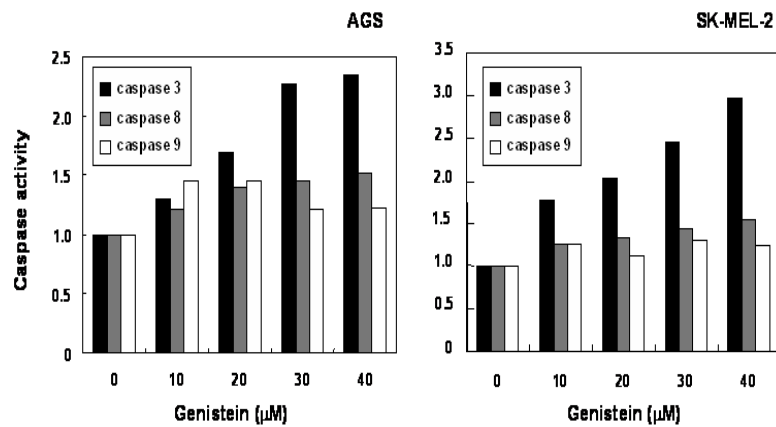
9. Genistein 처리에 따른 caspases의 활성화

이상의 결과에서 genistein 처리에 따른 위암세포 및 흑색종세포의 apoptosis 유발에는 apoptosis를 조절하는 다양한 유전자들의 발현 변화에 따른 결과가 밀접히 연관이 있음을 알 수 있었으나, 조사된 세포주에 따라 다소 상이한 결과들이 도출되었다. 이런 결과들에 의해서 genistein의 처리는 cell type 특이적으로 그 영향성을 발휘한다고 볼 수 있을 것이다. 그리고 일반적으로 apoptosis의 모든 단계에 caspases라는 효소가 관여할 수 있기 때문에 중요한 caspase의 발현 및 활성화에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 결과 18에서 알 수 있듯이 genistein의 처리 농도가 증가함에 따라 caspase-3의 비활성형 단백질의 발현이 AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 모두 감소되었음을 알 수 있었으며, 그 중 caspase-8의 경우 SK-MEL-2 세포에서도 다소 감소되었다. 이러한 비활성형 caspase 단백질의 발현 감소가 실질적인 효소로서의 활성을 가지는지의 여부를

in vitro assay를 통하여 조사한 결과 genistein 처리에 따라 특히 caspase-3의 활성 정도가 매우 높게 증가되었다(결과 19). 그리고 조사된 두 세포주 모두에서 caspase-8의 활성도 다소 증가하였으나, caspase-9의 경우 활성의 정도가 가장 낮게 나타났다.



결과 18. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 caspase 단백질 발현에 미치는 genistein의 영향



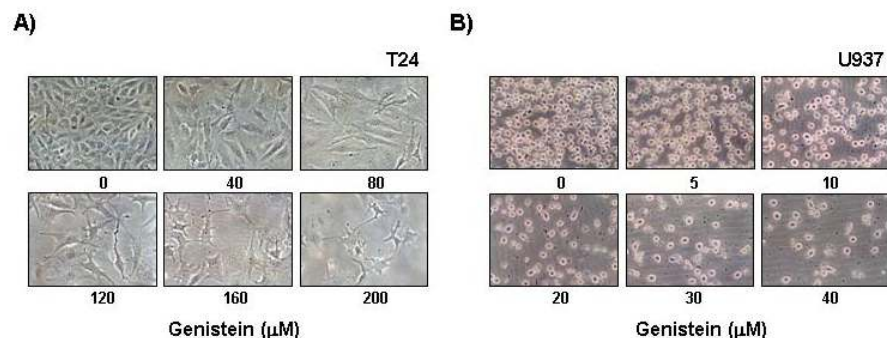
결과 19. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 genistein에 의한 caspase의 활성화

제 4 절 신경교세포에서 염증성 질환 관련 세포독성 보호 기전 해석

1. Genistein에 의한 T24 및 U937 세포의 증식 억제

T24 인체 방광암 및 U937 백혈병 세포의 증식에 미치는 genistein의 영향을 조사하기 위하여 이들 세포의 증식에 미치는 genistein의 영향을 MTT assay로 비교 조사하였다. 결과 1은 다양한 농도의 genistein 처리 48시간 후의 결과로서 두 세포주에서 모두 genistein 처리 농도 의존적으로 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었으나, T24 보다 U937 세포가 genistein에 5배 이상 감수성이 높음을 알 수 있었다. 이러한 암세포의 증식 억제 효과는 genistein의 농도 증가에 따른 심한 형태적 변형과도 연관성이 있었다(결과 1).

<결과 1>



2. Genistein에 의한 T24 및 U937 세포의 G2/M arrest

다음은 genistein의 암세포 증식억제 현상이 특정 세포주기 교란 현상과의 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 PI 염색 후 flow cytometry 분석을 실시한 결과는 결과 3A에 나타낸 바와 같다. 결과 3A의 결과에서 sub-G1기를 제외한 나머지 세포군을 대상으로 세포주기 각각의 시기에 해당되는 세포의 빈도를 정량화하여 결과 2에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 조건에서 배양된 U937 세포의 경우 G1기에 해당되는 세포의 빈도가 약 51% 정도인데 비하여 S 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 각각 약 29% 및 21% 정도였다.

그러나 genistein이 처리된 배지에서 배양된 U937 세포의 경우 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 genistein 처리 농도가 증가할수록 매우 증가되어 20 μ M 및 40 μ M 처리군에서 각각 약 37% 및 71%로 나타났으며, 상대적으로 G1기 및 S기에 해당되는 세포의 빈도는 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 genistein 처리에 따른 G2/M arrest 현상은 T24 세포에서도 같은 결과를 보여 주었다. 또한 결과 3A의 결과에서 알 수 있듯이 genistein의 처리 농도가 증가될수록 apoptosis 유발군으로 추정할 수 있는 sub-G1기의 빈도가 점차 증가함을 알 수 있었기에 이를 정량적으로 비교한 결과는 결과 3B에 나타낸 바와 같다. 결과 3B에서 알 수 있듯이 genistein의 apoptosis 유발의 정도에서도 T24 세포보다 U937 세포에서 매우 감수성이 높음을 알 수 있었다.

결과 2. Fractions of each cell cycle phase of T24 and U937 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of genistein

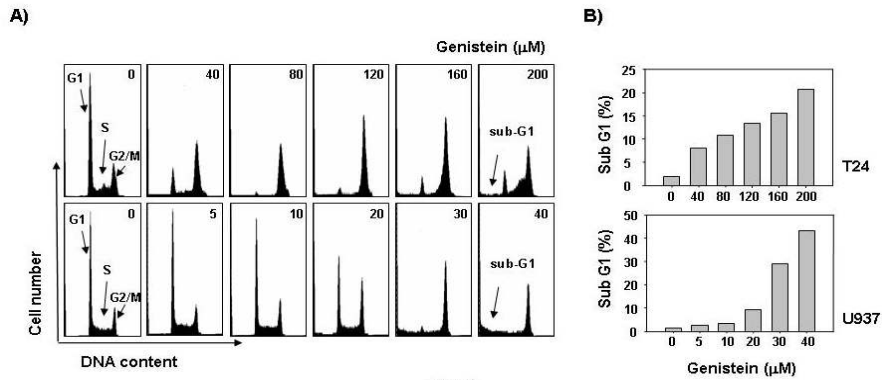
Cell line	Genistein (μ M)	% of cell		
		G1	S	G2/M
U937	0	50.75	28.61	20.64
	5	50.43	28.80	20.77
	10	45.66	28.38	25.96
	20	37.49	25.85	36.66
	30	10.11	17.14	72.75
	40	9.44	19.24	71.32
T24	0	53.95	19.89	26.16
	40	18.99	11.48	69.53
	80	3.75	3.19	93.06
	120	5.68	4.46	89.86
	160	9.14	10.17	80.69
	200	15.37	28.39	56.24

Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of genistein. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry.

3. G2/M기 조절 관련 cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 genistein의 영향

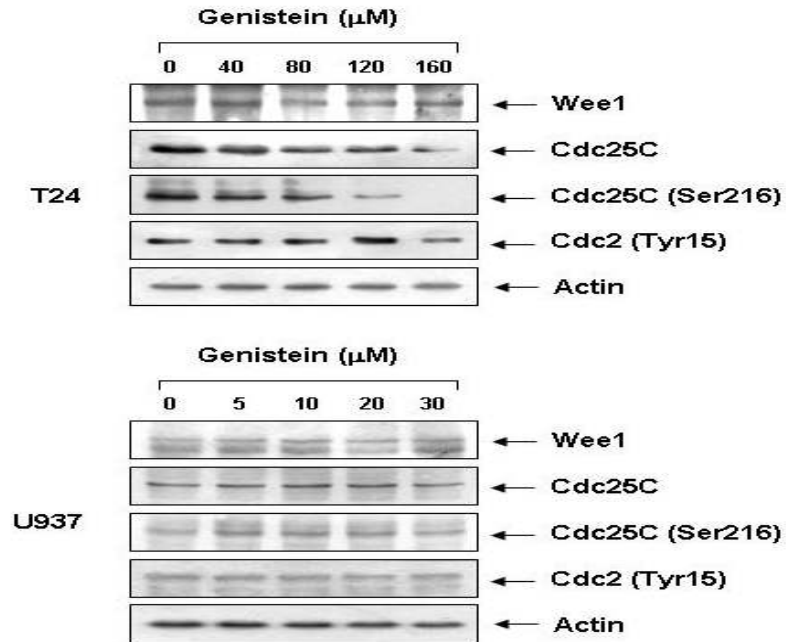
이상의 결과에서 감수성의 차이는 있었으나 genistein 처리에 의한 암세포의

<결과 3>



증식억제는 G2/M arrest 유발과 연관성이 있었기에 세포주기 G2/M 조절 관련 cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 결과 4A 및 B의 RT-PCR 및 Western blotting의 결과에서 나타낸 바와 같이 cyclin B1의 경우 T24 및 U937 세포에서 전사 및 번역 수준에서 genistein 처리 농도 의존적으로 발현이 감소되었으나, cyclin A의 경우 전사 수준에서 큰 변화 없이 번역 수준에서 서로 다른 결과를 보여 주었다. 즉 T24 세포에서는 cyclin A의 발현이 감소되었으나 U937 세포에서의 경우 genistein 처리 농도가 증가될수록 cyclin A의 발현은 증가되었다. Cdk의 경우, T24 세포에서 Cdc2의 경우를 제외하고 단백질 수준에서 큰 변화를 보이지 않았다(결과 5). 역시 G2/M기 조절에 중요한 역할을 하는 Wee1 단백질 발현의 경우는 두 세포주에서 genistein 처리에 따른 큰 차이가 없었으나 U937 세포에서와는 달리 T24 세포에서 genistein의 처리에 따라 Cdc25C의 발현과 활성이 감소되었음을 알 수 있었다(결과 6).

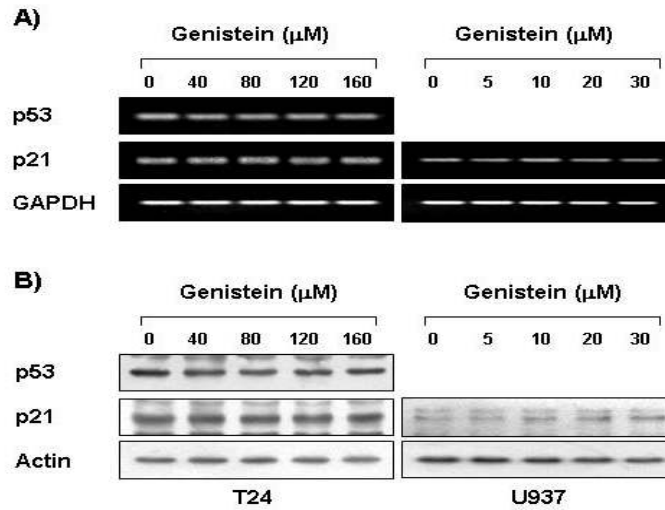
<결과 6>



4. 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 genistein의 영향

다음은 세포증식 억제 인자에 해당되는 유전자 중 세포주기 조절과 가장 밀접한 관련을 가지는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 본 연구에 사용된 T24 세포는 정상 p53 유전자를 가지지만, U937 세포는 p53 유전자가 결손된 세포주이다. 결과 7에서 볼 수 있듯이 T24 세포에서 genistein 처리에 의하여 p53 및 p21 유전자 모두 전사 및 번역 수준에서 큰 차이가 없었다. 그러나 p53이 결손된 U937 세포에서는 genistein 처리에 따라 p21의 단백질 수준에서의 발현 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 T24 세포에서 genistein 처리에 따른 세포증식 억제에 두 유전자는 큰 관여를 하는 것 같지 않으며, U937 세포에서 p21 단백질의 발현 증가가 p53 비의존적으로 일어날 수 있음을 의미한다.

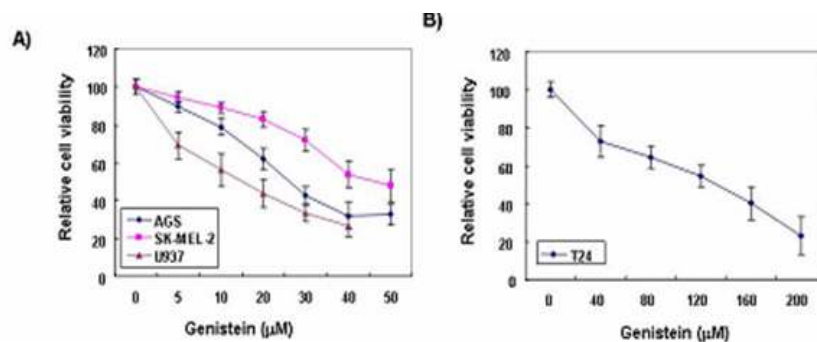
<결과 7>



5. Telomerase 및 cyclooxygenase 활성 조사를 위한 생존율 조사

Genistein에 의한 암세포의 증식억제 과정에서 telomerase 및 cyclooxygenase 활성의 변화가 동반되는지의 여부를 조사하기 위하여 실험 방법에서 설명한 방법에 준하여 다양한 암세포(AGS, 위암; SK-MEL-2, 흑색종; U937, 백혈병세포; T24, 방광암)의 증식억제 정도는 결과 8에 나타낸 바와 같이, AGS, SK-MEL-2, U937과 T24에서는 농도 의존적인 증식억제를 관찰할 수 있었지만, AGS, SK-MEL-2, U937과 T24 사이에는 약 3 - 5배 정도의 감수성 차이를 확인할 수 있었다.

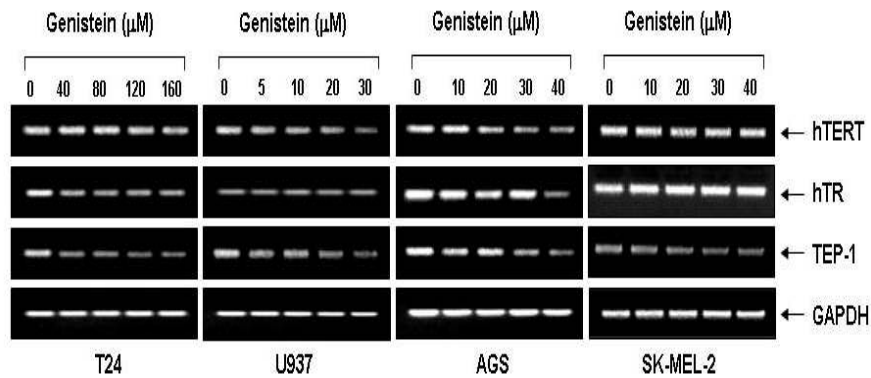
<결과 8>



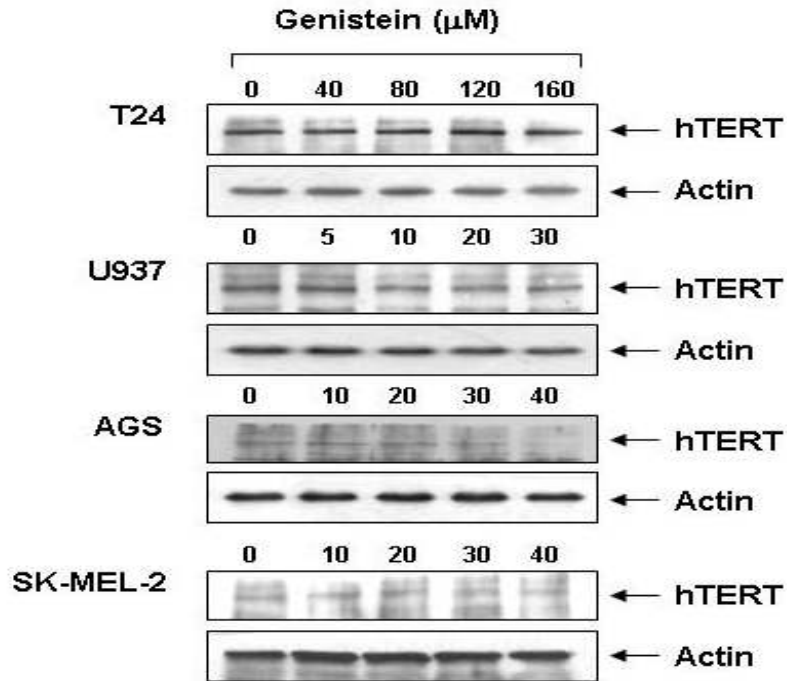
6. Telomere 조절 관련 유전자 발현과 telomerase 활성에 미치는 genistein의 영향

이상의 결과에 따른 증식억제를 확인하고 mitotic clock으로 작용하는 telomere 조절 관련 유전자에 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 결과 9에 나타난 바와 같이 telomere의 조절에 직접적으로 관여하는 인자들 [hTERT, human telomerase RNA(hTR) 및 telomerase-associated protein(TEP-1)]의 mRNA 수준을 조사하였을 때, 조사한 모든 암세포주(T24, U937, AGS 및 SK-MEL-2)에서 genistein의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적인 hTERT와 TEP-1의 발현 감소가 관찰되었고, T24와 AGS에서는 hTR의 감소 역시 관찰 할 수 있었다. 하지만 hTERT의 단백질 수준에서의 조사에서는 U937, AGS 및 SK-MEL-2 세포에서만 단백질의 발현 감소를 관찰할 수 있었다(결과 10). 그 외에 hTERT에 promoter영역의 조절인자에 해당하는 c-myc과 Sp-1의 mRNA 수준을 조사하였을 때, 결과 11에 나타난 바와 같이 U937, AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 c-myc의 발현 감소를 관찰 할 수 있었지만, Sp-1의 발현변화는 관찰 할 수 없었다. 이러한 결과에 따라 AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 telomerase 활성을 조사하였을 때, genistein의 처리 농도가 증가함에 따라 AGS 및 SK-MEL-2 두 세포주 모두에서 telomerase 활성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(결과 12).

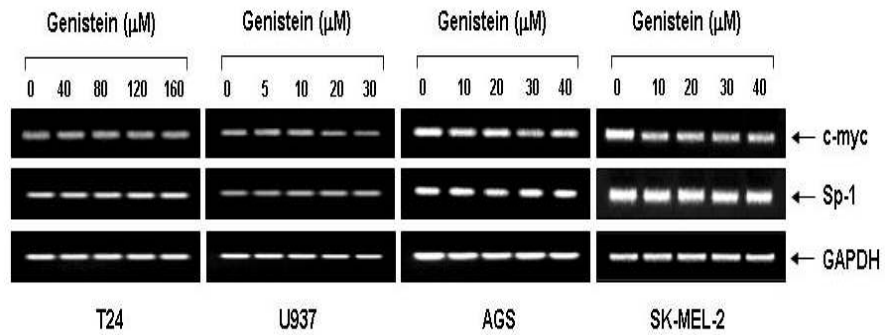
<결과 9>



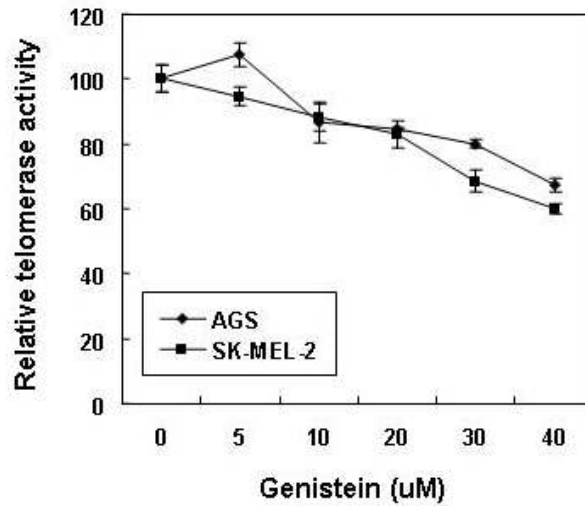
<결과 10>



<결과 11>



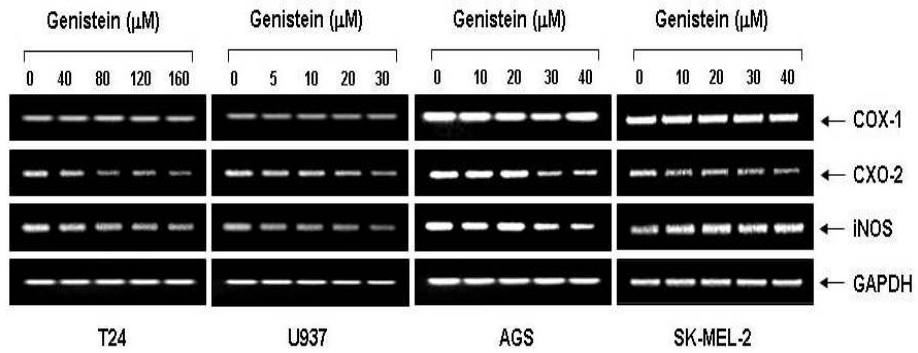
<결과 12>



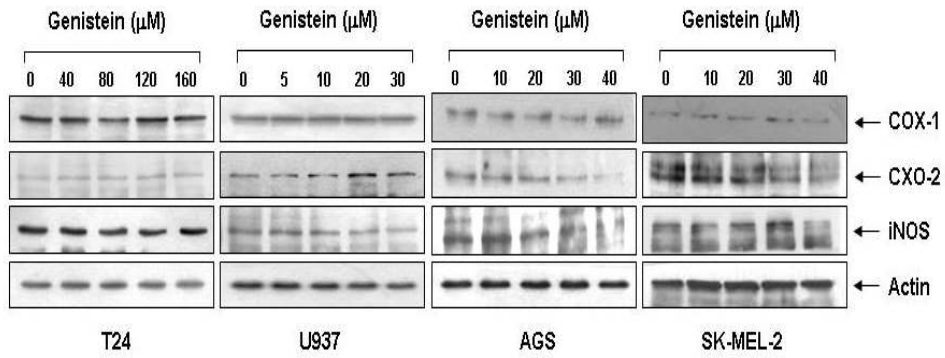
7. COXs 및 iNOS 발현과 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성에 미치는 genistein의 영향

염증반응과 여러 생체 반응에 관여하는 prostaglandin에 합성에는 cyclooxygenases (COXs)가 작용한다. 이에 따라 genistein처리에 따른 COXs와 iNOS 발현 변화와 PGE₂ 생성을 조사하였다. 결과 13과 같이 T24, U937 및 AGS와 SK-MEL-2 세포에서 COXs와 iNOS의 전사수준을 조사 하였을 때, 모든 세포주에서 COX-1은 변화가 없었으나, COX-2의 경우 genistein 처리 농도의존적인 감소는 관찰 할 수 있었으며, iNOS 역시 SK-MEL-2를 제외한 모든 세포주에서 발현 감소를 관찰 할 수 있었다. 하지만 번역 수준의 조사에서는 AGS와 SK-MEL-2 세포에서만 COX-2의 감소를 관찰 할 수 있었으며, COX-1의 변화는 관찰 할 수 없었다. 그리고 iNOS 역시도 U937과 AGS에서만 발현 감소를 관찰 할 수 있었다(결과 14). 이러한 결과에 따라 AGS 및 SK-MEL-2 세포의 PGE₂ 생성을 조사하였을 때, genistein 농도가 증가함에 따라 두 세포주 모두에서 PGE₂ 생성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(결과 15).

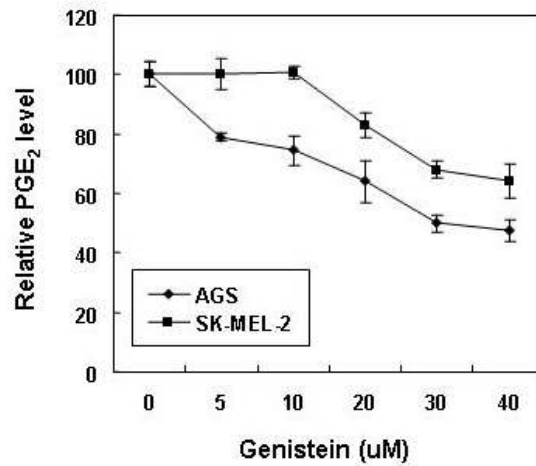
<결과 13>



<결과 14>



<결과 15>



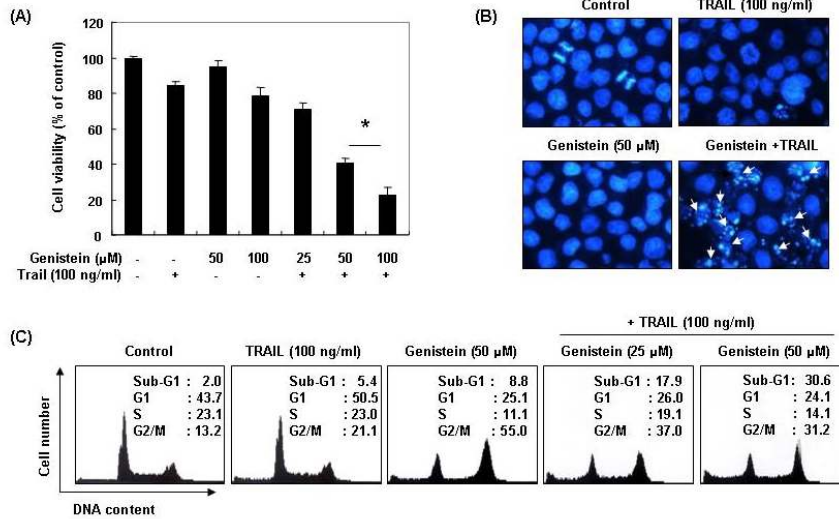
8. Genistein 및 TRAIL 혼합 처리에 따른 AGS 세포의 apoptosis 유발 증가 효과

TRAIL에 저항성을 가지는 AGS 인체위암 세포에 genistein과 TRAIL의 단독 처리 및 같이 처리하였을 경우 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는 지를 MTT assay, DAPI 염색 및 DNA flow cytometry를 이용하여 조사하였다. 먼저 MTT assay를 이용하여 세포증식의 억제 정도를 관찰하여 결과 16A에 나타난 바와 같다. Genistein을 50 μ M 및 100 μ M의 농도로 24시간동안 단독처리 하였을 경우와 TRAIL을 100 ng/ml의 농도로 단독처리 하였을 경우는 세포증식의 억제에 큰 영향을 미치지 못하였지만 100 ng/ml TRAIL에 genistein을 동시에 처리하였을 경우 농도 의존적으로 세포의 증식이 강하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 특히 100 ng/ml TRAIL과 50 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우는 약 60 % 정도의 증식억제 효과가 나타났고 100 ng/ml TRAIL과 100 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우는 70 % 이상의 증식억제 효과가 나타났다. 이러한 증식억제 효과가 apoptosis와 연관성이 있는지를 알아보기 위하여 DAPI 염색을 이용하여 핵의 형태 변화는 결과 16B에 나타난 바와 같이 TRAIL 및 genistein을 단독으로 처리하였을 때는 핵의 형태가 정상이었으나 100 ng/ml TRAIL과 50 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우에는 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 따라서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리했을 때 일어나는 증식억제 현상이 apoptosis와 연관이 있음을 알 수 있었다. 다음으로 이러한 apoptosis 유발의 정도를 DNA flow cytometry를 이용하여 정량적인 분석을 하여 결과 16C에 나타내었다. 즉 100 ng/ml의 TRAIL 및 50 μ M의 genistein을 단독으로 처리하였을 경우는 sub-G1의 비율이 각각 5.4 % 및 8.8 %로 나타나 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만 100 ng/ml의 TRAIL 및 25 μ M, 50 μ M의 genistein을 동시에 처리하였을 경우는 sub-G1의 비율이 각각 17.9 % 및 30.6 %로 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 genistein이 TRAIL에 저항성을 가지는 AGS 인체 위암세포에서 TRAIL에 의하여 유도되는 apoptosis를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

9. Mitochondria의 기능에 미치는 genistein 및 TRAIL의 혼합 처리 효과

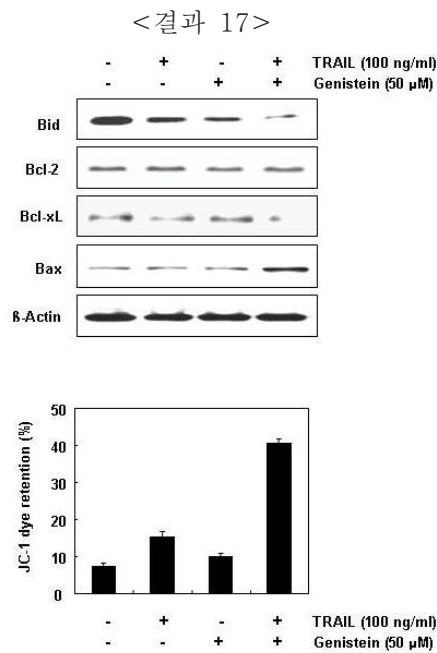
최근 연구에 따르면 apoptosis의 유발에 있어서 mitochondria가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어지고 있다. Apoptosis에 의한 세포 사멸의 경우는

<결과 16>



mitochondria의 depolarization이 유발이 되어 cytochrome *c*가 세포질로 방출되는데 이때 관여하는 유전자가 Bcl-2 family이다. Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있다. 그 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome *c*를 유리시켜 cysteine-related 단백질 분해효소인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하며, 서로 dimer의 형태로 존재하지만 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다. 따라서 TRAIL 및 genistein의 처리에 따른 이들 유전자의 발현정도를 관찰하여 결과 17A에 나타내었다. Bcl-2의 경우는 TRAIL과 genistein 각각을 단독으로 처리하였을 때와 동시에 처리하였을 경우 큰 차이가 나타나지 않았지만 anti-apoptotic 분자인 Bcl-xL의 경우는 동시에 처리하였을 경우 현저하게 감소하는 것으로 나타났고 pro-apoptotic 분자인 Bax의 경우는 TRAIL과 genistein을 동시에 처리하였을 경우 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 caspase-8에 의하여 영향을 받는 Bid의 경우는 TRAIL 및 genistein을 단독으로 처리하였을 경우 발현양이 조금 감소하였지만 동시에 처리하였을 경우에는 발현양의 감소가 더욱 강하게 나타났다. 다음으로 이러한 유전자들에 의하여 영향을 받는 mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi_m$)을 관찰하여 결과 17B에 나타낸 바와 같다. TRAIL 및 genistein을

단독으로 처리하였을 경우는 대조군에 비해서 큰 차이가 나타나지 않았지만 100 ng/ml TRAIL 및 50 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우 대조군에 비해서 $\Delta\psi_m$ 이 현저하게 증가되는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리했을 때 유도되는 apoptosis에서 mitochondria가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.



10. Caspases 및 PARP에 미치는 genistein 및 TRAIL의 영향

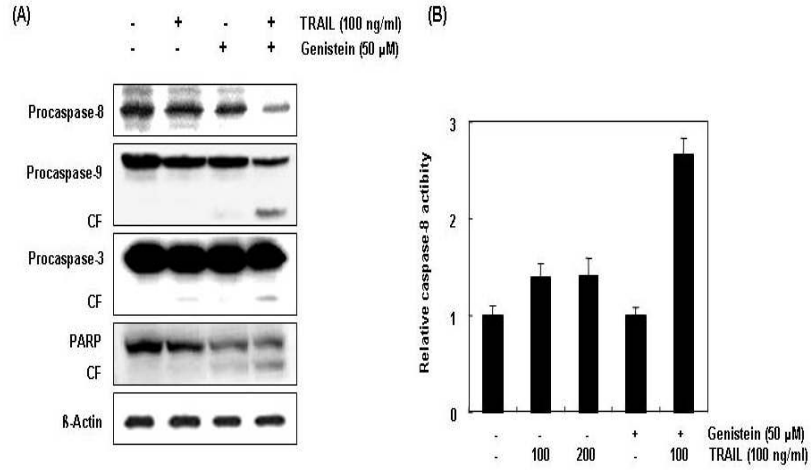
Caspase 단백질 분해효소 family에 속하는 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2/Bax family와 같은 apoptosis 유도를 활성화 시키는 신호에 의해 활성화된 단백질 분해효소로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. Caspase의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 또 다른 증거가 될 수 있으며 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔지만 많은 경우에 apoptosis는 이러한 유전자들의 발현이나 세포주기 비의존적으로도 일어날 수 있다. 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 대부분의 세포에서 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9이 높은 활성도를 나타내므로 TRAIL 및 genistein이 이들 caspases의 발현에 미치는 영향을 western bolt analysis를 통하여 조사하였다. 결과 18A에서 볼 수 있듯이 100 ng/ml의 TRAIL 및 50 μ M의 genistein을 단독으로 처리하였을 경우는 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우는 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9 모두에서 단백질의 발현이 감소하였고 특히 caspase-3 및 caspase-9에서는 활성형 단백질이 관찰되었다. 따라서 활성형 단백질이 관찰되지 않은 caspase-8은 *in vitro* assay를 이용하여 측정하여 결과 18B에 나타낸 바와 같

이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 각각을 단독으로 처리하였을 경우에 비해서 활성 정도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 다음으로 DNA repair 나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며, apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspases에 의하여 분해가 일어나는 PARP 단백질의 경우는 정상적인 세포의 경우 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있는데 결과 18A에서와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 단독으로 처리했을 경우에 비해서 발현양의 감소 및 단편화 현상이 현저하게 나타났다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein에 의해서 유도되는 apoptosis에는 이들 caspases들이 관여할 것이라고 생각된다.

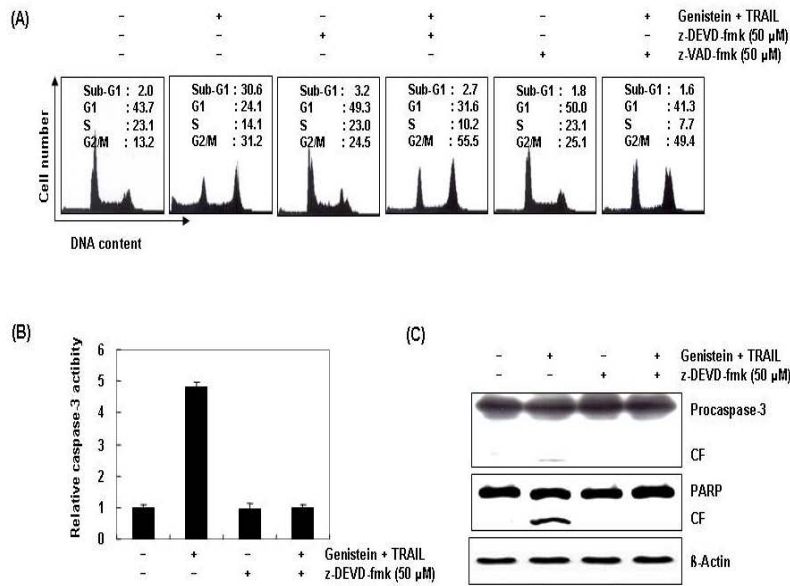
11. Genistein 및 TRAIL에 의한 apoptosis에서 caspase-3 inhibitor의 영향

결과 18에서 나타낸 바와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 유발되는 apoptosis에서 caspases가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 따라서 caspases의 활성을 억제하였을 경우 apoptosis의 유발이 억제 되는지를 caspase-3 inhibitor인 z-DEVD-fmk 및 pan caspase inhibitor 인 z-VAD-fmk를 이용하여 알아보았다. 먼저 결과 19A에 나타낸 바와 같이 DNA flow cytometry를 이용하여 관찰한 결과 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 sub-G1의 비율이 30.6 %로 나타났지만 z-DEVD-fmk를 선처리 하였을 경우는 2.7 %로 나타났고 z-VAD-fmk를 선처리 하였을 경우는 1.6 %로 현저하게 감소되는 것을 알 수 있었다. caspase-3의 활성의 경우도 Fig. 19B에서와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 대조군에 비해서 약 5배 정도 증가 하였지만 z-DEVD-fmk를 선처리 하면 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 19C에서 나타난 바와 같이 caspase-3의 단백질의 발현정도도 z-DEVD-fmk의 처리에 의하여 활성형 단백질이 감소하였으며 caspase-3의 표적 단백질인 PARP의 경우 TRAIL 및 genistein의 동시처리에 의해서 유발된 단편화 현상도 z-DEVD-fmk의 선처리에 의하여 완벽하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 유발되는 apoptosis에는 caspase-3의 활성화가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

<결과 18>



<결과 19>



12. Death receptors (DR4 & DR5)의 발현에 미치는 genistein 및 TRAIL의 영향

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL 또는

Apo2L)은 10여년 전에 최초로 발견되었다. Tumor necrosis factor (TNF) superfamily에 속하는 TRAIL은 암세포에 있어서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. TRAIL은 모두 다섯 종류의 ligand와 결합을 하는데 정상세포의 경우는 osteoprotegerin, DcR1 (TRAIL-R3) 및 DcR2 (TRAIL-R4)와 같은 세 종류의 decoy receptor와 결합을 함으로서 apoptosis를 일으키지 못하지만 암세포에서는 DR4 (TRAIL-R1) 및 DR5 (TRAIL-R2)와 결합을 하여 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다. TRAIL이 DR4 및 DR5와 결합을 하면 procaspase-8과 Fas Associated Death Domain (FADD)을 포함하는 Death Inducing Signaling Complex (DISC)을 형성함으로서 apoptosis를 유도한다. 즉 TRAIL은 정상세포에서는 독성을 가지지 않고 암세포에서만 독성을 가지므로 새로운 항암물질로서의 가능성을 인정받고 있다. 따라서 TRAIL 및 genistein에 의한 apoptosis 유발에 death receptor 중 DR4 및 DR5가 관여하는지의 여부를 Western blotting으로 조사하였다. 먼저 50 μ M의 genistein과 100 ng/ml의 TRAIL을 단독으로 처리하였을 경우 결과 20A 및 B에서와 같이 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 하지만 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우에는 결과 20C에서와 같이 DR4는 변화가 없었지만 DR5의 경우는 처리시간이 증가할수록 발현의 정도도 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리할 경우 DR5를 통한 death receptor pathway에 의하여 apoptosis가 유발된다는 것을 알 수 있었다.

13. 탈지고초, 탈지증자, 탈지황국 및 탈지 3단 추출물에 의한 U937 세포의 증식 억제

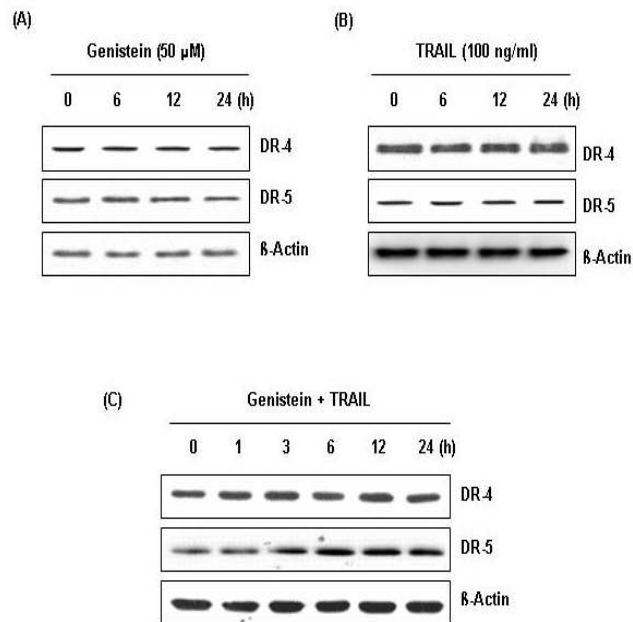
U937 백혈병 세포의 증식에 미치는 탈지고초, 탈지증자, 탈지황국 및 탈지3단의 영향을 조사하기 위하여 세포의 증식에 미치는 각각의 시료에 대한 영향을 MTT assay로 비교 조사하였다. 결과 21은 다양한 농도의 탈지고초, 탈지증자, 탈지황국 및 탈지 3단을 6시간 동안 처리한 결과로서 농도가 높아질수록 약간의 증식억제 효과가 나타났지만 네 가지 시료 모두에서 80 % 이상의 생존율이 유지되는 것으로 나타났다.

14. U937 세포에서 PMA 처리에 따른 COX-2의 발현 증가

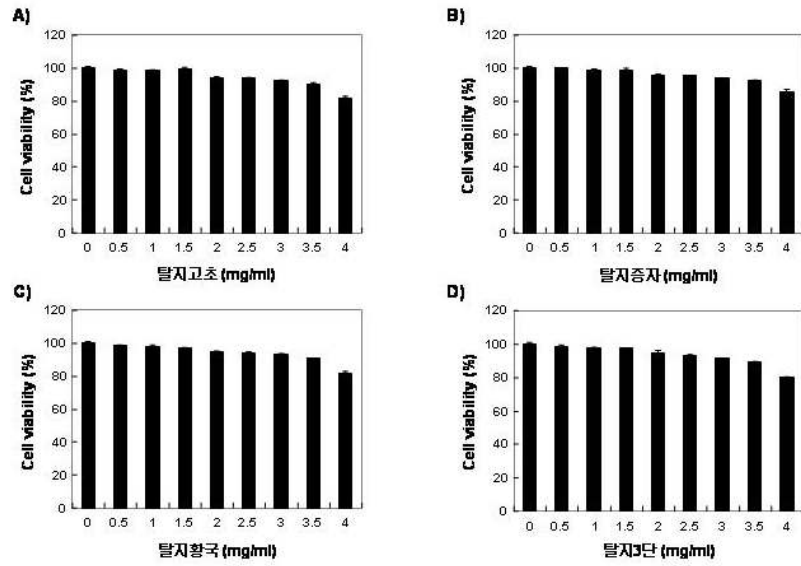
U937 인체 혈구암세포에서 PMA 처리에 따른 COX-2의 발현의 정도를 알아 보았다. 먼저 결과 22A에서와 같이 6시간동안 다양한 농도의 PMA를 처리하였

을 경우 40nM의 농도에서부터 COX-2의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 22B에서와 같이 40nM의 농도를 처리한 후 시간별로 COX-2의 발현의 정도를 관찰한 결과 2시간 까지는 발현이 관찰되지 않았지만 4시간째부터 COX-2의 발현이 관찰되었고 6시간에서는 COX-2의 발현이 강하게 나타났다. 하지만 iNOS 및 COX-1의 발현은 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 상기 Fig. 21의 결과와 융합된 향후 실험의 진행에 사용될 기본 결과로 활용될 것이다.

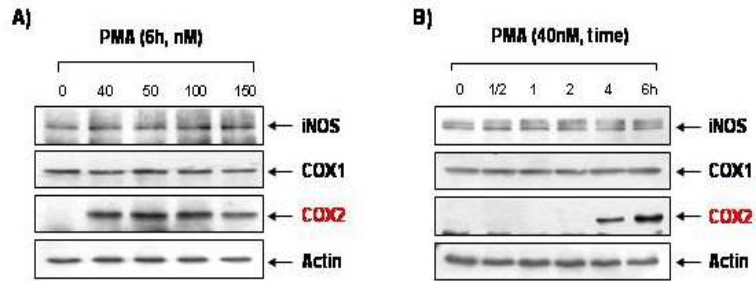
<결과 20>



<결과 21>



<결과 22>

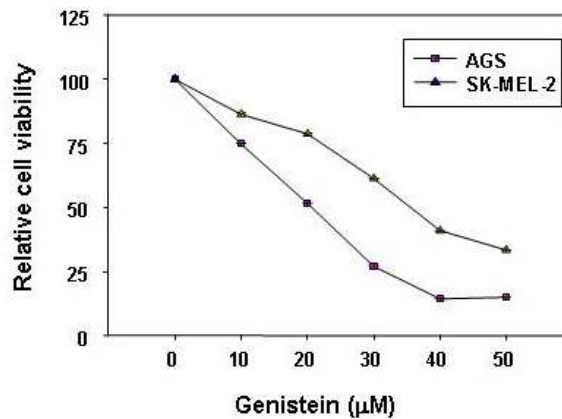


제 5 절 기능성 생리활성 후보 물질의 항암/면역증강 효능에 관한 연구

1. 암세포의 생존에 미치는 genistein의 영향

Genistein을 적정농도로 희석하여 AGS 및 SK-MEL-2 세포에 48시간 동안 처리한 후, hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하여 genistein이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 결과 1에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 처리된 genistein의 농도가 증가될수록 생존율은 두 세포주 모두에서 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었으며, 특히 40 μM 처리군에서 AGS 세포의 생존율은 약 10% 정도로 나타난 반면 SK-MEL-2 세포의 생존율은 약 40%로 나타나 AGS 세포가 genistein에 대해 민감하게 반응하는 것을 알 수 있었으며, 이는 MTT assay에 의한 결과와 거의 유사하였다.

<결과 1>

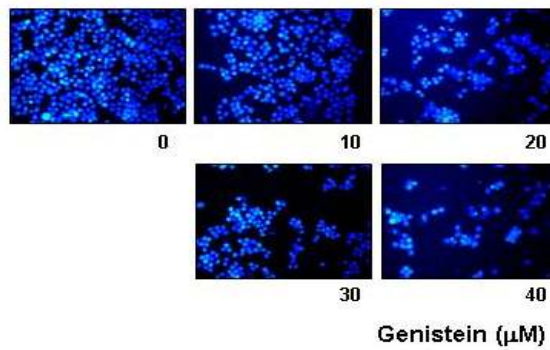


2. Genistein 처리에 의한 apoptosis 유도

Genistein의 처리에 따른 암세포의 증식억제에는 암세포의 전체적인 모양에서 다양한 형태적 변형을 유발하였으며(data not shown), 이러한 암세포의 성장억제와 형태적 변형이 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI staining을 실시하여 핵의 형태를 조사하였다. 결과 2에 나타낸 바와 같

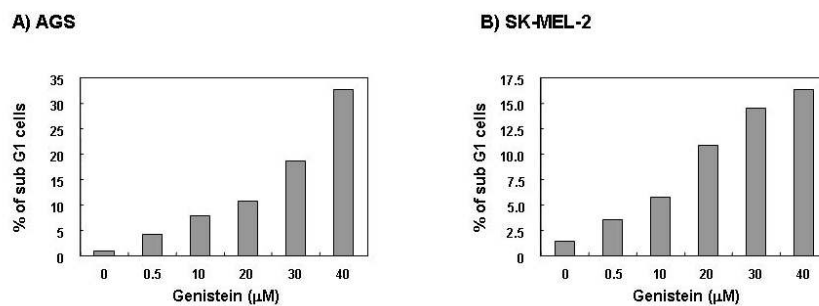
이 AGS 세포에서 genistein이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 genistein이 처리된 암세포의 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 농도 의존적으로 증가되었으며, 이는 SK-MEL-2 세포에서도 유사하게 관찰된 바 있다.

<결과 2>



이상의 형태적 분석에서 genistein에 의한 암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 직접적인 관련이 있었기에 genistein 처리에 따른 apoptosis 유발의 정도를 flow cytometry를 이용하여 정량적인 분석을 하여 결과 3에 나타내었다. 즉 정상 배지에서 자란 암세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 매우 낮았지만 (2% 미만) genistein의 처리 농도가 증가될수록 apoptosis의 유발 정도가 증가하여 40 μM 농도에서 AGS 세포는 sub-G1의 비율이 약 32% 였고 SK-MEL-2 세포는 약 16% 로 나타나 genistein의 처리에 따른 sub-G1의 경우도 AGS 세포에서 높게 나타났음을 알 수 있었다.

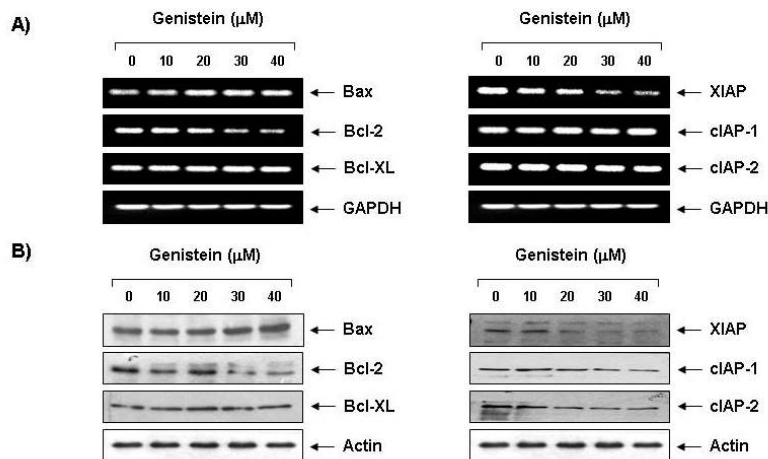
<결과 3>



3. Bcl-2 및 IAP family의 발현에 미치는 genistein의 영향

다음은 genistein의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 기전을 조사하기 위하여 AGS 세포를 대상으로 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 유전자의 발현 수준을 RT-PCR 및 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. 결과 4A 및 B에 나타낸 바와 같이 genistein 처리 농도 의존적으로 apoptosis 유도에 관여하는 Bax의 발현이 증가하였고 apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-2의 발현이 감소하였음을 알 수 있었다. 하지만 SK-MEL-2 세포에서는 Bax 및 Bcl-2 모두 genistein 처리에 따른 변화가 거의 관찰되지 않았다. IAP family의 경우, Fig. 19에 나타난 바와 같이 AGS 세포에서 genistein의 처리에 의해 전사 및 번역수준에서 IAP family의 선택적 감소 현상이 관찰되었다.

<결과 4>

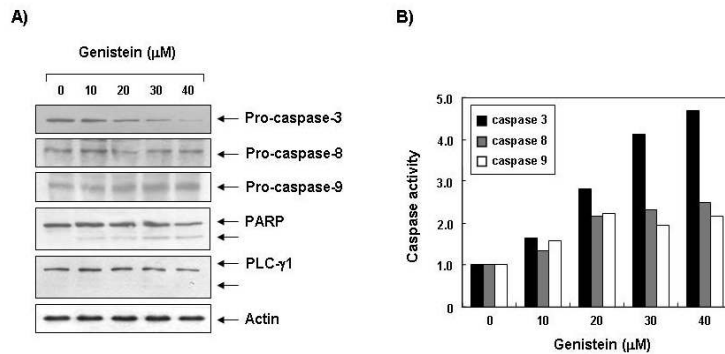


4. Caspases의 발현 및 활성화에 미치는 genistein의 영향

지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3, -8 및 -9의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 결과 5A의 결과에서 볼 수 있듯이 AGS 세포에서 genistein의 처리에 의하여 불활성형인 pro-caspase-3 단백질의 발현은 농도 의존적으로 감소되었으나 뚜렷한 활성형의 단백질 발현 증가를 정확히 관찰하기는 어려웠다. 따라서 caspases의 활성 정도를 직접 분석한 결과, 결과 5B에 나타난 바와 같이

genistein이 처리된 암세포에서는 처리 농도 의존적으로 caspase-3의 활성이 모두 증가되었음을 알 수 있었다. 특히 genistein을 40 μM 처리하였을 경우 caspase-3의 활성이 약 4.7배 정도 증가하였다.

<결과 5>



5. PARP 및 PLC- γ 1의 발현에 미치는 genistein의 영향

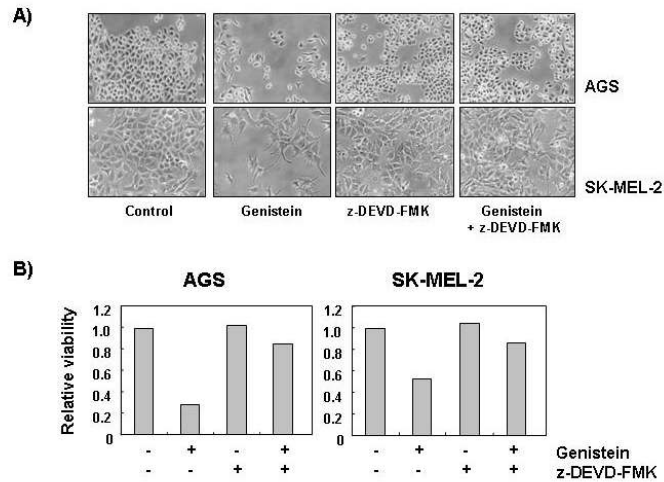
다음은 apoptosis 유발시 caspase에 의하여 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 genistein의 영향을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. 결과 5A에서 볼 수 있듯이 AGS 세포에서 genistein의 처리 농도 증가에 따라 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP 단백질의 발현의 단편화가 나타났으며, 세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 하는 PLC- γ 1 단백질의 발현 또한 genistein의 처리 농도 의존적으로 발현의 감소 또는 단편화현상이 나타났다.

6. Caspase-3 inhibitor에 의한 apoptosis의 억제

이상의 결과들을 살펴볼 때 caspase-3의 활성이 genistein에 의한 apoptosis에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 caspase-3 inhibitor가 genistein에 의한 apoptosis를 어떠한 영향을 주는지 조사하여 보았다. 결과 6에서 나타난 바와 같이 AGS 위암세포 및 SK-MEL-2 흑색종세포 모두에서 genistein의 처리에 의해 유도되는 apoptosis가 caspase-3 inhibitor인 z-DEVD-FMK 전 처리에 의해서 약 15% 정도 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 genistein에 의해서 유

도되는 apoptosis에는 caspase-3이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

<결과 6>

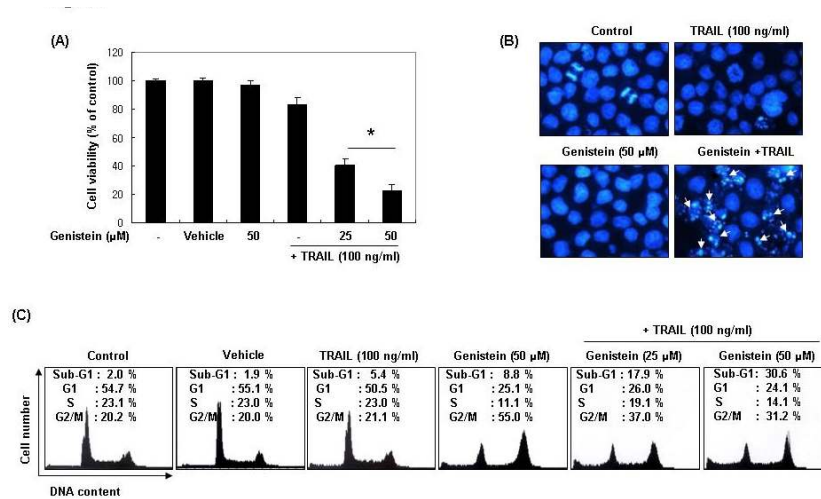


7. Genistein 및 TRAIL 혼합 처리에 따른 AGS 세포의 apoptosis 유발 증가 효과

TRAIL에 저항성을 가지는 AGS 인체위암 세포에 genistein과 TRAIL의 단독 처리 및 같이 처리하였을 경우 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는 지를 MTT assay, DAPI 염색 및 DNA flow cytometry를 이용하여 조사하였다. 먼저 MTT assay를 이용하여 세포증식의 억제 정도를 관찰하여 결과 7A에 나타내었다. Genistein을 50 μ M 및 100 μ M의 농도로 24시간동안 단독처리 하였을 경우와 TRAIL을 100 ng/ml의 농도로 단독처리 하였을 경우는 세포증식의 억제에 큰 영향을 미치지 못하였지만 100 ng/ml TRAIL에 genistein을 동시에 처리하였을 경우 농도 의존적으로 세포의 증식이 강하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 특히 100 ng/ml TRAIL과 50 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우는 약 60 % 정도의 증식억제 효과가 나타났고 100 ng/ml TRAIL과 100 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우는 70 % 이상의 증식억제 효과가 나타났다. 이러한 증식억제 효과가 apoptosis와 연관성이 있는지를 알아보기 위하여 DAPI 염색을 이용하여 핵의 형태 변화는 결과 7B에 나타난 바와 같이 TRAIL 및 genistein을 단독으로 처리하였을 때는 핵의 형태가 정상이었으나 100 ng/ml TRAIL과 50 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우에는 apoptosis가 일어난

세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 관찰되었다. 따라서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리했을 때 일어나는 증식억제 현상이 apoptosis와 연관이 있음을 알 수 있었다. 다음으로 이러한 apoptosis 유발의 정도를 DNA flow cytometry를 이용하여 정량적인 분석을 하여 결과 7C에 나타내었다. 즉 100 ng/ml의 TRAIL 및 50 μ M의 genistein을 단독으로 처리하였을 경우는 sub-G1의 비율이 각각 5.4 % 및 8.8 %로 나타나 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만 100 ng/ml의 TRAIL 및 25 μ M, 50 μ M의 genistein을 동시에 처리하였을 경우는 sub-G1의 비율이 각각 17.9 % 및 30.6 %로 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 genistein이 TRAIL에 저항성을 가지는 AGS 인체 위암세포에서 TRAIL에 의하여 유도되는 apoptosis를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

<결과 7>

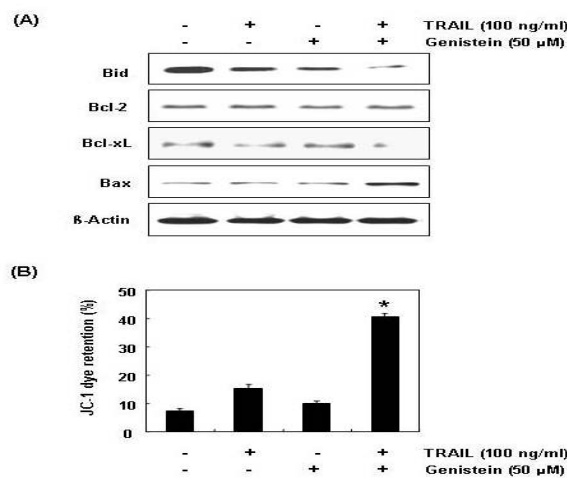


8. Mitochondria의 기능에 미치는 genistein 및 TRAIL의 혼합 처리 효과

최근 연구에 따르면 apoptosis의 유발에 있어서 mitochondria가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어지고 있다. Apoptosis에 의한 세포 사멸의 경우는 mitochondria의 depolarization이 유발이 되어 cytochrome *c*가 세포질로 방출되는데 이때 관여하는 유전자가 Bcl-2 family이다. Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있다. 그 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을

가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하며, 서로 dimer의 형태로 존재하지만 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다. 따라서 TRAIL 및 genistein의 처리에 따른 이들 유전자의 발현정도를 관찰하여 결과 8A에 나타내었다. Bcl-2의 경우는 TRAIL과 genistein 각각을 단독으로 처리하였을 때와 동시에 처리하였을 경우 큰 차이가 나타나지 않았지만 anti-apoptotic 분자인 Bcl-xL의 경우는 동시에 처리하였을 경우 현저하게 감소하는 것으로 나타났고 pro-apoptotic 분자인 Bax의 경우는 TRAIL과 genistein을 동시에 처리하였을 경우 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 caspase-8에 의하여 영향을 받는 Bid의 경우는 TRAIL 및 genistein을 단독으로 처리하였을 경우 발현양이 조금 감소하였지만 동시에 처리하였을 경우에는 발현양의 감소가 더욱 강하게 나타났다. 다음으로 이러한 유전자들에 의하여 영향을 받는 mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\Psi_m$)을 관찰하여 결과 8B에 나타내었다. TRAIL 및 genistein을 단독으로 처리하였을 경우는 대조군에 비해서 큰 차이가 나타나지 않았지만 100 ng/ml TRAIL 및 50 μ M genistein을 동시에 처리하였을 경우 대조군에 비해서 $\Delta\Psi_m$ 이 현저하게 증가되는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리했을 때 유도되는 apoptosis에서 mitochondria가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

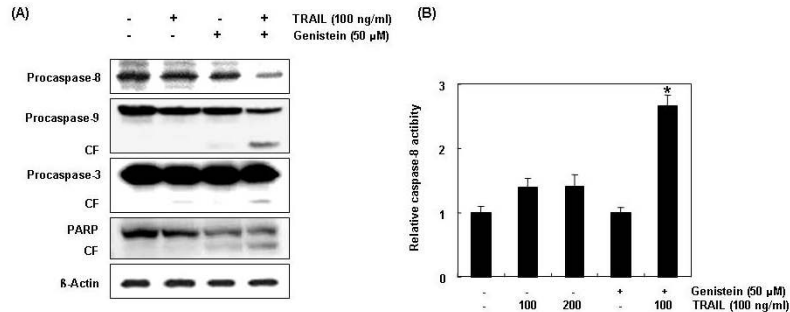
<결과 8>



9. Caspases 및 PARP에 미치는 genistein 및 TRAIL의 영향

Caspase protease family에 속하는 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2/Bax family와 같은 apoptosis 유도를 활성화 시키는 신호에 의해 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. Caspase의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 또 다른 증거가 될 수 있으며 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔지만 많은 경우에 apoptosis는 이러한 유전자들의 발현이나 세포주기 비의존적으로도 일어날 수 있다. 지금까지 알려진 caspase 중 apoptosis가 유발된 대부분의 세포에서 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9이 높은 활성도를 나타내므로 TRAIL 및 genistein이 이들 caspases의 발현에 미치는 영향을 western bolt analysis를 통하여 조사하였다. 결과 9A에서 볼 수 있듯이 100 ng/ml의 TRAIL 및 50 μ M의 genistein을 단독으로 처리하였을 경우는 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우는 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9 모두에서 단백질의 발현이 감소하였고 특히 caspase-3 및 caspase-9에서는 활성형 단백질이 관찰되었다. 따라서 활성형 단백질이 관찰되지 않은 caspase-8은 *in vitro* assay를 이용하여 측정하여 결과 9B에 나타낸 바와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 각각을 단독으로 처리하였을 경우에 비해서 활성 정도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 다음으로 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며, apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspases에 의하여 분해가 일어나는 PARP 단백질의 경우는 정상적인 세포의 경우 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있는데 결과 9A에서와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 단독으로 처리했을 경우에 비해서 발현량의 감소 및 단편화 현상이 현저하게 나타났다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein에 의해서 유도되는 apoptosis에는 이들 caspases들이 관여할 것이라고 생각된다.

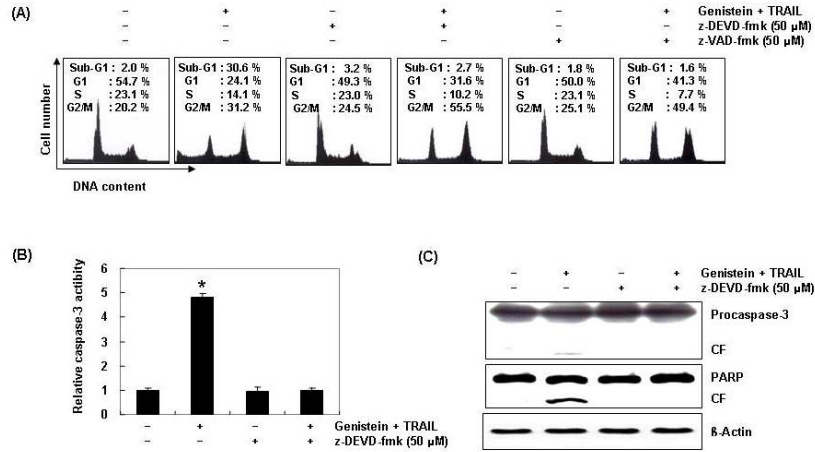
<결과 9>



10. Genistein 및 TRAIL에 의한 apoptosis에서 caspase-3 inhibitor의 영향

결과 9에서 나타난 바와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 유발되는 apoptosis에서 caspases가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 따라서 caspases의 활성을 억제하였을 경우 apoptosis의 유발이 억제 되는지를 caspase-3 inhibitor인 z-DEVD-fmk 및 pan caspase inhibitor 인 z-VAD-fmk를 이용하여 알아보았다. 먼저 결과 10A에 나타난 바와 같이 DNA flow cytometry를 이용하여 관찰한 결과 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 sub-G1의 비율이 30.6 %로 나타났지만 z-DEVD-fmk를 선처리 하였을 경우는 2.7 %로 나타났고 z-VAD-fmk를 선처리 하였을 경우는 1.6 %로 현저하게 감소되는 것을 알 수 있었다. caspase-3의 활성의 경우도 결과 10B에서와 같이 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 대조군에 비해서 약 5배 정도 증가 하였지만 z-DEVD-fmk를 선처리 하면 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한 결과 10C에서 나타난 바와 같이 caspase-3의 단백질의 발현정도 도 z-DEVD-fmk의 처리에 의하여 활성형 단백질이 감소하였으며 caspase-3의 표적 단백질인 PARP의 경우 TRAIL 및 genistein의 동시처리에 의해서 유발된 단편화 현상도 z-DEVD-fmk의 선처리에 의하여 완벽하게 억제되는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우 유발되는 apoptosis에는 caspase-3의 활성화가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

<결과 10>

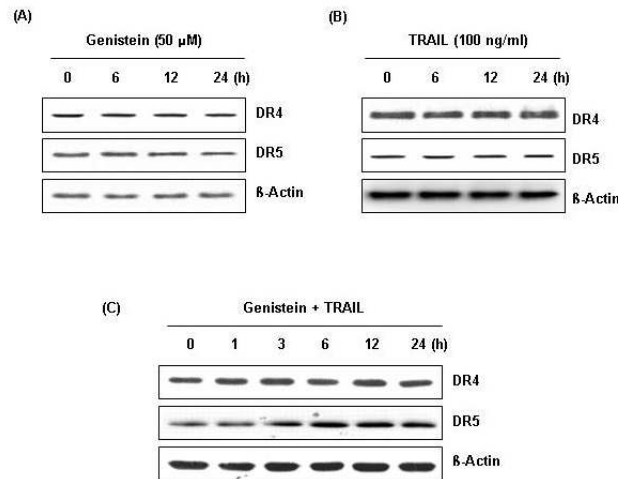


11. Death receptors (DR4 & DR5)의 발현에 미치는 genistein 및 TRAIL의 영향

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL 또는 Apo2L)은 10여년전에 최초로 발견되었다. Tumor necrosis factor (TNF) superfamily에 속하는 TRAIL은 암세포에 있어서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. TRAIL은 모두 다섯 종류의 ligand와 결합을 하는데 정상세포의 경우는 osteoprotegerin, DcR1 (TRAIL-R3) 및 DcR2 (TRAIL-R4)와 같은 세 종류의 decoy receptor와 결합을 함으로서 apoptosis를 일으키지 못하지만 암세포에서는 DR4 (TRAIL-R1) 및 DR5 (TRAIL-R2)와 결합을 하여 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다. TRAIL이 DR4 및 DR5와 결합을 하면 procaspase-8과 Fas Associated Death Domain (FADD)을 포함하는 Death Inducing Signaling Complex (DISC)을 형성함으로써 apoptosis를 유도한다. 즉 TRAIL은 정상세포에서는 독성을 가지지 않고 암세포에서만 독성을 가지므로 새로운 항암물질로서의 가능성을 인정받고 있다. 따라서 TRAIL 및 genistein에 의한 apoptosis 유발에 death receptor 중 DR4 및 DR5가 관여하는지의 여부를 Western blotting으로 조사하였다. 먼저 50 μM의 genistein과 100 ng/ml의 TRAIL을 단독으로 처리하였을 경우 결과 11A 및 B에서와 같이 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 하지만 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리하였을 경우에는

결과 11C에서와 같이 DR4는 변화가 없었지만 DR5의 경우는 처리시간이 증가할수록 발현의 정도도 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 TRAIL 및 genistein을 동시에 처리할 경우 DR5를 통한 death receptor pathway에 의하여 apoptosis가 유발된다는 것을 알 수 있었다.

<결과 11>



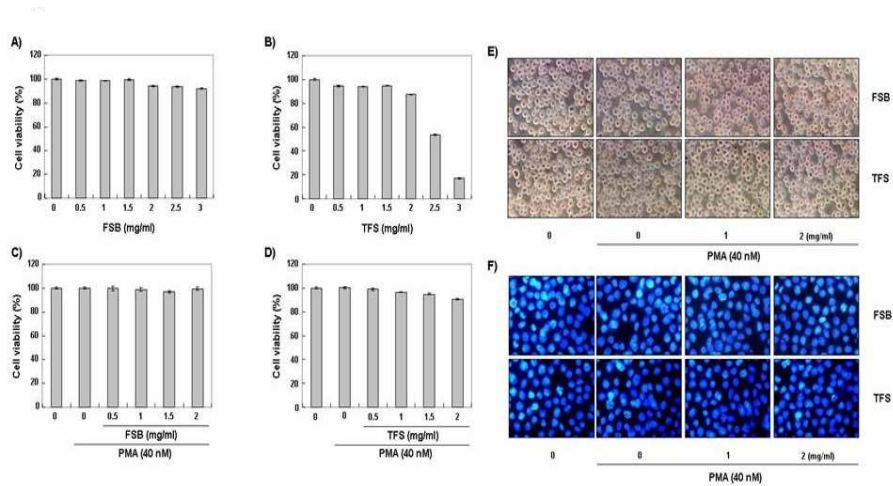
12. 세포의 증식에 미치는 PMA, FSB 및 TFS의 영향

FSB 및 TFS를 단독 처리했을 경우와 PMA와 같이 처리했을 경우 U937 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 결과 12A 및 B에서 나타난 바와 같이 FSB를 6시간동안 처리했을 경우는 3.0 mg/ml의 농도까지 아무런 변화가 나타나지 않았고, TFS의 경우는 2.5 및 3.0 mg/ml의 농도에서는 세포의 증식이 유의적으로 감소하였지만 2.0 mg/ml 이하의 농도에서는 변화가 관찰되지 않았다. 또한 결과 12C 및 D와 같이 FSB 및 TFS를 1시간 전처리한 다음 40 nM의 PMA를 6시간동안 처리했을 경우는 2 mg/ml의 농도까지 세포의 증식에 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 40 nM의 PMA와 2.0 mg/ml의 FSB 및 TFS는 U937 세포의 증식에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

13. 세포 형태에 미치는 PMA, FSB 및 TFS의 영향

PMA와 FSB 및 TFS의 처리에 따른 U937 세포의 전체적인 형태 변화를 알아보기 위하여 PMA를 1시간 선처리한 다음 FSB 및 TFS를 6시간 처리하였을 경우 결과 12E에서 보는 바와 같이 세포의 밀도도 감소하지 않았으며 세포의 형태에도 변화가 없음을 알 수 있었다. 또한 결과 12F에서 나타난 바와 같이 U937 세포 핵의 형태적 변화를 관찰하였을 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 관찰되지 않았고 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색되었다. 이는 PMA와 FSB 및 TFS의 처리에 따른 세포 증식 결과와 잘 부합되는 결과였다.

<결과 12>



14. COXs의 발현에 미치는 PMA의 영향

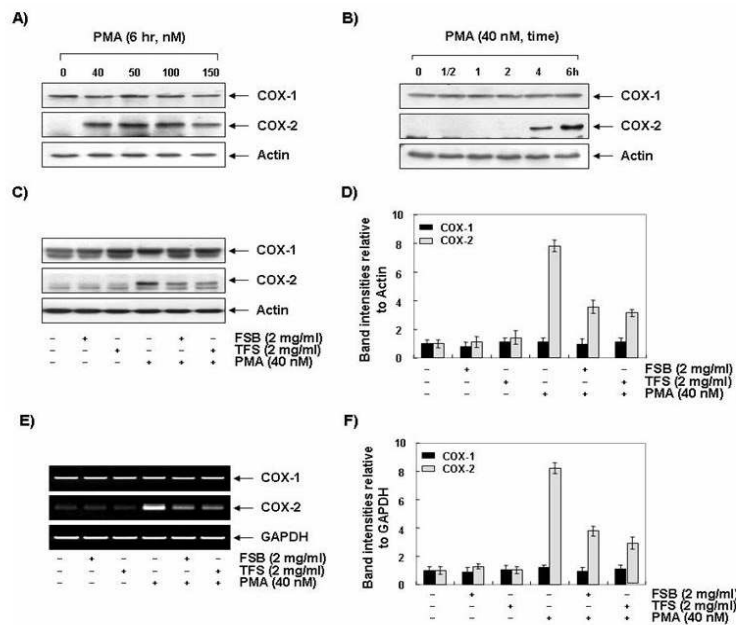
U937 세포에서 PMA 처리농도 또는 시간에 따른 COX-2 단백질의 발현 정도를 Western blotting으로 관찰하였다. 결과 13A에서 나타난 바와 같이 PMA를 농도별로 6시간동안 처리하였을 경우 COX-1의 경우는 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 COX-2의 경우는 40 nM의 농도에서부터 강하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 다음으로 PMA 처리시간에 따른 COX-2의 발현정도를 관찰하여 결과 13B에서 나타난 바와 같이 PMA 처리 2시간까지는 아무런 변화가 나타나지 않았지만 4시간부터 COX-2의 발현이 나타나기 시작하여 6시간에서는

현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 살펴볼 때 PMA는 U937세포에서 증식 및 COX-1의 발현에는 큰 영향을 미치지 못하지만 염증발현에 중요한 역할을 하는 COX-2의 발현을 증가시켰음을 알 수 있었다.

15. PMA에 의한 COX-2의 발현 증가에 미치는 FSB 및 TFS의 영향

인체의 거의 모든 세포에서 COX-2의 과발현은 여러 가지 질병을 일으키는 요인이 되는 것으로 밝혀지면서 이러한 염증매개인자의 억제에 관한 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다. 따라서 U937 세포에서 PMA에 의한 COX-2의 과발현 현상에 대한 FSB 및 TFS의 영향을 관찰하기 위하여 FSB 및 TFS를 2 mg/ml의 농도로 단독 처리하였을 경우와 PMA를 1시간 선처리한 후 FSB 및 TFS를 처리하여 6시간 경과 후의 COX-1 및 COX-2의 발현 정도를 Western blot 및 RT-PCR 방법으로 관찰하였다. 결과 13C 및 E에서 나타난 바와 같이 COX-1의 경우는 아무런 변화가 없었지만 PMA에 의해서 과발현된 COX-2의 경우는 단백질 및 mRNA 발현 모두에서 FSB 및 TFS의 선처리에 의해서 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 특히 FSB에 비해서 TFS를 선처리하였을 경우 COX-2 발현의 억제정도가 증가하는 것으로 관찰되었다.

<결과 13>

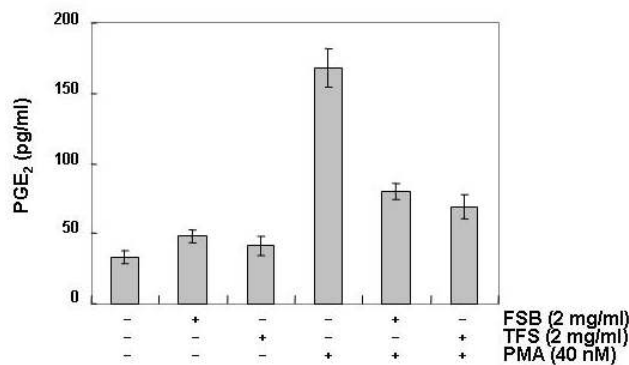


16. FSB 및 TFS의 PMA에 의한 PGE₂ 생성의 억제

염증성 질환을 포함한 다양한 생체반응에서 PGE₂는 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로써 각종 질병의 유발과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있으며, PMA는 전사조절인자들의 발현을 통하여 PGE₂의 생성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 따라서 U937 세포에서 PMA에 의한 PGE₂의 생성 증가에 미치는

결과 14에서 보는 바와 같이 PMA 처리에 의해서 PGE₂의 생성이 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었고, 또한 FSB 및 TFS의 선처리에 의하여 PGE₂의 생성이 매우 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 PGE₂의 생성 억제에 미치는 영향은 FSB에 비하여 TFS 처리군에서 더욱 효과적이었다. 이상의 결과를 살펴볼 때 FSB 및 TFS는 모두 COX-2의 활성 저해로 인한 PGE₂의 생성 억제작용이 있음을 알 수 있었다.

<결과 14>

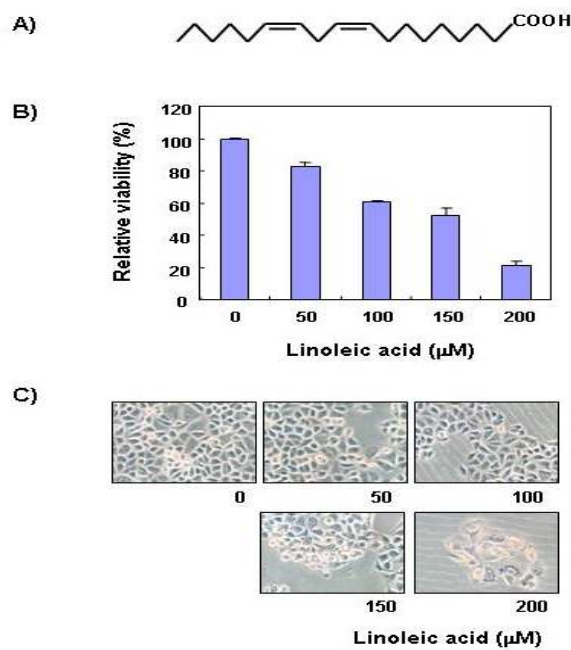


17. LA에 의한 위암세포의 증식억제 및 apoptosis 유도

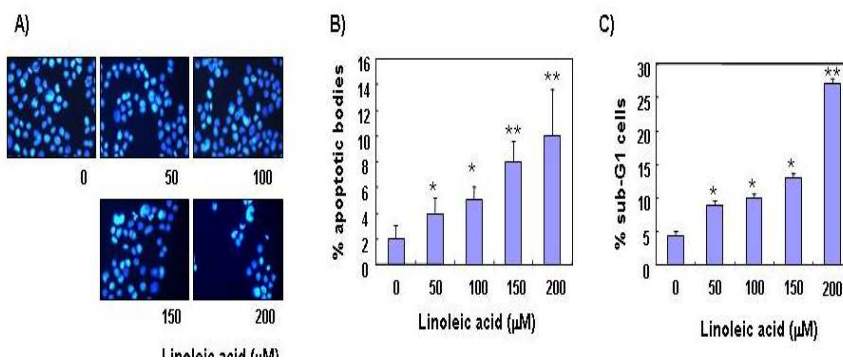
LA (결과 15A)의 항암작용 기전 해석의 시도를 위하여 AGS 인체 위암세포의 증식에 미치는 LA의 영향을 MTT assay로 조사하였다. 결과 15B에 나타낸 바와 같이 LA 처리 농도의 증가에 따라 AGS 세포의 증식이 점차 억제되었으며, 100 μM 및 200 μM LA 처리군에서 약 40% 및 78% 정도의 증식 억제 효능이 있었다. 동일조건에서 암세포의 형태적 변화 결과는 결과 15C에 나타낸 바와 같이 접착력 상실, cytoplasm shrinkage 및 membrane blebbing 현상이 관찰되어 apoptosis 유도 가능성을 제시하여 주었다. 그러나 세포주기 특이적 arrest 현상은 관찰할 수 없었다(data not

shown). 이러한 LA 처리에 따른 위암세포의 증식억제가 apoptosis 유도과 연관이 있을 것으로 관찰되었기에 이에 대한 증거제시를 위하여 DAPI staining에 의한 핵의 염색을 실시하였다. 결과 16에 나타낸 바와 같이 LA 처리 농도의 증가에 따라 apoptotic body의 증가(결과 16A, B) 및 sub-G1 기 해당되는 세포 빈도의 증가(결과 16C)가 관찰되어 LA에 의한 AGS 세포의 증식억제는 세포주기 arrest와 무관한 apoptosis 유발에 의한 것임을 알 수 있었다.

<결과 15>



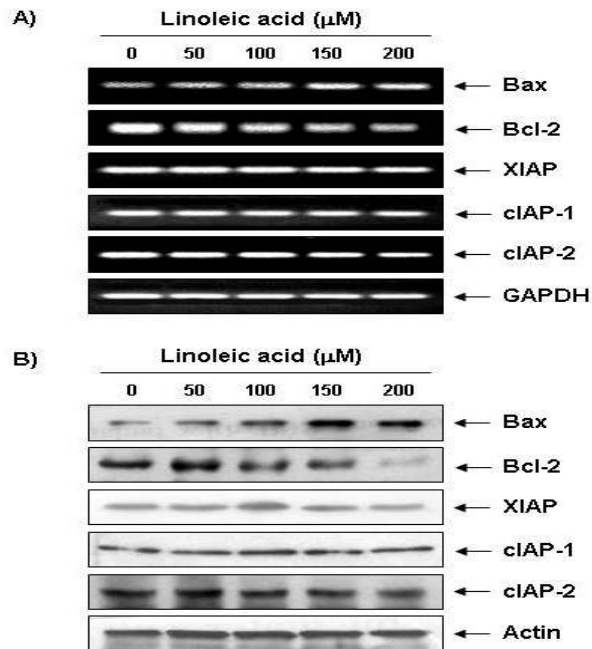
<결과 16>



18. Bcl-2 및 IAP family 인자들의 발현에 미치는 LA의 영향

LA에 의한 apoptosis 유도과정에서 Bcl-2 및 IAP family 인자들의 관련 여부를 조사하여 결과 17에 나타낸 바와 같이 pro-apoptotic Bax의 경우 mRNA 및 단백질 수준에서 LA 처리에 의하여 처리 농도 의존적으로 발현이 매우 증가하였으며, anti-apoptotic Bcl-2의 경우 전사 및 번역 수준에서 LA 처리에 따라 발현이 감소되었다. IAP family의 경우 조사된 3가지 유전자 모두 LA 처리에 따른 큰 변화는 관찰되지 않았다.

<결과 17>

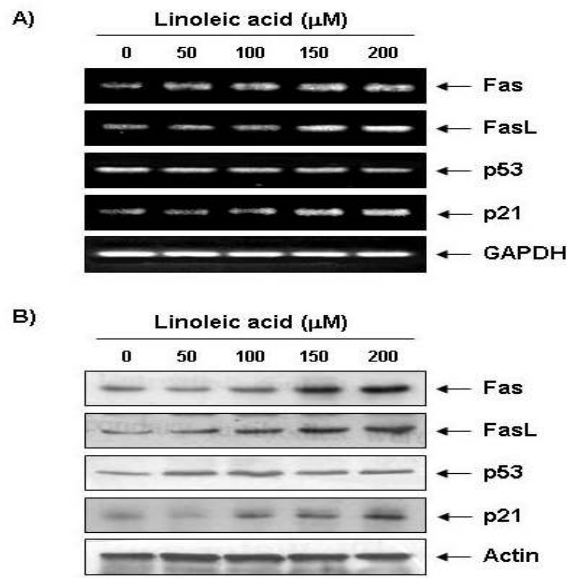


19. LA에 의한 Fas, FasL 및 p21 발현의 증가

Fas/FasL system의 발현 변화가 LA 처리에 따른 apoptosis 유도과정에서 관찰되는지의 여부를 조사하여 결과 18에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 LA 처리 농도가 증가할수록 Fas 및 FasL 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 증대되었음을 알 수 있었다. 그리고 종양억제 유전자 p53과 Cdk inhibitor p21의 발현 변화를 조사한 결과 p53의 발현은 큰 변화가 없었으나, p21의 발현

은 LA 처리에 따라 전사 및 번역 수준에서 모두 증대되어 LA 처리에 따른 p21 발현의 증가는 p53과 무관함을 보여주었다.

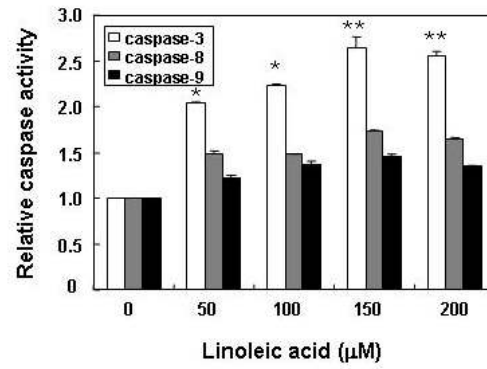
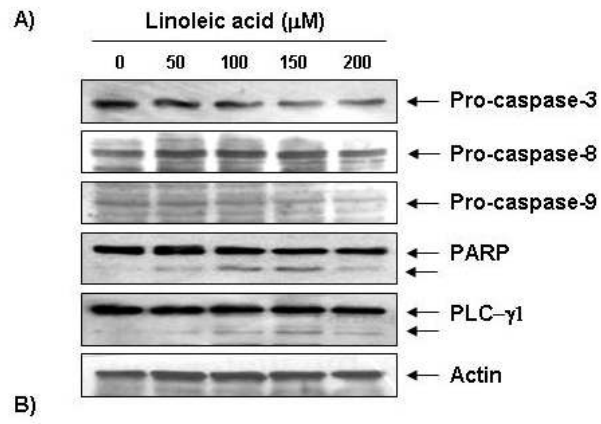
<결과 18>



20. LA 처리에 따른 caspases 활성의 증가와 PARP 및 PLC-γ1 단백질의 분해

다음은 LA 처리에 따른 apoptosis 유도에 caspase의 관련성 여부를 Western blotting 및 fluorogenic peptide를 이용한 *in vitro* caspase activity를 조사하여 결과 19에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 LA 처리에 따라 조사된 3가지 caspase (-3, -8 및 -9) 모두 비활성형 단백질의 발현이 감소되었으며, *in vitro* activity 역시 LA 처리에 따라 증가되었다. 특히 LA 처리에 따라 caspase-3의 활성이 가장 높게 나타났으며(2.6배 이상), 활성화된 caspase-3에 의하여 분해가 일어나는 PARP 및 PLC-γ1 단백질의 단편화가 LA 처리 농도 의존적으로 매우 강하게 발현되었다.

<결과 19>



제 5 장 Piglet에의 식이에 의한 영양·병리학 적 효능 평가

제 1 절 서 론

자돈의 장내균총 변화 최소화, 설사증 발생빈도 저하, 소화율을 향상 등의 목적을 충족시킬 수 있는 발효대두 첨가한 사료를 개발하고 그 효능을 본 연구를 통해 과학적으로 입증하여 발효 자돈 사료를 개발함으로써 고품질의 돈육을 생산할 수 있을 것이다.

최근 유럽을 비롯한 미국, 캐나다 그리고 일본 등에서 문제시되고 있는 소해면상뇌증(일명 광우병)을 비롯하여 사슴의 CWD(만성소모성질병)와 양의 스크래피와 같은 프리온 질병이 알려지기 시작한 이후 곡류는 동물의 사료로 사용하고 인간은 육류를 섭취한다는 관념이 팽대되어 있다. 한국, 일본 등과 같이 대두 등의 식물성 소재를 생체에 안전한 미생물로 발효시켜 소화율을 높여 식용하지 않아 이러한 식품의 개발이 미비한 서구에서는 이 분야의 관련 기술이 낙후되어 있는 실정이며 국내에도 알레르기를 유발할 수 있는 대두단백질의 완전한 분해법에 대한 기술은 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 multi-step 발효시스템으로 가공한 대두 발효물을 첨가한 고기능성 자돈 영양사료를 직접 급여하여 돼지의 증체량의 변화를 검증하고, 면역활성 능력, 설사병 예방효과 등 병리학적 효능을 평가하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 발효사료 투여 piglet의 영양학적 효과

가. Multi-step 발효물의 일반 사료 내 첨가 적정 조성비 확립을 위한 시험

임상관찰에서 건강상태가 양호하고 체중의 편차가 심하지 않은 20일~23일 정도의 이유 직후 체중 약 6-6.5kg인 자돈 80두를 4개 군으로 완전 임의로 배치하고 사육하였다. Multi-step 발효물을 배합사료 총급여량의 2.5%, 5% 및 10% 수준으로 차별 첨가하여 3개군을 사육하고 1개군은 발효물이 첨가되지 않은 일반 사료를 급여하여 대조구로 공시하였다. 사양관리는 일반 개방식 슬러리 돈사

에서 사육하였으며 사료는 자유로이 섭취토록 하고 급수는 돈방벽에 부착된 니플을 이용하여 자유로이 섭취토록 하였다. 시험개시 45일 후 자돈들의 체중을 측정하여 각 군별로 평균증체량과 일일증체량을 조사하였으며 사료 섭취량 및 사료효율 조사도 실시하였다.

나. 출하기까지의 증체율 비교시험

Multi-step 발효물의 5% 첨가가 가장 적정한 조성비로 결정됨에 따라 Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료와 일반사료를 급여하여 돼지의 출하기까지의 증체량을 비교 시험하였다.

임상관찰에서 건강상태가 양호하고 체중의 편차가 심하지 않은 25일령의 이유 직후 체중 약 7.0kg 전후의 자돈 15두씩 2개 군을 완전 임의로 배치하고 2개군 중 시험구에는 배합사료 총급여량 5% 수준의 Multi-step 발효물을 첨가하고 대조구에는 발효물이 첨가되지 않은 일반사료를 급여하면서 이유기부터 출하기까지 사육 관리하였다. 체중측정은 시험개시일로부터 30일 간격으로 4개월 간 실시하였으며 개체간의 체중편차를 줄이기 위해 시험개시일로부터 1개월 후인 55일령에 체중을 측정하여 평균보다 위측된 개체 5두씩을 시험구와 대조구에서 제외하고 10두만을 시험에 공시하였다. 사양관리는 개방식 슬러리 돈사에서 사육하였으며 사료는 자유로이 섭취토록 하고 급수는 돈방벽에 부착된 니플을 이용하여 자유로이 섭취토록 하였다.

다. Multi-step 발효물 첨가사료 및 일반사료 급여군의 혈액학적 차이 비교시험

Multi-step 발효물 첨가 사료를 급여하여 증체율 조사를 위해 사육 시험한 시험구와 대 조구를 대상으로 혈액을 채취하였다. 시험구와 대조구 4개군의 전 공시개체를 대상으로 시험 개시 전과 시험 25일 후 그리고 종료일에 실시하였으며, 헤파린이 첨가된 진공 채혈병으로 5ml의 전혈을 채취하였으며 채취한 혈액을 즉시 실험실로 옮겨 총백혈구, 호중구, 단핵구 그리고 림프구의 수치를 측정하였으며 혈액검사를 실시한 전혈을 원심 분리하여 그 상청액으로 주요 질병 면역조사를 위한 시료로 공시하였다.

2. Piglet의 설사증에 의한 폐사율 저감 효과 검토

가. Multi-step 발효사료와 일반사료 급여군에 대한 살모넬라 공격시험

Multi-step 발효물의 설사병 원인균에 대한 억제 효과를 조사하기 위한

Multi-step 발효물 급여한 시험구와 일반사료를 급여한 대조구의 자돈에 *Salmonella* 인공감염시험을 2차 년도에 실시하지 못하였다. 또한 3차 년도에는 2007년 1. 26일자로 동물보호법이 공포되어 동물실험의 엄격한 규정에 따라 실험방법을 변경 추진하였다.

1) Multi-step 발효사료 급여가 살모넬라 감염자돈에 미치는 영향 조사

살모넬라 감염증이 발생된 양돈장으로부터 임상증상은 나타내지 않았으나 살모넬라 감염이 의심되는 자돈 4두를 제공받아 인공감염과 같은 조건으로 실험을 실시하였다. 공시축 각각 2두씩을 임의로 배치하고 시험구에는 Multi-step 발효물을 10% 첨가한 사료를 급여하고 대조구에는 일반사료를 급여하면서 시험개시일 24시간 후부터 매일 돼지의 임상증상 관찰과 함께 분변을 채취하여 분변 1g에 존재하는 *Salmonella*균수를 측정하였다.

2) 세균수 측정

Salmonella 세균수 측정은 최확수법(MPN)으로 실시하였으며 이때 액체배지는 RV broth(MERCK, Germany)를 사용하였으며 또한 오염균의 발육을 최대한 억제하기 위하여 Sodium tetradecyl sulfate 26~28% solution(MERCK, Germany) 4.6ml/L를 RV broth에 첨가하였다.

즉, 인공 감염시킨 자돈의 분변 1g을 PBS(Phosphate buffered saline; pH 7.4) 10ml에 균질화하고, 균질화된 분변액을 10진 희석하였다. 10진 희석액 중 5단계(10^{-5}), 6단계(10^{-6}) 그리고 7단계(10^{-7}) 희석액 1ml를 5개의 RV broth 9ml에 각각 접종하였다. 즉 한 단계 희석배수에 5개의 RV broth를 접종하였다. 결과 판독은 분변 희석액 접종 RV broth를 18시간 배양한 후 각각의 배양액을 다시 RAMBACH Agar(MERCK, Germany) 평판배지에 접종하여 24시간 배양하고 *Salmonella*균을 확인하였으며 확인된 시험관을 양성관으로 판정하였다. 그리고 *Salmonella*균이 확인된 양성관의 갯수를 최확수표에 대입하여 계산하였다.

3) 주요 질병 면역학적 조사

1년차 연구에서 수행하지 못했던 Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료를 급여한 4개군에 대한 면역학적 조사를 실시하였다. 4개군에서 채취하여 -70°C 에 보관해 두었던 혈청에 대하여 돼지생식기호흡기증후군(PRRS)에 대한 항체 형성유무를 ELISA법으로 실시하였다.

ELISA 진단 kit는 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom Virus

Antibody Test Kit(IDEXX, USA)를 이용하였으며 시험 방법은 kit 제조사의 권장방법에 따라 실시하였다.

3. Multi-step 발효 사료 급여 돼지의 생산량 조사

가. Multi-step 발효 사료 급여 돼지의 육질 조사

Multi-step 발효물을 급여하였을 때 돼지 육질의 변화를 조사하기 위하여 임상관찰에서 건강상태가 양호하고 체중의 편차가 심하지 않은 25일령의 이유 직 후 체중 약 7.0kg 전후의 자돈 15두씩 2개 군을 완전 임의로 배치하였다. 2개구 중 시험구에는 배합사료 총급여량 5% 수준의 Multi-step 발효물을 첨가하고 대조구에는 발효물이 첨가되지 않은 일반사료를 급여하면서 이유기부터 출하기까지 사육 관리하였다. 시험개시일로부터 1개월 후인 55일령에 체중을 측정하여 평균보다 위축된 개체 5두씩을 시험구와 대조구에서 제외하고 10두만을 시험에 공시하였다. 사양관리는 개방식 슬러리 돈사에서 사육하였으며 사료는 자유로이 섭취토록 하고 급수는 돈방 벽에 부착된 니플을 이용하여 자유로이 섭취토록 하면서 사육하였다. 시험구와 대조구 돼지가 평균 100kg 정도가 되었을 때 도축장에 출하하여 도축을 실시 한 후 돈육의 좌반 도체 등지방을 포함하는 알등심을 채취하였다. 정확한 도체 육질 조사를 위해 채취한 시료를 진주산업대학교 생명자원과학대 동물소재공학과 식육가공과학연구실에 의뢰하여 콜레스테롤 등 17항목의 육질분석을 AOAC(1990) 방법에 따라 실시하였으며 분석항목은 아래와 같다.

1) 수분

건조법으로 실시하였다.

2) 조단백질 함량

Micro kjeldahle 방법으로 실시하였다.

3) 조지방 함량

Soxhlet 추출법으로 실시하였다.

4) 조회분 함량

전기회화로를 이용하여 측정하였다.

5) pH

근막, 지방 등을 제거한 후 세절한 시료 10g을 증류수 90 mL와 함께 homogenizer(T25B, IKA Sdn. Bhd., Malaysia)로 13,500 rpm에서 10초간 균질

화하여 pH-meter(8603, Metrohm, Swiss)로 측정하였다

6) 보수력

마쇄한 시료를 70°C의 항온수조에서 30분간 가열한 다음 냉각하여 1,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 무게를 측정하여 (시료 무게-유리수분 무게)/시료 무게×100의 식으로 계산하였다.

7) 가열감량

시료를 2 cm 두께로 일정하게 절단하여 무게를 측정한 다음, 전기오븐 200°C에서 전면 90초 후면 60초 가열하여 식힌 후 시료의 무게를 측정하여 가열 전 무게에 대한 백분율로 계산하였다.

8) 전단가

Instron 3343(US/MX50, A&D Co., USA)을 이용하여 비가열 시료를 가로로 놓혀 knife형 plunger로 측정하였다.

9) 조직감(texture analysis)

Instron 3343(US/MX50, A&D Co., USA)을 이용하여 가열한 시료를 식힌 후 세로로 세워서 plunger No. 3으로 측정하였고 이 때 분석 조건은 표 1과 같다.

표 1. 조직 분석을 위한 조건

Items	Fresh meat(전단가)	Cooked meat(조직감)
Table speed	200 mm/min	200 mm/min
Sample speed	80 m/s	60 m/s
Load cell	10 kg	10 kg
Adapter area	30 mm ²	28 mm ²
Sample size	Ø20×20 mm	Ø20×20 mm

10) 콜레스테롤

AOAC(1969) 방법에 따라 시료 1 g에 ethanol을 사용하여 추출한 후, 50% KOH용액으로 비누화시킨 후 Toluene을 넣어 재추출한 후, 0.5 M KOH와 증류수를 사용하여 toluene층을 여러 번 세척한 후, 용액을 감압하여 3 mL DMF시

약에 녹여서 GC(HP 6890, Agilent Co., USA)를 이용하여 표 2와 같은 조건으로 분석하였다.

표 2. 콜레스테롤 분석을 위한 GC 조건

Items	Conditions
Instrument	GC(HP 6890, Agilent Co., USA)
Column	Phenomenex, 30 m, 5% Phenyl Polysiloxane 0.25 mm I.D×0.25 μm film, Cat. No.: ZB-5
Injector temp.	250℃
Detector temp	300℃
Oven temperature	190℃ (2min hold) → 20℃/min climb, 230℃ (3min hold) → 40℃/min climb, 255℃ (25min hold)

11) 육색

등심근 단면적의 전 부위를 균일하게 측정하였다.

12) 지방색

등심에 붙어있는 등지방 부위를 Chromameter(CR-400, Minolta Co., Japan)를 사용하여 동일한 시료를 9회 반복 측정하였다. 이때 표준색판은 $L^*=89.2$, $a^*=0.921$, $b^*=0.783$ 으로 하였으며, 백색도 W는 $L^* - 3b^*$ 로 나타내었다.

13) 지방산 조성

시료 10 g을 이용하여 Folch 등(1957)의 방법으로 조지방을 추출하고, 추출된 조지방 시료에 chloroform 1 mL를 넣어 녹인 다음, 이 중 100 μL를 취하여 20 mL tube에 넣는다. 이때 1 mL의 methylation(methanolic-HCl-3 N) 시약을 넣고 항온수조에서 60℃로 40분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 방냉시키고, hexane 3 mL와 증류수 8 mL를 넣고 강하게 섞어준 다음 시료를 24시간 방치하여 층분리시키고 상층액 중 1 μL를 주입하여 GC(HP 6890, Tekmar Precert, Agilent Co., USA)를 이용하여 표 3과 같은 조건으로 분석하였다.

표 3. 지방산 분석을 위한 GC 조건

Items	Conditions
Instrument	GC(HP 6890, Tekmar Precert, Agilent Co., USA)
Column	Allech AT – Silar capillary column 30 m×0.32 mm×0.25 μ L Initial temp.: 140°C, Final temp.: 230°C Injector temp.: 240°C, Detector temp.: 250°C, Programming rate: 2°C/min.
Detector	Flame Ionization Detector
Carrier gas	He
Flow rate	50 ml/min
Split ratio	100:1

14) 아미노산 조성

AOAC(2000) 방법에 따라 시료 약 0.02 g에 6 N HCl 15 mL를 가하여, 110°C dry oven에서 24시간 이상 동안 산가수분해한 후 55°C Water bath에서 감압농축하여 pH 2.20 sodium citrate buffer로 25 mL Volumetric flask에 정용하여 아미노산자동분석기(Biochrom 20, Pharm Tek, England)를 이용하여 표 4와 같은 조건으로 분석하였다.

표 4. 아미노산 분석 조건

Items	Conditions
Instrument	Biochrom 20, Pharm Tek, England
Column	Cation Separation Column LCA K06, 4.6 mm × 150 mm Catalog NO. 51 12 001
Absorbance	570 nm and 440 nm
Reagent flow rate	0.25 mL/min
Buffer flow rate	0.45 mL/min
Reactor temperature	130°C
Reactor size	15 m

15) 관능검사

잘 훈련된 10명의 요원에 의해 신선육과 가열육을 대상으로 9점 척도법으로 실시하였으며, 1점은 매우 나쁘거나 낮음(extremely bad or slight), 9점은 매우 좋거나 강함(extremely good or much)으로 표시하게 하여 관능검사를 실시하였다. 다만 신선육의 드립로스만 수치가 낮을수록 좋고 나머지 모든 항목은 높을수록 좋다.

16) 통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 SAS(1999)의 GLM(General linear model) 방법으로 분석하였고 처리 평균 간의 비교를 위해 Duncan의 Multiple range test가 이용되었다.

나. Multi-step 발효 사료 급여 돼지의 도체병변조사

Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돼지와 일반사료 급여 돼지의 도체병변을 비교하기 위해 도체병변조사를 실시하였다. 도체병변조사 질병 항목은 일반적으로 도축검사에서 관찰할 수 있는 8종의 병변을 기준으로 하였으며 판정은 표 5의 기준으로 실시하였다.

표 5 도체 병변조사 항목 및 판정기준

질 병 명	판 정 기 준
복 막 염	복막염 유무를 양성과 음성으로 구분
회 장 염	회장염 유무를 양성과 음성으로 구분
흉 막 염	흉막염 유무를 양성과 음성으로 구분
심 낭 염	심낭염 유무를 양성과 음성으로 구분
간 백 반	간백반(Milk spot) 유무를 양성과 음성으로 판정
흉 막 폐 령	흉막폐렴 유무를 양성과 음성으로 구분
유행성폐렴	유행성폐렴 유무를 양성과 음성으로 구분
위축성비염	비갑개골 위축정도에 따라 0 - 5 단계로 구분 0 : 정상, 1 : 미약한 위축, 2 : 약하게 변화가 있는 상태, 3 : 많은 변화가 인정, 4 : 상당한 정도의 위축, 5 : 아주 심한 상태

다. Multi-step 발효물을 이용한 각종 사료 formulation 시험

1) 시험구 배치

Multi-step 발효물을 이용한 각종 사료의 적정 배합비를 얻기 위한 실험은 두개의 시험구로 수행하였다. 먼저 첫 번째 시험구는 어미돼지의 젖을 먹고 있는 5복의 10일령 어린돼지 41마리에 Multi-step 발효물이 20% 첨가된 갓난돼지 사료를 급여하고 2주간 사육한 후 이유기부터는 Multi-step 발효물이 첨가되지 않은 일반사료를 출하기까지 급여하였다. 두 번째 시험구는 5복의 44마리에 Multi-step 발효물이 10% 첨가된 갓난돼지 사료를 급여하고 2주간 사육한 후 이유기부터는 Multi-step 발효물이 첨가되지 않은 일반사료를 출하기까지 급여하였다.

2) 사료 formulation 시험을 위한 도체등급 비교 분석

각각의 시험구 돼지들을 대략 100kg에 도달하였을 때 도축장으로 출하하였으며 사료 적정 배합비를 조사하기위해 각 시험구의 도체등급을 조사하였다. 도체등급은 도축장에 근무하는 축산물등급 판정사에 의해 판정하였으며 발급된 도체등급판정결과서 비교 분석하여 보았다. 도체등급은 육질등급과 육량등급으로 나누어 측정하였으며 그 기준은 아래 표 6과 같다.

표 6. 돼지 도체등급 판정 기준

(축산물등급판정소기준)

구 분	기 준	도 체 중	등 지 방
육 질	1등급 기준	76 kg 이상	15 mm 이상
육 량	A등급 기준	80~ 93 kg	17 ~ 26 mm

제 3 절 Multi-step 발효사료 급여 piglet의 영양학적 효과

1. Multi-step 발효물의 일반 사료내 첨가 적정 조성비 확립을 위한 시험

가. 자돈의 증체량 조사

Multi-step 발효물을 배합사료 총급여량의 2.5%, 5% 및 10% 수준으로 차별 첨가하여 3개군을 사육하고 1개군은 발효물이 첨가되지 않은 일반사료를 급여하여 45일간 자돈을 사육한 후 증체량을 비교·시험한 결과는 결과 1과 같다.

평균증체량은 사료 내 Multi-step 발효물을 10% 첨가한 시험구가 24.5kg으로 가장 높았으며 대조구와 비교하면 3.8kg 정도가 높았다. 또한 일일증체량도 10% 첨가한 시험구가 545.56g으로 가장 높아 대조구에 비해 84.45g의 높은 증체를 보였다. 또한 2.5% 첨가군은 대조구에 비해 평균증체량 1.38kg, 일일증체량 30.67g이 높았으며, 5% 첨가군도 대조구보다 평균증체량은 1.9kg 일일증체량은 42.22g 높은 결과를 보였다. 한편 Multi-step 발효물 2.5%와 5% 첨가 급여군의 비교에서도 5% 첨가 급여군이 평균 증체량과 일일증체량이 공히 높게 나타났다.

결과 1. Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료 급여군의 증체량 비교

구 분	평균이유일 (일령)	시험개시 평균체중 (두/kg)	시험종료 평균체중 (두/kg)	평균증체량 (두/kg)	일일증체량 (두/g)
T1	21	6.50	28.63	22.13	491.78
T2	21	6.00	28.65	22.65	503.33
T3	21	6.00	30.55	24.55	545.56
C	21	6.50	27.75	20.75	461.11

※ T1 : 사료내 Multi-step 발효물을 2.5% 첨가하여 급여한 시험구

T2 : 사료내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구

T3 : 사료내 Multi-step 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구

C : 일반사료만 급여한 대조구

나. 사료 섭취량 및 사료효율 조사

Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료 급여군에 대한 사료섭취량과 사료효율 비교시험은 시험 개시일에서 시험종료일까지 섭취한 각 군별 사료섭취량을 기록하여 급여량을 측정하여 결과 2에 나타내었다.

각 시험구간의 사료섭취량은 사료내 Multi-step 발효물을 10.0% 첨가하여 급

여한 군이 가장 높았다. 또한 사료효율을 비교해 본 결과 사료 내 대두 발효물을 10% 첨가하여 급여한 군이 0.667로 가장 높게 나타나 Multi-step 발효물을 다량 첨가한 사료가 자돈의 증체량과 사료효율을 높게 나타냈다.

결과 2. Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료 급여군의 사료섭취량과 사료효율 비교

시험구	총사료섭취량 (kg)	두당평균사료 섭취량(kg)	두당일일사료섭 취량(kg)	사료효율 (FE)
T1	698.00	34.90	0.776	0.634
T2	699.00	34.95	0.777	0.647
T3	735.00	36.75	0.817	0.667
C	660.00	33.00	0.733	0.628

- ※ T1 : 사료내 Multi-step 발효물을 2.5% 첨가하여 급여한 시험구
- T2 : 사료내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구
- T3 : 사료내 Multi-step 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구
- C : 일반사료만 급여한 대조구

다. 사료 내 multi-step 발효물 첨가 적정 조성비 확립

위의 시험결과에서 multi-step 발효물이 많이 첨가된 사료를 급여할수록 자돈의 증체량과 사료 효율 공히 높게 나타난다는 결론을 얻었다. 이러한 결과 또한 대두발효사료가 자돈의 단백질 흡수율을 높이는 작용할 뿐만 아니라 그 이외 사료효율을 높여주는 여러 인자들이 있을 것으로 사료된다. 그러나 multi-step 발효물의 생산비용과 사료효율 측면을 감안하면 발효물 5% 수준의 첨가가 가장 경제적으로 적정하다고 사료된다.

라. 출하기까지의 증체율 비교시험

Multi-step 발효물의 일반 사료 내 첨가 조성비 확립을 위한 시험에서 가장 적정한 량인 5% 첨가 배합사료와 일반사료를 급여한 돼지에 대한 증체량을 측정하여 결과 3에 나타내었다.

결과 3. Multi-step 발효물 5% 첨가사료와 일반사료 급여군의 평균체중 비교

구 분	시험개시일 25일령 (kg)	1개월 후 55일령 (kg)	2개월 후 85일령 (kg)	3개월 후 115일령 (kg)	4개월 후 145일령 (kg)
T	6.7±0.4	22.2±1.4	39.0±1.2	65.8±2.3	89.5±3.9
C	6.8±0.3	20.9±1.2	33.9±1.5	57.6±2.1	80.9±3.8

※ T : 사료 내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구

C : 일반사료만 급여한 대조구

25일령의 이유기 자돈 15두씩을 Multi-step 발효물 5% 첨가사료 첨가한 시험구와 대조구로 구분하여 30일간 사육하고 체중을 측정된 후 증체량이 낮은 5두를 각각 제외한 10두의 평균체중을 조사한 결과 시험구는 22.2kg, 대조구는 20.9kg으로 나타나 1.3kg의 차이가 인정되었다. 또한 2개월 후는 시험구가 39.0kg, 대조구는 33.9kg으로 5.1kg의 차이가 인정되었으며, 3개월 후는 시험구가 65.8kg, 대조구는 57.6kg으로 두 군간의 체중차이가 8.2kg으로 증체량 차이가 더욱 크게 나타났다. 4개월 후 측정결과 시험구는 89.5kg, 대조구는 80.9kg으로 8.6kg의 차이를 나타내었다.

결과 4. Multi-step 발효물 5% 첨가사료와 일반사료 급여군의 평균 일일증체량 비교

구 분	1개월 후 55일령 (g)	2개월 후 85일령 (g)	3개월 후 115일령 (g)	4개월 후 145일령 (g)	평균일일 증체량 (g)
T	516	560	893	790	690
C	470	433	790	777	618

※ T : 사료내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구

C : 일반사료만 급여한 대조구

한편 multi-step 발효물 5% 첨가사료와 일반사료 급여군의 평균 일일증체량을 1개월 간격으로 비교한 결과는 결과 4와 같다. Multi-step 발효물 5% 첨가사료를 급여한 시험구가 시험개시일로부터 30일간 사육 후 일일 증체량을 조사한 결과 516g으로 나타났으며 대조구는 470g으로 나타났다. 2개월째는 시험구의 일일증체량이 560g, 대조구가 433g으로, 3개월째는 시험구가 893g, 대조구가 790g으로 4개월째는 시험구가 790g, 대조구가 777g으로 나타났다. 이런 결과를 최종적으로 분석한 4개월간의 사육 후 평균일일증체량은 시험구가 690g, 대조구가 618g으로 나타나 multi-step 발효물 5% 첨가사료로 사육한 돼지가 일반사료를 급여하여 사육한 돼지의 일일증체량이 72g이나 높게 나타났다.

2. Multi-step 발효물 첨가사료 및 일반사료 급여군의 설사증 발생 비교

Multi-step 발효물 첨가 사료를 급여하여 증체율 조사를 위해 사육 시험한 시험군과 대조군을 대상으로 자돈시기의 설사병 발생률을 조사한 결과 시험 개시 약 2주 후인 35일령의 시험돈군 전체에서 설사병이 발생되었다. 설사병의 원인은 대장균증으로 판정되었으며 지속적인 실험을 위해 치료를 실시하였는데 원인균을 분리 한 후 원인 대장균에 대하여 항생제감수성시험을 실시하였고 대장균증 대표적인치료제인 암피실린과 콜리스친 항생제를 5일간 음수로 투여하였으며 그 결과 설사병은 치료되었으며 시험 종료까지 설사병은 발생되지 않았다.

이러한 결과로 보아 발효사료의 설사병 발생은 일반사료와 차이가 없는 것으로 생각되며 특히 병원성미생물에 의한 설사병은 예방효과가 없는 것으로 추정된다. 그러나 발효 하거나 열처리를 하지 않은 대두에 의한 알리지 반응과 같은 식이성설사병에 대한 예방 효과는 계속적으로 관찰할 필요가 있을 것으로 사료된다.

3. Multi-step 발효물 첨가사료 및 일반사료 급여군의 혈액학적 차이 비교 시험

가. 혈액검사

Multi-step 발효물 첨가 사료를 급여하여 증체율 조사를 위해 사육 시험한 시험구와 대조구를 대상으로 실시한 혈액 검사한 결과는 결과 5와 같다.

각 군별로 비교한 혈액성상의 변화는 약간의 차이는 있었으나 유의성이 없는

것으로 나타나 Multi-step 발효물이 돼지의 혈액 성상에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 추정된다.

결과 5. Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료 급여군의 혈액학적 비교

시험구	T1			T2			T3			C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
총백혈구 (k/ul)	15.2 ±2.1	14.6 ±3.3	16.2 ±1.1	15.7 ±2.4	16.1 ±1.5	16.8 ±0.8	15.6 ±1.2	15.3 ±1.3	14.8 ±2.4	15.1 ±3.1	15.6 ±2.4	15.4 ±1.8
호중구 (%)	33 ±2.3	41 ±0.2	35 ±3.3	35 ±4.2	43 ±0.3	37 ±2.3	36 ±3.5	41 ±1.2	38 ±3.4	34 ±3.3	39 ±2.1	39 ±1.2
단핵구 (%)	4.8 ±0.2	5.2 ±0.4	5.3 ±0.3	3.9 ±0.2	5.4 ±0.1	6.1 ±0.1	4.9 ±0.2	5.3 ±0.3	6.2 ±0.1	4.9 ±0.2	5.4 ±0.3	5.6 ±0.2

- ※ T1 : 사료내 대두 발효물을 2.5% 첨가하여 급여한 시험구
(1; 시험 개시전, 2; 시험 25일 후, 3; 시험종료일)
- T2 : 사료내 대두 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구
(1; 시험 개시전, 2; 시험 25일 후, 3; 시험종료일)
- T3 : 사료내 대두 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구
(1; 시험 개시전, 2; 시험 25일 후, 3; 시험종료일)
- C : 일반사료만 급여한 대조구
(1; 시험 개시전, 2; 시험 25일 후, 3; 시험종료일)

나. 주요 질병 면역학적 조사

발효사료와 일반사료를 투여한 4개의 전 시험군에 대한 주요 질병 면역학적 조사는 PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 등 3종의 예방접종을 표준 프로그램에 맞추어 아래와 같이 전 공시개체에 예방접종하였다. 또한 채혈은 전 공시 개체를 대상으로 시험 개시 전과 시험 25일 후 그리고 종료일에 실시하였으며 각 예방 백신에 대한 면역 활성도는 PRRS에 대하여 ELISA법으로 검사를 실시할 예정이나 검사 진단 키트 국내 생산수입지연으로 -70℃에 보관하며 실험하였다.

제 4 절 Piglet의 설사증에 의한 폐사율 저감 효과 검토

1. Multi-step 발효물이 살모넬라 감염 의심축에 미치는 영향

Multi-step 발효물의 설사병 원인균 억제를 관찰하기 위해 살모넬라 감염이 의심되는 자돈에 Multi-step 발효물을 10% 첨가한 사료를 급여한 시험구와 일반사료를 급여한 대조구를 비교 관찰한 결과는 다음과 같았다. 시험개시일 24시간 후 관찰에서 일반사료를 급여한 대조구와 Multi-step 발효물 10% 첨가사료를 급여한 시험구의 돼지들 공히 어떠한 임상증상을 나타내지 않았다. 48시간 후 관찰에서도 특별한 임상증상이 나타내지 않았으나 대조구의 자돈들에서 설사소견이 관찰 되었다. 72시간 후 관찰에서는 시험구와 대조구 공히 39℃ 정도의 체온상승과 함께 약간의 침울 소견을 보이며 설사증상이 관찰되었다. 접종 4일째인 96시간 후 관찰에서 시험구와 대조구 공히 체온상승과 함께 심한 설사가 진행되었다. 5일째 이후부터는 심한 원기소실과 함께 설사를 나타내었으며 폐사할 우려가 있어 안락사를 시켜 도태하였다.

2. 세균수 측정 결과

시험개시일로부터 24시간 간격으로 채취한 분변의 세균수를 측정한 결과는 결과 1과 같았다.

결과 1. Multi-step 발효물 첨가사료 및 일반사료 급여 자돈의 살모넬라 억제 시험 결과

구 분	1day	2days	3days	4days	5days
T	79×10^5	920×10^5	$2,400 \times 10^5$	$2,400 \times 10^5$	$2,400 \times 10^5$
C	$2,400 \times 10^5$	$2,400 \times 10^5$	$2,400 \times 10^5$	$2,400 \times 10^5$	$2,400 \times 10^5$

T : Multi-step 발효물을 10% 첨가한 사료를 급여한 시험구

C : 일반사료를 급여한 대조구

시험개시일로부터 24시간 후(1day)에 채취한 시험구의 분변은 10진 5단계 (10^{-5}) 희석액을 접종한 5개 모든 시험관이 *Salmonella*균이 배양되어 양성관으로 판정되었으며 6단계(10^{-6}) 희석액에서는 5개 시험관중 3개가 양성관으로 판정되었다. 그러나 7단계(10^{-7})에서는 5개 모든 시험관이 아무런 세균도 배양되지 않아 음성관으로 판정되었다. 한편 일반사료를 급여한 대조구의 분변은 10진 5단계(10^{-5}), 6단계(10^{-6}) 그리고 7단계(10^{-7}) 희석액을 접종한 각각의 5개 시험관 모두에서 *Salmonella*균이 배양되어 양성관으로 판정되었다. 이 성적을 최확수표에 대입한 결과 5:3:0으로 판정된 시험구의 세균수는 79×10^{-5} 수준으로 측정되었으며, 5:5:5 로 판정된 대조구의 결과는 $2,400 \times 10^5$ 수준으로 측정되었으나 이 수준은 측정불가를 의미하는 것이다.

시험개시일로부터 48시간 후(2days)에 채취한 분변은 시험구가 5:5:3으로 판정되어 920×10^5 수준으로 측정되었으며 대조구는 24시간 후와 같이 $2,400 \times 10^5$ 수준으로 측정 불가하였다. 시험개시일로부터 72시간 후(3days)에 채취한 분변은 시험구와 대조구 공히 측정불가인 $2,400 \times 10^5$ 수준으로 나타났으며 그 이후는 모두 동일한 결과를 나타내었다.

이러한 결과를 분석하여 보면 자돈에서 *Salmonella*가 감염되었을 때 Multi-step 발효물이 *Salmonella*를 억제하는 항균력이 있는 것으로 추정되며 권 등이 보고한 낫도균으로 발효한 청국장이 닭에서 *Salmonella*균이 감염율을 저하시킨다는 결과와 일치하였다.

3. 주요 질병 면역학적 조사

1년차 연구에서 수행하지 못했던 Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료를 급여한 4개군에 대한 면역학적 조사를 위해 실시한 돼지생식기호흡기증후군(PRRS)에 대한 항체 형성유무를 ELISA법으로 실시한 결과는 결과 2와 같다.

결과 2. Multi-step 발효물 첨가사료와 일반사료 급여군의 PRRS항체 형성률

구 분	합 계 (두)	PRRS 항체 검출	
		양 성	음 성
T1	20	19	1
T2	20	20	0
T3	20	18	2
C	20	20	0

- ※ T1 : 사료내 Multi-step 발효물을 2.5% 첨가하여 급여한 시험구
- T2 : 사료내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구
- T3 : 사료내 Multi-step 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구
- C : 일반사료만 급여한 대조구

사료 내 multi-step 발효물을 2.5% 첨가하여 급여한 시험구 20두 중 PRRS 19두가 항체가 형성 되었으며, 사료 내 multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구는 20두 모두 항체가 형성되었다. 또한 사료 내 multi-step 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구는 18두가 형성된 반면 일반사료를 급여한 대조구는 20두 모두 항체가 형성 되었다.

이러한 결과로 보아 Multi-step 발효물이 돼지 체내에서 항체에 대하여 항체를 형성하는 면역원성 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 이 실험과 같이 예방접종에 의한 항원에 대하여 항체 형성 유무를 양성과 음성으로 판정한 후 면역원성의 높고 낮음을 규정한다는 것은 분석을 위한 실험설계 수준이 너무 부족하였다고 사료된다.

제 5 절 Multi-step 발효사료 급여 돼지의 생산량 조사

1. Multi-step 발효 사료 급여 돼지의 육질 조사

가. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 일반성분 검사

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 일반성분인 수분(Moisture), 조단백질(Crude protein), 조지방(Crude fat) 그리고 조회분(Crude ash)에 대한 검사결과는 결과 1에서 보는 바와 같다.

일반성분에 있어 대조구에 비하여 시험구가 수분 함량은 적었으며 조지방 함량은 많았다. 조단백질과 조회분 함량은 처리 간에 유의적 차이가 없었다.

결과 1. 성분함량 (%)

처리구 ¹⁾	수분	조단백질	조지방	조회분
C	74.00 ^A	23.15	1.71 ^B	1.08
T	73.04 ^B	23.25	1.83 ^A	1.26
SE	0.21	0.25	0.11	0.05

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

나. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 이화학적 특성 검사

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 이화학적 특성인 pH, 보수력, 가열감량, 육 및 지방의 전단가 그리고 콜레스테롤 함량은 결과 2과 3에서 보는 바와 같다.

이화학적 특성에 있어 대조구에 비하여 시험구가 pH는 높았고, 가열감량은 많았다. 보수력, 육 및 지방의 전단가와 콜레스테롤 함량은 처리 간에 유의적 차이가 없었다.

Table 2. 생화학적 특성 (I)

처리구 ¹⁾	pH	보수력(%)	조리시 손실량 (%)
C	5.18 ^B	51.77	35.52 ^B
T	5.35 ^A	61.45	37.83 ^A
SE	0.03	1.00	0.55

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

결과 3. 생화학적 특성(II)

처리구 ¹⁾	육 전단가 (kg/cm ²)	지방 전단가 (kg/cm ²)	Cholesterol 함량 (mg/100g)
C	2.66	6.38	38.06
T	2.70	7.89	31.47
SE	0.13	1.00	4.81

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

다. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 육색 및 지방색의 특성 검사

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 육색의 특성은 결과 4, 지방색 특성은 결과 5에서 보는 바와 같다.

육색 및 지방색에 있어 대조구에 비하여 시험구가 육색의 황색도가 높았고, 지방색의 명도와 황색도가 높았다. 육색의 명도, 적색도, 백색도 및 지방색의 적색도, 백색도는 처리 간에 유의적 차이가 없었다.

결과 4. 육색

처리구 ¹⁾	육색			
	L*	a*	b*	W
C	58.33	11.43	0.83 ^B	55.83
T	57.70	13.07	1.76 ^A	52.41
SE	1.95	0.56	0.29	1.56

$$* W = L^* - 3b^*$$

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

결과 5. 지방색

처리구 ¹⁾	지방색			
	L*	a*	b*	W
C	78.11 ^B	7.19	-0.82 ^B	80.57
T	81.62 ^A	7.07	0.82 ^A	79.16
SE	0.41	0.19	0.25	0.92

* $W = L^* - 3b^*$

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

라. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 조직감 특성 검사

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 조직감 특성은 결과 6, 7에서 보는 바와 같다.

조직감에 있어 대조구에 비하여 시험구가 경도, 표면경도 및 씹힘성은 낮았고, 응집성, 탄력성, 검성 및 부착성은 처리 간에 유의적 차이가 없었다.

결과 6. 조직감 특성(I)

처리구 ¹⁾	경도 (kg)	표면경도 (kg)	응집력 (%)	탄력성 (mm)
C	1.70 ^A	1.67 ^A	0.45	1.09
T	1.32 ^B	1.21 ^B	0.42	1.04
SE	0.09	0.08	0.02	0.04

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

결과 7. 조직감 특성(II)

처리구 ¹⁾	검성 (kg)	씹힘성 (kg,mm)	부착성 (kg)
C	6.38	0.85 ^A	0.25
T	0.55	0.57 ^B	0.19
SE	3.94	0.06	0.03

C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

마. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 지방산 조성 검사

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 지방산 조성 검사 결과는 결과 8에서 보는 바와 같다.

지방산 조성에 있어 대조구에 비하여 시험구가 미리스틱산, 올레익산, 포화지방산은 적었고, 리놀산, 리놀렌산 및 아라키돈산, 불포화지방산, 필수지방산, 불포화지방산/포화지방산 비율, 필수지방산/불포화지방산 비율, 오메가-3 및 6 지방산과 오메가-6/오메가-3 비율은 높았다. 팔미틱산, 팔미톨레익산 및 스테아릭산 비율은 처리 간에 유의적 차이가 없었다.

바. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 아미노산 조성 검사

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 아미노산 조성은 결과 9에서 보는 바와 같다.

아미노산 조성에 있어 대조구에 비하여 시험구가 FAA(풍미 관련 아미노산), STAA(단맛 관련 아미노산) 및 TAA(총 아미노산) 함량은 많았고, AAA(방향족아미노산), BAA(쓴맛 관련 아미노산) 및 EAA(필수아미노산) 함량은 처리 간에 유의적 차이가 없었다.

결과 8. 지방산 조성

지방산	처리구 ¹⁾		
	C	T	SE
Myristic acid (C14:0)	0.87 ^A	0.69 ^B	0.06
Palmitic acid (C16:0)	22.99	22.03	0.38
Palmitoleic acid (C16:1)	2.22	2.00	0.2
Stearic acid (C18:0)	9.05	8.66	0.16
Oleic acid (C18:1)	28.38 ^A	24.55 ^B	1
Linoleic acid (C18:2, n-6)	28.46 ^B	32.27 ^A	0.89
Linolenic acid (C18:3, n-3)	0.54 ^B	0.70 ^A	0.04
Arachidonic acid (C20:4, n-6)	7.51 ^B	9.10 ^A	0.4
SFA ¹⁾	32.90 ^A	31.38 ^B	0.38
UFA ¹⁾	67.10 ^B	68.62 ^A	0.38
EFA ¹⁾	36.50 ^B	42.08 ^A	1.19
UFA/SFA	2.04 ^B	2.19 ^A	0.04
EFA/UFA	0.54 ^B	0.61 ^A	0.02
n-3 fatty acid	0.54 ^B	0.70 ^A	0.04
n-6 fatty acid	35.96 ^B	41.37 ^A	1.17
n-6/n-3	69.38 ^B	60.23 ^A	4.26

¹⁾ SFA (saturated fatty acid), UFA (unsaturated fatty acid), EFA (essential fatty acid), C : 일반 사료를 급여한 대조구, T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

결과 9. Amino acid compositions (%)

Amino acids	처리구 ¹⁾		
	C	T	SE
Aspartic acid	1.45 ^B	1.91 ^A	0.04
Threonine ^{*, 3)}	0.64 ^B	0.81 ^A	0.02
Serine ³⁾	0.54 ^B	0.77 ^A	0.01
Glutamic acid ²⁾	2.50 ^B	3.05 ^A	0.06
Proline	0.63 ^B	0.70 ^A	0.02
Glycine ³⁾	0.72 ^B	0.82 ^A	0.02
Alanine ³⁾	0.84 ^B	1.18 ^A	0.02
Valine ^{*, 6)}	0.91 ^B	0.99 ^A	0.2
Isoleucine ^{*, 6)}	0.90 ^B	0.97 ^A	0.02
Leucine [*]	1.58	1.64	0.03
Tyrosine ^{5), 6)}	0.73 ^A	0.66 ^B	0.01
Phenylalanine ^{*, 5), 6)}	0.75 ^B	0.81 ^A	0.02
Histidine ^{*, 6)}	1.20 ^A	1.05 ^B	0.02
Lysine [*]	1.82	1.84	0.04
Arginine ^{*, 6)}	1.48 ^A	1.36 ^B	0.03
FAA ²⁾	2.50 ^B	3.05 ^A	0.06
STAA ³⁾	2.74 ^B	3.58 ^A	0.07
AAA ⁵⁾	1.48	1.47	0.03
BAA ⁶⁾	5.97	5.84	0.12
EAA [*]	9.28	9.47	0.18
TAA ⁷⁾	16.70 ^B	18.56 ^A	0.35

¹⁾ C : 일반사료를 급여한 대조구, T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구
²⁾ FAA (flavourous amino acid), ³⁾ STAA (sweet taste amino acid), ⁴⁾ AAA(aromatic amino acid), ⁵⁾ BAA (bitter amino acid), ⁶⁾ EAA (essential amino acid), ⁷⁾ TAA (total amino acid).

사. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 신선육 관능평가

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 신선육에 대한 관능평가 결과는 결과 10에서 보는 바와 같다.

신선육 관능평가에 있어 대조구에 비하여 시험구가 육색, 드립량, 마블링 정도 및 전체적 기호도 모든 항목에서 높았다.

결과 10. 신선육에 대한 관능평가

처리구 ¹⁾	육색	Drip량	Marbling 정도	기호도
C	6.32 ^B	5.80 ^B	5.92 ^B	6.08 ^B
T	7.03 ^A	7.02 ^A	7.20 ^A	7.04 ^A
SE	0.1	0.1	0.1	0.09

* Sensory scores were assessed on 9 point scale base on 1=very poor or unpalatable, 9=very good or palatable.

¹⁾ C : 일반사료를 급여한 대조구

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

아. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돈육의 가열육 관능평가

Multi-step 발효물 첨가사료를 급여한 돼지의 육질 조사에서 가열육에 대한 관능평가 결과는 결과 11에서 보는 바와 같다.

가열육 관능평가에 있어 대조구에 비하여 처리구가 육색, 향, 맛, 연도, 다즙성 및 전체적 기호도 모든 항목에서 높았다.

결과 11. 가열육에 대한 관능평가

처리구 ¹⁾	색	Aroma	Flavor	연도	다즙	기호도
C	5.92 ^B	6.06 ^B	5.56 ^B	5.43 ^B	5.67 ^B	5.82 ^B
T1	6.84 ^A	6.64 ^A	6.62 ^A	6.77 ^A	6.67 ^A	6.83 ^A
SE	0.07	0.08	0.06	0.07	0.07	0.08

관능평가는 9점법으로 나타냈으며 1=아주 나쁘거나 약하다, 9=아주 좋거나 강하다로 나타냄. ¹⁾ C : 일반사료를 급여한 대조구,

T : Multi-step 발효물을 5% 첨가한 사료를 급여한 시험구

이상의 결과를 요약하면 일반사료를 급여하여 사육한 대조구에 비하여 Multi-step 발효물을 첨가한 사료를 급여하여 사육한 시험구가 조지방 함량, 풍미, 단맛 관련 및 총 아미노산 함량은 많았으며, pH, 지방의 명도, 불포화지방산, 필수지방산, 불포화지방산/포화지방산 비율, 필수지방산/불포화지방산 비율, 오메가-3 지방산, 신선육 및 가열육 관능 평가 결과 등 모든 항목에서도 결과가 높게 나타났다.

또한 대조구에 비하여 시험구가 경도, 표면경도 및 씹힘성, 포화지방산은 낮은 장점을 나타낸 반면, 가열감량은 많았고, 육 및 지방의 황색도, 오메가-6 지방산과 오메가-6/오메가-3 비율이 높았고, 수분 함량은 적은 단점을 나타내었다.

2. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돼지와 일반사료 급여 돼지의 도체병변조사

Multi-step 발효물 5% 첨가사료를 급여한 시험구와 일반사료를 급여한 대조구의 출하기까지 사육한 후 도축하여 도체병변조사를 실시한 결과를 결과 12에 나타내었다.

결과 12. Multi-step 발효물 첨가사료 급여 돼지의 도체병변 조사 결과

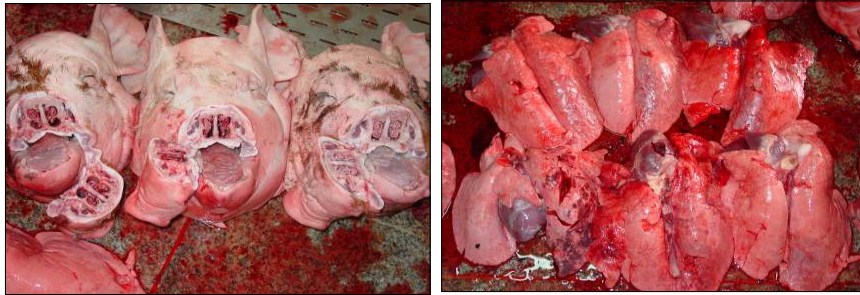
구 분	복막염	회장염	홍막염	심낭염	간백반	홍막 폐렴	유행성 폐렴	위축성비염 감염지수					
								0	1	2	3	4	5
T	-	-	4	-	-	4	3	3	4	2	1	-	-
C	-	-	5	-	-	5	4	4	2	3	1	-	-

※ T : 사료내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험구

B : 일반사료만 급여한 대조구

시험구와 대조구 공히 복막염, 회장염, 심낭염 그리고 간백반 현상은 나타나지 않았으나 홍막염과 홍막폐렴이 시험구에서 4두, 대조구에서 5두 발생되었고, 유행성폐렴의 경우 시험구에서 3두, 대조구에서 4두가 양성으로 나타났다. 또한 위축성 비염의 경우 증상이 시험구에서 3두, 대조구에서 4두 그리고 위축상태에 따라 지수를 측정한 결과 심한 감염상태는 아니었으나 감염개체가 다수 관찰되었다. 따라서 Multi-step 발효물이 돼지 질병에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났다.

이러한 성적은 일반적으로 도축장에서 실시하고 있는 도체 병변조사의 항목이 주로 호흡기 질병에 초점이 맞추어져 있어서 나타나는 결과로 사료된다. 만약 소화기질병의 병변을 중점적으로 관찰하였다면 일반사료를 급여한 돼지와 Multi-step 발효물이 첨가된 사료를 급여한 돼지간의 병변의 차이가 어느 정도는 인정되었을 것으로 생각된다.



결과 13. 도살 확인 : 위축증 비염(Atrophic rhinitis)과 유행성 폐렴(Epidemic pneumonia)

3. Multi-step 발효물을 이용한 각종 사료 formulation 시험

가. 시험구 출하 및 도축

Multi-step 발효물 적정 배합비 시험을 위해 배치한 2개 시험구를 사육한 결과 20% 첨가 시험구는 41두중 28두, 10% 첨가 시험구는 44두 중 34두가 최종 출하되었다.

나. 도체등급 비교분석

Multi-step 발효물이 각각 20%와 10%를 첨가된 갓난돼지 사료를 급여한 돼지의 출하시 도체등급판정결과서는 결과 15, 16과 같았으며 이 결과를 종합하여 등급별로 구분하여 보면 결과 14와 같다.

결과 14. Multi-step 발효물 20% 및 10% 첨가 갓난 돼지 사료 급여 돼지의 출하시 도체등급성적

	합 계	A 등급	B 등급	C 등급	D 등급
합 계	62	21(33.9)	18(29.0)	10(16.1)	3(4.8)
T1	28	9(32.1)	11(39.3)	7(25)	1(3.6)
T2	34	12(35.3)	17(50.0)	3(8.8)	2(5.9)

※ T1 : 사료내 Multi-step 발효물을 20% 첨가하여 급여한 시험구

T2 : 사료내 Multi-step 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구

Multi-step 발효물 20% 첨가된 갓난 돼지 사료를 급여한 시험구(T1)를 성돈까지 사육한 후 도축한 28두의 도체등급을 판정한 결과 A등급이 9두(32.1%), B등급이 11두(39.3%)로 나타나 B등급 이상이 71.4%를 차지하였다. 이에 비교하여 multi-step 발효물이 10% 첨가된 갓난 돼지 사료를 급여한 시험구(T2)의 34두의 경우 A등급이 12두(35.3%), B등급이 17두(50%)로 나타나 B등급 이상으로 판정된 개체가 85.3%를 차지하였다. 즉 20%를 첨가하여 급여한 시험구보다 10%를 첨가하여 급여한 시험구의 도체등급이 다소나마 우수하게 나타남으로써 multi-step 발효물 첨가량은 도체등급에 영향이 없는 것으로 판정되었다.

결론적으로 위의 성적과 1차년도 연구에서 Multi-step 발효물이 첨가된 사료를 급여하여 돼지를 사육하면 증체량이나 사료효율은 높아진다는 성적을 종합하여 분석하여 보면 젖을 떼기 전에 급여하는 갓난 돼지 사료에 첨가량은 10% 정도가 적합하리라 사료된다. 또한 젖을 떼는 시기인 이유 후부터 자돈기의 적정 배합비의 경우 Multi-step 발효물 5% 첨가로도 일반사료 보다도 영양적으로 높은 효율을 나타내고 있어 사료 효율과 경제적 측면도 고려하여 5% 정도가 적합하리라 사료된다.

구분 (구분명)	성 질 명	판정일		연도 월	연도 일	판 정 항 목	판 정 항 목	성 상	도 체 (kg)	해 지 부 위 (mm)	2차 판 정 항 목	1차 판 정 항 목	2차 판정												판 정 항 목	판 정 항 목	판 정 항 목	판 정 항 목				
		외관											성질						기타													
		외 관	성 질										기 타	외 관	성 질	기 타	외 관	성 질	기 타	외 관	성 질	기 타	외 관	성 질					기 타			
9	명리학산	02	21	221	00	탈락	거세	88	27			1B															1	B				
10	명리학산	02	21	222	00	탈락	거세	95	24			1B																1	B			
11	명리학산	02	21	223	00	탈락	얇	85	15			1B																1	B			
12	명리학산	02	21	224	00	탈락	거세	87	27			1B			1													2	B			
13	명리학산	02	21	225	00	탈락	거세	86	26			1A																1	A			
14	명리학산	02	21	226	00	탈락	얇	90	20			1A																1	A			
15	명리학산	02	21	227	00	탈락	거세	75	20			2C																2	C			
16	명리학산	02	21	228	00	탈락	거세	87	24			1A																1	A			
17	명리학산	02	21	229	00	탈락	거세	85	27			1B			2													2	B			
18	명리학산	02	21	230	00	탈락	거세	77	21			1B			2													2	B			
19	명리학산	02	21	231	00	탈락	거세	80	18			1A																2	B			
20	명리학산	02	21	232	00	탈락	거세	75	20			2C																2	C			
21	명리학산	02	21	233	00	탈락	거세	107	21			1D																2	D			
22	명리학산	02	21	234	00	탈락	거세	80	26			1A																1	A			
23	명리학산	02	21	235	00	탈락	거세	76	18			1B																2	B			
24	명리학산	02	21	236	00	탈락	얇	83	14			2C																2	C			
25	명리학산	02	21	237	00	탈락	거세	84	18			1A																1	A			
26	명리학산	02	21	238	00	탈락	얇	87	14			2C																2	C			
27	명리학산	02	21	239	00	탈락	거세	84	20			1A																1	A			
28	명리학산	02	21	240	00	탈락	거세	89	20			1A																1+	A			

* 판정방법: 온도제 판정(온), 냉도제 판정(냉).
 중심직경 및 수율이 표기된 경우는 기계 등급판정 임

결과 15-2. Multi-step 발효물 20% 첨가 갓난 돼지 사료 급여 돼지의 출하시
 도체 판정결과서

돼지도체 등급판정결과

출하자명 : 조재주

판정일자 : 2008년 03월 26일 ~ 2008년 03월 26일

인쇄일자 : 2008년 04월 10일

1. 등급판정결과 요약표

단위(두)

구분	A					B					C					D					E	스 계	
	1+	1	2	3	계	1+	1	2	3	계	1+	1	2	3	계	1+	1	2	3	계			
암		4	1		5		7	3		10			3		3				1		1		
수																							
거세		6	1		7		7			7							1				1		
계		10	2		12		14	3		17			3		3		1	1			2		34

* 돼지 등급판정기준이 2007년 7월 1일부터 변경되었기 때문에 이전 결과는 "등급별 계"에 포함하여 표시됨

2. 등급판정 항목별 평균

단위(두, kg, mm, 원)

구분	박 피					탕 박					판정두수	
	두수	근내지방	도체중	등지방	경락단가	두수	근내지방	도체중	등지방	경락단가	온도체	냉도체
암						19		89.2	16.9		19	
수												
거세						15		90.4	20.9		15	
소계						34		89.7	18.7		34	

* 도체중, 등지방 두께, 경락단가는 E등급을 제외하고 계산되었으며, 근내지방은 냉도체 판정분에 한하여 집계됨

3. 1차등급 대비 육질 및 규격 하락율

(단위 : %)

1차등급 대비 규격 및 육질 하락율											
구분	균형	비육	지방부착	마무리	조식감	육색	지방색	근내지방	삼겹살	결함	전체
암							5.3		15.8		4두(21.1%)
수											
거세							6.7				1두(6.7%)
소계							5.9		8.8		5두(14.7%)

* 1차등급 대비 육질 및 규격 하락율은 E등급제외 하여 집계

4. 등급판정결과 세부내역

일련 번호	작업장명	판정일		도체 번호	판정 방법	도체 형대	성 상	도체 중 (kg)	등지 방 두께 (mm)	등지방 조식감	수 율	1차 판정	2차 판정										최종등급	경락 단가	
		월	일										육 질					규격							P S E
													육색	지방 색	조식 감	지방 부착	삼 겹 살	결함	균형	비육	지방 부착	마무 리			
1	명목축산	03	26	211	온	탕박	암	97	19			1B											1	B	
2	명목축산	03	26	212	온	탕박	암	95	21			1B											1	B	
3	명목축산	03	26	213	온	탕박	암	85	14			2C										2	C		
4	명목축산	03	26	214	온	탕박	거세	97	28			1B											1	B	
5	명목축산	03	26	215	온	탕박	암	90	15			1B			2								2	B	
6	명목축산	03	26	216	온	탕박	암	90	22			1A											1	A	
7	명목축산	03	26	217	온	탕박	거세	88	19			1A											1	A	
8	명목축산	03	26	218	온	탕박	거세	93	20			1A											1	A	

결과 16-1. Multi-step 발효물 10% 첨가 갓난 돼지 사료 급여 돼지의 출하시
도체 판정결과서

번호	종류	명칭	판정일		판정처	판정성	판정대상	상	도체중(kg)	통지일평균(mm)	판정비율(%)	수	판정	2차 판정										최종등급		판정				
			월	일										판					격					등급	구분					
														목	금	토	일	월	목	금	토	일	월				목	금	토	일
9	영곡축산	영곡축산	03	26	219	판	탈박	안	84	19			1A														2	A		
10	영곡축산	영곡축산	03	26	220	판	탈박	거세	84	20			1A															2	A	
11	영곡축산	영곡축산	03	26	221	판	탈박	거세	94	21			1B															1	B	
12	영곡축산	영곡축산	03	26	222	판	탈박	안	91	18			1A															1	A	
13	영곡축산	영곡축산	03	26	223	판	탈박	거세	95	19			1B															1	B	
14	영곡축산	영곡축산	03	26	224	판	탈박	안	96	17			1B															1	B	
15	영곡축산	영곡축산	03	26	225	판	탈박	거세	82	18			1A															1	A	
16	영곡축산	영곡축산	03	26	226	판	탈박	안	90	14			2C															2	C	
17	영곡축산	영곡축산	03	26	227	판	탈박	안	84	12			2D															2	D	
18	영곡축산	영곡축산	03	26	228	판	탈박	거세	97	26			1B															1	B	
19	영곡축산	영곡축산	03	26	229	판	탈박	거세	81	26			1A						Y									1	A	
20	영곡축산	영곡축산	03	26	230	판	탈박	거세	86	18			1A															1	A	
21	영곡축산	영곡축산	03	26	231	판	탈박	안	95	18			1B															1	B	
22	영곡축산	영곡축산	03	26	232	판	탈박	거세	88	15			1B															1	B	
23	영곡축산	영곡축산	03	26	233	판	탈박	거세	81	19			1A															1	A	
24	영곡축산	영곡축산	03	26	234	판	탈박	안	81	16			1B							2								2	B	
25	영곡축산	영곡축산	03	26	235	판	탈박	안	96	19			1B															1	B	
26	영곡축산	영곡축산	03	26	236	판	탈박	안	85	14			2C															2	C	
27	영곡축산	영곡축산	03	26	237	판	탈박	거세	94	24			1B															1	B	
28	영곡축산	영곡축산	03	26	238	판	탈박	안	90	16			1B															1	B	
29	영곡축산	영곡축산	03	26	239	판	탈박	거세	95	20			1B															1	B	
30	영곡축산	영곡축산	03	26	240	판	탈박	거세	101	21			1D															1	D	
31	영곡축산	영곡축산	03	26	241	판	탈박	안	88	16			1B								2							2	B	
32	영곡축산	영곡축산	03	26	242	판	탈박	안	80	18			1A															1	A	
33	영곡축산	영곡축산	03	26	243	판	탈박	안	88	16			1B															1	B	
34	영곡축산	영곡축산	03	26	244	판	탈박	안	89	18			1A															1	A	

* 판정방법 : 온도체 판정(온), 냉도체 판정(냉).
 동심지경 및 수량이 표기된 경우는 기계 등급판정 임

결과 16-2. Multi-step 발효물 10% 첨가 갓난돼지 사료 급여 돼지의 출하시
 도체판정결과서

4. Multi-step 발효물의 사료내 권장 첨가량 분석

위의 결과를 분석하여 돼지의 사육 시기별 사료에 Multi-step 발효물을 첨가하는 적정 배합비를 확립하여 보면 결과 17과 같이 권장할 수 있을 것 같다.

결과 17. 돼지의 사육 시기별 급여사료와 Multi-step 발효물 권장 첨가량

구 분	체 중 (kg)	사육시기 (주령)	사 료 명	권장 첨가율 (%)
포유기	분만 - 7	1 - 4	갓난돼지사료	10
이유기	7 - 10	4 - 6	젓먹이돼지사료	5
자돈기	10 - 40	6 - 12	젓뎨돼지사료	2.5
육성기	40 - 80	12 - 20	육성돈사료	1
비육기	80 -110	20 이상	비육돈사료	-

돼지가 어린시기에는 어미돼지의 젓만으로도 영양분의 공급이 충분하지만 생후 3주령에 이르게 되면 어미의 젓양도 줄어들기 시작하고 자돈도 증체되면서 어미젓만으로는 영양분이 부족하게 된다. 따라서 보조 사료가 필요한데 생후 7-10일령부터 먹이는 것이 소화능력이 좋아지고 발육도 빨라지며 젓떼기를 하더라도 지장이 없이 커갈 수 있으므로 포유기의 갓난 돼지에 급여하는 사료는 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 이 시기에는 Multi-step 발효물이 10% 정도 첨가된 갓난돼지 사료를 급여하여 사료급여에 대한 적응과 충분한 단백질을 공급하여 주는 것이 좋을 것으로 사료된다

포유기에 갓난돼지 사료와 같은 입붙이기 사료를 급여하고 나면 농가에 따라 약간의 차이는 있으나 보통 20~30일령에 이유 즉 젓을 떼기 시작한다. 돼지는 이유직후 환경의 급격한 변화에 의해 성장지연 및 체중감소 현상을 보인다. 더욱이 사료의 주요 성분으로 구성되는 대두는 대부분 열처리 과정을 거치지 않고 분말화 되어 첨가됨에 따라 아직 소화기관이 미성숙한 어린 자돈에서는 흡수하지 못하고 배출되어 식이성 자돈설사의 원인이 되기도 한다. 또한 이유 후 2주간의 증체량이 출하일령에 약 10일 정도 영향을 미치므로 자돈기 사료를 비록 가격이 비싸더라도 고품질의 사료를 선택해야 하며 이유기와 자돈기(이

유~30kg) 및 육성기(30~50kg)동안 골격 및 근육조직이 왕성하게 발달하므로 고열량, 고단백 사료를 급여하여야 한다. 그러나 이 시기에는 사료의 섭취량이 급격히 증가함을 감안하여야 한다. 따라서 이 시기에는 Multi-step 발효물이 5% 정도 첨가된 사료를 급여하여 주는 것이 좋을 것으로 사료된다.

자돈기와 육성기 돼지의 성장속도는 사료섭취량보다 훨씬 높으며, 높은 아미노산을 공급하더라도 그 아미노산을 이용할 수 있는 에너지가 충분하지 못하면 정육생산에 효율적으로 이용되지 못하므로 최대의 성장효과를 위해서는 고에너지 사료가 필수적이다. 따라서 이 시기의 사료섭취량을 감안하여 자돈기에는 2.5%, 육성기에는 1% 정도의 Multi-step 발효물을 첨가하여 주는 것이 좋을 것으로 사료된다.

제 6 장 발효 시스템에 따른 대두 알레르기성 분석

제 1 절 서 론

이유기의 어린 동물의 경우 소화기관의 발달 미숙으로 통과된 알레르기성 단백질에 감작되어 알레르기성 설사증과 성장장애가 일어나고 심한 경우 사망하는 개체가 생겨 축산 농가에 심각한 정신적, 경제적인 피해를 유발하고 있다. 본 연구에서는 유산균, 황국균, 고초균 등의 안전한 식품용 미생물로 대두 중의 난 소화성 물질까지도 효율적으로 분해시킨 multi-step 대두 발효물을 자돈 영양사료화함으로써 고부가가치의 사료산업 및 축산 농가를 활성화하여 경제적 효과를 극대화할 수 있다.

미국, 유럽등지에서 이유기 자돈에서 알레르기 유사 반응이 발견되고 있으나 그 원인이나 사료의 알레르기 유발 가능성에 대한 국내 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 사료에 단백질원으로 첨가되는 대두의 알레르기성을 규명하고자 한다.

원인불명 설사증 자돈의 혈청을 인체에 알레르기를 유발하는 단백질(항원: *Gly m Bd 28K*, *Gly m Bd 30K* 등)과 면역학적으로 분석함으로써 식품알레르기의 가능성 규명과 대두의 품종에 따른 항원성 물질의 정량하고 multi-step 발효시스템으로 항원성 단백질의 한계 크기인 10kD이하 펩타이드로 분해함으로써 항원성의 분해도를 확인하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 대두 단백질 분리

Hexane 처리하여 얻어진 탈지 대두분말 0.5 g씩을 증류수로 20배(w/w) 희석하고 콩가루 용액을 얻는다. NaOH로 pH 8.0으로 맞춘 뒤 60분간 진탕하여 용해하고 6000 rpm으로 60분간 원심분리하며 상층액 중 0.5 mL을 다른 시험관에 옮긴 후 이를 soy total로 표시한다. 나머지 상층액은 타 시험관에 옮긴 후 HCl

을 첨가하여 pH를 4.0으로 조정하며, 6000 rpm을 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 whey fraction으로 표시한다. 원심분리된 침전물은 증류수에 현탁하여 NaOH를 이용하여 pH를 7.5로 조정하며 침전물의 용해 후 6,000 rpm으로 8분간 원심분리하여 얻어진 상층액은 globulin fraction으로 표시한다. 같은 방법으로 발효 처리된 대두의 단백질을 분리하여 확보한다.

2. 단백질 농도 측정

분리된 단백질 농도는 Bio-Rad에서 제공한 Protein Assay Kit(Cat. No. 500-001)를 이용하여 측정하고 이때 bovine serum albumin(BSA)를 표준물질로 사용한다.

3. 대상 환자 및 혈청 확보

환자혈청은 아토피증상으로 삼성서울병원에 내원한 환자를 대상으로 대두에 대한 CAP assay상 0.7 ku/L 이상이거나 피부단자검사상 3+ 이상인 경우를 확인하여 혈청을 확보한다. 얻어진 혈청은 20 °C에서 냉동보관하며, 환자의 연령, 진단, challenge 여부 등의 임상정보를 database화하여 정리한다.

4. SDS-PAGE

13% separating gel과 5% stacking gel을 이용한다. 시료로서는 분리된 raw soybean extract, 대두단백조제유, 피부단자검사용 시약 등을 사용한다. 시료는 5배 농도의 sample buffer (1M Tris-HCl: pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromphenol blue)와 4:1(w/w)로 섞은 후 끓는 물에서 5분간 증탕 가열한 뒤 lane당 30 g의 농도로 분리한다. 전기영동은 100 volt에서 5분, 200 volt에서 40분 시행하며, 전기영동 후 gel은 Coomassie staining solution(1.0 g Coomassie blue R-250, 450 mL methanol, 450 mL H₂O, 100 mL glacial acetic acid)로 5분간 염색하고 Coomassie destaining solution(100 mL methanol, 100 mL glacial acetic acid, 800 mL H₂O)로 적절히 탈색 후 건조보관한다. 분리된 fraction을 시료에 따라 비교 분석한다.

5. Immunoblotting

SDS-PAGE sample buffer와 혼합한 시료는 10 g/cm의 농도로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane(NC)에 transfer buffer(Tris base 11.5 g, Glycine 58 g, 10% SDS 20 mL, methanol 400 mL, 1500 mL H₂O)를 사용하여 100 volt에서 1시간 electrotransfer하고 0.3%의 Tween 20이 포함된 PBS로 1시간 실온에서 blocking한다. 0.02% Tween-20이 들어있는 TBS용액으로 환자 혈청을 희석한 후 membrane을 상온에서 3시간동안 incubation한다. Washing buffer로 3회 washing한 뒤 membrane을 biotin-conjugated antihuman IgE로 상온에서 2시간동안 incubation한다. 0.03% Tween-20이 포함된 PBS용액으로 3회 세척 후 1 : 3000으로 희석한 streptavidin alkaline phosphatase와 30분간 반응시키며 3회 세척한다. 이후 alkaline phosphatase conjugate substrate를 반응시켜 발색반응을 관찰한다. IgE-binding molecule의 size를 확인하고 환자에 따른 분포를 확인한다. 환자군을 다시 3세 이하군과 10세 이상군으로 나누어 주된 알레르겐의 분포를 비교·분석한다.

제 3 절 국산, 수입산 대두의 품종별 알레르기성 비교 분석

1. 국내산 대두와 수입산 대두, 그리고 GM 대두 시료

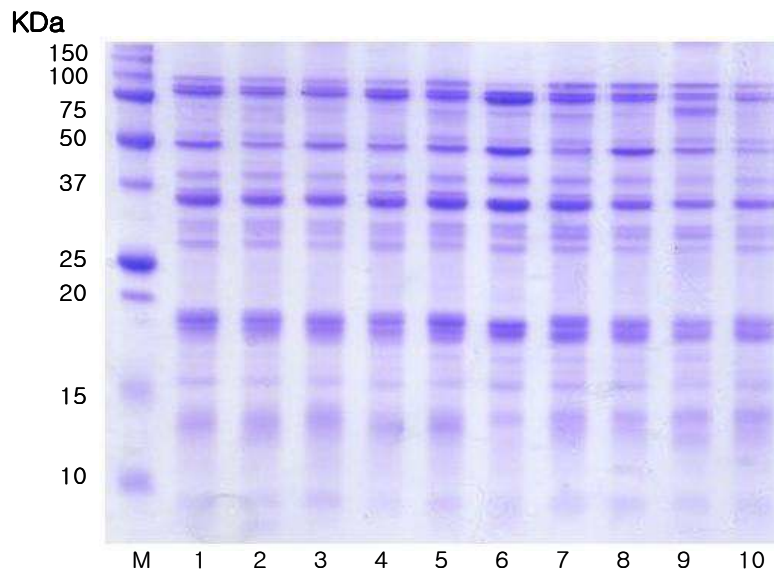
국내산 대두 황금콩, 태광콩, 다원콩, 화엄꽃콩, 대원콩, 진품콩 6 품종은 농촌진흥청으로부터 제공받았으며 수입산 품종인 윌리엄스 282, Jack, Perking은 농업생명공학연구원으로부터 제공받았다. 그리고 유전자재조합 작물인 GM 대두는 경희대학교로부터 제공받아 사용하였다.

2. 항원 추출 및 SDS-PAGE

국내산 및 수입산 대두와 유전자 재조합 대두를 분쇄한 후, Hexane 처리하여 24시간 상온에서 건조시킨다. Phosphate buffered saline (PBS)을 1 : 10 w/v 혼합하여 2시간 동안 4℃에서 추출하였다. 이 용액을 3,000g로 20분간 원심분리한 후 상층액을 투석막(dialysis membrane)을 이용하여 48시간 동안 투석하였

다. 여과된 추출 용액을 동결건조 시키고 사용하기 전까지 -20°C 에서 보관하였다. 추출된 항원은 SDS-PAGE를 실시하여 단백질 밴드를 확인하였다(결과 1).

국내산 대두 6종과 수입산 대두 3종 그리고 유전자 재조합 대두 1종의 조항원은 15% SDS-PAGE 상에서 그 단백질 밴드의 분포가 유사하였으며 따라서 대두 품종들 간의 단백질 차이는 없었다.



결과 1. 국산, 수입산, 유전자 재조합 대두 추출물의 SDS-PAGE 전기영동 (M: Molecular weight marker/ 1: 황금콩, 2: 태광콩, 3: 다원콩, 4: 화엄꽃콩, 5: 대원콩, 6: 진품콩, 7: 윌리엄스, 8: Jack, 9: Perking, 10: GM)

3. 혈청 특이 IgE 항체의 측정

국내산 및 수입산 대두와 유전자 재조합 대두 추출물을 $10\mu\text{g/ml}$ 농도로 96-well microplate (Nunc, USA)에 $100\mu\text{l/well}$ 을 넣고 4°C 에서 12시간 이상 반응시킨 후 이를 0.05% PBS-Tween20으로 4회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 2% Bovine Serum Albumin-phosphate buffered saline (BSA-PBS)을 각 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 넣어 1시간 반응시켰다. 1 : 50 희석한 환자의 혈청을

well 당 100 μ l 씩 넣어 상온에서 2시간 반응시켰다. 4회 세척한 후 biotin labeled goat anti-human IgE 항체(KPL, USA) 1:4,000 v/v를 well당 100 μ l씩 넣고 1시간 반응시킨 후 4회 세척하였다. 여기에 NeutrAvidin-HRP(Pierce, USA) 1:8,000 v/v를 well당 100 μ l 씩 투여하여 1시간 반응시킨 후 다시 4회 세척하였다. TMB substrate(Bio-Rad, USA) 100 μ l를 well 당 넣고 10분간 발색반응 후 6N H₂SO₄로 발색을 중지시키고 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 정상 대조군의 평균값에 3배의 편차치를 더하여 cut-off치를 산출하여 그 이상인 경우를 양성 반응으로 간주하였다.

2005년 4월부터 2006년 1월까지 알레르기 질환을 주소로 삼성서울병원 알레르기 센터를 방문하여 CAP assay 결과 대두에 양성으로 판정된 소아 환자 16명을 대상으로 ELISA를 이용하여 품종별 알레르기성을 조사 하였다. ELISA의 흡광도(OD)에 따른 IgE 값을 상대적으로 비교하면 결과 2와 같다. 16명의 환자별 IgE 수준은 품종 간에 의미 있는 차이가 나지 않았지만 수입산 Jack에서 다소 높은 IgE 값을 확인할 수 있었다.

결과 2. ELISA 흡광도에 따른 대두 품종별 IgE 값

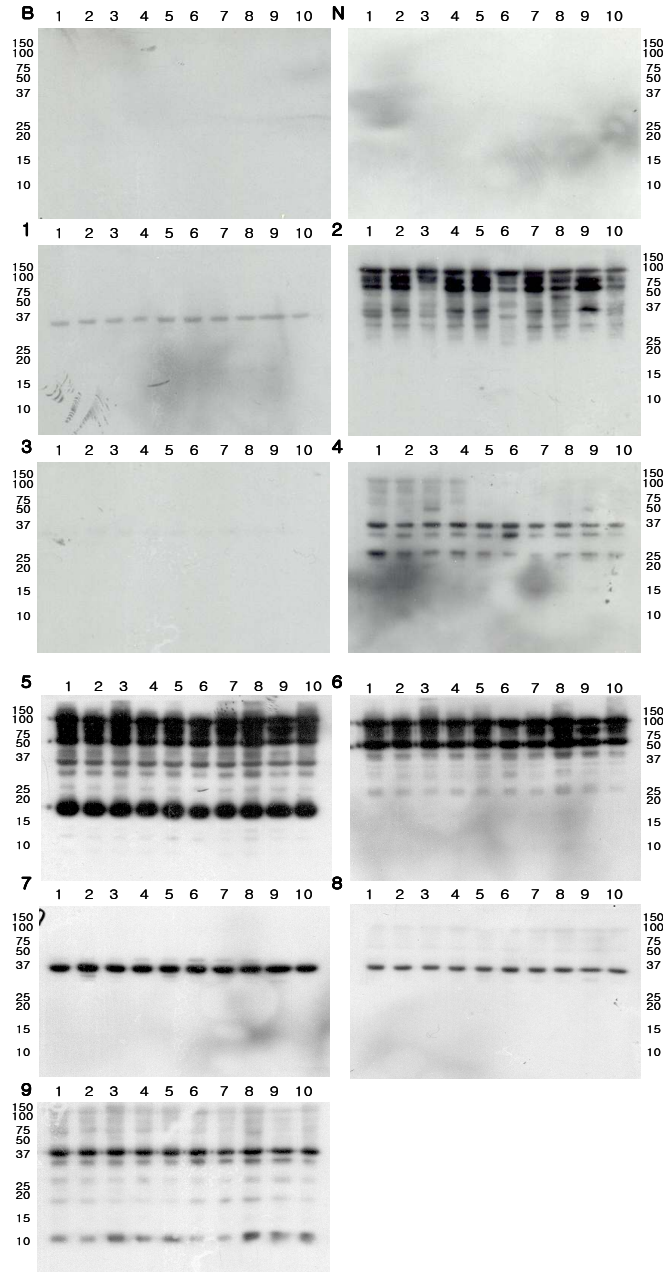
대두품종	국내산						수입산		GM	
	황금콩	태광콩	다원콩	화엄꽃콩	대원콩	진품콩	윌리엄스	Jack, Perking	GM	
양성혈청의 IgE(AU)	6.47 \pm 0.032	5.64 \pm 0.035	3.07 \pm 0.020	4.97 \pm 0.032	6.16 \pm 0.031	5.50 \pm 0.024	5.17 \pm 0.026	8.21 \pm 0.028	2.87 \pm 0.029	4.85 \pm 0.041

4. IgE immunoblot 분석

효소면역측정법에 의한 혈청 특이 IgE 항체 측정치를 비교하여 9명 환자를 대상으로 IgE immunoblot analysis를 수행하였다. 각 대두 항원을 15% SDS-PAGE에 전기영동 후 PVDF membrane으로 전이 시킨 후, 2% NFDM을 이용하여 1시간 동안 비특이적 결합을 방지하였다. 1:10으로 희석한 환자 혈청으로 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 반응시켰다. Biotin labeled goat anti-human IgE 항체(KPL, USA) 1:4,000 v/v를 1시간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 여기에 NeutrAvidin-HRP(Pierce, USA) 1:10,000 v/v를 투여하여 30분 반응시킨 후 다시 3회 세척하였다. ECL(Amersham, USA)용액을 넣은 후 감광하여 확인하였

다.

환자마다 혈청의 IgE와 반응하는 단백질 띠에는 차이가 있었으나, 한 환자가 품종별 IgE와 반응하는 단백질 띠에는 차이를 보이지 않았다(결과 3).



결과 3. 환자 혈청(1~9), 완충액(B)와 정상인 혈청(N)을 이용한 대두 추출물의 IgE. (Lane 1: 황금콩, 2: 태광콩, 3: 다원콩, 4: 화엄꽃콩, 5: 대원콩, 6: 진품콩, 7: 윌리엄스, 8: Jack, 9: Perking, 10: GM)

5. 대두에 의한 동물 알레르기 발생에 관한 정보 조사 및 확보

2005년 4월부터 2006년 1월까지 알레르기 질환을 주소로 삼성서울병원 알레르기 센터를 방문하여 식품 알레르기 질환으로 의심되는 소아 환자를 대상으로 혈청을 확보하여 -70°C 에 보관하였다. 알레르기질환의 원인이 되는 식품을 파악하기 위하여 특정식품에 대한 특이 IgE 항체를 Pharmacia CAP system FEIA를 이용하여 측정하였다. 확보된 혈청은 품종별 대두와 IgE 반응성을 분석하는데 사용하였다.

품종별 immunoblot을 시행한 대두에 양성 반응을 보인 환자 9명을 대상으로 여러 다른 식품에 대한 특이 IgE 항체의 상관성을 살펴본 결과 혈청 IgE는 여러 다른 식품에서도 강한 양의 상관관계를 나타내는 것을 확인하였다(결과 4). 이는 식품군에 의한 교차반응뿐만 아니라 유전적인 요소가 관여한다는 점을 의미한다.

결과 4. CAP-FEIA에 의해 분석한 임상학적 결과

항원	난백	우유	밀	메밀	콩	땅콩
Patient 1	0	0	2.6	2.53	3.35	9.46
Patient 2	7.81	4.56	7.28	1.84	3.86	11.3
Patient 3	61.9	86.5	101.0	2.2	29.6	52.3
Patient 4	11.8	0.52	0	0	0.6	0
Patient 5	1.29	0	1.13	.	0.44	.
Patient 6	6.66	0.43	0.5	0.55	1.32	20.1
Patient 7	69.9	27.9	0.98	0.81	1.09	8.27
Patient 8	6.08	.	0.41	.	0.41	0.84
Patient 9	151	15.9	1.37	0	3.82	11.5

6. 대두에 알레르기 반응을 일으키는 사람 및 동물의 혈청 확보

대두 알레르기의 진단, 평가는 CAP-FEIA(Fluorescent Enzyme Immunoassay)

(Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 현재까지 삼성서울병원에 확보되어 있는 대두 알레르기 환자 혈청은 다음과 같다(결과 5).

결과 5. 확보된 대두 알레르기 사람의 혈청

CAP class	1	2	3	4	5	6
갯수	44	56	26	11	5	3
총합						145

제 4 절 Multi-step 대두 발효물과 혈청을 이용한 알레르기성 분석

1. 국내산 대두의 단일 및 복합 발효

단일종균과 복합종균으로 발효시킨 대두는 세부기관 책임자인 경상대학교 류충호 교수님으로부터 제공받아 사용하였다. 단일 발효는 고초균을 사용하였으며 복합 발효는 유산균, 고초균, 황국균을 사용하였다.

2. 대상 환자

2006년 3월부터 2006년 8월까지 삼성서울병원 소아과를 내원한 소아 환자 1,075명 중 아토피피부염 질환으로 의심되는 환자를 대상으로 대두 특이 IgE 수치가 30 kU_A/L 이상인 환자를 선정하였다.

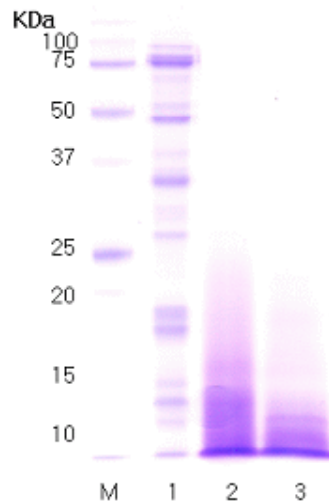
3. 항원 추출 및 확인

국내산 및 단일 및 복합 발효물을 분쇄한 후, Hexane 처리하여 24시간 상온에서 건조시킨다. Phosphate buffered saline (PBS)을 1:10 w/v 혼합하여 2시간

동안 4℃에서 추출하였다. 이 용액을 3,000g로 20분간 원심분리한 후 상층액을 0.45μm membrane을 이용하여 여과하였다. 여과된 추출 용액을 동결건조 시키고 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 추출된 항원은 SDS-PAGE를 실시하여 단백질 밴드를 확인하였다(결과 2).

결과 1. Clinical data for patients with soy allergy

Patimt no.	Age(y)	Sex	Symptom	CAP of soy specific IgE (kU _A /L)
1	3	M	AD	101
2	0	M	AD	47.5
3	0	M	AD	35.3
4	0	M	AD	101
5	0	M	AD	68.9
6	4	M	AD	36.1
7	0	M	AD	101
8	1	M	AD	101
9	1	F	AD	85.2



결과 2. 단일 및 multi-step 발효물의 SDS-PAGE

M : Molecular marker, 1 : 국내산 대두, 2 : 고초균 단일발효물, 3 : Multi-step 발효물

국내산 대두와 단일 발효물 그리고 복합 발효물의 조항원은 12% SDS-PAGE 상에서 그 단백질 밴드의 분포가 상이한 차이를 보이고 있다. 발효시키지 않은 정상군의 콩은 10 kDa에서 100 kDa 까지 광범위한 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 반면, 단일 발효물의 단백질들은 모두 15 kDa 이하, 그리고 복합 발효물의 단백질들은 10 kDa 이하로 분해된 것을 확인할 수 있다. 따라서 복합종군으로 발효시킨 대두의 단백질들이 단일종군보다 단백질 분해가 높음을 확인할 수 있었다.

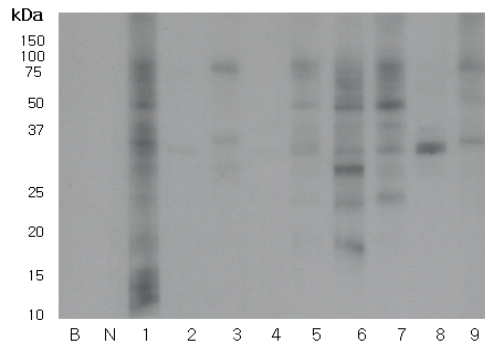
4. IgE immunoblot 분석

CAP 검사법에 의해서 혈청 특이 IgE 항체 측정치를 비교하여 대두 항원에 대하여 30 kU_A/L이 넘는 환자를 대상으로 IgE immunoblot analysis를 수행하였다. 각 대두 항원을 12% SDS-PAGE에 전기영동 후 PVDF membrane으로 전이 시킨 후, 2% NFDM을 이용하여 1시간 동안 비특이적 결합을 방지하였다. 1:10으로 희석한 환자 혈청으로 4°C에서 12시간 이상 반응시켰다. Biotin labeled goat anti-human IgE 항체(KPL, USA) 1:4,000 v/v를 1시간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 여기에 NeutrAvidin-HRP(Pierce, USA) 1:10,000 v/v를 투여하여 30분 반응시킨 후 다시 3회 세척하였다. ECL(Amersham, USA)용액을 넣은 후 감광하여 확인하였다.

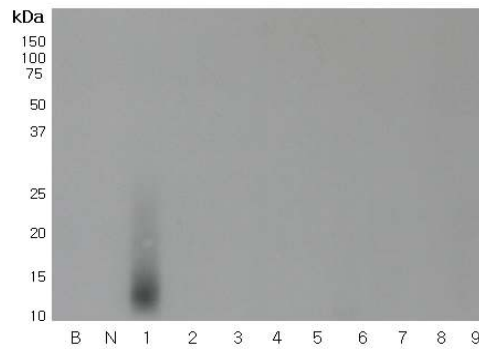
실험1에서, 발효시키지 않은 정상대두에서는 환자마다 혈청의 IgE와 반응하는 단백질 밴드의 차이가 확인되었다(결과 3). 그러나, 단일 발효물과 복합 발효물에서는 혈청 IgE와의 반응성에서 많은 차이를 보이고 있다. 이것은 발효가 되면서 발효시키기 전 대두에서의 단백질이 15 kDa 이하로 분해되면서 생긴 것으로 보인다. Patient 1은 단일 발효물과 복합 발효물에서 혈청 IgE 반응성의 차이를 확인할 수 없었다. 그리고 Patient 2, 6은 복합 발효물에서 혈청 IgE 반응이 단일 발효물보다 강하게 반응성을 나타내고 있다. 이러한 결과는 복합 발효물이 단일 발효물 보다 알레르기성이 증가했음을 나타내는 결과이며, 실험 과정에서 문제가 있었던 것으로 추측되었다. 따라서 본 연구자들은 Patient 6 혈청으로 다시 실험을 하였다.

<실험 1>

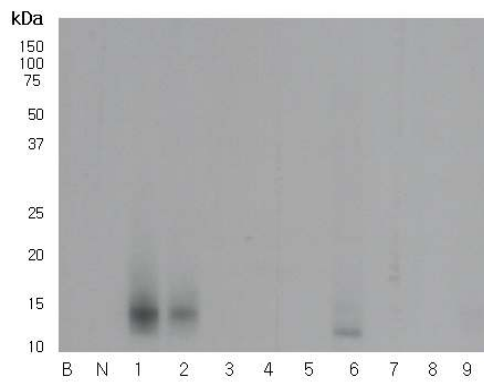
(a)



(b)



(c)

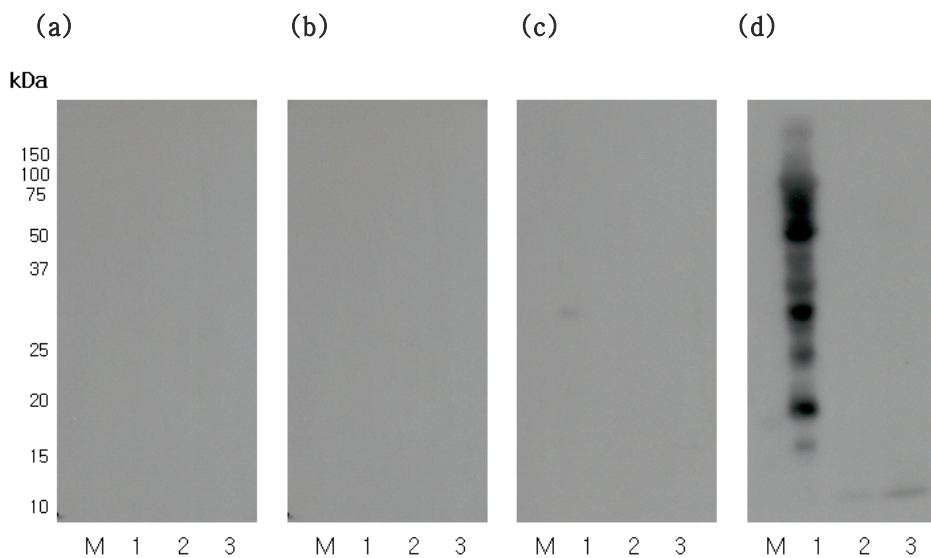


결과 3. 환자 혈청을 대두 추출물의 IgE immunoblot 분석.

(a: 국내산대두, b: 단일 발효물, c: 복합 발효물,
1~9: 환자 혈청, B: buffer, N:정상인혈청)

실험2는 실험1에서 복합 발효물에서 단일 발효물보다 강하게 반응성을 보인 Patient 6를 대상으로 immunoblot을 다시 시행하였다. 실험방법은 실험1과 동일하였다. 정상대두에서는 실험1과 동일한 혈청 IgE 반응성을 확인하였다. 그러나 복합 발효물보다 단일 발효물에서 강한 IgE 반응성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 단일 발효물보다 복합 발효물의 알레르기성이 감소함을 보여주고 있다. 따라서 단일 발효물보다 복합 발효물의 알레르기성이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

< 실험 2 >



결과 4. 국산콩(1), 고초균 단일 발효물(2), multi-step 대두 발효물(3)의 IgE immunoblot 분석

(a: 대조구, b: 정상인혈청, c: 환자 혈청 2, d: 환자혈청 6).

제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 세부과제(경상대학교)

- 가. 유제품에서 nisin 생성 유산균을 스크리닝하였으나 낮은 pH와 강한 산미로 인하여 전통 대두 발효공정에 사용하기 부적합하므로 nisin 생성능이 우수하고 중성 pH를 유지할 수 있는 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IFO 12007 균주를 이용하여 대두발효를 실시하였다.
- 나. 시판 전통사각메주 및 콩알 메주에서 분리한 균주와 증무발효에서 장류용 국균을 구입하여 실험에 사용하였다.
- 다. 청국장과 메주 등에서 혈전용해효소 활성이 있는 균주를 스크리닝한 다음 이취생성능이 결여된 우수한 고초균을 선별하였다.
- 라. 천연항균제 생성 유산균, GABA 생성능이 우수한 황국균, 혈전용해효소생성 고초균의 최적발효조건을 규명하여 대두의 multi-step 발효 기반 확립하였으며, 국외 학술지에 논문을 게재하여 우수성을 홍보하였다.
- 마. 최적발효 조건에서 제조된 단일 및 multi-step 발효물의 수분, 환원당, 총당 등 일반성분 특성을 비교하였으며 확립된 multi-step 발효 조건으로 대두 발효 중 단백질분해효소, 유리 아미노산 함량, phytase 활성과 각종 미네랄 성분의 유리율 등을 측정하여 multi-step 발효물의 우수성을 입증하였다.
- 바. GABA의 최적 생성 및 혈전용해효소 활성 최대시기를 검토하여 효율적인 multi-step 발효 시스템을 구축하였다.

제 2 절 협동과제(동의대학교)

- 가. 대두 유래 genistein의 항암 활성 기전의 확인 및 세포주별 비교를 통하여 후보물질들의 항암활성 비교를 위한 중요한 자료로 활용될 것으로 평가됨.

나. 대두 유래 genistein의 항염증 가능성의 확인 및 기전 연구를 통해 후보물질들의 항염증 효능 비교를 위한 중요한 자료로 활용될 것으로 평가됨.

다. U937 세포에서 COX-2와 각종 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 PGE₂의 발현 정도는 대조구와 비교하여 고초균 단일 발효 대두(FSB) 및 multi-step 발효 대두(TFS) 처리에 의해서 강하게 억제되었다. 특히 FSB에 비하여 TFS를 전처리하였을 경우 PMA에 의하여 과발현된 COX-2 및 PGE₂ 생성의 억제정도가 더 강하게 나타났다. 이는 FSB 및 TFS의 항염증기전 해석을 위한 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 사료된다.

라. 대두 산물 등에 많이 함유되었을 것으로 추정되는 linoleic acid(LA)의 항암활성을 인체 위암세포를 대상으로 조사하였다. LA가 처리된 AGS 위암 세포는 LA 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되었으며, apoptotic body 형성, 염색질 응축 및 sub-G1 세포의 빈도를 동반하여 apoptosis가 유도되었음을 알 수 있었다. 대두 유래 LA의 항암활성 해석을 위한 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 사료된다.

제 3 절 협동과제(경남축산진흥연구소)

가. 평균증체량과 일일증체량은 사료 내 Multi-step 대두 발효물을 10% 첨가한 시험구에서 가장 높게 나타났다.

나. Multi-step 발효물을 다량 첨가한 사료가 자돈의 증체량과 사료 효율을 높게 나타났다.

다. 자돈에서 *Salmonella*가 감염되었을 때 Multi-step 발효물이 *Salmonella*를 억제하는 항균력이 있는 것으로 추정되며 권 등이 보고한 낮도균으로 발효한 청국장이 닭에서 *Salmonella*균이 감염율을 저하시킨다는 결과와 일치하였다.

라. 사료 내 Multi-step 발효물을 2.5% 첨가하여 급여한 시험구 20두 중 PRRS 19두가 항체가 형성되었으며, 사료 내 Multi-step 발효물을 5% 첨가하여 급여한 시험은 20두 모두 항체가 형성되었다. 또한, 사료 내 Multi-step 발효물을 10% 첨가하여 급여한 시험구는 18두가 형성된 반면 일반사료를 급여한 대조구는 20두 모두 항체가 형성되었다.

마. 육질조사에서는 일반사료를 급여하여 사육한 대조구에 비하여 multi-step 대두 발효물을 첨가한 사료를 급여하여 사육한 시험구가 조지방 함량, 풍미, 단맛 관련 및 총 아미노산 함량은 많았으며, pH, 지방의 명도, 불포화지방산, 필수지방산, 불포화지방산/포화지방산 비율, 필수지방산/불포화지방산 비율, 오메가-3 지방산, 신선육 및 가열육 관능 평가 결과 등 모든 항목에서도 높게 나타났다. 대조구에 비하여 시험구가 경도, 표면경도 및 씹힘성, 포화지방산은 낮은 장점을 나타내었다.

바. 도체병변조사에서는 Multi-step 발효물이 돼지 질병에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났다.

사. Multi-step 발효물을 이용한 각종 사료 formulation 시험에서는 multi-step 발효물 첨가량은 도체 등급에 영향이 없는 것으로 판정되었으며 결론적으로 갓난 돼지 사료에 첨가되는 multi-step 대두 발효물의 함량은 10%정도가 적합하며 돈기의 적정 배합비는 사료 효율과 경제적 측면을 고려하여 5% 정도가 적합하리라 사료된다.

제 4 절 위탁과제(성균관대학교)

가. 대두 알레르기환자 혈청과 국산 및 수입산 대두와 immunoblot 및 ELISA방법으로 IgE값의 수준을 분석한 결과 환자에 따른 품종별 반응 정도는 차이를 보이지 않았다.

나. 식품 알레르기 질환으로 의심되는 소아 환자를 대상으로 145개 혈청을 확보하였다.

다. 대두 알레르기환자 혈청과 단일 발효물을 immunoblot 방법으로 IgE 반응성을 분석한 결과 단일 발효물에서 IgE 반응성이 낮아짐을 알 수 있었다.

라. 대두 알레르기환자 혈청과 multi-step 발효물을 immunoblot 방법으로 IgE 반응성을 분석한 결과 multi-step 발효물에서 IgE 반응성이 낮아짐을 알 수 있었다.

마. 단일 발효물보다 multi-step 발효물이 알레르기성 감소에 효과적임을 알 수 있었다.

제 8 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구결과의 활용계획

본 연구는 multi-step 발효 시스템으로 항원성 단백질의 한계 크기인 10 KDa 이하 수준으로 대두단백질을 분해시킴으로써 항원성을 원천적으로 제거하고 장관흡수가 용이한 형태로 분해시킴과 동시에 기능성 펩타이드도 생성되어 자돈 사망률을 현저히 감소시키고 축산 농가의 경제적 손실을 절감시키고자 실시하였다.

본 연구과정을 통해 평가되어진 연구결과는 국내·외 각종 학회지나 저널지 등에 게재하여 multi-step 발효 대두를 혼합하여 제조한 자돈 사료에 대한 영양학적·사료적 가치를 홍보할 계획이다. 이미 multi-step 대두 발효물에 대한 연구 결과 국내·외 학술지에 게재한 바 있으며 한국미생물·생명공학회지 학술회의에서 발표된 바 있다. 현재, (주)양지푸드에 multi-step 대두 발효 시스템 관련 기술이전이 이루어진 상태이며, multi-step 발효 시스템을 활용한 다양한 산업에 적용하기 위한 기술이전을 시도할 계획이다.

본 연구에서는 사료에 영양제, 항생제, 항균물질 등을 인위적 투여를 억제하고 발효물 형태로 가공함으로써 소화율을 향상시키고 설사로 인한 자돈의 폐사를 예방하기 위해 유산균, 황국균, 고초균 등의 안전한 식품용 미생물로 대두 중의 난소화성 물질을 효율적으로 분해시킨 multi-step 대두 발효물을 자돈 영양 사료화함으로써 고부가가치의 사료 산업 및 축산 농가에 보급 및 활용화하여 농가소득 증대를 극대화할 수 있을 것으로 기대한다.

또한, 확립된 multi-step 발효 시스템을 이용하여 다른 난분해성 폐자원을 발효함으로써 새로운 산업적 활용이 가능하며, multi-step 발효 대두의 유용성분을 추출하여 설사증 자돈용 영양제로의 개발뿐만 아니라 건강보조식품 및 의약품으로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

제 2 절 연구로부터 발생된 업적

1. 국내·외 전문학술지 논문게재

가. New fermentation technique for complete digestion of soybean protein, *Journal of microbiology and biochemistry*, 17(11), 1904 -1907 (2007. 07.)

나. Genistein sensitizes TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3, *Cancer Letters*, 257(1) 56-64 (2007. 11.)

다. Induction of apoptosis by linoleic acid is associated with the modulation of Bcl-2 family and Fas/FasL system and activation of caspases in AGS human gastric adenocarcinoma cells, *Journal of Medicinal Food*, 11(1) 1-8 (2008. 03.)

라. SK-MEL-2 흑색종세포에서 genistein에 의한 세포주기 G2/M arrest 및 apoptosis 유발, *대한암예방학회지*, 11(4) 46-47 (2006. 03.)

마. Induction of G2/M Arrest of the Cell Cycle by Genistein in Human Bladder Carcinoma and Leukemic Cells, *한국생명과학회지*, 16(4) 589-597 (2006. 07.)

바. Induction of Apoptosis by genistein through caspase-3 activation in human gastric carcinoma and melanoma cells, *대한암예방학회지*, 11(3) 225-234 (2006. 09.)

사. 고품질 장류생산을 위한 3단 발효기술의 개발, *한국콩연구회지*, 23(1) 10-18 (2006. 11.)

아. Inhibition of phorbol 12-myristate-13-acetate-induced cyclooxygenase-2 activity by three-step fermented soybeans, *한국생명과학회지*, 18(2) 180-186 (2008. 02.)

자. Induction of G2/M arrest of the cell cycle and apoptosis by genistein in SK-MEL-2 human melanoma cells, *대한암예방학회지*, 11(1) 46-57 (2006. 03.)

2. 학술발표

가. 2005. 10. 26. - 10. 27. G2/M arrest of the cell cycle and apoptotic cell death by genistein in human gastric cancer cells, 2005년 대한생화학분자생물학회 추계국제학술대회

나. 2006. 05. 25 - 05. 26. Induction of G2/M arrest and apoptosis by genistein in U937 human leukemia cells, 제 63회 한국생화학분자생물학회 정기학술대회 및 국제 심포지움

다. 2007. 06. 29 - 07. 01. Genistein sensitizes TRAIL resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3, 2007 World Congress on Gastrointestinal Cancer

라. 2007. 06. 28 - 06. 29. Decrease in allergen of whole wheat flour by treatment with three step fermented soybean solution, 한국미생물·생명공학회

제 9 장 참고문헌

고태구, 김진동, 한영근 등. 항생제 무첨가 이유자돈 사료 개발에 관한 연구. 한국축산학회지 42(1), 45-54, 2000.

권미순, 이지영, 박인규, 윤여백, 정동석. 낮도균을 이용한 닭 생산성과 질병예방에 관한 연구. 한국가위. 29(3), 257-266, 2006.

김두환, 김철욱, 진상근. 교배조합과 산차 및 이유일령이 돼지의 도체형질에 미치는 영향. 동물자원지 37(5), 475-481, 1995.

김상호, 박수영, 유동조 등. 육계생산성 및 맹장 내 미생물에 대한 유산균의 첨가 효과. 한국가금학회지 27, 37-41, 2000.

김재황, 김상철, 고영두 등. *Bacillus* spp. 접종우모분이 Broiler의 생산성과 영양소 이용율에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 46(4), 603-612, 2004.

남궁환, 손익환, 정진성 등. 생균제와 항생제가 병아리의 성장과 장내세균총에 미치는 영향. 한국가금학회지 13, 49-55, 1986.

노선호, 이찬호, 최윤제 등. 항생제, 효소제, 효모제, 생균제 및 β -agonist가 육계의 성장과 영양소 이용율에 미치는 효과. 한국동물자원과학회지 36(6), 630-638, 1994.

류경선, 박홍석, 생균제의 급여가 육계의 생산성과 장내미생물의 변화에 미치는 영향. 한국가금학회지 25(1), 31-37, 1998.

박성진, 박희성, 유성오. 건지황첨가가 육계의 성장과 생리적 변화에 미치는 영향. 한국가금학회지 25(4), 195-202, 1998.

방극승. 초음파를 이용한 한우 생체평가와 도체평가의 비교. 동물자원지 39(2), 117-123, 1997.

변명우, 김동호. 장류의 보존성확보 및 새로운 기술개발을 위한 이온화 에너지 이용, 전통 장류의 생리활성 기능, 제 5회 영남대학교 부설 장류 연구소 심포지움 초록집, 61-79, 2002.

유동조, 나재천, 김태호 등. 복합생균제의 급여가 육계의 생산성, 육의 이화학적 특성 및 장내 미생물에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 46(4), 593-602,

2004.

이기현, 김희철, 박달수 등. 손바닥선인장 발효물이 자돈장내 Galectin-3의 발현에 미치는 영향. 한국공중보건학회지 29(1), 19-25, 2005.

이정옥. 3단 발효법에 의한 콩알메주의 제조와 특성, 경상대학교 대학원 석사학위 논문. 2003.

장영호, 김종근, 김홍중 등. 자돈에 투여한 *Lactobacillus reuteri* BSA-131의 생균제 효과. 산업미생물학회지 28(1), 8-13, 2000.

조경오, 고흥범, 김계엽 등. 가금티푸스 감염에 대한 키토산의 면역반응. 대한수의학회지 44(1), 73-82, 2004.

최신양. 청국장효능과 산업화, 전통장류의 생리활성 기능, 제 5회 영남대학교 부설 장류 연구소 심포지움 초록집, 39-58, 2002.

Abdollahi T. Potential for TRAIL as a therapeutic agent in ovarian cancer. *Vitam Horm* 67, 347-364, 2004.

Aggarwal BB and Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, *Biochem Pharmacol* 71, 1397-1421, 2006.

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5595, 1987.

Allen RT, Cluck MW and Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide, role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 54, 427-445, 1998.

Andrade LN, Lima TM, Curi R and Castrucci AM. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicol In Vitro* 19, 553-560, 2005.

AOAC (1969) Official Methods of analysis. 17th ed, Association. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ch.45 pp. 82.

AOAC (1990) Official methods of analysis, 15th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, pp. 931.

AOAC (2000) Official methods of analysis. 17th ed, Association. Official Methods of Analysis of AOAC International, Ch. 4 pp. 5.

Arends LG. Influence of *L acidophilus* administered via the drinking water on broiler performance. *Poult Sci.* 60(5-8), 1617, 1981.

Ashkenazi A and VM. Dixit, Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260, 1999.

Bae SS, Perry DK, Oh YS, Choi JH, Galadari SH, Ghayur T, Ryu SH, Hannun YA and Suh PG. Proteolytic cleavage of phospholipase C- γ 1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J* 14, 1083-1092, 2000.

Balabhadrapathruni S, Thomas TJ, Yurkow EJ, Amenta PS, Thomas T. Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Oncol Rep* 7, 3-12, 2000.

Basta S, Knoetig S, Summerfield A and McCullough KC. Lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate 13-acetate both impair monocyte differentiation, relating cellular function to virus susceptibility. *Immunology* 103, 488-497, 2001.

Begin ME, Dae UN, Ells G, Horrobin DF. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukt Med* 19, 177-186, 1985.

Bektic J, Guggenberger R, Eder IE, Pelzer AE, Berger AP, Bartsch G and Klocker H. Molecular effects of the isoflavonoid genistein in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 4, 124-129, 2005.

Bennet M, MacDonald K, Cha SW, Luzio JP, Simari R and Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas, a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282, 290-293, 1998.

Biggs JR, Kudlow JE and Kraft AS. The role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the WAF1/CIP1 gene in U937 leukemic cells. *J Biol Chem* 271, 901-906, 1995.

- Breckenridge DG and Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 647–652, 2004.
- Brown JR and DuBois RN. Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10, 4266s–4269s, 2004.
- Brunelle M, Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J and Dore M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol* 43, 656–666, 2006.?
- Buchler P, Gukovskaya AS, Mouria M, Buchler MC, Buchler MW, Friess H, Pandol SJ, Reber HA and Hines OJ. Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid. *Pancreas* 26, 264–73, 2003.
- Burkett RF, Thayer RH and Morrison RD. Supplementing market broiler rations with *Lactobacillus* and live yeast cultures. In Animal science agricultural research report. Okla-homa State University and USDA. USA, 1977.
- Chamras H, Ardashian A, Heber D and Glaspy JA. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J Nutr Biochem* 13, 711–716, 2002.
- Chan WH and Yu JS. Inhibition of UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermal carcinoma A431 cells by genistein. *J Cell Biochem* 78, 73–84, 2000.
- Chandler DS and Mynott TL. Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gut* 43, 196–202, 1998.
- Chang JS, Noh DY, Park IA, Kim MJ, Song H, Ryu SH and Suh PG. Overexpression of phospholipase C- γ 1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res* 57, 5465–5468, 1997.
- Chawla-Sarker M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ and Borden EC. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs

- sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11, 915–923, 2004.
- Chiang SH and Hsieh WM. 1995. Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asian-Australian J Anim Sci* 8, 159–162.
- Chiarugi V, Magnelli L and Basi G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 40, 603–612, 1994.
- Choi JH, Kwon SH, Lee SW, Nam SH, Choi SD and Park SK. Quality properties of capsule type *meju* prepared with *Aspegillus oryzae*. *Korean Journal of food Preservation*. 10, 339–346, 2003.
- Choi YH, Lee WH, Park KY and Zhang L. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 91, 164–173, 2000.
- Choi YH, Zhang L, Lee WH and Park KY. Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 13, 391–396, 1998.
- Cohen JH, Kristal AR and Stanford JL. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 5, 61–68, 2005.
- Colquhoun A and Curi R. Effects of saturated and polyunsaturated fatty acids on human tumor-cell proliferation. *Gen Pharmacol* 30, 191–194, 1998.
- Conklin CM, Bechberger JF, McFabe D, Guthrie N, Kurowska EM and Naus CC. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 93–100, 2007.
- Constantinou A, Kiguchi K and Huberman E. Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 50, 2618–2624, 1990.
- Cranwell PD, Noakes DE and Hill KJ. Gastric selection and fermentation in the suckling pig. *Br J Nutr* 36(1), 71–86, 1976.
- De Graaf AO, de Witte T and Jansen JH. Inhibitor of apoptosis proteins,

new therapeutic targets in hematological cancer. *Leukemia* 18, 1751–1759, 2004.

Degen WG, Pruijn GJ, Raats JM and van Venrooij WJ. Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death Differ* 7, 616–627, 2000.

Dempke, W., C. Rie, A. Grothey and H. J. Schmolz. Cyclooxygenase-2, a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 411–417, 2001.

Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS and Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18, 5242–5251, 1999.

Dorai T and Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* 215, 129–140, 2004.

Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases, structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383–424, 1999.

Eastman A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J Cell Biochem* 91, 223–231, 2004.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825, 1993.

Elledge SJ and Harper JW. Cdk inhibitors, on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 6, 847–852, 1994.

Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* 17, 461–476, 1993.

Finlay GJ, Holdaway KM and Baguley BC. Comparison of the effects of genistein and amsacrine on leukemia cell proliferation. *Oncol Res* 6, 33–37, 1994.

FitzGerald GA. COX-2 and beyond, Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2, 879–890, 2003.

Folch, J., Lees M., and Sloane–Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–507, 1957.

French LE, Tschopp J The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 5, 146–147, 1999.

Fukuda K. Apoptosis–associated cleavage of β –catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 519–529, 1999.

Fuller R. Probiotic in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66, 365–378, 1989.

Giercksky KE. COX–2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15, 821–833, 2001.

Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312, 1998.

Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW and Gores GJ. cFLIPL prevents TRAIL–induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, 1337–1346, 2007.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K and Elledge SJ. The p21 Cdk–interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin–dependent kinases. *Cell* 75, 805–816, 1993.

Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299, 125–140, 1996.

Hetz CA, Torres V and Quest AF. Beyond apoptosis, nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochem Cell Biol* 83, 579–588, 2005.

Holcik M, Gibson H and Korneluk RG. XIAP, apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*. 6, 253–261, 2001.

Hotz MA, Del Bino G, Lassota P, Traganos F and Darzynkiewicz Z. Cytostatic and cytotoxic effects of fostriecin on human promyelocytic HL–60 and lymphocytic MOLT–4 leukemic cells. *Cancer Res* 52, 1530–1535, 1992.

- Hurst A. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85–123, 1981.
- Jeroen L. Kiers, M.J. Robert Nout, Frans M. Romouts, Esther E. van An del, Marius J.A. Nabuurs and Jan van der Meulen. Effect of processed and fermented soyabeans on net absorption in enterotoxigenic *Escherichia coli*-infected piglet small intestine British. *Journal of Nutrition.* 95, 1193–1198, 2006.
- Jerry DJ, Dickinson ES, Roberts AL, Said TK. Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor suppressor gene. *J Dairy Sci* 85, 1103–1110, 2002.
- Ji WD, Lee EJ and Kim JK. Volatile flavor compounds of soybean pastes manufactured with traditional *meju* and improved *meju*. *J. Korean J. Food Sic. Technol.* 32, 640–645, 1995.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cho-lesterol of broilers fed diets contain-ing *Lactobacillus* cultures. *Poult Sci* 177(9), 1259–1265, 1998.
- Jin Z and el-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4, 139–163, 2005.
- Johnson AC. Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *J Biol Chem* 271, 3033–3038, 1996.
- Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18, 345–357, 1999.
- Jung EM, Lim JH, Lee TJ, Park JW, Choi KS and Kwon TK. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5). *Carcinogenesis* 26, 1905–1913, 2005.
- Juven BJ, Meinersmann RJ and Stem NJ. Antagonistic effects of *lactobacilli* and *pediococci* to control intestinal colonization by human ente-ro pathogens in live poultry, Review. *J Appl Bacteriol* 70(2), 95–103, 1991.

Karmali RA, Adams L and Trout JR. Plant and marine n-3 fatty acids inhibit experimental metastasis of rat mammary adenocarcinoma cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48, 309-314, 1993.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-3985, 1993.

Kavurma MM and Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 10, 36-44, 2003.

Kiers JL, Meijer JC, Nout MJ, Rombouts FM, Nabuurs MJA and van der Meulen J. Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *J Appl Microbiol* 95, 545-552, 2003.

Kiers JL, Nout MJ, Rombouts FM, Nabuurs MJA and van der Meulen J. Net absorption of fluid in uninfected and ETEC-infected piglet small intestine, effect of osmolality. In *Digestive Physiology in pigs. Proceeding of the 8th Symposium*, pp.277-279, 2001.

Kiers JL, Nout RMJ and Rombouts FM. In vitro digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. *J Sci Food Agric* 80, 1325-1331.

Kiguchi K, Constantinou AI and Huberman E. Genistein-induced cell differentiation and protein-linked DNA strand breakage in human melanoma cells. *Cancer Commun* 2, 271-277, 1990.

Kim DH, Lee KH, Yoo HS, Kim JH, Shin MG and Byun MW. Quality characteristics of gamma irradiated grain shape improved *meju*. *Korean J. Food Sic. Technol.* 32, 640-645, 2000.

Kim DH, Lim DW, Bai S and Chun SB. Fermentation characteristics of whole soybean *meju* model system inoculated with 4 *bacillus* strains. *Korean J. Food Sic. Technol.* 29, 1006-1015, 1997.

Kim IJ, Lee JO, Shon DH, Ha YL and Ryu CH. Preparation method of *meju* by three step fermentation. *Korean J. Food Sic. Technol.* 34, 536-539, 2002

- Kim JK and Kim CS, The taste components of ordinary korean soy sauce. *Agric. Chem. Biothenol.* 23, 89–105, 1980.
- Kim KJ, Ryu MK and Kim SS. *Chungkook-jang koji* fermentation with rice straw. *Korean J. Food Sic. Technol.* 14, 301–308, 1982.
- Kim SK, Lee SJ, Baek YJ and Park YH. Isolation of bacteriocin-producing lactococcus sp. HY 449 and Its antimicrobial characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biothenol.* 22, 259–265, 1994.
- Kim SO, Chun KS, Kundu K and Surh YJ. Inhibitory effects of [6]-gingerol on PMA-induced COX-2 expression and activation of NF- κ B and p38 MAPK in mouse skin. *Biofactors* 21, 27–31, 2004.
- Kim YH, Park JW, Lee JY and Kwon TK. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 25, 1813–1820, 2004.
- Kroemer G and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513–519, 2000.
- Kumagai A and Dunphy WG. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64, 903–914, 1991.
- Lactobacilli* cultures on intestinal microflora and performance in broiles. *Asia-Australian J Anim Sci* 9, 397–403, 1996.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG and Earnshaw WC, Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 371, 346–347, 1994.
- Lee CY. Korean soy seasonings and culture. *Food Science and industry.* 22, 3, 1989.
- Lee JM, Kim YS, Hong YM and Yu JH. Studies on the substitution of raw material for soy sauce(III). *Korean J. Food Sic. Technol.* 4, 182–186, 1972.

Lee JO and Ryu CH. Preparation of low salt Doenjang using by nisin-producing lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food sic. Nutr.* 31, 75–80, 2002.

Lian F, Li Y, Bhuiyan M and Sarkar FH. p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells. *Nutr Cancer* 33, 125–131, 1999.

Lieberthal W, Koh JS and Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* 18, 505–518, 1998.

Lub-de Hooge MN, de Jong S, Vermot-Desroches C, Tulleken JE, de Vries EG and Zijlstra JG. Endotoxin increases plasma soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand level mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Shock* 22, 186–188, 2004.

MacGregor JT. Genetic toxicology of dietary flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 206, 33–43, 1986.

Madhavi N, Das UN. Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Lett* 84, 31–41, 1994.

Maiolino R, Fioretti A and Mennam LF, et al. 1992. Research on the efficiency of probiotics in diets for broiler chickens. *Nutrition Abstracts and Reviews*(Series B). 62(7), 482, 2000.

Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB and Larsen AK. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 49, 5111–5117, 1989.

Masui Y and Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177, 129–145, 1971.

McCabe MJ Jr, Orrenius S. Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 944–950, 1993.

Merghous J, Lacroix C and Simard RE. The effects on vegetative cells and

spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food microbiology*. 16, 105–114, 1999.

Messina M, Barnes S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst* 83, 541–546, 1991.

Messina MJ, Persky V, Setchell KD and Barnes S. Soy intake and cancer risk, a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21, 113–131, 1994.

Mohan B, Kadirvel R and Natarahan A, et al. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *Br Poult Sci* 37(2), 395–401, 1996.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131–134, 1995.

Muzio M. Signalling by proteolysis, death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res* 28, 141–147, 1998.

Nagata S, Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355–365, 1997.

Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N and Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108–116, 2003.

Nimmanapalli R and Bhalla K. Targets in apoptosis signaling, promise of selective anticancer therapy. *Methods Mol Biol* 223, 465–483, 2003.

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9, 484–496, 1995.

Norman A, Bennett L, Mead JF, Iwamoto KS. Antitumor activity of sodium linoleate. *Nutr Cancer* 11, 107–115, 1988.

Omura K, Hitosugi M and Zhu X, et al. A newly derived protein from *Bacillus subtilis natto* with both anti-thrombotic and fibrinolytic effects. *J Pharmacol Sci* 99(3), 247–251, 2005.

Osford SM, Dallman CL, Johnson PW, Ganesan A and Packham G. Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells. *Curr Med Chem* 11, 1031–1039, 2004.

- Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C and Nicoletti I. Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer*. 30, 1675-1682, 1994.
- Park CK and Hwang IK. Consumption pattern of korean traditional dot sauce and consumer sensory evaluation. *Kor. J. Soc. Food Sic. Nutri*. 11, 521-526, 1975.
- Park KI. Studies on the N-compounds during *chungkook-jang meju* fermentation(I).*J. Korean Agricultural Chemical Society*. 15, 93-109, 1972.
- Park KY, Jung KO, Rhee SH and Choi YH. Antimutagenic effects of doenjang (Korean fermented soy paste) and its active compounds. *Mut Res* 324-324, 43-53, 2003.
- Park KY, Lee JM, Moon SH and Jung KO. Inhibitory effect of Doenjang (Fermented Korean soy patste) extracts and linoleic acid on the growth of human cancer cell lines. *J Food Sci Nutr* 5, 114-118, 2000.
- Park SY and Seol DW. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 515-518, 2002.
- Peterson G and Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate*. 22, 335-345, 1993.
- Peterson G and Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells, independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 661-667, 1991.
- Phoon MC, Desbordes C, Howe J and Chow VT. Linoleic and linoleic acids differentially influence proliferation and apoptosis of MOLT-4 leukemia cells. *Cell Biol Int* 25, 777-784, 2001.
- Pines J. Protein kinases and cell cycle control. *Semin Cell Biol* 5, 399-408, 1994.
- Rao L and White E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators,

making a connection. *Curr Opin Genet Dev* 7, 52–58, 1997.

Rauth S, Kichina J and Green A. Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells in vitro by genistein, chemosensitivity is regulated by cellular. *Bri J Cancer* 75, 1559–1566, 1997.

Reddy BS, Burill C and Rigotty J. Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 487–491, 1991.

Rend F and Cannas M. Effect of prostaglandin E2 on PMA-induced macrophage differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 75, 13–24, 2005.

Rubin JB, Shia MA and Pilch PF. Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation in vitro by insulin-like growth factor I. *Nature*. 305, 438–440, 1983.

Salvesen GS and Duckett CS. IAP proteins, blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3, 401–410, 2002.

Sanchez V, McElroy AK and Spector DH. Mechanisms governing maintenance of Cdk1/cyclin B1 kinase activity in cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 77, 13214–13224, 2003.

Sarkar FH and Li Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev* 21, 265–280, 2002.

Schaffer JE. Fatty acid transport, the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E239~E246, 2002

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S and Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*. 254, 439–459, 1998.

Searle J, Kerr JF and Bishop CJ. Necrosis and apoptosis, distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17, 229–259, 1982.?

Shankar S and Srivastava R. Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation, mechanisms and clinical

implications. *Drug Resist Updat* 7, 139-156, 2004.

Shankar S and Srivastava RK. Bax and Bak genes are essential for maximum apoptotic response by curcumin, a polyphenolic compound and cancer chemopreventive agent derived from turmeric, *Curcuma longa*. *Carcinogenesis* 28, 1277-1286, 2004.

Sheikh MS and Huang Y. Death receptors as targets of cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 97-104, 2004.

Sherr CJ. The Pezcoller lecture, cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-3695, 2000.

Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW and Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263, 1143-1145, 1994.

Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL and its role in cancer therapy. *Mol Cell Biol Res Commun* 4, 67-75, 2000.

Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L, mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 3, 535-546, 2001.

Stennicke HR and Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387, 17-31, 1998.

Suh JS, Lee SG and Ryu MK. Effect of *bacillus* strains on the *chungkook-jang* processing(II). *Korean J. Food Sic. Technol.* 14, 309-314

Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases, enemies within. *Science* 281, 1312-1316, 1998.

Tsai WS, Nagawa H, Kaizaki, S, Tsuruo T and Muto T. Inhibitory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on sigmoid colon cancer transformants. *J Gastroenterol* 33, 206-212, 1998.

Venema K, Abee T, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, J Kok, EM Koings and G Venema. Mode of action of *lactococcin* B, a thiol-activated bacteriocin from *lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1041-1048, 1993

Wang S and eI-Deiry WS, TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors, *Oncogene* 22, 8628–8633, 2003.

Watkins BA and Kratzer FH. Drinking water treatment with a commercial preparation of a con-centrated *Lactobacillus* culture for broiler chickens. *Poult Sci* 63(8), 1671–1673, 1984.

Xu Q, Yajima T and Li W, et al. Levan (beta-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating pro-perties via Toll-like receptor 4 signalling, induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy* 36(1), 94–101, 2006.

Yanagihara K, Ito A, Toge T and Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 53, 5815–5821, 1993.

Yeh CT and Yen GC. Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis* 26, 2138–2148 2005.

Yeo J and Kim KI. Effect of feeding diets containing an antibio-tic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease acti-vity in broiler chicks. *Poult Sci* 76(2), 381–385, 1997.

Yoo JY and Kim HG. Characteristics of traditional *meju* of nation-wide collection. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23, 259–267, 1998.

Yoo JY, Lee IS, Chung KS and Nam YJ. Isolation and properties of bacteriocin-producing microorganism. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 8–13. 1991.

Yu J and Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 851–858, 2005.

Yu Z, Li W and Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett.* 215, 159–166, 2004.

Zhang L and Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced

apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12, 228–237, 2005.

Zock PL and Katan MB. Linoleic acid intake and cancer risk, a review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 68, 142–153, 1998.

주 의

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