

316005-05

강원도 청정지역 특화 축산물의 개발 및 브랜드화

2021

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

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

농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003574-01

강원도 청정지역 특화 축산물의 개발 및 브랜드화

2021. 05. 31.

주관연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “강원도 청정지역 특화 축산물의 개발 및 브랜드화”(개발기간 : 2016 . 05 . 01 ~ 2020 . 12 . 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 05. 31.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (최해철) (인)



1세부연구책임자 : 허 철 성

2세부연구책임자 : 강 상 기

3세부기관책임자 : 박 병 철

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	316005-5	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.05.01.~ 2020.12.31	단 계 구 분	(1)/(1)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	강원도 청정지역 특화 축산물의 개발 및 브랜드화			
연구책임자	허철성	해당단계 참여연구원 수	총: 37 명 내부: 20 명 외부: 17 명	해당단계 연구개발비	정부: 1,870,000 천원 민간: 653,000 천원 계: 2,523,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 37 명 내부: 20 명 외부: 17 명	총 연구개발비	정부: 1,870,000 천원 민간: 653,000 천원 계: 2,523,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교			참여기업명 (주)서울에프엔비, (주)케이프라이드	
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음			상대국 연구기관명: 해당사항 없음	
위탁연구	연구기관명: 해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및	일반, [국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정] 제24조의4에 따라 일반과제로 결정				

사유

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소 프 트 웨 어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생 명 정 보	생물자원	정 보	실 물
등록·기탁 번호	0175-7598, 2672-0191, 1344-3941, 2671-4639, 0022-5142, 1011-2367, 1017-7825, 1738-8872, 1573-4978	1019968640000, 1020190084229, 10-2036275, 1020170127927, 1020170127943, 1020170140386, 1020180117761, 1020180117810, 1020180126040, 1019206570000, 10-1964883, 1019968640000, 1020190155663, 1020760890000, 1020200049968, 1020200113697, 1021794630000	-	-	-	-	-	-	KCTC13564BP, KCTC 18613P, KCTC 18612P, KCTC 18611P, KCTC 18819P, KCTC13563BP	-	-

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

기능성 극대화를 위한 산야초/약용작물 이용 식품천연원료 및 천연 사료첨가제 개발과 산야초/약용작물 유래 기능성분 고함유 축산물 (유제품, 육제품, 가공제품, 난제품)을 개발 함. 산야초/약용작물 유래 기능성분과 축산물 시너지 효과 규명하였고 브랜드 제품 규격화를 위한 기능성분 정량적 평가기법 확립함. 강원지역 특화 기능성 축산물 브랜드 산업화를 위한 기술이전과 시제품 개발과 우유 및 유제품 품질고급화 및 상품화를 위한 핵심기술, 산야초/약용작물 활용 기능성 웰빙 한우 브랜드 개발, 기능성 웰빙 계육 및 계란 생산 기술을 개발함. 대표 정량적 성과는 SCI 논문 9건, 제품화 11건, 특허 출원 및 등록 16건, 학술 발표 19건이 있음.

보고서 면수
337

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 발효축산물, 치즈 종균 개발 및 풍미증진 기술 개발, ○ 기능성 작물 부산물 활용 TMR 사료의 한우 급여시험을 통한 생산성 및 TMR 사료 기능성 다변화 연구, ○ 산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 함유 계육, 계란 생산 체계 확립
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 극대화를 위한 산야초/약용작물 이용 식품천연원료 및 천연 사료첨가제 개발 ○ 산야초/약용작물 유래 기능성분 고함유 축산물 (유제품, 육제품, 가공제품, 난제품) 개발 ○ 산야초/약용작물 유래 기능성분과 축산물 시너지 효과 규명 ○ 브랜드 제품 규격화를 위한 기능성분 정량적 평가기법 확립 ○ 강원지역 특화 기능성 축산물 브랜드 산업화 ○ 우유 및 유제품 품질고급화 및 상품화를 위한 핵심기술, 산야초/약용작물 활용 기능성 웰빙 한우 브랜드 개발, 기능성 웰빙 계육 및 계란 생산 기술 개발 ○ 대표 정량적 성과: SCI 논문 9건, 제품화 11건, 특허 출원 및 등록 16건, 학술발표 19건
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> 가) 산야초/약용작물의 원물 및 부산물을 활용한 가공식품 및 사료용 천연원료 가공기술 개발로 이용성 확대 나) 강원 청정지역 특화 유산종균 확보와 산야초/약용작물과의 발효를 통한 기능성 극대화 기술 개발 다) 기능성 천연 사료첨가제를 활용한 가축 생산성 증진 및 신선 축산물 내 전이 극대화를 위한 패키지 기술 완성 라) 정량적 품질관리 기술 개발을 통한 브랜드 축산물의 규격화 달성 ○ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> 가) 국내 산야초/약용작물 생산 및 이용성 현황 조사분석을 통한 타산업 응용성 확대 기여 나) 소비자 분석을 기초로 한 기능성 축산물 브랜드 추진방안 도출을 통해 국내 축산업 시장확대 기회 제공 다) 강원지역 특산 산야초/약용작물과 축산물의 결합을 통한 기능성 축산물 개발 계획 수립을 통해 지역 농축산 경제 활로 모색

	라) 지속적 품질관리를 통한 기능성 유효물질 정량적 보장 구현 으로 소비자 신뢰 획득 마) 강원도 특화 축산물의 가치 증진 및 글로벌화 바) 고기능성 웰빙 축산물 생산을 통한 한국 축산업 경쟁력 확보 및 축산농가 소득 증대 기회 제공				
국문핵심어 (5개 이내)	강원도	산야초	약용작물	브랜드 축산물	기능성 첨가제
영문핵심어 (5개 이내)	Gangwon-Do	Wild herbs	Medical herbs	Branded livestock products	Functional additives

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	10
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	341
4. 연구결과의 활용 계획 등	343
붙임. 참고 문헌	345

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

“강원지역 산야초/약용작물 활용을 통한 고품질 기능성 축산물 개발 및 브랜드화“

- 기능성 극대화를 위한 산야초/약용작물 이용 식품천연원료 및 천연 사료첨가제 개발
- 산야초/약용작물 유래 기능성분 고함유 축산물 (유제품, 육제품, 가공제품, 난제품) 개발
- 산야초/약용작물 유래 기능성분과 축산물 시너지 효과 규명
- 브랜드 제품 규격화를 위한 기능성분 정량적 평가기법 확립
- 강원지역 특화 기능성 축산물 브랜드 산업화

강원 지역 산야초/약용작물 활용을 통한 고품질 기능성 축산물 개발 및 브랜드화



그림 1. 산야초/약용작물 활용 기능성 축산물 개발 및 브랜드화 개요

1-2. 연구개발의 필요성

1) FTA 시장경쟁 체제와 한국 축산업 위기

- 가) 축산분야는 한국 농업생산총액의 50%의 비중을 차지하는 중요한 산업
- 나) 축산업은 자유무역 체제하에서 가장 큰 타격이 우려되는 국내 산업 분야
- 다) 식량안보 차원에서 국내 축산업의 인프라를 지켜내는 것은 국가적 현안

2) 패러다임 전환을 통한 미래형 축산업 발전의 필요성

- 가) 국민의 소득수준이 증가함에 따라 축산물에 대한 의존도는 더욱 높아짐
- 나) 기존 3D 산업의 이미지에서 탈피, 축산업을 미래 지속가능 친환경 산업으로 육성
- 다) 차별화/전문화된 축산 실용화 기술 개발을 통해 한국 축산 브랜드 세계화 필요

3) 강원지역 특화 고품질 축산물 브랜드 개발의 필요성

- 가) 강원지역은 무공해/청정 이미지와 함께, 산야초/약용작물 재배의 메카
- 나) 강원지역은 한우산업으로 대변할 수 있는 전통적으로 축산업 강세 지역
- 다) 강원 청정지역 특성 활용 미래형 고부가가치 고품질 기능성 축산물 브랜드 개발 가능
- 라) 서울대학교 평창캠퍼스 그린바이오과학기술연구원을 비롯한 풍부한 축산물 관련 산학연 인프라 보유로 기능성 축산물 브랜드 성공 가능성 높음

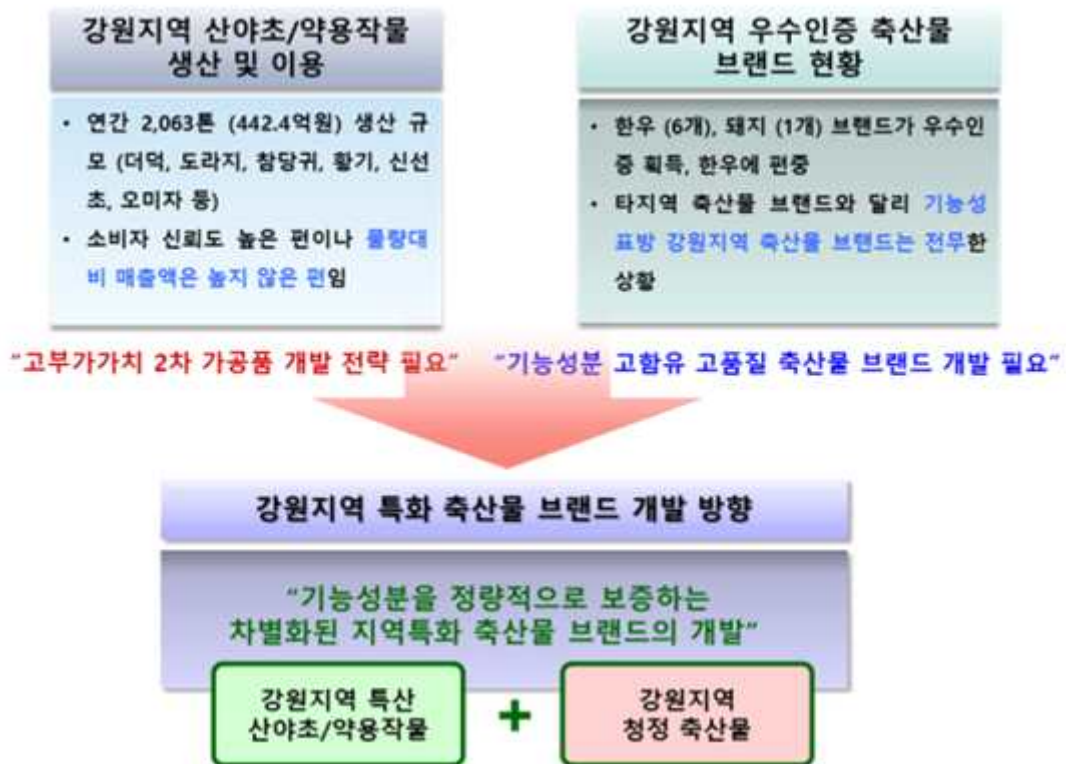


그림 2. 강원지역 특화 축산물 브랜드 개발 방향 요약

1-3. 연구개발 범위

1) 산야초/약용작물 활용 기능성 원료 개발

- 강원지역 산야초/약용작물을 활용한 기능성 식품 천연원료 및 천연 사료첨가제 개발
- 기능성 식품 천연원료의 축산물 가공식품 개발에 이용
- 기능성 천연 사료첨가제의 신선 축산식품 개발에 이용

2) 기능성분 고함유 축산물 및 축산 가공식품 개발

- 기능성 산야초/약용작물 원물 또는 부산물을 기능성 식품 천연원료 형태로 개발
- 기능성 유효성분 이용성 증진을 위한 식품 천연원료 제조방법 개발
- 가공유 (발효유, 치즈 등) 및 가공육제품 (햄, 소시지, 삼계탕 등) 제품 개발
- 제품의 기능성, 인체 전이율 및 경제성을 고려한 축산물 가공식품 제조기술 개발

3) 기능성분 고함유 신선 축산식품 개발

- 기능성 산야초/약용작물 원물 또는 부산물을 기능성 천연 사료첨가제 형태로 개발
- 대상가축의 소화생리를 고려한 가축 체내 흡수율 증진 위한 사료첨가제 제조방법 개발
- 유우, 한우, 육계, 산란계 대상 사료첨가제 형태로 급여
- 기능성 천연 사료첨가제의 양대 기능: 가축 사양기간동안에는 가축 강건성 유지 및 생산성에 기여, 출하 후에는 신선 축산물 내 기능성분 함유로 소비자의 건강 증진에 기여

4. 정량적 품질검사 시스템 개발

- Mass spectrophotometry 장비 등을 활용한 기능성 유효성분의 정량평가 시스템 확립
- 제품화 이후 QC를 통해 축산물 내 기능성분 함유량에 대한 정량 인증 시스템 확립

강원지역 산야초/약용작물 활용을 통한 고품질 기능성 축산물 개발 및 브랜드화

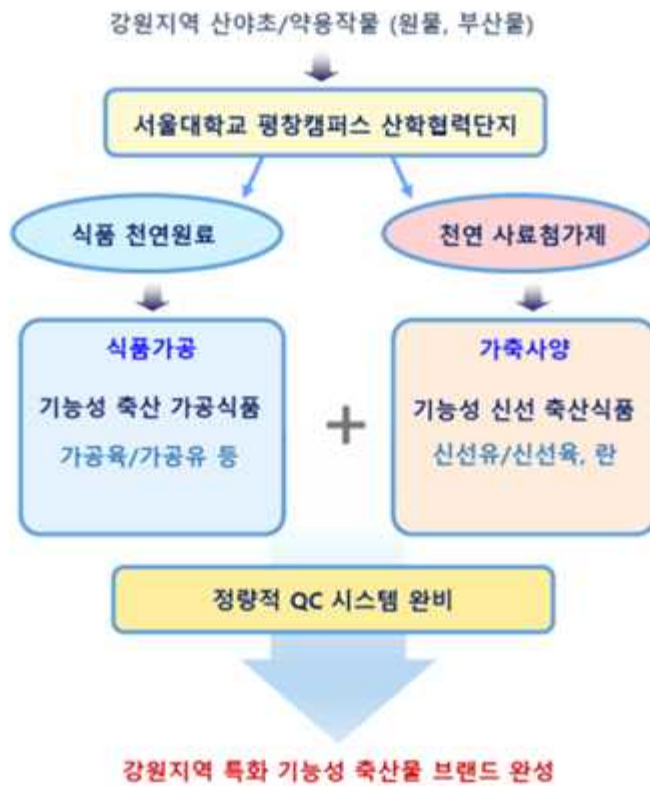


그림 3. 산야초/약용작물 활용 기능성 축산물 개발 방향 개요

2. 연구수행 내용 및 결과

<제1세부>

연구목표1: 기능성 성분 강화 우유 생산 및 미생물 제어기술 개발

1. 불포화지방산 고함유 우유생산 기술 개발

1) 불포화지방산 소스에 따른 불포화지방산 생산 우유

(1) 불포화지방산 고함유 우유생산의 필요성

- 현재 유가공 산업은 양적 성장에서 질적 성장으로 변모해가고 있고 FTA (Free Trade Agreement)가 타결됨에 따라 외국 유제품과 직접적으로 경쟁해야하는 상황에 직면해 있음.
- 과거 소비자의 우유 및 유제품 수요가 영양공급을 위한 수단이었으나 현재는 건강을 추구하기 위한 목적으로 수요가 늘고 있고 다양한 종류와 맛을 선호하고 있음.
 - 우유의 소비는 정체되어 있고 발효유 소비는 소폭 증가되고 치즈의 소비는 폭발적으로 증가.
- 시중에 판매되고 있는 우유에는 기존의 일반 우유에서 저지방, 무지방, 유기농 우유로 고급화되어 가고 있을 뿐만 아니라 기능성 성분이 강화된 우유도 선보이고 있으므로 유제품의 고급화는 선택이 아닌 필수가 되고 있음.
 - 우유의 기능성 성분은 특수 사료를 이용한 오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산의 비율 조정, CLA (Conjugated Linoleic acid) 강화 형태로 연구가 진행되고 그러한 고급 우유에 대한 소비자의 선호도가 서서히 증가하는 추세임.
- 오메가-3 지방산은 탄소 원자가 사슬 모양으로 연결된 카르복시산의 총칭으로 단백질과 탄수화물과 함께 3대 영양소인 지질의 구성 성분으로 단가 불포화지방산은 올리브기름, 땅콩기름, 카놀라유 등에 많고, 다가 불포화지방산인 오메가-3 지방산은 참치, 고등어 등 등푸른 생선에 다량 함유되어 있음.
- 오메가-6 지방산은 메틸기가 붙어있는 오메가 탄소로부터 6번째에 이중 결합이 있는 불포화 지방산으로 리놀렌산과 아라키돈산이 대표적임. 이 지방산은 옥수수 기름, 콩기름, 해바라기 씨유 등에 다량 포함되어 있음.
- 일반적으로 소나 돼지의 사료에는 옥수수가 다량 포함되어 있는데 옥수수는 대표적인 오메가-6 지방산임. 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산의 비율은 4대1로 유지하는 것이 건

강에 좋다고 알려져 있으나 육류를 많이 섭취하는 현대인은 오메가-6 지방산을 굉장히 높은 비율로 섭취하고 있음.

- 대부분의 목장에서 고기나 우유 생산을 목적으로 사육하는 가축의 경우 옥수수가 많이 함유된 오메가-6 사료를 많이 급여하기 때문에 생산물의 불포화 지방산 함량은 오메가-6 지방산이 굉장히 높은 것으로 알려져 있음.
- A. P. Simopoulos가 2002년 발행한 review 논문에 따르면 현대인의 오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산의 비율이 불균형을 이루는 이유는 현대의 공장식 축산업과 곡물사료의 사용에서 기인한 것이라고 주장함¹⁾
- 세계 오메가-3 시장은 2013년 기준 약 2조 4천억 원 규모에서 연평균 15.5 %로 빠르게 성장하여 2018년 약 4조 9천억 원 규모로 2배 이상 커질 것으로 예상됨. 국내 시장 또한 2013년 567억 원에서 2018년 1,110억 원의 시장을 형성할 것으로 전망되며, 두 자릿수의 성장률로 시장이 확대될 전망이다.
- 이러한 급격한 성장의 원인으로서는 오메가-3의 효과에 대한 소비자 인식변화, 식약처의 오메가-3 권장 섭취량 지정 (0.5~2 g/일, 한국과 일본: 1 g 이상, 프랑스: 0.5 g, 노르웨이: 0.45 g, 호주, 벨기에 등: 0.2 g 등), 고농도 원료를 활용한 고품질 제품으로 효과성 증대 및 관련 수요 증가 등이 주장되고 있음.
- 그러므로 이러한 시장 상황을 고려해 건강 기능성과 고급화 두 가지 목적을 모두 충족시킬 수 있는 우유를 생산함으로써 소비자의 수요를 만족시키고 현대인의 불포화 지방산 불균형도 개선할 수 있을 것으로 기대됨.

(2) 불포화지방산 고함유 우유생산을 위한 불포화지방산 소스 선정

- 식이용 다가 불포화 지방산 (Polyunsaturated fatty acids, PUFA)이 포화 지방산보다 더 건강한 것으로 알려지자 영양학자들은 소에게 PUFA 유래 사료를 급여하여 반추 미생물에 의한 생체경화 작용을 방지함으로써 우유 내 지방산 조성을 조절하기 시작함.
 - 예를 들어, 리놀렌산이 풍부한 아마씨 (linseed or flaxseed)와 같은 PUFA 공급원을 젖소에게 급여한 결과 우유 내 오메가-3 지방산의 비율이 증가했다는 연구가 있음²⁾
 - 또한, 젖소에게 사료와 아마씨를 함께 급여한 결과 우유 지방의 단쇄 및 중쇄 지방산의 농도가 감소하고 장쇄 지방산의 함량이 증가했다는 결과도 보고됨³⁾.

1) Simopoulos A.P. (2002), The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids Biomed Pharmacother, 56: 365-379

2) Kennelly, J.J. (1996) The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. Anim. Feed Sci. Technol. 60, 137-152.

3) Mustafa AF, Seguin P (2003) Characteristics and in situ degradability of whole crop faba bean, pea, and soybean silages. Can J

○ 아마씨는 심혈관계 질환을 예방하고 시력을 강화하며 항암 작용이 있다고 알려진 오메가-3 지방산을 공급하는 훌륭한 소스로 알려져 있음⁴⁾.

- 아마씨는 참깨와 비슷한 생김새를 가지고 있고 원산지는 중앙 아시아이며 씨의 기름을 짜내 약용과 식용 기름으로 이용되기도 함. 오메가-3 지방산의 함량이 높고 항산화 효과에 탁월한 리그난이라는 성분이 풍부함.

- 아마씨는 오메가-3 지방산 중 대표적으로 잘 알려져 있는 리놀렌산이 전체 지방산 중 약 56 % 정도로 풍부하게 함유되어 있으며 특히, 착유우에게 공급하였을 때 유지방 및 유량의 감소 없이 불포화 지방산 함량을 조절할 수 있다는 장점을 가지고 있음.

표 1. 지방 소스의 종류에 따른 지방산 조성

지방 종류	C16:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)
버터	28	14	1	1
코코넛	9	6	2	
옥수수	13	31	52	1
어류(cod liver)	14	22	1	
아마씨	6	17	14	60
돼지 기름	27	44	11	1
팜핵유	9	15	2	
콩	11	22	53	8
우지	26	31	2	

- 지방 소스 별 지방산 조성을 나타낸 위의 표를 통해 다른 지방 소스보다 아마씨의 오메가-3 지방산 함량이 굉장히 높다는 사실을 알 수 있음.

- 알파-리놀렌산 소스는 소스 자체가 가지고 있는 함유량도 중요하지만 반추동물의 반추위 보호율에 따른 실질적인 생물학적 이용성이 매우 중요함.

(3) 불포화지방산 고함유 우유생산을 위한 사료 개발

○ 사료의 배합은 유전 능력을 최대한 발휘하기 위하여 요구되는 모든 영양소를 함유한 사료를 생산하는 목적으로 만들어진 배합비를 근거로 설계됨.

- 배합비란, 이용 가능한 여러 원료를 최적의 조건으로 공급하기 위하여 작성된 원료들의 혼합 비율표로써 사료를 생산하기 위해서는 이러한 배합비를 경제적인 조건을 만족하면서 효율이 가장 좋은 방식으로 설계해야함.

Anim Sci 83(4):793-799

4) Wright DP, Read DJ, Scholes JD (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ* 21:881-891

- 다음 표는 농후 사료와 TMR (Total Mixed Ration) 사료의 배합비를 나타낸 것임.

표 2. 불포화 지방산 고함유 TMR배합비

원료	%
농축사료	31.55
단백피	2.33
비트펄프펠렛	1.58
맥주박	25.00
물	10.09
당밀	3.55
라이그라스 짚	4.42
툴페스큐 건초	7.57
알팔파 건초	1.58
티모시 건초	1.58
연맥 건초	4.11
클라인 건초	5.40
석회석	0.60
중조	0.32
발효제	0.32
합	100.00

표 3. 불포화 지방산 고함유 농후 사료 배합비

	농축사료 (%)	펠릿사료 (%)
옥수수	16.73	8.61
소맥	15.98	33.00
생미강	-	2.66
대두피	3.00	12.66
대두박	0.66	-
요소	0.62	-
소금	0.45	0.57
당밀	3.00	3.00
산화마그네슘	0.40	0.10
중조	0.40	0.60
염화암모늄	0.50	-
항곰팡이제	0.05	0.05
팜박	7.00	3.28
CMS	1.50	0.66
야자박	12.00	10.00
채종박	3.16	5.00
주정박	-	10.00
단백피	19.98	-
석회석	1.30	1.49
대두유	1.00	-
익스트루전 아마종실	12.00	8.00
향미제	-	0.08
미네랄/비타민 프리믹스	0.27	0.25
합계	100	100

○ 실험 사료는 (주)카길애그리퓨리나의 TMR 및 펠릿 사료를 통해 제조 및 급여함. (주)카길애그리퓨리나의 불포화 지방산 소스는 추출화된 (extruded) 아마씨가 주원료인 Linomax라는 제품인데 TMR 사료에는 농축사료를 통해 Linomax가 혼합되고 펠릿사료에는 Linomax가 그대로 혼합됨.

- 다음 표는 펠릿 사료 형태의 농후사료와 TMR 사료의 영양 성분을 나타낸 것임.

표 4. 농후 사료와 TMR 사료 (조사료)의 영양 성분표

%DM	펠릿사료	TMR
<i>Proximate composition</i>		
Crude protein	22.88	16.38
Crude fat	5.33	4.41
NDF	21.90	39.33
ADF	9.73	19.23
Ashes	8.17	11.09
Calcium	0.92	1.34
Phosphorus	0.60	0.42
<i>Fatty acid composition</i>		
C16:0	0.55	0.56
C18:0	0.13	0.10
Oleic acid (C18:1n9c)	1.27	0.77
Linoleic acid (C18:2n6c)	1.81	1.63
Linolenic acid (C18:3n3)	0.93	0.76
Moisture, %	12.60	37.57
급여량, kg/h/d as fed	3.00	32.00

2) 불포화지방산 사료 처리 방법 개발

(1) 불포화지방산 사료 처리 방법 개발

○ 우유 중 오메가-3 지방산과 같은 불포화 지방산 함량을 높이기 위한 방법으로 방목 및 조사료와 농후사료의 비율을 조절하는 방법, 리놀레인산 또는 리놀렌산의 함량이 풍부한 식물성 오일을 함유한 사료를 젖소에게 급여하는 경우가 효과적으로 보고되고 있음⁵⁾.

- 그러나 불포화도가 높은 식물성 프리 오일을 급여할 경우 반추위 내의 미생물 활성을 억제하고 섬유소원의 피복 등으로 인한 소화율이 감소하는 것은 물론 유지지방함량의 감소 등을 일으키는 문제점을 가지고 있음⁶⁾.

- 아마씨는 가공하는 방법에 따라 가공되지 않은 아마씨, 익스트루전 방법을 사용한 추출된 아마씨, 아마씨유로 나눌 수 있는데 이 중 앞서 언급된 문제점을 해결하기 위한 방안으로 추출된 아마씨를 사용하는 것이 제안되고 있음.

5) Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., & Tolosa, M. X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, 83, 1016-1027.

6) Kowalczyk J, Orskov ER, Robinson JJ, Stewart CS. (1977) Effect of fat supplementation on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. *Brit. J. Nutr.* 37:251-7.

- 익스트루전 가공을 통해 불포화지방산이 반추위에서 소화되지 않고 소장에서 소화되는 반추위 우회 과정이 가능하고 아마씨 1 kg 당 함유되어있는 187 g의 알파-리놀렌산 중 소장에서 흡수되는 양은 약 150 g 정도로 평가받고 있음.

- 종실의 경우 cyanide라는 항영양인자가 존재하는데 이를 파괴하는 공정이 함께 동반되어야 흡수율이 높아질 수 있음.

(2) 불포화지방산 고함유 우유생산을 위한 사료 검정

○ 동물 사료 전문업체인 (주)카길애그리퓨리나에서 개발한 불포화 지방산 사료를 급여하였을 때 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산의 비율이 낮아졌는지를 검정하기 위해 서울대학교 평창캠퍼스 실험목장 착유우 3두를 대상으로 원유를 채취하여 실험함.

- 실험은 2016년 10월 4일부터 11월 4일까지 총 5주 동안 실시하였음.

- 착유우 3두의 젖소명은 16호, 49호 그리고 72호로 설정함.

○ 불포화 지방산 사료를 급여하기 전에 시중에 일반적으로 판매되고 있는 제품을 일정 기간 동안 급여한 후 착유한 원유를 대조군 (D0)으로 설정하여 실험을 진행.

- 사료급여는 농후사료를 하루에 3 kg, TMR (Total Mixed Ration) 사료를 하루에 32 kg을 10일 동안 급여한 후 착유하여 분석함.

- 이후 4주간 오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산의 비율을 조절하기 위해 시험 사료를 급여하여 매주 2회씩 원유를 채취하여 불포화 지방산 조성과 원유 성분, TA (Titratable Acidity), pH를 분석 및 측정함.

○ 원유의 불포화 지방산 조성을 알아보기 위해 동물 사료 전문업체인 (주)카길애그리퓨리나에 의뢰하여 가스 크로마토그래피를 이용하여 측정하였고 분석 조건은 아래와 같음.

표 5. 원유의 지방산 조성을 측정하기 위한 Capillary gas chromatography 분석 조건

Parameter	Conditions
Instrument	Agilent 7890B
Column	SP-2560 (100 m x 0.25 mm)
Temperature programming	140 °C (5 min) → 4 °C/min → 240 °C (45 min)
Injection temperature	250 °C
Detector temperature	250 °C
Detector	FID

- 원유의 지방산 조성을 측정하기 위한 기기는 Agilent 7890B를 이용하였고 column은 SP-2560 (100 m x 0.25 mm) 제품을 사용하였음. 검출기는 가스 크로마토그래피에서 가장 보편적으로 사용하는 검출기인 FID (Flame Ionization Detector)를 사용하였고 분석 조건은 140 °C에서 5분으로 유지하고 분당 4 °C로 온도를 높여 45분 동안 240 °C를 유지하도록 설정한 후 주입과 검출이 250 °C에서 이루어질 수 있도록 함.
- 원유의 다양한 불포화 지방산 중 본 실험에서 검증하고자 하는 오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산의 비율을 각 샘플마다 같은 실험 조건에서 분석. 표 2를 통해 분석 결과를 확인할 수 있음.

표 6. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 지방산 비율 변화

Treatment (Day)	Number of milk cattle	Total w-6/w-3 ratio	Average
D0	16호	14.86	14.57
	49호	14.41	
	72호	14.44	
D7	16호	4.35	4.84
	49호	5.08	
	72호	5.10	
D10	16호	3.83	4.29
	49호	4.20	
	72호	4.86	
D14	16호	3.83	4.50
	49호	5.00	
	72호	4.65	
D17	16호	3.77	3.98
	49호	4.12	
	72호	4.05	
D21	16호	4.11	4.84
	49호	5.06	
	72호	5.34	
D24	16호	3.97	3.99
	49호	3.70	
	72호	4.29	
D28	16호	4.75	4.73
	49호	4.70	
	72호	4.73	
D31	16호	4.93	4.78
	49호	4.32	
	72호	5.09	

- 일반 사료를 먹인 착유우를 대조군 (D0)으로 설정하고 불포화 지방산 사료를 섭취한 착유우로부터 채취한 샘플을 비교하면 대조군의 지방산 비율이 월등히 높은 것을 확인할 수 있음. 시험 사료를 먹인 후부터 비율이 급격히 낮아져 17일 째에는 오메가-6와 오메가-3 지방산의 비율이 4:1로 근접한 수치까지 떨어진 것을 확인.
- 17일에는 불포화 지방산 비율이 가장 많이 떨어졌고 21일에는 불포화 지방산 비율이 소폭 상승했으나 24일 째에 17일의 수치까지 다시 떨어졌음. 실험 마지막 주에는 오메가-6와 오메가-3 지방산의 비율이 약 4.7 정도로 안정된 것을 확인함.
- 원래 목표로 했던 불포화 지방산 비율인 4 : 1을 완전히 달성하지 못한 것은 실험용 젖소의 수가 작고 다른 착유우와 분리하여 관리해야 하는 문제점으로 인해 사양 관리가 정확히 이루어지지 않았을 것으로 생각됨.

- 불포화 지방산 비율의 경향성을 한 눈에 쉽게 파악하기 위해 16호, 49호, 72호 착유우의 원유 샘플의 평균값을 꺾은 선 그래프로 나타냄.

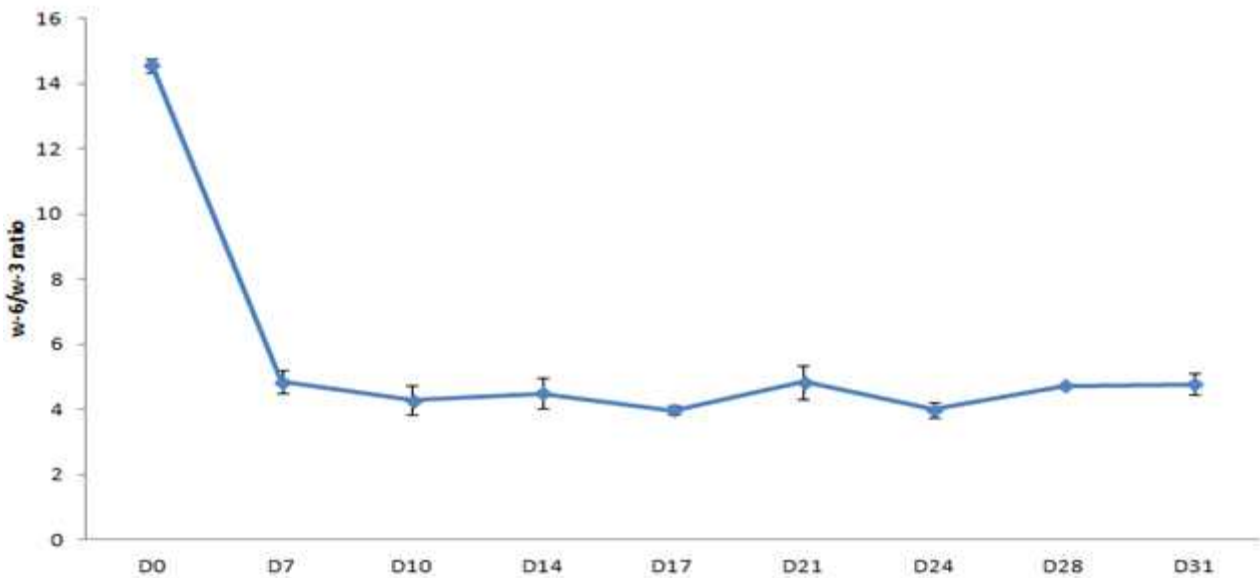


그림 4. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 오메가-3지방산과 오메가-6 지방산의 비율

- 그래프를 통해 확인할 수 있듯이, 시험 사료를 급여하고 3일 만에 불포화 지방산 비율의 평균값이 대조군 14.57에서 4.84로 굉장히 빠른 감소 추세를 보인 것을 확인함.
- 시험사료를 먹이는 기간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 시험사료 급여 17일째에는 비율이 소폭 상승함.
- 불포화 지방산 비율은 감소하였으나 시험사료의 급여가 유성분에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 원유 분석 기기인 milkoscan 6,000 serier (Foss Electric Co., Denmark)를 이용하여 분석하였음.
- 원유의 주요 성분인 Fat, Protein, Lactose, Total Solid 성분을 분석하여 표 7에 나타냄.

표 7. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 원유의 성분 분석 결과

(단위: %)

Treatment (Day)	Number of milk cattle	Fat	Protein	Lactose	Total Solid
D0	16호	2.57	3.37	4.60	11.56
	49호	4.35	3.44	4.65	13.90
	72호	4.30	3.07	4.76	13.27
D7	16호	3.54	3.42	4.53	12.59
	49호	4.01	3.38	4.47	13.24
	72호	4.23	3.04	4.56	12.86
D10	16호	3.65	3.34	4.56	12.65
	49호	4.13	3.42	4.58	13.54
	72호	4.02	3.01	4.63	12.70
D14	16호	2.99	3.47	4.70	12.28
	49호	3.78	3.44	4.65	13.29
	72호	3.79	3.00	4.71	12.60
D17	16호	3.31	3.45	4.63	12.43
	49호	4.04	3.48	4.57	13.47
	72호	3.94	3.03	4.72	12.78
D21	16호	3.32	3.60	4.68	12.64
	49호	4.02	3.52	4.57	13.46
	72호	3.25	3.11	4.66	12.06
D24	16호	3.38	3.47	4.63	12.57
	49호	4.65	3.58	4.58	14.20
	72호	3.63	3.04	4.68	12.45
D28	16호	3.12	3.48	4.67	12.25
	49호	3.96	3.67	4.60	13.62
	72호	4.17	3.03	4.66	12.94
D31	16호	2.76	3.55	4.77	12.08
	49호	3.59	3.68	4.55	13.14
	72호	4.35	3.00	4.42	12.78

- 지방은 대조군의 경우 16호가 49호, 72호에 비해 성분 함량이 낮게 측정되었으나 시험 사료를 급여하면서 점점 증가하여 일반적인 지방 수준에 도달하는 것을 확인함. 49호의 지방 성분은 일정하지는 않으나, 평균적으로 4%를 유지하는 것을 확인함. 72호의 경우 시험 사료 급여 후 6일까지는 4%를 이상으로 유지되었으나 10일 이후로는 4% 이하로 점차 감소하는 것으로 나타남.
- 단백질과 젖당 함량은 착유우마다 약간의 수치 차이가 나타났으나 16호, 49호, 72호 각각을 시험사료 급여 기간에 따라 비교해 보았을 때는 변화량이 매우 적은 것을 확인함.

- 각각의 착유우 마다 우유 성분 차이가 나타났기 때문에 사료 섭취 기간별로 경향성을 확인하기 위해 16호, 49호, 72호 3두의 원유 샘플의 평균값을 그래프로 확인함.

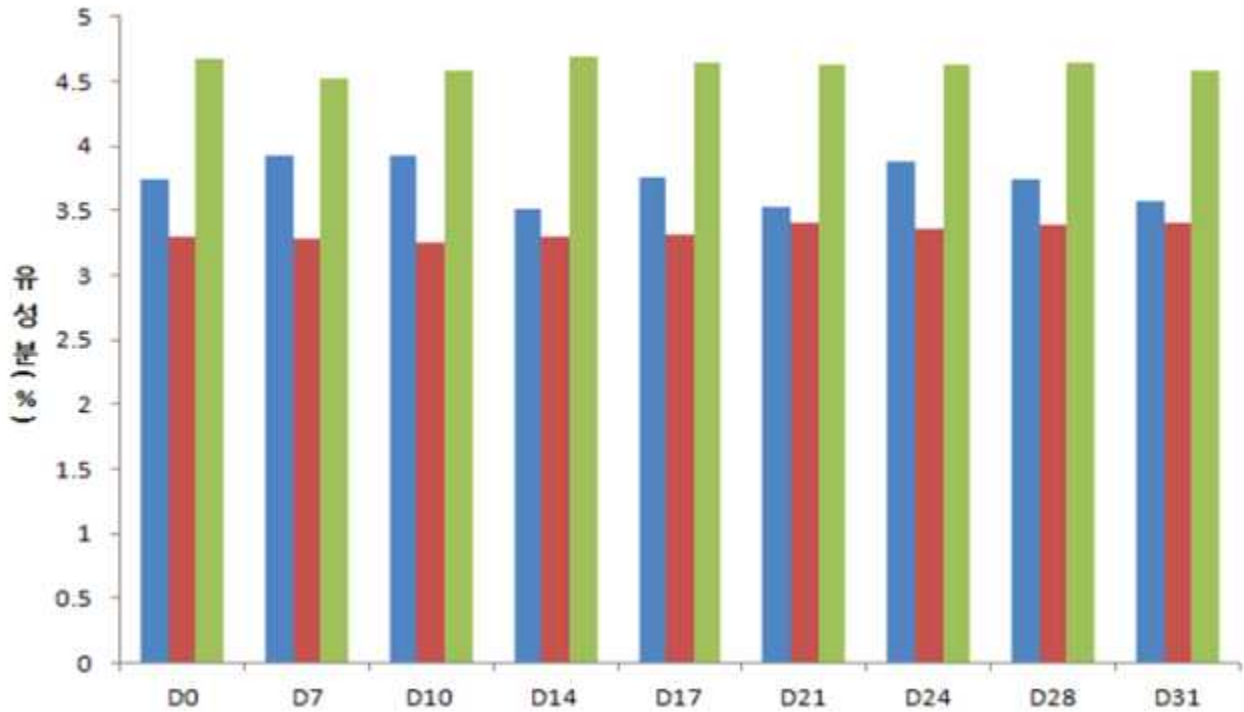


그림 5. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 원유의 지방, 단백질, 젖당 함량 변화
(Blue: 지방, Red: 단백질, Green: 젖당)

- 그래프를 통해 단백질과 젖당 성분비는 소폭 변화가 있었으나 거의 일정하게 유지된 것을 확인. 지방의 경우에는 수치 변화가 단백질, 젖당에 비해 크게 나타났지만 사료 섭취 기간이 경과함에 따라 증가하거나 감소하는 경향성은 확인할 수 없었기 때문에 착유우의 건강 및 영양 상태와 환경이 주요 요인으로 작용한 것으로 예상됨.
- 따라서, 우유 성분의 유의적인 변화 없이 오메가-6와 오메가-3 불포화 지방산 비율은 본 실험의 목적인 4 : 1로 감소하였으므로 (주)카길에그리푸리나의 오메가 사료를 급여 함으로써 기능성 원유를 생산할 수 있는 것을 확인함.

표 8. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 pH와 TA 측정 결과 값

Treatment (Day)	Number of milk cattle	pH	TA
D0	16호	6.7	0.17
	49호	6.58	0.19
	72호	6.64	0.19
D7	16호	6.69	0.18
	49호	6.64	0.19
	72호	6.68	0.19
D10	16호	6.73	0.18
	49호	6.68	0.19
	72호	6.72	0.19
D14	16호	6.71	0.19
	49호	6.7	0.18
	72호	6.73	0.18
D17	16호	6.7	0.17
	49호	6.6	0.17
	72호	6.65	0.18
D21	16호	6.78	0.17
	49호	6.67	0.17
	72호	6.82	0.17
D24	16호	6.78	0.15
	49호	6.67	0.15
	72호	6.67	0.17
D28	16호	6.87	0.14
	49호	6.73	0.15
	72호	6.73	0.17
D31	16호	6.64	0.17
	49호	6.68	0.17
	72호	6.68	0.17

- 우유를 시장에 판매하기 위해 시행하는 대표적인 품질관리 (Quality Control) 항목인 pH와 TA (Titratable Acidity)를 통해 원유의 품질을 확인할 수 있음. TA는 적정 산도로써 우유가 함유한 산성도를 알칼리 표준액을 사용하여 일정 조건하에서 적정할 수 있는 산성도를 의미함. 신선한 우유의 pH value는 6.5~6.7이고 TA 값은 0.15~0.16 %임.

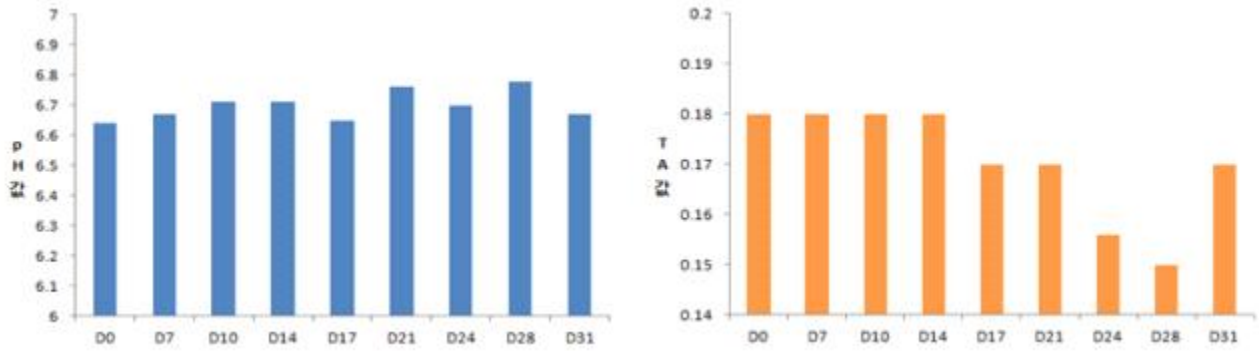


그림 6. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 pH와 TA값 측정

- 3두의 착유우에서 채취한 원유를 측정 후 평균값을 사료 섭취 기간에 따라 나타낸 그래프 (그림 6)를 통해 pH value는 6.6~6.7로 유지되는 것을 확인함. TA 값의 경우에는 초반에 0.18을 유지했으나 시간이 지날수록 0.15 정도로 정상범위로 돌아온 것을 확인.
- 마지막 주의 원유 샘플의 TA 평균값은 0.17로 소폭 상승했는데 이것은 원유를 채취한 후 바로 측정하지 못하고 약 5일 정도 냉장 보관했기 때문에 원유 품질이 조금 하락했기 때문인 것으로 추정됨.

2. 우유 내 미생물 제어기술 개발

1) 강원도 지역 내 (횡성군·평창군) 원유의 미생물 분석

(1) 농가 별 원유 샘플링

- 강원도 지역 내의 개별 농가별 및 표준 원유 미생물 균총을 분석·파악하기 위해 횡성군 10개 (2016.09.19), 평창군 10개 (2016.09.29~2016.09.30) 농가를 선정하여 착유하고 집유 전 탱크로리에서 원유 500 ml를 멸균된 용기에 샘플링.

표 9. 횡성군·평창군 대상 농가별 기본 정보

지역	No.	농가	착유두수(두)	우유생산량(kg/day)	납품처	사양특이성
횡성군	1	태현지	45	1200	범산우유	농후사료-퓨리나유기농 조사료-수입건초 자가배합(알팔파, 수단사일리지, 연맥)
	2	장군	100	3000	범산우유	농후사료-안성축협유기농 조사료-수입건초 자가배합(알팔파, 수단사일리지, 연맥)
	3	동은	45	1200	롯데푸드	농후사료-퓨리나 조사료- 톨페스큐, 티모시
	4	경진	55	1500	롯데푸드	농후사료-퓨리나 조사료- 연맥
	5	출록	40	1100	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료- 자가 TMR (연맥, 티모시, 옥수수 자가)
	6	무례	60	1500	롯데푸드	농후사료-퓨리나 조사료- 수단 헤일리지
	7	영옥	20	500	롯데푸드	농후사료-선진 조사료-톨페스큐
	8	하나	25	700	낙농진흥회	농후사료-선진 조사료-티모시, 연맥
	9	대흥운	35	1000	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료- 연맥, 페스큐
	10	지구	80	2500	롯데푸드	농후사료-퓨리나 조사료-티모시

평창 군	11	하일	60	1500	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내(옥수수), 수입건초(구입)
	12	청송	55	1500	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내에서 수입건초와 배합
	13	무진	35	1000	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-TMR(여주)
	14	창화	80	2200	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내(옥수수), 건초, 짚(구입)
	15	은미	30	970	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내(옥수수), 수입건초
	16	양지	64	1950	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내(옥수수), 수입건초
	17	하평	25	800	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내(옥수수), 수입건초(티모시)
	18	강소 망	39	1200	롯데푸드	농후사료-퓨리나 조사료-수입건초(티모시, 톨페스큐), TMR
	19	보배	67	2300	롯데푸드	농후사료-CJ 조사료-가내(옥수수), 수입건초(티모시, 알팔파, 연맥)TMR
	20	서울 대목 장	26	780	오멜	농후사료-퓨리나 조사료-수입건초(티모시, 알티블루 큐브, 톨페스큐짚)

(2) 원유 일반 성분 분석 및 균수 측정

- 샘플링한 원유는 각각 milkoscan 6,000 serier (Foss Electric Co., Denmark)을 이용하여 일반성분을 분석.
- TBC (Total Bacterial count)는 PCA (Plate Count Agar) plate에 원유를 희석, 도말하여 37 ℃ 24시간동안 배양한 후 계수.
- PBC (Psychrotrophic Bacterial count)는 원유를 PCA배지액과 혼합하여 평판한 후 7 ℃ 10일동안 배양, 계수.

표 10. 원유 성분 분석 및 균수 측정 결과

No.	Fat	Protein	Lactose	TS	SNF	TBC	PBC
1	3.28	2.91	4.52	11.63	8.47	1.E+04	1.E+03
2	3.22	3.15	4.58	11.88	8.73	2.E+03	8.E+01
3	3.3	3.12	4.56	12.08	8.82	7.E+02	4.E+02
4	2.95	2.9	4.45	11.38	8.49	6.E+04	2.E+03
5	3.68	3.13	4.52	12.31	8.7	2.E+03	2.E+02
6	3.17	2.81	4.46	11.54	8.41	6.E+03	8.E+02
7	3.97	3.23	4.44	12.53	8.65	9.E+02	5.E+03
8	3.09	2.96	4.27	11.21	8.21	1.E+05	9.E+03
9	4.09	3.23	4.46	12.7	8.7	1.E+04	2.E+02
10	2.72	3.03	4.55	11.36	8.7	7.E+02	6.E+02
11	3.12	3.11	4.53	11.79	8.69	3.E+03	3.E+02
12	3.06	3.16	4.56	11.85	8.8	9.E+02	4.E+01
13	3.41	2.98	4.61	12.02	8.64	3.E+03	5.E+02
14	4.05	3.11	4.55	12.7	8.74	1.E+03	8.E+01
15	3.57	3.15	4.54	12.33	8.79	9.E+02	2.E+02
16	3.78	3.22	4.65	12.67	8.93	4.E+03	7.E+02
17	3.66	3.06	4.53	12.24	8.61	3.E+04	3.E+02
18	3.51	2.96	4.52	12.19	8.66	4.E+03	1.E+02
19	3.74	3.14	4.59	12.44	8.76	3.E+04	1.E+03
20	4.08	3.37	4.5	13.22	9.21	3.E+05	3.E+03

(3) 원유 미생물 균총 분석

- 원유 내 미생물 균총 분석을 위해 DNA추출 후 Miseq system을 이용하여 NGS (Next generation sequencing) 실행, RTA (Real Time Analysis. v1.18)을 이용하여 일차분석 진행.

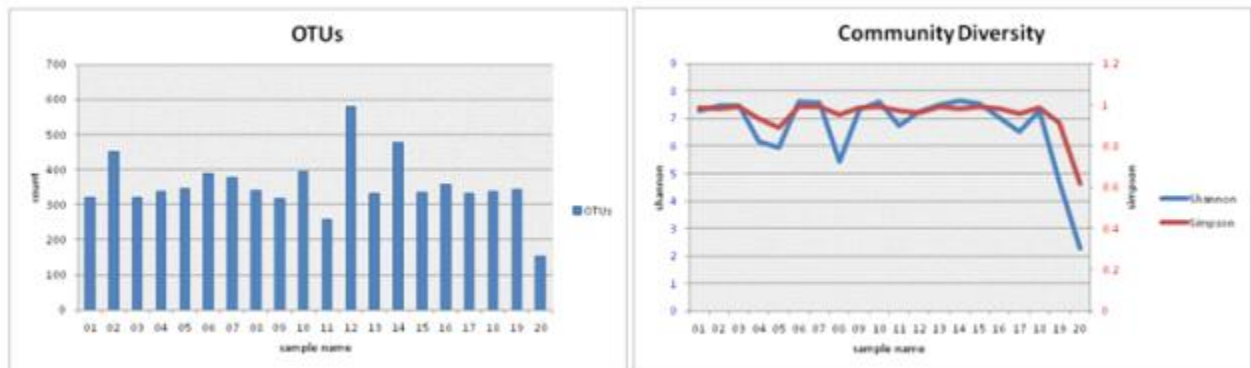


그림 7. 원유별 균총의 richness와 diversity

- 원유 내 균총의 richness를 판별하기 위해 분류단위인 OTU (Operational Taxonomic Unit)값을 살펴본 결과, 12번 샘플에서 가장 많게 20번 샘플에서 가장 적게 OTU가 확인됨. 군집별 다양성 측면에서도 20번 샘플의 다양성이 다른 샘플에 비해 떨어지는 것을 볼 수 있음 (그림 7).

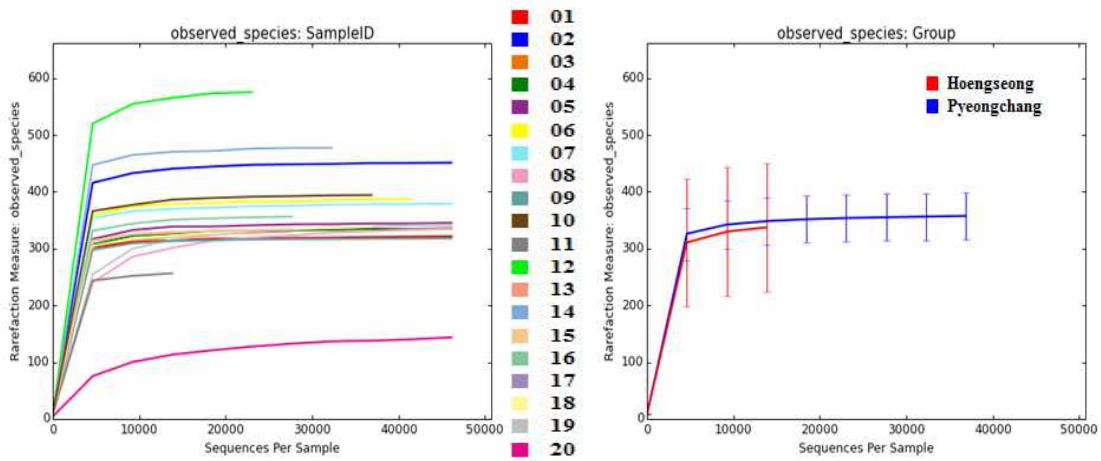


그림 8. 원유별 α -diversity 척도 결과

- 일정한 환경 내에서의 종수의 다양성을 나타내는 α -diversity를 살펴본 결과, 12, 20번 샘플을 제외하고는 비슷한 정도의 다양성을 갖는 것으로 나타났으며 20번 샘플의 다양성이 다른 샘플에 비해 비교적 적은 것으로 추정. 황성군 (붉은색)과 평창군 (푸른색) 두 지역을 비교했을 때는 평창군에 비해 황성군의 다양성이 떨어지는 것으로 나타남 (그림 8).

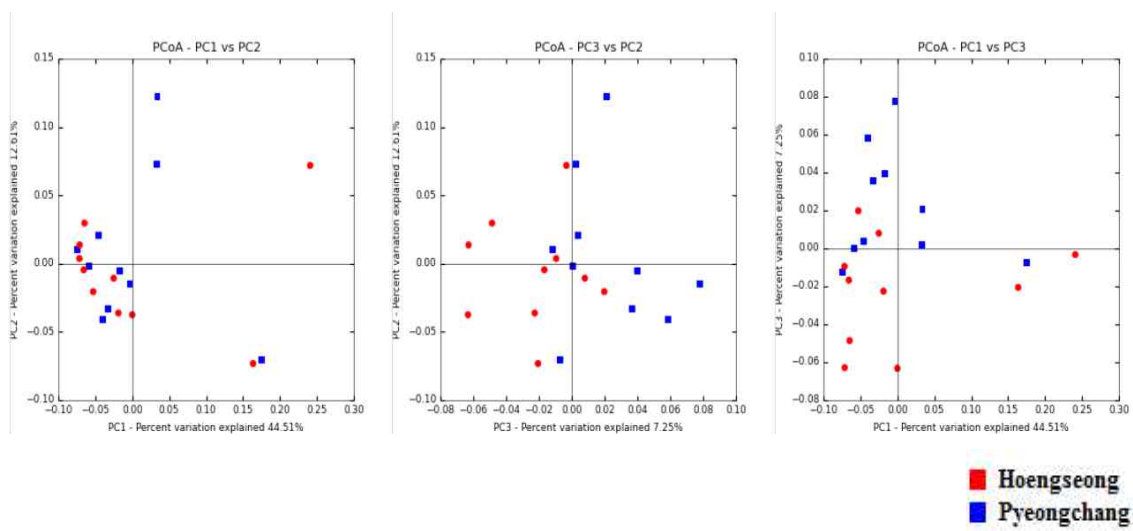


그림 9. 지역별 원유 PcoA plot 2D 결과

○ PcoA plot (Principal Coordinate Analysis) 결과 횡성군 원유 (붉은색)와 평창군 원유 (푸른색)가 두 군집으로 분리됨을 살필 수 있음 (그림 9).

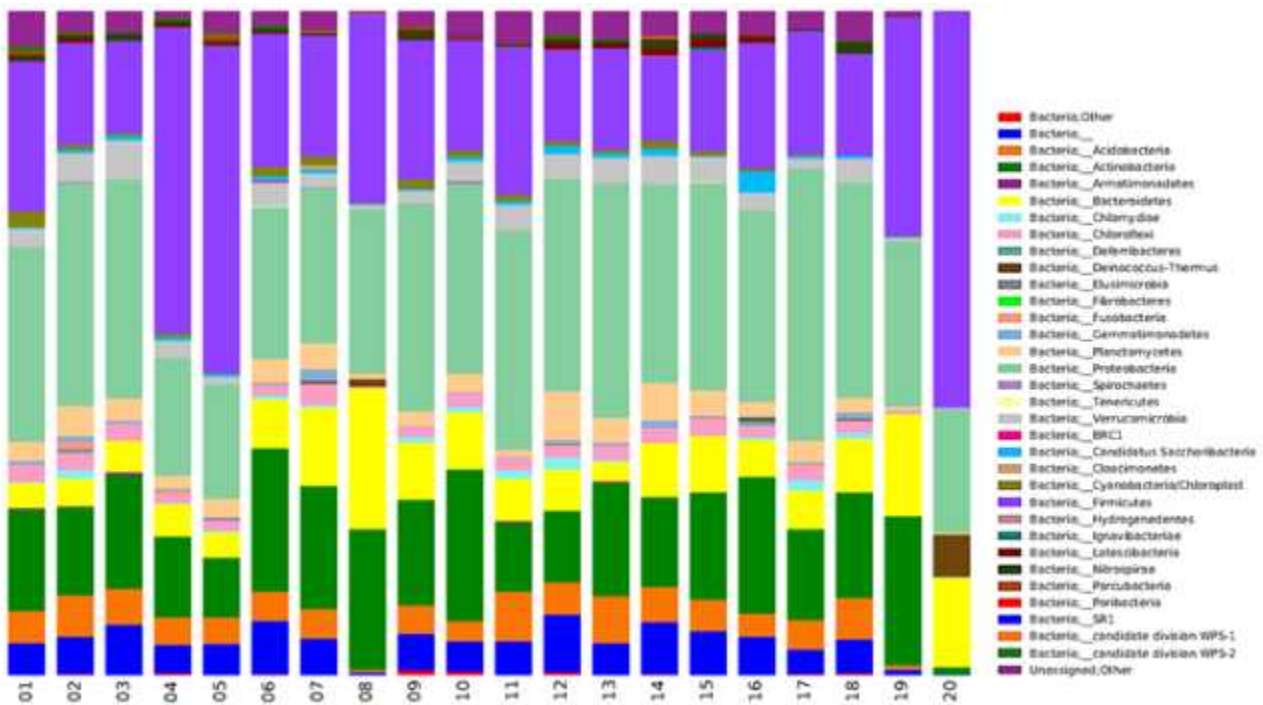


그림 10. 원유별 Phylum level 분포 결과

표 11. 상위 5개 Phylum level 분포량

Count	Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria	Bacteroidetes	Acidobacteria
1	29.3%	22.7%	15.3%	3.8%	4.8%
2	33.5%	15.4%	13.3%	4.2%	6.3%
3	32.9%	13.8%	17.2%	4.6%	5.4%
4	17.8%	46.0%	12.2%	4.8%	4.2%
5	17.2%	49.3%	9.1%	3.7%	3.9%
6	22.8%	20.0%	21.6%	7.4%	4.4%
7	23.3%	18.2%	18.6%	11.8%	4.4%
8	24.9%	28.3%	21.3%	21.1%	0.4%
9	31.3%	21.0%	15.9%	8.6%	4.3%
10	28.5%	16.7%	22.8%	8.6%	3.1%
11	33.0%	22.3%	10.3%	6.3%	7.6%
12	32.0%	13.9%	10.9%	6.1%	4.7%
13	35.4%	15.3%	17.0%	2.9%	7.0%
14	29.8%	12.7%	13.6%	8.1%	5.4%
15	31.4%	15.3%	16.3%	8.4%	4.6%
16	29.0%	19.0%	20.6%	5.5%	3.5%
17	41.0%	18.6%	13.6%	5.8%	4.5%
18	32.4%	15.4%	15.9%	8.1%	6.2%
19	25.0%	32.9%	22.4%	15.4%	0.6%
20	18.7%	59.6%	1.2%	13.4%	0.1%

- 원유 별 Phylum level 분포를 살펴본 결과, 모든 샘플에서 Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes 문이 많은 부분 (60-70 %)을 차지하는 것으로 나타났으며 Bacteroidetes, Acidobacteria 문이 뒤따르는 것으로 나타남.
- 특징적으로 4, 5, 20번 샘플에서 Firmicutes문의 비율이 높게 나타났고 8, 19, 20번 샘플에서 Bacteroidetes문의 비율이 높게 나타남.

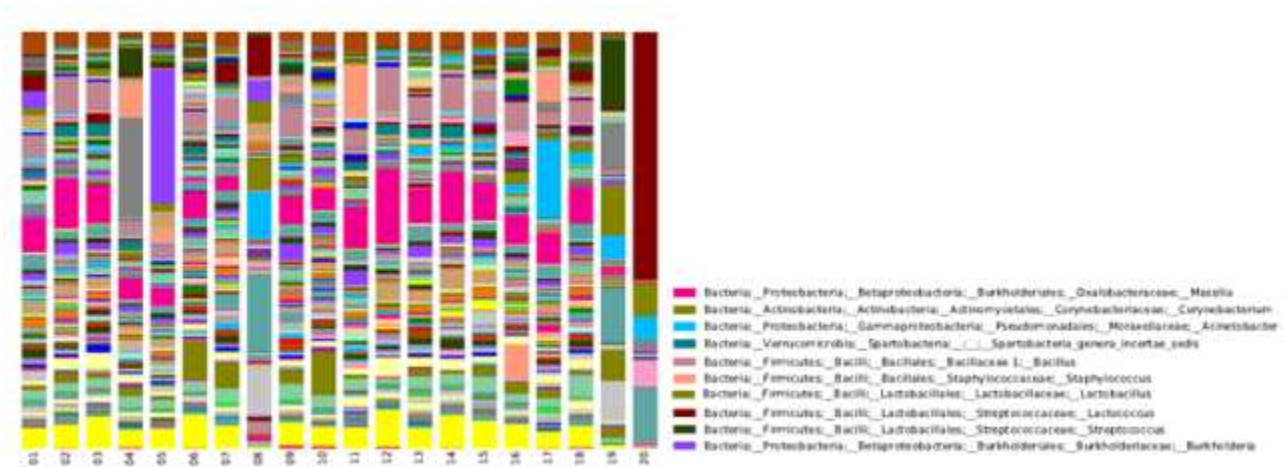


그림 11. 원유별 Genus level 분포 결과

표 12. 대표 5개 Genus level 분포량

Count	Massilia	Bacillus	Burkholderia	Lactococcus	Pediococcus
1	8.0%	5.3%	1.5%	3.6%	4.1%
2	12.1%	8.5%	2.6%	0.0%	0.1%
3	9.0%	6.3%	1.5%	0.2%	0.0%
4	5.1%	3.0%	1.6%	0.4%	0.2%
5	4.1%	3.1%	1.0%	0.3%	32.2%
6	6.2%	4.3%	1.0%	0.7%	0.2%
7	3.5%	5.4%	1.0%	4.4%	0.1%
8	0.6%	0.9%	0.2%	9.5%	4.8%
9	6.5%	7.1%	3.6%	0.0%	0.4%
10	5.3%	3.0%	1.5%	0.4%	0.0%
11	9.9%	4.3%	3.3%	0.0%	0.0%
12	18.2%	10.7%	0.6%	0.1%	0.1%
13	8.5%	5.2%	2.8%	0.0%	0.0%
14	12.5%	8.0%	1.6%	0.0%	0.0%
15	9.2%	6.7%	1.8%	0.0%	0.0%
16	7.1%	6.6%	0.5%	0.6%	0.1%
17	7.5%	2.2%	1.3%	1.7%	0.1%
18	8.7%	5.4%	1.7%	2.5%	0.0%
19	1.1%	0.6%	0.1%	0.5%	0.0%
20	0.2%	0.1%	0.1%	59.4%	0.0%

- Genus level 분포를 살펴본 결과, 대표적으로 Proteobacteria 문의 Massilia속의 비율이 대부분 샘플에서 높게 나왔으나 8, 19, 20번 샘플에서는 거의 검출되지 않음.
- 20번 샘플에서는 Lactococcus속의 비율이 약 60 %를 차지, 5번 샘플에서는 Pediococcus속의 비율이 약 32 %를 차지.
- 8번과 19번 샘플은 다른 샘플들과 달리 Kocuria (약10 %), Chryseobacterium (13-18 %), Acinetobacter (5-11 %), Enhydrobacter (7-12 %)속의 분포를 가지는 것으로 나타남. 19번 샘플은 이외에도 Streptococcus속이 16 %를 차지.

2) 원유 내 미생물 제어

(1) 원유 내 미생물 품질 제어 필요성

- 우유는 착유 후부터 가공 전까지 냉장온도에서 저장되고 이 온도에서 우유의 장시간 저장은 낙농업에 있어 품질과 밀접한 관련이 있음. 냉장온도와 같은 저온에서도 자랄 수 있는 미생물들을 내냉성 미생물 (psychrotroph)이라 일컬으며 토양, 물, 공기 등 자연계에 널리 분포하고 있고 우유의 일반적인 오염원임.
- 원유 내의 내냉성 미생물은 냉장저장 중 증식하여 일부 내열성 효소를 생산하는데 이는 주로 지방분해효소나 단백질분해효소로 살균온도에서도 잔존하여 유제품의 품질 (off-flavor, bitter taste, rancidity 등)과 수율의 저하를 가져옴.
- 대표적이며 내냉성 미생물은 Pseudomonas속이며 그람음성균이고 이외에도 Acinetobacter, Aeromonas, Escherichia, Bacillus, Micrococcus 등이 내냉성 미생물에 속함.
- 원유 내 내냉성 미생물의 수는 착유 후 원유의 저장온도, 저장기간 등에 따라 크게 좌우되는데, 양호한 위생상태이면서 4 °C이하에 저장했을 경우 내냉성 미생물은 총 미생물 수의 10 % 미만이며 빠르게 증식하지 않지만, 비위생상태일 경우 빠르게 증식.
- 원유는 자연적으로 젖산구균과 그람음성간균의 증식을 억제하는 lactoperoxidase system이 있지만 이로는 충분치 않기 때문에 가공 전 냉장 우유를 특별한 온도처리를 하는 등의 부가적인 방법을 통해 통제하고자 함.
- 우리나라에서는 1980년대 우유 냉장이 일반화되기 시작하면서 내냉성 미생물에 대한 관심이 고조되기 시작. 최근 낙농가에 냉각기가 설치되고 탱크로리에 의한 콜드체인시스템 (cold chain system)이 도입되면서 원유의 미생물학적 품질이 크게 향상되었으나, 여전히 내냉성 미생물의 오염으로 인한 원유의 품질 제어는 어려운 상황.

- 해외, 특히 유럽에서는 무살균 원유를 이용하여 숙성치즈를 제조. 살균한 원유를 사용하였을 때보다 고유의 풍미를 가짐.
- 향후 국내에서도 규제가 완화될 경우, 살균하지 않은 원유를 이용하여 유제품을 가공할 수 있기 때문에 주요 내냉성 미생물과 병원성 미생물을 제어할 필요가 있음.

(2) 주요 원유 미생물 제어 미생물 분리

표 13. 원유 내 주요 병원성, 내냉성 레퍼런스 미생물

Number	Name	ATCC	KCTC	Gram	Morphology
A	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	KCTC3624	+	rod
B	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	KCTC1682	-	rod
C	<i>Listeria monocytogenes</i>		KCTC13064	+	rod
D	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	KCTC3586	+	rod
E	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	KCTC1621	+	grape-like cluster
F	<i>Salmonella typhimurium</i>			-	rod
G	<i>Yersinia enterocolitica</i>			-	rod
H	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	KCTC5327	-	spiral
a	<i>Bacillus circulans</i>	ATCC 4513	KCTC3347	+	rod
b	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	KCTC1918	+	rod
c	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	KCTC3135	+	rod
d	<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416	KCTC2966	-	rod
e	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698	KCTC3063	+	cocci (tetrad or irregular cluster)
f	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525	KCTC42821	-	rod
g	<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633	KCTC1644	-	rod

- 선행 연구 레퍼런스를 참고하여 원유 내 주요 미생물을 선발. 병원성 미생물 6종 (A, B, C, D, E, H), 내냉성 미생물 7종 (a, b, c, d, e, f, g)은 KCTC에서 구매. 병원성 미생물 2종 (F, G)은 분류.

- 유산균을 원유로부터 분리 (총 309종) 후 해당 미생물에 대한 항균 능력 검증.

- 유산균은 BCP (Bromo Cresol Purple) agar 와 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) agar를 이용하여 30 °C, 37 °C로 분리하여 분리. BCP agar를 이용하여 121종, MRS agar를 이용하여 188종 분리.
- 항균력 검정은 paper disc assay 법을 이용.

연구목표2: 고급 우유의 생산화 기반기술 확립 및 고급 발효유, 치즈 생산을 위한 증균 선발

1. 불포화지방산 함유 우유의 필드 적용

1) 불포화지방산 생산 우유의 생산성 검증

(1) 불포화지방산 고함유 우유 생산성 검증을 위해 사용된 사료 정보

- 1차년도 실험을 통해 대표적인 오메가-3 지방산 소스로 알려진 아마씨를 익스트루전 가공하여 추출하는 방법으로 처리함으로써 기존에 알려진 소화율 및 유지방 감소의 단점을 보완하고 우유 내 오메가-3 지방산의 함량을 효율적으로 높이는 결과를 확인함.
- 실험 사료는 (주)카길에그리퓨리나의 TMR 및 펠렛 사료를 적절한 배합비로 제조 및 급여함. (주)카길에그리퓨리나에서 제조된 사료는 익스트루전 가공 방법을 통해 추출된 아마씨가 주원료인 Linomax라는 제품이고 다음 표는 농후 사료와 TMR (Total Mixed Ration) 사료의 영양 성분표를 나타낸 것임.

표 14. 불포화 지방산 고함유 TMR 및 농후 사료 배합비

TMR 배합비	
원료	성분비 (%)
농축사료	31.55
단백피	2.33
비트펄프펠렛	1.58
맥주박	25
물	10.09
당밀	3.55
라이그라스짚	4.42
톨페스큐건초	7.57
알팔파건초	1.58
티모시건초	1.58
연맥 건초	4.11
클라인건초	5.4
석회석	0.6
중조	0.32
발효제	0.32
합	100

농후 사료 배합비		
원료	농축사료 (%)	펠렛사료 (%)
옥수수	16.73	8.61
소맥	15.98	33
생미강	-	2.66
대두피	3	12.66
대두박	0.66	-
요소	0.62	-
소금	0.45	0.57
당밀	3	3
산화마그네슘	0.4	0.1
중조	0.4	0.6
염화암모늄	0.5	-
항곰팡이제	0.05	0.05
팜박	7	3.28
CMS	1.5	0.66
야자박	12	10
채종박	3.16	5
주정박	-	10
단백피	19.98	-
석회석	1.3	1.49
대두유	1	-
익스트루전아마종실	12	8
향미제	-	0.08
미네랄/비타민프리믹스	0.27	0.25
합계	100	100

- 사료의 배합은 착유우의 우유 생산성을 유지하면서 불포화 지방산 함유량을 높일 수 있도록 만들어진 배합비를 근거로 설계되었음. TMR 사료에는 농축사료를 통해 Linomax 제품이 혼합되고 펠렛사료에는 Linomax가 그대로 혼합된 형태로 착유우에게 급여함.
- 펠렛 사료 형태의 농후사료와 TMR 사료의 영양 성분을 나타낸 표는 다음과 같음.

표 15. 농후 사료와 TMR 사료 (조사료)의 영양 성분표

%DM	펠릿사료	TMR
<i>Proximate composition</i>		
Crude protein	22.88	16.38
Crude fat	5.33	4.41
NDF	21.90	39.33
ADF	9.73	19.23
Ashes	8.17	11.09
Calcium	0.92	1.34
Phosphorus	0.60	0.42
<i>Fatty acid composition</i>		
C16:0	0.55	0.56
C18:0	0.13	0.10
Oleic acid (C18:1n9c)	1.27	0.77
Linoleic acid (C18:2n6c)	1.81	1.63
Linolenic acid (C18:3n3)	0.93	0.76
Moisture, %	12.60	37.57
급여량, kg/h/d as fed	3.00	32.00

(2) 불포화지방산 고함유 우유 생산을 위한 실험 사료의 펠드 적용 가능성 확인 및 검증

○ 서울대학교 평창캠퍼스 실험목장 착유우 3두를 대상으로 선행되었던 사양 실험을 통해 불포화 지방산 고함유 우유 생산을 위한 사료를 검정하였음.

- 실험은 2016년 10월 4일부터 11월 4일까지 총 5주 동안 실시하였고 착유우 약 25 ~ 35 마리에서 매주 1회씩 원유를 채취하여 불포화 지방산 조성과 원유 성분, TA (Titratable Acidity), pH value를 분석 및 측정함으로써 실험 사료의 효과를 검정하였음.

○ (주)카길애그리퓨리나에서 개발, 설계된 불포화 지방산 사료를 착유우 3두를 대상으로 급여함으로써 생산 가능성을 확인하여 다음으로 여름기간에 약 4주 동안의 대규모 실험을 통해 펠드에 적용하는 것이 가능한지 확인 및 검증하는 사양 실험을 시행하였음.

- 선행 실험에서는 불포화 지방산 사료를 급여하기 전, 시중에 일반적으로 판매되는 제품을 일정 기간 급여하여 착유한 원유를 대조군으로 설정하였으나 본 실험은 서울대학교 평창캠퍼스 실험목장에서 사육되는 전체 착유우를 대상으로 한 대규모 실험이므로 일반 사료는 따로 급여하지 않았음.

- 실험은 2017년 5월 15일부터 6월 12일까지 여름 기간 동안 총 4주간 서울대학교 평창 캠퍼스 실험 목장에 사육되고 있는 전체 착유우 25 ~ 35마리를 대상으로 시행됨.

- 사료급여는 농후사료를 하루에 3 kg, TMR (Total Mixed Ration) 사료를 하루에 32 kg 을 4주 동안 급여한 후 착유하고 매주 1회씩 샘플링하여 불포화 지방산 조성과 원유 성분, TA (Titratable Acidity), pH 값을 분석 및 측정함.

- 샘플링한 원유의 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산의 비율을 확인하기 위해서 동물사료 전문업체인 (주)카길애그리퓨리나에 의뢰하여 가스 크로마토그래피를 이용하였고 분석 조건은 다음 표에 나타냄.

표 16. 원유의 지방산 조성을 측정하기 위한 Capillary gas chromatography 분석 조건

Parameter	Conditions
Instrument	Agilent 7890B
Column	SP-2560 (100 m x 0.25 mm)
Temperature programming	140 °C (5 min) → 4 °C/min → 240 °C (45 min)
Injection temperature	250 °C
Detector temperature	250 °C
Detector	FID

- Agilent 7890B를 이용하여 원유의 지방산 조성을 측정하였고 column은 SP-2560 (100 m x 0.25 mm) 제품을 사용하였음. 또한 가스 크로마토그래피에서 가장 보편적으로 사용하는 검출기인 FID (Flame Ionization Detector)를 사용하여 분석함. 분석 조건은 140 °C에서 5분으로 유지하고 분당 4 °C로 온도를 높여 45분 동안 240 °C를 유지하도록 설정한 후 주입과 검출이 250 °C에서 이루어질 수 있도록 함.
- 원유의 다양한 불포화 지방산 중 본 실험에서 검증하고자 하는 오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산의 비율을 각 샘플마다 같은 실험 조건 및 기계를 이용하여 분석. 다음 표는 4주 동안 샘플링한 원유의 오메가-6 지방산 및 오메가-3 지방산 조성을 나타냄.

표 17. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 지방산 비율 변화

Treatment (Day)	Total w-6/w-3 ratio
D0	4.06
D7	3.80
D14	3.88
D21	3.72
D28	3.56

- 불포화 지방산 사료 급여에 따른 지방산 비율을 분석한 결과, 약 35두의 착유우를 대상으로 한 대규모 실험에서도 초기에 목표로 했던 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산 비율이 약 4대1 정도로 안정적으로 유지되고 있는 것을 확인할 수 있음.
 - 1차년도의 실험 결과는 초기에 목표로 했던 불포화 지방산 비율인 4 : 1 에 완전히 도달하지 못했으나, 당해년도에 시행된 실험 결과 통해 실험 사료를 필드에 적용하는 것이 충분히 가능할 것으로 예상할 수 있음.
- 불포화 지방산 비율이 안정적으로 유지되고 있는 것을 한 눈에 쉽게 파악하기 위해 25~35두 착유우에서 샘플링한 원유의 불포화 지방산 비율을 꺾은선 그래프로 나타냄.

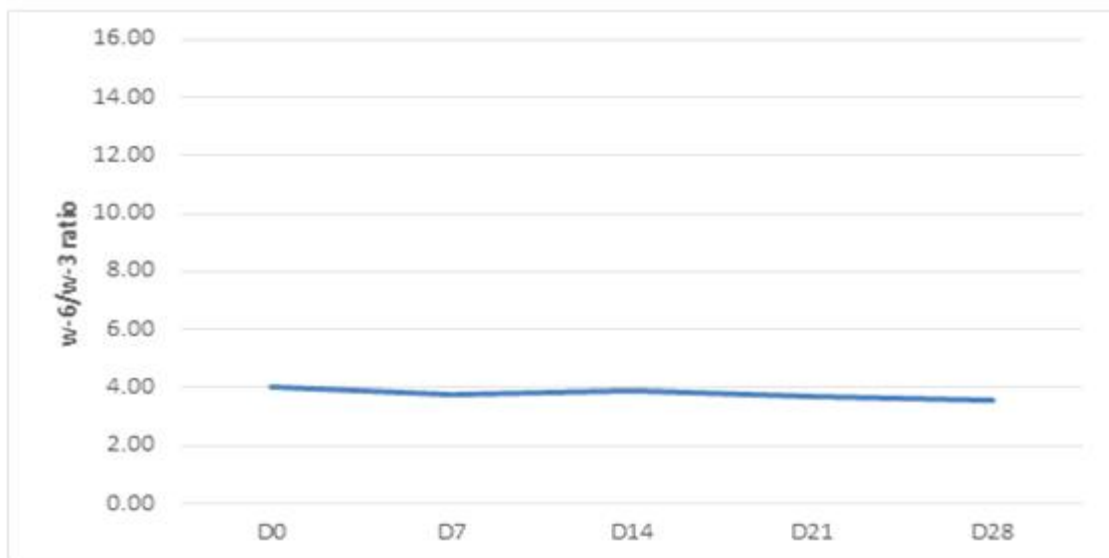


그림 12. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 오메가-3지방산과 오메가-6 지방산의 비율

- 그래프를 통해 확인할 수 있듯이, 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산 비율이 전체 실험 기간 동안 안정적으로 유지됨. 시험 사료의 급여가 성분에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 원유 분석 기기인 milkoscan 6,000 serier (Foss Electric Co., Denmark)를 이용하여 유성분을 분석함.
- 다음 표는 원유의 주요 성분인 Fat, Protein, Lactose, Total Solid 성분을 분석하여 나타낸 것임.

표 18. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 원유의 성분 분석 결과

(단위: %)

Treatment (Day)	Fat	Protein	Lactose	Total solid
D0	3.67	2.97	4.55	12.26
D7	3.73	2.98	4.54	8.68
D14	3.9	3	4.52	8.69
D21	4.1	2.98	4.55	8.75
D28	4.01	2.9	4.56	8.65

- 지방은 시험 사료를 급여하기 시작한 날 (D0)은 3.67 %로 다소 낮은 경향을 보였으나 사료를 급여하는 동안 4 %정도로 일반적인 지방 함량 수준에 도달 및 유지하는 것을 확인함. 단백질은 2.97 ~ 3 % 로 거의 변화가 없이 유지되고 유당 또한 거의 일정하게 유지되는 경향을 보임.
- 시험 사료 급여에 따른 유성분 변화를 한 눈에 관찰하기 위해 원유 샘플의 유성분을 막대그래프로 나타냄.

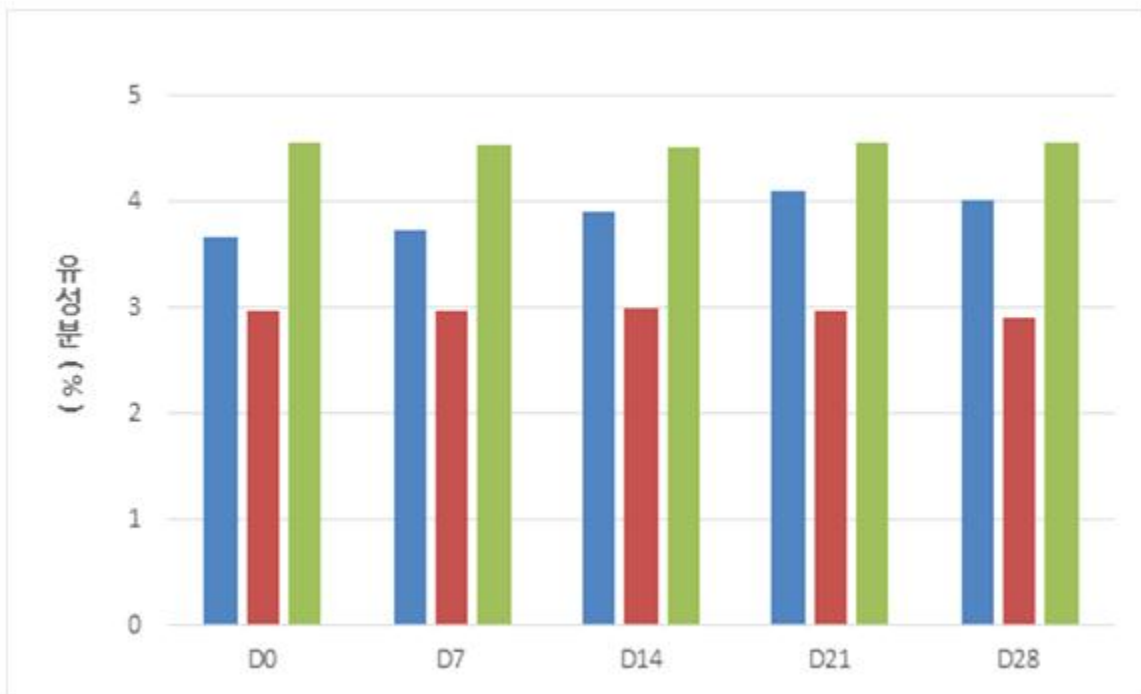


그림 13. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 원유의 지방, 단백질, 젖당 함량 변화

(Blue: 지방, Red: 단백질, Green: 젖당)

- 그래프를 통해 단백질과 지방의 함량은 소폭 변화가 있었으나 거의 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있음. 지방의 경우, 단백질과 지방에 비해 상대적으로 함량 변화가 크게 나타났으나 전체적인 수치로 확인했을 때 약 4 % 정도로 유지되는 경향성을 확인할 수

있음.

- 따라서, 본 실험 결과를 요약하자면, 서울대학교 평창캠퍼스 실험목장에서 사육되는 25~35두의 착유우를 대상으로 시험 사료를 약 4주 동안 급여한 결과 원유 성분의 유의적인 변화 없이 오메가-6 지방산과 오메가-3 불포화 지방산 비율은 4대1로 안정적으로 유지되는 것을 확인하였으므로 (주)카길애그리퓨리나의 사료를 필드에 적용함으로써 기능성 우유를 생산할 수 있음.
- 우유를 시장에 판매할 경우 시행하는 대표적인 품질관리 (Quality Control) 항목인 pH와 TA (Titratable Acidity)를 통해 기능성 사료 급여에 따라 원유의 품질의 변화가 없는지 확인함. TA는 적정 산도로써 우유가 함유한 산성도를 알칼리 표준액을 사용하여 일정 조건하에서 측정할 수 있는 산성도를 의미함. 신선한 우유의 pH value는 6.5~6.7이고 TA 값은 0.15~0.17 %임.

표 19. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 pH와 TA 측정 결과 값

Treatment (Day)	pH	TA
D0	6.59	0.14
D7	6.89	0.18
D14	6.69	0.17
D21	6.64	0.17
D28	6.72	0.16

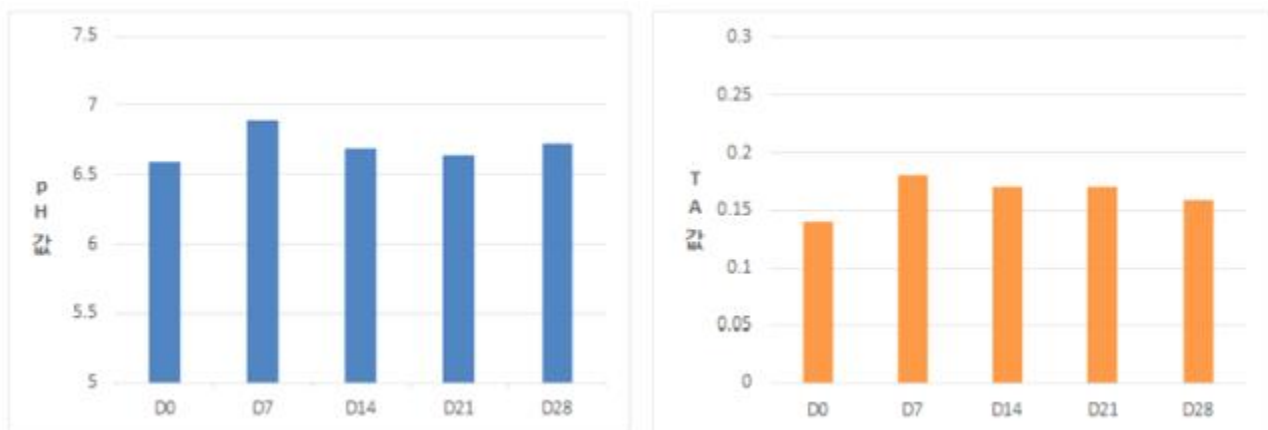


그림 14. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 pH와 TA 값 측정

- 착유한 원유에서 샘플링한 원유의 TA 및 pH 값을 사료 섭취 기간에 따라 나타낸 그래프 (그림 14)를 통해 pH 값은 6.6~6.7로 유지되는 것을 확인함. TA 값의 경우 대부분의 측정 기간 동안 0.16에서 0.17을 유지했으나 7일차만 0.18로 다소 높아진 것을 확인함.

(3) 불포화지방산 고함유 우유 생산성 검증

- 일반적으로 젖소의 원유 생산량은 젖소의 혈통과 개체, 분만 횟수, 비유기, 착유 방법, 사료와 사양방법, 기온과 계절 등 다양한 원인에 의해 변동될 수 있는데 시험 사료 급여에 의해 우유 생산량이 변동되는지 검증하고자 함.
- 다음 표는 4주 동안 실험목장 내 착유우의 착유 두수, 착유 횟수, 전체 착유량, 평균 착유량을 주차별로 정리하여 나타낸 것임.

표 20. 실험 기간에 따른 착유 정보 및 착유량

기간	착유두수	착유횟수	전체 착유량 (Kg)	평균 착유량 (Kg)
5월 15일~21일(1주차)	27±1.64	52±4.34	769.4±53	28.67±1.52
5월 22일~29일(2주차)	32±1.39	61±4.15	900.6±75.26	27.9±1.46
5월 20일~6월 5일(3주차)	35±0	67±0.83	996.5±45.64	28.47±1.3
6월 6일~12일(4주차)	25±0.45	65±2.56	1005±28.12	28.96±0.9

- 착유두수 및 착유 횟수는 소의 건강 상태 및 영양 상태에 따라 다르기 때문에 매일 변동이 있어 주차별 평균값과 표준편차로 표현함. 평균 착유량은 전체 착유량에서 착유두수로 나눈 값임. 시험사료에 급여에 따른 우유 생산성을 한눈에 확인하기 위해 꺾은선 그래프로 나타냄.

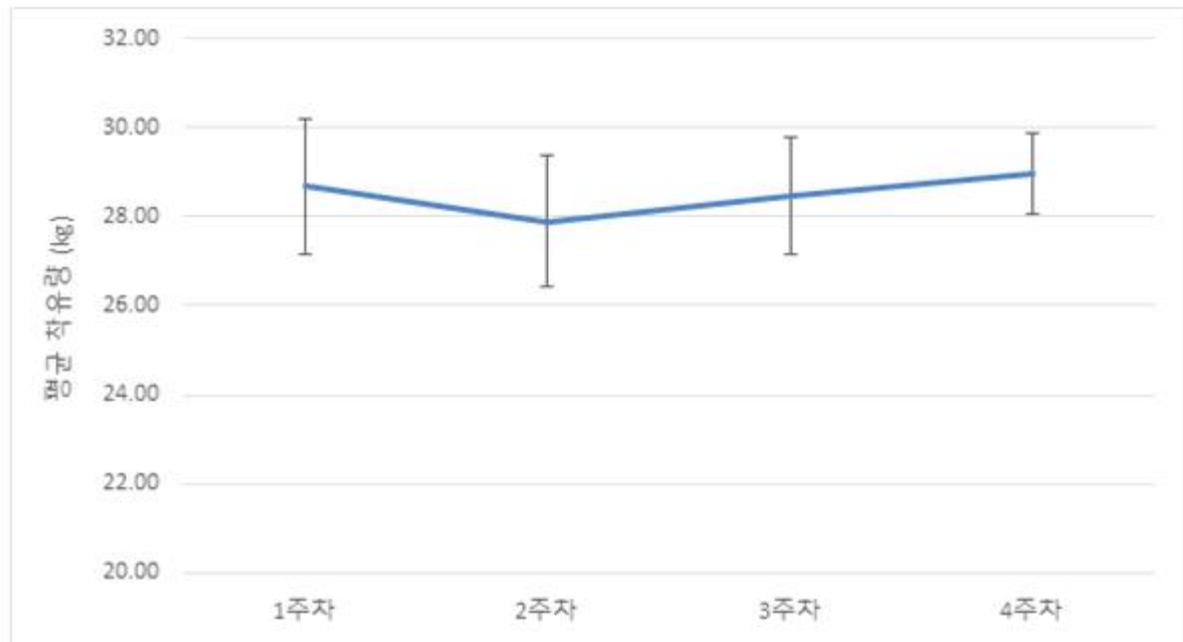


그림 15. 불포화 지방산 사료 급여에 따른 평균 착유량 변화

- 그래프를 통해 확인할 수 있듯이, 시험사료를 4주 동안 급여했을 때 각 주차별 평균 착유량 변화는 2주차에 소폭 감소했으나 3주차, 4주차에는 거의 일정한 수준으로 유지되는 것을 확인함.

- 각 주차별 평균 착유량은 변화량이 매우 적고 약 28 kg 정도로 일정하게 유지되는 것을 확인했으므로 시험 사료 및 사양법에 따라 우유 생산량이 영향 받지 않는다는 것을 검증함. 결론적으로, 불포화 지방산 고함유 우유를 대량 생산하기 위해 필드에 적용하는 것은 충분히 가능하다고 사료됨.

2) 기능성 사료 급여에 따른 시기별 불포화지방산 함유량 비교

(1) 기능성 사료 급여에 따른 시기별 원유 성분 비교

- 일반적으로 젖소는 온혈동물로 열 환경의 영향을 많이 받기 때문에 온도, 습도, 공기유동, 방사 등과 같은 열 환경 요소들에 의해 우유 생산성 및 원유 성분이 변화되는 것으로 알려져 있음.
- 특히, Heinrichs, J.가 1997년 발행한 논문에 따르면 여름 시기에는 유지방 및 유단백질의 성분비가 감소하는 것으로 알려짐⁷⁾.
- 시기별 원유 성분을 비교하기 위해 당해년도 5~6월 여름 시기에 진행된 실험 결과와 10~11월 겨울 시기에 진행된 실험 결과를 한눈에 확인 및 비교할 수 있도록 유지방, 유단백질, 유당 성분비를 각각 막대그래프로 나타냄.

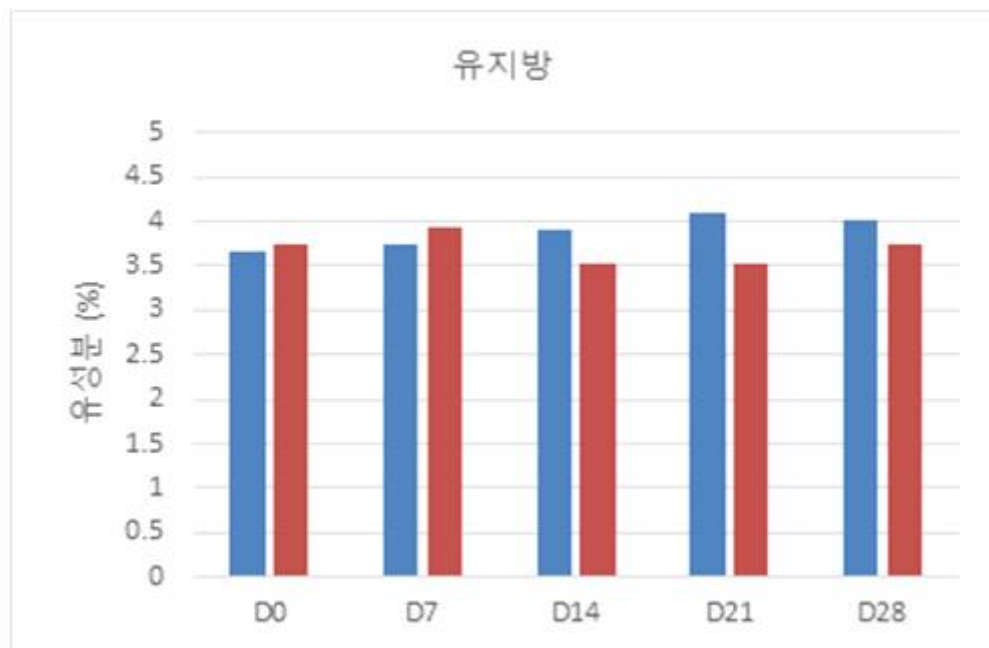


그림 16. 기능성 사료 급여에 따른 시기별 유지방 성분비 변화 그래프 (Blue: 여름, Red: 겨울)

7) Heinrichs J, Jones C, Bailey K. Milk components: understanding the causes and importance of milk fat and protein variation in your dairy herd. Dairy Anim Sci. 1997;5:1e-8e.



그림 17. 기능성 사료 급여에 따른 시기별 유단백질 성분비 변화 그래프
(Blue: 여름, Red: 겨울)

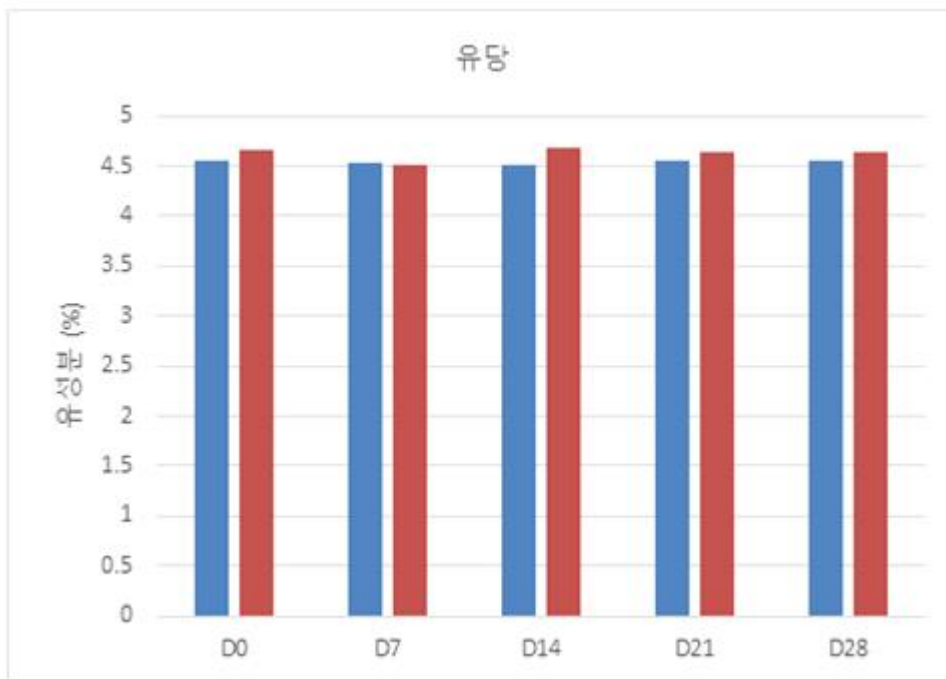


그림 18. 기능성 사료 급여에 따른 시기별 유당 성분 변화 그래프
(Blue: 여름, Red: 겨울)

- 유지방의 경우 기능성 사료 급여기간이 늘어날수록 여름철에 비해 겨울철에 소폭 감소하는 경향을 보였고 유단백질의 경우 여름철에 비해 겨울철에 전반적으로 다소 높은 비율로 유지되는 것을 확인함. 유당의 경우는 여름철과 겨울철에 특별히 차이가 없는 것

으로 보임.

- 일반적으로 알려진 것처럼 시기별 원유 성분에 다소 차이가 있으나, 그 차이는 매우 적은 수준이므로 기능성 사료 급여에 따른 원유 성분이 시기별로 큰 차이는 없음.

(2) 기능성 사료 급여에 따른 시기별 불포화 지방산 함유량 비교

- 기능성 사료 급여에 따라 계절이 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산의 비율에 영향을 미치는지 알아보기 위해 시기별 불포화 지방산 함유량을 꺾은선 그래프로 나타내어 한눈에 비교함.

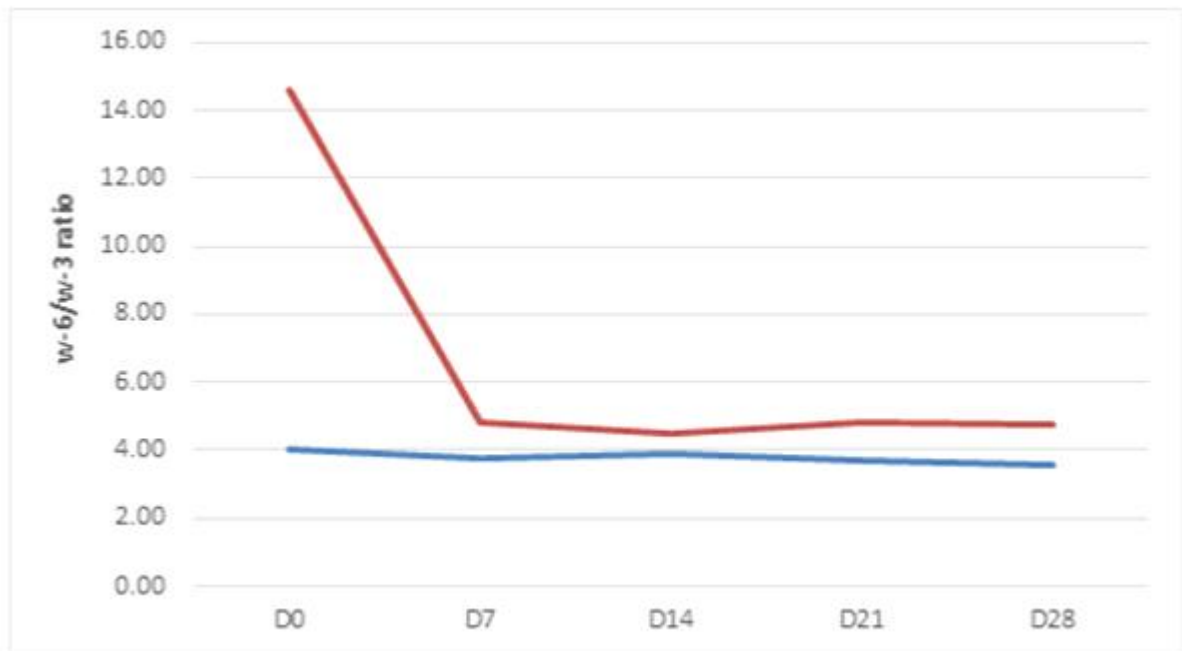


그림 19. 기능성 사료 급여에 따른 시기별 오메가-6 지방산과 오메가-3 지방산 비율 (Blue: 여름, Red: 겨울)

- 겨울 시기의 경우 0일차를 일반사료를 먹인 대조군으로 설정하였기 때문에 여름 시기와 차이를 보였으나 7일차 결과부터는 불포화 지방산 비율이 여름철과 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있음.
- 그러나 겨울철보다 여름철에 시행된 대규모 실험이 당초 목표로 했던 불포화 지방산 비율인 4대1에 더욱 가깝게 도달한 것을 확인함. 결론적으로 기능성 사료 급여에 따른 여름철과 겨울철의 불포화 지방산 비율은 약 4대1 정도로 유지되고 있으므로 계절에 큰 영향을 받지 않는다는 것을 검증함.

3) 장기 사료 급여 시 지속성 검토 및 품질 관리기준 작성

(1) 장기 사료 급여 시 지속성 검토

○ 장기 사료 급여를 위한 관리 및 체크 항목을 확인하였음. 오메가 3 TMR, 오메가 3 펠릿 사료 별로 관리 및 체크 항목이 나뉨.

○ 오메가 3 TMR.

- TMR 구성 원료의 오메가 6 지방산 함량 점검.

- 전지면실과 같은 고 오메가 6 지방산 원료 배제.

- TMR 혼합도 극대화.

- 입자 관리, 원료 투입 순서 점검.

- 보관 중 2차 발효/변패 차단.

- 서늘하고 그늘진 곳에 보관.

- 지방 산패 차단.

- 공급 후 2주 이내 급여.

○ 오메가 3 펠릿사료.

- 지방 산패 차단.

- 공급 후 2주 이내 급여.

- 지대 서늘하고 그늘진 곳에 보관 / 벌크빈 차광막 설치 등.

(2) 장기 사료 급여 시 지속성을 위한 품질 관리 기준

○ 옥수수사일리지, 호맥사일리지 등 오메가 6 지방산 높은 조사료 추가 급여 금지.

○ 전지면실, 참깨박(호마박) 등 오메가 6 지방산 높은 단미원료 추가 급여 금지.

○ 주기적 유조성분 및 유지방산 프로필 분석 진행 및 유지방율/오메가 3지방산 함량 항상 성 유지.

○ TMR/펠릿사료 섭취량 점검 및 항상성 유지.

- 분변 상태 모니터링 (연변 또는 설사 발생 여부).

4) 관능검사 실시 및 생산 추진

(1) 관능검사를 위한 시험용 우유 제품 생산 및 유성분 검사

- 서울대학교 실험목장 착유우를 대상으로 시험사료를 급여한 원유를 채취하여 집유, 수유, 균질공정을 거친 후 72 - 75 °C에서 15초간 살균하는 고온 단시간 살균법 (high-temperature short-time sterilization, HTST)을 이용하여 관능검사를 하기 위한 시험용 우유 제품을 생산함.
- 관능검사를 통해 비교하기 위한 시료는 시중에 많이 판매되고 있는 매일유업에서 생산되는 매일우유와 남양유업에서 생산되는 남양우유를 직접 구매하여 시험용 우유 제품과 관능검사 및 유성분 검사를 통해 비교함.
- 시중에 판매되는 우유와 비교했을 때 시험용 우유가 차이가 있는지 확인하기 위해 원유 분석 기기인 milkoscan 6,000 serier (Foss Electric Co., Denmark)를 이용하여 유성분을 분석함.

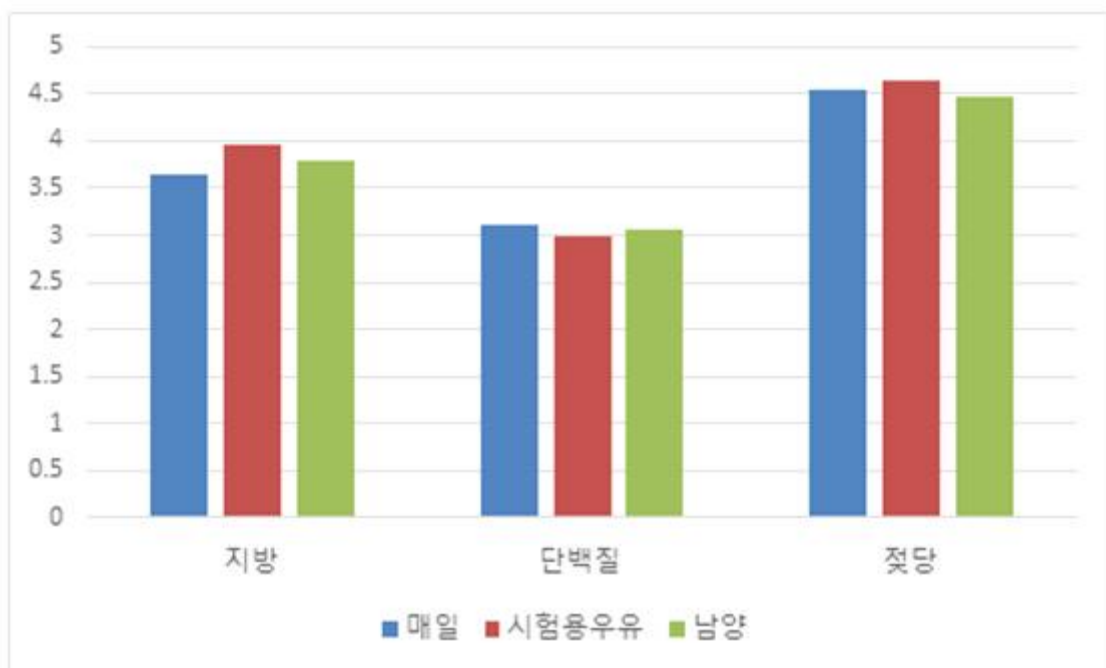


그림 20. 각 유업체 별 우유 제품의 유성분 분석 비교 그래프

- 분석 결과, 샘플 별로 큰 차이는 없었으나 시험용 우유가 타 제품보다 지방 및 젖당 함량이 상대적으로 높았고 단백질의 경우는 다소 낮은 경향을 보임. 그러나 각 샘플 별 차이는 굉장히 근소한 차이이므로 시험용 우유가 시중에 판매되는 우유와 비교했을 때 유

성분에 큰 차이가 없다는 것을 확인함.

(2) 시험용 우유 제품을 통한 관능검사 실시

- 서울대학교 학생 및 연구원 29명 (남: 15, 여: 14) 을 소비자 패널로 선정하고 묘사용어 추출을 통해서 얻어진 용어 중 우유의 특성을 가장 잘 반영할 수 있는 특성 5가지를 선정하고 전체적인 맛을 평가하도록 함. 관능검사 방법은 각각의 특성의 강도를 숫자로 표시하는 척도법과 소비자 선호도를 평가하기 위한 순위법을 이용함.
- 묘사용어 추출을 통해서 얻어진 용어는 신선함, 구수한 맛, 후미 (마신 후 입안에 남는 맛), 바디감 (입 안 질감 및 목넘김), 이미 및 이취 (우유 내 이상한 맛, 냄새)가 있었으며, 이렇게 설정된 용어와 전체적인 맛을 척도법에 적용하여 관능검사에 사용함. 기호도에 따라 점수를 달리하였고 각각의 점수표는 아래와 같음.

표 21. 우유 특성을 나타내는 묘사 용어에 따른 점수 배점표

특성 \ 점수	1	2	3	4	5	6	7
전체적인 맛	매우싫다	싫다	약간싫다	보통이다	약간좋다	좋다	매우좋다
신선함	매우부족	부족	약간부족	적당하다	약간신선	신선하다	매우신선
구수한 맛	매우부족	부족	약간부족	적당하다	약간구수함	구수함	매우구수함
후미	매우싫다	싫다	약간싫다	보통이다	약간좋다	좋다	매우좋다
바디감	매우싫다	싫다	약간싫다	보통이다	약간좋다	좋다	매우좋다
이미, 이취	매우많다	많다	약간있다	잘모르겠다	느끼지못함		



그림 21. 3가지 우유 샘플의 관능 검사 결과

- 소비자 패널의 나이는 24 세에서 61 세이고 평균 나이는 약 30 세임. 관능 검사 결과는 한눈에 알아보기 위해 우유 특성을 나타내는 묘사 용어에 할당된 점수를 평균값으로 환산하여 방사형 그래프로 나타냄.
- 그림의 결과를 통해 유성분은 거의 차이가 없는데도 불구하고 시험용 우유가 시중에 판매되고 있는 우유에 비해 모든 특성에서 점수가 낮게 나타난 것을 확인할 수 있는데, 이는 시험용 우유의 불포화 지방산 조성에 차이가 있기 때문으로 추측해 볼 수 있음. 시험용 우유의 경우 오메가-3 지방산 비율이 타 우유 샘플보다 훨씬 높게 만들어졌기 때문에 이것이 우유의 맛에 영향을 미친 것으로 추측됨.
- 비록 시중에 판매하는 두 우유 샘플보다는 관능검사 점수가 낮은 것을 확인할 수 있지만 시험용 우유가 타 우유 샘플보다 담백한 맛과 깔끔한 맛이 강하고 오메가-3 지방산 강화로 인한 건강 효과를 기대할 수 있기 때문에 시중에 판매하여도 충분히 가능성이 있을 것이라 생각됨.

2. 우유 내 미생물 제어기술 효과 측정

1) 원유 미생물 저감 효과 측정

- 병원성 미생물 5종, 내냉성 미생물 7종을 대상으로 paper disc assay 법을 이용하여 원유로부터 분리한 유산균 (총 309종)의 항균능력 검정 후 유산균 후보균 및 항균능력 스펙트럼 설정.

표 22. 원유 내 주요 병원성, 내냉성 레퍼런스 미생물

Cat.	Indicator	Source	Culture medium	Incubation temperature(°C)
A	<i>Bacillus cereus</i> KCTC3624	KCTC	BHI	37
B	<i>Escherichia coli</i> KCTC1682	KCTC	BHI	37
D	<i>Listeria innocua</i> KCTC3586	KCTC	BHI	37
E	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC	BHI	37
G	<i>Yersinia enterocolitica</i>		BHI	37
a	<i>Bacillus circulans</i> KCTC3347	KCTC	BHI	37/30
b	<i>Bacillus licheniformis</i> KCTC1918	KCTC	BHI	37
c	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC3135	KCTC	BHI	37/30
d	<i>Burkholderia cepacia</i> KCTC2966	KCTC	NB	30
e	<i>Micrococcus luteus</i> KCTC3063	KCTC	NB	30
f	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC42821	KCTC	NB	30
g	<i>Pseudomonas putida</i> KCTC1644	KCTC	NB	30

- 대량 스크리닝 과정 후 비교적 넓은 범위의 지시 미생물에 대한 항균력을 가진 2종과 좁은 범위지만 내냉성 부패 미생물에 대해 항균력을 비교적 크게 갖는 3종을 유산균 후보군으로 선별.
- 유산균 후보군 5종에 대하여 동정을 실시함.

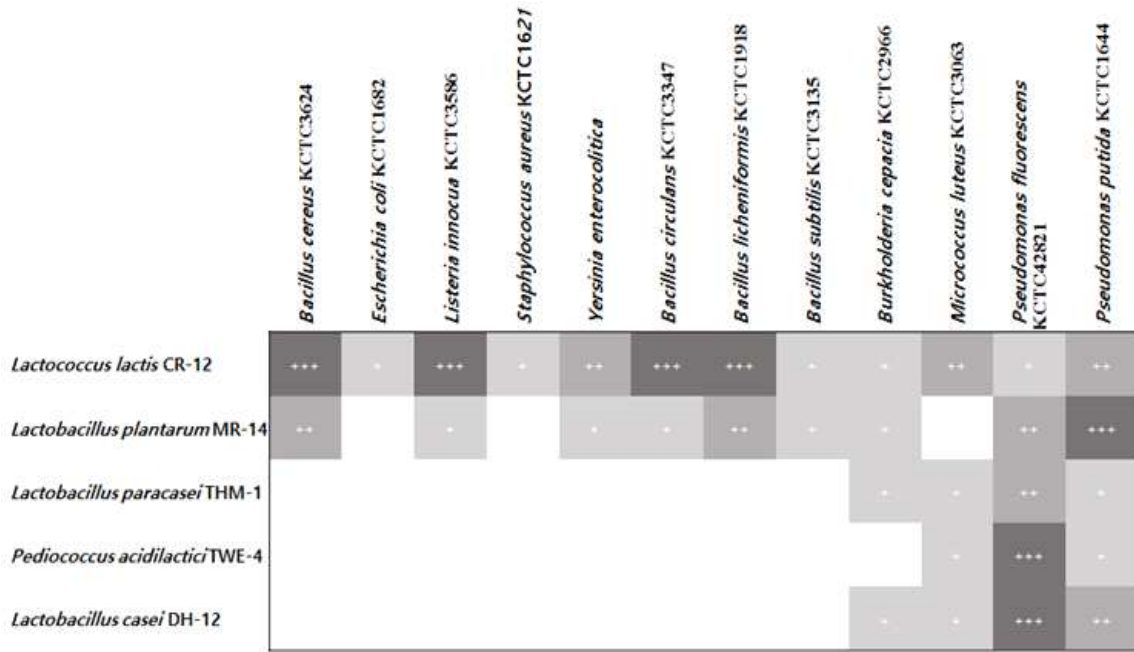


그림 22. 유산균 후보균 5종의 지시균 12종에 대한 항균력 측정 결과

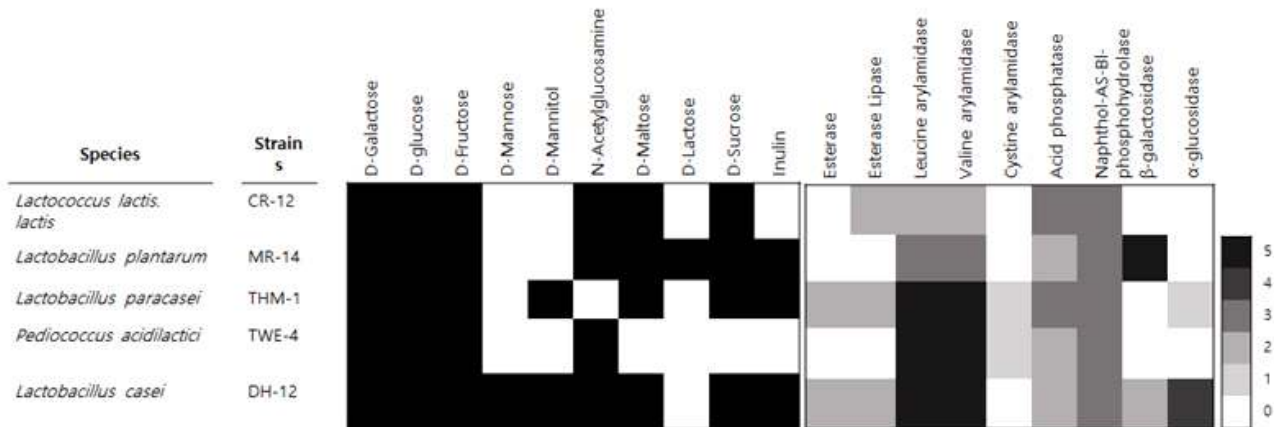


그림 23. 유산균 후보균의 당 발효 및 효소 profile

○ API CH50 kit 및 Zym kit를 이용하여 동정한 결과와 16S rRNA sequencing 결과를 종합하여 *Lactococcus lactis. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei* 종으로 동정.

○ 유산균 후보균 5종 중 항균 스펙트럼이 가장 넓은 CR-12 균에 대해 세 가지 항균능력 검정법 (paper disc assay, agar well diffusion assay, top agar assay)을 이용하여 항균 능력검정 및 일관성 있는 결과 도출.

- Paper disc assay

① 실험 전날 유산균과 병원성 미생물을 접종해 놓음.

② OD값을 0.5로 맞춘 병원성 미생물 균액 100 μ l를 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 배지와 BHI (Brain heart infusion), NA (Nutrient agar) 배지를 각각 1:1로 혼합해 제조한 평판위에 뿌리고 면봉으로 도말함.

③ 충분히 말린 후 paper disc(6mm)를 평판에 올리고 유산균 균액 혹은 상층액을 10 μ l 접종.

④ 24시간 배양 후 clear zone을 확인.

- Agar well diffusion assay

① 실험 전날 유산균과 병원성 미생물을 접종해 놓음.

② OD값을 0.2로 맞춘 병원성 미생물 균액 100 μ l를 첨가한 soft agar(agarose를 0.8% (w/v)첨가했을 시) 4ml을 TSA (Tryptic soy agar) 배지 평판 위에 덮어준 후 20-30분 동안 말림.

③ Soft agar가 굳고 난 후 멸균된 1000 μ l tip 뒷부분으로 구멍을 뚫음.

④ 구멍난 well 부분에 유산균 배양액 및 상층액을 100 μ l 접종한 후 12시간 배양.

⑤ Clear zone을 확인.

- Top agar assay

① 실험 전날 유산균과 병원성 미생물을 접종해 놓음.

② 유산균을 새로운 MRS broth에 접종 (0.1%)하고 30분 배양.

③ 평판 당 집락 수가 약 10-20개 정도 자라도록 희석하여 MRS 평판 배지에 100 μ l를 도말한 후 2시간 배양.

④ Agarose를 0.5%(w/v) 첨가한 TSA 배지 2ml을 그 위에 덮고 1시간 배양.

⑤ OD값을 0.5로 맞춘 병원성 미생물 균액 30 μ l를 첨가한 배지 3ml을 또 그 위에 덮어준 후 24시간 배양.

⑥ Clear zone을 확인.

표 23. 세 가지 항균능력검정법을 이용한 CR-12균의 항균력 검증

	Paper disc assay				Agar well diffusion assay			Top agar assay
	cell	cell free supernatant	pH adjusted supernatant	Medium	cell	cell free supernatant	pH adjusted supernatant	cell
A	+	-	-	MRS+BHI	+	-	-	+
B	+	-	-	MRS+BHI	+	-	-	+
C	+	+	+	MRS+BHI	+	+	+	+
F	+	+	+	MRS+BHI	+	+	+	+
G	+	-	-	MRS+BHI	+	-	-	+
a	+	-	-	MRS+NB	+	+	-	+
b	+	+	+	MRS+NB	+	+	+	+
c	+	+	+	MRS+NB	+	+	+	+
d	+	-	-	MRS+NB	+	+	-	+
e	+	+	+	NB	+	+	+	+
f	+	+	-	NB	+	+	-	+
g	+	+	+	MRS+NB	+	+	+	+

- 세 가지 항균능력검정법에 의해 일관된 항균력 검증 후 원유 적용에 앞서 안전성 검사 (항생제 내성 검사, 용혈 작용 검사) 실시.

표 24. CR-12균의 항생제 내성 및 용혈 작용 검사 결과

Species	Strains	AMP	KAN	STR	ERY	TET	CHL	GEN	Hemolytic activity(+/-)
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	CR-12	S	S	S	S	S	S	S	-

- CR-12균이 항생제⁸⁾ 7종 (Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Erythromycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Gentamycin)에 대해 내성이 없고 용혈작용이 없는 것으로 나타남.

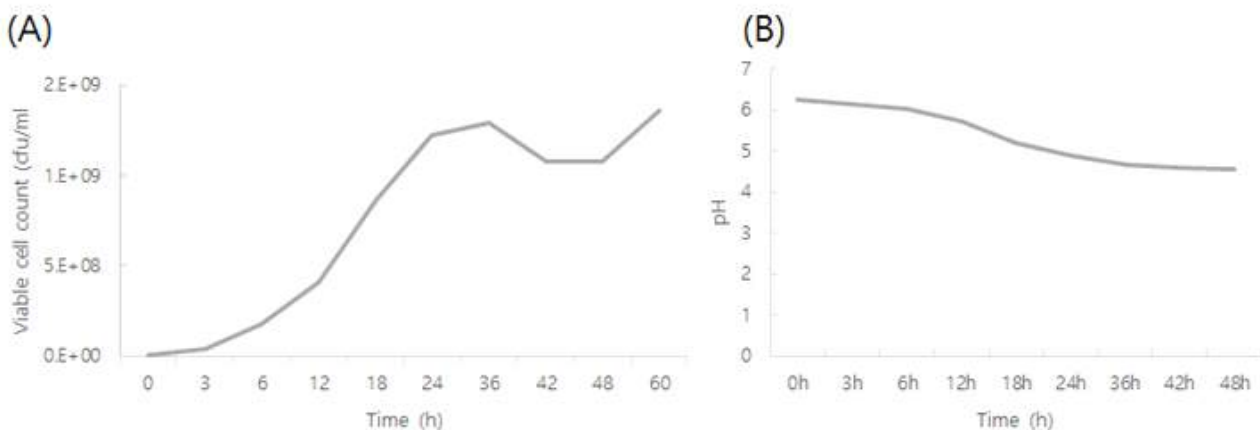


그림 24. skim milk 10%배지에서의 CR-12균의 성장 곡선 (A) 및 pH 곡선 (B)

8) Broaders, E., Gahan, C. G., and Marchesi, J. R. (2013) Mobile Genetic Elements of the Human Gastrointestinal Tract: Potential for Spread of Antibiotic Resistance Genes. *Gut Microbes* 4: 271-280.

- CR-12균을 skim milk 10% 배지에 접종하여 성장곡선 및 pH 변화를 살펴봄.
- 성장 곡선의 경우 약 3시간의 lag phase와 21시간 정도 exponential phase를 가진 후 36 시간 이상 stationary phase를 가지는 것으로 나타남.
- 최대 균수는 10^9 수준으로 계수.
- pH 변화는 초기 6.2에서 4.5까지 떨어지며 pH가 4.5-5.0 사이인 구간 (20시간째)에서 커드가 형성됨.
- 멸균된 skim milk 10% 배지에 병원성 미생물 및 내생성 미생물과 선발한 유산균을 1:1로 접종, 배양하여 우유 내 항균 능력 파악.
- 선택배지를 이용한 균수 측정과 특정 균에 부착하는 primer를 이용한 qRT-PCR을 이용함.
- 원유 미생물 대 유산균의 적정 비율을 조정한 후 온도별, 날짜별 우유 내 성장 및 항균 능력 파악 함께 산도, pH변화 측정.

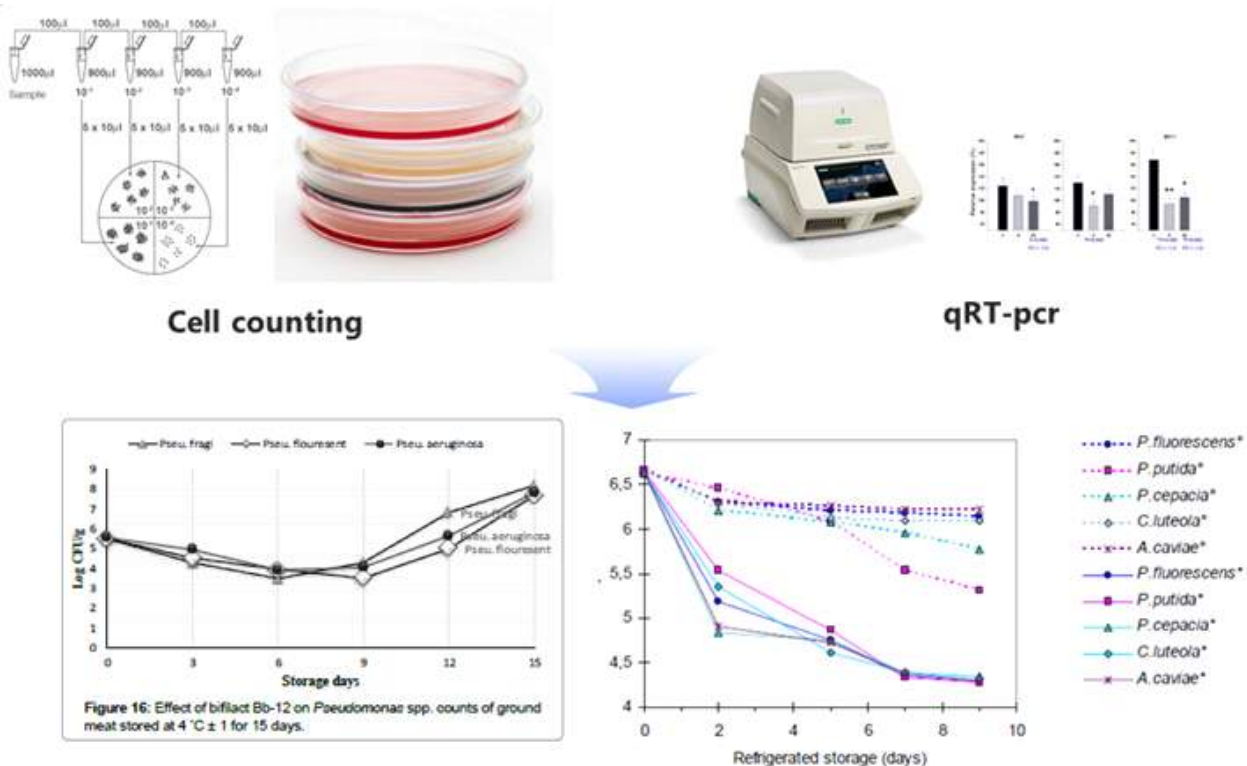


그림 25. 우유 내에서의 선발 유산균의 항균력 검증 개요

표 25. 병원성 미생물 및 내냉성 부패 미생물에 대한 선택 배지

Medium name	Species
	<i>Bacillus cereus</i>
Mannitol egg yolk polymixin MYP (281010, Difco)	<i>Bacillus circulans</i>
Egg yolk enrichment 50% (233472, Difco)	<i>Bacillus licheniformis</i>
Antimicrobial vial P polymyxin B (232681, Difco)	<i>Bacillus subtilis</i>
Oxford agar (222530, Difco)	<i>Listeria monocytogenes</i>
Oxford antimicrobial supplement (211763, Difco)	<i>Listeria innocua</i>
Mannitol salt agar (211407, Difco)	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Micrococcus luteus</i>
Pseudomonas agar base (CM0559B, Oxoid)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Pseudomonas CFC selective supplement (SR0103E, Oxoid)	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i>
Eosin methylene blue agar (CM0069B, Oxoid)	<i>Escherichia coli</i>
CIN agar base (CM0653B, Oxoid)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yersinia selective supplement (SR0109E, Oxoid)	

표 26. 병원성 미생물 및 내냉성 미생물과 선발한 유산균에 특정하여 부착하는 primer set

Species	Primer	Target gene	5'-sequence-3'	Product Size (bp)	TM(°C)	%GC	Reference
<i>Bacillus cereus</i>	BCFomp1 BCRomp1	motB gene	ATCGCCTCGTTGGATGACGA CTGCATATCCTACCGCAGCTA	575	63.4 61.7	55 52	Oliwa-Stasiak <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus circulans</i>	cirF cirR	16S rRNA	GAGTAACTGCTGTACCTTGACGG GCGCTCAGCGTCAGTTA	303	61.7 62	50 61	This study
<i>Bacillus licheniformis</i>	serA2F serA2R		TCACAACCCGTTGACGACAA CGTGCCGAGTGTGCGTTATAT	247	60.6 62.3	50 50	Almeida <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	EN1F EN1R	endoglucanase gene	CCAGTAGCCAAGAATGGCCAG CCGCATATGGTTAATATCACGC	451	62.1 58.7	57 43	Modification (Ashe <i>et al.</i> , 2014)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lis-1 Lis-2	hlyA gene (listeriolysin O)	GGATGCATCTGCATTCAATAAAGA TGTCACCTGCATCTCCGTGG	178	57.7 62.2	37 57	Modification (Deneer <i>et al.</i> , 1991)
<i>Listeria innocua</i>	lin0464F lin0464R	transcriptional regulator gene	CGCATTTATCGCCAAAACCTCAAG TCGTGACATAGACCGGATTG	749	58.2 59.8	43 50	Liu <i>et al.</i> , 2003
<i>Staphylococcus aureus</i>	primer 1 primer 2	nuclease A	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC	281	59.8 63.2	47 50	Brakstad <i>et al.</i> , 1992
<i>Micrococcus luteus</i>	rpfF rpfR	resuscitation-promoting factor	CCGAGTGGAGTCCAACG CTGCAGGTCTGGAGGAT	167	62.7 60.7	66 61	This study
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16SPSEfluF 16SPSER	16S specific region	GGAACTGCATTCAAAAAGTACTGAC AGAAAGTTTCATTGGATGTCAAAGCC	385	60.3 61.1	44 44	Modification (Scarpellini <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pseudomonas putida</i>	P734 P1455r	gyrB	GGGCGTTGGCATTCTGCT CAAGATCGCCTGGGTACGA	739	62.3 61	61 57	Modification (Yamamoto <i>et al.</i> , 1995)
<i>Burkholderia cepacia</i>	PSL1 PSR1	16S rRNA	AACTAGTTGTTGGGATTTCATTC TTTCGAGCACTCCACCT	209	56.1 59.4	37 55	Modification (Campbell <i>et al.</i> , 1995)
<i>Escherichia coli</i>	16 E1 16 E2		GGGAGTAAAGTTAATACCTTTTGCT TTCCGAAGGCACATTCT	584	56.4 56.6	40 50	Tsen <i>et al.</i> , 1998
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YE-1 YE-2	enterotoxin gene	CTGTCTTCATTGGAGCAATFCGG GCAACATACATCCGACGAATC	159	60 59.6	47 47	Wang <i>et al.</i> , 1997
<i>Lactococcus lactis</i>	LcLapp-F Le-R	16S rRNA	GTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTA GTTGAGCCACTGCCTTTTAC	387	58.5 57.1	40 50	Modification (Odamaki <i>et al.</i> , 2011)

○ 살균하지 않은 원유에 병원성 미생물 및 내냉성 미생물과 선발한 유산균을 함께 접종, 배양하여 온도별, 날짜별 우유 내 성장 및 항균능력 파악, 유성분 분석.

○ 원유 미생물 제어 수준으로 최종 선발 예정

3. 고급 발효 축산물, 치즈 생산을 위한 종균 선발

1) 원유 및 전통식품에서 유산균 분리

(1) 원유 및 전통식품 유래 종균의 필요성

- 대표적인 고급 발효 축산물인 치즈의 국내 소비량은 1990년부터 지속적으로 증가하여 2014년에는 일인당 2.1 kg을 소비하는 것으로 조사됨 (낙농진흥회, 2017).
- 국내에서 치즈는 대부분은 수입되어 소비되고 있음. 2015년 기준으로 국내의 치즈 총 소비량은 약 13만 4700톤이었고 그 중에서 수입량은 약 11만 1000톤이었음. 국내 생산량은 가공치즈 1만 5940톤, 자연치즈 7240톤에 그쳤음 (낙농진흥회, 2015).
- 연간 국내 치즈 생산량 추이를 살펴보면 가공 치즈의 생산은 감소한데 반해서 자연치즈 생산은 2011년 14.4 %에서 2014년 36.1 %로 지속적 증가를 보였음 (한국낙농육우협회, 2014).
- 과거에는 자연치즈 중에서도 신선치즈의 일종인 스트링 치즈, 퀘사 블랑코 치즈, 모짜렐라 치즈 등이 시장 점유율이 높았던 반면에 2015년에는 고다 치즈, 까망베르 치즈 등 숙

성치즈의 소비가 증가했음 (한국농수산물유통공사, 2015).

- 신선치즈는 단순히 산 또는 렌넷을 첨가하는 것만으로도 생산할 수 있으나 숙성치즈는 원유미생물 제어, 종균의 선발 및 첨가, 숙성과정 중의 NSLAB (Non-starter lactic acid bacteria) 등을 고려해야함.
- 숙성치즈의 생산에서 반드시 필요하므로 심사숙고해서 선정해야하는 것이 종균임. 종균은 스타터 컬처 (Starter culture)라고 불리며 이름에서 알 수 있듯이 숙성치즈 제조 초기 단계에 우유에 적용하여 산 생성 및 유단백의 응고를 유도함. 숙성치즈의 타입과 풍미 등을 결정짓는 데에도 중요한 역할을 함.
- 하지만 국내에서는 종균을 생산하고 있지 않음. 숙성치즈의 복잡한 생산과정을 한국에 정착시켜 국내 자연치즈 생산량을 증가시킨다 해도 종균은 수입해서 적용해야하는 문제점이 있음.
- 국내에 상업화된 종균은 전무하지만 종균 개발을 위한 연구는 다소 있었음. 하지만 대부분이 김치, 젓갈, 장류, 전통주 등의 전통식품을 위한 종균 개발 연구였고, 누룩과 바실러스균에 대한 것이 많음.
- 발효축산물을 위한 종균 개발 연구로는 2013년 박종혁 등이 발행한 논문과 2014년 유선아 등이 발행한 논문이 존재함.
 - 전자는 발효유 제품을 위한 종균개발에 관한 논문이며 후자는 발효소시지 제품을 위한 종균개발에 관한 논문임.
- 치즈용 종균 개발에 대한 연구로는 2010년 한국식품연구원이 농림수산식품부 주관의 과제로 수행한 면역증신 젓산균을 이용한 모짜렐라 치즈 개발에 관한 연구와 2013년 오현희 등이 발행한 논문에서 김치 분리 향진균 유산균의 치즈 스타터로서 이용가능성에 관한 연구가 있음.
 - 한국식품연구원의 과제는 신선치즈 개발에 초점을 두었으며 분변 유래의 유산균 *Lactobacillus fermentum*과 *Streptococcus salivarius*를 선발했고, 오현희 등의 논문에서는 *Lactobacillus sakei*와 *Pediococcus pentosaceus*를 선발했음. 그러나 이들 모두 상업적으로 주로 이용되고 있는 species는 아님.
- 국내 치즈 시장 확대에 따라 국내산 자연치즈의 생산량도 늘어가고 있음. 단순히 자연치즈 생산기술의 현지화뿐만 아니라 치즈 생산에 필수적으로 사용되는 종균도 현지화할 필요성이 있음. 상업적으로 이용 가능한 한국 고유의 치즈 종균의 선발이 중요한 시점임.

(2) 유산균 분리를 위한 샘플 수집

- 한국 고유의 치즈 종균 개발을 위해 평창, 횡성, 강릉, 원주, 영월 등의 강원지역에서 원유와 전통발효식품을 샘플링 함.
 - 횡성군에서 10곳 (2016.09.19), 평창군에서 10곳 (2016.09.29~2016.09.30)의 농가를 선정하여 착유하고 집유 전 탱크로리에서 원유 500 ml를 멸균된 용기에 담아 수집함.
 - 김치, 젓갈, 막걸리, 장류 등의 전통발효식품은 각 지역의 오일장 및 전통시장과 개인사업체 등을 통해서 구입하여 즉시 실험실로 가져와 멸균 용기에 옮겨 담았음 (2016.05.14~2016.10.17).
 - 다음 표는 강원지역에서 수집한 샘플 현황을 나타낸 것임.

표 27. 유산균 분리를 위해 강원지역에서 수집한 샘플 현황

샘플	강원도				합계
	평창	횡성	강릉	기타	
원유	10	10			20
김치	27		6		33
젓갈	9		6		15
막걸리		2		9	11
청국장			1		1
합 계					80

(3) 원유 및 전통식품에서의 유산균 분리

- 수집한 샘플은 실험에 이용되기 전까지 멸균된 용기에 담아 -20 °C 에 보관했고 실험하기 직전에 상온에서 해동 후 사용했음.
- 샘플은 각 1 g 또는 1 ml 취하여 0.85 % NaCl 멸균액으로 10배 희석했음. 각 희석액은 cheese starter로 많이 사용되는 *Lactobacillus* 속과 *Lactococcus* 속을 분리를 위해 selectrive media에 도말했음. MRS (Man, Rogosa and Sharp, Difco, USA) 고체 배지 및 0.5 % Lactose 첨가 M17 (Difco, USA) 고체 배지를 사용하여 48시간 동안 호기조건에서 배양했음.
- 다수의 균 확보를 위해 각 배지에서 colony morphology을 관찰하여 선택한 후 동일한 액체 배지에 다시 접종하여 24시간 동안 호기조건에서 배양했음.
- 액체 배지에 배양한 균은 bromocresol purple을 첨가한 plate count (BCP, Eiken chemical Co., Ltd, Japan) 고체 배지에 streaking 하여 노란색 colony를 형성하는 균을 유산균으로 선별했음.

- 3.5 % H₂O₂를 이용해 카탈레이즈 (Catalase) 실험을 했고 그람 염색을 한 후 현미경으로 형태를 확인했음. 카탈레이즈 음성 및 그람 양성의 구균 또는 간균을 선별하여 유산균임을 판정했음.
- 결과적으로 강원지역에서 수집한 80개의 원유 및 전통발효식품 샘플에서 총 615개의 유산균을 분리해냈음.

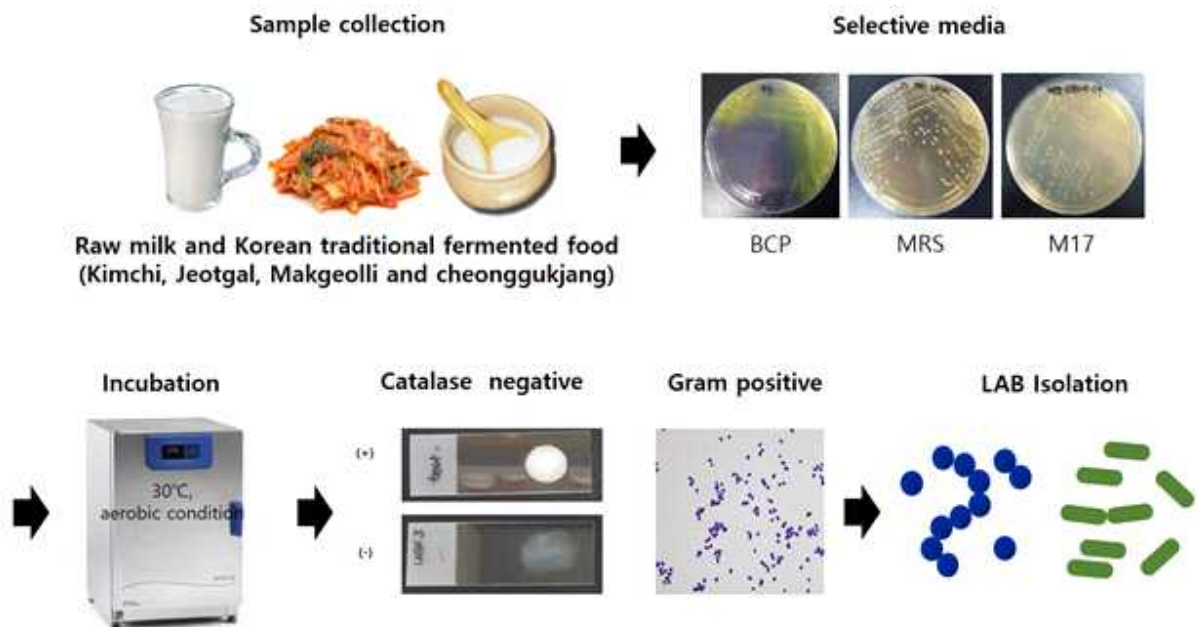


그림 26. 원유 및 전통발효식품에서의 유산균 분리 방법 모식도

표 28. 강원지역에서 수집한 샘플로부터 분리해낸 유산균의 수

Samples	No. of samples	No. of isolates
원유	20	306
김치	33	181
젓갈	15	91
막걸리	11	31
청국장	1	6
합계	80	615

2) 유산균의 우유 내 성장 및 특성 파악

(1) 산 생성능과 커드 형성 확인

- 치즈 종균 가장 중요한 역할은 산 생성을 통한 pH 감소임. 빠른 산 생성은 유해 미생물의 오염을 막아주며 커드 (curd) 형성에 기여함.

- 하지만 지나친 pH 감소는 오히려 쓴 맛 등의 이취 (off-flavor)를 발생시키고 지나친 커드 형성으로 좋지 않은 질감이 되기 때문에 주의해야 함.
- 적당한 pH의 기준을 세우기 위해서 상업적으로 많이 사용되는 치즈 종균인 크리스찬 한센 (Chr.Hansen, Denmark)의 CHN-11 제품으로부터 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CHN-11-1, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CHN-11-3, *Leuconostoc pseudomesenteroides* CHN-11-48 균을 분리해내고 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403과 함께 대조균으로 비교함.
- 멸균한 10 % 탈지유 (Oxoid, UK)에 균을 접종하고 6시간과 48시간 후에 ORION STAR A211 pH 미터기 (Thermo Scientific, USA)로 측정하여 산 생성능을 확인했음.

- 다음 표는 164개 유산균의 산 생성능을 확인한 결과임.

표 29. 164개 유산균의 6시간 및 48시간 후의 pH 변화

ΔpH		No. of isolates		
		Class I ^a (ΔpH<1.5)	Class II ^b (1.5≤ΔpH<2.0)	Class III ^c (ΔpH≥2.0)
ΔpH 6h	Control	4	0	0
	Isolates	163	1	0
ΔpH 48h	control	2	2	0
	Isolates	24	62	78

^a Class I : Low acidifying isolates, causing a pH decrease lower than 1.5 pH units.

^b Class II : The group of medium acidifying activity, showing a pH drop of between 1.5 and 2.0 units.

^c Class III : highly acidifying isolates showing a pH decrease of over 2 pH units.

- 커드 형성은 10 % 탈지유에 균을 접종 후 24시간 및 48시간 후에 실험관을 기울여서 시각적으로 확인. 응고되어 기울어지지 않는 것을 양성, 응고되지 않아 기울어지지 않는 것을 음성으로 했음.

- 다음은 커드 형성 양성과 음성을 확인한 예시임.

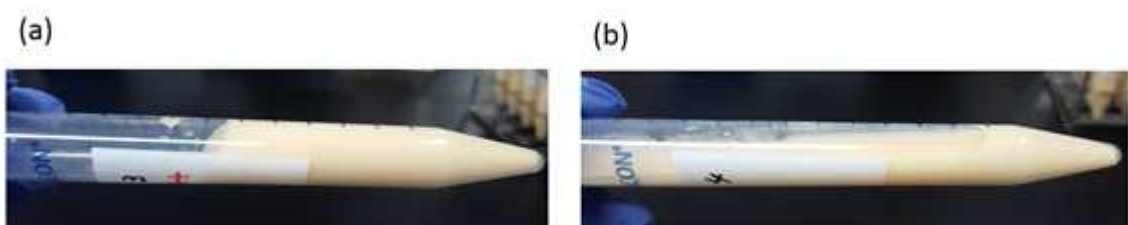


그림 27. 10 % 탈지유에서의 커드 형성 양성 (a) 과 음성 (b) 예시

(2) 풍미 성분 생산에 관여하는 효소 검증

- 산 생성능 다음으로 중요한 종균의 역할은 풍미 성분 생산임.
- 치즈의 풍미 성분은 유당, 유단백질, 유지방 등의 우유 구성분이 당 분해 경로 (glycolysis), 단백질 분해 경로 (proteolysis), 지방 분해 경로 (lipolysis)를 거쳐 생성됨.
- 종균 유산균은 유성분 분해 경로 중에서도 특히 아미노산 분해 과정과 연관성이 크다고 알려져 있음. 아미노산 분해 경로는 주요 풍미 생산 경로임.
- 산 생성능과 커드 형성능이 있는 균이 풍미 생산 경로에 관여하는지를 확인하고자 몇 가지 특정 효소를 선정했음. 본 연구에서 주목한 효소들은 Bifunctional Alcohol/Aldehyde dehydrogenase (AdhE), Branched chain aminotransferase (BcaT), Aromatic aminotransferase (AraT), Esterase (EstA), Alcohol dehydrogenase (Adh), Citrate permease (CitP), Keto acid decarboxylase (KdcA), Glutamate dehydrogenase (GDH) 임.
- 164개 유산균에서 AdhE, BcaT, AraT, EstA, Adh, CitP, KdcA를 확인하기 위해서 Multiplex PCR 방법을 이용했고, GDH 활성은 colorimetric assay로 진행했음.
- Amplicon 크기와 melting temperature에 따라서 7개의 타겟 유전자를 3개의 그룹으로 나누어서 Multiplex PCR을 실행했음.
 - 4쌍의 프라이머는 직접 설계했고 2쌍의 프라이머는 논문을 참고했음. 모든 프라이머는 Bioneer (South Korea)에서 주문 제작했음.

표 30. Multiplex PCR에 사용된 프라이머 정보

Group	Target Gene	Primer	Sequence (5'-3')	TM (°C)	GC %	Amplicon(bp)	Reference
1	Bifunctional Alcohol/Alddehyde dehydrogenase	AAdh_F	CAAGTCGATACTA TTGTC	48.0	38	2158	In this study
		AAdh_R	TTTATGAGCAAGTG AGTG	49.9	38		
	Branched chain aminotransferase	BcAT_F	TACCTTTTCGTTAT ATCGC	49.8	36	884	In this study
		BcAT_R	TCCTACTTCTGTTT CTGAA	49.9	36		
	Aromatic aminotransferase	ArAT_F	GTCATTATACTGGA ATGG	47.7	38	750	In this study
		ArAT_R	CAAGGTCTGACAT CTTT	49.0	38		
	Esterase	Est_F	GGGATGAATCGAA AAGTT	48.8	38	617	In this study
		Est_R	CCTAATTTTTTCAA CTCGG	48.0	36		
2	Alcohol dehydrogenase	Adh_F	TGTTGAAAAGGAA CTTCG	48.7	38	880	In this study
		Adh_R	AATTGGTTTTACCT TACCC	48.3	36		
	Citrate permease	P4(S)	GGAGTTGGTGCTG GTATTGTG	60.2	52	616	Klijn <i>et al.</i> , (1995)
		P5(A)	CCAACCCTGCTGTA ATAGCAG	59.7	52		
3	Keto acid decarboxylase	3fw	GTATACAGTAGGA CATTACC	51.1	40	1630	Yvon, M., (2006)
		1633Rev	GCTCAGCAAATAA TTTACCC	51.7	40		

○ 164개 유산균 각각의 colony 하나와 *i*-Taq™ 2X PCR Master mix Solution (iNtRON, South Korea) 그리고 해당하는 10 pmole의 프라이머 쌍을 넣어 20 μ l의 reaction mixture를 만들어 PCR을 진행함.

- 다음 그림은 multiplex PCR 후 아가로스 겔 전기영동을 통해 타겟 유전자의 여부를 확인한 내용 일부를 나타낸 것임.

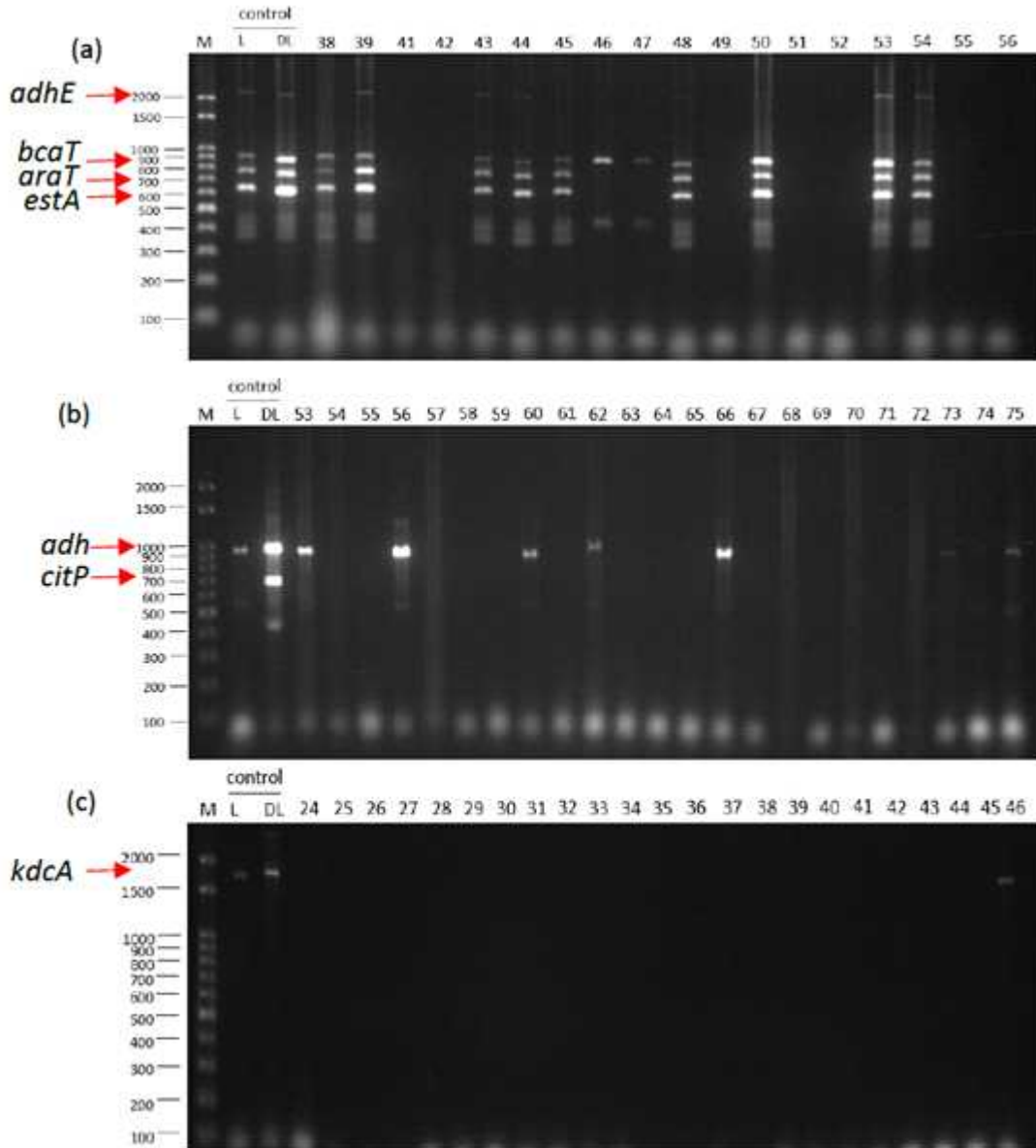


그림 28. 첫 번째 그룹 (a), 두 번째 그룹 (b), 세 번째 그룹 (c)의 Multiplex PCR 후 아가로스 겔 전기영동 결과 일부. M: 100 bp ladder, L: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, DL: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CHN-11-1.

- 대조균으로 사용한 *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403은 타겟했던 모든 유전자를 가지고 있었고, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CHN-11-1은 *CitP*를 제외한 모든 유전자를 가지고 있었음. *L. lactis* subsp. *cremoris* CHN-11-3은 *bcaT* 만을 발견됐고 *L. pseudomesenteroides* CHN-11-48에는 타겟 유전자가 없는 것으로 확인됐음.
- 실험균 164개 중에서는 44개의 유산균이 최소 3개의 이상의 타겟 유전자를 가지고 있는 것으로 확인이 되었음. *CitP*를 가지고 있는 균은 없었고 세 개의 균만이 *kdcA*를 가지고 있었음.

- 다음은 Multiplex PCR 결과를 요약한 내용임.

표 31. Multiplex PCR을 통해서 확인한 풍미 생산에 관여하는 효소의 존재 여부

	Target gene						
	<i>adhE</i>	<i>bcaT</i>	<i>araT</i>	<i>estA</i>	<i>adh</i>	<i>citP</i>	<i>kdcA</i>
Control							
<i>L.subsp. lactis</i> IL1403	+	+	+	+	+	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CHN-11-3	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetyllactis</i> CHN-11-1	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. pseudomesenteroides</i> CHN-11-48	-	-	-	-	-	-	-
Strains							
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L5	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L9	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L19	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L20	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L21	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L23	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L29	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L39	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L43	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L44	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L45	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C46	-	+	-	-	-	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L48	+	+	+	+	-	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L54	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L30	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L53	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L56	+	+	+	+	+	-	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L66	+	+	+	+	+	-	-

- GDH 활성을 측정하기 위해서 1 % (v/v) 접종하여 키운 10 ml의 배양액을 원심분리 (15,000 rpm, 5 min, 4 °C)하여 phosphate-buffered saline (Mediatech. Inc., USA)으로 두 번 washing 후 0.1 mm의 silica beads가 든 microtube에 옮겨 담음. Biospec Products의 Mini-Beadbeater-16 기기를 이용하여 30초 동안 1차 파쇄 후 1분 동안 얼음에 담가 식히고 다시 30초 동안 2차 파쇄 함. 세포 파쇄액 (Cell free extracts; CFEs) 은 다시 원심분리 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C)하여 beads와 cell debris를 제거한 후 -20 °C 에 보관함.
- 각 균의 CFEs에서 R-biopharma 의 glutamic acid assay kit를 이용하여 GDH 활성을 측정했음. GDH에 의한 glutamic acid의 산화적 탈아미노기 반응은 cofactor인 NADH의 생산을 감소시킴. NADH는 idonitrotetrasolium (INT)와 만나 diaphorase에 의해서 Formazan을 형성하게 되고 이것의 발색을 측정하게 됨.

- 다음은 GDH 측정을 위한 colorimetric assay의 원리를 나타낸 모식도임.

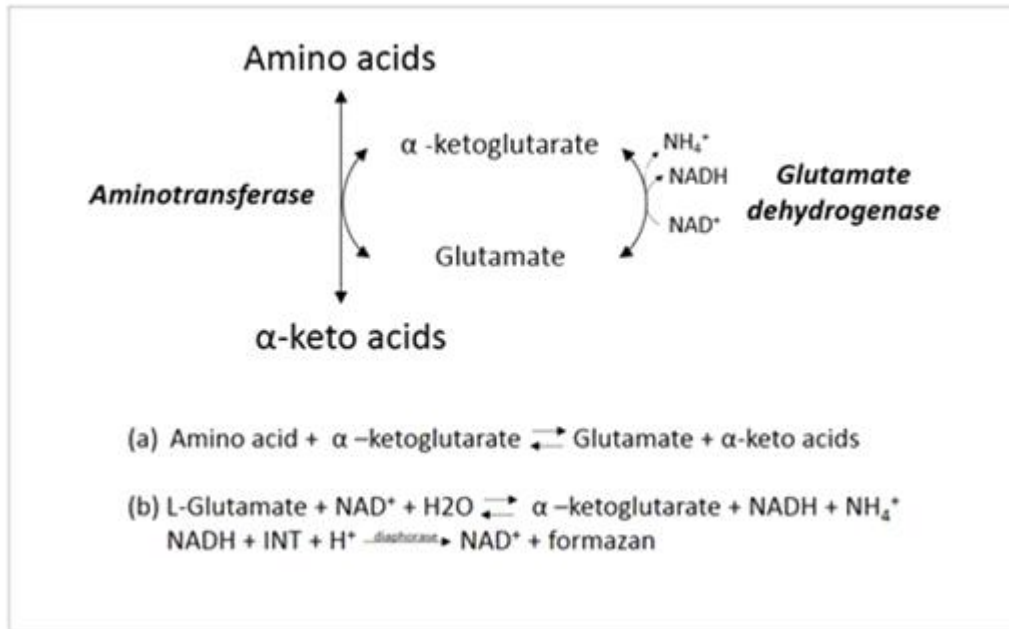


그림 29. Aminotransferase 과정 (a)와 Glutamate 측정 과정 (b) 모식도

○ 멸균수 80 μl , potassium phosphate/triethanolamine buffer (pH 8.6) 80 μl , INT 40 μl 그리고 NAD·diaphorase 40 μl 을 혼합해 반응용액을 만들고 60 μl 의 CFE를 더한 뒤 즉시 100 mM 의 L-Glutamic acid 40 μl 을 넣어 총 600 μl 가 되도록 하고 이를 200 μl 씩 96 well plate 3 곳에 나누어 담음. 30 $^\circ\text{C}$ 에서 3 시간 동안 배양 후 492 nm에서 흡광도를 측정했음.

○ 대조군으로 사용한 *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CHN-11-1에 비교해서 총 16개의 균이 유의적으로 GDH 활성이 높았음.

- 다음은 대조군 대비 실험 균들의 GDH 활성을 막대그래프로 나타낸 그림임.

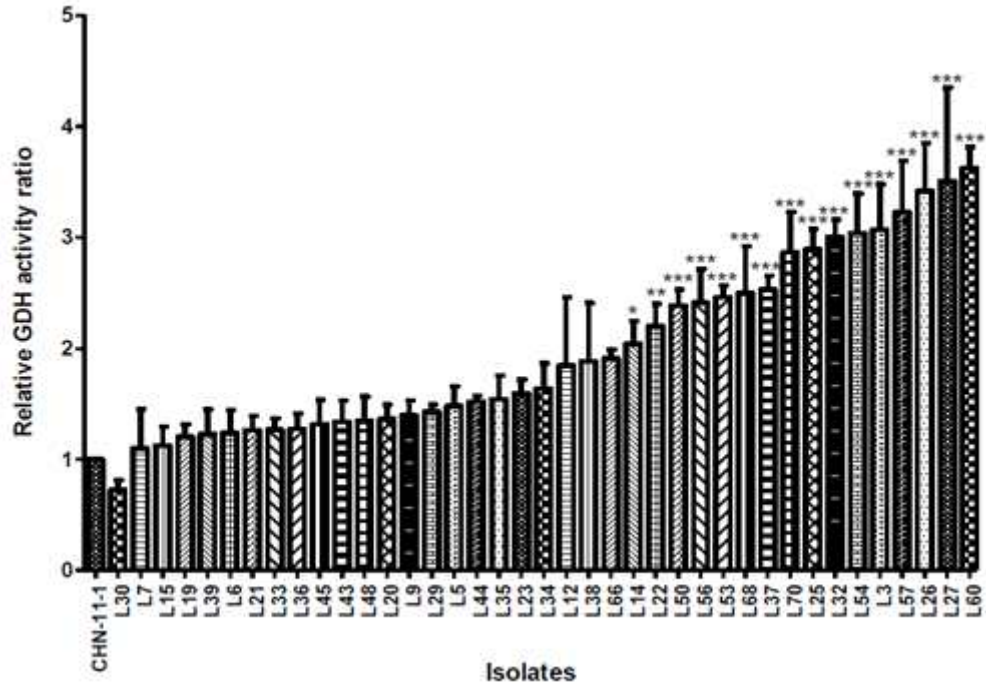


그림 30. GDH 활성 측정 결과를 대조군에 대비하여 나타낸 막대그래프

(3) 종균 후보군의 선발 및 동정

- 산 생성능과 커드 형성능이 있는 것으로 확인된 164개의 균 중에서 풍미 생산에 기여하는 효소를 가진 균은 44개로 확인되었음.
- 44개의 균은 16s rRNA sequence 분석을 진행함. Universal primer 쌍인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하였고 Macrogen (South Korea)에 의뢰해서 서열을 확인하였음. 확인된 서열은 National centre for Biotechnology Information (USA)의 BLAST 서비스를 이용해 GenBank 데이터베이스와 비교하여 99 % 이상의 확률로 최종 동정했음.
 - 그 결과 한 개의 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*와 두 개의 *Lactobacillus casei* 그리고 41개의 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균을 확인했음.
- 종균 후보군은 다음과 같은 우선순위를 고려하여 선발했음.
 - 첫째, 풍미 생산에 기여하는 타겟 유전자를 가지고 있으며 두 개 이상의 균을 조합했을 때 상호보완적일 수 있는 것.
 - 둘째, 대조군에 상당하는 산 생성능을 가진 것.
 - 셋째, 대조군에 상당하는 커드 형성을 하는 것.

- 넷째, 유래가 서로 다른 것.

- 다섯째, GDH 활성이 높은 것.

- 다음 5개의 균 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* C46 (C46), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* L5 (L5), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* L23 (L23), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* L48 (L48), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* L56 (L56)을 최종 종균 후보 균으로 선발했음.

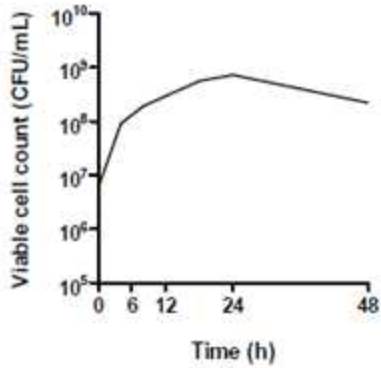
(4) 우유에서의 성장성 확인

- 선발균 5개의 10 % 탈지유에서의 성장성을 확인하였음.

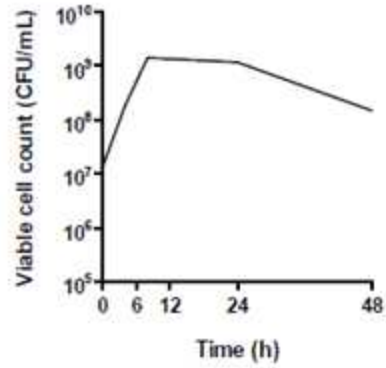
- L5는 접종 24시간째에 7.2×10^8 CFU/ml로 가장 생균수가 많았고, 나머지 L23, L48, L56, C46 균들은 접종 8시간째에 1.4×10^9 CFU/ml, 8.9×10^8 CFU/ml, 1.4×10^9 CFU/ml, 2.0×10^8 CFU/ml로 각각 최고 생균수를 보였음.

- *L. lactis* subsp. *lactis* 균주인 L5, L23, L48, L56은 최고 생균수를 보인 이후부터 성장성이 감소하는 것을 볼 수 있었지만, *L. lactis* subsp. *cremoris* C46은 접종 48시간 후에도 최고 생균수를 유지하는 것을 볼 수 있었음.

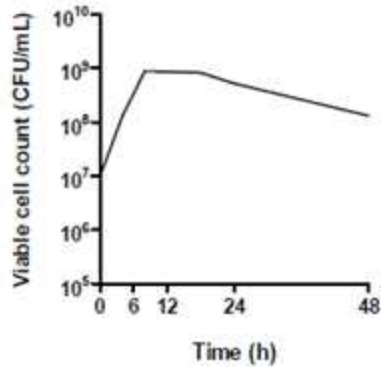
Lactococcus lactis subsp. *lactis* L5



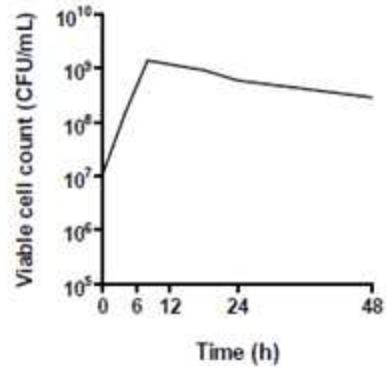
Lactococcus lactis subsp. *lactis* L23



Lactococcus lactis subsp. *lactis* L48



Lactococcus lactis subsp. *lactis* L56



Lactococcus lactis subsp. *cremoris* C46

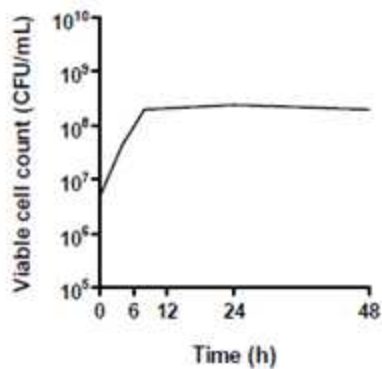


그림 31. 10 % 탈지유에서의 균 성장성.

(5) 탄수화물 발효 및 효소 프로파일

○ API 50 CHL kit와 API ZYM kit (BioMérieux, France)를 이용하여 선발균 5개의 탄수화물 발효 및 효소 프로파일을 분석하여 흑백 색표로 도표화하였음.

- 대조균인 IL1403 및 CHN-11-1과 비교하였을 때, L5, L23, L48, L56의 탄수화물 발효

및 효소 프로필이 더 다양하며 활성이 더 컸음을 알 수 있음.

- 대조균인 CHN-11-3과 비교하였을 때, C46의 탄수화물 발효 및 효소 프로필이 더 다양하며 활성이 더 컸음을 알 수 있음.

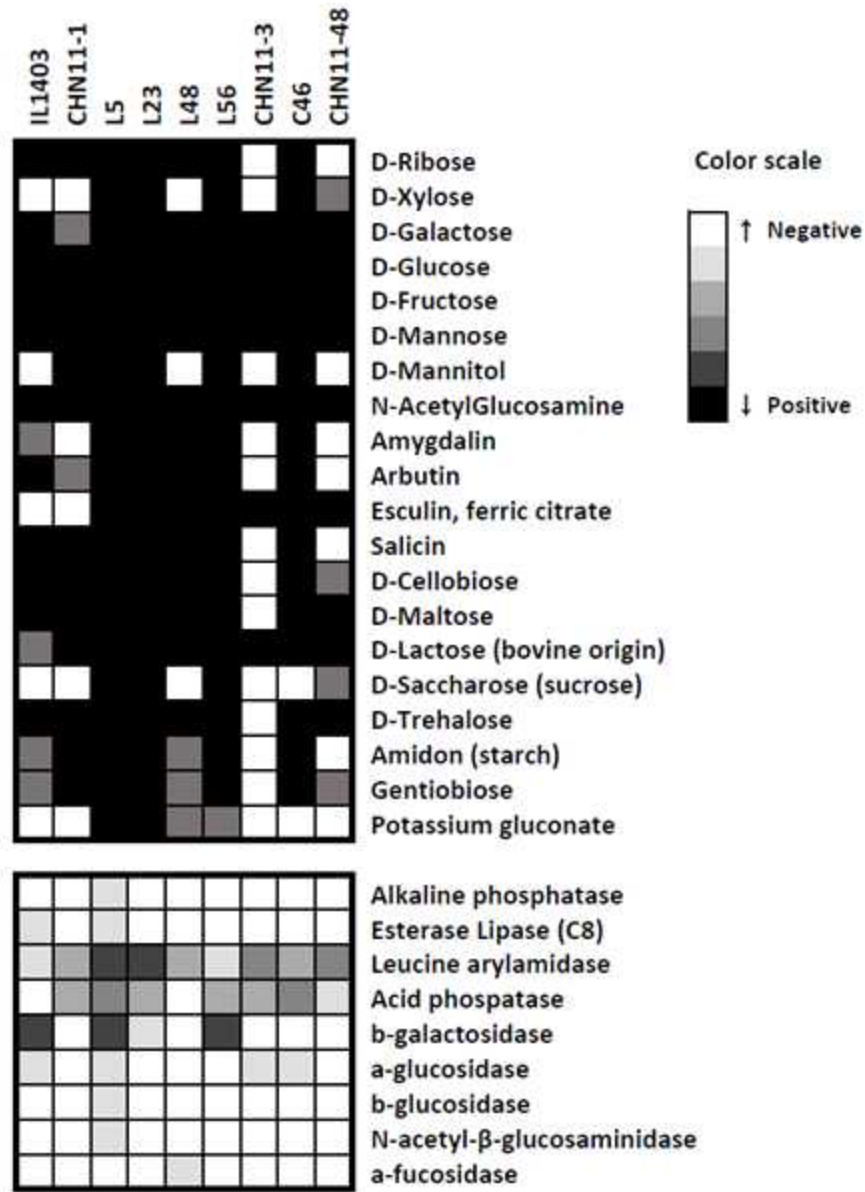


그림 32. API 50 CHL과 API ZYM kit로 분석한 대조균과 선발균의 탄수화물 발효와 효소 패턴을 나타낸 흑백 색표. 흑백일수록 양성에 가깝고 백색일수록 음성에 가까움.

(6) 자가분해 (Autolysis) 능력 확인

- 치즈 종균은 원유에 접종 후 일정시간이 지나면 자가 분해하는 능력이 필요함. 자가 분해 시에 종균 세포내의 효소가 방출되는데, 이 효소들은 원유의 아미노산 분해 등 치즈 풍미형성에 기여하는 것으로 알려져 있음9)

- 균 배양액을 원심 분리하여 세포만 취하고 이를 0.5 M sodium chloride (Sigma, USA) 를 함유한 0.01 M phosphate buffer (pH 5.5) (Mediatech, Inc., USA)에 풀은 뒤 600nm 에서의 흡광도를 0.9 와 1.0 사이로 조정하여 준비함. 초기 흡광도를 일정하게 맞춰준 균 현탁액은 30 °C 배양기에 보관하며 6 시간, 24 시간, 48 시간 후에 흡광도를 측정했음.
- *L. lactis* subsp. *lactis* 그룹에서는 L48을 제외하고는 모두 대조균인 IL1403 보다 우수한 자가분해능력을 보였고, *L. lactis* subsp. *cremoris* 그룹에서도 대조균인 CHN-11-3 보다 C46의 자가분해능력이 우수한 것으로 분석됨.

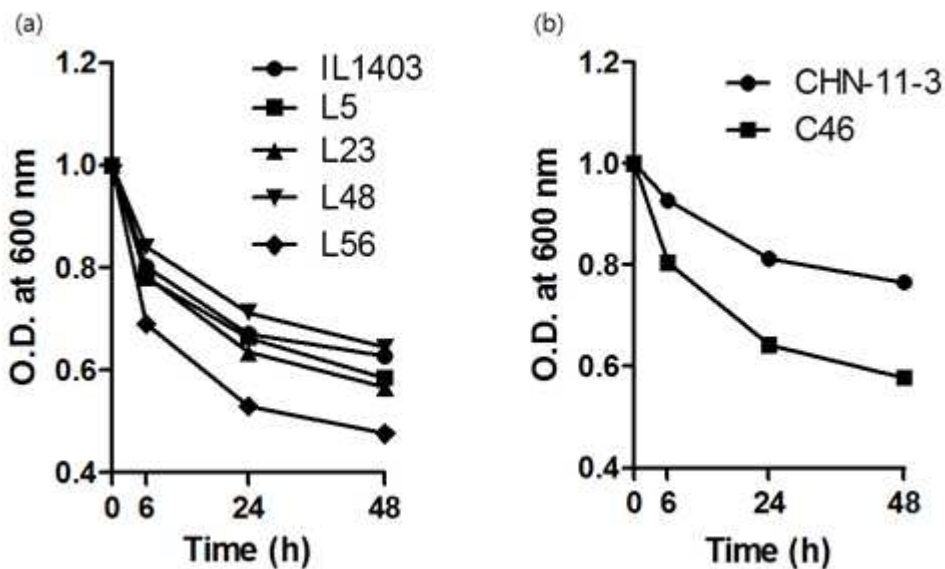


그림 33. *L. lactis* subsp. *lactis* 그룹 (a)과 *L. lactis* subsp. *cremoris* 그룹 (b)의 자가분해능력을 나타낸 꺾은선 그래프.

(7) 동결건조 과정에서의 안정성

- 치즈 종균이 산업적으로 이용될 때에는 일반적으로 Direct Vat Set (DVS) 형태로 이용되므로 Freeze-drying process에 안정성이 있는지도 중요한 평가 요소임.
- 0.5 % glucose를 첨가한 M17 (GM17) 액체배지 500 ml를 30 °C에서 100 rpm 으로 24 시간 배양한 후 원심분리 (4,000 rpm, 20 min, 4 °C)로 세포를 취함. 이를 다시 skim milk 10 % (Oxoid, UK), lactose 3 % (Difco, USA), yeast extract 0.1 % (Difco, USA) 로 구성된 액체 배지 10 ml에 풀어준 뒤 -80 °C의 초저온냉동고 (IE2386D, Thermo Fisher Scientific, USA)에 하루 동안 얼림. GM17 고체배지를 이용해 동결건조 전의 생균수를 측정하고, -80 °C의 동결건조기 (MCFD8518, IIShinBioBaseCo. Ltd., South

9) Bourdat-Deschamps M, LeBars D, Yvon M, Chapot-Chartier M-P (2004) Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *Int Dairy J* 14:791-800

Korea)에서 24시간 동안 동결 건조한 후의 생균수를 측정함.

- 동결건조 전과 후의 대조균과 선발균의 생균수를 비교했을 때, 실험균은 비슷한 Log CFU/g 값을 보이거나 1 Log CFU/g 만 감소한데에 반해서 대조균은 1에서 2 Log CFU/g 정도의 생균수가 감소한 것으로 분석됨. 따라서 동결건조 과정에서 선발균의 안정성이 더 높다고 할 수 있음.

표 32. 동결건조 전과 후의 대조균과 선발균의 생균수

	Before freeze-drying (Log CFU/g)	After freeze-drying (Log CFU/g)
Control		
IL1403	11.64 ± 0.00	10.43 ± 0.09
CHN-11-1	10.51 ± 0.21	8.83 ± 0.13
CHN-11-3	10.72 ± 0.11	8.91 ± 0.01
CHN-11-48	10.81 ± 0.19	9.96 ± 0.17
Test		
L5	10.47 ± 0.05	10.73 ± 0.04
L23	10.80 ± 0.17	10.25 ± 0.07
L48	11.55 ± 0.02	10.49 ± 0.08
L56	11.33 ± 0.01	10.38 ± 0.09
C46	11.64 ± 0.05	10.43 ± 0.22

3) 종균 후보균 선발-유발효성, 풍미, 성장성

(1) 실험실 단위 치즈 모델 제조로 종균 후보균 검정

- 서울대학교 농업생명과학대학에서 당일 착유한 원유를 실험실 단위의 치즈 모델 제조에 사용함.

- Milkoscan FT2 (Foss Analytical A/S, Denmark)를 이용하여 원유 조성을 측정하였음.

표 33. 실험실 단위 치즈 모델에 사용한 원유의 조성

Composition	Contents (%)
Milk fat	3.69
Milk protein	2.99
Lactose	4.58
Solid non fat (SNF)	8.61
Total solid (TS)	12.20

- CHN-11-3과 IL1403의 두 균을 넣은 것을 Control 1로 하고 이 두 균에 CHN-11-1과 CHN-11-48을 추가한 것을 Control 2로 하였음. 선발한 종균 후보균 C46을 L5, L23,

L48, L56과 각각 조합하여 Test 1, Test 2, Test 3, Test 4로 하였음.

- 실험실 단위 치즈 모델 제조에 사용한 대조균과 종균 후보균의 조합 및 접종비는 다음 표로 정리하였음.

표 34. 실험실 단위 치즈 모델 제조에 사용한 대조균과 종균 후보균의 조합 및 접종비

Group		Combination of strains	Ratio
Control	1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CHN-11-3, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	7:3
	2	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CHN-11-3, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CHN-11-1, <i>L. pseudomesenteroides</i> CHN-11-48	7:1:1:1
Test	1	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C46, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L5	7:3
	2	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C46, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L23	7:3
	3	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C46, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L48	7:3
	4	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C46, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> L56	7:3

- 미리 살균한 500 ml 원심분리 튜브에 원유를 400 ml 씩 분주한 후 68 ℃에서 25 분 동안 살균. 30℃ 향온수조에서 약 30분가량 정치. 표 34의 균주 조합대로 원유에 2 % (v/v) 접종하고 다시 30℃ 향온수조에서 1시간가량 정치. 미리 0.2 μm의 Minisart® Syringe Filter (Satorius AG, Germany)로 필터링해둔 STD PLUS 290렌넷 (Chr.Hansen, Denmark)을 권장용량대로 접종한 후 응유될 때까지 약 두 시간정도 30℃ 향온수조에 정치.
- 살균된 일회용 스틱을 이용하여 커드를 잘라주고 Laboshaker R100 (Labogene, South Korea)을 이용해서 10 rpm으로 20분 동안 교반. 약 40 %의 유청을 제거한 후 살균한 30 ℃ 증류수를 동량 더해 curd washing. 다시 10 rpm으로 10분 동안 교반 후 원심분리 (380 g, 10 min, 30 ℃) 해서 액체 제거. 살균된 새 원심분리 통에 커드를 옮겨 담고 다시 원심분리 (1,400 g, 1 h, 30 ℃). 유청 제거 후 커드를 뒤집어서 원심분리 (1,400 g, 30 min, 30 ℃).
- 치즈 모양을 잡은 후 숙성할 용기에 옮겨 담고 66% NaCl 용액에 5분 동안 침지 후 용액 제거.

○ 한 달 동안 10 °C 숙성시킴. 같은 방식으로 제조한 30 °C 숙성 치즈 모델은 일주일 동안 숙성.

- 다음은 실험실 단위 치즈 모델의 제조 직후의 무게 및 생산량을 나타낸 표. 평균 치즈 무게는 49.32 g 이었고 평균 생산량은 12.33 % 였음.

표 35. 10 °C 및 30 °C 숙성 치즈 모델의 초기 무게와 생산량

	10 °C 숙성		30 °C 숙성	
	무게 (g)	생산량 (% w/v)	무게 (g)	생산량 (% w/v)
Control 1	50.83	12.71	47.68	11.92
Control 2	45.26	11.32	45.87	11.47
Test 1	60.33	15.08	43.12	10.78
Test 2	65.15	16.29	41.63	10.41
Test 3	51.92	12.98	47.68	11.92
Test 4	51.50	12.88	40.82	10.21

- 다음은 실험실 단위 치즈 모델 제조 과정을 모식화한 것임.

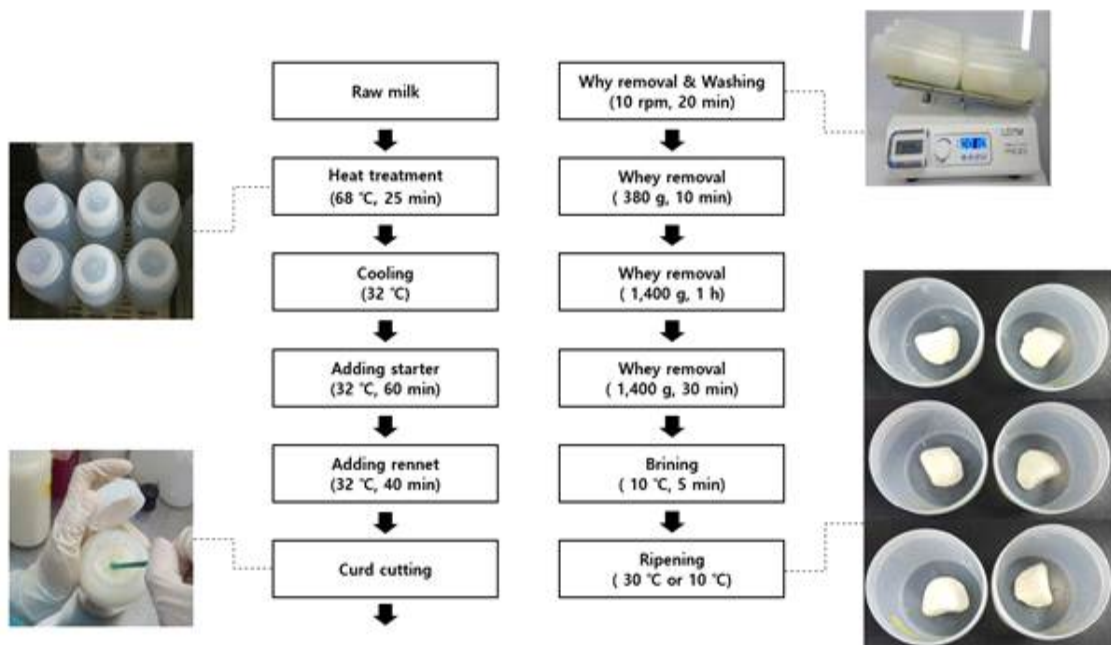


그림 34. 실험실 단위 치즈 모델 제조 과정 모식도

(2) 종균 후보군의 유발효에 의한 pH 변화

○ 10 °C 와 30 °C 숙성 치즈 모두 균 접종 직후 6시간 동안 pH가 급격하게 감소하였으며 일정 숙성 기간 이후에는 pH가 다소 상승하는 경향성을 보였음.

- 숙성과정 중에 아미노산이 분해되면 pH가 상승하므로 pH 상승은 숙성정도를 파악할 수 있는 지표가 됨.

○ 10 °C 숙성 치즈는 숙성 21일까지 계속해서 pH가 감소하다가 Control 4와 Test 4를 제외하고는 모두 28일째에 다소 pH가 상승하였음.

○ 30 °C 숙성 치즈 중 Control 1, Control 2, Test 3은 숙성 1일 이후에는 pH가 상승하였고, Test 1, Test 2, Test 4는 숙성 3일 이후부터 pH가 상승하였음.

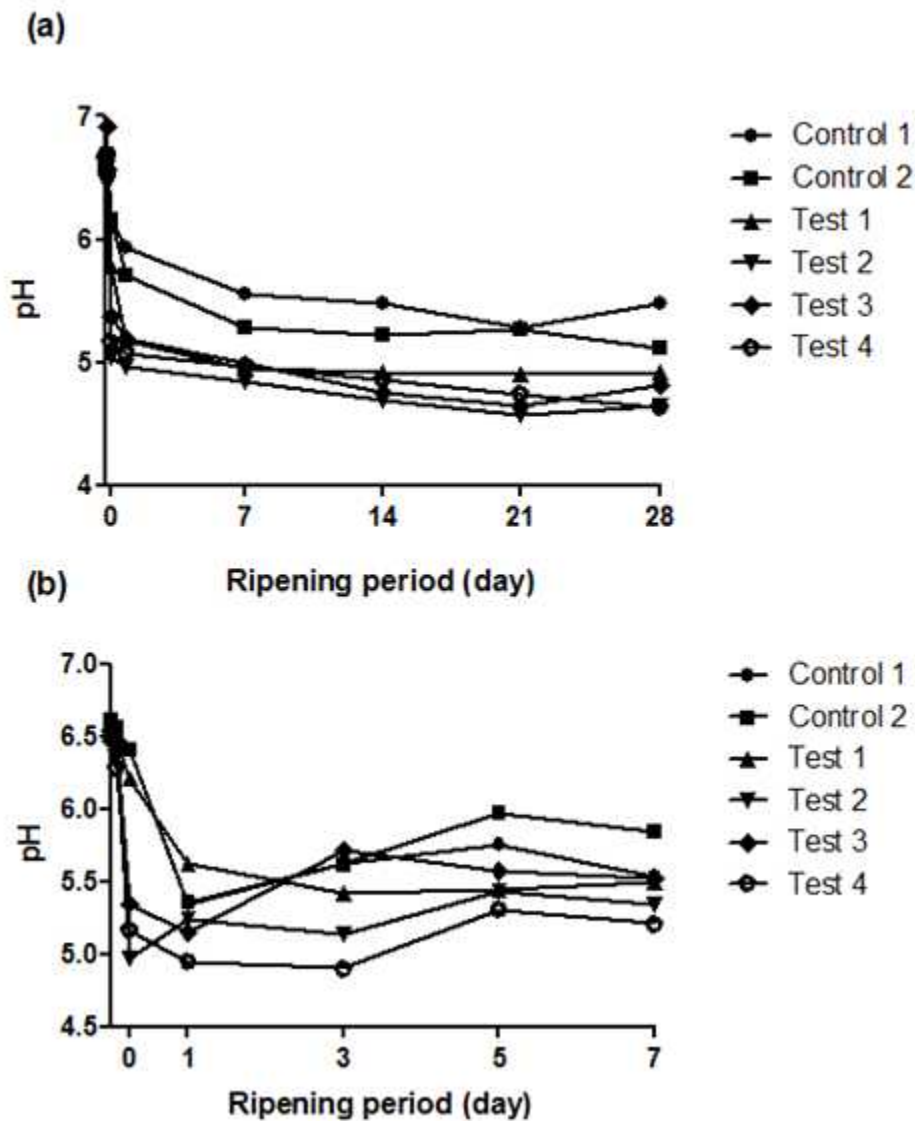


그림 35. 10 °C (a) 및 30 °C (b) 숙성 치즈 모델의 pH 변화 곡선

(3) 전자코를 이용한 치즈 모델의 풍미성분 분석

○ Heracles II Analyzer (Alpha M.O.S, France)를 이용하여 숙성 온도 및 숙성 기간에 따른 Control 두 그룹과 Test 네 그룹의 풍미 성분을 분석하였음.

- Heracles II Analyzer는 DB-5와 DB-WAX 두 개의 컬럼 (column)이 장착된 가스 크로마토그래피 타입의 전자코 기기으로써 Combi PAL Auto-Sampler (CTC Analytics AG, Switzerland)가 장착된 모델이었음.

- 기기는 제작자의 권장 설명서대로 작동하였음. 다음은 전자코 분석 조건을 정리한 표임.

표 36. 모델 치즈의 풍미 성분 분석을 위해 사용한 전자코 모델명과 분석 조건

Instrument	Heracles II Analyzer (Alpha M.O.S, France)
Column	DB-5 (30m x 0.25mm I.d., film thickness = 1.0 μ m) DB-WAX (30m x 0.32mm I.d., film thickness = 0.25 μ m)
Carrier gas	Hydrogen gas
Oven temp.	50 °C (2s) → 1 °C/s → 30 °C → 3 °C/s → 250 °C (21s)
Injector temp.	200 °C
D e t e c t o r temp.	260 °C
Detector	Flame ionization detectors (FID)

○ 10 ml의 vial에 담긴 1g의 치즈 시료를 70 °C에서 20분 동안 pre-incubation 후 vial의 headspace 부분에서 auto-sampler를 이용해 휘발성 성분을 injector에 주입함. TENAX adsorbent trap을 통해서 약간 농축된 휘발 성분들은 수소 가스에 의해서 두 개의 컬럼에 동일한 양으로 이동하며 분리되는 동시에 Flame ionization detectors (FID)에 의해서 탐지됨.

○ 두 개의 컬럼에 의해 생성된 각각의 크로마토그램은 Alpha M.O.S사에서 제공하는 AroChemBase라는 소프트웨어에 의해서 분석되었음.

○ 10 °C 숙성 모델 치즈를 분석한 결과 DB-5와 DB-WAX 컬럼 모두에서 Control 그룹보다 Test 그룹의 풍미 성분이 더욱 다양했음.

- DB-5로 분석된 Control 그룹에서는 ethanol, butane-2,3-dione, acetoin이 발견되었고, Test 그룹에서는 ethanol, butane-2,3-dione 뿐만 아니라 3-methyl-3-buten-2-one 과 methyl isothiocyanate가 발견되었음.

- DB-WAX로 분석된 Control 그룹에서는 3-buten-2-one, acetoin, formic acid가 발견

되었고 Test 그룹에서는 2,4 dimethylfuran, 1-propanol, 2-methyl-, isopropyl isothiocyanate, methyl isothiocyanate 등이 추가로 발견되었음.

- 10 °C 숙성 0 주차에는 methylethyl formate, 2-propenol, methylbutanone 등이 높은 수치로 발견되었으나 숙성 4 주차에는 이 성분들은 거의 사라졌음. 대신에 butane-2,3-dione, 3-methyl-3-buten-2-one, methyl isothiocyanate, formic acid가 숙성 기간 중에 증가한 것으로 확인됨.

○ 30 °C 숙성 모델 치즈는 10 °C 숙성 모델 치즈에 비해 풍미 성분이 더욱 다양하게 확인 되었으며, 10 °C 숙성 모델 치즈에서와 마찬가지로 두 개의 컬럼 모두에서 Cotrol 그룹 보다 Test 그룹에서의 풍미가 더욱 다양했음.

- DB-5로 분석된 Control 그룹에서는 ethanol, butane-2,3-dione, acetoin, 1,3-dimethylcyclohexane, 3-methyl-3butanol, heptafluorobutyrate가 발견되었고, Test 그룹에서는 위의 5개 풍미 성분외에 methylbutanone과 methyl isothiocyanate가 추가적으로 발견되었음.

- DB-WAX로 분석된 Control 그룹에서는 enflurane, 3-buten-2-one, butane-2,3-dione, methyl isothiocyanate, acetoin, formic acid, ethylene glycol이 발견되었고, Test 그룹에서는 Control 그룹에서 발견된 성분 이외에 1-propanol, 2-methyl-, isopropyl isothiocyanate, 3-formylthiophene, methylbutanone이 추가로 발견되었음.

- 30 °C에서 가속화 숙성한 모델 치즈는 7일 동안 충분히 다양한 풍미 성분을 생성했음. 0일차에는 모든 그룹에서 높은 수치의 methylbutanone과 enflurane이 발견되었고 Test 1 과 Test 2에서는 초기에 3-buten-2-one이 발견되었다가 사라졌음. 대신에 butane-2,3-dione, acetoin, methyl isothiocyanate, 1,3-dimethylcyclohexane, 3-methyl-3butanol, heptafluorobutyrate, formic acid, furfural, ethylene glycol이 숙성 기간에 따라 증가했음.

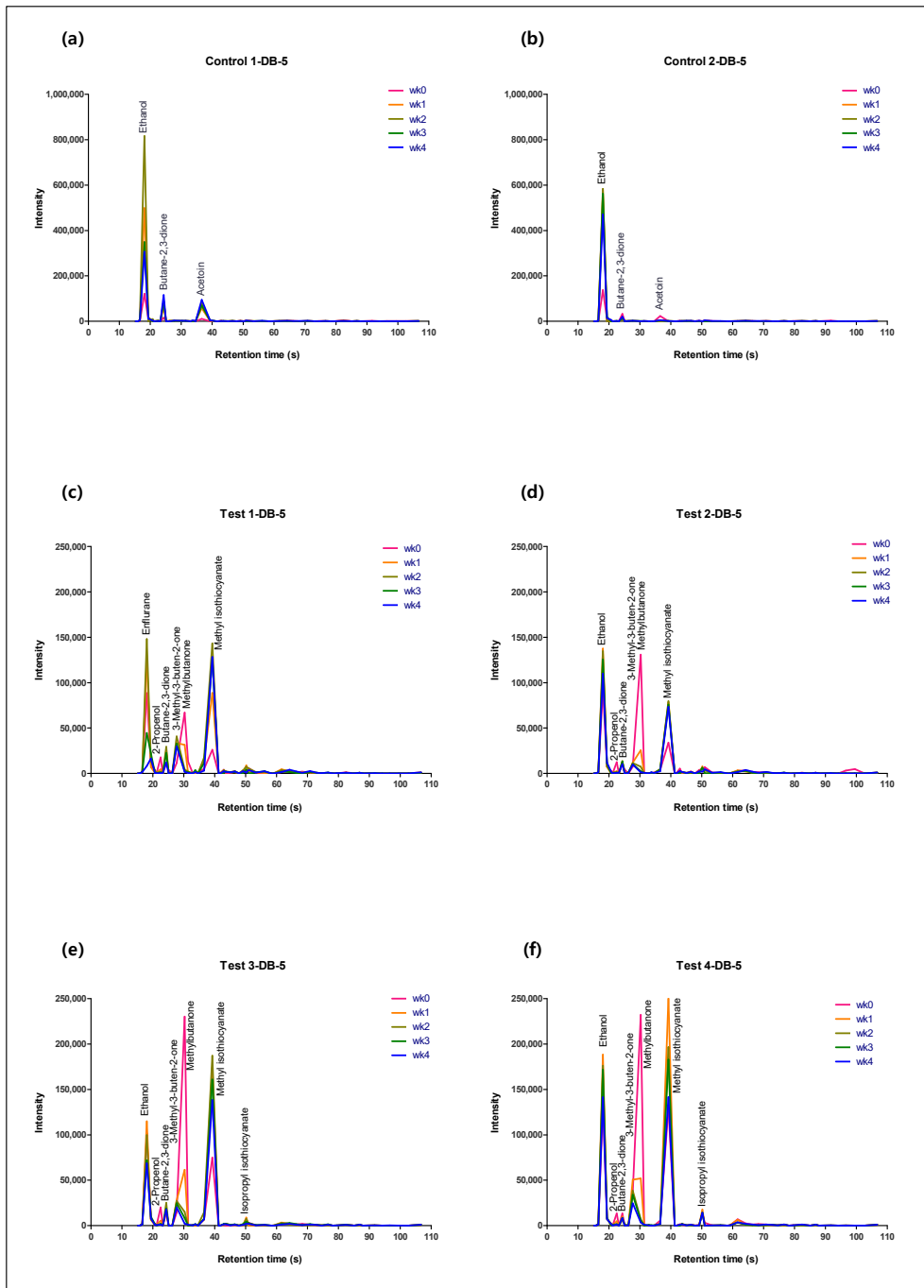


그림 36. DB-5 컬럼으로 분석한 10 °C 숙성 치즈의 크로마토그램.
Control 1 (a), Control 2 (b), Test 1 (c), Test 2 (d),
Test 3 (e), Test 4 (f).

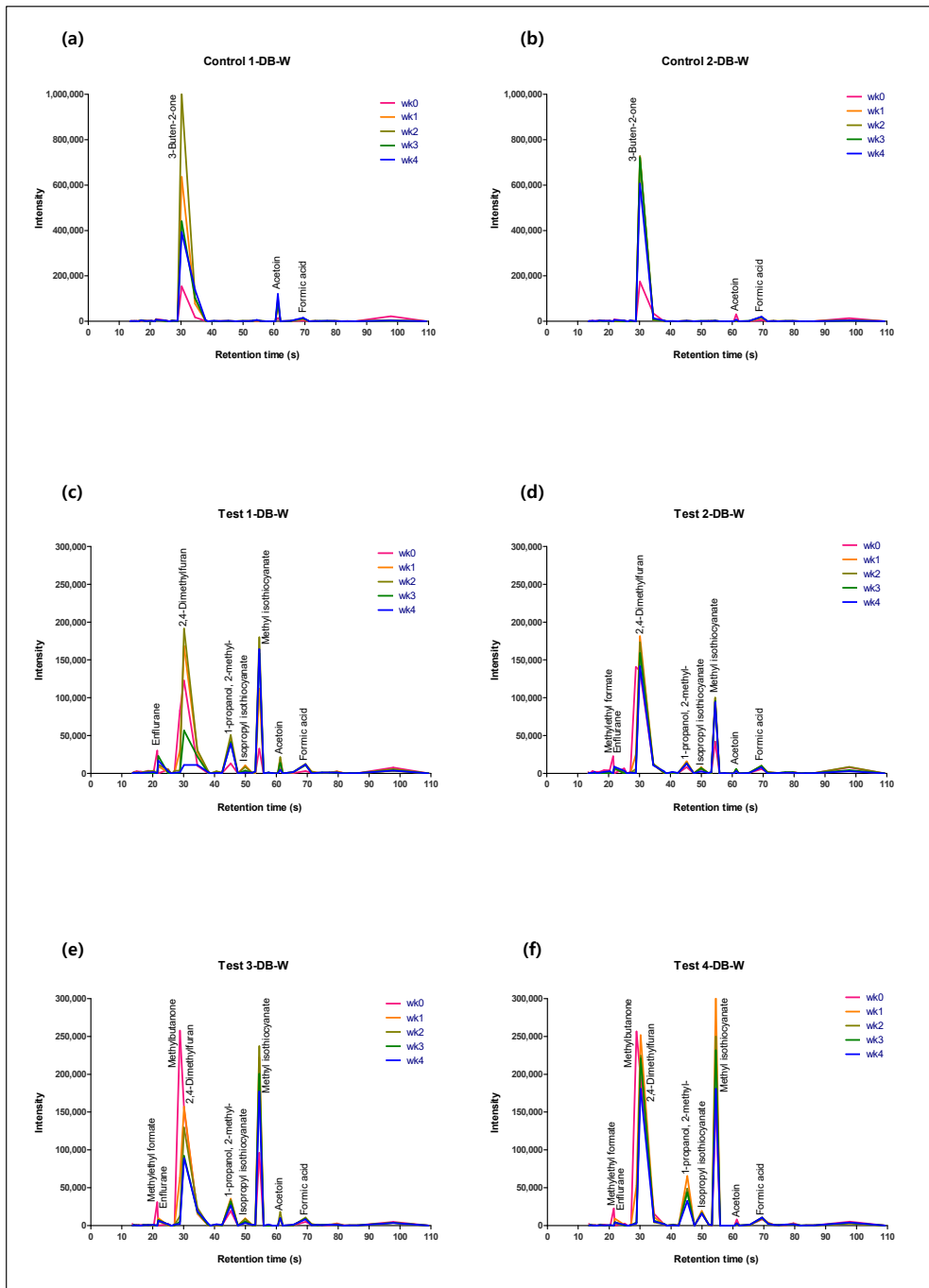


그림 37. DB-WAX 컬럼으로 분석한 10 °C 숙성 치즈의 크로마토그램.
Control 1 (a), Control 2 (b), Test 1 (c), Test 2 (d),
Test 3 (e), Test 4 (f).

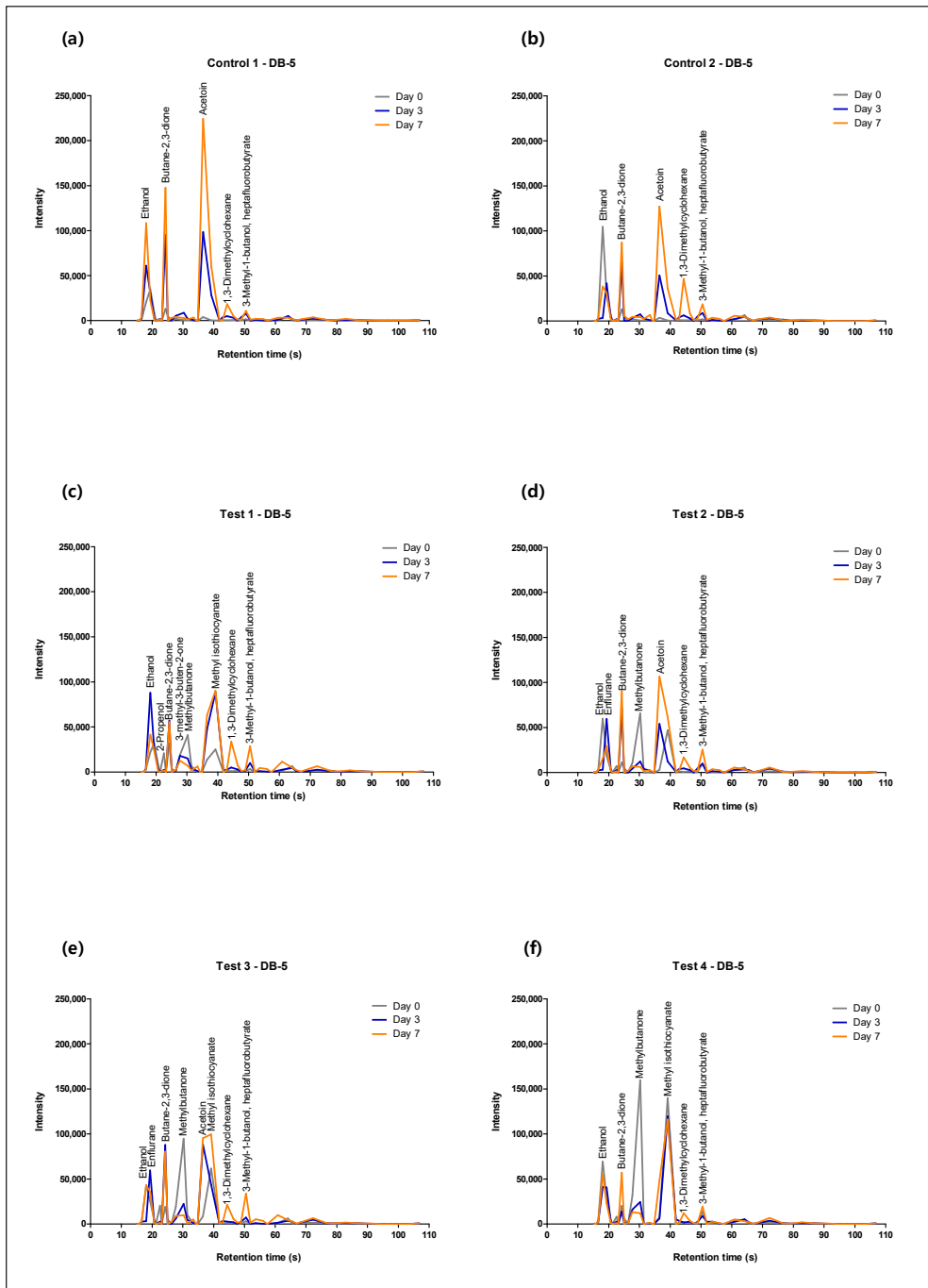


그림 38. DB-5 컬럼으로 분석한 30 °C 숙성 치즈의 크로마토그램.
Control 1 (a), Control 2 (b), Test 1 (c), Test 2 (d),
Test 3 (e), Test 4 (f).

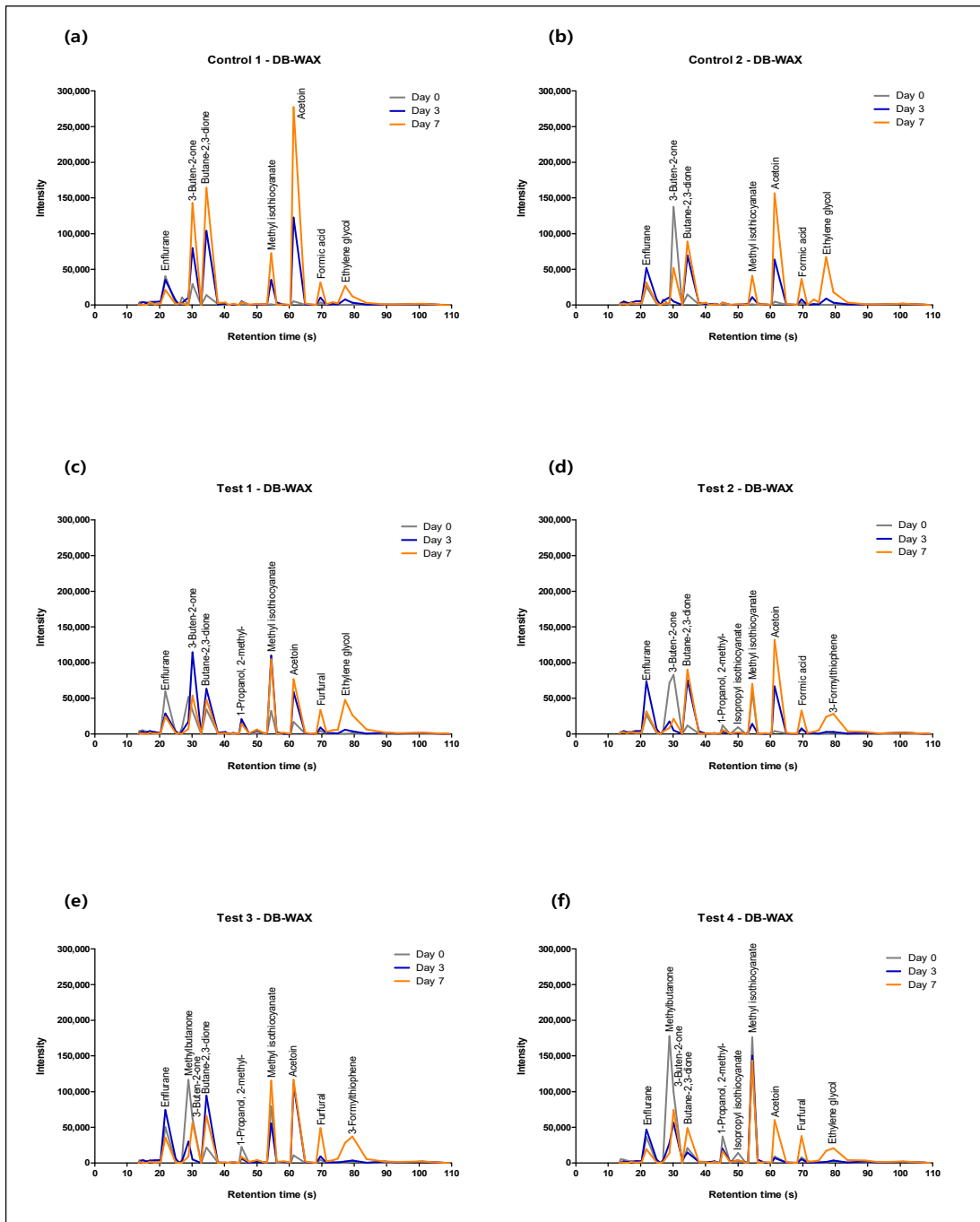


그림 39. DB-WAX 컬럼으로 분석한 10 °C 숙성 치즈의 크로마토그램. Control 1 (a), Control 2 (b), Test 1 (c), Test 2 (d), Test 3 (e), Test 4 (f).

표 37. 전자코를 이용해 분석한 풍미 성분 프로파일

	Control group	Test group	Formula	Sensory descriptors	Reference
10°C	Acetoin	Acetoin	C4H8O2	Butter, Coffee, Creamy	Arochembase ^a
	Butane-2,3-dione	Butane-2,3-dione	C4H6O2	Butter, Caramelized, Creamy, Fruity, Pineapple	Arochembase
	Ethanol	Ethanol	C2H6O	Alcoholic, Ethanol, Pungent, Sweet	Arochembase
	Formic acid	Formic acid	CH2O2	Savory	FEMA ^b
	3-Buten-2-one	-	C4H6O	sweet	Arochembase
		1-Propanol, 2-methyl-	C4H10O	Alcoholic, Bitter, Chemical, Glue, Leek, Licorice, Solvent, Winey	Arochembase
		2,4-Dimethylfuran	C6H8O	Onion, Galic, Leek	Villière <i>et al.</i> , (2015)
		2-Propenol	C3H6O	Mustard	https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/2357
		3-Methyl-3-buten-2-one	C5H8O	Alcoholic, Etheral	Arochembase
		Enflurane	C3H2ClF5PO	Etheral, Pungent	Arochembase
		Isopropyl isothiocyanate	C4H7NS	Savory	FEMA
	Methylbutanone	C5H10O	Camphor	Arochembase	
	Methylethyl formate	C4H8O2	Fruit	FEMA	
	Methyl isothiocyanate	C2H3NS	Nauseating, Toxic smell	Duque, Carmenza, <i>et al.</i> , (2001)	
30°C	1,3-Dimethylcyclohexane	1,3-Dimethylcyclohexane	C8H16	Perfumery	Arochembase
	3-Buten-2-one	3-Buten-2-one	C4H6O	sweet	Arochembase
	3-Methyl-1-butanol, heptafluorobutyrate	3-Methyl-1-butanol, heptafluorobutyrate	C9H11F7O2	Fatty	Arochembase
	Acetoin	Acetoin	C4H8O2	Butter, Coffee, Creamy	Arochembase
	Butane-2,3-dione	Butane-2,3-dione	C4H6O2	Butter, Caramelized, Creamy, Fruity, Pineapple	Arochembase
	Enflurane	Enflurane	C3H2ClF5PO	Etheral, Pungent	Arochembase
	Ethylene glycol	Ethylene glycol	C2H6O2	bittersweet	Berman <i>et al.</i> , (1957)
	Ethanol	Ethanol	C2H6O	Alcoholic, Ethanol, Pungent, Sweet	Arochembase
	Formic acid	Formic acid	CH2O2	Savory	FEMA
	Methyl isothiocyanate	Methyl isothiocyanate	C2H3NS	Nauseating, Toxic smell	Duque, Carmenza <i>et al.</i> , (2001)
		1-Propanol, 2-methyl-	C4H10O	Alcoholic, Bitter, Chemical, Glue, Leek, Licorice, Solvent, Winey	Arochembase
		2-Propenol	C3H6O	Mustard	https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/2357
		3-Formylthiophene	C5H4OS	Floral, vegetable	Arochembase
		3-Methyl-3-buten-2-one	C5H8O	Alcoholic, Etheral	Arochembase
	Enflurane	C3H2ClF5PO	Etheral, Pungent	Arochembase	
	Furfural	C5H4O2	Almond, Bread, Sweet	Arochembase	
	Isopropyl isothiocyanate	C4H7NS	Savory	FEMA	
	Methylbutanone	C5H10O	Camphor	Arochembase	

^a Database provided by electronic nose manufacturer (Alpha M.O.S, France) which is linked with NIST database (<http://webbook.nist.gov/chemistry>).

^b FEMA;Flavor & Extract Manufacturers Association.

○ 전자코로 확인한 10 °C 및 30 °C 숙성 치즈의 풍미 성분을 판별함수분석 (Discriminant Function Analysis) 함.

- 10 °C 숙성 치즈의 각 Control 과 Test 그룹간의 풍미 성분 차이로 인해 분류가 가능했으며, 30 °C 숙성 치즈에서는 숙성기간에 따라서도 풍미 성분이 차이를 보여 분류할 수 있었음.

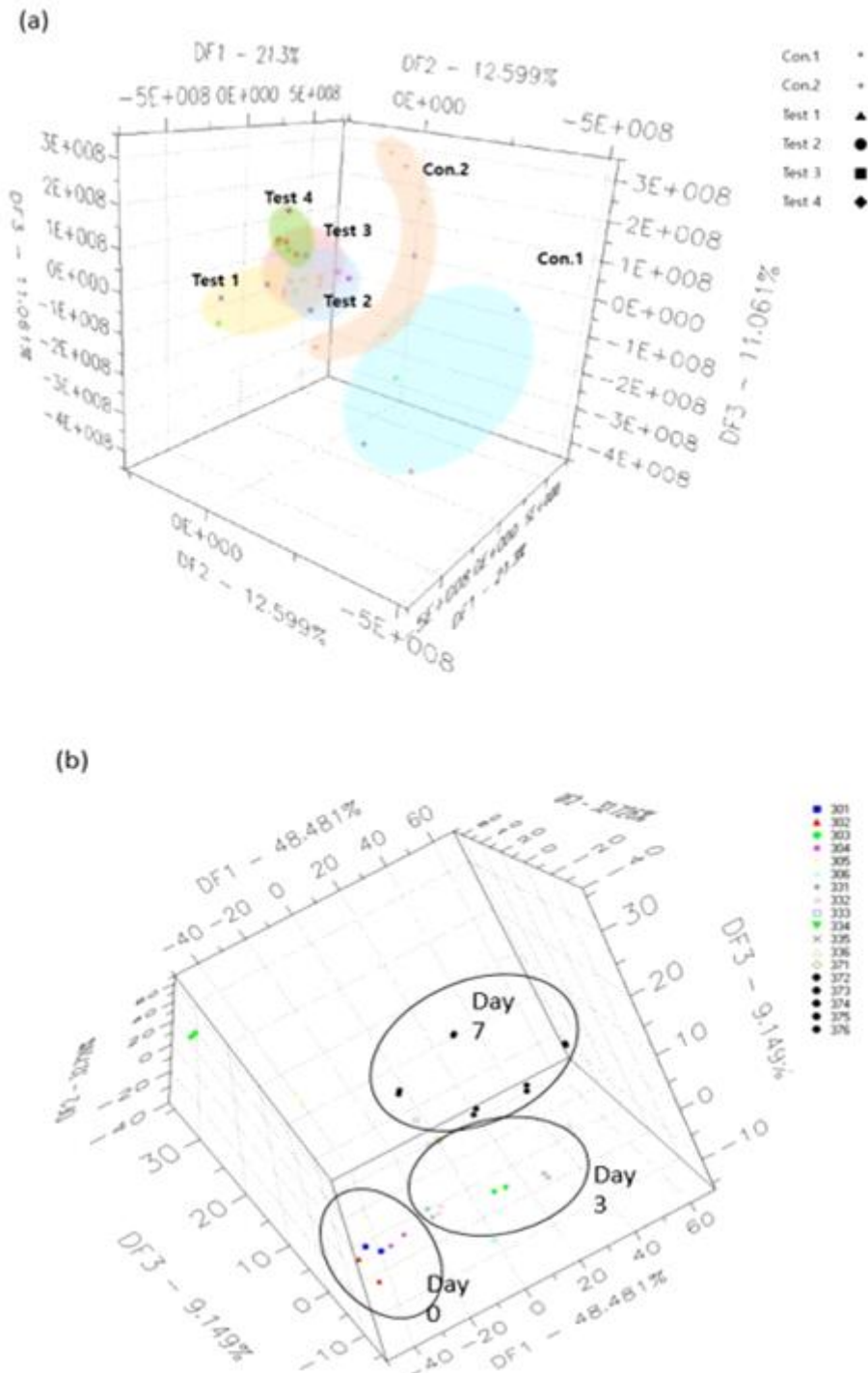


그림 40. 10 °C 숙성 치즈 (a)와 30 °C 숙성 치즈의 풍미 성분 패턴 분석을 판별함수분석

(4) 치즈 모델에서의 평균 성장성 확인

○ Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 방법을 이용해 치즈 모델에서의 평균 성장성을 확인함.

- Control 1과 Test 1, Test 2, Test 3, Test 4 치즈에서의 *L. lactis* subsp. *lactis* 와 *L. lactis* subsp. *cremoris* 의 균수를 확인함.

표 38. qRT-PCR에 사용된 프라이머 정보

Target subsp species	Primer	Sequence (5'-3')	TM (°C)	G C %	Amplicon (bp)	Reference
lactis	LLhis3F	AAAGAATTTTCAGAGAAA	40.5	27	343	Beimfohr, C <i>et al.</i> , 1997
	LLhis4R	ATTTAGAATTGGTTCAAC	43.1	38		
cremoris	68FCa33	GATGAAGATTGGTGC TTGCAC	58.5	47	241	Grattepanche, F <i>et al.</i> 2005
	16SR308	CCTCTCAGGTCGGCTATGTA	60.4	55		

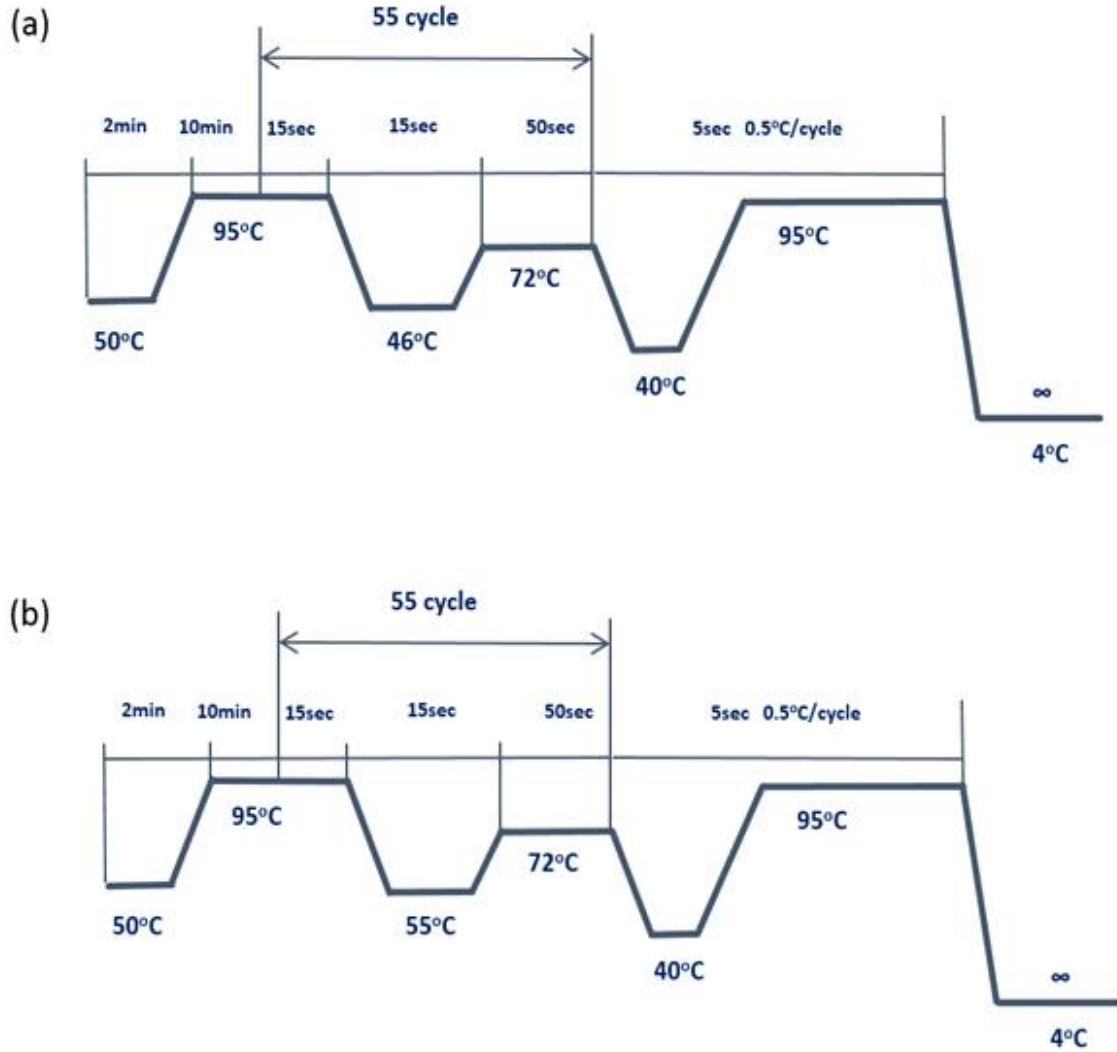


그림 41. lactis (a) 및 cremoris (b) 생균수 확인을 위한 qRT-PCR 진행과정

표 39. qRT-PCR을 통한 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 균수 확인

Ripening days	Lactis concentration (Log CFU/ml)				
	Control 1	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
0	6.53	8.44	7.72	6.07	5.56
3	7.60	8.93	6.10	7.20	6.01
7	9.43	8.98	6.65	7.59	6.35

표 40. qRT-PCR을 통한 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 균수 확인

Ripening days	Cremoris concentration (Log CFU/ml)				
	Control 1	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
0	4.04	6.52	6.48	5.75	6.42
3	4.02	5.61	4.76	6.28	6.48
7	5.85	5.97	4.97	6.16	6.51

4. 원유에서 발효유 생산을 위한 종균 유산균 분리

1) 발효유용 종균 유산균 분리를 위한 샘플 수집

- 한국 고유의 발효유 종균 개발을 위해 평창지역소재 목장 3곳 (서울대목장, 보배목장, 하늘목장)에서 원유를 샘플링 함.
 - 평창군에서 3곳의 농가를 선정하여 착유하고 집유 전 탱크로리에서 원유 2L를 멸균된 용기에 담아 수집함.

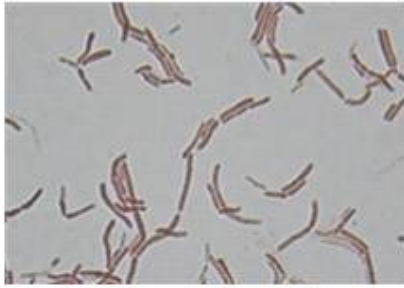
2) 원유에서의 유산균 분리

- 원하는 종균을 선택적으로 분리해내기 위해 일부는 항생제 vancomycin을 처리한 후 (20mg/L) 40℃에서 24시간 전배양함.
- 전배양 후 원유 1 ml를 취하여 0.85 % NaCl 멸균액으로 10배 희석했음. 각 희석액은 발효유 종균으로 많이 사용되는 Lactobacillus 속과 Streptococcus 속을 분리를 위해 selective media인 MRS (Man, Rogosa and Sharp, Difco, USA) 고체 배지 및 0.5 % Lactose 첨가 M17 (Difco, USA) 고체 배지에 도말했음. 이 후 48시간 동안 호기조건에서 배양했음.
- 다수의 균 확보를 위해 각 배지에서 colony morphology을 관찰하여 선택한 후 동일한 액체 배지에 다시 접종하여 24시간 동안 호기조건에서 배양했음.
- 3.5 % H₂O₂를 이용해 카탈레이즈 (Catalase) 실험을 했고 그람 염색을 한 후 현미경으로 형태를 확인했음. 카탈레이즈 음성 및 그람 양성의 구균 또는 간균을 선별하여 유산균임을 판정했음.
- 총 33개의 유산균을 분리해 냈으며, 일부인 25개는 16S rRNA sequencing을 통해 동정하였음.

표 41. 분리한 유산균의 colony morphology 및 catalase, gram test 결과

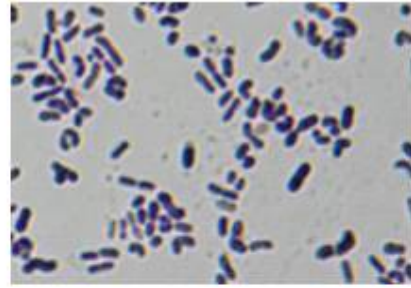
	Strain	shape (colony)	color	size (mm)	humidity (+/-)	transparency (+/-)	catalase (+/-)	gram (+/-)	morphology	temp. (°C)	Origin
1	M1	round	white (우유)	1	++	-	-	+	cocci	30	서울대 목장
2	M3	round	투명	<1	++	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
3	M6	round	투명	<2	++	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
4	M7	round	투명	<3	++	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
5	R4	round	투명	<4	++	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
6	H-2	rough	연한 아이보리	1	-	-	-	+	Rod	40	하늘장 목장
7	H-3	rough	연한 아이보리	1	-	-	-	+	Rod	40	하늘장 목장
8	HV-1	round	연한 아이보리	1	++	-	-	+	Rod	40	하늘장 목장
9	HV-2	round	투명	<1	++	+	-	+	Rod	40	하늘장 목장
10	MH-2	round	white (우유)	1.5	++	-	-	+	cocci	40	하늘장 목장
11	MH-3	round	white (우유)	1.5	++	-	-	+	cocci	40	하늘장 목장
12	MHV-1	round	아이보리	1	++	-	-	+	cocci	40	하늘장 목장
13	MHV-2	round	연한 아이보리	1	++	-	-	+	Rod	40	하늘장 목장
14	S-1	round	투명	<1	+	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
15	S-2	round	투명	<1	+	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
16	S-3	round	투명	<1	-	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
17	S-4	round	투명	<1	+	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
18	SV1-1	round	아이보리	1	++	-	-	+	cocci	40	서울대 목장
19	SV1-2	round	아이보리	1	++	-	-	+	cocci	40	서울대 목장
20	SV2-1	round	아이보리	1	++	-	-	+	cocci	40	서울대 목장
21	SV2-2	round	아이보리	1	++	-	-	+	cocci	40	서울대 목장
22	SV-3	round	투명	<1	+	+	-	+	cocci	40	서울대 목장
23	MS-2	round	투명	<1	+	+	-	+	Rod	40	서울대 목장
24	MSV-2	round	아이보리	1	++	-	-	+	cocci	40	서울대 목장
25	MSV-3	round	아이보리	1	++	-	-	+	Rod	40	서울대 목장
26	BV-1	round	연한 아이보리	1.5	++	-	-	+	Rod	40	보배 목장
27	MB-3	round	white (우유)	1.5	++	-	-	+	cocci	40	보배 목장
28	MB-4	round	white (우유)	1.5	++	-	-	+	cocci	40	보배 목장
29	MBV-2	round	투명	<1	-	+	-	+	Rod	40	보배 목장
30	MS-1	round	투명	<1	+	+	-	+	Rod	40	보배 목장
31	MH-1	round	투명	<1	++	+	-	+	cocci	40	보배 목장
32	MBV-3	round	우유	1.5	++	-	-	+	cocci	40	보배 목장
33	BV-4	round	연한 아이보리	1	++	-	-	+	Rod	40	보배 목장

(A)



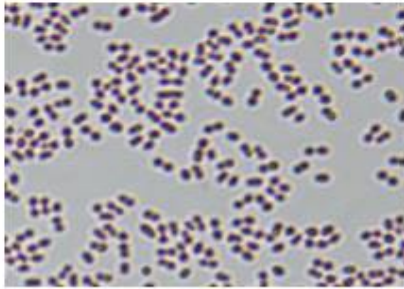
Lactobacillus delbrueckii subsp.
bulgaricus

(B)



Lactobacillus rhamnosus

(C)



Streptococcus thermophilus

(D)



Lactococcus lactis

그림 42. 대표 유산균 균주의 그람염색 사진

연구목표3: 발효축산물, 치즈 종균의 기능성 입증

1. 프로바이오틱스 후보 균주의 항충치능력 평가

1) 프로바이오틱스 후보 균주의 충치균에 대한 항균활성 능력 검증

- 충치를 형성하는데 주요한 원인균 중 하나인 *Streptococcus mutans*를 선정. Strain은 *S. mutans* ATCC 25175와 *S. mutans* ATCC 700610 사용.

(1) Agar well diffusion을 통한 항균활성 능력 검증

- BHI agar plate를 base agar로 선정하고, *S. mutans*를 10^8 CFU/ml 수준으로 0.8 % BHI soft agar에 접종한 후, base agar 상층 부분에 분주하여 2시간 동안 굳힘. Agar가 충분히 굳었을 때, well을 만들고 각 well에 10^8 CFU/ml과 유산균 배양액의 상층액을 100 ul 접종한 후 48 시간 37 °C에서 호기로 배양함.
- *S. mutans* ATCC 700610의 경우, colony가 agar plate상에서 자라지 않아 확인 불가능하였음.

표 42. *S. mutans* ATCC 25175에 대한 각 프로바이오틱스 후보 균주의 항균활성 능력

Species	Strain	Diameter of the inhibition zone (mm) ^a	
		Cell suspension	Cell supernatant
<i>L. rhamnosus</i>	GG	++	-
<i>L. fermentum</i>	KM6-5	-	-
<i>L. fermentum</i>	LM15-1	-	-
<i>L. fermentum</i>	LM16-10	-	-
<i>L. gasseri</i>	LM8-5	++	-
<i>L. paracasei</i>	LM1-1	+	-
<i>L. paracasei</i>	LM1-3	++	-
<i>L. paracasei</i>	LM3-5	+	-
<i>L. paracasei</i>	M9-1	+++	-
<i>L. plantarum</i>	KM14-5	++	-
<i>L. reuteri</i>	LDTM7503	-	-
<i>L. reuteri</i>	LDTM7504	-	-
<i>L. reuteri</i>	LDTM7505	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	HM15-5	+	-
<i>L. rhamnosus</i>	HM26-1	+	-
<i>L. rhamnosus</i>	LM11-1	++	-
<i>L. rhamnosus</i>	LM14-3	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LDTM6801	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LDTM6804	+	-
<i>P. acidilactici</i>	LDTM5201	+	-
<i>W. cibaria</i>	LDTM8901	-	-

^a+++ , > 7mm; ++ , > 6mm; + , < 6mm; - , no clear zone

- 각 프로바이오틱스 후보 균주의 상층액에서는 항균 능력이 확인되지 않았지만, cell suspension으로 실험 시 확인 가능. *L. paracasei* M9-1이 가장 좋은 능력을 보임.

2) 프로바이오틱스 후보 균주 상층액의 biofilm에 미치는 영향 확인

- *S. mutans*는 성장 환경에 sucrose 같은 당이 존재할 경우, 이를 대사에 이용하는 과정에서 biofilm을 형성함. 프로바이오틱스 후보 균주 상층액이 *S. mutans*가 형성하는 biofilm에 어떠한 영향을 미치는지 알아봄.

(1) *S. mutans*와 프로바이오틱스 후보 균주 상층액을 동시에 처리하였을 시

- BHI broth에 0.2 % sucrose를 첨가한 broth를 제작하고, overnight culture 한 *S. mutans*를 washing하여 배지 성분을 모두 제거한 후 harvest하여 BHI broth에 0.2 % sucrose가 첨가된 broth로 10^8 CFU/ml 수준으로 균수를 조절함. 96 well plate에 균수가 조절된 *S. mutans* 100 ul과 프로바이오틱스 후보 균주 상층액 100 ul을 동시에 접종하고 37 °C, 호기로 24 시간 배양함. 배양 후 crystal violet assay를 통하여 biofilm의 양을 측정함.

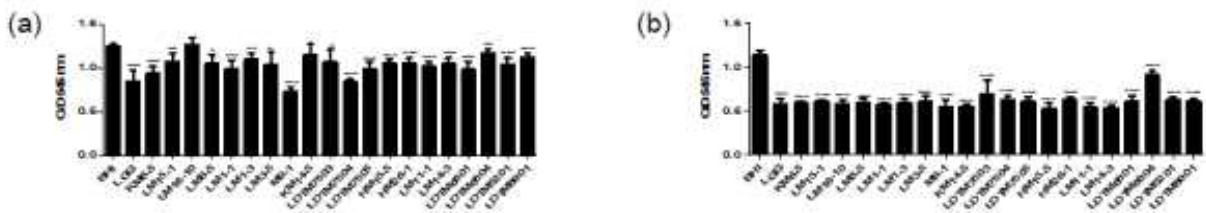


그림 43. *S. mutans*와 동시에 프로바이오틱스 후보 균주 첨가 시 나타나는 biofilm 생성량 (a) *S. mutans* ATCC 25175, and (b) *S. mutans* ATCC 700610

- 배지가 미치는 영향성을 제거하기 위하여 control group으로 프로바이오틱스 후보 균주 상층액 대신 BHI broth를 첨가함.
- 모든 프로바이오틱스 후보 균주 상층액이 biofilm 생성을 억제하는 것을 확인함. 특히 *L. paracasei* M9-1이 가장 뛰어난 억제 능력을 보임.

(2) *S. mutans*를 먼저 24 시간 배양하여 biofilm을 형성 시킨 후, 프로바이오틱스 후보 균주 상층액을 처리하였을 시

- BHI broth에 0.2 % sucrose를 첨가한 broth를 제작하고, overnight culture 한 *S. mutans*를 washing하여 배지 성분을 모두 제거한 후 harvest하여 BHI broth에 0.2 % sucrose가 첨가된 broth로 10^8 CFU/ml 수준으로 균수를 조절함. 96 well plate에 균수가 조절된 *S. mutans* 100 ul을 처리한 후, 37 °C, 호기로 24 시간 배양함. 상층액을 제거한 후 프로바이오틱스 후보 균주 상층액 100 ul을 접종하고 37 °C, 호기로 24 시간 배양함. 배양 후 crystal violet assay를 통하여 biofilm의

양을 측정함.

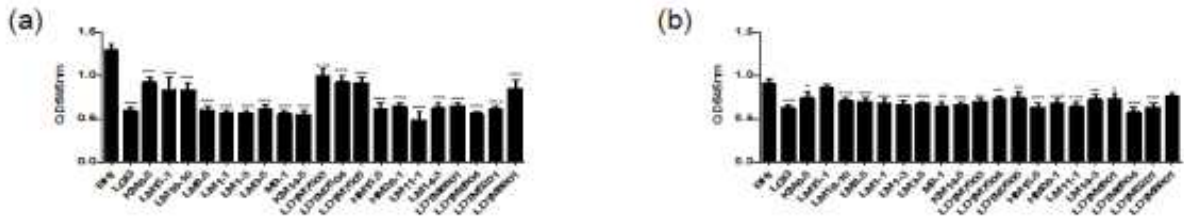


그림 44. Biofilm 형성 후, 프로바이오틱스 후보 균주가 biofilm 분해에 미치는 영향
(a) *S. mutans* ATCC 25175, and (b) *S. mutans* ATCC 700610

- 배지가 미치는 영향성을 제거하기 위하여 control group으로 프로바이오틱스 후보 균주 상층액 대신 BHI broth를 첨가함.
- 모든 프로바이오틱스 후보 균주 상층액이 생성된 biofilm을 분해하는 것을 확인함. 특히 *L. paracasei* M9-1이 가장 뛰어난 분해 능력을 보임.

3) 프로바이오틱스 후보 균주와 *S. mutans* 간의 co-aggregation 능력 확인

- 프로바이오틱스는 병원성 미생물과 aggregation 하여, 해당 미생물의 부착 receptor 부분을 block 해버림으로써 병원성 미생물의 부착을 방지할 수 있음. 이에 따라 *S. mutans*와 프로바이오틱스 후보 균주간의 aggregation 정도를 확인하여 프로바이오틱스 후보 균주의 co-aggregation 능력을 확인함.

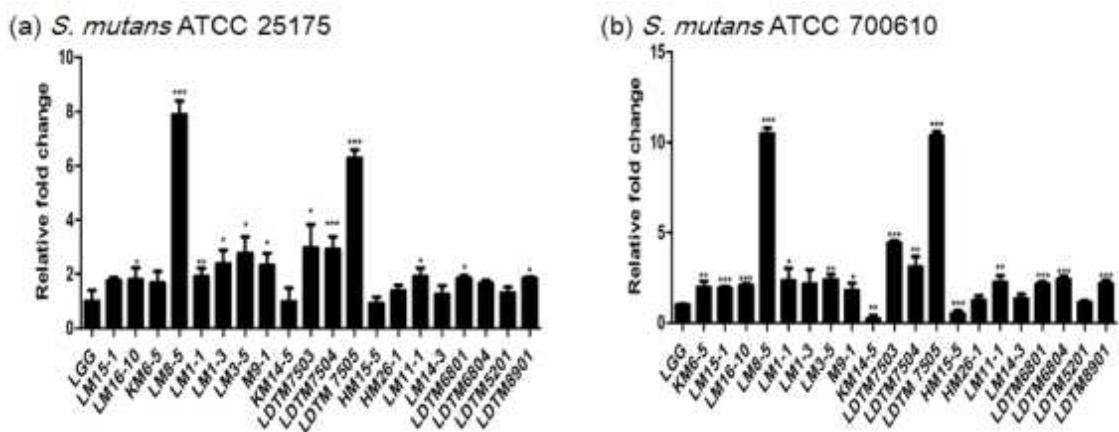


그림 45. 프로바이오틱스 후보 균주의 *S. mutans*에 대한 co-aggregation 정도
(a) *S. mutans* ATCC 25175, and (b) *S. mutans* ATCC 700610

- 프로바이오틱스 후보 균주와 *S. mutans* 모두 10^8 cfu/ml (600nm에서 흡광도 측정 시 1.0)로 균수를 통일시키고 같은 양을 co-culture함. 측정 시, 균액의 가장 상층액 부분을 수집하여 600nm에서

흡광도를 측정함. Co-aggregation 정도는 $[1 - \text{흡광도}_{\text{mix}} / (\text{흡광도}_{\text{프로바이오틱스}} + \text{흡광도}_{\text{S.mutans}})] / 2 \times 100$ 으로 계산함. 모든 프로바이오틱스 후보 균주가 상업화 균주인 *L. rhamnosus* GG 보다 co-aggregation 능력이 좋은 것을 확인함.

- 특히 *L. reuteri* group이 aggregation 능력이 매우 좋은 것으로 평가되고 species간의 유사한 결과값을 나타냄.

2. 기능성 발효 종균 후보 균주 선별 및 *in vitro* 상에서의 검증

1) 기능성 발효 종균 후보 균주 선별 및 프로바이오틱스 특성 검증

(1) 기능성 발효 종균 후보 균주 분리

- 1, 2차년도 실험을 통해 선별한 원유 미생물 제어 균주 및 치즈 발효 종균 외에 추가로 기능성을 가지는 발효 종균을 선별하기 위해 평창, 횡성, 강릉 등의 강원 지역의 재래시장에서 전통 발효식품을 수집함.

- 평창군에서 김치 27개, 젓갈 9개 샘플을 수집하고 횡성군에서 막걸리 2개, 강릉시에서 김치 13개, 젓갈 11개, 청국장 1개 샘플을 수집함. 그 외 강원 지역에서 김치 12개, 막걸리 2개 샘플을 수집하여 총 77개의 전통발효식품을 샘플링함.

- 김치, 젓갈, 막걸리, 장류 등의 전통발효식품은 구입 직후 실험실로 가져와 멸균 용기에 옮겨 담고 유산균 분리를 진행할 때까지 -20 °C 에 냉동 보관하고 실험하기 직전에 상온에서 해동 후 사용했음.

- 다음 표는 강원지역에서 수집한 샘플 현황을 나타낸 것임.

표 43. 유산균 분리를 위해 강원지역에서 수집한 샘플 현황

샘플명	강원도				합계
	평창군	횡성군	강릉시	그 외 지역	
김치	27		13	12	52
젓갈	9		11		20
막걸리		2		2	4
청국장			1		1
합계					77

- 샘플은 각 1 g 또는 1 ml 취하여 0.85 % NaCl 멸균액으로 10배 희석했음. 각 희석액은 유산균을 선택적으로 분리하기 위해 selective media에 도말했음. MRS (Man, Rogosa and Sharp, Difco, USA) 고체 배지 및 10 % Lactose 첨가 M17 (Difco, USA) 고체 배

지를 사용하여 48시간 동안 호기조건에서 배양했음.

- 다수의 균 확보를 위해 형태가 상이한 콜로니 (colony)를 선택하여 각각 MRS broth 와 10 % Lactose 첨가 M17 broth에 계대 배양하여 순수 분리를 확인하고, 3.5 % H₂O₂를 이용해 카탈레이즈 (Catalase) 실험을 했고 그람 염색을 한 후 현미경으로 형태를 확인함. 실험 결과 카탈레이즈 음성 및 그람 양성의 구균 또는 간균을 선별하여 유산균임을 판정했음.
- 선별된 유산균은 60 % (v/v) 글리세롤이 함유된 MRS broth에 현탁하여 -80 °C에 동결하여 장기 보관하였음.
- 결과적으로 강원지역에서 수집한 77개의 전통발효식품 샘플에서 총 399개의 미동정 분리균을 확보함.

(2) 기능성 발효 종균 후보 균주의 프로바이오틱스 특성 검증

- 분리한 유산균주가 기능성 균주로서 숙주에 유익한 건강 기능을 가져오기 위해서는 인체의 소화기관에서 생존하여야 하므로 장내 적합성 및 안전성에 기반한 프로바이오틱스 특성 검증이 반드시 필요함.
- 분리한 399개의 유산균주를 고속 스크리닝 하기 위해 흡광도 측정을 이용한 내담즙성 실험을 수행하였음.
- Overnight 배양된 유산균주를 0.3 % (w/v) oxgall이 첨가된 MRS 배지에 1 % 접종하고, 동시에 oxgall이 첨가되지 않은 MRS 배지에도 같은 양으로 접종한 후 37 °C 호기 배양함. 12시간 배양 후 분광 광도계 (SPECTROstar Nano microplate reader, BMG LABTECH)로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였고 oxgall을 첨가하지 않은 MRS 배지에 배양한 균주의 흡광도를 control 값으로 사용함.
- 유산균주의 상대적 내담즙성은 아래의 수식으로 산출하였음.

$$\frac{\text{0.3 \% oxgall이 첨가된 MRS 배양액의 흡광도 (600nm)}}{\text{oxgall이 첨가되지 않은 MRS 배양액의 흡광도 (600nm)}} \times 100 (\%)$$

그림 46. 상대적 내담즙성 산출식

- 일반적으로 위장에서의 pH는 음식물의 종류 및 섭취에 따라 유동적이고 2.0~4.0 까지 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있음. 본 실험에서는 평균값으로 pH 3.0 조건을 기준으로 하여 유산균주의 생존율을 측정하고, 내산성¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾이 우수한 균주를 선발하였음.

- Overnight 배양된 유산균주를 pH 3.0으로 조정된 MRS 배지에 1% 접종하고 2시간동안 호기 배양함. 배양 전과 배양 후의 샘플을 각각 단계 희석하여 MRS 고체 배지에서 drop plate method로 진행함. 배양 전 유산균주의 생균수 대비 2시간 배양 후의 생균수를 측정하여 생존율 (% , survival rate)을 산출함.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{pH 3.0 MRS 배지에서 2시간 배양 후 생균수 (CFU/ml)}}{\text{pH 3.0 MRS 배지에서 배양 전의 생균수 (CFU/ml)}} \times 100$$

그림 47. pH 3.0 에서의 생존율 산출식

- 내담즙성 및 내산성과 같은 외부 환경에 대한 저항성은 일반적으로 종간의 차이가 있으므로 종 특이적인 특성으로 고려하여야 하지만 각 종에 대한 대표적인 비교 균주가 존재하지 않는 점, 비교 균주가 적절한지 검증하는 기준이 모호함, 스크리닝 단계 간소화 등의 이유로 위의 두 가지 산출식을 통해 얻은 값을 임의로 50 %를 기준으로 하여 생존율이 50 % 이상인 균주를 내산, 내담즙성이 우수하다고 간주하여 선별하였음.
- 내담즙성 실험 결과 399개 균주 중 124개의 균주가 50 % 이상인 것으로 나타나 이 124개의 균주만 선별하여 내산성 실험을 추가로 진행하였음. 124개의 균주의 내산성 실험 결과 56개의 유산균주가 pH 3.0에서 생존율이 50% 이상인 것을 확인함.
- 결과적으로 미동정 분리균 399개 중 내담즙성 및 내산성이 우수한 균주를 56개 선별함. 중복 선별을 예방하고 후보 균주의 다양성을 확보하고자 동일 시료에서 분리된 것들 중 같은 균주로 추정되는 균은 일부를 제외하였음.
- 선별한 유산균주 총 56주 중 일부를 제외하고 다른 strain으로 추정되는 41주를 최종 선별함. 선별한 균주는 16s rRNA sequence 분석을 통해 동정하였음. Universal primer 쌍인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하였고 Macrogen (South Korea)에 의뢰해서 서열을 확인하였음. 확인된 서열은 National centre for Biotechnology Information (USA)의 BLAST 서비스를 이용해 GenBank 데이터베이스와 비교하여 99 % 이상의 확률로 최종 동정했음.
- 총 41주에 대한 내산성 및 내담즙성 결과 및 동정 결과는 다음과 같음.

10) Chiang, S. S., and Pan, T. M. 2013. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 903-916.

11) Berardi, C. W., Solovey, E. T., and Cummings, M. L. (2013) Investigating the Efficacy of Network Visualizations for Intelligence Tasks. *IEEE* 278-283

12)Palachum, W., Chisti, Y., and Choorit, W. (2018) In-vitro assessment of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* WU-P19 isolated from a traditional fermented herb. *Ann Microbiol* 68: 79-91.

표 44. 선별된 유산균의 내산성 및 내담즙성 (%) 결과

유산균	내담즙성 (%)	내산성 (%)
<i>Enterococcus faecium</i>		
M7e-1	59.49	79.66
M7e-4	59.13	60.16
M7e-5	56.05	81.51
MCL-2	78.42	89.80
MCL-4	99.35	70.91
ECL-4	69.69	50.91
CLE-3	68.02	72.31
M0h-3	59.90	73.33
M0k-2	62.41	64.10
Mm-4	69.32	94.59
M7k-1	71.91	74.51
<i>L. brevis</i>		
Mj-1	87.37	60.00
Mj-3	108.64	81.82
B4	59.76	94.59
RS8	80.20	53.49
H219	53.15	85.57
<i>L. harbinensis</i>		
Mo-1	52.62	72.50
<i>L. casei</i>		
pm1	67.66	55.45
<i>L. paracasei</i>		
Mm-1	55.86	63.18
Mo-5	58.42	152.94
Mr-1	72.82	83.33
<i>L. plantarum</i>		
Mo-4	65.47	60.00
M0u-3	66.85	124.00
M0u-4	54.84	72.00
Mu-4	51.88	89.29
M7u-1	66.59	88.24
M7u-2	54.38	128.00
<i>Lactococcus lactis</i>		
EOI-8	73.63	55.42

<i>Pediococcus acidilactici</i>		
EK-1	57.11	58.67
BC-5	59.00	67.50
NG-4	121.59	115.00
GG-6	53.47	70.67
GG-7	55.38	83.18
JO-2	59.90	91.23
SK-5	65.72	64.00
RO3	73.56	120.90
H63	56.83	153.85
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
HS-1	74.70	116.67
<i>Weissella cibaria</i>		
MOG-1	82.42	75.00
Bu-3	53.34	52.54
HS-2	55.88	100.00
OI-4	55.16	61.54
P6	57.94	50.19
<i>Weissella confusa</i>		
MOG-3	56.33	100.00
CO-4	103.33	54.55
Sk-2	95.07	68.00
Sk-3	84.85	62.16
<i>Weissella hellenica</i>		
WKC-4	58.01	55.38

- 일반적으로 식품에서 분리한 균주 중 *Lactobacillus* 속으로 대표되는 유산균으로 동정될 경우 숙주에 적용 가능 여부를 판단하기 위한 안전성 지표로서 용혈 활성 여부, 생체 아민 생성 및 항생제 내성 여부 확인 과정은 필수적으로 요구되는 사항임. 다음 그림은 진행한 안전성 실험의 순서를 나타내었음.



그림 48. 안전성 실험의 모식도

- 선별된 48주의 용혈 활성 여부 확인은 (주) 기산바이오로부터 5 % (v/v) defibrinated sheep blood가 첨가된 agar (MB-B1005-P50)를 구입하여 사용함. 각 균을 배양한 후 blood agar에 streaking하여 37 °C에서 4일 동안 호기 배양 후 용혈환의 생성 여부를 관찰하였음. Positive control로는 β -hemolysis 활성을 갖는 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212를 사용함.
- 실험 결과, 선별 균주 48주 모두 용혈 활성이 없는 것으로 확인하였음.

- 용혈 활성이 없는 것으로 확인된 선별 균주는 다음 안전성 실험 중 하나인 생체아민 생성 여부 확인을 진행하였음. 생체 아민은 부적절한 발효 과정에서 미생물에 의한 아미노산 탈카르복실화 활성에 의해 생성되는데 대표적인 생체 아민으로 알려진 히스타민, 티라민, 푸트레신, 카다베린은 신경독성, 혈압 상승 등의 건강 문제를 유발할 수 있음. 따라서 본 연구에서는 선별된 48개 균주의 탈카르복실화 활성을 확인하였음.
- 생체 아민 생성 여부를 확인하기 위해 Bover-Cid and Holzapfel (1999)에 의해 고안된 배지 조성을 사용하였고, 위의 네 가지 생체 아민의 전구체인 histidine monohydrochloride, tyrosine free base, ornithine monohydrochloride, lysine monohydrochloride (Sigma-aldrich, USA)를 첨가하여 준비함. Overnight 배양된 실험 균주 48주를 배지에 streaking하여 4일간 37 °C에 호기 배양 후 배지의 색 변화 관찰을 통해 확인하였음. 배지 내에 포함되어 있는 bromocresol purple이 indicator로써 사용되어 아민 성분이 생성될 경우 보라색으로 색깔이 변함. Positive control로는 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212를 사용하였음.
- 실험 결과, 선별된 유산균 48주 중 M0h-3 균주를 제외한 모든 균주가 생체 아민 생성하지 않는 것으로 확인하였음. 다음 그림은 용혈 활성 및 생체 아민 생성 실험 결과 예시를 나타낸 것임.



그림 49. 용혈 활성 실험 결과 (왼쪽) 및 생체 아민 생성 실험 결과 (오른쪽) 예시

- 마지막 안전성 실험으로 항생제 내성 여부를 확인하는 실험을 진행하였음. 본 연구에서는 선별된 47주의 항생제 내성 여부를 고속 스크리닝하기 위해 디스크 확산법 (disk diffusion method)을 사용하였음. 유산균주의 항생제 내성 여부를 확인하기 위해 고안된 배지인 LSM (LAB susceptibilty medium)를 사용하였음. LSM 배지의 조성은 90 % Isosensitest broth (Oxoid), 10 % MRS broth, 1.5 % agar을 포함함. 선별된 47주의 유산균을 멸균된 면봉으로 LSM 배지에 도말한 후 항생제가 일정 농도로 함유되어 있는 종이 디스크 (Oxoid)를 dispenser를 이용하여 배지 위에 붙이고 37 °C에서 24 시간동안 호기 배양하였음.

- 사용된 항생제 종류 및 농도는 아래 표와 같으며 그 기준은 NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, 2010)에 제시된 것에 따라 진행하였음.

표 45. 항생제 내성 여부 확인 실험에 사용된 항생제 종류 및 농도

항생제	농도	표기
Tetracycline	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	TE30
Erythromycin	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	E15
Chloramphenicol	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	C30
Ampicillin	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	AMP10
Kanamycin	128 $\mu\text{g}/\text{mL}$	K128
Streptomycin	128 $\mu\text{g}/\text{mL}$	S128
Gentamycin	120 $\mu\text{g}/\text{mL}$	CN120

- 실험 결과, M7e-5와 CLE-3, 2가지 균주가 항생제에 내성이 있는 것으로 확인되었고 나머지 45개 균주는 본 실험에서 사용한 항생제에 내성이 없는 것으로 확인됨. 아래 표는 선별된 45개 균주의 안전성 실험 결과를 정리한 것임.

표 46. 선별된 유산균의 안전성 실험 결과

No.	sample name	Antibiotics susceptibility							Hemolytic activity	Biogenic amine production
		TE30	E15	C30	S128	AMP10	K128	CN120		
1	M7e-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
2	M7e-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
3	MCL-2	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
4	MCL-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
5	ECL-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
6	M0k-2	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
7	Mm-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
8	M7k-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
9	Mj-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
10	Mj-3	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
11	H219	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
12	B4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
13	RS8	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
14	Mo-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
15	pm1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
16	Mm-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
17	Mo-5	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
18	Mr-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
19	Mo-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
20	M0u-3	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative

21	M0u-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
22	Mu-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
23	M7u-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
24	M7u-2	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
25	EOI-8	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
26	EK-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
27	BC-5	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
28	NG-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
29	GG-6	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
30	GG-7	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
31	JO-2	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
32	SK-5	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
33	RO3	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
34	H63	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
35	HS-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
36	MOG-1	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
37	Bu-3	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
38	HS-2	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
39	OI-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
40	P6	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
41	MOG-3	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
42	CO-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
43	Sk-2	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
44	Sk-3	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative
45	WKC-4	S	S	S	S	S	S	S	Negative	Negative

2) 기능성 발효 종균 후보 균주의 *in vitro* 상에서의 검증

(1) 대장 관련 질환에 효과적인 기능성 발효 균주 선정

- 본 실험에서는 유산균의 다양한 기능성 중, 최근 대두되고 있는 염증성 장 질환 및 과민성 대장 증후군과 같은 대장 관련 질환에 예방 및 치료 효과가 있는 생균제에 주목하여 이 생균제를 유제품에 적용하여 기능성 유제품을 만드는 것을 목표로 설정하였음. 따라서, 내산성, 내담즙성, 안전성 실험을 통해 기본적인 프로바이오틱스 특성이 검증된 45개 유산균주의 대장 내 염증 억제 효과와 관련된 기능성에 집중하였음.
- 대장 관련 질환에 효과적인 기능성 발효 종균 후보 균주를 선별하기 위해 본 실험에서는 크게 항균 활성, 항염증성, 대장 내 tight junction protein 강화 효과의 3가지 기능성이 있는 유산균을 선발하고자 함.

(2) 고속 스크리닝을 위한 항균 활성 실험

- 항균활성 실험을 진행하기에 앞서, 시간과 비용을 절감하기 위해 동일 시료에서 분리된 것들 중 colony의 형태학적 관찰 및 내산성, 내담즙성 결과를 통해 같은 균주 (strain)로 추정되는 균은 일부를 제외함으로써 중복 선별을 예방하고자 하였음. 그 결과 45개의 균주 중 39개 균주가 선별되어 항균 활성 실험을 진행함.
- 항균 활성을 갖는 기능성 미생물을 선별하기 위해 식품 내 식중독을 일으키는 것으로 알려진 대표적인 병원균과 염증성 장질환과 같은 대표적인 대장 관련 질환을 유발하는 병원균을 선정하여 항균 활성 테스트를 진행하였음.
- 39개 균주의 항균 활성을 단 시간에 효과적으로 검증하기 위해 첫 번째로 Paper disc assay를 이용하여 항균 활성의 유무를 확인하였음. Paper disc assay에 사용된 병원균 목록은 다음과 같음.

-유산균의 항균력 확인을 위해 주로 사용되는 병원성 지시균 6종 (*Escherichia coli* K88, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* KVCC BA0001449) 및 IBD의 원인으로 알려진 병원성 미생물 1종 (*Campylobacter coli* ATCC 33559).

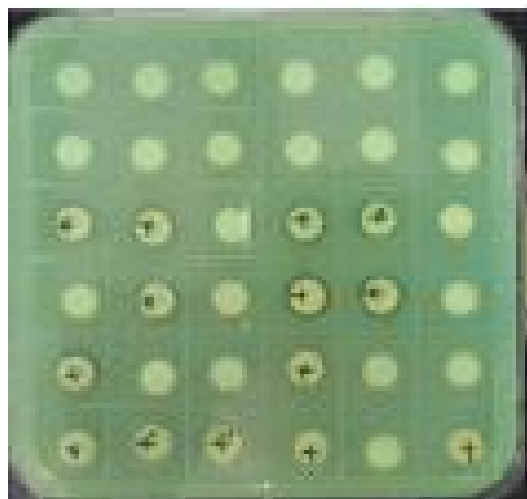


그림 50. Paper disc assay 실험 예

- 39개 균주의 항균 활성을 테스트한 결과, 테스트한 7 종의 병원균에 항균 활성을 최대한 많이 가지는 동시에 종의 다양성을 고려하여 총 16개 균주를 선별하였고 이 균주들로 장내 부착성 실험을 진행하였음. 선별한 유산균주는 아래 표의 strain 이름에 빨간색으로 표기하였음.

표 47. Paper disc assay를 이용한 항균활성 실험 결과

No.	Species	Name	SA	K88	EF	LM	LI	PAO1	C.coli
1	<i>E. faecium</i>	M7e-4	+	+	+	+	+	+	+
2	<i>E. faecium</i>	MCL-4	+	+	+	+	+	+	+
3	<i>E. faecium</i>	ECL-4	+	+	+	+	+	+	+
4	<i>E. faecium</i>	M7k-1	+	+	+	+	+	+	+
5	<i>E. faecium</i>	Mm-4	+	-	+	-	+	+	+
6	<i>L. brevis</i>	RS8	+	+	+	+	w	+	+
7	<i>L. brevis</i>	H219	w	-	-	+	-	-	-
8	<i>L. brevis</i>	Mj-1	+	-	+	+	+	+	+
9	<i>L. brevis</i>	Mj-3	+	-	+	+	+	+	+
10	<i>L. brevis</i>	B4	+	+	+	+	+	+	+
11	<i>L. casei</i>	pm1	w	-	-	-	-	-	-
12	<i>L. harbinensis</i>	Mo-1	+	+	+	+	-	+	+
13	<i>L. paracasei</i>	Mo-5	+	w	+	+	+	+	+
14	<i>L. paracasei</i>	Mr-1	+	+	+	+	+	+	+
15	<i>L. paracasei</i>	Mm-1	+	+	+	-	+	+	+
16	<i>L. plantarum</i>	Mo-4	+	w	+	+	+	+	+
17	<i>L. plantarum</i>	M7u-2	+	+	+	+	+	+	+
18	<i>L. plantarum</i>	M0u-3	+	+	+	+	+	+	+
19	<i>L. plantarum</i>	Mu-4	+	+	-	+	+	+	W
20	<i>L. lactis</i> subsp. <i>Hordniae</i>	EOI-8	+	+	+	+	+	+	+
21	<i>P. acidilactici</i>	RO3	+	w	+	-	w	-	-
22	<i>P. acidilactici</i>	H63	+	-	-	+	-	-	-
23	<i>P. acidilactici</i>	EK-1	+	-	+	-	-	-	+
24	<i>P. acidilactici</i>	BC-5	+	-	-	+	+	+	+
25	<i>P. acidilactici</i>	NG-4	+	-	+	+	-	+	+
26	<i>P. acidilactici</i>	GG-7	+	-	-	-	-	-	+
27	<i>P. acidilactici</i>	SK-5	-	-	-	-	-	-	-
28	<i>P. acidilactici</i>	JO-2	-	-	+	+	-	-	W
29	<i>P. pentosaceus</i>	HS-1	+	+	+	+	+	+	+
30	<i>W. cibaria</i>	P6	+	-	-	+	-	-	W
31	<i>W. cibaria</i>	MOG-1	+	+	+	+	+	+	+
32	<i>W. cibaria</i>	Bu-3	+	+	+	+	+	+	+
33	<i>W. cibaria</i>	OI-4	+	+	+	+	+	+	+
34	<i>W. cibaria</i>	HS-2	+	+	+	+	+	+	+
35	<i>W. confusa</i>	MOG-3	+	+	+	+	+	+	+

36	<i>W. confusa</i>	CO-4	+	-	-	w	-	-	+
37	<i>W. confusa</i>	SK-2	+	+	+	+	+	+	+
38	<i>W. confusa</i>	SK-3	-	-	-	-	-	-	-
39	<i>W. hellenica</i>	WKC-4	+	+	+	+	+	+	+

K88, *Escherichia coli* K88; EF, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; LI, *Listeria innocua* ATCC 33090^T; SA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; PAO1, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; LM, *Listeria monocytogenes* KVCC BA0001449
+, > 1.0 cm; w, < 1.0 cm; -, no clear zone

(3) 선별된 유산균주의 장내 부착능 확인

- 선별된 16개의 균주에 한해, 프로바이오틱스로써 숙주 장내 환경에 대한 적합성을 판단하는 대표적인 실험으로 간주되는 장세포 부착능 실험을 진행하였음. 본 연구에서는 유산균의 장부착능 확인에 대표적으로 사용되는 HT-29 cell line을 사용하였음. HT-29 cell line은 Caucasian 성인 대장에서 분리한 colorectal adenocarcinoma로 알려져 있음.
- 많은 연구에서 *L. rhamnosus* GG (LGG; Valio Ltd, Finland)와 같은 상업균주와 비교하여 유산균주의 장내적합성을 판단·선별해오고 있으므로, 본 실험에서도 LGG 균주를 기준으로 하여 상대적 부착능이 더 우수한 균주를 선별하고자 함.

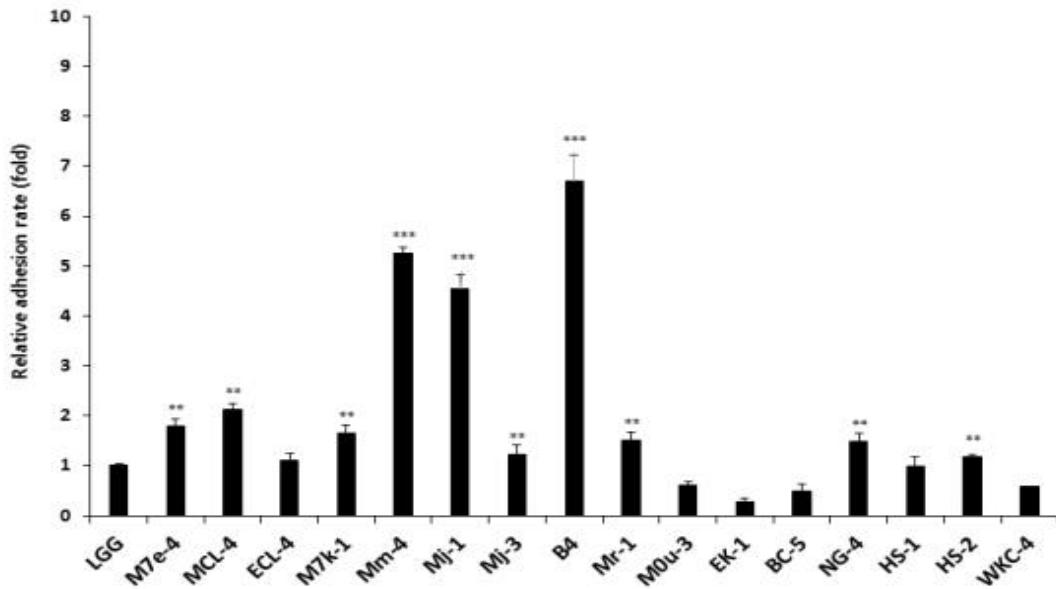


그림 51. 선별된 유산균주의 장 세포에 대한 상대적 부착능 결과

- 실험 결과, LGG의 장세포 부착능을 1로 보았을 때 총 16개 균주 중 M7e-4, MCL-4, M7k-1, Mm-4, Mj-1, Mj-3, B4, Mr-1, NG-4, HS-2 10개 균주가 LGG에 비해 유의적으로 좋은 부착능을 가지는 것을 확인함.

(4) 기능성 검증을 위한 유산균주의 최종 선별

- 앞서 진행된 내산성, 내담즙성, 항균 활성, 장세포 부착능 실험 결과를 바탕으로 종 다양성을 유지하면서 가장 좋은 장내 적합성을 가지는 균주를 선별하였음. 그 결과, 16개 균주 중 5개 균주를 최종 선별하여 항균 활성, 항염증 특성, 대장 내 tight junction protein 강화 효과를 추가적으로 검증하였음. 다음은 최종 선별한 균주의 동정 및 형태학적 특성을 나타낸 표임.

표 48. 최종 선별된 유산균주의 동정 및 특징

No.	16s rRNA sequence analysis (Closest known species)	Strain	Origin	Catalase test	Gram staining	Morphology	Culture condition ^a	
				(+/-)	(+/-)		Anaerobic	Aerobic
1	<i>Enterococcus faecium</i>	M7k-1	김치	-	+	Cocci	+	+
2	<i>Lactobacillus brevis</i>	B4	김치	-	+	Rod	+	+
3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Mr-1	김치	-	+	Rod	+	+
4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	NG-4	젓갈	-	+	Cocci	+	+
5	<i>Weissella cibaria</i>	HS-2	젓갈	-	+	Cocci	+	+

(5) 최종 선별된 유산균의 당 발효 및 효소 profile 확인

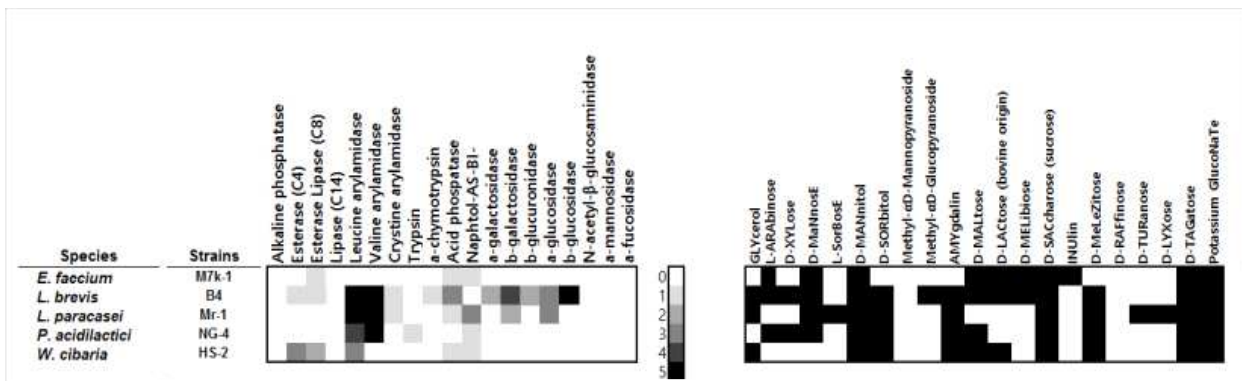


그림 52. 선별된 유산균주의 당 발효 및 효소 profile

- 유산균주의 탄수화물 대사는 API 50 CH kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 사용하여 조사함.
- 유산균주의 효소 활성은 API ZYM kit (BioMérieux)을 사용하여 조사함.
- 유산균주의 당 발효 및 효소 profile 확인을 통해 각 균주가 같은 strain이 아닌 것을 확인하였고 16s rRNA sequencing 결과를 종합하여 각 균주 동정 결과가 정확한 것을 확

인함.

(6) 최종 선별된 유산균의 항균력 검증

- 앞서 진행한 paper disk assay를 통해 항균 능력이 있는 유산균주를 최종 선별하였음. 본 실험에서는 최종 선별한 유산균주의 항균력을 상업 균주인 LGG와 비교하여 검증하기 위해 agar well diffusion assay를 선별된 균주에 한해 추가적으로 시행하였음.

표 49. 병원균에 대한 유산균 억제환의 지름 길이

Name	대장 관련 병원체 관련된 병원균 ^a (mm)				병원성 지시균 ^b (mm)				
	C. coli	HP	CJ	K88	SA	EF	LM	LI	PAO1
M7k-1	1.76±0.09	1.42±0.1	1.63±0.15	1.81±0.15	1.47±0.02	1.6±0.2	1.49±0.06	1.51±0.08	1.43±0.07
B4	1.62±0.12	-	-	1.76±0.11	1.53±0.09	-	1.71±0.13	1.59±0.09	1.76±0.11
Mr-1	2.5±0.25	1.5±0.07	1.91±0.08	1.92±0.09	1.71±0.05	1.29±0.04	1.63±0.01	1.58±0.05	1.75±0.06
NG-4	2.05±0.19	1.54±0.05	2.28±0.13	1.9±0.11	1.5±0.04	1.44±0.12	1.43±0.13	1.54±0.05	1.88±0.08
HS-2	1.8±0.15	1.74±0.21	1.69±0.11	1.83±0.13	1.48±0.07	1.2±0.08	1.44±0.12	1.59±0.03	1.39±0.09
LGG	2.57±0.19	1.58±0.1	1.72±0.16	1.72±0.18	1.7±0.04	1.41±0.15	1.5±0.04	1.45±0.05	1.79±0.12

^a C. coli; *Capmpylobacter coli* KTCC 15212, HP; *Helicobacter pylori* KTCC 12083, CJ; *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* ATCC 33560, K88; *Escherichia coli* K88

^b SA; *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, EF; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, LI; *Listeria innocua* ATCC 33090, LM; *Listeria monocytogenes* KCTC 13064, PAO1; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Lactobacillus rhamnosus* GG, a commercial lactic acid bacteria, was used as a standard reference culture,.-; no clear zone

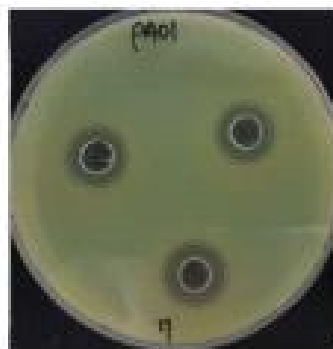


그림 53. Agar well diffusion assay 실험 결과 예시

- 실험 결과, B4 균주를 제외하고 나머지 4개 균주 모두에서 LGG 보다 우수하거나 비슷한 억제환의 길이가 측정됨.

(7) 유산균 후보 균주의 항염증 기능성 평가 - mouse cell line

- 본 실험에서는 mouse *in vivo* 실험과 향후 임상에서의 기능성 효과 가능성을 기대하기 위해 mouse cell line과 human cell line 실험 모델에서 항염증 효과를 가진 기능성 프로바이오틱스를 선별하는 전략을 구상하였음.
- 본 실험에 사용된 RAW264.7 cell line은 마우스 대식세포주 (*Mus musculus* macrophage)로, 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC, Korean Collection for Type Cultures, Jeollabuk-do 56212, Republic of Korea)에서 구입하였음.
- 첫 번째, mouse cell line 모델에서는 앞서 실험한 병원균에 의해 유발되는 염증 모델을 구축하여 항염증 효과를 확인하였음. 염증을 유도하기 위해 사용된 LPS (Lipopolysaccharide)는 그람 음성 세균의 세포벽에 존재하는 물질로써 대식세포가 이것을 인식하여 면역 반응이 일어나는 것으로 알려져 있음.
- LPS로 대식세포에 자극을 주면 Nitric oxide (NO)라는 물질이 생성되는데 이 물질은 염증 반응 동안 분비되어 신호 전달 및 숙주 방어 역할을 하는데 대장 관련 질환 환자의 경우 과도한 염증 반응을 억제하는 것이 중요하기 때문에 NO 생성을 억제하는 효과가 있는 균주를 선별하고자 하였음.

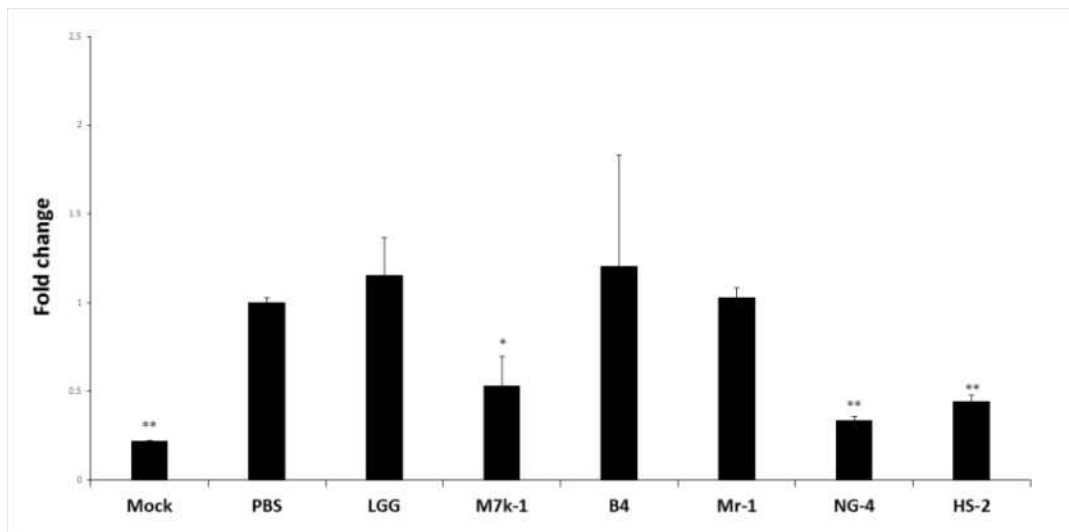


그림 54. RAW264.7 mouse 대식세포에서 선별한 균주의 NO 억제 결과

- NO assay 실험 결과, LPS만 처리했을 때를 기준으로 유산균을 처리한 경우, M7k-1, NG-4, HS-2 이 세가지 균주가 유의적으로 NO 생성을 억제하는 결과를 보임.

(8) 유산균 후보 균주의 항염증 기능성 평가 - Human cell line

- 정상적인 장내는 염증성 및 항염증성 사이토카인이 균형을 이루면서 항상성을 유지하

고 있음. 그러나 이러한 사이토카인의 균형이 무너지면 비정상적인 염증 반응이 일어날 수 있음. 특히, 염증성 사이토카인 중 종양 괴사 인자로 불리는 TNF는 대표적인 염증성 사이토카인으로써 염증성 장질환 환자에게서 굉장히 높은 수치로 관찰되는 특징이 있음. TNF는 다양한 세포에서 분비되고 다양한 메커니즘을 통해 염증 및 세포괴사를 유발할 수 있으며 초기 염증 반응에서 분비됨으로써 다른 사이토카인의 발현을 조절함.

- 따라서, 본 실험에서는 Human cell line에 TNF- α 로 염증을 유발한 후 선발한 균주의 염증 억제 효과를 살펴봄으로써 *in vitro* 상에서 만성 염증 질환 모델을 구축하였음. Human cell line으로는 장세포로 알려진 HT-29 cell line을 이용하였고 염증 반응의 지표로써 IL-8을 선정함. IL-8은 염증 반응에서 가장 기본적으로 발현되는 사이토카인으로써 neutrophil 유도 인자로 잘 알려져 있음. 장내 염증이 유발될 경우 이 사이토카인이 높은 수치로 관찰된다는 연구 결과를 토대로, 이것을 억제하는 유산균을 선별하고자 함. 실험 방법은 다음과 같음.

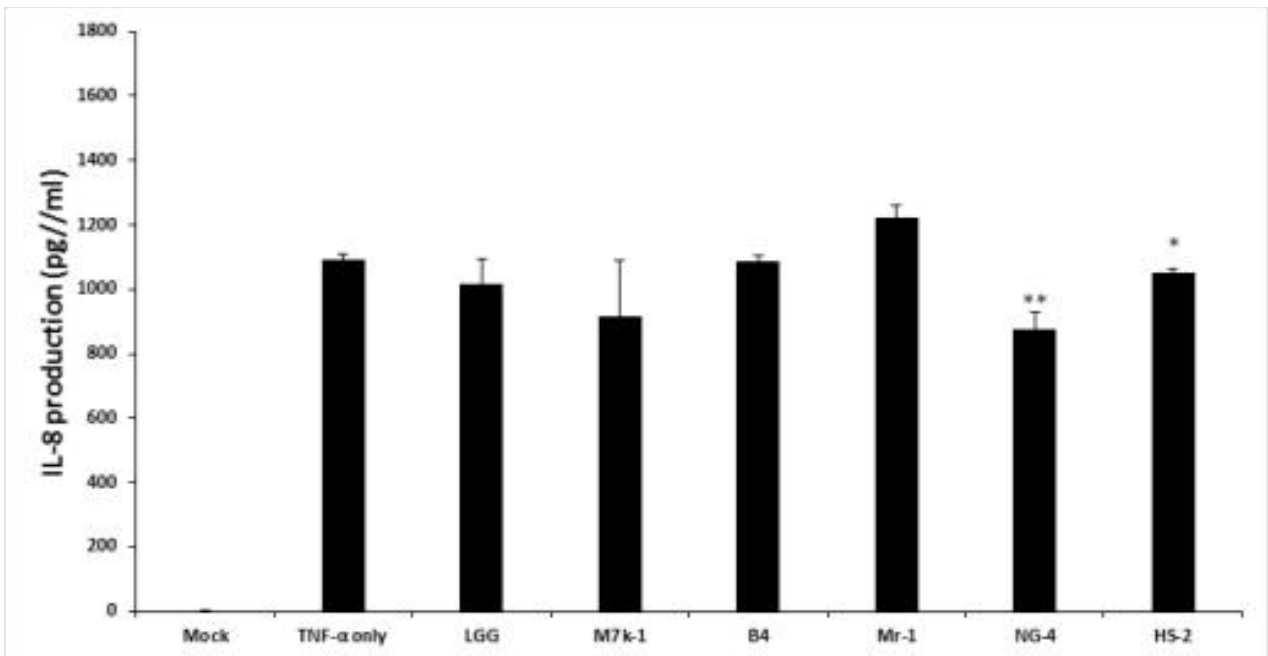


그림 55. TNF- α 로 염증이 유도된 HT-29 cell line에서 유산균의 IL-8 생성 억제 효과

- 실험 결과, NG-4와 HS-2 두 균주가 TNF- α 로 자극받은 HT-29 세포의 IL-8 생성을 유의적으로 억제하는 결과를 보임. 따라서, 본 실험 결과를 바탕으로 장 세포 내 tight junction protein 발현 강화 효과를 검증하기 위해 두 균주에 한해 추가적으로 실험을 진행함.

(9) 유산균 후보 균주의 tight junction protein 발현 강화 효과 확인

- 장 상피세포는 tight junction protein이라는 단백질로 단단히 연결되어 외부로부터 보호

하는 보호 장벽의 역할을 수행함. 하지만 대장 관련 질환 중 염증성 장질환 환자의 경우 다양한 요인에 의해 TNF- α , IFN- γ 와 같은 사이토카인이 과분비됨으로써 tight junction이 느슨해지게 되고 장내 세포가 사멸되는 악순환을 반복하는 것으로 알려져 있음.

- 이러한 손상에 대해 유산균이 tight junction protein 강화하는 가능성이 있는지 확인하기 위해, 본 실험에서는 앞서 선발한 두 균주에 대해 tight junction protein 강화 효과를 qRT-PCR 기법을 이용하여 확인해보았음.
- 따라서, 본 연구에서는 대장 상피세포인 caco-2 cell에 TNF- α 로 48시간동안 자극시켜 tight junction 단백질의 발현을 억제한 후, 유산균을 처리하여 tight junction protein 상대적 발현량을 확인하였음. 타겟으로 선정된 tight junction protein의 경우 가장 잘 알려진 단백질인 Claudin-1 (CLDN1), Zonula occludens-1 (TJP1), Occludin (OCLN)을 사용하였음. Reference gene으로는 대표적인 housekeeping gene인 β -actin을 사용하였음. qRT-PCR 조건과 프라이머 정보는 다음과 같음.

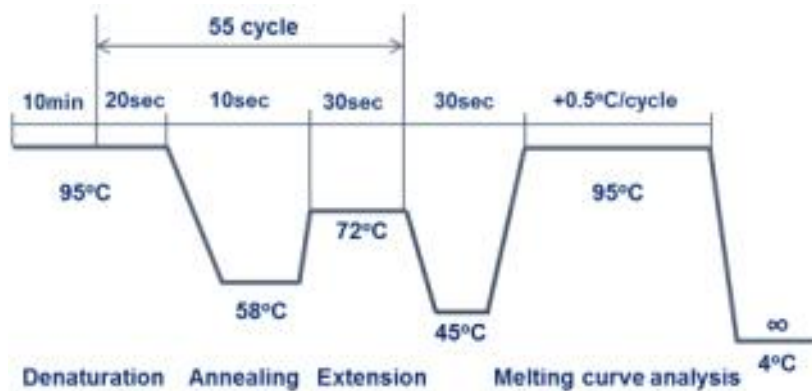


그림 56. qRT-PCR에 사용된 조건

표 50. Tight junction 단백질 발현 확인에 사용된 프라이머 정보

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)
CLDN1	GTGGTTGGCATCCTCCTG	AATTCGTACCTGGCATTGACTGG	232
TJP1	CAAGATAGTTTGGCAGCAAGAGATG	ATCAGGGACATTCAATAGCGTAGC	182
OCLN	TCAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG	CATCAGCAGCAGCCATGTACTCTT	189
β -actin	AAGGACCTCTACGCCAACAC	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	210

- 실험 결과, 세 가지 단백질 발현 모두 아무것도 처리하지 않은 군보다 TNF- α 를 처리한 군에서 유의적으로 발현이 억제된 것을 확인할 수 있음. 또한 HS-2 균주의 경우

occludin과 claudin-1의 발현을 유의적으로 증가시켰으며, NG-4 균주의 경우 ZO-1과 claudin-1의 발현을 유의적으로 증가시킨 것을 확인함. 즉, 두 균주 모두 TNF- α 로 인하여 감소된 tight junction protein의 발현을 강화하는 효과를 나타내었다고 할 수 있음.

- 두 가지 균주 모두가 *in vitro* 실험에서 항균 활성, 항염증, tight junction 단백질 강화 효과를 가지는 것으로 검증되었으므로, 이 두 균주를 *in vivo* 실험에서 염증 완화 효과가 있는지 검증하였음.

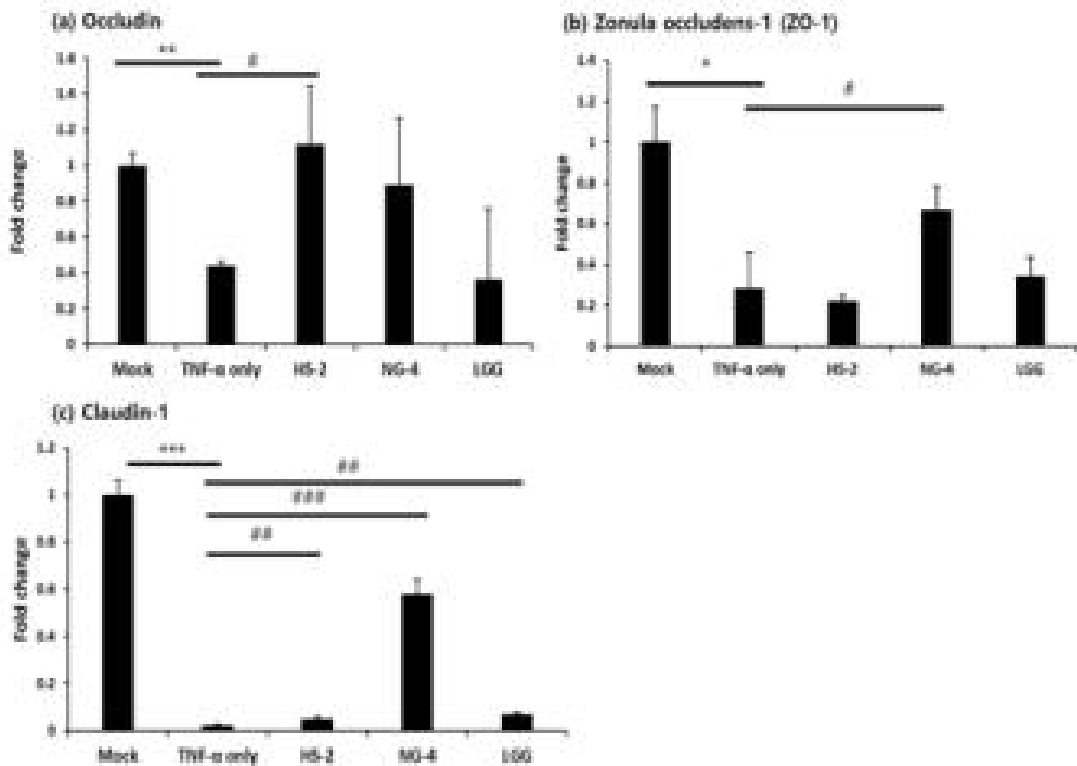


그림 57. Tight junction 관련 mRNA 유전자 발현 결과. (a) Occludin (b) Zonula occludens-1 (c) Claudin-1. * $P < 0.05$, t-test로 통계 처리. * $P < 0.01$; Mock 대비 TNF- α 처리군, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; LAB 처리군 대비 TNF- α 처리군

3. *In vitro* 선발균주의 동물실험을 통한 기능성 검증

1) 동물 실험 모델 구축 및 디자인

(1) 선발 균주 마우스 투여 시 동물 실험 디자인

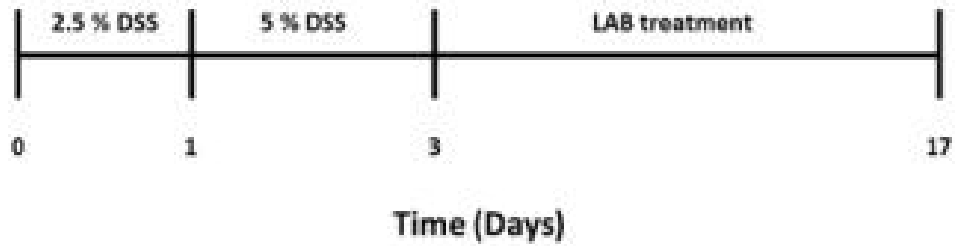


그림 58. 선발균주의 기능성 검증을 위한 동물 실험 모식도

- 실험용 쥐로는 8주령의 암컷 C57BL/6을 사용하였고 무작위로 3그룹으로 나누었음. 1그룹당 3마리씩, 총 3 cage로 설정하였고 Dextran sulfate sodium (DSS)를 하루에 2.5% 농도로 1일간 처리하여 염증 유도를 시작한 후 2일간 5% DSS를 처리하여 장내 염증을 유발하였음.
- 대장염을 유발한 후 프로바이오틱스 후보균주를 1.0×10^7 CFU/ml 농도로 14일간 경구 투여하였을 때 일어나는 체내 변화 및 염증 완화 효과를 확인하였음.
- 3일간 염증 유도 후 첫 번째 그룹에는 *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주를 처리하여 대조군으로 설정하였고, 두 번째 그룹에는 *Weissella cibaria* HS-2, 세 번째 그룹에는 *Pediococcus acidilactici* NG-4 균주를 처리하여 각각의 후보 균주의 염증 완화 효과를 검증하였음.
- 유산균 후보 균주 및 대조군 균주는 18 시간 동안 37 °C에서 배양 후 원심분리 (14,000 rpm, 7 min, 4 °C)하여 균체를 회수하고 1×PBS로 2회 세척함. 미생물의 흡광도 (600 nm)를 약 1.0 (1.0×10^8 CFU/ml)이 되도록 1×PBS에 현탁하여 준비. 14일 간 매일 같은 시간에 유산균을 200 μ l 경구투여하였음.

표 51. 그룹 당 처리한 유산균 후보 균주의 동물 실험 계획

Group	Cage	Mice/cage	LAB treatment	Cfu/ml	Treatment periods (Days)
LGG (Control)	3	3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG	$(3.0 \pm 1.2) \times 10^8$	14
HS-2	3	3	<i>Weissella cibaria</i> HS-2	$(3.7 \pm 1.4) \times 10^8$	14
NG-4	3	3	<i>Pediococcus acidilactici</i> NG-4	$(4.6 \pm 1.8) \times 10^8$	14

(2) 마우스에 DSS 투여 시 염증 모델 구축

- 대장염 유도 모델 중 가장 많이 사용되는 것 중 하나인 Dextran sulfate sodium (DSS)를 처리하여 대장염을 유도하였음. DSS를 처음부터 고용량으로 투여할 경우, 패혈증을

유발하여 실험쥐의 사망 가능성이 있어 하루 동안 낮은 농도의 DSS를 처리하여 mild-inflammation을 유발한 후 농도를 높혀 처리하였음.

- 아래 결과를 보면 체중은 크게 변화가 없었으나 평균 사료 섭취량을 2~3일째에 유의적으로 감소하였고 분변 관찰 결과를 통해 혈변 및 설사를 관찰할 수 있었음. 또한 병변의 심각도를 평가할 수 있는 DAI를 측정하여 염증 정도를 평가한 결과 3일째 DAI가 유의적으로 증가하였음. DAI 평가 기준은 다음과 같음 (Murthy *et al.*, 1993); a) 체중감소 (0점 = 없음, 2점 = 1~2 % 감소, 3점 = 2~5 % 감소, 4점 = 5~10 % 감소, 5점 = 10 % 이상 감소) b) 분변 굳기 정도/설사 (0점 = 정상, 3점 = 약간 무른 정도, 5점 = 설사) c) 혈변 (0점 = 정상, 3점 = 약간의 혈액이 관찰, 5점 = 심각한 혈변). 따라서, DSS 처리 시 염증이 효과적으로 유발된 것을 확인할 수 있음.

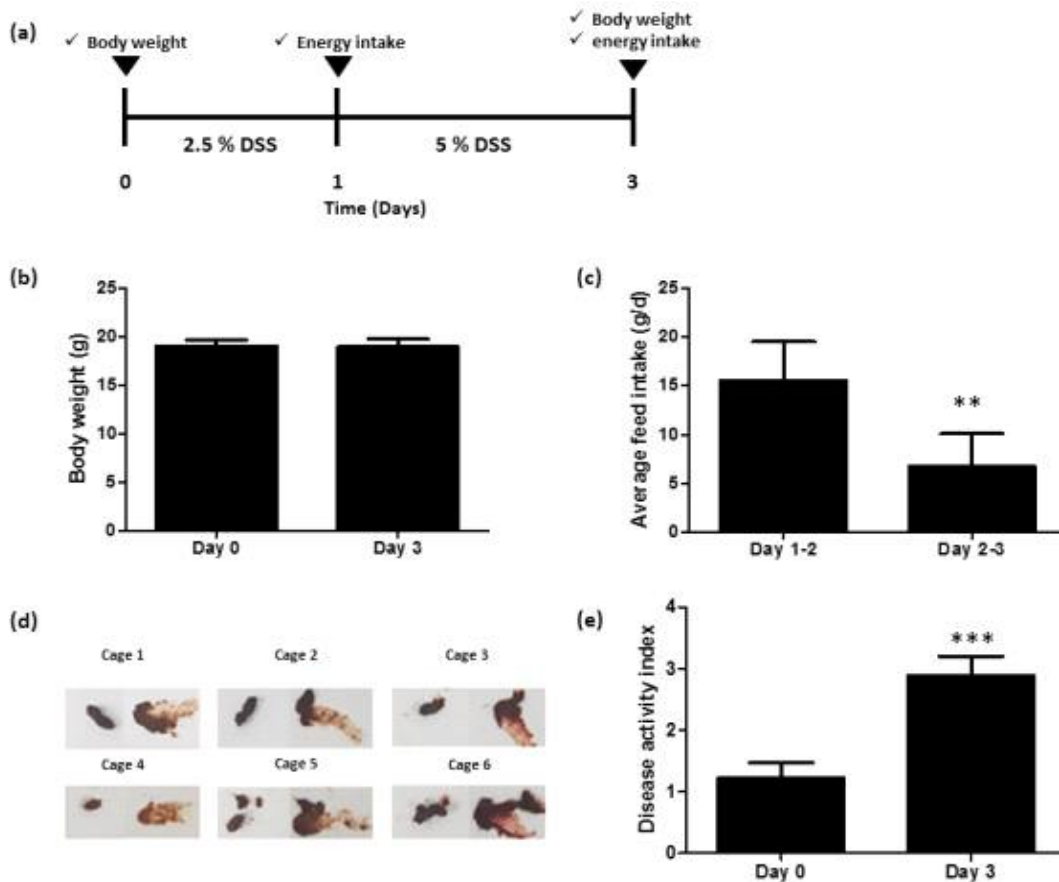


그림 59. DSS로 유발한 마우스 염증 모델의 평가 (a) DSS 처리 기간동안 타임 스케줄, (b) 체중 변화, (c) 평균 사료 섭취량, (d) 3일째의 분변 사진, (e) disease activity index (DAI) 결과. * $p < 0.05$; t-test 분석을 통한 대조군 대비 유의성 평가

2) 선발된 프로바이오틱스 후보 균주의 기능성 검증

(1) 유산균 후보 균주 투여 시 염증 완화 효과 확인

- 14일 동안 유산균을 투여하면서 0일 째, 14일 째 분변 샘플 및 혈액을 샘플링하였고, 0일 째, 7일째, 14일째에는 체중 및 사료 섭취량을 측정하였음.

- 유산균을 투여하면서 유의적이지는 않으나 모든 그룹에서 쥐의 체중이 점차 증가하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었고 사료 섭취량은 NG-4 균주를 섭취한 그룹에서 유의적으로 증가한 것을 확인함. 7일째와 14일째 분변 사진을 확인했을 때 혈변이 거의 관찰되지 않고 변의 균기 또한 정상으로 점차 돌아온 것을 확인할 수 있었음. 총 9마리씩 3그룹의 생존율은 LGG 그룹에 비해 유산균 후보 균주를 투여한 두 그룹이 더 좋은 것을 확인할 수 있음. 마지막 DAI 결과값에서도 다른 그룹은 유의적인 차이가 없었으나 NG-4 균주를 투여한 그룹은 값이 유의적으로 증가하였으므로 병변의 심각도도 완화되었다고 할 수 있음.

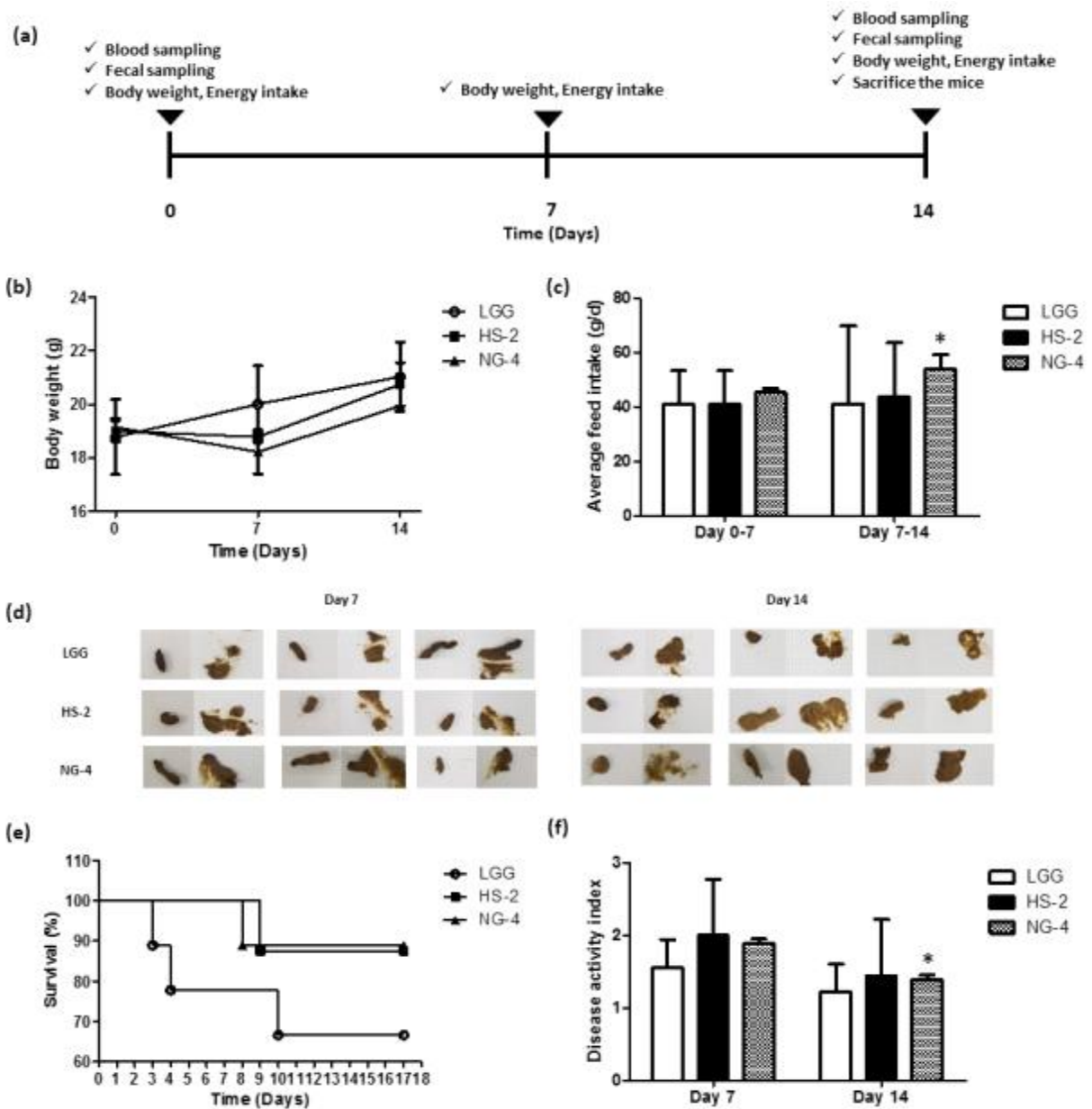


그림 60. 유산균 후보 균주 처리 시 DSS로 유도된 마우스의 장내 염증 완화 효과 (a) 유산균 처리 시 타임 스케줄, (b) 체중 변화, (c) 평균 사료 섭취량, (d) 7일 및 14일째의 분변 사진, (e) 생존율 평가, (f) disease activity index (DAI) 결과.

* $p < 0.05$; t-test 분석을 통한 대조군 대비 유의성 평가.

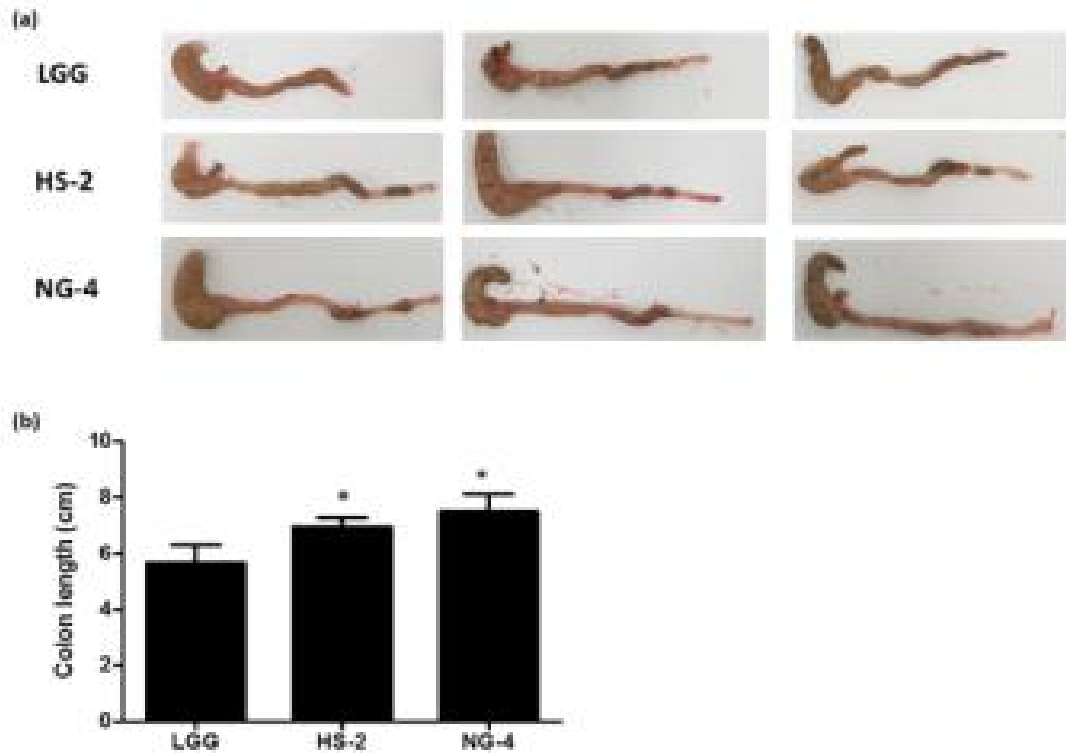


그림 61. DSS로 염증이 유도된 쥐의 장 사진 및 길이 측정 결과. (a) 유산균 투여 14일째에 찍은 사진 (b) 유산균 투여 14일 째에 샘플링한 장의 길이. * $p < 0.05$; t-test 분석을 통한 대조군 대비 유의성 평가.

- 쥐에 염증 반응이 일어날 경우 염증으로 인해 장의 길이가 줄어든다는 연구 결과를 토대로 유산균 투여 마지막 날에 쥐를 안락사 시킨 후 장을 적출하여 관찰하였음. 적출한 장의 길이를 관찰한 결과 LGG 그룹에 비해 다른 두 그룹 모두 유의적으로 장의 길이가 증가한 것을 알 수 있음.

(2) 유산균 후보 균주 투여 시 혈액 내 염증 지표 확인

- 마우스에서 염증이 유발될 경우, 일반적으로 염증성 사이토카인은 증가하고 항염증성 사이토카인이 감소한다는 연구결과가 알려져 있음. 또한 DSS를 처리한 마우스의 경우 조절 사이토카인인 IL-17이 유의적으로 감소한다는 연구를 토대로 각각의 사이토카인 양을 측정하였음.
- 샘플링한 혈액은 -80°C 에서 보관 후 실험 시에 녹여서 사용하였음. ELISA 기법을 이용해 혈액 내 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 양을 측정하였고 동시에 항염증성 사이토카인인 IL-10과 조절 사이토카인인 IL-17의 양을 측정하였음. 각각의 사이토카인은 mouse ELISA kit (Koma biotech, Korea)를 사용하여 프로토콜에 따라 측정.

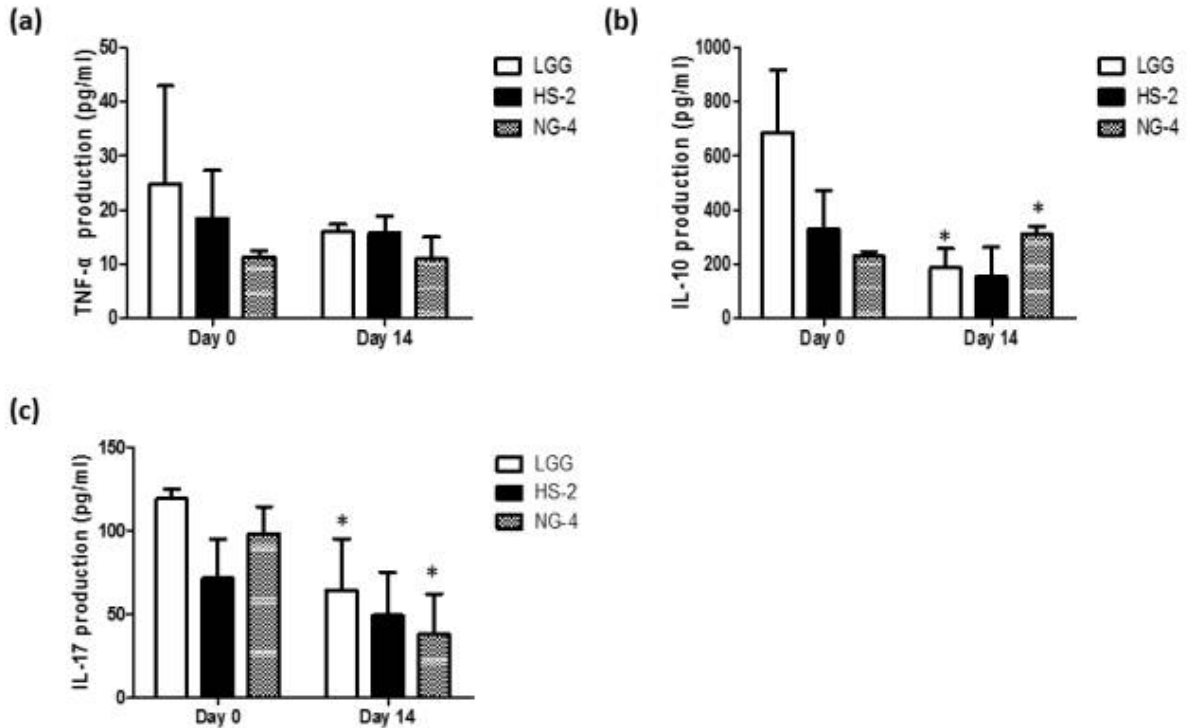


그림 62. 각 유산균 투여 그룹 당 serum 내 사이토카인 수준 확인. (a) TNF- α , (b) IL-10, (c) IL-17, * $p < 0.05$; t-test 분석을 통한 대조군 대비 유의성 평가.

- TNF- α 의 경우 유산균 투여 전에 비해 14일째에 유의적인 변화가 관찰되지 않았음. IL-10의 경우 LGG 그룹의 경우 유의적으로 감소하였고 NG-4 그룹에서는 유의적으로 증가하였음. 또한 IL-17 수준은 LGG 및 NG-4 그룹 모두 유의적으로 감소하였음. 이러한 결과를 토대로, 유산균 처리 시 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 변화 없이 항염증성 사이토카인이 유의적으로 증가함과 동시에 조절 사이토카인인 IL-17이 감소함으로써 염증 완화 효과를 보인 것으로 생각됨.

(3) 유산균 후보 균주 투여 시 tight junction protein의 강화 효과 확인

- 14일 째에 적출한 장에 AccuZol™ (Bioneer, USA) 용액 1ml 처리 후 실험할 때까지 -80 °C에 보관하였음.
- 시약 프로토콜에 따라 RNA 추출 후 the ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover kit (TOYOBO, Japan)를 이용하여 cDNA 합성. TOPreal™ qPCR2X PreMIX (SYBR Green with low ROX) kit (Enzynomics, Korea)를 이용하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실행함. 사용된 프라이머와 qRT-PCR 조건은 아래 그림과 같음.

표 52. 마우스 장내 tight junction 단백질 발현 확인에 사용된 프라이머 정보

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)
CLDN1	TATGACCCCTTGACCCCAT	TTGTTTTCCGGGGACAGGAG	127
TJP1	GCAGACTTCTGGAGGTTTCG	CTTGCCAACTTTTCTCTGGCAAC	194
GAPDH	CCAGGATTATGGGCTTGAGA	TCTGACACAAGACGCACTCC	135

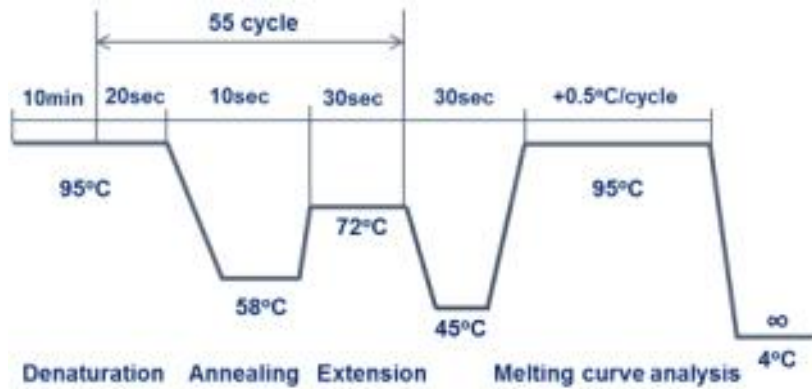


그림 63. qRT-PCR에 사용된 조건

- 타겟으로 선정된 tight junction protein의 경우 가장 잘 알려진 단백질인 Claudin-1 (CLDN1), Zonula occludens-1 (TJP1)을 사용하였고 Occludin (OCLN)의 경우 발현양이 충분하지 않아 증폭이 잘 되지 않은 문제가 있어 제외하였음. Reference gene으로는 대표적인 housekeeping gene인 GAPDH를 사용하였음.
- 실험 결과, 두 가지 단백질 발현 모두 LGG 균주를 처리한 군보다 유산균 후보 균주를 처리한 두 그룹에서 유의적으로 발현이 증가된 것을 확인할 수 있음. 즉, 상업화 및 기능성 균주로 잘 알려진 LGG 보다 염증 완화 효과가 더 뛰어나다고 결론지을 수 있음.

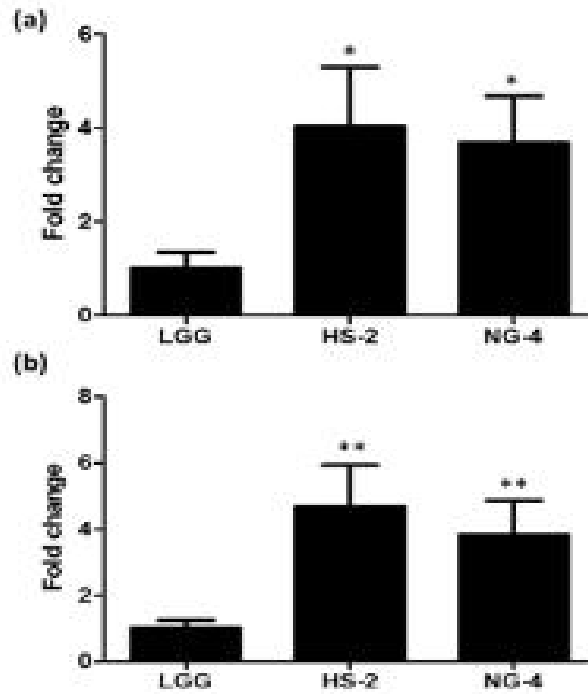


그림 64. 유산균 투여 14일 췌의 장내 tight junction 단백질 mRNA 상대적 발현량. (a) Claudin-1, (b) Zonula occludens-1 (ZO-1)

(4) 유산균 후보 균주 투여 시 장내 균총 변화 확인

- 마우스의 분변 샘플을 DSS 처리전 (C1 ~ C2), DSS 처리 후 (DSS1 ~ DSS6), LGG 처리 (G1-1 ~ G1-6), HS-2 처리 (G2-1 ~ G2-6), NG-4 처리 (G3-1 ~ G3-6)로 나누어 총 26개의 DNA 추출 및 마크로젠 (대한민국, 대전)에 의뢰하여 high throuput sequencing 을 진행함. 이후, CD-HIT-OTU/rDna Tools와 QIIME을 이용하여 taxonomy와 diversity 분석을 진행.

표 53. 장내 미생물 균총 분석을 위한 sequencing 결과

Sample No.	Sample Name	Total Bases (bp)	Read Count	GC (%)	Q20 (%)
01	C1	101,035,928	222,744	54.00	98.22
02	C2	76,850,219	169,433	54.02	98.16
03	DSS1	68,458,927	151,033	52.68	98.10
04	DSS2	74,627,547	164,678	52.79	98.30
05	DSS3	90,554,803	198,349	52.19	98.20
06	DSS4	78,289,024	171,127	52.52	97.97
07	DSS5	79,305,867	175,513	52.27	98.19
08	DSS6	84,195,290	186,680	52.89	98.24
09	G1-1	79,207,272	174,236	51.30	98.27
10	G1-2	89,581,336	199,207	53.93	98.17
11	G1-3	81,079,148	177,401	50.88	98.17
12	G1-4	78,407,089	173,652	52.93	98.29
13	G1-5	87,084,035	192,787	53.73	98.22
14	G1-6	97,786,033	215,790	53.72	98.33
15	G2-1	80,366,116	176,905	53.32	98.17
16	G2-2	99,695,619	219,579	53.28	98.19
17	G2-3	85,399,582	189,412	53.74	98.30
18	G2-4	83,725,229	184,061	53.38	98.13
19	G2-5	68,641,420	153,098	54.00	98.02
20	G2-6	86,568,011	190,051	51.93	98.29
21	G3-1	86,582,730	192,607	53.74	98.27
22	G3-2	72,079,361	158,764	53.45	98.21
23	G3-3	75,666,876	168,796	53.62	98.34
24	G3-4	92,811,294	204,018	53.40	98.22
25	G3-5	85,587,601	188,010	53.48	98.01
26	G3-6	75,326,451	166,613	53.58	98.37

- Sequencing 결과 평균적으로 83,035,108개의 base, 183,251개의 read를 확보하였고, 52 ~ 54 % GC content를 보이며, Q20 값 또한 98 % 이상으로 sequencing quality에 문제가 없어 추후 분석에 이용.
- PcoA (Principal Coordinates Analysis)기법을 통해 생균제 처리 전, 후의 장내 미생물 균총을 비교 분석.

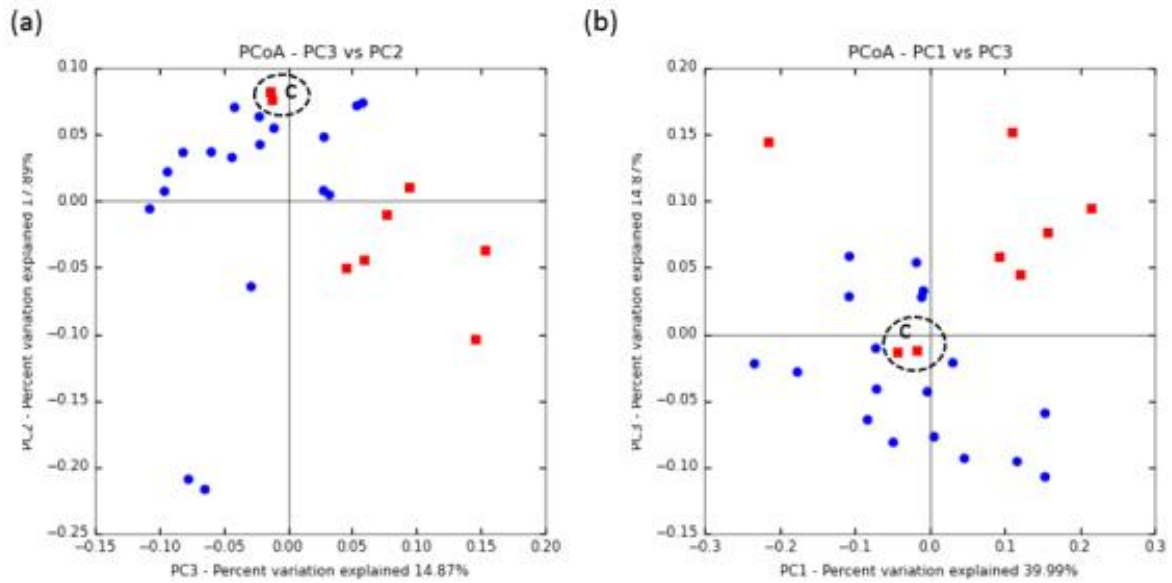


그림 65. PcoA 분석을 이용한 장내 미생물 군총 비교. 빨간 네모; 생균제 처리 전 (C1~C2, DSS1~DSS6) 샘플, 파란 동그라미; 생균제 처리 후 (G1-1 ~ G3-6) 샘플.

- 분석 결과, DSS 처리 전 (C1~C2)과 DSS 처리 후의 장내 미생물 군총이 확연히 달라짐을 확인. 또한 LGG, NG-4, HS-2 균주를 처리한 세 그룹 별 차이는 없으나, DSS 처리 전 상태와 비슷해 지는 것을 확인.

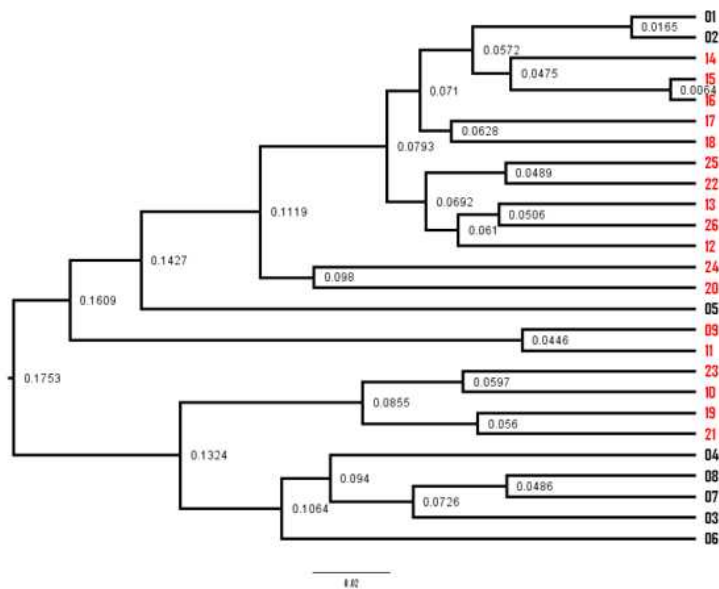


그림 66. UPGMA를 이용한 샘플별 유사성 분석.

- 또한 UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) 분석을 통해 샘플별 장내 미생물 군총 유사성을 확인한 결과, DSS 처리 전과 후로 크게 나뉘며 생균제 투여 그룹이 DSS 처리 전과 비슷해 지는 것을 확인.

표 54. Phylum 수준의 그룹별 장내 미생물 분포.

Phylum	C	DSS	G1	G2	G3
Unknown	2.33%	3.46%	2.14%	1.54%	3.32%
—	0.03%	0.10%	0.19%	0.13%	0.20%
Actinobacteria	1.94%	1.63%	0.36%	1.14%	0.81%
Bacteroidetes	48.72%	46.55%	44.38%	46.16%	50.06%
Deferribacteres	0.75%	0.37%	0.31%	0.34%	0.27%
Firmicutes	42.21%	38.55%	47.32%	44.21%	38.09%
Proteobacteria	3.89%	8.89%	4.75%	5.23%	7.20%
Tenericutes	0.01%	0.38%	0.46%	0.96%	0.04%
Verrucomicrobia	0.11%	0.07%	0.08%	0.30%	0.02%

- 각 그룹별 차이는 있으나, bacteriodetes, firmicutes가 가장 많은 비율로 장내 미생물 균총을 이루는 것을 확인.
- G3에서 특히나 bacteriodetes 비율이 대조군보다 높아졌음을 확인하였으며, G2 그룹이 대조군과 가장 비슷한 수치로 장내 미생물 균총이 회복 되었음을 확인.

표 55. Order 수준의 그룹별 장내 미생물 분포

Order	C	DSS	G1	G2	G3
Unknown	2.33%	3.46%	2.14%	1.54%	3.32%
Bifidobacteriales	1.75%	1.33%	0.27%	0.86%	0.65%
Coriobacteriales	0.05%	0.23%	0.04%	0.21%	0.12%
Bacteroidales	48.72%	46.55%	44.38%	46.16%	50.06%
Deferribacterales	0.75%	0.37%	0.31%	0.34%	0.27%
Erysipelotrichales	6.20%	13.47%	4.14%	8.49%	5.87%
Bacillales	0.00%	0.04%	0.00%	0.01%	0.01%
Lactobacillales	11.85%	5.77%	15.78%	10.50%	4.87%
Clostridiales	24.16%	19.27%	27.40%	25.21%	27.34%
Rhizobiales	0.01%	0.00%	0.04%	0.02%	0.01%
Rhodospirillales	0.10%	0.55%	0.34%	0.21%	0.33%
Burkholderiales	0.69%	1.72%	0.56%	1.09%	0.93%
Desulfovibrionales	1.77%	4.37%	1.98%	2.52%	4.05%
Desulfuromonadales	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Campylobacteriales	1.32%	1.88%	1.79%	1.34%	1.87%
Anaeroplasmatales	0.01%	0.38%	0.46%	0.96%	0.04%
Verrucomicrobiales	0.11%	0.07%	0.08%	0.30%	0.02%

- Order 수준에서 그룹별로 비교해 보았을 때, DSS 처리 후 그룹보다 G1, G2, G3 그룹이 대조군에 더 비슷하게 회복 되는 것을 확인.
- 특히나, Lactobacillales가 G1, G2에서 DSS 그룹보다 2배 정도 증가하는 것을 확인.
- 이에 *Pediococcus acidilactici* NG-4 균주를 *Pediococcus acidilactici*

LDTM5201균주로, *Weissella cibaria* HS-2 균주를 *Weissella cibaria* LDTM8901 균주로 기탁하였으며, 항-염증 효과가 우수한 균주로 특허 출원을 진행하였음.

4. 선발된 프로바이오틱스 후보 균주의 안정성 확인

- 본 연구과제에서 선발한 기능성 균주 (*L. paracasei* M9-1, *P. acidilactici* LDTM5201, *W. cibaria* LDTM8901, *L. lactis* LDTM6804)를 이용하여 잘 알려진 *L. rhamnosus* GG 균주와 프로바이오틱스의 안정성 평가를 진행.

1) 프로바이오틱스 후보 균주의 장내 적합성 평가

- 프로바이오틱스 후보 균주는 섭취 시 인체의 소화 기관에서 사멸되지 않고 장까지 도달하여 부착해야만 비로소 그 기능을 나타낼 수 있음.
- 이에 따라 강산성 조건인 위에서의 생존성과 담즙산 존재하의 생존성, 그리고 장내 부착 능력을 평가함.

(1) 프로바이오틱스 후보 균주의 내산성

- 프로바이오틱스 후보 균주의 선택 배지를 pH 2.0으로 조절한 후, 프로바이오틱스 후보 균주를 접종하여 2 시간 배양 간 30 분마다 CFU값을 측정함.

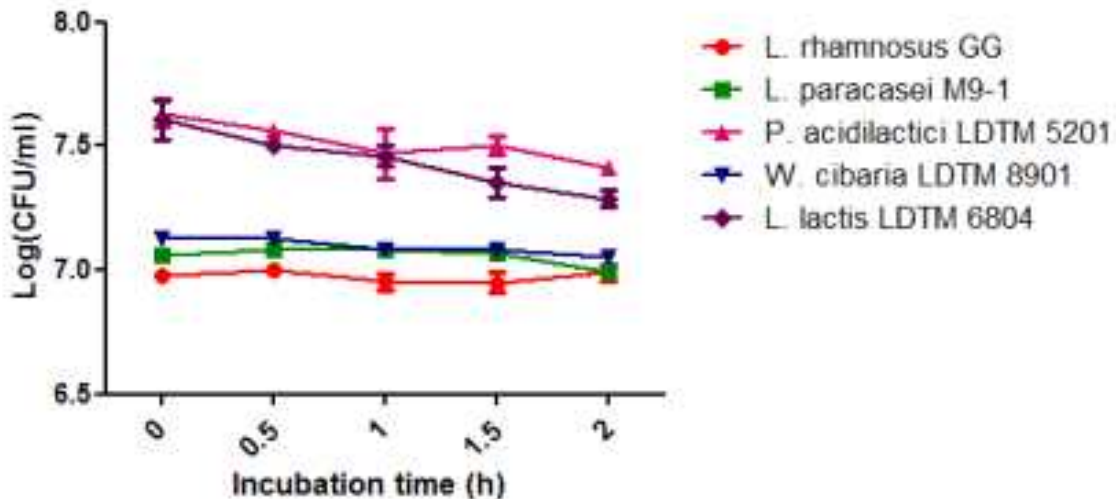


그림 67. pH 2.0인 선택배지에서 2 시간 배양 시, 각 프로바이오틱스 후보 균주의 생균수 변화

(2) 프로바이오틱스 후보 균주의 내담즙성

- 프로바이오틱스 후보 균주의 선택 배지에 0.3 % oxgall을 첨가하여 담즙산 환경을 조성

한 후, 프로바이오틱스 후보 균주를 접종하여 oxgall을 첨가하지 않았을 때와 첨가하였을 때의 CFU값을 비교하여 내담증 능력을 평가함.

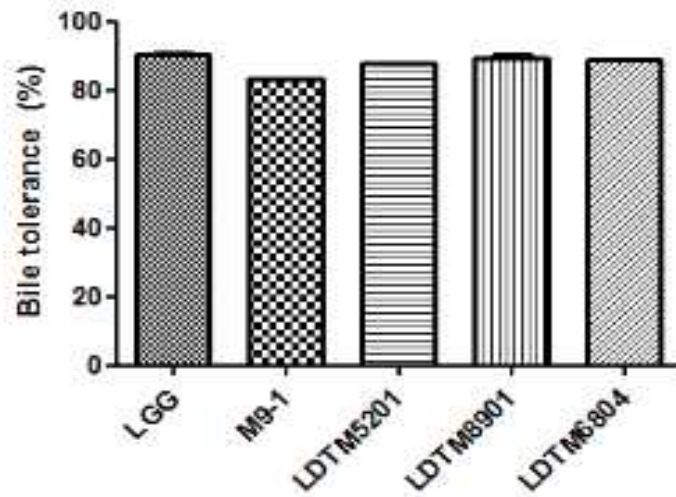


그림 68. 0.3 % oxgall 첨가 시, 각 프로바이오틱스 후보 균주의 나타나는 CFU 값 변화량

(3) 프로바이오틱스 후보 균주의 장내 부착성

○ 인간의 장 상피세포로 알려진 CACO-2 cell line에 균수를 통일시킨 프로바이오틱스 후보 균주를 접종하고, 접종 초기 CFU값과 2 시간 co-culture 후, washing하여 부착하지 않은 균을 제거한 뒤, 측정된 CFU 값의 변화량으로 장내 부착능력을 확인함.

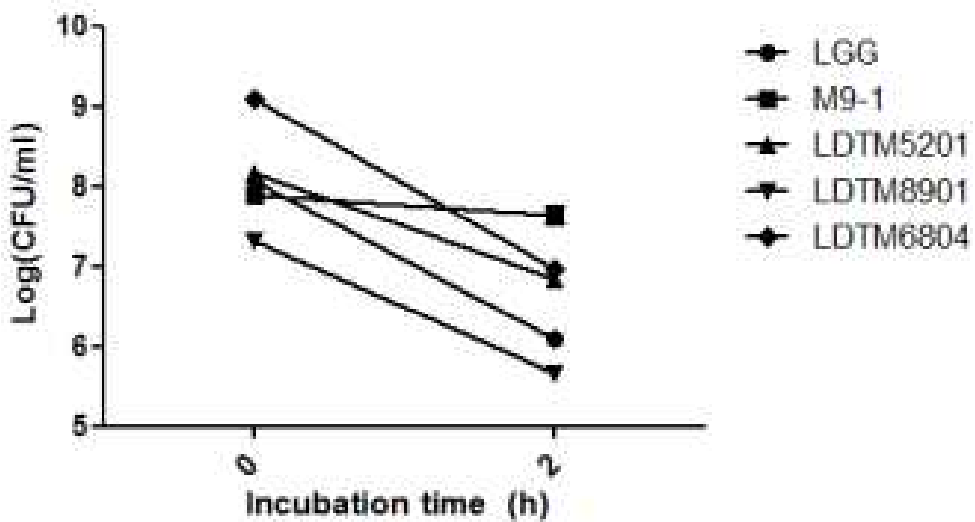


그림 69. 선발된 프로바이오틱스 후보 균주의 장내 부착능력 확인.

2) 선발된 프로바이오틱스 후보 균주의 안전성 확인

- 프로바이오틱스 후보 균주는 인체에 유해한 기능을 나타낼 시, 프로바이오틱스로 정의될 수 없으므로 용혈 활성, 생체 아민 생성 능력과 항생제 감수성 검사를 통하여 안전성을 검증함.

(1) 프로바이오틱스 후보 균주의 용혈활성 및 생체 아민 생성 능력

- 7 % sheep blood가 첨가된 blood agar를 제작하여 프로바이오틱스 후보 균주를 도말한 뒤, 37 °C, 호기 조건으로 48 시간 배양하여, colony 주변의 clear zone 유무로 용혈 활성 능력여부를 확인함.
- 잘못된 발효과정에서 발생하는 아미노산 탈카르복실화에 의해 생성되는 생체 아민을 측정하기 위하여 가장 주요하게 보고되는 histamine, tyramine, putrescine, cadaverine의 전구체인 histidine, tyrosine, ornithine, lysine을 첨가한 생체 아민 측정 배지를 제작하여 프로바이오틱스 후보 균주를 도말하여 37 °C, 호기 조건으로 48 시간 배양하여, bromocresol purple의 색변화를 확인함.

표 56. 프로바이오틱스 후보 균주의 용혈 활성 및 생체 아민 생성 능력 여부

Species	Strain	Hemolytic activity	Biogenic amine production
<i>L. rhamnosus</i>	GG	- ^a	-
<i>L. paracasei</i>	M9-1	-	-
<i>L. subsp. lactis</i>	LDTM6804	-	-
<i>P. acidilactici</i>	LDTM5201	-	-
<i>W. cibaria</i>	LDTM8901	-	-

^a- : negative

(2) 프로바이오틱스 후보 균주의 항생제 감수성 확인

- 2012 European Food Safety Authority (EFSA) 기준에 따른 각 프로바이오틱스 후보 균주의 항생제 감수성을 평가함. Oxoid 및 Biovision 사의 M.I.C. Evaluator strips를 구매하여 Isosensitest broth 90 %와 MRS broth 10 %, bacto agar 1.5 %를 첨가한 LSM 배지를 제작하여 평가함.

표 57. 각 프로바이오틱스 후보 균주의 항생제에 대한 최소 저해 농도 (ug/ml)

Species	Name	Antibiotics susceptibility								
		AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL
<i>L. rhamnosus</i>	GG	0.5	>256	2	24	6	<0.015	0.06	0.12	
<i>L. paracsei</i>	M9-1	0.25	>256	8	8	64	<0.015	<0.015	0.5	
<i>L. lactis</i>	LDTM52 01	1	>256	4	64	32	0.25	<0.015	8	
<i>P. acidilactici</i>	LDTM89 01	0.5	1	4	4	2	0.12	<0.015	2	
<i>W. cibaria</i>	LDTM68 04	0.12	0.5	4	4	24	0.06	0.12	0.06	
Suggested breakpoint in accordance to the European Food Safety Authority (EFSA)										
<i>L. rhamnosus</i>		4	n.r ^a	16	64	32	1	1	8	4
<i>L. paracsei</i>		4	n.r	32	64	64	1	1	4	4
<i>L. lactis</i>		4	n.r	16	64	64	1	1	8	4
<i>P. acidilactici</i>		1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2
<i>W. cibaria</i>		2	4	32	64	32	1	1	4	8

Susceptibility of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissela*, and *Lactococcus* subsp. *lactis* were determined according to European Food Safety Authority (EFSA, 2012). AMP, VAN, GEN, KAN, STR, ERY, CLI, TET, CHL refer to ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol.

^an.r not required.

연구목표4: 기능성 발효축산물, 치즈 종균 개발 및 풍미증진 기술 개발

1. 고급 발효축산물 및 치즈발효 종균의 적합성

1) 유육제품 발효 종균 개발

(1) 발효소시지

○ 채래시장과 가정에서 발효된 김치 10종과 젓갈 11종의 시료로부터 74개 유산균 균주를 분리함. *Lactobacillus* 속 분리는 MRS 배지 (Difco, USA), *Streptococcus* 속 분리는 M17 배지 (Difco, USA)를 각각 사용함. 각 시료별 배지에서 형성된 단일 콜로니를 Gram staining, Catalase activity 검사를 통해 1차 선별함.

○ 내산성 시험: 후보 균주들을 MRS broth에서 Overnight 배양 후에 pH 3.0으로 조정된 MRS broth에 배양액을 1% 접종하고 37°C에서 2시간 배양시킴. 배양 전후의 생균수를 고체 배지에서 drop plate 방법을 사용하며 측정하고 생존율을 산출함.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{pH 3.0 MRS culture (CFU/mL}_{2\text{hr.}})}{\text{pH 3.0 MRS culture (CFU/mL}_{0\text{hr.}})} \times 100$$

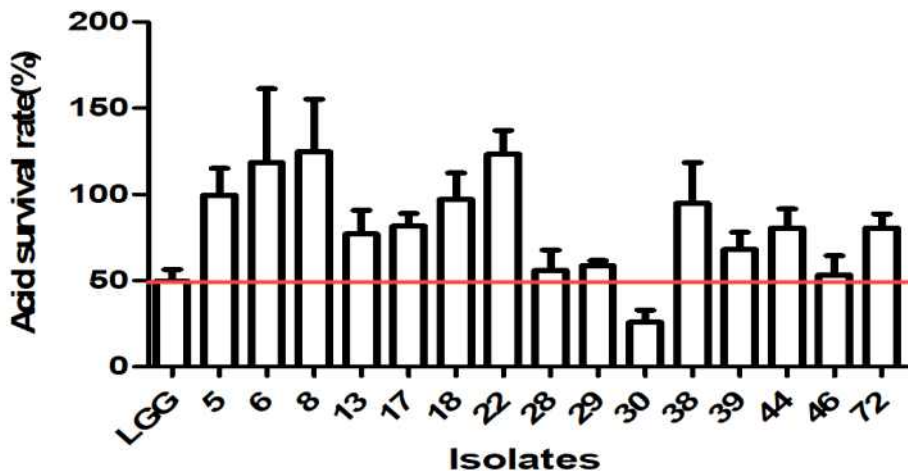


그림 70. 선별 균주들의 내산성 확인

○ 내산성 결과: Reference 균주로서 대표적인 상업용 균주인 *Lactobacillus ramosus* GG 를 사용, 내산성의 우선순위로 판단하였을 때 5, 6, 8, 13, 17, 18, 22, 28, 29, 38, 39, 44, 46, 72 번 균주가 우수한 능력을 보였으며 이들은 모두 Cocci 형태로, 선별 과정에서 Rod-shaped 형태의 균주들은 산성 조건에서 생존능이 나타나지 않음.

○ 내담즙성 시험: 후보 균주들을 MRS broth에서 Overnight 배양 후에 대조균 역할을 수행하는 MRS broth와 0.3%의 oxgall이 첨가된 MRS broth에 배양액을 1% 씩 접종하고 37°C에서 각각 12시간 배양시킨 뒤 MRS 고체 배지에서 drop plate방법을 사용하며 생균수를 측정함. 12시간 배양시킨 MRS broth와 0.3%의 oxgall이 첨가된 MRS broth의 생균수를 비교하여 나타낸 내담능 결과 (그림 71).

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{0.3\% \text{ oxgall MRS culture (CFU/mL}_{12\text{hr.}})}{\text{MRS culture (CFU/mL}_{0\text{hr.}})} \times 100$$

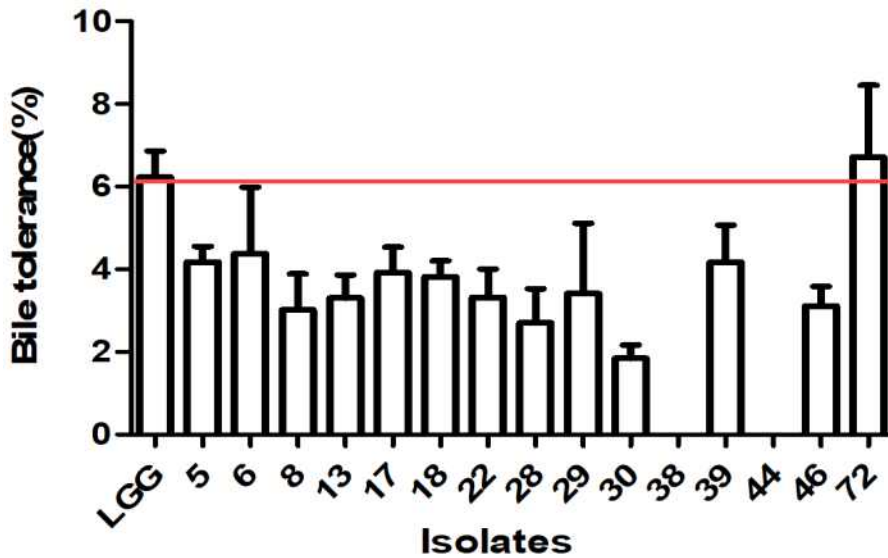


그림 71. 선별 균주들의 내담즙성 확인

- **내담즙성 결과:** 내산성 및 내담즙성 시험에서 생존능을 보이는 균주인 5, 6, 8, 13, 17, 18, 22, 28, 29, 30, 39, 46, 72번 균주들을 2차로 선발함.
- **내염성 시험:** 2차 선별된 균주들을 Tryptic Soy Broth(TSB, Difco, USA)를 이용하여 37°C 16시간에서 24시간 동안 배양 후에 2%, 3%, 4%, 8%, 12%, 16%, 20%, 24%의 NaCl이 첨가된 TSB broth에 배양액 1%를 접종하고 37°C에서 48시간 배양시킴. Spectrophotometer OD_{600nm}에서 균의 생존성을 판단하였고 0시간, 24시간, 48시간의 OD_{600nm} 값을 측정함.
- **내염성 결과:** LGG를 포함한 모든 균주가 4%까지 내염성을 보이고 8% 이상에서는 내염능을 보이지 않아 그보다 높은 농도의 결과는 생략함. 시험에 사용된 균주 간의 내염성 차이는 뚜렷하게 나타나지 않음. 다만 내산성 시험에 선발되지 못한 후보 균주들 가운데 12, 70번 균주의 내염성이 매우 높게 나타남을 확인함.

표 58. 선별 균주들의 내염성 확인

Isolates	Salt tolerance (TSB broth added to NaCl)			
	2%	3%	4%	8%
LGG	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	+	-
8	+	+	+	-
13	+	+	+	-

17	+	+	+	-
18	+	+	+	-
22	+	+	+	-
28	+	+	+	-
29	+	+	+	-
30	+	+	+	-
38	+	+	+	-
39	+	+	+	-
44	+	+	+	-
46	+	+	+	-
72	+	+	+	-

Abbreviations : +, positive; -, negative,

- **단백질 및 지방 분해능 시험:** 단백질 분해(proteolysis)는 소시지 숙성과정 중 일어나는 주된 현상 중 하나로서, 육류 단백질은 calpain 또는 cathepsins과 같은 peptidases나 proteases의 주된 타깃 되어 polypeptides, small peptides을 거쳐 최종적으로는 free amino acids (FAAs)로 가수분해 됨. 마찬가지로 소시지 숙성 과정 동안 미생물이 가지고 있는 lipase 혹은 esterase에 의한 지방 분해(lipolysis)도 FAAs를 생성하게 되는데, FAAs는 미생물에 의해 대사되어 소시지의 향미에 영향을 주는 산화물로 전환됨.
- **단백질 및 지방분해능 결과:** 단백분해능과 지방분해능은 선별 균주들을 각각 2% skim milk 포함 TSB 배지와 1% Glyceryl tributyrat를 포함한 Trybutyrin agar에서 배양 후 colony 주변의 clear zone의 크기로 활성을 판단함. 8, 29, 44번 균주를 제외한 모든 균주에서 단백 및 지방분해능이 관찰되지 않음.
- **종합 결과 및 선발:** 내산성 및 단백질 분해능 면에서 *Pediococcus acidilactici* 3개 균주(8, 29, 44번)가 선별되었고, 내담즙성 면에서 *Lactobacillus casei* (12번 균주), *Lactobacillus plantarum* (70번 균주)가 각각 1개 균주씩 선별됨. 선별된 균주들의 내염, 단백분해, 지방분해 특성들을 덴마크 Christian Hansen 사의 Bactoferm F-LC, F-RM-52 salami starter 제품과 비교한 결과를 표에 표현하였음. 비교 조건에서는 자체 분리 균주 및 상용 스타터 균주 모두 지방분해능이 나타나지 않음. 자체 분리된 *Pediococcus acidilactici* 3개 균주는 Bactoferm F-LC에 포함된 *Pediococcus acidilactici* 균주에 비해 내염성 및 단백분해능이 우수한 것으로 판단됨.

표 59. 선별 균주들과 상용 균주들의 내염, 단백분해, 지방분해 특성 비교

Source	No.	Species	내염성	단백분해 능	지방분해 능
Isolates	(8)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	≥4%	+	-
	(29)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	≥4%	+	-
	(44)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	≥4%	+	-
	(12)	<i>Lactobacillus casei</i>	≥4%	-	-
	(70)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	≥4%	-	-
Bactoform F-LC		<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	-
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	≥12%	+	-
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	≥8%	-	-
Bactoform F-RM-52		<i>Staphylococcus carnosus</i>	≥16%	+	-
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	≥8%	-	-

- 발효소시지 제조: 실제 소시지 발효 적합성을 확인하기 위해 테스트 스타터 조합을 3개를 만들어 표의 조건으로 제조함. 각 균주는 10⁶ CFU/g 으로 접종함.

표 60. 발효소시지 제조 조건 및 구성

Ingredients	Control	T1	T2	T3
Lean	3,200kg	3,200kg	3,200kg	3,200kg
Fat	800kg	800kg	800kg	800kg
Pork_totally	4,000kg	4,000kg	4,000kg	4,000kg
Starter culture	F-LC	<i>P.acidilactici</i> (8) <i>L.plantarum</i> (70) <i>S.xylosus</i>	<i>P.acidilactici</i> (8) <i>L.plantarum</i> (70)	<i>P.acidilactici</i> (8)
Salt	108.0g	108.0g	108.0g	108.0g
Nitrite	0.28g	0.28g	0.28g	0.28g
Dextrose	80.0g	80.0g	80.0g	80.0g



- 발효소시지 적합성: 소시지 제조 완료 후 발효가 진행되는 3일 간의 pH 변화에서 3개의 테스트 그룹이 상용스타터인 Control 그룹 (F-LC)에 비해 pH 저하 속도가 느리게 나타났으며 T1 그룹만이 pH 5 이하로 값이 내려가는 것으로 확인됨. 또한 생균수 측정 결과에서도 Control이 우세하게 나타남. F-LC의 구성을 토대로 *L. curvatus* 역할의 중요성을 유추할 수 있으며 이를 보완할 추가 균종 발굴 및 소시지 발효 조건을 탐색 중에 있음.

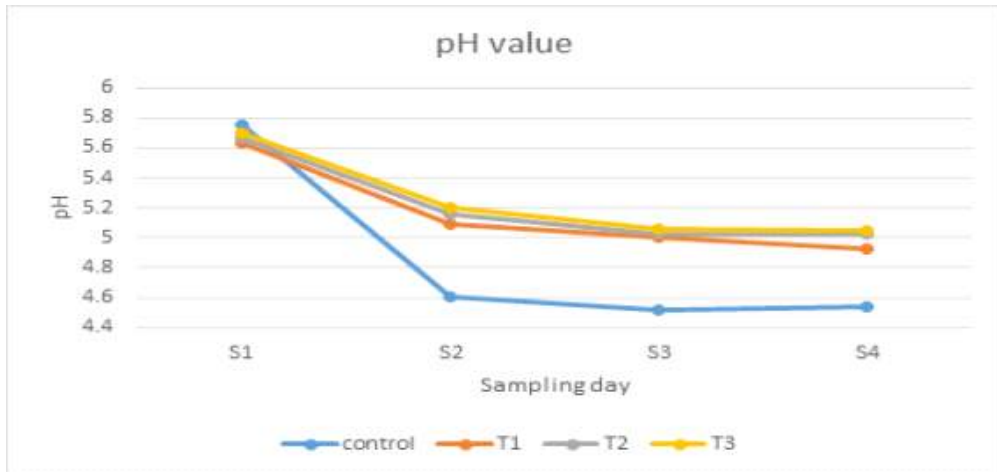


그림 72 각 테스트 그룹의 소시지 발효 과정 중 pH 변화

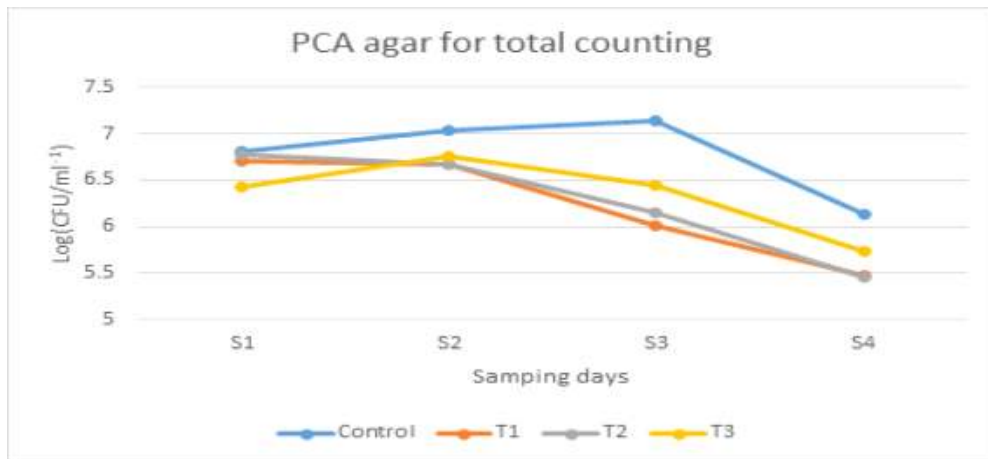


그림 73. 각 테스트 그룹의 소시지 발효 과정 중 생균수 변화

(2) 발효유

- 균주 선별: 강원도 유가공 목장 원유로부터 분리된 안전성 적합 균주들 중 *Lactonacillus bulgaricus*와 *Streptococcus Thermophilus*만을 선별하여 skimmilk에서의 성장 및 산생성 특성을 확인함. 후보 균주들을 Overnight 배양 후 10% skimmilk에 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 pH 저하능과 생균수가 우수한 균주들을 선발함. 각 균주들을 표에 나타냄.

표 61. Skimmilk 적합성 우수 선별 균주

Species	No.	CFU	pH
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	H2	6.5E+07	4.20
	BV4	8.9E+07	4.13
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M3	2.3E+09	4.12
	M7	2.6E+08	4.50

- **발효유 제조:** 선별된 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*를 4개 그룹으로 조합하여 10⁶ CFU/ml로 원유에 접종하고 37°C에서 6시간 배양 후 pH 및 생균수를 측정함. 모든 그룹에서 pH가 4.6이하로 감소하고 생균수는 10⁹ CFU/ml 이상으로, 선별된 4개의 균주는 모든 조합에서 발효 적합성이 우수한 것으로 나타남. 해당 균주들을 활용한 발효유 제품 개발을 위한 안정성, 생산성, 맛과 풍미 등에 대한 추가 연구를 진행 할 예정임.

표 62. 발효유 제조 적합성 검증










	T1	T2	T3	T4
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	H2	BV4	H2	BV4
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M3	M3	M7	M7
pH	4.53	4.48	4.47	4.43
CFU	4.7E+09	4.2E+09	8.6E+09	2.7E+09







2) 치즈 제품 발효 종균 개발

(1) 치즈 제조 및 발효 적합성에 의한 최종 발효 종균 선정

- 기 수행된 연구결과로서 확보된 치즈 발효 종균 후보균주들의 실제 적합성을 검증하기 위해 고다 (Gouda) 치즈 제조를 기반으로 종균의 종류, 함량 등을 검토함. 치즈 제조 방법은 표에 나타냄.

표 63. 고다 치즈 제조 과정

제 조 과 정	내 용	예 시
살균	VAT에 원유 100kg 당 Beta-carotene 2ml 첨가 후 30분 동안 온도를 65℃까지 올리면서 가열 및 살균	
냉각	가열된 원유의 온도가 다시 32℃가 되도록 정치	
Starter 접종	VAT 내 원유의 온도가 32℃가 되면 10%skimmilk에 접종해둔 starter 접종, 1시간 정치	 
렌넷(rennet) 첨가	렌넷(rennet)을 100kg 기준, 19ml 넣음. 이때 DW 81ml과 렌넷 19ml을 섞어 100ml을 만들어 VAT에 넣고 살짝 교반 후 멈추고 40-45분간 유지	 
커드(curd) 절단 및 교반	커드(curd) 절단기 0.7mm를 사용하여 좌우 번갈아 가면서 커드를 절단. 교반 20분 동안 하면서 커드가 뭉치치 않도록, 커드 내 수분이 많이 빠질 수 있도록 함	 
가수세척	VAT 내 유청을 40% 빼내고, 온수를 넣어줌. 1차 가온 - 36℃ 2차 가온 - 38℃ 온도가 38℃ 도달 후, 50분 정치.	 

유청제거	VAT 내 유청을 완전히 제거하고, VAT안에서 정치		
성형 및 압착	성형틀에 넣고 압착 예비압착 1차압착(1.0bar) 2차압착(1.5bar) 3차압착(2.0bar) 4차압착(2.5bar) 각 30분		
염지	4차 압착 후 overnight. 무게를 측정한 후 염지. (염지는 kg당 8시간)		

- 상업용 고다 치즈 발효 제품의 균종 구성을 토대로 본 연구에서 확보된 후보 균주 중 선별 과정에서 우수한 특성을 나타내었던 *Lactococcus lactis* L5 및 *Lactococcus cremoris* C46 2종을 제조에 적용함. 총 생균수 기준 CHN과 균수를 동일하게 조정하여 각각 2%로서 접종한 결과 두 그룹 모두 렌넷 첨가 후 커드 생성 및 치즈 제조가 확인됨. 보다 낮은 pH 값과 더 우수한 안정성을 얻기 위해 종균의 구성과 비율을 세분화 하여 추가 연구를 진행함.

표 64. 고다 치즈 발효 적합성 검증 (1차)

	CHN	LDTM
원유량	100kg	100kg
Starter 종류	상업용균주 Chr.Hansen의 CHN-11 제품	<i>Lactococcus lactis</i> L5 <i>Lactococcus cremoris</i> C46
접종량	2 %	2 %
과정별 pH 변화		
렌넷 첨가 후	6.46	6.63
압착 후	6.30	6.52
* CHN-11: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> . 4종류의 종균으로 구성		

- 선별된 균주들 중 skimmilk에서 생존능이 우수했던 *Leuconostoc mesenteroides* B2 균주를 LDTM 스타터 구성에 추가하여 독자 균주들로 구성된 CHN 대응 치즈 발효 복합 종균을

구성함. 더불어 최적화를 위해 접종량과 비율을 달리하여 skimmilk에서 배양 테스트를 진행함. 종균 구성 균주들 중 pH 저하능이 가장 뛰어난 *L. cremoris* C46의 비율을 2배 증가시키고 전체 스타터 접종량을 원유량 대비 2%에서 4%로 증가시킨 조건에서 기존 조건이나 CHN보다 더 우수한 pH 저하 결과를 확인할 수 있었으며 이를 토대로 2차 치즈 제조를 진행함.

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{(\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH}) \times \text{F} \times 9}{\text{Weight of sample (g)}}$$

F Factor of NaOH solution = 1 , Lactic acid = 0.009

표 65. 치즈 스타터의 skimmilk 발효 특성

Strain		pH	TA(%)
CHN	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6.08 ± 0.04	0.16 ± 0.01
	<i>Lactococcus lactis</i>	5.05 ± 0.02	0.40 ± 0.01
	<i>Lactococcus cremoris</i>	5.09 ± 0.02	0.35 ± 0.01
LDTM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B2	5.94 ± 0.01	0.17 ± 0.01
	<i>Lactococcus lactis</i> L5	5.42 ± 0.04	0.26 ± 0.02
	<i>Lactococcus cremoris</i> C46	4.85 ± 0.02	0.45 ± 0.01

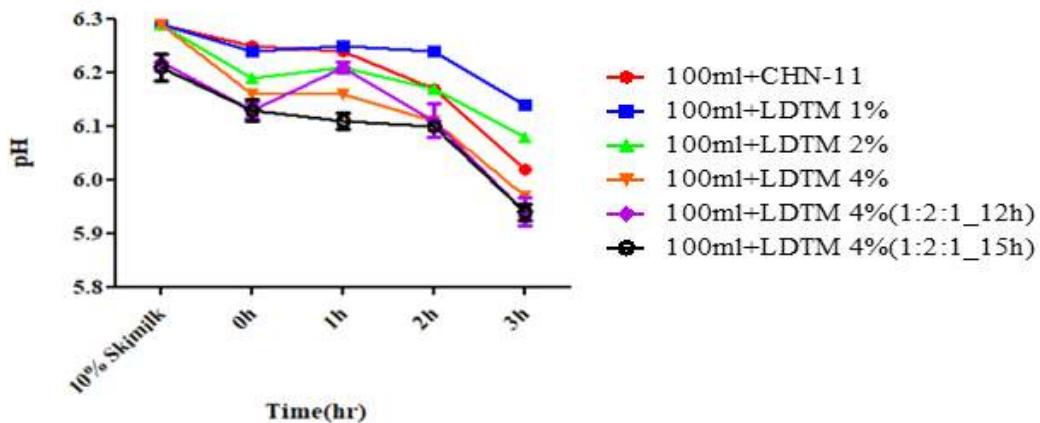


그림 74. LDTM 복합 종균의 접종량과 구성 비율에 따른 pH 저하 특성

- 구성이 변경된 LDTM 복합 종균을 사용한 2차 고다 치즈 제조 과정에서 pH의 저하가 1차에 비해 약 0.26 가량 더 저하되는 것을 확인함. 이후 냉장 보관 설비 내에서 발효를 계속

진행하여 균수, pH, 풍미, 물성, 유기산 (flavor) 형성을 확인함.

표 66. 고다 치즈 발효 적합성 검증 (2차)

	CHN	LDTM
원유량	100kg	100kg
Starter 종류	상업용균주 Chr.Hansen의 CHN-11 제품	<i>Lactococcus lactis</i> L5 <i>Lactococcus cremoris</i> C46* <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B2
접종량	제조사 권장 사항을 따름	4 % (1:2:1)
과정별 pH 변화		
렌넷 첨가 후	6.51	6.35
압착 후	6.49	6.28

- 숙성 2개월 동안의 각 고다 치즈 내 pH, TA, 생균수 변화를 측정된 결과, CHN에 비해 LDTM이 더 낮은 pH로 유지되고 생균수 역시 3-6배 가량 높은 것으로 나타남.

표 67 고다 치즈 발효 안정성 검증

	CHN				LDTM			
	pH	TA(%)	CFU/ml (MRS)	CFU/ml (M17)	pH	TA(%)	CFU/ml (MRS)	CFU/ml (M17)
0일차	5.52	0.149	-	3.E+07	5.50	0.16	3.E+07	2.E+08
2주차	5.73	0.146	-	1.E+07	5.50	0.18	5.E+07	2.E+08
4주차	5.73	0.164	4.E+08	5.E+08	5.48	0.187	6.E+08	1.E+09
8주차	5.82	0.160	6.E+06	3.E+06	5.54	0.193	2.E+07	2.E+07

2. 발효조건에 따른 풍미, 물성 조절제어기술개발

1) 고다 치즈 제조를 통한 품질 특성 분석

(1) 풍미 변화 확인

- 숙성 2개월 시점에서 풍미 및 조직감을 분석한 결과 전반적으로 기성 제품인 CHN이 기호적인 측면에서 LDTM보다 더 높은 평가를 얻었음. LDTM 고다 치즈는 CHN 고다 치즈에 비해 보다 짙은 황색을 띄었고 상대적으로 낮은 정도에 따른 조직감 부족, 기성품이 보여주는 맛과 향미의 친숙성과는 다른 관능 특성이 나타남. 이는 종균 투여 방법의 차이로 판단되며 종균 생산을 분말 종균으로 전환한다면 좀 더 좋은 결과를 나타 낼 것으로 보여 현재의 우수성 판단은 아직 어려움.

표 68. 관능적 기호도 분석 결과 (단위: 9점 만점)

구 분		숙성 기간(개월)	
		0	2
색	CHN	7.20±0.35	7.69±0.32
	LDTM	5.84±0.22	6.79±0.29
향미	CHN	5.88±0.30	6.75±0.16
	LDTM	4.26±0.26	5.53±0.64
조직감	CHN	6.22±0.33	6.78±0.18
	LDTM	6.24±0.17	6.10±0.62
맛	CHN	5.76±0.30	6.66±0.20
	LDTM	3.82±0.35	4.85±0.80
종합적 기호도	CHN	6.10±0.36	6.69±0.25
	LDTM	4.13±0.28	4.86±0.58

* 관능평가용 치즈 시료는 가로, 세로, 높이 각 1 cm 크기의 균일한 정육면체 큐브형태로 절단하여, 훈련된 패널 10명을 대상으로 색, 향미, 조직감, 맛, 종합적기호도 항목에 대한 관능적 선호도를 '대단히 싫다'를 1점, '대단히 좋다'를 9점으로 나타내는 9점 척도법으로 평가

표 69. 조직감 분석 결과

구 분		숙성 기간(개월)	
		0	2
경도 (Hardness, kg)	CHN	0.43±0.06	0.57±0.03
	LDTM	0.52±0.08	0.44±0.03
응집성 (Cohesiveness, %)	CHN	1.44±0.02	1.53±0.08
	LDTM	1.63±0.08	1.58±0.13
탄력성 (Springiness, mm)	CHN	31.98±0.31	32.75±0.25
	LDTM	32.55±0.31	32.42±0.12
검성 (Gumminess)	CHN	0.61±0.10	0.87±0.07
	LDTM	0.85±0.13	0.70±0.10
씹힘성 (Chewiness)	CHN	19.52±3.22	28.58±2.40
	LDTM	27.53±4.57	22.84±3.33

○ 종합적으로 볼 때, LDTM 복합 종균에 의한 고다 치즈는 치즈의 안정성과 유산균의 활성화 면에서는 CHN보다 더 우수한 것으로 나타났으나 소비자들에게 익숙한 기성 제품과 비교하여 맛과 풍미 면에서는 종균 투여 방법의 개선을 통하여 개선 가능함.

(2) 물성 변화 확인

- 숙성 2개월 이후 수분, 단백질, 지방, 염분의 함량은 CHN과 LDTM에서 크게 차이가 나타나지 않음. 따라서 풍미와 조직감에 영향을 주는 요인으로 각종 유기산 등의 flavor 성분들을 고려할 필요가 있음.

표 70. 일반 성분 분석결과 (단위: %)

구 분		숙성 기간(개월)	
		0	2
수분	CHN	39.58±0.06	32.22±0.05
	LDTM	40.04±0.08	33.18±0.05
단백질	CHN	23.03±0.05	28.27±0.20
	LDTM	23.53±0.06	27.59±0.10
지방	CHN	32.43±0.04	36.63±0.10
	LDTM	31.60±0.03	34.99±0.12
염분	CHN	1.55±0.03	1.73±0.03
	LDTM	1.49±0.04	1.83±0.01

(3) 유기산 (flavor) 생성 조건 확인

- 유기산 측정은 SPME-GC/MS를 사용하여 Internal standard에 의한 정량적 값을 도출하였음. 숙성 2개월 이후 CHN과 LDTM의 유기산 함유량을 다변량분석(PLS-DA)한 결과 두 치즈 그룹이 서로 다른 구성을 가지고 있음을 확인함. 각 그룹 내에서 살펴보면 CHN의 유기산 분포는 매우 일정한 반면 LDTM의 분포는 샘플간 다소 차이가 있어 특성이 있는 치즈임.

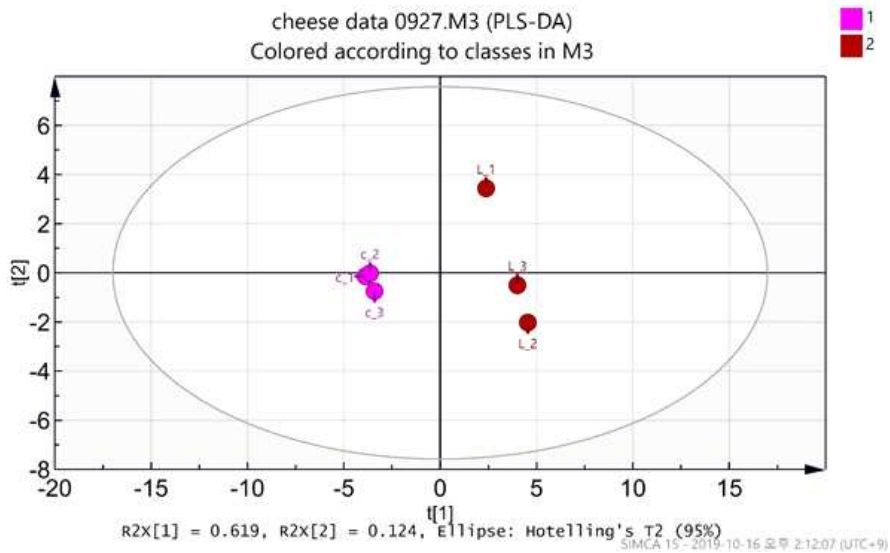


그림 75. SPME-GC/MS에 의한 유기산 측정값의 다변량 분석

- 각 치즈 그룹간 주요하게 밀집되어 있는 유기산을 분석한 결과 CHN은 Butanoic acid, Hexanoic acid, Octanoic acid, Butanediol 등이 특징적으로 분포하고 있고, LDTM은 Acetic

acid, Decanoic acid를 비롯한 다양한 휘발성 물질들이 분포되어 있음을 알 수 있으며 따라서 이들 물질들이 두 치즈 간의 맛과 풍미의 차이를 만드는 주요한 요인 중 하나로 판단됨.

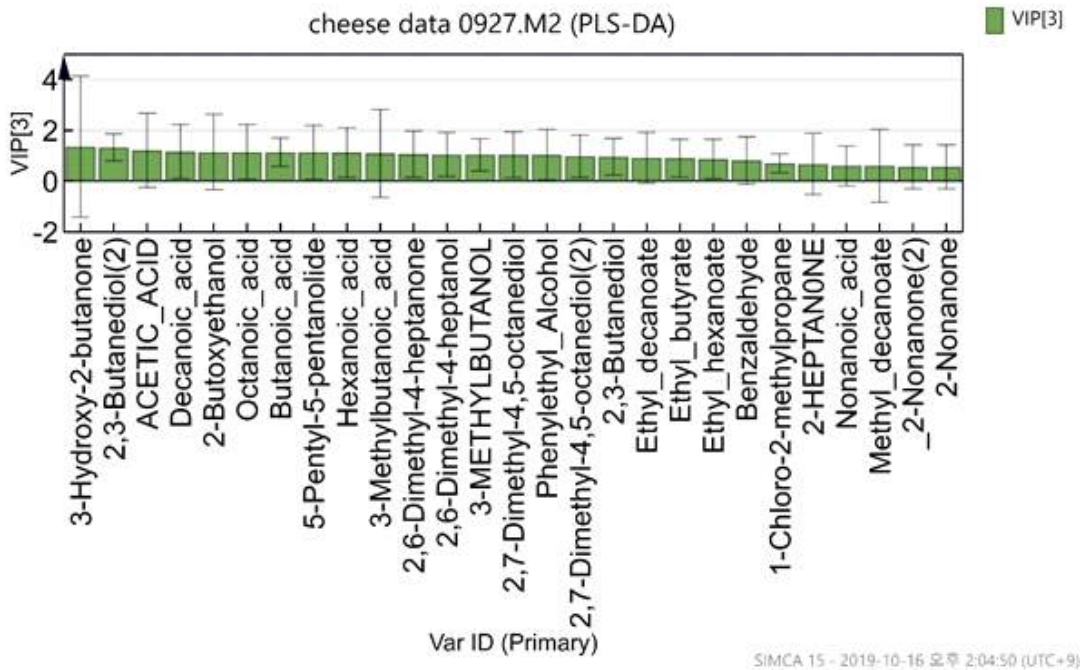
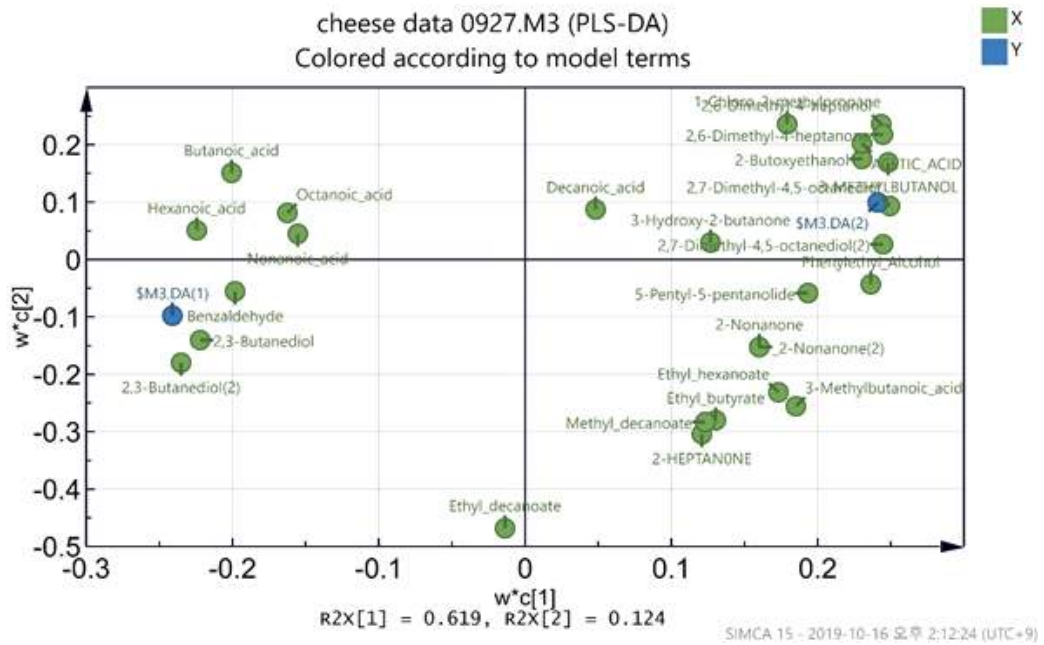


그림 76. 그룹 간 차이를 야기하는 주요 유기산 및 휘발성 flavor 물질들

○ **종합 평가:** 치즈의 제조에서 원유의 차이를 배제하면 그 다음으로는 스타터의 역할이 가장 크다고 할 수 있으며¹³⁾¹⁴⁾ 본 연구의 결과도 이를 나타내고 있음. 발효 종균의 차이로 인해 발

13) Julie Paquet et al. 2000. Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese

생하는 pH, 미생물 안정성, 물성, 유기산에서의 차이는 치즈의 안정성과 풍미에 영향을 주며 따라서 발효 종균의 제어기술에 의해 치즈의 품질 개선과 제품 다양화를 기대할 수 있음. LDTM치스는 기존의 CHN치스와는 차별되는 새로운 맛의 치즈로 판단되며 종균의 투여 방법을 통하여 맛의 향상을 계속 추진하여 한국 특유의 치즈로 개발 예정임.

startersInternational Dairy Journal vol. 10(5-6), 391-399

14) Vaughan L. Crow et al. 1993. Starters as finishers: Starter properties relevant to cheese ripening International Dairy Journal vol. 3(4-6), 423-460

연구목표5: 고급 발효축산물의 생산 및 신규 종균 치즈 제조속성 기술개발

1. 고급 발효축산물의 생산 및 경제성 분석 (매출액)

- 불포화지방산 고함유 우유 생산성 검증 완료 후 배합사료인 퓨리나 퓨라텍오메가와 TMR 사료인 퓨리나 목장맞춤3호의 TMR사료를 구입하여 오메가 3 고함유 원유를 납유함 (보배목장, 서울 F&B).
- **종합평가:** 매출액은 3차년도부터 29,419,467원, 4차년도는 118,554,463원이며 5차년도 244,532,093원으로 납유량 및 매출 모두 연차별 증가가 되었음을 볼 수 있음. 이는 목표로 한 매출액의 7배임. 본 생산 및 판매 결과로 불포화지방산 고함유 우유 (오메가 3 고함유 원유)는 생산 목표 이상을 달성함.

2. 신규 종균 치즈 제조속성 기술개발

1) 기능성 신규 종균 선발

- (1) 담즙산 내성 균주 선발을 새로운 프로토콜의 확립 및 적용

[1] 담즙산 내성 균주 선발을 위한 새로운 프로토콜의 확립

- 담즙산 내성이 높은 균주의 선발을 빠르고 간단하게 할 수 있는 방법을 확립하기 위한 연구를 진행. 유산균의 경우 증식하면서 젖산 및 초산과 같은 유기산을 생산하여 pH를 감소. 따라서, 배지에 pH 지시약인 BCP를 첨가하면 색의 변화만을 통해서 간단하게 균의 증식을 확인할 수 가능. 또한, 0%, 0.5%, 1%, 2%의 PBE 를 첨가하여 담즙산 내성을 확인. 담즙산 내성의 정도에 따라 담즙산의 농도별 색 변화의 유무 및 시간이 다르게 나타났으며, 담즙산 내성이 높은 균주는 높은 농도의 PBE에서도 증식하며 모든 농도에서의 색 변화가 빠르게 나타남. 많은 균주와 여러 담즙산 농도에서의 색 변화 비교를 용이하게 하기 위해 96 well plate를 접목. MRS에 BCP만 첨가했을 때보다 더 확실한 색 변화를 확인할 수 있도록 dipotassium phosphate를 적당량 첨가하여 배지의 초기 pH를 높임. 이는 MRS 배지의 구성 성분 중의 하나로 적정량 더 첨가하였을 때 균의 성장에 큰 영향을 미치지 않으며 초기 배지의 pH를 높여 더 진한 보라색을 띠게 할 수 있음.

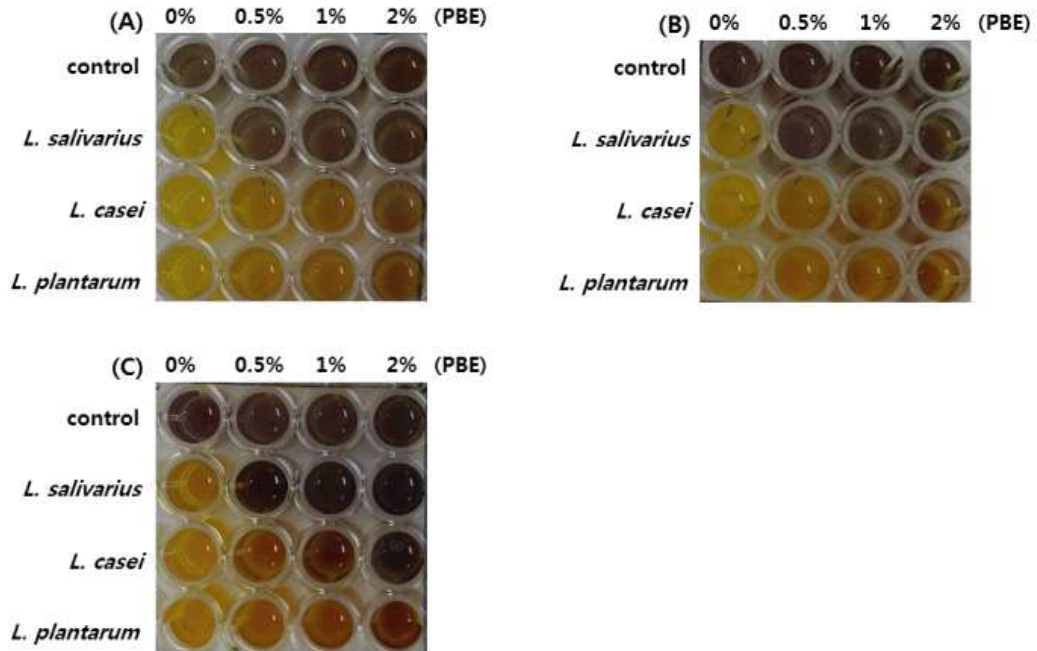


그림77 0%, 0.5%, 1%, 2%의 PBE 를 첨가하여 담즙산 내성을 확인 (A) Control (MRS), (B) MRS + 0.2% dipotassium phosphate, (C) MRS + 0.3% dipotassium phosphate.

[2] 새로운 프로토콜을 이용한 담즙산 내성 균주의 선발 기술 개발

- 96 well plate에 스크리닝 배지 100 ul와 균주 100 ul를 분주. 최종적으로 PBE 농도 0%, 0.5%, 1%, 2%와 균 1%가 접종되도록 하였음. Bile salt hydrolase 활성이 있는 *Lactobacillus* 균주들 간의 담즙산 내성을 비교함. 일정 시간이 배양 후에 색깔 변화에 의한 상대적인 담즙산 내성을 비교할 수 있었으며 (그림) 이 결과를 정리하면 표와 같이 나타낼 수 있음.

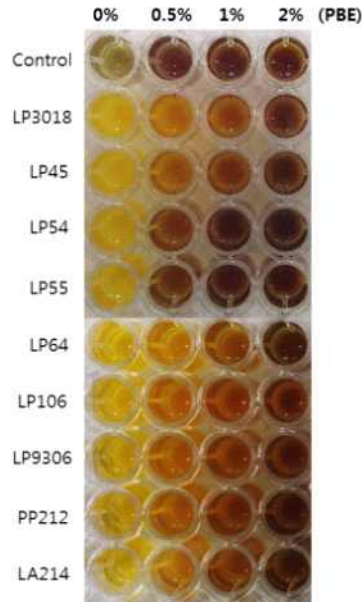


그림78. *Lactobacillus spp*의 담즙산 내성 비교

표71. *Lactobacillus spp*의 상대적 담즙산 내성을 비교

No.	Genus & Species	Bile salt tolerance
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 3018 ^T (LP3018)	++
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 45 (LP45)	++
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> 54 (LP54)	+
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> 55 (LP55)	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 64 (LP64)	++
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 106 (LP106)	+++
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> 9306 (LP9306)	+++
8	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 212 (PP212)	++
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 214 (LA212)	++

(2) 콜레스테롤 저하 유산균 분리 및 특성 파악

○ 콜레스테롤 저하 유산균 분리를 위해 BSH 활성 균주를 찾는 것과 동시에 분리 방법의 확립을 위한 실험을 진행함 Enterohepatic circulation (EHC) mechanism을 기반으로 높은 BSH 활성을 가진 균주가 높은 콜레스테롤 저하능을 가질 것이라 가정¹⁵⁾하고, BSH positive 균주를 스크리닝 하였음. 배양된 균주는 순수분리 과정을 진행하여 단일 균주로 분리를 진행하였고, 선발된 균주로 미생물 동정을 진행한 결과는 다음과 같음 (표). 16SrDNA sequencing 결과 LPP1과 LPP2는 같은 균으로 확인

15) Jian-Shan Cai & Jin-Hong Chen. 2014. The Journal of Membrane Biology volume 247, 1067-1082

표72. 배추김치, 총각김치에서 분리한 균

No.	Genus & Species	Sample
1	<i>Lactobacillus brevis</i> M1 (LBM1)	Mart
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> P1 (LPP1)	Napa cabbage
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> P2 (LPP2)	Napa cabbage
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> P3 (LPP3)	Napa cabbage
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> P4 (LPP4)	Napa cabbage
6	<i>Lactobacillus brevis</i> P5 (LBP5)	Napa cabbage
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> C1 (LPC1)	Bachelor radish

[1] 콜레스테롤 저하 유산균 특성 파악

○ Bile salt hydrolase (BSH) 활성 확인

김치에서 분리한 LBM1, LPP1, LPP2, LPP3, LPP4, LBP5, LPC1 균주를 2 mM glycodeoxycholate 가 첨가된 MRS 고체배지 표면에 10 ul 떨어뜨리고 배양을 진행한 뒤 하얀 침전을 확인하였다. 37°C에서 48시간 배양한 결과 7균주 모두 하얀 침전이 생긴 것을 확인할 수 있음.

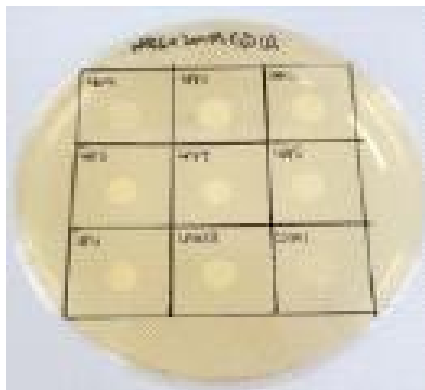


그림79. Bile salt hydrolase (BSH) 활성 확인.
Lactobacillus plantarum 3018^T, positive control; *Lactobacillus salivarius* 301, negative control.

표73. 균주의 BSH 활성 측정

No.	Genus & Species	BSH activity
1	<i>Lactobacillus brevis</i> M1 (LBM1)	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> P1 (LPP1)	++
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> P2 (LPP2)	++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> P3 (LPP3)	++
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> P4 (LPP4)	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> P5 (LBP5)	+
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> C1 (LPC1)	++

○ 내담즙성 확인

96 well plate 의 각 well에 김치 분리균 100 ul 와 스크리닝 배지 100 ul를 넣어준 후 37°C에서 24시간 동안 배양을 진행함. 내담즙성을 가지고 있는 균주는 스크리닝 배지에서 성장할 수 있고, 이로 인해 배지의 pH가 낮아지면서 노란색으로 변할 것이라 예측하였음. 4시간 마다 배지의 색 변화를 관찰함

표75. 내담즙성을 가지고 있는 균주

No.	Genus & Species	Bile acid tolerance
1	<i>Lactobacillus brevis</i> M1 (LBM1)	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> P1 (LPP1)	+++
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> P2 (LPP2)	+++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> P3 (LPP3)	+++
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> P4 (LPP4)	+++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> P5 (LBP5)	+
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> C1 (LPC1)	++

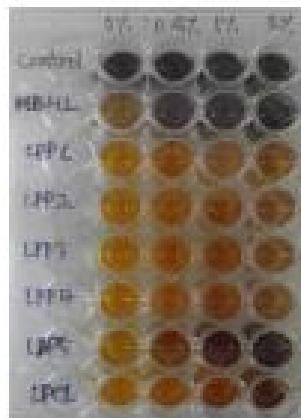


그림80. 내담즙성을 가지고 있는 균주 색상 변화

○ 산 생성능 확인

선발된 균주를 치즈 스타터로 사용할 수 있는지 평가하기 위해 1.75% (w/v) glucose가 첨가된 skim milk 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양 후 curd 형성 여부를 확인하고 pH를 측정. 그 결과는 LPP1, LPP2, LPP3, LPC1이 curd를 형성하였으며, pH는 4.6~5.0 인 것으로 보아 치즈 스타터로 사용할 수 있다고 판단

○ 콜레스테롤 저하능 확인

Cholesterol이 첨가된 MRS-thio broth에 김치 분리 균과 현재 연구실에서 보유하고 있는 BSH 활성균(listed in 표)을 1% 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 *In vitro* cholesterol assimilation 능력을 비교함. 원심 분리와 hexane, 질소 가스 pulsing을 통해 콜레스테롤을 추출한 후 정량을 위해 o-phthalaldehyde reagent (0.5 mg/ml in glacial acetic acid) 와 황산을 처리하였음¹⁶⁾. 보라색 발색 반응을 확인한 후 550nm에서 O.D.값을 측정하였으며, 그 결과는 그림과 같음. *Lactobacillus casei* MCL과 LS301 균주는 negative control로, LP3018^T는 positive control로 사용

표74. 콜레스테롤 저하 BSH활성균 list

No.	Genus & Species
1	<i>Lactobacillus brevis</i> M1 (LBM1)
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> P1 (LPP1)
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> P3 (LPP3)
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> P4 (LPP4)
5	<i>Lactobacillus brevis</i> P5 (LBP5)
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> C1 (LPC1)
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> 45 (LP45)
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> 54 (LP54)
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> 106 (LP106)
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> 9006 (LP9006)
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 214 (LA214)
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 212 (PP212)

16) Chandra Shekhar Pundir & Rachna Rawal. 2013 Analytical and Bioanalytical Chemistry vol. 405, 3049-3062

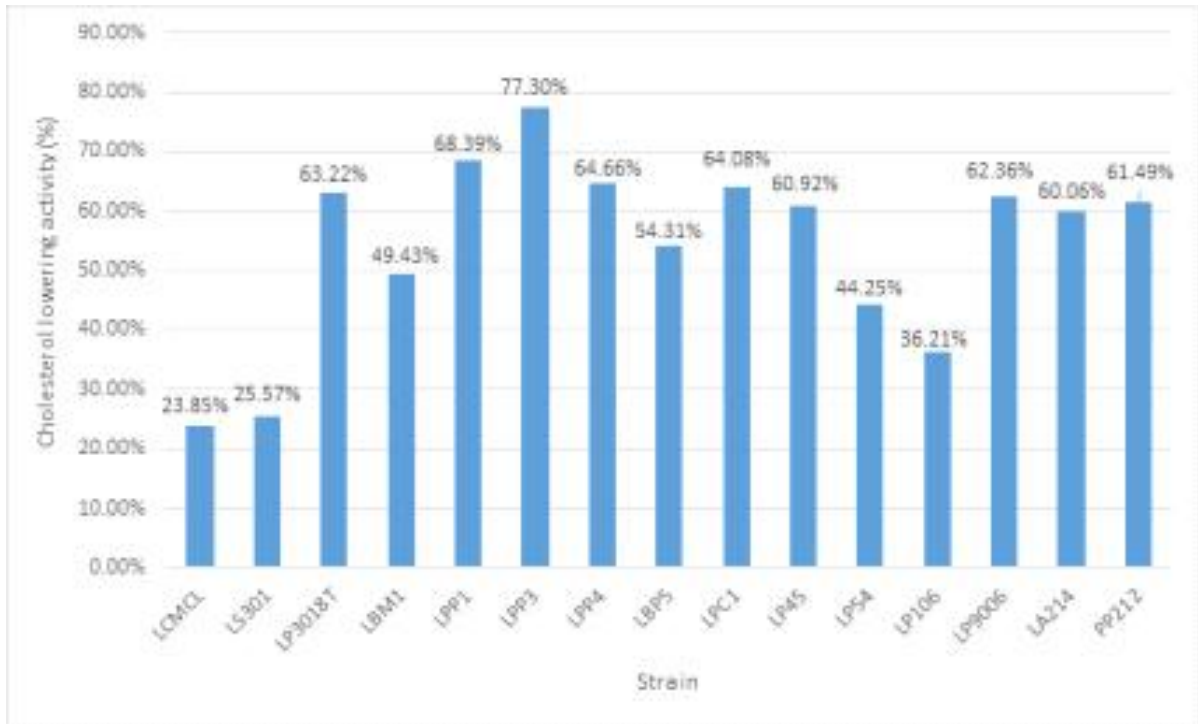


그림81. 콜레스테롤 저하 BSH활성

(3) BSH 유전자들의 과발현, 분리 정제 및 효소 특성 확인

○ BSH gene cloning

L. plantarum 54, *L. brevis* P5, *P. pentosaceus* 212 균주에서 얻은 bsh gene을 가지고 cloning을 수행함. Overexpression *E.coli* 로 BL21을 사용하였고, vector는 pET-22b vector를 사용하였다. 그림24는 PCR product에 대한 전기영동 사진.

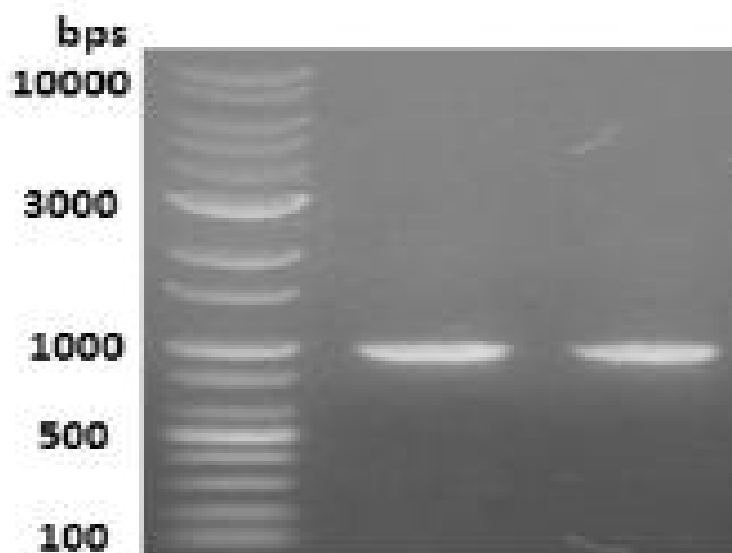


그림82. *L. plantarum* 54, *L. brevis* P5, *P. pentosaceus* 212 균주에서 얻은 bsh gene의 PCR product에 대한 전기영동 사진

- BSH gene overexpression *L.plantarum* 54, *L.brevis* P5, *P.pentosaceus* 212에서 얻은 BSH 유전자 모두 overexpression 되었음이 확인되어 Ni-NTA resin을 이용해 분리정제 단계를 진행함(그림). BSH는 GDCA를 가수분해하여 DCA와 glycine 을 생성하고 (deconjugation) 이 과정에서 하얀 침전이 생기게 됨. 분리 정제한 3종류의 BSH 효소가 deconjugation 과정에서 만드는 하얀 침전 생성 시간을 측정함으로써 각 효소의 활성을 비교함.

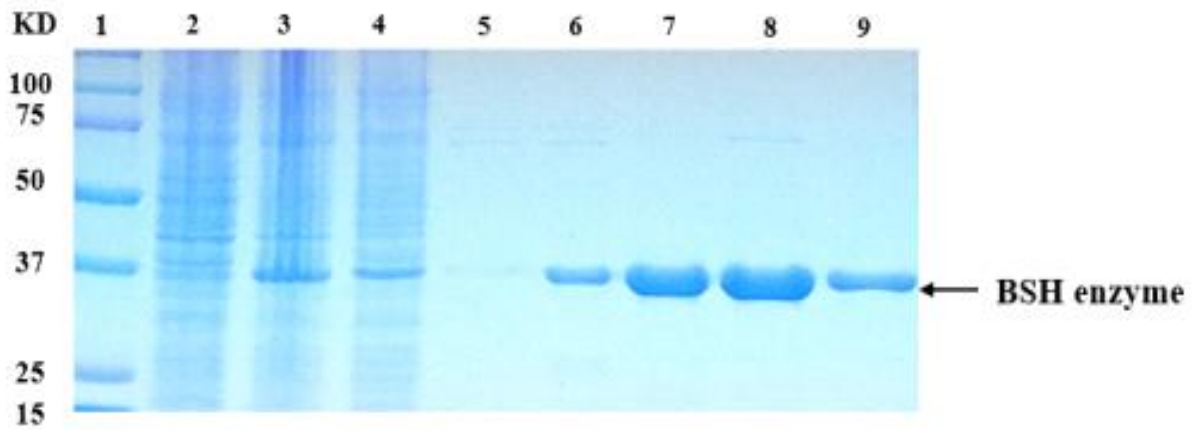


그림83. *L. plantarum* 54, *L. brevis* P5, *P. pentosaceus* 212에서 얻은 BSH 유전자 모두 overexpression 되었음이 확인되어 Ni-NTA resin을 이용해 분리정제 단계를 진행.

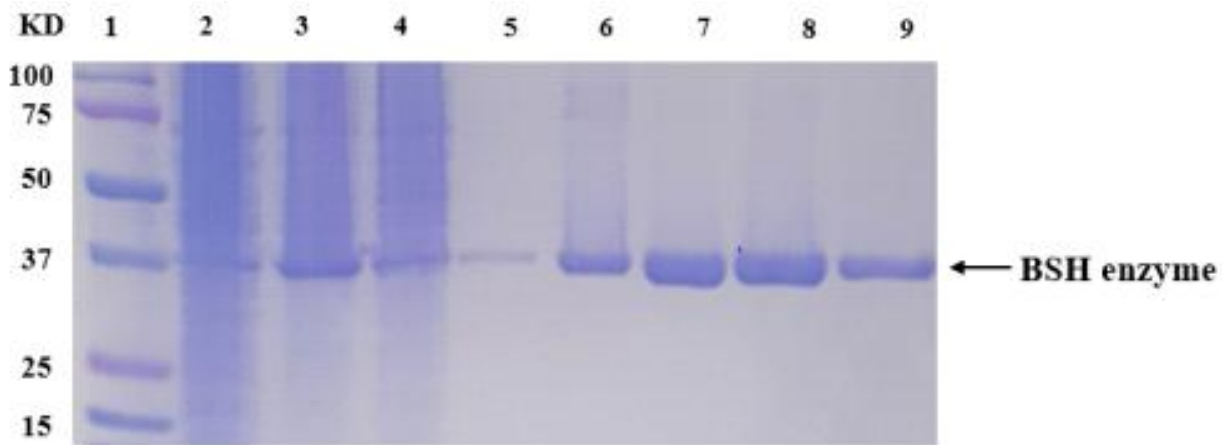


그림84. *L. plantarum* 54, *L. brevis* P5, *P. pentosaceus* 212에서 얻은 BSH 유전자 모두 overexpression 되었음이 확인되어 Ni-NTA resin을 이용해 분리정제 단계를 진행.

표75. SDS-PAGE 분석: 분리 정제한 3종류의 BSH 효소가 deconjugation 과정에서 만드는 하얀 침전 생성 시간을 측정함으로써 각 효소의 활성을 비교

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Sonication	30.0	26667	889	1	100
Desalting	5.4	6667	1235	1.39	25.0

One unit ; Enzyme with liberated 0.5 μ mol of glycine from the substrate per min (at 37 $^{\circ}$ C)

(4) BCAA균주의 성장 및 프로바이오틱 특성

- 치즈 종균으로 후보 균주가 인체에서 소화될 때 얼마나 생존율이 있는지 확인하기 위하여 LGG와 함께 6가지 *L. plantarum*을 비교하여 진행하였음. 이후 분리된 유산균의 BCAA 생성 능력을 확인하기 위하여 *L.fermentum* 선발하여 strain 3종의 생물학적인 특성을 살펴보았음. 전반적으로 LDTM 7301이 가장 사이즈가 크고 BCAAs 생합성의 Comparative metabolic pathway heatmap이 가장 높게 나타남. ATCC 14931도 Comparative metabolic pathway heatmap에서는 BCAA transaminase에서 LDTM 7301만큼 활성을 보임을 알 수 있었음.

표76. *L.fermentum* strain의 유전체 특성

Species	<i>Lactobacillus fermentum</i>			
	Strain	LDTM 7301	ATCC 14931 ^T	DSM 20055 ^T
Size (bp)		2,046,212	1,867,005	1,900,053
G+C content (%)		51.7	50.8	52.0
No. of CDSs		1,998	1,796	1,843
No. of contigs		1	74	102
N50 (bp)		2,046,212	219,560	43,184
rRNAs		15	4	3
tRNAs		58	56	48

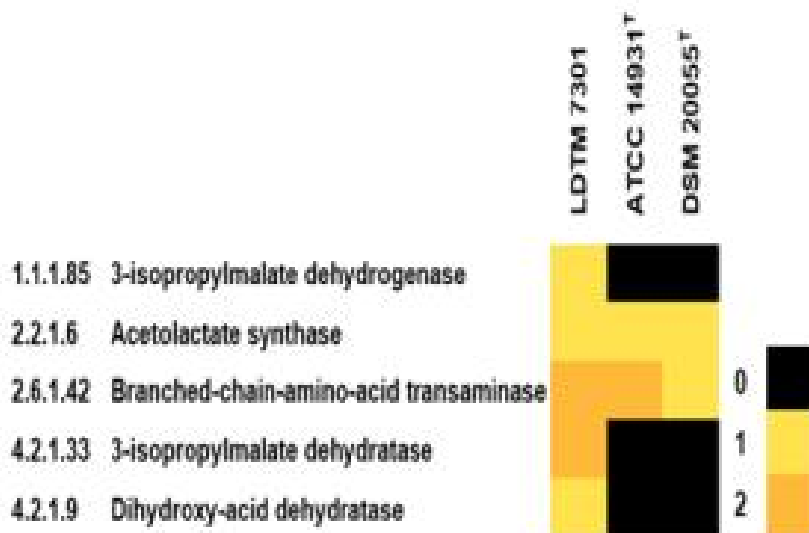


그림85. BCAAs 생합성의 Comparative metabolic pathway heatmap

- HPLC 분석 결과로 볼 때 BCAA 생산은 LDTM 7301에서 가장 높게 나왔고 DSM 20055 에서는 그보다 낮았지만 증가하는 경향을 보였음. ATCC 14931에서는 감소하는 경

향을 볼 수 있었고, 성장 곡선 실험에서도 LDTM 7301에서 가장 빠른 시간 내에 성장을 하였고, DSM20055에서 그다음 그리고 ATCC 14931은 가장 늦게 성장하는 것을 볼 수 있었음.

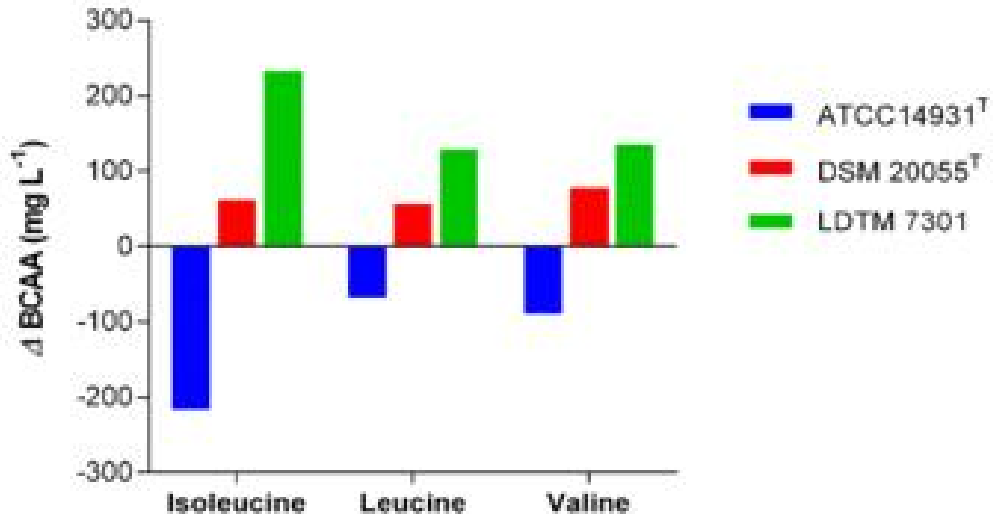


그림86. MRS배지에서 BCAAs 생산(HPLC)

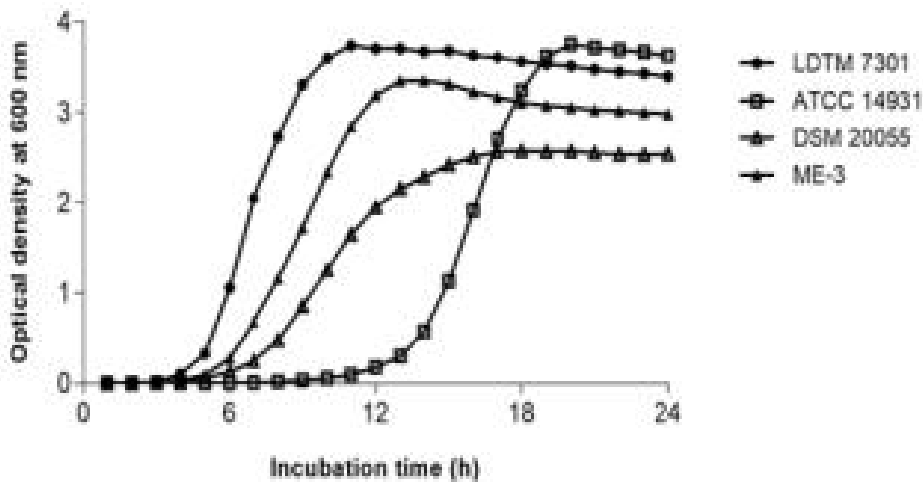


그림87. 37°C에서 BCAA생성 균주의 성장 곡선

2) 기능성 신규 종균을 이용한 기능성 치즈 제조 및 분석

표 77. 치즈 제조 공정 중의 pH, CFU/ml 분석

	LDTM + BCAA		LDTM + P3	
	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml

Starter 접종 전 (1h)	6.63		6.62	
렌넷 첨가 전 (1h)	6.56	4.E+06	6.53	2.E+07
교반 전 유청 (1h)	6.56	1.E+07	6.49	4.E+06
최종 유청 (1.25h)	6.53	3.E+06	6.48	2.E+06
최종 커드 (1.25h)	6.44	3.E+08	6.42	2.E+08
Overnight 후 최종 치즈 (19h)	5.82	3.E+08	6.08	5.E+08
염지 후 최종 치즈 (10h)	5.78	3.E+08	6.02	2.E+08

○ 선행 개발된 LDTM 스타터와 함께 콜레스테롤 저하 기능성 균주를 첨가하여 치즈제조를 진행함. 접종 이후 치즈 내 생균수를 보면 렌넷 첨가에 따른 커드 형성 과정에서 급격히 생균수가 증가하고 이후 완성 단계까지 10^8 CFU/ml(g) 이상의 수준을 유지하고 이에 따라 지속적으로 pH가 감소하여 치즈의 안정성을 보임을 알 수 있음.

표 78. 치즈 제조 후 pH, TA(%) 분석

	CHN		LDTM + BCAA		LDTM + P3	
	pH	TA(%)	pH	TA(%)	pH	TA(%)
0일차	5.52	0.149	5.52	0.155	5.57	0.16
2주차	5.73	0.146	5.47	0.205	5.40	0.182
4주차	5.73	0.164	5.44	0.202	5.42	0.193
8주차	5.82	0.160	5.50	0.180	5.44	0.187

○ 토종 유산균을 이용한 스타터 치즈(LDTM)와 이에 기능성 유산균(P3)을 추가하여 제조한 치즈를 Chr. Hansen CHN-11 제품으로 제조한 치즈와 비교하여 pH 및 TA(%)를 측정하였음(표). LDTM 기반 기능성 치즈들은 발효가 진행됨에 따라 CHN 치즈보다 더 낮은 pH를 유지하며 TA(%)는 더 높은 수준을 유지함. 따라서 신규 종균이 추가된 LDTM 스타터는 치즈 발효 중 유산 생성능이 상업 스타터를 사용한 CHN보다 높은 것으로 판단됨.

표 79. 치즈 제조 후 생균수 분석 (CFU/ml)

	CHN		LDTM + BCAA		LDTM + P3	
	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17
0일차	-	3.E+07	2.E+07	2.E+08	1.E+07	1.E+08
2주차	-	1.E+07	5.E+07	2.E+08	5.E+07	2.E+08
4주차	4.E+08	5.E+08	4.E+08	1.E+09	5.E+08	7.E+08
8주차	6.E+05	3.E+06	2.E+07	3.E+07	2.E+07	2.E+07

○ 기능성 균주가 첨가된 치즈들은 4주차에 1×10^9 CFU/g 수준까지 생균수가 증가한 후 8주차에는 10^7 수준으로 감소하여 CHN에 비해 약 10배 가량 생균수가 많은 것으로 나타남. 이는 기능성 균주를 추가하여 제조한 결과가 CHN보다 생균수가 안정적으로 감소함을

볼 수 있으며, 이는 기능성 신 규 종균의 치즈 숙성 개발이 안정적으로 완료됨

표 80. 치즈 제조후 일반성분 분석결과(단위:%)

	CHN		LDTM + BCAA		LDTM + P3	
	0개월	2개월	0개월	2개월	0개월	2개월
수분	39.58	32.22	43.56	36.68	42.16	37.52
단백질	23.03	28.27	22.47	25.66	22.36	24.84
지방	32.43	36.63	29.92	32.51	30.48	32.78
염분	1.55	1.73	1.38	1.77	1.64	1.77

○ 제조된 치즈별 수분, 단백질, 지방, 염분 분석결과는 표 81와 같음. 기능성 유산균을 첨가한 치즈 들은 제조 직후에도 비교군인 CHN 단일 치즈에 비해 일반 성분의 차이를 나타내며 발효 후를 살펴보면 수분 함량이 3~5% 높고 단백질과 지방은 2~4% 가량 낮은 특성을 나타냄.

표 81. 치즈 제조후 조직감 분석결과

	CHN		LDTM + BCAA		LDTM + P3	
	0개월	2개월	0개월	2개월	0개월	2개월
경도 (Hardness, kg)	0.43	0.57	0.59	0.57	0.59	0.51
응집성 (Cohesiveness, %)	1.44	1.53	1.49	1.65	1.49	1.52
탄력성 (Springiness, mm)	31.98	32.75	32.27	32.76	32.32	32.29
검성 (Gumminess)	0.61	0.87	0.88	0.95	0.88	0.78
씹힘성 (Chewiness)	19.52	28.58	28.39	31.08	28.50	25.04

○ CHN과 LDTM의 조직감 비교의 경우 발효 전후의 차이가 크게 나타나는 경향성을 보임. 기능성 종균 첨가 치즈에서는 LDTM 단일 치즈와 마찬가지로 CHN에 비해 경도, 검성, 씹힘성이 낮게 나타남. 따라서 스타터 외 첨가된 기능성 유산균에 의한 치즈 발효 특성 변화가 일반성분 및 조직감에 영향을 주는 것을 확인함.

3. 신규 중균 치즈의 효능 검증을 위한 동물실험

○ 고 콜레스테롤 사료 (D12336, Reserach diet) 와 일반 사료 (D10001, Reserach diet) 를 4주간 그룹별로 급여하였음. 그룹은 균 그룹과 치즈 그룹으로 나누어 진행함. 균 그룹은 (1) ND (D10001, normal diet), (2) HCD (D12336, high cholesterol diet), (3) HCD+P3 (D12336+*L. plantarum* P3), (4) HCD+W (D12336+*L. plantarum* WSCF1) 으로 각 프로바이오틱스를 1×10^9 CFU/ml 경구투여를 진행함. 치즈 그룹은 (1) ND+CHN, (2) ND+LDTM, (3) ND+P3, (4) HCD+CHN, (5) HCD+LDTM, (6) HCD+P3 C 으로 마리 당 프로바이오틱 치즈를 0.5 g/daily 급여하였음.

○ 4주간의 프로바이오틱스, 치즈 급여 후 심장에서 혈액을 채취함. 원심분리를 통해 serum을 얻었으며, 총 콜레스테롤과 중성 지방을 정량 키트를 이용하여 측정함. HDL-C 와 LDL-C는 삼광의료재단을 통해 분석. 측정 결과는 아래와 같음.

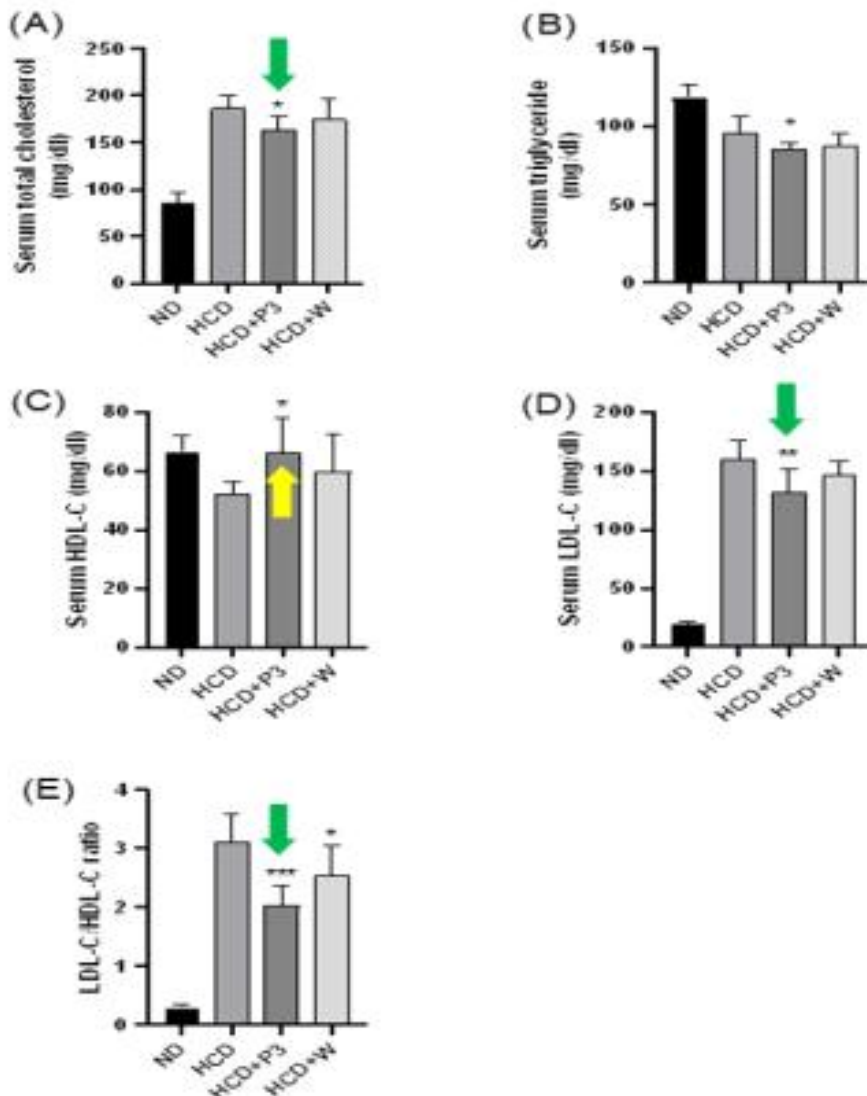


그림88. 콜레스테롤 저하 균주의 serum lipid levels을 그룹별로 나타냄. (A)TC,

(B)TG,(C)HDL-C, (D)LDL-Cand (E)LDL-C/HDL-Cratioin probiotics group of hypercholesterolemic mice. Data are expressed as means standard deviation for 8 mice in each group. p-values were determined using a one-way ANOVA (*P<0.05,**P<0.01,and***P<0.001).Unpublished data

- LDL/HDL 비율에서 유의차 있게 낮아지는 결과로 균주 자체의 LDL 억제 효과를 확인할 수 있음.

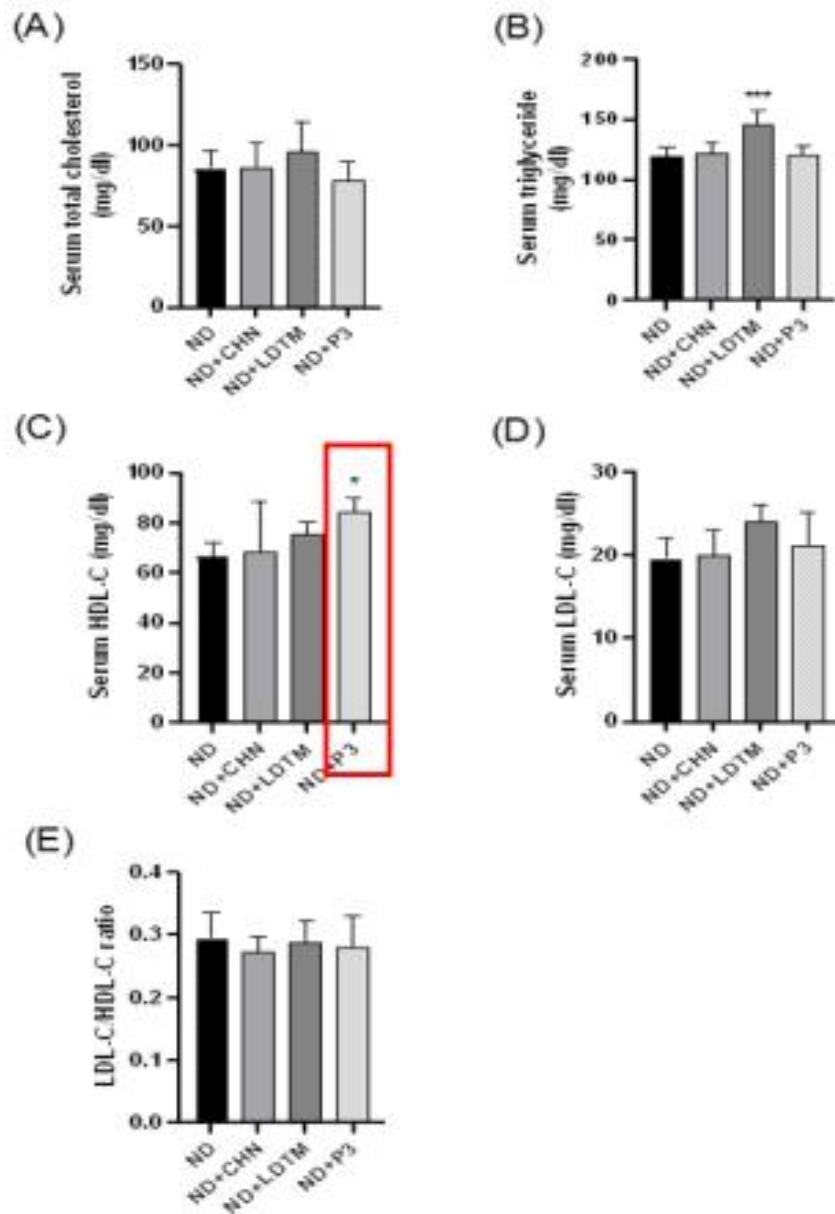


그림89. 콜레스테롤 저하 군주가 들어간 치즈의 serum lipid levels을 그룹별로 나타냄. (A) TC, (B) TG, (C) HDL-C, (D) LDL-C and (E) LDL-C/HDL-C ratio in normal diet with cheese group of hypercholesterolemic mice. Data are expressed as means standard deviation for 8 mice in each group. p-values were determined using a one-way ANOVA (*P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001). **Unpublished data**

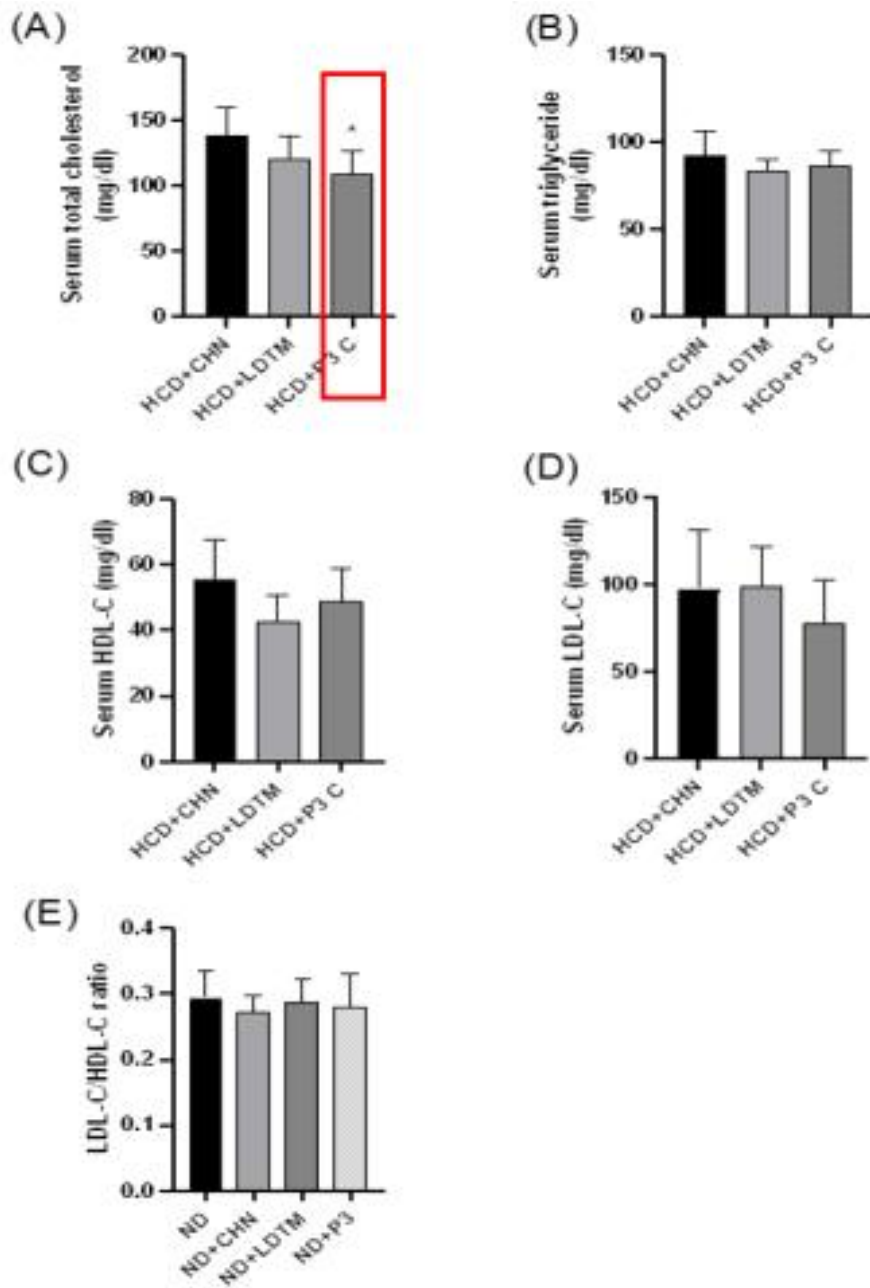


그림 90. Serum lipid levels의 콜레스테롤 저하군주의 효능 (A) TC, (B) TG, (C) HDL-C, (D) LDL-C and (E) LDL-C/HDL-C ratio in high cholesterol diet with cheese group of hypercholesterolemic mice. Data are expressed as means \pm SD (n = 8). p-values were determined using a one-way ANOVA (*P<0.05,**P<0.01,and***P<0.001).

○ 일반 사료를 먹인 그룹에 비해 고 콜레스테롤 사료를 먹은 그룹은 간 크기가 컸으며 무게

가 더 높았으나 프로바이오틱스 섭취는 간 무게에 영향을 미치지 않았음. H&E 결과 HCD 그룹의 경우 핵의 크기가 커진 것을 확인. 프로바이오틱스를 급여한 그룹은 HCD 그룹에 비해 간세포 간극이 감소함

표 82. Hypercholesterolemic mice에서 Liver weights

	Group	Liver (g)
Probiotics	Control	0.87 ± 0.06
	HCD	1.28 ± 0.26
	HCD+P3	1.20 ± 0.10
	HCD+W	1.27 ± 0.08
cheese	Con+CHN	0.84 ± 0.09
	Con+LDTM	0.84 ± 0.07
	Con+P3	0.76 ± 0.04
	HCD+CHN	1.05 ± 0.19
	HCD+LDTM	0.96 ± 0.10
	HCD+P3	1.00 ± 0.14

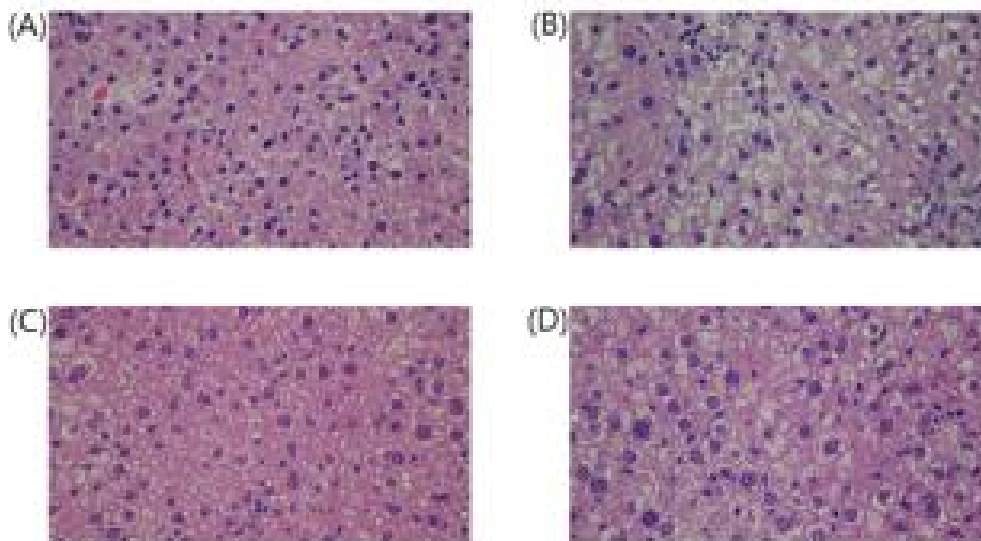


그림91. Hypercholesterolemic miced의 Hepatic lipid deposition과 liver tissue에서 콜레스테롤 저하 균주의 효능. The liver sections were stained hematoxylin and eosin (H&E) and observed under a light microscope (n = 8 per group). (A) Control group; (B) HCD group; (C) HCD+P3 group; and (D) HCD+W group

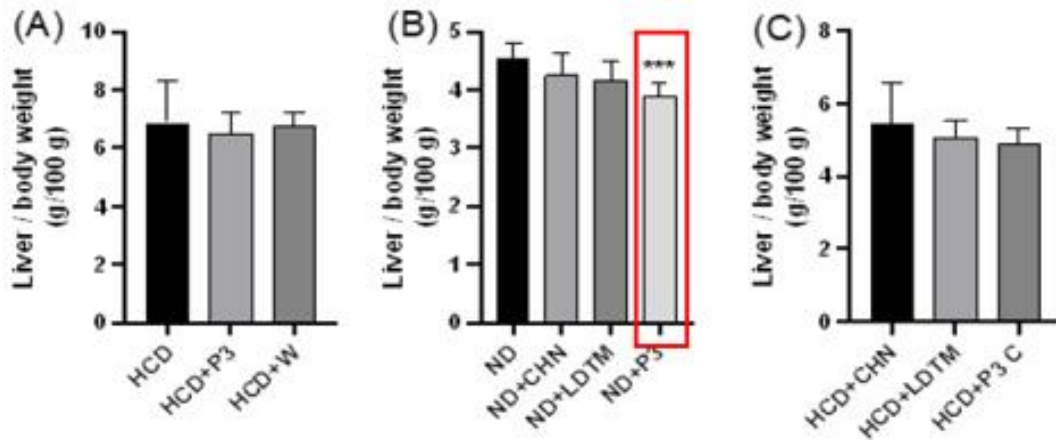


그림 92. Body weights당 Liver weights 측정값 (A) ND diet and (B) HCD diet cheese group of hypercholesterolemic mice (*P<0.05,**P<0.01,and***P<0.001). **Unpublished data**

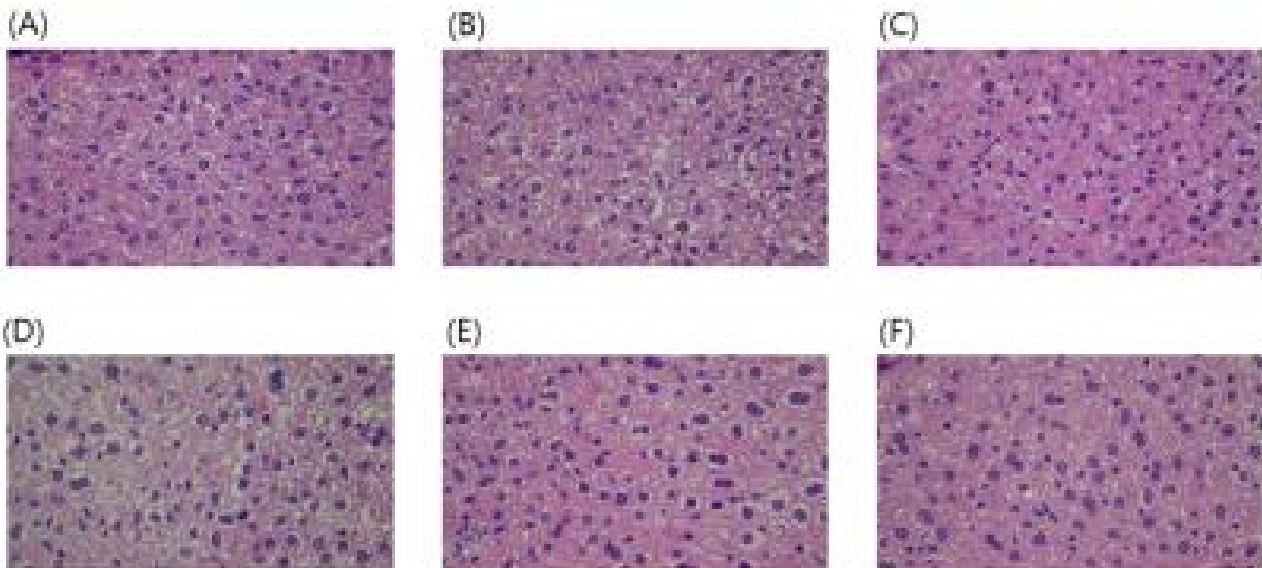


그림 93. Hypercholesterolemic miced의 Hepatic lipid deposition과 liver tissue에서 콜레스테롤 저하 균주의 효능. The liver sections were stained hematoxylin and eosin (H&E) and observed under a light microscope (n = 8 per group). (A) ND+CHN group; (B) ND+LDTM group; (C) ND+P3 group; (D) HCD+CHN group; (E) HCD+LDTM group; and (F) HCD+P3 C group. **Unpublished data**

- 치즈 그룹은 (1) ND+CHN, (2) ND+LDTM, (3) ND+P3,C 으로 나누어 투여시 마리 당 프로바이오틱 치즈를 0.5 g/daily 급여한후 간 크기를 측정하였음,
- 그림에서 보는 바와 같이, *L. plantarum* P3 치즈 그룹의 간 무게는 ND group에 비해 유의하게 감소하였음. 또한 diet에 상관없이 간세포 간극이 감소한 것을 확인.

○ *L. plantarum* P3 의 콜레스테롤 저하 기작을 확인하기 위해 각 그룹간 LXR, FXR, PPAR, CYP8B1, CYP7A1, ABCG5/8, NPC1L1, LDLR 유전자 발현량을 비교하였음.

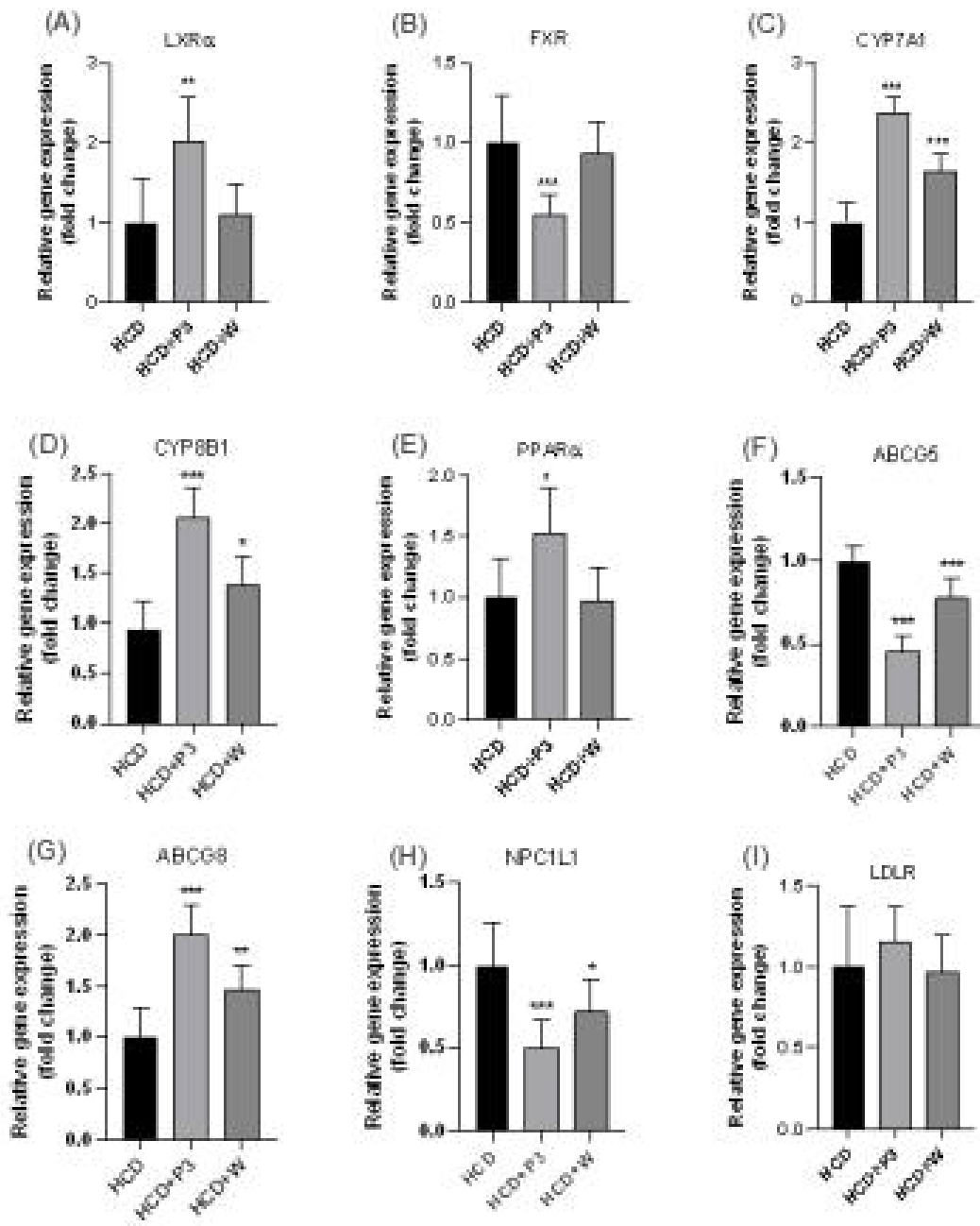


그림 94. Hypercholesterolemic mice의 probiotics group에서 콜레스테롤 저하 균주의 효능 확인을 위한 Bile acid와 cholesterol mechanism이 포함된 key genes의 발현량 측정. (A) Expression of hepatic LXR; (B) expression of hepatic FXR; (C) expression of hepatic CYP7A1; (D) expression of hepatic CYP8B1; (E) expression of hepatic PPAR; (F) expression of hepatic ABCG5; (G) expression of hepatic ABCG8; (H)

expression of hepatic NPC1L1; and (I) expression of hepatic LDLR. p-values were determined using a one-way ANOVA (*P<0.05,**P<0.01,and***P<0.001).Unpublished data

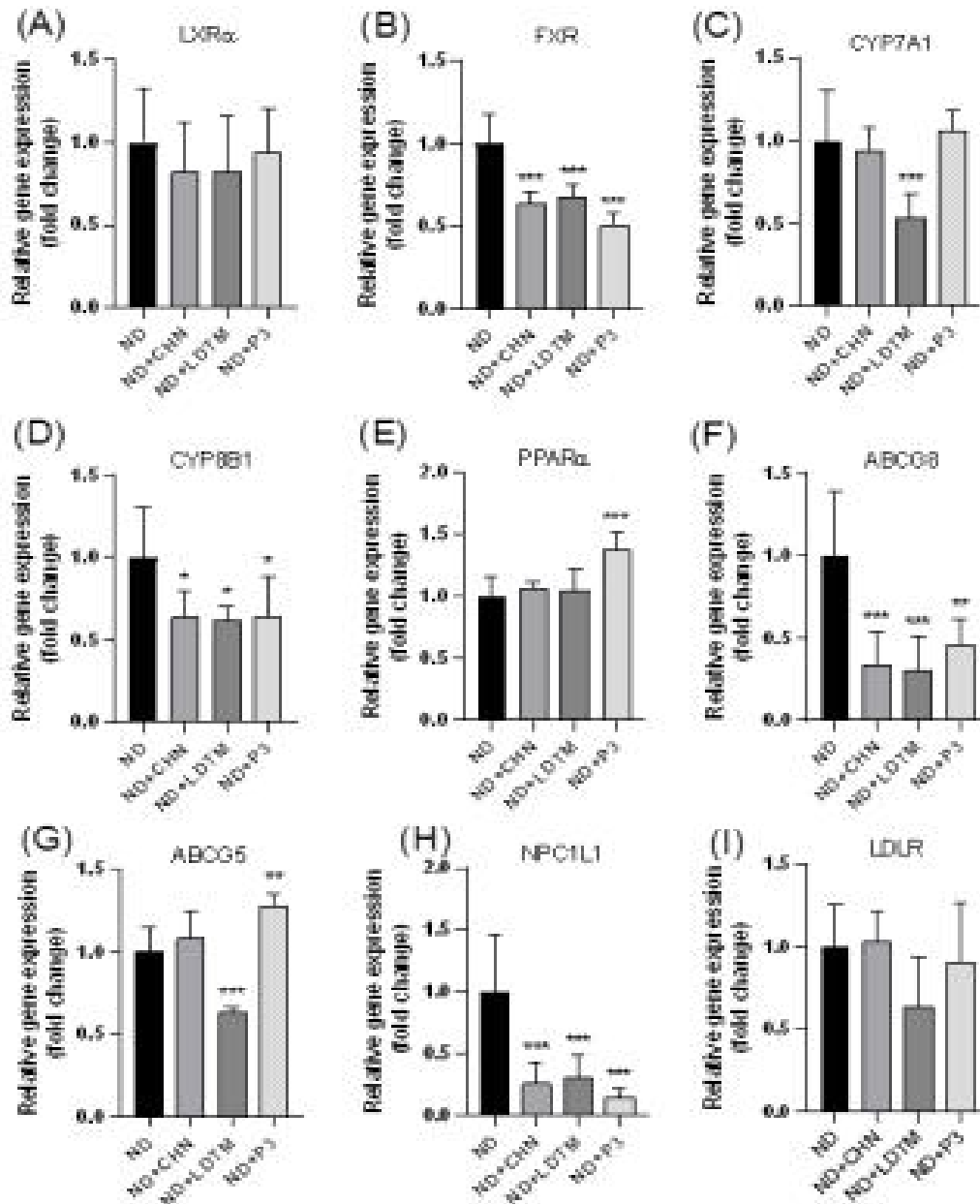


그림 95. Hypercholesterolemic mice의 ND diet cheese group에서 콜레스테롤 저하 군주의 효능 확인을 위한 Bile acid와 cholesterol mechanism이 포함된 key genes의 발현량 측정. (A) Expression of hepatic LXR; (B) expression of hepatic FXR; (C) expression of hepatic CYP7A1; (D) expression of hepatic CYP8B1; (E) expression of hepatic PPAR; (F) expression of hepatic ABCG8; (G) expression of hepatic ABCG5; (H) expression of hepatic NPC1L1; and (I) expression of hepatic LDLR. p-values were determined using a one-way ANOVA (*P<0.05,**P<0.01,and***P<0.001).Unpublished data

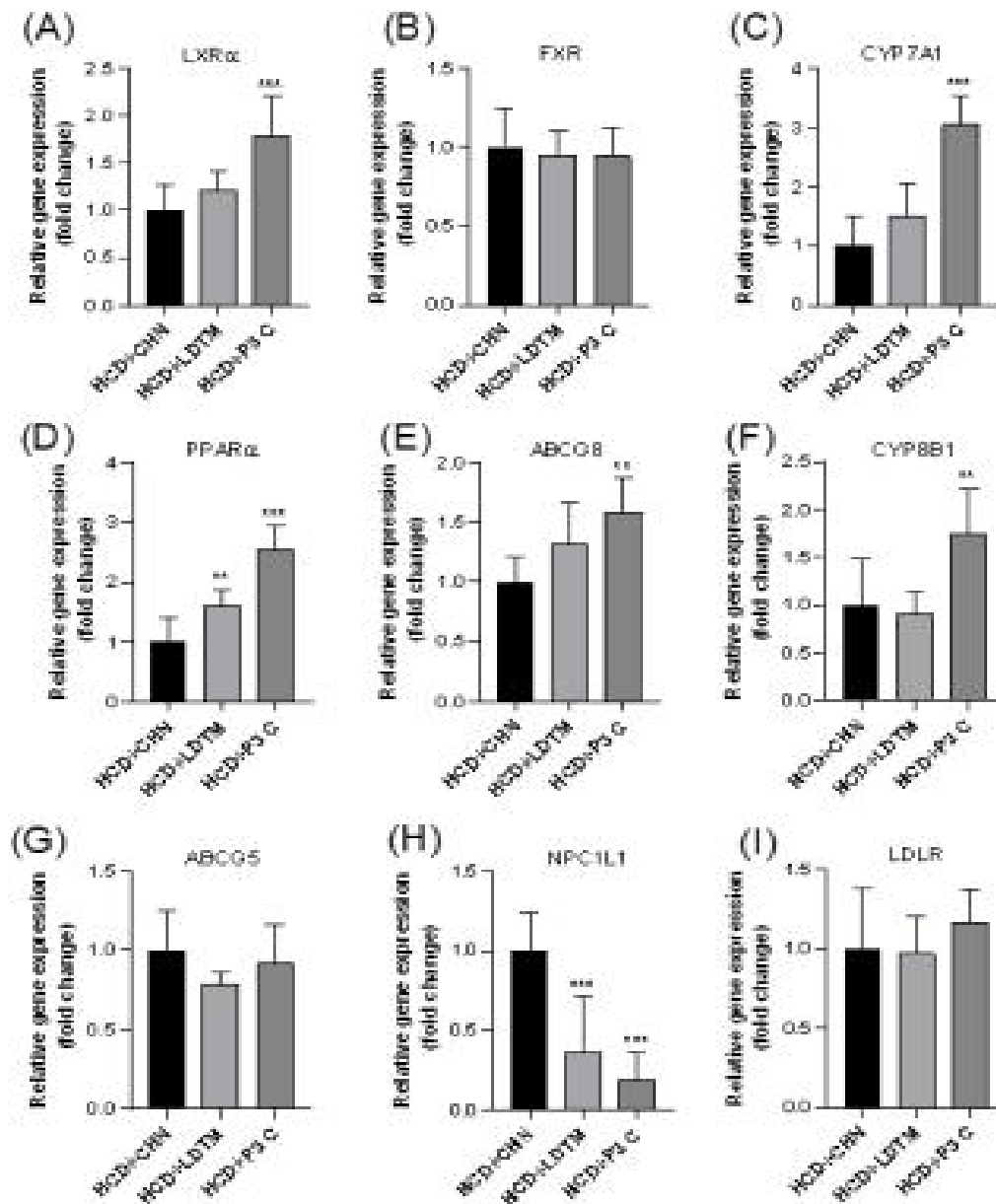


그림 96. Hypercholesterolemic mice의 HCD diet cheese group에서 콜레스테롤 저하 군주의 효능 확인을 위한 Bile acid와 cholesterol mechanism이 포함된 key genes의 발현량 측정. (A) Expression of hepatic LXR; (B) expression of hepatic FXR; (C) expression of hepatic CYP7A1; (D) expression of hepatic PPAR; (E) expression of hepatic ABCG8; (F) expression of hepatic CYP8B1; (G) expression of hepatic ABCG5; (H) expression of hepatic NPC1L1; and (I) expression of hepatic LDLR. p-values were determined using a one-way ANOVA (*P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001). Unpublished data

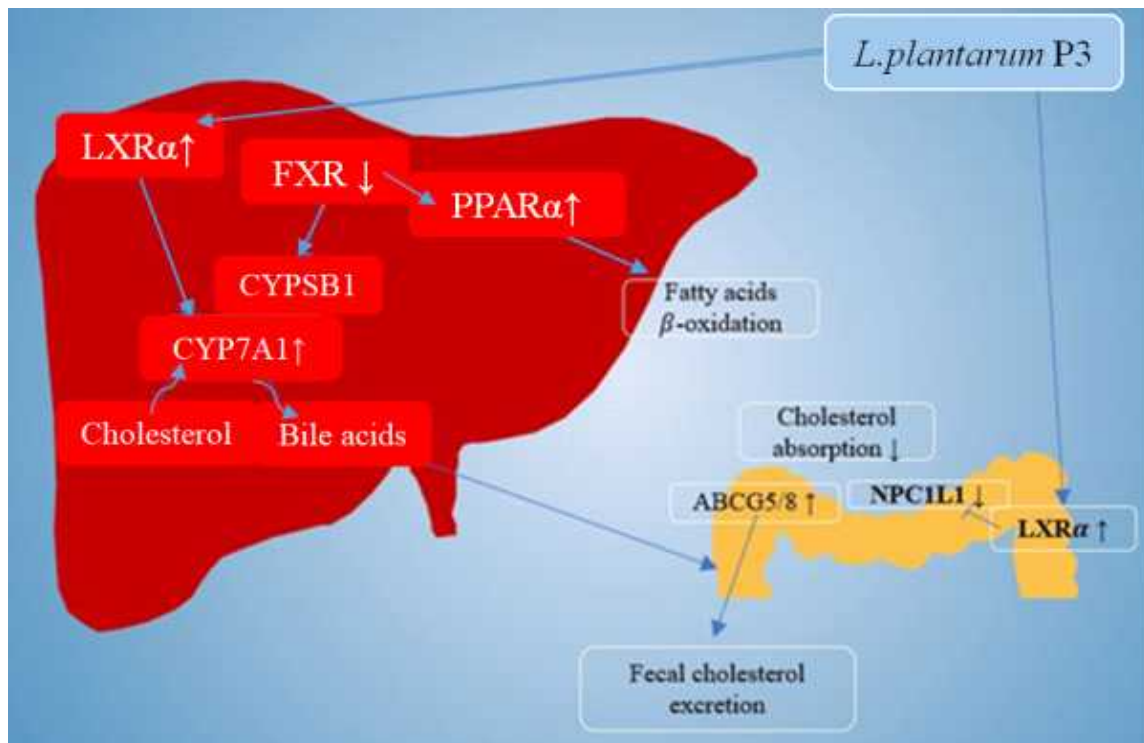


그림 97. Proposed mechanism for *L. plantarum* P3 reduces cholesterol level

○ BSH 활성 균주 *L. plantarum* P3는 conjugated bile acid를 deconjugation 시킬 수 있음. BSH에 의해 생성된 Unconjugated bile acid는 수용성이 낮기 때문에 분변으로 배출되고¹⁷⁾, 이로 인해 담즙산의 재흡수가 감소함. 간에서는 bile acid 항상성을 유지하기 위해 담즙산 신생성경로를 활성화시킴. FXR이 down-regulation 되고 CYP7A1 과 CYP8B1을 up-regulation 시켜 콜레스테롤을 bile acid로 전환하여 콜레스테롤 소모를 촉진함. 또한, *L. plantarum* P3는 LXRα와 PPARα의 agonist로 작용하여 beta-oxidation과 콜레스테롤 배출을 촉진하여 혈중 콜레스테롤과 중성지방을 감소시킴. 이러한 작용은 P3 균주를 포함시킨 치즈에서도 확인됨.

○ 근육강화 기능성 치즈 스타터 유산균 개발 (*in vivo* 효과 확인)

· 근육강화 기능성 균주의 *in vivo* 효과 확인

*마우스: (주)대한바이오텍에서 5주령의 female C57BL6/J 일반 자유 식이

*처리구(3개): 대조군 (균주 미급여), 실험군 1 *L. plantarum* D2-1 (1×10^9 CFU/day 경구 투여), 실험군 2 *L. plantarum* WCFS1 (1×10^9 CFU/day 경구 투여)

*분석항목: 장내균총 변화, 운동능력 세부 측정. 근육량

17) Ger P.A. Bongaerts et al. 2000. Bile acid deconjugation by Lactobacilli and its effects in patients with short small bowel. J Gastroenterol 35:801-804

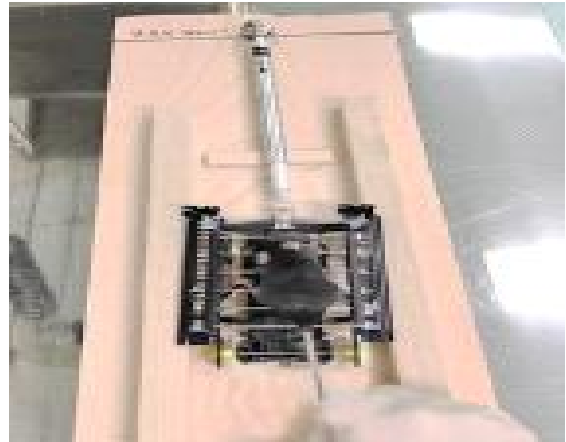


그림98. 근육강화 기능성 치즈 균주의 *in vivo* 효과 확인 방법 (Rota rod, Modified grip strength meter)

1) 장내균총 변화

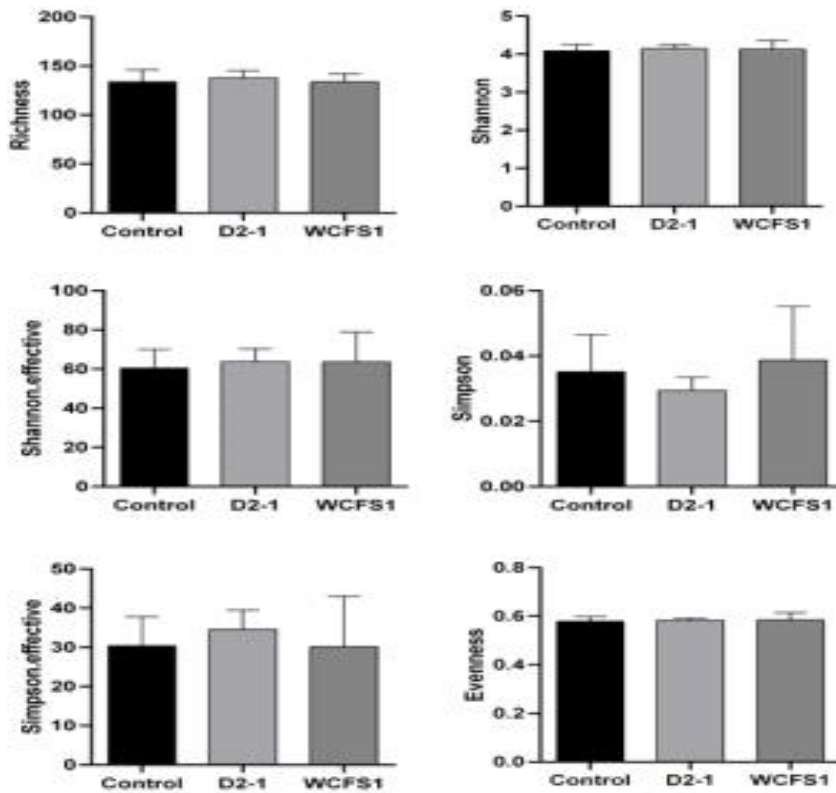


그림 99. *Alpha*-diversity of the cecum sample. Unpublished data

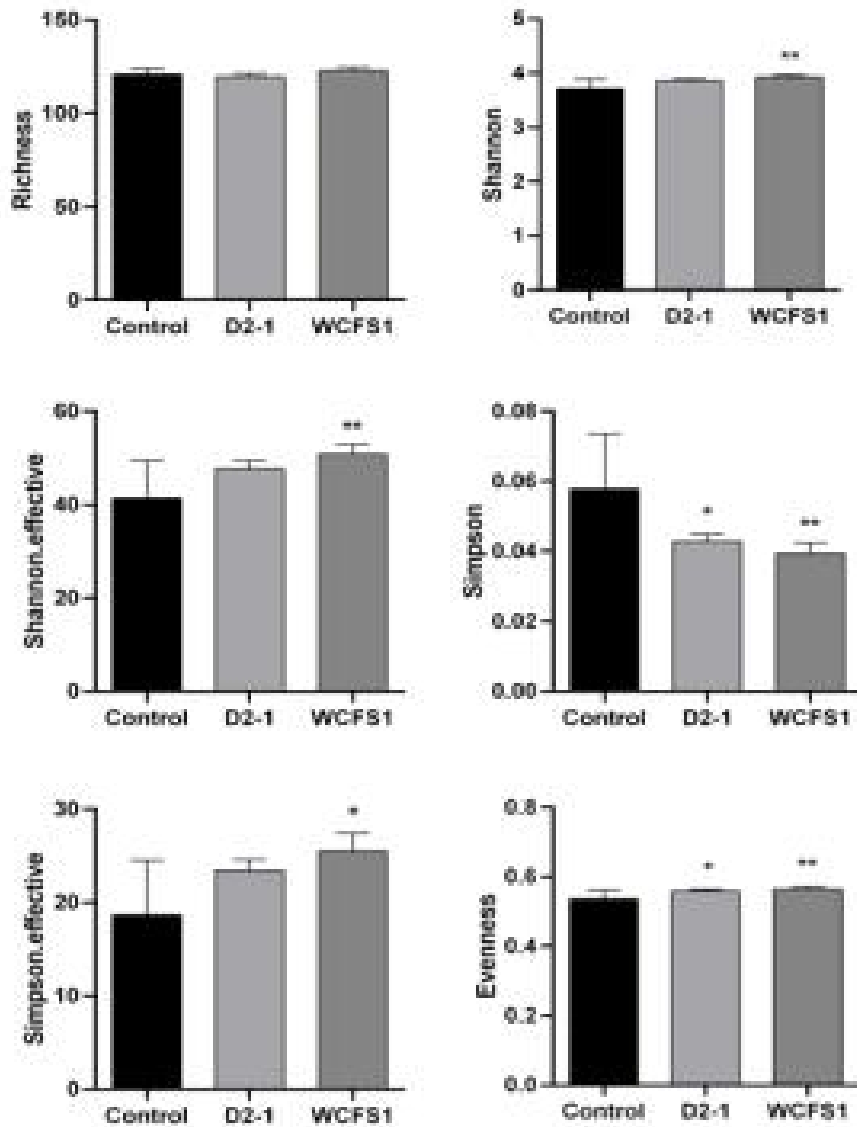


그림 100. *Alpha*-diversity of the fecal sample. **Unpublished data**

- Alpha-diversity에서 WCFS1은 Shannon, Simpson, Evenness에서 유의성을 보였고, D2-1은 Simpson에서 유의성 있게 낮아짐.

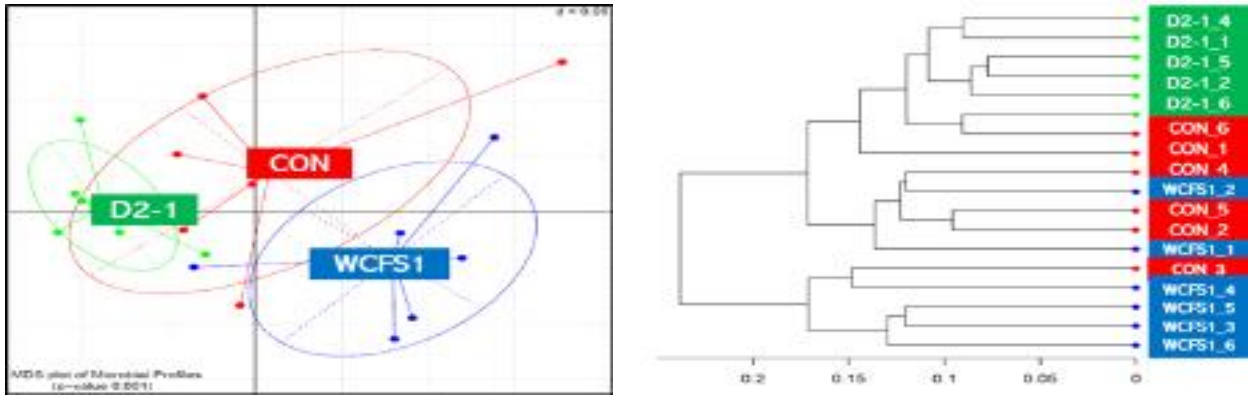


그림 101. Beta-diversity of cecum sample.
 (a) multi-dimensional scaling (MDS) plot (b) phylogram.

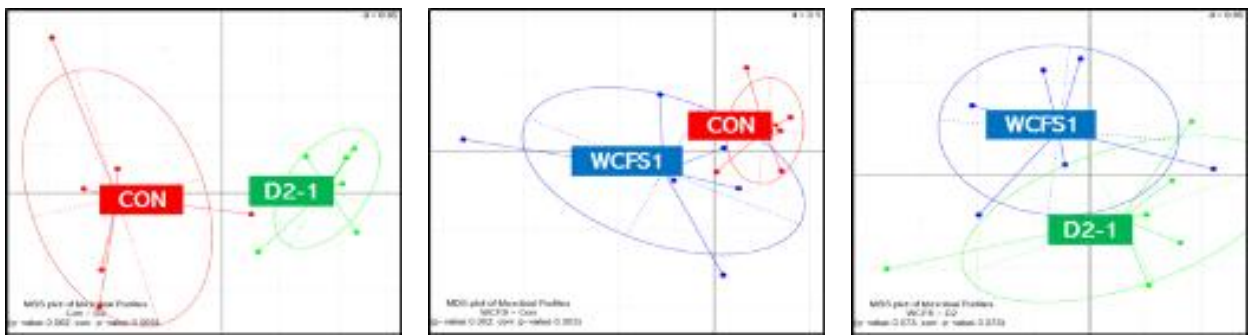


그림 102. Pairwise comparison of the cecum sample.

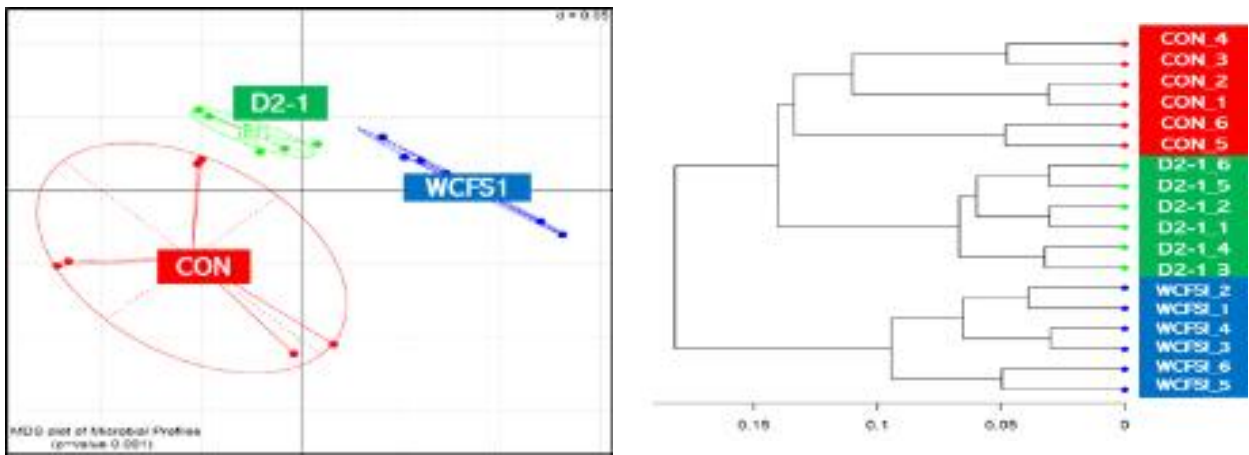


그림 103. Beta-diversity of feces sample Unpublished data
 (a) multi-dimensional scaling (MDS) plot (b) phylogram.

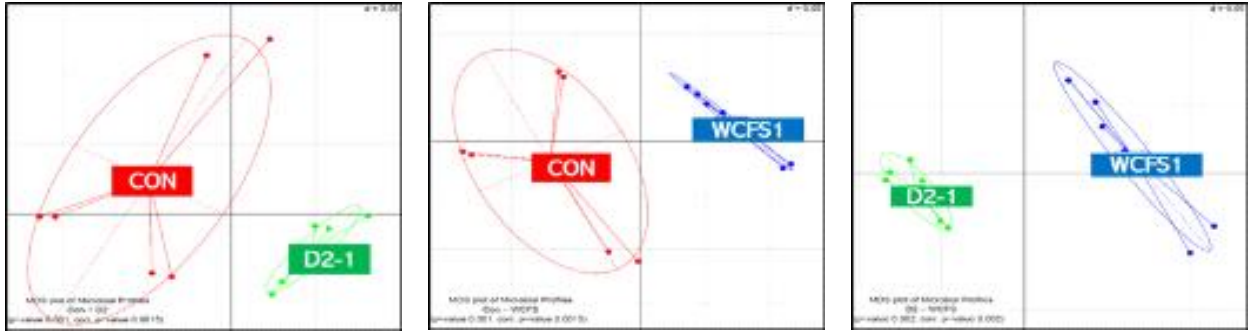


그림 104. Pairwise comparison of the feces sample. Unpublished data

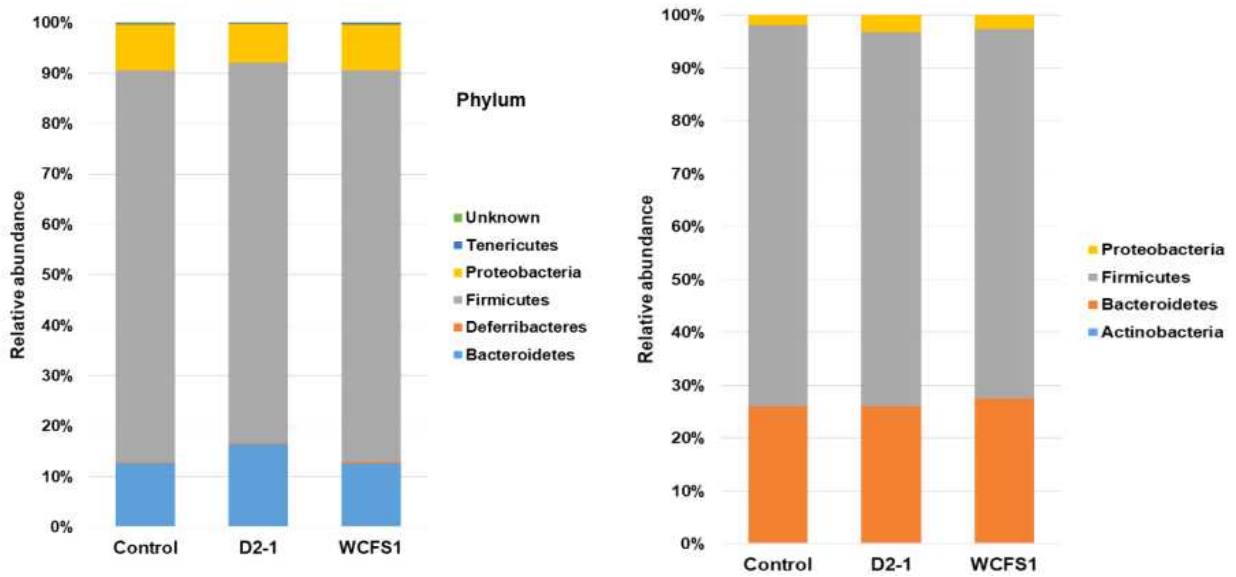


그림 105. Relative abundance of classification at the phylum level
(a) cecum (b) feces Unpublished data

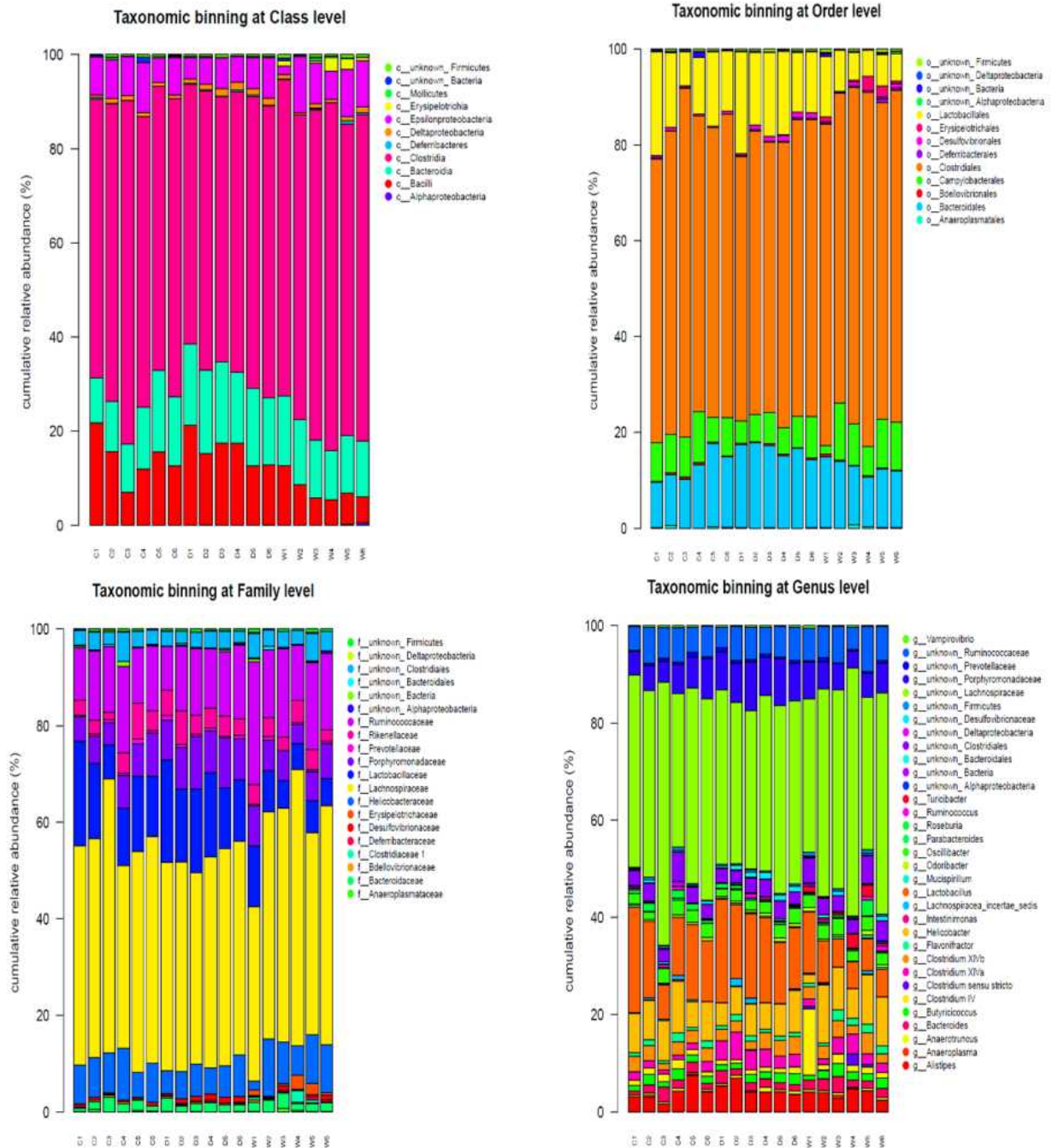


그림 106. Relative abundance of classification at the class, order, family and genus level in cecum. Unpublished data

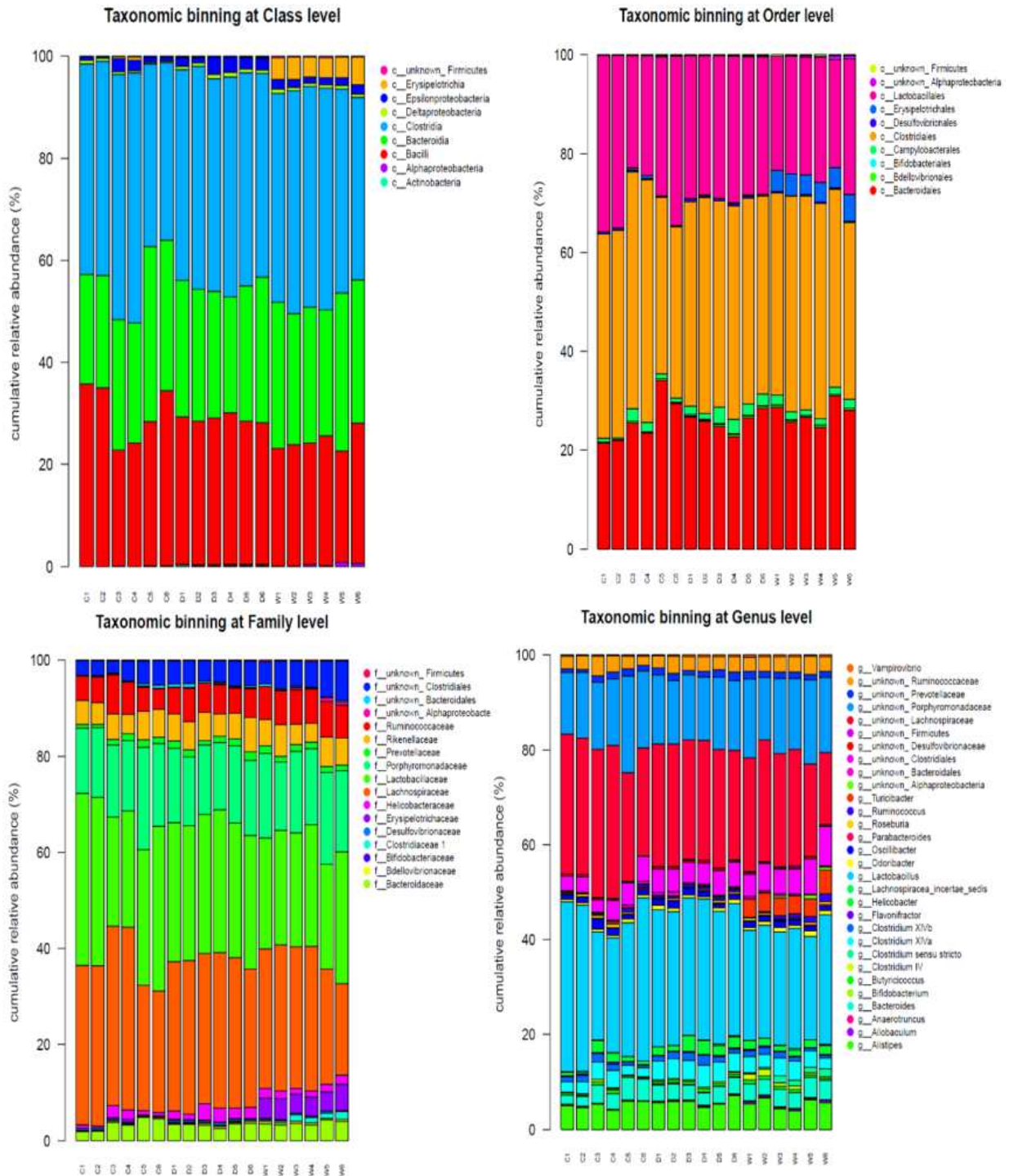


그림 107. Relative abundance of classification at the class, order, family and genus level in fecesUnpublished data

- 장내균총 변화: phylum 에서 genus level까지 장내균총 변화를 측정하였음. Cecum에서는 feces 보다 phylum *Firmicutes* 가 높게 측정되었음. 본 실험은 Dufrene 과 Legendre¹⁸⁾ 방법으로 진행함. D2-1에서 phylum *Actinobacteria* 가 feces에서 높게 나타났음. D2-1은 *Clostridium* cluster XIVa¹⁹⁾와 *Bifidobacterium*이 증가한 반면 WCFS1은 *Turicibacter*,

18) Dufrene, M., and P. Legendre. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67:345-366.

Clostridium, *Allobaculum*,와 *Parabacteroides*가 증가함. alpha-diversity 가 WCFS1에서 더 증가한 것처럼 indicator가 D2-1보다 WCFS1에서 더 증가함을 볼 수 있음.

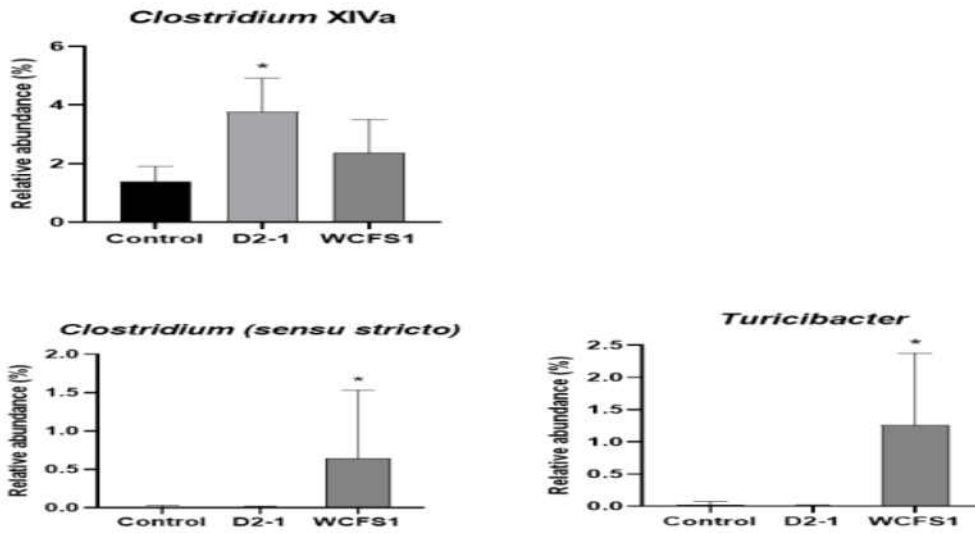
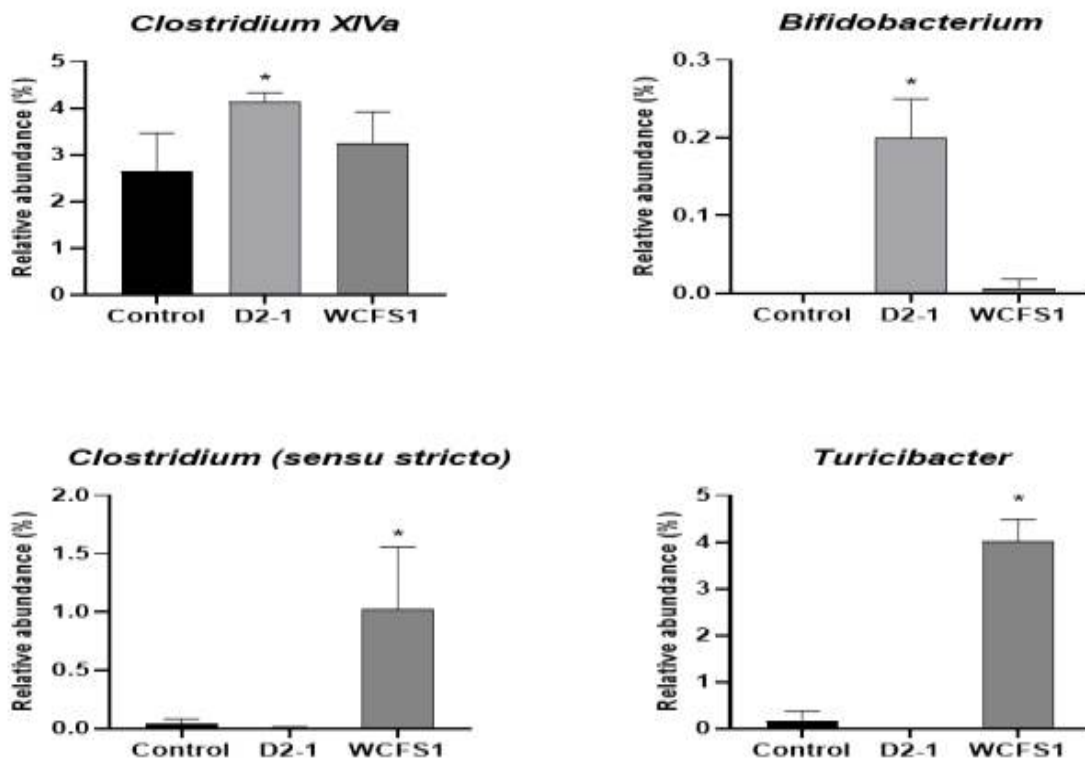


그림 108. Relative abundance of specific strains modulated in cecum microflora



19) Julie Paquet et al. 2000. Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters. International Dairy Journal vol. 10(5-6), 391-399

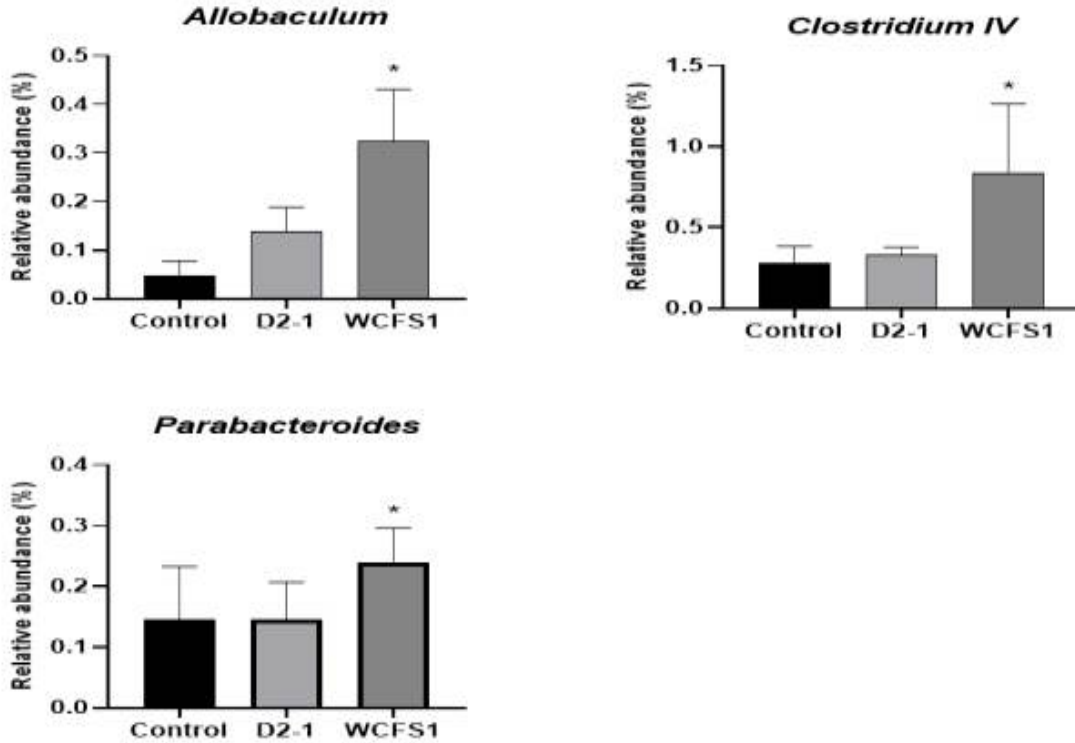


그림 109. Relative abundance of specific strains modulated in feces microflora
Unpublished data

- Rota rod test: 그림 43과 같이 20rpm에서 15분 가속(20-50rpm)에서 5분 측정함. 본 결과 유의 차이는 없었으나 D2-1 그룹이 가장 높은 경향을 보임.

표 83. 각 그룹의 Rota-rod test 결과

	Control	D2-1	WCFS1
Distance (m)	469.14 ± 245.2	525 ± 141.8 ^{n.s.}	492.57 ± 85.4 ^{n.s.}
Drop time (sec.)	17 ± 11.2	18.65 ± 7.2 ^{n.s.}	16.60 ± 4.4 ^{n.s.}

Values indicate mean ± SD.

^{n.s.} means no significant difference.

- Grip strength test: 유의차 있게 LAB처리 그룹이 높았고 두 그룹 중에서는 유의성은 없었으나 D2-1 그룹이 가장 높은 경향을 보임

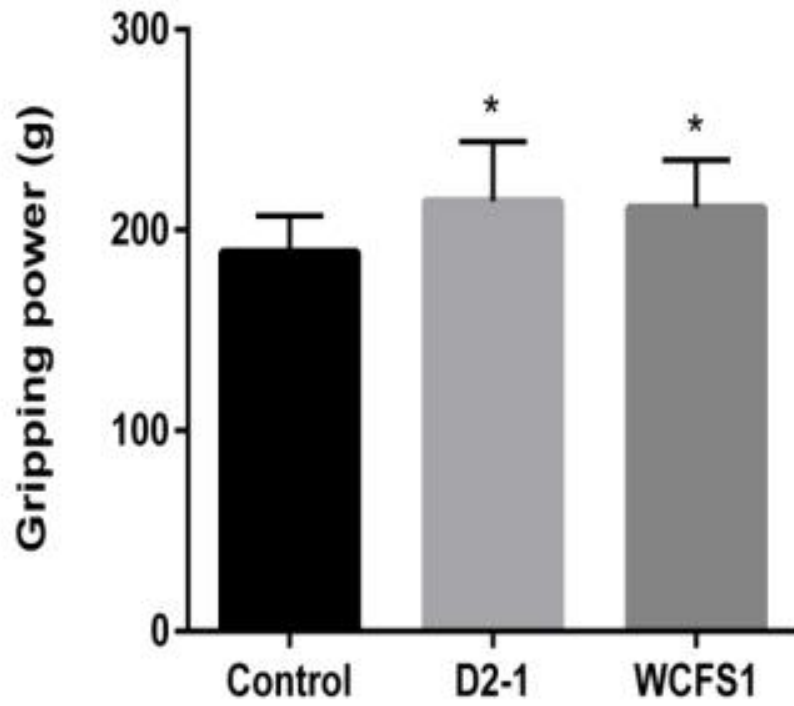


그림 110. Effect of LAB on gripping power (g) (n=9).
 Unpublished data

- **Hind limb muscles:** 각 그룹의 Hind limb muscles을 그룹별 Body weight에 대비하여 통계처리함. 본 결과 D2-1에서 유의성 있게 가장 높은 결과를 보임.

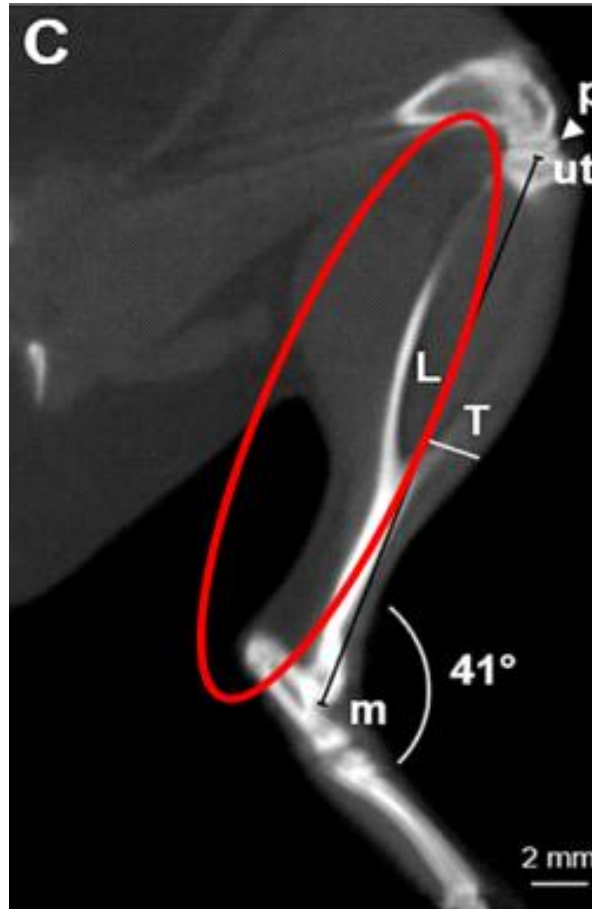


그림 111. Hind limb muscle mass의 Micro-CT evaluation²⁰⁾

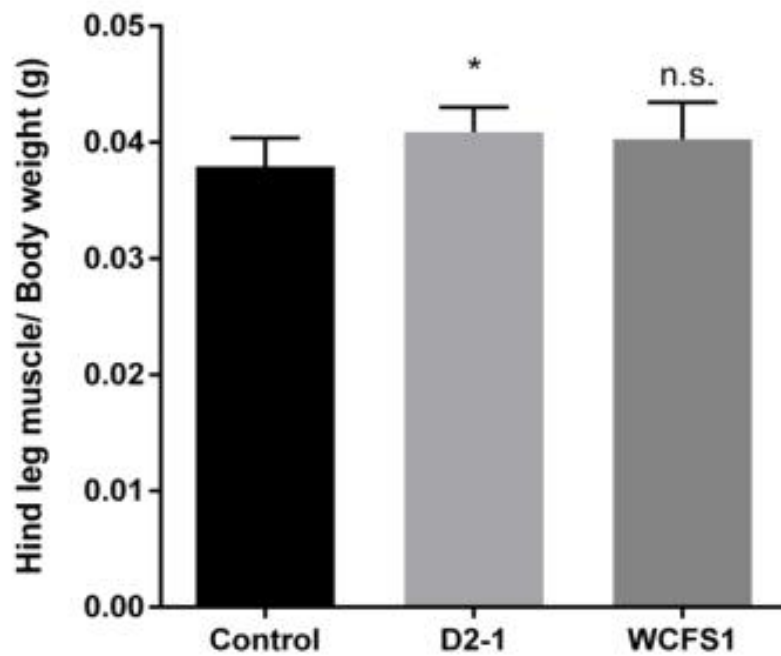


그림 112. 근육강화 기능성 균주의 Hind limb muscle 증가 효과 Unpublished data
 - biochemical serum 분석: Serum glucose level은 균주 투여 그룹에서 감소하였고 blood

20) Pasetto L, et al. (2018) Micro computed tomography for non-invasive evaluation of muscle atrophy in mouse models of disease. PLoS ONE 13(5): e0198089

lipid의 indicator인 TG는 증가하는 하였음. CK 수치는 운동 후 부족한 ATP로 인하여 증가하였고 D2-1 그룹은 상대적으로 낮은 수치를 보임. 부상 index인 LDH은 WCFS에서 가장 감소하였음. 종합적으로 D2-1에서 glucose 감소 TG 증가와 CK 증가 경향을 볼 때 energy metabolism 운동 후 적합함을 볼 수 있었음²¹⁾²²⁾.

표 84. 각 그룹의 serum biochemical analysis 결과

Parameter	Post-exercise		
	Control	D2-1	WCFS1
Glucose (mg/dL)	117.3 ± 207	94.7 ± 16.7 ^{n.s.}	104.7 ± 14 ^{n.s.}
TG (mg/dL)	26.7 ± 13	22.3 ± 6.8 ^{n.s.}	21.7 ± 9.6 ^{n.s.}
CK (U/L)	168 ± 82.5	61.7 ± 29 ^{n.s.}	80.3 ± 63.4 ^{n.s.}
LDH (U/L)	369.7 ± 24.4	320 ± 42.3 ^{n.s.}	246.7 ± 50.5 ^{n.s.}
Lactate (mmol/L)	4.17 ± 0.05	3.29 ± 0.71 ^{n.s.}	4.00 ± 0.2 ^{n.s.}

Values indicate mean ± SD for n=6 mice each of post-exercise group.

TG, triacylglycerol; CK, creatine kinase; LDH, lactate dehydrogenase.

^{n.s.} means no significant difference compared with post-exercise control.

- 본 근육강화 기능성 치즈 스타터 유산균 개발 실험은 *in vivo* 효과 확인하여 (주)대한바이오링 크에서 5주령의 female C57BL6/J로 진행함. 유의차이가 있게 지표가 개선된 부분과 유의차이는 없어지만 개선된 경향을 보임. 이는 D2-1 균주가 근육강화 기능성 치즈 스타터로서 적합함을 볼 수 있음.

- 치즈 유산균의 경제성 분석

구분	금액(단위: 천원)
원료유	13,840
유산균	5,910
고용노동비	1,674
검사비	1,521
소계	22,945
상각비	12,667
전기료	5,800

21) Hsu, Y. J., Huang, W. C., Lin, J. S., Chen, Y. M., Ho, S. T., Huang, C. C., and Tung, Y. T. (2018) Kefir supplementation modifies gut microbiota composition, reduces physical fatigue, and improves exercise performance in mice. *Nutrients* 10.

22) Chen, Y. M., Wei, L., Chiu, Y. S., Hsu, Y. J., Tsai, T. Y., Wang, M. F., and Huang, C. C. (2016) *Lactobacillus plantarum* TWK10 Supplementation Improves Exercise Performance and Increases Muscle Mass in Mice. *Nutrients* 8: 205.

수리비	7,600
포장재 등 기타	135
소계	69,617
자가노력비	4,454
자본이자(고정)	3,167
자본이자(유동)	1,424
산비	78,662
총수입	109,800
소득	40,183
순소득	31,138

- 2018년 축산기술개발 경제성 분석 방법 및 사례(국립축산과학원)를 기반으로 분석.
유산균의 비용은 차이가 나지 않지만 경제성을 분석해보면 치즈 스타터는 수입산 대다수 존재하며 국내에 수입되는 미생물 종균은 연간 1억 달러임. 이중 발효 종균은 4,400만 달러에 달하고 있음. 이에 4,400만 달러의 대체 효과를 기대할 수 있음.

<제2세부>

연구목표1: 강원지역 산야초/약용작물 부산물 활용 사료첨가제화 연구

1. 사료화 가능 강원지역 산야초/약용작물 (기능성 작물) 조사 및 선정

1) 기능성 작물 조사 및 선정

(1) 브로콜리 (Broccoli)

○ 학명으로는 *Brassica oleracea* 라고 하며 십자화과 (cultivar group)에 속하는 짙은 녹색채소. 줄기와 잎 부분은 식용으로 이용되지 않고 줄기의 끝에 매달리는 작은 꽃 뭉치만을 식용하는데 높이 50~80 cm로 자란 가지의 끝에 달림.

(2) 영양적 특성

○ 브로콜리 꽃 부분에는 많은 양의 미네랄, 비타민, 섬유질 성분을 가지고 있으며 특히 항암 및 해독에 효과가 있는 성분을 많이 포함하고 있음. 그 외의 줄기와 잎 부분에도 브로콜리가 가지고 있는 영양 성분들의 약 80 %를 포함하고 있음.

2) 평창 지역 브로콜리 재배 및 부산물 발생현황

(1) 평창지역 브로콜리 재배 현황

○ 강원도 평창지역에서는 약 170 ha 정도의 브로콜리를 재배하고 있으며 우리나라 전체 브로콜리 생산의 약 10 %를 차지하고 있음. 특히 서울대학교 평창캠퍼스가 속해 있는 대화면이 평창 전체 재배의 약 70%를 차지하고 있음. 브로콜리는 1년에 2번 수확을 하는 이모작 형태로 재배되어지고 있음.

(2) 브로콜리 부산물 발생 현황

○ 브로콜리는 1년에 2번 수확을 하는 이모작 형태로 재배되어 지고 있으며, 연간 약 4,000 t 을 수확하고 있음. 하지만 브로콜리를 수확하고 남은 부산물 (잎, 줄기) 같은 경우에는 연간 약 5,000~6,000 t 정도가 발생되며, 발생한 부산물들은 다른 목적으로 활용되지 않고 버려지고 있는 실정임.



그림 1. 평창지역의 브로콜리 재배 및 부산물 발생 현황

2. 기능성 작물 부산물 내 기능성분 선정 및 분석법 확립

1) 브로콜리 및 브로콜리 부산물 내 기능성분

(1) 브로콜리 부산물 내 기능성분: GSL (Glucosinolate)

○ GSL의 정의

- 십자화과 식물들의 2차 대사산물로서 겨자, 서양고추냉이, 양배추, 무, 케일, 브로콜리, 배추 등의 십자화과 채소들에게 많이 포함된 유기화합물이며 포도당으로부터 유래한 황, 질소 등을 함유하고 있음. 메티오닌 (methionine), 페닐알라닌 (phenylalanine) 그리고 트립토판 (tryptophan)과 같은 아미노산 (amino acid) 으로부터 형성됨. 십자화과 채소들이 물리적 자극 또는 미생물에 의한 손상을 입을 때 가수분해효소인 myrosinase에 의해서 분해됨으로써 포도당과 다른 분자들로 분해가 됨. GSL은 사람의 체내에서 항암효과에 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.

(2) Glucosinolate의 항암 효과

○ GSL의 활성화

- R group의 다양성에 따른 여러 종류의 GSL 중에서도, 항암 효과로 흔히 잘 알려져 있고 브로콜리 내에 많이 존재하는 GSL인 glucoraphanine과 glucobrassicin을 target GSL로 선정. GSL은 분해가 이루어지고 발생한 대사산물이 그러한 효과를 나타내는데, 물리적 또는 미생물에 의한 자극을 받게 되면 식물체 조직 내의 myrosin 세포 내에 존재하는 GSL 분해 효소인 myrosinase가 분비되고 또한 액포가 터짐으로써 물과 GSL이 방출되어 물과 myrosinase에 의해 GSL이 가수분해 되어짐. Glucoraphanin은 물리적 자극을 받는다면 myrosinase에 의해 isothiocyanate 형태인 sulforaphane으로 분해되고, glucobrassicin은 myrosinase에 의해 indole-3-carbinol로 분해가 되어짐. 이때 형성된 sulforaphane과 indole-3-carbinol이 항암 효

과를 일으키는 주요 물질임.

○ GSL의 항암 효과 메커니즘

- 형성된 isothiocyanate형태인 sulforaphane과 indole-3-carbinol은 암을 발생하게 하는 물질인 carcinogens의 활성을 유발하는 Phase 1 효소인 cytochrome P450의 활성을 억제하고, 또한 암 형성을 일어나지 못하게 하는 Phase 2 효소인 여러 detoxification 효소들의 분비를 촉진시킴으로써 항암 효과를 가짐.

2) 기능성분 분석법 확립

(1) Sulforaphane 분석법



UPLC-MSMS

LC	AQUITY UPLC BEH C18 column (Waters, USA) (Waters, USA)		
Column	AQUITY UPLC BEH C18 column (Waters, USA) 50 mm x 2.1 mm, 1.7 μm		
Standard	DL-Sulforaphane (Sigma-Aldrich, Germany)		
Mobile phase A	100 % Distilled water		
Mobile phase B	100 % Acetonitrile		
Column temp.	45.0 °C		
Sample temp.	4.0 °C		
PDA detector	202 nm		
Flow rate	0.1 mL/min		
Injection volume	1 μL		
Isocratic (6min)	Time (min)	A (%)	B (%)
	6	70.0	30.0

그림 2. UPLC를 이용한 Sulforaphane 분석법

(2) Beta-carotene 분석

- UPLC-PDA (AQUITY UPLC BEH C18 column - Waters, USA)
- Column : AQUITY UPLC BEH C18 column (Waters, USA)
- Mobile phase : A : 70 % acetonitrile : methanol (85:15) B: 30 % dichloromethanol
- Flow rate : 1 mL / min
- Injection volume : 3.5 μL
- PDA Detector : 254nm

(3) Vitamin A

- UPLC-PDA (AQUITY UPLC BEH C18 column - Waters, USA)
- Column : AQUITY UPLC BEH C18 column (Waters, USA)
- Mobile phase : Acetonitrile : MeOH (1 : 1)
- Gradient : Isocratic
- Flow rate : 0.4 mL / min
- Injection volume : 3 μ L
- PDA Detector : 325nm

3. 브로콜리 부산물 활용 사일리지 제조 연구 (1차)

1) 사일리지 및 TMR

(1) 브로콜리 부산물을 사일리지 형태로 이용하는 이유

○ 사일리지란 수분 함량이 많은 목초류 ·야초류 ·꽃배기작물 ·근채류 등을 혐기적으로 저장하여 젖산 발효를 시켜 부패균이나 분해균 등의 번식을 억제함으로써 생초의 양분의 손실을 막고 저장성을 높이려는 목적의 사료임. 사일리지 사료의 장점은 건초에 비해 날씨의 영향을 적게 받고 기계화가 쉽고 저장 손실이 적어서 경제적임. 또한 대량의 사료를 균일한 품질로 저장 가능하기 때문에 낙농에 알맞음.

○ 수분이 많은 작물 같은 경우에는 수분이 많아 부패가 쉽게 일어나 저장성이 낮은 특징이 있어 사일리지 형태로 혐기적 조건을 형성하여 브로콜리 부산물 내에 존재하는 영양소들의 손실을 줄이고 저장성을 높여야 함으로 브로콜리 부산물을 사일리지 형태로 이용함.

○ 사일리지를 저장하는 단계에서 유산균에 의한 발효가 일어나는데, 발효에 의한 유용 미생물의 균체, 미생물 유래 생리활성 물질, 유기산 생성 그리고 분해 산물의 영양학적 개선 등의 효과가 발생될 수 있음.

(2) TMR 원료로써의 브로콜리 사일리지의 기능

○ TMR (Total mixed ration) 이란?

- Total mixed ration의 약어로서 배합사료를 의미함. TMR은 섬유질 성분을 많이 함유 하고 있는 건초나 사일리지와 같은 조사료와 높은 에너지 사료로써 곡물과 같은 농후사료를 6 : 4의 비율로 혼합한 사료임. 농후사료와 조사료를 소에게 따로 급여를 할 시에는 반추위 내 pH의 fluctuation에 의해서 소의 생리에 악 영향을 미침. 농후사료를 급여할 시기에는 반추위 내 존재하는 미생물들이 분해하기 쉬운 형태인 곡물 형태의 농후사료를 빠르게 분해시켜 에너지 자원으로 사용하며 그로 인한 반추위 내 pH가 급격히 낮아지게 됨. 낮아진 pH

는 반추위 내 존재하는 미생물들의 생존을 어렵게 하며 또한 산의 축적으로 인한 소가 acidosis와 같은 산화증에 걸릴 수 있게 됨. 그리고 조사료를 급여할 시기에는 미생물들이 천천히 조사료를 분해하기 때문에 pH가 다시 올라가는 경향이 생김. 그러므로 반추위 내 pH의 fluctuation을 방지하고 안정하게 유지시키기 위해 TMR 급여가 필요함.

○ TMR 원료로써의 브로콜리 사일리지의 기능

- TMR은 앞서 설명하였듯이 조사료와 농후사료가 6 : 4 로 배합된 사료임. 이때 브로콜리 사일리지는 조사료에 해당함으로써 TMR 형태로 급여가 이루어 질것인데, 이때 TMR의 조사료와 농후사료의 6 : 4 비율에 브로콜리 부산물 사일리지가 농후사료의 일부분을 대체하여 급여 되어 진다면 영양소 함량이 우수한 브로콜리 사일리지에 의한 농후사료의 비율이 줄어들어도 문제가 없어짐. 그러므로 농가에서는 TMR 사료에서 농후사료 영양적 가치를 브로콜리 부산물 사일리지로 일부분 대체함으로써 비싼 농후사료를 적은 양을 구입해도 문제가 없으므로 경제적으로 도움이 될 수 있음.

2) 부형제의 선정



그림 3. 브로콜리 부산물 (잎/줄기) 및 부재료의 종류와 역할

○ 일반적인 사일리지의 경우 수분함량을 약 65~75 % 가져야 함. 하지만 브로콜리 부산물 원물은 수분함량이 약 90~95 %를 차지함. 그러므로 수분조절을 위한 부형제가 필요한데, 사탕무의 가공으로 인하여 발생한 부산물을 펠렛 형태로 제조한 비트펠프 같은 경우에는 흡습효과가 뛰어나 수분 조절을 위해 부형제로서 사용함. 또한 비트펠프는 탄수화물 원료로서도 활용이 됨. 밀을 도정하고 생긴 부산물인 밀기울은 일부 흡습의 효과도 있지만 주로 소에게 에너지를 제공하는 탄수화물의 원료로서 사용됨. 벼에서 왕겨를 뽑고 난 다음 현미를 백미로 도정하는 공정에서 분리되는 미강의 경우에도 탄수화물의 원료로서 사용하였음. 메밀을 도정하고 생긴 부산물인 메밀강은 지역적 부산물으로써 실험군으로 비교함.

3) 시험 사일리지 제조 계획

○ 총 11개의 테스트 구를 선정하였으며 각 처리구 당 3반복 제조하였음. 사일리지 한통 당 20 kg을 목표로 부재료의 함량에 따라 브로콜리 부산물의 양을 각각 16, 14 kg 으로 계획하였음. 또한 흡습제로 사용하기 위한 비트펠프는 공통 부재료로 사용을 하였고 밀기울과 미강을 탄수화물 원료로서 대조 실험을 하기 위해 같은 조건으로 제조 하였으며, 밀기울과 미강 각각 부재료 함량을 20 % 또는 30 % 로 비교하여 실험이 진행되었고 유산균인 락토바실러스 플란타룸의 접종 유무 또한 비교군으로 삼았음. T 10과 T 11은 부재료를 혼합하지 않은 브로콜리 부산물 원료의 사일리지며 미생물 접종 유무만을 비교군으로 설정함.

표 1. 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 제조 계획

Sample No.	시험부재료 (kg)	공통부재료 비트펠프 (kg)	주재료 브로콜리 (kg)	접종원	부재료 함량
T 1	밀기울 2	2	16	-	20%
T 2	밀기울 2	2	16	+	20%
T 3	밀기울 3	3	14	-	30%
T 4	밀기울 3	3	14	+	30%
T 5	미강 2	2	16	-	20%
T 6	미강 2	2	16	+	20%
T 7	미강 3	3	14	-	30%
T 8	미강 3	3	14	+	30%
T 9	메밀강 3	3	14	+	30%
T 10	-	-	20	-	-
T 11	-	-	20	+	-

4) 시험 사일리지 제조 과정

(1) 시험 사일리지 제조 과정 및 시료 채취

○ 사일리지를 제조하기 위한 브로콜리 부산물 (잎, 줄기) 을 학교 인근 농장으로부터 획득 (약 500 kg).

○ 세절 된 브로콜리 부산물들을 시험 계획표의 순서에 맞게 부형제 및 유산균을 접종함. 이때 브로콜리 부산물들과 부형제들이 균일하게 섞일 수 있도록 손으로 잘 섞어줌. 제대로 섞여진 혼합물을 뚜껑을 닫았을 시에 공기가 통하지 않는 20 L 플라스틱 통에 넣음. 또한 사일리지 품질 평가 항목인학적 평가 방법 그리고 일반성분 분석 방법을 하기 위한 샘플링 작업을 동시에 실시.



그림 4. 브로콜리 부산물 및 부재료를 이용한 계획표에 따른 사일리지 제조

○ 만들어진 사일리지를 20 L 플라스틱 통에 넣을 시 혐기적 발효 조건을 형성하기 위해 발로 밟아 브로콜리 부산물들과 부재료들 사이사이에 존재하는 공기를 없애기 위한 진압 과정을 거침. 최대한 눌러 담아 진압 실시.

○ 시료 채취 및 전처리.

표 2. 브로콜리부산물, 부형제, 시험 사일리지의 시료 채취 및 전처리 방법

시료		시료 채취	전처리	
			건조	냉동 보관
원재료	브로콜리 부산물 (잎/줄기)	○ 브로콜리 부산물을 약 1000 g을 공기가 통할 수 있는 종이 봉투를 이용하여 채취. (브로콜리 부산물 원재료 자체에는 수분함량이 많으므로 많은 양의 샘플 필요) ○ 시료 내 품질평가 및 GSL 측정을 위한 냉동보관 샘플 약 800 g 채취.	○ 수분을 제거하기 위해 건조기를 이용하여 65 °C에서 72 hr 건조 시킴. ○ 72 hr 후 건조가 된 시료는 시료 분쇄기를 이용하여 가루 형태로 될 때까지 분쇄 한 다음 약 200 g를 얻음. ○ (사)한국단미사료협회에 보내어 일반 성분 및 암모니아태 질소 함량 측정	○ 냉동보관 시료들은 -20 °C에서 저장을 하며 pH, 유기산 및 GSL 분석을 할 때 이용.
	부형제	○ 비트펄프, 미강, 밀기울 그리고 메밀강 원재료를 약 300 g을 종이 봉투를 이용하여 채취.		
시험 사일리지	○ 브로콜리 부산물과 부형제를 혼합하여 제조한 시험 사일리지는 약 800 g을 종이 봉투를 이용하여 채취. ○ 시료 내 품질평가 및 GSL 측정을 위한 냉동보관 샘플 약 800 g 채취.			

○ 총 11개 브로콜리 부산물 사일리지 테스트 구를 3반복 제조 하여 총 33개의 사일리지를 만듦. 약 70일간 발효시킴.

(2) 시험 사일리지 발효 완료 및 시료 채취

○ 사일리지를 제조 한 후 약 70일 후에 발효가 끝난 사일리지를 개봉함 (브로콜리 부산물 사일리지 테스트 11번구는 발효 도중 생성되는 가스에 의해 사일리지 통의 뚜껑이 열림으로써 내용물이 분출되어 실험 대상에서 제외함).

○ 시료 채취 및 전처리



그림 5. 시험 사일리지의 발효 완료 후 개봉

4. 브로콜리 부산물 활용 사일리지 특성 평가

1) 시험 사일리지 원료 일반성분 분석

표 3. 시험 사일리지 제조를 위한 원료들의 일반성분

Sample Name	조단백질	조지방	조회분	산성세제불용섬유	중성세제불용섬유
브로콜리 부산물	27.27	2.97	22.07	25.51	30.34
미강	12.47	15.96	7.70	8.07	20.27
밀기울	14.28	3.56	3.40	10.86	32.87
메밀강	10.09	1.83	2.27	48.40	59.19
비트펠프	8.12	0.69	3.53	25.81	42.78

○ 브로콜리 부산물 (잎/줄기)은 조단백질과 조회분의 수치가 높은 특징이 있음. 앞서 설명 드렸듯이 브로콜리 내에는 많은 양의 미네랄이 풍부한데, 미네랄 함량에 해당하는 조회분의 수치를 보면 다른 원료들에 비해 상당히 높은 것으로 확인되어짐.

2) 브로콜리 부산물 사일리지 사료가치 평가

(1) Flieg's scoring

○ pH 값을 이용한 사료가치 평가

표 4. pH 및 건물물을 이용한 사일리지 평가 기준 (Kimermeier 등, 1963)

Flieg점수	평가	건물물 (%)							
		15	20	25	30	35	40	45	50
81-100	아주 좋음	3.6	3.9	4.1	4.4	4.6	4.9	5.1	5.4
61-80	좋음	4.1	4.4	4.6	4.9	5.1	5.4	5.6	5.9
41-60	보통	4.6	4.9	5.1	5.4	5.6	5.9	6.1	6.4
21-40	나쁨	5.1	5.4	5.6	5.9	6.1	6.4	6.6	6.9
0-20	아주 나쁨	5.6	5.9	6.1	6.4	6.6	6.9	7.1	7.4

- 양질 사일리지의 적정 pH는 사일리지의 건물물에 따라 그 기준이 달라짐. 정상적인 발효가 끝난 사일리지라면 건물물이 낮을수록 pH는 낮아지고, 반대로 건물물이 높을수록 pH는 높아짐. 그러므로 동일한 건물물을 기준으로 하였을 때 pH가 낮은 것이 품질이 우수함.

○ 시험 사일리지 pH 측정 결과 및 평가.

표 5. 시험 사일리지 pH 측정 결과 및 평가

Sample	pH	건물률(%)	평가
T 1 (밀기울,20%,-)	5.12	26.37	보통
T 2 (밀기울,20%,+)	4.57	23.21	좋음
T 3 (밀기울,30%,-)	4.45	32.84	아주 좋음
T 4 (밀기울,30%,+)	3.92	31.23	아주 좋음
T 5 (미강,20%,-)	4.47	21.45	좋음
T 6 (미강,20%,+)	3.93	22.32	아주 좋음
T 7 (미강,30%,-)	3.92	28.82	아주 좋음
T 8 (미강,30%,+)	3.88	32.22	아주 좋음
T 9 (메밀강,30%,+)	4.23	33.21	아주 좋음
T 10 (control,-)	6.8	7.38	아주 나쁨

- pH 측정 및 평가 결과 부재료를 넣어준 시험구들 대부분에서 좋은 평가가 이루어 졌으며, 부재료인 밀기울과 미강을 30% 넣어준 테스트 사일리지 처리구에서 대체로 pH가 낮게 나왔으며 flieg's scoring을 통한 평가에서 아주 좋음을 나타내었음. 부재료를 넣지 않고 브로콜리 부산물만을 사일리지로 이용한 그룹에서는 pH가 높게 나왔으며 평가 결과 아주 나쁨을 나타내었음.

○ 유기산 함량을 이용한 사료가치 평가

- 발효산물인 유기산을 정량하여 그 조성 비율을 근거로 평가하는 방법으로 유산, 초산, 낙산 함량을 분석하여 총산 내 각 산의 비율을 계산, 평가기준에 의하여 총점수를 산출하여 평가함.

○ 유기산 함량을 이용한 평가기준

- 총산함량 중 유산의 비율이 높고 초산이나 낙산의 조성 비율이 낮은 것이 양질임. 특히 낙산 비율이 높으면 불량한 사일리지로 평가됨.

표 7. 암모니아태 질소 함량을 통한 평가기준 (Conway 등, 1962) (단위: 총 질소 %)

암모니아태 질소	고 품질	중 품질	저 품질
NH ₃ -N/TN	< 8	8 ~ 15	> 16

○ 전체 질소 함량에 비해 암모니아태 질소의 수치가 높으면 저 품질 사일리지로 평가됨. 만약 암모니아태 질소의 함량이 10 % 이하라면 고 품질 사일리지로 평가됨.

다) 시험 사일리지 암모니아태 질소 함량 측정 및 평가

표 8. 시험 사일리지 암모니아태 질소 함량 및 평가 (단위: 총 질소 %)

Sample	암모니아태 질소	평가
T 1 (밀기울,20%,-)	0.57	고 품질
T 2 (밀기울,20%,+)	0.54	고 품질
T 3 (밀기울,30%,-)	0.46	고 품질
T 4 (밀기울,30%,+)	0.44	고 품질
T 5 (미강,20%,-)	0.66	고 품질
T 6 (미강,20%,+)	0.33	고 품질
T 7 (미강,30%,-)	0.28	고 품질
T 8 (미강,30%,+)	0.31	고 품질
T 9 (메밀강,30%,+)	0.49	고 품질
T 10 (control,-)	0.34	고 품질

○ 전체 시험 사일리지들의 암모니아태 질소 함량은 모두 8 % 이하인 고품질 사일리지로 평가됨.

(3) 일반성분 분석

가) 일반성분 분석을 통한 사료가치 평가 방법

○ 일반성분 분석 항목 : 조단백질, 조지방, 조회분, 중성세제불용섬유 (NDF), 산성세제불용섬유 (ADF).

나) 일반성분 분석 결과 평가 기준

표 9. 화분과, 두과, 혼파의 일반성분 분석 기준 및 품질 등급 (Linn et al., 1987)

품질등급	조단백질	ADF	NDF	DDM	DMI	RFV
특급	>19	<31	<40	>65	>3.0	>151
1	17~19	31~35	40~46	62~65	3.0~2.6	151~125
2	14~16	36~40	47~53	58~61	2.5~2.3	124~103
3	11~13	41~42	54~60	56~57	2.2~2.0	102~87
4	8~10	43~45	61~65	53~55	1.9~1.8	86~75
5	<8	>45	>65	<53	<1.8	<75

○ DDM (Digestible dry matter) = $88.9 - (0.779 \times \text{ADF})$

DMI (Dry matter intake) = $120 / \text{NDF}$

RFV (Relative feed value) = $(\text{DDM} \times \text{DMI}) / 1.29$

다) 시험 사일리지 일반성분 분석 및 평가

○ 시험 사일리지 일반성분 분석

- 시험 사일리지 일반성분 분석은 (사)한국단미사료협회에 의뢰하였으며 발효 전 샘플들과 발효 후 샘플들 모두 측정하였음. 발효 전 과 후를 비교하였을 때 조단백질의 경우 T 10을 제외한 대부분의 샘플에서 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 대부분의 분석항목에서 발효 후에 증가하는 것을 알 수 있었고 그러므로 상대사료가치인 RFV가 발효 후에 높게 측정되는 것을 알 수 있었음. 또한 조지방과 조회분 함량도 증가하는 것을 알 수 있었음.

표 10. 시험 사일리지 일반성분 분석

Sample	조단백질		ADF		NDF		DDM		DMI		RFV		조지방		조회분	
	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후
T 1 (밀기울,20%,-)	15.58	18.36	19.57	21.40	37.28	35.34	73.65	72.23	3.22	3.40	183.8	190.4	2.64	2.97	6.66	8.95
T 2 (밀기울,20%,+)	18.09	18.23	17.68	20.12	35.53	32.87	75.13	73.23	3.38	3.65	196.8	207.3	2.76	3.56	7.32	8.87
T 3 (밀기울,30%,-)	12.94	16.89	18.88	19.76	37.93	33.62	74.19	73.50	3.16	3.57	181.7	203.4	2.16	3.36	5.42	7.16
T 4 (밀기울,30%,+)	17.66	16.60	18.88	18.72	37.25	34.42	74.19	74.31	3.22	3.51	185.1	202.2	2.47	3.05	5.89	6.99
T 5 (미강,20%,-)	16.24	18.12	17.77	20.71	30.55	33.01	75.06	72.77	3.93	3.64	228.6	205.5	9.56	10.32	5.89	10.28
T 6 (미강,20%,+)	17.47	17.54	16.44	20.78	27.86	32.95	76.09	72.71	4.31	3.65	254.2	206.0	10.48	9.66	8.82	9.48
T 7 (미강,30%,-)	14.64	15.77	18.83	21.02	31.50	35.11	74.23	72.52	3.81	3.42	219.2	192.1	10.56	13.10	9.49	8.12
T 8 (미강,30%,+)	14.81	15.68	18.48	18.85	31.85	31.30	74.50	74.21	3.77	3.85	217.7	221.3	8.96	10.90	8.04	8.28
T 9 (메밀강,30%,+)	12.88	15.04	40.45	38.84	52.55	49.98	57.39	58.64	2.28	2.40	101.4	109.1	2.00	2.60	5.52	6.63
T 10 (control,-)	27.27	18.94	25.51	28.25	30.34	32.71	69.03	66.89	3.96	3.69	211.9	191.3	2.97	5.78	22.07	20.33

○ 시험 사일리지 일반성분 분석 결과 등급

- 시험 사일리지의 일반성분 분석 결과에 따른 등급은 조단백질을 제외한 나머지 성분 항목에서 대부분 특을 받았으며 메밀강을 30 % 섞고 미생물 접종을 한 T 9는 다른 비교군들 보다 상대적으로 저 품질로 평가되어짐. 특히 밀기울 20 % 섞고 미생물 접종을 한 **T 2** 번과 미강 20 %를 섞고 미생물 접종을 한 **T 6** 이 조단백질 항목에서도 모두 1등급을 받았으며 나머지 항목들에 대해서는 모두 특을 받았으므로 일반성분 분석 평가에서는 제일 **고품질 사일리지**로 평가되어짐.

표 11. 시험 사일리지 일반성분 분석 결과 등급

Sample	조단백질		ADF		NDF		DDM		DMI		RFV	
	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후
T 1 (밀기울,20%,-)	2	1	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 2 (밀기울,20%,+)	1	1	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 3 (밀기울,30%,-)	3	2	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 4 (밀기울,30%,+)	1	2	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 5 (미강,20%,-)	2	1	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 6 (미강,20%,+)	1	1	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 7 (미강,30%,-)	2	2	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 8 (미강,30%,+)	2	2	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특
T 9 (메밀강,30%,+)	3	2	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2
T 10 (control,-)	특	1	특	특	특	특	특	특	특	특	특	특

(4) 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 관능평가

가) 관능평가를 통한 사료가치 평가 방법

○ 평가 대상 처리군: T 1-1 ~ T 10-3 (각 처리군 당 1구).

평가자: 총 6명 (전문가 5명, 연구원 1명)

방법: 샘플들이 들어 있는 통의 라벨을 가린 뒤 블라인드 테스트를 통하여 평가표에 의해 점수 산출

나) 평가 기준 및 등급

○ 색 : 일반적으로 밝은 감을 주는 것이 좋고, 어두운 감을 주는 것은 좋지 않음.

○ 촉감 : 손으로 만졌을 때 적당한 수분이 있어 촉촉하고 까실까실한 느낌이 있는 것이 좋음. 또한 재료 중의 잎이 충전 당시의 형태 그대로 보존되고 조직이 파괴되지 않은 것이 좋음.

○ 냄새 : 산뜻하고 향긋한 사일리지 특유의 산취가 나는 것이 좋음. 양질의 사일리지는 낙산

을 함유하지 않으므로 부패취나 낙산취와 같은 악취가 없음.

표 12. 사일리지 관능평가 항목 및 점수 (Ohyama 등, 1980)

항목	성 상	점수
냄새 (14)	1. 낙산취가 전혀 없으며, 향긋한 산취, 향취, 과일취 또는 빵냄새	14
	2. 미약한 낙산취, 강한 산취, 예건 사일리지의 경우 약간의 향취	10
	3. 상당한 낙산취, 약간의 곰팡이 냄새	4
	4. 강한 낙산취 또는 암모니아 냄새, 매우 미약한 산취	2
	5. 분냄새, 부패취, 강한 곰팡이 냄새 또는 퇴비냄새	0
촉감 (4)	1. 잎과 경부의 구조가 양호하게 보존된 것	4
	2. 잎의 구조가 약간 파괴된 것	2
	3. 잎과 경부의 구조가 많이 파괴된 것, 약간의 곰팡이 및 오염	1
	4. 잎과 경부의 변패, 심한 오염	0
색깔 (2)	1. 재료와 동일한 사일리지의 색, 담록색의 예건 사일리지	2
	2. 부분적인 변색, 담황색이 없는 갈색	1
	3. 극도의 변패, 심한 녹색 또는 황색으로의 퇴색, 심한 곰팡이 형성	0

표 13. 사일리지 관능평가 점수 및 등급 (Ohyama 등, 1980)

관 정		
점수	등급	사료가치감소
20-16	1 (우수)	경미
15-10	2 (만족)	중등
9-5	3 (중간)	높음
4-0	4 (변패)	매우높음

다) 관능평가 결과

○ 관능평가 결과 대체적으로 좋은 등급을 받았지만 부재료로써 미강을 이용한 사일리지보다 밀기울을 이용한 사일리지의 높은 등급을 받았음. 또한 미강과 밀기울을 각각 30 % 사용한 **T 4와 T 7**이 20%를 사용하였을 때 보다 좋은 평가를 받았으므로 **고품질 사일리지**로 평가됨. 하지만 부재료를 섞지않은 T 10 control 그룹 같은 경우에는 강한 낙산취 및 암모니아 냄새가

났고 수분함량이 높으며 부패가 일어난 것으로 추정되며 평가 결과 제일 낮은 등급을 받았음.

표 14. 시험 사일리지 관능평가 결과 및 등급

Sample	관능평가 점수 평균	등급
T 1 (밀기울, 20%, -)	10.8	2
T 2 (밀기울, 20%, +)	14.2	2
T 3 (밀기울, 30%, -)	17.2	1
T 4 (밀기울, 30%, +)	20	1
T 5 (미강, 20%, -)	11.8	2
T 6 (미강, 20%, +)	14.3	2
T 7 (미강, 30%, -)	15.5	2
T 8 (미강, 30%, +)	17.5	1
T 9 (메밀강, 30%, +)	14.8	2
T 10 (control, -)	5	4

(5) 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 가축 기호성 평가 (승인번호 : SNU-170310-9)

○ 브로콜리 부산물 사일리지 가축 기호성 평가 시험 설계

- 장소 : 서울대학교 실험 목장
- 대상 우 : 10 ~ 14개월 홀스타인 암소 26두
- 환경 : 6구 시험 사일리지 사료 자유 접근 채식
- 샘플 사료 : 관능 평가를 통한 우수 샘플들 선발 (Sample 2, 4, 6, 8, 9, 10)
- 시간 : 약 1시간 (09:08 ~ 10:00)

○ 평가자들을 통한 관능평가를 통해 우수한 사일리지 샘플만을 기호성 평가의 샘플로써 사용함. 각 사일리지 샘플들의 초기 급여량은 위의 표에 나와 있으며 1시간 동안 자유 접근 채식 방법을 이용하였음. 1시간 후 잔량들을 회수 하여 섭취량을 파악해본 결과, 사람이 직접 시행하는 관능 평가에서 부재료로써 밀기울과 미강을 각각 30 % 사용한 샘플들이 높은 등급을 받은 반면 소들에 의한 기호성 평가에서는 부재료로써 밀기울과 미강을 각각 20 % 사용한 시료

샘플들이 높은 등급을 받았음. 즉 부재료 함량이 20 % 인 것이 소들의 접근성과 기호성이 높다는 것을 알 수 있고 특히 **T 2**가 제일 **기호성이 좋은 사일리지**로 평가되어짐. 또한 부재료가 전혀 들어 있지 않은 T 10 같은 경우에는 관능평가에서와 마찬가지로 이듯이 소들의 기호성 평가에서도 접근성이 거의 없는 것으로 관찰됨.



그림 6. 홀스타인을 이용한 기호성 평가

○ 기호성 평가 결과

표 15. 기호성 평가를 위한 조건 및 선호도

Sample	초기 급여량 (kg)	잔량 (kg)	섭취량 (%)	순위
T 2 (밀기울,20%,+)	30	0.8	97.3	1
T 4 (밀기울,30%,+)	30	6.2	79.3	3
T 6 (미강,20%,+)	30	5.8	80.7	2
T 8 (미강,30%,+)	30	9.4	68.7	4
T 9 (메밀강,30%,+)	28	20.3	27.5	5
T 10 (control,-)	18	17	5.6	6

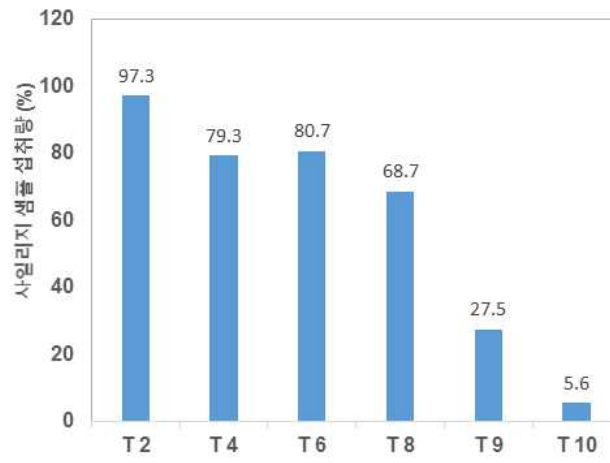


그림 7. 시험 사일리지의 섭취량 (%)

연구목표2: 브로콜리 부산물 활용 사일리지 제조 조건 최적화 연구

1. 브로콜리 부산물 활용 사일리지 제조 연구 (2차)

1) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 제조

(1) 부형제의 선정



그림 8. 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에 사용된 원료 및 부형제의 종류

○ 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에서는 1차 시험 사일리지와 마찬가지로 주재료로서 브로콜리 부산물 (잎/줄기)를 활용하였고 서울대학교 평창캠퍼스 인근 농가로부터 브로콜리 부산물을 매수하여 시험에 활용하였음.

○ 공통 부형제로는 흡습제 역할로 사탕무의 가공으로 인하여 발생한 부산물을 펠렛 형태로 제조한 비트펄프와 옥수수의 부산물 옥수수대인 콘콕을 활용함. 또한 탄수화물을 기반으로 한 에너지 원천의 역할로 1차 시험 사일리지와 마찬가지로 벼에서 왕겨를 뽑고 난 다음 현미를 백미로 도정하는 공정에서 분리되는 미강, 밀을 도정하여 생긴 부산물인 밀기울, 카사바를 이용하여 알코올을 생산 후 남은 찌꺼기인 카사바주정박 그리고 카사바주정박과 버섯배지박 등을 혼합하여 섬유질 기반으로 만든 섬유질 기초원료를 각각 실험군으로 설정하고 또한 유산균 접종원으로서 *Lactobacillus plantarum* (1×10^{10} cfu / 13kg silage)인 청미락토 (상품명)를

이용하여 시험에 활용하였음.

(2) 시험 사일리지 제조 계획

표 16. 브로콜리 부산물과 부형제의 조합 비율에 따른 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 제조 구성

(n=2/group)

Treatment No.	브로콜리 부산물 (kg)	부형제 (kg)		공동 부형제 (kg)		<i>L. plantarum</i> ^a	부형제 ^b (%)	수분함량 (%)
T 1	16.0	밀기울	1.75	콘콕	1.75	+	17.9	75
T 2	14.0	밀기울	2.50	콘콕	2.50	+	26.3	65
T 3	11.5	미강	1.25	콘콕	1.25	+	17.9	75
T 4	11.1	미강	1.95	콘콕	1.95	+	26.2	65
T 5	12.7	주정박	1.35	콘콕	1.35	+	17.9	75
T 6	11.1	주정박	1.95	콘콕	1.95	+	26.2	65
T 7	12.7	섬유질기초원료	1.35	콘콕	1.35	+	17.9	75
T 8	11.1	섬유질기초원료	1.95	콘콕	1.95	+	26.2	65
T 9	12.7	콘콕	1.35	콘콕	1.35	+	17.9	75
T 10	11.1	콘콕	1.95	콘콕	1.95	+	26.2	65
T 11	12.7	비트펠프	1.35	비트펠프	1.35	+	17.9	75
T 12	11.1	비트펠프	1.95	비트펠프	1.95	+	26.2	65
T 13	12.7	미강	1.35	밀기울	1.35	+	17.9	75

^a *Lactobacillus plantarum* (1×10^{10} cfu/13kg silage) : treated (+), non-treated (-).

^b Total additives / total silage amount (w/w %)

○ 총 13개의 시험 구를 선정하였으며 각 처리구 당 2반복 제조하였음. 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에서는 콘콕을 공동부형제로 하여 밀기울, 미강, 주정박 그리고 섬유질기초원료 부형제들을 혼합하여 제조한 사일리지 실험군 (T1 ~ T10), 비트펠프만을 이용하여 제조 한 사일리지 실험군(T11 ~ T12) 그리고 미강과 밀기울을 혼합하여 제조 한 사일리지 실험구 (T13) 를 대상으로 비교 실험이 진행되었음. 또한 같은 부형제를 혼합한 처리구들 간에는 전체 사일리지 양에 대한 부형제 함량을 약 18%와 26%로 나누어 수분함량을 각각 75%와 65%로서 비교 실험 진행.

○ 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 결과에 따른 유산균 접종원인 *L. plantarum*을 전 처

리군에 접종을 시행하여 발효가 전반적으로 원활히 진행될 수 있게 처리하였음.

(3) 시험 사일리지의 저장 및 발효

○ 13개 처리구들을 각각 2반복 하여 총 28개 (T1과 T2는 3반복)의 브로콜리 부산물 시험 사일리지를 제조 하여 약 80일간 발효를 시행함.



그림 9. 제조 된 브로콜리 부산물 시험 사일리지의 발효

2) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 개봉

(1) 발효 후의 시험 사일리지 및 분석 시료 채취

○ 사일리지를 제조 한 후 약 80일 후 발효가 안정적으로 진행되어 있는 사일리지를 개봉함.

2. 브로콜리 부산물 활용 사일리지 특성 평가

1) 사일리지 원료들의 성분 분석

표 17. 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에 이용된 원료 및 부형제들의 성분 함량

(Unit : % DM)

Major material						
Name	Crude protein	Crude fat	Ash	Crude fiber	Moisture contents	Etc.
브로콜리 부산물 (잎/줄기)	27.27	2.97	22.07	ADF ^a : 25.51 NDF ^b : 30.34	93.00	-
Supplementary materials						
Contents	Crude protein	Crude fat	Ash	Crude Fiber	Moisture contents	Etc.
비트펄프	8.12	0.69	3.53	ADF: 25.81 NDF: 42.78	-	-
콘콧	1.72	0.44	1.39	ADF: 45.79 NDF: 80.43	-	lignin: 4.71
카사바주정박	10.50	2.00	19.00	25.60	12.00	< 0.30
섬유질기초원료	14.90	3.50	20.50	21.70	11.80	< 0.30
미강	12.47	15.96	7.70	ADF: 8.07 NDF: 20.27	-	-
밀기울	14.28	3.56	3.40	ADF: 10.86 NDF: 32.87	-	-

^a ADF : Acidic detergent fiber, ^b NDF: Neutral detergent fiber.

○ 브로콜리 부산물 (잎/줄기)은 조단백질과 조회분의 함량의 비율이 매우 높은 것으로 확인되었고 수분 함량이 약 93%로 측정됨. 부형제들의 경우에는 콘콧에서 조단백질의 함량이 매우 낮으며 ADF가 높은 것으로 확인이 되었고, 비트펄프에서 ADF와 NDF의 비율이 적절한 것으로 확인이 됨.

2) 제조된 사일리지의 성분 분석, 소화율 및 사료가치 평가

표 18. 2차 브로콜리 부산물 사일리지의 성분 분석 및 사료 가치 평가

	Feed value					
	NDF (%)	ADF (%)	CP (%)	TDN (%)	RFV	Grade ^a
T 1 (W,C,18%,+)	45.6	27.2	16.4	67.4	138.0	1
T 2 (W,C,26%,+)	47.9	27.6	14.5	67.1	131.0	1
T 3 (R,C,18%,+)	42.7	26.0	15.4	68.4	149.5	1
T 4 (R,C,26%,+)	47.5	27.9	13.7	66.9	131.5	1
T 5 (D,C,18%,+)	51.9	38.5	17.9	58.5	105.6	2
T 6 (D,C,26%,+)	56.7	40.9	13.5	56.6	93.5	3
T 7 (F,C,18%,+)	49.5	33.1	16.7	62.8	118.6	2
T 8 (F,C,26%,+)	53.1	34.3	15.3	61.8	108.9	2
T 9 (C,C,18%,+)	63.2	38.5	10.9	58.5	86.8	4
T 10 (C,C,26%,+)	62.8	37.3	10.0	59.4	88.7	4
T 11 (B,B,18%,+)	33.8	23.7	18.7	70.2	193.9	Excellent
T 12 (B,B,26%,+)	35.3	24.4	16.3	69.6	184.1	Excellent
T 13 (R,W,18%,+)	27.3	14.6	21.9	77.4	263.9	Excellent

W : wheat bran, C : corn cob, R : rice bran, B : beet pulp, D : cassava distillers dried grains, F : fibrous feed, % : Total additives / total silage amount, + or - : L. plantarum treated or non-treated.

NDF : Neutral detergent fiber, ADF : Acidic detergent fiber, CP : Crude protein, TDN : Total digestible nutrients, RFV : Relative feed value.

^a RFV grade : Excellent (>151), 1 (151~125), 2 (124~103), 3 (102~87), 4 (86~75), 5 (<75).

(1) 여러 화학적 성분들 중 NDF, ADF 및 CP는 사일리지의 성분 분석에 대한 데이터로 이용됨. 큰콩만을 부형제로 사용한 T9와 T10에서는 다른 처리구들에 비해 CP와 NDF 함량이 매우 낮게 확인이 됨. T9와 T10을 제외한 나머지 처리구들은 좋은 등급의 일반 성분들의 비율을 가짐. 특히 비트펄프만을 부형제로 사용한 T11, T12와 미강과 밀기울을 사용한 T13이 매우 우수한 등급을 보임.

(2) RFV를 이용한 사료가치 기준에서 T11, T12 그리고 T13이 매우 우수한 사료가치 등급을

보임. 콘콕을 공통부형제로 사용한 처리구들 (T1 ~ T10) 중에서 밀기울과 미강을 이용한 처리구들 (T1 ~ T4)가 주정박 또는 섬유질기초원료, 콘콕을 사용한 처리구들 (T5~T10)에 비해 상대적으로 높은 등급의 가치를 보임. 특히 콘콕만을 부형제로 이용한 T9와 T10에서는 RFV 값이 다른 처리구들에 비해 현저히 떨어지는 것으로 확인이 되지만, 비트펄프 만을 사용한 처리구들(T11, T12)과 밀기울과 미강만을 사용한 처리구 (T13)은 RFV 값이 매우 높게 측정이 되어 매우 우수한 등급의 사료가치를 나타냄. 결론적으로 부형제로서의 콘콕은 비트펄프에 비하여 사료가치수준이 낮다고 판단됨

3) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 품질 평가

(1) pH 측정 및 건물률 확인

○ 시험 사일리지 pH 측정 결과 및 평가

표 19. 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지의 pH 및 건물률에 기반 한 등급

Sample	pH	DM(%)	Grade
T 1 (W,C,18%,+)	4.03	30.79	Excellent
T 2 (W,C,26%,+)	4.03	32.38	Excellent
T 3 (R,C,18%,+)	4.01	27.09	Excellent
T 4 (R,C,26%,+)	3.96	33.15	Excellent
T 5 (D,C,18%,+)	4.30	25.51	Excellent
T 6 (D,C,26%,+)	4.15	30.39	Excellent
T 7 (F,C,18%,+)	4.39	26.01	Good
T 8 (F,C,26%,+)	4.33	29.80	Excellent
T 9 (C,C,18%,+)	4.62	26.23	Good
T 10 (C,C,26%,+)	4.36	29.92	Excellent
T 11 (B,B,18%,+)	4.13	23.88	Excellent
T 12 (B,B,26%,+)	4.08	30.28	Excellent
T 13 (R,W,218%,+)	3.93	25.45	Excellent

W : wheat bran, C : corn cob, R : rice bran, B : beet pulp, D : cassava distillers dried grains, F : fibrous feed, % : Total additives / total silage amount, + or - : L. plantarum treated or non-treated.

○ 대부분의 시험구들이 pH 4.0 초반으로 측정이 되어 발효가 잘 일어난 것으로 보임. 부형제 함량을 26% 첨가한 처리구들이 18% 첨가한 처리구들 보다 pH가 낮게 나오는 경향이 있음. 미강과 밀기울을 부형제로 첨가한 T13이 제일 낮은 pH 값을 보임. 그러므로 전체 처리구에서 pH 등급이 우수하다고 판단됨.

(2) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 유기산 함량 및 평가

표 20. Organic acid를 기반으로 한 Flieg's score를 이용한 사일리지 품질 평가

	pH	Organic acid (% DM)			Flieg's score	Grade ^a
		Acetic acid	Lactic acid	Butyric acid		
T 1 (W,C,18%,+)	4.03	12.25	87.28	0.47	100	1
T 2 (W,C,26%,+)	4.03	11.35	88.65	0	100	1
T 3 (R,C,18%,+)	4.01	10.72	89.28	0	100	1
T 4 (R,C,26%,+)	3.96	7.99	92.01	0	100	1
T 5 (D,C,18%,+)	4.30	21.75	77.27	0.98	96	1
T 6 (D,C,26%,+)	4.15	24.34	75.40	0.26	93	1
T 7 (F,C,18%,+)	4.39	23.37	75.87	0.75	96	1
T 8 (F,C,26%,+)	4.33	19.74	77.87	2.39	86	1
T 9 (C,C,18%,+)	4.62	36.35	62.22	1.43	77	2
T 10 (C,C,26%,+)	4.36	29.77	69.60	0.63	84	1
T 11 (B,B,18%,+)	4.13	28.19	71.81	0	88	1
T 12 (B,B,26%,+)	4.08	24.51	75.49	0	93	1
T 13 (R,W,18%,+)	3.93	8.70	91.30	0	100	1

W : wheat bran, C : corn cob, R : rice bran, B : beet pulp, D : cassava distillers dried grains, F : fibrous feed, % : Total additives / total silage amount, + or - : L. plantarum treated or non-treated. ^a Quality grade : 1 (100~81), 2 (80~61), 3 (60~41), 4 (40~21), 5 (<20).

○ 사일리지 내에서의 총 유기산 : acetic acid + lactic acid + butyric acid, 또한 유기산 함량은 Lactic acid 함량이 높고 Butyric acid 함량이 낮을수록 고품질 사일리지로 판단되어짐. 대부분의 사일리지에서 lactic acid 함량이 높고 butyric acid 함량이 낮아 발효가 잘 일어났다고 판단됨.

콘칩을 공통부형제로 하고 밀기울과 미강을 첨가한 T1~14번 처리구들과 밀기울, 미강을 첨가한 T13 에서 lactic acid 함량이 매우 높고 butyric acid 함량이 낮은 특징으로 Flieg's

score 100점 을 받음으로서 매우 우수한3 발효로 판단되어짐. 하지만 콘콕 만을 부형제로 이용한 T9와 T10이 상대적으로 다른 처리구들에 비해 Flieg's score 값이 낮게 나온 것을 확인함.

4) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 관능 평가

○ 사일리지의 냄새, 촉감 그리고 색을 사람에 의해 평가됨으로서 사일리지의 발효 등급을 판단함. 또한 객관적인 평가를 위한 블라인드 테스트를 실시함.



그림 10. 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지의 관능평가

표 21. 2차 시험 사일리지의 관능평가 결과

	Avg. score	Grade
T 1 (W,C,18%,+)	15	2
T 2 (W,C,26%,+)	17	1
T 3 (R,C,18%,+)	16.66	1
T 4 (R,C,26%,+)	16.66	1
T 5 (D,C,18%,+)	15.33	2
T 6 (D,C,26%,+)	14.66	2
T 7 (F,C,18%,+)	11	2
T 8 (F,C,26%,+)	13.33	2
T 9 (C,C,18%,+)	13.83	2
T 10 (C,C,26%,+)	17.33	1
T 11 (B,B,18%,+)	14.83	2
T 12 (B,B,26%,+)	14.66	2
T 13 (R,W,18%,+)	12.5	2

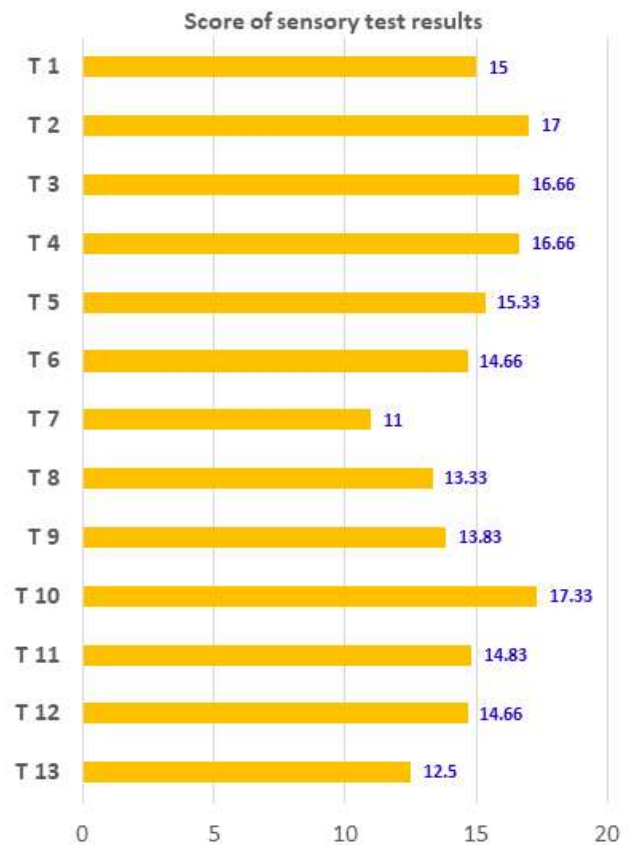


그림 11. 2차 시험 사일리지의 관능평가 결과

○ 사람의 관능평가 결과 전반적으로 좋은 등급을 받았음. 그 중에서도 콘콕만을 부형제로 사용한 (26%) 사일리지 (T11)가 17.33으로 가장 높은 점수를 받았으며, 콘콕과 섬유질 기초원료를 부형제로 사용한 (18%) 사일리지 (T7)은 가장 낮은 점수대를 보였지만 좋은 등급을 나타내는 범위에는 속해 있었음. 또한 콘콕과 밀기울, 미강을 혼합하여 만든 사일리지 (T1 ~ 4)가 콘콕과 카사바주정박, 섬유질 기초원료를 혼합하여 만든 사일리지 (T5 ~ 8)보다 상대적으로 높은 평가를 받은 것으로 확인됨.

5) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 기호성 평가 (승인번호 : SNU-170310-9)

(1) 정해진 시간에 따른 소들의 접근성과 섭취량에 따른 기호성을 평가하여 최적의 조건을 확립.

(2) 한우에 의한 기호성 평가

○ 장소 : 서울대학교 실험 목장

○ 대상 우 : A 그룹 - 약 24개월령 한우 9마리, B 그룹 - 약 13개월령 한우 13마리.

○ 평가 사일리지 : 전체 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 (총 13구).

○ 환경 : 전체 시험 사일리지 사료 자유 접근 채식.

○ 시간 : 7시간 (A 그룹과 B 그룹 동일).



그림 12. 한우의 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지의 기호성 평가

(3) 기호성 평가 결과

○ 비트펄프 만을 부형제로 이용한 T11과 T12가 다른 처리구들에 비해 현저히 빨리 섭취되는 특징을 가졌음 (2시간 이내). 가장 기호성이 좋은 처리구라고 판단됨. 다음으로는 부형제로서 밀기울과 미강을 첨가한 처리구들 (T1~T4, T13)에서 기호성이 좋은 것으로 보였음. 그리고 2차 사일리지 부형제로써 사용된 주정박 및 섬유질기초사료를 첨가한 처리구들은 기호성이 좋지 않은 것으로 보였음. 특이적으로 콘톱을 공통 부형제로써 사용한 처리구들 (T1~T10)에서 잔량 확인 시 콘톱만을 남겨놓는 특징이 있었음. 그리하여 흡습제로써 콘톱이 비트펄프보다 소들의 기호성이 낮다고 판단됨 (발효 후 비트펄프에 비해 콘톱의 성상이 소들이 섭취하기에 좋지 않다고 판단됨).

표 22. 2차 시험 사일리지의 기호성 평가 결과

	Feed ration (kg)	Intake amount (%)		Grade
		Group A	Group B	
T 1 (W,C,18%,+)	10	99.5	100	2
T 2 (W,C,26%,+)	10	76	99.7	4
T 3 (R,C,18%,+)	10	70	99.7	6
T 4 (R,C,26%,+)	10	71	100	5
T 5 (D,C,18%,+)	10	32	72	9
T 6 (D,C,26%,+)	10	28	40	11
T 7 (F,C,18%,+)	10	64	49	8
T 8 (F,C,26%,+)	10	19	22	12
T 9 (C,C,18%,+)	10	91	41	7
T 10 (C,C,26%,+)	10	72	28	10
T 11 (B,B,18%,+)	10	100	100	1
T 12 (B,B,26%,+)	10	100	100	1
T 13 (R,W,18%,+)	10	90	100	3

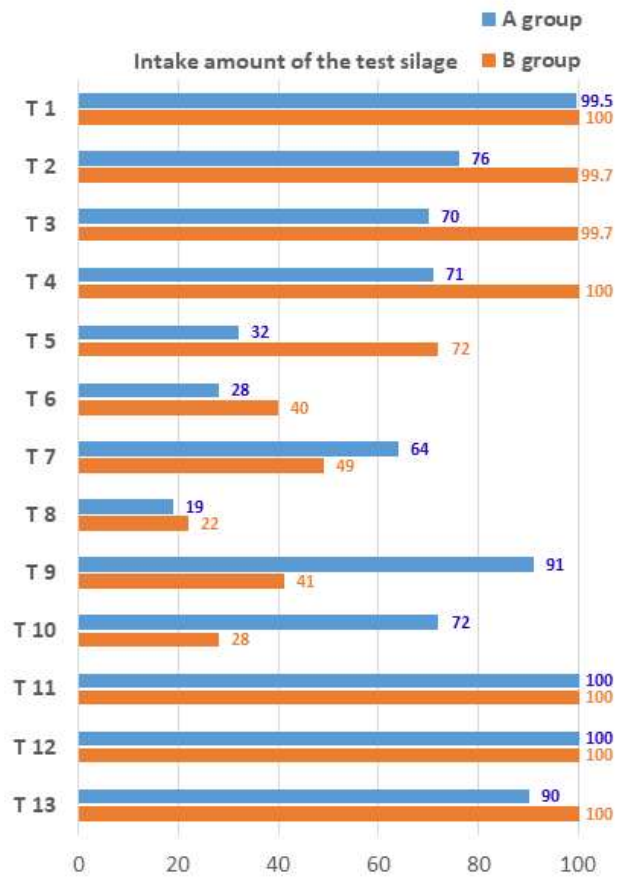


그림 13. 2차 시험 사일리지의 기호성 평가 결과

3. 브로콜리 부산물 활용 사일리지 제조 최적조건 확립 (1,2차 사일리지 제조 비교 분석)

1) 브로콜리 부산물 시험 사일리지의 평가 결과 비교

(1) 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 평가 결과

○ RFV를 이용한 사료가치 측면에서는 대부분의 처리구에서 매우 우수한 결과를 보였음 (메밀강을 부형제로 사용하여 만든 사일리지인 T9에서는 다른 처리군들에 비해 낮은 RFV 수치를 보였으며 그에 따라 등급 또한 낮게 나왔음). 대부분의 처리구에서 유산균 접종원을 처리한 처리군들에서 접종원을 처리하지 않은 처리군들에 비해 RFV가 높게 나온 것을 확인함.

○ 유기산 함량 분포에 따른 Flieg's score를 이용한 사료 품질 평가에서는 다양한 결과 값이 나타남. Flieg's score에 따른 등급에 대한 결과를 보면 유산균 접종원을 처리한 처리군들이 비처리군들에 비해 높은 수치를 보였음. 그리고 부형제 함량에 따른 결과를 보면 부형제 함량을 30%로 제조한 사일리지들에서 Flieg's score가 높게 나오는 것으로 확인이 되었음. 또한 미강

을 부형제로 사용한 처리구들이 밀기울을 사용한 처리구들에 비해 Flieg's score가 높게 나오는 것으로 확인됨. 대조군에 비해 부형제를 추가하여 수분 조절한 실험군들이 Flieg's score에 따른 등급이 높게 나오는 것으로 확인됨에 따라 발효에 있어서 수분 조절과 유산균 접종원이 크게 영향을 미치는 것으로 사료됨(단 T1은 발효과정에 문제 있는 것으로 보아 제외).

○ 소의 기호성 평가에 따르면 밀기울과 비트펄프를 부형제로 20%를 사용한 T2가 가장 기호성이 좋은 사일리지로 판단됨. 미강과 비트펄프를 부형제로 20%를 사용한 T6이 T2에 다음으로 기호성이 좋게 나타남. 또한 부형제를 20% 사용한 사일리지들이 30% 사용한 사일리지들에 비해 높은 기호성을 보임. 이를 종합하여 소의 기호성에는 부형제의 함량을 20%로 하는 것이 30%보다 좋다고 판단됨.

○ 유기산 함량에 따른 사일리지 품질 평가에 따르면 부형제로 미강을 사용하는 것이 밀기울을 사용하는 것보다 좋다는 결과가 나왔고 30%의 부형제 함량이 좋은 품질로 나오는 결과가 있었지만, 소의 기호성 평가와 비교해 보았을 때 부형제로 밀기울을 사용하는 것이 미강에 비해 기호성이 좋게 나왔고 20%의 부형제 함량에서 소의 기호성이 더 좋게 나타남. 사일리지를 제조 하는데 있어서 발효 품질이 중요하지만 소의 기호성이 더 우선시 되어야 한다는 판단으로 브로콜리 부산물에 비트펄프와 미강의 함량을 20% 첨가한 사일리지가 1차 시험 사일리지에서 가장 적절한 제조 조건으로 판단됨 (미강과 밀기울을 사용한 결과를 비교해보면 사료 가치와 품질에 있어서 차이가 많지 않은 것으로 보아 사일리지의 제조에 있어서 미강과 밀기울을 대체적으로 사용해도 무관하다고 판단됨).

표 23. 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 사료가치, 품질 및 기호성 평가 결과

	Feed value		Quality evaluation						Palatability
	RFV	Grade ^a	pH	Organic acid (% DM)			Flieg's score	Grade ^b	
				Acetic acid	Lactic acid	Butyric acid			
T 1 (W,B,20%,-)	190.4	Excellent	5.12	4.60	2.96	0.77	13	5	-
T 2 (W,B,20%,+)	207.3	Excellent	4.57	4.72	7.59	0	64	2	1
T 3 (W,B,30%,-)	203.4	Excellent	4.45	2.81	6.59	0	72	2	-
T 4 (W,B,30%,+)	202.2	Excellent	3.92	1.26	9.68	0	98	1	3
T 5 (R,B,20%,-)	205.5	Excellent	4.47	3.36	9.67	0	77	2	-
T 6 (R,B,20%,+)	206.0	Excellent	3.93	2.70	12.68	0.04	93	1	2
T 7 (R,B,30%,-)	192.1	Excellent	3.92	1.62	10.09	0	98	1	-
T 8 (R,B,30%,+)	221.3	Excellent	3.88	1.32	9.80	0	98	1	4
T 9 (BW,B,30%,+)	109.1	2	4.23	3.53	6.69	0	68	2	5
T 10 (control,-)	191.3	Excellent	6.80	10.38	0.06	0.2	50	3	6

B : Beet pulp, W : Wheat bran, R : Rice bran, BW : Buckwheat bran, % : Total additives / total silage amount, + or - : L. plantarum treated or non-treated, RFV : Relative feed value.

^a RFV grade : Excellent (>151), 1 (151~125), 2 (124~103), 3 (102~87), 4 (86~75), 5 (<75).

^b Quality grade : 1 (100~81), 2 (80~61), 3 (60~41), 4 (40~21), 5 (< 20).

(2) 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 평가 결과

표 24. 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지 사료가치, 품질 및 기호성 평가 결과

	Feed value		Quality evaluation						Palatability
	RFV	Grade ^a	pH	Organic acid (% DM)			Flieg's score	Grade ^b	
				Acetic acid	Lactic acid	Butyric acid			
T 1 (W,C,18%,+)	138.0	1	4.03	12.25	87.28	0.47	100	1	2
T 2 (W,C,26%,+)	131.0	1	4.03	11.35	88.65	0	100	1	4
T 3 (R,C,18%,+)	149.5	1	4.01	10.72	89.28	0	100	1	6
T 4 (R,C,26%,+)	131.5	1	3.96	7.99	92.01	0	100	1	5
T 5 (D,C,18%,+)	105.6	2	4.30	21.75	77.27	0.98	96	1	9
T 6 (D,C,26%,+)	93.5	3	4.15	24.34	75.40	0.26	93	1	11
T 7 (F,C,18%,+)	118.6	2	4.39	23.37	75.87	0.75	96	1	8
T 8 (F,C,26%,+)	108.9	2	4.33	19.74	77.87	2.39	86	1	12
T 9 (C,C,18%,+)	86.8	4	4.62	36.35	62.22	1.43	77	2	7
T 10 (C,C,26%,+)	88.7	4	4.36	29.77	69.60	0.63	84	1	10
T 11 (B,B,18%,+)	193.9	Excellent	4.13	28.19	71.81	0	88	1	1
T 12 (B,B,26%,+)	184.1	Excellent	4.08	24.51	75.49	0	93	1	1
T 13 (R,W,18%,+)	263.9	Excellent	3.93	8.70	91.30	0	100	1	3

W : wheat bran, C : corn cob, R : rice bran, B : beet pulp, D : cassava distillers dried grains, F : fibrous feed, % : Total additives / total silage amount, + or - : L. plantarum treated or non-treated, RFV : Relative feed value.

^a RFV grade : Excellent (>151), 1 (151~125), 2 (124~103), 3 (102~87), 4 (86~75), 5 (<75).

^b Quality grade : 1 (100~81), 2 (80~61), 3 (60~41), 4 (40~21), 5 (< 20).

○ RFV를 이용한 사료 가치 측면에서는 부형제로 비트펄프만 사용을 한 T11, T12 와 밀기울과 미강을 사용한 T13에서 가장 우수한 등급을 보였음. 또한 콘콕을 공통 부형제로 하여 밀기울과 미강을 사용한 처리구들 (T1 ~ T4)가 우수한 등급을 보였으나 부형제로 콘콕과 카사바주정박, 섬유질기초원료 그리고 콘콕 만을 이용한 처리구들에서는 앞서 언급한 처리구들에 비해서는 낮은 RFV 값을 보임으로서 낮은 등급을 보임.

○ 유기산 함량 분포에 따른 Flieg's score를 이용한 사료 품질 평가에서는 T9를 제외한 전체 처리구들에서 매우 우수한 품질로 확인이 됨 (T9 또한 우수한 등급). 하지만 Flieg's score를 기준으로 보았을 때 콘콕을 공통 부형제로 하여 미강과 밀기울을 사용하는 것이 카사바주정박과 섬유질기초사료를 사용하는 것에 비해 높은 Flieg's score 수치를 보임. 전체 사일리지에서 Acetic acid 함량이 높고 butyric acid 함량이 낮게 측정된 것으로 보아 발효가 매우 잘 일어났다고 볼 수 있음.

○ 소의 기호성 평가에서는 비트펄프만을 부형제로 사용한 T11과 T12에서 가장 기호성이 좋다는 결과가 나왔음. 콘콕을 공통 부형제로 미강과 밀기울을 사용한 처리구들 (T1 ~ T4, T13) 이 T11과 T12의 다음으로 기호성이 좋다는 결과가 나왔음. 하지만 콘콕을 공통 부형제로 카사바주정박과 섬유질 기초원료를 이용한 처리구들 (T5 ~ T10)에서는 다른 처리구들에 비해 기호성이 떨어지는 것으로 확인됨. 특이점으로는 소들이 섭취 한 콘콕을 공통부형제로 이용한 처리구들의 잔량을 확인해 보았을 때 많은 양의 콘콕이 존재하는 것을 확인하였음. 하지만 비트펄프, 밀기울 그리고 미강만을 이용하여 제조한 처리구들에서는 잔량이 남아 있지 않은 것을 확인 함. 즉, 콘콕을 부형제로 사용하는 것은 부적절하다고 판단됨.

○ 대부분의 사일리지에서 발효의 품질은 좋게 나왔지만 사료 가치 평가 측면에서는 콘콕을 사용하는 것이 비트펄프를 사용하는 것에 비해 떨어지는 것으로 확인이 되었음. 또한 기호성에 있어서 콘콕을 사용하는 것은 부적절 하다고 판단이 되며 비트펄프 만을 사용하거나 밀기울과 미강을 이용한 사일리지가 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에서는 적절한 제조 조건으로 판단 됨.

2) 브로콜리 부산물 사일리지 제조 최적조건 확립

(1) 브로콜리 부산물 사일리지 제조 최적조건

○ 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지와 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지의 결과를 비교하여 최적 조건의 브로콜리 부산물 사일리지 제조 방법을 확립하여 그 조건에 따른 대량 브로콜리 부산물 사일리지를 제조하며 사양실험에 적용을 하는 것이 목표임.

○ 1차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에서는 브로콜리 부산물에 비트펄프와 미강의 함량을 20% 첨가한 사일리지가 가장 적절한 제조 조건으로 판단되었으며, 2차 브로콜리 부산물 시험 사일리지에서는 비트펄프만을 부형제로 사용하거나 밀기울과 미강을 이용한 사일리지가 적절한 제조 조건으로 판단되었음. 결론적으로 브로콜리 부산물 사일리지를 제조 하는데 있어서 브로콜리 부산물에 흡습역할의 부형제로 비트펄프를 이용하며 또한 밀기울을 이용하여 탄수화물 에너지 소스로 에너지를 제공하고 (부형제 / 총사일리지 = 20%) 유산균 접종원을 처리하여 고품질의 발효가 일어나게 하는 조건이 최적의 조건으로 결정됨.

연구목표3: 브로콜리 부산물 사일리지 함유 사료 젖소 및 산란계 사양시험

1. 유산균 접종을 통한 브로콜리 사일리지 대량 제조

1) 브로콜리 부산물 사일리지 대량 제조

(1) 사일리지 대량 제조 계획

표 25. 브로콜리 부산물 사일리지 대량 제조 계획

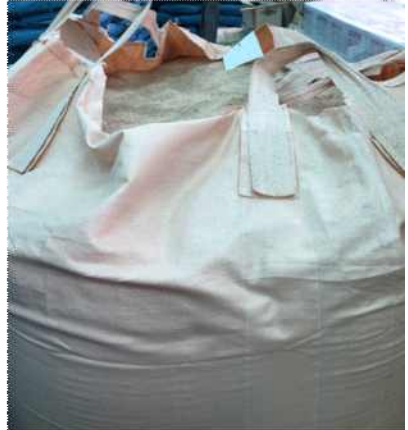
주재료 브로콜리 (kg)	부형제 비트펄프(kg)	부형제 밀기울(kg)	<i>L. plantarum</i> ^a	부형제 ^b	수분함량	총량 (kg)
7,200	900	900	+	20%	75%	9,000

^a *Lactobacillus plantarum* (1×10^{10} cfu/13kg silage) : treated (+).

^b Total additives / total silage amount (w/w %).

(2) 사일리지 제조 과정

○ 브로콜리 부산물 시험 사일리지를 제조하기 위한 브로콜리 부산물 (잎, 줄기)을 학교 인근 농장 으로부터 매수함 (약 7,200 kg). 또한 부형제인 비트펄프와 밀기울 준비(각 부형제 당 900 kg).



**Broccoli by-product
(leaves & stems)**

Beet pulp

Wheat bran

그림 14. 브로콜리 부산물 사일리지 대량 제조를 위한 원료 준비

○ 브로콜리 부산물 (줄기/잎)과 부형제인 비트펄프와 밀기울을 정량하여 TMR 배합기에 넣어 대용량으로 섞이도록 하는 혼합과정을 거침.

- TMR 배합기는 대량의 TMR의 만들기 위해 사용되는 기계로 부산물과 부형제를 넣어 혼합을 하는 과정에 사용됨. TMR 배합기 원료 주입 구간의 대용량 정량 장치에 의해 정량 후 투입.



그림 15. 브로콜리 부산물 대량 사일리지 제조에 사용된 TMR 배합기



그림 16. 브로콜리 부산물 및 부형제의 정량 및 운반

○ 브로콜리 부산물과 부형제들이 혼합이 되는 과정 중 유산균 접종원 (*L. plantarum*) 처리 시행.



그림 17. 브로콜리 부산물의 절단, 부형제와의 혼합 및 접종원 처리

○ 혼합되어진 브로콜리 부산물 사일리지를 받기위한 2차 혼합 및 TMR 배합기로 부터의 회수.



그림 18. 혼합되어진 브로콜리 부산물 사일리지의 운반 및 회수

○ 톤백에 받은 사일리지의 진압 및 혐기적 발효가 일어나기 위한 밀봉 실시.



그림 19. 브로콜리 부산물 사일리지의 진압 과정 및 밀봉

○ 총 15개의 톤백 (약 600kg)에 브로콜리 부산물 사일리지를 제조 하였으며 총 9,000kg 정도의 브로콜리 부산물 사일리지를 제조함. 제조된 사일리지는 그늘진 곳에서 약 45일간 발효.



그림 20. 제조 된 브로콜리 부산물 사일리지의 저장 및 발효

2) 브로콜리 부산물 사일리지 품질 및 기능성 성분 분석

(1) 브로콜리 부산물 사일리지의 영양 및 발효 품질 평가

○ 브로콜리 부산물 사일리지 대량 제조 시 건물함량은 22.8%를 보였으며 ADF를 기반으로 한 TDN 값이 71.7, RFV 수치가 213 으로 (건물 기준) 우수한 사료 가치를 보였음.

○ 유기산 함량에 따른 발효 품질 평가에서는, lactic acid 함량이 11.54%로 acetic acid와 butyric acid 보다 높은 수치를 보였음. 높은 lactic acid 함량과 pH 3.96의 수치로 미루어볼 때 유산 발효가 잘 일어 난 것으로 사료됨. Flieg's score는 93이었으며 1등급 품질임을 확인함.

○ 따라서 분석 결과, TDN 70 이상, RFV 190 이상, pH 4.0 이하, 유산함량 10% DM 이상, Flieg's scoring 1등급을 나타내어 본 대량 제조에 있어서 조성 및 제조 조건의 기준이 되었던 시험 발효사료 T1과 사료가치와 발효품질에 있어서 대등한 특성을 가지고 있는 것으로 판정됨

표 26. 대량 제조 브로콜리 부산물 발효사료의 사료가치 및 발효특성 평가

	DM (%)	TDN (% DM)	RFV	pH	Organic acids (% DM)			Flieg's score ¹⁾	Grade ²⁾
					Acetic acid	Lactic acid	Butyric acid		
Broccoli by-product silage	22.8	71.7	213	3.96	2.97	11.54	0	93	1

BBP, broccli by-product; BP, beet pulp; WB, wheat bran; DM, dry matter; TDN, total digestible nutrients; RFV, relative feed value

¹⁾ Flieg et al. (1938) determined the method how to evaluate the silage quality as a score

²⁾ Quality grade according to Flieg's score : 1 (100~81), 2 (80~61), 3 (60~41), 4 (40~21), 5 (< 20)

○ 발효 기간 중 사일리지 내 온도

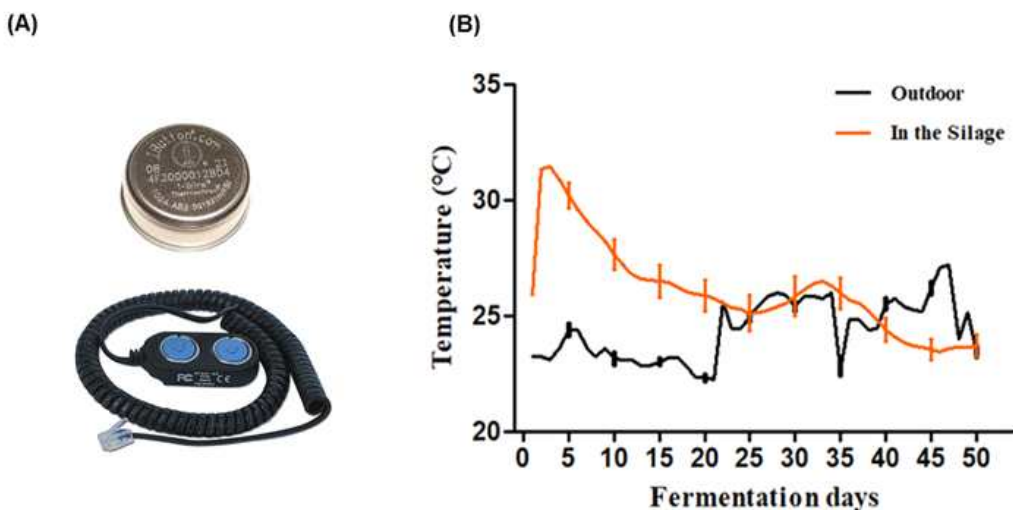


그림 21. 저장 기간 중 브로콜리 부산물 발효사료 내부 온도 측정 (A) 온도 기록 센서와 리더기, (B) 저장 기간 중 브로콜리 부산물 발효사료 내부 온도와 외기온도 변화 비교

- 브로콜리 부산물 사일리지의 저장 기간 중 내부 온도 변화를 조사하기 위해 사일리지를 톤백에 충전할 때 각각의 톤백 심부에 온도 기록 센서(temperature log sensor, ibutton, Maxim integrated, USA)를 설치하여 1일 1회, 60일간 온도 측정 진행.
- 톤백의 내부온도는 저장 2일째 최대 32도로 상승한 후 급격히 하락하여 저장 15일째 초기 온도로 돌아온 후 서서히 외기온도에 수렴하여 낮아지는 경향을 나타냄 (그림 21).
- 유산균을 접종한 후 혐기적 환경에서 사료를 저장할 경우 저장 초기 5일 안에 급격히 발효가 유도되는 것으로 추정할 수 있음. 따라서 브로콜리 부산물 발효사료의 적정 발효기간은 발효 종료 후 후숙기간까지 고려하여 상승한 내부온도가 다시 초기온도로 되돌아오는 15일 (2주)이상이 적절한 것으로 판단됨.

(2) 브로콜리 부산물 사일리지 내 기능성 물질

○ Sulforaphane 함량

- 브로콜리 내 대표적인 항암물질 역할을 하는 sulforaphane을 브로콜리 부산물 사일리지 내 분석에 앞서 원료들에 대한 분석을 진행하였음. 브로콜리 화퇴 부분에는 sulforaphane을 1013.6 mg/kg DM 함유, 브로콜리 부산물인 줄기와 잎에는 338.7 mg/kg DM 함유되어 있음. 브로콜리 부산물에는 sulforaphane 함량이 브로콜리 화퇴 부분의 약 1/3 수준으로 존재함.
- 브로콜리 부산물과 부형제들을 혼합하여 제조 한 브로콜리 부산물 사일리지에서는 제조 당시 sulforaphane의 함량이 91.64 mg/kg DM이 존재하는 것을 확인함.
- 사일리지가 발효하는 동안 sulforaphane의 변화량을 알기 위해 사일리지 제조한 당일을 0w로 설정하여 일주일마다 sulforaphane의 함량을 측정하였음. 그 결과 0w에서 91.6 mg/kg이었던 sulforaphane이 1주일 후 3.20 mg/kg으로 90% 이상 감소하였음. 이후 약 1 mg/kg 수준으로 6주간 지속되는 결과를 나타냄. 발효를 시작하고 발효 효율이 가장 높은 1주일 내에 sulforaphane이 동시에 감소됨을 확인함. (그림 22).

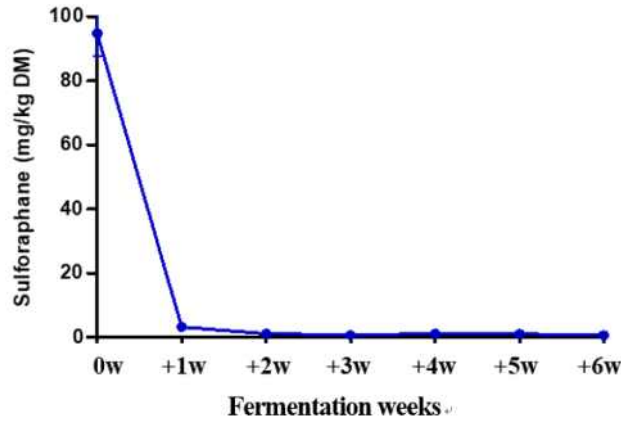


그림 22. 발효 기간 중 브로콜리 부산물 사일리지 내 sulforaphane 함량의 변화

○ Beta-carotene, vitamin-A, phenolics acid, antioxidant activity 분석

- 브로콜리 부산물 발효사료의 발효 전과 발효 후 기능성 물질인 beta-carotene, vitamin A, 및 total phenolics content (TPC) 함량을 분석 비교하였고, 또한 DPPH radical scavenging activity를 통해 radical 소거 능력을 이용하여 사료의 발효 전과 후의 항산화 활성도 변화를 조사하였음.
- 발효 후 사일리지 내 비타민 A의 전구체인 beta-carotene 함량은 두 배 이상 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었지만, 비타민 A 함량은 유의적으로 줄어드는 결과를 나타내었음. TPC는 발효 전에 비해 발효 후 약 20%가 증가하였으며, 이러한 항산화 능력이 있는 기능성 물질인 beta-carotene과 TPC의 유의적 증가에 따라 항산화 활성도가 발효 전 39.11%에서 발효 후 60.53%로 유의적으로 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었음 (표 27).

표 27. 브로콜리 부산물 사일리지 발효 전과 후의 기능성 물질 함량 변화

Functional ingredients	Broccoli by-product silage		SEM	P-value
	before fermentation	after fermentation		
Beta-carotene (mg/kg)	12.0	28.9	1.02	0.0003
Vitamin A (mg/kg)	0.702	ND	0.102	0.008
Total phenolics content (mg GAE/kg)	166.92	201.28	3.03	0.001
DPPH radical scavenging activity (%)	39.11	60.53	2.15	0.002

2. 브로콜리 부산물 사일리지 함유 TMR 사료 젖소 사양시험

1) 시험 사일리지 젖소 사양시험 (승인번호 : SNU-170310-9)

(1) 브로콜리 부산물 사일리지 사양 시험의 목적

○ 현재 우리나라에서 수확되어 지고 있는 식용 가능한 브로콜리 화퇴 부분을 제외 한 다른 목적으로 활용되지 않고 버려지고 있는 브로콜리 부산물인 줄기와 잎 (약 5,000 ~ 6,000 톤)을 활용하여 오랜 기간 저장이 가능하고 영양학적 가치를 높혀 주는 사일리지 형태로 제조하여 젖소에게 사료로써 급여하는데 그 목적이 있음.

○ 브로콜리 부산물을 사일리지 형태로 제조하여 젖소에게 급여하게 된다면 우유로 전이되는 기능성 물질들과 더불어 항산화 효과를 가지는 물질들의 발견과 유성분과 혈액지표에 따른 긍정적인 변화에 대해 기대해 볼 수 있음.

○ 기존 TMR 형태의 배합사료의 일부분을 영양학적 가치가 높은 브로콜리 부산물 사일리지로 대체함으로써 TMR 제조에 있어 단가가 높은 농후사료의 비율을 줄여 농가에 있어서 경제적으로 도움이 될 것을 기대해 볼 수 있음.

(2) 급여 사료의 형태 및 배합 조성비

○ 브로콜리 사일리지의 성분과 실험목장에서 사료로 급여중인 낙농 TMR과 비교하였을 때 단백질, 에너지 등 주요 성분들이 브로콜리 부산물 사일리지의 값이 더 높은 결과가 있었음. 하지만 에너지 평가의 경우 사일리지는 계산식이고 낙농 TMR은 실제 값이므로 사일리지의 에너지 값을 보수적으로 보아 브로콜리 부산물 사일리지와 TMR 간 성분 가치는 동일하다고 간주하는 게 좋을 것이라고 판단, 수분함량만 감안하여 1:1 대체로 결정하였음.

표 28. 브로콜리 부산물 사일리지와 실험목장 TMR 스펙 비교

		브로콜리 부산물 사일리지	실험목장 낙농 TMR
수분 함량 (%)		77.2	37.8
성분 (DM 기준)	CP (%)	19.0	16.5
	NDF (%)	31.4	39.3
	EE (%)	3.9	4.4
	CA (%)	8.9	11.1
	UIP (%)	5.7	5.9
	DIP (%)	13.3	10.4
	NFC (%)	36.7	29.4
	NEL (Mcal/kg)	1.67	1.62
1:1 현물기준 (kg)		1	0.37
1:1 현물기준 (kg)		2.73	1

○ 시험기간 동안 기존 TMR 급여량의 20%를 브로콜리 부산물 사일리지로 대체 급여.

표 29. 브로콜리 부산물 사일리지 및 기존 사료의 배합 조성비 (1일 34두 기준)

기존 낙농 TMR	27 포
브로콜리 사일리지	326 kg
호맥 사일리지 (건초)	340 kg

(3) 시험 계획

- 시험 장소 : 서울대학교 농생명과학대학 부설 연구 목장 (평창캠퍼스)
- 시험 대상 : 착유우 34두
- 시험 계획

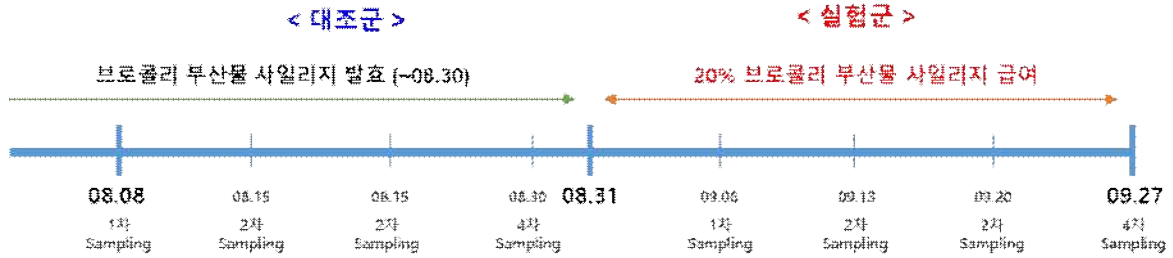


그림 23. 브로콜리 부산물 사일리지 급여 사양 실험 계획

○ 대조군 기간 : 17. 08. 08. ~ 17. 08. 30. / 실험군 기간 : 17. 08. 31. ~ 17. 09. 27.

(4) 우유 샘플 샘플링 및 분석 항목

○ 샘플링 방법 : 로봇 착유기 (DeLaval mobile milking unit, MMU)를 이용한 개체별 오토 샘플링

○ 분석 항목 : 개체별 유량 / Fat / protein / lactose / cell / SnF (Solid-not-fat)
MUN (Milk urea nitrogen), 기능성 물질



그림 24. DeLaval 로봇 착유기

(5) 사양 실험 과정 (실험군)

○ 발효가 완료된 브로콜리 부산물 사일리지 (약 9톤), 기존 낙농 TMR 그리고 호맥 사일리지 (건초) 정량하여 TMR 배합기에 주입한 후 매일 8번에 거친 균등 급여.

- TMR 배합기 내에 존재하는 TMR은 자동화 급여기에 의해 일정 시간 균등 분배.



발효 후
브로콜리 부산물 사일리지

기존 낙농 TMR

호맥 사일리지 (건초)

그림 25. 브로콜리 부산물 사일리지 TMR 배합 원료



그림 26. 사양실험을 위한 TMR 혼합 제조



그림 27. 자동 급이기를 통한 착유우 TMR 급여

(4) 시험 사료 및 기간

○ 비유중기 이후의 착유우 15두를 대상으로 총 시험기간 8주 동안 4주간은, 착유우 두당 하루에, 기존 상용 TMR 20kg과 호밀 곤포 사일리지 10kg을 급여하였고(대조구), 이후 4주간은, 착유우 두당 하루에, 기존 상용 TMR의 건물함량 기준 20%를 브로콜리 부산물 발효사료로 대체한 시험사료 27kg과 호밀 곤포 사일리지 10kg(시험구)을 급여하였음.

○ 사료는 TMR 자동급이기를 이용하여 일일 3회로 나누어 급여하였고, 8주의 시험기간 동안 로봇착유기(VMS1, DeLaval, Sweden)를 통해 착유를 진행하면서 각 착유우의 개별 유생산량을 매일 자동으로 기록하고, 매주 1회 각 착유우로부터 우유시료를 채취하여 유성분 분석에 이용하였음.

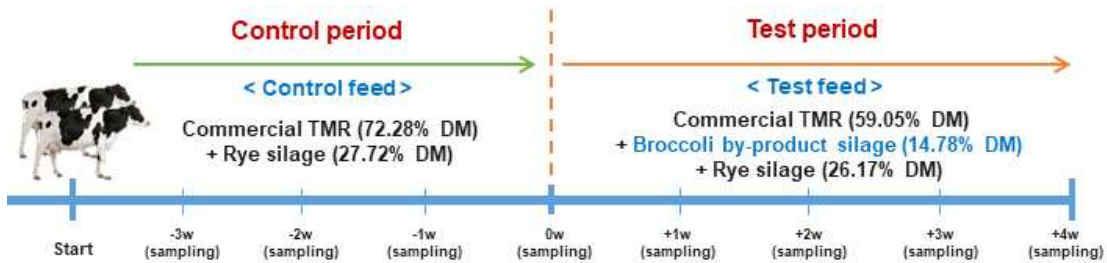


그림 28. 브로콜리 부산물 사일리지 급여 사양시험 개요

2) 브로콜리 부산물 사일리지 급여가 착유우 생산성에 미치는 영향

(1) 유량에 미치는 영향

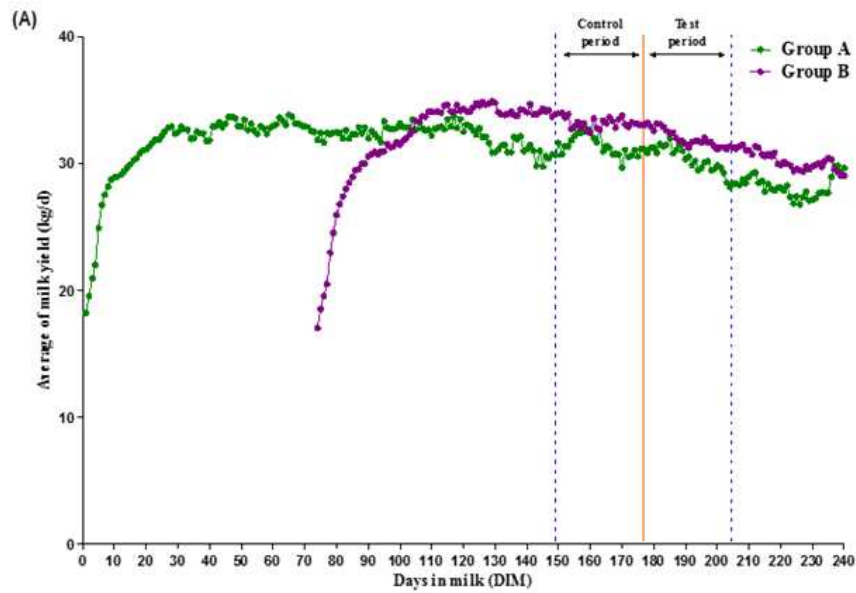
○ 브로콜리 부산물 발효사료의 기존 상용 TMR 대체효과를 알아보기 위해 시험기간 동안 착유우의 유량 및 유성분 변화를 비교 분석 진행.

○ 시험에 이용된 홀스타인 착유우를 시험개시일 기준 착유일수(DIM: Days in Milking)에 따라 2그룹(그룹 A, 5두: DIM 146.8 ± 22.9일; 그룹 B, 10두: DIM 73.9 ± 6.9 days)으로 나눈 후

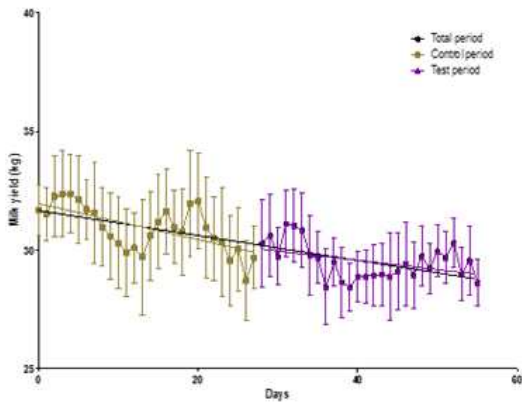
로봇착유기 시스템에 기록된 일일 착유량 정보를 이용하여 각 그룹의 평균 유생산량 곡선을 도출하였고 이를 이용하여 시험기간 중 유생산량의 변화 여부를 분석 (그림 29).

○ 분만 후 홀스타인 젖소의 표준 착유일수를 305일 기준으로 볼 때, 그룹 A의 경우에는 시험기간이 비유 중기, 그룹 B의 경우에는 시험기간이 비유 초기에 해당하는 것을 알 수 있었음 (그림 29 A). 그림 29 (A)에서 보인 것과 같이, 젖소의 유생산량은 송아지 분만 후 1~2 개월이 지나 최대생산량에 도달한 후 나머지 착유기간 동안 점차 감소하므로, 사료 대체에 따른 시험기간 동안의 유생산량 변화를 분석하기 위해 그룹 A, B의 평균 유생산량 곡선의 대조구 기간과 시험구 기간으로부터 각각 선형 회귀식을 도출하였고, 두 선형 회귀식의 기울기의 증감 여부를 통해 대조구 기간과 시험구 기간 전후의 유생산량 변화를 통계분석을 통해 판정하고자 함.

○ 그 결과, 비유 중기 및 비유 초기에 해당하는 그룹 A($p=0.7429$), B($p=0.5564$) 모두 대조구 기간과 비교하여 브로콜리 부산물 발효사료를 급여한 시험구 기간에서 전후의 유생산량 차이에 유의적인 변화가 나타나지 않았음.



(B) Group A



(C) Group B

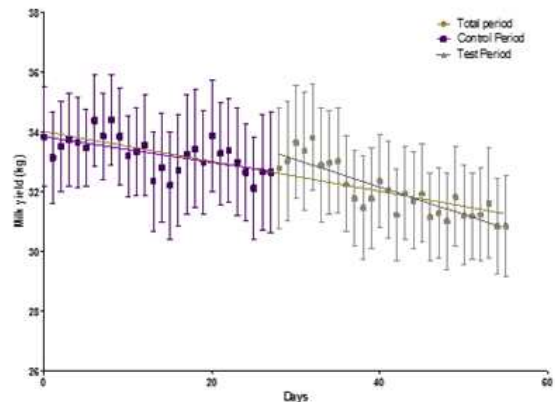


그림 29. 브로콜리 부산물 발효사료 급여가 유생산량에 미치는 영향 분석. (A) 착유우의 평균 유량곡선, 그룹 A (5두, DIM 146.8 ± 22.9 일, 비유중기), 그룹 B (10두, DIM 73.9 ± 6.9 days, 비유초기), (B) 그룹 A의 대조구 기간과 시험구 기간 사이의 유생산량 변화 분석, (C) 그룹 B의 대조구 기간과 시험구 기간 사이의 유생산량 변화 분석

(2) 유성분에 미치는 영향

○ 유성분 함량의 변화는 그룹 A, B에서 대조구 기간과 시험구 기간에 생산된 우유 시료로부터 유지방(milk fat), 유단백(milk protein), 유당(lactose), 및 무지고형분(SnF, Solid not Fat)의 함량을 분석하여 비교함. 그 결과, 조사한 모든 유성분에 대해 대조구에 비해 시험구에서 다소 높은 평균값을 보였으나, 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았음 (그림 30).

○ 이상의 시험 결과를 종합할 때, 착유우를 대상으로 기존 상용 TMR을 브로콜리 부산물 발효사료로 건물 기준 20% 대체하여 급여할 경우 유생산량 및 유성분 함량 등, 생산성에 유의적인 변화를 초래하지 않아 본 발명에서 제시하는 브로콜리 부산물 사일리지의 사료 대체효과가 인정됨.

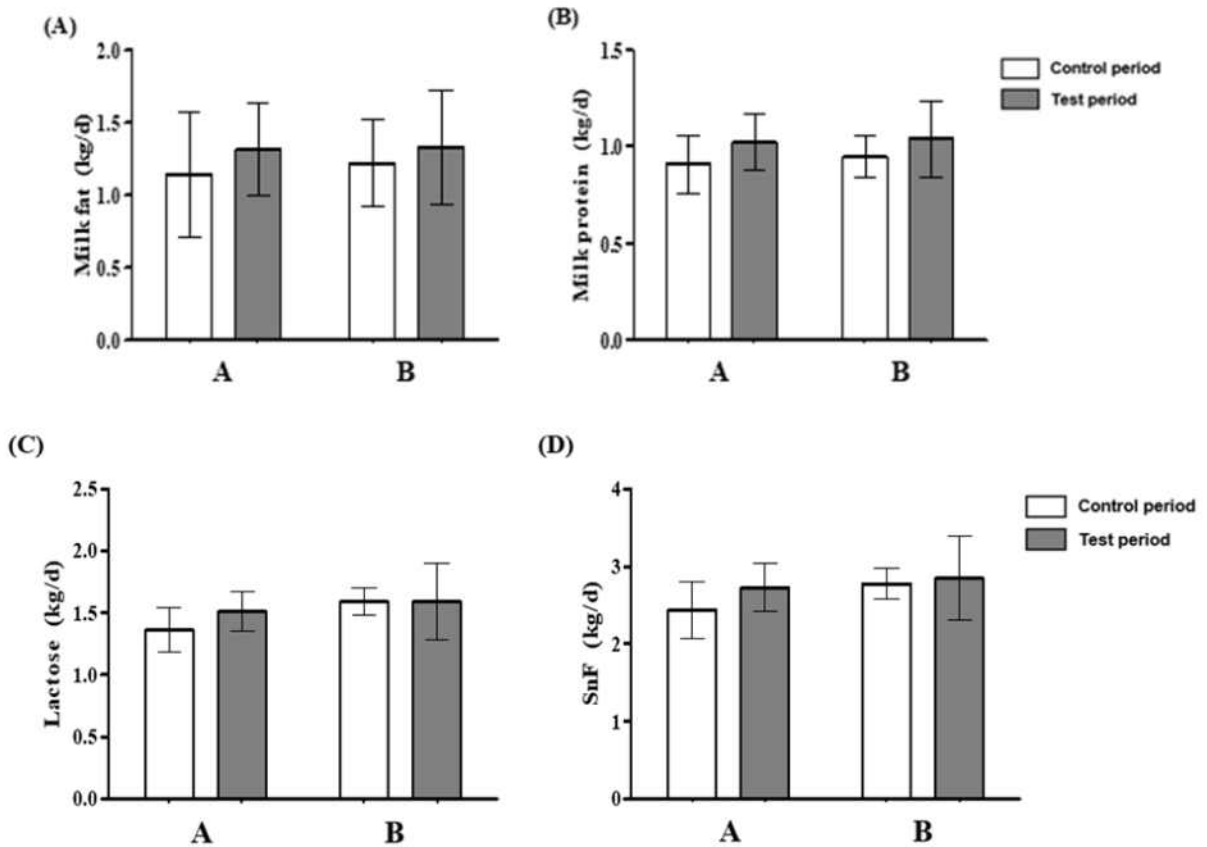


그림 30. 시험기간 내 유성분 변화 확인. (A) milk fat (kg/d). (B) milk protein (kg/d). (C) Lactose (kg/d). (D) SnF(Solid not fat) (kg/d)

3. 건조 브로콜리 부산물 사일리지 사료 산란계 사양시험

1) 산란계 사양시험 (승인번호 : SNU-180219-1)

○ 서울대학교 그린바이오과학기술원에 위치한 양계사에 있는 산란계 (품종명: 라만 브라운, Lahmann Brown-Lite) 52주령 100수를 대상으로 건조한 브로콜리 부산물 사일리지 급여 시험을 진행함. 각 케이지 당 5수를 배치하고 10개의 케이지가 한 그룹으로 기존 산란계 사료에 건조 브로콜리 사일리지를 2.5% (그룹 A)와 5% (그룹 B)를 첨가하여 실험 및 분석을 진행함.

2) 시험사료 및 기간

(1) 시험사료 제조

○ 50 kg의 브로콜리 부산물 사일리지를 65°C에서 3일 동안 건조한 후 닭이 섭취할 수 있도록 5 mm 이하의 크기로 분쇄.

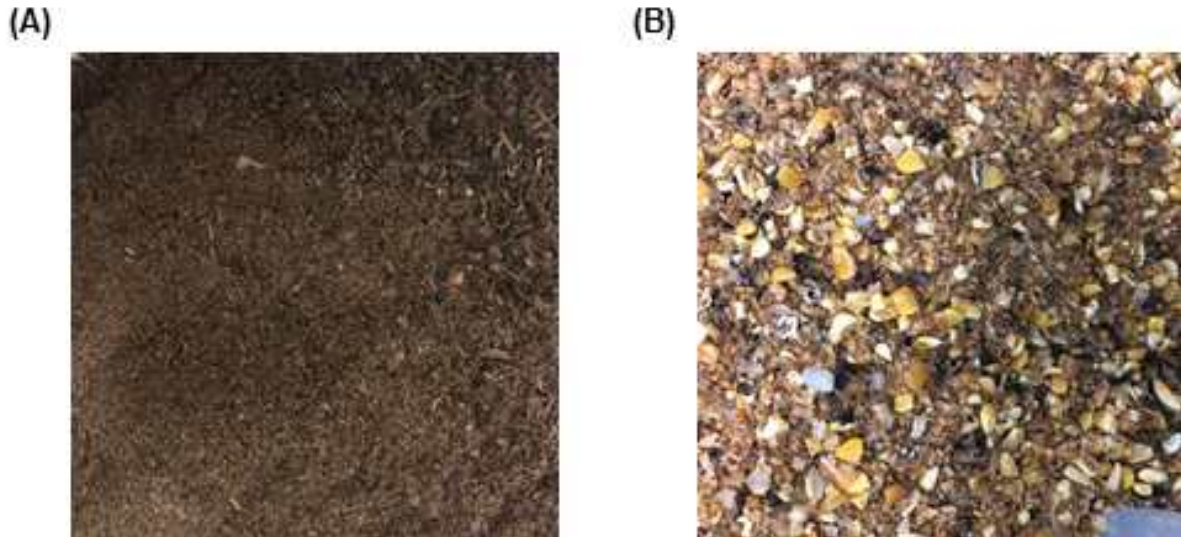


그림 31. 양계 사양시험에 사용된 브로콜리 부산물 사일리지의 분쇄 형태 (A) 및 양계 사료의 5%를 대체 혼합한 형태 (B)

(2) 급여 방법 및 기간

○ 브로콜리 부산물 사일리지의 처리량에 따른 산란계의 성적을 분석하기 위해 건물기준 2.5%와 5% 를 혼합하여 급여함. 사료급여 기간 28일 (4주)간 진행되었으며, 사료급여 전 (0주), 2주, 4주차에 혈액을 채취, 매주 계란을 수거 및 분석.

○ 산란계의 성적을 확인하기 위해 매주 사료잔량을 기록하고 평균 계란의 무게 산란 수를 기록함. 또한, 산란계 건강에 영향을 주는 인자를 분석하기 위해 혈액을 채취하였고 계란의 품질을 분석하기 위해 매주 계란을 분석함.

3) 브로콜리 부산물 사일리지 급여가 산란계 생산성에 미치는 영향

(1) 산란계 생산성에 미치는 영향

○ 건조한 브로콜리 부산물 사일리지를 첨가하였을 때 특유의 향 때문에 초기에 산란계의 사료섭취량이 대조군에 비해 사료섭취량이 떨어지는 경향을 보였으나 유의적이지는 않음. 사일리지가 많이 첨가 될수록 이런 경향성이 더 커짐. 시간이 지날수록 사료 섭취량은 회복하는 양상을 보임.

○ 사료섭취 저하로 인한 계란의 무게와 생산성이 일시적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았음 (표 30).

○ 시험이 계속될수록 5%를 사일리지로 대체한 그룹에서 대조군에 비해 사료섭취량과 그에 따른 계란 무게 및 생산성에 유의적으로 차이가 두드러지는 양상을 보였으나, 2.5%를 대체한

그룹과의 유의적 차이는 없었음 (표 30).

표 30. 시험기간 동안 브로콜리 부산물 사일리지 급여 산란계의 생산성

Items	Treatment			p-value
	Control	B2.5	B5	
0 TO 1 WEEK				
Daily feed intake(g/head)	119.73±0.02 a	114.49±1.86 a	112.39±1.79 a	0.1502
Average egg weight(g)	57.63±2.39 a	57.61±1.80 a	53.46±2.47 a	0.3375
Feed conversion ratio	2.077±0.09 a	1.99±0.06 a	2.10±0.09 a	0.5257
Hen-day egg production, %	98.10±4.04 a	95.71±3.13 a	90.00±4.36 a	0.3390
1 TO 2 WEEK				
Daily feed intake(g/head)	119.71±0.01 a	117.23±1.28 a	115.54±1.02 a	0.1918
Average egg weight(g)	57.33±1.01 a	55.52±1.35 a	54.31±1.26 a	0.2374
Feed conversion ratio	2.09±0.04 a	2.11±0.05 a	2.13±0.05 a	0.8077
Hen-day egg production, %	94.29±1.74 a	91.43±2.13 a	90.57±2.21 a	0.4194
2 TO 3 WEEK				
Daily feed intake(g/head)	119.71±0.01 a	116.88±1.49 a	115.07±1.04 a	0.1964
Average egg weight(g)	56.99±1.26 a	56.72±0.81 a	54.12±0.38 a	0.0668
Feed conversion ratio	2.10±0.05 a	2.06±0.03 a	2.13±0.01 a	0.3984
Hen-day egg production, %	93.33±2.06 a	93.43±1.49 a	90.86±0.74 a	0.4203
3 TO 4 WEEK				
Daily feed intake(g/head)	117.43±0.33 a	117.45±1.25 a	117.73±0.65 a	0.9745
Average egg weight(g)	60.02±1.88 a	56.25±1.42 ab	53.75±1.11 b	0.0277
Feed conversion ratio	1.96±0.07 a	2.09±0.05 a	2.19±0.05 a	0.0840
Hen-day egg production, %	96.19±3.21 a	92.00±2.47 a	89.43±1.89 a	0.2016
0 TO 4 WEEK				
Daily feed intake(g/head)	119.15±0.31 a	116.51±0.74 ab	115.18±0.65 b	0.0160
Average egg weight(g)	58.00±0.84 a	56.52±0.67 a	53.91±0.71 b	0.0009
Feed conversion ratio	2.06±0.03 a	2.06±0.03 a	2.14±0.03 a	0.1085
Hen-day egg production, %	95.48±1.42 a	93.14±1.17 ab	90.21±1.25 b	0.0179

Each value represents the mean±SD of ten replicate cages(five birds per cage).
a-b Means in a row without a common superscript letter differ as analyzed by one-way ANOVA and the TUKEY test.

(2) 계란 품질의 대한 영향

- 달걀의 품질을 분석하기 위해 난백의 높이와 난황의 높이를 측정하고 albumen의 높이 및

호우 유닛 (haugh unit) 그리고 난각의 두께를 측정함. 또한 브로콜리에 포함된 오메가3 지방산이 달걀의 지방 축적에 영향을 미치는지 확인하기 위해 오메가3 및 오메가6 지방산의 비율 분석 진행.

○ 호우유닛은 계란의 신선도를 측정하는 지표로써 높을수록 신선도가 높음을 의미함. 브로콜리 부산물 사일리지를 급여에 따라 난백과 호우유닛이 높아지는 경향성이 분석됨. 이는 달걀의 생산성이 조금 줄어드는 대신 신선도가 높은 달걀이 생산되는 것으로 의미를 해석할 수 있음. 난각의 두께의 경우에는 브로콜리 첨가 유무에 따라 변화하는 경향성은 보이지 않았음 (그림 32).

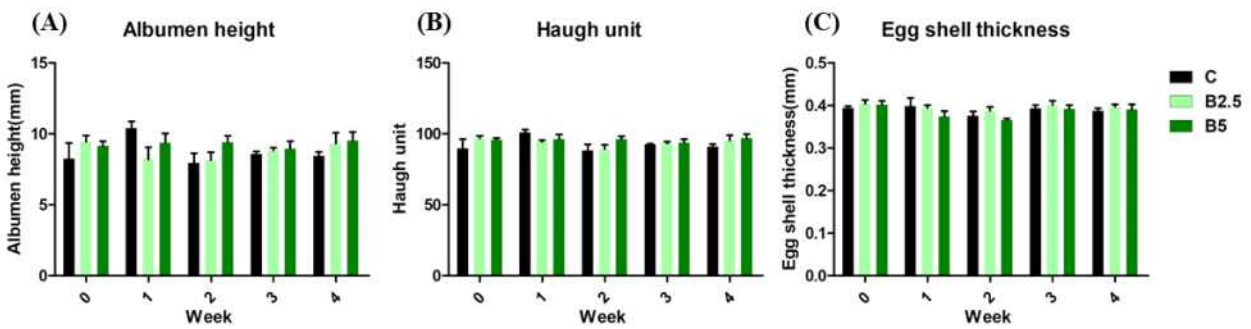


그림 32. 계란의 품질 측정 결과. (A) 난백의 높이. (B) 호우 유닛. (C) 난각의 두께.

○ 계란에 포함된 오메가3와 오메가6 지방산의 비율을 분석을 통해 브로콜리 부산물 사일리지에 포함된 오메가3 지방산의 영향을 분석함. 대조군에 비해 브로콜리 사일리지를 첨가하였을 때 오메가 6:오메가3 비율이 감소하는 경향을 보이긴 했지만 유의적인 차이가 없었음. 브로콜리 내 오메가3 함량은 계란의 지방 profile에 영향을 미치지 않음 (그림 33).

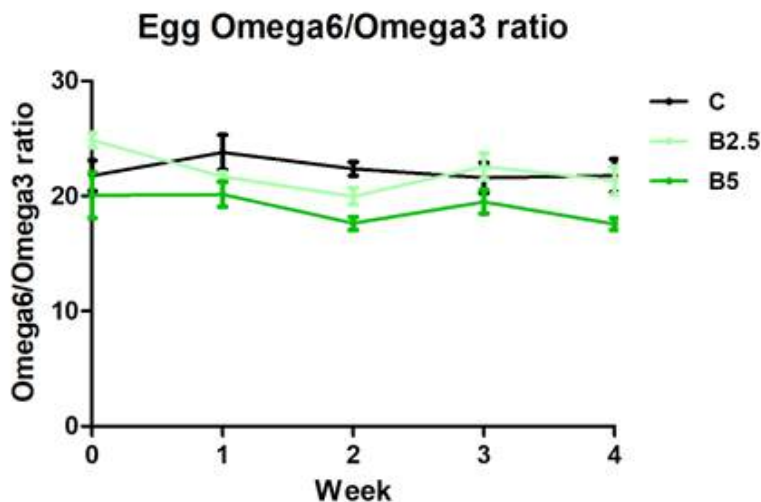


그림 33. 계란의 지방내 오메가6:오메가3 지방산 비율 분석

(3) 산란계의 건강에 미치는 영향

○ 산란계는 일생을 좁은 케이지 안에서 밀집 사육되므로 환경적 요인에 의한 스트레스가 있을 수 있음에 따라 만성적 염증이 발생할 수 있음. 염증은 조직 손상을 누적시키고 다양한 문제를 발생시킬 수 있음.

○ 채취한 산란계의 혈액을 이용하여 염증성 지표인 heterophil과 lymphocyte 의 비율 (H:L ratio)을 분석하고 스트레스성 호르몬인 corticosterone을 분석함. H:L ratio의 경우 브로콜리 사일리지를 5%를 첨가한 그룹과 대조군이 비슷한 양상을 보였고 2.5%를 첨가한 그룹은 유의적으로 ratio가 낮았음. ratio가 낮은 그룹은 스트레스가 다른 그룹에 비해 많다는 것을 의미함. Corticosterone의 경우 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었지만 2.5% 첨가한 그룹에서 가장 높았음 (그림 34).

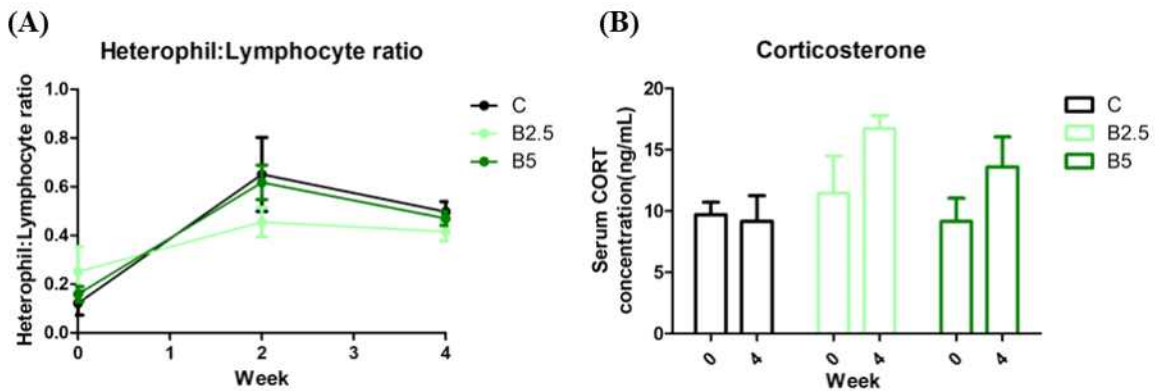


그림 34. 산란계 혈액지표 분석 (A) H:L ratio. (B) corticosterone.

○ 채취한 산란계의 혈액을 이용하여 염증성 지표인 TNF- α , IL-6 그리고 IL-1 beta 등 사이토카인을 분석함. 이 세 가지 사이토카인은 염증성지표로 높을수록 산란계 체내의 염증이 만성적임을 의미함. 브로콜리 사일리지를 2.5% 처리 하였을 때 염증성 사이토카인이 증가하는 경향을 보이거나 5%를 처리하였을 때는 줄어드는 경향을 보임 (그림 35).

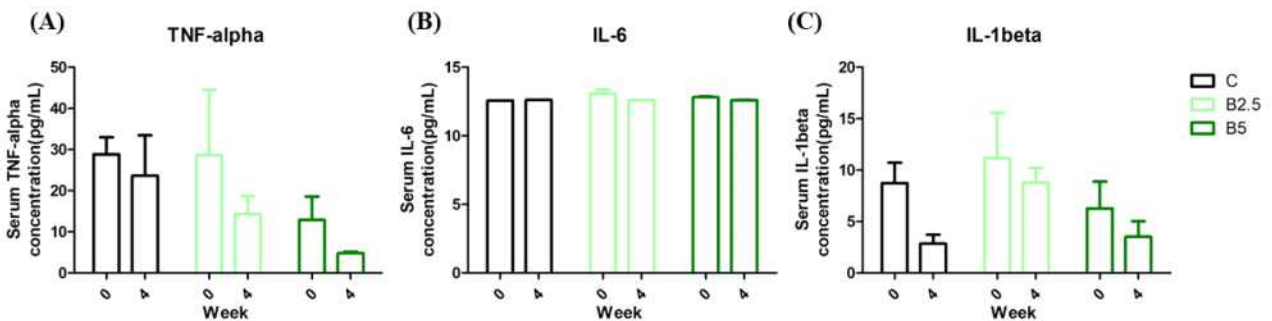


그림 35. 산란계 혈액 내 염증성 지표인 cytokine 분석. (A) TNF-alpha. (B) IL-6. (C) IL-1beta

○ 한 달간 사양시험 종료 후, 간을 적출 및 조직을 분쇄하여 mRNA를 추출. 추출한 mRNA

를 이용하여 qRT-PCR을 통해 cDNA를 만들어 지방대사 및 스트레스, 염증 관련 유전자 활성화 여부를 확인함. Cox2는 효소로서 지방산 변성을 유발하는 인자. 오메가3 및 오메가6 지방산 모두 변성시킬 수 있으며 지방산 조성에 따라 염증성 및 항염증성 사이토카인을 유발함. 브로콜리 사일리지 5%를 급여하였을 때 *cox2* 유전자가 활성화되는 것을 알 수 있었음 (그림 36).

○ 스트레스 지표로서 HSP 70은 단백질 refolding과 관련된 효소로써 스트레스가 많아질 경우 세포 내에서 단백질의 폴딩이 잘못이루어지기 때문에 활성화 됨. 사일리지 5% 급여군과 control 군에서는 HSP70 유전자가 높음. 이것은 활성화가 되어 염증성 지표를 저감하는 쪽으로 작용하였기 때문임 (그림 36).

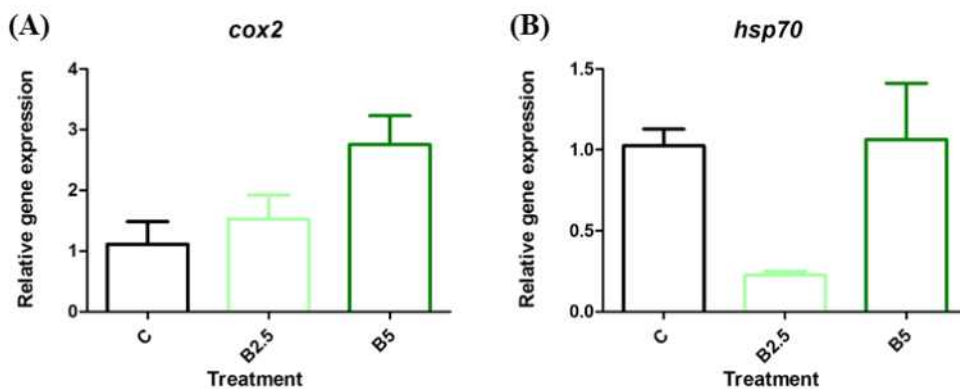


그림 36. 산란계 간에서 유전자 발현 양상 확인. (A) *cox2*. (B) *hsp70*.

○ 이상의 시험 결과를 종합할 때, 산란계를 대상으로 기존 상용 사료에 브로콜리 부산물 발효사료를 5% 처리하였을 때 생산성은 조금 줄어드는 경향을 보였으나, 계란의 품질이 좋아지고 스트레스 지표에서도 우수한 양상을 보임. 또, 이 발효사료는 생산성에 유의적인 변화를 초래하지 않아 본 발명에서 제시하는 브로콜리 부산물 사일리지의 사료 대체효과가 인정됨.

연구목표4: 브로콜리 부산물 TMR 기능성 증진을 위한 생산조건 개선

1. MHA 처리에 의한 브로콜리 부산물 사일리지 보존성 검사

1) MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 제조 시험

(1) MHA 처리 시험 개요

○ MHA (methionine hydroxy analogue, 메치오닌수산화물)

- methionine의 아미노기 (-NH₂) 대신에 수산기 (-OH)가 대치되는 것으로 methionine 대체 물질로 MHA는 사료에 있어 칼슘의 원료로도 사용이 되며 산성제 이므로 완충력을 죽이는 역할을 하기도 함. 보통 젖소사료에 첨가될 시 유지방율을 높인다는 보고가 있으며, 양계사료에 첨가 시 비유초기에 성장율을 높이며 성숙한 닭에서는 생산성을 높인다는 결과가 있음. 따라서 저비용 고효율의 유용한 첨가제로써 분류됨. MHA는 산도가 1 이하로 매우 낮으며, MHA 또는 DL-methionine은 박테리아의 질소 결합을 촉진시키고 기질의 소화율에도 작용한다는 연구가 있음.

- MHA를 사료 첨가제로써 사용을 하면 고온다습한 상황에서 유발되는 사료의 부패 지표인 곰팡이 발생과 연화 현상 등을 방지하는 특성을 가지고 있음. 즉, 혐기상태에서의 사료 젖산 등의 발효를 억제하게 하는 특징을 가짐.

○ 유산균을 접종하여 제조한 발효 사일리지 선행 연구 결과, 발효 과정을 거치면서 기능성 성분이 감소되는 현상을 확인하였음. 발효를 억제시켰을 때 이러한 감소현상 방지여부 및 사일리지의 품질을 확인하고자 비발효 사일리지 제조 시험을 계획하였고, 발효 억제를 위한 소재로 유기산, MHA를 선정하여 진행하였음.

(2) MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 제조

표 31. MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 배합표

원료		Control 1	Control 2	T 0.2%***	T 0.4%	T 0.8%
브로콜리 (부산물/파지)		28.8kg	28.8kg	28.8kg	28.8kg	28.8kg
부형제 (20%)	비트펠프	3.6kg	3.6kg	3.6kg	3.6kg	3.6kg
	밀기울	3.6kg	3.6kg	3.6kg	3.6kg	3.6kg
MHA (Methionine hydroxy analogue)		DW 350ml*	LP 200mg** DW 350ml	MHA 81.9ml DW 268.1ml	MHA 163.8ml DW 186.2ml	MHA 327.6ml DW 22.4ml
Sampling		각 그룹별 0d, 10d, 20d, 30d, 60d, 1kg씩 소분하여 sampling				

* 부형제 20% 브로콜리 부산물 사일리지 수분함량 약 70%로, 처리 당 약 0.97% 수분함량 상승

** LP (청미락토) 200mg은 3.0×10^9 cfu에 해당

*** MHA의 %는 브로콜리 부산물 사일리지 중량 기준

2) MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 성분 분석

(1) 제조한 사일리지를 0, 10, 20, 30, 60일차에 샘플링 하였고, 성분 분석을 통하여 각 일차별로 사일리지 품질, 보존성 확인과 기능성 물질 함량의 변화 확인. 다만 일반성분은 0, 30, 60일차에만 분석을 수행.

(2) 일반성분

○ DM, CP, EE, CF, Ash, ADF, NDF 등 일반 성분 분석을 진행하였으며 MHA 처리 브로콜리 사일리지의 성분 분석과 사료 가치 평가 기준을 이용하여 대조구와 MHA 처리구 사일리지의 사료 가치를 비교분석함.

○ 전반적으로 모든 처리구에서 결과 값이 비슷한 양상을 보임. 이로써 MHA 처리를 했음에도, 사일리지 성분에 악영향을 미치지 않는 것을 확인함. 선행 연구를 통해 가장 우수한 조합의 부형제와 비율을 찾고, 그에 맞게 제조하였기 때문에 Control에서는 좋은 결과를 예상하였음. TDN 결과를 보면, 모든 처리구에서 70 전후로 높은 결과를 얻음. 또한 RFV를 이용한 사료 가치 평가 결과, Con1의 60일차를 제외하고는 모든 샘플에서 Excellent 등급을 받음. MHA를 처리한 모든 처리구 또한 151점 이상의 Excellent 등급으로 나왔음. 종합적으로 봤을 때 0.2~0.8 % MHA의 첨가로 인한 손실이나 사료 가치 저하 현상은 없는 것을 알 수 있음.

표 32. 일반 성분 분석 결과

Sample	Date	DM	CP	EE	CF	Ash
		%				
Con 1	0d	24.70	18.65	2.94	13.37	8.51
	10d	24.20	18.67	2.81	17.83	9.89
	30d	22.07	20.59	4.02	17.22	11.57
	60d	20.53	20.30	3.84	19.26	11.74
	Mean	22.88	19.55	3.40	16.92	10.43
Con 2	0d	24.00	18.26	2.91	14.08	8.35
	10d	27.40	18.04	3.30	17.2	8.14
	30d	26.53	17.75	6.23	16.33	8.27
	60d	25.00	19.59	3.03	18.26	10.18
	Mean	25.73	18.41	3.87	16.47	8.74
T 0.2%	0d	26.63	19.14	3.55	14.84	9.17
	10d	26.53	17.20	2.91	18.99	8.43
	30d	23.67	20.41	3.95	17.19	11.24
	60d	23.33	18.67	3.05	16.98	10.26
	Mean	25.04	18.86	3.37	17.00	9.78
T 0.4%	0d	27.33	17.76	3.03	17.83	8.25
	10d	26.33	20.15	2.34	17.31	9.91
	30d	24.20	18.32	3.47	16.94	8.92
	60d	26.07	19.30	3.83	15.82	9.88
	Mean	25.98	18.88	3.17	16.98	9.24
T 0.8%	0d	24.00	19.05	3.36	15.84	9.12
	10d	27.67	18.43	2.92	15.39	8.97
	30d	27.60	18.37	4.58	17.12	8.69
	60d	25.40	19.56	3.55	16.02	9.92
	Mean	26.17	18.85	3.60	16.09	9.18

표 33. 2차 브로콜리 부산물 사일리지의 성분 분석 및 사료 가치 평가

Sample	Date	ADF	NDF	Ammonia	TDN	RFV
		%				
Con 1	0d	18.82	37.06	0.31	74.03	186.35
	10d	21.89	39.13	0.50	71.61	170.80
	30d	21.04	34.69	0.67	72.28	194.44
	60d	24.08	43.96	0.69	69.88	148.43
	Mean	21.46	38.71	0.54	71.95	175.00
Con 2	0d	21.60	41.57	0.30	71.84	161.28
	10d	22.49	43.15	0.40	71.13	153.88
	30d	20.45	36.73	0.47	72.74	184.80
	60d	23.47	43.02	0.65	70.36	152.70
	Mean	22.00	41.12	0.46	71.52	163.17
T 0.2%	0d	19.36	38.58	0.32	73.61	177.99
	10d	23.68	42.21	0.38	70.19	155.27
	30d	21.13	34.10	0.63	72.21	197.61
	60d	22.16	40.18	0.58	71.39	165.85
	Mean	21.58	38.77	0.48	71.85	174.18
T 0.4%	0d	23.48	43.15	0.31	70.35	152.22
	10d	23.29	44.36	0.39	70.5	148.38
	30d	21.79	36.59	0.42	71.69	182.86
	60d	19.39	39.02	0.48	73.58	175.93
	Mean	21.99	40.78	0.40	71.53	164.85
T 0.8%	0d	20.67	40.42	0.28	72.57	167.54
	10d	21.17	40.16	0.32	72.18	167.72
	30d	23.66	37.25	0.38	70.21	175.98
	60d	20.96	38.97	0.44	72.34	173.23
	Mean	21.62	39.20	0.36	71.82	171.12

(3) 유기산 분석 결과

표 34. 유기산(Acetic/Lactic/Propionic/Butiric) 분석 결과

Sample	Data	LA	AA	PA	BA
		%DM			
Con1	0d	1.82 ^c	0.57 ^d	0.08 ^a	0.11 ^b
	10d	15.95 ^b	2.14 ^c	0.13 ^a	0.14 ^b
	20d	20.53 ^a	2.66 ^{bc}	0.52 ^a	0.50 ^{ab}
	30d	21.34 ^a	3.83 ^{ab}	0.29 ^a	0.84 ^a
	60d	25.30 ^a	4.76 ^a	0.49 ^a	0.37 ^{ab}
	Mean	16.99 ^A	2.79 ^A	0.30 ^A	0.39 ^A
Con2	0d	5.75 ^b	0.82 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
	10d	8.30 ^b	2.95 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
	20d	20.11 ^a	2.58 ^a	0.03 ^b	0.03 ^b
	30d	21.91 ^a	2.30 ^a	0.04 ^b	0.12 ^b
	60d	21.26 ^a	3.03 ^a	1.99 ^a	1.03 ^a
	Mean	15.47 ^A	2.34 ^{AB}	0.41 ^A	0.24 ^{AB}
T0.2%	0d	1.24 ^d	0.48 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
	10d	9.85 ^c	2.28 ^a	0.03 ^a	0.00 ^a
	20d	17.81 ^b	1.66 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
	30d	21.93 ^a	2.66 ^a	0.05 ^a	0.05 ^a
	60d	19.89 ^{ab}	2.59 ^a	0.00 ^a	0.06 ^a
	Mean	14.14 ^A	1.93 ^{AB}	0.02 ^A	0.02 ^B
T0.4%	0d	0.98 ^c	0.42 ^d	0.00 ^a	0.00 ^a
	10d	10.62 ^b	1.45 ^{bc}	0.00 ^a	0.00 ^a
	20d	18.52 ^a	2.03 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	30d	21.10 ^a	1.90 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a
	60d	21.49 ^a	1.32 ^c	0.00 ^a	0.00 ^a
	Mean	14.54 ^A	1.42 ^{AB}	0.00 ^A	0.00 ^B
T0.8%	0d	0.64 ^c	0.43 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
	10d	7.24 ^b	1.09 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	20d	16.07 ^a	1.21 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	30d	18.04 ^a	1.21 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
	60d	15.70 ^a	1.40 ^a	0.00 ^a	0.03 ^a
	Mean	11.54 ^A	1.07 ^B	0.00 ^A	0.01 ^B

○ Acetic acid (초산)

- 모든 그룹에서 10일 차부터 Acetic acid의 함량이 증가하는 경향을 보임. Acetic acid를 생성하는 균에 의해 그 산물인 Acetic acid가 증가됨. 타 그룹과 비교했을 때, MHA 0.4% 처리구

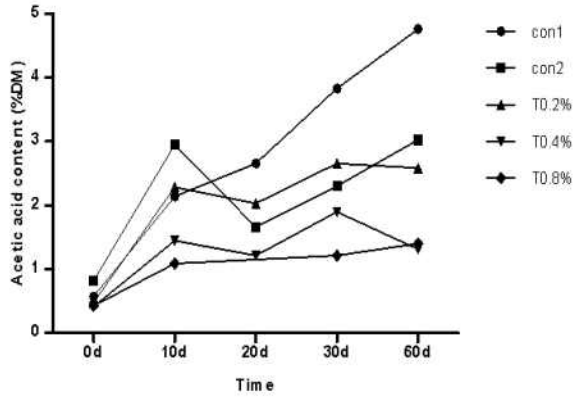
와 특히 0.8% 처리구에서 Acetic acid의 함량이 증가하는 폭이 낮고 전반적으로 낮은 농도를 유지하는 경향을 보임. 이는 MHA의 첨가로 pH가 낮아져 acetic acid를 생성하는 균을 억제하는 것으로 사료됨.

○ Lactic acid (유산)

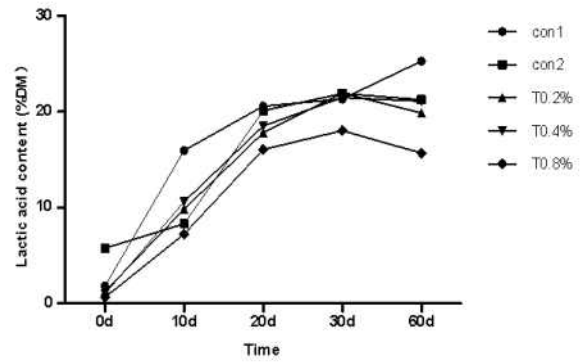
- 위와 같이 모든 그룹에서 0~20일동안 LA함량이 증가하여 20일 이후에 유지되는 경향을 보임. 이는 모든 그룹에서 유산 발효가 일어났음을 알 수 있음. MHA를 첨가하였음에도 발효가 일어났으나 MHA 처리그룹에서 Lactic acid의 함량이 낮은 경향이 있고, 0.8%를 첨가한 처리구에서는 전 기간 동안 Lactic acid의 함량이 가장 낮음. 이는 MHA를 처리함으로써 발효가 다소 억제된 것으로 사료됨.

○ Butyric acid (낙산)

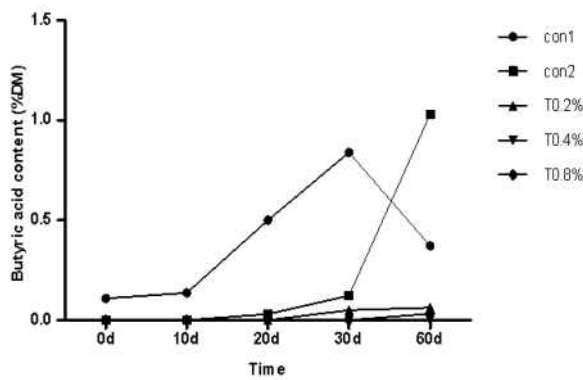
- 유산균이나 MHA를 첨가하지 않은 Con1의 결과를 보면 butyric acid 함량이 증가한 것으로 보아 낙산 발효가 일어났음을 확인. 유산균을 첨가한 Con2의 경우, 초반에 유산 발효가 잘 일어났지만 20일 차부터 butyric acid 함량이 증가하기 시작해 60일에는 급상승함. 반면 MHA를 첨가한 처리구에서는 butyric acid 함량이 대조구에 비해 상당히 적거나(T0.2 처리구) 아예 검출되지 않음.(T0.4/T0.8 처리구) 이는 MHA의 첨가가 pH가 저하 등으로 인해 butyric acid 생성균을 억제하는 효과를 나타낸 것으로 사료됨.



초산 (acetic acid)



유산 (lactic acid)



낙산 (butyric acid)

그림 37. MHA 브로콜리 부산물 사일리지 유기산 함량 변화

(4) pH

○ 발효 전인 0일차에서는 대부분의 그룹의 pH가 5.0 이상으로 측정되었고, MHA의 영향으로 0.8% 처리구만이 pH가 5.0 이하로 측정됨. 이로 인해 pH 5~6 사이에서 생성되는 Acetic acid가 억제 되었음으로 사료됨. 모든 그룹에서 10일차에 급격하게 pH가 감소하였고 Lactic acid의 함량 증가로 보아 모든 그룹에서 유산 발효가 일어났음을 짐작할 수 있음. Con1 그룹은 20일차부터 pH가 증가하여 30일차에 가장 높은 수치를 보이는데, 이는 Con1의 butyric acid 결과 값과 일치함. Con2 또한 butyric acid 결과와 일치하는 것을 확인함. pH의 증가로 인해 낙산발효가 일어나 butyric acid이 생성된 것으로 판단됨. 이전에 언급한대로 MHA를 첨가한 처리구에서는 MHA로 인해 pH가 저하 되었고, 이로 인해 Acetic acid 및 butyric acid 생성이 억제된 것으로 판단됨.

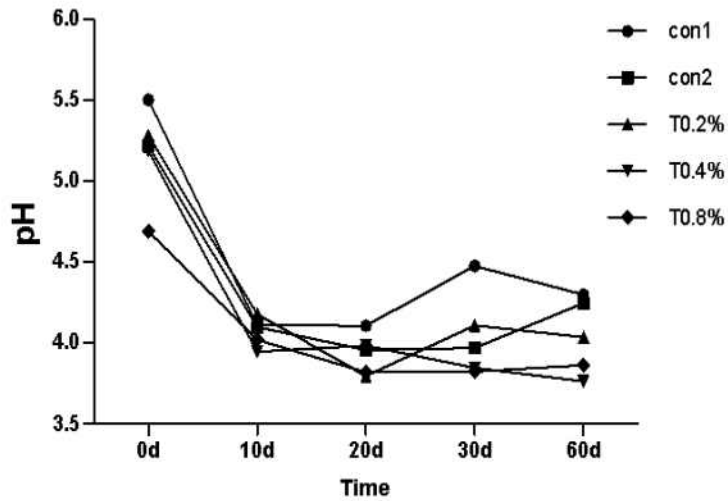


그림 38. 발효기간 별 pH 변화

(5) 미생물 분석

○ LAB의 수는 전반적으로 0일차부터 서서히 증가하여 10, 20일차에 가장 높고 이후 점점 감소하는 경향을 보임. 그러나 MHA 처리구는 10~60일차 모두 Con1, 2 보다 LAB의 수가 적게 나타남. 이는 위에 언급한 lactic acid data와 일치함.

○ 부패와 관련된 mold와 yeast의 수는 Con1, 2에서 가장 많은 것으로 나타남. 10, 20일차에 가장 높고 그 이후 약간 감소하지만 0일차보다는 그 수가 많음. 반면에 T0.2와 T0.4의 결과를 보면 10,20일차에 수가 증가하였으나, 이후 점점 감소하여 60일차에는 다시 처음의 수와 비슷한 수준으로 감소하였음. T0.8의 경우는 10일차에 아주 약간 증가하였으나 20일차에 다시 감소하여 이후 유지함. 전반적으로 처음의 수를 유지하는 결과가 나타남.

○ 종합적으로 총균수는 10, 20일차에 가장 많고, 그 이후에 점차 감소함. 하지만 MHA를 처리한 T0.2-0.8은 Con1, 2와 비교 시 그 수가 상대적으로 적고, 증가하는 정도 또한 적음. MHA의 첨가는 사일리지 내 미생물의 증식을 억제하여 발효 및 부패에 영향을 미치는 것으로 판단됨.

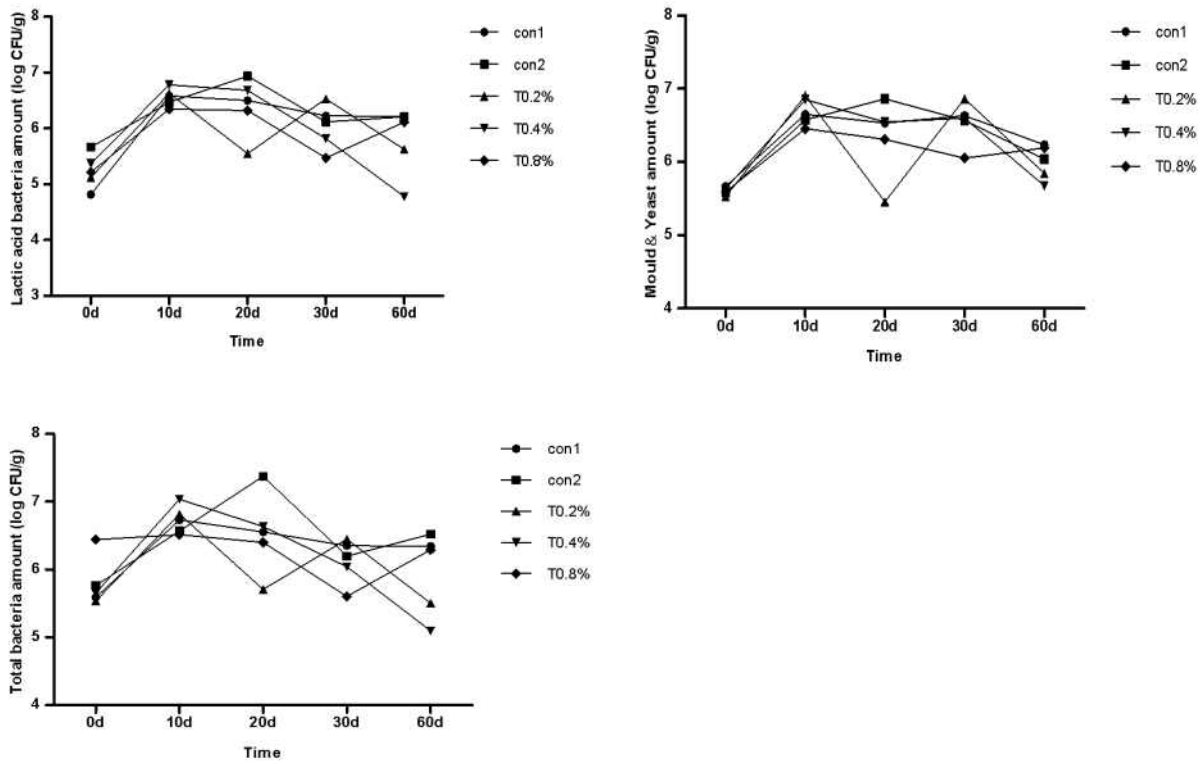


그림 39. 저장기간별 미생물 변화

(6) Sulforaphane

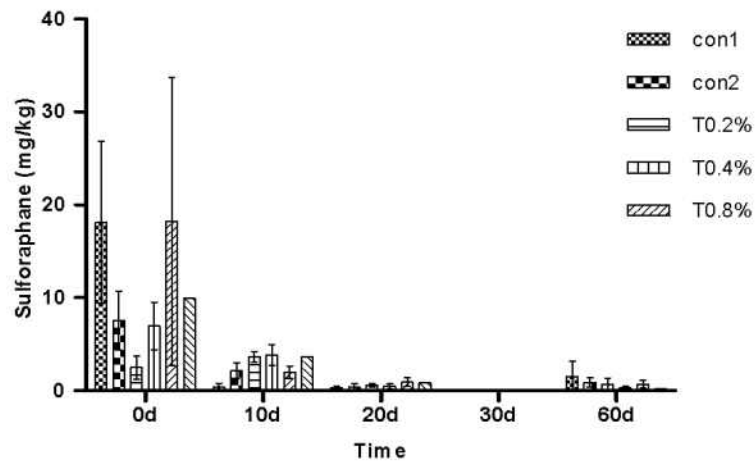


그림 40. Sulforaphane 함량 변화

○ 선행 연구를 통해 사일리지 발효기간이 경과함에 따라 sulforaphane 함량이 차츰 감소하여 전부 손실되는 것을 확인하였음. 이번 실험에서는 MHA의 첨가로 sulforaphane의 손실을 방지 또는 속도를 늦추는 효과를 기대하였으나, MHA 첨가와는 상관없이 모두 손실되는 결과를 얻음.

(7) Beta-carotene

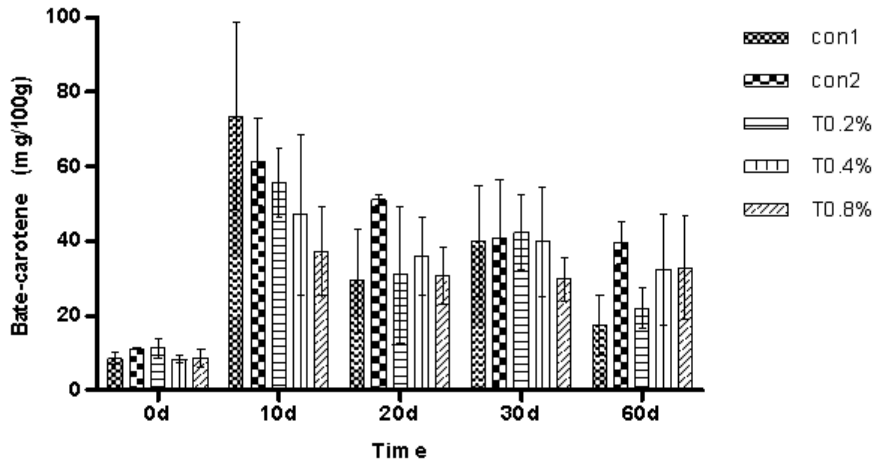


그림 41. Beta-carotene 함량 변화

○ 모든 그룹에서 10일차에 베타카로틴의 함량이 급격하게 증가했고 이후에 감소하는 추세를 보임. 위와 같이 Con1 그룹에서는 10일 차에 급격하게 증가하고 이후 급격하게 감소하여 60일 차에는 0일 차보다 다소 높은 함량을 보임. 반면에 MHA 첨가 그룹에서는 농도가 높을수록 베타카로틴의 함량이 증가하는 경사가 완만하고 이후 감소하는 속도가 더딤. 또한, 60일 차 함량이 0일차보다 비교적 높게 나타난 것으로 보아 MHA의 첨가는 발효 중 증가된 베타카로틴 함량 안정화에 효과가 있으므로 사료됨.

(8) Antioxidant activity

○ Total phenolics content(TPC)함량을 분석 비교하였고, 또한 DPPH radical scavenging activity를 통해 radical 소거 능력을 이용하여 각 그룹별 항산화 활성도 변화를 조사하였음.

- DPPH 라디칼 소거능 결과는 그룹 전반적으로 비슷한 경향을 보임. 발효 30일차에 항산화 활성도가 증가하고, 증가한 활성도가 60일까지도 유지되거나 더 증가함. MHA를 첨가했음에도 활성도가 증가하고 유지되는 것으로 보아 MHA가 항산화 활성도를 저해하는 악영향은 없으므로 사료됨.

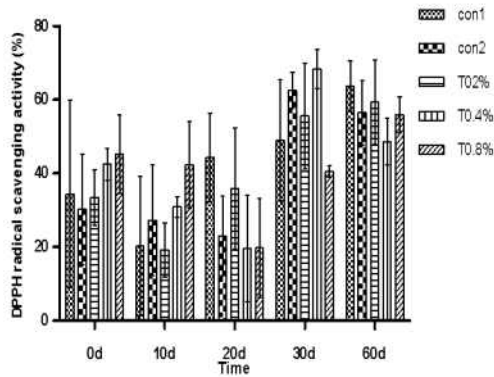


그림 42. DPPH radical scavenging activity

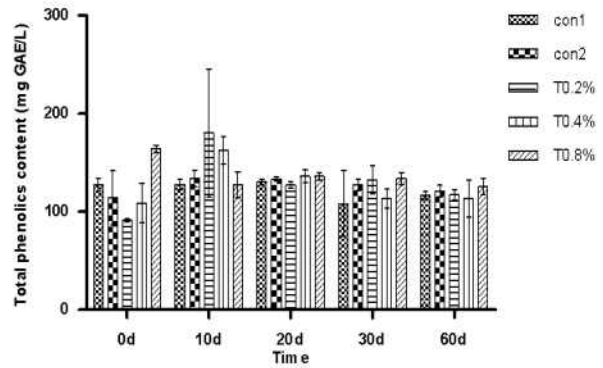


그림 43. Total phenolics 함량 변화

- Total phenolics content (mg GAE/L)

총 페놀 함량의 경우 그룹별 혹은 기간별로 큰 차이를 보이지 않음. 발효 기간이 총 페놀 함량에 영향을 미치지 않고, 또한 MHA의 첨가로 인해 페놀 함량이 감소하지 않고 어느 정도 일정하게 유지됨을 확인함.

(7) MHA 첨가를 하였을 시 발효가 완벽히 억제되지는 않으나 대조구와 비교하였을 때 다소 억제하는 것을 확인하였고, MHA 첨가로 인해 pH를 초반에 낮춤으로써 acetic acid나 butyric acid를 생성하는 잡균 혹은 부패균을 방지하는 것을 확인하였음. 이는 사일리지 보존성과 품질에 큰 효과가 있는 것으로 판단됨. 사료 가치 측면에서도 선행 연구를 통해 좋은 평가를 받은 대조구와 비슷한 결과값을 얻었으며, 항산화 활성도나 미생물 분석 결과 또한 대조구와 큰 차이를 보이지 않아 MHA 첨가로 기능성 혹은 사료 가치가 저해되는 역효과는 없는 것으로 판단됨. 또한 0.2, 0.4, 0.8%의 세 처리구를 비교하였을 시 0.4%의 결과 값이 가장 좋은 것으로 확인되었으며, 경제적인 측면에서도 적합하다고 판단함. 위의 분석 결과를 토대로 추후 한우 사양 시험을 위한 대량 브로콜리 부산물 사일리지는 MHA를 0.4% 첨가하여 제조하는 것으로 확정함.

2. MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 대량 제조

○ 약 2톤의 브로콜리 파지 및 부산물을 수거한 후, 이를 주재료로 TMR 제조 설비의 계량대에서 2종의 부형제 (비트펄프, 밀기울) 그리고 연맥 건초를 정량하여 컨베이어 벨트에 의해 '원료 세절 배합기'로 이송함. 원료 세절 배합기에 투입된 재료는 배합기 하단에 장착된 스크류 타입의 다중 오우거(auger)에 의해 세절과 동시에 20분간 골고루 혼합함. 20분간의 세절 및 배합 과정 후, 발효균 접종을 위해 혼합기 상단의 해치를 열고 MHA 현탁액을 압축 분무기를 이용해 사료에 골고루 도포하면서 30분간 더 혼합함. 배합이 완료된 사료 재료는 컨베이어 벨트에 의해서 사료 교반 탱크로 이송됨. 사료 교반 탱크에 저장된 배합이 완료된 사료는 20kg 씩 정량하여 비닐 재질의 사료 봉투에 소분 및 충전 작업을 하여 혐기 상태를 형성함.

표 35. MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 대량 제조 계획

	Lot #1		Lot #2		Note
	Actual amount (FW)	Mixed ratio (% FW)	Actual amount (FW)	Mixed ratio (% FW)	
Broccoli	842 kg	63.5%	1,080 kg	63.5	- 건초를 추가하여 수분함량을 60.4%로 조절하여 물성을 좋게 제조
Additives	Beet pulp	140 kg	179 kg	21.1%	
	Wheatbran	140 kg	179 kg	21.1%	
Oats (Hay)	200 kg	15.1%	257 kg	15.1	
MHA (Methionine hydroxy analogue)	5L (35.2% MHA)	0.38% (제품기준 0.16%)	5L (51.8% MHA)	0.38% (제품기준 0.18%)	- 원액: 88% MHA - 희석액 5L 사용
Total	1,327 kg	100 %	1,700 kg	100 %	

3. MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지 한우 기호성 검사

1) 시험 목적

○ 2018년 9월 25일 제조한 브로콜리 부산물 사일리지에 대한 한우 번식우 섭취량조사

2) 시험사료의 급여방법과 시험목표 (승인번호 : SNU-170310-9)

○ 4일 간격으로 공급량을 증가시켜 사료변화에 대한 스트레스를 최소화하고 생산된 시험사료의 전체를 소모하는데 소요된 일수와 최대섭취량을 조사함으로써 브로콜리 사일리지의 한우 번식우에 대한 장기간 급여기준을 결정하기 위한 기초자료를 얻고자 함

3) 재료 및 방법

(1) 시험장소 : 강원도 평창군 대화면 밝은목장(대표 : 최재연)

(2) 시험기간 : 2019. 07-15~ 08-02(19일간)

(3) 공시축 : 39.6±28.3개월령, 번식우(우) 18두

표 36. 시험 번식우 공시 기초자료

명호	생년월일	월령
7091-9	2018-09-28	9.5
1042-8	2018-08-20	10.8
1023-3	2018-07-17	11.9
1859-8	2018-07-05	12.3
6490-3	2018-03-08	16.3
6498-7	2018-03-08	16.3
5054-2	2017-09-03	22.4
7089-7	2017-07-10	24.2
2460-2	2017-02-25	28.6
4284-2	2016-08-07	35.3
4215-7	2015-11-28	43.6
9730-4	2015-07-03	48.5
1869-1	2014-10-07	57.3
1870-6	2014-10-07	57.3
8073-4	2014-05-28	61.6
6211-9	2013-08-04	71.4
4404-2	2013-05-11	74.2
4809-6	2010-03-30	111.6
mean		39.6
SD		28.3

(4) 사양 시험 방법

○ 공시축은 아침(07:00)과 저녁(06:00) 사료급여 전에 스탠천에 채우고, 시험사료급여 총량으로 공급 후 개체별로 균분공급함. 시험사료는 급여 후 1시간 동안 급여 사료를 소진한 것을 확인한 후 다음 사료를 급여하는 방법으로 급여함. 먼저 브로콜리 TMR 사일리지를 급여하고 1시간 후 잔량을 조사하였으며, 두 번째로 배합사료를 급여하였으며, 마지막으로 호맥 베일러를 급여하였음.

○ 공시축의 관행 사료급여는 매일 한우 번식우 배합사료(TDN 72%, TCP 14%) 1.5kg와 호맥 베일러3.5kg를 1일 2회로 급여하였으며, 물과 광물질공급은 농가 관행대로 자유 채식하게 하였음.

○ 14일간 예비시험기간(순치기간)을 통하여 공시축의 사료변화 스트레스를 최소화하기 위하여 호맥 베일러는 상대적으로 감량하여 급여하고, 브로콜리 TMR 사일리지는 4일 간격으로 증량 급여하여 순치 기간이 끝난 뒤 최대섭취량을 조사함. 배합사료는 두당 3.0kg, 호맥베일러는 두당 6.0kg에서 4.0kg, 2.0kg, 0kg 으로 점진적으로 감량하고, 브로콜리 TMR사일리지는 2.2kg에서 4.4, 5.5kg 및 11.1kg으로 전진적으로 증량 급여하였음.

표 37. 시험사료 일자별 공급량(두당 급여량)

급여일수	급여두수	배합사료	호맥베일러	브로콜리 TMR 사일리지
1	18	54(3.0)	108(6.0)	40(2.2)
2	18	54(3.0)	108(6.0)	40(2.2)
3	18	54(3.0)	108(6.0)	40(2.2)
4	18	54(3.0)	108(6.0)	40(2.2)
5	18	54(3.0)	72(4.0)	80(4.4)
6	18	54(3.0)	72(4.0)	80(4.4)
7	18	54(3.0)	72(4.0)	80(4.4)
8	18	54(3.0)	72(4.0)	80(4.4)
9	18	54(3.0)	72(4.0)	80(4.4)
10	18	54(3.0)	72(4.0)	80(4.4)
11	18	54(3.0)	36(2.0)	100(5.5)
12	18	54(3.0)	36(2.0)	100(5.5)
13	18	54(3.0)	36(2.0)	100(5.5)
14	18	54(3.0)	36(2.0)	100(5.5)
15	18	54(3.0)	0.0	200(11.1)
16	18	54(3.0)	0.0	200(11.1)
17	18	54(3.0)	0.0	200(11.1)
18	18	54(3.0)	0.0	200(11.1)
19	18	54(3.0)	0.0	200(11.1)

(4) 시험결과 및 고찰

○ 브로콜리 TMR 사일리지의 최대섭취량과 도달일수

- 19일 동안의 시험기간 동안 시험사료별 평균 두당섭취량은 배합사료 3.0kg, 호맥 베일러 2.9±2.2kg 및 브로콜리 TMR 사일리지 5.8±3.1kg을 나타내 브로콜리 TMR사일리지의 기호성이 좋은 것으로 나타남

- 브로콜리 TMR 사일리지의 1일 최대섭취량은 11.1kg으로 나타났으며, 도달일수는 시험개시 후 17일로 나타내었음.

표 38. 시험사료 일일 두당 섭취량

급여일수	배합사료	호맥베일러	브로콜리 TMR 사일리지
1	3	6.0	2.2
2	3	6.0	2.2
3	3	6.0	2.2
4	3	6.0	2.2
5	3	4.0	4.4
6	3	4.0	4.5
7	3	4.0	4.5
8	3	4.0	4.5
9	3	4.0	4.5
10	3	4.0	4.6
11	3	2.0	5
12	3	2.0	5.5
13	3	2.0	5.5
14	3	2.0	5.5
15	3	0.0	8.5
16	3	0.0	10.5
17	3	0.0	11.1
18	3	0.0	11.1
19	3	0.0	11.1
mean(\pm SD)	3.0 \pm 0.0)	2.9 \pm 2.2	5.8 \pm 3.1

○ 한우 번식우를 위한 브로콜리 TMR 사일리지의 1일 급여량은 두당 10kg이상도 가능한 것으로 기호성이 좋은 것으로 나타났으며, 순치기간은 15일이상이 필요한 것으로 나타내었음.

5차년도 : MHA 처리 브로콜리 부산물 사료 한우 사양시험 및 가공육제품 제조

1. MHA 처리 브로콜리 부산물 TMR 사료 대량 제조

1) 목적

○ 본 연구를 통해 선정된 기존의 유산균 접종 발효 공정을 대체하는 메티오닌 수산화 유도체(Methionin Hydroxy Analogue) 처리 브로콜리 부산물 사일리지로 한우를 대상으로 한 급여 시험을 진행하기 위해 적합한 배합비로 대량 생산

2) 제조 및 샘플링

(1) 대량 사일리지 제조

표 39. 대량 사일리지 배합표

Broccoli by-product TMR	kg
1. 브로콜리 부산물	3,761
2. 임자박	173
3. 석회석	38
4. 소금	44
5. 미강	86
6. 보릿짚	395
7. 밀기울	697
8. 비트펄프	610
9. 엿밥	697
10. MHA	29.55

* MHA는 사일리지 중량 기준 0.398%



그림 44. 대량 사일리지 제조과정

(2) 0일, 45일, 102일차에 품질 및 기능성 성분 분석을 위한 샘플링 진행

3) 대량 사일리지 품질 및 기능성 성분 분석

(1) 일반성분

표 40. 대조구와 실험구 일반성분 분석 결과

Treatment	DM	CP	EE	CF	Ash	ADF	NDF	Ammonia	TDN	RFV
	%DM									
BBS-0d	39.81	21.76	4.17	13.08	9.75	19.07	30.9	0.4	73.83	222.91
BBS-45d	39.2	23.09	5.33	11.87	10.05	18.2	29.65	0.46	74.52	234.43
BBS-102d	37.81	21.98	3.66	13.38	10.13	17.58	31.69	0.45	75.01	220.76
CS	46.31	33.85	9.4	11.56	6.36	15.52	32.09	0.73	76.64	222.66
BF	29.77	5.77	1.95	31.01	10.28	36.39	59.71	0.11	60.15	94.34

BBS-0d : broccoli by-product sampling on 0 day
 BBS-24d : broccoli by-product sampling on 24 day
 BBS-45d : broccoli by-product sampling on 45 day
 BBS-102d : broccoli by-product sampling on 102 day
 CS : corn silage
 BF : balery straw forage

○ 대조구와 실험구 간 큰 차이가 없으며, 모두 가소화양분총량 및 상대적 사료 가치에서 우수한 결과를 나타내었음. MHA 처리 또는 장기간의 저장이 사료가치에 유해한 영향을 미치지 않음을 알 수 있음.

(2) pH & 유기산

표 41. pH와 유기산 분석 결과

Treatment	pH	Organic acid (% DM)			
		Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
BBS-0d	5.75	1.55 ^f	2.78 ^d	0.25 ^c	0.95 ^{ab}
BBS-24d	3.8	19.61 ^e	6.02 ^c	0.41 ^{bc}	0.59 ^b
BBS-45d	3.84	23.03 ^b	6.67 ^c	0.24 ^c	0.85 ^{ab}
BBS-102d	3.82	28.58 ^a	9.43 ^b	0.68 ^a	1.26 ^a
CS	5.07	15.23 ^d	15.16 ^a	0.51 ^{ab}	0.07 ^e
BF	4.66	8.87 ^e	10.55 ^b	0.57 ^{ab}	1.14 ^a

○ pH와 유산 함량을 보아 유산 발효가 일어났으며, 4차년도 of in vitro test 연구결과와 동일하게 MHA 처리로 인해 pH가 낮아져 빠르게 유산 발효로 진입한 것으로 사료됨. 이로 인해 CS (기존사료)보다 우수한 품질의 발효 사일리지가 생산됨.

(3) 미생물

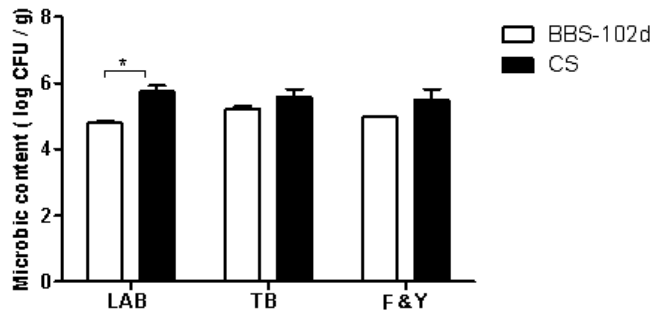


그림 45. 미생물 분석 결과

○ 전반적으로 큰 차이는 없으나 유산균의 경우 실험구보다 대조구에서 더 검출되었음.

(4) Beta-carotene

표 42. 베타카로틴 함량

Treatment	Beta-carotene (mg / kg)	SEM	P-value
BBS-0d	0.5	0.12	
BBS-24d	3.27	0.16	
BBS-45d	3.74	0.02	<0.0001
BBS-102d	2.7	0.09	
CS	0.33	0.01	

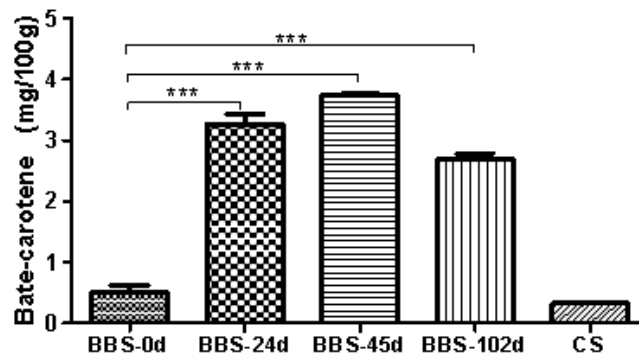


그림 46. 베타카로틴 함량 비교

○ 발효 후 베타카로틴의 함량이 증가, 대조구보다 실험구에서 베타카로틴을 더 많이 함유하고 있음.

(5) 항산화능

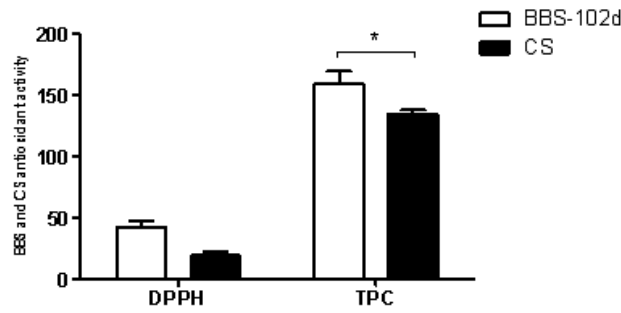


그림 47. DPPH & TPC 비교

○ DPPH 라디칼 소거능과 총 페놀함량 모두 실험구에서 대조구보다 더 높은 결과를 나타냄.

2. MHA 처리 브로콜리 부산물 TMR 사료 한우 사양 시험

1) 목적

○ 한우시험축의 건강지표(체중, 체형 측정, 대사 판정 시험, 총 혈구 분석결과) 및 혈장 내 기능성 성분 분석 결과를 토대로 상용 사료 대비 한우 번식우의 유지 사료로써의 가치 평가

2) 기간 및 샘플링 (승인번호 : SNU-200505-1)

○ 약 3달간 진행하였으며 3주 간격으로 체중 및 체위 측정, 채혈하였음.

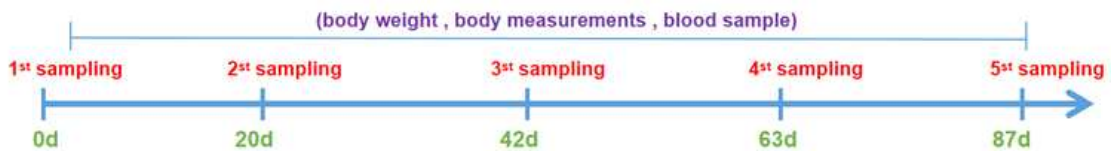


그림 195. 사양시험 계획

3) 급여 방법

표 43. 대조구와 실험구 TMR 급여량

Group	Type	1st (0-20 d)	2nd (20-42 d)	3rd (42-63 d)	4nd (63-87d)
		kg			
Con-TMR group (대조군)	CS	6	6	6	6
	BF	6	6	6	6
	BT	1	1	3	3
BB-TMR group (실험군)	BS	6	8	8	8
	BF	6	6	6	6
	BT	1	1	3	3

※ CS: corn silage, BF: barley straw forage, BT: base TMR, BS: broccoli by-product silage



그림 48. 급여 & 샘플링 & 체위 측정

4) 시험 결과

(1) 체중 및 체중

○ 체중

- 사양기간 동안 대조구와 실험구 모두 체중이 증가하는 양상을 보임. 체중 그래프의 기울기로 증체율을 확인할 수 있으며, 대조구(기존 TMR 급여)와 실험구의 증체율은 동일하게 나타남.

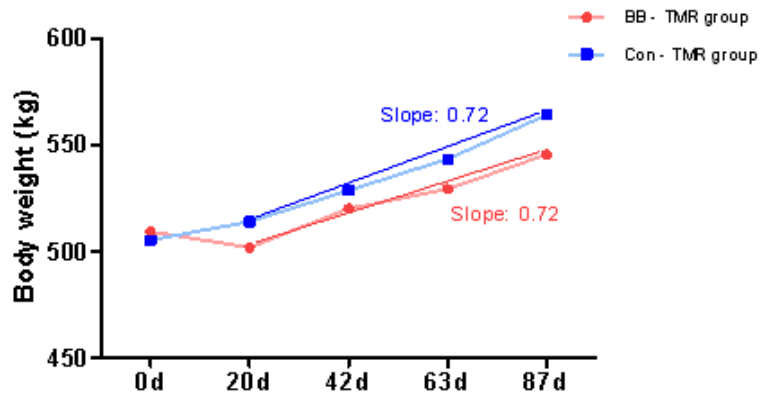


그림 49. 사양기간 중 체중 변화

○ 체위

- 흉위, 체장, 체고, 십자부고를 측정하였으며, 체형은 크게 변하지 않음. 기울기를 보아 체형이 변화되는 정도 또한 유사함.

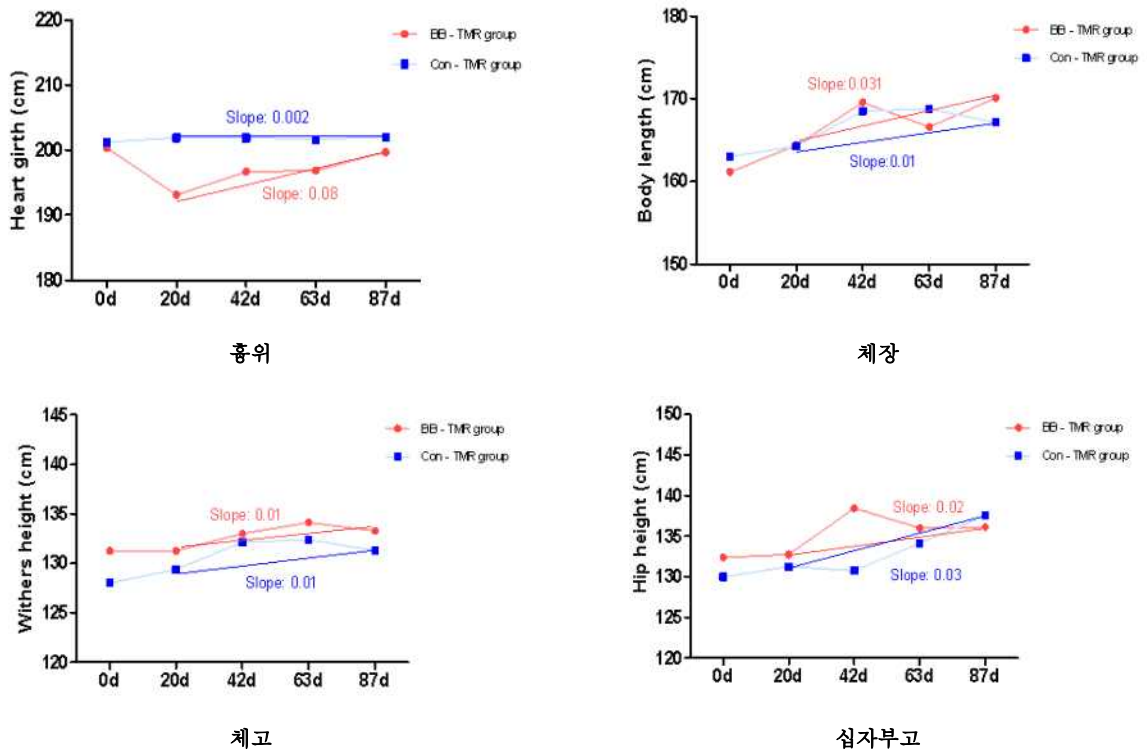
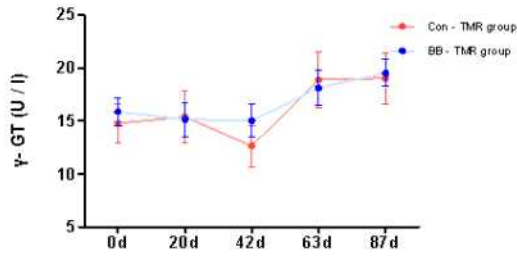


그림 50. 사양기간 중 체위 변화

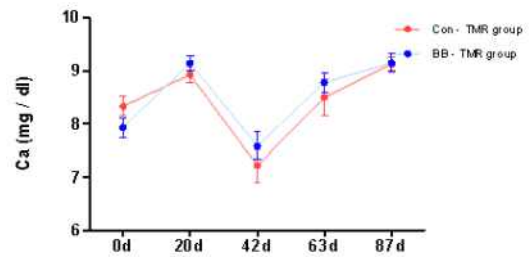
(2) 혈액 분석

○ MPT : Metabolic Profile Test

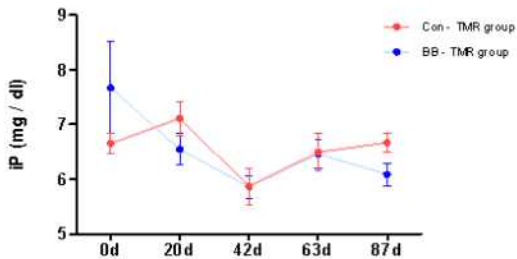
- 사양기간 동안 혈중 대사 지표 물질 변화 양상은 전반적으로 실험구와 대조구 간 큰 차이를 보이지 않으나,
 BUN의 경우 실험구에서 사양기간 초반에 수치가 감소하였음. 비록 감소하였으나, 전 기간 BUN의 수치가 기준치 내에 있으며 감소한 수치는 사양 기간 중 다시 회복하였음.



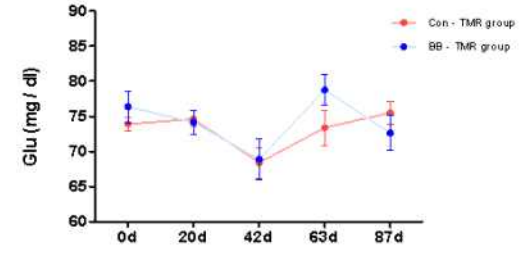
Gamma Glutamyl Transpeptidase



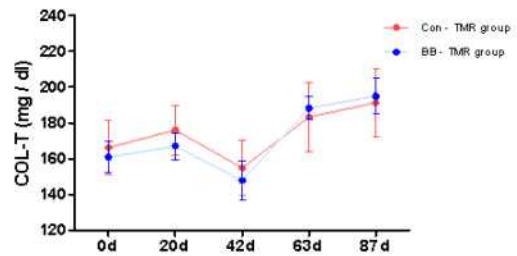
Calcium



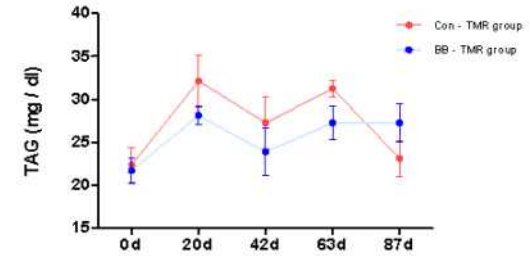
Inorganic Phosphorus



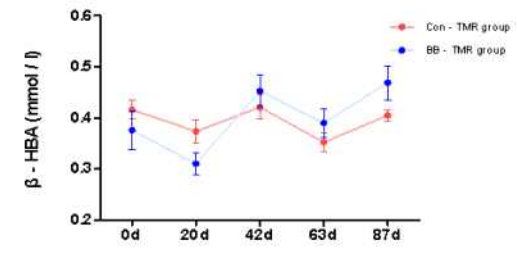
Glucose



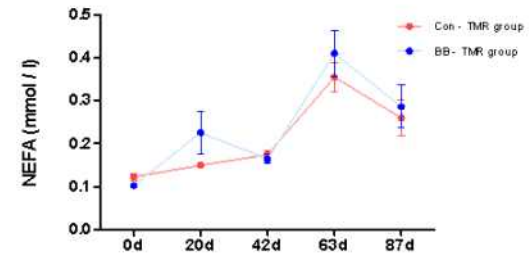
Cholesterol



Triglycerides



β - hydroxybutyrate



Non Esterified Fatty acid

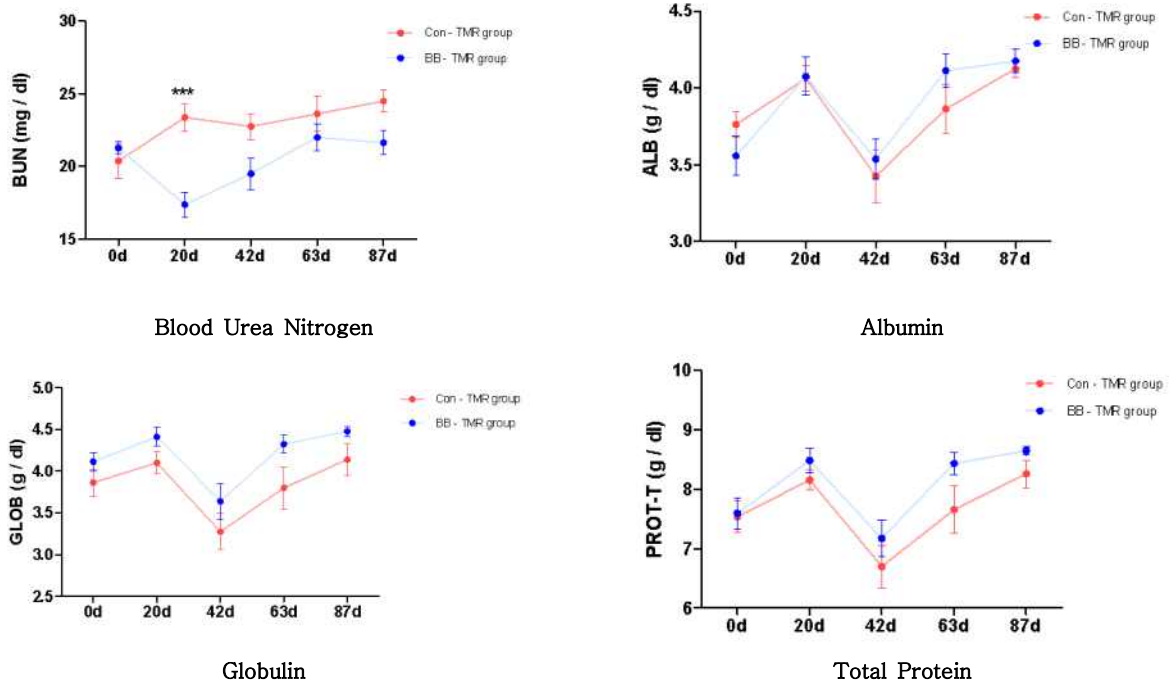


그림 51. 사양기간 동안 혈중 MPT 지표 물질 변화

○ Vitamin A

- 실험구와 대조구 간 혈중 비타민A 함량은 유의적 차이를 보이지 않음.

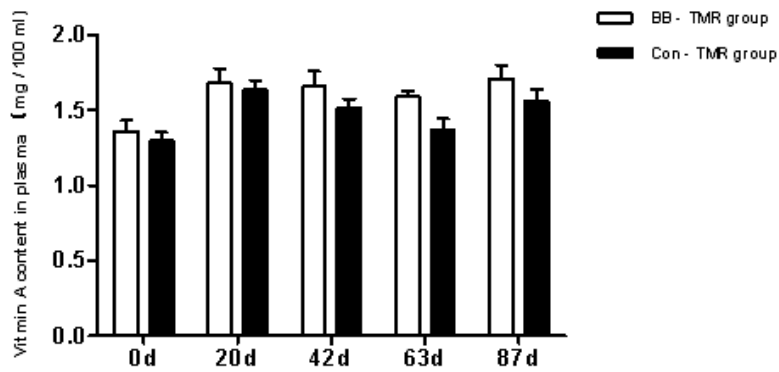


그림 52. 사양기간 동안 혈중 비타민A 변화

○ 지방산 조성

- 단일 불포화지방산인 올레인산(oleic acid)의 경우 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였으나, 포화지방산인 스테아르산(stearic acid)의 경우, 실험구에서 대조구보다 낮은 경향을 보임.

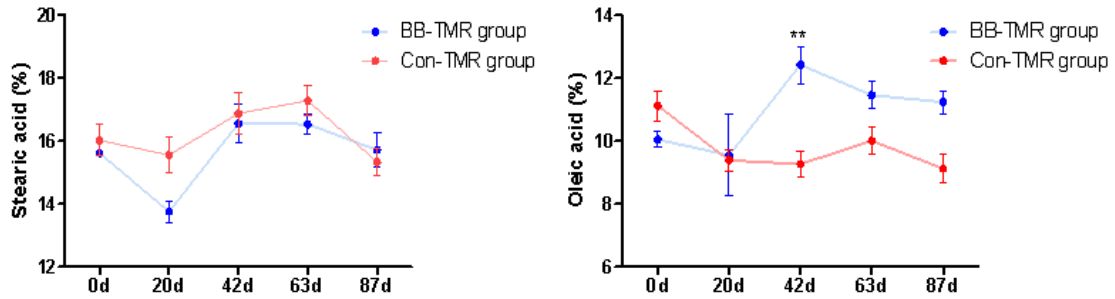


그림 53. 혈중 스테아르산 & 올레인산 조성 변화

○ 향산화능

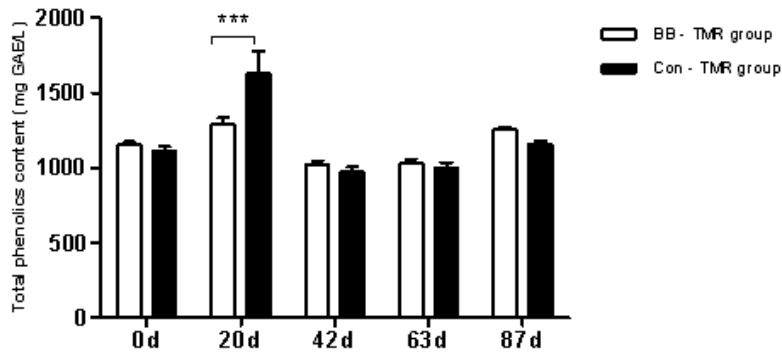


그림 54. 총 페놀함량 변화

- 총 페놀 함량의 경우 실험구와 대조구 간 큰 차이를 보이지 않음. 선행 연구 결과와 동일하게 MHA의 첨가로 인해 페놀 함량이 감소하지 않고 어느 정도 일정하게 유지됨을 확인함.

5) 이러한 결과들을 종합적으로 고려해 볼 때, MHA 처리 브로콜리 부산물 사일리지는 한우 번식우의 유지를 위한 농가 자가배합 TMR을 제조함에 있어서 경제적인 대체자원으로 활용할 수 있을 것으로 판단됨.

3. 브로콜리 부산물 TMR 급여 한우육을 활용한 가공육제품(소시지) 제조

1) 제조 개요

(1) 브로콜리 부산물 TMR 급여 한우(암소 번식우) 출하 후 3두로부터 우둔육 채취

(2) 한우 가공육 (소시지 2종) 시제품 제조

- 브로콜리 먹은 한우: 브로콜리 부산물 TMR 급여 한우육을 원료로 만든 소시지
- 브로콜리 품은 한우: 브로콜리 부산물 TMR 급여 한우육 원료에 생 브로콜리를 4% 첨가하여 소시지 제조

2) 제조 공정

- (1) 브로콜리 부산물 사일리지를 급여한 한우 원료육을 분쇄기를 이용하여 분쇄.
- (2) spice, 첨가제 및 브로콜리 계량 후 분쇄한 원료육과 혼합.
- (3) 진공 포장 후 4℃에서 24시간 염지.
- (4) 식용 콜라겐 케이싱에 충전 및 결착.
- (5) 건조 / 훈연 / 가열
- (6) 진공 포장 및 라벨 부착.

표 44. 한우 쇠고기 소시지 제조 원료 배합비

원료	쇠고기	쇠고기 지방	솔트 (첨가제)	Spice	전분	물	(브로콜리)
합량(%)	67.79	13.3	2.76	1.88	0.95	13.3	(4)

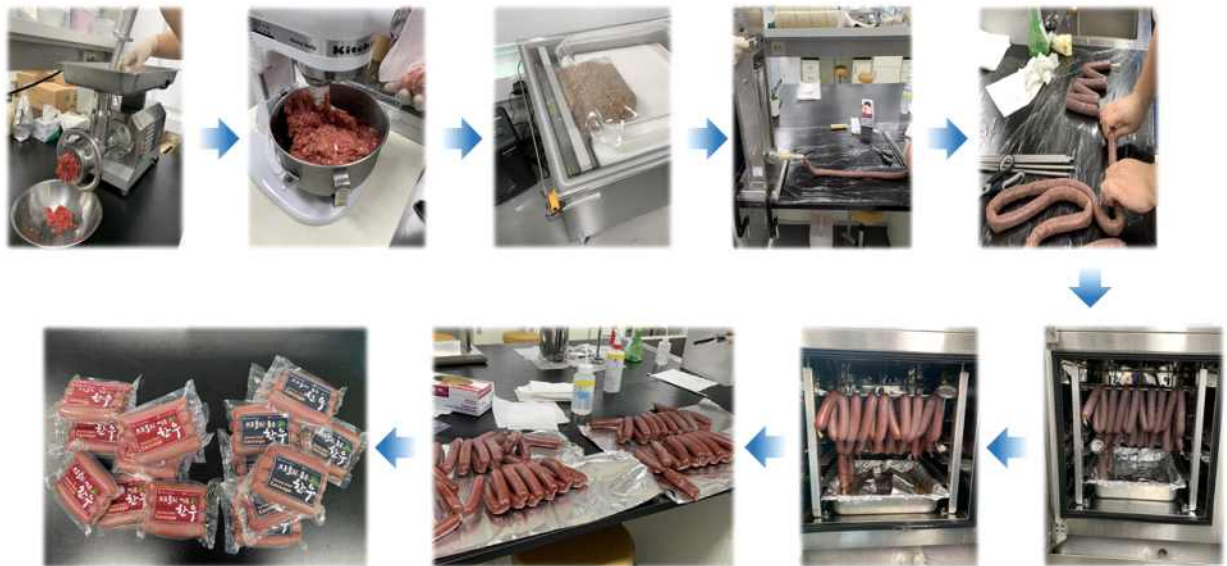


그림 55. 소시지 제조 과정

2) 제품 평가 및 기대효과

- (1) 제조 후 내부 관능 평가를 진행, 두 제품 모두 맛과 조직감에서 우수한 평가를 받음.
- (2) 직화구이시 스테이크와 유사한 풍미로 기존 돈육 소세지와 차별화.
- (2) 한우 전육을 활용한 소시지는 시장에 전무, 비선호 부위인 우둔 등의 부위를 활용하여 한우 쇠고기 소비촉진에 활용 가능할 것으로 판단됨.



그림 56. 한우 가공육 시제품

브로콜리 사일리지 경제성 분석

1) 농산 부산물 활용 사일리지의 경제적 의미

- (1) 국내 축산업은 제한적인 토지와 사료자원으로 인한 사료원료에 대한 해외 의존도가 높으며 최근 해외 농작물 작황 부진으로 인한 사료비 상승이 지속됨에 따라 농가 생산비 대비 사료비 부담이 가중되고 있음.
- (2) 이에 대한 하나의 대책으로는 국내 농작물을 재배하면서 과생되는 **농산 부산물**을 적극적으로 사료화하여 재활용하는 방법이 있으며, 이러한 접근은 향후 지속가능한 축산업의 발전을 위해 사료비 절감과 함께 환경보전 측면에도 매우 효과적인 방법임
- (3) 그러나, 대부분의 작물에서 시장에 출하되는 식용부위보다 더 많은 양의 농산 부산물이 발생함에도 그 용도를 찾지 못해 폐기되고 있는 현실이며, 이는 높은 수분함량으로 인한 장기간 유통의 어려움, 사료자원으로써의 영양가치, 가축의 기호성 및 이용방법에 대한 정보 부족에 기인함
- (4) 따라서 장기간 보관, 유통이 가능하며, 사료자원으로써의 영양가치가 인정되고, 가축의 기호성이 높은 농산 부산물 활용 사료가 개발된다면 큰 경제적 가치를 지닐 것으로 생각됨

2) 브로콜리 사일리지의 경제적 의미

- (1) 브로콜리는 화퇴(꽃)부분을 채취해 식용하는 십자화과의 채소로 우리나라에서는 주로 제주도(전체 생산량의 약 76%)와 강원도(전체 생산량의 약 10%)가 주산지로서, 연간 25,101여 톤 (2018 시설채소 온실현황 및 채소류 생산실적, 농림축산식품부, 2019)을 생산 (표 1).

표 1. 2018년 브로콜리 생산현황

지역	면적 (ha)	단수 (kg/10a)	생산량 (톤)
경기	36	1,645	597
강원	267	927	2,477
충북	148	1,226	1,809
충남	7	1,287	84
전북	16	1,212	191
전남	25	3,184	807
경북	16	966	157
경남	3	796	27
제주	1,496	1,267	18,953
전국	2,014	1,246	25,101

- (2) 이 때, 잎, 줄기 등 화퇴 생산량의 약 2.5배(연간 약 60,000톤)의 비식용 부위가 부산물로서

그대로 노지에 폐기되는 것으로 추정되며, 브로콜리의 화퇴(꽃, 식용부위)를 생산하고 남은 부산물(줄기와 잎)을 활용하여 가축의 기호성과 저장성이 높고, 많은 부분 수입에 의존하는 기존 축산 사료를 대체할 수 있는 발효사료를 제조함으로써, 국내 농업의 큰 과제인 농산 부산물의 활용도 제고와 함께, 축산업의 생산성 향상에 도움을 주고 더 나아가 환경을 생각하는 미래 지속가능한 축산업 발전에 기여할 것으로 생각됨 (그림 2).



그림 2. 브로콜리와 브로콜리 부산물

3) 브로콜리 사일리지의 경제성 분석

(1) 경제성 분석 전략

- 본 연구에서는 브로콜리 사일리지가 기존의 옥수수 사일리지를 대체할 수 있음을 과학적 실험을 통해 입증하였음
- 이에 더하여, 브로콜리 사일리지는 기존의 옥수수 사일리지에 비해 높은 더 베타-카로틴 함량을 가지며, 높은 항산화가를 보유하기 때문에 이것을 먹는 소의 건강 증진에 도움을 주어 동물복지 측면에서 잇점을 가질 것으로 생각됨
- 따라서 기능성분을 통한 동물복지 증진 프리미엄 사일리지 전략과 기존 옥수수 사일리지를 대체할 경제성 TMR 원료 전략 으로 나누어 경제성 분석 진행

(2) 경제성 분석

○ 기능성분을 통한 동물복지 증진 프리미엄 사일리지 전략

- 2020년 기준으로 옥수수 사일리지는 톤 당 16~20 만원 수준 (베일러 500 kg 한 롤 기준 8~10 만원)이며, 70 %의 수분 함량을 고려했을 때, kg 당 160~200 원 수준임
- 프리미엄 사일리지 전략이므로, 비교 대상을 최고 양질의 옥수수 사일리지로 설정하여 kg 당 200 원으로 가격을 설정함
- 이 때, 부형제 (90 원/kg)와 제조 비용 (20 원/kg)을 제외한 90 원/kg을 브로콜리 부산물 구매 가격으로 생각할 수 있음
- 이렇게 브로콜리 부산물을 90 원/kg로 구매할 경우, 평창지역에서 연간 약 5.4억 원의 수익이 발생할 것으로 예상되며, 전국 확대시 약 54억 원의 수익이 발생할 것으로 예상함
- 또한 제조한 브로콜리 사일리지를 판매할 경우, 평창지역에서 연간 약 12억 원의 매출이 발생할 것으로 예상되며, 전국 확대시 약 120억 원의 매출이 발생할 것으로 예상함

○ 기존 옥수수 사일리지를 대체할 경제성 TMR 원료 전략

- 단순히 기존 옥수수 사일리지를 대체하는 목적일 경우, 단가 경쟁을 위해 비교 대상을 가장 값싼 옥수수 사일리지로 설정하여 kg 당 160 원으로 가격을 설정함
- 이 때, 부형제 (90 원/kg)와 제조 비용 (20 원/kg)을 제외한 50 원/kg을 브로콜리 부산물 구매 가격으로 생각할 수 있음
- 이렇게 브로콜리 부산물을 50 원/kg로 구매할 경우, 평창지역에서 연간 약 3억 원의 수익이 발생할 것으로 예상되며, 전국 확대시 약 30억 원의 수익이 발생할 것으로 예상함
- 또한 제조한 브로콜리 사일리지를 판매할 경우, 평창지역에서 연간 약 9억 6천만 원의 매출이 발생할 것으로 예상되며, 전국 확대시 약 96억 원의 매출이 발생할 것으로 예상함

○ 기타

- 브로콜리 부산물 사일리지를 제조하여 판매할 경우, 기존 옥수수 재배 면적의 다른 용도 활용이나, 브랜드 축산물 생산을 통한 부가이익 등 기타 부가 이익도 존재함

부록. 과량의 MHA 처리가 브로콜리 사일리지 보존성에 미치는 영향 조사

1) 목적

당초 MHA 첨가 실험을 계획 시, pH를 낮추어 발효가 억제되는 현상을 확인하려 하였으나, 설정된 MHA 농도는 사일리지의 pH가 4.2 이상으로 충분히 낮아지지 않았고 발효가 억제되지 않았음. 이전 실험보다 과량의 MHA를 처리하였을 때의 발효 양상과 특성, 기능성 성분 등을 확인하고자 *in vitro* 실험을 추가로 진행하였음.

2) 제조 및 저장기간

(1) 저장기간 및 샘플링



그림 1. 고농도 MHA 사일리지 제조 시험 계획

(2) 제조 방법

4차년도에 실행한 *in vitro* 실험에서 가장 높은 농도로 0.8%를 설정하였으므로, 0.8% 보다 더 높은 농도로 실험을 계획. 미첨가, 1%, 2.5%, 5%로 실험구를 설정하여 제조하고, 제조 당일로부터 10일 간격으로 30일 동안 샘플링하여 품질 및 기능성 성분 분석 진행하였음.

표 1. 고농도 MHA 사일리지 재료 투입량

원료	Control (0%)	T 1%	T 2.5%	T 5%
브로콜리 (부산물/파지)	12kg	12kg	12kg	12kg
비트펄프	2.25kg	2.25kg	2.25kg	2.25kg
밀기울	2.25kg	2.25kg	2.25kg	2.25kg
MHA (Methionine hydroxy analogue)	0	187.4g	468.6g	937.2g

3) 품질 및 기능성 성분 분석

(1) 일반 성분

○ 대조구와 실험구 전반적으로 모두 일반 성분 결과값이 비슷한 양상을 보임. TDN 결과를 보면, 모든 처리구에서 70 전후로 높은 결과를 얻음. 또한 RFV를 이용한 사료 가치 평가 결과, 모든 처리구에서 151점 이상의 높은 등급으로 평가됨. 종합적으로 봤을 때, 일반 성분 측면에서는 1~5 % MHA의 첨가로 인한 손실이나 사료 가치 저하 현상은 없는 것을 알 수 있음.

표 2. 고농도 MHA 사일리지 일반 성분

Sample	Date	DM	% DM						TDN	RFV
			CP	EE	CF	Ash	ADF	NDF		
Con	0d	28.03	15.67	2.16	11.44	6.89	17.20	33.60	75.31	209.03
	30d	30.03	16.02	2.98	13.31	7.26	20.68	34.59	72.56	195.76
	Mean	29.03	15.85	2.57	12.38	7.08	18.94	34.10	73.94	202.30
T1%	0d	27.00	15.78	2.84	10.79	6.50	16.36	33.03	75.98	214.48
	30d	33.10	16.31	4.52	14.60	7.46	18.89	32.53	73.98	212.14
	Mean	30.05	16.05	3.68	10.79	6.98	17.63	32.78	74.98	213.32
T2.5%	0d	27.97	14.99	5.00	12.12	7.09	16.62	30.42	75.77	232.26
	30d	30.70	16.09	6.21	14.34	7.47	19.31	32.27	73.65	212.91
	Mean	29.33	15.54	5.61	13.23	7.28	17.97	31.35	74.71	222.30
T5%	0d	32.27	14.29	8.03	12.66	6.54	16.00	31.65	76.26	224.65
	30d	32.90	14.90	9.01	11.12	6.95	16.58	29.18	75.80	242.23
	Mean	32.58	14.60	8.52	11.89	6.75	16.29	30.42	76.03	233.09

DM, dry matter; CP, crude protein; EE, ether extract; CF, crude fiber; ADF, acidic detergent fiber; NDF, neutral detergent fiber; TDN, total digestible nutrients; RFV, relative feed value; Con 1, blank control; T1%, 1% MHA treatment group; T2.5%, 2.5% MHA treatment group; T5%, 5% MHA treatment group.

(2) pH 및 발효 양상

○ MHA 2.5%와 5%의 실험구에서 제조일로부터 30일까지 4.2이하의 pH를 유지함. 유산균 수와 Lactic acid 함량 변화 또한 0%, 1%의 실험구와 확연한 차이를 보임. 제조일로부터 30일까지 증가하지 않고 낮은 수치를 나타내고 있음. 결과를 종합해보면 MHA 2.5% 이상에서는 발효가 억제되었음을 명확히 나타냄. 선행 연구 결과를 기반으로 예측한대로 MHA 2.5% 이상 첨가되어야 발효가 완전히 억제되는 것을 확인함.

표 3. 처리구별 pH

Treatments	0d	10d	20d	30d
Control	6.32	4.64	4.52	4.62
T 1%	4.59	4.76	4.33	4.09
T 2.5%	4.25	3.73	3.87	4.06
T 5%	3.39	3.49	3.87	3.35

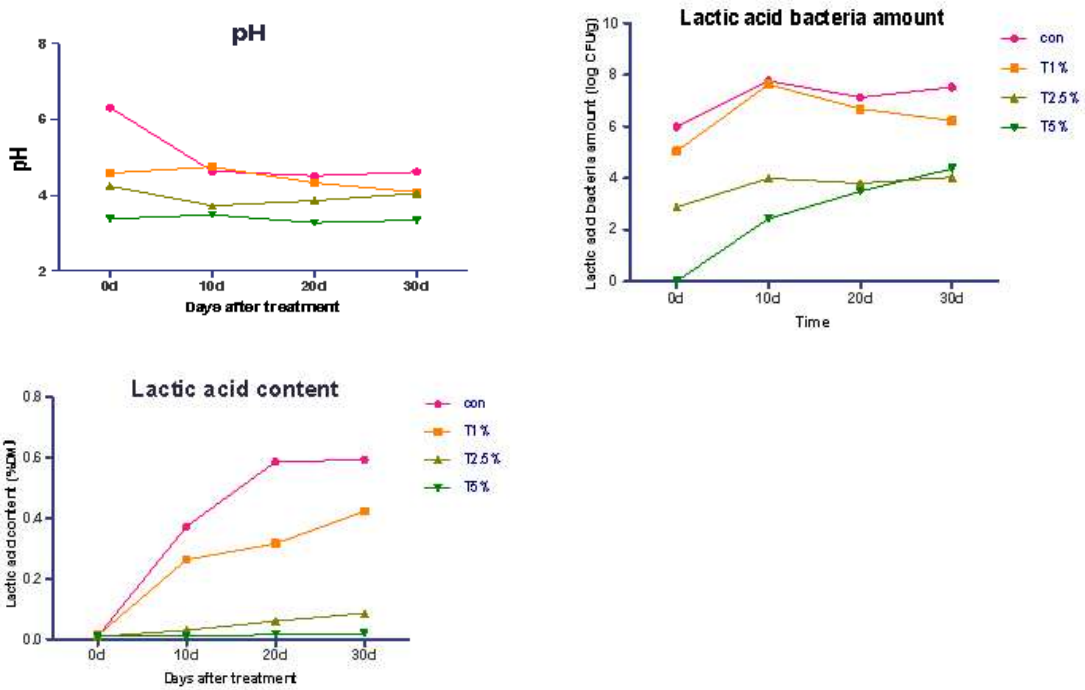


그림 2. 저장기간 중 pH & 유산균 & 유산 변화

(3) 미생물 분석

○ MHA를 고농도로 첨가한 처리구(T 2.5%, T 5%)에서 곰팡이 및 총 균수가 타처리구에 비해 현저히 낮은 결과가 나타남. 계속해서 언급한대로 초기의 낮은 pH가 발효와 미생물의 증식을 효과적으로 억제하기 때문임.

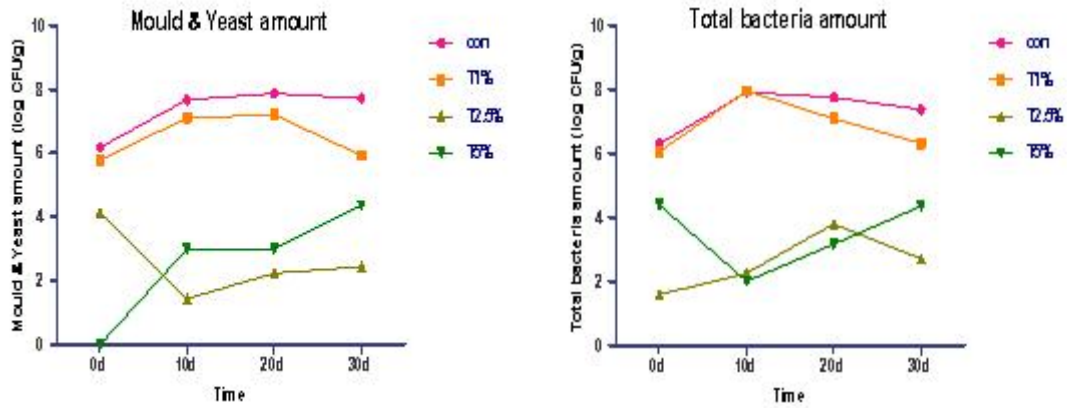


그림 3. 저장기간 중 미생물 변화

표 4. 저장기간 중 처리구별 미생물 수

Treatment	Date	LAB	F & Y	TB
		log CFU/g		
Con	0d	5.98a	6.19a	6.30a
	10d	7.76b	7.68b	7.91b
	20d	7.13ab	7.87b	7.76b
	30d	7.52b	7.72b	7.37b
	Mean	7.10B	7.36B	7.34B
T1%	0d	5.04a	5.79a	6.05a
	10d	7.63bc	7.11b	7.96c
	20d	6.68c	7.20b	7.08b
	30d	6.22b	5.93a	6.31ab
	Mean	6.39B	6.51B	6.85B
T2.5%	0d	2.87a	4.13a	1.58a
	10d	3.99a	1.43a	2.26a
	20d	3.79a	2.23a	3.80a
	30d	4.03a	2.43a	2.71a
	Mean	3.67A	2.56A	2.59A
T5%	0d	0.00a	0.00a	4.39b
	10d	2.42b	3.00b	2.00a
	20d	3.48b	3.00b	3.16ab
	30d	4.36b	4.36c	4.36b
	Mean	2.57A	2.59A	3.48A

(4) 유기산

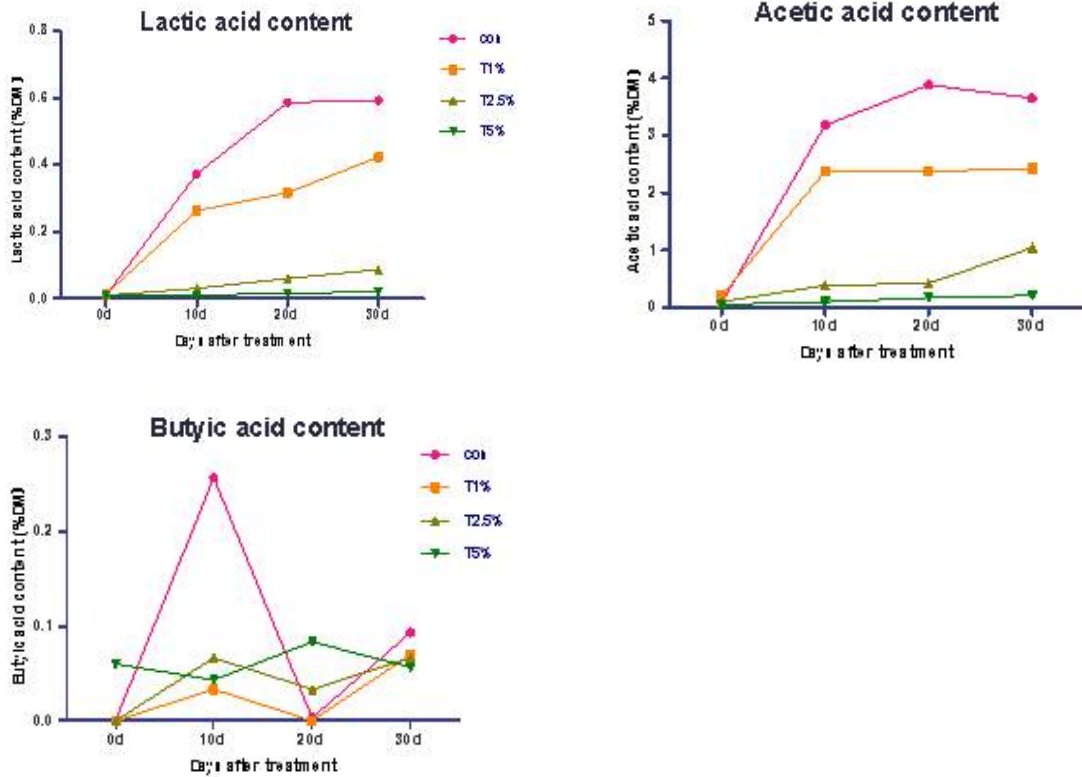


그림 4. 저장기간 중 유기산 변화

○ 위에서 언급한대로 Lactic acid의 함량은 대조구, 1% 처리구와 2.5%, 5% 처리구 간 뚜렷한 차이를 보임. Acetic acid 함량 또한 동일한 양상을 나타냄. 유산 발효뿐 아니라 초산 발효 또한 억제되었으므로 사료됨. Butyric acid 함량은 큰 차이를 보이지 않으나 대조구에서 다소 높은 경향을 보임.

(5) Sulforaphane

○ 발효를 억제함으로써 설포라판의 보존 효과를 기대하였으나, 발효를 억제해도 설포라판이 소실되는 결과를 얻음. 낮은 산도에서 설포라판이 소실되는 것으로 사료됨. 5% 실험구의 경우 제조 당일(0일 차)에 이미 대부분의 설포라판이 손실되었으며 또 다른 발효 억제 실험구인 2.5%에서도 대조구와 1%의 실험구보다 설포라판 함량이 낮은 수준으로 검출됨.

표 5. 설포라판 함량

Treatment	Sulforaphane content (mg/kg)				SEM	P-value
	0d	10d	20d	30d		
Con	7.13	0.45	0.36	0.22	1.70	0.0018
T 1%	8.94	1.14	0.21	0.11	2.13	<0.001
T 2.5%	6.21	0.20	0.14	0.12	1.51	0.10
T 5%	1.09	0.00	0.00	0.00	0.27	< 0.001

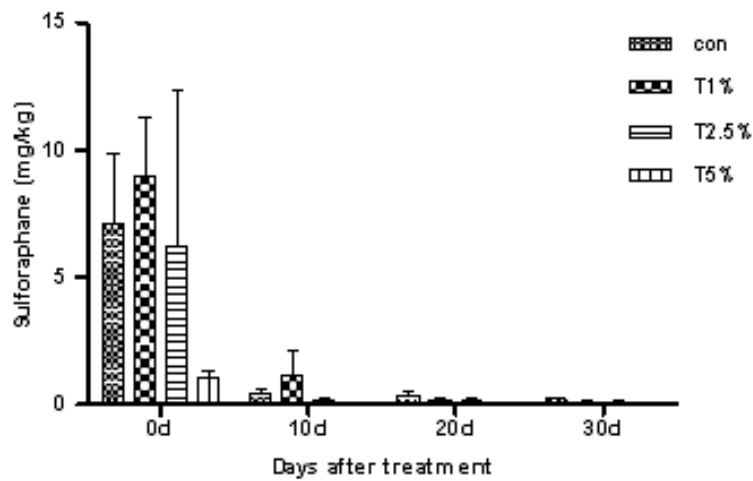


그림 5. 저장기간 별 설포라판 함량 변화

(6) 항산화능

○ 항산화능 실험 결과, 실험구와 대조구 간 큰 차이를 보이지 않음.

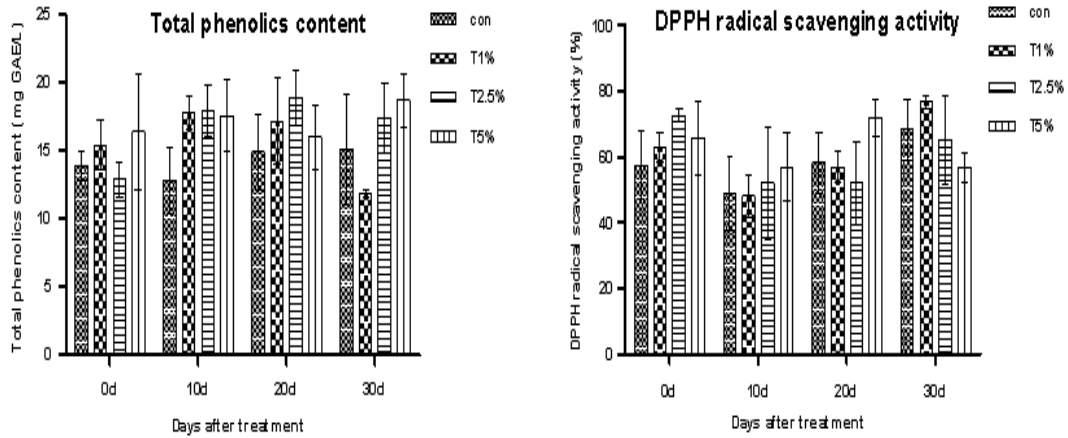


그림 6. 총 페놀 함량 & DPPH 라디칼 소거능 변화

(7) MHA를 2.5% 이상 과량으로 처리하였을 시, 발효는 완전히 억제됨을 확인함. 발효를 억제한다고 하여 대부분의 기능성 성분이 파괴되지는 않았으나, 설포라판의 경우 낮은 pH에서도 완전히 소실되는 것으로 보여짐. 발효를 억제함으로써 Lactic acid의 함량과 유산균 수 또한 적음. 종합적으로 고려해볼 때, MHA는 과량 처리하는 것 보다 잡균 및 부패균을 방지하여 유산 발효에 유리한 환경을 조성하고 보존성과 품질면에서도 우수한 0.4~0.8%로 처리하는 것이 적절함.

<제3세부>

연구목표1: 산야초/부산물 유효성분 검증 시스템 구축

1) 체외 세포배양을 통한 유효성분 활성 분석

(1) 닭 지방전구세포 (preadipocyte) 분리 및 체외 배양

① 닭 지방조직 채취 및 세포 분리

- 발생 2주령 병아리 (상업종 산란계 하이라인 품종)로 부터 복부 및 다리 지방 조직 채취 후 항생제가 들어있는 PBS에 3회 세척.
- 암수를 생식기 형태에 의해 구분한 후 암수별로 지방 조직 혼합 사용 (각각 수컷 4수, 암컷 5수).
- HBSS를 첨가하여 수술용 미세가위를 이용하여 각각의 지방조직을 최대한 작은 크기로 세밀하게 chopping.
- Dissociation media (2 mg/ml collagenase 함유 HBSS) 10 ml씩에 chopped tissue를 10분 동안 37 °C에서 배양.
- 10분 배양 후 pipetting에 의해 최대한 부드럽게 up&down을 통한 agitation 후 37 °C에서 10분간 추가 배양.
- FBS가 함유되어 있는 Culture media 10 ml을 추가하여 불활성화한 후 cell strainer를 이용한 filtering.
- 원심분리 (300rpm, 5min)를 통한 cell pellet harvest 및 상층액을 제거한 후에 최종 배양 용기에 *in vitro* primary culture.

② 닭 지방전구세포 (preadipocyte) 체외 배양

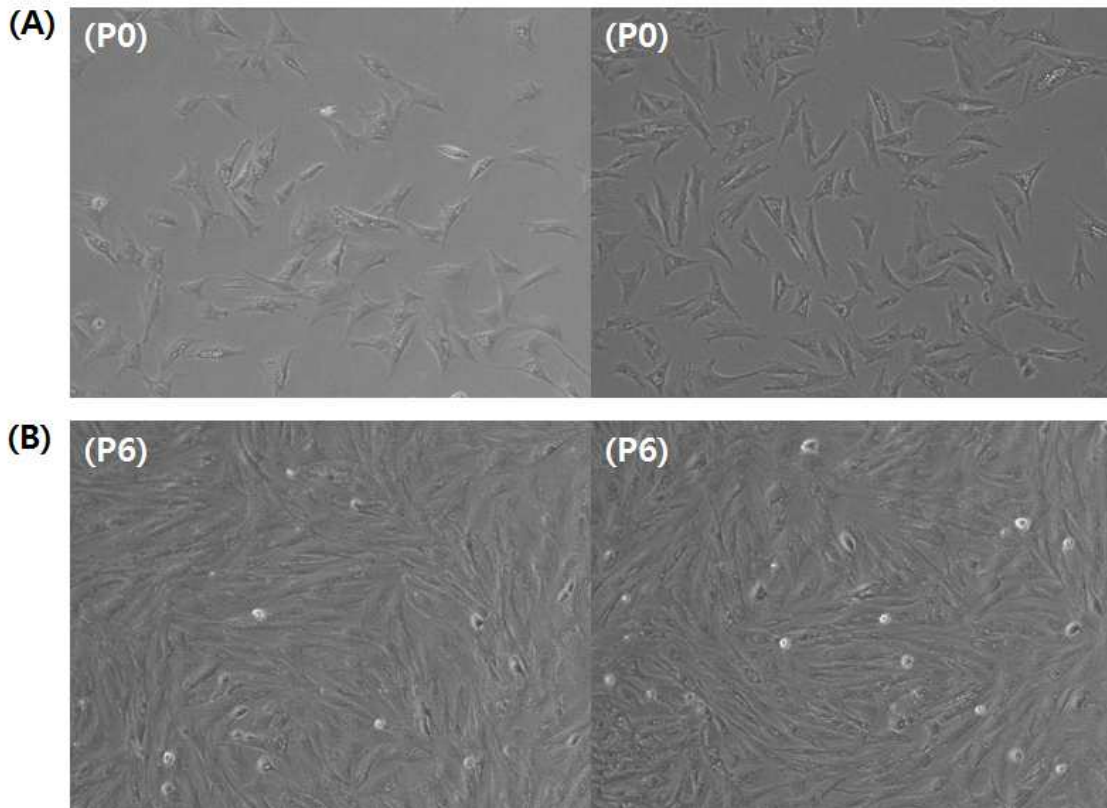


그림 1. 2주령 병아리의 지방조직으로부터 분리한 닭 지방전구세포의 1차 배양 후 (A)와 6차 계대 배양 후 (B)

- 배양 배지 조성
 - DMEM/F12, 10% FBS, 1 % chicken serum, 1x ABAM.
 - 0.1% gelatin-coated culture plate를 이용한 체외 배양.
- 닭 지방전구세포에 대한 체외배양을 통한 안정적인 세포배양 조건 확립 (그림 1).
- 체외 배양된 닭 지방전구세포는 방추형의 형태적 특징을 나타내고 있으며 안정적으로 계대배양 성공.
- 체외 배양된 닭지방전구세포의 냉동보존을 통한 장기 보관.
 - 닭지방전구세포 (수컷) : 계대배양별 18 vials 냉동보관.

- 닭지방전구세포 (암컷) : 계대배양별 6 vials 냉동보관.
- 체외 배양된 닭지방전구세포는 계속 계대 배양 유지 중.
- 유효성분에 대한 세포 배양 분석에 활용 예정 및 지방분화 과정에서의 유효성분의 효과 검증 실험 사용.
- 지방전구세포에 대한 지방세포분화를 위한 최적 조건 확립 중.
 - : 지방세포 분화 유도제 (bovine insulin, dexamethasone, IBMX, oleic acid)
- 더불어 근육 전구세포 관련 세포 배양 기법 확립 및 체외 배양 분석 시스템을 통한 유효 성분 분석 체계 확립.

2) 산야초/부산물 사료 제형화 기술 개발

(1) 당귀 잎/줄기 확보 및 첨가제 제조를 위한 건조 조건 확립 (그림 2)

① 강원도 청정 지역에서 재배된 당귀 확보 (평창군 진부면)

○ 가식부위인 당귀 뿌리로 15 kg 확보.

- 가식부위 중 당귀 머리 부위와 장미, 중미, 단미 등의 구분 없이 건조 진행 (그림 3).
 - : 일반적으로 단미의 경우 상품성이 없어 폐기되거나 매우 저가로 유통되어 가식부위 중에서도 단미는 첨가제로서의 활용성이 있음.

- 확보된 당귀 뿌리는 자연 건조 후 건조기 건조 (65 °C, 36-48시간 건조).

- 건조 후 뿌리는 1-2 mm 크기로 세절 및 분쇄.

○ 부산물인 불가식 부위로 당귀 줄기와 잎 300 kg 확보.

- 불가식 부위인 당귀 잎, 줄기는 자연 건조 후 건조기 건조 (65 °C, 36-48시간 건조).

- 건조 후 잎, 줄기 구분없이 1-2mm 크기로 세절 및 분쇄.

○ 건조시 유효성분 변성 저해를 위한 건조 온도 및 시간 조정.

- 불가식 부위인 당귀 잎, 줄기의 경우 높은 수분 함량에 의한 최적 건조 조건 확립 필요.

- 65 °C 온도에서 36-48시간 건조하는 것이 최적의 조건으로 확인.

○ 건조 작업 후 불가식 부위의 수분함량.

- 건조 전 수분함량은 85 % (건물 15 %)으로 확인됨.

(A)



(B)



그림 2. 강원도 평창군 진부면의 당귀 채배지 및 당귀 채취 후 자연 건조 (A) 와 당귀 잎, 줄기의 건조기 건조 (65℃, 36-48시간 건조) (B)



그림 3. 건조기 건조 후 당귀 뿌리 (위: 당귀머리, 아래: 장미, 중미 부위) (A) 와 당귀 줄기 및 잎 (B)

3) 산야초 및 산야초 부산물 사료첨가제 투여 후 생산성 검증

(1) 당귀 뿌리 첨가에 의한 산란관련 경제 형질 분석

① 당귀 뿌리 첨가에 의한 산란 형질관련 생산성 검증

○ 기본 사료(시판 산란계사료)+ 당귀 뿌리 처리군 (0.3, 0.6 %)에 따른 산란 형질관련 생산성 검증.

- 세 가지 처리군에 따른 산란계 급이 실험 진행.

- 34주령 하이라인 브라운 산란계에 대한 급이 후 생산성 검증.

- 개체 당 일정한 사료량 급이 실시(사료급여량, 100 g/일).

- 6주 급이 실험 : 모든 처리구에서 사료 잔량은 없었으며, 당귀 첨가에 따른 산란계의 사료 섭취 제한은 나타나지 않음.

○ 당귀 급이에 따른 산란율 검증.

- 세 가지 처리군에 따른 산란계 급이 실험 진행.
- 4주간 처리에 의한 산란율은 대조구-91.5±6.2 %, 0.3 % 처리군-90.7±7.32 %, 0.6 % 처리군-94.0±4.8 % 나타냄.
- 0.6 % 처리군에서 가장 높은 산란율을 나타내기는 하였지만, 전반적으로 통계적인 유의성이 나타나지 않음 (그림 4).
- 0.6 % 처리구에서 산란율에 대한 개체 간 차이가 대조구에 비교하여 균일하고 차이가 없게 나타남.

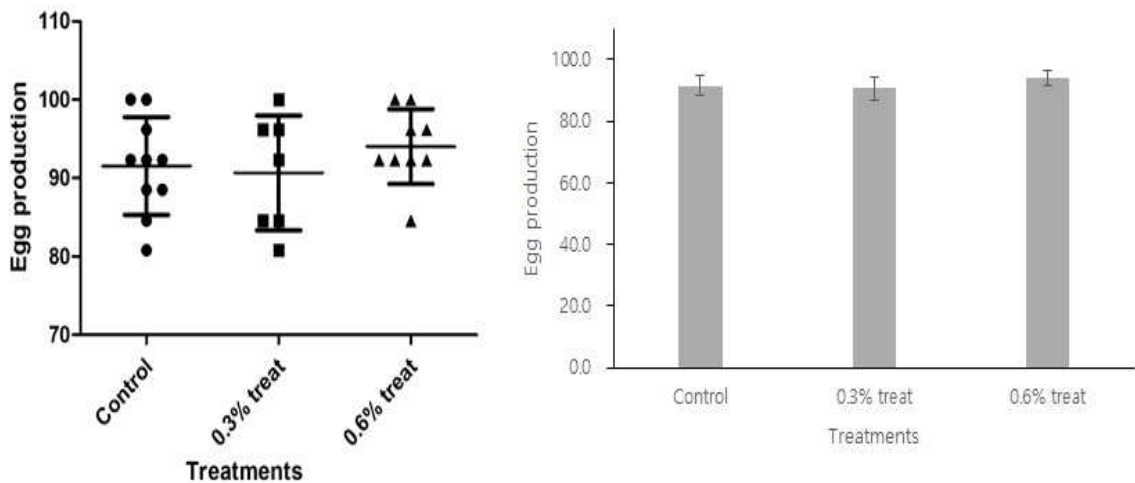


그림 4. 당귀 급이에 따른 산란율 비교

○ 당귀 급이에 따른 난중 검증.

- 세 가지 처리군에 따른 산란계 급이 및 난중 변이 분석.
- 4주간 처리에 의한 난중은 대조구: 57.7±3.6 g, 0.3 % 처리군: 58.0±4.7 g, 0.6 % 처리군: 59.0±4.5 g 나타냄.
- 0.6 % 처리군에서 가장 높은 난중을 나타내기는 하였지만, 전반적으로 통계적인 유의성이 나타나지 않음 (그림 5).

- 각 처리구내에서의 개체 간 난중 비교에서 유의적인 차이는 나타나지 않음.
- 따라서 당귀 처리에 의한 산란계 사료 섭취량 감소나 산란율 및 난중의 감소 양상은 나타나지 않았으며, 통계적으로 유의적이지는 않지만 전반적으로 당귀 처리군에서 증가하는 양상을 나타내고 있음.

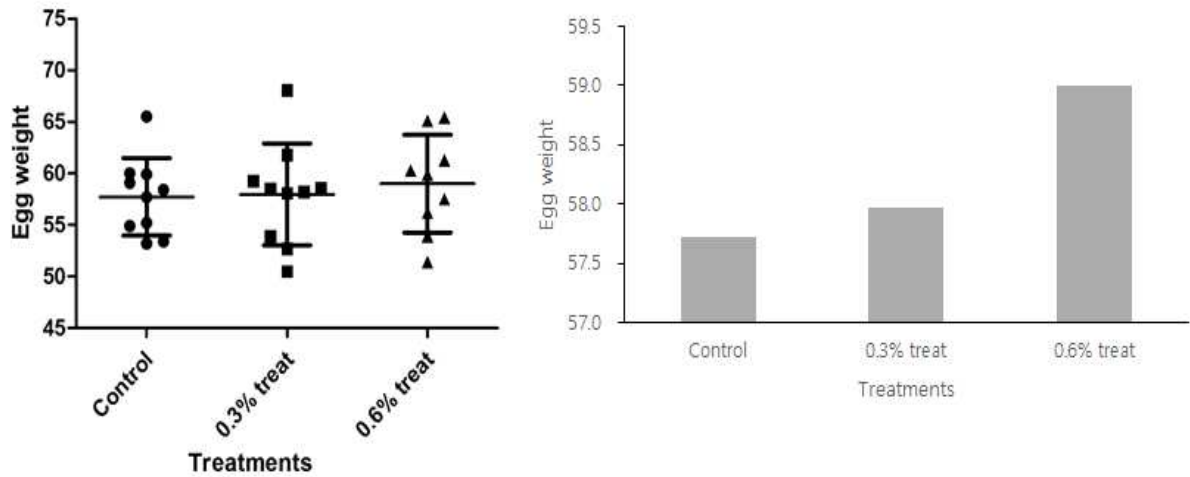


그림 5. 당귀 급이에 따른 난중 비교

○ 당귀 급이에 따른 난중 변이 검증.

- 세 가지 처리군에 따른 급이 초기 5일 동안의 난중과 4주째 5일 동안 난중을 비교하였을 경우, 대조구에서는 평균 0.5 g의 증가를 나타내었으며, 처리구에서는 각각 0.9 g (0.3 % 처리군), 0.5 g (0.6 % 처리군)의 증가를 나타냄.
- 0.3 % 처리군은 급이 초기에 비하여 1.5 %의 난중 증가로 처리에 따른 가장 높은 난중 증가율을 나타냄 (그림 6).

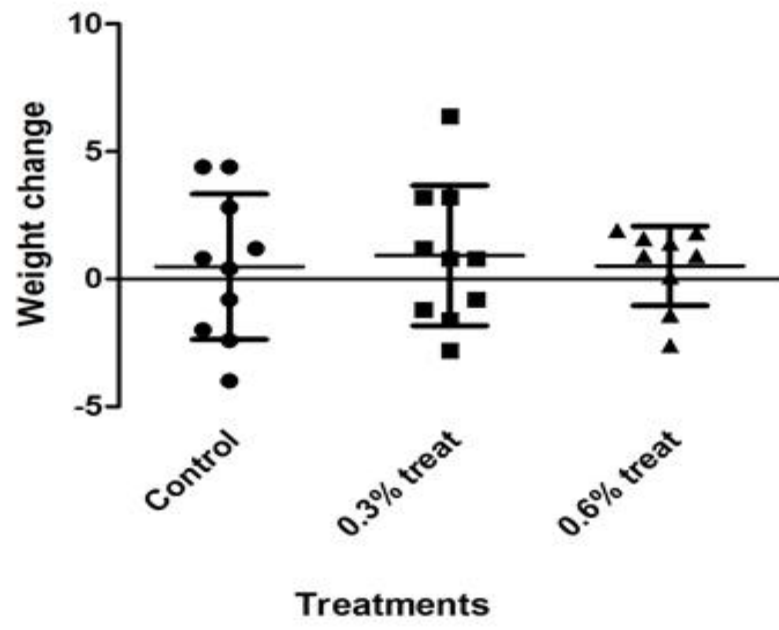


그림 6. 당귀 급이에 따른 난중 변이

연구목표2: 산야초/부산물 급이 계속, 계란 내에서의 유효성분 검증 규격화 프로토콜 확립

1. 유효성분 분석 체계 및 분석 규격화 프로토콜 확립

1) 유효성분의 정성적, 정량적 분석을 위한 HPLC 활용 검출 체계 확립

(1) 당귀 전처리 조건 확립

- 당귀 뿌리 및 전체 부산물을 일차적으로 65 °C air-forced drying oven에서 72시간 건조. 건조 후 뿌리, 줄기, 잎을 각각 분리하여 분쇄기로 최대한 작게 파쇄. 건조 후 파쇄한 각각의 당귀 부위에 대해 1.0 g을 50 mL glass centrifuge tube에 분주.
- 각각의 튜브에 25 mL methanol (99 % HPLC grade)을 첨가하여 뚜껑으로 밀봉한 후 70 °C water bath에서 2시간동안 배양. 배양동안 매 15-20분 간격으로 혼합 과정을 진행.
- 배양 종료 후 unfiltered samples은 하룻밤동안 냉장고에서 정치. Unfiltered samples에 대해 Whatman No. 40 filter를 이용하여 필터링을 진행한 후 evaporation tube로 각 샘플을 옮긴 후 evaporator (Hypervap, HV-300)을 이용하여 evaporation을 수행.
- 조건은 40 °C에서 30 psi 압력으로 진행하였으며, Evaporation후 5 mL methanol (99% HPLC grade) 첨가 후 15 mL centrifuge tube에 옮김. 원심분리는 4 °C에서 3000 rpm으로 10분간 진행.
- 최종적으로 disposable syringe와 0.45 um nylon membrane filter를 이용하여 필터링 후 UPLC 분석을 위해 0.5 ul씩 UPLC vial에 분주.
- 전처리된 샘플은 분주하여 -20 °C냉동고에 보관하였으며 추후 실험에 사용.

(2) 혈액 및 계란 전처리 조건 확립

- 계란의 경우 건조하기 전 난백과 난황을 분리하였으며, 분리 후 각각의 난백과 난황에 대한 무게를 측정.
- 난백과 난황은 50 ml Falcon tube에 옮긴 후 -80°C deep-freezer에 보관. 최종적으로 freeze-dry에서 5일간 건조를 진행.

- 각 개체에 대한 혈액 샘플도 채혈 후 원심분리에 의해 혈장을 분리하였으며, 각각의 혈장은 계란과 동일하게 freeze-dry에서 5일간 건조를 진행. 건조 후 난백, 난황 및 혈장 1.0 g을 50 mL glass centrifuge tube에 분주.
- 각각의 튜브에 25 mL methanol (99 % HPLC grade)을 첨가하여 뚜껑으로 밀봉한 후 70 °C water bath에서 2시간동안 배양.
- 배양동안 매 15-20분 간격으로 혼합 과정을 진행. 배양 종료 후 unfiltered samples은 하룻밤동안 냉장고에서 정치. Unfiltered samples에 대해 Whatman No. 40 filter를 이용하여 필터링을 진행한 후 evaporation tube로 각 샘플을 옮긴 후 evaporator (Hypervap, HV-300)을 이용하여 evaporation을 수행.
- 조건은 40 °C에서 30 psi 압력으로 진행하였으며, Evaporation후 5 mL methanol (99 % HPLC grade) 첨가 후 15 mL centrifuge tube에 옮김.
- 원심분리는 4 °C에서 3000 rpm으로 10분간 진행. 최종적으로 disposable syringe와 0.45 um nylon membrane filter를 이용하여 필터링 후 UPLC 분석을 위해 0.75 ul씩 UPLC vial에 분주.
- 전처리된 샘플은 분주하여 -20 °C 냉동고에 보관하였으며 추후 실험 사용.

(3) UPLC 분석 조건 확립

- 본 연구에서는 테커신 및 테커시놀 안젤레이트 분석을 위해서 UPLC system (Waters® Xevo® TQ MS ACQUITY UPLC® System)을 사용.
- 전처리 과정에서 준비된 각각의 샘플 (당귀 뿌리, 줄기, 잎 각각 0.5 uL씩, 난백, 난황, 혈장 각각 0.75 uL씩)과 테커신 및 테커시놀 안젤레이트 스탠다드 (각각 0.5 uL씩)를 UPLC column (ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 um, 2.1 mm*50 mm)에 40 °C (sample at 4 °C)에서 gradient water-acetonitrile solvent system을 이용하여 주입.
- 주입 후 flow rate은 0.64 ml/min이었으며, 테커신과 테커시놀 안젤레이트는 UV 330 nm (300~330 nm)에서 검출 조건을 확립하였으며 (그림 7) 결과에 대한 데이터 분석은 MassLinx V.4.1을 통해 진행.

Gradient Results - Untitled

Molecular Weight: 301-500 Da

Column Temperature: 35 °C

From HPLC:

Particle Size: 5 µm

Dwell Volume: 0.000 mL

To UPLC:

Target System: UPLC (BSM)

Maximum Pressure: 14997 psi

Particle Size: 1.7 µm

Dwell Volume: 0.125 mL

Organic Mix:

Acetonitrile 100.0 %

Methanol 0.0 %

Original HPLC column conditions

250 mm x 4.5 mm, 5.0 µm

Run Time (min)	Peak Capacity	Flow Rate (mL/min)	Pressure (psi)	Injection Volume (µL)
50.00	40	1.00	1197	10.0

Time (min)	Flow (mL/min)	%A (Aqueous)	%B (Organic)	Column Volumes
Initial	1.00	80.0	20.0	--
3.00	1.00	80.0	20.0	1.14
8.00	1.00	70.0	30.0	1.91
18.00	1.00	70.0	30.0	3.81
19.00	1.00	50.0	50.0	0.38
40.00	1.00	50.0	50.0	8.00
41.00	1.00	10.0	90.0	0.38
50.00	1.00	10.0	90.0	3.43

New UPLC conditions with scaled gradient (accounting for particle size)

50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm

Use pre-injector volume = 125 µL

Run Time (min)	Peak Capacity	Flow Rate (mL/min)	Pressure (psi)	Injection Volume (µL)
3.20	31	0.64	6844	0.4

Time (min)	Flow (mL/min)	%A (Aqueous)	%B (Organic)	Column Volumes
Initial	0.64	80.0	20.0	--
0.01	0.64	80.0	20.0	0.06
0.35	0.64	70.0	30.0	1.90
1.03	0.64	70.0	30.0	3.81
1.10	0.64	50.0	50.0	0.38
2.52	0.64	50.0	50.0	8.00
2.59	0.64	10.0	90.0	0.38

그림 7. UPLC 기본 조건 및 데커신-데커시놀 안젤레이트 검출을 위한 조건 확립 (solvent gradient condition)

2) 유효성분의정량적 분석을 위한 표지 규격화 및 분석법 확립

(1) 데커신, 데커시놀 안젤레이트 검출 표준화

- 당귀의 유효유효질인 데커신과 데커시놀 안젤레이트의 정확한 검출 및 정량화를 위하여 정제된 데커신과 데커시놀 안젤레이트를 이용하여 표준화를 진행.
- 99 %이상 정제된 데커신과 데커시놀 안젤레이트는 (주)천연물바이오에서 구입하여 UPLC 검출 조건 확립에 사용. 우선 데커신과 데커시놀 안젤레이트 각각에 대해 UPLC 검출 및 정량을 위한 분석을 진행 (그림 8).

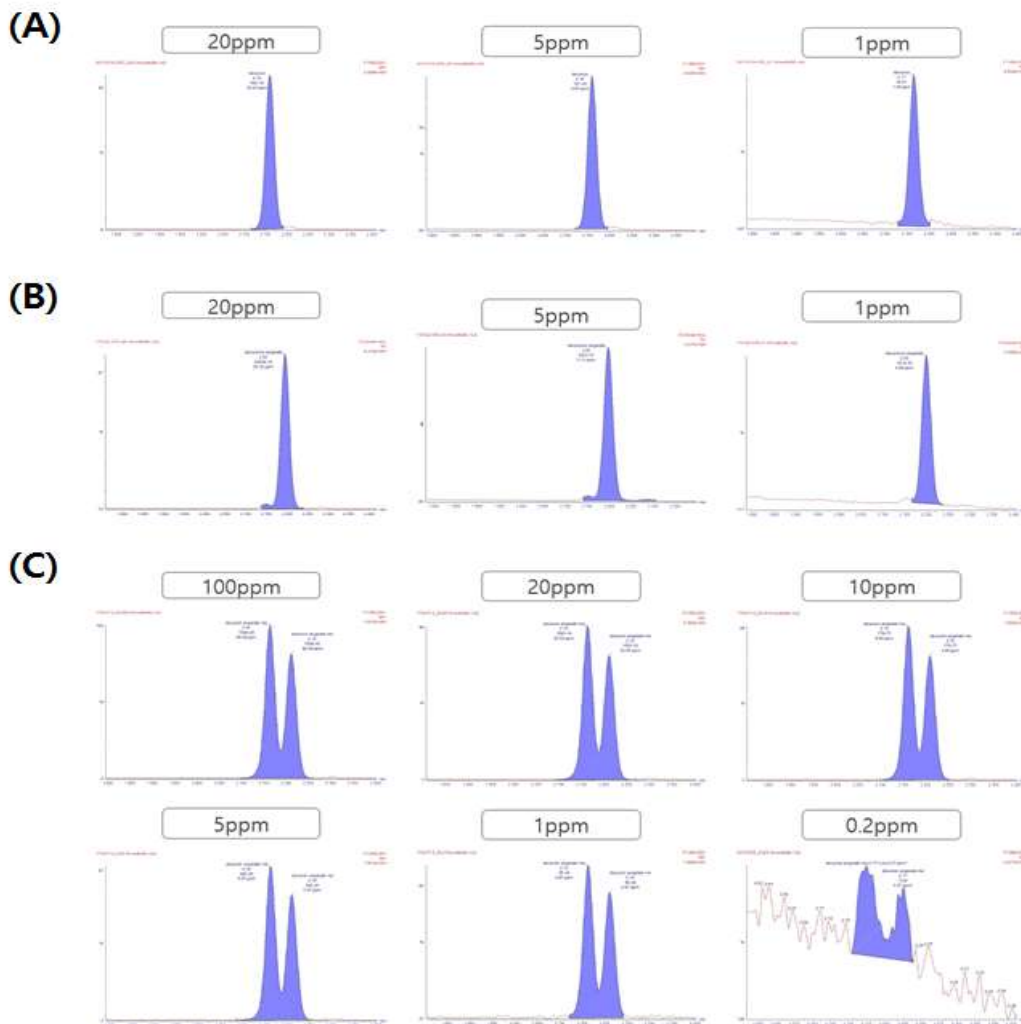


그림 8. UPLC를 이용한 데커신과 데커시놀 안젤레이트 검출. (A) 데커신 검출 (1 ppm~20 ppm). (B) 데커시놀 안젤레이트 검출 (1 ppm~20 ppm). (C) 데커신과 데커신 안젤레이트 혼합에 의한 검출 (1 ppm~20 ppm).

- 앞서 언급한 바와 같이 UPLC 기본 조건에서 변형된 조건을 기반으로 하여 1 ppm~20 ppm까지 테커신 (그림 8A)과 테커시놀 안젤레이트 (그림 8B)에 대한 검출 조건을 확립.
- 본 조건은 각각의 테커신과 테커신 안젤레이트 모두 1 ppm까지 안정적으로 검출 가능.
- 또한 테커신과 테커신 안젤레이트를 혼합한 후 각각의 물질이 서로간의 간섭없이 검출 되는지 검증.
- 검출 결과, 각각의 테커신과 테커신 안젤레이트는 정확하게 검출이 확인되었으며 (그림 8C), 각각의 조건보다 더 낮은 농도인 0.2 ppm까지도 두 물질에 대한 정확한 검출 및 정량화가 가능 (그림 8C).

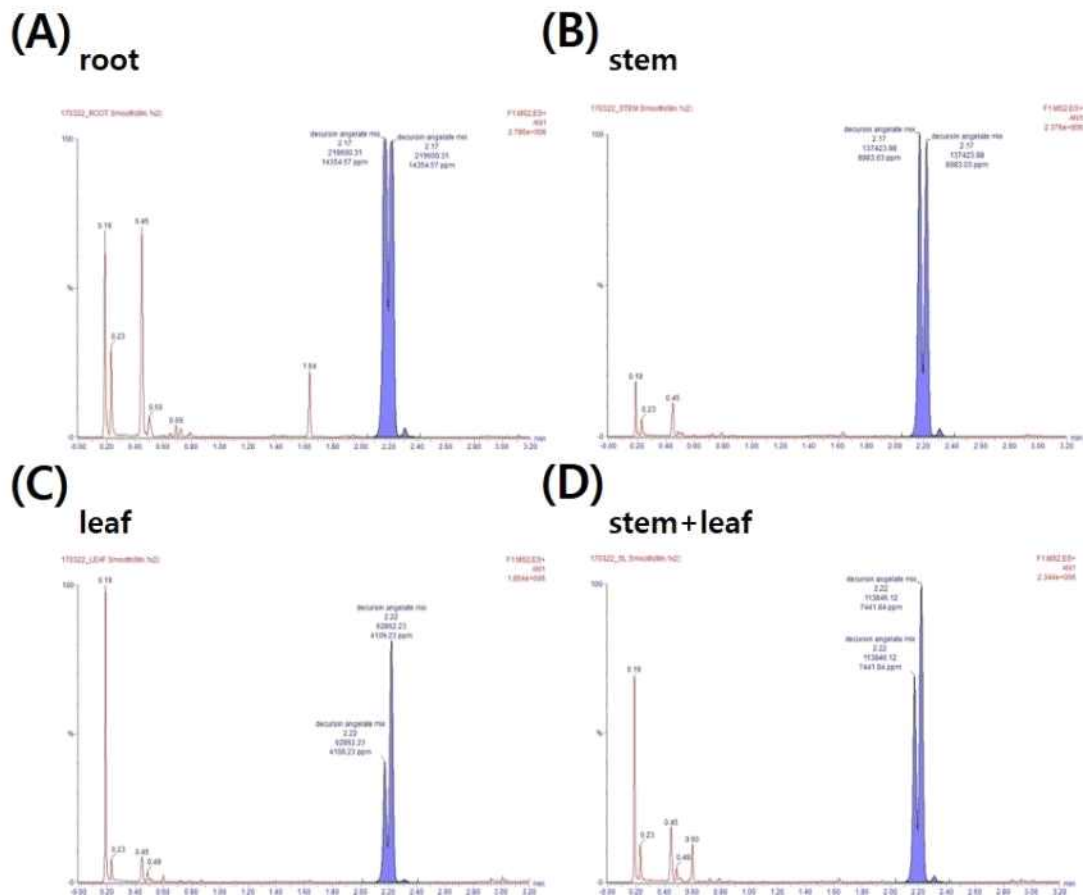


그림 9. 당귀 뿌리 (A), 줄기 (B), 잎 (C)에서의 테커신과 테커신 안젤레이트 검출. (D) 최종적으로는 줄기와 잎이 혼합된 건조물에서 테커신과 테커신 안젤레이트 검출.

- 다음으로 건조된 당귀의 뿌리, 줄기, 잎에서의 테커신과 테커신 안젤레이트 검출 및 분석을 진행.
- 전처리된 당귀의 뿌리, 줄기, 잎에 대하여 정제된 스탠다드에 대한 조건으로 UPLC 분석을 진행.
- 당귀 뿌리의 경우에는 예상대로 테커신과 테커신 안젤레이트 모두 안정적으로 검출 (그림 9A).
- 당귀 줄기의 경우에도 뿌리와 비교했을 때 1/3정도의 수준이지만 테커신과 테커신 안젤레이트가 모두 비슷한 양으로 검출됨 (그림 9B).
- 그러나 당귀 잎의 경우에는 다소 다른 양상을 나타냄.
- 총량에 대해서는 뿌리와 비교했을 때 줄기와 비슷하게 1/3정도 검출됨 (그림 9C). 그러나 당귀 잎의 경우에는 테커신보다는 테커시놀 안젤레이트가 두 배정도 많이 검출 (그림 9C).
- 또한 줄기와 잎을 혼합 경우에도 예상대로 테커신과 테커시놀 안젤레이트 검출되었으나 잎의 영향으로 테커시놀 안젤레이트가 테커신보다 좀 더 많이 검출됨 (그림 9D).
- 이상의 결과로 볼 때, 가식부위인 당귀 뿌리보다는 적은 양이지만 비가식 부위인 줄기와 잎에도 1/3정도의 유효성분인 테커신과 테커시놀 안젤레이트가 존재하는 것을 검증함으로써 부산물에 대한 사료자원의 가능성을 제시해주고 있음.
- 당귀의 테커신과 테커시놀 안젤레이트가 사료첨가제로 급여 후 계란에 축적이 된다하더라도 난백과 난황의 간섭 효과 없이 검출이 가능해야만 정량화 및 규격화가 가능.
- 따라서 난백 및 난황에 대해 테커신과 테커시놀 안젤레이트를 혼합하여 spike test를 진행.
- 난백과 난황 각각에 대해, 난백-난황 혼합액에 대해 일정량의 테커신과 테커시놀 안젤레이트를 혼합하여 검출 가능성을 확인.
- 확립한 UPLC 검출 조건에 대하여 각각의 난백과 난황에 혼합한 테커신과 테커시놀 안젤레이트는 간섭 영향 없이 정확하게 검출 (그림 10A, B).

- 또한 난백과 난황이 혼합액에 대해 데커신과 데커시놀 안젤레이트을 첨가하여 측정.
- 각각의 난백과 난황에서 검출되는 것과 동일하게 데커신과 데커시놀 안젤레이트 모두 검출이 가능 (그림 10C).
- 이로써 본 실험을 통해 사료첨가제로써 당귀부산물 급여 이후 계란 내 데커신과 데커시놀 안젤레이트가 축적되었을 경우 검출 가능한 조건을 확립.

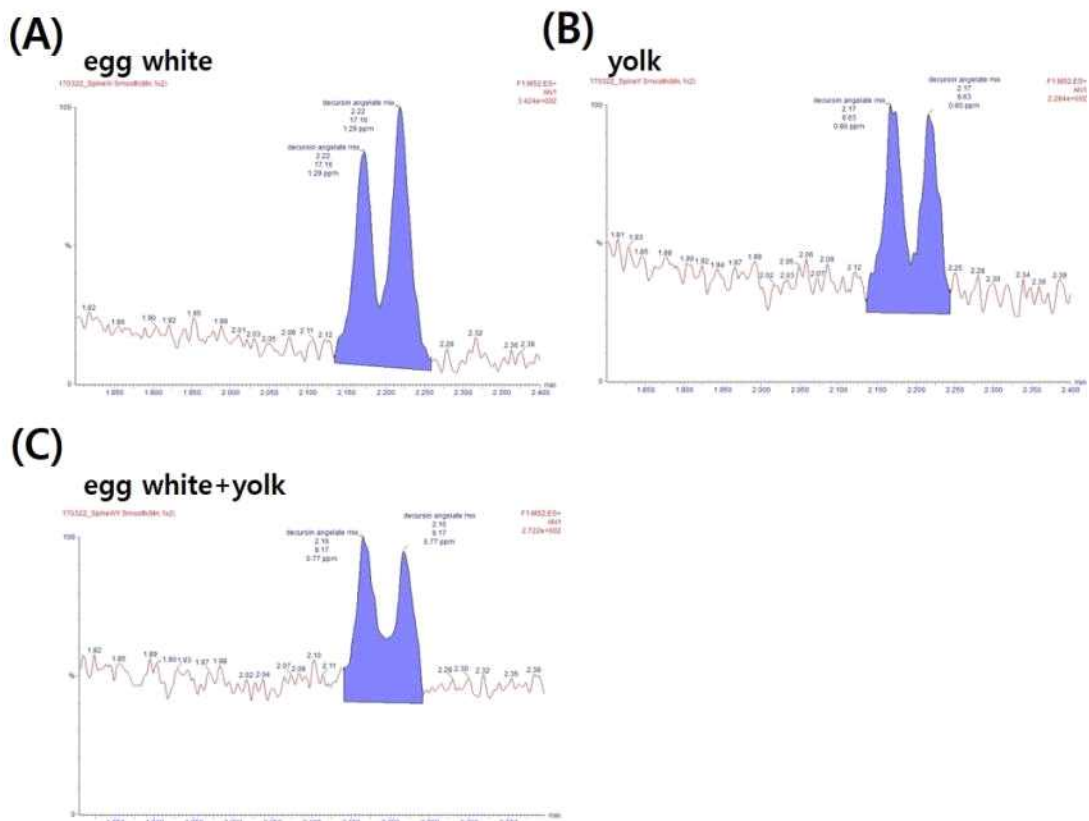


그림 10. 난백과 난황내 데커신과 데커시놀 안젤레이트 혼합 후 UPLC에 의한 검출 조건 확립을 위한 spike test. (A) 난백내 데커신과 데커시놀 안젤레이트 혼합 후 검출. (B) 난황내 데커신과 데커시놀 안젤레이트 혼합 후 검출. (C) 난백 및 난황내 데커신과 데커시놀 안젤레이트 혼합 후 검출.

3) 세포 배양 및 유효성분 처리에 의한 유효성분 안전성 및 기능성 분석 확립

(1) 당귀 추출물 제조

- 사료첨가제 사용시 당귀내 유효성분의 보다 효율적인 이용 및 체내 흡수를 위해 단순 건조 및 파쇄가 아니라 열수 추출 방법을 기반한 고온 고압 추출법을 확립.
- 당귀의 잎이나 줄기의 셀룰로오스 등 세포벽은 견고하여 세포내 유효성분을 닭이 직접적으로 분해 및 흡수하기는 매우 어려움.
- 따라서 사료첨가제에 대한 닭의 원활한 체내 흡수와 계란 내 전이를 위하여 추출법에 대한 조건을 확립.
- 건조한 당귀 뿌리의 경우 60 g, 건조한 당귀 잎과 줄기는 혼합하여 200 g을 각각 1 L 병에 담은 뒤 600 mL 증류수를 첨가하여 autoclave (Wiseclave WAC-60, 대한과학)에서 110 °C, 5.69 psi에서 15 min 동안 추출.
- 열수 추출후 상등액을 6,500 rpm, 4 °C 에서 10 min동안 원심분리하고 다시 얻은 상등액은 3~5 μm 여과지 (Hyundai Micro) 와 0.2 μm syringe filter (Sartorius)을 이용하여 필터링을 진행.
- 최종적으로 여과된 추출물은 동결건조용 튜브를 이용하여 동결 건조기에서 건조. 각각의 당귀 산물에 대해 고온 고압 열수 추출물을 제조 한 후 건조 중량을 측정 하였을 때, 당귀 뿌리 추출물은 20.33±2.83 mg/mL, 당귀 잎·줄기 추출물은 55.33± 1.53mg/mL로 측정되었고, 수율은 각각 20.33±2.83%과 33.20±0.92%로 분석됨 (표 1).

표 1. 당귀 내 유효성분 고온 고압 추출법 조건

Table 1. Extraction condition, dried weight and % of yield of *Angelica gigas*.

	Extraction Temperature (°C)	Extraction pressure (psi)	Dried weight (mg/mL)	% of Yield
<i>Angelica gigas</i> -Root	110	5.69	20.33 ± 2.83	20.33 ± 2.83
<i>Angelica gigas</i> -leaf	110	5.69	55.33 ± 1.53	33.20 ± 0.92

* Data expressed as mean ± standard deviation (SD) value of three replicates.

(2) 당귀 산물 처리에 의한 세포 성장 곡선 (growth curve analysis) 분석

- 돼지 대식세포주 (porcine macrophage cell line)인 3D4/31 세포 (American Type Culture Collection; ATCC)를 이용하여 당귀 산물에 대한 세포 생존율 및 증식 분석을 진행.
- 3D4/31 세포는 기본 배지는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지 (RPMI1640; WelGene)를 사용하였으며 10 % Fetal bovine serum (FBS; WelGene) 및 1% Penycillin-streptomycine (Sigma-Aldrich)을 첨가하여 37 °C CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific; 95 % air, 5 % CO₂)에서 배양.
- 세포 증식 영향을 분석하기 위해서 3D4/31 세포를 60 mm cell culture plate에 5x10⁴ 수만큼 seeding하여 12시간 동안 배양한 후 vehicle (distilled water), 2 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich)와 당귀 추출물을 농도 별로 처리.
- 배지는 24시간마다 배지를 교체하고 vehicle과 당귀 추출물도 농도 별로 다시 처리. 세포수는 0, 1, 2, 3 일 마다 0.4 % (w/v) trypan blue (Thermo Fisher Scientific)로 1분간 염색한 후 hemocytometer로 측정을 진행.
- 당귀에 대한 생존율 증진 효능을 검증하기 위한 세포 생존율 (cell viability) 측정은 96 well cell culture plate에 3D4/31 세포를 3x10³ 수만큼 100 μL 배지에 seeding하여 12시간 동안 배양한 후 vehicle, 2 nM PMA와 당귀추출물을 농도 별로 처리한 뒤 24 시간 동안 추가 배양.
- 그 후 10 % EZ cytox cell viability assay reagent (WST-1 cell viability assay kit; DoGenBio)를 각 well 마다 처리하고 2시간 동안 배양한 뒤 microplate reader (Tecan)로 450 nm에서 흡광도를 측정.
- 당귀 산물 처리에 의한 세포 성장 곡선 실험 결과, 3D4/31 세포에 당귀 뿌리 추출물을 처리했을 대조군에 비해서 2, 3일차에 각 17.12±8.32 %, 16.74±3.15 %가 증가 하였고, 당귀 잎·줄기 추출물을 처리 하였을 때는 대조군에 비하여 2, 3 일차에서 각 10.59±5.16 %, 29.30±7.13 %가 증가 (그림 11).
- 또한 2 nM PMA를 처리했을 때는 1, 2, 3일 차에 대조군에 비해 각 35.27±10.18 %, 22.97±6.11 %, 45.81±4.88 % 가 감소하였으나, PMA와 당귀 뿌리 추출물을 함께 처리했

을 때 PMA 처리 군에 비해 1, 2, 3일차에 각 49.25±9.86 %, 38.01±3.47 %, 60.33±7.24 %가 증가(그림 11).

- PMA와 당귀 잎·줄기 추출물을 처리하였을 때 PMA 처리군에 비해 1, 2, 3일차에 각 38.81±4.48 %, 54.39±7.02 %, 38.41±3.13 % 증가 (그림 11).
- 이를 통해 당귀 뿌리뿐만 아니라 잎·줄기에서의 추출물은 세포 증식을 증진 시키며 PMA처리에 의해 대조군에 비해 세포 증식이 약 40 % 가량 감소하지만 당귀 추출물은 대조군 증식률의 80 % 정도 수준까지 회복시킴을 알 수 있음.

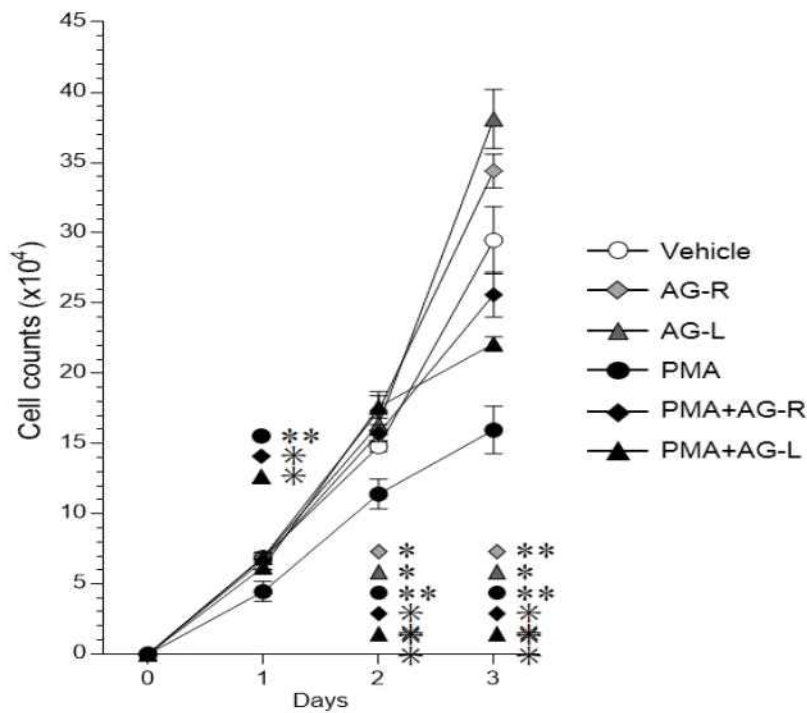


그림 11. 당귀 뿌리, 잎·줄기 추출물 처리에 의한 3D4β1 세포에서의 증식 분석. Data presented as mean ± SD values (n = 3); *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

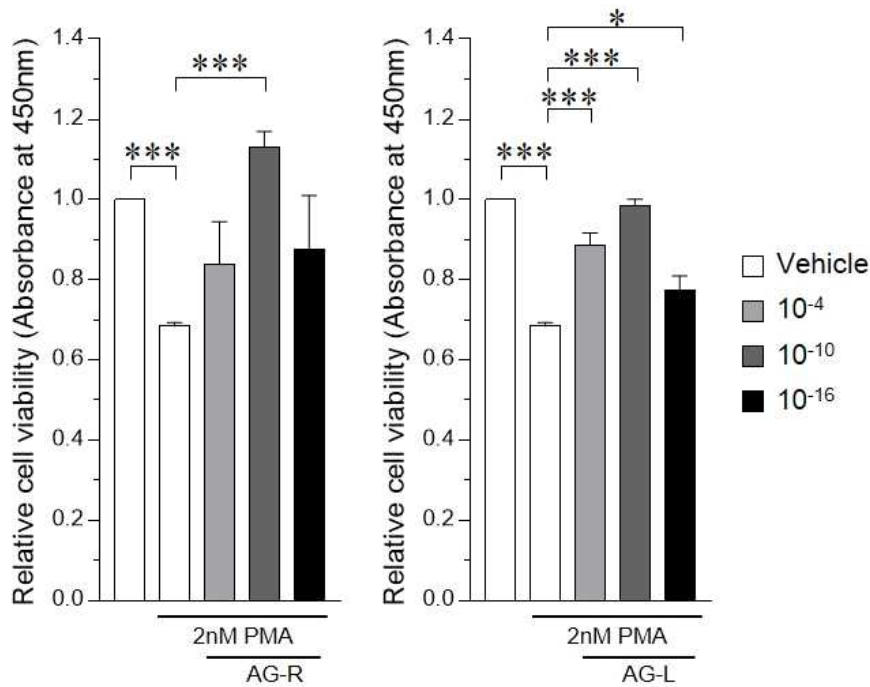


그림 12. 당귀 뿌리, 잎·줄기 추출물 처리에 의한 3D4β1 세포에서의 생존율 분석. 세포 생존율은 WST-1을 이용하여 측정. Data presented as mean ± SD values (n = 3); *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

- 세포 생존율 측정결과는 PMA 처리 시에는 대조군에 비하여 31.65±0.94% 감소하였으나 PMA와 함께 당귀 뿌리 추출물을 처리 했을 때 는 10⁻¹⁰ 농도에서 PMA 처리 군에 비해 65.32±3.93% 증가 (그림 12).
- PMA와 함께 당귀 잎·줄기 추출물을 처리했을 때 10⁻⁴, 10⁻¹⁰, 10⁻¹⁶의 농도에서 PMA 처리 군에 비해 각 29.80±2.99%, 53.99±1.67%, 13.32±3.45%가 증가 (그림 12).
- 이와 같은 결과를 통해 PMA 처리에 의해 생존률이 대조군 대비 약 30% 감소하였음에도 당귀 추출물을 처리시 대조군 수준까지 생존률을 회복.
- 따라서 본 연구에서의 세포 성장 곡선 실험 및 세포 생존율 결과는 당귀의 비가식 부위인 잎·줄기에 대해서도 당귀 뿌리와 유사하게 세포의 증식과 생존율 증진의 효능이 있음.

(3) 세포 배양을 통한 당귀의 항산화 효능 및 지질 축적 검증

- 3D4/31 세포를 이용하여 당귀 추출물의 항산화 효능을 측정. 3D4/31 세포를 60 mm cell

culture plate (SPL Life Sciences) 에 5×10^5 수만큼 seeding하여 12시간 동안 배양.

- 12시간 후 vehicle (distilled water)과 당귀추출물을 농도 별로 처리한 뒤 12시간 동안 추가 배양한 후 $10 \mu\text{M}$ 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; D35845, Invitrogen)을 각각 처리한 뒤 30분간 배양.
- 처리된 세포를 1.5 mL tube에 모은 후 phosphate-buffered saline (PBS) 로 washing하고 Guava EasyCyte (Millipore)로 세포내 활성산소 총 수준을 측정. 최종적으로 DCF의 Mean fluorescence intensity (MFI) 는 Flowjo Version 10.0.7.2 (TreeStar)로 측정 (그림 13).
- 3D4/31 세포에 당귀 뿌리 추출물을 처리하였을 때 세포내 활성산소 종 (Reactive Oxygen Species; ROS) 농도는 대조군에 비하여 $24.60 \pm 7.49 \%$ ($p < 0.005$)가 감소하였고, 당귀 잎·줄기 추출물을 처리하였을 때는 대조군에 비하여 $25.09 \pm 8.91 \%$ ($p < 0.01$)가 감소하였음 (그림 14).
- 이를 통해 일차적으로 당귀 추출물이 항산화 효능을 지님을 알 수 있었으며, 추가적으로 부산물인 잎·줄기 추출물의 항산화력이 당귀 뿌리와 유사한 효능을 가지고 있음을 알 수 있었음 (그림 13).

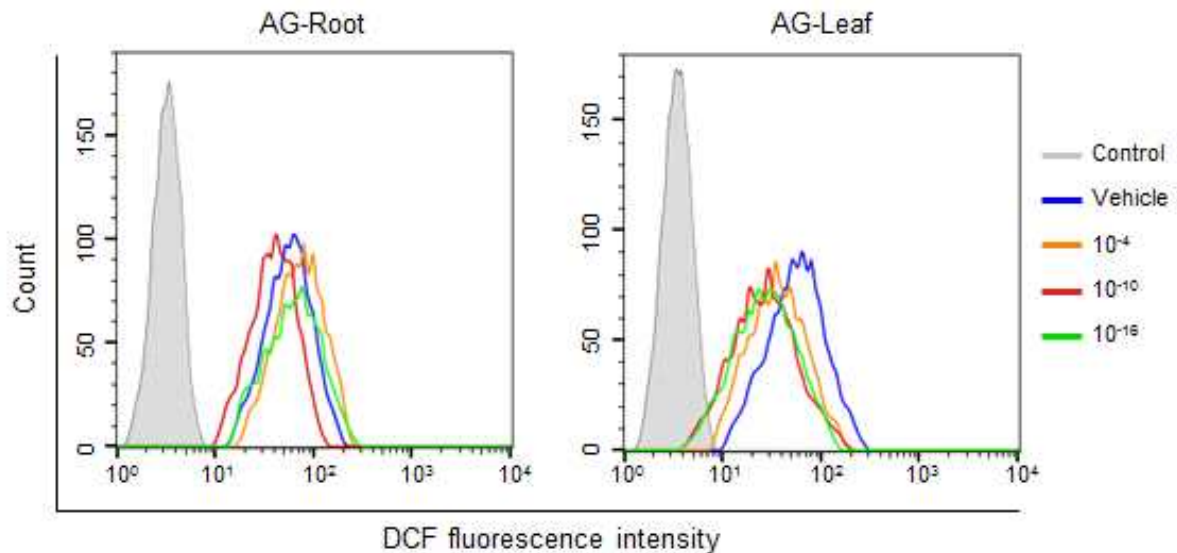


그림 13. 돼지 3D4/31 세포에 대한 당귀 추출물의 항산화 효과 검증. 당귀 뿌리와 잎·줄기로부터 추출한 추출물에 대한 세포내 활성산소 종 (intracellular ROS) 수준의 Flow cytometry 분석 결과.

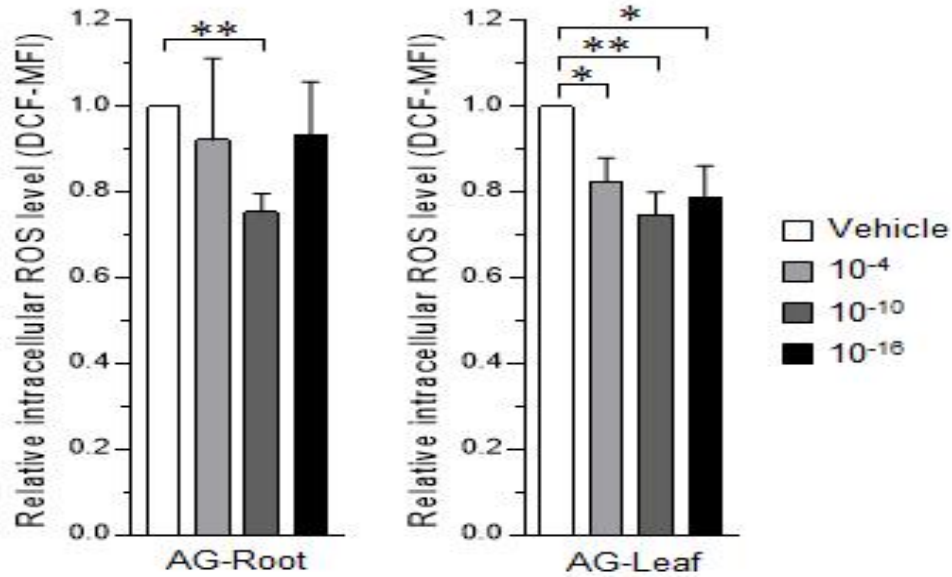


그림 14. 돼지 3D4/β1 세포에 대한 당귀 추출물의 항산화 효과 검증. 당귀 뿌리와 잎·줄기로부터 추출한 추출물에 대한 세포내 활성산소 종 (intracellular ROS) 수준 비교 결과. Data presented as mean±SD values (n = 3); *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

- 다음으로 당귀 추출물에 대한 지방 축적 저해 효능을 검증.
- 항산화 효능 검증과 동일하게 돼지 3D4/31 세포를 60 mm cell culture plate (SPL Life Sciences)에 5×10^5 수만큼 seeding하여 12시간 동안 배양.
- 12시간 후 vehicle 및 2 nM PMA 와 당귀추출물을 농도 별로 처리한 뒤 24 시간 동안 추가 배양을 진행.
- 최종적으로 처리된 3D4/31 세포를 3.8 % formaldehyde (Sigma-Aldrich)로 15분, 60 % isopropanol로 5분 간 고정 시키고 완전히 건조.
- Oil Red O 염색은 60 % isopropanol에 0.18 % (w/v) Oil Red O (Sigma-Aldrich) 용액을 상온에서 15분간 염색을 진행한 후에 DW로 4회 세척.
- 세포내 축적 지질 확인은 DMi 8 fluorescence microscope (Leica)로 이미지 시각화 하고 이미지는 LAS X (Leica)와 Photoshop CC 2017 (Adobe Systems)로 분석.
- 또한 세포내 지질 함량에 대한 수치화 및 분석을 위해 3D4/31 세포를 96 well cell

culture plate에 3×10^3 수만큼 100 μL 배지에 seeding 한 후 12 시간 동안 배양.

- 12시간 배양 후 vehicle 및 2 nM PMA 와 당귀추출물을 농도 별로 처리한 뒤 24 시간 동안 배양한 후 Oil Red O 염색과 동일 한 방법으로 세포를 염색 한 뒤 well 에서 용액을 전부 제거.
- 제거 후 각 well 마다 60 % isopropanol을 100 μL 씩 넣고 상온에서 30분간 반응 시킨 뒤 microplate reader로 492 nm에서 흡광도를 측정하여 수치화. 당귀 추출물의 지질 합성 조절 효능 검증을 위한 Oil Red O 염색으로 3D4/31세포 내의 지질 함량을 분석 했을 때, PMA 처리 시 대조군에 비해 18.60 ± 3.26 % 증가 (그림 15).
- 당귀 산물에 대한 세포내 지질 축적 검증 결과, 당귀 뿌리 추출물을 처리하였을 때는 대조군에 비해 3.30 ± 0.50 % 감소하였고 PMA와 함께 처리했을 때는 대조군에 비해 19.33 ± 1.44 % 감소 (그림 15).
- 그러나 당귀 뿌리와 달리 당귀 잎·줄기로부터 추출한 추출물 처리 시에는 대조군에 비해 11.59 ± 5.91 % 증가하였고 PMA와 함께 처리한 경우 대조군에 비해 4.82 ± 1.24 % 증가함이 나타남 ($p < 0.05 \sim 0.001$, 그림 15).
- 이를 통해 당귀 뿌리 추출물은 3D4/31세포의 지질 합성을 저해하지만, 반대의 경향으로 당귀 잎·줄기 추출물은 지질 합성을 증진 시키는 효능을 지님을 알 수 있었음.
- ROS 는 거의 모든 세포에서 만들어지고 동물의 경우 주로 미토콘드리아 대사 과정에서 생성되는 것으로 알려져 있으며, ROS는 신호전달, 세포 증식, 대식세포의 섭취 작용 (phagocytosis) 등에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었지만 과도한 ROS의 생성은 세포내 DNA, 미토콘드리아 등 각종 소기관에 악영향을 주어 암 유발, 세포사멸, 노화를 촉진하기도 함.
- 본 연구 결과에서는 두 가지 당귀 추출물 (뿌리 및 잎·줄기 추출물)의 돼지 대식세포 (3D4/31) 에 대한 항산화 효능은 세포 사멸 및 노화를 억제하고 증식 및 생존률을 증진시킬 수 있었음.
- PMA는 protein kinase C (PKC) 활성화제로 대식세포를 활성화 시킬 수 있고, 활성화 된 대식세포는 세포내 ROS 농도, 지질 합성, 지질 과산화 반응 (peroxidation)이 증가하며 증식이 억제 되고 세포 생존률이 감소하는 것으로 알려져 있음.

- 이에 두 가지 당귀 추출물은 돼지 대식세포의 증식을 증진 시켰고 PMA에 의한 활성화 시에도 대조 군의 80 % 수준까지 세포 증식률을 증가 시킴.
- 또한 당귀 추출물은 PMA처리시에도 세포 생존률을 대조 군과 유사한 수준까지 회복시킴이 확인되었었으며, 이는 두 가지 당귀 추출물은 대식세포의 증식 및 생존률을 비활성 및 활성화 시 모두 증가 시켰으며 이는 당귀 추출물이 대식세포 사멸 억제 및 증식 증진을 통해 돼지의 1차 면역반응을 강화 시켜 항병성을 증진 시킬 수 있는 가능성을 제시.
- 또한 오래전부터 약재로 사용되어 고가로 거래되는 당귀 뿌리와 달리 부산물로서 버려지는 잎·줄기 추출물이 항산화, 세포 증식 및 생존률 증진 효능이 거의 유사하여 경제성으로 인해 가축에 사용할 수 없는 당귀 뿌리를 대신해 부산물인 잎·줄기를 활용 할 시 훨씬 경제적으로 당귀 뿌리와 유사한 효능을 지닌 가축 사료 첨가제 개발 등이 가능함을 알 수 있었음.
- 또한 두 가지 당귀 추출물은 서로 다른 지질 합성 조절 효능이 확인 되었는데 당귀 뿌리 추출물은 지질 합성을 저해하며, 이는 대식세포의 과도한 활성을 억제하여 과도한 염증 반응을 억제하고 대식세포의 사멸을 억제 할 수도 있음.
- 그러나 잎·줄기 추출물은 돼지 대식세포의 지질 합성을 증진 시켰는데 이는 대식세포의 지질 과산화를 촉진시켜 대식세포의 활성을 증진 시킬 수 있을 것으로 판단.
- 이러한 작용은 세포 사멸 억제를 통해 대식세포의 생존률을 높여 최종적으로 대식세포에 의한 1차면역반응을 증진 시킬 수도 있을 것으로 판단.

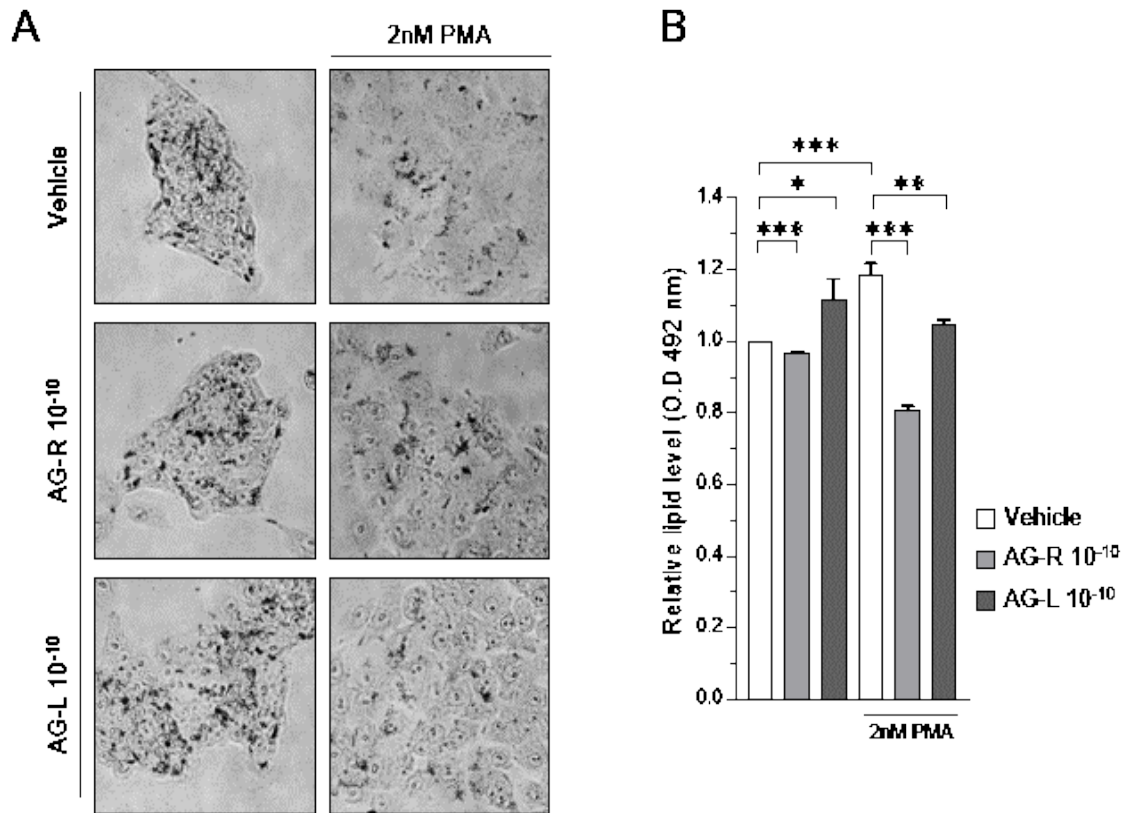


그림 15. 돼지 3D4 β 1 세포에 당귀 뿌리와 잎·줄기로부터 추출한 추출물에 대한 세포내 지질 축적 저해 효과 검증. (A) 돼지 3D4 β 1 세포에서 Oil Red O 염색 결과. (B) 돼지 3D4 β 1 세포에서 Oil Red O 염색 결과에 대한 정량화. Data presented as mean \pm SD values (n = 3); *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

2. 생산된 계육, 계란내 유효성분 분석 및 활성 검증

- 1차년도에 확보한 당귀의 뿌리에 대한 건조 및 파쇄를 진행하였으며, 당귀 뿌리에 대한 산란계 급여와 계란내 테커신과 테커시놀 안젤레이트에 대한 분석을 진행.
- 사료 내 첨가함량은 당귀 잎·줄기 각각 0.3 %와 0.6 %로 30일간 급여. 테커신과 테커시놀 안젤레이트 검출 방법은 앞서 서술한 바와 같이 확립된 난백, 난황 전처리 조건 및 UPLC 검출 조건을 이용하여 검증.
- 일차적으로 급여 후 5일 시점에서부터 난백과 난황에서의 테커신과 테커시놀 안젤레이트가 검출. 당귀 뿌리 급여 5일에서의 난백과 난황내 총 테커신과 테커시놀 안젤레이트 함량은 126.16 mg/egg~200.89 mg/egg 수준으로 검출되었으며, 당귀 뿌리를 급여하지 않은 대조구의 경우에는 검출이 되지 않음 (그림 16).

- 이상의 결과는 당귀 뿌리의 사료내 첨가에 의해 안정적으로 유효성분인 데커신과 데커시놀 안젤레이트가 전이됨을 확인해주는 결과라 할 수 있음.

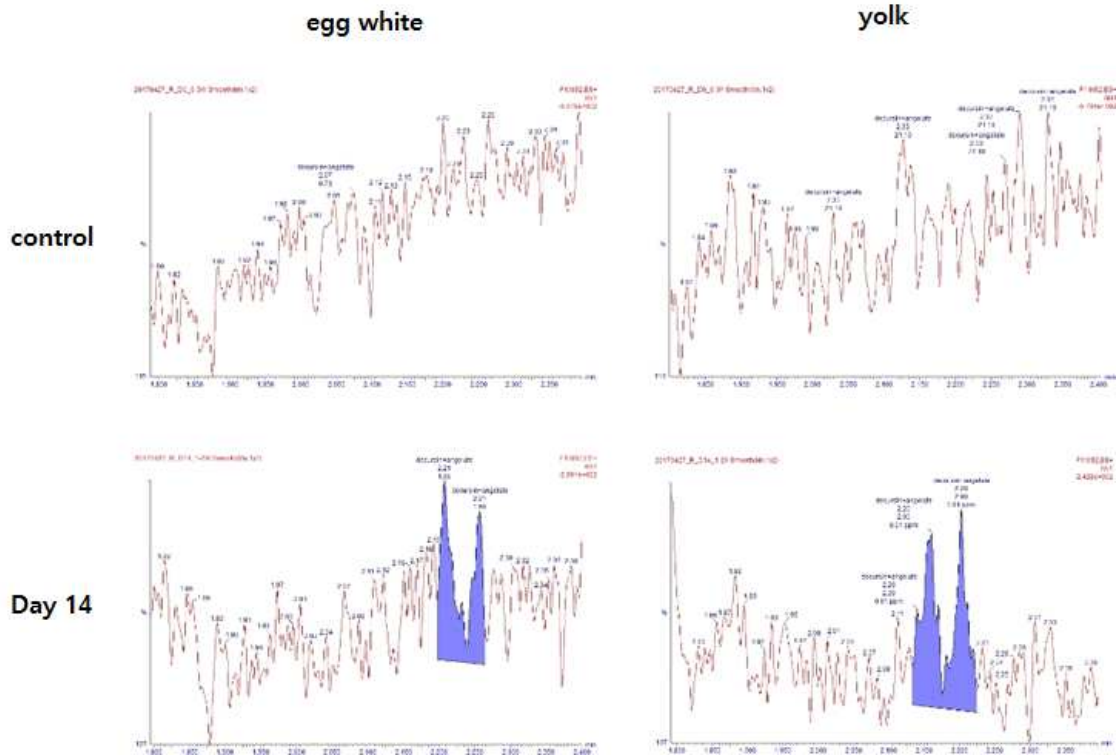


그림 16. 당귀 뿌리 급여 후 난백과 난황에서의 데커신 및 데커시놀 안젤레이트 검출. 당귀를 급여하지 않은 대조군의 경우 검출이 되지 않았으며, 당귀 뿌리를 급여한 경우에는 안정적으로 난백 및 난황에서 데커신 및 데커시놀 안젤레이트 검출.

3. 분석 및 검증 결과를 반영한 유효성분의 일관성 및 재현성 확립

- 다음 실험으로 당귀 급여에 따른 산란계 개체에 대한 혈액내 생화학 분석에 따른 지표 및 면역관련 지표 분석을 진행.
- 당귀를 급여하지 않은 대조군과 건조된 당귀 뿌리의 0.3 % 및 0.6 % 수준의 사료내 첨가 후 각각 5개체에 대한 혈액을 샘플링. 샘플링한 혈액에 대해 생화학적 분석 (PCV, Ca, Phosphate, Albumin, Total protein, Total cholesterol, AST, ALP) 및 면역관련 지표 (IL-1b, IFN-gamma, IL-6)에 대한 분석 및 ELISA 검증을 진행.
- 분석 결과 PCV (Packed Cell Volume, 적혈구용적률 또는 농축세포용적로서 전체 혈액

중에서 적혈구가 차지하는 비율을 말하며 적혈구 증가증 및 빈혈의 정도를 파악하는 척도) 경우 대조군과 0.3 %, 0.6 % 처리군에 대해 유의적인 차이는 나타나지 않음 (그림 17A).

- Ca과 P의 경우에는 당귀 뿌리 첨가 수준이 증가함에 따라 유의적으로 낮아짐을 알 수 있었음 (그림 17A).
- 또한 당귀 뿌리 첨가에 의해 농도 증가에 따라서 albumin과 total protein은 감소하는 결과가 나왔으며, total cholesterol의 경우에도 당귀 뿌리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 낮아지는 경향을 나타냄 (그림 17A).
- 특히 total cholesterol의 경우에는 비처리 대조군에 비하여 유의적으로 55 %까지 감소하는 것으로 나타남 (그림 17A).
- 따라서 이러한 결과는 당귀 처리에 의해 산란계의 혈액내에서의 생화학적 지표에 대한 효능이 있음을 알 수 있었음.
- 또한 당귀 급여에 대한 간 기능 영향 및 손상 여부를 검증하기 위하여 ALT (Alanine transaminase, 알라닌 아미노기 전달 효소)와 AST (Aspartate aminotransferase, 아스파르트산염 아미노기 전달 효소) 수준을 검증.
- ALP의 경우에는 비처리 대조군과 0.3 %, 0.6 %간에 유의적 차이는 나타나지 않음 (그림 17B).
- AST의 경우에는 0.6 % 처리구에서 대조군과 0.3 %에 비하여 유의적인 차이를 나타내었으나 이에 대한 정확한 검증 및 간 손상 영향에 대해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료 (그림 17B).
- 마지막으로 혈액내 면역관련 지표에 대한 분석 및 대조군과 처리군 사이의 유의적 차이를 비교.
- 기본적으로 대조군에 대해 당귀 급여 처리군은 당귀의 첨가 농도에 상관없이 IFN-gamma와 IL-6는 유의적이 차이를 나타내지 않음 (그림 17C).
- 다만 IL-1b의 경우에는 당귀 뿌리의 농도가 증가함에 따라 혈액내 농도가 증가하는 것

으로 나타나고 있음 (그림 17C).

- 이상의 결과로 볼 때, 사료내 당귀의 급여에 따라 산란계 개체에 대한 생화학적, 면역학적 다양한 효능이 있는 것으로 판단.

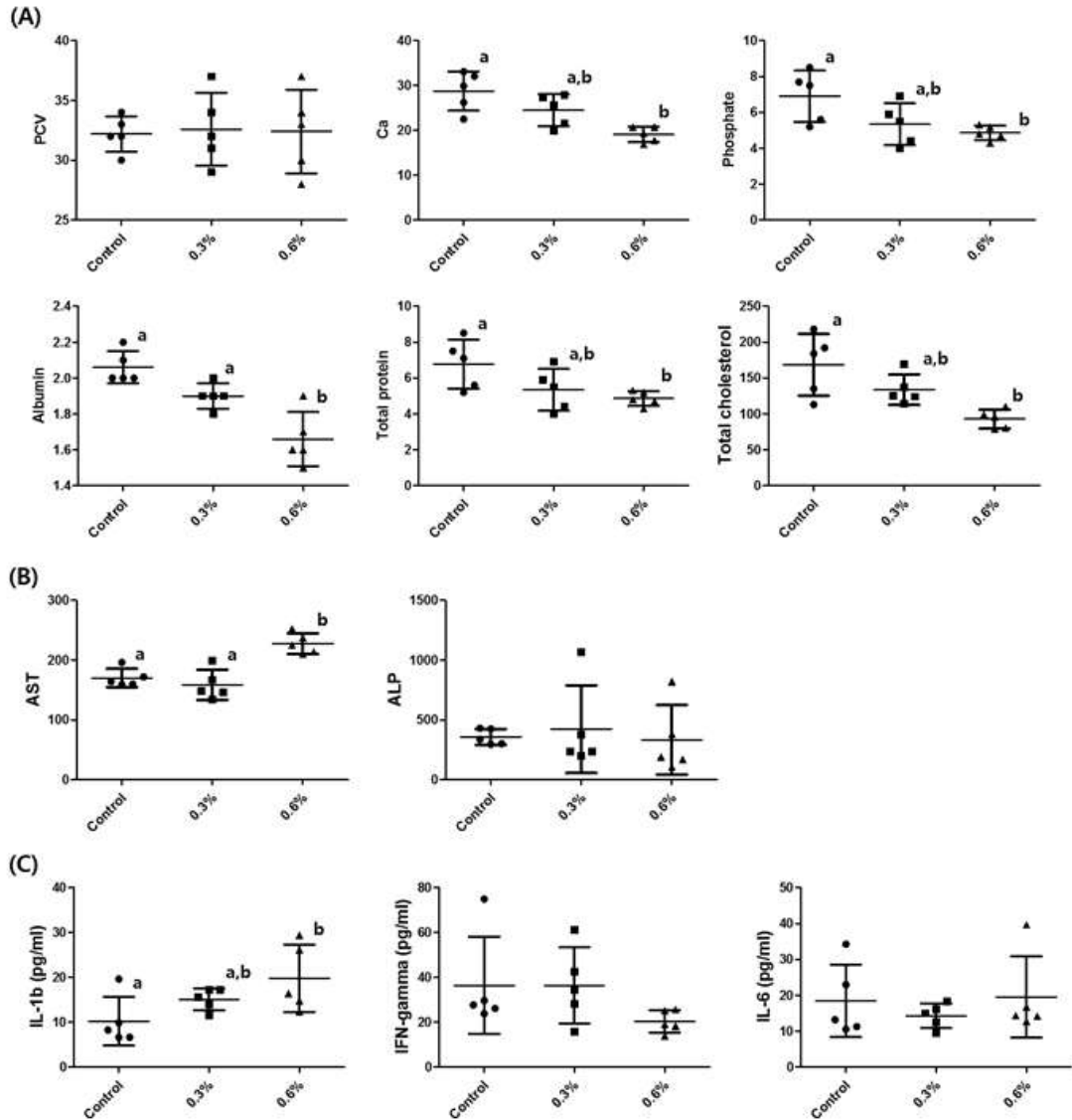


그림 17. 대조군 및 당귀 뿌리 처리군 (0.3 %, 0.6 %)에 대한 혈액내 생화학적 지표 분석 및 면역관련 지표 분석 결과. (A) 혈액내 PCV, Ca, Phosphate, albumin, total protein 및 total cholesterol 수치 비교. (B) 혈액내 AST와 ALP 수치 비교. (C) 혈액내 IL-1b, IFN-gamma, IL-6 수치 비교.

4. 기능성 계육, 계란 생산을 위한 규격화 총 프로토콜 확립

- 30일간 당귀 급여를 통한 산란계의 기본적인 경제형질에 미치는 영향을 분석.

- 30일동안 평균 산란율은 비처리 대조군이 91.33 ± 5.71 %이었으며 0.3 % 처리군이 87.41 ± 8.46 %으로 0.6 % 처리군이 92.96 ± 5.39 %으로 측정.
- 0.6 % 처리군이 평균값은 약간 높았으나 통계적의 유의성은 나타나지 않음 (그림 18A).
- 또한 30일간의 평균 난중도 통계적으로 대조군과 처리군간 차이는 없는 것으로 나타남.
- 대조군의 경우 평균 57.79 ± 3.87 g이었으며 0.3 % 처리군이 57.92 ± 5.27 g으로 0.6 % 처리군이 59.05 ± 4.78 g으로 측정 (그림 18A).
- 또한 당귀 뿌리 급여 후 5일간격으로 측정한 산란율과 난중의 경우에도 대조군과 처리군 사이의 유의적인 차이는 나타나지 않음 (그림 18B). 즉, 당귀 급여에 따른 산란율과 난중의 변화는 30일간 평균과 기간별로 비교했을 때 영향은 없는 것으로 판단.
- 최종적으로는 당귀 부산물인 잎·줄기 급여에 대한 계란내 데커신과 데커시놀 안젤레이트의 전이 여부를 검증.
- 1차년도 확보한 당귀 잎·줄기에 대해 건조 및 파쇄를 통해 사료 내 첨가 비율 1 %와 3 % 조건으로 검증. 데커신과 데커시놀 안젤레이트 검출 방법은 앞서 서술한 바와 같이 동일하게 난백, 난황 전처리 조건 및 UPLC 검출 조건을 이용하여 검증. 일차적으로 급여 후 3일 시점에서는 3 % 첨가 조건에서만 난백과 난황에서의 데커신과 데커시놀 안젤레이트가 검출 (그림 19).

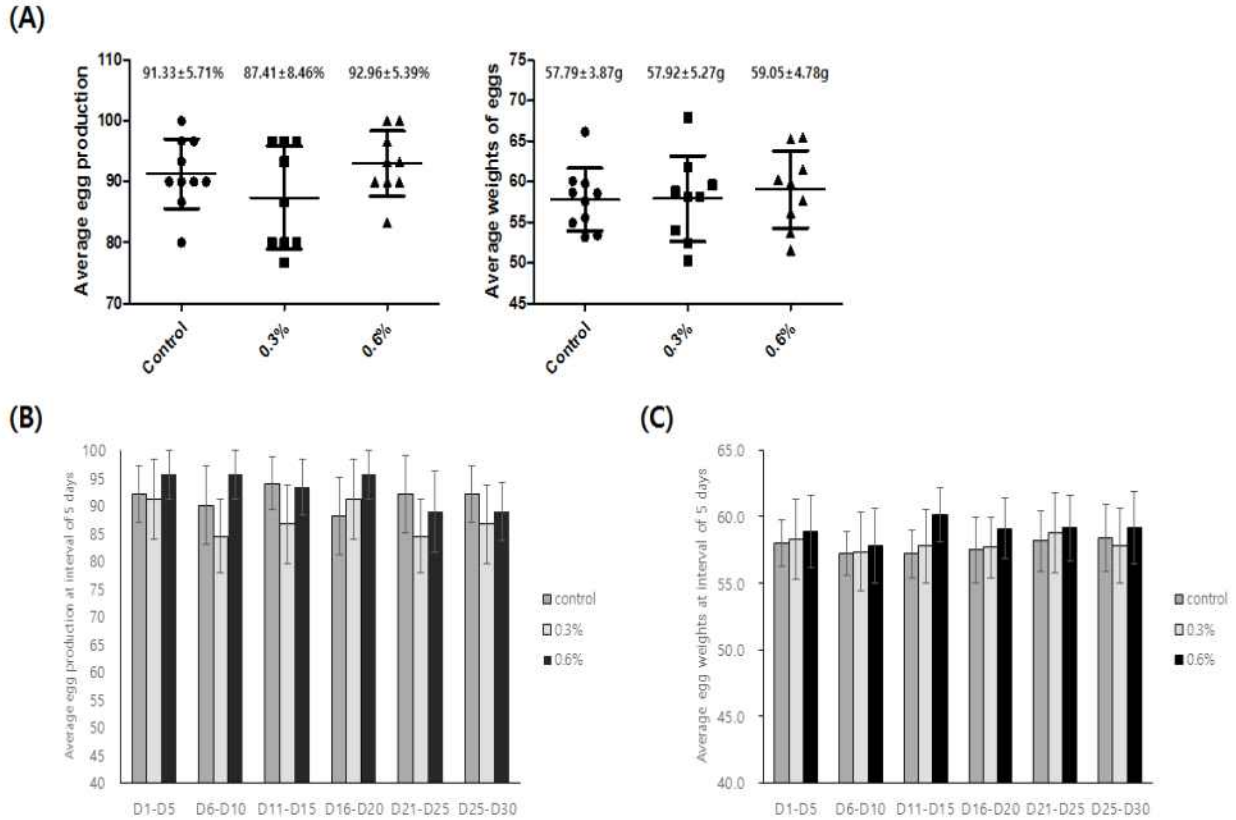


그림 18. 당귀 뿌리 급여 기간 (30일)동안의 산란율 및 난중 변화 비교. (A) 30일 전체 평균 산란율 및 난중 비교. (B) 5일 간격별 산란율 및 난중 변화 비교.

- 당귀 잎·줄기 3 % 급여 조건에서 3일에서의 총 데커신과 데커시놀 안젤레이트 함량은 난백내에서는 90.86 mg/egg white로 난황에서는 106.98 mg/egg yolk로 검출. 5일 시점에서는 1 %와 3 % 처리군 모두에서 데커신과 데커시놀 안젤레이트가 검출.
- 1 % 처리군의 난백내에서는 33.18 mg/egg white로 난황에서는 103.5 mg/egg yolk로 검출되었으며, 3 % 처리군의 난백내에서는 218.31 mg/egg white로 난황에서는 93.65 mg/egg yolk로 검출 (그림 19).
- 7일 시점에서는 1 % 처리군의 난백내에서는 평균 85.00±77.27 mg/egg white (18.65~218.31 mg/egg white)로 난황에서는 평균 105.34±74.73 mg/egg yolk (15.39~233.51 mg/egg yolk)로 검출 (그림 19).
- 계란 내 전체 데커신과 데커시놀 안젤레이트 함량은 개체에 따른 변이가 다소 많이 차이가 났으며, 7일 시점에서 가장 함량이 높은 경우는 233.51 mg/egg yolk가 검출.
- 이상의 결과는 당귀의 부산물인 잎·줄기 급여에 의해 계란 내 난백과 난황 모두 전이 및

추적되는 것을 확인할 수 있었음.

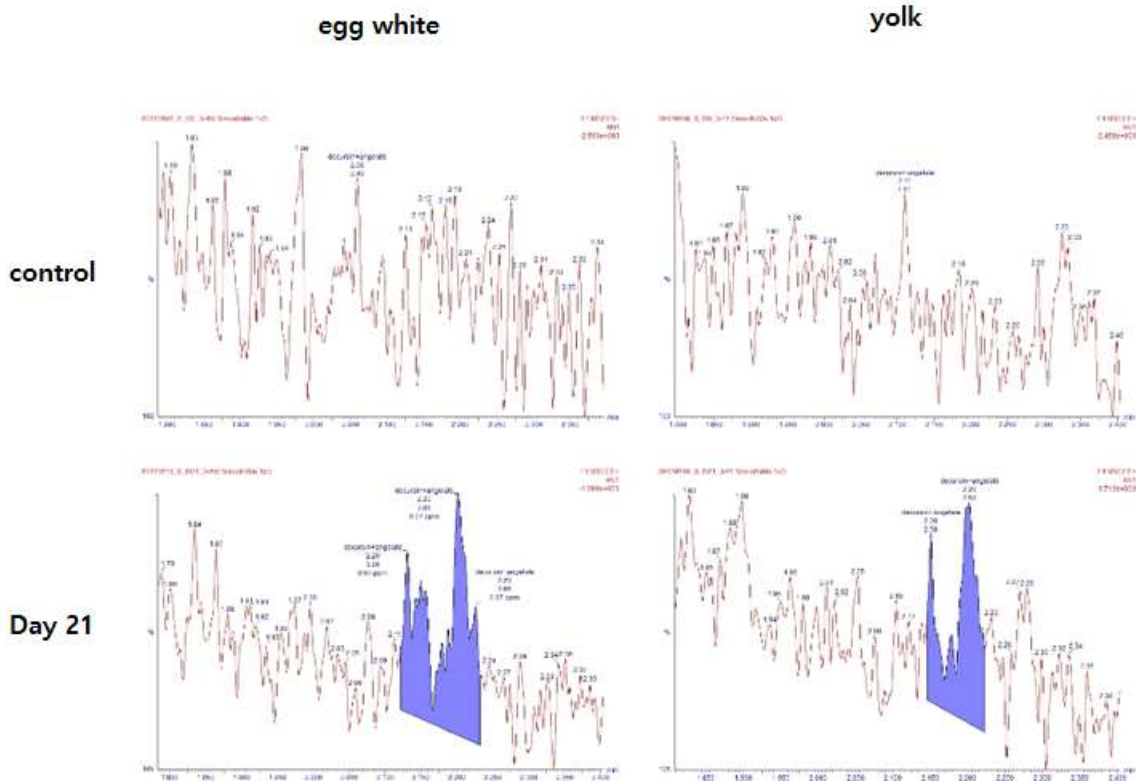


그림 19. 당귀 잎·줄기 급여 후 난백과 난황에서의 데커신 및 데커시놀 안젤레이트 검출. 당귀를 급여하지 않은 대조군의 경우 검출이 되지 않았으며, 당귀 뿌리를 급여한 경우에는 안정적으로 난백 및 난황에서 데커신 및 데커시놀 안젤레이트 검출.

연구목표3:산야초/부산물 사료첨가제 활용 체계 확립

1. 산야초 부산물 추출 첨가제의 시너지 효과 검증

1) 당귀 뿌리 및 부산물 (줄기, 잎) 추출물에 대한 고압열수출에 의한 추출물 확보

(1) 당귀 뿌리로부터 고압열수출에 의한 고농축 추출물 확보

- 건조된 당귀 뿌리 100g을 3차 증류수 1L와 혼합한 후 고압열수출을 진행.
- 고압열수출 조건은 110°C, 5.69 PSI에서 15분간 진행한 후 상층액을 수집하여 -80°C에 보관.
- 최종적으로 수집된 추출물은 동결건조기를 통해 powder type으로 동결건조하여 추후 실험에 사용 (그림 20).

(2) 당귀 부산물 (줄기/잎)로부터 고압열수출에 의한 고농축 추출물 확보

- 건조된 당귀 부산물 (줄기/잎) 300g을 3차 증류수 900ml과 혼합한 후 고압열수출을 진행.
- 고압열수출 조건은 110°C, 5.69 PSI에서 15분간 진행한 후 상층액을 수집하여 -80°C에 보관.
- 최종적으로 수집된 추출물은 동결건조기를 통해 powder type으로 동결건조하여 추후 실험에 사용 (그림 20).



그림 20. 당귀 뿌리 (왼쪽) 및 당귀 부산물 줄기/잎 (오른쪽)으로부터 고압열수출에 의한 고농축 추출물.

2) 당귀 뿌리 및 부산물 (줄기, 잎) 추출물에 대한 *in vitro* assay 및 효과 검증

- 본 실험은 기능성 계육 생산을 위하여 당귀 부산물 활용 방법 개발을 위해 우선 닭 근육 세포를 이용하여 *in vitro* assay를 진행.
- 본 실험에서는 세포 독성 (cellular toxicity)나 세포 분열 영향뿐만 아니라 정확한 기전 구명을 위하여 유전자 수준에서의 당귀 추출물 처리에 의한 변화 양상도 함께 분석.

(1) 닭 근육세포의 분열 및 성장 속도 영향 분석

- 당귀 뿌리 추출물 처리에 의한 닭 근육 세포 성장 속도 영향 분석.
 - 당귀 뿌리 추출물에 대한 *in vitro* assay를 위 닭 근육세포를 사용.
 - 닭 근육세포는 발생 슛컷 병아리의 근육 조직에서 배양하여 사용.
 - 세포 분리 방법은 대흉근 (pectoralis major)으로부터 trypsin-EDTA 처리에 의해 single cell dissociation을 진행하여 준비.

- 또한 암수 감별은 생식기 형태를 기준으로 판별.
- 당귀 뿌리의 고압열수출에 대한 추출물을 농도별 닭 근육세포 성장을 측정 (그림 21).
- 실험 결과 당귀 뿌리 추출물 농도에 따라 닭 근육세포의 분열이 다소 감소되는 양상을 나타냄 (그림 21).

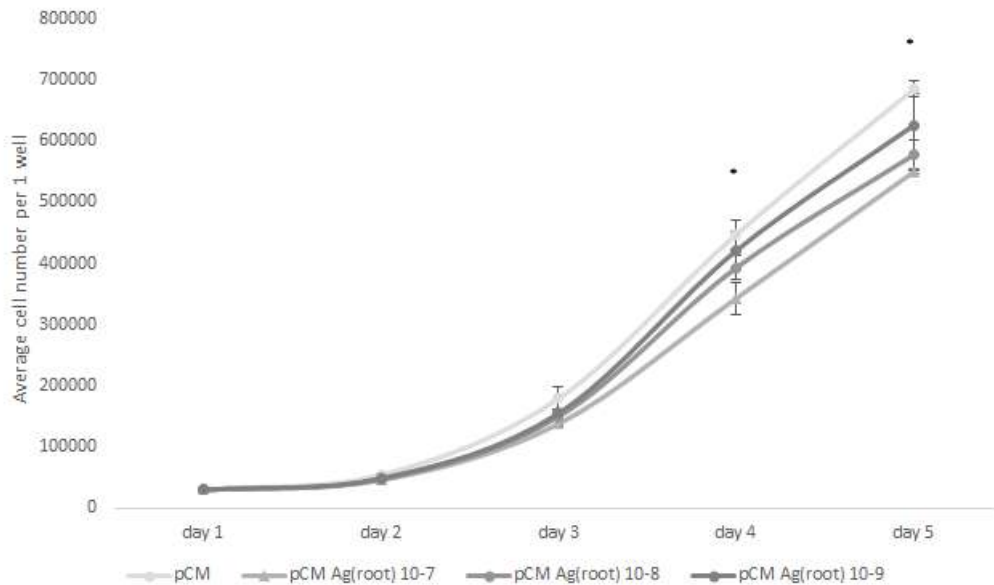


그림 21. Proliferation assay of chicken muscle cells depending on the concentrations of the extracts derived from root of *Angelica gigas*. The concentrations ranged from 10^{-7} to 10^{-9} . pCM and Ag indicate the primary chicken muscle cells and *Angelica gigas*, respectively.

- 당귀 부산물 (줄기, 잎) 추출물 처리에 의한 닭 근육 세포 성장 속도 영향 분석.
 - 다음으로 당귀의 부산물인 줄기와 잎을 당귀 뿌리와 동일하게 고압열수출을 하여 추출물을 확보하였으며, 이에 대한 닭 근육 세포의 성장 속도 영향을 분석.
 - 당귀 뿌리와 동일하게 닭 근육세포에 대해 당귀 부산물 추출물에 대한 농도별 세포 성장 속도를 비교 (그림 22).

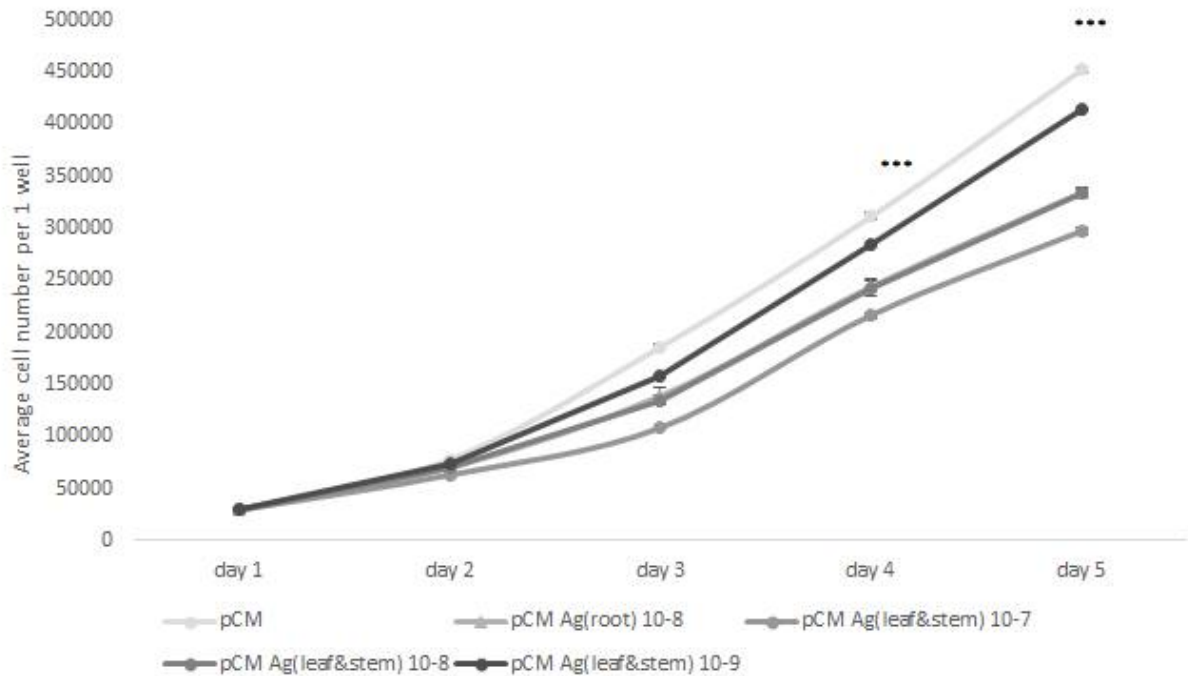


그림 22. Proliferation assay of chicken muscle cells depending on the concentrations of the extracts derived from leaf/stem of *Angelica gigas*. The concentrations ranged from 10^{-7} to 10^{-9} . pCM and Ag indicate the primary chicken muscle cells and *Angelica gigas*, respectively.

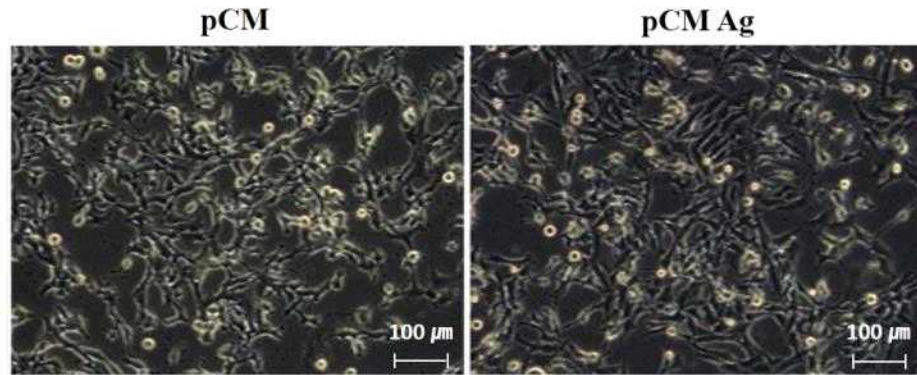
- 당귀의 부산물에 대한 열수출물도 당귀 뿌리와 유사한 결과를 나타냄 (그림 22).
- 고압열수출 방법에 의한 추출물 (뿌리 및 줄기/잎)은 세포 독성은 나타내지 않았으며, 이는 본 연구에서 확립한 추출방법이 상대적으로 안전성을 보여줌.
- 그러나 모든 추출물에서 세포 성장은 유의성있게 감소하는 결과를 보여주며, 이는 당귀 유래 물질이 Rat의 근육세포를 성장을 저해한다는 기존 보고와 유사한 결과라 할 수 있음.
- 그러나 세포 수준의 적정 농도 이상의 처리시에는 생리학적 영향이외의 세포 성장을 저해할 수 있을 수 있기 때문에 향후 3차년도 후반기에 계획되어져 있는 육계 급여 실험을 통해 보다 정확한 근육에서의 영향 여부를 검증하고자 함.

(2) 닭 근육세포에서의 당귀 추출물 특성 분석

- 당귀 추출물 처리에 의한 닭 근육세포에서의 분자생물학적 특성을 검증.

- 앞서 서술 바와 같이 닭 근육세포에 당귀 추출물을 처리하였을 경우, 세포 독성 및 형태적 변화는 나타나지 않음 (그림 23A).
- 사용한 농도에 상관없이 닭 근육세포 (myoblast cells)에 대한 세포 독성에 의한 세포 사멸이나 대조군 (비처리군)과 비교를 통한 세포 형태적 변이는 세포 배양 기간동안 관찰되지 않았으며, 당귀 추출물 처리에 의한 닭 근육세포의 특징적인 유전자 발현 양상을 검증.
- 근육세포의 가장 중요한 조절 유전자인 Pax7 (근육전구세포 유지를 위한 특이적 유전자)과 MyoD (근육분화 유도 유전자)를 RT-PCR에 의하여 대조군과 당귀 추출물 처리군의 유전자 발현량을 분석.
- 실험결과를 볼 때, 특이적으로 당귀 추출물 처리에 의해 닭 근육세포에서는 근육전구세포 유지를 위한 유전자인 Pax7의 유전자는 대조군과 비교시 유의적으로 높게 나타났으며, 반대로 근육분화 유도 유전자인 MyoD는 유의적으로 감소 (그림 23B).
- 당귀 추출물에 대한 닭 근육세포 성장 효과와 더불어 유전자 발현 양상은 당귀 추출물이 근육세포에 있어 근육의 분열-분화 촉진 보다는 전구세포로의 유지를 촉진시키는 것으로 예측.
- 그러나 최종적으로 3차년도 후반기에 계획되어져 있는 육계 급여 실험을 통해 보다 정확한 근육에서의 영향 여부를 검증하고자 함.

(A)



(B)

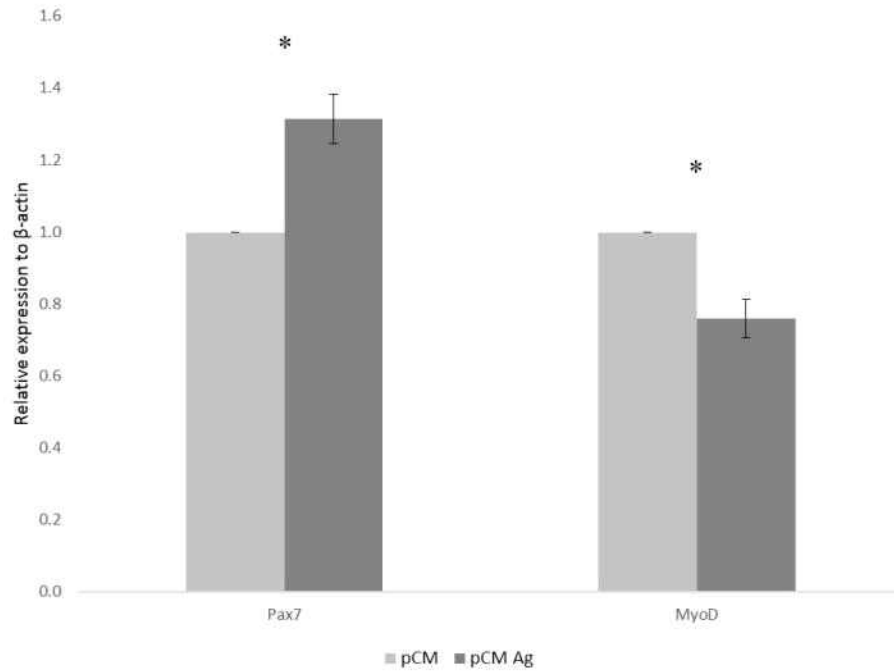


그림 23. (A) Comparison of cell morphology of Ag extract with control. (B) Comparison of Pax7 and MyoD gene expression between control and Ag-treated pCM cells.

○ 보다 정확한 분석을 위하여 당귀 추출물 처리에 의한 닭 근육세포에서의 Western blotting을 진행.

- RT-PCR과 동일하게 닭 근육세포의 중요 조절 유전자인 Pax7과 MyoD에 대한 Western blotting을 진행.

- 실험결과, RT-PCR과 동일하게 당귀 추출물 처리에 의해 닭 근육세포에서는 근육전구세포 유지를 위한 유전자인 Pax7의 유전자는 대조군과 비교시 유의적으로 높게 나타났으며, 반대로 근육분화 유도 유전자인 MyoD는 유의적으로 감소 (그림 24).

- 결론적으로 *in vitro* assay를 통해서 당귀 추출물 처리에 의해 닭 근육세포에서는 근육전구세포 유지를 증가시키는 반면에 근육 분화는 다소 감소하는 경향을 보임.

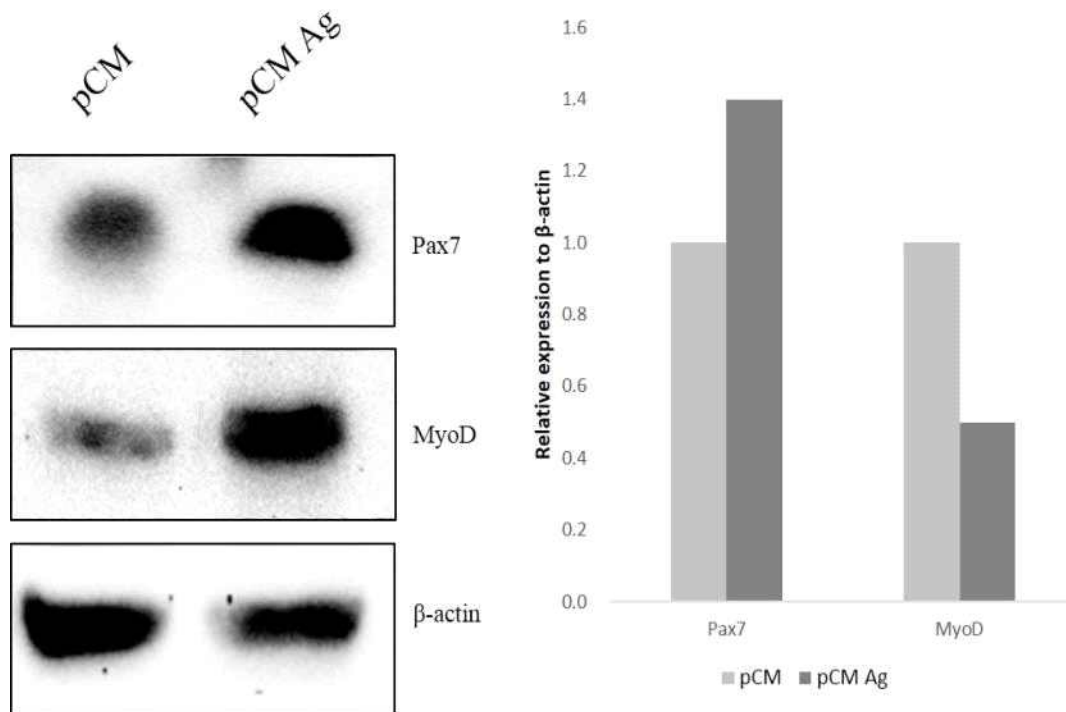


그림 24. Comparison of Pax7 and MyoD expression between control and Ag-treated pCM cells by Western blotting.

3) 당귀 추출물에 대한 닭 근육세포에서의 유전자 발현 변화 분석

○ 닭 근육세포 당귀 추출물 처리 및 유전자 발현 분석.

- 본 실험은 기능성 계육 생산에 대한 당귀 추출물의 정확한 영향과 기전 검증을 위하여 당귀 추출물 처리후 RNA sequencing을 통한 닭 근육세포에서의 전사체 분석을 진행.
- 닭 근육세포 배양 중 당귀 추출물을 첨가하여 당귀 추출물에 대한 adaptation을 진행하였으며, 비처리구인 대조군과 처리군 닭 근육세포에서 total mRNA를 추출하여 RNA sequencing 및 전사체 분석을 진행.
- 이후 생물정보학 분석 (Bioinformatics analysis)을 통해 유의미한 유전자 발현 양상을 확인하였으며, 최종적으로는 quantitative RT-PCR (qRT-PCR)을 통하여 당귀 추출물에 의한 닭 근육세포에서의 유전자 발현을 검증.
- 닭 근육세포에서 당귀 추출물 처리 후 RNA sequencing 결과, 전체 26,640 genes를 확보 (그림 25).
- 이중에 down-regulated DEGs (differentially-expressed genes)는 11,146 genes이었으며, up-regulated DEGs는 9,225 genes이었음 (그림 25A).
- 닭 근육세포에서의 대조군과 당귀 추출물 처리군간의 전반적인 유전자 발현 양상의 차이는 크게 나타나지는 않았지만 일부 유전자에 대해서는 유의적인 차이를 보여줌 (그림 25B).

(A)



(B)

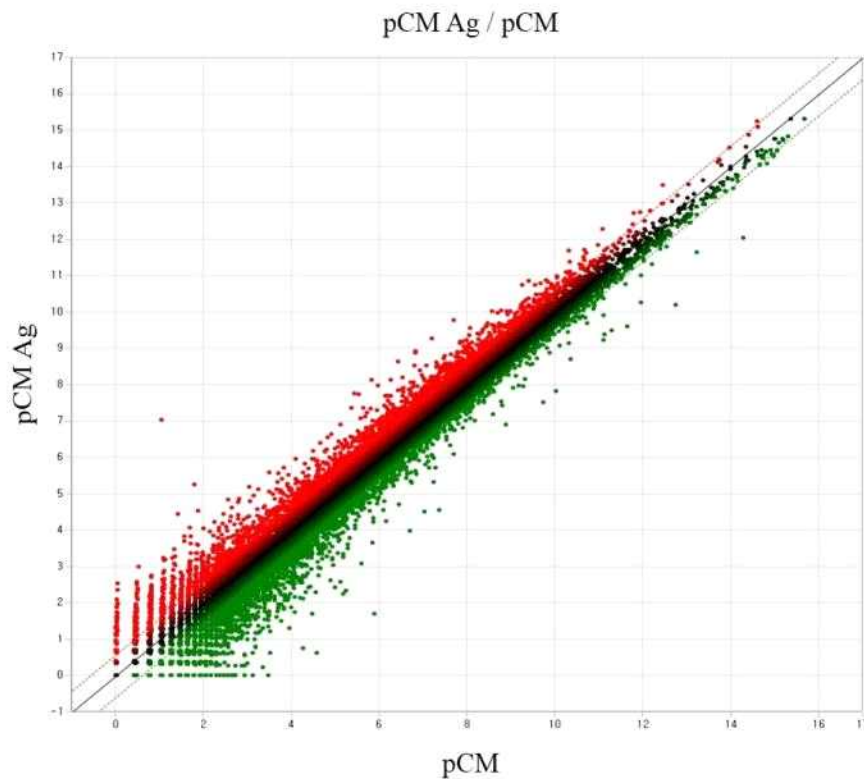


그림 25. mRNA sequencing analysis between control and Ag-treated pCM cells. (A) Number of up- and down-regulated DEGs (differentially-expressed genes). (B) Scatter plot of DEGs between control and Ag-treated pCM cells.

- 당귀 추출물 처리에 의해 닭 근육세포에서 유의적인 유전자 발현 변화를 나타내는 유전자군으로는, Pancreas beta cells, Fatty acid metabolism, Glycolysis 관련 조절 유전자가 up-regulation되는 양상을 보였으며, Adipogenesis 관련 조절 유전자의 발현이 down-regulation되는 경향을 나타냄 (표 2).

- 이러한 전사체 분석 결과는 당귀 추출물이 닭 근육세포에서 지방 (Fat) 과 당 (Glucose)

대사에 영향을 주는 것을 알 수 있었으며, 이는 당귀 추출물이 닭에서 있어 중요한 경제형질을 조절할 수 있음을 제시.

표 2. List of up- and down-regulated gene sets.

Up-regulated Gene Sets Name	Description	Count	p-value
Pancreas beta cells	Genes specifically up-regulated in pancreatic beta cells.	2	2.58E-03
Fatty acid metabolism	Genes encoding proteins involved in metabolism of fatty acids.	3	3.31E-03
Glycolysis	Genes encoding proteins involved in glycolysis and gluconeogenesis.	3	6.37E-03
Down-regulated Gene Sets Name	Description	Count	p-value
Adipogenesis	Genes up-regulated during adipocyte differentiation (adipogenesis).	3	7.23E-03

- RNA sequencing 분석을 통해 발현량이 유의적으로 변화된 유전자에 대한 qRT-PCR에 의한 검증을 진행.
- 이는 RNA sequencing과 더불어 유의적 차이를 보이는 개별 유전자에 대한 분석을 진행함으로써 보다 정확한 유전자 발현 양상을 비교.
- qRT-PCR 분석 유전자는 당귀 추출물 처리에 의해 과발현 양상을 나타내는 유전자를 분석.

표 3. List of primer sets for qRT-PCR analysis.

Gene	Forward	Reverse	Annealing Temp. (°C)	PCR size(bp)
<i>Actin</i>	GATGATATTGCTGCGCTCGT	GTGCTCCTCAGGGGCTACTC	60°C	618
<i>Pax7</i>	AGGTACCAAGAGACGGGCTC	CTCGGCAGTGAAAAGTGGTCC	60°C	411
<i>MyoD</i>	ACACGTCGGACATGCACTTC	TCTGACTCCCCGCTGTAGTG	55°C	433
<i>GCLC</i>	CAGTGGAAAGGAGGAGCTTCA	CTGTAGAACGGAGATGCAGC	60°C	373
<i>HSPH1</i>	CGGGATTGGGAATGCATTGT	TCCTTACAAACGGGACAGACA	60°C	364
<i>ISL1</i>	TACCGGAAGTGAAGTGGCAT	TCCTTGAGTAGCGTGGTGGT	60°C	354
<i>SLC25A13</i>	ATTCCAAACACCAGCAACCC	ACTTAGCGCGTGTCTGTAGA	60°C	323
<i>TGFBI</i>	CTCTCTCTGTGCTGCTGGAT	ATGAAGGAGAACTCGGGTGG	60°C	329
<i>YWHAH</i>	AAATTGAGTAGCGTGGTGGT	ATGGCTGATGGGAACGAGAA	60°C	326
<i>Desmin</i>	CTGAAGGATGAGATGGCC	GGTCGCCTCGCTCACCAC	60°C	628

- 분석에 사용한 유전자의 프라이머 서열, Annealing temperature 및 PCR product size에 대한 정보는 표 3에 제시.
- qRT-PCR 분석 결과, RNA sequencing 결과와 동일하게 *GCLC*, *HSPH1*, *ISL1*, *SLC25A13*, *TGFBI*, *YWHAH* 유전자는 모두 당귀 추출물 처리 닭 근육세포에서 발현량이 증가 (그림 26).
- *GCLC*와 *TGFBI*의 경우에는 다른 유전자에 비하여 상대적으로 높은 발현량 증가를 나타내지 않았으나 나머지 유전자 (*HSPH1*, *ISL1*, *SLC25A13*, *YWHAH*)에 대해서는 6배 이상 발현량 증가.
- 따라서 이러한 유전자들은 당귀 추출물에 의해 직접적인 영향을 받은 것으로 판단되며 향후 육계 사양 실험에서도 중요한 표지 유전자로써 활용이 가능할 것으로 사료.

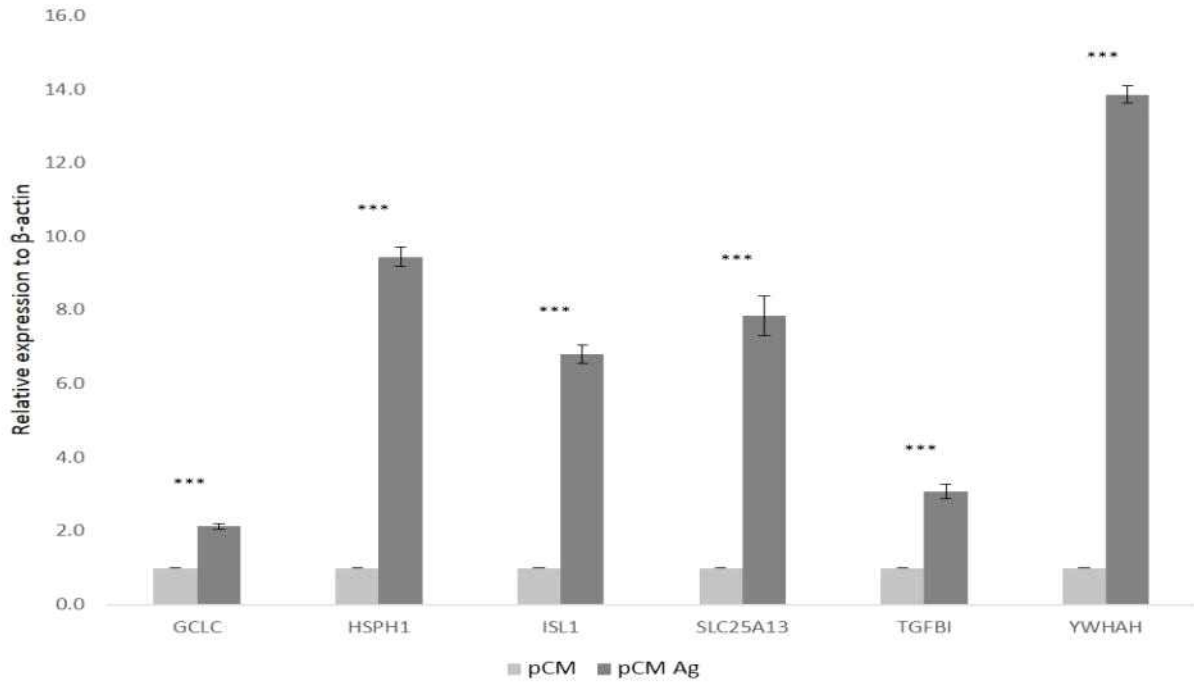


그림 26. Quantitative RT-PCR analysis of up-regulated genes in Ag-treated pCM cells. All of DEGs showed the significant up-regulation in Ag-treated pCM cells compared to control.

- 또한 이러한 up-regulated DEGs간의 상호 조절 네트워크를 분석.
- 이는 당귀 추출물이 닭 근육세포에 영향하는 정확한 기전을 확인함으로써 안정적 활용을 위한 기초 자료 제공이 가능할 것으로 사료.
- STRING analysis 결과를 볼 때, GCLC, ISL1, SLC25A13, TGFB1의 경우에는 상호 작용 없이 독립적으로 조절하는 것으로 나타났으며, HSPH1과 YWHAH는 상호 연관되어 있음을 알 수 있음 (그림 27).
- GCLC의 경우에는 GCLM과 GSS간의 상호 조절 기전에 의해 네트워크를 형성하고 있었으며, HSPH1과 YWHAH는 직접적인 상호작용이 아닌 HSP90AB1을 중간 매개로 하여 최종 YWHAH를 통해 TSC2의 down-stream cascade pathway를 보여 줌 (그림 27).
- Up-regulated DEGs간의 직접적인 상호 작용은 활발하지 않더라도 ACAA1/2, ACAT1/2, HMGCS1, HMGCLL1, HMGCR 등과의 상호 조절 네트워크를 구성하고 있음을 알 수 있었으며, 향후 추가적인 분석은 당귀 추출물에 대한 닭 근육세포의 영향에 대해 보다 정확한 기전을 제시해 줄 수 있을 것으로 사료.

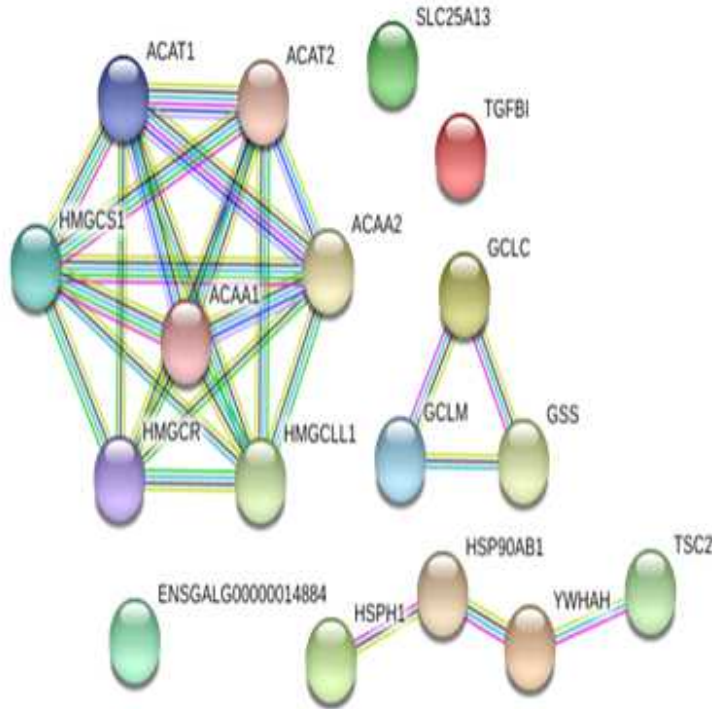


그림 27. STRING analysis of the up-regulated DEGs (differentially-expressed genes) in Ag-treated pCM cells.

4) 당귀 추출물에 대한 닭 근육세포의 근분화 영향 분석

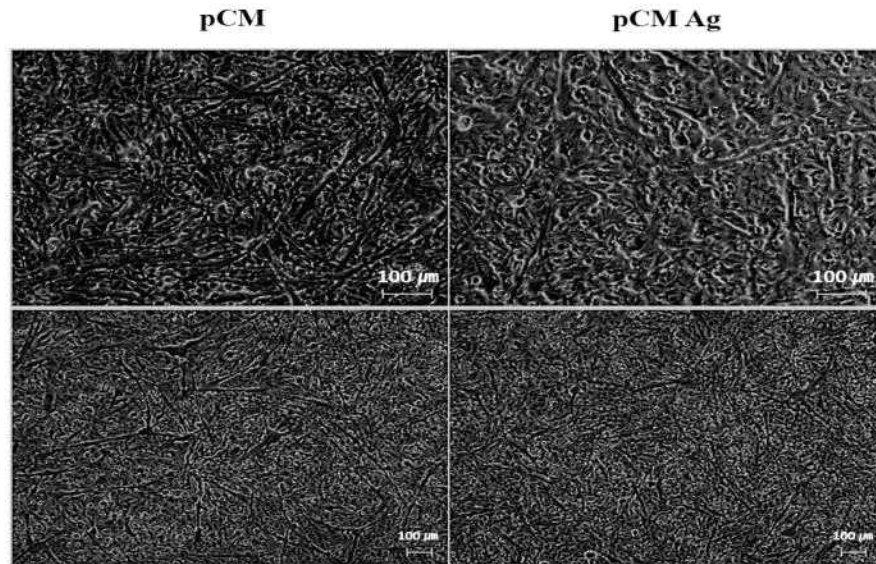
(1) 닭 근육세포 당귀 추출물 처리에 의한 근분화도 분석

○ 당귀 추출물에 대한 닭 근육세포의 근분화도를 분석.

- 이는 앞서 닭 근육세포의 분열, 성장과 더불어 닭 근육세포의 근분화도를 분석함으로써 정확한 당귀 추출물의 영향을 검증하고자 진행.
- 우선 당귀 추출물 첨가에 의해 닭 근육전구세포의 adaptation (당귀 추출물 농도 10^{-8})을 진행.
- 당귀 추출물에 대한 adaptation 후 비처리군 대조구와의 근분화도를 측정.
- 닭 근육전구세포에 0.5% FBS 첨가 배지로 교환해줌으로써 근분화를 유도.
- 실험결과, 당귀 추출물 처리의 경우에는 닭 근육전구세포의 myotube 형성을 나타내는 근분화도가 유의적으로 감소되는 경향을 나타냄 (그림 28).

- 이러한 결과는 앞서 진행한 qRT-PCR과 Western blotting 결과 (그림 23, 24)를 반영하는 것으로 판단.
- 즉, 당귀 추출물은 미분화 닭 근육세포에서 근육세포 유지에 중요한 *Pax7* 유전자 발현을 증가시키는 반면에, 근분화 촉진 유전자인 *MyoD* 유전자의 감소를 보임 (그림 23, 24).
- 당귀 추출물 비처리군인 대조군의 경우에는 근분화후 myotube 분화 면적이 전체 면적의 $19.44 \pm 0.01\%$ 인 반면에 당귀 추출물 처리구의 경우에는 $18.4 \pm 0.01\%$ 를 나타내어 통계적으로도 유의한 근분화 감소를 보임 ($p < 0.05$, 그림 28B).
- 따라서 이는 당귀 추출물이 근분화를 억제하는 역할을 보이기 때문에 당귀 추출물에 adaptation된 닭 근육전구세포의 경우에는 근분화가 상대적으로 억제된 것으로 판단.

(A)



(B)

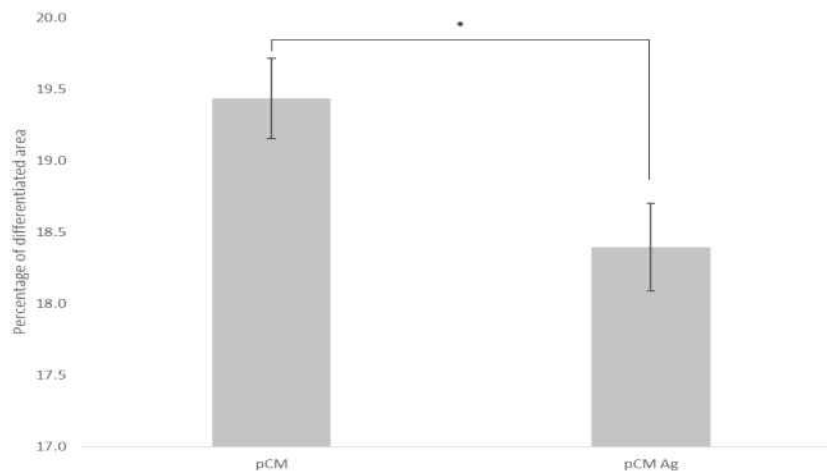


그림 28. Comparison of myotube differentiation between control and Ag-treated pCM cells. (A) Myotube formation during differentiation. (B) Comparison of the percentages of differentiation area between control and Ag-treated pCM cells. There was a significant difference of differentiation areas between control and Ag-treated pCM cells ($p < 0.05$).

(2) 닭 근육세포 당귀 추출물 처리에 의한 근분화과정에서의 유전자 발현 양상 분석

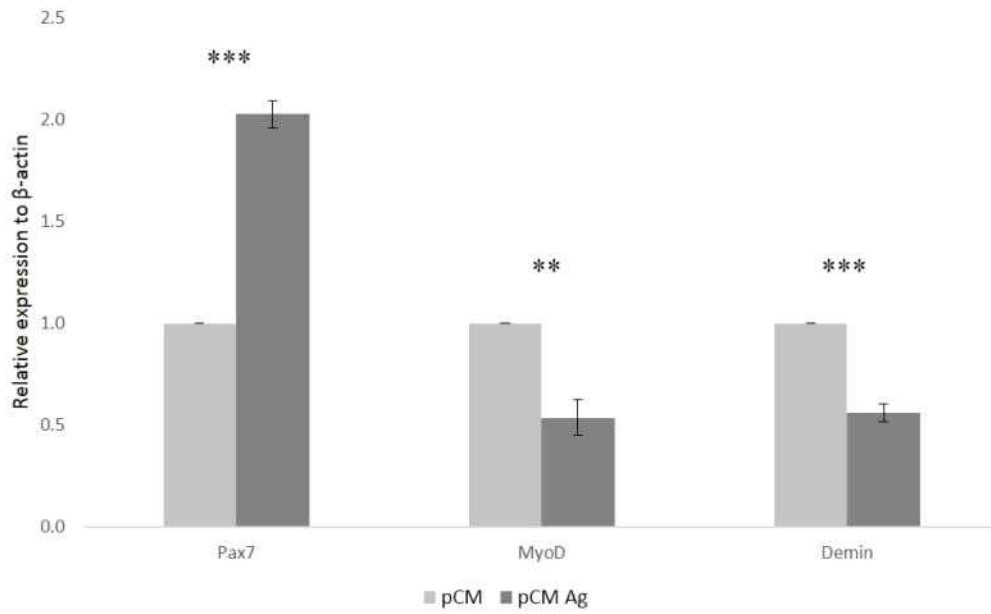
○ 정확한 닭 근육분화 과정 중에 조절인자를 확인하기 위하여 근분화과정 중에 유전자 발현 양상을 분석.

○ 이는 표현형적으로 당귀 추출물 처리군이 근분화도가 감소하였는데 정확한 원인을

분석하기 위하여 qRT-PCR과 Western blotting을 진행.

- 근분화과정 중에서도 qRT-PCR과 Western blotting 모두에서 근육세포 유지에 중요한 *Pax7* 유전자 발현을 증가시키는 반면에, 근분화 촉진 유전자인 *MyoD* 유전자의 감소를 보임 (그림 29).
- 따라서 이는 당귀 추출물 처리가 미분화상태의 닭 근육세포의 근분화를 억제하고 지속적으로 근분화과정에서도 작용하는 것으로 판단.
- 결론적으로 당귀 추출물은 닭 근육세포에 대해 미분화 상태뿐만 아니라 근분화과정 중에서도 지속적으로 근육세포 유지에 중요한 *Pax7* 유전자 발현 증가를 유도하면서 근분화 촉진 유전자인 *MyoD* 유전자가 감소하여 근육세포의 근분화보다는 유지에 영향을 주는 것으로 판단.
- 그러나 당귀 추출물이 근육분화는 억제하더라도 RNA sequencing 분석에 나타나듯이 지방 (Fat) 및 당 (Glucose) 대사 관여함으로써 다양한 생리학적 영향을 미칠 것으로 사료.
- *in vitro* assay를 통한 유효성 평가 시스템에 대한 특허 등록 완료.

(A)



(B)

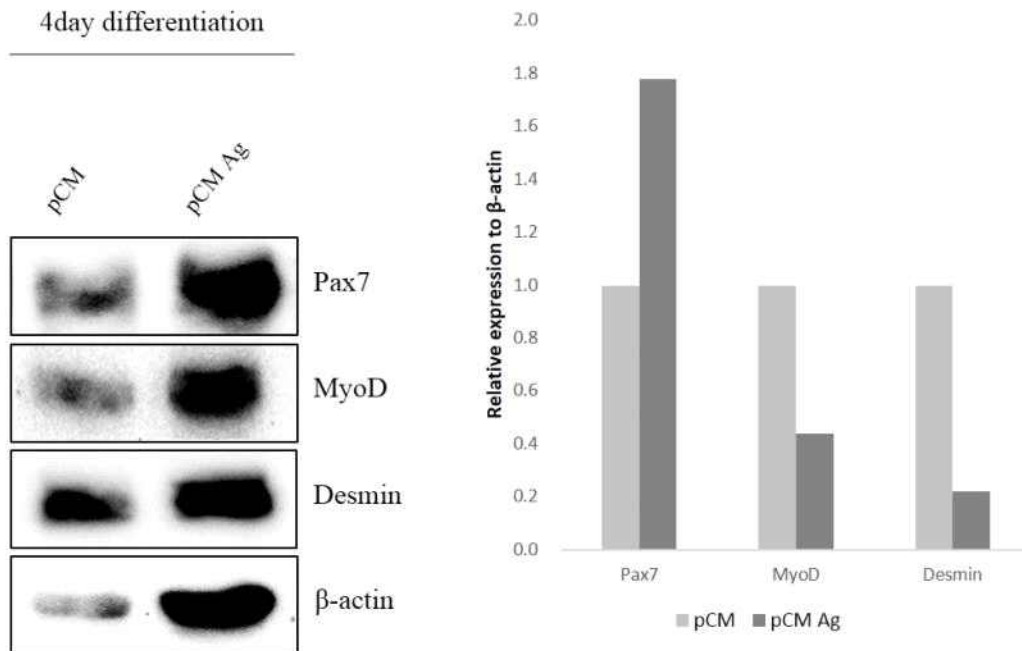


그림 29. Expression profile analysis. (A) Comparison of quantitative RT-PCR analysis between control and Ag-treated pCM cells after myotube differentiation. (B) Comparison of Western blotting between control and Ag-treated pCM cells after myotube differentiation.

3. 생리활성물질 함유 사료첨가제 제형 검증

1) 육계 급여를 위한 당귀 뿌리 및 부산물 (줄기, 잎) 추출물에 대한 고압열수출에 의한 추출물 확보

○ 육계 급여 및 다양한 처리군 실험 설계를 위하여 당귀 뿌리 및 부산물 (줄기, 잎)을 이용하여 추출물을 대용량으로 확보.

○ 일차적으로 제형은 액상으로 당귀 뿌리 및 부산물 (줄기, 잎)에 대해 각각 10L 이상의 추출물을 처리하여 각각 500ml (전체 1L 이상)을 추출하여 확보 (그림 30).

○ 당귀 뿌리 및 줄기/잎 추출물은 사양 실험에 있어 액상 및 기능성 사료첨가제로써의 활용을 검증.



그림 30. The liquid-type extracts derived from roots (right three tubes) and stem/leaf (left three tubes) of *Angelica gigas*.

2) 당귀 뿌리 및 부산물 (줄기, 잎) 추출물 동결건조물 확보

○ 사양 급여 실험을 위해 액상과 더불어 동결건조를 통해 당귀 뿌리 및 줄기/잎으로부터 추출물 분말을 확보 (그림 31).

○ 균일한 실험 진행 및 동일 배치 사용을 위하여 대용량의 당귀 뿌리 및 줄기/잎 추출 물을 확보하였으며, 이에 대한 동결건조 분말을 최종 확보.



그림 31. The freeze-dried extracts derived from roots (left two tubes) and stem/leaf (right one tube) of *Angelica gigas*.

연구목표4:산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 유래 첨가제 검증

기능성 생리활성물질을 다수 포함하고 있는 medical herb 중 하나인 달맞이꽃 (Evening primrose, *Oenothera odorata*)에 대한 육계 성장 영향 분석 및 산업적 활용 가치를 본 과제를 통하여 검증하였다. 달맞이꽃의 경우에는 주로 열매에 대한 보조기능식품으로 많이 사용되어지고 있으나 대부분의 비가식 대부분의 생초부분은 폐기되고 있다. 이는 지역농산업의 새로운 부가가치 창출 및 폐기되는 비가식 부분에 대한 활용 증대를 위해 진행하였다. 현재에도 허브추출액을 이용한 항생제 대체제나 성장 촉진을 위한 다양한 연구가 가축을 대상으로 보고되었다. 본 연구에서는 육계를 대상으로 짧은 투여 기간 동안 검증 할 수 있는 시스템을 구축하였다. 산업적 활용전 기능성 유용 후보 물질에 대한 직접적인 경제능력 영향 평가 및 생리학적 검증을 수행하였다.

1. 기능성 검증을 위한 육계 실험 설계

본 과제에서 달맞이꽃 기능성 영향 검증을 위한 육계실험은 서울대학교 실험동물윤리위원회의 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, 승인번호 SNU-190306-1)를 거쳐 진행하였다. 육계는 현재 국내에서 사육되어지고 있는 상업종으로 인디언리버를 사용하였다. 육계는 발생직후 운송되어 실험계사로 입식되었으며 사료와 물은 안정적으로 공급되었다. 육계 사육조건 각각 처리구에 대해 케이당 3-4수씩 18케이지에 분산 사육하였으며 사료조성은 표 4와 같다. 모든 실험축에 대한 사육사, 사육환경 (온도, 습도, 환기 및 일조량)은 동일 조건에서 실험을 진행하였다. 사료섭취량은 정기적으로 사료급여 후 측정하였으며, 사료와 물은 자유 급식으로 실험 진행하였다. 1일령부터 11일까지는 육계초기사료, 12일령부터 25일령까지는 육계성장사료 및 26일령부터 실험종료 49일령까지는 일반육계사료를 급여하였다 (표 4).

표4. Composition of commercial feeds during experiment period

Composition	Commercial feed		
	Starter	Grower	Finisher
Crude protein	> 22.00%	> 20.00%	> 18.50%
Crude fat	> 2.50%	> 2.50%	> 2.50%
Crude fiber	< 6.00%	< 6.00%	< 6.00%
Ash	< 8.00%	< 8.00%	< 8.00%
Calcium	> 0.80%	> 0.70%	> 0.80%
Phosphor	< 1.20%	< 1.20%	< 1.20%
Met + Cys	> 0.90%	> 0.80%	> 0.70%
AMEn	2,850 kcal/kg	2,950 kcal/kg	3,000 kcal/kg

전체 250수 육계에 대한 Genomic DNA 추출 및 sexing PCR을 거쳐 균일한 실험결과 도출을 위해 암컷은 배제하고 숫컷만을 투여 실험에 사용하였다 (그림 32). 전체 112수의 숫컷에 대한 1일령 체중 측정을 시작으로 하여 무작위로 5개의 실험군으로 배치하였다 (표 5). 배치된 실험군은 3주령까지 동일조건으로 사육 후 3주째부터 처리군에 따라 달맞이꽃 추출액 투여를 시작하였다.

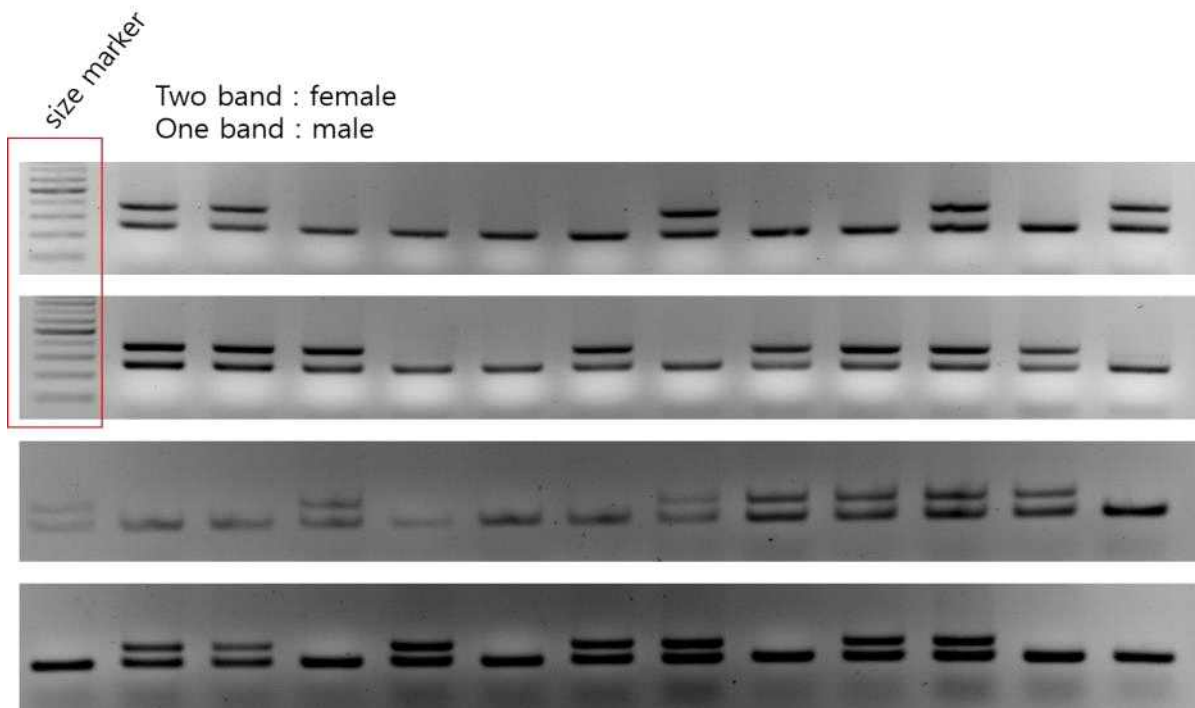


그림 32. Genomic PCR analysis for sex determination. 374bp (upper band) and 252bp (lower band) PCR products represent the W-chromosome specific locus (female-specific) and an internal control, respectively.

표 5. Experimental groups for treatments

Experimental groups	Treatments
Control	No administration
IV	Intravascular administration
IP	Intraperitoneal administration
IV(2x)	Intravascular administration with double dose
IP(2x)	Intraperitoneal administration with double dose

본 연구에서는 달맞이꽃 기능성 분석의 직접적이고 빠른 평가를 위하여 혈관투여와 피하투여 방법을 이용하여 검증 시스템을 구축하였다 (표 5).

2. 달맞이꽃 (evening primrose extract, EPE) 전초 추출액 투여 조건

본 연구에서는 달맞이꽃 (*Oenothera odorata*)에 대한 전초 (씨앗, 뿌리, 꽃, 잎, 줄기)대한 메탄올 추출물을 사용하였다. 3주령부터 투여 농도는 육계 주령에 따른 평균 체중 대비 비율에 따라 표 6와 같이 일주일에 1회씩 동일 시점에 투여하였다. 두 배 처리구 (2x)에 대해서는 동일량을 1주일에 2회 투여하는 조건으로 실험을 수행하였다. 투여액 조성은 메탄올 추출후 동결건조된 달맞이꽃 전초를 PBS에 녹여 주령에 따라 투여량을 처리하였다. 달맞이꽃 추출액은 3주령부터 6.5주령까지 투여하였으며 최종 7주령 (49일령)에 도계 후 체중, 장기 무게 측정에 따른 분석을 진행하였다.

표 6. Dose of evening primrose extract (EPE) for broiler chickens during experiment period

Weeks of age	3wk	3.5wk	4wk	4.5wk	5wk	5.5wk	6wk	6.5wk
Dose(ul/g)	210	210	420	420	580	580	810	810
Treatment groups	IV, IP	IV(2x), IP(2x)	IV, IP	IV(2x), IP(2x)	IV, IP	IV(2x), IP(2x)	IV, IP	IV(2x), IP(2x)

3. 처리군간 경제능력 및 혈액내 생화학 지표 분석

처리군간 경제능력 분석은 경제형질능력에 대한 평가를 진행하였다. 평가항목으로는 주간 체중, 증체량, 사료섭취량, 사료효율 등을 7주간 (주 1회 측정) 측정하였다. 도계 후 경제형질

능력 평가는 5주, 6, 7주에 수행하였다. 도체 후 평가 항목은 가슴근육, 다리 및 간, 심장, 비장, 근육 등의 무게를 개체별로 측정하였다.

달맞이꽃 추출액 처리에 따른 혈액내 생화학 지표 변화를 위한 분석을 발생 후, 4주, 6주령에 수행하였다. 각각 대조구 및 처리구에서 5마리씩 선발하여 익정맥으로부터 혈액을 채취한 후 헤파린 튜브에 수집하였다. 채혈 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리를 수행하여 혈장을 분리하였으며 생화학분석기 (IDEXX, Catalyst Dx)를 통해 triglyceride, total cholesterol, glucose content을 분석하였다.

4. 달맞이꽃 추출액 처리에 따른 성장 영향 분석

달맞이꽃 전초 추출액 처리에 따른 전체적인 성장관련 능력 검정은 표 7에 제시하였다.

표 7. Effect of evening primrose extract on growth performance of broiler chickens at ages 5-7 weeks

Age of week	Treatment					p-value
	Control	IV	IP	IV(2x)	IP(2x)	
Body Weight (g)						
5wk	1489.1±81.9	1531.3±85.1	1561.8±70.2	1423.3±82.2	1675.0±101.8	0.2024
6wk	1960.5±112.4 ^a	2217.6±97.2 ^c	2005.0±136.3 ^b	2106.0±142.2 ^{bc}	2181.3±62.7 ^{bc}	0.0812
7wk	2212.5±38.5 ^a	2747.5±148.9 ^b	2635.0±129.1 ^b	2747.5±8.8 ^b	2625.0±152.3 ^b	0.0527
Body Weight Gain (g)						
5wk	1442.4±82.6	1483.3±85.4	1513.5±70.4	1375.3±83.9	1625.7±98.7	0.2174
6wk	1914.3±112.5 ^a	2169.6±96.8 ^c	1955.4±138.3 ^b	2058.0±143.0 ^{bc}	2132.0±58.9 ^{bc}	0.0854
7wk	2163.0±37.8 ^a	2696.5±148.6 ^b	2583.7±133.2 ^b	2700.5±6.7 ^b	2575.7±151.4 ^b	0.0539
Feed Intake (g)						
5wk	2504.2±98.1 ^a	2739.9±119.5 ^b	2742.0±123.2 ^b			0.0393
6wk	3378.3±215.0	3978.1±466.4	3753.0±291.7			0.2226
7wk	4951.8±89.4 ^a	5239.3±77.5 ^{ab}	5274.7±51.7 ^{ab}	5248.0±11.3 ^{ab}	5453.0±274.0 ^b	0.2724
Feed Conversion Ratio						
5wk	1.78±0.14	1.94±0.15	1.78±0.05			0.3046
6wk	1.71±0.11	1.92±0.21	2.03±0.26			0.2688
7wk	2.29±0.04 ^a	1.97±0.11 ^b	2.08±0.13 ^{ab}	1.96±0.00 ^b	2.11±0.11 ^{ab}	0.2057

^{a-c} Values with different superscripts within a row differ significantly ($P<0.05$)

4.1. 체중 및 증체량 비교 분석

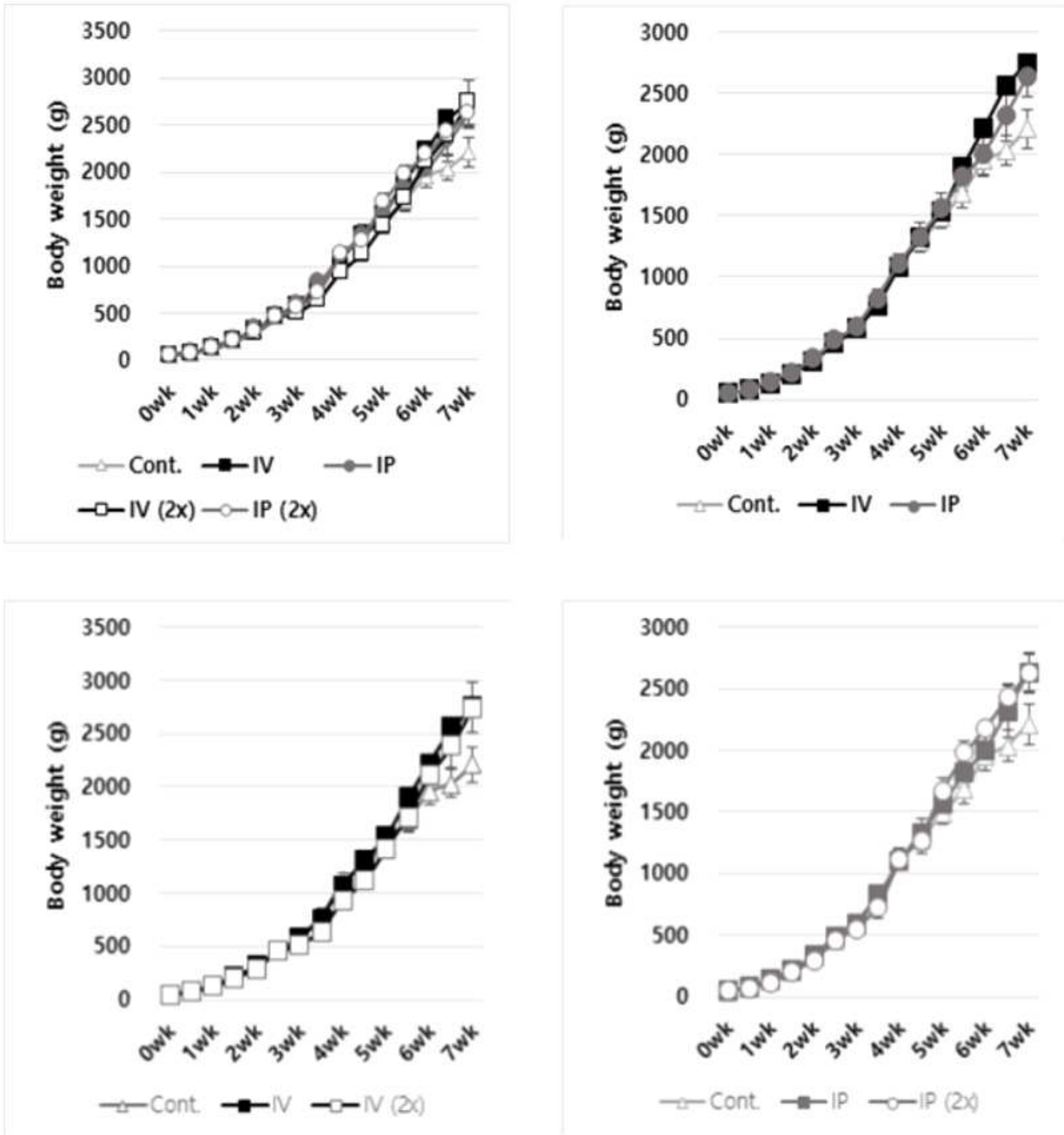


그림 33. Effect of evening primrose extract on body weights of broiler chickens. There were significant differences between all the treatment groups and control at 6-7 weeks of age ($P < 0.05$).

대조구와 비교시 7주령에서의 평균체중 및 증체량은 IV, IP, IV(2x), IP(2x) 모두에서 유의적으로 증가를 나타내었다 ($P < 0.005$, 그림 33). 상대적으로 1회 처리한 IV, IP에서 유의적인 체중 증가를 보여주고 있다 (그림 33). 특히, 1회 처리한 IV의 경우에는 6주령부터 7주령까지 다른 처리구에 비하여 높은 체중 증가를 보여주었다.

4.2. 사료 섭취량 및 사료효율 (Feed conversion ratio, FCR) 비교

사료섭취량은 IV와 IP 처리구에서 대조군에 비하여 5주째부터 유의적인 증가를 나타내었다 (그림 34A). 사료효율 (FCR, feed conversion ratio)의 경우에는 6주째까지는 큰 차이를 나타내지 않았으나 7주째의 경우에는 대조군에 비하여 유의적으로 낮은 효율을 보여주었다 ($P < 0.005$, 그림 34B). 이러한 결과는 달맞이꽃 전초 추출액 처리에 의해 사료섭취량의 증가와 함께 사료효율의 개선 효과가 있음을 보여주고 있으며, 이는 향후 육계뿐만 아니라 다양한 축종에 대해 검증해 볼 수 있는 결과라 할 수 있다.

5. 도계 특성 분석

달맞이꽃 전초 추출액 처리에 따른 전체적인 도계 특성은 Table 4에 제시하였다. 기본적으로 도계 후 특성 분석은 7주째에 수행하였으나 IV 및 IP의 경우에는 5주령과 6주령에도 도계 특성 분석을 진행하였다 (표 8). 도계 후 개체별 가슴살, 다리 및 장기 (간, 심장, 근육, 비장 및 복부지방)에 대한 무게를 측정함으로써 특성 비교를 진행하였다 (표 8).

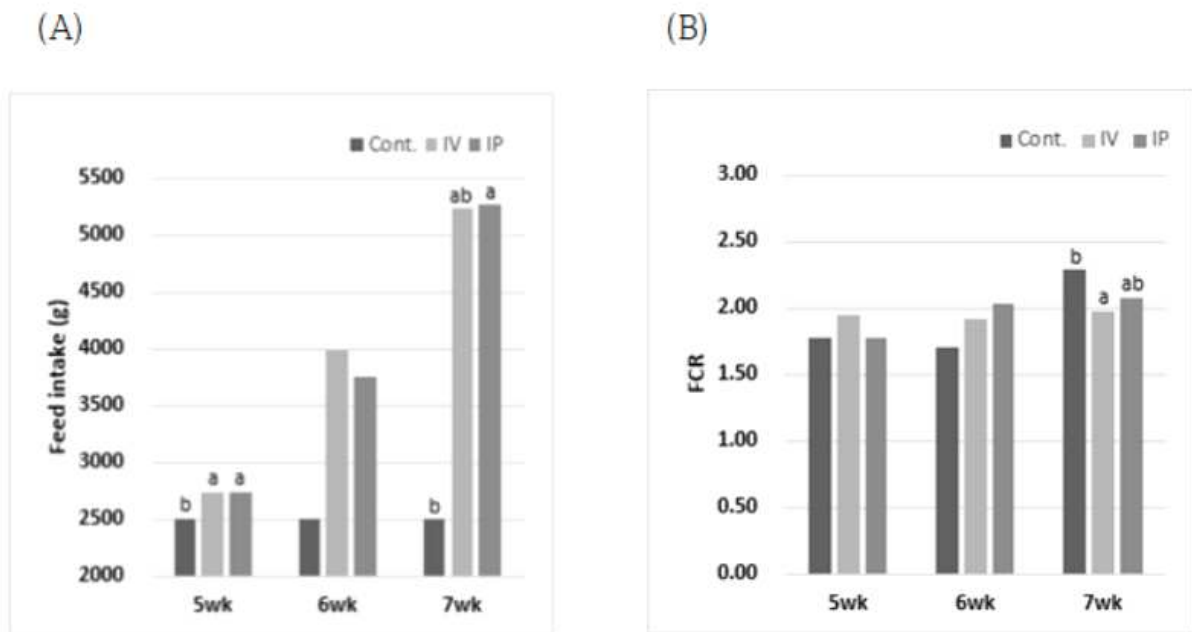


그림 34. Effect of evening primrose extract on feed intake (A) and feed conversion ratio (B) of broiler chickens at the age of 5-7 weeks.

5-6주령에서의 가슴살 근육 무게에 대해서는 대조구 및 처리구에 대한 유의적 차이는 나타나지 않았다 (표 8, 그림 35). 그러나 7주령에서 대조구에 비교하여 IV 처리구에서 가슴살 무게의 유의적인 증가를 보여주었다 ($P < 0.05$, 표 8, 그림 35). 유사하게 다리 무게 (drumstick weight)에서도 5-6주령에서의 다리 무게의 대조구 및 처리구에 대한 유의적 차이는 나타나지 않았다 (표 8, 그림 35). 그러나 7주령에서 대조구에 비교하여 IV 처리구에서 다리 무게가 유의적인 증가를 보여주었다 ($P < 0.05$, 표 8, 그림 35).

표 8. Effect of evening primrose extract on carcass characteristics of broiler chickens at the age of 5-7 weeks

Parameter	Treatment					p-value
	Control	IV	IP	IV(2x)	IP(2x)	
Dressed weight (g)						
5wk (d 1-35)						
Liver	40.1±2.9	39.4±1.8	42.5±4.8	N/A	N/A	0.6017
Heart	7.5±0.4	8.0±0.5	8.3±0.5	N/A	N/A	0.2295
Gizzard	25.1±2.0	28.5±2.7	24.0±2.6	N/A	N/A	0.1384
Spleen	1.9±0.3	2.2±0.4	2.1±0.3	N/A	N/A	0.7440
Abd. Fat	13.2±3.1	13.3±2.0	14.0±3.0	N/A	N/A	0.9407
Breast M.	260.4±23.1 ^{ab}	251.4±16.0 ^a	293.3±19.5 ^b	N/A	N/A	0.0984
Drumstick	279.2±16.7	273.1±15.5	283.9±17.5	N/A	N/A	0.8003
6wk (d 1-42)						
Liver	47.4±5.0	50.3±4.3	54.3±4.8	N/A	N/A	0.4397
Heart	9.9±0.6 ^a	11.1±0.5 ^{ab}	11.6±0.8 ^b	N/A	N/A	0.0437
Gizzard	28.9±3.3	26.4±2.7	28.3±3.0	N/A	N/A	0.7109
Spleen	2.8±0.5	3.7±0.8	2.8±0.4	N/A	N/A	0.2611
Abd. Fat	22.4±6.9	29.9±7.6	19.7±4.9	N/A	N/A	0.3956
Breast M.	394.2±15.3 ^b	404.5±11.3 ^b	351.8±24.5 ^a	N/A	N/A	0.0.86
Drumstick	370.7±20.8	397.0±12.0	367.6±27.9	N/A	N/A	0.3634
7wk (d 1-49)						
Liver	47.5±0.9 ^a	68.3±7.3 ^b	50.6±7.3 ^{ab}	42.1±0.4 ^a	45.8±2.4 ^a	0.0915
Heart	10.1±0.9 ^a	13.2±0.6 ^b	10.6±0.7 ^a	10.8±0.5 ^{ab}	11.7±0.3 ^{ab}	0.0628
Gizzard	26.7±2.7	28.8±1.9	25.5±1.8	29.8±2.1	29.3±1.0	0.6720
Spleen	3.4±0.5	4.8±1.5	2.5±0.2	2.9±0.4	3.5±0.4	0.4635
Abd. Fat	18.5±7.6	27.4±8.7	25.0±3.6	25.7±7.2	30.8±3.1	0.7983
Breast M.	406.4±23.3 ^a	571.4±56.0 ^b	512.4±52.2 ^{ab}	575.6±16.0 ^{ab}	444.2±57.6 ^{ab}	0.1386
Drumstick	409.7±20.9 ^a	526.3±44.4 ^b	490.3±31.2 ^{ab}	536.3±6.6 ^b	480.7±29.9 ^{ab}	0.1300

^{a-b} Values with different superscripts within a row differ significantly ($P < 0.05$)

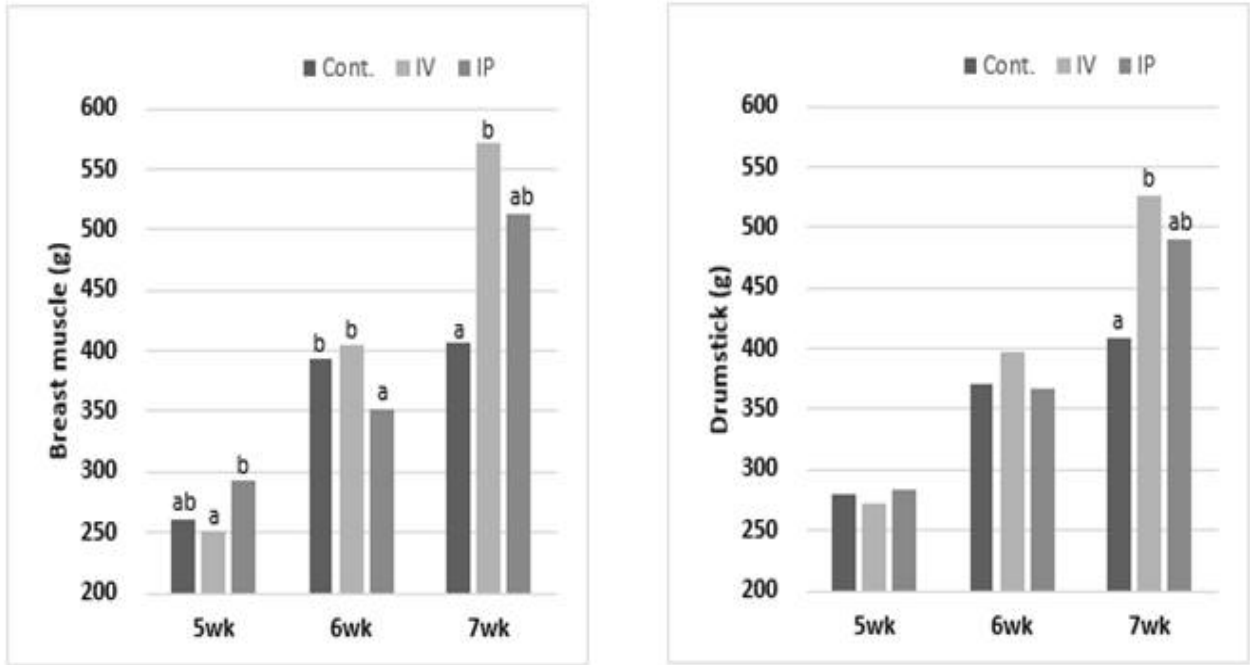


그림 35. Effect of evening primrose extract on carcass yields of broiler chickens at the age of 5-7 weeks. Comparisons of the dressed weights of breast and drumstick.

기본적으로 5-6주령에서의 간 무게는 대조구와 처리구간 유의적 차이는 나타내지 않았다 (그림 36). 그러나 7주령의 IV 처리구에 있어서는 대조구에 비하여 유의적인 증가를 나타내었다 ($P < 0.05$, 그림 36). 심장 무게의 경우에는 5주령까지는 차이를 나타내지 않았으나 6주령에 있어서는 대조구에 비하여 IP 처리구가 높았으며, 7주령에 있어서는 대조구에 비하여 IV 처리구가 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$, 그림 36). 나머지 장기 무게 (비장, 근위, 복부지방)에 대해서는 주령별, 처리구별 유의적 차이는 나타나지 않았다 (그림 36).

5-7주령사이에 도체 후 체중대비 각각 장기 및 근육 무게 비교는 중 표 9에 제시하였다. 도체 후 체중대비 가슴살, 다리, 복부 지방 무게에 대한 통계적인 분석은 유의하게 나타나지 않았다 (그림 37). 또한 가슴살, 다리, 복부 지방 무게에 대한 복부지방 비율도 5-7주령간 유의적 차이는 나타나지 않았다 (그림 37). 본 실험에서는 달맞이꽃 추출액에 대한 지방 감소에 의한 경제 능력 향상 또는 체중 증가에 의한 경제 형질 증가 유조 여부를 기본 가설로 하여 도체 후 다양한 비교 분석을 통한 유의성 분석 및 영향 여부를 검증하고자 하였다.

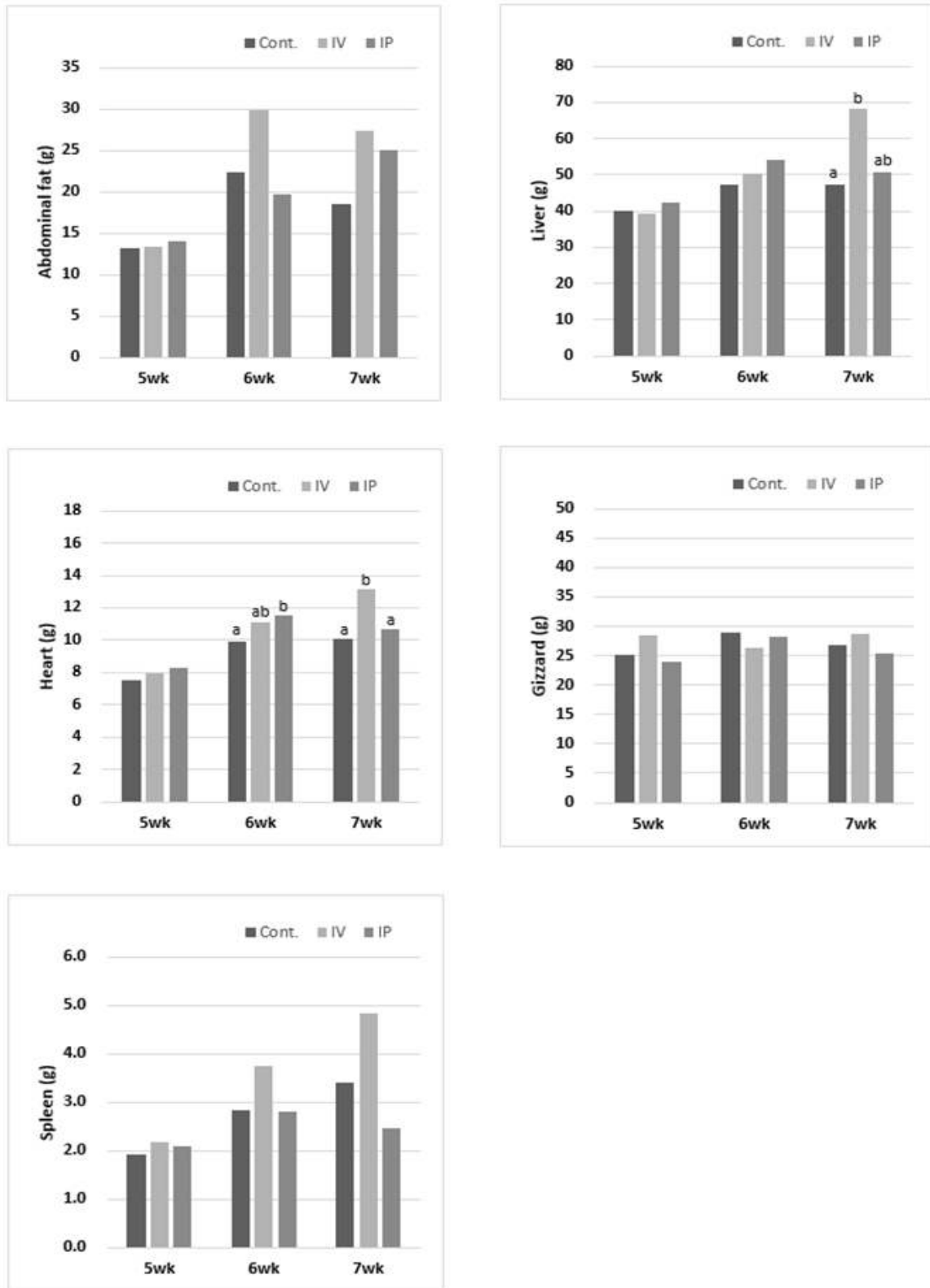
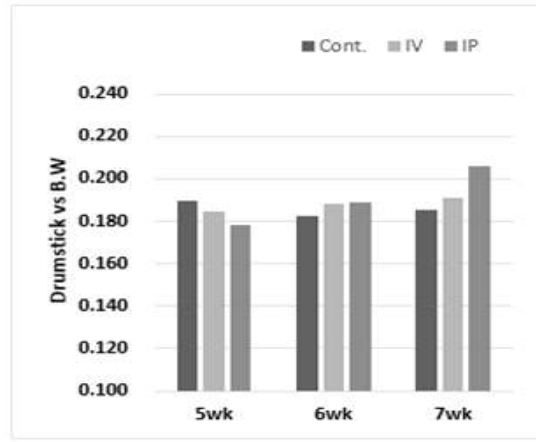
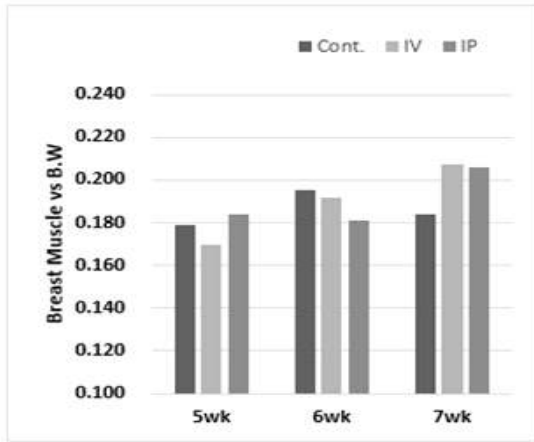


그림 36. Effect of evening primrose extract on carcass yields of broiler chickens at the age of 5-7 weeks. Comparisons of the dressed weights of internal organs and abdominal fat.

9. Effect of evening primrose extract on carcass characteristics of broiler chickens at the age of 5–7 weeks. Carcass yield-to-body weight ratio and abdominal fat-to-carcass yield ratio.

Parameter	Treatment					P-value
	Control	IV	IP	IV(2x)	IP(2x)	
Ratio of carcass yield to body weight						
5wk (d 1-35)						
Breast M.:BW	0.017±0.009	0.170±0.004	0.184±0.007	N/A	N/A	0.1751
Drumstick:BW	0.190±0.008	0.185±0.006	0.178±0.006	N/A	N/A	0.1774
Abd. Fat:BW	0.009±0.002	0.009±0.001	0.010±0.002	N/A	N/A	0.7982
6wk (d 1-42)						
Breast M.:BW	0.195±0.010	0.192±0.007	0.181±0.006	N/A	N/A	0.3000
Drumstick:BW	0.183±0.007	0.188±0.004	0.189±0.006	N/A	N/A	0.5345
Abd. Fat:BW	0.011±0.003	0.014±0.004	0.010±0.002	N/A	N/A	0.4654
7wk (d 1-49)						
Breast M.:BW	0.184±0.013	0.208±0.014	0.206±0.008	0.210±0.007	0.145±0.038	0.3359
Drumstick:BW	0.185±0.009	0.191±0.008	0.188±0.005	0.195±0.003	0.183±0.001	0.8427
Abd. Fat:BW	0.008±0.003	0.010±0.003	0.012±0.002	0.010±0.002	0.012±0.001	0.8784
Ratio of abdominal fat to carcass yield						
5wk (d 1-35)						
Fat:Breast M.	0.048±0.009	0.053±0.0098	0.053±0.012	N/A	N/A	0.7891
Fat:Drumstick	0.045±0.010	0.049±0.007	0.055±0.012	N/A	N/A	0.5902
6wk (d 1-42)						
Fat:Breast M.	0.056±0.017	0.0763±0.022	0.055±0.013	N/A	N/A	0.5104
Fat:Drumstick	0.058±0.015	0.076±0.021	0.053±0.012	N/A	N/A	0.4243
7wk (d 1-49)						
Fat:Breast M.	0.048±0.022	0.051±0.019	0.053±0.014	0.046±0.014	0.048±0.014	0.9993
Fat:Drumstick	0.046±0.041	0.054±0.018	0.052±0.010	0.048±0.014	0.065±0.007	0.9445

(A)



(B)

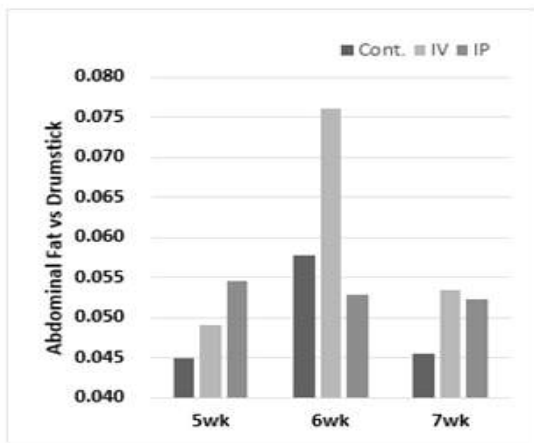
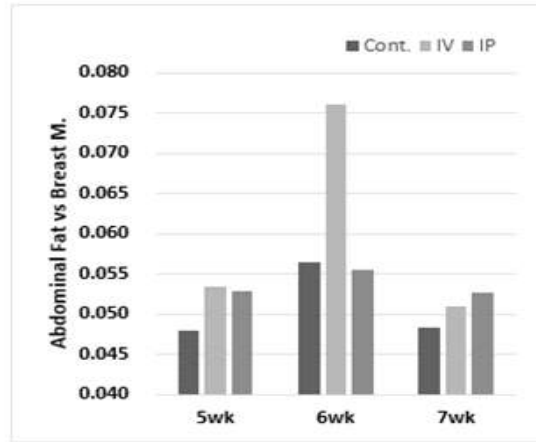
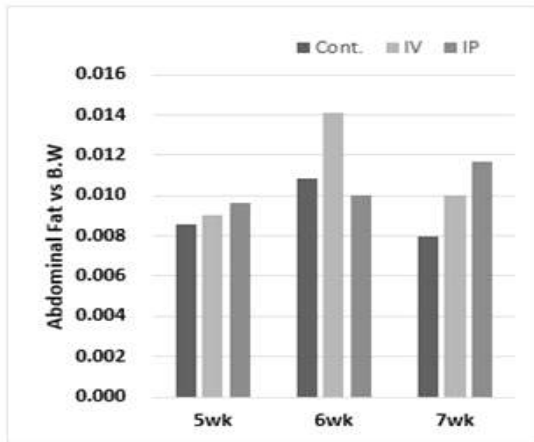


그림 37. Effect of evening primrose extract on carcass yields of broiler chickens at the age of 5-7 weeks. (A) Carcass yields (weight ratio of breast muscle and drumstick compared to body weight). (B) Carcass yields (weight ratio of abdominal fat compared to weight of total body, breast muscle and drumstick).

6. 혈액내 생화학 분석을 통한 생리적 변화 검증

달맞이꽃 전초 추출액 처리에 대한 생리학적 변화를 분석하기 위하여 혈액내 생화학 지표에 대한 비교분석을 수행하였다. 혈액내 생화학분석은 0, 4, 6주령에서 익정맥으로부터 혈액 채취 후 total triglyceride (TG), total cholesterol, glucose의 농도를 측정하였으며, 결과는 Table 6에 정리하였다. 그러나 모든 분석항목 (total triglyceride (TG), total cholesterol, glucose)에서 주령별, 처리구별 유의적인 큰 차이는 나타나지 않았다 (표 10, 그림 38). 무엇보다도 생화학 분석 지표 결과에서는 개체별 변이가 다소 크게 나타나서 달맞이꽃 전초 추출액 처리에 따른 정확한 유의적 영향 분석은 다소 어렵다고 판단된다.

표 10. Results of blood plasma analysis in broiler chickens at the age of 0, 4 and 6 weeks

Parameter	Treatment					p-value
	Control	IV	IP	IV(2x)	IP(2x)	
Triglycerides (mg/dl)						
0wk (d 0)	129.0±30.0	164.8±26.9	133.0±4.8	145.0±7.9	132.0±9.2	0.7835
4wk (d 1-28)	42.0±14.1 ^a	78.3±19.2 ^{ab}	47.7±16.5 ^a	114.0±25.1 ^b	72.0±12.7 ^{ab}	0.1626
6wk (d 1-42)	78.5±13.1 ^b	49.0±8.5 ^a	81.0±3.5 ^b	174.5±5.3 ^c	87.5±35.0 ^{bc}	0.0915
Total cholesterol (mg/dl)						
0wk (d 0)	49.3±14.2	80.3±6.9	36.7±8.3	62.0±13.8	62.0±6.4	0.1706
4wk (d 1-28)	91.3±8.0 ^a	107.3±4.4 ^{ab}	87.3±2.8 ^a	126.3±9.4 ^c	115.0±2.1 ^b	0.0150
6wk (d 1-42)	100.5±36.4	101.0±17.7	103.5±2.5	102.0±13.4	110.5±11.7	0.9988
Glucose (mg/dl)						
0wk (d 0)	257.8±3.8	247.3±17.4	228.3±7.4	242.0±3.0	244.5±9.5	0.4945
4wk (d 1-28)	246.5±5.0	255.5±9.9	230.3±2.8	239.7±8.9	245.5±1.8	0.2759
6wk (d 1-42)	244.0±14.1	229.5±10.3	212.5±1.8	242.5±6.7	231.0±8.5	0.5090

^{a-c} Values with different superscripts within a row differ significantly ($P < 0.05$)

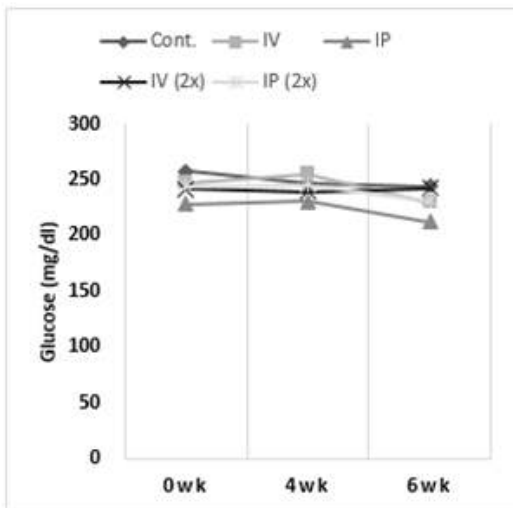
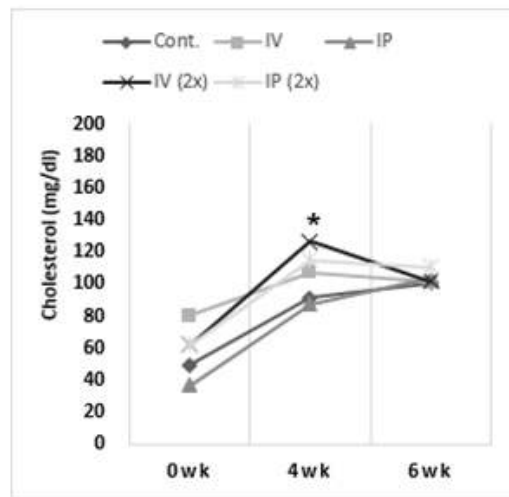
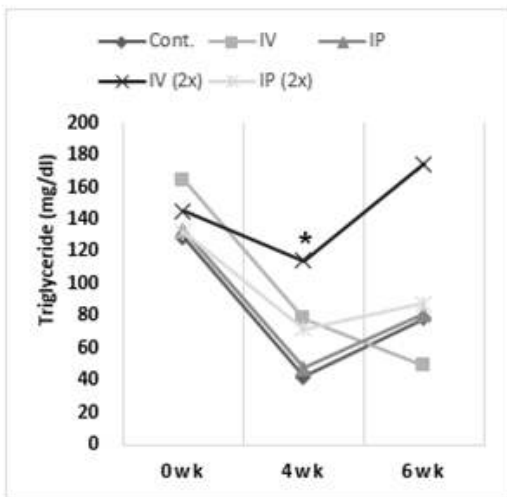


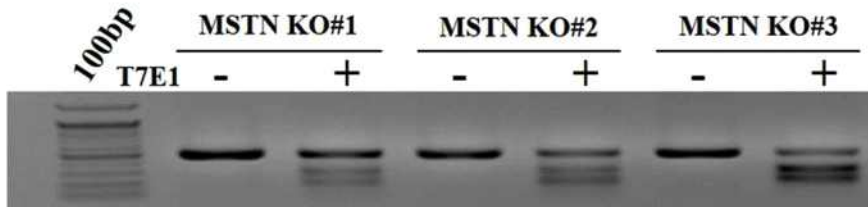
그림 38. Plasma contents of triglyceride (TG), total cholesterol and glucose of broiler chickens at the age of 0, 4 and 6 weeks according to the treated groups.

연구목표5:근육세포 활용 기초 기전 규명 시스템 검증

1. 근육전구 세포 활용을 통한 근분화 기전 검증

육계에 있어서 근육분화의 정확한 기전을 분석하기 위하여 기 확립된 근육전구세포 및 knockout 세포주를 이용하여 *in vitro* assay를 진행하였다. 근육 성장 조절에 중요한 역할을 하는 마이오스타틴 (myostatin, MSTN) 유전자를 제거한 근육전구세포주를 확립하였으며 (그림 39), 정상 근육전구세포와의 근분화 과정의 변이를 분석함으로써 조절 기전을 구명하고자 하였다. 이는 첨가제에 의한 경제형질 향상과 더불어 정확한 분화 및 성장 기전을 밝힘으로써 정확한 제어 통한 경제형질 향상을 피하고자 하였다. 따라서 이러한 연구 전략은 향후 다양한 첨가제에 의한 정확한 기전연구에 활용 가능할 것으로 사료된다.

(A)



(B)

Wild type	CTGAAAAAGACGGACTGTGCAATGCTTGTACGTGGAGACAGAACACAA	
MSTN KO#1	CTGAAAAAGACGGACTGTGCAATGC---TACGTGGAGACAGAACACAA CTGAAAAAGACGGACTGTGCAATGCTTGtTACGTGGAGACAGAACACAA	3nt del 1nt in
MSTN KO#2	CTGAAAAAGACGGACTGTGCAATGCT-GT--GTGGAGACAGAACACAA CTGAAAAAGACGGACTGTGC-----TACGTGGAGACAGAACACAA	3nt del 8nt del
MSTN KO#3	CTGAAAAAGACGGACTGTGCAA-----TGGAGACAGAACACAA CTGAAAAAGAC-----GTACGTGGAGACAGAACACAA	10nt del 16nt del

그림 39. 첨가제 유효 기초 기전 분석을 위한 기 확립된 닭 유래 근육 전구세포서의 마이오스타틴 유전자 제거 세포주

2. MSTN KO 근육전구세포의 분화능 비교 분석

근육 성장 억제 유전자인 MSTN이 제거된 근육전구세포와 일반 (wild-type) 근육전구세포와의 성장 (proliferation rate)와 근분화 (myotube differentiation) 능력을

비교하였다. 우선 MSTN KO 근육전구세포와 WT 근육전구세포의 근육 성장 (proliferation rate) 비교하였다 (그림 40). 근육성장 (proliferation rate)은 4일차부터 MSTN KO 근육전구세포가 WT 근육전구세포와 비교시 유의적으로 증가하고 있음을 보여주고 있다 (그림 40). 또한 근육 분화 (myotube differentiation) 실험에서도 MSTN KO 근육전구세포가 WT 근육전구세포와 비교시 유의적으로 증가하였다 (그림 40).

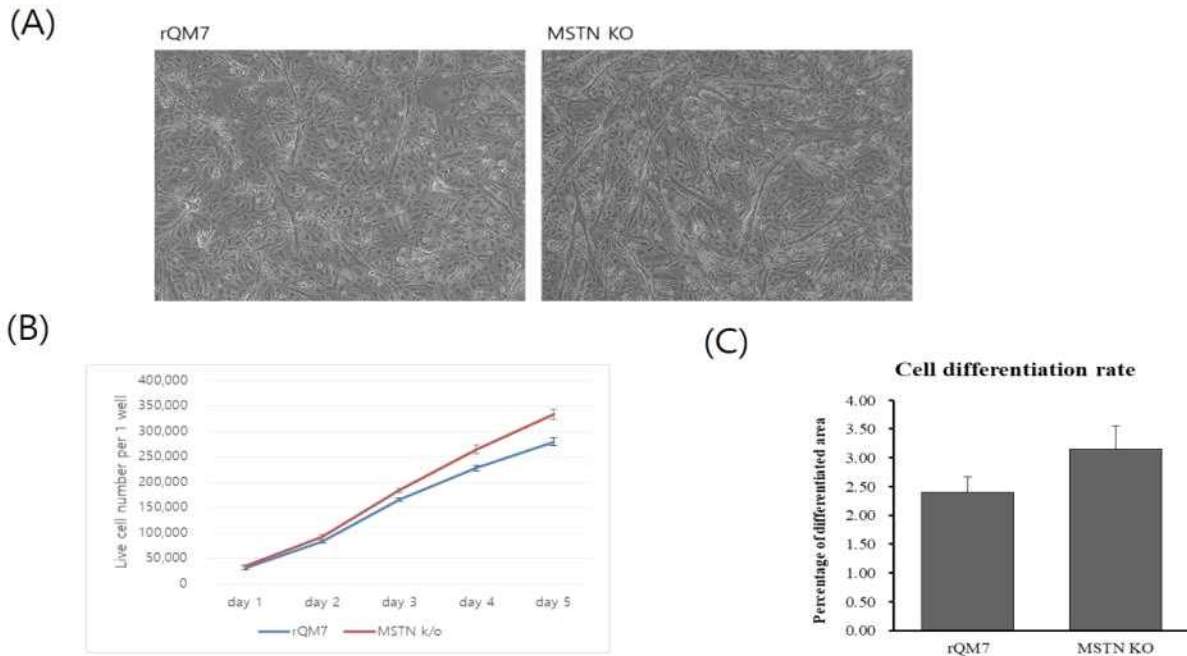


그림 40. Proliferation and differentiation of myoblast cells and myostatin knockout (MSTN KO) myoblast cells. (A) Morphology of differentiated myoblast cells and MSTN KO cells. (B) Comparison analysis of myoblast cells and MSTN KO cells by day 5. (C) Comparison of differentiated areas during differentiation periods.

또한 MSTN KO 근육전구세포와 WT 근육전구세포의 전반적인 유전자 발현을 비교하기 위하여 RNA NGS sequencing을 진행하여, 유전자 발현 양상을 비교 분석하였다 (그림 41). Global gene expression 비교에서 유의적인 차이를 보이는 DEGs (differentially expressed genes)에 대한 후보 유전자들을 확인하였으며, 이러한 기초 기전 기반 비교 분석 시스템은 육계 근성장과 분화관련 정확한 유전자 발현 양상 분석과 조절 기전을 검증을 통한 효율적인 첨가제 개발 등에 활용될 수 있을 것으로 판단된다 (in vitro assay를 통한 유효성 평가 시스템에 대한 특허 등록 완료).

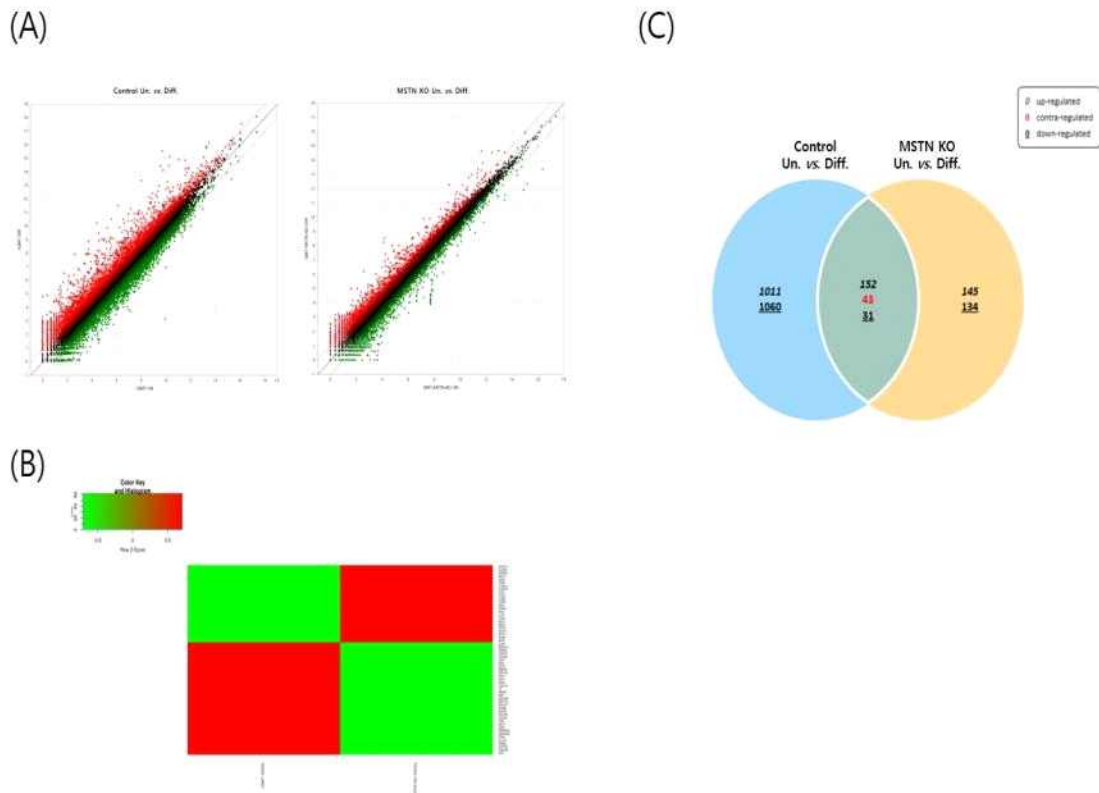


그림 41. (A) The pie charts displayed the compositions of the DEGs between Control and MSTN KO myoblast cells. (B) Heatmap analysis of clustered DEGs between Control and MSTN KO myoblast cells. (C) Vendiagram of Control and MSTN KO myoblast cells between undifferentiated (Un.) and differentiated (Diff.) stages.

유전자 발현 양상에 대한 비교구는 diff. WT QM7/undiff. WT QM7와 diff. MSTN KO QM7/undiff. MSTN KO QM7를 우선 비교 분석 후 최종적으로 두 비교군간의 차이를 분석하였다 (그림 41). 최종적으로 WT 근육전구세포에서는 2,416 DEGs, MSTN 근육전구세포에서는 1,631 DEGs를 확인하였다 (그림 41). 이러한 비교 분석을 통해 최종적으로 MSTN근육전구세포와 WT 근육전구세포의 분화 과정 중에서의 1,139 DEGs를 확인하였다. (cut off values; fold change > 1.5, average normalized RC (Log2) > 2, p-value < 0.01). 이러한 DEGs를 통해 10개의 clustered biological process GO terms을 확인하였으며 (표 11), 특히 p53 pathway-related process에서의 유의적인 차이를 확인하였다 (표 11).

표 11. List of GO (Gene Ontology) terms obtained using enrichment analysis for the differentially expressed genes.

GO terms	p-value	FDR q-value
IL2_STAT5_SIGNALING	1.14E-05	5.72E-04
APICAL_JUNCTION	8.05E-05	8.64E-04
EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	8.05E-05	8.64E-04
GLYCOLYSIS	8.05E-05	8.64E-04
DNA_REPAIR	8.64E-05	8.64E-04
HYPOXIA	5.02E-04	2.79E-03
INFLAMMATORY_RESPONSE	5.02E-04	2.79E-03
OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	5.02E-04	2.79E-03
p53_PATHWAY	5.02E-04	2.79E-03
COMPLEMENT	2.73E-03	1.36E-02

정확한 근분화 과정에서의 p53 signal pathway 기전 분석을 위하여 추가적인 실험을 진행하였다. mRNA NGS 와 웨스턴 블로팅 결과로 볼 때, p53 발현은 감소하지만 p21 발현은 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 미분화뿐만 아니라 근분화 후에도 동일한 양상을 보여주었다 (그림 42). Desmin 발현 양상을 볼 때, MSTN KO 에서 표현형적으로 많은 분화 양상을 보여준 것과 동일하게 (그림 40) 웨스턴 블라팅에서도 유의적인 증가를 보여 주었다 (그림 42).

그림 43 은 String 분석으로 근육 분화 간 p53 에 연관된 유전자의 발현 양상을 확인하여 p21 (CDKN1A), 백혈병 억제 인자 (LIF), DNA 손상 유도 전사인자 4 (DDIT4)가 p53 (TP53)과 직접적으로 상호작용한다는 것을 확인하였다 (그림 43). LIF 와 DDIT4 의 발현을 검증하기 위해 우리는 근관 분화 과정 간 WT QM7 과 MSTN KO QM7 에서 qRT-PCR 을 진행하였다. 그림 3-43 에서와 같이, LIF 와 DDIT4 의 발현 수준은 mRNA NGS 분석과 비슷하게 분화 중인 MSTN KO QM7 에서 유의적으로 감소되었다 (그림 43). 이런 결과들은 mRNA NGS 에서 추론된 p53 신호전달체계와 연관된 유전자들이 근세포의 분화에 주요한 역할을 할 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과는 근분화 중인 MSTN KO QM7 에서 LIF 의 유의적인 하향 조절은 MSTN 이 LIF 의 발현을 조절함으로써 근분화를 저해할 수 있음을 시사한다. DDIT4 는 mTOR 경로의 억제 조절인자로 성장, 자가 포식, 세포 사멸 및 DNA 손상 반응과 같은 다양한 세포 기능을 조절한다. 근육에서는 DDIT4 가 mTOR 경로를 통한 근육의 비대와 위축에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 Akt/mTOR FoxO

신호전달과 함께 DDIT4의 상향 조절은 근육 위축 및 골격근 섬유 크기의 감소와 관련이 있다는 발표가 있었다. 실질적으로 DDIT4 유전자는 p53에 의해 전사의 발현이 유도되는 직접적인 표적이다. 따라서, 종합적으로 본 결과는 MSTN이 p21과 p53의 세포 주기와 DDIT4와 LIF의 발현을 조절함으로써 근성장과 근분화에 중요한 역할을 할 수 있음을 보여주고 있다.

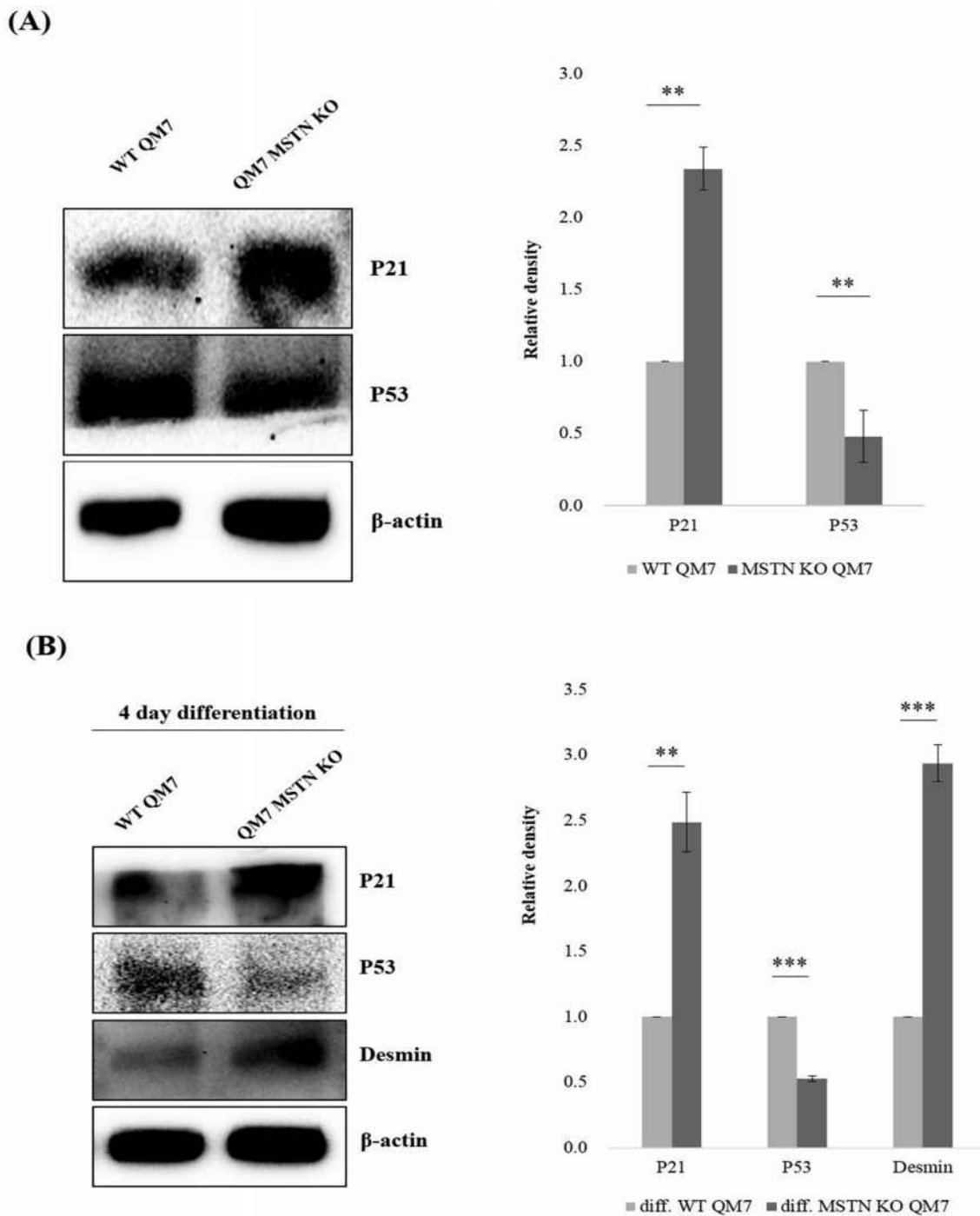
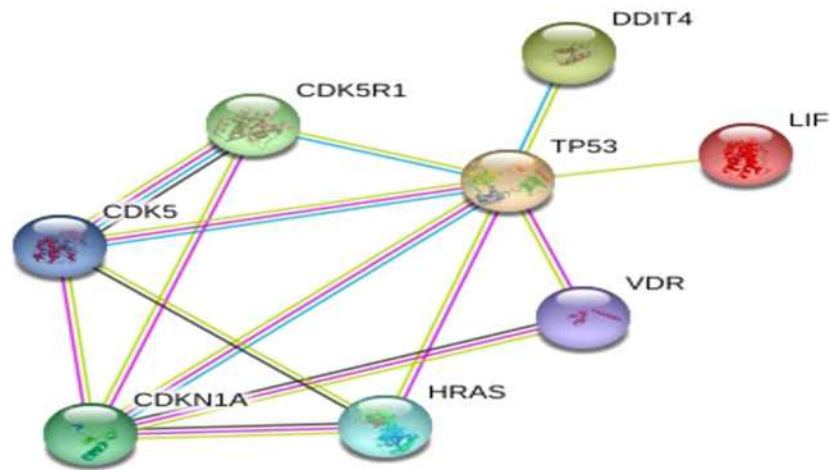


그림 42. Western blot analysis of wild-type (WT) QM7 and myostatin knockout (MSTN KO) QM7 cells in the undifferentiated and differentiated stages. (a) Protein expression profiles of p21 and p53 were compared between WT QM7 and MSTN KO QM7 in the undifferentiated stage (** $p < 0.01$, $n = 3$). (b) After 3 days of myotube differentiation, the expression levels of p21, p53, and Desmin were compared between WT QM7 and MSTN KO QM7. The graph indicates the density comparison of each protein expression profile from western blotting. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$

(A)



(B)

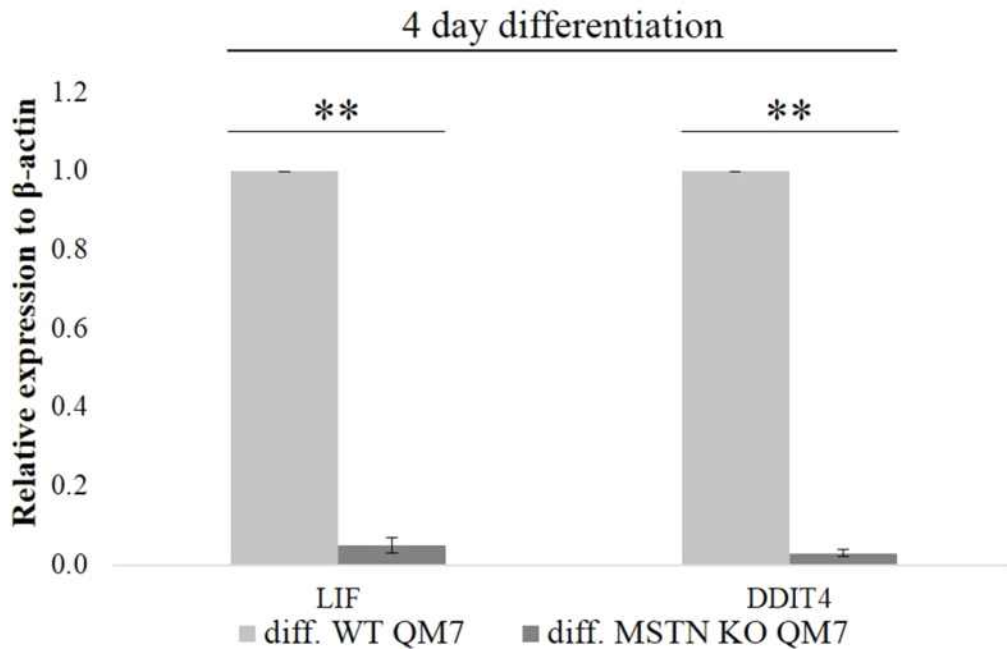


그림 43. String analysis and qRT-PCR validation of p53-related genes. (a) String analysis of p21 (CDKN1A), p53 (TP53), and p53-related candidate genes identified from RNA-sequencing data. Protein - protein interactions were analyzed with the STRING software. In the network, proteins are represented as nodes. (b) Expression levels of LIF and DDIT4 were analyzed by qRT-PCR (** $p < 0.01$, $n = 3$). Quantitative analysis was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method by normalization to beta-actin gene expression.

연구목표6:산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 함유 제제 개발: 당귀 powder를 이용한 enteric coating에 의한 제제 생산 및 내산성 시험

1. 당귀 powder를 이용한 enteric coating에 의한 제제 생산 (그림 44)

- 코팅제 처방

구분	기능	성분	중량	비고
Core	주성분	당귀 분말	25g	
	부형제	미결정 셀룰로오스	30g	
	부형제	유당	10g	
	부형제	전젤라틴화전분	10g	
	붕해제	크로스카멜로스 나트륨	5g	
	용제	정제수	78g	
장내 코팅	코팅기제	Kollicoat MAE 30DP	41.02g	고형분으로 12.31g
	가소제	PlasAcryl HTP20	10.47g	고형분으로 2.09g
	용제	정제수	20.47g	
합계			94g	

- 제조 방법

1) Core pellet의 제조

i. i를 구성하는 성분을 칭량후 혼합

ii. i의 혼합물에 정제수를 넣고 연합물을 제조

iii. ii의 연합물을 extruder(체망 크기 : 1.0mm, 회전 속도 : 30rpm)를 이용하여 원통형 과립을 제조.

2) Extruder 사양

- Model 명 : MG-55 (제조사: Paudal, Japan)

iv. iii의 원통형 과립을 Spheronizer(회전속도 : 1000rpm)을 이용하여 구형과립을 제조

3) Spheronizer 사양

- Mode 1명 : QJ-230T-1 Type (제조사 : Paudal, Japan)

v. iv의 구형과립을 평판건조기에서 건조한다. (건조조건 : 60℃, 12hr)

vi. v의 건조된 구형과립을 체과 (체망 : 18mesh)

vii.vi의 구형과립을 Flow coater를 이용하여 장용코팅

4) Flow coater 사양

- Model 명 : WBF-II (제조사 : ChongQing ENGER Granulation & coating Technology Ltd.)

5) Process parameter

- Core 투입량 : 800g
- Drying Air Volume : 70~90m³/H
- Atomizing Air Pressure : 200Kpa
- Inlet Temperature : 40~50℃
- Material Temperature : 26~29℃
- Exhaust air Temperature : 27~30℃
- Spray rate : 8~15g/min/kg

viii. vii의 장용코팅 구형과립을 평판건조기에서 건조(건조온도 : 40℃, 2hr)

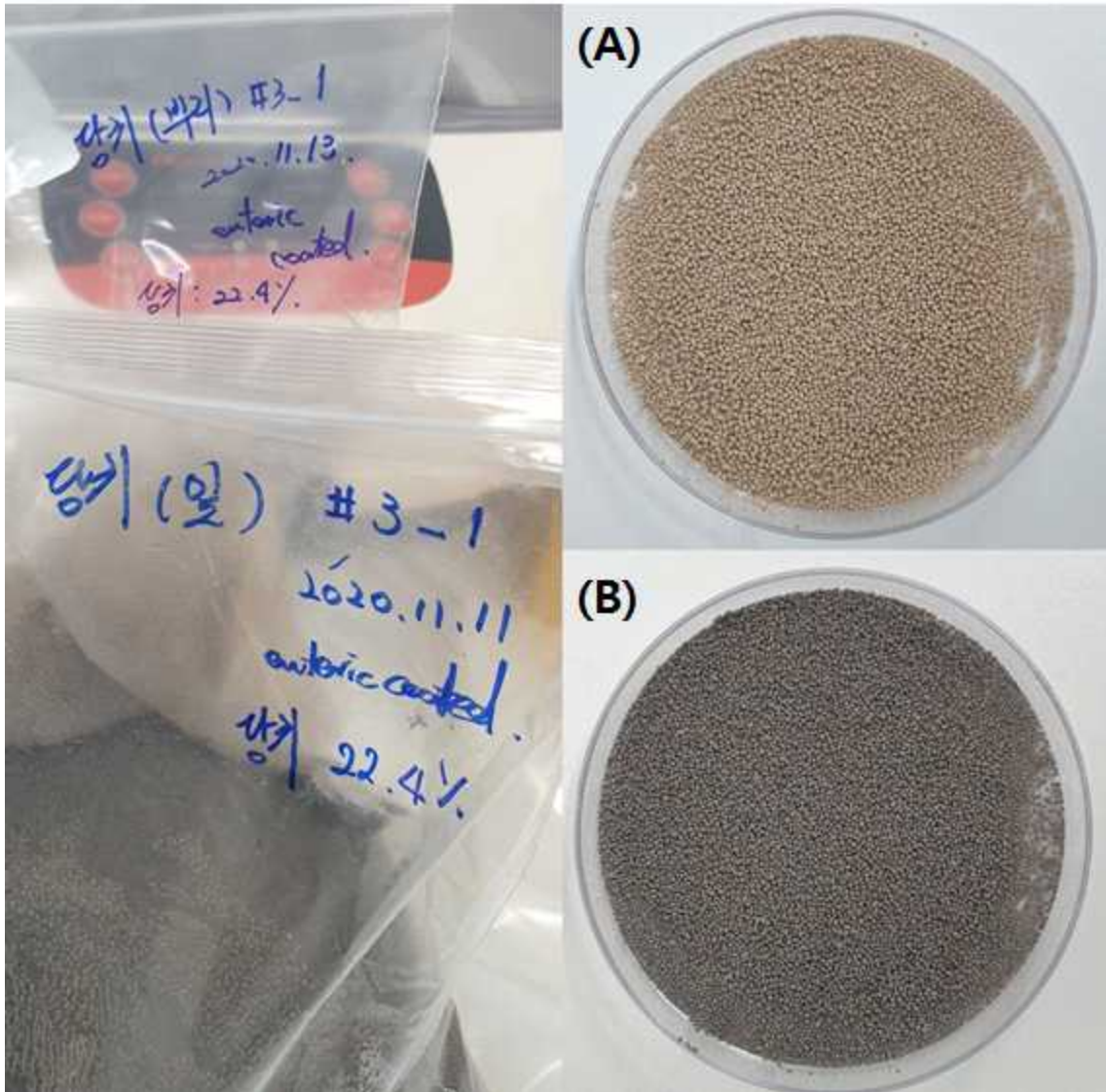


그림 44. 장내 코팅 (enteric coating) 후 당귀 분말 제형. (A) 당귀 뿌리 분말 제형.
 (B) 당귀 잎/줄기 분말 제형.

2. 봉해시험법의 한 당귀 부산물의 enteric coating 내산성 시험 방법 및 조건 확립

- 장치는 높이 138~160 mm로서 침적부의 안지름이 97~115mm의 1000mL의 밑이 평평한 비커, 37±2℃로 조절이 가능한 항온조, 1 분간에 29~32회 왕복, 진폭 53~57mm 상하로 운동하는 시험기 및 전동기로 구성하였다. 비커에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라 왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 적어도 15mm 이상 떨어지도록 하고 시험기가 가장 아래로 내려 갔을 때 망면은 비커의 바닥으로부터 25mm 이상 이며 시험기가 완전히 잠기지 않도록 하였다. 전동기의 위아래로의 이동시간은 같으며 또한 위아래로의 방향전환은 급하지 않고 부드럽게 하였다. 시험기는 수직축에 따라 작동하고 수평으로 움직여 이동하지 않도록 하였다.

- 시험기는 길이 77.5±2.5mm, 안지름 20.7~23.0mm, 두께 1.0~2.8mm 의 양쪽 끝이 열려 있는 투명한 유리관 6 개와 이들의 관을 아래위 방향으로 수직으로 서 있도록 하기 위한 지름 88~92mm, 두께 5~8.5 mm의 2장의 플라스틱판으로 구성하였다. 이들 판에는 각각 지름 22~26mm 구멍 6개가 중심으로부터 같은 거리 및 같은 간격으로 뚫려 있다. 아래의 플라스틱판의 아랫면에는 체눈의 간격이 1.8~2.2mm, 선재의 지름이 0.57~0.66mm의 평평한 스테인레스강 망을 부착시켰다 (본 시험에서는 pellet의 크기를 고려하여 30mesh (체눈간격 : 500um) 체망을 덧대어 사용하였음). 시험기는 2장의 플라스틱판을 관통하는 3개의 지주를 써서 조립하여 고정하였으며 그림 3-45 및 그림 3-46의 구조를 가지고 있다. 시험기는 그의 중심축에 따라 상하운동을 할 수 있도록 전동기에 적당한 방법으로 매달았다.

- 제1액은 염화나트륨 2.0g에 염산 7.0 mL 및 물을 넣어 녹여 1000 mL로 하였다 (pH 약 1.2). 제2액은 0.2 mol/L 인산이수소 칼륨시액 250mL에 0.2mol/L, 수산화나트륨시액 118mL 및 물을 넣어 1000mL로 하였다 (pH 약 6.8).

- enteric coating 당귀 부산물 100mg씩을 봉해시험기의 유리관에 1개씩 넣고, 제1 액에 의한 시험 및 제2 액에 의한 시험 등 두 번의 시험을 수행하였다.

○ 제1액에 의한 시험(내산성시험) : 시험기 6개의 유리관 각각에 검체 100mg씩을 넣고 시험액으로 제1액을 써서 120 분간 37 ±2 ℃에서 시험기를 작동하였으며, 적부판정은 enteric coating 당귀 부산물의 봉해가 일어나지 않음을 육안으로 확인하였다.

○ 제2액에 의한 시험 : 시험기 6개의 유리관 각각에 enteric coating 당귀 부산물 100mg

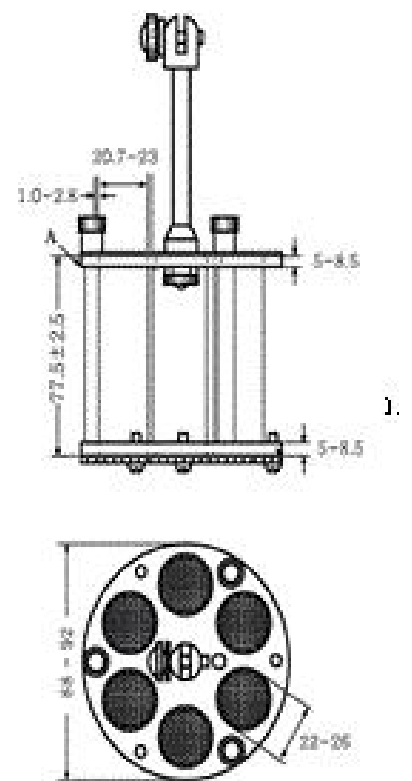


그림 45. 시험기 모식도

씩을 넣고 시험액으로 제2액을 써서 30 분간 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 시험기를 작동시켰다. 적부 판정은 enteric coating 당귀 부산물체의 잔류물이 유리관 안에 없든가 있더라도 분명하게 원형을 나타내지 않는 연질의 물질일 때, 또는 불용성의 제피 또는 캡슐 피막의 단편일 때 검체는 봉해된 것으로 판단하였다.



그림 46. 봉해시험장치

3. 봉해시험법의 한 당귀 부산물의 enteric coating 내산성 시험 결과

제1액과 제2액을 이용한 봉해시험 결과, enteric coating 당귀 부산물체의 잔류물이 유리관 안에 없든가 있더라도 분명하게 원형을 나타내지 않는 연질의 물질일 때, 또는 불용성의 제피 또는 캡슐 피막의 단편일 때 검체는 봉해된 것으로 기준하였다. 그러나 본 연구에서 제작한 enteric coating 당귀 부산물 제제에서는 봉해가 일어나지 않음을 육안으로 확인하였다.

4. 당귀 뿌리 및 부산물 (잎/줄기) 분말 제형 시제품 생산

최종적으로 당귀 뿌리 및 부산물 (잎/줄기) 분말에 대한 제형 시제품 생산하였다 (그림 3-47, 그림 3-48). 본 과제를 통해 당귀 뿌리 및 부산물 (잎/줄기)에 대한 유효 성분 검증과 산란계 기능성 검증을 완료하였으며, 최종적으로 제형화를 통해 시제품 개발까지 완료하였다. 이러한 전 과정에 대한 SOP 구축을 통해 향후 기술이전 및 산업화를 하고자 한다.



그림 47. 당귀 뿌리 분말을 이용한 장내 코팅 사료첨가제 시제품



그림 48. 당귀 부산물 (깎, 줄기) 분말을 이용한 장내 코팅 사료첨가제 시제품

당귀 사료첨가제 경제성 분석

1. 강원도 당귀 생산량 현황

- 당귀는 전국 재배면적 중 강원도가 58%를 차지하고 있으며, 전국 생산량도 65%이상을 강원도에서 생산하고 있음 (표 1).
- 당귀는 특용작물로서 뿌리를 채취해 약재 및 식재료로 사용하며, 나머지 비가식 부위 (줄기, 잎)은 전량 폐기되고 있으나 노지에 전량 폐기되는 당귀 잎과 줄기에도 본 과제를 통해 분석한 결과, 뿌리와 비교했을 때 당귀의 기능성 유효성분인 데커신과 데커시놀 안젤레이트가 약 30% 이상 함유되어 있을 것을 확인함.
- 따라서 이러한 부산물을 통한 사료첨가제 개발은 가축의 건강 증진 및 기능성 유효성분의 계란과 닭고기로의 전이를 통해 소비자가 꾸준히 섭취하여 기능성 효과를 가질 수 있는 장점이 있음.

표 1. 2019년 당귀 생산현황

지역	면적 (ha)	단수 (kg/10a)	생산량 (M/T)
강원	265 (58.0%)	321	828 (65.4%)
경북	143 (31.3%)	258	369 (29.1%)
제주	49 (10.7%)	245	69 (5.5%)
전국	457	274.7	1,266

2. 당귀 사료첨가제 경제성 분석

- 현재 기준으로 가축용 사료첨가제의 수용 가능한 범위는 양돈 사료의 경우 사료 kg당 1~15원, 양계사료의 경우 사료 kg당 1~10원 수준임.
- 당귀 부산물(잎, 줄기)을 200원/kg로 수매하고 수거 및 운송 등을 포함한 사료 첨가제로의 임가공비용을 1,800원/kg으로 보면, 당귀 부산물의 사료첨가제 원가는 2,000원/kg임.
- 당귀 부산물(줄기, 잎)을 5,000원/kg로 판매할 경우, 평창지역에서 연간 약 12억의 매출이 이익 발생할 것으로 예상함 (줄기, 잎 부산물의 양을 당귀 생산량의 50%일 경우).
- 양돈 사료의 경우 톤당 위 당귀 부산물 1~3kg 첨가시 첨가비용은 사료 kg당 5~15원, 양계 사료의 경우 톤당 1~2kg 첨가시 첨가비용은 사료 kg당 5~10원 수준임.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

(단위 : 건수)

성과 목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술 이전	사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활동 등)
	출원	등록		제품 화	기술 창업	매출 창출 (백만 원)	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표					
										SCI	비 SCI				정책 활용	홍보 전시	
최종 목표	12	12	7	10	-	900	8	-	-	11	8	14	16	16			
1차년도	2											2					
2차년도	3		1							1	2	3	4	4			
3차년도	3	2	2	2		5	2			2	2	3	4	4			
4차년도	2	3	2	3		20	2			3	2	3	4	4			
5차년도	2	3	2	3		30	2			3	2	3	4	4			
소 계	12	8	7	8	0	55	6	0	0	9	8	14	16	16			
종료 1차년도		2		0		95	2			2							
종료 2차년도		2		1		145											
종료 3차년도				1		145											
종료 4차년도				0		230											
종료 5차년도				0		230											
소 계	-	4	-	2	-	845	2	-	-								
합 계	12	12	7	10	-	900	8	-	-	11	8	14	16	16			

3-2. 목표 달성여부

성과지표	계획(A)	실적(B)	목표달성률	지표달성률
특허 출원	12	10	83.3%	83.3%
특허 등록	8	6	75.0%	75.0%
품종 등록		6	-	-
기술이전(건)	7	2	28.6%	28.6%
기술료(백만원)			-	-
제품화(건)	8	11	137.5%	100.0%
매출액(백만원)	55	392	712.7%	100.0%
수출액(백만원)			-	-
고용창출(명)	6	9	150.0%	100.0%
투자유치(백만원)			-	-
기술인증			-	-
논문(SCI)	9	10	-	-
논문(비SCI)	8	1	-	-
논문평균 IF			-	-
학술발표	14	19	135.7%	100.0%
교육지도	16	18	112.5%	100.0%
인력양성	16	17	106.3%	100.0%
정책활용			-	-
홍보전시			-	-
영농활용			-	-

- 최종연구개발실적 요약: 특허 출원 및 특허 등록과 기술이전은 각 지표 달성률 83%, 75%, 28% 달성함. 이외의 사업화 목표 (제품화, 매출액, 고용창출)은 각 추가 목표 달성(지표 달성률 각 100%, 목표달성률 137%, 712%, 150%)과 함께 이외의 지표인 학술발표와 교육지도 및 인력양성도 모두 100%를 달성함.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

특허출원 및 등록: 연구비 및 연구기간의 제한으로 차후 추가 특허 출원 계획

기술이전: 연구비 및 연구기간의 제한으로 기술이전 부족 그러나 매출액에서 목표 이상 달성

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

○ 우유 및 유제품 품질고급화 및 상품화를 위한 핵심기술

연구결과 중간 산출물인 기능성 성분이 강화된 고품질 우유 생산 (불포화지방산 고함유 우유생산 기술) 및 미생물제어 기술 (목장내 우유의 미생물 분석 기술, 원유 미생물 제어 미생물 분리 기술)은 개발과 동시에 현장 적용이 가능할 것으로 판단됨. 또한 개발되는 발효유/치즈 생산을 위한 개별적인 종균은 특허 출원/등록이 가능하며, 이에 종균별 기술이전 또는 산업화 활용이 가능. 발효조건에 따른 풍미, 물성 조절제어 기술도 개발과 동시에 기술이전이 가능할 것으로 판단됨.

○ 산야초/약용작물 활용 기능성 웰빙 한우 브랜드 개발

산야초/약용작물에 대한 반추가축에서 활용할 수 있는 기능성 사료첨가제 개발과 이를 통한 고부가가치 한우 브랜드 개발로 고급육 제품 다양화와 함께 강원지역 한우산업 발전을 모색하고, ICT 기술 기반의 한우 개체관리 시스템 도입으로 브랜드 한우의 전제조건이라고 할 수 있는 규격화를 연구. 한편, 국립축산과학원 한우연구소와의 유기적인 협력체계를 구축하여 일반 농가에 대한 홍보 및 지원을 통한 개발기술의 보급과 실용화 검정을 지속적으로 진행할 예정.

○ 기능성 웰빙 계육 및 계란 생산 기술 개발

산야초/부산물 사료첨가제 활용 기술 개발을 위해 다양한 산야초에 대한 유효성분 검증 체계 확립 및 규격화 프로토콜을 확립할 계획이며, 이에 개별적인 산야초/부산물 사료첨가제 제형개발은 직접적인 현장 실증과 서울대학교 실험목장을 통해 소규모 판매를 통해 실용화 검증을 계획.

4-2. 기대성과 및 파급효과

○ 기술적 측면

- 가) 산야초/약용작물의 원물 및 부산물을 활용한 가공식품 및 사료용 천연원료 가공기술 개발로 이용성 확대
- 나) 강원 청정지역 특화 유산종균 확보와 산야초/약용작물과의 발효를 통한 기능성 극대화 기술 개발
- 다) 기능성 천연 사료첨가제를 활용한 가축 생산성 증진 및 신선 축산물 내 전이 극대화를 위한 패키지 기술 완성
- 라) 정량적 품질관리 기술 개발을 통한 브랜드 축산물의 규격화 달성

○ 경제적·산업적 측면

- 가) 국내 산야초/약용작물 생산 및 이용성 현황 조사분석을 통한 타산업 응용성 확대 기여
- 나) 소비자 분석을 기초로 한 기능성 축산물 브랜드 추진방안 도출을 통해 국내 축산업 시장확대 기회 제공
- 다) 강원지역 특산 산야초/약용작물과 축산물의 결합을 통한 기능성 축산물 개발 계획 수립을 통해 지역 농축산 경제 활로 모색
- 라) 지속적 품질관리를 통한 기능성 유효물질 정량적 보장 구현으로 소비자 신뢰 획득
- 마) 강원도 특화 축산물의 가치 증진 및 글로벌화
- 바) 고기능성 웰빙 축산물 생산을 통한 한국 축산업 경쟁력 확보 및 축산농가 소득 증대

붙임. 참고문헌

1. Simopoulos A.P. (2002), The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids
Biomed Pharmacother, 56: 365-379
2. Kennelly, J.J. (1996) The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding o
ilseeds. Anim. Feed Sci. Technol. 60, 137-152
3. Mustafa AF, Seguin P (2003) Characteristics and in situ degradability of whole crop fa
ba bean, pea, and soybean silages. Can J Anim Sci 83(4):793-799
4. Wright DP, Read DJ, Scholes JD (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole pla
nt carbon balance of *Trifolium repens* L. Plant Cell Environ 21:881-891
5. Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., & Tolosa, M.
X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets ric
h in linoleic and linolenic acid. Journal of Dairy Science, 83, 1016-1027
6. Kowalczyk J, Orskov ER, Robinson JJ, Stewart CS. (1977) Effect of fat supplementatio
n on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. Brit. J. Nutr. 37:251-7
7. Heinrichs J, Jones C, Bailey K. Milk components: understanding the causes and
importance of milk fat and protein variation in your dairy herd. Dairy Anim Sci.
1997;5:1e-8e
8. Broaders, E., Gahan, C. G., and Marchesi, J. R. (2013) Mobile Genetic Elements of the
Human Gastrointestinal Tract: Potential for Spread of Antibiotic Resistance Genes. *Gut
Microbes* 4: 271-280.
9. Bourdat-Deschamps M, LeBars D, Yvon M, Chapot-Chartier M-P (2004) Autolysis of
Lactococcus lactis AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from
amino acids in a cheese model. Int Dairy J 14:791-800
10. Chiang, S. S., and Pan, T. M. 2013. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei*
subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:
903-916
11. Berardi, C. W., Solovey, E. T., and Cummings, M. L. (2013) Investigating the
Efficacy of Network Visualizations for Intelligence Tasks. *IEEE* 278-283
12. Palachum, W., Chisti, Y., and Choorit, W. (2018) In-vitro assessment of probiotic
potential of *Lactobacillus plantarum* WU-P19 isolated from a traditional fermented
herb. *Ann Microbiol* 68: 79-91.
13. Julie Paquet et al. 2000. Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation
processes for production of cheese starters International Dairy Journal vol. 10(5-6),
391-399
14. Vaughan L. Crow et al. 1993. Starters as finishers: Starter properties relevant to
cheese ripening International Dairy Journal
15. Jian-Shan Cai & Jin-Hong Chen. 2014. The Journal of Membrane Biology volume
247, 1067-1082
16. Chandra Shekhar Pundir & Rachna Rawal. 2013 Analytical and Bioanalytical Chemistry
vol. 405, 3049-3062
17. Ger P.A. Bongaerts et al. 2000. Bile acid deconjugation by *Lactobacilli* and its effects

in patients with a short small bowel. *J Gastroenterol* 35:801-804

18. Dufrene, M., and P. Legendre. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67:345-366.
19. Julie Paquet et al. 2000. Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters. *International Dairy Journal* vol. 10(5-6), 391-399
20. Pasetto L, et al. (2018) Micro computed tomography for non-invasive evaluation of muscle atrophy in mouse models of disease. *PLoS ONE* 13(5): e0198089
21. Hsu, Y. J., Huang, W. C., Lin, J. S., Chen, Y. M., Ho, S. T., Huang, C. C., and Tung, Y. T. (2018) Kefir supplementation modifies gut microbiota composition, reduces physical fatigue, and improves exercise performance in mice. *Nutrients* 10.
22. Chen, Y. M., Wei, L., Chiu, Y. S., Hsu, Y. J., Tsai, T. Y., Wang, M. F., and Huang, C. C. (2016) *Lactobacillus plantarum* TWK10 Supplementation Improves Exercise Performance and Increases Muscle Mass in Mice. *Nutrients* 8: 205.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 강원도 청정지역 특화 축산물의 개발 및 브랜드화				
	(영문) Development of the specialized and branded livestock products in Gangwon-Do				
주 관 연 구 기 관	서울대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 서울대학교	
참 여 기 업	(주)서울에프엔비,케이프라이드			(성명) 허철성	
총연구개발비 (2,523,000 천원)	계	2,523,000 천원	총 연 구 기 간	2016. 05. 01 - 2020. 12. 31 (4년 8개월)	
	정부출연 연구개발비	1,870,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	37명
	기업부담금	653,000 천원		내부인원	20명
	연구기관부담금			외부인원	17명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - SCI 논문 9건, 제품화 11건, 특허 출원 및 등록 16건, 학술발표 19건 - 기능성 발효축산물, 치즈 종균 개발 및 풍미증진 기술 개발 - 기능성 작물 부산물 활용 TMR 사료의 한우 급여시험을 통한 생산성 및 TMR 사료 기능성 다변화 연구 - 산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 함유 계육, 계란 생산 체계 확립 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 극대화를 위한 산야초/약용작물 이용 식품천연원료 및 천연 사료첨가제 개발 - 산야초/약용작물 유래 기능성분 고함유 축산물 (유제품, 육제품, 가공제품, 난제품) 개발 - 산야초/약용작물 유래 기능성분과 축산물 시너지 효과 규명 - 브랜드 제품 규격화를 위한 기능성분 정량적 평가기법 확립 - 강원지역 특화 기능성 축산물 브랜드 산업화 - 우유 및 유제품 품질고급화 및 상품화를 위한 핵심기술, 산야초/약용작물 활용 기능성 웰빙 한우 브랜드 개발, 기능성 웰빙 계육 및 계란 생산 기술 개발 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산야초/약용작물의 원물 및 부산물을 활용한 가공식품 및 사료용 천연원료 가공기술 개발로 이용성 확대 - 강원 청정지역 특화 유산종균 확보와 산야초/약용작물과의 발효를 통한 기능성 극대화 기술 개발 - 기능성 천연 사료첨가제를 활용한 가축 생산성 증진 및 신선 축산물 내 전이 극대화를 위한 패키지 기술 완성 - 고기능성 웰빙 축산물 생산을 통한 한국 축산업 경쟁력 확보 및 축산농가 소득 증대 기회 제공 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	316005-5		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	동물자원과학, 축산, 동물사료, 사육		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	강원도 청정지역 특화 축산물의 개발 및 브랜드화		과제유형	개발	
연구기관	서울대학교		연구책임자	허철성	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도		270,000	117,000	387,000
	2차연도		400,000	134,000	534,000
	3차연도		400,000	134,000	534,000
	4차연도		400,000	134,000	534,000
	5차연도		400,000	134,000	534,000
	계		1,870,000	653,000	2,523,000
참여기업	(주)서울에프엔비, 케이프라이드				
상대국	해당사항 없음	상대국연구기관	해당사항 없음		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.02.15

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교	교수	허철성

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

기능성 극대화를 위한 산야초/약용작물 이용 식품천연원료 및 천연 사료첨가제 개발과 산야초/약용작물 유래 기능성분 고함유 축산물 (유제품, 육제품, 가공제품, 난제품) 개발 및 산야초/약용작물 유래 기능성분과 축산물 시너지 효과 규명
브랜드 제품 규격화를 위한 기능성분 정량적 평가기법 확립과 강원지역 특화 기능성 축산물 브랜드 산업화

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

핵심기술 패키지 개발과 시스템 완비로 브랜드 축산물에 대한 소비자 신뢰 회복 및 지속적 품질관리를 통한 기능성 유효물질 정량적 보장 구현이 가능. 이와 함께 강원도 특화 축산물의 가치 증진 및 글로벌화와 고기능성 웰빙 축산물 생산을 통한 한국 축산업 경쟁력 확보 및 축산농가 소득 증가.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

산야초/약용작물 활용 기능성 식품첨가제 및 사료첨가제 제조기술 확보 하였으며 기능성 식품첨가제 활용 축산물 가공식품 제조기술 확보 및 기능성 사료첨가제 활용 가축 사양기술을 확립함.
기능성분 인체 및 가축 체내 전이율 증진 기술 개발하였고 이를 통한 강원 청정지역 특화 발효자원 (유산종균)을 확보함. 또한 정량적 품질관리 기술을 확립함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구팀은 협약시 연구 계획대로 차질없이 연구를 진행하여 각 연차별 연구 수행 완료

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

SCI 논문 9건, 제품화 11건, 특허 출원 및 등록 16건, 학술발표 19건으로 목표대비 우수한 성과를 달성함.

II. 연구목표 달성도

제1세부과제: 산야초/약용작물 활용 우유 및 유제품 품질고급화 및 상품화를 위한 핵심기술 개발

구분	연구개발의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1차년도	기능성 성분 강화 우유 생산 및 미생물 제어기술 개발	20	20	1) 불포화지방산 고함유 우유생산 기술 개발 2) 우유 내 미생물 제어기술 개발
2차년도	고급 우유의 생산화 기반 기술 확립 및 고급 발효유, 치즈 생산을 위한 종균 선발	20	20	1) 불포화지방산 함유 우유의 필드 적용 2) 우유 내 미생물 제어기술 효과 측정 3) 고급 발효축산물, 치즈 생산을 위한 종균 선발
3차년도	발효 축산물, 치즈 종균의 기능성 입증	20	20	1) 마우스 투여시 장내 균종의 변화 2) In vitro 선발균주의 동물시험을 통한 기능성 검증 및 작용기전 규명 3) 마우스 투여 시 혈액 및 혈액 지표 변화
4차년도	기능성 발효 축산물, 치즈 종균 개발 및 풍미증진 기술 개발	20	20	1) 고급 발효축산물 및 치즈발효 종균의 적합성 2) 발효조건에 따른 풍미, 물성 조절제어 기술개발
5차년도	고급 발효축산물의 생산 및 신규 종균 치즈 제조숙성 기술개발	20	20	1) 고급 발효축산물의 생산 2) 신규 종균 치즈 제조 및 숙성
합계		100	100	연구개발의 목표에 맞춰 목표 달성

제2세부과제: 산야초/약용작물 활용 기능성 한우 신선육 개발

구분	연구개발의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1차년도	강원지역 산야초/약용작물 활용 비육우용 사료첨가제화 연구	20	20	○ 보호지방과 함께 고온 단시간 (HTMT; high temperature micro time) 첨가제처리 방법 등 반추위 우회기술 적용여부 조사 ○ 효모/버퍼제 기반의 반추위 pH 안정화 제제 개발 ○ 비육후기 TMR용 사료첨가제 제형 연구
2차년도	한우 생산성 및 기능성분	20	20	○ 한우 도체성적과 혈중 MPT (metabolites)

	전이 효과 검증연구			profile test) 결과를 연계한 생산성 검정 ○ Mass spectrometer를 이용한 한우 신선육 내 기능성분 전이 효과 검증 기법 확립 ○ 기능성분 규격화 지표 설정 ○ 품질검사 표준 프로토콜 (SOP) 설정
3차년도	한우 비육기 기능성 사료 첨가제 개발 및 급여프로그램 확립	20	20	○ 반추위 pH 안정화 제제에 대한 in vitro 및 in vivo 효과 검정 ○ 반추위 우회 기능성 사료첨가제 및 반추위 pH 안정화 제제가 혼합된 TMR 급여 비육후기 사양시험 진행 ○ 가축 생산성 및 우육 내 기능성분 전이 효과 검정 ○ 기능성 한우 신선육 생산 표준 사양체계 설정 ○ 추가 기능성 항목 조사: 오메가 지방산 균형, 베타인 강화육, 가공육에서 변화 등
4차년도	산야초를 이용한 기능성 한우 생산 및 오메가 지방산 등 기능성 다변화 연구	20	20	○ 산야초를 이용한 기능성 한우 상업적 생산 및 필드조건에서의 기능성 검정 ○ 추가기능성 항목선정: 오메가 지방산 균형육/ 베타인이 강화된 고급육, 신선육을 활용 가공육 등 ○ 추가기능성을 구현하기 위한 사료첨가제 개발 및 급여실험 ○ 추가기능성 물질의 우육내 전이효율 연구
5차년도	산야초와 오메가 지방산 등 추가기능성 첨가제를 활용한 고급 기능성 한우 생산	20	20	○ 산야초첨가제와 추가기능성첨가제 조합의 성능검증 ○ 필드에서 최종 기능성 물질의 전이효율 검정
합계		100	100	연구개발의 목표에 맞춰 목표 달성

제3세부과제: 산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 함유의 고급, 기능성 웰빙 계육 및 계란 생산 기술 개발

구분	연구개발의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
----	----------	--------	---------	------

1차년도	산야초/부산물 유효성분 검증 및 사료 제형화 기술 개발	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체외 세포배양을 통한 유효성분 활성 분석 ○ 산야초/부산물 사료 제형화 기술 개발 ○ 산야초 및 산야초 부산물 사료첨가제 투여 후 생산성 검증
2차년도	산야초/부산물 급이 계육, 계란 내에서의 유효성분 검증 규격화 프로토콜 확립	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효성분 분석 체계 및 분석 규격화 프로토콜 확립 ○ 생산된 계육, 계란내 유효성분 분석 및 활성 검증 ○ 분석 및 검증 결과를 반영, 유효성분 일관성 및 재현성 확립 ○ 기능성 계육, 계란 생산을 위한 규격화 총프로토콜 확립
3차년도	산야초/부산물 사료첨가제 활용 체계 확립	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 조합 산야초/부산물 발굴 ○ 생리활성물질 함유 사료첨가제 제형 검증 ○ 최적 조합의 사료 내 여타 첨가제와의 시너지 효과 검증 ○ 사료형태 (펠릿, 가루 등)에 따른 유효물질 activity standard 검증
4차년도	산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 함유 계육, 계란 생산 체계 확립	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사료 형태에 따른 계육, 계란내 유효물질 최적 activity standard 확립 ○ 산야초/부산물 사료첨가제 대량 생산 실용화 검증 ○ 산업화를 위한 기술 패키지화 (사료첨가제 제형 및 규격화, 계육/계란내 유효성분 검출에 대한 기술 패키지화)
5차년도	산야초 활용을 통한 생리활성 천연물 함유 계육, 계란 산업화	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생리활성물질 함유 사료첨가제 제형 대량 생산 시스템 확립 ○ 산야초/부산물 기능성 계육, 계란 산업화 및 브랜드화
합계		100	100	연구개발의 목표에 맞춰 목표 달성

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

최종목표인 강원지역 산야초/약용작물 활용을 통한 고품질 기능성 축산물 개발 및 브랜드화에 연구개발을 진행하여 기능성 극대화를 위한 산야초/약용작물 이용 식품천연원료 및 천연 사료첨가제 개발연구와 산야초/약용작물 유래 기능성분 고함유 축산물 (유제품, 육제품, 가공제품, 난제품) 개발, 발효식품 유래 발효유제품 자연 종균개발 및 그를 이용한 발효유제품 (치즈, 발효유) 상업화와 산야초/약용작물 유래 기능성분과 축산물 시너지 효과 규명하였음. 이와 함께 기술이전을 진행하여 목표 매출 이상을 달성하고 SCI 논문 9건, 제품화 11건, 특허 출원 및 등록 16건, 학술발표 19건으로 초과성적을 달성한 지표가 있음. 이에 연구기간내 우수한 연구개발결과를 도출함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

정량적 지표에서 연구종료 후 목표한 결과가 존재함. 이에 본 연구 종료 후에도 성과를 달성할 예정임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구팀은 협약시 계획대로 차질없이 연구를 진행하여 5차년도 연구 마감일(20.12.31)까지 연구비 사용과 연구 진행이 충분히 잘 수행되었음. 자세한 내용은 최종보고서에 전체적 연구 내용 기술함.

IV. 보안성 검토 (해당사항없음)

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	12	8	-	7	-	8	55	-	6	-	-	9	8	-	14	16	16			
연구기간내 달성실적	10	6	6	2		11	39 2		9			9	1		19	18	17			
달성율(%)	83	75		28		13 7	71 2		15 0			-	-		13 5	11 2	10 6			

4. 핵심기술

구분	6핵심기술명
①	풍미 생산성이 우수한 치즈 스타터 종균
②	오메가 지방산의 균형과 베타인이 강화된 기능성 돈육 및 가공육 생산과 그 생산방법
③	항-염증 활성이 우수한 페디오코커스 악시딜락티시 LDTM 5201 신균주(KCTC 13563BP)
④	한국 유아 분변 유래의 베타-갈락토시데이즈 활성이 우수한 신규 균주 비피도박테리움 애니멀리스 LDTM8101
⑤	니신 Z 생산능이 우수한 락토코커스 락티스 서브스페이스 락티스 LDTM6804 신균주
⑥	브로콜리 부산물을 이용한 발효사료 및 이의 제조방법
⑦	생리활성물질이 함유된 계란 생산용 가축 사료첨가제 조성물
⑧	메치오닌수산화물을 이용한 가축용 사료조성물 및 이의 제조방법
⑨	한국 토종종균 혼합조성물을 이용한 고다치즈 제조방법
⑩	닭의 대흉근으로부터 확립된 근아섬유세포주 및 이를 이용한 생리활성물질 스크리닝 방법
⑪	반추동물용 사료를 활용한 불포화지방산 고함유 우유 생산 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)						
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장으로 해	결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v					
②의 기술		v					v					
③의 기술		v					v					
④의 기술		v					v					
⑤의 기술		v					v					
⑥의 기술		v					v					
⑦의 기술		v					v					
⑧의 기술		v					v					
⑨의 기술		v					v					
⑩의 기술		v					v					
⑪의 기술		v						v				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	풍미 생산성이 우수한 치즈 스타터 중균 개발 기술로 활용 가능
②의 기술	오메가 지방산의 균형과 베타인이 강화된 기능성 돈육 및 가공육 생산과 그 생산방법을 활용하여 돈육 및 가공육 생산 기대
③의 기술	항-염증 활성이 우수한 페디오코커스 악시덜락티시 LDTM 5201 신균주로 본 기능성에 대한 균주의 분리 및 검증법 확립
④의 기술	한국 유아 분변 유래의 베타-갈락토시테이즈 활성이 우수한 신규 균주 비피도박테리움 애니멀리스 분리 및 검증법 확립
⑤의 기술	니신 Z 생산능이 우수한 락토코커스 락티스 서브스페이스 락티스 신균주 분리 활용 가능
⑥의 기술	브로콜리 부산물을 이용한 발효사료 및 이의 제조방법 확립 및 추후 적용 가능
⑦의 기술	생리활성물질이 함유된 계란 생산용 가축 사료첨가제 조성물 배합법 활용
⑧의 기술	메치오닌수산화물을 이용한 가축용 사료조성물 및 이의 제조방법 활용
⑨의 기술	한국 토종중균 혼합조성물을 이용한 고다치즈 제조방법 추후 생산시 적용
⑩의 기술	닭의 대홍근으로부터 확립된 근아섬유세포주 및 이를 이용한 생리활성물질 스크리닝 방법으로 가금산업에 적용 가능
⑪의 기술	반추동물용 사료를 활용한 불포화지방산 고함유 우유 생산 기술로 매출액 증가

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실 시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용)
	특 허	특 허	품 종	건 수	기 술	제 품	매 출	수 출	고 용	투 자		논문		학 술			정 책	홍 보	
												SC	비 문						

	출원	등록	등록	료	화	액	액	창출	유치	I	SC I	평균 IF	발표	명	활용	전시	등)
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	건	건	건	건	명			
가중치																	
최종목표	12	8	-	7	-	8	55	-	6	-	-	9	8	-	14	16	16
연구기간내 달성실적	10	6	6	2		11	39		9*			9	1		19	18	17
연구종료후 성과창출 계획		4					84		2								
							5										

*고용창출의 경우 기존 연구종료 후 성과창출 계획 이상을 달성 완료.

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	불포화지방산강화우유		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2017-12-12 완료	실용화예상시기 ³⁾	2018 제품 판매 실시
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	비영리법인 직접 실시		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.