

최      중  
연구보고서

젖소 초유의 생리활성기능과 산업화 기술  
개발

Biological function and development of  
industrial technology from bovine colostrum

연구기관

충남대학교 농업생명과학대학  
충남대학교 의과대학

농    립    부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “젓소 초유의 생리활성기능과 산업화 기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 남 명 수

세부연구책임자 : 남 명 수

연 구 원 : 배 형 철

연 구 원 : 랜친헨트

연 구 원 : 강 기 훈

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 서 영 준

위탁연구기관명 : (주)청미바이오

위탁연구책임자 : 최 성 현

# 요 약 문

## I. 제 목

젖소 초유의 생리활성 기능과 산업화 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 젖소 초유의 생리활성 기능을 밝히고 잉여초유를 이용하여 자돈용 사료첨가제 및 기능성 화장품을 개발하고자 한다. 초유는 분만 후 3일 동안 생산되는 우유로서 영양분이 풍부할 뿐 아니라 면역단백질을 공급하여 어린 송아지의 질병을 예방할 수 있는 기능을 가진다(Larson 등, 1977). 이러한 초유의 성분변화를 최소화 할 수 있는 방법으로 가공처리 하여 자돈용 사료첨가제를 개발하여 자돈에 급여함으로써 자돈의 면역력을 높일 수 있어 질병예방과 폐사율이 낮아지고 성장률은 높아지는 효과를 얻을 수 있다.

분만 후 생산되는 초유의 양은 어린송아지가 약 1/3정도 섭취하고 나머지 2/3는 현재 이용되지 않고 버려지는 현실이다. 최근에 웰빙을 추구하는 사회적 분위기에 맞추어 뉴질랜드, 호주 미국 등에서 생산된 건강보조식품 형태의 초유제품이 수입되고 있고, 초유를 포함하는 제품의 수입은 2004년도에 1억7천8백억 달러(식품의약품안전청, 2006)에 달하고 있다. 따라서 국내에서 생산되는 잉여 초유를 이용하면 낙농가에 수익을 높일 수 있을 뿐만 아니라, 초유를 이용한 제품의 개발로 수입대체 효과 및 국내 낙농산업에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

또한 피부과 영역에서는 현재까지 초유성분인 lactoferrin이 염증반응에 깊게 관여하는 것으로 알려져 있어 이를 활용한 항염증 효과를 가지는 화장품을 개발하고 이를 피부질환 및 문제성 피부에 적용하고자 한다. Lactoferrin은 초유뿐만 아니라 피부에서 정상적으로 생성되어 분비되는 물질중의 하나로 이것이 IL-1과 TNF- $\alpha$  등의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 이를 이용하여 항염증작용이 있는, 그리하여 문제가 있다고 생각되는 염증성 피부질환 또는 민감성 피부 등에 이용

될 수 있으리라 생각된다. 또한 이제까지 생각하지 못하였던 보습효과, 피부각질층 분화 및 상처치료 회복 등에 대한 초유 성분의 다른 효과를 분석하여 보습제, 상처 치료제 등 적용 범위의 확장 가능성을 연구한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제1세부과제 : 젖소초유의 생리활성 특성 조사

- 1) 젖소 초유의 일반성분 및 생리활성물질 정량, 병원성 미생물의 항균효과 및 유산균 성장 촉진 시험
- 2) 젖소초유가 항염·항암 및 알러지 효과 시험
- 3) 실험동물을 이용한 젖소초유의 생리활성 효과 시험

제2세부과제 : 젖소 초유를 이용한 기능성 화장품 개발 및 임상시험

- 1) 초유로부터 기능성 화장품 개발에 필요한 성분 조사, 제조 및 *in vitro* 기능 평가
- 2) 기능성 화장품 개발 및 *in vivo* 기능 평가
- 3) 기능성 화장품의 임상시험

위탁과제 : 젖소 초유를 이용한 자돈용 사료첨가제 개발

- 1) 국내 초유 현황조사, 관리 체계 구축 및 초유 발효 미생물 탐색
- 2) 초유 발효 미생물 최적 조건 및 초유 가공 조건 확립과 사료첨가제 제조 기술 개발
- 3) 자돈의 초유 첨가사료를 이용한 사양시험

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제1세부과제 : 젖소초유의 생리활성 특성 조사

홀스타인종 젖소 초유의 lactoferrin, IgA, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>의 함량은 여름철의 경우 분만 후 첫째 날에 각각 0.30 mg/mL, 0.37 mg/mL, 4.00 mg/mL, 0.37 mg/mL, 겨울철의 경우 분만 후 첫째 날에 각각 1.16 mg/mL, 2.60 mg/mL, 13.35 mg/mL, 1.30 mg/mL로 측정되었다. 무열처리한 초유와 65°C에서 30분간 열처리한 초유에서 배양한 병원성 미생물의 변화는 *E. coli* 균주에 대하여 초유의 항균활성이 나타났다. 초유 첫째 날, 둘째 날, 세째 날의 유산균수 성장촉진 효과는 *B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*의 상업용 혼합균주와 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*에서 모두 정상유보다 균수가 증가하였다. 초유 첫째 날, 둘째 날, 세째 날의 pH는 배양 15시간 후 *B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*의 상업용 혼합균주와 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*에서 각각 4.97~5.22 및 5.96~6.47로 나타났으나, 정상유에서는 각각 4.89, 6.50~6.81이었다. 초유 첫째 날, 둘째 날, 세째 날의 산도는 *B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*의 상업용 혼합균주와 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*에서 각각 0.75~0.88% 및 0.29~0.48%로 나타났으나, 정상유에서는 각각 0.70%, 0.20~0.25%이었다.

초유첨가가 혈액세포의 성장에 미치는 영향은 U937세포는 lactoferrin, whey 첨가 시 myeloid 계통의 세포성장을 유의성 있게 억제하였고, 분화와 활성화에 관련된 cytokine인 GM-CSF/IL-4, PMA에 첨가군도 lactoferrin, whey 첨가 시 세포성장의 억제현상이 나타났다. HMC-1 세포에서 IL-10의 발현은 lactoferrin의 첨가에 의하여 전반적으로 억제되는 현상을 확인하였다. 특히 mitogen이 PMA를 자극하였을 경우, HMC-1과 U937 세포에서는 lactoferrin을 첨가하였을 경우, 현저하게 IL-10의 발현을 억제하는 효과가 있었고, 고농도 (10ug/ml)의 whey에서도 IL-10의 발현을 감소시켰다. IL-13의 발현도 HMC-1과 U937 세포에서 고농도의 lactoferrin에 의하여 발현이 저하되었고, 고농도의 whey에 의하여도 억제되었다. Bone marrow 세포에서 HSC (Hemopoietic Stem Cell)을 분리하여 초유 성분에 의한 분화를 유도하여 새로운 형태의 면역세포 분화가 형성되고 있음을 확인하였고, 새로운 타입의 면역세포가 암세포의 전이와 생성의 억제에 효능을 가지고 있음을 확인하였다.

## 제2세부과제 : 젖소 초유를 이용한 기능성 화장품 개발 및 임상시험

초유함유 화장품개발을 위하여 *in vitro* 및 *in vivo* 모델을 이용하여 몇 가지 피부 기능 시험을 통하여 초유의 효과를 평가하였다. 초유는 비만세포 활성의 저해를 통해서 항알러지 효과를 나타내었다. 또한 초유는 각질분화와 상처 치유효과도 있었다. 이러한 결과를 통해서 초유는 피부조직을 향상시키는 성분으로 응용할 수 있는 기초 자료를 얻었다. 초유를 이용한 스킨로션과 크림의 규격을 만들었고, 독성실험에서 초유함유 화장품은 피부 자극 및 눈 자극이 없는 안전한 것으로 나타났다. 후보자를 통한 전임상 실험에서 초유함유 화장품은 홍반이나 부종과 같은 다른 영향을 나타내지 않았다. 피부기능시험에서는 초유함유 화장품은 피부보습효과가 향상되었는데 이는 아토피와 같은 병리학적 피부조건에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 위탁과제 : 젖소 초유를 이용한 자돈용 사료첨가제 개발

국내 초유의 현황과 이용을 알아보기 위하여 33개 목장을 대상으로 초유현황에 관하여 설문조사를 하였다. 착유두수는 20-40두가 15목장(46%)으로 가장 높았고, 송아지 사육두수는 20-40두가 13목장(39%), 40-60두가 14목장(43%)이었다. 1일 초유 생산량은 20-30 kg이 10목장(31%), 30-40 kg은 10목장(31%)이고 1일 송아지의 초유섭취량은 4 kg이 15목장(46%)으로 가장 높았다. 송아지 급여 후 28목장(85%)은 잉여초유가 생기고, 22목장(67%)은 잉여초유를 이용하지 않고 버린다. 잉여초유를 이용할 할 필요성은 30목장(91%)이었다. 잉여 초유의 판매가격은 kg당 1,000원 미만이 가장 높았다. 초유수집과 이용은 항생제를 투여하지 않은 목장을 선정하고 착유한 초유는 낙농가 별로 정기적으로 항생물질 및 미생물, 일반성분, 체세포 검사를 통하여 엄격하게 초유의 질을 관리한다. 착유한 초유는 즉시 냉각기로 4℃로 보존 후 초유제품을 생산한다.

초유발효를 위하여 젖소 초유로부터 분리한 *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus macedonicus*와 청미바이오에서 보관중인 *Lactobacillus fermentum* 균을 비교 실험한 결과 *Streptococcus thermophilus*가 pH, 적정산도, 유산균수에서 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 초유발효는 *Streptococcus thermophilus*를 이용하여 사료를 제조하였다. 24두의 자돈을 대조구와 초유첨가 사료 섭취구로 나누어 사양시험을 한 결과는 0.5% 초유첨가 사료 급여구가 대조구에 비해 증체율이 유의성 있게

16.73% 증가하였다. 따라서 초유첨가 사료급여에 따른 사양성적은 매우 우수한 것으로 확인되었다. 혈액성분 분석에서는 대조구와 0.5% 초유첨가 사료급여구 모두 조사 항목이 정상범위 또는 정상범위 부근에 들어가서 양호한 것으로 나타났다. 자돈의 설사는 시험기간 4주 간 설사증상을 보이는 개체는 대조구에 비해 0.5% 처리구에서 전혀 나타나지 않았다. 따라서 0.5% 초유첨가 사료급여는 증체율을 향상시키고 혈액 성분은 양호하며 설사증상은 나타나지 않은 것을 알 수 있었다.

#### **활용에 대한 건의**

- 초유를 allergy 치료제 개발을 위한 추가 연구 필요

## SUMMARY

Colostrum was collected at the first, second, and third day after parturition in summer and winter season. The contents of lactoferrin, IgA, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> was 0.30 mg/mL, 0.37 mg/mL, 4.00 mg/mL, 0.37 mg/mL at the first day of the summer season, whereas that of winter season was 1.16 mg/mL, 2.60 mg/mL, 13.35 mg/mL, 1.30 mg/mL, respectively. Heat treated (65°C for 30min) or non-heat treated colostrum showed antibacterial activity against *E. coli*. The growth of commercial mixed strains (*B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*), *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, and *L. lactis* subsp. *cremoris* was improved in the colostrum that collected at the first, second and third day after parturition compare with that of normal milk. Commercial mixed strains (*B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*) lowered the pH to 4.97~5.22 and 4.89 while they increased the titratable acidity to 0.75~0.88% and 0.70% in colostrum and normal milk. However, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris* lowered the pH to 5.96~6.47 and 6.5~6.8 while they increased the titratable acidity to 0.29~0.48% and 0.20~0.25% in colostrum and normal milk, respectively. To confirm the biological function of colostrum, we evaluated the effects of lactoferrin, whey on cell growth and cytokine expression using U937 cell and HMC-1. Lactoferrin and whey showed the inhibition of GM-CSF/IL-4, IL-10 and IL-13. In addition, colostrum induced differentiation of hemopoietic stem cell from bone marrow and inhibited metastasis and formation of cancer cell.

To develop the colostrum-containing cosmetics, we first evaluated the effects of colostrum on several skin functions using in vitro and in vivo models. Colostrum showed the anti-allergic effect through the inhibition of mast cell activation. In addition, colostrum induced keratinocyte differentiation and enhanced wound healing. Based on these results, we thought that colostrum could be applicable as an active ingredient to improve skin texture. We made the formulations for skin lotion and cream using colostrum. In toxicology analysis, colostrum-containing cosmetics showed no skin irritation and eye irritation, confirming the safety of colostrum-containing cosmetics. In pre-clinical test using

volunteers, colostrum-containing cosmetics did not provoke any side effects such as erythema and edema. Finally, skin function tests clearly showed that colostrum-containing cosmetic improved the skin water-holding capacity, suggesting that it may give the beneficial effect on the pathological skin conditions such as atopy.

Questionnaire on utilization of colostrum was carried out in 33 farms. Highest milking cow numbers were 20~40 heads in 45.5% of the farms. Calf numbers were 20~40 heads in 39.4% of the dairy farms and 40~60 heads in 42.4% of the farms. The amount of colostrum production per day was 20~30 kg in 30.3% of the farms and 30~40 kg in 30.3% of the farms. Colostrum intake per calf per day was 4 kg in 45.5% farms. Surplus colostrum after intake by calf was farms(85%) was wasted in 67% of the farms. More than 90% of dairy farms recognize an necessity to use surplus colostrum. Selling price of surplus colostrum was below 1,000 won per kg at 15 dairy farms and 1,000~2,000 won per kg at 4 dairy farms. Colostrum collection and use should be done by the dairy farms of antibiotics free. Quality control of colostrum should be done by testing antibiotics, microbacterium, chemical composition, somatic cells and etc. The colostrum is subjected to cool down below 4°C just after milking and process for the colostrum products. In order to the fermentation of colostrum, we isolated *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus macedonicus* from colostrum. We investigated the characterization(pH, titratable, viable cell count) of *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus macedonicus* and *Lactobacillus fermentum* as control and *Streptococcus thermophilus* showed excellent. Effects of the administration of colostrum feed 0.5% to pigs were investigated 24 piglet. Two treatments and 12 animals per treatments were control and feeding colostrum feed. Average growth rate was increased 16.73% in pigs fed colostrum feed compare with control. Incidence of scouring was no in pigs fed colostrum feed compare with control.

# CONTENTS

|  |     |
|--|-----|
| Chapter 1. Introduction -----  | 11  |
| Chapter 2. Current status of technique -----                                     | 13  |
| Chapter 3. Research contents and result -----                                    | 15  |
| 1. Characterization of biological function of colostrum -----                    | 15  |
| 2. Development of functional cosmetic and clinical test using<br>colostrum ----- | 57  |
| 3. Development of child pig's feed using colostrum -----                         | 94  |
| Chapter 4. Achievements and contributions -----                                  | 146 |
| Chapter 5. Application -----   | 147 |
| Chapter 6. International trend and scientific information -----                  | 148 |
| Chapter 7. Reference -----   | 149 |

# 목 차

|  |     |
|--|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 -----   | 11  |
| 제 2 장 국내외 기술 개발 현황 -----   | 13  |
| 제 1 절 기술개발현황 -----   | 13  |
| 제 2 절 산업화시 예상되는 시장 규모 분석 -----                                     | 13  |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----   | 15  |
| 제 1 절 젖소초유의 생리활성 특성 조사 -----                                       | 15  |
| 1. 젖소 초유의 일반성분 및 생리활성물질 정량, 병원성 미생물의<br>항균효과 및 유산균 성장 촉진 시험 -----  | 15  |
| 2. 젖소초유가 항염·항암 및 엘러지 효과 시험 -----                                   | 28  |
| 3. 실험동물을 이용한 젖소초유의 생리활성 효과 시험 -----                                | 42  |
| 제 2 절 젖소 초유를 이용한 기능성 화장품 개발 및 임상시험 -----                           | 57  |
| 1. 초유로부터 기능성 화장품 개발에 필요한 성분 조사, 제조 및<br><i>in vitro</i> 기능평가 ----- | 57  |
| 2. 기능성 화장품 개발 및 <i>in vivo</i> 기능 평가 -----                         | 67  |
| 3. 기능성 화장품의 임상실험 -----   | 76  |
| 제 3 절 젖소 초유를 이용한 자돈용 사료첨가제 개발 -----                                | 94  |
| 1. 국내 초유 현황조사, 관리 체계 구축 및 초유 발효 미생물 탐색 -----                       | 94  |
| 2. 초유 발효 미생물 최적 조건 및 초유 가공 조건 확립과 사료첨가제<br>제조 기술 개발 -----          | 120 |
| 3. 자돈의 초유 첨가사료를 이용한 사양시험 -----                                     | 138 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----                                     | 146 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----   | 147 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----                                  | 148 |
| 제 7 장 참고문헌 -----   | 149 |

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

포유동물의 초유는 분만 후 72시간(3일) 동안 분비되는 것으로서 영양분이 풍부할 뿐 아니라, 갓 태어난 새끼에게 개체 보존에 필요한 유용한 물질이 많이 함유되어 있다. 초유는 송아지를 위한 첫 자연식품으로 무엇보다도 중요한 것은 성장촉진과 항균기능을 가진 생리활성성분을 포함하고 있다는 것이다(Larson et al., 1977). 이러한 성장물질은 송아지의 성장과 발달을 촉진시키고, 항균물질은 유해한 미생물의 감염에 대해 방어를 하는 역할을 한다. 초유에서 항균활성은 대부분 immunoglobulin, lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase 등의 성분에 의해 나타난다(Besser and Gay, 1994; Donovan and Odle, 1994; Foley and Otterby, 1978; Reiter, 1978; Shams, 1994). 또한 성장과 세포 복원요소로 transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), insulin-like growth factor 1 and 2(IGF-1 and 2)가 있다. Bifidobacteria 성장촉진인자로 buffalo 초유로부터 분리한 유청에서 acidic glycoprotein이 bifidobacteria 성장에 영향을 준다고 보고하였다(Aparna and Salimath, 1999). 지금까지 젖소 초유의 생리활성물질의 정량(Masson and Heremans, 1971), 항균활성 측정(Erdei et al, 1994; Korhonen and Syvaeva, 1995; Naidu and Arnold, 1994) 및 유산균성장촉진효과(Aparna and Salimath, 1999; Tacket, et al. 1992)에 관한 연구들이 발표되었지만, 국내에서 사육중인 젖소의 초유를 이용한 연구는 미미하다.

분만 후 생산되는 초유의 양은 어린송아지가 약 1/3정도 섭취하고 나머지 2/3는 현재 이용되지 않고 버려지는 현실이다. 최근에 웰빙을 추구하는 사회적 분위기에 맞추어 뉴질랜드, 호주 미국 등에서 생산된 건강보조식품 형태의 초유제품이 수입되고 있고, 초유를 포함하는 제품의 수입은 2004년도에 1억7천8백억 달러(식품의약품안전청, 2006)에 달하고 있다. 하지만 국내에서 생산된 초유를 이용한 제품생산은 극히 미미하다. 따라서 국내에서 생산되는 잉여 초유를 산업적으로 이용하게 되면 낙농가에 경제적으로 큰 도움이 될 뿐만 아니라, 수입대체효과도 크고, 초유에 함유된 유용한 성분을 제품화하여 국민건강에도 크게 기여 할 수 있다고 생각한다. 국내에서 생산되는 초유의 이용에 관한 연구는 Kwon 등(1991)이 젖소초유의 이용성 증진에 관한 연구에서 유기산 첨가에 의한 초유의 보존(제1보), 식품 보존제, 항생물질 및 formaldehyde 첨가에 의한 초유의 보존(제2보), 젖산균 첨가에 의한 초유의 보존(제3보)에 관하여 보고하였고, Kim과 Heo (2000)는 안성지역의 초유 생산량 및 이용

실태에서, 생산된 초유 중 27%가 송아지에게 급여되고 33%는 버려진다고 보고하였고, 보존제 처리, 가열 및 동결에 의한 초유의 성분과 미생물의 변화에 관하여도 보고하였다. 또한 Lee 등(2001)은 가공처리조건이 초유 immunoglobulin G의 변화에 미치는 영향에 대하여, Nam 등(2002)은 젖소 초유로부터 TGF- $\beta$ 1의 정제, Cho 등(2003)은 초유로부터 분리·정제된 IGFs의 안전성 평가에 관한 연구, Hwang 등(2004)은 젖소 초유 중의 insulin-like growth factor-1 함유 분획이 세포 성장에 미치는 영향에 대하여 보고하였고, 잉여 초유의 보존성을 증진시키는 방법으로 자연발효(Otterby et al., 1980; Rindsig and Bodoh, 1977)와 acetic acid, formic acid, propionic acid, 그리고 formaldehyde를 첨가하여 초유를 산성화하는 방법(Muller et al., 1976; Otterby et al., 1977; Polzin et al., 1975), 동결 및 microwave를 이용한 방법(Jones et al., 1987) 등이 연구되었다.

본 연구는 젖소 초유의 생리활성 기능을 밝히고 잉여 초유를 산업화 하기위하여 초유를 이용한 특수사료 첨가제 개발과 초유 첨가 기능성 화장품 개발에 관한 연구를 수행 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 기술개발현황

#### 1. 기능성 화장품

초유를 이용한 기능성 화장품 개발은 국내외적으로 초기 수준에 머물고 있다.

#### 2. 특수사료 첨가제 개발

초유를 이용한 특수사료 첨가제 개발은 국내외적으로 시작단계이다.

### 제2절 산업화시 예상되는 시장 규모 분석

#### 1. 기능성화장품의 예상 시장 규모

국내 화장품 시장규모는 2005년 기준으로 약 5조 3500 억원 정도로 추정되고 있으며, 아토피 화장품의 경우 약 500 억원 규모로 추정된다. 미국 National Research Council는 2010년이 되면 아토피 환자가 전체 인구의 60% 정도가 될 것이라고 전망 하였으며, 이는 향후 아토피 피부염 환자의 증가에 따라 아토피 화장품의 시장규모 역시 급격하게 성장할 것임을 예상케 하고 있다. 따라서 아토피 화장품의 시장 규모는 향후 2-3년 이내에 1,000 억원대로 급성장하리라 전망된다. 현재까지 국내에 출시된 아토피 화장품의 경우 liposome 또는 pseudoceramide 등과 같은 지질성분을 이용하여 피부 각질층의 피부장벽 (skin barrier) 기능을 강화 시키는 제품이 주종을 이루고 있다. 초유 함유 기능성 화장품은 기존제품과 차별화 되는 새로운 제품군으로서, 향후 전체 시장의 1-5% (약 5-25 억원)를 점유할 수 있으리라 기대되며, 또한 시장 규모 확대에 따라 매년 10-20%의 매출 성장을 이룰수 있을 것으로 전망된다.

## 2. 사료첨가제의 예상 시장 규모

현재 형성된 사료첨가제 (면역 증강제)의 시장 규모는 아래와 같다.

| 사료첨가제           | 생산량 (톤)      | 생산액 (원, 예상치) | 청미바이오(주) 실적   |
|-----------------|--------------|--------------|---------------|
| 목초추출물           | 498.5        | 20억          |               |
| 키토산             | 37.75        | 6억           |               |
| 추출제             | 63.73        | 6억           |               |
| 자몽종자, 포도        | 108.16       | 5억           |               |
| 해초추출물           | 589.65       | 6억           |               |
| 과실추출물           | 66.88        | 6억           |               |
| 반추위             | 10.47        | 1억           |               |
| 효소제             | 1,806        | 180억         |               |
| 올리고당            | 146.85       | 14억          |               |
| <b>합 계</b>      | <b>3,327</b> | <b>244억</b>  |               |
| 생균제             | 10,295       | 500억         | 29억(5.97%)*   |
| <b>초유발효 생균제</b> |              |              | <b>1.4억**</b> |

\*: 2006년 청미바이오 주식회사 매출액

\*\* : 초유발효 생균제의 예상치: 올리고당의 10%인 1.4억원 정도

2006년도 사료첨가제 시장규모 중 청미바이오주식회사의 점유율 5.97%를 기준으로 초유발효 생균제의 출시에 따른 경제적 가치(예상치)는 대략 1.4억원 정도로 추정하며 매년 10-20%의 매출이 성장될 것으로 전망한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 젓소초유의 생리활성 특성 조사

#### 1. 젓소 초유의 일반성분 및 생리활성물질 정량, 병원성미생물의 항균효과, 유산균 성장촉진 시험

##### 가. 초유의 일반성분 및 생리활성 물질 함량

충남대학교 동물사육장에서 착유한 초유의 일반성분은 Milko Scan(Foss Electric, Denmark)을 사용하여 성분을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 초유의 일반성분은 초유를 착유한 시기에 따라 다소 차이를 보였으나 일반적으로 초유의 수분함량은 정상유보다는 적으며, 분만 후 시간이 지남에 따라 고형분 함량이 줄어들면서 수분 함량은 점차 증가하였다. 여름철 분만 후 첫째 날 착유한 초유의 수분 함량은 약 85.71% 이었고 둘째 날은 86.64%, 셋째 날은 87.98%로 나타났다. 겨울철에 분만한 초유의 수분함량은 첫째 날은 약 74.91%, 둘째 날은 78.95%, 셋째 날은 83.28%로 나타났다. 이와 같이 계절에 따라 수분함량의 차이가 있음을 알 수 있었는데 이는 여름철에는 신선한 청초 위주로 사료를 급여하고 겨울철에는 사일리지 및 농후사료 중심으로 사료를 급여하기 때문으로 생각되어진다.

초유의 단백질 함량은 정상유보다 많게는 두 세배 정도 함유되어 있으며, 시간이 지나면서 급속히 감소하는 경향을 보이고 있다. 여름철에는 분만 후 첫째 날 단백질 함량은 약 6.49% 이었고 둘째 날은 5.67%, 셋째 날은 4.57%로 나타났다. 겨울철에는 분만 후 첫째 날 단백질 함량은 약 11.77% 이었고 둘째 날은 9.17%, 셋째 날은 7.42%로 나타났다. 초유의 지방은 정상유에 비해 짙은 노란색을 띠었고, 여름철에는 분만 후 첫째 날은 약 2.59% 이었고 둘째 날은 2.26%, 셋째 날은 1.76%로 나타났다. 겨울철에는 분만 후 첫째 날은 약 6.54% 이었고 둘째 날은 5.43%, 셋째 날은 3.76%로 나타났는데 여름철의 지방 함량이 겨울철에 비해 상당히 적은 것을 알 수 있었다. 유당은 계절에 관계없이 거의 일정한 수준으로 분비되는데 유당의 함량은 여름철분만 후 첫째 날 착유한 초유에서는 약 4.19%, 둘째 날은 4.87%, 셋째 날은 4.22%이고 겨울철에는 분만 후 첫째 날 착유한 초유에서는 약 4.96%, 둘째 날은 4.62%, 셋째 날은 4.58%로 나타났다. 또한 회분 함량은 정상유보다 높은 것으로 보아 갈슘, 인 등 광물질의 함량이 정상유보다 높은 것을 알 수 있었다.

Table 1. General composition of colostrum

| Colostrum |         | Composition(%) |         |      |         |      |
|-----------|---------|----------------|---------|------|---------|------|
|           |         | Moisture       | Protein | Fat  | Lactose | Ash  |
| Summer    | 1st day | 85.71          | 6.49    | 2.59 | 4.19    | 1.02 |
|           | 2nd day | 86.64          | 5.67    | 2.26 | 4.37    | 1.06 |
|           | 3rd day | 87.98          | 4.57    | 1.76 | 4.72    | 0.97 |
| Winter    | 1st day | 74.91          | 11.77   | 6.54 | 4.96    | 1.82 |
|           | 2nd day | 78.95          | 9.17    | 5.43 | 4.62    | 1.83 |
|           | 3rd day | 83.28          | 7.42    | 3.76 | 4.58    | 0.96 |

초유의 생리활성물질은 초유를 4°C에서 3,000g로 10분간 원심분리하여 유지방을 분리한 탈지초유를 시료로 사용하였고, ELISA kit(BETHYL, TX. USA)를 사용하여 생리활성물질인 lactoferrin, IgA, IgG<sub>1</sub>, Ig G<sub>2</sub> 양을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 송아지 분만 후 첫째 날이 가장 높게 나타났고 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 초유의 lactoferrin 함량은 여름철 첫째 날은 0.30 mg/mL, 둘째 날은 0.14 mg/mL, 셋째 날은 0.12 mg/mL로 나타났다. IgA는 첫째 날은 0.37 mg/mL, 둘째 날은 0.12 mg/mL, 셋째 날은 0.10 mg/mL로 나타났고 IgG<sub>1</sub>은 첫째 날은 4.00 mg/mL, 둘째 날은 0.20 mg/mL, 셋째 날은 0.16 mg/mL로 나타났다. 또한 IgG<sub>2</sub>는 첫째 날은 0.37 mg/mL, 둘째 날은 0.14 mg/mL, 셋째 날은 0.07 mg/mL로 나타났다.

겨울철의 초유의 lactoferrin 함량은 첫째 날은 1.16 mg/mL, 둘째 날은 0.88 mg/mL, 셋째 날은 0.57 mg/mL로 나타났다. IgA는 첫째 날은 2.60 mg/mL, 둘째 날은 2.02 mg/mL, 셋째 날은 0.85 mg/mL로 나타났고 IgG<sub>1</sub>은 첫째 날은 13.35 mg/mL, 둘째 날은 6.90 mg/mL, 셋째 날은 3.54 mg/mL로 나타났다. 또한 IgG<sub>2</sub>는 첫째 날은 1.30 mg/mL 둘째 날은 0.71 mg/mL, 셋째 날은 0.44 mg/mL로 나타났다. 이와 같이 여름철보다 겨울철이 lactoferrin과 면역글로블린 함량이 훨씬 높았고 면역글로블린 중에는 IgG<sub>1</sub> 함량이 가장 높고 다음이 IgA, IgG<sub>2</sub> 순임을 알 수 있었다. Korhonen (1977)은 초유에서 lactoferrin의 함량은 1.5~5.0 mg/mL, Tsuji 등 (1990)은 정상유에서는 0.1 mg/mL이라고 보고하였고, Mach 과 Pahud (1971)는 초유에서 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> 의 양은 각각 52.0~87.0 mg/mL, 1.6~2.1 mg/mL, IgM은 3.7~6.1 mg/mL, IgA는 3.2~6.2 mg/mL 이라고 보고하였다. 한편 Butler(1994)는 IgG<sub>1</sub>이 46.4 mg/mL, IgG<sub>2</sub>는 2.9 mg/mL, IgM은 6.8 mg/mL, IgA는 5.4 mg/mL 함유되어 있다고 보고하였다. 이와같이 연구자에 따라 lactoferrin과 immunoglobulin의 함량 차이가 있는 것을 알 수 있다.

Table 2. Content of lactoferrin, IgA, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> in colostrum

| Colostrum |         | Concentration (mg/mL) |      |                  |                  |
|-----------|---------|-----------------------|------|------------------|------------------|
|           |         | Lactoferrin           | IgA  | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>2</sub> |
| Summer    | 1st day | 0.30                  | 0.37 | 4.00             | 0.37             |
|           | 2nd day | 0.14                  | 0.12 | 0.20             | 0.14             |
|           | 3rd day | 0.12                  | 0.10 | 0.16             | 0.07             |
| Winter    | 1st day | 1.16                  | 2.60 | 13.35            | 1.30             |
|           | 2nd day | 0.88                  | 2.02 | 6.90             | 0.71             |
|           | 3rd day | 0.57                  | 0.85 | 3.54             | 0.44             |

## 나. 초유의 병원성 미생물에 대한 항균효과

### 1) 무열처리한 초유에서 배양한 병원성 미생물의 변화

초유가 병원성 미생물에 대하여 항균활성 기능을 가지고 있는지 알아보기 위해 서 열처리하지 않은 초유에 6종류의 병원성 미생물을 접종한 후 12시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 미생물의 변화를 계측한 결과는 Fig. 1과 같다. *E. coli*를 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에 첨가하여 배양한 결과는, 배양 후 3시간째까지는 감소하다가 이후에 증가하여 9시간까지 지속되다가 다시 감소하는 경향을 보였는데 이는 정상유에 비해 초유성분이 *E. coli*에 대해서 항균효과가 있다는 것을 말한다. *S. enteritidis* KCCM3313은 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에서 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였는데 정상유와 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 초유성분이 *S. enteritidis* KCCM3313에는 항균효과가 없는 것으로 나타났다.

*L. monocytogenes* KCTC3443은 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에서 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였어 *L. monocytogenes* KCTC3443에는 항균효과가 없는 것으로 나타났다. *B. avium*, *P. aeruginosa*, *M. pulmmis* 모두 정상유와 같이 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에서 배양시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였고, 이는 초유성분이 *B. avium*, *P. aeruginosa*, *M. pulmmis*에 대하여 항균효과가 없는 것을 의미한다.

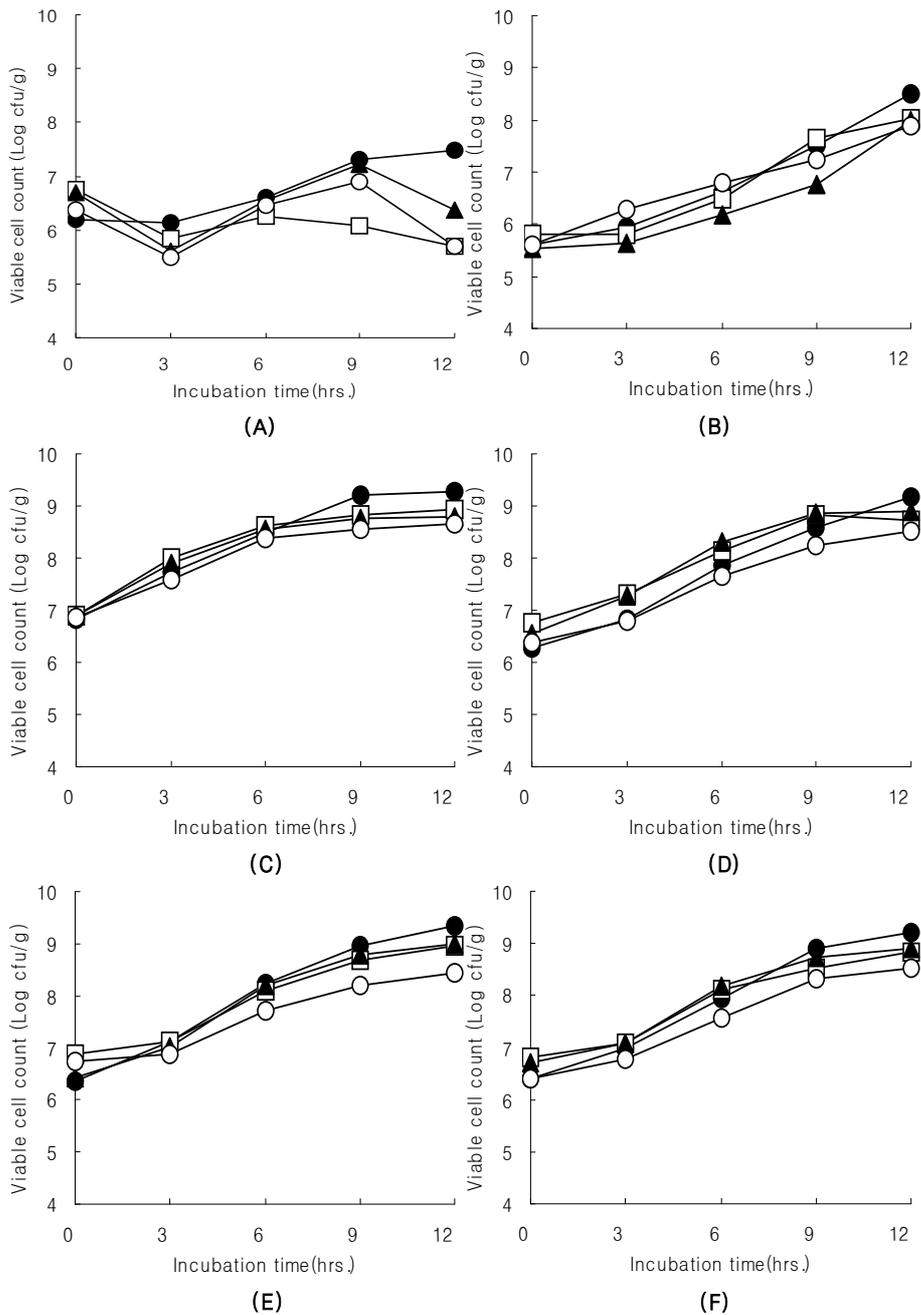


Fig. 1. Antibacterial activity of pathogenic bacteria in non-heat treated colostrum during incubation time. A : *Escherichia coli*, B : *Salmonella enteritidis*, C : *Listeria monocytogenes*, D : *Bordetella avium*, E : *Pseudomonas aeruginosa*, F : *Mycoplasma pulmmis*. -●- : normal milk, -□- : colostrum of 1st day, -▲- : colostrum of 2nd day, -○- : colostrum of 3rd day.

## 2) 열처리한 초유에서 배양한 병원성 미생물의 변화

초유의 항균활성 기능을 알아보기 위해서 열처리한 초유에서 배양한 병원성 미생물의 변화를 알아보았다. 방법은 앞에서와 같이 초유에 6종류의 병원성 미생물을 접종한 후 12시간 동안 배양하면 3시간 간격으로 미생물의 변화를 계측하였는데 결과는 Fig. 2와 같다. *E. coli* KCTC1039를 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에 첨가하여 배양한 결과는 정상유에 비해 배양 전 시간에 걸쳐 성장이 억제되는 것으로 나타났다. 배양 후 3시간째까지는 감소하다가 이후에 증가되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 초유성분이 *E. coli* KCTC1039에는 항균효과가 있다는 것을 말하는데 열처리하지 않은 초유에서 배양한 병원성 미생물의 변화에서와 같은 결과를 나타내고 있다.

*S. enteritidis* KCCM3313은 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에서 비슷한 수로 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였어 *S. enteritidis* KCCM3313에는 항균효과가 없는 것으로 나타났다. *L. monocytogenes* KCTC3443, *B. avium*, *P. aeruginosa*, *M. pulmmis* 모두 정상유와 같이 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 착유한 초유에서 시간이 지남에 따라 비슷하게 증가하는 경향을 보였는데, 이는 초유성분이 *L. monocytogenes* KCTC3443, *B. avium*, *P. aeruginosa*, *M. pulmmis*에 대해서는 항균효과가 없음을 나타낸다. 무열처리한 초유와 열처리한 초유에서 배양한 병원성 미생물의 항균효과는 차이가 없었는데, 이는 65°C에서 30분간 열처리 영향에 의해 항균활성을 나타내는 성분들의 변화가 없는 것으로 생각되어진다.

Hoshower(1994)는 초유에 함유된 sIgA 에 의해 poliovirus, influenza A virus, herpes simplex virus, *E. coli*, *Salmonella*, *Streptococcus*에 대한 방어기능이 있다고 보고하였고, Carol 등 (1992)은 건강한 성인에게 *Shigella flexneri*를 투여 후 immunoglobulin의 농도에 따른 효과를 연구하였다. Lactoferrin의 항균활성에 대해서도 *E. coli*(Rainard, 1986; Saito *et al.*, 1991), *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteria*(Batish *et al.*, 1988), *Listeria monocytogenes*(Payne *et al.*, 1990), *Streptococcus mutans*(Lassiter *et al.*, 1987), *Bacillus stearothermophilus* 와 *Bacillus subtilis*(Oram and Reiter, 1968) 등에 관하여 보고되었다. Lysozyme 의 항균활성 기전에 대하여 Reiter(1978)는 미생물 세포벽의 peptidoglycan 층을 분해하여 미생물을 파괴한다고 보고하였다. Lactoperoxidase의 항균효과에 대해서는 Reiter 등(1976)은 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Salmonella typhimurium*에 대하여, Siragusa와 Gaya 등(1991), Johnson(1989), Kamau 등(1990)은 *Listeria monocytogenes*에 대하여 보고하였다.

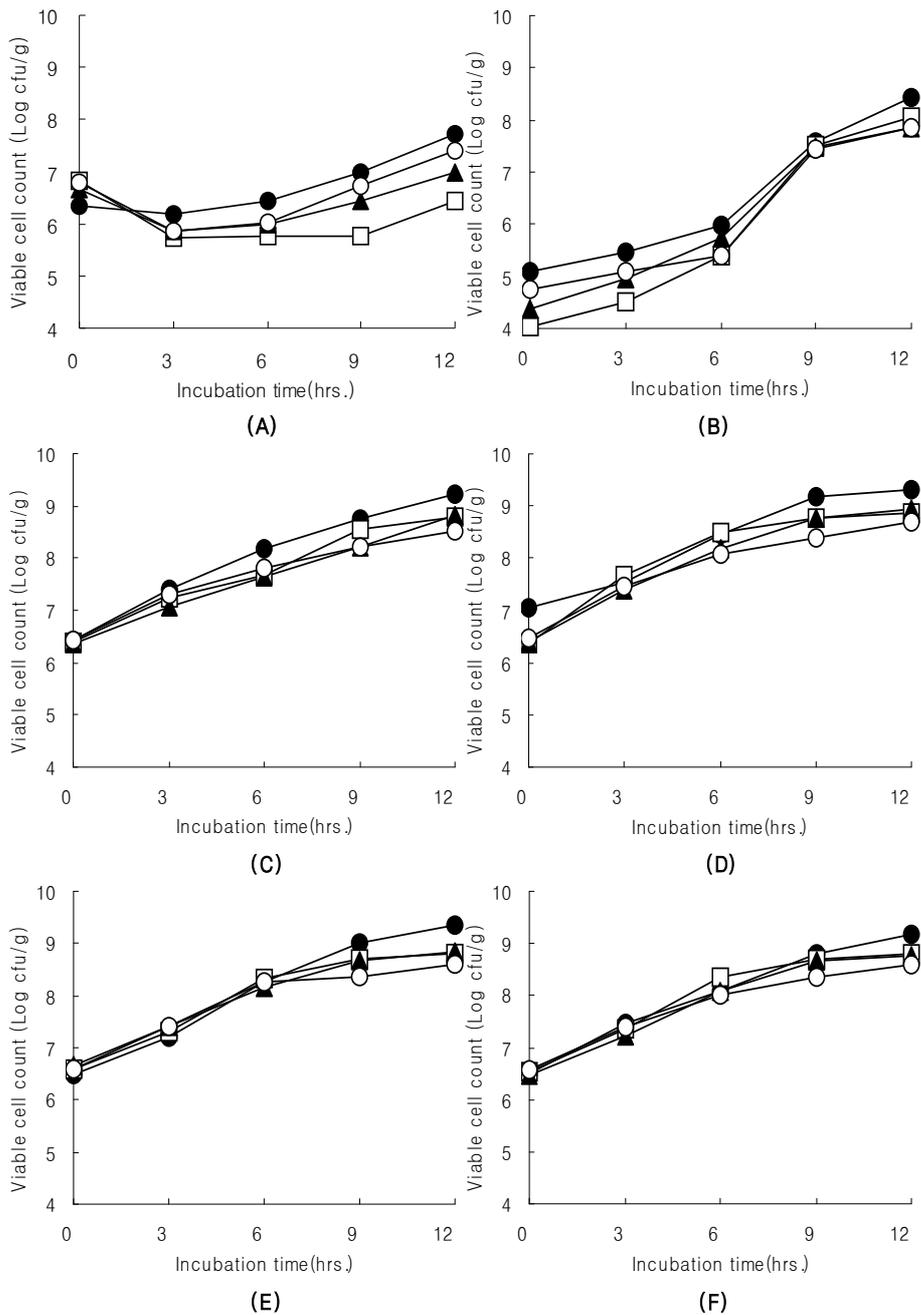


Fig. 2. Antibacterial activity of pathogenic bacteria in heat treated colostrum during incubation time. A : *Escherichia coli*, B : *Salmonella enteritidis*, C : *Listeria monocytogenes*, D : *Bordetella avium*, E : *Pseudomonas aeruginosa*, F : *Mycoplasma pulmmis*. -●- : normal milk, -□- : colostrum of 1st day, -▲- : colostrum of 2nd day, -○- : colostrum of 3rd day.

### 3) 초유에서 유산균 성장촉진 능력

공시균주는 10% 탈지유 배지를 조제하여 121°C에서 15분간 열처리한 후 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*와 혼합균주인 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*(Nocks, Japan)를 이용하였다.

초유에 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*와 상업용 혼합유산균주 *B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*을 2% 접종한 후 37°C에 15시간 배양하면서 3시간 간격으로 멸균수에 십진 희석하여 BCP plate count agar(Eiken Chemical Co. Ltd., Japan)에 접종한 후 24시간 이상 배양한 후 유산균수를 계측하였다.

초유에 유산균을 접종한 후 15시간 동안 배양하면서 3시간마다 적정산도와 pH를 측정하였다. 적정산도는 Richardson(1985)의 방법에 따라 측정하였으며, pH는 pH meter(Model 740P, Istek, Korea)를 사용하여 측정하였다.

초유에서 유산균 성장촉진 능력을 알아보기 위해 초유에 유산균을 접종하고 15시간 동안의 유산균수의 변화를 계측한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 접종한 유산균 중 정상유에 비해 상업용 혼합균주(*B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*)와 *L. bulgaricus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*가 초유에서 더 잘 자라는 것을 알 수 있었다. 상업용 혼합균인 *B. longum*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*을 접종한 초유에서는 배양 후 3시간 간격으로 15시간에 이르기까지 균수를 계측한 결과 배양 3시간까지 증가속도가 급상승하였고 3시간 이후 9시간까지는 서서히 증가하다가 9시간 이후는 성장이 중지하였다. 대조구인 정상유에 비해 균수가 증가하고 있음을 알 수 있었는데, 15시간 배양 후 정상유의 균수는  $6.70 \times 10^7$  cfu/g이었으나 첫째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $1.65 \times 10^8$  cfu/g, 둘째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $1.51 \times 10^8$  cfu/g, 셋째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $9.25 \times 10^7$  cfu/g으로 모두 정상유보다 균수가 증가하였다.

*L. acidophilus*를 접종한 초유에서 배양 후 3시간 간격으로 15시간에 이르기까지 균수를 계측한 결과를 정상유와 비교하면 조금 증가하였다. *L. casei*도 *L. acidophilus*와 비슷한 경향을 보였다. *L. bulgaricus*를 접종한 초유에서는 배양 후 3시간 간격으로 균수를 계측한 결과 15시간에 이르기까지 정상유에서 균수는 시간이 지나도 거의 증가하지 않고 일정하게 유지하다가 12시간 이후 감소됨을 알 수 있었다. 그러나 첫

째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $4.10 \times 10^7$  cfu/g, 둘째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $6.25 \times 10^7$  cfu/g, 셋째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $5.20 \times 10^7$  cfu/g으로 정상유보다 균수가 증가하였다. *L. lactis* subsp. *cremoris*도 접종한 초유에서는 배양 후 3시간 간격으로 균수를 측정한 결과 15시간에 이르기까지 정상유에 비해 균수가 증가하고 있음을 알 수 있었다. 정상유에서 배양한 균수는 처음이나 15시간 후나 큰 차이가 없이  $6.70 \times 10^7$  cfu/g이었으나, 첫째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $1.65 \times 10^8$  cfu/g, 둘째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $1.51 \times 10^8$  cfu/g로 가장 높았고, 셋째 날 착유한 초유에서는 15시간 배양 후  $9.25 \times 10^7$  cfu/g으로 모두 정상유보다 균수가 증가하였다. 이러한 결과는 초유에서 유산균 증식효과가 정상유보다 우수하다는 것을 입증하였다. *L. bulgaricus*와 *L. lactis* subsp. *cremoris*를 제외한 다른 균에서 첫째 날 착유한 초유에서 균수가 가장 높았고, 둘째 날에서 셋째 날로 갈수록 균수는 조금씩 감소하였다. 따라서 첫째 날 착유한 초유에서 유산균 증식효과가 가장 높은 것으로 보아 이는 초유성분이 고형분 함량과 관계가 있는 것으로 생각된다. 첫째 날이 고형분 성분이 가장 높아서 이러한 고형분 성분 중에서 유산균을 증식시키는 물질이 함유되어 있는 것으로 생각되어진다.

초유에서 유산균이 성장하면서 유산을 생성하는 정도를 알아보기 위해서 초유에 유산균을 접종하고 15시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 pH와 적정산도의 변화를 측정한 결과는 Table 3 및 Table 4와 같다. Table 3에서 나타난 바와 같이 유산균 숫자가 증가하면 유산생성이 증가하여 pH는 낮아지고 산도는 높아지는 것을 Table 3 및 Table 4에서 볼 수 있다. 유산균 종류별로 배양 15시간 후에 측정한 pH는 정상유에 비해 초유 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 모두 낮은 것을 알 수 있다. 정상유는 대체적으로 pH가 6.5~6.8 사이였으나 유산균을 접종한 각 그룹은 pH 5.96~6.57로 나타났고 *B. longum* *L. acidophilus* *S. thermophilus*는 정상유는 5.04인 반면 초유 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 모두 4.98 전후로 나타났다. 각 유산균 종류별로 배양 15시간 후에 측정한 산도는 정상유에 비하여 초유 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 모두 높은 것을 알 수 있다. 정상유는 대체적으로 산도가 0.20~0.25% 사이였으나 초유에서는 산도가 0.29~0.48%로 나타났고, *B. longum* *L. acidophilus* *S. thermophilus*는 예외적으로 정상유는 0.70%인 반면 초유 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 모두 0.75~0.88% 사이로 나타났다. 이러한 결과는 유산균 숫자와 pH 및 산도의 결과가 일치하는 것으로 나타났다. 한편 Aparna와 Salimath (1999)는 물소 초유에서 분리한 산성당 단백질이 *Bifidobacterium bifidus* var. *pennsylvanicus*의 성장을 향상시킨다고 보고하였다.

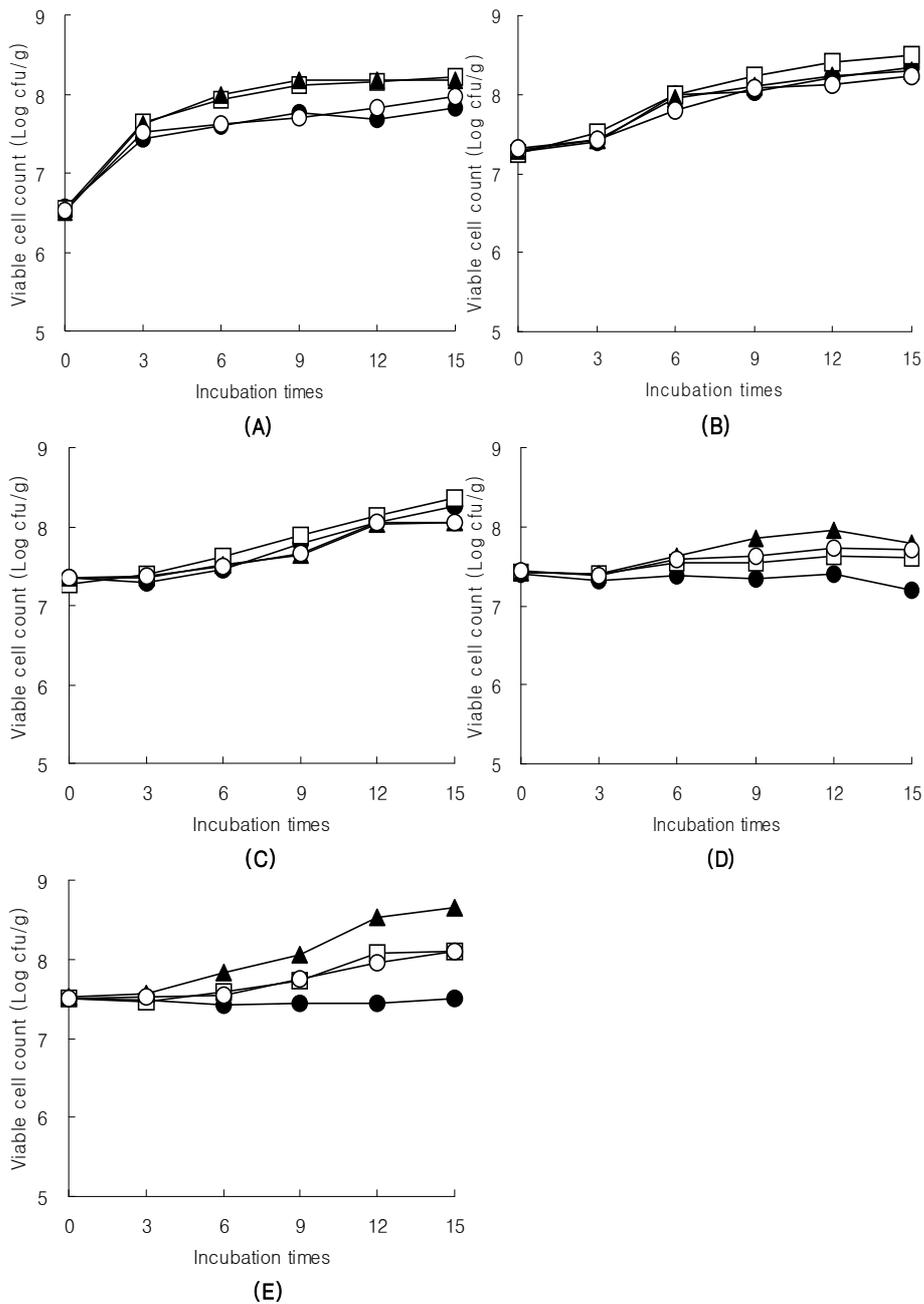


Fig. 3. Effect of growth enhancement of lactic acid bacteria in non-heat treated colostrum during incubation time. A : *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, B : *Lactobacillus acidophilus*, C : *Lactobacillus casei*, D : *Lactobacillus bulgaricus*, E : *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*, -●- : normal milk, -□- : colostrum of 1st day, -▲- : colostrum of 2nd day, -○- : colostrum of 3rd day.

Table 3. Changes of pH in fermented colostrum by lactic acid bacteria

| Colostrum |             | Incubation time (hrs.) |      |      |      |      |      |
|-----------|-------------|------------------------|------|------|------|------|------|
|           |             | 0                      | 3    | 6    | 9    | 12   | 15   |
| MC        | 1st day     | 6.55                   | 6.19 | 5.97 | 5.55 | 5.25 | 5.22 |
|           | 2nd day     | 6.62                   | 6.19 | 5.72 | 5.26 | 5.00 | 4.99 |
|           | 3rd day     | 6.43                   | 6.01 | 5.76 | 5.20 | 4.98 | 4.97 |
|           | Normal milk | 6.86                   | 6.43 | 5.83 | 5.28 | 4.98 | 4.89 |
| LA        | 1st day     | 6.47                   | 6.48 | 6.38 | 6.23 | 6.11 | 5.96 |
|           | 2nd day     | 6.54                   | 6.56 | 6.48 | 6.38 | 6.34 | 6.23 |
|           | 3rd day     | 6.64                   | 6.67 | 6.59 | 6.49 | 6.39 | 6.25 |
|           | Normal milk | 6.88                   | 6.84 | 6.77 | 6.73 | 6.65 | 6.50 |
| LB        | 1st day     | 6.44                   | 6.45 | 6.40 | 6.32 | 6.20 | 6.10 |
|           | 2nd day     | 6.50                   | 6.54 | 6.49 | 6.48 | 6.39 | 6.31 |
|           | 3rd day     | 6.61                   | 6.64 | 6.59 | 6.58 | 6.49 | 6.40 |
|           | Normal milk | 6.84                   | 6.84 | 6.80 | 6.75 | 6.67 | 6.60 |
| LC        | 1st day     | 6.55                   | 6.56 | 6.52 | 6.54 | 6.53 | 6.47 |
|           | 2nd day     | 6.45                   | 6.48 | 6.42 | 6.43 | 6.40 | 6.33 |
|           | 3rd day     | 6.63                   | 6.66 | 6.60 | 6.63 | 6.61 | 6.57 |
|           | Normal milk | 6.86                   | 6.86 | 6.85 | 6.87 | 6.85 | 6.81 |
| LD        | 1st day     | 6.57                   | 6.51 | 6.45 | 6.27 | 6.37 | 6.30 |
|           | 2nd day     | 6.48                   | 6.41 | 6.34 | 6.17 | 6.23 | 6.11 |
|           | 3rd day     | 6.65                   | 6.60 | 6.54 | 6.37 | 6.47 | 6.36 |
|           | Normal milk | 6.88                   | 6.81 | 6.77 | 6.65 | 6.83 | 6.76 |

MC : mix culture of *B. longum* *L. acidophilus* *S. thermophilus*. LA : *L. acidophilus*.

LB : *L. casei*, LC : *L. bulgaricus*, LD : *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Table 4 Changes of titratable acidity(%) in fermented colostrum by lactic acid bacteria

| Colostrum |             | Incubation time(hrs.) |      |      |      |      |      |
|-----------|-------------|-----------------------|------|------|------|------|------|
|           |             | 0                     | 3    | 6    | 9    | 12   | 15   |
| MC        | 1st day     | 0.41                  | 0.35 | 0.42 | 0.53 | 0.62 | 0.75 |
|           | 2nd day     | 0.40                  | 0.34 | 0.46 | 0.61 | 0.94 | 0.85 |
|           | 3rd day     | 0.32                  | 0.36 | 0.47 | 0.66 | 0.96 | 0.88 |
|           | Normal milk | 0.20                  | 0.25 | 0.38 | 0.50 | 0.64 | 0.70 |
| LA        | 1st day     | 0.31                  | 0.31 | 0.34 | 0.38 | 0.42 | 0.48 |
|           | 2nd day     | 0.31                  | 0.30 | 0.33 | 0.35 | 0.37 | 0.39 |
|           | 3rd day     | 0.27                  | 0.27 | 0.28 | 0.31 | 0.33 | 0.37 |
|           | Normal milk | 0.18                  | 1.86 | 0.20 | 0.21 | 0.22 | 0.25 |
| LB        | 1st day     | 0.31                  | 0.31 | 0.32 | 0.35 | 0.38 | 0.43 |
|           | 2nd day     | 0.31                  | 0.31 | 0.35 | 0.34 | 0.34 | 0.38 |
|           | 3rd day     | 0.27                  | 0.27 | 0.28 | 0.29 | 0.31 | 0.34 |
|           | Normal milk | 0.18                  | 0.18 | 0.20 | 0.21 | 0.22 | 0.23 |
| LC        | 1st day     | 0.29                  | 0.31 | 0.31 | 0.31 | 0.32 | 0.34 |
|           | 2nd day     | 0.31                  | 0.32 | 0.32 | 0.32 | 0.34 | 0.34 |
|           | 3rd day     | 0.26                  | 0.27 | 0.28 | 0.28 | 0.29 | 0.29 |
|           | Normal milk | 0.17                  | 0.19 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.20 |
| LD        | 1st day     | 0.31                  | 0.32 | 0.32 | 0.35 | 0.35 | 0.40 |
|           | 2nd day     | 0.29                  | 0.31 | 0.33 | 0.34 | 0.38 | 0.42 |
|           | 3rd day     | 0.26                  | 0.27 | 0.29 | 0.30 | 0.32 | 0.34 |
|           | Normal milk | 0.19                  | 0.18 | 0.20 | 0.20 | 0.19 | 0.20 |

MC : mix culture of *B. longum* *L. acidophilus* *S. thermophilus*. LA : *L. acidophilus*.

LB : *L. casei*, LC : *L. bulgaricus*, LD : *L. lactis* subsp. *cremoris*.

## 2. 초유가 항염, 항바이러스 및 면역활성에 미치는 효과 시험

### 가. 초유성분의 항염증 효과 조사

In vitro에서 배양 가능한 혈액세포주의 배양조건을 확립하여 초유가 이들 세포에 미치는 영향을 분석하여, 항염증에 관여하는 초유의 기능을 세포내에서 일어나는 과민 면역반응에 관여하는 분자들의 상호작용과 세포외의 성장에 미치는 영향등을 분석하기 위하여 동물 세포주 배양조건을 확립하였다.

세포 증식 및 유지를 위한 기본 배양액으로 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 unit/ml) 및 streptomycin (100 ug/ml) 혼합용액 (Sigma chemical), 2mM L-glutamin, 5mM HEPES (Sigma), 2-mercaptothanol을 함유하는 RPMI 1640을 사용하였다. 항염증에 관련된 생체내의 세포로는 면역반응에 관련된 대부분의 혈액세포가 관여하게 된다. 이들 세포는 항염증 반응에 관여하는 각종 cytokine의 생성이나, histamine, IgE의 생산이 생체에서 또는 생체 외에서 생성되는 allergen에 의하여 활성화되면서 과민한 면역반응을 유도하게 된다. 과민한 면역반응의 기작은 단순한 한두 가지 세포만이 관여하는 것도 아니고 이를 일으키는 물질 또한 한두 가지가 아니기 때문에 생체기작을 밝혀내는 것이 쉬운 일은 아니다.

배양조건을 확립한 세포 주는 myeloid 계의 U937 세포, human mast cell 계의 HMC-1, eosinophil이나 basophil의 전구세포인 HL-60 세포주의 배양조건을 확립하였고, 생쥐로부터 회수한 monocytes의 분리 및 배양조건도 확립하였다. Fig. 4는 배양조건이 확립된 U937 세포와 HMC-1의 세포성장에 초유가 미치는 영향을 분석한 결과이다. Fig. 4의 초유(whey)첨가가 혈액세포의 성장에 미치는 영향에서 U937세포는 lactoferrin, whey 첨가 시 myeloid 계통의 세포성장을 유의성있게 억제하였고, 전반적으로 면역활성을 유도하는 mitogen인 PMA의 처리군은 세포의 성장이 억제된다는 사실은 이미 많이 알려진 사실이며, 분화와 활성화에 관련된 cytokine GM-CSF/IL-4, PMA에 첨가군에서도 lactoferrin, whey 첨가시 세포성장의 억제현상이 나타났다. 한편 U937세포와는 달리 Mast 세포인 HMC-1 세포 주에서는 lactoferrin, whey 첨가에 의한 세포의 성장을 억제하는 현상을 보이지는 않았다. 그리고 HMC-1세포에 PMA를 처리하였을 경우, 세포의 성장 억제현상이 U937 세포보다 더 뚜렷하게 나타나는 사실을 확인하였다.

초유의 유청에 의한 면역조절 기능은 유정차체가 복합물질이기 때문에 antagonist

와 against를 동시에 함유하고 있을 가능성과 면역조절에 관여하는 혈액세포에 따라 반응의 차이를 나타내고 있기 때문에 정확한 세포내에서의 기작을 밝히기 위해서는 다양한 경우의 실험이 요구된다.

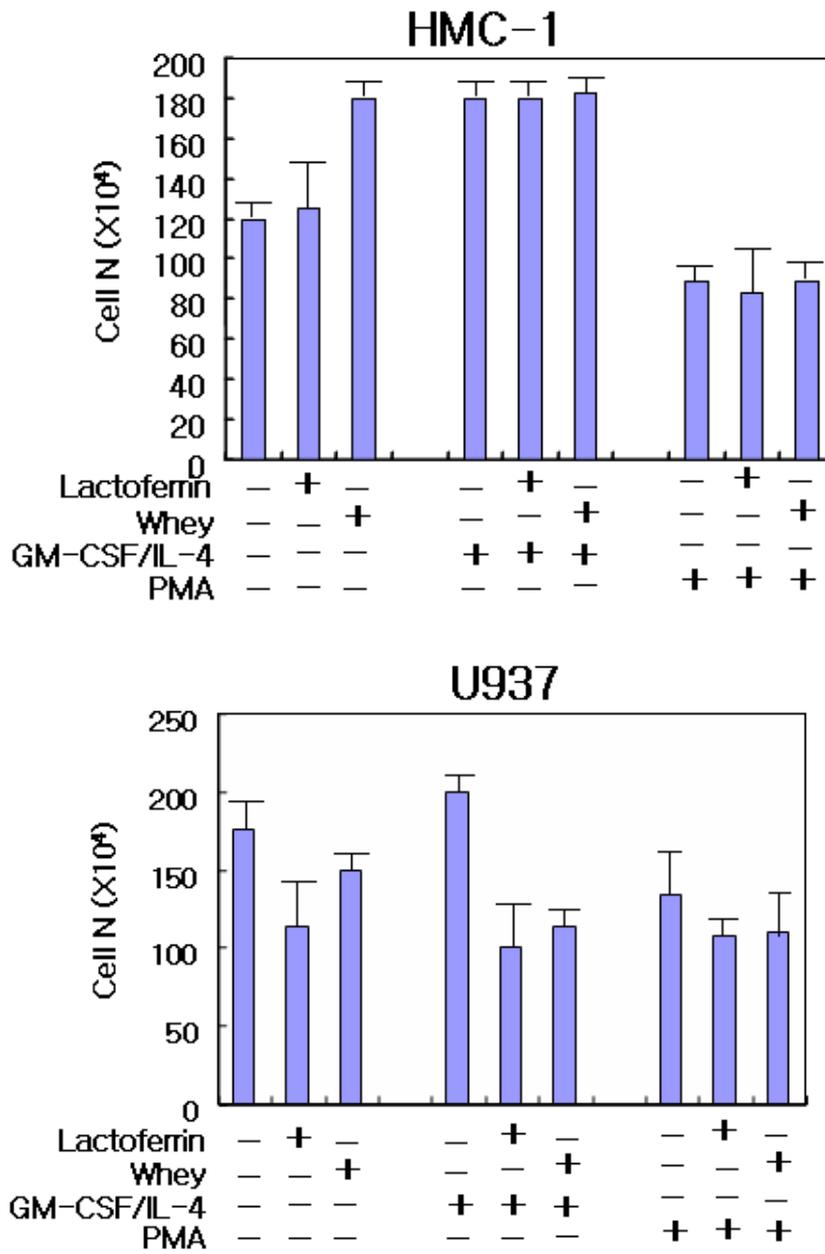


Fig. 4. Effect on growth of HMC-1 and U937 cell treated with colostrum whey.

## 나. 초유성분의 항암 효과 조사

### 1) PPAR-gamma, delta에서의 초유와 Lactoferrin의 효과

항암을 비롯한 항염증, 대사성질환 개선의 표적단백질인 PPARs와 그의 co-activator(SRC-1)의 결합력을 이용한 후보물질 탐색법을 이용한 ELISA system을 이용해 초유와 Lactoferrin의 효능을 시험 하였다.

SRC-1이 코팅된 96-well plate에 Lactoferrin과 초유를 각각 최종 농도 10, 20, 40, 80, 160, 320 ug/mL이 되도록 넣은 다음 PPAR-gamma, delta lysate를 첨가하고 1시간 반응 시켰다. 1시간 뒤 PPAR-gamma, delta 항체를 넣고 1시간 반응 시켰다. 1차 항체 반응 뒤 2차 항체로서 anti-mouse IgG HRP를 넣고 1시간 반응 시킨 후 기질(TMB; 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)을 넣고 어느 정도 반응 후 2.5N Sulphuric acid로 반응 중지 시키고 450nm에서 흡광도를 측정 하였다.

Fig. 5는 암질환의 개선을 나타내는 표적단백질인 PPARs와 그의 co-activator(SRC-1)의 결합력을 이용한 후보물질 탐색을 ELISA system을 이용해 초유와 Lactoferrin의 암질환 개선 효능을 시험한 결과이다. 위의 결과로 보아 PPARgamma,delta-coactivator 간의 결합력을 바탕으로 한 ELISA 탐색법 결과에서는 lactoferrin과 초유는 PPARgamma,delta co-activator간의 결합력을 증가 시키지 못하였다. 따라서 lactoferrin과 초유는 PPAR-gamma,delta 리간드로써의 가능성은 매우 희박 한 것으로 여겨진다.

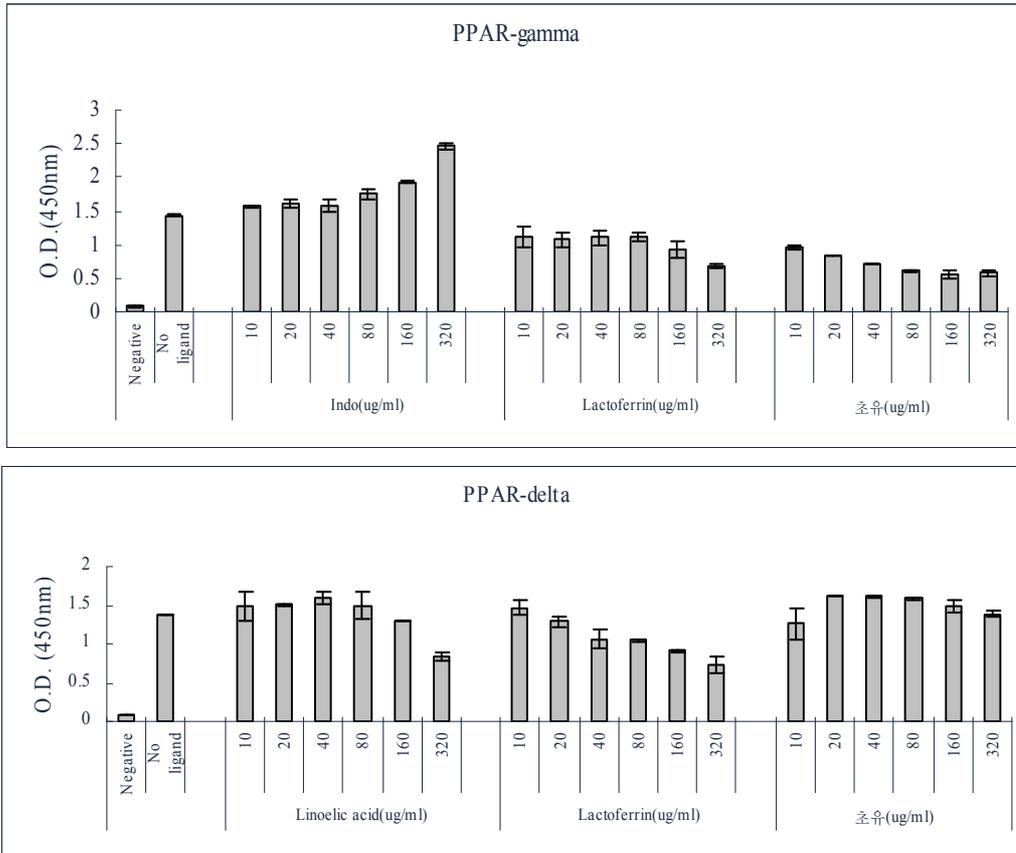


Fig. 5. Effect on colostrum and lactoferrin at PPAR-gamma, delta.

## 2) E6, E6AP, E7에서의 초유와 Lactoferrin의 효과

자궁 경부암 유발인자 E6와 E6AP, E7의 작용을 후보물질 탐색법을 이용한 ELISA system을 이용해 초유와 Lactoferrin의 효능을 시험하였다. E6, E6AP 그리고 E7이 코팅된 96-well plate에 Lactoferrin과 초유를 각각 최종 농도 5, 50 µg/ml이 되도록 넣은 다음 각각 p53, E6, Rb lysate (Binding protein)를 첨가하고 1시간 반응 시켰다. 1시간 뒤 p53, E6, Rb 항체를 넣고 1시간 반응 시켰다. 1차 항체 반응 뒤 2차 항체로서 anti-mouse IgG HRP를 넣고 1시간 반응 시켰다. 그 후 기질 (TMB; 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)을 넣고 어느 정도 반응 후 2.5N 황산으로 반응 중지 시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fig. 6의 결과에 의하면, 자궁 경부암 유발인자 E6-p53, E6-E6AP, E7-Rb 단백질 간의 결합력을 ELISA 탐색법으로 시험한 결과, lactoferrin과 초유는 E6, E6AP, E7과 Binding protein 간의 결합력을 감소시키지 못하였다. 따라서 lactoferrin과 초유는 E6, E6AP, E7 Inhibitor로서의 가능성은 매우 희박한 것으로 여겨진다.

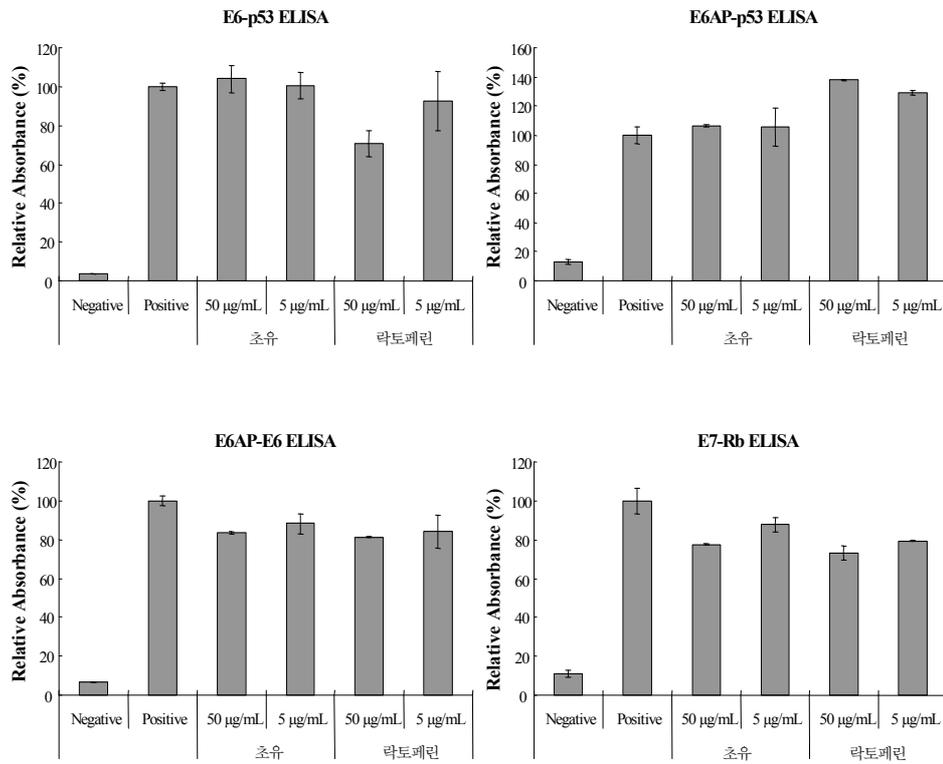


Fig. 6. Effect on colostrum and lactoferrin at E6, E6AP, E.

### 3) D10S cell 에서의 초유와 Lactoferrin의 효과

96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well 이 되도록 D10S cell 을 넣고, Lactoferrin과 초유를 각각 최종 농도 20, 100 $\mu$ g/ml 이 되도록 넣은 뒤, 1시간 반응 시켰다. hIL-1 $\beta$ 를 1ng/ml 이 되도록 첨가한 뒤 37 $^{\circ}$ C 배양기에 48시간 반응 시킨 후, MTS를 처리한 뒤 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

면역 매개 물질 IL-1 $\beta$  에 대해 IL-1R antagonist 로서 작용하는 후보물질을 탐색하기 위하여 D10S cell (Th2) 을 이용하여 MTS assay를 통해 초유와 Lactoferrin의 효능을 시험한 결과 Fig. 7과 같다. Fig. 7의 결과에 의하면, 초유와 lactoferrin은 hIL-1 $\beta$  에 대한 D10S 의 증식에 영향을 미치지 못하였다. 따라서 초유와 lactoferrin은 IL-1R 에 대한 antagonist로서의 기능을 가지고 있지 않는 것으로 생각된다.

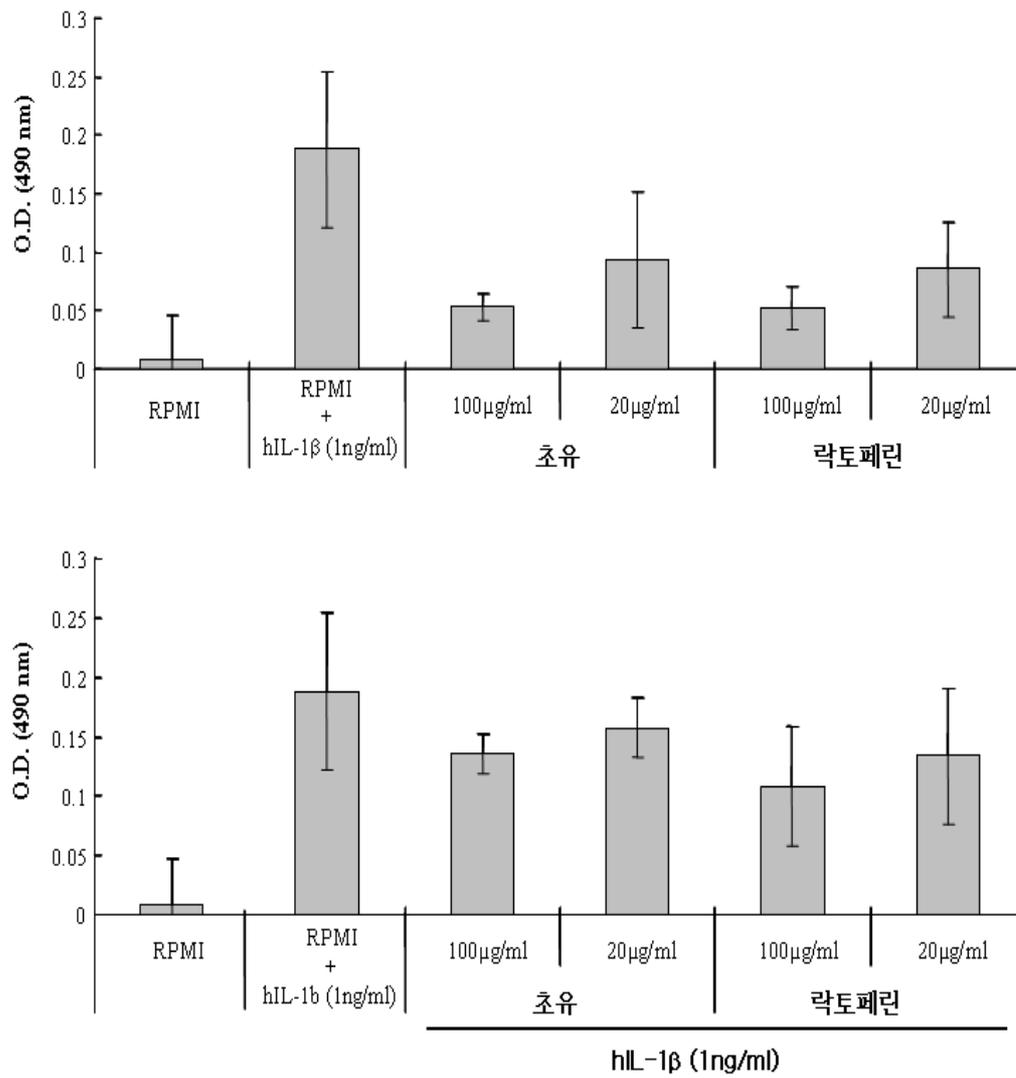


Fig. 7. Effect on colostrum and lactoferrin at D10S cell.

4) C-33A, SiHa, HaCaT 에서의 초유(colostrum) 와 Lactoferrin의 효과

96-well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well 이 되도록 D10S cell 을 넣고, Lactoferrin과 초유를 각각 최종 농도 20, 50, 100 $\mu$ g/ml 이 되도록 넣고 37 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 반응 시킨 후, MTS를 처리한 뒤 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

C-33A, SiHa, HaCaT 에서의 초유(colostrum) 와 Lactoferrin의 효과는 MTS assay를 통해 초유와 Lactoferrin의 효능을 시험한 결과 Fig. 8과 같다. Fig. 8의 결과에 의하면, 초유와 lactoferrin은 C-33A, SiHa, HaKaT 의 증식에 영향을 미치지 못하였다.

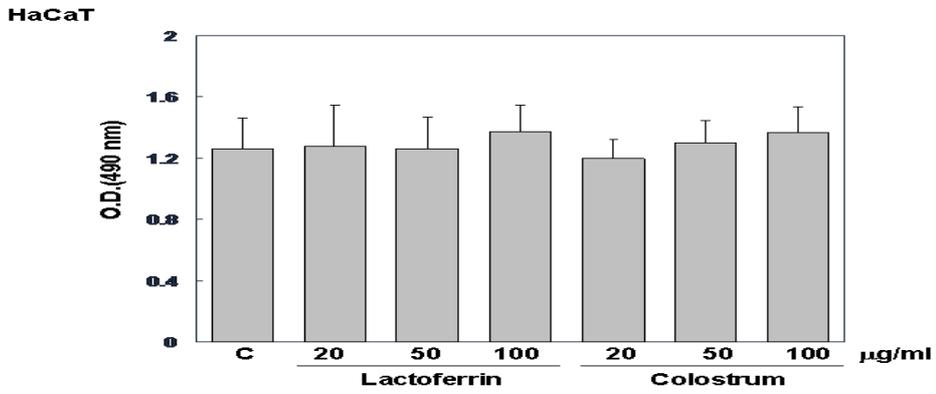
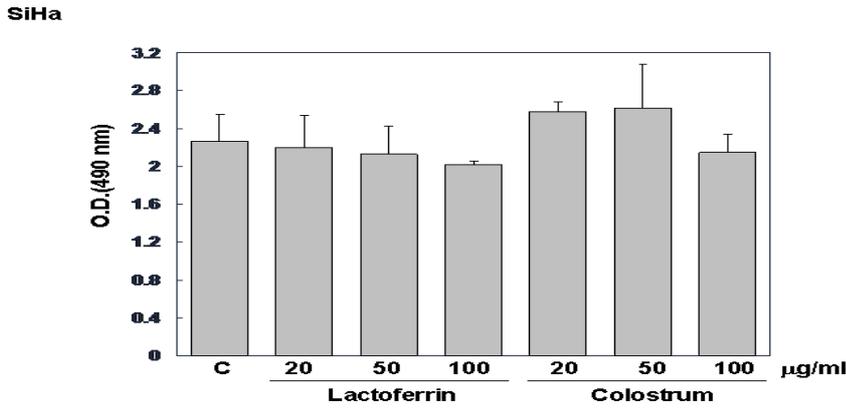
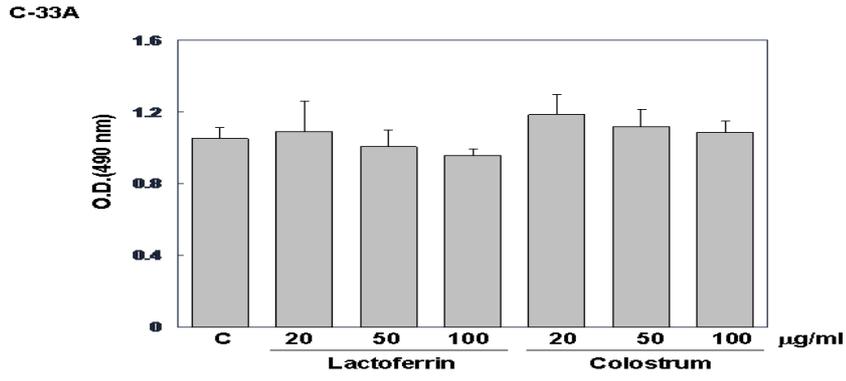


Fig. 8. Effect on colostrum and lactoferrin at C-33A, SiHa, HaCaT.

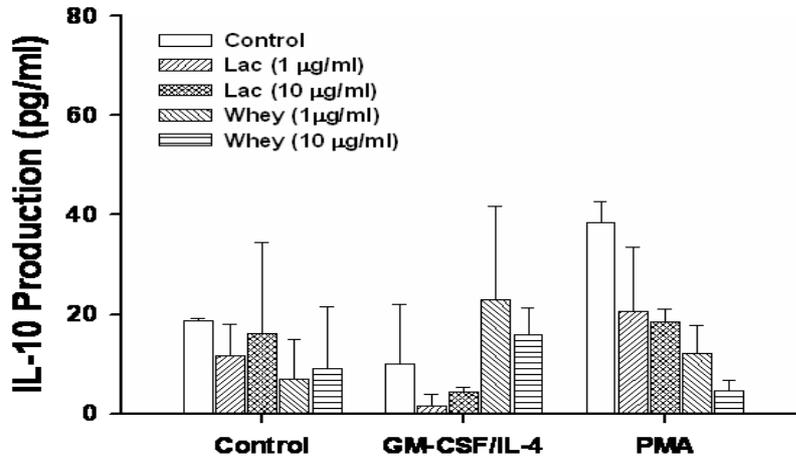
다. Allergy 증상에 미치는 효과

젖소 초유성분을 human mast cell의 세포주인 HMC-1와 monocyte 전구세포 성격이 강한 U937에서 처리한 후에 allergy에 관련된 사이토카인인 IL-13과 IL-10의 물질을 ELISA Kit을 이용하여 정량화하였다. Fig. 9의 혈액세포인 HMC-1과 U937에서 IL-13과 IL-10의 발현에 초유가 미치는 영향에서 IL-10은 대표적인 anti-cytokine으로 allergy의 치료제로서 개발될 정도로 강력한 anti-inflammatory effect를 갖는 cytokine이다 (Fig. 9-A,B). HMC-1 세포에서 IL-10의 발현은 lactoferrin의 첨가에 의하여 전반적으로 억제되는 현상을 확인하였다 (Fig. 9-A). 특히 mitogen이 PMA를 자극하였을 경우, HMC-1세포에서는 IL-10이 증가되는데 lactoferrin을 같이 첨가하였을 경우, 형격하게 IL-10의 발현을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 9-A).

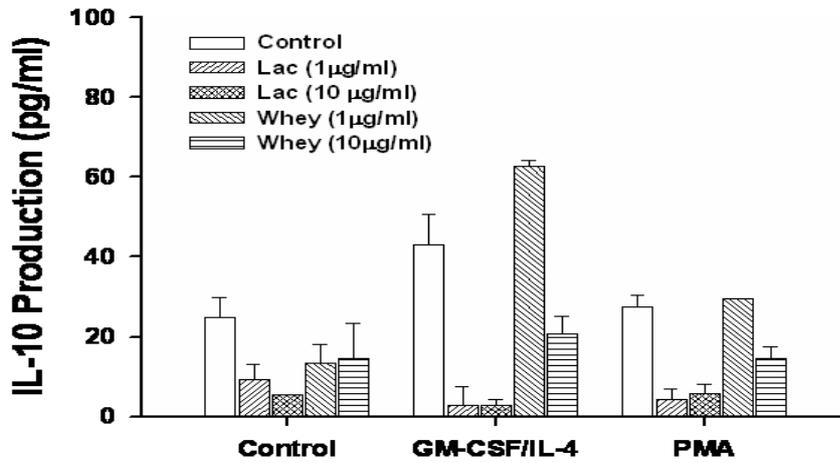
U937 세포의 경우에도 Lactoferrin의 첨가에 의한 IL-10 발현의 감소현상을 보이 고있고 고농도 (10ug/ml)의 whey에서도 IL-10의 발현을 감소시키는 현상을 알 수 있었다(Fig. 9-B). lactoferrin과 whey의 생체 내 기작이 면역반응의 modulator로 알려져 있지만 아직은 정확한 기전을 밝히지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서 얻은 결과를 바탕으로 염증반응과 밀접하게 관련된 IL-10 cytokine의 조절기작에 whey가 관여한다면 이는 hypersensitivity를 조절하는 새로운 물질로서 각광을 받게될 가능성이 있다고 판단된다 (Fig. 9-A,B).

IL-13의 발현도 HMC-1 세포에서 고농도의 lactoferrin에 의하여 발현이 저하되는 현상을 발견할 수 있었다 (Fig. 9-C). IL-13은 U937세포에서는 lactoferrin에 의하여 발현이 억제되고 고농도의 whey에 의하여도 억제가 된다 (Fig. 9-D). IL-10과 IL-13 이외의 cytokine은 detection limit이하에서 발현이 되고 있어 transcriptional level에서 분석하기 위하여 RT-PCR을 통한 정량분석중이다.

**A. HMC-1**

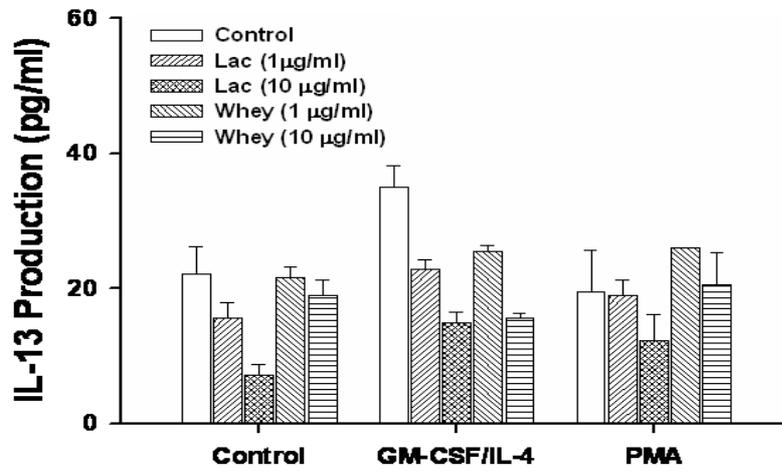


**B. U937**



C.

### HMC-1



D.

### U937

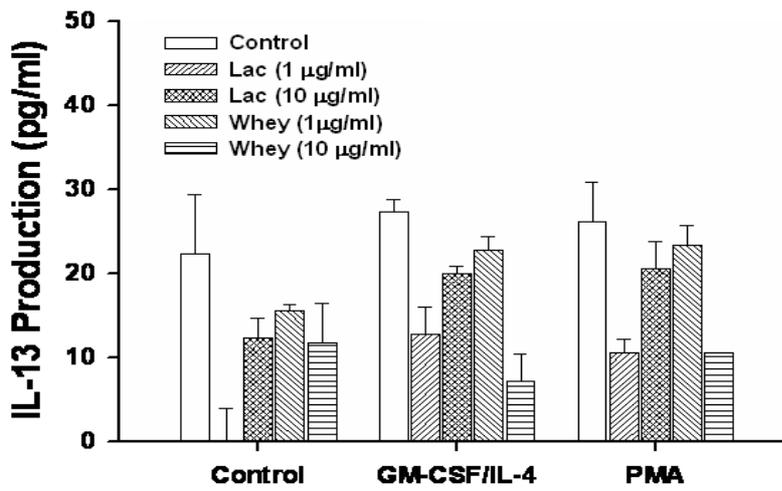


Fig. 9. Effect of colostrum on expression of IL-13과 IL-10 at HMC-1 and U937.

### 3. 실험동물을 이용한 젖소초유의 생리활성효과

#### 가. 초유 섭취가 마우스 증체율 및 사료 요구량에 미치는 영향

3주령의 BALB/C 마우스를 각 군당 10마리씩 시험군으로 하여 2주간 대조군, 시유, 초유를 각각 사료와 같이 무제한 급여시켰다. 매일 사료, 물, 시유, 초유의 섭취량을 측정하였고, 몸무게는 4일마다 측정하였다. 증체율은 Duncan의 다중검정(DMRT) 5%로 통계처리 하였다.

Fig. 10에 나타난바와 같이 대조군은 1일 4.72 g, 시유 섭취군은 3.94 g, 초유 섭취군은 3.41 g으로 시유와 초유 섭취 영향으로 사료 섭취량이 대조군에 비해 적었으며, 특히 초유 섭취군이 사료 섭취량이 시유보다도 적은 것을 알 수 있다. 이는 초유의 영양성분이 우수하기 때문에 사료섭취량이 적은 것으로 사료된다.

시유와 초유 섭취량은 Fig. 11에 나타나 있다. 시유 섭취군은 1일 9.9 ml, 초유 섭취군은 10.2 ml로 시유보다 초유 섭취량이 0.3 ml 정도 많은 것으로 나타났다.

1일 물 섭취량은 Fig. 12에 나타난바와 같이 대조군은 1일 6.3 ml, 시유 섭취군은 4.7 ml, 초유 섭취군은 4.6 ml로 대조군이 물 섭취량이 가장 많았고 시유와 초유 섭취군은 시유와 초유의 수분함량 영향으로 물 섭취량이 적은 것으로 나타났다.

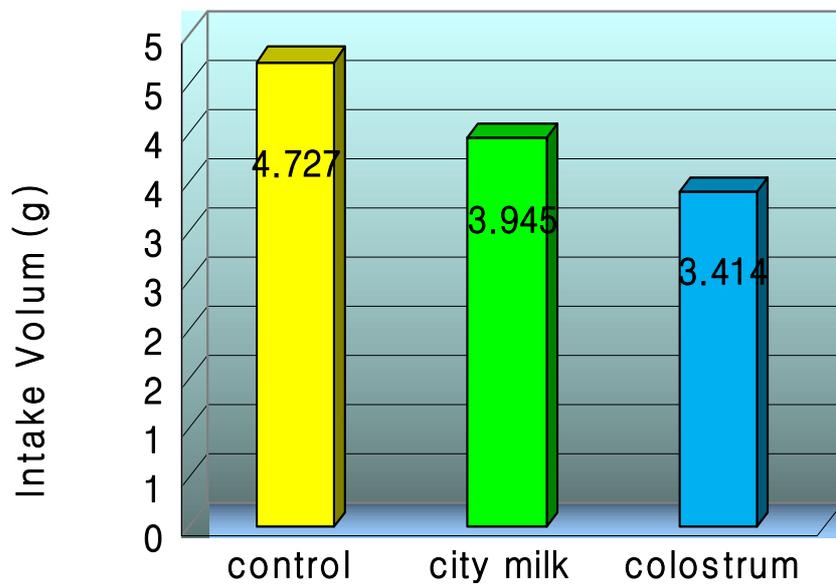


Fig. 10. Intake volume of feed mouse/day

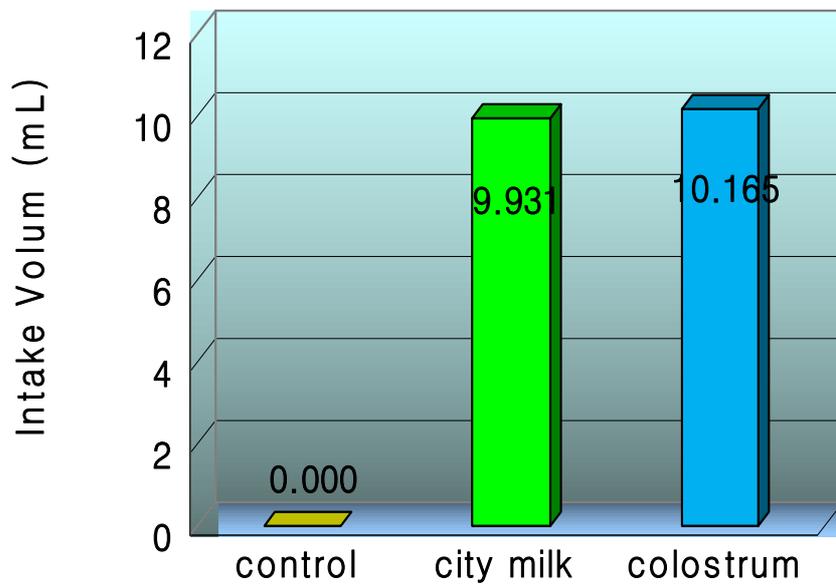


Fig. 11. Intake volume of city milk and colostrum mouse/day

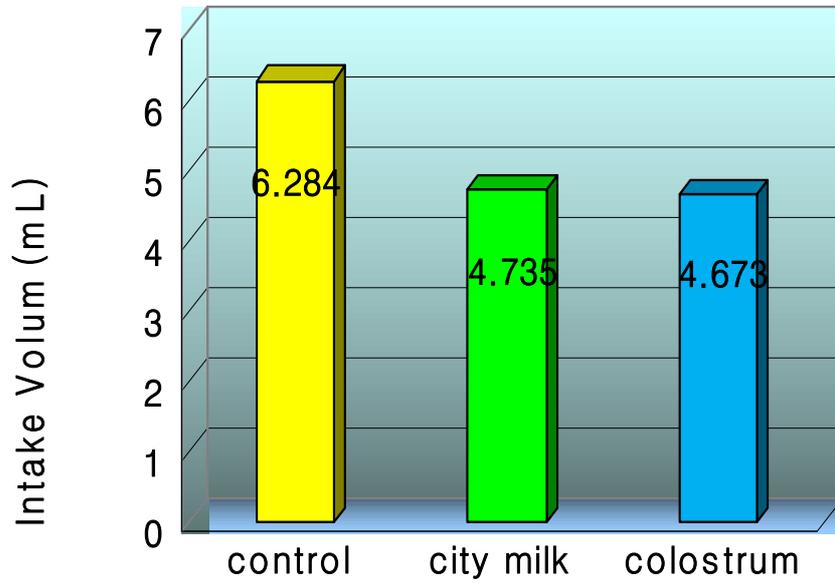


Fig. 12. Intake volume of water mouse/day

이유 후 2주간 시유 및 초유 급여가 마우스의 증체에 미치는 효과는 Table 5에 나타난 바와 같다. 각 군당 10마리씩 시험구로 하여 실험한 결과 실험 시작 시 몸무게는 대조군이 25.35 g, 시유군은 g, 초유군은 25.75 g이었다. 실험 완료인 2주후 몸무게는 대조군이 30.81 g, 시유군은 g, 초유군은 31.70 g으로 측정되었다. 따라서 증체량은 대조군은 5.46 g, 시유군은 g, 초유군은 5.95 g으로 나타났다. 사료요구율은 대조군이 0.87, 시유군이 6.38, 초유군이 5.95로 시유군보다 낮았다. 이는 초유의 영양성분이 우수한 결과에 기인한 것으로 사료된다. 아울러 사료 요구율 효과도 대조군을 100으로 기준을 하였을때 시유군이 140.3, 초유군이 151.1로 초유군이 시유군에 비해 높은 것으로 나타났다.

Table 5. Grow effect of mouse on intake city milk and colostrum during 2 weeks after wean

| Item                             | Treatment |             |           |
|----------------------------------|-----------|-------------|-----------|
|                                  | Control   | Normal Milk | Colostrum |
| No. of mouse                     | 10        | 10          | 10        |
| Starting average body weight(g)  | 25.35     |             | 25.75     |
| Final average body weight(g)     | 30.81     |             | 31.70     |
| Total gain(g)                    | 5.46      | 6.38        | 5.95      |
| Feeding demanding rate           | 0.87      | 0.62        | 0.57      |
| Effect of Feeding demanding rate | 100       | 140.3       | 151.1     |

#### 나. 마우스혈액으로부터 알러지 관련 물질 조사

대조군, 시유, 초유를 각각 섭취한 마우스의 혈액으로부터 알러지와 관련이 있는 사이토카인인 IL-4와 IL-13을 분석하였다. 알러지와 관련있는 비만세포는 알러지원으로부터 자극을 받으면 활성화가 되어 IL-4와 IL-13과 같은 사이토카인이 분비되어 알러지 증상을 유발한다. IL-4와 IL-13 측정은 R&D 사(USA)에서 구입한 ELISA Kit 이용하였다. 분석방법은 ELISA Kit 매뉴얼에 따라 실시하였다.

IL-4 측정량은 Table 6과 같다. 대조군은 19.52 pg/ml, 시유군은 31.90 pg/ml, 초유군은 22.00 pg/ml로 나타났다. 초유군이 대조군보다 약간 높은 수준이었고, 시유군보다 약 10 pg/ml 정도 낮은 것은 초유가 시유보다 알러지 저감효과가 있는 것으로 나타났다. 초유에는 각종 생리활성물질이 풍부하게 함유되어 있어 이러한 물질들이 알러지 저감효과를 가져오게 한 것으로 사료된다.

IL-13 측정량은 Table 7에 나탄 바와 같다. 대조군은 40.00 pg/ml, 시유군은 44.05 pg/ml, 초유군은 26.02 pg/ml로 나타났다. 초유군은 대조군과 시유군보다 현격하게 낮은 수준으로 함유되어 있고, IL-4와 같이 초유가 시유보다 알러지 저감효과가 있는 것으로 나타났다. 이 역시 초유에는 각종 생리활성물질이 풍부하게 함유되어 있어 이러한 물질들이 알러지 저감효과를 가져오게 한 것으로 사료된다.

Table 6. IL-4 from mouse blood (pg/ml)

|      |           |       |
|------|-----------|-------|
| IL-4 | Control   | 19.52 |
|      | City milk | 31.90 |
|      | Colostrum | 22.00 |

Table 7. IL-13 from mouse blood (pg/ml)

|       |           |       |
|-------|-----------|-------|
| IL-13 | Control   | 40.00 |
|       | City milk | 44.05 |
|       | Colostrum | 26.02 |

#### 다. 항암효과 조사

##### 1) 초유 성분이 항암 관련 면역 세포인 Dendritic cell 분화와 활성화에 미치는 영향

Bone marrow 세포에서 HSC (Hemopoietic Stem Cell)을 분리하여 DC(Dendritic Cell)로 분화를 시키는 과정에서 초유 성분에 의한 분화를 유도하는 영향을 분석하였다. 면역세포인 DC는 암세포를 인지하고 effector 세포인 T세포를 활성화 시키는 세포로서 암의 생성과 분화에 밀접한 관계를 지닌 세포이다. 초유 성분 중에 포함된 lactoferrin은 DC 세포의 분화에 많은 영향을 미치고 있다는 사실을 DC세포의 표면 물질인 MHC molecules를 중심으로 분석하여 확인 할 수 있었고 이는 새로운 형태의 면역세포 분화가 형성되고 있음을 알 수가 있었다. (Fig. 13) 새롭게 형성된 타입의 DC세포의 기능 연구는 암세포의 전이와 생성의 억제에 효능 가능성을 제시한 결과라 볼 수 있다.

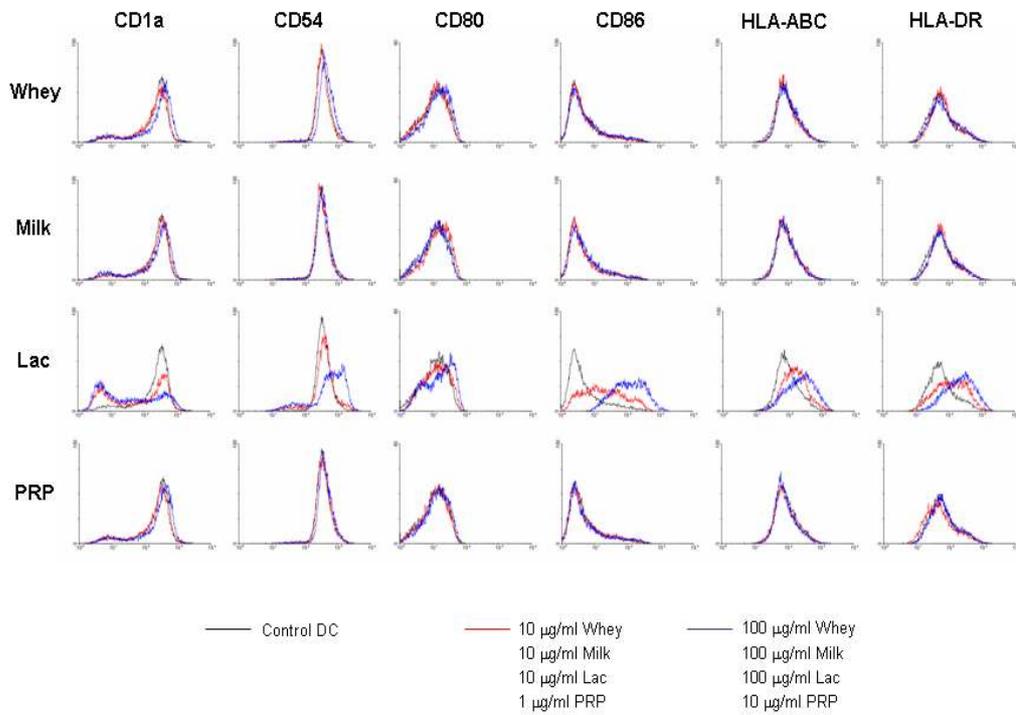


Fig. 13. Effect of colostrum on DC(Dendritic Cell) differentiation.

## 2) 초유 성분의 항 알레르기 관련 cytokine의 분비능력의 차이의 분석

초유 성분 중에서 정상유와 비교하여 월등히 많은 양을 차지하고 있는 락토페린은 DC 세포와 면역세포 주에서 IL-10, TNF- $\alpha$ 의 생산을 촉진하는 기능을 가지고 있음을 확인하였다. 일반적으로 IL-10은 항염증반응과 allergy에 특이한 억제 효능을 지니고 있는 Anti-cytokines으로 알려져 있는데 Lactoferrin이 특이적으로 IL-10의 양을 조절하는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 TNF- $\alpha$ 의 생산량도 증가되고 있음을 ELISA(enzyme-linked immunoabsorbent assay)를 통하여 확인하였다. 이는 monocyte에서 분화한 면역세포의 기능을 조절하는 역할을 lactoferrin 이 하고 있음을 보여 주고 있다.(Fig. 14)

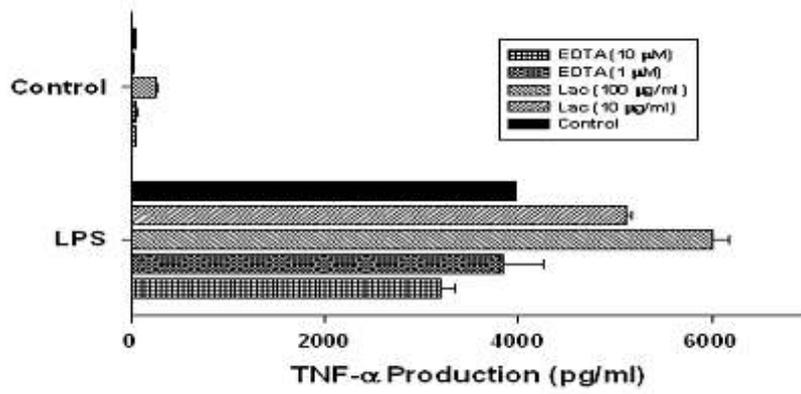


Fig. 14. Effect of colostrum on cytokine secretion in human monocyte-derived DC cell.

### 3) 초유 성분에 의한 항암효과 분석

*In vitro* 에서 면역세포인 DC의 활성을 유도하는 능력은 생쥐 실험에서도 활성화된 DC세포를 주입하여 암이 유발된 생쥐에서도 그 효능을 입증하였다. 암 세포(B16F10)를 인위적으로 마우스의 상피조직에 이식 한 후 암조직을 유발하고 초유 성분에 의하여 분화된 DC를 정맥으로 투여하여 암 조직의 생성과 암 조직의 크기를 분석하였을 때 확연한 효능을 입증할 수 있었다(Fig. 15) 이러한 결과는 면역세포의 활성을 증가시키는 lactoferrin의 *in vitro* 실험의 결과와 일치하며 이는 생체 내에 존재하는 면역세포의 활성을 증가시키는 능력을 가지고 있음을 보여 준다

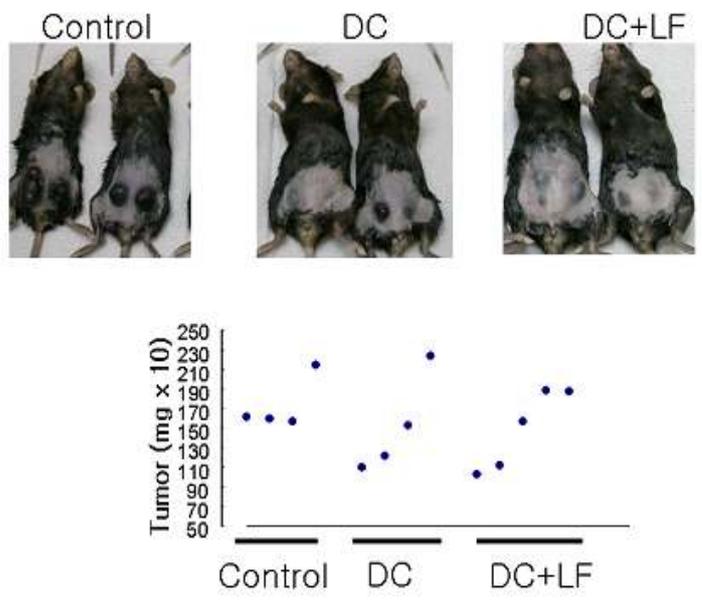


Fig. 15. Anti-cancer effect of DC cell by colostrum.

## 제 2 절 젖소 초유를 이용한 기능성 화장품 개발 및 임상시험

### 1. 초유로부터 기능성 화장품 개발에 필요한 성분 조사, 제조 및 *in vitro* 기능평가

#### 가. 세포독성평가

Fig. 16은 초유의 효과를 세포배양시스템을 이용하여 평가하기 위하여, 먼저 초유 성분이 일반 우유 성분과 차이가 있는지 전기영동방법을 통하여 비교하였다. 특히, 세포배양시스템에 적용하기 위해서는 초유의 멸균작업이 필요하기 때문에 filtration에 의한 멸균과정에서 초유성분에 변화가 생기는지 확인코자 하였다. 초유의 멸균작업을 위해서 0.45  $\mu\text{m}$  pore의 low protein binding membrane을 사용하였다. 전기영동 결과 출산 직후 수집한 0 일차 초유 및 1일, 2일차 초유는 일반 우유에 비해 50 kd 분자량의 단백질을 다량 함유하고 있었고 기타 고분자량의 여러 단백질을 함유하고 있었다. 또한 0.45  $\mu\text{m}$  low protein binding membrane을 사용하여 멸균 작업을 수행한 이후 단백질 조성의 변화가 거의 관찰되지 않았다.

Fig. 17은 초유가 세포에 독성을 미치는지 확인하기 위하여 사람의 비만세포주인 HMC-1 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$ 개가 되도록 seeding하여 하루 간 배양하고, 초유를 농도별로 첨가하여 하루 동안 더 배양하였다. 세포의 생존을 평가를 위해 MTT시약을 1 mg/ml로 처리한 후 4시간 더 배양하고, 배양액을 제거한 후 DMSO를 처리하여 insoluble 상태의 MTT를 용출 시켰다. 이를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가해 본 결과 초유 처리 농도가 10 mg/ml 정도까지 세포독성을 나타내지 않았다.

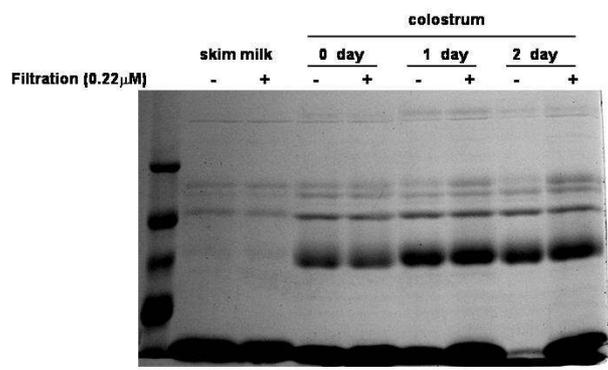
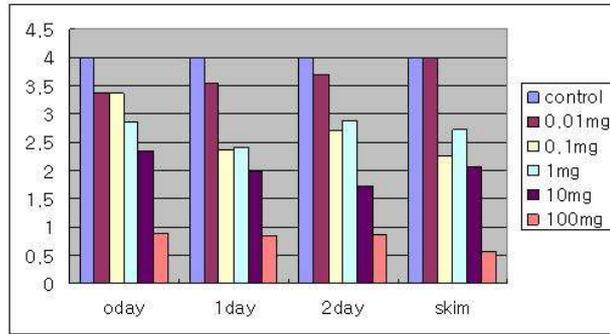


Fig. 16. SDS-polyacrylamide electrophoresis analysis of colostrum proteins.

### MTT assay



.yt i libaid lech

#### 나. 항산화능 평가

초유의 항산화능 평가는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다. Absolute ethanol을 이용해 0.1%와 0.01%로 희석한 sample 1 ml에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml를 가하여 mixing하고, 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, 반응물 흡광도를 spectrophotometer를 이용해 516nm에서 측정하였다. 이때 음성대조군으로는 ethanol을, 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene(BHT)을 사용하였다. Free radical 소거능을 나타내는 radical scavenging activity (%)는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Radical Scavenging activity (\%)} = 100 - (\text{OD}_{\text{exp.}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / \text{OD}_{\text{control}} \times 100$$

측정 결과, 출산후 0일차에 수집된 초유는 0.1% 농도에서 약 20%의 항산화능을 나타내었다. 그러나 대조군으로 사용한 BHT의 경우 0.001%에서 약 90%의 항산화능을 보여 상대적으로 초유는 항산화능이 없는 것으로 판단되었다.(Table 8)

Table 8. Antioxidant activity of colostrum

| Sample    | 농도 (%) | OD1    | OD2    | Average OD | 남은 DPPH양 (%) | 항산화력(%) |
|-----------|--------|--------|--------|------------|--------------|---------|
| Blank     | -      | 0.4189 | 0.4145 | 0.4167     | 100.0        | 0.0     |
| 대조군(BHT)  | 0.001  | 0.0411 | 0.0420 | 0.0416     | 10.0         | 90.0    |
| Day 2     | 0.1    | 0.4033 | 0.4061 | 0.4047     | 97.1         | 2.9     |
|           | 0.01   | 0.4142 | 0.4260 | 0.4201     | 100.8        | 0.0     |
| Day 1     | 0.1    | 0.4062 | 0.4123 | 0.4093     | 98.2         | 1.8     |
|           | 0.01   | 0.4189 | 0.4243 | 0.4216     | 101.2        | 0.0     |
| Day 0     | 0.1    | 0.3274 | 0.3350 | 0.3312     | 79.5         | 20.5    |
|           | 0.01   | 0.3982 | 0.3971 | 0.3977     | 95.4         | 4.6     |
| Skim Milk | 0.1    | 0.3797 | 0.3689 | 0.3743     | 89.8         | 10.2    |
|           | 0.01   | 0.4048 | 0.4235 | 0.4142     | 99.4         | 0.6     |

다. 비만세포를 이용한 항알러지 효능 평가

비만세포 (mast cell)는 세포내 granule안에 히스타민, protease, leukotriene 및 각종 사이토카인을 포함하고 있는 세포로서, 특히 외부항원에 의해 IgE가 활성화되면 이에 반응하여 급격하게 mediators를 세포외로 분비한다. 그 결과, 혈관확장, 혈관침투성 증가 및 다양한 염증관련 세포의 조직내 침윤을 유도함으로써 알러지 유발에 결정적 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 외부 항원에 의한 비만세포의 활성을 효과적으로 억제 할 경우 알러지 유발을 억제할 수 있을 것으로 기대된다. 초유의 항알러지 효과를 in vitro 실험방법으로 조사해 보기 위하여, 비만세포주인 MHC-1세포를 이용하였다. MHC-1를 활성화 시키기 위하여 0.25  $\mu$ M A23187과 0.05  $\mu$ M PMA를 이용하였다. 초유를 농도별로 처리한 후 30분간 배양하고, A23187 및 PMA를 첨가한 후 염증 매개 사이토카인인 IL-5 와 TNF alpha의 유전자 발현이 영향을 받았는지 RT-PCR을 수행 하였다. 그 결과, 초유는 IL-5와 TNF alpha의 유전자 발현을 유의할만한 수준으로 감소시킴을 알 수 있었다.(Fig. 18)

초유가 염증 매개성 사이토카인인 IL-5와 TNF alpha 의 유전자 발현을 억제하는 기전을 살펴보기 위하여 비만세포의 활성화에 관련된 여러 signaling molecule의 활성화 정도를 Western blot 방법으로 살펴 보았다. HMC-1세포를 A23187 및 PMA로 활성화 시킬 경우 p38, JNK, p42/44 ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성이 증가함을 알 수 있었다. 초유를 전처리한 비만세포의 경우 p38, JNK, p42/44 ERK의 활성이 현저히 억제됨을 알 수 있었다.(Fig. 19)

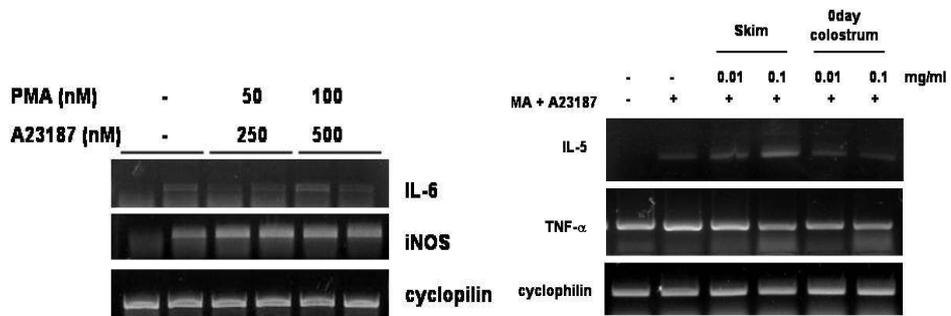


Fig. 18. Effect of colostrum on the mast cell activation. After mast cell activation, mRNA levels for proinflammatory cytokines and iNOS are determined by RT-PCR.

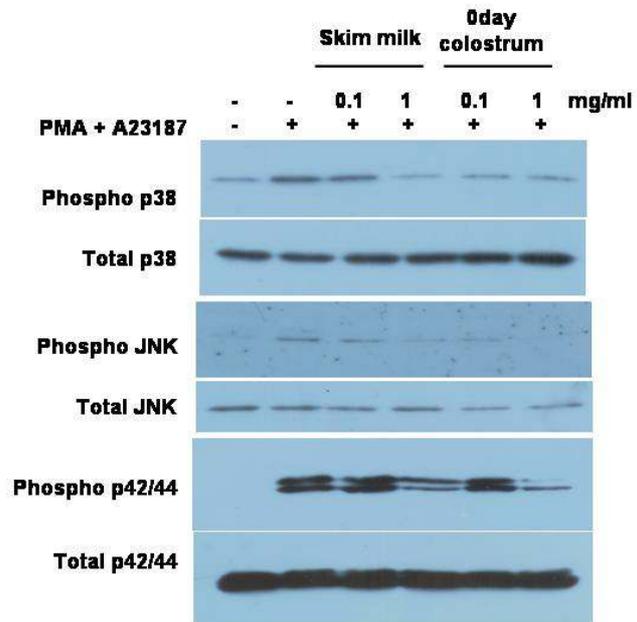


Fig. 19. Effect of colostrum on the activation of intracellular signaling cascades in mast cells.

#### 라. 대식세포를 이용한 항염증효과 평가

대식세포 (macrophage)인 Raw 264.7 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양하였다. 대식세포 활성을 위해 lipopolysaccharide를 처리 하였다. 대식세포는 알러지성 염증반응을 매개하는 중요한 면역세포로서 LPS와 같은 외부항원 자극 시 Cox-2, IL-6, TNF-alpha 및 iNOS 등과 같은 염증 매개성 사이토카인의 유전자 발현이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 초유가 대식세포에서 이러한 염증 매개성 사이토카인의 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 RT-PCR로 확인해 본 결과, 초유에 의한 염증매개성 사이토카인 유전자 발현은 억제되지 않는 것을 알 수 있었다. 흥미롭게 filter를 이용하여 멸균하지 않은 초유의 경우는 오히려 대식세포 활성을 유도하였다. 이러한 결과는 멸균되지 않은 초유의 경우 대식세포를 자극할 수 있는 미생물이 완전히 제거되지 않은 결과로 생각된다.(Fig. 20)

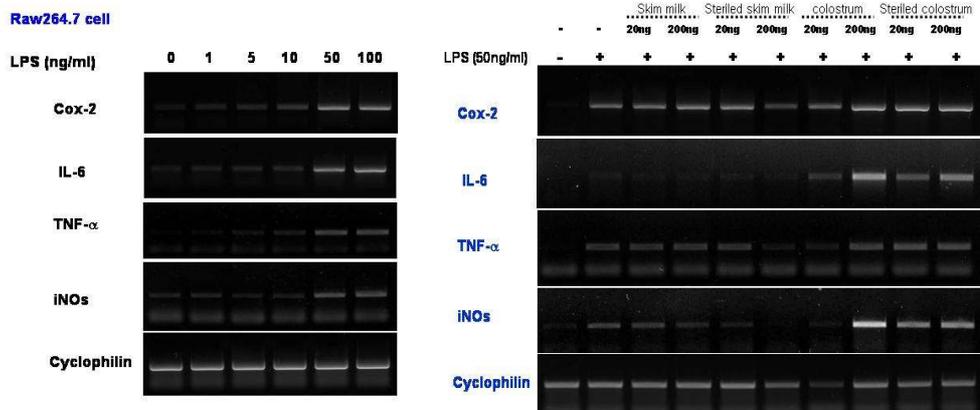


Fig. 20. Effect of colostrum on the macrophage activation. After macrophage activation, mRNA levels for proinflammatory cytokines and mediators are determined by RT-PCR.

## 2. 기능성 화장품 개발 및 in vivo 기능 평가

### 가. Compound 48/80-induced skin reaction

비만세포 의존적 알러지성 염증에 대한 효과를 검증하기 위하여 스킷 Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 compound 48/80-induced skin reaction을 유도하였다. 초유를 3일간 경구투여 또는 단회 경피투여 한 후, 0.1% compound 48/80 용액을 등쪽 피부에 intradermal 주사하였다. 약 30분 후 1% Evans blue 용액을 꼬리 정맥에 주사하고 1시간 후 흰쥐를 도살하여 피부를 적출하였다. 초유의 항알러지 효능은 육안 판정 하였다. 초유는 경구투여 및 경피투여 모두에서 대조군에 비해 현저한 항알러지 효과를 나타내었다. 특히 3일간 sonde를 통해 경구투여한 실험군에서 현저한 항알러지 효과를 나타내었다.(Fig.21)

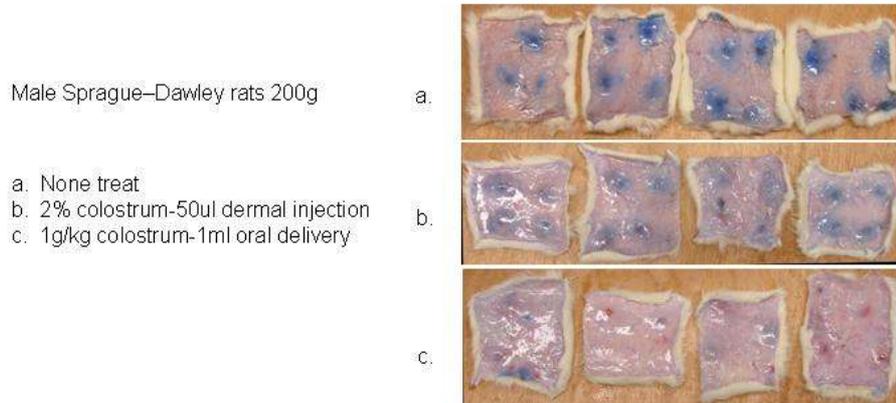


Fig. 21. Effect of colostrum on the compound 48/80-induced passive cutaneous anaphylaxis reaction.

#### 나. 각질분화에 대한 영향

아토피와 같은 만성피부질환의 원인은 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 아토피 피부염의 경우 특징적으로 표피층이 두꺼워져 있으며 각질형성세포가 빠르게 분열하면서 분화가 비정상적으로 일어남이 잘 알려져 있다. 이러한 각질형성세포의 비정상적 분화는 피부장벽의 손실을 유래하여 건조피부를 유발시키고 외부로부터의 항원물질에 대한 피부방어 기능을 현저히 떨어뜨리게 된다. 본 연구에서는 초유가 각질형성세포의 분화에 어떠한 영향을 주는지 살펴봄으로써 아토피피부염에 적용이 가능한 기능성 소재로서의 가능성을 확인코자 하였다. 이를 위해 사람의 포피로부터 분리배양한 각질형성세포에 초유를 농도별로 처리하고 각질분화가 일어날 때 증가하는 몇몇 구조 단백질의 변화를 Western blot analysis로 확인하였다. 그 결과, 초유처리에 의해 각질형성세포의 후기 분화마커인 filaggrin과 loricrin이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 또한 초기 분화마커인 K1, K10, involucrin 등의 발현도 증가함을 확인하였다. 그러나 기저막세포 마커인 K14는 큰 영향을 받지 않았다. 이러한 결과로부터 초유가 각질형성세포의 분화를 촉진하는 효과가 있음을 확인하였으며, 비정상 각질분화에 기인하는 아토피와 같은 만성피부질환에 적용이 가능할 것으로 생각된다.(Fig. 22)

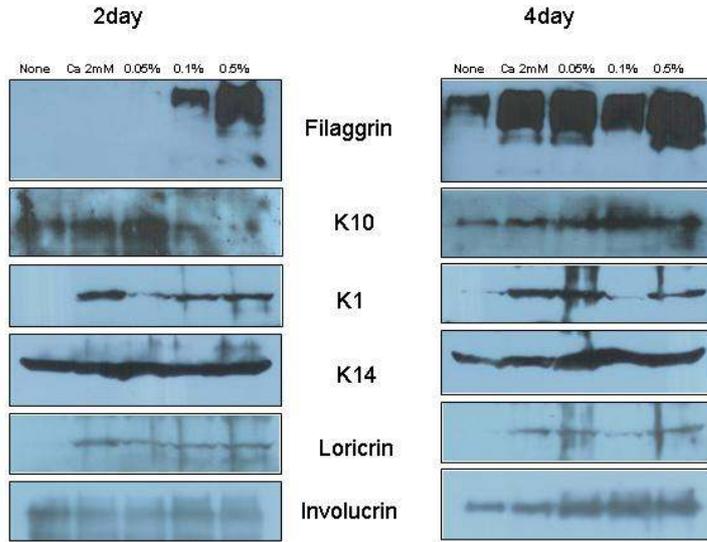


Fig. 22. Effect of colostrum on the keratinocyte differentiation.

#### 다. 피부 보습에 대한 영향

아토피의 경우 비정상 각질분화로 인한 피부장벽의 손실은 피부의 보습능을 현저히 떨어뜨리고 이로 인해 건조피부 유발 및 심한 소양증을 동반하게 된다. 그러므로 아토피 치료에 있어 가장 효과적인 방법 중의 하나가 피부 보습능을 증가시키는 것이라 할 수 있다. 각질형성세포에서 보습에 관여하는 물질로는 natural moisturizing factor 및 glycerol 등을 들 수 있다. 본 연구에서는 초유가 각질형성세포내로 glycerol uptake을 얼마나 많이 촉진 할 수 있는지 방사선동위원소가 표지된 glycerol을 이용하여 평가 하였다. 그 결과, 초유는 glycerol uptake에는 큰 영향이 없는 것으로 생각 되었다. 이와 더불어 피부 탄력도와 관련이 있는 elastase 효소에 대한 억제능을 살펴본 결과 현저한 elastase inhibition potential을 보여 피부탄력 개선에 도움을 줄 수 있으리라 생각되었다.(fig. 23)

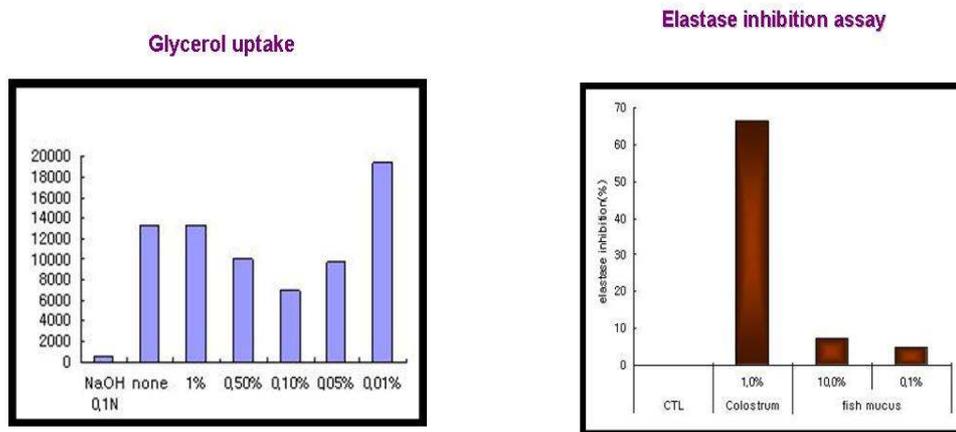


Fig. 23. Effect of colostrum on the glycerol uptake and elastase activity.

라. 상처회복에 대한 영향

초유성분이 상처회복을 촉진시키는지 확인하기 위하여 rabbit ear model을 이용하여 실험 하였다. 토끼 귀의 안쪽 면에 6mm biopsy puch를 이용하여 incision wound를 만들고 초유를 1일 1회 씩 7일간 도포 하였다. 그 결과, 대조군에 비해 초유처리군의 경우 상처회복이 현저히 증가 되지는 않았다. 그러나 진피부에 형성되는 granulation tissue의 변화는 초유 처리군에서 약간 증가한 양상을 나타내어 초유가 상처회복에 어느 정도 도움을 주리라 판단되었다.(Fig. 24, 25)

**PCNA - 1:200**

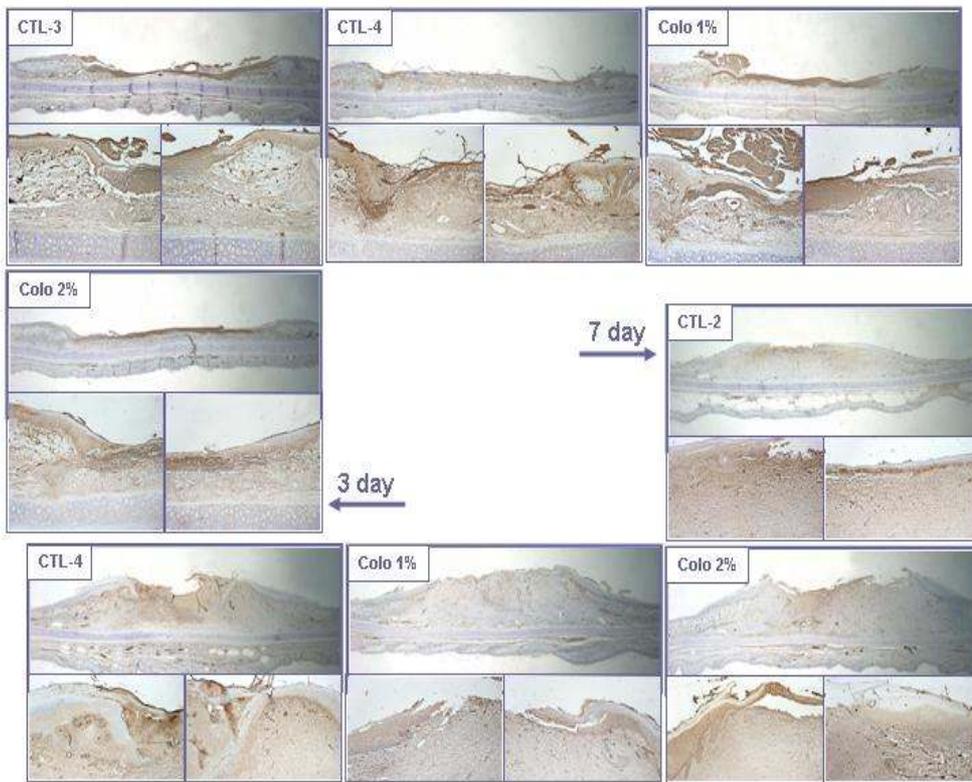


Fig. 24. Effect of colostrum on the wound healing.

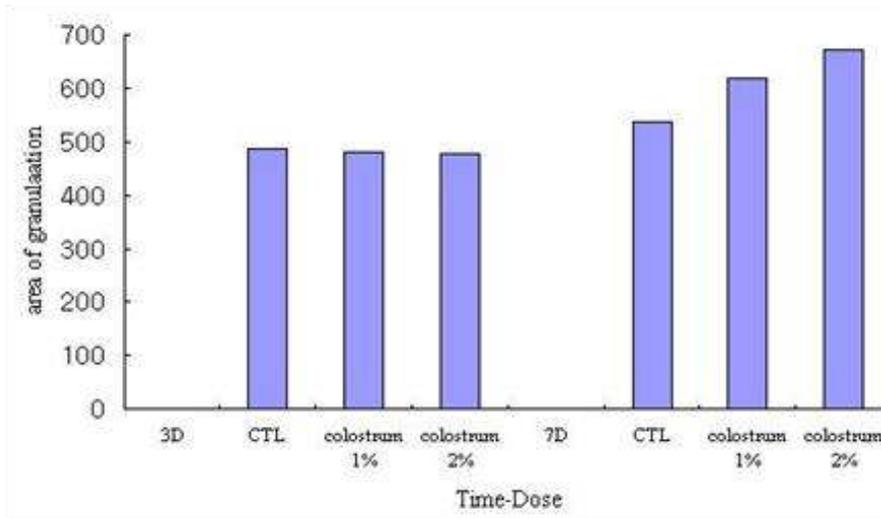


Fig. 25. Effect of colostrum on the granulation tissue formation during the wound healing process.

### 3. 기능성 화장품의 임상 실험

#### 가. 기능성화장품 처방 확정

기능성화장품의 처방 및 규격은 Table 9, 10과 같다. 초유를 포함하는 기능성화장품으로 로션 및 크림을 제조하였다.(Fig. 26)

Table 9. Formulation for functional cosmetics

|                         | <b>Atopy lotion ingredient</b>            |           |
|-------------------------|---|-----------|
| function                | INCI Name                                 | Sample(%) |
| solvent                 | Purified Water                            | 53.020    |
| Humectant               | 1,3 Butylene glycol                       | 7.000     |
| Humectant               | Glycerine                                 | 6.000     |
| Skin conditioning agent | Caprylic/Capric triglyceride              | 4.000     |
| Skin conditioning agent | Portulaca oleracea extract                | 4.000     |
| surfactant              | C14-22 Alcohols                           | 3.000     |
| Majer agent             | colostrum                                 | 2.000     |
| Skin conditioning agent | Butylene glycol dicaprylate/dicaprate     | 2.000     |
| surfactant              | Stearic acid                              | 2.000     |
| Emollient               | Macadamia Ternifolia seed oil             | 2.000     |
| Emollient               | Squalane                                  | 2.000     |
| Skin conditioning agent | Beta-glucan                               | 2.000     |
| Skin conditioning agent | Hordeum vulgare extract                   | 2.000     |
| Skin conditioning agent | Carthamus tinctorious seed oil            | 1.950     |
| Skin conditioning agent | ceramide.                                 | 1.000     |
| surfactant              | Cetostearyl alcohol                       | 1.000     |
| Antioxidant             | Tocopheyl acetate                         | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Lonicera japonica flower extract          | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Angelca acutiloba root extract            | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Sophora angustifolia extract              | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Ophiopogon japonicus root extract         | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Ulmus davidiana root extract              | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Paeonia albiflora root extract            | 0.500     |
| Skin conditioning agent | Polygonum multiflorum root extract        | 0.500     |
| Emollient               | Dimethecone                               | 0.200     |
| Preservative            | Phenoxyethanol                            | 0.200     |
| Preservative            | Methyl paraben                            | 0.200     |
| skin protectant         | Allantion                                 | 0.100     |
| pH control agent        | Triethanolamine                           | 0.100     |
| Emollient               | Melaleuca alternifolia(Tea tree) leaf oil | 0.060     |
| Preservative            | Propyl paraben                            | 0.050     |
| Emollient               | Vitis vinifera oil                        | 0.050     |
| skin protectant         | Dipotassium glycyrrhizate                 | 0.050     |
| Antioxidant             | Butylated hydroxy toluene                 | 0.020     |

| <b>Atopy cream ingredient</b> |   |           |
|-------------------------------|---|-----------|
| function                      | INCI Name                                 | Sample(%) |
| solvent                       | Purified Water                            | 61.140    |
| Humectant                     | 1,3 Butylene glycol                       | 5.000     |
| Humectant                     | Glycerine                                 | 4.000     |
| surfactant                    | Cetostearyl alcohol                       | 3.770     |
| surfactant                    | Cetearyl olivate                          | 2.620     |
| Emollient                     | Macadamia Ternifolia seed oil             | 2.600     |
| Emollient                     | Carthamus tinctorious seed oil            | 2.600     |
| Emollient                     | Squalane                                  | 2.600     |
| Majer agent                   | colostrum                                 | 2.000     |
| Skin conditioning agent       | ceramide.                                 | 2.000     |
| Skin conditioning agent       | Portulaca oleracea extract                | 2.000     |
| Skin conditioning agent       | Beta–glucan                               | 2.000     |
| Skin conditioning agent       | Hordeum vulgare extract                   | 2.000     |
| Skin conditioning agent       | Lonicera japonica flower extract          | 1.000     |
| surfactant                    | Stearic acid                              | 0.950     |
| surfactant                    | Glyceryl sterate                          | 0.530     |
| Antioxidant                   | Tocopheyl acetate                         | 0.520     |
| Emollient                     | Dimethecone                               | 0.500     |
| Skin conditioning agent       | Angelca acutiloba root extract            | 0.500     |
| Skin conditioning agent       | Sophora angustifolia extract              | 0.500     |
| Skin conditioning agent       | Ophiopogon japonicus root extract         | 0.500     |
| Skin conditioning agent       | Ulmus davidiana root extract              | 0.500     |
| Skin conditioning agent       | Paeonia albiflora root extract            | 0.500     |
| Skin conditioning agent       | Polygonum multiflorum root extract        | 0.500     |
| viscosity increasing agent    | Cabomer                                   | 0.200     |
| Preservative                  | Phenoxyethanol                            | 0.200     |
| Preservative                  | Methyl paraben                            | 0.200     |
| pH control agent              | Triethanolamine                           | 0.200     |
| skin protectant               | Allantion                                 | 0.100     |
| Emollient                     | Melaleuca alternifolia(Tea tree) leaf oil | 0.100     |
| Preservative                  | Propyl paraben                            | 0.050     |
| Emollient                     | Vitis vinifera oil                        | 0.050     |
| skin protectant               | Dipotassium glycyrrhizate                 | 0.050     |
| Antioxidant                   | Butylated hydroxy toluene                 | 0.020     |

Table 10. Specifications of functional cosmetics

Atopy lotion 규격 (2007.2)

| 항목           | 기준  | 기준                 | 시험법                    | 비고                                     |
|--------------|---|--------------------|------------------------|--|
| 1.성상         | 백색의 로션  |                    | 표준품과 비교                | 전제품을 대상으로 시험                           |
| 2.향취         | 특이취가있음 (표준품과 관능적으로동일)                                 |                    | 표준품과 비교                | 전제품을 대상으로 시험                           |
| 3.내용량        | 표기량에 대하여 100%이상                                       |                    | 식약청고시 2003-23호         | 전제품을 대상으로 시험                           |
| 4.물리,화학적 특성  | pH  | 5.5~7.5            | 식약청고시 2003-23호         | 액상 눈화장용 크림 립스틱류에 대하여 시험 (크린싱및 셰이빙크림제외) |
|              | 점도  | 25000~35000cps(#3) | 자가시험법 (Brookfield 점도계) | 점조성액, 로션성상의 제품에 대하여 시험                 |
|              | 경도  | 해당사항없음             | 자가시험법 (Rheo meter 사용)  | 크림성상의 제품에 대하여 시험                       |
|              | 납   | 해당사항없음             | 식약청고시 2003-23호         | 메이크업, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험    |
|              | 비소  | 해당사항없음             | 식약청고시 2003-23호         | 메이크업, 눈화장용, 샴푸, 린스 및 헤어스프레이에 대하여 시험    |
|              | 수은  | 해당사항없음             | 식약청고시 2003-23호         | 기초화장품용 제품류중 크림류에 대하여 시험                |
|              | 메탄올   | 해당사항없음             | 식약청고시 2003-23호         | 에탄올이 4% 초과 함유된 제품에 대하여 시험              |
|              | 주성분   | 해당사항없음             | 식약청고시 2003-23호         | 기능성 화장품에 대하여 시험                        |
| 5.일반세균및 특정세균 | 일반세균 100cfu/g이하 특정세균 불검출                              |                    | 대한약전 일반 시험법            | 전제품을 대상으로 시험                           |
| 6.안정도        | 5, 35, 45도 3일간 안정                                     |                    | 자가시험법                  | 전제품을 대상으로 시험                           |
| 7.포장및 표시사항   | 작업표준및 제품의 표시사항에 따르고 인쇄상태 표시상태 외관등은 표준품과 비교하여 대등하여야 한다 |                    | 표준품과 비교                | 전제품을 대상으로 시험                           |



Fig. 26. Sample of functional cosmetic including colostrum.

나. 초유함유 화장품의 단회투여 독성 평가

흰쥐 (rat)에 대한 단회투여독성을 평가하기 위하여 여부를 조사하기 위하여, 실험동물을 control, PBS처리군, 초유크림 처리군, 초유팩 처리군의 4군으로 나누고 각 군당 오차를 줄이기 위해 2마리씩 실험하였다. 시험에 앞서 물질 투여 전 체중 측정을 측정하고 시험군에 sonde로 1 ml의 초유함유화장품을 경구투여 한 후 처리 후 5시간까지 1시간단위로 생체변화(운동성, 호흡, 경련 등)를 관찰 하였으며, 1일 단위로 체중을 측정하였다. 시험개시 2주 후 장기를 적출하여 무게를 측정한 후 10% 포르말린으로 고정하고 파라핀 포매하여 조직학적으로 관찰 하였다. 그 결과, 초유함유화장품 투여 후 5 시간까지 특이할 만한 생체변화는 관찰되지 않았으며, 2 주까지 체중 변화도 관찰되지 않았다. 또한 조직학적 소견 상 초유함유화장품 처리군에서 장기별 특이 사항을 발견하지 못하였다.9fig. 27, 28, 29, Table 11)

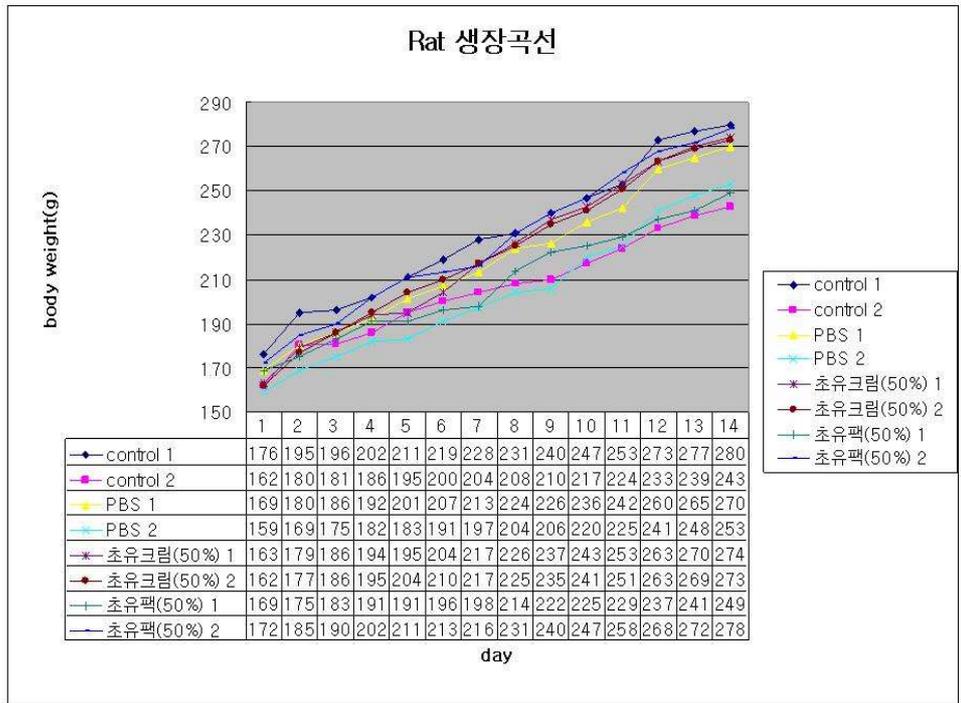


Fig. 27. Acute toxicity of colostrum-containing cosmetics.

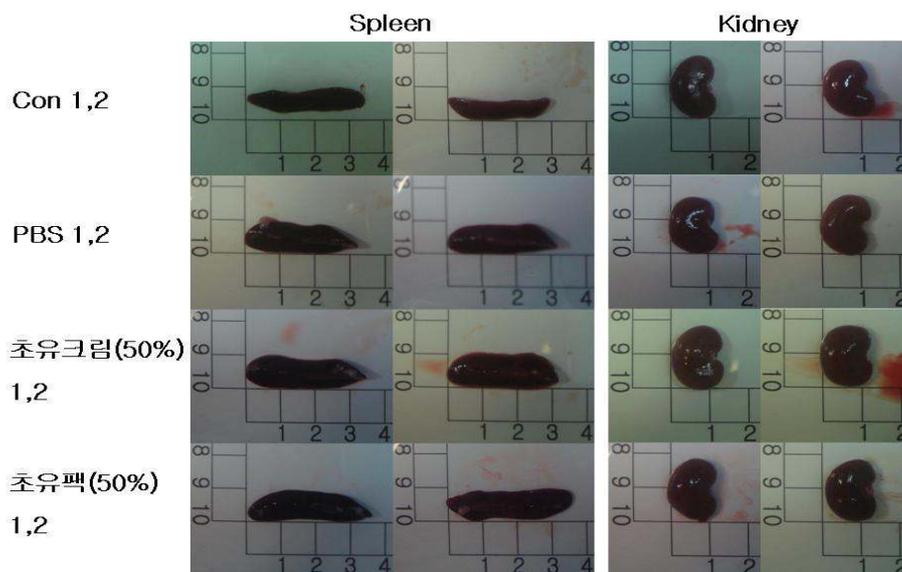
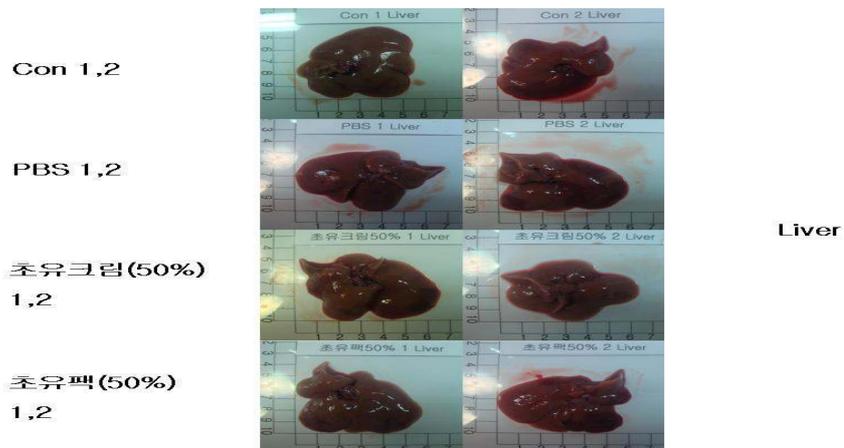


Fig. 28. Toxicity test of oral colostrum-containing cosmetics. After eating the colostrum-containing cosmetics, toxicity of internal organs such as spleen, kidney and liver were examined.

Table 11. Cytotoxicity test in spleen, liver, kidney of cosmetic including colostrum.

| Group     | Number | 체중(g) |           | Sample |        |        |
|-----------|--------|-------|-----------|--------|--------|--------|
|           |        |       |           | spleen | liver  | kidney |
| con       | rat1   | 269   | 중량(g)     | 0.536  | 13.301 | 1.119  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.049  | 2.088  |
|           | rat2   | 232   | 중량(g)     | 0.412  | 11.226 | 1.033  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.048  | 2.507  |
| PBS       | rat3   | 254   | 중량(g)     | 0.576  | 13.364 | 1.040  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.053  | 1.806  |
|           | rat4   | 242   | 중량(g)     | 0.594  | 13.130 | 1.050  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.054  | 1.768  |
| 초유크림(50%) | rat5   | 274   | 중량(g)     | 0.604  | 14.572 | 1.122  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.053  | 1.858  |
|           | rat6   | 261   | 중량(g)     | 0.626  | 13.166 | 1.051  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.050  | 1.679  |
| 초유팩(50%)  | rat7   | 244   | 중량(g)     | 0.616  | 15.361 | 1.259  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.003  | 0.063  | 2.044  |
|           | rat8   | 283   | 중량(g)     | 0.692  | 12.558 | 1.329  |
|           |        |       | 비율(중량/체중) | 0.002  | 0.044  | 1.921  |

|            | 1      |       |        | 2      |       |        |
|------------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|
|            | Spleen | Liver | Kidney | Spleen | Liver | Kidney |
| Control    |        |       |        |        |       |        |
| PBS        |        |       |        |        |       |        |
| 조유크림 (50%) |        |       |        |        |       |        |
| 조유팩 (505)  |        |       |        |        |       |        |

Fig. 29. Histologic examination of internal organs after eating colostrum-containing cosmetics.

#### 다. 초유함유 화장품의 안자극성 평가

초유함유 화장품의 안자극성을 평가하기 위하여 흰 토끼 (New Zealand white rabbit)을 이용하였다. 토끼의 한 쪽 눈에 액체시료는 0.1 ml, 고체시료는 100 mg을 적하(滴下)하고 다른 쪽 눈은 비교를 위하여 그대로 두었다. 테스트 물질을 1 분간 적하 후 흐르는 물로 씻어내고 24, 48, 72시간 후 안구 손상의 유무를 확인 하였다. 그 결과, 초유함유 화장품에 의한 안자극은 관찰되지 않았다.(Fig. 30)



Fig. 30. Draize eye irritation test of colostrum-containing cosmetics.

라. 초유함유 화장품의 피부자극성 평가

초유함유 화장품의 피부자극성을 평가하기 위하여 흰 토끼 (New Zealand white rabbit)을 이용하였다. 토끼의 피부를 제모 후, 제모 부위에 초유함유 화장품을 도포하고 1, 24, 48, 72시간 후 피부 홍반 및 부종을 검사하였다. 그 결과, 초유함유 화장품에 의한 피부자극은 관찰되지 않았다.(Fig. 31)



Fig. 31. Draize skin irritation test of colostrum-containing cosmetics.

마. 초유함유 화장품의 인체 자극성

자원자를 대상으로 초유함유 화장품 (크림)의 자극성 간이 임상을 실시하고, 임상 양상에 따라 평균피부 반응도를 산출한 후 이를 이용하여 시료의 반응도를 판정 하였다. 그 결과 모든 초유함유 화장품 (크림)은 무자극을 나타내어 피부자극성이 없는 것을 알 수 있었다.(Table 12)

Table 12. Human skin irritation test.

| 피험자<br>번호 | 나이/성별 | 결과    |       |
|-----------|-------|-------|-------|
|           |       | 48시간후 | 96시간후 |
| 1         | 38/F  | -     | -     |
| 2         | 34/M  | -     | -     |
| 3         | 32/M  | -     | -     |
| 4         | 24/F  | -     | -     |
| 5         | 24/F  | -     | -     |
| 6         | 28/F  | -     | -     |
| 7         | 24/F  | -     | -     |
| 8         | 30/F  | -     | -     |
| 9         | 29/M  | -     | -     |
| 10        | 26/M  | -     | -     |
| 11        | 31/F  | -     | -     |
| 12        | 26/F  | -     | -     |
| 13        | 29/F  | -     | -     |
| 14        | 28/M  | -     | -     |
| 15        | 29/M  | -     | -     |
| 16        | 27/M  | -     | -     |
| 17        | 24/M  | 1+    | 1+    |
| 18        | 24/F  | -     | -     |
| 19        | 24/F  | -     | -     |
| 20        | 41/F  | -     | -     |

바. 초유함유 화장품의 피부보습효과

피험자의 상박부를 대상으로 하여 초유함유 화장품 (크림) 도포 전과 도포 후의 피부 보습 상태를 corneometer 및 Tewameter로 측정 하였다. Corneometer 결과 도포 전 대비 화장품 도포 후의 평균 피부 수분 증가율은 59.66% 였다. 또한 Tewameter 를 이용한 피부 수분 증발도 측정 결과, 경피 수분증발을 평균 23.73% 낮추는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼때, 초유함유 화장품은 피부 보습에 우수한 효과가 있는 것으로 생각된다.(Table 13)

Table 13. Skin water-holding capacity of cosmetic including colostrum.

| 번호 | 성명  | 나이/<br>성별 | corneometer(수분함유도) |        |        |        |        | Tewameter(수분증발도) |        |        |        |        | TEMP  | HUMID |
|----|-----|-----------|--------------------|--------|--------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
|    |     |           | 도포전                | 10'(1) | 10'(2) | 10'(3) | 10'(4) | 도포전              | 10'(1) | 10'(2) | 10'(3) | 10'(4) |       |       |
| 1  | 이영숙 | 38/F      | 20.40              | 36.60  | 31.00  | 39.80  | 34.70  | 8.10             | 7.70   | 6.10   | 7.10   | 6.60   | 24.80 | 27.80 |
| 2  | 김진화 | 34/M      | 23.20              | 41.00  | 41.50  | 39.40  | 43.20  | 8.60             | 9.70   | 6.20   | 8.30   | 7.60   | 24.20 | 27.50 |
| 3  | 최태영 | 32/M      | 29.30              | 42.30  | 41.30  | 44.00  | 41.10  | 9.90             | 10.70  | 7.70   | 9.00   | 8.70   | 26.70 | 30.70 |
| 4  | 김미운 | 24/F      | 18.40              | 21.70  | 35.60  | 27.00  | 27.80  | 11.60            | 11.70  | 9.50   | 10.00  | 8.70   | 24.40 | 27.40 |
| 5  | 정소영 | 24/F      | 24.80              | 38.90  | 41.80  | 41.80  | 43.40  | 7.00             | 6.80   | 5.80   | 7.40   | 6.60   | 24.40 | 26.80 |
| 6  | 시가  | 28/F      | 32.80              | 35.10  | 43.40  | 42.80  | 54.50  | 9.00             | 11.20  | 8.30   | 10.10  | 9.10   | 24.70 | 28.40 |
| 7  | 이옥문 | 24/F      | 21.20              | 25.10  | 45.40  | 45.10  | 35.40  | 12.50            | 9.00   | 7.90   | 9.00   | 7.20   | 24.20 | 26.60 |
| 8  | 최대경 | 30/M      | 20.70              | 37.60  | 39.40  | 44.00  | 44.70  | 10.10            | 11.60  | 8.90   | 9.80   | 9.60   | 25.20 | 26.50 |
| 9  | 안세진 | 29/M      | 25.50              | 33.20  | 38.50  | 27.90  | 35.00  | 7.70             | 7.00   | 8.60   | 9.60   | 7.80   | 27.00 | 32.50 |
| 10 | 육재민 | 26/M      | 29.60              | 33.90  | 49.50  | 36.40  | 35.80  | 10.10            | 8.80   | 8.80   | 9.30   | 8.40   | 27.10 | 33.00 |
| 11 | 윤현경 | 31/F      | 30.80              | 39.50  | 48.10  | 37.10  | 35.10  | 10.90            | 9.40   | 8.10   | 8.40   | 7.20   | 24.90 | 28.00 |
| 12 | 장선혜 | 26/F      | 33.60              | 43.00  | 43.00  | 30.30  | 45.00  | 12.50            | 11.60  | 9.20   | 11.70  | 8.40   | 24.40 | 27.00 |
| 13 | 권유빈 | 29/F      | 35.00              | 48.00  | 45.40  | 42.10  | 37.30  | 39.30            | 8.70   | 8.30   | 11.30  | 8.30   | 24.40 | 28.50 |
| 14 | 박지훈 | 28/M      | 18.00              | 56.10  | 52.60  | 47.90  | 48.80  | 13.40            | 26.00  | 14.20  | 14.80  | 14.00  | 27.10 | 32.10 |
| 15 | 서강식 | 29/M      | 28.70              | 29.60  | 47.70  | 32.70  | 39.30  | 21.80            | 8.80   | 7.20   | 7.30   | 6.90   | 26.40 | 31.80 |
| 16 | 허준영 | 27/M      | 12.80              | 32.20  | 36.80  | 38.90  | 35.70  | 17.00            | 31.40  | 11.80  | 22.20  | 10.70  | 26.70 | 29.20 |
| 17 | 형계풍 | 24/M      | 18.30              | 27.8   | 29.6   | 24.00  | 23.8   | 8.40             | 8.30   | 8.60   | 6.00   | 7.50   | 27.1  | 30.3  |
| 18 | 황혜경 | 24/F      | 31.30              | 52.6   | 39.5   | 61.8   | 38.7   | 9.70             | 10.00  | 8.30   | 9.50   | 9.30   | 24.0  | 27.3  |
| 19 | 문혜정 | 24/F      | 33.00              | 56.50  | 57.20  | 47.90  | 41.50  | 55.30            | 11.70  | 8.80   | 15.50  | 10.70  | 23.9  | 27.6  |
| 20 | 이경미 | 41/F      | 23.80              | 34.20  | 48.10  | 37.20  | 33.90  | 8.80             | 10.70  | 9.40   | 10.90  | 9.00   | 23.9  | 26.9  |

### 제 3 절 젓소 초유를 이용한 자돈용 사료첨가제 개발

#### 1. 국내 초유 현황조사, 관리 체계 구축 및 초유 발효미생물 탐색

##### 가. 낙농가의 초유 현황 조사

충청남도과 충청북도 소재의 33개 목장을 대상으로 하여 “낙농가의 초유 현황 실태 조사” 라는 11개 항목으로 구성된 설문지를 통하여 초유의 현황을 조사하였다. 설문지 내용은 아래와 같다.

- 1) 귀하의 목장에서 사육하는 착유 두수는 몇 두 입니까?
- 2) 연간 생산되는 송아지는 몇 두 입니까?
- 3) 1일 두당 초유 생산량은 몇 kg 정도 입니까?
- 4) 1일 송아지가 섭취하는 초유 량은 몇 kg 정도 입니까?
- 5) 초유는 송아지에게 급여 후 남습니까?
- 6) 현재 급여 후 남는 초유는 어떻게 처리 합니까?
- 7) 잉여 초유를 이용할 방법을 개발할 필요성이 있다고 생각합니까?
- 8) 잉여 초유를 수집하는 회사가 있다면 판매 할 생각은 있습니까?
- 9) 판매할 생각이 있다면 초유 보관 시설을 설치할 의향은 있습니까?
- 10) 초유가격은 kg당 어느 정도가 적당하다고 생각합니까?

설문조사 내용을 통계 분석한 결과는 다음과 같다.

1) 귀하의 목장에서 사육하는 착유 두수는 몇 두 입니까?

설문대상 낙농가의 사육 두수는 1-20두부터 80두 이상 다양한 분포를 하고 있는데, 20-40두 미만인 낙농가가 약 46%를 차지하여 가장 높았다. 이어서 40-60두 미만인 낙농가가 30%로 그 다음으로 높았고, 80두 이상 사육하는 대규모 낙농가도 9%나 되는 것으로 나타났다. 1970년대, 80년대에는 20두 이하의 사육농가가 많았으나 90년대에 들어오면서 낙농가 당 사육두수는 점차 증가되어 낙농업을 전업으로 하는 농가가 증가하였다. 따라서 사육규모는 대형화되어 낙농업에 전념할 수 있고 사양관리를 효율적으로 하여 낙농가의 소득도 큰 폭으로 향상되는 추세이다.(Table 14)

Table 14. Milking head per dairy farm

| Milking head | Dairy farm number |
|--------------|-------------------|
| 1 ~ 19       | 3                 |
| 20 ~39       | 15                |
| 40 ~ 59      | 10                |
| 60 ~ 79      | 2                 |
| 80 ~         | 3                 |
| Total        | 33                |

2) 연간 생산되는 송아지 수는 몇 두 입니까?

설문대상 낙농가의 송아지 생산 두수는 20두미만은 9%, 20-40두 미만인 낙농가가 약 39%를 차지하였다. 40-60두 미만인 낙농가가 43%로 가장 높았고, 60-80두 미만으로 생산하는 낙농가도 3%나 되는 것으로 나타났다. 90년대에 들어오면서 낙농가당 사육두수가 증가됨에 따라 송아지 생산 두수도 비례적으로 점차 증가되고 있는 추세이다.(Table 15)

Table 15. Calf head per dairy farm

| Calf head   | Dairy farm number |
|-------------|-------------------|
| 1 ~ 19      | 3                 |
| 20 ~ 39     | 13                |
| 40 ~ 59     | 14                |
| 60 ~ 80     | 2                 |
| No response | 1                 |
| Total       | 33                |

3) 1일 두당 초유 생산량은 몇 kg 정도 입니까?

1일 두당 초유 생산량에 대한 설문대상 낙농가의 응답은 20-30kg 미만 생산하는 낙농가 및 30-40kg 미만 생산하는 낙농가가 각각 38%로 대부분을 차지하였고 10-20kg 미만 생산하는 낙농가는 9%로 나타났다. 따라서 대부분의 낙농가에서는 두당 1일 약 30kg의 초유를 생산하는 것을 알 수 있다.(Table 16)

Table 16. Colostrum production of head per day

| Production volume(kg) | Dairy farm number |
|-----------------------|-------------------|
| 1 ~ 9                 | 5                 |
| 10 ~ 19               | 5                 |
| 20 ~ 29               | 20                |
| 30 ~ 39               | 20                |
| 40 ~                  | 2                 |
| No response           | 1                 |
| Total                 | 33                |

4) 1일 송아지가 섭취하는 초유량은 몇 kg 정도입니까?

어미소가 생산하는 초유를 1일 송아지가 섭취하는 양은 46%의 낙농가가 4 kg으로 가장 높았고 그 다음이 3kg으로 24%를 차지하였다. 6kg 이상 섭취하는 낙농가도 15%로 나타났다. 설문 다에 나타난 바와 같이 두당 초유 생산량은 평균 30kg 정도로 보면 송아지가 섭취하는 양은 1일 약 5 - 6kg 정도임을 알 수 있다. 따라서 잉여분의 초유는 25kg 정도로 약 1/5 정도를 송아지가 섭취하고 4/5 정도는 남는다는 것을 알 수 있다.(Table 17)

Table 17. Colostrum intake of head per day

| Intake volume(kg) | Dairy farm number |
|-------------------|-------------------|
| 2                 | 1                 |
| 3                 | 8                 |
| 4                 | 15                |
| 5                 | 3                 |
| 6이상~              | 5                 |
| No response       | 1                 |
| Total             | 33                |

5) 초유는 송아지에게 급여 후 남습니까?

설문 라에서 두당 약 20kg 정도의 잉여초유가 발생하는 것으로 이미 밝혀진 바와 같이 초유를 송아지에게 급여 후 남는다고 응답한 낙농가는 85%로 나타났다. 이와 같이 대부분의 낙농가에서는 송아지에게 급여 후 잉여분의 초유가 발생하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 잉여초유의 이용에 관하여 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.(Table 18)

Table 18. Dairy farm numbers of extra colostrum

| Section     | Dairy farm number |
|-------------|-------------------|
| Extra       | 28                |
| No extra    | 3                 |
| No response | 2                 |
| Total       | 33                |

6) 현재 급여 후 남은 초유는 어떻게 처리 합니까?

초유 급여 후 잉여분을 낙농가에서 처리하는 방법은 설문 사에서 보는 바와 같이 가장 많은 낙농가가 버리는 것을 알 수 있었는데 약 35%의 농가나 되는 것으로 나타났다. 그 다음이 젓 떼 후에도 송아지에게 다시 급여하는 낙농가가 27%, 버리기 아까워서 냉동 및 냉장 보관하는 낙농가가 20%, 보관 후 급여하는 농가가 13%, 가타 다른 동물에게 급여하는 낙농가가 13%로 나타났다. 이와 같이 초유를 버리는 낙농가도 높지만 버리기 아까워서 다시 송아지에게 급여를 하던지 보관 후 급여 또는 다른 동물에게 급여하는 방법으로 초유를 이용하고 있는 실정이다.(Table 19)

Table 19. Consumption method of extra colostrum

| Section       | Dairy farm number |
|---------------|-------------------|
| Waste         | 10                |
| Calf intake   | 8                 |
| Storage       | 6                 |
| Waste/Storage | 4                 |
| Animal intake | 1                 |
| No response   | 1                 |
| Total         | 30                |

7) 잉여 초유를 이용할 방법을 개발할 필요성이 있다고 생각합니까?

잉여 초유를 이용할 방법을 개발할 필요성에 대한 설문에는 91%의 낙농가가 필요하다고 응답하였다. 이와 같이 대부분의 낙농가는 잉여 초유의 이용에 대하여 필요성을 느끼고 있는 것으로 밝혀졌다.(Table 20)

Table 20. Utilization of extra colostrum

| Section     | Farm no. |
|-------------|----------|
| Yes         | 30       |
| No          | 1        |
| No response | 2        |
| Total       | 33       |

8) 잉여 초유를 수집하는 회사가 있다면 판매 할 생각은 있습니까?

잉여 초유를 수집하는 회사가 있다면 판매 할 생각에 대한 설문에는 79%의 낙농가가 판매 할 생각이 있는 것으로 나타났다. 현재 국내에는 초유 제품을 생산하려는 분위기는 조성되어 있지만 초유를 수집하여 제품을 생산하는 회사는 아직까지 없다. 하지만 조만간 초유를 이용하여 제품을 생산하려는 회사가 있을 것으로 기대한다.(Table 21)

Table 21. Intention of extra colostrum selling

| Section     | Dairy farm number |
|-------------|-------------------|
| Yes         | 26                |
| No          | 6                 |
| No response | 1                 |
| Total       | 33                |

9) 판매할 생각이 있다면 초유 보관 시설을 설치할 의향은 있습니까?

잉여분의 초유를 판매할 생각이 있다면 보관 시설을 설치할 의향에 대한 설문에는 80%의 낙농가가 의향이 있다고 응답하였다. 초유를 이용하기 위해서는 착유한 초유의 위생적인 수집과 저온 저장 시설은 필수적인 사항이다. 초유 보관 시설을 설치하기 위해서 상당한 비용이 투자되어야 하는데도 불구하고 보관 시설을 설치할 의향이 있다는 낙농가가 80%가 된다는 것은 초유를 판매하여 낙농가 소득을 향상시키려는 의지가 강하다는 것으로 풀이된다.(Table 22)

Table 22. Intention of storage instrument of extra colostrum

| Section     | Dairy farm number |
|-------------|-------------------|
| Yes         | 22                |
| No          | 2                 |
| No response | 2                 |
| Total       | 26                |

10) 초유가격은 kg당 어느 정도가 적당하다고 생각합니까?

초유가격은 kg당 어느 정도가 적당한가라는 설문에는 1,000원 미만이 33%로 가장 높았고 1,000-2,000원은 12%, 무응답이 33%로 나타났다. 이러한 결과는 현재 원유 kg당 가격이 원유의 등급에 따라 차등지급을 하지만 1등급 원유가 700원 정도로 초유의 가격이 원유의 가격과 비슷한 정도의 수준을 요구하는 것으로 풀이된다.(Table 23)

Table 23. Selling price of extra colostrum

| Price/kg(won) | Dairy farm number |
|---------------|-------------------|
| 4,000         | 2                 |
| 4,000 ~3,000  | 2                 |
| 2,000 ~ 3,000 | 2                 |
| 1,000 ~ 2,000 | 4                 |
| 1,000         | 15                |
| No response   | 8                 |
| Total         | 33                |

#### 나. 초유수집 및 보존체계 구축

젖소로부터 착유한 초유의 위생적인 수집과 저온 저장은 초유를 이용하여 제품을 생산하는데 있어서 품질을 좌우하는 중요한 과정이다. 질 좋은 초유를 원료로 하여 생산하는 제품은 당연히 질 좋은 제품이 생산되는 것이다. 초유의 질이 좋으려면 원유를 착유하는 과정과 같이 착유단계에서부터 미생물의 오염을 최대한 줄이기 위하여 위생적인 환경과 착유한 초유의 보존 및 관리가 동시에 이루어져야 한다. 특히 초유는 송아지가 먹은 후 잉여분을 제품으로 생산하기 때문에 세심한 관리가 필요하다. 따라서 낙농가의 규모나 환경에 맞게 초유를 수집·보존 및 이용하는 방법을 강구하여야 할 것이다.

젖소로부터 착유한 초유를 이용하여 제품을 생산하기 위해서는 질 좋은 초유를 원료로 사용하여 제품을 생산해야만 한다. 초유의 질이 좋으려면 착유단계에서부터 미생물의 오염을 최대한 줄이기 위하여 위생적인 환경과 착유한 초유의 보존 및 관리가 동시에 이루어져야 한다. 따라서 낙농가의 규모에 맞게 초유를 수집하고 보존하는 방법을 제안한다(그림 1). 그림 1에서 보는 바와 같이 우선 초유를 수집 할 낙농가를 엄격한 기준에 의해 선정한다. 원유를 유업회사에 납유 할 때 평가받은 등급을 참고로 하여 질 좋은 원유를 생산한 낙농가를 선정한다. 특히 송아지 분만 후 어미소는 질병 감염의 위험성으로 인해 항생제를 투여하는 경우가 꽤 있다. 따라서 초유에 항생제가 이행하기 때문에 상당한 문제를 야기 시킬 수 있다. 그래서 목장을 선정 할 때 항생제를 투여하지 않은 목장을 선정하고 착유단계에서부터 미생물의 오염을 최대한 줄이기 위하여 위생적으로 착유한다. 착유한 초유는 낙농가 별로 정기적으로 항생물질 및 미생물, 일반성분, 체세포 검사를 통하여 엄격하게 초유의 질을 관리한다.

착유한 초유는 즉시 냉각기로 이동시켜 4℃로 보존하면서 착유 시 오염된 미생물의 증식을 억제시킨다. 냉각장치가 구비된 탱크롤리로 낙농가에서 보존하고 있는 초유를 집유하여 제품 생산 공장으로 이동한다. 생산 공장에서는 집유 한 초유를 제품생산에 맞게 처리하여 제품을 생산한다.(Fig. 32)

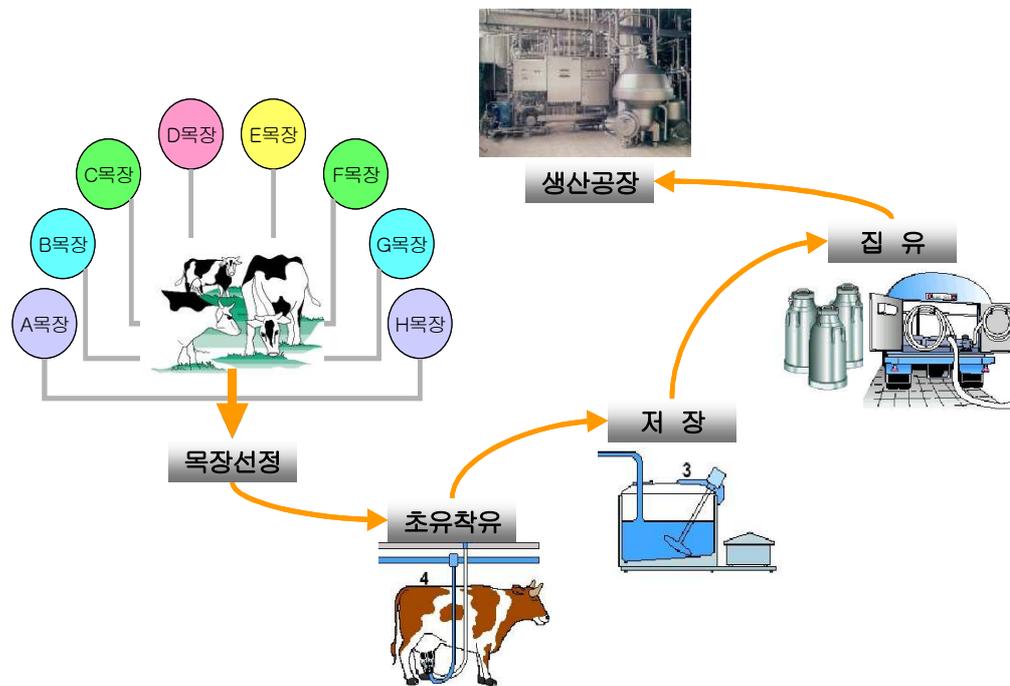


Fig. 32. Colostrum collection and storage system.

#### 다. 초유 발효 미생물 탐색

젖소 초유 및 산양초유, 사일리지를 시료로 하여 유산균을 분리하였는데, 각 시료를 멸균수에 적당히 십진 희석하여  $\text{CaCO}_3$ 를 첨가한 BCP plate count agar에 배양한 후 clear zone이 생성된 colony를 가지고 다섯 번 계대배양하면서 분리하였다. 10% skim milk에 1개씩의 colony를 접종하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양한 후 pH를 측정하였다. 분리된 유산균주의 종류를 밝히기 위해서 API 50CH kit (bioMerieux, France)를 사용하여 분석하였다.

초유로부터 유산균을 분리한 결과 젖소 초유에서 241개, 산양유 초유에서 164개, 사일리지에서 25개의 유산균 집락(colony)을 분리하였다. 분리한 유산균 집락 중에서 산 생성이 우수한 유산균을 찾아내기 위해 10% skim milk에 1개씩의 colony를 접종하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양한 후 pH를 측정한 결과는 아래의 Table 24와 같다. Table 24에 나타난바와 같이 1, 71, 86, 96, 112, 128, 144, 152, 190번 집락이 pH가 4.90이하로 산 생성이 우수한 집락으로 확인되었다. 위 집락들을 API kit를 이용하여 24시간 배양시킨 후 나타난 색의 변화를 보았는데 1번, 71번 집락을 제외한 나머지 집락은 당 이용성이 거의 나타나지 않았다. 이 균들의 특성은 계속 연구 중에 있고 2차 년도에 초유발효미생물로서 분리된 이 균을 이용하여 발효의 최적조건을 실험 하였다.

Table 24. pH after fermentation by lactic acid bacteria from colostrum in 10% skim milk at 37°C for 24 hours

| No. | pH   |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| 1   | 4.81 | 47  | 6.21 | 93  | 5.49 | 139 | 5.98 | 185 | 5.44 |
| 2   | 5.41 | 48  | 6.20 | 94  | 5.29 | 140 | 5.84 | 186 | 5.41 |
| 3   | 5.45 | 49  | 5.82 | 95  | 5.40 | 141 | 5.18 | 187 | 5.36 |
| 4   | 5.36 | 50  | 6.20 | 96  | 4.48 | 142 | 5.47 | 188 | 5.26 |
| 5   | 5.39 | 51  | 5.79 | 97  | 5.34 | 143 | 5.82 | 189 | 5.94 |
| 6   | 5.37 | 52  | 6.11 | 98  | 5.60 | 144 | 4.63 | 190 | 4.05 |
| 7   | 5.38 | 53  | 5.80 | 99  | 6.34 | 145 | 5.69 | 191 | 5.21 |
| 8   | 5.39 | 54  | 5.85 | 100 | 6.21 | 146 | 4.55 | 192 | 6.18 |
| 9   | 5.35 | 55  | 5.81 | 101 | 5.95 | 147 | 5.52 | 193 | 4.65 |
| 10  | 5.47 | 56  | 6.26 | 102 | 5.05 | 148 | 5.12 | 194 | 5.49 |
| 11  | 5.34 | 57  | 6.24 | 103 | 5.84 | 149 | 5.62 | 195 | 5.82 |
| 12  | 5.39 | 58  | 5.87 | 104 | 5.85 | 150 | 6.30 | 196 | 5.55 |
| 13  | 5.39 | 59  | 5.81 | 105 | 5.43 | 151 | 5.78 | 197 | 5.47 |
| 14  | 5.81 | 60  | 6.22 | 106 | 5.46 | 152 | 4.05 | 198 | 5.31 |
| 15  | 5.40 | 61  | 5.84 | 107 | 5.31 | 153 | 5.26 | 199 | 5.02 |
| 16  | 5.77 | 62  | 5.87 | 108 | 5.38 | 154 | 5.41 | 200 | 4.98 |
| 17  | 5.79 | 63  | 6.43 | 109 | 5.39 | 155 | 5.84 | 201 | 5.48 |
| 18  | 5.82 | 64  | 5.68 | 110 | 5.76 | 156 | 6.31 | 202 | 5.76 |
| 19  | 5.79 | 65  | 5.47 | 111 | 6.30 | 157 | 5.94 | 203 | 5.46 |
| 20  | 5.78 | 66  | 5.42 | 112 | 4.88 | 158 | 5.75 | 204 | 5.33 |
| 21  | 5.78 | 67  | 5.55 | 113 | 5.65 | 159 | 5.12 | 205 | 5.26 |
| 22  | 5.77 | 68  | 5.36 | 114 | 5.47 | 160 | 4.74 | 206 | 5.32 |
| 23  | 6.17 | 69  | 5.85 | 115 | 5.13 | 161 | 5.64 | 207 | 5.77 |
| 24  | 5.75 | 70  | 5.67 | 116 | 5.54 | 162 | 5.59 | 208 | 5.37 |
| 25  | 6.14 | 71  | 4.78 | 117 | 5.68 | 163 | 6.22 | 209 | 5.06 |
| 26  | 6.22 | 72  | 5.56 | 118 | 5.69 | 164 | 6.01 | 210 | 5.00 |
| 27  | 5.79 | 73  | 5.47 | 119 | 5.57 | 165 | 5.89 | 211 | 6.28 |
| 28  | 5.81 | 74  | 5.84 | 120 | 5.34 | 166 | 5.93 | 212 | 4.94 |
| 29  | 5.80 | 75  | 6.20 | 121 | 5.81 | 167 | 5.42 | 213 | 5.16 |
| 30  | 5.81 | 76  | 6.01 | 122 | 5.69 | 168 | 5.35 | 214 | 5.42 |
| 31  | 6.20 | 77  | 5.78 | 123 | 5.84 | 169 | 5.33 | 215 | 5.30 |
| 32  | 6.16 | 78  | 5.43 | 124 | 5.74 | 170 | 5.61 | 216 | 5.77 |
| 33  | 5.82 | 79  | 4.95 | 125 | 5.51 | 171 | 5.84 | 217 | 5.45 |
| 34  | 5.80 | 80  | 5.84 | 126 | 5.67 | 172 | 5.15 | 218 | 5.64 |
| 35  | 6.26 | 81  | 6.13 | 127 | 5.21 | 173 | 5.39 | 219 | 5.51 |
| 36  | 5.79 | 82  | 4.77 | 128 | 4.64 | 174 | 5.91 | 220 | 5.52 |
| 37  | 5.78 | 83  | 5.46 | 129 | 5.49 | 175 | 4.59 | 221 | 5.11 |
| 38  | 5.80 | 84  | 5.84 | 130 | 5.28 | 176 | 5.21 | 222 | 5.34 |
| 39  | 5.83 | 85  | 5.90 | 131 | 5.49 | 177 | 5.75 | 223 | 4.87 |
| 40  | 5.83 | 86  | 4.49 | 132 | 6.33 | 178 | 5.74 | 224 | 5.19 |
| 41  | 6.20 | 87  | 5.38 | 133 | 6.20 | 179 | 5.11 | 225 | 5.02 |
| 42  | 5.81 | 88  | 5.39 | 134 | 5.11 | 180 | 6.28 | 226 | 5.47 |
| 43  | 5.71 | 89  | 6.25 | 135 | 5.47 | 181 | 5.74 | 227 | 5.47 |
| 44  | 5.79 | 90  | 5.74 | 136 | 5.82 | 182 | 5.81 | 228 | 6.72 |
| 45  | 6.14 | 91  | 5.34 | 137 | 5.66 | 183 | 6.17 | 229 | 6.76 |
| 46  | 5.82 | 92  | 5.81 | 138 | 5.24 | 184 | 5.44 | 230 | 6.69 |

| No. | pH   |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| 231 | 5.98 | 277 | 6.56 | 323 | 6.39 | 369 | 5.58 | 415 | 6.70 |
| 232 | 6.69 | 278 | 5.89 | 324 | 6.30 | 370 | 5.74 | 416 | 6.60 |
| 233 | 5.98 | 279 | 6.46 | 325 | 6.40 | 371 | 5.31 | 417 | 6.71 |
| 234 | 6.37 | 280 | 6.75 | 326 | 6.45 | 372 | 5.36 | 418 | 6.71 |
| 235 | 5.89 | 281 | 6.47 | 327 | 5.74 | 373 | 5.78 | 419 | 6.69 |
| 236 | 6.56 | 282 | 6.58 | 328 | 5.78 | 374 | 5.26 | 420 | 6.72 |
| 237 | 6.63 | 283 | 6.75 | 329 | 6.28 | 375 | 5.76 | 421 | 6.73 |
| 238 | 6.71 | 284 | 6.76 | 330 | 6.31 | 376 | 5.79 | 422 | 6.72 |
| 239 | 6.75 | 285 | 5.73 | 331 | 5.80 | 377 | 5.78 | 423 | 6.67 |
| 240 | 5.99 | 286 | 6.74 | 332 | 6.71 | 378 | 5.82 | 424 | 6.66 |
| 241 | 6.58 | 287 | 6.21 | 333 | 6.73 | 379 | 5.80 | 425 | 6.69 |
| 242 | 6.56 | 288 | 6.75 | 334 | 5.49 | 380 | 5.31 | 426 | 6.69 |
| 243 | 6.51 | 289 | 6.74 | 335 | 5.64 | 381 | 5.28 | 427 | 6.69 |
| 244 | 5.95 | 290 | 6.05 | 336 | 6.25 | 382 | 5.78 | 428 | 6.66 |
| 245 | 5.94 | 291 | 5.89 | 337 | 5.81 | 383 | 5.76 | 429 | 6.67 |
| 246 | 6.62 | 292 | 6.31 | 338 | 6.32 | 384 | 5.76 | 430 | 6.70 |
| 247 | 5.96 | 293 | 5.88 | 339 | 5.80 | 385 | 5.76 |     |      |
| 248 | 6.56 | 294 | 6.23 | 340 | 5.36 | 386 | 5.77 |     |      |
| 249 | 6.74 | 295 | 6.59 | 341 | 5.82 | 387 | 5.78 |     |      |
| 250 | 6.03 | 296 | 6.40 | 342 | 5.83 | 388 | 5.50 |     |      |
| 251 | 6.44 | 297 | 5.91 | 343 | 5.95 | 389 | 5.80 |     |      |
| 252 | 6.77 | 298 | 5.92 | 344 | 5.38 | 390 | 5.46 |     |      |
| 253 | 6.32 | 299 | 6.49 | 345 | 5.41 | 391 | 5.73 |     |      |
| 254 | 6.49 | 300 | 6.75 | 346 | 5.82 | 392 | 5.73 |     |      |
| 255 | 6.12 | 301 | 6.73 | 347 | 5.83 | 393 | 5.99 |     |      |
| 256 | 6.73 | 302 | 6.73 | 348 | 5.50 | 394 | 5.48 |     |      |
| 257 | 6.74 | 303 | 5.68 | 349 | 6.27 | 395 | 5.29 |     |      |
| 258 | 5.86 | 304 | 6.23 | 350 | 5.44 | 396 | 5.77 |     |      |
| 259 | 5.79 | 305 | 6.18 | 351 | 6.43 | 397 | 5.78 |     |      |
| 260 | 6.45 | 306 | 6.51 | 352 | 6.24 | 398 | 5.28 |     |      |
| 261 | 6.28 | 307 | 6.13 | 353 | 6.71 | 399 | 6.29 |     |      |
| 262 | 5.91 | 308 | 6.30 | 354 | 5.80 | 400 | 5.47 |     |      |
| 263 | 6.14 | 309 | 5.78 | 355 | 6.70 | 401 | 6.21 |     |      |
| 264 | 5.89 | 310 | 6.33 | 356 | 5.43 | 402 | 5.73 |     |      |
| 265 | 5.80 | 311 | 6.18 | 357 | 5.83 | 403 | 6.27 |     |      |
| 266 | 6.56 | 312 | 6.48 | 358 | 5.88 | 404 | 6.26 |     |      |
| 267 | 5.78 | 313 | 6.24 | 359 | 5.48 | 405 | 6.26 |     |      |
| 268 | 6.58 | 314 | 6.32 | 360 | 5.83 | 406 | 6.69 |     |      |
| 269 | 6.46 | 315 | 6.25 | 361 | 5.83 | 407 | 6.73 |     |      |
| 270 | 6.55 | 316 | 6.36 | 362 | 5.83 | 408 | 6.73 |     |      |
| 271 | 5.93 | 317 | 6.46 | 363 | 5.84 | 409 | 6.73 |     |      |
| 272 | 6.30 | 318 | 5.46 | 364 | 5.35 | 410 | 6.73 |     |      |
| 273 | 6.27 | 319 | 6.70 | 365 | 5.70 | 411 | 6.73 |     |      |
| 274 | 6.11 | 320 | 6.52 | 366 | 5.84 | 412 | 6.73 |     |      |
| 275 | 5.96 | 321 | 6.26 | 367 | 5.73 | 413 | 6.71 |     |      |
| 276 | 6.56 | 322 | 6.63 | 368 | 6.45 | 414 | 6.72 |     |      |

source : 1~63, 228-405 : colostrum(bovine), 64~227 : colostrum(goat), 406~430 : silage

## 2. 초유 발효 미생물 최적 조건 및 초유 가공 조건 확립과 사료 첨가 제 제조기술 개발

### 가. 초유의 발효 최적조건

최종 분리된 2개의 유산균의 동정은 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 이용하여 동정을 실시하였다. 두 균주의 DNA를 추출하여 universal primer (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하여 Yoon 등(1997)의 조건에 따라 PCR을 행하여 16S rDNA (16S rRNA coding gene)를 증폭하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR product purification kit (Qiagen 사)를 사용하여 정제한 후 sequencing 반응에 이용하였다. 염기서열 결정은 Genetic analyzer 377 (Perkin-Elmer 사)을 사용하였으며 염기서열의 분석은 주로 CLUSTALW 프로그램 (Thompson et al., 1994) 및 PHYLIP 프로그램 (Felsenstein, 1993)을 사용하였다.

분리한 1번, 71번 유산균의 종류를 알아보기 위하여 16S rRNA gene sequence를 분석한 결과는 Fig. 1, 2에 나타낸 바와 같다. Fig. 33 은 1번 유산균의 16S rRNA gene sequence 834 bp의 분석으로 100% *St. thermophilus* 균주로 밝혀졌다. Fig. 34 는 71번 유산균의 16S rRNA gene sequence 736 bp의 분석으로 100% *St. macedonicus* 균주로 밝혀졌다.

GCAGTGAACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAGAGTTGGAAGAGTTGCG  
AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTATTAGTGGGGGATAAC  
TATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAATAGTGTTTAAACACATGT  
TAGAGACTTAAAAGATGCAATTGCATCACTAGTAGATGGACCTGCG  
TTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATAC  
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGG  
GCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGAT  
CGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTGGAAAGT  
TCACACAGTGACGGTAACTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGC  
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATT  
GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGC  
AGTGGCTTAACCATTGTTTCGCTTTGGAAACTGTTAAACTTGAGTGC  
AGAAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT  
ATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC TG  
ACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG  
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCG  
GGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG

Fig. 33. 16S rDNA sequence (834 bp) of lactic acid bacteria 1.

ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGAACGCTGAAG  
AGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACG  
CGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGATAACTATTGGAAACGATA  
GCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAA  
GGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAG  
TAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATACATAGCCGACCTG  
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGA  
CCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT  
CTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGT  
GACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA  
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGC  
TCAACCATAGTTCGCTTTGGAACTGTCAAACCTGAGTGCAGAAGG  
GGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG  
GAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA ACTGACGC  
TGAGC

Fig. 34. 16S rDNA sequence (736 bp) of lactic acid bacteria 71.

젖소 초유로부터 분리한 *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus macedonicus*와 청미바이오에서 보관중인 *Lactobacillus fermentum* 균을 MRS 시험관 배지에 37°C에서 24시간 배양 후 starter로 사용하였다. 수집된 초유를 스팀관이 연결된 살균솥에서 저온살균(65°C에서 30분)하고 냉각수를 순환시켜 식힌 후 starter를 접종하여 37°C에서 배양하였다.

유산균을 접종한 배양액은 각각 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48시간에 시료를 취하여 배양액의 당 함량, pH, 적정산도, 유산균수를 A.O.A.C. 방법에 따라 측정하였다. 또한 발효액의 보존 중 변화를 측정하기 위하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 각각 1, 3, 5, 7일에 시료를 채취하여 배양액 중의 당 함량, pH, 적정산도, 유산균수를 A.O.A.C. 방법에 따라 측정하였다.

청미바이오(주)에서 보관하고 있는 유산균 *L. fermentum*과 초유에서 분리된 유산균인 *St. thermophilus*, *St. macedonicus*를 초유와 탈지초유에 각각 발효시켜 조건을 검토하였다. Fig. 35는 발효과정 중 당 함량의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유가 48시간 발효과정 중 당 함량은 비슷한 경향을 보였지만 당 함량은 초유보다 탈지초유가 높았다. 초유에서 *L. fermentum* 발효는 발효초기부터 3시간까지 당 함량이 감소하다가 3시간 이후부터 15시간까지 변화가 없었고, 15시간 이후부터 36시간까지 급격히 감소하다가 48시간까지는 약간 증가하였다. *St. thermophilus*는 15시간까지 변화가 없었고, 15시간 이후부터 24시간까지 감소하다가 48시간까지는 약간 증가하였다. *St. macedonicus*는 15시간까지 변화가 없다가 18시간까지 약간 감소 48시간까지는 증가하였다. 따라서 당 이용성은 *L. fermentum*이 가장 높았고 *St. thermophilus*가 그 다음이고 *St. macedonicus*는 거의 이용하지 않았다.

Fig. 36 발효과정 중 pH의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유가 발효과정 중 시간이 경과함에 따라 비슷한 경향을 보였는데, pH는 떨어져 *L. fermentum*은 48시간 경과 후 4.3, 4.5로 각각 나타내었다. *St. thermophilus*는 48시간 이후 5.3이었고 *St. macedonicus*는 거의 변화를 보이지 않았다. 따라서 pH는 *L. fermentum*이 가장 높았고 *St. thermophilus*가 그 다음이고 *St. macedonicus*는 거의 변화가 없었다.

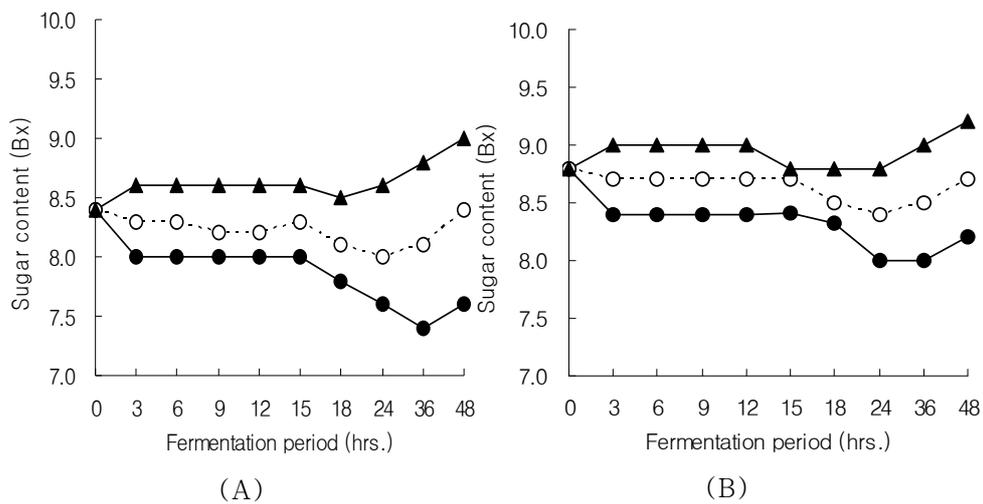


Fig 35. Changes of sugar contents in fermented colostrum using isolated strains. (A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

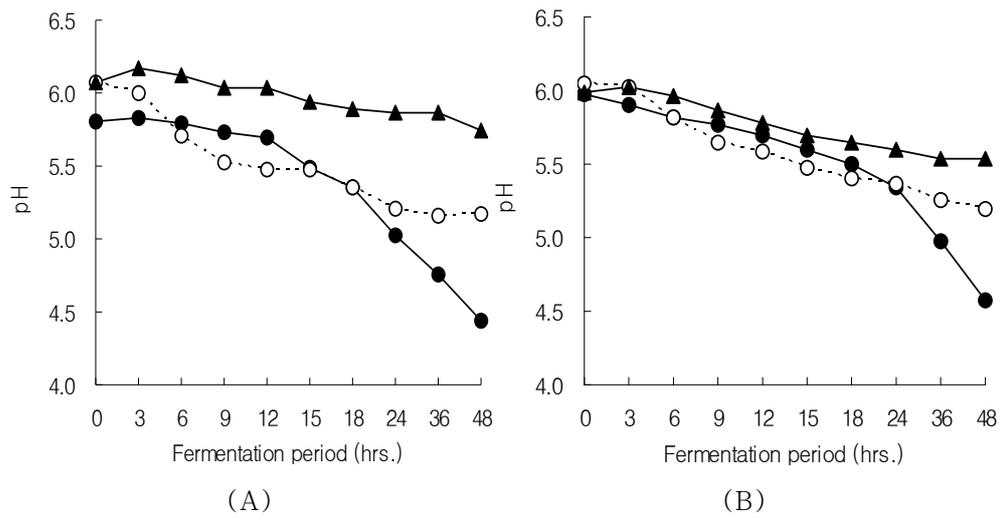


Fig. 36. Changes of pH in fermented colostrum using isolated strains.  
 (A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

Fig. 37은 발효과정 중 적정산도의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유에서 *L. fermentum* 발효는 발효초기부터 12시간까지는 변화가 없었으나 이후부터 48시간 동안 각각 1.1%, 1.0%까지 급속히 증가하였다. *St. thermophilus*는 발효초기부터 서서히 증가하여 48시간 후 0.6%, 0.5% 증가하였다. *St. macedonicus*는 초유에서 산도의 증가 속도가 늦어 48시간 후 0.3%, 탈지초유에서는 0.45%까지 증가하였다. 따라서 산생성 정도는 *L. fermentum*이 가장 높았고 *St. thermophilus*가 그 다음이고 *St. macedonicus*는 산성이 약했다. Fig. 38은 발효과정 중 유산균수의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유에서 *L. fermentum*은 발효초기부터 성장하여 18시간 후에 최대 성장을 보였고 이후부터 48시간까지 약간 감소하였다. *St. thermophilus*는 발효초기부터 성장하여 9시간 후에 최대 성장을 보였고 이후부터 48시간까지 약간 감소하였다. *St. macedonicus*는 발효초기부터 성장속도가 늦었고 48시간 후에도 약간 증가하였다. 따라서 각 균주별 성장 속도는 *L. fermentum*이 가장 높았고 *St. thermophilus*가 그 다음이고 *St. macedonicus*는 가장 낮았다.

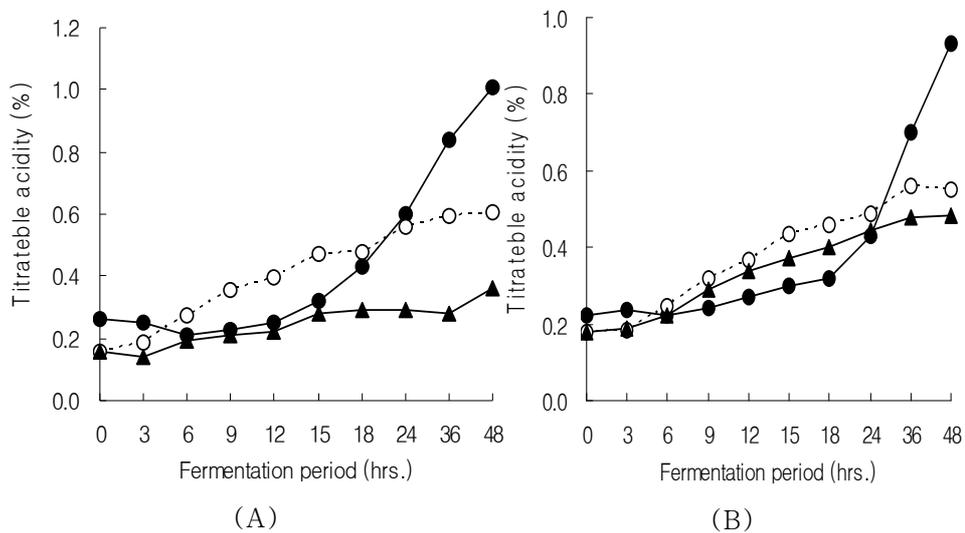


Fig. 37. Changes of titratable acidity in fermented colostrum using isolated strains.

(A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

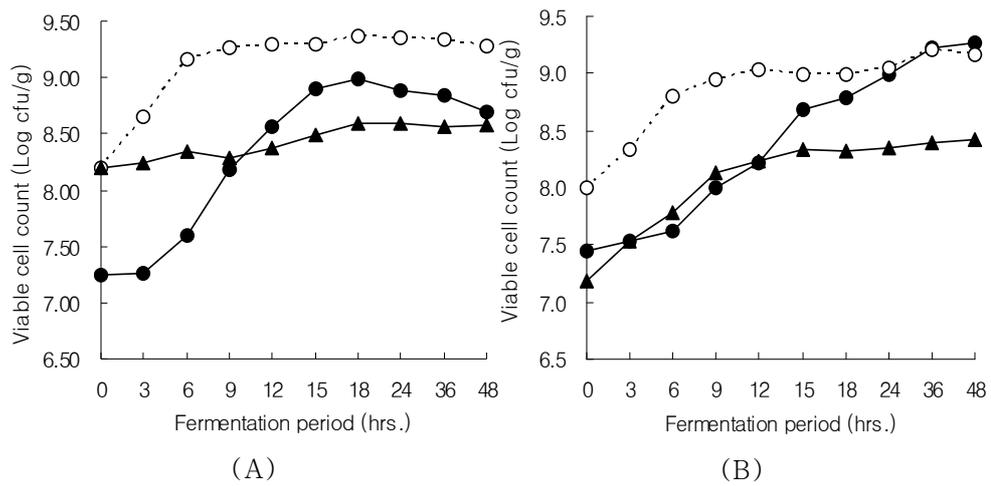


Fig. 38. Changes of viable cell count in fermented colostrum using isolated strains. (A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

발효유의 보존 중 변화를 측정하기 위하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 각각 1, 3, 5, 7일에 시료를 채취하여 배양액 중의 당 함량, pH, 적정산도, 유산균수를 측정하였다. Fig. 39는 저장 중 당 함량의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유 발효유에서 *L. fermentum*과 *St. thermophilus*는 저장 1일 후까지 감소하다가 이후 7일까지는 변화가 거의 없었다. 이는 발효 후 온도가 냉각되는 과정 중 후 발효가 계속 일어나 당 함량이 떨어지는 것이고, 1일 이후에는 완전히 냉각된 상태라 후 발효가 일어나지 않았기 때문이다. *St. macedonicus*는 초유에서는 저장 기간 동안 후 발효는 거의 일어나지 않았고 탈지초유에서는 저장 1일 후까지 감소하다가 이후 7일까지는 변화가 거의 없었다.

Fig. 40은 저장 중 pH 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유 발효유에서 *L. fermentum*과 *St. thermophilus*는 저장 1일 후까지 감소하다가 이후 7일까지는 변화가 거의 없었다. 이는 발효 후 온도가 냉각되는 과정 중 후 발효가 계속 일어나 당 함량이 떨어지는 것이고, 1일 이후에는 완전히 냉각된 상태라 후 발효가 일어나지 않았기 때문이다. *St. macedonicus*는 초유에서는 저장 기간 동안 후 발효는 거의 일어나지 않았고 탈지초유에서는 저장 1일 후까지 감소하다가 이후 7일까지는 변화가 거의 없었다. 발효과정 중 pH의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유가 발효과정 중 시간이 경과함에 따라 비슷한 경향을 보였는데, pH는 떨어져 *L. fermentum*은 48시간 경과 후 4.3, 4.5로 각각 나타내었다. *St. thermophilus*는 48시간 이후 5.3이었고 *St. macedonicus*는 거의 변화를 보이지 않았다. 따라서 pH는 *L. fermentum*이 가장 높았고 *St. thermophilus*가 그 다음이고 *St. macedonicus*는 거의 변화가 없었다.

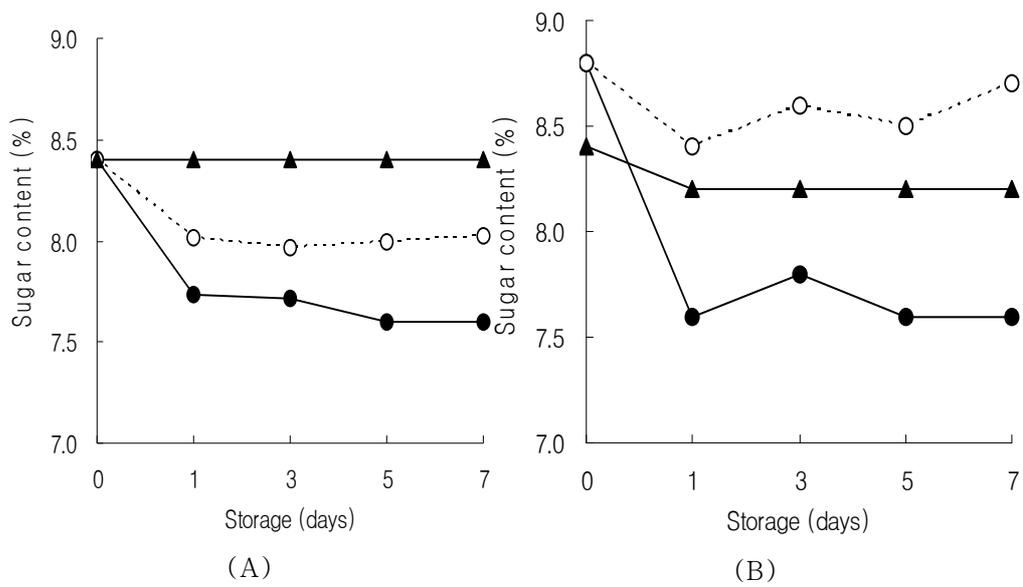


Fig 39. Changes of sugar contents in fermented colostrum using isolated strains during 7 days storage. (A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

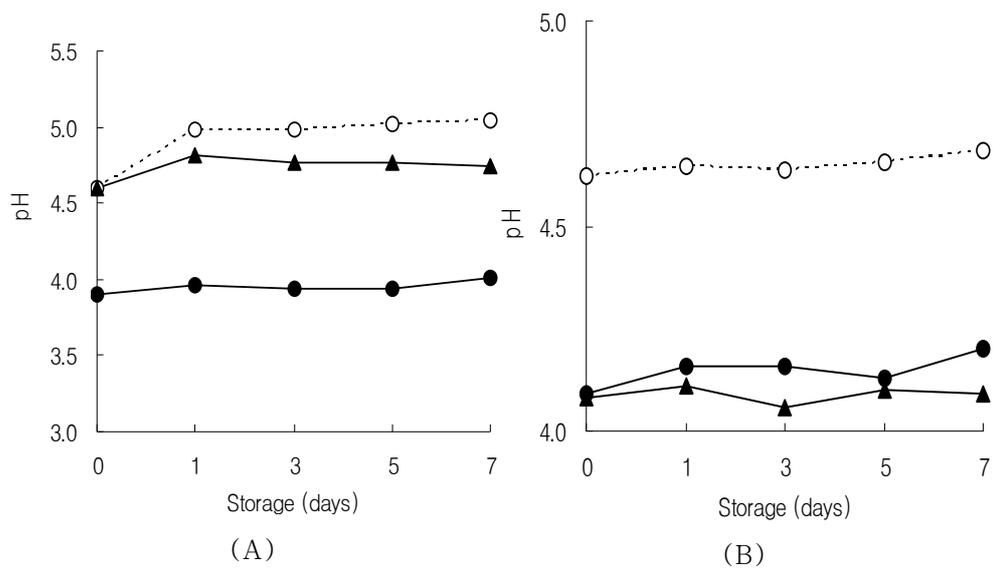


Fig. 40. Changes of pH in fermented colostrum using isolated strains during 7 days storage.

(A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

Fig. 41은 저장 중 적정산도의 변화를 측정한 것으로, 초유와 탈지초유에서 *L. fermentum*은 1.5%, 1.3%, *St. thermophilus*는 0.75%, *St. macedonicus*는 0.75 %, 1.1%를 나타내어 모두 발효 후 저장 초기의 산도를 저장 7일간 그대로 유지하였다. Fig. 42는 저장 중 유산균수의 변화를 측정한 것으로 초유와 탈지초유에서 *L. fermentum*은 발효 후 저장 1일째  $10^9$ 에서  $10^{9.5}$  으로 증가하다가 이후부터는 저장기간 동안 약간 감소하였다. *St. thermophilus*는 발효 후 저장 1일째까지 감소하다가 이후부터 그대로 유지되었다. *St. macedonicus*는 초유에서 저장 3일까지 약간 증가하다가 감소하는 경향을 보였고 탈지초유는  $10^{7.5}$ 에서 시작하여 3일까지 증가 후 약간 감소하는 경향을 보였다.

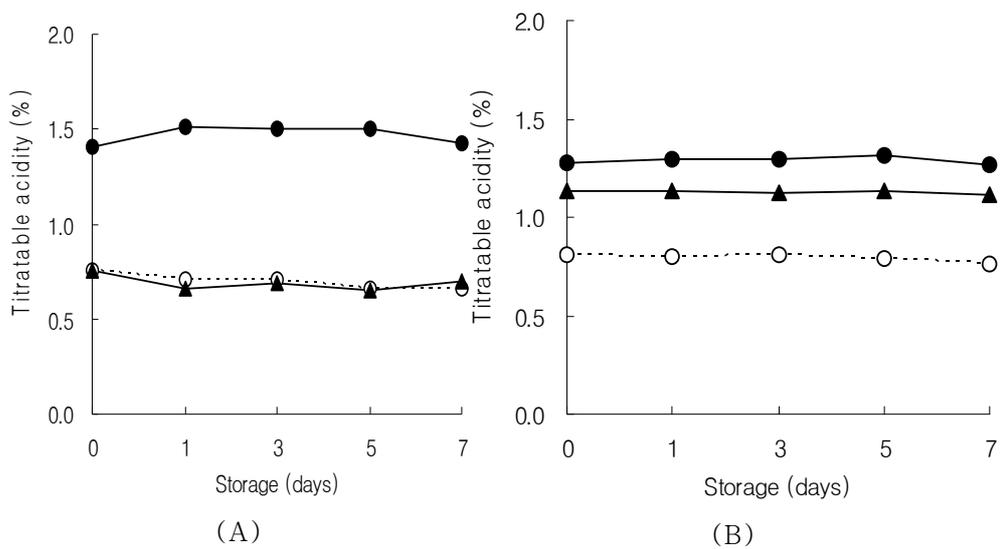


Fig. 41. Changes of titratable acidity in fermented colostrum using isolated strains during 7 days storage. (A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

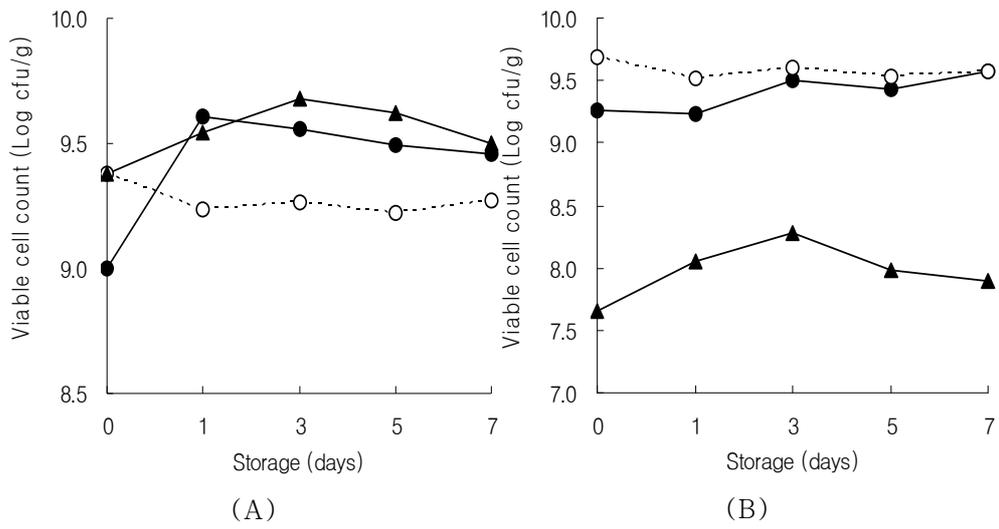


Fig. 42. Changes of viable cell count in fermented colostrum using isolated strains during 7 days storage. (A) whole colostrum, (B) skimmed colostrum, —●— *L. fermentum*, ...○... *St. thermophilus*, —▲— *St. macedonicus*

#### 나. 초유의 가공 조건과 사료첨가제 제조 기술

초유는 경기도 안성시, 이천시, 충북 음성군 일대의 축산농가에서 수집하였으며, 수집된 초유는 스티프관이 연결된 살균 솔에서 저온살균(65℃에서 30분)하고 냉각수를 순환시켜 식힌 후 미리 준비된 젖산균 starter를 접종하여, 35℃에서 24시간 배양하였다. 배양된 발효물은 동결건조기용 스텐레스 용기에 담아 초저온 냉장고에서 24시간 얼린 다음 동결건조기에서 72시간 건조시켜 건조분말을 얻고 믹서로 갈아서 균질한 분말을 만들어 사료첨가제의 생균제로서 첨가하였다. 시제품은 Fig. 43과 같다.

- 1) 초유수집 : 축산농가로부터 초유를 수집하기 위하여 경기도 안성시, 이천시, 충북 음성군 일대의 농가와 초유수집 연결망을 구축한다.
- 2) Starter 준비 : MRS 시험관 배지에 하루 동안 배양된 젖산균 (*L. fermentum*, *St. thermophilus*, *St. macedonicus*)을 2L용 광구병의 새 배지에 접종한 후 하루 동안 배양하여 준비한다.
- 3) 수집된 초유를 스티프관이 연결된 살균 솔에서 저온살균(65℃에서 30분)하고 냉각수를 순환시켜 식힌 후 starter를 접종한다. 35℃에서 24시간 배양한다.
- 4) 동결건조기용 스텐레스 용기에 담아 초저온 냉장고에서 24시간 얼린 다음 동결건조기에서 72시간 건조시켜 건조분말을 얻고 믹서로 갈아서 균질한 분말을 만든다.
- 5) 시제품 I: 산업적 스케일로 청미바이오(주)에서 생산되는 피그펄 제품에 3번의 발효물을 1:1로 혼합하여 자연건조 시킨다. 건조분말을 분쇄하여 균질한 입자크기로 한 다음 5 Kg 혹은 20 Kg 지대에 포장한다.
- 6) 올리고당이 함유된 발효물을 청미바이오(주)에서 생산되는 피그펄 제품과 1:1로 혼합하여 자연 건조시킨 다음 건조분말을 분쇄하여 균질한 크기로 한다.
- 7) 시제품 II: 산업적 스케일 생산 제품II를 생산하기 위해서는 시제품 I에 6번의 건조물을 1:1로 혼합하여 5번과 동일한 방법으로 포장한다.

8) 초유면역단백질의 파괴를 알아보기 위하여 초유를 전지발효 및 탈지발효 시킨 후 냉동건조시킨 후 면역글로블린 IgG양을 측정한 결과 발효시키지 않은 초유는 2.27mg/ml이었는데 발효시킨 전지초유는 1.97mg/ml, 탈지초유는 2.57mg/ml로 발효 전과 발효 후 면역글로블린의 양은 약간의 차이는 있었으나 제품생산에 큰 영향을 미칠 정도는 아니라 생각한다.



Fig. 43. Sample of functional feed using colostrum.

### 3. 자돈의 발효초유첨가사료를 이용한 사양시험

#### 가. 발효초유첨가사료 급여에 따른 사양시스템 및 사양성적 조사

사양시험을 하기위하여 생후 3주후 이유한 자돈 수컷을 일주일동안 시험돈사에 적응시켰다. 시험구는 대조구와 발효초유사료 0.5% 급여구로 나누어 처리구당 12두로 하였고, 사료는 무제한 급여를 했고 몸무게는 0주, 2주 4주에 측정하였다. 사양시험기간은 4주간 수행하였고 4주 후 증체율은 Duncan의 다중검정(DMRT) 5%로 통계처리 하였다. 혈액은 임의로 처리구당 5두씩 혈액을 채취하여 분석하였다. 혈액분석방법은 혈당은 hexokinase enzymatic UV method에 준하였고 Diasys(독일)사의 Kit를 사용하였다. 콜레스테롤은 CHOD-PAD enzymatic photomatic test method에 준했으며, Diasys(독일)사의 Kit를 사용하였다. 알부민은 bromocresol green method에 준했으며 Diasys(독일)사의 Kit를 사용하였다. 글로블린은 총단백질에서 알부민값을 빼서 글로블린치를 구하였다.

Table 25에서 보는 바와 같이 0.5% 발효초유사료 급여구가 대조구에 비해 증체율이 16.73% 증가하였다. 대조구는 0 주째  $10.00^a \pm 0.41$ , 2주째  $17.96^a \pm 1.77$ , 4주째  $24.66^a \pm 1.42$ 이였으나, 0.5% 발효초유사료 처리구는 0주째  $10.00^b \pm 0.52$ , 2주째  $18.58^b \pm 1.33$ , 4주째  $27.11^a \pm 2.57$ 로 증체율이 유의성 있게 16.73% 증가하였다. 따라서 발효초유첨가사료 급여에 따른 사양성적은 매우 우수한 것으로 확인되었다. Fig. 44에 나타난 바와 같이 이유자돈에 발효초유사료 0.5%를 4주간 급여 후 증체율 개선효과(%)는 대조구보다 16.73% 증가한 것으로 나타나 발효초유사료 급여에 따른 사양성적은 매우 우수한 것으로 확인되었다.

Table 25. Effect of feeding colostrum feed on the growth rate in piglet

|                          | 0                        | 2 week                   | 4 week                   |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control                  | 10.00 <sup>a</sup> ±0.41 | 17.96 <sup>a</sup> ±1.77 | 24.66 <sup>a</sup> ±1.32 |
| Colostrum feed<br>(0.5%) | 10.00 <sup>b</sup> ±0.52 | 18.58 <sup>b</sup> ±1.33 | 27.11 <sup>a</sup> ±2.57 |

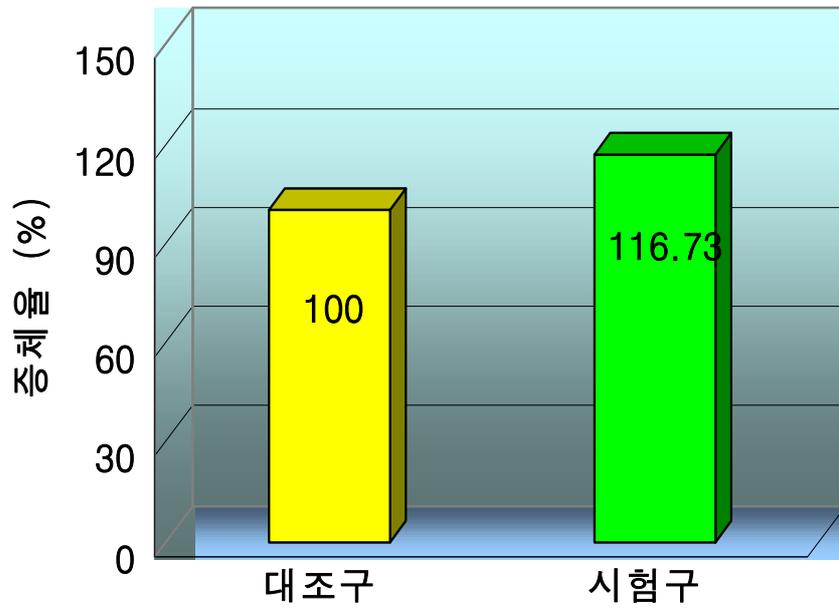


Fig. 44. Effect of feeding colostrum feed 0.5% on the growth rate in piglet during 4 weeks.

이유 후 4주간 초유첨가 사료급여가 자돈의 증체에 미치는 효과는 Table 26에 나타난 바와 같다. 각 구당 12두씩 시험구로 하여 실험한 결과 실험 시작 시 몸무게는 대조구과 초유발효 첨가사료를 10 kg으로 보정하여 비교하였다. 실험 4주후 몸무게는 대조구이 24.66 kg 발효초유첨가구는 27.11 kg으로 측정되었다. 따라서 증체량은 대조군은 14.66 kg, 발효초유첨가구는 17.11 kg으로 나타났다. 증체율 개선효과는 16.73 %이었고, 일일 증체량은 대조구는 505.57 g, 발효초유첨가구는 590.13 g으로 대조구에 비해 초유발효첨가구가 85.13 g 높았다. 따라서 발효초유첨가사료 급여에 따른 사양성적은 매우 우수한 것으로 나타났다.

Table 26. Effects of growth rate feeding colostrum feed 0.5% in piglet during 4 weeks.

| Item                             | Treatment |                          |
|----------------------------------|-----------|--------------------------|
|                                  | Control   | Colostrum feed<br>(0.5%) |
| No. of Pigs                      | 12        | 12                       |
| Starting average body weight(kg) | 10.00     | 10.00                    |
| Final average body weight(kg)    | 24.66     | 27.11                    |
| Total gain(kg)                   | 14.66     | 17.11                    |
| Improvement(%)                   | 0         | 16.73                    |
| Day / Gain(g)                    | 505.57    | 590.13                   |

나. 자돈의 혈액성분 조사

Table 27에 나타난 바와 같이 혈액성분 중 혈당, 콜레스테롤, 알부민, 글로블린의 양은 전체적으로 대조구와 0.5% 처리구가 크게 차이는 나타나지 않았다. 혈당이 대조구보다 다소 떨어졌고 콜레스테롤도 조금 떨어진 것으로 나타났다. 면역글로블린 총량은 0.5% 처리구가 약간 높았다. 대조구와 0.5% 초유첨가사료 급여구 모두 조사항목이 정상범위 또는 정상범위 부근에 들어가서 양호한 것으로 나타났다.

Table 27. Blood analysis of feeding colostrum feed 0.5% in piglet during 4 weeks.

|                        | blood<br>glucose<br>(mg/dl) | choleste<br>rol<br>(mg/dl) | albumin<br>(g/dl) | globulin<br>(g/dl) | albumin/globu<br>lin<br>(%) |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| Control                | 71.8                        | 110.1                      | 3.50              | 2.76               | 1.34                        |
| Colostrum feed<br>0.5% | 64.2                        | 104.6                      | 3.30              | 2.84               | 1.23                        |

#### 다. 자돈의 설사증상 억제

자돈의 설사는 시험기간 4주 동안 대조구와 0.5% 초유발효첨가 처리구를 매일 관찰하여 확인하였다. 자돈의 설사는 시험기간 4주 동안 대조구와 0.5% 초유발효첨가 처리구를 매일 관찰하여 확인하였다. 시험기간 4주 중 설사증상을 보이는 개체는 대조구에서는 통상적으로 나타나는 설사증상이 2두 있었으나, 0.5% 초유발효첨가 처리구에서 전혀 나타나지 않았다. 따라서 초유발효첨가 사료 급여가 자돈의 설사증상 억제에 큰 효과가 있는 것으로 확인되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

| 구분       | 연도   | 세부연구목표   | 연구결과 수행내용   | 달성도(%) |
|----------|------|--|---|--------|
| 1차<br>연도 | 2005 | 제1세부과제<br>초유의 생리활성물질 정량, 병원성 미생물의 항균효과 및 유산균 성장촉진 시험             | ○ 일반성분 및 생리활성 물질의 정량<br>○ 병원성 미생물의 항균활성 조사<br>○ 유산균 성장촉진 효과 조사  | 100    |
|          |      | 제2세부과제<br>초유로부터 기능성 화장품 개발에 필요한 성분 조사, 제조 및 <i>in vitro</i> 기능평가 | ○ 세포독성 평가<br>○ 항산화능 평가<br>○ 알러지성 염증평가   | 100    |
|          |      | 위탁과제<br>국내 초유 현황조사, 관리 체계 구축 및 초유 발효 미생물 탐색                      | ○ 대규모 목장 중심으로 초유 현황 조사<br>○ 초유수집·보존 체계 구축<br>○ 초유 발효 미생물 탐색   | 100    |
| 2차<br>연도 | 2006 | 제1세부과제<br>초유가 항염, 항바이러스 및 면역활성에 미치는 효과 시험                        | ○ 초유성분의 항염증 효과 조사<br>○ 초유성분의 항암 효과 조사<br>○ Allergy 증상에 미치는 효과   | 100    |
|          |      | 제2세부과제<br>기능성 화장품 개발 및 <i>in vivo</i> 기능평가                       | ○ compound 48/80-induced skin reaction<br>○ PCA reaction<br>○ 각질분화에 대한 영향   | 100    |
|          |      | 위탁과제<br>초유 발효 미생물 최적 조건 및 초유 가공 조건 확립과사료 첨가제 기술 개발               | ○ 초유 발효 최적 조건<br>○ 초유의 가공 조건<br>○ 사료 첨가제 제조 기술  | 100    |
| 3차<br>연도 | 2007 | 제1세부과제<br><i>In vivo</i> 에서 젖소초유의 생리활성 효과 시험                     | ○ 초유 급여 마우스의 사양 성적 조사<br>○ 혈액으로부터 allergy 증상 물질 조사<br>○ 항암효과 조사   | 100    |
|          |      | 제2세부과제<br>기능성 화장품의 임상실험  | ○ 기능성화장품의 알러지 유발가능성 평가<br>○ 단회독성 및 피부자극성 평가<br>○ 피부보습 간이 임상평가   | 100    |
|          |      | 위탁과제<br>자돈의 초유 첨가사료를 이용한 사양 시험                                   | ○ 초유첨가사료 급여 사양 성적 조사<br>○ 자돈의 설사증상 억제 시험<br>○ 혈액성분 조사   | 100    |
| 최종<br>평가 | 2007 | 제1세부과제<br>초유의 생리활성특성 조사  | ○ 초유에 함유된 생리활성물질의 정량 및 미생물에 미치는 영향<br>○ 항염증, 항암 및 면역활성 효과<br>○ 혈액의 allergy 증상물질 및 항암효과                            | 100    |
|          |      | 제2세부과제<br>초유를 이용한 기능성 화장품 개발                                     | ○ 초유로부터 기능성 화장품 개발에 필요한 성분 조사, 제조 및 <i>in vitro</i> 기능평가<br>○ 기능성 화장품 개발 및 <i>in vivo</i> 기능평가<br>○ 기능성 화장품의 임상실험 | 100    |
|          |      | 위탁과제<br>초유를 이용한 자돈용 사료첨가제 개발                                     | ○ 초유첨가사료 급여 사양성적 조사<br>○ 자돈의 설사증상 억제 시험<br>○ 혈액성분 조사  | 100    |

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### \* 기업화 추진방안

#### 1. 기능성 화장품

초유를 이용한 기능성 화장품 개발은 국내외적으로 초기 수준에 머물고 있다. 따라서 국내 화장품 회사에서 많은 관심을 보이고 있고 그 중 (주)에이티랩과 기술이전을 논의 중에 있다.

#### 2. 특수사료 첨가제 개발

초유를 이용한 특수사료 첨가제 개발은 국내외적으로 시작단계이다. 특수사료 첨가제 개발에 참여한 (주)청미바이오와 기술이전을 진행 중에 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 기능성 화장품

초유를 이용한 기능성 화장품 개발은 국내외적으로 초기 수준에 있다.

### 2. 특수사료 첨가제 개발

초유를 이용한 특수사료 첨가제 개발은 국내외적으로 시작단계이다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Aparna, H. S. and Salimath, P. V. (1999) Acidic glycoproteins of buffalo colostrum and their influence on the growth of *Bifidobacterium bifidus*. *Nutritional Research* **19**, 295–303.
2. Batish. V. K., Chander. H., Zumdegeni. K. C., Bhatia. K. L., and Singh, R. S. (1988) Antibacterial activity of lactoferrin against some common food-borne pathogenic organisms. *The Australian Journal of Dairy Technology* **5**, 16–18.
3. Besser, T. E. and Gay, C. C. (1994) The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice* **10**, 107–117.
4. Butler, J. E. (1994) Passive immunity and immunoglobulin diversity. In: Indigenous antimicrobial agents of milk – Recent Developments. *International Dairy Federation Special Issue* **9404**, 14–50.
5. Cho, Y. H., Lee, S. W., Chung, M. S., Baek, S. H., Jekal, S. J., and Park, G. Y. (2003) Safety evaluation of IGFs separated and refined from colostrum. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**, 137–144.
6. Donovan, S. M. and Odle, J. (1994) Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annual Review of Nutrition* **14**, 147–167.
7. Erdei, J., Forsgren, A., and Naidu, A. S. (1994) Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia Coli*. *Infection and Immunity* **62**, 1236–1240.
8. Foley, J. A. and Otterby. D. E. (1978) Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum. A review. *Journal of Dairy Science* **61**, 1033–1060.
9. Gaya, P., Medina, M., and Nunez, M. (1991) Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3355–3360.
10. Hoshower L. (1994) Brief communication: immunologic aspects of human colostrum and milk—a misinterpretation. *American Journal of Physics and Anthropology* **94**, 421–425.
11. Hwang, K. A., Yang, H. J., Ha, W., and Lee, S. W. (2004) Effect of bovine colostrum whey fraction containing insulin-like growth factor on cell proliferation. *Korean J.*

- Food Sci. Ani. Resour.* **24**, 171–175.
12. Jones, L. R., Taylor, A. W., and Hines, H. C. (1987) Characteristics of frozen colostrums thawed in a microwave oven. *J. Dairy Sci.* **70**, 1941–1945.
  13. Kamau, D. N., Doores, S., and Pruitt, K. M. (1990) Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2711–2716.
  14. Kim, S. K. and Hoe, K. C. (2000) Effects of preservative treatment, heating and freezing on compositional and microbiological changes of colostrum. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **42**, 659–668.
  15. Korhonen, H. (1977) Antimicrobial factors in bovine colostrum. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* **49**, 434–447.
  16. Korhonen, H., Syvaaja, E. L., Ahola-Luttila, H., Sivela, S., Kopola, S., and Husu, J. (1995) Bactericidal effect of bovine normal and immune serum, colostrum and milk against *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 655–662.
  17. Kwon, M. K., Jang, Y. H., Ahn, J. K., Goh, J. S., and Kwon, I. K. (1991) **1.** Improving availability of surplus colostrum. I. Influence of organic acids on preservation of colostrum. *Korean J. Dairy Sci.* **13**, 71–78.
  18. Kwon, M. K., Jang, Y. H., Ahn, J. K., Goh, J. S., and Kwon, I. K. (1991) **2.** Improving availability of surplus colostrum. I. Influence of food preservatives, antibiotics and formaldehyde on preservation of colostrum. *Korean J. Dairy Sci.* **13**, 97–102.
  19. Kwon, M. K., Jang, Y. H., Ahn, J. K., Goh, J. S., and Kwon, I. K. (1991) **3.** Improving availability of surplus colostrum. I. Influence of lactic acid bacteria on preservation of colostrum. *Korean J. Dairy Sci.* **13**, 191–196.
  20. Larson, L. L., Owen, F. G., Albright, J. L., Appleman, R. D., Lamb, R. C., and Muller, L. D. (1977) Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *Journal of Dairy Science* **60**, 989–1003.
  21. Lassiter, M. O., Newsome, A. L., Sams, L. D., and Arnold, R. R. (1987) Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* **66**, 480–485.

22. Lee, S. W., Yang, D. H., Hwangbo, S., and Lee, S. H. (2001) Changes of bovine colostral immunoglobulin G on processing conditions. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **21**, 265–271.
23. Mach, J. P. and Pahid, J. J. (1971) Secretory IgA: a major immunoglobulin in most bovine external secretion. *Journal of Immunology* **106**, 552–563.
24. Masson, P. L. and Heremans, J. F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **39**, 119–29.
25. Muller, L. D., Ludens, F. C., and Rook, J. A. (1976) Performance of calves fed ferment colostrums or colostrums with additives during warm ambient temperatures. *J. Dairy Sci.* **59**, 930–935.
26. Naidu, A. S. and Arnold, R. R. (1994) Lactoferrin interaction with Salmonellae potentiates antibiotic susceptibility in vitro. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **20**, 69–75.
27. Nam, M. S. , Bae, H. C., Kim, P. H., Kim, W. S., and Goh, J. S. (2002) Purification of TGF- $\beta$ 1 from bovine colostrum. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **22**, 343–347.
28. Oram, J. D. and Reiter. B. (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochimica el Biophysica Acta* **170**, 351–365.
29. Otterby, D. E., Dutton, R. E., and Foley, J. A. (1977) Comparative fermentations of bovine colostral milk. *J. dairy Sci.* **60**, 73–78.
30. Otterby, D. E., Johnson, D. G., Foley, J. A., Tomsche, D. S., Lundouist, R. G., and Hanson, P. J. (1980) Fermented or chemically-treated colostrums and nonsalable milk in feeding programs for calves. *J. Dairy Sci.* **63**, 951–958.
31. Payne. K. D., Davidson. P. M., and Olivier. S. P. (1990) Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **53**, 468–472.
32. Polzin, H. W., Otterby, D. E., and Johnson, D. G.. (1975) Responses of calves fed fermented or acidified colostrums. *J. Dairy Sci.* **58**, 224–234.
33. Rainard. P. (1986) Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastic bacteria. *Veterinary Microbiology* **11**, 387–392.
34. Reiter. B., Marshall. V. M., Bjorck. L., and Rosen. C. G. (1976) Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide

- system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens. *Infection and Immunity* **13**, 800–807.
35. Reiter, B. (1978) Review of the progress of dairy science: Antimicrobial systems in milk. *Journal of Dairy Research* **45**, 131–147.
  36. Richardson, G. H. (1985) Standard methods for the examination of dairy products 15th ed, American Public Health Association Inc. Washington, DC, pp. 133.
  37. Rindsig, R. B. and Bodoh., G. W. (1977) Growth of calves fed colostrums naturally fermented or preserved with propionic acid or formaldehyde. *J. Dairy Sci.* **60**, 79–84.24.
  38. Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S., and Tomita, M. (1991) Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Dairy Science* **74**, 3724–3730.
  39. Shams, D. (1994) Growth factors in milk. *Endocrine Regulations* **28**, 3–8.
  40. Siragusa, G. R. and Johnson, M. G. (1989) Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase thiocyanate–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antimicrobial system. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 2802–2805.
  41. Tacket, C. O., Binion, S. B., Bostwick, E., Losonsky, G., Roy, M. J., and Edelman, R. (1992) Efficacy of bovine immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **47**, 276–283.
  42. Tsuji, S., Hirata, Y., Mukai, F., and Ohtagaki, S. (1990) Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *Journal Dairy Science* **73**, 125–128.
  43. 2004년도 식품 및 식품첨가물 생산실적 보고서. (2006) 식품의약품안전청.

## 주 의

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