

도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 최적 조건 개발

(Development of optimum conditions for the production of enzyme from slaughterhouse rumen contents)

경북대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 최적 조건 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 11월 일

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 김 은 중

연 구 원 : 이 도 형

연 구 원 : 우 예 진

요 약 문

I. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 최적 조건 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 전 세계적인 사료원료 가격 상승과 조사료 자원의 가격 상승으로 인하여 우리나라 축산업계는 매우 어려운 시점이다. 이러한 이유는 국내 축산업의 생산비 경제성에 있어 사료비가 차지하는 비중이 다른 요인들에 비하여 상대적으로 매우 높기 때문이다. 가축 산업의 경제성 확보를 위하여 여러 가지 부산물을 사료로 활용하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 그 대체효과에 대해서는 아직 많은 연구를 필요로 한다. 부존사료 자원의 활용 및 반추위 기능 유지와 향상에 적합한 자원으로 도축반추위액을 들 수 있다. 도축부산물 중 하나인 도축 반추위 내용물은 보조사료로서 사용이 가능하며 2008년 개정된 사료관리법을 통하여 위해사료에서 제외됨에 따라 보조사료 뿐만 아니라 사료원료로서도 사용이 가능하다. 전국적으로 축우의 도축장 수는 약 170여개가 있고, 전국적으로 일일 약 2,500두 이상의 소가 도축되고 있으며, 도축 과정에서 발생하는 부산물인 반추위 내용물은 전국적으로는 일일 120톤 그리고 연간 약 35,000톤에 이른다. 도축 반추위 내용물에는 반추위 기능을 유지하고 개선하는데 필요한 다양한 미지 성장인자 뿐만 아니라 도축 직전까지 반추위미생물이 생산하는 다양한 효소들이 잔류하고 있어, 효소제로서의 가치가 매우 우수하다. 실제 반추동물에 있어 섬유소 분해효소, 전분 분해효소 및 자일란 분해효소와 같은 효소제의 사료 첨가 급여는 반추위내 영양소 이용효율을 향상시켜 가축의 생산성을 증가시킬 수 있다. 또한 효소제는 사료첨가제 외에 제지산업, 바이오연료 산업 등의 다양한 산업분야에서 응용이 가능하기 때문에 향후 도축 반추위 부산물을 이용한 효소제의 개발은 다양한 분야에서 그 활용도가 높다고 볼 수 있다. 이에 본 연구에서는 기존에 폐기물로 처리되는 도축 반추위 내용물을 이용하여 산업적으로 유용한 고부가가치 효소제를 생산하고 이를 효율적으로 수행할 수 있는 시스템 개발에 필요한 기초적인 요인들을 분석하고 최적화 조건들을 도출하려 하였다. 따라서 본 연구와 같이 폐기되는 자원의 재활용 및 재순환 그리고 대체 에너지 생산을 위한 기초 자료 구축 연구는 녹색 산업 및 지속가능 축산업 발전에 초석과도 같은 연구이며, 무엇보다도 환경에 큰 관심과 노력이 기울여지는 현시대에 있어 매우 필요하며 가치 있는 연구라 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. **국내 발생 도축 반추위 내용물의 특성조사:** 지역별, 계절별 발생하는 도축 반추위 내용물의 효소 생산 원료적 특징 조사(효소활성, 생산효소 종류)
2. **생산 가능한 효소제의 종류 파악:** 도축 반추위 내용물을 이용한 효소별 활성 평가 (cellulase, xylanase, amylase)
3. **도축 반추위 내용물의 직접적 이용을 통한 효소제 생산 기반 확보:** 제형화 조건에 따른 효소제 활력 평가
4. **효소제 생산 효율 증진을 위한 방안 설정:** 효소 생산 효율 향상을 위한 부수적인 탄소원의 최적화 및 발효 조건 설계를 위한 발효기간별 효소 생산 역학 조사
5. **도축 반추위내용물을 이용한 최적 효소제 생산 조건 개발 및 효율 평가:** 도축 반추위 내용물을 이용한 발효기 운영 및 생산 효소제의 활력 평가

IV. 연구개발결과

도축 반추위 내용물을 이용하여 반추동물 사료첨가용 효소제로서 활용하기 위하여 도축 반추위의 특성을 조사하였다. 그 결과 자일란 분해효소와 전분 분해효소의 활력은 우수하였으나 섬유소 분해효소는 비교적 활성이 낮게 나타났다. 도축 반추위 내용물의 직접적인 이용을 위하여 단순 열건조 과정을 적용하였고, 열건조 조건 중에서 가열 온도와 가열 시간 그리고 부형제의 첨가 비율의 효과를 분석하였다. 그 결과 자일란 분해효소는 열에 대하여 비교적 안정하게 나타났으며, 섬유소 분해효소와 전분 분해효소의 활성은 열에 대하여 안정하지 못하였다. 건조를 통한 도축 반추위 내용물 제형 조건은 생산을 목적하는 효소의 특징에 따라서 다르게 나타났다. 자일란 분해효소의 생산 목적에는 온도 90℃에서 12시간 동안 22%의 부형제 함량으로 건조하는 것이 가장 우수하였다. 섬유소 분해효소는 60℃의 온도에서 12시간 동안 12%의 부형제, 전분 분해효소는 60℃의 온도에서 12시간 동안 33%의 부형제에서 제형하는 것이 가장 우수한 효소활성을 기대할 수 있었다.

도축 반추위 내용물의 발효에 있어 부수적인 영양소원의 첨가가 효소생산에 미치는 효과를 조사하였다. 섬유소, 자일란 및 전분을 기질로 사용하여 도축 반추위 내용물 발효에 첨가한 후 배양 후의 효소활성을 평가한 결과 섬유소와 자일란을 각각 1:1의 비율로 0.1%의 수준으로 첨가하는 것이 가장 우수한 효소 생산효율을 나타내었다. 발효기 운전 조건을 조사하기 위하여 도축 반추위 내용물을 serum bottle에 넣고 6일간 정치 배양하며 시료를 채취하여 효소활성을 분석한 결과 모든 효소에서 활성이 배양 1일차부터 급격하게 떨어졌다. 최종적으로 HRT 4일, 섬유소 0.5 g/L, 자일란 0.5 g/L, 도축반추위액을 매일 투여하며 7일간 발효기를 운전한 결과, 자일란 분해효소는 약 1,000 Unit, 전분 분해효소는 약 1,000 Unit 그리고 섬유소

분해효소는 약 300 Unit로 생산이 가능하였다. 이상의 결과들은 도축 반추위 내용물을 더 이상 폐기물로 처리하지 않고 가축 사료 첨가용 효소제의 생산 기질로 재활용하는 것이 가능한 것으로 나타났으며, 반추위 내용물에 포함된 다양한 미지영양인자까지 고려하면 반추동물 사료효율 개선 및 생산성 향상에 있어 우수한 사료첨가제로서 작용할 것으로 판단된다. 또한 향후, 생산된 도축 반추위 내용물을 제형화 과정을 거친 후 실제 반추동물에게 급여하여 고기 생산 및 우유 생산성에 미치는 효과를 분석하여 개발된 기술의 효능을 검증하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구는 기존에 폐기물로 버려지는 도축 반추위 내용물을 이용하여 발효 및 건조 과정을 거쳐 가축의 사료 이용성 및 생산성 향상을 위한 사료첨가제로서 개발하는 것이다. 일련의 연구를 통하여 얻어진 결과들은 특허 출원을 통하여 지적 재산을 확보할 예정에 있으며, 지적 재산권 획득 절차가 진행 된 후에 국내·외 학술 저널에 발표할 예정에 있다. 산업화를 위하여 연구 결과로 얻어진 기술들을 사료첨가제 제조 회사와 기술이전 계약을 체결한 후에 대량 생산 조건 확립, 사료첨가제 시제품 제작 및 가축 급여를 통한 효능 검증 시험을 수행할 예정에 있다. 본 연구를 통하여 얻어진 결과는 기존에 버려지는 자원에 대한 재활용을 넘어서 새로운 고부가가치 물질의 생산의 의미가 더 크며, 산업적인 활용 가치 또한 매우 높다고 할 수 있다.

SUMMARY

In Korea, animal industry has been suffering for rising inflation of grain and roughage for feed because feed cost takes much part of total cost for animal production. Therefore, development of new cheap resources for feedstuff is important for securing economical feasibility of animal products in Korea.

In this research, slaughterhouse rumen content (SRC) was studied as an economical feed resource. SRC had been treated as a waste unable to recycle for feed material for animal until a few years ago. However, recently SRC was reconsidered as potential feed resources and was finally permitted to use for animal feed or feed additive materials by the revision of Feed Management Regulations in 2008. In Korea there are approximately 170 slaughterhouses operated and the amount of SRC per a day and a year reach 120 ton and 35,000 ton, respectively. It is reported that SRC contains many unknown growth factors, promoting rumen function, and various digestive enzymes. The benefit of using SRC as feed resources or feed additives in ruminant animal can be found in numerous research articles. Moreover, enzymes such as cellulase, xylanase and amylase are to be used effectively in other industrial fields including pulp, textile and bio-fuel. Therefore, SRC which had been considered as highly concentrated pollutant can be a good resource for animal industry, and the meaning of this application can be aimed at re-use of renewable waste and be thought to create added value to animal industry in Korea.

The present study was conducted to develop effective techniques for the production of enzyme-rich feed additives using SRC. First, available enzymes in SRC were investigated from SRC. Both xylanase and amylase activities were detected at higher level, but cellulase was relatively lower than xylanase and amylase. Then we tested various drying conditions for formulation of SRC to use it directly. In terms of materials and methods, heating temperature, heating duration and filler addition levels were used as variables and their three levels were assigned to total 45 experimental runs (triplicates repeating blocks) according to Box-Behnken experimental design (BBD), a fractional factorial design. Heating temperatures were varied from 60°C to 90°C, heating duration were ranged from 12 h to 48 h and filler addition levels were varied from 12%(w/w) to 33%. Enzyme activities from each experimental run were measured and used for responses of experimental system. The responses were calculated using response surface model and

optimization process was employed to simulate optimum conditions using fitted response surface model. For maximum production of xylanase from SRC, 90°C (heating temperature), 12 h (heating duration) and 22% (filler level) were detected as optimum conditions. For cellulase, optimum conditions were calculated as 60°C, 12 h, 12%, and for amylase activity the condition was detected as 60°C, 12 h, 33%. Interestingly, xylanase from SRC showed heat resistant feature, which can be advantageous for the application, because heat treatment during formulation process while preparing feed additives can damage enzyme activity. Additional carbon sources that can improve enzyme activity were tested. Cellulose, xylan and starch were used for variables and BBD with 15 runs was employed. Through response surface model analysis, mixture of cellulose and xylan in the ratio of 1:1 presented the highest enzyme activities in all enzymes. SRC was incubated for 7 days in order to calculate hydraulic retention time (HRT), an input and output volume. All enzymes were sharply dropped with incubation time. Finally, SRC fermenter was operated for a week under the following conditions: working volume 2 L, HRT -4 days, adding cellulose 0.5 g and xylan 0.5 g per 1 liter of feed stock. Enzyme activities were slightly decreased until 4 days of incubation and it became stable after that. Average activity at stable periods for xylanase was approximately 1,000 U, for cellulase it was 300 U and for amylase it was 300 U.

As a result, SRC can be a useful feed additives enriched with digestive enzyme activities for feed digestion in ruminant. For industrialization, development of mass production process and verification of the products using animal feeding study should be followed as a further research.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	9
Paragraph 1. Research background	9
1. Shortage of feed resources	9
Paragraph 2. Necessity	15
Paragraph 3. Target	16
Chapter 2. Status of market and technical development	17
Paragraph 1 Technical status	17
Paragraph 2 Market status and economical impact	18
Chapter 3. Research results	20
Paragraph 1. Materials and methods	20
1. Characteristics of slaughterhouse rumen content and available enzyme	20
2. Direct application of SRC	21
3. Improvement of enzyme production	24
4. Operation of SRC fermentation system	28
Paragraph 2. Results	30
1. Characteristics of slaughterhouse rumen content and available enzyme	30
2. Direct application of SRC	31
3. Improvement of enzyme production	41
4. Operation of SRC fermentation system	47
Paragraph 3. Conclusion	49
Chapter 4. References	51

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제 1 절 연구개발 배경	9
1. 부존 사료자원의 부족	9
제 2 절 연구개발의 필요성	15
제 3 절 연구개발의 목표	16
제 2 장 국내·외 기술개발 현황 및 시장 현황	17
제 1 절 국내·외 기술 개발 현황 분석	17
제 2 절 개발 기술의 시장 현황 및 경제적 효과	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절 연구 방법	20
1. 국내 도축 반추위 내용물의 특성 조사 및 생산 가능한 효소 조사	20
2. 도축 반추위 내용물의 직접적 이용을 통한 효소제 생산 기반 확보	21
3. 효소제 생산 효율 증진을 위한 방안 설정	24
4. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 발효기의 운전	28
제 2 절 연구결과	30
1. 국내 도축 반추위 내용물의 특성 조사 및 생산 가능한 효소 조사	30
2. 도축 반추위 내용물의 직접적 이용을 통한 효소제 생산 기반 확보	31
3. 효소제 생산 효율 증진을 위한 방안 설정	41
4. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 발효기의 운전	47
제 3 절 종합 결론	49
제 4 장 참고문헌	20

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 배경

1. 부존 사료자원의 부족

- 최근 전 세계적인 사료원료 가격 상승과 조사료 자원의 가격 상승으로 인하여 우리나라 축산업계는 매우 어려운 시점이다. 이러한 이유는 국내 축산업의 생산비 경제성에 있어 사료비가 차지하는 비중이 다른 요인들에 비하여 상대적으로 매우 높기 때문이다. 가축 산업의 경제성 확보를 위하여 여러 가지 부산물을 사료로 활용하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 그 대체효과에 대해서는 아직 많은 연구를 필요로 한다.
- 조사료는 축산업, 특히 반추동물 산업에 있어서 매우 중요한 사료자원이다. 초식동물인 반추동물은 고기나 우유와 같은 축산물 생산에 필요한 에너지 대부분을 조사료에서 충당하며, 원활한 조사료의 공급은 반추위의 안정성을 확보하는데 큰 도움을 준다. 그러나 조사료 위주의 반추동물 사양은 축산물 생산성이 우수한 고능력우의 경우에는 가축의 유전적 능력을 충족해 주지 못한다. 이러한 이유로 인해 현대 축산업은 배합사료 위주의 사양방식으로 전환되어 있으며, 배합사료 위주의 사양은 결과적으로 축산물 생산에 있어 그 생산비를 높이는 큰 요인으로 작용하고 있다(Kwon, 2008).
- 반추동물의 경우, 위에서 언급한 것과 같이 원활하고 안정적인 반추위 기능 확보를 위해서는 배합사료의 급여비율을 최대한 낮추고 조사료의 사료 내 비중을 높여야 한다. 반추가축인 한우와 젖소를 배합사료 위주로 사육하는 현실은 하루 빨리 시정되어야 하며, 양질 조사료의 자급이 시급한 때이다. 그러나 국내 조사료생산용 초지 재배면적은 1990-2004년 15년 동안 181,000 ha에서 66,000 ha로 약 63.54% 가량 줄었으며, 같은 기간 초지면적은 90,000 ha에서 46,000 ha로 약 48.89% 가량 감소하였다. 한국은 2000년대 이후 약 66만 톤을 해마다 수입하고 있으며, 이로 인하여 높은 사료비로 인한 생산비 부담이 사료가격 불안정화를 야기하고 있다(Choi, 2006). 수입사료 대체 조사료원인 볏짚은 조사료 자급률을 높이는 기는 하지만, 소화흡수율과 영양소 함량 및 기호도가 낮은 문제점이 존재한다(Lee, 2000). 따라서 한국의 많은 농가들은 조사료 급여 대신 농후사료를 과다 급여하는 축산업의 형태를 유지하고 있다.

- 반추위 내 미생물의 활동, 특히 섬유소 분해 미생물의 활력을 향상시키기 위해서는 반추위 내용물의 산도가 적정범위(pH 6.2 - 6.8)을 유지해야만 한다. 이러한 반추위 pH 안정화에 있어 조사료의 급여는 큰 도움을 준다. 급여된 조사료는 소의 타액 분비량을 증가시키고, 타액에 포함되어 있는 완충용액들이 반추위로 유입되면서 반추위의 pH 안정화를 도와주게 되고, 반추위액의 산성화를 억제하게 된다.
- 그러나 조사료의 급여가 원활하지 못하거나 과도한 농후사료를 급여하게 되면 전분 분해 미생물의 활력이 향상되고, 이러한 미생물의 최종 대사산물인 젖산이 반추위내 축적되면서 반추위액의 산도는 급격히 저하된다. 반추위액의 산도가 pH 6.0 이하로 낮아지게 되면 섬유소 분해 미생물의 활력은 급격히 낮아지고, 결국 사료 소화 기능을 수행하지 못하게 된다. 이러한 현상이 지속되면 반추위의 기능이 실질적으로 정지되며, 반추동물은 산중독증에 걸려, 생산성 저하 및 급성의 경우 폐사에 이를 수도 있다(Gilliland 등, 1985; Girard와 Dawson, 1993; Hungate 등., 1952; Slyeter, 1976; Mackie and Gilchrist, 1979). 반추위액의 산성화는 산중독증을 유발시키고, 위점막을 손상시키며 간농양이 유발되는 동시에 고창증을 비롯한 여러 가지 대사성 질병으로도 발전된다. 그러나 반추위의 기능적 안정성만을 고려하여 조사료 위주의 사양을 지속하면 공급되는 영양소 수준이 가축이 가지고 있는 유전적 능력에 미치지 못하여 결국 생산성이 저하되게 된다. 이에 반추위 기능을 적절하게 유지시키며, 쉽게 이용될 수 있는 영양소를 공급하거나 영양소의 이용 효율을 향상시키는 기술이 필요하다.
- 부존사료 자원의 개발 및 반추위 기능 유지와 향상에 적합한 자원으로 도축반추위액을 들 수 있다. 최근 도축부산물 중 하나인 도축 반추위 내용물은 보조사료로서 사용이 가능하며 2008년 개정된 사료관리법을 통하여 위해사료에서 제외됨에 따라 보조사료 뿐만 아니라 사료원료로서도 사용이 가능하다.
- 전국적으로 축우의 도축장 수는 약 170여개가 있으며, 전국적으로 일일 약 2,500두 이상의 소가 도축되고 있다. 이 중 약 36%에 해당하는 900여두가 서울과 경기도 지역에서 도축되고 있으며, 경상도에서 약 23%에 해당하는 580여두가 도축되고 있다. 도축 과정에서 발생하는 부산물인 반추위 내용물은 두당 약 50kg 정도가 발생하며, 전국적으로는 일일 120톤 그리고 연간 약 35,000톤이 발생된다.
- 이러한 도축 반추위내용물은 생물학적 산소요구량이 약 25,000 ppm으로 고농도 유기성 폐

자원으로 구분되며, 단위 중량당 오염 부하량이 높은 심각한 환경오염 물질로 인식되어져 왔다. 또한 현재에는 거의 대부분의 도축장에서 처리비용을 지불하며 도축 반추위 내용물을 폐기하고 있는 실정이다. 도축 반추위 내용물의 폐기비용은 톤당 약 15만원 정도가 소요되며, 전국규모 일일 약 1,700만원이 소요되는 것으로 추정된다. 이것은 연간 52억원에 해당하며, 도축부산물의 세척을 위한 폐수 처리비용(톤당 약 3,000원)까지 합치면 처리비용은 더욱 증가한다. 따라서 지속적인 축산업의 발전과 환경오염 기여도가 낮은 친환경 축산업의 구축을 위해서는 도축과정에서 발생하는 반추위 내용물의 효율적인 처리 및 재활용 방법의 연구개발이 반드시 수행되어져야만 한다.

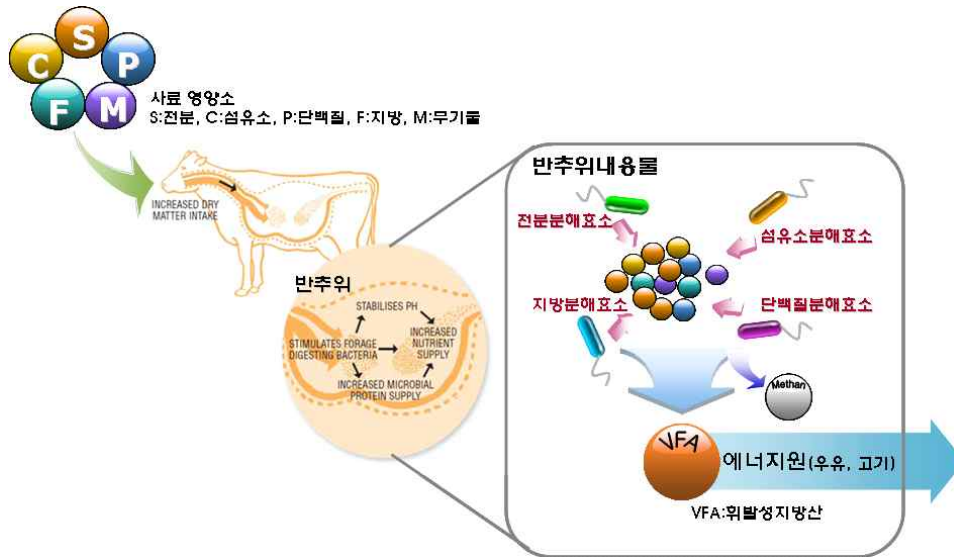


< 축산업 발전과 도축 반추위 내용물의 발생 >

- 초식동물인 반추동물은 풀과 같은 조사료를 주로 섭취하며 반추위내 미생물들로부터 분비되는 효소에 의하여 조사료 내 섬유소 성분들이 휘발성 지방산으로 분해, 전환된다. 이러한 과정을 통하여 생성된 휘발성 지방산은 반추동물의 에너지원으로 작용하고 우유와 고기와 같은 축산물을 생성하게 된다. 그러나 반추동물의 생산성을 향상시키기 위한 목적으로 전분 함유량이 상대적으로 높은 곡류사료(농후사료)들의 급여비율이 높아지고 있고, 조사료의 급여비율은 감소하고 있다.
- 현재 도축되는 반추동물의 반추위 내용물에는 섬유소 분해효소 및 전분 분해효소 뿐만 아니라 다양한 영양소 분해효소들이 존재하고 있다. 그리고 이러한 효소들을 생성할 수 있는

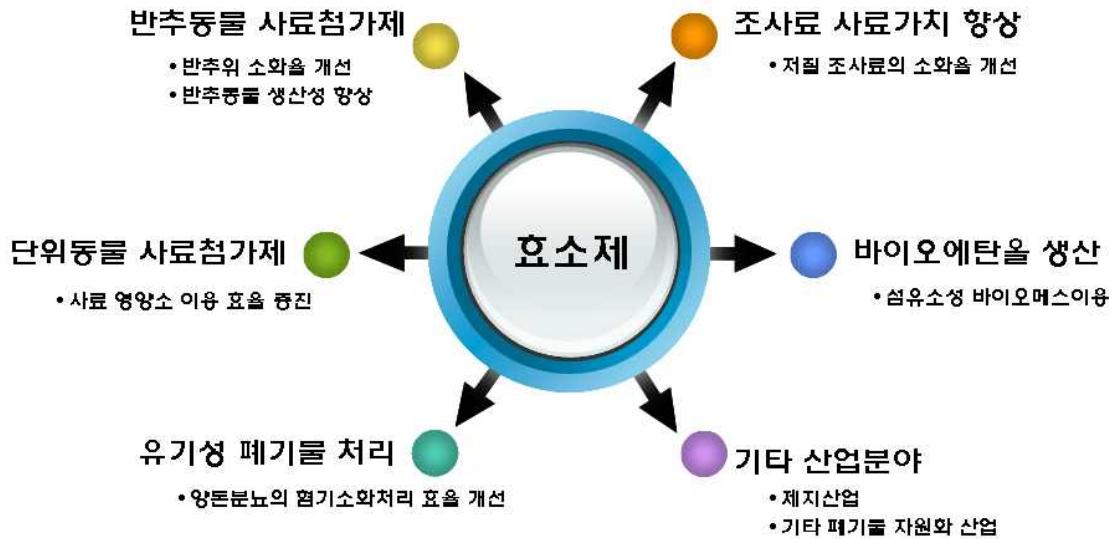
우수한 미생물 바이오메스를 가지고 있다. 반추위 내용물은 건물기준 조단백질, 조섬유 및 조지방 함량이 각각 21.1%, 20.4% 및 13.7%로 미처 소화되지 않은 영양소가 매우 높은 농도로 잔류하고 있다. 또한 반추위 내용물에 포함된 미생물들은 도축 직후에도 그 활력을 잃지 않고 일정 기간 유지할 수 있다. 따라서 도축 후 얻어지는 반추위 내용물을 수거한 후에 일정 기간 온도와 혐기상태(산화환원전위)를 유지하면 반추위 미생물들의 활력이 유지되고 다양한 효소를 높은 효율로 생산할 수 있다.

- 특히 도축 반추위 내용물의 경우, 반추위 미생물의 미지성장인자들을 함유하고 있어 반추위 기능 향상에 큰 도움이 되는 것으로 보고된 바 있다(Kim 등, 2000). 실제 도축 부산물로 얻어진 반추위 내용물을 단순 건조하여 면양사료에 4%까지 첨가한 결과, 사료섭취량, 일당 증체율 등에는 아무런 영향을 미치지 않는다고 하였고(Salinas-Chavira 등, 2007), 비육우의 경우 조사료의 30%까지 건조된 반추위 내용물을 사용할 수 있는 것으로 보고되었다(Rincon 등, 2010). 반추동물사료 외에도 양계사료 내 옥수수의 37.5%까지 건조된 반추위 내용물로 대체할 수 있는 것으로 보고되었다(Adeniji 과 Jimoh, 2007). 반추위 내용물은 수분함량이 높고, 젖산균이 포함되어 있어 사일리지 원료로도 이용될 수 있다. 반추위 내용물에 밀짚과 당밀을 혼합하여 60일간 발효시켜 제조된 사일리지를 반추동물에게 급여한 결과, 기존에 사용되던 TMR의 50%까지 대체가 가능하다고 보고하였다. 또한 반추위 내용물은 사료첨가용 생균제인 *Aspergillus oryzae*의 배양원료로도 사용된 바 있다(Kim 등, 2000). 따라서 도축 반추위 내용물의 적절한 활용 방법 개발은 부존사료 자원의 개발과 고능력우를 위한 농후사료 위주의 사양에 있어 반추위 기능을 안정화 시킬 수 있는 유용한 자원으로서 그 가치가 높을 것으로 판단된다. 특히 도축 반추위액에는 반추동물이 섭취한 사료자원을 분해할 수 있는 다양한 소화효소가 존재하여 효소제 개발의 원료로서도 훌륭하다고 볼 수 있다.



<도축 반추위 내용물에 포함된 다양한 효소>

- 반추동물에 있어 섬유소 분해효소, 전분 분해효소 및 자일란 분해효소와 같은 효소제의 사료내 첨가는 반추위내 영양소 이용효율을 향상시켜 가축의 생산성을 증가시킬 수 있다. 섬유소 분해효소의 첨가급여는 섬유소 이용률을 높이고, 반추위내 미생물태 단백질의 합성을 증진시키며 단백질 분해율을 향상시킨다고 보고되었다(Eun 등, 2007; Kung 등, 2002). 전분 분해효소의 첨가급여는 급여되는 사료의 전분 분해효율을 향상시키고, 착유우에 있어 유생산량 증가와 비육우의 일당 증체량 증가의 효과가 보고된 바 있다(Klingerman 등, 2009; Tricarico 등, 2007).
- 이와 같이 효소제는 축산업의 사료 및 사료첨가제 산업 외에 매우 다양한 산업분야에서 응용이 가능하며, 보다 경제적인 방법으로 효소제를 생산하기 위한 연구가 지속적으로 수행되어져 오고 있다. 효소제는 현재 축산업 및 바이오에너지 분야에서 다양하게 사용되고 있다.

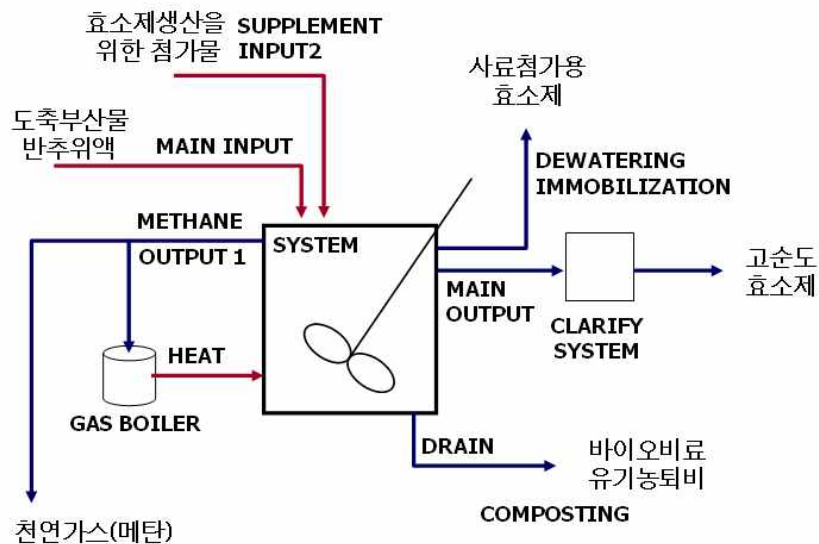


<효소제의 활용 산업 분야>

- 가축에게 급여되는 효소제는 소화기관내에서의 영양소 이용효율을 개선시킴으로서 가축의 생산성을 향상시키고, 또한 영양소의 이용효율이 증진됨으로 인하여 분 중으로 배출되는 미소화 영양소 함량을 낮추어 궁극적으로는 분, 노의 배출로 인한 환경오염을 저감 시킬 수 있다. 또한 효소제는 사료자원의 영양학적 가치 향상에도 기여할 수 있다.
- 현재 국내에서는 사료자원의 부족으로 인하여 축산물 생산비 증가 및 국내 축산물의 경쟁력 약화 등이 문제점으로 대두되고 있다. 이러한 현실에서 국내에서 수급이 가능한 사료자원, 특히 조사료자원의 사료적 가치를 향상시킬 수 있는 방법의 도출은 매우 중요한 부분이다. 사료적 가치가 낮은 부존 사료자원의 가치 향상 방법으로 효소제의 활용이 가장 효율적인 것으로 알려져 있다. 그러나 실질적으로 이러한 효소제들은 가격이 매우 높아 그 사용이 매우 제한적이다. 따라서 경제적인 효소제의 생산 및 보급은 국내 축산업의 경제적 상태 개선 및 축산물의 경제적 경쟁력 확보에 있어 꼭 필요하다.

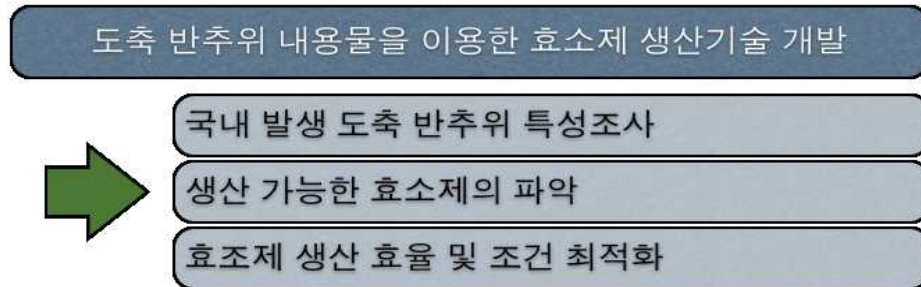
제 2 절 연구개발의 필요성

- 기존에 상당한 비용을 지불하고 폐기되는 도축 반추위 내용물은 다양한 미생물 바이오메스를 포함하고 있는 에너지가 높은 우수한 유기성 자원임에 틀림없다.
- 도축 반추위 내용물에는 다양한 효소를 생산할 수 있는 반추위 미생물들과 효소 생산을 위한 미생물들의 먹이원이 되는 사료입자들이 풍부하게 존재한다. 따라서 기본적인 조건들을 갖추어 주면 높은 수준의 효소를 지속적으로 생산할 수 있는 잠재적 가치를 보유하고 있다.
- 이에 본 연구에서는 기존에 폐기물로 처리되는 도축 반추위 내용물을 이용하여 산업적으로 유용한 고부가가치 효소제를 생산하고 이를 효율적으로 수행할 수 있는 시스템 개발에 필요한 기초적인 요인들을 분석하고 최적화 조건들을 도출하려 한다.
- 따라서 본 연구와 같이 버려지는 자원의 재활용 및 재순환 그리고 대체 에너지 생산을 위한 기초 자료 구축 연구는 녹색 산업 및 녹색 축산업 형성에 초석과도 같은 연구이며, 무엇보다도 환경에 큰 관심과 노력이 기울여지는 현시대에 있어 매우 필요하며 가치 있는 연구라고 사료된다.



<도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 시스템>

제 3 절 연구개발의 목표



1. 국내 발생 도축 반추위 내용물의 특성조사
 - 지역별, 계절별 발생하는 도축 반추위 내용물의 효소 생산 원료적 특징 조사(효소활성, 생산효소 종류)
2. 생산 가능한 효소제의 종류 파악
 - 도축 반추위 내용물을 이용한 효소별 활성 평가(cellulase, amylase, xylanase)
3. 도축 반추위 내용물의 직접적 이용을 통한 효소제 생산 기반 확보
 - 도축 반추위 내용물에 포함되어 있는 효소를 직접적으로 이용할 수 있는 조건 탐색
 - 제형화 조건에 따른 효소제 활력 평가
4. 효소제 생산 효율 증진을 위한 방안 설정
 - Anaerobic Batch/Fed-Batch Culture System을 이용한 효소 생산 가능 시간 및 생산량 조사
Feeding frequency 및 volume (Hydraulic Retention Time)의 결정
 - 효소제 생산 효율 향상에 미치는 요인 설정
5. 도축 반추위내용물을 이용한 최적 효소제 생산 조건 개발 및 효율 평가
 - 도축 반추위내용물을 이용한 최적 효소제 생산 조건 탐색

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 시장 현황

제 1 절 국내·외 기술 개발 현황 분석

1. 관련 특허 현황

- 도축 부산물인 반추위 내용물을 이용하여 고부가가치의 물질을 생산하는 분야에 있어 현재 까지 부가가치 물질에 대한 명확한 언급이 없으며, 관련 기술 또한 물질의 생산보다는 단순히 반추위 내용물을 가공하여 사료첨가제로 사용하는 것으로 이용되어 왔다. 따라서 본 연구를 통하여 얻어지는 효소제 생산 기술에 관한 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획이다.

2. 관련 논문 현황

- 도축 부산물인 반추위 내용물을 이용하는 연구 논문들의 대부분이 단순 건조를 통하여 기존에 사용하던 사료원료와의 대체효과에 관한 것으로 본 연구와 같이 특정 고부가가치 물질의 생산에 대한 체계적인 연구가 없다.

3. 관련 제품 및 시장분석 측면

- 효소제 관련 국내시장은 매우 미비하며, 대부분의 효소제들이 수입되고 있는 실정이다. 이러한 현실로 인하여 농가에서는 저렴한 비용으로 효소제를 구매하기 어렵다. 이에 본 연구 개발을 통하여 값싼 혹은 무상으로 공급받을 수 있는 도축 반추위 내용물을 이용하여 경제적인 효소제를 생산하여 농가에서 사료비 상승에 큰 영향을 받지 않고 효소제를 구매 및 활용할 수 있는 방안이 제시될 수 있다.

제 2 절 개발 기술의 시장 현황 및 경제적 효과

1. 국내 시장 현황

- 국내에서 유통되고 있는 사료첨가용 혹은 동물약품용 효소제의 대부분은 수입된 제품이며, 국내에서 생산된 효소제는 생균제의 형태로 미생물의 대사산물인 효소를 함유하는 제품으로 유통되고 있다.
- 국내 효소제 제품의 경우 *Aspergillus oryzae*를 유효 균주로 하는 제품과 *Bacillus* genus의 제품들이 주를 이루고 있다.
- 도축 부산물인 반추위 내용물을 이용한 효소제 제품은 현재까지 출시된바 없으며, 일부 도축 반추위 내용물을 포함하는 제품의 경우, 단순 건조를 통하여 반추위 기능개선제로서 유통되고 있다.
- 사료첨가제를 포함한 동물약품의 국내시장 규모(2008년 기준)는 4,622억원으로 세계시장의 2.4%를 점유하고 있다(한국동물약품협회).

2. 국외 시장 현황

- 세계적으로 효소제 시장은 덴마크의 바이오벤처 기업인 노보자임이 높은 시장점유율을 보이고 있으며, 다양한 국가에서 나머지 시장을 나누어 가지고 있다.
- 세계적인 효소제 시장은 축산뿐만 아니라 바이오에탄올 생산, 폐기물 처리, 식품 가공, 제지 산업 등 매우 다양한 분야에서 폭넓게 이용되고 있다.

<세계 동물 약품 시장 규모 (2009년 한국동물약품협회)>

구 분	사료첨가제	구충제	생물학적제제	항병원성약	기타
비율(%)	28.5	25.3	14.6	11.7	20.0
달러(\$)	2.2 billion	5.3 billion	4.7 billion	2.7 billion	3.7 billion

3. 산업적 기대효과

가. 산업화 방향

(1) 가축 사료 첨가용 효소제

- 대상: 축우용 사료첨가제
- 특징: 반추위내 섬유소 소화율을 향상시키고 반추위내 환경을 안정화시켜 축우의 생산성을 향상시킨다.

(2) 조사료 품질 개선을 위한 첨가제

- 대상: 볏짚과 같은 저질 조사료
- 특징: 국내에서는 벼 수확이 완료된 후에 남은 볏짚을 베일로 포장하여 일정기간 숙성시킨 후에 농가에 판매하는 형태로 볏짚 조사료가 이용되고 있음. 따라서 베일포장 시에 개발 제품을 첨가시켜 일정기간 숙성시키면서 볏짚의 세포벽 구성물질의 분해를 촉진시키고, 축우에게 급여 시에 섬유소 이용성을 향상시켜, 궁극적으로 조사료의 사료적 가치를 개선한다.

(3) 효소제 생산 시스템

- 대상: 설계, 시공
- 특징: 기존에 폐기되던 도축 반추위 내용물을 원료로 하여 고부가가치 효소제를 생산하는 공정의 기초 조건들 제공하여 관련 시설의 설계 및 시공을 위한 자료로 활용될 수 있다.

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	50	70	100	150	200	570
경제적 파급효과	50	80	100	150	250	630
부가가치 창출액	100	150	200	250	400	1,100
합 계	200	300	400	550	850	2,300

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 방법

1. 국내 도축 반추위 내용물의 특성 조사 및 생산 가능한 효소 조사

가. 도축반추위 내용물의 효소활성 평가

- 도축반추위 내용물에서 생산 가능한 효소를 탐색하기 위하여 도축 반추위 내용물의 효소활성을 평가하였다. 효소활성은 섬유소 분해효소, 자일란 분해효소 및 전분 분해효소를 평가하였다.

(1) 도축 반추위 내용물의 확보

- 도축 반추위 내용물은 경상북도 구미에 소재한 도축장에서 도축이 완료된 직후에 채취하였다. 채취된 도축 반추위 내용물은 보온 용기에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였고, 분석에 사용하였다.

(2) 효소활성의 평가

- 배양이 완료된 배양물을 충분히 교반한 뒤에 효소활성 분석의 시료로 사용하였다. 효소활성의 분석은 다음과 같다. 기질로서는 전분 분해효소 측정시에는 soluble starch (Difco), 섬유소 분해효소 측정시에는 Carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma) 그리고 자일란(xylan) 분해효소 측정시에는 birchwood xylan (Sigma)을 기질로 사용하였다.
- 전분 분해효소와 xylan 분해효소 측정을 위한 기질용액은 각각의 기질을 1% 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)을 사용하였고, 섬유소 분해효소 측정용 기질용액은 0.5% CMC 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)을 사용하였다.
- 효소반응은 시료 1 g에 기질용액 9 ml을 혼합한 후에 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 (150 rpm)에 원심분리(10,000 rpm 5 min)하여 상등액을 분리하였다. 다시 상등액 300 μ L와 DNS 용액 (3,5-Dinitrosalicylic acid, 1%; sodium sulfate, 0.05%; sodium hydroxide, 1%) 300 μ L를 혼합한 후에 90°C에서 10분간 반응시켰다.
- 반응액을 상온으로 냉각한 후에 40% potassium sodium tartrate 용액 50 μ L를 혼합한 후에 0.45 μ m filter로 불순물을 제거한 후에 575 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- 배양물에 존재하는 환원당에 의한 back ground는 기질을 포함하지 않은 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)용액과 반응한 용액의 흡광도를 이용하여 배제하였다. 효소반응을 통하여 유리된 당의 농도는 회귀방정식을 이용하여 평가하였으며, 각 효소별로 사용된 표준물질로 전분 분해효소와 섬유소 분해효소는 포도당을 사용하였고, 자일란 분해효소는 xylose를 표준물질로 사용하였다. 효소활성 1 unit는 분당 시료 1 g으로부터 생성된 1 μ M glucose 혹은 xylose로 나타내었다.

2. 도축 반추위 내용물의 직접적 이용을 통한 효소제 생산 기반 확보

가. 도축 반추위 내용물의 제형화 방법 탐색

- 도축 반추위 내용물을 발효과정을 거치지 않고 직접적으로 사용하기 위한 제형방법을 탐색하였다. 제형 방법은 경제적으로 가장 비용이 저렴한 단순 열건조 방법을 적용하였다. 열풍 건조에 영향을 미치는 요인으로 온도, 건조시간 및 부형제(filler)의 비율을 설정하였다.

(1) 실험 조건

- 경상북도 구미에 소재한 도축장에서 채취된 반추위 내용물을 보온병에 담아서 실험실로 옮긴 후에 cutter miller로 분쇄하여 입자도를 작게 하였다. 이때에 공기 중의 산소 유입을 최소화하기 위하여 이산화탄소를 주사하며 분쇄 작업을 수행하였다.
- 준비된 도축 반추위 내용물은 실험설계에 따라서 부형제와 혼합한 후에 용기에 담아 실험설계에 따라 정해진 온도와 시간동안 건조하였다.

(2) 실험설계

- 건조 조건에 영향을 미치는 요인들로 온도, 시간 및 부형제와의 혼합비율을 선택하였고, 실험설계는 부분요인 분석법 중 하나인 Box-Behnken 실험설계법에 따라서 수행하였다. 실험설계법에 따라서 구성된 실험들과 각 실험들에 배치된 요인들의 수준은 표에서 보는 것과 같다. 모든 실험은 블록없이 3반복으로 하여 총 45개의 실험을 구성하였다(표 1).

(3) 결과해석

- 실험설계에 따라서 도축 반추위 내용물과 부형제를 혼합한 후에 정해진 온도와 시간동안 건조과정을 진행하였고, 얻어진 도축 반추위 내용물 혼합물의 효소활성을 평가하였다.
- 결과는 반응표면모형을 이용하여 근사화 하였고, 분산분석을 통하여 유의성을 검정하였다.
- 최적화는 각각의 효소활성에 대하여 개별적으로 진행하였다.
- 실험설계와 통계분석 그리고 최적화 산출은 Minitab (version 14) 통계 프로그램을 이용하여 수행하였다.

표 1. 건조조건이 효소활성에 미치는 영향 분석을 위한 실험설계표

Runs	Variables		
	Heat °C	Time, h	Filler, %
1	60	12	22.5
2	90	12	22.5
3	60	48	22.5
4	90	48	22.5
5	60	30	12.0
6	90	30	12.0
7	60	30	33.0
8	90	30	33.0
9	75	12	12.0
10	75	48	12.0
11	75	12	33.0
12	75	48	33.0
13	75	30	22.5
14	75	30	22.5
15	75	30	22.5
16	60	12	22.5
17	90	12	22.5
18	60	48	22.5
19	90	48	22.5
20	60	30	12.0
21	90	30	12.0
22	60	30	33.0
23	90	30	33.0
24	75	12	12.0
25	75	48	12.0
26	75	12	33.0
27	75	48	33.0
28	75	30	22.5
29	75	30	22.5
30	75	30	22.5
31	60	12	22.5
32	90	12	22.5
33	60	48	22.5
34	90	48	22.5
35	60	30	12.0
36	90	30	12.0
37	60	30	33.0
38	90	30	33.0
39	75	12	12.0
40	75	48	12.0
41	75	12	33.0
42	75	48	33.0
43	75	30	22.5
44	75	30	22.5
45	75	30	22.5

3. 효소제 생산 효율 증진을 위한 방안 설정

가. Batch culture 시스템에서 효소 생산 효율 증진을 위한 최적 기질 조합의 결정

- 도축 반추위 내용물을 이용하여 효소를 생산함에 있어 부수적인 기질의 첨가 및 첨가되는 기질의 종류가 효소 생산효율에 미치는 영향을 조사하였다.

(1) 부수적인 기질의 종류

- 부수적인 기질로는 섬유소(carboxymethyl cellulose, Sigma), 자일란(birchwood xylan, Sigma) 및 수용성전분(soluble starch, Difco)을 사용하였다.

(2) 효소생산을 위한 발효기 운전 조건

- 경상북도 구미에 소재한 도축장에서 채취된 반추위 내용물을 보온병에 담아서 실험실로 옮긴 후에 8점의 거즈를 이용하여 고형분과 반추위액을 분리하였다.
- 고액 분리된 반추위 내용물 중 액상 부분을 300 mL 용기에 100 mL 정도를 담고 준비된 부수적인 기질을 첨가하였다. 기질을 첨가한 후에 실리콘 재질의 마개를 이용하여 입구를 밀봉하고 알루미늄 재질의 seal을 이용하여 다시 밀봉하였다 (그림 1).
- 준비된 발효용기는 39°C 진탕 배양기에서 발효를 진행하였다.

(3) 실험설계

- 도축 반추위 내용물의 발효를 통한 효소 생산 활성화에 있어 부수적으로 첨가되는 기질의 효과는 부분요인 분석법을 이용하여 평가하였다. 총 3가지 기질(섬유소, 자일란, 수용성 전분)을 요인으로 설정하고 각 요인들은 3가지 농도 수준(-1, 0 +1)으로 배치하여 총 15가지의 서로 다른 실험들을 구성하였다. 상세한 실험 설계는 표 2에서 보는 것과 같다.



그림 1. Serum bottle을 이용한 도축 반추위 내용물의 발효

표 2. 부수적인 기질 종류와 그 첨가 수준이 도축 반추위 내용물의 발효를 통한 효소 생산에 미치는 영향 조사 실험설계표

Trials	Variables (g/L)			Responses of enzyme activity (U/mL ¹)		
	Cellulose	Xylan	Starch	Xylanase	Cellulase	Hemicellulase
1	0.1	0.1	0.55	0.46±0.01 ²	0.13±0.01	0.73±0.01
2	1.0	0.1	0.55	0.28±0.09	0.14±0.00	0.87±0.00
3	0.1	1.0	0.55	0.36±0.01	0.11±0.01	0.46±0.16
4	1.0	1.0	0.55	0.25±0.00	0.14±0.01	0.61±0.00
5	0.1	0.55	0.1	0.36±0.01	0.13±0.00	0.70±0.00
6	1.0	0.55	0.1	0.42±0.01	0.19±0.01	0.55±0.19
7	0.1	0.55	1.0	0.33±0.01	0.09±0.00	0.63±0.00
8	1.0	0.55	1.0	0.45±0.00	0.11±0.00	0.62±0.00
9	0.55	0.1	0.1	0.44±0.01	0.17±0.01	0.68±0.01
10	0.55	1.0	0.1	0.42±0.01	0.13±0.01	0.58±0.01
11	0.55	0.1	1.0	0.34±0.01	0.10±0.00	0.63±0.01
12	0.55	1.0	1.0	0.43±0.01	0.08±0.01	0.65±0.06
13	0.55	0.55	0.55	0.45±0.01	0.14±0.00	0.44±0.03
14	0.55	0.55	0.55	0.59±0.01	0.11±0.00	0.47±0.01
15	0.55	0.55	0.55	0.34±0.00	0.09±0.00	0.46±0.01

¹.Enzyme activities of cellulase and hemicellulase were represented as mM glucose produced per a min of reaction. For xylanase, the activity was represented as mM xylose per a min of reaction.

².Mean±tandard deviation (n=3).

나. HRT(Hydraulic retention time)결정을 위한 효소 활성 평가

- 도축 반추위 내용물을 발효시킬 경우, 발효 지속기간에 따른 효소생산량 변화를 조사하여 새로운 기질의 투여 빈도를 결정하는 것이 중요하다. 이에 본 실험에서는 도축 반추위 내용물을 일정기간 발효시키면서 시간이 경과함에 따른 효소 종류별 생산량의 변화를 조사하였다.

(1) 도축 반추위 내용물의 준비 및 발효조건

- 경상북도 구미에 소재한 도축장에서 채취된 반추위 내용물을 보온병에 담아서 실험실로 옮긴 후에 cutter miller로 분쇄하여 입자도를 작게 하였다. 이때에 공기 중의 산소 유입을 최소화하기 위하여 이산화탄소를 주사하며 분쇄 작업을 수행하였다.
- 분쇄 및 균질화된 반추위 내용물을 500 mL 용기에 300 mL 정도를 담고 준비된 부수적인 기질을 첨가하였다. 기질을 첨가한 후에 실리콘 재질의 마개를 이용하여 입구를 밀봉하고 알루미늄 재질의 seal을 이용하여 다시 밀봉하였다(그림 2).
- 준비된 발효용기는 39°C 진탕 배양기에서 발효를 진행하였고, 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.
- 발효기간은 0일에서 6일까지 총 7일간 수행하였으며, 각 기간별 발효액은 원심분리(10,000 rpm; 10 min)한 후에 섬유소 분해효소, 자일란 분해효소 및 전분 분해효소 활성을 평가하였다.



그림 2. 도축 반추위 내용물의 발효용 용기

4. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 발효기의 운전

- 일련의 연구결과를 바탕으로 도축 반추위 내용물의 발효를 통한 효소제 생산 발효기를 운전하며 효소제를 생산하였다.
- 발효기는 3 L 규모의 플라스틱 재질의 용기를 사용하였고, effluent port, gas outlet을 설치한 후에 39°C 항온 수조에서 7일간 운전하며 5일간 시료를 채취하였으며, 시료들의 효소활성을 평가하였다.
- 실험에 사용한 발효기는 그림 3에서 보는 것과 같다.
- 기질은 도축장에서 채취한 도축 반추위 내용물을 cutter mill로 분쇄한 후에 -40°C에서 보관하면 투입 직전에 상온에서 해동한 후에 투여하였다.
- 반추위 내용물을 혼합할 때에 섬유소와 자일란을 각각 0.5 g/L씩 첨가해 주었다.
- 기질의 투여는 HRT 4일 기준으로 매일 한번 씩 오후 5시에 실시하였다.
- Effluent는 채취 후 4°C 냉장고에 보관하며 효소활성을 평가하였다.

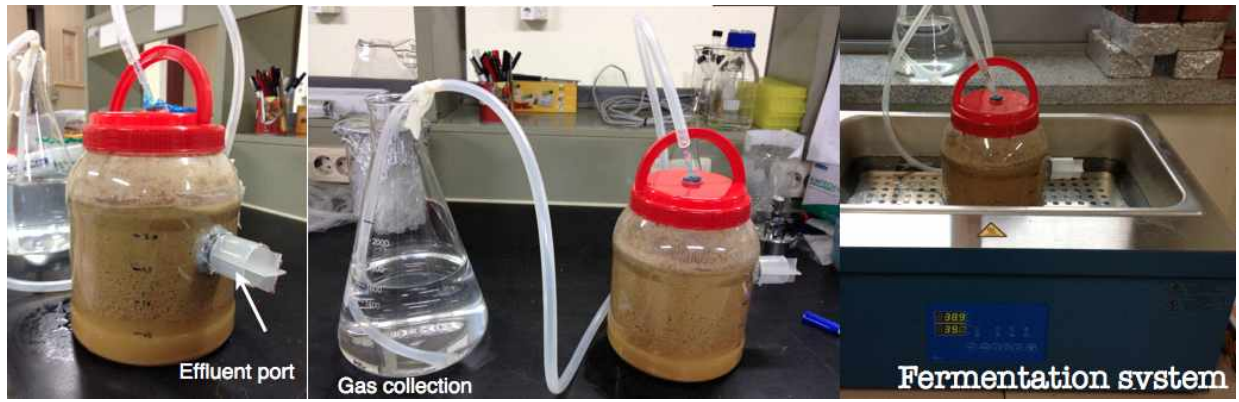


그림 3. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소생산용 발효 시스템

제 2 절 연구결과

1. 국내 도축 반추위 내용물의 특성 조사 및 생산 가능한 효소 조사

- 도축반추위의 효소활성을 평가한 결과 표 3과 같이 나타났다. 효소활성은 자일란 분해활성이 가장 우수하였으며, 다음으로 전분 분해효소와 섬유소 분해효소의 순서로 나타났다(그림 4).

표 3. 도축 반추위 내용물의 효소활성

효소종류	효소활성
Cellulase	356.59±7.38
Xylanase	991.39±6.00
Amylase	857.24±16.60

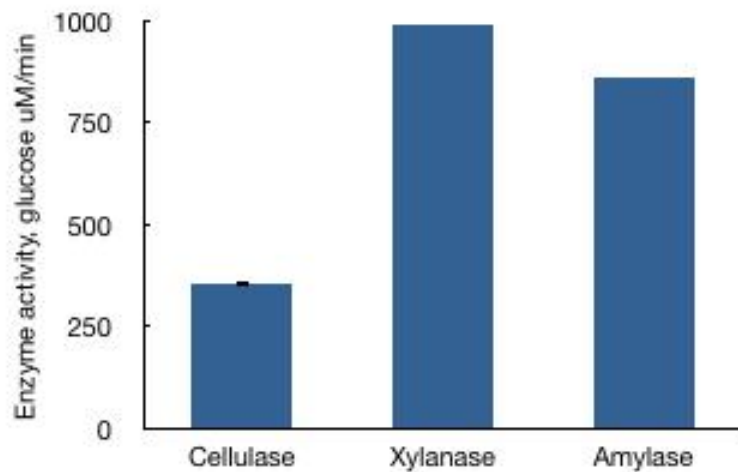


그림 4. 도축 반추위 내용물의 효소활성

2. 도축 반추위 내용물의 직접적 이용을 통한 효소제 생산 기반 확보

가. 도축 반추위 내용물의 제형화 방법 탐색

- 실험설계법에 따라서 구성된 총 45개의 실험들에서 얻어진 효소활성은 표 4에서 보는 것과 같다.

표 4. 건조조건이 효소활성에 미치는 영향 분석을 위한 실험들의 반응값들

Run order	Variables			Response		
	Heat, °C	Time, time	Filler, %	Xylanase	Cellulase	Amylase
1	60	12	22.5	222.7	109.9	405.3
2	90	12	22.5	291.5	78.3	276.6
3	60	48	22.5	222.7	99.4	331.4
4	90	48	22.5	235.2	71.9	335.7
5	60	30	12.0	264.4	84.6	329.3
6	90	30	12.0	262.3	59.3	266.0
7	60	30	33.0	210.2	74.1	382.1
8	90	30	33.0	206.0	65.6	242.8
9	75	12	12.0	224.8	65.6	333.5
10	75	48	12.0	226.9	65.6	339.9
11	75	12	33.0	274.8	40.3	312.4
12	75	48	33.0	206.0	67.7	377.8
13	75	30	22.5	270.6	69.8	398.9
14	75	30	22.5	243.5	53.0	263.9
15	75	30	22.5	293.5	42.4	259.7
16	60	12	22.5	224.8	112.0	407.4
17	90	12	22.5	295.6	74.1	280.8
18	60	48	22.5	220.6	93.0	335.7
19	90	48	22.5	239.4	71.9	339.9
20	60	30	12.0	262.3	90.9	327.2
21	90	30	12.0	270.6	57.2	259.7
22	60	30	33.0	210.2	71.9	386.3
23	90	30	33.0	199.8	71.9	255.5
24	75	12	12.0	229.0	67.7	339.9
25	75	48	12.0	222.7	63.5	335.7
26	75	12	33.0	268.5	38.2	304.0
27	75	48	33.0	204.0	71.9	386.3
28	75	30	22.5	249.8	67.7	405.3
29	75	30	22.5	243.5	59.3	259.7
30	75	30	22.5	289.4	46.6	268.1
31	60	12	22.5	222.7	105.7	411.6
32	90	12	22.5	293.5	71.9	272.4
33	60	48	22.5	212.3	97.3	339.9
34	90	48	22.5	243.5	67.7	337.8
35	60	30	12.0	258.1	86.7	335.7
36	90	30	12.0	270.6	50.8	263.9
37	60	30	33.0	216.5	67.7	388.4
38	90	30	33.0	216.5	67.7	251.3
39	75	12	12.0	241.5	63.5	337.8
40	75	48	12.0	218.5	67.7	342.0
41	75	12	33.0	266.5	42.4	299.8
42	75	48	33.0	220.6	67.7	386.3
43	75	30	22.5	268.5	67.7	394.7
44	75	30	22.5	251.9	55.1	261.8
45	75	30	22.5	299.8	42.4	261.8

위 표의 반응 결과값들을 이용하여 분산분석을 수행하였다.

(1) 자일란 분해효소활성

- 자일란 분해효소활성에 대한 각 요인들의 효과에 대한 분산분석결과는 표 5에서 보는 것과 같다.
- 회귀모형, 선형효과, 곡률효과 및 상호작용 모두에서 유의성이 발견되었다.

표 5. 도축반추위 제형화 조건에 있어 설정요인들의 자일란 효소 활성에 미치는 효과에 대한 분산분석

Source	DF	SS	MS	F value	P value
Regression	9	22757	2528.6	6.08	<0.01
Linear	3	11969	2401.6	5.77	<0.01
Square	3	6945	2314.8	5.56	<0.01
Interaction	3	3843	1281.1	3.08	0.04
Residual error	35	14567	416.2		
Total	44	37324			

- 분산 분석 결과 회귀모형의 유의성이 발견되었다. 이에 반응표면모형을 이용하여 설정된 각 요인들의 효과를 구체적으로 조사하였고, 그 결과는 표 6에서 보는 것과 같다.

표6. 자일란 분해효소 활성에 대한 반응표면모형 계수와 그 확률값

Term	Coefficient	SE	T value	P value
Constant	-306.407	177.895	-1.722	0.094
Heat	9.364	4.232	2.213	0.034
Time	6.618	2.214	3.116	0.004
Filler	10.625	3.893	2.729	0.010
Heat ²	-0.046	0.027	-1.671	0.104
Time ²	-0.043	0.019	-2.266	0.030
Filler ²	-0.184	0.056	-3.314	0.002
Heat × time	-0.046	0.022	-2.093	0.044
Heat × filler	-0.018	0.037	-0.472	0.064
Time × filler	-0.067	0.031	-2.152	0.038

- 반응표면모형을 근사화 시킨 후에 각 계수들의 확률값을 분석한 결과 자일란 효소활성에 있어서는 열온도의

곡률효과, 열온도와 부형제의 첨가량 사이의 상호작용을 제외하고는 나머지 모든 계수에서 유의성이 발견되었다.

- 자일란 분해효소에 대한 각 요인들의 상호작용에 대한 관계를 등고선 그림으로 나타내었다. 그 결과는 그림 5 - 7에서 보는 것과 같다.

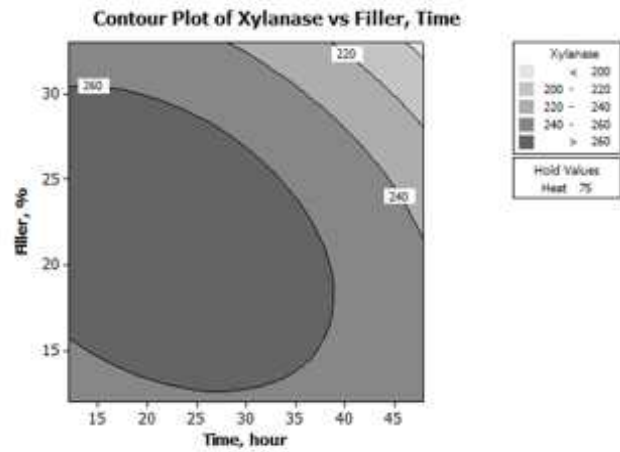


그림 5. 도축 반추위액을 이용한 자일란 분해효소 생산에 있어 열처리 시간과 부형제의 상호작용

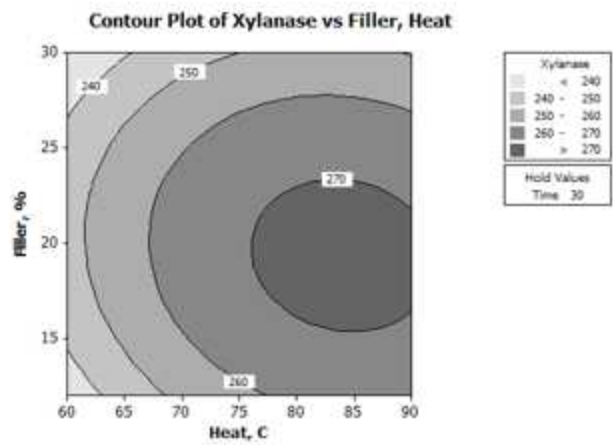


그림 6. 도축 반추위액을 이용한 자일란 분해효소 생산에 있어 열처리 온도와 부형제의 상호작용

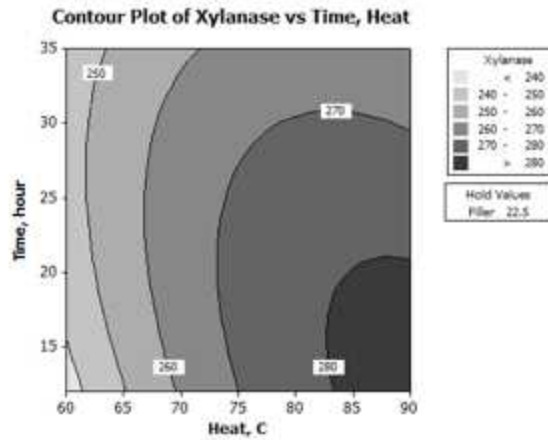


그림 7. 도축 반추위 내용물을 이용한 자일란 분해효소 생산에 있어 열처리 온도와 열처리 시간의 상호작용

- 이상의 상호관계 조사 결과와 근사화된 반응표면 모형을 미분하여 자일란 분해효소 생성 최대를 위한 최적화 과정을 수행하였다. 그 결과는 그림 8에서 보는 것과 같다. 최적 조건으로는 온도 90°C, 시간 12 h 및 부형제 22%로 나타났다.

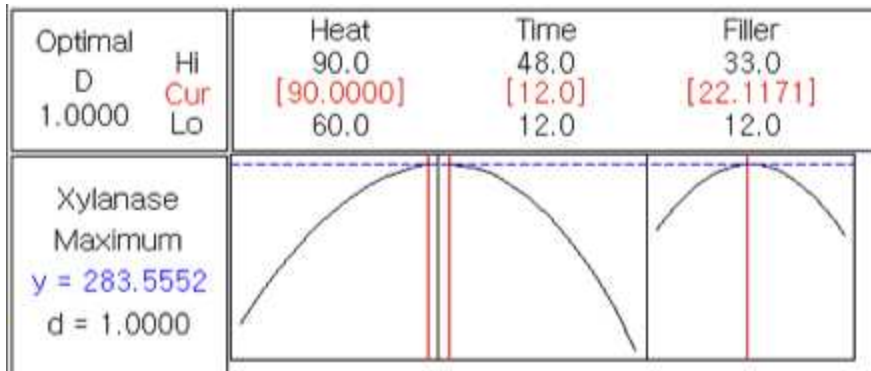


그림 8. 도축 반추위 내용물의 최적 제형조건

(2) 섬유소 분해효소활성

- 섬유소 분해효소활성에 대한 각 요인들의 효과에 대한 분산분석결과는 표 7에서 보는 것과 같다.
- 회귀모형, 선형효과, 곡률효과 및 상호작용 모두에서 유의성이 발견되었다.

표 7. 도축반추위 제형화 조건에 있어 설정요인들의 섬유소 분해 효소 활성에 미치는 효과에 대한 분산분석

Source	DF	SS	MS	F value	P value
Regression	9	11681	1297.89	19.57	<0.01
Linear	3	3674	2160.81	32.58	<0.01
Square	3	6707	2235.60	33.71	<0.01
Interaction	3	1300	433.46	6.54	<0.01
Residual error	35	2321	66.31		
Total	44	14002			

- 분산 분석 결과 회귀모형의 유의성이 발견되었다. 이에 반응표면모형을 이용하여 설정된 각 요인들의 효과를 구체적으로 조사하였고, 그 결과는 표 8에서 보는 것과 같다.

표 8. 섬유소 분해효소 활성에 대한 반응표면모형 계수와 그 확률값

Term	Coefficient	SE	T value	P value
Constant	768.937	71.0104	10.829	<0.01
Heat	-16.159	1.16894	-9.565	<0.01
Time	-3.625	0.8477	-9.923	<0.01
Filler	-2.247	1.5540	-1.446	0.157
Heat ²	0.094	0.0109	8.646	<0.01
Time ²	0.033	0.0076	4.335	<0.01
Filler ²	-0.058	0.0222	-2.635	0.012
Heat × time	0.008	0.0087	0.897	0.376
Heat × filler	0.046	0.0149	3.066	0.004
Time × filler	0.038	0.0124	3.066	0.004

- 반응표면모형을 근사화 시킨 후에 각 계수들의 확률값을 분석한 결과 섬유소 효소활성에 있어서는 부형제 농도의 선형효과와 열처리 온도와 열처리 시간과의 상호관계를 제외하고는 모든 항목에서 유의성이 발견되었다.

- 섬유소 분해효소에 대한 각 요인들의 상호작용에 대한 관계를 등고선 그림으로 나타내었다. 그 결과는 그림 9 - 11에서 보는 것과 같다.

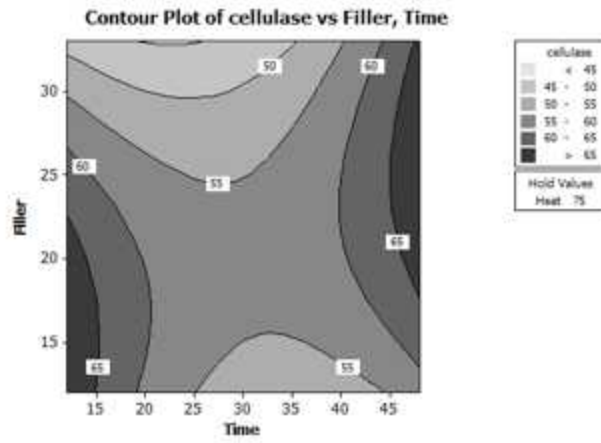


그림 9. 도축 반추위액을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어 열처리 시간과 부형제의 상호작용

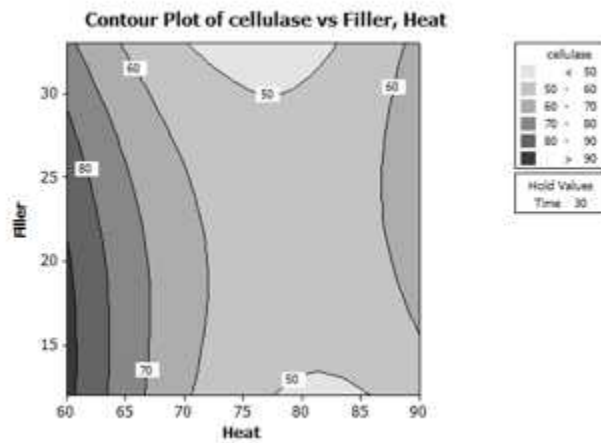


그림 10. 도축 반추위액을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어 열처리 온도와 부형제의 상호작용

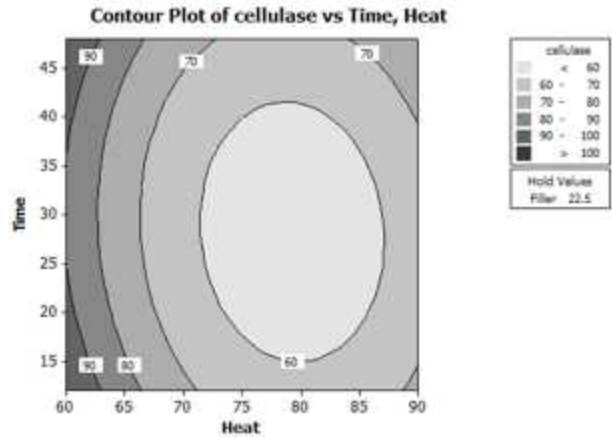


그림 11. 도축 반추위 내용물을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어 열처리 온도와 열처리 시간의 상호작용

- 이상의 상호관계 조사 결과와 근사화된 반응표면 모형을 미분하여 섬유소 분해효소 생성 최대를 위한 최적화 과정을 수행하였다. 그 결과는 그림 12에서 보는 것과 같다.

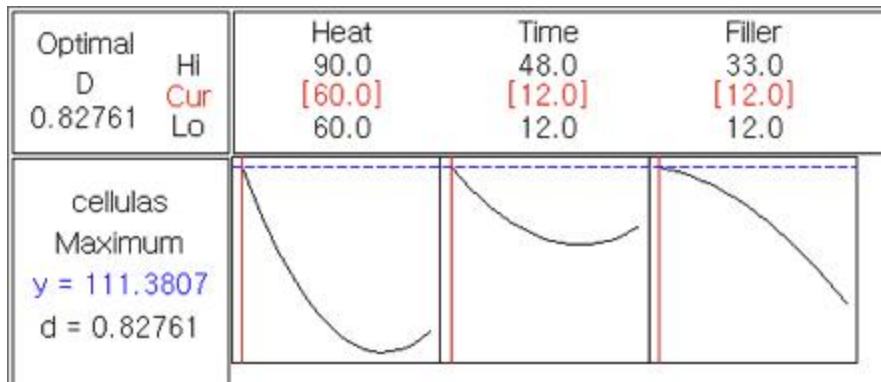


그림 12. 도축 반추위 내용물의 최적 제형조건

(3) 전분 분해효소활성

- 전분 분해효소활성에 대한 각 요인들의 효과에 대한 분산분석결과는 표 9에서 보는 것과 같다.
- 회귀모형, 선형효과, 곡률효과 및 상호작용 모두에서 유의성이 발견되었다.

표 9. 도축반추위 제형화 조건에 있어 설정요인들의 섬유소 분해 효소 활성에 미치는 효과에 대한 분산분석

Source	DF	SS	MS	F value	P value
Regression	9	77558	8618	6.91	<0.01
Linear	3	44372	9726	7.80	<0.01
Square	3	11980	3993	3.20	0.035
Interaction	3	21206	7069	5.67	<0.01
Residual error	35	43643	1247		
Total	44	121201			

- 분산 분석 결과 회귀모형의 유의성이 발견되었다. 이에 반응표면모형을 이용하여 설정된 각 요인들의 효과를 구체적으로 조사하였고, 그 결과는 표 10 에서 보는 것과 같다.

표 10. 전분 분해효소 활성에 대한 반응표면모형 계수와 그 확률값

Term	Coefficient	SE	T value	P value
Constant	710.364	307.924	2.307	0.027
Heat	-3.168	7.326	-0.432	0.668
Time	-17.1	3.676	-4.652	<0.01
Filler	5.572	6.738	0.827	0.414
Heat ²	-0.006	0.047	-0.124	0.902
Time ²	0.101	0.033	3.074	0.004
Filler ²	0.004	0.096	0.041	0.967
Heat X time	0.124	0.038	3.277	0.002
Heat X filler	-0.108	0.065	-1.673	0.103
Time X filler	0.1	0.054	1.863	0.071

- 반응표면모형을 근사화 시킨 후에 각 계수들의 확률값을 분석한 결과 전분 효소활성에 있어서는 부형제의 비율에 대한 선형효과, 열처리 온도의 곡률효과, 부형제 비율의 곡률효과, 열처리 온도와 부형제의 비율 및 열처

리 시간과 부형제의 비율간의 상호작용을 제외한 나머지 요인들의 효과들에 대하여 유의성이 나타났다 ($P < 0.05$).

- 전분 분해효소에 대한 각 요인들의 상호작용에 대한 관계를 등고선 그림으로 나타내었다. 그 결과는 그림 13 - 15에서 보는 것과 같다.

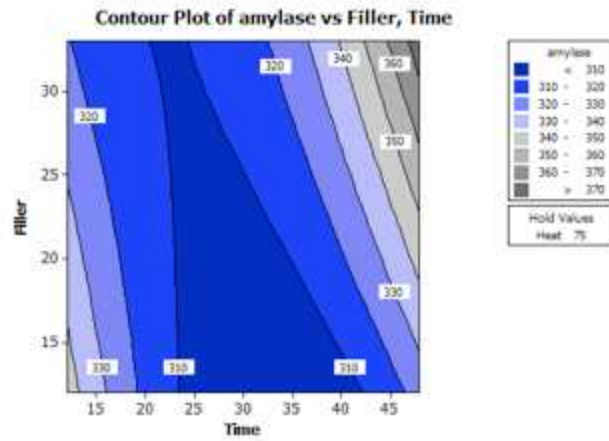


그림 13. 도축 반추위액을 이용한 전분 분해효소 생산에 있어 열처리 시간과 부형제의 상호작용

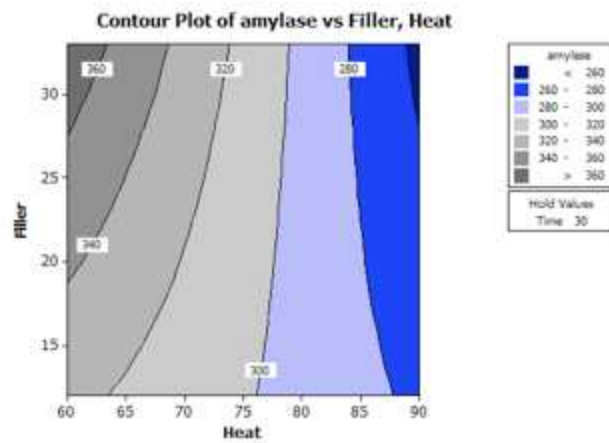


그림 14. 도축 반추위액을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어 열처리 온도와 부형제의 상호작용

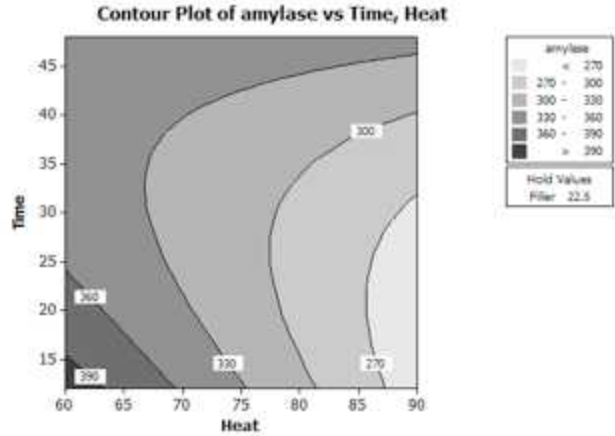


그림 15. 도축 반추위 내용물을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어 열처리 온도와 열처리 시간의 상호작용

- 이상의 상호관계 조사 결과와 근사화된 반응표면 모형을 미분하여 전분 분해효소 생성 최대를 위한 최적화과정을 수행하였다. 그 결과는 그림 16에서 보는 것과 같다.

Optimal	Hi	Heat	Time	Filler
D	Cur	90.0	48.0	33.0
1.0000	Lo	[60.0]	[12.0]	[33.0]
		60.0	12.0	12.0
amylase Maximum $y = 411.1639$ $d = 1.0000$				

그림 16. 도축 반추위 내용물의 최적 제형조건

(4) 결론

- 건조를 위한 열처리 온도, 건조 시간 및 부형제(말분)의 비율이 건조 도축 반추위 내용물의 효소활성에 미치는 효과를 분석한 결과, 자일란 분해효소의 경우에는 비교적 열에 안정적인 현상을 알 수 있었다. 반면 섬유소 분해효소와 전분 분해효소는 열처리 온도가 증가함에 따라서 급격하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 열처리 시간에 따라서도 섬유소와 전분 분해효소의 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 부형제의 경우 자일란 분해효소의 경우 22%에서 최고 효과를 나타내었고, 섬유소 분해효소는 부형제의 비율이 증가함에 따라서 감소하

는 결과를 나타내었다. 전분 분해효소의 경우, 섬유소 분해효소와는 다르게 부형제의 비율이 증가할수록 효소 활성이 향상되는 것을 알 수 있었다.

- 이에 세 가지 효소의 제형화 조건이 서로 매우 다르게 나타남에 따라서 공통적인 조건을 찾기는 어려우며, 효소 생산의 목적에 따라서 각기 다른 건조 조건을 적용해야 할 것으로 사료된다.

3. 효소제 생산 효율 증진을 위한 방안 설정

가. Batch culture 시스템에서 효소 생산 효율 증진을 위한 최적 기질 조합의 결정

- 서로 다른 부수적인 기질의 종류와 그 농도로 구성된 총 15가지의 실험들은 표 2에서 보는 것과 같으며, 각 실험들에서 얻어진 효소활성은 매우 다양하게 나타났다.
- 총 15가지 실험들에서 얻어진 효소활성들에 대하여 반응표면모형을 근사화 시킨 후에 등고선 그래프를 이용하여 기질들 간의 상호작용 및 최적 농도를 결정하였다.
- 그 결과는 그림 17에서 보는 것과 같다. 각 요인들이 효소활성에 대한 영향을 분석한 결과 두드러진 상호작용은 자일란 분해효소 활성에서 나타났으며, 자일란과 섬유소(셀룰로오스)를 1:1의 비율로 첨가하는 것이 가장 좋은 효과, 즉 우수한 효소 생산량을 나타내었다.

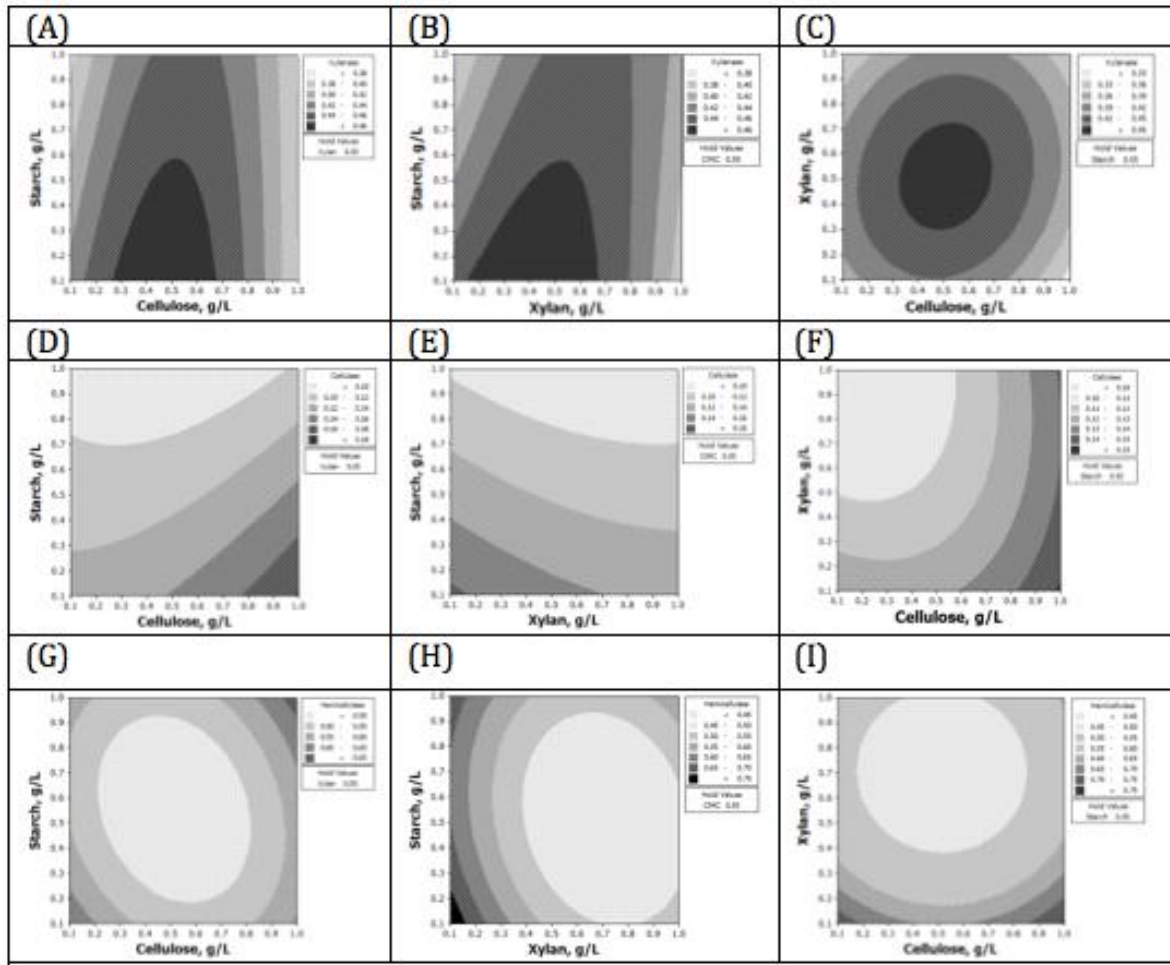


그림 17. 도축 반추위 내용물의 발효를 통한 효소 생산에 있어 부수적인 기질의 종류와 농도가 미치는 효과. (A)에서 (C)는 자일란 분해효소에 대한 효과, (D)에서 (F)는 섬유소(셀룰로오스) 분해효소에 대한 효과 및 (G)에서 (I)는 헤미셀룰로오스 분해효소 활성에 대한 효과

나. HRT(Hydraulic retention time)결정을 위한 효소 활성 평가

- 대조구, 성유소, 전분 및 자일란을 첨가한 처리구들을 6일간 배양하며, 발효액 내의 효소 생산량을 조사하였다. 모든 효소에서 배양 기간이 지남에 따라서 효소활성이 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. 성유소 분해효소의 배양 기간별 생산량은 표 11와 그림 18에서 보는 것과 같다. 배양기간이 증가함에 따라서 지속적으로 효소활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 전체적으로 효소활성이 우수하게 나타난 처리구는 자일란을 투여한 처리구에서 나타났다. 또한 처리구간 효소활성이 저감되는 형태는 서로 유의적으로 다르게 나타났다($P<0.05$).

표 11. 배양 기간별 성유소 분해효소 활성의 변화 및 첨가 기질의 효과

Treatment	Incubation time						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	267.44a	103.59a	98.66	100.77	112.73b	122.57	104.99
Soluble starch	269.55a	114.14b	90.23	107.10	100.77ab	110.62	98.66
CMC	271.66a	121.17ab	95.15	103.59	104.99a	114.84	98.66
Xylan	349.02b	142.26c	94.44	99.37	97.96a	118.35	98.66
SEM	7.85	6.39	4.83	6.64	4.52	6.64	3.85
Significance	Treatment		***				
	Time		***				
	Interaction		***				
Different letters in same column mean significantly different ($P<0.05$).							

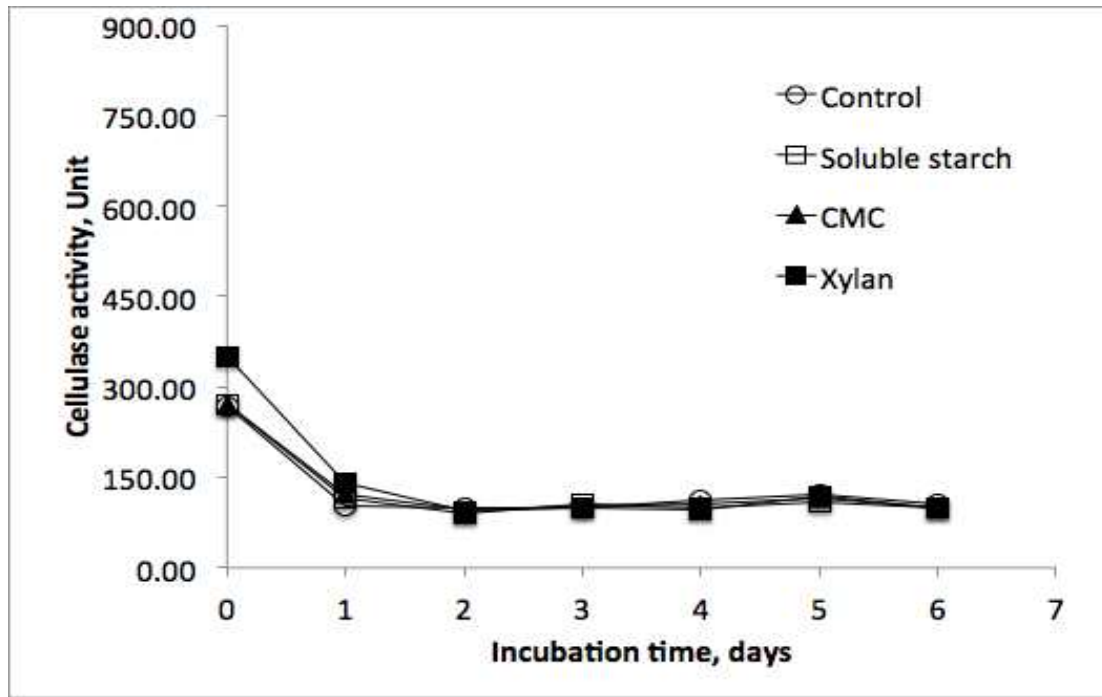


그림 18. 도축 반추위 내용물의 발효기간별 섬유소 분해효소의 생성 효율 및 부수적인 영양소의 첨가효과

- 배양기간별 자일란 분해효소의 생성 형태는 표 12와 그림 19에서 보는 것과 같다. 자일란 분해효소 또한 배양 기간이 증가함에 따라서 감소하는 것을 알 수 있었다. 처리구간의 효과에서는 자일란을 투여한 처리구에서 유의적으로 높은 효소 생산효율을 나타내었다($P < 0.05$).

표 12. 배양 기간별 자일란 분해효소 활성의 변화 및 첨가 기질의 효과

Treatment	Incubation time						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	743.54b	161.60a	167.85a	173.40	235.21b	112.99a	156.74a
Soluble starch	712.99b	167.85a	172.01a	183.13	234.51b	133.13b	151.88c
CMC	729.65a	161.60a	169.24a	180.35	244.24b	130.35b	172.01b
Xylan	828.96c	308.82b	192.15b	178.26	156.74a	136.60b	174.10d
SEM	7.70	5.14	8.80	9.66	5.98	6.91	4.62
Significance	Treatment			***			
	Time			***			
	Interaction			***			

Different letters in same column mean significantly different ($P < 0.05$).

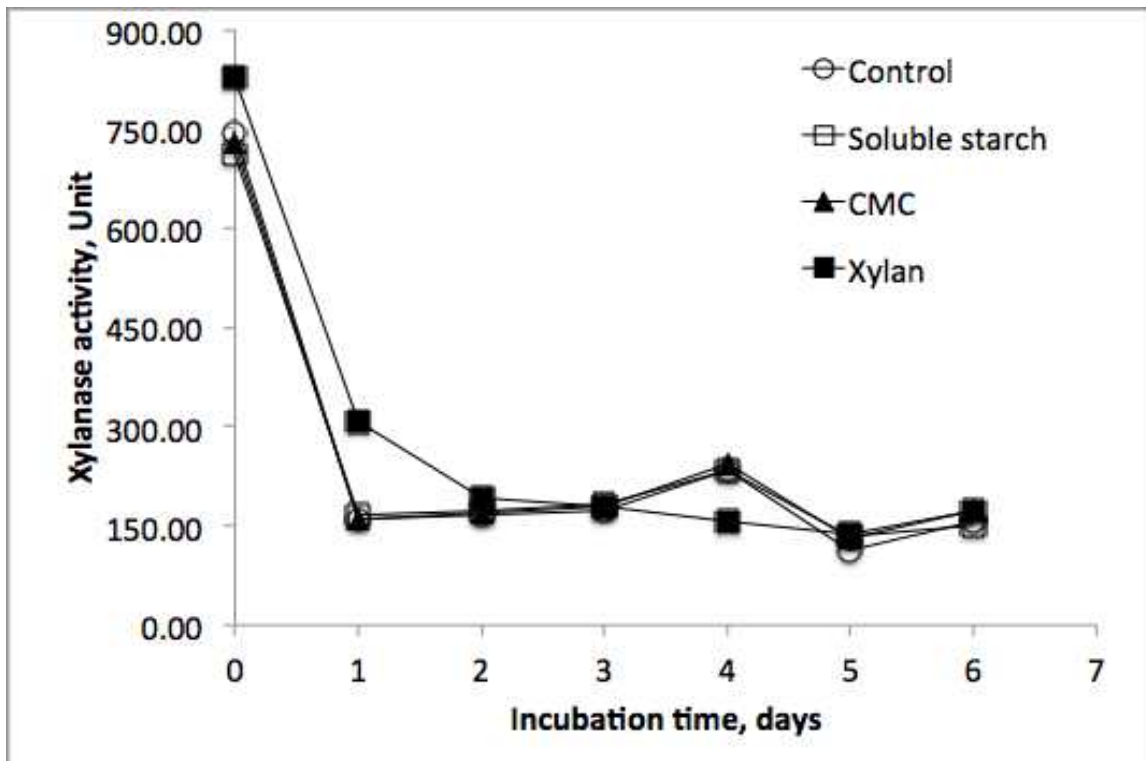


그림 19. 도축 반추위 내용물의 발효기간별 자일란 분해효소의 생성 효율 및 부수적인 영양소의 첨가효과

- 배양기간별 전분 분해효소 생성 형태는 표 13과 그림 20에서 보는 것과 같다. 자일란 분해효소 또한 배양기간이 증가함에 따라서 감소하는 것을 알 수 있었다. 처리구간의 효과에서는 자일란을 투여한 처리구에서 유의적으로 높은 효소 생산효율을 나타내었다($P<0.05$).

표 13. 배양 기간별 전분 분해효소 활성의 변화 및 첨가 기질의 효과

Treatment	Incubation time						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	642.97d	341.28a	406.68b	378.55b	405.98a	293.46a	320.18a
Soluble starch	567.72a	344.80b	394.73a	345.50a	435.51a	305.41b	344.09b
CMC	522.71b	368.71a	360.97b	332.84a	403.87b	344.80c	342.69b
Xylan	616.95c	447.47c	391.91b	343.39a	417.23ab	394.73d	410.20c
SEM	13.43	11.11	13.47	16.11	11.96	4.67	5.96
Significance	Treatment			***			
	Time			***			
	Interaction			***			
Different letters in same column mean significantly different ($P<0.05$).							

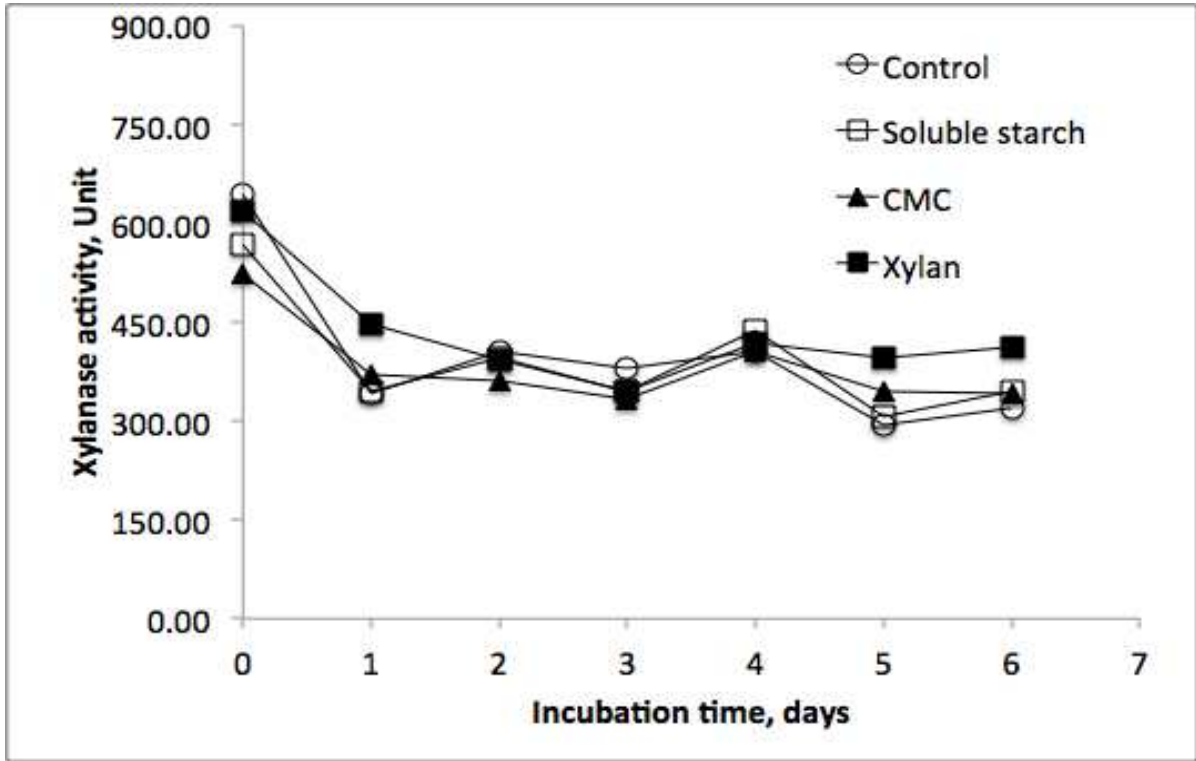


그림 20. 도축 반추위 내용물의 발효기간별 전분 분해효소의 생성 효율 및 부수적인 영양소의 첨가효과

- 일련의 실험 결과, 도축 반추위 내용물은 발효 후 1일이 경과하는 시점부터 효소 활성이 급격하게 저하됨을 알 수 있었다. 그리고 첨가제로서는 자일란을 0.1% 첨가하는 것이 모든 효소들의 생성량을 증가시키는 것으로 나타났다.

4. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소제 생산 발효기의 운전

- 도축 반추위 내용물을 이용하여 발효기를 제작한 후에 7일간 운전하면 5일간 시료를 채취하여 효소활성을 평가하였다. 그 결과는 표 14와 그림 21에서 보는 것과 같다.

표 14. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소생산 발효기의 운전 결과

효소	발효기간, 일				
	1	2	3	4	5
xylanase	1110.87	1046.43	971.60	965.70	970.90
cellulase	397.67	331.83	298.47	285.00	281.03
amylase	1092.13	1050.07	1086.60	1028.67	1020.73

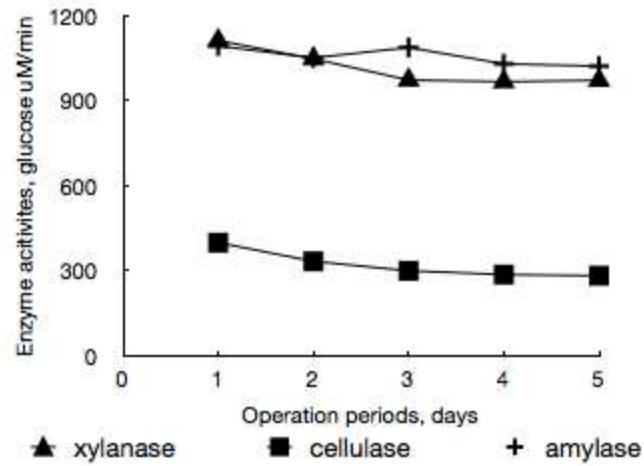


그림 21. 도축 반추위 내용물을 이용한 효소생산 발효기의 운전 결과

- 총 3가지 효소활성 중에서 자일란 분해효소와 섬유소 분해효소의 활성이 가장 우수하게 나타났으며, 섬유소 분해효소는 비교적 낮게 나타났다. 발효 개시 이후에 다소 효소활성이 감소하는 결과를 나타내었으나 발효개시 4일 이후에는 비교적 안정화 되는 형태를 나타내었다.

제 3 절 종합 결론

- 도축 반추위 내용물을 이용하여 반추동물 사료첨가용 효소제로서 활용하기 위하여 도축 반추위의 특성을 조사하였다. 그 결과 자일란 분해효소와 전분 분해효소의 활력은 우수하였으나 섬유소 분해효소는 비교적 활성이 낮게 나타났다.
- 도축 반추위 내용물의 직접적인 이용을 위하여 단순 열건조 과정을 적용하였고, 열건조 조건 중에서 가열 온도와 가열 시간 그리고 부형제의 비율의 효과를 분석하였다. 그 결과 자일란 분해효소는 열에 대하여 비교적 안정하게 나타났으며, 나머지 섬유소 분해효소와 전분 분해효소의 활성은 열에 대하여 안정하지 못하였다.
- 건조를 통한 도축 반추위 내용물 제형 조건은 생산을 목적하는 효소의 특징에 따라서 다르게 나타났다. 자일란 분해효소의 생산 목적에는 온도 90℃에서 12시간 동안 22%의 부형제 함량으로 건조하는 것이 가장 우수하였다. 섬유소 분해효소는 60℃의 온도에서 12시간 동안 12%의 부형제, 전분 분해효소는 60℃의 온도에서 12시간 동안 33%의 부형제에서 제형하는 것이 가장 우수한 효소활성을 기대할 수 있었다.
- 도축 반추위 내용물의 발효에 있어 부수적인 영양소원의 첨가가 효소생산에 미치는 효과를 조사하였다. 섬유소, 자일란 및 전분을 기질로 사용하여 도축 반추위 내용물 발효에 첨가한 후 배양 후의 효소활성을 평가한 결과 섬유소와 자일란을 각각 1:1의 비율로 0.1%의 수준으로 첨가하는 것이 가장 우수한 효소 생산효율을 나타내었다.
- 발효기 운전 조건을 조사하기 위하여 도축 반추위 내용물을 serum bottle에 넣고 6일간 정지 배양하며 시료를 채취하여 효소활성을 분석한 결과 모든 효소에서 배양 1일차부터 급격하게 떨어졌다.
- 최종적으로 HRT 4일, 섬유소 0.5 g/L, 자일란 0.5 g/L, 도축반추위액을 매일 투여하며 7일간 발효기를 운전한 결과, 자일란 분해효소는 약 1,000 Unit, 전분 분해효소는 약 1,000 Unit 그리고 섬유소 분해효소는 약 300 Unit로 생산이 가능하였다.
- 이상의 결과들은 도축 반추위 내용물을 더 이상 폐기물로 처리하지 않고 가축 사료 첨가용

효소제의 생산 기질로 재활용하는 것이 가능한 것으로 나타났으며, 반추위 내용물에 포함된 다양한 미지영양인자까지 고려하면 반추동물 사료효율 개선 및 생산성 향상에 있어 우수한 사료첨가제로서 작용할 것으로 판단된다.

- 또한 향후, 생산된 도축 반추위 내용물을 제형화 과정을 거친 후, 실제 반추동물에게 급여하여 고기 생산 및 우유 생산성에 미치는 효과를 분석하여 개발된 기술의 효능을 검증하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

제 4 장 참고문헌

- Adeniji, A. A. and A. Jimoh. 2007. Effects of replacing maize with enzyme-supplemented bovine rumen content in the diets of pullet chicks. *Int. J. Poult. Sci.* 6: 814-817.
- Choi, S., and S. Hwangbo. 2006. Effects of total mixed ration with wet brewer's grain on nutrient utilization in breeding Korean native goats. *J. Korean Soc. Grassland Sci.* 26:147-154
- Eun, J. S., K. A. Beauchemin and H. Schulze. 2007. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. *J. Dairy Sci.* 90: 1440-1451.
- Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377-381.
- Girard, I., C. Jones, and K. Dawson. 1993. Lactic acid utilization in rumen-stimulating cultures receiving a yeast culture supplement. *J. Anim. Sci.* 71(Suppl. 1): 288.
- Hungate, R., R. Dougherty, M. Bryant, and R. Cello. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. *Cornell Vet.* 42: 423.
- Kim, B. S., K. H. Chung, and H. T. Shin. 2000. Study on the development of *Aspergillus oryzae* culture with rumen fluids from slaughterhouse. *Korean Soc. Anim. Sci. Tech.* 42: 85-92.
- Klingerman, C. M., W. Hu, E. E. McDonell, M. C. DerBedrosian and L. Kung. 2009. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 1050-1059.
- Kung, L., M. A. Cohen, L. M. Rode and R. J. Treacher. 2002. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2396-2402.
- Kwon, Y.-U., S.-B. Baek, H.-Y. Heo, H.-H. Park, J.-G. Kim, J.-E., Lee, C.-K. Lee, and J.-C. Shin. 2008. Changes in forage quality of plant parts with harvesting time in five winter cereal crops. *Korean J. Crop Sci.* 53: 144-149.
- Lee, S. C. 2000. Effects of chemical treatments and ensiling on the chemical composition and degradation rate in the rumen. *J. Korean Soc. Grassl. Sci.* 20: 177-184.

주 의

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