

발 간 등 록 번 호
11-1543000-001414-01

기질 특이적 유기태화-
미네랄류 제조법 확립
을 통한 다기능성 사료
첨가제 개발 및 수출용
기능성 미네랄 강화란
대량생산시스템 정립

최종보고서

2016.07.15.

주관연구기관 / 한일바이오메드
협동연구기관 / 메디뉴트럴
협동연구기관 / 전남대 수의대

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립” (개발기간 : 2013.07.16.~2016.07.15.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 07. 15.

주관연구기관명 : 한일바이오메드 (대표자) 조 향 현 (인)

협동연구기관명 : 메디뉴트럴 (대표자) 김 영 호 (인)

협동연구기관명 : 전남대 산학협력단 (대표자) 송 진 규 (인)

주관연구책임자 : 조 향 현

협동연구책임자 : 김 영 호

협동연구책임자 : 고 홍 범

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	113024-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.07.16. ~ 2016.07.15.	단 계 구 분	(해당 3단계) /(총 3 단계)
연구 사업 명	중 사업 명	자유공모			
	세부 사업명	고부가식품기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립			
	1 세부과제명	기질 특이적 유기태화-미네랄류 대량제조시스템 정립 및 산업화			
	2 세부과제명	유기태화 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립			
	3 세부과제명	양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가			
	4 세부과제명	육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛답) 생산			
	5 세부과제명	“헬리코박터 제어형 건기식 원료 및 제품형” 기능성 유기태화 소재 개발 및 동물 안전성(GLP) 및 인체유효성(CRO) 평가			
연구 책임자	조 향 현	해당단계 참 여 연구원 수	총: 15명 내부: 15명 외부: 명	해당단계 연구 개발 비	정부: 120,000천원 민간: 80,000천원 계: 200,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 50명 내부: 45명 외부: 5 명		총 연구개발비
연구기관명 및 소속 부서명	한일바이오메드/기업부설연구소			참여기업명	메디뉴트럴
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자 :	
<p>본 연구는 “기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립”을 목표로 5개 세부목표로 대별한 연구결과는 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 최종 선발된 2개 기질 (키토산 1, 유청단백질 1)과 유기태 수출 향상형 선발 축대로 핵산류를 사용하여 고효율 유기태 미네랄류 개발 및 안전성 평가 결과, 기질별 6종씩 총 18종의 표준화 생산공정 및 제품 QA를 고려한 분석법 정립과 10종 식품(사료전용 가능)과 6종 배합사료 등록을 완료하였다. 2. 산란계 대상, 기질별 유기태 미네랄 강화 사료 레시피 정립과 안전성 및 생육 특성 평가 (체액면역증진, Prebiotic, 성장능력 등)를 거쳐 기능성 축산물[항질병 혹은 미네랄 혹은 면역 글로브린 (IgY) 강화란] 생산용 사료첨가제의 표준 규격화 생산시스템 및 현장 매뉴얼을 정립하였으며, 최종 5종의 제품등록 (배합사료)을 완료 하였다. 3. 양계 현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가결과, 산란계 및 육계 공통으로 생육특성 증대, 장내 유산균 증폭 유도 및 유해균(살모넬라 및 대장균 등) 억제, 체내면역증진형 인 후보 4종중 최종 1종의 제품 등록 (배합사료)을 완료 하였다. 4. 육계 대상, 기능성 고급브랜드 계육 대량생산시스템 정립 관련 예비 선발 후보군 4종의 현장 유효성 평가 (장내 유해균 억제, 성장능력, 도체특성 및 육질분석 등)를 통해 표준화 우리맛답 생산용 제품 1종의 등록(제품명 : 메디프리바이오)을 완료하였다. 5. “헬리코박터 제어형 건기식 원료 및 제품” 개발 관련, 유기태 기법을 적용하여 제조한 기능성 원료(유청가수분해단백분말)의 7단계 건기식제품개발과정 (식약처 기준)중 최종 7단계 (인체유효성 평가, CRO)가 현재 진행 중이며, 최종 개별인증 획득(예정일:2017.11.)을 목표로 원활 하게 진행 중이며, 우선 1종의 식품품목 등록을 완료하였다. 				보고서 면수 1,091	

국문 요약문

		D-01
연구의 목적 및 내용	<p>1. 연구목적</p> <p>본 연구는 무기태 이온의 섭이 시 단점 (독성, 생체흡수 저하, 환경오염 등)을 해결하기 위하여, 기질 특이성 (단백질, 탄수화물류) 을 적용하여 제조한 신규한 유기태 미네랄 소재류 개발 및 이들을 적용한 최적 사료 레시피를 정립 한 후, 가금류 (산란계 및 육계) 를 대상으로 현장 유효성 평가하였다. 산란계를 대상으로는 고질적 살모넬라증 감염억제 효능 확인과 연계하여 고품질 축산물 생산과 관련한 항질병, 미네랄 및 면역인자 고함유 강화란 생산 관련 생체전이 메카니즘 규명과 현장 대량생산시스템을 정립 하였다. 산란계 실험결과를 토대로 항질병형 Prebiotic 사료 첨가제를 선발 한 후, 육계를 대상으로 항질병 및 고품질 계육 대량 생산시스템을 확립 하였다. 그리고, 유기태 기법을 적용한 개별인증 확보형 항헬리코박터 식품 (위 건강형, 기능성 원료) 개발하였다. 또한, 신규한 유기태 물질과 제조법 및 용도·용법 관련 지식소유권의 확보 및 최종 산업화 연구를 실시 하였다.</p> <p>2. 연구내용</p> <p>가. 1 세부과제 : 기질 특이적 유기태미네랄류 대량제조시스템 정립 및 산업화 (연구내용) 1세부과제에서는 천연물 (단백질류 및 탄수화물류) 을 기질로 미네랄 유기태 소재류 (항질병, 혈중 항체 증가 및 계란내 미네랄류 및 면역글로블린 증대형)의 개발과 산업화 연구를 실시하였다. 결과로서 유기태 기질로 유기태 효능이 최적화 되도록 분자량 및 순도를 조절한 1종 키토산올리고당 (이하, OCHT), 11종 후보 유단백질류중 유청 단백질 1종 (이하 WPS) 그리고 4종 핵산류중 5'-구아닐산이 나트륨 (이하, GMP) 1종을 최종 선발 하였다. 제조기법 정립으로서, 미네랄별 유기태화 메카니즘 확인과 유기태 소재류 제조 후 잉여 미네랄 및 이온류 제거법, 유기태 미네랄별 생체 흡수능과 관련한 pH 별 용출 효능 평가, 사료 내 미네랄 분산 및 균일성 및 항균성을 동시에 부여하기 위한 최적 11종 후보군중 최적 Surfactant 1종 선발 및 적용법 개발, 유기태 효능 증대형 촉매인자의 개발 및 추후 산업화시 제품류 QA(C) 까지 고려한 분석기법을 체계적으로 정립 하였다. 제품류의 현장대량생산시스템 정립으로서, 기질별 “단일 및 다중 미네랄 유기태 소재류 (Organo-mineral 형)” 및 “미네랄 강화 사료류 ” 제조 기법과 사용에 편리 하도록 제형화 (분말형, 과립 분산형 그리고 타정형) 를 표준 규격화 하였다.</p> <p>나. 2 세부과제 : 유기태 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 대량생산 시스템 정립 (연구내용) 2 세부과제에서는 유기태 미네랄 강화 사료류 제조 레시피 정립과 이들의 가금류 (산란계, 육계) 현장 유효성 평가를 통한 안전성 및 생육 특성 등의 현장유효성 평가를 통한 최적 투여농도 등을 설정 하였으며, 기능성 축산물 생산을 위한 현장 시스템 확립 연구를 실시하였다. 결과로서, 연구 성과목표별 유기태 미네랄별 강화 사료 레시피와 시작품 그리고 이들의 현장적용 매뉴얼을 확정하였다.</p> <p>다. 3 세부과제 : 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가 (연구내용) 3 세부과제에서는 현장유효성 평가 (2 세부과제 연계) 를 통하여, 가금류 (산란계 및 육계 구분) 사육현장 내 고질적 살모넬라증 감염 예방형 최적 유기태 미네랄 소재 선발 및 사료제조 레시피 확정 및 생육특성과 항질병 효능 등 파악과 연계 하여 고품질 기능성 축산물인 “단일 및 다중 동시 고함유 기능성 미네랄 강화란” 과 “기능성 면역체 (IgY) 강화란” 의 현장 대량생산 시스템을 확립 하였으며, 최종적으로 사료첨가제 및 축산물의 시작품과 현장매뉴얼을 확정하였다.</p>	

	<p>라. 4 세부과제 : 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산” 연구 (연구내용) 4 세부과제에서는 산란계 실험 결과를 토대로 선발된 유기태 미네랄 강화 사료의 현장 유효성 평가를 통한 항질병 및 무항생제 고품질 계육 생산 시스템 정립 [생산성 (성장) 증진 및 육질 등 분석 연구]을 통한 우리 맛닭 생산형 효능 평가를 실시하였으며, 최종 시작품과 브랜드 계육 현장 생산 매뉴얼을 확정하였다.</p> <p>마. 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구 (연구내용) 유기태 기질인 유청 단백질내 지표 및 항균 기능성분으로 Sialic acid를 효소 분리 및 유기태 칼슘 제조기법을 적용하여 제조한 항헬리코박터 제균형 “유청 가수분해단백분말” 시제품을 제조하였으며, 개별인증 (식약처, 위 건강) 신청 연구를 7단계 [1단계 : 소재 탐색, 2단계: 기준규격 설정 (표준분석법 Validation) , 3단계 : 생산공정 확립, 4단계 : 안전성 확인 (시험관 및 GLP), 5단계 : 효능 및 섭취량 검증 (GLP 및 CRO), 6단계 : 식약처 신청, 7단계 : 개별인증 확보 및 제품개발] 순서로 6단계 완료 및 7단계가 진행 중이다. 결과로서, 기능성 원료인 “유청가수분해단백분말)은 칼슘 포함 및 비포함형 2종과 지표 성분의 순도 조절형 2종을 시제품으로 제조 하였다. 개별인증 연구는 최종 7단계인 인체 CRO 평가 (단국대 병원, 완료 예정일 : 2016. 11. 30.) 가 종료 후 개별인증 확보예정일을 2017년도 10월 을 목표로 하여 원만하게 진행 중이다.</p> <p>바. 산업화 (연구내용) 산업화를 위해 지적 소유권 (특허출원 : 12건, 등록 5건)을 확보함과 동시에 국내외 판매를 위한 생산 공장 확보와 지속적 R&D연구기반 시설로서 기업부설연구소 (미래창조과학부, 농기평 보고)를 보유한 “(주)메디뉴트롤”사의 신규 기술창업과 사료 제조업 및 개발 제품류의 등록 (시작품)과 판매 허가를 완료 하였다.</p>
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 세부과제 : 기질 특이적 유기태-미네랄류 대량제조시스템 정립 및 산업화 (연구 성과) 유기태 기질은 키토산, 유청 단백질 그리고 핵산을 선발 하였으며, 기질별 “단일 및 다중 미네랄 유기태 소재류 (Organo-mineral 형)” 및 “미네랄 강화 사료류 제조” 그리고 현장 대량생산시스템을 확립 하였다. 2. 2 세부과제 : 유기태 미네랄 강화 사료를 이용한 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립 (연구 성과) “1 세부과제” 에서 제조된 기질별 유기태 미네랄 강화 사료류의 현장 유효성 평가 결과를 토대로, 목표별 사료 레시피 확정 및 현장 대량생산 시스템 정립 (시작품) 그리고 사육 현장 매뉴얼을 확정하였다. 3. 3 세부과제 : 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가 (연구 성과) 가금류 (산란계 및 육계 구분) 사육 현장내 고질적 살모넬라증 감염 예방형 최적 유기태 소재 선발 및 사료 레시피 확정 및 현장 유효성 평가를 통하여, 생육 특성과 항질병 효능 및 “단일 및 다중 동시 함유 기능성 미네랄 강화란” 과 “기능성 면역체 (IgY) 강화란” 대량생산 시스템 확립함과 동시에 최종 시작품과 현장적용 매뉴얼을 확정하였다. 4. 4 세부과제 : 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산” 연구 (연구 성과) 유기태 미네랄 강화 사료 (4종) 중 항질병 및 고품질 계육 생산형 최적 사료 첨가제 확정 (시작품 : 1종, 제품등록 : 메디프리바이오) 및 현장 대량생산 시스템 정립 및 시작품 (4종) 과 고품질 계육의 현장 생산 매뉴얼을 확정하였다. 5. 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구 (연구 성과) 항헬리코박터 관련, 지표 및 기능성분을 Sialic acid로 확정 및 효소 분리

	<p>법을 적용한 기능성 원료로서 “유청가수분해단백분말 (개별인증 신청명 확정)”의 대량생산시스템 정립과 시제품 4종 (식품등록 1종 완료, 종류 : 갈습 포함 및 비포함형 2종과 지표성분의 순도 조절형 2종)을 제조하였다. 개별인증 (식약처, 위 건강형 기능성 원료) 신청 연구 관련, 필수 수행 7단계 중 현재 진행 중인 최종 7단계의 인체 CRO 평가 (단국대 병원, 완료 예정일 : 2016. 11. 30.) 후 2017년도 10월 기점으로 개별인증 확보를 목표로 원만하게 진행 중이다.</p> <p>6. 산업화 (연구 성과) 산업화를 위해 “핵심 물질 및 제조” 부분과 연계된 “용도·용법” 관련 지적 소유권을 확보함과 동시에 국내외 판매를 위해 R&D형 생산공장 (전남, 영광) 및 연구시설 (기업부설 연구소, 미래창조과학부) 을 보유한 “(주)메디뉴트럴” 사 신규 기술창업과 사료 제조업 (2015. 11. 2) 및 제품 등록과 판매 허가를 완료 (2016. 04.~07.) 하였다.</p>					
<p>연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 기대 효과</p> <p>가. 국내외 가축 보건 건강 및 소비자 건강증진 등 삶의 질 향상을 위한 글로벌 기능성 축산자재 제품 개발 관련 활용</p> <p>나. 기술적 측면</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 당 사 : 신규 유기태 소재 개발 축적 KNOW-HOW결과 관련기술 국제선도화 및 기업 활성화 기대 2) 지역산업 : 농축산업 사육 현장의 고질적 질병 예방 문제 해결 기대 3) 국 가 : “친환경농업육성 중장기 정책목표(무기이온 및 항생제 절감)” 부합된 국가 현안 기술로 적용 기대 4) 해 외 : 기능성 유기태 소재 및 제품 개발 KNOW-HOW의 산업화 연구에 기여 <p>다. 산업적 측면</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 당 사 : 유기태 미네랄 강화 사료첨가제 현장 런칭을 통한 당사 수익증대 기대 2) 지역산업 : 유기태 사료류 현장 런칭에 따른 관련 산업 연계 활성화 기대 3) 국 가 : 무기태 제제 관련 국가대책에 부합함에 따른 관련 산업화 연구방향 제시 4) 해 외 : 농축수산업분야 관련 미네랄 시장 활성화 기대 <p>라. 경제적 측면</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 당 사 : 국내 사료시장을 기반으로 60억 이상 및 200%/년 매출 신장효과 기대 2) 지역산업 : 항생제 저감형 현장 사육시스템 및 절감 효과 및 수익증대 기대 3) 국 가 : 국가 항생제 저감 및 무기태 미네랄류 수입대체효과 기대 4) 해 외 : 항생제 절감으로 동물 및 소비자 건강 복지와 농가 수익 증대기대 <p>2. 활용계획</p> <p>가. 국내외 가축시장 고질적 살모넬라증 감염예방형 기능성 사료첨가제 공급으로 현장 애로해결에 활용</p> <p>나. 유기태화 미네랄 소재류 : 건강기능식품으로 판매</p> <p>다. 유기태화 미네랄 강화사료 : 농축/수산업 사료첨가제로 판매</p> <p>라. 기능성 미네랄 강화란 : 성장기, 임신수유부 및 고령식 건강기능식품으로 판매</p> <p>마. 기능성 IgY 강화란 : 영유아용(식) 항로타바이러스용 식품첨가제로 판매</p> <p>바. 추후, 국내외 사료첨가제 이외 관련 농축수산업 분야 추가 확대 활용</p> <p>사. 추후, 국내외 건강기능식품 및 식품분야로 활용</p> <p>아. 추후, 국내외 미네랄 강화 사료첨가제(축산 및 수산) 제품화 연구개발 활용</p> <p>자. 추후, 국내외 미네랄 산업으로 용도·용법 및 적용성 확대 연구개발에 활용</p>					
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>유기태 미네랄 소재 개발</p>	<p>유기태 미네랄 강화 사료첨가제 개발</p>	<p>가금류 대상 현 장유효성 평가</p>	<p>고품질 기능성 축산물 생산</p>	<p>기능성 식품 개발</p>	

< SUMMARY >

		D-02
Purpose & Contents	<p>1. Purpose of Research</p> <p>The purpose of this research is to solve the demerits of feeding inorganic ions (such as toxicity, inducement of slow bioavailability, environmental pollution, etc.) and to develop a new organic mineral substance adopting the substrate specificity (of proteins and carbohydrates), and to evaluate the validity of a new recipe for optimal forage by in-field testing on poultry (both laying chickens and broilers). For the laying chickens, in connection with the effect of suppressing infection of salmonellosis, the biotransfer mechanism of reinforced eggs possessing high concentrations of anti-pathogenic minerals and immunologic factors related to production of high quality livestock, was closely examined to be adopted to the actual mass production system. Based on the test results of laying chickens, anti-pathogenic prebiotic forage additives were selected, and a mass production system for high-quality anti-pathogenic broilers was established.</p> <p>Anti-Helicobacter foods, with individual accreditation certificates (Gastrointestinal Friendly, Functional Ingredients) were developed adopting the organic technique.</p> <p>In addition, intellectual property rights for the new organic substances, its manufacturing process, and its use and usage were registered and now protected by law, and detail study for industrializing was performed.</p> <p>2. Detail of Research</p> <p>A. 1 Sub-Research: Establishment of mass production system of substrate specific organic minerals, and its industrializing. (Research Detail) Sub-Research1, looked into the development and industrializing of organic mineral substances (anti-pathogenic, and increasing: antibodies in blood; mineral containment of eggs; immunity globin) with substrates from natural substances (proteins and carbohydrates). As a result, chitosan, whey protein and nucleic acid were selected as organic substrates, and organic effect enhancing catalyst and “Single and/or multiple mineral organic substances (Organo-mineral)” were developed, and the mass production system for “Mineral enforced forage manufacturing” was established.</p> <p>B. 2 Sub-Research: Establishment of mass production system of functional enhanced livestock adopting organic mineral enforced forages. (Research Detail) Sub-Research 2 established the optimized dosage of organic mineral enforced forages, with development of new recipes for manufacturing, and field testing on poultry (laying chickens and broilers) to evaluate the validity, safety and effects on growth and development, along with detail research on how to adopt the functional livestock manufacturing system in the field. As a result, new recipes for each research objective organic mineral enforced forages, their prototype samples, and their field manuals were developed.</p> <p>C. 3 Sub-Research: Selecting organic substances to prevent chronic diseases in the poultry industry, and evaluating their effects. (Research Detail) Based on the field evaluation performed for Sub-Research 2, Sub-Research 3 selected organic mineral substances</p>	

	<p>which prevent the chronic salmonellosis infections in the poultry industry, and developed recipes of new forages, established a mass production system for “High concentrated single and/or multiple mineral enforced eggs” and “Functional immune body (IgY) enforced eggs” related to understanding the characteristics of growth and development, anti-pathogenic effects, etc., and as a result, forage additives, prototype samples of forages, and their field manuals were established.</p> <p>D. 4 Sub-Research: Enforcing anti-pathogeny of broilers, and research on the manufacturing of high-quality chicken products ‘Woori Matdak’ . (Research Detail) Sub-Research 4 established a mass production system of anti-pathogenic and antibiotic-free high-quality chicken products based on the field validity evaluation of the organic mineral enforced forage selected by the experiments on the laying chickens, evaluated the efficacy of the productivity of ‘Woori Matdak’ with the [Productivity (Growth) enhancement and flesh quality analysis study], and developed prototype samples and field manufacturing manuals.</p> <p>E. Research on development of functional health foods (individually accredited, Helicobacter controlling ingredients). (Research Detail) Prototype of anti-helicobacter whey protein hydrolysate powder was produced adopting the enzyme isolation of Sialic acid as the antimicrobial component of organic whey protein with the production method of organic calcium. Each prototype is undergoing individual accreditation (Ministry of Food and Drug Safety, Gastrointestinal Friendly) in 7 stages [Stage1: Material Selection; Stage2: Standard Establishment (Standard analysis validation); Stage3: Production process establishment; Stage4: Safety evaluation (test tube and GLP); Stage5: Confirmation of effects and dosage (GLP and CRO); Stage6: Application to the Ministry of Food and Drug Safety; Stage7: Attain individual accreditation and product development], where Stage6 is completed and now Stage7 is under progress. As a result, 4 prototypes of the functional ingredient, “Whey protein hydrolysate powder” were developed: including calcium; not including calcium; and two types where the index ingredient purity can be controlled. The individual accreditation is on schedule and is expected to be completed in October of 2017, after the completion of Stage7 human body CRO evaluation (Dankook University Hospital, Planned completion date: November 30th, 2016).</p> <p>F. Industrialization (Research Detail) The intellectual property rights has been registered for industrialization, and for domestic distribution, all required registration and permits were acquired for the technology foundation, forage manufacturing business and products of Medinutrol Co., Ltd..</p>
Results	<p>1. 1 Sub-Research: Establishment of mass production system of substrate specific organic minerals, and its industrializing. (Research Result) Chitosan, whey protein and nucleic acid were selected as organic substrates, and mass production system for each substrate ‘s “Single and/or multiple mineral organic substances (Organo-mineral)” and for “Mineral enforced forage manufacturing” were established.</p> <p>2. 2 Sub-Research: Establishment of mass production system of functional</p>

	<p>enhanced livestock adopting organic mineral enforced forages. (Research Result) Based on the field testing to evaluate the validity of each organic mineral enforced forage for each substrate, new recipes for each research objective organic mineral enforced forages, their mass production system, their prototype samples, and their field manuals were developed.</p> <p>3. 3 Sub-Research: Selecting organic substances to prevent chronic diseases in the poultry industry, and evaluating their effects. (Research Result) Organic mineral substances which prevent the chronic salmonellosis infections in the poultry industry were selected, recipes of new forages were developed, mass production systems for “High concentrated single and/or multiple mineral enforced eggs” and “Functional immune body (IgY) enforced eggs” related to understanding the characteristics of growth and development, anti-pathogenic effects, etc. were established, and final trial product along with its field manual were developed.</p> <p>4. 4 Sub-Research: Enforcing anti-pathogeny of broilers, and research on the manufacturing of high-quality chicken products ‘Woori Matdak’ . (Research Result) The optimum forage for anti-pathogenic high-quality chicken production was selected amongst the developed organic mineral enforced forages (4 types) (Trial Product: 1 type; Product Registration: MEDI-PREBIO), in-field mass production system was established, four trial products and field manuals for production of high-quality chicken products were developed.</p> <p>5. Research on development of functional health foods (individually accredited, Helicobacter controlling ingredients). (Research Detail) Mass production system for whey protein hydrolysate powder (each name for individual accreditation confirmed) was established; and 4 Prototypes (1 Completely registered; Types: including calcium; not including calcium; and two types where the index ingredient purity can be controlled) of the whey protein hydrolysate were produced, adopting the enzyme isolation of Sialic acid as the index and functional ingredient with regard to anti-helicobacter. The individual accreditation is on schedule and is expected to be completed in October of 2017, after the completion of Stage7 human body CRO evaluation (Dankook University Hospital, Planned completion date: November 30th, 2016).</p> <p>6. Industrialization (Research Detail) The intellectual property rights of the “use and usage” related to the “Production of key materials” has been registered for industrialization, and for domestic and overseas distribution, the registration for technology founding and forage manufacturing (2015.11.2) of Medinutrol Co., Ltd, who already has an R&D type production facility (Yeonggang, Jeollanam-do) and R&D Center (Industrial R&D Center certified by the Ministry of Science, ICT and Future Planning) and the product registration and distribution permit was completed (April ~ July, 2016).</p>
Expected	1. Expected Effects

Contribution	<p>A. Application to development of global functional livestock materials to improve the quality of life such as, enhancing the health of consumers and domestic animals.</p> <p>B. Technological Ripple Effect</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Company: Acquire a dominant position in the industry with the know-hows from the development of new organic materials, and vitalization of business. 2) Regional Industry: Solution to the chronic diseases in the livestock industry. 3) National: Expected to be selected as a National issue of state technology, with its compliance with the “Mid and Long term Policy Guide for Nurturing Eco-Friendly Agriculture (Reduction of inorganic ions, and antibiotics)” . 4) Overseas: Contribution to the research of production and industrialization of functional organic materials. <p>C. Industrial Ripple Effect</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Company: Profits from in-field launching of organic mineral enforced forage additives. 2) Regional Industry: Vitalization of satellite business according to the in-field launching of new organic forages. 3) National: Suggesting the way-forward for industrialization researches to follow the national policy on suppressing inorganic substances. 4) Overseas: Vitalization of the Mineral market for the agricultural and stockbreeding field. <p>D. Economical Ripple Effect</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Company: Annual sales over 6 billion KRW and annual growth of 200% is expected. 2) Regional Industry: Expected to have less pathogenic diseases, which results in increased profits due to less antibiotics, and anti-pathogenic manufacturing system. 3) National: Reduction of antibiotics, and import substituting effect of inorganic minerals. 4) Overseas: Better welfare and health for human and animals with reduced antibiotics. <p>2. Application Plan</p> <ol style="list-style-type: none"> A. Resolve difficulties in the industry by providing anti-pathogenic forage additives to suppress salmonellosis infections. B. Widen the application from domestic and international forage additives to more areas in the agricultural and stockbreeding industry. C. Application to domestic and international food industry and the functional health food market. D. Application to product research and development of mineral enforced forage additives (livestocks, fishery). E. Application to research and development of use, usage and applicability to domestic and international mineral industry. 				
Keywords	Development of organic mineral substances.	Development of organic mineral enforced forage additives.	Field validity evaluation on poultry.	Production of high quality functional livestock products.	Development of functional health food.

< CONTENTS >

1. Overview of Research	1
2. Domestic and International Technology Development Status	24
3. Detail and Result of Research	33
A. International and domestic trends of the technical development ----	33
B. Establishment of essential analysis methods -----	44
C. Establishment of mass production system of substrate -----	72
specific organic minerals, and its industrializing.	
D. Establishment of mass production system of -----	315
functional enhanced livestock, adopting organic mineral enforced forages.	
E. Selecting organic substances to prevent chronic -----	585
diseases in the poultry industry, and the evaluation of their effects.	
F. Establishment of mass production system for -----	727
High-quality functional Eggs product brand	
G. Establishment of mass production system for -----	816
High-quality functional chicken product brand	
H. Research and development of anti-Helicobacter -----	837
functional (Gastrointestinal Friendly) ingredients.	
4. Research Achievements, and Contributions to Industry	1030
5. Future Plan on Research Result	1039
6. Foreign Science and Technology Obtained Throughout the Research	1042
7. Security Class of Research and Development Result	1048
8. Status of Research Facilities and Equipment registered	
to National Science & Technology Information Service (NTIS).	1048
9. Safety Protocols Performed Throughout the Research and Development.	1048
10. Representative Achievement of Research and Development.	1049
11. Others	1053
12. References	1068

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	24
3. 연구수행 내용 및 결과	33
제 1 장 국내외 관련 연구경향 지속적 조사 -----	33
제 2 장 필수분석법 정립 -----	44
제 3 장 유기태 미네랄류 대량제조시스템 정립 및 산업화 -----	72
제 4 장 유기태 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 대량생산 -----	315
제 5 장 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가 -----	585
제 6 장 기능성 축산물(계란) 대량생산시스템 정립 -----	727
제 7 장 기능성 고급브랜드 계육 대량생산시스템 정립 -----	816
제 8 장 건기식 “헬리코박터 제어형(위 건강) 기능성 원료 및 제품 개발 연구 -----	837
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	1030
5. 연구결과의 활용계획 등	1034
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	1042
7. 연구개발성과의 보안등급	1048
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	1048
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	1048
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	1049
11. 기타사항	1053
12. 참고문헌	1068

1. 연구개발과제의 개요

D-03

1-1. 연구개발 목적

- 현재 국내외적으로 기능성 식품에 대한 소비자 요구성은 “효능 및 성분 안정(전)성”을 기본으로, 가격은 “식품”으로, 품질은 “의약품”수준 그리고 생산과 제품화에 있어 “친환경 등”을 동시에 요구하고 있다.
- 본 연구는 국내외 소비자 요구성을 충족시킬 수 있는 제안 건으로서, 국내외 신규성과 진보성을 보유한 신규한 다기능성 유기태화-미네랄 소재류를 개발 및 이를 적용한 사료첨가제를 가금류에 급여시켜, 건강기능증진형 해외수출용 기능성 강화란 및 브랜드 계속 현장대량생산시스템 정립에 관한 제안이다.
- 본 과제를 진행하기 위한 전체적인 수행방법은 다음과 같이 요약할 수 있다.
 - 1) 잉여자원인 천연물(단백질류 및 탄수화물류)을 기질로 신규한 다기능성미네랄 유기태화 소재류(항질병, 혈중항체 증가 및 계란내 미네랄류 및 면역글로블린 동시 증대형)를 개발하고, 2) 이를 사료첨가제로서 사료내 혼합하여 가금류(산란계, 육계)에 급여하는 사양시스템(육계생산시험 : 산란계 사육시스템 적용, 현장시설 보강 불필요)을 통하여, 3) 건강체로서의 사양조건 정립과 4) 국내외 소비자(성장기, 임신수유부, 성장기 및 고령식)요구성에 충족되는 5) 개발 기능성 제품군으로서 “단일 및 다중 동시 함유 기능성 미네랄 강화란”과 닭 체내면역인자와 연계한 생체전이시스템을 극대화하여 난백(IgA, IgM) 및 난황(IgY)내로 면역인자를 축적시킨 “기능성 면역체 강화란”과 미네랄류 및 불포화지방산이 강화되면서 육질이 토종닭 같은 “브랜드 계속(우리맛닭) 생산”과 더불어 5) “양질 병아리의 생산형 항질병 강화방안(면역글로브린 증대)”제시와 6) “건강기능성식품(개별인증 획득)” 및 “의약품 제품영역(가공분말)”까지, 7)용도·용법 및 응용성 확대결과를 토대로 관련 제품과 기술을 연계한 제품군(국내외 소비자 요구성 충족)을 해외수출과 국내판매 사업화를 동시에 진행하고 저 한다.
- 연구목표(핵심 개발내역 및 개발제품군)
 - 기능성 미네랄 유기태화 소재(12종) 대량생산시스템 정립 및 제품화
 - 단일 또는 다중 미네랄류 함유 강화란 생산형 사료 레시피(6종 이상) 정립 및 제품화
 - 산란계 및 육계 면역증대형(질병예방형) 기능성 사료레시피(1종 이상) 정립 및 제품화
 - 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립 및 제품화
 - 면역인자(IgY) 증대형 기능성 강화란(1종이상) 대량생산시스템 정립 및 제품화
 - 기능성 고급브랜드 계속(우리맛닭 1종) 생산시스템 정립
 - 건기식 기능성 원료 (유청가수분해단백분말)의 동물안전성(GLP) 및 인체유효성(CRO) 평가(개별인증 신청 및 획득)

1-2. 연구개발의 필요성

본 과제는 잉여자원인 천연물(유청, 유단백질, 키토산)을 기질로 다기능성(항질병, 혈중항체 증가, 계란내 미네랄 및 면역글로블린 동시 증대형) 미네랄 유기태화 소재류를 개발하고 이를 사료첨가제로서 가금류(산란계, 육계)에 섭이토록 하는 단순한 사양시스템(현장시설 보강 불필요)을 통하여, 국내외 소비자(성장기, 임신수유부, 성장기 및 고령식) 요구성에 충

족되는 “기능성 미네랄 강화란” 과 닭 체내면역인자 극대화와 연계 생체전이시스템을 통하여 난황(IgY)내로 면역인자를 축적시킨 “기능성 면역체 강화란” 과 “브랜드 계육(우리맛 닭)” 및 “대량생산시스템 정립” 과 더불어 “양질 병아리의 생산형 항질병 강화방안” 제시와 “건강기능성식품의 영역” 까지 연계한 국내외 소비자를 대상으로 한 용도·용법 및 이용성을 확대 시키고 저 하였다. 본 과제 수행을 위한 세부연구항목별 필요성을 정리 하였다.

가. 건강 기능성 식품으로의 개발 필요성

- 현재 국내외적으로 기능성 식품에 대한 소비자 요구성으로 “효능 및 성분 안정성” 과 가격은 “식품” 으로 품질은 “의약품” 수준을 요구하고 있으며, 생산과 제품화에 친환경 등을 동시에 요구하고 있다.
- 개발 예정 기능성 유기태화 미네랄 소재류와 기능성 강화란(가공처리 기준)의 경우는 건강기능성 식품 소재 및 제품으로 즉시 적용이 가능하다. 따라서, 관련 국내외 시장성을 조사하여 보았다(근거: 복지부, 미래 질환별 건강기능식품 융복합 핵심기술 연구개발 지원,2011).
 - 세계 기능성식품 시장은, 통계기관별로 다소 차이가 있으나 NBJ(Nutrition Business Journal, 2010)의 보고에 따르면 2000년 1,435억불 규모였던 세계 기능성식품시장은 높은 성장률로 2008년 2,697억불 시장규모를 차지하고 있으며, 세계 기능성식품 시장은 지속적 성장으로 2014년도에는 3,973억불 시장을 형성 할 것으로 전망 하고 있다.
 - 국내 건강기능식품 시장규모는, 건강지향적인 사회트렌드에 힘입어 2009년 기준 1조 2,000억원 그리고 2014년 4조 7,693억원로 증가하는 것으로 추산되고, 본 과제가 성공적으로 종료시는(R&D 투자율 15%, 생물자원 이용 비율을 100, 20, 10%로 가정, 이익 공유비율을 0.1~5%로 가정) 관련제품군 대비 생물자원의 원산국에 지불해야 하는 로열티는 188 ~ 1,642 억원에 달하는 수입대체효과를 얻을 수 있을 것으로 추정 된다.
- 국내는 2002년 건강기능식품에 관한 법률을 제정한 이후 국내 연구개발제품에 대한 정책적 지원 프로그램이 미미한 상태였으나, 최근 농림수산물부와 식품의약품안전청을 중심으로 건강기능식품산업을 미래 식품산업의 캐시카우로 육성하기 위한 정책적 지원 프로그램을 추진하고 있어, 건강기능식품 개발을 촉진할 것으로 보인다.
- 우리나라의 경우, 출산율 감소 추세가 진행됨에 따라 가구당 자녀수가 줄어들고 있는 반면 자녀의 건강을 위한 지출은 증가하고 있다. 또한, 고령친화형 건강기능식품 중 미네랄류, 면역제제 및 두뇌 기능향상, 집중력, 기억력 관련 제품은 어린이 및 청소년과 수요층이 중복되므로 인구구조 변화는 이들 제품군에 대한 수요 촉진요인으로 분석된다. 따라서, 과학의 진보가 인류의 수명연장을 가져옴에 따라 인간은 건강한 삶을 추구하였고, 이러한 소비자의 요구가 건강식품의 개발로 이어지면서 건강기능식품은 미래식품산업의 돌파구로 부상하게 되었다.
- 건강기능식품의 발전은 정체기에 들어선 세계 식품산업의 새로운 발전의 계기가 되어 세계 식품산업의 전반에 걸쳐 커다란 지각변동을 일으킬 것 이라는 전문가들의 예측이 현실로 구현되고 있으며, 이러한 시장변화는 많은 기업에게 새로운 기회로 인식되어 식품산업체 뿐만 아니라 식품 관련 분야에 참여하고 있는 대기업, 다국적 유통업체 및 제약업체도 적극 적인 시장참여 의사를 밝히고 있다.

- 우리나라 식품산업은 원재료의 80%를 수입 원료에 의존하고 있으나, 건강기능식품산업은 선진기술을 바탕으로 국내 자생원료만으로 개발이 가능하므로, 국내식품산업 구조개선 전략분야로 인식되어 관련제도 및 국가적 지원규모가 크게 확대될 전망이고, 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장 간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망이다.
- 국내 건강기능성식품 연구개발을 위한 저해요인으로는 다음과 같다.
 - 건강기능식품은 식품으로서 섭취를 통한 건강 및 질병 개선에 도움을 주는 효과를 구명해야하므로 일반식품에 비해 소재 개발, 효과구명, 임상연구 등 고도의 기술 수준이 요구됨. 약품과는 달리 안전성에 까다로운 기준으로 이를 확인하기 위한 노력이 필요하다.
 - 관련 산업 및 제도가 앞서 발달한 선진국 대비하여 기술력, 전문인적자원, 인프라, 투자 등이 여전히 부족한 실정으로, 수입 원료 및 제품에 대한 의존도가 높은 상황으로 저해요인으로 작용하며, 해외시장 진출 시에 각국의 특화된 인허가 제도에 대한 이해 및 정보획득이 쉽지 않은 상황이며, 관련 전문인력 또한 부족한 실정으로, 해외진출을 통한 수출산업화가 어렵다.
- 국내의 424개 기능성식품 제조업소는 제한된 품목의 제품군을 생산하는 영세한 규모의 업체가 대다수로, 주로 내수 시장 중심의 영업을 중심으로 하므로 업체간 경쟁이 치열할 수 밖에 없는 실정이다. 따라서 효능·효과에 대한 허위, 과대 표시광고가 문제가 되고 있으며, 이에 대해 식품의약품안전청에서도 지속적으로 관리, 감독을 하고 있으나 제한된 인력으로 적절한 관리가 이루어지기 어려운 상황이다. 이는 결국 소비자 신뢰의 저하로 연결되어 관련 기능성식품 산업의 활성화를 저해하는 요인으로 작용한다.
- 국내 10대 질환별 건강기능식품 R&D 로드맵을 살펴보면, 생활습관병인 비만(치지방유지), 당뇨병(혈당유지), 고혈압(혈행개선), 이상지질혈증(콜레스테롤유지), 관절염(뼈건강), 면역증강과 환경질환인 천식(호흡기질환), 아토피(피부염), 정신건강병인 치매(기억력개선), 우울증(스트레스해소)으로 선정한 바 있으며, 건강기능성식품의 연구개발 방향도 여기에 발맞추어 집중되고 있다.
- 2010년 국내 기능성 개별인증 내용별 현황은 국내 10대 질환중 건강기능식품 10대 R&D로드맵과 일치하는 경향을 보이지만, 본 과제와 관련한 기능성 미네랄 유기태화 부분(칼슘흡수 도움, 관절/뼈건강, 소화기능, 장건강)과 기능성 면역인자 강화란부분(면역기능)에 대한 개별인증은 저조한 실정이다. 따라서, 본 과제를 성공적으로 완료시 결과물(기능성 미네랄 소재류와 기능성 강화란 및 유청단백질의 동물 및 인체유효성 평가를 거쳐 개별인증을 확보(소비자 신뢰성 확보)한 경우 이들 해당분야로의 신규시장 런칭이 가능할 것이다.

나. 기능성 미네랄 강화란 연구개발 필요성

- 현대의 소비자들은 기능성 식품을 선호함에 있어, 단순영양성분 섭취외에 건강과 관련한 물질을 선호하고 있다. 소비자의 기능성 계란에 대한 선호도는 지속적으로 증가하고 있으며, 소비자의 기능성 니즈는 성별, 연령별 세분화 및 다양화 되고 있다.
- 현재, 국내 산란계는 7천만수를 유지하고 있는데 이를 기준으로 연간 계란시장을 추정하면 20,440천억의 시장을 형성하고 있다(근거 : 70,000천수/산란계 보유수x100원/알

x80%/년생산수율x365일).

- 국내 계란 거래가격('12.07.06.기준)으로 대한양계협회의 고시가격기준에서 할인율을 적용한 가격으로 계란을 매입해 오다가 '12.7.6일부터 변경된 고시 가격기준(할인율 배제한 시세로 전환)에 준해 거래되고 있는데, 계란 10개당 470~490 원이 하향되어 거래되고 있으며 하향수치 만큼 농가수익감소로 연결되고 있다(근거 : 자료 : 대한양계협회, 시세정보. '12.7월 기준 고시 변경기준일 전·후 평균가격., 축산물품질평가원. 「계란유통, 도매단계」.한국의 축산물 유통. 2012.11월. p.607.).
- 현재, 산란실용병아리 입식자체, 산란실용계 사육주령기간 단축, 대규모 농가 사육수수 감축운동 등 산란계농가의 자구적인 노력에도 불구하고 산란계수급상황이 악화되고 있어 생산자의 자율적인 수급조절만으로는 산란계산업의 위기를 막기 어려운 상황임에 따라 기능성 강화란에 대한 연구가 대안으로 대두되고 있다(근거, 대한양계협회 '12. 09.)
- 계란이 완전한 건강식품임에도 소비자들로부터 그에 상응하는 평가를 받지 못하고 있으며, 계란의 진가를 올리기 위해서는 식품의 3차적 기능인 생체조절에 중요시되는 영양소와 생리활성물질이 강화된 기능성 계란의 개발은 필요하다. 기 보고된 일반계란내 영양성분 분석결과는 다음과 같다(근거 : 식품영양소 함량자료집, 한국영양학회, 2009.).

표 1. 일반계란의 영양성분 분석표(가식부, 100g당)

● 영양성분(주요영양성분)

구분	에너지(Kcal)	수분(g)	단백질(g)	지방(g)	회분(g)	탄수화물(g)	식이섬유(g)	콜레스테롤(mg)
전란	138	76.2	11.8	8.2	1.0	2.8	0.00	475
생것	난백	49.0	87.7	9.8	0.0	0.7	1.8	0.00
	난황	362	50.2	15.5	30.5	1.7	2.1	0.00

● 영양성분(미네랄류)

구분	Ca(mg)	P(mg)	Na(mg)	K(mg)	Cl(mg)	Mg(mg)	F(ug)	Fe(mg)	Zn(mg)	Cu(mg)	Mn(mg)	Se(ug)	I(ug)
전란(생것)	43.0	162	152	143	180	12	1.0	1.4	1.3	0.18	0.03	31.7	25.6
생것	난백	3.0	13.0	285	213	-	11	-	0.3	tr	0.02	0.04	20.0
	난황	139	530	43	96	180	5	-	5.4	4.2	0.20	0.12	56.0

● 영양성분(비타민류)

구분	A(RE)	레티놀(ug)	B-카로틴(ug)	D(ug)	E(mg)	K(ug)	B12(ug)	엽산(ug)	C(mg)	B1(mg)	B2(mg)	B6(mg)	니아신(mg)	판토텐산(mg)	비오틴(ug)
전란	153	150	18	3.0	0.70	-	1.29	124.5	0.0	0.05	0.28	0.07	0.6	1.44	25.0
생것	난백	0	0	0	0	-	0.09	4.0	0.0	0.02	0.44	0.00	0.6	0.19	7.0
	난황	454	445	54	6.0	3.60	0.7	1.95	146	0.0	0.22	0.44	0.26	0.1	2.99

-근거 : 식품영양소 함량자료집(100g/가식부, 한국영양학회, 2009)

- 현재, 국내외적으로 기능성 계란은 계란이 갖는 기능성 물질 중 소량으로 존재하거나 없는 물질을 사료, 미생물 또는 인위적인 방법을 이용하여 계란내 축적시킨 것으로 영양소함량에서의 차이는 어떠한 기능성 물질인가에 따라 차이는 있을 수 있으나 기능성 물질을 제외한 다른 부분에서는 큰 차이는 없으나, 기능성 강화란의 성분균일성이 확보되어 소비자의 신뢰를 확보할 수 있다면 일반란 대비 고가의 소비자가를 형성 할 것이라는 점에는 이의가 없을 것으로 조사되었다(근거 : 현지 판매가 및 소비자 기호도 자체조사 결과, 2012. 07.).

표 2. 시판 계란 및 제품화 기능성 강화란 분석 결과

순서	구분	제품특성	판매가격 (소비자가, 원/알)	경쟁사명	비고
0	일반란	일반란	180	비상표	
1	일반 계란	특란	230	아침의특란	
		대란	213	"	
		왕란	247	"	
2	유정란	특란	240	알짜란	
		대란	350	"	
		왕란	350	"	
3	친환경 유기인증란	친환경전셀	280	유기란	
4	목초란	목초사료	360	(주)풀무원	
5	의성마늘란	마늘사료	367	의성축협	
6	오메가-3란	오메가합유	280	(주)생로원	
7	비타민E란	레티놀(비타민E)합유	413	(주)안전지대	경쟁업체
8	아그네스제로란	어드름 예방 항세 합유(마사지전용)	5,000	(주)에그바이오텍	경쟁업체
9	감마란	감마리놀렌산 합유	280	여주양계	경쟁업체
10	연천풀무홍란	풀무사료	375	연천군농업기술센터	
11	몸에 좋은 RG 홍삼란	홍삼조사포닌 합유	400	(주)엔엔비텍	경쟁업체
12	미네럴 강화란 (예: Fe-Egg)	미네럴 성분 고함유	300~413 (예상소비자가)	본 과제 해당	

- 국내 기능성 계란(계란내 기능성 성분 검출기준) 시장은 초기 단계임에 따라 평가가 불가하나, 기능성 축산물 및 계란시장이 점진적으로 성장하는 추세로 본다면 성장 잠재력은 무한 할 것으로 예상된다. 따라서, 객관적이면서 소비자 기호성을 충족(기능성분 함유량 기준) 할 수 있는 객관성을 확보한 제품을 출시시 시장성은 무한할 것으로 예측 된다. 국외시장의 경우, 현재는 예측불가하나, 국내시장에서 기능성 강화란에 대한 검증이 완료된 경우 무한한 국외 시장진출이 가능할 것이다.
- 본 과제에서는 식품소재(식품첨가물 공전 등재 소재)인 유단백질 및 다당류를 무기태 미네럴을 유기태화 시키는 기질로 활용하고, 무기태 이온을 여기에 킬레이팅 시키므로서 무독성 및 체내흡수효능을 증가시키면서 전이 기전을 통하여 최종 계란내 농축시켜 최종 목표인 “기능성 미네럴 강화란”을 생산하고 저 하였으며, 현재 국내외적으로 개발된 사례는 없다(2012.09.특허조사 결과). 본 연구가 성공적으로 완료시 개발된 “기능성 미네럴 강화란” 내 목표 함유 미네럴과 제품별 용도는 하기 표와 같으며, 더욱이 식품으로서 식약청 규제 대상에서 제외됨에 따라 신속히 시장접근이 용이하다.

표 3. 개발 기능성 강화란별 미네럴 함유량 목표치 및 핵심용도

제품화 순위	개발 기능성계란	목표 미네럴 함유량 (100g당)	제품별용도 (국내외 소비자)	안전성평가여부 (식약청 기준)	비고
1	Fe-Egg	4.5~15mg	1. 성장기 2. 철분결핍환자 3. 빈혈환자 4. 임신수유부	식품(비해당)	
2	Ca-Egg	100~200mg	1. 골다공증환자 2. 성장기 3. 구강 및 뼈건강 4. 노인환자	식품(비해당)	
3	Se-Egg	50~135ug	1. 암환자식 2. 고령친화식	식품(비해당)	
4	Cu-Egg	0.45~7.0mg	1. 철분결핍환자 2. 빈혈환자(철분흡수) 3. 임신수유부 4. 두피건강 5. 발모촉진 6. 탈모예방	식품(비해당)	
5	Zn-Egg	3.6~12mg	1. 면역증강환자 2. 성장기 청소년	식품(비해당)	
6	Mix-Egg	1~5항	1~5항	식품(비해당)	

○ 실제적으로, 연구진은 본 과제의 협동연구기관인 원일농장(산란계, 40,000수 기준, 60일)에서 선행연구를 실시한 결과를 토대로 기능성 미네럴 소재를 사료첨가제로서 섭이시켰을 때 농가추가 발생수익 부분을 분석하여 보았더니, 계란(기능성 미네럴 강화란)에서 352,152천원 그리고 브랜드 계육(우리맛닭)의 경우는 131,360천원으로 총 473,512원의 추가이익(상시이익제외)이 발생하는 것으로 분석되었다.

[산출근거]

1. 농가수익(기능성 강화란, 원일농장) : 352,152천원/년
 - 근거. 26.8원/1개 x 36,000개/일 x 365일/년)
 - 계란 1개 산출 : 계란 100개 생산시 산출비용(기능성 소재 4주급여)

수익증가액(A)		비용증가액(B)		이윤(원) (A-B)
항목	금액(원)	항목	금액(원)	
판매수익금	25,000	첨가제 비용	22,324.4	2,675.6
산출근거	<ul style="list-style-type: none"> ○ 판매수입금 산출근거 <ul style="list-style-type: none"> - 일반계란 150원/개, 기능성 미네럴 강화란 400원/개 ○ 첨가제 비용 산출근거(산란계 100수) <ul style="list-style-type: none"> - 사료섭취량 : 3,189.2g(113.9g/일 x 첨가제 10% x100수x4주) - 첨가제 비용 7원/g(7,000원/Kg) ○ 급여 4주이후 개발사료 소요비용: 7.973원/1개 생산가능예상 			

2. 농가수익(닭고기 판매, 원일농장 기준) : 131,360천원
 - 근거 : 821원/1마리x40,000원/원일농장x4회/년=131,360천원/년

다. 미네럴(임산수유부 관련) 제품개발 필요성

- 본 과제 수행후 성과물인 “기능성 미네럴(칼슘, 칼슘, 구리, 아연, 셀레늄)강화란” 및 “면역증진형(IgY) 강화란” 은 성장기(0~19세), 임신수유부 및 고령식(65세 이상)에 있어 필수적으로 필요한 건강기능식품일 수 밖에 없다. 따라서, 개발 제품은 순차적으로 국내외의 관련 건강식품 분야에 대하여 런칭함과 동시에 시장성을 확보할 예정이다.
- 2000년 기준 국내 출생아수는 634,501(조출생률 13.3%)명에서 2005년 435,031명(조출생률 8.9%)으로 급속히 감소하다가 출산장려정책에 힘입어 2011년은 471,265명(조출생률 94%)으로 증가한 것으로 조사 되었다.
- 철분을 포함한 대부분의 미네럴은 인체, 가축 및 식물을 막론하고 반드시 필요한 영양소이나, 결핍시 미네럴 결핍성 질환이 수반되나, 현재 상용 미네럴의 경우 무기태임에 따라 독성을 보유하고 생체흡수능이 낮음으로 인하여 유기태화 기법의 개발을 통하여 이를 해결하고자 하는 연구가 국내외적으로 활발히 이루어지고 있다.
- 관련하여, 임신수유부 대상 개발제품의 시장성 또한 증가할 것으로 예상되는데, 임신수유부가 섭취할 수 있는 미네럴 제품의 경우는 대부분이 무기태 이온임에 따라 그 자체가 보유하고 있는 독성 및 체내흡수효율이 낮음에 따라 과량 섭취를 기본으로 하고 있다.

표 4 . 무기태 및 유기태 미네럴 소재의 독성저감 효과(예 : 철분제제 기준)

독성 평가	대표적 무기태화 소재(2가철 기준)			유기태화 제제 (선행제조, Fe-WPS)
	Ferrous Sulfate	Ferrous Fumarate	Ferrous Gluconate	
LD ₅₀ (mice)	245mg	540 mg	630 mg	3,200mg
비고	출처 :현대양돈(2002년 6월호)			선행연구결과

- 철분 결핍은 가장 흔한 영양소 결핍 중의 하나로 WHO에 의하면 전 세계 인구의 66~80%인 40~50억에 영향을 미치고 있고, 세계 인구의 30%인 약 20억이 철분 결핍이 주 원인이 된 빈혈로 고통 받고 있다고 한다. 이처럼 철분 결핍과 빈혈은 국제적인 보건 문제 중의 하나로 영·유아에게는 성장 지연 및 인지 능력 저하를, 성인에게는 운동 수행 능력 및 생산성 저하를 유발시키고, 특히 임신 기간의 빈혈은 모체 사망률을 증가시킬 뿐만 아니라, 태아성장지연, 저체중아 출산, 태아의 사망률을 증가 시킨다.
- 철분 결핍의 원인은 철분 섭취가 부족하거나 영·유아기, 청소년기, 임신·수유기처럼 철분 필요량이 급격히 증가하여 섭취량이 따라가지 못하는 경우, 충분히 섭취하고 있음에도 불구하고 만성 위장 출혈, 치질, 기생충 감염 등의 이유로 제대로 흡수, 이용되지 못하는 경우로 나눌 수 있다.
- 임신 중기에 비해 임신 말기에서 한국 임신부의 평균 Hb 수치가 증가하고, 빈혈 판정 임신부의 비율이 14.5% 감소한 것은 임신을 이유로 섭취하기 시작한 건강식품, 특히 중기부터 섭취하기 시작했다는 철분 보충제의 효과가 큰 것으로 판단된다. 철분 보충제의 효과에도 불구하고 임신 말기 빈혈 판정 임신부의 비율은 29.1%로 여전히 높게 나타났다 (근거 : 국내임산부의 임신단계별 철분결핍형 빈혈발생 현황, 매일유업 자료, 2007)
- 한국 임신부의 철분 결핍 상태는 79%라는 상당히 높은 철분 보충제 섭취 비율에도 불구하고 전체 임신부의 35.9%가 여전히 빈혈로 판정되는 심각한 수준임과. 이와 같은 현상을 개선하기 위하여, 철 보충의 노력시기를 앞당기고, 임신 중기에 철분을 과다 함유하여 금속성 맛, 메스꺼움 등의 부작용을 유발하는 철 보충제를 섭취하는 대신, 임신 전부터 일상적으로 꾸준히 철분강화식품, 비타민, 건강식품과 같은 다양한 diet-based approach를 시도할 것을 제안하였다(근거, 매일유업 발표자료, 2007).
- 무기태 미네랄의 단점을 보완할 수 있는 유기태화 미네랄 제제의 개발 필요성에 대하여는 국내외 식품/농업/축산업 관계자 및 식품영양학자들 모두가 공감하고 있으나, 현재는 무기태 이온의 단점을 해결할 수 있는 소재개발과 이들에 대하여 유기태화 시킬 수 있는 객관적인 결과물은 없으며, 아미노산, 효모추출물 및 철분제제의 말비장 추출물을 활용한 “페리친” 이외에는 현재 산업화 제품은 없다.
- 제품화 가격의 경우에서도 무기태 < 유기태화 소재 < 천연(동물추출물 등) 제품순으로 제품가격은 높은데, 본 과제 관련(유기태화 미네랄 소재) 아미네이트 계열 소재가 동물 사료첨제로서 사용되고 있지만 안정성(pH, 내열성 등) 결여로 인하여 인체부분(식품 및 건기식품)에는 사용이 회피되고 있다. 이를 해결하기 위하여, 국내외 식품영양 학자들은 무기태 이온을 유기태화 하고 저 하는 시도가 경쟁적으로 이루어지고 있으나, 현재 가시화된 제품으로는 본 과제 수행부분 이외에는 없다.

표 5 . 미네럴 관련 건기식 및 상용화 제품의 현황 및 경제성 평가

구분	경제제품비교부문					경제성평가 (순수미네럴기준)		판매사
	미네럴 소재 적용 제품별/분야별 분석					함유량(mg)	원/1mg	
	품목명	제품화 기본원료	킬레이팅 TYPE	주 요 적용분야	소비자 제품가격 (원/Kg)			
Ca	칼슘분	인산수소칼슘	무기태	의약품		151/캡슐		(주)팜동제약
	Natural Ca600	CaCO ₃	무기태	건기식품	45,000원/120캡슐	600/캡슐	0.625	㈜NAWELL
	마시는칼슘	수용성아쿠아민	무기태	건기식품	98,000원/60개	288/개	0.176	㈜천호식품
	칼슘	폐각칼슘	무기태	건기식품	80,000원/120정	1,000/정	0.667	㈜보령약품
	Ca-WPS, Ca-OCHT, Ca-CP	유단백질	유기태	다용도	10,000원/Kg			본 과제 해당
Fe	헤마틴	말비장추출물	페리친단백질	의약품	120,000원/60캡슐	20/캡슐	100	조아제약(빈혈치료)
	헨젤	돼지비장추출물	페리친단백질	건기식품	40,000원/60캡슐	15/캡슐	44.4	㈜동서바이오팜
	Organic Iron	Ferrous Fumate	무기태	건기식품	29,000원/100정	73/정	3.97	㈜NAWELL
	SOLARAY Iron	젓산철	무기태	건기식품	36,000원/60캡슐	50/캡슐	12	SOLARAY사(미국)
	페로바-유	FeSO ₄	무기태	의약품	30,000원/60정	80mg/캡슐	6.25	㈜부광약품
Zn	체로아미노킬레이트(10%)	아미노산	아미네이트	사료첨가제	4,000원/Kg	100,000/Kg	0.04	㈜동우TMC
	Fe-WPS, Fe-OCHT, Fe-CP	유단백질	유기태	다용도	10,000원/Kg			본 과제 해당
	Organic Zinc	Zinc Gluconate	아미네이트	건기식품	52,400원/90정	105/정	0.180	㈜NAWELL
	ZMD(아연올료)	ZnSO ₄	무기태	건기식품		12/병(80ml)		㈜팜동제약
	키토징크S(4%)	효모배양	아미네이트	사료첨가제	13,000원/Kg	40,000/Kg	0.325	㈜삼양애니팜
Cu	Zn-메치오닌(16%)	메치오닌	아미네이트	사료첨가제	12,000원/Kg	160,000/Kg	0.071	㈜다원케미칼
	제텐아미노킬레이트(16.8%)	아미노산	아미네이트	사료첨가제	8,000원/Kg	168,000/Kg	0.048	㈜동우TMC
	Zn-WPS, Zn-OCHT, Zn-CP	유단백질	유기태	다용도	10,000원/Kg			본 과제 해당
	Chelated Copper 3mg	Bisglyconate	유기태	건기식품	9,000/90캡슐	3/캡슐	33.33	BLUEBONNET(미국)
	카파아미노킬레이트	아미노산	아미네이트	사료첨가제	7,000원/Kg	100,000/Kg	0.07	㈜동우TMC
Se	Cu-WPS, Cu-OCHT, Cu-CP	유단백질	유기태	다용도	10,000원/Kg			본 과제 해당
	Seleno Excell	효모배양	아미네이트	건기식품	9,000/180캡슐	200ug/캡슐	250	Health Origin사(미국)
	GNC셀레늄	효모배양	아미네이트	건기식품	38,000/100정	100ug/정	3,800	GNC사(미국)
	셀레니스트(2,000ppm)	효모배양	아미네이트	사료첨가제	20,000원/Kg	2,000/Kg	10	㈜다원케미칼
Se-WPS, Se-OCHT, Se-CP	유단백질	유기태	다용도	10,000원/Kg			본 과제 해당	

- 본 과제에서는 무기태 미네럴을 유기물질에 킬레이팅 한 유기태화-미네럴 소재를 개발 함으로서 1차 무기태 이온이 보유하는 고유독성을 저감시킴과 동시에 체내흡수능력을 증대시키고, 이를 동물(산란계 및 육계)섭이를 통하여 계란에 전이 및 농축시키심으로서 미네럴류와 동시에 면역인자를 고품량 함유시킨 제품으로 개발하여 안심제품으로서 섭취할 수 있는 기능성 강화란을 개발하고 이를 제품으로 제공할 것이다.
- 개발제품인 “기능성 미네럴 강화란” 과 “기능성 면역증진형 강화란” 의 신규규모는 약 22억원으로 예측되고, 이때 소요 강화란수는 7,163,227개(년)개와 관련한 신규시장 런칭이 가능할 것으로 판단 된다.

라. 미네럴(“성장기” 관련) 제품 개발필요성

본 과제 수행후 성과물인 “기능성 미네럴(칼슘, 칼슘, 구리, 아연, 셀레늄)강화란” 및 “면역증진형(난황 : IgY) 강화란” 은 성장기(0~19세), 임신수유부 및 고령식(65세 이상)에 있어 필수적으로 필요한 건강기능식품일 수 밖에 없다. 따라서, 개발 제품은 순차적으로 국내외 관련 건강식품 분야에 대하여 런칭과 동시에 시장성을 확대가 가능할 것으로 판단되었다.

- 2012년 7월1일 기준, 국내 총인구수는 50,345,325명으로 조사되었는데, 본 과제와 관련한 성장단계(남여 총계, 0~19세)범위의 인구수는 1,1217,998명(남자 : 5,787,408명, 여자 : 5,359,588명)으로 조사되었다.
- 성장단계에 있는 유아 및 청소년은 미네럴의 체내소요량이 높은 편이나 상급이 있었듯이 무기태 미네럴을 섭취하는 것이 현실이다. 따라서, 본 과제가 성공적으로 완료되는 기능성 미네럴과 영양원을 동시에 공급하는 우수한 식품으로 인정받을 것이다.

표 6 . 식약청 기준 일일 무기태 미네랄류의 권장 및 상한섭취량(식약청, 식품공전 기준)

미네랄류	미네랄별 일일 권장량 및 섭취상한수치(mg/일당)								
	평균필요량			권장섭취량			상한섭취량		
	유아	남자	여자	유아	남자	여자	유아	남자	여자
Ca	390~470	560~800	510~660	500~600	700~1,000	650~900	2,500	2,500	2,500
Fe	4.5~5.4	6.3~11.8	5.8~12.9	6~7	8~15	8~14	40	40~45	40~45
Cu	0.22~0.25	0.33~0.6	0.33~0.6	0.3~0.33	0.43~0.8	0.43~0.8	1.5~2	3~10	3~10
Zn	2.4~3.2	4.5~8.2	4.4~7.2	3~4	5~10	5~9	6~9	13~35	13~35
Se	0.017~0.019	0.025~0.06	0.025~0.06	0.02~0.025	0.03~0.06	0.03~0.06	0.08~0.12	0.15~0.4	0.15~0.4

마. 기능성 축산물 개발 필요성 [국내 가금류(닭, 오리) 보유량 및시장성 분석]

- 본 과제에서 해결하려는 기능성 축산물 개발개념은 다음과 같다. 즉, 개발된 유기태화 미네랄류는 물리/이화학적 반응조건에서 안정하고, 장내 미생물만의 영양분해 및 체내 흡수토록 제조한 후, 사료로서 섭이시 혈청면역인자 증가와 생체전이 시스템을 통하여, 산란계를 대상으로는 기능성 미네랄류 및 면역글로부린(IgY)의 함유량을 의약품 수준으로 극대화된 기능성 강화란을, 육계(산란계 사육시스템 적용)는 미네랄 증가, 불포화 지방산 증대, 수분량 감소 등 및 식감이 토종닭과 동일수준의 브랜드화 “우리맛닭”을 개발 하는 것이다.
- , 기능성 축산 개발을 위해 사용되는 국내외적 사료첨가제 개발관련 기초소재로는 탄수화물류 (올리고당, 키토산), 단백질류(보호아미노산, Exorphin), 지방류(보호지방, 올레인산), 비타민류(카르니틴, 나이아신, 비타민 A 등), 미네랄류 및 기능성 지질류(올레인산, GLA 등)등이 대부분 단일소재로서 단일기능성을 기초로 현장에 적용되고 있다.
- 국외 축산물 시장은 다음과 같이 극단적으로 양극화되어 있는데, 저개발국은 축산물의 절대적 물량 자체가 근본적으로 부족하여 대다수 국가의 경우 사회적으로 가장 선호되는 기호성 식량이 수요에 비해 항상 공급이 부족하다. 선진국의 경우는 건강과 축산물 사이의 상호 관계를 사회적으로 충분히 인식하고 있어 전통적 축산물 및 축산 가공물은 시장이 정체되어 있지만, 기능성 축산물 및 고기능성 축산 가공물 시장이 급격하게 성장 중에 있다.
- 저개발국은 전통적 축산물 및 축산 가공물 위주로 시장이 형성되어 있지만, 선진국에서는 성장한계에 도달한 축산 시장에 기능성 축산 가공물이 주목받고 있다.
- 현재, 선진국은 고기능성 축산가공물은 아직 연구단계에 있지만, 기능성 축산물은 다수 개발되어 시장을 형성하고 있으며 대표적인 기능성 축산물의 예는 다음과 같다.
 - Egglad's Best egg사의 Egglad's Best 계란 : 식물성 사료첨가제를 먹여 계란 내 콜레스테롤 함량이 일반란에 비해 15 % 이상 낮아 일반란에 비해 2배 이상의 가격에 팔리고 있어, 미국 내 양계 회사 중 최고의 수익을 올리고 있다.
 - Omega meat사, California sunshine사 등에서 불포화지방산 강화 축산물을 시장에 출시고 있으며, 불포화지방산 축산물 시장이 형성되는 초기 단계에 있다.
 - 유용 미생물을 이용해 축산물의 콜레스테롤 수치를 낮추는 기술은 세계 수준에 올라 있으며 현재 세계적 축산회사들과 공동 연구 및 기술이전을 추진 중에 있어, 향후 미생물을 이용해 개발된 저콜레스테롤 축산물이 세계 축산 시장에 선두로 등장할 가능성이 있

다. 또한 아직은 초기단계이지만 본 연구팀이 제안하는바와 같이 각종 질환 예방 효과를 목적으로 하는 고기능성 축산물에도 활발한 연구가 진행되어지고 있어 곧 다양한 고기능성 축산 가공물이 시장에 선보일 것으로 예측된다.

- 유럽의 식육 가공품 분야에서는 알긴산과 허브류 추출물을 첨가한 저칼로리 식품소재 및 항산화 물질 첨가한 가공품에 대한 특허가 1/3을 차지하고 있다
- 기능성 식품이 시장에서 성공하기 위해서는 영양적 연구, 제품 개발이 필수적이거나, 반대로 기능성 식품시장은 제품 실패율이 높은 특징을 갖고 있음 식품 마케팅의 일반적인 성공요인 (기호성, 편의성, 다양성)은 기능성 식품에서도 중요한 역할 (Menard 2003)을 한다.

○ 양계부분에서, 2012년 12월 기준 국내 닭보유수는 146,835,639마리(3,144농장)를 보유하고 있으며, 이중 산란계는 약 6천 2백만마리(1,295농장)를 그리고 육계의 경우는 약 7천7백만 마리(1,571농장)를 보유하고 있으며, 이에 따른 전국 1일 평균 식용계란 생산량은 3천 6백만개 수준을 유지하고 있다 (근거: 통계청, 농림어업 가축동향조사, 2012. 1/4~4/4분기 평균).

- 양계농가는 일정규모이상일 경우에서 안정된 수익성을 보장받을 수 있는데, 현재 산란계농장의 경우에서 50,000수이상 규모를 보유하고 있는 농장은 전체규모에서 322농장으로 약 24%의 점유율을 보이고 있는데 이는 국내 양계농가의 영세성을 대변한다 할 수 있다.

- 육계농장의 경우도 50,000수 이상 규모를 보유하고 있는 농장이 약 40%이내임을 감안하면 국내 전체 양계농장은 약 70%가 영세성을 벗어나지 못하고 있음을 알 수 있다.

○ 오리의 경우(2012.12. 기준), 852가구에서 11,161,324마리를 보유하고 있는데, 이중 종오리는 약 124만마리(115농장)를 그리고 육용오리는 약 982만 마리(751농장)를 보유하고 있는 것으로 통계되고 있는데, 50,000수 이상의 농장은 현재 없으며 대부분이 5,000~30,000수 사육범위를 넘지 못하는 것으로 조사되었다(근거: 통계청, 농림어업 가축동향조사, 2012.).

○ 국내 산란계 산업 현황과 문제점 및 관련기관 대처상황은 다음과 같다.

- 소비자의 요구에 따른 산란계에서의 동물복지 필요성과 금년부터 산란계 동물복지인증제 시행되고 있으며, 밀집사육과 공장형 축사의 증가에 따른 계란생산과잉과 생산비이하의 가격형성으로 산란계농가의 생존에 걸림돌로 작용한다.

- 최근 축산농장의 동물복지 필요성이 대두되면서 밀집사육과 공장형 축산에 대한 대안이 요구되고 있는 상황으로 산란계농가들은 소비자의 여론을 수렴하고 술선수범하여 산란계사육환경을 변화시켜 정부정책에 동참하고 있다.

- 현재 산란계산업은 만성적인 생산과잉상태로 자체적인 수급조절이 어려운 상황으로 계란생산과잉이 이어지면서 난가는 지속적인 폭락으로 생산원가에 크게 못 미치는 상황에 처해있어 산란계농가의 경영악화와 산란계산업에 큰 위기감이 고조되고 있어 대책마련이 시급하다.

- 산란계 수급조절 현황으로서, 산란계 사육수수가 약 7천만수에 가까운 수치로 예년대비 큰 폭 증가함으로서, 산지 계란가격은 특란 개당 80원대 이하로 생산비 120원을 크게 하회 한다.

- 산란계 사육수수 증가로 장기불황 예고에 따른 산란노계 조기도태를 위한 랜더링이 진행중이나, 노계 도태량 증가로 정상적 도태기간은 약 1개월 소요되고 또한 노계 계정육으로 처리했을 경우 도태 기간 지연 및 재고량 증가로 악순환이 되풀이 되고 있다.
- 일부 농장을 제외한 대부분이 영세성을 넘지 못함에 따라 생산물에 대한 소비자가, 소비량및 해외수입 축산물 등의 관련 외부요인에 대한 민감성과 이에 따른 경제성(농가수익) 또한 동일선상에서 확보하지 못하는 실정이다. 이 문제를 해결하기 위해 관련업체, 관련학교 및 연구기관과 범정부차원에서 갖은 노력을 경주하고 있지만 뚜렷한 대안을 제시하지 못하고 있는 실정이다.
- 대안연구개발은 기본적으로 연구계통에서 진행하여야 하는데, 현재 계란소재 및 연구개발부분으로서 산업화(대량소비)에 치중되는 기초소재에 주안점을 둔 단편적인 연구가 학교(학회)주관으로 수행되고 있으며, 인력공급의 핵심인 축산관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있다.
- 결국 국내 양계 및 축산업의 총체적인 피해로 연결되고 있어 첨단화(고부가가치화) 연구개발 필요성에 대하여는 전체적인 공감대가 형성되어 있으나, 시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 잉여계란 원부자재에 한정되는 소재 제조와 제품생산에 치중하고 있음. 이에 따라 대규모 양계산물이 필요한 소비자층(식품관련 기업)도 연구개발보다는 국외에서 반제품 상태의 가공물을 직수입하여 제품화 및 판매유통을 실시하는 실정이다.
- 본 과제는 기능성 소재를 개발하고 이를 산란계(기능성 강화란 개발) 및 육계(고급브랜드화 우리맛닭 개발)에 적용함으로써 국내외 소비자 기호성에 충족할 수 있는 고부가 양계산물을 생산함과 동시에 내수시장 및 해외수출을 목표로 하고 있음에 따라, 상기의 국가적 현상애로문제(FTA대처형, 국내농가수익모델 제시)를 해결할 수 있는 중요한 대안이 될 것이다.
- 실제적으로 기능성 사료첨가에 따른 브랜드 계육 생산가능성과 추가이익 발생액을 현장시험(40,000수, 원일농장 기준, 위탁연구기관)을 통하여 선행평가(기존 산란계 사양시스템 적용기준)하여 보았더니, 본 과제 관련 기능성 사료첨가제 급여후 닭고기 판매수익은 1개농장 기준으로 년 3억9천만원의 추가이익이 발생하는 것으로 예측되었다.

- 산출근거: 40,000수/1회전x821원(추가이익)/1마리x12회/년=394,080천원/년

수익증가액(A)		비용증가액(B)		이윤(원) (A-B)
항목	금액(원)	항목	금액(원)	
판매수익금	100,000	첨가제 비용	17,906	82,094
산출근거	○ 판매수입금 산출근거(추정) - 일반닭고기 3,000원/마리, 미네럴 사료첨가 4,000원/마리 ○ 첨가제 비용 산출근거 : 사료섭취량 x 첨가제 비용 x 급여기간 - 사료섭취량 : 2,558g(2,558g/4주 x 첨가제 10% x 100수) - 첨가제 비용 7원/g(7,000원/Kg) ○ 평가개체수 : 100마리 기준 산출			

바. 기능성 강화란 개발 필요성(국내 계란 수입량 분석)

- 현재, 국내 산란계는 약 7천만수를 유지하고 있으며, 이를 기준으로 연간 계란시장을 추정하면 20,440억의 시장을 형성하고 있다(근거 : 70,000천수/산란계x100원/알 x

80%/년생산수율 x 365일).

- 현재, 국내 가공용 계란 시장규모는 1조 2천억 시장을 형성하고 있는데, 가공용은 2400억(점유율 20%, 시장예측규모의 20% 적용), 업소용은 5,400억(45%) 그리고 가정용은 4,200억(35%)의 시장성을 보유하고 있다(근거 : 축산물품질평가원. 「계란유통, 출하단계」.한국의 축산물 유통. 2012.11.).
- FTA체결 기점으로 국내 거대 계란시장에 대하여 계란수입량 또한 급증하고 있는 실정이다. 2011년 기준 국내 계란 수입량은 420만Kg였으며, 이중 중국산이 대부분(약 280만Kg)을 차지하고 있으며 다음으로는 미국, 독일, 우크라이나 순으로 수입하고 있으며, 2010년에 계란 총수입량은 95만Kg(중국산 54만 Kg)에서 최대 약 130만(100만Kg 점유, 2005) 범위였던 수입량이 2011년 이후로는 급격히 증가되는 추세이다.
- 현재, 국내 계란 수입량의 대부분은 중국산(저가계란)이 대량수입 및 가공식품화 되고 있는 실정임. 이러한 결과는 소비자가 하락폭 증가와 연계하여 국내 계란가격은 생산가가 당연히 높아지는 연결고리가 형성되면서 양계농가는 수익성 악화가 반복되는 악순환이 계속되고 있으나, 국가차원에서 특별한 대안(소비 진작, 기능성 강화란 개발 등)이 없는 실정이며, 뚜렷한 대안이 제시되지 않는 한 해가 지날수록 이러한 굴곡은 심해질 것으로 판단 된다(근거 : 출처 : 축산물품질평가원. 「계란유통, 출하단계」.한국의 축산물 유통. 2012.11.).
- 대안으로서, 국내의 계란시장성을 높이기 위하여 관련 업체들은 기능성 강화란을 생산하기 위한 활발한 연구를 진행하고 있는데, 본 과제는 상기의 국가적 현장애로문제(FTA대처형, 국내농가수익모델 제시)를 해결할 수 있는 중요한 대안이 될 것이다.

사. 기능성 유기태화 미네랄 소재류 개발 필요성

본 연구에서는 다기능성(항질병, 혈중항체 증가, 계란내 미네랄 및 면역글로블린 동시 증대형) 미네랄 유기태화 소재 개발하고 이를 사료첨가제로서 가금류(산란계, 육계)에 섭이토록 하는 단순한 사양시스템을 통하여, 혈중항체 극대화과 연계 생체전이시스템을 통하여 난백(IgA, IgM) 및 난황(IgY)내로 면역인자를 축적시키는 결과를 확보함으로써 기능성을 보유한 계란 생산, 병아리의 항질병 강화방안 해결과 더불어 가공식품의 영역까지 용도·용법 및 이용성을 증대시키고 저 한다.

- 미네랄은 생체에서 절대 필요한 영양인자이며, 생명체계에서 단일 및 복합적으로 다양한 역할을 수행하고 있음. 현재 식품, 의약품, 사료첨가제 및 농업용 미네랄 제제의 대부분은 무기태화 소재를 경제성과 대체소재의 부재로 인하여 동일선상으로 사용하고 있다.

표 7 . 생명체계내에서 미네랄의 역할

생명체계	미네랄 기능성	비고
면역체계	구리, 아연, 철, 셀레늄	
에너지생성체계	마그네슘, 인, 망간	
호르몬 체계	철, 망간, 아연, 구리,마그네슘,칼륨	
비타민 생성체계	코발트	
혈액생성체계	아연, 구리, 망간, 마그네슘, 철	
번식(생식)체계	인, 구리, 칼륨, 망간, 아연, 마그네슘	

- 무기태 미네랄의 단점(독성 및 체내흡수력 저하, 환경오염원 등)을 보완할 수 있는 유기태화 미네랄 제제의 개발 필요성에 대하여는 국내외 식품/농업/축산업 관계자 및 식품영양학자들 모두가 공감하고 있으나, 현재는 무기태 이온의 단점을 해결할 수 있는 소재의 개발과 이들에 대하여 유기태화 시킬 수 있는 객관적인 결과물은 없으며, 철분제제중 말비장 추출물을 활용한 “페리친” 이외에는 현재 산업화 제품은 없다.
- 현재 국내외 관련 미네랄 분야의 고부가성을 위하여, 무기태 이온의 유기태화 미네랄 소재로의 개발원칙을 설정한 바 있다(근거 :AAFCO, 1998). 본 연구에서 유기태화를 위한 기질 물질 후보군으로 적용 예정인 물질이 단백질류 (탈지분유, 전지분유, 유청단백질 등)와 Nucleotides 및 키토산류이고 여기에 수용성 광물질을 공유결합 등을 통한 복합물로 개발할 예정이다. 결국 본 과제의 결과물은 이 원칙을 충분히 수용한 개발품이며 따라서 현재 보유기술만으로 국내외 연구분야에서 선도적인 기술 우위를 점하고 있다 할 수 있다.

표 8 .국내외 무기태 이온의 유기태화 미네랄 소재로의 개발원칙(AAFOO,1998)

유기태화형태	정의	해당부분 (개발소재)
Metal Amino Acid Complex	수용성 광물질염과 아미노산의 복합물	+++
Metal Amino Acid Chelate	광물질 한개가 1~3개의 아미노산과 공유결합을 이루고 있는 상태를 말하며, 가수분해된 아미노산의 평균무게는 150정도이고, 전체 Chelate복합물의 분자량이 800dalton을 넘지 않아야 함.	+++
Metal Polysaccharide complex	광물질과 다당체가 결합된 복합물	+++
Metal-Proteinate	광물질과 여러 개의 아미노산(Peptide), 또는 부분적으로 가수분해된 단백질이 Chelate된 복합물	++++

-: 해당사항없음, + : 근접성 10%이하, ++: 근접성 10~50%, +++:근접성 50%~90% 이상, ++++: 근접성 :90% 이상

- 본 과제와 연계하여 개발코 저 하는 유기태화 미네랄 소재류는 이러한 무기태 이온의 단점을 해결하는 신규한 연구결과물이 될 것임. 식품부분에서는 “바이오 식품” 영역에 해당되는데, 이는 축산업에 적용 시는 사료첨가제, 식품에 첨가 시는 식품첨가제 그리고 건강기능식품으로 적용 시는 건강기능식품 소재 등으로 별도의 허가과정이 필요 없이 즉시 사용이 가능하고 용도·용법 및 응용성 또한 무궁무진하다 (근거 : 2011년 식약청 건식 적용자문평가).
- “바이오식품” 영역에서의 국내 판매액 및 수출액을 기준으로 시장성(2010년 기준)을 평가하여 보았더니, 건강기능식품은 1,230억(수출액 290억원), 식품첨가물은 약 1,800억 (수출액 3,900억), 사료첨가제는 4,990억(수출액 8,880억) 그리고 기타바이오식품 영역은 1,130억(수출액 196억)으로 조사되어 총 연간 약 9,000억(수출액 1조 4천억)이상의 국내외 신규 런칭이 가능함을 확인 하였다 (근거 : 지식경제부, 바이오산업 국내판매 및 수출규모, 2010).

표 9. “바이오식품” 영역에서의 적용영역별 국내 수입액

(단위: 백만원)

대분류별	소분류별	2007	2008	2009	2010
바이오식품	계	12,016	19,617	30,391	4,840
바이오식품	건강기능식품	5,078	5,741	6,820	2,440
바이오식품	식품첨가물	711	2,801	3,927	289
바이오식품	사료첨가제	5,373	10,110	18,664	1,938
바이오식품	기타바이오식품	854	965	980	173

- 본 과제를 통하여 기능성 유기태화 미네럴 소재가 경제성 및 균일성(성분 및 효능)과 동시에 객관성을 확보되는 경우, 전체(자국판매 및 수출입 전체) 2조 8천억에 해당하는 국내외 초기 시장성을 기준으로 신규런칭이 가능할 것으로 예상된다.
- 본 과제에서 개발예정인 유기태화 미네럴 소재는 건강기능식품 공전(한국기능식품연구원, 2100.08.)의 “II. 개별기준 및 규격” 내 미네럴 영양성분(II.1.1.1~II. 1.1.25.)규정에서 “식품원료를 사용하여 미네럴을 보충 할 수 있도록 제조·가공한 것”에 해당 한다. 따라서, 개발이 완료될시 별다른 허가사항 및 검정절차 없이 생산 및 판매가 가능하다.

표 10. 기능성 미네럴 강화란 생산용 원료 및 유기태화 미네럴 소재의 법적규제 회피내역

제품화 순위	목표 기능성 계란	적용 미네럴류	사용원료	국가기준규격(영업/마케팅 컨셉)	
			유기태화기질류 (3부류 10종 적용)	건강기능성식품공전(II 영양소)	일일섭취량
1	Fe-Eg g	FeSO4	단백질류(탈지분유, 유청당백질), 키토산류(3종류)	II.1.1.17., 1)제조기준,(1)원료, (라) 식품 원료를 사용하여 철을 보충할 수 있도록 제 조·가공한 것	4.5~15mg
2	Ca-Eg g	CaCl2	단백질류(탈지분유, 유청당백질), 키토산류(3종류)	II.1.1.15., 1)제조기준,(1)원료, (라) 식품 원료를 사용하여 칼슘을 보충할 수 있도록 제조·가공한 것	210~800m g
3	Se-Eg g	SeO2	단백질류(탈지분유, 유청당백질), 키토산류(3종류)	II.1.1.20., 1)제조기준,(1)원료, (라) 식품 원료를 사용하여 셀을 보충할 수 있도록 제 조·가공한 것	15~135ug
4	Cu-Eg g	CuSO4	단백질류(탈지분유, 유청당백질), 키토산류(3종류)	II.1.1.19., 1)제조기준,(1)원료, (라) 식품 원료를 사용하여 구리를 보충할 수 있도록 제조·가공한 것	0.45~7mg
5	Zn-Eg g	ZnSO4	단백질류(탈지분유, 유청당백질), 키토산류(3종류)	II.1.1.18., 1)제조기준,(1)원료, (라) 식품 원료를 사용하여 아연을 보충할 수 있도록 제조·가공한 것	3.6~12mg
6	Mix-E gg	복합	단백질류(탈지분유, 유청당백질), 키토산류(3종류)	II.1.1.17(철), II.1.1.15(칼슘), II.1.1.20 (셀레늄), II.1.1.19(구리), II.1.1.18(아 연)	

- 현재, 유기태화 미네럴 소재연구가 국내외적으로 활발히 진행되고 있으나, 상용화된 제품으로서 본 과제의 유기태화 소재와 관련하여 유사한 소재로서는 아미노산중 "메치오닌 “을 기질로 하여 Fe-, Zn-, Se- 및 Cu-메치오닌 제제가 있다. 이외에도 효모내 미네럴 축적 후 가수분해물, 혈액부산물을 이용한 소재 등이 있으나 산업화에 있어 소비자 신뢰를 얻지 못하고 있다.
- 메치오닌유기태화 소재는 메치오닌(아미노산)이 보유하고 있는 기능기인 -NH2 및 -COOH에 미네럴를 도입함으로써 Aminate Type를 보유토록 제조하였으나, 이들은 물리/화학적 변화가 주어지는 경우 미네럴이 이탈되는 단점이 있다.

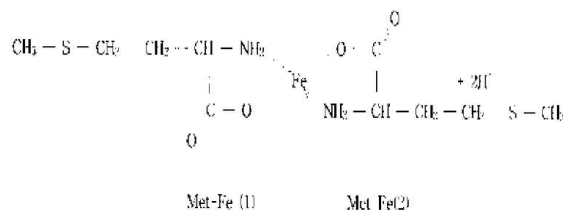


Fig 1. 현재 시판 사료첨가제로서의 대표적 유기태화 미네랄 제제 구조(예: Fe-메치오닌, 구조 : Aminate Type, 근거 : 특허출원(1020030055368, 2003.08.11.)

○ 본 과제의 유기태화 미네랄 소재 개발개념은 기존의 상용 유기태화 소재류(Aminate)와는 전혀 다른 제조메카니즘을 보유하고 있다. 즉, 일정 분자량을 보유하고 있는 다당체 혹은 단백질원을 원료를 대상으로 우선 분자량을 목표에 맞게 조절한 후, 기질 유기태 물질의 킬레이팅 관련 기능기(-S, -P, -COOH, -NH₂)를 극대화 되도록 유도한 후 여기에 목표 미네랄을 킬레이팅 반응을 유도하며, 이어서 물리/이화학적 변화에 안정하도록 결정구조화를 시킴으로서, 섭취 후 단지 생물활성(장내 미생물의 분해작용)만을 통하여 분해 (아미노산 4~5구성, 분자량 400~500)되어 체내흡수 되도록 구조(Oligopeptide Type)를 완성하였는데, 국내외적으로 이러한 결과물은 발표된 예는 현재까지는 없다.

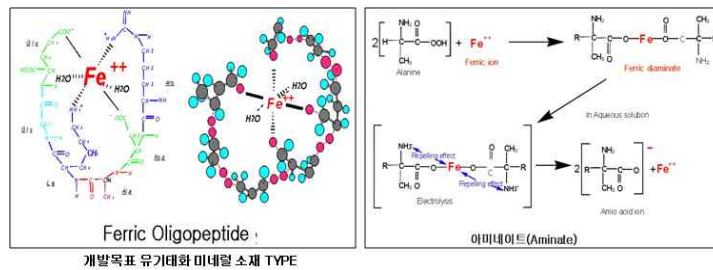


Fig 2. 개발목표 유기태화 미네랄(Oligopeptide Type) 대비 상용 유기태화 소재(Aminate Type)의 구조 비교

아. 본 과제관련 원료수급 및 시장성 분석

- 현재, 치즈제조 후 잉여 부산물인 유청단백질(1,000~2,000원/Kg, SD분말)의 경우, 최근 제과 및 제빵분야(제빵 착색, 경도향상 등)에 제한적으로 사용되고 있으나, 본 과제와 관련하여 산업화 관련 보고 된 바는 없다. 2020년 이후 FTA협약에 따른 관련 시장이 완전 개방 될 경우, 관련 제품의 시장은 해외 메이저 회사에 종속되리라 판단된다.
- 유단백질중 탈지분유(1,500원~2,000원/Kg)의 경우 매년 10만톤 이상이 누적되고 있는 실정으로 젓소농가와 국가적인 고민거리로 대두되고 있다. 또한, 키토산류(30,000원/Kg, 기준 : DAC 90%이상 및 점도 500CPS)는 건기식 원료로 국내외 시장에서 매출액이 높은 것으로 알려져 있으나, 용도·용법에 있어 극히 제한적이다.
- 본 과제가 성공적으로 완료시, 유기태화 개발 원료로서 유청단백질 만으로도 연간 소요량(유기태화 소재 1종 기준)이 1,650톤(소요비용:33억)이 소요되리라 판단되며, 현재 국제 시세가는 1,500원/1Kg(서유럽, 오세아니아기준, 1\$=1,000원 기준)으로 형성되어 있으며, 국내생산량 및 수입량은 43,506톤이다.

자. 본과제 관련 미네랄 소재류 식품적용성 현황

- 유기태 소재류를 적용한 국내 및 국외시장 제품화 경향으로, 우유와 계란이 대표적인

기능성 축산물 연구를 위한 우수한 소재로 대두 되고 있으며, 특히 국내의 경우는 이에 대한 연구개발 및 제품화가 활발히 진행되고 있으며 현재는 초기시장이 활발히 형성되어가고 있다.


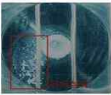

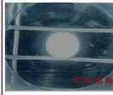
- 국내는 유제품 및 계란에 DHA, 칼슘 및 셀레늄 등의 미네랄을 첨가한 장, 위 및 간보호 효과보유 기능성 발효유(헛개추출물 첨가) 및 계란제품(난황 IgY)등이 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 가축 섭이시 단점(독성, 생체흡수능력 저하, 사료섭취량 감소로 인한 우유생산량 감소 등)해결이 가능한 소재 안심개발 및 목표 기능성분의 함량의 균일성을 확보할 수 사양기술이 부족함에 따라 단순첨가방법으로 회귀하는 수준이다.
- 본 과제 관련 개발제품인 유기태화 미네랄 소재류(5종 : Ca, Fe, Zn, Cu, Se)는 자체를 식품첨가물로 즉시 적용이 가능한데, 현재 국내 제품중 가장 접근성이 빠른 것은 유제품이다. 유제품은 고칼슘우유가 시장에 런칭되어 안정화됨에 따라 기능성 소재 첨가를 통한 강화우유의 고부가제품화를 목적으로 개발연구가 메이저급 유제품회사 주도로 경쟁적으로 진행되고 있다.
- 국내 메이저급의 영유아식을 포함한 단일사별 무기태화 칼슘제제(대표: 탄산칼슘 및 인산칼슘)첨가에 따른 비용은 연간 평균 30억을 초과하고 있었는데(노인식 및 특수영양식품 비적용), 이에 따라 유기태화 소재 필요성은 절대적으로 공감하지만 개발보다는 국내외 납품을 통하여 해결하고자 한다. 즉, 대체소재의 국내외적 부재와 설사 있다 하더라도 단순구입후 제품배합 패턴에 장기적 적용되어 있음으로 인한 개발의지 부재는 인정하는 경향이다.
- 현재, 국내우유시장은 2조(2010년 기준)을 형성하고 있는데, 이중 기능성 강화유 시장성(5종 기준)은 2,900억 그리고 단일제품에 대하여 약 1,200억 시장을 형성하고 있다(예 ; 고칼슘 우유 기준). 그러나, 제품화 연구개발보다는 경제성(영양학적 측면)에 치우친 단순첨가수준(예, 고칼슘 우유, DHA우유 등)에서 고가제품화 정책을 장기간 추진함에 따라 역시 소비자의 신뢰를 얻지 못하였으며, 결과로서 인하여 정체기에 접어들고 있다.

표 11. 국내 기능성 강화유의 개발제품 현황 및 시장성

제품명	시장성(억원)	특징	비고
□DHA우유 (오메가-3)	1,600	○ 어린이시장(1,000억원) ○ 베이비시장 : 600억원	사료공급 및 첨가를 통한 오메가-3g함량 보정
칼슘우유	1,200	대표 첨가원료 : CaCO ₃	시장성 감소(신뢰성)
저지방우유	1,200	지방제거	
비타민우유	2,500	방문판매	
Lacto-Free우유	□ 100	락타제 처리	Lactose효소분해
철분강화우유	- (기피)	○ 첨가물 : FeSO ₄ (7.5mg) ○ 물리이화학적변화(산화/환원) ○ 유지방산화(이미/이취/색변화) ○ 영양소 손실(품질/기호성 저해) ○ 철분 고유 : 비린맛, 철냄새	시장진입 실패
합계	3,100억		

- 기능성 미네랄 강화유중 대표적으로 시장진입에 성공하였다고 알려진 칼슘우유의 경우

도 무기태 칼슘류의 단점(유단백질과 반응성, 비중 높음으로 인한 침전현상 유발)으로 인하여 이를 해결하기 위한 칼슘제제개발이 활발히 이루어지고 있으나, 현재까지 경제성과 문제점을 동시에 해결한 미네랄 소재는 없다.

제조사 및 제품명	[M 사] 백분 가는 칼슘우유	[M 사] 백분 우유 클로렐라	[L 사] 백분본 칼슘우유	[K 사] 고칼슘 우유 이커데미	[H 사] 고칼슘 우유
적용 무기태칼슘 (첨가량 mg Ca/100ml)	M사, 나노칼슘 (206mg/100ml)	K사, 맥릭칼 (206mg/100ml)	L사, 슬파칼슘 (216mg/100ml)	I사, 슬파칼슘 (150mg/100ml)	유정칼슘 (150mg/100ml)
6일차 (침전물량,mg)					
6일차 (침전물 색깔)	진한 황갈색	백색	갈색+연갈색	연갈색	연한 황색
6일차 (침전물 고착정도)	높음	낮음	매우높음	매우높음	매우높음

완제품內 침전도 비교 : 사진, 침전물량, 침전물 색깔, 침전물의 고착 정도

Fig 3. 우유내 무기태 칼슘 첨가시 침전현상 분석결과(예 : 고칼슘-우유)

○ 철분제제를 우유에 첨가한 유제품이 국내외적으로 출시된 예가 있었으나, 유단백질과의 결합, 색상변화 및 철분고유의 맛(쇠맛)으로 인하여 시장에서 철수하였으며, 예로서, 가임기 여성(생리) 및 임신수유부용 철분의약품 제제 시장에서도 유기태화 소재를 적용한 제품개발 결과 또한 국내외적으로 발표된 바 없다. 따라서, 철분제제의 제품화를 위한 연구가 국내외적으로 활발히 이루어지고 있다.

- 우유 및 식품내 철분강화를 위한 연구개발방법으로, Polyglycerine monostearate를 사용하여 무기철분이온(FeSO₄·7H₂O 등)을 코팅에 따른 미세캡슐화(곽해수, 1999) 및 효모배양간 생체축적 방법을 이용한 방법 등은 보고된 바 있으나, 실제적으로 식품분야에서 실용화 된 예는 없다.

- 유사한 연구결과로서, 철분 및 아연 함유량이 증가된 빈혈치료가 가능한 기능성 쌀생산 기술이 “21세기 프론티어 작물유전체 기능연구사업(포스텍 생명과학과팀)”결과 발표된 바 있었다. 이는 식품첨가물로서 철분첨가문제를 생물체 흡수증대를 통한 해결책을 제시 하고져 하였다. 핵심연구결과는 벼의 유전자 조작기법(GMO변형기술)이 적용된 예였으며, 식품산업에서는 유전자 변형식품의 안전성 확보와 관련된 문제해결이 선행됨에 따라 시장진입에 실패하였다.

- 도축혈액의 트랜스페린(transferrin)을 이용한 철분강화 유제품 개발 연구(한국식품개발연구원,농림부, 1999)에서 철분 source 중 FeCl₃, 철분-트랜스페린 추출물, FeSO₄ 순으로 관능적으로 우수하였으나 FeCl₃는 철분 생이용성이 FeSO₄보다 낮은 것으로 알려져 있고 FeSO₄는 상대적으로 FeCl₃보다 지방과의 반응성이 높아 제품의 품질에 나쁜 영향을 줄 소지가 많음으로 철분 생체이용성도 뛰어나고 제품의 품질에 비교적 영향을 작게 미치는 철분-트랜스페린을 개발 식품첨가제로서 적용을 시도하였으나 시장진입은 실패하였다.

- 따라서, 상기 분석결과를 보면 무기이온보다는 유기태화시 안전성 및 체내 이용성의 증대효율이 증대함을 증명함과 동시에 유기태화 미네랄의 개발가치를 확인하였으며, 이에

따라 이를 해결 하고 저 하는 국내외 연구자들의 연구가 얼마나 치열한지와 또한 현장 적용이 가능한 소재 개발 및 제품적용이 얼마나 어려운지를 시사 하였다.

- 본 연구과제와 관련하여 기능성 셀레늄강화 우유(우유사)가 생산되어 기존에 판매된 사례가 국내에 있음. 즉, 무기셀레늄을 젖소사료에 혼합 및 투여시 생체전이메카니즘을 거쳐 우유로의 전이되는 원리를 적용한 예였지만, 젖소에서 셀레늄 고유 독성(일일 최대 흡수량 450 μg/d, 750-900 μg/d이상 섭취시 생체독성효과 나타냄.)으로 인하여 생산량 감소 및 체중감소등의 부작용으로 인하여 생산이 중단된 사례가 있음. 따라서, 본 과제에서 유기태화 셀레늄 소재를 적용시 관련 시장에 대하여 런칭이 가능할 것이며 이 경우 단일 기능성 셀레늄강화유로 인하 시장 또한 1,200억 형성과 더불어 원료판매 수익만으로 12억 이상(첨가비용 1% 점유율 기준)이 가능할 것으로 판단된다.



Fig 4. 국내외 철분강화우유 및 의약품 제품화 현황 및 제품가격 현황

- 최근에 해외(일본, 와코도사) 및 국내 메이저급 유제품회사에서는 영유아용 미네럴 강화식품(튀밥류 : 3,000원/210~300g(1봉) 및 팝스낵류 : 370원/10g)를 경쟁적으로 시장에 출시하고 있는데, 역시 첨가되는 미네럴류는 무기태 미네럴을 영양성분 고려하여 출시 중에 있다. 이는 첨가물 적용에 있어 가장 민감한 영유아용 식품부분에서도 국내외 적 무기태 미네럴을 대체할 수 있는 고부가 소재 개발 및 제품화 적용 사례는 없음을 실증한 사례이다 (근거 : 현장 벤치마킹 결과, 2012~13.).



Fig 5. 국내외 미네럴 강화 영유아식품 출시제품 및 가격

- 본 연구가 성공적으로 종료되기 위한 핵심기술은, 유기태 과정 (무기물의 1차 독성소거)

과 생체전이메카니즘 단계 (기능성 순수 정제화)로 2중 필터링을 과정을 거치는 것이다. 본 과제와 관련, 무기 철분제제 단점을 해결형 사료첨가제 개발 및 이의 생체전이메카니즘 정립을 통한 최종 미네럴 강화란 관련 연구결과는 보고 된 바 없으며, 안전식품으로 계란섭취만으로 미네럴 결핍 해소 등의 문제해결에 도움이 될 것이다.

- 무기태 소재의 단점 해결형 유기태화 소재 및 제품개발에 대한 다각적인 노력이 국내외적으로 경주하고 있으나, 핵심소재와 이를 연계한 현장사양기법 개발 및 연계한 제품개발 실적은 국내외적으로 미미하고 이 역시 소비자의 신뢰를 얻지 못하고 있다. 예로서, 기능성 강화란 시장의 경우도 유제품과 대동소이한 소재를 적용하고 있는데, 현재 시장성은 초기진입단계이며, 현재 목표성분의 균일성 및 소비자 요구성 또한 충족시키지 못하고 있다.
- 본 연구를 통하여 유기태화 미네럴 소재류의 개발과 동물(GLP) 및 인체유효성(CRO) 평가까지 완료(개별인증 획득)된 경우, 국내만 건강기능식품중 비타민 및 무기질 제품분야만으로도 연 7,200억(2011년 기준) 시장런칭이 가능할 것이며, 해외의 경우는 평가가 불가능 하다.
- 개발될 유기태화 소재를 유제품중 미네럴 강화우유(예: 고칼슘 우유 Type)내 개발 유기태화 미네럴류를 첨가 시, 연간 국내 신규런칭 시장성(1종 기준)은 720억원 이상이였으며, 단일 소재류로 환산할 경우 120억시장을 확보할 수 있을 것으로 평가 되었다.
 - 근거 : 1,200억/미네럴강화우유 1종 년시장성 x 시장점유율 10% x 6종유기태소재

차. 기능성 미네럴 강화 사료 개발 필요성(산관계 사료업체 및 사료수급현황, 2011년 기준)

- 본 과제에서는 핵심소재인 미네럴 유기태화 소재 및 미네럴 강화 사료첨가제 개발개념은, 잉여자원인 천연물(치즈 제조후 유청, 유단백질 및 키토산)을 기질로 하여, 유기태화는 단일 및 복합 킬레이팅 능력 관련 기능기를 극대화 할 수 있도록 유도 후, 공중합기법을 적용 미네럴류를 단일 또는 다종을 동시에 다량결합토록 유기태화소재를 개발(OligoPeptide Type)후 사료에 농도별 첨가한다.
- 본 과제와 관련하여 국내의 축산농가에서 사용되고 있는 유기태화 미네럴 사료첨가제는 현재 효모를 이용한 미네럴 제제와 메티오닌등의 아미노산류를 기질 Aminate형태로 대별되고 있으며, 6,000원~20,000원/Kg범위로 현장에 판매되고 있으나 효능성의 불안정으로 인하여 기피되고 있는 실정이다.
- 유기태화 미네럴류는 물리/이화학적 반응조건에서 안정하고 장내 미생물만의 영양분해 및 체내흡수토록 제조한 후 사료로서 섭이시 혈청면역인자 증가와 생체전이 시스템을 통하여, 산관계를 대상으로는 기능성 미네럴류 및 면역글로부린(IgY)의 함유량을 의약품 수준으로 극대화된 기능성 강화란을, 육계(산관계 사육시스템 적용)는 미네럴 증가, 불포화지방산 증대, 수분량 감소 등 및 식감이 토종닭과 동일수준의 브랜드화 “우리맛닭” 개발을 가능하도록 제조된 소재류를 사료에 첨가할 것이다.
- 국내 사료는 농후사료 77.7%와 조사료 22.3%로 구성되어 있는데, 농후사료 77.7%는 배합사료 67.4%와 농가자급사료 10.3%로 구성되어 있음에 따라 개발 미네럴 강화사료첨가제는 배합사료 회사와 농가에 직접적인 판매가 가능할 것으로 판단된다.

- 2011년 기준으로 국내배합사료 생산실적은 16,815천톤으로 약 9조원 내외의 시장규모 형성하고 있으며, 국내는 40여 업체가 시장에 참여하며 농협사료가 32.5%대의 시장점유하고 있으며, 단체별 생산비중은 사료협회(66.8%; 39개소), 농협사료(32.5%), 기타(0.7%)임. 축종별로는 축우(603만톤), 양돈(448만톤), 양계(474만톤), 기타(140만톤)로 구성되어 있다(근거 : 자료 : 농림수산식품부, 2011 농림수산식품 주요통계).
- 본 과제관련, 배합사료 생산실적 및 연도별 가격동향으로서 양계용 배합사료 생산실적은 2005년 이후로 약 450~약 480톤을 유지하고 있으며, 가격은 양계를 포함한 축종에 관계없이 약 2배 이상 증가되고 있다(축산물품질평가원. 「계란유통, 출하단계」.한국의 축산물 유통. 2012.11.).
- 현재 국내 사료 생산량은 산란계, 육계, 양돈, 낙농, 비육, 양어 및 기타분야로 분류하여 월 1,223,123톤으로서 3,669,279천원의 생산량을 가지고 있다. 이를 기준으로 개발제제를 0.1%[철분 첨가량: 1Kg(Fe:50,000ppm)/사료M/T, mineral-complex제제 3,000원/Kg, 점유율 : 5%기준]로 사료체 첨가 전제시, 년 739,873톤이 사용되어지고, 이는 신규 22억 시장 런칭이 가능하리라 판단된다[출처:2009년 배합사료첨가제 사용량 추세, (사)한국동물약품협회,2009].
- 양계생산 현장에서 사료가 차지하는 생산비가 높음으로 인해 관련 축산물의 생산단가 또한 지속적으로 높아질 수 밖에 없는 국내 실정에서 이를 인정하고 수익을 높일 수 있는 대안으로 개발 가능성 미네랄 유기태화 소재를 사료첨가제로서 적용 시 고부가 가능성 강화란 및 고브랜드 계육 생산이 가능할 것으로 판단되며 농가수익보장형 현장애로 해결을 위한 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다.

카. 기능성 면역인자 강화란 개발 필요성

- 본 과제수행 후 최종 결과물중 “면역증진형 (IgY) 강화란”은 암환자 및 일반환자, 성장기(0~19세), 임신수유부 및 고령식(65세 이상)에 있어 필수적으로 필요한 건기식일 수 밖에 없다.
- 포유류는 태반 또는 모유를 통하여 면역항체를 획득하고 자기면역기능이 성숙해질 때까지 초기의 감염증을 피할 수 있게 되는데, 가금류 등의 난생동물의 면역항체는 혈중항체가 난황 및 난백중으로 이행 및 축적되어 자손에게 전달되는 특이적인 모자면역기능 체계를 가지고 있다.
- 난황중의 항체는 포유류의 IgG항체에 상응하는 것이지만 단백질화학적 성질이 약간 다르고, 암탉으로부터 이행된 항체로서 부화후 난황(IgY, Mw: 180KDa, 등전점 : 6.5~7.5)은 병아리의 혈액으로 그리고 난백중의 IgA와 IgM은 장내로 이행되는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 암탉의 모체내 혈청면역을 증가시킨다는 것은 항질병형 계란생산이 가능하다는 것을 시사하는 것이며 이는 병에 강한 병아리 생산과 또 다른 영역인 계란을 이용한 기능성 식품의 개발과 곧바로 직결 되는 선도 기술개발 건이라 할 수 있다.
- 난황중의 IgY함량은 ml당 9~25mg으로 동량의 혈청중의 IgG함량과 유사하며, 이를 난 1개당 15ml의 난황이 분리되는 전제에서 닭 마리당 IgY의 연간 생산량은 40g정도이다(근거: Korean Chem. Eng. Res., Vol.50(4). 2012). 본 연구에서는 동일 사육기간에서 사료첨가제 섭이를 통하여 혈청면역 수치증대를 통하여, 난황내 IgY의 함유량을 두배

이상(20~50mg/난황ml)의 목표로 하고 있는데 관련한 국내외적 발표된 사례가 없다.

- 개발 제품(면역증대형 강화란)은 순차적으로 국내외의 관련 건강식품 분야에 대하여 런칭함과 동시에 시장성을 확보할 예정인데, 본 과제에서는 면역제품으로서 계란내 면역글로부린(난황 : IgY)을 강화하고 이를 제품으로서 국내외에 대하여 순차적인 시장진입을 진행할 예정이다.
- 2010년 기준, 국내 의약분야 면역제제(대분류 : 바이오의약) 시장은 국내시장 6백억(2010년 기준)과 수입액 530억을 합친다면 총1,130억 시장이 형성되어 있으나, 건강기능식품(개별인정형 소재 기준) 시장은 179억원(12.6% 점유)으로 현재는 미미한 실정이다. 그러나, 의약분야까지 합친다면 미래시장성을 충분히 보유하고 있다고 할 수 있다. 따라서, 면역관련제품의 국내외 연구개발이 활발하게 진행되고 있으며 더불어 면역관련 기능성식품 시장(개별인정형 소재 적용제품 기준)도 년 200%의 급격한 성장율을 보이고 있다 (근거 : 식품의약품안전청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과).

표 12 . 개별인정형 기능성 제품의 시장성 평가(2011)

품목	제품	생산액(억원)	비중(%)
1	간건강	532	37.5
2	면역기능	179	12.6
3	관절, 뼈건강	153	10.8
4	피부건강	100	7.0
5	갱년기 여성건강	64	4.5
6	콜레스테롤 개선	52	3.7
7	눈 건강	51	3.6
8	전립선 건강	50	3.5
9	기억력 개선	47	3.3
10	항산화	45	3.2
11	혈당조절	44	3.1
12	피로개선	14	1.0

(자료 : 식품의약품안전청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과, 2012)

- 국내의 경우, 영유아 식품(유제품)내 난황(면역글로브린 IgY)을 첨가하므로써 로타바이러스에 의한 영유아 설사예방을 시도하고 있지만 뚜렷한 효능을 인정받지 못하고 있으며, 역시 혈중면역증대 및 난황내 면역글로브린 증대를 위한 소재 및 가축사양기법 및 관련한 제품개발 결과는 국내외적으로 발표된 바 없다.
- 첨가되는 난황의 IgY를 기본 영업컨셉으로 하여 산업화 하고 있는 국내생산업체는 1개 업체(제품이니셜명 : SLC IgY) 밖에 없는데, 소비자 요구성에 충족되는 면역역가치가 낮은 관계로 대부분이 일본산(Pharma Food Intenational사, 일본) 제품을 고가로(100,000원/Kg)수입 및 식품첨가물로 사용하고 있는 실정이다.
- 계란으로부터 IgY를 생산하는 방법은 혈청으로부터 IgG를 생산하는 것에 비해서 산업적 규모의 생산이 용이한데 이는 양계장 수준에서 난황 및 난가공의 차등화가 가능하기 때문이다.
 - 예로서, 닭을 이용한 항로타바이러스 IgY 생산성은 Wa Strain(serotype 1)의 경우 15배, Mo Strain(Serotype 3)은 120배의 항체중화 역가치를 보였는데, 토끼를 면역화 하는 것보다 훨씬 효율적이라고 보고된 바 있다(근거: 난황유래 면역단백질 IgY의 산업적 이용, 미생물과 산업, 2002). 따라서, 닭 모체의 혈청면역과 계란내 면역인자가 균일하고

안정(전)하게 증대화를 유발 시킬 수 있는 첨단 소재 개발과 이를 이용한 사료첨가제 그리고 사양기술이 연계되어 개발된다면, 국내외적인 기술우위성 확보와 더불어 관련제품 및 산업분야에 기여 할 수 있을 것이다.

- 세균, 바이러스 및 단백질 등의 여러 가지 항원을 조류에 면역을 증가시켜 이에 대응하는 특이적인 항체를 난황으로 이행시키는 연구가 다수 보고 되었다. 본 연구와 관련하여 국내외적으로 계란의 난황내 면역글로브린(IgY)을 증가 시키므로써 건강한 병아리 생산과 더불어 능성 면역글로블린 강화형 난황(IgY) 을 이용한 가공식품개발 시도가 국내외적 활발히 진행되고 있다.
- 관련한 시장성으로서, 종합병원에 장염으로 입원하는 소아군의 약 50%가 로타바이러스(가성콜레라, 소아설사 유발체) 감염질환으로 알려져 있는데 선진국(미국)의 경우 매년 약 500,000명의 환자가 발생하고 있으며, 치료비용만도 10억달러 이상이 지출되고 있다.
- 현재, 국내외적으로 로타바이러스에 대한 백신개발을 5대 최우선 과제에 포함시켜 연구를 진행 중에 있으나, 지난 10여 년간 전통적인 방법과 분자생물학적인 방법을 이용한 많은 백신 후보 물질이 개발 중이지만 아직까지 해결되고 있지 않고 있다.

표 13. 국내 계란관련 가공원자재별 현황

가공품종류	취급업체수 (중복포함)	제품명
전란액	8	목계촌, 미소란,세원전란액, 알찬전란액, 네모난계란전란, 백운전란액
난황액	7	천연품, 세원난황액, 알찬난황액, 알찬계란난황, 얼씨릭
전란분	1	폴리락
난백액	2	난백액, 네모난 계란난백
난황분	1	셀리코IgY
난백분	1	Egg알부민
가열성형 제품	23	옥돌영양란, 알뜨란 지단, 토종환, 꾸미란, 고연지단, 백운살균란, 햄베 이킨볶음밥, 알도배기, 간계란, 지단, 소금구이계란, 구운계란, 블록류, 알뜨란 초밥용 지단, 오솔길, 후라이, 염지란
염지란	3	삶아서깎메추리알, 참숯훈제란, 간계란
기타	17	전란액, 가당난황액, 계란구이J, 들풀신선정란, 난황액, 난백액

- 본 연구 Part에서는 가금류(산란계)에 대하여, “항질병 강화 유정란 생산용 사료첨가제” 및 “기능성 면역증강 식품 개발 및 제품화” 를 목표로 다음과 같이 설정 하였다.
 - 기능성 유기태화 미네랄류중 최적 항질병 및 면역항체 증대효과 보유 사료첨가제 개발
 - 개발 다기능성 유기태화 미네랄 소재의 사료섭이(산란계 및 육계)를 통한 항질병 임상 증상 및 혈청면역인자 증대형 가금류 사양기법 확보
 - 육계 대상, 안전성 및 항질병(혈청항체 증대, 질병 예방 및 치료) 효능평가
 - 산란계 안전성 평가와 미네랄류와 난황 면역글로블린 동시증가형 강화란 생산기법 정립

타. 질병예방형 유기태화 미네랄 소재류 개발 필요성

- 스트렙토마이신을 병아리 사료에 첨가했을 때 증체율이 개선되었다는 보고 이후 가축 생산성 개선을 위해 현재까지 가축 사료에 항생제가 첨가되고 있으며, 사료내 항생제 첨가는 질병 예방 및 치료의 효과뿐만 아니라 사료효율 개선의 효과를 얻을 수 있다.

- 사료에 첨가되는 항생제로 인한 항생제 내성문제는 세계적으로 보고되고 있으며 항생제 내성균의 뿐 아니라 축산식품 내 잔류에 의한 인체의 항생제 내성에 대해서도 우려되고 있으므로 (Solomons , 1978), 멀지 않아 전 세계적으로 사료 내 항생제의 첨가가 전면금지 될 것이고, 우리나라에서도 이미 1998년부터 ‘식육 중 잔류물질 검사요령 (NRP National Residues Program)’ 을 제정하여 현재까지 운영한 이래 2012년부터 사료내 항생제 첨가가 금지 되었다.
- 현 시점에서 항생제를 대체할 있는 물질을 개발하는 것이 축산업계의 당면 과제이며 항생제 대체제 개발을 위해 기존의 사료원료에 대한 기능성 연구는 물론이고 다양한 동식물 자원에까지 그 영역이 확대되고 있다.
- 항생제의 사료첨가는 장내 소화 장애의 방지, 사료효율 개선, 질병 예방 및 동물성장 촉진 등의 효과가 있으며, 이와 같은 기능을 대체하기 위한 항생제 대체제로 고효율 미네랄제 (highly available minerals) , 유기산제 , 올리고당 (prebiotics) , 생균제 (probiotics) , 효소제 (enzymes) , 천연약용식물 등과 같은 천연 생리활성물질 (natural bioactive materials) 활용되고 있다.
- 위에서 언급한 물질들을 직접 동물용 사료 첨가제로 활용하는 것은 경제적으로 그 효용 가치가 매우 낮다고 할 수 있으며, 이를 보완하기 위해서 기능성 미네랄을 이용한 사료를 개발하여 부가가치 향상시키는 사료를 개발하여 양계농장에 적용하고자 한다.
- 따라서, 본 연구에서는 기능성 미네랄을 이용한 사료첨가제를 개발하여 면역력 증강효과 및 *S. Gallinarium*에 대한 항병력 효과, 산란계의 생산성, 육계 생산성과 육질에 미치는 영향 등을 조사하고자 한다.

1-3. 연구개발 범위

- 국내외적 연구개발(특허, 논문, 국책연구 등) 현황 지속적 조사
- 연구진행간 필수분석법 정립
- 기능성 미네랄 유기태화 소재류 대량생산시스템 정립 및 제품화 (12종)
 - 목표 단일 및 복합 미네랄(목표 미네랄 : Fe,Ca,Zn,Cu,Se)의 킬레이팅 최적화 유기태 기질(2부류 6종., 종류 : 유단백질류 3종, 키토산류 3종, 핵산류 4 종) 선발 및 경제성 평가
 - 목표 미네랄 최대 킬레이팅 효율 확보형(경제성 포함) 유도기능기 극대화 기법 정립
 - 미네랄 유기태화 소재류별 킬레이팅 효율 및 구조분석
 - 미네랄 유기태화 소재류별 독성저감(Cell-Line, 공시균 대상) 평가
 - 미네랄 유기태 소재류별 장단기 제품적용성(반응성, 내산 및 내염기성, 내열성) 평가
 - 기능성 미네랄 유기태화 소재류별 장단기 동물안전성 및 기초효능평가(Mouse)
- 다종 기능성 미네랄류 강화란 생산형 사료레시피 개발 및 제품화(12종 이상)
 - 기능성 미네랄 강화란 생산을 위한 산란계(일령별) 사료배합 레시피 정립 및 제품화
 - 목표 미네랄류 계란내 고농도 축적을 위한 최적 소재, 처리농도 및 일정 설정 평가
 - 미네랄 유기태화 소재류별 적용사료의 목표 미네랄 계란내 전이 및 농축효능 평가
 - 기능성 미네랄 유기태화 섭이에 따른 안전성(성장률, 사료효율, 생체이상 등) 평가
- 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립 및 제품화(6종 이상)
 - 국내형 표준 양계 시스템 적용, 강화란 생산을 위한 영양 및 사양관리 기법 정립

- 기능성 강화란 생산 양계 시범농가의 생산성, 경제성 자료수집
- 기능성 강화란의 유효성분(목표 미네랄 및 면역항체)측정에 관한 기준 및 시험법 확립
- 철분 등 미네랄 결핍 해소형 제품화별 레시피 정립 및 대량 생산 process 정립
- 제품 적용성, 효력 및 안정성 확인 (유제품등 반응성, pH, 온도별 안정성 test)
- 생산 기능성 미네랄 강화란 품질 유효성 평가 및 시험분석법 정립
- . 무게(건조전/후 무게: 전란, 난황, 난백 및 난각), 미네랄류 함유량(난황, 난백 및 난각), 색차(난황, 난각), 난황높이, 난백 호유니트, 난각강도
- 면역 글로브린(IgY) 증대형 기능성 강화란 대량생산시스템 정립 및 제품화(1종 이상)
 - 난황 면역인자(IgY) 증대형성 미네랄 사료첨가제 선발 및 현장매뉴얼 정립
- 양계 질병예방형 미네랄 강화사료 개발 및 현장시스템 정립 및 제품화(1종 이상)
 - 체내면역 증가형 기능성 미네랄 유기태화 사료선발 및 최적 현장적용기법 정립
 - 체내면역 및 Probiotic 및 연계 병원균(살모넬라) 공격접종에 따른 질병예방효과 검정
- 기능성 브랜드 계육(우리맛닭) 대량생산시스템 정립 및 제품화(1종 이상)
 - 국내형 양계시스템(기존 산란계 cage) 적용, 육계생산을 위한 영양 및 사양관리
 - 고급 육질화를 위한 최적 사료첨가제 선발 및 현장적용기법 정립
 - 생산 육계의 기능성 및 품질균일화(이화학조사 등) 검정 공인분석(농업기술실용화재단)
 - 기능성 성분 결과 확보(도체내 미네랄, 콜레스테롤 함유량변화 등) 및 제품화
- 건기식품(위건강형, 항헬리코박터 원료) 개발 연구(개별인증 신청 및 획득, 9단계)
 - 목표 : 기능성 원료 “유청가수분해단백분말” 의 건기식 기능성 원료 등록 및 제품화
 - 1 단계 : 소재 탐색
 - 2 단계 : 기준규격 설정(지표물질 Validation, 유해물질)
 - 3 단계 : 생산공정 설정[생산가능여부, 경제성(수율), Lot별 생산관리(안전성)]
 - 4 단계 : 시험관 시험(기초효능 평가, 지표성분 확인)
 - 5 단계 : GLP 안전성 평가(설치류 및 비설치류, 소핵, 미생물돌연변이, 장기섭이 등)
 - 6 단계 : 효능과 섭취량 검증확인 (CRO 인체유효성 평가)
 - Biomaker, 기전, 효능평가(소퇴율 기준)
 - 7 단계 : 개별인증 신청(예정일 : 2017. 11.)
 - 8 단계 : 개별인증 신청 및 획득(2급 이상)
 - 확보예정일 : 2018. 11.
 - 9 단계 : 사업화(2018. 11.월 기점 실시)

2. 국내외 기술개발 현황

D-04
<p>본 연구는 잉여자원인 천연물(유단백질류, 키토산류 및 핵산류)을 기질로 하여, 무기태 미네랄의 단일 및 복합 킬레이팅 능력 관련 기능기를 극대화 할 수 있도록 유도 후, 공중합 기법을 적용하여 단일 또는 다종을 동시에 결합토록 제조한 유기태 미네랄 소재류를 첨가한 기능성 사료의 개발 및 현장 평가를 통하여 양계농장의 현장 애로(동물복지 충족형 항질병 소재 필요) 해결과 고품질 무항생제 계육의 대량생산시스템 확립에 핵심 연구개발 목표가 있다. 관련한 국내외 기술개발 현황은 다음과 같다.</p> <p>가. 국내외 양계산업의 현황</p>

- 국내 양계농장에서 살모넬라 감염증은 가금티푸스, 추백리가 대표적이며 이들 질병은 개발도상 국가에서 만연하고 있는 후진적인 질병으로서 아직까지도 빈번히 국내에서도 발생하고 있다. 특히 가금티푸스는 폐사율이 90% 이상의 치명적인 질병으로 전국 양계농장의 70%가 원인체인 *Salmonella enterica* serovar Gallinarium (*S. Gallinarium*)에 오염되어 있는 것으로 파악되어 국내 양계산업의 기반을 위협하고 있는 실정이다. 또한 살모넬라 감염증은 대표적인 인수공통전염병의 하나이며, 오염된 달걀과 계육을 통해 사람에게 감염되며 사람에서 장염 및 장티푸스를 유발하는 중요한 세균성 질병이다.
- 동물과 사람에서 감염을 일으키는 *Salmonella* spp.는 운동성을 갖는 그람 음성 간균으로서, 숙주의 탐식세포 및 비탐식세포 내에서 증식이 가능한 세균이기 때문에 항생제로서 치료가 상당히 어려운 대표적인 난치성 질병 중 하나이다. 또한 항생제의 오남용으로 발생한 약제내성으로 *Salmonella* spp.는 공중보건학적 측면에서도 심각한 문제가 되고 있다.
- 양계장의 살모넬라 감염증은 대표적인 난계대 감염 질병으로서 질병의 근절을 위해서는 항생제의 투여 보다는 청정한 계군 관리가 필요하기에 이를 위한 양성 계군의 적발과 도태를 위해서는 많은 비용과 노력이 필요하다. 또한 사람에게 식중독을 유발하는 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*. 등은 오염된 계육을 매개로 샐러드나 야채에 교차 오염될 가능성이 크기 때문에 근본적으로는 양계농장에서 이러한 세균에 닭이 감염되지 못하도록 하는 것이 최선의 요구이다. 또한 양계장의 살모넬라 감염은 오염된 사료에 기인하기 때문에 철저한 HACCP 관리를 통한 사료 매개성 살모넬라 오염을 최소화 시켜야 한다.
- 최근 소비자들의 청정 축산물에 대한 요구 조건과 함께, 각국의 항생제 사용에 대한 규제 조건의 강화, 세계화의 가속화로 축산물의 국제교류가 활발해지는 현시점에서 친환경적인 기술의 개발 및 도입은 국내 양계산업이 생존에 기술적 대안으로 선택되어야 할 것으로 판단된다. 최근 친환경 사양 기술의 일환으로 항생제를 대체 할 수 있는 천연 생리 활성 물질을 활용한 다양한 시도가 진행되고 있다.

나. 항생제 대체제 개발 현황

- Penicillin과 bacitracin 등과 같은 항생제는 1950년대 이후 어린 가축의 성장촉진과 사료효율을 개선하고 축산물의 생산효율을 향상시킬 목적으로 사료첨가제로서 널리 사용되어 왔다. 항생제의 작용기전은 먼저 가축체내에 존재하는 살모넬라, 대장균 및 클로스트리디움 등과 같은 장내 병원성균의 세포막을 분해하여 사멸 시키고, 소장 흡수세포벽을 얇게 하여 영양소의 흡수율을 증대시켜 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다. 그러나, 가축 생산성 증대와 같은 긍정적인 효과에도 불구하고 항생물질이 고기, 우유, 계란 등의 축산물에 잔류될 수 있다는 점과 축산물을 통하여 섭취된 항생물질이 인체의 내성을 증가시켜 항생물질에 대하여 저항성을 나타낼 수 있다는 일부 부정적인 효과가 밝혀지면서 최근 항생제의 사용에 문제점이 제기되고 있다. 스웨덴, 덴마크 등과 같은 유럽 국가들을 중심으로 가축 사료첨가제로서 항생제 사용이 금지 되

나 극도로 제한되고 있다.

- 최근 이와 같은 시대적 흐름에 따라 사료에 첨가되는 항생제 사용이 금지되는 상황에서, 항생제를 대체 할 수 있는 대체제에 대한 연구가 절실히 요구된다. 축산식품 소비자는 물론 생산자를 위해서도 사료에 첨가되는 항생제를 대체할 수 있는 안전성이 확보된 후보 물질의 개발연구 및 효능 연구는 미래 지속가능한 동물산업을 위해 필연적으로 해결해야만 하는 향후의 과제인 것이다.
- 스트렙토마이신을 병아리 사료에 첨가했을 때 증체율이 개선되었다는 보고 이후 가축 생산성 개선을 위해 현재까지 가축 사료에 항생제가 첨가되고 있다. 특히, 사료 내 항생제 첨가는 질병 예방 및 치료의 효과뿐만 아니라, 사료효율 개선의 효과를 얻을 수 있다. 그러나, 사료에 첨가되는 항생제로 인한 항생제 내성 문제는 세계적으로 보고되고 있으며 항생제 내성균의 출현 뿐 아니라 축산식품 내 잔류에 의한 인체의 항생제 내성에 대해서도 우려되고 있다(Solomons, 1978). 세계와 더불어 우리나라에서도 이미 1998년부터 ‘식육 중 잔류물질 검사요령 (NRP National Residues Program)’을 제정하여 현재까지 운영한 이래 2012년부터 사료내 항생제 첨가가 금지되었다.
- 현 시점에서 항생제를 대체할 수 있는 물질을 개발하는 것이 축산업계의 당면 과제이며 항생제 대체제 개발을 위해 기존의 사료원료에 대한 기능성 연구는 물론이고 다양한 동식물 자원에까지 그 영역이 확대되고 있다. 항생제의 사료첨가는 장내 소화 장애의 방지, 사료효율 개선, 질병 예방 및 동물성장 촉진 등의 효과가 있으며, 이와 같은 기능을 대체하기 위한 항생제 대체제로 고효율 미네랄제 (highly available minerals), 유기산제, 올리고당 (prebiotics), 생균제 (probiotics), 효소제 (enzymes), 천연약용식물 등과 같은 천연 생리활성물질 (natural bioactive materials)이 활용되고 있다.

다. 유기태 미네랄 소재 및 제품화 개발 연구

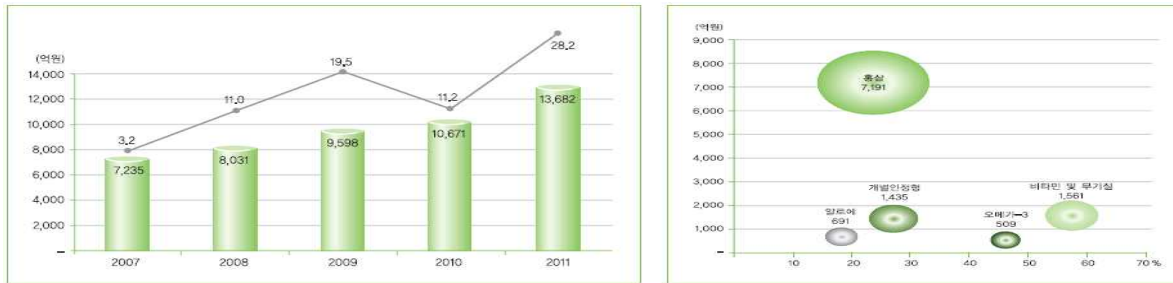
- 최근 국내외 소비자들은 식품안전에 대한 관심 증가로 안전한 친환경 농축산물을 선호하는 경향이 증가되고 있다. 따라서 안전하고 친환경적인 축산물을 생산하기 위한 방안으로 기능성을 증진시키는 유기태 미네랄류 개발이 활발히 이루어지고 있다(Ko 등, 2012).
- 미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다. 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Baek, 2009 ; Vanessa 등, 2004; Hong 등, 2002).
- 가축 사료내 사용되는 미네랄류는 무기태 광물질(minerals)을 첨가하고 있는데, 독성을 보유하고 있으며, 소화 흡수율 저하로 인하여 과량이 첨가됨에 따라 비흡수 미네랄류의 배설로 인한 토양 및 수질오염, 독성이 문제시되고 있어 농축산업의 저해요인이 되고 있다 (Kim 등, 2002).

- 가축 산업의 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있는데, 유기산(예 gluconic acid), 다당류(예 algal polysaccharide), 아미노산(예 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된다. 아미노산 chelate 제제가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값이 비싸고 흡수력이 낮은 아미노산 대신에 소화 시킨 단백질을 이용한 펩티드 복합체(peptide complex)가 개발되면서, 광물질 자원을 절약하고, 소화 흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 및 기능성 식품 생산에 효과적으로 이용 가능해졌다 (Han 등, 2009).
- 농업분야에서 세계적으로 빠른 비료 효능을 얻기 위하여 완효성 또는 용출조절형 비료보다는 속효성 비료류를 대부분을 사용하고 있는데, 사용 편리성과 비료성분의 작물 이용성 증대 및 유실을 저감시킬 수 있는 방법으로 완효성 또는 용출조절형 비료의 사용 또는 질산화 억제제 처리등을 통해 해결하고자 하는 것이 최근의 연구 추세이다 (Alexander 등, 1990; Shaviv 등, 1993).
- ◆ 비료의 속효성 충족과 토양오염 해소 등을 효과적으로 구현할 수 있는 방법으로 최근 유기태 기능을 탑재 시킨 비료 개발에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으나, 안전한 유기태화 기질의 개발, 고단가 제조 과정 및 허가 관련 제조 설비 등의 문제로 인해 완효성 비료보다는 농업 전반에 널리 보급되지 못하고 있는 실정이다. 현재는 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), DTPA (Diethylenetriamine pentaacetic acid) 및 EDDHA (Ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic acid) 등을 기질로 하는 킬레이트 철 제품을 비료 원료로 일부 사용되고 있는데, 이들은 생체 독성을 보유함에 따라 식품 등에 사용시는 제한을 받고 있다 (Lee 등, 2004; Park 등, 2007).
- 농가에서 사용되고 있는 유기태 미네랄을 첨가하여 제조한 사료첨가제는 현재 효모를 이용한 미네랄 제제와 메티오닌 등의 아미노산류를 기질 Aminate형태로 대별되고 있으며, 6,000원~20,000원/Kg범위로 현장에 판매되고 있으나, 효능성의 불안정으로 인하여 기피되고 있는 실정이다.
- 유기태 미네랄 제조에 있어 기질로 키토산, 유단백질 그리고 핵산류를 사용할 수 있는데, 이중 키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아, 항염증 반응, 항암 작용, 항바이러스 활성을 통한 상처치유 등의 기능을 나타내기 때문에 여러 가지 분야에 적용이 가능하다 (Yoon 등, 2005; Skjak 등, 1988; Gordon 등, 1983; No 등, 2002; Kim 등, 2010; Yoon 등, 2007; Yoon 등, 2008).
- 유청(milk serum)은 우유(또는 탈지유)에 산 등을 가했을때 생성되는 카제인 응고물을 제거하고 남아 있는 용액이다. 유청에는 주성분인 젖당이외에 다양한 무기염류와 단백질, 수용성 비타민 등 함유되어 있으며, 이중 단백질의 경우는 미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기를 보유하고 있으나, 이를 이용한 유기태 미네랄 개발연구 및 제품화 결과는 국내외적으로 없다 (Park 등, 2008).
- 최근에는 비타민을 기질로 하는 유기태 미네랄 소재류를 비료로 사용하는 제품화가 완료되어 판매되고 있다(Noh 등, 2016).

라. 기능성 농축산물 생산 연구

- 식품의약품안전청 건강기능식품 생산실적 분석결과에 따르면 2011년 건강기능식품 생산액은 1조 3천 682억원으로 2010년 대비(1조 671억원)28.2% 증가한 것으로 나타났다(근거 : 식품의약품안전청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과, 2012.).
- 건강기능식품의 연도별, 품목별 상위 품목 생산액은 홍삼제품이 7,191억원으로 전체의 52.6%를 점유하여 1위를 차지했고, 그 다음으로 비타민 및 무기질(1,561억원, 기능성 미네랄 강화란 해당), 개별인정형 제품(1,432억원), 알로에 제품(691억원), 오메가-3 제품(509억원)의 순이었다. 특히 감마리놀렌산 제품(기능성 면역인자 강화란 해당)은 223억원으로 전년 대비 139.8%의 괄목할 성장세를 나타내었다(자료 : 식품의약품안전청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과, 2012.).

표. 국내 건강기능식품 생산액 및 성장률 현황



자료 : 식품의약품안전청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과, 2012

마. 기능성 계육(우리맛닭) 생산 연구

- 국내 양계산업은 대외 경쟁력에 있어 여러 가지 문제점을 지니고 있는데, 무엇보다 양계농장의 규모가 90년대 이후 대형농장으로 증가하는 양적, 질적인 팽창에도 불구하고 출하체중과 출하연령에 있어서는 미국, 일본 등과 같은 선진국에 비하여 경쟁력이 떨어지고 있다.
- 국내육계 출하체중은 1.5 kg 전후로서 일본 2.2 kg, 미국 2.0 kg대만 2.3 kg에 비하여 매우 낮은 수준이다. 이러한 요인은 난계대 감염증과 낮은 부화율 그리고 낮은 병아리의 생존율과 같은 질병에 대한 적절한 관리가 이루어지지 못한 위생관리의 허점을 통한 악순환으로 생산성 저해요인이 되고 있다. 따라서, 국내 양계산업의 대외 경쟁력을 확보하기 위해서는 질병예방기술을 개선을 통한 생산성을 향상 방안이 절실히 요구된다.
- 국내에서는 가금류의 질병을 예방하기 위하여 백신이나 항생제를 사용하고 있다. 그러나 백신이나 항생제를 장시간 투여시 발생하는 생물학적 변이와 항생제의 내성균주가 출현하여 또 다른 종류의 백신이나 항생제를 사용하여야 됨으로 약품비가 증가와 방역대책의 한계가 되고 있다. 그러므로 현재와 같이 항생제에 의존하는 수동적인 질병 치료의 개념과 예방기술로서는 질병의 근절은 물론 양계산업의 경쟁력 확보도 어려운 실정이다.
- 미국과 유럽 등 양계 선진국에서는 항생제를 사용하지 않고 유용미생물과 같은 생물학

적 제제를 이용하여 항생제 사용을 줄여가면서 생산성을 높이고 계속의 안전성을 확보하는 기술을 실용화하고 있으며, 국내에서도 유용미생물과 천연물질을 이용한 기술을 적용하여 양계산업의 생산성을 향상시키는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

마. 위건강형, 건기식 개발(유기태 기법 적용) 연구

1) 국내외 헬리코박터균 관련 현황분석

- 일부 병원체의 만성 감염은 암을 일으킬 수 있음. 국제암연구소(IARC)와 미국 국립암 협회지는 암 발생자의 20% 이상이 만성 감염으로 인해 암이 발생하고 있으며, 최신의 국내 연구에 의하면 우리나라 암 환자 중 21% 가량이 감염에 의한 것으로 추정 되고 있다.
- 국제암연구소가 1급 발암물질(Group 1 carcinogen)로 규정하는 병원체에는 B형 및 C형 간염 바이러스(hepatitis B, C virus), 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV), 헬리코박터균(Helicobacter pylori), 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 간흡충(간디스토마, clonorchis sinensis), 인간면역결핍바이러스(Human Immunodeficiency virus, HIV), 인간 T세포 바이러스(Human T-Lymphotropic Virus-1, HTLV-1), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma herpes virus, KSHV), 주혈흡충(schistosoma haematobium), 타이간흡충(Opisthorchis viverrini)이 있으며, 이 중 B형 및 C형 간염, 인유두종바이러스, 헬리코박터균, 엡스타인바 바이러스, 간흡충의 감염은 우리나라에서 흔히 발생하고 있다.
- 헬리코박터(Helicobacter pylori, H.pylori)는 위염과 소화성 궤양의 원인이 되는 위에 기생하는 나선형 모양의 세균이고, 헬리코박터는 국제보건기구(WHO) 산하의 국제암 연구소(IARC)에서 위암의 원인으로 판정하였고, 인간에 대한 1등급 발암 요인으로 규정하고 있다. 서구에 비해 우리나라 국민의 헬리코박터 감염률은 매우 높으며, 우리나라의 위암 발생도 세계적으로 가장 높은 수준이다.
- 헬리코박터균에 감염된 사람은 대개 만성위염 증후를 보이고 위염이 만성화되면 위 점막이 얇아지고 주름이 생기는 '위축성 위염' 이 발생함. 위축된 위 점막은 장 점막의 상피세포가 잠식해 들어오는 '장상피화생(腸上皮花生)' 단계로 발전하는 데 이것은 위장 표면이 꽃이 핀 것처럼 거친 상태를 의미하며 이것이 발전하면 위 점막의 표층에 암 비슷한 세포가 생기는 '이형성증' (neoplasia) 단계로 넘어가서 위암으로 발전하는 병리학적 발생단계를 거친다. 만성위염의 약 50%가 위축성 위염으로 발전하고, 위축성 위염의 약 80%가 장상피화생으로, 장상피화생의 약 20%가 위암으로 발전하고 있다.
- 우리나라는 1998년과 2005년에 전국 규모의 헬리코박터 유병률 조사를 실시한 바 있음. 1998년 조사에서는 어머니로부터 태반을 통해 받은 헬리코박터 IgG 항체가 사라지는 7개월부터 9세까지의 유병률이 12.7%로 완만한 증가를 보이다가 10-12세에 27.3%로 급격히 증가했고, 이 시기부터 가장 빠른 증가를 보인 31-40세의 74%까지 매년 약 1.7%씩 증가 하였다. 헬리코박터 유병률은 1998년 조사의 16세 이상 전국평균 66.9%에 비해 2005년에는 59.6%로 감소하였으며, 이는 사회, 경제적 수준 및 위생상태의 향상에 의한 것으로 추정되고 있다.

- 일반적으로 헬리코박터균 자체가 큰 위협이 되는 것은 아니나 이것의 감염으로 인한 위암 발생율이 상당히 소화성 궤양, 조기위암, 위의 림프종이 있는 경우에는 위암 예방과 위암 진행을 막기 위해 헬리코박터균을 치료해야 함. 그러나 치료에 앞서 이것을 예방하는 것이 더 시급하다 할 수 있다.

2) 국내 항헬리코박터 제품 개발 및 제품화 현황 분석

- 베리 마셜 박사의 헬리코박터 파이로리의 발견 이후 많은 파이로리 억제 및 예방제제들이 개발되고 있으나 항생제는 기존의 항생제를 조합한 제제 요법이고, 파이로리에 의한 감염을 억제할 것으로 예상되는 유산균 및 천연물 유래 화합물에 그치고 있으며, 천연물 유래 화합물은 일반적인 항균작용을 가졌다고 알려진 성분들로 프로폴리스, 감초 엑기스, 전차(煎茶)추출물 및 카테킨 등을 함유한 정제의 방식으로 제품화 되고 있다.
- 헬리코박터의 유해성이 알려지면서 야구르트사(윌), 남양유업(위력), 매일유업(구트), 롯데우유(루테리) 및 해태유업(위화장력) 등에서 유산균 또는 항헬리코박터 성분을 첨가한 상품 등을 잇달아 개발하였으나, 개별인증 절차를 거쳐 제품화까지 연계된 경우는 없으며, 현재 제품화한 경우도 일반식품으로 판매되는 경우(과대광고 규제, 식약처)가 대부분이다.
 - 국내 대표적인 관련 제품(식품)으로서, 2000년 야구르트사의 “윌(비개별인증형 식품)” 이 헬리코박터 균을 치료할 수 있다고 특허 받은 유산균(HY2177, HY2743)을 발표하였으나, 이 유산균에 대한 유효성 논란이 계속 되고 있으며, 동물실험에서는 요구르트를 복용한 쥐에서 헬리코박터가 잘 감염되지 않았으며 배양실험에서는 유산균이 헬리코박터 제균효과가 있었으나 인체대상에서는 그 유효성이 입증되지 못했고, 헬리코박터 감염에 대한 치료효과가 있다는 연구결과도 일치하지 않았다(중앙일보 헬스미디어 2013. 8). 또한, 개별인증을 비확보한 식품임에 따라 관련 항헬리코박터의 효능에 대한 광고를 할 수 없도록 식약처로부터 규제를 받고 있다.
 - 일동제약에서는 헬리코박터에서 나오는 독소를 중화하는 성분인 항 헬리코박터 VacA IgY를 개발 특허 등록한 바 있고, 야구르트에서는 유산균 주 2종을 특허 등록하였으나, 야구르트의 유산균을 제외하면 항원으로 한국인에서 분리된 *H. pylori*의 균종의 항원과 계란의 난황중의 면역글로블린을 이용하여 난황항체 (IgY)를 제조하고 이를 효과적으로 분리하여 *H. pylori*균 감염에 대해 항생제가 치료법으로 등록하였으나, 이의 임상적 효과는 미미한 것으로 평가되고 있다.

2) 국내 항헬리코박터 치료관련 병원 처방 현황

- 헬리코박터의 감염에 대한 치료의 경우 주로 항생제를 이용하는 일반적으로 항생제 2개, 위산억제제 1개를 합쳐서 1주에서 2주 동안 복용하고 2주 후 치료결과를 체크하여 제균에 실패하였으면 2차 약물을 사용해 다시 시행하고 있으며. 헬리코박터 감염치료의 경우 건강보험적용 대상에서 제외 되고 있다.
- 치료에 사용되는 항생제는 크게 아목실린 (페니실린 계열) 과 Clarithromycin (퀴놀론 계열) 의 항생제와 양성자 펌프 억제제의 삼제요법을 권고하고 있으나 이러한 항생제의 장기복용은 복통, 설사, 구역질, 알러지 등의 표면적인 부작용 외에 내성균을 양성할 수

있어 제균율의 감소뿐 아니라 다른 질병의 제균 효과까지 감소시킬 수 있다. 그러한 결과로 한번에 치료가 되지 않는 경우들이 발생해 재차 다른 항생제를 바꿔 치료하는 경우도 실제로 다수 발생하고 있어 비용적인 문제와 더불어 위장내 유익균까지 모두 없어져버려 악성질환으로의 잠재성을 가지고 있다.

3) 유단백질 기질화 항헬리코박터 제제 개발

- Glycomacropeptide(이하 GMP)는 안전식품인 우유를 원료로 치즈를 제조하고 남은 부산물인 유청단백질에서 분리 및 분말화 과정을 거쳐 생산 및 국내외적으로 식품 및 식품첨가물로 판매되고 있다.
- GMP는 우유 속 단백질의 일종인 κ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 의미하며, 생산 방법에 따라 당과 인의 함량에 상당한 차이를 가진다고 한다(Yoon 등, 2000). GMP는 *Vibrio cholera*와 *Escherichia coli*의 enterotoxins과 부착하는 능력을 가지고 있고 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진하며, 박테리아와 바이러스의 장기와의 접촉을 억제하는 효능을 가지고 있다(Ernes, 2000). 또한 chymosin에 의하여 κ -casein의 phenylalanine-methionine peptide bond가 절단되면 친수성의 GMP가 유리되는데, N-acetylneuraminic acid(Sialic acid), galactose(gal), N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있는데 이때 말단에 위치한 Sialic acid를 자르는 효소를 neuraminidase라고 한다. Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다(Moon 등, 2005). Sialic acid는 우리 몸 속의 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고(Wang 등, 2003; Schauer 등, 1984; Wang 등, 2001; Wang 2009), 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 2001; Wang 2009; Wang 등, 2007). 이 밖에도 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거에 역할을 한다고 알려져 있어 현재 기능성 식품으로 연구되어지고 있다(Gorog 등, 1978; Iijima, 2004). Sialic acid는 현재 대부분 재조합 *E. coli*에서 합성되거나 *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로 부터 합성되며 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다(Ishikawa 등, 2010; Zimmerman 등, 2007).
- 항균성 관련하여 핵심물질인 NANA의 경우, 특수시약으로 판매(대장균 유래)이외에 상용화가 가능한 제품화는 국내외적으로 없으며, 국제시장 가격(2013.기준)은 순도에 따라 차이는 있지만, 1Kg당 260만원에서 1,000만원을 초과하는 고가로 판매되고 있다(Table 1).
- 산업화 적용에 있어 대부분 의료용 소재로 활용(이유: 합성제품, 대장균 유래)되고 있으며, 식품산업은 적용예는 없다. 이러한 가장 큰 이유는 제품화시 항헬리코박터 제품의 경우는 영유아가 섭취가 용이함에 따라 합성제품의 경우와 유전자 제조합 유래의

원료의 경우는 근본적으로 식품첨가물 원료로서 규제(식약처)하고 있으며, 더욱이 안전성을 확보한 경우라 하더라도 제품화시 가장 필요한 항목인 경제성 충족이 어렵기 때문이다.

Table 1. 현재 판매되는 sialic acid의 제조방법 및 순도별 국제 시장가격 조사결과

구분	소비자 가격 (원/Kg,VAT 별도)	생산국(회사)	비고
발효 sialic acid(10%)	2,600,000	중국(JK Bioteck사)	대장균 유래
발효 sialic acid(98%)	8,000,000	중국(JK Bioteck사)	대장균 유래
합성 sialic acid(99%)	10,000,000	일본(MARUKIN)	합성제품
천연sialic acid(7% 기준)	70,000	(주)메디뉴트롤	천연 유단백질 분리

3. 연구수행 내용 및 결과(코드번호 : D-06)

제 1 장 국내외 관련 연구경향 지속적 조사

1. 연구목표

국내외 연구경향 및 제품화 개발관련 사전선행조사와 연계하여, 지속적으로 국내외 지적재산권과 관련한 항목별(특허, 연구보고, 논문 및 유사과제) 조사를 실시하였다. 연구결과는 본 과제개발 목표(사료첨가제 및 기능성 미네랄 강화 축산물개발)이외에 식품분야(헬리코박터 제균형 건강기능식품 분야) 및 농업, 축산, 수산분야 등 까지 범위를 확대하여 조사하였으며, 항목별 결과는 다음과 같다. 본 과제가 기존 연구개발 및 제품화된 경우 등을 사전조사 및 비교를 통하여, 개발 타당성과 신규성과 진보성 및 관련 지적소유권(특허) 회피방안 설정에 있어 문제가 없는지를 평가하기 위하여 특허, 논문 및 대형국책과제 등으로 구분하여, 관련 유사성 및 중복성을 세세하게 평가하였으며 평가결과는 아래와 같다.

2. 연구수행방법

가. 유기태화 미네랄 소재류 부분

- 1) 유사과제 분석(NTIS) : 관련 유사과제 여부는 “기수행과제” 및 “타인등록과제”로 구분하여 신규성 및 진보성을 선확인 하였다.
- 2) 특허출원 및 등록 분석(특허기준 평가) : 대상DB(WIPS, 국내 특허), 대상국가(한국, 일본, 미국, 유럽 공개특허) 기준으로 조사하였다.
- 3) 대형국책 연구과제 조사: “기수행과제” 및 “타인등록과제”로 구분, 신규성 및 진보성을 확인 하였다.
- 4) 조사항목(검색키워드): “계란*강화란*기능성계란*가금류*육계*산란계*사료첨가제*유청*단백질*미네랄*칼슘*철분*구리*유기태화 등 “

나. 헬리코박터 제균형 건강기능성 식품 개발

- 1) 유사과제 분석(NTIS) : “유기태화 미네랄 소재류 부분” 과 동일
- 2) 특허출원 및 등록 분석(특허기준 평가) : “유기태화 미네랄 소재류 부분” 과 동일
- 3) 대형국책 연구과제 조사 : “유기태화 미네랄 소재류 부분” 과 동일
- 4) 조사항목(검색키워드): “헬리코박터*유단백질*식품추출물*유산균*제품*유청*단백질*미네랄*칼슘*철분*구리*유기태화 등 “

3. 연구결과

가. 유기태화 미네랄 소재류 부분

1) 유사과제 분석(NTIS)

본 과제 관련 유사과제여부를 “기수행과제” 및 “타인등록과제”로 구분하여 신규성 및 진보성을 선 확인하였다. 결과로서, 기수행과제 및 타인등록과제 유사과제는 없었으며, 따라서 본 과제는 신규성과 진보성을 갖는 것으로 확인되었다. 다음과 같이 실시하였다.

가) 등록과제명 : 산란계용 신규 다기능성 유기태화-미네랄 사료첨가제 개발 및 이를 이용한 기능성 미네랄류/면역글로브린 강화란 대량생산/판매/유통 사업화

나) 연구목표 : 요약서 동일

다) 연구방법 : 요약서 동일

라) Key Word : 요약서 동일

마) 확인시스템 : 국가R&D과제관리시스템(NTIS)

바) 조사항목 : 가)~바)항 기준 기수행과제 및 타인등록과제로 구분 검정

사) 조사결과(유사도 60% 기준) : 본 과제 관련 기수행과제 및 타인등록과제 없음

2) 특허출원 분석(평가)

가) 목표 : 본 과제 제안전 관련 국내외 선행기술 조사결과(특허기준)

나) 조사자 : 변리사 손성철(특허법인 충현)

다) 조사내역

1) 대상DB : WIPS

2) 대상국가 : 한국, 일본, 미국, 유럽 공개특허

3) 검색일 : 2014. 04. 23.~2015. 04.30.

라) 조사내용

1) 1차적으로 유기미네랄 자체를 검색하였다.

2) 다음으로 사료 분야 용도를 한정하였다.

- 국제특허분류:A23K 동물위해 특히 적합한 먹이;그것의 생산을 위해 특히 적합한 방법

3) 조사 항목 : 키워드 기준 검색 및 검색건수 적용 조사

표 . 본 과제 제안전 국내외 선행특허출원 분석결과

구분	검색식	검색건수	비고
1	(유기철 유기철분 ((유기 유기태 오가닉 organic) adj (철 철분 아이언 iron))) (유기징크 유기아연 ((유기 유기태 오가닉 organic) adj (아연 징크 zinc zn))) (유기 셀렌 유기셀레늄 유기셀레나이트 유기셀레네이트 ((유기 유기태 오가닉 organic) adj (셀렌 셀레늄 셀레나이트 셀레네이트 se selenium selenite selenate))) (유기구리 유기동 유기쿠퍼 ((유기 유기태 오가닉 organic) adj (구리 동 쿠퍼 cu copper))) (유기칼슘 ((유기 유기태 오가닉 organic) adj (칼슘 ca calcium))) (유기미네랄 ((유기 유기태 오가닉 organic) adj (미네랄 mineral)))	한국 및 일본 1010	-
2	s1 and ((사료 양식 축산 산란계 닭 계란 달걀 젖소 우유 유제품 feed culture farming livestock dairy cow	한국 및 일본 53건	초록 확인

	chicken egg milk) (a23k*).IPC.)		
3	s1 and ((사료 양식 축산 산란계 닭 계란 달걀 젖소 우유 유제품 feed culture farming livestock dairy cow chicken egg milk) (a23k*).IPC.)	미국, 유럽 및 일본 31건	초록 확인

3) 조사결과

본 제안서 관련 직접적인 선행결과는 없었으며, 따라서, 특허부분에 있어 신규성 및 진보성을 확보함을 확인하였으며, 과제수행 후 결과물의 경우 국내외적 특허 회피성을 확보하고 있는 것으로 사전 확인 되었다.본 과제 관련 국내 유사특허출원 및 등록현황 조사결과 요약서 및 유사특허별 분석내역은 다음과 같다.

표 . 본 과제 관련 국내 유사특허출원 및 등록현황 조사결과 요약서

특허(발명제목)	특허출원	해당국가	유사성(%)
동일계 내에서 제조되는 나노미터 크기의 금속 입자를 통해 핵산을 선택적으로 금속화하는 방법	등록1020010073583	유럽	10
가용성 칼슘-핵산물질 복합체 및 그 제조방법	등록 100513011	한국	50
핵산을 함유한 항산화 및 면역증강용 건강식품조성물	출원1020050121572	한국	10
유기태화 칼슘함유량이 높은 유단백질 제조방법	공개20110056004	한국	50
효모펩타이드가 결합된 유기태 희토류원소 화합물을 함유하는 사료첨가제	공개20110006431	한국	10
베타클루칸 및 효모유기철을 함유하는 이유자돈 사료첨가제	공개20080110327	한국	10
녹차 및 유기태철분(효모)을 함유한 사료조성물	공개20010100309	한국	20
유기태(아미노산)아연과 망간이 함유된 오리사육용 사료 및 오리사육방법	등록0745569	한국	10
생리활성을 촉진하여 젖소에서 착유한 우유내의 체세포수를 저감하는 젖소용사료첨가제(효모->아연-메치오닌)	등록0576094	한국	0
유기철(효모)물고기병예방제	등록2004182662	일본	10
Fe(III), 폴리히드록실레이트 및 알루미늄으로 구성된 복합체(철결핍성 빈혈치료제)	등록20060223	이탈리아	10
철킬레이팅화용조성물(퀴닌설페이트외)과 그의 제조방법	등록20020424	한국	10

3) 유사특허-1

가) 발명특허명 : 동일계 내에서 제조되는 나노미터 크기의 금속 입자를 통해 핵산을 선택적으로 금속화하는 방법

- 11020010073583 (2001.11.24.) (소니 인터내셔널(유로파) 게엠베하)

나) 유사도 : 10%

다) 주요내용 : 핵산 특이적 금속 착화합물을 핵산과 반응시켜 금속 착화합물-핵산 컨쥬게이트를 생성시키는 단계, 비컨쥬게이트화 금속 착화합물 및/또는 비컨쥬게이트화 부산물을 제거하는 단계 및 금속 착화합물-핵산 컨쥬게이트를 환원제와 반응시켜 나노미터 크기의 금속 입자-핵산 복합물을 생성시키는 단계를 포함하는, 나노미터 크기의 금속 입자-핵산 복합물의 제조방법. 핵산 특이적 금속 착화합물을 핵산과 반응시켜 금속 착화합물-핵산 컨쥬게이트를 생성시키는 단계, 비컨쥬게이트화 금속 착화합물 및/또는 비컨쥬게이트화 부산물을

제거하는 단계 및 금속 착화합물-핵산 컨쥬게이트를 환원제와 반응시켜 나노미터 크기의 금속 입자-핵산 복합물을 생성시키는 단계를 포함하는, 동일계 내에서 제조되는 나노미터 크기의 금속 입자를 통해 핵산을 직접적이고도 선택적으로 금속화하는 개선된 방법을 제공한다. 당해 나노미터 크기의 금속 입자-핵산 복합물은, 예를 들면, 고밀도 배열을 가능하게 하는 전자 네트워크 및 회로에서 나노미터 크기의 와이어를 형성하는 데 사용될 수 있다.

3) 유사특허-2

가) 발명특허명 : 가용성 칼슘-핵산물질 복합체 및 그 제조방법

- 등록 100513011(2005.08.30.), 출원인: 주식회사 동원에프앤비

나) 유사도 : 50%

다) 주요내용 : 인체를 구성하는 미네랄 중 가장 많은 함량을 차지하며, 여러 생리활성에 관여하고 있는 칼슘의 체내 흡수율을 향상시키기 위하여, 칼슘과 고분자 핵산물질(M.W.1,000 - 1,000,000)을 결합시켜 체내 흡수가 용이하도록 한 칼슘-핵산물질 복합체 및 그 제조방법에 관한 것임. 칼슘 원료를 유기산(초산, 구연산, 젖산) 또는 물에 용해하여 얻어진 칼슘 용액에 동물, 식물 또는 미생물 유래의 분자량 50,000-500,000 범위의 고분자 핵산물질을 상기 칼슘에 대하여 20-150 중량% 비율로 첨가하여 칼슘-핵산물질 복합체 용액을 형성하고, 상기 유기산을 용매로 사용시 상기 칼슘-핵산물질 복합체 용액의 pH를 4.0-7.5로 조절하고, pH 조절로 인한 불용성 칼슘-핵산물질 복합체를 여과하여 제거하고, 여과액 내의 칼슘-핵산물질 복합체를 건조 및 마쇄하여 얻어지는 가용성 칼슘핵산물질 복합체에 관한 것이었다.

3) 유사특허-3

가) 발명특허명 : 핵산을 함유한 항산화 및 면역증강용 건강식품 조성물

- 출원 1020050121572(2005.12.12.), 주식회사 동원에프앤비

나) 유사도 : 10%

다) 주요내용 : 참치정소에서 추출 정제한 핵산(DNA)과 비타민, 콜라겐, 셀레늄, 스테아린 마그네슘을 함유하여 항산화 기능 및 면역증강 기능이 우수한 건강식품 조성물에 관한 것으로, 핵산 1-90중량%, 비타민 C 1-27 중량%, 비타민 E 0.5-0.8 중량%, 어류 콜라겐 3-28 중량%, 셀레늄 1-1.6 중량%, 스테아린 마그네슘 0.5-0.6 중량% 및 기타 부형제로 구성되었다.

3) 유사특허-4

가) 발명특허명 : 골다공증 예방 효과를 가지는 유기태화 칼슘 강화 유단백질(본 연구진)

- 등록 : 2012-0066918(2012.06.25.)

나) 유사도 : 80%

다) 주요내용 : 유단백질에 킬레이트화되어 생체흡수율이 뛰어난 유기태 칼슘 강화 유단백질을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 골다공증 예방 및 치료용 조성물은 생체 안전성을 확보하고 있음은 물론 뼈의 무게 및 강도를 증가시키고, 골다공증을 예방 및 치료에 효과적이며, 이를 주성분으로 하는 건강기능식품으로 활용될 수 있음을 특징으로 하였다.

3) 유사특허-5

가) 발명특허명 : 유기태화 칼슘 함유량이 높은 유단백질의 제조방법(본 연구진)

- 등록 : 2011-0056004(2011.05.2)

나) 유사도 : 80%(유사특허 4와 연계 출원)

다) 주요내용 : 살균처리되지 않은 유청을 70 ~ 100 °C에서 10분 이상 가열처리 하는 것을 특징으로 하는 유기태화 칼슘 강화 유단백질의 제조방법에 관한 것으로, 수용성 칼슘의 첨가만으로 유기태 칼슘 함량을 증대시킬 수 있고, 제조방법이 간단하여 손쉽고 저렴하게 생체흡수율이 뛰어난 유기태 칼슘급원을 제조할 수 있는 방법을 제공하기 때문에 흡수율이 낮은 무기태 칼슘을 사용하는 식품이나 의약 또는 사료, 비료 등 광범위한 분야에서 무기태 칼슘이 유기태 칼슘급원으로 대체될 수 있고, 이로 인해 무기태 칼슘의 과량 사용으로 인해 식품 등의 물성, 기호, 맛에 영향을 주는 한계를 극복할 수 있음을 특징으로 하였다.

3) 유사특허-6

가) 발명특허명 : 유기태 아연과 망간이 함유된 오리 사육용 사료 및 그 사료를 이용한 오리의 사육방법(등록 : 2007-0059341, 2007.06.12)

나) 유사도 : 10%

다) 주요내용 : 황산아연이나 황산망간을 아미노산과 2:1로 결합된 킬레이트 유기태 미네랄 또는 아미노산과 미네랄이 1:1로 결합된 복합 유기태 미네랄형태로 함유된 오리 사육용 사료에 관한 것임. 인공사육되는 오리에 항생제를 투여하지 않고도, 상기 항생제를 대체물질로서 아연과 망간을 비롯한 점토광물질과 솔잎을 사료에 함유시켜 제공함으로써 면역력 강화 및 자연사육상태와 같은 건강한 상태를 유지할 수 있도록 하며, 사료요구율 및 폐사율이 낮춰 농가 소득에 큰 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라 사료에 포함된 아연과 망간은 체내흡수율이 좋은 유기 화합물 형태로 첨가되어 환경오염을 최소화하고, 솔잎과 같은 약효성분이 체내에 축적되어 오리고기의 상품성을 향상시킬 수 있음을 특징으로 하였다.

3) 유사특허 4

가1) 발명특허명 : 효모 자가효소분해에 의한 셀레늄 펩타이드의 생산방법

- 등록 : 2006-0012436(2006.02.10)

나) 유사도 : 30%

다) 주요내용 : 효모 자가효소분해에 의한 셀레늄 펩타이드(selenium peptide)의 생산방법에 관한 것으로, 구체적으로 효모를 셀레늄-함유 배지에서 배양하여 셀레늄 효모를 제조하는 단계; 상기 셀레늄 효모를 분리하여 파쇄한 후 자가효소분해 촉진제를 첨가하고 자가효소분해에 의해 셀레늄 펩타이드를 포함하는 자가효소분해물을 얻는 단계; 및 이로부터 항산화 활성이 우수하고 저분자량의 셀레늄 펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, 효모 자가효소분해에 의한 셀레늄 펩타이드의 생산방법에 관한 것이었다.

3) FRIS(농림수산식품부, 연구개발사업 통합정보서비스) 유사중복성 검색결과

1) 검색키워드 : 키워드 : 유기태화*핵산*미네랄*시설원예*사료첨가제*기능성*식품*Organic*Neucleotide*mineral*Horiculture*Food additive*Functional*Food

2) 검색수 : 1건

3) 과제명 : 칼슘-유단백질 킬레이팅화를 통한 고칼슘 유기태화 식품소재 개발 및 이를 이용한 기능성 노인식 분말제품개발(본 연구진 개발)

4) 연구내용요약

가) 칼슘 유기태화 소재 대량생산기법 정립

나) 선발 칼슘-유단백질 유기태화 소재의 안전성 및 체내흡수량 조사

다) 칼슘-유단백질 킬레이팅 유기태 칼슘제제의 안전성 및 체내이용성 평가

라) 골다공증 모델동물을 이용하여 유기태 칼슘제제의 효능 평가

마) 사업명(년도) : 농림기술개발사업(2009~2010)

나. 헬리코박터 제균형 건강기능성 식품 개발

1) 국내외적 개발 필요성

- 일부 병원체의 만성 감염은 암을 일으킬 수 있음. 국제암연구소(IARC)와 미국 국립암협회지는 암 발생자의 20% 이상이 만성 감염으로 인해 암이 발생한다고 추정하고 있으며, 최신의 국내 연구에 의하면 우리나라 암 환자 중 21% 가량이 감염 된 것으로 추정된다.
- 국제암연구소가 1급 발암물질(Group 1 carcinogen)로 규정하는 병원체에는 B형 및 C형 간염 바이러스(hepatitis B and C virus), 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV), 헬리코박터균(helicobacter pylori), 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 간흡충(간디스토마, chlonorchis sinensis), 인간면역결핍바이러스(Human Immunodeficiency virus, HIV), 인간 T세포 바이러스(Human T-Lymphotropic Virus-1, HTLV-1), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma herpes virus, KSHV), 주혈흡충 (schistosoma haematobium), 타이간흡충(Opisthorchis viverrini)이 있으며, 이 중 B형 및 C형 간염, 인유두종바이러스, 헬리코박터균, 엡스타인바 바이러스, 간흡충의 감염은 우리나라에서 비교적 흔히 발생한다.
- 헬리코박터(Helicobacter pylori, H.pylori)는 위염과 소화성 궤양의 원인이 되는 위에 기생하는 나선형 모양의 세균임. 헬리코박터는 국제보건기구(WHO) 산하의 국제암연구소(IARC)에서 위암의 원인으로 판정하였고, 인간에 대한 1등급 발암 요인으로 규정하고 있음. 서구에 비해 우리나라 국민의 헬리코박터 감염률은 매우 높으며, 우리나라의 위암 발생도 세계적으로 가장 높은 수준이다.
- 헬리코박터균에 감염된 사람은 대개 만성위염 증후를 보이고 위염이 만성화되면 위 점막이 얇아지고 주름이 생기는 '위축성 위염' 이 발생한다. 위축된 위 점막은 장 점막의 상피세포가 잠식해 들어오는 '장상피화생(腸上皮花生)' 단계로 발전하는 데 이것은 위장 표면이 꽃이 핀 것처럼 거친 상태를 의미하며 이것이 발전하면 위 점막의 표층에 암 비슷한 세포가 생기는 '이형성증' (neoplasia) 단계로 넘어가서 위암으로 발전하는 병리학적 발생단계를 거침. 만성위염의 약 50%가 위축성 위염으로 발전하고, 위축성 위염의 약 80%가 장상피화생으로, 장상피화생의 약 20%가 위암으로 발전한다.
- 우리나라는 1998년과 2005년에 전국 규모의 헬리코박터 유병률 조사를 실시한 바 있다. 1998년 조사에서는 어머니로부터 태반을 통해 받은 헬리코박터 IgG 항체가 사라지는 7

개월부터 9세까지의 유병률이 12.7%로 완만한 증가를 보이다가 10-12세에 27.3%로 급격히 증가했고, 이 시기부터 가장 빠른 증가를 보인 31-40세의 74%까지 매년 약 1.7%씩 증가하였다. 헬리코박터 유병률은 1998년 조사의 16세 이상 전국평균 66.9%에 비해 2005년에는 59.6%로 감소하였으며, 이는 사회, 경제적 수준 및 위생상태의 향상에 의한 것으로 추정된다.

- 우리나라에서 헬리코박터 감염은 주로 5세 이하에서 일어나 일생 지속되는 것으로 알려져 짐. 헬리코박터는 사람에서 사람으로 전염되며, 주로 아동기에 감염이 일어나고, 가족 내 감염이 주된 감염 경로라고 추측 하였다. 대부분의 헬리코박터 감염자에게는 아무런 증상이 없으나 성인에게는 위염, 위십이지장 궤양의 중요한 원인이며, 선진국에서는 어린이의 만성 복통, 성장지연, 만성위염, 철결핍성 빈혈 등과 관련이 있는 것으로 조사되었다.
- 일반적으로 헬리코박터균 자체가 큰 위협이 되는 것은 아니나 이것의 감염으로 인한 위암발생율이 상당히 높고 소화성 궤양, 조기위암, 위의 림프종이 있는 경우에는 위암 예방과 위암 진행을 막기 위해 헬리코박터균을 치료해야 함. 그러나 치료에 앞서 이것을 예방하는 것이 더 시급하다.

2) 기존제품 및 경쟁제품과의 비교분석

- 2000년 야쿠르트사의 “월” 이 헬리코박터 균을 치료할 수 있다고 특허 받은 유산균 (HY2177, HY2743)을 발표하였음. 그러나 이 유산균에 대한 유효성 논란이 계속 되고 있다. 동물실험에서는 요구르트를 복용한 쥐에서 헬리코박터가 잘 감염되지 않았으며 배양 실험에서는 유산균이 헬리코박터 제거 효과가 있었으나 인체대상에서는 그 유효성이 입증 되지 못했고, 헬리코박터 감염에 대한 치료효과가 있다는 연구결과도 일치하지 않았다 (중앙일보 헬스미디어 2013. 8).
- 헬리코박터의 유해성이 알려지면서 2003년 남양유업(위력), 매일유업(구트), 롯데우유(루테리), 해태유업(위화장력)등에서 항헬리코박터 성분을 첨가한 상품등을 잇달아 개발 하였다.
- 연세우유는 최근 우유제품으로는 처음으로 항 헬리코 물질인 렉토팩-Y를 넣어 만든 '세브란스 헬스다터'를 출시하였는데 현재 특허출원 중인 렉토팩-Y는 위에 들어가 헬리코박터의 증식을 억제하는 역할을 한다는 게 회사측의 주장이다.
- 삼육식품의 기능성 두유 '삼육위조이'는 헬리코박터 파괴효능 활성을 억제하는 특허출원 유산균 성분 '헬리코신-엘씨21'을 두유에 첨가해 만들었다.
- 삼양식품은 칩꽃 추출물을 성분으로 헬리코박터 파괴효능의 증식을 억제시키는 유산균 음료 '위풍당당골드'를 출시하였는데, 위장장애 해소에 효과적인 칩꽃 추출물과 칼슘·철분 등이 함유된 두릅 추출물, 간장보호와 간기능을 향상시키는 매실 농축과즙이 함께 들어 있다.
- 덴마크밀크도 최근 항 헬리코 작용 효과가 있는 위 전문 요구르트 '필러스'를 내놓았다 (2003.9-2013.8).
- 헬리코박터의 감염에 대한 치료의 경우 주로 항생제를 이용하는 일반적으로 항생제 2대, 위산억제제 1개를 합쳐서 1주에서 2주 동안 복용하고 2주 후 치료결과를 체크하여 제균에 실패하였으면 2차 약물을 사용해 다시 시행한다. 또한, 헬리코박터 감염치료의 경우

건강보험적용 대상이 아니다.

- 치료에 사용되는 항생제는 크게 아목실린 (페니실린 계열) 과 Clarithromycin (퀴놀론계열) 의 항생제와 양성자 펌프 억제제의 삼제요법을 권고하고 있으나 이러한 항생제의 작기복용은 복통, 설사, 구역질, 알러지 등의 표면적인 부작용 외에 내성균을 양성할 수 있어 제균율의 감소뿐 아니라 다른 질병의 제균 효과까지 감소시킬 수 있다. 그러한 결과로 한번에 치료가 되지 않는 경우들이 발생해 재차 다른 항생제를 바꿔 치료하는 경우도 실제로 다수 발생하고 있어 비용적인 문제와 더불어 위장내 유익균까지 모두 없어져버려 악성질환으로의 잠재성을 가지고 있다.

3) 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황

가) 세계적 수준

개념 정립 단계	0	기업화 단계	0	기술 안정화 단계	
----------	---	--------	---	-----------	--

나) 국내 수준

- 베리 마셜 박사의 헬리코박터 파이로리의 발견 이후 많은 파이로리 억제 및 예방제제들이 개발되고 있으나 항생제는 기존의 항생제를 조합한 제제요법이고 파이로리에 의한 감염을 억제할 것으로 예상되는 유산균 및 천연물유래 화합물에 그치고 있다. 천연물유래 화합물은 일반적인 항균작용을 가졌다고 알려진 성분들로 프로폴리스, 감초 엑기스, 전차(煎茶)추출물, 카테킨을 함유한 정제의 방식이다.
- 일동제약에서는 헬리코박터에서 나오는 독소를 중화하는 성분인 항 헬리코박터 VacA IgY를 개발 특허 등록한 바 있고, 연세대에서는 렉토펙-Y, 야쿠르트에서는 유산균 주 2종을 특허 등록하였다. 야쿠르트의 유산균을 제외하면 위의 발명은 항원으로 한국인에서 분리된 H. pylori의 균종의 항원과 계란의 난황중의 면역글로블린을 이용하여 난황항체 (IgY)를 제조하고 이를 효과적으로 분리하여 H. pylori 감염에 대해 항생제가 치료법으로 등록하였으나 이의 임상적 효과는 미미함. 이외에도 국내의 항 헬리코박터 제제 특허는 총 10건 조사되었다.

일련 번호	발명의 이름	발명의 내용	출원인	출원번호
1	서덜취 추출물을 포함하는 항균 조성물	본 발명은 서덜취 (Saussurea grandifolia) 추출물 및 이로부터 분리한 비텍신 (vitexin)을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터균에 대한 항균 조성물에 관한 것이다.	대한민국	10-2011-0122792 (2011-11-23)
2	산초 추출물을 포함하는 항균 조성물	본 발명은 산초 (Zanthoxylum schinifolium) 추출물 및 이로부터 분리한 베르갭텐 (bergapten) 또는 루페올 (lupeol) 을 유효성분으로 포함하는 헬리코박터균에 대한 항균 조성물에 관한 것이다.	대한민국 (산림청 국립수목원장)	10-2011-0122852 (2011-11-23)
3	누리장나무 추출물을 포함하는 항균 조성물	본 발명은 누리장나무 (Clerodendron trichotomum) 추출물 및 이로부터 분리한 22-디하이드로클레로스테롤 (22-dehydrocleroesterol) 또는 베타-아미린 (β-amyrin) 을 유효성분으로 포함한다.	대한민국	10-2011-0122835 (2011-11-23)
4	장미의 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 또는 항염증용 조성물	본 발명은 장미(Rosahybrida) 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균활성 조성물 및 항염증 조성물에 관한 것이다.	충북대학교 산학협력단	10-2012-0006005 (2012-01-19)
5	건강식품용 유산균 발효	본 발명은 건강식품용 유산균 발효 요구르트 제조방	김광순	10-2012-0036617

	요구르트 제조방법	법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 국내산 천연토종 솔잎을 이용하여 유산균 요구르트와 솔잎을 혼합 발효하는 방법으로 인체에 유해한 물질인 병원균.		(2012-04-09)
6	난황항체를 첨가한 녹즙	본 발명은 가열하지 않은 생야채로 된 영양이 풍부한 녹즙류에 난황항체(LGY)를 첨가하여 영양이 풍부한 녹즙류에 난황항체(LGY)를 첨가하여 녹즙 음용시에 녹즙의 풍부한 영양소를 섭취함과 함께 위 건강을 해치는 헬리코박터균에 대한 항균 조성물에 관한 것이다.	이재현	10-2005-0079371 (2005-08-29)
7	항원성이 보장된 헬리코박터 SP를 생산하는 방법과 이를 포함하는 방법	장내 세균 항원 또는 독성인자의 발현을 유도하거나 강화시키는 시험관내 공정을 이용하는 방법을 상술하고 있다.	마이크로카르브, 인코퍼레이티드	10-1997-0702257 (1997-04-07)
8	MRNA로 전달이입된 항원제시세포	본 발명은 안티센스 방향의 RNA 분자가 실질적으로 결여되어 있으며, 방향성이 주로 센스방향으로 되어 있는 RNA 분자를 수득하기 위한, RNA를 증폭하는 방법에 관한 것이다.	아르고스 쉐라퓨틱스 인코포레이티드	10-2006-7012706 (2006-06-23)
9	브로콜리를 유산균으로 발효한 항염 및 항헬리코박터의 효과가 있는 기능성 발효물질 및 이의 제조방법	본 발명은 브로콜리를 유산균으로 발효한 항염 및 항헬리코박터의 효과가 있는 기능성 발효물질 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 상기 유산균은 Lactobacillus plantarum MG207이다.	주식회사 메디오젠	10-2010-0021310 (2010-03-10)
10	헬리코박터 펠로리 감염성 위질환의 예방과 치료를 위한 새로운 치료법 개발과 고 특이성 항 헬리코박터 펠로리면역글로블린 와이	본 발명은 항원으로서 한국인에서 분리된 H. pylori의 균종의 항원과 계란의 난황중의 면역글로블린을 이용하여 난황항체 (IgY)를 제조하고 이를 효과적으로 분리하여 H. pylori 감염에 대해 항생제가 아닌 획득면역으로 대항한다.	주식회사 리스나	10-2000-0055828 (2000-09-22)

다) 국내외의 연구 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용 현황
한국야쿠르트	항 헬리코박터 제균효과가 있는 유산균 개발	상품 개발 및 특허완료
연세대학교	항원을 이용하여 헬리코박터 제균을 유도하는 면역글로블린 개발	상품 개발 및 특허완료
Pasteur institute (France)	항 헬리코박터 효과가 있는 유산균 개발	상품 개발 및 특허완료
National cancer institute	헬리코박터 중균 분리 및 보유 최다, 제균제 및 면역증강제 개발	연구데이터베이스 구축에 기여

4) 국내외 관련 시장 현황

- 현재 항헬리코박터 파일로리를 표반하는 일반식품 시장은 약 2600억원에 달함 (2013년 바이오인, BT 동향) . 이들 일반 식품은 한국야쿠르트의 “월” 남양유업의 “위력”, 매일유업의 “구트” 등 발효유가 대부분을 차지 한다. 특히 2000년 9월 출시된 한국야쿠르트의 헬리코박터 프로젝트 월은 헬리코박터를 일반인에게 알리는 계기가 되어 전체 매출액의 약 절반을 차지하고 있다. 그러한 이러한 유제품들은 유통기한이 짧고 우리나라 성인의 90% 이상이 유당불내증이 가지고 있어 우리 실정에 맞지 않는다는 의견이 제기되고 있다.
- 삼육식품은 2003년 두유부문에서 항헬리코박터를 내세운 삼육위조이를 출시하였는데 특허출원 소재인 헬리코신을 함유하고 카톤포장을 더해 유통기한을 4개월 연장시키는데 성공하였다. 이들 발효유 외에도 건국유업의 “클” 과 크라운 제과의 헬코자일리톨은 각각 세이프락이 함유된 기능성 우유와 기능성검으로 항헬리코박터 기능을 표장하고 있음. 최근에는 생식에도 이용 쉐택에서 쉐바이오생식이라는 브랜드로 출시되고 있다.

5) 핵심 기능성분의 국내외적 인증(CAS No. 기준) 및 시장성 평가

가) NANA의 국제시장 가격(2009.04 .09.기준)은 수백에서 수천만원을 호가하는 고가원료이나, 산업화 적용에 있어 대부분 의료용 소재로 활용(이유 : 합성제품)되고 있으며, 식품산업은 적용예가 없다(이유 : 천연제제의 개발품 부존재로 안전성 확보 필요, 경제성 부적합).

구분	소비자 가격 (원/Kg,VAT 별도)	생산국(회사)	비고
합성NANA(10%)	2,600,000	중국(JK Bioteck사)	유기합성
합성NANA(98%)	8,000,000	중국(JK Bioteck사)	유기합성
합성NANA(99%)	10,000,000	일본(MARUKIN)	유기합성
합성NANA(98%)	4,500,000	뉴질랜드산	chitin Base합성
천연NANA(본 과제)	500,000	연구종결시	천연유단백질 분리

나) 상용 합성 NANA 국제안전규격(MSDS)조사 결과는 다음과 같다.
(상기 일본 및 중국 제조사 기준 작성)

M A T E R I A L S A F E T Y D A T A S H E E T

SECTION 1. - - - - CHEMICAL IDENTIFICATION- - - - -

CATALOG #: A8001.

NAME: SIALIC ACID

SYNONYMS: SA, N-ACETYLNEURAMINIC ACID, NANA

5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid

SECTION 2. - - - COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS - - - - -

CAS #: 131-48-6

MF: C11H19NO9

EC NO: 205-023-1

SECTION 3. - - - - HAZARDS IDENTIFICATION - - - - -

HYGROSCOPIC. POTENTIAL HEALTH EFFECTS THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THIS MATERIAL HAVE NOT BEEN INVESTIGATED. USE APPROPRIATE PROCEDURES TO PREVENT OPPORTUNITIES FOR DIRECT CONTACT WITH THE SKIN OR EYES AND TO PREVENT INHALATION.

SECTION 4. - - - - FIRST-AID MEASURES- - - - -

IN CASE OF CONTACT, IMMEDIATELY FLUSH EYES WITH COPIOUS AMOUNTS OF WATER FOR AT LEAST 15 MINUTES. IN CASE OF CONTACT, IMMEDIATELY WASH SKIN WITH SOAP AND COPIOUS AMOUNTS OF WATER. IF INHALED, REMOVE TO FRESH AIR. IF NOT BREATHING GIVE ARTIFICIAL RESPIRATION. IF BREATHING IS DIFFICULT, GIVE OXYGEN. IF SWALLOWED, WASH OUT MOUTH WITH WATER PROVIDED PERSON IS CONSCIOUS. CALL A PHYSICIAN. WASH CONTAMINATED CLOTHING BEFORE REUSE.

SECTION 5. - - - - FIRE FIGHTING MEASURES - - - - -

EXTINGUISHING MEDIA WATER SPRAY. CARBON DIOXIDE, DRY CHEMICAL POWDER

OR APPROPRIATE FOAM. SPECIAL FIREFIGHTING PROCEDURES WEAR SELF-CONTAINED BREATHING APPARATUS AND PROTECTIVE CLOTHING TO PREVENT CONTACT WITH SKIN AND EYES. UNUSUAL FIRE AND EXPLOSIONS HAZARDS EMITS TOXIC FUMES UNDER FIRE CONDITIONS.

SECTION 6. - - - - - ACCIDENTAL RELEASE MEASURES- - - - -

WEAR RESPIRATOR, CHEMICAL SAFETY GOGGLES, RUBBER BOOTS AND HEAVY RUBBER GLOVES. SWEEP UP, PLACE IN A BAG AND HOLD FOR WASTE DISPOSAL. AVOID RAISING DUST. VENTILATE AREA AND WASH SPILL SITE AFTER MATERIAL PICKUP IS COMPLETE.

SECTION 7. - - - - - HANDLING AND STORAGE- - - - -

REFER TO SECTION 8.

SECTION 8. - - - EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION- - - - -

CHEMICAL SAFETY GOGGLES. COMPATIBLE CHEMICAL-RESISTANT GLOVES. NIOSH/MSHA-APPROVED RESPIRATOR. SAFETY SHOWER AND EYE BATH. MECHANICAL EXHAUST REQUIRED. AVOID INHALATION. AVOID CONTACT WITH EYES, SKIN AND CLOTHING. AVOID PROLONGED OR REPEATED EXPOSURE. WASH THOROUGHLY AFTER HANDLING. KEEP TIGHTLY CLOSED AND FREEZE.

SECTION 9. - - - - - PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES - - - - -

APPEARANCE AND ODOR. WHITE TO OFF-WHITE POWDER. PHYSICAL PROPERTIES MELTING POINT: 184 C TO 186 C (DEC).

SECTION 10. - - - - - STABILITY AND REACTIVITY - - - - -

CHEMICAL STABILITY: STABLE UNDER NORMAL TEMPERATURES AND PRESSURES. CONDITIONS TO AVOID: STRONG OXIDANTS. INCOMPATIBILITIES WITH OTHER MATERIALS: NOT AVAILABLE. HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: IRRITATING AND TOXIC FUMES AND GASES. HAZARDOUS POLYMERIZATION: HAS NOT BEEN REPORTED.

SECTION 11. - - - - TOXICOLOGICAL INFORMATION - - - - -

ACUTE EFFECTS
MAY BE HARMFUL BY INHALATION, INGESTION, OR SKIN ABSORPTION.
MAY CAUSE EYE IRRITATION. MAY CAUSE SKIN IRRITATION. TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE, THE CHEMICAL, PHYSICAL, AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES HAVE NOT BEEN THOROUGHLY INVESTIGATED.

SECTION 12. - - - - ECOLOGICAL INFORMATION - - - - -

DATA NOT YET AVAILABLE.

SECTION 13. - - - - - DISPOSAL CONSIDERATIONS - - - - -

DISSOLVE OR MIX THE MATERIAL WITH A COMBUSTIBLE SOLVENT AND BURN IN A CHEMICAL INCINERATOR EQUIPPED WITH AN AFTERBURNER AND SCRUBBER. OBSERVE ALL FEDERAL, STATE AND LOCAL ENVIRONMENTAL REGULATIONS.

제 2 장 필수분석법 정립

1. 연구목적(필수 분석법 정립)

현재 식품산업에 사용되는 무기태 미네랄 소재의 경우, 섭취량 대비 낮은 생체흡수율등 비효율적인 특성을 보이는 것으로 알려지고 있다. 또한, 대부분 독성을 보유하고 있어 필요 섭취량 및 생체흡수율(이용률)를 충족시키기 위해 과량을 사용할 수 없는 한계와 애로점을 가지고 있다고 보고되고 있다. 본 연구는 식품업계에서 기존 사용하고 있는 무기태화 소재의 단점을 킬레이팅 기법을 도입한 유기태화 방법으로 해결하고자 하였다. 따라서, 기질 특이성을 고려한 무기태 이온간 유기태화 제제 개발은 이제까지의 연구개발과는 다른 차원의 목표와 수단이 적용됨에 따라 갈습 반응전/후의 변화확인을 위한 분석방법 정립은 절대적으로 필요하다 할 수 있다.

본 연구간 정립하고자 하는 분석법은, 영양성분 분석 (당류, 단백질류, 지방류, 유기산류, 그리고 미네랄류 등), 유기태화 제제 개발간 분자량 변화량 확인 분석, 유기태화 반응에 있어 주요한 관련 기능기 확인분석 (FT-IR 분석), 잉여 미네랄 및 독성음이온 제거에 따른 효율검정을 위한 분석법(IC분석)과 최종적으로 유기태화 제제체내 미네랄과 단백질의 결합구조 및 성상 분석(X-선회절분석)에 관한 연계된 일련의 분석법을 전체적으로 정립함으로써 개발제제의 특성을 구명과 산업화시 원료 및 제품류의 QA기법까지 정립 하고자 하였다.

당초 제시한 분석법 정립방법 및 목표 분석법은 다음과 같다

분석법 정립방법	정립예정 분석법
1. 영양성분 분석법 정립 가.이론적 접근방법 : 기질 대비 미네랄 유기태화 반응전/후의 영양성분 변화검정 분석법 확립 필요 나. 실험실적 접근방법 : 분석방법 정립	1. 영양성분 분석 방법 정립 가. 킬달분석 : 조단백질 확인 나. GC분석 : 지방산 확인 다. 조지방분석 : 조지방 확인 라. HPLC 분석 : 당류, 유기산 등 분석 마. ICP분석: 미네랄 킬레이팅 결과 분석
2. 분자량 변화 분석법 정립 가. 이론적 접근방법 : 유기태화 미네랄 반응전/후의 분자량 변화 조사 필요 나. 실험실적 접근방법: 분석방법 정립	2. 분자량 변화분석 정립 가. FPLC(Peptide)분석 : 분자량 변화 평가 나. FPLC(GPC)분석: 단백질 분자량 이동 패턴 조사 다. PreP LC : 분자량 변화 분석
3. 킬레이팅 효과 분석법 정립 가. 이론적 접근방법 : 선발 기질 대비 킬레이팅 반응전/후 관련 기능기 및 구조변화 확인 필요 나. 실험실적 접근방법 : 분석방법 정립	3. 유기태화 킬레이팅 효과 분석방법 정립 가. FT-IR분석: 킬레이팅 관련 기능기 분석 나. EC측정 : 킬레이팅 반응효율 측정 다. XRD분석: 킬레이팅 구조분석
4. 구조결정화 패턴분석 가. 이론적배경 : 유기태화 미네랄 소재의 외부간섭 저항성(물리/이화학/생물학) 평가 필요 나. 실험실적 접근방법 : 분석법 정립	4. 구조결정화 패턴분석 가. Lazer Particle analysis : 입주크기 검정 나. XRD : 구조결정 평가 다. SEM분석: 성상확인
5. 미반응 미네랄 및 유해이온 제거효율 검정 가. 이론적 접근방법 : 선발 기질 대비 킬레이팅 반응 후 미반응 미네랄과 독성음이온 제거 필요 나. 실험실적 접근방법 : 분석방법 정립	5. 미반응 미네랄 및 유해 음이온 분석방법 정립 가. IC분석: Permate 음이온 제거효율(안전성) 평가 나. ICP분석 : 세척단계별 Permate 및 Retenate시료내 미네랄 함유량 조사
6. 미생물 검사법 정립	6. 미생물 검사법 정립 : 식약청 식품공전 미생물 검사

가. 이론적 접근방법 : 유기태화 제제 개발 시 예측되는 감염균 확인 및 제어방법 필요 나. 실험실적 접근방법: 미생물 분석방법 정립	법(기준) 가. 총균수 정성시험 나. 대장균군 정성시험 다. 진균수 정성시험 라. 유산균 정성시험
---	--

가. 영양성분 분석법 정립

1) HPLC분석 (당류)

가) 분석방법

당류분석 위한 HPLC시스템 및 조건은 표 1. 과 같으며, 기본적으로는 식품공전(제10 일반 시험법, 5) 탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다. 최저검출한계검정은 1%(w/v) 당류(5종, Lactose, Galactose, Glucose, Fructose 및 Sucrose)를 표준체로 하였는데, 측정간 농도는 당류별 5,000ppm, 10,000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm 및 0.1ppm농도별로 희석하여 사용하였다. 검출효율검정은 멸균유내 표준체별 100ppm을 첨가한 후 역시 식품공전법에 준하여 실시하였다.

나) 결과

- (1) 당류별 최저 검출한계는 10ppm이상이었다(표 2, 그림 1.).
 - (2) 당류별 검출효율은 92~108%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(표 2, Fig 2.).
- 결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 당류분석방법은 정립되었다(표 2.).

2) HPLC 분석(유기산류)

가) 분석방법

유기산류 분석 또한 HPLC분석법을 적용하여 실시하였다. 표 3. 과 같으며 시료로 유기산 대표 표준체 9종을 선별하여, 측정 간 1,000ppm의 Stock solution을 준비하여 희석하여 사용하였다. 분석법 정립 시, 유기산은 Tartaric acid(Sigma, USA), DL-Malic acid(Junsei, Japan)을 사용하였으며, 비교를 위한 표준체는 표 4와 같다.

나) 결과

본 연구간 우선 킬레이팅 반응을 위한 기질로서 유청단백질을 사용하였는데, 이에 따라서, 유청단백질의 생산을 위한 치즈제조간 사용되는 유기산과 미생물 번식에 의하여 야기될 수 있는 단백질의 변성 등의 영향을 평가하기 위하여 유기산 분석법을 정립하였다. 결과로서, 유기산에 분석을 위한 HPLC(Aminex 컬럼)분석법이 정립되었고, 분석대상 유기산 9종을 대상으로 실시한 검출한계는 1ppm이상이었다.(그림 3.). 또한, 유기산 검출효율은 81~114%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(그림 4.).

2) ICP 분석(미네랄)

가) 연구수행방법

영양성분 분석법 중 미네랄류는 ICP분석법을 적용(ICP-OES시스템, 모델 : Optima 5300DV, Perkin Elmer사, USA) 실시하였으며, 기본분석법은 식품공전(제10 일반시험법, 10)칼슘, 2009)에 준하여 실시하였다. 연구간 사용할 ICP분석기기의 최저검출효율 및 검출한계는 기본적으로 사용하는 ICP분석용 표준용액을 사용하였다. 최저검출효율 및 검출한계를 검정하기 위하여 ICP표준 용액 중 Ca, Fe 및 Mg3종을 선별하여 이들 용액을 0.01ppm, 0.1ppm, 1.0ppm 그리고 10ppm까지 농도별로 조성한 후 이를 시료로 사용하였다(표 5.).

전처리로 마이크로웨이브 시스템 병행적용 하였다. 분석샘플에서 분취(0.5g)를 하여 가수분해용액 첨가 (70% HNO₃ 7ml+H₂O₂ 1ml)하고 유기물제거(마이크로웨이브 시스템, 190°C 20min)과정을 거치고 Mass-up(2% HNO₃ 용액첨가, 최종50ml로 조절)통해 ICP 샘플별 3반복 측정하여 결과도출(평균±표준편차)을 하였다.

나) 결과확인

검정방법으로는 우선 조성된 검정용액으로 ICP시스템의 표준검량선을 작성한 후, 이를 시료로 재측정 하므로써, 분석시스템의 최저검출한계(ppm) 및 측정효율(%) 비교하였다.

다) 결론

- 1) 3종의 표준시료(Ca, Fe, Mg)에 대하여 측정 시, 최저검출한계는 0.10ppm이상이었다.
- 2) 검출효율은 전체 표준시료에서 97~109%범위를 보여 유의성이 인정되었다(P<0.05).
- 3) 미네랄별 검출농도는 다른 것으로 나타나 미량인 경우는 표준용액 범위를 조절하여 측정함으로써 검출오차를 줄여야 한다고 판단되었다.
- 4) 결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 미네랄 분석방법은 정립 되었다.

4) FPLC(Peptide, GPC) 분석

가) 연구수행방법

우선 목표 유기태화 소재류중 선행제조한 칼슘-유기태화를 시료로하여 제조간 기질단백질의 분자량 변화 검정을 위한 FPLC분석시스템 및 분석조건은 표 6과 같다. 시험간 표준체로서는 저분자부터 고분자까지 분자량을 보유하고 있는 FPLC Calibration kit를 시험간 사용하였다(표 7). 표준체 시료는 가장 낮은 분자량인 Mw 209인 NAG(N-acetyl glucosamine. 1 당체), 분자량이 1,355인 Vitamine B12, Aprotinin(Mw 6,500) Chtochrome(Mw 12,384), Ribonuclease-A(Mw 13,700), Ovalbumin(Mw 43,000), Conalbumin(Mw 75,000), Aldolase(Mw 158,000) 그리고 가장 높은 분자량 수치를 보유한 Myosin(Mw 212,000)까지 9종을 대상으로 검량선을 작성하였다(그림 5).

나) 결과확인

본 연구간 미네랄(칼슘) 유기태화 제조간 기질단백질의 분자량 변화 검정은 저분자부터 고분자까지 분자량별 표준체별로 FPLC 측정을 통하여 분자량별 검출시간을 측정하였으며, 이를 기준으로 검출식을 분자량 대비 시간으로 각각 작성하였다. 이를 기준으로 최종 칼슘 유기태화 제제 개발간 분자량변화가 예상되는 시료를 검출식에 대입하여 결과를 확인하였으며, 검량식

대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 검출효율 측정을 통하여 검량식의 측정효율을 재확인하였다.

다) 결과

표준체를 이용한 FPLC(Peptide, GPC)를 통해 분자량을 기준으로 작성한 검량식은 $y=5616.7x^2-31422x+37263$, 검출시간을 기준으로 작성한 검정식으로는 $y=5616.7x^2-31422x+37263$ 을 정립 완료하였다. 또한, 정립된 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 분자량을 확인시 검출효율은 95~112%의 범위로 나타나 검량식은 정립되었음을 확인하였다(그림 8).

4) FT-IR 분석

가) 분석방법

본 연구간 내열성 보유 유단백질인 WPI를 기준으로 미네랄 킬레이팅에 관련한 기능기 확인이 필요하여 FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법을 정립하고 저 하였다.

분석간 사용기기는 Bruker Optics IFS66/S기종, 4,000~600Cm⁻¹/Resol 이었으며, 분석 샘플은 KBr-Pellet Disc법에 의해 준비되었으며 실험구 내역 및 분석방법은 표 9와 같다.

나) 결과

- 1) 정립 분석법은 FT-IR분석법에 의하여 정립되었다.
- 2) 정립된 분석법에 의한 분석 결과 Ca의 경우는 이온화 후 유단백질내 치환 가능 기능기중 (-NH₂, -COOH) -COOH기와 결합하는 것으로 확인되었다.(그림 6.)
- 3) 제법에 따라 유단백질 보유기능기중 Ca이온과 결합되는 기능기 극대화 방법(처리구1.) 정립을 완료하였다.(그림 6.)
- 4)정립된 FT-IR분석법을 통하여 내열성 보유 유단백질인 유청분말(아산공장, 유효기간 : 2010.02.03)를 기준으로 미네랄 킬레이팅 도입량별 기능기 확인을 완료하였다.
- 5) 제법에 따라 칼슘함량 동시증대 및 이중 미네랄의 킬레이팅 기능기 극대화 효과를 확인 정립하였다.

결과로서 본 연구개발간 필수적으로 필요한 미네랄 킬레이팅에 관련한 기능기 확인을 FT-IR 분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법이 정립되었다.

6) X-선 회절분석

가) 연구수행방법

본 연구에서도 역시 유기태화 미네랄 소재류를 대상으로 본 검정법을 정립 및 평가하였는데, 칼슘-유기태화 제조간 대조구 WPS 분말과 함께 유기태화 칼슘 함유 유단백질 분말(Ca-WPS)의 칼슘의 결합 형태와 킬레이팅 구조를 분석을 위해 X-선회절분석방법(XRD분석)시스템이 사용되었다. 분석조건을 정립하기 위한 시료는 다음과 같이 준비하였다.

대조구(WPS)로서는, 유청분말(매일유업) 50g을 정제수 300ml에 용해한 후 상온조건에서

30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm, 15℃, 15분)후 동결건조 처리하였다. 처리구로는 대량생산시스템 정립후 시제품에 대하여 검정시료로 사용하였다.

나) 결과 확인

동결처리된 시험구별(WPS, Ca-WPS) 시료는 XRD 분석을 통하여 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 반응에 따른 구조분석을 실시하였다.

분석은 Powder XRD 분석시스템(모델: D8-FOCUS, BURKER사, USA)을 이용하였으며, 기기 권장방법에 의하여 결과를 확인하였다.

다) 결과

유기태 칼슘의 결합 형태는 칼슘 포타슘 포스페이트 하이드레이트(Calcium Potassium Phosphate Hydrate [$\text{Ca}_2\text{K}_2(\text{P}_6\text{O}_{18})_6(\text{H}_2\text{O})$]), 칼슘 수소포스페이트 하이드레이트(Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$]), 아나파이트(Anapaite [$\text{Ca}_2\text{Fe}+2(\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$]), 포타슘 칼슘 수소포스페이트(Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [$\text{CaK}_3\text{H}(\text{PO}_4)_2$]), 브루사이트(Brushite [$\text{CaPO}_3(\text{OH})\text{H}_2\text{O}$]), 칼슘 설파이드 포스페이트(Calcium Sulfide Phosphate [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{S}$])인 것을 X-선 회절분석을 통해 확인할 수 있었다.(표 10, Fig 7).

7) IC 분석법 정립(이온분석)

가) 연구목적

칼슘유기태화 제제 제조시, 기질단백질로는 유청분말을 킬레이팅 물질로는 칼슘소재($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 사용하게 되는데, 칼슘유기태화 반응이 종료되게 되면 미반응 칼슘과 음이온(Cl^-)이 다량잔존하게 되는데 독성을 보유하기 때문에 반드시 이를 제거하여야 한다. 따라서, 칼슘유기태화 대량생산시스템내 세척공정을 정립하기 위하여 이의 제거효율을 확인하고자 하였다.

나) 연구수행방법

본 분석법은 기본적으로 칼슘 고함량(80,000~100,000ppm) Ca-WPS제조법을 적용하였다, 시료는 대량생산시스템 정립후 시제품을 검정시료로 사용하였다.

다) 결과 확인

세척단계별 상층액내 음이온(Cl^-)의 제거효율은 IC분석법을 적용하여 검정하였는데, 적용한 IC분석시스템 및 분석조건은 다음과 같다.

- 분석시스템 : Dionex ICS-3000(USA)

- 분석조건

. Eluent : 3~75mM KOH

. Gradient : 0min. (3mM KOH) → 15min. (3mM KOH) → 15 ~ 30 min. (20mM KOH) → 30min. (75mM KOH) → 34min. (75mM KOH) → 34min. (3mM

KOH) → 45min. (3mM KOH)

- . Eluent Source : EGC-KOH II Cartridge
- . Flow rate : 1.2ml/min.
- . Detection : Suppressed Conductivity
- . Suppressor : Anion Self-Regenerating Suppressor (ASRS 300 x 4mm)
- . Applied Current : 223mA
- . Injection Volume : 250uL

라) 결과

칼슘 유기태화 제조후 용액내 염소이온(Cl^-)의 검출량은 57,500ppm이었으나, 세척단계가 진행될 수록 검출수치는 감소하였으며, 최종 5단계 세척시는 검출량은 0.01ppm으로 나타나 완전히 제거된 것으로 판정되었다(표 11. 그림 8.). 따라서, 이상의 결과로 볼 때 음이온(Cl^-)의 검출방법은 정립되었다.

8) 키토산 및 키토산 올리고당 제조 및 물성분석법 정립

가) 연구목표

본 연구는 키토산을 기질로 하여 유기태화 미네랄 소재류를 유기태화 함에 있어 키토산의 물성 조절 기술이 가장 핵심적인 성공요인인데, 이는 키토산은 물성 조절에 따라 다양한 특성을 보이기 때문이다.

본 과제외의 중요한 목표중 한 종류가 산란계를 대상으로 개발예정인 미네랄 유기태화 소재의 산란계를 공시동물로 섭이를 통해 기능성 축산물의 생산과 더불어 산란계 생산현장의 고질적인 질병을 억제 혹은 치료를 할 수 있는 항질병형 소재류 개발이다.

따라서, 본 연구에서는 상기 목표에 도달할 수 있는 최적의 물성을 보유하도록 하는 물성조절법을 정립하고, 이를 전체 연구에 적용하였으며, 시험방법과 결과는 다음과 같다.

나) 연구수행방법

(1) 원료 준비 및 키토산 올리고당 제조

계껍질에서 추출한 키토산을 원료로 하여 제조된 키토산 (Average molecular weight ; 1×10^6 , deacetylation ratio; 92%)을 50g을 3차 탈이온수에 1L에 고르게 분산시킨 후, 30ml acetic acid를 투여하고 150rpm으로 교반하면서 용해시켰다. 이어서, 60°C로 승온하고, 키토산 분해 효소(*Bacillus* sp. CMB26 기원의 효소) 4.5mg를 넣은 후 12시간 동안 가수분해시켜 올리고당화 키토산(Average molecular weight; 1,357)을 제조 및 이를 전체 실험간 사용하였다.

(2) 키토산 및 제조 키토산올리고당의 물성분석

본 실험에 사용된 키토산 제제의 물성확인 절차는 다음과 같이 실시하였다. 원료처리 과정에서 고분자로서의 성격을 보유할 시의 분자량의 감소 수치인 점도는 Brookfield 점도계(모델 DV-RVII++, 미국)를 사용하여 100rpm으로 측정하였고, 측정 시 사용하는 고분자키토산

용액은 600ml가 되도록 1% 초산용액에 0.5%(W/W)에 완전 용해하여 기포가 제거된 후 25℃ 조건에서 측정하였으며, 측정간 측정 스피들은 1~7번을 사용하여 측정하였다. 사용 원료인 올리고당화키토산의 분자량의 조성확인을 위한 분자량 분포도 분석은 GPC(gel permeation chromatography 분석시스템(JASCO, Model LC-90, Jasco Co., Japan)을 이용하였고 그 분석조건은 Table 12와 같은 조건으로 분석하였다. 키토산의 탈아세틸화도는 콜로이드 적정법을 적용하여 측정하였다

다) 연구수행결과(물성분석 결과)

본 연구에 사용된 키토산올리고당의 점도를 Brookfield점도계를 사용하여 100rpm으로 측정한 결과 점도는 2.2cps(centi poise)로 나타났다. 그리고, 키토산이 보유한 기본 물성치인 탈아세틸화도는 92%를 나타내어 일반적으로 키토산올리고당으로 제조시 탈아세틸화도(Deacetylation ratio, %)가 50%이상일 때 키토산이라고 함과 비교시 본 연구에 사용한 키토산올리고당의 순도는 높은 것으로 확인되었다.

본 연구에 사용된 키토산올리고당의 구성성분을 GPC분석을 실시하여 검정한 결과는 다음과 같다(Fig.9~10) 우선 GPC분석에 앞서 분석기기의 객관성을 부여하기 위하여 표준정량을 실시하였다(Fig. 9). 그 결과, 표준체로서 Pullulan(MW 1,660,000, 380,000, 186,000, 100,000, 48,000, 23,700, 12,200, 5,800, 966)과 oligosaccharides(MW 805, 644, 483, 322, 161) 14개체를 검정한 결과 분석기기의 측정오차는 최저 -10.5%~최대 24.98%의 범위를 나타내었으나, 본 연구의 재료로 사용한 키토산올리고당의 정량분석에는 문제가 없는 것으로 인정되었다(Fig. 9). 키토산올리고당의 분석조건은 Table 12와 같은 조건으로 실시하였는데, 평균분자량은 1,396, 수평균(Mn)의 경우는 752, 분석간 분포지수는 1.86이었다. 분자량의 조성은 최저 268에서 최대 16,869의 범위를, 1~10당체의 올리고당의 함유량이 78.3%함유되어 있었고, 저분자화-키토산은 21.7%의 범위를 보유하고 있었다(Fig 10).

Table 1. HPLC 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : Carbohydrate (5um,4.6 x 150mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase :ACN(75):ddH ₂ O(25)
Autosampler:Model G1313A	.Flow Rate:1.0ml/min.
. Detector (RI):Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector (RI):Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul

Table 2. 검출한계 및 검출효율 검정결과

표준체별 조성내역	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
Lactose	10	108
Galactose	10	97.9
Glucose	10	92.5
Fructose	10	105
Sucrose	10	92.2

Table 3. HPLC 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : AMINEX HPX-87 (300mm x 7.8mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase :10mM H2SO4
Autosampler:Model G1313A	.Flow Rate:1.0ml/min.
. Detector (RI):Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector (RI):Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul
	.Detection(UV): 210nm

Table 4. 유기산 대표표준체 함유량 및 제조사

표준체명 (9종, 함유량)	제조사명
1. Sodium Oxalate (0.8umol)	Organic Acid Standard (Bio-RAD(USA))
2. Sodium Citrate (4.0umol)	
3. Sodium Malate (8.0umol)	
4. Sodium Succinate (20.0umol)	
5. Sodium Formate (20.0umol)	
6. Sodium Acetate (40.0umol)	
7. Tartaric acid (C ₄ H ₆ O ₆ .H ₂ O)	SAMCHUN (KOREA)
8. D-Lactic acid	GmBH (Germany)
9. L-Lactic Acid	GmBH (Germany)

Table 5. ICP분석법 정립을 위한 미네랄별 최저검출효율 및 검출한계 측정결과

ICP분석법정립용 표준용액(ppm)	Ca		Fe		Mg	
	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
0.01	ND	-	ND	-	ND	-
0.10	0.097	79	0.109	109	0.108	108
1.0	1.049	105	1.010	101	1.096	109
10.0	10.66	106	10.44	104	10.55	105

Table 6. 유기태화와 미네랄 소재류 제조간 기질단백질의 분자량 변화 검정을 위한 FPLC분석 시스템 및 분석조건

FPLC 분석시스템 및 분석조건

1. 시스템 (AKTA, 스웨덴) : UPC900 +D920+CU950
 2. 운용조건
 - 가. column(Temp.) : Superdex Pep 10/300GL(35' C)
 - 나. Mobile Phase : Phosphate buffer (50mM Na₂HPO₄+150mM NaCl+ddH₂O 1L)
 - 다. Flow rate : 0.5ml/min.
 - 라. Press : 0.84PSI
 - 마. injection volumn: 100ul(시료 1%용액)
 3. 표준체 : FPLC Calibration kit
-

Table 7. 기질단백질의 분자량 변화 검정용 표준체 내역

표준체명	분자량	비고
NAG	209	N-acetyl glucosamine
Vitamine B12	1,355	Sigma
Aprotinin	6,500	FPLC Calibration kit
Cytochrome c	12,384	"
Ribonuclease-A	13,700	"
Ovalbumin	43,000	"
Conalbumin	75,000	"
Aldolase	158,000	"
Myosin	212,000	"

Table 8. 기질단백질(WPI) 대비 칼슘 킬레이팅 관련 기능기 검정을 위한 시험조성내역

실험구	내역	비 고
대조구	20% CaCl ₂ (정제수 180g+CaCl ₂ 70g)제조 후 20%CaCl ₂ 100g분취하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	CaCl ₂
비교구	정제수 90dp WPI(Arla Co.,) 10g만을 첨가하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	WPI
처리구-1	WPI(Arla Co., Lot No.: S090213) 10g과 CaCl ₂ 13.23g을 먼저 혼합후 정제수 90g을 추가첨가하여 용해후 동결건조 시켜 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	(CaWPI+DW)
처리구-2	정제수 90g에 CaCl ₂ 1.32g을 녹인 후 WPI(Arla Co., Lot No.: S090213)10g을 첨가하여 반응 시킨 후 동결건조 시켜 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	(DWCa+WPI)

Table 9. XRD분석을 통한 칼슘 유기태화 제제의 화학구조 분석결과표

XRD결과	Compound Name(Formular)	Y-Scale	d x by	Wavelength	System	a	b	c	alpha	beta	gamma	Bravais L	Space Group
01-086-1221 (C)	Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca ₂ K ₂ (P ₆ O ₁₈)(H ₂ O) ₆]	43.56	1	1.5406	Monoclinic	7.266	11.833	12.3	90	103.17	90	Primitive	P21/n (14)
00-026-1056 (+)	Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ •6H ₂ O]	119.95	1	1.5406	Triclinic	9.529	18.994	6.855	92.33	90.13	79.93		
00-034-0148 (I)	Anapaite [Ca ₂ Fe+2(PO ₄)•2H ₂ O]	49.53	1	1.5406	Triclinic	6.4508	6.8187	5.9017	101.65	104.26	70.76	Primitive	P-1 (2)
00-034-1239 (C)	Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK ₃ H(PO ₄) ₂]	38.57	1	1.5406	Monoclinic	9.88	5.733	7.432	90	94.1	90	Base-centered	C2/m (12)
00-009-0077 (+)	Brushite, syn [CaPO ₃ (OH)•H ₂ O]	40.58	1	1.5406	Monoclinic	6.363	15.19	5.815	90	118.5	90	Base-centered	Cc (9)
00-038-0263 (+)	Calcium Sulfide Phosphate [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ S]	44.59	1	1.5406	Hexagonal	9.4554	9.4554	6.8405	90	90	120	Primitive	P63 (173)

Table 10. IC분석시스템을 이용한 칼슘유기태화 제조간 세척단계별 음이온(Cl^-) 제거효과

세척단계	검출염소이온농도(ppm)	비고
Blank	0.01	IC분석전용액
원액	57,500	칼슘유기태화 반응후 분리용액
1 단계	22,500	세척수 : 2차 정제수
2 단계	15,000	
3 단계	5,000	
4 단계	0.01	
5 단계	0.01	

Table 11. Condition of gel permeation chromatography for the analysis of chitosan

1. Instruments

- System : JASCO GPC, Model(LCSS-905)
- Pump : PU-980
- Detector : RI-930
- Injector : Rheodyne 7125
- Oven : CO-965

2. Conditions

- Column : Shodex OHpak SB-801+ SB-801+SB-803(7.5mm ID x 300mm L)
- Mobile phase : 0.1M NaCl in 0.2% acetic acid
- Flow rate : 1ml/min
- Column temp. : 40°C
- Injection volumn : 200 μ L

3. Sample

- MW maker : Pullulan[MW 853,000, 95,400, 23,700, 5,800, Shodex Co.,(Japan)], oligosaccharides[MW 322.32, 483, 706, 876, Kimizu Co.,(Japan)]
 - Sample : 0.1% (W/V) in eluent(remove insolueble component with 0.45 μ m membrane filter)
-

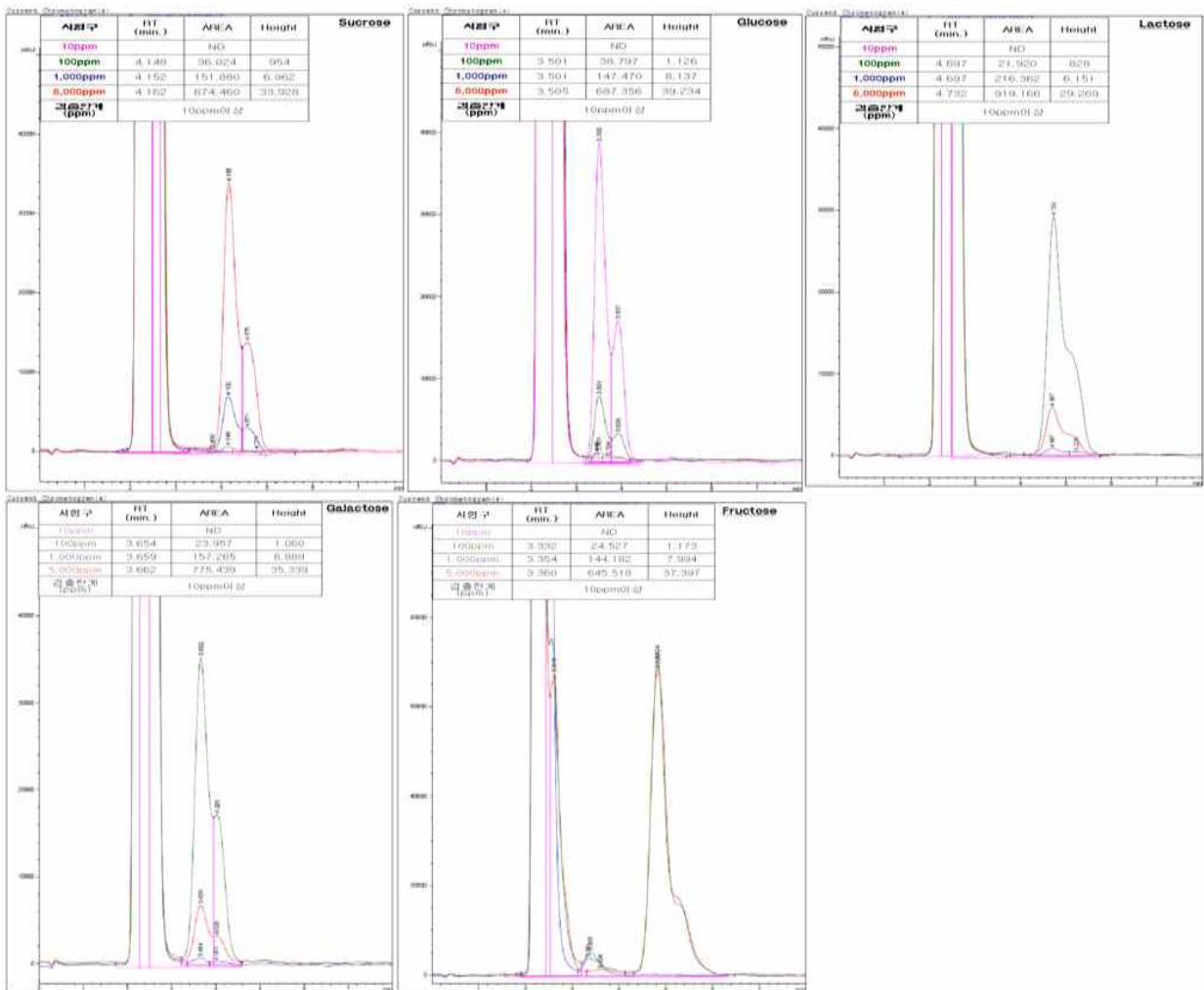


Fig . 1 . 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출한계 검정(Peak analysis) 결과

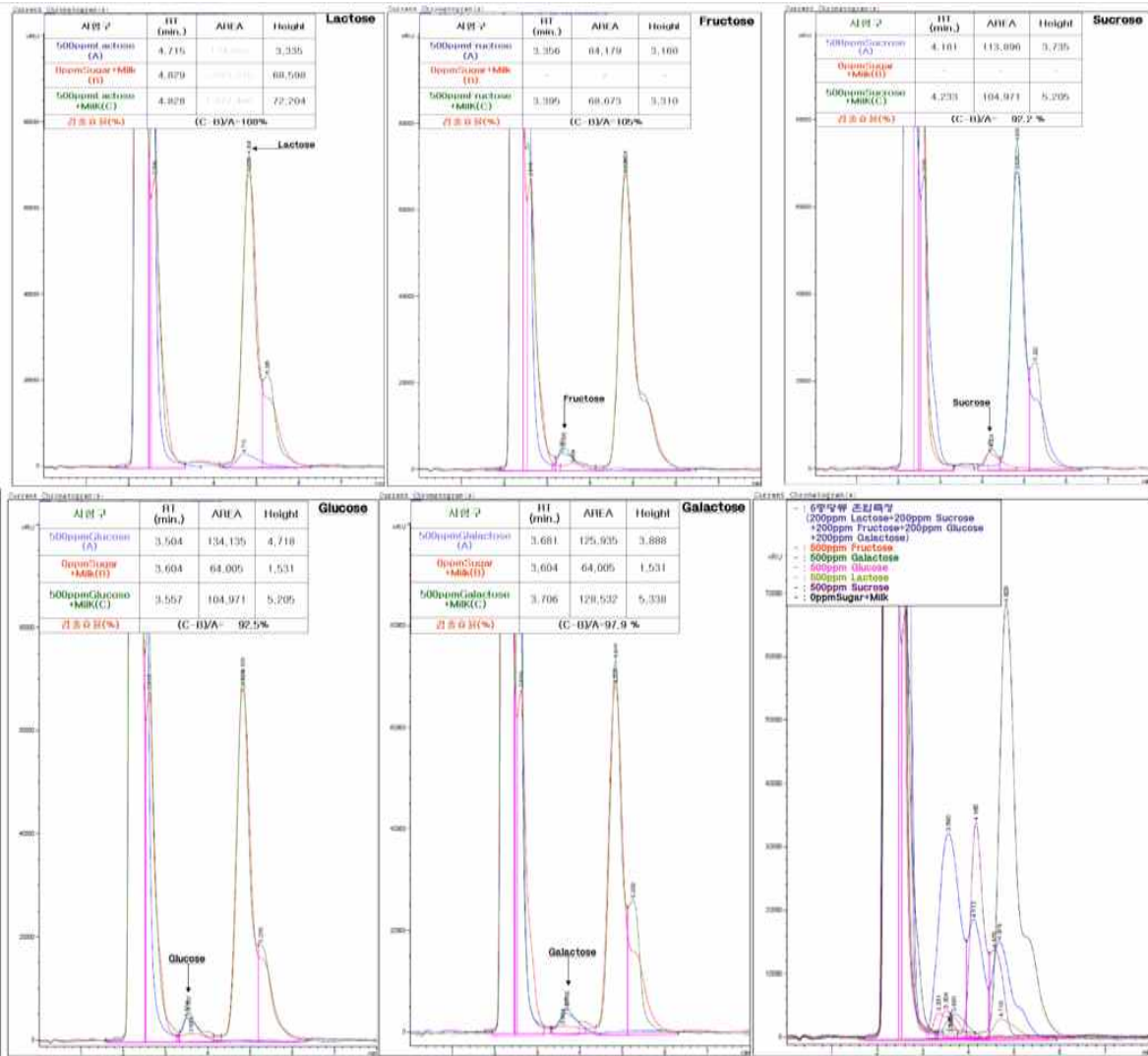


Fig. 2 . 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출효율 검정(Peak analysis) 결과

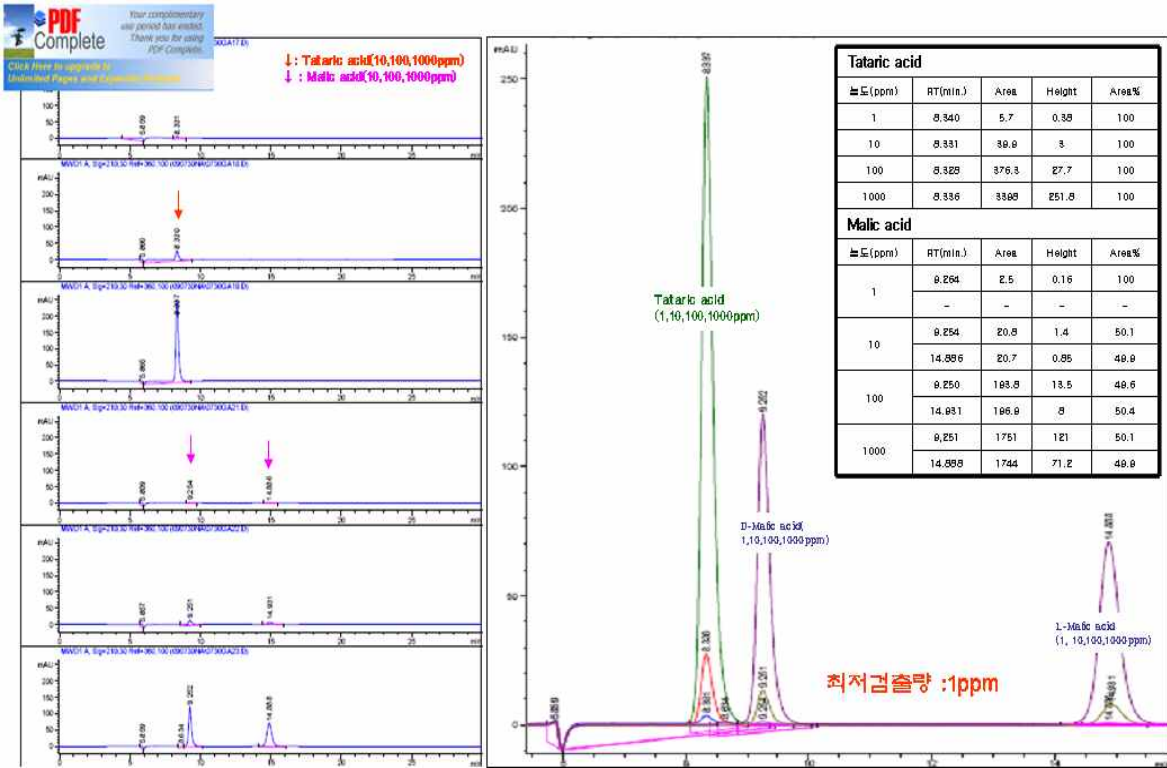


Fig. 3 . 유기산 분석법 정립을 위한 유기산별 최저검출한계 검정(Peak analysis)결과

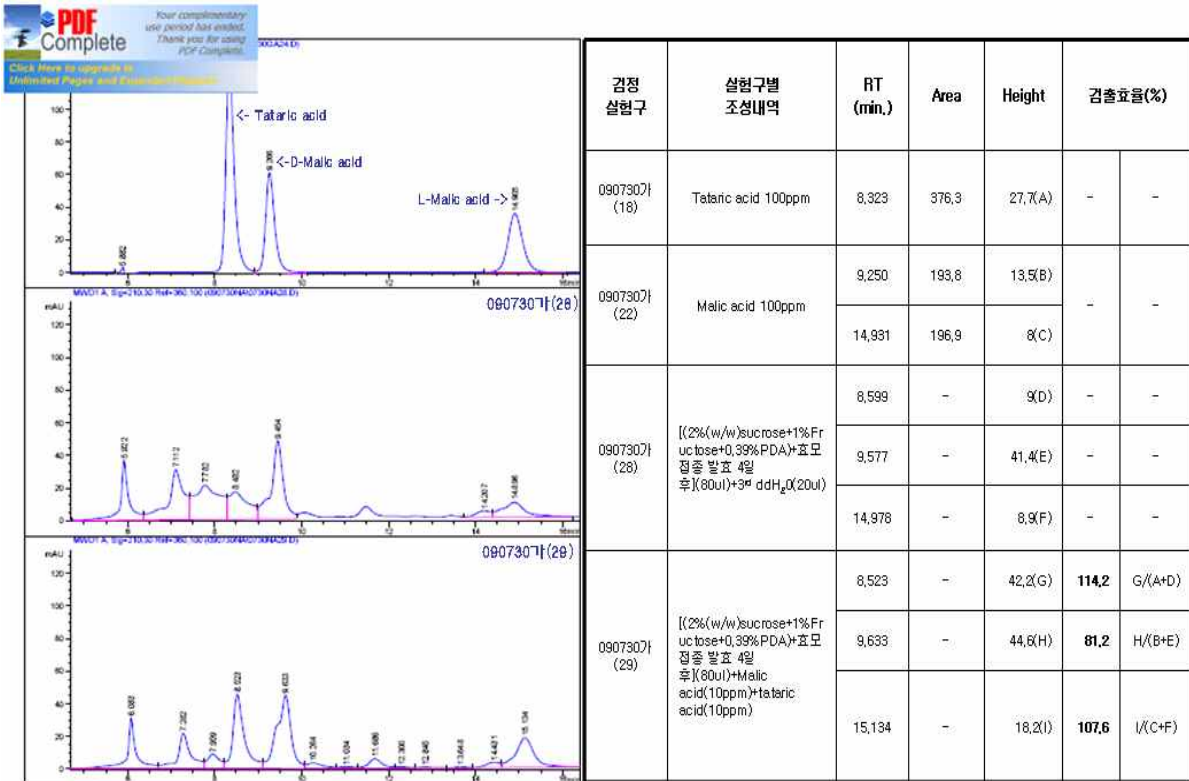


Fig . 4 . 유기산 분석법 정립을 위한 유기산별 최저검출효율 검정(Peak analysis)결과

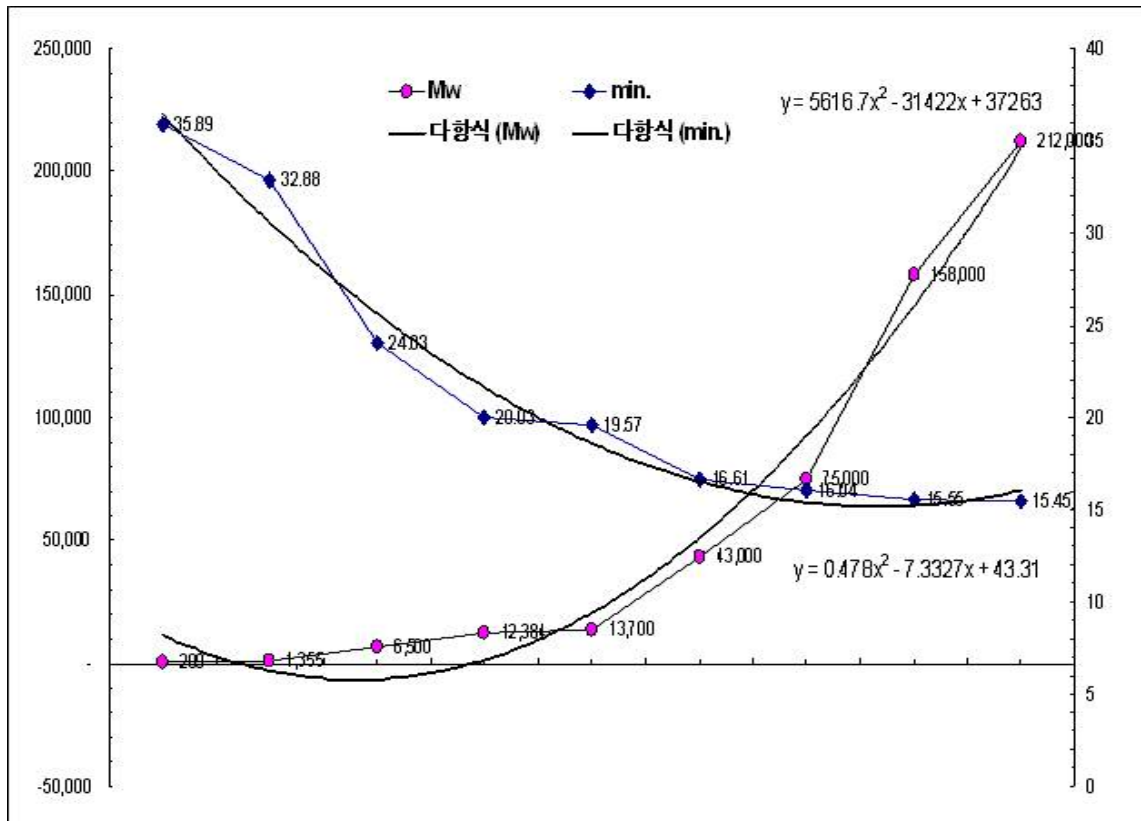


Fig. 5. 유기태화 미네랄 소재류 제조간 기질단백질의 변화량 검정을 위한 FPLC Calibration 작성결과 및 검정식 정립결과

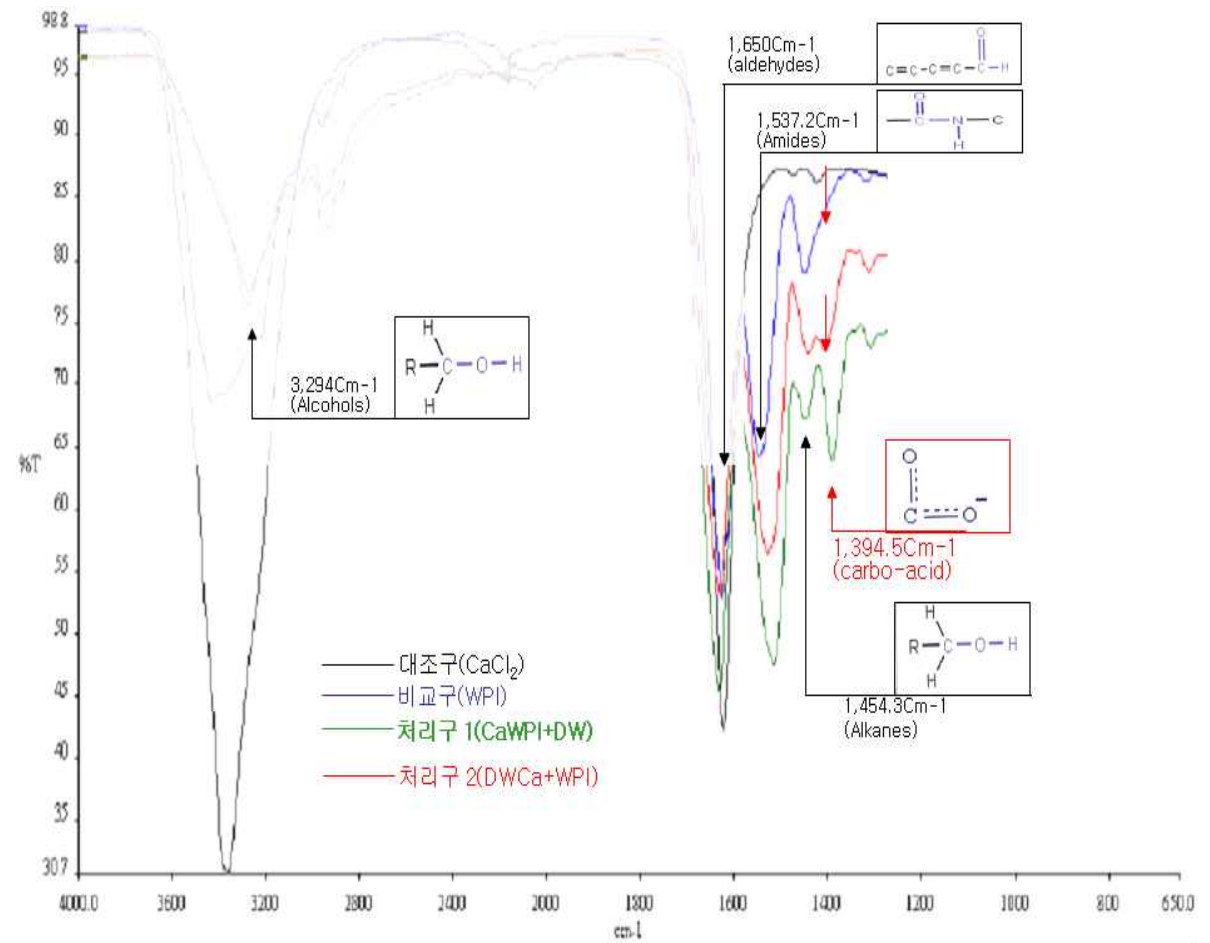


Fig. 6. 유단백질 보유 기능기중 Ca이온과 결합되는 활성 기능기 판단(↓)을 위한 FT-IR Peak analysis결과

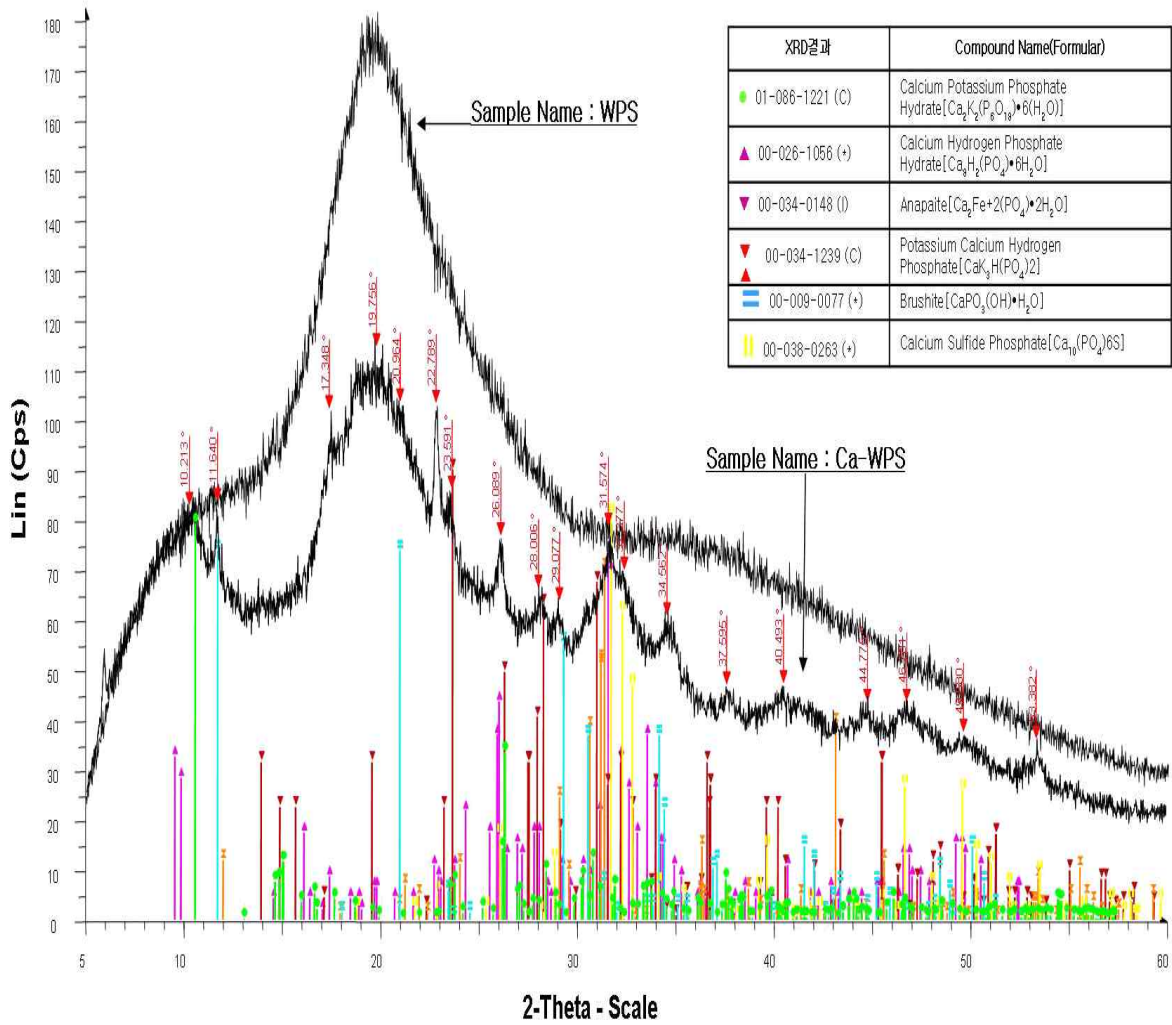


Fig. 7. 원료유청분말(WPS) 대비 칼슘 유기태화 제제(Ca-WPS)의 화학구조 구조결정분석 (XRD analys) 결과

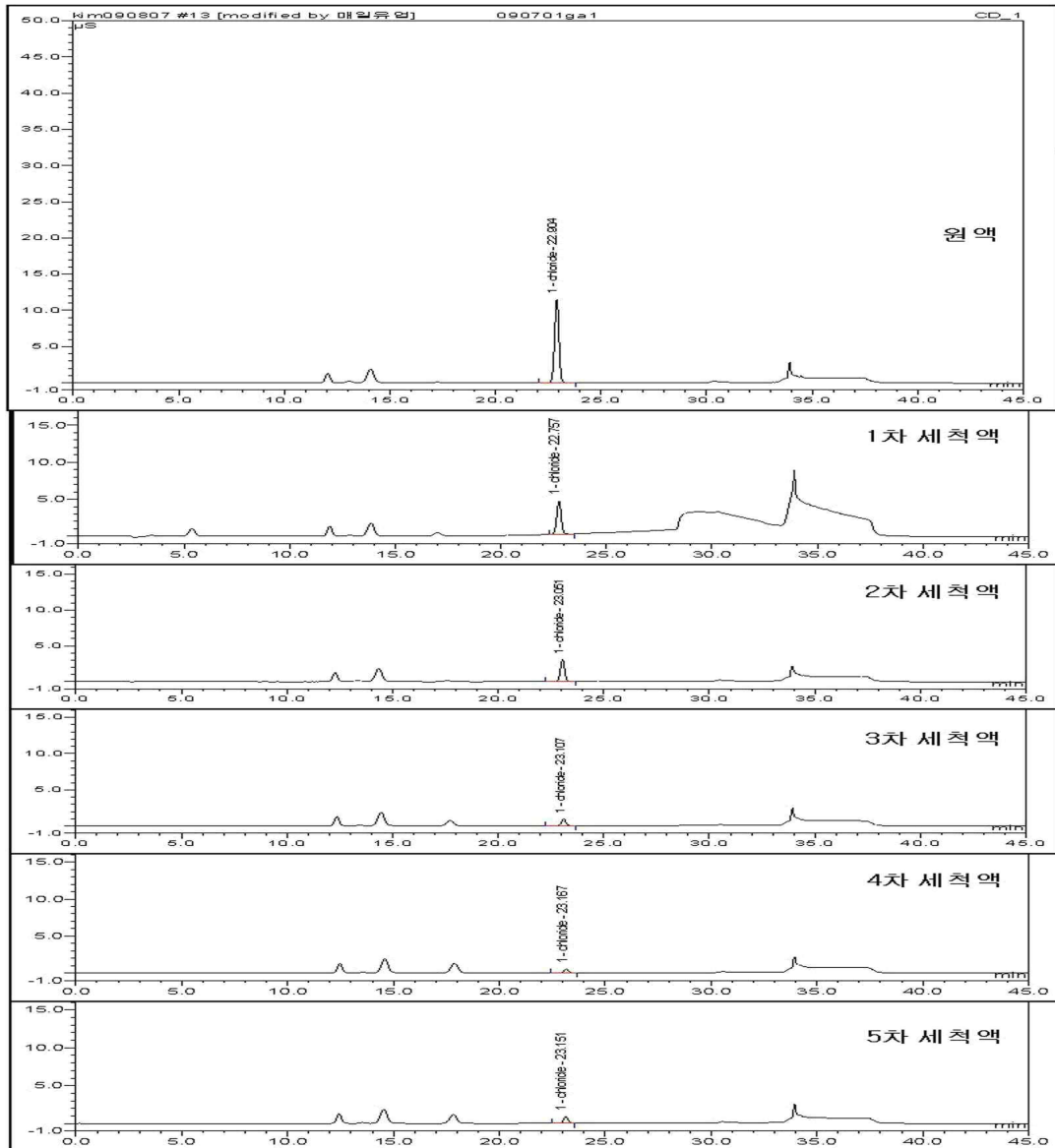
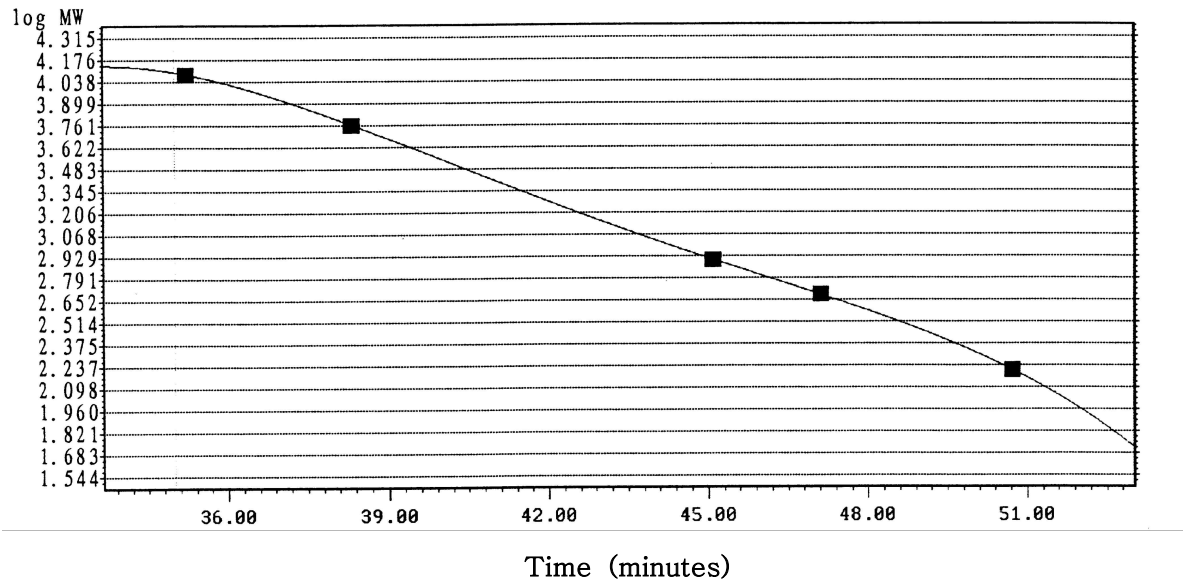


Fig. 8. IC분석시스템을 이용한 칼슘유기태화 제조간 세척단계별 음이온(Cl^-) 제거효과

A. MW calculation curve of Chitosan



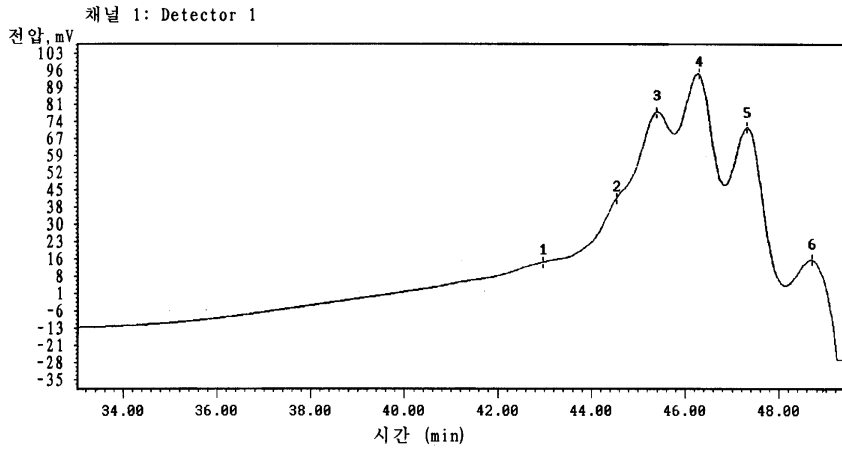
Calibration coefficients, r : 1
 0 : -1.690165e+002
 1 : 1.660491e+001
 2 : -5.881992e-001
 3 : 9.144840e-003
 4 : -5.304260e-005

Time (minutes) : 35.00 - 53.00

ID No.	Time	MW	Result	Error
1	35,210	12200	12200	0.00
2	38,330	5800	5800	0.00
3	45,100	805	805	0.00
4	47,110	483	483	0.00
5	50,710	161	161	0.00

Fig. 9. GPC analysis on the production of low molecular weight Chitosan and oligosaccharides by the treatment of enzyme to high molecular weight of Chitosan. (A) : calibration curve

B. Identification of MW calculation



Time (minutes)

Total peak : 44.40, 33.70- 43.32 (minutes) D : 1.86
 Mp : 982 Mn : 752
 Mw : 1396 Mz : 2974
 Slice-calculation : 30
 Slice-report : 32

(Slice-calculation Results)

ID No.	Time	Height	Cummulative %	MW
1	33.967	0	100.000	16869
2	34.500	0	100.919	14601
3	35.033	21	100.444	12743
4	35.567	93	99.978	11190
5	36.100	206	99.882	9863
6	36.633	359	99.670	8709
7	37.167	547	99.340	7687
8	37.700	761	98.736	6770
9	38.233	1005	97.951	5942
10	38.767	1276	96.915	5191
11	39.300	1563	95.601	4511
12	39.833	1839	93.989	3897
13	40.367	2164	92.073	3349
14	40.900	2496	89.943	2863
15	41.433	2771	87.275	2437
16	41.967	2898	84.419	2069
17	42.500	3002	81.431	2026
18	43.033	3346	78.337	1717
19	43.567	4423	74.889	1455
20	44.100	6123	70.330	1235
21	44.633	7423	64.018	1052
22	45.167	7517	56.365	901
23	45.700	7274	48.617	776
24	46.233	6772	41.119	673
25	46.767	6109	34.139	607
26	47.300	5134	27.843	533
27	47.833	5062	22.551	469
28	48.367	4629	17.334	441
29	48.900	3467	12.564	389
30	49.433	3776	8.990	341
31	48.833	3646	5.098	318
32	49.367	1300	1.340	273

Mp : main peak (top peak), Mn : No. of average molecular weight
 Mw : weight average molecular weight, Mz : z average molecular weight, D : dispersion

Fig 10. GPC analysis on the production of low molecular weight Chitosan and oligosaccharides by the treatment of enzyme to high molecular weight of Chitosan. (A) : calibration curve, (B) Oligomer-Chitosan

제 3 장 기질 특이적 유기태화 미네랄류 대량제조시스템 정립 및 산업화

제 1-1 절 유기태화 미네랄 소재류 제조용 키토산 제조기법 정립

1. 연구목적

본 연구는 키토산을 기질로 하여 유기태화 미네랄 소재류를 유기태화 함에 있어 키토산의 물성 조절 기술이 가장 핵심적인 성공요인인데, 이는 키토산은 물성 조절에 따라 다양한 특성을 보이기 때문이다. 본 과제의 중요한 목표중 한 종류가 산란계를 대상으로 개발예정인 미네랄 유기태화 소재의 산란계를 공시동물로 섭이를 통해 기능성 축산물의 생산과 더불어 산란계 생산현장의 고질적인 질병을 억제 혹은 치료를 할 수 있는 항질병형 소재류 개발이다. 이를 충족시키기 위하여, 제조단계별 OCHT를 분취한 후 공시균으로서 대장균을 기준으로 항균성 비교 평가를 통하여 최적 항균성을 보유하는 단계의 물성을 본 연구에 적합한 기질로 선정하고, 이를 기준으로 목표 유기태화 소재류를 제조하였다. 따라서, 본 연구에서는 상기 목표에 도달할 수 있는 최적의 물성을 보유하도록 하는 물성조절법을 정립하고, 이를 전체 연구에 적용하였으며, 시험방법과 결과는 다음과 같다.

2. 연구수행방법

가. 키토산 및 키토산 올리고 혼합체 제조 및 당체별 분리

1) 원료 준비

기초 재료로서 키틴을 추출하기 위한 재료로 사용한 갑각류 껍질로서는 한국의 동해안에서 수집되어 게 육질만을 사용한 후, 폐기물로 존재하는 게껍질중 다리 부분만을 경북 후포에 소재를 둔 (주)세원수산에서 구입하여 사용하였다.

2) 고순도 및 고분자 키틴 제조

고순도 및 고분자의 키틴의 제조를 위하여, 다음과 같이 조건을 달리 설정하여 실험을 실시하였다.

가) 실험군-1은 게 몸체에서 다리 껍질만을 분리하여 5cm~10cm이하로 분쇄한 후, 이중 50g를 1.8L의 3차 탈이온수가 충전된 3L 3구 둥근 플라스크에 넣고 냉각 조건과 질소 기체를 주입하면서 온도를 점차 100℃로 상승시켰을 때 100℃가 되는 점에서 희석한 50%(w/v) NaOH 용액 0.2L를 추가로 투여하여 3시간동안 100rpm으로 교반하여 1차로 단백질을 제거하고 중간체를 여과하였다. 이 중간체를 다시 3구 둥근 플라스크에 투여한 후 동일하게 1.8L의 3차 탈이온수를 첨가한 후 다시 50% NaOH용액 0.2L를 추가 투여 및 역시 기체 질소를 주입하면서, 3시간동안 다시 반응시켜 잔여 단백질을 제거 및

여과하고 여과 시는 3차 탈이온수를 사용하여 2회 세척하였다. 여기에 1N HCl용액을 사용하여 pH를 중성으로 조정 한 후, 추가적으로 단백질이 제거된 게껍질 중간체를 일반 상온조건에서 2N HCl용액 1L를 비이커에 투입하고 3시간동안 100rpm으로 교반 반응하여 게껍질에 잔존하는 칼슘을 제거하고 3차 탈이온수를 이용하여 여과시 수회 세척하여 염산 잔액을 세척하였으며, 이어서 5% NaOH용액으로 pH를 6~8로 조절한 후 3차 탈이온수를 이용하여 추가로 2~3회 세척과정을 실시하여 반응간 형성된 염분을 제거하여 일반건조기를 사용하여 60℃에서 24시간동안 강제 건조를 통하여 키틴 중간체를 얻었다. 그리고, 게 껍질에 존재하는 색소인 아스타크산틴(astaxanthin) 색소의 제거를 위하여, 키틴 중간체 100g당 500ml의 아세톤을 첨가하여 상온조건에서 100rpm, 24시간동안 교반하고, 이를 2~3회 반복함으로써 용출된 색소를 제거 한 후, 자연 건조로 색소를 제거하여 최종적으로 키틴 분말을 얻었다.

나) 실험군-2는 알칼리 및 염산 반응조건하에서 키틴이 보유한 고유 분자사슬의 절단이 발생됨에 따라 점도의 감소가 발생하는지를 확인하기 위하여, 실험군-1과 동일하게 실험조건을 실시하였으나, 다만 불활성 기체인 질소를 주입하지 않은 조건하에서 키틴 추출 반응을 진행하였다.

다) 실험군-3은 최초의 게 껍질의 크기에 따라 산 및 알칼리 반응시, 점도에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 게 껍질의 분쇄를 2mm이하로 정하였고, 기타의 반응 조건은 실험군 1과 동일하게 설정하였다.

라) 실험군-4는 게 껍질의 크기가 2mm이하 및 불활성 기체인 질소를 첨가하지 않은 조건에서 점도변화를 확인하여 보았으며, 기타 실험조건은 실험군-1의 조건으로 실험을 실시하였다.

마) 실험군-5는 게껍질을 2N HCl용액 1L에 에탄올 100ml를 혼합한 용액을 비이커에 투입하고 -30℃로 조절된 메탄올 반응조에서 50~100rpm으로 3시간 동안 저온 교반시켜 고점도 키틴의 제조 및 천일 건조로 아스타크산틴의 색도 성상을 얻을 수 있는지를 위하여 실험을 실시 하였으며, 기타 조건은 실험군-1과 동일하게 실험을 실시하였다.

바) 실험군-6은 기체 질소의 주입 유무에 따른 점도 변화와 천일 건조에서 실시한 이외에는 실험군-1과 동일하게 실험을 실시하였다.

3) 키토산의 고분자화 및 탈아세틸화도 조절

키토산의 분자량 및 탈아세틸화도(DAC : Deacetylation concentration)를 조절하는 방법을 확인하기 위하여, 다음과 같이 실험조건을 달리 설정하여 반응을 진행 하였다.

가) 실험군-1은 우선 3 L의 3구 둥근 플라스크에 40% KOH용액 2L를 충전하고 키토산의 분자사슬의 절단을 일으킬 수 있는 산소의 유입을 차단하기 위해 불활성 기체인 질소를 주입하면서 온도를 95℃로 상승 시켰다. 승온이 완료된 시점에서 준비된 키틴(점

도: 2,850cps) 100g을 투입하고, 냉각조건하에서 3시간을 100rpm으로 교반하여 1차 반응을 실시한 후 여과하였으며, 여과된 중간체에 대하여 다시 동일한 KOH 농도, 온도 및 반응 조건하에 6시간동안 2차 반응을 실시하여 탈아세틸화도의 증가가 되는지를 확인하였다. 이어서, 여과 과정과 3차 탈이온수로 세척과정을 병행하여 pH가 중성이 될 때까지 반복 세척하고, 이를 일반건조기 60℃에서 24시간동안 강제 건조를 통하여 분말상의 키토산을 얻었다.

- 나) 실험군-2는 실험군-1과 동일하게 실시하였으나, 다만, 키토산제조시 잔존하고 있는 아스타 크산틴 색소를 천일건조에 의해 산화 분해시켜 제거할 수 있는지 확인하였다.
- 다) 실험군-3은 실험군-1과 동일하게 실시 하였으나, 다만, 질소 치환 반응조건을 제외하여 키토산 제조 반응간 불활성 기체인 질소가 키토산 반응시 점도변화에 영향을 미치는지를 확인하여 보았다.
- 라) 실험군-4는 실험군-1과 동일조건으로 실시하였으나, 다만, KOH용액을 고농도인 50%의 용액으로 대체하여 반응간 탈아세틸화도 및 분자량의 변화여부를 확인하고, 천일 건조로 색도의 차이를 더불어 비교 하였다.
- 마) 실험군-5는 실험군-1과 동일조건으로 실시하였으나, 키틴의 입자를 달리한 경우(입자 크기: 2mm이하)에서 탈아세틸화도 및 분자량의 변화여부를 확인하며, 천일조건에서 건조를 실시하여 색도의 변화여부를 확인하였다.
- 바) 실험군-6은 KOH를 50%(w/v)용액으로 반응시 불활성 기체인 질소에 의한 점도의 변화여부를 확인하기 위하여, 질소를 치환하지 않은 조건에서 반응을 진행하되 기타 조건은 실험군-1과 동일하게 실시 하였다.
- 사) 실험군-7은 KOH 용액의 처리 회수가 키토산의 점도 및 탈아세틸화도의 증감에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실험군-1과 동일하게 반응을 진행하였으나 40% KOH 용액(w/v)에 의한 반응은 1회로 실시 하였다.

나. 키토산의 저분자화 및 키토산올리고 혼합물의 제조

1) 키토산 분해효소

키토산 가수분해효소로는 기본적으로 셀룰로오스 가수분해효소를 사용하였으며, 키토산에 대한 분해능력을 높이기 위하여, 다음과 같은 효소를 추가하여 키토산 가수분해효소로서 적용하였다. 즉, 기본 효소로서 사용한 Cellulase는 gram당 24,733 units의 역가치를 갖는 물성(ACE cellulase, USA)이었다. 여기에 Lipase를 300 TAU/ml, Amylase 22,000 SAU/ml 및 Protease 1,200 PCU/ml를 혼합하여 조제한 셀룰로오스 가수분해효소 혼합체를 사용하였다. 그리고, 각 효소의 혼합 설정량은 다양한 첨가 농도, 시간 및 pH 조건 등에 따른 키토산에 대한 분해능에 대하여 예비 실험을 통해, 뚜렷하게 높은 키토산 가수분해를 나타내는 혼합 조건으로 정하였다.

2) 저분자 키토산 및 키토산올리고 혼합체 제조

셀룰로오스 가수분해효소 혼합체를 이용한 키토산의 저분자화 및 OCHT 혼합체를 제조하는 실험군을 다음과 같이 설정하여 키토산 분해능을 검정하였다.

- (1) 실험군-1은 입자 크기가 100mesh, 탈아세틸화도 62% 및 점도 1,347의 키토산

50g을 메탄올과 0.5L에 혼합하여 30분동안 충분히 교반시킨 후 1차로 2N HCl 40ml를 점차 투여하고 1시간 동안 상온에서 교반하고, 이어서 진농염산(35%) 40ml를 투여하고 3시간 이상 교반한 후 이를 여과하였다. 여과된 중간체를 반응기에 투입하고 메탄올 0.5L를 첨가하여 30분 교반한 후 5%(w/w) NaOH용액을 이용하여 pH를 6.0~6.5로 조절한 후 12시간 동안 실시하였다. 그리고, 여과하여 50℃, 24시간동안 건조하여 분말형태의 키토산 염산염을 얻었다. 이를 3L 3차 탈이온수 2L에 키토산 염산염 200g을 완전 용해 시킨 후, 키토산 염산염 용해액을 0.5L 3구 둥근 플라스크에 0.25L씩 투입하고 pH는 5.5, 온도를 52℃로 상승 시켰다. 이어서 셀룰로오스 가수분해효소 20ml를 첨가하고 150rpm으로 교반하면서 24시간 동안 키토산 분해 반응을 진행하였으며, 1시간 단위로 시료를 채취하여 점도 저하 및 분자량 분포도의 변화를 점도계 및 GPC 분석을 실시하여 확인하였다. 그리고, 효소의 활성을 제거하기 위하여, 최종 24시간 반응이 경과시 온도를 80℃로 상승, 5%(w/v) NaOH용액으로 pH를 6~7로 조정 한 후 12시간 정체시켜 효소 역가치가 실효되어 침전된 효소를 원심분리(15,000rpm, 15분)를 실시하여 제거하였다. 그리고, 상등액 만을 대상으로 농축과 동결건조하여 분말상의 분자량이 등급화된 키토산을 제조하였다.

- (2) 실험군-2는 실험군-1과 동일하게 반응조건을 설정하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소 혼합체의 투여량을 10ml로 다르게 첨가하여 키토산의 분해능력을 확인하였다.
- (3) 실험군-3은 실험군-1에서와 동일한 조건과 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으며, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 투입량을 5ml만으로 하였다.
- (4) 실험군-4는 실험군-1에서와 동일한 조건과 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 투입량을 2.5ml만으로 하였다.
- (5) 실험군-5는 실험군-1에서와 동일한 조건 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 투입량을 1.5ml만으로 하였다.
- (6) 실험군-6은 실험군-1과 동일하게 실시하였으나, 다만 사용한 키토산의 탈아세틸화도 75%, 점도 1,400cps의 물성을 사용하였으며, 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(20ml)을 달리하였다.
- (7) 실험군-7은 실험군-6에서와 동일한 조건 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(10ml)을 달리하였다.
- (8) 실험군-8은 실험군-6에서와 동일한 조건 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(5ml)을 달리하였다.
- (9) 실험군-9는 실험군-6에서와 동일한 조건 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(2.5ml)을 달리하였다.

- (10) 실험군-10은 실험군-6에서와 동일한 조건 물성을 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(1.5ml)을 달리하였다.
- (11) 실험군-11은 실험군-1과 동일하게 실시하였으나, 다만 사용한 키토산의 탈아세틸화도 87%, 점도 1,470cps의 물성을 사용하였으며, 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량은 20ml로 첨가하였다.
- (12) 실험군-12은 실험군-11에서와 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소 첨가량(10ml)만을 달리하였다.
- (13) 실험군-13은 실험군-11에서와 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(5ml)만을 하였다.
- (14) 실험군-14는 실험군-11에서와 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(2.5ml)만을 달리하였다.
- (15) 실험군-15는 실험군-11에서와 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(1.5ml)을 하였다.
- (16) 실험군-16은 실험군-1과 동일하게 실시하였으나, 다만 사용한 키토산의 탈아세틸화도 87%, 점도 1,470cps의 물성치를 사용하였으며, 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(20ml)을 첨가하였다.
- (17) 실험군-17는 실험군-16에서와 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소를 첨가량(10ml)만으로 달리 처리하였다.
- (18) 실험군-18은 실험군-11에서와 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(5ml)만을 달리하였다.
- (19) 실험군-19는 실험군-11에서와 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 첨가량(2.5ml)만을 달리하였다.
- (20) 실험군-20은 실험군-11과 역시 동일한 조건 물성치를 보유한 키토산에 대하여 동일조건으로 실시하였으나, 다만 셀룰로오스 가수분해효소의 투입량(1.5ml)만을 달리하였다.

다. 원료 및 키토산 올리고당의 물성분석

1) FT-IR 분석

물성치를 달리한 키토산에 대하여 효소반응간 물성의 변화를 검정하기 위하여, FT-IR분석

법을 사용하였다. 이를 위해 FT/IR-300E와 Micro-FT/IR 분석기(Jasco Model-300E, 일본)로 KBr 디스크법을 활용하였는데 400 ~ 4000cm⁻¹ 흡수파장 범위에서 %T mode를 적용하였다. 이 실험에 사용한 OCHT의 구조적인 변형상태는 일반 키토산(Sigma Co., C3646)을 구입하여 이를 대조구로 하여 비교하였다.

2) 분자량 측정

키틴 및 키토산의 점도의 검정을 위해, 키틴의 점도는 DMAC(dimethylacetamide)와 5% LiCl용액(w/w)을 조제한 후, 0.5% 키틴(w/v)을 녹인 용액 600 mL를 만들어 Physica 점도계(Model SM-HM Mc10, Germany)를 이용, 20℃에서 점도를 측정하였다. 키토산의 경우는 1% 초산용액에 0.5%(w/v) 키토산을 녹여 동일한 점도계에서 20℃에서 점도를 측정하였다.

3) 탈아세틸화도 측정

키토산의 효소 반응간 발생할 수 있는 탈아세틸화도 수치는 콜로이드 적정법을 이용하여 측정하였다. 0.5%(w/w) 초산용액에 0.5%(w/v) OCHT를 용해한 후, 이중 1ml를 취하여 일정액의 3차 탈이온수를 첨가하고 methylene blue용액과 1/400 N polyvinyl sulfate potassium salt 용액으로 적정하여 탈아세틸화도를 측정하였다.

4) 키토산 및 OCHT의 분자량 분포도 검정

키토산 및 OCHT 분자량의 분포도 분석은 GPCgel permeation chromatography(GPC) 분석시스템(JASCO, Model LC-90, Jasco Co., 일본)을 이용하였고, 그 분석조건은 표 1에 나타내었다.

5) OCHT 잔존 염산기의 적정

본 연구에서는 OCHT의 시료에 남아있는 HCl의 정량을 위하여, silver nitrate(AgNO₃) 적정법을 사용하였다. 즉, OCHT 0.5g을 정확히 취하여 이를 3차 탈이온수 45ml에 OCHT 대비 1.5M AgNO₃량을 넣고 30분간 교반하고, 생성된 침전물을 여과하여 건조 후 침전물의 무게를 측정하였다. 그리고, 아래 식에 준하여 OCHT에 잔존하는 HCl의 양을 적정하였다.

$$[\text{Cl}] \text{의 몰수} = \frac{\text{AgCl의 침전량}}{\text{AgCl의 분자량}(143.34)}$$

$$[\text{HCl}].\text{g 량} = [\text{Cl}] \text{의 몰수} \times \text{HCl 분자량}$$

$$[\text{Cl}] \% = \frac{[\text{HCl}].\text{g 량}}{\text{OCHT(g)}} \times 100$$

라. 종이 디스크법에 의한 항균성 OCHT 제제 선발 및 MIC설정

1) 분자량별 OCHT선정

준비된 OCHT중 물에 대한 용해성이 탁월하며, 항균성이 우수한 물성의 당체의 분포도 및 최소저지농도(minimum inhibition concentration, MIC)를 확인하였다. 이를 위해서, 분자량 분포도가 1~6당체가 함유된 OCHT-1, 7~14당체가 함유된 OCHT-2 및 1~16개의 당체의 분자량 분포도를 갖는 OCHT-3의 구성을 갖는 3종류의 OCHT를 대상으로 대장균에 대한 항균성 및 최소저지 농도를 종이 디스크법을 적용하여 확인하였으며, 전체 실험간 사용된 OCHT의 탈아세틸화도는 평균 96%였다.

2) 병원균주의 선발

분자량 분포도를 다르게 제조하여 예비 항균성 평가를 통하여 우선 3종류(최종년도 제조법 제시예정)를 선발한 후 이를 OCHT-1, OCHT-2 및 OCHT-3로 칭하였다. 선발된 OCHT 3종류를 대상으로 하여 항균성을 나타내는 분자량 분포도 및 최소저지농도를 확인하기 위하여, 자돈에 대하여 병원성 설사를 유발하는 대장균중 무작위적으로 혈청형이 다른 O157:K88ac, O20:K101, nontypable 및 O4:K12등 4종류를 선정하여 사용하였다.

3) 대장균 선발균주의 배양

E. coli 분리주들은 각기 다른 영양 육즙배지(Difco)에 접종하여 37℃, 150 rpm에서 18 시간동안 진탕배양하였다. 이 대장균 배양액을 원심분리(500 xg, 4min)하여 *E. coli*를 분리한 다음 인산완충액(0.1M, pH 7.0)으로 희석하였으며, 이 원심과정을 수회 반복하여 세균수를 조정하여 실험에 사용하였다.

4) OCHT용액 조제

제조된 3종류의 OCHT에 대하여 분자량 분포에 따른 항균성의 차이와 농도별 항균성 범위를 설정하기 위하여 재료인 OCHT용액은 다음과 같이 제조하여 실험에 사용하였다.

우선 선발된 3종류의 OCHT 각각을 인산완충용액에 5%(w/v)용액 함량이 되도록 용해하였고 이를 희석하여 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.0004% 및 0.00001% OCHT용액으로 조제하여 항균성을 나타내는 물성의 OCHT를 선발하고 또한 항균성을 나타내는 최소 저지 농도를 검정하기 위한 시료로 사용하였다.

5) 항균성 OCHT선발 및 MIC농도 결정

분자량별 OCHT의 항균성을 확인하기 위하여, 우선 일반적인 방법으로 MacConKey 배지를 제조하고, 여기에 배양된 각각 *E.coli* 용액을 50 μ l를 고르게 도말한 후, 여기에 멸균된 종이(Φ 5mm)를 거치하였다. 그리고, 거치된 종이 위에 각 농도로 조절된 OCHT을 마이크로피펫을 이용하여 정확하게 10 μ l를 떨어뜨린 후, 37℃, 24시간동안 배양하였다. 24시간 경과한 후 이때 형성되는 저지환을 측정하였으며, 이를 기초로 항균성 분자량이 탁월한 OCHT를 선발하였다. 또한, 본 실험간에 대조군으로는 인산완충액(0.1M, pH 7.0)을 사용하여 이를 OCHT첨가군과 비교하였다.

마. 병원성 대장균에 대한 실험실적 항균성 효과검정

1) 대장균 분리 및 OCHT 준비

가) 시료채취 및 OCHT 준비

사용된 공시 균주는 설사가 보여 실험실 진단이 의뢰된 자돈 분변에서 분리하여 사용하였으며, 항균시료로는 OCHT-3을 이용하였다.

나) 사용배지

*E.coli*를 분리하기 위해 MacConkey agar(Difco)와 Blood agar는 pili 생성을 검사하기 위해 Minca medium(KH_2PO_4 1.36g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.008g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.000135g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0004g, Glucose 1g, Casamio acid 1g, Yeast extract 1g, Bacto agar 3g, distilled water 1,000ml, pH 7.5)을 사용하였다. 이열성 장독소를 확인하기 위해서는 Trace salt solution(MgSO_4 5g, MnCl_2 0.5g, 0.5 % FeCl_3 solution 10ml, distilled water 90ml)이 1ml 첨가된 Casamino acid-Yeast extract medium(CYEM : casamino acid 20g, Yeast extract 6g, NaCl 2.5g, K_2HPO_4 8.71g, distilled water 999ml)를 사용하였다.

다) *E.coli* 분리 및 동정

분변시료를 MacConkey agar와 Blood agar에서 심어 18~24시간 배양하고, MacConkey agar plate의 경우, 유당 분해 집락 1~2개를 선정하고, Blood agar plate에서는 완전 용혈을 나타낸 탄백색(炭白色)의 Smooth한 집락을 1~2개 선정하여 순수 분리 하였다. 순수 분리된 집락은 자동 미생물 동정장치(Vitek System, Automicrobic System, AMS)를 이용하여 생화학적 성상에 의하여 동정 하였다.

라) 혈청학적 동정

분리균을 혈청학적으로 동정하기 위하여, Ørskov 등의 방법(1977)에 준하여 생산된 OK항혈청을 이용하여 평판 응집반응법으로 OK 항혈청을 결정하였다.

마) Pilus 생성능 검사

Mannose-resistant hemagglutination(MRHA)test는 Jones와 Rutter의 방법(1972)으로 실시 하였다. 즉, MRHA test는 Minca broth에 18~24시간 37°C에서 배양한 항원을 0.5% Mannose PBS(NaCl 8g, Na_2HPO_4 11.5g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, D-mannose 5g, Distilled water 1.000ml, pH 7.2) 0.025mlTlr을 U-form microplate(Dynatech Lab.)에 넣은후 2배수 희석하였다. Alsever 용액(Glucose 2.05g, Sodium Citrate 0.8g, NaCl 0.42g, Citric acid 0.055g, Distilled warwe 10ml)과 guinea-pig에서 채혈한 동량의 혈액을 섞은 후 PBS로 3회 세척 후 PBS에 1%(v/v)로 부유 시켜 만든 1% guinea-pig 적혈구액 0.025ml를 dropper(Dynatech Lab.)로 Plate에 점적 하면서 잘 혼합하여 0~4°C에서 2~3시간 방치 시킨 후 혈구 응집이 일어난 항원의 최고 희석 배수를 MRHA로 정하였다.

바) Hemolysin의 검사

분리균을 Blood agar에 도말 접종한 다음 용혈 여부로 Hemolysin을 증명하였다.

사) 이열성 장독소(Heat-labeled enterotoxin : LT 검사)

분리균주의 이열성 장독소(LT)증명을 위해 분리균을 CYEM에 접종 하고, 37°C에서 18~24시간 진탕 배양하여 원심 분리한 후, 그 상층액을 실험재료로 사용하였다. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)는 WHO방법(1983)에 준하여 검정하였으며, 판정은 Well의 Optical density(OD)평균치를 음성 대조균의 평균치와 비교하여 OD치의 차가 0.2이상일 경우 LT 생성 양성균주로 판정하였다.

아) 대장균 O157:H7균의 준비

사용된 균주는 1992년 4월부터 1993년 3월까지 지정병원을 내원한 설사환자 145명으로부터 분리한 O157 설사 유발 대장균중 Brown등(1982)의 방법에 따라 혈청 분석 및 독소형을 판정한 균주로서, Verotoxin1(VT1)생산 대장균 및 Verotoxin2(VT2) 생산 대장균 VT1 : O157 : H7(ACH5), V2 : O157 : H7(O59)과 V1+V2 : O157 : H7(670), VT2 Cl-O157 : H7, VTe 0138, E57(VTe), VT2 Cl-O157: H7 총 6종을 경상대학교 동물 면역 연구소에서 분양 받아 사용하였다.

자) 대장균 O157:H7균주의 혈청학적 동정

적용하고자 하는 人·獸공통 병원균 O157:H7 대장균에 대하여 혈청학적 시험은 Karmail(1985)의 방법을 적용하여 O-group serotype 6종 균주에 대하여 평판응집반응을 실시하여 응집유무를 판정하였으며(Fig 1), 생화학적 성상시험은 Edwards와 Ewing의 방법(1986)에 준하여 실시하여 추가적으로 O157:H7 대장균임을 확인하였다.

2) 대장균의 배양

E.coli 분리주들은 영양 육즙배지(Difco)에 접종하여 37°C, 150 rpm에서 18시간동안 진탕배양하였다. 이 대장균 배양액을 원심분리(500 xg, 4min)하여 *E.coli*만을 순수하게 분리한 다음 인산완충액(0.1M, pH 7.0)으로 희석하되 필요할 경우 이 원심과정을 수회 반복하여 세균수를 조정하여 실험에 사용하였다.

3) 대장균의 optical density 측정

OCHT의 *E. coli*에 대한 증식억압 능력을 측정하기 위하여, 영양 육즙배지(Difco)를 만들어 pH를 6.0으로 조정한 후 250 ml 삼각플라스크에 이 배지액을 분주한 다음, 고압 멸균시켰다. 이 영양 육즙배지에 농도별(0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00002%)로 희석한 OCHT용액을 첨가하고, 앞서 준비한 *E. coli* 배양액을 1ml씩 분주한 후, 37°C에서 진탕배양시키면서 1시간부터 한시간 간격으로 12시간까지 optical density치를 흡광광도계(Spectronic 20, Bauch & Lomb, 독일)를 이용(660 nm)하여 측정하였다.

4) OCHT첨가후 대장균수 측정

OCHT의 첨가농도별 항균성을 알아보기 위해 250 ml 플라스크내 영양 육즙배지를 만들어 *E. coli*를 접종하여 37°C에 배양시켰었다. 이들 대장균 배양액은 2×10^7 CFU/ml로 조정된 다음, OCHT를 농도별(0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%)로 첨가한 5개 처리군과 OCHT를 첨가하지 않은 대조군을 두었다. OCHT를 첨가한 후 1분, 2분, 3분, 4분 및 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 12시간에 각 처리군별로 10 μ l씩 채취하여 990 μ l의 인산완충액을 넣은 켈시시험관에 잘 섞은 다음 이중 50 μ l를 혈액 한천배지에 도말하여 하루동안 배양시켜 나타난 집락수를 세었다.

4. 연구수행결과

가. 키토산 및 키토산올리고 혼합체 제조 및 당체별 분리

1) 고순도 및 고분자 키토산 제조 결과

Table 3은 고순도 및 고분자의 키토산을 얻기 위해, 단백질 및 칼슘 제거공정과 조건을 달리 하여 실험을 실시한 결과이다. 우선 게 껍질의 최초 분쇄 입자 크기에 따른 키토산의 점도 변화를 확인하기 위하여, 입자를 2mm이하(실험군-4)와 50~100mm(실험군-2, 6)로 두 종류를 준비하여 최종 추출된 키토산의 점도를 측정하였다. 그 결과, 점도는 실험군-4의 경우 2,120cps, 실험군-2, 6의 경우에는 1,620cps 및 1,420cps로 나타나 입자 크기에 따른 점도 변화는 뚜렷한 차이는 없었다. 동일 입자 크기에서 단백질 제거 공정에서, 질소 가스를 주입한 실험군-1과 질소를 주입하지 않은 실험군-2의 경우는 2,850cps와 1,620cps의 점도로 나타나 질소 가스가 단백질 제거 반응시 NaOH 및 온도조건에 따라 나타날 수 있는 분자사슬 절단을 억제 하는 것으로 밝혀졌다($P < 0.01$). 그리고, 입자 크기가 적은 게껍질을 원료로 키토산을 추출하는 과정에서 알칼리 처리중 질소가스를 주입하는 공정(실험군-3)과 주입하지 않은 경우(실험군-4)에서의 점도변화를 확인하여 본 결과, 3,500cps와 2,120cps로 차이가 나타나 최초 게 껍질의 입자크기가 적은 경우에는 질소가스 주입시 약 1.65배의 고분자 키토산이 추출됨을 확인 되었다($P < 0.01$). 이를 추가 확인하기 위하여 최초 게 껍질의 입자가 큰 실험군-1과 입자가 적은 실험군-3의 경우에서도 실험군-3이 실험군-1과 비교할 때 점도는 1.22배로 뚜렷하게 높게 나타나 입자의 크기도 키토산의 점도를 결정하는 요인인 것으로 확인되었다($P < 0.01$).

칼슘을 제거하기 위해 사용된 공정인 HCl처리 공정에서 온도차이가 점도에 영향을 미치는지를 확인하여 보았다. 결과로서 -30°C에서 염산 처리한 실험군-5와 상온조건인 실험군-6에서 점도차이는 실험군-5의 경우가 실험군-6의 경우에 비하여, 2.8배의 고분자의 키토산이 추출되어 염산 처리시 반응온도도 키토산의 점도에 영향을 미치는 요인으로 확인되었다. 또한, 회분 및 단백질 함량은 입자가 적은 경우가 뚜렷하게 낮게 나타나 게 껍질의 입자크기가 키토산의 점도 및 순도결정에 주요한 요인으로 확인되었다($P < 0.01$).

키토산에서 키토산을 제조하는 Hackman(1954)에 의해서 실용적으로 키토산에서 키토산으로 제조하는 방법이 알려졌으며, 이때의 제조법은 게 껍데기를 세척하고 100°C에서 건조한 다음 실온조건하에서 2N 염산 용액하에서 5시간 처리하고 세척 및 건조하여 분쇄하여 분말화 하였으며, 이를 2N 염산조건하에서 0°C조건하에서 교반하여, 칼슘을 제거 후 이를 100°C조건하에서 1N NaOH 수용액에서 수회 반복 처리하여 키토산을 얻는 방법을 사용하였다.

최근의 일반적인 키틴 제조 공정은 게나 새우 및 오징어를 탈육시킨 후, 반응 효율을 높이기 위하여, 0.5~3cm의 크기로 분쇄하는 공정, 다음으로는 칼슘등 미네랄을 제거하는 방법으로서 염산 1~2N과 포름산 90%를 사용하여 교반 하는 공정, 그리고 NaOH용액을 1~5%조정하고 실온 또는 고온에서 수시간 동안 가열함으로써 단백질을 제거하는 공정으로 키틴을 제조하고 있다.

본 연구에서는 고순도, 고분자 키틴 제조 방법을 검토하였다. 키틴 제조시 분자사슬의 절단을 최대한 방지하기 위해 게 껍질을 2mm이하로 미세 분쇄하여 이를 질소 기체를 첨가하면서 온도를 80~100°C조건으로 조절하고, 희석한 0.5% NaOH 용액을 이용하여 1~3시간 교반 반응하여 1차 및 2차 반복하여 단백질이 제거된 중간체를 얻었다. 이어서 -30°C조건에서 0.5N HCl용액을 이용하여 1차 칼슘을 제거하는 전처리 과정과 1~2N HCl용액으로 2차 처리를 반복하여 잔량의 칼슘 및 미네랄을 제거함과 동시에 점도의 감소가 억제되도록 한 후 천일건조의 자연광에 의해 게껍질이 가지고 있는 아스타크산틴색소를 산화 시켜 백색도가 뛰어난 고점도 키틴을 얻을수 있었다. 결과적으로, 고순도 및 고분자 키틴을 제조하는 공정은 색소 제거를 위해서 유기용매인 아세톤보다는 천일조건에서 산화 분해조건이 뚜렷하게 효과가 있으며, 게껍질은 입자가 적을수록, 산처리 공정에서는 온도가 낮은 조건 및 탈단백질 공정에서는 질소가스를 치환시키는 공정을 병행시 고분자 및 고순도의 키틴을 제조할 수 있는 것으로 확인되었다.

2) 키틴산의 고분자화 및 탈아세틸화도 조절

일반적으로 고알칼리 가열법에 의한 키틴산 제조의 경우는 키틴산의 탈아세틸화도(DAC)는 증가되나 이와는 반대로 점도는 급격히 감소가 일어나며 또한, 갈변화가 발생하는 것으로 알려지고 있다. 따라서, 고분자상태로 보존하고 키틴산의 순도인 탈아세틸화도(DAC : Deacetylation concentration)를 함께 증강시키는 방법에 대하여 검토하였다.

기존의 키틴에서 키틴산을 제조하는 시약으로서 고농도 NaOH용액을 대신하여 KOH를 사용하였고, 각기 반응조건을 달리하여 점도와 탈아세틸화도를 함께 증강시키는 조건별 실험 결과를 표 2에 나타내었다. 우선 제조된 키틴산에 남아 있는 아스타크산틴 색소를 천일건조에서 산화분해 되어 제거 할 수 있는지 알아보기 위한 실험을 실시 하였다.

실험군-1에서는 강제 건조를, 실험군-2, 4, 5,는 천일건조를 실시한 결과, 실험군-1은 핑크빛을 나타내는데 반하여 실험군-2, 4, 5는 백색을 나타내어 천일건조시 색소는 산화분해 시킬 수 있음이 확인 되었다.

키틴의 입자 크기를 50~100mm로 조절하고, KOH 농도만을 40%(w/v, 실험군-1, 2)와 50% KOH 용액으로 조성을 달리한 실험군-4에서의 반응 결과. 탈아세틸화도와 점도 변화를 측정하여 보았더니, 전반적으로 탈아세틸화도는 85~88%의 범위를, 점도는 430~542cps범위를 나타내어 KOH의 농도는 키틴산 제조시 탈아세틸화도 및 점도는 뚜렷한 차이는 없었다. 그리고, 동일한 반응조건에서 불활성 기체인 질소의 투입여부에 의한 점도 및 탈아세틸화도의 변화를 확인하여 본 결과, 실험군-1에서는 탈아세틸화도 및 점도는 85% 및 430cps로, 실험군-3의 경우 79%와 340cps로 나타나, 키틴의 입자가 큰 경우에서도 역시 물성의 차이는 없었다. 그러나, 키틴의 입자가 적은 경우(2mm이하)에서 질소의 투입 여부(실험군-5, 6)에 대한 키틴산의 탈아세틸화도 및 점도 변화를 확인하여 보았더니, 질소를 투입한 경우에서 탈아세틸화도는 97%, 점도는 2,200cps, 질소를 투입하지 않았던 실

험군-7의 경우에는 탈아세틸화도는 98%, 점도는 230cps로 나타나 입자가 적은 키틴을 사용시 탈아세틸화도의 증가와 더불어 키토산의 점도 감소는 약 10배 억제 되는 것으로 확인 되었다. 그리고, 입자 크기와 KOH를 40%농도(질소 투입)로 동일하게 조성 후, KOH 용액의 교체횟수를 달리하고 탈아세틸화도와 점도의 관계를 확인하여 보았다(실험군-1, 실험군 7). KOH를 1회 사용한 경우 탈아세틸화도는 61%로, 점도는 2,140cps, KOH를 교체하여 2회 사용한 경우는 탈아세틸화도는 85%와 점도는 430cps를 나타내어 KOH의 사용 횟수는 키토산의 물성조절에 주요한 변수인 것으로 확인되었다.

현재의 키틴을 추출하는 과정에서의 Hackman방법(1954)에서는 키토산은 탈아세틸화도는 65~81.2%였으며, 분자량 및 점도에 대한 언급은 없었다. 그러나, 1992년의 Alimuniar 등(1992)에 의해 발표된 자료에 의하면, 새우껍질에서 제조한 키토산의 경우는 탈아세틸화도는 56~68%로 제조시 점도는 5,074cps로 나타나 키틴에서 키토산으로 전환되는 기점에서 점도는 매우 높은 것으로 보고된 바 있다.

제조된 키틴을 39~55%의 KOH 또는 NaOH용액하에서 30℃~150℃온도 조건으로 0.5시간~144시간까지 교반 반응을 실시하여 키토산을 제조하는 방법이라고 할수 있으며, 이때의 키토산의 탈아세틸화도는 56~68%를 나타낼 때 점도는 60~5,074cps범위를, 탈아세틸화도가 68~78%부분의 경우에서의 점도는 117~5,110cps였고, 80~90%범위에서는 186~780cps범위, 99%의 범위에서 키토산은 갈변화가 일어났다. 즉, 점도와 탈아세틸화도의 관계가 동시에 고려되지 않은 제조법의 범위를 넘지 않았다.

상술한 기존의 키틴의 추출 및 키토산을 제조하는 일반적인 방법으로서 키틴 및 키토산의 분자사슬의 절단이 발생하는 단점을 나타내고 특히, 키토산을 고온 및 고알칼리 용액에서 장시간 처리하는 탈아세틸화도는 높아지는 대신 키토산의 색깔이 갈변화가 발생하고 점도는 급격히 감소하며, 고분자의 키토산을 제조하는 탈아세틸화도는 극히 낮게 나타나는 단점을 나타낸다고 보고되고 있다(Lusena 등, 1953).

본 연구와 관련한 제조법에 대한 국내의 보고된 바를 살펴보면, 공보 제95-18054호 "새우갑각으로부터 생체 임상의학용 키틴 및 키토산의 제조법"에 의하면, 새우갑각으로부터 고순도 및 고분자량, 고아세틸화도 및 고백색도를 갖는 임상 의학용 키토산을 제조하는 방법에 대하여 출원되었다. 또한 국내 공보 제 95-18057호 "대롱수염 새우갑각으로부터 생체 임상의학용 키틴 및 키토산의 제조"의 경우가 출원되었는데 전반적으로, 새우 껍질을 대상으로하여 1~6N 염산 용액하에서 -40℃~+30℃온도범위조건에서 1.5시간 처리하고, 10% NaOH용액으로 90~100℃로 0.5시간 및 6시간 처리하여 생체 의학용 키토산을 제조으로서, 탈아세틸화도는 92%이상, 점도 분자량은 700~3,270까지 나타났다고 보고된 결과와 비교할때, 본 연구에서는 갑각류 유래의 게껍질을 대상으로 2N 염산용액에서 온도를 -30℃로 조절하여 제조된 키토산이 2,000cps이상의 고분자인 것으로 나타나, 본 연구 결과에서도 유사한 결과가 나타났다. 그러나, 본 연구에서는 NaOH대신에 KOH를 사용함에 차이를 부여한 결과에서도 역시 유사한 결과가 나타나 NaOH 및 KOH는 두 시약 모두 탈아세틸화도를 높힐 수 있는 것으로 확인되었다.

일반적으로 게껍질을 원료로 한 키틴에서 키토산을 제조하는 제조법으로 47%의 NaOH 용액을 사용하여 60℃온도 조건하에서 2시간씩 1~4회, 110℃에서 1시간씩 1~3회 및 110℃에서 3시간 1회로 처리 조건을 달리하여 키토산의 분자량 및 탈아세틸화도의 변화를 Mini등(1983)에 의해서 검토 된 바 있다. 이때의 키토산의 최종 탈아세틸화도는 57~

90%, 78~96% 및 99%가 나타나 실제적인 키토산의 탈아세틸화도는 조절이 가능하다고 할 수 있으나, 이때의 분자량은 5.0×10^5 범위 부근에서 평균 분자량이 나타나 실제로 본 연구간에 96% 탈아세틸화도, 점도 2.02cps의 키토산을 대상으로 한 GPC분석 결과 2×10^5 의 평균 분자량을 나타냄에 비교한다면 저분자화 되었다고 할 수 있으며, 이 제법은 탈아세틸화도의 증강이외의 분자량에 대해서는 저감시키는 결과를 나타낸다고 할 수 있다. 또한, 39% KOH 용액을 이용한 키토산의 제조 방법에 대해서 Anderson등(1978)에 의해서 제안된 바 있는데 이는 온도는 reflux조건으로 설정하고, 20시간을 반응 시 점도는 67cps로 나타나 실제적으로 점도가 급격히 낮아지는 제법이라 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 이러한 점도의 감소를 억제하기 위하여, 질소의 충전 및 키틴의 제조시 입자의 크기의 조절과 고분자화 제조법을 확립 및 KOH의 사용횟수를 바꾸어 가면서 제조하여 보았다.

그 결과, 탈아세틸화도는 97%, 점도는 2,200cps로 탈아세틸화도를 증강시키면서 동시에 키토산의 점도 저하는 억제 되는것으로 확인되었다. 결론적으로, 키틴 입자의 크기는 적을 수록, KOH의 교환은 2회이상, 불활성 기체인 질소를 주입하는 조건과 천일건조로 키토산을 제조시 탈아세틸화도와 점도를 함께 증강시킨 고순도 및 고분자의 백색의 키토산을 제조할 수 있었다.

3) 키토산의 저분자화 및 키토산 올리고 혼합물 제조

Fig 4는 고분자 키토산을 섬유소 분해효소인 셀룰로오스 가수분해효소혼합체를 이용한 저분자 키토산 및 키토산 올리고혼합체를 제조한 결과이다.

우선 키토산을 셀룰로오스 가수분해효소혼합체를 이용하여 가수분해 시키는 과정에서 발생할 수 있는 탈아세틸화도 변화는 콜로이드 적정법으로, 화학적인 물성 변화는 FT-IR법으로 검정하여 보았다. 결과로서 최초 키토산의 탈아세틸화도가 62%, 75%, 87% 및 99%의 물성에 대하여 가수분해 과정중 시간별로 시료를 채취하여 이의 탈아세틸화도 변화를 확인하여 본 결과 전체 공정에서 탈아세틸화도의 변화는 인정되지 않았다.

셀룰로오스 가수분해효소에 의한 가수분해과정중에서 시료를 일정시간 경과시, 채취하고 이를 분말화한 후 KBr 디스크법을 통하여 FT-IR에 흡광도 분석을 실시하여 물성의 변화를 확인하여 보았다. 대조로서 Sigma사(미국)에서 판매하는 일반 키토산 구입하여 비교 검정하여 본 결과, 최초 사용된 키토산과 채취된 시료인 10cps, 1.5cps등에 대하여 화학 구조 변화에 따른 흡수파장은 나타나지 않아 셀룰로오스 가수분해효소는 가수분해 과정중 물성 변화는 유발시키지 않았다. 또한, 최초 키토산을 효소로 가수분해 과정중 3시간, 6시간, 12시간 및 24시간이 경과시 일정 시료를 채취하여 thin layer chromatography(TLC)검정법으로 올리고당체의 생성을 확인하여 보았더니, 셀룰로오스 가수분해효소에 의하여 키토산은 3시간 이내에 올리고 당체가 나타나기 시작하였으며, 단 당체 키토산 올리고는 생성되지 않았다. 그리고, 12시간 이후로는 점진적인 분해가 이루어지는 것으로 판단되었다. 셀룰로오스 가수분해효소가 키토산의 물성차이에 따른 가수분해율을 확인하여 보기위하여 점도는 1,300~1,500cps범위, 탈아세틸화도는 62%, 75%, 87% 및 99%로 달리 제조된 키토산 네종류를 1%(w/v) 키토산 용액으로 제조 후 각각 250ml씩 나누어 셀룰로오스 가수분해효소를 1.5ml, 2.5ml, 5ml, 10ml 및 20ml로 달리 첨가한 후 동일조건에서 키토산의 가수 분해능을 확인하여 보았다(Fig 1). 그 결과, 탈아세틸화도가 다른 네종류의 키토산에 대하여 10ml의 셀룰로오스 가수분해효소가 가수

분해에 필요한 적정 투여량으로 인정되었으며, 점도 1,347cps의 키토산이 2~10당체의 분자량 분포도가 70%이상을 점유하는 점도인 1.2cps로 가수분해되는데 소요되는 시간은 3시간 이내였다. 그리고, 5ml이상의 효소가 첨가된 경우 1.2cps이하의 점도 범위를 나타내는데는 약 12시간이 필요로 하였으며, 2.5ml이하 첨가시에는 24시간 이후에도 1.2cps 점도는 나타나지 않았으나, 지속적으로 감소하는 것으로 사료 되었다. 따라서, 키토산의 탈아세틸화도 차이는 셀룰로오스 가수분해효소에 의한 가수분해에 영향을 주지 않았으며, 가수분해율은 시간과 효소의 첨가량 및 온도가 주 요인인것으로 확인 되었다. 그러나, 이러한 가수 분해율의 측정은 단순히 점도 측정법에 의한 결과이므로 이의 분자량 분포 변화 여부를 확인할 필요가 있어, 키토산 가수 분해 과정중의 일부 키토산 가수분해 용액을 분취하여 GPC분석을 실시하여 분자량의 분포도를 확인하여 보았다.

Fig 7(A)는 GPC분석 시스템의 검정조건을 확인하기 위한 검량선 조건으로서, 표준체인 평균 분자량이 161인 단당체, 483인 3 당체 및 805인 5 당체 키토산 올리고와 평균 분자량 5,800 및 12,200인 폴루란 표준체에 대해 검정하여 본 결과 GPC분석 시스템은 분석시 문제가 없는 것으로 인정되었다. 이를 근거로 탈아세틸화도 96% 및 점도 2.02cps의 키토산의 분자량 분포도를 분석하여 본 결과, 평균 분자량은 207,954였으며, 분자량 분포는 최저 49,012에서 235,448의 범위를 나타내고 있었으며(Fig 7-B), 효소 분해 과정 중 12시간 경과시 평균 분자량은 1,608, 분자량 분포 범위는 279~17,853으로서 10 당체 이내의 함유량은 약 74%이상을 점유하고 있었다(Fig 7-C). 또한 24시간이 경과시 평균 분자량은 1,088, 전체 분자량 분포는 300~12,796으로 10당체 이내의 분포는 전체의 87.6%를 점유하고 있었다(Fig 7-D). 그러나, 24시간이 경과시는 뚜렷하게 분자량 분포의 변화는 나타나지 않아 24시간이내에 셀룰로오스 가수분해효소에 의한 키토산의 가수분해는 종료되는 것으로 판단되었다.

키토산의 저분자화 및 키토산 올리고 혼합체 제조시 용해제로 사용되어 남아있을 수 있는 염산 잔존량을 AgNO_3 적정법으로 적정하여 보았더니 전체 실험군에서 $1.2 \pm 0.8\%$ (평균 \pm S.D) 이내로 나타나 염산기는 중화과정에서 제거되어 OCHT는 순수 키토산의 성격을 보유하고 있다고 인정되었다. 일반적으로 키토산을 가수분해하는 방법은 효소를 사용하는 방법등(Fukamizo 등, 1995)과 강산 등을 이용한 산분해 방법(Holowitzt 등, 1957)이 이용 되어지고 있으나, 근래에는 효소를 이용하는 방법이 보편화 되어지고 있다. 그러나, 이러한 키토산 분해효소는 고가로서 이의 대체 효소로서 섬유소 분해 효소인 셀룰로오스 가수분해효소등의 대체 이용효소에 대한 연구결과가 발표 된 바 있다(Muraki 등, 1991).

또한, 여러종류의 상용화된 셀룰로오스 가수분해효소에 대하여 키토산 분해효소의 효소 활성 역가치의 비교 결과를 보고한 자료를 살펴보면, 일반 셀룰로오스 가수분해효소의 키토산 분해능력은 키토산 분해효소의 역가치에 비해 약 1/3~1/6의 분해능력 밖에 나타내지 않는다고 발표 한 바 있다 (夜久, 1990). 그러나, 본 연구에 사용된 효소는 일반 셀룰로오스 가수분해효소가 갖는 키토산의 분해 능력을 증강시키기 위한 목적으로 다종의 효소를 복합적으로 조합하여 키토산에 대한 분해능력을 증진시키 결과 3시간 이내에 분해효과가 나타났으며, 12시간이후 분자량 분포도중 10당체 이하의 분포는 70%이상인, 24시간 이 경과시는 85%이상인 나타나 분해능력이 기존에 보고된 셀룰로오스 가수분해효소의 가수 분해 능력보다 뚜렷하게 증진된 것으로 확인되었다.

Pelletier등(1990)은 *Bacillus megaterium* P1에서 정제한 키토산 분해효소 등을 이용

하여 키토산의 가수 분해 능력을 측정한 결과에서 키토산 분해효소를 1~2회 추가로 첨가한 조건에서 24시간에서 90시간이 경과시 키토산 80%이상의 올리고 함유량을 나타내었다는 보고와 비교시, 본 연구에서 사용된 셀룰로오스 가수분해효소는 키토산 분해 역가는 높은 것으로 인정되었다. 고분자 키토산을 이용하여 분자량 등급별 키토산 및 올리고 혼합체를 제조하기 위한 방법으로서 국내·외의 발표현황을 살펴보면, 우선 화학적인 제조법으로서, 키토산을 40~50% 고알칼리 처리에 의해 제조하는 방법으로서 이는 탈아세틸화도와 동시에 결합 분자사슬이 절단되는 메카니즘을 이용하는 것과, 질소 환류하에 의해 분자사슬이 절단되는 방법등이 알려지고 있으나, 이러한 방법은 100℃의 온도에서 5~24시간 정도 가열하는 등 특별한 조건들이 필요하다. 전자의 경우는 고알칼리 반응시 분자사슬의 절단이외에 아미노기가 현저히 증가하고 갈변화 현상이 나타나고, 후자의 경우는 저분자화 부분의 효율이 5%의 경우로 낮게 나타나고 있다.

화학적 방법으로서 과산화수소를 이용한 방법(特開昭 54-143390号)으로서 이 방법은 아미노화 반응과 동시에 착색반응을 동반하고 분자사슬의 절단을 수반하는 방법으로서 적용되고 있다.

효소를 이용하는 방법으로 1989년 일본 특허출원(公報 平1-256395号)에서 “저분자화 키토산의 제조방법”에 대해서 발표가 된바 있는데, 이는 키토산으로부터 얻어진 탈아세틸화 키토산에 효소를 사용하여 저분자화 키토산을 얻는 방법으로서 pH 3~9의 범위로 조절 후 단당체가 형성되지 않은 분자량 340~50,000범위의 저분자 키토산을 얻었다고 하였으며, 이때 사용된 효소는 *Bacillus circulans* LCC-1(特開昭 62-30103号)유래의 키토산 분해효소를 사용하였다. 또한, *Bacillus*속 유래의 효소를 이용하는 방법[特開昭 62-30103号]등이 있으며, 이들 방법은 전반적으로 키토산 올리고당을 제조하는 방법이라고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 분자량이 조절된 등급화별 키토산을 제조하기 위하여, 키토산 분해효소를 대체할 수 있는 저가의 효소로서 저분자화를 효과적으로 진행시킬 수 있도록 키토산을 수용화합에 있어 수용성 키토산-산염을 제조한 후 이를 일반수에 용해하여 사용하는 전처리 방법을 적용하여 여기에 셀룰로오스 가수분해효소를 첨가하고, 단시간 내에 고분자 키토산의 저분자화 및 올리고 혼합체를 제조 이를 등급화 시킬 수 있도록 새로운 방법을 확립하고, 최종적으로 10당체 이하의 키토산 올리고가 87% 이상 함유된 혼합체를 얻었다.

4. 종이 디스크법에 의한 항균성 OCHT 제재 선별 및 MIC평가

일반수에 용이하게 용해되며 pH에 안전한 OCHT에 대하여 항균성 제재로 선별된 OCHT-1, 2, 3을 대상으로 4종류(*E.coli* O157:K88ac, *E.coli* O20:K101, *E.coli* nontypable 및 *E.coli* O4:K12)의 자돈 병원성 설사 유발균에 대한 최소저지농도(MIC)를 성장저지환을 측정하여 본 결과, 전체 대장균에 대하여 분자량 분포도내 올리고당(1~6개)를 다량 보유한 OCHT 제재는 농도에 상관없이 항균성이 인정되지 않았다(Table 3). 그러나 올리고당이 7~14개범위(OCHT-2)와 1~16개 범위의 점유율이 높았던 OCHT-3의 경우에는 물성에 상관 없이 항균 효과가 인정되었다. 이를 기초로 올리고당이 1~16개의 당체를 다량 보유한 OCHT-3을 선정하여 이를 농도별로 확인하여 본 결과, 0.0004% 이상의 농도

가 첨가된 종이 디스크에서 항균효과가 인정되었다. 또한 OCHT-3을 0.00001%~0.5%로 각기 농도를 달리한 경우에서 12시간 후의 항균 효과를 검정시 항균 효과가 인정되어 항균 효과는 12시간 이내에 결정되는 것으로 판단하였다.

결론적으로, OCHT-3의 최소저지 농도는 0.0004%이상인 OCHT-3을 최종 선발하여 전체 연구간에 유기태화 미네랄 소재류 기질로 하는 물성을 확정하였으며 전체 제조기법으로 사용하였다.

정되었다.

5. 병원성 대장균에 대한 실험실적 항균성 효과검정

가. 현장 감염 대장균 분리

이 연구에 사용된 균주는 설사가 보여 실험실 진단이 의뢰된 자돈 분변에서 분리하여 본 결과, 그 혈청형은 O88:K-, O147:K88ac, O9:K103, O15:K-, O4:K12가 각 1주씩, O157:K88ac, O15:K-, O9:K103, O20:K101 및 미분류형 등은 각 2주씩, O1:K-가 3주, 그리고 O149:K91가 7주 등 총 26종이었다(Table 4). 이들 혈청형중 O157:K88ac, O1:K-, O149:K91등은 내열성 독소를 생산하는 것이었다. 그리고, 본 실험에 사용된 설사 환자 유래 VT생산 대장균들인 O157:H7의 Verotoxin 1(VT1) 또는 Verotoxin 2(VT2)인 것으로 추가 확인 시험을 실시하기 위하여, O157:H7 항혈청을 이용하여 이를 이용한 중화 실험을 실시한 결과 분리균 모두 O-group serotype의 VT1 또는 VT2되었다.

나. OCHT의 대장균 항균성

이 실험에 사용한 *E. coli*주들의 항균성은 대조군에 비하여 0.00002% OCHT처리외에 0.001~0.1%농도사이의 OCHT를 첨가 후 1~12시간동안에 뚜렷한 차이를 나타내어 매우 우수한 항균효과를 보였다(Table 5). 결과로서 대조군에 비하여 전체적으로 0.0001%~0.5%농도의 OCHT를 투여시, 전반적으로 O157:H7 대장균의 성장이 억제되는 것을 확인하였다. 그러나, 대장균중 VT2 Cl-O157:H-은 0.001%이하, VT2 Cl-O157:H7중은 0.001%이하의 농도의 OCHT를 첨가하는 성장을 억제 시키지 못하는 것으로 나타났다(Fig 35-B~C, $P<0.05$). 이는 O157:H7균들중 혈청형에 따른 항균 효과가 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나, 그 이외의 O157:H7균은 1~12시간동안 성장 억제 효과는 뚜렷한 차이를 나타내어 매우 우수한 항균효과를 보였다.

다. OCHT처리후 대장균수

UCHT를 첨가하지 않은 대조군에 대하여 0.001%의 OCHT를 첨가한 실험군의 *E. coli*에 대한 항균성은, 0.0001~0.5% OCHT 첨가시 10분 이내에 *E. coli*주들의 집락수가 대조군에 비해 뚜렷하게 감소하였고, 대조군내 *E. coli*들은 최초투여 후 10분에 집락수가 평균 1.21배 증가하여 있었다(Table 5). OCHT처리후 10분 이내 대장균 집락수는 0.5% OCHT 처리시 대조군(100%기준)에 비해 상대적으로 평균 87.7%가 감소하였고, 0.1% OCHT 처리시 평균 95.8%가, 0.01% OCHT처리시 100%까지 떨어져 *E. coli*를 찾아 볼 수 없었다. 또한 0.001%와 0.0001% OCHT처리시에도 *E. coli*의 집락수가 대조군에 비해 평균 87%, 84.3%로 각각 뚜렷하게 감소하였다. 0.001% OCHT 농도만을 투여한 후

10분부터 12시간까지의 항균효과는 10분이 경과시 *E. coli*의 집락수가 뚜렷하게 감소되어 있었고, 0.0001% ~ 0.5% OCHT 처리군의 경우, 12시간째에는 모든 OCHT 첨가군에서 *E. coli*의 집락을 볼 수 없었다. 또한 전체 대장균에 대한 OCHT의 첨가 농도별 항균효과를 OCHT를 첨가 한 후 1시간 이 경과시, 이중 일부를 분취하여 영양고체 배지에도말하고 배양하여 성장한 대장균 집락수를 확인하여 본 결과, 전체 대장균 중 0.001%이상의 OCHT처리군중 O157:K88ac:K89, O9:K103:K987 대장균은 57.3 및 20.4%가 생존하여 있었으며, 이외의 대장균의 생존률은 약 10% 이내로 나타나 OCHT에 의한 항균성은 균종 및 혈청형에 따라 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나, 대조군의 경우 대장균수가 최초 측정시에 비해 12시간후에는 평균 약 6.9배까지 지속적으로 증식이 이루어지고 있다. OCHT를 첨가한 항균억제 효과를 검정한 흡광도(O.D) 실험 결과(Fig 53~55)에서, OCHT는 세균에 대한 성장 억압 효과가 확인 되었으나, 이 결과가 사멸에 의한 효과인지, 정균작용에 대한 효과인지는 확인 할수 없어 집락을 확인하여 사멸 및 정균효과를 판정하기 위하여 실험을 진행하여 보았다.

결과로서, OCHT를 첨가하지 않은 대조군에 대하여 0.0001%의 OCHT를 첨가한 실험군의 각 *E. coli* O157 : H7에 대한 항균 효과 결과를 Fig 35에 나타내었다. 즉, 0.0001% OCHT를 첨가시 10분이내에 *E. coli* O157 : H7주들의 집락수가 대조군(100% 기준)에 비해 VT1 : O157 : H7(ACH5), V2 : O157 : H7(O59)과 V1+V2 : O157 : H7(670) 및 VTe O138, E57(VTe)의 경우 약 20%에서 49%까지 감소하였다.

그러나, VT2 Cl-O157 : H⁻의 경우는 오히려 약 102%~105%로 증가하는 경향을 나타내었으나, OCHT첨가 후 2시간이 경과한 후에는 약 53%로 뚜렷하게 감소하였다. 또한, VT2 Cl-O157: H7의 경우는 0.001% 이하의 OCHT 농도군에서도 대장균은 사멸 및 정균효과는 인정되지 않았다. 그리고, 대조군내 *E. coli* O157 : H7들은 최초 투여후 시간이 경과시 집락수가 점차적으로 증가해 있었다.

E.colii VT1 O157:H7(ACH5)에 대한 OCHT첨가 농도별 항균 효과이다. 대조군은 최초 투여시에 비하여 14시간이후에는 1.8배 성장하여 있었으며, 전체 OCHT 처리시 14시간에 경과시는 집락은 나타나지 않아, 완전 사멸된 것으로 나타났다(P<0.01). 그리고, 0.001%의 OCHT를 첨가시, 5분이 경과시는 최초투여시에 비교시 약 38%까지 균은 감소되어 있었고, 30분이 경과시는 30%로, 2시간이 경과시는 5.5%로 감소되고 최종 14시간이 경과시는 집락은 나타나지 않아 완전히 사멸된 것으로 나타났다.

E. coli VT1 O157:H7(O59)에 대한 OCHT첨가 농도별 항균 효과이다. 대조군은 최초 투여시에 비하여 14시에는 2.72배 성장하여 있었으며, 전체 OCHT 처리시 14시간에 경과시에 집락은 나타나지 않아, 완전 사멸된 것으로 나타났다, 그리고, 0.001%의 실험군을 기준으로, OCHT 첨가후 5분이 경과시는 최초와 비교시 약 28%까지 균은 감소되어 있었고, 30분이 경과시는 6%로, 2시간이 경과시는 25%로 감소되고 최종 14시간이 경과시는 집락은 나타나지 않아 완전히 사멸된 것으로 나타났다.

E. coli VT1+VT2 O157:H7(670)에 대한 OCHT첨가 농도별 항균 효과이다. 대조군은 최초 투여시에 비하여 14시간이 경과시 5.65배 성장하여 있었으며, 전체 OCHT 처리시 14시간에 경과시에 집락은 나타나지 않아, 완전 사멸된 것으로 나타났다), 그리고, 0.001%의 실험군을 기준으로, OCHT 첨가후 5분이 경과시는 최초와 비교시 약 69%까지 균은 감소 되어 있었고, 30분이 경과시는 약 48%로, 2시간이 경과시는 1.56%로 감소되

고 최종 14시간이 경과시는 집락은 나타나지 않아 완전히 사멸된 것으로 나타났다. 또한, *E. coli* VTe O138, E57(VTe)에 대한 OCHT첨가 농도별 항균 효과이다. 대조군은 최초 투여시에 비하여 14시간이 경과시 6.6배 성장하여 있었으며, 전체 OCHT 처리시 14시간에 경과시에 집락은 나타나지 않아, 완전 사멸된 것으로 인정되었다, 그리고, 0.001%의 실험군을 기준으로, OCHT 첨가후 5분이 경과시는 최초와 비교시 약 48%까지 균은 감소 되어 있었고, 30분이 경과시는 약 39%로, 2시간이 경과시는 12%로 감소되고 최종 14시간이 경과시는 집락은 나타나지 않아 완전히 사멸된 것으로 인정되었다.

E. coli VTe O138, E57(VTe)에 대한 OCHT첨가 농도별 항균 효과이다. 대조군은 최초 투여시에 비하여 6시간이 경과시 1.15배 성장하여 있었으며, 전체 OCHT 처리시 6시간에 경과시에 0.001% OCHT 처리군의 집락은 최초와 비교시 1.6%로 감소 되어 나타났으나, 0.0001% OCHT 투여군은 항균효과가 없는 것으로 인정되었으며, 0.001%이상의 OCHT를 처리시는 지속적으로 균의 수는 감소되고 있었다.

E. coli VT2 Cl-O157:H7에 대한 OCHT첨가 농도별 항균 효과이다. 대조군은 최초 투여시에 비하여 6시간이 경과시 1.02배 성장하여 있었으며, 전체 OCHT 처리시 6시간에 경과시에 0.001% OCHT 처리군의 집락은 최초와 비교시 약 3%로 감소 되어 나타났으나, 0.0001% OCHT 투여군은 항균효과가 없는 것으로 나타났다. 0.001%이상의 OCHT를 처리시는 지속적으로 균의 수가 감소하는 현상을 보였다. 결론적으로, OCHT를 투여후 10분부터 6시간 및 14시간까지의 항균효과는 10분이 경과시 *E. coli* O157 : H균중 *E. coli* VT2 Cl-O157:H7와 VT2 Cl-O157:H⁻를 제외한 나머지 4종류의 균의 집락수가 뚜렷하게 감소되어 있었고(P<0.01), 전체적으로는 2시간 이후로부터 급격한 집락수는 뚜렷하게 감소하였으며(P<0.01), 14시간 및 그 이후에는 모든 OCHT 첨가군에서 *E. coli* O157 : H7균의 집락을 볼 수 없었다. 그러나, *E. coli* VT2 Cl-O157:H7는 0.01%, VT2 Cl-O157:H⁻의 경우는 0.001%이상의 OCHT가 첨가 될시 균은 1시간, 10분이후부터 사멸효과가 나타났다. 이러한 결과는, 세균의 종적인 차이로 사료되었다. 그리고, 대조군의 경우 전체 대장균수가 최초 측정시에 비교할때, 지속적으로 증식이 일어났다. 결과로서, 전체 실험 *E. coli* O157 : H균중 *E. coli* VT2 Cl-O157:H7와 *E. coli* VTe O138, E57(VTe)를 제외한 나머지 4종류의 균의 집락수가 뚜렷하게 감소되어 있었으나), 전체적으로는 2시간 이후로부터 급격한 집락수는 뚜렷하게 감소하였으며, 6시간 및 그 이후에는 모든 OCHT 첨가군에서 *E. coli* O157 : H7균의 집락을 볼 수 없었다(P<0.01). 그러나, *E. coli* VT2 Cl-O157:H7와 *E. coli* VTe O138, E57(VTe)의 경우도 0.01%이상의 OCHT가 첨가시 균은 6시간 이내에 전체가 사멸되는 것으로 나타났기 때문이다. 현재 *E. coli*에 대한 키토산의 항균성 기전은 키토산의 아미노기가 특이적으로 병원균의 세포벽과 결합에 따른 균증식의 방해 때문이라는 주장(Uchida, 1995.)과 더불어 일반 세균에 대한 키토산의 항균작용이 균체표면의 구조에 대한 영향(Young 등, 1982)이나 균의 대사과정 중 DNA형성에 대한 저해작용(Stossel 등, 1984)이라는 추정도 대두되고 있으나 아직 확실히 규명되어 있지 못하다. 따라서 향후 이에 대한 기전의 규명 역시 키토산의 응용범위를 확장시키는데 매우 중요한 과제라 여겨진다. 결론적으로 본 연구를 통하여, 키토산을 원료로 하여 유기태화 미네랄 소재류를 제조함에 있어, 본연구에서 핵심연구목표로 하는 항질병형 유기태화 미네랄 소재류 제조시 사전 기질제조시 항균효능에 대한 안정성을 확보하는 기술과 물성제조 기법을 체계적으로 완료하였다고 확인되었다.

Table 1. Condition of gel permeation chromatography for the analysis of chitosan-oligosaccharides(OCHT)

1. Instruments

- System : JASCO GPC, Model LCSS-905
- Pump : PU-980
- Detector : RI-930
- Injector : Rheodyne 7125
- Oven : CO-965

2. Conditions

- Column : Shodex OHpak SB-801+ SB-801+SB-803(7.5mm ID x 300mm L)
- Mobile phase : 0.1M NaCl in 0.2% acetic acid
- Flow rate : 1ml/min
- Column Temp. : 40°C
- Injection volume : 200 μ L

3. Sample

- MW maker : Pullulan(MW 853000, 95400, 23700, 5800), chitosan-oligosaccharides(MW 322.32, 483, 706, 876)
 - OCHT: 0.1% (W/V) in eluent(remove insoluble component with 0.45 μ L membrane filter)
-

Table 2. Specification of chitin manufactured by different conditions along the experimental groups

Division	Group No.					
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Color	Pink	Pink	Pink	Pink	white	white
Mesh(mm)	50 ~ 100	50 ~ 100	< 2	< 2	50 ~ 100	50 ~ 100
Ash(%)	2.42	2.81	0.28	0.12	0.01	1.56
Protein content (%)	1.34	1.65	0.16	0.13	1.34	2.04
Viscosity (CPS)	2,850	1,620	3,500	2,120	3,964	1,420

Table 3 Specification of chitosan manufactured by different conditions along the experimental groups

Division	Group No.						
	Group-1	Group-2	Group-3	Group-4	Group-5	Group-6	Group-7
Color	Pink	white	white	white	white	white	white
Mesh(mm) ^a	50 ~ 100	50 ~ 100	50 ~ 100	50 ~ 100	< 2	< 2	50 ~ 100
Ash(%) ^b	1.23	1.04	0.28	1.56	0.12	3.45	0.13
Insoluble(%) ^c	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.01	< 0.01	< 4
DAC(%) ^d	85	87	79	88	97	98	61
Viscosity ^e	430	542	340	540	2,200	230	2,140

Mositure content(%): 7.0 ~ 7.5, pH : 6 ~ 8 and Protein content(%) : < 1

a : Sieve No. 25 ~ 100 pass region(Fisher)

b : Ashing method(800°C, 6 hrs)

c : Dissolved 10g of chitosan in 50ml of 1%(w/w) acetic acid solution

chitosan solution solution to which added 200ml distilled water was stirred

1hr. filtration with a GF/C and washed 20ml acetone, Dry residue at 105°C

d : Degree of Deacetylation, Colloidal method

e : Viscosity method

Table 4 Antibacterial effects of chitosan-oligosaccharide(OCHT) with different concentrations(- : Not Testing)

<i>E.coli</i>	OCHT Concentration	Clear zone on plate(mm)		
		OCHT-1	OCHT-2	OCHT-3
O157:K88ac	1%	0	13	13
	0.1%	0	9	10
	0.01%	0	3	4
O20:K101	1%	0	14	14
	0.1%	0	12	12
	0.01%	0	8	8
nontypable	1%	0	12	12
	0.1%	0	12	13
	0.01%	0	10	12
	0.001%	0	8	9
O4:K12	0.5%	-	-	14
	0.1%	-	-	12
	0.05%	-	-	10
	0.01%	-	-	8
	0.0004%	-	-	5
	0.00001%	-	-	2

Table 5. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from piglets with diarrhea used

Characteristics of <i>Escherichia coli</i>						
Types	serotype	F4	F5	F6	LT	ST
β	0147:K88ac:K89	–	+	–	–	–
β	0157:K88ac	–	–	+	–	+
β	0157:K88ac	+	–	–	–	+
β	0157:K88ac	–	–	–	–	+
β	0149:K91	+	–	–	–	
β	0149:K91	–	–	–	–	
β	0149:K91	–	–	–	–	
γ	0149:K91	+	–	–	–	
β	0149:K91	+	–	–	–	
β	0149:K91	+	–	–	–	+
β	0149:K91	–	–	+	–	+
γ	020:K101	+	–	–	–	
γ	020:K101	–	–	–	–	
γ	01:K–	–	–	–	–	
β	015:K–	–	–	–	–	
γ	04:K12	–	–	–	–	
γ	088:K–	–	–	–	–	
β	01:K–	–	–	–	–	+
γ	09:K103:K987	–	–	–	–	
β	01:K–	–	–	–	–	+
γ	nontypable	+	–	–	–	
γ	09:K103:K987	+	–	–	–	
β	04:K12	–	–	–	–	
γ	nontypable	–	–	–	–	
γ	nontypable	–	–	+	–	
γ	015:K–	–	–	+	–	

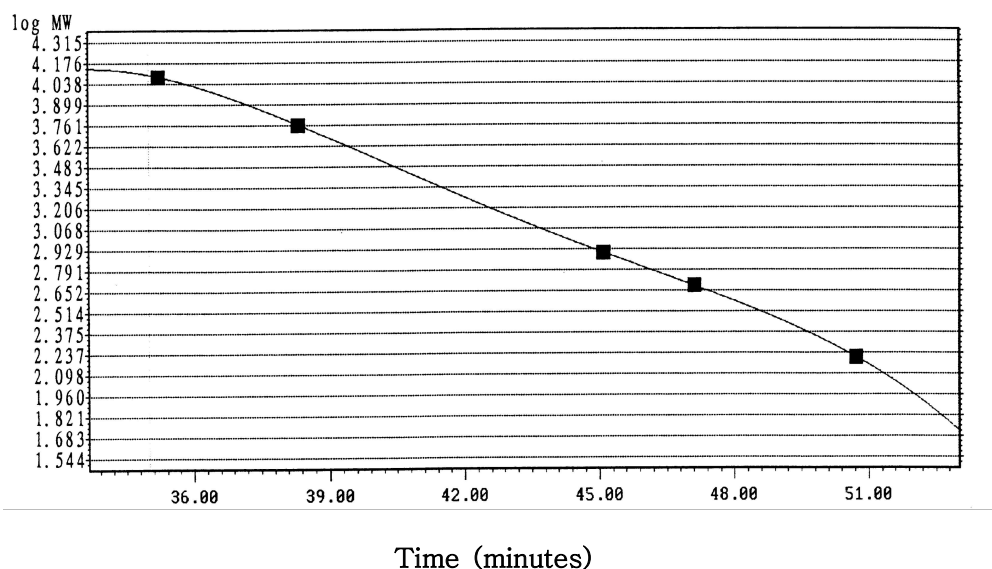
Table 6. Antibacterial action after chitosan–oligosaccharide (OCHT) treatment of various concentration against 26 *Escherichia coli* isolates piglet with diarrhea (1 hours after treatment of chitosan–oligosaccharide, 37 °C).

Serotypes	Antibacterial effects(%) after OCHT treatment of various concentration					
	control	0.5%*	0.1%*	0.01%*	0.001%*	0.0001%**
0147:K88ac:K89	100	1.8±0.7	18.0±6.5	14.7±5.5	24.5±8.9	57.3±13.2
0157:K88ac	100	0.4±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
0157:K88ac	100	0.0±0.0	0.0±0.0	7.0±2.4	9.5±3.4	10.4±5.6
0157:K88ac	100	0.0±0.0	0.0±0.0	4.6±1.2	6.5±3.2	10.0±4.5
0149:K91	100	0.0±0.0	1.5±0.4	3.8±1.5	7.0±4.1	7.9±2.9
0149:K91	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3	4.2±2.4
0149:K91	100	0.0±0.0	1.2±0.6	0.9±0.8	1.2±0.8	7.1±3.4
0149:K91	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3	4.7±2.3
0149:K91	100	0.0±0.0	1.2±1.6	0.9±0.2	1.2±0.8	7.1±4.5
0149:K91	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
0149:K91	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
020:K101	100	0.0±0.0	0.0±0.0	26.8±12.0	21.8±13.2	0.4±0.3
020:K101	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
01:K-	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.15	2.0±0.12	2.7±2.3
015:K-	100	0.1±0.2	0.0±0.0	0.1±0.02	2.9±1.3	4.1±1.4
04:K12	100	0.0±0.0	1.5±0.34	4.3±2.4	5.1±1.3	7.6±3.3
088:K-	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
01:K-	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
09:K103:K987	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	18.3±8.7	20.4±12.4
01:K-	100	0.0±0.0	1.7±0.7	1.7±0.3	7.1±3.2	0.0±0.0
nontypable	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.2
09:K103:K987	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.23	0.0±0.0
04:K12	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
nontypable	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	5.0±6.2	0.0±0.0
nontypable	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.03±0.04	0.0±0.0	0.0±0.0
015:K-	100	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3	2.9±3.2

* P<0.01 as compared to control

** P<0.05 as compared to control

A. MW calculation curve of OCHT



Calibration coefficients, r : 1 Time (minutes) : 35.00 - 53.00
 0 : -1.690165e+002
 1 : 1.660491e+001
 2 : -5.881992e-001
 3 : 9.144840e-003
 4 : -5.304260e-005

ID No.	Time	MW	Result	Error
1	35.210	12200	12200	0.00
2	38.330	5800	5800	0.00
3	45.100	805	805	0.00
4	47.110	483	483	0.00
5	50.710	161	161	0.00

- Continues-

B-D. Identification of MW calculation

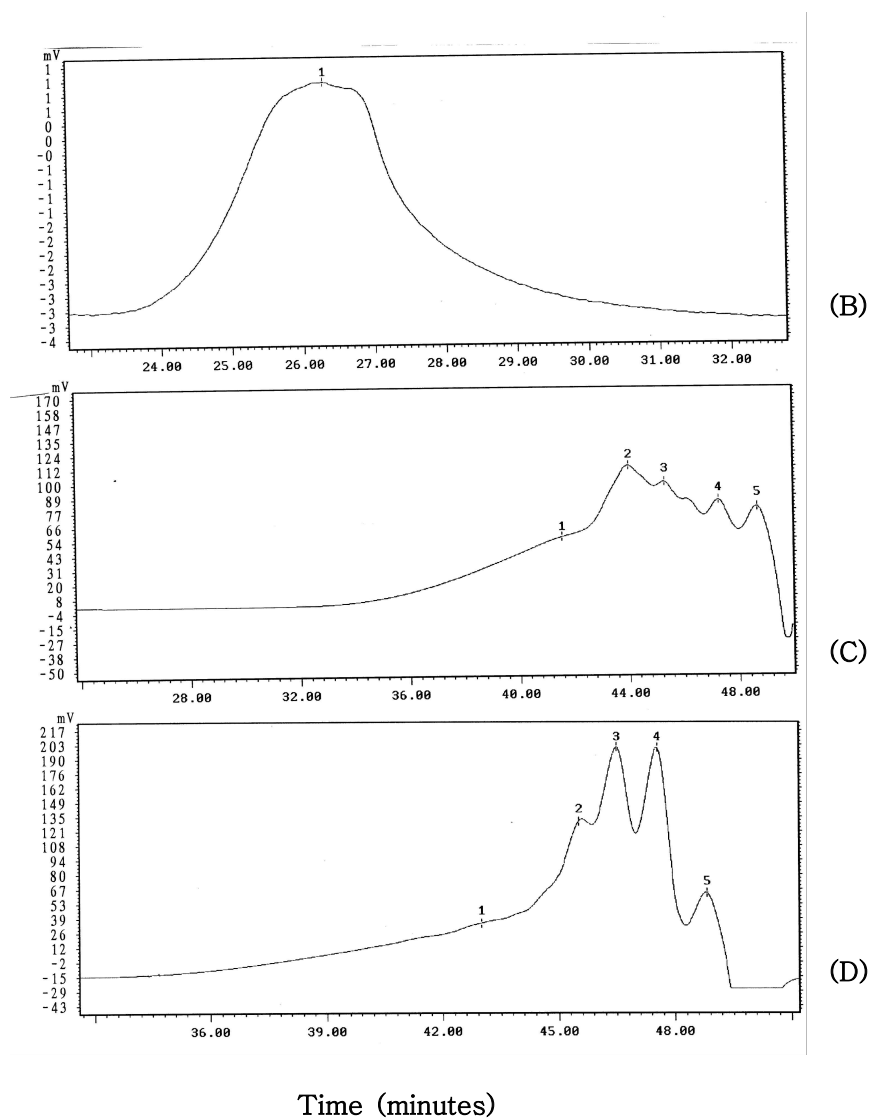


Fig. 7. GPC analysis on the production of low molecular weight chitosan and oligosaccharides by the treatment of enzyme to high molecular weight of chitosan

(A) : calibration curve, (B) : raw chitosan(DAC : 96%, viscosity: 2.02cps), (C) : 12 hours after enzyme treatment, (D) : 24 hours after enzyme treatment.

제 1-2 절 키토산 기질화 유기태 미네럴 소재류 대량생산기법 정립

1. 연구목적

본 연구목표인 미네럴 및 면역인자 증대형 기능성 축산물 생산 연구간 현장에서 절제적으로 필요한 항병력 보유형 유기태화 제품의 개발과 이를 사료첨가제로 하는 현장 적용 시스템까지를 연계하는 유기태화 소재를 개발함에 본 연구의 목표가 있다. 이를 해결하기 위하여, 키토산을 기질로 하는 유기태화 소재류를 개발함에 있어 키토산이 보유하고 있는 기능성을 극대화 하기 위해서는 핵심 기질의 조절 능력이 필요하였다. 따라서, 선행연구인 1절에서 키토산의 기능성을 극대화 시키는 기법정립 결과를 토대로 여기에 미네럴류를 유기태화 시켜 무기태 미네럴이 보유한 고질적인 단점인 독성해결과 생체흡수능력 저하라는 단점을 해결 할 수 있는 대안이라 할 수 있다. 즉, 키토산이 가지고 있는 항균성 보유 능력을 이용한 항질병형 능력과 생리활성증진 능력 그리고 이들이 보유하고 있는 미네럴 킬레이팅 능력을 종합한 다기능성 유기태화 소재류를 개발 하고 이를 산관계를 대상으로 섭이시켜 최종 기능성 계란 등의 고부가 축산물을 개발함과 동시에 현장 애로사항인 질병을 예방 할 수 있는 수단을 제공하고, 최종 제품화 하는데 연구 목표를 부여하였다.

2. 연구수행방법

선행연구에서 완성한 항균성이 극대화 되도록 키토산의 분자량 조절기법에 미네럴류를 킬레이팅 시켜 최종 목표인 유기태화 미네럴 소재류를 제조하는 방법은 다음과 같다.

Ca-OCHTS(칼슘-유기태화 소재 제조법)

Ca-OCHT의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 키토산 그리고 기질내 미네럴 킬레이팅을 유도하기 위한 무기태 미네럴류는 건강기능식품공전(영양소내 미네럴류)내 등록된 미네럴 소재류중 식품첨가물로 허가된 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 소재로 적용하였다, 기본제조를 위한 기초 배합비율은 기질 OCHT를 5(기준)로 하여, 미네럴류는 3.7 그리고 반응용매로서는 정제수를 13.5의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다(Fig 1).

Fe-OCHT(철분-유기태화 소재 제조법)

Fe-OCHT의 제조법은 Ca-OCHT제조와 동일하게 실시하나, 다만 무기태화 미네럴을 식품첨가물로 허가된 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 소재로 적용하였다, 선발 철분소재 역시건강기능식품공전(영양소내 미네럴류)내 등록된 미네럴중 식품첨가물로 허가된 제품을 구입하여 사용하였다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 OCHT를 4(기준)로 하여, 미네럴류는 1 그리고 반응용매로서는 정제수를 13.5의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다(Fig 2~3). 다만, Fe-OCHT는 대장균성 설사증 감소형 제품제조를 위한 액상형 제품으로 개발○르 추가하였는데, 이는 전체 공정은 같으나 SD공정단P를 삭제하고 포장 단계로 진행한 것만이 제법 차이를 보유하고 있다(Fig 2).

Zn-OCHT(아연-유기태화 소재 제조법)

Zn-OCHT의 제조법은 Ca-OCHT제조와 동일하게 실시하나, 다만 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재중 식품첨가물로 허가된 미네랄 제품중 ZnSO₄·7H₂O 제품을 구입하여 사용하였다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 OCHT를 6.25(기준)로 하여, 미네랄류는 1 그리고 반응용매로서는 정제수를 13.5의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다(Fig 3).

Cu-OCHT(구리-유기태화 소재 제조법)

Cu-OCHT의 제조법은 Ca-OCHT제조와 동일하게 실시하되 다만 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재중 식품첨가물로 허가된 미네랄 제품중 CuSO₄·7H₂O 제품을 구입하여 사용하였다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 OCHT를 12.5(기준)로 하여, 미네랄류는 1 그리고 반응용매로서는 정제수를 13.5의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다(Fig 4).

Se-OCHT(셀레늄-유기태화 소재 제조법)

Se-OCHT의 제조법은 칼슘-OCHT제조법과 동일 제조법을 적용하되 다만 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재중 식품첨가물로 허가된 미네랄 제품중 Na₂SeO₃제품을 구입하여 사용하였다, 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 OCHT를 30(기준)로 하여, 미네랄류는 1 그리고 반응용매로서는 정제수를 13.5의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다(Fig 5).

3. 연구수행결과

유기태화 미네랄 소재류 제조법

최종 정립된 대량생산시스템으로서 시제 4회(이미코젠사, OEM, 규모 : 5톤)를 거쳐 정립된 결과이며, 5종 유기태화 미네랄 소재류의 대량생산공정시스템은(5톤 반응기 적용, Working Vol. : 70% 기준) 9단계로 정리되었다(Fig 1~6). 현장생산용 공통작업지시서 내용은 다음과 같다,

- 1 단계는, 반응기(5톤)에 정제수를 2,700Kg을 충전한다.
- 2 단계는, 초산을 66Kg를 투입한 후 80rpm~500rpm범위에서 5분동안 교반한다.
- 3 단계는, 키토산 200Kg을 투여한후 역시 80rpm~500rpm범위에서 5분동안 교반한다
- 4 단계는, 키토산이 완전 용해되면 45℃로 승온시키면, 500rpm으로 교반한다.
- 5 단계는, 키토사나제를 20g을 투여한다.
- 6 단계는, “5공정” 이 완료되면 24시간(45℃, 500rpm)에서 교반하면서 가수분해를 시킨다.

- 7 단계는, “6공정” 이 완료되면 CaCl₂ 54Kg을 혼합 및 용해시킨다.
 8 단계는, “7공정” 이 완료되면 필터프레스로 이물질을 제거한다.
 9 단계는, “8공정” 이 완료되면 UF(MW 1000)를 7회 반복처리하면서 미반응 미네랄을 완전히 제거한다.
 10단계는, 건조 분말단계이며, 175℃에서 시간당 적정생산비율(현장고려)로 건조한다.
 11단계는, 제품으로서 포장한다.

현장대량생산 시제품 분석

실험실 조건을 기초로 하여, 현장에서 생산한 시제품 성상 및 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효율 관련 분석내용은 다음과 같다(그림 1~6). 유기태화 미네랄 소재류의 현장생산한 시제품의 성상은 전체가 수용성의 분말형이며, 소재별 생산수율을 기질로 사용한 키토산량을 기준으로 산출한 결과 생산수율은 80~90% 범위를 보임으로서 실험실 조건과 차이가 없었다. 시제품별 생산수율을 조사와 더불어 전체 유기태화 미네랄 소재류를 대상으로 미네랄 함유량을 조사함으로써 목표 유기태화 효율을 평가하였는데, Ca-OCHT내 목표 칼슘의 함유량은 66,880ppm, Fe-OCHT내 철분은 37,780ppm, Cu-OCHT내 구리함유량은 약 47,280ppm, Zn-OCHT내 아연 함유량은 19,200ppm 그리고 Se-OCHT내 셀레늄 함유량은 35,000ppm의 킬레이팅 효율을 보였다(Table 1). 이러한 결과는 실험실 정립조건의 현장대량시스템과 연계시 연구개발 결과는 일치함을 알 수 있었는데 실험실적 정립조건의 정밀성을 다시 한번 확인 할 수 있었다.

유기태 미네랄 소재의 구조

키토산은 중금속을 포함한 흡착체로서 효과가 탁월하고, pH가 중성으로 갈수록 금속이온의 흡착능이 증가하는데, 아미노기 함량, 탈아세틸화도 및 분자량의 차이에 따라 그 효능이 크게 달라진다고 보고된 바 있다. (Maruca 등, 1982; Iwakura 등, 1979; Kim 등 1996; Muzarelli 등, 1969). 따라서, 본 연구에서 제조한 키토산 기질화 유기태 구조는 Table 7과 같다. 즉, 키토산의 분자량에 따라 미네랄과의 결합 패턴이 다르게 나타나는데, 분자량이 큰 경우는 Ologopeptide형 그리고 분자량이 적은 Oligosaccharide의 경우는 Aminate형을 나타내는데 본 연구에서 제조한 유기태 기질인 키토산은 Oligosaccharide형임에 따라 Aminate형의 구조를 나타낸다 할 수 있다.

연구수행방법 및 결과(시작품)

연구에서 완료된 5종의 유기태화 미네랄 소재류와 유기태화에 따른 소재별 확정 미네랄 함유량은 다음과 같다(Fig 8, Table 2).

최종 확정된 유기태화 미네랄 제품은 총 10종(분말형)으로서 이들에 대한 사료제조 레시피 또한 정립이 완료 되었다. 확정 유기태화 제품별 미네랄 함유량은 사료첨가량에 준하여, 사료 1톤당 1Kg을 첨가하는 수준의 함유량에 맞추어 유기태화 제품의 생산 공정을 완료하였다(Table). 칼슘의 경우, 사료에 첨가량이 가장 많은 미네랄이기 때문에 칼슘함유량은 10%를 유기태화 시켰지만, 셀레늄의 경우는 미량을 첨가하는 관계로 0.5%의 수준으로 제품화를 완료 하였다.

Table 1. 키토산 기질화 유기태화 소재류(시제품)의 미네랄 킬레이팅 효율 및 검출결과

유기태화미네랄류		OCHT기질화 유기태화 미네랄 소재류별 미네랄 함유량 조사(ppm)															합계(ppm)		
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Cr	K	Mg	Mn	Na	Hg	AS	Pb	Cd	S	P	P,S포함	P,S비포함
OCHT	Average	2,999	359	2,931	0.89	3.33	2.89	3,115	349	0.45	844	NT	NT	NT	NT	1,400	9,771	18,849	7,678
	SE	12	140	0.016	0.023	0.57	0.08	8.00	0.50	0.005	2.80					5	10	3.4	2.5
Amico-CaOCHT	Average	66,880	15.3	2.93	1.20	ND	5.62	32.1	77.4	1.89	1,968	9.53	ND	ND	0.09	416	14.6	69,423	68,993
	SD	1,086	0.18	0.03	0.02		0.07	1.93	0.37	0.03	10.0	3.61			0.01	4.1	0.16	110	6,899
Amico-FeOCHT	Average	1,473	37,780	15.5	20.56	49.9	11.3	20.5	68.3	66.6	180	ND	ND	ND	ND	38,720	87.4	78,473	39,665
	SD	5	622	0.07	0.03	2.61	0.07	1.38	0.16	0.59	0.50				0.02	297	0.48	63	4,407
Amico-ZnOCHT	Average	540	132	19,200	1.307	ND	12.2	14.2	76.2	2.58	148	ND	ND	ND	0.08	26,170	9.65	33,387	7,208
	SD	3.1	0.50	315	0.025		0.06	0.97	0.25	0.002	1.10				0.002	112	0.14	2	801
Amico-CuOCHT	Average	535	78.3	1,160	47,280	ND	12.4	13.0	86.3	6.86	139	ND	ND	ND	ND	29,960	ND	31,991	2,031
	SD	1.7	0.42	4.00	690		0.08	0.73	0.13	0.02	0.80					75		1	254

Table 2. 키토산 기질화 유기태화 미네럴 제품별 제조특성 및 제품별 미네럴 함유량(확정)

순서	제품명	제조원료		제품(유기태화 소재별) 미네럴 함유량
		기질	무기태미네럴	
1	Ca-OCHT	키토산	CaCl ₂	10% 이상
2	Fe-OCHT	키토산	FeSO ₄	5% 이상
3	Zn-OCHT	키토산	ZnSO ₄	5% 이상
4	Cu-OCHT	키토산	CuSO ₄	5% 이상
5	Se-OCHT	키토산	Na ₂ SeO ₃	0.5% 이상
6	Mn-OCHT	키토산	MnSO ₄	5% 이상
7	K-OCHT	키토산	KCl	10% 이상
8	Mo-OCHT	키토산	MoNa ₂ O ₄	5% 이상
9	Mg-OCHT	키토산	MgSO ₄	5% 이상
10	Cr-OCHT	키토산	CrCl ₃	5% 이상
비고		식품첨가물류 및 사료첨가제		

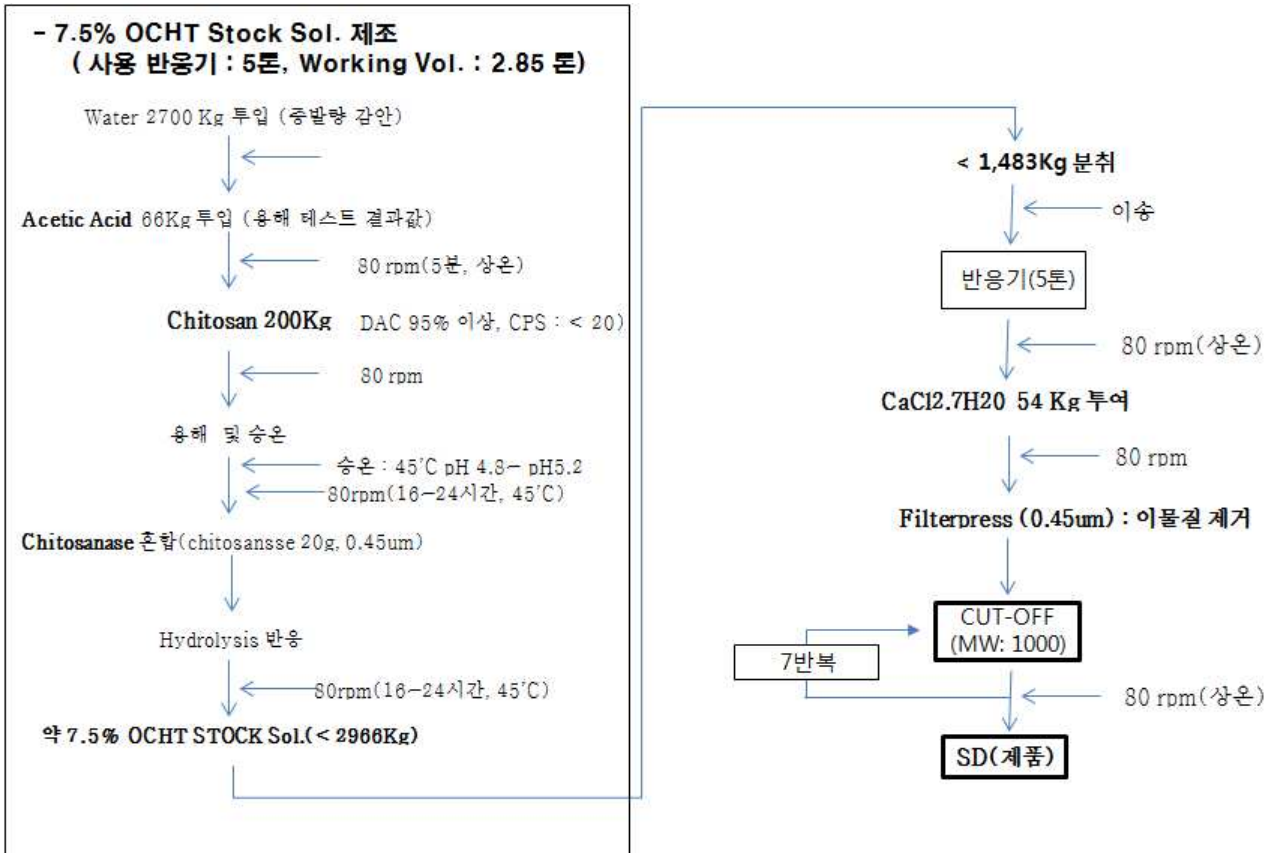


Fig 1. 중분자 키토산 올리고당을 기질로 하는 유기태화 칼슘 소재류 제조 Scheme(분말형)

-사용 반응기 : 20톤, Working Vol. : 80%

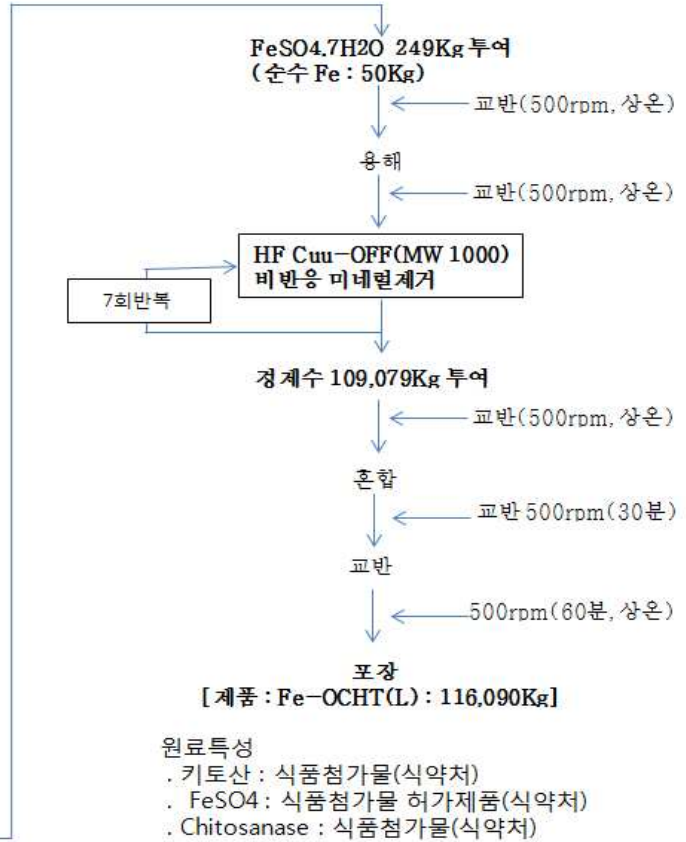
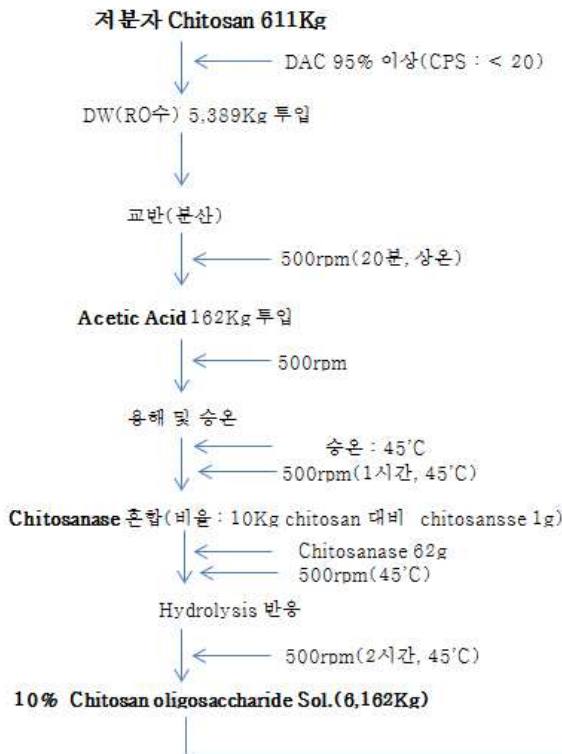
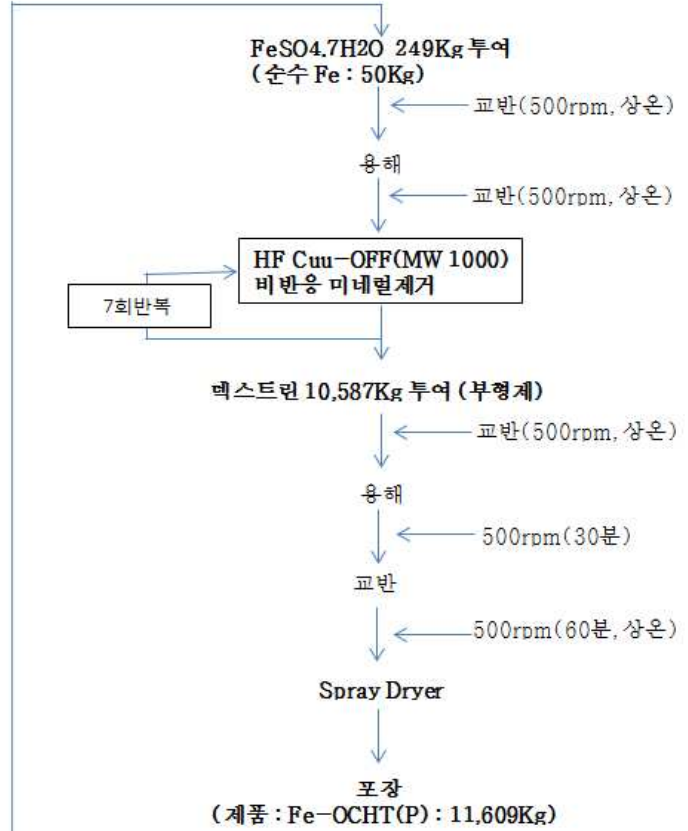
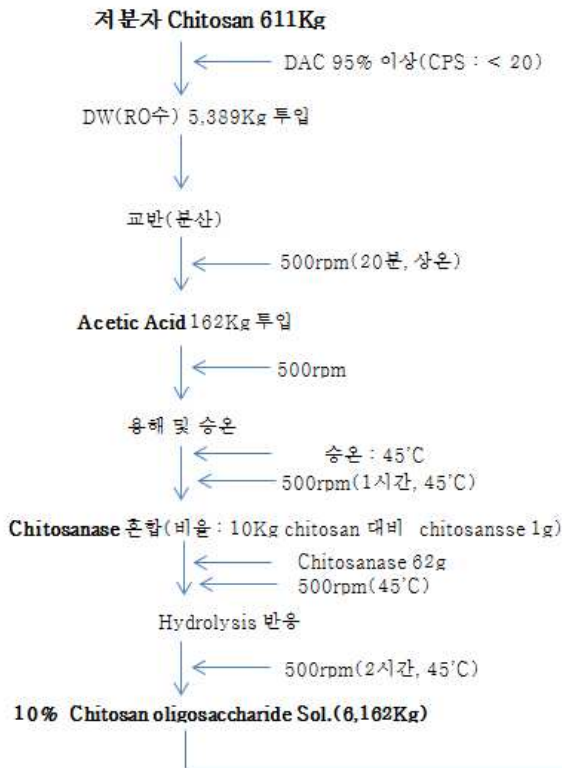


Fig 2 . 중분자 키토산 올리고당을 기질로 하는 유기태화 철 소재 제조 Scheme(액상형)

-사용 반응기 : 20톤, Working Vol. : 80%



- 원료특성
- . 키토산 : 식품첨가물(식약처)
 - . FeSO4 : 식품첨가물 허가제품(식약처)
 - . Chitosanase : 식품첨가물(식약처)

Fig 3 . 중분자 키토산 올리고당을 기질로 하는 유기태화 철 소재 제조 Scheme(분말형)

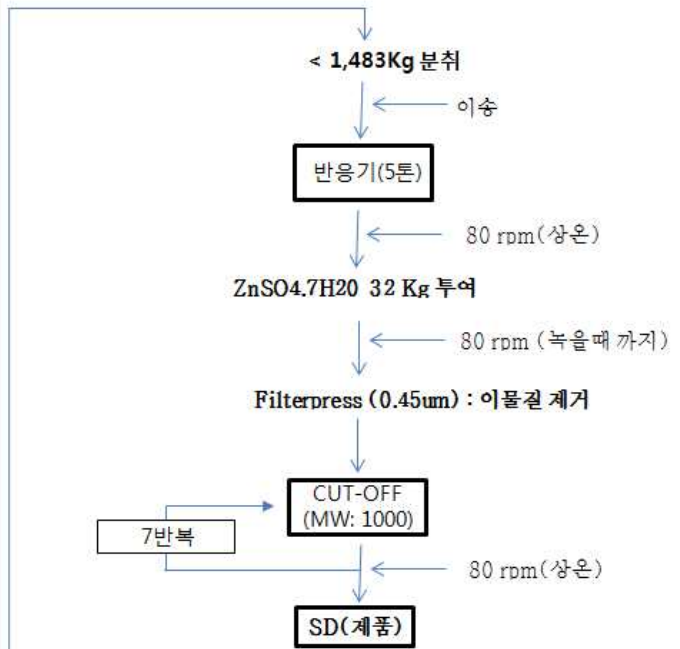
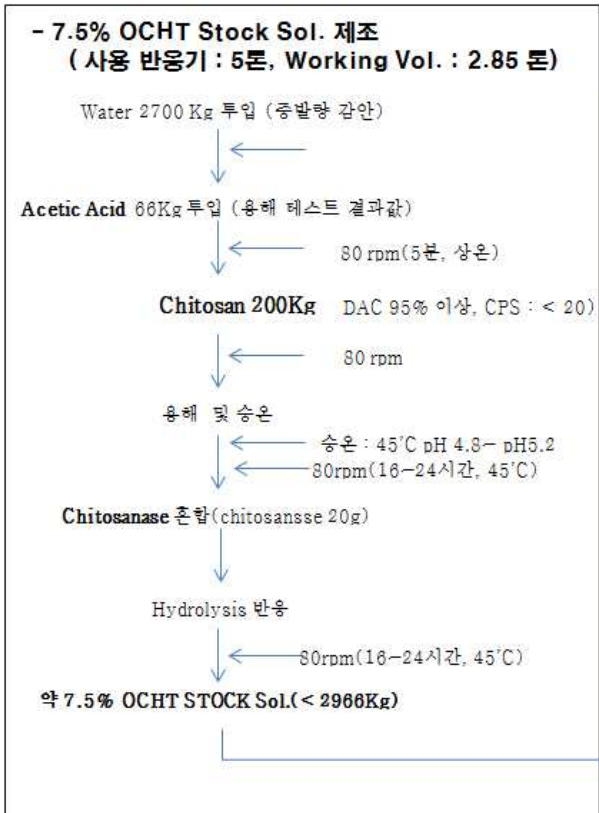


Fig 4. 중분자 키토산 올리고당을 기질로 하는 유기태화 아연 소재류 제조 Scheme (분말형)

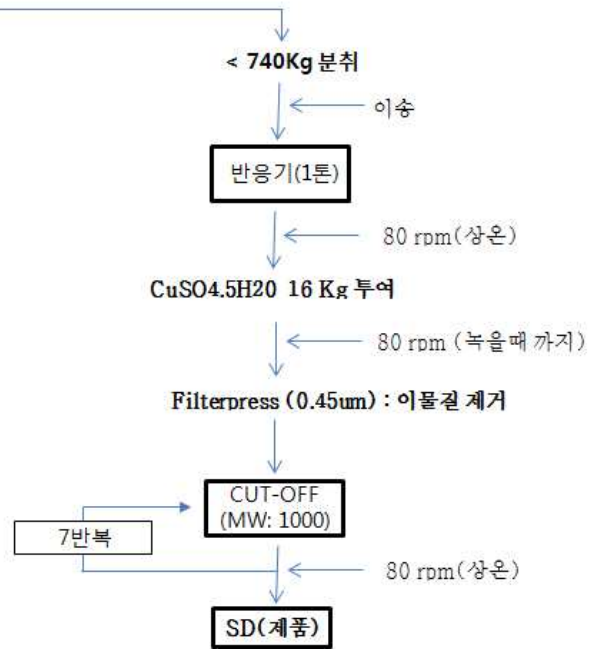
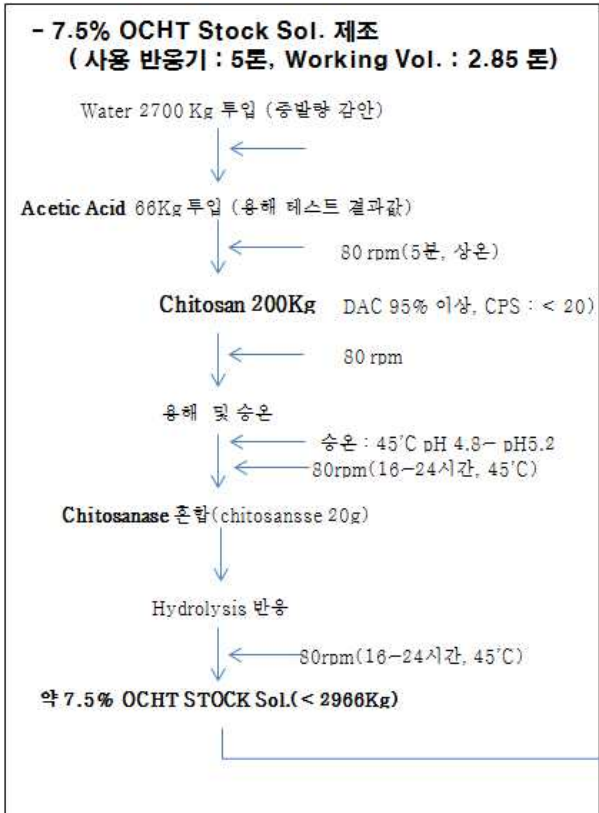


Fig 5. 중분자 키토산 올리고당을 기질로 하는 유기태화 구리 소재류 제조 Scheme (분말형)

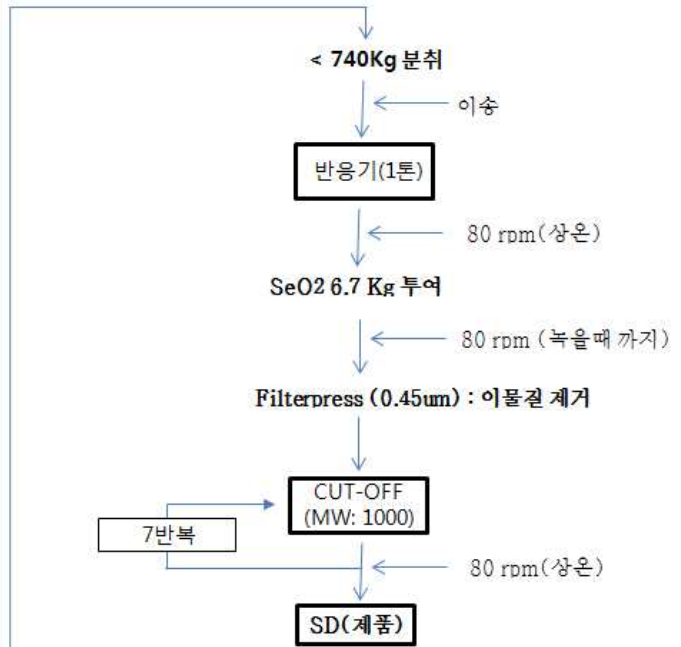
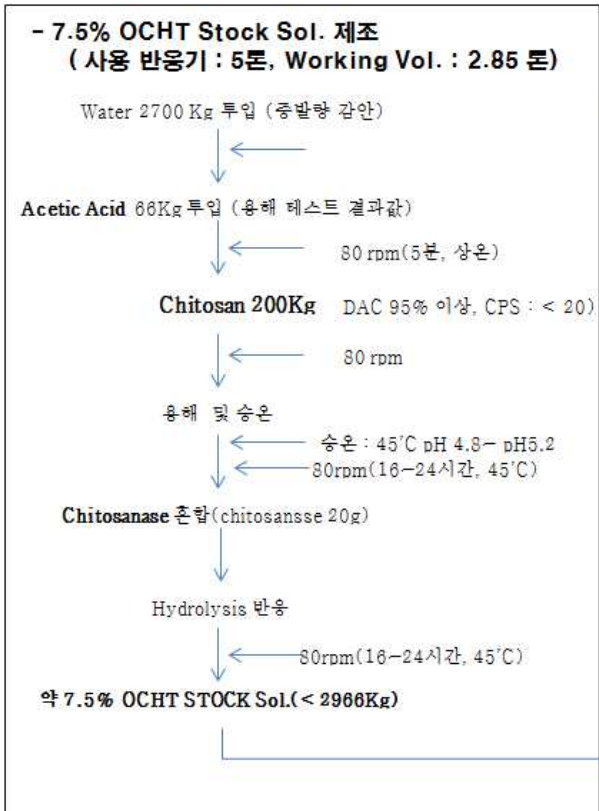


Fig 6. 중분자 키토산 올리고당을 기질로 하는 유기태화 셀레늄 소재류 제조 Scheme(분말형)

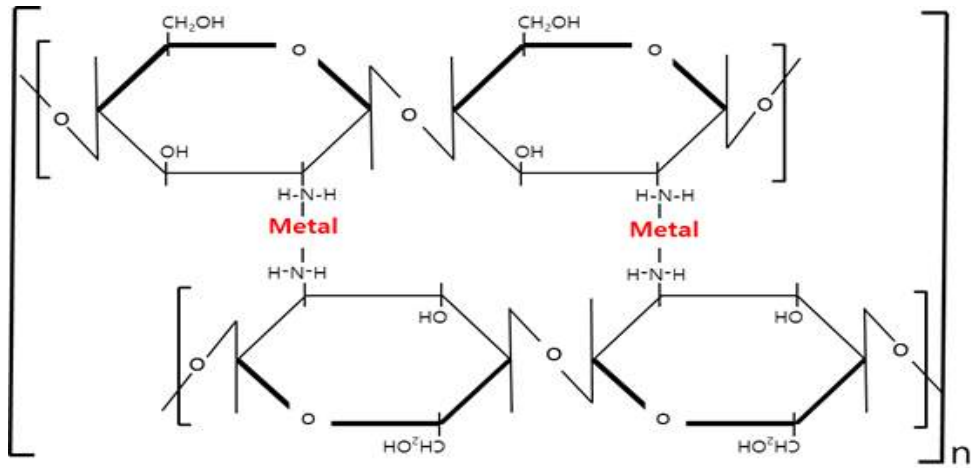


Fig 7. 키토산을 기질로하는 유기태 미네럴 소재류의 유기태 구조
 Compound: N-Deacetyl-Glucosamine
 Deacetylation Percentage : more than 98%
 Molecular Formular: $[(C_8H_{13}NO_5) - Metal - C_8H_{13}NO_5]_n$
 Physical Form : Powder(Water Soluble)



Fig 8 . 키토산 기질화 제조된 유기태 미네럴 소재류(제품 10종, 분말형)

2-1 절 핵산 기질화 유기태 미네랄 소재류 대량생산시스템 정립 [개발 촉매제적용, 외부간섭저항형(킬레이팅 및 생산수율 동시증대형) 유기태화 미네랄 소재류 개발용 촉매제 선발]

1. 연구목표

선행연구에서 선발된 유단백질(WPS)를 기준으로 미네랄류를 킬레이팅화 시키는 경우, 생산수율은 Se-WPS는 6%수준이었으며, 다른 4종의 유기태화 소재류의 경우는 10~13%의 낮은 생산수율을 보임으로서 현장제품화에 있어 경제성 비교에서 우수하다고 인정을 할 수 없었다. 현재 정립된 표준유기태화 미네랄 소재류 제조법을 적용하여 제품을 제조시 경제성 평가를 실험실 조건에서 핵심소재류의 사용량만을 고려하여 평가할 때, Ca-WPS는 1Kg당 약 34,000원, Fe-WPS는 약 74,000원, Cu-WPS는 약 240,000원, Zn-WPS는 약 300,000원 그리고 Se-WPS는 약 430,000원의 높은 생산가를 보였다.

실험실적 도출한 생산단가는 실험실 조건에서 핵심소재만의 사용량을 기준으로 평가한 것이므로, 실제적으로는 훨씬 높은 생산단가를 보일 것으로 판단되었다. 따라서, 현재 정립된 유기태화 미네랄 소재류의 표준제조법을 기본으로 적용하되 생산수율을 획기적으로 높힐수 있는 신기술 정립을 통하여 적어도 100배 이상의 생산단가를 낮출 필요가 있다.

본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위한 해결수단으로 미네랄 킬레이팅 능력을 증가시키면서 동시에 목표 유기태화 미네랄 소재류의 생산성을 획기적으로 증대시킬 수 있는 촉매제 및 관련 인자를 개발하고자 하였다. 또한, 본 연구에서 연구결과가 성공적으로 완료되었다 하더라도 사업화와 연계할 때, 동물 및 인간이 섭이시 독성을 유발하는 결과물의 경우는 전체연구의 취지와 맞지 않기 때문에, 이를 위한 촉매 소재류는 식품첨가물 공전에 등록된 소재류중 선발하고 이를 제품화 개발에 응용코져 본 연구를 실시하였다. 이를 해결하기 위한 시료는 식품공전에 등록된 천연 또는 합성 소재류중 핵산류를 촉매소재로 선발하여 이를 촉매소재로 사용코져 하였는데, 선발사유는 다음과 같다.

연구개발 목표설정을 위한 핵심소재로 선발한 핵산류는 “식품첨가제(식품공전 등재, 식약처)로 등재(인체 안전성 확보) 되어 있음과, 기 보고된 “핵산류의 다기능성(생장, 면역증진, 질병예방 등)” 관련 사전분석을 통하여, 선발소재가 연구개발 방향설정에 따라 그 용도용법 및 적용성 또한 무궁무진할 수 있음에 주목하였다.

본 과제의 성공과 직결되는 핵심요소로서, 선발 핵산류는 생체흡수와 직접 관련되는 “수용성과 분자량(MW : 500이하)” 을 보유하고 있음과, 더불어 무기미네랄 이온류에 대한 “킬레이팅 관련 핵심 기능기(-P, -NH₂)” 를 다량함유하고 있음에 크게 주목하고, 선행 미네랄과 핵산류별 킬레이팅 능력을 평가하여 보았더니 역시 그 가능성이 충분함을 사전 파악하였다.

본 과제에서는 무기태 이온류를 단순혼합하여 산업현장에서 사용하는 무기태 미네랄류 및 외부환경 불안전형 아미네이트형 유기태화 소재류 등의 단점을 해소하고 이들을 대체 할 수 있는 미네랄 소재류를 개발함에 이를 핵산을 촉매로 적용 신규제품을 개발 하고 저 하였다.

2. 연구방법

식품첨가물로 등재된 핵산 4종을 구입(CJ, 한국)준비하여 이를 사용하였는데, 이노신-5'-모노포스페이트(IMP), 구아닌-5'-모노포스페이트(GMP), 시틸딜산 모노포스페이트(CMP) 및 아데닌-5'-모노포스페이트(AMP)를 촉매제로서 선발시험에 사용하였다.

핵산류 촉매효능 평가는 킬레이팅 능력을 기본으로 하여 선발하였는데, 이를 위한 무기태화 미네랄류는 칼슘은 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 철분은 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 아연은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 구리는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 그리고 셀레늄은 Na_2SeO_3 를 소재류중 칼슘소재만을 우선 사용하였으며, 식품첨가물로 등록소재류에서 선발하였다. 촉매제로서 평가를 위한 실험조건은 다음과 같다.

우선 칼슘을 기준으로 단일 핵산처리구 4종과 4종 핵산류 전체첨가시험구 1종으로 총 5종의 시험구를 조성하였다. 단일 핵산처리구는 준비된 4종 핵산류(Ca-GMP, Ca-IMP, Ca-CMP, Ca-AMP)를 각각 5.0g씩 분취한 후 정제수 10g을 추가하여 용해시키는 공정을 진행한 후, 여기에 선발된 칼슘 5g을 추가적으로 혼합 및 재용해 처리한 후 이를 상온에서 1일이 방치시 유기태화 반응과 관련한 외관평가(침전, 용해, 응고, 부착, 겔화 현상)를 비교하였다.

전체핵산혼합처리구(Ca-Mixer)는 준비된 핵산류를 단일처리구와 동일량에 대하여 동시에 첨가하는 조건만을 다르게 하였으며, 기타 조건은 단일핵산류 처리구와 동일하게 진행하였다. 촉매제로서 선발을 위한 조건으로서는, 칼슘과의 반응이 종결되었음에도 겔화, 용해상태 유지, 부착 및 부유 현상이 심한 경우는 촉매선발 조건에서 제외하였으며, 다음으로 원심분리(3,000rpm, 20분, 상온)시 유기태화 반응에 따른 침전분리물에 대한 정제수를 이용 5회 세척 및 동결건조시 생산수율이 높으면서, 역시 첨가한 칼슘 기원성 킬레이팅 효율이 높은 시료를 최적의 촉매제로 선발 하였다. 또한, 전체시험구에 대하여 유기태화 반응유도후 상등액만을 별도로 분리후 칼슘과의 반응이 초기에는 유발되지 않는 핵산류가 있을 것을 대상으로 1일 경과후 부터 성장변화를 역시 조사하였다.

3. 연구결과

단일 및 다중 핵산류에 대하여 칼슘을 첨가시 초기에는 용해성이 매우 좋은 것으로 보였으나, 일정 시간이 경과하면 전체 핵산류는 칼슘과의 유기태화 반응으로 인하여 발열반응이 발생하는 경향을 보였다(표 1, 그림 1).

유기태화 반응에 따라 IMP와 GMP는 유사하게 침전, 부유, 부착 및 응고현상이 동시에 나타났으며, 나머지 AMP, CMP 및 전체핵산 혼합처리구는 대부분이 용해성을 그대로 보유하고 있는 경향을 보였다. 이러한 초기경향은 1일이 경과시도 유의한 차이를 보이지 않았는데, 상등액만을 분리하여 거치시킨 시험구중 CMP처리구가 점진적인 유기태화 반응이 유발되면서 겔화 현상이 발생하였다. 따라서, 전체 핵산류중 칼슘과의 유기태화 반응후 침전물만을 분리한후 동결건조시론에 대한 생산수율을 조사하여 보았더니, Ca-IMP는 69.6%, Ca-GMP는 74.1%, Ca-AMP는 81.48%, Ca-CMP는 1.2% 그리고 Ca-Mixer처리구는 1.6%의 생산수율을 나타내므로써 생산수율로만 본다면 가장 효과적인 유기태화 반응을 보인 핵산은 AMP였으며 그리고 IMP 다음으로 GMP의 순이었다. 그러나, 본 과제가 사업화에 주안점을 두고 연구개발을 진행함을 고려할 때, 현장생산시 신속한 반응을 요구받는다든 차원에서 보면 초기 액상상태에서 시간이 경과 후 겔화가 되는 AMP는 현장조건을 비충족함으로서 촉매선발에서 제외하였고, 최종 IMP와 GMP를 최적의 촉매류 후보군에 선발하였다.

4종 핵산류를 단일 및 다중 복합조건에서 첨가된 칼슘과의 유기태화 반응에 따른 생산

효율과 더불어 최적의 촉매를 선정하기 위한 킬레이팅 조건을 파악하여 보았다(표 2). 그 결과 AMP와 CMP는 칼슘의 킬레이팅 효능 거의 없음이 평가되었으며, IMP는 칼슘의 함유량이 81,569ppm, GMP는 84,498ppm이 검출되었는데, 가장 킬레이팅 효과가 높을 것으로 예상하였던 Ca-Mixer처리구는 43,393ppm이 검출되어 IMP와 GMP의 반수준의 킬레이팅 효능을 보유한 것으로 평가되었다.

결론적으로, 4종 핵산류에 대하여 칼슘이온만을 대상으로 유기태화 반응을 유도시 생산수율과 미네랄류에 대한 킬레이팅 능력까지 고려할 때 IMP와 GMP가 최적의 촉매제로서 선발되었다.

4. 추후진행사항

본 연구결과는 신규한 유기태화 소재 개발과 관련되므로 신속하게 특허출원을 진행 할 것이다. 또한, 연구결과에서 도출된 결과를 기준으로 유단백질 및 탄수화물을 기질로 제조되는 유기태화 소재류 개발에 접목하여 단점인 생산수율과 킬레이팅 능력을 더욱 보강 하면서 더불어 외부인자(pH)에 저항성을 갖도록 연구를 진행간 기초 자료로 적극 활용 예정이다.

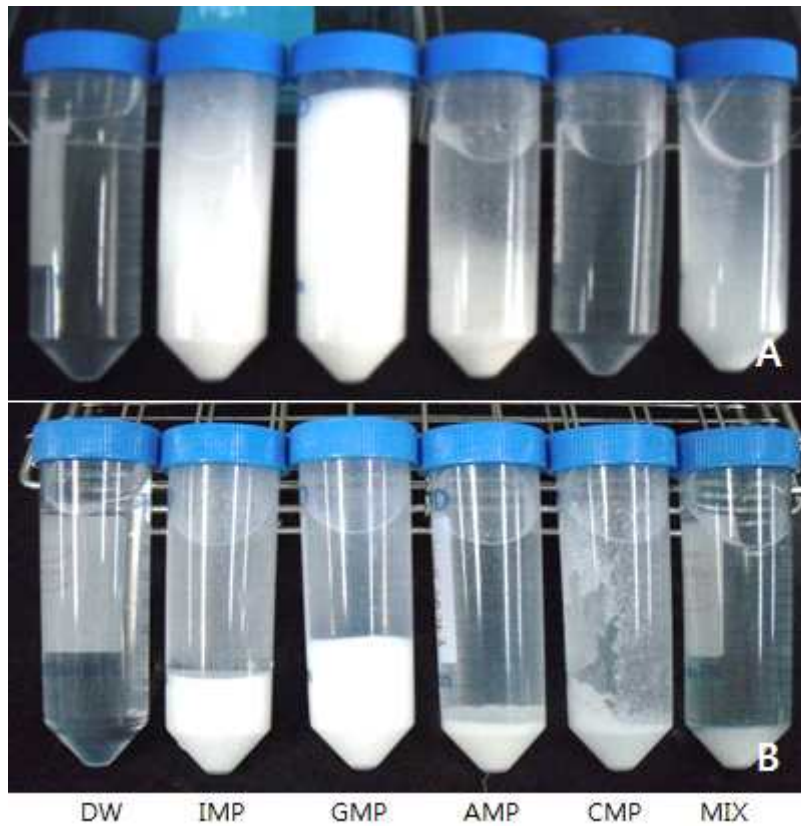


Fig 1 . 4종 핵산류(5g) 대비 칼슘(5g)과 정제수 10g을 기본 배합비율로 하여 유기태화 반응 유도시 성상 및 반응특성 조사결과
 A: 유기태화 반응후, B: 유기태화 반응후 원심과정 수행후(5차세척후)

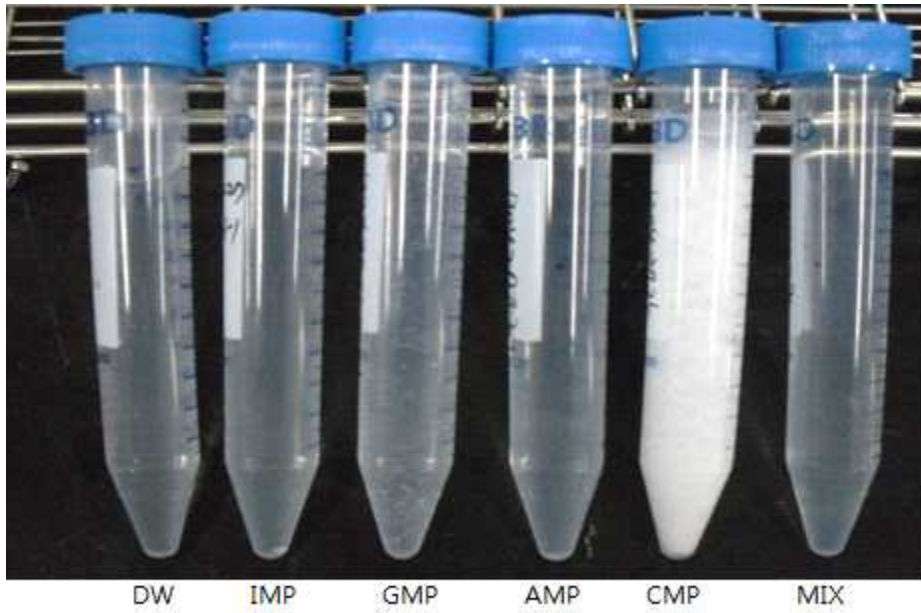


Fig 2. 4종 핵산류(5.0g) 대비 칼슘(5.0g)과 정제수 10g을 기본 배합비율로 하여 유기태화 반응 유도후 상등액의 시간경과시 성상변화 조사 결과
- 유기태화 반응및 원심수행후(상등액, 상온 24시간 경과시)

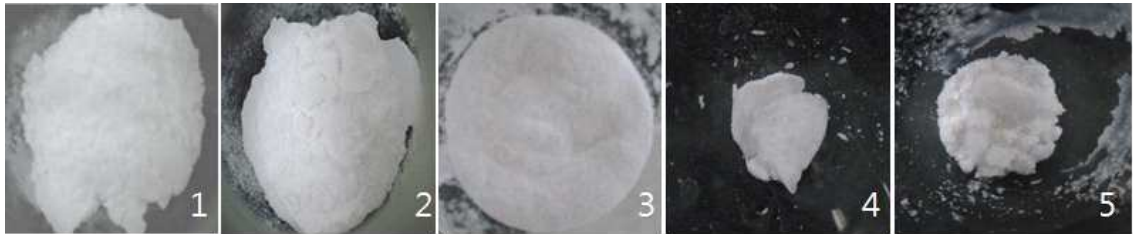


Fig 3. 4종 핵산류(5.0g) 대비 칼슘(5.0g)과 정제수 10g을 기본 배합비율로 하여 유기태화 반응물에 대한 FD후 성상

1: Ca-IMP, 2: Ca-GMP, 3: Ca-AMP, 4 : Ca-CMP, 5: Ca-Mixer

- 침전물 : 5차세척후 동결건조

Table 1. 4종 핵산류(5.0g) 대비 칼슘(5.0g)과 정제수 10g을 기본 배합비율로 하여 유기태화 반응 유도시 성상 및 반응특성 조사결과

평가항목		핵산류별 칼슘과의 유기태화 반응특성					비고
		IMP	GMP	AMP	CMP	MIX(4종)	
발열반응유발성		+++	+++	+	++	+++	
성상변화	응고	+++	+++	-	-	-	
	부착	+	++	-	-	-	
	침전	+	++	++	-	+	
	부유	++	+	-	-	-	
용해성		+++	+++	+++	+++	+++	
비고		+++ : 매우심함, ++:심함, +:초기발생, -:무반응					

Table 2. 4종 핵산류(5.0g) 대비 칼슘(5.0g)과 정제수 10g을 기본 배합비율로 하여 유기태 화 반응 유도시 미네랄 킬레이팅 효능평가 결과

Elem	IMP(5)+CaCl2(5)		GMP(5)+CaCl2(5)		AMP(5)+CaCl2(5)		CMP(5)+CaCl2(5)		MIX(5)+CaCl2(5)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Ca	81,569	1,208	84,498	592	78	53			43,393	387
Fe	4	0	12	0	9	0	7	0	20	0
Zn										
Cu										
Se	1	5	13	2			17	5	5	9
P	63,322	823	59,435	597	70,919	325	79,722	672	63,883	2,134
S										
Mn										
Mg	1.00	0.10	16.30	0.20					2.30	0.10
Pb					1	1				
Cd										
As	4	4	0	3						
Cr	3	0	3	0	4	0			3	0
Hg									23	6
Co	0.20	0.30	0.10	0.30						
Ba	3.90	0.10	3.60	0.10					5	0
Be										
Bi						1.00	3.70	12.00	0.70	2.40
Ga										
In	3.50	0.10							5.10	0.10
Na						1,647	53,988	99,317	77,874	68,224
Ni	1.00	0.40	1.20	0.60	0.20	0.10	2.10	1.10	0.70	0.10
Sr	95	8	53	8	4	3	28	68	92	21
Tl	2	2	4	8					2	2
U	4	3								
V										
비고							90% 이상 수용성			

2-2 절 핵산 기질화 유기태 미네랄 소재류 대량생산시스템 정립 [무기태 미네랄류(5종)대비 핵산류의 유기태화 패턴 평가]

1. 연구목표

선행연구에서 선발된 촉매제의 역할은 선행정립된 표준유기태화 제조법을 기준으로 선발 촉매제를 사용함에 따라 유단백질 및 탄수화물을 기질로 하여 제조되는 유기태화 미네랄 소재류의 생산수율과 동시에 목표 미네랄류의 킬레이팅 효율을 증대시키는데 있다.

선발된 핵산류는 선행연구를 통하여, 미네랄과 접촉시 강력한 유기태화 능력과 더불어 생산효율 또한 증대시키는 능력이 탁월함이 증명되었는데, 이외에도 이들이 보유하고 있는 -NH₂ 및 -P 의 기능성이 단백질류에 대한 킬레이팅 능력을 보유하고 있으리라 판단된다. 따라서, 본 연구에서는 우선 선발된 2종 핵산류(GMP, IMP)에 대하여 목표 미네랄류 5종 (Ca, Fe, Zn, Cu, Se)중 셀레늄을 제외한 4종의 미네랄류를 적용 제조된 단일 유기태화 소재(이하, IMP 기질 : M-IMP, GMP 기질 : M-GMP)와 4종 미네랄이 동시에 킬레이팅된 다중미네랄-핵산 유기태화 소재(이하, M-HAC) 소재류를 제조하므로서 신규한 유기태화 제조법을 정립함과 동시에 전체연구간 M-WPS 소재류(유청단백질 기질)의 단점인 생산수율과 미네랄 킬레이팅 효능을 증대 시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다.

2. 연구수행방법

가. 시료준비

본 연구에 유기태화 시료는 선행연구에서 선발된 핵산2종은 CJ제일제당(한국)에서 구입하여 이를 촉매제로 하여 미네랄-핵산 유기태화 소재류를 선행연구에서 제조하였고 이를 본 실험에서 기초 소재로 사용하였다.

전체시험간 적용시료는 선행연구(제 2 절)간 정립된 2종 핵산류에 대한 Ca-HAC제조방법을 기본으로 하여 시료제조한 후 를 전체시험에서 사용하였다.

나. 실험조성

1) 단일 핵산- 단일 미네랄 도입 유기태화 미네랄 소재 개발

GMP와 IMP를 기질로 하여 5종 미네랄을 각각 반응시킨 단일 미네랄-핵산 유기태화소재류와 동일기질에 대하여 전체 미네랄류를 동시 처리하는 다중 미네랄 킬레이팅 효능 평가군으로 대별하여 시험군을 준비하였다.

단일핵산-단일미네랄 유기태화 소재군으로서는 GMP촉매처리구는 Ca-GMP, Fe-GMP, Zn-GMP 및 Cu-GMP인 4종과 IMP촉매처리구는 Ca-IMP, Fe-IMP, Zn-IMP 과 Cu-IMP인 4종으로 총 8종을 대상으로 평가하였다.

2) 단일 핵산- 다중(5종) 미네랄 도입 유기태화 미네랄 소재 개발

본 연구는 선행결과에서 유청단백질을 기질로 하여 다중미네랄이 동시에 킬레이팅화 시켜 최종 다중미네랄류 함유된 유기태화 소재류 개발에 대한 검토를 실시한 결과에서 5종 무기태화 미네랄류(Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se)를 배합하는 조건으로 제조 결과, 5종중 Ca, Fe 및

Se만 킬레이팅 되는 결과를 확인 한 바 있어 유단백질과 킬레이팅 반응에서 이온경쟁성이 존재한다는 사실을 확인한 바 있다.

본 연구에서는 기질이 다른 핵산의 경우는 목표 미네럴류에 대한 이온경쟁성과 킬레이팅 효과의 차이가 존재하는 지를 평가하여 보고저 하였다.

다중 미네럴-핵산류(M-HAC)는 GMP(M-GHAC)와 IMP(M-IHAC)로 구분하여 여기에 미네럴류를 동시 배합하는 조건으로 유기태화 소재류를 제조하되 불용성 침전물(GMP 처리구 : MUS-GHAC, IMP처리구 : MUS-IHAC)과 반응액중 상등액만을 각각 분리하여 동결건조한 시료(GMP : MS-GHAC, IMP: MS-IHAC)로 구분하여 제조한 후 이를 전체 실험간 사용하였다.

본 연구에서는 단일기질인 핵산을 기준으로 단일 미네럴를 유기태화 반응을 유도하기 위하여 5종 미네럴류 이외에 2종을 추가하여 총 7종의 미네럴를 동시에 배합하였을 때 미네럴류의 킬레이팅 패턴 및 이온경쟁성이 존재하는지를 조사하여 보았다.

이를 위하여 사용된 미네럴류는 ZnSO₄·7H₂O(빅솔, 한국), MgSO₄(Sigma-Aldrich), KCl(Yakuri Pure Chemical), FeSO₄·7H₂O(Yakuri Pure Chemical), CuSO₄·5H₂O(Yakuri Pure Chemical), CaCl₂·2H₂O(Junsei), Na₂SeO₃(XinXianShi Qiyuan Food Additive Co.)이다.

기본 배합비율은 GMP 100g 대비 각 미네럴별 10씩을 분취 및 이를 배합하는 조성으로 하였다.

3. 결과 확인

선행 정립된 핵산류를 기질로 하는 유기태화 제조법을 적용하여, 핵산과 미네럴의 유기태화 반응간 성장평가를 우선 실시하였는데, 평가항목으로는 유기태화 반응후 침전, 응고, 부착, 부유, 겔화현상의 발생유무와 유기용해성 및 색상변화로 구분하여 평가하였는데, 매우 심한 경우는 +++, 심한경우는 ++, 보통은 + 그리고 이상이 없는 경우는 -로 구분하여 평가하였다.

선행 정립된 핵산류를 기질로 하는 유기태화 제조후 건조분말에 대하여, 원료 대비 생산량을 기준으로 생산수율을 조사함과 동시에 ICP분석을 통하여 검출되는 미네럴량을 비교하여 촉매로서 선발된 핵산류의 유기태화 소재 개발과 관련된 킬레이팅 증대와 생산수율 증대 효과를 동시에 평가하였다.

5. 연구결과

가. 단일 핵산- 단일 미네럴 도입 유기태화 미네럴 소재 개발

Fig 1은 미네럴-핵산 유기태화 소재류의 외부저항성평가를 위한 소재류의 개발을 위한 원료 및 제품의 성상이다.

Table 1은 선발 핵산류를 기질로 하여 목표 미네럴류를 유기태화 반응후의 성상 변화 및 최종 제조된 미네럴-핵산 유기태화 소재류의 생산효율을 평가한 결과이다.

결과로서, 대조로서 GMP와 IMP를 20%(w/w) 되게 정제수에 용해시 전체성상은 용해성이 뛰어나기 때문에 전체적인 성상은 무색의 용해성을 보였다.

이를 기준으로 촉매제로서 그리고 유기태화 개발을 위한 기질 소재로서 선발을 위하여서는

미네랄과 접촉시 킬레이팅화 되면서 불용성의 침전물의 성상을 보이는 경우가 본 연구에서 선발하려는 미네랄 킬레이팅형 촉매제의 선발조건인데, 이를 기본적으로 충족시키는 핵산류는 Ca, Fe, Cu, Zn의 경우는 GMP와 IMP 두종류가 공히 선발조건을 통과하였으나, 셀레늄의 경우는 침전성을 보이지 않아 촉매제 및 유기태화 기질 소재로서 선발조건에서 제외되었다(그림 2~5).

미네랄과 접촉시 킬레이팅화 되면서 불용성의 침전물의 성상을 보이는 경우가 본 연구에서 선발하려는 미네랄 킬레이팅형 촉매제의 선발조건인데, 이를 기본적으로 충족시키는 핵산류는 Ca, Fe, Cu 및 Zn의 경우는 GMP와 IMP 두종류가 공히 선발조건을 통과하였으나, 셀레늄의 경우는 침전성을 보이지 않아 촉매제 및 유기태화 기질 소재로서 선발조건에서 제외되었다.

또 다른 선발조건은 생산수율이 높아야 하는데 이를 고려하면 Cu-IMP처리구는 생산효율이 약 60%이내를 보여 역시 제외하였는데, 나머지 처리구는 최저 95%에서 최대 133%의 범위를 보였다.

결과적으로, 셀레늄을 제외한 전체 미네랄류를 대상으로 생산효율과 침전성(소재개발 핵심)을 동시에 충족시키는 핵산류의 기능성을 특성을 파악되었으며, 전체 목적에 부합되는 촉매제로서 적합성을 보유하고 있는 것으로 최종 평가 되었다.

Table 2는 유청단백질을 기질로 하는 유기태화 소재류 개발시 단점(저생산효율) 해결과 동시에 목표 미네랄류를 단일 혹은 동시에 증가시킬 수 있는 촉매제 개발에 앞서, 우선 선발 핵산류를 기질로 하여 제조된 미네랄-핵산 유기태화 소재류내 미네랄 함유량 조사를 통하여 이중 미네랄 함유량을 증가시킬 수 있는지를 사전 평가하였다.

결과로서, 대조인 GMP와 IMP가 고유하게 보유하고 있는 칼슘 함유량을 살펴 보았더니, GMP만 36ppm으로 미미한 수준으로 검출되었으며, 철분은 2.82 및 5.92ppm이 검출되었는데, 아연, 구리 및 셀레늄은 검출되지 않았다(표 1).

이를 기준으로 Ca-GMP는 62,000ppm 그리고 IMP는 58,000ppm수준의 킬레이팅 효능을 보임으로서 유기태화 반응과 더불어 킬레이터로서 우수한 소재임을 확인 하였다.

Fe-GMP내 철분 함유량은 36,720ppm 그리고 IMP는 42,430ppm, Zn-GMP 및 Zn-IMP시험구내 아연의 분포량은 11,000ppm의 결과를 보였는데, Cu-HAC시험구는 전체가 100,000ppm을 상회하는 킬레이팅 능력을 보였다. 따라서, 첨가된 미네랄량의 수량을 조절하는 경우 보다 높은 수율의 유기태화가 가능할 것으로 평가되었다.

선행연구에서 언급하였듯이 핵산의 고유구조를 살펴보면 -P와 -NH₂, -S의 기능기를 보유하고 있는데 이들이 단일 또는 복합적으로 미네랄 등에 대한 킬레이팅 능력을 발휘 할 것이라 예측되어, 분석간 -P와 -S의 함량 변화를 대조 대비 비교하여 보았더니, IMP내 -P는 50,000ppm 그리고 -S는 5.47ppm의 분포를 보였는데, GMP는 -P가 51,000ppm만 검출되었을 뿐 -S는 검출되지 않았다.

이를 기준으로 우선 Ca-HAC소재류의 -P와 -S의 함유량을 조사하여 보았더니 -S는 검출량이 미미하였으나, -P는 Ca-GMP시험구에서 약 41,000ppm이 검출되었는데 이때 유기태화 결과는 61,900ppm의 결과를 보였으며, Ca-IMP 시험구에서는 50,980ppm범위의 P함량 대비 57,420ppm에 해당되게 킬레이팅 능력을 보였임으로서 핵산이 고유하게 보유하고 있는 기능기중 -P만을 검출한 결과를 보면 미네랄류는 -P 기능기에 킬레이팅 되는 것으로 평가되었으며, -NH₂기능기가 보완하는 것으로 예측되었다.

Ca-HAC 소재류를 기준으로 미네랄 킬레이팅 관련 기능기를 확인 한 결과를 다른 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 결과와 비교하여 보았더니, Ca-GMP 및 IMP와 동일한 경향을 보였다.

2종 핵산을 기준으로 4종 미네랄-핵산 유기태화 소재류를 제조하고 유기태화 패턴을 조사 한 결과, 핵산의 기본 화학식 및 구조가 유사함에 따라 킬레이팅 효능 또한 거의 유사하였고 관련 킬레이팅 기능기 및 이들의 역할 또한 유사 한 것으로 평가되었음에 따라 이 결과를 기초로 유기태화 미네랄 소재류 개발과 촉매제로서의 역할은 적절히 수행 할 것으로 평가 되었다.

따라서, 미네랄 킬레이팅 효과 이외에 생산수율에 미치는 연구를 전체과제내에서 수행함으로써 촉매제로서 이용성을 극대화 할 것이고 신규 유기태화 제조법정립 및 지적소유권 확보를 통하여 국내외 기실선점과 산업화에 있어 우위를 점유 할 수 있도록 진행할 예정이다.

나. 단일 핵산- 다중(7종) 미네랄 도입 유기태화 미네랄 소재 개발

유기태화 소재류의 생산 및 이의 산업화를 위한 조건은 생산수율과 작업의 편리성이 무엇보다 중요한 항목일 수 밖에 없다. 이를 확인하기 위하여, 우선 7종 미네랄류를 동시에 선발 핵산류에 배합처리하는 조건에서 유기태화 소재인 침전물의 생산수율을 비교하여 보았더니, GMP를 기질로 제조된 M-GHAC소재류는 생산수율은 158% 그리고 IMP를 기질로 사용한 M-IHAC는 162%의 생산수율을 나타내어 유사한 결과를 보였다(표 4, 그림 6~8).

다중 미네랄이 유기태화 되어 형성된 불용성 침전물은 유기태화 반응에 따른 일체의 불필요한 성상이 관찰되지 않았으며, 침전현상만이 뚜렷히 관찰 되었다. 따라서, 생산수율의 평가기준이 기질로 사용된 핵산량 대비 결과이므로 상식적으로 평가해도 미네랄류가 약 60%로 높게 킬레이팅 되어 유기태화 반응이 완료되었음을 예측 할 수 있었다.

이러한 결과는 단일 기질 대비 단일 미네랄을 유기태화 시켰을 때의 90~130% 범위와 비교할 때 1.2배에서 1.8배의 증가수치를 보이는 것으로 평가되었다.

Table 3은 단일 기질 대비 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 핵산소재류의 미네랄 킬레이팅 효능 및 이온경쟁성여부를 평가한 결과이다(그림 6~8).

우선 7종 미네랄에 대한 킬레이팅량을 침전물 기준으로 비교하여 보았더니, 핵산류에 구애를 받지 않는 미네랄류는 칼슘, 철분, 셀레늄의 경우였으며, 칼슘의 경우는 9,400~10,000ppm, 철분은 약 13,000~16,000ppm 그리고 셀레늄의 경우는 32,000~34,000ppm의 범위를 보였다.

GMP가 유기태화 효율에서 우수한 경우는 아연, 칼륨 및 마그네슘 3종이었으며, 아연의 경우는 GMP는 약 11,000ppm을 나타내었는데 반하여 IMP는 약 3,600ppm으로 GMP 대비 67% 수준의 킬레이팅 효율을 보였고, 칼륨은 12,000ppm 대비 IMP는 약 2,800ppm으로 77%, 마그네슘은 GMP가 약 5,700ppm이었는데 IMP는 2,800ppm으로 유사한 저감수치를 보였다.

이중 IMP가 GMP보다 유기태화에 유리한 경우는 단지 구리였으며, GMP는 23,000ppm 그리고 IMP는 35,000ppm의 유기태화 효율 차이를 보였다.

핵산을 유기태화 반응 후 침전물을 분리하고 상등액만을 동결건조시켜 제조한 시료를 다시 일정계수를 이용하여 용해성 평가를 진행하였더니 용해성은 우수한 것으로 평가되었다(vy 4, 그림 8).

상등액 건조물내에 검출된 미네랄량을 조사하여 보았더니, GMP처리구에서는 첨가된 이온류중 구리와 아연 구리는 검출량이 20~240ppm만이 검출됨으로서 유기태화 반응시 우선 순위를 점유하는 것으로 잠정 평가되었으며, 다음으로는 칼슘과 셀레늄 마그네슘 그리고 칼륨의 순서인 것으로 판단되었다(표 4). 이러한 경향은 GMP 처리구에 비하여 다소 높은 결과치를 보였지만, IMP의 경우에서도 유사한 경향을 보였으므로 현재 제조법으로 제조시 첨가된 미네랄량이 다중 미네랄을 킬레이팅화시 기질 대비 가장 적정량인 것으로 평가 되었다. 이러한 결과는, 유청단백질을 기질로 다중 미네랄을 킬레이팅시는 이온경쟁성이 명확하게 구분되었는데, 핵산류는 유청단백질에 비하여 이온경쟁성이 거의없는 것으로 평가되었다.

결론적으로, 핵산을 기질로 하는 단일 기질내 다중 미네랄이 동시에 킬레이팅 및 유기태화시키는 신규 유기태화 제조법이 완료되었으며, 본 과제 관련 촉매제로서 우수한 소재임이 증명되었다.

6. 결론

가. 우선 핵산을 이용한 신규한 미네랄-핵산 유기태화 소재류 제조관련 제조법 개발이 완료되었다.

나. 전체 미네랄-핵산 유기태화 소재류를 대상으로 안전성 및 외부환경저항 효과를 10일이 경과시 확인결과, pH 2~10범위에서 대부분 안정한 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 핵산을 촉매제로 사용시, M-WPS소재류의 단점인 생산수율과 미네랄 킬레이팅 효능을 보다 더 증가시킬수 있을 것으로 판단되었는데, 이는 핵산이 고유적으로 보유하고 있는 -NAH₂ 기능기는 유단백질에 대하여여 응집효과가 있을 것으로 판단되었기 때문이다. 미네랄 킬레이팅 효능을 증가시킬 수 있음은 사전 M-WPS제조시 1차적으로유청단백질내 킬레이팅 된 결과 이외에 핵산이 보유하고 있는 -P기능기가 미잉여 미네랄류를 2차적으로 킬레이팅화 함으로서 증대시키는 효과가 보다 높은 것으로 평가되었다.

다. 따라서, 핵산은 유청단백질을 포함한 단백질류를 기질로 하는 유기태화 소재류 개발시 생산효율과 미네랄 킬레이팅 효능을 단일 또는 동시에 증가시키는 우수한 소재로 평가되었다.

7. 추후진행사항

제조한 10종을 유기태화 핵산류중 셀레늄의 경우는 유기태화 반응 후 액상상태의 패턴을 보여 핵산류는 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 증대형 촉매제로서 적용이 적절하지 않는 것으로 판단되었기 때문에 별도의 기질 선발과 동일 목적의 유기태화 핵산류 제조기법을 본 전체과제에서 별도로 정립할 것이다. 4종 미네랄 대상으로 유기태화 특성을 파악한 결과, 매우 우수한 성능을 보유한 것으로 조사되었는데 이용성에 대한 적극적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다. 4종 미네랄을 대상으로 기존 표준정립법에 따른 저생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효능 증대를 위한 촉매제로서 4종 핵산류중 2종이 선발 및 이들의 관련 특성파악 결과를 기초로 본 과제에서는 사료첨가제 개발에 있어 보조제로서 사용연구가 완료되었지만 추후 용도용법 및 적용성 확대를 위한 산업화 연구에서 적극 활용할 것이다.

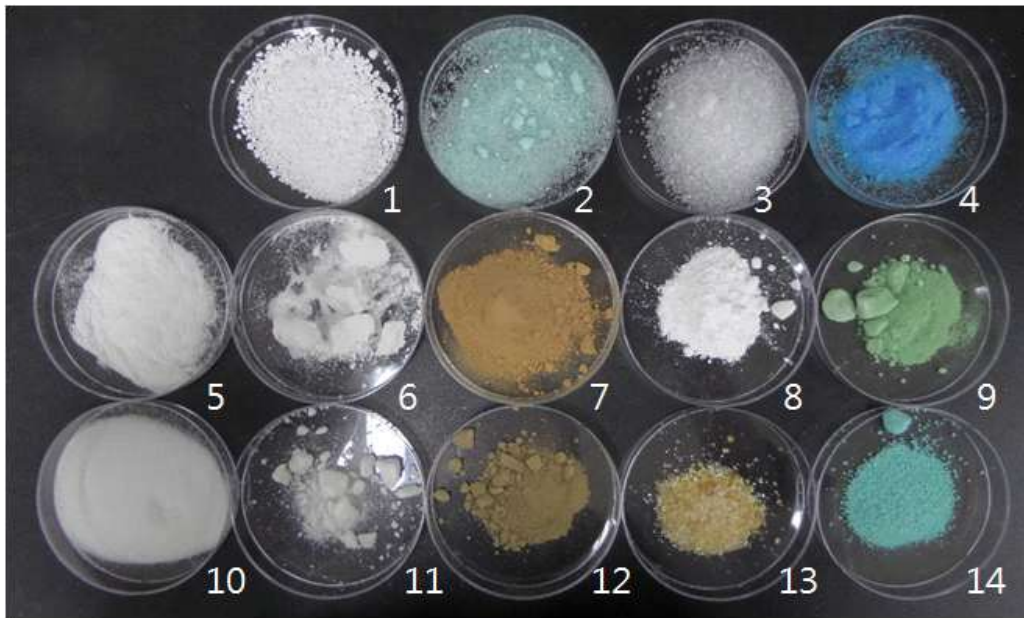


Fig 1 . 핵산류를 촉매로 하는 유기태화 미네랄 소재류 개발 결과

1: CaCl₂, 2: FeSO₄, 3:ZnSO₄, 4: CuSO₄, 5: GMP, 6: Ca-GMP, 7: Fe-GMP, 8:Zn-GMP, 9:Cu-GMP, 10 IMP, 11 : Ca-IMP, 12:Fe-IMP, 13:Zn-IMP, 14:Cu-IMP

Table 1. 선발 핵산류를 기질로 하여 유기태화 반응후의 성장 변화 및 최종 제조된 미네랄-핵산 유기태화 소재류 생산효율 평가 결과

시험구	성장 평가(원심전/원심후)							침전물 용해성 및 수율			결과
	침전	응고	부착	부유	겔화	용해성	색상	비건조무게 (g)	건조무게 (g)	생산수율 (%)	
20%GMP	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	투명	-	-	-	
20%IMP	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	투명	-	-	-	
Ca-GMP	-/>+++	+/>-	+/>-	+/>-	+/>-	-/>-	W/W	16.93	5.74	114.8	채택
Fe-GMP	-/>+++	+++/>-	+/>-	-/>-	-/>-	-/>-	썩색/썩색	30.80	6.60	132.0	채택
Se-GMP	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	+++/>-	투명/투명	용해	-	비침전	채택
Cu-GMP	+++/>+++	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	B/하늘색	12.60	5.20	103.9	채택
Zn-GMP	+++/>+++	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	W/W	17.97	5.34	107.3	채택
Ca-IMP	+++/>+++	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	W/W	11.88	4.85	97.0	채택
Fe-IMP	+++/>+++	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	B/썩색	13.45	4.76	95.2	채택
Se-IMP	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	+++/>-	투명/투명	용해	-	비침전	채택
Cu-IMP	+++/>+++	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	-/>-	Blue/비취	8.385	2.96	59.2	
Zn-IMP	-/>+++	+/>-	+/>-	+/>-	+/>-	-/>-	W/W	21.0	5.25	105	채택
비고	생산수율 : 반응물(침전물)의 열풍건조(80°C, 4일)후 무게조사 및 결과조사(기질 핵산 대비 생산수율 조사)										

Table 2. 선발 핵산류를 기질로 하여 제조된 미네랄-핵산 유기태화 소재류내 미네랄 함유량 조사 결과

시험구		미네랄 킬레이팅 효능 평가(ppm)															합계(ppm)		결과	
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	As	Cd	Hg	Pb	PS+		PS-
IMP(대조)	Mean	36	2.82	ND	ND	ND	100	48	1.28	54,030	0.02	50,180	5.47	ND	ND	ND	0.23	104,403	54,218	
	SD	1	0.02				2	0.60	0.01	377	0.04	226	0.44				0.07			
GMP(대조)	Mean	ND	5.92	ND	ND	ND	25	3.90	0.35	54,320	0.16	51,420		ND		ND	0.36	105,776	54,356	
	SD		0.04				2	0.02	0.00	272	0.03	154		0.01		0.06				
Ca-GMP	Mean	61,980	11	ND	ND	1.31	58.0	47.2	0.38	29,720	ND	41,170	31.9	ND	0.02	ND	0.66	132,985	91,783	재택
	SD	355	0.05			0.47	8.28	0.54	0.01	82		95	1.00	ND	0.01		0.12			
Ca-IMP	Mean	57,420	12.7	ND	ND	0.85	48.0	44.3	1.12	15,340	ND	50,980	43.7		0.03	ND	0.61	123,891	72,868	비재택
	SD	335	0.03			0.05	2.62	0.46	0.09	47		116	0.09		0.003		0.14			
Fe-GMP	Mean	ND	36,720	4.06	12.1	ND	10	2.01	40.2	10,120	9.33	47,160	18,230	ND	2.99	ND	146	112,457	47,067	재택
	SD		101	0.03	0.24		0.01	0.19	0.19	10	0.08	25	8		0.02		0.80			
Fe-IMP	Mean	ND	42,430	3.52	8.48	ND	23	15	102	19,130	8.93	48,170	30,220	ND	2.99	ND	148	140,262	61,872	재택
	SD		370	0.02	0.09		0.04	0.25	0.50	57	0.04	8	34		0.01		1.90			
Cu-GMP	Mean	ND	29	1,208	102,300	ND	1	8.99	2.94	12,550	0.13	51,730	18,880	ND	0.13	ND	1.72	186,712	116,102	재택
	SD		4	6	133		0.02	0.25	0.02	59	0.05	222	80		0.01		0.14			
Cu-IMP	Mean	ND	41	1,452	109,500	22.5	12	16	3.34	15,290	0.07	48,320	26,800	ND	0.15	ND	2.07	201,459	126,339	재택
	SD		0.30	5	150	0.75	0.03	0.35	0.02	4.00	0.03	150	74		0.01		0.26			
Zn-GMP	Mean	ND	10	11,880	ND	ND	3	6.28	0.62	19,280	0.31	54,820	19,300	ND		ND	1.25	105,302	31,182	재택
	SD		0.51	110			0.02	0.18	0.01	101	0.03	84	35				0.47			
Zn-IMP	Mean	ND	6.16	11,360	63	ND	27	31	1.94	26,700	0.12	49,700	41,030	ND	0.01	ND	1.72	128,921	38,191	재택
	SD		0.38	29	0.34		0.15	0.20	0.01	95	0.07	64	25		0.00		0.13			
Se-GMP	Mean																			비재택
	SD																			
Se-IMP	Mean																			비재택
	SD																			

Table 3 . 단일 기질 대비 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 핵산소재류 제조간 성장 및 생산수
 율 조사결과

시험구	성장 평가(원심전/원심후)						침전물 용해성 및 수율			생산수율 (기질 핵산대비)
	침전	응고	부착	부유	겔화	색상	세척 회수	비건조(g)	건조무게(g)	
M-GHAC	-/+++	-/-	-/-	-/-	-/-	Y/Y	0	119.7 (침전물)	NT	
								41.16 (상등액)	2.49 (TS :6%, HD)	
							1	113 (침전물)	NT	158.3%
								181 (침전물)	52.2 (TS:29.0%, HD)	
2	5.76 (침전물)	1.618 (TS : 28.1%, HD)								
M-IHAC	-/+++	-/-	-/-	-/-	-/-	Y/Y	0	112 (침전물)	NT	
								38.9 (상등액)	2.813 (TS:7.23%, HD)	
							1	97.16 (침전물)	NT	161.7%
								158g (침전물)	53.4 (TS:33.72%,HD)	
2	5.96 (침전물)	2.01 (TS:33.7%, HD)								
비고	<ul style="list-style-type: none"> • M-GHAC 상층액 분리량 : 230ml • M-IHAC 상층액 분리량 : 230ml 									

Table 4 . 단일 기질 대비 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 핵산소재류의 미네랄 킬레이팅 효능 및 이온경쟁성 평가

시험구		개발 유기태화 미네랄 소재류내 미네랄 함유량 조사결과(ppm)												합계		결과	
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	PS+	PS-		
M-GHAC	상증액 건조물	Mean	3,345	24	240	214	3,373	38,740	4,348	2.21	55,900	0.01	60	39,320	145,567	106,187	
		SD	23	1.12	0.60	0.50	12	389	19	0.01	396	0.02	0.39	101	943	841	
	침전물 건조물	Mean	9,492	13,990	11,080	23,340	34,450	12,660	5,660	39.0	6,322	28.9	29,640	877	147,580	117,063	
		SD	43	42	28	151	51	102	17	0.11	15	0.06	72	4	525	449	
	합계	Mean	12,837	14,014	11,320	23,554	37,823	51,400	10,008	41	62,222	29	29,700	40,197	293,147	223,250	
		SD	14.1	28.9	19.4	106.4	27.6	202.9	1.4	0.1	269.4	0.0	50.6	68.6	295.6	277.2	
M-IHAC	상증액 건조물	Mean	5,048	29	1,110	806	11,810	64,920	9,801	9.20	82,460	ND	14,070	53,580	243,644	175,994	
		SD	4	0.14	4.00	2	28.0	306	13	0.04	266		37	81	741	623	
	침전물 건조물	Mean	10,590	16,080	3,550	33,590	32,920	5,484	2,782	46.9	11,700	36.38	28,860	4,119	159,759	126,780	
		SD	36	14	54	45	168	25	14	0.23	25	0.17	68	21	471	382	
	합계	Mean	15,638	16,109	4,660	34,396	44,730	70,404	12,583	56	94,160	36.38	42,930	57,699	403,403	302,774	
		SD	22.6	9.8	35.4	30.4	99.0	198.7	0.7	0.1	170.4	0.17	21.9	42.4	190.9	170.4	



Fig 2 . 핵산류(2 : GMP, 3 : IMP) 대비 무기태 칼슘(1)의 킬레이팅 반응후 유기태화 패턴 및 성상조사(A : 반응종료후, B : 유기태화 반응물에 대한 분리후 성상)



Fig 3 . 헥산류(2 : GMP, 3 : IMP) 대비 무기태 철(1)의 킬레이팅 반응후 유기태화 패턴 및 성상조사(A : 반응종료후, B : 유기태화 반응물에 대한 분리후 성상)

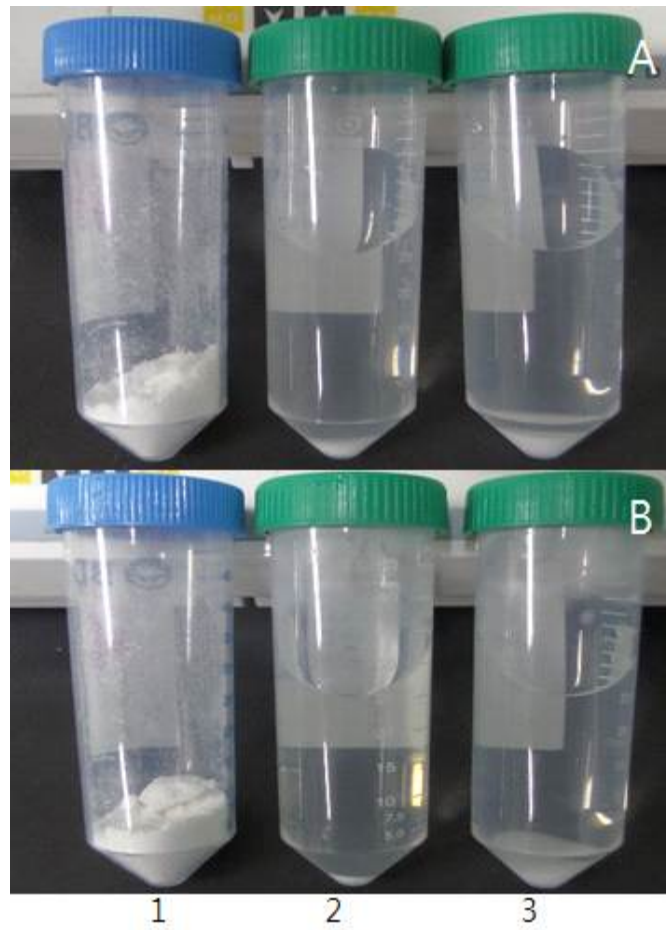


Fig 4 . 핵산류(2 : GMP, 3 : IMP) 대비 무기태 셀레늄(1)의 킬레이팅 반응후 유기태화 패턴 및 성장조사(A : 반응종료후, B : 유기태화 반응물에 대한 분리후 성장)

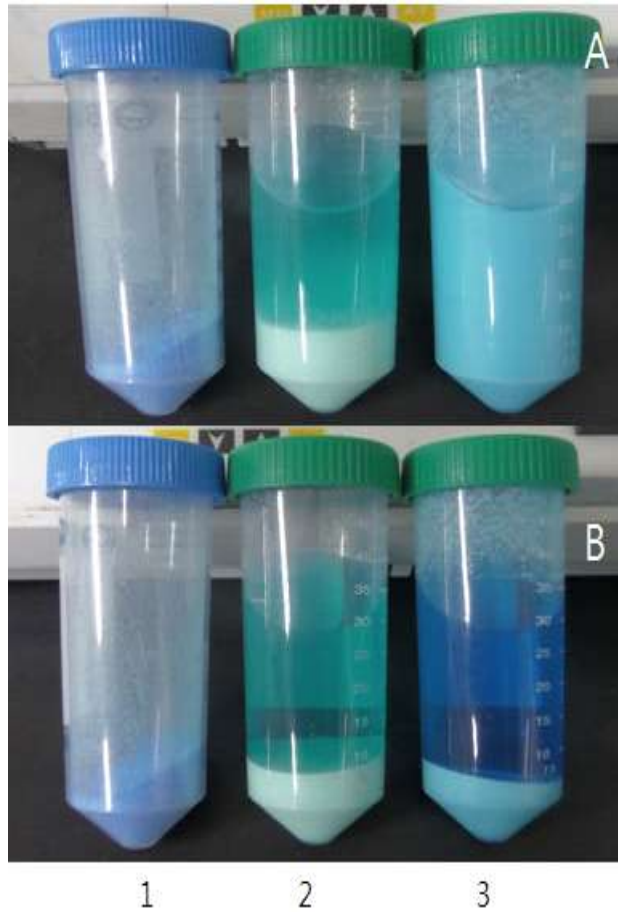


Fig 5 . 핵산류(2 : GMP, 3 : IMP) 대비 무기태 구리(1)의 킬레이팅 반응후 유기태화 패턴 및 성상조사(A : 반응종료후, B : 유기태화 반응물에 대한 분리후 성상)



Fig 6 . 헥산류(2 : GMP, 3 : IMP) 대비 무기태 아연(1)의 킬레이팅 반응후 유기태화 패턴 및 성상조사(A : 반응종료후, B : 유기태화 반응물에 대한 분리후 성상)

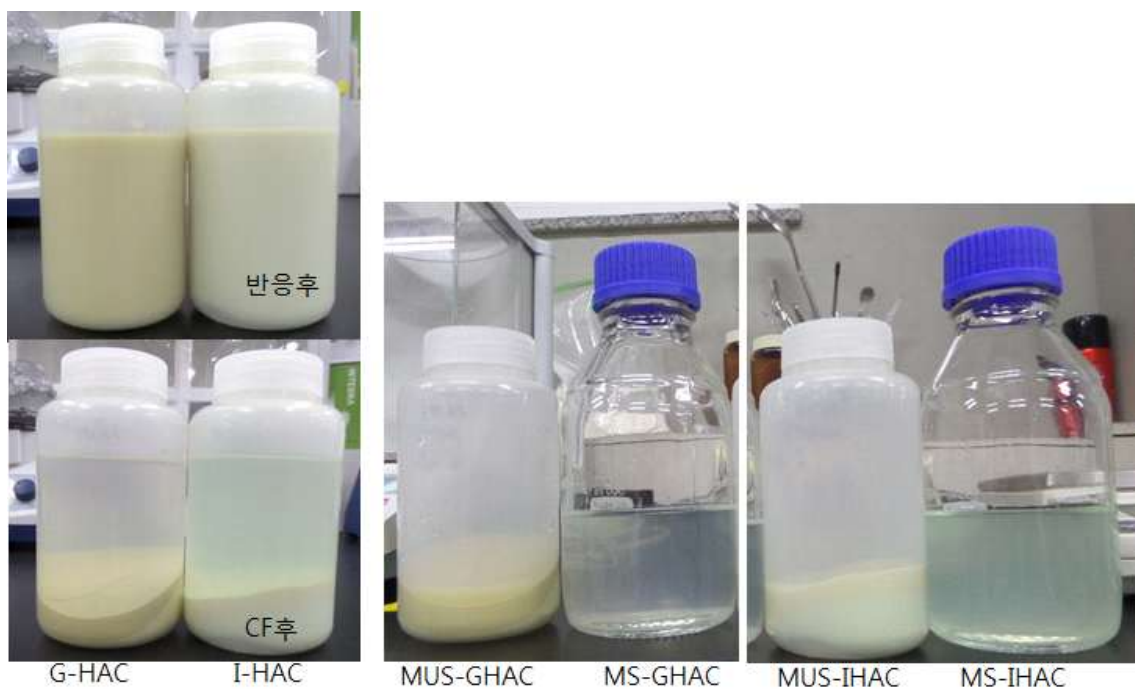


Fig 6. 다중 미네럴 대비 GMP 및 IMP를 기질로 하여 M-GHAC, M-IHAC제조 후 및 CF후 성장 비교

- MUS : unsoluble, multi-minerals chelation Material , MS : Soluble, multi-minerals chelation Material
- GHAC : GMP-Nuclear acids chelation Material, IHAC : IMP-Nuclear acids chelation Material

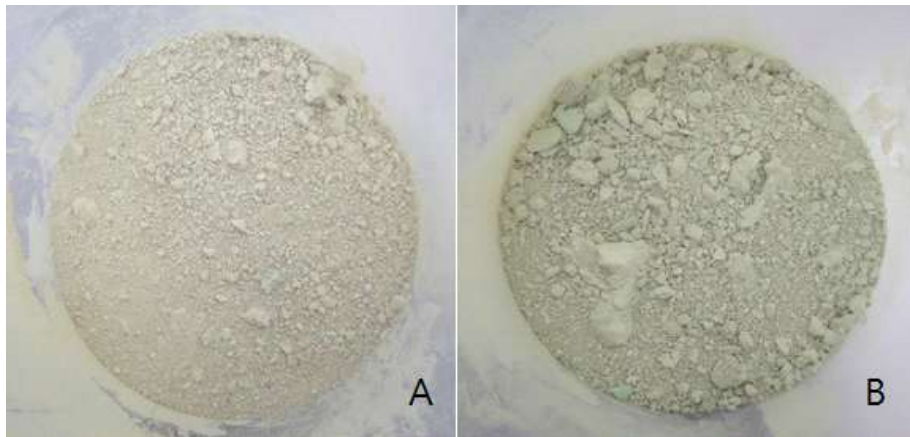


Fig 7. 다중 미네랄 대비 GMP 및 IMP를 기질로 하여 M-GHAC(A), M-IHAC(B) 성장(동결건조)

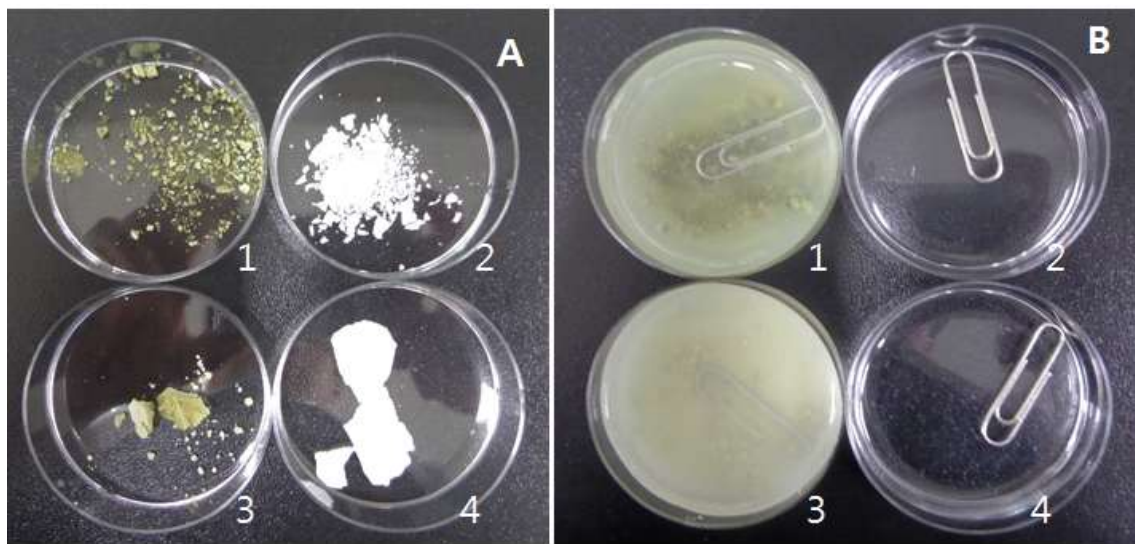


Fig 8. 다중 미네랄 대비 GMP 및 IMP를 이용한 수용성 및 불용성 유기태화 시료에 대한 용해성 평가 결과

A: 용해성 평가전 시료성상, B : 일반수 대비 용해성 평가결과

1 : GMP 기질 제조 불용성 유기태화 소재(침전물, 강제건조)

2 : GMP 기질 제조 수용성 유기태화 소재(상등액, 강제건조)

3 : IMP 기질 제조 불용성 유기태화 소재(침전물, 강제건조)

4 : IMP 기질 제조 수용성 유기태화 소재(상등액, 강제건조)

제 2-3 절 핵산 기질화 유기태 미네럴 소재류 대량생산시스템 정립 [표준규격화 대량생산시스템 확립]

1. 연구목적

본 연구는 유기태화 미네럴 소재류 개발과 이를 사료에 첨가한 미네럴 강화 사료를 제조한 후, 이를 공시동물인 산란계를 대상으로 장기간 섭이시 목표 기능성 축산물 생산 가능성과 더불어 신규하게 제조된 소재임에 따라 이들의 기초효능(산란율 증대성, 안전성, 항질병 등)을 평가 하고 저 하였다. 본 연구실시전 예비연구에서, 핵산을 기질로 하는 유기태화 소재류중 단일 미네럴만을 도입한 경우보다 2종의 미네럴이 도입되는 경우 목표 효능이 우수하다는 평가결과를 확보함에 따라, 일반적으로 가장 필요한 칼슘을 기본으로 여기에 이중 미네럴류를 1종씩 추가하는 방법으로 유기태화 미네럴 소재를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가에 사용하였다. 전체 실험방법 및 결과는 다음과 같다.

2. 연구수행방법

기능성 강화 축산물 생산을 위한 핵심 소재인 핵산 기질화 유기태화 미네럴 소재류의 종류별(6종) 제조는 다음과 같이 실시하였다.

유기태화 미네럴 소재류 제조 원료 준비

본 연구에서 사용한 유기태화 기질인 핵산은 유기태화 기질로는 식품첨가물로 인정되어 식품에 적용되고 있는 안전성이 확보된 핵산류중 예비 효용성 평가를 거쳐 선발된 GMP(5'-구아닐산이나트륨, 수용성)와 IMP(5'-이노신산이나트륨)를 대상하였다(Fig 1, Table 1). 유기태화시 미네럴류 도입은 칼슘을 기본으로 하되 여기에 이중 미네럴을 추가로 킬레이팅화한 유기태화 소재류를 제조였다. 유기태화 미네럴 소재류 제조를 위해 사용된 무기태화 미네럴류는 칼슘은 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 철분은 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 아연은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 구리는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 그리고 셀레늄은 Na_2SeO_3 를 유기태화 미네럴 소재류로 총 5종이 사용하였는데, 식품첨가물로 등록된 소재류에서 선발하여 사용하였다.

핵산기질화 유기태화 미네럴 소재류 제조

준비된 핵산류 및 무기태 미네럴을 원료로 하여 칼슘 단일 그리고 칼슘을 기본으로 추가 이중 미네럴을 킬레이팅화 한 유기태화 미네럴 소재류의 제조방법은 다음과 같다(Fig 2~12).

Ca-GHAC

유기태화 기질로는 GMP 그리고 유기태화 미네럴 소재로는 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 단일 소재로 사용하였으며, 단계별 유기태화 제조방법은 다음과 같다(Fig 2~3). 1 단계로는 기질 GMP 2.5 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 1의 비율로 혼합공정을 실시하였다. 2 단계에서는 온도를 17°C 로 조절한 정제수를 4L를 준비한 후, 이를 4단계에 걸쳐 소분 첨가과정을 통하여 유

기태화 미네랄 반응을 극대화 하였다. 3 단계는, 2단계 공정이 완료된 시점에서 분자량이 1,000인 UF시스템을 반복통과 시켜 미반응 핵산 혹은 미네랄을 제거하는 공정을 실시하였다. 4 단계는, 3단계 공정이 완료된 후 세척수를 투여하여 세척하는 단계를 진행하므로서 혹시 UF과정에서 제거되지 않은 미네랄을 제거공정을 추가로 실시하였다. 5 단계에서는, 4단계 공정이 완료된 상태에서 원심분리 과정을 실시하여 상등액을 제거하고 목표 침전물(Ca-GHAC)만을 분리 하였다. 6 단계에서는, 수거된 침전 물리물을 동결건조 하는 과정을 거쳐 최종 유기태화 미네랄 소재(Ca-GHAC)를 제조하였다. 7 단계에서는, 제조된 Ca-GHAC를 ICP분석을 실시하여 유기태화 효율 및 함유량을 확인하였다.

CaFe-GHAC

칼슘을 기본으로 함유하되 추가 미네랄로 철분 보강한 이중 유기태화 미네랄 소재류 단계별 제조방법 및 제조된 유기태화 소재류의 성상은 다음과 같다(Fig 4~5.). 1 단계로는 GMP 1 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 그리고 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 0.2 비율로 혼합공정을 실시 하였다. 2 단계에서는 온도를 17°C 로 조절한 정제수를 4L를 준비한 후, 이를 2단계에 걸쳐 소분 첨가과정을 통하여 유기태화 미네랄 반응을 유도한후 이를 상온에서 18시간을 추가 반응 시킴으로서 유기태화 반응을 종료하였다. 3 단계에서부터 분석단계인 마지막 7단계 공정은 Ca-GHAC 제조공정과 동일하게 실시하였다.

CaZn-GHAC

본 연구에서는 유기태화 기질로는 핵산중 GMP를 기준으로 여기에 칼슘을 기본으로 함유하되 추가 미네랄로 아연을 보강한 이중 유기태화 미네랄 소재류 단계별 제조방법 및 제조된 유기태화 소재류의 성상은 다음과 같다(Fig 6~7.). 1 단계로는 GMP 1 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 0.2 그리고 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,를 0.4 비율로 혼합공정을 실시하였다. 2 단계에서는 온도를 $16\sim 17^\circ\text{C}$ 로 조절한 정제수를 2L를 준비한 후, 이를 2단계에 걸쳐 소분 첨가과정을 통하여 유기태화 미네랄 반응을 유도한 후 이를 상온에서 18시간을 추가 반응시킴으로서 유기태화 반응을 종료하였다. 3 단계에서부터 분석단계인 마지막 7단계 공정은 Ca-GHAC의 제조공정과 동일하게 실시 하였다.

CaCu-GHAC

칼슘을 기본으로 함유하되 추가 미네랄로 구리를 보강한 이중 유기태화 미네랄 소재류 단계별 제조방법 및 제조된 유기태화 소재류의 성상은 다음과 같다(Fig 8~9.). 1 단계로는 GMP 1 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,를 각각 0.4 비율로 혼합공정을 실시 하였다. 2 단계에서는 온도를 14°C 로 조절한 정제수를 2L를 준비한 후, 이를 2단계에 걸쳐 소분 첨가과정을 통하여 유기태화 미네랄 반응을 유도한 후 이를 상온에서 18시간을 추가 반응 시킴으로서 유기태화 반응을 종료하였다. 3 단계에서부터 분석단계인 마지막 7단계 공정은 Ca-GHAC의 제조공정과 동일하게 실시하였다.

CaSe-GHAC

칼슘을 기본으로 함유하되 추가 미네랄로 셀레늄을 보강한 이중 유기태화 미네랄 소재류 단계별 제조방법 및 제조된 유기태화 소재류의 성상은 다음과 같다(Fig 10~11.).

1 단계로는 GMP 1 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 0.2 그리고 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 0.1 비율로 혼합 공정을 실시하였다. 2 단계에서는 온도를 16~17°C로 조절한 정제수를 2L를 준비한 후, 이를 2단계에 걸쳐 소분 첨가과정을 통하여 유기태화 미네랄 반응을 유도한후 이를 상온에서 18시간을 추가 반응 시킴으로서 유기태화 반응을 종료하였다. 3 단계에서부터 분석 단계인 마지막 7단계 공정은 Ca-GHAC의 제조공정과 동일하게 실시 하였다.

CaZn-IHAC

전체연구에서 유기태화 기질로 사용된 핵산류는 GMP와 IMP인데 이들은 화학적 구성 및 구조차이는 매우 유사하다 따라서 이들에 대한 효능을 비교 할 필요가 있다. 이를 확인하기 위하여, 유기태화 기질로는 핵산중 GMP를 대신하여 IMP를 기준으로 여기에 칼슘을 기본으로 함유하되 추가 미네랄로 아연을 보강한 이중 유기태화 미네랄 소재류 단계 별 제조방법 및 제조된 유기태화 소재류의 성상은 다음과 같다(Fig 12~13.).

1 단계로는 IMP 1 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 0.4 그리고 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 0.4 비율로 혼합 공정을 실시하였다. 2 단계에서는 온도를 16~18°C로 조절한 정제수를 6L를 준비한 후, 이를 2단계에 걸쳐 소분 첨가과정을 통하여 유기태화 미네랄 반응을 유도한 후 이를 상온에서 18시간을 추가 반응 시킴으로서 유기태화 반응을 종료 하였다. 3 단계에서부터 분석단계인 마지막 7단계 공정은 CaZn-GHAC의 제조공정과 동일하게 실시하였다.

유기태화 미네랄 소재류별 생산수율 평가

당초 기질 대비 미네랄의 유기태화가 완료후 생산효율 비교는 최종 유기태화 미네랄 소재류의 동결건조가 완료될 기점에서 기질인 핵산량 대비 생산효율을 비교 평가하였다(Fig 2~12).

유기태화 미네랄 소재류의 물리.이화학적적 특성 평가

선발 핵산류의 이화학 특성분석

본 연구의 핵심소재인 상용핵산인 IMP와 GMP는 효모를 원료로 이들이 보유한 염색체를 효소분해하여 단당체화 시킴과 동시에 Sodium을 킬레이팅 시켜 수용성화 되도록 제조되었다(Fig 1, 13). 본 연구에서 사용된 핵산류의 구조 및 이화학적 특성은 제조사의 자료와 식품첨가물(식약처) 등재사항을 근거로 확인하였다.

유기태화 미네랄 소재류의 용해성 평가

당초 수용성 특성을 보유하고 있던 기질 핵산이 유기태화가 완료 된 후 용해성 평가를 실시함으로써 현장 유효성 평가전, 생체내 섭이에 따른 제품 적용성 특성 및 흡수기작 관련 기능성을 사전 평가하여 보았다(Fig 14). 이를 확인하기 위한 방법으로, 당초 기질 핵산 대비 제조된 유기태화 미네랄 소재류별로 10%(W/W) 되게 정제수에 혼합 및 교반과정을 통하여 용해특성을 평가하여 보았다.

유기태화 미네랄 소재류의 입자성상변화 평가

원료 핵산인 GMP과 IMP를 기질로 하여 단일 및 2중 그리고 10종의 다중 미네랄류를

킬레이팅 후 제조된 유기태화 미네랄 소재류별 외형상 입자변화가 유발되는지를 SEM 결과를 비교하여 평가하였다(Fig 15~16.)

유기태화 미네랄 소재류의 입도분석 평가

원료 핵산류인 IMP 및 GMP의 경우는 수용성을 보유하고 있음에 따라 구조결정을 미보유하고 있음에 따라 이를 기준으로 유기태화 미네랄 반응에 따른 구조결정 형성여부를 입도분석을 통하여 확인 하여 보았다(Fig 17.). 또한, CaFe-GHAC결과를 입도분석결과를 기준으로 이중 유기태화 미네랄 소재류의 경우도 동일한 패턴을 보이는지를 Ca와 Se를 동시에 킬레이팅 시켜 제조한 유기태화 소재를 시료를 선별하여 비교함과 동시에 핵산종류만을 다르게 하여 제조한 경우에서도 입자형성과 크기분포를 비교 확인하였다(Fig 17-1~17-2).

유기태화 미네랄 소재류의 구조결정 형성여부 평가

당초 기질인 핵산류는 기본적으로 수용성 소재임에 따라 구조결정은 형성되지 않는 패턴을 보유하고 있다. 이러한 패턴은 유기태화 반응이 완료되었을 때의 유기태화 미네랄 소재류의 특성이 불용성으로 전환되는 경향을 고려하면, 미네랄과의 결합과 더불어 구조결정이 형성되는 특성을 보유하고 있을 것으로 판단되어 이를 X-ray 회절분석을 실시함으로써 확인하였다. 단일 핵산류(IMP 및 GMP) 대비 2종 미네랄 또는 10종 미네랄류가 킬레이팅된 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 구조결정 형성 여부 분석을 위한 시료로서는 다음과 같다(Fig 18~19).GMP 기질화 유기태화 소재류는 원료 GMP(5'-구아닐산이나트륨), M(10)-GHAC(단일 GMP 기질화 미네랄 10종 킬레이팅, 1년차 개발완료), CaFe-GHAC[단일 GMP 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄 킬레이팅] 및 CaSe-GHAC[단일 GMP 기질화 2종(Ca, Se) 미네랄 킬레이팅]를 준비하였다(Fig 18). 화학구조 및 이화학적 특성이 GMP와 유사하였던 IMP의 경우는 원료 IMP(기질 핵산, 5'-이노신산이나트륨), M(10)-IHAC(단일 IMP 기질화 미네랄 10종 킬레이팅), CaCr-IHAC(단일 IMP 기질화 2종(Ca, Cr) 미네랄 킬레이팅) 및 CaSe-IHAC(단일 IMP 기질화 2종(Ca, Se) 미네랄 킬레이팅)을 선별하여 전체적인 특성을 평가하였다(Fig 19).

유기태화 관련 기능기 평가

본 연구는 기질 핵산 대비 미네랄이 킬레이팅화 반응을 유발시키는 관련 기능기를 평가하기 위하여, 기질 핵산류를 대조로 유기태화 미네랄 소재류를 시험물질로 하여 FT-IR분석을 실시하여 확인하였다(Fig 20-1~20-2). 단일 핵산(IMP) 대비 2종 미네랄 또는 10종 미네랄류가 킬레이팅된 유기태화 미네랄 소재류를 선별하여 구조변화 및 유기태화 패턴 변화를 비교함으로써 미네랄 관련 기능기를 FT-IR분석법을 분석한 후 이를 Peak analysis 평가를 통하여 최종 유기태화 관련 기능기를 확인하였다. 이를 위하여 선별 핵산류(GMP 및 IMP)별 미네랄을 도입한 후 원료 핵산 대비 FT-IR패턴 변화를 비교를 위하여, GMP계열은 원료 GMP, 10종 미네랄 동시 유기태화형 소재(M(10)-GHAC), 2종 미네랄 도입형 소재로는 CaFe-GHAC과 CaSe-GHAC를 선별하여 분석시료로 사용하였다. 이중 IMP계열은 역시 원료로는 IMP를 역시 10종 미네랄 도입형 소재(M(10)-IHAC), 2종 미네랄 도입형 소재로는 CaCr-IHAC과 CaSe-IHAC를

선발하여 역시 분석시료로 사용하였다.

유기태화 미네랄류별 유기태화 효율 평가

본 연구는 핵산을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재류 개발과 이를 사료첨가를 통해 기능성 축산물 생산용 제품화(사료첨가제)에 목표를 두고 1년차 연구결과를 연계하여 2종 미네랄이 함유되도록 하는 유기태화 미네랄 소재류를 신규로 제조한후 이들에 대한 유기태화 효율 및 미네랄 16종에 대한 함유량을 ICP분석을 통하여 세세하게 분석하였다 (Table 2). 이를 위한 분석시료는 GMP계열은 GMP와 Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC 및 CaCu-GHAC로 5종을 준비하였다. 또한, GMP와 IMP 기질별 유기태화 효율차이를 검정하기 위하여 IMP와 유기CaZn-GHAC와 비교가 가능하도록 CaZn-IHAC를 준비하여 분석간 시료로 사용하였다.

3. 연구수행결과

선발 핵산류의 유기태화 관련 이화학적 특성 분석

상용 핵산은 생명의 근원인 염색체를 효소 분해하여 단당체화 시킴과 동시에 Sodium 을 킬레이팅 시켜 수용성화 되도록 제조 되었다(Fig 1, 13). 성상은 GMP의 경우는 5탄 당 1분자에 구아닐산이 1분자, 그리고 IMP는 역시 동일 5탄당 1분자에 이노산이 1분자를 보유하고 있으며, 3개의 인산기를 보유하는 기본 구조를 보유하고 있었다. 분자량은 GMP는 407.2, IMP는 392.17이었으며, 화학식은 $C_{10}H_{11}O_8N_4PNa_2$, $C_{10}H_{12}O_8N_5PNa_2$ 였다. 이는 유기태화 반응과 관련하여 유사한 화학식을 보유하고 있음에 따라 미네랄 킬레이팅 반응 또한 유사할 것으로 판단되었고, 분자량은 약 400이이므로 유기태화시 최종 유기태화 미네랄 소재류의 분자량은 1분자의 핵산대비 1 원소의 미네랄이 킬레이팅 되는 경우는 500, 그리고 2분자의 핵산을 기질로 1원소의 미네랄이 킬레이팅 되는 경우는 최대 분자량은 1,000이내일 것으로 판단되었다.

유기태화 미네랄 소재류의 생산수율 평가

당초 수용성인 핵산류가 유기태화 반응이 완료시, 사용된 기질인 핵산량 대비 생산수율을 평가하여 본 결과, 최소 100%에서 최대 119%의 생산수율을 나타내었는데 이러한 결과는 단일 혹은 2종 미네랄류를 도입한 결과 모두 동일한 패턴을 보였다(Fig 2~10).

유기태화 미네랄 소재류의 용해특성 평가

당초 유기태화 기질인 핵산류는 물과 혼합 시 용해성이 뛰어났으나, 단일 및 이종 미네랄과 유기태화 반응 후에는 전체가 불용성으로 전환되는 특성을 보였다(Fig 3, 5, 7, 9, 10). 이러한 유기태화 미네랄류는 물과 접촉 시 겔화 되는 특성을 보유함하고 있었으며 선발 핵산인 IMP와 GMP 전체가 동일한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 생체에 섭이시 소화관내 흡수기작을 통한 체내흡수가 용이할 것으로 판단되었다(Fig 13).

유기태화 미네랄 소재류의 물리 및 이화학적 변화 판정

입자변화 평가

GMP와 IMP를 기질로 하여 단일, 2중 및 다중 미네랄류를 킬레이팅 후 제조된 유기태화 미네랄 소재류별 입자형성 변화를 확인한 결과(Fig 15~16), 당초 GMP와 IMP는 저배율(100~200배)에서 관찰시 4각형의 결정구조를 보유하고 있었으나, 유기태화가 완료되면 당초의 결정구조는 미세화 분말구조로 전환됨을 확인 할 수 있었으며, 동일한 패턴을 보였다.

입도분석

원료 핵산류인 IMP 및 GMP의 경우는 수용성을 보유하고 있음에 따라 구조결정을 미보유하고 있음에 따라 이를 기준으로 유기태화 미네랄 반응에 따른 구조결정 형성여부를 입도분석을 통하여 확인 하여 보았다(Fig 17.). 이를 위하여, 개발 소재류중 CaFe-GHAC을 대표적으로 하여 이를 일반수에 용해 후 이 입도분석기에서 확인하여 보았더니, 유기태화 반응에 따라 구조결정이 형성되었으며, 입자 크기는 최소 0.48um에서 최대 120um의 크기를 보임으로서 나노화 Size의 구조결정을 보유하고 있음을 확인 하였다(Fig 17-1). CaFe-GHAC결과를 입도분석결과를 기준으로, 이중 유기태화 미네랄 소재류의 경우도 동일한 패턴을 보이는지를 Ca와 Se를 동시에 킬레이팅 시켜 제조한 유기태화 소재를 시료를 선별하여 비교함과 동시에 핵산종류만을 다르게 하여 제조한 경우에서도 입자형성과 크기분포를 비교 확인한 결과, CaSe-GHAC와 CaSe-IHAC의 입자크기는 1~100um범위에서 분포하고 있었으며 역시 나노화 사이즈를 형성하고 있는 경향과 핵산류별 입자형성에 미치는 결과 또한 동일한 패턴을 보였다(Fig 17~2). 따라서, 이러한 결과를 보면 핵산류가 가지고 있는 킬레이팅 관련 기능기는 동일하고 이에따라 동일한 구조결정 형성과 동시에 유기태화 패턴도 동일한 것으로 평가되었다.

구조결정 형성

수용성으로서 비결정구조 구조결정은 형성되지 않는 패턴을 보유하고 있음을 기준으로 유기태화 미네랄 소재류의 특성이 불용성으로 전환되는 경향을 고려하면, 미네랄과의 결합과 더불어 구조결정이 형성되는 특성을 나타내는지 확인을 위한 X-ray 회절분석 결과는 다음과 같다(Fig 18~19). 결과로서, 전체 핵산류는 비결정구조임였음에 비하여, 유기태화 미네랄 소재류는 단일, 2중 혹은 다중의 미네랄이 킬레이팅 모든 되는 경우에서 구조결정이 형성되었음을 확인하였다. 또한 핵산류의 종류에 관계없이 동일한 패턴을 보였는데, 이는 본 연구에서 사용되는 핵산이외에 유사한 핵산류는 동일한 유기태화 패턴을 보일 것으로 예측되는 결과였다.

유기태화 관련 기능기 평가

본 연구는 기질 핵산 대비 미네랄이 킬레이팅화 반응을 유발시키는 관련 기능기를 평가하기 위하여, 기질 핵산류를 대조로 유기태화 미네랄 소재류를 시험물질로 하여 FT-IR 분석을 실시하여 확인하였다(Fig 20-1~20-2). 결과로서, 기질 핵산이 보이는 스펙트럼 패턴을 기준으로 유기태화 소재류별 패턴을 비교하여 보았더니, 유기태화 미네랄이 2중 혹은 10중이 도입된 전체적으로 변화가 유발되는 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 핵산류별로 비교하여 보았더니, 핵산 종류에 상관없이 동일한 유기태화 패턴을 보이는 것으로

평가 되었다. 분석결과를 기준으로 핵산류별 보유한 기능기중 유기태화 관련 기능기군을 구조식에서 평가하여 보았더니, 예상되는 기능기는 -P, -OH가 유력한 후보군이였다.

핵산류가 보유한 유기태화 후보군중 가장 유력한 기능기는 -P였으나, 유기태화 반응전 후 검출된 Sodium의 변화(ICP 분석)는 심하지 않은 것으로 평가되어 후보군에서 제외되었으며, Peak analysis 분석결과를 비교하여 보았더니 최종 -OH기가 유기태화 관련 기능기였음이 평가 되었다.

유기태화 미네럴류별 유기태화 효율 평가

원료 핵산류와 유기태화 미네럴 소재류의 유기태화 효율, 16종 미네럴류에 대한 함유량을 ICP분석을 통하여 세세하게 분석하였다(Table 2). 우선 원료인 GMP와 IMP이 고유적으로 함유하고 있는 총 미네럴(16종 합계)량은 두종류 공히 약 15%였으며, 이중 GMP는 Na와 P가 99.9%를 IMP의 경우는 99.98%가 대부분을 점유하고 있었다. 그리고, 본 연구에서 도입할 예정인 Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se의 경우 합계량은 100ppm이하로 거의 미미한 수준이였다. 이를 기준으로 Ca단일 미네럴만 도입한 Ca-GHAC의 경우는 칼슘함유량은 9%, CaFe-GHAC는 칼슘 5.2%와 철은 3.4%를, CaZn-GHAC는 칼슘 약 13%와 아연은 약3.1%를, CaCu-GHAC의 경우는 칼슘은 약 4.5% 그리고 구리는 약 3.2% 그리고 CaSe-GHAC는 칼슘 약 4.6%와 Se는 약 3.3%의 함유량을 보유하고 있었다.

GMP와 IMP를 각 기질로 2종 미네럴(Ca과 Zn)를 도입한 유기태화 미네럴 소재류에 대한킬레이팅 효율을 검정한 결과, IMP의 경우는 Ca은 약 7.6% 그리고 아연은 약 3.6%의 유기태화 효율을 보였다. 이 경우 최초 첨가한 무기태화 미네럴중 칼슘과 아연을 기질 (1) 대비 공히 0.6비율로 첨가한 경우와 CaZn-GHAC의 기질 GMP(1) 대비 0.2와 0.4 비율로 첨가하여 유기태화 효율을 비교하면 GMP계열이 2종 미네럴류의 유기태화 효율이 칼슘은 1.73배 높은 것으로 조사되었으나 아연의 경우는 차이가 없는 것으로 평가되었다.

이러한 결과로 보면 결국 2종 이상의 미네럴 유기태화시 GMP가 IMP보다 유기태화 효율이 높은 소재임이 확인 되었다.

유기태화 미네럴 소재류의 구조확인

핵산 대비 유기태화 미네럴 소재류의 구조를 단국대 분석센터(박재원 교수)에 제조된 Ca-GHAC를 대상으로 구조분석을 의뢰를 통하여 확인하였다(Fig 16.). 결과로서, 핵산(GMP) 기질화 제조된 유기태화 미네럴 소재류(선발: Ca-GHAC)의 화학구조변화를 전문 분석기관에 의뢰하여 확인하여 본 결과, 핵산 2개 분자에 미네럴이 1개가 결합되는 구조를 보유하고 있으며, 이는 기본적으로 아미네이트 구조로 형성 되었음을 확인하였다.

따라서, 이러한 결과는 2종 혹은 다종 미네럴을 혼합한 경우에는 이온 경쟁성 순서에 준하여 순차적으로 킬레이팅화 되든지 혹은 이온 경쟁성이 없이 무작위적으로 미네럴류가 동시에 유기태화 될 수 있음을 확임함과 동시에 핵산류는 미네럴 킬레이팅 능력이 뛰어난 우수한 소재임을 알 수 있었다.

Table 1. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위한 유기태화 미네랄 소재 제조를 위해 적용된 핵산류의 구조 및 특성 분석

기질핵산종류 (원재료명, 고유용해성)	화학식	분자량	사용용도 (현재)	기본 원소구성(%)						
				N	P	C	H	O	Na	합계
IMP (5'-이노신산이나트륨, 수용성)	$C_{10}H_{11}O_8N_4PNa_2$	392.17	식품	14.3	7.88	30.6	2.80	32.6	11.7	100
GMP (5'-구아닐산이나트륨, 수용성)	$C_{10}H_{12}O_8N_5PNa_2$	407.20	식품	17.2	7.61	34.4	2.95	31.4	11.3	100
CMP (5-시티딜산이나트륨, 수용성)	$C_9H_{12}N_3Na_2O_8P$	367.16	식품 (식약처, 규제)	11.4	8.44	29.4	3.27	34.9	12.5	100
UMP (5'-우리딜산이나트륨, 수용성)	$C_9H_{11}N_2Na_2O_9P$	368.15	식품 (식약처, 규제)	7.6	8.42	29.3	2.99	39.1	12.5	100

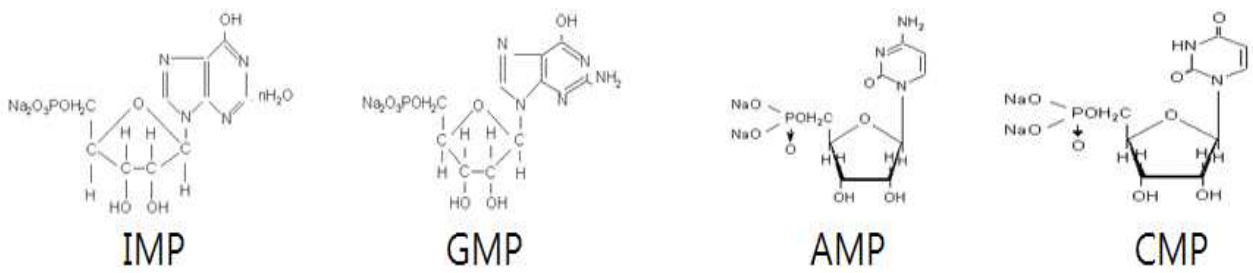


Fig 1. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위한 유기태화 미네럴 소재류 제조를 위해 적용된 핵산류 구조

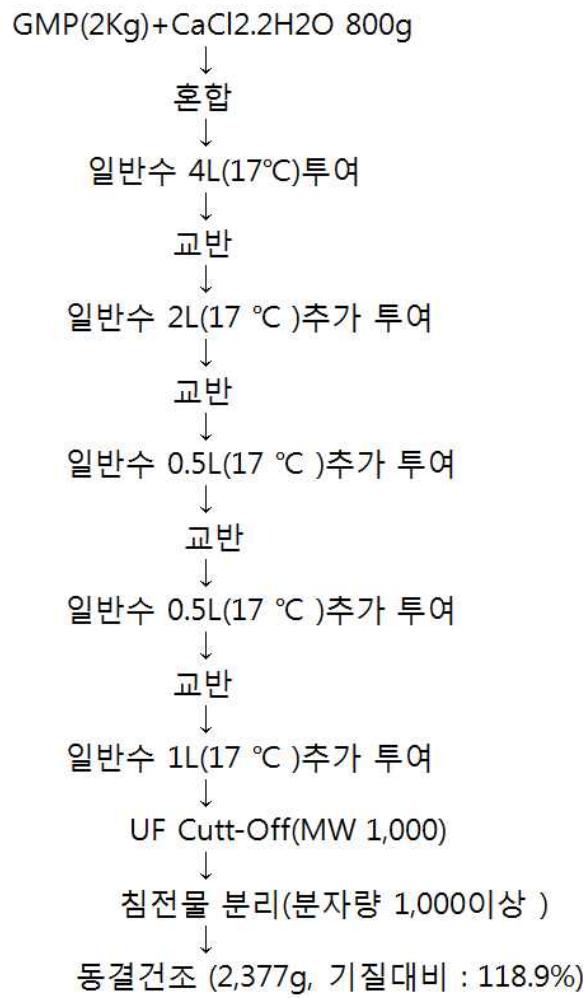


Fig 2. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(Ca-GHAC)의 기본 제조 Scheme



Fig 3. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용 핵산 기질화 유기 태화 미네랄 소재류(Ca-GHAC)의 성상
 1: 건조전 성상, 2: 기질 GMP, 3: 건조 후(열풍, 80℃), 4: 동결 건조후(시제품)

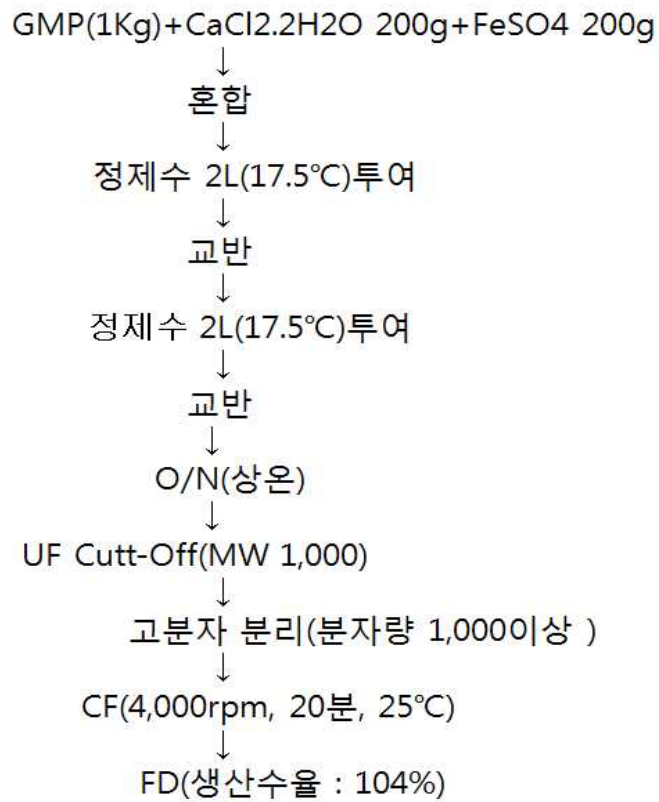


Fig 4. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 미네랄 보유형 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaFe-GHAC)의 기본 제조 Scheme



Fig 5. 산란계 현장 시험용, 이중 미네랄 보유형 핵산 기질화 유기태 미네랄 소재류(CaFe-GHAC)시제품 제조과정
 1: 원료배합, 2: 유기태화 반응후, 3: 유기태화 반응 30분진행후(일반수 2L투여조건, 응고+++),
 4:시제품(FD)

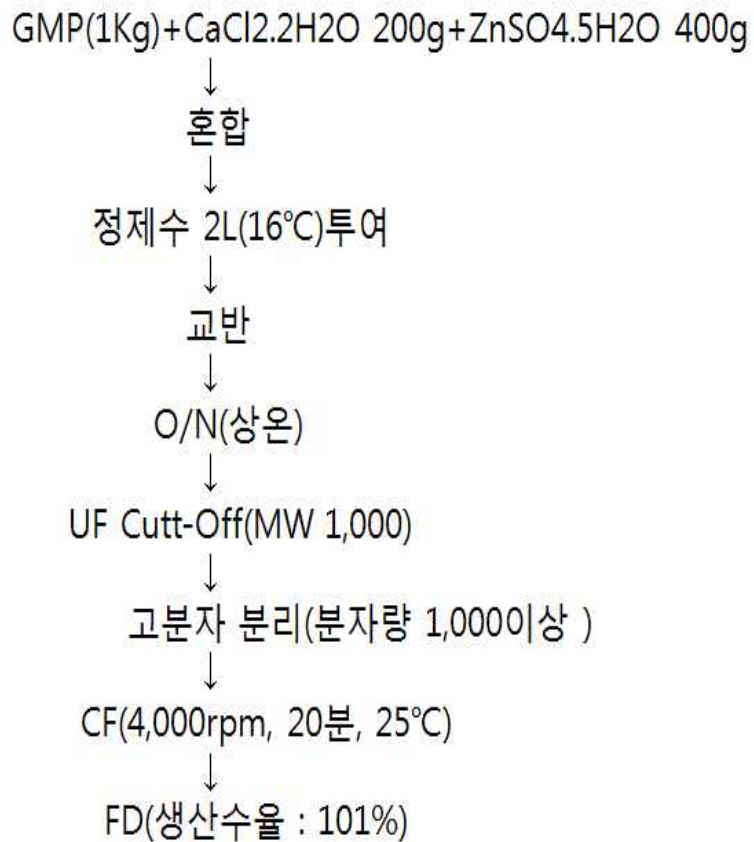


Fig 6. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 미네랄 보유형 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaZn-GHAC)의 기본 제조 Scheme



Fig 7 . 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaZn-GHAC)의 제품 성상
 1: 원료배합, 2: 유기태화 반응, 3: 유기태화 반응 3시간 및 UF 진행후, 4: 시제품(FD)

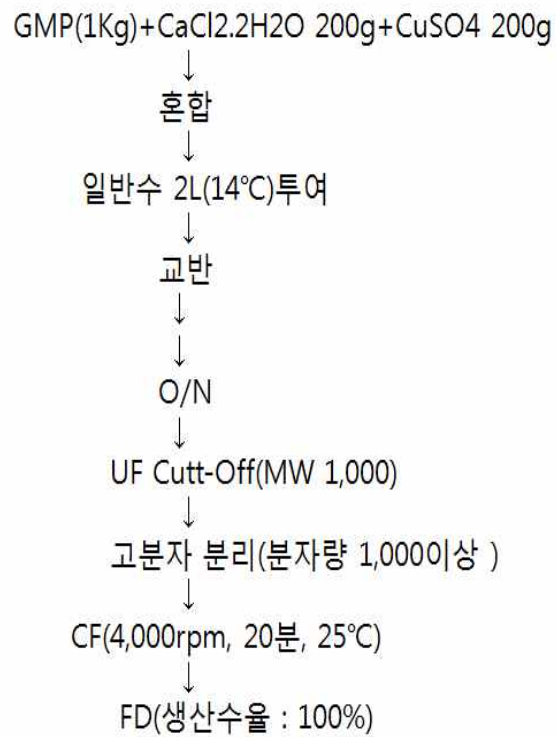


Fig 8. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 미네랄 보유형 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaCu-GHAC)의 기본 제조 Scheme

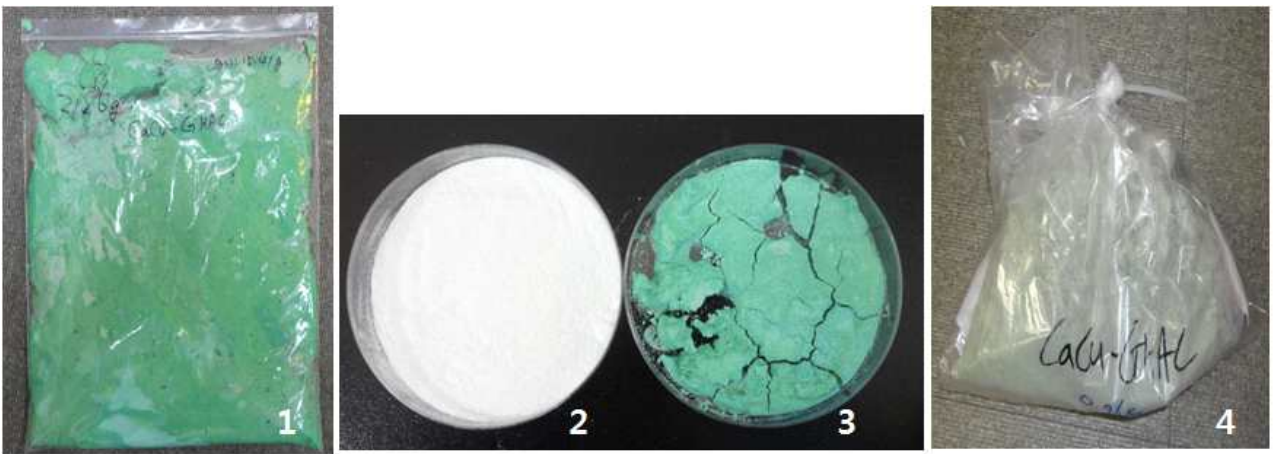


Fig 9. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaCu-GHAC)의 제품 성상

1: 건조전 성상, 2: 기질 GMP, 3: 건조후(열풍, 80℃), 4: 동결건조후(시제품)

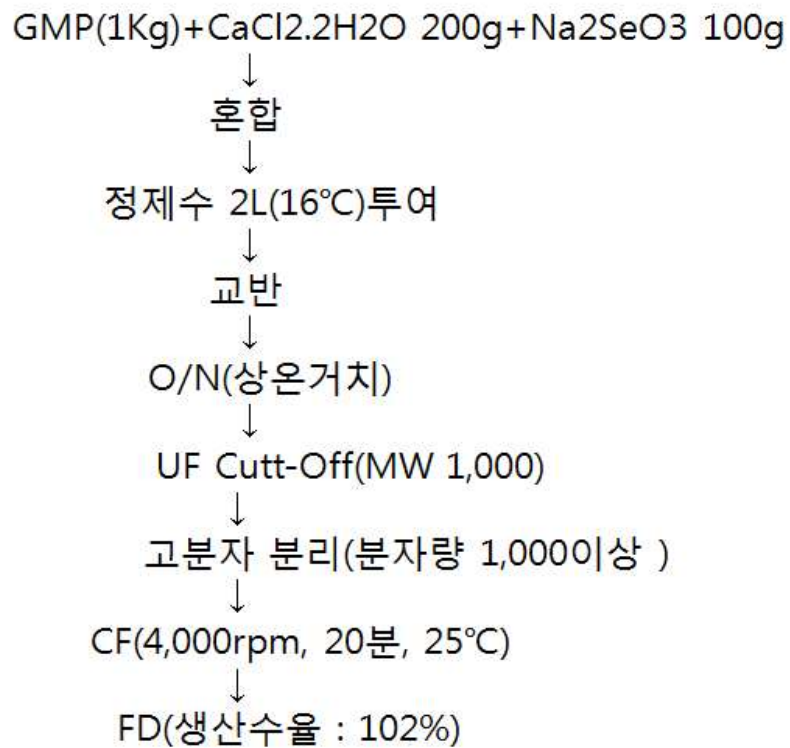


Fig 10 . 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 미네랄 보유형 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaSe-GHAC)의 기본 제조 Scheme



Fig 11. 기능성 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaSe-GHAC)의 제품 성상
 1: 원료배합, 2: 유기태화 반응후 10분경과, 3: 유기태화 반응후 O/N후(응고+++), 4:시제품(FD)

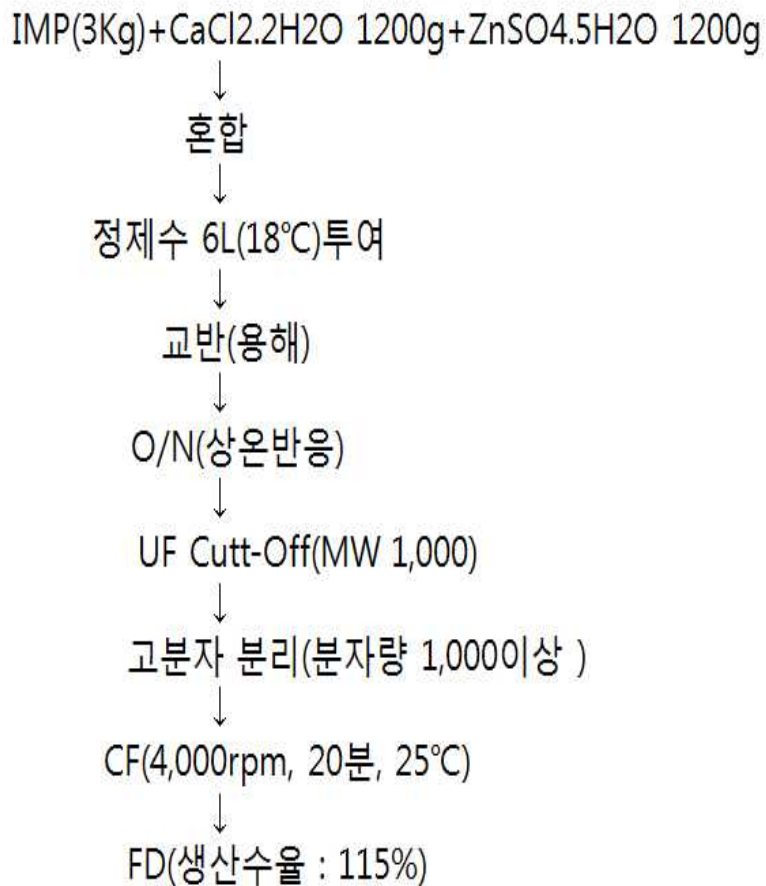


Fig 12. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 미네랄 보유형 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaSe-IHAC)의 기본 제조 Scheme



Fig 13 . 기능성 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조한 현장 유효성 평가용, 이중 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류(CaSe-IHAC)의 제품 성상

1: 원료배합, 2: 유기태화 반응후 10분경과, 3: 유기태화 반응후, 4 : 시제품(FD)

Table.2. 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립을 위해 제조된 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류의 킬레이팅에 따른 16종 미네랄류 함유량 조사결과(ICP)

유기태화 시료		미네랄 함유량 조사결과(ppm)																합계		Cl (%)	비고 (Lot No.)
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Mg	Mn	Cr	K	Na	P	S	As	Cd	Hg	Pb	PS+	PS-		
GMP	Mean	35.7	2.82	ND	ND	ND	47.9	1.28	0.02	99.8	95,530	50,180	5.5	ND	ND	ND	0.23	145,903	95,718	ND	원료
	SD	0.76	0.02	ND	ND	ND	0.60	0.01	0.04	1.58	733	226	0.4	ND	ND	ND	0.07	1,326	479		
IMP	Mean	ND	5.92	ND	ND	ND	3.90	0.35	0.16	25.1	96,820	51,420	ND	ND	ND	ND	0.36	148,275	96,855	ND	원료
	SD	ND	0.04	ND	ND	ND	0.02	0.00	0.03	1.75	211	154	ND	ND	ND	ND	0.06	1,427	397		
Ca-GHAC (FD)	Mean	90,160	30.8	ND	3.89	8.06	8.80	0.44	ND	ND	78,620	91,368	13.2	ND	ND	0.34	ND	260,214	168,832	17.2	141116가
	SD	1,689	0.34	ND	11.0	9.8	1.37	0.05	ND	ND	393	590	3.59	ND	ND	0.17	ND	2,698	2,105		
CaFe-GHAC (FD)	Mean	51,780	34,250	ND	ND	23.4	8.41	38.6	5.44	ND	93,860	100,000	19,313	ND	2.41	3.6	0.31	299,285	179,972	9.23	141114나
	SD	261	138	ND	ND	6.47	1.15	0.27	0.30	ND	301	594	103	ND	0.04	0.61	0.71	1,406	710		
CaZn-GHAC (FD)	Mean	124,400	21.3	31,260	ND	ND	66.9	3.91	ND	ND	51,420	42,852	99,149	ND	0.02	0.47	ND	349,174	207,173	19.0	141115가
	SD	1,181	0.30	288	ND	ND	0.50	0.11	ND	ND	302	286	534	ND	0.02	0.23	ND	2,592	1,772		
CaCu-GHAC (FD)	Mean	44,280	31.6	ND	31,760	ND	5.20	0.31	ND	ND	79,530	102,037	16,623	ND	0.04	ND	69.8	274,337	155,677	10.0	141114가
	SD	373	0.66	ND	90	ND	0.91	0.09	ND	ND	76	595	105	ND	0.02	ND	0.53	1,242	541		
CaSe-GHAC (FD)	Mean	45,510	14.1	0.55	ND	32,550	10.0	0.24	ND	ND	115,300	104,559	48.2	ND	ND	ND	ND	297,992	193,385	9.41	141115나
	SD	918	0.47	1.11	ND	275	1.00	0.04	ND	ND	290	628	2.71	ND	ND	ND	ND	2,116	1,486		
CaZn-IHAC (FD)	Mean	76,050	3.03	36,180	ND	ND	85.0	0.94	ND	ND	65,130	96,469	27,768	ND	ND	ND	ND	301,686	177,449	16.7	141118나
	SD	235	0.34	233	ND	ND	0.11	0.04	ND	ND	98	259	71	ND	ND	ND	ND	896	566		

비고

- PS+ : 전체 미네랄류 함유량 합계
- PS- : P 및 S제외 미네랄류함유량 합계
- ND : Not Detection
- NC : Not Counting
- FD : Freeze Drying



(A)

(B)

Fig 14. 정제수에 10% GMP(B) 그리고 10% CaZn-GHAC(A)소재 첨가 후 용해성 평가

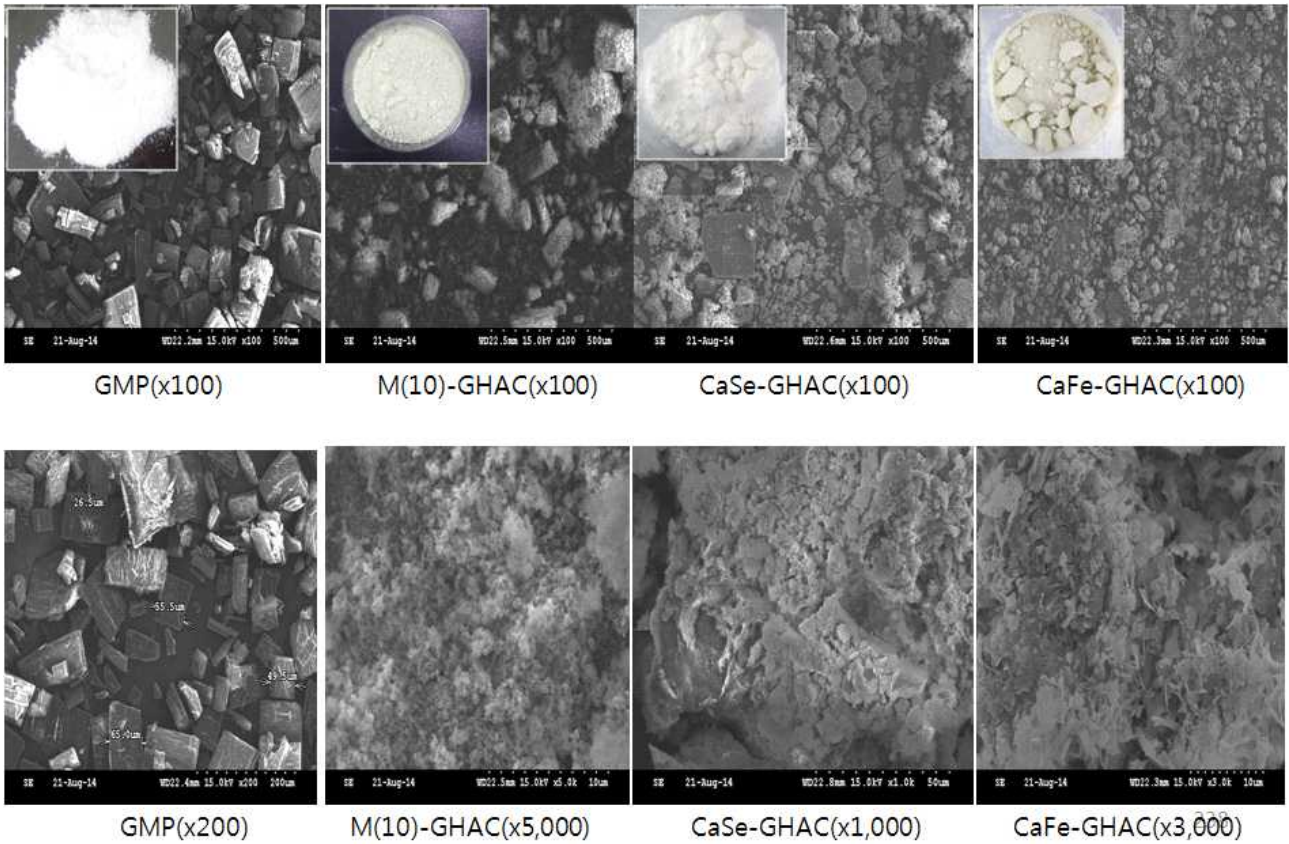
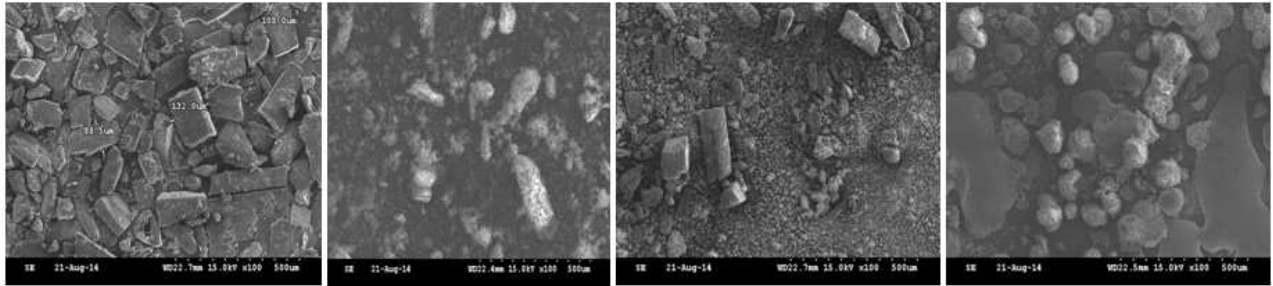


Fig 15. 핵산(GMP, 대조) 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄류(소재명 : CaFe-GHAC) 혹은 10종 미네랄류 유기태화(소재명 : M(10)-GHAC)를 제조후 결정구조형성에 따른 입자분포도 평가 결과

1 : GMP(x 200), 2: CaFe-GHAC(x10,000), 3 : M(10)-GHAC(x 10,000)



IMP(x100), M(10)-IHAC(x100), CaSe-IHAC(x100), CaCr-IHAC(x100)



IMP(기질)

M(10)-IHAC

CaSe-IHAC

CaCr-IHAC

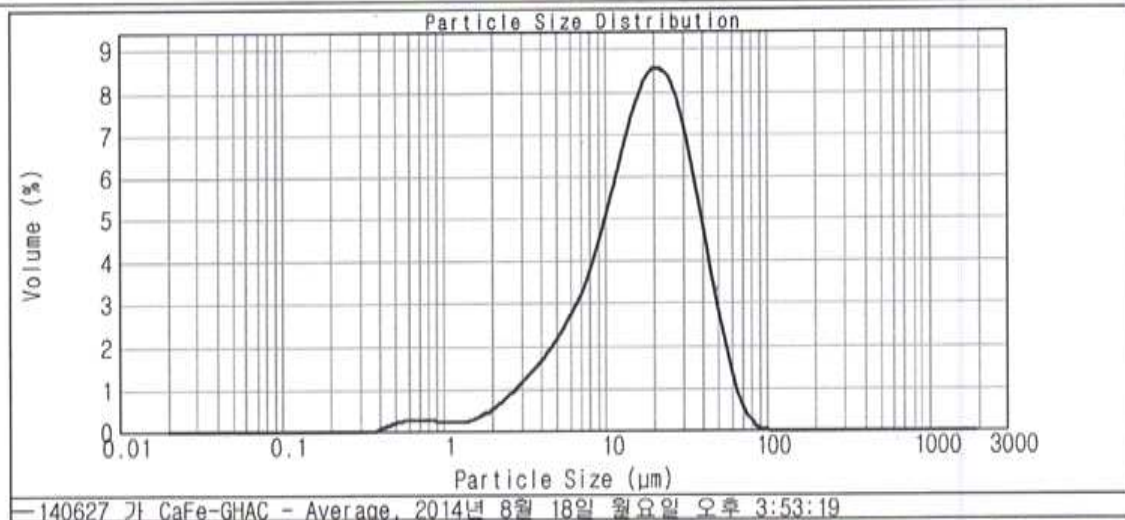
Fig 16. 핵산(IMP, 대조) 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄류(소재명 : CaFe-GHAC) 혹은 10종 미네랄류 유기태화(소재명 : M(10)-GHAC)를 제조후 결정구조형성에 따른 입자분포도 평가 결과

1 : GMP(x 200), 2: CaFe-GHAC(x10,000), 3 : M(10)-GHAC(x 10,000)

d(0.1): 5.072 um

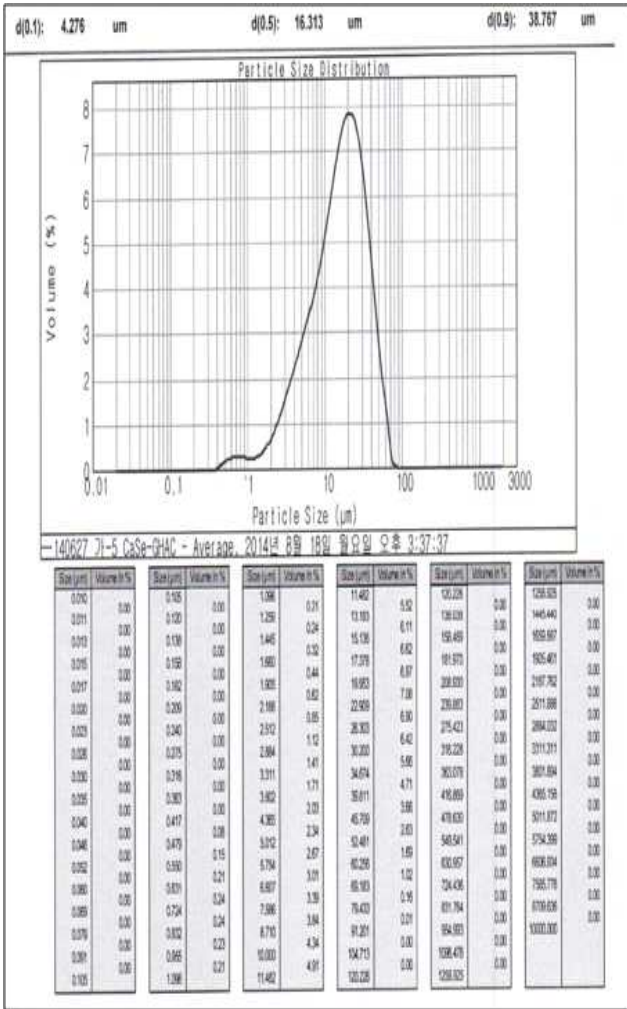
d(0.5): 17.515 um

d(0.9): 39.462 um

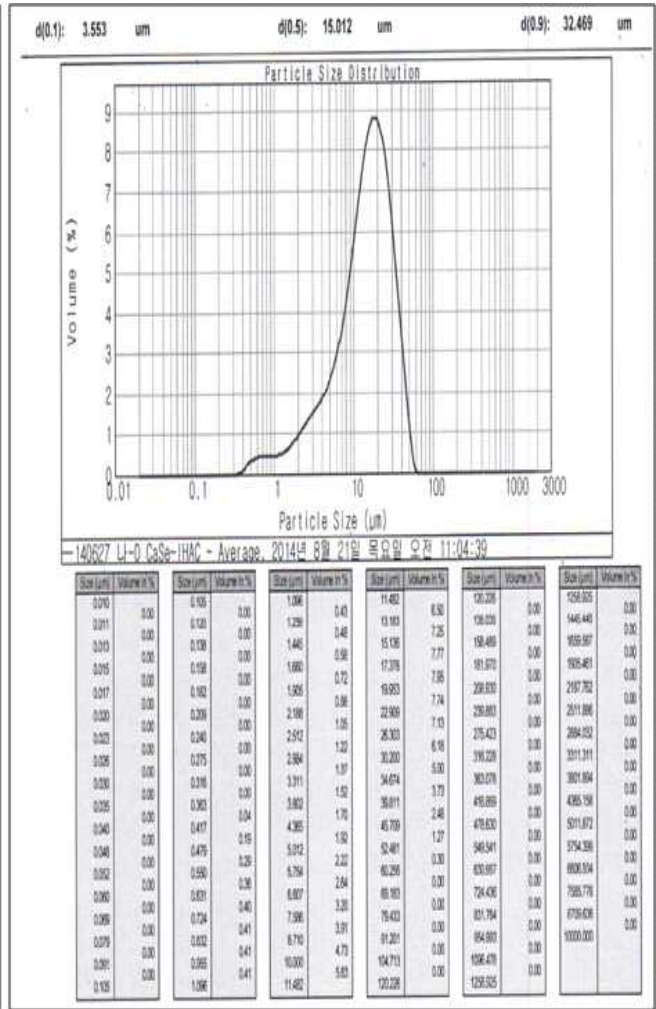


Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.095	0.16	11.462	5.78	120.226	0.00	1250.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.18	13.183	6.56	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.24	15.136	7.20	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.34	17.378	7.62	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.49	19.953	7.73	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.68	22.909	7.49	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.85	26.303	6.90	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.85	30.200	6.02	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	1.05	34.674	6.02	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	1.27	39.811	4.95	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	1.51	45.709	3.81	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.478	0.10	5.012	1.77	52.481	2.71	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.16	5.754	2.08	60.255	1.77	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.22	6.607	2.47	69.183	0.93	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.23	7.586	2.94	79.433	0.40	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.23	8.710	3.52	91.201	0.08	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.20	10.000	4.20	104.713	0.01	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.18	11.462	4.96	120.226	0.00	1258.925	0.00		

Fig 17-1. 핵산(GMP) 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄류 유기태화(CaFe-GHAC) 소재류 제조후 결정구조 형성에 따른 입자분포도 평가 결과



CaSe-GHAC



CaSe-IHAC

Fig 17-2. 핵산(GMP) 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄류 유기태화(CaFe-GHAC) 소재류 제조후 결정구조 형성에 따른 입자분포도 평가 결과

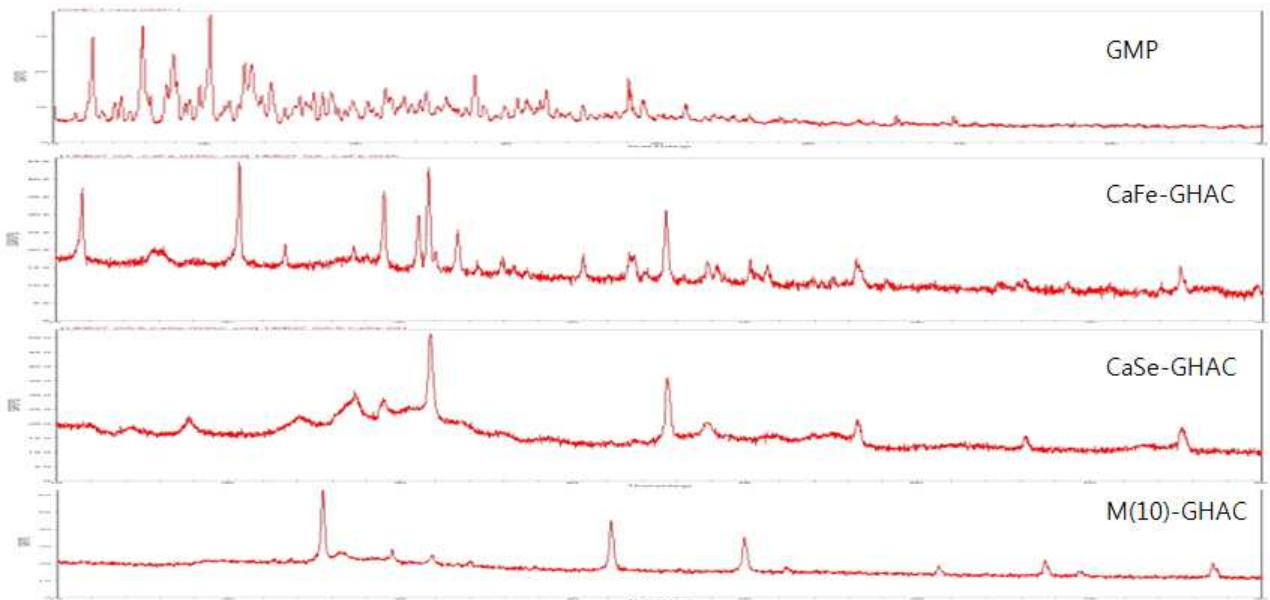


Fig 18. 단일 핵산(GMP) 대비 2종 미네랄 또는 10종 미네랄류가 킬레이팅된 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 구조결정 및 결합구조 패턴변화 분석결과

GMP : 기질 핵산((5'-구아닐산이나트륨)

M(10)-GHAC : 단일 GMP 기질화 미네랄 10종 킬레이팅

CaFe-GHAC : 단일 GMP 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄 킬레이팅

CaSe-GHAC : 단일 GMP 기질화 2종(Ca, Se) 미네랄 킬레이팅

GHAC : GMP기질화 미네랄 유기태화 소재류

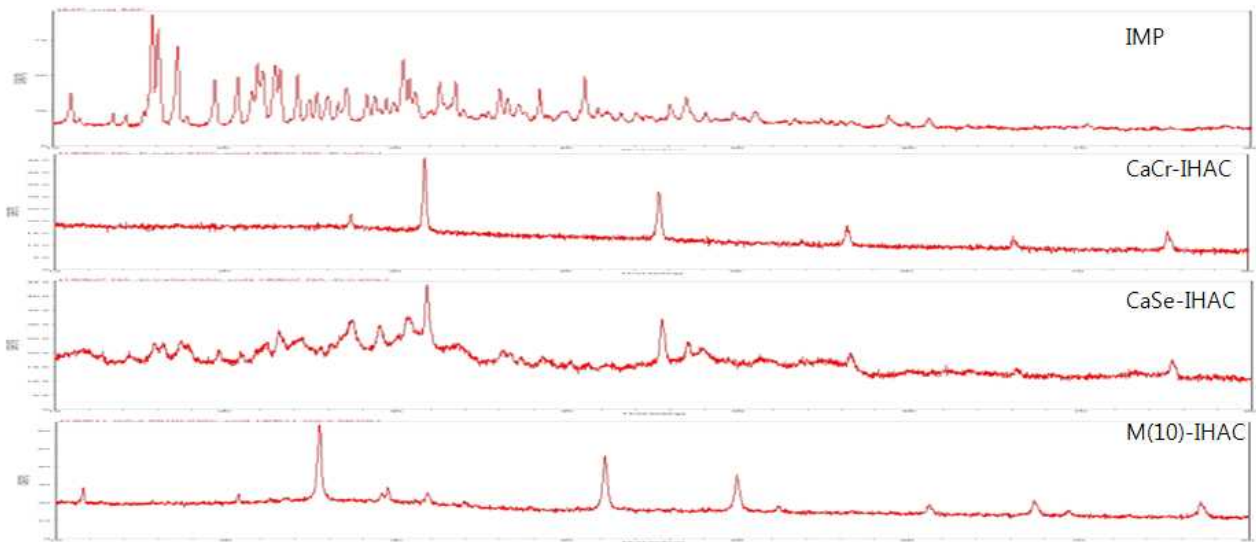


Fig 19. 단일 핵산(IMP) 대비 2종 미네랄 또는 10종 미네랄류가 킬레이팅된 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 구조결정 및 결합구조 패턴변화 분석결과

IMP : 기질 핵산((5'-이노신산이나트륨)

M(10)-IHAC : 단일 IMP 기질화 미네랄 10종 킬레이팅

CaCr-IHAC : 단일 IMP 기질화 2종(Ca, Cr) 미네랄 킬레이팅

CaSe-IHAC : 단일 IMP 기질화 2종(Ca, Se) 미네랄 킬레이팅

IHAC : IMP기질화 미네랄 유기태화 소재류

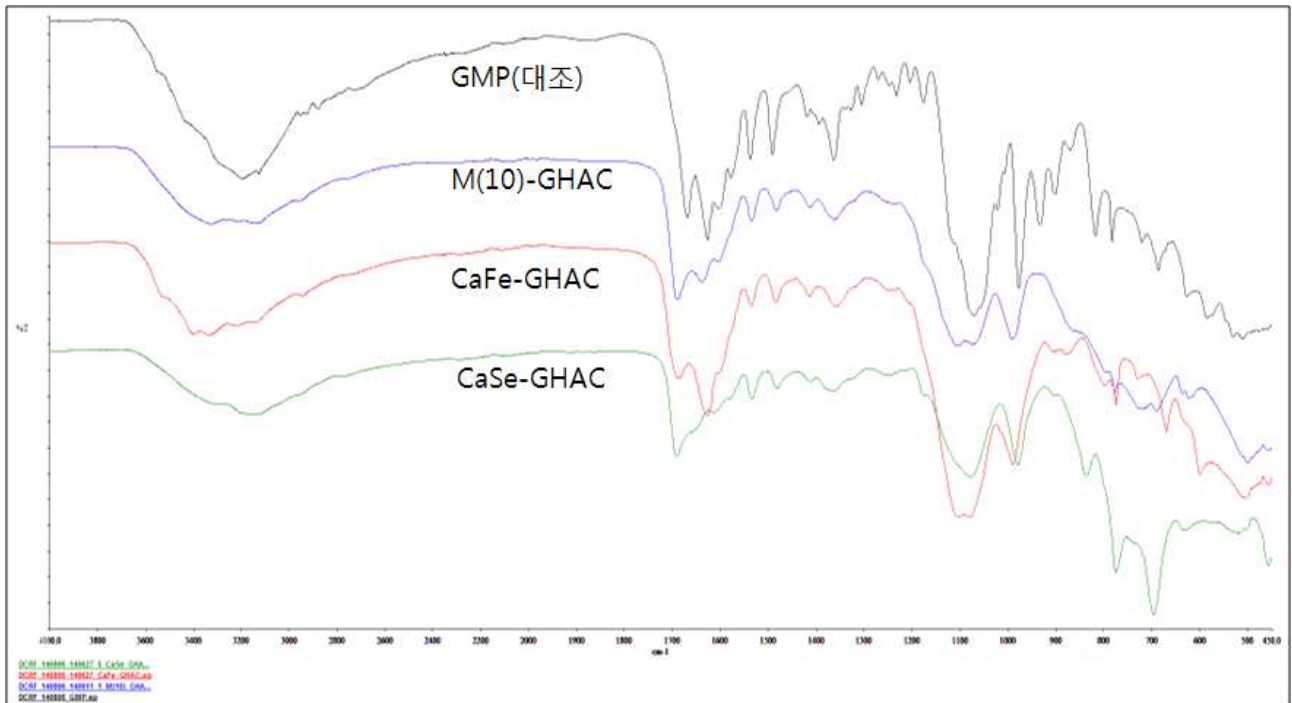


Fig 20-1. 단일 핵산(GMP) 대비 2종 미네랄 또는 10종 미네랄류가 킬레이팅된 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 구조변화 및 패턴변화 분석결과

- GMP : 기질 핵산((5'-구아닐산이나트륨)
- M(10) : 단일 GMP 기질화 미네랄 10종 킬레이팅
- CaFe : 단일 GMP 기질화 2종(Ca, Fe) 미네랄 킬레이팅
- CaSe : 단일 GMP 기질화 2종(Ca, Se) 미네랄 킬레이팅
- GHAC : GMP기질화 미네랄 유기태화 소재류

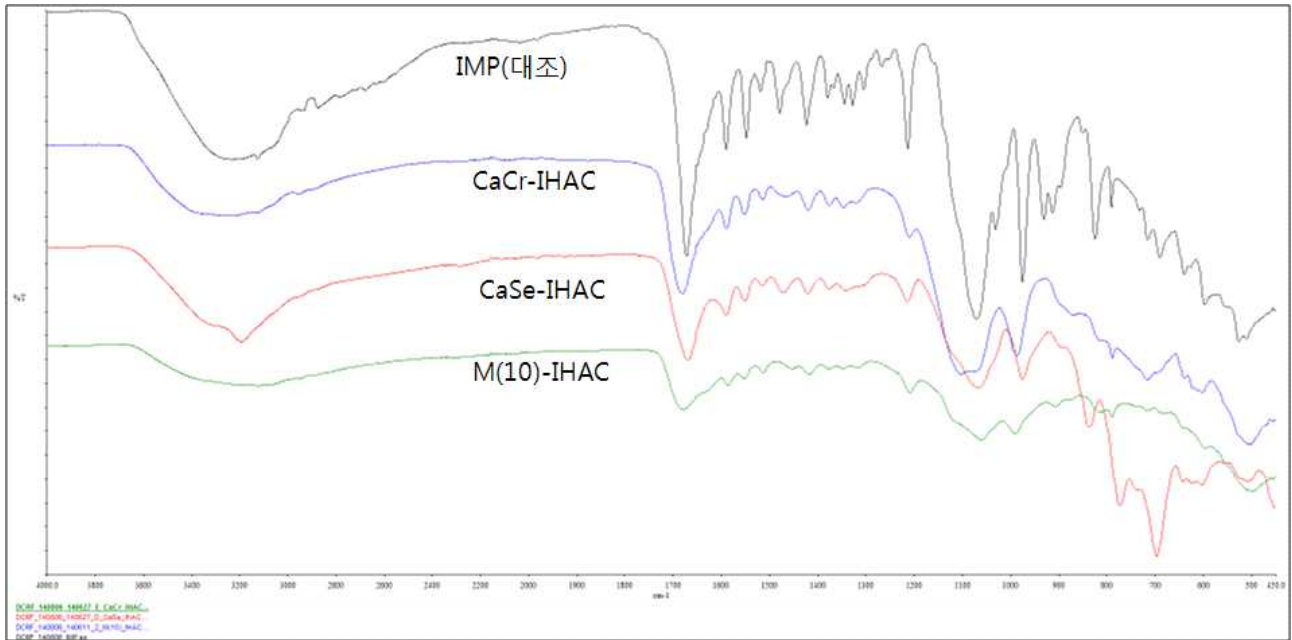


Fig 20-2. 단일 핵산(IMP) 대비 2종 미네랄 또는 10종 미네랄류가 킬레이팅된 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 구조변화 및 유기태화 패턴변화 분석결과

IMP : 기질핵산(5'-이노신산이나트륨)

M(10) : 단일 IMP 기질화 미네랄 10종 킬레이팅

CaCr : 단일 IMP 기질화 2종(Ca, Cr) 미네랄 킬레이팅

CaSe : 단일 IMP 기질화 2종(Ca, Se) 미네랄 킬레이팅

- IHAC : IMP기질화 미네랄 유기태화 소재류

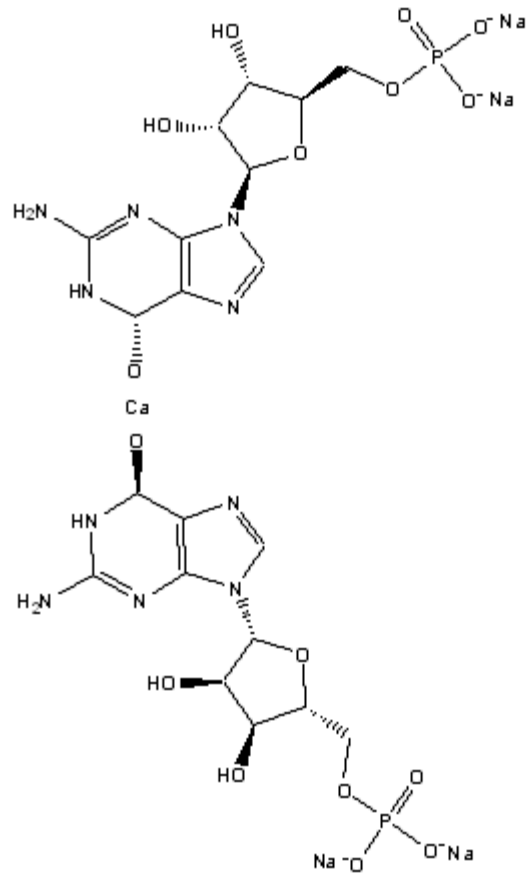


Fig 16 . 핵산(GMP) 기질화 제조된 Ca-GHAC의 화학구조변화 검정결과



Fig 17. 핵산 기질화 사업화 유기태 미네랄 소재류(13종, 분말형)

제 2-4 절 핵산 기질화 유기태 미네랄 소재류 대량생산시스템 정립 [핵산 미네랄 소재류의 외부저항성 평가]

1. 연구목표

선행연구에서 선발된 촉매제의 역할은 선행정립된 표준유기태화 제조법을 기준으로 선발 촉매제를 사용함에 따라 유단백질 및 탄수화물을 기질로 하여 제조되는 유기태화 미네랄 소재류의 생산수율과 동시에 목표 미네랄류의 킬레이팅 효율을 증대시키는데 있다. 선발된 핵산류는 선행연구를 통하여, 미네랄과 접촉시 강력한 유기태화 능력과 더불어 생산효율 또한 증대시키는 능력이 탁월함이 증명되었는데, 이외에도 이들이 보유하고 있는 -NH₂ 및 -P 의 기능성이 단백질류에 대한 킬레이팅 능력을 보유하고 있으리라 판단된다. 따라서, 본 연구에서는 우선 선발된 2종 핵산류(GMP, IMP)에 대하여 목표 미네랄류 5종(Ca, Fe, Zn, Cu, Se)중 셀레늄을 제외한 4종의 미네랄류를 적용 제조된 유기태화 4종(M-HAC) 소재류에 대한 pH안전성을 평가하므로서 외부저항성평가를 확인하고 저 하였다. 연계하여, 도출된 결과를 기준으로 유단백질 및 탄수화물을 기질로 제조되는 유기태화 소재류에 접목하여 이들의 단점인 생산수율과 킬레이팅 능력을 더욱 보강 하면서 더불어 외부인자(pH)에 저항성을 갖도록 하고저 본 연구를 진행하였다.

2. 연구수행방법

시료준비

본 연구에 유기태화 시료는 선행연구에서 선발된 핵산2종은 CJ제일제당(한국)에서 구입하여 이를 촉매제로 하여 미네랄-핵산 유기태화 소재류를 선행연구에서 제조하였고 이를 본 실험에서 기초 소재로 사용하였다. 전체시험간 적용시료는 선행연구(제 3 절)간 정립된 2종 핵산류에 대한 Ca-HAC제조방법을 기본으로 하여 시료제조 후 전체시험에서 사용하였다.

실험조성

GMP와 IMP를 기질로 하여 5종 미네랄을 각각 반응시킨 단일 미네랄-핵산 유기태화소재류와 동일기질에 대하여 전체 미네랄류를 동시 처리하는 다중 미네랄 킬레이팅 효능 평가군으로 대별하여 시험군을 준비하였다. 단일 핵산-단일미네랄 유기태화 소재군으로서는 GMP 촉매처리구는 Ca-GMP, Fe-GMP, Zn-GMP 및 Cu-GMP인 4종과 IMP촉매처리구는 Ca-IMP, Fe-IMP, Zn-IMP 과 Cu-IMP인 4종으로 총 8종을 대상으로 평가하였다.

결과 확인

전체 M-HAC소재류들에 외부인자 저항성 평가를 위한, pH용액은 시판중인 시약(DEJUNG사, 한국)을 pH별(1.68, 4.00, 7.00, 10.00 및 12.46)로 구입한 후 이를 이용하여 평가에 사용하였다. 단일기질-단일 미네랄 유기태화형 소재류(M-HAC소) 8종과 시료에 대하여 pH차이에 따른 안전성을 기준으로 외부저항성 효과를 평가하기 위한 시험디자인은 다음과 같이 준비하였다. 5ml 볼륨의 EP튜브에 준비된 pH용액을 4ml씩 각각 분취한 후, 여기에 준비된 MWPS-HAC소재류를 0.5g씩 첨가한 후 충분히 분산과정과 Sonocation

공정을 진행하였고, 10일 동안을 상온에서 거치시킨 후 외관평가를 통하여 성상변화를 침전, 용해, 용출 및 겔화 현상으로 구분하여 평가하였는데, 매우심한경우는 +++, 심한경우는 ++, 초기현상이 발생한 경우는 +, 그리고 변화가 없는 경우는 -로 구분하여 평가하였다.

외관 평가가 완료되면 원심(3,000rpm, 20분, 25℃)처리후 상등액만을 분취 0.25um여과 필터를 거쳐 ICP분석을 통하여 상등액내 존재하는 미네랄량을 비교하여 개발 소재류의 안전성과 관련한 외부환경저항 효과를 확인하였다.

3. 연구결과

외부인자저항성(pH) 평가

Fig 1은 미네랄-핵산 유기태화 소재류의 외부저항성평가를 위한 소재류의 개발을 위한 원료 및 제품의 성상이다. Table 1은 촉매제로 선별한 후 이를 기질로 하여 제조한 미네랄-핵산 유기태화 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 안전성 및 외부저항성 검정을 위해 pH별 조성액내 동일양의 시료를 첨가한 후 10일 경과시, 원심분리후 분취한 상등액내 분포하는 미네랄의 함량을 비교하여 이를 결과로 하였다.

핵산종류가 외부환경저항성에 있어 보유하고 있는지를 평가하여 본 결과, 이들은 전체 pH 범위에서 큰 변화를 보이지 않는 것으로 판단되었으며, 따라서 이러한 결과는 미네랄이 도입된 경우 이들이 안전하게 킬레이팅 구조를 형성 할 수 있는 근거를 제시하는 결과였다. 이를 근거로 미네랄이 킬레이팅 된 소재류에 대하여, pH별 안전성을 성상변화를 기준으로 평가하여 보았더니, 전체 시험군에서 pH 2~10 범위내에서는 안정한 것으로 평가되었다. 이중 Cu-GMP의 경우는 강산성인 pH 1의 범위에서 용해되면서 미네랄이 용출 및 겔화 현상이 심하게 발생하는 결과를 보였는데, pH가 중성 및 염기조건의 진해하면 이러한 현상은 발생하지 않았다.

pH가 산성조건에서 미네랄 분리 및 용출과 관련한 성상변화를 유발하는 시험구가 또 있는지를 살펴보았더니, Fe-GMP 및 Fe-IMP가 해당되었는데 이중 Fe-GMP시료는 pH가 12 이상의 염기조건에서 용출되는 현상이 더욱 심하게 나타났다.

본 결과는 성상비교 평가를 통하여, pH조건이 목표 미네랄의 분리시키는 지를 평가한 결과인데, 전체 시험구가 2~10의 범위에서 안전성을 확보하고 있는 것으로 조사됨에 따라 본 연구에서 촉매제로 사용하는 경우, pH가 6.8범위에서 M-WPS소재류가 개발되고 분말화 되는 기본 공정내에서는 미네랄의 이탈없이 킬레이팅 효능의 증대와 더불어 외부저항성에 있어 문제가 없는 것으로 평가 되었다. 그러나, 미생물의 번식으로 인한 유기산의 생성 혹은 과즙 음료 등의 pH가 약산성임을 고려 할 때, 추후 용도용법 및 적용성 확장시는 개발 미네랄-핵산 유기태화 소재류는 고려의 대상이 될 수 있음을 알게 되었다.

따라서, 미네랄 킬레이팅 효과 이외에 생산수율에 미치는 연구를 전체과제내에서 수행함으로써 촉매제로서 이용성을 극대화 할 것이고 신규 유기태화 제조법정립 및 지적소유권 확보를 통하여 국내외 기실선점과 산업화에 있어 우위를 점유 할 수 있도록 진행할 예정이다.

장기 pH보관에 따른 유기태화 미네랄 용출성 평가

Ca-HAC소재류

전체 HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 평가를 상등액내 미네랄류 용출성을 평가함으로서 개발 유기태화 소재류의 안정성을 확인함과 동시에 전체과제에서 사용될 촉매제로서 적용이 가능한지를 평가하고 저 하였다(표 2). 우선 Ca-HAC 소재류의 pH안전성 범위를 확인하여 보았더니, 전체 범위에서 안전성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다(표 3, 그림 2). 즉, 칼슘을 포함한 전체 미네랄류 합계치를 비교하여 보았더니 Ca-GHAC는 P와 S를 포함한 전체 합계에서는 90~231ppm을 P와 S를 뺀 미네랄 수치치가 41~190ppm의 범위를, IMP를 기질로 하는 경우에는 71~114ppm과 54~106ppm의 미미한 수치만의 결과를 확인하였다. 이러한 결과는 기질 핵산류는 적어도 칼슘에 있어 유기태화 반응이 종결되면 내산, 내염기 및 내열성을 보유하는 효능을 보유하는 물성을 갖는 것을 시사하는 것으로 본 과제의 목표에 부합하는 촉매제로서 충분한 자격을 보유한 소재임이 확인되었다.

Fe-HAC소재류

전체 HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성을 평가함으로서 개발 유기태화 소재류의 안정성을 확인함과 동시에 촉매제로서 적용이 가능한지를 평가하고 저 하였다.

Fe-HAC소재류의 경우도 Ca-HAC소재류와 비교시 다소 높은 미네랄 분포 수치를 보였지만, 전체 범위에서 안전성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다(표 3, 그림 4). 즉, 철분만을 대상으로 비교하여 보았더니 Fe-GHAC는 pH 7에서는 2ppm, Fe-IHAC는 1ppm으로 조사되어 중성 조건에서는 용출효과는 거의 없는 것으로 평가되었는데, 산성 및 염기성 조건으로 갈수록 용출량은 증가하는 것으로 평가 되었지만, 침전물내 함유되어 있는 미네랄의 수치가 Fe-GHAC는 30,000ppm이상 그리고 Fe-IHAC는 42,000ppm이상의 유기태 효율을 보존하고 있었던 점과 10일동안 용출수치인 결과로 보면 이들은 내산 및 내염기성을 보유하고 있는 것으로 평가가 되었다. 이러한 결과는 기질 핵산류는 적어도 철분에 대하여도 칼슘과 같이 유기태화 반응이 종결되면 내산, 내염기 및 내열성을 보유하는 효능을 보유하는 물성을 갖는 것을 시사하는 것으로 본 과제의 목표에 부합하는 촉매제로서 충분한 자격을 보유한 소재임이 확인되었다.

Fe-HAC소재류

전체 HAC 소재류를 대상으로 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성을 평가함으로서 개발 유기태화 소재류의 안정성을 확인함과 동시에 전체과제에서 사용될 촉매제로서 적용이 가능한지를 평가하고 저 하였다. Cu-HAC소재류의 경우의 안전성을 구리만을 대상으로 비교하여 보았더니 Cu-GHAC는 pH 7에서는 20ppm, Fe-IHAC는 1.27ppm으로 조사되어 중성 조건에서는 용출효과는 거의 없는 것으로 평가되었는데, 산성 및 염기성 조건으로 갈수록 용출량은 1,000~3,000ppm범위 이내로 증가하는 것으로 평가 되어 안전조건은 pH 4~10범위인 것으로 평가 되었다(표 4, 그림 4). 침전물내 함유되어 있는 미네랄의 수치가 Cu-GHAC와 Fe-IHAC 공히 100,000ppm이상의 유기태 효율을 보존하고 있었던 점과 10일동안 용출수치인 결과로 보면 내산, 내염기성 및 내열성을 보유하고 있는 것으로 평가가 되었다. 이러한 결과는 기질 핵산류는 적어도 구리에 대하

여 유기태화 반응이 종결되면 내산, 내염기 및 내열성을 보유하는 물성을 갖는 것을 시사 하는 것으로 촉매제로서 효능을 보유한 소재임이 확인되었다.

Zn-HAC소재류

전체 HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성을 평가함으로써 개발 유기태화 소재류의 안정성을 확인함과 동시에 전체과 제에서 촉매제로서 적용이 가능한지를 평가하고 저 하였다. Zn-HAC소재류의 경우의 안전 성을 아연만을 대상으로 비교하여 보았더니 Zn-GHAC는 pH 7에서는 25ppm, Zn-IHAC 는 366ppm으로 조사되어 중성 조건에서는 용출효과는 거의 없는 것으로 평가되었다(표 5, 그림 5). 내산 및 내염기성을 보유하고 있는지를 조사하여 보았더니 Zn-GHAC소재류는 내 산 보다는 염기조건으로 갈수록 용출량은 3ppm으로 감소함에 따라 내염기성이 뛰어난 것 으로 판단되었다. 그러나, Zn-IHAC소재류는 내산 및 내염기성을 동시에 보유하는 것으로 조사 되어 다른 미네랄 소재보다는 다소 차이를 보였다. 침전물내 함유되어 있는 미네랄의 수치가 Zn-GHAC와 Fe-IHAC 공히 10,000ppm이상의 유기태 효율을 보존하고 있었던 점 과 10일동안 용출수치인 결과로 보면 다소 용출되는 수치가 높기는 하지만 이들은 내산 및 내염기성을 보유하고 있는 것으로 평가가 되었다. 이러한 결과는 기질 핵산류는 적어도 아연 에 대하여 유기태화 반응이 종결되면 내산, 내염기 및 내열성을 보유하는 물성을 갖는 것을 시사 하는 것으로 촉매제로서 효능을 보유한 소재임이 확인되었다.

6. 결론

- 가. 우선 핵산을 이용한 내산 및 내염기성 및 내열성을 갖는 신규한 미네랄-핵산 유기태화 소재류 제조관련 제조법 개발이 완료되었다.
- 나. 전체 미네랄-핵산 유기태화 소재류를 대상으로 안전성 및 외부환경저항 효과를 10일이 경과시 확인결과, pH 2~10범위에서 대부분 안정한 것으로 평가되었다.
- 다. 이러한 결과는 핵산을 촉매제로 사용시, M-WPS소재류의 단점인 생산수율과 미네랄 킬 레이팅 효능을 보다 더 증가시킬수 있을 것으로 판단되었는데, 이는 핵산이 고유적으로 보유하고 있는 -NH₂ 기능기는 유단백질에 대하여여 응집효과가 있을 것으로 판단되었기 때문이다.
- 라. 미네랄 킬레이팅 효능을 증가시킬 수 있음은 사전 M-WPS제조사 1차적으로유청단백질 내 킬레이팅 된 결과 이외에 핵산이 보유하고 있는 -P기능기가 미잉여 미네랄류를 2차 적으로 킬레이팅화 함으로서 증대시키는 효과가 보다 높은 것으로 평가되었다.
- 마. 따라서, 핵산은 유청단백질을 포함한 단백질류를 기질로 하는 유기태화 소재류 개발시 생산효율과 미네랄 킬레이팅 효능을 단일 또는 동시에 증가시키는 우수한 소재로 평가되 었다.

7. 추후진행사항

제조한 10종을 유기태화 핵산류중 셀레늄의 경우는 유기태화 반응 후 액상상태의 패턴을 보여 핵산류는 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 증대형 촉매제로서 적용이 적절하지 않는 것으 로 판단되었기 때문에 별도의 기질 선발과 동일 목적의 유기태화 핵산류 제조기법을 본 전 체과제에서 별도로 정립할 것이다. 4종 미네랄 대상으로 유기태화 특성을 파악한 결과, 매

우 우수한 성능을 보유한 것으로 조사되었는데 이용성에 대한 적극적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다. 4종 미네랄을 대상으로 기존 표준정립법에 따른 저생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효능 증대를 위한 촉매제로서 4종 핵산류중 2종이 선발 및 이들의 관련 특성파악 결과를 기초로 본 과제에서는 사료첨가제 개발에 있어 보조제로서 사용연구가 완료되었지만 추후 용도용법 및 적용성 확대를 위한 산업화 연구에서 적극 활용할 것이다.

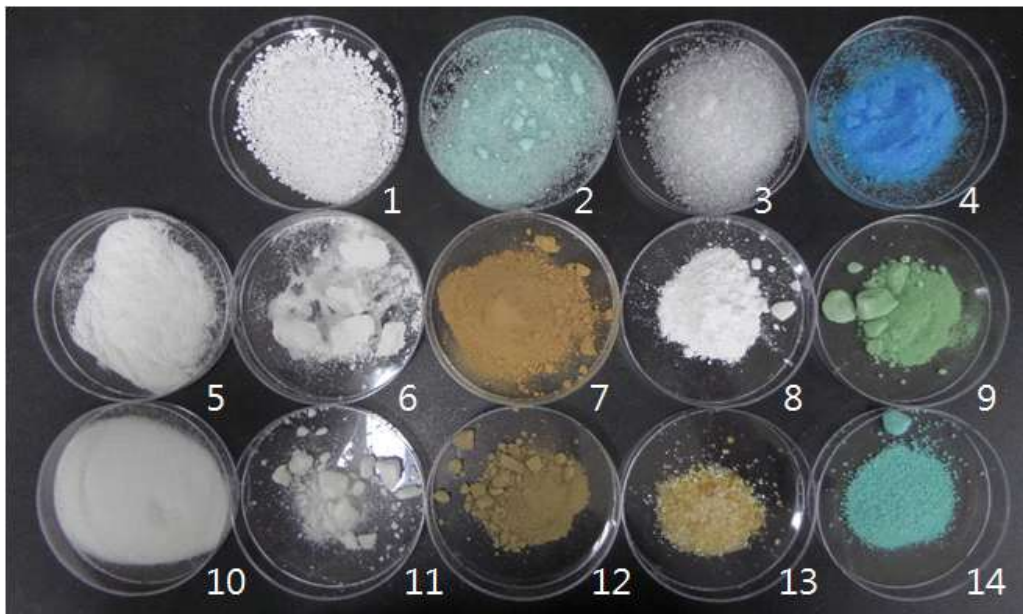


Fig 1 . 핵산류를 촉매로 하는 유기태화 미네랄 소재류 개발 결과

1: CaCl₂, 2: FeSO₄, 3:ZnSO₄, 4: CuSO₄, 5: GMP, 6: Ca-GMP, 7: Fe-GMP, 8:Zn-GMP, 9:Cu-GMP, 10 IMP, 11 : Ca-IMP, 12:Fe-IMP, 13:Zn-IMP, 14:Cu-IMP

Table 1. 유기태화 핵산류(M-HAC류)의 pH별 안전성 관련 성상변화 평가결과

유기태화 핵산류	유기태화 핵산소재별 pH조건별 안정성 평가																			비고	
	pH 1.68				pH 4.00				pH 7.00				pH 10.00				pH 12.46				
	침전	용해	용출	겔화	침전	용해	용출	겔화	침전	용해	용출	겔화	침전	용해	용출	겔화	침전	용해	용출		겔화
Ca-GMP	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	
Ca-IMP	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	
Fe-GMP	+++	-	++	-	+++	-	+	-	+++	-	-	-	+++	-	+	-	+++	-	+++	-	
Fe-IMP	+++	-	++	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	+++	-	+	-	+++	+	+	-	
Cu-GMP	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	+	-	
Cu-IMP	+++	+	-	-	+++	-	+	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	+	-	
Zn-GMP	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	
Zn-IMP	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	
비고	+++:매우심함, ++:심함, +:초기발생, -:안정																				

Table 2 . Ca-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가결과

HAC소재류			pH별 안전성(미네랄 용출현상)평가결과(ppm)										합계		비고
			Ca	Fe	Se	Mg	Mn	K	Cr	S	P	Na	PS+	PS-	
Ca -GHAC	pH 1.68	Mean	0.20	0.011	0.001	0.02	0.0003	33.9	0.004	0.01	49.5	6.71	90	41	
		SD	0.00	0.000	0.001	0.00	0.0001	0.1	0.000	0.00	0.29	0.24			
	pH 4.0	Mean	41.8	0.009	0.002	0.03	0.0004	36.0	0.004	0.01	30.4	13.5	122	91	
		SD	0.19	0.001	0.002	0.01	0.0001	0.2	0.000	0.00	0.12	0.45			
	pH 7.0	Mean	0.62	0.003	0.002	0.02	ND	20.5	0.004	0.01	52.1	46.8	120	68	
		SD	0.00	0.001	0.002	0.00		0.1	0.000	0.00	0.03	0.81			
	pH 10.0	Mean	79.0	0.003	0.001	0.05	0.0002	43.1	0.004	0.03	41.3	68.1	231	190	
		SD	0.13	0.0001	0.002	0.01	0.0001	0.2	0.000	0.00	0.13	0.76			
	pH12.46	Mean	40.0	0.0024	0.001	0.04	ND	40.3	0.004	0.01	31.3	34.7	146	115	
		SD	0.14	0.0007	0.001	0.01		0.1	0.000	0.00	0.14	0.24			
Ca -IHAC	pH 1.68	Mean	0.24	0.0151	0.002	0.02	ND	32.8	0.004	ND	16.4	21.0	71	54	
		SD	0.00	0.0001	0.001	0.01		0.1	0.000		0.01	1.00			
	pH 4.0	Mean	28.6	0.0037	0.003	0.02	ND	32.5	0.004	ND	3.73	17.1	82	78	
		SD	0.08	0.0010	0.001	0.01		0.2	0.000		0.01	0.25			
	pH 7.0	Mean	0.72	0.0021	0.001	0.01	ND	19.0	0.004	0.01	46.4	47.9	114	68	
		SD	0.00	0.0002	0.003	0.00		0.2	0.000	0.00	0.16	0.68			
	pH 10	Mean	23.1	0.0036	0.002	0.00	ND	41.3	0.004	0.02	1.44	41.9	108	106	
		SD	0.10	0.0004	0.001	0.01		0.2	0.001	0.00	0.01	0.64			
	pH 12.46	Mean	19.5	0.0054	0.001	0.01	ND	41.0	0.004	ND	9.38	38.1	108	99	
		SD	0.02	0.0004	0.001	0.02		0.1	0.000		0.03	0.77			

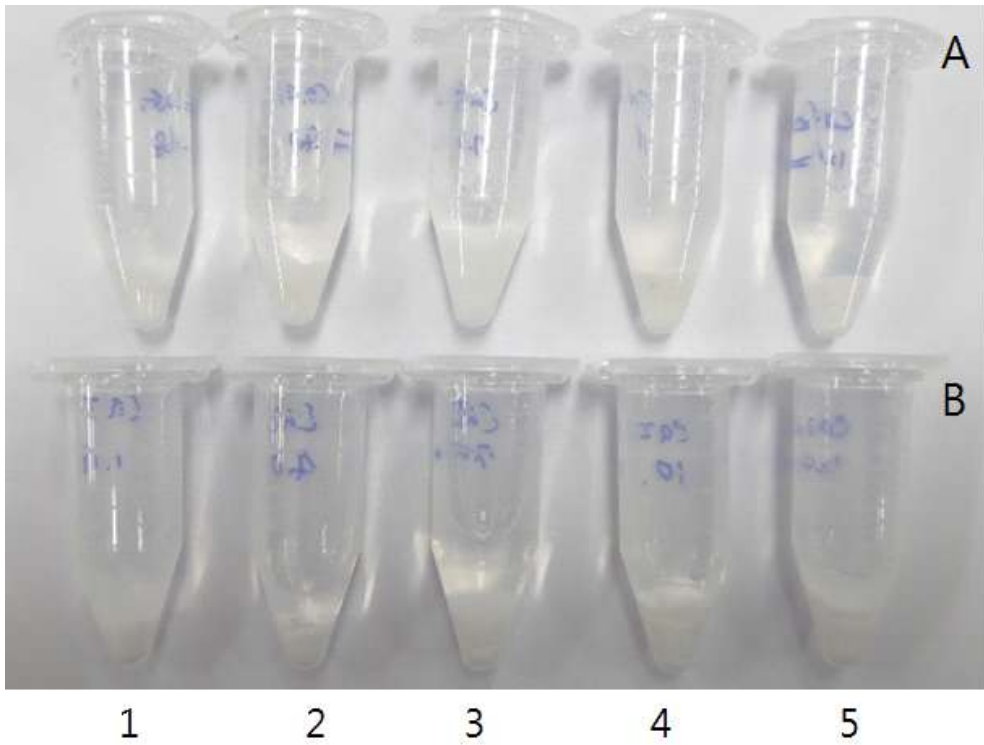


Fig 2 . Ca-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가과정

A: Ca-GMP, B: Ca-IMP

1: pH 1.68, 2: pH 4.00, 3: pH 7.00, 4: pH 10, 5: pH 12.48

Table 3. Fe-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가결과

HAC소재류		pH별 안전성(미네랄 용출현상)평가결과(ppm)										합계		결과	
		Fe	Se	Ca	Mg	Mn	K	Cr	S	P	Na	PS+	PS-		
Fe -GHAC	pH 1.68	Mean	663	0.02	1.88	0.00	1.37	1,658	0.18	2,092	696	1,397	5,847	3,059	
		SD	1	0.10	0.04	0.28	0.02	13	0.02	5	2	27			
	pH 4.0	Mean	315	0.32	2.52	0.35	2.65	1,641	0.13	1,077	4	728	3,456	2,375	
		SD	1	0.08	0.02	0.55	0.01	5	0.03	1	0	29			
	pH 7.0	Mean	2	0.18	1.59	0.28	0.06	809	0.15	1,544	2,679	2,701	7,735	3,512	
		SD	0.05	0.11	0.02	0.19	0.00	3	0.01	3	5	34			
	pH 10.0	Mean	184	0.08	2.16		2.79	1,865	0.14	2,070	1	2,369	6,310	4,239	
		SD	1	0.10	0.02		0.01	4	0.03	6	1	3			
	pH12.46	Mean	153	0.16	2.43	0.00	0.39	1,812	0.14	1,059	416	1,688	4,978	3,503	
		SD	0	0.05	0.02	0.36	0.00	7	0.01	2	1	33			
Fe -IHAC	pH 1.68	Mean	1,384		2.80		3.39	1,642	0.19	1,531	1,570	910	5,660	2,559	
		SD	2		0.01		0.01	6	0.02	3	8	34			
	pH 4.0	Mean	838	0.03	3.24	0.53	5.55	1,614	0.11	1,603	28	1,027	4,282	2,651	
		SD	1	0.06	0.02	0.33	0.01	6	0.02	5	0.56	12			
	pH 7.0	Mean	3	0.09	1.75	0.49	0.18	708	0.18	1,351	2,532.00	2,293	6,887	3,004	
		SD	0.04	0.02	0.01	0.41	0.00	5	0.01	4	11.00	12			
	pH 10	Mean	18	0.26	1.91	1.13	1.61	1,795	0.16	1,417	18.99	1,744	4,980	3,544	
		SD	0.06	0.05	0.01	0.30	0.01	4	0.02	4	0.27	29			
	pH 12.46	Mean	91	0.10	2.52	0.69	2.75	1,827	0.15	1,585	180.10	2,001	5,599	3,834	
		SD	0.39	0.08	0.01	0.13	0.01	8	0.01	6	0.20	8			

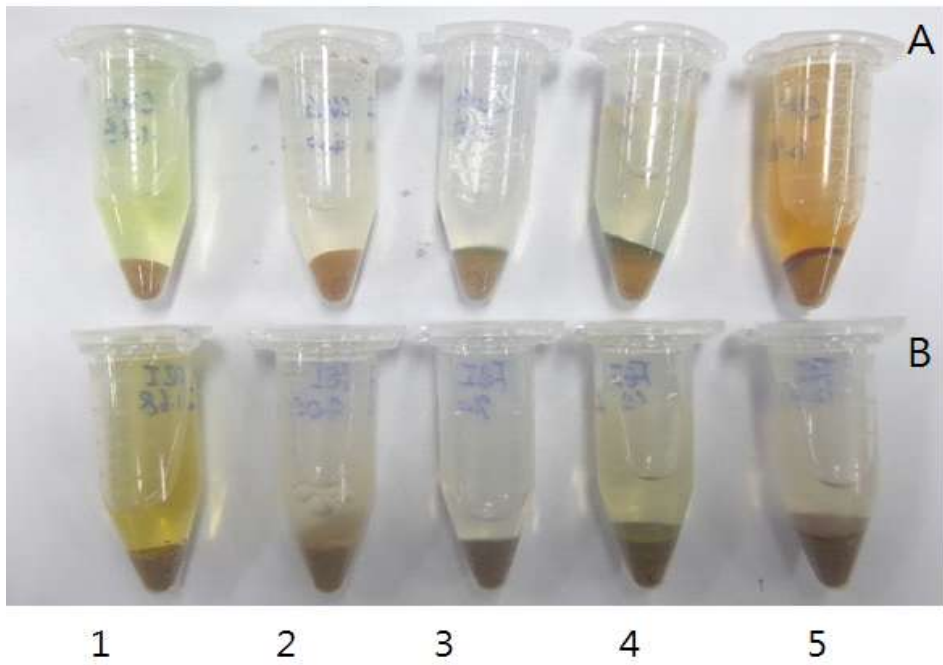


Fig 3 . Fe-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액 내 미네랄류 용출성 평가과정

A: Fe-GMP, B: Fe-IMP

1: pH 1.68, 2: pH 4.00, 3: pH 7.00, 4: pH 10, 5: pH 12.48

Table 4. Cu-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가결과

HAC소재류		pH별 안전성(미네랄 용출현상)평가결과(ppm)												합계		결과		
		Cu	Fe	Se	Zn	Ca	Mg	Mn	K	Cr	S	P	Na	PS+	PS-			
Raw milk	Mean	27.70	2.34	1.56	3.83	1,093	97.62	0.03	1,215	0.06	313	1,426	284	4,431	2,692			
	SD	0.04	0.02	0.10	0.01	2.00	0.57	0.01	2	0.03	1	5	50					
Cu-GHAC	pH 1.68	Mean	3,349	1.33	0.32	0.21	4.21	1.30	0.18	1,398	0.16	1,836	2,597	1,010	6,847	2,414		
		SD	22	0.03	0.23	0.00	0.06	0.08	0.01	8	0.04	17	24	55				
	pH 4.0	Mean	1,978	0.66	0.19		2.60	0.09	0.18	1,579	0.10	1,487	498	986	4,553	2,568		
		SD	1.00	0.01	0.04		0.01	0.33	0.01	14	0.01	1	2	13				
	pH 7.0	Mean	20	0.10	0.03		1.03	0.96	0.14	931	0.12	1,858	2,725	2,846	8,362	3,779		
		SD	0.12	0.03	0.08		0.02	0.05	0.00	2	0.03	7	12	21				
	pH 10.0	Mean	104	9.22	0.86		1.75	0.39	0.07	1,806	0.12	1,224	60	1,842	4,934	3,650		
		SD	0.30	0.05	0.10		0.01	0.08	0.00	10	0.03	3	0	8				
	pH12.46	Mean	509	0.17	0.06	0.11	1.59	0.37	0.03	1,805	0.13	1,186	415	1,731	5,139	3,538		
		SD	1.50	0.02	0.06	0.00	0.04	0.10	0.01	1	0.02	3	1	43				
	Cu-IHAC	pH 1.68	Mean	69	0.70	0.33	0.10	2.86	0.43	0.08	1,594	0.13	1,061	1,576	560	4,794	2,157	
			SD	0.21	0.08	0.05	0.00	0.05	0.41	0.00	5	0.01	5	4	25			
pH 4.0		Mean	1,092	0.53	0.21		2.46	0.34	0.09	1,600	0.16	704	101	333	2,740	1,936		
		SD	2.00	0.01	0.05		0.03	0.32	0.00	3	0.01	2	1	38				
pH 7.0		Mean	1.27	0.16	0.16		1.29	0.26	0.00	925	0.14	639	3,262	1,898	6,726	2,825		
		SD	0.01	0.03	0.02		0.02	0.03	0.01	1	0.02	1	9	54				
pH 10		Mean	16.5	0.12	0.02		2.24	0.53	0.02	1,833	0.13	767	26	1,363	3,992	3,199		
		SD	0.04	0.04	0.09		0.01	0.66	0.01	5	0.01	2	1	10				
pH 12.46		Mean	76.0	0.27	0.17		1.58	0.30	(0.01)	1,814	0.14	1,005	229	1,520	4,570	3,336		
		SD	0.13	0.03	0.06		0.03	0.45	0.01	6	0.01	3	1	27				

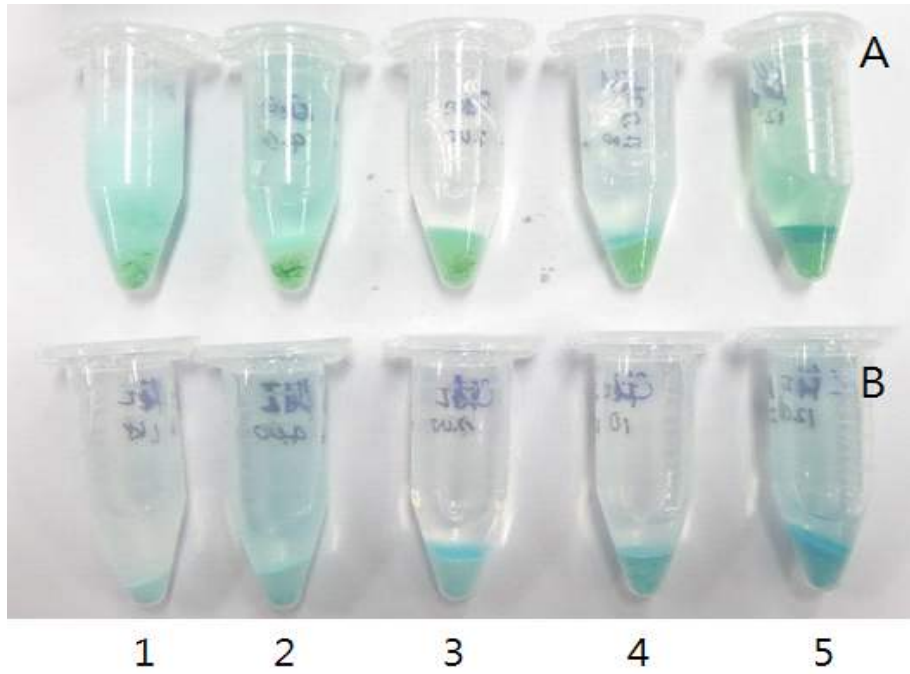


Fig 4. Cu-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가과정

A: Cu-GMP, B: Cu-IMP

1: pH 1.68, 2: pH 4.00, 3: pH 7.00, 4: pH 10, 5: pH 12.48

Table 5. Zn-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가결과

HAC소재류		pH별 안전성(미네랄 용출현상)평가결과(ppm)											합계		결과	
		Zn	Fe	Se	Ca	Mg	Mn	K	Cr	S	P	Na	PS+	PS-		
Zn-GHAC	pH 1.68	Mean	819	0.63	0.07	0.93	0.37	0.03	1,005	0.20	2,605	987.70	2,176	6,775	3,183	
		SD	3	0.02	0.09	0.03	0.29	0.00	4	0.01	6	2.70	56			
	pH 4.0	Mean	1,633	4.02	0.09	1.82	0.56	0.09	1,789	0.20	2,472	373.70	2,136	6,774	3,928	
		SD	4	0.04	0.01	0.02	0.59	0.01	14	0.02	2	0.10	26			
	pH 7.0	Mean	25	0.11	0.12	0.60	0.23		857	0.18	1,151	3,399.00	2,567	7,975	3,425	
		SD	0.05	0.01	0.07	0.01	0.49		6	0.02	3	6.00	51			
	pH 10.0	Mean	116	0.09	0.18	1.80	0.53	0.01	1,943	0.18	2,548	6.44	3,087	7,587	5,033	
		SD	0.20	0.02	0.12	0.02	0.59	0.00	10	0.02	7	0.12	24			
	pH12.46	Mean	3	0.31	0.12	1.08	0.30		1,932	0.19	1,747	279.50	2,404	6,364	4,338	
		SD	0.01	0.02	0.04	0.01	0.38		8	0.01	5	2.10	21			
Zn-IMP	pH 1.68	Mean	71	1.18	0.05	3.90	1.43	0.01	1,777	0.20	1,940	3,210.00	1,442	8,375	3,225	
		SD	0.06	0.03	0.03	0.02	0.67	0.00	16	0.01	2	8.00	3			
	pH 4.0	Mean	2,564	0.33	0.08	5.63	2.00	0.09	1,799	0.19	2,920	821.10	2,117	7,665	3,924	
		SD	8	0.01	0.07	0.07	0.50	0.00	13	0.03	5	3.10	27			
	pH 7.0	Mean	366	0.13	0.07	2.27	2.12	0.03	922	0.18	2,486	2,955.00	3,372	9,739	4,298	
		SD	0.30	0.11	0.05	0.02	0.07	0.01	3	0.02	3	14.00	27			
	pH 10	Mean	82	0.08	0.062	3.56	1.38	0.02	1,945	0.18	1,926	12.70	2,407	6,296	4,357	
		SD	0.09	0.029	0.108	0.03	0.27	0.01	3	0.02	1	0.21	17			
	pH 12.48	Mean	430	0.222	0.115	5.95	1.56	0.02	2,009	0.20	2,434	85	2,839	7,375	4,856	
		SD	1.40	0.047	0.056	0.02	0.29	0.01	2.00	0.01	5.00	0.64	33.00			

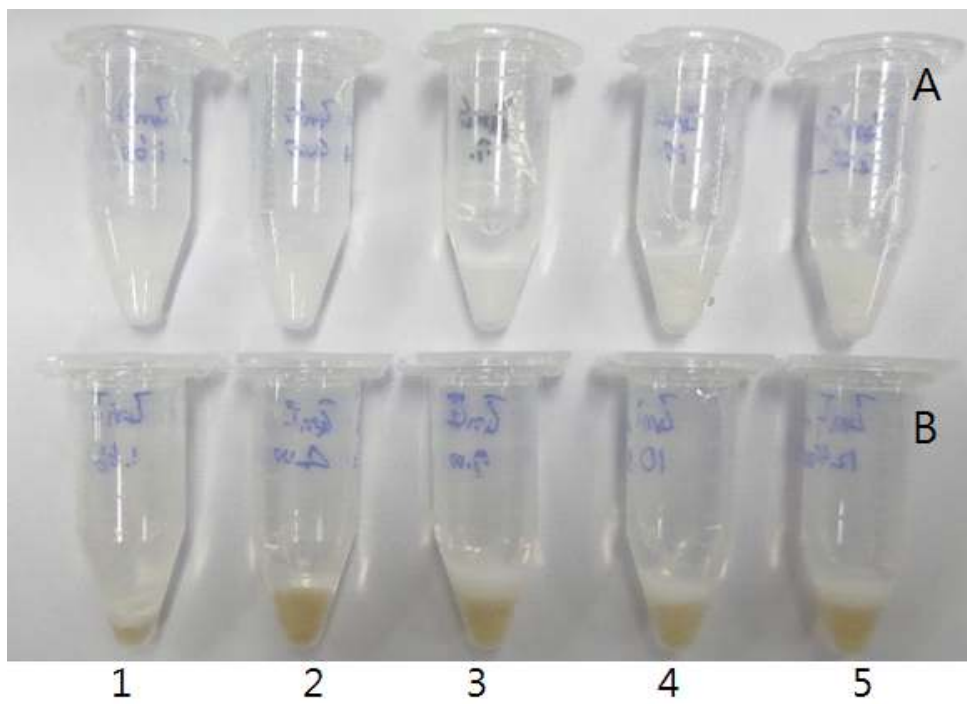


Fig 4. Zn-HAC 소재류를 대상으로 한 pH별 처리에 따른 외부저항성 검정을 위한 상등액내 미네랄류 용출성 평가과정

A: Zn-GMP, B: Zn-IMP

1: pH 1.68, 2: pH 4.00, 3: pH 7.00, 4: pH 10, 5: pH 12.48

제 3-1 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립(유기태화 소재 개발용 기질 선발)

1. 연구목적

본 연구는 본과제의 최종 목표인 무기태 미네랄의 유기태화 제제로 개발을 위하여, 우선 전체 목표 미네랄(Ca, Zn, Fe, Cu, Se)중 칼슘만을 대상으로 킬레이팅화를 위한 기질단백질의 선발을 위하여 실시하였다.

이를 위하여 기 발표 및 보고 된 결과를 토대로 유단백질류를 우선 선발하고 칼슘을 포함한 미네랄 함유량 조사를 통하여 본 개발 간 킬레이팅 기질단백질을 선발하고 저 하였다.

선발기준은 칼슘의 함유량이 높으면서 잉여자원으로서 저가 생산이 가능한 재료를 기준으로 하였다.

본 연구목표인 미네랄유 킬레이팅 기질단백질 선발을 위한 우유소재 단백질내 미네랄 분포조사 결과는 다음과 같이 실시하였다.

2. 연구수행방법

기질 단백질 선발을 위하여 22종의 우유유래의 단백질류 및 부산물을 수집하여 이를 시험간 재료로 사용하였다. 시험간 수집한 재료는 시유, 멸균유, 유청단백질(매일유업, Whey Protein Separation, 이하 WPS), WPI(Arla사), 사이알릴올리고당, 상용 락토펜린류 [DMV-LF(SD), MORINAGA LF(FD), TATURA-LF(FD), TATUA-LF(FD), FONTERA-LF(FD), MG-LF(SD)], α -Lactalbumin, 유지방구막단백질, 고단백유청분말, 가수분해유청단백질, 탈염유청분말, 우유인지질, 유당, 초유단백분말, Lactic Casein, 탈지분유 그리고 전지분유이다.

3. 결과확인

22종의 기질 단백질류 및 부산물내 존재하는 칼슘 및 미네랄 분석을 ICP분석을 통하여 검정하였으며, 조사항목은 Ca, P, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na 및 Zn으로 9종을 분석대상으로 하였다.

4. 연구수행결과

칼슘을 포함한 대표적 미네랄을 기준으로 구성 유단백질별 함유량을 확인하여 본 결과, 전체적으로 Ca > P > K > Na > Fe > Zn > 기타 순으로 경향을 보였다. 유단백질별 고유 칼슘보유량(mg/Kg)의 경우는, 단백질 구성차이 및 제조공법에 따라 함유량 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

기질 단백질별 칼슘의 함유량을 조사하여 보았더니, 우유인지질은 0.6ppm, Lactoferrin류는 100ppm 이내의 범위를 탈염유청 탈염유청분말(507mg/Kg) < 가수분해유청분말(775mg/Kg) < 고단백유청분말 (2,054mg/Kg) < WPI(1,264mg/Kg) < 유지방구단백질(4,211mg/Kg) < α -Lactalbumin(4,851mg/Kg) < 시유(9,660mg/Kg) < 멸균유(9,972mg/Kg) < 전지분유(10,280mg/Kg) 순으로 보였다(Table 1).

우선 시유와 멸균유내 칼슘함유량을 조사하여 보았더니 1,136ppm~1,163ppm의 범위로 조사되었는데, 기존 보고(한국영양학회, 2000) 결과와 유사하기 조사되어 결과의 유의성은 인정되었다. 이를 기초로 기질단백질내 칼슘함유량을 비교하여 보았더니, 초유유청분말의 경우는 17,430ppm, 탈지분유는 15,480ppm, 전지분유 10,280ppm 그리고 사이알릴올리고당의 경우는 12,820ppm으로 높은 수치를 보였지만 자체가 고가의 원료임으로 인하여 본 연구간 기질단백질 소재로서 제외하였다.

치즈제조 후 건조시킨 유청분말(매일유업)내 칼슘함유량은 5,038ppm, α -Lactalbumin의 경우는 4,851ppm, 유지방구막단백질은 4,200ppm, 고단백유청분말 제제는 2,054ppm의 칼슘함유량 수치를 보였는데, 이외의 재료는 기질단백질서 칼슘함유량 선발기준 이하였으므로 제외하였다.

치즈생산 후 열풍건조한 유청분말의 칼슘수치가 5,000ppm이상이었는데, 유청분말 기본 구성단백질이 α -Lactalbumin, 유지방구막단백질 및 고단백유청분말 등이고 이들의 칼슘함유량이 높았음을 판단하면 유청분말자체를 기질단백질로 사용함이 가장 타당하다고 결론 내릴 수 있었다. 그러나, 동일하게 치즈부산물로 생산한 WPI(Arla사, 덴마크)의 경우, 단백질 함유량을 90%이상 함유되게 정제한 경우에서 칼슘검출량은 1,264ppm이었다. 이는 적어도 유청단백질내 1,200ppm 정도의 칼슘을 킬레이팅이 가능함을 시사하였으며, 유기태화 소재개발간 기질단백질 제조는 치즈생산시부터 개발공정이 필요함을 알 수 있었다.

따라서, 유청분말내 높은 칼슘수치를 함유하고 있으면서, 잉여소재로서 저가로 제조가 가능하다는 점, 주관기관에서 치즈생산 후 대량생산이 가능하다는 점 등 경제성 부분 등을 종합적으로 고려할 때, 본 연구간 기질단백질로서 유청분말이 최적 소재임이 확인되었다.

5. 선발 원료확보현황 분석

본 과제를 진행시 유단백질류중 무기태 미네랄의 유기태화 기질로서 최적의 선발 목표를 제시하였는데, 경제성 및 원료확보의 용이성 등이 동시에 충족될 수 있는 기질로는 1순위는 유청단백질(WPS), 2순위는 탈지분유(년 10톤이상의 국내재고) 그리고 3순위는 전지분유 순으로 선정하였다.

본 과제를 진행하기 위해서는 원료인 유청분말의 확보와 경제성은 주요한 항목임에 따라 국내외적 현황을 분석하여 보았다(Table 2).

본 과제가 성공적으로 종료시, 예상되는 원료 유청의 소요량은 유기태화 미네랄 소재류 1종만으로도 1,650톤(소요비용 : 33억)이 소요될 것으로 예상되는데, 관련하여 국제시세가는 1,500원/1Kg(서유럽, 오세아니아 기준, 1\$=1,000원 기준)이 형성되어 있었으며, 국내 유청분말 생산량 및 수입량은 총 43,506톤이었다.

Table 1. 유기태화 기질선발을 위한 우유소재 단백질내 미네랄 분포조사 사전조사결과

원단백질종류	ICP측정결과(mg/kg)									비고
	Ca	P	Cu	Fe	Mg	Mn	K	Na	Zn	
시유	1,136	918	1.89	0.65	92.3	0.18	1,870	519	4.29	
멸균유	1,163	896	1.94	0.46	101	ND	1,894	526	3.49	
WPS(매일유업)	5,038	3,717	ND	17.4	766	ND	8,714	6,236	ND	선발 1
WPI(Arla사)	1,264	1.24	ND	12.2	453	ND	6,423	5,867	ND	단백질 90%이상
사이알릴올리고당	12,820	11,540	ND	10.03	4,524	ND	13,500	NT	4.45	
DMV-LF(SD)	0.762	395.8	ND	221.0	ND	ND	ND	NT	1.81	Lactoferrin
MORINAGA LF(FD)	639.4	138.6	2.507	266.2	76.62	ND	3.04	NT	4.144	
TATURA-LF(FD)	106.9	71.74	ND	184.9	55.83	ND	7.53	NT	3.27	
TATUA-LF(FD)	86.93	76.45	ND	200.5	10.79	ND	8.47	NT	3.38	
FONTERA-LF(FD)	13.13	95.49	ND	180.0	0.281	ND	3.99	NT	1.67	
MG-LF(SD)	10.72	317.6	ND	169.5	ND	ND	14.47	NT	9.41	
α-Lactalbumin	4,851	4,453	ND	4.02	976.0	ND	3,755	NT	5.62	
유지방구막단백질	4,211	NT	ND	31.76	1,016	ND	NT	NT	NT	
고단백유청분말	2,054	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
가수분해유청단백질	775	4,888	2.36	5.22	133	ND	NT	15,140	56.43	
탈염유청분말	507	NT	ND	ND	436	ND	NT	NT	NT	
우유인지질	0.609	NT	ND	ND	NO	ND	NT	NT	NT	
유당	562	858.4	ND	ND	90.51	ND	177.20	72.31	ND	
초유단백분말	17,430	27,940	0.67	11.49	1,718	ND	4,404	1,303	141.8	
Lactic Casein	415.2	19.45	1.55	3.9	34	ND	59.48	ND	51.25	
탈지분유	15,480	NT	ND	16.65	2,095	ND	NT	NT	NT	선발 2
전지분유	10,280	NT	ND	ND	1,550	ND	NT	NT	NT	선발 3

SD:Sprayer Dry, NT : Not Testing, ND :Not Detection

Table 2. 국내 유청분말 생산량 및 수입량분석결과

(단위 : 톤)

년도	국내생산량	수입량(톤, USD 1\$=1,000원)	계
2011	7,864	30,432(42,939)	38,296
2010	7,325	37,598(40,661)	44,923
2009	7,576	32,219(28,888)	39,795
2008	7,933	32,007(38,306)	39,940
2007	7,784	46,792(67,083)	54,576
비고	축산식문(2012.11.)	1. 2011.낙농통계연감 2. 2011이후 수입쿼터제 적용 - 2020년 이후 : 무제한 수입	

제 3-2 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립(선발 기질(유단백질)의 킬레이팅 촉매인자 설정기법 정립)

1. 연구목표

전체과제에서 중요한 핵심목표는 무기태 미네랄의 단점 극복형 유기태화 미네랄 소재류를 개발함에 있고, 이를 위한 핵심기질의 선발과 이들을 이용한 유기태화 제조법을 정립함에 있어 목표 미네랄류의 기질내 킬레이팅 효율과 생산수율을 극대화를 시키기 위한 보조로서 핵심 촉매인자 및 촉매류를 개발함이 중요한 목표이다. 본 연구에서는 이를 위하여 선발되 2종 기질인 유청단백질 및 탈지분유중에 유청단백질만을 대상으로 최적 촉매인자를 선발하기 위한 기법을 정립코 저 하였다. 본 연구에서 개발하고 저 하는 유기태화 소재류가 본 전체과제에서는 사료에 혼합 사료첨가제로 활용함이 목적이지만, 본 연구를 통하여 개발된 소재류는 주관기관이 추후 진출하고 저 하는 사업영역이 식품 및 건기식품임에 따라 제조법 또한 영유아식 제품원료 및 제품류의 생산기준를 개발 방향으로 설정하였다. 따라서, 선행연구수준에서부터 식품첨가물로서 등재된 소재만을 선발하고, 일체의 화학반응 및 관련 시료사용을 배제하는 조건으로 표준 유기태화 제조기법을 정립하였다.

본 과제에서는 촉매인자로서 pH를 우선 고려하여 선행연구를 실시한 바, pH 4~10의 범위에서는 안전성을 확보하였음에 따라 유기태화 제조법은 중성 pH조건으로 설정하였다.

연계하여, 본 연구에서는 촉매인자를 온도조건과 미네랄 킬레이팅과 관련한 주요인자로서 -P 및 -S을 기능기로 설정하고, 온도처리가 미네랄 킬레이팅 효능에 미치는 효능과 미네랄 킬레이팅 관련 핵심 기능기의 증대에 미치는 효능을 비교하여 최적 온도범위를 설정코 저 하였다.

2. 연구수행방법

본 연구간 사용된 유기태화 기질은 선행연구를 거쳐 선발된 유청분말(매일유업(주))을 사용하였으며, 온도별 처리가 선발된 유청단백질의 유기태화시 킬레이팅 효능에 미치는 효과를 평가하기 위하여 외부에서 미네랄을 첨가하지 않는 조건으로 순수하게 유청단백질이 고유적으로 보유하고 있는 미네랄류만의 킬레이팅 효과를 평가하였다.

온도별 처리가 유기태화 반응에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 25%(w/w) 용액으로 조성한 유청액에 대하여 무처리구, 60, 70, 80 및 90' C로 처리한 시험구별로 30분(1회)처리한 후, 침전물을 분리 및 이를 정제수로 7차 세척단계를 거친 동결건조물에 대하여 미네랄 함유량 변화를 비교하여 최적 촉매인자로서 온도범위를 설정하였다. 또한, 유단백질과 무기태 미네랄의 킬레이팅과 관련한 -P 및 -S기의 증감수치를 비교함으로써 촉매인자로서 온도조건 및 기능기의 상관성을 평가하였다.

3. 연구결과

온도를 처리하지 않은 대조구인 유청분말인 WPS내 고유 미네랄 함유량을 12종을 대상으로 조사하여 우선 보았더니, 칼슘은 4,700ppm, K는 21,910ppm, Mg 988ppm, Mn은 6,776ppm, P는 6,620ppm그리고 S은 1,327ppm으로 총 42,363ppm이

검출되었으며, 나머지 미네랄류는 10ppm미만으로 보유하고 있는 것으로 조사되었다.

온도별 처리시 미네랄 함유량의 변화를 12종의 총 검출량으로 비교하여 보았더니, 80℃ 처리구가 96,616ppm으로 조사되어 대조 대비 2.28배의 증가수치를 보이면서 가장 높은 미네랄 킬레이팅 효능을 보였으며, 다음으로는 70℃(91,898ppm)는 2.17배, 90℃(81,413ppm)는 1.92배 그리고 60℃(77,991ppm)는 1.84배 순이었다.

대조구 대비 P와 인을 제외한 전체 미네랄류의 증가경향을 보았더니, Na를 제외한 전체의 미네랄 수치는 대부분이 높은 증가수치를 보였는데, 칼슘의 경우(대조:4,702ppm)는 최저 4.7배~8배까지 증가되어 있었으며, 철(대조:1.11ppm)은 dir 5배에서 44배, 아연(대조: 1.82ppm)은 5.54배에서 9.4배, 구리(대조:0.44ppm)는 1.36~105배 그리고 Mg(대조 : 998ppm)은 2.63~3.84배등 전체적으로 높은 수치 증가를 보였다.

미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기인 -P(대조: 6,660ppm), -S(대조:1,327ppm)가 온도 처리시 증가에 미치는 효과를 비교하여 보았더니, 전체적으로 -P는 최저 2.12배에서 최대 2.67배까지 증가하였는데 전체 온도처리중 80℃를 처리한 경우의 수치증가가 가장 높았으며, -S의 경우도 1.34배에서 최대 1.96배까지 증가되면서 유사한 온도범위를 보였다.

이러한 결과로 -P가 주도적으로 미네랄 킬레이팅 증대효과를 주도하면서 보조로서 -S등의 관련 기능기가 관여하는 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 순수한 유단백질이 고유적으로 보유하고 있는 미네랄류만을 이용한 열처리조건에서의 미네랄 킬레이팅 증가효과와 관련 기능기인 -P와 -S가 상호보완적으로 미네랄 킬레이팅과 관계가 있음을 평가하였다.

결론으로서, 본 연구에서는 유기태화 미네랄류 제조시, 유단백질류내 목표 미네랄류의 도입을 위한 촉매인자로서 온도 주요 촉매인자임을 확인하였다. 그러나, 단백질의 열변성에 따른 고유물성 및 성분등의 변화 등이 변화 될 수 있음은 배제할수 없기 때문에 추후 연구는 고온의 온도를 처리하지 않는 조건에의 유기태화 미네랄 소재류의 개발에 대한 연구를 세세하게 진행예정이다.

4. 추후진행사항

본 결과를 통하여 단백질이 보유하고 있는 미네랄 킬레이팅과 관련된 기능기의 증폭기법이 정립되었음을 확인할 수 있었고, 킬레이팅 효능과는 별도로 미네랄류에 대한 유기태화 영역을 확대 할 수 있는 중요한 단서를 확보하게 되었다.

본 연구는 유기태화 효능을 증폭 시킬수 있는 핵심 촉매인자로서 온도조건을 정립하였지만 생산성이 보장 되지 않은 연구라면 산업화에서 무의미 하다 할 수 있기 때문에, 본 연구결과를 활용하되 추후 연구에서 개발목표인 생산수율 및 외부인자저항형(내열성, 내산 및 내염기 저항성)이 보장되는 촉매류 개발에 적극 활용할 것이다.

최종적으로, 본 연구에서의 결과는 본 과제 이외의 단백질류를 기질로 하는 유기태화 미네랄류 연구개발에 기초자료로 적극 활용할 것이다.

Table 1. 선발 유청단백질만을 대상으로 온도별 처리가 고유보유 미네랄류의 킬레이팅에 미치는 효과 평가

시험구		WPS대비 온도별 처리에 따른 미네랄 이동패턴(ppm)											합계		
		Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Se	Zn	P,S 포함	P,S 비포함
WPS (CNTL)	Mean	4,702	0.08	0.44	1.11	21,910	998	0.08	6,776	6,620	1,327	ND	1.82	42,363	34,390
	SD	47	0.01	0.05	0.02	204	4.7	0.00	81	20	9		0.01		
WPS-60	Mean	29,340	0.82	0.60	44.1	24,670	2,997	0.54	5,130	14,020	1,775	ND	13.5	77,991	62,197
	SD	129	0.13	0.02	0.29	77	8	0.004	20	31	5		0.1		
WPS-70	Mean	33,340	0.85	0.63	8.06	29,980	3,470	0.58	6,424	16,510	2,148	ND	16.7	91,898	73,241
	SD	106	0.074	0.007	0.05	386	24	0.002	52	93	9		0.12		
WPS-80	Mean	37,640	0.82	46.0	8.57	29,030	3,836	0.67	6,067	17,650	2,320	0.21	17.1	96,616	76,646
	SD	127	0.08	0.06	0.05	38	3	0.002	76	26	7	1.55	0.03		
WPS-90	Mean	22,130	0.82	2.68	5.66	31,380	2,631	0.41	6,738	15,910	2,602	2.35	10.2	81,413	62,901
	SD	104	0.093	0.007	0.01	136	9	0.001	52	29	5	1.08	0.05		

제 3-3 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립 [고지방(일반) 및 저지방형 유청단백질(WPS) 특성평가]

1. 연구목표

본 연구에서는 유기태화 기질로 선발된 유청단백질(WPS)류를 기질로 하여 선행 유기태화 미네랄 소재류를 제조하여 보았다. 결과로, 유기태화 미네랄 반응이 종료된 중간생성물에 대하여, 미잉여 반응 미네랄 및 독성이온을 세척하는 공정을 진행 한 바 일반 WPS(지방 고함유)의 경우는 자체 보유하고 있는 지방성분으로 인해 세척단계의 UF시스템의 멤브레인막의 표면을 도포함으로서 세척단계에서 심각한 애로점이 발생하였다. 이를 해결하기 위하여, 사전에 일반 WPS가 보유하고 있는 지방을 제거하는 공정을 정립함으로서 이를 해결할 수 있지 않을까하여 본 연구를 실시하였다.

2. 연구수행방법

본 연구를 위한 기질소재로서는 일반 WPS(매일유업, 한국)과 농축유청(30%)을 구입하여 이를 소재로 하여 연구를 실시하였다. 이를 위한 시스템은 3개시스템(원심분리시스템, NF시스템 그리고 크림분리시스템)을 대상으로 검토하였으며 관련 시험구 조성은 다음과 같이 설정하여 진행하였다.

- 가. 대조구 : 치즈제조 후 농축유청액(TS : 3.2)을 열풍건조한 유청분말을 그대로 대량생산 시스템에 적용하되 원심분리시스템(GEA, Wesfalia separator AGset, Swiss)을 적용하고 이를 다시 열풍건조한 경우에서의 지방제거율을 조사하였다.
- 나. 비교구 : 치즈제조 후 농축유청액(TS : 32)을 열풍건조한 유청분말을 우선 Ca-WPS 소재류 개발에 적용하되 NF시스템(Falling Film Evaporator Heated By M.V.R., Germany)을 적용에 따른 지방제거율을 조사하였다.
- 다. 처리구 : 치즈제조 후 생산되는 유청액을 총고형분이 30~32되게 농축한 후 이를 우유 크림분리기(Tetra Pak, Tetra Centri AirTight, Sweden)에 1회 처리(유청액내 거대지방구를 기본적으로 제거)하고 다시 열풍건조한 경우에서의 지방제거율을 조사하였다.

3. 결과확인

각 시스템별 처리 전/후 샘플을 각각 채취한 후 동결건조처리(Freeze Dryer EYELA FD-81, Japan)를 거친 시료를 대상으로 미네랄 함유량(ICP분석법), 조지방(Gerber법, 수의학 검역원 2007), 조단백질(Kjeldahl Method, 식품첨가물공전 2008) 및 탄수화물(Lactose, HPLC 분석) 함유량을 비교 검정하였다.

4. 연구결과

원심분리기(대조구)를 사용한 경우, 처리전 지방함유량이 7%였음을 기준으로 비교할 때원심분리기 처리시 지방은 제거되지 않았으며, 오히려 22%로 농축되는 결과를 보였다. NF시스템을 적용한 경우, 4%의 지방량이 검출되어 당초 7%에 비하여 3%는 제거되는 결과를 보였다. 즉, NF시스템 적용시 NF필터를 통과할 수 있는 미세지방구는 제거되었으나, 거대 지방구의 경우는 입자크기가 크므로 인하여 미세거 된 이유로 판단되었다. 또한, NF시스템의 적용시는 오히려 거

대지방구로 기인한 NF필터의 막힘 현상 발생으로 인하여 50%이상의 농축유청액 손실요인이 발생함으로서 크림분리기 처리를 통하여 미세지방구를 제거하는 사전 공정이 필요로 함을 알 수 있었다.

크림분리시스템을 적용한 경우, 처리전 지방량(7%)대비 4%의 지방량이 검출되었는데, 이는 미세지방구인 것으로 판단되었는데, 치즈제조 및 농축유청액 생산 공정 중 원유 균질화 처리로 인해 당초 지방구가 미세화 됨으로서 크기가 감소한 것으로 판단되었다. 따라서, 미세지방구까지 제거된 무지 유청분말의 제조는 크림분리 시스템처리 이후 반드시 NF시스템 처리공정이 연계되어야 함을 추가적으로 확인하였다.

처리방법에 따라 지방함량 변화 이외 영양성분의 변화는 없었으며, WPS 대량생산을 위한 기질 단백질로서 무지유청분말 생산공정은 다음과 같이 설정되었다. 즉, 농축유청액(총고형분 30~32 기준)에 대하여 1차 제거 시스템은 크림분리기를 적용하여 거대지방구를 제거한 후 이를 건조분말화 하고, 건조 유청분말과 Ca을 킬레이팅 반응 후 세척단계에서 NF시스템을 적용함으로서 미세지방(잔존하는 지방)과 독성이온(Cl) 및 미반응 칼슘을 동시에 제거하는 방법을 대량시스템 공정조건으로 설정하였다.

5. 추후진행사항

본 연구를 통하여 유기태화 미네럴 소재류 개발을 위한 기질로서 WPS중 지방함유량인 7%인 일반 WPS와 저지방 WPS로 구분하여 제조법을 완료함으로서 일단 세척공정에서의 문제점(멤브레인 막힘현상)을 해결방법을 재정립하였다. 그러나, 저지방 함유 WPS의 경우에서 미네럴 킬레이팅 능력이 저하된다면, 개발의미는 저감된다 할 수 있기 때문에 이들에 대한 유기태화 반응을 통한 비교 평가가 필요하다. 따라서, 다음연구에서는 이에 대한 세세한 평가 시험을 실시할 예정이다.

Table 1. 크림분리기 적용에 따른 저지방 함유 유청분말 제조결과

분석항목	시험구별 분석결과		비 고
	WPS(원료)	탈지WPS	
미네랄 함유량(%)	0.5	0.5	ICP분석(Ca 기준)
단백질(%)	14	12	킬달분석
대조구	7	-	원심분리시스템
조지방(%) 비교구	7	-	NF시스템적용)
처리구	7	4	유지방분리시스템
탄수화물(당류, %)	60	60	HPLC(Lactose 1종)
수분함량(%)	2.9	2	수분측정기

제 3-4 절 유단백질 기질화 유기태 미네럴 소재 대량생산시스템 정립 [유기태화 기질선발을 위한 고지방(일반) 및 저지방형 기질 WPS의 유기태화 미네럴 반응패턴 조사]

1. 연구목표

선행 연구를 통하여 유기태화 미네럴 소재류 개발을 위한 기질로서 WPS중 지방함유량인 7%인 일반 WPS와 저지방 WPS로 구분하여 제조법을 완료함으로서 일단 세척공정에서의 문제점(멤브레인 막힘현상)을 해결방법을 재정립 한 바 있는데, 저지방 함유 WPS의 경우에서 미네럴 킬레이팅 능력이 저하 된다면, 개발의미는 저감된다 할 수 있기 때문에 유기태화 반응을 통한 세제화 평가가 필요하다. 본 과제에서는 선행연구를 통하여 제조된 고지방 함유 WPS(일반)와 지방제거공정을 통해 제조된 저지방 WPS를 대상으로 유기태화 기질로서 가장 적절한 WPS의 선발을 목적으로 본 연구를 실시 하였다..

2. 연구수행방법

본 연구에서는 선행제조된 일반WPS(매일유업, 지방함유량 6%)와 저지방 WPS(이하 무지방 WPS)를 소재로 하여, 선행정립된 유기태화 미네럴 소재류 개발법에 준하여 제조하였다. 유기태화 미네럴 소재류 개발간 사용된 무기태화 미네럴류는 칼슘은 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 철분은 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 아연은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 구리는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 그리고 셀레늄은 Na_2SeO_3 를 유기태화 미네럴 소재류로 사용하였는데, 이들은 식품첨가물로 등록된 소재류에서 선발하였다. 유기태화 반응 선행정립된 유기태화 미네럴소재류 제조법에 준하여 각각을 제조하였으며, 이때 배합비율은 WPS(5)대비 Mineral(1)과 정제수를 5 비율로 설정하였으며, 다만 셀레늄의 경우는 0.1비율로 배합비율을 설정하였다(저농도 일일 섭취량 적용).

3. 결과확인

대조구인 일반WPS와 무지방WPS를 기질로 하여 제조된 각각의 시료를 7회 세척과정을 거쳐 미반응 미네럴류와 반응에 따라 생성되는 독성이온을 제거하는 공정을 거친 후 동결처리한 시료를 대상으로 목표 미네럴의 킬레이팅 능력 및 유기태화 미네럴류의 생산수율(동결 후)을 비교함으로서 두 중 WPS중 최적 유기태화 물성치를 보유한 WPS를 선발코져 하였다. 또한, 선행연구에서 기질 유단백질에 대하여 킬레이팅 관련기가 -P와 -S가 핵심 기능기임이 판명됨에 따라 목표 미네럴류의 킬레이팅 효율과의 연관성을 동시에 평가하였다.

4. 연구결과

일반 WPS와 무지방 WPS의 생산수율을 비교하여 보았더니 셀레늄을 제외한 전체 유기태화 미네럴 소재류의 생산수율은 13~16% 범위로 비슷하였으며, 셀레늄의 경우는 5~6% 수준이었다. 따라서, 생산수율에 있어서는 두 시료의 차이점은 인정되지 않았다(Table 1~2).

목표 미네럴별 유기태화 패턴을 살펴본 결과, 시료인 일반 WPS의 미네럴 함유량이 칼슘의 경우 3,111ppm 그리고 철분의 경우는 1.30ppm이 검출되었으며 나머지 목표 미네럴류의 경우는 검출이 되지 않았음에 비교하면 유기태화 반응이 진행된다면 적게는 미네럴별 차이는

있지만 5,000ppm에서 많게는 약 40,000ppm범위로 높은 킬레이팅 반응성을 보였다(Table 1~2).

유기태화 반응이 종료된 시점에서 일반WPS시험구에 비하여 셀레늄(대조 5,202ppm)의 경우만 무지방WPS시험구의 경우에서 2.8배의 높은 수치를 보이는 반면 나머지 미네랄류의 경우는 일반WPS의 경우가 높은 수치를 보였다.

선행연구에서 기질 유단백질에 대하여 킬레이팅 관련기가 -P와 -S가 핵심 기능기임이 판명됨에 따라 목표 미네랄류의 킬레이팅 효율과의 연관성을 평가하여 보았더니, 일반시료인 WPS내 P는 약 5,000ppm 그리고 S는 약 1,600ppm의 범위였다. 그러나, 유기태화 킬레이팅 관련 P와 S의 함유량은 살펴보았더니, P는 무지방 WPS처리구의 경우는 약 45,000ppm에서 많게는 약 68,000ppm의 범위를 그리고 일반 WPS처리구의 경우는 적게는 1,706ppm에서 많게는 약 18,000ppm의 범위를 보였다.

S기의 경우는 무지방WPS시험구는 약 6,700ppm에서 많게는 68,000ppm을 그리고 일반 WPS시험구의 경우는 약 5,300ppm에서 많게는 약 12,000ppm의 범위를 나타내었다.

이러한 결과를 목표 미네랄의 함유량과 비교하면 셀레늄의 경우는 P가 핵심기능기이며 수치가 높을수록 셀레늄의 킬레이팅 능력 또한 높아지는 메카니즘을 보였다. 이 외의 미네랄류는 P와 S기가 감소하면 할수록 목표 미네랄류의 킬레이팅 수치가 높아지는 동일한 패턴을 보였다. 이러한 경우는 유기태화 반응을 유도하는 공정에서 극대화 노출되었던 P와 S기에 동시에 킬레이팅 되면서 감소되는 수치를 보이는 것으로 판단되었다. 따라서, 킬레이팅 관련 기능기는 미네랄군마다 유기태화 효율에 있어 다른 차이를 보임을 확인 할 수 있었다.

결론적으로, 일반WPS의 현장생산 편리성(UF시스템 적용시, 멤브레인막 막힘현상 예방)을 고려하여 제조한 무지방WPS의 유기태화 효율이 감소됨에 따라 최종 소재 선별에서 제외하였다. 따라서, 일반WPS를 기질로 유기태화 미네랄 소재류 개발시는 UF시스템보다는 일반 원심분리기를 사용하여 분리 및 세척공정을 진행방법으로 진행함이 타당하다고 결론지었다.

5. 추후진행사항

- 가. 본 연구를 통하여 일반WPS를 추후 연구개발과정에서 사용하는 최종 기질로 선별하였다.
- 나. 일반WPS의 유기태화 반응유도시 관련 기능기인 -P와 -S기의 극대화 도출과 킬레이팅 적용기술을 추후연구 개발과정에서 중요한 QA기법으로 적용예정이다.

Table 1. 일반 WPS를 기질로 제조한 5종 M-WPS내 미네랄 분포량 조사결과(표준제조법, FD)

유기태화 시료명	기질 WPS 대비 유기태화 기초효능 평가 결과(ppm)												합계		수율 (% WPS대비)	
	Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	PS+	PS-		
WPS	Avg	3,111	1.30	ND	ND	ND	19,490	976	0.06	7,940	0.61	4,989	1,572	38,082	31,521	ND
	SD	8	0.02				58	1.60	0.002	64	0.01	19	7.00			
Ca-WPS	Avg	38,800	25	0.44	3.55	ND	2,496	1,016	0.66	1,456	2.33	13,740	2,589	60,131	43,802	13.9
	SD	132	0.07	0.04	0.003		13	2.00	0.01	12	0.04	20	5.00			
Fe-WPS	Avg	10,990	19,120	10	7.43	11	2,371	813	75.65	685	3.43	12,950	5,358	52,420	34,112	13.0
	SD	35	43	0.06	0.06	1.92	17	5.10	0.18	3.80	0.08	29	18			
Cu-WPS	Avg	5,757	35	49,890	21	2.48	2,822	56	0.53	1,495	0.85	13,190	11,320	84,591	60,081	13.6
	SD	21	0.12	29	0.05	2.42	19	0.30	0.002	13	0.02	40	38			
Zn-WPS	Avg	12,560	12	5.53	15,190	ND	1,956	974	0.44	749	0.88	17,080	6,300	54,828	31,448	10.0
	SD	73	0.04	0.10	10		9.00	2.10	0.01	3.70	0.02	116	66			
Se-WPS	Avg	1,275	6.79	1.04	ND	5,202	518	299	0.11	326	1.31	1,706	5,229	14,565	7,630	6.36
	SD	5	0.05	0.08		23	4.00	1.20	0.002	1.10	0.03	5.00	20			

Table 2. 무지방 WPS를 기질로 제조한 5종-WPS내 미네랄 분포량 조사결과(표준제조법, FD)

유기태화 시료명	미네랄분포량 조사결과(ppm)												합계		수율 (% WPS대비)	
	Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	PS+	PS-		
WPS	Avg	3,111	1.30	ND	ND	ND	19,490	976	0.06	7,940	0.61	4,989	1,572	38,082	31,521	ND
	SD	8	0.02				58	1.60	0.002	64	0.01	19	7.00			
Ca-WPS	Avg	18,650	35	10	10	0.95	77	948	4.74	72	0.39	67,210	6,545	93,568	19,813	16.0
	SD	45	0.08	0.22	0.20	0.07	4.97	1.50	0.02	0.48	0.02	222	26			
Fe-WPS	Avg	19,490	9,293	3.67	7.98	0.99	765	608	20	227	19	48,810	68,380	147,631	30,441	15.4
	SD	39	69	0.11	0.02	0.14	13	4.00	0.14	1.50	0.14	134	154			
Cu-WPS	Avg	18,560	34	31,160	0.73	ND	802	40	0.36	223	0.28	45,370	57,540	153,731	50,821	15.8
	SD	12	0.52	159	0.04		11	0.09	0.01	1.70	0.01	133	204			
Zn-WPS	Avg	18,100	19	3.86	9,318	0.88	356	600	1.67	174	0.38	49,760	61,880	140,216	28,576	16.3
	SD	37	0.31	2.11	72	0.31	2.10	2.90	0.01	0.90	0.01	60	63			
Se-WPS	Avg	18,850	27	0.87	11	14,650	8.19	956	6.56	112	0.79	66,850	6,661	108,137	34,626	5.43
	SD	100	0.11	0.12	0.42	21	2.70	5.20	0.04	1.80	0.01	83	9.00			

제 3-5 절 유단백질 기질화 유기태 미네럴 소재 대량생산시스템 정립 [유기태화 기질 선발 (탈지분유 및 전지분유)]

1. 연구목표

본 연구에서는 선행연구를 통하여 유기태화 미네럴 소재류 개발을 위한 기질 후보군으로서 WPS, 탈지분유와 전지분유를 선발하였었는데, 본 연구에서는 이중 탈지분유를 기 선발과정을 완료한 유청분말 다음대상으로 사용이 가능여부를 평가 하고 저 하였다. 유기태화 미네럴 소재류 개발을 위한 예비 평가에서 전지분유는 효능은 있으나 지방함유량이 27%로 높게 함유되어 있음에 따라 후보군에서 제외 하였다. 탈지분유를 소재로서 선발한 이유는, 현재 국내 유가공 산업에서 잉여산물로 매년 10톤씩 재고가 쌓이고 있는 잉여 농축산물이므로 고부가 이용성 창출관련 소재로서 적절 하다는 점과 일반 WSP(지방 7% 함유)를 유기태화소재로 제조시 세척공정이 필요한데 이때 지방으로 인하여 유발되는 문제점(멤브레인 막힘현상)을 해결방법을 재정립 한 바 있는데, 사전 지방이 제거된 탈지분유는 이를 해결할 수 있는 소재로 평가되어 선발하였다. 본 과제에서는 선행연구를 통하여 정립된 표준제조법을 적용하여 유기태화 소재 개발을 위한 기질로서 적절성을 보유하는지를 평가와 동시에 선발을 목적으로 본 연구를 실시 하였다.

2. 연구수행방법

본 연구에서는 일반 탈지분유(서울우유, 한국)를 구입하여 유기태화 기질소재로 사용하였으며, 미네럴 도임을 위한 무기태화 미네럴류는 칼슘은 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 철분은 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 아연은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 구리는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 그리고 셀레늄은 Na_2SeO_3 를 유기태화 미네럴 소재류로 사용하였는데, 이들은 식품첨가물로 등록된 소재류에서 선발 하였다. 유기태화 반응은 선행정립된 유기태화 미네럴소재류 제조법에 준하여 각각을 제조하였으며, 이때 배합비율은 WPS(10) 대비 Mineral(5) 과 정제수를 100비율로 설정하였고, 다종 미네럴류를 동시에 첨가시 미네럴별 킬레이팅 효능 및 이온경쟁성을 평가하기 위하여는 배합비율을 WPS(10) 대비 각 미네럴별(2) 그리고 정제수는 100비율로 설정하였다.

유기태화 반응을 위한 촉매인자중 일체를 제외하고 온도만을 상온 및 고온(80℃) 처리하는 방법으로 유기태화 효율을 검정하였다 .

3. 결과확인

대조구인 탈지분유 기질로 하여 제조된 각각의 시료를 7회 세척과정을 거쳐 미반응 미네럴류와 반응에 따라 생성되는 독성이온을 제거하는 공정을 거친 후 동결처리한 시료를 대상으로 생산수율과 미네럴류의 킬레이팅 능력을 ICP분석을 통하여 확인하였다. 유기태화 미네럴류의 생산수율(동결후)과 기질 유단백질에 대하여 킬레이팅 관련기가 -P와 -S가 핵심 기능기임이 판명됨에 따라 목표 미네럴류의 킬레이팅 효율과의 연관성을 동시에 평가하였다.

4. 연구결과

순수 탈지분유(SMP, Skim Milk Powder)를 대조구로 하여 비열처리 및 고온처리과정을 거쳐 각각 제조된 유기태화 소재류의 생산수율을 비교하여 보았다.

가. 비열처리구(표 1, 그림 1~2)

대조구의 유기태화 반응에 따른 침전물의 획득이 불가능 하였으므로 생산수율은 0%였음에 비교하여 Ca-NHSMP, Fe-NHSMP 그리고 Cu-NHSMP처리구도 동일하게 생산수율은 낮았다. 그러나, Zn-NHSMP와 Se-NHSMP 그리고 5종의 미네랄을 복합 처리한 M-NHSMP처리구는 32.8%, 28.9% 그리고 77.9%의 높은 생산수율을 보였다. 관련하여 첨가된 목표 미네랄류 대비 킬레이팅 효능을 평가하여 보았더니, 대조구인 탈지분유내 칼슘은 10,800ppm, 철은 4ppm, 아연은 31.6ppm, 구리는 0ppm, 셀레늄은 4.61ppm의 검출량을 보였으며, 킬레이팅과 관련된다고 판단되는 P는 9,882ppm 그리고 S는 2,753ppm의 수치를 보유하고 있었다.

대조시료와 비교시 생산수율이 낮았던 Ca-NHSMP내 칼슘량은 70,000ppm이상의 검출량을 보여 대조 대비 약 7배, Fe-NHSMP내 철은 14,000ppm으로 약 3,500배, Cu-NHSMP처리구는 구리의 킬레이팅량은 약 36,000ppm이상의 효율을 보였다.

생산수율이 약 33%로 높았던 Zn-NHSMP처리구는 아연 함유량이 16,000ppm으로 검출됨으로서 대조 대비 약 508배, Se-NHSMP는 56,310ppm으로 약 13,000배 이상을 상회하였으며, 가장 높은 생산수율(77.9%)을 보였던 복합미네랄 처리군인 M-NHSMP의 경우는 5종 미네랄중 칼슘은 59,690ppm, 철은 12,910ppm 그리고 셀레늄의 함유량이 47,900ppm으로 높게 나타났는데 아연과 구리이온의 경우는 낮게 나타남으로서 전체 미네랄류중 이온경쟁성에서 배제되는 것으로 조사 되었다. 이러한 결과는 유청단백질을 대상으로 한 평가에서도 동일한 결과를 보였는데 아마도 유단백질의 고유 특성이 아닌가 하고 판단되었다. 따라서, 생산효율이 낮은 3종 시험구에 대하여는 개발 촉매를 사용하여 이들의 생산수율을 획기적으로 향상시키는 방법을 본 과제를 수행시 개발함으로서 고부가 산업화 소재로서 개발 완료예정이다. 또한, 생산효율 및 미네랄 킬레이팅 효능이 동시에 높았던 3개 유기태화 소재 시험구(Zn-NHSMP, Se-NHSMP, M-NHSMP)는 본 과제를 통하여 미네랄 킬레이팅 능력을 더욱 향상시키면서 동시에 생산수율을 증대시키는 연구를 완료함으로서 고부가 산업소재로 개발을 완료할 예정이다

나. 고온처리구(표 1, 그림 1~2)

비열처리구에 비하여 열처리를 통한 응집성 패턴을 미네랄 킬레이팅 능력 증대와 더불어 우유 단백질의 열변성 요인을 활용한 침전유도로 생산수율 증대효과를 배가 시킬수 있는지의 평가를 통하여 잉여 탈지분유의 고부가 유기태화 소재류로 개발 타당성을 평가하여 보았다. 대조구의 유기태화 반응에 따른 침전물의 획득이 불가능 하였으므로 생산수율은 0%였음에 비교하여 Ca-NHSMP는 41.4%, Fe-NHSMP 42.8% 그리고 Cu-NHSMP처리구는 39%, Zn-NHSMP처리구는 41.8%, Se-NHSMP 32.8%로 조사되어 단일 미네랄 처리구의 경우는 32%에서 최대 43% 범위의 생산수율을 나타내었다. 그리고 5종의 미네랄을 복합처리한 M-NHSMP처리구는 84%로 전체 열처리 시험구에서 가장 높은 생산수율을 보였으며 전체적으로 비열처리구 보다 유의하게 높은 생산수율 증대 결과를 보였다.

고온처리구별 목표 미네랄류 처리에 따른 킬레이팅 효능을 평가하여 보았더니, 대조구인

탈지분유내 칼슘은 10,800ppm, 철은 4ppm, 아연은 31.6ppm, 구리는 0ppm, 셀레늄은 4.61ppm의 검출량을 보였으며, 킬레이팅과 관련된다고 판단되는 P는 9,882ppm 그리고 S는 2,753ppm의 보유 수치와 유기태화 반응후 유기태화 소재류별 미네랄 킬레이팅 수치를 비교 함으로서 효능평가를 비교하여 보았다.

결과로서, 고온처리구중 유일하게 다중 유기태화 미네랄 소재류(M-HSMP)의 경우가 비열처리구에 비하여 생산수율과 더불어 미네랄류 킬레이팅 효능 칼슘은 28%(76,780ppm), 철은 33%(17,150ppm), 아연은 83%(567ppm), 구리는 73%(3,570ppm) 그리고 셀레늄의 경우는 36%(65,330ppm)으로 전체적으로 증가되는 것으로 평가되었다. 그러나, 단일 미네랄을 처리한 유기태화 소재류의 경우 비열처리구에 비하여 생산수율은 전체적으로 매우 높게 나타났는데 미네랄 킬레이팅 효능은 Ca-HSMP처리구내 칼슘은 35,520ppm이 검출되어 비열처리구에 비하여 49.6%가 감소하였는데, Fe-HSMP처리구는 11,500ppm으로 18.8% 그리고 셀레늄을 대상으로 한 고온처리시 유기태화 효능을 평가한 결과에서도 검출량은 49,790ppm으로 조사되어 비열처리구에 비하여 11.7%가 감소하는 결과를 보였다.

특이한 것은 Cu-HSMP내 Cu이온은 검출되지 않아 열처리시 비열처리시 킬레이팅된 구리이온이 열처리시 오히려 분리되어 100% 제거되는 현상이 발생하였으며, 아연을 대상으로 한 처리구인 Zn-HSMP처리구내 아연 검출량은 16,730ppm으로 비열처리구와 동등성을 보였다.

따라서, 탈지분유를 기질로 하는 전제하에서 고온처리조건에서 생산효율 증대화 관련하여서는 전체시험구중 Cu-HSMP시험구를 제외한 나머지 시험구를 추후 유기태화 소재류 제조 방법으로 채택이 가능하다고 판단되었으며, 미네랄 킬레이팅 효능까지 고려한 경우는 M-HSMP 그리고 Se-HSMP시험구가 우수하다고 판단 되었다.

5. 추후진행사항

- 가. 본 연구를 통하여 유기태화 기질로서 유청단백질(WPS)외 추가적으로 잉여자원인 탈지분유를 유기태화 기질로서 선발 및 확정하였다.
- 나. 우선 선발된 WPS에서 제조시 생산수율이 낮은 셀레늄 유기태화 소재 제조에 활용함으로써 본 과제의 핵심목표인 5종 유기태화 미네랄 소재류 제조부분을 현장 시제까지 연계하여 완료할 것이다.
- 다. 추후, 본 결과를 기초로 미네랄 킬레이팅 능력을 향상시킬 수 있는 촉매인자 및 촉매제 개발을 통하여 생산수율과 미네랄 킬레이팅 능력을 보다 향상시킴으로서 고부가 유기태화 소재류 개발을 본 과제수행기간 동안 완료할 것이다.

Table 1. 탈지분유 기질화 유기태화 미네랄 소재류 개발 타당성 평가 결과(비열처리구)

미네랄류	탈지분유를 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재류 개발을 평가(ppm)													
	SMP		Ca-NHSMP		Fe-NHSMP		Cu-NHSMP		Zn-NHSMP		Se-NHSMP		M-NHSMP	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Ca	10,800	70	70,520	1,226	11,910	37	5,912	32	7,639	20	1,211	41	59,690	940
Fe	4	0	4	0	14,170	95	12	0	7	0	9	0	12,910	128
Zn	31.6	0.2	31.07	0.43	32.7	0.36	5.55	0.07	16,080	360	8.22	0.31	310	7
Cu	ND	ND	ND	ND	4.3	0.06	36,040	240	3.23	0.46	2.16	0.11	2,061	41
Se	4.61	1.7	294	16	40.8	5.61	82.8	9.41	52.41	2.42	56,310	410	47,900	618
P	9,882	23	9,888	44	8,594	25	ND	ND	20,480	219	8,006	64	3,013	107
S	2,753	12	2,638	39	29,520	60	10,490	49	6,528	10	5,221	13	39,770	661
Mn	0.26	0	0.3	0	35.09	0.1	0.11	0	0.33	0	0.02	0	ND	ND
Mg	1,441	23.7	906	15.5	706.3	2.4	258.5	1.1	497	11	150	1	ND	ND
생산수율 (탈지분유대비)	NT		NT		NT		NT		32.8		28.9		77.9	
성상	NT		±		±		+++		+++		++++		++++	
비고														

Table 2. 탈지분유 기질화 유기태화 미네랄 소재류 개발 타당성 평가 결과(고온처리구)

미네랄류	탈지분유를 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재류 개발을 평가(ppm)													
	SMP		Ca-HSMP		Fe-HSMP		Cu-HSMP		Zn-HSMP		Se-HSMP		M-HSMP	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Ca	10,800	70	35,520	209	10,120	89	9,528	33	10,950	58	454	13	76,780	493
Fe	4	0	6	0	11,500	86	11	0	4	0	5	0	17,150	558
Zn	31.6	0.2	62.6	0.5	56.3	0.2	2.03	0.27	16,730	127	4.5	0.2	567	28.25
Cu	ND	ND	0.54	0.01	3.73	0.09	ND	ND	4.26	0.73	0.51	0.13	3,570	18
Se	4.61	1.7	14.4	0.1	ND	ND	7.78	2.79	9.03	0.68	49,790	613	65,330	1,737
P	9,882	23	17,940	155	9,342	120	ND	ND	18,070	101	6,885	165	620	95
S	2,753	12	5,304	20	10,520	6	14,210	62	12,480	12	5,120	99	48,150	1,167
Mn	0.26	0	0.59	0	21.65	0.34	0.03	0	0.09	0	ND	ND	0.04	0.02
Mg	1,441	23.7	571	6.3	298	5.1	112	2	149	1	57.5	1.6	ND	ND
생산수율 (탈지분유대비)	NT		41.4		42.8		39		41.8		32.9		84	
성상	NT		±±±±		±±±±		±±±±		±±±±		±±±(적색)		±±±	
비고														



Fig 1. 유기태화 소재류내 신규제조를 위한 선발 기질별, 표준유기태화 제조법 적용시 성장평가(4차세척후 성장평가)

A:비열처리조건(CF:3,000rpm, 20분, 25℃), B:열처리조건(80℃, CF : 3,000rpm, 20분, 25℃)

1-1: Fe-WMP(NH), 1-2:Fe-WMP(H), 2-1:Fe-SMP(NH), 2-2: Fe-SMP(H),
 3-1: Ca-WMP(NH), 3-2: Ca-WMP(H), 4-1: Ca-SMP(NH), 4-2 : Ca-SMP(H),
 5-1: Se-WMP(NH), 5-2:Se-WMP(H), 6-1:Se-SMP(NH), 6-2: Se-SMP(H)

- WMP : Whole milk Powder, SMP: Skim Milk Powder

- 적용 미네랄류 : Ca(CaCl₂), Fe(FeSO₄), Se(SeO₂)

- H(열처리) : 80℃ , 30분, 150rpm, NH : Not Heating

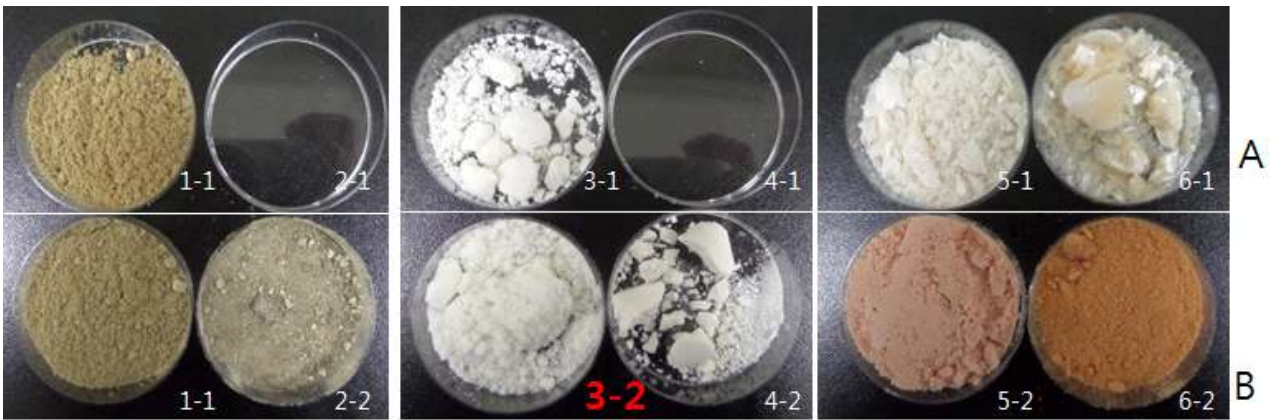


Fig 2. 유기태화 소재류내 신규기질 탐구를 위한 선발기질별 및 미네랄류에 대한 비열 및 열처리(80℃) 처리후 동결건조물에 대한 색상 및 생산수율 평가(4차세척후 동결건조)
 A:비열처리조건(CF:3,000rpm,20분,25℃), B:열처리조건(80℃,CF: 3,000rpm, 20분, 25℃)
 1-1: Fe-WMP(NH), 1-2:Fe-WMP(H), 2-1:Fe-SMP(NH), 2-2: Fe-SMP(H),
 3-1: Ca-WMP(NH), 3-2: Ca-WMP(H), 4-1: Ca-SMP(NH), 4-2 : Ca-SMP(H),
 5-1: Se-WMP(NH), 5-2:Se-WMP(H), 6-1:Se-SMP(NH), 6-2: Se-SMP(H)
 - WMP : Whole milk Powder, SMP: Skim Milk Powder
 - 적용 미네랄류 : Ca(CaCl₂), Fe(FeSO₄), Se(SeO₂)
 - H(열처리) : 80℃ , 30분, 150rpm, NH : Not Heating
 - 2-1 및 4-1 : 생산수율 평가불가(유기태화 반응 감소)

제 3-6 절 유단백질 기질화 유기태 미네럴 소재 대량생산시스템 정립 [최종선발 유청단백질 기질화 유기태 미네럴 소재류 제조법 정립, (정제기법 정립: 잉여미네럴 및 독성이온 제거)]

1. 연구목표

무기태화 미네럴류는 생체흡수율이 낮으며, 과량사용시 인체독성 등의 피해가 유발되기 때문에 일일섭취량을 국가(식약처) 등에서 엄격히 규제하고 있다. 또한, 식품현장에서 무기태화 미네럴 소재류를 식품첨가 및 건식제품으로 개발함에 있어 이들은 제품내에서 화학반응이 유발되고, 이미 및 이취 그리고 성상을 변화 시키므로서, 타정 등의 포장방식을 빌려 이들의 문제를 해결 하고 있다. 본 전체과제에서 해결코져 하는 목표중의 한가지가 이러한 무기태 미네럴류의 단점을 해결할 수 있는 신규한 유기태화 미네럴 소재류의 개발이다. 그러나, 유단백질을 기질로 하여 무기태화 미네럴류를 유기태화 반응이 종료되면 잉여미네럴과 무기태 미네럴에서 유래되는 이온이 잔류하게 되는데 이를 제거하기 위하여 세척공정을 제조과정에서 적용토록 하였다.

본 연구에서는 최종 선발된 미네럴 유기태화 기질인 WPS를 원료로 선행 정립된 기초 유기태화 제조법을 적용하여 7차 세척과정을 거치면서 획득된 유기태화 미네럴류의 함유량을 비교함으로써 최종 정제과정을 정립코져 본 실험을 실시하였다.

2. 연구수행방법

본 연구간 사용된 유기태화 기질은 매일유업(주)에서 구입한 유청분말을 사용하였으며, 기질 유기태화에 대하여 킬레이팅 반응도입을 위한 무기태화 미네럴류는 칼슘은 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 철분은 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 아연은 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 구리는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 그리고 셀레늄은 Na_2SeO_3 를 소재류로 사용하였는데, 전체는 식품첨가물로 등록된 소재류에서 선발하였다. 유기태화 반응은 선행정립된 유기태화 미네럴소재류 제조법에 준하여 각각을 제조하였으며, 이때 유기태화 시료별 배합비율은 WPS(5)대비 Mineral(1)과 정제수는 5비율로 설정하였는데, 다만 셀레늄의 경우는 0.1비율로 배합비율을 설정하였다(저농도 일일 섭취량 적용 고려).

3. 결과도출

본 연구에서는 최종선발 WPS(일반)를 기질로 유기태화 미네럴 반응을 유도한 후 최초 대비 유기태화 미네럴 소재류별 세척과정(7~9차)을 진행하면서, 세척단계별 분취 및 동결건조한 유기태화 미네럴 소재류별 잉여미네럴류 제거효율은 선행정립된 ICP분석을 통하여 최초 대비 세척단계별 비교 확인하였다. 유기태화 반응이 종료된후 무기태 미네럴류에서 기인한 이온제거효율은 전체 유기태화 미네럴 소재류중 유기태화 칼슘소재류만을 대상으로 유기태화 반응전과 반응후로 구분하여 이를 세척단계별로 상층액을 대상으로 염소이온과 황이온으로 구분하여 비교하였다.

4. 연구수행결과

최종선발 WPS(일반)를 기질로 유기태화 미네랄 반응을 유도한 후 최초 대비 유기태화 미네랄 소재류별 세척과정(7~9차)을 진행하면서, 세척단계별 분취 및 동결건조한 유기태화 미네랄 소재류별 잉여 미네랄류 제거효율을 평가한 결과, 전체 유기태화 미네랄류의 대부분은 2회 세척단계에서 99%이상의 잉여 미네랄이 제거되는 것으로 판단되었으나, 과제의 특성상 추후 생체 섭이시 안전성을 고려하여 최적 세척회수를 3회로 설정함이 타당하다고 평가되었다(표 1).

칼슘-유기태화 미네랄 소재만을 대상으로 최초 대비 유기태화 미네랄 소재류별 세척과정(7차)을 진행하면서, 세척단계별 상등액내 이온 제거율을 평가하여 보았더니, 대부분은 2회 세척단계에서 99%이상이 제거되는 것으로 판단되었으나, 본 과제의 특성상 추후 생체섭이시 안전성을 고려하여 최적 세척회수를 3회로 설정함이 타당하다고 평가되었다(표 2).

최종 7차(셀레늄의 경우 9차)세척과정을 거쳐 제조된 유기태화 미네랄 소재류내 미네랄함량을 조사하여 보았더니, 칼슘 유기태화소재류내 칼슘함유량은 약 83,000ppm, Fe-WPS는 약 13,000ppm, Zn-WPS내 아연 함유량은 약 46,000ppm, Cu-WPS내 구리 함유량은 약 81,000ppm이 검출되므로서 높은 킬레이팅 능력을 보였다.

Se-WPS내 셀레늄 함유량은 약 5,000ppm의 수치를 보였는데, 당초 유기태화 반응시 이종 미네랄류 대비 10%만을 사용함을 고려하면 약 50,000ppm의 범위를 보일 것으로 판단되었다. 이는 당초 기질로 사용된 WPS내 함유된 고유 미네랄류의 분석결과인 칼슘(약 5,000ppm)과 비교하면 칼슘-유기태화 미네랄 소재류는 166%, Fe-WPS소재류내 철분(2ppm)의 경우는 6,500배, Zn-WPS내 함유된 아연(1.97ppm)은 24,000배, Cu-WPS의 경우는 400,000배, 셀레늄은 기질 WPS내 함유된 고유 Se량에 대비하여 50,000배 이상의 유기태화 효율을 보였다. 그러나, 생산수율은 Se-WPS는 6%수준이었으며, 다른 4종의 유기태화 소재류의 경우는 10~13%의 낮은 생산수율을 보임으로서 현장제품화에 있어 경제성 비교에서 우수하다고 인정을 할 수 없었다.

현재 정립된 표준유기태화 미네랄 소재류 제조법을 적용하여 제품을 제조시 경제성평가를 실험실 조건에서 핵심소재류의 사용량만을 고려하여 평가할 때, Ca-WPS는 1Kg당 약 34,000원, Fe-WPS는 약 74,000원, Cu-WPS는 약 240,000원, Zn-WPS는 약 300,000원 그리고 Se-WPS는 약 430,000원의 높은 생산가를 보였다. 따라서, 도출한 생산단가는 실험실 조건에서 핵심소재만의 사용량을 기준으로 평가한 것이므로, 실제적으로는 훨씬 높은 생산단가를 보일 것으로 판단된다(표 4). 현재 정립된 유기태화 미네랄 소재류의 표준제조법을 기본으로 적용하되 생산수율을 획기적으로 높힐 수 있는 신기술 정립을 통하여 적어도 100배 이상의 생산단가를 낮출 필요가 있다.

5 추후진행사항

현재 선행정립된 유기태화 표준제조법은 기질 유기태화 미네랄류 킬레이팅 효율에서는 우수하지만 최종 사업화 관련해서 중요한 항목인 제품의 생산수율의 경우는 경제성 비교에서 떨어진다 할 수 있다. 따라서, 다음 연구에서는 정립된 표준제조법을 통한 유기태화를 유도한 후 천연소재중에서 생산수율을 높힐수 있는 고수준의 생산기법을 정립할 필요가 대두되고 됨에 따라 관련연구를 통하여 생산수율을 극대화 시키는 방법을 정립할 예정이다.

Table 1. 유기캐화 미네랄 소재류의 세척단계별 잉여미네랄 및 독성이온 제거효과 평가

세척단계		5중 유기태화미네랄소재류 제조결과(ppm)					비고
		Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS	Se-WPS	
WPS	Avg	4,907	2.00	1.97	0.20	ND	대조
	SD	18	0.02	0.004	0.01		
□최초	□Avg	84,500	17,400	15,280	72,600	13,350	
	□SD	531	39.0	94	277	50	
01차 세척	□Avg	98,260	15,990	15,520	75,790	12,140	
	□SD	57	25.0	152	311	17	
02차 세척	□Avg	87,100	12,440	17,950	81,310	10,070	
	□SD	365	102	111	545	28	
03차 세척	□Avg	88,400	11,830	20,350	80,460	7,975	
	□SD	207	62.0	78	33.0	31	
04차 세척	□Avg	88,860	12,190	17,420	77,060	5,896	
	□SD	523	39.0	60	591	9.0	
05차 세척	□Avg	88,130	14,200	16,690	85,380	4,431	
	□SD	254	27.0	107	345	10	
06차 세척	□Avg	80,420	11,960	20,670	90,920	7,828	
	□SD	179	7.00	98	703	36	
07차 세척	□Avg	82,520	12,140	45,890	83,350	6,062	
	□SD	116	52.0	289	213	4.0	
08차 세척	□Avg	NT	NT	NT	NT	5,081	
	□SD					5.0	
9차 세척	□Avg	NT	NT	NT	NT	4,758	
	□SD					16	

Table.2 개발 5종 유기태화 미네랄 소재류중 Ca-WPS만을 대상으로 제조단계 및 세척단계별 독성이온 제거효과 평가결과(IC분석법, Cl+SO4이온)

순번	구분	시료명	Chloride (ug/ml)	Sulfate (ug/ml)
1	Ca-WPS반응전 세척단계별 (대조)	원액	65,433	ND
2		원액상등액	65,832	ND
3		1차세척 상등액	11,2651	ND
4		2차세척 상등액	1,435	ND
5		3차세척 상등액	287	ND
6		4차세척 상등액	96	ND
7		5차세척 상등액	22	ND
8		6차세척 상등액	13	ND
9		7차세척 상등액	11	ND
10	Ca-WPS제조후 및 세척단계별	원액	52,021	ND
11		원액상등액	52,296	ND
12		1차세척 상등액	10,788	ND
13		2차세척 상등액	2,243	ND
14		3차세척 상등액	1,025	ND
15		4차세척 상등액	1,262	ND
16		5차세척 상등액	265	ND
17		7차세척 상등액	166	ND

Table 3. 최종 세척단계를 거쳐 동결건조된 유기태화 미네랄 소재류의 유기태화 효율 평가

결과		5종 유기태화미네랄소재류 제조결과(ppm)					비고
		Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS	Se-WPS	
WPS	Avg	4,907	2.00	1.97	0.20	ND	대조
	SD	18	0.02	0.004	0.01		
□미네랄 측정량	□Avg	82,520	12,440	45,890	80,460	4,758	
	□SD	116	102	289	33.0	16	
생산수율(%)		13	7.3~13	10~11	7.2~13	6~7.1	WPS대비
비고		-WPS :100g(단백질:10%) -미네랄 : 40g -제조법 : 표준제조법 적용				-제조조건 : 좌동 -미네랄첨가량:4g	

Table 4. 선행정립 유기태화 표준제조법을 통한 유기태화 미네랄 소재류 제조시 경제성 평가

유기태화 미네랄 소재류	표준제조법을 기준으로 제조시 경제성 평가(실험실)					
	WPS사용량 (g)	생산량 (g)	생산수율 (%)	1kg제조시 필요WPS(g)	1kg제조시 필요Mineral(g)	1kg제조시 단가(원)
Ca-WPS	12.5	1.6	13.0	7,678	3,071	33,753
Fe-WPS	12.5	0.9	7.3	13,650	5,460	73,766
Cu-WPS	12.5	0.9	7.2	13,966	5,587	232,570
Zn-WPS	12.5	1.4	11.0	9,075	3,630	296,768
Se-WPS	12.5	0.9	7.1	14,177	567	422,760

제 3-7 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립 [유기태화 반응 패턴조사, (칼슘-유기태화 소재)]

1. 연구목표

본 연구Part의 목표는 유기태화 기질로 선발된 기질류를 대상으로 우선 예비실험(선행정립 유기태화 제조법 적용)을 거쳐 최적의 유기태화 기질을 선발함이 주요연구목표이다.

해결수단으로서, 선행연구결과 및 선행정립된 유기태화 제조법을 연계 및 적용하여 목표 미네랄류(5종) 대비 선발기질에 대하여 유기태화 패턴을 사전평가 함으로서, 무기태 미네랄의 유기태화 제조방법 개발에 있어 기정립 방법 기본적용 또는 신규제조법 개발 여부를 사전 파악하기 위하여 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 22종 우유유래 단백질내 칼슘 및 미네랄류의 분포조사를 통하여, 최종 선발된 유청단백질(WPS) 대비 목표 5종의 미네랄류중 칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Junsei, 일본)을 대상으로 사전정립된 유기태화 기법을 적용하여 킬레이팅 능력과 더불어 반응패턴을 확인하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

가. 유기태화 기질 준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여이를 철분-유기태화 소재의 제조에 이용하였다.

나. 유단백질과 칼슘의 킬레이팅 패턴 평가

WPS 5 대비 무기태 칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 및 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10으로 배합하는 비율로 사전정립된 제조법에 따라 제조하였으며, 반응종료 후 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리하는 세척공정을 4회 이상 반복한 후 이를 동결건조하여 유기태화 칼슘 강화 유단백질을 최종 제조하였다. 본 연구간 사용된 무기태 칼슘은 추후 사업화에 있어 식품분야 등에 진출을 염두로 두고 식품공전 및 건강기능식품 공정내 등록된 시료중에서 선발하였고, 구입제품 또한 식품첨가물로 판매허가된 제품을 구입하여 본 연구간 사용하였다.

3. 결과확인

시험구간 기질단백질과 철분의 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP분석결과를 비교하였으며, 미네랄 유기태화와 관련된 기능기 판정을 위하여는 필수분석법에 정립된 FT-IR방법으로 그리고 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조는 XRD분석법을 통하여 확인하였다.

4. 연구결과

본 과제의 핵심기술은 목표 미네랄류를 최대 킬레이팅화 시키는 기법과 관련한 메카니즘을 규명함으로서 이들의 효능을 유기태화 반응으로 연계함에 있는데 단백질이 고유적으로

보유하고 있는 -NH₂, Amide, -S, -P등이 미네럴 킬레이팅 능력과 밀접한 관련성을 가지고 있을 것으로 판단되었다. 이를 확인하기 위하여, 순수 칼슘 함유량이 30,000~40,000ppm을 보유하도록 칼슘-유기태화 소재를 제조 후, 대조로서 선발 기질 WPS와의 미네럴 킬레이팅 능력을 비교하여 보았다(표 1).대조 WPS의 경우는 칼슘의 함유량은 약 3,200ppm으로 조사되었으며, 이때 P와 S의 함유량은 약 5,000ppm과 1,600ppm의 수치를 보였다. 그러나, 칼슘이 도입된 유기태화 소재류의 경우는 칼슘함유량이 약 40,000ppm으로 증가되면서 이때 P는 14,000ppm으로 2.75배, S 기능기는 2589ppm으로 조사되어 대조 대비 1.65배의 증가 수치를 보임으로서 유기태화에 관련된 핵심기능기는 -P와 -S를 포함한 -NH₂ 및 Amide, COOH기등이 복합적으로 작용함이 확인되었다. 연관하여, 선발 유단백질(WPS)를 기준으로 무기태 칼슘(CaCl₂·7H₂O)를 농도차를 부여하여 제조한 후 이를 FT-IR분석과 분석결과의 Peak Analysis과정을 통하여 확인하여 보았더니, 원료 WPS 대비 유기태화 진행간 변화된 Peak는 역시 4종(-NH₂, Amide, -S, -P)의 변화가 가장 심하게 유발되었으며, 대조 대비 저농도 및 고농도의 수치를 비교결과 그 변화는 비례적임을 예측할 수 있었으며 이러한 변화가 무기태 미네럴의 유단백질내로 도입되어 유기태화를 유발하는 것으로 평가되었다(그림 3). 따라서, 미네럴 킬레이팅 관련 기능기의 극대화 도출기술은 중요한 핵심기술임이 확인되었고, 추후 연구 개발에 핵심기술로 적용할 예정이다.

유단백질에 미네럴의 킬레이팅후 제조된 칼슘-WPS소재류의 무형태의 입자성상 및 불용성의 특성을 보였다(그림 1). 유단백질과 미네럴과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조를 XRD분석법을 통하여 확인한 결과, 대조 WPS의 경우는 비결정구조 패턴을 보였지만 무기태 미네럴인 칼슘은 유단백질과 결합시 Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca₂K₂(P₆O₁₈)₆(H₂O)], Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca₈H₂(PO₄)₆H₂O], Anapaite [Ca₂Fe+2(PO₄)₂H₂O], Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK₃H(PO₄)₂], Brushite [CaPO₃(OH)H₂O] 및 Calcium Sulfide Phosphate [Ca₁₀(PO₄)₆S] 형태로 결합 및 결정구조 성상을 이루고 있었다(그림 1~2). 이상의 결과를 종합하면 유단백질내 -NH₂와 -COOH와 미네럴의 결합이 이루어진 유기태화 구조는 올리고펩타이드형을 형성하는 것으로 판단되었다(Fig 3)

결론적으로, 미네럴을 도입시 관련 킬레이팅 기능기의 평가와 이들의 극대화 향상방법, 이들 기능기의 극대화 제조방법의 정립과 제조된 유기태화 미네럴 소재류의 안전(정)성 및 특성등 전체 메카니즘이 연계되어 정립되었다. 선행정립된 유기태화 미네럴 소재류 제조법 적용시, 칼슘-유기태화 소재류의 경우는 지방을 제거한 경우는 약 54,000ppm의 기본 칼슘의 킬레이팅 효율을 보였는데, 이는 당초 원료인 유청분말(WPS) 대비 17배 이상의 킬레이팅 효능을 보이는 것으로 조사되었다(표 2).

5. 추후진행사항

무기태 칼슘 대상 선발 유기태화 기질인 WPS의 유기태화 반응시 고효율의 목표 미네럴류의 함량을 높이는 핵심방법은 기능기인 -P와 -S가 관여하는 것으로 조사되었음에 따라 유단백질이 보유하고 있는 킬레이팅 기능기의 노출의 극대화 방법에 대한 정립연구를 진행 할 필요가 있다. 현재 연구는 무기태 미네럴중 칼슘외 4종을 대상으로 유기태화 패턴을 조사하였으나, 동일기질을 사용한다는 전제하에서 추후 이중 미네럴류의 유기태화 반응

패턴 또한 동일할 것으로 판단되었다. 따라서, 현재 결과를 기초로 동일 유기태화 반응에 따른 목표미네랄에 적극활용 성공적인 연구결과의 도출에 활용할 것이다.

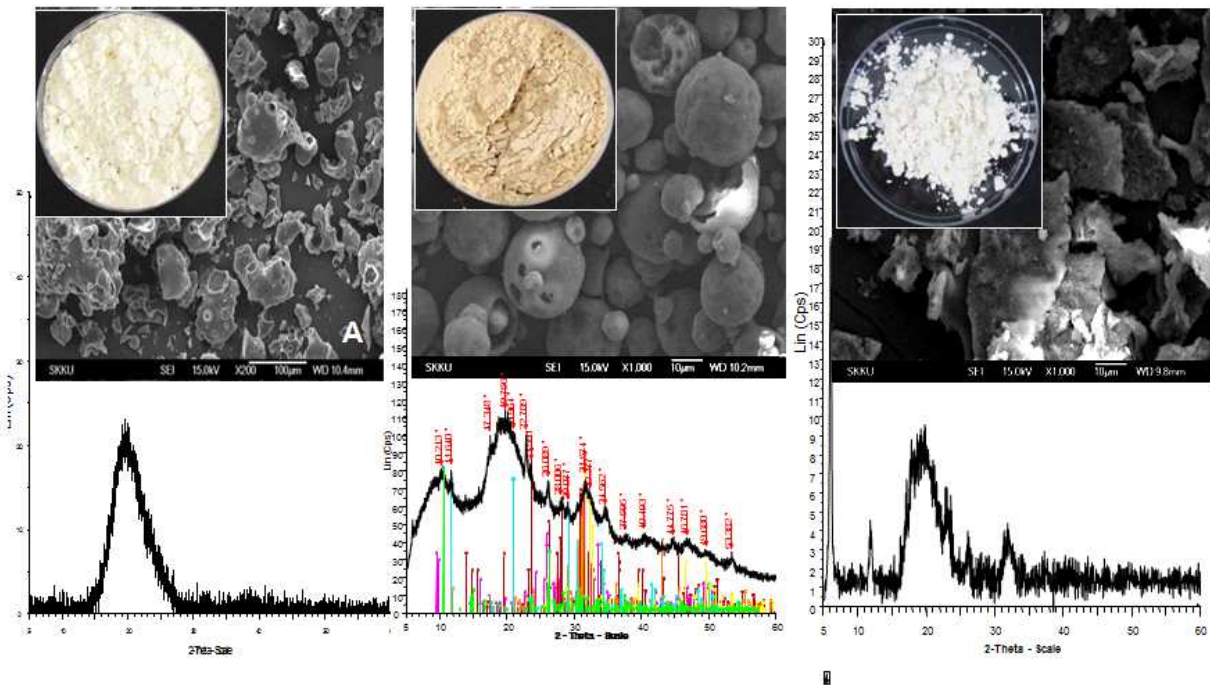


Fig 1. 유청단백질(WPS)를 원료로 하여 제조한 Ca-WPS(B~C)의 성상((열전계방사형주사현미경:FESEMII/EDS/EBSD) 및 결정구조 형성여부(XRD) 평가 결과

A: 원료 WPS(관찰배수 : x 200배), B : Ca-WPS(Ca함유량 100,000ppm이상, 유지방 함유량 7%이상 WPS 원료사용 유기태화 칼슘제조, 관찰배수 : x 1,000), C:Ca-WPS(Ca함유량 53,000ppm, 유지방 함유량 4% WPS 원료사용 유기태화 칼슘제조

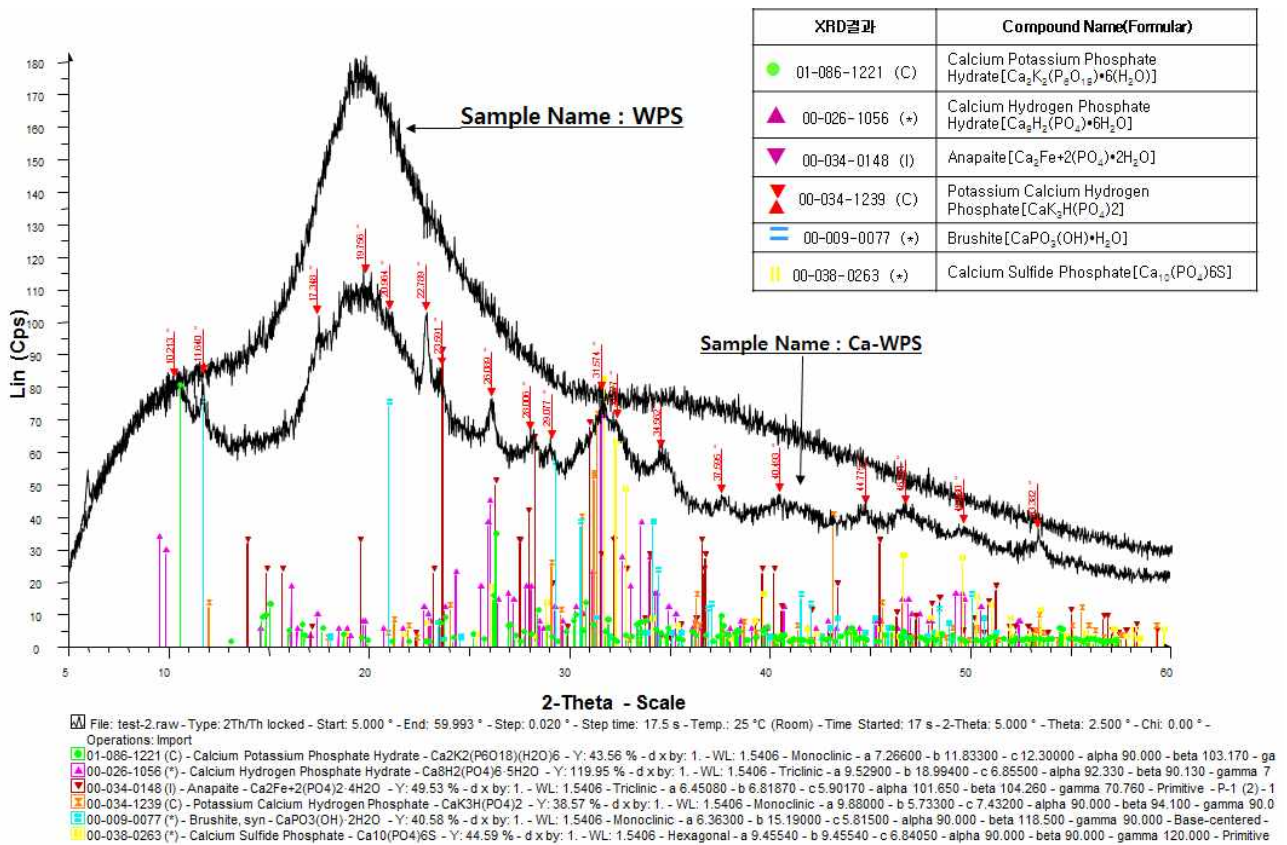
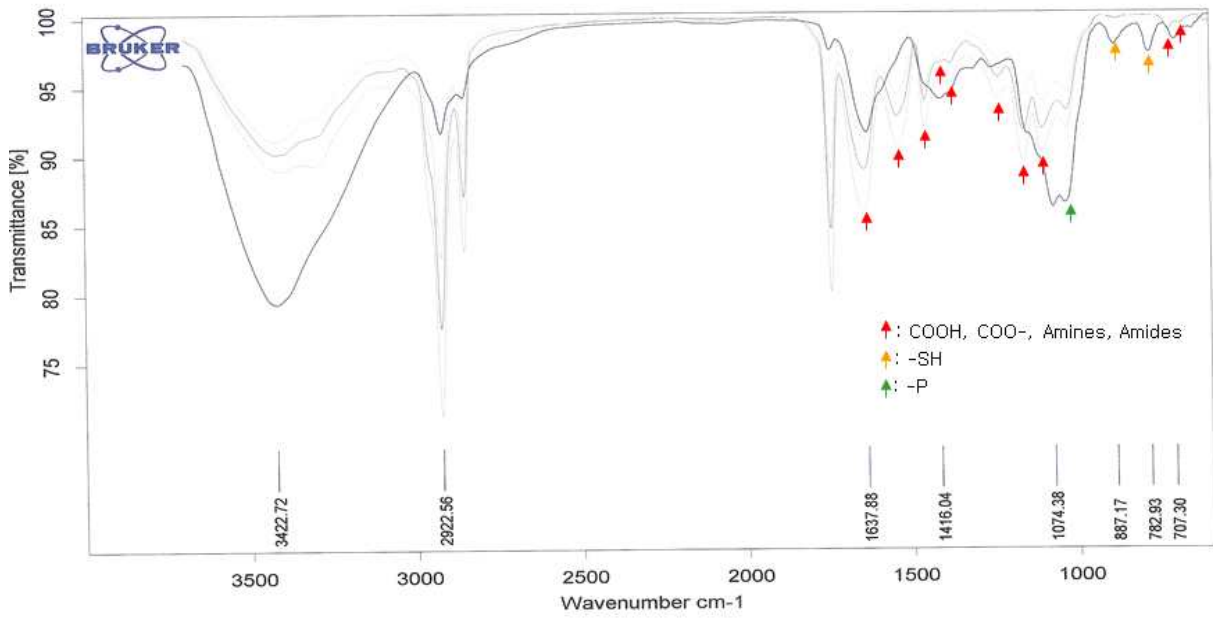
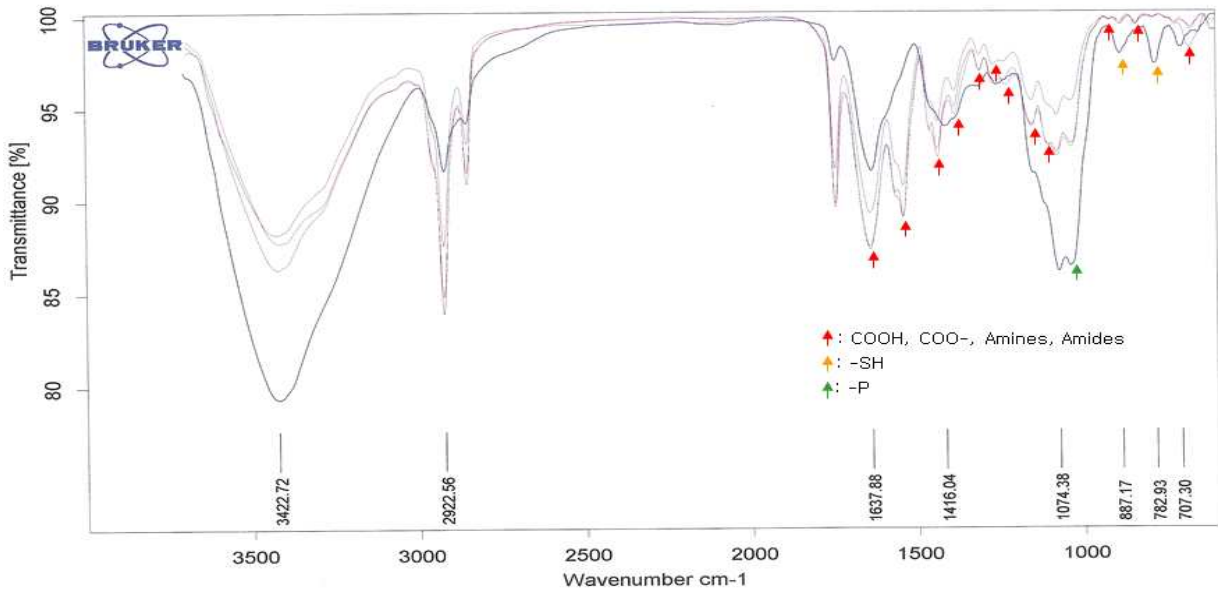


Fig 2 . 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Ca-WPS의 구조분석을 위한 XRD분석결과
 A : 치즈제조후 유청단백질, B : 유기태화 원료 제조된 유청단백질(거대지방구 제거공정후 미세유지방 4% 함유), C: 유기태화 미네랄 소재류



D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090601GA(0).0	090601GA(0)	sample form	2009/06/10
D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090601NA1-1.0	090601NA1-1	sample form	2009/06/10
D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090602NA2-1.0	090602NA2-1	sample form	2009/06/10
D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090602NA3-1.0	090602NA3-1	sample form	2009/06/10

A



D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090601GA(0).0	090601GA(0)	sample form	2009/06/10
D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090601NA1-2.0	090601NA1-2	sample form	2009/06/10
D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090602NA2-2.0	090602NA2-2	sample form	2009/06/10
D:\FT-IR\2009\06\0610\4\090602NA3-2.0	090602NA3-2	sample form	2009/06/10

B

Fig 3. 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Ca-WPS소재의 킬레이팅 관련 기능기 평가 및 극대화 여부 비교검정 결과(FT-IR분석결과)

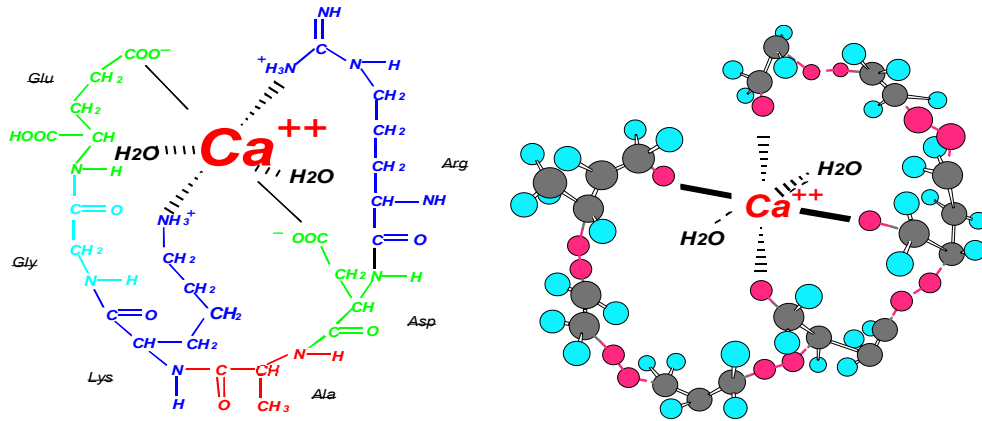
A : 칼슘 도입량 30,000ppm, B: 칼슘도입량 100,000ppm

Table 1 . 칼슘-유기태화 소재제조시, 저칼슘량 킬레이팅화 반응에 따른 관련 기능기 P,S의 함량변화 조사 결과

시험구		유기태화미네랄소재내 미네랄킬레이팅 효능 및 이온경쟁성 평가(ppm)											
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S
WPS	Avg	3,111	1.30	ND	ND	ND	9,490	976	0.06	7,940	0.61	4,989	1,572
	SD	8	0.02				58	1.60	0.00	64	0.01	19	7.00
Ca-WPS	Avg	38,800	25	0.44	3.55	ND	2,496	1,016	0.66	1,456	2.33	13,740	2,589
	SD	132	0.07	0.04	0.003		13	2.00	0.01	12	0.04	20	5.00

Table 2 . 칼슘-유기태화 소재 제조시, 표준제조법의 적용 결과

유기태 미네랄 소재류	WPS 대비 단일미네랄의 킬레이팅 효과 조사(동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
WPS	3,111±8	ND	1.30±0.02	ND	ND	WPS+CaCl2
Ca-WPS	53,480±43	ND	ND	42.2±0.4	ND	WPS+CaCl2
Fe-WPS	9,220±79	ND	24,010±112	9.9±0.4	ND	WPS+FeSO4
Zn-WPS	8,608±111	25,470±31	ND	ND	ND	WPS+ZnSO4
Cu-WPS	6,655±83	ND	ND	29,100±128	3,542±46	WPS+CuSO4
Se-WPS	8,641±44	ND	ND	ND	19,310±103	WPS+SeO2



Calcium Oligopeptide

Fig 4 . 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Ca-WPS의 유기태 구조 패턴

Compound: Organic mineral and Whey Protein complex

Protein Percentage : >40% (Lactose : 50%<<)

Minerals Percentage : 0.5% ~ 10% <<

Molecular Formular: Minerals Oligopeptide TYPE

Physical Form: Powder (Water insoluble)

제 3-8 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립 [유기태화 반응 패턴조사, (철분-유기태화 소재)]

1. 연구목표

본 연구Part의 목표는 유기태화 기질로 선발된 기질류를 대상으로 우선 예비실험(선행정립 유기태화 제조법 적용)을 거쳐 최적의 유기태화 기질을 선발함이 주요연구목표이다.

해결수단으로서, 선행연구결과 및 선행정립된 유기태화 제조법을 연계 및 적용하여 목표 미네랄류(5종) 대비 선발기질에 대하여 유기태화 패턴을 사전평가 함으로서, 무기태 미네랄의 유기태화 제조방법 개발에 있어 기정립 방법 기본적용 또는 신규제조법 개발 여부를 사전 파악하기 위하여 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 22종 우유유래 단백질내 칼슘 및 미네랄류의 분포조사를 통하여, 선발된 레이팅 반응을 위해 최종 선발된 유청단백질(WPS) 대비 목표 5종의 미네랄류중 철분만을 우선 대상으로 사전정립된 유기태화 기법을 적용하여 킬레이팅 능력과 더불어 반응패턴을 본 시험전 확인하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여 이를 철분-유기태화 소재의 제조에 이용하였다.

기질 단백질과 철분의 킬레이팅 반응패턴 조사

WPS 5 대비 무기태 철분($\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 및 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10으로 배합하는 비율로 사전정립된 제조법에 따라 제조하였으며, 반응종료 후 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리하는 세척공정을 4회 반복한 후 이를 동결건조하여 유기태화 철분 강화 유단백질을 최종 제조하였다. 본 연구간 사용된 무기태 철분은 추후 사업화에 있어 식품분야 등에 진출을 염두로 두고 식품공전 및 건강기능식품 공정내 등록된 시료중에서 선발하였고, 구입제품 또한 식품첨가물로 판매허가된 제품을 구입하여 본 연구간 사용하였다.

3. 결과확인

시험구간 기질단백질과 철분의 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP분석결과를 비교하였으며, 미네랄 유기태화와 관련된 기능기 판정을 위하여는 필수분석법에 정립된 FT-IR방법으로 그리고 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조는 XRD분석법을 통하여 확인하였다.

4. 연구결과

유단백질에 미네랄의 킬레이팅후 제조된 Fe-WPS소재류의 무형태의 입자성상 및 불용성의 특성을 보였다(그림 1). 미네랄 킬레이팅과 관련한 유단백질의 핵심기능기는 -P, -S, -NH₂, -COOH 및 Amide가 관여하는 것으로 조사되었는데, 이중 핵심적인 기능기

는 -P와 -S인 것으로 판단되었다(그림3). 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조를 XRD분석법을 통하여 확인한 결과, 대조 WPS의 경우는 비결정구조 패턴을 보였지만 무기태 미네랄인 철분은 유단백질과 결합시 Ferric-Fe Anapaite [$\text{Ca}_2\text{Fe}+2(\text{PO}_4)2\text{H}_2\text{O}$], Ferric Sulfide Phosphate [$\text{Fe}_{10}(\text{PO}_4)6\text{S}$] 및 Hydrogen Phosphite (H_3PO_3), Ferric Sulfate Hydrate ($\text{FeSO}_3(\text{H}_2\text{O})_{2.5}$) 형태로 결합 및 결정구조 성상을 이루고 있었다(그림 1~2).

선발 유단백질을 기질로 하여 제조한 Fe-WPS소재내 미네랄 함유량을 전체 목표 미네랄과 동시에 조사하여 보았더니, 원료 WPS내 칼슘은 3,111ppm, 철은 1.30ppm이 검출되었는데, 철은 1.30ppm으로 적은량이 검출되었고 나머지 미네랄류 3종은 검출되지 않았다(표 1). 그러나, 유기태화가 완료된 Fe-WPS소재의 경우는 WPS내 존재하였던 칼슘(9,220ppm)까지 약 3배를 증가시키면서 동시에 철분도 24,000ppm까지 동시에 증가시키는 놀라운 결과를 보였다. 이를 보면 유기태화 반응이 진행되면서 칼슘과 철분은 이온경쟁성에서 우열이 없음이 확인됨과 동시에 추후 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류 제조시 유용한 기초결과를 제공하였다 판단되었다.

5. 추후진행사항

무기태 철분 대상 선발 유기태화 기질인 WPS의 유기태화 반응시 고효율의 목표 미네랄류의 함량을 높이는 핵심방법은 기능기인 -P와 -S기가 관여하는 것으로 조사되었음에 따라 유단백질이 보유하고 있는 킬레이팅 기능기의 노출의 극대화 방법에 대한 정립연구를 진행할 필요가 있다. 현재 연구는 무기태 미네랄중 철분만을 대상으로 유기태화 패턴을 조사하였으나, 동일기질을 사용한다는 전제하에서 이종 미네랄류의 유기태화 반응패턴 또한 동일할 것으로 판단되었다. 따라서, 현재 결과를 기초로 동일 유기태화 반응에 따른 4종 목표미네랄에 대한 추가 정립을 실시할 예정이다.

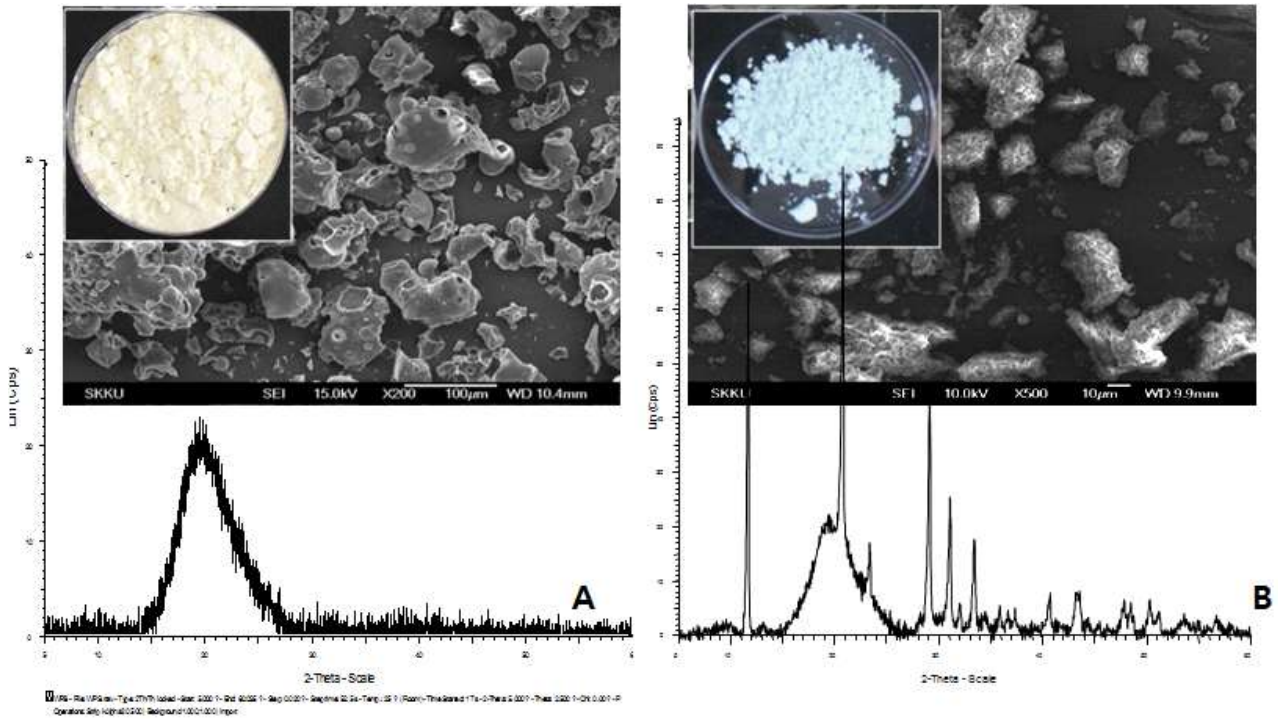


Fig. 1. 유청단백질(WPS)를 원료로 하여 제조한 FeWPS(B)의 정상((열전계방사형주사현미경:FESEMII/EDS/EBSD) 및 구조변화(XRD) 비교결과

A: 원료 WPS(관찰배수: x200배), B:Fe-WPS(Fe함유량 24,010ppm, 유지방 함유량 4% WPS 원료사용 유기태화 철분제조)

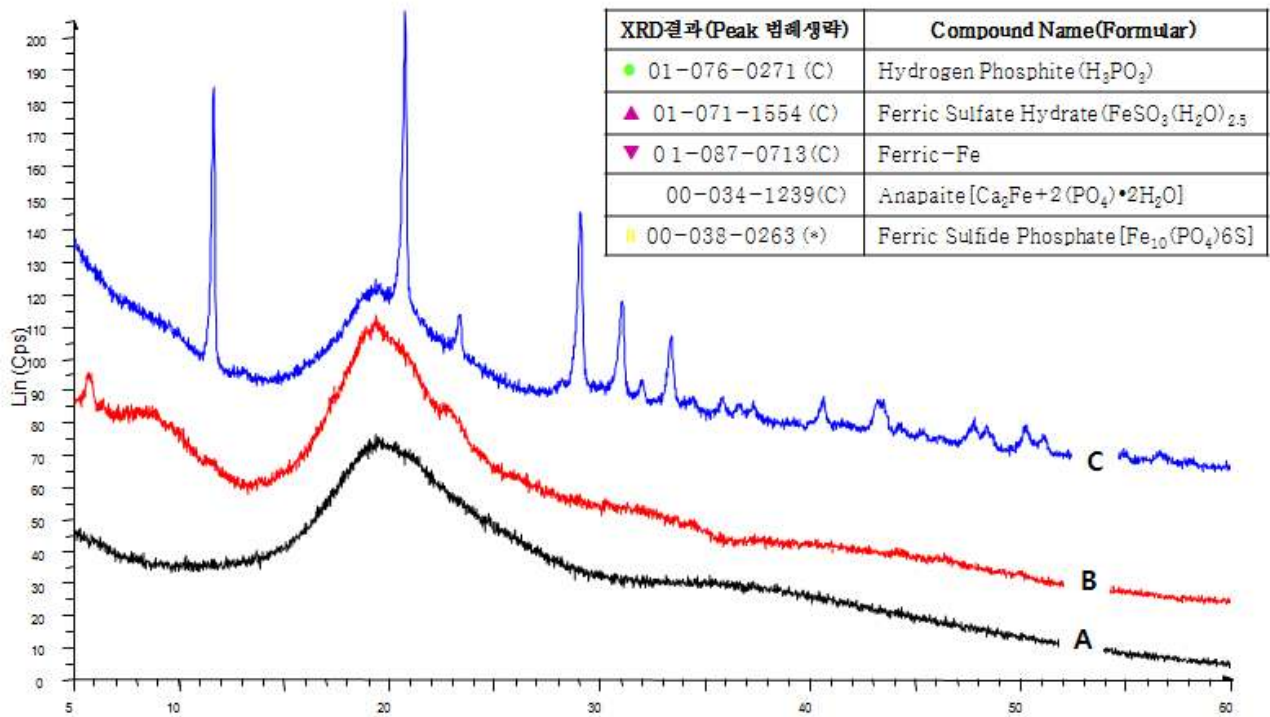


Fig 2 . 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Fe-WPS의 구조분석을 위한 XRD분석결과
 A : 치즈제조후 유청단백질, B : 유기태화 원료 제조된 유청단백질(거대지방구 제거공정후 미세유지방 4% 함유), C: 유기태화 Fe-WPS(Fe함유량 : 24,010ppm)

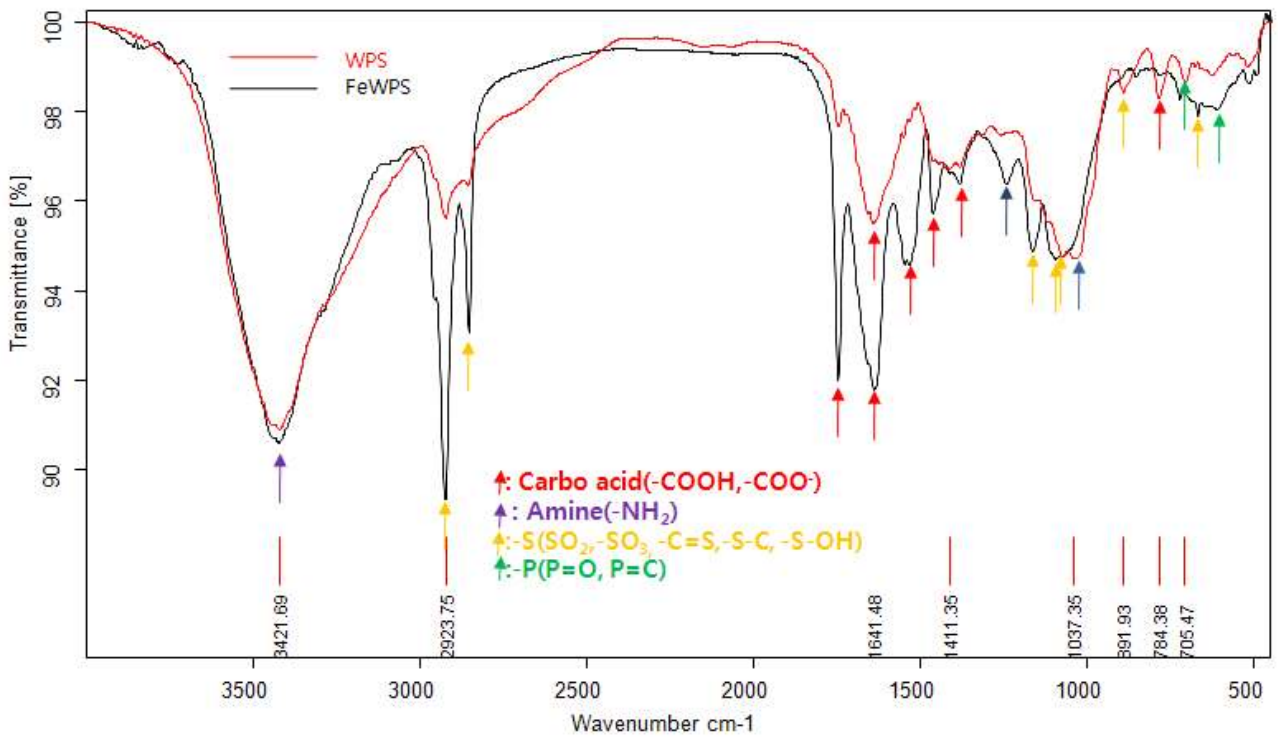


Fig 3. 유단백질 WPS를 원료로 하여 킬레이팅 관련 기능기 극대화(Fe-WPS) 여부 비교검정 결과(FT-IR분석결과)

Table 1 . 정제 WPS 대비 목표 단일 미네랄 킬레이팅 반응후 제조된 MC-complex소재별 미네랄류내 미네랄 함유량 분포조사결과(단위: ppm)

유기태 미네랄 소재류	WPS 대비 단일미네랄의 킬레이팅 효과 조사(동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
WPS	3,111±8	ND	1.30±0.02	ND	ND	WPS+CaCl ₂
Ca-WPS	53,480±43	ND	ND	42.2±0.4	ND	WPS+CaCl ₂
Fe-WPS	9,220±79	ND	24,010±112	9.9±0.4	ND	WPS+FeSO ₄
Zn-WPS	8,608±111	25,470±31	ND	ND	ND	WPS+ZnSO ₄
Cu-WPS	6,655±83	ND	ND	29,100±128	3,542±46	WPS+CuSO ₄
Se-WPS	8,641±44	ND	ND	ND	19,310±103	WPS+SeO ₂

제 3-9 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립 [유기태화 반응 패턴조사, (아연-유기태화 소재)]

1. 연구목표

본 연구Part의 목표는 유기태화 기질로 선발된 기질류를 대상으로 우선 예비실험(선행정립 유기태화 제조법 적용)을 거쳐 최적의 유기태화 기질을 선발함이 주요연구목표이다.

해결수단으로서, 선행연구결과 및 선행정립된 유기태화 제조법을 연계 및 적용하여 목표 미네랄류(5종) 대비 선발기질에 대하여 유기태화 패턴을 사전평가 함으로서, 무기태 미네랄의 유기태화 제조방법 개발에 있어 기정립 방법 기본적용 또는 신규제조법 개발 여부를 사전 파악하기 위하여 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 22종 우유유래 단백질내 칼슘 및 미네랄류의 분포조사를 통하여, 선발된 유청단백질(WPS) 대비 목표 5종의 미네랄류중 아연을 대상으로 사전정립된 유기태화 기법을 적용하여 킬레이팅 능력과 더불어 반응패턴을 확인하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

유기태화 기질 준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장 에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여 이를 아연-유기태화(Zn-WPS) 소재의 제조에 이용하였다.

유단백질과 아연의 킬레이팅 패턴 평가

WPS 5 대비 무기태 아연($ZnSO_4 \cdot 5H_2O$) 1 및 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10으로 배합하는 비율로 사전정립된 제조법에 따라 제조하였으며, 반응종료 후 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리하는 세척공정을 4회이상 반복한 후 동결건조공정을 거쳐 유기태화 아연 강화 유단백질을 최종 제조하였다. 본 연구간 사용된 무기태 아연은 추후 사업화에 있어 식품분야 등에 진출을 염두로 두고 식품공전 및 건강기능식품 공전내 등록된 시료중에서 선발하였고, 구입제품 또한 식품첨가물로 판매허가된 제품을 구입하여 본 연구간 사용하였다.

3. 결과확인

시험구간 기질단백질과 아연과 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP분석결과를 비교하였으며, 미네랄 유기태화와 관련된 기능기 판정을 위하여는 필수분석법에 정립된 FT-IR방법으로 그리고 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조는 XRD분석법을 통하여 확인하였다.

4. 연구결과

유단백질에 미네랄의 킬레이팅후 제조된 아연-WPS소재류의 무형태의 입자성상 및 불용성의 특성을 보였다(그림 1),

미네랄 킬레이팅과 관련한 유단백질의 핵심기능기는 -P, -S, -NH₂, -COOH 및 Amide가 관여하는 것으로 조사되었는데, 이중 핵심적인 기능기는 -P와 -S인 것으로 판단되었다(그림3). 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조를 XRD분석법을 통하여 확인한 결과, 대조 WPS의 경우는 비결정구조 패턴을 보였지만 무기태 미네랄인 아연과 유단백질과 결합시, Zinc Sulfate Hydrate - ZnSO₃(H₂O)_{2.5}, Hydrogen Phosphite - H₃PO₃, Potassium Hydrogen Sulfite - KHSO₃, Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate - Ca₈H₂(PO₄)₆H₂O, Calcium Sulfate Hydrate - CaSO₄(H₂O)_{0.67}, Calcium Sulfide Phosphate - Ca₁₀(PO₄)₆S, Brushite, syn - CaPO₃(OH)₆H₂O, Zinc - Zn류의 형태로 결합 및 결정구조 성상을 이루고 있었다(그림 1~2).

선발 유단백질을 기질로 하여 제조한 Zn-WPS소재내 미네랄 함유량을 전체 목표 미네랄과 동시에 조사하여 보았더니, 원료 WPS내 칼슘은 3,111ppm, 철은 1.30ppm이 검출되었는데, 아연을 포함한 나머지 미네랄류 3종은 검출되지 않았다(표 1). 그러나, 유기태화가 완료된 Zn-WPS소재의 경우는 WPS내 존재하였던 칼슘(8,608ppm)까지 증가시키면서 동시에 아연의 킬레이팅 능력 또한 동시에 약 8,600ppm까지 증가시키는 결과를 보였다. 이를 보면 유기태화 반응이 진행되면서 칼슘과 아연은 이온경쟁성에서 우열이 없음이 확인됨과 동시에 추후 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류 제조시 유용한 기초결과를 제공하였다 판단되었다.

결론적으로, 미네랄을 도입시 관련 킬레이팅 기능기의 평가와 이들의 극대화 향상방법, 이들 기능기의 극대화 제조방법의 정립과 제조된 유기태화 미네랄 소재류의 안전(정)성 및 특성등 전체 메카니즘이 연계되어 정립되었다.

4. 추후진행사항

무기태 아연 대상 선발 유기태화 기질인 WPS의 유기태화 반응시 고효율의 목표 미네랄류의 함량을 높이는 핵심방법은 기능기인 -P와 -S기가 관여하는 것으로 조사되었음에 따라 유단백질이 보유 킬레이팅 기능기의 노출의 극대화 방법에 대한 정립연구를 진행 할 필요가 있다. 현재 연구는 무기태 미네랄중 아연을 유기태화 패턴을 조사하였으나, 선행 칼슘 및 철분의 유기태화 반응패턴과 연계하여 살펴보면, 동일기질을 사용한다는 전제하에서 이중 미네랄류의 유기태화 반응패턴 또한 동일할 것으로 판단되었다.

따라서, 현재 결과를 기초로 동일 유기태화 반응에 따른 4종 목표미네랄에 대한 추가 정립을 실시할 예정이다.

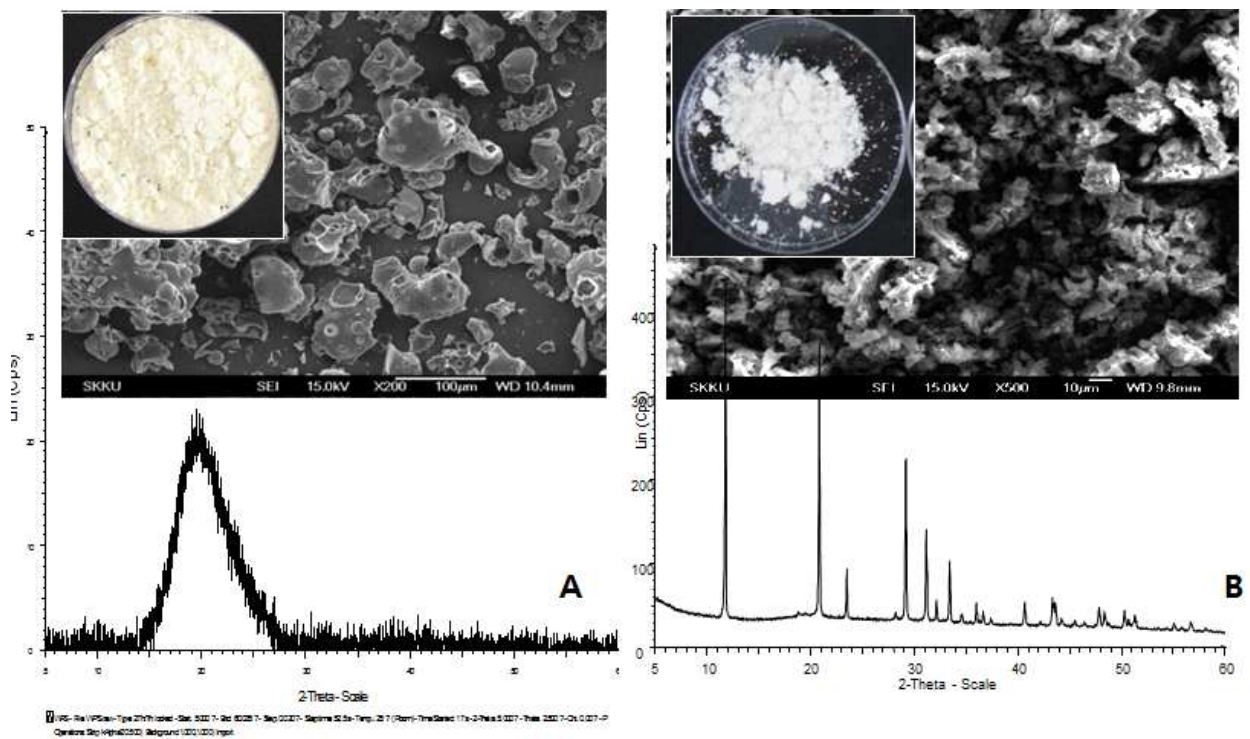


Fig 1. 유청단백질(WPS)를 원료로 하여 제조한 Zn-WPS(B)의 정상((열전계방사형주사현미경:FESEMII/EDS/EBSD) 및 구조변화(XRD) 비교결과

A: 원료 WPS(관찰배수, x 200배), B : ZnWPS(Zn함유량 25,470ppm)

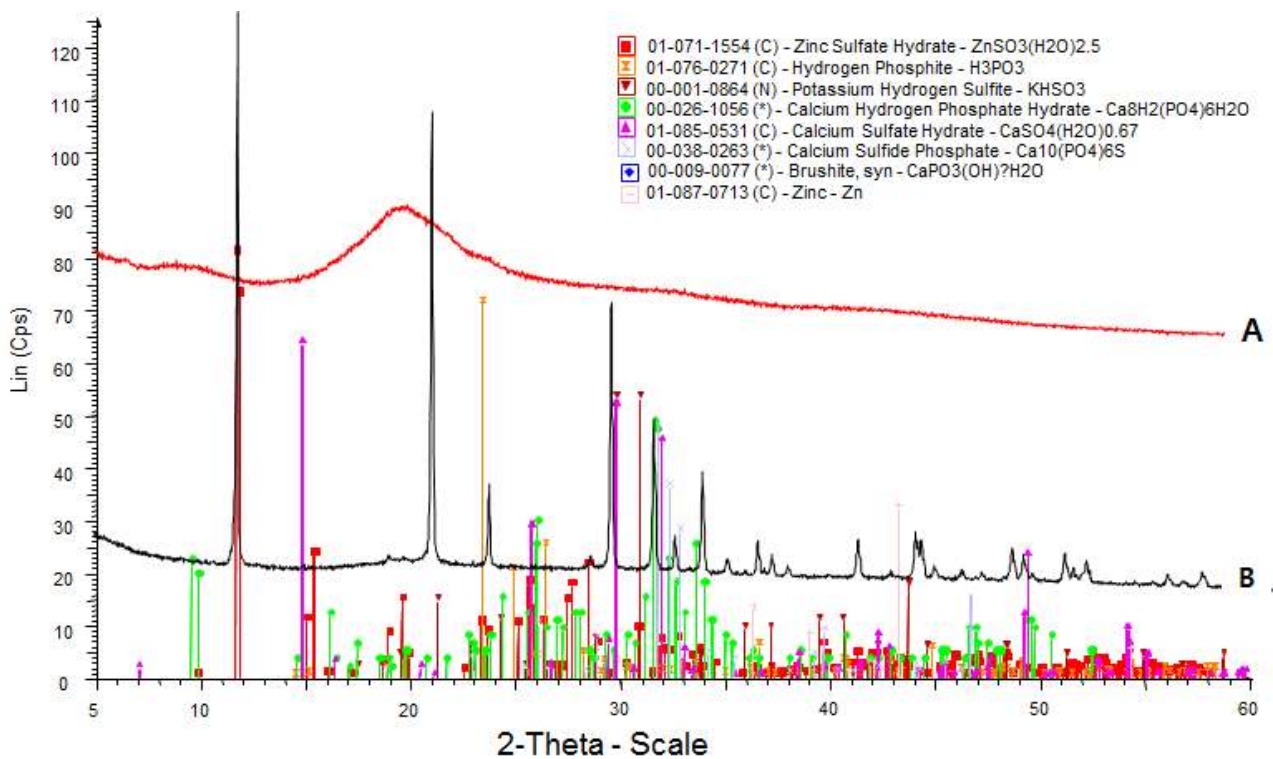


Fig 2 . 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Zn-WPS의 구조분석을 위한 XRD분석결과
 A : 치즈제조후 유청단백질, B : 유기태화 원료 제조된 유청단백질(거대지방구 제거공정후 미세유지방 4% 함유), C: 유기태화 Fe-WPS(Fe함유량 : 24,010ppm)

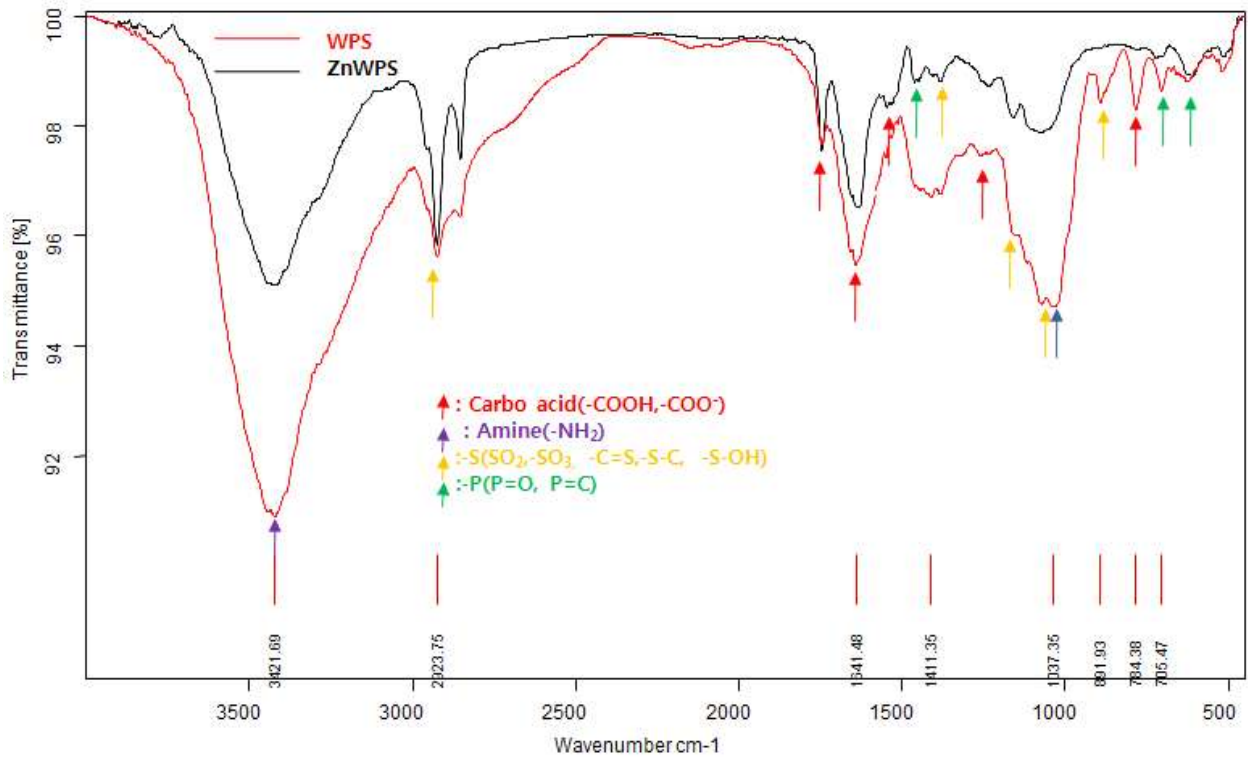


Fig 3. 유단백질 WPS를 원료로 하여 킬레이팅 관련 기능기 극대화 (Zn-WPS, Zn함유량 25,470ppm) 여부 비교검정 결과(FT-IR분석결과)

Table 1 . 정제 WPS 대비 목표 단일 미네랄 킬레이팅 반응후 제조된 MC-complex소재별 미네랄류내 미네랄 함유량 분포조사결과(단위: ppm)

유기태 미네랄 소재류	WPS 대비 단일미네랄의 킬레이팅 효과 조사(동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
WPS	3,111±8	ND	1.30±0.02	ND	ND	WPS+CaCl ₂
Ca-WPS	53,480±43	ND	ND	42.2±0.4	ND	WPS+CaCl ₂
Fe-WPS	9,220±79	ND	24,010±112	9.9±0.4	ND	WPS+FeSO ₄
Zn-WPS	8,608±111	25,470±31	ND	ND	ND	WPS+ZnSO ₄
Cu-WPS	6,655±83	ND	ND	29,100±128	3,542±46	WPS+CuSO ₄
Se-WPS	8,641±44	ND	ND	ND	19,310±103	WPS+SeO ₂

제 3-10 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립[유기태화 반응 패턴조사, (구리-유기태화 소재)]

1. 연구목표

본 연구Part의 목표는 유기태화 기질로 선발된 기질류를 대상으로 우선 예비실험(선행정립 유기태화 제조법 적용)을 거쳐 최적의 유기태화 기질을 선발함이 주요연구목표이다.

해결수단으로서, 선행연구결과 및 선행정립된 유기태화 제조법을 연계 및 적용하여 목표 미네랄류(5종) 대비 선발기질에 대하여 유기태화 패턴을 사전평가 함으로서, 무기태 미네랄의 유기태화 제조방법 개발에 있어 기정립 방법 기본적용 또는 신규제조법 개발 여부를 사전 파악하기 위하여 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 22종 우유유래 단백질내 칼슘 및 미네랄류의 분포조사를 통하여, 최종 선발된 유청단백질(WPS) 대비 목표 5종의 미네랄류 중 구리만을 우선 대상으로 사전정립된 유기태화 기법을 적용하여 킬레이팅 능력과 더불어 반응패턴을 확인하였다.

2. 연구수행방법

유기태화 기질 준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장 에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여 이를 구리-유기태화(Cu-WPS) 소재의 제조에 이용하였다.

유단백질과 구리의 킬레이팅 패턴 평가

WPS 5 대비 무기태 구리($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 및 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10으로 배합하는 비율로 사전정립된 제조법에 따라 제조하였으며, 반응종료 후 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리하는 세척공정을 4회이상 반복한 후 동결건조공정을 거쳐 유기태화 아연 강화 유단백질을 최종 제조하였다. 본 연구간 사용된 무기태 구리는 추후 사업화에 있어 식품분야 등에 진출을 염두로 두고 식품공전 및 건강기능식품 공전내 등록된 시료중에서 선발하였고, 구입제품 또한 식품첨가물로 판매허가된 제품을 구입하여 본 연구간 사용하였다.

3. 결과확인

시험구간 기질단백질과 구리와 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP분석결과를 비교하였으며, 미네랄 유기태화와 관련된 기능기 판정을 위하여는 필수분석법에 정립된 FT-IR방법으로 그리고 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조는 XRD분석법을 통하여 확인하였다.

4. 연구결과

유단백질에 미네랄의 킬레이팅후 제조된 Cu-WPS소재류의 무형태의 입자성상 및 불용성의 특성을 보였다(그림 1). 미네랄 킬레이팅과 관련한 유단백질의 핵심기능기는 -P,

-S, -NH₂, -COOH 및 Amide가 관여하는 것으로 조사되었는데, 이중 핵심적인 기능기는 -P와 -S인 것으로 판단되었다(그림3).

유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조를 XRD분석법을 통하여 확인한 결과, 대조 WPS의 경우는 비결정구조 패턴을 보였지만 무기태 미네랄인 아연은 유단백질과 결합시 Hydrogen Phosphite(H₃PO₃), Copper Hydrate(CuSO₃(H₂O)_{2.5}), Copper-Cu 및 Copper Sulfide Phosphate[Cu₁₀(PO₄)₆S]류의 형태로 결합 및 결정구조 성상을 이루고 있었다(그림 1~2).

선발 유단백질을 기질로 하여 제조한 Cu-WPS소재내 미네랄 함유량을 전체 목표 미네랄과 동시에 조사하여 보았더니, 원료 WPS내 칼슘은 3,111ppm, 철은 1.30ppm이 검출되었는데, 구리를 포함한 나머지 미네랄류 3종은 검출되지 않았다(표 1). 그러나, 유기태화가 완료된 Cu-WPS소재의 경우는 WPS내 존재하였던 칼슘(6,655ppm)까지 증가시키면서 동시에 구리의 킬레이팅 능력 또한 동시에 증가시키는 결과를 보였다. 이를 보면 유기태화 반응이 진행되면서 칼슘과 구리는 이온경쟁성에서 우열이 없음이 확인됨과 동시에 추후 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류 제조시 유용한 결과를 제공하였다 판단되었다.

결론적으로, 미네랄을 도입시 관련 킬레이팅 기능기의 평가와 이들의 극대화 향상방법, 이들 기능기의 극대화 제조방법의 정립과 제조된 유기태화 미네랄 소재류의 안전(정)성 및 특성등 전체 메카니즘이 연계되어 정립되었다.

4. 추후진행사항

무기태 구리 대상 선발 유기태화 기질인 WPS의 유기태화 반응시 고효율의 목표 미네랄류의 함유량을 높이는 핵심방법은 기능기인 -P와 -S기가 관여하는 것으로 조사되었음에 따라 유단백질이 보유 킬레이팅 기능기의 노출의 극대화 방법에 대한 정립연구를 진행 할 필요가 있다. 현재 연구는 무기태 미네랄중 구리만을 대상으로 유기태화 패턴을 조사하였으나, 선행 칼슘, 철분, 아연의 유기태화 반응패턴과 연계하여 살펴보면, 동일기질을 사용한다는 전제하에서 이중 미네랄류의 유기태화 반응패턴 또한 동일할 것으로 판단되었다. 따라서, 현재 결과를 기초로 동일 유기태화 반응에 따른 목표미네랄 함유량 증대 및 유기태화 미네랄 소재류의 생산성 증대기법을 개발 연구와 연계 진행할 예정이다.

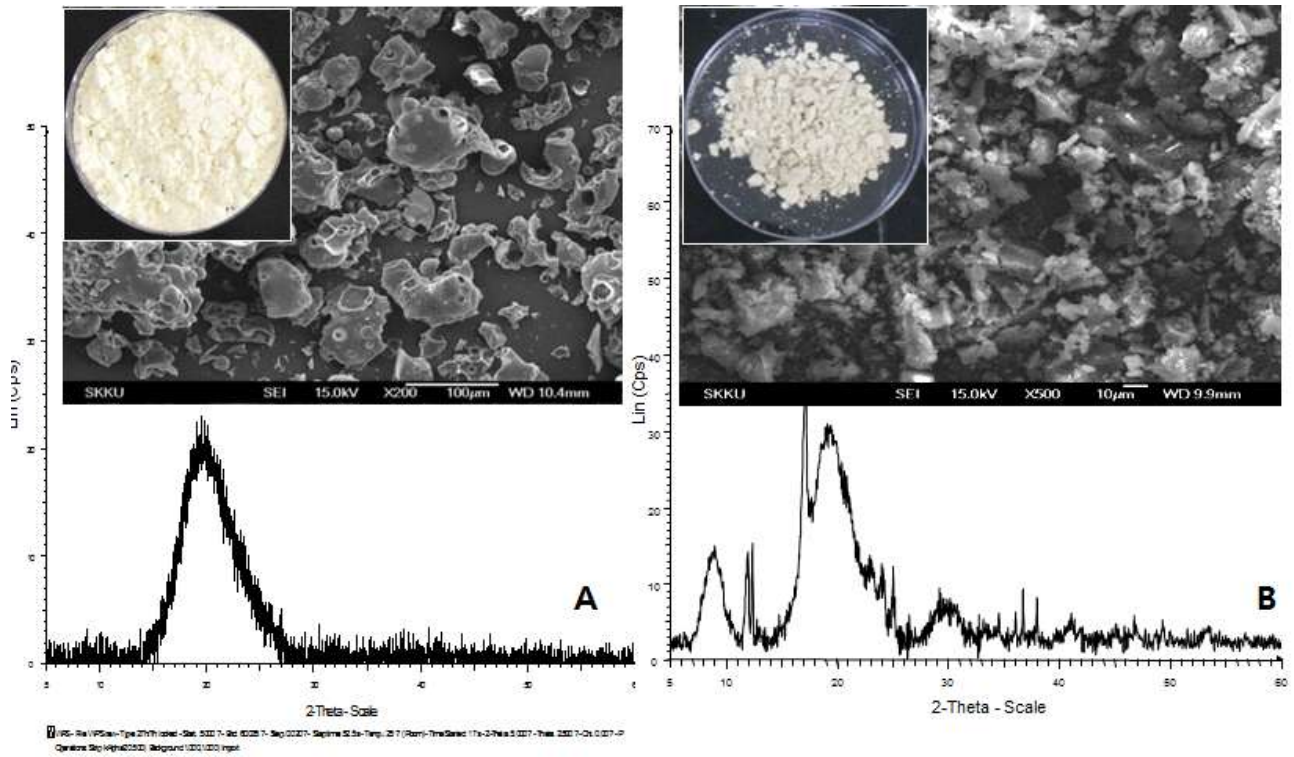


Fig 1. 유청단백질(WPS)를 원료로 하여 제조한 Cu-WPS(B)의 정상((열전계방사형주사현미경:FESEMII/EDS/EBSD) 및 구조변화(XRD) 비교결과
A: 원료 WPS(관찰배수, x 200배), B : Cu-WPS(Cu함유량 29,0000ppm)

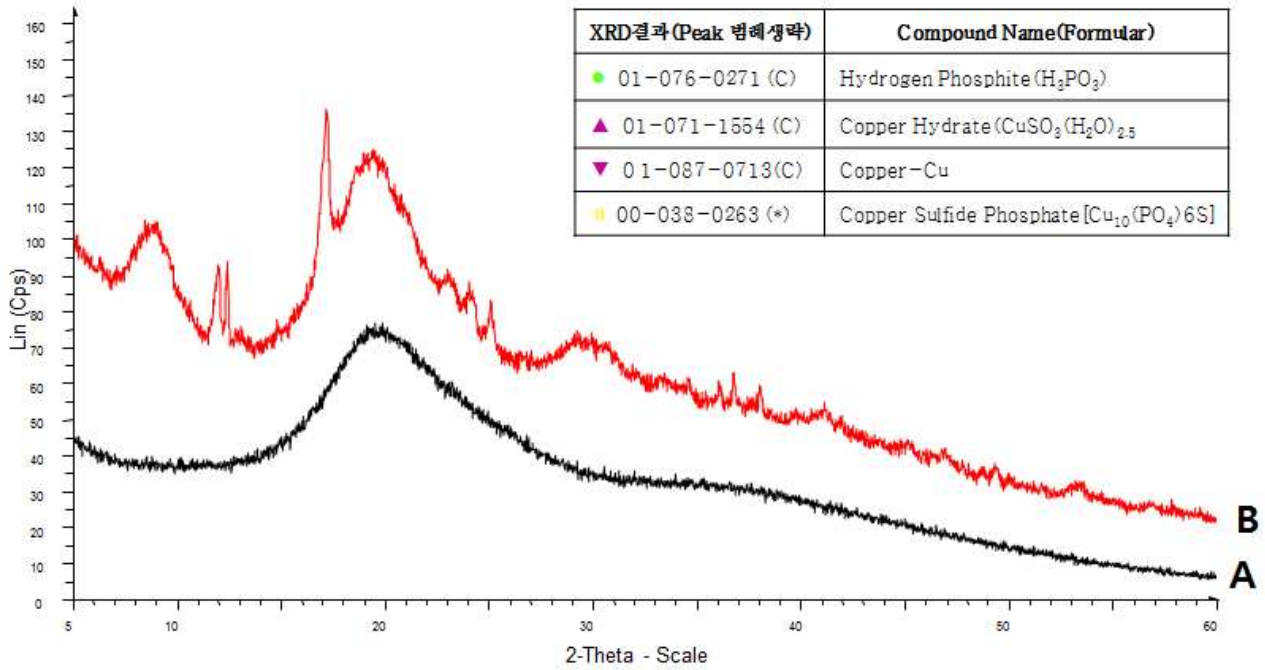


Fig 2 . 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Cu-WPS의 구조분석을 위한 XRD분석결과
 A : 치즈제조후 유청단백질, B : 유기태화 원료 제조된 유청단백질(거대지방구 제거공정후 미세유지방 4% 함유), C : 유기태화 Cu-WPS(Cu함유량 : 29,000ppm)

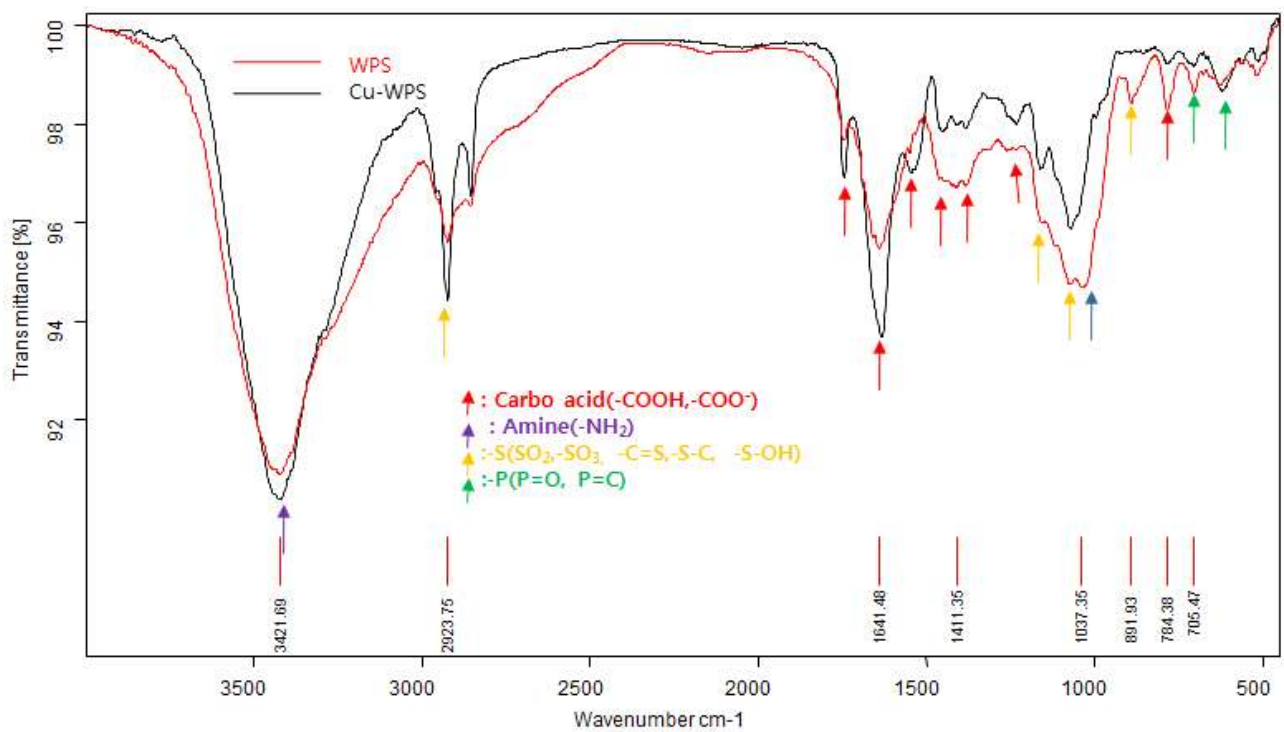


Fig 3. 유단백질 WPS를 원료로 하여 킬레이팅 관련 기능기 극대화(Cu-WPS, Cu함유량 29,000ppm) 여부 비교검정 결과(FT-IR분석결과)

Table 1 . 정제 WPS 대비 목표 단일 미네랄 킬레이팅 반응후 제조된 MC-complex소재별 미네랄류내 미네랄 함유량 분포조사결과(단위: ppm)

유기태 미네랄 소재류	WPS 대비 단일미네랄의 킬레이팅 효과 조사(동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
WPS	3,111±8	ND	1.30±0.02	ND	ND	WPS+CaCl ₂
Ca-WPS	53,480±43	ND	ND	42.2±0.4	ND	WPS+CaCl ₂
Fe-WPS	9,220±79	ND	24,010±112	9.9±0.4	ND	WPS+FeSO ₄
Zn-WPS	8,608±111	25,470±31	ND	ND	ND	WPS+ZnSO ₄
Cu-WPS	6,655±83	ND	ND	29,100±128	3,542±46	WPS+CuSO ₄
Se-WPS	8,641±44	ND	ND	ND	19,310±103	WPS+SeO ₂

제 3-11 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립[유기태화 반응 패턴조사, (셀레늄-유기태화 소재)]

1. 연구목표

본 연구Part의 목표는 유기태화 기질로 선발된 기질류를 대상으로 우선 예비실험(선행정립 유기태화 제조법 적용)을 거쳐 최적의 유기태화 기질을 선발함이 주요연구목표이다.

해결수단으로서, 선행연구결과 및 선행정립된 유기태화 제조법을 연계 및 적용하여 목표 미네랄류(5종) 대비 선발기질에 대하여 유기태화 패턴을 사전평가 함으로서, 무기태 미네랄의 유기태화 제조방법 개발에 있어 기정립 방법 기본적용 또는 신규제조법 개발 여부를 사전 파악하기 위하여 연구를 실시하였다. 본 연구에서는 22종 우유유래 단백질내 칼슘 및 미네랄류의 분포조사를 통하여, 최종 선발된 유청단백질(WPS) 대비 목표 5종의 미네랄류 중 셀레늄을 사전정립된 유기태화 기법을 적용하여 킬레이팅 능력과 더불어 반응패턴을 확인하였다.

2. 연구수행방법

유기태화 기질 준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장 에서 생산된 제품으로 농축유청을 대상으로 균질화, 살균 및 저온 열풍건조한 WPS를 특별히 주문하여 이를 셀레늄-유기태화(Se-WPS) 소재의 제조에 이용하였다.

유단백질과 셀레늄의 킬레이팅 패턴 평가

WPS 5 대비 무기태 셀레늄(Na_2SeO_3) 0.1 및 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10으로 배합하는 비율로 사전정립된 제조법에 따라 제조하였으며, 반응종료 후 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리하는 세척공정을 4회이상 반복한 후 동결건조공정을 거쳐 유기태화 아연 강화 유단백질을 최종 제조하였다. 본 연구간 사용된 무기태 셀레늄은 추후 사업화에 있어 식품분야 등에 진출을 염두로 두고 식품공전 및 건강기능식품 공전내 등록된 시료 중에서 선발하였고, 구입제품 또한 식품첨가물로 판매허가된 제품을 구입하여 본 연구간 사용하였다.

3. 결과확인

시험구간 기질단백질과 셀레늄과 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP 분석결과를 비교하였으며, 미네랄 유기태화와 관련된 기능기 판정을 위하여는 필수분석법에 정립된 FT-IR방법으로 그리고 유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조는 XRD분석법을 통하여 확인하였다.

4. 연구결과

유단백질에 미네랄의 킬레이팅후 제조된 Se-WPS소재류의 무형태의 입자성상 및 불용성의 특성을 보였다(그림 1). 단백질류는 기본적으로 P, -S, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ 및 Amide

류의 기능기를 보유하고 있는데, 따라서 미네랄 킬레이팅과 관련한 유단백질의 핵심기능기 역시 이들일 것으로 예측되어, 유기태화 미네랄 소재류를 제조후 이들의 관계를 파악하여 보았더니, 이중 핵심적인 기능기는 -P와 -S인 것으로 판단되었는데 본 연구에서 평가 결과가 그렇다는 것이고, 이외의 기능기 또한 보조적인 역할을 동시에 수행할 것으로 잠정 평가되었다(그림3).

유단백질과 미네랄과의 결합에 따른 구조결정 및 유단백질과의 결합구조를 XRD분석법을 통하여 확인한 결과, 대조 WPS의 경우는 비결정구조 패턴을 보였지만 무기태 미네랄인 셀레늄 유단백질과 결합시 Hydrogen Phosphite(H_3PO_3), Selenium-Se의 형태로 결합 및 결정구조 성상을 이루고 있었다(그림 1~2).

선발 유단백질을 기질로 하여 제조한 Se-WPS소재내 미네랄 함유량을 전체 목표 미네랄과 동시에 조사하여 보았더니, 원료 WPS내 칼슘은 3,111ppm, 철은 1.30ppm이 검출되었는데, 구리를 포함한 나머지 미네랄류 3종은 검출되지 않았다(표 1).

선발 유단백질을 기질로 하여 제조한 Se-WPS소재내 미네랄 함유량을 전체 목표 미네랄과 동시에 조사하여 보았더니, 원료 WPS내 칼슘은 3,111ppm, 철은 1.30ppm이 검출되었는데, 구리를 포함한 나머지 미네랄류 3종은 검출되지 않았다(표 1). 그러나, 유기태화가 완료된 Se-WPS소재의 경우는 WPS내 존재하였던 칼슘(8,600ppm)까지 증가시키면서 동시에 구리 또한 19,000ppm까지 증가시키는 결과를 보였다. 이를 보면 유기태화 반응이 진행되면서 칼슘과 셀레늄은 이온경쟁성에서 우열이 없음이 확인됨과 동시에 추후 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류 제조시 유용한 기초결과를 제공하였다 판단되었다. 그러나, FT-IR의 기능기 변화 패턴과 유기태화에 따른 셀레늄의 킬레이팅 패턴은 다른 미네랄류의 결과와 비교하면 유사한 결과를 보였는데, XRD분석결과를 통하여 구조결정 패턴은 다른 4종의 미네랄의 결과와는 다소 다른 패턴으로 나타났다. 즉, 기질 유청단백질의 경우는 구조결정 형태를 이루지 못하는 분석결과를 비교하면 셀레늄-유기태화 소재류의 경우도 크게 차이를 보이지 않았기 때문이다. 이는 추후 구조분석을 통하여 세세하게 파악함으로써 제품화 개발에 활용토록 할 예정이다.

결론적으로, 미네랄을 도입시 관련 킬레이팅 기능기의 평가와 이들의 극대화 향상방법, 이들 기능기의 극대화 제조방법의 정립과 제조된 유기태화 미네랄 소재류의 안전(정)성 및 특성등 전체 메카니즘이 연계되어 정립되었다.

4. 추후진행사항

무기태 셀레늄 대상 선발 유기태화 기질인 WPS의 유기태화 반응시 고효율의 목표 미네랄류의 함량을 높이는 핵심방법은 기능기인 -P와 -S기등이 관여하는 것으로 조사되었음에 따라 유단백질이 보유하고 있는 고유의 킬레이팅 기능기들의 극대화 노출방법에 대한 정립 연구를 진행 할 필요가 있다. 선행 칼슘, 철분, 아연, 구리 및 셀레늄의 유기태화 반응패턴이 동일한 것으로 평가 되었는데 이는 동일기질을 사용한다는 전제하에서 본 과제에서 수행한 미네랄 이외에 이중 미네랄류의 유기태화 반응패턴 또한 동일할 것으로 판단되었다.

따라서, 현재 결과를 기초로 동일 유기태화 반응에 따른 목표미네랄 함유량 증대 및 유기태화 미네랄 소재류의 생산성 증대기법을 개발 연구와 연계 진행할 예정이다.

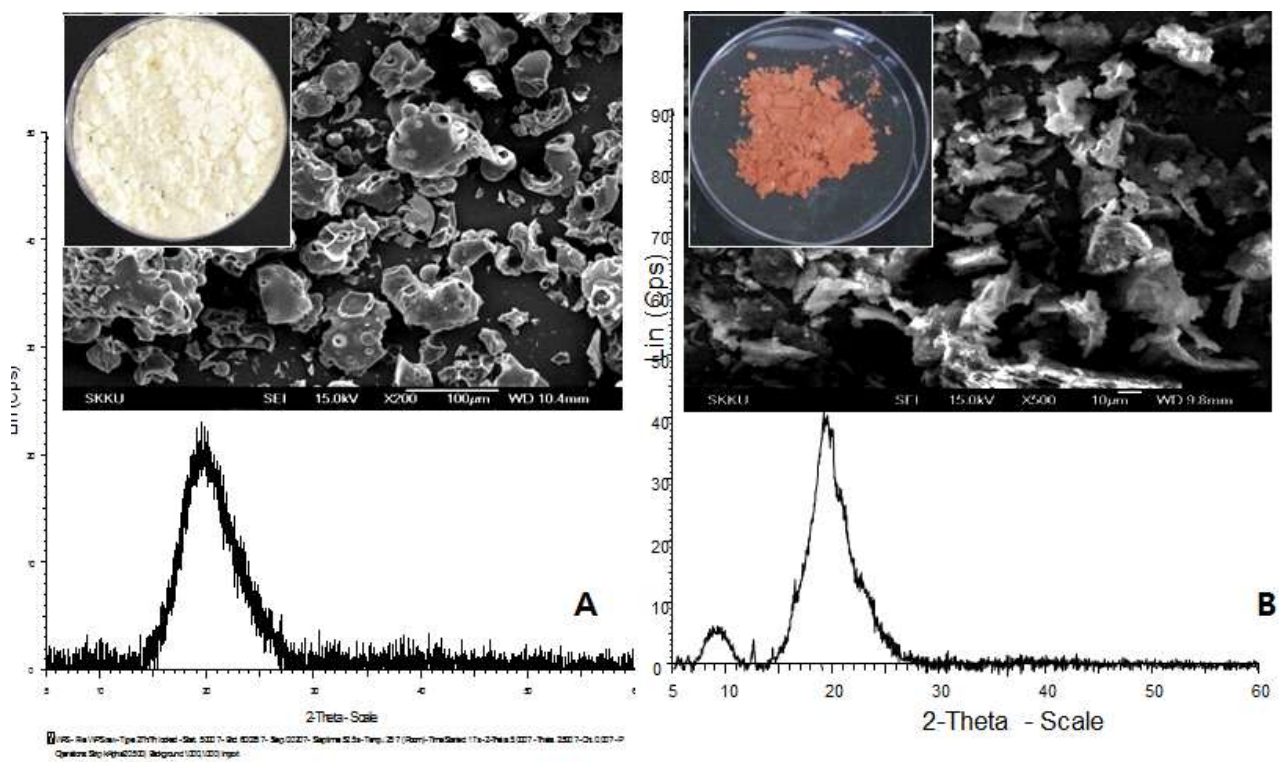


Fig 1. 유청단백질(WPS)를 원료로 하여 제조한 Se-WPS(B)의 성상((열전계방사형주사현미경:FESEMII/EDS/EBSD) 및 구조변화(XRD) 비교결과
 A: 원료 WPS(관찰배수, x 200배), B : Se-WPS(Se함유량 19,310ppm)

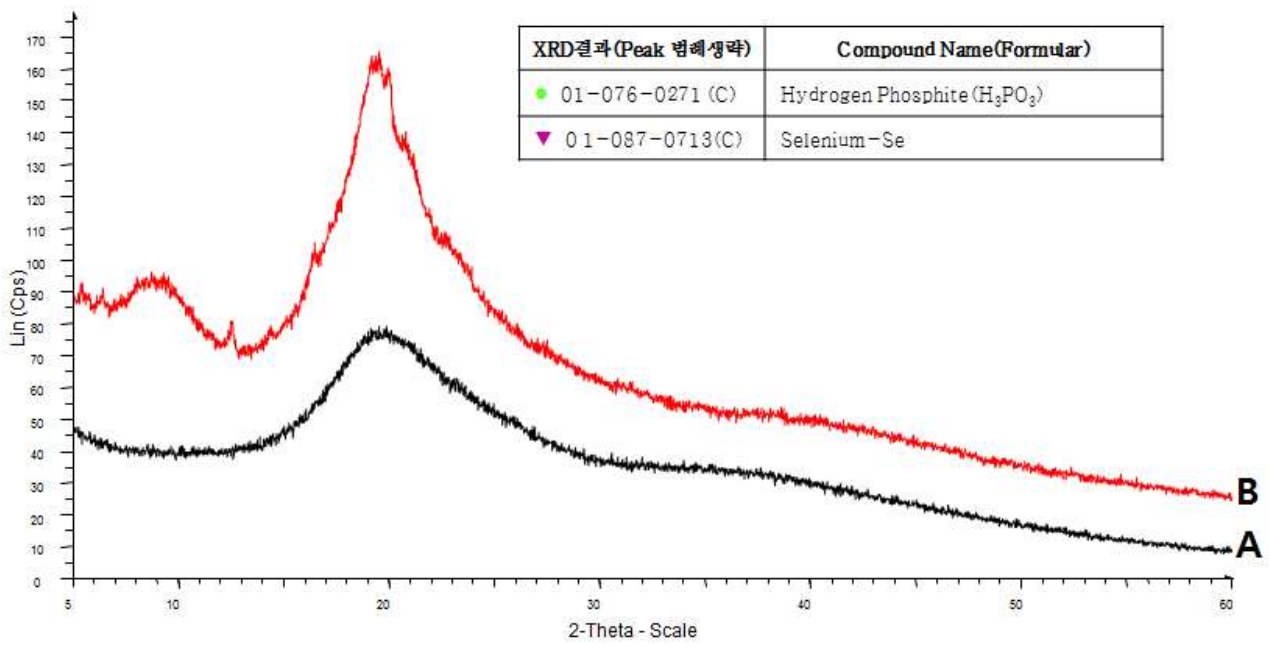


Fig 2 . 유단백질 WPS를 원료로 하여 제조된 Se-WPS의 구조분석을 위한 XRD분석결과
 A : 치즈제조후 유청단백질, B : 유기태화 원료 제조된 유청단백질(거대지방구 제거공정후 미세유지방 4% 함유), C: 유기태화 Se-WPS(Se함유량 : 19,310ppm)

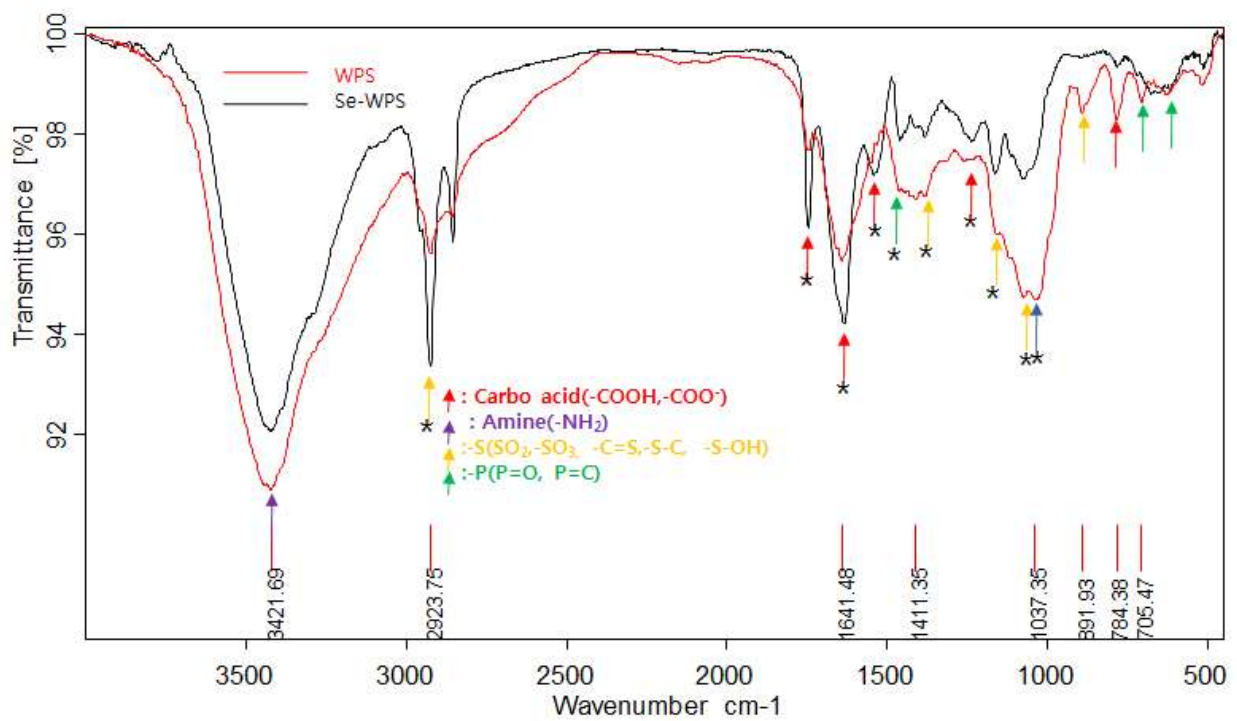


Fig 3. 유단백질 WPS를 원료로 하여 킬레이팅 관련 기능기 극대화(Se-WPS, Se함유량 19,310ppm) 여부 비교검정 결과(FT-IR분석결과)

Table 1 . 정제 WPS 대비 목표 단일 미네랄 킬레이팅 반응후 제조된 MC-complex소재별 미네랄류내 미네랄 함유량 분포조사결과(단위: ppm)

유기태 미네랄 소재류	WPS 대비 단일미네랄의 킬레이팅 효과 조사(동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
WPS	3,111±8	ND	1.30±0.02	ND	ND	WPS+CaCl ₂
Ca-WPS	53,480±43	ND	ND	42.2±0.4	ND	WPS+CaCl ₂
Fe-WPS	9,220±79	ND	24,010±112	9.9±0.4	ND	WPS+FeSO ₄
Zn-WPS	8,608±111	25,470±31	ND	ND	ND	WPS+ZnSO ₄
Cu-WPS	6,655±83	ND	ND	29,100±128	3,542±46	WPS+CuSO ₄
Se-WPS	8,641±44	ND	ND	ND	19,310±103	WPS+Na ₂ SeO ₃

제 3-12 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립[유기태화 반응 패턴조사, (다중(5종) 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재)]

1. 연구목표

유기태화 기질로 선발된 기질인 유청단백질(WPS)를 대상으로 이들이 고유하게 보유하고 있는 미네랄류와 별도로 첨가한 무기태 미네랄류가 유기태화 반응패턴을 보면서, 칼슘을 기준으로 별도의 1종의 미네랄을 각각 추가시 이온경쟁성 없으면서 유기태화 효능은 높았던 선행 결과를 확인 한 바 있다. 추후 산업화에 있어 소비자가 단일 미네랄, 2종 혹은 다중 킬레이팅 미네랄 유기태화 소재류에 대한 선택권을 요구할 수 있으므로, 본 연구에서는 단일 및 2종 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재 개발관련 선행연구를 통하여 예측되었던 연구결과를 기초로, 전체연구에서 사용되는 미네랄류를 칼슘을 기본 첨가하는 조건에서 각각 1종씩 그리고 동시에 5종을 동시에 첨가시키는 방법을 통하여 2종 및 다중 미네랄 동시에 킬레이팅 되는 유기태호기 미네랄 소재류의 개발 가능성과 동시에 이온 경쟁성을 평가하여 보고 저 본 연구를 실시하였다.

2. 연구수행방법

유기태화 기질 준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여 이를 다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재의 제조에 이용하였다.

단일 기질 유단백질과 다중 미네랄류 킬레이팅 패턴 평가

전체적인 배합비율은 WPS 5 대비 무기태 미네랄 1 및 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10으로 배합하는 비율로 사전정립된 제조법에 따라 제조하였다. 단일 또는 2종 및 5종 미네랄류의 처리에 따른 다중미네랄 함유 유기태화 소재를 개발하기 위하여 무기태 미네랄류 별 첨가량도 동일하게 적용하였다. 유기태화 반응이 종료되면 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리 세척공정을 7회이상 반복후 동결건조공정을 거쳐 유기태화 소재류를 최종 제조하였다. 본 연구간 사용된 무기태 미네랄은 추후 산업화에 있어 식품분야 등에 진출을 염두로 두고 식품공전 및 건강기능식품 공정내 등록된 시료중에서 선발하였고, 구입 제품 또한 식품첨가물로 판매허가된 제품을 구입하여 본 연구간 사용하였다.

3. 결과확인

시험구간 기질단백질과 구리와 킬레이팅 능력은 여기 동결건조한 시료를 대상으로 ICP분석결과를 비교하였으며, 생산수율은 최종시료를 동결처리한 후 기질 유청단백질(WPS)의 처리량에 비교하여 산출하였다,

4. 연구결과

유단백질에 미네랄의 킬레이팅후 제조된 전체 유기태화 미네랄 소재류는 무형태의 입자

성상 및 불용성의 특성을 보였다(그림 1). 단일 유기태화 미네랄 소재류의 경우는 미네랄 킬레이팅과 관련한 유단백질의 핵심기능기인 -P, -S, -NH₂, -COOH 및 Amide중 이중 핵심적인 기능기는 -P와 -S인 것으로 판단되었는데, 3종 킬레이팅 유기태화 미네랄 소재의 경우는 Phosphorus, Sulfur, Amines, Carbo acid, Carbonates, Amides가 복합적으로 킬레이팅화 되면서 기질 WPS와는 전혀 다른 물질의 패턴을 보였다(그림 2).

선발 원료인 WPS내 칼슘은 3,111ppm, 철은 1.30ppm이 검출되었는데, 구리를 포함한 나머지 미네랄류 3종은 검출되지 않았다. 기질 유청단백질 대비 단일 미네랄을 각각 처리 후, 선행정립된 표준유기태소재제조법을 적용하여 유기태화 반응이 종결될 시점에서 미네랄 킬레이팅 효능을 살펴보았더니, 미네랄류 마다 다소 차이는 있었지만 최저 1.95%에서 최대 5.4%의 킬레이팅 능력을 보였다(표 1).

단일 미네랄의 킬레이팅 결과를 기초로 2종의 미네랄을 동시에 킬레이팅 유도시는 셀레늄을 제외하고는 전체 시험군에서 높은 유기태화 효능을 보임으로서 이들은 이온경쟁성에서 문제가 없는 것으로 평가 되었다. 즉, 칼슘을 기본으로 하되 미네랄을 1종씩 추가하는 경우에서 셀레늄은 칼슘과의 이온 경쟁성에서 우위를 점유하는 결과를 보이는 것으로 평가되었는데, 이는 아마도 4종 미네랄류와는 다른 킬레이팅 메카니즘을 보유하고 있는 것 때문으로 판단되었다.

단일 및 2종의 미네랄을 동일 기질에 킬레이팅하시 결과를 기초로 하여, 5종의 미네랄류를 동시에 킬레이팅화 반응을 유도하면 어떠한 변화가 유발되는지를 평가하여 보았다.

결과로서, 아연과 구리는 전체 이온경쟁성에서 배제되는 결과를 보였으며 이외 3종의 킬레이팅 결과를 비교시 셀레늄이 가장 이온경쟁성에서 우위를 점유하였고 다음으로 칼슘 그리고 철분 순으로 이온경쟁성을 보였다(표 2). 이러한 이온경쟁성은 결국 생산수율에서 차이를 보일 것으로 예측되어 대조 Ca-WPS(9.5%)의 생산수율과 비교하여 보았더니, 가장 이온경쟁성이 우수하였던 Se-WPS의 생산수율은 4.3%로 가장 낮았던 반면에 2종 미네랄 유기태화 소재류의 경우는 최저 8.2%에서 최대 4.5%의 생산수율을 보임으로서 차이가 인정되지 않았다. 그러나, 5종을 동시에 처리한 유기태화 미네랄 소재의 경우는 32.2%의 생산수율과 미네랄 함유량이 칼슘은 65,840ppm으로 대조 대비 1.92배 셀레늄의 경우는 7.93배의 높은 킬레이팅 능력을 보였으며 철분(Ca+Fe-WPS, 39,930ppm)의 경우는 동등성을 보유하고 있었다. 따라서, 생산수율 증대와 미네랄 함유량 증대 및 단일제품을 통하여 다종 유기태화 미네랄류를 섭취토록 용도용법 및 제품개발 확대를 위한 다종 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류 연구개발에 추후 전념할 예정이다. 결론적으로, 단일 및 다종 미네랄을 도입시 관련 킬레이팅 기능기의 평가와 이들의 극대화 향상방법, 이들 기능기의 극대화 제조방법의 정립과 제조된 유기태화 미네랄 소재류의 안전(정)성 및 특성등 전체 메카니즘이 연계되어 정립되었다.

4. 추후진행사항

본 연구를 통하여 유기태화 미네랄 소재류 개발에 있어 단일 및 2종 및 3종의 미네랄을 동시에 유기태화 시키는 방법을 확인하였다

따라서, 본 결과를 기초로 생산수율 증대와 미네랄 함유량 증대 및 단일제품을 통하여 다종 유기태화 미네랄류를 섭취토록 용도용법 및 제품개발 확대를 위한 다종 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류 연구개발에 추후 전념할 예정이다.

Table 1. 단일 미네럴 유기태화 소재류내 미네럴 함유량 조사결과

단일미네럴 유기태화 미네럴소재류	WPS 대비 단일미네럴 처리시 킬레이팅 효과 조사(동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
Ca-WPS	53,480 ±43	ND	ND	42.2 ±0.4	ND	WPS+CaCl ₂
Fe-WPS	9,220 ±79	ND	24,010 ±112	9.9 ±0.4	ND	WPS+FeSO ₄
Zn-WPS	8,608 ±111	25,470 ±31	ND	ND	ND	WPS+ZnSO ₄
Cu-WPS	6,655 ±83	ND	ND	29,100 ±128	3,542 ±46	WPS+CuSO ₄
Se-WPS	8,641 ±44	ND	ND	ND	19,310 ±103	WPS+Na ₂ SeO ₃

Table 2. 다중(2중 및 3중) 미네랄 유기태화 소재류내 미네랄 함유량 조사결과

다중 미네랄 킬레이팅 유기태화 소재류	WPS 대비 다중미네랄 처리시 킬레이팅 효과 조사(ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
WPS+(Ca)	34,260 ±1,140	ND	ND	ND	ND	수율:9.5%
WPS+(Ca+Cu)	30,250 ± 841	ND	ND	27,090 ±211	ND	수율:13.74%
WPS+(Ca+Se)	ND	ND	ND	ND	14,440 ±45	수율:4.3%
WPS+(Ca+Zn)	25,100 ±668	19,040 ±176	ND	ND	ND	수율:8.2%
WPS+(Ca+Fe)	38,730 ±568	ND	39,930 ±601	ND	ND	수율:14.5%
WPS+(Ca+Cu+Fe+Zn+Se)	65,840 ±800	ND	39,020 ±251	ND	114,500 ±717	수율:32.2%

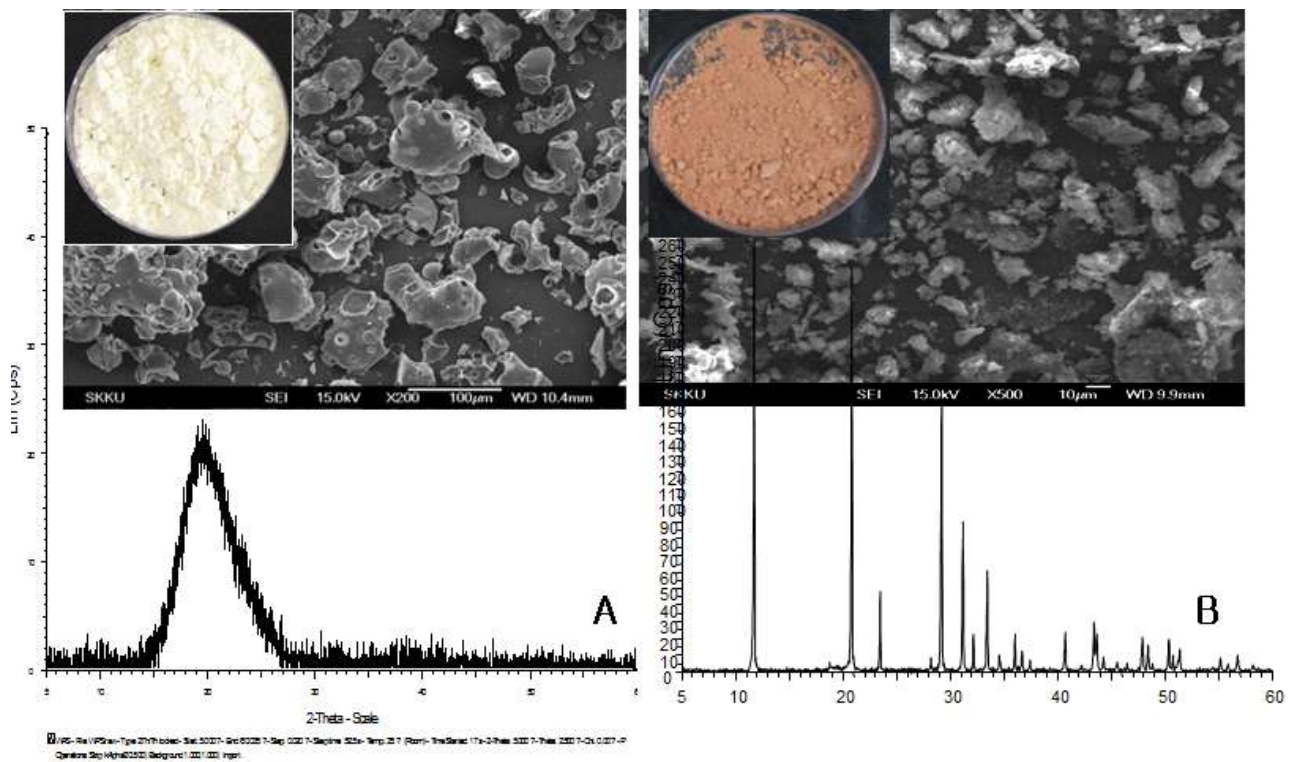


Fig 1. 유청단백질(WPS)를 원료로 하여 제조한 유기태화 미네랄 제제의 성상((열전계방사형주사현미경:FESEMII/EDS/EBSD) 및 구조변화(XRD) 비교결과
 A: 원료 WPS(관찰배수, x 200배), B:(Ca+Fe+Se)-WPS(x500))

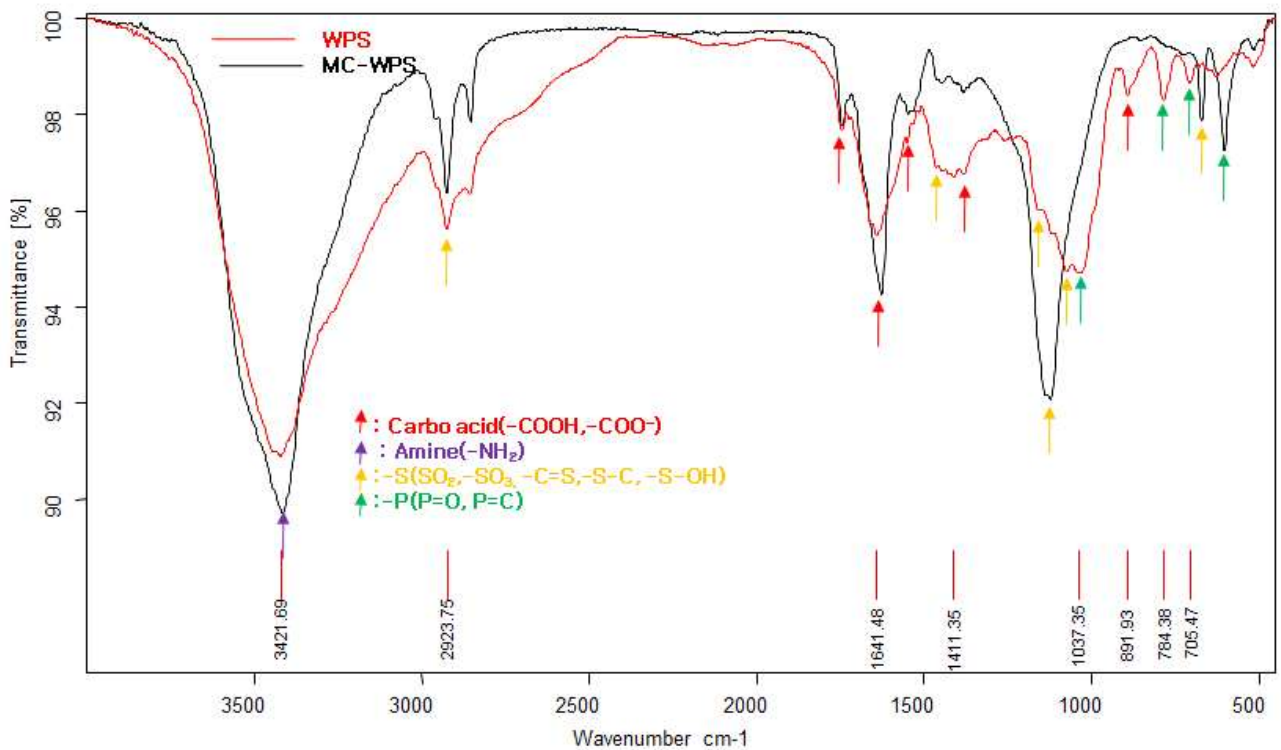


Fig 2. 유단백질(WPS)를 원료로 하여 제조된 다중 미네랄 함유 유기태화 미네랄 소재 (MC-WPS: (Ca+Fe+Se)-WPS) 관련 기능기 극대화(MC-WPS)여부 비교검정 결과 (FT-IR분석결과)

제 3-13 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립[유기태화 반응 패턴조사, 무기태 미네랄류의 킬레이팅 효율 평가]

1. 연구목표

본 연구에서는 무기태 미네랄류를 기질인 유청단백질내 킬레이팅화 하는 공정을 통하여 최종 유기태화 반응이 완료되는 메카니즘에서 유기태화 미네랄 소재인 분리 침전물과 잉여 미네랄 및 이온제거와 연계되는 상등액을 각각 분리 및 이를 동결건조 과정을 거쳐 분말화 한 후 미네랄 함유량을 조사함으로써 킬레이팅 효율을 평가 하고 저 하였다. 본 연구에서 평가 하고 저 하는 무기태 미네랄의 킬레이팅 효율과 손실부분에 대한 조사결과는 추후 진행되는 개발 촉매제를 적용한 유기태화 미네랄 소재류의 신규제조법에 있어 기초자료로 활용함으로써, 일반 유기태화 제조업의 문제점인 생산수율과 미네랄 킬레이팅 효율이 증가된 신규한 유기태화 미네랄류 개발에 적극 활용 및 관련 연구개발을 완료 하고저 하였다.

2 연구수행수행방법

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여 이용하였다. 본 연구를 수행하기 위하여, 5종 유기태화 미네랄 소재류중 대표적으로 Ca-WPS와 Fe-WPS소재류를 대상으로 진행하였다.

대상 시험군 조성을 위한 모체 유기태화 소재류인 Ca-WPS와 Fe-WPS의 제조는 촉매인 자만인 비열처리 조건으로 하는 표준유기태화제조법을 적용하여 제조하였으며, 유기태화 반응이 종결되는 단계에서 원심분리(3,000rpm, 20분, 상온)후 침전물과 상등액으로 구분하여 분리한 후 상등액은 즉시 열풍건조(Spray Dryer)공정을 진행하였고, 분리 침전물은 정제수를 이용하여 7회세척 후 동결건조 과정을 거쳐 획득된 분말시료를 분석시료로 준비하였다.

시험군은 Ca-WPS소재류는 Ca-WPS(침전물, 동결건조)과 Ca-WPS(상등액 건조분말)으로 분리하여 조성하였으며, Fe-WPS소재류의 경우는 Fe-WPS(침전물, 동결건조)과 Fe-WPS(상등액 건조분말)으로 총 4 시험군에 대하여 실시하였다.

3. 연구결과

무기태 미네랄의 킬레이팅 효율 평가를 위한 조성물의 미네랄 함유량 분석을 침전물 및 상등액으로 구분하여 총미네랄 검출량을 기준으로 분석함으로써 첨가된 미네랄이 유기태화 반응에 관련되는 킬레이팅 효율을 평가하였다.

Ca-WPS소재류에 적용된 칼슘은 총 38,340ppm이었는데, 이중 침전물인 유기태화 반응에 48.6%가 상등액내는 51%가 점유하고 있는 것으로 확인되었다.

Fe-WPS소재류의 경우는 사용된 무기태 미네랄($FeSO_4 \cdot 5H_2O$)의 총량은 46,930ppm이었는데 이중 침전물로는 22,470ppm이 킬레이팅 되므로서 47.9% 그리고 상등액으로는 52%의 점유율을 나타내었다.

따라서, 전체시험결과에서 사용된 미네랄에 대하여 유기태화 반응에는 평균 48%가 사용되

며, 상등액으로 손실되는 미네랄량은 약 52%인 것으로 평가되었으며, 이러한 경향은 나머지 유기태화 미네랄 소재류에도 동일한 결과를 보일 것으로 예측되었다.

4. 추후진행사항

본 연구를 통하여 확인된 결과는 일체의 촉매인자 및 관련 기법을 적용하지 않은 순수한 유기태화 반응 결과임에 따라 본 결과는 추후 생산수율과 동시에 미네랄 킬레이팅 효율을 증대시키고 저 하는 전체연구에서 확보하여야 하는 미네랄량을 확인하였다는데 중요한 의미가 있다. 따라서, 추후 연구과정에서 개발 촉매인자 및 촉매제를 적용하여 이를 해결 하는 데 있어 기초자료로 적극 활용예정이다.



Fig 1. 무기태 미네랄의 킬레이팅 효율 평가를 위한 2종 유기태화 미네랄 소재류 제조시 분리 및 건조물의 성상비교평가

Table 1. 무기태 미네랄의 킬레이팅 효율 평가를 위한 조성물별 미네랄 함유량 분석결과(침전물 및 상등액 구분)

시험구		개발 유기태화 미네랄 소재류내 미네랄 함유량 조사결과(ppm)																합계		비고	
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	K	Mg	Mn	Na2	Cr	P	S	As	Cd	Hg	Pb	PS+	PS-		
Ca-WPS	침전물 (FD)	Mean	18,650	36	7.63	0.85	0.85	6,221	865	143	3,674	1.57	11,080	2,955	ND	0.24	4.85	11.91	43,499	29,464	
		SD	149	0.07	0.04	0.04	0.13	34	4	0	22	0.03	21	11		0.01	1.16	0.21	242	210	
	상등액 (SD)	Mean	19,690	3.61	0.27	0.07	0.7	13,870	404	0.38	6,982	0.21	1,727	836	ND	0.05	0.89	ND	43,516	40,953	
		SD	44	0.04	0.02	0.03	0.24	122	1.2	0.01	49	0.01	4	0.9		0	0.1		222	217	
	합계		38,340	40	8	1	2	20,091	1,269	2	10,656	2	12,807	3,791		0	6		87,015	70,417	
Fe-WPS	침전물 (FD)	Mean	7,213	22,460	6.12	16	ND	3,667	653	58.4	1,539	76	13,460	9,303	ND	1.29	0.17	34.24	58,453	35,690	
		SD	18	45	0.01	0.09		65	7	0.26	17	0.59	66	22		0.01	0.01	0.71	241	153	
	상등액 (SD)	Mean	1,137	24,470	2.75	19	ND	14,580	430	109	5,286	91.2	1,480	36,820	ND	1.7	0.09	47.3	84,426	46,126	
		SD	5	109	0.03	0.16		21	2.1	0.2	7	0.56	5	70		0.01	0.03	0.76	220	145	
	합계		8,350	46,930	9	35		18,247	1,083	167	6,825	167	14,940	46,123		3	0	82	142,879	81,816	

제 3-14 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립[기질 유단백질 대비 유기태화 미네랄 소재류 제조간 핵심영양 성분 변화 조사]

1. 연구목표

본 과제에서 핵심소재로 사용되는 기질 단백질은 유청분말임에 따라 이들을 기질로 하여 유기태화 미네랄류를 제조함에 있어 고유 영양성분의 변화에 미치는 결과확인, 제품의 안전성 확보와 더불어 추후 사업화 진행간 개발 소재류의 안전성 관련 소비자 신뢰를 확보함에 있어 중요한 항목이기 때문에 이를 검정할 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 기질 유청분말 대비 전체제조된 유기태화 미네랄 소재류중 Ca-WPS만을 대상으로 영양성분과 아미노산 분석을 통하여 이를 평가하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

시료준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여 이를 구리-유기태화(Cu-WPS) 소재의 제조에 이용하였다. 유기태화 미네랄 소재 제조간 영양성분류 변화조사를 위한 유기태화 미네랄 소재는 선행준비된 소재류중 Ca-WPS(칼슘 함유량 : 36,200ppm)를 대상으로 전체 유기태화 소재류의 경향을 평가하고 저 하였다.

필수영양성분 변화조사

본 연구에서는 당초 원료로 사용된 유청단백질(WPS) 대비 Ca-WPS 제조에 따른 필수 영양성분의 변화가 유발되는지를 조사하여 보았다(표 1). 이를 위하여 단백질, 조지방, 탄수화물 및 수분함유량을 기준으로 영양성분을 비교하되 관련 평가를 위한 검정은 선행정립된 필수분석법을 항목별 적용 평가하였다. 즉, 단백질은 킬달분석법, 조지방은 거버법, 탄수화물의 경우는 HPLC(RID)분석을 통하여 조사하였으며 마지막으로 수분함유량은 수분측정기를 사용하여 평가하였다.

필수아미노산 변화조사

기질 대비 칼슘-유기태화 미네랄 소재의 필수 아미노산(18종)을 수원여대 분석센터에 공인분석 의뢰하여 이를 확인하였다.

3. 연구수행결과

필수영양성분 변화조사

원료 WPS의 단백질량은 14%, 조지방은 7%, 탄수화물류중 락토스만 약 50%의 함유량 분포를 보였는데, Ca-WPS소재류의 경우는 단백질 함유량이 44% 그리고 지방함유량은

22%로 대조 대비 높은수치의 증가 패턴을 보였고, 탄수화물인 락토스는 세척과정에서 제거됨으로서 검출되지 않았다. 따라서, 기질 단백질인 유청분말에 목표 미네랄이 킬레이팅 되는 과정에서 단백질과 지방에 동시에 반응이 됨으로서 불용성화 되면서 침전되는 것으로 사료되었다(표 1).

필수아미노산 성분 변화

기질로 사용된 원료 WPS 대비 제조된 유기태화 미네랄 소재류(선발 Ca-WPS)를 대상으로 유기태화 전후의 아미노산 변화에 미치는 결과를 확인하여 보았다(표 2)

결과로서, 우선 총단백질의 함량비교를 하여 보았더니 WPS의 경우는 7.86% 그리고 Ca-WPS는 8.46%의 수치를 보였다. 이를 기준으로 18종에 대한 필수 아미노산별 함유량 차이를 연계하여 비교하여 보았더니, 총아미노산 함유량중 Proline의 수치만 WPS는 1.12%였는데, 이때 Ca-WPS의 경우는 2.12%로 증가되는 경향을 제외하고는 나머지 17종의 차이는 크게 인정되지 않았다.

따라서, 이러한 결과를 종합하면 기질 유청에 미네랄류가 유기태화 반응이 유발될 때, 단백질과 지방에 동시에 킬레이팅 되지만, 유기태화 제조과정에 따른 유단백질의 기본성분에 미치는 영향은 없는 것으로 평가되었다

4. 추후진행사항

본 연구결과는 개발 유기태화 미네랄 소재류가 원료 WPS의 고유영양성분을 파괴 또는 변형시키지 않음을 확인한 주요한 결과임에 따라 본 과제의 목표인 사료첨가제로서 적용시 영양성분 관련 별다른 보정없이 제품화가 가능할 것이고, 추후 식품첨가물 또는 건기식품 개발에 있어 별다른 첨가물이 필요 없이 기능성을 확보할 수 있는 자료임에 따라 제품판매 및 추후 고부가제품 개발에 기초자료로 적극 활용예정이다.

Table 1. 기질 유단백질 대비 개발 Ca-WPS의 핵심영양성분 변화 조사

분석항목	분석시료별 영양성분 확인결과		비고
	원료 WPS	1차 시제 Ca-WPS	
단백질함량(%)	14%	44%	킬달분석
조지방 함량(%)	7%	22%	거버법
탄수화물(당류, %)	49.74	0%	HPLC
수분함량(%)	2.91%	2.30%	수분측정기

Table 2. 원료 WPS(유지방 7%함유) 대비 유기태화 반응후 Ca-WPS소재내 단백질(아미노산 및 총아미노산)변화 조사결과

비교대상 아미노산종류	농도(mg/100g)		아미노산(%)		총아미노산(%)	
	WPS (유지방:7% 함유)	Ca-WPS	WPS (유지방:7% 함유)	Ca-WPS	WPS (유지방:7% 함유)	Ca-WPS
Aspartic acid	746.1	711.88	0.75	0.71	7.86	8.46
Threonine	501.81	451.63	0.5	0.45		
Serine	364.66	342.23	0.36	0.34		
Glutamic acid	1,297.04	1,232.10	1.3	1.23		
Proline	1,115.27	2,120.22	1.12	2.12		
Glycine	148.12	131.49	0.15	0.13		
Alaline	336.14	301.06	0.34	0.3		
Cysteine	208.41	250.04	0.21	0.25		
Valine	407.44	364.53	0.41	0.36		
Methionine	111.54	108.72	0.11	0.11		
Isoleuscne	413.33	377.49	0.41	0.38		
Leucine	722.64	660.68	0.72	0.66		
Tyrosine	46.8	41.41	0.05	0.04		
Phenylalanine	247.29	211.22	0.25	0.21		
Histidine	154.93	125.59	0.15	0.13		
Lysine	616.05	574.98	0.62	0.57		
Arginine	190.69	157.75	0.19	0.16		
Tryptophan	227.55	296.4	0.23	0.3		
합 계	7,856	7.87	7.85	8.45	7.86	8.46
비고	1. Ca-WPS : 칼슘 함유량 100,000ppm이상 2. Ca-WPS 제조용 원료 WPS : 치즈유정분말(유지방 함유량 7%, 거대유지방 미제거)					

제 3-15 절 유단백질 기질화 유기태 미네랄 소재 대량생산시스템 정립[유기태화 소재류의 외부인자저항성 평가]

1. 연구목적

본 연구Part에서는 표준유기태화 제조법을 적용하여 제조한 유기태화 미네랄류에 대한 외부인자 저항성을 평가함에 목표를 두었다. 개발 소재류에 대한 외부인자 저항성인자 평가를 진행하는 목적은 다음과 같다. 즉, 우선 원료인 유청단백질 및 이들이 영양성분은 기본적으로 섭이시, 입에서부터 분해작용이 유발되는데 위를 거쳐 장에 도달하면서 각 영양성분의 분해작용이 이루어지고 최종적으로 체내흡수되어 체내대사에 이용된다. 당초 유기태화 미네랄 소재류의 개발 개념이 pH 특히 산조건에서 저항성을 보유함으로써 이들이 장내의 분해미생물에 의해서만 분해되는 과정에서 적정분자량에 도달하면 유기태화 미네랄 은 단백질과 동시에 체내흡수되는 과정에서 동시에 체내 흡수되는 기전을 확보하고 저 함이 핵심 개발내용이다.

따라서, 개발 유기태화 미네랄 소재류가 실제로 이러한 저항성을 보유하여야 하는데, 즉 위(산성)조건에서 적어도 3시간 이내의 저항성을 보유하고 있는지를 확인하고 저 총 10일에 걸쳐 3단계로 본 실험을 진행하였다.

2. 연구수행방법

본 연구에서 사용된 시료는 현장에서 생산된 시제품 5종을 대상시료로 하여 사용 하였다.

외부저항성 평가는 유기태화 제조법 자체가 고온에서 열처리 방법이 기본으로 적용되었음에 따라 내열성은 보유한 것으로 결정 한 후, 내산 및 내염기성에 대한 저항성을 기본 결과로 하였다. 전체 유기태화 미네랄 소재류(5종)들에 외부인자 저항성 평가를 위한, pH용액은 시판중인 시약(DEJUNG사, 한국)을 pH별(1.68, 4.00, 7.00, 10.00 및 12.46)로 구입한 후 이를 이용하여 평가에 사용하였다.

단일기질-단일 미네랄 유기태화형 소재류 5종과 시료에 대하여 pH차이에 따른 안전성을 기준으로 외부저항성 효과를 평가하기 위한 시험디자인은 다음과 같이 준비하였다.

5ml 볼륨의 EP튜브에 준비된 pH용액을 4ml씩 각각 분취한 후, 여기에 준비된 유기태화 미네랄 소재류를 0.5g씩 첨가한 후 충분히 분산과정과 Sonocation 공정을 진행하였고, 1일, 3일 및 10일 동안을 상온에서 거치시킨 후 원심(3,000rpm, 20분, 25℃)처리후 상등액만을 분취 0.25um여과필터를 거쳐 ICP분석을 통하여 상등액내 존재하는 미네랄량을 비교하여 개발 소재류의 안전성과 관련한 외부환경저항 효과를 확인하였다.

전체 시험일정이 도달하면 ICP검정용 시료를 분취한 후 새로운 3차 탈이온수를 교체한 후 상기 시험을 반복하여 진행하였다.

3. 연구결과

Ca-WPS

본 결과는 Ca-WPS시험구를 대상으로 pH별 및 장기보관조건에서 내산 및 내염기성 관련 저항성을 보유하고 있는지를 평가한 결과이다(표 1).

전체 10일 동안의 결과를 보면, 내산 및 내염기성 저항성을 보유하고 있는 것으로 평가 되었는데, 1일이 경과시 전체 용출량중 96% 이상이 용출된 후 나머지 9일이 경과시는 4% 이내의 추가 용출결과를 보였는데 이러한 경향은 전체 시험군에서 동일한 패턴이었다. 이러한 경과를 유기태화 반응에 따라 형성된 구조결정입자의 안과 밖에 미네랄이 킬레이팅 되어 있는데, 이중 밖에 존재하는 미세척 미네랄이 1일차에 세척되어 상등액내에 존재하는 결과로 판단되었다. 그러나, 최초 사용된 Ca-WPS내 칼슘 함유량이 당초 약 40,000ppm였음을 감안하면 전체 용출량은 5% 수준이므로 결국 Ca-WPS소재는 외부저항성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 기초로 개발 촉매제를 적용시 표준유기태화 제조법과 연계시 생산수율만 증가시킬 수 있다면, 개발 Ca-WPS소재류는 경제성 부분까지도 확보되는 고부가가치 창출형 소재로 우수할 것으로 판단되었다.

Fe-WPS

본 결과는 Fe-WPS시험구를 대상으로 pH별 및 장기보관조건에서 내산 및 내염기성 관련 저항성을 보유하고 있는지를 평가한 결과이다(표 2).

10일 동안의 결과를 보면, 전체적으로는 내산 및 내염기성 저항성을 보유하고 있는 것으로 평가 되었으며, 안전성을 보유한 범위는 pH 4~10 였다. 그러나, pH 1의 경우는 1일과 4일이 경과시 전체 용출량중 74% 이상이 용출된 후 나머지 5일이 경과시는 6% 이내의 추가 용출결과를 보였는데, pH 12의 경우는 5일동안 83%가 그리고 추가 5일 동안 나머지 7%가 용출되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 유기태화 반응에 따라 형성된 구조결정입자의 안과 밖에 미네랄이 킬레이팅 되어 있는데, 이중 밖에 존재하는 미세척 미네랄이 1일차에 세척되어 상등액내에 존재하는 결과로 판단되었다. 그러나, 최초 사용된 Fe-WPS내 철분 함유량이 당초 약 20,000ppm였음을 감안하면 pH 1과 12의 전체 용출량은 10% 수준이므로 결국 Fe-WPS소재는 전체 pH범위에서 외부저항성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 기초로 개발 촉매제를 적용시 표준유기태화 제조법과 연계시 생산수율과 미네랄 킬레이팅 효율을 동시에 증가시킬 수 있다면, 개발 Fe-WPS소재류는 경제성 부분까지도 확보되는 고부가가치 창출형 소재로 우수할 것으로 판단되었다.

Cu-WPS

본 결과는 Cu-WPS시험구를 대상으로 pH별 및 장기보관조건에서 내산 및 내염기성 관련 저항성을 보유하고 있는지를 평가한 결과이다(표 3).

10일 동안의 결과를 보면, 전체적으로는 내산 및 내염기성 저항성을 보유하고 있는 것으로 평가 되었으며 용출되는 수치는 최초 시료 Cu-WPS의 구리함유량이 50,000ppm 이였음을 고려하면 5%(pH 12 기준) 이내였다. 그러나, pH 12의 경우는 5일이 경과시 까지는 800ppm 이내가 용출 되다가 10일이 경과시 1,025ppm으로 갑자기 높은 용출 결과를 보였는데, 이는 아마도 유기태화 소재가 단백질임에 따라 시간이 경과하면서 용해되는 결과가 진행되면서 증가된 것으로 유추되었다. pH 12를 제외한 시험구는 총 10일 동안 약 3%수준의 용출량을 보였는데, 이는 유기태화 반응에 따라 형성된 구조결정입자의 안과 밖에 미네랄이 킬레이팅 되어 있는데, 이중 밖에 존재하는 미세척 미네랄이 1일차에 세척되어 상등액내에 존재하는 결과로 판단되었다. 따라서, 최초 사용된 Cu-WPS내 구리함유량이 당초 약 50,000ppm였음을 감안하면 pH 1과 12의 전체 용출량은 최대 5% 수준이므로 결국

Cu-WPS소재는 전체 pH범위에서 외부저항성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 기초로 개발 촉매제를 적용시 표준유기태화 제조법과 연계시 생산수율만 증가시킬 수 있다면, 개발 Cu-WPS소재류는 경제성 부분까지도 확보되는 고부가가치 창출형 소재로 우수할 것으로 판단되었다.

Zn-WPS

본 결과는 Zn-WPS시험구를 대상으로 pH별 및 장기보관조건에서 내산 및 내염기성 관련 저항성을 보유하고 있는지를 평가한 결과이다(표 4).

전체 10일 동안의 결과를 보면, 전체적으로는 내산 및 내염기성 저항성을 보유하고 있는 것으로 평가 되었으며 용출되는 수치는 최초 시료 Zn-WPS의 아연 함유량이 15,000ppm이었음을 고려하면 13%(pH 12 기준) 이내였다. pH 12의 경우는 1일이 경과시 597ppm이 용출 되다가 5일이 경과시 1,100ppm으로 갑자기 높은 용출결과를 보였으며 10일이 경과시는 314ppm으로 감소하는 특이성을 보였는데, 이는 아마도 유기태화 소재가 단백질임에 따라 시간이 경과하면서 용해되는 결과가 진행되는 이유가 아닌가 하고 판단되었다. pH 12를 제외한 시험구는 총 10일동안 약 10%수준의 용출량을 보였는데, 이는 유기태화 반응에 따라 형성된 구조결정입자의 안과 밖에 미네랄이 킬레이팅 되어 있는데, 이중 밖에 존재하는 미세척 미네랄이 1일차에 세척되어 상등액내에 존재하는 결과로 판단되었다. 따라서, 최초 사용된 Zn-WPS내 아연 함유량이 당초 약 15,000ppm였음을 감안하면 pH 1과 12의 전체 용출량은 최대 10% 수준이므로 결국 Zn-WPS소재는 전체 pH범위에서 외부저항성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 기초로 개발 촉매제를 적용시 표준유기태화 제조법과 연계시 생산수율과 미네랄 함유량을 동시에 증가시킬 수 있다면, 개발 Zn-WPS소재류는 경제성 부분까지도 확보되는 고부가가치 창출형 소재로 우수할 것으로 판단되었다.

Se-WPS

본 결과는 Se-WPS시험구를 대상으로 pH별 및 장기보관조건에서 내산 및 내염기성 관련 저항성을 보유하고 있는지를 평가한 결과이다(표 5).

10일 동안의 결과를 보면, Se-WPS소재류는 전체적으로 내산 및 내염기성 저항성을 보유하고 있는 것으로 평가 되었으며 용출되는 수치는 최초 시료 Se-WPS의 아연 함유량이 약 5,000ppm 이었음을 고려하면 10%(pH 12 기준) 이내였다.

전체적인 시험구에서 1일이 경과시 300ppm수준이 용출 되다가 5일이 경과시 100ppm 이내 그리고 10일이 경과시는 10ppm 수준으로 점차 감소하는 특이성을 보였는데, 유기태화 반응에 따라 형성된 구조결정입자의 안과 밖에 미네랄이 킬레이팅 되어 있는데, 이중 밖에 존재하는 미세척 미네랄이 1일차에 세척되어 상등액내에 존재하는 결과로 판단되었다.

결국 Se-WPS소재는 전체 pH범위에서 외부저항성을 보유하고 있는 것으로 평가되었는데, 이러한 결과를 기초로 개발 촉매제를 적용시 표준유기태화 제조법과 연계시 생산수율과 미네랄 함유량을 동시에 증가시킬 수 있다면, 개발 Se-WPS소재류는 경제성 부분까지도 확보되는 고부가가치 창출형 소재로 우수할 것으로 판단되었다.

4. 추후진행사항

5종 유기태화 미네랄 소재류에 대한 외부인지 저항성 평가를 pH조건을 다르게 하면서 장

기간 진행한 결과, Fe-WPS인 pH 4~10범위에서 그리고 4 종류는 전체가 내산 및 내염기성을 보유하고 있음을 확인하였다. 개발 유기태화 소재가 내산 및 내염기 및 내열성을 보유하고 있음을 국내외적 관련산업 및 용도용법 및 적용성 확대에 적극 활용하므로서 산업화를 성공적으로 완료할 것이다.

본 연구결과를 기초로 개발 촉매제를 적용시 표준유기태화 제조법과 연계하여 생산수율과 미네랄 함유량을 동시에 증가시킬 수 있도록 천연촉매류의 개발과 적용을 통한 경제성 부분 까지도 확보되는 고부가가치 창출형 소재를 전체 과정을 통하여 완료할 것이다.

Table 1. 표준제조법 적용 제조 유기태화 미네랄 소재류(Ca-WPS)의 내상 및 내염기성 효능 평가를 위한 미네랄 용출결과 확인 결과

Ca-WPS			pH별 처리에 따른 유기태화 미네랄소재류별 미네랄 용출량 평가결과(ppm)										
			Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S
pH 1	1Day	Avg	1,974	5.37	ND	0.25	ND	1,733	115	0.05	104	2,621	72
		SD	18	0.03		0.00		3	0	0.01	1	7	0
	3Day	Avg	53	0.43	ND	ND	ND	1,507	31	0.01	15	693	65
		SD	0	0.02		2		0	0.01	1	2	0	
	5Day	Avg	19	0.32	ND	0.04	ND	1,377	13	0.01	ND	426	17
		SD	0	0.01		0.00		5	0	0.01		1	0
pH 4	1Day	Avg	2,494	0.44	ND	ND	ND	1,758	37	0.01	121	1,060	64
		SD	7	0.00		8		0	0.00	1	1	0	
	3Day	Avg	1,154	0.28	ND	ND	ND	1,453	27	0.01	20	862	17
		SD	6	0.01		8		0	0.00	1	3	0	
	5Day	Avg	839	1.87	ND	0.14	ND	1,390	25	0.03	8	589	7
		SD	4	0.01		0.01		8	0	0.00	0	3	0
pH 7	1Day	Avg	799	0.37	ND	0.04	ND	1,100	25	0.02	1,524	2,137	56
		SD	7	0.01		0.00		9	0	0.00	5	11	0
	3Day	Avg	402	0.26	ND	ND	ND	828	13	0.01	1,384	2,796	26
		SD	0	0.01		4		0	0.00	7	9	0	
	5Day	Avg	181	0.25	ND	ND	ND	799	7	0.01	1,394	3,145	14
		SD	0	0.01		1		0	0.00	9	3	0	
pH 10	1Day	Avg	1,361	0.27	ND	ND	ND	1,945	18	0.00	935	68	64
		SD	10	0.00		4		0	0.00	4	1	0	
	3Day	Avg	463	1.37	ND	ND	ND	1,477	5	0.01	857	57	35
		SD	1	0.01		3		0	0.00	3	0	0	
	5Day	Avg	368	4.06	ND	ND	0.11	1,409	2	0.01	849	38	23
		SD	2	0.04		0.16	8	0	0.00	6	1	0	
pH 12	1Day	Avg	1,198	0.29	ND	ND	ND	1,961	13	0.01	961	81	76
		SD	15	0.00		8		0	0.00	8	0	0	
	3Day	Avg	507	0.33	ND	ND	ND	1,595	5	0.01	819	206	72
		SD	1	0.01		5		0	0.00	3	1	0	
	5Day	Avg	402	0.39	ND	0.14	ND	1,577	2	0.01	814	79	58
		SD	1	0.01		0.01		8	0	0.01	4	1	0

Table 2. 표준제조법 적용 제조 유기태화 미네랄 소재류(Fe-WPS)의 내상 및 내염기성 효능 평가를 위한 미네랄 용출결과 확인 결과

Fe-WPS			pH별 처리에 따른 유기태화 미네랄소재류별 미네랄 용출량 평가결과(ppm)										
			Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S
pH 1	1Day	Avg	86	1,301	ND	ND	ND	1,339	72	3.30	32	1,447	277
		SD	0	3				13	1	0.01	0	5	1
	3Day	Avg	27	1,006	ND	ND	ND	1,607	37	1.38	3	1,584	90
		SD	0	3				11	0	0.01	0	10	0
	5Day	Avg	13	833	ND	ND	ND	1,564	14	0.86	ND	1,339	28
		SD	0	1				9	0	0.01		1	0
pH 4	1Day	Avg	79	254	ND	0.09	ND	1,365	12	1.54	31	24	262
		SD	0	1		0.00		8	0	0.01	0	0	0
	3Day	Avg	82	194	ND	ND	ND	1,378	10	1.13	14	27	105
		SD	0	1				3	0	0.02	0	1	1
	5Day	Avg	79	71	ND	0.16	ND	1,358	7	0.55	5	23	20
		SD	0	0		0.00		0	0.00	1	1	0	
pH 7	1Day	Avg	17	241	4.27	ND	ND	506	2	0.32	1,174	3,338	331
		SD	0	1	0.06			3	0	0.01	3	11	0
	3Day	Avg	103	968	ND	0.04	ND	690	10	1.28	1,260	5,015	154
		SD	0	1		0.00		5	0	0.01	3	20	1
	5Day	Avg	33	372	ND	0.09	ND	718	3	0.46	1,352	4,826	34
		SD	0	1		0.01		1	0	0.00	6	12	0
pH 10	1Day	Avg	9	191	ND	ND	ND	1,475	2	0.29	774	112	281
		SD	0	1				6	0	0.00	5	1	0
	3Day	Avg	16	413	ND	ND	ND	1,197	2	0.57	728	264	150
		SD	0	0				6	0	0.01	4	1	0
	5Day	Avg	40	741	ND	0.02	ND	1,349	4	0.91	800	555	82
		SD	0	4		0.01		3	0	0.02	8	1	0
pH 12	1Day	Avg	40	607	ND	ND	ND	1,465	6	0.91	799	393	352
		SD	0	2				6	0	0.01	8	1	1
	3Day	Avg	187	1,195	ND	ND	ND	1,581	18	1.78	808	1,208	185
		SD	0	3				4	0	0.01	4	5	1
	5Day	Avg	121	368	ND	0.01	ND	1,665	10	0.61	844	835	86
		SD	0	1		0.01		5	0	0.01	4	2	0

Table 3. 표준제조법 적용 제조 유기태화 미네랄 소재류(Cu- WPS)의 내상 및 내염기성 효능 평가를 위한 미네랄 용출결과 확인 결과

Cu-WPS			pH별 처리에 따른 유기태화 미네랄소재류별 미네랄 용출량 평가결과(ppm)										
			Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S
pH 1	1Day	Avg	893	2	400	0	ND	2,221	10	0.10	113	3,208	1,471
		SD	12	0	1	0		7	0	0.01	1	6	2
	3Day	Avg	6	1	182	ND	ND	1,599	2	0.01	23	1,638	699
		SD	0	0	1			3	0	0.00	0	6	1
	5Day	Avg	12	1	68	0	ND	1,422	1	0.02	ND	287	215
		SD	0	0	0	0		5	0	0.01		2	1
pH 4	1Day	Avg	514	0	567	0	ND	2,043	10	0.11	86	296	1,643
		SD	1	0	6	0		6	0	0.01	1	1	6
	3Day	Avg	247	0	535	ND	ND	1,599	2	0.04	26	377	636
		SD	0	0	3			8	0	0.01	2	1	2
	5Day	Avg	140	0	613	1	ND	1,411	1	0.03	12	404	167
		SD	0	0	3	0		12	0	0.00	0	1	1
pH 7	1Day	Avg	277	0	151	ND	ND	1,384	10	0.09	1,394	3,405	1,566
		SD	1	0	1			7	0	0.01	4	7	4
	3Day	Avg	110	0	206	ND	ND	989	2	0.02	1,368	4,449	832
		SD	1	0	1			8	0	0.00	5	2	2
	5Day	Avg	33	0	147	ND	ND	804	0	0.01	1,358	4,912	210
		SD	0	0	0			1	0	0.01	13	17	1
pH 10	1Day	Avg	491	0	318	ND	ND	2,224	10	0.09	877	32	1,726
		SD	1	0	1			11	0	0.00	5	0	5
	3Day	Avg	104	0	310	ND	ND	1,500	1	0.01	803	91	651
		SD	0	0	1			6	0	0.00	5	1	3
	5Day	Avg	46	0	518	ND	ND	1,331	0	0.01	806	120	218
		SD	0	0	1			7	0	0.01	4	1	1
pH 12	1Day	Avg	600	0	525	ND	ND	2,343	10	0.11	917	47	2,040
		SD	2	0	1			25	0	0.01	3	1	4
	3Day	Avg	85	1	745	ND	ND	1,668	1	0.01	817	211	662
		SD	0	0	2			3	0	0.00	4	1	2
	5Day	Avg	44	1	1,025	1	ND	1,555	0	0.02	819	311	226
		SD	0	0	5	0		3	0	0.00	1	1	1

Table 4. 표준제조법 적용 제조 유기태화 미네랄 소재류(Zn-WPS)의 내상 및 내염기성 효능 평가를 위한 미네랄 용출결과 확인 결과

Zn-WPS		pH별 처리에 따른 유기태화 미네랄소재류별 미네랄 용출량 평가결과(ppm)											
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	
pH 1	1Day	Avg	255	0	ND	594	ND	1,603	92	0.02	48	4,777	503
		SD	1	0		1		8	1	0.01	0	8	1
	3Day	Avg	6	0	ND	20	ND	1,467	21	0.00	ND	1,630	177
		SD	0	0		0		7	0	0.00		12	1
	5Day	Avg	14	1	ND	15	ND	1,376	5	0.02	ND	1,023	63
		SD	0	0		0		13	0	0.01		2	0
pH 4	1Day	Avg	121	0	ND	473	ND	1,594	22	0.03	55	609	548
		SD	1	0		2		2	0	0.00	1	1	1
	3Day	Avg	260	0	ND	675	ND	1,453	28	0.02	15	842	105
		SD	1	0		1		.	0	0.01	1	1	0
	5Day	Avg	325	1	ND	408	ND	1,403	25	0.02	8	801	34
		SD	1	0		1		8	0	0.00	0	2	0
pH 7	1Day	Avg	25	0	ND	206	ND	778	4	0.01	1,288	4,228	614
		SD	0	0		0		1	0	0.00	5	6	2
	3Day	Avg	197	0	ND	333	ND	872	17	0.01	1,367	5,807	220
		SD	1	0		1		0	0	0.01	15	23	1
	5Day	Avg	55	1	ND	29	ND	889	4	0.01	1,298	5,246	34
		SD	0	0		0		2	0	0.01	3	11	0
pH 10	1Day	Avg	12	0	ND	205	ND	1,680	6	0.01	805	111	574
		SD	0	0		1		8	0	0.00	2	1	0
	3Day	Avg	94	0	ND	695	ND	1,448	9	0.01	803	692	172
		SD	0	0		3		7	0	0.00	5	3	0
	5Day	Avg	67	0	ND	355	ND	1,387	6	0.00	809	377	60
		SD	0	0		1		4	0	0.01	5	1	0
pH 12	1Day	Avg	49	0	ND	597	ND	1,727	9	0.01	838	423	631
		SD	0	0		0		8	0	0.00	4	1	1
	3Day	Avg	199	1	ND	1,100	ND	1,658	20	0.01	796	1,213	224
		SD	1	0		3		6	0	0.00	3	3	1
	5Day	Avg	111	0	ND	314	ND	1,618	10	0.01	788	762	108
		SD	0	0		1		1	0	0.01	6	2	0

Table 5. 표준제조법 적용 제조 유기태화 미네랄 소재류(Se-WPS)의 내상 및 내염기성 효능 평가를 위한 미네랄 용출결과 확인 결과

Se-WPS		pH별 처리에 따른 유기태화 미네랄소재류별 미네랄 용출량 평가결과(ppm)											
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	
pH 1	1Day	Avg	4	0	ND	ND	214	1,640	66	0.00	27	183	74
		SD	0	0			1	0	0.01	0	1	0	
	3Day	Avg	7	0	ND	ND	93	1,556	15	0.01	ND	104	114
		SD	0	0			0	1	0	0.00		1	1
	5Day	Avg	13	0	ND	0	43	1,449	5	0.00	ND	41	50
		SD	0	0		0	0	5	0	0.01		1	0
pH 4	1Day	Avg	245	0	ND	0	238	1,695	67	0.02	43	191	33
		SD	1	0		0	1	11	0	0.01	0	0	0
	3Day	Avg	65	0	ND	ND	55	1,514	16	0.01	9	42	11
		SD	0	0			0	5	0	0.00	0	1	0
	5Day	Avg	92	1	ND	3	16	1,505	6	0.03	4	14	4
		SD	1	0		0	0	12	0	0.00	0	1	0
pH 7	1Day	Avg	225	1	ND	ND	301	992	63	0.02	1,438	4,557	207
		SD	1	0			1	7	0	0.01	3	6	1
	3Day	Avg	64	1	ND	0	114	885	15	0.02	1,403	4,269	217
		SD	0	0		0	1	5	0	0.01	11	17	0
	5Day	Avg	26	0	ND	0	16	852	2	0.01	1,388	4,150	28
		SD	0	0		0	0	5	0	0.00	10	6	0
pH 10	1Day	Avg	202	1	ND	ND	346	1,758	58	0.00	811	403	352
		SD	1	0			2	4	0	0.01	4	1	1
	3Day	Avg	61	0	ND	ND	106	1,508	16	0.00	818	124	177
		SD	0	0			0	3	0	0.01	2	1	1
	5Day	Avg	15	0	ND	ND	14	1,448	3	0.01	818	13	24
		SD	0	0			0	3	0	0.00	3	1	0
pH 12	1Day	Avg	220	1	ND	ND	378	1,804	61	0.01	875	438	473
		SD	0	0			1	2	0	0.01	11	2	2
	3Day	Avg	59	0	ND	ND	69	1,778	15	0.01	848	127	277
		SD	0	0			0	5	0	0.01	5	0	0
	5Day	Avg	10	0	ND	ND	31	1,752	1	0.01	844	20	54
		SD	0	0			0	8	0	0.00	6	1	0

제 4 절 유청단백질 기질화 유기태화 미네랄 소재류 대량생산시스템 정립 [축매제 비적용, 유기태화 미네랄 소재류 대량생산기법정 립]

1. 연구목표

본 과제에서는 1차년도 핵심목표인 “유단백질을 기질로 하는 5종 유기태화 미네랄 소재류 개발과 현장대량생산시스템 정립” 결과를 현장대량생산단계(시제 3회)를 거쳐 시제품 생산과 더불어 생산 시제를 이용한 현장유효성평가(기능성 미네랄 강화란 생산 등)에 적용하고 있다. 관련하여 일련의 목표는 다음과 같다.

첫째로, 실험실 조건에서 정립된 결과의 산업화를 위한 현장시스템으로의 연계를 위한 시제품 제작과 현장에서의 문제점 도출을 위한 목적이 가장 크다 할 수 있다.

둘째로, 대량생산시스템을 통해 생산된 균일성 있는 시제품을 이용한 현장유효성평가 시 현장생산 소재를 사용함으로써 실험간 제품 및 결과에 대한 신뢰확보를 통한 판매사업화에 있어 소비자 요구성에 충족조건을 사전 준비함이 목적이다(현재, 산란계 대상 현장적용성 평가에 사용중임).

셋째로, 본 생산을 통한 시제품 제조를 위한 사전 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 능력 등 기초현장 정보를 확보와 동시에 주관기관이 생산시설을 현재 미보유되어 있음에 따라 생산시설을 우선 확보하는 것이 시급하기 때문에 이를 해결하기 위한 목적이다.

넷째로, 본 연구를 통한 연구결과의 사업화 목표가 추후 식품첨가물 및 건기식 제품까지 진행예정임에 따라 관련 원료단계부터 제품류까지 연계되는 제조 및 판매 등의 인허가 확보가 가장 선결적으로 해결하여야 하는 문제이다. 관련하여, 인허가 및 규제기관인 식약처가 해당기관인데 신청서류 항목에 준하는 절차대로 진행하여야 하며, 주관기관은 3단계로 식약처와 협의를 통한 사전 절차를 준비하여 왔다.

다섯 번째로, 상기사항에에 근거, 식품첨가물 및 건기식원료 및 제품화 규격에 준하여 판매를 위한 인허가 신청 및 확보에 목적이 있다, 현재 시제품 생산을 위한 생상공장(아미코젠사)은 KGMP 및 GMP시설 및 제조 및 판매허가를 획득한 코스닥 상장회사임에 따라, 추후 주관기관의 기능성 강화농산물에 대한 개별인증 신청과정에서 관련 허가신청(식약처)시, 발생될 수 있는 문제점을 사전차단하기 위하여 핵심원료인 유기태화 미네랄 소재 제조단계에서부터 식품첨가물 허가신청에 준하여 준비함에 목적이 있다(현재, 아미코젠사에서 유기태화 미네랄 소재류에 대한 사전협의를 품목제조신청 단계에 있음, 식약처).

정립된 유기태화 미네랄 제조법을 적용하여 우선 목표 소재를 개발하되 표준제조법이 보유하고 있는 단점인 생산수율 증대 및 외부환경인자 저항형 유기태화 미네랄 소재류 제조법을 보장하는 연구개발 함으로서 경제성이 확보된 신규한 제조법을 추후 완료하고 저하였다.

2. 연구수행방법

사전정립된 유기태화 미네랄 소재류 제조관련 표준제조법은 다음과 같다.

Ca-WPS(칼슘-유기태화 소재 제조법)

Ca-WPS의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 선발된 유청단백질 그리고 기질내 미네랄 킬레이팅을 유도하기 위한 무기태 미네랄류는 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재류중 식품첨가물로 허가된 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 소재로 적용하였다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준)로 하여, 미네랄류는 2 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다.

Fe-WPS(철분-유기태화 소재 제조법)

Fe-WPS의 제조법은 Ca-WPS제조와 동일하게 실시하나, 다만 무기태화 미네랄을 식품첨가물로 허가된 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 소재로 적용하였다, 선발 철분소재 역시건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄중 식품첨가물로 허가된 제품을 구입하여 사용하였다,

Zn-WPS(아연-유기태화 소재 제조법)

Zn-WPS의 제조법은 Ca-WPS제조와 동일하게 실시하나, 다만 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재중 식품첨가물로 허가된 미네랄 제품중 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 제품을 구입하여 사용하였다,

Cu-WPS(구리-유기태화 소재 제조법)

Cu-WPS의 제조법은 Ca-WPS제조와 동일하게 실시하되 다만 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재중 식품첨가물로 허가된 미네랄 제품중 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 제품을 구입하여 사용하였다,

Se-WPS(셀레늄-유기태화 소재 제조법)

Se-WPS의 제조법은 칼슘-유기태화 미네랄 소재 제조법과 동일 제조법을 적용하되 다만 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재중 식품첨가물로 허가된 미네랄 제품중 Na_2SeO_3 제품을 구입하여 사용하였다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준)로 하여, 미네랄류는 0.5 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다.

3. 연구수행결과

유기태화 미네랄 소재류 제조법(촉매인자 적용, 촉매류 비적용)

본 선행실험실 정립조건을 현장에 적용하여 최종정립된 대량생산시스템으로서 시제 3회(이미코젠사, OEM, 규모 : 3톤)를 거쳐 정립된 결과이며, 5종 유기태화 미네랄 소재류의 대량생산공정시스템은(1톤 반응기 적용, Working Vol. : 70% 기준) 9단계로 정리되었다(그림 1~5). 현장생산용 공통작업지시서 내용은 다음과 같다,

- 1 단계는, 농축유청액을 건조분말화 하기 위한 Spray Drying공정이며, 이때 균질화 및 제균공정이 동시에 진행되는 단계이다. 제균공정은 HTST(High Temperature Short Time, 85℃, 15초, 1회)시스템을 적용한다.
- 2 단계는, 건조 유청분말과 킬레이팅 반응을 위한 무기태화 미네랄을 혼합하는 단계인데, 이때 혼합비율은 유청분말(5기준) 대비 미네랄류는 1비율로 배합한다.
- 3 단계는, 미네랄과 기질 유청단백질간 1차 유기태화반응을 유도하는 단계인데, 정제수를 유청분말 무게 대비 2배수를 투입하고 용해 및 교반하는 단계인데 1,000rpm이상의 교반속도로 1시간을 반응시킨다. 이때 목표 킬레이팅량의 30%이상이 반응하는 단계이다.
- 4 단계는, 미네랄의 킬레이팅 효과를 증가시키면서 입자화(미네랄 올리고펩타이드 TYPE)를 유도하는 단계이다. 이 단계의 중요성은 입자화가 완료되면 물리 및 이화학적 변화에 크게 안정화가 가능하기 때문에 핵심적인 단계이다.
- 5 단계는, 미반응한 잉여 미네랄 및 독성이온(Cl 및 -SO₄) 제거를 위한 세척단계이며, 이때 사용하는 시스템은 원심분리 시스템을 사용하고, 정제수를 사용하여 4회 반복 세척함으로써 미반응 미네랄 및 이온을 제거하는 단계이다.
- 6 단계는, 균질화 공정이다. 유기태화 반응간 유청단백질의 입자는 1.8um까지 성장한다, 따라서 균질화를 통하여 0.2~0.6um까지 균일화를 유도하는 단계이다.
- 7 단계는, 제균공정이며 HTST(High Temperature Short Time, 85℃, 15초, 1회) 시스템을 적용한다. 이는 유기태화 제제 생산을 위한 원료가 고영양성분으로서 미생물의 오염이 쉽게 될 수 있다. 또한, 유기태화 제제 자체가 원료이면서 완제품이므로 제균에 대한 공정이 절대적으로 필요하다.
- 8 단계는, 건조분말화 단계이며, 175℃에서 시간당 적정생산비율(현장고려)로 건조한다.

현장대량생산 OEM 시제품 분석

실험실 정립내용인 선발된 촉매인자(온도 등)을 기초로 하여, 현장에서 생산한 시제품 성상 및 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효율 관련 분석내용은 다음과 같다(그림 6~7).

실험실 정립내용인 선발된 촉매인자(온도 등)를 적용한 유기태화 미네랄 소재류의 현장 생산한 시제품의 성상은 전체가 불용성의 분말형이며, 소재별 생산수율을 기질로 사용한 유청단백질량을 기준으로 산출한 결과 Se-WPS가 6,4%로 가장 낮은 생산효율을 보였으며, Ca-WPS를 포함한 나머지 4종의 생산수율은 10%에서 최대 약 14%의 생산수율 범위를 보임으로서 실험실 조건과 차이가 없었다(표 1, 그림 7).

시제품별 생산수율을 조사와 더불어 전체 유기태화 미네랄 소재류를 대상으로 미네랄 함유량을 조사함으로써 목표 유기태화 효율을 평가하였는데, Ca-WPS내 목표 칼슘의 함유량은 약 40,000ppm, Fe-WPS내 철분은 약 20,000ppm, Cu-WPS내 구리함유량은 약 50,000ppm, Zn-WPS내 아연함유량은 약 16,000ppm 그리고 Se-WPS내 셀레늄 함유량은 52,000ppm(WPS 5 : Na₂SeO₃ 1 : ddH₂O 10비율 환산)의 킬레이팅 효율을 보였다(표 1, 그림 7). 이러한 결과는 실험실 정립조건의 현장대량시스템과 연계시 연구개발 결과는 일치함을 알 수 있었는데 실험실적 정립조건의 정밀성을 다시 한번 확인 할 수 있었으나, 역시 생산수율과 목표 미네랄 함유량이 다소 낮은 결과를 보였다.

따라서, 이들의 문제점을 해결 할 수 있는 해결수단으로서 천연촉매제 개발과 이를 적용한 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효능을 단일 및 동시에 증가시키는 연구를 완료예정이다.

4. 추후진행사항

- 가. 사전 정립된 유기태화 미네랄 제조법의 단점보강연구를 통하여 생산수율 증대 및 외부환경인자 저항형 유기태화 미네랄 소재류 제조법을 보강하는 연구개발 함으로서 경제성이 확보된 신규한 제조법을 추후 완료하고 저 한다.
- 나. 개발된 신규 유기태화 미네랄 소재류는 신속히 국내외 특허출원과 등록을 완료하므로써 관련 기술선점을 실시함과 동시에 국내 판매 및 해외수출에 이르는 산업화에 있어 우위선점전략을 확보 하고 저 한다.
- 다. 현장생산시스템 확보부분으로서, 코스닥 상장회사인 (주)아미코젠사와 “개발 유기태화 제품에 대한 3차 시제생산단계” 를 거쳐 “비밀유지 및 OEM생산” 협의를 완료하였다.
- 라. 식품첨가 및 건기식 제품 판매 인허가 확보 부분으로서, 현재(2014, 05. 13.), 식약처와 “유기태화 미네랄 소재류 5종” 에 대한 협의완료 후, 관련 제품등록/제조.판매관련 인허가 신청이 완료되어 등록을 완료하였다.

1) 신청내역 및 항목은 다음과 같다.

가 적용분야 : 식품첨가물/건강기능식 원료 및 제품

나) 신청품목(5종)

- Ca-유기태화 미네랄 제제
- Fe-유기태화 미네랄 제제
- Zn-유기태화 미네랄 제제
- Cu-유기태화 미네랄 제제
- Se-유기태화 미네랄 제제

다) 적용기준

- 식품첨가물 원료 및 제품기준
- 건기식 원료 및 제품기준

라) 표시가능항목(건기식품 공전) : 기능성 미네랄류 기준 적용 표시가능

Table 1. 유기태화 미네럴 소재류의 생산수율 및 미네럴 함유량 분석결과

시제유기태화 미네럴 소재류		기질 WPS대비 유기태화 기초효능 평가 결과(ppm)											수율 (%, WPS 대비)	
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P		S
WPS	Avg	3,111	1.30	ND	ND	ND	19,490	976	0.06	7,940	0.61	4,989	1,572	ND
	SD	8	0.02				58	1.60	0.002	64	0.01	19	7.00	
Ca-WPS	Avg	38,800	25	0.44	3.55	ND	2,496	1,016	0.66	1,456	2.33	13,740	2,589	13.9
	SD	132	0.07	0.04	0.003		13	2.00	0.01	12	0.04	20	5.00	
Fe-WPS	Avg	10,990	19,120	10	7.43	11	2,371	813	75.65	685	3.43	12,950	5,358	13.0
	SD	35	43	0.06	0.06	1.92	17	5.10	0.18	3.80	0.08	29	18	
Cu-WPS	Avg	5,757	35	49,890	21	2.48	2,822	56	0.53	1,495	0.85	13,190	11,320	13.6
	SD	21	0.12	29	0.05	2.42	19	0.30	0.002	13	0.02	40	38	
Zn-WPS	Avg	12,560	12	5.53	15,190	ND	1,956	974	0.44	749	0.88	17,080	6,300	10.0
	SD	73	0.04	0.10	10		9.00	2.10	0.01	3.70	0.02	116	66	
Se-WPS	Avg	1,275	6.79	1.04	ND	5,202	518	299	0.11	326	1.31	1,706	5,229	6.36
	SD	5	0.05	0.08		23	4.00	1.20	0.002	1.10	0.03	5.00	20	

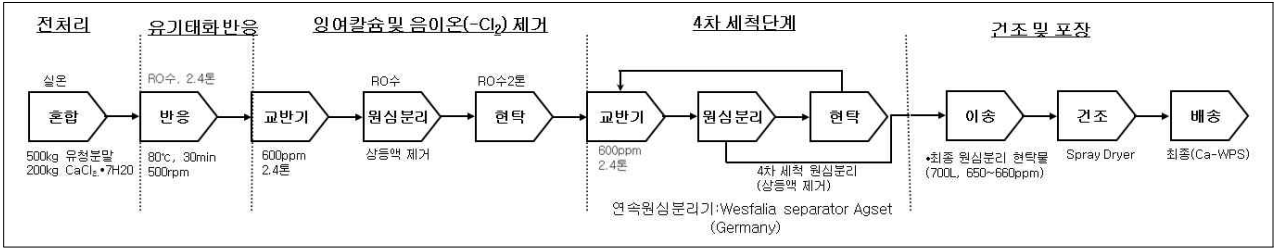


Fig 1. 유단백질을 기질로 하는 Ca-WPS제조 Scheme

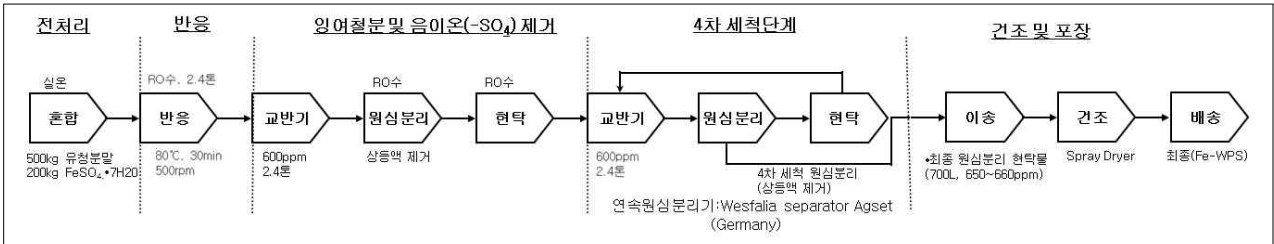


Fig 2. 유단백질을 기질로 하는 Fe-WPS제조 Scheme

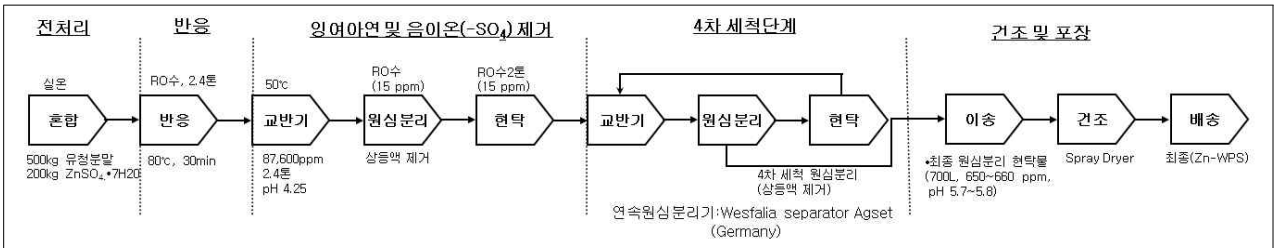


Fig 3. 유단백질을 기질로 하는 Zn-WPS제조 Scheme

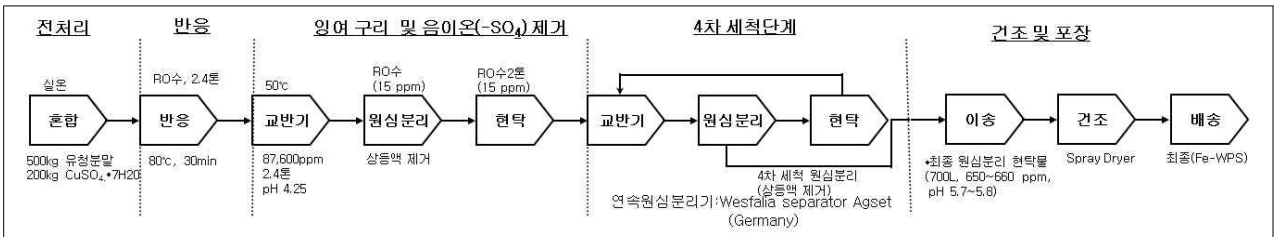


Fig 4. 유단백질을 기질로 하는 Cu-WPS제조 Scheme

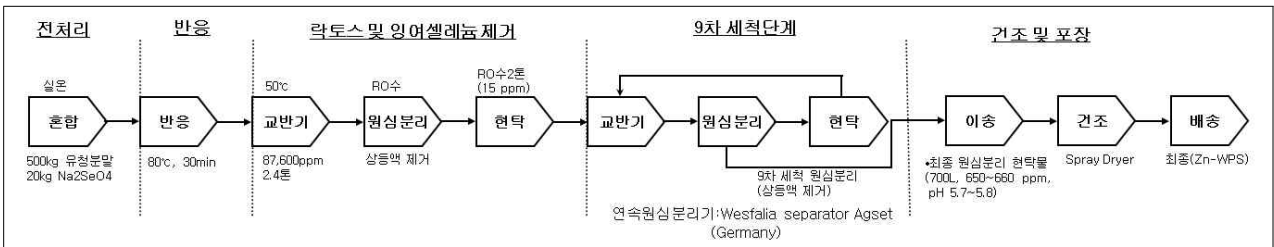


Fig 5. 유단백질을 기질로 하는 Se-WPS제조 Scheme



Fig 6 . 실험실 정립 유기태화 미네랄 소재류의 현장생산과정 (OEM)

A: 원료 투입, B: 유기태화 반응과정, C: 완제품 (SD공정)



Fig 7. 현장제조 유기태화 미네랄 소재류의 현장시제품(아미코젠, OEM, 3톤 규모)의 성상

제 5 절 유기태화 소재류(외부간섭저항형, 킬레이팅 및 생산수율 동시증대형)개발법 정립

1. 연구목표

선행정립된 유기태화 미네럴 소재류 제조법을 적용하여, 유기태화 소재류를 제조시 가장 문제는 저생산효율(5~14%범위, 원료 유휴분말 기준)을 보임으로서 최종 제품의 생산단가는 매우 높은 결과를 보였다. 따라서, 목표 미네럴류 대비 기질내 미네럴 킬레이팅 효율을 표준 생산법과 비교할 때 동등성 이상을 확보함과 동시에 생산수율을 산업화에 적합하도록 높이는 신규방법이 필요하다고 판단되었다.

본 연구Part에서는 선행연구에서 관련하여 선발된 2종의 핵산류(GMP, IMP)를 사전에 제조된 표준제조법에 적용함으로써, 이들의 문제를 해결할 수 있는지를 확인함과 동시에 유기태화 제조법에서 고온처리에 따른 영양성분 및 물성의 변화를 예방 할 수 있는 신규제조법에 대한 개발이 가능한지를 동시에 확인하고자 하였다.

이를 해결하기 위한 연구는 총 2단계로 진행하였는데, 1단계는 유휴단백질(WPS)를 기준으로 유기태화 표준제조법을 적용 제조 시 상온(비열처리)처리, 2단계는 고온처리(80℃)후 각각 준비된 5종 유기태화 반응용액별로 선발 촉매류를 각각 처리시 생산수율과 더불어 미네럴 킬레이팅 효율이 동시에 높은 유기태화 미네럴 소재별 최적의 제조법을 선발하고자 하였다.

본 연구와 관련한 내용은 특허출원절차(특허출원명 : 핵산을 촉매로 사용하는 생산수율이 증대된 유기태화 미네럴 함유 유단백질 소재의 제조방법)가 진행중이다.

2. 연구수행방법

우선 유휴단백질은 매일유업(주)에서 구입한 유휴분말을 준비한 후, 선행정립된 표준유기태화 소재 제조법을 적용하여 1차 유기태화 반응액을 준비하되 비열처리 조건으로 하여 5종의 유기태화 미네럴 소재류 용액을 준비하였다.

우선 기본 유기태화 조성액 조성을 위하여, 전체 전처리 용액조성은 표준 유기태화 조성법에 준하여 WPS(5) 대비 Ca과 Fe, Zn, Cu 는 1 대비 정제수는 10의 비율로 배합비율을 조성하였는데, 셀레늄의 경우는 배합비율을 0.1의 비율로 설정하여 사전 800g을 기본조성액으로 준비하였다.

준비된 시제별로 각각 100ml 비이커에 40ml씩을 분취한 후 여기에 선발 핵산류를 0.5g, 1g, 2g, 4g 및 8g씩을 첨가하는 비율로 유기태화 반응을 진행하였다(유기태화 진행 프로세스는 최종년도 제시에정임, 특허출원 심사과정에 있음).

본 실험은 총 2 단계로 진행하였는데, 1 단계는 일반WPS 기질 대비 단일 M-WPS(비열처리) 제조 후 GMP 및 IMP 농도별 첨가시에 성장 및 생산수율에 미치는 효과를 평가하였으며, 2단계에서는 기존 정립된 유기태화 소재 제조관련 표준제조법과 비교하기 위하여 1 단계 진행 후 고온처리(83℃, 20분, 1회)공정을 추가하여 관련 목표를 확인하였다.

2단계를 거쳐 최종 유기태화 반응이 종료되면 이들에 60ml의 정제수를 투여 및 분산시키는 공정을 진행하였으며, 원심분리(3,000rpm 20분, 상온) 과정을 거쳐 유기태화 반응에 따른 침전물을 분리하였으며, 이 과정을 7회 반복하여 잉여 미네럴 및 핵산과 독성이온까지 세

척 제거하였다.

세척공정이 완료되면 생산수율(비건조상태)을 평가하기 위한 동결건조 과정을 거쳐 최종 촉매제를 적용한 유기태화 미네랄 소재류(이하, HAC)를 제조하였다.

3. 결과도출

우선 표준제조법을 적용한 유기태화 미네랄 제조과정과 이를 기준으로 선발촉매를 적용하여 제조시, 유기태화 반응에 따른 성장변화를 응집, 침전, 부유, 부착 등의 성장변화를 비교하였으며, 이때 외관평가지 변화가 심하게 발생한 경우는 +++, 보통은 ++, 발생초기는 + 그리고 비발생인 경우는 -표시로 구분하여 결과를 확인 하였다.

본 연구에서는 유기태화 기질로서 유청단백질을 사용하였는데 이들이 고유적으로 보유하고 있는 지방함량은 7%로 매우 높은 수치임과 미네랄 킬레이팅 과정에서 지방에 30,000~40,000ppm이 킬레이팅 된다는 선행연구의 결과를 비교 시, 이들의 회수는 전체생산 수율과 경제성에서 중요하다 할 수 있다.

표준유기태화 제조법을 적용하여 유기태화 반응을 종결하고, 이들에 미잉여 미네랄류와 독성이온의 제거공정에서 대부분이 손실됨으로서 생산수율이 낮게 나타났음을 확인하였는데, 본 연구를 통하여 선발촉매류를 사용시, 지방의 침전을 통한 효능이 있는지는 중요하다 할 수 있다.

관련하여 촉매류를 농도별 처리시 지방침전 효능은 역시 100%를 회수하는 경우를 매우 좋음(+++), 50%이상을 회수하는 경우는 보통(++), 회수효과가 일부 있다고 평가되는 경우는 초기(+) 그리고 효과가 전혀 없는 경우는 (-)표시로 구분하여 결과를 확인 하였다.

촉매류 사용에 따른 생산수율조사는, 일반 표준제조법의 제조된 표준 유기태화 미네랄 소재류와 선발 핵산류를 촉매로 제조(이하, M: 미네랄 종류, GMP적용 : M-GHAC, IMP적용 : M-IHAC)한 후 세척공정을 거쳐 동결한 시료의 생산량을 비교하여 평가하였다.

촉매사용에 따른 미네랄 킬레이팅 효능은 앞서 획득된 동결건조물에 대하여, ICP분석을 통하여 목표 미네랄류의 킬레이팅 효능을 평가하였다.

4. 연구결과

핵산류별 촉매로서 효능평가를 위한 유기태화 미네랄 소재별 평가결과는 다음과 같다.

가. Ca-HAC 소재 부분

본 결과는 Ca-WPS에 대한 선발 핵산류별로 첨가농도별 성장변화(침전, 응고, 부착, 부유, 겔화, 지방제거도 및 색상변화 확인과 유기태화 반응이 종료되어 분리, 세척 및 동결공정을 거쳐 최종 생산된 최종생산물(핵산촉매 적용, 유기태화 미네랄 소재류 개발)의 생산수율을 조사를 통하여 칼슘-WPS소재류 부분만에 한정하여 생산수율 증대법 관련 신규개발법의 정립여부를 확정하였다(Fig 1~2, 표 1).

결과로서, 촉매류중 생산수율이 높다 하더라도 제조시 지방제거도와 부유현상은 산업화 현장에서 생산편리성과 생산효율을 감소시키는 요건이 되므로, 우선 이 항목을 선발기준으로 할 때, GMP가 IMP보다는 우수한 것으로 평가되었다.

생산효율을 보면 GMP는 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조(100% 기준) 대비 최저 359%에서 최대 약 800%의 생산 증대효과를 보였으며, GMP의 첨가량이 증가하면 할수록

역시 생산수율 증대효과를 보였다.

IMP 처리구는 부유 및 지방제거 효율이 낮아 선발에서 제외하였지만, 이를 제외한 경우에서 1g이상의 첨가조건에서 178%에서 최대 667%의 증가 효과를 보였으며, 역시 첨가 농도가 높을수록 유기태화 생성물도 증가하는 결과를 보였다.

생산효율 증가부분과 미네랄 킬레이팅 효율과 연계하여 살펴 보았더니, 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조구의 경우는 칼슘이 42,700ppm(100% 기준) 효율을 보였는데, GMP 처리구는 생산효율이 가장 높았던 8g처리구에서 18,000ppm 그리고 IMP처리구는 19,850ppm의 검출량을 보임으로서 50%의 이상의 미네랄 킬레이팅 효능을 감소시키는 것으로 조사되었다(표 2). 이러한 결과는 생산수율이 7~8배임을 고려하면 오히려 3.5배에서 4배의 증가효과를 보이는 것으로 결론 지어졌다.

전체 핵산류 처리농도에서 살펴보면 전체핵산 처리구에서 GMP와 IMP 공히 0.5g 첨가조건에서 36,400ppm와 46,000ppm의 킬레이팅 결과가 나타났는데 핵산류 첨가 농도가 높을수록 감소하는 경향을 보였다.

이러한 경향은 GMP를 0.5g이상의 농도를 처리한 경우에는 전처리 유기태화 반응액의 침전을 유도하지만, 일부 칼슘이온은 GMP와 결합후 세척단계에서 제거되는 이유 때문인 것으로 판단되었다.

미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기를 조사한 결과, GMP는 -P가 그리고 IMP는 -S기가 중요한 역할을 담당하는 것으로 조사되었다.

따라서, 선 유기태화 반응액을 조성한 후 핵산류를 촉매로 사용하는 경우는 GMP가 가장 적절한 소재로 판단되었으며 첨가량은 0.5g을 적용하는 것이 타당하다고 결정되었으며, 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효과를 보장하는 제조법은 비열처리 및 열처리 공히 적용이 가능한 방법으로 정립하였다.

나. Fe-HAC 소재 부분

본 결과는 Fe-WPS에 대한 선발 핵산류별로 첨가농도별 성장변화(침전, 응고, 부착, 부유, 겔화, 지방제거도 및 색상변화 확인과 유기태화 반응이 종료되어 분리, 세척 및 동결공정을 거쳐 최종 생산된 최종생산물(핵산촉매 적용, 유기태화 미네랄 소재류 개발)의 생산수율을 조사를 통하여 Fe-WPS소재류 부분만에 한정하여 생산수율 증대법 관련 신규개발법의 정립여부를 확정하였다(Fig 1, 3., 표 3~4.).

결과로서, 촉매류중 생산수율이 높다 하더라도 제조시 지방제거도와 부유현상은 산업화 현장에서 생산편리성과 생산효율을 감소시키는 요건이 되므로, 우선 이 항목을 선발기준으로 할 때, GMP는 4g이상을, IMP는 8g을 첨가할 때 최적조건인 것으로 평가되었다.

생산효율을 보면 GMP는 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조(100% 기준) 대비 최저 77%(0.5g첨가구)에서 최대 약 895%(8g 첨가구)의 생산 증대효과를 보였으며, GMP의 첨가량이 증가하면 할수록 역시 생산수율 증대효과를 보였다.

IMP 처리구도 0.45% 1g이상의 첨가조건에서 대조 대비 45%의 감소수치를 보였는데, IMP 첨가농도가 높으면 높을수록 증가하다가 최대 8g을 첨가시는 791%의 최대 생산수율 증대 효과를 보였다. 따라서, 이러한 경향은 두종류의 핵산류 공히 동일한 경향을 보이는 결과였다.

Fe-WPS반응액내 핵산류 농도별 첨가에 따른 생산효율 증가부분과 미네랄 킬레이팅 효

율과 연계하여 살펴 보았더니, 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조구의 경우는 철분의 함유량이 30,170~31,900ppm(100% 기준)의 킬레이팅 효율을 보였다.

GMP 처리구는 생산효율이 가장 높았던 8g처리구에서 15,000ppm 그리고 IMP처리구는 18,170ppm의 검출량을 보임으로서 50%의 이상의 미네랄 킬레이팅 효능을 감소시키는 것으로 조사되었다(표 2). 이러한 결과는 생산수율이 8.9~7.9배임을 고려하면 오히려 3.5배에서 4배 범위의 증가효과를 보이는 것으로 결론지어졌는데, 이 경향은 Ca-GHAC와 Ca-IHAC와 동일한 경향이였다.

전체 핵산류 처리농도에서 생산효율이 증대되면서 동시에 미네랄 킬레이팅의 효율이 대조 대비 동등성을 나타내는 첨가농도를 살펴보았더니, GMP처리구는 0.5g에서 1g을 처리시 35,000~42,000ppm을 IMP는 1~2g의 첨가농도범위에서 30,360~37,000ppm까지 증가하는 결과를 확인하였다.

이러한 경향은 GMP나 IMP는 Fe-WPS에서는 고농도를 첨가한다 해서 미네랄 킬레이팅 효능이 증가하는 것이 아니고, 적정량의 범위를 보유하고 있는 것이 확인된 결과였다. 즉, 적정 농도 이상의 핵산류를 처리한 경우에는 전처리 유기태화 반응액의 침전을 유도하지만, 일부 칼슘이온은 GMP 및 IMP와 일부가 결합된 후 세척단계에서 제거되는 이유 때문인 것으로 판단되었다.

미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기를 조사한 결과, GMP는 -P가 그리고 IMP는 -S기가 중요한 역할을 담당하는 것으로 조사되었다.

따라서, 선 유기태화 반응액을 조성한 후 핵산류를 촉매로 사용하는 경우는 GMP가 가장 적절한 소재로 판단되었으며 첨가량은 4g이 가장 적절한 농도로 결정되었으며, 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효과를 보장하는 제조법은 비열처리 및 열처리 공히 적용이 가능한 방법으로 정립하였다.

다. Zn-HAC 소재 부분

본 결과는 Zn-WPS에 대한 선발 핵산류별로 첨가농도별 성장변화(침전, 응고, 부착, 부유, 겔화, 지방제거도 및 색상변화 확인과 유기태화 반응이 종료되어 분리, 세척 및 동결공정을 거쳐 최종 생산된 최종생산물(핵산촉매 적용, 유기태화 미네랄 소재류 개발)의 생산수율을 조사를 통하여 Fe-WPS소재류 부분만에 한정하여 생산수율 증대법 관련 신규개발법의 정립여부를 확정하였다(Fig 1, 4., 표 5~6).

결과로서, 촉매류중 생산수율이 높다 하더라도 제조시 지방제거도와 부유현상은 산업화 현장에서 생산편리성과 생산효율을 감소시키는 요건이 되므로, 우선 이 항목을 선발기준으로 할 때, ZnWPS-HAC처리구에서는 GMP는 지방제거에 있어 효과가 없어 제외하였고, IMP는 전체 첨가농도에서 지방제거도에서 효과가 탁월 하였기 때문에 ZnWPS-HAC제조에 있어 최적 소재로 선발되었다.

생산효율을 보면 GMP는 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조(100% 기준) 대비 최저 143%(0.5g첨가구)에서 최대 약 615%(8g 첨가구)의 생산 증대효과를 보였으며, GMP의 첨가량이 증가하면 할수록 역시 생산수율 증대효과를 보였다.

IMP 처리구도 0.5g의 첨가조건에서 대조 대비 1,078%의 증가수치를 보였는데, IMP 첨가농도가 높으면 높을수록 증가하다가 최대 8g을 첨가시는 1,382%의 최대 생산수율 증대효과를 보였으며 이러한 경향은 두종류의 핵산류 공히 동일하였다.

Zn-WPS반응액내 핵산류 농도별 첨가에 따른 생산효율 증가부분과 미네랄 킬레이팅 효율과 연계하여 살펴 보았더니, 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조구의 경우는 아연의 함유량이 40,00ppm(100% 기준) 범위의 킬레이팅 효율을 보였다(표 5).

GMP 처리구는 생산효율이 가장 높았던 8g처리구에서 24,510ppm 그리고 IMP처리구는 16,990ppm의 검출량을 보임으로서 39%에서 57%의 미네랄 킬레이팅 효능을 감소시키는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 생산수율이 7.9배임을 고려하면 오히려 3배 이상의 증가효과를 보이는 것으로 결론지어졌다.

전체농도처리구에서 미네랄 킬레이팅 효과를 종합적으로 살펴보았더니, 두종 핵산류 모두 0.5g처리시 GMP는 47,130ppm 그리고 IMP처리구는 30,760ppm으로 조사되었는데 핵산 첨가농도가 증가되면 미네랄 검출량도 감소하는 경향은 두 핵산균 모두 동일하였다.

이러한 경향은 GMP나 IMP는 Zn-WPS에서 고농도를 첨가한다 해서 미네랄 킬레이팅 효능이 증가하는 것이 아니고, IMP와 GMP 모두 0.5g의 적정량의 범위를 보유하고 있는 것이 확인된 결과였다. 즉, 적정 농도 이상의 핵산류를 처리한 경우에는 전처리 유기태화 반응액의 침전을 유도하지만, 일부 칼슘이온은 GMP 및 IMP와 일부가 결합된 후 세척단계에서 제거되는 이유 때문인 것으로 판단되었다.

미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기를 조사한 결과, GMP는 -P가 그리고 IMP는 -S기가 중요한 역할을 담당하는 것으로 조사되었다.

따라서, 선 유기태화 반응액을 조성한 후 핵산류를 촉매로 사용하는 경우는 IMP가 가장 적절한 소재로 판단되었으며 0.5g의 적은 농도를 처리하더라도 생산량은 1,000%이상으로 동시에 증가하였으므로 적정한 농도로 결정되었으며, 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효과를 보장하는 제조법은 비열처리 및 열처리 공히 적용이 가능한 방법으로 정립하였다.

라. Cu-HAC 소재 부분

본 결과는 Cu-WPS에 대한 선발 핵산류별로 첨가농도별 성장변화(침전, 응고, 부착, 부유, 겔화, 지방제거도 및 색상변화 확인과 유기태화 반응이 종료되어 분리, 세척 및 동결공정을 거쳐 최종 생산된 최종생산물(핵산촉매 적용, 유기태화 미네랄 소재류 개발)의 생산수율을 조사를 통하여 Cu-WPS소재류 부분만에 한정하여 생산수율 증대법 관련 신규개발법의 정립여부를 확정하였다(Fig 1, 5., 표 7~8).

결과로서, 촉매류중 생산수율이 높다 하더라도 제조시 지방제거도와 부유현상은 산업화 현장에서 생산편리성과 생산효율을 감소시키는 요건이 되므로, 우선 이 항목을 선발기준으로 할 때, CuWPS-HAC처리구에서 GMP처리구 전체에서 지방제거효과와 부유 효과가 없어 선발되었고, IMP는 전체 첨가농도에서 전체 시험구에서 효과가 미미함에 따라 촉매로서는 제외하였다(표 6).

생산효율을 보면 GMP는 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조(100% 기준) 대비 최저 96%(0.5g첨가구)에서 최대 약 165%(8g 첨가구)의 동등성 이상을 확보되는 생산 증대효과를 보였으며, GMP의 첨가량이 증가하면 할수록 역시 생산수율 증대효과를 보였다.

IMP 처리구는 0.5g~4g의 첨가조건에서 대조 대비 동등성 생산효율을 보였으며, 최고 농도인 8g을 처리시 최대 생산수율인 265%의 수치를 보였는데, 전반적으로는 GMP와 같이 IMP 첨가농도가 높으면 높을수록 생산수율은 증대 효과를 보였으며 이러한 경향은 두종류의 핵산류 공히 동일하였다.

Cu-WPS반응액내 핵산류 농도별 첨가에 따른 생산효율 증가부분과 미네랄 킬레이팅 효율과 연계하여 살펴 보았더니, 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조구의 경우는 구리의 함유량이 42,770ppm(100% 기준) 범위의 킬레이팅 효율을 보였다(표 7).

GMP처리구는 생산효율이 가장 높았던 8g처리구에서 37,760ppm 그리고 IMP처리구는 18,640ppm의 검출량을 보임으로서, 11%와 53%의 미네랄 킬레이팅 효능을 감소시키는 것으로 조사되었다.

전체농도처리구에서 미네랄 킬레이팅 효과를 종합적으로 살펴보았더니, 두종 핵산류 모두 0.5g처리시 GMP는 46,090ppm 그리고 IMP처리구는 33,920ppm으로 조사되었는데 핵산 첨가농도가 증가되면 미네랄 검출량도 감소하는 경향은 두 핵산군 모두 동일하였다.

이러한 경향은 GMP나 IMP는 Cu-WPS에서 고농도를 첨가한다 해서 미네랄 킬레이팅 효능이 증가하는 것이 아니고, IMP와 GMP 모두 0.5g의 적정량의 범위를 보유하고 있는 것이 확인된 결과였다. 즉, 적정 농도 이상의 핵산류를 처리한 경우에는 전처리 유기태화 반응액의 침전을 유도하지만, 일부 칼슘이온은 GMP 및 IMP와 일부가 결합된 후 세척단계에서 제거되는 이유 때문인 것으로 판단되었다.

미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기를 조사한 결과, GMP와 IMP 모두 -S기가 중요한 역할을 담당하는 것으로 조사되었다.

따라서, 선 유기태화 반응액을 조성한 후 핵산류를 촉매로 사용하는 경우는 GMP가 가장 적절한 소재로 판단되었으며 1g의 적은 농도를 처리하더라도 생산량은 동등하되 미네랄 킬레이팅 효능은 증가하였으므로 적정한 농도로 결정되었으며, 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효과를 보장하는 제조법은 열처리 공정이 첨가될 시 가장 효율이 높은 것으로 제조방법을 정립하였다.

마. Se-HAC 소재 부분

본 결과는 Se-WPS에 대한 선발 핵산류별로 첨가농도별 성장변화(침전, 응고, 부착, 부유, 겔화, 지방제거도 및 색상변화 확인과 유기태화 반응이 종료되어 분리, 세척 및 동결공정을 거쳐 최종 생산된 최종생산물(핵산촉매 적용, 유기태화 미네랄 소재류 개발)의 생산수율을 조사를 통하여 Se-WPS소재류 부분만에 한정하여 생산수율 증대법 관련 신규개발법의 정립 여부를 확정하였다(Fig 1, 6., 표 8~9).

결과로서, 촉매류중 생산수율이 높다 하더라도 제조시 지방제거도와 부유현상은 산업화 현장에서 생산편리성과 생산효율을 감소시키는 요건이 되므로, 우선 이 항목을 선발기준으로 할 때, SeWPS-HAC처리구에서는 GMP 및 IMP처리구 전체에서 지방제거효과는 인정되지 않았으며, 부유 현상이 심하게 발생하여 따라 선정원칙에 준하여 촉매로서 적용부분에서 제외하였다(그림 6, 표 8).

생산효율을 보면 GMP는 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조(100% 기준) 대비 1g이상의 농도를 처리시 동등성이 확보되는 경과를 확인 하였으며, 1g이상의 처리군에서 117%에서 최대 약 455%(8g 첨가구)의 생산 증대효과를 보였으며, GMP의 첨가량이 증가하면 할수록 역시 생산수율 증대효과를 보였다.

IMP 처리구는 8g의 첨가조건에서만 296%의 생산효율을 보였으며, 그 이하의 농도에서는 대조구 보다도 훨씬 낮은 생산 수율을 보였는데, GMP처리구와 같이 첨가농도의 농도가 높으면 높을수록 역시 생산수율이 증가하는 패턴은 동일하였다.

이러한 결과는 다른 4종 소재류에 대한 핵산류 처리 결과와는 전혀 다른 패턴을 보였으며, 따라서 셀레늄의 경우는 본 방법 이외에 추가적인 방법의 정립이 필요하다고 판단되었다.

이를 해결하기 위한 추후 방법으로는 기질 자체 및 유기태화 방법의 정립 등의 개발을 통하여 이를 해결예정이며, 본 전체과정에서 해결예정이다.

Se-WPS반응액내 핵산류 농도별 첨가에 따른 생산효율 증가부분과 미네랄 킬레이팅 효율과 연계하여 살펴 보았더니, 표준유기태화 제조법으로 제조한 대조구의 경우는 구리의 함유량이 7,306ppm(100% 기준) 범위의 킬레이팅 효율을 보였다(표 9).

GMP처리구는 생산효율이 가장 높았던 8g처리구에서 3,907ppm 그리고 IMP처리구는 2,826ppm의 검출량을 보임으로서, 약 47%와 약 60%의 미네랄 킬레이팅 효능을 감소시키는 것으로 조사되었다.

전체농도처리구에서 미네랄 킬레이팅 효과를 종합적으로 살펴보았더니, 두종 핵산류 모두 0.5g처리시 GMP는 5,995ppm 그리고 IMP처리구는 6,9430ppm으로 조사되었는데 핵산 첨가농도가 증가되면 미네랄 검출량도 감소하는 경향은 두 핵산균 모두 동일하였다.

이러한 경향은 GMP나 IMP는 Se-WPS에서 고농도를 첨가한다 해서 미네랄 킬레이팅 효능이 증가하는 것이 아니고, IMP와 GMP 모두 0.5g의 적정량의 범위를 보유하고 있는 것이 확인된 결과였다. 즉, 적정 농도 이상의 핵산류를 처리한 경우에는 전처리 유기태화 반응액의 침전을 유도하지만, 일부 칼슘이온은 GMP 및 IMP와 일부가 결합된 후 세척단계에서 제거되는 이유 때문인 것으로 판단되었다.

미네랄 킬레이팅과 관련한 기능기를 조사한 결과, GMP와 IMP 모두 -P와 -S기가 일부 역할을 수행하는 것으로 조사되었으며, 기능기의 역할은 대조에서 검출된 수치 기준으로 10% 이내의 범위를 보였다.

따라서, 선 유기태화 반응액을 조성한 후 핵산류를 촉매로 사용하는 경우는 GMP는 4~8g, IMP는 8g의 농도처리범위가 생산량 증대에 기여하는 범위이나 미네랄 킬레이팅 증대에 있어서는 기여를 하지는 못하는 전체화 선발 농도로 결정되었으며, 적어도 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 효과를 보장하는 제조법은 비열처리 공정이 가장 효율이 높은 것으로 제조 방법을 정립하였다.

5. 종합결론

선행정립된 표준유기태화제조방법을 적용하여 유기태화 반응 조건을 조성한 반응액을 기준으로 정립된 MWPS-HAC신규제조법 정립 결과는 다음과 같다(표 10).

가. SeWPS-HAC는 전체공정에서 채택은 하되 부유 및 지방제거법을 적용하는 새로운 생산수율 및 미네랄 킬레이팅 제조방법의 개발이 필요하며, 전체연구간 개발완료 예정이다.

나. 셀레늄을 제외한 4종의 MWPS-HAC소재류의 신규제조법은 개발 완료되었다.

다. 신규제조법은 유청분말을 기질원료로 유기태화 제조법을 적용 개발하되 생산수율과 목표 미네랄류에 대한 킬레이팅 효능을 동시에 획기적으로 증가시키는 신규한 제조법이다.

라. GMP를 촉매로 선정된 제조법은 CaWPS-HAC, FeWPS-HAC이고, IMP를 촉매로 하여 제조법은 ZnWPS-HAC 및 CuWPS-HAC제조법이다.

마. MWPS-HAC제조법은 다음과 같다.

- 1). 비열처리조건 : M-WPS(5:1:10) 제조->비열처리->핵산류 첨가-> CF(3,000rpm,

20분, 25℃)→세척(3배 용량)→교반(분산)→CF(1차세척)→분반→ CF(2차세척)→ 건조(SD)

2) 열처리조건 : M-WPS(5:1:10)제조→헥산류 첨가→열처리(80℃,30분)→ CF(3,000rpm, 20분, 25℃)→세척(3배 용량)→교반(분산)→CF(1차 세척)→분반→ CF(2차세척)→ 건조(SD)

6. 추후진행사항

본 연구결과는 국내외적으로 사례가 없는 결과임에 따라 연구결과는 특허출원 및 우선 특허심사과정을 거쳐 신속히 등록완료 예정이다.

따라서, 본 연구결과는 본 과제에서 제시한 성과에 이미 도달하였으며, 추후 관련연구에 기초 및 응용자료로서 적극 활용할 예정이다.



Fig 1. 선발 핵산류의 촉매로서의 효과 및 패턴조사를 위한 5종 유기태화 미네랄 소재류(비열 처리)의 선행조성액 제조결과

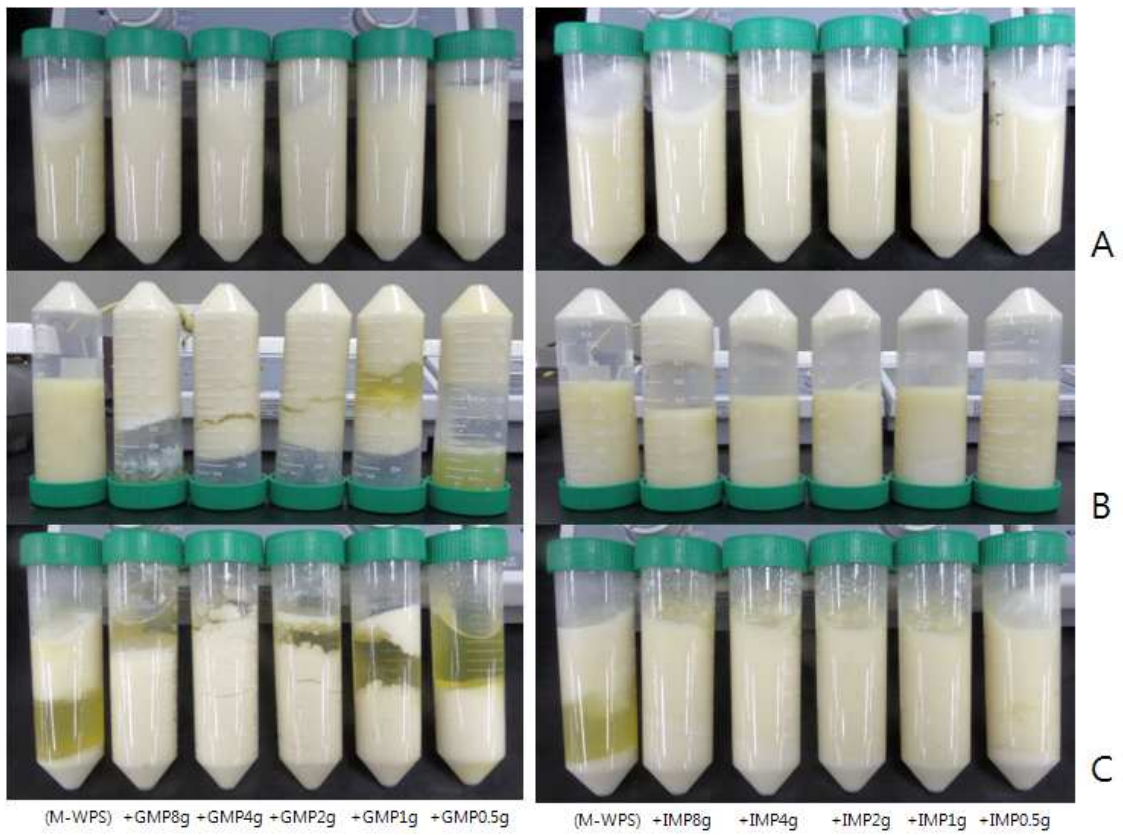


Fig 2. 선제조 Ca-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 열처리(83℃, 20분)시 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율(침전물 및 상등액 회수) 증대에 미치는 효과 평가

A : 반응후, B: A반응+CF(3,000rpm, 20분, 25℃), C: B+열촉매처리+ CF(3,000rpm, 20분, 25℃)

Table 1. 선제조 Ca-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 열처리(83°C, 20분)시 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율(침전물 및 상등액 회수) 증대에 미치는 효과 평가 디자인

CaWPS-HAC 시험구		성상 평가(비열처리+핵산처리+원심후/열처리공정후)						침전물 용해성 및 수율				생산수율 (대조대비)	결과
		침전	응고	부착	부유	결화	지방제거도	색상	세척회수	비건조(g)	건조무게(g)		
Ca-WPS 40g	GMP 0g (대조1)	+/++	-/-	+/-	++/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/2.81	NT/100	비열처리:비선택 열처리후:비선택
	GMP 8g	+++/>+++	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/21.9	NT/779	비열처리:완료 열처리후:완료
	GMP 4g	+++/>+++	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/16.2	NT/587	비열처리:완료 열처리후:완료
	GMP 2g	+++/>+++	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/12.7	NT/451	비열처리:완료 열처리후:완료
	GMP 1g	+++/>+++	-/>+++	-/-	+++/>-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/9.0	NT/320	비열처리:완료 열처리후:완료
	GMP 0.5g	+++/>+++	-/>+++	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/10.1	NT/359	비열처리:완료 열처리후:완료
	IMP 0g (대조2)	+/++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/3.1	NT/100	비열처리:비선택 열처리후:비선택
	IMP 8g	+++/>+++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/20.7	NT/667	비열처리:보완 열처리후:비선택
	IMP 4g	++/>+++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/11.7	NT/378	비열처리:보완 열처리후:비선택
	IMP 2g	++/>+++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/12.0	NT/388	비열처리:비선택 열처리후:비선택
	IMP 1g	++/>+++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/9.55	NT/178	비열처리:비선택 열처리후:비선택
	IMP 0.5g	+/++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/2.16	NT/0.70	비열처리:비선택 열처리후:비선택
	비고												

Table.2. 선제조 Ca-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 처리공정에 따른 미네랄 킬레이팅 효과 분석결과

시험구	개발 촉매제 적용 신규제조법에 따른 미네랄류 킬레이팅 효과평가(ppm)											합계		결과
	Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	PS+	PS-	
Ca-G(0)HAC	Mean	42,700	77.9	5.0	40.7	ND	9,972	748	0.364	4,018	6,316	1,459	65,373	57,598
	SD	421	0.9	0.1	0.2		119	1	0.073	54	16	2		
Ca-G(8)HAC	Mean	18,070	4.7	2.2	ND	ND	8,527	331	0.268	36,980	11,990	883	76,782	63,909
	SD	161	0.3	0.3			44	0	0.022	61	25	4		
Ca-G(4)HAC	Mean	25,620	5.8	4.9	ND	ND	12,960	571	0.336	21,800	7,742	889	69,581	60,950
	SD	127	0.3	0.4			22	5	0.032	47	41	3		
Ca-G(2)HAC	Mean	34,800	6.0	2.4	ND	ND	15,700	655	0.275	16,480	9,705	1,070	78,401	67,626
	SD	171	0.1	0.3			85	2	0.060	29	42	6		
Ca-G(1)HAC	Mean	33,880	4.2	2.1	ND	ND	12,170	635	0.122	9,249	6,198	1,035	63,155	55,922
	SD	171	0.1	0.4			63	2	0.004	54	10	5		
Ca-G(0.5)HAC	Mean	36,400	4.8	2.4	ND	ND	12,130	641	0.124	7,274	5,367	1,153	62,956	56,436
	SD	179	0.4	0.2			53	1	0.013	29	19	5		
Ca-I(0)HAC	Mean	46,610	9.7	2.8	ND	ND	11,580	772	0.224	4,639	7,436	1,473	72,514	63,605
	SD	412	0.1	0.2			167	12	0.042	42	7	1		
Ca-I(8)HAC	Mean	19,850	2.8	1.2	ND	ND	7,661	491	0.302	17,890	5,914	1,110	52,897	45,873
	SD	171	0.2	0.6			72	1	0.030	64	15	1		
Ca-I(4)HAC	Mean	22,990	29.3	1.2	ND	ND	7,407	533	0.476	11,830	5,147	1,094	48,998	42,757
	SD	75	0.0	0.4			86	2	0.051	31	16	4		
Ca-I(2)HAC	Mean	25,710	3.1	1.2	ND	ND	7,466	517	0.161	7,599	4,193	961	46,430	41,276
	SD	72	0.2	0.3			63	3	0.077	56	16	4		
Ca-I(1)HAC	Mean	29,230	4.7	5.3	ND	ND	10,520	538	0.221	8,429	5,887	1,127	55,705	48,691
	SD	208	0.3	0.2			63	1	0.037	31	16	5		
Ca-I(0.5)HAC	Mean	46,020	14.1	3.1	ND	ND	10,950	871	0.370	7,692	11,350	1,644	78,536	65,542
	SD	72	0.3	0.1			16	2	0.040	26	15	3		

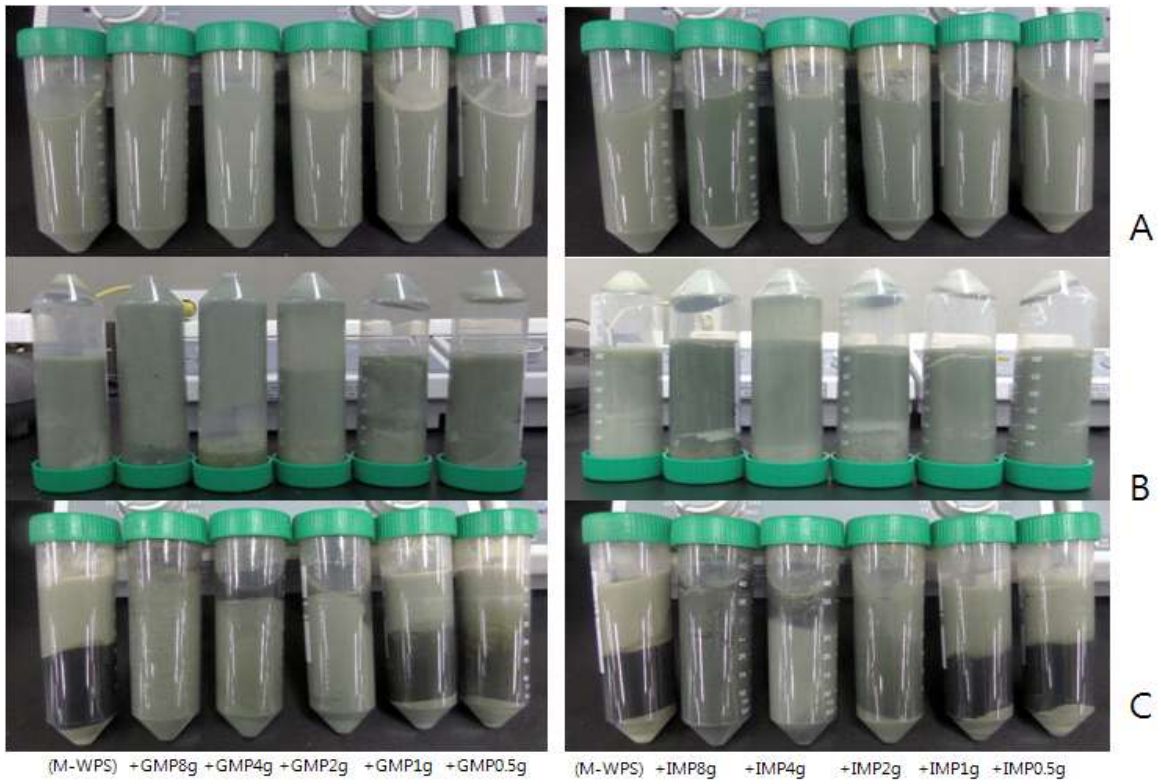


Fig 3. 선제조 Fe-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 열처리(83℃, 20분)시 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율(침전물 및 상등액 회수) 증대에 미치는 효과 평가

A : 반응후, B: A반응+CF(3,000rpm, 20분, 25℃), C: B+열촉매처리+ CF(3,000rpm, 20분, 25℃)

Table 3. 선제조 Fe-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 성상 및 생산수율 증대에 미치는 효과 평가결과

FeWPS-HAC 시험구		성상 평가(비열처리+핵산처리+원심후/열처리공정후)							침전물 용해성 및 수율			생산수율 (대조대비)	결과
		침전	응고	부착	부유	결화	지방제거도	색상	세척회수	비건조(g)	건조무게(g)		
Fe-WPS 40g	GMP 0g (대조1)	+/+	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	Black/B	0/1	NT/	NT/2.86	NT/100	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	GMP 8g	+++/>+++	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	B/B	0/1	NT/	NT/25.6	NT/895	• 비열처리:완료 • 열처리후:완료
	GMP 4g	+++/>+++	-/+++	-/-	+/-	-/-	+++/>+++	B/B	0/1	NT/	NT/16.3	NT/571	• 비열처리:완료 • 열처리후:완료
	GMP 2g	++/>+++	-/+++	-/-	+/>+++	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/	NT/6.87	NT/240	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	GMP 1g	++/>+	-/>+	+/>+	+++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/	NT/2.67	NT/0.93	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	GMP 0.5g	++/>+	-/>+	-/-	+++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/	NT/2.21	NT/0.77	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 0g (대조2)	+/+	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	Black/B	0/1	NT/	NT/3.63	NT/1	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 8g	++/>+++	-/+++	-/-	+/-	-/-	++/>+++	B/B	0/1	NT/	NT/28.7	NT/791	• 비열처리:비선택 • 열처리후:완료
	IMP 4g	++/>++	-/>+	-/-	++/>++	-/-	-/>++	B/B	0/1	NT/	NT/6.08	NT/167	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 2g	+/>+	-/>+	-/-	++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/	NT/2.35	NT/64.9	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 1g	+/>+	-/>+	-/-	++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/	NT/1.36	NT/0.38	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 0.5g	+/>+	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/	NT/1.62	NT/0.45	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
비고													

Table. 4. 선제조 Ca-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 처리공정에 따른 미네랄 킬레이팅 효과 분석결과

시험구		개발 촉매제 적용 신규제조법에 따른 미네랄류 킬레이팅 효과평가(ppm)											합계		결과
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	PS+	PS-	
Fe-G(0)HAC	Mean	4,216	31,900.0	10.0	5.7	14.7	13,860	806	85,830	4,607	5,849	16,620	77,946	55,477	
	SD	18	221.0	0.3	0.1	8.0	74	1	0.140	33	9	17			
Fe-G(8)HAC	Mean	1,297	15,060.0	5.2	8.1	8.9	9,987	411	38,160	28,190	14,530	13,890	83,397	54,977	
	SD	4	66.0	0.4	0.1	7.8	70	5	0.170	115	27	12			
Fe-G(4)HAC	Mean	2,103	19,520.0	6.3	6.4	6.2	12,380	570	48,330	20,750	7,599	17,010	79,990	55,381	
	SD	8	53.0	0.5	0.1	5.6	29	3	0.170	83	36	69			
Fe-G(2)HAC	Mean	3,286	28,750.0	9.3	7.3	7.7	11,850	691	73,050	12,100	8,243	16,140	81,152	56,769	
	SD	11	102.0	0.1	0.1	2.3	60	3	0.270	38	20	13			
Fe-G(1)HAC	Mean	4,920	41,230.0	13.2	4.0	0.5	14,930	782	117,200	11,880	26,110	10,600	110,590	73,880	
	SD	25	111.0	0.4	0.1	7.0	84	3	0.300	104	123	29			
Fe-G(0.5)HAC	Mean	6,070	35,990.0	12.4	4.3	0.4	14,110	840	100,800	7,684	14,860	14,610	94,284	64,814	
	SD	37	258.0	0.2	0.2	5.6	96	1	0.200	48	37	20			
Fe-I(0)HAC	Mean	6,873	30,170.0	9.9	2.2	0.4	11,490	768	83,040	3,831	8,779	14,200	76,207	53,228	
	SD	26	231.0	0.2	0.2	20.9	60	2	0.060	31	60	76			
Fe-I(8)HAC	Mean	1,208	18,170.0	5.9	7.9	14.7	8,723	502	46,070	21,570	16,480	10,740	77,425	50,205	
	SD	3	39.0	0.3	0.1	5.3	35	3	0.160	26	60	40			
Fe-I(4)HAC	Mean	2,789	28,920.0	8.9	6.4	5.0	9,952	597	76,570	15,840	15,340	12,530	86,050	58,180	
	SD	2	102.0	0.1	0.0	12.5	38	3	0.300	36	58	52			
Fe-I(2)HAC	Mean	6,334	37,500.0	11.3	3.1	0.3	12,190	777	103,700	11,430	16,770	14,030	99,148	68,348	
	SD	36	82.0	0.3	0.1	8.4	61	3	0.600	100	79	46			
Fe-I(1)HAC	Mean	10,060	30,360.0	9.6	1.8	11.9	10,820	903	87,440	10,900	18,760	12,260	94,176	63,156	
	SD	70	192.0	0.3	0.1	9.1	124	1	1.060	125	26	41			
Fe-I(0.5)HAC	Mean	6,599	23,400.0	7.4	4.4	3.2	8,454	671	65,340	4,418	9,070	10,720	63,403	43,613	
	SD	12	53.0	0.1	0.1	12.2	62	6	0.210	26	16	35			



Fig 4. 선제조 Zn-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 헥산류 농도별 공정후 열처리(83℃, 20분)시 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율(침전물 및 상등액 회수) 증대에 미치는 효과 평가

A : 반응후, B: A반응+CF(3,000rpm, 20분, 25℃), C: B+열충매처리+ CF(3,000rpm, 20분, 25℃)

Table 5. 선제조 Zn-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 성상 및 생산수율 증대에 미치는 효과 평가

ZnWPS-HAC시험구		성상 평가(비열처리+핵산처리+원심후/열처리공정후)							침전물 용해성 및 수율			생산수율 (대조대비)	결과
		침전	응고	부착	부유	결화	지방제거도	색상	세척회수	비건조(g)	건조무게(g)		
Zn-WPS 40g	GMP 0g (대조1)	+/+	-/-	+/-	++/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/1.64	NT/100	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	GMP 8g	+++/>+++	-/-	-/-	+/+++	-/-	+/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/11.6	NT/709	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:비선택
	GMP 4g	++/+++	-/-	-/-	+/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/10.1	NT/615	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	GMP 2g	++/++	-/-	-/-	+/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/5.50	NT/336	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	GMP 1g	++/++	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/3.59	NT/219	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	GMP 0.5g	++/+	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/2.35	NT/143	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	IMP 0g (대조2)	+/+	-/-	+/-	++/+++	-/-	-/-	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/1.40	NT/100	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	IMP 8g	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/19.4	NT/1,382	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:완료 열처리후:완료
	IMP 4g	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/15.8	NT/1,129	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:완료 열처리후:완료
	IMP 2g	+++/>+++	-/-	-/-	-/-	-/-	+++/>+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/15.1	NT/1,081	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:완료 열처리후:완료
	IMP 1g	++/+++	-/-	-/-	++/-	-/-	++/+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/17.6	NT/1,253	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:완료
	IMP 0.5g	++/+++	-/-	-/-	++/-	-/-	++/+++	Y/Y	0/1	NT/NT	NT/15.1	NT/1,078	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:완료
비교													

Table 5. 선제조 ZnWPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 미네랄 킬레이팅 효과 분석결과

시험구		개발 촉매제 적용 신규제조법에 따른 미네랄류 킬레이팅 효과평가(ppm)											합계		결과
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	PS+	PS-	
Zn-G(0)HAC	Mean	9,531	31.1	1.2	40,310	29.2	11,350	991	0.687	3,621	13,580	13,350	92,734	65,804	
	SD	35	1.3	0.6	22	8.7	98	8	0.032	25	52	42			
Zn-G(8)HAC	Mean	4,569	5.9	1.1	24,510	10.8	8,814	592	0.472	26,250	15,230	14,260	94,248	64,758	
	SD	24	0.3	0.1	48	14.3	127	2	0.018	219	33	36			
Zn-G(4)HAC	Mean	2,547	3.2	0.2	19,020	0.9	9,526	583	0.330	14,640	4,947	13,750	65,015	46,318	
	SD	8	0.2	0.4	38	17.4	37	1	0.042	55	21	42			
Zn-G(2)HAC	Mean	6,950	6.0	1.1	37,330	180.9	11,330	790	0.672	12,330	16,950	13,450	99,319	68,919	
	SD	12	0.4	0.2	107	5.8	58	5	0.012	65	24	13			
Zn-G(1)HAC	Mean	6,931	6.3	3.1	39,650	180.0	13,130	845	0.689	10,190	18,350	13,430	102,716	70,936	
	SD	18	0.4	0.1	311	12.3	89	5	0.039	51	27	20			
Zn-G(0.5)HAC	Mean	9,120	8.4	1.1	47,130	217.3	14,240	982	0.653	8,471	22,940	13,350	116,461	80,171	
	SD	29	0.1	0.3	20	9.9	80	4	0.033	45	64	29			
Zn-I(0)HAC	Mean	9,575	8.4	1.0	40,070	189.6	12,070	1,017	0.616	4,000	14,510	14,040	95,480	66,930	
	SD	16	0.6	0.2	139	7.5	124	3	0.074	23	50	39			
Zn-I(8)HAC	Mean	1,579	3.3	0.3	16,990	19.6	13,150	578	0.316	22,100	6,821	16,960	78,202	54,421	
	SD	1	0.1	0.4	15	10.3	46	3	0.026	34	10	5			
Zn-I(4)HAC	Mean	1,431	4.1	0.0	21,910	9.8	14,330	585	0.424	20,160	6,965	17,740	83,113	58,408	
	SD	7	0.2	0.6	13	18.0	18	3	0.017	85	22	32			
Zn-I(2)HAC	Mean	1,637	2.7	0.3	27,330	30.2	15,010	674	0.459	12,750	5,218	17,720	80,313	57,375	
	SD	1	0.1	0.2	62	15.8	96	5	0.051	43	27	52			
Zn-I(1)HAC	Mean	950	2.0	0.0	26,900	28.2	13,400	713	0.468	8,051	2,245	16,760	68,993	49,988	
	SD	2	0.1	0.5	55	15.0	47	3	0.013	17	4	55			
Zn-I(0.5)HAC	Mean	2,135	3.2	0.6	30,760	40.0	12,860	695	0.495	5,959	4,344	15,870	72,588	52,374	
	SD	7	0.2	0.4	102	6.7	60	3	0.115	55	5	27			

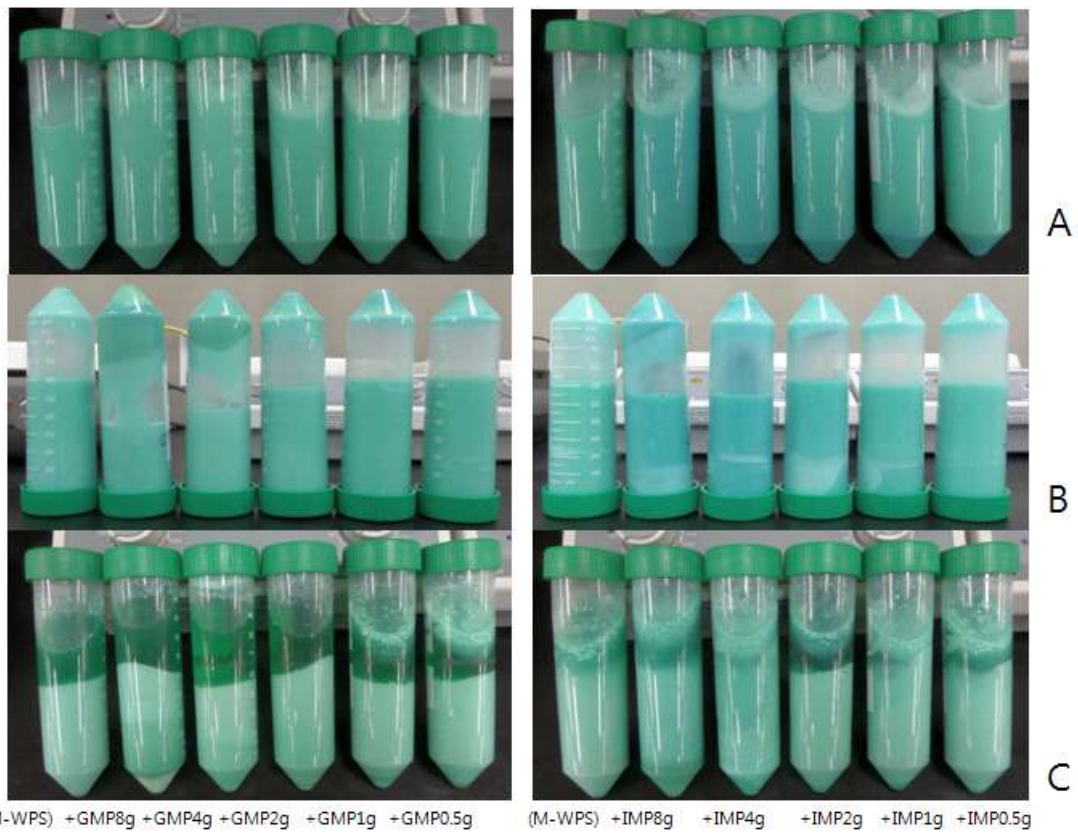


Fig 5. 선제조 Cu-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 열처리(83℃, 20분)시 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율(침전물 및 상등액 회수) 증대에 미치는 효과 평가

A : 반응후, B: A반응+CF(3,000rpm, 20분, 25℃), C: B+열촉매처리+ CF(3,000rpm, 20분, 25℃)

Table 6. 선제조 CuWPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 성상 및 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율 증대에 미치는 효과 평가 결과

CuWPS-HAC시험구		성상 평가(비열처리+핵산처리+원심후/열처리공정후)						침전물 용해성 및 수율			생산수율 (대조대비)	결과	
		침전	응고	부착	부유	겔화	지방제거도	색상	세척회수	비건조(g)			건조무게(g)
Cu-WPS 40g	GMP 0g (대조1)	+/+++	-/-	-/-	+/-	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/NT	NT/10.5	NT/100	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:완료
	GMP 8g	+++/>+++	-/-	-/-	+/-	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/NT	NT/16.9	NT/161	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:완료
	GMP 4g	++/>+++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/NT	NT/13.1	NT/125	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:완료
	GMP 2g	++/>+++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/NT	NT/12.6	NT/120	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:완료
	GMP 1g	++/>+++	-/-	-/-	+/-	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/NT	NT/10.8	NT/103	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:완료
	GMP 0.5g	-/+++	-/-	-/-	-/+	-/-	-/++	B/B	0/1	NT/NT	NT/10.3	NT/0.98	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:완료
	IMP 0g (대조2)	+/+++	-/-	-/-	+/+++	-/-	-/+++	B/B	0/1	NT/NT	NT/8.86	NT/100	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
	IMP 8g	+++/>+++	-/-	-/-	++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/NT	NT/23.5	NT/265	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:비선택
	IMP 4g	++/>++	-/-	-/-	++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/NT	NT/8.93	NT/101	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:보완 열처리후:비선택
	IMP 2g	++/>+++	-/-	-/-	++/>+	-/-	-/+	B/B	0/1	NT/NT	NT/10.5	NT/100	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:완료
	IMP 1g	++/>++	-/-	-/-	++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/NT	NT/8.59	NT/0.97	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택
IMP 0.5g	++/>++	-/-	-/-	++/>+++	-/-	-/-	B/B	0/1	NT/NT	NT/8.10	NT/0.91	<ul style="list-style-type: none"> 비열처리:비선택 열처리후:비선택 	
비고													

Table 7. 선제조 Cu-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 시 미네랄 킬레이팅 효과 분석결과

시험구		개발 촉매제 적용 신규제조법에 따른 미네랄류 킬레이팅 효과평가(ppm)											합계		비고
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	PS+	PS-	
Cu-G(0)HAC	Mean	2,030	7.7	42,770.0	- 1.3	- 17.5	13,920	705	2,525	5,225	4,749	17,990	87,351	64,612	
	SD	3	0.3	204.0	3.9	4.0	57	6	0.077	6	28	127			
Cu-G(8)HAC	Mean	1,474	9.8	37,760.0	26.4	- 23.5	7,621	201	0.799	24,230	11,800	14,960	98,032	71,272	
	SD	6	0.1	134.0	4.8	13.1	91	0	0.059	57	26	41			
Cu-G(4)HAC	Mean	2,194	8.7	34,380.0	- 7.5	- 26.7	10,060	491	2.005	16,970	7,762	15,940	87,751	64,049	
	SD	7	0.2	20.0	0.2	12.1	82	2	0.068	163	12	19			
Cu-G(2)HAC	Mean	2,161	6.4	38,520.0	- 5.4	- 14.2	14,030	639	2.096	12,950	8,655	17,970	94,885	68,260	
	SD	15	0.1	144.0	1.0	6.8	154	5	0.038	141	39	84			
Cu-G(1)HAC	Mean	2,449	10.1	46,090.0	- 5.6	- 18.7	14,540	630	2.279	9,601	8,339	17,990	99,594	73,265	
	SD	7	0.2	72.0	0.0	9.9	41	3	0.042	41	6	41			
Cu-G(0.5)HAC	Mean	2,008	6.7	42,060.0	- 7.2	- 11.8	15,470	761	2.655	7,841	5,693	19,690	93,482	68,099	
	SD	8	0.2	156.0	0.4	6.4	40	3	0.056	30	33	54			
Cu-I(0)HAC	Mean	2,078	63.1	40,030.0	1.7	- 22.1	13,080	683	2.448	4,712	4,791	17,240	82,631	60,600	
	SD	9	0.4	97.0	7.6	3.3	112	1	0.033	60	7	51			
Cu-I(8)HAC	Mean	2,291	4.0	18,640.0	- 4.9	- 21.1	9,718	508	1.824	11,500	7,516	12,080	62,220	42,624	
	SD	3	0.6	25.0	3.2	14.8	23	2	0.024	46	15	32			
Cu-I(4)HAC	Mean	2,746	7.1	25,380.0	- 6.5	- 14.6	12,210	661	2.511	16,150	10,790	15,120	83,030	57,120	
	SD	13	0.2	34.0	0.3	6.1	11	3	0.031	71	26	15			
Cu-I(2)HAC	Mean	1,594	4.7	30,460.0	- 8.3	- 17.7	12,320	620	2.241	10,890	7,492	15,680	79,015	55,843	
	SD	6	0.1	105.0	0.2	11.4	60	4	0.028	75	14	98			
Cu-I(1)HAC	Mean	1,588	6.3	34,030.0	- 5.7	- 16.7	12,930	628	2.527	8,745	6,602	16,150	80,667	57,915	
	SD	6	0.3	55.0	0.0	3.6	44	2	0.036	39	14	18			
Cu-I(0.5)HAC	Mean	1,433	5.7	33,920.0	- 6.3	- 11.2	14,180	745	2.629	7,122	5,298	17,470	80,133	57,365	
	SD	3	0.2	21.0	0.0	11.3	47	8	0.017	11	24	37			



Fig 6. 선제조 Se-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 헥산류 농도별 공정후 열처리(83℃, 20분)시 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율(침전물 및 상등액 회수) 증대에 미치는 효과 평가

A : 반응후, B: A반응+CF(3,000rpm, 20분, 25℃), C: B+열촉매처리+ CF(3,000rpm, 20분, 25℃)

Table 8. 선제조 SeWPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 성상 및 미네랄 킬레이팅 효과 및 생산수율 증대에 미치는 효과 평가

SeWPS-HAC시험구		성상 평가(비열처리+핵산처리+원심후/열처리공정후)							침전물 용해성 및 수율			생산수율 (대조대비)	결과
		침전	응고	부착	부유	겔화	지방 제거도	색상	세척 회수	비건조 (g)	건조 무게(g)		
Se-WPS 40g	GMP 0g (대조1)	+/+	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/1.07	NT/100	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	GMP 8g	+++/>+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/4.87	NT/455	• 비열처리:보완 • 열처리후:비선택
	GMP 4g	+++/>+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/2.73	NT/255	• 비열처리:보완 • 열처리후:비선택
	GMP 2g	+++/>+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/1.68	NT/157	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	GMP 1g	+++/>+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/1.25	NT/117	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	GMP 0.5g	+++/>+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/0.90	NT/0.83	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 0g (대조2)	+/+	-/-	-/-	-/+++	-/-	-/-	Y/R	0/1	NT/NT	NT/0.82	NT/100	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 8g	+++/>+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	+++/>+	Y/R	0/1	NT/NT	NT/2.43	NT/296	• 비열처리:보완 • 열처리후:비선택
	IMP 4g	+/+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	+++/>+	Y/R	0/1	NT/NT	NT/0.70	NT/0.85	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 2g	+/+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	+++/>+	Y/R	0/1	NT/NT	NT/1.03	NT/125	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 1g	+/+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	+++/>+	Y/R	0/1	NT/NT	NT/0.82	NT/100	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
	IMP 0.5g	+/+	-/-	-/-	+++/>+	-/-	+++/>+	Y/R	0/1	NT/NT	NT/0.81	NT/0.98	• 비열처리:비선택 • 열처리후:비선택
비고													

Table 9. 선제조 Se-WPS(반응단계까지, 비열처리) 제조후 핵산류 농도별 공정후 시 미네랄 킬레이팅 효과 분석결과

시험구		개발 촉매제 적용 신규제조법에 따른 미네랄류 킬레이팅 효과량가(ppm)											합계		결과
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	P	S	PS+	PS-	
Se-G(0)HAC	Mean	22,220	16.7	19.1	7.3	7,306.0	13,980	2,377	0.747	8,982	17,360	3,173	75,441	54,908	
	SD	197	0.2	13.1	0.2	37.0	51	12	0.015	6	84	18			
Se-G(8)HAC	Mean	8,043	10.7	2.9	-	4.3	3,907.0	14,880	1,667	0.845	40,970	38,340	861	108,681	69,480
	SD	27	0.4	1.9	0.2	18.0	152	3	0.079	277	105	3			
Se-G(4)HAC	Mean	6,861	8.3	1.2	-	5.9	3,899.0	16,850	1,761	0.651	37,760	36,230	918	104,286	67,138
	SD	16	0.2	0.7	0.1	.	96	10	0.025	212	91	3			
Se-G(2)HAC	Mean	8,489	9.4	1.1	-	2.3	3,907.0	21,390	1,794	0.682	41,330	41,730	1,036	119,687	76,921
	SD	55	0.3	0.3	0.1	6.0	175	3	0.040	393	136	2			
Se-G(1)HAC	Mean	14,000	9.5	1.7	-	0.4	4,204.0	19,580	2,044	0.781	29,310	34,770	1,492	105,414	69,152
	SD	34	0.1	0.2	0.1	20.0	64	10	0.005	92	78	7			
Se-G(0.5)HAC	Mean	19,120	11.2	2.3	1.9	5,995.0	17,600	2,274	0.741	19,870	27,940	2,471	95,289	64,878	
	SD	34	0.1	0.4	0.1	19.0	107	5	0.030	75	48	3			
Se-I(0)HAC	Mean	24,120	12.7	5.2	7.2	6,941.0	13,600	2,482	0.864	8,734	19,670	2,954	78,530	55,906	
	SD	254	0.2	1.5	0.1	31.0	43	7	0.018	52	39	7			
Se-I(8)HAC	Mean	6,793	6.9	3.8	-	4.8	2,826.0	8,726	708	1.923	51,660	43,200	836	114,757	70,721
	SD	38	0.3	1.9	0.1	12.0	49	5	0.062	282	133	5			
Se-I(4)HAC	Mean	19,510	12.4	3.0	4.1	6,423.0	12,120	2,095	3.247	22,320	26,350	2,425	91,269	62,494	
	SD	69	0.1	0.3	0.1	14.0	108	11	0.039	155	57	5			
Se-I(2)HAC	Mean	18,670	10.9	3.9	2.5	5,653.0	12,660	1,880	1.812	25,590	29,760	2,130	96,362	64,472	
	SD	29	0.4	0.3	0.1	1.0	92	5	0.021	34	76	7			
Se-I(1)HAC	Mean	22,780	12.6	4.9	4.6	6,091.0	15,000	2,327	1.548	21,340	29,660	2,843	100,065	67,562	
	SD	177	0.4	0.4	0.1	17.0	137	18	0.016	118	139	13			
Se-I(0.5)HAC	Mean	26,360	13.1	2.3	7.3	6,943.0	14,940	2,707	1.313	13,100	24,890	3,059	92,025	64,076	
	SD	85	0.3	0.1	0.1	36.0	48	5	0.044	68	98	3			

Table 10. 선제조 M-WPS를 기질로 하는 MWPS-HAC신규제조법 정립 결과 (SeWPS-HAC제외)

축매인자 처리여부	기질 핵산류	M-HAC 소제류	핵산투입량(g. M-WPS 40ml기준)						제조기법 정립여부	비고
			0	8	4	2	1	0.5		
비 열 처 리	GMP	Ca-GHAC	-	+++	+++	+++	+++	+++	정립	선택
		Fe-GHAC	-	+++	+++	-	-	-	정립	선택
		Zn-GHAC	-	-	-	-	-	-		
		Cu-GHAC	-	-	-	-	-	-		
		Se-GHAC	-	-	-	-	-	-		
	IMP	Ca-IHAC	-	-	-	-	-	-		
		Fe-IHAC	-	-	-	-	-	-		
		Zn-IHAC	-	+++	+++	+++	+	+	정립	
		Cu-IHAC	-	-	-	-	-	-		
		Se-IHAC	-	-	-	-	-	-		
열 처 리	GMP	Ca-GHAC	-	+++	+++	+++	+++	+++	정립	
		Fe-GHAC	-	+++	+++	-	-	-	정립	
		Zn-GHAC	-	-	-	-	-	-		
		Cu-GHAC	-	+++	+++	+++	+++	+++	정립	선택
		Se-GHAC	-	-	-	-	-	-		
	IMP	Ca-IHAC	-	-	-	-	-	-		
		Fe-IHAC	-	+++	-	-	-	-		
		Zn-IHAC	-	+++	+++	+++	+++	+++	정립	선택
		Cu-IHAC	-	+	+	+++	+	+	정립	
		Se-IHAC	-	-	-	-	-	-		

6 절 유기태 미네랄 소재류 대량생산시스템 개발

[천연촉매제 적용, 외부간섭저항형, 킬레이팅 및 생산수율 동시증대형]

1. 연구목적

본 연구는 선행연구개발 및 현장 대량생산생산시스템 정립과 정립기법을 적용시 된 “5종 유기태화 미네랄 소재류(촉매인자 : 온도적용)” 의 가장 큰 문제는 생산수율이 낮다는 것이었는데, 산업화를 위하여는 생산 제품의 가격이 소비자가 요구하는 최저수치를 충족하여야 하는데 이를 해결함에 있어 문제점으로 대두 되었다. 이를 해결하기 위한 수단으로 미네랄 킬레이팅 및 외부인자저항성 효능을 보유하는 촉매인자 개발과 생산효율을 증대시킬 수 있는 촉매제 개발이 필요함을 당초 제시한 바 있다. 따라서, 본 연구에서는 사전연구된 결과를 기준으로 외부인자저항형, 미네랄 킬레이팅 효능과 생산수율이 동시에 증가되는 신규 유기태화 소재류 대량생산법을 다음과 같이 정립하였다.

2. 연구수행방법

신규한 유기태화 미네랄 소재류 제조관련 표준제조법은 다음과 같다.

가. CaWPS-HAC(칼슘-핵산 유기태화 미네랄 소재 제조법)

CaWPS-HAC의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 선발된 유청단백질은 일반제품이면 유기태화 소재 개발을 위한 기질로서 적용 가능하다. 기질내 미네랄 킬레이팅을 유도하기 위한 무기태 미네랄류는 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재류중 식품첨가물로 허가된 전체 칼슘소재가 사용가능하지만 제성과 원료확보의 편리성을 고려하여 이중 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 소재로 적용한다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준) 대비 미네랄류는 2 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다. 생산수율 극대화가 확보되는 CaWPS-HAC소재류 개발을 위한 핵심 핵산류는 GMP 이고, 첨가량은 유청분말 500Kg 대비 2Kg~320Kg의 범위로 배합하되 바람직하게는 20Kg 이다. 외부인자저항성 및 목표 미네랄 킬레이팅 효능의 극대화가 동시에 가능한 유기태화 반응형 촉매인자인 온도범위는 상온에서 90℃범위까지 기능하지만 바람직하게는 상온조건(비열처리)이 최대 촉매인자 적용조건이다. 촉매인자 및 개발 천연 촉매제를 적용하는 이외의 조건은 표준유기태화 제조법(Cu-WPS)과 동일하지만 다만 비열처리 조건으로 유기태화 반응을 종결하여야 하는점이 차이점이다.

나. FeWPS-HAC(철분-핵산 유기태화 미네랄 소재 제조법)

FeWPS-HAC의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 선발된 유청단백질은 일반제품이면 유기태화 소재 개발을 위한 기질로서 적용 가능하다. 유기태화 반응을 유도하기 위한 무기태화 미네랄은 식품첨가물로 허가된 철분소재류가 전체 사용이 가능하지만 이중 제성과 원료확보의 편리성을 고려 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 소재로 적용한다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준) 대비 미네랄류는 2 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을

기준 제조법으로 하였다. 생산수율 극대화가 확보되는 FeWPS-HAC소재류 개발을 위한 핵심 핵산류는 GMP이고, 첨가량은 유청분말 500Kg 대비 2Kg~320Kg의 범위로 배합하되 바람직하게는 160Kg이다. 외부인자저항성 및 목표 미네랄 킬레이팅 효율의 극대화가 동시에 가능한 유기태화 반응형 촉매인자인 온도범위는 상온에서 90℃범위까지 기능하지만 바람직하게는 상온조건(비열처리)이 최대 촉매인자 적용조건이다. 촉매인자 및 개발 천연 촉매제를 적용하는 이외의 조건은 표준유기태화 제조법(Fe-WPS)과 동일하지만 다만 비열처리 조건으로 유기태화 반응을 종결하여야 하는점이 차이점이다.

다. ZnWPS-HAC(아연-핵산 미네랄 유기태화 소재 제조법)

ZnWPS-HAC의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 선발된 유청단백질은 일반제품이면 유기태화 소재 개발을 위한 기질로서 적용 가능하다. 기질내 미네랄 킬레이팅을 유도하기 위한 무기태 미네랄류는 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재류중 식품첨가물로 허가된 전체 아연소재류 사용가능하지만 제성과 원료확보의 평리성을 고려하여 이 중 ZnSO₄·7H₂O를 적용한다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준) 대비 미네랄류는 2 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다. 생산수율 극대화가 확보되는 ZnWPS-HAC소재류 개발을 위한 핵심 핵산류는 IMP이고, 첨가량은 유청분말 500Kg 대비 2Kg~320Kg의 범위로 배합하되 바람직하게는 20Kg이다.

외부인자저항성 및 목표 미네랄 킬레이팅 효율의 극대화가 동시에 가능한 유기태화 반응형 촉매인자인 온도범위는 상온에서 90℃범위까지 기능하지만 바람직하게는 80℃조건의 열처리 공정첨가가 최대 촉매인자 활용조건이다. 촉매인자 및 개발 천연 촉매제를 적용하는 이외의 조건은 표준유기태화 제조법(Zn-WPS)과 동일하지만 다만 비열처리 조건으로 유기태화 반응을 종결하여야 하는점이 차이점이다.

라. CuWPS-HAC(구리-핵산 유기태화 미네랄 소재 제조법)

CuWPS-HAC의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 선발된 유청단백질은 일반제품이면 유기태화 소재 개발을 위한 기질로서 적용 가능하다. 기질내 미네랄 킬레이팅을 유도하기 위한 무기태 미네랄류는 건강기능식품공전(영양소내 미네랄류)내 등록된 미네랄 소재류중 식품첨가물로 허가된 전체 구리소재가 사용가능하지만 경제성과 원료확보의 평리성을 고려하여 이 중 CuSO₄·7H₂O를 소재로 적용한다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준) 대비 미네랄류는 1 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다. 생산수율 극대화가 확보되는 CuWPS-HAC소재류 개발을 위한 핵심 핵산류는 GMP이고, 첨가량은 유청분말 500Kg 대비 2Kg~320Kg의 범위로 배합하되 바람직하게는 20Kg이다. 외부인자저항성 및 목표 미네랄 킬레이팅 효율의 극대화가 동시에 가능한 유기태화 반응형 촉매인자인 온도범위는 상온에서 90℃범위까지 기능하지만 바람직하게는 80℃의 열처리 공정첨가가 최대 촉매인자 활용조건이다. 촉매인자 및 개발 천연 촉매제를 적용하는 이외의 조건은 표준유기태화 제조법(Cu-WPS)과 동일하지만 다만 비열처리 조건으로 유기태화 반응을 종결하여야 하는점이 차이점이다.

마. SeWPS-HAC(셀레늄-핵산 유기태화 미네럴 소재 제조법)

SeWPS-HAC의 제조를 위한 핵심소재인 기질은 탈지분유 및 유청단백질중 선택하여 사용이 가능하나, 바람직하게는 탈지분유가 기질로서 가장 효율적이다. 기질내 미네럴 킬레이팅을 유도하기 위한 무기태 미네럴류는 건강기능식품공전(영양소내 미네럴류)내 등록된 미네럴 소재류중 식품첨가물로 허가된 전체 구리소재가 사용가능하지만 경제성과 원료확보의 편리성을 고려하여 이중 Na_2SeO_3 를 소재로 적용 하였다. 기본제조를 위한 기초배합비율은 기질 WPS를 5(기준)로 하여, 미네럴류는 0.1 그리고 반응용매로서는 정제수를 10의 비율로 배합함을 기준 제조법으로 하였다. 생산수율 극대화가 확보되는 SeWPS-HAC소재류 개발을 위한 핵심 핵산류는 GMP이고, 첨가량은 유청분말 500Kg 대비 2Kg~320Kg의 범위로 배합하되 바람직하게는 20Kg이다. 외부인자저항성 및 목표 미네럴 킬레이팅 효율의 극대화가 동시에 가능한 유기태화 반응형 촉매인자인 온도범위는 상온에서 80°C범위까지 기능하지만 바람직하게는 80°C의 열처리 공정첨가가 최대 촉매인자 활용조건이다. 촉매인자 및 개발 천연 촉매제를 적용하는 이외의 조건은 표준유기태화 제조법(Cu-WPS)과 동일하지만 다만 비열처리 조건으로 유기태화 반응을 종결하여야 하는점이 차이점이다.

3. 연구수행결과

가. 유기태화 미네럴 소재류 제조법(촉매인자 적용, 촉매류)

본 선행실험실 정립조건을 현장에 적용하여 최종정립된 대량생산시스템은 5종 미네럴-핵산 또는 탈지분유를 기질로 제조 되는 유기태화 소재류의 대량생산공정시스템은(1톤 반응기 적용, Working Vol. : 70% 기준) 9단계로 정리되었다, 현장생산용 공통작업지시서 내용은 다음과 같다,

- 1 단계는, 농축유청액을 건조분말화 하기 위한 Spray Drying공정이며, 이때 균질화 및 제균공정이 동시에 진행되는 단계이다. 제균공정은 HTST(High Temperature Short Time, 85°C, 15초, 1회)시스템을 적용한다.
- 2 단계는, 건조 유청분말과 킬레이팅 반응을 위한 무기태화 미네럴을 혼합하는 단계인데, 혼합비율은 유청분말(5기준) 대비 미네럴류는 1비율로 배합한다.
- 3 단계는, 미네럴과 기질 유청단백질간 1차 유기태화반응을 유도하는 단계인데, 정제수를 유청분말 무게 대비 2배수를 투입하고 용해 및 교반하는 단계인데 1,000rpm이상의 교반속도로 1시간을 반응시킨다. 이때 목표 킬레이팅량의 30%이상이 반응하는 단계이다.
- 4 단계는, 촉매제를 첨가하므로써 생산수율을 증대시키는 단계이다. 첨가량은 CaWPS-HAC 제조시는 GMP 20Kg, FeWPS-HAC 제조시는 GMP 160kg, ZnWPS-HAC제조시는 IMP 20Kg, CuWPS-HAC제조시는 GMP 20Kg, SeWPS-HAC 및 SeSMP-HAC제조시는 GMP 20Kg를 첨가하는 조건이다.
- 5 단계는, 미네럴의 킬레이팅 효과를 증가시키면서 입자화(미네럴 올리고펩타이드 TYPE)를 유도하는 단계로서 소재별로 상온 및 열처리 공정을 첨가 하거나 비첨가 할 수 있

다. 이 단계의 중요성은 입자화가 완료되면 물리 및 이화학적 변화에 크게 안정화가 가능하기 때문에 핵심적인 단계이다. CaWPS-HAC, FeWPS-HAC류, SeWPS-HAC 및 SeSMP-HAC제조시 비열처리가 효과적이고, ZnWPS-HAC, CuWPS-HAC제조시는 80℃ 조건으로 열처리공정을 첨가하는 것이 바람직 하다.

- 6 단계는, 미반응한 잉여 미네랄 및 독성이온(Cl 및 -SO₄) 제거를 위한 세척단계이며, 이때 사용하는 시스템은 원심분리 시스템을 사용하고, 정제수를 사용하여 4회 반복 세척함으로써 미반응 미네랄 및 이온을 제거하는 단계이다.
- 7 단계는, 균질화 공정이다. 유기태화 반응간 유청단백질의 입자는 1.8um까지 성장한다, 따라서 균질화를 통하여 0.2~0.6um까지 균일화를 유도단계이다.
- 8 단계는, 제균공정이며 HTST(High Temperature Short Time, 85℃, 15초, 1회) 시스템을 적용한다. 이는 유기태화 제제 생산을 위한 원료가 고영양성분으로서 미생물의 오염이 쉽게 될 수 있다. 또한, 유기태화 제제 자체가 원료이면서 완제품이므로 제균에 대한 공정이 절대적으로 필요하다.
- 9 단계는, 건조분말화 단계이며, 175℃에서 시간당 적정생산비율(현장고려)로 건조한다.

4. 추후진행사항

- 가. 기존 유기태화 미네랄 제조법의 단점보강연구를 통하여 생산수율 증대 및 외부환경인자 저항형 및 미네랄킬레이팅 증대형 신규 유기태화 미네랄 소재류 제조법을 보강연구를 완료함으로써 경제성이 확보된 신규한 제조법을 완료하였다..
- 나. 개발된 신규 유기태화 미네랄 소재류는 신속히 국내외 특허출원과 등록을 완료하므로써 관련 기술선점을 실시함과 동시에 국내 판매 및 해외수출에 이르는 산업화에 있어 우위선점전략을 확보 하고 저 한다.
- 다. 현장생산시스템 확보부분으로서, 코스닥 상장회사인 (주)아미코젠사와 “개발 유기태화 제품에 대한 3차 시제생산단계” 를 거쳐 “비밀유지 및 OEM생산” 협의를 완료하였다.
- 라. 추후 식품첨가 및 건기식 제품 판매 인허가 확보 부분으로서, 식약처와 “미네랄-핵산 및 탈지분유 기질화 신규 유기태화 미네랄 소재류 5종” 에 대한 협의완료 후, 관련 제품 등록/제조.판매관련 인허가 신청과 등록단계를 완료하고 저 한다.

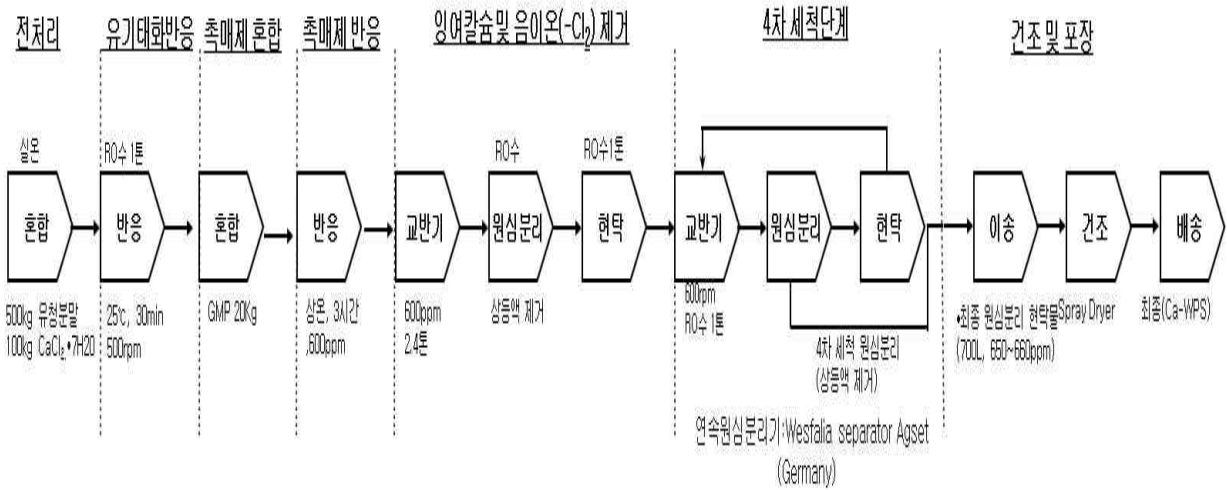


Fig 1. CaWPS-HAC(칼슘-핵산 유기태화) 제조공정도(유청단백질 기질)

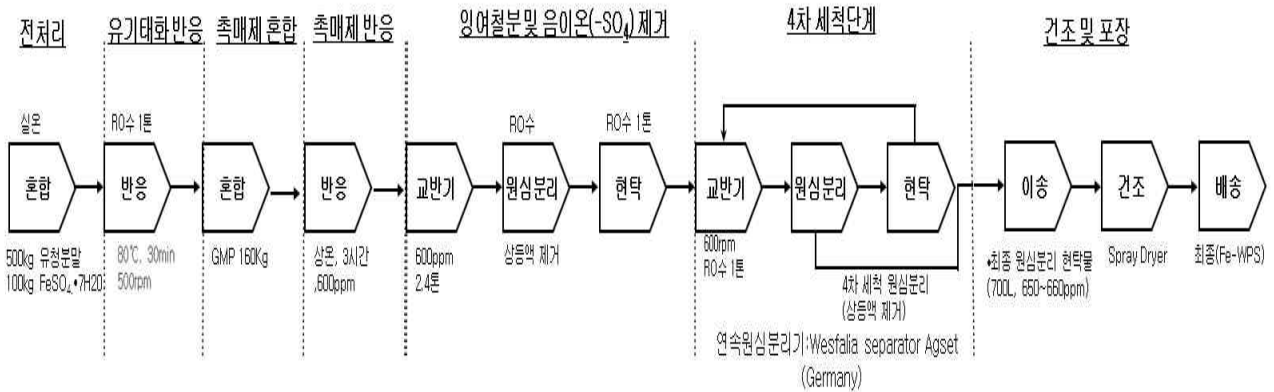


Fig 2. FeWPS-HAC(철-핵산 유기태화) 제조공정도(유청단백질 기질)

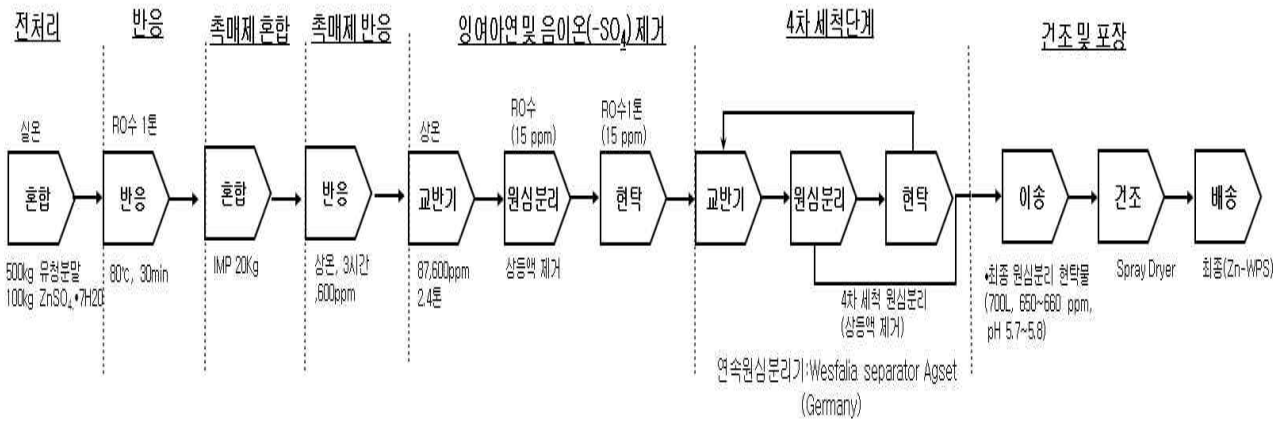


Fig 3. ZnWPS-HAC(아연-핵산 유기태화) 제조공정도(유청단백질 기질)



Fig 4. CuWPS-HAC(구리-핵산 유기태화) 제조공정도(유청단백질 기질)

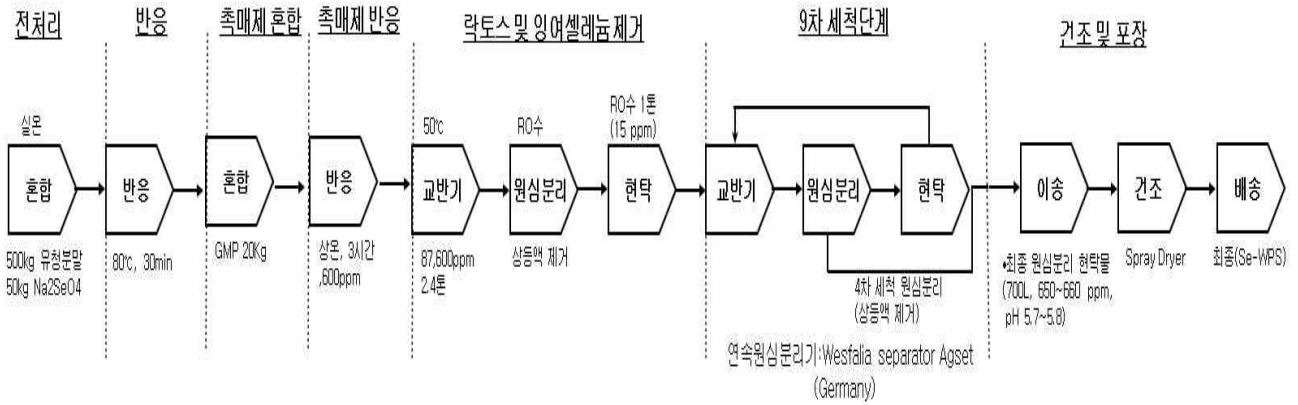


Fig 5-1. SeWPS-HAC(셀레늄-핵산 유기태화) 제조공정도(유청단백질 기질)

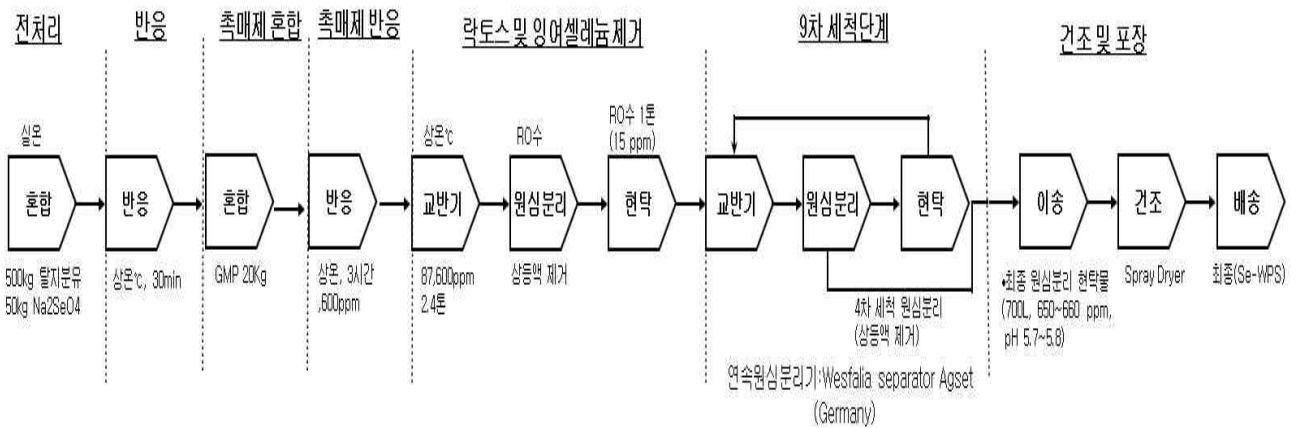


Fig 5-2. SeSMP-HAC(셀레늄-핵산 유기태화) 제조공정도(탈지분유 기질, 상온조건)

제 7 절 과립분산형 유기태화 미네랄 소재 개발(제품화)

1. 연구목적

본 연구는 개발된 개발 유기태화 소재류를 원료로 하여 사료첨가시 현장 편리성 및 사료내 목표 미네랄의 균일성 있는 분산력을 화고할 있도록 제품화 관련 제형 레시피를 확립하였다. 제형성상으로는 사료 첨가시 현장에서 정제수와 혼합시 영유아식 조제분유 수준으로 첨가시 분산과 용해가 쉽도록 한 과립형으로 하여 레시피를 정립하였다. 개발 유기태화 소재류는 본 과제의 미네랄 강화 사료류 제조 이외에 추후 식품분야 및 건강기능식품 및 미네랄 결핍 해소형 의약품분야 까지 사업화 진출을 염두에 두고 있으므로 과립분산형을 포함한 정제형(타정형) 까지 동시에 정립하였다.

2. 연구수행방법

과립분산형 유기태화 소재류 개발을 위해서, 전체 12종 유기태화 미네랄 소재중 Ca-WPS를 선발하여 이를 제품화(제형화 및 레시피 정립) 개발에 시료로 사용하였다. 이를 위하여, 건강기능성 식품제조회사이면서, 정제형 및 과립형 생산시설을 보유하고 관련 제품개발에 관한 KNOW-HOW를 충분히 보유하고 있는 아미코젠사(경남 진주소재)에 의뢰하여 제형별 레시피를 정립하였다.

제형화를 위한 소재선발 및 제조방법은 실무자 협의후 진행되었는데, 선발 Ca-WPS를 이용한 제형화 레시피는 이외 11종의 유기태화 미네랄 소재류에 공통 적용가능하도록 설계되었다.

3. 연구결과

사료첨가 및 추후 용도용법 및 적용성 확대를 위한 과립분산형 유기태화 미네랄 소재류의 제조 레시피는 폴리텍스트로스, 이소말트, 스테아린산마그네슘 및 HPMC를 기준으로 최종 배합비를 설정하였으며, 과립입자 사이즈는 20mesh이내가 되도록 제조되었다(그림 1, 표 1~2).

최초 원료인 Ca-WPS(87,000ppm)소재를 이용하여 제조한 과립분산형 Ca-WPS내 칼슘 함유량은 28,650ppm이었으며, 제조된 유기태화 소재류는 협동연구기관에 공여하여 현장 유효성평가에 적용토록 하였다(표 1, 그림 1).

추후 식품 및 건기식 및 의약품 진출을 위한 제형별 레시피 조건으로서, 정제형은 1정(750mg/1정)으로, 과립형은 1포(Stick 포장)당 2,000mg으로 정하였고 이때 첨가되는 Ca-WPS(칼슘함유량 : 87,000ppm)의 칼슘 함유량은 정제형은 50mg을 기준으로 과립형은 100mg이 되도록 조건을 부여하였다(그림 2, 표 2).

제형별 섭취에 따른 조건으로서, 정제형은 위내에서 분해되어 위장관내에서 흡수되도록 제형화 조건을 부여하였고, 과립형은 액상음료를 통한 섭취를 기준으로 하였으므로 액상제품내에서 혼합이 용이토록 하는 조건으로 정하였다.

제형별 제품은 추후 영유아부터 성인까지 전연령대에 적용이 가능하도록 영유아식 제품 제조기준으로 하여 사용재료는 식품공전(식약청, 2010) 및 식품첨가물공전(한국식품공업협회, 2007)에 등재된 재료만을 엄선하여 최종 레시피 조성을 완료하였으며, 과립형 및 정제형 유기태화 칼슘제품의 레시피는 표 2와 같다.

경제성 평가결과로서, 정제형 1정(750mg) 및 과립형 1포(Stick)당 제조단가는 10~15원으로 단일제품으로 사용하든지, 타제품에 첨가하는 경우라도 생산원가에 미치는 영향은 없는 것으로 평가 되었다(표 2).

4. 추후진행사항

Ca-WPS를 이용한 제형화 레시피는 이외 11종의 유기태화 미네럴 소재류에 공통 적용예정이며, 이를 이용하여 현장유효성 평가를 진행예정이다.

개발 12종 유기태화 소재류는 제품화는 원료 및 고부가제품으로 개발과 더불어 추후 국내외 관련산업에 광범위 사용토록 사업화를 진행할 것이다.

Table 1. 과립분산형(용해성 증대) Ca-WPS내 미네럴 함유량 조사결과

Ca-WPS (과립형)	과립분산형(용해성 증대) Ca-WPS내 미네럴 함유량 조사결과(ppm)														
	Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	As	Cd	Hg
Mean	28,650	3.05	0.35	0.86	0.81	283	1,376	1.62	351	0.61	4,208	1,287	ND	ND	ND
Stddev	346	0.07	0.03	0.013	1.15	6.2	32	0.02	4.9	0.03	30	10			



Fig 2. 유기태화 미네랄 소재를 이용하여 제조한 일반 및 과립분산형 Ca-WPS성상 비교
1: 일반 WPS, 2: 저지방 WPS(4% 지방 함유), 3: 과립분산형 Ca-WPS, 4: 일반 Ca-WPS



그림 2. 대량생산시스템 적용 제조된 Ca-WPS와 이를 이용한 기능성 제품

Table 2. 칼슘 유기태화(Ca-WPS)제제의 제형화 및 레시피 정립결과(TYPE : 과립형)

제품명	Ca-WPS(과립)			제형 1 STICK(포)		과립	
	원료명	배합비	mg	단가(원)	Ca함량	50kg 제조(g)	Ca 100mg/2,000mg
조성비	Ca-WPS	60.00	1,200.00	11.20	102	30.00	 Size : << 20mesh
	폴리덱스트로즈	26.00	520.00	4.0		13.00	
	이소말트	10.00	200.00		5.00		
	스테아린산마그네슘	2.000	40.00		1.00		
	HPMC	2.000	40.00		1.00		
	합계	100.00	2,000.00		15.4	50.00	
생산수율	50kg 과립제조시 생산수율 : 95% 수율 적용 (타점갯수: 23,750 stick/2g)						

제 8 절 유기태화 미네랄 소재류의 제품적용성 평가

1. 연구목표

본 과제에서 전체 개발되는 유기태화 미네랄 소재류의 제품화 방향은 다음과 같다. 첫 번째로는 원료로 판매하는 방법, 둘째로는 반제품으로 판매하므로서 최종 소비자가 완제품 제조시 첨가물로 사용하는 방법 그리 셋째로는 개발 제품 자체를 제품화 하는 방법으로 전개할 것이다. 이 과정에서 두 번째의 경우는 소비자의 요구성은 완제품내 첨가시 기존 무기태화 미네랄 소재류의 단점(성상변화, 이미 및 이취유발, 색상변화, 화학반응 유발, 독성유발, 생체흡수저하능력 저하 등)을 해결할 수 있는가 “가” 초미의 관심사항일 것이기 때문에 이의 대책을 확립할 필요가 있다. 이를 검정하기 위한 수단으로 멸균시유(매일유업, 200ml)를 구입한 후 여기에 제조된 유기태화 미네랄 소재를 농도별로 첨가 후 상온 및 저온조건에서 장단기 평가를 실시하였는데, 멸균시유를 제품화 평가 소재로 선발한 이유는 우유내 구성물질의 다양성(다종의 단백질류, 다종의 지방류, 다종의 미네랄류, 다종의 효소류 및 탄수화물류)에 주목하였기 때문이다. 즉, 개발 유기태화 미네랄 소재류를 멸균시유에 첨가시, 이들 구성성분들과의 반응성 및 변화등이 유발되지 않은 경우 제품의 현장 선택성 및 용도용법의 확장될 수 있는 최적의 소재임이 증명되기 때문에 이를 최적 소재로 선발 사용하였다.

2. 연구수행방법

유기태화 기질 준비

본 연구간 사용된 기질 단백질인 유청분말(선행연구결과 적용)은 매일유업(주) 아산공장에서 생산된 제품으로 살균 및 저온분무건조한 WPS를 엄선 주문하여이를 철분-유기태화 소재의 제조에 이용하였다.

유기태화 미네랄 소재류 제조

제품적용성 평가를 위한 유기태화 미네랄 소재류는 선행정립된 표준제조법을 적용하여 총 6종을 제조하였는데, 단일 미네랄이 유기태화된 Ca-WPS, 기질 유단백질에 칼슘을 기본으로 유기태화 하되 철, 아연 구리 및 셀레늄을 추가로 도입한 2종 미네랄 유기태화 소재류 4종과 칼슘과 구리 및 아연을 동시에 유기태화 시킨 3종 미네랄 유기태화 소재를 각각 제조하여 이들을 제품적용성 평가에 적용하였다.

기본 제조를 위한 배합비율은 WPS 5 비율 대비 무기태 미네랄은 1 그리고 반응용매로서 탈이온수(pH 6.7)를 10의 비율로 하여 사전정립된 제조법에 따라 제조하였으며, 반응종료 후 미반응 미네랄 및 독성이온의 제거를 위하여 원심분리하는 세척공정을 4회 반복한 후 이를 동결건조한 분말시료를 제품적용성 평가에 사용하였다.

시험구 조성 및 평가방법

제품화 적용성 평가를 위한 유기태화 미네랄 소재류는 기질 유청단백질내 칼슘 단일종을 킬레이팅 시킨 Ca-WPS첨가구와 그리고 칼슘을 기본으로 하되 별도로 1종 또는 2종의 미네랄을 추가로 동시 유기태화 시킨 소재류를 (Ca+Cu)-WPS, (Ca+Se)-WPS,

(Ca+Zn)-WPS, (Ca+Fe)-WPS 그리고 (Ca+Fe+Se)-WPS 처리구로 총 6종을 선행 제조하여 이를 제품적용성 평가에 사용하였으며, 대조구로서는 멸균시유 자체를 사용하였다. 제품 적용성 평가를 위하여, 멸균유를 40g씩을 정밀하게 분취한 후 여기에 유기태화 미네럴 소재류를 0.3g씩을 첨가 및 혼합과정을 거친 시험구를 다시 열처리전과 열처리(80°C, 30분/1회, 200rpm) 시험구로 분리하는 공정을 거쳐 시험평가 항목인 물리/이화학적 변화를 관찰 하였다.

3. 결과확인

멸균시유(매일유업, 200ml)를 구입한 후 여기에 제조된 유기태화 미네럴 소재를 농도별로 첨가후 상온 및 저온조건에서 장단기 평가를 실시과정에서 침전, 응집성, 부유, 부착 및 pH변화 등의 유발성을 평가 하였다.

4. 연구결과

평가용 유기태화 미네럴 소재류 제조

WPS 대비 단일종 및 2종 및 다종 미네럴 유기태화 소재류내 미네럴을 동시에 유기태화 반응후 제조된 6종의 유기태화 소재류내 미네럴 함유량 분석결과는 다음과 같다(표 1).

단일 미네럴의 킬레이팅화를 통한 제조한 칼슘 유기태화 소재의 경우는 칼슘함유량이 34,260ppm을 보유하고 있었다. 2종 미네럴을 동시 킬레이팅 시킨 (Ca+Cu)-WPS 소재류는 칼슘은 30,250ppm 그리고 Cu는 27,090ppm을 함유하고 있었으며, (Ca+Se)-WPS는 Se만이 14,440ppm을 보유하고 있었고, (Ca+Zn)-WPS소재는 Ca 2,100ppm, Zn:19,040ppm, (Ca+Fe)-WPS소재는 Ca은 38,730ppm 그리고 Fe는 39,980ppm을 함유하고 있는 것으로 조사되었다. 3종 무기태 미네럴류를 동시에 킬레이팅 시켜 제조한 다종 유기태화 소재류내 미네럴류의 분포량을 조사하여 보았더니, 칼슘은 65,840, 철은 39,020ppm 그리고 셀레늄은 114,500ppm의 미네럴 함유량의 구성을 보였다

유기태화 미네럴 소재류 제품적용성 평가

제조된 1종 대비 2종 및 3종을 동시에 유기태화 반응시킨 소재류의 경우도 제품적용성에서 어떠한 물리/이화학적 변화가 유발되는지를 비교 평가용 시료로 사용하였다.

멸균시유(매일유업, 200ml)를 구입한 후 여기에 제조된 유기태화 미네럴 소재류를 농도별로 첨가후 상온 및 저온조건에서 장단기 평가를 실시과정에서 침전, 응집성, 부유, 부착 및 pH변화 등의 유발성을 평가한 결과로서, 3종의 미네럴류를 도입한 다종 미네럴 킬레이팅 유기태화 소재의 경우에서 열처리전에 비교하여 열처리 후에 응고, 부유, 응집 및 겔화 현상이 발생하였으나, 1종 또는 2종의 미네럴을 함유하는 유기태화 미네럴 소재의 경우는 침전 현상을 제외하고는 어떠한 물리/이화학적 변화가 감지 되지 않았다(그림 1).

1종 및 2종의 미네럴 킬레이팅 유기태화 소재류를 멸균시유에 첨가시 침전반응이 유발되는 현상이 유발되었는데, 이는 물리/이화학적 반응으로 인한 것이 아닌 유기태화에 따른 비중증가로 인한 현상으로 평가되었다.

5. 추후진행사항

1종 또는 2종 또는 3종의 미네랄을 킬레이팅 시켜 제조한 유기태화 소재류는 제품적용성에 있어 1종 2종 이내의 미네랄을 킬레이팅 시켜 제조한 유기태화 미네랄 소재류는 안전성이 확인되었다. 그러나, 2종이상의 미네랄류를 동시에 킬레이팅 시켜 제조한 유기태화 소재류는 안전성에 있어 다소 문제가 있었지만, 추후 유기태화 기법의 추가정립 및 킬레이팅 미네랄류 함유량 조절과 제품화 사용기법등의 추가 정립을 통하여 이를 보완한 후 사업화에 있어 중요한 마케팅 자료로 적극 활용할 예정이다.

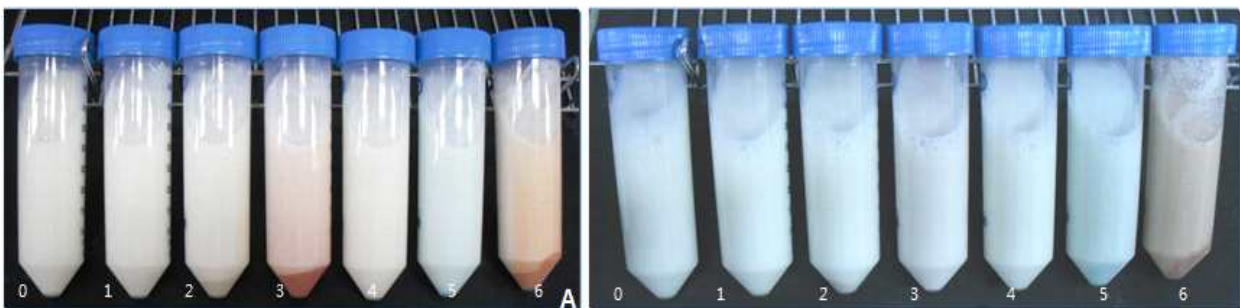


Fig 1. 멸균유 첨가(MC-WPS 0.3g+멸균유 40g mass-Up) 및 열처리전/후(80℃, 30분/1회, 200rpm) 물리/이화학적 반응유발에 정상변화 평가결과
A: 열처리전, B:열처리후, 0: only milk, 1: WPS-Ca, 2:WPS-(Ca+Cu), 3: WPS-(Ca+Se), 4: WPS-(Ca+Zn), 5: WPS-(Ca+Fe), 6 : WPS-(Ca)+Fe+Se)

Table 1 .WPS 대비 단일 및 2종 및 다종 미네랄 유기태화 소재류내 미네랄 함유량 조사결과

MC-Complex시험구 (대상 다종미네랄)	WPS 대비 다종미네랄 처리시 킬레이팅 효과 조사 (동결분말, ppm)					비고
	Ca	Zn	Fe	Cu	Se	
Ca-WPS	34,260 ±1,140	ND	ND	ND	ND	수율:9.5%
(Ca+Cu)-WPS	30,250 ± 841	ND	ND	27,090 ±211	ND	수율:13.74%
(Ca+Se)-WPS	ND	ND	ND	ND	14,440 ±45	수율:4.3%
(Ca+Zn)-WPS	25,100 ±668	19,040 ±176	ND	ND	ND	수율:8.2%
(Ca+Fe)-WPS	38,730 ±568	ND	39,930 ±601	ND	ND	수율:14.5%
(Ca+Fe+Se)-WPS	65,840 ±800	ND	39,020 ±251	ND	114,500 ±717	수율:32.2%

Table 2. 멸균유 첨가(MC-WPS 0.3g+멸균유 40g mass-Up) 및 열처리전/후(80℃, 30분/1회, 200rpm) 물리/이화학적 반응유발에 정상변화 평가결과

시험구	비열처리/열처리(78℃,30min., 1회) 조건 부여에 따른 물성변화						
	침전*	응고	부착	부유	응집	겔화	pH
CNTL(milk)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	6.7/6.8
Milk+[WPS-Ca]	++++*/++++*	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1.55/
Milk+[WPS-(Ca+Cu)]	++++*/++++*	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT/
Milk+[WPS-(Ca+Se)]	++++*/++++*	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT/
Milk+[WPS-(Ca+Zn)]	++++*/++++*	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT/
Milk+[WPS-(Ca+Fe)]	++++*/++++*	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT/
Milk+[WPS-(Ca+Fe+Se)]	++++*/++++*	+/**	-/+	-/+	-/+	-/+	NT/

* : MC-WPS고유비중으로 인한 침전

- 평가 : 변화없음(-), 초기(+), 심함(++), 매우심함(+++)

제 9 절 유기태화 미네럴류 사료첨투촉진형(침투확산 및 전단력 해체형) Surfactant개발

1. 연구목적

본 연구는 개발 전체 12종 유기태화 소재류를 이용한 기능성 미네럴 및 면역글로브린 강화란 및 고급육질의 육계생산 및 항질병 예방 등의 기능성을 평가(1~3년차 연계)함에 가장 중요한 조건은 사료내 목표 미네럴의 균일성 있는 분산효과를 안정적으로 보장하여야 한다. 실제 기본 사료내 미네럴 및 기타 첨가제를 첨가함에 있어 분산력을 증가 시키기 위하여, 일반수에 혼합한 후 이를 첨가하는 방법이 일반적으로 사용되는데, 산란계 사료내 지방 및 입자내 부착 및 침투 및 확산능력을 부여한 다면 보다 목표 미네럴의 안정(전)된 분산이 가능할 것으로 판단되었다. 실제로 제조된 유기태화 소재류중 Ca-WPS(유단백질 기질, 시제품), Fe-OCHT(탄수화물 기질, 시제품)를 대상으로 사료첨가 과정내 문제점을 사전 파악하여 본 결과, 일반수에 용해성이 뛰어났던 Fe-OCHT는 사료내 혼합시 현장 편리성이 확보됨과 동시에 미네럴 분포가 균일성을 보였다. 그러나, Ca-WPS는 밀가루와 같이 일반수와 접촉시 뭉침현상이 발생하므로써 분산력이 감소되는 연계성을 보이면서로서 사료내 목표 미네럴의 분포 역시 불균일성을 보였다. 따라서, 이를 해결하고자 식품첨가물중 일반수에 대한 장력을 해체능을 보유하고 있으면서, 동시에 침투 및 확산 능력을 보유하고 있는 Surfactant를 선발하였다. 또한, 유기태화 미네럴 소재류는 우유단백질을 기질로 사용함에 따라 미생물의 오염으로부터 자유롭지 못하는 이유로 선발 Surfactant를 제조레시피에 첨가하므로써 항균력을 이용한 제품 안전성을 확보하고자 본 연구를 진행하였다.

2. 연구수행방법

배지는 Tryptic Soy Agar(Difco™, Becton, Dickinson and company, USA)를 12°C에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 공시균은 그람양성균 *Bacillus cereus* 및 그람음성균 *Enterobacter sakazakii*를 사용하였고, 배양조건은 37°C에서 18시간 호기성 배양하였다. *Bacillus cereus*는 균수를 고, 중, 소로 나누어 각각 8.0×10^8 (cfu/ml), 8.0×10^5 (cfu/ml), 8.0×10^3 (cfu/ml)로 배지에 50 μ l씩 도말하였고, *Enterobacter sakazakii*는 1.8×10^{10} (cfu.ml), 1.8×10^7 (cfu/ml), 1.8×10^5 (cfu/ml)로 배지에 각각 50 μ l씩 도말하였다. 균 도말 배지 위에 농도별(2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%) surfactant를 30 μ l씩 점적한 후 37°C에서 18시간 호기성 배양하였다. 공시균은 그람양성균 *Bacillus cereus*, 그람음성균 *Enterobacter sakazakii*를 사용하였고, surfactant의 농도별 점적을 통해 항균성과 효능을 평가하였다.

3. 연구결과

전단력 평가에서 매우우수(+++), 우수(++), 보통(+), 효능없음(-) 4가지로 구분하였을 때 침투·확산이 뛰어난 surfactant는 700과 707이었고, 매우 우수(+++)로 판단하였다. 두 개의 surfactant 중 700(surfactant name)이 *E.sakazakii*(그람음성균), *B.cereus*(그람양성균)에 대한 MIC(최소저해농도)가 더 낮았고, *E.sakazakii*(그람음성균) 고농도에서 MIC는 0.5%, *B.cereus*(그람양성균) 고농도에서 MIC는 0.25%이었다.

Table 1. 수용성계 surfactant 항균모델 및 효능평가

구분		전단력평가		농도별 균수 대비 농도별 Surfactant의 항균성 평가(MIC)					
				그람음성균(<i>E.sakazakii</i>)			그람양성균(<i>B.cereus</i>)		
		침투	확산	고농도	중농도	저농도	고농도	중농도	저농도
MODEL 1	700	+++	+++	0.5%	0.25%	0.25%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 2	Q-14S	+++	++	1%	0.1%	0.05%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 3	870	+++	+	1%	0.5%	0.1%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 4	P-1570	+++	++	0.5%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.05%
MODEL 5	F-160	+++	+	0.25%	0.1%	0.1%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 6	F-110	+++	-	0.5%	0.25%	0.1%	1%	0.1%	0.05%
MODEL 7	707	+++	+++	1%	0.5%	0.5%	0.5%	0.25%	0.05%
MODEL 8	750	+++	++	0.5%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.05%
MODEL 9	760	+++	++	-	-	2%	0.25%	0.1%	0.05%
MODEL 10	Q-12S	+++	+	-	-	-	0.5%	0.25%	0.25%
MODEL 11	P-1670	+++	+	-	-	-	2%	0.1%	0.05%
비고		+++ : 매우우수 ++ : 우수 + : 보통 - : 효능없음		MIC 선정 기준 : 성장저지환 형성(항균성 50% 이상)					

- *E.sakazakii*(그람음성균) : 고농도 - 1.8×10^{10} (cfu/ml) 중농도 - 1.8×10^7 (cfu/ml) 저농도 - 1.8×10^5 (Cfu/ml)
 - *B.cereus*(그람양성균) : 고농도 - 8.0×10^8 (Cfu/ml) 중농도 - 8.0×10^5 (Cfu/ml) 저농도 - 8.0×10^3 (Cfu/ml)

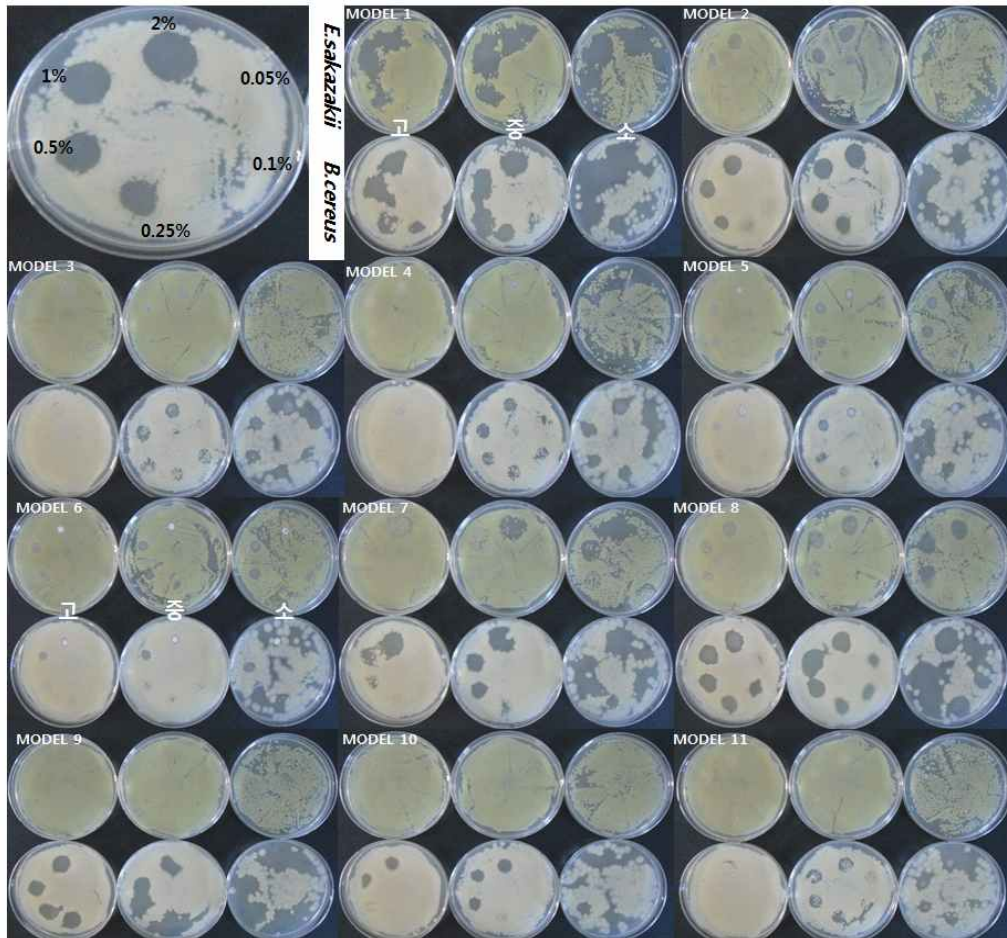


Fig 1. 선발된 11종의 surfactant의 농도별 항균 및 효능평가 결과

- MODEL 1(700), MODEL 2(Q-14S), MODEL 3(870), MODEL 4(P-15700), MODEL 5(F-160), MODEL 6(F-110), MODEL 7(707), MODEL 8(750), MODEL 9(760), MODEL 10(Q-12S), MODEL 11(P-1670)

-*E.sakazakii*(그람음성균):고농도(1.8×10^{10} cfu/ml), 중농도(1.8×10^7 cfu/ml), 저농도(1.8×10^5 cfu/ml)

-*B.cereus*(그람양성균):고농도(8.0×10^8 cfu/ml), 중농도(8.0×10^5 cfu/ml), 저농도(8.0×10^3 cfu/ml)

제 4 장 유기태화 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립

제 1 절 키토산 기질화 기능성 미네랄 강화 사료 제조 및 현장평가

제 1-1 절 기능성 칼슘 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로써 고부가가치를 올릴 수 있게 된다 (Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산 (예; gluconic acid), 다당류 (예; algal polysaccharide), 아미노산 (예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제 (Cu, Zn) 와 기능성 식품 (Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다 (Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다 (Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여 한다 (Yoo 등., 2006., Han 등., 1998).

최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다 (Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

칼슘은 광물질 중 가장 많이 존재하는 무기질 원소로서 체내 칼슘의 99%는 골격 형성에 관여하고, 나머지 1% 정도만이 근수축과 이완, 심장박동, 혈액, 효소 활성, 세포 자극 및 흥분전달 등과 같은 생리 기능에 관여한다 (Einhorn 등., 1990) . 칼슘은 여러 가지 대사과정을 걸쳐 체내에서 약 20~30%가 흡수되며, 나머지는 대소변을 통해 체외로 배설된다.

최근에는 천연자원을 이용한 고이온화 칼슘 제조 기술이 개발되고 있으며, 대량생산과 저장성, 편리성, 안정성의 과제를 해결해 줄 수 있는 기반기술 개발이 절실히 요구되어 지고 있다. 현재 기능성 소재로 사용되는 칼슘 중 국내에서는 해조칼슘이 원료 비중 중 45.6%로 가장 높고, 유청 칼슘이 24.6%로 그 다음 순이다 (Kang 등., 2008, Dickerson., 2007). 칼슘은 소화관 내에서 인산, 피틴산, 옥살산, 과잉 지방 등과 불용성염을 형성하여 이용성이 저하되기 때문에 oligopeptide, CPP (casein phosphopeptide) 와 같은 물질을 이용한 유기태화를 통해 무기태 칼슘보다 흡수율을 높이고 있다 (Park 등., 2012, Kitt 등., 1992, Ashmead., 1991).

본 연구에서는 키토산올리고당을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섭이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 기존 일반사료내 무기 미네랄 대체 조건에서 산란계 안전성 및 생육 패턴을 평가함으로써 최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립 코져 하였다.

2. 연구방법

미네랄 소재류 준비

무기 미네랄류

무기태 미네랄류인 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 (㈜이노바텍 (한국) 에서 구입하여 시험 간 사용하였다.

시험 유기태 미네랄 소재류

키토산 기질화 제조된 유기태 미네랄 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당 (chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네랄을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다. 이중 시험 간 사용된 유기태 칼슘 소재류 (이하, Ca-OCHT) 는 칼슘 120,000 ppm과 나머지는 키토산올리고당이 함유된 구성 이었다.

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱” 을 주문시 칼

습만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 칼슘 함유량을 102,880 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 0.5, 0.75, 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 5종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 칼슘 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 칼슘 미네랄만 제외된 주문식 '산란톱' 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 체제를 0.5배, 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리하는 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 칼슘만을 102,888 mg/Ton (1배 농도, Ca-대조구-G1), 200,576 mg/Ton (2배 농도, Ca-대조구-G2)과 200,576 mg/Ton(4배 농도, Ca-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 칼슘만을 51,440 mg/Ton (0.5배 농도, Ca-유기태구-G0.5), , 77,160 mg/Ton (0.75배 농도, Ca-유기태구-G0.75), 102,880 mg/Ton (1배 농도, Ca-유기태구-G1), 205,760 mg/Ton (2배 농도, Ca-유기태구-G2)와 유기태 칼슘을 가장 높은 첨가량인 411,520 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Ca-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무계 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN) 을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19일), 실험중기 (32-34일), 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

계란 총무계, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무계, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN, CR-400<(Ø8 mm)/CR-410(Ø50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 측정하였다.

두께

섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

기본 사료내 미네럴 및 영양성분 조성

사료영양조성내역

기본사료인 “산란톱” 내 주요 영양성분은 전체 중량 대비 옥수수 50 %, limestone 10.48%, 동물성지방 0.7 %, DDGS 20 %, Mineral premix 0.12 %, lysine 0.32 %, vramin premix 0.11 %, MDCP 0.53 %, MHA (Rhodimet) 0.1 %, Soybean meal 8.9 % 이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1 %, phosphorus 0.53 %, methionine+cystein 0.711 %, crude protein 17 %, crude fat 4.94 %, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789 kcal/kg이었다.

미네럴 함유량 조사

Table 1과 2는 표준 사료인 “산란톱 (중추사료)” 내 미네럴 및 영양성분 조성내역이며, 칼슘은 102,880 mg/Ton, 철분 55,000 ppm, 구리 5,500 ppm, Zn과 Mn은 88,000 ppm이었으며 Se과 요오드는 300과 1,700 mg/Ton이었다.

유기태 미네럴강화 사료내 미네럴 함유량 조사

유기태 강화 사료

사료는 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준 (1배) 으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 칼슘의 경우에는 무기태 미네럴 칼슘을 대체하여 유기태 칼슘을 농도별 (0.5, 0.75, 1, 2, 4배 농도) 로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨

가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다(Table 4).

대조구(정상구) 대비 평가

대조구 대비 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다. 계란품질 항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 대조구 대비 유기태 칼슘 시험구의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 1배, 가식부 무게 4배, 난각 두께 2배, 난백과 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 1~2배였다. 산란계 대상 성장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구) 는 2배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 대조구 대비 1~2배였다.

무기태 칼슘 대비 평가

무기태 칼슘 대비 유기태 칼슘시험구의 각 평가항목별 최적 농도는 계란품질 항목 평가의 경우 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 0.75배, 난각 두께 0.75배, 난백 및 난황 높이 3배, 난각 및 난황색 0.5배였다. 산란계 대상 성장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구) 는 0.5배, 산란율은 0.75배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 무기태 칼슘 대비 0.5~0.75배였다

계란품질 평가

총무게 변화

Table 5는 정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 전체 무게를 측정하였다. 대조구 대비 섭이 19일째에 Ca-대조구는 -0.78~10.13 %, Ca-시험구는 -3.16~6.86 %로였다. 대조구 대비 Ca-시험구-G4군이 6.86 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 33일째에 Ca-대조구는 4.83~9.80 %, Ca-시험구는 -8.70~1.48 %였다. 대조군 대비 Ca-시험구-G0.5군이 1.48 %로 가장 많이 증가하였다. 대조구 대비 섭이 43일째에 Ca-대조구는 4.09~20.24 %, Ca-시험구는 -0.63~7.03 %였다. 대조구 대비 Ca-시험구-G0.5군이 7.03 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

계란 가식부 생중량 변화

Table 6은 일반사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘이 혼합된 사료를 산란계에 섭이시킨 후, 계란 가식부(난황과 난백) 생중량을 측정하였다. 대조구 대비 섭이 19일째에 Ca-대조구는 0.31~2.75 %, Ca-시험구는 -2.03~1.04 %였다. 대조구 대비 Ca-시험구-G0.5군이 1.04 %로 가장 많이 증가하였다. 대조구 대비 섭이 33일째에 Ca-대조구는 -3.12~0.16 %, Ca-시험구는 -6.81~-0.25 %였다. 대조구 대비 섭이 43일째에 Ca-대조구는 0.15~3.49 %, Ca-시험구는 -1.76~4.1 %로 Ca-시험구-G2을 제외한 다른 실험군에서 증가하는 것을 확인하였다. 대조구 대비 Ca-시험구-G0.75군이 4.1 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적

농도는 0.75배였다.

가식부 건조중량 변화

Table 7은 일반사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 혼합된 사료를 산란계에 섭이시킨 후, 가식부위(난황과 난백)의 건조중량을 측정했다. 대조구 대비 섭이 19일째에 Ca-대조구는 29.8~32.4 %, Ca-시험구는 29.8~31.1 %로 모든 Ca-시험구에서 가식부 건조중량이 증가하였다. 건조무게가 가장 많이 증가한 군은 Ca-시험구-G0.75으로 대조구 대비 37 % 증가하였다. 대조구 대비 섭이 33일째에 Ca-대조구는 8.9~10.8 %, Ca-시험구는 -4.3~15.0 %로였다. 대조구 대비 섭이 43일째에 Ca-대조구는 16.1~26.4 %, Ca-시험구는 16.1~29.6 %로 모든 Ca-시험구에서 가식부 건조 중량이 증가하였다. 건조 무게가 가장 많이 증가한 군은 Ca-시험구-G0.75군으로 대조구 대비 29.6 % 증가하였다.

본 실험 결과를 통해 가식부 건조무게 변화에 유기태 및 무기태 사료가 관여하는 것을 알 수 있었으며, 유기태와 무기태 칼슘 사료는 무게 변화 차이가 없다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 정상군 대비 유기태 칼슘군의 가식부의 무게 변화는 섭이 19, 43일째에 관찰되었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8은 일반사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 난각 두께를 측정하였다. 대조구 대비 섭이 19일째에 Ca-대조구는 4.9~9.4 %, Ca-시험구는 0.8~14.1 %로 모든 Ca-시험구에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 대조구 대비 Ca-시험구-G0.5군이 14.1 %로 난각 두께가 다른 군에 비해 가장 많이 증가하였다. 대조구 대비 섭이 33일째에 Ca-대조구는 -0.8~10.7 %, Ca-시험구는 3.3~15.2 %로 모든 Ca-시험구에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 대조구 대비 Ca-시험구-G0.75군이 15.2% 난각 두께가 다른 군에 비해 가장 많이 증가하였다($P<0.05$).

대조구 대비 섭이 43일째에 Ca-대조구는 6.5~8.0 %, Ca-시험구는 0.4~10.8 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 대조군 대비 Ca-시험구-G2군이 10.8 % 난각 두께가 다른 군에 비해 더 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 0.75배였다.

계란 난각 착색도 변화

Table 9는 유기태 사료류 섭이에 따른 계란 난각의 색차 변화에 미치는 효과 평가 결과이다. 칼슘을 포함한 미네랄이 함유된 표준사료를 섭이 시킨 대조구의 색차 변화는 섭이 19일째, 33일 그리고 43일째에 보았더니, L값은 61.67에서 61.97, 58.98, a값은 15.95에서 13.32, 18.12 그리고 b값은 28.83에서 33.03 및 37.31의 측정 결과를 보였다. 19일 대비 43일째 L 값(명도)은 4.36 % 감소하였고, a값과 b값은 11.9 % 와 22.7 % 증가하였다.

결과적으로, 일반 사료를 장단기 섭이 시는 난각은 어두우면서 붉은 색 계열은 변동이 심하였으며, 노란색 계열은 지속적으로 증가시키는 패턴을 보였음에 따라 노란색에 영향을 미치는 것으로 평가되었다. 결론으로 일반사료 섭이 시는 밝은 갈색난을 생산하는 패턴임을 확인하였다.

이러한 결과를 기준으로 표준사료에 사용한 칼슘제재에 농도 구배차에서 난각에 미치는 효과

를 확인한 결과, 무기태 경우는 섭이 농도가 높을수록 밝은색을 나타냈으나, 유기태 경우는 섭이 농도가 낮을수록 밝은색을 나타냈었으나, 고농도에서는 검은색을 나타내는 패턴을 보였다. 붉은색 계열(a값)은 농도에 상관없이 감소함으로써 녹색 계열로 이동하는 패턴을 보였다. 무기태 및 유기태 칼슘 제재는 농도별로 처리시 b값(노란색)은 감소시킴으로써 파란색 계열로 이동하는 동일한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 무기태 대비 유기태 사료는 난각의 색차에 영향을 주었는데, 무기태는 밝은 갈색을 그리고, 유기태는 진한 갈색의 발현에 영향을 미치는 것을 확인하였고, 섭이 농도가 높을수록 증가하는 패턴을 보였다.

결론적으로, 유기태 미네럴은 생체 흡수 및 전이 메카니즘을 통하여 계란의 난각의 색차에 영향을 주는 것으로 확인되었으며, 색차에 소비자 기호성이 밝은 갈색난을 요구하는 경우는 1배, 진갈색난은 1배 이상을 섭이시키는 경우였다.

난황 착색도 변화

Table 10은 유기태 사료류 섭이에 따른 계란 난황의 색차 변화에 미치는 효과 평가 결과이다. 칼슘을 포함한 미네럴이 함유된 표준사료를 섭이 시킨 대조구의 색차 변화는 섭이 19일째, 33일 그리고 43일째에 보았더니, L 53.53에서 44.34, 59.96, a값은 1.50에서 1.94, 1.38, b값은 43.51에서 37.25 및 53.18의 측정 결과를 보였다. 19일 대비 43일째 L값(명도)은 10.7 % 증가하였고, a값과 b값은 -8.7 % 감소와 18.2 % 증가하였다. 결과적으로, 일반 사료를 장단기 섭이 시는 난황은 밝아지면서 붉은 색 계열과 노란색 계열은 변동이 심하였으나, 노란색 계열은 증가시키는 패턴을 보였음에 따라 노란색에 영향을 미치는 것으로 평가되었다. 결론으로 일반사료 섭이 시는 밝은 갈색난을 생산하는 패턴임을 확인하였다.

이러한 결과를 기준으로 표준사료에 사용한 칼슘제재에 농도 구배차에서 난황에 미치는 효과를 확인한 결과, 무기태 경우는 섭이 농도가 높을수록 밝은색을 나타냈으나, 유기태 경우는 섭이 농도가 낮을수록 검은색을 나타냈었으나, 고농도에서는 밝은색을 나타내는 패턴을 보였다. 붉은색 계열(a값)은 농도에 상관없이 감소함으로써 녹색 계열로 이동하는 패턴을 보였다. 무기태 및 유기태 칼슘 제재는 농도별로 처리시 b값(노란색)은 증가시킴으로써 노란색 계열로 이동하는 동일한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 무기태 대비 유기태 사료는 난각의 색차에 영향을 주었는데, 무기태는 밝은 갈색을 그리고, 유기태는 진한 갈색의 발현에 영향을 미치는 것을 확인하였고, 섭이 농도가 높을수록 증가하는 패턴을 보였다.

결론적으로, 유기태 미네럴은 생체 흡수 및 전이 메카니즘을 통하여 계란의 난각의 색차에 영향을 주는 것으로 확인되었으며, 색차에 소비자 기호성이 밝은 갈색난을 요구하는 경우는 1배, 진갈색난은 0.5배 이상을 섭이시키는 경우였다.

계란 난황고 변화

Table 11은 유기태 사료류 섭이에 따른 계란 난황의 높이 변화에 미치는 효과 평가 결과이다. 칼슘을 포함한 미네럴이 함유된 표준사료를 섭이 시킨 대조구의 난황고 변화를 섭이 19일째, 33일 그리고 43일째에 보았더니, 14.2에서, 14.09 그리고 14.26의 측정 결과를 보였다. 결과적으로 거의 영향을 주지 않는다는 동일한 패턴을 보였다. 이러한 결과를 기준으로 표준사료에 사용한 칼슘제재에 농도 구배차에서 난황고에 미치는 효과를 확인한 결과, 무기태와 유기태 칼슘 농도가 증가할수록 난황고가 증가하는 것을 확인하였다. 대조구 대비 난백고가 가장 많이 증가한 군은 섭이 33일째 Ca-시험구-G4군으로 10.4 %였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

난백고 변화

Table 12는 유기태 사료류 섭취에 따른 산란율 변화에 미치는 효과 평가 결과이다. 칼슘을 포함한 미네랄이 함유된 표준사료를 섭취 시킨 대조구의 난백고 변화를 섭취 19일째, 33일 그리고 43일째에 보았더니, 6.66에서, 7.84 그리고 6.63의 측정 결과를 보였다. 섭취 초기에는 난백고를 증가시키다가 평가 중기 때는 감소시켰으며, 평가 후기에는 초기 평가 단계와 비슷한 난백고 패턴을 보였다. 무기태 칼슘의 경우에는 섭취 농도가 증가할수록 실험 중기때 감소하다가 실험 후기때는 증가하는 대조구와 유사한 패턴을 보였다. 유기태 칼슘군도 무기태 칼슘 섭취군과 비슷한 패턴을 보였지만, 지속적으로 난백고가 감소하는 것을 확인하였다. 대조구 대비 유기태 칼슘군 중에서 가장 많이 난백고가 증가된 군은 섭취 19일째 Ca-시험구-G2군으로 12.6 %이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

산란계 산란율 변화

Table 13은 유기태 사료류 섭취에 따른 산란율 변화에 미치는 효과 평가 결과이다. 칼슘을 포함한 미네랄이 함유된 표준사료를 섭취 시킨 대조구의 평균 산란수는 10.51개였다. 무기태 칼슘군은 9.75~10.1개, 유기태 칼슘군은 9.8~10.17개였다. 무기태와 유기태 칼슘 섭취 농도가 증가할수록 평균 산란 갯수가 약간 감소하였다. 유기태 칼슘 섭취 군은 무기태 칼슘 사료를 먹인 군과 비교하여 산란수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 0.75배였으며, 무기태 대비 최적농도는 0.75배였다.

산란계 체중 변화

Table 14는 유기태 사료류 섭취에 따른 산란계 체중 변화에 미치는 효과 평가 결과이다. 칼슘을 포함한 미네랄이 함유된 표준사료를 섭취 시킨 대조구의 경우 0일에서 36일, 그리고 49일째에 0.25, -0.11 kg 감소하였다.

무기태 및 유기태 칼슘군의 체중 증감 패턴은 36일째에 모든 군에서 증가하다가, 산란이 본격적으로 진행되면서 49일 경과 시는 모두 감소하였는데, 이는 정상군과 동일한 패턴을 보였다. 유기태 소재류 처리군의 경우는 표준사료를 섭취한 대조구 체중량을 기준으로 평가할 때, 유기태 소재류별 그리고 농도별 처리에 따른 장단기적 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되어 칼슘의 유기태화에 따라 발생될 수 있는 독성 요인은 없는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 유기태화 미네랄 소재류는 최고 4배까지 섭취한다 하더라도 생체중에 미치는 안전성에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

4. 종합결론

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란품질과 산란계 성장 및 안전성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 성장 및 안전성 평가 최적 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 표준 사료 대비 유기태 칼슘 사료의 최적 농도 범위는 1~2배였고, 무기태 대비 0.5~0.75배였다.

바. 무기태 칼슘 미네랄 제제 대체형으로 제조된 유기태 칼슘 제제는 표준 사료를 섭이한 대조구와 무기태 칼슘을 농도별로 섭이한 Ca-대조구에 비해 산란계 성장 및 안전성, 산란계 생산성 등을 향상 시키는 것으로 확인되었다.

사. 유기태 칼슘 소재의 관련 현장평가를 통하여 최종 레시피 완료되어 현장적용성 평가에 공여하였다.

아. 계란의 무게는 난백에서의 수분 감소가 원인이 되어 시간이 지남에 따라 감소되는데 (Lee 등., 1998), 본 연구에서는 유기태 칼슘 처리군에서 계란 전체 무게가 정상군 및 무기태 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 산란계 사료에 고칼슘 급여 시 난각질이 개선되고, 칼슘 첨가량에 따라 난각 강도 및 난각 두께가 일반 대조군에 비해 높은 경향을 나타낸다는 연구 보고와 난각 두께에 영향을 주지 못한다는 보고가 있는데 (Lee 등., 1998, Kwang 등., 2008, Han 등., 1999), 본 연구에서는 정상군과 비교하여 유기태 칼슘군이 난각 두께를 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 산란계 내에서 유기태화 칼슘 흡수율이 증대되면서 계란으로의 전이가 정상군 및 무기태 보다 더 많이 진행되었기 때문에 난각 두께에 영향을 준 것으로 판단되어진다. 키토산이 첨가된 천연미네랄 복합제는 난황 색차 변화에 변화가 없으며, 생약 추출물, 허브를 사료에 첨가하면 난황색이 증가한다는 연구 보고가 있는데 (Yoo 등., 2015, Kim 등., 2015, Udedible 등., 1998), 본 연구에서는 유기태 칼슘 소재가 난황 및 난각색의 명도(L), b(노란색) 값을 정상군 대비 유의성 있게 증가시켰다.

Table 1. 산란계(중추용) 표준 사료내 사용된 무기 미네랄류 및 미네랄 영양원 조성표

원 료 (미네랄 종류)		무기미네랄 첨가량(%) 및 목표미네랄 함유량		사료내 순수 미네랄 함유량 (mg)/1000kg	비고
		사료내 첨가량 (g)	목표 미네랄 함유량 (%)		
Ca	CaCO ₃	261.79	39.3	102,880	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	183.33	30	55,000	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	251.43	35	88,000	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	16.18	34	55,000	
Se	Na ₂ SeO ₂	0.7	43	300	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	283.87	31	88,000	
I	CaIO ₃	0	63	1,700	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	0	33	0	

-(주) 현대사료, 기술연구소 자료

Table 2. 산란계(중추용) 표준사료 (사료 톤당 기준) 내 사용된 영양원소류 조성내역

Ingredients (%)	Layer Feed (20 ~ 29 Week)
Corn	50
Wheat	4.39
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
Chemical composition calculated %	Normal group
Metabolic energy, kcal/kg	2,780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

-(주)현대사료, 기술연구소 자료

Tble 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네랄류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네랄(Ca-OCHT)첨가량별 사료내 미네랄 조성표									
		유기태 소재 첨가량(g/사료톤당)					미네랄 함유량 (mg/1톤)				
		0.5배	0.75배	1배	2배	4배	0.5배	0.75배	1배	2배	4배
Ca	102,880	183	196	261	522	1,044	51,440	77,160	102,880	205,760	411,520
Fe	55,000	183.33					55,000				
Zn	88,000	251.43					88,000				
Cu	5,500	16.18					5,500				
Se	300	0.7					300				
Mn	88,000	-					88,000				
I	1,700	-					1,700				
CO	0	-					0				

Ca-OCHT : 키토산 기질화 칼슘 유기태 소재

Table 4. 키토산 기질 유기태 칼슘 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

생장 및 안전성 평가 최적 농도						
주요평가항목		세부 평가 항목		평가 결과		
				대조구 대비	무기태 대비	
계란품질		총무게		2배 (17.7%)	2배 (16.1%)	
		가식부 무게 (건조)		1배 (33.4%)	1배 (21.1%)	
		가식부 무게 (비건조)		4배 (2.4 %)	0.75배 (4.4 %)	
		난각두께		1배 (21.7%)	0.75배 (19.6%)	
		난황높이		4배 (12.9%)	4배 (19.8%)	
		난백높이		4배 (22.2%)	4배 (27.8%)	
		난황색		(L, 명도)	4배 (15.6%)	0.5배 (20.6%)
				(a, 붉은색)	1배 (37.7%)	2배 (20.7%)
				(b, 노란색)	2배 (20.7%)	0.75배 (23.8%)
		난각색		(L, 명도)	4배 (28.1%)	0.5배 (32.7%)
				(a, 붉은색)	2배 (70.8%)	0.5배 (74.3%)
				(b, 노란색)	4배 (39.2%)	0.5배 (45.8%)
		생장 및 안전성평가	생장특성	생장율		4배 (15.7%)
혈액안전성	적혈구		4배 (15.7%)	2배 (41.5%)		
	백혈구		2배 (13.7%)	0.75배 (29.8%)		
	림프구		2배 (-1.35%)	0.5배 (32.5%)		
최종 레시피 정립 결과(현장적용성 평가 공여)				1~2배	0.5~0.75배	

Table 5. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 계란 무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)		
		19일	33일	43일
대조구	-G1	52.86 ± 3.79	55.19 ± 5.1	51.86 ± 2.53
Ca-대조구	-G1	52.45 ± 2.89	58.67 ± 3.24	51.39 ± 6.59
	-G2	54.99 ± 4.39	57.99 ± 2.96	54.07 ± 4.84
	-G4	58.82 ± 3.37	51.19 ± 6.11	55.01 ± 3.14
Ca-시험구	-G0.5	51.24 ± 3.27	56.02 ± 2.2	55.78 ± 2.84
	-G0.75	51.53 ± 4.11	52.61 ± 2.95	54.56 ± 1.81
	-G1	51.78 ± 2.72	53.85 ± 2.70	52.06 ± 1.88
	-G2	54.77 ± 2.09	53.92 ± 3.52	54.83 ± 3.28
	-G4	56.75 ± 2.90	50.78 ± 6.17	51.53 ± 8.29

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 가식부무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태, 단위: g)		
		19일	33일	43일
대조구	-G1	85.03±1.46	86.16±1.31	84.58±2.24
Ca-대조구	-G1	85.32±1.21	83.61±2.40	86.57±2.00
	-G2	87.43±1.24	86.25±1.46	84.70±1.40
	-G4	85.29±3.07	86.36±1.59	87.64±1.88
Ca-시험구	-G0.5	85.93±1.65	80.72±2.12	85.07±1.27
	-G0.75	85.49±1.37	84.74±2.67	88.20±8.07
	-G1	85.50±0.64	83.77±0.98	83.13±2.21
	-G2	85.39±1.33	86.44±2.35	83.12±1.75
	-G4	83.33±6.72	84.39±1.30	85.84±0.81

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 가식부무게 변화

시험구		가식부무게 (건조상태, 단위: g)		
		19일	33일	43일
대조구	-G1	15.73 ± 3.04	20.64 ± 2.16	17.05 ± 2.15
Ca-대조구	-G1	23.06 ± 0.32	23.16 ± 3.91	21.24 ± 1.26
	-G2	23.26 ± 0.39	22.89 ± 2.49	23.15 ± 2.91
	-G4	22.40 ± 1.16	22.67 ± 1.94	20.31 ± 0.58
Ca-시험구	-G0.5	22.41 ± 0.23	19.78 ± 0.68	20.64 ± 0.68
	-G0.75	25.33 ± 0.79*	21.07 ± 1.43	24.21 ± 2.92*
	-G1	24.14 ± 0.16*	24.29 ± 3.66	21.03 ± 4.01
	-G2	22.75 ± 1.14	21.13 ± 0.76	22.01 ± 2.14
	-G4	25.01 ± 3.70*	21.29 ± 0.63	20.33 ± 1.01

*P<0.05 as compared with Group 1

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)		
		19일	33일	43일
대조구	-G1	0.38±0.04	0.39±0.03	0.38±0.01
Ca-대조구	-G1	0.42±0.03	0.44±0.01	0.42±0.01
	-G2	0.42±0.06	0.41±0.01	0.41±0.01
	-G4	0.40±0.02	0.39±0.03	0.42±0.03
Ca-시험구	-G0.5	0.45±0.01	0.44±0.04	0.40±0.03
	-G0.75	0.39±0.01	0.46±0.01 [*]	0.40±0.02
	-G1	0.42±0.01	0.42±0.03	0.40±0.02
	-G2	0.41±0.01	0.40±0.08	0.43±0.02 [*]
	-G4	0.43±0.01	0.42±0.02	0.39±0.02

* $P < 0.05$ as compared with Group 1

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 난각 색차 변화

시험구			난각 색차 (단위:nm)		
			19일	33일	43일
대조구	-G1	L	61.67±4.51	61.97±1.83	58.98±1.03
		a	15.95±3.01	13.32±2.72	18.12±1.49
		b	28.83±5.92	33.03±2.30	37.31±0.04
Ca-대조구	-G1	L	63.33±1.41	61.64±0.89	59.74±5.51
		a	16.21±1.85	15.68±0.89	19.80±2.57
		b	34.57±0.44	30.53±0.33	32.70±2.88
	-G2	L	59.42±7.53	63.29±3.09	66.63±3.46
		a	19.27±4.23	15.07±2.40	13.45±1.43
		b	34.77±2.39	27.87±5.22	31.13±0.51
	-G4	L	57.87±0.62	57.97±4.00	61.12±3.53
		a	21.24±2.06	18.45±1.53	18.30±2.74
		b	33.85±1.72	30.21±3.73	35.51±1.92
Ca-시험구	-G0.5	L	67.55±3.18	62.08±3.38	70.63±3.83*
		a	14.79±2.73	14.19±1.00	12.38±2.23
		b	30.47±2.88	26.53±6.75	26.63±4.15
	-G0.75	L	57.52±2.34	65.62±1.98	66.27±6.75
		a	17.99±1.95	14.81±2.94	15.82±4.28
		b	35.12±0.41	30.01±1.58	32.13±0.51
	-G1	L	64.35±1.96	60.93±7.97	62.56±6.17
		a	16.54±1.47	14.78±1.98	17.28±2.00
		b	33.81±2.55	30.09±0.41	28.37±5.36
	-G2	L	65.46±2.53	62.47±0.70	62.56±6.17
		a	13.24±0.93	12.87±1.57	17.28±2.00
		b	32.86±2.83	26.13±3.73	28.37±5.36
	-G4	L	64.74±6.22	63.46±4.41	67.08±3.13*
		a	13.68±1.99	13.70±1.63	12.79±0.47
		b	32.74±3.08	30.70±1.05	25.46±0.65

*P<0.05 as compared with Group 1

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 난황 색차 변화

시험구			난황 색차 (단위:nm)		
			19일	33일	43일
대조구	-G1	L	53.53±4.58	44.34±0.57	59.96±1.83
		a	1.50±0.29	1.94±0.88	0.38±0.01
		b	43.51±9.42	37.25±3.09	53.18±0.26
Ca-대조구	-G1	L	57.04±1.05	43.49±4.42	51.47±8.70
		a	0.98±0.19	2.62±1.34	1.55±0.89
		b	54.89±6.55	34.85±6.12	40.96±10.42
	-G2	L	59.08±4.32	43.13±4.17	56.67±6.50
		a	1.16±0.12	3.91±1.44	0.87±0.26
		b	61.01±4.25	33.38±4.67	48.70±5.62
	-G4	L	54.72±3.02	43.42±1.95	59.28±1.38
		a	0.99±0.25	2.20±0.64	0.99±0.65
		b	45.1±5.01	33.22±1.70	52.31±0.65
Ca-시험구	-G0.5	L	56.18±4.43	44.93±1.76	53.41±1.85
		a	1.16±0.88	3.79±0.74	0.87±0.72
		b	47.62±3.89	33.25±1.95	44.91±6.73
	-G0.75	L	60.73±0.09	48.96±0.09	54.31±7.14
		a	0.44±0.07	2.47±0.33	0.38±0.10
		b	43.67±11.38	35.39±5.07	47.90±10.36
	-G1	L	58.44±0.49	51.90±5.00	61.08±2.89
		a	0.5±0.32	1.77±0.42	1.10±0.22*
		b	52.41±4.83	35.45±2.86	56.44±6.46
	-G2	L	56.06±6.75	49.56±0.34	51.69±3.64
		a	0.74±0.51	1.76±0.52	1.43±0.14*
		b	49.61±7.59	39.08±0.77	42.00±6.90
	-G4	L	55.30±6.81	43.78±1.67	54.47±5.94
		a	1.20±0.62	0.79±0.11	0.77±0.58
		b	48.61±6.39	35.57±2.05	49.48±11.79

* $P<0.05$ as compared with Group 1

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 난황고 변화

시험구		난황고 (단위:mm)		
		19일	33일	43일
대조구	-G1	14.20±1.20	14.09±0.05	14.26±0.58
Ca-대조구	-G1	13.68±1.01	15.02±1.28	14.30±0.13
	-G2	13.69±0.59	16.20±1.12	15.40±0.45
	-G4	14.30±0.80	15.03±0.81	15.55±1.07
Ca-시험구	-G0.5	15.03±0.49	14.52±0.21	15.15±0.72
	-G0.75	14.12±0.57	14.54±0.49	14.76±0.56
	-G1	14.37±0.22	15.02±1.82	15.12±0.12*
	-G2	14.05±1.38	15.59±1.03	14.07±0.30
	-G4	14.33±1.70	15.72±1.70	15.16±1.48

* $P < 0.05$ as compared with group 2

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 난백고 변화

시험구		난백고 (단위:mm)		
		19일	33일	43일
대조구	-G1	6.66±0.19	7.84±0.78	6.63±0.76
Ca-대조구	-G1	6.73±0.77	6.16±0.46	8.23±1.18
	-G2	7.31±0.51	7.25±0.40	6.49±0.33
	-G4	7.10±0.25	6.73±0.91	8.94±0.71
Ca-시험구	-G0.5	7.35±0.11 [*]	5.42±0.50	6.86±0.31
	-G0.75	6.85±0.12	6.92±0.58	6.49±0.55
	-G1	7.09±0.31	5.93±0.32	6.51±0.52
	-G2	7.62±0.37 [*]	4.91±1.47	6.31±0.12
	-G4	7.01±0.11	5.39±0.92	6.58±1.13

^{*}P<0.05 as compared with Group 1

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 산란수 변화

시험구		산란수 (단위:개) <섭이기간:45일>	
		총 산란수	평균산란수
대조구	-G1	473	10.51
Ca-대조구	-G1	455	10.11
	-G2	450	10.0
	-G4	439	9.75
Ca-시험구	-G0.5	448	9.95
	-G0.75	458	10.17
	-G1	456	10.13
	-G2	441	9.8
	-G4	447	9.8

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 14. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료 체중 증가 효과

시험구		체중 증가(단위:kg)				
		0일	36일		49일	
			평균무게	증감(+/-)	평균무게	증감(+/-)
대조구	-G1	1.64	1.89	0.25	1.77	-0.11
Ca-대조구	-G1	2.06	2.04	-0.01	1.79	-0.25
	-G2	1.92	2.12	0.21	1.71	-0.41
	-G4	1.92	2.07	0.15	1.75	-0.31
Ca-시험구	-G0.5	1.96	2.12	0.17	1.77	-0.35
	-G0.75	1.76	2.16	0.40	1.77	-0.38
	-G1	1.92	1.98	0.06	1.81	-0.17
	-G2	1.87	2.12	0.25	1.80	-0.32
	-G4	1.39	2.06	0.67	1.78	-0.27

대조구-G1:대조구(일반사료섭이),Ca-대조구-G1:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-대조구-G2:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),Ca-대조구-G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),Ca-시험구-G0.75:유기태시험구(칼슘첨가량:77,160mg/1톤사료),Ca-시험구-G1:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),Ca-시험구-G2:유기태시험구(칼슘첨가량:200,576mg/1톤사료),Ca-시험구-G4:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 1-2 절 기능성 철 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

철은 생체 내 거의 모든 대사에 필수 성분으로 비교적 소량이 필요한 광물질 중 하나이지만, 결핍되기 쉬운 영양소로 주요 영양 문제가 되고 있다(Bezkorovainy 등., 1989, Finch 등., 1986, Hallberg., 1984). 생체 내에서 중요한 기능을 하는 철은 자연 상태인 경우 금속염의 경우, 생체내로 흡수될 때 체내 흡수율이 아주 낮아져 그 이용률이 문제점으로 제기되어 왔다. 식품에 함유되어 있는 철은 그 함량도 중요하지만 실제적으로 이용되는 정도를 평가하는 생체 내 이용도가 매우 중요하다(Fritz 등., 1970, Hallberg., 1981, Monsen., 1988). 가축 사료에 첨가되는 철은 제 1철염이 철 첨가제로 대부분 이용되고 있으나, 이들은 체내 흡수율이 비교적 낮고 분뇨로 배설이 많아질 경우, 토양과 목초 등에 오염문제가 발생할 수 있어 철의 흡수율이 높은 철 강화 사료의 개발이 필요하다(Yang 등., 2004).

본 연구에서는 키토산올리고당을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섭이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평

축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 기존 일반사료내 무기 미네랄 대체 조건에서 산란계 안전성 및 생육 패턴을 평가함으로써 최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립 코져 하였다.

2. 연구방법

미네랄 소재류 준비

무기 미네랄류

무기태 미네랄류인 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 (주)이노바텍 (한국) 에서 구입하여 시험 간 사용하였다.

시험 유기태 미네랄 소재류

키토산 기질화 제조된 유기태 미네랄 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당 (chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네랄을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다. 이중 시험 간 사용된 유기태 철 소재류 (이하, Fe-OCHT) 는 철 55,000 ppm과 나머지는 키토산올리고당이 함유된 구성 이었다.

비교 유기태 미네랄 소재류(아미네이트 타입)

키토산 기질 유기태 시험 사료와의 비교를 위한 아미네이트 타입 Fe을 (동우화학, 한국) 구입하여 키토산 기질 유기태 미네랄 비교시험구를 위한 산란계 사료에 혼합하여 제조(1배)하는데 사용하였다.

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(철) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱” 을 주문시 철분만을 제외한 사료 톤당 유기태 철 소재 내 순수 철 함유량을 55,000 ppm을 첨가한 시험군 (이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 3종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 철 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 칼슘 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리하는 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 철만을 55,000 mg/Ton (1배 농도, Fe-대조구-G1), 110,000 mg/Ton (2배 농도, Fe-대조구-G2)과 220,000 mg/Ton (4배 농도, Fe-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 철만을 55,000 mg/Ton (1배 농도, Fe-유기태구-G1), 110,000 mg/Ton (2배 농도, Fe-유기태구-G2)와 가장 높은 첨가량인 220,000 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Fe-유기태구-G4)로 조절하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시 하였다.

현현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섞이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섞이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

생장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도)에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19일), 실험중기 (32-34일), 실험후기 (43-44일)로 구분하여 확인하였다

계란 총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN, CR-400(Φ 8 mm)/CR-410(Φ 50 mm)), JAPAN)를 이용하여 L (명도), a (붉은색), b (노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

변화

섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

기본 사료내 미네럴 및 영양성분 조성

사료영양조성내역

기본사료인 “산란톱” 내 주요 영양성분은 전체 중량 대비 옥수수 50 %, limestone 10.48%, 동물성지방 0.7 %, DDGS 20 %, Mineral premix 0.12 %, lysine 0.32 %, vramin premix 0.11 %, MDCP 0.53 %, MHA (Rhodimet) 0.1 %, Soybean meal 8.9 % 이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1 %, phosphorus 0.53 %, methionine+cystein 0.711 %, crude protein 17 %, crude fat 4.94 %, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789 kcal/kg이었다.

미네럴 함유량 조사

Table 1과 2는 표준 사료인 “산란톱 (중추사료)” 내 미네럴 및 영양성분 조성내역이며, 칼슘은 102,880 mg/Ton, 철분 55,000 ppm, 구리 5,500 ppm, Zn과 Mn은 88,000 ppm이었으며 Se과 요오드는 300과 1,700 mg/Ton이었다.

유기태 미네럴강화 사료내 미네럴 함유량 조사

유기태 강화 사료

사료는 (주)현대사료 제품 (제품명:산란톱, 중추사료) 을 기준 (1배) 으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 철의 경우에는 무기태 미네럴 철을 대체하여 유기태 철을 농도별 (1, 2 및 4배 농도) 로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다. 같다 (Table 4).

대조구(정상구) 대비 평가

대조구 대비 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다. 계란품질 항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 대조구 대비 유기태 철 시험구의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1~4배, 난각 두께 2배, 난백과 난황 높이 1배, 난각 및 난황색 2배였다. 산란계 대상 성장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구,백혈구,림

프구) 는 2배, 산란율은 4배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 무기태 철 대비 1~2배였다.

무기태 철 대비 평가

무기태 철 대비 키토산 기질 유기태 철의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 4배, 가식부 무게 1배, 난각 두께 2배, 난백 및 난황 높이 1~4배, 난각 및 난황색 2배였다. 산란계 대상 성장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구)는 2배, 산란율은 4배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 무기태 철 대비 1~2배였다

안전성 및 생육 증진성 최적 첨가농도

무기태 철 대체형으로 제조된 유기태 철 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 철을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 가식부(난황, 난백 무게), 난황, 난백높이와 난황색을 증가시켰다. 또한, 무기태 대비 산란계 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포 (백혈구, 림프구) 의 증가, 농가 생산성과 연관(파란울)된 계란 난각 두께를 증가시켰다.

계란 전체 무게 변화

Table 5는 무기태 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 총 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군(Fe-OCHT-2군)에서 2.07~8.54% 계란무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배(Fe-OCHT-4군)를 섭이시킨 군에서 8.54%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 3.09~16.1% 계란무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭이시킨 군에서 16.1%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 32일째에는 모든 실험군에서 계란 총무게가 증가하였고, 33일째에는 유기태 철 2배 처리군에서만 -11.1% 까지 감소하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 1.93~15.6% 계란무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배(Fe-OCHT-4군)를 섭이시킨 군에서 15.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정, 43일째에는 모든 실험군에서 계란 총무게가 증가하였고, 44일째에는 유기태 철 1배 처리군에서만 -4.65% 까지 감소하였다 .

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 계란 총무게를 최고 16% 이상 증가를 유도하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

계란 가식부(생중량) 무게 변화

Table 6 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 생중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 0.12~1.6% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭취시킨 군에서 1.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 0.31~0.66% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭취시킨 군에서 0.66%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 0.11~2.74% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭취시킨 군에서 2.74%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 가식부 무게를 최고 2.7% 이상 증가를 유도하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 가식부(건조중량) 무게 변화

Table 7는 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 건조중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 0.92~47.6% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배(Fe-OCHT-4군)를 섭취시킨 군에서 47.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 19일째 모든 유기태 섭취군에서 정상군 대비 39.4~47.6% 계란 가식부 건조중량 무게가 증가하였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 5.62~15.6% 계란 가식부 건조중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭취시킨 군에서 15.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 33일째 모든 유기태 철 실험군에서 5.62~15.6%로 계란 가식부 건조중량 무게가 증가하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 측정 44일째 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 0.44% 증가하였고, 다른 모든 실험군에서 계란 가식부 건조 무게가 감소하였다.

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 가식부 무게를 최고 47% 이상 증가를 유도하였으며, 특히, 측정 19일째에는 모든 유기태 실험군에서 가식부 건조 중량이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8는 무기태 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 파란을 감소 효과를 알아보기 위하여 계란 난각 두께 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 0.00~10.5% 계란 난각 두께가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 10.5%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 18-19일째 모든 유기태 섭취군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였다. 상업화 된 아미네이트 타입 철(G8군)대비 측정 18일째 유기태 철 모든 군은 유의적인 차이가 있었다($P<0.05$).

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 4.87~14.6% 계란 난각 두께가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 14.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 32일째 모든 유기태 섭취군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다. 하지만, 상업화 된 아미네이트 타입 철(G8군)대비 측정 32일째 유기태 철 모든 군은 유의적인 차이가 있었다($P<0.05$).

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 2.63~13.8% 계란 난각 두께가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 13.8%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 43일째 모든 유기태 섭취군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였다.

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 난각 두께를 최고 13% 이상 증가를 유도하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

계란 난황고 변화

Table 9는 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황고 증가 효과를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 4.85~7.04% 계란 난황고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭취시킨 군에서 7.04%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 일반 상업화 된 아미네이트 타입 제품(G8군) 대비 유기태 실험군(G7군)에서는 유의적인 차이가 있었다($P<0.05$).

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 2.55~9.95% 계란 난황고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배(Fe-OCHT-1군)를 섭취시킨 군에서 9.95%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 32일째 모든 유기태 실험군에서 정상군 대비 난황고가 증가하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 1.33~8.34% 계란 난황고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배(Fe-OCHT-4군)를 섭취시킨 군에서 8.34%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 43일째 모든 유기태 섭취군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였다.

결론적으로, Fe-OCHT 제제는 측정 기간 동안 난황고를 최고 9% 이상 증가를 유도할 수 있음을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

계란 난백고 변화

Table 10 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난백고 증가 효과를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 2.94~30.0% 계란 난백고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배(Fe-OCHT-4군)를 섭취시킨 군에서 30.0%로 가장 많이 증가하였고, 측정 18일째 모든 유기태 실험군에서 난백고가 증가하였다($P<0.05$).

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 1.83~6.06% 계란 난백고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 6.06%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 무기태 대비 유기태 군에서는 유의성 있는 차이가 관찰되었다($P<0.05$).

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 0~10.2% 계란 난백고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 10.2%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 난백고를 최고 30% 이상 증가시키는 것을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 난황 착색도 변화

Table 11는 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황 착색도 변화를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 L값(명도)의 경우 7.78~13.8% 계란 난황 L값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 13.8%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 a값(붉은색)의 경우 12.1~20% 계란 난황 a값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 20%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 b값(노란색)의 경우 15.2~35.4% 계란 난황 b값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를 섭취시킨 군에서 35%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 중기(섭이 32-34일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 L값(명도)의 경우 0.1~9.89% 계란 난황 L값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(Fe-OCHT-2군)를

섭이시킨 군에서 9.89%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 a값(붉은색)의 경우 6.7~42.7% 계란 난황 a값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배 (Fe-OCHT-2군)를 섭이시킨 군에서 42%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 b값(노란색)의 경우 0.8~10.5% 계란 난황 b값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배 (Fe-OCHT-2군)를 섭이시킨 군에서 10%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 L값(명도)의 경우 0.78~1.29% 계란 난황 L값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배(Fe-OCHT-4군)를 섭이시킨 군에서 1.29%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 a값(붉은색)의 경우 8.27~86.2% 계란 난황 a값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배 (Fe-OCHT-2군)를 섭이시킨 군에서 86%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 b값(노란색)의 경우 1.69~6.5% 계란 난황 b값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배 (Fe-OCHT-2군)를 섭이시킨 군에서 6.5%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 난황의 L, a, b 값의 증가를 유도할 수 있음을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

혈액 내 주요 혈구 수치 변화

Table 12는 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 이를 위하여, 전체 시험간 36일 경과 시, 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다. 결과는 다음과 같다.

본 실험에 사용된 공시동물은 증추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰 병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다. 일반사료를 공급한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 대조군 대비 철만을 보유토록 제조된 Fe-OCHT 소재류의 혈액조성에 미치는 효과를 평가함으로써 최종 안전성 관련 결과를 확인 하였다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 철 2배(ORG Fe-2군)를 섭이시킨 군에서 6.47%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Fe-OCHT의 경우는 미네랄을 2배 처리한 경우는 염증반응을 감소시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭이는 최저 -27.03%까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류를 2배 이상 섭이에 따라 증가시키는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 지방 축적에 따른 간 지방 손상 및 사육환경 조건 등에 따라 유발된 염증 반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었

다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위는 정상군 1.88~2.01 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 칼슘군 1.76~2.05 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 칼슘군 1.48~2.14 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 칼슘 2배(ORG Ca-2군)를 섭취시킨 군에서 -5.1 %로 가장 적게 감소하는 결과를 보였다. 이 결과는 Fe-OCHT의 경우는 미네랄을 2배 처리한 경우는 염증반응을 완화시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭취는 최저 -44.23 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 칼슘군 55.0~75.0 %, 유기태 칼슘군 52.0~72.0 % 이었다.

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 칼슘 2배(ORG Ca-2군)를 섭취시킨 군에서 11.59%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Fe-OCHT의 경우는 미네랄을 2배 처리한 경우는 WBC 수치를 증가시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭취는 최저 -43.92%까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.27~337.87 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 칼슘군 246.4~403.67 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 칼슘군 234.77~382.17 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

본 실험 결과, 칼슘 유기태 소재는 산란계의 지방 축적으로 인한 피해를 감소시킬 수 있으며, Lymphocyte, WBC, RBC 수치를 증가시켰다. 최적 농도는 2배였으며, 이 농도에서는 이미 피해를 입은 간 등에 무리를 주지 않으면서 혈액 관련 수치를 증가시키거나 동등성을 유지시켜 면역시스템을 유도하는 것으로 평가되었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

산란계 산란율 변화

Table 13은 정상사료, 무기태 철과 유기태 철을 산란계에 섭취시킨 후, 생산성 미 안전성과 연관된 계란 산란율을 측정하였다. 정상사료, 무기태 철과 유기태 철을 산란계에 섭취시킨 후, 총 계란 개수를 산란계 개체수로 나누어 평균 계란수를 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭취 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 칼슘을 섭취 시킨 군에서는 G7군(ORG Fe-4)이 10.16개로 가장 높았다. 무기태 철은 9.80~10.18개이었으며, 유기태 철군은 10.02~10.16개이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

산란계 체중(몸무게) 변화

Table 14는 무기태 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 체중(몸무게) 변화의 차이를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 전체 실험 기간 공급한 사료량은 산란계 1수당 100g/1일이었다. 각 실험군 별로 최초(시험전), 중기(36일 경과), 그리고 최종 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 실험군별로 무게를 측정하였다. 결과는 다음과 같다. 전체적인 무게 변화는 36일째에는 정상군이 0 일군과 비

교하여 0.25g 증가하였고, 무기태 철군 -0.04~-0.16g, 유기태 철군이 0.13~0.28g 증가하였다. 49일째에는 정상군이 0일군과 비교하여 -0.11g으로 감소하였고, 무기태 철군 -0.26~-0.24g, 유기태 철군이 -0.36~-0.27g 감소하였다. 유기태 실험군의 무게 변화 패턴은 정상군과 동일하였는데, 36일째에는 모든 군에서 증가하다가, 산란이 본격적으로 진행되면서 49일 경과 시는 모두 감소하는 패턴을 나타내었다.

유기태 소재류 처리군의 경우는 정상군 대비 체중량을 기준으로 평가할 때, 유기태화 소재류 별 그리고 농도별 처리에 따른 장단기적 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되어 철의 유기태화에 따라 발생될 수 있는 독성요인은 없는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 유기태화 미네랄 소재류는 최고 4배까지 섭취한다 하더라도 생체중에 미치는 안전성에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

4. 종합결론

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란고품질과 산란계 안정성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안정성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 철 사료의 최적 농도 범위는 무기태 철 대비 1~2배였고, 대조구 대비는 1~2배였다.

바. 유기태 철 제재는 일반 사료를 섭취한 대조구와 무기태 철을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 가식부(난황, 난백 무게) 무게, 난황, 난백높이와 난황색을 증가시켰다. 또한, 무기태 대비 산란계 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사. 기능성 분말을 사료에 첨가한 사료를 섭취시킨 경우 난백고 및 난황고 변화에 유의적인 차이가 없다는 연구 보고가 있는데(Park 등., 2012), 본 연구에서는 농도 구배차, 섭취 기간에 따른 난황고 증가에 차이가 있었다. 난황의 색상 성분(착색도)은 소비자들의 계란 기호성과 밀접한 관련이 있는데(Shin 등., 2009, Park 등., 2012, Jang 등., 2007) 본 연구에서는 유기태화 철의 농도 구배차, 섭취 기간별로 난황 착색도가 증가 혹은 감소하였다.

Table 1. 산란계(중추용) 표준 사료내 사용된 무기 미네랄류 및 미네랄 영양원 조성표

원 료 (미네랄 종류)		무기미네랄 첨가량(%) 및 목표미네랄 함유량		사료내 순수 미네랄 함유량 (mg)/1000kg	비고
		사료내 첨가량 (g)	목표 미네랄 함유량 (%)		
Ca	CaCO ₃	261.79	39.3	102,880	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	183.33	30	55,000	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	251.43	35	88,000	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	16.18	34	55,000	
Se	Na ₂ SeO ₂	0.7	43	300	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	283.87	31	88,000	
I	CaIO ₃	0	63	1,700	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	0	33	0	

-(주) 현대사료, 기술연구소 자료

Table 2. 산란계(중추용) 표준사료 (사료 톤당 기준) 내 사용된 영양원소류 조성내역

Ingredients (%)	Layer Feed (20 ~ 29 Week)
Corn	50
Wheat	4.39
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
Chemical composition calculated %	Normal group
Metabolic energy, kcal/kg	2,780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

-(주)현대사료, 기술연구소 자료

Table 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 철 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네럴류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네럴(Fe-OCHT)첨가량별 사료내 미네럴 조성표					
		유기태 소재 첨가량(g/사료톤당)			미네럴 함유량 (mg/1톤)		
		1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	102,880	261.79			102,880		
Fe	55,000	183.33	366.66	733.32	55,000	110,000	220,000
Zn	88,000	251.43			88,000		
Cu	5,500	16.18			5,500		
Se	300	0.7			300		
Mn	88,000	-			88,000		
I	1,700	-			1,700		
CO	0	-			0		

Fe-OCHT : 키토산 기질화 철 유기태 소재

Table 4. 키토산 기질 유기태 철 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

생장 및 안전성 평가 최적 농도						
평가		세부 평가 항목		정상구 대비	무기태 대비	
생장 및 안전성평가	생장특성	생장을		1배 (15.7%)	1배 (17.6%)	
	혈액안전성	적혈구		1배 (15.7%)	1배 (17.6%)	
		백혈구		2배 (18.6%)	2배 (17.8%)	
		림프구		2배 (-4.2%)	2배 (23.6 %)	
계란품질		총무게		2배 (10.3%)	4배 (22.2)	
		가식부 무게(건조)		4배 (32.2%)	1배 (31.2%)	
		가식부 무게(비건조)		1배 (2.6%)	1배 (4.23%)	
		난각두께		2배 (23.4%)	2배 (38.3%)	
		난황높이		1배 (10.8%)	4배 (19.7%)	
		난백높이		1배 (24.9%)	1배 (52.9%)	
		난황색	(L, 명도)		4배 (11.1%)	4배 (13.4%)
			(a, 붉은색)		1배 (24.9%)	2배 (34.0%)
			(b, 노란색)		2배 (23.5%)	2배 (23.6%)
		난각색	(L, 명도)		2배 (30.2%)	2배 (29.8%)
			(a, 붉은색)		2배 (69.3%)	2배 (78.7%)
			(b, 노란색)		2배 (37.2%)	1배 (47.4%)
		최적 농도				1~2배

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	50.53±1.97	52.86±3.79	51.09±2.31	55.19±5.1	51.86±2.53	55.19±2.07
Fe-대조구	G2	51.86±0.86	56.03±6.51	54.29±1.91	59.60±1.27	60.59±3.58	57.89±3.08
	G3	47.90±2.86	51.29±4.08	55.2±1.88	57.22±4.0	53.19±5.15	58.56±2.22
	G4	55.16±2.58	53.16±5.86	55.66±2.3	60.31±3.16	61.89±5.95	55.47±2.31
Fe-시험구	G5	51.58±0.89	52.05±1.93	59.35±1.96	61.43±4.3	57.88±1.43	52.62±1.79
	G6	48.54±4.12	50.44±3.4	56.34±3.67	49.01±5.24	54.25±2.17	56.47±2.31
	G7	54.85±5.06	48.36±3.8	52.67±2.15	61.55±4.05	59.96±3.35	56.26±3.65
Fe-비교구	G8	57.04±8.01	46.68±3.11	55.17±3.67	54.64±1.57	55.00±0.83	54.21±5.71

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 가식부 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	84.61±0.57	85.03±1.46	86.35±0.49	86.16±1.31	84.58±2.24	85.47±0.82
Fe-대조구	G2	83.24±3.78	85.89±1.92	85.17±0.17	86.42±1.29	85.97±1.30	87.93±0.48
	G3	85.31±0.90	87.22±.98	87.15±0.15	87.22±3.10	83.65±4.40	88.93±0.01
	G4	86.62±3.22	86.83±0.38	85.99±0.37	86.83±0.83	87.39±1.63	87.23±0.18
Fe-시험구	G5	85.97±1.01	85.29±1.88	86.92±0.88	85.82±1.94	86.90±1.85	86.89±0.05
	G6	83.45±1.01	85.14±1.49	86.19±0.47	85.47±1.03	84.52±2.95	85.57±1.88
	G7	84.53±1.21	84.37±0.93	86.18±0.89	86.43±1.18	86.70±2.80	84.79±0.61
Fe-비교구	G8	86.22±3.23	89.00±5.72	85.02±2.58	84.94±1.40	85.45±0.15	86.69±2.46

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 가식부 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	19.41±1.67	15.73±3.04	21.54±1.14	20.64±2.16	17.05±2.15	22.66±2.94
Fe-대조구	G2	21.93±0.41	23.82±0.86	23.99±1.68	23.11±1.79	21.05±1.55	23.79±1.50
	G3	24.14±3.13	23.96±1.16	22.18±0.06	22.49±1.14	17.61±0.02	22.52±0.92
	G4	16.41±1.92	24.01±0.06	22.78±0.69	21.72±3.24	20.77±1.80	25.14±1.51
Fe-시험구	G5	19.59±0.59	21.93±1.61	20.04±0.64	23.86±3.89	16.45±2.07	22.38±0.13
	G6	22.85±3.63	22.68±0.89	19.81±0.27	21.80±2.07	14.32±2.90	22.76±0.62
	G7	18.91±0.60	23.22±0.83	21.24±0.94	22.39±0.79	15.09±2.57	21.92±0.81
Fe-비교구	G8	18.80±1.46	24.67±1.16	21.44±0.41	21.18±0.74	20.53±0.13	23.65±0.86

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	0.41±0.03	0.38±0.04	0.41±0.03	0.39±0.03	0.38±0.01	0.36±0.02
Fe-대조구	G2	0.42±0.04	0.42±0.02	0.38±0.03	0.46±0.03	0.42±0.01	0.41±0.02
	G3	0.41±0.07	0.36±0.06	0.29±0.03	0.38±0.03	0.40±0.01	0.34±0.02
	G4	0.42±0.05	0.44±0.02	0.37±0.02	0.42±0.01	0.41±0.04	0.38±0.03
Fe-시험구	G5	0.44±0.01*	0.40±0.02	0.43±0.02	0.44±0.03	0.39±0.01	0.35±0.01
	G6	0.41±0.02*	0.42±0.01	0.47±0.02**	0.35±0.01	0.39±0.03	0.41±0.01
	G7	0.45±0.04*	0.42±0.04	0.46±0.02	0.41±0.03	0.43±0.02	0.39±0.03
Fe-비교구	G8	0.32±0.02	0.44±0.02	0.38±0.03	0.42±0.03	0.38±0.00	0.37±0.01

* $P<0.05$ as compared with G8, ** $P<0.05$ as compared with G3

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	15.23±0.39	14.20±1.20	14.37±1.16	14.09±0.05	14.26±0.58	15.13±1.41
Fe-대조구	G2	14.10±0.70	13.96±1.64	15.07±0.26	14.71±0.45	15.25±0.65	14.98±0.41
	G3	13.23±0.34	12.83±0.46	14.10±1.80	15.79±0.71	15.11±2.18	14.98±1.67
	G4	14.07±0.22	15.04±1.40	15.94±0.53	15.07±0.55	15.85±0.33	15.17±1.23
Fe-시험구	G5	15.21±0.18	13.90±0.09	15.80±0.36	15.09±0.69	14.56±0.50	14.37±0.35
	G6	12.88±1.16	13.57±1.01	15.46±0.40	13.12±1.53	14.45±0.70	15.41±1.11
	G7	15.97±0.74	15.20±0.13*	14.95±0.77	14.45±0.41	15.45±1.10	14.20±1.91
Fe-비교구	G8	14.76±1.15	13.03±0.22	14.69±0.78	14.75±0.23	15.24±0.36	13.65±0.31

* $P < 0.05$ as compared with G8

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		난백고 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	6.79±0.27	6.66±0.19	7.09±0.64	7.84±0.78	6.63±0.76	6.90±0.58
Fe-대조구	G2	7.48±0.88	7.18±1.20	4.90±0.43	8.00±0.42	7.74±0.10	6.50±0.53
	G3	6.42±0.34	6.29±0.87	5.63±0.40	6.67±0.71	6.76±0.25	7.40±0.83
	G4	7.05±0.07	6.43±0.54	4.87±0.77	8.26±0.53	7.76±1.58	7.24±0.44
Fe-시험구	G5	7.87±0.07 ^a	10.35±4.29	7.22±0.07 ^b	7.41±0.38	7.05±0.56	6.90±0.30
	G6	6.99±0.70	6.55±0.42	7.52±0.91	7.23±1.04	7.31±0.09	6.81±0.41
	G7	8.83±0.51 ^a	6.40±0.63	6.66±0.33 ^c	7.82±0.32	7.14±0.64	7.43±1.01
Fe-비교구	G8	6.66±1.11	6.72±0.21	5.86±0.66	6.87±0.57	6.69±0.10	7.03±0.45

^a $P < 0.05$ as compared with G1, ^b $P < 0.05$ as compared with G2, ^c $P < 0.05$ as compared with G4

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난황색 변화

시험구		난황색 (단위:nm)							
		18일	19일	32일	33일	41일	43일	44일	
대조구	G1	L	48.83±4.18	53.53±4.58	47.41±6.07	44.34±0.57	61.54±0.42	61.54±0.42	53.44±4.17
		a	1.40±0.29	1.50±0.29	2.73±0.48	1.94±0.88	0.85±0.06	0.87±0.06	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	43.51±9.42	43.20±6.52	37.25±3.09	62.79±2.12	62.79±2.12	43.01±7.44
Fe-대조구	G2	L	54.47±1.61	56.42±5.81	45.90±0.80	44.58±0.83	56.50±0.88	55.49±1.74	56.74±4.31
		a	2.26±0.44	2.03±1.08	2.47±0.87	2.72±0.54	0.71±0.61	1.55±0.31	0.90±0.34
		b	49.50±0.39	48.60±12.45	40.60±2.33	31.09±2.73	50.86±4.56	50.50±13.5	51.66±2.59
	G3	L	53.28±1.49	56.48±2.81	49.59±0.83	47.21±2.24	59.77±2.10	58.05±8.89	55.51±3.69
		a	1.48±0.44	0.98±0.91	2.13±1.13	2.26±0.02	0.57±0.11	1.91±1.30	0.74±0.38
		b	43.08±5.41	48.08±5.09	47.74±6.03	35.60±2.81	57.29±6.24	50.60±10.4	53.24±12.96
	G4	L	50.19±4.51	53.36±4.10	49.71±1.42	44.90±3.87	61.09±4.03	58.13±3.21	56.38±5.41
		a	2.38±0.41	1.37±7.05	1.59±0.55	2.97±0.62	0.58±0.17	0.86±0.31	1.24±0.08
		b	41.65±5.48	48.02±7.05	38.55±1.68	32.12±6.09	58.83±2.08	52.97±6.53	52.64±5.78
Fe-시험구	G5	L	55.56±3.20	57.07±3.29	47.46±1.55	49.07±2.77	61.78±3.59	57.76±1.34	53.86±0.16
		a	0.99±0.05	0.58±0.04	1.25±0.87	2.07±0.71	0.17±0.06	1.17±1.06	1.57±0.25
		b	50.11±2.75	51.15±4.22	40.53±3.48	37.56±5.17	59.18±4.09	53.18±2.89	44.21±3.03
	G6	L	52.63±4.59	60.93±2.17	52.10±1.84	48.44±1.00	63.53±1.64	57.66±1.58	51.62±2.63
		a	1.68±0.76	0.83±0.85	2.68±1.33	2.77±0.44	0.37±0.17	1.62±0.54	1.09±0.21
		b	45.52±7.43	58.91±2.94	47.76±0.43	37.09±1.13	59.29±4.50	56.58±2.55	45.82±6.54
	G7	L	55.33±3.14	59.74±7.14	48.24±2.01	42.90±6.91	53.47±5.38	55.72±4.58	54.13±8.50
		a	1.57±3.47	0.88±0.47	1.50±0.64	2.10±0.52	0.17±0.02	0.19±0.03	0.35±0.31
		b	52.99±5.31	56.97±11.38	40.68±1.66	29.72±2.16	48.49±3.01	48.68±3.99	43.74±6.13
Fe-비교구	G8	L	56.11±2.30	52.28±2.32	44.09±2.09	52.25±4.89	55.53±4.30	50.24±7.38	52.87±2.47
		a	1.29±0.16	1.13±1.08	2.21±0.75	2.49±1.06	0.13±0.00	1.84±0.77	0.33±0.19
		b	47.77±3.55	44.90±4.00	36.80±2.97	45.74±4.77	50.65±2.20	43.40±11.2	48.72±7.03

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		RBC(단위:10 ⁶ /μl)		WBC(단위:10 ⁹ /μl)		Lymphocyte(단위:%)	
		36일	48일	36일	48일	36일	48일
대조구	G1	1.88±0.32	2.01±0.16	337.87±39.98	311.27±19.62	75.67±0.06	75.00±0.41
Fe-대조구	G2	1.98±0.19	1.76±0.07	348.55±73.75	246.40±55.07	75.50±2.02	72.00±0.00
	G3	1.90±0.08	2.02±0.22	299.50±17.68	340.20±18.51	55.00±5.36	79.00±0.07
	G4	2.03±0.21	2.05±0.23	357.67±76.23	403.67±53.74	68.00±0.83	75.00±0.29
Fe-시험구	G5	1.61±0.27	2.10±0.37	260.53±82.35	334.77±90.94	62.00±056	65.50±012
	G6	2.01±0.09	2.14±0.25	382.17±36.38	319.77±74.44	72.00±0.83	69.50±0.36
	G7	1.48±0.30	1.82±0.23	234.77±79.30	302.47±54.84	61.67±0.02	52.00±0.41
Fe-비교구	G8	1.87±0.57	2.22±0.02	364.60±72.41	341.50±25.31	57.00±0.07	50.50±6.26

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총계란수	평균산란수
정상구	G1	473	10.51
Fe-대조구	G2	458	10.18
	G3	456	10.13
	G4	441	9.80
Fe-유기태구	G5	456	10.13
	G6	451	10.02
	G7	457	10.16
Fe-비교구	G8	452	10.04

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 14. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 산란계 체중 변화

시험구		체중 (unit:kg)				
		0일	36일		49일	
			평균체중	증감(+/-)	평균체중	증감(+/-)
대조구	G1	1.64	1.89	0.25	1.77	-0.11
Fe-대조구	G2	2.08	1.99	-0.09	1.73	-0.26
	G3	2.00	1.96	-0.04	1.73	-0.22
	G4	2.22	2.07	-0.16	1.83	-0.24
Fe-시험구	G5	1.91	2.10	0.19	1.74	-0.36
	G6	1.73	2.01	0.28	1.72	-0.29
	G7	1.88	2.01	0.13	1.75	-0.27
Fe-비교구	G8	1.92	2.18	0.26	1.77	-0.41

G1:대조구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 1-3 절 기능성 아연 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 2002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

아연은 DNA, RNA 합성 및 세포분열에 관여하여 세포 증식과 면역 체계의 발달에 중요한 역할을 수행하는 미량원소이다(Brown 등., 2003, Nishi 등., 1996). 아연은 성장호르몬의 작용을 강화시킨다(Solomons., 1976). 초유에는 풍부한 양의 단백질과 아연이 함유되어 있어 신생아의 성장 및 발달에 도움을 주며, 특히, IGF-1, IGFBP-3의 작용을 강화 및 합성에 필요한 기질을 형성 한다(Martorell 등., 2002). 또한 알칼리성 인산분해효소의 합성 및 뼈 조직 안에서의 활성을 강화시켜 뼈와 조직의 성장에 관련이 있다(Doherty 등., 2002, Neve 등., 1992, Butrimovitz 등., 1978). 아연의 결핍 현상은 잘못된 식이 습관에 의해 발생하며 아연의 흡수를 방해하는 피테이트(phytate)가 함유된 음식 섭취가 원인인 경우가 대부분으로 특히, 임신부들에서는 저단백질, 고피테이트 식이와 장내 아연의 흡수 저하로 인해 아연 결핍이 쉽게 발생할 수 있다(Prasad., 1996, Carlos., 2003). 아연 성분이 부족하면 태아 성장 부진, 저체중아, 자궁 내 성장지연, 선천성 기형, 조기 출산이나 지연 출산 등의 심각한 합병증을

초래할 수 있어 임신부들에게 아연 결핍에 대한 진단과 치료가 중요하다(Carlos., 2003). 이러한 결과로 상대적으로 아연 뿐 아니라 다른 미량원소 및 영양소가 부족하기 쉬운 후진국과 개발도상국에서는 미량원소, 특히 아연 보충의 중요성이 점차 대두되고 있다(Carlos., 2003., Sandstead., 1991).

본 연구에서는 키토산올리고당을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섭이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 기존 일반사료내 무기 미네랄 대체 조건에서 산란계 안전성 및 생육 패턴을 평가함으로써 최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립 코져 하였다.

2. 연구방법

미네랄 소재류 준비

무기 미네랄류

무기태 미네랄류인 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 (주)이노바텍 (한국) 에서 구입하여 시험 간 사용하였다.

시험 유기태 미네랄 소재류

키토산 기질화 제조된 유기태 미네랄 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당 (chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네랄을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다. 이중 시험 간 사용된 유기태 아연 소재류 (이하, Zn-OCHT) 는 아연 88,000 ppm과 나머지는 키토산올리고당이 함유된 구성 이었다.

비교 유기태 미네랄 소재류(아미네이트 타입)

키토산 기질 유기태 시험 사료와의 비교를 위한 아미네이트 타입 Zn을 (동우화학, 한국) 구입하여 키토산 기질 유기태 미네랄 비교시험구를 위한 산란계 사료에 혼합하여 제조(1배)하는데 사용하였다.

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(아연) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사

료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱”을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 아연 소재 내 순수 아연 함유량을 88,000 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 3종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국)에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 아연 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 칼슘 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 1배, 2배 및 4배 되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리하는 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

실험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 아연만을 88,000 mg/Ton (1배 농도, Zn-대조구-G1), 176,000 mg/Ton (2배 농도, Zn-대조구-G2)과 352,000 mg/Ton(4배 농도, Zne-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 철만을 88,000 mg/Ton (1배 농도, Zn-유기태구-G1), 176,000 mg/Ton (2배 농도, Zn-유기태구-G2)와 가장 높은 첨가량인 352,000 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Zn-유기태구-G4)로 조절하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시 하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭취에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭취에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭취에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭취에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭취에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭취 시 확인을 위하여 사료류 섭취 기간에 따라 실험전기 (18-19일), 실험중기 (32-34일), 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

계란 총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭취에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭취에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN,CR-400<(Φ8 mm)/CR-410(Φ50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L (명도), a (붉은색), b (노란색) 를 측정하였다.

난각 두께

섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN) 를 이용하여 측정하였다.

, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

기본 사료내 미네럴 및 영양성분 조성

사료영양조성내역

기본사료인 “산란톱” 내 주요 영양성분은 전체 중량 대비 옥수수 50 %, limestone 10.48%, 동물성지방 0.7 %, DDGS 20 %, Mineral premix 0.12 %, lysine 0.32 %, viramin premix 0.11 %, MDCP 0.53 %, MHA (Rhodimet) 0.1 %, Soybean meal 8.9 % 이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1 %, phosphorus 0.53 %, methionine+cystein 0.711 %, crude protein 17 %, crude fat 4.94 %, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789 kcal/kg이었다.

미네럴 함유량 조사

Table 1과 2는 표준 사료인 “산란톱 (중추사료)” 내 미네럴 및 영양성분 조성내역이며, 칼슘은 102,880 mg/Ton, 철분 55,000 ppm, 구리 5,500 ppm, Zn과 Mn은 88,000 ppm이었으며 Se과 요오드는 300과 1,700 mg/Ton이었다.

유기태 미네럴강화 사료내 미네럴 함유량 조사

유기태 강화 사료

사료는 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준 (1배) 으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 아연의 경우에는 무기태 미네럴 아연을 대체하여 유기태 아연을 농도별 (1, 2 및 4배 농도) 로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다. 같다(Table 4).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭취시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다 (Table 4).

대조구(정상구) 대비 평가

대조구 대비 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다. 계란품질 계란항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 아연의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1배, 난각 두께 4배, 난백과 난황 높이 1배, 난각 및 난황색 1~4배였다. 산란계 대상 생장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~2배, 산란율은 2배였다. 최종 레시피 정립 결과는 대조구 대비 1~2배였다.

무기태 아연 대비 평가

무기태 아연 대비 키토산 기질 유기태 아연의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 1배, 가식부 무게 1~4배, 난각 두께 4배, 난백 및 난황 높이 1배, 난각 및 난황색 4배였다. 산란계 대상 생장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~2배, 산란율은 2배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 무기태 아연 대비 1~2배였다.

안전성 및 생육 증진성 최적 첨가농도

무기태 아연 대체를 위해 제조된 유기태 아연 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 아연을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다.

평가항목

계란 전체 무게 변화

Table 5는 무기태 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 총 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기 (섭이 18일), 실험 중기 (섭이 32일째), 실험 후기 (섭이 44일째) 을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군은 0.14~12.65 %, 유기태 아연군은 -2.25~9.25 %, 유기태 혼합군은 9.12 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였으며, 정상군 대비 G5군이 9.25 %로 가장 많이 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 3.42~16.7 %, 유기태 아연군은 2.33~17.8 %, 유기태 혼합군은 16.56 %로 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하는 것을 확인

하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군이 17.88 %로 가장 많이 증가하였다($p < 0.05$). 또한, 유기태 아연 G5군은 상용화 된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유의성 있는 차이가 있었다. ($p < 0.05$).

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 $-0.77 \sim -117$ %, 유기태 아연군은 $-3.4 \sim 6.8$ %로 유기태 실험군 G6군을 제외한 모든 유기태에서 실험군에서 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군이 6.8 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(생중량) 무게 변화

Table 6 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 생중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군은 $-2.16 \sim 1.83$ %, 유기태 아연군은 $0.59 \sim 4.03$ %로 모든 유기태 아연 실험군에서 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군이 4.03 %로 가장 많이 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 $-2.13 \sim 0.69$ %, 유기태 아연군은 $-0.21 \sim 0.77$ %로 유기태 아연 실험군 별로 생중량이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 아연 중 G6군이 0.77 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 $-1.53 \sim 2.20$ %, 유기태 아연군은 $-1.15 \sim 2.38$ %로 유기태 아연 실험군에서 별로 생중량이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 아연군 중 G5군이 2.38 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 실험 기간 동안 유기태 아연이 계란 가식부 생중량을 증가시키는 것을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 가식부(건조중량) 무게 변화

Table 7은 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 건조중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군 $8.36 \sim 22.36$ %, 유기태 아연군은 $-1.36 \sim 3.91$ %로 유기태 아연 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 아연군 중 G5군이 3.91 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 $-0.7 \sim 5.73$ %, 유기태 아연군은 $-7.97 \sim -0.98$ %로 모든 유기태 아연 실험군에서 건조중량이 감소하였다.

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 $2.54 \sim 10.79$ %, 유기태 아연군은 $-1.84 \sim 0.04$ %로 유기태 아연 실험군 중 G6군을 제외한 다른 군에서 건조중량이 감소하는 것을 확인하였

다. 유기태 아연 실험군 중 G6군이 0.18 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8는 무기태 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 과란율 감소 효과를 알아보기 위하여 계란 난각 두께 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일째), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 43일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군은 -36.67~-10.81 %, 유기태 아연군은 4.65~10.87 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 아연군의 난각 두께는 0.43~0.46 mm 범위이며, 무기태 군의 난각 두께는 0.3~0.37 mm 범위로 유기태 아연군이 무기태 아연군에 비해 난각 두께가 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$). 또한, 유기태 아연의 경우 일반 상용화된 대조군 제품(아미네이트 형태)인 G8군 난각 두께 0.28 mm와는 유의성 있는 차이가 나타났다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 -32.26~-20.59 %, 유기태 아연군은 4.65~8.89%로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 아연군은 무기태 아연군과 일반 상용화된 대조군 제품(아미네이트 형태)과 비교 시 난각 두께 증가에 유의성 있는 차이가 나타났다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 -5.88~14.29 %, 유기태 아연군은 -9.09~7.69 %로 유기태 실험군 중 G5군을 제외한 다른 군에서 난각 두께가 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 4배였다.

계란 난황 착색도 변화

Table 9는 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황 착색도 변화를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다. 정상군 대비 섭이 18일째에 L값은 무기태 아연군 -4.6~0.6 %, 유기태 아연군 0.74~4.74 %로 모든 유기태 아연 실험군에서 L값이 증가하였다. 유기태 아연 실험군 중 G6군이 4.74 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 a값은 무기태 아연군은 14.17~21.98 %, 유기태 아연군은 -3.52~14.31 %로 유기태 실험군 중 G5군을 제외한 다른 군에서 a값이 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G6군이 14.31 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 아연군은 8.04~14.35 %, 유기태 아연군은 4.94~11.32 %로 모든 유기태 실험군에서 b값이 증가하였다. 유기태 실험군 중 G7군이 11.32 %로 가장 많이 증가하였다. 또한, 상용화 된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유기태 아연군 사이에도 L, a, b값 차이는 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 L값은 무기태 아연군은 5.48~10.32 %, 유기태 아연군은 8.97~14.54 %로 모든 유기태 아연 실험군에서 L값이 증가하였다. 유기태 아연 실험군 중 G6군이 14.54 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 a값은 무기태 아연군은 -1.54~69.07

%, 유기태 아연군은 -39.17~48.45 %로 유기태 실험군 중 G6군을 제외한 다른 군에서 a값이 증가하였다. 유기태 실험군 중 G5군이 48.45 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 b값은 무기태 아연군은 1.20~3.08 %, 유기태 아연군은 -2.98~32.75 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 b값이 증가하였다. 유기태 실험군 중 G6군이 32.75 %로 가장 많이 증가하였다. 또한, 상용화 된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유기태 아연군 사이에도 L. a. b 값 차이는 없었다.

정상군 대비 섭이 44일째에 L값은 무기태 아연군은 -7.57~3.75 %, 유기태 아연군은 -3.49~11.2 %로 유기태 아연 실험군 중 G5군을 제외한 다른 군에서 L값이 감소하였다. 유기태 아연 실험군 중 G5군이 11.2 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 a값은 무기태 아연군은 -17.93~6.89 %, 유기태 아연군은 -26.2~3.45 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 a값이 감소하였다. 유기태 실험군 중 G7군이 3.45 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 b값은 무기태 아연군은 1.18~22.01 %, 유기태 아연군은 3.83~25.31 %로 모든 유기태 실험군에서 b값이 증가하였다. 유기태 셀레늄 실험군 G5군이 25.31 %로 가장 많이 증가하였다. 또한, 상용화 된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유기태 아연군 사이에도 L. a. b 값 차이는 없었다.

산란계 주요 혈액 수치 변화

Table 10 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 전체 실험간 32일 경과 시, 44일 경과 시를 종료점으로 하여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다. 본 실험에 사용된 공시동물은 중추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰 병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다. 일반사료를 공급한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 결과는 다음과 같다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G7군에서 5.05 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 유기태 농도별로 최저 -15.34 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 농도별 섭이에 따라 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이런 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위는 정상군 1.88~2.01 10⁶/μl, 무기태 아연군 1.71~1.96 10⁶/μl, 유기태 아연군 1.63~2.00 10⁶/μl 이었으며, 상용화된 아미네이트 형태군 1.90 10⁶/μl이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 실험군 중 G2군에서 2.36 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 2배 이상의 섭이는 최저 -22.95 %까지 감소하는 결과를 보였다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 아연군 60.5~71.5 %, 유기태 아연군 61.0~77.5 %, 상용화된 아미네이트 형태군 47~60.67 %로 모든 유기태 처리군에서 상용화 된 아미네이트 형태 처리군에서 비해 유의성 있는 차이가 관찰되었다(p<0.05).

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군에서 3.73 %로 가장 많이 증가하였다. 하지만, 2배 이상의 섭이는 최저 -27.18 %까지 감소하는 결과를 보였다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.27~337.87 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 아연군 262.57~355.97 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 아연군 265.67~323.33 $10^6/\mu\text{l}$, 상용화된 아미네이트 형태군 321~324.33 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

계란 난황고 변화

Table 11 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배(ORG Zn-1군)를 섭이시킨 군에서 7.75 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 18일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 7.57 % 증강되었는데 반하여 1배 이상을 섭이한 군에서는 최저 0.32 %까지 난황고 증가가 감소하였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 아연 2배(ORG Zn-2군)를 섭이시킨 군에서 8.93 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 32일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 8.93 % 증강되었는데 반하여 2배 이상을 섭이한 군에서는 최저 5.7 %까지 난황고 증가가 감소하였다. 유기태 아연 섭이 32일째에 다른 유기태 아연 섭이군도 난황고가 정상군 대비 약 3.8~5.7 % 정도 증가하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배(ORG Ca-1군)를 섭이시킨 군에서 9.74 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 43일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 9.74 % 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭이한 군에서는 최고 -1.4 %까지 난황고 가 감소하였다.

Zn-OCHT제제는 전체적으로 9.7 %이상의 난황고 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 4 배 수준이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 난백고 변화

Table 12는 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해

수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배(ORG Zn-1군)를 섭이시킨 군에서 15.0 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 19일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 15.0% 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭이한 군에서는 최저 1.59 %까지 난백고가 감소하였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 아연 2배(ORG Zn-2군)를 섭이시킨 군에서 10.7 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 32일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 10.7 % 증가되었는데 반하여 2배 이하를 섭이한 군에서는 최고 -1.7 %까지 난백고가 감소하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배(ORG Zn-1군)를 섭이시킨 군에서 12.98 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 유기태 철 섭이 44일째에 다른 유기태 아연 섭이군에서도 난백고가 정상군 대비 약 6.3~8.36% 정도 증가하였다.

Zn-OCHT제제는 전체적으로 15%이상의 난백고 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 2배 수준이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

산란계 산란율 변화

Table 13은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 산란계 내 산란율의 변화를 확인함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 결과는 다음과 같다.

정상사료, 무기태 아연과 유기태 아연을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다. 실험기간 동안 정상사료, 무기태 아연과 유기태 아연을 산란계에 섭이시킨 후, 총 계란 개수를 산란계 개체수로 나누어 평균 계란수를 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭이 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 아연을 섭이 시킨 군에서는 G6군(ORG Zn-2)이 10.36개로 가장 높았다. 무기태 아연군은 10.11~10.22개이었으며, 유기태 아연군은 10.11~10.26개였다. 유기태 아연 섭이 군은 무기태 아연 사료를 먹인 군과 비교하여 산란 수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배였고, 대조구 대비 2배였다.

산란계 체중(몸무게) 변화

Table 14는 무기태 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 체중(몸무게) 변화의 차이를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 전체 실험 기간 공급한 사료량은 산란계 1수당 100g/1일 이었다. 각 실험군 별로 최초(시험전), 중기(36일 경과), 그리고 최종 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 실험군별로 무게를 측정하였다. 결과는 다음과 같다.

전체적인 무게변화는 36일째에는 정상군이 0 일군과 비교하여 0.25g 증가하였고, 무기태 아연군 2.10~2.28g, 유기태 아연군이 2.10~2.14g 증가하였다. 49일째에는 정상군이 0 일군과 비교하여 -0.11g으로 감소하였고, 무기태 아연군 -0.51~-0.32g, 유기태 아연군이 -0.47~-0.28g 감소하였다. 유기태 실험군의 무게 변화 패턴은 정상군과 동일하였는데, 36일째에는 모든 군에서 증가하다가, 산란이 본격적으로 진행되면서 49일 경과 시는 모두 감소하는 패턴을 나타내었다.

유기태 소재류 처리군의 경우는 정상군 대비 체중량을 기준으로 평가할 때, 유기태화 소재류 별 그리고 농도별 처리에 따른 장단기적 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되어 아연의 유기태화에 따라 발생될 수 있는 독성요인은 없는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 유기태화 미네랄 소재류는 최고 4배까지 섭취한다 하더라도 생체중에 미치는 안전성에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

4. 종합결론

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 아연 제재를 대체할 유기태 아연을 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란품질과 산란계 안전성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안전성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 아연 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

바. 제조된 유기태 아연 제재는 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란울)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사. 유기태 아연 소재의 관련 현장평가를 통하여, 현장형 사료첨가제 제조 레시피 정립이 완료되었다.

아. 산란계에 효모-철 혹은 유기태화 칼슘, 철을 을 공급하면 난각 두께, 난황색이 증가한다는 보고가 있는데(Jung 등., 2004, Cho 등., 2015, Kim 등., 2002), 본 연구에서는 유기태화 아연 사료가 무기태 및 일반 상용화 된 아미네이트 형태 아연 제품과 비교 시는 유의성 있게 난각 두께를 증가시키는 것을 관찰하였다. 한약재 급여가 산란계의 백혈구, 적혈구, 림프구 수치 변화에 영향을 주지 않는다는 연구 보고와 황토를 첨가 시 백혈구 수치가 증가한다는 연구보고가 있는데(Park 등., 2010, Kim 등., 2015), 본 실험 결과 유기태 아연 소재는 WBC, RBC 수치를 증가시켰고, Lymphocyte의 경우는 일반 상용화 된 아미네이트 형태 군보다 수치를 증가시켰다.

Table 1. 산란계(중추용) 표준 사료내 사용된 무기 미네랄류 및 미네랄 영양원 조성표

원 료 (미네랄 종류)		무기미네랄 첨가량(%) 및 목표미네랄 함유량		사료내 순수 미네랄 함유량 (mg)/1000kg	비고
		사료내 첨가량 (g)	목표 미네랄 함유량 (%)		
Ca	CaCO ₃	261.79	39.3	102,880	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	183.33	30	55,000	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	251.43	35	88,000	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	16.18	34	55,000	
Se	Na ₂ SeO ₂	0.7	43	300	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	283.87	31	88,000	
I	CaIO ₃	0	63	1,700	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	0	33	0	

-(주) 현대사료, 기술연구소 자료

Table 2. 산란계(중추용) 표준사료 (사료 톤당 기준) 내 사용된 영양원소류 조성내역

Ingredients (%)	Layer Feed (20 ~ 29 Week)
Corn	50
Wheat	4.39
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
Chemical composition calculated %	Normal group
Metabolic energy, kcal/kg	2,780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

-(주)현대사료, 기술연구소 자료

Table 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 아연 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네랄류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네럴 (Zn-OCHT) 첨가량별 사료내 미네럴 조성표					
		유기태 소재 첨가량(g/사료톤당)			미네럴 함유량 (mg/1톤)		
		1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	102,880	261.79			102,880		
Fe	55,000	183.33			55,000		
Zn	88,000	251.53	502.86	100.572	88,000	176,000	352,000
Cu	5,500	16.18			5,500		
Se	300	0.7			300		
Mn	88,000	-			88,000		
I	1,700	-			1,700		
CO	0	-			0		

Zn-OCHT : 키토산 기질화 아연 유기태 소재

Table 4. 키토산 기질 유기태 아연 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

생장 및 안전성 평가 최적 농도 (% 증감율)					
평가		세부 평가 항목		정상구 대비	무기태 대비
생장 및 안전성평가	생장특성	생장을		2배 (17.3%)	2배 (46.8%)
	혈액안전성	적혈구		4배 (6.0%)	4배 (14.5%)
		백혈구		1배 (3.7%)	1배 (30.9%)
		림프구		2배 (3.2%)	2배 (21.9%)
계란품질	총무게		2배 (20.3%)	1배 (20.2%)	
	가식부 무게(건조)		1배 (38.9%)	4배 (9.9%)	
	가식부 무게(비건조)		1배 (4.1%)	1배 (9.0%)	
	난각두께		4배 (21.7%)	4배 (28.2%)	
	난황높이		1배 (14.7%)	1배 (19.6%)	
	난백높이		1배 (24.4%)	1배 (42.6%)	
	난황색	(L, 명도)		4배 (11.0%)	4배 (22.3%)
		(a, 붉은색)		1배 (29.1%)	1배 (21.3%)
		(b, 노란색)		1배 (19.6%)	4배 (25.5%)
	난각색	(L, 명도)		4배 (31.8%)	4배 (28.0%)
		(a, 붉은색)		1배 (82.6%)	4배 (26.0%)
		(b, 노란색)		4배 (42.3%)	4배 (41.6%)
	최적 농도				1~2배

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)		
		18일	32일	44일
대조구	G1	50.53±1.97	51.09±2.31	55.19±2.07
Zn-대조구	G2	50.60±5.58	52.90±2.39	54.77±0.75
	G3	53.38±0.33	61.30±4.62	52.12±1.75
	G4	57.85±2.39	57.81±3.21	49.40±0.93
Zn-시험구	G5	55.68±6.42	62.21±0.59 ^{a,b,c}	59.23±5.37
	G6	53.50±2.80	52.31±2.04	53.37±4.66
	G7	49.42±1.86	54.95±3.69	56.01±4.71
Zn-비교구	G8	51.72±1.66	48.86±3.13	54.35±1.97

^aP<0.05 as compared with G1, ^bP<0.05 as compared with G2, ^cP<0.05 as compared with G8

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 가식부(비건조상태) 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)		
		18일	32일	44일
대조구	G1	84.61±0.57	86.35±0.49	85.47±0.82
Zn-대조구	G2	85.80±2.53	85.85±0.53	87.39±1.35
	G3	82.82±1.40	86.95±0.66	84.18±1.45
	G4	86.19±0.39	84.55±4.36	85.70±0.29
Zn-시험구	G5	88.16±3.05	86.47±0.66	87.55±0.17
	G6	85.11±0.54	87.02±0.89	85.35±0.43
	G7	85.17±9.01	86.17±0.14	84.50±0.15
Zn-비교구	G8	83.90±1.50	85.51±0.73	86.52±0.97

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 가식부(건조상태) 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)		
		18일	32일	44일
대조구	G1	19.41±1.67	21.54±1.14	22.66±2.94
Zn-대조구	G2	25.00±0.65	22.85±1.43	23.55±0.86
	G3	24.70±2.17	21.39±1.08	23.25±0.64
	G4	21.18±0.38	22.82±2.07	25.40±2.16
Zn-시험구	G5	20.20±0.81	19.95±1.70	22.25±1.75
	G6	20.10±0.46	20.59±0.80	22.70±1.23
	G7	19.15±0.94	21.13±1.10	22.65±1.34
Zn-비교구	G8	21.55±2.10	21.33±1.09	24.18±1.44

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)		
		18일	32일	44일
대조구	G1	0.41±0.03	0.41±0.03	0.36±0.02
Zn-대조구	G2	0.36±0.03	0.34±0.01	0.34±0.03
	G3	0.30±0.01	0.33±0.04	0.41±0.01
	G4	0.37±0.06	0.31±0.09	0.42±0.03
Zn-시험구	G5	0.44±0.02 ^b	0.45±0.02 ^{b,c}	0.33±0.01
	G6	0.44±0.02 ^{a,b}	0.41±0.03	0.39±0.01
	G7	0.46±0.01 ^b	0.45±0.01 ^{b,d}	0.38±0.03
Zn-비교구	G8	0.28±0.04	0.37±0.03	0.42±0.01

^a*P*<0.05 as compared with G3, ^b*P*<0.05 as compared with G8, ^c*P*<0.05 as compared with G2, ^d*P*<0.05 as compared with G4

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난황색 변화

시험구			난황색 (단위:nm)		
			18일	32일	44일
대조구	G1	L	48.83±4.18	44.34±0.57	53.44±4.17
		a	1.40±0.29	1.94±0.88	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	37.25±3.09	43.01±7.44
Zn-대조구	G2	L	50.97±3.63	48.06±1.83	55.03±2.22
		a	2.15±0.58	4.19±1.47	1.40±0.20
		b	43.29±5.04	37.70±1.70	52.48±6.32
	G3	L	54.15±2.32	46.77±2.93	49.84±0.70
		a	1.89±0.91	1.92±0.21	1.19±0.33
		b	48.23±2.09	38.35±6.10	45.56±1.24
	G4	L	52.29±4.68	48.92±1.40	49.39±2.41
		a	0.84±0.42	3.28±0.54	1.55±0.54
		b	46.83±8.20	38.40±1.80	43.52±6.19
Zn-시험구	G5	L	55.53±5.01	48.32±0.99	59.43±0.60
		a	2.25±1.50	2.88±0.62	1.31±0.11
		b	45.81±4.69	40.86±1.15	53.90±4.15
	G6	L	57.55±2.70	50.79±8.70	51.57±5.31
		a	1.18±0.91	1.18±0.91	1.07±0.17
		b	49.45±5.06	49.45±8.06	44.66±6.05
	G7	L	58.45±6.02	48.90±0.16	53.20±1.20
		a	1.03±0.72	2.31±0.83	1.50±0.29
		b	52.65±6.33	36.14±2.31	45.42±2.26
Zn-비교구	G8	L	54.76±3.84	48.49±0.72	53.03±4.45
		a	1.75±0.68	1.82±0.53	1.46±0.34
		b	50.16±6.62	38.51±4.69	46.67±9.85

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		적혈구(단위:10 ⁶ /μl)		림프구(단위:%)		백혈구(단위:10 ³ /μl)	
		32일	44일	32일	44일	32일	44일
대조구	G1	1.88±0.32	2.01±0.16	75.67±0.06	75.00±0.41	337.87±39.98	311.27±19.62
Zn-대조구	G2	1.96±0.15	1.83±0.11	68.33±2.31	73.67±9.45	262.57±30.8	277.07±72.32
	G3	1.88±0.16	1.86±0.21	65.00±5.75	60.50±7.78	318.67±60.92	292.00±32.93
	G4	1.71±0.18	1.88±0.06	71.50±6.36	67.33±9.50	307.55±78.98	355.97±58.48
Zn-시험구	G5	1.84±0.25	1.85±0.21	63.33±3.21 ^a	72.00±2.83	265.67±66.25	323.33±68.95
	G6	1.63±0.47	1.84±0.12	77.50±3.54 ^{a,b}	69.00±5.20	288.60±38.18	303.77±52.20
	G7	1.98±0.06	2.00±0.24	68.33±7.51 ^a	61.00±8.49	309.67±51.97	314.13±68.14
Zn-비교구	G8	1.90±0.17	1.99±0.24	47.00±1.41	60.67±8.49	321.60±73.49	324.33±21.07

^aP<0.05 as compared with G3, ^bP<0.05 as compared with G8

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고(단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	15.23±0.39	14.20±1.20	14.37±1.16	14.09±0.05	14.26±0.58	15.13±1.41
Zn-대조구	G2	13.28±0.60	14.10±0.14	13.45±1.15	15.44±0.88	14.89±0.52	14.62±1.17
	G3	14.48±0.03	13.05±0.57	15.85±1.04	14.72±2.12	15.32±0.59	13.31±0.10
	G4	13.58±0.82	13.04±0.55	14.91±1.51	14.77±0.66	16.26±0.74	13.78±1.03
Zn-시험구	G5	16.51±0.62	14.04±0.36	14.95±1.67	15.22±1.45	15.80±0.64	15.59±1.32
	G6	15.91±0.88	14.18±0.49	15.78±1.26	14.80±0.59	14.05±0.42	15.02±0.86
	G7	15.28±0.01	14.63±2.33	15.24±0.26	15.18±0.07	15.03±1.12	15.88±0.71
Zn-비교구	G8	13.56±1.04	14.79±1.38	14.69±0.78	15.00±0.79	14.98±1.07	14.02±0.59

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		난백고(단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	6.79±0.27	6.66±0.19	7.09±0.64	7.84±0.78	6.63±0.76	6.90±0.58
Zn-대조구	G2	7.03±0.82	6.29±0.24	5.03±0.46	6.80±1.26	7.28±0.69	6.32±0.38
	G3	6.20±0.57	6.15±1.02	5.34±0.44	6.82±0.44	7.79±0.24	7.55±1.10
	G4	6.46±0.45	5.83±0.74	5.64±0.39	8.42±0.58	7.35±0.46	6.87±0.61
Zn-유기태구	G5	7.99±1.13	5.89±0.85	6.97±1.16	8.77±0.29	7.51±0.47	7.53±2.31
	G6	7.86±0.66*	6.80±0.78	7.94±0.44*	8.38±0.27**	7.42±0.66	7.93±0.86
	G7	6.90±0.47	6.94±0.54	7.30±0.35*	7.67±0.97	7.30±0.18	7.37±0.23
Zn-비교구	G8	6.29±0.36	6.58±0.70	5.86±0.66	7.16±0.57	6.77±0.06	6.78±0.57

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:개) <섭이기간:45일>	
		총산란수	평균산란수
대조구	G1	473	10.51
Zn-대조구	G2	460	10.22
	G3	457	10.16
	G4	455	10.11
Zn-시험구	G5	461	10.24
	G6	466	10.36
	G7	455	10.11
Zn-비교구	G8	434	9.64

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 14. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		체중 (unit:g)				
		0일	36일		49일	
			평균체중	증감(+/-)	평균체중	증감(+/-)
대조구	G1	1.64	1.89	0.25	1.77	-0.11
Zn-대조구	G2	1.83	2.10	0.27	1.76	-0.34
	G3	1.75	2.28	0.53	1.77	-0.51
	G4	1.76	2.19	0.43	1.85	-0.34
Zn-시험구	G5	1.87	2.10	0.23	1.78	-0.32
	G6	1.61	2.14	0.54	1.79	-0.35
	G7	1.54	2.11	0.57	1.64	-0.47
Zn-비교구	G8	2.03	2.07	0.04	1.79	-0.28

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료).모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 1-4 절 기능성 구리 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe)생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

본 연구에서는 키토산올리고당을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섞이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다.

2. 연구방법

미네랄 소재류 준비

무기 미네랄류

무기태 미네랄류인 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 (주)이노바텍

(한국) 에서 구입하여 시험 간 사용하였다.

시험 유기태 미네랄 소재류

키토산 기질화 제조된 유기태 미네랄 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당 (chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네랄을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다. 이중 시험 간 사용된 유기태 구리 소재류 (이하, Cu-OCHT) 는 구리 55,000 ppm과 나머지는 키토산올리고당이 함유된 구성 이었다.

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(구리) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱” 을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 구리 함유량을 55,000 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 3종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 구리 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 구리 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 구리 제제를 1배, 2배 및 4배 되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리의 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 구리만을 55,000 mg/Ton (1배 농도, Cu-대조구-G1), 110,000 mg/Ton (2배 농도, Fe-대조구-G2)과 220,000 mg/Ton (4배 농도, Cu-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다.

또한 시험사료의 경우는 유기태 구리만을 55,000 mg/Ton (1배 농도, Cu-유기태구-G1), 110,000 mg/Ton (Cu 농도, Cu-유기태구-G2)와 가장 높은 첨가량인 220,000 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Cu-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시 하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

성분 분석

섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19 일) , 실험중기 (32-34일) , 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

계란 총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN,CR-400(Φ 8 mm)/CR-410(Φ 50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은 색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

기본 사료내 미네랄 및 영양성분 조성

사료영양조성내역

기본사료인 “산란톱” 내 주요 영양성분은 전체 중량 대비 옥수수 50 %, limestone 10.48%, 동물성지방 0.7 %, DDGS 20 %, Mineral premix 0.12 %, lysine 0.32 %, vramin premix 0.11 %, MDGP 0.53 %, MHA (Rhodimet) 0.1 %, Soybean meal 8.9 % 이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1 %, phosphorus 0.53 %, methionine+cystein 0.711 %, crude protein 17 %, crude fat 4.94 %, crude fiber 3.73 %, metabolic

energy는 2,789 kcal/kg이었다.

미네랄 함유량 조사

Table 1과 2는 표준 사료인 “산란톱 (중추사료)” 내 미네랄 및 영양성분 조성내역이며, 칼슘은 102,880 mg/Ton, 철분 55,000 ppm, 구리 5,500 ppm, Zn과 Mn은 88,000 ppm이었으며 Se과 요오드는 300과 1,700 mg/Ton이었다.

유기태 미네랄강화 사료내 미네랄 함유량 조사

유기태 강화 사료

사료는 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준 (1배) 으로 하여 핵심 무기태 미네랄을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 칼슘의 경우에는 무기태 미네랄 칼슘을 대체하여 유기태 칼슘을 농도별 (0.5, 0.75, 1, 2, 4배 농도) 로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다. 같다(Table 4).

대조구(정상구) 대비 평가

대조구 대비 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

계란품질 항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 구리의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1~2배, 난각 두께 4배, 난백과 난황 높이 1~2배, 난각 및 난황색 1~4배였다. 산란계 대상 생장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적 농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구) 는 2~4배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 1~2배였다.

무기태 구리 사료 평가

무기태 구리 대비 키토산 기질 유기태 구리의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 4배, 가식부 무게 2배, 난각 두께 4배, 난백 및 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 1~4배였다. 산란계 대상 생장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구) 는 1~2배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 무기태 구리최적 농도는 1~2배였다.

안전성 및 생육 증진성 최적 첨가농도

무기태 구리 제제 대체를 위해 제조된 유기태 구리 제제는 일반 사료를 섞이한 정상구와 무기태 구리를 섞이한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다.

평가항목

계란 총무게 변화

Table 5는 무기태 키토산올리고당 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섞이 시킨 산란계에서 생산한 계란 총무게 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

정상사료, 무기태 구리와 유기태 구리를 산란계에 섞이시킨 후, 계란 전체 무게를 측정하였다. 정상군 대비 섞이 18일째에 무기태 구리군은 -1.89~ 10.34 %, 유기태 구리군은 -0.34~13.5 %로 유기태 실험군 중 G5군(ORG Cu-1)을 제외한 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 정상대비 유기태 실험군 중 G6군(ORG Cu-2)이 13.5 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 50.36 ~58.44 g 범위로 무기태 군의 생중량 49.5~56.3 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섞이 19일째에 무기태 구리군은 -6.4~1.55 %, 유기태 구리군은 -11.2~-3.53 %로 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 감소하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 47.5~51.0 g으로 무기태 군의 생중량 49.6~53.6 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섞이 32일째에 무기태 구리군은 7.45~12.2 %, 유기태 구리군은 -1.5~8.11 %로 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)을 제외한 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 50.2~55.6 g 범위로 무기태 군의 생중량 55.2~58.2 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섞이 33일째에 무기태 구리군은 0.27~6.31 %, 유기태 구리군은 -11.4~1.21 %로 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)을 제외한 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 49.5~54.5 g 범위로 무기태 군의 생중량 55.3~58.9 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섞이 43일째에 무기태 구리군은 -2.11~9.76 %, 유기태 구리군은 -0.29~16.31 %로 유기태 G6군(ORG Cu-2)을 제외한 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 51.7~61.9 g 범위로 무기태 군의 생중량 52.9~57.4 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섞이 44일째에 무기태 구리군은 -16.7~-4.21 %, 유기태 구리군은 -0.89~-8.83 %로 유기태 실험군 모두에서 계란 총무게가 감소하였다.

유기태 구리군의 계란 전체 무게는 50.8~54.7 g 범위로 무기태 군의 생중량 47.2~52.9 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(난황+난백) 생중량 변화

Table 6은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섞이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 가식부(난백+난황) 생중량 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계

효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다. 정상사료, 무기태 아연과 유기태 아연을 산란계에 섭취시킨 후, 계란 가식부 생중량을 측정하였다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 구리군은 -3.69~1.92 %, 유기태 구리군은 -7.88~1.08 %로 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)을 제외한 다른 실험군에서 생중량이 감소하였다. 유기태 구리군 중 G7군(ORG Cu-4)이 1.08 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 생중량은 78.43~85.53 g 범위로 무기태 군의 생중량 81.6~86.27 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 19일째에 무기태 구리군은 -1.00~0.69 %, 유기태 구리군은 -7.32~1.74 %로 유기태 구리 실험군 별로 생중량이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 구리군 중 G7군(ORG Cu-4)이 1.74%로 가장 많이 증가하였지만, 통계적으로 유의성은 없었다. 유기태 구리군의 생중량은 79.23~86.54 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.19~85.62 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 구리군은 -5.23~0.96 %, 유기태 구리군은 -8.09~0.77 %, 유기태 미네랄 혼합군은 -0.97 %로 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)을 제외한 다른 군에서 생중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G6군(ORG Cu-2)이 0.77 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 구리군은 -2.53~-0.68 %, 유기태 구리군은 -3.78~-1.13 %로 유기태 구리 실험군 모든 실험군에서 생중량이 감소하였다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 구리군은 0~0.91 %, 유기태 구리군은 0.47~3.5 %로 유기태 구리 모든 실험군에서 생중량이 증가하였다. 유기태 구리 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 3.5 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 생중량은 84.98~87.65 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.58~85.36 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 구리군은 -1.28~0.41 %, 유기태 구리군은 -6.45~1.57 %로 유기태 구리 실험군 중 G6군(ORG Cu-2)을 제외한 다른 군에서 생중량이 증가하였다. 유기태 구리 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 1.57 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 생중량은 80.29~86.83 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.39~85.82 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 무기태 및 유기태 구리는 계란 가식부 생중량에 영향을 주는 것을 확인하였다. 가식부 생중량은 유기태 아연 실험군에서 전체적으로 섭이 43일째 정상군 대비 증가하였다. 유기태 아연 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 다른 군들에 비해 가식부 생중량 증가가 확인되었다. 유기태 군과 무기태 군 사이에는 가식부 생중량 변화에 차이가 없었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배 였으며, 대조군 대비 2배였다.

계란 가식부(난황+난백) 건조중량 변화

Table 7은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 가식부(난백+난황) 건조중량 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다. 정상사료, 무기태 구리와 유기태 구리를 산란계에 섭취시킨 후, 계란 가식부 건조중량을 측정하였다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 구리군은 1.13~15.09 %, 유기태 구리군은 0.82~12.57 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G5군(ORG Cu-1)이 12.57 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 19.57~22.2 g 범

위로 무기태 군의 건조중량 21.99~22.85 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 19일째에 무기태 구리군은 27.38~32.98 %, 유기태 구리군은 31.37~34.16 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G7군(ORG Cu-4)이 34.16 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 22.92~23.89 g 범위로 무기태 군의 건조중량 21.66~23.47 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 구리군은 0.14~8.61 %, 유기태 구리군은 1.15~13.39 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G7군(ORG Cu-4)이 13.39 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 21.79~24.87 g 범위로 무기태 군의 건조중량 21.57~23.57 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 구리군은 -0.15~3.14 %, 유기태 구리군은 0.91~28.18 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G5군(ORG Cu-1)이 28.18 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 20.83~28.74 g 범위로 무기태 군의 건조중량 20.61~21.31 g 범위로 무기태 구리군 G2(Con-1) 대비 유기태 구리군 G5군(ORG Cu-1)에서 25.8 % 증가하였다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 구리군은 21.0~22.3 %, 유기태 구리군은 15.84~21.25 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G6군(ORG Cu-2)이 21.25%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 20.26~21.25 g 범위로 무기태 군의 건조중량 21.6~21.94 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 구리군은 5.39~10.12 %, 유기태 구리군은 2.83~9.79 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G6군(ORG Cu-2)이 9.79%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 23.32~25.12 g 범위로 무기태 군의 건조중량 23.95~25.21 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 무기태 및 유기태 구리가 계란 가식부 건조중량에 영향을 주는 것을 확인하였다. 유기태 구리 실험군 중 G5군(ORG Cu-1), G7군(ORG Cu-4)군이 측정 기간 동안 건조중량 증가가 다른 군에 비해 높았다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네럴 대비 2배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8은 무기태 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 난각 두께 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 구리군은 -2.5~-10.8 %, 유기태 구리군은 -20.6~-10.8 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 감소하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.34~0.37 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.37~0.4 mm 범위로 차이가 없었다. 정상군 대비 섭이 19일째에 무기태 구리군은 2.56~11.63 %, 유기태 구리군은 7.32~13.64 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 13.64%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.41~0.44 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.39~0.43 mm 범위로 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 구리군은 -32.3~-5.1 %, 유기태 구리군은 -13.9~-2.5

%로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 감소하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.38~0.4 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.31~0.39 mm 범위와 수치 차이는 있었다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 구리군은 -2.63~ 2.5%, 유기태 구리군은 -14.71~9.3%로 유기태 실험군 중 G5군(ORG Cu-1)을 제외한 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 9.30%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.34~0.4 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.38~0.4 mm 범위와 차이는 없었다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 구리군은 0~5 %, 유기태 구리군은 5~9.52 %로 모든 유기태에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G5군(ORG Cu-1)이 9.52 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.4~0.42 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.38~0.4 mm 범위와 차이는 없었다. 정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 구리군은 2.7~21.74 %, 유기태 구리군은 -12.5~7.69 %로 유기태 실험군 중 G6군을 제외한 다른 군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 7.69%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.32~0.39 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.37~0.46 mm 범위와 차이는 없었다.

본 실험 결과 무기태와 유기태 구리가 난각 두께에 영향을 주는 것을 확인하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 다른 군에 비해 난각 두께를 증가시키는 것을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배 였으며, 대조구 대비 4배였다.

계란 난황고 변화

Table 9는 무기태 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)를 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서 1.11 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 19일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 1.11% 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭이한 군에서는 최고 -2.45 %까지 난황고 가 감소하였다.

실험중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 4배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서 9.2 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 4배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 33일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 4배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 4배 처리 시는 9.2% 증강되었는데 반하여 4배 이하를 섭이한 군에서는 최고 -8.6 %까지 난황고가 감소하였다.

실험후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서

8.11 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 43일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 8.11 % 증가되었는데 반하여 2배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -1.3 %까지 난황고가 감소하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배 였으며, 대조구 대비 2배였다.

계란 난백고 변화

Table 10은 무기태 대비 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험전기(섭이18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 9.46 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 18일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 9.46 % 증가되었는데 반하여 2배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -4.03 %까지 난백고가 감소하였다.

실험중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 -15.1 %로 가장 적게 감소하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 적게 감소시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 32일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 -15.1 % 감소되었는데 1배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -38.4 %까지 난백고가 감소하였다.

실험후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배(ORG Cu-1군)를 섭취시킨 군에서 13.1 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 44일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 13.1 %가 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -13.86 %까지 난백고가 감소하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란(난각) 착색도 변화

Table 11는 무기태 대비 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을

수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 산란계 난각의 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 평가하였다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 4배를 섭이시킨 군에서 L값 3.83 %, 유기태 구리 2배 a값 21.66 %, 유기태 구리 2배 b값을 12.55 %로 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 2, 4배 처리한 경우 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 중기(섭이33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배를 섭이시킨 군에서 L값 4.76 %, 유기태 구리 1배 a값 7.69 %, 유기태 구리 4배 b값 -18.8 % 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 후기(섭이 41~44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서 L값 6.77 %, 유기태 구리4배 a값 7.59 %, 유기태 구리 1배 b값 10.67 % 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다

Cu-OCHT제제는 전체적으로 난각의 착색도를 L값 6.76 %, a값 21.66 %, b값 12.55 %이상의 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 1배 수준이었다.

계란(난황) 착색도 변화

Table 12는 무기태 대비 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 산란계 난황의 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 평가하였다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배를 섭이시킨 군에서 L값 18.01 %, 유기태 구리 1배 a값 61.8 %, 유기태 구리 2배 b값 31.7 %로 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1~2배 처리한 경우 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 중기(섭이 33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배를 섭이시킨 군에서 L값 7.0 %, 유기태 구리 1배 a값 52.9 %, 유기태 구리 4배b값 -2.3 % 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 후기(섭이 41~44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 4배를 섭이시킨 군에서 L값 17.5 %, 유기태 구리 1배(ORG Cu-1군) a값 31.2 %, 유기태 구리 4배농도는 b값을 27.3 % 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다

Cu-OCHT제제는 전체적으로 난각의 착색도를 L값 18 %, a값 61 %, b값 31 % 이상의 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 1, 4배 수준이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2~4배였고, 대조구 대비 2~4배였다.

혈액 내 주요 혈구 수치 변화

Table 13은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서

섭이 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다.

이를 위하여, 전체 시험간 36일 경과 시, 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit: $10^6/\mu\text{l}$), WBC(unit: $10^3/\mu\text{l}$), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다.

본 실험에 사용된 공시동물은 중추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다. 일반사료를 공급한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 대조군 대비 구리만을 보유토록 제조된 Cu-OCHT 소재류의 혈액조성에 미치는 효과를 평가함으로써 최종 안정성 관련 결과를 확인 하였다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 구리 2배를 섭이시킨 군에서 3.59 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우는 미네랄을 2배 처리한 경우는 RBC 수치를 증가시키는 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 농도에서 최저 -27.89 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류별 섭이에 따라 증가시키는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 지방 축적에 따른 간 지방 손상 및 사육환경 조건 등에 따라 유발된 염증 반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위는 정상군 1.88~2.01 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 아연군 1.84 ~2.03 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 아연군 1.47~1.95 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 아연 4배를 섭이시킨 군에서 -5.58 %로 가장 적게 감소하는 결과를 보였다. 이 결과는 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 아연군 46.0~71.67 %, 유기태 아연군 56.33~71.67 % 이었다.

본 실험 결과, 구리 유기태 소재는 산란계의 지방 축적으로 인한 피해를 감소시킬 수 있으며, WBC, RBC 수치를 증가시켰다. 최적 농도는 2배였으며, 이 농도에서는 이미 피해를 입은 간 등에 무리를 주지 않으면서 혈액 관련 수치를 증가시키거나 동등성을 유지시켜 면역시스템을 유도하는 것으로 평가되었다

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 구리 1배를 섭이시킨 군에서 14.26 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우는 미네랄을 1배 처리한 경우는 WBC 수치를 증가시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭이는 최저 -19.66 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.3~337.9 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 구리군 273.1~380.3 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 구리군 282.3~363.0 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 2~4배였다. .

산란율 변화

Table 14는 무기태 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 산란계 내 산란율의 변화를 확인함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 정상사료, 무기태 구리와 유기태 구리를 산란계에 섭취시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭취 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 구리를 섭취 시킨 군에서는 G5군이 10.11개로 가장 높았다. 무기태 구리군은 8.64~9.58개이었으며, 유기태 구리군은 8.64~9.58개였다. 유기태 구리 섭취 군은 무기태 구리 사료를 먹인 군과 비교하여 산란수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

산란계 체중 변화

Table 15는 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 체중 변화의 차이를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다.

전체적인 무게변화는 36일째에는 정상군이 0 일군과 비교하여 0.25g 증가하였고, 무기태 구리군 2.11~2.19g, 유기태 구리군이 2.14~2.16g 증가하였다. 49일째에는 정상군이 0 일군과 비교하여 -0.11g으로 감소하였고, 무기태 구리군 -0.47~ -0.38g, 유기태 구리군이 -0.50~-0.32g 감소하였다. 유기태 실험군의 무무게 변화 패턴은 정상군과 동일하였는데, 36일째에는 모든 군에서 증가하다가, 산란이 본격적으로 진행되면서 49일 경과 시는 모두 감소하는 패턴을 나타내었다.

유기태 소재류 처리군의 경우는 정상군 대비 체중량을 기준으로 평가할 때, 유기태화 소재류 별 그리고 농도별 처리에 따른 장단기적 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되어 아연의 유기태화에 따라 발생할 수 있는 독성요인은 없는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 유기태화 미네랄 소재류는 최고 4배까지 섭취한다 하더라도 생체중에 미치는 안전성에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

4. 종합결론

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 구리 제재 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란고품질과 산란계 안전성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안전성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 구리 사료의 최적 농도 범위는 무기태 대조구 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

바. 유기태 구리 제재는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 구리를 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사. 유기태 구리 소재의 관련 현장평가를 통하여, 현장형 사료첨가제 제조 레시피 정립이 완료되었으며, 가축 현장에 대한 현장적용 매뉴얼 및 대량생산 시스템까지 연계되어 확립되었다.

Table 1. 산란계(중추용) 표준 사료내 사용된 무기 미네랄류 및 미네랄 영양원 조성표

원 료 (미네랄 종류)		무기미네랄 첨가량(%) 및 목표미네랄 함유량		사료내 순수 미네랄 함유량 (mg)/1000kg	비고
		사료내 첨가량 (g)	목표 미네랄 함유량 (%)		
Ca	CaCO ₃	261.79	39.3	102,880	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	183.33	30	55,000	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	251.43	35	88,000	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	16.18	34	55,000	
Se	Na ₂ SeO ₂	0.7	43	300	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	283.87	31	88,000	
I	CaIO ₃	0	63	1,700	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	0	33	0	

-(주) 현대사료, 기술연구소 자료

Table 2. 산란계(중추용) 표준사료 (사료 톤당 기준) 내 사용된 영양원소류 조성내역

Ingredients (%)	Layer Feed (20 ~ 29 Week)
Corn	50
Wheat	4.39
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
Chemical composition calculated %	Normal group
Metabolic energy, kcal/kg	2,780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

-(주)현대사료, 기술연구소 자료

Table 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 아연 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네랄류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네랄 (Cu-OCHT) 첨가량별 사료내 미네랄 조성표					
		유기태 소재 첨가량 (g/사료톤당)			미네랄 함유량 (mg/1톤)		
		1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	102,880	261.79			102,880		
Fe	55,000	183.33			55,000		
Zn	88,000	251.53			88,000		
Cu	5,500	16.18	32.36	64.72	5,500	11,000	22,000
Se	300	0.7			300		
Mn	88,000	-			88,000		
I	1,700	-			1,700		
CO	0	-			0		

Cu-OCHT : 키토산 기질화 구리 유기태 소재

Table 4. 키토산 기질 유기태 구리 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

생장 및 안전성 평가 최적 농도 (% , 증감율)				
평가		세부 평가 항목	정상구 대비	무기태 대비
생장 및 안전성평가	생장특성	생장을	1배 (-3.9%)	2배 (20.8%)
	혈액안전성	적혈구	4배 (14.3%)	1배 (24.7%)
		백혈구	2배 (3.6%)	2배 (5.6%)
		림프구	4배 (-4.6%)	4배 (35.8%)
계란품질	총무게		2배 (13.5%)	4배 (23.7%)
	가식부 무게(건조)		1배 (45.3%)	2배 (17.9%)
	가식부 무게(비건조)		2배 (2.8%)	2배 (6.2%)
	난각두께		4배 (18.2%)	4배 (29.5%)
	난황높이		2배 (11.2%)	4배 (14.7%)
	난백높이		1배 (16.5%)	4배 (43.4%)
	난황색	(L, 명도)	2배 (9.6%)	2배 (11.1%)
		(a, 붉은색)	4배 (34.3%)	4배 (38.1%)
		(b, 노란색)	1배 (22.7%)	1배 (26.4%)
	난각색	(L, 명도)	4배 (29.4%)	4배 (30.5%)
		(a, 붉은색)	1배 (87.8%)	1배 (87.8%)
		(b, 노란색)	4배 (37.0%)	4배 (43.3%)
	최적 농도			1~2배

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	50.53±1.97	52.86±3.79	51.09±2.31	55.19±5.10	51.86±2.53	55.19±2.07
Cu-대조구	G2	51.65±1.91	53.36±2.36	58.21±1.72	57.2±39.41	52.98±1.63	52.96±1.47
	G3	56.36±2.63	53.69±0.47	56.29±1.66	58.91±4.19	56.11±5.53	51.49±0.96
	G4	49.59±2.15	49.67±3.85	55.20±0.37	55.34±2.41	57.47±2.56	47.28±1.04
Cu-시험구	G5	50.36±0.64	50.89±2.03	55.60±2.28	54.53±2.82	57.04±0.31	54.70±1.18
	G6	58.44±3.85	51.06±3.26	54.05±2.04	54.48±2.66	51.71±2.02	50.85±6.67
	G7	52.31±1.81	47.52±1.10	50.29±2.34	49.54±2.15	61.97±7.23	51.43±1.25

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 가식부무게(비건조상태) 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	84.61±0.57	85.03±1.46	86.35±0.49	86.16±1.31	84.58±2.24	85.47±0.82
Cu-대조구	G2	81.60±0.48	84.43±0.43	87.18±2.11	85.27±4.57	84.58±2.36	85.50±1.09
	G3	84.36±0.78	84.19±1.77	82.06±4.81	85.58±2.13	84.98±2.11	84.39±1.62
	G4	86.27±1.29	85.62±1.65	85.65±1.00	84.03±3.14	85.36±1.34	85.82±1.52
Cu-시험구	G5	84.05±1.29	79.23±9.26	86.47±0.66	85.20±0.90	86.39±0.69	86.69±0.54
	G6	78.43±11.7	85.21±0.75	87.02±0.89	85.05±2.34	84.98±0.45	80.29±10.0
	G7	85.53±0.58	86.54±0.62	79.89±8.47	83.02±3.10	87.65±0.48	86.83±0.51

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 가식부무게(건조상태) 변화

시험구		가식부무게 (건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	19.41±1.67	15.73±6.04	21.54±1.14	20.64±2.16	17.05±2.15	22.66±2.94
Cu-대조구	G2	21.99±1.18	21.66±0.27	23.57±2.77	21.31±0.50	21.60±1.65	23.95±2.45
	G3	21.84±3.23	23.07±0.80	21.57±1.35	20.61±2.83	21.78±2.72	25.21±2.73
	G4	22.86±0.28	23.47±0.60	21.82±0.09	20.97±1.94	21.94±1.98	24.59±1.90
Cu-시험구	G5	22.20±1.12	23.08±0.49	21.79±0.93	28.74±2.62*	20.41±0.68	23.32±1.33
	G6	19.57±1.34	22.92±1.45	21.99±2.45	22.41±1.53	21.65±2.01	25.12±2.08
	G7	20.74±0.51	23.89±0.83	24.87±4.07	20.83±0.85	20.26±1.37	24.77±0.99

* $P < 0.05$ as compared with G2

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난각 두께변화

시험구		두께 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	0.41±0.03	0.38±0.04	0.41±0.03	0.39±0.03	0.38±0.01	0.36±0.02
Cu-대조구	G2	0.40±0.02	0.41±0.01	0.31±0.06	0.40±0.03	0.40±0.02	0.46±0.02
	G3	0.40±0.01	0.39±0.01	0.38±0.06	0.40±0.04	0.38±0.04	0.40±0.02
	G4	0.37±0.02	0.43±0.02	0.39±0.04	0.38±0.05	0.39±0.03	0.37±0.01
Cu-시험구	G5	0.34±0.04	0.41±0.03	0.38±0.04	0.34±0.01	0.42±0.07	0.37±0.04
	G6	0.35±0.06	0.43±0.02	0.40±0.02	0.40±0.04	0.40±0.04	0.32±0.10
	G7	0.37±0.04	0.44±0.02	0.36±0.03	0.43±0.01	0.41±0.03	0.39±0.04

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고(단위:nm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	15.23±0.39	14.20±1.20	14.37±1.16	14.09±0.05	14.26±0.58	15.13±1.41
Cu-대조구	G2	13.69±0.08	13.78±0.71	15.94±1.06	16.09±1.06	14.42±0.56	13.57±0.33
	G3	14.73±0.73	14.99±1.08	15.35±.70	14.93±0.66	15.46±0.74	14.26±0.57
	G4	13.23±1.11	13.68±1.21	14.46±0.13	14.26±1.71	14.31±1.37	13.81±0.15
Cu-시험구	G5	12.93±0.62	12.64±0.73	14.31±1.33	12.97±0.79	15.04±0.37	15.42±0.21*
	G6	14.56±1.22	14.36±0.76	14.71±0.50	14.95±0.87	15.52±0.23	15.87±0.44
	G7	13.18±1.09	13.86±1.63	14.59±0.97	15.52±0.71	14.45±1.19	14.42±0.79

* $P < 0.05$ as compared with G3

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		난백고(단위:nm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	6.79±0.27	6.66±0.19	7.09±0.64	7.84±0.78	6.63±0.76	6.90±0.58
Cu-대조구	G2	6.86±1.00	6.17±1.61	5.54±0.20	6.97±1.68	6.63±0.76	6.57±1.00
	G3	7.15±0.45	6.61±0.07	5.85±0.32	6.49±1.08	6.67±0.57	6.79±0.45
	G4	6.94±0.86	6.25±0.48	4.49±1.18	6.38±0.78	7.49±0.88	5.79±0.25
Cu-대조구	G5	7.47±0.46	6.73±0.27	6.16±0.42	6.40±0.15	7.50±0.04	7.94±0.66
	G6	7.50±0.58	6.33±0.18	5.12±0.46	6.25±0.42	6.40±0.41	6.34±1.30
	G7	7.12±0.62	6.73±0.28	5.38±0.68	5.44±0.30	6.40±0.10	6.06±0.50

* $P<0.05$ as compared with G2.

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난각색 변화

시험구			난각 (단위:nm)					
			18일	19일	33일	41일	43일	44일
대조구	G1	L	62.12±5.61	61.67±4.51	61.97±1.83	56.51±0.03	58.98±3.46	60.83±2.49
		a	15.87±3.01	15.95±3.01	13.32±2.72	19.15±0.04	18.12±1.49	16.14±3.22
		b	29.84±4.32	28.83±5.92	33.03±2.30	37.31±0.33	37.31±0.04	31.88±2.57
Cu-대조구	G2	L	58.11±0.62	58.73±2.18	61.94±6.45	58.61±2.68	62.66±1.57	61.32±2.05
		a	17.27±3.41	22.40±0.69	14.20±2.16	17.80±3.83	19.00±1.16	16.66±3.53
		b	32.97±1.26	33.92±2.59	29.23±2.22	33.85±4.78	33.84±1.32	34.41±0.73
	G3	L	63.66±2.51	63.83±4.53	60.49±3.22	61.39±4.30	63.90±0.60	63.77±2.41
		a	19.77±1.96	14.16±1.62	17.68±1.88	20.17±1.89	17.98±0.99	13.82±1.72
		b	34.44±0.32	30.48±1.45	27.46±1.39	39.53±0.95	33.59±1.41	34.04±4.27
	G4	L	59.95±7.69	59.03±3.74	63.46±4.09	58.07±2.56	57.78±5.66	63.91±2.46
		a	17.37±1.32	16.38±3.51	12.54±4.00	19.68±0.70	20.10±3.88	13.94±3.94
		b	37.93±6.61	32.93±1.98	30.47±1.04	34.96±2.50	32.57±2.66	33.97±0.63
Cu-시험구	G5	L	59.50±3.19	60.80±3.15	63.41±1.05	60.16±2.00	60.16±2.00	60.88±0.96
		a	15.60±3.79	19.25±1.54	14.43±1.14	17.23±1.35	17.23±1.35	19.88±1.70
		b	34.13±1.24	35.33±2.01	27.12±3.68	37.33±2.03	37.33±2.03	35.69±2.33
	G6	L	59.88±2.28	59.67±2.20	65.07±7.86	59.40±0.71	59.40±0.71	65.25±1.11
		a	17.33±5.37	19.81±0.93	13.44±4.16	18.91±2.92	18.26±0.31	14.63±1.32
		b	32.20±5.02	35.93±0.74	25.58±6.11	35.17±0.12	33.86±0.90	30.07±3.12
	G7	L	61.13±0.02	64.13±3.81	62.34±1.89	64.55±4.94	61.88±3.45	63.79±1.58
		a	20.26±0.05	14.95±1.68	14.09±1.72	16.30±1.53	19.61±1.41	17.64±1.16
		b	32.27±0.09	35.18±0.79	27.78±1.98	36.94±0.83	34.52±1.61	32.56±3.12

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난황색 변화

시험구			난황 (unit:nm)					
			18일	19일	33일	41일	43일	44일
대조구	G1	L	48.83±4.18	53.53±4.58	44.34±0.57	61.54±0.42	61.54±0.42	53.44±4.17
		a	1.40± 0.29	0.50±0.29	1.94±0.88	0.85± 0.06	0.87± 0.06	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	43.51±9.42	37.25±3.09	62.79±2.12	62.79±2.12	43.01±7.44
Cu-대조구	G2	L	50.53±4.69	55.64±8.66	45.18±1.59	62.69±7.30	57.35±2.08	51.76±2.52
		a	1.84±0.86	1.47±0.30	1.92±1.12	1.12±0.47	0.50±0.16	0.82±0.29
		b	43.67±7.89	49.59±6.51	33.55±2.72	60.59±14.5	53.23±1.90	43.27±4.72
	G3	L	58.86±0.06	62.21±2.18	43.61±1.48	66.82±1.38	62.03±1.41	51.68±6.26
		a	1.08±0.08	0.85±0.42	2.04±0.92	0.77±0.84	2.23±0.65	1.81±0.89
		b	55.73±2.34	59.49±7.30	31.53±0.87	66.19±4.92	56.16±1.20	41.32±5.40
	G4	L	49.21±5.10	60.50±3.01	45.15±0.98	65.71±4.76	58.17±4.76	55.37±0.17
		a	0.56±0.26	1.44±1.15	2.09±0.59	1.76±0.72	0.99±0.62	2.20±1.27
		b	41.65±5.68	62.26±3.77	36.43±2.62	60.05±11.0	51.06±9.92	47.82±1.74
Cu-시험구	G5	L	48.44±2.57	59.39±4.02	44.20±3.71	60.33±1.54	60.33±1.54	51.15±5.35
		a	3.67±0.53	1.00±0.98	4.12±0.16	1.71±1.16	1.71±1.16	2.13±0.67
		b	42.18±3.55	54.41±8.39	32.00±2.74	58.27±1.36	58.27±1.36	45.82±4.28
	G6	L	47.63±3.03	62.55±1.21	47.70±2.93	61.15±6.90	60.75±4.85	42.95±9.15
		a	2.16±0.63	1.08±0.53	2.81±1.12	1.55±0.95	2.32±0.85	1.93±1.21
		b	37.33±4.12	57.86±1.60	33.21±3.72	55.18±12.2	52.74±9.60	41.60±1.52
	G7	L	59.56±7.19	60.60±2.75	46.71±3.10	59.05±4.76	57.96±2.04	62.82±1.60
		a	0.12±0.02	1.63±1.23	3.40±0.64	1.87±1.26	0.55±0.17	1.81±0.28
		b	44.475±0.2	57.73±0.71	36.38±2.63	55.57±6.88	50.83±3.81	59.17±2.22

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		적혈구(단위:10 ⁶ /μl)		백혈구(단위:10 ³ /μl)		림프구(단위:%)	
		36일	48일	36일	48일	36일	48일
대조구	G1	1.88±0.32	2.01±0.16	337.87±39.98	311.27±19.62	75.67±0.06	75.00±0.41
Cu-대조구	G2	2.03±0.17	1.93±0.04	380.30±14.14	328.20±59.23	69.00±5.66	66.67±8.62
	G3	1.91±0.06	1.84±0.26	332.80±26.45	308.40±29.90	58.33±4.73	71.67±6.66
	G4	1.97±0.20	1.90±0.04	273.10±39.58	330.17±61.38	46.00±11.31	67.33±6.66
Cu-시험구	G5	1.75±0.25	1.86±0.19	287.90±51.25	363.03±33.3	67.00±7.21	62.33±7.64
	G6	1.95±0.14	1.93±0.11	323.93±42.73	309.53±53.98	56.33±7.37	53.00±6.10
	G7	1.47±0.29	1.85±0.37	282.35±26.94	279.65±30.33	71.67±2.89*	61.00±8.49

*P<0.05 as compared with G4

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 14. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:개) <섭이기간:45일>	
		총계란수	평균계란수
대조구	G1	473	10.51
Cu-대조구	G2	431	9.58
	G3	413	9.18
	G4	389	8.64
Cu-시험구	G5	455	10.11
	G6	414	9.20
	G7	401	8.91

GG1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 15. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 산란계 체중 변화

시험구		체중 (단위:g)				
		0 일	36일		49일	
			평균체중	증감(+/-)	평균체중	증감(+/-)
대조구	G1	1.64	1.89	0.25	1.77	-0.11
Cu-대조구	G2	1.67	2.11	0.44	1.74	-0.38
	G3	1.88	2.19	0.31	1.71	-0.47
	G4	1.97	2.19	0.22	1.77	-0.42
Cu-시험구	G5	1.71	2.14	0.43	1.64	-0.50
	G6	1.97	2.16	0.18	1.84	-0.32
	G7	2.07	2.16	0.08	1.77	-0.38

G1:대조구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(구리첨가량:5500mg/1톤사료),G3:무기태조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:무기태대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G7:유기태시험구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 1-5 절 기능성 셀레늄 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성화 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

셀레늄(Selenium)은 사람과 동물에 매우 낮은 농도로 요구되어지면서, 보통 식물, 가축, 어류 등의 해산물을 통하여 섭취되어 진다. 성인의 하루 추천 섭취량은 $55\mu\text{g day}^{-1}$ 이다(Clark 등., 1998, Yun 등., 2008). 셀레늄은 필수 미량 광물질로서, 항암, 항바이러스 효과, 번식 기능 및 면역력 기능에 중요한 역할을 한다(Jun 등., 1973, Combs 등., 1981). 가금류에서 셀레늄의 적절한 수준은 산란율과 부화율이 개선되고(14), 계란 내 셀레늄 함량이 증가하고(Hassan 등., 1986, Payne 등., 2005,), 공급 형태에 따른 이행 효율은 유기태 셀레늄이 무기태 셀레늄에 비해 높다(Na., 2007).

본 연구에서는 키토산올리고당을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섭이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 기존 일반사료내 무기 미네랄 대체 조건에서 산란계 안전

및 생육 패턴을 평가함으로써 최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립 코져 하였다.

2. 연구방법

미네랄 소재류 준비

무기 미네랄류

무기태 미네랄류인 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 (주)이노바텍 (한국) 에서 구입하여 시험 간 사용하였다.

시험 유기태 미네랄 소재류

키토산 기질화 제조된 유기태 미네랄 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당 (chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네랄을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다. 이중 시험 간 사용된 유기태 셀레늄 소재류 (이하, Se-OCHT) 는 셀레늄 300 ppm과 나머지는 키토산올리고당이 함유된 구성 이었다.

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱” 을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 셀레늄 소재 내 순수 셀레늄 함유량을 300 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 3종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하

여 실험에 사용하였다..

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 셀레늄 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 셀레늄 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란툼’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기태 및 유기태 셀레늄 체제를 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리하는 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 셀레늄만을 300 mg/Ton (1배 농도, Se-대조구-G1), 600 mg/Ton (2배 농도, Se-대조구-G2)과 1,200 mg/Ton (4배 농도, Se-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 셀레늄만을 300 mg/Ton (1배 농도, Se-유기태구-G1), 600 mg/Ton (2배 농도, Se-유기태구-G2)와 가장 높은 첨가량인 1,200 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Se-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시 하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭취에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭취에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭취에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭취 시 확인을 위하여 사료류 섭취 기간에 따라 실험전기 (18-19일) , 실험중기 (32-34일) , 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

계란 총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭취에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭취에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN,CR-400(Φ 8 mm)/CR-410(Φ 50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭취에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭취에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭취에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

기본 사료내 미네럴 및 영양성분 조성

사료영양조성내역

기본사료인 “산란톱” 내 주요 영양성분은 전체 중량 대비 옥수수 50 %, limestone 10.48%, 동물성지방 0.7 %, DDGS 20 %, Mineral premix 0.12 %, lysine 0.32 %, vramin premix 0.11 %, MDCP 0.53 %, MHA (Rhodimet) 0.1 %, Soybean meal 8.9 % 이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1 %, phosphorus 0.53 %, methionine+cystein 0.711 %, crude protein 17 %, crude fat 4.94 %, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789 kcal/kg이었다.

미네럴 함유량 조사

Table 1과 2는 표준 사료인 “산란톱 (중추사료)” 내 미네럴 및 영양성분 조성내역이며, 칼슘은 102,880 mg/Ton, 철분 55,000 ppm, 구리 5,500 ppm, Zn과 Mn은 88,000 ppm이었으며 Se과 요오드는 300과 1,700 mg/Ton이었다.

유기태 미네럴강화 사료내 미네럴 함유량 조사

유기태 강화 사료

사료는 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준 (1배) 으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 셀레늄의 경우에는 무기태 미네럴 셀레늄을 대체하여 유기태 셀레늄을 농도별 (1, 2 및 4배 농도) 로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다. 같다(Table 4).

대조구(정상구) 평가

대조구 대비 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다. 계란품질 항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 구리의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 2배, 난각 두께 1배, 난백과 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 2~4배였다. 산란계 대상 생장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~4배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 대조구 대비 2~4배였다.

무기태 셀레늄 대비 평가

무기태 셀레늄 대비 키토산 기질 유기태 셀레늄의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1~2배, 난각 두께 1배, 난백 및 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 2~4배였다. 산란계 대상 성장 및 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적 농도는 혈구수 (적혈구, 백혈구, 림프구)는 1배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 최종 레시피 정립 결과는 무기태 셀레늄 대비 안전성 및 생육 증진성 최적 농도는 2~4배였다.

안전성 및 생육 증진성 최적 첨가농도

유기태 셀레늄 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 셀레늄을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 계란 총무게, 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다.

평가항목

계란 전체 무게 변화

Table 5는 무기태 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 총 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄은 -4.42~6.55 %, 유기태 셀레늄은 0.15~5.11 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상대비 유기태 실험군 중 G7군이 5.11 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄은 -1.45~8.53 %, 유기태 셀레늄은 -4.06~4.84 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G7군이 4.84 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 32일째에 무기태 셀레늄은 4.06~5.55 %, 유기태 셀레늄은 -1.63~7.73 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G5군이 7.73 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 33일째에 무기태 셀레늄은 1.3~10.9 %, 유기태 셀레늄은 0.5~3.6 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G6군이 3.6 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 43일째에 무기태 셀레늄은 -0.15~7.43%, 유기태 셀레늄은 7.01~14.8 %로 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G6군이 14.8 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 44일째에 무기태 셀레늄은 -4.98~5.90 %, 유기태 셀레늄은 -5.30~4.65 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G6군이 4.65 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배였고,

대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(생중량) 무게 변화

Table 6 무기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 무게(생중량) 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100%) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄은 0.37~2.08 %, 유기태 셀레늄군은 0.84~2.02 %로 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 2.02 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄은 -0.28~2.58 %, 유기태 셀레늄군은 -1.01~1.63 %로 생중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 1.63 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 32일째에 무기태 셀레늄은 -0.94~0.56 %, 유기태 셀레늄군은 -2.91~-1.03 %로 셀레늄 실험군에서 생중량이 감소하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 33일째에 무기태 셀레늄은 -1.96~-0.42 %, 유기태 셀레늄군은 -2.25~1.19 %로 생중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 1.19 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 43일째에 무기태 셀레늄은 -4.95~1.24 %, 유기태 셀레늄군은 -1.44~1.66 %로 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 1.66 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이(100 %) 44일째에 무기태 셀레늄은 0.31~2.63 %, 유기태 셀레늄군은 -2.02~5.18%로 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 5.18 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배였고, 대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(건조중량) 무게 변화

Table 7은 무기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 건조중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄군은 3.72~15.68 %, 유기태 셀레늄군은 -2.32~6.86 %로 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 6.86 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄군은 15.28~18.24 %, 유기태 셀레늄군은 10.56~18.2 %로 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 18.24 %로 가장 많이 증가하였다($p < 0.05$).

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 셀레늄군은 -7.92~1.82 %, 유기태 셀레늄군은 -2.47~8.81 %로 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 8.81 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 셀레늄군은 8.23~12.8 %, 유기태 셀레늄군은 -2.99~-8.35 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 건조중량이 감소하였다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 셀레늄군은 7.88~13.01 %, 유기태 셀레늄군은 3.69~15.03 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7

군이 15.03 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 셀레늄군은 -5.59~9.21 %, 유기태 셀레늄군은 2.91~6.75 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 건조중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 6.75 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비는 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8는 무기태 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 과란율 감소 효과를 알아보기 위하여 계란 난각 두께 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄군은 -41.3~4.65 %, 유기태 셀레늄군은 -5.18~2.38 %로 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 2.38 %로 가장 많이 증가하였다. 하지만, 무기태 대비 유기태 실험군 간에는 통계적 유의성이 있었다($p<0.05$). 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄군은 7.32~11.62 %, 유기태 셀레늄군은 2.56~11.62 %로 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 11.62 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 셀레늄군은 -24.2~-13.88 %, 유기태 셀레늄군은 -13.89~-10.81 %로 난각 두께가 모두 감소하였다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 셀레늄군은 -11.4~2.5 %, 유기태 셀레늄군은 -10.73~23.52 %로 유기태 실험군 중 G6군을 제외하곤, 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 23.52 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 셀레늄군은 7.32~11.63 %, 유기태 셀레늄군은 5.26~16.2 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 16.2 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 셀레늄군은 5.26~12.19 %, 유기태 셀레늄군은 5.26~16.2 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 16.2 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 착색도 변화

Table 9는 무기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황의 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색) 변화를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 33일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째 L값은 무기태 셀레늄군은 -1.98~11.47 %, 유기태 셀레늄군은 -0.54~14.08 %로 L값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 14.08 %로 가장 많이 증가하였다. a값은 무기태 셀레늄군은 -5.26~52.22 %, 유기태 셀레늄군은 29.29~46.76 %로 a값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 46.76 %로 가장 많이 증가하였다. b값은 무기태 셀레늄군은

3.35~14.75%, 셀레늄군은 7.23~19.66 %로 b값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 19.66%로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭취 33일째 L값은 무기태 셀레늄군은 -7.57~6.09 %, 유기태 셀레늄군은 1.35~7.97 %로 L값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 7.97 %로 가장 많이 증가하였다. a값은 무기태 셀레늄군은 -24.35~9.34 %, 유기태 셀레늄군은 29.19~43.27 %로 a값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 43.27 %로 가장 많이 증가하였다. b값은 무기태 셀레늄군은 -20.09~-2.62 %, 유기태 셀레늄군은 -16.07~-4.63%로 b값이 감소하였다.

정상군 대비(100 %) 섭취 44일째 L값은 무기태 셀레늄군은 -3.68~1.83 %, 유기태 셀레늄군은 0.20~14.23 %로 L값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 14.23 %로 가장 많이 증가하였다. a값은 무기태 셀레늄군은 -35.51~3.33 %, 유기태 셀레늄군은 -43.56~21.19 %로 a값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 21.19 %로 가장 많이 증가하였다. b값은 무기태 셀레늄군은 9.56~13.72 %, 유기태 셀레늄군은 0.51~24.54 %로 b값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 24.54 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2~4배였고, 대조구 대비 2~4배였다.

산란계 주요 혈액 수치 변화

Table 10은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 평가 결과는 36일, 48일을 기준으로 하였으며, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte (unit:%)를 측정하였다.

정상군 대비(100 %) 섭취 36일째 RBC 값은 무기태 셀레늄군은 -42.42~7.84 %, 유기태 셀레늄군은 0.54~13.76 %로 RBC 값이 모든 유기태 실험군에서 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 13.76 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭취 48일째 RBC값은 무기태 셀레늄군은 -14.85~0.98 %, 유기태 셀레늄군은 -6.91~5.63 %로 RBC 값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 5.63 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭취 36일째 WBC 값은 무기태 셀레늄군은 -27.75~10.79 %, 유기태 셀레늄군은 -13.27~21.49 %로 RBC 값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 21.49 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭취 48일째 WBC 값은 무기태 셀레늄군은 -10.70~5.42 %, 유기태 셀레늄군은 -6.80~11.45 %로 WBC 값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 11.45 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100%) 섭취 36일째 Lymphocyte 값은 무기태 셀레늄군은 -42.77~-8.87 %, 유기태 셀레늄군은 -30.46~-2.71 %로 모든 실험군에서 값이 감소하였다. 정상군 대비(100 %) 섭취 48일째 Lymphocyte 값은 무기태 셀레늄군은 -21.95~-9.76 %, 유기태 셀레늄군은 -19.67~-13.63 %로 모든 실험군에서 감소하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

산란율 변화

Table 11는 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서

섭이 기간 동안 산란계 내 산란율의 변화를 확인함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 정상사료, 무기태 셀레늄과 유기태 셀레늄을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭이 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 셀레늄을 섭이 시킨 군에서는 G5군(ORG Se-1)이 9.04개로 가장 높았다. 무기태 구리군은 7.93~9.46개이었으며, 유기태 구리군은 8.42~9.04개였다. 유기태 셀레늄 섭이 군은 무기태 셀레늄 사료를 먹인 군과 비교하여 산란수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

산란계 체중 변화

Table 12는 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 체중(몸무게) 변화의 차이를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 전체 실험 기간 공급한 사료량은 산란계 1수당 100g/1일 이었다. 각 실험군 별로 최초(시험전), 중기(36일 경과), 그리고 최종 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 실험군별로 무게를 측정하였다. 결과는 다음과 같다.

전체적인 무게변화는 36일째에는 정상군이 0 일군과 비교하여 0.25g 증가하였고, 무기태 셀레늄군 2.01~2.16g, 유기태 셀레늄군이 2.14~2.22g 증가하였다. 49일째에는 정상군이 0 일군과 비교하여 -0.11g으로 감소하였고, 무기태 셀레늄군-0.50~-0.36g, 유기태 셀레늄군이 -0.48~-0.27g 감소하였다. 유기태 실험군의 무게 변화 패턴은 정상군과 동일하였는데, 36일째에는 모든 군에서 증가하다가, 산란이 본격적으로 진행되면서 49일 경과 시는 모두 감소하는 패턴을 나타내었다.

유기태 소재류 처리군의 경우는 정상군 대비 체중량을 기준으로 평가할 때, 유기태화 소재류 별 그리고 농도별 처리에 따른 장단기적 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되어 아연의 유기태화에 따라 발생할 수 있는 독성요인은 없는 것으로 확인되었다.

결론적으로, 유기태화 미네랄 소재류는 최고 4배까지 섭이한다 하더라도 생체중에 미치는 안전성에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

4. 종합요약

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 적용용법별로 사료첨가형과 생산공장형 형태로 나누어 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 적용용법별로 사료첨가형과 생산공장형 사료를 이용하여 계란고품질과 산란계 안정성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안정성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 셀레늄 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2~4배였고, 대조구 대비 2~4배였다.

바. 유기태 셀레늄 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 셀레늄을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 계란 총무게, 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란 율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 1. 산란계(중추용) 표준 사료내 사용된 무기 미네랄류 및 미네랄 영양원 조성표

원 료 (미네랄 종류)		무기미네랄 첨가량(%) 및 목표미네랄 함유량		사료내 순수 미네랄 함유량 (mg)/1000kg	비고
		사료내 첨가량 (g)	목표 미네랄 함유량 (%)		
Ca	CaCO ₃	261.79	39.3	102,880	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	183.33	30	55,000	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	251.43	35	88,000	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	16.18	34	55,000	
Se	Na ₂ SeO ₂	0.7	43	300	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	283.87	31	88,000	
I	CaIO ₃	0	63	1,700	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	0	33	0	

-(주) 현대사료, 기술연구소 자료

Table 2. 산란계(중추용) 표준사료 (사료 톤당 기준) 내 사용된 영양원소류 조성내역

Ingredients (%)	Layer Feed (20 ~ 29 Week)
Corn	50
Wheat	4.39
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
Chemical composition calculated %	Normal group
Metabolic energy, kcal/kg	2,780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

-(주)현대사료, 기술연구소 자료

Table 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 아연 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네랄류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네랄 (Se-OCHT) 첨가량별 사료내 미네랄 조성표					
		유기태 소재 첨가량(g/사료톤당)			미네랄 함유량 (mg/1톤)		
		1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	102,880	261.79			102,880		
Fe	55,000	183.33			55,000		
Zn	88,000	251.53			88,000		
Cu	5,500	16.18			5,500		
Se	300	0.7	1.4	2.8	300	600	1,200
Mn	88,000	-			88,000		
I	1,700	-			1,700		
CO	0	-			0		

Se-OCHT : 키토산 기질화 셀레늄 유기태 소재

Table 4. 키토산 기질 유기태 셀레늄 소재류 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

생장 및 안전성 평가 최적 농도 (% , 증감율)					
평가		세부 평가 항목		정상구 대비	무기태 대비
생장 및 안전성평가	생장특성	생장율		1배 (20.3%)	1배 (20.3%)
	혈액안전성	적혈구		1배 (27.7%)	1배 (11.4%)
		백혈구		1배 (13.8%)	1배 (39.4%)
		림프구		4배 (-1.8%)	1배 (28.0%)
계란품질	총무게		2배 (16.9%)	2배 (22.0%)	
	가식부 무게(건조)		2배 (35.2%)	1배 (17.0%)	
	가식부 무게(비건조)		2배 (6.1%)	2배 (10.6%)	
	난각두께		1배 (29.4%)	1배 (43.1%)	
	난황높이		4배 (15.7%)	4배 (22.7%)	
	난백높이		4배 (15.9%)	4배 (41.2%)	
	난황색	(L, 명도)		4배 (10.9%)	4배 (14.4%)
		(a, 붉은색)		2배 (36.7%)	2배 (38.9%)
		(b, 노란색)		2배 (20.8%)	2배 (31.4%)
	난각색	(L, 명도)		2배 (31.9%)	4배 (14.4%)
		(a, 붉은색)		2배 (36.7%)	2배 (38.9%)
		(b, 노란색)		2배 (20.8%)	2배 (31.4%)
	최적 농도				2~4배

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	50.53±1.97	52.86±3.79	51.09±2.31	55.19±5.10	51.86±2.53	55.19±2.07
Se-대조구	G2	54.07±1.81	57.79±4.54	53.92±2.58	61.97±2.85	55.81±2.16	58.65±1.35
	G3	48.39±1.81	53.84±4.58	54.09±3.26	55.92±1.81	56.02±4.92	56.12±1.12
	G4	52.52±1.40	47.43±4.21	53.25±5.25	56.61±3.09	51.78±1.14	52.57±2.07
Se-시험구	G5	54.15±3.89	50.8±20.57	55.37±2.96	56.35±4.11	55.77±1.57	52.41±2.70
	G6	52.97±2.28	52.52±1.11	53.11±3.38	57.26±4.01	60.87±4.25	55.52±1.48
	G7	53.25±1.52	55.55±3.61	50.27±8.04	55.46±5.56	56.85±2.46	57.88±1.68

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 가식부(비건조상태) 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	84.61±0.57	85.03±1.46	86.35±0.49	86.16±1.31	84.58±2.24	85.47±0.82
Se-대조구	G2	84.92±0.89	84.79±1.77	85.55±0.62	85.80±0.90	80.59±1.60	87.59±0.63
	G3	85.28±0.63	85.16±1.06	86.84±1.22	84.50±0.74	85.64±0.35	85.74±0.82
	G4	86.41±0.65	87.28±1.20	85.67±2.17	84.97±1.21	84.09±2.73	87.78±1.42
Se-시험구	G5	83.95±1.21	84.18±0.74	85.47±0.51	86.74±1.00	85.59±0.54	83.78±1.30
	G6	85.33±0.50	86.43±1.51	84.87±0.84	87.20±0.75	83.38±3.73	90.14±0.45
	G7	86.35±0.27	85.29±1.97	83.91±2.38	84.26±1.14	86.01±1.00	87.77±0.94

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 가식부(건조상태) 무게 변화

시험구		가식부무게 (건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	19.41±1.67	19.73±1.04	21.54±1.14	20.64±2.16	17.05±2.15	22.66±2.94
Se-대조구	G2	20.99±0.82	24.13±0.86	21.25±0.88	22.80±3.42	20.68±1.58	21.46±4.07
	G3	23.02±0.80	23.99±1.16	21.94±0.76	22.49±1.77	20.85±1.27	24.13±2.62
	G4	20.16±0.71	23.29±1.68	19.96±2.86	23.67±3.66	21.90±2.83	24.96±1.21
Se-시험구	G5	18.97±1.20	24.13±0.28 ^a	21.02±0.84	19.05±4.41	21.31±1.99	24.30±2.29
	G6	20.84±0.65	22.06±1.51	23.15±3.39	19.94±2.02	19.78±2.43	24.10±0.40
	G7	20.50±0.10	22.35±1.18	23.62±4.43	20.04±1.67	22.42±1.30	23.34±0.27

^aP<0.05 as compared with G1

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	0.41±0.03	0.38±0.04	0.41±0.03	0.39±0.03	0.38±0.01	0.36±0.02
Se-대조구	G2	0.33±0.02	0.43±0.03	0.33±0.01	0.39±0.01	0.43±0.01	0.39±0.02
	G3	0.29±0.03	0.41±0.03	0.34±0.08	0.40±0.04	0.41±0.03	0.41±0.01
	G4	0.43±0.03	0.41±0.02	0.36±0.06	0.35±0.04	0.43±0.01	0.38±0.04
Se-시험구	G5	0.42±0.02 ^b	0.43±0.01	0.36±0.07	0.51±0.04 ^{a,b}	0.42±0.03	0.38±0.02
	G6	0.40±0.00 ^c	0.39±0.01	0.37±0.00	0.36±0.01	0.47±0.02	0.40±0.02
	G7	0.39±0.04	0.43±0.01	0.35±0.03	0.42±0.02	0.43±0.03	0.43±0.02 ^a

^a $P < 0.05$ as compared with G1, ^b $P < 0.05$ as compared with G2, ^c $P < 0.05$ as compared with G3

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 난황색 변화

시험구		난황 (단위:nm)					
		18일	19일	33일	43일	44일	
대조구	G1	L	48.83±4.18	53.53±4.58	44.34±0.57	61.54±0.42	53.44±4.17
		a	1.40±0.29	0.50±0.29	1.94±0.88	0.87±0.06	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	43.51±9.42	37.25±3.09	62.79±2.12	43.01±7.44
Se-대조구	G2	L	47.88±1.93	61.90±2.41	41.22±1.93	52.68±9.21	52.87±1.11
		a	2.87±0.78	2.61±0.73	1.56±0.44	0.87±0.53	1.50±1.08
		b	40.88±1.35	59.42±1.36	30.45±4.88	46.68±10.9	47.56±0.51
	G3	L	48.89±1.74	57.98±3.17	44.89±4.41	55.54±5.39	54.44±5.08
		a	2.93±0.75	0.91±0.30	2.09±0.07	1.26±1.04	1.07±0.19
		b	42.04±2.01	53.16±6.12	30.26±9.27	50.31±3.69	49.85±7.28
	G4	L	55.16±4.49	62.15±4.87	47.22±1.88	50.68±4.79	51.54±2.99
		a	1.33±0.74	0.57±0.38	2.14±0.77	1.55±0.95	1.08±0.57
		b	46.35±3.88	59.59±0.53	36.30±0.94	43.64±12.2	49.49±8.37
Se-시험구	G5	L	56.84±0.36	58.75±2.64	44.95±0.08	60.47±0.89	53.55±7.73
		a	1.98±0.80	2.04±1.05	3.00±0.95	1.87±1.45	1.01±0.48
		b	49.18±5.25	55.98±8.84	35.60±1.44	56.74±1.79	44.02±5.45
	G6	L	48.57±3.17	55.96±3.91	46.68±2.43	65.07±3.29	58.96±4.98
		a	2.63±0.43	0.60±0.37	2.74±0.38	1.19±.08	1.84±0.40
		b	42.59±3.50	46.33±5.55	32.09±1.98	58.25±3.78	57.00±1.71
	G7	L	54.76±0.99	60.25±0.55	48.18±1.04	64.77±2.00	62.31±4.46
		a	2.29±0.68	1.38±0.92	3.42±0.58	0.50±0.30	1.11±0.10
		b	48.39±0.30	58.13±0.84	33.51±2.63	58.84±2.86	43.23±1.37

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		적혈구 (unit: $10^6/\mu\ell$)		백혈구 (unit: $10^3/\mu\ell$)		림프구 (unit: %)	
		36일	48일	36일	48일	36일	48일
대조구	G1	1.88±0.30	2.01±0.16	337.87±39.98	311.27±19.62	75.67±0.06	75.00±0.41
Se-대조구	G2	1.32±0.42	1.76±0.13	264.47±49.58	281.17±60.29	67.00±3.46	64.00±5.00
	G3	2.04±0.16	2.03±0.12	316.00±72.13	329.13±49.15	53.00±7.00	68.33±7.64
	G4	1.85±0.45	1.75±0.08	378.75±36.98	288.03±75.74	69.50±19.09	61.50±7.78
Se-시험구	G5	2.18±0.30	2.13±0.07 ^a	430.40±38.89 ^a	351.53±52.39	58.00±7.07	66.00±0.10
	G6	1.89±0.12	1.93±0.13	298.27±45.06	325.71±8.65	68.00±14.53	62.67±9.61
	G7	1.98±0.03	1.88±0.09	324.13±69.87	291.43±88.66	73.67±5.69	65.67±2.31

^a $P < 0.05$ as compared with G2

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총계란수	평균계란수
정상구	G1	473	10.51
	G2	426	9.46
Se-대조구	G3	377	8.38
	G4	357	7.93
	G5	407	9.04
Se-시험구	G6	389	8.64
	G7	379	8.42

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 섭취에 의한 산란계 체중 변화

시험구		체중 (단위:kg)				
		0일	36일		49일	
			평균무게	증감(+/-)	평균무게	증감(+/-)
대조구	G1	1.64	1.89	0.25	1.77	-0.11
Se-대조구	G2	1.94	2.10	0.16	1.74	-0.36
	G3	2.08	2.16	0.07	1.65	-0.50
	G4	2.08	2.01	-0.07	1.65	-0.36
Se-시험구	G5	2.01	2.22	0.21	1.75	-0.48
	G6	1.90	2.16	0.26	1.76	-0.39
	G7	2.07	2.14	0.08	1.87	-0.27

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(n=15).

제 2 절 유청단백 기질화 기능성 미네럴 강화 사료 제조 및 현장평가

제 2-1 절 기능성 칼슘 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질용 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe)생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

미네럴은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가끔에 있어 미네럴의 흡수율을 높인 킬레이트 미네럴 또는 유기태 미네럴 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네럴의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

유청(whey)은 치즈 제조 시 커드로부터 방출되는 불투명하고 황록색을 띤 액체로서, 최근 치즈 소비가 늘어남에 따라 그 생산량도 늘어나고 있으며, 탈지분유 대용품 등으로 사용되고 있는 유가공 부산물이다(Ronsivalli 등, 1990). 세계적으로 치즈 생산의 증가와 더불어 유청의 생산 역시 증가하는 추세에 있다. 유청단백질은 다양한 기능적, 영양적 및 생리활성적 기능을 가지는 단백질이 풍부한 혼합물이다(Yamauchi 등., 1992). 우유 단백질 중에서 유청 단백질은 밀단백질이나 쌀 또는 옥수수단백질에 비해서 전반적으로 필수아미노산의 조성이 우수하여 면역 증강 효과가 우수하다(Ha., 1995., Bounous., 등 1989). 유단백질을 단백질분해 효소로 처리할 경우 allergen의 제거와 기능성 peptide의 생성이 가능하다(Lee 등., 2002). 또한, 유청은 액체 상태로 동물에게 사료로 이용되었으나, 그 후 중세시대에는 의약품, 정력제, 피부 방향제로써 이용하였으며, 화상을 완화시키거나 체력을 회복 시키고, 질병을 치료하는 의약품이나 연고의 구성성분으로서도 이용된 것으로 기록되었다(McIntosh 등., 1998).

본 연구에서는 유단백질을 기질로 하는 유기태 미네럴을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대

비하여 혼합하여 섞이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 이를 위하여, 유기태 미네랄 소재류의 사료 첨가시, 기존 일반사료(미네랄 첨가형)에 해당 유기태 소재를 추가로 첨가하는 조건으로 제조한 사료첨가형(현장 사육농가 적용형)과 대규모 사료제조 공장에서 무기질 미네랄 제제를 대체하는 조건으로 유기태 미네랄 제제를 첨가하는 생산공장형으로 구분하여 **최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립을 위한 현장유효성 평가**를 진행하였다.

2. 연구방법

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱”을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 칼슘 함유량을 102,880 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 0.5, 0.75, 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 5종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 칼슘 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 칼슘 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 0.5배, 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료

류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리의 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 칼슘만을 102,888 mg/Ton (1배 농도, Ca-대조구-G1), 200,576 mg/Ton (2배 농도, Ca-대조구-G2)과 200,576 mg/Ton(4배 농도, Ca-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 칼슘만을 51,440 mg/Ton (0.5배 농도, Ca-유기태구-G0.5), 77,160 mg/Ton (0.75배 농도, Ca-유기태구-G0.75), 102,880 mg/Ton (1배 농도, Ca-유기태구-G1), 205,760 mg/Ton (2배 농도, Ca-유기태구-G2)와 유기태 칼슘을 가장 높은 첨가량인 411,520 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Ca-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN) 을 이용하여 측정하였다.

성분 분석

시험사료류 섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19일) , 실험중기 (32-34일) , 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

계란 총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN, CR-400<(Φ8 mm)/CR-410(Φ50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

기본 사료내 미네랄 및 영양성분 조성

사료영양조성내역

기본사료인 “산란톱” 내 주요 영양성분은 전체 중량 대비 옥수수 50 %, limestone 10.48%, 동물성지방 0.7 %, DDGS 20 %, Mineral premix 0.12 %, lysine 0.32 %, viramin premix 0.11 %, MDCP 0.53 %, MHA (Rhodimet) 0.1 %, Soybean meal 8.9 %

이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1 %, phosphorus 0.53 %, methionine+cystein 0.711 %, crude protein 17 %, crude fat 4.94 %, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789 kcal/kg이었다.

미네랄 함유량 조사

Table 1과 2는 표준 사료인 “산란톱 (중추사료)” 내 미네랄 및 영양성분 조성내역이며, 칼슘은 102,880 mg/Ton, 철분 55,000 ppm, 구리 5,500 ppm, Zn과 Mn은 88,000 ppm이었으며 Se과 요오드는 300과 1,700 mg/Ton이었다.

유기태 미네랄강화 사료내 미네랄 함유량 조사

유기태 강화 사료

사료는 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준 (1배) 으로 하여 핵심 무기태 미네랄을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 칼슘의 경우에는 무기태 미네랄 칼슘을 대체하여 유기태 칼슘을 농도별 (0.5, 0.75, 1, 2, 4배 농도) 로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다(Table 4).

대조구(정상구) 대비 평가

대조구 대비 현장유효성 평가를 실시하였다.결과는 다음과 같다. 계란품질 항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 칼슘의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2 배, 가식부 무게 0.5배, 난각 두께 1배, 난백과 난황 높이 2배, 난각 및 난황색 0.5~1배였다. 산란계 대상 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~4배, 산란율은 2배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안전성 및 생육 증진성 최적 농도는 2~4배였다.

무기태 칼슘 대비 평가

무기태 칼슘 대비 키토산 기질 유기태 칼슘의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 1배, 가식부 무게 0.5배, 난각 두께 1배, 난백 및 난황 높이 2배, 난각 및 난황색 0.5~1배였다. 산란계 대상 안전성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구,백혈구,림프구)는 0.5~4배, 산란율은 2배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안전성 및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다

계란품질 평가

계란 총무게 변화

Table 5는 무기태 유청분말 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란 총무게 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭취시킨 후, 계란 전체 무게를 측정하였다. 정상군 대비 섭취 19일째에 무기태 칼슘군은 -13.04~-4.39 %, 유기태 칼슘군은 -24.31~-12.56 %로 모든 유기태 칼슘 실험군에서 계란 총무게가 감소하는 것을 확인하였다. 유기태 칼슘군의 계란 무게는 46.86~51.75 g 범위로 무기태 군의 생중량 51.53~55.03 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭취 33일째에 무기태 칼슘군은 2.52~7.62 %, 유기태 칼슘군은 -10.24~2.01 %로 유기태 칼슘 실험군 중 G7군(CaWPS-2)를 제외한 다른 실험군에서 계란 총무게가 감소하였다. 유기태 칼슘 실험군 G7군(CaWPS-2)이 2.01 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 계란 전체 무게는 51.28~57.69 g 범위로 무기태 군의 생중량 57.99~61.19 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭취 43일째에 무기태 칼슘군은 -5.47~65.01%, 유기태 칼슘군은 -10.39~3.86%로 유기태 칼슘 실험군 별로 계란 총무게가 증가 혹은 감소하였다. 유기태 칼슘 실험군 G6군(CaWPS-1)이 3.86%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 계란 전체 무게는 51.66~59.32 g 범위로 무기태 군의 생중량 54.07~65.01 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 결과를 통해 계란 전체 무게 변화에 유기태 및 무기태 사료가 관여하는 것을 알 수 있었으며, 유기태와 무기태 칼슘 사료간에는 계란 생중량 전체 무게 변화에 차이가 없었다. 계란 전체 무게 변화는 섭취 18일째 모든 유기태 칼슘 사료 실험군에서 감소하다가 시간의 경과에 따라 칼슘 섭취 농도에 따라 계란 총무게가 증가 혹은 감소하는 경향을 보였다. 유기태 칼슘 실험군 중에서 계란 전체 무게 변화는 G7군(CaWPS-2)에서 다른 군에 비해 효과가 있었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 가식부(난황+난백) 건조중량 변화

Table 6은 무기태 대비 유청분말 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란에서 건조 중량 가식부(난황+난백) 무게 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭취시킨 후, 계란 가식부 건조 무게를 측정하였다.

정상군 대비 섭취 18일째에 무기태 칼슘군은 -9.43~17.89 %, 유기태 칼슘군은 3.56~14.96 %로 모든 유기태 칼슘 실험군에서 가식부 건조 무게가 증가하였다. 유기태 칼슘 실험군 중 G6군이 14.96 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 가식부 건조 무게는 20.13~22.82 g 범위로 무기태 군 21.43~23.64 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭취 33일째에 무기태 칼슘군은 8.95~10.88 %, 유기태 칼슘군은 -2.66~13.28 %로 유기태 칼슘 실험군 중 G8군(CaWPS-4)를 제외한 다른 실험군에서 가식부 건조 무게가 증가하였다. 유기태 칼슘 실험군 G5군(CaWPS-0.5)이 13.28 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 가식부 건조 무게는 20.1~23.8 g 범위로 무기태 군 22.67~23.16 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 칼슘군은 16.05~26.35 %, 유기태 칼슘군은 8.18~19.79 %로 유기태 칼슘 실험군 G5군(CaWPS-0.5)을 제외한 다른 군에서 가식부 건조 무게가 증가하였다. 유기태 칼슘 실험군 G7군(CaWPS-2)이 19.79 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 가식부 건조 무게는 15.76~21.26 g 범위로 무기태 군 20.31~23.15 g 범위였다.

본 결과를 통해 계란 가식부 건조무게 변화에 유기태 및 무기태 사료가 관여하는 것을 알 수 있었으며, 유기태와 무기태 칼슘 사료간에는 가식부 건조 무게 변화에 차이가 없었다. 가식부 건조 무게 변화는 유기태 칼슘 실험군에서 측정 기간동안 정상군 대비 증가하는 경향을 보였다. 특히, G6, G7군(CaWPS-1, CaWPS-2)은 유기태 사료 섭취 기간 동안 가식부 건조 무게가 증가하여 변화에 효과가 있었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 0.5배였으며, 무기태 대비 최적농도는 0.5배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 7는 무기태 유청분말 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란에서 난각 두께 차이를 비교함으로써 계란 파란을 개선을 통한 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 난각 두께를 측정하였다. 정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 칼슘군은 -10.81~4.65%, 유기태 칼슘군은 -56.69~-32.26%로 모든 유기태 칼슘 실험군에서 계란 난각 두께가 감소하는 것을 확인하였다. 유기태 칼슘군의 계란 난각 두께는 0.26~0.31 mm 범위로 무기태 군 0.37~0.43 mm 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 칼슘군은 0~11.36%, 유기태 칼슘군은 -30.0~15.22%로 유기태 칼슘 실험군 별로 난각 두께가 증가 혹은 감소하였다. 유기태 칼슘 실험군 G6군(CaWPS-1)이 15.22%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 계란 난각 두께는 0.3~0.46 mm 범위로 무기태 군 0.39~0.44 mm 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 칼슘군은 7.32~9.52%, 유기태 칼슘군은 -31.03~13.64%로 유기태 칼슘 실험군 중 G6군(CaWPS-1)을 제외한 다른 군에서 난각 두께가 감소하였다. 유기태 칼슘 실험군 G6군(CaWPS-1)이 13.64%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 계란 난각 두께는 0.29~0.44 mm 범위로 무기태 군 0.41~0.42 mm 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적농도는 1배였다.

계란 난황고 변화

Table 8는 무기태 대비 유청분말 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란에서 난황고, 난백고 차이를 비교함으로써 계란 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 난황고를 측정하였다. 정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 칼슘군은 -17.33~-7.48 %, 유기태 칼슘군은 -10.44~-6.58 %로 모든 유기태 칼슘군에서 난황고가 감소하는 것을 관찰하였다. 유기태 칼슘군의 난황고는 13.79~14.29 mm 범위로 무기태 군 12.98~14.17 mm 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 칼슘군은 6.19~13.02 %, 유기태 칼슘군은 7.12~11.33 %로 모든 유기태 실험군에서 난황고가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 G7군(CaWPS-2)이 11.33 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 난황고는 15.17~15.89 mm 범위로 무기태 군 15.02~16.2 mm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 칼슘군은 0.28~8.3 %, 유기태 칼슘군은 6.61~16.27 %로 모든 유기태 칼슘 실험군에서 난황고가 증가하는 것을 관찰하였다. 정상군 대비 난백고가 가장 많이 증가한 군은 유기태 칼슘군은 G7군(CaWPS-2)이 16.27%로 가장 많이 증가하였다($P<0.05$). 유기태 칼슘군의 난황고는 15.27~17.03 mm 범위로 무기태 군 14.3~15.55 mm 범위와 차이를 나타내지 않았다.

유기태 칼슘 실험군 중에서 G7군(CaWPS-2)이 다른 군에 비해 난황고 변화가 관찰되어 변화에 효과가 있었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

계란 난백고 변화

Table 9는 정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 난백고를 측정하였다. 정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 칼슘군은 -8.81~15.23 %, 유기태 칼슘군은 -15.28~7.37 %로 유기태 칼슘군 중 G6군(CaWPS-1)을 제외한 다른 군에서 난백고가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 칼슘군 중 G7군(CaWPS-2)이 7.37 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 난백고는 5.89~7.33 mm 범위로 무기태 군 6.24~8.01 mm 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 칼슘군은 -27.27~-8.14 %, 유기태 칼슘군은 -15.81~-7.4 %로 모든 유기태 실험군에서 난백고가 감소하는 것을 관찰하였다. 유기태 칼슘군의 난백고는 6.77~7.3 mm 범위로 무기태 군 6.16~7.25 mm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 칼슘군은 -2.16~25.84 %, 유기태 칼슘군은 -7.28~14.12 %로 유기태 칼슘 실험군 중 G5군(CaWPS-0.5)을 제외한 다른 군에서 난백고가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 칼슘군 중 G7군(CaWPS-2)이 14.12 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 난백고는 7.4~7.72 mm 범위로 무기태 군 6.49~8.23mm 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

계란 난각 착색도 변화

Table 10은 무기태 유청분말 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란에서 착색도를 비교함으로써 계란 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다.

정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 난각 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색)변화를 측정했다.

정상군 대비 섭이 18일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘군은 -0.98~2.4%, 유기태 칼슘군은 -4.1~5.7%로 유기태 실험군 별로 L값에 변화가 관찰되었다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G6군이 L값이 5.7 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 L값은 59.6~65.9로 무기태 칼

습균 61.5~63.5 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘균은 11~17%, 유기태 칼슘균은 -2.93~26 %로 유기태 칼슘균 G5군을 제외한 다른 유기태 실험군에서 a값이 증가하는 것을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘균 중 G7군 a값이 26 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 a값은 15.3~21.3으로 무기태 칼슘균 17.8~19.0 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘균은 0.47~15%, 유기태 칼슘균은 -10.2~14%, 유기태 혼합균은 11%로 유기태 칼슘균 G5군을 제외한 다른 유기태 실험군에서 b값이 증가하는 것을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘균 중 G8군 b값이 14%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 b값은 27.0~34.7으로 무기태 칼슘균 29.7~35.3 nm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 19일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘균은 -6.5~2.6%, 유기태 칼슘균은 -7.2~8.7%로 유기태 실험군 별로 L값에 변화가 관찰되었다. 정상 대비 유기태 칼슘균 중 G5군이 L값이 8.7 %로 가장 많이 증가하였다. a값을 보면, 무기태 칼슘균은 1.6~25% 였는데 유기태 칼슘균은 -20.5~11 %로 유기태 실험군 별로 a값이 증가 혹은 감소하는 것을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘균 중 G6 군 a값이 11%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 a값은 13.2~16.5으로 무기태 칼슘균 16.2~21.2 nm 범위와 차이가 없었다. b값을 보면, 무기태 칼슘균은 2.7~16% 그리고 유기태 칼슘균은 12~18%로 모든 유기태 실험군에서 b값이 증가하는 것을 관찰하였는데, G8 군의 b값이 16 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 33일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘균은 -6.9~0.5 %, 유기태 칼슘균은 -14.8~5.5 %로 유기태 G7군을 제외한 다른 유기태 실험군에서 L값의 증가가 관찰되었다. 정상 대비 유기태 칼슘균 중 G6 군이 L값이 5.5 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 L값은 53.9~65.6으로 무기태 칼슘균 57.9~63.2 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘균은 12~28 %, 유기태 칼슘균은 -3.5~10%로 유기태 실험군 중 G8 군을 제외한 실험군에서 a 값이 증가하는 것을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘균 중 G6 군 a값이 10 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 a값은 12.9~14.8으로 무기태 칼슘균 13.3~15.7 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘균은 -18.5~-8.1 %, 유기태 칼슘균은 -26.4~-7.6 %로 모든 유기태 실험군에서 b값이 감소하는 것을 관찰하였다. 유기태 칼슘균의 b값은 26.1~30.7으로 무기태 칼슘균 27.9~30.5 nm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 43일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘균은 1.2~11.4 %, 유기태 칼슘균은 5.7~16.4 %로 모든 유기태 실험군에서 L값의 증가가 관찰되었다. 정상군 대비 유기태 칼슘균 중 G5 군 L값이 16.4 %로 가장 많이 증가하였다($P<0.05$). 유기태 칼슘균의 L값은 62.5~70.6으로 무기태 칼슘균 59.7~66.3 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘균은 -10.4~12.8 %, 유기태 칼슘균은 -2.9~8.5 %로 유기태 실험군 중 G7을 제외한 다른 실험군에서 a 값이 증가하는 것을 관찰하였다. 정상대비 유기태 실험군 중 G6 군이 8.5%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 a값은 15.6~17.6으로 무기태 칼슘균 14.6~17.3 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘균은 1.3~2.4 %, 유기태 칼슘균은 -1.03~10.8 %로 유기태 실험군 별로 b값이 증가 혹은 감소하는 것을 관찰하였다. 정상대비 유기태 실험군 중 G8 군이 10.8 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘균의 b 값은 28.7~35.7으로 무기태 칼슘균 32.3~32.6 nm 범위와 차이가 없었다.

계란 난황 착색도 변화

Table 11는 무기태 유청분말 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란에서 착색도 차이를 비교하여 계란 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 정상사료, 무기태 칼슘과 유기태 칼슘을 산란계에 섭취시킨 후, 계란 난황 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색)변화를 측정했다. 정상군 대비 섭취 18일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘군은 -0.47~10.0 %, 유기태 칼슘군은 6.42~3.8 %로 모든 유기태 실험군에서 L값이 증가함을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G7 군이 L값 13.8%로 가장 많이 증가하였다 ($P<0.05$). 유기태 칼슘군의 L값은 52.1~56.6으로 무기태 칼슘군 48.6~54.2 nm 범위와 차이가 있었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘군은 2.7~24.3 %, 유기태 칼슘군은 -17.1~59.2 %로 유기태 실험군 별로 a값이 증가 혹은 감소하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G5 군 a값이 59.2 %로 가장 많이 증가하였다($P<0.05$). 유기태 칼슘군의 a값은 1.16~2.3으로 무기태 칼슘군 1.44~1.51 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘군은 1.8~21.4 %, 유기태 칼슘군은 6.8~18.4 %로 모든 유기태 칼슘군에서 b값이 증가하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G7 군 b값이 18.4 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 b값은 42.3~48.4으로 무기태 칼슘군 40.2~50.2 nm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭취 19일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘군은 2.1~9.3 %, 유기태 칼슘군은 3.2~11.8%로 모든 유기태 실험군에서 L값이 증가함을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G6 군이 L값 11.8 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 L값은 55.3~60.7으로 무기태 칼슘군 54.7~59.0 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘군은 -53.1~-29.3 %, 유기태 칼슘군은 -70.7~-25 %로 모든 유기태 실험군에서 a값이 감소하는 것을 관찰하였다. 유기태 칼슘군의 a값은 0.44~1.2으로 무기태 칼슘군 0.98~1.16 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘군은 3.5~28.6 %, 유기태 칼슘군은 0.3~16.9%로 모든 유기태 칼슘군에서 b값이 증가하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G7군 b값이 16.9 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 b값은 43.6~52.4으로 무기태 칼슘군 45.1~61.0 nm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭취 33일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘군은 -2.8~1.9 %, 유기태 칼슘군은 -1.2~14.5 %로였다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘군은 11.8 ~50.3 %, 유기태 칼슘군은 -145.1~48.8 %로 유기태 실험군 별로 a값이 증가 혹은 감소하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 G5군이 a값 48 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 a값은 0.7~3.7로 무기태 칼슘군 2.2~3.9 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘군은 -12.1~-6.8 %, 유기태 칼슘군은 -12.0~4.6%로 유기태 실험군 소재별로 b값이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 칼슘군의 b값은 33.2~39.0으로 무기태 칼슘군 33.2~34.8 nm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭취 43일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘군은 -19.5~-3.8 %, 유기태 칼슘군은 -19.0~-0.7 %로 모든 무기태, 유기태 실험군에서 L값이 감소함을 관찰하였다. 유기태 칼슘군의 L값은 51.6~61.0으로 무기태 칼슘군 51.4 ~59.2 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘군은 0.0~43.8 %, 유기태 칼슘군은 -128.9~41.2 %로 유기태 실험군 별로 a값이 증가 혹은 감소하는 것을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 G8 군이 a값 41.2%로 가장 많이 증가하였다($P<0.05$). 유기태 칼슘군의 a값은 0.3~1.4로 무기태 칼슘군 0.8~1.5 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘군은 -53.3~-20.0 %, 유기태 칼슘군은 -49.5~-11.2%로 모든 무기태, 유기태 실험군에서 b값이 감소하는 것을

관찰하였다. 유기태 칼슘군의 b값은 42.0~56.4으로 무기태 칼슘군 40.9~52.3 nm 범위와 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 44일째에 L값을 보면, 무기태 칼슘군은 0.0~10.1 %, 유기태 칼슘군은 -2.3~13.2%로 모든 유기태 실험군에서 L값이 증가함을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 중 G5 군이 L값 13.2%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 L값은 54.7~61.6로 무기태 칼슘군 53.4 ~59.4 nm 범위와 차이가 없었다. 정상군 대비 a값을 보면, 무기태 칼슘군은 -101.3~-7.4%, 유기태 칼슘군은 -229.5~26.0%였다. 정상 대비 유기태 칼슘군 G9 군이 a값 26.0%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 a값은 0.4~1.9로 무기태 칼슘군 0.7~1.3 nm 범위와 차이가 없었다. 유기태 혼합군을 섭이시킨 군에서는 1.6 nm로 무기태 혹은 유기태 칼슘 범위내로 차이는 없었다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 칼슘군은 14.4~22.4 %, 유기태 칼슘군은 7.6~-20.2%로 모든 무기태, 유기태 실험군에서 b값이 증가하는 것을 관찰하였다. 정상 대비 유기태 실험군 중 G5 군 b값이 20.2% 가장 많이 증가하였다. 유기태 칼슘군의 b값은 46.5~53.9로 무기태 칼슘군 50.3~55.4 nm 범위와 차이가 없었다.

혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구)수치 변화

Table 12는 무기태 유청분말 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다.

이를 위하여, 전체 실험간 36일 경과 시, 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다. 본 실험에 사용된 공시동물은 중추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰 병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다.

일반사료를 공급한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 대조군 대비 칼슘만을 보유토록 제조된 Ca-WPS 소재류의 혈액조성에 미치는 효과를 평가함으로써 최종 안전성 관련 결과를 확인 하였다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 칼슘 0.75배(CaWPS-0.75군)를 섭이시킨 군에서 12.29 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 CaWPS의 경우는 미네랄을 0.75배 처리한 경우는 RBC 수치를 증가시키는 농도임이 확인 되었다. 그러나, 1배 이상의 농도에서 최저 -9.94 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류별 섭이에 따라 증가시키는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 지방 축적에 따른 간 지방 손상 및 사육환경 조건 등에 따라 유발된 염증반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위는 정상군 1.88~2.01 10⁶/μl, 무기태 칼슘군 1.53~1.92 10⁶/μl, 유기태 칼슘군 1.71~2.23 10⁶/μl 이었다.

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 칼슘 0.5배(CaWPS-0.5군)를 섭이시킨 군에서 16.77 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 CaWPS의 경우는 미네랄을 0.5배 처리한 경우는 WBC 수치를 증가시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭이

는 최저 -27.3 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.2~337.8 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 칼슘군 234.2~372.2 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 칼슘군 265.4~374.0 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 칼슘 4배(CaWPS-4군)를 섭취시킨 군에서 4.05 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 CaWPS의 경우는 미네랄을 4배 처리한 경우는 림프구 수치를 증가시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 유기태 칼슘 섭취 농도에 따라 최저 -25.42 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 칼슘군 57.67~80.33 %, 유기태 칼슘군 60.33~78.16 % 이었다.

산란계 산란수 변화

Table 13은 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 산란수 변화의 차이를 관찰함으로써 유기태 미네랄의 안정성 효과를 평가하였다. 정상사료, 유기태 칼슘을 산란계에 섭취시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다.

실험기간 동안 일반 사료를 섭취 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.87개이었다. 유기태 칼슘을 섭취 시킨 군에서는 G4군(CaWPS-2)이 10.51개로 가장 높았다. 유기태 칼슘군의 평균 산란 갯수는 10.04~10.51개였다. 유기태 칼슘 섭취 군은 정상군과 비교하여 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

4. 종합요약

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란품질과 산란계 성장 및 안전성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 성장 및 안전성 평가 최적 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 표준 사료 대비 유기태 칼슘 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 무기태 대비 2~4배였다.

바. 무기태 칼슘 미네랄 제제 대체형으로 제조된 유기태 칼슘 제제는 표준 사료를 섭취한 대조

구와 무기태 칼슘을 농도별로 섭이한 Ca-대조구에 비해 산란계 성장 및 안전성, 산란계 생산성 등을 향상 시키는 것으로 확인되었다.

사. 유기태 칼슘 소재의 관련 현장평가를 통하여 최종 레시피 완료되어 현장적용성 평가에 공여하였다.

Table 1. 산란계(중추용) 표준 사료내 사용된 무기 미네럴류 및 미네럴 영양원 조성표

원 료 (미네럴 종류)		무기미네럴 첨가량(%) 및 목표미네럴 함유량		사료내 순수 미네럴 함유량 (mg)/1000kg	비고
		사료내 첨가량 (g)	목표 미네럴 함유량 (%)		
Ca	CaCO ₃	261.79	39.3	102,880	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	183.33	30	55,000	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	251.43	35	88,000	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	16.18	34	55,000	
Se	Na ₂ SeO ₂	0.7	43	300	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	283.87	31	88,000	
I	CaIO ₃	0	63	1,700	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	0	33	0	

-(주) 현대사료, 기술연구소 자료

Table 2. 산란계(중추용) 표준사료 (사료 톤당 기준) 내 사용된 영양원소류 조성내역

Ingredients (%)	Layer Feed (20 ~ 29 Week)
Corn	50
Wheat	4.39
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
Chemical composition calculated %	Normal group
Metabolic energy, kcal/kg	2,780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

-(주)현대사료, 기술연구소 자료

Table 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 칼슘 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네랄류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네랄(Ca-WPS)첨가량별 사료내 미네랄 조성표							
		유기태 소재 첨가량(g/사료톤당)				미네랄 함유량 (mg/1톤)			
		0.5배	1배	2배	4배	0.5배	1배	2배	4배
Ca	102,880	183	261	522	1,044	51,440	102,880	205,760	411,520
Fe	55,000	183.33				55,000			
Zn	88,000	251.43				88,000			
Cu	5,500	16.18				5,500			
Se	300	0.7				300			
Mn	88,000	-				88,000			
I	1,700	-				1,700			
CO	0	-				0			

Ca-WPS : 유청단백질 기질화 칼슘 유기태 소재

Table 4. 유청단백질 기질 유기태 칼슘 소재류 안전성 및 생육증진성 최적 첨가농도 설정평가

생장 및 안전성 평가 최적 농도 (% , 증감율)				
평가		세부 평가 항목	정상구 대비	무기태 대비
생장 및 안전성평가	생장특성	생장율	4배 (27.5%)	4배 (29.9%)
	혈액안전성	적혈구	4배 (15.7%)	2배 (41.5%)
		백혈구	2배 (13.7%)	0.75배 (29.8%)
		림프구	2배 (-1.35%)	0.5배 (32.5%)
계란품질	총무게		2배 (17.7%)	2배 (16.1%)
	가식부 무게(건조)		1배 (33.4%)	1배 (21.1%)
	가식부 무게(비건조)		4배 (2.4 %)	0.75배 (4.4 %)
	난각두께		1배 (21.7%)	0.75배 (19.6%)
	난황높이		4배 (12.9%)	4배 (19.8%)
	난백높이		4배 (22.2%)	4배 (27.8%)
	난황색	(L, 명도)	4배 (15.6%)	0.5배 (20.6%)
		(a, 붉은색)	1배 (37.7%)	1배 (37.1%)
		(b, 노란색)	2배 (20.7%)	0.75배 (23.8%)
	난각색	(L, 명도)	4배 (28.1%)	0.5배 (32.7%)
		(a, 붉은색)	2배 (70.8%)	0.5배 (74.3%)
		(b, 노란색)	4배 (39.2%)	0.5배 (45.8%)
	최적 농도			2~4배

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총중량 (단위: g)		
		18일	33일	43일
대조구	G1	58.25 ± 3.36	56.53 ± 1.17	57.03 ± 1.13
Ca-대조구	G2	55.03 ± 1.63	58.67 ± 3.24	61.39 ± 6.59
	G3	51.53 ± 1.95	57.99 ± 2.96	54.07 ± 4.84
	G4	55.80 ± 2.81	61.19 ± 6.11	65.01 ± 3.14
Ca-시험구	G5	51.75 ± 5.65	54.41 ± 2.92	51.66 ± 0.54
	G6	46.86 ± 0.34	52.37 ± 2.98	59.32 ± 1.58
	G7	50.33 ± 0.55	57.69 ± 2.02	58.00 ± 0.41
	G8	51.39 ± 0.52	51.28 ± 1.54	54.59 ± 1.04

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 가식부(건조상태) 무게 변화

시험구		가식부 무게 (건조상태) (단위: %)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	19.41 ± 1.67	20.64 ± 2.16	17.05 ± 2.15
Ca-대조구	G2	21.74 ± 0.29	23.16 ± 3.91	21.24 ± 1.26
	G3	23.64 ± 3.89	22.89 ± 2.49	23.15 ± 2.91
	G4	21.43 ± 0.33	22.67 ± 1.94	20.31 ± 0.58
Ca-시험구	G5	22.31 ± 1.88	23.80 ± 4.22	15.76 ± 4.05
	G6	22.82 ± 1.07	22.25 ± 1.66	21.21 ± 1.75
	G7	20.13 ± 0.56	21.30 ± 0.45	21.26 ± 0.84
	G8	20.48 ± 0.86	20.10 ± 0.78	20.27 ± 0.46

G1: 정상구 (일반사료섭이), G2: 무기태대조구 (칼슘첨가량: 102,880mg/1톤사료), G3: 무기태대조구 (칼슘첨가량: 205,760mg/1톤사료), G4: 무기태대조구 (칼슘첨가량: 411,520mg/1톤사료), G5: 유기태시험구 (칼슘첨가량: 51,440mg/1톤사료), G6: 유기태시험구 (칼슘첨가량: 102,880mg/1톤사료), G7: 유기태시험구 (칼슘첨가량: 205,760mg/1톤사료), G8: 유기태시험구 (칼슘첨가량: 411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균 ± 표준오차로 표시 (개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.01
Ca-대조구	G2	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.42 ± 0.01
	G3	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01
	G4	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.03
Ca-시험구	G5	0.31 ± 0.07	0.42 ± 0.03	0.37 ± 0.06
	G6	0.31 ± 0.04	0.46 ± 0.01	0.44 ± 0.02
	G7	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.01
	G8	0.28 ± 0.02	0.35 ± 0.06	0.29 ± 0.01

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 난각색 변화

시험구			난각색 (단위:nm)		
			19day	33day	43day
정상구	G1	L	61.67±4.51	61.97±1.83	58.98±1.03
		a	15.95±3.01	13.32±2.72	18.12±1.49
		b	28.83±5.92	33.03±2.30	37.31±0.04
Ca-대조구	G2	L	63.33±1.41	61.64±0.89	59.74±5.51
		a	16.21±1.85	15.68±0.89	19.80±2.57
		b	34.57±0.44	30.53±0.33	32.70±2.88
	G3	L	59.42±7.53	63.29±3.09	66.63±3.46
		a	19.27±4.23	15.07±2.40	13.45±1.43
		b	34.77±2.39	27.87±5.22	31.13±0.51
	G4	L	57.87±0.62	57.97±4.00	61.12±3.53
		a	21.24±2.06	18.45±1.53	18.30±2.74
		b	33.85±1.72	30.21±3.73	35.51±1.92
Ca-시험구	G5	L	67.55±3.18	62.08±3.38	70.63±3.83*
		a	14.79±2.73	14.19±1.00	12.38±2.23
		b	30.47±2.88	26.53±6.75	26.63±4.15
	G6	L	57.52±2.34	65.62±1.98	66.27±6.75
		a	17.99±1.95	14.81±2.94	15.82±4.28
		b	35.12±0.41	30.01±1.58	32.13±0.51
	G7	L	64.35±1.96	60.93±7.97	62.56±6.17
		a	16.54±1.47	14.78±1.98	17.28±2.00
		b	33.81±2.55	30.09±0.41	28.37±5.36
	G8	L	65.46±2.53	62.47±0.70	62.56±6.17
		a	13.24±0.93	12.87±1.57	17.28±2.00
		b	32.86±2.83	26.13±3.73	28.37±5.36
	G9	L	64.74±6.22	63.46±4.41	67.08±3.13*
		a	13.68±1.99	13.70±1.63	12.79±0.47
		b	32.74±3.08	30.70±1.05	25.46±0.65

*P<0.05 as compared with Group 1

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 난황색 변화

시험구			난황색 (단위:nm)		
			19일	33일	43일
정상구	G1	L	53.53±4.58	44.34±0.57	59.96±1.83
		a	1.50±0.29	1.94±0.88	0.38±0.01
		b	43.51±9.42	37.25±3.09	53.18±0.26
Ca-대조구	G2	L	57.04±1.05	43.49±4.42	51.47±8.70
		a	0.98±0.19	2.62±1.34	1.55±0.89
		b	54.89±6.55	34.85±6.12	40.96±10.42
	G3	L	59.08±4.32	43.13±4.17	56.67±6.50
		a	1.16±0.12	3.91±1.44	0.87±0.26
		b	61.01±4.25	33.38±4.67	48.70±5.62
	G4	L	54.72±3.02	43.42±1.95	59.28±1.38
		a	0.99±0.25	2.20±0.64	0.99±0.65
		b	45.1±5.01	33.22±1.70	52.31±0.65
Ca-시험구	G5	L	56.18±4.4.3	44.93±1.76	53.41±1.85
		a	1.16±0.88	3.79±0.74	0.87±0.72
		b	47.62±3.89	33.25±1.95	44.91±6.73
	G6	L	60.73±0.09	48.96±0.09	54.31±7.14
		a	0.44±0.07	2.47±0.33	0.38±0.10
		b	43.67±11.3	35.39±5.07	47.90±10.36
	G7	L	58.44±0.49	51.90±5.00	61.08±2.89
		a	0.5±0.32	1.77±0.42	1.10±0.22*
		b	52.41±4.83	35.45±2.86	56.44±6.46
	G8	L	56.06±6.75	49.56±0.34	51.69±3.64
		a	0.74±0.51	1.76±0.52	1.43±0.14*
		b	49.61±7.59	39.08±0.77	42.00±6.90
	G9	L	55.30±6.81	43.78±1.67	54.47±5.94
		a	1.20±0.62	0.79±0.11	0.77±0.58
		b	48.61±6.39	35.57±2.05	49.48±11.79

*P<0.05 as compared with Group 1

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고 (단위:mm)		
		19일	33일	43일
정상구	G1	14.20±1.20	14.09±0.05	14.26±0.58
Ca-대조구	G2	13.68±1.01	15.02±1.28	14.30±0.13
	G3	13.69±0.59	16.20±1.12	15.40±0.45
	G4	14.30±0.80	15.03±0.81	15.55±1.07
Ca-시험구	G5	15.03±0.49	14.52±0.21	15.15±0.72
	G6	14.12±0.57	14.54±0.49	14.76±0.56
	G7	14.37±0.22	15.02±1.82	15.12±0.12*
	G8	14.05±1.38	15.59±1.03	14.07±0.30
	G9	14.33±1.70	15.72±1.70	15.16±1.48

* $P<0.05$ as compared with group 2

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		난백고 (단위:mm)		
		19일	33일	43일
정상구	G1	6.66±0.19	7.84±0.78	6.63±0.76
Ca-대조구	G2	6.73±0.77	6.16±0.46	8.23±1.18
	G3	7.31±0.51	7.25±0.40	6.49±0.33
	G4	7.10±0.25	6.73±0.91	8.94±0.71
Ca-유기태구	G5	7.35±0.11*	5.42±0.50	6.86±0.31
	G6	6.85±0.12	6.92±0.58	6.49±0.55
	G7	7.09±0.31	5.93±0.32	6.51±0.52
	G8	7.62±0.37*	4.91±1.47	6.31±0.12
	G9	7.01±0.11	5.39±0.92	6.58±1.13

*P<0.05 as compared with Group 1

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 칼슘 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		산란수 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총 산란수	평균산란수
정상구	G1	473	10.51
Ca-대조구	G2	455	10.11
	G3	450	10.0
	G4	439	9.75
Ca-시험구	G5	448	9.95
	G6	458	10.17
	G7	456	10.13
	G8	441	9.8
	G9	447	9.8

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G3:무기태대조구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G4:무기태대조구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료),G5:유기태시험구(칼슘첨가량:51,440mg/1톤사료),G6:유기태시험구(칼슘첨가량:102,880mg/1톤사료),G7:유기태시험구(칼슘첨가량:205,760mg/1톤사료),G8:유기태시험구(칼슘첨가량:411,520mg/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 2-2 절 기능성 철 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 2002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

철은 생체 내 거의 모든 대사에 필수 성분으로 비교적 소량이 필요한 광물질 중 하나이지만, 결핍되기 쉬운 영양소로 주요 영양 문제가 되고 있다(Bezkorovainy 등., 1989, Finch 등., 1986, Hallberg., 1984). 생체 내에서 중요한 기능을 하는 철은 자연 상태인 경우 금속염의 경우, 생체내로 흡수될 때 체내 흡수율이 아주 낮아져 그 이용률이 문제점으로 제기되어 왔다. 식품에 함유되어 있는 철은 그 함량도 중요하지만 실제적으로 이용되는 정도를 평가하는 생체 내 이용도가 매우 중요하다(Fritz 등., 1970, Hallberg., 1981, Monsen., 1988). 가축 사료에 첨가되는 철은 제 1철염이 철 첨가제로 대부분 이용되고 있으나, 이들은 체내 흡수율이 비교적 낮고 분뇨로 배설이 많아질 경우, 토양과 목초 등에 오염문제가 발생할 수 있어 철의 흡수율이 높은 철 강화 사료의 개발이 필요하다(Yang 등., 2004).

본 연구에서는 유단백질을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섭이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로

축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 이를 위하여, 유기태 미네랄 소재류의 사료 첨가시, 기존 일반사료(미네랄 첨가형)에 해당 유기태 소재를 추가로 첨가하는 조건으로 제조한 사료첨가형(현장 사육농가 적용형)과 대규모 사료제조 공장에서 무기질 미네랄 제제를 대체하는 조건으로 유기태 미네랄 제제를 첨가하는 생산공장형으로 구분하여 **최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립을 위한 현장유효성 평가**를 진행하였다.

2. 연구방법

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱”을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 칼슘 함유량을 102,880 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 0.5, 0.75, 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 5종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 철 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 철 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리의 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 철만을 55,000 mg/Ton (1배 농도, Fe-대조구-G1), 110,000 mg/Ton (2배 농도, Fe-대조구-G2)과 220,000 mg/Ton(4배 농도, Fe-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다.

또한 시험사료의 경우는 유기태 철만을 55,000 mg/Ton (1배 농도, Fe-유기태구-G1), 110,000 mg/Ton (2배 농도, Fe-유기태구-G2)와 유기태 철을 가장 높은 첨가량인 220,000 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Fe-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN) 을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19일) , 실험중기 (32-34일) , 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN,CR-400(Φ 8 mm)/CR-410(Φ 50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

미네랄 소재류

무기 미네랄류

본 실험을 위해 사용되어진 주요 무기태 미네랄류는(Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se)은 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 로 (주)이노바텍(정읍, 전북, 한국)에서 구입하여 현장시험 목적에 맞게 OEM방식(현대사료 제품<제품명:산란톱>)에서 Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se 미네랄이 제외된 상태로 제조된 제품 구입함)으로 주문 된 산란계 사료에 적정 농도(1배 기준)를 사료에 혼합하여 제조하는데 사용하였다.

비교 유기태 미네럴 소재류(아미네이트 타입)

키토산 기질 유기태 시험 사료와의 비교를 위한 아미네이트 타입 Fe을 (동우화학, 경기도, 한국) 구입하여 키토산 기질 유기태 미네럴 비교시험구를 위한 산란계 사료에 혼합하여 제조(1배)하는데 사용하였다.

시험 유기태 미네럴 소재류(키토산 기질)

키토산 기질 유기태 미네럴 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당(chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네럴을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다.

현장적용 사료 제조 레시피 정립

현장적용 사료는 생산 현장 및 농가의 상황을 고려하여 일반 상용화 제품인 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하였다. 제품에 대한 분석 자료를 본 연구개발의 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다(Table 1~2). 분석 결과를 보면, 현장에서 사용되고 있는 산란계 사료의 주요 미네럴 함유량은 Ca 10,288, Fe 5,500, Zn 8,800, Cu 550, Se 30, Mn 8,800, I 170(mg/100kg 기준)등이었다. 또한, 주요 영양 성분은 전체 중량 대비(%) 옥수수 50, limestone 10.48, 동물성지방 0.7, DDGS 20, Mineral premix 0.12, lysine 0.32, viramin premix 0.11 MDCP 0.53, MHA (Rhodimet) 0.1, Soybean meal 8.9 %이었다.

주요 화합물 조성은 calcium 4.1, phosphorus 0.53, methionine+cystein 0.711, crude protein 17, crude fat 4.94, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789(kcal/kg)이었다.

기능성 강화 사료제 사료

현장시험용 사료는 생산 현장 및 농가의 상황을 고려하여 상용화 된 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 제조하여 현장평가에 활용하였다. 무기태 미네럴 철을 대체하여 유기태 철을 적정농도(1배 기준, 첨가량: 10,288 mg/100kg) 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

현장적용성 평가를 생육 증진성 최적 첨가농도(공통농도)를 선정하여 제 2협동 분시험연계에 활용하도록 하였고, 평가 결과는 다음과 같다(Table 4).

대조구 대비 평가

상용화 되고 있는 산란계 사료에 함유되어 있는 주요 미네럴 함유량(1배 기준)을 기준으로 하여 키토산 기질 유기태 철을 OEM 주문 사료에 1배 농도로 사료에 혼합한 후, 일반사료 대비 유기태 기질 사료의 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

고품질 계란항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상군 대비 유기태 철의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1~4배, 난각 두께 2배, 난백과 난황 높이 1배, 난각 및 난황색 2배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구,백혈구,림프구)는 2배, 산란율은 4배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안정성 및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다.

무기태 미네랄 대비 평가

무기태 철 대비 키토산 기질 유기태 철의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 4배, 가식부 무게 1배, 난각 두께 2배, 난백 및 난황 높이 1~4배, 난각 및 난황색 2배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구,백혈구,림프구)는 2배, 산란율은 4배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안전성 및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다

계란 전체 무게 변화

Table 5 는 무기태 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 총 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 2.07~8.54% 계란무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배를 섭이시킨 군에서 8.54%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 3.09~16.1% 계란무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 16.1%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 32일째에는 모든 실험군에서 계란 총무게가 증가하였고, 33일째에는 유기태 철 2배 처리군에서만 -11.1% 까지 감소하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 1.93~15.6% 계란무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배를 섭이시킨 군에서 15.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정, 43일째에는 모든 실험군에서 계란 총무게가 증가하였고, 44일째에는 유기태 철 1배 처리군에서만 -4.65% 까지 감소하였다 .

결론적으로, Fe-OCHT 제제의 경우는 측정 기간 동안 계란 총무게를 최고 16% 이상 증가를 유도하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

계란 가식부(생중량) 무게 변화

Table 6은 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 생중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 0.12~1.6% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 1.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 0.31~0.66% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 0.66%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 0.11~2.74% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 2.74%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

결론적으로, Fe-WPS 제제의 경우는 측정 기간 동안 가식부 무게를 최고 2.7% 이상 증가를 유도하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 가식부(건조중량) 무게 변화

Table 7 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 건조중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 0.92~47.6% 계란 가식부 생중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배를 섭이시킨 군에서 47.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 19일째 모든 유기태 섭이군에서 정상군 대비 39.4~47.6% 계란 가식부 건조중량 무게가 증가하였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리군에서 5.62~15.6% 계란 가식부 건조중량 무게가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 15.6%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 33일째 모든 유기태 철 실험군에서 5.62~15.6%로 계란 가식부 건조중량 무게가 증가하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 측정 44일째 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이 시킨 군에서 0.44% 증가하였고, 다른 모든 실험군에서 계란 가식부 건조 무게가 감소하였다.

결론적으로, Fe-WPS 제제의 경우는 측정 기간 동안 가식부 무게를 최고 47% 이상 증가를 유도하였으며, 특히, 측정 19일째에는 모든 유기태 실험군에서 가식부 건조 중량이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8은 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 과란율 감소 효과를 알아보기 위하여 계란 난각 두께 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 0.00~10.5% 계란 난각 두께가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 10.5 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 18-19일째 모든 유기태 섭이군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였다. 상업화 된 아미네이트 타입 철(G8군)대비 측정 18일째 유기태 철 모든 군은 유의적인 차이가 있었다($P<0.05$).

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 4.87~14.6% 계란 난각 두께가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배(를 섭이시킨 군에서 14.6 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 32일째 모든 유기태 섭이군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다. 하지만, 상업화 된 아미네이트 타입 철(G8군)대비 측정 32일째 유기태 철 모든 군은 유의적인 차이가 있었다($P<0.05$).

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 2.63~13.8% 계란 난각 두께가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 13.8 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 43일째 모든 유기태 섭이군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

계란 난황고 변화

Table 9은 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황고 증가 효과를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 4.85~7.04% 계란 난황고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 7.04%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 일반 상용화 된 아미네이트 타입 제품(G8군) 대비 유기태 실험군(G7군)에서는 유의적인 차이가 있었다($P<0.05$).

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 2.55~9.95% 계란 난황고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 1배를 섭이시킨 군에서 9.95%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 32일째 모든 유기태 실험군에서 정상군 대비 난황고가 증가하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 1.33~8.34% 계란 난황고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배를 섭이시킨 군에서 8.34%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 측정 43일째 모든 유기태 섭이군에서 정상군 대비 계란 난각 두께가 증가하였다.

결론적으로, Fe-WPS 제제는 측정 기간 동안 난황고를 최고 9% 이상 증가를 유도할 수 있음을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

계란 난백고 변화

Table 10은 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결

수 있는 계란의 품질 중 난백고 증가 효과를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 2.94~30.0% 계란 난백고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배를 섭이시킨 군에서 30.0%로 가장 많이 증가하였고, 측정 18일째 모든 유기태 실험군에서 난백고가 증가하였다($P<0.05$).

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 1.83~6.06% 계란 난백고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 6.06%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 무기태 대비 유기태 군에서는 유의성 있는 차이가 관찰되었다($P<0.05$).

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 0~10.2% 계란 난백고가 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 10.2%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

결론적으로, Fe-WPS 제제의 경우는 측정 기간 동안 난백고를 최고 30% 이상 증가시키는 것을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 1배였다.

계란 난황 착색도 변화

Table 11는 무기태 대비 유기태 철 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황 착색도 변화를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 L값(명도)의 경우 7.78~13.8% 계란 난황 L값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 13.8%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 a값(붉은색)의 경우 12.1~20% 계란 난황 a값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배 2군)를 섭이시킨 군에서 20%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 b값(노란색)의 경우 15.2~35.4% 계란 난황 b값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 35%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 중기(섭이 32-34일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 L값(명도)의 경우 0.1~9.89% 계란 난황 L값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 9.89%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 a값(붉은색)의 경우 6.7~42.7% 계란 난황 a값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 42%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 b값(노란색)의 경우 0.8~10.5% 계란 난황 b값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 10%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 L값(명도)의 경우 0.78~1.29% 계란 난황 L값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 4배를 섭이시킨 군에서 1.29%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 a값(붉은색)의 경우 8.27~86.2% 계란 난황 a값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를

섭이시킨 군에서 86%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 정상군 대비 유기태 철 처리 군에서 b값(노란색)의 경우 1.69~6.5% 계란 난황 b값이 증가하였고, 그 중 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 6.5%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다.

결론적으로, Fe-WPS 제제의 경우는 측정 기간 동안 난황의 L, a, b 값의 증가를 유도할 수 있음을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

혈액 내 주요 혈구 수치 변화

Table 12은 무기태 유청단백기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다.

이를 위하여, 전체 시험간 36일 경과 시, 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit: $10^6/\mu\text{l}$), WBC(unit: $10^3/\mu\text{l}$), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다. 결과는 다음과 같다.

본 실험에 사용된 공시동물은 중추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다. 일반사료를 공급한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 대조군 대비 철만을 보유토록 제조된 소재류의 혈액조성에 미치는 효과를 평가함으로써 최종 안전성 관련 결과를 확인 하였다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 철 2배를 섭이시킨 군에서 6.47%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Fe-WPS의 경우는 미네랄을 2배 처리한 경우는 염증반응을 감소시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭이는 최저 -27.03%까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류를 2배 이상 섭이에 따라 증가시키는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 지방 축적에 따른 간 지방 손상 및 사육환경 조건 등에 따라 유발된 염증 반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위는 정상군 1.88~2.01 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 칼슘군 1.76~2.05 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 칼슘군 1.48~2.14 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 칼슘 2배를 섭이시킨 군에서 -5.1 %로 가장 적게 감소하는 결과를 보였다. 그러나, 2배 이상의 섭이는 최저 -44.23 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 칼슘군 55.0~75.0 %, 유기태 칼슘군 52.0~72.0 % 이었다.

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 칼슘 2배를 섭이시킨 군에서 11.59%로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 미네랄을 2배 처리한 경우는 WBC 수치를 증가시키는 적

정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭이는 최저 -43.92%까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭이에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.27~337.87 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 칼슘군 246.4~403.67 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 칼슘군 234.77~382.17 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

본 실험 결과, 칼슘 유기태 소재는 산란계의 지방 축적으로 인한 피해를 감소시킬 수 있으며, Lymphocyte, WBC, RBC 수치를 증가시켰다. 최적 농도는 2배였으며, 이 농도에서는 이미 피해를 입은 간 등에 무리를 주지 않으면서 혈액 관련 수치를 증가시키거나 동등성을 유지시켜 면역시스템을 유도하는 것으로 평가되었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 2배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 2배였다.

산란계 산란율 변화

Table 13은 정상사료, 무기태 철과 유기태 철을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다. 정상사료, 무기태 철과 유기태 철을 산란계에 섭이시킨 후, 총 계란 개수를 산란계 개체수로 나누어 평균 계란수를 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭이 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 칼슘을 섭이 시킨 군에서는 G7군이 10.16개로 가장 높았다. 무기태 철은 9.80~10.18개이었으며, 유기태 철군은 10.02~10.16개였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 4배였으며, 무기태 대비 최적 농도는 4배였다.

4. 종합요약

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란고품질과 산란계 안정성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안전성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 철 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

바. 유기태 철 제재는 일반 사료를 섭이한 정상구와 무기태 철을 섭이한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 가식부(난황, 난백 무게) 무게, 난황, 난백높이와 난황색을 증

가시켰다. 또한, 무기태 대비 산란계 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사. 유기태 구리 소재의 관련 현장평가를 통하여, 현장형 제조 레시피 정립이 완료되었으며, 가축 현장에 대한 현장적용 매뉴얼 및 대량생산 시스템까지 연계되어 확립되었다.

아. 기능성 분말을 사료에 첨가한 사료를 섭취시킨 경우 난백고 및 난황고 변화에 유의적인 차이가 없다는 연구 보고가 있는데(Park 등., 2012), 본 연구에서는 농도 구배차, 섭취 기간에 따른 난황고 증가에 차이가 있었다. 난황의 색상 성분(착색도)은 소비자들의 계란 기호성과 밀접한 관련이 있는데(Shin 등., 2009, Park 등., 2012, Jang 등., 2007) 본 연구에서는 유기태화 철의 농도 구배차, 섭취 기간별로 난황 착색도가 증가 혹은 감소하였다.

Table 1. 산란계 영양 사료 미네럴 기본 조성 비율

원료 (미네럴 종류)		원료 시료내 목표 미네럴 함유량(%)	사료율	비고
			함량 (mg)/100kg	
Ca	CaCO ₃	39.3	10,288	레시피 (제조 판매 된 현대사료)
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	30	5,500	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	35	8,800	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	34	550	
Se	Na ₂ SeO ₂	43	30	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	31	88,00	
I	CaIO ₃	63	170	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	33	0	

Table 2. 산란계 현장 적용 사료 영양 조성물 비율

혼합물 성분	%
Corn	50
Wheat grain	
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
화합물 조성	
Metabolic energy, kcal/kg	2780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

Table 3. 산란계 대상, 무기이온 첨가 일반사료 대비 유기태 철 강화 사료내 칼슘 첨가내역 (중추용, mg/사료 1톤 기준)

미네랄류	일반사료 (mg/1톤)	유기태 미네랄(Fe-WPS)첨가량별 사료내 미네랄 조성표					
		유기태 소재 첨가량(g/사료톤당)			미네랄 함유량 (mg/1톤)		
		1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	102,880	261.79			102,880		
Fe	55,000	183.33	366.66	733.32	55,000	110,000	220,000
Zn	88,000	251.43			88,000		
Cu	5,500	16.18			5,500		
Se	300	0.7			300		
Mn	88,000	-			88,000		
I	1,700	-			1,700		
CO	0	-			0		

Fe-WPS : 유청단백질 기질화 철 유기태 소재

Table 4. 키토산 기질 유기태 철 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

현장평가 사료유형	안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가																최적 농도
	계란고품질											산란계 안정성					
	총무게	가식부 (난황 +난백) 무게 (건조)	가식부 (난황 +난백) 무게 (비건조)	난각 두께	난황 높이	난백 높이	난각색			난황색			적혈구	백혈구	립프구	산란율	
							(L)	(a)	(b)	(L)	(a)	(b)					
대조구 대비	2배 (10.3%)	4배 (32.2%)	1배 (2.6%)	2배 (23.4%)	1배 (10.8%)	1배 (24.9%)	4배 (11.1%)	1배 (24.9%)	2배 (23.5%)	2배 (30.2%)	2배 (69.3%)	2배 (37.2%)	1배 (15.7%)	2배 (18.6%)	2배 (12.1 %)	2배 (-4.2%)	4배 (-3.5%)
무기태 미네랄 대비	4배 (22.2%)	1배 (31.2%)	1배 (4.23%)	2배 (38.3%)	4배 (19.7%)	1배 (52.9%)	4배 (13.4%)	2배 (34.0%)	2배 (23.6%)	2배 (29.8%)	2배 (78.7%)	1배 (47.4%)	1배 (17.6%)	2배 (17.8%)	2배 (35.5 %)	2배 (23.6 %)	4배 (3.5%)
안정성 및 생육 증진성 최적 첨가 농도(공통적용 농도-본시험연계:2협동 공여)																	
1~2배																	

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	50.53±1.97	52.86±3.79	51.09±0.31	55.19±5.1	51.86±2.53	55.19±2.07
Fe-대조구	G2	51.86±0.86	56.03±6.51	54.29±1.91	59.60±1.27	60.59±3.58	57.89±3.08
	G3	47.90±2.86	51.29±4.08	55.2±1.88	57.22±4.0	53.19±5.15	58.56±2.22
	G4	55.16±2.58	53.16±5.86	55.66±2.3	60.31±3.16	61.89±5.95	55.47±2.31
Fe-시험구	G5	51.58±0.89	52.05±1.93	59.35±0.96	61.43±4.3	57.88±1.43	52.62±1.79
	G6	48.54±4.12	50.44±3.4	56.34±3.67	49.01±5.24	54.25±2.17	56.47±2.31
	G7	54.85±5.06	48.36±3.8	52.67±2.15	61.55±4.05	59.96±3.35	56.26±3.65
Fe-비교구	G8	57.04±8.01	46.68±3.11	55.17±1.67	54.64±1.57	55.00±0.83	54.21±5.71

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 가식부 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	84.61±0.57	85.03±1.46	86.35±0.49	86.16±1.31	84.58±2.24	85.47±0.82
Fe-대조구	G2	83.24±3.78	85.89±1.92	85.17±0.17	86.42±1.29	85.97±1.30	87.93±0.48
	G3	85.31±0.90	87.22±1.98	87.15±0.15	87.22±3.10	83.65±4.40	88.93±0.01
	G4	86.62±3.22	86.83±0.38	85.99±0.37	86.83±0.83	87.39±1.63	87.23±0.18
Fe-시험구	G5	85.97±1.01	85.29±1.88	86.92±0.88	85.82±1.94	86.90±1.85	86.89±0.05
	G6	83.45±1.01	85.14±1.49	86.19±0.47	85.47±1.03	84.52±2.95	85.57±1.88
	G7	84.53±1.21	84.37±0.93	86.18±0.89	86.43±1.18	86.70±2.80	84.79±0.61
Fe-비교구	G8	86.22±3.23	89.00±5.72	85.02±2.58	84.94±1.40	85.45±0.15	86.69±2.46

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 가식부 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	19.41±1.67	15.73±3.04	21.54±1.14	20.64±2.16	17.05±2.15	22.66±2.94
Fe-대조구	G2	21.93±0.41	23.82±0.86	23.99±1.68	23.11±1.79	21.05±1.55	23.79±1.50
	G3	24.14±3.13	23.96±1.16	22.18±0.06	22.49±1.14	17.61±0.02	22.52±0.92
	G4	16.41±1.92	24.01±0.06	22.78±0.69	21.72±3.24	20.77±1.80	25.14±1.51
Fe-시험구	G5	19.59±0.59	21.93±1.61	20.04±0.64	23.86±3.89	16.45±2.07	22.38±0.13
	G6	22.85±3.63	22.68±0.89	19.81±0.27	21.80±2.07	14.32±2.90	22.76±0.62
	G7	18.91±0.60	23.22±0.83	21.24±0.94	22.39±0.79	15.09±2.57	21.92±0.81
Fe-비교구	G8	18.80±1.46	24.67±1.16	21.44±0.41	21.18±0.74	20.53±0.13	23.65±0.86

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	0.41±0.03	0.38±0.04	0.41±0.03	0.39±0.03	0.38±0.01	0.36±0.02
Fe-대조구	G2	0.42±0.04	0.42±0.02	0.38±0.03	0.46±0.03	0.42±0.01	0.41±0.02
	G3	0.41±0.07	0.36±0.06	0.29±0.03	0.38±0.03	0.40±0.01	0.34±0.02
	G4	0.42±0.05	0.44±0.02	0.37±0.02	0.42±0.01	0.41±0.04	0.38±0.03
Fe-시험구	G5	0.44±0.01*	0.40±0.02	0.43±0.02	0.44±0.03	0.39±0.01	0.35±0.01
	G6	0.41±0.02*	0.42±0.01	0.47±0.02**	0.35±0.01	0.39±0.03	0.41±0.01
	G7	0.45±0.04*	0.42±0.04	0.46±0.02	0.41±0.03	0.43±0.02	0.39±0.03
Fe-비교구	G8	0.32±0.02	0.44±0.02	0.38±0.03	0.42±0.03	0.38±0.00	0.37±0.01

* $P<0.05$ as compared with G8, ** $P<0.05$ as compared with G3

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:,55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	15.23±0.39	14.20±1.20	14.37±1.16	14.09±0.05	14.26±0.58	15.13±1.41
Fe-대조구	G2	14.10±0.70	13.96±1.64	15.07±0.26	14.71±0.45	15.25±0.65	14.98±0.41
	G3	13.23±0.34	12.83±0.46	14.10±1.80	15.79±0.71	15.11±2.18	14.98±1.67
	G4	14.07±0.22	15.04±1.40	15.94±0.53	15.07±0.55	15.85±0.33	15.17±1.23
Fe-시험구	G5	15.21±0.18	13.90±0.09	15.80±0.36	15.09±0.69	14.56±0.50	14.37±0.35
	G6	12.88±1.16	13.57±1.01	15.46±0.40	13.12±1.53	14.45±0.70	15.41±1.11
	G7	15.97±0.74	15.20±0.13*	14.95±0.77	14.45±0.41	15.45±1.10	14.20±1.91
Fe-비교구	G8	14.76±1.15	13.03±0.22	14.69±0.78	14.75±0.23	15.24±0.36	13.65±0.31

* $P < 0.05$ as compared with G8

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		난백고 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
대조구	G1	6.79±0.27	6.66±0.19	7.09±0.64	7.84±0.78	6.63±0.76	6.90±0.58
Fe-대조구	G2	7.48±0.88	7.18±1.20	4.90±0.43	8.00±0.42	7.74±0.10	6.50±0.53
	G3	6.42±0.34	6.29±0.87	5.63±0.40	6.67±0.71	6.76±0.25	7.40±0.83
	G4	7.05±0.07	6.43±0.54	4.87±0.77	8.26±0.53	7.76±1.58	7.24±0.44
Fe-시험구	G5	7.87±0.07*	10.35±4.29	7.22±0.07**	7.41±0.38	7.05±0.56	6.90±0.30
	G6	6.99±0.70	6.55±0.42	7.52±0.91	7.23±1.04	7.31±0.09	6.81±0.41
	G7	8.83±0.51*	6.40±0.63	6.66±0.33***	7.82±0.32	7.14±0.64	7.43±1.01
Fe-비교구	G8	6.66±1.11	6.72±0.21	5.86±0.66	6.87±0.57	6.69±0.10	7.03±0.45

* $P < 0.05$ as compared with G1, ** $P < 0.05$ as compared with G2, *** $P < 0.05$ as compared with G4

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:,55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 난황색 변화

시험구		난황색 (단위:nm)							
		18일	19일	32일	33일	41일	43일	44일	
대조구	G1	L	48.83±4.18	53.53±4.58	47.41±6.07	44.34±0.57	61.54±0.42	61.54±0.42	53.44±4.17
		a	1.40±0.29	1.50±0.29	2.73±0.48	1.94±0.88	0.85±0.06	0.87±0.06	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	43.51±9.42	43.20±6.52	37.25±3.09	62.79±2.12	62.79±2.12	43.01±7.44
Fe-대조구	G2	L	54.47±1.61	56.42±5.81	45.90±0.80	44.58±0.83	56.50±0.88	55.49±1.74	56.74±4.31
		a	2.26±0.44	2.03±1.08	2.47±0.87	2.72±0.54	0.71±0.61	1.55±0.31	0.90±0.34
		b	49.50±0.39	48.60±12.45	40.60±2.33	31.09±2.73	50.86±4.56	50.50±13.5	51.66±2.59
	G3	L	53.28±1.49	56.48±2.81	49.59±0.83	47.21±2.24	59.77±2.10	58.05±8.89	55.51±3.69
		a	1.48±0.44	0.98±0.91	2.13±1.13	2.26±0.02	0.57±0.11	1.91±1.30	0.74±0.38
		b	43.08±5.41	48.08±5.09	47.74±6.03	35.60±2.81	57.29±6.24	50.60±10.4	53.24±12.96
	G4	L	50.19±4.51	53.36±4.10	49.71±1.42	44.90±3.87	61.09±4.03	58.13±3.21	56.38±5.41
		a	2.38±0.41	1.37±7.05	1.59±0.55	2.97±0.62	0.58±0.17	0.86±0.31	1.24±0.08
		b	41.65±5.48	48.02±7.05	38.55±1.68	32.12±6.09	58.83±2.08	52.97±6.53	52.64±5.78
Fe-시험구	G5	L	55.56±3.20	57.07±3.29	47.46±1.55	49.07±2.77	61.78±3.59	57.76±1.34	53.86±0.16
		a	0.99±0.05	0.58±0.04	1.25±0.87	2.07±0.71	0.17±0.06	1.17±1.06	1.57±0.25
		b	50.11±2.75	51.15±4.22	40.53±3.48	37.56±5.17	59.18±4.09	53.18±2.89	44.21±3.03
	G6	L	52.63±4.59	60.93±2.17	52.10±1.84	48.44±1.00	63.53±1.64	57.66±1.58	51.62±2.63
		a	1.68±0.76	0.83±0.85	2.68±1.33	2.77±0.44	0.37±0.17	1.62±0.54	1.09±0.21
		b	45.52±7.43	58.91±2.94	47.76±0.43	37.09±1.13	59.29±4.50	56.58±2.55	45.82±6.54
	G7	L	55.33±3.14	59.74±7.14	48.24±2.01	42.90±6.91	53.47±5.38	55.72±4.58	54.13±8.50
		a	1.57±3.47	0.88±0.47	1.50±0.64	2.10±0.52	0.17±0.02	0.19±0.03	0.35±0.31
		b	52.99±5.31	56.97±11.38	40.68±1.66	29.72±2.16	48.49±3.01	48.68±3.99	43.74±6.13
Fe-비교구	G8	L	56.11±2.30	52.28±2.32	44.09±2.09	52.25±4.89	55.53±4.30	50.24±7.38	52.87±2.47
		a	1.29±0.16	1.13±1.08	2.21±0.75	2.49±1.06	0.13±0.00	1.84±0.77	0.33±0.19
		b	47.77±3.55	44.90±4.00	36.80±2.97	45.74±4.77	50.65±2.20	43.40±11.2	48.72±7.03

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:,55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		RBC(단위:10 ⁶ /μl)		WBC(단위:10 ⁹ /μl)		Lymphocyte(단위:%)	
		36일	48일	36일	48일	36일	48일
대조구	G1	1.88±0.32	2.01±0.16	337.87±39.98	311.27±19.62	75.67±0.06	75.00±0.41
Fe-대조구	G2	1.98±0.19	1.76±0.07	348.55±73.75	246.40±55.07	75.50±2.02	72.00±0.00
	G3	1.90±0.08	2.02±0.22	299.50±17.68	340.20±18.51	55.00±5.36	79.00±0.07
	G4	2.03±0.21	2.05±0.23	357.67±76.23	403.67±53.74	68.00±0.83	75.00±0.29
Fe-유기태구	G5	1.61±0.27	2.10±0.37	260.53±82.35	334.77±90.94	62.00±0.56	65.50±0.12
	G6	2.01±0.09	2.14±0.25	382.17±36.38	319.77±74.44	72.00±0.83	69.50±0.36
	G7	1.48±0.30	1.82±0.23	234.77±79.30	302.47±54.84	61.67±0.02	52.00±0.41
Fe-비교구	G8	1.87±0.57	2.22±0.02	364.60±72.41	341.50±25.31	57.00±0.07	50.50±6.26

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 철 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총계란수	평균산란수
대조구	G1	473	10.51
Fe-대조구	G2	458	10.18
	G3	456	10.13
	G4	441	9.80
Fe-유기태구	G5	456	10.13
	G6	451	10.02
	G7	457	10.16
Fe-비교구	G8	452	10.04

G1:정상구(일반사료섭이),G2무기태대조구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(철함유량:220,000ppm/1톤사료),G5:유기태시험구(철함유량:55,000ppm/1톤사료),G6:유기태시험구(철함유량:110,000ppm/1톤사료),G7:유기태시험구(철함유량:220,000ppm/1톤kg사료),G8:비교대조구(아미네이트철함유량:55,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 2-3 절 기능성 아연 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 2002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

아연은 DNA, RNA 합성 및 세포분열에 관여하여 세포 증식과 면역 체계의 발달에 중요한 역할을 수행하는 미량원소이다(Brown 등., 2003, Nishi 등., 1996). 아연은 성장호르몬의 작용을 강화시킨다(Solomons., 1976). 초유에는 풍부한 양의 단백질과 아연이 함유되어 있어 신생아의 성장 및 발달에 도움을 주며, 특히, IGF-1, IGFBP-3의 작용을 강화 및 합성에 필요한 기질을 형성 한다(Martorell 등., 2002). 또한 알칼리성 인산분해효소의 합성 및 뼈 조직 안에서의 활성을 강화시켜 뼈와 조직의 성장에 관련이 있다(Doherty 등., 2002, Neve 등., 1992, Butrimovitz 등., 1978). 아연의 결핍 현상은 잘못된 식이 습관에 의해 발생하며 아연의 흡수를 방해하는 피테이트(phytate)가 함유된 음식 섭취가 원인인 경우가 대부분으로 특히, 임신부들에서는 저단백질, 고피테이트 식이와 장내 아연의 흡수 저하로 인해 아연 결핍이 쉽게 발생할 수 있다(Prasad., 1996, Carlos., 2003). 아연 성분이 부족하면 태아 성장 부진, 저체중아, 자궁 내 성장지연, 선천성 기형, 조기 출산이나 지연 출산 등의 심각한 합병증을

초래할 수 있어 임신부들에게 아연 결핍에 대한 진단과 치료가 중요하다(Carlos., 2003). 이러한 결과로 상대적으로 아연 뿐 아니라 다른 미량원소 및 영양소가 부족하기 쉬운 후진국과 개발도상국에서는 미량원소, 특히 아연 보충의 중요성이 점차 대두되고 있다(Carlos., 2003., Sandstead., 1991).

본 연구에서는 유단백질을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섞이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 이를 위하여, 유기태 미네랄 소재류의 사료 첨가시, 기존 일반사료(미네랄 첨가형)에 해당 유기태 소재를 추가로 첨가하는 조건으로 제조한 사료첨가형(현장 사육농가 적용형)과 대규모 사료제조 공장에서 무기질 미네랄 체제를 대체하는 조건으로 유기태 미네랄 체제를 첨가하는 생산공장형으로 구분하여 **최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립을 위한 현장유효성 평가**를 진행하였다.

2. 연구방법

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱(중추사료)” 표본으로 사용하였다(Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려(경제성 고려)한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱”을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 칼슘 함유량을 102,880 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 0.5, 0.75, 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 5종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다(Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장(한국)에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line(20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 철 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 철 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리의 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 아연만을 88,000 mg/Ton (1배 농도, Zn-대조구-G1), 176,000 mg/Ton (2배 농도, Zn-대조구-G2)과 352,000 mg/Ton(4배 농도, Zn-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 아연만을 88,000 mg/Ton (1배 농도, Zn-유기태구-G1), 176,000 mg/Ton (2배 농도, Zn-유기태구-G2)와 유기태 아연을 가장 높은 첨가량인 352,000 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Zn-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섞이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섞이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섞이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섞이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN) 을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19일) , 실험중기 (32-34일) , 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

계란 총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN, CR-400<(Ø8 mm)/CR-410(Ø50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

미네랄 소재류

무기 미네럴류

본 실험을 위해 사용되어진 주요 무기태 미네럴류는(Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se)은 CaCO₃, FeSO₄.H₂O, ZnSO₄.H₂O, CuSO₄.H₂O 및 Na₂SeO₂로 (주)이노바텍(정읍, 전북, 한국)에서 구입하여 현장시험 목적에 맞게 OEM방식(현대사료 제품<제품명:산란톱>에서 Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se 미네럴이 제외된 상태로 제조된 제품 구입함)으로 주문 된 산란계 사료에 적정 농도(1배 기준)를 사료에 혼합하여 제조하는데 사용하였다.

비교 유기태 미네럴 소재류(아미네이트 타입)

유청분말 기질 유기태 시험 사료와의 비교를 위한 아미네이트 타입 Zn을 (동우화학, 경기도, 한국) 구입하여 키토산 기질 유기태 미네럴 비교시험구를 위한 산란계 사료에 혼합하여 제조 (1배)하는데 사용하였다.

시험 유기태 미네럴 소재류(키토산 기질)

유청분말 기질 유기태 미네럴 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 유청분말을 기질로 한 유기태 강화 미네럴을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다.

현장적용 사료 제조 레시피 정립

현장적용 사료는 생산 현장 및 농가의 상황을 고려하여 일반 상용화 제품인 현대사료 제품 (제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하였다. 제품에 대한 분석 자료를 본 연구개발의 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다(Table 1~2). 분석 결과를 보면, 현장에서 사용되고 있는 산란계 사료의 주요 미네럴 함유량은 Ca 10,288, Fe 5,500, Zn 8,800, Cu 550, Se 30, Mn 8,800, I 170(mg/100kg 기준)등이었다. 또한, 주요 영양 성분은 전체 중량 대비(%) 옥수수 50, limestone 10.48, 동물성지방 0.7, DDGS 20, Mineral premix 0.12, lysine 0.32, vramin premix 0.11 MDCP 0.53, MHA (Rhodimet) 0.1, Soybean meal 8.9 %이었다.

주요 화합물 조성은 calcium 4.1, phosphorus 0.53, methionine+cystein 0.711, crude protein 17, crude fat 4.94, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789(kcal/kg)다.

기능성 강화형 사료제 사료

기능성 강화형 사료는 (주)현대사료제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 기능성 강화 유기태 아연의 경우에는 무기태미네럴 아연을 대체하여 유기태 칼슘을 농도별(1, 2 및 4배 농도)로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인 하였다(Table 4).

대조구(정상구) 대비 평가

고품질 계란항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 아연의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1배, 난각 두께 4배, 난백과 난황 높이 1배, 난각 및 난황색 1~4배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~2배, 산란율은 2배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안정성 및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다.

무기태 칼슘 대비 평가

무기태 아연 대비 키토산 기질 유기태 아연의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 1배, 가식부 무게 1~4배, 난각 두께 4배, 난백 및 난황 높이 1배, 난각 및 난황색 4배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~2배, 산란율은 2배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안정성 및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다.

평가항목

계란 전체 무게 변화

Table 5는 무기태 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 총 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군은 0.14~12.65 %, 유기태 아연군은 -2.25~9.25 %, 유기태 혼합군은 9.12 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였으며, 정상군 대비 G5군이 9.25 %로 가장 많이 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 3.42~16.7 %, 유기태 아연군은 2.33~17.8 %, 유기태 혼합군은 16.56 %로 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군이 17.88 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$). 또한, 유기태 아연 G5군은 상용화 된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유의성 있는 차이가 있었다. ($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 -0.77~-11.7 %, 유기태 아연군은 -3.4~6.8 %로 유기태 실험군 G6군을 제외한 모든 유기태에서 실험군에서 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군이 6.8 %로 가장 많이 증가하였다. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 1배였고, 대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(생중량) 무게 변화

Table 6 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 생중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군은 -2.16~1.83 %, 유기태 아연군은 0.59~4.03 %로 모든 유기태 아연 실험군에서 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군이 4.03 %로 가장 많이 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 -2.13~0.69 %, 유기태 아연군은 -0.21~0.77 %로 유기태 아연 실험군 별로 생중량이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 아연 중 G6군이 0.77 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 -1.53~2.20 %, 유기태 아연군은 -1.15~2.38 %로 유기태 아연 실험군에서 별로 생중량이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 아연군 중 G5군이 2.38 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 실험 기간 동안 유기태 아연이 계란 가식부 생중량을 증가시키는 것을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 가식부(건조중량) 무게 변화

Table 7은 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 건조중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군 8.36~22.36 %, 유기태 아연군은 -1.36~3.91%로 유기태 아연 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 아연군 중 G5군이 3.91 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 -0.7~5.73 %, 유기태 아연군은 -7.97~-0.98 %로 모든 유기태 아연 실험군에서 건조중량이 감소하였다.

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 2.54~10.79 %, 유기태 아연군은 -1.84~0.04 %로 유기태 아연 실험군 중 G6군을 제외한 다른 군에서 건조중량이 감소하는 것을 확인하였다. 유기태 아연 실험군 중 G6군이 0.18 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8은 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 과란율 감소 효과를 알아보기 위하여 계란 난각 두께 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일째), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 43일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 아연군은 -36.67~-10.81 %, 유기태 아연군은 4.65

~10.87 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 아연군의 난각 두께는 0.43~0.46 mm 범위이며, 무기태 군의 난각 두께는 0.3~0.37 mm 범위로 유기태 아연군이 무기태 아연군에 비해 난각 두께가 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$). 또한, 유기태 아연의 경우 일반 상용화된 대조군 제품(아미네이트 형태)인 G8군 난각 두께 0.28 mm와는 유의성 있는 차이가 나타났다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 아연군은 -32.26~-20.59 %, 유기태 아연군은 4.65~8.89%로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 아연군은 무기태 아연군과 일반 상용화된 대조군 제품(아미네이트 형태)과 비교 시 난각 두께 증가에 유의성 있는 차이가 나타났다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 아연군은 -5.88~14.29 %, 유기태 아연군은 -9.09~7.69 %로 유기태 실험군 중 G5군을 제외한 다른 군에서 난각 두께가 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 4배였다.

계란 난황 착색도 변화

Table 9 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황 착색도 변화를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 32일째), 실험 후기(섭이 44일째)를 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 L값은 무기태 아연군 -4.6~0.6 %, 유기태 아연군 0.74~4.74 %로 모든 유기태 아연 실험군에서 L값이 증가하였다. 유기태 아연 실험군 중 G6군이 4.74 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 a값은 무기태 아연군은 14.17~21.98 %, 유기태 아연군은 -3.52~14.31 %로 유기태 실험군 중 G5군을 제외한 다른 군에서 a값이 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G6군이 14.31 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 b값을 보면, 무기태 아연군은 8.04~14.35 %, 유기태 아연군은 4.94~11.32 %로 모든 유기태 실험군에서 b값이 증가하였다. 유기태 실험군 중 G7군이 11.32 %로 가장 많이 증가하였다. 또한, 상용화된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유기태 아연군 사이에도 L, a, b값 차이는 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 L값은 무기태 아연군은 5.48~10.32 %, 유기태 아연군은 8.97~14.54 %로 모든 유기태 아연 실험군에서 L값이 증가하였다. 유기태 아연 실험군 중 G6군이 14.54 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 a값은 무기태 아연군은 -1.54~69.07 %, 유기태 아연군은 -39.17~48.45 %로 유기태 실험군 중 G6군을 제외한 다른 군에서 a값이 증가하였다. 유기태 실험군 중 G5군이 48.45 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 b값은 무기태 아연군은 1.20~3.08 %, 유기태 아연군은 -2.98~32.75 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 b값이 증가하였다. 유기태 실험군 중 G6군이 32.75 %로 가장 많이 증가하였다. 또한, 상용화된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유기태 아연군 사이에도 L, a, b값 차이는 없었다.

정상군 대비 섭이 44일째에 L값은 무기태 아연군은 -7.57~3.75 %, 유기태 아연군은 -3.49~11.2 %로 유기태 아연 실험군 중 G5군을 제외한 다른 군에서 L값이 감소하였다. 유기태 아연 실험군 중 G5군이 11.2 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 a값은 무기태 아연

군은 -17.93~6.89 %, 유기태 아연군은 -26.2~3.45 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 a값이 감소하였다. 유기태 실험군 중 G7군이 3.45 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 b값은 무기태 아연군은 1.18~22.01 %, 유기태 아연군은 3.83~25.31 %로 모든 유기태 실험군에서 b값이 증가하였다. 유기태 셀레늄 실험군 G5군이 25.31 %로 가장 많이 증가하였다. 또한, 상용화 된 아미네이트 형태 제품인 G8군과 유기태 아연군 사이에도 L. a. b 값 차이는 없었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 4배였다.

산란계 주요 혈액 수치 변화

Table 10 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계 에 서 사료 섭취 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생 체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 전체 실험간 32일 경과 시, 44일 경과 시를 종료점으로 하 여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다.

본 실험에 사용된 공시동물은 중추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰 병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다. 일반사료를 공급 한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 결과 는 다음과 같다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G7군에서 5.05 % 로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 유기태 농도별로 최저 -15.34 %까지 감소하 는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태 화 농도별 섭취에 따라 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이런 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위 는 정상군 1.88~2.01 10⁶/μl, 무기태 아연군 1.71~1.96 10⁶/μl, 유기태 아연군 1.63~2.00 10⁶/μl 이었으며, 상용화된 아미네이트 형태군 1.90 10⁶/μl이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 실험군 군 G2군에서 2.36 %로 가장 많 이 증가하는 결과를 보였다. 하지만, 2배 이상의 섭취는 최저 -22.95 %까지 감소하는 결과 를 보였다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 아연군 60.5~ 71.5 %, 유기태 아연군 61.0~77.5 %, 상용화된 아미네이트 형태군 47~60.67 %로 모든 유기태 처리군에서 상용화 된 아미네이트 형태 처리군에서 비해 유의성 있는 차이가 관찰되었 다($p<0.05$).

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 실험군 중 G5군에서 3.73 %로 가장 많이 증가하 였다. 하지만, 2배 이상의 섭취는 최저 -27.18 %까지 감소하는 결과를 보였다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.27~337.87 10⁶/μl, 무기태 아연군 262.57~355.97 10⁶/μl, 유기태 아연군 265.67~323.33 10⁶/μl, 아미네이트 형태군 321~324.33 10⁶/μl 이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 대조구 대비 1~2배 였으며, 대조구 대비 1~2배였다.

계란 난황고 변화

Table 11 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배를 섭취시킨 군에서 7.75 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 18일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 7.57 % 증강되었는데 반하여 1배 이상을 섭취한 군에서는 최저 0.32 %까지 난황고가 감소하였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 아연 2배를 섭취시킨 군에서 8.93 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-WPS의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 32일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 8.93 % 증강되었는데 반하여 2배 이상을 섭취한 군에서는 최저 5.7 %까지 난황고 증가가 감소하였다. 유기태 아연 섭이 32일째에 다른 유기태 아연 섭이군도 난황고가 정상군 대비 약 3.8~5.7 % 정도 증가하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배를 섭취시킨 군에서 9.74 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 43일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 9.74 % 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -1.4 %까지 난황고 가 감소하였다.

Zn-WPS제제는 전체적으로 9.7 %이상의 난황고 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 4 배 수준이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 생산공장형은 1배였고, 사료 첨가제형은 1배였다.

계란 난백고 변화

Table 12는 무기태 대비 유기태 아연 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배(ORG Zn-1군)를 섭취시킨 군에서 15.0 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 19일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로

증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 15.0% 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭취한 군에서는 최저 1.59 %까지 난백고가 감소하였다.

실험 중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 아연 2배(ORG Zn-2군)를 섭취시킨 군에서 10.7 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 32일째에 유기태화 아연의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 10.7 % 증가되었는데 반하여 2배 이하를 섭취한 군에서는 최고 -1.7 %까지 난백고가 감소하였다.

실험 후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 아연 1배(ORG Zn-1군)를 섭취시킨 군에서 12.98 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Zn-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 유기태 철 섭이 44일째에 다른 유기태 아연 섭취군에서도 난백고가 정상군 대비 약 6.3~8.36% 정도 증가하였다.

Zn-OCHT제제는 전체적으로 15%이상의 난백고 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 2배 수준이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 생산공장형은 1배였고, 사료 첨가제형은 1배였다.

산란계 산란율 변화

본 연구에서는 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 산란계 내 산란율의 변화를 확인함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 결과는 다음과 같다.

정상사료, 무기태 아연과 유기태 아연을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다 (Table 13). 실험기간 동안 정상사료, 무기태 아연과 유기태 아연을 산란계에 섭이시킨 후, 총 계란 개수를 산란계 개체수로 나누어 평균 계란수를 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭이 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 아연을 섭이 시킨 군에서는 G6군(ORG Zn-2)이 10.36개로 가장 높았다. 무기태 아연군은 10.11~10.22개이었으며, 유기태 아연군은 10.11~10.26개였다. 유기태 아연 섭취 군은 무기태 아연 사료를 먹인 군과 비교하여 산란수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배였고, 대조구 대비 2배였다.

4. 종합 요약

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을

분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 계란고품질과 산란계 안정성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안전성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 아연 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

바. 제조된 유기태 아연 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 칼슘을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사. 유기태 구리 소재의 관련 현장평가를 통하여, 현장형 사료첨가제 제조 레시피 정립이 완료되었으며, 가축 현장에 대한 현장적용 매뉴얼 및 대량생산 시스템까지 연계되어 확립되었다.

아. 산란계에 효모-철 혹은 유기태화 칼슘, 철을 을 공급하면 난각 두께, 난황색이 증가한다는 보고가 있는데(Jung 등., 2004, Cho 등., 2015, Kim 등., 2002), 본 연구에서는 유기태화 아연 사료가 무기태 및 일반 상용화 된 아미네이트 형태 아연 제품과 비교 시는 유의성 있게 난각 두께를 증가시키는 것을 관찰하였다. 한약재 급여가 산란계의 백혈구, 적혈구, 림프구 수치 변화에 영향을 주지 않는다는 연구 보고와 황토를 첨가 시 백혈구 수치가 증가한다는 연구보고가 있는데(Park 등., 2010, Kim 등., 2015), 본 실험 결과 유기태 아연 소재는 WBC, RBC 수치를 증가시켰고, Lymphocyte의 경우는 일반 상용화 된 아미네이트 형태 군보다 수치를 증가시켰다.

Table 1. 산란계 영양 사료 미네럴 기본 조성 비율

원료 (미네럴 종류)		원료 시료내 목표 미네럴 함유량(%)	사료율	비고
			함량 (mg)/100kg	
Ca	CaCO ₃	39.3	10,288	레시피 (제조 판매 된 현대사료)
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	30	5,500	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	35	8,800	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	34	550	
Se	Na ₂ SeO ₂	43	30	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	31	88,00	
I	CaIO ₃	63	170	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	33	0	

Table 2. 산란계 현장 적용 사료 영양 조성물 비율

혼합물 성분	%
Corn	50
Wheat grain	
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
화합물 조성	
Metabolic energy, kcal/kg	2780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

Table 3. 산란계 현장 적용 유기태 강화 사료 제조 레시피(중추용, 사료1톤기준)

무기태 미네럴류		일반사료 (사료1톤기준)		Zn-OCHT					
		1배		주문형 사료내 첨가량(g)			미네럴함유량(mg/1톤)		
		첨가량 (%)	순수 미네럴 함유량 (mg/1톤)	1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	CaCO ₃	39.3	102,880	261.79			102,880		
Fe	FeSO ₄ .H ₃ O	30	55,000	183.33			55,000		
Zn	ZnSO ₄ .H ₃ O	35	88,000	251.53	502.86	100.572	88,000	176,000	352,000
Cu	CuSO ₄ 4.H ₃ O	34	5,500	16.18			5,500		
Se	Na ₂ SeO ₂	43	300	0.7			300		
Mn	MnSO ₄ .H ₃ O	31	88,000	-			88,000		
I	CaIO ₄	63	1,700	-			1,700		
CO	CoSO ₄ .H ₃ O	33	0	-			0		

Table 4. 키토산 기질 유기태 아연 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

현장평가 사료유형	안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가																최적 농도
	계란고품질											산란계 안정성					
	총무게	가식부 (난황 +난백) 무게 (건조)	가식부 (난황 +난백) 무게 (비건조)	난각 두께	난황 높이	난백 높이	난각색			난황색			적혈구	백혈구	림프구	산란율	
							(L)	(a)	(b)	(L)	(a)	(b)					
사료첨가형	2배 (20.3%)	1배 (38.9%)	1배 (4.1%)	4배 (21.7%)	1배 (14.7%)	1배 (24.4%)	4배 (11.0%)	1배 (29.1%)	1배 (19.6%)	4배 (31.8%)	1배 (82.6%)	4배 (42.3%)	4배 (6.0%)	1배 (3.7%)	2배 (3.2%)	2배 (-1.5%)	1~2배
생산공장형	1배 (20.2%)	4배 (9.9%)	1배 (9.0%)	4배 (28.2%)	1배 (19.6%)	1배 (42.6%)	4배 (22.3%)	1배 (21.3%)	4배 (25.5%)	4배 (28.0%)	4배 (26.0%)	4배 (41.6%)	4배 (14.5%)	1배 (30.9%)	2배 (21.9%)	2배 (2.4%)	1~2배
안정성 및 생육 증진성 최적 첨가 농도(공통적용 농도-본시험연계:2협동 공여)																	
1~2배																	

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)		
		18일	32일	44일
정상구	G1	50.53 ± 1.97	51.09 ± 2.31	55.19 ± 2.07
Zn-대조구	G2	50.60 ± 5.58	52.90 ± 2.39	54.77 ± 0.75
	G3	53.38 ± 0.33	61.30 ± 4.62	52.12 ± 1.75
	G4	57.85 ± 2.39	57.81 ± 3.21	49.40 ± 0.93
Zn-유기태구	G5	55.68 ± 6.42	62.21 ± 0.59 ^{a,b,c}	59.23 ± 5.37
	G6	53.50 ± 2.80	52.31 ± 2.04	53.37 ± 4.66
	G7	49.42 ± 1.86	54.95 ± 3.69	56.01 ± 4.71
Zn-비교구	G8	51.72 ± 1.66	48.86 ± 3.13	54.35 ± 1.97

^a $P < 0.05$ as compared with G1, ^b $P < 0.05$ as compared with G2, ^c $P < 0.05$ as compared with G8

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 가식부(비건조상태) 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)		
		18일	32일	44일
정상구	G1	84.61 ± 0.57	86.35 ± 0.49	85.47 ± 0.82
Zn-대조구	G2	85.80 ± 2.53	85.85 ± 0.53	87.39 ± 1.35
	G3	82.82 ± 1.40	86.95 ± 0.66	84.18 ± 1.45
	G4	86.19 ± 0.39	84.55 ± 4.36	85.70 ± 0.29
Zn-유기태구	G5	88.16 ± 3.05	86.47 ± 0.66	87.55 ± 0.17
	G6	85.11 ± 0.54	87.02 ± 0.89	85.35 ± 0.43
	G7	85.17 ± 9.01	86.17 ± 0.14	84.50 ± 0.15
Zn-비교구	G8	83.90 ± 1.50	85.51 ± 0.73	86.52 ± 0.97

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 가식부(건조상태) 무게 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)		
		18일	32일	44일
정상구	G1	19.41 ± 1.67	21.54 ± 1.14	22.66 ± 2.94
Zn-대조구	G2	25.00 ± 0.65	22.85 ± 1.43	23.55 ± 0.86
	G3	24.70 ± 2.17	21.39 ± 1.08	23.25 ± 0.64
	G4	21.18 ± 0.38	22.82 ± 2.07	25.40 ± 2.16
Zn-유기태구	G5	20.20 ± 0.81	19.95 ± 1.70	22.25 ± 1.75
	G6	20.10 ± 0.46	20.59 ± 0.80	22.70 ± 1.23
	G7	19.15 ± 0.94	21.13 ± 1.10	22.65 ± 1.34
Zn-비교구	G8	21.55 ± 2.10	21.33 ± 1.09	24.18 ± 1.44

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)		
		18일	32일	44일
정상구	G1	0.41±0.03	0.41±0.03	0.36±0.02
Zn-대조구	G2	0.36±0.03	0.34±0.01	0.34±0.03
	G3	0.30±0.01	0.33±0.04	0.41±0.01
	G4	0.37±0.06	0.31±0.09	0.42±0.03
Zn-유기태구	G5	0.44±0.02 ^b	0.45±0.02 ^{b,c}	0.33±0.01
	G6	0.44±0.02 ^{a,b}	0.41±0.03	0.39±0.01
	G7	0.46±0.01 ^b	0.45±0.01 ^{b,d}	0.38±0.03
Zn-비교구	G8	0.28±0.04	0.37±0.03	0.42±0.01

^a*P*<0.05 as compared with G3, ^b*P*<0.05 as compared with G8, ^c*P*<0.05 as compared with G2, ^d*P*<0.05 as compared with G4

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난황색 변화

시험구			난황색 (단위:nm)		
			18일	32일	44일
정상구	G1	L	48.83±4.18	44.34±0.57	53.44±4.17
		a	1.40± 0.29	1.94±0.88	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	37.25±3.09	43.01±7.44
Zn-대조구	G2	L	50.97±3.63	48.06±1.83	55.03±2.22
		a	2.15±0.58	4.19±1.47	1.40±0.20
		b	43.29±5.04	37.70±1.70	52.48±6.32
	G3	L	54.15±2.32	46.77±2.93	49.84±0.70
		a	1.89±0.91	1.92±0.21	1.19±0.33
		b	48.23±2.09	38.35±6.10	45.56±1.24
	G4	L	52.29±4.68	48.92±1.40	49.39±2.41
		a	0.84±0.42	3.28±0.54	1.55±0.54
		b	46.83±8.20	38.40±1.80	43.52±6.19
Zn-유기태구	G5	L	55.53±5.01	48.32±0.99	59.43±0.60
		a	2.25±1.50	2.88±0.62	1.31±0.11
		b	45.81±4.69	40.86±1.15	53.90±4.15
	G6	L	57.55±2.70	50.79±8.70	51.57±5.31
		a	1.18±0.91	1.18±0.91	1.07±0.17
		b	49.45±5.06	49.45±8.06	44.66±6.05
	G7	L	58.45±6.02	48.90±0.16	53.20±1.20
		a	1.03±0.72	2.31±0.83	1.50±0.29
		b	52.65±6.33	36.14±2.31	45.42±2.26
Zn-비교구	G8	L	54.76±3.84	48.49±0.72	53.03±4.45
		a	1.75±0.68	1.82±0.53	1.46±0.34
		b	50.16±6.62	38.51±4.69	46.67±9.85

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). .모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		적혈구(단위:10 ⁶ /μl)		림프구(단위:%)		백혈구(단위:10 ³ /μl)	
		32일	44일	32일	44일	32일	44일
정상구	G1	1.88±0.32	2.01±0.16	75.67±0.06	75.00±0.41	337.87±39.98	311.27±19.62
Zn-대조구	G2	1.96±0.15	1.83±0.11	68.33±2.31	73.67±9.45	262.57±30.8	277.07±72.32
	G3	1.88±0.16	1.86±0.21	65.00±5.75	60.50±7.78	318.67±60.92	292.00±32.93
	G4	1.71±0.18	1.88±0.06	71.50±6.36	67.33±9.50	307.55±78.98	355.97±58.48
Zn-유기태구	G5	1.84±0.25	1.85±0.21	63.33±3.21 ^a	72.00±2.83	265.67±66.25	323.33±68.95
	G6	1.63±0.47	1.84±0.12	77.50±3.54 ^{a,b}	69.00±5.20	288.60±38.18	303.77±52.20
	G7	1.98±0.06	2.00±0.24	68.33±7.51 ^a	61.00±8.49	309.67±51.97	314.13±68.14
Zn-비교구	G8	1.90±0.17	1.99±0.24	47.00±1.41	60.67±8.49	321.60±73.49	324.33±21.07

^aP<0.05 as compared with G3, ^bP<0.05 as compared with G8

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

T

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고(단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	15.23±0.39	14.20±1.20	14.37±1.16	14.09±0.05	14.26±0.58	15.13±1.41
Zn-대조구	G2	13.28±0.60	14.10±0.14	13.45±1.15	15.44±0.88	14.89±0.52	14.62±1.17
	G3	14.48±0.03	13.05±0.57	15.85±1.04	14.72±2.12	15.32±0.59	13.31±0.10
	G4	13.58±0.82	13.04±0.55	14.91±1.51	14.77±0.66	16.26±0.74	13.78±1.03
Zn-유기태구	G5	16.51±0.62	14.04±0.36	14.95±1.67	15.22±1.45	15.80±0.64	15.59±1.32
	G6	15.91±0.88	14.18±0.49	15.78±1.26	14.80±0.59	14.05±0.42	15.02±0.86
	G7	15.28±0.01	14.63±2.33	15.24±0.26	15.18±0.07	15.03±1.12	15.88±0.71
Zn-비교구	G8	13.56±1.04	14.79±1.38	14.69±0.78	15.00±0.79	14.98±1.07	14.02±0.59

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 혈백고 변화

시험구		난백고(단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	6.79±0.27	6.66±0.19	7.09±0.64	7.84±0.78	6.63±0.76	6.90±0.58
Zn-대조구	G2	7.03±0.82	6.29±0.24	5.03±0.46	6.80±1.26	7.28±0.69	6.32±0.38
	G3	6.20±0.57	6.15±1.02	5.34±0.44	6.82±0.44	7.79±0.24	7.55±1.10
	G4	6.46±0.45	5.83±0.74	5.64±0.39	8.42±0.58	7.35±0.46	6.87±0.61
Zn-유기태구	G5	7.99±1.13	5.89±0.85	6.97±1.16	8.77±0.29	7.51±0.47	7.53±2.31
	G6	7.86±0.66*	6.80±0.78	7.94±0.44*	8.38±0.27**	7.42±0.66	7.93±0.86
	G7	6.90±0.47	6.94±0.54	7.30±0.35*	7.67±0.97	7.30±0.18	7.37±0.23
Zn-비교구	G8	6.29±0.36	6.58±0.70	5.86±0.66	7.16±0.57	6.77±0.06	6.78±0.57

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). .모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 아연 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총산란수	평균산란수
정상구	G1	473	10.51
Zn-대조구	G2	460	10.22
	G3	457	10.16
	G4	455	10.11
Zn-유기태구	G5	461	10.24
	G6	466	10.36
	G7	455	10.11
Zn-비교구	G8	434	9.64

.G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G3:무기태대조구(아연첨가량:176,00ppm/1톤사료),G4:무기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G5:유기태대조구(아연첨가량:88,000ppm/1톤사료),G6:유기태대조구(아연첨가량:176,000ppm/1톤사료),G7:유기태대조구(아연첨가량:352,000ppm/1톤사료),G8:비교대조구(아미네이트아연첨가량:88,000ppm/1톤사료). .모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 2-4 절 기능성 구리 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe)생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 002).

미네럴은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네럴의 흡수율을 높인 킬레이트 미네럴 또는 유기태 미네럴 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네럴의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

본 연구에서는 유단백질을 기질로 하는 유기태 미네럴을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섞이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 이를 위하여, 유기태 미네럴 소재류의 사료 첨가시, 기존 일반사료(미네럴 첨가형)에 해당 유기태 소재를 추가로 첨가하는 조건으로 제조한 사료첨가형(현장 사육농가 적용형)과 대규모 사료제조 공장에서 무기질 미네럴 제제를 대체하는 조건으로 유기태 미네럴 제제를 첨가하는 생산공장형으로 구분하여 **최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립을 위한 현장유효성 평가**를 진행하였다.

2. 연구방법

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네럴류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네럴 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네럴을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱” 을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 칼슘 함유량을 102,880 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 0.5, 0.75, 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 5종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 철 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 철 미네럴만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급여 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리의 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 구리만을 5500 mg/Ton (1배 농도, Cu-대조구-G1), 11,000 mg/Ton (2배 농도, Cu-대조구-G2)과 22,000

mg/Ton(4배 농도, Cu-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 구리만을 5,500 mg/Ton (1배 농도, Cu-유기태구-G1), 11,000 mg/Ton (2배 농도, Cu-유기태구-G2)와 유기태 구리를 가장 높은 첨가량인 22,000 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Cu-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN) 을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을 20 cc 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19

일), 실험중기 (32-34일), 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

총무게, 가식부 중량

섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN, CR-400(Φ 8 mm)/CR-410(Φ 50 mm)), JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은 색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

미네랄 소재류

무기 미네랄류

본 실험을 위해 사용되어진 주요 무기태 미네랄류는(Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se)은 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 로 (주)이노바텍(정읍, 전북, 한국)에서 구입하여 현장시험 목적에 맞게 OEM방식(현대사료 제품<제품명:산란톱>에서 Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se 미네랄이 제외된 상태로 제조된 제품 구입함)으로 주문 된 산란계 사료에 적정 농도(1배 기준)를 사료에 혼합하여 제조하는데 사용하였다.

시험 유기태 미네랄 소재류(키토산 기질)

키토산 기질 유기태 미네랄 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당(chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네랄을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다.

현장적용 사료 제조 레시피 정립

현장적용 사료는 생산 현장 및 농가의 상황을 고려하여 일반 상용화 제품인 현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하였다. 제품에 대한 분석 자료를 본 연구개발의 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다(Table 1~2). 분석 결과를 보면, 현장에서 사용되고 있는 산란계 사료의 주요 미네랄 함유량은 Ca 10,288, Fe 5,500, Zn 8,800, Cu 550, Se 30, Mn 8,800, I 170(mg/100kg 기준)등이었다. 또한, 주요 영양 성분은 전체 중량 대비(%) 옥수수 50, limestone 10.48, 동물성지방 0.7, DDGS 20, Mineral premix 0.12, lysine 0.32, vramin premix 0.11 MDCP 0.53, MHA (Rhodimet) 0.1, Soybean meal 8.9 %이었다.

주요 화합물 조성은 calcium 4.1, phosphorus 0.53, methionine+cystein 0.711, crude protein 17, crude fat 4.94, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789(kcal/kg)다.

기능성 미네랄 강화 사료

사료는 (주)현대사료제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하여 핵심 무기태 미네랄을 대체하는 형태로 사료를 평가에 활용하였다. 무기태 미네랄 구리를 대체하여 유기태 구리를 농도별(1, 2, 4배 농도)로 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

현장적용성 평가를 사료첨가형 사료와 생산공장형 사료를 제조하여 평가항목별로 수행하였다. 평가 결과를 통해 각 항목별 최적 농도를 사료첨가형과 생산공장형으로 구분하였고, 이들 결과를 종합하여 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도(공통농도)를 선정하여 제 2협동 분시험연계에 활용하도록 하였고, 평가 결과는 다음과 같다(Table 4).

대조구 대비 평가

고품질 계란항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 구리의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1~2배, 난각 두께 4배, 난백과 난황 높이 1~2배, 난각 및 난황색 1~4배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 2~4배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안정성 및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다.

무기태 미네랄 평가

무기태 구리 대비 키토산 기질 유기태 구리의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 4배, 가식부 무게 2배, 난각 두께 4배, 난백 및 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 1~4배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~2배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안전성

및 생육 증진성 최적 농도는 1~2배였다.

평가항목

계란 총무게 변화

Table 5는 무기태 키토산올리고당 기질-미네랄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란 총무게 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

정상사료, 무기태 구리와 유기태 구리를 산란계에 섭취시킨 후, 계란 전체 무게를 측정하였다. 정상군 대비 섭취 18일째에 무기태 구리군은 -1.89~ 10.34 %, 유기태 구리군은 -0.34~13.5 %로 유기태 실험군 중 G5군을 제외한 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 정상대비 유기태 실험군 중 G6군이 13.5 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 50.36 ~58.44 g 범위로 무기태 군의 생중량 49.5~56.3 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭취 19일째에 무기태 구리군은 -6.4~1.55 %, 유기태 구리군은 -11.2~-3.53 %로 모든 유기태 실험군에서 계란 총무게가 감소하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 47.5~51.0 g으로 무기태 군의 생중량 49.6~53.6 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭취 32일째에 무기태 구리군은 7.45~12.2 %, 유기태 구리군은 -1.5~8.11 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 50.2~55.6 g 범위로 무기태 군의 생중량 55.2~58.2 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭취 33일째에 무기태 구리군은 0.27~6.31 %, 유기태 구리군은 -11.4~1.21 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 49.5~54.5 g 범위로 무기태 군의 생중량 55.3~58.9 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭취 43일째에 무기태 구리군은 -2.11~9.76 %, 유기태 구리군은 -0.29~16.31 %로 유기태 G6군을 제외한 유기태 실험군에서 계란 총무게가 증가하였다. 유기태 구리군의 계란 전체 무게는 51.7~61.9 g 범위로 무기태 군의 생중량 52.9~57.4 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭취 44일째에 무기태 구리군은 -16.7~-4.21 %, 유기태 구리군은 -0.89~-8.83 %로 유기태 실험군 모두에서 계란 총무게가 감소하였다.

유기태 구리군의 계란 전체 무게는 50.8~54.7 g 범위로 무기태 군의 생중량 47.2~52.9 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고,, 대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(난황+난백) 생중량 변화

Table 6은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란의 가식부(난백+난황) 생중량 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다. 정상사료, 무기태 아연과 유기태 아연을 산란계에 섭취시킨 후, 계란 가식부 생중량을 측정하였다

정상군 대비 섭취 18일째에 무기태 구리군은 -3.69~1.92 %, 유기태 구리군은 -7.88~1.08 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 실험군에서 생중량이 감소하였다.

유기태 구리군 중 G7군)이 1.08 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 생중량은 78.43~85.53 g 범위로 무기태 군의 생중량 81.6~86.27 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 19일째에 무기태 구리군은 -1.00~0.69 %, 유기태 구리군은 -7.32~1.74 %로 유기태 구리 실험군 별로 생중량이 증가 혹은 감소하였다. 유기태 구리군 중 G7군(ORG Cu-4)이 1.74%로 가장 많이 증가하였지만, 통계적으로 유의성은 없었다. 유기태 구리군의 생중량은 79.23~86.54 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.19~85.62 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 구리군은 -5.23~0.96 %, 유기태 구리군은 -8.09~0.77 %, 유기태 미네랄 혼합군은 -0.97 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 생중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G6군(ORG Cu-2)이 0.77 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 구리군은 -2.53~-0.68 %, 유기태 구리군은 -3.78~-1.13 %로 유기태 구리 실험군 모든 실험군에서 생중량이 감소하였다. 유기태 구리군의 생중량은 83.02~85.2 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.03~85.58 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 구리군은 0~0.91 %, 유기태 구리군은 0.47~3.5 %로 유기태 구리 모든 실험군에서 생중량이 증가하였다. 유기태 구리 실험군 중 G7군이 3.5 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 생중량은 84.98~87.65 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.58~85.36 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 구리군은 -1.28~0.41 %, 유기태 구리군은 -6.45~1.57 %로 유기태 구리 실험군 중 G6군)을 제외한 다른 군에서 생중량이 증가하였다. 유기태 구리 실험군 중 G7군)이 1.57 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 생중량은 80.29~86.83 g 범위로 무기태 군의 생중량 84.39~85.82 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 무기태 및 유기태 구리는 계란 가식부 생중량에 영향을 주는 것을 확인하였다. 가식부 생중량은 유기태 아연 실험구에서 전체적으로 섭이 43일째 정상군 대비 증가하였다. 유기태 아연 실험군 중 G7군)이 다른 군들에 비해 가식부 생중량 증가가 확인되었다. 유기태 군과 무기태 군 사이에는 가식부 생중량 변화에 차이가 없었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배였으며, 대조구 대비 2배였다.

계란 가식부(난황+난백) 건조중량 변화

Table 7은 무기태 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 가식부(난백+난황) 건조중량 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다. 정상사료, 무기태 구리와 유기태 구리를 산란계에 섭이시킨 후, 계란 가식부 건조중량을 측정하였다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 구리군은 1.13~15.09 %, 유기태 구리군은 0.82~12.57 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G5군(ORG Cu-1)이 12.57 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 19.57~22.2 g 범위로 무기태 군의 건조중량 21.99~22.85 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 19일째에 무기태 구리군은 27.38~32.98 %, 유기태 구리군은 31.37~34.16 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G7군이 34.16 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 22.92~23.89 g 범위로 무기태 군의 건조중량

21.66~23.47 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 구리군은 0.14~8.61 %, 유기태 구리군은 1.15~13.39 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G7군이 13.39 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 21.79~24.87 g 범위로 무기태 군의 건조중량 21.57~23.57 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 구리군은 -0.15~3.14 %, 유기태 구리군은 0.91~28.18 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G5군이 28.18 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 20.83~28.74 g 범위로 무기태 군의 건조중량 20.61~21.31 g 범위로 무기태 구리군 G2 대비 유기태 구리군 G5군에서 25.8 % 증가하였다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 구리군은 21.0~22.3 %, 유기태 구리군은 15.84~21.25 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G6군이 21.25%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 20.26~21.25 g 범위로 무기태 군의 건조중량 21.6~21.94 g 범위와 차이를 나타내지 않았다. 정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 구리군은 5.39~10.12 %, 유기태 구리군은 2.83~9.79 %로 모든 유기태 구리 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 구리군 중 G6군이 9.79%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 건조중량은 23.32~25.12 g 범위로 무기태 군의 건조중량 23.95~25.21 g 범위와 차이를 나타내지 않았다.

본 실험 결과 무기태 및 유기태 구리가 계란 가식부 건조중량에 영향을 주는 것을 확인하였다. 유기태 구리 실험군 중 G5군, G7군군이 측정 기간 동안 건조중량 증가가 다른 군에 비해 높았다. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 생산공장형은 2배였고, 사료첨가제형은 1배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8은 무기태 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 난각 두께 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

정상군 대비 섭이 18일째에 무기태 구리군은 -2.5~-10.8 %, 유기태 구리군은 -20.6~-10.8 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 감소하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.34~0.37 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.37~0.4 mm 범위로 차이가 없었다. 정상군 대비 섭이 19일째에 무기태 구리군은 2.56~11.63 %, 유기태 구리군은 7.32~13.64 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 13.64%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.41~0.44 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.39~0.43 mm 범위로 차이가 없었다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 구리군은 -32.3~-5.1 %, 유기태 구리군은 -13.9~-2.5 %로 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 감소하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.38~0.4 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.31~0.39 mm 범위와 수치 차이는 있었다.

정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 구리군은 -2.63~ 2.5%, 유기태 구리군은 -14.71~9.3%로 유기태 실험군 중 G5군을 제외한 모든 유기태 실험군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 9.30%로 가장 많이 증가하였다.

유기태 구리군의 난각 두께는 0.34~0.4 mm 범위로 무기태 군의 난각 두께는 0.38~0.4 mm 범

위와 차이는 없었다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 구리군은 0~5 %, 유기태 구리군은 5~9.52 %로 모든 유기태에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G5군(ORG Cu-1)이 9.52 %로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.4~0.42 mm 범위로 무기태군의 난각 두께는 0.38~0.4 mm 범위와 차이는 없었다. 정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 구리군은 2.7~21.74 %, 유기태 구리군은 -12.5~7.69 %로 유기태 실험군 중 G6군을 제외한 다른 군에서 난각 두께가 증가하는 것을 관찰하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 7.69%로 가장 많이 증가하였다. 유기태 구리군의 난각 두께는 0.32~0.39 mm 범위로 무기태군의 난각 두께는 0.37~0.46 mm 범위와 차이는 없었다.

본 실험 결과 무기태와 유기태 구리가 난각 두께에 영향을 주는 것을 확인하였다. 유기태 실험군 중 G7군(ORG Cu-4)이 다른 군에 비해 난각 두께를 증가시키는 것을 확인하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 생산공장형은 4배 였으며, 사료첨가제형은 4배였다.

계란 난황고 변화

Table 9는 무기태 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)를 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서 1.11 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 19일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 1.11% 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭이한 군에서는 최고 -2.45 %까지 난황고 가 감소하였다.

실험중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 4배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서 9.2 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 4배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 33일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 4배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 4배 처리 시는 9.2% 증강된 반면, 4배 이하 섭이 군에서는 최고 -8.6 %까지 난황고가 감소하였다.

실험후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭이시킨 군에서 8.11 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난황고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난황고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 43일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 8.11 % 증가되었는데 반하여 2배 이상을 섭이한 군에서는 최고 -1.3 %까지 난황고가 감소하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 생산공장형은 4배 였으며, 사료첨가제형은 2배였다.

계란 난백고 변화

Table 10은 무기태 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가결과는 다음과 같다.

실험전기(섭이18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 9.46 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 2배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 18일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 2배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 2배 처리 시는 9.46 % 증가되었는데 반하여 2배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -4.03 %까지 난백고가 감소하였다.

실험중기(섭이 32-33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 -15.1 %로 가장 적게 감소하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 적게 감소시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 32일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 -15.1 % 감소되었는데 1배 이상에서는 최고 -38.4 %까지 난백고가 감소하였다.

실험후기(섭이 43-44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배(ORG Cu-1군)를 섭취시킨 군에서 13.1 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 1배 처리한 경우 계란 난백고를 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다. 실험 기간 중 난백고 증가에 가장 높은 수치를 보였던 44일째에 유기태화 구리의 농도별 효과를 평가하여 보았더니, 농도별로 분명한 증감 차이를 보였다. 즉, 정상군 대비 1배 처리구를 기점으로 증감의 차이가 결정되었는데, 1배 처리 시는 13.1 %가 증가되었는데 반하여 1배 이상을 섭취한 군에서는 최고 -13.86 %까지 난백고가 감소하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 1배였다.

계란 착색도 변화

Table 11은 무기태 대비 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 산란계 난각의 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 평가하였다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 4배(ORG Cu-4군)를 섭취시킨 군에서 L값 3.83 %, 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군) a값 21.66 %, 유기태 구리 2배(ORG Cu-4군)b 값 12.55 %로 증가하였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우 미네랄을 2, 4배 처리한 경우 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 중기(섭이33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배를 섭취시킨 군에서 L값 4.76 %, 유기태 구리 1배 a값 7.69 %, 유기태 구리 4배 b값 -18.8 % 증가하였다. 이 결과는 각 성분별로 계란

난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

후기(섭이 41~44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 L 값 6.77 %, 유기태 구리4배 a값 7.59 %, 유기태 구리 1배(ORG Cu-1군) b값 10.67 % 증가하였다. 이 결과는 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도이다

유기태 제재는 전체적으로 난각의 착색도를 L값 6.76 %, a값 21.66 %, b값 12.55 %이상의 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 1배 수준이었다.

계란 착색도 변화

Table 12는 무기태 대비 유기태 구리 소재를 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서 현장 애로점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 결과 도출과 제품화를 완성하고자 하였다. 평가 결과는 실험전기(섭이 18-19일), 실험중기(섭이 32-33일째), 실험후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 산란계 난황의 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색)를 평가하였다.

실험 전기(섭이 18-19일째)에 정상군 대비 유기태 구리 1배를 섭취시킨 군에서 L값 18.01 %, 유기태 구리 1배 a값 61.8 %, 유기태 구리 2배 b값 31.7 %로 증가하였다. 이 결과는 미네랄을 1~2배 처리한 경우 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 중기(섭이 33일째)에 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 L값 7.0 %, 유기태 구리 1배 a값 52.9 %, 유기태 구리 4배 b값 -2.3 % 증가하였다. 이 결과는 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다.

실험 후기(섭이 41~44일째)에 정상군 대비 유기태 구리 4배를 섭취시킨 군에서 L값 17.5 %, 유기태 구리 1배 a값 31.2 %, 유기태 구리 4배 b값 27.3 % 증가하였다. 이 결과는 각 성분별로 계란 난황의 L, a, b값을 가장 많이 증가시키는 농도임이 확인되었다

구리 제재는 전체적으로 난각의 착색도를 L값 18 %, a값 61 %, b값 31 % 이상의 증가를 유도하였으며, 섭이 적정농도는 1, 4배 수준이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2~4배였고, 대조군 대비 2~4배였다.

혈액 내 주요 혈구 수치 변화

Table 13은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 이를 위하여, 전체 시험간 36일 경과 시, 49일 경과 시를 종료점으로 하여, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다.

본 실험에 사용된 공시동물은 중추 산란계를 구입한 후 산란계용(큰병아리용 사료)사료를 전체 실험 기간 공급하면 체내 복부 및 내장지방이 점차적으로 심각하게 축적되면서 간 지방 증가와 간 손상으로 인한 염증 증가가 발생하는 공통적인 현상이 발생하였다. 일반사료를 공급한 정상군의 비정상 임상관련 예측 결과를 포함함으로써 안정성 관련 여부를 측정하였다. 대조군 대비 구리만을 보유토록 제조된 Cu-OCHT 소재류의 혈액조성에 미치는 효과를 평가함으로써 최종 안정성 관련 결과를 확인 하였다.

RBC(적혈구)수치 변화는 다음과 같다. 정상군 대비 유기태 구리 2배(ORG Cu-2군)를 섭취시킨 군에서 3.59 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우는

미네랄을 2배 처리한 경우는 RBC 수치를 증가시키는 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 농도에서 최저 -27.89 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류별 섭취에 따라 증가시키는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 지방 축적에 따른 간 지방 손상 및 사육환경 조건 등에 따라 유발된 염증 반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄에 의한 결과가 아닌 기존 지방과다 축적으로 인한 간 손상이 이루어졌으므로, 간 독성 효능이 감소된 결과라고 판단되었다. 측정 기간 중 RBC 수치 범위는 정상군 1.88~2.01 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 아연군 1.84 ~2.03 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 아연군 1.47~1.95 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

Lymphocyte(림프구)의 경우 정상군 대비 유기태 아연 4배(ORG Zn-4군)를 섭취시킨 군에서 -5.58 %로 가장 적게 감소하는 결과를 보였다. 이 결과는 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 림프구 수치 범위는 정상군 75.0~75.67 %, 무기태 아연군 46.0~71.67 %, 유기태 아연군 56.33~71.67 % 이었다.

본 실험 결과, 구리 유기태 소재는 산란계의 지방 축적으로 인한 피해를 감소시킬 수 있으며, WBC, RBC 수치를 증가시켰다. 최적 농도는 2배였으며, 이 농도에서는 이미 피해를 입은 간 등에 무리를 주지 않으면서 혈액 관련 수치를 증가시키거나 동등성을 유지시켜 면역시스템을 유도하는 것으로 평가되었다

WBC(백혈구)의 경우 정상군 대비 유기태 구리 1배(ORG Cu-1군)를 섭취시킨 군에서 14.26 %로 가장 많이 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 Cu-OCHT의 경우는 미네랄을 1배 처리한 경우는 WBC 수치를 증가시키는 적정 농도임이 확인 되었다. 그러나, 2배 이상의 섭취는 최저 -19.66 %까지 감소하는 결과를 보임으로서 지방축적에 따라 간 지방 손상 등으로 인해 발현된 염증반응이 유기태화 소재류 섭취에 따른 염증 반응을 완화시키거나 감소시키지 못하는 결과를 보이는 것으로 판정되었다. 측정 기간 중 WBC 수치 범위는 정상군 311.3~337.9 $10^6/\mu\text{l}$, 무기태 구리군 273.1~380.3 $10^6/\mu\text{l}$, 유기태 구리군 282.3~363.0 $10^6/\mu\text{l}$ 이었다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 생산공장형은 1~2배 였고, 사료첨가제형은 2~4배였다. .

산란율 변화

Table 14는 무기태 유청분말 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 사료 섭취 기간 동안 산란계 내 산란율의 변화를 확인함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 정상사료, 무기태 구리와 유기태 구리를 산란계에 섭취시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다. 실험 기간 동안 일반 사료를 섭취 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 구리를 섭취 시킨 군에서는 G5군이 10.11개로 가장 높았다. 무기태 구리군은 8.64~9.58개이었으며, 유기태 구리군은 8.64~9.58개였다. 유기태 구리 섭취 군은 무기태 구리 사료를 먹인 군과 비교하여 산란수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 2배였고, 대조구는 2~4배였다.

4. 종합 요약

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 제조된 사료를 계란고품질과 산란계 안전성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안정성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 구리 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

바. 사료 평가를 통하여 유기태 구리 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 구리를 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란 율)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사. 유기태 구리 소재의 관련 현장평가를 통하여, 현장형 사료첨가제 제조 레시피 정립이 완료되었다.

Table 1. 산란계 영양 사료 미네럴 기본 조성 비율

원료 (미네럴 종류)		원료 시료내 목표 미네럴 함유량(%)	사료율	비고
			함량 (mg)/100kg	
Ca	CaCO ₃	39.3	10,288	레시피 (제조 판매 된 현대사료)
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	30	5,500	
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	35	8,800	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	34	550	
Se	Na ₂ SeO ₂	43	30	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	31	88,00	
I	CaIO ₃	63	170	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	33	0	

Table 2. 산란계 현장 적용 사료 영양 조성물 비율

혼합물 성분	%
Corn	50
Wheat grain	
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
화합물 조성	
Metabolic energy, kcal/kg	2780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

Table 3. 산란계 현장 적용 유기태 강화 사료 제조 레시피(중추용, 사료1톤기준)

무기태 미네랄류		일반사료 (사료1톤기준)		Cu-WPS					
		1배		주문형 사료내 첨가량(g)			미네랄함유량(mg/1톤)		
		첨가량 (%)	순수 미네랄 함유량 (mg/1톤)	1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	CaCO ₃	39.3	102,880	261.79			102,880		
Fe	FeSO ₄ .H ₃ O	30	55,000	183.33			55,000		
Zn	ZnSO ₄ .H ₃ O	35	88,000	251.53			88,000		
Cu	CuSO ₄ 4.H ₃ O	34	5,500	16.18	32.36	64.72	5,500	11,000	22,000
Se	Na ₂ SeO ₂	43	300	0.7			300		
Mn	MnSO ₄ .H ₃ O	31	88,000	-			88,000		
I	CaIO ₄	63	1,700	-			1,700		
CO	CoSO ₄ .H ₃ O	33	0	-			0		

Cu-WPS: 유청분말 기질 유기태 사료

Table 4. 키토산 기질 유기태 구리 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

현장평가 사료유형	안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가																최적 농도
	계란고품질											산란계 안정성					
	총무게	가식부 (난황 +난백) 무게 (건조)	가식부 (난황 +난백) 무게 (비건조)	난각 두께	난황 높이	난백 높이	난각색			난황색			적혈구	백혈구	림프구	산란율	
							(L)	(a)	(b)	(L)	(a)	(b)					
사료첨가형	2배 (13.5%)	1배 (45.3%)	2배 (2.8%)	4배 (18.2%)	2배 (11.2%)	1배 (16.5%)	2배 (9.6%)	4배 (34.3%)	1배 (22.7%)	4배 (29.4%)	1배 (87.8%)	4배 (37.0%)	4배 (14.3%)	2배 (3.6%)	4배 (-4.6%)	1배 (-3.9%)	1~2배
생산공장형	4배 (23.7%)	2배 (17.9%)	2배 (6.2%)	4배 (29.5%)	4배 (14.7%)	4배 (43.4%)	2배 (11.1%)	4배 (38.1%)	1배 (26.4%)	4배 (30.5%)	1배 (87.8%)	4배 (43.3%)	1배 (24.7%)	2배 (5.6%)	4배 (35.8%)	1배 (15.4%)	1~2배
안정성 및 생육 증진성 최적 첨가 농도(공통적용 농도-본시험연계:2협동 공여)																	
1~2배																	

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 계란 총무게 변화

시험구		총무게 (단위: g)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	50.53±1.97	52.86±3.79	51.09±2.31	55.19±5.10	51.86±2.53	55.19±2.07
Cu-대조구	G2	51.65±1.91	53.36±2.36	58.21±1.72	57.2±39.41	52.98±1.63	52.96±1.47
	G3	56.36±2.63	53.69±0.47	56.29±1.66	58.91±4.19	56.11±5.53	51.49±0.96
	G4	49.59±2.15	49.67±3.85	55.20±0.37	55.34±2.41	57.47±2.56	47.28±1.04
Cu-유기태구	G5	50.36±0.64	50.89±2.03	55.60±2.28	54.53±2.82	57.04±0.31	54.70±1.18
	G6	58.44±3.85	51.06±3.26	54.05±2.04	54.48±2.66	51.71±2.02	50.85±6.67
	G7	52.31±1.81	47.52±1.10	50.29±2.34	49.54±2.15	61.97±7.23	51.43±1.25

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 6. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 가식부무게(비건조상태) 변화

시험구		가식부무게 (비건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	84.61±0.57	85.03±1.46	86.35±0.49	86.16±1.31	84.58±2.24	85.47±0.82
Cu-대조구	G2	81.60±0.48	84.43±0.43	87.18±2.11	85.27±4.57	84.58±2.36	85.50±1.09
	G3	84.36±0.78	84.19±1.77	82.06±4.81	85.58±2.13	84.98±2.11	84.39±1.62
	G4	86.27±1.29	85.62±1.65	85.65±1.00	84.03±3.14	85.36±1.34	85.82±1.52
Cu-유기태구	G5	84.05±1.29	79.23±9.26	86.47±0.66	85.20±0.90	86.39±0.69	86.69±0.54
	G6	78.43±11.73	85.21±0.75	87.02±0.89	85.05±2.34	84.98±0.45	80.29±0.03
	G7	85.53±0.58	86.54±0.62	79.89±8.47	83.02±3.10	87.65±0.48	86.83±0.51

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 7. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 가식부무게(건조상태) 변화

시험구		가식부무게 (건조상태) (단위: %)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	19.41 ± 1.67	15.73 ± 6.04	21.54 ± 1.14	20.64 ± 2.16	17.05 ± 2.15	22.66 ± 2.94
Cu-대조구	G2	21.99 ± 1.18	21.66 ± 0.27	23.57 ± 2.77	21.31 ± 0.50	21.60 ± 1.65	23.95 ± 2.45
	G3	21.84 ± 3.23	23.07 ± 0.80	21.57 ± 1.35	20.61 ± 2.83	21.78 ± 2.72	25.21 ± 2.73
	G4	22.86 ± 0.28	23.47 ± 0.60	21.82 ± 0.09	20.97 ± 1.94	21.94 ± 1.98	24.59 ± 1.90
Cu-유기태 구	G5	22.20 ± 1.12	23.08 ± 0.49	21.79 ± 0.93	28.74 ± 2.62*	20.41 ± 0.68	23.32 ± 1.33
	G6	19.57 ± 1.34	22.92 ± 1.45	21.99 ± 2.45	22.41 ± 1.53	21.65 ± 2.01	25.12 ± 2.08
	G7	20.74 ± 0.51	23.89 ± 0.83	24.87 ± 4.07	20.83 ± 0.85	20.26 ± 1.37	24.77 ± 0.99

* P<0.05 as compared with G2

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난각 두께변화

시험구		두께 (단위:mm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	0.41±0.03	0.38±0.04	0.41±0.03	0.39±0.03	0.38±0.01	0.36±0.02
Cu-대조구	G2	0.40±0.02	0.41±0.01	0.31±0.06	0.40±0.03	0.40±0.02	0.46±0.02
	G3	0.40±0.01	0.39±0.01	0.38±0.06	0.40±0.04	0.38±0.04	0.40±0.02
	G4	0.37±0.02	0.43±0.02	0.39±0.04	0.38±0.05	0.39±0.03	0.37±0.01
Cu-유기태구	G5	0.34±0.04	0.41±0.03	0.38±0.04	0.34±0.01	0.42±0.07	0.37±0.04
	G6	0.35±0.06	0.43±0.02	0.40±0.02	0.40±0.04	0.40±0.04	0.32±0.10
	G7	0.37±0.04	0.44±0.02	0.36±0.03	0.43±0.01	0.41±0.03	0.39±0.04

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난황고 변화

시험구		난황고(단위:nm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	15.23±0.39	14.20±1.20	14.37±1.16	14.09±0.05	14.26±0.58	15.13±1.41
Cu-대조구	G2	13.69±0.08	13.78±0.71	15.94±1.06	16.09±1.06	14.42±0.56	13.57±0.33
	G3	14.73±0.73	14.99±1.08	15.35±.70	14.93±0.66	15.46±0.74	14.26±0.57
	G4	13.23±1.11	13.68±1.21	14.46±0.13	14.26±1.71	14.31±1.37	13.81±0.15
Cu-유기태구	G5	12.93±0.62	12.64±0.73	14.31±1.33	12.97±0.79	15.04±0.37	15.42±0.21*
	G6	14.56±1.22	14.36±0.76	14.71±0.50	14.95±0.87	15.52±0.23	15.87±0.44
	G7	13.18±1.09	13.86±1.63	14.59±0.97	15.52±0.71	14.45±1.19	14.42±0.79

*P<0.05 as compared with G3

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난백고 변화

시험구		난백고 (단위:nm)					
		18일	19일	32일	33일	43일	44일
정상구	G1	6.79±0.27	6.66±0.19	7.09±0.64	7.84±0.78	6.63±0.76	6.90±0.58
Cu-대조구	G2	6.86±1.00	6.17±1.61	5.54±0.20	6.97±1.68	6.63±0.76	6.57±1.00
	G3	7.15±0.45	6.61±0.07	5.85±0.32	6.49±1.08	6.67±0.57	6.79±0.45
	G4	6.94±0.86	6.25±0.48	4.49±1.18	6.38±0.78	7.49±0.88	5.79±0.25
Cu-유기태구	G5	7.47±0.46	6.73±0.27	6.16±0.42	6.40±0.15	7.50±0.04	7.94±0.66
	G6	7.50±0.58	6.33±0.18	5.12±0.46	6.25±0.42	6.40±0.41	6.34±1.30
	G7	7.12±0.62	6.73±0.28	5.38±0.68	5.44±0.30	6.40±0.10	6.06±0.50

* $P < 0.05$ as compared with G2.

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난각색 변화

시험구			난각 (단위:nm)					
			18일	19일	33일	41일	43일	44일
정상구	G1	L	62.12±5.61	61.67±4.51	61.97±1.83	56.51±0.03	58.98±3.46	60.83±2.49
		a	15.87±3.01	15.95±3.01	13.32±2.72	19.15±0.04	18.12±1.49	16.14±3.22
		b	29.84±4.32	28.83±5.92	33.03±2.30	37.31±0.33	37.31±0.04	31.88±2.57
Cu-대조구	G2	L	58.11±0.62	58.73±2.18	61.94±6.45	58.61±2.68	62.66±1.57	61.32±2.05
		a	17.27±3.41	22.40±0.69	14.20±2.16	17.80±3.83	19.00±1.16	16.66±3.53
		b	32.97±1.26	33.92±2.59	29.23±2.22	33.85±4.78	33.84±1.32	34.41±0.73
	G3	L	63.66±2.51	63.83±4.53	60.49±3.22	61.39±4.30	63.90±0.60	63.77±2.41
		a	19.77±1.96	14.16±1.62	17.68±1.88	20.17±1.89	17.98±0.99	13.82±1.72
		b	34.44±0.32	30.48±1.45	27.46±1.39	39.53±0.95	33.59±1.41	34.04±4.27
	G4	L	59.95±7.69	59.03±3.74	63.46±4.09	58.07±2.56	57.78±5.66	63.91±2.46
		a	17.37±1.32	16.38±3.51	12.54±4.00	19.68±0.70	20.10±3.88	13.94±3.94
		b	37.93±6.61	32.93±1.98	30.47±1.04	34.96±2.50	32.57±2.66	33.97±0.63
Cu-유기태구	G5	L	59.50±3.19	60.80±3.15	63.41±1.05	60.16±2.00	60.16±2.00	60.88±0.96
		a	15.60±3.79	19.25±1.54	14.43±1.14	17.23±1.35	17.23±1.35	19.88±1.70
		b	34.13±1.24	35.33±2.01	27.12±3.68	37.33±2.03	37.33±2.03	35.69±2.33
	G6	L	59.88±2.28	59.67±2.20	65.07±7.86	59.40±0.71	59.40±0.71	65.25±1.11
		a	17.33±5.37	19.81±0.93	13.44±4.16	18.91±2.92	18.26±0.31	14.63±1.32
		b	32.20±5.02	35.93±0.74	25.58±6.11	35.17±0.12	33.86±0.90	30.07±3.12
	G7	L	61.13±0.02	64.13±3.81	62.34±1.89	64.55±4.94	61.88±3.45	63.79±1.58
		a	20.26±0.05	14.95±1.68	14.09±1.72	16.30±1.53	19.61±1.41	17.64±1.16
		b	32.27±0.09	35.18±0.79	27.78±1.98	36.94±0.83	34.52±1.61	32.56±3.12

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 난황색 변화

시험구			난황 (unit:nm)					
			18일	19일	33일	41일	43일	44일
정상구	G1	L	48.83±4.18	53.53±4.58	44.34±0.57	61.54±0.42	61.54±0.42	53.44±4.17
		a	1.40± 0.29	0.50±0.29	1.94±0.88	0.85± 0.06	0.87± 0.06	1.45±0.85
		b	39.51±5.42	43.51±9.42	37.25±3.09	62.79±2.12	62.79±2.12	43.01±7.44
Cu-대조구	G2	L	50.53±4.69	55.64±8.66	45.18±1.59	62.69±7.30	57.35±2.08	51.76±2.52
		a	1.84±0.86	1.47±0.30	1.92±1.12	1.12±0.47	0.50±0.16	0.82±0.29
		b	43.67±7.89	49.59±6.51	33.55±2.72	60.59±14.5	53.23±1.90	43.27±4.72
	G3	L	58.86±0.06	62.21±2.18	43.61±1.48	66.82±1.38	62.03±1.41	51.68±6.26
		a	1.08±0.08	0.85±0.42	2.04±0.92	0.77±0.84	2.23±0.65	1.81±0.89
		b	55.73±2.34	59.49±7.30	31.53±0.87	66.19±4.92	56.16±1.20	41.32±5.40
	G4	L	49.21±5.10	60.50±3.01	45.15±0.98	65.71±4.76	58.17±4.76	55.37±0.17
		a	0.56±0.26	1.44±1.15	2.09±0.59	1.76±0.72	0.99±0.62	2.20±1.27
		b	41.65±5.68	62.26±3.77	36.43±2.62	60.05±11.0	51.06±9.92	47.82±1.74
Cu-유기태구	G5	L	48.44±2.57	59.39±4.02	44.20±3.71	60.33±1.54	60.33±1.54	51.15±5.35
		a	3.67±0.53	1.00±0.98	4.12±0.16	1.71±1.16	1.71±1.16	2.13±0.67
		b	42.18±3.55	54.41±8.39	32.00±2.74	58.27±1.36	58.27±1.36	45.82±4.28
	G6	L	47.63±3.03	62.55±1.21	47.70±2.93	61.15±6.90	60.75±4.85	42.95±9.15
		a	2.16±0.63	1.08±0.53	2.81±1.12	1.55±0.95	2.32±0.85	1.93±1.21
		b	37.33±4.12	57.86±1.60	33.21±3.72	55.18±12.2	52.74±9.60	41.60±1.52
	G7	L	59.56±7.19	60.60±2.75	46.71±3.10	59.05±4.76	57.96±2.04	62.82±1.60
		a	0.12±0.02	1.63±1.23	3.40±0.64	1.87±1.26	0.55±0.17	1.81±0.28
		b	44.475±0.2	57.73±0.71	36.38±2.63	55.57±6.88	50.83±3.81	59.17±2.22

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 혈구수 변화

시험구		적혈구(단위:10 ⁶ /μl)		백혈구(단위:10 ³ /μl)		림프구(단위:%)	
		36일	48일	36일	48일	36일	48일
정상구	G1	1.88±0.32	2.01±0.16	337.87±39.98	311.27±19.62	75.67±0.06	75.00±0.41
Cu-대조구	G2	2.03±0.17	1.93±0.04	380.30±14.14	328.20±59.23	69.00±5.66	66.67±8.62
	G3	1.91±0.06	1.84±0.26	332.80±26.45	308.40±29.90	58.33±4.73	71.67±6.66
	G4	1.97±0.20	1.90±0.04	273.10±39.58	330.17±61.38	46.00±11.31	67.33±6.66
Cu-유기태구	G5	1.75±0.25	1.86±0.19	287.90±51.25	363.03±33.3	67.00±7.21	62.33±7.64
	G6	1.95±0.14	1.93±0.11	323.93±42.73	309.53±53.98	56.33±7.37	53.00±6.10
	G7	1.47±0.29	1.85±0.37	282.35±26.94	279.65±30.33	71.67±2.89*	61.00±8.49

*P<0.05 as compared with G4, G1:정상구(일반사료섭이), G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료), G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료), G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료), G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료), G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료), G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

Table 14. 산란계 내 무기태 또는 유기태 구리 섭취에 의한 산란율 변화

시험구		산란수 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총계란수	평균계란수
정상구	G1	473	10.51
Cu-대조구	G2	431	9.58
	G3	413	9.18
	G4	389	8.64
Cu-유기태구	G5	455	10.11
	G6	414	9.20
	G7	401	8.91

G1:정상구(일반사료섭이),G2:비교대조구(구리첨가량:5,500mg/1톤사료),G3:비교대조구(구리첨가량:11,000mg/1톤사료),G4:비교대조구(구리첨가량:22,000mg/1톤사료),G5:유기태시험구(구리첨가량:5,500mg/1톤료),G6:유기태시험구(구리첨가량:11,0mg/1톤료),G7:유기태시험구(구리첨가량:550mg/2,200kg사료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15).

제 2-5 절 기능성 셀레늄 강화 사료 부분

1. 연구목적

최근 소비자들은 건강과 삶의 질을 고려한 안정성과 건강기능성을 추구하면서 식품에 많은 관심을 가지고 있는데, 이 중 브랜드 계란 생성을 위한 광물질은 비타민과 더불어 양계산물인 계란 내 이행이 쉬운 것으로 알려져 왔으며, 부족하기 쉬운 미량 원소를 계란 내로 이행시킴으로서 고부가가치를 올릴 수 있게 된다(Park 등., 2009, Utterback., 2005).

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다. 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값비싼 아미노산 대신에 소화시킨 단백질을 이용한 peptide complex가 개발되어지고 있으며, 이러한, 유기태 광물질들은 유한한 광물질 자원을 절약하고, 소화흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 대체제(Cu, Zn)와 기능성 식품(Fe) 생산에 효과적으로 이용 가능하다(Baek., 2009).

키토산은 생체에 대한 독성이 없고, 친수성, 생분해성, 항박테리아 등의 기능을 나타내기 때문에 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 키토산은 그람 양성, 음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여 한다(Yoon 등., 2005, Skjak 등., 1988., Gordon 등., 1983, No 등., 002).

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성화 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 위산, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다(Yoo 등., 2006., Han 등., 1998). 최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다(Yoo 등., 2006., Vanessa, 등., 2004, Hong 등., 2002).

셀레늄(Selenium)은 사람과 동물에 매우 낮은 농도로 요구되어지면서, 보통 식물, 가축, 어류 등의 해산물을 통하여 섭취되어 진다. 성인의 하루 추천 섭취량은 $55\mu\text{g day}^{-1}$ 이다(Clark 등., 1998, Yun 등., 2008). 셀레늄은 필수 미량 광물질로서, 항암, 항바이러스 효과, 번식 기능 및 면역력 기능에 중요한 역할을 한다(Jun 등., 1973, Combs 등., 1981). 가금류에서 셀레늄의 적절한 수준은 산란율과 부화율이 개선되고(14), 계란 내 셀레늄 함량이 증가하고(Hassan 등., 1986, Payne 등., 2005,), 공급 형태에 따른 이행 효율은 유기태 셀레늄이 무기태 셀레늄에 비해 높다(Na., 2007).

본 연구에서는 유단백질을 기질로 하는 유기태 미네랄을 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비하여 혼합하여 섭이시킨 후, 각 측정 기간별로 품질 및 산란계 안정성을 비교 평가함으로써 축산 현장에서 절실히 필요로 하는 현장 애로점을 해결할 수 있는 대안을 제시함과 동시에 제품화를 완성하고 저 본 연구를 수행하였다. 이를 위하여, 유기태 미네랄 소재류의 사료 첨가시, 기존 일반사료

(첨가형) 에 해당 유기태 소재를 추가로 첨가하는 조건으로 제조한 사료첨가형(현장 사육농가 적용형)과 대규모 사료제조 공장에서 무기질 미네랄 제제를 대체하는 조건으로 유기태 미네랄 제제를 첨가하는 생산공장형으로 구분하여 **최적 생육 및 기능성 축산물 생산형 사료제조 레시피 정립을 위한 현장유효성 평가**를 진행하였다.

2. 연구방법

시험사료 준비

일반사료(표준) 사료준비

시험당시 일령 등을 고려한 공시동물인 산란계 대상 적절한 사료의 선발은 (주)현대사료 기술연구소의 자문을 받아 동일사에서 생산한 “산란톱 (중추사료)” 표본으로 사용 하였다 (Table 2). 기본사료 내 미네랄류는 Mineral premix 형태로 사료 1톤당 첨가방법이 일반적이며 관련한 미네랄 및 사료조성 내역은 (주)현대사료 기술연구소의 자료를 인용하였다.

유기태 강화 사료(칼슘) 준비

유기태 소재류의 대량 생산 시, 무기 미네랄을 대체한 첨가방법을 고려 (경제성 고려) 한 사료를 제조한 후 이를 현장 유효성 평가를 실시하였다. 즉, 표준사료인 “산란톱” 을 주문시 칼슘만을 제외한 사료 톤당 유기태 칼슘 소재 내 순수 칼슘 함유량을 102,880 ppm을 첨가한 시험군(이하 1배)와 이를 기준으로 첨가농도를 0.5, 0.75, 1, 2 및 4배로 조절한 유기태 강화 사료류 5종을 제조하여 전체 시험 간 사용하였다 (Table 3).

시험구 조성

공시동물

공시동물은 형제농장 (한국) 에서 사육하고 있는 현장사육중인 시설내에서 임의적으로 선발한 Hy-line (20주령)을 대상으로 동일한 사육시설내 공장형 산란계 케이지내 에서 실시하였다. 공시동물 선발 조건은 외관상 건강체 산란계중 체중 범위가 1.5~2.0 kg인 동물을 사용하였다.

사육 조건

시험구별로 3마리씩을 공장형 산란계 케이지에 넣어서 사육하였다.

시험 사료 제조

무기태 혹은 유기태 철 사료를 제조하기 위하여 표준사료내 단지 철 미네랄만 제외된 주문식 ‘산란톱’ 사료 구입 한 후 이를 (주)바이오리소스사 (한국)에 위탁하여 준비된 무기 및 유기태 칼슘 제제를 1배, 2배 및 4배되게 동량으로 혼합한 무기태 및 유기태 강화 사료류를 제조하여 전체 시험사료로 사용하였다.

사료 급여

사료의 급이 조건은 산란계 1마리당 100g을 오전 8시에 50g 그리고 오후 8시에 50g씩을 공급하는 조건으로 전체 시험기간인 50일 동안 제한 급여하였다. 음용수 공급과 기타 현장 관리의 일반 방법으로 실시하였다.

시험구 조성

시험구 조성으로 일반사료를 섞이시킨 군(정상구-G1, 대조구)와 무기태 셀레늄만을 300 mg/Ton (1배 농도, Se-대조구-G1), 600 mg/Ton (2배 농도, Se-대조구-G2)과 1,200 mg/Ton(4배 농도, Se-대조구-G4) 되게 각각 혼합한 비교구로서 조성 하였다. 또한 시험사료의 경우는 유기태 셀레늄만을 300 mg/Ton (1배 농도, Se-유기태구-G1), 600 mg/Ton (2배 농도, Se-유기태구-G2)와 유기태 철을 가장 높은 첨가량인 1,200 mg/Ton으로 첨가한 4배 처리구 (Se-유기태구-G4)로 조성하였다. 시험구별 사용된 산란계는 15마리씩을 대상으로 시험을 실시하였다.

현장유효성 평가

무기태 및 유기태 강화사료의 농도별로 장단기 섭이시 안전성 및 생육증진에 미치는 최적 첨가농도 설정을 위한 현장 유효성 평가는 다음과 같이 확인하였다.

유계 생산성 관련 계란품질 평가

시험사료류 섭이에 따른 계란 생산성 및 품질 평가항목으로는 총무게 (농가 수익증대 및 기호성 증대), 가식부 생중량 및 건조중량 (소비자 기호성 증진), 난각 두께 (파란을 감소 해결), 계란 착색도 (소비자 기호성 증진), 산란율 (농가 수익증진) 등이었다.

생체 활성 변화를 위한 성장 및 안전성 평가

성장특성 비교 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 성장 특성 평가항목으로는 산란계 체중 변화이다.

혈액안전성 평가

시험사료류 섭이에 따른 산란계 혈구세포 (적혈구, 백혈구 와 림프구) 수치 변화이다.

평가방법

특성 비교 평가

체중 증체율

시험사료류 섭이에 따른 산란계 체중 증체율은 사료 섭취 기간 0일, 36일 및 49일을 기점으로 체중 증감을 저울 (Model No. EK-4100, JAPAN) 을 이용하여 측정하였다.

혈액 성분 분석

시험사료류 섭이에 따른 혈액 분석을 위해 사료 섭취 36일 및 48일째에 산란계 날개정맥에서 혈액을

20 채혈한 후, CBC bottle에 넣어 냉장보관 상태로 실험실로 운반하였다. 혈액 속에 있는 백혈구, 적혈구와 림프구 수치 변화를 확인하기 위한 성분 분석을 위해 채혈 후 (주)녹십자의료재단 (경기도) 에 혈액 분석을 의뢰하였다.

계란품질 평가

계란품질 평가는 장단기 섭이 시 확인을 위하여 사료류 섭이 기간에 따라 실험전기 (18-19 일) , 실험중기 (32-34일) , 실험후기 (43-44일) 로 구분하여 확인하였다

총무게, 가식부 중량

시험사료류 섭이에 따른 계란 총무게, 가식부 중량 변화를 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)을 이용하여 측정하였다.

계란 착색도

시험사료류 섭이에 따른 계란의 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA (JAPAN,CR-400(Φ 8 mm)/CR-410(Φ 50 mm)>, JAPAN)를 이용하여 L(명도), a(붉은 색), b(노란색)를 측정하였다.

난각 두께

시험사료류 섭이에 따른 계란 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

난백고, 난황고 높이

시험사료류 섭이에 따른 계란 난황고, 난백고, 난각 두께 변화를 Absolute Digimeter (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란율 변화

시험사료류 섭이에 따른 산란율은 매일 아침 8시경 계란을 집락한 후, 산란개수를 파악하였다.

3. 연구결과

미네랄 소재류

무기 미네랄류

본 실험을 위해 사용되어진 주요 무기태 미네랄류는(Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se)은 CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 Na_2SeO_2 로 (주)이노바텍(정읍, 전북, 한국)에서 구입하여 현장시험 목적에 맞게 OEM방식(현대사료 제품<제품명:산란톱>)에서 Ca, Fe, Zn, Cu 및 Se 미네랄이 제외된 상태로 제조된 제품 구입함)으로 주문 된 산란계 사료에 적정 농도(1배 기준)를 사료에 혼합하여 제조하는데 사용하였다.

시험 유기태 미네럴 소재류(키토산 기질)

키토산 기질 유기태 미네럴 소재류는 주관기관인 (주)한일바이오메드에서 키토산올리고당(chitosan oligosaccharide, 이하 OCHT)을 기질로 한 유기태 강화 미네럴을 제조한 것을 현장적용 평가를 위하여 공여 받아 사용하였다.

현장적용 사료 제조 레시피 정립

현장적용 사료는 생산 현장 및 농가의 상황을 고려하여 일반 상용화 제품인 현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하였다. 제품에 대한 분석 자료를 본 연구개발의 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다(Table 1~2). 분석 결과를 보면, 현장에서 사용되고 있는 산란계 사료의 주요 미네럴 함유량은 Ca 10,288, Fe 5,500, Zn 8,800, Cu 550, Se 30, Mn 8,800, I 170(mg/100kg 기준)등이었다. 또한, 주요 영양 성분은 전체 중량 대비(%) 옥수수 50, limestone 10.48, 동물성지방 0.7, DDGS 20, Mineral premix 0.12, lysine 0.32, vramin premix 0.11 MDCP 0.53, MHA (Rhodimet) 0.1, Soybean meal 8.9 %이었다. 주요 화합물 조성은 calcium 4.1, phosphorus 0.53, methionine+cystein 0.711, crude protein 17, crude fat 4.94, crude fiber 3.73 %, metabolic energy는 2,789(kcal/kg)이었다.

무기태 미네럴 대체형 사료

현장시험용 사료는 생산 현장 및 농가의 상황을 고려하여 상용화 된 (주)현대사료 제품(제품명:산란톱, 중추사료)을 기준(1배)으로 하여 핵심 무기태 미네럴을 대체하는 형태로 사료를 제조하여 현장평가에 활용하였다. 무기태 미네럴 셀레늄을 대체하여 유기태 셀레늄을 적정농도(1배 기준, 첨가량: 30 mg/100kg) 혼합하여 사료를 제조하였다(Table 3).

현장유효성평가

현장적용성 평가를 통해 각 항목별 최적 농도를 종합하여 안전성 및 생육 증진성 최적 첨가 농도(공통농도)를 선정하여 제 2협동 분시험연계에 활용하도록 하였고, 평가 결과는 다음과 같다(Table 4).

무기태 미네럴 대비 평가

상용화 된 산란계 사료에 함유되어 있는 주요 미네럴 함유량(1배 기준)을 기준으로 하여 키토산 기질 유기태 셀레늄을 OEM 주문 사료에 1배 농도로 사료에 혼합한 후, 일반사료 대비 유기태 기질 사료의 현장유효성 평가를 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

고품질 계란항목 평가의 경우 일반 사료를 섭취한 정상구 대비 유기태 구리의 각 평가항목별 최적 농도는 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 2배, 난각 두께 1배, 난백과 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 2~4배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1~4배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안정

성 및 생육 증진성 최적 농도는 2~4배였다.

대조구(정상구) 대비 평가

무기태 셀레늄 대비 키토산 기질 유기태 셀레늄의 각 평가항목별 최적 농도는 고품질 계란항목 평가의 경우 계란 총무게는 2배, 가식부 무게 1~2배, 난각 두께 1배, 난백 및 난황 높이 4배, 난각 및 난황색 2~4배였다. 산란계 대상 안정성 평가에 대한 각 평가항목별 최적농도는 혈구수(적혈구, 백혈구, 림프구)는 1배, 산란율은 1배였다. 위와 같은 결과를 종합해 볼 때, 안정성 및 생육 증진성 최적 농도는 2~4배였다.

평가항목

계란 전체 무게 변화

Table 5 무기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로 점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 총 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)를 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄은 -4.42~6.55 %, 유기태 셀레늄은 0.15~5.11 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상대비 유기태 실험군 중 G7군이 5.11 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄은 -1.45~8.53 %, 유기태 셀레늄은 -4.06~4.84 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비 유기태 실험군 중 G7군이 4.84 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 32일째에 무기태 셀레늄은 4.06~5.55 %, 유기태 셀레늄은 -1.63~7.73 %로 유기태 실험군 중 G7군을 제외한 다른 군에서 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G5군이 7.73 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 33일째에 무기태 셀레늄은 1.3~10.9 %, 유기태 셀레늄은 0.5~3.6 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G6군이 3.6 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 43일째에 무기태 셀레늄은 -0.15~7.43%, 유기태 셀레늄은 7.01~14.8 %로 계란 총무게가 증가하는 것을 확인하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G6군이 14.8 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 44일째에 무기태 셀레늄은 -4.98~5.90 %, 유기태 셀레늄은 -5.30~4.65 %로 계란 총무게가 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 유기태 실험군 중 G6군이 4.65 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 4배였다.

계란 가식부(생중량) 무게 변화

Table 6는 기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로 점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 무게(생중량) 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험

(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100%) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄은 0.37~2.08 %, 유기태 셀레늄군은 0.84~2.02 %로 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 2.02 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄은 -0.28~2.58 %, 유기태 셀레늄군은 -1.01~1.63 %로 생중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 1.63 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 32일째에 무기태 셀레늄은 -0.94~0.56 %, 유기태 셀레늄군은 -2.91~-1.03 %로 셀레늄 실험군에서 생중량이 감소하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 33일째에 무기태 셀레늄은 -1.96~-0.42 %, 유기태 셀레늄군은 -2.25~1.19 %로 생중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 1.19 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 43일째에 무기태 셀레늄은 -4.95~1.24 %, 유기태 셀레늄군은 -1.44~1.66 %로 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 1.66 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이(100 %) 44일째에 무기태 셀레늄은 0.31~2.63 %, 유기태 셀레늄군은 -2.02~5.18%로 생중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 5.18 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 4배였다.

계란 가식부(건조중량) 무게 변화

Table 7은 태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 현장 애로 점을 해결할 수 있는 계란의 품질 및 소비자 기호성 관련 계란 가식부(난백+난황) 건조중량 무게 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄군은 3.72~15.68 %, 유기태 셀레늄군은 -2.32~6.86 %로 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 6.86 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄군은 15.28~18.24 %, 유기태 셀레늄군은 10.56~18.2 %로 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 18.24 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 셀레늄군은 -7.92~1.82 %, 유기태 셀레늄군은 -2.47~8.81 %로 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 8.81 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 셀레늄군은 8.23~12.8 %, 유기태 셀레늄군은 -2.99~-8.35 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 건조중량이 감소하였다.

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 셀레늄군은 7.88~13.01 %, 유기태 셀레늄군은 3.69~15.03 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 건조중량이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 15.03 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 셀레늄군은 -5.59~9.21 %, 유기태 셀레늄군은 2.91~6.75 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 건조중량이 증가하는 것을 확인하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 6.75 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 2배였다.

계란 난각 두께 변화

Table 8 무기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로 점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 파란을 감소 효과를 알아보기 위하여 계란 난각 두께 변화에 대한 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18-19일), 실험 중기(섭이 32-33일째), 실험 후기(섭이 43-44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째에 무기태 셀레늄군은 -41.3~4.65 %, 유기태 셀레늄군은 -5.18~2.38 %로 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 2.38 %로 가장 많이 증가하였다. 하지만, 무기태 대비 유기태 실험군 간에는 통계적 유의성이 있었다($p<0.05$). 정상군 대비(100 %) 섭이 19일째에 무기태 셀레늄군은 7.32~11.62 %, 유기태 셀레늄군은 2.56~11.62 %로 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 11.62 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비 섭이 32일째에 무기태 셀레늄군은 -24.2~-13.88 %, 유기태 셀레늄군은 -13.89~-10.81 %로 난각 두께가 모두 감소하였다. 정상군 대비 섭이 33일째에 무기태 셀레늄군은 -11.4~2.5 %, 유기태 셀레늄군은 -10.73~23.52 %로 유기태 실험군 중 G6군을 제외하곤, 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 23.52 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 43일째에 무기태 셀레늄군은 7.32~11.63 %, 유기태 셀레늄군은 5.26~16.2 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 16.2 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

정상군 대비 섭이 44일째에 무기태 셀레늄군은 5.26~12.19 %, 유기태 셀레늄군은 5.26~16.2 %로 모든 유기태 셀레늄 실험군에서 난각 두께가 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 16.2 %로 가장 많이 증가하였다($p<0.05$).

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 4배였고, 대조구 대비 2배였다.

계란 착색도 변화

Table 9은 무기태 대비 유기태 셀레늄 소재를 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 현장 애로 점을 해결할 수 있는 계란의 품질 중 난황의 착색도 L(명도), a(붉은색), b(노란색) 변화를 알아보기 위하여 결과를 도출하였다. 평가 결과는 실험 전기(섭이 18일), 실험 중기(섭이 33일째), 실험 후기(섭이 44일째)을 기준으로 하였으며, 평가 결과는 다음과 같다.

정상군 대비(100 %) 섭이 18일째 L값은 무기태 셀레늄군은 -1.98~11.47 %, 유기태 셀레늄군은 -0.54~14.08 %로 L값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 14.08 %로 가장 많이 증가하였다. a값은 무기태 셀레늄군은 -5.26~52.22 %, 유기태 셀레늄군은 29.29~46.76 %로 a값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 46.76 %로 가장 많이 증가하였다. b값은 무기태 셀레늄군은 3.35~14.75%, 유기태 셀레늄군은 7.23~19.66 %로 b값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 19.66%로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 33일째 L값은 무기태 셀레늄군은 -7.57~6.09 %, 유기태 셀레늄군은 1.35~7.97 %로 L값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 7.97 %로 가장 많이 증가하였다. a값은 무기태 셀레늄군은 -24.35~9.34 %, 유기태 셀레늄군은 29.19~43.27 %로 a값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 43.27 %로 가장 많이 증가하였다. b값은 무기태 셀레늄군은 -20.09~-2.62 %, 유기태 셀레늄군은 -16.07~-4.63%로 b값이 감소하였다.

대비(100 %) 섭이 44일째 L값은 무기태 셀레늄군은 -3.68~1.83 %, 유기태 셀레늄군은 0.20~14.23 %로 L값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G7군이 14.23 %로 가장 많이 증가하였다. a값은 무기태 셀레늄군은 -35.51~3.33 %, 유기태 셀레늄군은 -43.56~21.19 %로 a값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 21.19 %로 가장 많이 증가하였다. b값은 무기태 셀레늄군은 9.56~13.72 %, 유기태 셀레늄군은 0.51~24.54 %로 b값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G6군이 24.54 %로 가장 많이 증가하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~4배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

산란계 주요 혈액 수치 변화

Table 10은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 혈액 내 주요 혈구(백혈구, 적혈구, 림프구) 수치의 변화를 비교함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 평가 결과는 36일, 48일을 기준으로 하였으며, 각 실험별로 혈액을 채취한 후, RBC(unit:10⁶/μl), WBC(unit:10³/μl), Lymphocyte(unit:%)를 측정하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 36일째 RBC 값은 무기태 셀레늄군은 -42.42~7.84 %, 유기태 셀레늄군은 0.54~13.76 %로 RBC 값이 모든 유기태 실험군에서 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 13.76 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 48일째 RBC값은 무기태 셀레늄군은 -14.85~0.98 %, 유기태 셀레늄군은 -6.91~5.63 %로 RBC 값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 5.63 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100 %) 섭이 36일째 WBC 값은 무기태 셀레늄군은 -27.75~10.79 %, 유기태 셀레늄군은 -13.27~21.49 %로 RBC 값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 21.49 %로 가장 많이 증가하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 48일째 WBC 값은 무기태 셀레늄군은 -10.70~5.42 %, 유기태 셀레늄군은 -6.80~11.45 %로 WBC 값이 증가하였다. 유기태 셀레늄군 중 G5군이 11.45 %로 가장 많이 증가하였다.

정상군 대비(100%) 섭이 36일째 Lymphocyte 값은 무기태 셀레늄군은 -42.77~-8.87 %, 유기태 셀레늄군은 -30.46~-2.71 %로 모든 실험군에서 값이 감소하였다. 정상군 대비(100 %) 섭이 48일째 Lymphocyte 값은 무기태 셀레늄군은 -21.95~-9.76 %, 유기태 셀레늄군은 -19.67~-13.63 %로 모든 실험군에서 감소하였다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

산란율 변화

Table 11은 무기태 대비 키토산올리고당 기질-유기태 소재를 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 사료 섭이 기간 동안 산란계 내 산란율의 변화를 확인함으로써 생체 내 안정성 여부를 확보하고자 하였다. 정상사료, 무기태 셀레늄과 유기태 셀레늄을 산란계에 섭이시킨 후, 계란 산란율을 측정하였다. 실험기간 동안 일반 사료를 섭이 시킨 정상군의 평균 산란 갯수는 10.51개이었다. 유기태 셀레늄을 섭이 시킨 군에서는 G5군(ORG Se-1)이 9.04개로 가장 높았다. 무기태 구리군은 7.93~9.46개이었으며, 유기태 구리군은 8.42~9.04개였다. 유기태 셀레늄 섭이 군은 무기태 셀레늄 사료를 먹인 군과 비교하여 산란수 차이는 없었으며, 정상군과 비교하여도 차이가 없어 산란수에 안정성이 있다고 판단된다.

본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1배였고, 대조구 대비 1배였다.

4. 종합요약

가. 현장적용 평가를 위한 무기 미네랄 및 유기태 미네랄을 준비하여 현장평가용 사료 혼합에 사용하였다.

나. 현장적용 사료 제조 레시피 정립을 위해 산란계 사료의 영양성분과 필수 미네랄 함유량을 분석하였고, 이를 현장적용 사료 개발 레시피의 기초자료로 활용하였다.

다. 현장적용 사료는 무기태 미네랄 대체형으로 제조하여 평가에 활용하였다.

라. 적용용법별로 사료첨가형과 생산공장형 사료를 이용하여 계란고품질과 산란계 안정성 등의 현장적용성 평가지표를 설정하여 현장 평가를 진행하여 안정성 및 생육 증진성 최적첨가 농도를 확보하였다.

마. 본 실험 결과 일반 사료 대비 유기태 셀레늄 사료의 최적 농도 범위는 무기태 미네랄 대비 1~2배였고, 대조구 대비 1~2배였다.

바. 제조된 유기태 셀레늄 제제는 일반 사료를 섭취한 정상구와 무기태 셀레늄을 섭취한 대조구에 비해 소비자들의 기호성과 신선도에 연관된 계란 총무게, 난황고와 난백고 높이, 난황과 난각색 증가, 생체 활성 변화와 연관된 혈구 세포(백혈구, 림프구)의 증가, 농가 생산성과 연관(파란울)된 계란 난각 두께를 증가시켰다. 이를 통해 산란계 생체 활성 변화 및 무기태 미네랄 대체 효과, 산란계 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 1. 산란계 영양 사료 미네럴 기본 조성 비율

원료 (미네럴 종류)		원료 시료내 목표 미네럴 함유량(%)	사료율 함량 (mg)/100kg	비고
Ca	CaCO ₃	39.3	10,288	
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	30	5,500	레시피 (제조 판매 된 현대사료)
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	35	8,800	
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	34	550	
Se	Na ₂ SeO ₂	43	30	
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	31	88,00	
I	CaIO ₃	63	170	
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	33	0	

Table 2. 산란계 현장 적용 사료 영양 조성물 비율

혼합물 성분	%
Corn	50
Wheat grain	
Soybean meal	8.9
Corn gluten meal	0.26
DDGS	20
Animal fat	0.7
MDCP	0.53
Limestone	10.48
NaHCO ₃	0.1
Sodium chloride	0.21
Vitamin premix	0.11
Mineral premix	0.12
MHA (Rhodimet)	0.1
Lysine (H ₂ SO ₄)	0.32
Choline chloride	0.05
화합물 조성	
Metabolic energy, kcal/kg	2780
Crude protein (%)	17.00
Crude fat (%)	4.94
Crude fiber (%)	3.73
Lysine (%)	0.846
Methionine + Cystein (%)	0.711
Calcium (%)	4.1
Phosphorus (%)	0.53

Table 3. 산란계 현장 적용 유기태 강화 사료 제조 레시피(중추용, 사료1톤기준)

무기태 미네랄류		일반사료 (사료1톤기준)		Cu-OCHT					
		1배		주문형 사료내 첨가량(g)			미네랄함유량(mg/1톤)		
		첨가량 (%)	순수 미네랄 함유량 (mg/1톤)	1배	2배	4배	1배	2배	4배
Ca	CaCO ₃	39.3	102,880	261.79			102,880		
Fe	FeSO ₄ .H ₃ O	30	55,000	183.33			55,000		
Zn	ZnSO ₄ .H ₃ O	35	88,000	251.53			88,000		
Cu	CuSO ₄ 4.H ₃ O	34	5,500	16.18			5,500		
Se	Na ₂ SeO ₂	43	300	0.7	1.4	2.8	300	600	1,200
Mn	MnSO ₄ .H ₃ O	31	88,000	-			88,000		
I	CaIO ₄	63	1,700	-			1,700		
CO	CoSO ₄ .H ₃ O	33	0	-			0		

Table 4. 키토산 기질 유기태 구리 소재류의 안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가

현장평가 사료유형	안정성 및 생육 증진성 최적 첨가농도 설정 평가																최적 농도
	계란고품질											산란계 안정성					
	총무게	가식부 (난황 +난백) 무게 (건조)	가식부 (난황 +난백) 무게 (비건조)	난각 두께	난황 높이	난백 높이	난각색			난황색			적혈구	백혈구	림프구	산란율	
							(L)	(a)	(b)	(L)	(a)	(b)					
사료첨가형	2배 (16.9%)	2배 (35.2%)	2배 (6.1%)	1배 (29.4%)	4배 (15.7%)	4배 (15.9%)	4배 (10.9%)	2배 (36.7%)	2배 (20.8%)	2배 (31.9%)	4배 (85.3%)	4배 (39.2%)	1배 (27.7%)	1배 (13.8%)	4배 (-1.8%)	1배 (-13.9%)	2~4배
생산공장형	2배 (22.0%)	1배 (17.0%)	2배 (10.6%)	1배 (43.1%)	4배 (22.7%)	4배 (41.2%)	4배 (14.4%)	2배 (38.9%)	2배 (31.4%)	2배 (36.6%)	4배 (77.5%)	4배 (40.7%)	1배 (11.4%)	1배 (39.4%)	1 배 (28.0%)	1배 (21.4%)	2~4배
안정성 및 생육 증진성 최적 첨가 농도(공통적용 농도-본시험연계:2협동 공여)																	
2~4배																	

Table 5. 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 계란 무게 변화

시험구		총중량 (unit: g)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	58.25±3.36	56.53±1.17	57.03±1.13
Se-대조구	G2	54.07±1.81	61.97±2.85	55.81±2.16
	G3	48.39±1.81	55.92±1.81	56.02±4.92
	G4	52.52±1.4	56.61±3.09	51.78±1.14
Se-유기태구	G5	52.33±1.43	56.02±1.08	58.81±0.75
	G6	57.62±1.88	59.28±1.21	59.25±2.59
	G7	54.35±2.09	55.87±2.11	62.51±5.22

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 6 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 가식부 무게(건조상태) 변화

시험구		가식부 무게 (건조상태) (단위: %)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	21.43±1.61	19.62±1.22	21.44±1.31
Se-대조구	G2	20.99±0.82	22.80±3.42	20.68±1.58
	G3	23.02±0.80	22.49±1.77	20.85±1.27
	G4	20.16±0.71	23.67±3.66	21.90±2.83
Se-유기태구	G5	21.12±0.19	20.95±1.39	21.7±0.23
	G6	20.21±1.33	21.12±1.28	20.96±1.29
	G7	20.50±0.61	20.66±0.29	21.81±0.73

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 7 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 난각 두께 변화

시험구		두께 (단위:mm)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	0.41±0.03	0.39±0.03	0.36±0.02
Se-대조구	G2	0.33±0.02	0.39±0.01	0.39±0.02
	G3	0.29±0.03	0.40±0.04	0.41±0.01
	G4	0.43±0.03	0.35±0.04	0.38±0.04
Se-유기태구	G5	0.29±0.02	0.31±0.02	0.31±0.01
	G6	0.32±0.01	0.30±0.01	0.32±0.02
	G7	0.27±0.01	0.29±0.02	0.29±0.01

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 8. 산란계 내 무기태 또는 유기백질 기질 셀레늄 섭취 후 난황고 변화

시험구		난황고 (단위:mm)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	11.01±1.01	14.09±1.34	15.33±0.63
Se-대조구	G2	13.67±1.54	13.71±0.37	14.34±1.30
	G3	15.50±0.59*	15.85±0.57	12.91±0.38
	G4	13.54±0.44	14.73±1.47	13.51±0.77
Se-유기태구	G5	13.58±1.88	13.32±0.99	16.43±1.24
	G6	14.72±0.70*	14.74±0.37	16.61±0.74**
	G7	13.65±0.26*	13.35±1.79	16.32±0.40**

* $P < 0.05$ as compared with G1, ** $P < 0.05$ as compared with G3

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 9. 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 난황고 변화

시험구		난백고 (단위:mm)		
		18일	33일	43일
정상구	G1	6.79±0.27	7.84±0.78	6.63±0.76
Se-대조구	G2	5.04±0.93	7.00±0.35	7.94±0.51
	G3	4.64±0.36	5.82±0.56	7.23±0.54
	G4	6.78±0.34	6.47±0.42	7.11±0.67
Se-유기태구	G5	7.23±0.21 [*]	6.71±0.30	8.00±0.27
	G6	6.90±0.31 ^{**}	6.99±0.68	7.75±0.64
	G7	7.31±0.35	7.02±0.05	8.30±0.55

^{*} $P < 0.05$ as compared with G1, ^{**} $P < 0.05$ as compared with G2)

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 10. 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 난각 색차 변화

시험구			난각 (단위:nm)		
			18일	33일	43일
정상구	G1	L	61.47±5.67	60.56±1.53	62.60±0.96
		a	14.07±2.66	19.68±1.01	16.33±1.12
		b	29.13±1.56	30.11±1.50	28.62±2.62
Se-대조구	G2	L	56.70±0.59	65.62±2.39	61.03±5.15
		a	18.33±1.88	12.84±2.45	19.88±3.26
		b	32.82±1.59	24.98±2.67	34.60±2.02
	G3	L	61.25±5.11	63.34±2.47	60.55±3.50
		a	18.23±2.94	15.49±0.46	18.40±2.69
		b	32.84±0.57	28.39±2.85	30.73±3.48
	G4	L	61.96±2.09	61.27±5.73	62.57±6.20
		a	18.74±2.69	14.54±2.45	15.31±1.05
		b	33.72±2.30	28.94±1.39	31.68±3.12
Se-유기태구	G5	L	57.32±1.60	59.25±0.53	57.38±0.05
		a	19.32±0.83	13.90±1.38	19.18±1.39
		b	31.86±1.25	30.59±0.57	31.15±0.88
	G6	L	58.44±1.61	63.12±2.80	61.15±3.14
		a	15.56±1.02	15.77±2.82	16.02±1.30
		b	25.91±6.24	30.16±1.86	27.42±4.77
	G7	L	60.35±1.53	60.50±2.01	62.43±0.91
		a	17.28±1.47	16.83±1.81	15.42±0.85
		b	30.93±0.65	27.71±2.29	28.61±2/53

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 11. 산란계 내 무기태 또는 유기태 셀레늄 기질 셀레늄 섭취 후 난황 색차 변화

시험구			난황 (단위:nm)		
			18일	33일	43일
정상구	G1	L	56.07±1.49	54.38±3.39	56.77±1.16
		a	1.23±0.69	1.81±0.61	0.91±0.37
		b	50.46±2.93	47.60±1.71	46.59±1.85
Se-대조구	G2	L	61.90±2.41	41.22±1.93	52.68±9.21
		a	2.61±0.73	1.56±0.44	0.87±0.53
		b	59.42±1.36	30.45±4.88	46.68±10.95
	G3	L	57.98±3.17	44.89±4.41	55.54±5.39
		a	0.91±0.30	2.09±0.07	1.26±1.04
		b	53.16±6.12	30.26±9.27	50.31±3.69
	G4	L	55.16±4.49	47.22±1.88	50.68±4.79
		a	1.33±0.74	2.14±0.77	1.55±0.95
		b	46.35±3.88	36.30±0.94	43.64±12.21
Se-유기태구	G5	L	55.00±0.11	54.01±7.88	56.14±9.03
		a	0.41±0.13	1.01±0.22	1.77±0.77
		b	44.76±2.58	45.13±8.32	49.66±5.63
	G6	L	54.77±0.75	55.28±1.54	56.70±3.37
		a	0.50±0.26	1.36±0.61	1.58±0.64
		b	46.34±1.78	44.49±2.05	44.46±4.31
	G7	L	53.11±1.65	48.91±6.86	52.46±6.59
		a	1.68±0.96	0.66±0.26	2.24±1.17
		b	49.53±4.97	4.97±3.57	42.07±9.20

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 12. 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 혈구수 변화

시험구		RBC(단위:10 ⁶ /μl)		WBC(단위:10 ³ /μl)		Lymphocyte(단위:%)	
		36일	48일	36일	48일	36일	48일
정상구	G1	1.88±0.32	2.01± 0.16	337.87±39.98	311.27±19.62	75.67± 0.06	75.00± 0.41
Se-대조구	G2	1.32± 0.42	1.76± 0.13	264.47±49.58	281.17±60.29	67.00± 3.46	64.00± 5.00
	G3	2.04± 0.16	2.03± 0.12	316.00±72.13	329.13±49.15	53.00± 7.00	68.33± 7.64
	G4	1.85± 0.45	1.75± 0.08	378.75±36.98	288.03±75.74	69.50± 19.09	61.50± 7.78
Se-유기태구	G5	1.87± 0.09	2.20± 0.12	312.72±19.47	285.28±36.22	65.20± 2.77	76.55± 7.89
	G6	1.81± 0.13	2.22± 0.10	309.44±23.15	284.33±14.60	66.20± 2.16	81.25± 3.77
	G7	1.90± 0.19	2.08± 0.09	273.70±23.15	243.17±52.12	64.60± 6.54	79.70± 4.94

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

Table 13. 산란계 내 무기태 또는 유단백질 기질 셀레늄 섭취 후 산란율 변화

시험구		산란율 (단위:%) <섭이기간:45일>	
		총산란수	평균산란수
대조구	G1	489	10.87
	G2	475	10.56
Se-유기태구	G3	465	10.33
	G4	447	9.93

G1:정상구(일반사료섭이),G2:무기태대조구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G3:무기태대조구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G4:무기태대조구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤사료),G5:유기태시험구(셀레늄첨가량:300mg/1톤사료),G6:유기태시험구(셀레늄첨가량:600mg/1톤사료),G7:유기태시험구(셀레늄첨가량:1,200mg/1톤료). 모든 군당 평균±표준오차로 표시(개체수=15)

제 3 절 기능성 미네럴 강화사료제조 기법 정립

1. 연구목적

개발된 유기태화 미네럴 소재류를 이용한 기능성 미네럴 및 면역글로브린 강화란 및 고급 육질의 육계생산 및 항질병 예방 등의 기능성을 평가(1~3년차 연계)함에 가장 중요한 조건은 사료내 목표 미네럴의 균일성 있는 분산효과를 안정적으로 보장하여야 한다. 실제 기본 사료내 미네럴 및 기타 첨가제를 첨가함에 있어 분산력을 증가 시키기 위하여, 일반수에 혼합한 후 이를 첨가하는 방법이 일반적으로 사용되는데, 산란계 사료내 지방 및 입자내 부착 및 침투 및 확산능력을 부여한 다면 보다 목표 미네럴의 안정(전)된 분산이 가능할 것으로 판단되었다. 본 연구에서는 선행 정립된 연구결과인 향균 및 침투확산 능력을 보유한 Surfactant 와 일반수내 용해 및 분산력이 뛰어나도록 제조된 과립형 유기태화 제조기법을 전체적으로 적용하여, 목표 미네럴류의 사료내 분포균일성을 확보 할 수 있도록 사료제조 레시피를 확립 하고져 본 연구를 실시하였다.

2. 연구수행방법

본 연구를 위해서 기본사료는 산란계용 큰병아리용 사료를 구입하였으며, 사료내 본과제와 연관되는 5종 미네럴의 함유량을 우선 조사하여 보았더니, Ca는 18,897ppm, Fe는 483ppm, Zn는 106ppm, Cu는 111ppm 그리고 Se는 0.56ppm이 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 기본사료내 함유되어 있는 미네럴을 기준으로 여기에 사전 미네럴 함유량을 조사한 유기태화 소재류를 첨가하여 Ca는 20,000ppm, Fe는 2,300ppm, Zn은 2,400ppm, Cu는 600ppm 그리고 Se는 550ppm이 최종 함유되도록 디자인 하였다. 시험군은 기본사료내 유기태화 미네럴 소재류만을 첨가한 대조구에 대하여, 과립형 유기태화 소재류를 적용한 비교구 그리고 과립형 유기태화 소재류와 개발 Surfactant(선발 : 700)를 0.1%(w/w)되게 동시에 첨가한 시험구로 총 3개 시험구에 대하여 사료내 목표 미네럴류의 분산성 및 균일분포성을 평가하였다(ICP). 이를 위하여 시제[품인 Ca-WPS(과립분산형), Fe-WPS(일반형), Zn-WPS(일반형), Cu-WPS(일반형) 및 Se-WPS(일반형)]를 전체시험간 유기태화 소재류로 사용하였다(Fig 1).

3. 연구결과

Table 1은 WPS를 기질로 제조된 5종 일반 유기태화 미네럴 소재류를 산란계 사료내 혼합한 후 미네럴 함유량 조사를 통한 목표미네럴의 균일성 여부를 평가한 결과이다(그림 1). 우선 당초 기본사료내 유기태화 소재류를 첨가시 최종 미네럴 총량이 Ca는 20,000ppm, Fe는 2,300ppm, Zn은 2,400ppm, Cu는 600ppm 그리고 Se는 550ppm 되도록 조성하였음을 기준으로, ICP분석결과 Ca는 17,190ppm으로 약 86%수준만 검출되었으며, Fe는 1,615ppm으로 70% 검출수중이고, Zn는 첨가량 대비 137%로 오히려 높게 확인 되었다,

구리의 경우는 약 90%수준, 마지막으로 Se는 94%수준이 검출되었는데, 이러한 결과는 함량 허용범위를 80~120%의 허용하는 경우 Fe과 Se을 제외하고는 목표미네럴의 사료내에 분포가 균일성을 보이는 것으로 확인 할 수 있었다. 따라서, 미네럴 검출량 수치가 허용 오차범위를 넘어선 Fe와 Se의 첨가기법에 대한 보강과 최초 사료혼합전 균일성 있는 용해

및 분산만 가능하다면 단일 유기태화 미네럴 소재류의 첨가만으로도 목표 미네럴류는 사료 내에 분포에 있어 균일성을 확보 할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

Table 2은 WPS를 기질로 제조된 5종 일반 유기태화 미네럴 소재류와 개발 Surfactant(0.1%)를 산란계 사료내 혼합한 후 미네럴 함유량 조사를 통한 목표미네럴의 균일성 여부를 평가한 결과이다. 우선 당초 기본사료내 유기태화 소재류를 첨가시 최종 미네럴 총량이 Ca는 20,000ppm, Fe는 2,300ppm, Zn은 2,400ppm, Cu는 600ppm 그리고 Se는 550ppm 되도록 조성하였음을 기준으로, ICP분석결과 Ca는 20,190ppm으로 100%, Fe는 800ppm으로 35% 검출수준을 보였으며, Zn는 첨가량 대비 124% 그리고 구리는 116수준, 마지막으로 Se는 126%수준으로 높은 수치를 보였다. 이러한 결과는 함량 허용 범위를 80~120%의 허용하는 경우 Fe를 제외하고는 목표 미네럴의 사료내에 분포가 균일성을 보였으며, Surfactant의 침투확산 능력이 목표 미네럴의 분포에서 균일성에 기여하는 것으로 확인 할 수 있었다.

Table 3은 WPS를 기질로 제조된 5종 과립형 유기태화 미네럴 소재류(시제품)와 개발 Surfactant(0.1%)를 1차 혼합한후 산란계 사료내 혼합한 후 미네럴 함유량 조사를 통한 목표미네럴의 균일성 여부를 평가한 결과이다. 우선 당초 기본사료내 유기태화 소재류를 첨가시 최종 미네럴 총량이 Ca는 20,000ppm, Fe는 2,300ppm, Zn은 2,400ppm, Cu는 600ppm 그리고 Se는 550ppm 되도록 조성하였음을 기준으로, ICP분석결과 Ca는 21,1370ppm으로 약 106%, Fe는 2,257m으로 98% 검출수준을 보였으며, Zn는 첨가량 대비 104% 그리고 구리는 98%수준, 마지막으로 Se는 99%수준으로 이론치 투첨가량과 거의 일치하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 함량 허용범위를 80~120%의 허용하는 경우에 모두 해당할 수 있는 높은 수치의 균일성을 보이는 것으로, 결국 유기태화 소재류는 일반수에 용해성과 분산성을 확보하도록 과립분산형으로 제조하고, 여기에 이들의 신속한 침투확산능력을 보유하도록 Surfactant(0.1%)를 첨가하는 경우, 항균성을 포함한 목표 미네럴의 사료내 균일성에기여하는 것으로 확인 할 수 있었다.

4. 추후진행사항

연구결과를 토대로 사료내 유기태화 미네럴 소재류 혼합기법이 정립되었으며, 이는 세부적인 연구결과를 추가하여 기능성 미네럴 강화 사료제조관련 특허를 신청예정이며, 당해연도 후반기 최종 현장유효성 평가에 적용할 수 있도록 “과립형 유기태화 미네럴 소재류(시제품)” 및 Surfactant의 적용방법까지 포함하여 협동연구기관에 공여하였다.



Fig 1. 5종 유기태화 미네랄 소재류별 첨가사료의 성상
 1: Normal(산란계 사료), 2: Ca-WPS(과립분신형)첨가구, 3 : Fe-WPS 첨가구,
 4 : Zn-WPST첨가구, 5: Cu-WPST첨가구, 6:Se-WPS첨가구

Table 1. WPS를 기질로 하는 5종 일반 유기태화 미네랄 소재류를 첨가한 산란계 사료내 미네랄 함유량 조사결과

유기태화 첨가 사료시험구 (시료번호)	WPS 기질화 제조한 5종 유기태화소재 첨가사료에 대한 미네랄 분석결과(ppm)											비고	
	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	K	Mg	Mn	P	S	Hg		
FeWPS Diet (2)	Avg	8,983	1,615	56	10.9	ND	4,733	1,511	91	2,948	3,561	ND	
	SD	34	3.00	0.20	0.11		10	5.0	0.2	4.0	8.0		
ZnWPS Diet (3)	Avg	19,280	512	3,310	15.8	0.53	5,983	2,521	167	4,930	6,356	ND	
	SD	75	1.60	15	0.10	0.22	14	6.0	0.5	13.0	18.0		
CuWPS Diet (4)	Avg	11,510	401	72.2	538	0.55	10,140	1,635	100	2,918	3,281	ND	
	SD	28	0.10	0.15	0.50	0.21	3	3.0	0.1	15.0	12.0		
SeWPS Diet (5)	Avg	10,900	254	50.8	8.43	516	6,573	1,332	86	2,787	2,485	ND	
	SD	14	0.30	0.14	0.06	0.70	38	6.0	0.1	3.0	5.0		
CaWPS Diet (1)	Avg	17,190	248	44	6.39	0.21	5,633	1,127	68	2,697	1,942	ND	
	SD	15	0.50	0.03	0.07	0.06	9	4.00	0.11	6.00	5.00		

Table 2. WPS를 기질로 하는 5종 유기태화 미네랄 소재류와 Surfactant (0.1%)를 첨가한 산란계 사료내 미네랄 함유량 조사결과

유기태화 첨가사료		WPS기질화 제조한 5종 유기태화 소재 및 Surfactant 첨가사료에 대한 미네랄 분석결과(분쇄조건, ppm)															비고	
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	K	Mg	Mn	Cr	Na	P	S	Hg	Pb	Cd		As
Fe-WPS	Avg	22,042	800	71	12	0.30	5,493	1,670	111	3.29	5,496	3,836	3,805	ND	0.35	0.06	ND	
	SD	14,596	402	13.4	0.9	0.09	514	122	26.1	1.12	153	573	159		0.17	0.02		
Zn-WPS	Avg	15,270	485	2,978	14.3	0.3	6,216	2,013	150	2.52	6,282	5,019	5,860	0.03	0.23	0.08	ND	
	SD	58	1	4	0.05	0.1	23	9	0.2	0.03	38	7	19	0.06	0.07	0.01		
Cu-WPS	Avg	13,530	409	96	696	0.95	6,247	1,988	134	3.38	5,673	4,592	4,435	-0.11	0.77	0.08	ND	
	SD	22	0.8	0.23	0.8	0.18	30	13	0.4	0.02	71	9	14	0.06	0.19	0.01		
Se-WPS	Avg	13,750	469	86	14.1	694	6,320	2,011	137	2.56	6,206	4,680	4,241	-0.07	0.27	0.07	ND	
	SD	49	1.6	0.26	0.18	0.9	4	6	0.5	0.02	81	10	16	0.03	0.13	0.01		
Ca-WPS	Avg	20,190	551	73	11.3	0.26	5,817	1,707	116	3.53	5,325	3,972	3,733	0.11	0.22	0.08	0.03	
	SD	25	1.3	0.11	0.21	0.09	26	5	0.1	0.02	74	9	13	0.07	0.09	0.01	0.15	

Table 3. WPS를 기질로 하는 5종 과립분산형 유기태화 미네럴 소재류와 Surfactant(0.1%)를 첨가한 산란계 사료내 미네럴 함유량 조사결과

유기태화 첨가사료 분석회수	WPS 기질화 제조한 5종 과립분산형 유기태화 소재와 Surfactant 첨가 사료내 미네럴 분포에 미치는 효과(ppm)																비고
	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	Pb	Hg	As	Cd	
Fe-WPS	1st	14,190	2,193	68	14	0.21	4,748	1,694	117	1,692	2.73	4,240	4,186	ND	ND	ND	0.06
	2nd	15,500	2,354	83	15	0.14	4,999	2,024	136	1,787	2.43	4,626	4,504	ND	ND	ND	0.06
	3rd	13,860	2,224	72	15	0.48	4,760	1,896	122	1,767	2.48	4,177	4,298	ND	ND	ND	0.06
	Aver	14,517	2,257	75	15	0.27	4,836	1,871	125	1,749	2.55	4,348	4,329	ND	ND	ND	0.06
	SD	867	85	7.75	0.54	0.18	142	166	10	50	0.16	243	161				0.00
Zn-WPS	1st	14,380	373	2,486	12	0.34	4,569	1,751	118	1,773	2.40	3,718	4,402	ND	ND	ND	0.07
	2nd	15,710	419	2,543	12	0.53	4,676	1,904	126	1,869	2.67	4,540	4,502	ND	ND	ND	0.07
	3rd	16,220	519	2,480	12	0.63	4,611	1,866	121	1,776	2.58	4,069	4,442	ND	ND	ND	0.10
	Aver	15,437	437	2,503	12	0.50	4,619	1,840	122	1,806	2.55	4,109	4,449	ND	ND	ND	0.08
	SD	950	75	35	0.30	0.15	54	80	4.09	55	0.14	412	50				0.02
Cu-WPS	1st	13,990	387	77	596	0.36	4,494	1,762	114	1,653	2.31	4,033	3,418	ND	ND	ND	0.06
	2nd	12,560	344	79	602	0.35	4,542	1,778	120	1,697	2.22	3,554	3,581	ND	ND	ND	0.07
	3rd	12,830	375	75	570	0.53	4,521	1,820	122	1,683	2.60	3,757	3,242	ND	ND	ND	0.06
	Aver	13,127	369	77	589	0.41	4,519	1,787	119	1,678	2.38	3,781	3,414	ND	ND	ND	0.07
	SD	760	22	1.62	17	0.10	24	30	4.55	22	0.20	240	170				0.01
Se-WPS	1st	18,280	426	76	13	551	4,346	1,882	127	1,736	2.66	4,238	3,098	ND	ND	ND	0.08
	2nd	13,930	392	78	13	565	4,535	1,865	126	1,820	2.66	3,833	3,249	ND	ND	ND	0.06
	3rd	12,470	309	66	11	511	4,296	1,692	112	1,744	2.42	3,448	2,921	ND	ND	ND	0.06
	Aver	14,893	376	73	12	542	4,392	1,813	121	1,767	2.58	3,840	3,089	ND	ND	ND	0.07
	SD	3,022	60	6.38	1.05	28	126	105	8.21	46	0.14	395	164				0.01
Ca-WPS	1st	20,920	296	58	8.35	0.25	3,796	1,501	96	1,379	2.47	4,286	2,673	ND	0.07	ND	0.07
	2nd	20,730	536	57	8.46	0.43	3,478	1,335	89	1,277	3.02	4,081	2,472	ND	0.13	ND	0.06
	3rd	21,760	657	58	9.20	0.51	3,835	1,488	95	1,411	3.38	2,714	2,554	ND	0.02	ND	0.05
	Aver	21,137	496	58	8.67	0.39	3,703	1,441	94	1,356	2.96	3,694	2,566	ND	0.07	ND	0.06
	SD	548	184	1.13	0.46	0.13	196	92	3.51	70	0.46	855	101		0.05		0.01

제 4 절 산란계 대상, 기능성 고급브랜드 계육(우리 맛 닭) 대량생산 시스템 예비 기법 정립

1. 연구목적

본 연구는 우리 맛 닭 개발과 관련하여 최적소재(OCHT계열 유기태화 미네랄 소재류 5종, WPS계열 유기태화 미네랄 소재류 5종)를 현장 유효성 평가를 통해 선정한 후, 제2 협동기관인 전남대학교 수의과대학과의 공동 연구를 진행하였으며, 본 협동기관에서는 소재류에 대한 현장 유효성 평가를 통한 기초 결과를 제시하며, 구체적인 평가 결과는 제 2협동기관에서 작성하였다. 우리 맛 닭 생산을 위해 유기태 미네랄 소재가 보유 하여야 하는 효능은 다음 기준을 근거로 하여 선정하였다. 하기와 같은 선정 기준을 바탕으로 하여 OCHT 계열 및 WPS 계열 유기태화 미네랄 소재류의 현장 적용 평가 결과를 토대로 Fe-OCHT 유기태 미네랄 소재를 최종 선정하여 현장 적용성 평가를 진행하였다.

가. 우리 맛 닭의 생산을 위한 핵심능력인 지방 감소 유도.

나. 고농도(사료첨가량 허용기준치 4배 기준) 섭이 시 안전성 확보.

다. 육계를 이용한 우리 맛 닭의 생산 기간이 40일 이내임을 고려 시 선발 소재의 섭이를 한 고질적인 현장 병원성 세균병(대장균 및 살모넬라증 질병)에 대한 항질병 효과를 보유하여야 한다.

2. 연구방법

가. 현장 적용성 물질 선정

고품질 계육(우리 맛 닭) 생산형 유기태화 소재(현장용 시제품)은 현장산란계에 대한 유효성 검정이 완료된 키토산 기질화 소재인 Fe-OCHT를 후보물질로 선발하였다. 현장 평가용 제품은 정립된 표준제조법에 준하여 OEM(아미코젠사, 한국)생산과정을 거쳐 제조(5% 철분 함유)한 후, 이를 사료첨가제로 하여 전체 실험 기간 동안 사용하였다.

나. 실험농도 선정 및 실험 시 고려 사항

환우단계 산란계를 대상으로 한 실험을 위해서는 내장 및 복부지방 축적이 확실함을 부검을 통하여 확인된 현장 사육중인 환우단계(55주령, Hy-line 계열) 산란계를 공시동물로 선발하였으며, 이때 부검 임상소견으로서는 복부 및 내장지방 과대 축적으로 인한 지방간의 손상이 매우 심함을 확인하였다. 이러한 지방간이 손상은 간의 효능 중 해독작용의 역할이 크다는 것을 고려하면 선발소재가 철분이 함유된 제제임에 따라 간에 무리를 줄 수 있음을 착안하여 농도별(철성분의 사료첨가량 기준, 1배)평가의 필요성을 느껴 실험을 농도구배 차이(0.5배, 1배, 2배, 4배)를 부여하여 진행하였다.

다. 실험동물(육계)

성장단계 육계 실험을 위해서는 3주령(430~450g, Ross Broiler계열) 육계를 구입하여 전체 실험에 사용하였다. 전체 실험은 위탁 농장인 산란계 농장(형제농장, 전남 화순)에서 산란계용 케이지에서의 사육조건으로 전체 사양시험을 진행하였다.

라. 사료제조

본 연구 간 적용 사료는 (주)현대사료의 제품을 기본으로 사용하였는데, 육계용은 육계전기용 제품(제품명:프리미엄 중병아리 가루, 25kg/포대), 산란계용은 산란후기용 제품(제품명:산란튕분말, 25kg/포대)을 주문하되, 다만 철분만을 미첨가 되도록 특별 주문하여 기본 사료로 사용하였다. 철분 미함유 주문 사료는 사료배합 전문회사인 (주)바이오리소스사(전남, 한국)에 의뢰하여 Fe-OCHT (5% 철분함유)를 산란계용은 (주)현대사료 제조 레시피(1배 기준)에 준하여 철분함유량을 0.5배, 1배, 2배 그리고 가장 높은 농도인 4배 첨가구로 하여 각각 준비하여 전체 시험 간 사용하였다. Fe-OCHT를 기준으로 유기태화 전후의 차이를 비교하기 위하여, 비교구로서는 유기태화 소재 제조 시 사용하였던 동일 무기태화 미네랄인 FeSO₄를 동일농도로 첨가한 사료를 준비하여 비교시험에 사용하였다. 대조 사료서는 (주)현대사료의 상용 사료(제품명:산란튕분말, 25kg/포대)를 구입하여 사용하였다.

마. 평가항목

1) 지방감소량 및 가슴살 색상 변화

Fe-OCHT를 환우단계의 산란계를 대상으로 농도별로 47일간 섭이시킨 후 관련 유효성 평가를 실시하였는데, 이때 내장 및 복부지방의 감소여부와 가슴살의 색상변화(선홍색 발현 기준)를 평가지표로 확인하였다(Fig 8-1). 평가방법으로서 지방감소량은 부검 후 복부내 지방을 적출 한 후 대조 대비 감소량을 비교하였으며, 가슴살의 색상변화는 색차계를 이용하여 역시 대조 대비 비교하였다.

2) 지방두께 변화

지방감소 효과 평가를 위해 지방 두께조사와 더불어 고기 품질을 관능평가를 실시하여 우선 고품질 육계 생산가능성을 평가하였다. 지방두께는 도살 후, 닭의 뒷발, 흉부육을 고기와 껍질로 분리한 후 대조구 대비 무게 비교를 실시하였으며, 지방두께는 가장 두꺼운 곳의 지방의 두께 정도를 측정 후 지방함율(피+지방, 모든 무게×100%)치를 결과로 하였다.

3) 관능평가

관능평가 방법으로는 대조 대비 눈으로 구별하는 변별법과 감각기관을 사용하는 판례법으로 하여 평가하였으며, 이때 평가지표는 대조 대비 실험군별 조리 시 가식부인 흉부육의 및 닭발의 질감과 육색 선호도, 맛의 차이 및 보드라운 정도 및 맛의 개운함을 지표로 하였다.

4) 계육생산량 대비 유기태화 미네랄 첨가량 산출

계육생산량 대비 유기태화 미네랄 첨가량 산출량은 Fe-OCHT의 첨가량을 육계 일령, 체중(kg), 음수량(ℓ), 사료섭취량(kg) 대비 Fe-OCHT 첨가량(g)을 일령별 산출하여 보았다. Fe-OCHT(철분 5% 함유)는 사료 1톤 또는 음용수 1톤에 첨가하는 기준을 0.2%로 설정하고 산출하였다.

3. 연구결과

가. 내장 및 지방 축적 변화

내장 및 복부지방 감소효과를 알아보기 위하여 내장 및 복부지방의 축적이 심한 산란계를 대상으로 측정한 결과, 산란계 1수당 대조구의 지방 적출량은 70~90g의 수치를 보였는데, 이는 생체중(2kg기준) 대비 3.5~4.5% 수준으로 매우 높은 수준이었다. 시험구의 경우는 5~20g 범위로 역시 생체중 대비 0.25~1%의 수준이었음을 비교할 때 매우 낮은 지방분해 효과가 있음을 확인하였다(Table 8-1~2, Fig 8-2).

나. 가식부(가슴살) 색차변화

가식부(가슴살) 색차변화를 알아보기 위하여 대조 대비 Fe-OCHT 처리구는 전체 처리 농도군에서 명도(밝기)와 관련한 색차수치 L은 유의성 있는 변화가 없었으나, 적색 계열의 평가수치인 a은 대조(1.74) 대비 2.10~2.50 범위, 노랑색 수치인 b의 수치는 대조(1.77) 대비 2.32~2.76의 결과를 보였다. 육계를 대상으로 한 후속 연구에서 우리 맛 닭의 예비 생산 후 이를 대상으로 관능평가를 실시한 결과에서 맛이 좋으면서 선홍색을 띠는 평가결과와 정확하게 일치함을 알 수 있었다(Table 8-3, Fig 8-1~2).

다. 지방 두께 및 함피지율 변화

지방 감소 효능평가를 알아보기 위한 결과에서, Fe-OCHT 소재는 닭의 지방함유율을 낮추고 육질의 품질을 증진 시킬 수 있는 것으로 확인되었다(Table 8-1~2, Fig-2). 대조구 대비 가식부 중 닭발의 지방두께(대조 5.67mm 기준)와 함피지율(대조 0.16 기준)에 미치는 영향을 평가한 결과 38.9%와 14.9%의 높은 감소 결과를 보였다. 또한, 흥부(가슴살)의 지방두께(대조 5.21mm 기준)와 함피지율(대조 0.12 기준)은 16.1%로 감소되었으나, 함피지율은 0.4%의 증가수치를 보였으나, 큰 차이로는 인정되지 않았다.

라. 관능평가

관능평가를 통한 효능을 알아보기 위한 결과에서, 대조구 계육 대비 유기태화 미네랄 소재 류 섭취 시, 실험군의 흥부육은 선선하고 육질이 빨갛고 부드러우며 그리고 선명함이 뛰어나

고 또한 대조구와 명확하게 차이가 나는 것으로 확인되었다(Fig 8-2). 가식부인 닭발 색깔 역시 선홍색으로 변한 특징이 있으며, 조리하며 시식을 통한 평가를 실시한 결과, 맛은 향기로웠고 육질(섬유질)은 보드라우며 매끄럽고 또한 맛이 개운함을 특징으로 하는 뚜렷한 맛 차이를 보였다.

마. 계육 생산량 대비 유기태화 미네랄 첨가량 산출

우리 맛 닭 생산가능성 평가 결과를 토대로, 육계의 성장 및 사료섭이량을 육계생산 시 체중량과 연계한 일령별 사료톤 당 Fe-OCHT를 첨가량을 체중량 및 사료섭취량 등을 고려한 첨가량은 1일령부터 7일령까지는 10~30g 14일까지는 35~74g, 체중이 688kg에 달하는 경우는 15일부터 21일령까지는 82~138g, 그리고 육계 출하일령에 해당되는 경우인 28일령(1kg)의 첨가량은 218g 및 체중이 1,448kg(34일령)의 경우는 290g을 첨가 및 섭이시키는 경우, 고품질 우리 맛 닭을 생산 할 수 있을 것으로 판단되었다(Table 8-4).

4. 결론 및 고찰

- 가. Fe-OCHT는 지방 축적량이 4.5% 높았던 우리 맛 닭 생산을 위한 핵심기술인 지방감소 메카니즘을 보유하고 있음이 확인되었다.
- 나. Fe-OCHT 소재는 1배에서 4배 범위로 미네랄 첨가량을 조절한 사료를 공급하는 경우 선홍색을 특징으로 하는 브랜드화 우리 맛 닭 생산이 가능할 것으로 판단되었다.
- 다. Fe-OCHT 소재는 우리 맛 닭 생산을 위한 핵심기술인 지방감소 메카니즘을 보유하고 있음과 우리 맛 닭 생산까지 연계되는 효능을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.
- 라. 세포주(3T3-L1)에 키토산올리고당을 처리한 경우 지방세포 분화억제에 효과가 있다는 연구 보고가 있다(Shin 등., 2012). 본 연구에서는 키토산올리고당 기질 유기태-철 Fe-OCHT)소재를 이용하여 현장 적용성 예비 기법을 확인하기 위해 닭의 지방두께 및 함피지율을 평가한 결과, Fe-OCHT 소재는 닭의 지방두께 및 함피지율을 낮추어 지방 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 결론적으로, Fe-OCHT 소재는 지방 억제 효과를 갖추면서 육질의 품질을 증진시켜 우리 맛 닭 대량생산시스템 정립 및 제품화를 위한 최적의 소재라고 확인하였다.

Table 8-1. 공시동물 성장단계 육계에 대하여 유기태화 미네랄 소재(Fe-OCHT) 첨가 사료 3주간 섭취 시 지방두께에 미치는 효과

가식부 구분	지방두께 비교 결과(mm)		백분차	백분율
	—————			
	실험군	대조군		
발	3.1575	5.66667	0.388871	38.9%
흉부	4.371429	5.20625	0.16035	16.1%

Table 8-2. 공시동물 성장단계 육계에 대하여 유기태화 미네랄 소재(Fe-OCHT)를 첨가한 사료 섭이 시 함피지율에 미치는 효과

가식부 구분	함피지율 비교 결과		백분차	백분율
	실험군	대조군		
발	0.159288	0.187152	0.148888	14.9%
홍부	0.125371	0.120032	-0.04448	-4.0%

Table 8-3. 산란계 대상 일반사료 대비 유기태화 철분(Fe-OCHT)소재 첨가 사료 장기(47일) 섭이에 따른 가식부 (가슴살) 의 색차변화

시험구	적색육 생산효과 평가						항목별 평가결과			종합 결과	비고	
	L		a		b		독성 보유	지방감소 효과	적색육 형성여부			
	평균	SD	평균	SD	평균	SD						
대조구	54.64	0.73	1.74	0.15	1.77	0.22	대조	-	-	-	일반사료	
비교구	Con(Fe-1)	55.91	1.02	2.14	0.18	2.42	0.11	-	-	+++	+++	FeSO ₄
	Con(Fe-2)	52.40	0.92	1.50	0.11	0.06	0.20	-	-	-	-	
	Con(Fe-4)	57.96	0.51	1.19	0.05	4.42	0.12	-	-	-	++	
시험구	Org(Fe-1)	56.01	0.79	2.50	0.50	2.76	1.22	-	+	+++	+++	Fe- OCHT
	Org(Fe-2)	55.19	0.50	2.10	0.03	2.32	0.19	-	+	+	+	
	Org(Fe-4)	54.42	0.31	2.11	0.05	2.67	0.15	-	+++	++	++	

-독성보유효과(외관평가, 간기준) : +++(매우심함), ++(심함), +(초기형성), -(대조대비, 정상)
 -복부지방감소효과(외관평가) : +++(매우양호), ++(양호), +(초기형성), -(대조대비)
 -적색육 형성 결과(가슴살 기준) : +++(매우양호), ++(양호), +(초기형성), -(백색육, 대조대비)
 . 결과확인 : 시험군 별 3개체 무작위 선발 및 부검 시 측정
 Con : 무기태 철 시험군, Org : 유기태 철 시험군

Table 8-4. 고품질 우리 맛 닭형 계육 생산을 위한 유기태화 미네랄 첨가량 산출

일령	체중 (kg)	음수량 (ℓ)	사료섭취량 (kg)	Fe-OCHT 첨가량(g)	비고
1	50	23	10	10	
2	62	32	14	13	
3	77	38	15	16	
4	93	42	18	19	
5	110	47	20	22	
6	128	57	22	26	
7	148	64	26	30	
8	171	68	31	35	
9	197	74	35	40	
10	226	80	40	45	
11	258	82	44	52	
12	293	90	49	59	
13	330	97	53	66	
14	368	104	58	74	
15	408	111	63	82	
16	450	118	67	90	
17	494	126	74	99	
18	540	137	79	108	
19	588	145	85	118	
20	637	155	91	127	
21	688	156	96	138	
22	741	164	105	148	
23	795	168	116	159	
24	853	175	126	171	
25	911	180	127	183	
26	970	186	129	195	
27	1029	190	132	206	
28	1088	194	135	218	
29	1148	196	138	230	
30	1208	197	139	242	
31	1268	201	140	254	
32	1328	203	144	266	
33	1388	207	147	278	
34	1448	210	150	290	

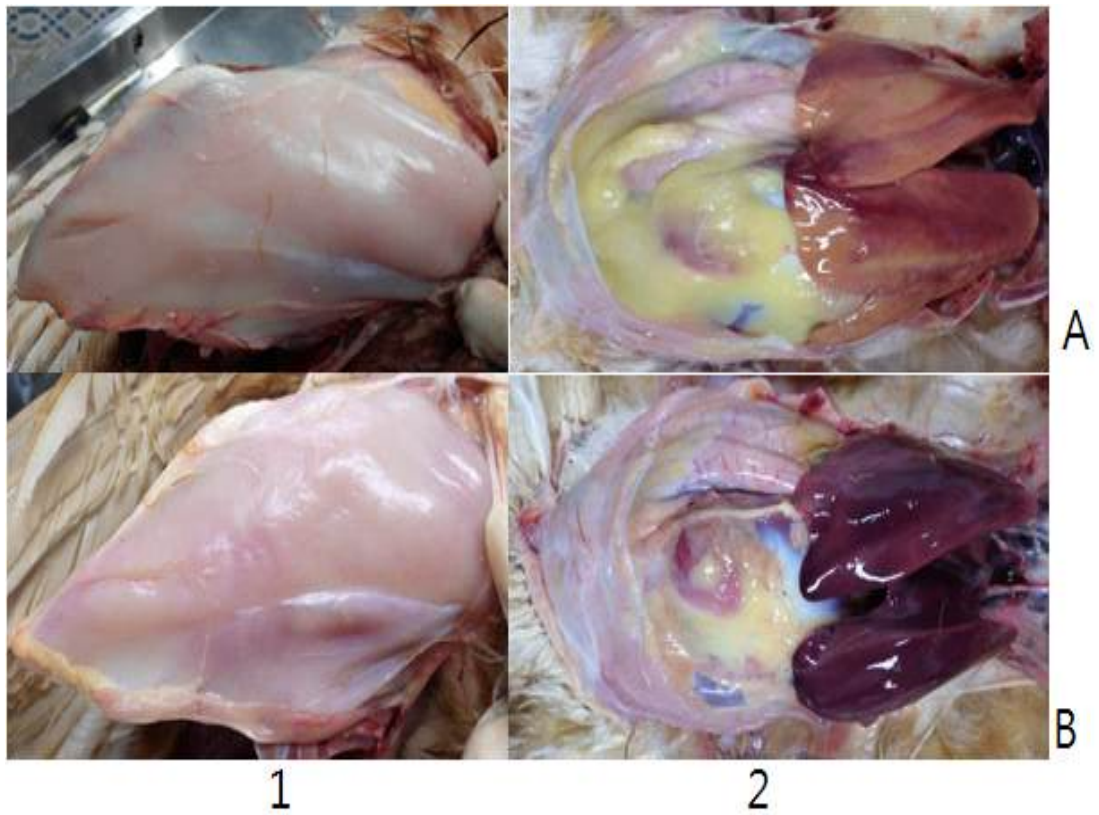


Fig 8-1. 유기태 철분(Fe-OCHT, 4배) 섭취가 환우단계 산란계(47일 섭취, 3개체 반복) 가식부 색상변화 및 지방감소에 미치는 효과 평가결과

A : 일반사료 섭취구, B : 유기태화 사료 섭취구, 1 : 가슴살, 2 : 내장지방



Fig 8-2. 성장단계 육계를 대상으로 한 지방 분해형 기능성 사료(Fe-OCHT, 4배T) 섭취(30일) 시 복부 및 내장지방 억제에 미치는 효과

1: 일반사료 섭취군(1-1 : 지방 정상), 2: 기능성 사료 섭취구(2-1 : 지방 정상)

제 5 장 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선별 및 효능 평가

제 1 절 유기태화 미네럴 소재 안전성 및 항균성 기초 효능 평가

1.

본 과제를 진행 간 유기태화 소재류는 기질 다변화(유단백질류 및 탄수화물류)를 기준으로 6종 미네럴류(Ca, Fe, Zn, Cu, Se, S)를 킬레이팅화 한 유기태화 미네럴 소재류를 개발함과 동시에 이를 사료에 혼합하여 산란계에 섭취과정을 통하여 기능성 미네럴류가 강화된 미네럴 결핍 해소형 강화란 생산과 가공분말제품을 개발하고 국내 판매사업화에 연구개발 목적이 있다. 본 연구에서는 전체 개발예정인 유기태화 소재 중 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네럴 소재 6종 그리고 탄수화물인 키토산을 기질로 제조되는 6종으로 총 12종이 제조될 예정이다. 따라서, 이들에 대한 전체적인 현장유효성 평가를 진행함에 있어 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재를 우선 제조하여, 이들 소재를 표준세포주와 생쥐, 대장균등을 대상으로 하여 안전성, 항균독성, 생체생장율과 사료섭취율을 평가하고자 한다.

궁극적으로는 본 연구결과를 통하여 도출된 세포유전학적 독성, 항균독성 및 생체생장율과 사료섭취율 등의 결과를 통해 현장제품 적용성 관련 실험 진행을 위한 기초결과를 사전 확보하는데 목적이 있다.

2. 연구수행방법(유기태화 소재류의 안전성 및 관련 기초효능 평가)

실험재료

표준세포주는 RAW 264.7(macrophage cell line) 세포주를 실험실에서 배양하여 사용하였다. 실험동물은 생쥐(Mouse, 4주령)을 사용하였으며, AIN-76A Diet 사료를 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 무기태 소재는 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2 이며, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재는 6종으로 Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS이다.

세포주 안전성 평가

세포 독성(MTT), 염증(NO) 및 유전독성(미소핵) 평가하기 위한 농도는 식약청 일일 섭취량을 기준으로 하였으며, 표 1로 제시하였다.

미생물 안정성 평가

무기태화 대비 유기태화 소재의 항균성은 *B.cereus* (43×10^4 cfu/ml), *E. saazakii* (212×10^4 cfu/ml)균을 대상으로 하여 평가하였다.

안정성 평가항목.

- 가) 미네랄류 대비 유기태화 소재 안전성 평가를 위한 농도 설정
- 나) 무기태 미네랄류 대비 유기태화 소재 농도별 세포독성(MTT)에 미치는 평가
- 다) 무기태 미네랄류 대비 유기태화 소재 농도별 항염증(NO) 효과에 미치는 평가
- 라) 무기태 미네랄류 대비 유기태화 소재 농도별 항균독성에 미치는 평가
- 마) 무기태 미네랄류 대비 유기태화 소재 농도별 염색체이상(미소핵) 변화 평가
- 바) 무기태 대비 유기태화 소재 농도별 생쥐생장을 및 사료섭취율 변화 평가

3. 안전성평가 방법 및 결과

무기태 대비 유기태화 소재 안전성 평가를 위한 농도 설정

본 연구에서는 무기태 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS)을 제조하여 *in vitro*, *in vivo* 안전성 평가를 위한 농도를 설정하였다. 농도는 크게 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량으로 구분하여 설정하였다. 무기태 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재의 현장 적용성 평가를 위한 세포유전학적 독성(MTT, 염색체이상), 항염증, 항균성, 생체 안정성 및 사료섭취율을 평가하기 위한 농도를 설정하여 본 현장 시험에 대비한 기초 평가 자료를 확인한다.

처리 농도는 식약청 기준 대조 대비 일일필요섭취량(저농도), 평균섭취량(중농도) 및 상한섭취량 기준(고농도 처리군)등 3군으로 선정하여 평가를 진행하였다(Table 1 참조). 실험에 사용한 유기태화 실험군의 농도는 다음과 같다. 유기태화 실험군에서 Ca, Fe의 평균필요량은 0.55이고, Cu, Zn, Se의 평균필요량은 0.04로 설정하였다. 유기태화 실험군에서 Ca, Fe의 상한섭취량은 5.75이고, Cu, Zn, Se의 평균필요량은 0.24로 설정하였다. 유기태화 실험군에서 Ca, Fe의 최대섭취량은 11이고, Cu, Zn, Se의 평균필요량은 0.05로 설정하여 안정성 평가 결과를 도출하였다.

결론적으로, 일반 대조구 및 무기태 소재 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재의 투여 농도 범위를 선정하였으며, 이와 같은 처리 농도를 기초로 하여 도출된 각각의 결과는 본 연구 과제를 통한 현장 평가 시 실험 농도 선정에 중요한 자료로 활용될 것이다.

무기태 대비 유기태화 미네랄소재 농도별 세포독성(MTT)에 미치는 평가

표준세포주(cell line, RAW 264.7 macrophage cell)를 대상으로 MTT 평가를 실시하였다. 실험에 사용한 무기태 소재는 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2 를 사용하였고, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS)을 각 농도별로 사용하였다. 측정에는 microplate reader (540nm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)기를 사용하였다. 연구에서는 무기태 대비 유단백질을 기질로 하는 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS) 유기태화 미네랄 소재의 세포안전성을 세포독성 평가 항목 중 대표적인 MTT 평가를 통해 안전성을 평가하였다(Table. 2 참조). 일반적 세포 배양 배지로 실험한 정상(100%) 대비 유기태화 실험군의 평균필요량에서 생존율 결과는 Ca-WPS, Fe-WPS는 80~90%, Zn-WPS, Se-WPS, Cu-WPS제재는 60~70% 생존율이 관찰되었다. 하지만, 유기태화 소재군을 무기태 소재군과 비교해 보면, 무기태 대조(100%) 대비

Ca-WPS, Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS 소재는 -5.8, 64.4, 286.3, 9.4, 104.5, 236.5%로 관찰되었다. 상한섭취량에서 생존율 결과를 보면, Ca-WPS는 무기태 대조(100%)대비 -12%였지만, Ca-WPS를 제외한 Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS 소재는 무기태 대조(100%) 대비 세포생존율이 109.8, 213, 103.3, 182.7, 297.5%로 생존율이 훨씬 더 높게 나옴을 관찰할 수 있었다. 최대섭취량에서 생존율 결과를 보면, Ca-WPS는 무기태 대조(100%)대비 -5.8%였지만, Ca-WPS를 제외한 Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS 소재는 무기태 대조(100%) 대비 세포생존율이 108.5, 227.7, 77.4, 102.1, 238.5%로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 무기태보다는 유기태 실험군에서 세포생존율이 훨씬 더 높게 나오는 것을 확인할 수 있어서 안전성이 우수함이 확인되어 안전성 평가 및 소재 선정 시 중요한 자료라고 판단된다. 하지만, 정상 대비 유기태화 미네랄 소재군에서도 Cu, Zn 및 Se군에서 평균 필요량 섭취 농도에서 60~70%의 세포 생존율이 관찰되어 세포생존율에 영향을 주는 것으로 확인된 바, 농도 선정 시 고려해야 할 것으로 판단된다.

, 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재의 투여 농도범위에는 안전성에 있어 문제점은 도출되지 않았으며, 본 과제에서 해결하려는 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재의 세포안전성을 표준세포주 실험을 통해 사전평가하므로써 추후 진행될 기능성 강화란 소재 개발 시 유기태화 미네랄 소재류의 안전성 문제를 해소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

대비 유기태화 소재 농도별 항염증 효과(NO)에 미치는 평가

표준세포주(cell line, RAW 264.7 macrophage cell)를 대상으로 염증관련 대표적인 평가 항목인 NO(nitric oxide) 평가를 실시하였다. 실험에 사용한 무기태 소재는 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2 를 사용하였고, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS)을 각 농도별로 사용하였다. 측정은 microplate reader(540nm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)기를 사용하였다.

본 연구에서는 무기태 대비 유단백질을 기질로 하는 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS) 유기태화 미네랄 소재의 항염증 효과를 평가하기 위하여 항염증 평가에 대표적인 NO 평가를 통해 항염증 효과를 확인하였다(Table. 3 참조).

무기태 대조(100%) 대비 유기태화 소재군의 평균필요량 농도에서 항염증 결과는 Ca-WPS, Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS 소재는 32.1, 95.6, 52.5, 28.3, 33.0, 6.6%로 관찰되었다. 상한섭취량에서는 Ca-WPS, Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS 소재는 -9, 75.1, 60.9, 67.4, 41.7, 10.5%로 관찰되었다. 최대섭취량에서는 Ca-WPS, Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS 소재는 -5.1, 64.9, 55.3, 66.9, 35.2, 5.6%로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 유기태화 소재군은 무기태 소재 대비 실험에 사용한 농도 범위에서 항염증 효과가 우수함을 실험을 통해 확인할 수 있었다. 하지만, 칼슘 유기태 소재의 경우는 평균필요량 농도에서는 항염증 효과가 낮게 나오는 것을 확인할 수 있어 소재 차별성이 있음을 판단하였다. 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재 중 항염증 효과가 우수한 것은 철, 구리, 아연 유기태화 소재임이 확인되었다.

, 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에는 항염증 효과가 우수함이 입증되었으며, 본 과제에서 해결하려는 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재의 항염증효과를 실험을 통해 사전평가하므로써 추후 진행될 기능성 강화란 소재의 면역 증대 및 항염증 소재 개발 시 유기태화 미네랄 소재류의 문제를 해소시킬 수 있는 중요한 자료라고 판단된다.

대비 유기태화 소재 농도별 항균독성에 미치는 평가

공시균주 *B.cereus* (43×10^4 cfu/ml), *E. sazzakii* (212×10^4 cfu/ml) 균을 대상으로 항균독성 관련 안정성 평가를 실시하였다. 실험에 사용한 무기태 소재는 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2 를 사용하였고, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS, Mix-WPS)을 각 농도별로 사용하였다.

본 연구에서는 *B.cereus*, *E. sazzakii* 균을 대상으로 한 항균독성 평가를 실시하여 무기태 대비 유단백질을 기질로 하는 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Cu-WPS, Zn-WPS, Se-WPS, Mix-WPS) 유기태화 미네랄 소재의 항균성을 평가하여 안정성 결과를 확인하고자 하였다 (Table. 4 참조). 무기태 소재 균들에 대한 생존율은 아연, 셀렌늄 소재에서 생존율이 0~1% 까지 급격히 감소한 반면, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 균들에 대한 생존율이 100%로 관찰되었다. 이 결과를 통해서 볼 때, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 항균 독성 평가 결과 독성이 전혀 관찰되지 않았다.

결론적으로, 무기태 소재 및 일반 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에는 항균독성이 없음이 입증되었으며, 본 과제에서 해결하려는 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재의 항균독성 효과를 실험을 통해 사전평가하므로써 추후 진행될 기능성 강화란 소재의 질병억제 및 면역 증대 소재 개발 시 유기태화 미네랄 소재류의 항균성 문제를 해소시킬 수 있는 중요한 자료라고 판단된다.

무기태 대비 유기태화 소재 농도별 염색체이상(미소핵) 변화 평가

생쥐 대퇴 부위에서 골수세포를 채취, 배양한 후 미소핵을 통한 염색체이상을 평가하여 유전독성 관련 안정성 평가를 실시하였다. 실험에 사용한 무기태 소재는 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2 를 사용하였고, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 5종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS)을 각 농도별로 사용하였다. 측정은 1,000배 광학현미경하에서 계수하였다.

본 연구에서는 생쥐 대퇴 부위에서 골수세포를 채취, 배양한 후, 유전독성을 평가하는 대표적인 항목 중 염색체이상(미소핵)을 평가하여 유단백질을 기질로 하는 5종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS)의 유기태화 소재 유전적 안정성 결과를 확인하고자 하였다 (Table. 5 참조). 4주째 무기태 칼슘 소재 대비 유기태 칼슘 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 2,0,2개이었다. 무기태 소재는 1,3,3개 빈도로 관찰되었다. 8주째 무기태 칼슘 소재 대비 유기태 칼슘 소재 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 1,2,3개이었다. 무기태 소재는 평균 3,0,3개 발생 빈도로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 칼슘 유기태 소재는 무기태 소재에 비해 유전독성을 평가하는 미소핵 발생빈도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

4 무기태 철 소재 대비 유기태 철 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 1,0,3개이었다. 무기태 소재는 4,1,8개 빈도로 관찰되었다. 8주째 무기태 칼슘 소재 대비 유기태 칼슘 소재 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 2,4,3개이었다. 무기태 소재는 평균 3,3,3개 발생 빈도로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 철 유기태 소재는 무기태 소재에 비해 유전독성을 평가하는 미소핵 발생빈도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

4주째 무기태 아연 소재 대비 유기태 아연 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 1,0,0개이었다. 무기태 소재는 2,1,2개 빈도로 관찰되었다. 8주째 무기태 아연 소재 대비 유기태 칼슘 소재 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 1,3,2개이었다. 무기태 소재는 평균 4,2,2개 발생 빈도로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 아연 유기태 소재는 무기태 소재에 비해 유전독성을 평가하는 미소핵 발생빈도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

4주째 무기태 구리 소재 대비 유기태 구리 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 1,1,5개이었다. 무기태 소재는 3,1,0개 빈도로 관찰되었다. 8주째 무기태 아연 소재 대비 유기태 칼슘 소재 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 0,1,2개이었다. 무기태 소재는 평균 1,2,1개 발생 빈도로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 구리 유기태 소재는 무기태 소재에 비해 유전독성을 평가하는 미소핵 발생빈도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

4주째 무기태 셀레늄 소재 대비 유기태 셀레늄 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 0,0,0개이었다. 무기태 소재는 5,1,3개 빈도로 관찰되었다. 8주째 무기태 셀레늄 소재 대비 유기태 셀레늄 소재 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량의 미소핵 개수는 4,1,5개이었다. 무기태 소재는 평균 2,1,3개 발생 빈도로 관찰되었다. 이 결과로 보면, 셀레늄 유기태 소재는 미소핵 발생빈도가 4주에 비해 8주째 증가하였는데, 무기태 소재군도 비속하게 미소핵 발생 빈도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 실험 결과를 통해서 볼 때, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재(칼슘, 철, 아연, 구리)는 정상이었지만, 셀레늄 유기태 소재는 미소핵 발생 빈도가 다른 소재 대비 2배 이상으로 추후 현장 적용성 실험 시 농도 설정을 고려해야 할 것으로 본다.

결론적으로, 무기태 소재 및 일반 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에는 유전독성이 없음이 입증되었으며, 본 과제에서 해결하려는 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재의 유전독성 효과를 실험을 통해 사전평가하므로써 추후 진행될 기능성 강화란 생산용 소재로서 안정성 문제를 해소시킬 수 있는 중요한 자료라고 판단된다.

무기태 대비 유기태화 소재 농도별 생쥐생장을 및 사료섭취율 변화 평가

생쥐에서 체중 및 사료 섭취량을 측정하여 생체내 안정성 평가를 실시하였다. 실험에 사용한 생쥐는 ICR Mouse(4주령)을 사용하였으며, AIN-76A Diet 사료를 구입하여 사용하였다. 무기태 소재는 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, SeO_2 를 사용하였고, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재는 5종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS)을 각 농도별로 사용하였다.

본 연구에서는 생쥐에서 체중 및 사료 섭취량을 측정하여 생체내 안전성 결과를 평가하고자 하였다. 유단백질을 기질로 하는 5종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS)의 유기태화 소재 생체내 안전성 평가는 장,단기로 0, 4, 8주 동안 생쥐 무게 및 사료섭취량을 측정하여 확인하였다(Table. 6 참조).

일반 사료를 섭취시킨 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Ca-WPS를 섭취시킨 생쥐 생장을 변화는 0.6, -2.1, -0.9%이었고, 사료섭취율은 -12.8, 6.8, 4.8%이었다.

일반 사료를 섞이시킨 (100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Ca-WPS 생쥐 생장을 변화는 -4.2, -0.8, 0.3%이었고, 사료섭취율은 -25, 16.7, 11.6%이었다. 이 결과로 보면 일반 대조 대비 칼슘 유기태 소재 중 평균필요량 농도를 제외한 상한섭취량, 최대섭취량 군에서 4주째 감소한 체중이 8주째 증가하면서 사료 섭취율은 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Fe-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 -1.5, 2.7, 2.8%이었고, 사료섭취율은 -12.8, 9.3, -6.5%이었다. 일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Fe-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 4.7, -3.7, 2.9%이었고, 사료섭취율은 -8, 16.3, -14%이었다. 이 결과로 보면 일반 대조 대비 철 유기태 소재 중 상한섭취량 농도를 제외한 평균필요량, 최대섭취량 군에서 4주째 감소한 체중이 8주째 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Zn-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 -5.5, 14.5, -3.7%이었고, 사료섭취율은 -4.3, 6.9, -2.3%이었다. 일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Zn-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 -0.6, -0.3, 3.1%이었고, 사료섭취율은 9.3, 0, -4.4%이었다. 이 결과로 보면 일반 대조 대비 아연 유기태 소재 중 상한섭취량 농도를 제외한 평균필요량, 최대섭취량 군에서 4주째 감소한 체중이 8주째 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Cu-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 0.3, 3.8, 3.5%이었고, 사료섭취율은 -2.2, 0, 2.3%이었다. 일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Cu-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 -0.6, -0.3, 3.1%이었고, 사료섭취율은 0, 4.4, -11.8%이었다. 이 결과로 보면 일반 대조 대비 구리 유기태 소재 중 최대섭취량 군만 체중이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Se-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 0.6, 1.5, 0%이었고, 사료섭취율은 0, 2.4, -4.5%이었다. 일반 사료를 섞이시킨 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Se-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 4.5, 0.8, 2.2%이었고, 사료섭취율은 -6.7, 0, -2.2%이었다. 이 결과로 보면 일반 대조 대비 셀레늄 유기태 소재는 모든 실험 농도 군에서 체중이 증가하고 사료섭취율은 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

무기태 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Ca-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 2.46, -2.11, -0.69%이었고, 사료섭취율은 -17.4, 4.5, -2.4%이었다. 무기태 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Ca-WPS 생쥐 생장을 변화는 4.2, -1.9, -4.7%이었고, 사료섭취율은 -17.9, 6.3, -2.3%이었다. 이 결과로 보면 칼슘 유기태 소재는 섞이 기간에 따라 평균필요량과 상한섭취량 농도에서 체중이 증가하여 생장이 증가하면서 사료섭취율에서는 4주, 8주째 감소하는데, 기간별 차이는 없는 것으로 관찰되었다.

무기태 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Fe-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 1.5, -2.1, 4%이었고, 사료섭취율은 -10.6, -2.3, -10.9%이었다. 무기태 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Fe-WPS를 섞이시킨 생쥐 생장을 변화는 0.5, -6.1, 3.8%이었고, 사료섭취율은 -8, 11.6, -8%이었다. 이 결과로 보면 철 유기태 소재는 섞이 기간에 따라 평균필요량과 최대섭취량 농도에서 체중이 증가하여 생장이 증가하면서 사료섭취율에서는 4주, 8주째 차이가 없는 형태로 관찰되었다. 하지만, 상한 섭취량 농도에서는 생쥐 생장이 감소하면서 사료섭취율은 증가하는 것으로 관찰되어 농도별 차이가 있음을 관찰할 수 있었다.

대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Cu-WPS를 섭취시킨 생쥐 생장율 변화는 3.9, 5.4, 1.5%이었고, 사료섭취율은 -8.9, -6.7, 0%이었다. 무기태 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Cu-WPS를 섭취시킨 생쥐 생장율 변화는 2.2, -2.2, 2.3%이었고, 사료섭취율은 2.1, 6.7, -7.8%이었다. 이 결과로 보면 아연 유기태 소재는 섭취 기간에 평균필요량과 최대섭취량 농도에서 체중이 증가하여 생장율이 증가하면서 사료섭취율도 증가하는 것이 관찰되었다. 하지만, 상한 섭취량 농도에서는 생쥐 생장율이 감소하면서 사료섭취율은 증가하는 것으로 관찰되어 농도별 차이가 있음을 관찰할 수 있었다.

무기태 대조(100%) 대비 4주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Se-WPS를 섭취시킨 생쥐 생장율 변화는 -1.2, -3.3, 2.1%이었고, 사료섭취율은 -2.3, 2.4, -2.3%이었다. 무기태 대조(100%) 대비 8주째 평균필요량, 상한섭취량, 최대섭취량 별 Se-WPS를 섭취시킨 생쥐 생장율 변화는 -5.9, -1.9, 7.7%이었고, 사료섭취율은 0, 4.4, -8.7%이었다. 이 결과로 보면 셀레늄 유기태 소재는 섭취 기간에 평균필요량과 상한섭취량 농도에서 체중이 감소하여 생장율이 감소하면서 사료섭취율도 감소하는 것이 관찰되었다. 그리고, 최대 섭취량 농도에서는 생쥐 생장율이 증가하면서 사료섭취율은 감소하는 것으로 관찰되어 농도별 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 위의 결과로 볼 때, 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재를 섭취시킨 군에서는 무기태 대비 생쥐 생장이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만, 각 소재별, 농도별 경향에 차이가 있는 점은 고려해 볼 사항이다.

결론적으로, 무기태 소재 및 일반 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에는 무기태 대비 유기태화 소재류가 사료섭취율 및 생체 생장율에 효과가 있음이 입증되었으며, 본 과제에서 해결하려는 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재의 사료섭취 및 성장 효과를 실험을 통해 사전평가하므로서 추후 진행될 기능성 강화란 소재의 소재 안정성, 사료섭취율 및 산란계 및 육계 품질 개선 문제를 해소시킬 수 있는 중요한 자료라고 판단된다.

4. 추후진행예정사항

- 가. 유단백질을 기질로 제조되는 6종에 대한 기초 평가 농도를 선정하였다.
- 나. 표준세포주를 대상으로 한 세포 독성, 항염증, 2종의 균을 대상으로 한 항균독성 평가 및 생쥐 대상 생체생장율과 사료섭취율 평가에서 관련 목표인 기본 연구방향 및 목표에 근접하는 결과를 보였다.
- 다. 궁극적으로는 본 연구결과를 통하여 현장제품 적용성 관련 실험 진행을 위한 기초결과를 사전 확보하였다 판단되었다.
- 라. 이 결과를 기초로 예측할 수 있는 농도를 본 실험을 위한 예비 결과 확보를 위한 현장 실험에 적용 하므로서 산란계의 안전성 평가, 섭취량 기초산정, 미네랄 강화란 생산 가능성 및 생체전이 패턴조사, 질병예방 및 육질에 미치는 효과에 관련되는 결과를 확인할 예정이다.

Table. 1. 대비 유기태화 소재 안정성 평가를 위한 농도 설정

시험구	세포안전성 평가 위한 실험 농도(단위: ppm)			
	평균필요량	상한섭취량	최대섭취량	
대조구 (무기태)	Ca-CNTL	850	2,500	5,000
	Fe-CNTL	850	2,500	5,000
	Cu-CNTL	11.5	42.5	85
	Zn-CNTL	11.5	42.5	85
	Se-CNTL	6.5	20	40
	MIX-CNTL	6.5	20	40
실험구 (유기태)	Ca-WPS	0.55	5.75	11
	Fe-WPS	0.55	5.75	11
	Cu-WPS	0.04	0.24	0.50
	Zn-WPS	0.04	0.24	0.50
	Se-WPS	0.04	0.24	0.50
MIX-CNTL	- Multi complex-(Ca 33ppm+Fe 19.5 ppm+Se 57.3 ppm)/ MIX-complex 0.5g			

Table. 2. 대비 유기태화 소재 농도별 세포독성(MTT)에 미치는 효과

		결과 (% of normal)			
		평균필요량	상한섭취량	최대섭취량	비 고(독성평가)
normal		100	100	100	기준
대조구 (무기태)	Ca-CNTL	85.7±0.8	79.4±18.0	85.7±0.8	-
	Fe-CNTL	55.3±0.6	43.6±0.6	43.6±0.6	+++
	Cu-CNTL	15.3±0.5	18.4±1.6	18.4±1.6	+++
	Zn-CNTL	61.5±2.3	38.1±2.3	38.1±2.3	+++
	Se-CNTL	37.4±5.5	29.6±2.3	29.6±2.3	+++
	MIX-CNTL	20.0±2.9	20.0±2.9	20.0±2.9	+++
실험구 (유기태)	Ca-WPS	80.7±1.1	69.8±9.8	80.7±1.1	-
	Fe-WPS	90.9±9.3	91.5±2.2	90.9±9.3	-
	Cu-WPS	59.1±0.5	57.6±1.0	60.3±1.4	+
	Zn-WPS	67.3±1.3	79.5±11.0	67.6±3.3	+
	Se-WPS	76.5±1.5	83.7±5.0	77.0±1.1	+
	MIX-WPS	67.3±1.3	79.5±11.0	67.7±3.3	+

* 독성 평가 : -(정상), +(독성 있음), ++(독성 심함), +++(독성 아주 심함)

Table. 3. 대비 유기태화 소재 농도별 항염증반응(NO, nitric oxide) 효과에 미치는 영향

	normal	결과 (% of normal)			비 고(단위: ppm)
		평균필요량 100	상한섭취량 100	최대섭취량 100	
대조구 (무기태)	Ca-CNTL	104.9±6.1	69.5±0.9	71.2±3.4	필요량 : 850
	Fe-CNTL	32.3±2.4	42.6±6.6	30.2±2.8	상한치 : 2,500 최대치 : 5,000
	Cu-CNTL	19.0±0.5	18.7±1.4	17.7±1.7	필요량 : 11.5
	Zn-CNTL	35.3±0.5	37.5±1.4	36.9±1.2	상한치 : 42.5 최대치 : 85
	Se-CNTL	37.8±1.9	38.6±7.7	34.0±3.9	필요량 : 6.5
	MIX-CNTL	21.2±1.4	20.9±1.9	19.6±2.2	상한치 : 20 최대치 : 40
실험구 (유기태)	Ca-CNTL	71.2±0.9	75.8±0.9	74.9±1.2	필요량 : 0.55
	Fe-CNTL	14.1±2.4	10.6±0.0	10.6±0.0	상한치 : 5.75 최대치 : 11
	Cu-CNTL	9.0±0.0	7.3±0.0	7.9±0.9	필요량 : 0.04
	Zn-CNTL	17.9±2.8	12.2±0.0	12.2±0.0	상한치 : 0.24 최대치 : 0.50
	Se-CNTL	25.3±1.4	22.5±1.9	22.0±1.6	-Multi complex-
	MIX-CNTL	19.8±3.8	18.7±0.0	18.5±0.5	(Ca 33ppm+Fe 19.5ppm +Se 57.3ppm)/ MIX-complex 0.5g

* : 효과 없음(100~80%), 효과 약간 있음(80~50%), 효과 있음(50~40%), 매우 있음(40~0%)

Table. 4. 대비 유기태화 소재 농도별 안전성(항균성 기준) 효과에 미치는 영향

실험구	공시균주별, 시험구별 적용된 미네랄 처리농도별(일일 필요량, 상한치 및 최대허용치) 항균독성(제재 접촉 후 18시간 경과) 결과(결과 : 대조대비 생존율 %)							비 고 (단위, ppm)
	필요량		상한치		최대치			
	<i>B.cereus</i>	<i>E. sazazakii</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E. sazazakii</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E. sazazakii</i>		
normal	100	100	100	100	100	100	100	-대조(Broth+공시균)
대조구 (무기태)	Ca-CNTL	100	100	100	100	0	100	필요량: 850 상한치 : 2,500 최대치 : 5,000
	Fe-CNTL	100	100	100	100	100	100	
	Cu-CNTL	100	100	0	100	0	0	필요량: 11.5 상한치 : 42.5 최대치 : 85
	Zn-CNTL	100	100	0	100	0	0	
	Se-CNTL	100	100	1.3	100	11.3	100	필요량 : 6.5 상한치 : 20 최대치 : 40
	MIX-CNTL	100	100	100	100	0	100	
실험구 (유기태)	Ca-WPS	100	100	100	100	100	100	필요량 : 0.55 상한치 : 5.75 최대치 : 11
	Fe-WPS	100	100	100	100	100	100	
	Cu-WPS	100	100	100	100	100	100	필요량: 0.04 상한치: 0.24 최대치: 0.50
	Zn-WPS	100	100	100	100	100	100	
	Se-WPS	100	100	100	100	100	100	-Multi complex-(Ca 33ppm + Fe 19.5 ppm + Se 57.3ppm)
	MIX-WPS	100	100	100	100	100	100	/MIX- complex 0.5g

Table. 5. 대비 유기태화 소재 농도별 염색체이상(미소핵) 변화에 미치는 영향

시험구		염색체이상(MN)조사 결과(단위:mean±SD, Aberration/total)				
		4주		8주		
	normal	0/2500,	0.0000±0.0000	8/6000,	0.0013±0.0013	
Ca	무기태	Ca-CNTL(L)	1/1500,	0.0007±0.0012	3/3000,	0.0010±0.0010
		Ca-CNTL(M)	3/1500,	0.0020±0.0020	0/3000,	0.0000±0.0000
		Ca-CNTL(H)	3/1500,	0.0020±0.0000	3/3000,	0.0010±0.0010
	유기태	Ca-WPS(L)	2/1500,	0.0013±0.0023	1/3000,	0.0003±0.0006
		Ca-WPS(M)	2/1500,	0.0013±0.0012	2/3000,	0.0007±0.0006
		Ca-WPS(H)	0/1500,	0.0000±0.0000	3/3000,	0.0010±0.0000
Fe	무기태	Fe-CNTL(L)	2/1500,	0.0013±0.0012	1/3000,	0.0003±0.0006
		Fe-CNTL(M)	4/1500,	0.0027±0.0030	3/4000,	0.0008±0.0003
		Fe-CNTL(H)	1/1500,	0.0007±0.0012	3/3000,	0.0010±0.0010
	유기태	Fe-WPS(L)	8/3000,	0.0027±0.0006	3/3000,	0.0010±0.0000
		Fe-WPS(M)	1/1500,	0.0007±0.0012	2/3000,	0.0007±0.0006
		Fe-WPS(H)	0/1500,	0.0000±0.0000	4/3000,	0.0013±0.0015
Zn	무기태	Zn-CNTL(L)	3/1500,	0.0020±0.0020	3/3000,	0.0010±0.0000
		Zn-CNTL(M)	2/1500,	0.0013±0.0023	4/3000,	0.0013±0.0006
		Zn-CNTL(H)	1/1500,	0.0007±0.0012	2/3000,	0.0007±0.0012
	유기태	Zn-WPS(L)	2/2000,	0.0013±0.0023	2/3000,	0.0007±0.0012
		Zn-WPS(M)	1/1500,	0.0007±0.0012	1/3000,	0.0003±0.0006
		Zn-WPS(H)	0/1500,	0.0000±0.0000	3/3000,	0.0010±0.0010
Cu	무기태	Cu-CNTL(L)	0/3000,	0.0000±0.0000	2/3000,	0.0007±0.0006
		Cu-CNTL(M)	3/1500,	0.0020±0.0020	1/3000,	0.0003±0.0006
		Cu-CNTL(H)	1/1500,	0.0007±0.0012	2/3000,	0.0007±0.0006
	유기태	Cu-WPS(L)	0/3000,	0.0000±0.0000	1/3000,	0.0003±0.0006
		Cu-WPS(M)	1/1500,	0.0007±0.0012	0/3000,	0.0000±0.0000
		Cu-WPS(H)	1/1500,	0.0007±0.0012	1/3000,	0.0003±0.0006
Se	무기태	Se-CNTL(L)	5/3000,	0.0017±0.0006	2/3000,	0.0007±0.0006
		Se-CNTL(M)	1/1500,	0.0007±0.0012	1/3000,	0.0003±0.0006
		Se-CNTL(H)	3/1500,	0.0020±0.0020	3/3000,	0.0010±0.0000
	유기태	Se-WPS(L)	0/3000,	0.0000±0.0000	4/3000,	0.0013±0.0015
		Se-WPS(M)	0/1500,	0.0000±0.0000	1/3000,	0.0003±0.0006
		Se-WPS(H)	0/1500,	0.0000±0.0000	5/3000,	0.0017±0.0006

Table. 6. 대비 유기태화 소재 농도별 성장률 및 사료효율에 미치는 영향

시험구			장단기 유기태화 소재 섭취에 따른 사료 섭취 및 성장효과											
			0 주				4 주				8 주			
			Weight(g)		Ingest(g)		Weight(g)		Ingest(g)		Weight(g)		Ingest(g)	
			Ave rage	SD	Ave rage	SD	Ave rage	SD	Ave rage	SD	Ave rage	SD	Ave rage	SD
Ca	Normal		22.7	1.4	4.8	0.2	33.0	0.4	5.4	0.4	36.4	0.7	6.6	1.4
		L	22.2	1.1	4.6	0.1	33.2	0.4	3.9	0.4	37.3	0.3	4.6	0.4
	CNTL	M	21.2	1.5	4.7	0.1	32.4	0.8	4.6	0.3	35.4	1.0	5.1	0.4
		H	20.4	1.1	4.4	0.2	32.6	0.4	4.1	0.4	34.3	1.0	4.2	1.0
		L	22.3	0.9	4.6	0.1	32.4	1.0	4.7	0.7	35.8	1.0	5.6	0.5
		M	21.4	1.6	4.7	0.1	33.1	1.2	4.4	0.1	36.1	0.5	4.8	0.9
Fe		H	21.3	0.8	4.8	0.1	32.8	0.9	4.2	0.3	36.0	1.0	4.3	0.9
		L	22.1	1.1	4.1	0.3	34.8	0.4	4.2	0.2	36.7	1.2	4.6	0.5
	CNTL	M	22.3	0.8	4.7	0.1	32.7	0.3	4.2	0.4	35.6	0.4	4.8	0.5
		H	22.4	1.2	4.7	0.1	33.8	0.8	4.1	0.3	38.2	0.5	4.6	0.5
		L	22.6	0.9	4.7	0.1	34.3	0.9	4.7	0.5	36.5	0.6	5.0	0.7
		M	22.8	1.2	4.7	0.1	33.4	1.0	4.3	0.4	37.9	0.8	4.3	0.6
Zn		H	22.5	0.8	4.7	0.1	32.5	0.9	4.6	0.4	36.8	0.9	5.0	0.5
		L	24.4	1.1	5.0	0.8	34.8	0.7	4.3	0.2	38.8	0.3	4.5	0.5
	CNTL	M	22.4	1.7	5.1	0.2	33.0	1.4	4.5	0.7	36.1	0.5	4.9	0.7
		H	21.9	1.1	4.6	0.2	34.2	1.2	4.4	0.3	36.7	0.6	4.7	0.5
		L	21.4	1.5	5.0	0.1	36.2	0.9	4.6	0.3	38.6	1.0	4.3	0.7
		M	21.1	0.9	5.0	0.1	31.6	1.0	4.3	0.3	34.3	0.3	4.3	1.0
Cu		H	21.5	0.7	4.7	0.1	32.8	0.7	4.4	0.3	34.6	0.8	4.5	0.8
		L	21.9	1.6	4.7	0.1	34.0	1.1	4.1	0.3	37.1	0.7	4.8	0.4
	CNTL	M	21.7	1.0	4.8	0.2	33.2	1.2	4.2	0.2	35.6	1.2	4.8	0.2
		H	22.3	1.2	5.2	0.1	32.8	0.5	4.4	0.2	36.1	0.5	4.7	0.4
		L	21.6	1.2	4.4	0.1	32.7	0.9	4.5	0.3	36.3	0.9	4.7	0.5
		M	21.7	1.6	4.5	0.1	31.5	1.1	4.5	0.3	36.4	0.3	4.5	0.5
Se		H	20.7	1.1	4.8	0.1	32.3	1.0	4.4	0.4	35.3	0.7	5.1	0.3
		L	22.0	1.9	5.0	0.2	33.2	0.5	4.2	0.2	35.3	0.7	4.5	0.4
	CNTL	M	20.5	1.0	5.3	0.1	32.0	0.6	4.3	0.7	36.5	1.1	4.7	0.5
		H	21.8	1.1	4.8	0.2	33.8	0.6	4.3	0.5	39.2	0.8	4.2	1.0
		L	23.4	1.3	4.7	0.1	33.6	0.9	4.3	0.2	37.5	0.7	4.5	0.6
		M	22.8	1.2	4.7	0.2	33.1	1.1	4.2	0.2	37.2	1.2	4.5	0.6
	H	22.0	1.4	4.7	0.2	33.1	0.8	4.4	0.2	36.4	0.6	4.6	0.5	

제 2 절 유기태화 미네랄 소재류의 항균성 보유능력 평가

1. 연구목표

본 연구는 탄수화물 소재로서 우선 키토산 계열의 개발 결과를 축산분야에 첨가가 가능한 다기능성 소재로서의 기능성 파악을 통하여, 사료첨가제 소재로서의 활용성에 연구개발 목적을 부여하였다. 검토결과를 토대로 다기능성 보유 극대화 기법을 극대화 하기 위한 추가 기술을 정립과정을 거쳐, 최종 다기능성 소재로서(항균 / 성장촉진 / 면역증가 / 질병치료 / 생리활성증가 등)제제 개발 목적을 부여 하였다. 통상적으로 제제의 개발은 특정 기능성을 주 개발목표로 하지만, 천연고분자 물질들은 제조기법에 따라 다양한 성격을 보이고 또한 부여할 수 있는 특성을 보유하고 있다. 현재 기존 첨가되는 무기태 물질이 보유하는 단점(안전성, 안정성 및 체내흡수성 결여 등)의 문제를 해결을 목적으로 유기태화 소재를 개발하고, 이를 현장애로기술 해결형으로 대체 적용코 저 함에 있어, 키토산은 기본적으로 항균성과 미네랄에 대하여 킬레이트 효과를 보유하고 있는 바, 경제성(저가)이 확보되는 담체 소재 등으로 활용 가능성이 충분한 다기능성 제제로 개발 가능성을 보유하고 있다. 이를 위하여, 키토산 및 키토산 올리고당 그리고 키토산올리고당을 킬레이팅 담체로 정하고, 여기에 무기태화 미네랄을 도입한 유기태화 제제 3종을 준비한 후 이를 소재로 항균성을 평가하였다. 이 실험의 목표는 항균성이 극대화 되도록 제조한 기질 키토산올리고당과 여기에 미네랄이 도입되는 경우 항균성 비교를 통하여, 최종 개발제품인 유기태화 미네랄 소재류가 유기태화 효과와 항균성 능력까지도 동시보유하는 다기능성 제품의 가능화 여부를 판단함에 목적이 있다. 평가결과는 가축사양현장에서 고질적 질병에 대한 치료와 목표 기능성 축산물의 생산 및 국내외 소비자 요구성에 충족되는 축산용 제품의 개발과 판매사업화를 실시 할 예정이다.

2. 연구수행방법

가. 기질 키토산 올리고당체 준비

키토산올리고당(OCHT)는 선행 제조된 항균성 극대화 소재를 사용하였는데, 분자량별 차이만을 특성으로 하여 고분자형 OCHT(HM-OCHT), 중분자형OCHT(MM-OCHT) 및 저분자형OCHT(LM-OCHT)]으로 하여 준비하였다(Fig 1). 이 중 항균성 평가를 실시하여 가장 항균성이 높았던 중분자형 소재(MM-OCHT)를 유기태화 소재제조에 사용하였다.

나. 유기태화 미네랄 소재류 준비

유기태화 미네랄 도입전 원료 OCHT 대비 무기태 미네랄인 Ca, Zn 및 Fe를 유기태화 시킨 Zn-*MMOCHT*(5% Zn함유), Ca-*MMOCHT*(5% Ca 함유) 그리고 Fe-OCHT(5% Fe함유)로 준비하여 전체 시험간 사용하였으며(Fig 2), 제조법은 3장(제 3-3 절)에 준하여 제조하였다..

다. 공시균주 확보

본 연구간 사용된 공시균주는 *E.coli*, *E. sakazakii* 및 *B. cereus*를 확보하여 전체연구에

서 사용하였으며, 균주 분리 및 동정방법은 식약청 유해세균 동정 분리법에 준하여 실시하였다. 분리간 액상배지는 NB Broth를 그리고 고상배지는 TSA를 사용하였는데, 전체 시험간 배양온도는 37°C에서 24시간 배양하는 조건으로 하였다.

라. 시험구 조성

개발 유기태화 소재류의 항균성 비교 시험을 위한 대조구서는 PBS buffer 용액 만을 사용하였으며, 유기태화 미네럴 소재 비교구는 유기태화 미네럴 소재를 제조시 시용한 무기태 미네럴을 사용하여 유기태화 전후의 항균성을 농도별로 비교하였다. 이때 사용한 무기태 미네럴류는 ZnSO₄, CaCl₂ 및 FeSO₄였으며 항균성 평가를 위한 Stocking Sol.은 PBS용액에 5%(w/w) 되게 각각 조성하여 사용하였다. 시험구는 유기태화 소재인 Zn-MMOCHT, Ca-MMOCHT 및 Fe-OCHT를 미네럴 함유량 기준으로 역시 PBS용액에 5%(w/w) 되게 각각 조성하여 사용하였다.

마. 선발균주의 배양

선발균들은 각기 다른 영양육즙배지(Difco)에 접종하여 37°C, 150 rpm에서 18시간동안 진탕배양 후 균을 분리한 다음, 사용시는 인산완충액(0.1M, pH 7.0)으로 희석과정을 거쳐 세균수를 조정하여 실험에 사용하였다.

바. 항균성 극대화 OCHT제제 선발

분자량별 차이를 부여한 OCHT의 미네럴 도입에 따른 안정성 검정 분자량별 차이를 부여하여 제조한 OCHT에 대하여, 미네럴별 킬레이팅 유도시 응고현상발생 여부 등 안정성을 평가하고자 하였는데, 이 확인과정을 통하여 미네럴 킬레이팅시 최적 물성을 보유하는 OCHT를 선발하고자 하였음. 이를 위하여, 고분자 물질과의 킬레이팅 시 응고현상 등의 안정성 평가에 지표 미네럴로 사용되는 10%(w/w) Zn용액을 조성한 후 이를 각각의 OCHT에 동일량으로 지속적 점적시 응고현상 발생유무를 확인하는 결과를 안정성검정 결과로 정하였다.

2) 항균성 OCHT선발 및 MIC농도 결정

분자량 분포 등의 물성차이를 부여하여 제조한 고분자 키토산(Raw-chitosan)을 효소분해(chitosanase, 아마코젠)과정을 거쳐 제조한 3종의 OCHT(HM, MM그리고 LM-OCHT) 용액에 대하여, 우선 *E. coli*를 대상으로 농도별 항균성과 미네럴 도입시 OCHT의 정상변화(응고 발생) 등을 종합 평가한 결과, MM-OCHT를 최적 물성소재로 선발함과 동시에 이 결과를 토대로 미네럴 킬레이팅화 소재로 채택하였다. 3종 OCHT에 대한 예비 항균성 검정 절차는 다음과 같은 과정을 통하여 실시하였다.

가) 점적방법을 통한 항균성 검정

분자량별로 다르게 제조된 OCHT의 항균성을 점적방법을 적용하여 검정하였는 바, 우선

일반적인 방법으로 TSA배지를 제조하고, 여기에 배양된 대장균 용액을 50 μ l를 고르게 도달한 후, 각 농도[100,000ppm(10%), 65,000(6.5%), 5,000ppm, 4,000ppm(4%), 3,000ppm(3%), 2,000ppm(2%), 1,000ppm(1%), 5,000ppm(0.5%, w/v), 1,000ppm(0.1%), 500ppm(0.05%) 그리고100ppm(0.01%)균으로 희석 조제]로 조절된 OCHT을 마이크로 피펫을 이용하여 정확하게 30 μ l를 떨어뜨린 후, 37 $^{\circ}$ C, 24시간동안 배양하였으며, 이때 형성되는 성장저지환을 기준으로 대조구의 비교하여 항균성을 검정하였음. 또한 추가 필요시 농도는 재조절 하여 적용하였다.

나) 접촉시간 경과별 항균성 검정

점적방법을 통하여 확인되는 항균성을 추가적 확인을 위하여 제제의 접촉에 따른 항균성을 검정하였다. 이를 위하여, 준비된 제제를 PBS용액에 농도별(0.01%~10%)로 첨가한 희석액을 조성한 후, 여기에 공시균인 *E.coli*를 동일균수로 접종한 후 일정시간(30분, 3시간, 7시간 그리고 18시간)이 경과한 후에 TSA고체배지에 100 μ l를 도달하여 24시간(37 $^{\circ}$ C)배양 한 후 형성되는 생존 콜로니 수를 제제를 첨가하지 않은 대조구와 비교함으로써 항균성을 확인하였으며, 이를 기초로 항균성 분자량이 탁월한 OCHT와 MIC를 확인하였다

사. 유기태화 미네랄 제제의 항균성 효과 확인

1) 유기태화 제제의 준비

항균성 검정 결과를 기초로, 5%의 농도로 조제된 MM-OCHT에 대하여 미네랄을 도입한 유기태화 소재를 제조 후 사용시는 인산완충용액에 희석하되, 희석 농도균을 5,000ppm(0.5%, w/v), 1,000ppm(0.1%), 500ppm(0.05%), 100ppm(0.01%), 10ppm(0.001%), 5ppm(0.005%) 및 1ppm(0.0001%)균으로 조제하여 검정간 사용하였으며, 필요시 농도 조성구를 추가하였다. 대조구로서는 인산완충액만을 사용하여 시험간 균의 성장패턴과 이상유무 등을 확인하였으며, 대조구 및 처리구에 대한 효과의 정확성을 부여하기 위한 비교시험구로서는 유기태화 MM-OCHT를 제조시 사용한 미네랄을 처리구와 동일한 농도로 희석한 후 이를 비교 검정하였다.

2) 유기태화 제제별 대장균을 이용한 항균성 검정

가) Zn-MM OCHT의 대장균에 대한 항균성 효과

점적법을 통하여 확인되는 항균성을 추가적 확인을 위하여 유기태화 제제의 접촉과 시간 경과별 처리가 항균성에 미치는 결과를 검정하였으며, 이를 위하여, 준비된 제제를 PBS용액에 농도별로 첨가한 희석액을 조성한 후, 여기에 공시균인 *E.coli*를 동일균수로 접종한 후

일정시간(30분, 3시간, 7시간 그리고 18시간)이 경과한 후에 TSA고체배지에 100uL를 도말하여 24시간(37℃)배양 한 후 형성되는 생존 콜로니 수를 제제를 첨가하지 않은 대조구와 비교함으로써 항균성을 확인하였다. 이를 기초로 항균성이 탁월한 유기태화 미네랄 제제 개발 방향과 대장균 이외의 세균에 대하여 항균성 소재로의 이용 가능성을 평가 하였다.

나) 치환률 차이를 부여한 Zn-MM-OCHT의 대장균에 대한 항균성 검정효과

동일 샘플의MM-OCHT를 준비한 후 동일량의 MM-OCHT에 대하여 Zn를 킬레이팅화 하되 1.0, 0.5 그리고 0.1당량 차이로 3단계 농도로 부여하여 제조한 후, 이를 농도별 [0.001%(10ppm), 0.0001%(1ppm), 0.00001%(0.1ppm) 그리고 0.000001%(0.01ppm)]로 다르게 조성하여 공통적으로 3시간동안 대장균에 접촉시킨 후 이를 영양고체배지에 도말하는 방법으로 항균성을 확인하였다.

다) 유기태화소재의 미네랄 차이에 의한 대장균의 항균효과 검정

항균성을 극대화 되게 증가시킨MM-OCHT를 원료로 여기에 공통적으로 5%되게 Ca, Zn 그리고 Fe를 도입한 유기태화 제제와 이를 위해 사용된 미네랄별로 이들을 각각 0.0001%(1ppm) ~ 0.5%(5,000ppm) 범위에서 희석한 후, 3시간 동안 대장균에 접촉시킨 후 항균성에 미치는 효과를 확인하였다. 이는 본 연구개발의 핵심이 무기태화 미네랄의 유기태화 소재로 개발함과 아울러 항균성을 동시에 부여하는 다기능 제제를 제조함에 목적이 있는 만큼 이때 사용되는 미네랄들에 의하여 항균성이 차이가 증감될 수 있을 것이라 예측 할 수 있음에 따라, 만약 항균성에 있어서 차이를 나타내는지를 확인함과 동시에 차이가 발생한다면 그와 관련한 요인을 확인하기 위함이다..

라) 유기태화 제제의 액상 및 분말화 과정 반복처리시의 대장균에 대한 항균 재현성 검정

우선 제조된 제제의 특성은 액상화 상태이고 이를 기준으로 항균성 효과를 검정 후, 이를 동결건조방법을 통하여 분말화하고, 다시 3차 멸균수를 동일농도로 재투입하여 용해시키는 과정 전/후의 제제의 용해도와 더불어 물성변화로 인하여 항균성에 있어 차이를 보일수 있음을 예상할 수 있다. 이는 제제의 현장 적용성을 높이기 위한 보관성에서 중요한 요인일 수 있으므로 항균성을 기준으로 평가함에 목적이 있는데, 이를 위하여 동결건조 전후의 제제를 각각 취하여 이를 농도별(0.0001%~0.5%)로 희석한 후 역시 공시균인 대장균에 대하여 3시간접촉과 아울러 이를 고체영양배지에 도말 및 배양과정을 거쳐 상호 항균성을 비교함으로써 물성변화 여부를 평가하였다.

마) 유기태화 제제별 영유아식 오염 병원성 세균에 대한 항균성 검정

대장균에 대한 항균성 시험결과를 기초로 본 시험에서는 영유아 조제식에 감염되어 공중 보건학적 임상질병을 발생 시키는 *E.sakazakii*균과 *B.cereus*균의 제어가 가능할지를 검토 하였다. 이를 위하여, 항균성 검정은 점적방법으로, 재료는 MM-OCHT만을, 처리농도는 0.5%의 단일 농도하에서 단기 및 장시간 접촉에 의한 항균성을 대조구와 비교하여 확인하였다. 즉, PBS용액에 0.5%되게 MM-OCHT제제를 각각 조성한 후, 여기에 공시균인 *E.sakazakii*균과 *B.cereus*균을 역시 접종한 후 일정시간(30분, 3시간, 18시간)이 경과한 후에 TSA고체배지에 100uL를 도말하고 이를 24시간(37℃)배양 한 후 형성되는 생존 콜

로니 수를 제제를 첨가하지 않은 대조구와 비교함으로써 항균성을 확인하였다.

3. 연구수행결과

가. 분자량별 차이를 부여한 OCHT의 미네랄 도입에 따른 안정성 검정

분자량별 차이를 부여하여 제조한 OCHT에 대하여, 미네랄별 킬레이팅 유도시 효과적인 물성은 뚜렷히 구분되어짐을 확인 할 수 있었다(Fig 3). 가장 대표적으로 고분자 물질에 적용시 안정성 효과를 검정할 수 있는 미네랄로서 아연을 이용한 킬레이팅시의 OCHT의 안정성 결과를 확인한 바, 분자량이 적을수록 효과적이었으며, 추가적으로 Ca를 포함한 기타의 미네랄들의 경우는 분자량이 큰 경우의 OCHT가 최적의 킬레이팅 능력을 보였다.

나. 대장균을 대상으로 한 항균성 OCHT선발 및 MIC농도 결정

고분자 키토산을 원료로 하여, 분자량 분포 등의 물성차이를 부여하여 제조한 3종의 OCHT(HM, MM그리고 LM-OCHT)용액에 대하여, *E.coli*를 공시균으로 하여 각각의 제제에 대하여 농도별 항균성을 검정한 결과, HM(고분자) 및 MM(중분자) 물성을 보유한 OCHT가 항균성에 있어 0.0001%범위의 극미량을 첨가한 경우에도 높은 항균성을 보였는데, 반대로 MM-OCHT 0.0001%에서는 항균효과가 인정되지 않은 것으로 나타났다(Fig 4). 이는 항균성에 있어 분자량이 주요한 변수이고, 효소처리시 저분자화(MM)를 극대로 유도하면 오히려 항균성은 감소하는 것으로 조사되었는 바, 결국, 항균성에 있어서 HM~MM 범위의 물성을 보유하는 OCHT가 적절한 것으로 확인하였다.

다. 유기태화 제제별 대장균에 대한 항균성 검정결과

1) Zn-OCHT

아연이 도입된 OCHT제제를 농도별로 조절한 후 이를 대장균에 대하여 점적방법과 접촉실험을 병행하여 항균성에 미치는 효과를 확인하여 본 결과, 저농도라 하더라도 균과의 접촉시간이 길면 항균효과가 우수함을 알 수 있었다(Fig 5). 유기태화 제제는 대조구의 경우와 비교시, 1%이상의 농도로 처리시에만 항균성이 인정되는 것으로 관찰되었는데, 이는 고체배지에 도달한 균수가 많았기 때문일 것이라 판단되어, 이를 확인하기 위하여 유기태화 재제를 PBS용액에 농도별로 희석한 용액에 균을 동일량 추가 접종시킨 후 시간경과별로 항균성을 확인하여 보았더니, 점적결과와 다르게 전체 농도에서 어떠한 균도 나타나지 않아 배지와 균수별 등 항균성에 미치는 변수가 많음을 확인할 수 있었다. 점적법과 접촉법에 의한 유기태화제제를 처리시 항균성 차이를 나타내는 변수가 많았다는 결과는, 유기태화 제제는 물질에 따라 간섭효과를 나타낼 수 있음을 시사한 다 할 수 있는 바, 추후 제품 첨가에 따른 항균성 검정시에 주요하게 관심을 두고 세세하게 검토예정이다.

2) 미네랄 치환률 차이를 부여한 Zn-OCHT의 항균성 검정효과

MM-OCHT에 1.0, 0.5 그리고 0.1당량 차이로 아연을 킬레이팅 한 후 0.001%(10ppm)~0.000001%(0.01ppm) 범위에서 3시간 동안 대장균에 접촉시킨 후 항균성에 미치는 효과를 확인하였다(Table 2). 결과로서, 아연 도입전의 MM-OCHT는

0.0001%(1ppm)이상의 농도에서 99.9%이상의 항균효과를 나타내었으며, 그 이하의 농도 처리구의 경우는 항균성이 안정되지 않았다. 항균성 결과를 기준으로 아연의 도입량을 1~0.1eq되게 차이를 두어 제조한 유기태화 제제의 경우에서 항균성 차이를 비교 확인하여 보았더니, 아연 도입전의 MM-OCHT의 결과와 별로 차이가 없었다. 따라서 최초 OCHT에서 항균성이 극대화가 되게 한 후 여기에 미네랄을 킬레이팅 후 항균성과 다기능효과를 보유토록 하는 주요변수임을 알 수 있었다.

3) 유기태화 제제 제조시 도입 미네랄 차이에 의한 항균효과 변수 검정

항균성이 인정된 MM-OCHT에 5%되게 Ca, Zn 그리고 Fe를 각각 킬레이팅 한 후 유기태화 제제 및 도입된 미네랄을 희석한 용액을 0.0001%(1ppm)~0.5%(5,000ppm) 범위로 준비하여, 3시간 동안만 대장균에 접촉시킨 후 항균성에 미치는 효과를 확인하느로서, 이들 미네랄들에 의하여 야기될 수 변수를 확인하고 저 하였다. MM-OCHT는 전체 농도범위에서 생존하는 콜로니는 나타나지 않아서 높은 항균성 결과를 보였다. 미네랄만을 대상으로 한 항균성 검정 결과, 아연의 경우는 전체농도에서, 칼슘의 경우는0.001% 그리고 철의 경우는 0.01%이상의 농도에서는 어떠한 콜로니도 나타나지 않았으며 그 이하의 농도에서는 하여 사멸 보다는 정균효과가 있음이 확인되었다. 기본적으로 항균성이 확보된 결과를 보였던 미네랄 킬레이이팅 전의MM-OCHT과 킬레이팅 후의 각 유기태화 제제별의 항균효과를 살표본 결과, 철과 아연을 도입한 경우에는 뚜렷한 항균성 차이는 인정되지 않았음. 이는 MM-OCHT고유의 항균력은 철과 아연이 킬레이팅화 하더라도 저감되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 칼슘의 경우는 철과 아연의 경우는 전혀 다른 항균성 패턴을 보였는데, 칼슘만을 처리한 경우는 정상 농도구배 차이에 따라 항균성도 비례하여 나타났으며, 0.001% 이상의 농도에서는 우수한 항균력을 나타내는 것으로 조사된 반면, 칼슘이 도입된 유기태화 제제의 경우는 0.1%~0.5%의 높은 농도에서 항균력은 감소하였는데, 이 중0.5% 처리구의 경우는 대조구에 비하여 오히려 더욱 증식되는 결과를 보였는데, 이러한 원인은 추후 세세하게 검토할 예정이다.

4) 유기태화 제제의 액상 및 분말화 과정 반복처리시의 항균 재현성 검정

우선 최초 제조된 제제의 특성은 액상화 상태였고, 이를 기준으로 항균성 효과를 확인한 후, 이를 동결건조방법을 통하여 분말화하고, 다시 3차 멸균수를 동일농도로 재투입하여 용해시키는 과정을 반복한 뒤, 동결전후 전/후 용해도와 더불어 물성변화로 인하여 항균성 차이를 보일 수 있음이 충분히 예상됨에 따라 이를 확인하여 보았다(Table 4). 결과로서, 동결전후 제제를 각각 취하여 이를 농도별(0.0001%~0.5%)로 희석시 용해성 차이는 없었다.

각 농도별 처리구에 대하여 대장균을 접종하고 3시간 접촉후에 이들을 고체영양배지에 도말 및 배양과정을 거쳐 나타나는 균락을 계수하여 상호 항균성을 비교하여 보았더니, 동결건조 처리 전/후의 모든 시험구에서 어떠한 대장균 균락도 나타나지 않아 액상 및 분말화 후에 장기보관 시 항균성과 관련한 물성 변화는 거의 없거나 미미할 것으로 판단되었다.

5) 유기태화 제제별 영유아식 오염 병원성 세균에 대한 항균성 검정(표 5)

대장균에 대한 항균성 시험결과를 기초로 본 시험에서는 영유아 식품에 감염되어 공중보건학적 문제를 발생 시키는 *E.sakazakii*균과 *B.cereus*균의 제어가 가능할 지를 검토하였다

(Table 5). 이를 위하여, 점적방법으로, MM-OCHT를 0.5%의 단일 농도하에서 단기 및 장시간 접촉시에 항균성을 대조구와 비교하여 확인하였더니, 대조구의 경우는 지속적인 균의 성장이 이루어 지고 있었는데 반하여 두 균은 제제에 접촉 후 30분이 경과시 부터 99%이상의 사멸 효과를 보임으로서 대장균과 동일한 사멸효과를 보임을 알 수 있었다. 또한 Gram Negative균과 Gram Positive균의 일종인 *E.sakazakii*균과 *B.cereus*균에 대하여 상관없이 높은 항균성을 나타 내었는데, 이러한 결과는 식품내 오염된 병원성 세균에 대한 제어체로서 적용이 가능함을 시사한다 할 수 있을것이나, 식품의 물리화학적인 구성이 복잡함에 따른 간섭효과에 의한 항균성이 저하되는지 여부는 추후 세세한 검토를 실시할 예정이다.

4. 종합결론

- 항균성을 보유하는 분자량 범위는 HM~MM범위였다(표 1)
- 유기태화 도입전/후에서 미네랄이 당초 OCHT소재가 보유하는 항균성에 영향을 주는 지를 검정한 결과, 칼슘은 항균성을 저감시키는 것으로 조사된 반면, 이외의 미네랄의 경우는 항균성을 유지 혹은 오히려 증가시키는 효과를 보였다.
- 항균성을 보유하면서 안정성이 확보되는 범위에서 킬레이팅 능력은 Zn, Fe, Ca(항균성 억제 효과보유)등 전체가 OCHT대비 5%범위를 보였다.
- 미네랄별 유기태화 도입 시 아연의 경우는 MM~LM-OCHT, 칼슘을 포함한 다른 미네랄의 경우는 HM~MM-OCHT의 경우가 안정성을 확보할 수 있는 물성을 보유하는 것으로 판단되었다(표 1).
- 미네랄을 도입 후 안정성 결과와 항균 검정 결과를 종합하여 보면, 항균성이 보장되면서 킬레이팅 물질을 도입할 수 있는 다기능성 유기태화 소재로서 물성을 보유하고 있는 MM-OCHT가 최적임을 확인 할 수 있었다.
- 다기능성 효과를 나타낼 수 있도록 하는 HM그리고 MM-OCHT의 DAC는 95%이상, 점도(분자량)범위는 2.00~2.65mPas(5% 용액, 25℃), pH는 5~6범위, EC는 4.4~4.7 그리고 당도의 경우는 9~10범위를 보유 경우였다.
- 항균성에 있어서는 MM-OCHT 와 유기태화 제제는 Gram Negative균과 Gram Positive균에 대하여 광역 항균 스펙트럼을 보유하는 것으로 조사되었다.
- 결론적으로, 미네랄을 도입시 안정성 결과를 토대로 MM-OCHT를 항균성이 보장되면서 킬레이팅 물질을 도입할 수 있는 다기능성 유기태화 소재로서 물성을 보유하고 있도록 기초 유기태화 제제 개발이 완료 되었다.

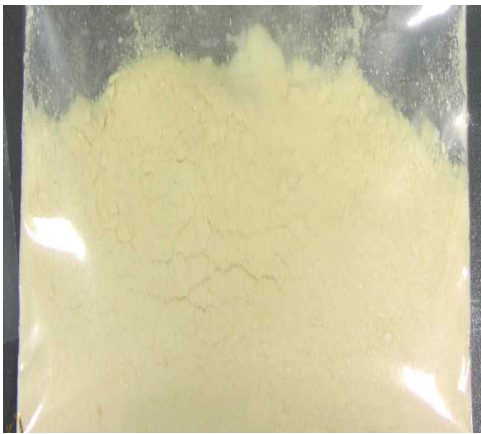
Table 1. 시험간 사용된 OCHT(5%기준)의 물성표

시료형	점도(mPas)	pH	EC	당도(Brix)	맛	색상	냄새
Raw-OCHT	63.0	4.29	6.32	7.53	-	yellow	+
HM-OCHT	8.98	4.98	4.01	9.24	-	"	+
MM-OCHT	2.65	5.32	4.41	9.38	-	"	+
LM-OCHT	2.09	4.80	3.60	8.78	-	"	+

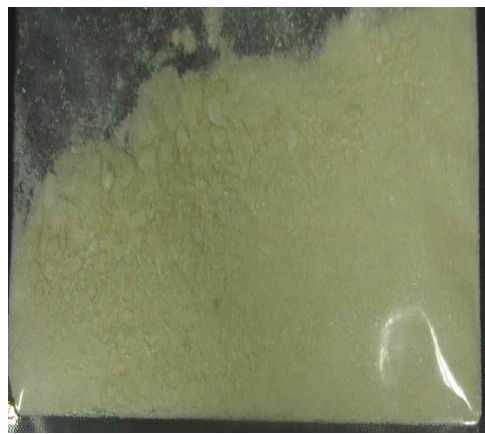
*Raw-OCHT : only chitosan , -: 없음, + : 약간 있음, ++:심함
 , +++: 아주심함, HM : high molecular weight, MM : Middle molecular weight, LM :
 Low molecular weight.



Fig 1. 시험간 사용된 3종 OCHT의 성상
[HM-OCHT(상), MM-OCHT(중), LM-OCHT(하)]



(OCHT)



(Zn-OCHT)

Fig 2. Zn-OCHT제조전(OCHT) 및 최종 제조후(동결건조, Zn-OCHT) 형태변화

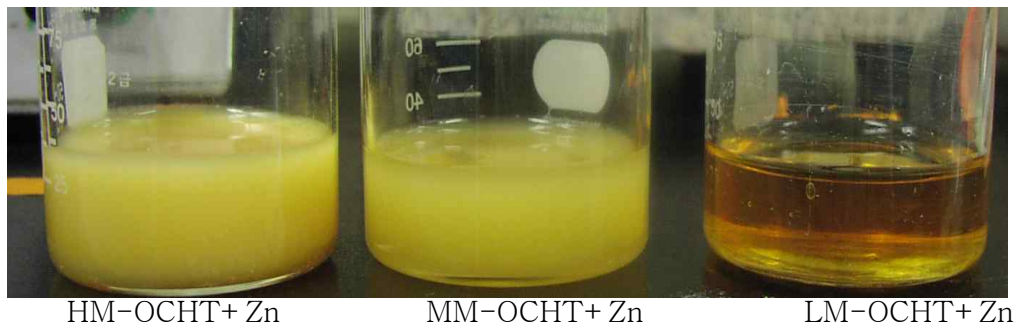


Fig 3. 분자량 차이를 부여한 OCHT에 대하여 아연을 처리시 형태변화 확인을 통한 안정성 평가(적용 미네랄시약 ; 10% ZnSO₄용액, HM :High molecular weight, MM : Middle molecular weight 그리고 LM : Low molecular weight)

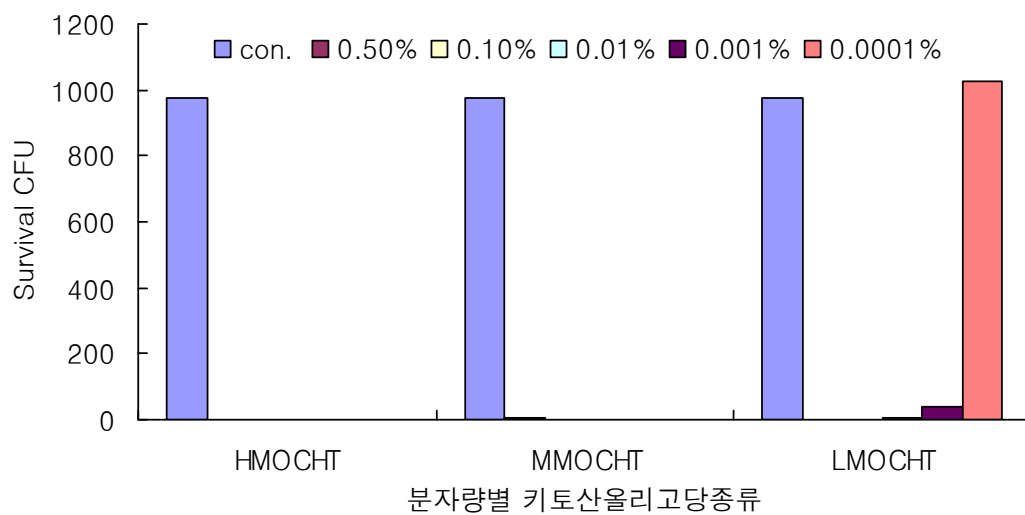


Fig 4. 분자량 분포 등의 물성차이를 부여하여 제조한 3종의 OCHT의 농도별 처리가 *E.coli*의 사멸효과에 미치는 영향 조사(균집축 3시간 후, HM : high molecular weight OCHT, MM : Middle molecular weight OCHT , LM : Low molecular weight OCHT)



그림 5. Zn 을 도입한 유기태화 제제(MM-OCHT)의 공시균인 대장균에 대한 농도별 (0.01%~10%) 그리고 시간경과시(3, 4그리고 18시간) 항균성에 미치는 효과(배양조건 : 37°C, 24시간)

Table 2. MM-OCHT에 대하여 Zn의 도입전/후 및 도입량을 다르게 하여 제조한 유기태화 제제의 농도별 처리가 항균성에 미치는 효과(3시간 접촉, 37℃, 24시간 배양)

처리농도	MMOCHT	1.0eq-MMOCHT	0.5eq-MMOCHT	0.1eq-MMOCHT
control	10,000(↑)	10,000(↑)	10,000(↑)	10,000(↑)
0.001%	0	0	0	0
0.0001%	5	0	0	0
0.00001%	10,000(↑)	10,000(↑)	10,000(↑)	10,000(↑)
0.000001%	10,000(↑)	10,000(↑)	10,000(↑)	10,000(↑)

-10,000(↑): colony 계수불가, MMOCHT :middle molecular weight-oligosaccharide chitosan, eq : equivalent, 0.001%~0.000001% : Zn(5% 함유)-MMOCHT 유기태화 제제를 희석 조성한 농도처리시험구

Table 3. 유기태화 제제 제조 전후 그리고 미네랄별 및 농도별 처리 차이가 대장균에 대한 항균성에 미치는 결과 및 차이점 검정

Treatment Groups	MMOCHT	Ca-group		Zn-group		Fe-group	
		MMOCHT + 5%Ca	5%Ca	MMOCHT +5%Zn	5%Zn	MMOCHT +5%Fe	5% Fe
control	976	976	976	976	976	976	976
0.50%	0	1,328	0	0	0	0	0
0.10%	0	864	0	0	0	0	0
0.01%	0	0	0	0	0	0	144
0.001%	0	0	428	0	28	0	187
0.0001%	0	0	1,128	0	76	0	696

MMOCHT :middle molecular weight-oligosaccharide chitosan, 0.0001%~0.5% : 유기태화 제제를 농도조성, MMOCHT+5%Ca, 5%Zn 그리고 5%Fe ; MMOCHT내 함유되어 있는 순수 미네랄량(Ca, Zn, Fe)이 5%되게 제조.

Table 4. 유기태화 제제의 안정성 및 보관성 향상을 위한 액상 및 분말화 과정 반복처리시의
 항균 재현성 검정을 통한 물성변화 확인

	Raw-MMOCHT	Resol-MMOCHT
Con.	976cfu	1,000cfu
0.5%	3	0
0.1%	0	0
0.01%	0	0
0.001%	0	0
0.0001%	0	0

Raw-MMOCHT : 최초 동결처리전 액상화 OCHT, Resol-MMOCHT : Raw-MMOCHT를 동결처리후 재용해한
 액상 제제, MM-OCHT : Middle molecular weight oligosaccharide chitosan, 0.0001%~0.5% : MM-OCHT 희
 석농도구

Table 5. 대장균에 대한 항균성 검정결과를 기초로 영유아식 오염병원균에 대한 MM-OCHT 제제의 항균효과 비교

	<i>E.sakazakii</i> 균			<i>B.cereus</i> 균		
	30분	3시간	18시간	30분	3시간	18시간
Con	3,040	3,432	100,000	259	284	5,984
0.5%	12	6	0	20	7	1

MM-OCHT :: Middle molecular weight oligosaccharide chitosan, 0.5% : MM-OCHT 0.5% (w/v) 희석 농도구

제 3 절 현장 질병예방형(Prebiotic) 최적사료 선발 및 현장 처리기법 정립[유기태 미네럴 강화사료 장기섭이(60일)후 분리변(맹장)내 Prebiotic 효과 평가]

1. 연구목적

현재 국내외 양축현장에서는 항생제 사용 규제가 엄격하므로, 이에 대한 대체형 연구가 국내외적으로 활발하게 진행되고 있다. 이러한 연구방향은 합성항생제를 대체하는 소재와 장내 유익균인 유산균을 활성화 시키는 Probiotic(유산균 개발) 혹은 Prebiotic(소재 개발)형 연구로 크게 대별되고 있다. 본 연구 실시전 무기태 미네럴류 대비 유기태화 미네럴 소재류를 대상으로 사료에 첨가후 60일 동안 산란계에 섭이토록 한 현장 실험결과, 개발 유기태화 미네럴 소재류는 우수한 Prebiotic 효능을 보유하고 있는 것으로 평가되었다. 즉, 맹장에서 분리한 분변내 총균수와 유산균의 수치가 증가하면서 이때 대장균구의 급격한 감소와 더불어 가금류에서 가장 고질적인 살모넬라균구는 불검출 되는 결과를 확인한 바, 이에 대한 유기태 미네럴 소재류가 보유하는 항질병 관련 메카니즘을 실험실적으로 규명하기 위하여 실험실적 효과를 평가하였다. 본 연구목표를 도달하기 위한 해결방법으로, 현장 유효성 평가를 통하여 Prebiotic 효과가 확인된 유기태 소재류를 선발하고 역시 현장에서 분리한 미생물을 유해균(대장균군, 살모넬라균)과 유익균(유산균)으로 구분한 후 선발 유기태화 소재류를 처리에 따른 출현균수를 비교함으로써, 최종 유기태화 미네럴 소재류의 Prebiotic 효능 평가와 제품화를 위한 유기태화 소재류의 적용 순서를 확정함에 본 연구목적에 부여하였다.

2. 연구수행방법

본 연구를 해결하기 위한 수단으로서, 산란단계에 있는 산란계(Hy-line계)를 공시동물로 하여 유기태화 미네럴류 소재로 하는 미네럴 강화사료를 섭이시킨 산란계에서 대장균성 및 살모넬라균으로 인한 질병을 예방 및 감소시킬 수 있는 신소재 개발과 이를 활용한 항질병형 사료첨가제 개발을 목표로 하는 연구수행방법은 다음과 같다.

가. 핵산 기질화 유기태화 미네럴 소재류 준비

본 연구를 수행하기 위한 유기태화 소재류는 “제 1 절 유기태 미네럴 소재류 제조(1년

차 연계건)”에서 준비된 소재류를 기본 현장 유효성 평가를 위한 미네럴 강화 사료 제조용 소재로 사용하였다. 시료로서 대조군은 단일 미네럴 보유형 유기태화 소재류는 Ca-GHAC를 사용하였고, 시험구로서는 2종 미네럴 보유형 CaFe-GHAC, CaZn-GHAC, CaCu-GHAC 및 CaSe-GHAC를 전체시험간 사용하였다.

나. 유기태화 미네럴 강화 사료제조 제조

1) 기본사료 준비

본 연구에 사용된 사료는 현재사료(주) 산란계큰병아리(제품)을 기본으로 하여 사용하였으며, 본 과제와 관련한 유기태화 미네럴 관련한 사료 1톤당 미네럴 첨가량은 칼슘은 261.8g, Fe는 183.3g, Zn은 251.43g, Cu는 16.18g 및 Se는 0.7g을 기본으로 하였다 (Table 1). 전체 시험간 사료준비는 현재사료(주)의 협조를 얻어 기본 사료(산란계 큰병아리용)에서 칼슘을 제외한 사료, 철분을 제외한 사료, 아연을 제외한 사료, 구리를 제외한 사료 및 셀레늄을 제외한 사료로 구분하여 구입한 사료를 준비하였다.

2) 미네럴 강화 사료 준비

현장 유효성 평가용 사료준비는 미리 주문 구입한 각 미네럴 제외사료류에 무기태 미네럴과 개발된 유기태화 미네럴류별 그리고 시험농도별 충족되도록 하는 사료배합은 역시 사료배합전문회사인 (주)바이오리쏘스사에 위탁하여 제조한 후 이를 전체 현장유효성 평가 시험간 공급하였다(Fig 1). 미네럴 강화사료는 상용 무기태화 미네럴류와 제조된 유기태화 미네럴 소재류를 현재사료(주)의 산란계 큰병아리용 사료에 첨가되는 미네럴 레시피에 준하여 동일량을 정량 혼합(실험군별)하여 준비하였다.

다. 공시동물

본 연구에서 유기태화 미네럴 소재류를 적용한 미네럴 강화사료의 장기섭이에 따른 기능성 축산물 생산형 현장 유효성평가를 위한 공시동물로는 Hy-line계열 중추 산란계를 사용하였다.

라. 시험구 조성

일반 무기태 미네럴 대비 유기태화 미네럴 소재류를 첨가하여 제조한 사료를 섭이한 산란계의 현장 유효성 평가를 위한 시험구 조성은 다음과 같다.

1) 대조구

(주)현대사료 제품인 큰병아리용 사료를 공급한 군(Normal군)

2) 비교구-1

가) 무기태 칼슘처리구 : 미네럴별 제외 주문사료에 CaCO₃를 0.5(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConCa-0.5), 1배(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConCa-1), 2배(현재사료 함유량 대비 2배 첨가, ConCa-2), 4배(현재사료 함유량 대비 4배 첨가, ConCa-4)

- 나) 무기태 철분처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 FeSO_4 를 0.5(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConFe-0.5), 1배(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConFe-1), 2배(현재사료 함유량 대비 2배 첨가, ConFe-2), 4배(현재사료 함유량 대비 4배 첨가, ConFe-4)
- 다) 무기태 아연처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 ZnSO_4 를 1배(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConZn-1), 2배(현재사료 함유량 대비 2배 첨가, ConZn-2), 4배(현재사료 함유량 대비 4배 첨가, ConZn-4)
- 라) 무기태 구리처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 CuCO_3 를 1배(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConCu-1), 2배(현재사료 함유량 대비 2배 첨가, ConCu-2), 4배(현재사료 함유량 대비 4배 첨가, ConCu-4)
- 마) 무기태 셀레늄처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 Na_2SeO_3 를 1배(현대사료 함유량과 동일량 첨가, ConSe-1), 2배(현재사료 함유량 대비 2배 첨가, ConSe-2), 4배(현재사료 함유량 대비 4배 첨가, ConSe-4)

3) 시험군

- 가) 유기태 칼슘처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 Ca-GHAC를 1배(현대사료 함유량과 동일량 첨가, Ca1-GHAC), 2배(현재사료 함유량 대비 2배 첨가, Ca2-GHAC), 4배(현재사료 함유량 대비 4배 첨가, Ca4-GHAC)처리군
- 나) 유기태 철분처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 CaFe-GHAC를 1배(현대사료 함유량과 비교 철분량 기준 1배 첨가, CaFe1-GHAC), 2배(현재사료 함유량 대비 철분량 기준 2배 첨가, CaFe2-GHAC), 4배(현재사료 함유량 대비 철분량 기준 4배 첨가, CaFe4-GHAC)처리군
- 다) 유기태 아연처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 CaZn-GHAC를 1배(현대사료 함유량과 비교 아연량 기준 1배 첨가, CaZn1-GHAC), 2배(현재사료 함유량 대비 아연량 기준 2배 첨가, CaZn2-GHAC), 4배(현재사료 함유량 대비 아연량 기준 4배 첨가, CaZn4-GHAC)처리군
- 라) 유기태 구리처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 CaCu-GHAC를 1배(현대사료 함유량과 비교 구리량 기준 1배 첨가, CaCu1-GHAC), 2배(현재사료 함유량 대비 구리량 기준 2배 첨가, CaCu2-GHAC), 4배(현재사료 함유량 대비 구리량 기준 4배 첨가, CaCu4-GHAC)처리군
- 마) 유기태 셀레늄처리구 : 미네랄별 제외 주문사료에 CaSe-GHAC를 1배(현대사료 함유량과 비교 셀레늄량 기준 1배 첨가, CaSe1-GHAC), 2배(현재사료 함유량 대비 셀레늄량 기준 2배 첨가, CaSe2-GHAC), 4배(현재사료 함유량 대비 셀레늄량 기준 4배 첨가, CaSe4-GHAC)처리군

마. 산란계 사료섭이 조건

시험용 산란계는 중추를 구입한 후 산란개시전 까지 시험농장(형제농장, 전남화순 소재)에서 사육한 후 산란이 개시되는 시점(0일)에서 준비된 시료를 산란계 1수당 100g/1일으로 전체시험(60일)간 공급하였으며, 기타 사육조건은 대조구와 동일하게 실시하였다. 각 개발 유기태화 사료의 유효성 평가를 위한 공시동물 배치는 10수를 1개 시험군으로

조성하였다.

바. Probiotic 효능평가 방법

무기태화 미네럴 대비 유기태화 미네럴 소재류 첨가 사료를 60일 섭이 후, 산란계를 도살 및 맹장분변 1g내 총균수를 확인함과 동시에 총균수내 유해균(대장균군 및 살모넬라균군)과 유익균(유산균)의 수치를 확인하여 개발 유기태화 소재류의 Probiotic 효능을 평가하였다. Probiotic 평가를 위하여, 분리한 분변을 생리식염수에 혼합 희석하고, 이어서 총균수는 영양육즙배지(PC) 고체배지, 대장균군 및 살모넬라균군의 경우는 MacConkey와 유산균의 경우는 BCP고체배지에 도달한 후, 24시간(37℃)배양 후 형성되는 균수를 비교 확인하였다.

사. 현장 유효성 평가

목표 미네럴 5종을 기준으로 하는 무기태 미네럴 대비 유기태화 미네럴 소재류의 Prebiotic 효능 평가는 2단계로 진행하였다. 1 단계는, Normal(산란계용 큰병아리 사료, 현대사료(주))대비 무기태 미네럴류만을 대상으로 평가하였으며, 2 단계는 역시 Normal 사료 대신 유기태화 미네럴 소재 첨가 사료만을 섭이 시킨 경우로 구분하여 실시 하였다.

Prebiotic 효능은 다음과 같은 기준(순서별 그룹분류)을 설정하여 평가하였는데, 가장 바람직하게(1 그룹)는 총균수와 유익균(유산균)을 동시에 증가시키면서 유해균 감소를 유발 하는 경우와, 2 그룹으로는 총균수는 무변화와 유산균을 증가시키면서 동시에 유해균을 감소시키는 경우, 그리고 3 그룹으로는 총균수와 유산균의 변화는 유발하지 않으면서 유해균만을 선택적으로 감소시키는 경우를 Prebiotic효능이 있는 것으로 평가기준을 설정하였다. 그리고 이외의 그룹은 Prebiotic 효능이 없는 것으로 평가되므로 제품화 후 보고에서 제외하였다.

3. 연구수행결과

개발 핵산 유기태화 미네럴 소재류를 적용한 미네럴 강화사료를 섭이시킨 산란계의 분리균의 Prebiotic 효과 평가를 통한 Prebiotic형 제품개발을 위한 목표로 한 현장유효성 평가 결과는 다음과 같다.

가. 현장 유효성 평가(1단계 : 무기태 미네럴류 첨가 사료군)

본 연구에서는 유기태화 미네럴의 현장 유효성 평가전, 우선 무기태화 미네럴류만을 대상으로 농도별 60일 동안 장기 섭이시 산란계의 장내 미생물의 변화를 우선 비교하여 보았다(Table 2). 무기태 미네럴별 균수변화를 평가하므로서, 이들이 장내 세균에 미치는 증감효과를 평가하여 보았다.

칼슘의 경우는 농도와 상관없이 총균수(대조 대비 1.8배~2배)와 더불어 유해균도 동시에 증가(대조 대비 3배~10배)하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 결국 칼슘의 경우는 장내 미생물과 접촉되면 이들의 생장을 촉발시킬수 있는 효과는 있을수 있으나, 본 과제에서 해결하려는 Prebiotic 소재로서의 접근성은 없는 것으로 평가되었다.

철분의 경우는, 섭이농도가 증가하면 총균수의 증가(대조 대비1.6배)되는데 반하여 유

해균은 최대 75%(ConFe-4)가 감소하는 것으로 확인되었으나, 사료권장 첨가량의 4배 수준인 경우에서 나타나는 결과였다.

아연 처리구의 경우는, 섭이농도가 증가하면 할수록 총균수의 급격한 감소(대조 대비 96% 감소)와 더불어 대장균군 또한 최대 75%가 감소하는 결과를 보였다. 따라서, 무기태 아연은 사료권장농도를 초과하는 경우, 장내 미생물총의 안전성에 심각한 영향을 미칠 수 있을 것으로 평가 되었다.

구리 처리구의 경우는, 대조 대비 섭이농도가 증가하면 총균수는 최대 4.8배를 증가시키는 결과를 보였던 반면에 대장균의 세균수는 오히려 90%이상을 감소시키는 효과를 보여 가장 우수한 Prebiotic 효능을 보였지만 유산균에 대한 증가를 유도할 수 없어 다소 아쉬움이 있다.

셀레늄 처리구의 경우는, 섭이농도가 증가할수록 총균수는 대조 대비 최대 76%까지 감소시키면서 오히려 대장균의 수치는 증가시키는 상반된 결과를 보였다. 이는 셀레늄은 장내 존재하는 일반균에 대한 독성을 유발하고, 농도별 차이에 의해 생존하는 유해균의 증가를 촉발시키는 것으로 평가되었다. 결국 무기태 미네랄류 중에서 가장 Prebiotic 효능을 보유한 소재류는 구리임이 확인되었지만, 농도별 추가시험을 통하여 유산균에 대한 증강효과에 대한 추가 시험이 보장될 필요가 있다.

상기 분석결과를 기준으로 사전 정립한 그룹별 Prebiotic 유효성을 순서적으로 평가하여 보았더니, 총균수와 유익균(유산균)을 동시에 증가시키면서 유해균 감소를 유발하는 1 그룹은 존재하지 않았다. 그리고, 총균수는 무변화와 유산균을 증가시키면서 동시에 유해균을 감소시키는 경우인 2그룹과 최하위 3그룹을 설정한 총균수와 유산균의 변화는 유발하지 않으면서 유해균만을 선택적으로 감소시키는 경우 또한 존재하지 않았다. 결론적으로, Prebiotic 선정기준에 적합한 무기태 미네랄류중 Prebiotic 소재는 선발되지 않았다.

나. 현장 유효성 평가(2 단계 : 유기태화 미네랄류 첨가 사료군)

본 연구에서는 무기태 미네랄류의 평가결과를 기초로 유기태화 소재류를 장기(60일) 섭이시, 장내 미생물총에 미치는 효능을 평가함과 동시에 Prebiotic 선발기준에 부합한 제 품화 소재류 선발을 목표로 현장 유효성 평가를 실시하여 보았다(Table 3~6).

1) CaFe-GHAC

일반사료 섭이균을 포함한 전체 유기태화 미네랄류의 장기간 섭이 후, 장내 균수변화에 미치는 증감효과를 비교한 결과는 다음과 같다(Table 3, Fig 2~3).

일반사료를 섭이시킨 대조구의 경우, 총균수는 1.2×10^7 cfu/g.분변(1배)가 검출되었는데, 대장균군은 3.9×10^5 cfu/g.분변으로 검출되어 총균수 대비 점유율은 2.08%였으며, 유산균군은 검출되지 않았다.

전체 유기태화 미네랄 처리구는 대조구 대비 최소 127%에서 최대 750%의 범위의 총균수 증가효과를 나타내었으며, 농도별 차이는 크게 인정되지 않았다. 총균수에서 0.01% 유산균 점유율을 보였던 대조군 대비 전체 유기태화 미네랄 소재류별 유산균 증감 범위는 최저 0.07%에서 최대 29%의 높은 증가 효과를 나타내었다.

유기태화 미네랄류의 섭이농도가 총균수 대비 유산균 점유율에 미치는 효과를 평가한

결과, 고농도 보다 낮은 섭이농도에서 더욱 효과적임을 동시에 확인 할 수 있었다. 즉, 칼슘 단독 보유형 Ca-GHAC처리구는 0.5배 처리구는 유산균 점유율이 0.15%, 1배는 5.56%, 2배 처리구는 3.75%, 4배처리구는 0.18%의 점유율을 보였다. 또한, 칼슘과 철 동시 보유형 CaFe-GHAC처리구의 경우는 0.5배 섭이군의 총균수 대비 유산균 점유율은 2.05%, 1배 처리구는 29%, 2배 섭이처리구에서는 0.22% 그리고 4배 처리구는 0.07%로 감소하는 경향의 유산균 점유율을 보였다. 결국, 경제성을 고려한 섭이농도와 연계하여 총균수와 유산균의 동시 증가형 Prebiotic소재류는 Ca-GHAC(1배 처리군)보다는 CaFe-GHAC소재류(1배 처리군)가 효과적임이 확인되었다.

유기태화 미네랄 소재류를 섭이시 총균수와 유산균이 동시에 증가성 평가 결과를 기준으로, 본 연구의 핵심목표인 항질병형 Prebiotic제품과 관련한 대장균군 점유율(대조구 점유율 2.58% 기준)과 비교하여 보았다. 결과로서, Ca-GHAC처리군을 4배 섭이군의 분변내 대장균은 대부분 개체에서 불검출되는 결과를 확인하였으며, 2배 섭이한 Ca2-GHAC 처리구가 0.01%, 1배 섭이구는 1.48%로 나타났다. 그러나, 가장 낮은 칼슘을 섭이한 Ca0.5-GHAC처리구는 대장균의 점유율이 5.37%의 나타났으며, 산란계 개체별 편차가 매우 심하였다. 이러한 결과는 항질병과 관련한 Ca-GHAC 소재류의 권장 섭이농도는 1배 이상임을 확인하는 결과였으며, Prebiotic소재로서 선발순서로는 Ca4-GHAC, Ca2-GHAC 그리고 Ca1-GHAC순이었다.

칼슘과 철분 동시 보유형 CaFe-GHAC소재의 농도별 처리가 대장균군의 감소에 미치는 효과를 평가하여 보았다. 결과로서, 가장 높은 농도를 섭이한 CaFe4-GHAC처리구와 CaFe1-GHAC의 대장균군 점유율이 15.2%와 0.61%로 나타났는데, 이러한 결과는 개체별 차이로 인한 결과로 확인되었으며, 이러한 결과는 현장(전체 실험 산란계 개체수를 고려하는 경우)에서는 67%이상의 항질병 효과를 보일 것으로 예측되었다. 그리고, CaFe2와 CaFe0.5-GHAC처리구의 대장균의 불검출 결과는 개체변이와 상관없는 결과였는데, 이러한 결과는 본 연구의 성과목표인 항질병형 Prebiotic 사료첨가 제조 레시피(제품화 관련) 정립시 0.5배~2배(철분기준)범위로 배합이 적절하다고 판단되었으며 현장적용시 우수한 Prebiotic 효능을 보장 할 수 있음을 확인하였다.

결국, CaFe-GHAC소재류를 기준으로 경제성, 섭이농도 및 총균수와 유산균의 동시 증가와 유해균인 대장균군의 감소형 Prebiotic 소재류는 CaFe1~2-GHAC(1배 혹은 2배 처리)로 확정되었다. 결론적으로, 본 연구에서 확인한 유기태화 소재류의 Prebiotic 효능 평가 결과는 다음과 같다.

1. 무기태 미네랄류는 Prebiotic효과(유산균 증대성 포함)가 인정되지 않았으며, 총균수와 대장균군의 증가효능을 보였다.
2. 무기태화 미네랄류 대비 핵산을 기질로 하는 유기태화 미네랄 소재류는 독성이 감소되었으며, Probiotic 및 Synbiotic효과(항질병형, 유해균 선택적 억제형)를 동시에 나타내는 Prebiotic 소재류의 효능을 보유하고 있었다.
3. 칼슘만을 킬레이팅 시킨 Ca-GHAC유기태화 소재는 섭이시 장내 미생물(총균수 및 유산균수)의 성장을 촉진시키며, 2~4배로 섭이시키는 경우 대장균의 감소효과가 탁월한 Prebiotic 효과를 나타냈다(Prebiotic분류 : 1 그룹).
4. 칼슘과 철분을 핵산에 유기태화 시켜 제조한 CaFe-GHAC소재의 경우, 0.5~2배 섭이 범위에서 가장 우수한 prebiotic 효능을 보였다(Prebiotic분류 : 1 그룹).

5. Ca-GHAC보다는 CaFe-GHAC가 더 우수한 Prebiotic 효능을 보였다.
6. CaFe-GHAC의 Prebiotic 효과는 칼슘이 우선 장내 총균수와 유산균의 점유율을 높이는 촉매제 역할을 수행하고, 2차적으로 유기태화 철분이 대장균군의 감소를 유발하는 메카니즘을 보이는 것으로 평가되었다.

2) CaZn-GHAC 소재류

본 연구에서는 무기태화 미네랄별 처리구와 일반사료 섞이구 대비 Ca-GHAC 섞이구에 대한 선행 Prebiotic 평가결과를 비교 기준으로, 역시 칼슘을 기본으로 하되 아연을 추가적으로 킬레이팅 하여 제조한 CaZn-GHAC소재의 Prebiotic형 제품화 가능여부를 평가하여 보았다(Table 4, Fig 4).

유기태화 미네랄 처리구별 총균수 변화를 대조구 대비 비교한 결과, Ca-GHAC 처리구(최소 127%~444%)와 CaZn-GHAC처리구(267%~300%)는 전체적으로 증가하는 패턴을 보였다. 그러나, CaZn4-GHAC처리구의 경우는 고농도 섞이군에서 약 80%가 감소하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 무기태화 칼슘을 고농도로 처리 시, 96%의 총균수 감소를 나타내었던 결과와 비교하면 유기태화에 따라 독성이 높게 감소된 것으로 확인되었다.

다음으로 총균수내 유산균구의 점유율 평가를 통하여 개발 유기태 소재가 Prebiotic 및 장내 Probiotic 효능을 유도하는지 확인하였다. 결과로서, CaZn-GHAC처리구의 경우 CaZn1-GHAC 섞이구의 총균수 대비 13.4%, CaZn2-GHAC처리구는 1.01%, CaZn4-GHAC 처리구는 0.65%로 전체적으로 유산균구의 증가효과를 보였는데, 이는 대조구(일반사료 섞이구)가 0.01%의 점유율을 보였던 것과 비교하면 매우 높은 Probiotic 수치였다. 이러한 결과는 무기태 아연을 처리하는 유산균구가 불검출 검출되었음과 일반사료 섞이구의 0.01% 그리고 비교구인 Ca1-GHAC섞이구가 16.4%(총균수 대조 대비 127%)였음과 CaZn1-GHAC가 13.4%(총균수 대조 대비 267%)의 유산균 검출결과를 비교하면, CaZn1-GHAC내 칼슘에 의하여 총균수와 유산균구가 동시에 증대시키는 효능을 보유함을 알 수 있었고, 결국 수치적인 유산균의 감소가 아닌 총균수내 점유율 차이인 것으로 평가되어 유기태화 아연에 의한 유산균 감소효과는 없는 것으로 확인되었다. 그러나, 최고 고농도를 섞이시킨 CaZn4-GHAC의 경우는 유산균의 점유율이 0.65%로 확인되어 대조구와 비교하면 증가효과를 보이는 것으로 보이지만, 총균수가 대조 대비 22%로 낮음을 고려하면 유기태화 아연이 농도차로 인한 장내 일반균에 독성을 보이면서 대장균과 유산균에 대하여는 피해를 주지 않은 결과로 추측되었다. 결국, 경제성을 고려한 섞이농도와 연계하여 총균수와 유산균의 동시 증가형 Prebiotic소재류는 Ca1-GHAC(1배 처리군)보다는 CaZn1-GHAC소재류(1배 처리군)가 효과적임이 확인되었다.

유기태화 미네랄 소재류를 섞이시 총균수와 유산균이 동시에 증가한 평가 결과를 기준으로, 본 연구의 핵심목표인 항질병형 Prebiotic제품과 관련한 대장균군 점유율(대조구 점유율 2.58% 기준)과 비교하여 보았다. 결과로서, 항질병과 관련한 Ca-GHAC 소재류의 권장 섞이농도는 1배 이상임을 확인하는 결과였으며, Prebiotic소재로서 선발순서로는 Ca4-GHAC, Ca2-GHAC 그리고 Ca1-GHAC순이었다(선행 연구결과 요약, CaFe-GHAC).

칼슘과 철분 동시 보유형 CaZn-GHAC소재의 농도별 처리가 항질병과 관련한 대장균

균의 감소에 미치는 효과를 평가하여 보았다. 결과로서, CaFe1-GHAC의 대장균구 점유율은 0.01%로 전체 CaZn-GHAC 시험군에서 가장 높게 나타났으며, CaZn2-GHAC는 0.03% 그리고 가장 높은 농도 섭이군의 경우는 31.1%의 수치를 보였다. 이중 CaZn4-GHAC의 경우는 개체별 차이로 인한 결과로 확인되었으며, 이러한 결과는 현장(전체 실험 산란계 개체수를 고려하는 경우)에서는 67%이상의 항질병 효과를 보일 것으로 예측되었다. 그리고, CaZn1과 CaZn2-GHAC처리구의 대장균의 불검출 결과는 개체변이와 상관없는 결과였는데, 이러한 결과는 본 연구의 성과목표인 항질병형 Prebiotic 사료첨가 제조 레시피(제품화 관련) 정립시 1배(아연기준)범위로 배합이 적절하다고 판단되었으며 현장적용시 우수한 Prebiotic 효능을 보장 할 수 있음을 확인하였다. 결국, CaZn-GHAC소재류를 기준으로 경제성, 섭이농도 및 총균수와 유산균의 동시 증가와 유해균인 대장균구의 감소형 Prebiotic 소재류는 CaZn1-GHAC소재류(1배 처리군)가 최종 선발 되었다. 결론적으로, 무기태 대비 유기태화 소재류의 Prebiotic 효능평가 결과는 다음과 같다.

1. 무기태 미네랄류는 Prebiotic효과가 인정되지 않았으며, 농도에 비례하여 장내 일반미생물총에 대하여 독성효과를 보였다.
2. 무기태화 미네랄류 대비 핵산을 기질화 유기태화 칼슘 및 아연 소재류는 독성이 감소되었으며, Probiotic 및 Synbiotic효과(항질병형, 유해균 선택적 억제형)를 동시에 나타내는 Prebiotic 소재류의 효능을 보유하고 있었다.
3. 칼슘만을 킬레이팅 시킨 Ca-GHAC유기태화 소재는 섭이시 장내 미생물(총균수 및 유산균수)의 성장을 촉진시키며, 2~4배로 섭이시키는 경우 대장균의 감소효과가 탁월한 Prebiotic 효과를 나타냈다(Prebiotic분류 : 1 그룹).
4. 핵산 기질화 칼슘 및 아연 동시 보유형 CaZn-GHAC소재류의 경우, CaZn1-GHAC 처리구가 가장 우수한 Prebiotic 효능을 보였다(Prebiotic분류:1 그룹).
5. Ca-GHAC보다는 CaZn-GHAC가 더 우수한 Prebiotic효능을 보였다.
6. CaZn-GHAC의 Prebiotic 효과는 칼슘이 우선 장내 총균수와 유산균의 점유율을 높이는 촉매제 역할을 수행하고, 2차적으로 유기태화 아연이 대장균군의 감소를 유발하는 메커니즘을 보이는 것으로 평가되었다.

3) CaCu-GHAC 소재류

본 연구에서는 무기태화 미네랄별 처리구와 일반사료 섭이구 대비 Ca-GHAC 섭이구에 대한 선행 Prebiotic 평가결과를 비교 기준으로, 역시 칼슘을 기본으로 하되 구리를 추가적으로 킬레이팅 하여 제조한 CaCu-GHAC소재의 Prebiotic형 제품화 가능여부를 평가하여 보았다(Table 5, Fig 5).

유기태화 미네랄 처리구별 총균수 변화를 대조구 대비 비교한 결과, Ca-GHAC 처리구(최소 127%~444%)와 CaCu-GHAC처리구(144~147%)는 전체적으로 증가하는 패턴을 보였다. 그러나, CaZn1-GHAC처리구의 경우는 대조 대비 91.6%로 감소하는 결과를 보였는데 이는 공시동물인 산란계의 개체적 차이로 인한 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 무기태화 구리를 농도별 섭이시, 1배 처리구는 180%, 2배는 100% 그리고 4배 처리구는 468%의 총균수 증가를 나타내었던 결과와 비교하면 칼슘과 구리 동시 보유형 CaCu-GHAC소재류는 독성이 없는 것으로 확인되었다.

다음으로 총균수내 유산균구의 점유율 평가를 통하여 개발 유기태화 소재가 Prebiotic 및 장내 Probiotic 효능을 보이는지 확인하였다. 결과로서, CaCu-GHAC처리구의 경우 CaCu1-GHAC 섭취구는 총균수 대비 5.23%, CaCu2-GHAC 처리구는 2% 그리고 CaCu4-GHAC 처리구는 28.2%로 전체적으로 유산균구의 증가효과를 보였는데, 이는 무기태 구리의 불검출, 대조구(일반사료 섭취구)는 0.01%의 점유율을 보였던 것과 비교하면 매우 높은 Probiotic 수치였다. 이러한 결과는 무기태 구리의 처리시는 유산균구가 불검출 검출되었음과 일반사료 섭취구의 0.01% 그리고 비교구인 Ca1-GHAC섭이구가 16.4%(총균수 대조 대비 127%)였음과 CaCu4-GHAC가 28.2%(총균수 : 대조 대비 147%)의 유산균 검출결과를 비교하면, CaZn-GHAC내 칼슘에 의하여 총균수와 유산균구가 동시에 증대시키는 효능을 보유함을 알 수 있었다. 그러나, 최저 농도를 섭이시킨 CaCu1-GHAC의 경우는 총균수가 대조 대비 약 92% 수준 이였음과 이때 유산균의 점유율이 5.29%로 확인되었는데, 이는 유기태화 구리 소재의 섭이에 따른 편차가 크기 때문인 것으로 평가 되었으며, 장내 일반균에 독성을 보이는 이유는 아닌 것으로 평가 되었다. 결국, 경제성을 고려한 섭이농도와 연계하여 총균수와 유산균의 동시 증가형 Prebiotic소재류는 CaCu4-GHAC(4배 처리군) 보다는 Ca1-GHAC(1배 처리군)이 효과적임이 확인되었다.

유기태화 미네랄 소재류를 섭이시 총균수와 유산균이 동시에 증가 된다는 선행 평가 결과를 기준으로, 본 연구의 핵심목표인 항질병형 Prebiotic제품과 관련한 대장균군 점유율(대조구 점유율 : 2.58% 기준)과 비교하여 보았다. 결과로서, 항질병과 관련한 Ca-GHAC 소재류의 권장 섭이농도는 1배 이상임을 확인하는 결과였으며, Prebiotic소재로서 선발순서로는 Ca4-GHAC, Ca2-GHAC 그리고 Ca1-GHAC순이었다(선행 연구결과 요약, CaFe-GHAC).

칼슘과 구리 동시 보유형 CaCu-GHAC소재의 농도별 처리가 항질병과 관련한 대장균군의 감소에 미치는 효과를 평가하여 보았다. 결과로서, CaCu1-GHAC의 대장균군 점유율은 3.94%로 전체 CaCu-GHAC 시험군에서 가장 높게 나타났으며, CaCu2-GHAC는 1.33% 그리고 가장 높은 농도 CaCu4-GHAC섭이군의 경우는 1.23%의 수치를 보였다. 이중 공시동물인 개체별 편차가 가장 적은 시험구는 CaCu4-GHAC였으며 이를 현장에 처리시 100%의 항질병 효과를 보일 것으로 예측되었다. 결국, CaCu-GHAC소재류를 기준으로 경제성, 섭이농도 및 총균수와 유산균의 동시 증가와 유해균인 대장균군의 감소형 Prebiotic소재류는 CaCu4-GHAC소재류(4배 처리군)가 최종 선발되었다. 결론적으로, 본 연구에서 확인한 유기태화 소재류의 Prebiotic 효능평가 결과는 다음과 같다.

1. 무기태 미네랄류는 Prebiotic효과(유산균 증대성 포함)가 인정되지 않았으며, 총균수 증가와 더불어 대장균군의 감소효능을 보였다.
2. 무기태화 미네랄류 대비 핵산을 기질화 유기태화 칼슘 및 Cu소재류는 무독성화 되었으며, Probiotic 및 Synbiotic효과(항질병형, 유해균 선택적 억제형)를 동시에 나타내는 Prebiotic 소재류의 효능을 보유하고 있었다.
3. 단일 칼슘 보유형 Ca-GHAC유기태화 소재는 장내 미생물(총균수 및 유산균수)의 성장을 촉진시키며, 2~4배로 섭이시키는 경우 대장균의 감소효과가 탁월한 Prebiotic 효과를 나타냈다(Prebiotic분류 : 1 그룹).
4. 핵산 기질화 칼슘 및 구리 보유형 CaCu-GHAC소재류의 경우, CaCu4-GHAC처리

구가 가장 우수한 Prebiotic 효능을 보였다(Prebiotic분류 : 1 그룹).

5. CaCu-GHAC처리구는 저농도 섭이시 총균수는 정체, 대장균군과 유산균을 동시에 증가시키는 효능을 보였으나, 1배 이상의 섭이시는 총균수(대조 대비 최대 147%)와 유산균의 증가(대조대비 최대 28%) 그리고 대장균의 감소 효과(대조 대비 109%~210%)는 농도에 비례하여 나타내는 특성을 보였다.
6. Ca-GHAC보다는 CaCu-GHAC가 더 우수한 Prebiotic효능을 보였다.
7. CaCu-GHAC의 Prebiotic 효과는 칼슘이 우선 장내 총균수와 유산균의 점유율을 높이는 촉매제 역할을 수행하고, 2차적으로 유기태화 Cu이 대장균군의 감소를 유발하는 메카니즘을 보이는 것으로 평가되었다.

4) CaSe-GHAC 소재류

본 연구에서는 무기태화 미네랄별 처리구와 일반사료 섭이구 대비 Ca-GHAC 섭이구에 대한 선행 Prebiotic 평가결과를 비교 기준으로, 역시 칼슘을 기본으로 하되 셀레늄을 추가적으로 킬레이팅 하여 제조한 CaSe-GHAC소재의 Prebiotic형 제품화 가능여부를 평가하여 보았다(Table 6, Fig 6).

유기태화 미네랄 처리구별 총균수 변화를 대조구 대비 비교한 결과, Ca-GHAC 처리구(최소 127%~444%)와 CaSe-GHAC처리구(112~511%)는 전체적으로 증가하는 패턴을 보였다. 이러한 결과는 무기태화 셀레늄을 농도별 섭이시, 대조구 대비 1배 처리구는 38%, 2배는 24% 그리고 4배 처리구는 26%의 총균수 감소를 나타내었던 결과와 비교하면 칼슘과 셀레늄 동시 보유형 CaSe-GHAC소재류는 무독성화 된 것으로 평가되었다.

다음으로 총균수내 유산균구의 점유율 평가를 통하여 개발 유기태화 소재가 Prebiotic 및 장내 Probiotic 효능을 보이는지 확인하였다. 결과로서, CaSe-GHAC처리구의 경우 CaSe1-GHAC 섭이구는 총균수 대비 19.6%, CaSe2-GHAC 처리구와 CaSe4-GHAC 처리구는 0.06%로 나타나 유기태화 셀레늄을 섭이시 전체적으로 유산균구의 증가효과를 보였는데, 이는 무기태 구리의 불검출, 대조구(일반사료 섭이구)는 0.01%의 점유율을 보였던 것과 비교하면 매우 높은 Probiotic 수치였다. 이러한 결과는 무기태 셀레늄을 처리하는 유산균구가 불검출 검출되었음과 일반사료 섭이구의 0.01% 그리고 비교구인 Ca1-GHAC섭이구가 16.4%(총균수 대조 대비 127%)였음과 CaSe1-GHAC가 19.6%(총균수 : 대조 대비 112%)의 유산균 검출결과를 비교하면, CaSe-GHAC내 칼슘에 의하여 총균수와 유산균구가 동시에 증대시키는 효능을 보유함을 알 수 있었으며, 나머지 처리군도 차이는 있을지라도 동일한 패턴을 보였다. 결국, 경제성을 고려한 섭이농도와 연계하여 총균수와 유산균의 동시 증가형 Prebiotic소재류는 CaSe1-GHAC(1배 처리군)이 Ca1-GHAC(1배 처리군)보다 효과적임이 확인되었다.

유기태화 미네랄 소재류를 섭이시 총균수와 유산균이 동시에 증가 된다는 선행 평가 결과를 기준으로, 본 연구의 핵심목표인 항질병형 Prebiotic제품과 관련한 대장균군 점유율(총균수 대비 대조구 점유율 : 2.58% 기준)과 비교하여 보았다. 결과로서, 항질병과 관련한 Ca-GHAC 소재류의 권장 섭이농도는 1배 이상임을 확인하는 결과였으며, Prebiotic 소재로서 선발순서로는 Ca4-GHAC, Ca2-GHAC 그리고 Ca1-GHAC순이었다(선행 연구결과 요약, CaFe-GHAC).

칼슘과 셀레늄 동시 보유형 CaSe-GHAC소재의 농도별 처리가 항질병과 관련한 대장

균군의 감소에 미치는 효과를 평가하여 보았다. 결과로서, CaSe1-GHAC의 대장균구 점유율은 0.51%, CaSe2-GHAC는 0.1% 그리고 가장 높은 농도 CaSe4-GHAC섭이균의 경우는 1.03%의 수치를 보였다. 결국, CaSe-GHAC소재류를 기준으로 경제성, 섭이농도 및 총균수와 유산균의 동시 증가와 유해균인 대장균구의 감소형 Prebiotic소재류는 CaSe1-GHAC소재류(1배 처리군)가 최종 선발되었다. 결론적으로, 본 연구에서 확인한 유기태화 소재류의 Prebiotic 효능평가 결과는 다음과 같다.

1. 무기태 미네랄류는 Prebiotic효과가 인정되지 않았으며, 농도에 비례하여 장내 미생물총에 대하여 심각한 독성효과를 보였다.
2. 무기태화 미네랄류 대비 핵산을 기질화 유기태화 칼슘 및 셀레늄 소재류는 무독성화되었으며, Probiotic 및 Synbiotic효과(항질병형, 유해균 선택적 억제형)를 동시에 나타내는 Prebiotic 소재류의 효능을 보유하고 있었다.
3. 단일 칼슘 보유형 Ca-GHAC유기태화 소재는 장내 미생물(총균수 및 유산균수)의 성장을 촉진시키며, 2~4배로 섭이시키는 경우 대장균의 감소효과가 탁월한 Prebiotic 효과를 나타냈다(Prebiotic분류 : 1 그룹).
4. 칼슘 및 셀레늄 동시 보유형 CaSe-GHAC소재류의 경우, CaSe1-GHAC처리구가 가장 우수한 prebiotic 효능을 보였다(Prebiotic분류:1 그룹).
5. CaSe-GHAC처리구는 전체 처리구에서 총균수(대조 대비 112%~511%) 및 유산균군[대조 점유율(0.01%) 대비 0.06~19.6%]을 동시에 증가시키면서 유해균인 대장균군(대조 대비 250%~2500% 감소)의 높은 감소를 효능을 보였다.
6. Ca-GHAC보다는 CaSe-GHAC가 더 우수한 Prebiotic효능을 보였다.
7. CaSe-GHAC의 Prebiotic 효과는 칼슘이 우선 장내 총균수와 유산균의 점유율을 높이는 촉매제 역할을 수행하고, 2차적으로 유기태화 셀레늄이 대장균군의 감소를 유발하는 메커니즘을 보이는 것으로 평가되었다.

Table 1. 유기태화 미네랄 강화 사료 현장 유효성 평가를 위한 기본 사료 조성표(현대사료, 산란용 큰병아리용)

원료사료 (미네랄 종류)		원료사료내 목표미네랄 함유량(%)	1톤사료내 목표미네랄류 함량(mg) 및 배합비	
			함량(mg)/1톤사료	원료배합비율(g/사료1톤)
Ca	CaCO ₃	39.3	102,884	261.79
Fe	FeSO ₄ .H ₂ O	30	55,000	183.33
Zn	ZnSO ₄ .H ₂ O	35	88,000	251.43
Cu	CuSO ₄ .H ₂ O	34	5,500	16.18
Se	Na ₂ SeO ₃	43	300	0.7
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	31	88,000	283.87
I	CaIO ₃	63	1,700	2.7
CO	CoSO ₄ .H ₂ O	33	0	0
합계(g/사료 1톤)				1,000



Fig . 현장유효성 평가용 유기태화 미네랄 강화 사료(정립 사료제조 레시피 적용)

Table 2. 상용 사료첨가제용 무기태 미네랄류의 산란계에 장기(60일) 섭이가 장내 미생물총 변화 확인을 통한 Prebiotic소재류 선발 평가 결과

(CFU/g.분변)

시험군		총균수 (PC)		대장균수 (MacConKey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	증감률 (%)#	검출균수	점유률 (%)\$	검출균수	점유률 (%)#
Normal		2.00E+08	100	4.00E+06	2.00	ND	
칼슘 처리구	ConCa-1	4.00E+08	200	8.00E+07	20.0	ND	
	ConCa-2	2.00E+08	50	1.20E+07	6.00	ND	
	ConCa-4	3.60E+08	180	2.40E+07	6.67	ND	
철분 처리구	ConFe-1	2.00E+08	100	1.20E+07	6.00	ND	
	ConFe-2	1.08E+08	54	1.20E+06	1.11	ND	
	ConFe-4	3.20E+08	160	1.60E+06	0.50	ND	
아연 처리구	ConZn-1	1.24E+08	62	1.20E+07	9.68	ND	
	ConZn-2	1.25E+08	63	1.09E+07	8.70	ND	
	ConZn-4	8.00E+06	4	1.20E+04	0.15	6.40E+06	80
구리 처리구	ConCu-1	3.60E+08	180	8.00E+05	0.22	ND	
	ConCu-2	2.00E+08	100	4.00E+05	0.20	ND	
	ConCu-4	9.36E+08	468	2.00E+07	2.14	ND	
셀레늄 처리구	ConSe-1	7.60E+07	38	2.20E+06	2.89	ND	
	ConSe-2	4.80E+07	24	2.00E+06	4.17	ND	
	ConSe-4	5.20E+07	26	1.60E+06	3.08	ND	

- \$: (시험군별 총균 검출균수/Normal 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100

Table 3. 핵산 기질화 유기태 미네랄류 (CaFe-GHAC)의 산란계에 장기(60일) 섭이가 장내 미생물총 변화 확인을 통한 Prebiotic소재류 선발 평가 결과

시험군		총균수(PC, Cfu/g.feces)			E.coli수 (Mac,Cfu/g.feces)		유산균수 (BCP, Cfu/g.feces)	
		검출균수	점유률# (%)	증감률\$ (%)	검출균수	점유률# (%)	검출균수	점유률# (%)
NORMAL	1	8,000,000	99.5		40,000	0.5	0	0
	2	16,000,000	95.3		744,000	4.65	2,800	0.02
	3	12,000,000	97.4		392,000	2.58	1,400	0.01
	평균	12,000,000	97.4	100	392,000	2.58	1,400	0.01
	표준편차	4,000,000	2.08		352,000	2.08	1,400	0.01
Ca0.5 -GHAC	1	4,000,000	83.5		644,000	16.1	16,000	0.4
	2	724,000,000	100		120,000	0.02	0	0
	3	8,000,000	100		0	0	3,440	0.04
	평균	245,333,333	94.5	2,044	254,667	5.37	6,480	0.15
	표준편차	414,542,318	9.51		342,469	9.29	8,422	0.22
Ca1 -GHAC	1	40,000,000	97.1		1,060,000	2.65	116,000	0.29
	2	1,600,000	98.3		28,000	1.75	0	0
	3	4,000,000	83.6		1,560	0.04	656,000	16.4
	평균	15,200,000	93	127	363,187	1.48	257,333	5.56
	표준편차	21,510,927	89.3		603,603	1.33	350,093	9.39
Ca2 -GHAC	1	28,000,000	95.7		160	0	1,192,000	4.26
	2	16,000,000	95.5		4,000	0.03	720,000	4.5
	3	8,000,000	97.5		0	0	200,000	2.5
	평균	17,333,333	96.2	144	1,387	0.01	704,000	3.75
	표준편차	10,066,446	1.1		2,265	0.01	496,194	1.09
Ca4 -GHAC	1	56,000,000	100		8,000	0.01	12,000	0.02
	2	44,000,000	99.5		0	0	200,000	0.45
	3	60,000,000	99.9		0	0	40,000	0.07
	평균	53,333,333	99.8	444	2,667	0	84,000	0.18
	표준편차	8,326,664	0.23		4,619	0.01	101,430	0.24
CaFe0.5 -GHAC	1	190,000,000	99.9		4,080	0	200,000	0.11
	2	40,000,000	99.9		320	0	20,000	0.05
	3	40,000,000	94		0	0	2,400,000	6
	평균	90,000,000	97.9	750	1,467	0	873,333	2.05
	표준편차	86,602,540	96.6		2,269	0	1,325,192	3.42
CaFe1- GHAC	1	64,000,000	97.7		1,168,000	1.83	320,000	0.5
	2	8,000,000	98.5		400	0.01	120,000	1.5
	3	8,000,000	15		480	0.01	6,800,000	85
	평균	26,666,667	70.4	222	389,627	0.61	2,413,333	29
	표준편차	32,331,615	47.97		674,091	1.05	3,800,281	48.5
CaFe2- GHAC	1	4,000,000	99.5		0	0	20,000	0.5
	2	16,000,000	99.9		1,120	0.01	16,000	0.1
	3	30,000,000	99.9		0	0	20,000	0.07
	평균	16,666,667	99.8	139	373	0	18,667	0.22
	표준편차	13,012,814	0.24		647	0	2,309	0.24
CaFe4- GHAC	1	12,000,000	99.8		40	0	20,000	0.17
	2	4,400,000	54.5		2,000,000	45.45	0	0
	3	38,000,000	99.9		6,800	0.02	20,000	0.05
	평균	18,133,333	84.8	151	668,947	15.16	13,333	0.07
	표준편차	14,047,855	89.3		468,208	10.71	4,714	0.01

- \$: 총균수 증감률, (시험군별 총균 검출균수/Normal 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100

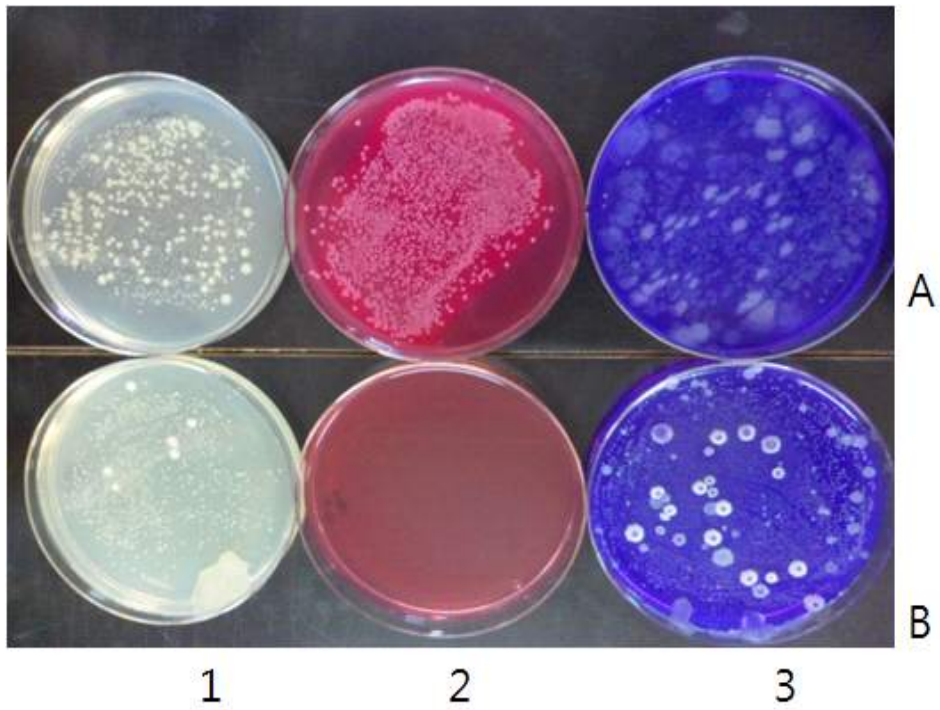


Fig 2. Ca4-GHAC소재료를 산란계에 대하여 농도별 장기(60일) 섭취시 Prebiotic효능 평가결과

A : 재조구(일반사료 섭취구), B : Ca4-GHAC섭이구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

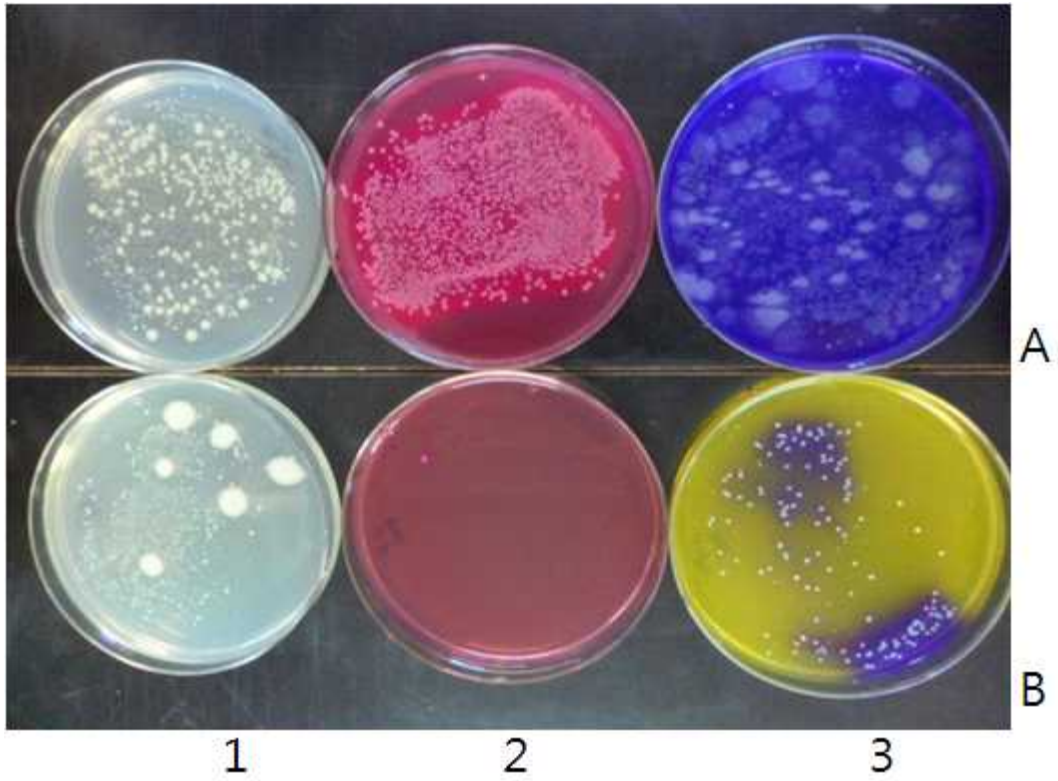


Fig 3. CaFe1-GHAC소재료를 산란계에 대하여 농도별 장기(60일) 섭취시 Prebiotic효능 평가결과

A : 재조구(일반사료 섭취구), B : CaFe1-GHAC섭이구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

Table 4. 핵산 기질화 유기태 미네랄류(CaZn-GHAC)의 산란계에 장기(60일) 섭취가 장내 미생물총 변화 확인을 통한 Prebiotic소재류 선발 평가 결과

시험군		총균수(PC, Cfu/g.feces)			E.coli수 (Mac,Cfu/g.feces)		유산균수 (BCP, Cfu/g.feces)	
		검출균수	점유률# (%)	증감률\$ (%)	검출균수	점유률# (%)	검출균수	점유률# (%)
NORMAL	1	8,000,000	99.5		40,000	0.5	0	0
	2	16,000,000	95.3		744,000	4.65	2,800	0.02
	3	12,000,000	97.4		392,000	2.58	1,400	0.01
	평균	12,000,000	97.4	100	392,000	2.58	1,400	0.01
	표준편차	4,000,000	2.08		352,000	2.08	1,400	0.01
Ca0.5-GHAC	1	4,000,000	83.5		644,000	16.1	16,000	0.4
	2	724,000,000	100		120,000	0.02	0	0
	3	8,000,000	100		0	0	3,440	0.04
	평균	245,333,333	94.5	2,044	254,667	5.37	6,480	0.15
	표준편차	414,542,318	9.51		342,469	9.29	8,422	0.22
Ca1-GHAC	1	40,000,000	97.1		1,060,000	2.65	116,000	0.29
	2	1,600,000	98.3		28,000	1.75	0	0
	3	4,000,000	83.6		1,560	0.04	656,000	16.4
	평균	15,200,000	93	127	363,187	1.48	257,333	5.56
	표준편차	21,510,927	89.3		603,603	1.33	350,093	9.39
Ca2-GHAC	1	28,000,000	95.7		160	0	1,192,000	4.26
	2	16,000,000	95.5		4,000	0.03	720,000	4.5
	3	8,000,000	97.5		0	0	200,000	2.5
	평균	17,333,333	96.2	144	1,387	0.01	704,000	3.75
	표준편차	10,066,446	1.1		2,265	0.01	496,194	1.09
Ca4-GHAC	1	56,000,000	100		8,000	0.01	12,000	0.02
	2	44,000,000	99.5		0	0	200,000	0.45
	3	60,000,000	99.9		0	0	40,000	0.07
	평균	53,333,333	99.8	444	2,667	0	84,000	0.18
	표준편차	8,326,664	0.23		4,619	0.01	101,430	0.24
CaZn1-GHAC	1	60,000,000	99.8		16,000	0.03	80,000	0.13
	2	12,000,000	60		0	0	4,800,000	40
	3	24,000,000	99.8		0	0	40,000	0.17
	평균	32,000,000	86.6	267	5,333	0.01	1,640,000	13.43
	표준편차	24,979,992	23		9,238	0.02	2,736,713	23.01
CaZn2-GHAC	1	32,000,000	97.8		17,200	0.05	680,000	2.13
	2	48,000,000	99.2		80	0	400,000	0.83
	3	28,000,000	99.9		12,800	0.05	20,000	0.07
	평균	36,000,000	99	300	10,027	0.03	366,667	1.01
	표준편차	10,583,005	98.9		8,891	0.03	331,260	1.04
CaZn4-GHAC	1	1,160,000	6.9		1,080,000	93.1	200	0.02
	2	4,000,000	99.5		800	0.02	20,000	0.5
	3	2,800,000	98.4		4,000	0.14	40,000	1.43
	평균	2,653,333	68.3	22	361,600	31.1	20,067	0.65
	표준편차	1,425,669	53.16		622,155	53.7	19,900	0.72

- \$: 총균수 증감률, (시험군별 총균 검출균수/Normal 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100



Fig 4. CaZn 1-GHAC소재료를 산란계에 대하여 농도별 장기(60일) 섭취시 Prebiotic효능 평가결과

A : 재조구(일반사료 섭취구), B : CaZn 1-GHAC섭이구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

Table 5 hexan 기질화 유기태 미네랄류(CaCu-GHAC)의 산란계에 장기(60일) 섭취가 장내 미생물총 변화 확인을 통한 Prebiotic소재류 선발 평가 결과

시험군		총균수(PC, Cfu/g.feces)			E.coli수 (Mac,Cfu/g.feces)		유산균수 (BCP, Cfu/g.feces)	
		검출균수	점유률# (%)	증감률\$ (%)	검출균수	점유률# (%)	검출균수	점유률# (%)
NORMAL	1	8,000,000	99.5		40,000	0.5	0	0
	2	16,000,000	95.3		744,000	4.65	2,800	0.02
	3	12,000,000	97.4		392,000	2.58	1,400	0.01
	평균	12,000,000	97.4	100	392,000	2.58	1,400	0.01
	표준편차	4,000,000	2.08		352,000	2.08	1,400	0.01
Ca0.5 -GHAC	1	4,000,000	83.5		644,000	16.1	16,000	0.4
	2	724,000,000	100		120,000	0.02	0	0
	3	8,000,000	100		0	0	3,440	0.04
	평균	245,333,333	94.5	2,044	254,667	5.37	6,480	0.15
	표준편차	414,542,318	9.51		342,469	9.29	8,422	0.22
Ca1 -GHAC	1	40,000,000	97.1		1,060,000	2.65	116,000	0.29
	2	1,600,000	98.3		28,000	1.75	0	0
	3	4,000,000	83.6		1,560	0.04	656,000	16.4
	평균	15,200,000	93	127	363,187	1.48	257,333	5.56
	표준편차	21,510,927	89.3		603,603	1.33	350,093	9.39
Ca2 -GHAC	1	28,000,000	95.7		160	0	1,192,000	4.26
	2	16,000,000	95.5		4,000	0.03	720,000	4.5
	3	8,000,000	97.5		0	0	200,000	2.5
	평균	17,333,333	96.2	144	1,387	0.01	704,000	3.75
	표준편차	10,066,446	1.1		2,265	0.01	496,194	1.09
Ca4 - GHAC	1	56,000,000	100		8,000	0.01	12,000	0.02
	2	44,000,000	99.5		0	0	200,000	0.45
	3	60,000,000	99.9		0	0	40,000	0.07
	평균	53,333,333	99.8	444	2,667	0	84,000	0.18
	표준편차	8,326,664	0.23		4,619	0.01	101,430	0.24
CaCu1 -GHAC	1	4,000,000	88.6		56,000	1.4	400,000	10
	2	28,000,000	94.7		800	0	1,480,000	5.29
	3	960,000	89.2		100,000	10.4	4,000	0.42
	평균	10,986,667	90.8	91.6	52,267	3.94	628,000	5.23
	표준편차	14,812,175	3.38		49,705	5.65	763,958	4.79
CaCu2 -GHAC	1	16,000,000	94.3		920,000	5.75	0	0
	2	24,000,000	98.7		400	0	320,000	1.33
	3	12,000,000	94		160,000	1.33	560,000	4.67
	평균	17,333,333	95.6	144	360,133	2.36	293,333	2
	표준편차	6,110,101	94.6		491,382	3.01	280,951	2.4
CaCu4 -GHAC	1	50,000,000	99.7		0	0	168,000	0.34
	2	1,720,000	96.3		48,000	2.79	16,000	0.93
	3	1,200,000	15.8		10,800	0.9	1,000,000	83.33
	평균	17,640,000	70.6	147	19,600	1.23	394,667	28.2
	표준편차	28,025,788	47.49		25,181	1.42	529,714	47.75

- \$: 총균수 증감률, (시험군별 총균 검출균수/Normal 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100

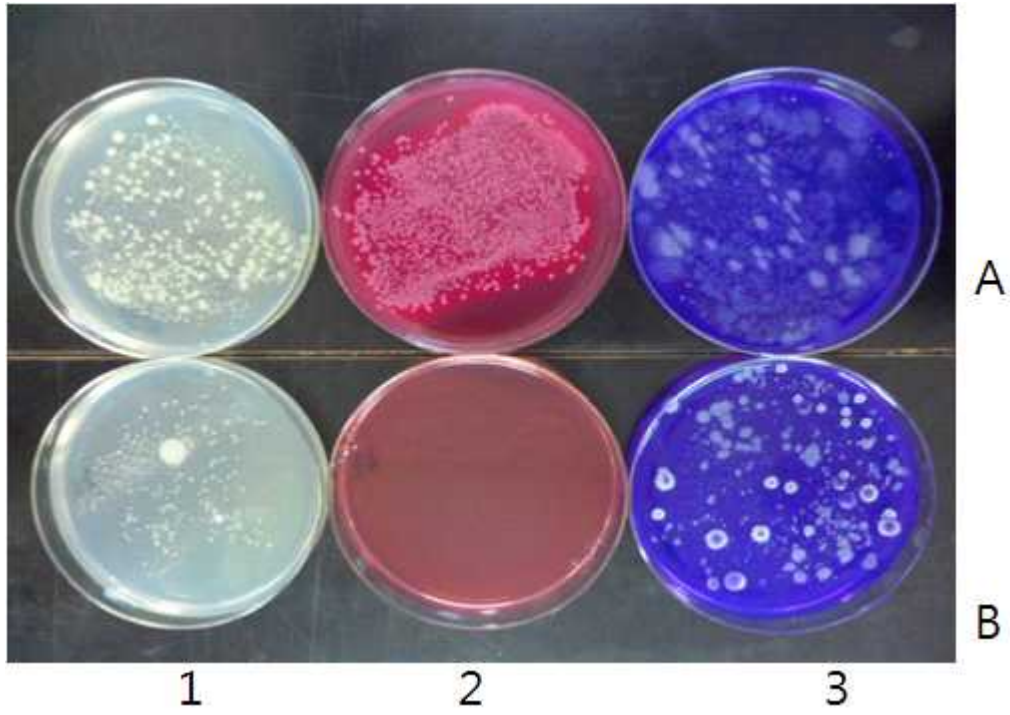


Fig 5. CaCu4-GHAC소재료를 산란계에 대하여 농도별 장기(60일) 섭취시 Prebiotic효능 평가결과

A : 재조구(일반사료 섭취구), B : CaCu4-GHAC섭이구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

Table 6 hexan 기질화 유기태 미네랄류(CaSe-GHAC)의 산란계에 장기(60일) 섭이가 장내 미생물총 변화 확인을 통한 Prebiotic소재류 선발 평가 결과

시험군		총균수 (PC, Cfu/g.feces)			E.coli수 (Mac,Cfu/g.feces))		유산균수 (BCP, Cfu/g.feces)	
		검출균수	점유률# (%)	증감률\$ (%)	검출균수	점유률# (%)	검출균수	점유률# (%)
NORMAL	1	8,000,000	99.5		40,000	0.5	0	0
	2	16,000,000	95.3		744,000	4.65	2,800	0.02
	3	12,000,000	97.4		392,000	2.58	1,400	0.01
	평균	12,000,000	97.4	100	392,000	2.58	1,400	0.01
	표준편차	4,000,000	2.08		352,000	2.08	1,400	0.01
Ca0.5 -GHAC	1	4,000,000	83.5		644,000	16.1	16,000	0.4
	2	724,000,000	100		120,000	0.02	0	0
	3	8,000,000	100		0	0	3,440	0.04
	평균	245,333,333	94.5	2,044	254,667	5.37	6,480	0.15
	표준편차	414,542,318	9.51		342,469	9.29	8,422	0.22
Ca1 -GHAC	1	40,000,000	97.1		1,060,000	2.65	116,000	0.29
	2	1,600,000	98.3		28,000	1.75	0	0
	3	4,000,000	83.6		1,560	0.04	656,000	16.4
	평균	15,200,000	93	127	363,187	1.48	257,333	5.56
	표준편차	21,510,927	89.3		603,603	1.33	350,093	9.39
Ca2 -GHAC	1	28,000,000	95.7		160	0	1,192,000	4.26
	2	16,000,000	95.5		4,000	0.03	720,000	4.5
	3	8,000,000	97.5		0	0	200,000	2.5
	평균	17,333,333	96.2	144	1,387	0.01	704,000	3.75
	표준편차	10,066,446	1.1		2,265	0.01	496,194	1.09
Ca4 -GHAC	1	56,000,000	100		8,000	0.01	12,000	0.02
	2	44,000,000	99.5		0	0	200,000	0.45
	3	60,000,000	99.9		0	0	40,000	0.07
	평균	53,333,333	99.8	444	2,667	0	84,000	0.18
	표준편차	8,326,664	0.23		4,619	0.01	101,430	0.24
CaSe1 -GHAC	1	12,000,000	98.7		5,080	0.93	44,000	0.37
	2	2,400,000	41.2		111,600	0.43	1,400,000	58.33
	3	26,000,000	99.7		10,400	0.16	40,000	0.15
	평균	13,466,667	79.9	112	42,360	0.51	494,667	19.62
	표준편차	11,868,165	33.47		60,023	0.39	784,044	33.53
CaSe2 -GHAC	1	16,000,000	99.7		40,000	0.25	16,000	0.1
	2	8,000,000	99.9		0	0	5,600	0.07
	3	52,000,000	99.9		26,000	0.05	10,000	0.02
	평균	25,333,333	99.8	211	22,000	0.1	10,533	0.06
	표준편차	23,437,861	0.16		20,298	0.13	5,220	0.04
CaSe4 -GHAC	1	12,000,000	99.8		2,000	0.02	20,000	0.17
	2	4,000,000	97		120,000	3	0	0
	3	168,000,000	99.9		100,000	0.06	20,000	0.01
	평균	61,333,333	98.9	511	74,000	1.03	13,333	0.06
	표준편차	92,462,605	1.66		63,151	1.71	11,547	0.09

- \$: 총균수 증감률, (시험군별 총균 검출균수/Normal 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100

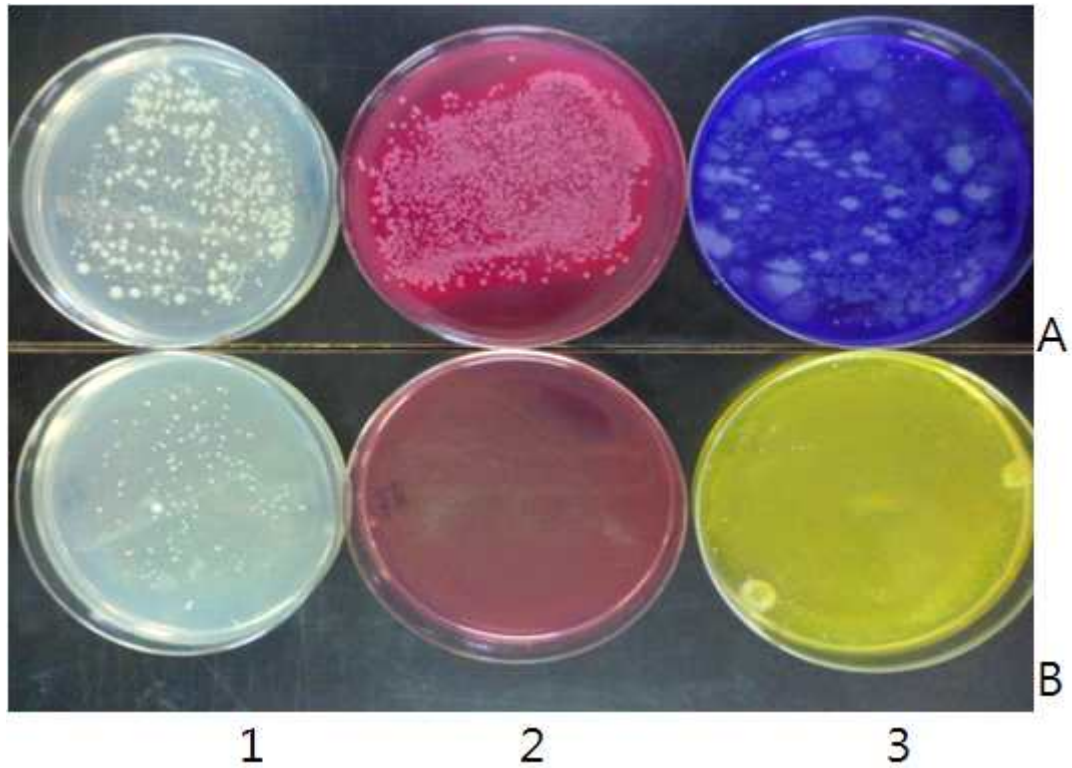


Fig 3. CaSe1-GHAC소재료를 산란계에 대하여 농도별 장기(60일) 섭취시 Prebiotic효능 평가결과
 A : 재조구(일반사료 섭취구), B : CaSe1-GHAC섭이구
 1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

제 4 절 산란계 맹장 분리균에 대한 유기태 미네랄 소재류의 Probiotic 효능 증대성 메카니즘 평가(*in vitro*)

1. 연구목적

본 연구는 무기태 및 유기태화 미네랄 소재류를 적용 제조한 미네랄 강화사료를 공시동물로 산란계를 대상으로 60일간 섭이시, Probiotic 효능을 보유함을 확인하였다(제 3-6-1절 참조). 이를 해결하기 위한 수단으로서, 현장유효성 평가가 종료되는 시점에서 분리한 맹장균내 야생균으로서 일반균, 대장균군 및 유산균으로 각각 구분하여 확보한 후 이들을 공시균으로 하여 유기태화 소재류를 농도별 처리함으로서 이들 소재류가 실제적으로 Probiotic 관련 효능을 보유하는지를 입증하고 저 하였다. 최종적으로, 단일균 복합균에 개발 유기태화 소재류가 이들 공시균의 성장증감에 미치는 효과와 동시에 Probiotic효과를 유도하는 경쟁성을 보이는가와 더불어 현장유효성 평가와의 연계성을 확인함으로서 개발 유기태화 미네랄 소재류의 항질병 메커니즘을 최종 평가 하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

현장 분리 공시균에 대한 유기태화 소재류의 Probiotic효능 평가를 위한 연구수행방법은 다음과 같이 실시하였다.

가. 공시균 준비

우선 연구간 사용되는 실험용 공시균주는 다음과 같이 준비하였다. 즉, 유기태화 미네랄 소재류를 60일 섭이한 현장시험 중 산란계 맹장내 분변을 무균상태에서 채취하여 사용하였는데, 이들 분변 중 대한 Probiotic 효능이 있음을 증명한 분변만을 선발하였다. 다음으로는 선발된 분변을 생리적 식염수에 필요배수로 희석한 후, 이들을 PC배지(일반균 확보용), MacConkey배지(대장균군 및 살모넬라균군 확보용) 그리고 BCP배지(유산균군 분리 확보용)에 50uL씩 도말하고 24시간(37℃) 배양하였다. 그리고, 각 배지별 성장균 중 계대 과정을 거쳐 분리한 균을 물리 및 이화학적 검사를 거쳐 최종 야생형 일반균과 대장균, 살모넬라균 그리고 유산균으로 구분하여 이를 전체 시험간 공시균주로 사용하였다. 이중 살모넬라균은 현장시험간 유기태화 소재류 섭이균에서 검출되지 않아 전남대 수의대 조류질병학실에 의뢰된 현장 가금류에서 분리한 *Salmonella gallinarum*을 공시균으로 추가하여 사용하였다.

나. 실험장소

본 실험은 전남대 수의대 미생물학실에서 보건학적 안전성에 주의하면서 실행하였다.

다. 시험재료

분리된 야외균주에 대한 개발 유기태화 소재류의 Probiotic효능 평가를 위한 소재준비는 다음과 같다.

1) 대조시료

본 연구간 시험시료로 사용한 유기태화 미네랄 소재류의 제조시 원료는 핵산과 유청 단백질임에 따라 이들에 공시균에 미치는 효과를 기준으로 시험시료인 유기태화 미네랄류

의 Probiotic 효능을 비교 평가가 가능하다 할 수 있다. 즉, 원료인 핵산과 유단백질을 대조시료로 준비하여 사용하였는데, 이중 핵산류는 GMP(5'-구아닐산이나트륨(수용성, 순도 100%, 이하 GMP), 5'-이노신산이나트륨, (수용성, 순도 100%, 이하 IMP)를 그리고 유단백질류는 치즈를 제조하고 분말건조한 Whey Protein(매일유업, 한국, 이하 WPS)를 대조시료로 사용하였다.

2) 비교시료

본 연구에 사용된 시료가 칼슘을 기본으로 하여 제조된 만큼 동물성 공시균의 먹이원으로 활용되는 WPS를 기질로 하여 제조된 Ca-WPS(Ca함유량 : 38,800ppm)를 준비하여 칼슘의 공시균에 미치는 효과를 평가하고 저 하였다.

3) 시험시료

핵산을 기질로 유기태화 미네랄 제조와 현장 적용성 평가시, Prebiotic효능이 입증된 CaZn-GHAC를 기본시료로 적용하되, 동일한 제조과정을 거치되 핵산 기질만을 GMP에서 IMP로 교체하여 제조한 CaZn-IHAC를 우선 준비하여 시험시료로 적용하였다. 이는 기본적으로는 CaZn-GHAC에 대하여 Probiotic효능을 평가하되, 화학구조와 미네랄 킬레이팅 반응 패턴이 유사한 핵산 유기태화 미네랄 소재류의 효과를 동시에 비교 하고 저 함에 목적을 두었다. 시험용 공시균 준비는 동일한 영양육즙배지에 준비된 공시균별 배양과정을 거쳐 준비한후 시험간 필요에 따라 적절한 균수를 희석하여 사용하였다.

4) 평가 시료내 미네랄 함유량 조사

시험시료는 ICP분석을 거쳐 목표 미네랄을 포함한 16종의 미네랄류별 함유량을 확인하였다.

5) 시험액 준비

공시균에 대한 시험시료별 Prebiotic효능 평가를 위한 시험액 조성은 다음과 같다. 대조구는 영양육즙배지에 공시균별 선배양액을 동일량으로 접종하되 시험시료만을 단지 투입하지 않은 시험군으로 하였다. 비교군은 영양육즙배지에 단일 혹은 복합균 배양액을 접종한 후 농도별 시험시료를 첨가 한 경우를 비교구로 하였으며, 이때 시험시료로서는 GMP, IMP 및 WPS를 적용하였다. 시험구는 유기태 미네랄 소재류인 Ca-WPS, CaZn-GAHC 그리고 CaZn-IHAC를 사용하는 이외는 비교구와 동일하게 처리하였다. 즉, 우선 동일량의 영양육즙배지를 충전한 시험관에 준비된 시험시료별로 0.01%, 0.05% 그리고 0.1%(v/w)되게 투여 및 혼합한 후 이를 멸균처리를 실시하였다. 그리고, 시험물질별 및 농도별 조성이 다르게 준비된 멸균처리 된 시험배지에 사전 배양된 공시세균을 단일균 또는 복합균 형태로 투여한 후 배양(37°C, 48시간)하였다.

라. Prebiotic 효과 평가방법

본 연구는 공시균인 일반균, 대장균, 살모넬라, 유산균을 사용하여 단일균별 혹은 복합균별로 배지 조건을 다르게 한 조건에서, 시험시료의 농도별 Prebiotic효능을 평가하였

다, 즉, 시료별 접촉시간이 48시간 경과한 균배양액을 선택적 고체배지에 도말 및 48시간 배양과정을 거쳐 형성되는 콜로니 수를 계측 및 비교함으로써 효능을 확인하는 방법으로 평가를 실시하였다. 이를 위하여, 총균수와 일반균은 PC배지, 대장균은 MacConkey배지 그리고 유산균은 BCP고체배지를 사용하였다. Prebiotic 효능 평가는, 대조구와 비교구 대비 시험물질이 총균수와 유산균을 동시에 증가 시키면서 유해균인 대장균수의 감소를 유발하는지를 기준으로 평가하였다. 이를 위한 Prebiotic평가는 3단계로 분리하여 다음과 같이 실시하였다.

1) 대장균 기준 Prebiotic효과 평가(1 단계)

본 연구는 우선 농도별 조성된 시험물질별에 대하여 공시균인 일반균, 대장균 및 유산균별(Table 3) 및 복합균 형태(Table 4)로 접종한 후 성장패턴을 비교하여 시험시료별 Prebiotic효능을 확인하였다.

2) 대장균 및 살모넬라 동시 접종조건 기준 Probiotic효과 평가(2 단계)

본 연구는 우선 농도별 조성된 시험물질별에 대하여 공시균을 일반균, 대장균, 살모넬라균 및 유산균에 대하여 단일균(Table 5) 및 복합균(Table 6) 형태로 접종한 후 성장패턴을 비교하여 시험시료별 Prebiotic효능을 확인하였다.

3) 살모넬라균 기준 Probiotic효과 평가(3 단계)

본 연구는 우선 농도별 조성된 시험물질별에 대하여 공시균을 일반균, 살모넬라 및 유산균에 대하여 단일균(Table 7) 및 복합균(Table 8) 형태로 접종한 후 성장패턴을 비교함으로써 시험시료별 Prebiotic효능을 확인하였다

3. 연구수행결과

가. 평가 시료내 미네랄 함유량 조사

원료 WPS의 경우는 칼슘이 0.3% 그리고 이를 기질로 제조된 Ca-WPS의 구성은 칼슘의 함유량이 약 3.88% 함유하고 있었으며, 아연은 두시료 모두 불검출되었다(Table 1).

핵산중 GMP내 칼슘은 약 36ppm을 그리고 IMP의 경우는 칼슘은 불검출 되었으며, 아연의 경우는 두 시료 모두 검출되지 않았는데, 칼슘과 아연을 동시에 유기태화 시킨 CaZn-GHAC는 칼슘과 아연을 12.5% 및 약 3.13%를 함유하고 있었으며, CaZN-IHAC는 칼슘 7.6%와 아연은 3.62%를 함유하고 있었다(Table 2).

나. Prebiotic 효과 평가방법

1) 대장균 기준 Prebiotic효과 평가(1 단계)

본 연구는 우선 농도별 조성된 시험물질별에 대하여 공시균인 일반균, 대장균 및 유산균별(Table 3) 및 복합균 형태(Table 4)로 접종한 후 성장패턴을 비교하여 시험시료별 Prebiotic효능을 확인하였으며, 결과는 다음과 같다(Table 9~10).

가) 단일균 처리효과

우선 단일균(대장균 기준)에 대한 시험소재별로 그리고 이들을 농도별로 처리한 경우에서 단일 공시균별의 성장에 미치는 효과를 평가하였으며, 이 결과를 토대로 복합균에 대한 동일시험소재류의 Prebiotic효능을 평가하고 저 하였다(Table 9, Fig 1~4). 농도별로 조성된 시험소재별에 대하여 공시균의 접촉이 이루어진 후 48시간이 경과시, 대조구 대비 성장에 미치는 효과를 평가하여 보았다. WPS계열의 경우에는, 유기태화 기질이었던 WPS와 유기태화-칼슘 소재류는 농도에 상관없이 대부분의 농도에서 100%이상의 성장효과를 보였다. 이러한 결과는 단일균에 대하여 독성효과는 없으며 오히려 증식효과를 촉진한다는 결과라고 확인되었다. 또한, 공시균에 대하여 시험물질이 성장촉진에 미치는 효과를 보았더니, 대장균이 가장 성장이 빠르게 이루어지는 것으로 평가되었으며, 다음으로 일반균 및 유산균의 순서로 었으며, 소재별로는 유의한 차이를 보이지 않았다. GMP계열에서의 효과를 평가하여 본 결과, 일반균과 대장균의 경우에는 WPS계열과 유사한 결과를 보였다. 그러나, 유산균의 경우에는 CaZn-GHAC소재를 농도별로 처리에서 대조 대비 0.01% 처리구에서는 80%, 0.05% 처리구에서는 43% 그리고 고농도 처리군인 0.1% 처리구에서는 90%범위로 성장효과가 감소되는 것으로 평가되었다. 따라서, 현장유효성 평가에서 안전하였던 CaZn-GHAC소재류는 실험실적 실험에서는 유산균에 대하여 다소 독성을 보유하는 것으로 비교평가 되었다.

핵산류중 IMP계열에서의 효과를 살펴보았더니, 일반균과 대장균의 경우에는 IMP계열의 소재류도 WPS 및 GMP계열의 소재류와 유사하게 농도와 상관없이 공시균의 성장촉진효과를 보이는 결과를 보였다. 유산균의 경우에는 IMP를 농도별 처리시 저농도인 0.01% 처리구에서는 대조 대비 147%의 균성장 효과를 보였음에 비하여 농도에 비례하여 97% 및 77%로 감소하는 경향을 보였는데, 유기태화 CaZn-IHAC도 유사한 경향을 보였다. 핵산계열의 원료 및 유기태화 미네랄 소재류는 실험실적 평가에서는 0.05%이상의 농도에서는 유산균의 성장을 다소 감소시키는 결과를 확인 하였다. 따라서, 현장유효성 평가에서 안전하였던 핵산계열의 소재류는 유산균에 대하여는 실험실적 실험에서는 유산균에 대하여 다소 독성을 보유하는 것으로 비교평가 되었다.

나) 복합균 처리효과

본 연구에서는 사전에 준비된 단일균과 소재류를 농도별로 처리시, 공시균의 성장증감에 미치는 효과와 동시에 Probiotic효과를 유도하는 경쟁성을 보이는가와 현장유효성 평가와의 연계성을 확인함으로써 개발 유기태화 미네랄 소재류의 항질병 메카니즘을 최종 평가하고 저 하였다(Table 10, Fig 7~9). 우선 3종 공시균을 혼합한 경우에서, 대조 대비 총균수를 기준으로 소재별 및 이들의 농도별 접촉이 이들 공시균에 대하여 증감에 미치는 효과를 평가함으로써 소재류의 안전성 및 Probiotic효과를 평가하여 보았다. WPS계열중 WPS처리구의 경우는 전체농도에서 최저 103%에서 최대 241% 범위의 총균수 증가효과를 보였으나, 유기태화 소재인 Ca-WPS의 경우에는 0.1%의 고농도를 처리한 경우에서 79%의 성장 저감효과를 보였다. 이러한 결과는 단일균별 처리시 모든 공시균에 대하여 100%의 성장촉진 효과를 보였던 점과, 현장유효성 평가에서 Ca-WPS소재류를 섭이시 농도 비례적으로 총균수 증가와 더불어 Prebiotic효과가 뛰어났던 점을 비교하면, 본 실험에서의 결과는 Ca-WPS소재류를 농도별로 접촉한 3종 공시균중 유산균이 비례적으

로 증가하면서 일반균과 대장균을 소멸시키면서 결국 유산균이 대부분을 점유하는 결과로 기인한 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 종합하면 Ca-WPS 소재류는 가축이 섭이시 Prebiotic효능을 보유하면서 2차적으로 장내 Probiotic효과와 더불어 유해균을 감소시키는 Synbiotic소재임이 확인되었다. 핵산 GMP계열이 3종 복합균에 미치는 효과를 대조구 대비 비교하여 보았더니, 총균수의 경우는 GMP는 농도 의존적 증가 효과를 보였는데, 저농도인 0.01%를 처리시 79%였던 결과가 0.05%에서는 110% 그리고 0.1%의 고농도 처리구에서는 145%로 농도 의존적 증가효과를 보였다. 총균수를 기준으로 대장균구(대조구 점유율 28%)와 유산균구(대조구 점유율 55%) 및 일반균구(대조구 점유율 17%)의 변화를 확인하여 보았더니, GMP 처리구는 대장균의 점유율이 최저 60%에서 최대 89%의 분포를 보인 반면에 유산균은 11~38% 그리고 일반균구는 0~19%의 낮은 점유율을 보였다. 따라서, GMP는 일반균과 유산균의 증가 효과보다는 대장균의 성장효과에 가장 영향을 미치는 것으로 평가되었으며 농도가 높아지면 유산균은 증가하면서 동시에 대장균은 감소하는 경향을 보였으나 Prebiotic 효능과의 유의성은 인정할 수 없는 수준이었다.

GMP가 혼합균에 미치는 효과를 기준으로 CaZn-GHAC의 효과를 비교하여 보았더니, 총균수는 100%이상 이었으며, 공시균별 증감효과를 비교하여 보았더니 일반균은 21~57% 그리고 유산균이 35~48%로 대부분을 점유하고 있었으며, 대장균구의 경우는 저농도 처리시 28%의 점유율을 보였으나 0.05%와 0.1% 처리시는 3~9%의 점유율 수치를 보였다. 이러한 결과를 기준으로 복합균 처리시, pH변화를 확인 함으로서, 유기태화 섭이에 따른 현장가축의 장내 이화학적 환경변화를 유발 시킬 수 있을지를 최종 확인하였더니, 전체적인 pH는 6.8~7.0(대조 : 6.98)범위를 나타내었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄 소재류의 가축섭이시 장내에서 이화학적 변화를 유발하지 않음을 간접적으로 확인하는 결과였다. 결국, GMP계열의 경우 유기태화 기질인 GMP는 Prebiotic효과를 보유하기는 커녕 오히려 대장균의 증대와 유익균 및 일반균의 감소를 유발하는 결과를 나타냈으나, 유기태화 소재로 개발된 CaZn-GAHC소재류는 이와는 반대로 유해균인 대장균을 억제하고 유산균과 일반균을 증대 시키는 우수한 Prebiotic효과를 나타내었다. 이러한 결과는 단일균별 처리시험에서는 전체 GMP계열 소재류는 대장균과 일반균의 증대성을 보이는 반면에 유산균의 감소효과를 유발하였던 점과 CaZn-GHAC를 산란계에 섭이시켰을 때의 우수한 Prebiotic 효능을 보였던 결과를 본 시험결과와 연계하면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 즉, CaZn-GAHC소재는 장내에 도달하면 pH변화 등의 변화없이 일반균과 유산균을 증식시키는 Probiotic효과를 유발하고 유해균을 급격하게 억제시키는 Synbiotic 소재로서 효능을 발휘하는 항질병 메카니즘을 보유하고 소재임이 평가 되었다.

GMP계열의 Prebiotic효과를 기준으로 동일 핵산류중 화학구조와 특성이 유사한 IMP만을 GMP와 대체하여 제조한 CaZn-IHAC의 Prebiotic효과 평가를 통하여, 이중 핵산류의 효능을 평가하여 보았더니 역시 GMP계열의 효능과 유사한 항질병 메카니즘을 보유하고 있음이 평가 되었다. 결론적으로, 본 실험을 통하여 핵산과 유단백질을 기질로 하여 제조한 유기태화 소재류는 우수한 Prebiotic소재임이 확인함과 동시에 이들의 항질병 메타니즘을 확인하는 우수한 결과를 확보하였다.

2) 대장균 및 살모넬라 동시 접종조건 기준 Probiotic효과 평가(2 단계)

본 연구는 우선 농도별 조성된 시험물질별에 대하여 공시균을 일반균, 대장균, 살모넬라

균 및 유산균에 대하여 단일균(Table 11) 및 복합균(Table 12) 형태로 접종한 후 성장 패턴을 비교하여 시험시료별 Prebiotic효능을 확인하였다.

가) 단일균 처리효과

우선 단일균(대장균 및 살모넬라균 기준)에 대한 시험소재별로 그리고 이들을 농도별로 처리한 경우에서 단일 공시균별의 성장에 미치는 효과를 평가하였으며, 이 결과를 토대로 복합균에 대한 동일시험소재류의 Prebiotic효능을 평가하고 저 하였다(Table 11, Fig 10~12.). 농도별로 조성된 시험소재별에 대하여 공시균의 접촉이 이루어진 후 48시간이 경과시, 대조구 대비 성장에 미치는 효과를 평가하여 보았다. 일반균구와 대장균구는 전체 소재류와 처리농도에 상관없이 대부분의 농도에서 100%이상의 성장효과를 보였다.

GMP계열의 경우 살모넬라균에서 최저 32%에서 74%범위 그리고 유산균구는 CaZn-GAHC에서 최저 43%에서 최대 90%범위에서 감소효과를 보였다, IMP계열의 경우를 살펴보았더니, IMP는 살모넬라균에서 최저 63%에서 79%범위 그리고 유산균구는 77%~97%의 감소효과를 보였으며, CaZn-IAHC는 살모넬라균의 경우 63~95% 및 유산균구에서는 최저 80%에서 최대 83%범위에서 감소효과를 보였는데, 유산균구의 경우는 핵산계열은 감소효과가 농도 의존성을 띠고 있었으며, 이러한 경향은 핵산계열에서 공통적으로 나타나는 결과였다. 또한, 공시균에 대하여 시험물질이 성장촉진에 미치는 효과를 보았더니, 대장균이 가장 생장이 빠르게 이루어지는 것으로 평가되었으며, 다음으로는 일반균, 유산균 및 유산균 그리고 살모넬라 순서였으며, 현장유효성 평가에서 안전하였던 핵산계열의 소재류는 유산균구 및 살모넬라구의 경우에 실험실적 실험에서는 다소 독성을 보유하는 것으로 평가 되었다.

나) 복합균 처리효과

본 연구에서는 사전에 준비된 단일균과 소재류를 농도별로 처리시, 공시균의 성장증감에 미치는 효과와 동시에 Probiotic효과를 유도하는 경쟁성을 보이는가와 현장유효성 평가와의 연계성을 확인함으로서 개발 유기태화 미네랄 소재류의 항질병 메카니즘을 최종 평가하고 저 하였다(Table 12, Fig 13~15.). 3종 공시균을 혼합한 경우에서, 대조 대비 총균수를 기준으로 소재별 및 이들의 농도별 접촉이 이들 공시균에 대하여 증감에 미치는 효과를 평가함으로서 소재류의 안전성 및 Probiotic효과를 평가하여 보았다. 시험시료를 처리하지 않았던 대조구의 경우, 단일균별 처리시는 전체균별로 성장이 정상적으로 이루어졌던 반면에, 4종 공시균을 혼합배양한 경우에는 총균수 중 유산균이 63%, 일반균이 27%, 대장균이 9.76%를 그리고 살모넬라균은 0.07%의 점유율 범위를 보였다. 당초 동일균수를 접종하여 동일조건에서 배양한 경우에서 이러한 결과는 혼합균들이 경쟁성이 유발되고 결과로 유산균이 가장 우점화 하면서 살모넬라균의 성장을 우선적으로 억제하는 이유로 판단되었고, 다음으로 대장균구 및 일반균 순으로 억제하는 것으로 판단되었는데, 이러한 경향은 전체처리균에서 유사한 패턴으로 나타났다. 이중 WPS계열중 WPS처리구의 경우는 전체농도에서 총균수는 최저 83%에서 최대 134% 범위의 총균수 증가효과를 보였으나, 유기태화 소재인 Ca-WPS의 경우에는 전체가 121% 이상의 성장효과를 보였다. 이러한 결과는 단일균별 처리시 모든 공시균에 대하여 147%의 이상의 성장촉진 효과를 보였던 점과, 현장유효성 평가에서 Ca-WPS소재류를 섭이시 농도 비례적으로 총

균수 증가와 더불어 Prebiotic효과가 뛰어났던 점을 비교하면, 본 실험에서의 결과는 Ca-WPS소재류를 농도별로 접촉한 4종 공시균 중 유산균의 총균수 대비 점유율이 81%까지 비례적으로 증가하면서 1차적으로 살모넬라균을 그리고 일반균을 감소시키는 결과를 보였으며, 대장균에 대한 감소는 대조 대비 없는 것으로 평가되었다. 이러한 결과를 종합하면 Ca-WPS 소재류를 가축이 섭이시 유산균이 증가하면서 적어도 유해균인 살모넬라균을 감소 시키 Prebiotic효능을 보유하면서 2차적으로 장내 Probiotic효과와 더불어 유해균을 감소시키는 Synbiotic소재임이 확인되었다. 실제적으로 Ca-WPS를 섭이시킨 산란계에서 분리한 분변내 미생물총을 조사한 결과, 살모넬라균은 전혀 검출되지 않은 이유를 본 실험을 통하여 확인 하였다.

핵산 GMP계열이 4종 복합균에 미치는 효과를 대조구 대비 비교하여 보았더니, 총균수의 경우 GMP는 전체농도에서 최소 105%농도 증가 효과를 보였는데, CaZn-GHAC처리구는 0.01% 처리구에서는 102%였던 결과가 농도가 증가하면 약 80% 수준까지 감소하는 결과를 보였다. 총균수를 기준으로 대장균구(대조구 점유율 9.76%)와 유산균구(대조구 점유율 63%) 및 일반균구(대조구 점유율 27%) 그리고 살모넬라균(대조구 점유율 0.07%)의 변화를 확인하여 보았더니, GMP 처리구는 살모넬라균은 불검출부터 최대 0.22%범위의 점유율수치를 보였고, 일반균은 26~42%, 대장균군은 11%~40% 그리고 유산균구는 30~36%의 범위를 나타내어 Prebiotic효과는 없는 것으로 평가되었다.

GMP가 4종 혼합균에 미치는 효과를 기준으로 CaZn-GHAC의 효과를 비교하여 보았더니, 0.05%와 0.1%의 농도 처리구에서 총균수는 80%수준을 나타냄을 기준으로, 균별 증감효과를 비교하여 보았더니 살모넬라균은 0.61% 이내, 일반균은 5% 그리고 대장균구의 경우는 12% 범위를 보였다.. 그러나 유산균군이 약 83%로 대부분을 점유하고 있으므로 동일농도에서 총균수의 대부분이 유산균구라 해도 과언이 아닐 정도로 드라마틱한 결과였다. 이러한 결과를 기준으로 복합균 처리시, pH변화를 확인 함으로서, 유기태화 미네랄 소재류의 섭이가 현장가축의 장내 이화학적 환경변화를 유발 시킬 수 있는 여부를 최종 확인하였더니, 전체적인 pH는 6.3~6.5(대조 : 6.38)범위로 나타나 배지내 이화학적 변화를 유발하지 않았음을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 유기태화 미네랄 소재류의 가축섭이시 장내에서 이화학적 변화를 유발하지 않음을 간접적으로 확인하는 결과였다. 이러한 결과는 실제 산란계를 대상으로한 현장 유효성 평가간에 분리한 맹장분변내 pH를 조사한 결과와도 완전히 일치하는 결과였다. 결국, GMP계열의 경우 유기태화 기질인 GMP는 Prebiotic효과를 보유하지 않은 반면에 유기태화 소재로 개발된 CaZn-GAHC소재류는 이와는 반대로 유해균인 살모넬라균과 대장균을 억제하고 유산균을 증대 시키는 매우 우수한 Prebiotic효과를 나타내었다. 이러한 결과는 단일균별 처리시험에서는 전체 GMP계열 소재류는 대장균과 일반균의 증대성을 보이는 반면에 유산균과 살모넬라균의 감소효과를 유발하였던 점과 CaZn-GHAC를 산란계에 섭이시켰을 때의 우수한 Prebiotic 효능을 보였던 결과를 본 시험결과와 연계하면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 즉, CaZn-GAHC소재는 장내에 도달하면 pH변화 등의 변화없이 일반균과 유산균을 증식시키는 Probiotic효과를 유발하고 유해균을 급격하게 억제시키는 Synbiotic 소재로서 효능을 발휘하는 항질병 메카니즘을 보유하고 있는 소재임이 다시한번 확인하게 되었다. GMP계열의 Prebiotic효과를 기준으로 동일 핵산류중 화학구조와 특성이 유사한 IMP만을 GMP와 대체하여 제조한 CaZn-IHAC의 Prebiotic효과 평가를 통하여, 이중 핵

산류의 효능을 평가하여 보았더니 역시 GMP계열의 효능과 유사한 항질병 메카니즘을 보유하고 있음이 평가 되었다. 결론적으로, 본 실험을 통하여 핵산과 유단백질을 기질로 하여 제조한 유기태화 소재류는 우수한 Prebiotic소재임이 확인함과 동시에 이들의 항질병 메카니즘을 확인하는 우수한 결과를 확보하였다.

3) 살모넬라균 기준 Probiotic효과 평가

본 연구는 우선 농도별 조성된 시험물질별에 대하여 공시균을 산란계 현장 시험간 분리한 일반균, 살모넬라 및 유산균에 대하여 단일균(Table 7) 및 복합균(Table 8) 형태로 접종한 후 성장패턴을 비교 하므로써 시험시료별 Prebiotic효능을 확인하였다

가) 단일균 처리효과

본 연구 실시전 무기태 미네랄류 대비 유기태화 미네랄 소재류를 대상으로 사료에 첨가후 60일 동안 산란계에 섭이토록 한 현장 실험결과, 개발 유기태화 미네랄 소재류는 우수한 Prebiotic 효능을 보유하고 있는 것으로 평가되었다(Table 13, Fig 10~12).

맹장에서 분리한 분변내 총균수와 유산균의 수치가 증가하면서 이때 대장균구의 급격한 감소와 더불어 가금류에서 가장 고질적인 살모넬라균구는 불검출 되는 결과를 확인한 바, 이에 대한 유기태 미네랄 소재류가 보유하는 항질병 관련 메카니즘을 실험실적으로 규명하기 위하여 실험실적 효과를 평가하였다. 따라서, 본 연구에서는 살모넬라균에 초점을 맞추어 이들에 대한 유기태화 미네랄 소재류의 항질병 관련 억제 효과를 보유하는 지를 평가하여 보았다. 영양육즙배지에 동량의 공시균별 접종 후 시험소재를 농도별로 각 각 접촉토록 하는 경우, 각 공시균들의 성장패턴을 대조구와 비교 하므로써 제제별 안전성과 더불어 생육에 미치는 효과를 확인 하고 저 하였다(Table13).

우선 각 공시균에 대하여 실험소재를 농도구배 차이를 두고 접촉시켜 보았더니, 일반균(대조구: 6×10^8 cfu/ml)은 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cfu/ml 범위의 성장패턴을 보였으며, 살모넬라균(대조 : 8×10^8 cfu/ml)의 경우는 1×10^8 cfu/ml, 유산균(대조: 1×10^9 cfu/ml)은 1×10^9 cfu/ml의 성장율을 보여 우선 시험물질별 및 이들의 농도별 차이에 의하여 크게 영향을 받지 않음을 확인하였다. 이러한 전체적인 성장패턴을 기준으로 대조 대비 공시균별로 시험소재로 기안한 성장증가 혹은 감소에 영향을 미치는지를 확인하여 보았더니, 일반균의 경우는 전체 시험재료별 그리고 농도별 처리에 따른 성장 촉진효과가 100~1,040% 까지 있었다. 이러한 결과는 일반균에 대한 개발소재류는 독성이 없으며 오히려 성장을 촉진하는 먹이원이 되는 것으로 평가되었다.

살모넬라균의 경우, WPS계열의 경우는 전체가 일반균의 경향과 동일한 성장촉진 효과를 보이는 것으로 평가되었으나, 핵산류와 이들을 기질로 하여 제조한 모든 유기태 소재류에서 대조구(100% 기준) 대비 최저 32%에서 최대 95% 수준의 생존 콜로니수가 검출됨으로서 결국 살모넬라균에 대한 성장억제 효과를 보이는 것으로 평가 되었다.

유산균의 경우를 살펴보았더니, 기질 GMP는 전체농도에서 성장 촉진을 그리고 IMP는 저농도에서는 성장 촉진 효과를 보였던 반면에 0.05% 이상의 농도에서는 농도에 비례하여 생존 콜로니수가 77%수준까지 감소하는 경향을 보임으로서 핵산류별 항균성에 있어 차이를 보이는 결과를 확인하였다. 이러한 결과는 공시균별로 소재에 대한 성장관련 반응 패턴이 다름을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 현장유효성과 연계시는 복합균 형태로 전

개되는 만큼 복합균으로 하여 처리시는 어떠한 생육 패턴을 보일지 알 수 없으므로 정밀한 검정이 필요하다 할 수 있다.

살모넬라균을 기준으로, GMP와 IMP가 살모넬라균에 있어 성장 감소효과가 있음을 기준으로 유기태화 전후에 어떠한 성장패턴을 보이는지를 조사하여 보았다. 결과로서, GMP를 0.01% 처리시 32%의 생육효과를 보였는데, 유기태화 후 CaZn-GAHC의 경우는 74%의 성장효과를 보였는데, 이러한 경향은 IMP를 기질로 하여 제조한 CaZn-IHAC의 경우에서도 유사한 경향을 보임으로서, 결국 유기태화 반응에 따라 기질과 미네랄류가 보유하고 있는 독성을 동시에 저감시키는 효과를 보유하고 있음을 확인하였다

나) 복합균 처리효과

본 연구에서는 사전에 준비된 단일균(일반균, 대장균군, 유산균군)과 소재류를 농도별로 처리시, 공시균의 성장증감에 미치는 효과와 동시에 Probiotic효과를 유도하는 경쟁성을 보이는가와 현장유효성 평가와의 연계성을 확인함으로서 개발 유기태화 미네랄 소재류의 항질병 메카니즘을 최종 평가 하고 저 하였다(Table 14, Fig 16~18).

3종 공시균을 혼합한 경우에서, 대조 대비 총균수를 기준으로 소재별 및 이들의 농도별 접촉이 이들 공시균에 대하여 증감에 미치는 효과를 평가함으로서 Probiotic효과를 평가하여 보았다. 시험시료를 처리하지 않았던 대조구의 경우, 단일균별로 처리시는 전체균별로 성장이 정상적으로 이루어졌던 반면에, 3종 공시균을 혼합 배양한 경우에는 총균수 중 유산균의 점유율이 대부분을 차지하고 있었으며, 살모넬라균은 2.7% 그리고 일반균의 경우는 생존 콜로니가 검출되지 않았다. 즉, 단일균별로 구분하여 배양시는 정상적인 생장이 이루어졌던 결과와는 판이한 경향을 보였는데, 당초 동일균수를 접종하여 동일조건에서 배양한 경우에서 이러한 결과는 혼합균들의 경쟁성이 유발되는 결과로 판단되었다. 즉, 유산균이 가장 우점화 하면서 일반균을 우선으로 그리고 살모넬라균을 억제하는 순서로 경쟁성 패턴을 나타낸 것으로 판단되었는데, 이러한 경향은 전체 처리균에서 유사한 패턴으로 나타났다.

실험소재별로의 경쟁성 패턴에 어떠한 영향을 미치는지를 총균수내 점유율을 기준으로 비교하여 보았더니, WPS는 유산균과 살모넬라균이 동시증식과 더불어 역시 일반균의 증식을 억제하므로써 대조구와 유사한 패턴을 보였다.

유기태화 기질인 WPS의 경과를 기준으로 유기태화 소재인 Ca-WPS는 고농도인 0.1% 처리구에서 총균수를 110%이상 그리고 유산균 또한 132%로 동시에 증가시키면서 살모넬라균의 점유율은 대조구 수준인 2.7%로 유지시키는 결과를 보였으며, 나머지 농도에서는 WPS와 동일한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 산란계를 대상으로 실시한 현장유효성 평가에서 Ca-WPS를 고함량 섭이한 경우에서 가장 우수한 Prebiotic 효능을 보였던 결과와 일치하는 패턴 이었다. 결과를 종합하면, Ca-WPS 소재류를 가축이 섭이시 유산균의 증기와 더불어 살모넬라균을 감소시키는 Prebiotic효능을 보유하면서 2차적으로 장내 Probiotic효과와 더불어 유해균을 감소시키는 Synbiotic소재임이 확인되었다. 실제적으로 Ca-WPS를 섭이시킨 산란계에서 분리한 분변내 미생물총을 조사한 결과, 살모넬라균은 전혀 검출되지 않은 이유를 본 실험을 통하여 근접적으로 확인 하였다.

핵산계열이 3종 복합균에 미치는 효과를 비교하여 보았더니, GMP와 IMP는 WPS와 유사한 패턴을 보였으며, 유기태화 반응 후 CaZn-GHAC와 CaZ-IHAC처리구는 0.01%

처리군에서 총균수 대비 살모넬라균이 단지 2.4%~2.9%범위의 점유율 보인 이외에는 유산균이 대부분을 점유하는 경우여서 본 연구목표와 일치하는 Prebiotic 효과를 보였는데, 이때도 일반균은 역시 검출되지 않았다. 이러한 결과를 기준으로 복합균 처리시, pH변화를 확인 함으로서, 유기태화 미네랄 소재류의 섭취가 현장가축의 장내 이화학적 환경변화를 유발 시킬 수 여부를 최종 확인하였더니, 대장균을 기준으로 평가한 경우는 pH는 6.3~6.6(대조 : 6.38)범위로 나타나 배지내 이화학적 변화를 유발하지 않았음을 확인 할 수 있었는데, 살모넬라를 기준으로 평가한 경우는 pH(대조 5.88)가 대부분 5.7~5.9범위를 보였다. 결국, 핵산계열의 경우 유기태화 기질인 GMP와 IMP는 Prebiotic효과를 보유하지 않은 반면에 유기태화 소재로 개발된 CaZn-GAHC와 CaZn-IHAC는 이와는 반대로 유해균인 살모넬라균을 억제하고 유산균을 증대 시키는 매우 우수한 Prebiotic효과를 나타내었다. 이러한 결과는 단일균별 처리시험에서는 전체 핵산계열 소재류는 대장균과 일반균의 증대성을 보이는 반면에 유산균과 살모넬라균의 감소효과를 유발하였던 점과 CaZn-GHAC를 산란계에 섭이시켰을 때의 우수한 Prebiotic 효능을 보였던 결과를 본 시험결과와 연계하면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 즉, CaZn-GAHC소재는 장내에 도달하면 우점화 세균에 의하여 pH변화 등의 변화가 예상되지만 일반균과 유산균을 증식시키는 Probiotic효과를 유발하고 유해균을 급격하게 억제시키는 Synbiotic 소재로서 효능을 발휘하는 항질병 메카니즘을 보유하고 있는 소재임이 다시 한번 확인하게 되었다.

동일 핵산류중 화학구조와 특성이 유사한 IMP만을 GMP와 대체하여 제조한 CaZn-IHAC의 Prebiotic효과 평가를 통하여, 이중 핵산류의 효능을 평가하여 보았더니 역시 GMP계열의 효능과 유사한 항질병 메카니즘을 보유하고 있음이 평가 되었다.

결론적으로, 본 실험을 통하여 핵산과 유단백질을 기질로 하여 제조한 유기태화 소재류는 우수한 Prebiotic소재임이 확인함과 동시에 이들의 항질병 메카니즘을 확인하는 우수한 결과를 확보하였다.

다. 장내 분리 유산균의 우점화 패턴 평가(in vitro)

선행연구에서 유기태화 미네랄 소재류를 사료첨가제로서 하여 산란계를 대상으로 한 현장평가에서 확인한 Prebiotic효과를 역시 현장실험간 분리한 야생균을 사용하여 이들의 효능을 세부적으로 평가하였다(Table 9~14, Fig 19). 공시균은 현장분리 대장균, 살모넬라균, 유산균 및 일반균으로 구분하여 실험간 적용하였는데, 우선 영양배지에 단일균별로 각각 배양시는 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml수준까지 정상적인 생장을 보였는데, 이들을 혼합하는 경우 유해균인 대장균과 살모넬라균은 감소하면서, 유산균(BCP)과 일반균(PC배지)은 증가하는 하는 패턴을 보였다(Table 9~14). 이러한 결과는 혼합균 중 유산균이 우점화 및 급격히 증가하면서 유해균들을 억제 한다는 것을 분명히 인지 할 수 있었지만, PC배지에서 생존하는 콜로니는 일반균인지 유산균인지 혹은 유해균인 대장균 및 살모넬라균인지가 불분명하였다. 만약, 일반배지에서 나타난 생존 콜로니가 일반균이라면 유기태화 소재류는 일반균과 유산균을 동시에 증가시키면서 유해균만 선택적으로 감소시키는 제제라는 의미이고, 일반균이 아닌 유산균이라면 개발제제는 유산균류만을 선택적으로 증폭시키는 제제라는 내용을 내포하는 것 인만큼 반드시 규명이 필요하였다. 이를 확인하기 위하여, 1차적으로 개발 유기태화 소재류를 적용한 후 PC배지에 존재하는 콜로니를

MacConkey배지와 BCP배지에 도말 접종 후 배양과정을 거쳐 이들이 일반균 인지 혹은 유산균인지를 확인하였다(Fig 19). 결과로서, 총균수내 일반균은 거의 검출 되지 않았으며, 이들은 유산균임이 확인되었다. 따라서, 유청단백질을 기질로하여 제조한 WPS계열 및 핵산류를 기질로 하여 제조한 유기태화 미네랄 소재류는 유산균만을 선택적으로 활성화 시키는 Prebiotic효능을 보유함을 재 확인 할 수 있었다.

Table 1. 유기태화 소재류의 Probiotic평가를 위해 사용된 유단백질 기질화 유기태화 미네랄 소재류의 미네랄 함유량 분석결과

유기태화 시료명		유기태화 미네랄 소재내 미네랄 분포조사 결과(ppm)															비고
		Ca	Fe	Cu	Zn	Se	K	Mg	Mn	Na	Cr	P	S	As	Hg	Pb	
WPS	Mean	3,111	1.30	ND	ND	ND	19,490	976	0.06	7,940	0.61	4,989	1,572	ND	1.65	0.21	ND
	SD	8	0.02				58	1.60	0.002	64	0.01	19	7.00		0.11	0.08	
Ca -WPS	Mean	38,800	25	0.44	3.55	ND	2,496	1,016	0.66	1,45	2.33	13,740	2,589	ND	0.25	1.39	0.01
	SD	132	0.07	0.04	0.003		13	2.00	0.01	12	0.04	20	5.00		0.03	0.26	0.00
Fe -WPS	Mean	1,990	19,120	10	7.43	11	2,371	813	75.65	685	3.43	12,950	5,358	ND	0.00	25.0	0.69
	SD	35	43	0.06	0.06	1.92	17	5.10	0.18	3.80	0.08	29	18		0.08	0.70	0.01
Cu -WPS	Mean	5,757	35	49,890	21	2.48	2,822	56	0.53	1,495	0.85	13,190	11,320	ND	0.05	0.84	0.05
	SD	21	0.12	29	0.05	2.42	19	0.30	0.002	13	0.02	40	38		0.11	0.27	0.01
Zn -WPS	Mean	12,560	12	5.53	15,190	ND	1,956	974	0.44	749	0.88	17,080	6,300	ND	ND	0.33	ND
	SD	73	0.04	0.10	10		9.00	2.10	0.01	3.70	0.02	116	66			0.14	
Se -WPS	Mean	1,275	6.79	1.04	ND	5,202	518	299	0.11	326	1.31	1,706	5,229	ND	0.42	0.37	ND
	SD	5	0.05	0.08		23	4.00	1.20	0.002	1.10	0.03	5.00	20		0.04	0.11	

Table 2. 야외분리 공시균을 적용한 Prebiotic 효능 검정을 위해 제조된 핵산 기질화 유기태화 미네랄 소재류의 미네랄류 함유량 조사결과 (ICP)

유기태화 시료		미네랄 함유량 조사결과(ppm)																합계		Cl (%)	비고 (Lot No.)
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Mg	Mn	Cr	K	Na	P	S	As	Cd	Hg	Pb	PS+	PS-		
GMP	Mean	35.7	2.82	ND	ND	ND	47.9	1.28	0.02	99.8	95,530	50,180	5.5	ND	ND	ND	0.23	145,903	95,718	ND	원료
	SD	0.76	0.02	ND	ND	ND	0.60	0.01	0.04	1.58	733	226	0.4	ND	ND	ND	0.07	1,326	479		
IMP	Mean	ND	5.92	ND	ND	ND	3.90	0.35	0.16	25.1	96,820	51,420	ND	ND	ND	ND	0.36	148,275	96,855	ND	원료
	SD	ND	0.04	ND	ND	ND	0.02	0.00	0.03	1.75	211	154	ND	ND	ND	ND	0.06	1,427	397		
Ca-GHAC (FD)	Mean	90,160	30.8	ND	3.89	8.06	8.80	0.44	ND	ND	78,620	91,368	13.2	ND	ND	0.34	ND	260,214	168,832	17.2	141116가
	SD	1,689	0.34	ND	11.0	9.8	1.37	0.05	ND	ND	393	590	3.59	ND	ND	0.17	ND	2,698	2,105		
CaFe-GHAC (FD)	Mean	51,780	34,250	ND	ND	23.4	8.41	38.6	5.44	ND	93,860	100,000	19,313	ND	2.41	3.6	0.31	299,285	179,972	9.23	141114나
	SD	261	138	ND	ND	6.47	1.15	0.27	0.30	ND	301	594	103	ND	0.04	0.61	0.71	1,406	710		
CaZn-GHAC (FD)	Mean	124,400	21.3	31,260	ND	ND	66.9	3.91	ND	ND	51,420	42,852	99,149	ND	0.02	0.47	ND	349,174	207,173	19.0	141115가
	SD	1,181	0.30	288	ND	ND	0.50	0.11	ND	ND	302	286	534	ND	0.02	0.23	ND	2,592	1,772		
CaCu-GHAC (FD)	Mean	44,280	31.6	ND	31,760	ND	5.20	0.31	ND	ND	79,530	102,037	16,623	ND	0.04	ND	69.8	274,337	155,677	10.0	141114가
	SD	373	0.66	ND	90	ND	0.91	0.09	ND	ND	76	595	105	ND	0.02	ND	0.53	1,242	541		
CaSe-GHAC (FD)	Mean	45,510	14.1	0.55	ND	32,550	10.0	0.24	ND	ND	115,300	104,559	48.2	ND	ND	ND	ND	297,992	193,385	9.41	141115나
	SD	918	0.47	1.11	ND	275	1.00	0.04	ND	ND	290	628	2.71	ND	ND	ND	ND	2,116	1,486		
CaZn-IHAC (FD)	Mean	76,050	3.03	36,180	ND	ND	85.0	0.94	ND	ND	65,130	96,469	27,768	ND	ND	ND	ND	301,686	177,449	16.7	141118나
	SD	235	0.34	233	ND	ND	0.11	0.04	ND	ND	98	259	71	ND	ND	ND	ND	896	566		

- PS+ : 전체 미네랄류 함유량 합계
- PS- : P 및 S제외 미네랄류함유량 합계
- ND : Not Detection
- NC : Not Counting
- FD : Freeze Drying

Table 3. 단일균(대장균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가 디자인

시험군		단일균에 대한 평가							
		총균수대비단일공시균별대조군대비성장률조사							
		총균수(PC)		대장균수 (MacConkey)		살모넬라갈리나 룩수 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*
Control		0	0	0	0	x	x	0	0
WPS	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
Ca-WPS	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
GMP	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
CaZn-GHAC	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
IMP	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
CaZn-IHAC	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0

(O: 실시, X : 비실시)

Table 4. 복합균(대장균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가 디자인

시험군		복합균에 대한 평가							
		총균수대비단일공시균별대조군대비성장률조사							
		총균수(PC)		대장균수 (MacConkey)		살모넬라갈리나룸수 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*
Control		0	0	0	0	x	x	0	0
WPS	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
Ca-WPS	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
GMP	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
CaZn-GHAC	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
IMP	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0
CaZn-IHAC	0.01%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.05%	0	0	0	0	x	x	0	0
	0.10%	0	0	0	0	x	x	0	0

(O: 실시, X : 비실시)

Table 5. 단일균(대장균 및 살모넬라 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가 디자인

시험군		단일균에 대한 평가							
		총균수대비단일공시균별대조군대비성장률조사							
		총균수(PC)		대장균수 (MacConkey)		살모넬라갈리나 룡수 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*
Control		0	0	0	0	0	0	0	0
WPS	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca-WPS	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
GMP	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
CaZn-GHAC	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
IMP	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
CaZn-IHAC	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0

(O: 실시, X : 비실시)

Table 6. 복합균(대장균 및 살모넬라 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가 디자인

시험군		복합균에 대한 평가							
		총균수대비단일공시균별대조군대비성장률조사							
		총균수(PC)		대장균수 (MacConkey)		살모넬라갈리나룸수 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*	검출균수	성장률*
Control		0	0	0	0	0	0	0	0
WPS	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca-WPS	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
GMP	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
CaZn-GHAC	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
IMP	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0
CaZn-IHAC	0.01%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10%	0	0	0	0	0	0	0	0

(O: 실시, X : 비실시)

Table 7. 단일균(살모넬라 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가 디자인

시험군		단일균에 대한 평가							
		총균수대비단일공시균 대조군 대비 성장률조사							
		총균수(PC)		대장균수 (MacConkey)		살모넬라갈리나룸수 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률	검출균수	성장률	검출균수	성장률	검출균수	성장률
Control		0	0	x	x	0	0	0	0
WPS	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
Ca-WPS	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
GMP	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
CaZn-GHAC	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
IMP	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
CaZn-IHAC	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0

(O: 실시, X : 비실시)

Table 8. 복합균(살모넬라 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가 디자인

시험군		복합균에 대한 평가							
		총균수대비단일공시균별대조군대비성장률조사							
		총균수(PC)		대장균수 (MacConkey)		살모넬라갈리나립수 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률	검출균수	성장률	검출균수	성장률	검출균수	성장률
Control		0	0	x	x	0	0	0	0
WPS	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
Ca-WPS	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
GMP	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
CaZn-GHAC	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
IMP	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0
CaZn-IHAC	0.01%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.05%	0	0	x	x	0	0	0	0
	0.10%	0	0	x	x	0	0	0	0

(O: 실시, X : 비실시)

Table 9. 단일균(대장균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가결과

시험군			단일균에 대한 유기태 소재류의 Probiotic 효과 (cfu/ml)					
			일반균군(PC)		대장균군(MacConkey)		유산균군(BCP)	
			검출균수	증감률 (%) ^{\$}	검출균수	증감률 (%) ^{\$}	검출균수	증감률 (%) ^{\$}
Control			6.00E+08	100	4.00E+07	100	1.20E+09	100
WPS 계열	WPS	0.01%	6.24E+09	1,040	3.20E+08	800	2.24E+09	187
		0.05%	1.20E+09	200	2.40E+08	600	1.12E+09	93
		0.1%	1.12E+09	187	2.00E+08	500	2.56E+09	213
	Ca -WPS	0.01%	8.80E+08	147	1.20E+08	300	1.28E+09	107
		0.05%	1.84E+09	307	1.60E+08	400	1.88E+09	157
		0.1%	1.16E+09	193	4.00E+07	100	1.84E+09	153
GMP 계열	GMP	0.01%	7.60E+08	127	2.40E+08	600	1.80E+09	150
		0.05%	8.40E+08	140	1.20E+08	300	1.32E+09	110
		0.10%	1.44E+09	240	2.40E+08	600	1.28E+09	107
	CaZn -GHAC	0.01%	1.44E+09	240	1.20E+08	300	9.60E+08	80
		0.05%	1.56E+09	260	8.00E+07	200	5.20E+08	43
		0.1%	1.16E+09	193	1.20E+08	300	1.08E+09	90
IMP 계열	IMP	0.01%	6.00E+08	100	2.00E+07	150	1.76E+09	147
		0.05%	2.20E+09	367	8.00E+07	200	1.16E+09	97
		0.10%	1.04E+09	173	3.20E+08	800	9.20E+08	77
	CaZn -IHAC	0.01%	8.00E+08	133	6.40E+07	160	1.28E+09	107
		0.05%	9.20E+08	153	5.60E+07	140	1.00E+09	83
		0.10%	5.60E+08	93	1.60E+08	400	9.60E+08	80

- \$: 일반균 증감률, (시험군별 일반균 검출균수/control 총균수)x100

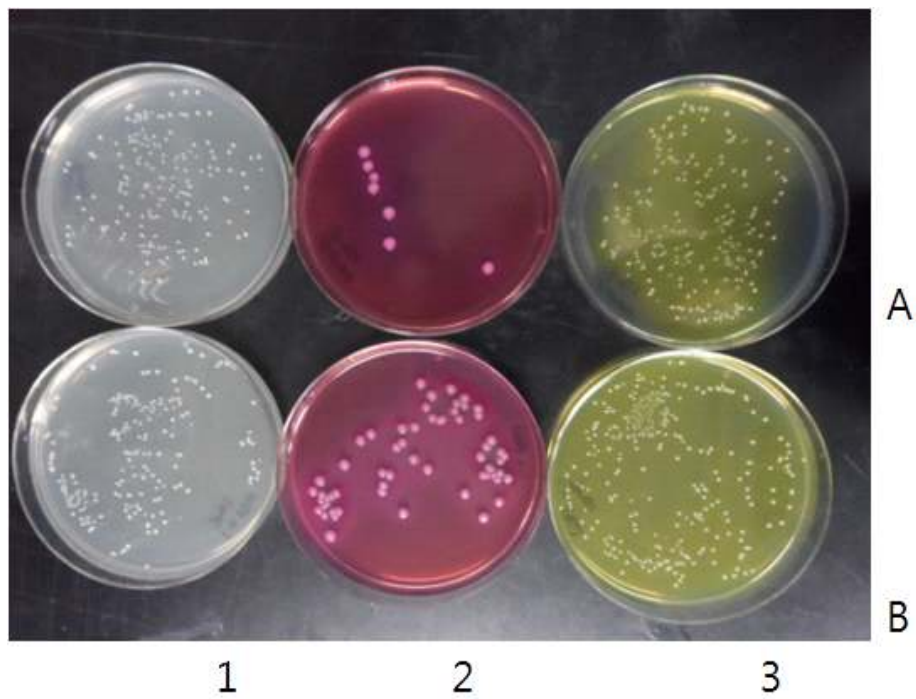


Fig 1. WPS소재류를 야외분리 3종 공시균(대장균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균 수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능평가 결과

A : 대조구,, B : WPS 0.1% 처리구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

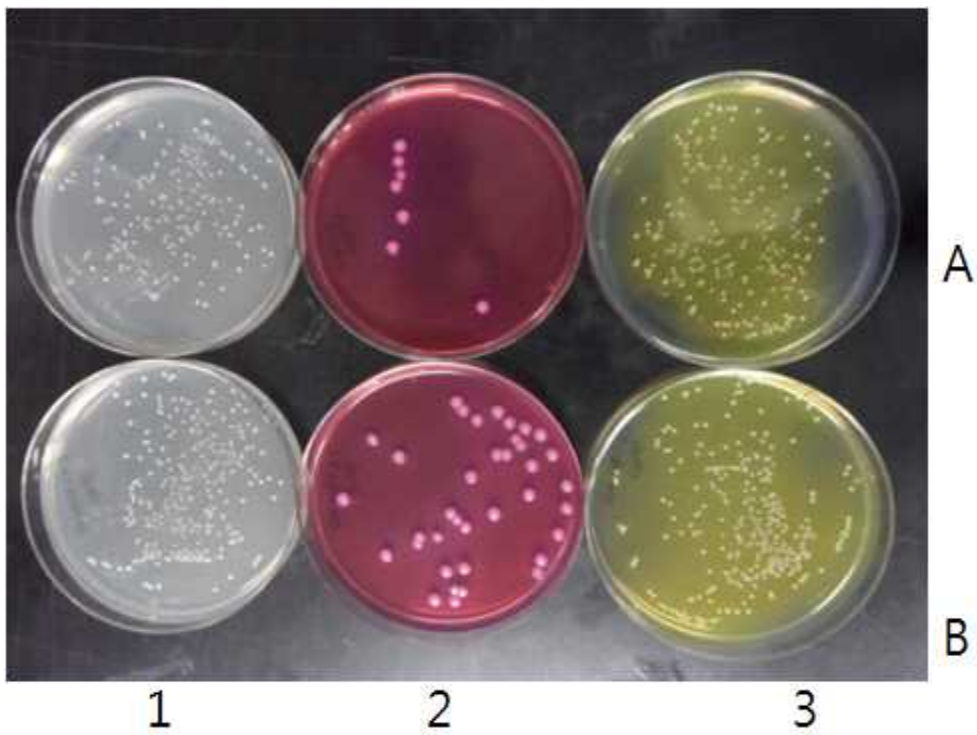


Fig 2. Ca-WPS(0.1%)소재료를 야외분리 3종 공시균(대장균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

A : 대조구,, B : Ca-WPS 0.1% 처리구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

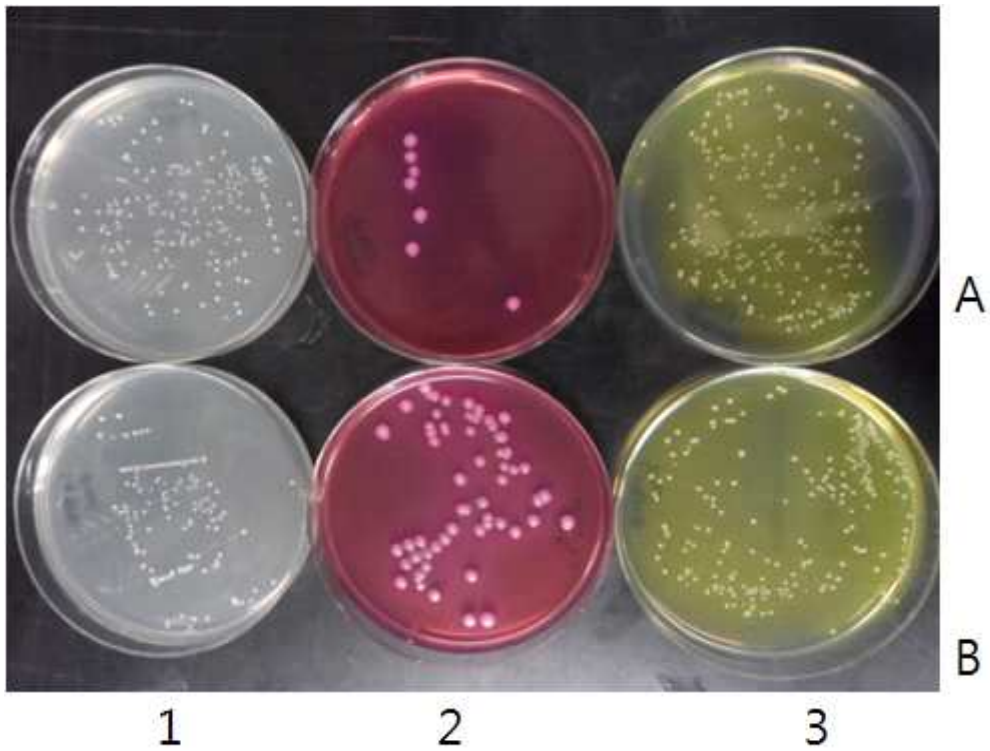


Fig 3. GMP(0.1%)소재류를 야외분리 3종 공시균(대장균 기준평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

A : 대조구,, B : GMP 0.1% 처리구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

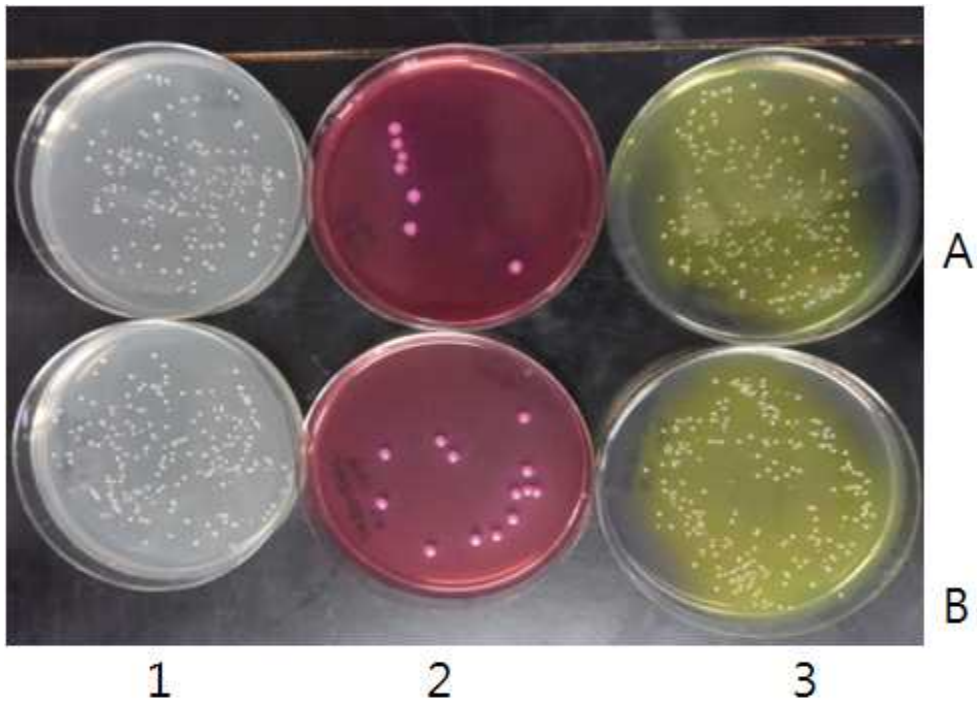


Fig 4. GMP 기질화 제조한 유기태화 미네랄 소재류인 CaZn-GAHC를 야외분리 3종 공시균 (대장균 기준평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

A : 대조구,, B : CaZn-GAHC 0.1% 처리구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

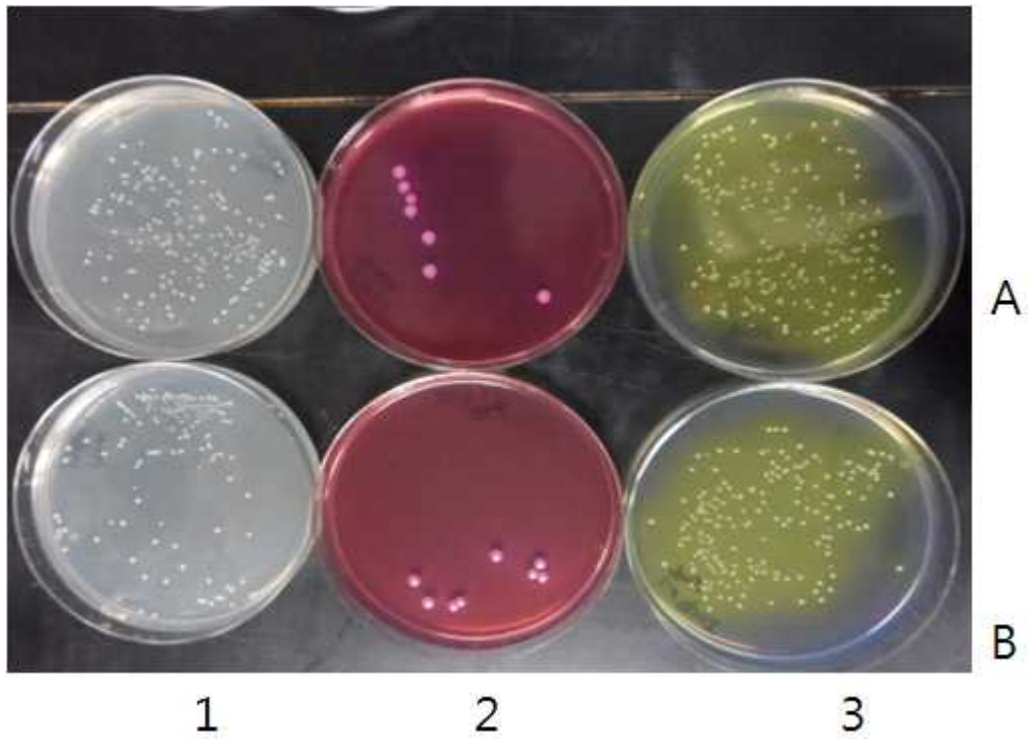


Fig 5. 핵산류 IMP소재류를 야외분리 3종 공시균(대장균 기준평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과
 A : 대조구,, B : IMP 0.1% 처리구
 1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

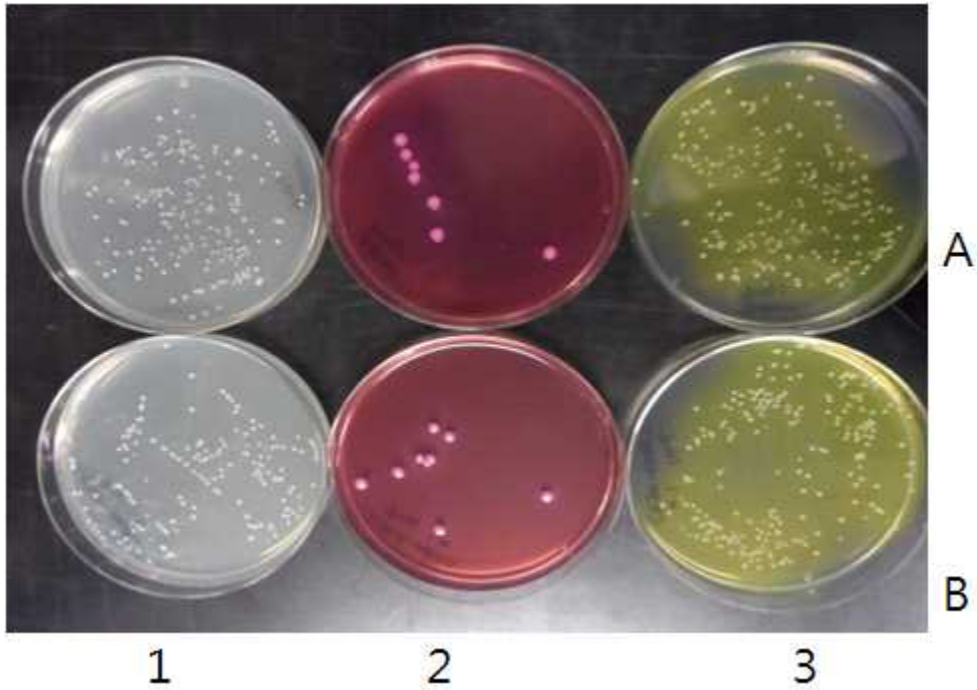


Fig 6. IMP 기질화 제조한 유기태화 소재류인 CaZn-IHAC를 야외분리 3종 공시균(대장균 기준평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

A : 대조구,, B : CaZn-IHAC 0.1% 처리구

1 : 총균수(PC배지), 2 : 대장균구수(MacConkey배지), 3 : 유산균수(BCP배지)

Table 10. 복합균(대장균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가

시험군		복합균에 대한 유기태 소재류의 Probiotic 효과(cfu/ml)							PH
		총균수(PC)			대장균군(MacConkey)		유산균군(BCP)		
		증감률 (%)\$	증감률 (%)\$	점유률 (%)#	검출균수	점유률 (%)#	검출균수	점유률 (%)#	
Control		1.16E+09	100	17	3.20E+08	28	6.40E+08	55	6.977
WPS	0.01%	2.80E+09	241	50	7.20E+08	26	6.80E+08	24	6.902
	0.05%	1.20E+09	103	3	6.40E+08	53	5.20E+08	43	6.891
	0.10%	1.36E+09	117	24	4.40E+08	32	6.00E+08	44	6.675
Ca-WPS	0.01%	1.28E+09	110	31	6.00E+08	47	2.80E+08	22	6.947
	0.05%	1.28E+09	110	50	2.40E+08	19	4.00E+08	31	6.896
	0.10%	9.20E+08	79	0	8.00E+07	9	8.40E+08	91	6.673
GMP	0.01%	9.20E+08	79	0	8.20E+08	89	1.00E+08	11	7.051
	0.05%	1.28E+09	110	19	8.40E+08	66	2.00E+08	16	7.053
	0.10%	1.68E+09	145	2	1.00E+09	60	6.40E+08	38	7.114
CaZn-GHAC	0.01%	1.16E+09	100	21	3.20E+08	28	6.00E+08	52	6.954
	0.05%	9.20E+08	79	57	8.00E+07	9	3.20E+08	35	7.047
	0.10%	1.24E+09	107	48	4.00E+07	3	6.00E+08	48	7.010
IMP	0.01%	8.80E+08	76	41	4.00E+07	5	4.80E+08	55	6.996
	0.05%	1.32E+09	114	55	3.20E+08	24	2.80E+08	21	6.923
	0.10%	2.00E+09	172	18	8.40E+08	42	8.00E+08	40	7.052
CaZn-IHAC	0.01%	1.32E+09	114	69	1.20E+08	9	2.92E+08	22	6.824
	0.05%	1.16E+09	100	45	8.00E+07	7	5.60E+08	48	6.920
	0.10%	1.36E+09	117	29	4.00E+07	3	9.20E+08	68	6.826

- \$: 일반균 증감률, (시험군별 일반균 검출균수/control 총균수) x 100

: (대장균군수 혹은 유산균수/총균수) x 100

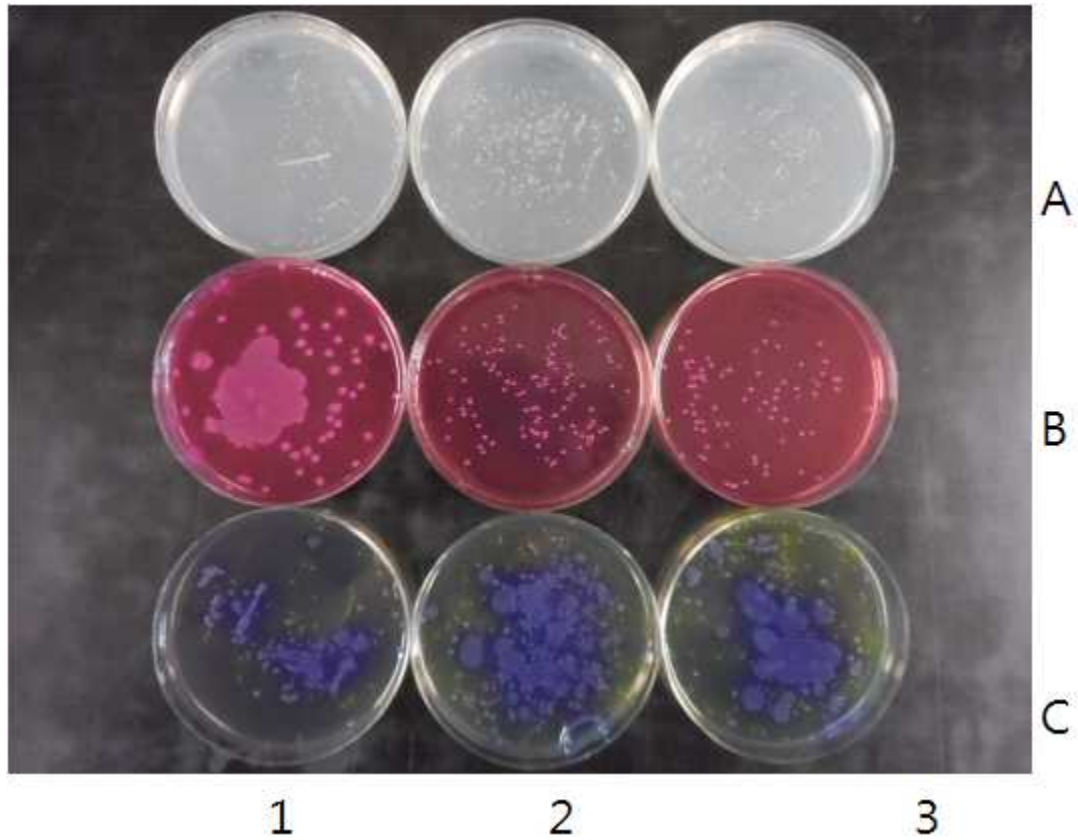


Fig 7. WPS계열 소재류의 야외분리 3종 혼합균(대장균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 대장균 및 유산균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능평가 결과

1: Control , 2 : WPS, 3 : Ca-WPS

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConkey배지), C : 유산균수(BCP배지)

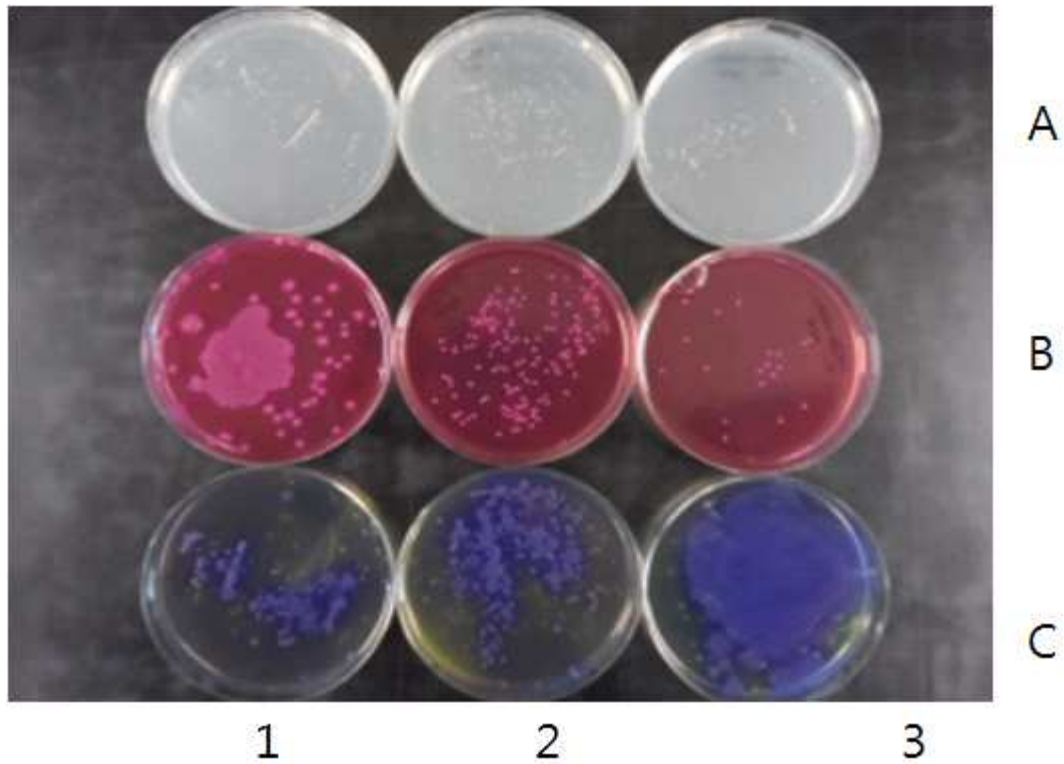


Fig 8. GMP계열 소재류를 야외분리 3종 공시균(대장균 기준평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1: Control , 2 : GMP, 3 : CaZn-GAHC

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConkey배지), C : 유산균수(BCP배지)

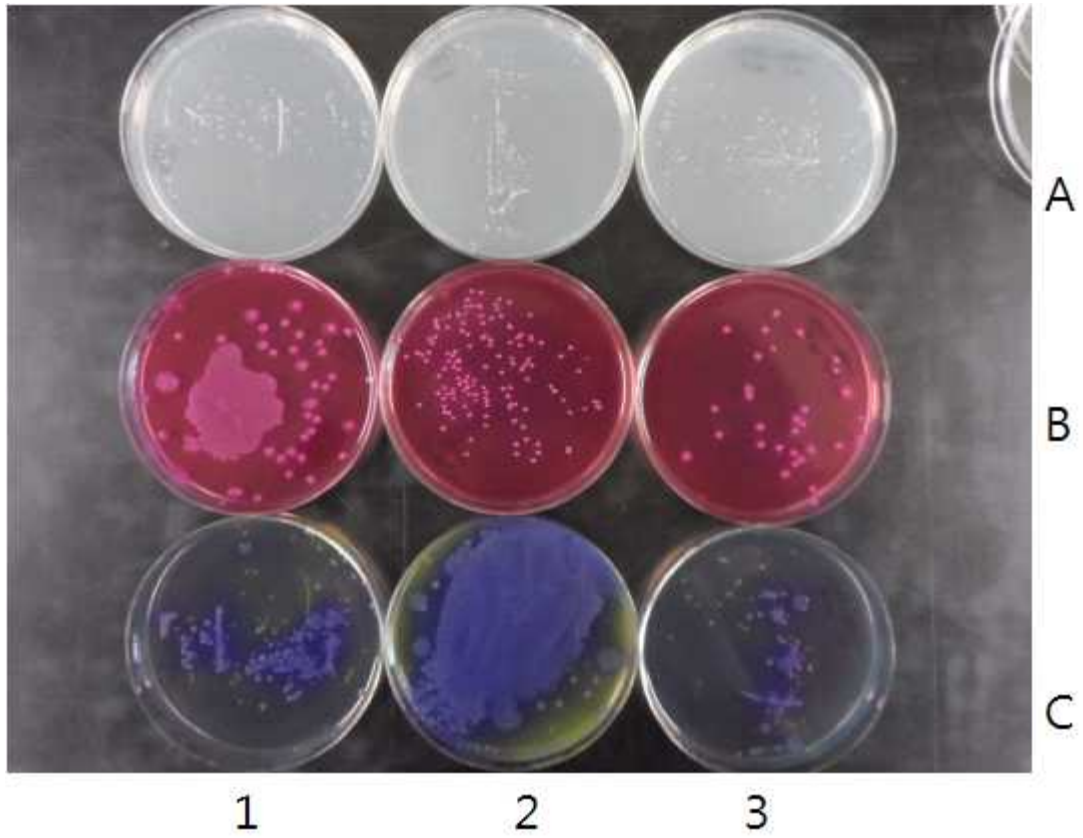


Fig 9. IMP계열 소재류를 야외분리 3종 혼합균(대장균 기준평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1: Control , 2 : IMP, 3 : CaZN-IHAC

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MackonKey배지), C : 유산균수(BCP배지)

Table 11. 단일균(대장균 및 살모넬라균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가결과

시험군		단일 공시균별 대조군 대비 성장률조사							
		일반균군 (PC)		대장균군 (MacConkey)		살모넬라갈리나룸 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률#	검출균수	성장률#	검출균수	성장률#	검출균수	성장률#
Control		6.E+08	100	4.E+07	100	8.E+08	100	1.E+09	100
WPS	0.01%	6.E+09	1,040	3.E+08	800	8.E+08	105	2.E+09	187
	0.05%	1.E+09	200	2.E+08	600	8.E+08	105	1.E+09	93
	0.10%	1.E+09	187	2.E+08	500	7.E+08	89	3.E+09	213
Ca-WPS	0.01%	9.E+08	147	1.E+08	300	8.E+08	105	1.E+09	107
	0.05%	2.E+09	307	2.E+08	400	1.E+09	137	2.E+09	157
	0.10%	1.E+09	193	4.E+07	100	9.E+08	116	2.E+09	153
GMP	0.01%	8.E+08	127	2.E+08	600	2.E+08	32	2.E+09	150
	0.05%	8.E+08	140	1.E+08	300	2.E+08	32	1.E+09	110
	0.10%	1.E+09	240	2.E+08	600	8.E+08	100	1.E+09	107
CaZn-GHAC	0.01%	1.E+09	240	1.E+08	300	6.E+08	74	1.E+09	80
	0.05%	2.E+09	260	8.E+07	200	4.E+08	53	5.E+08	43
	0.10%	1.E+09	193	1.E+08	300	6.E+08	74	1.E+09	90
IMP	0.01%	6.E+08	100	2.E+07	50	5.E+08	68	2.E+09	147
	0.05%	2.E+09	367	8.E+07	200	6.E+08	79	1.E+09	97
	0.10%	1.E+09	173	3.E+08	800	5.E+08	63	9.E+08	77
CaZn-IHAC	0.01%	8.E+08	133	6.E+07	160	5.E+08	63	1.E+09	107
	0.05%	9.E+08	153	6.E+07	140	8.E+08	105	1.E+09	83
	0.10%	6.E+08	93	2.E+08	400	7.E+08	95	1.E+09	80

- # : 일반균 증감률, (시험군별 일반균 검출균수/control 총균수) x 100



Fig 10. WPS(0.1%)계열 소재류의 야외분리 공시균(살모넬라균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능평가 결과

1: 대조구, 2 : WPS, 3: Ca-WPS



1

2

3

Fig 11. GMP계열 소재류의 야외분리 살모넬라균에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1 : 대조구, 2 : GMP, 3: CaZn-GHAC



1

2

3

Fig 12. IMP계열소재류의 약외분리 살모넬라균에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1 : 대조구, 2 : IMP, 3: CaZn-IHAC

Table 12. 혼합균(대장균 및 살모넬라균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic 효과 평가결과

시험군		혼합균에 대한 시험소재류 Prebiotic 효능평가(cfu/ml)										
		총균수(PC)		일반균수(PC)		대장균수(MacConkey)		살모넬라갈리나룸(MacConkey)		유산균수(BCP)		PH
		검출균수	성장률*	검출균수	점유율	검출균수	점유율	검출균수	점유율	검출균수	점유율	
Control		2.E+09	100	4.E+08	27	2.E+08	9.76	1.E+06	0.07	1.E+09	63	6.38
WPS	0.01%	1.E+09	83	5.E+08	38	7.E+08	50	4.E+05	0.03	2.E+08	12	6.44
	0.05%	1.E+09	85	5.E+08	37	5.E+08	37.1	4.E+06	0.29	4.E+08	26	6.30
	0.10%	2.E+09	134	1.E+09	64	6.E+08	25.5	4.E+04	0.002	2.E+08	11	6.17
Ca-WPS	0.01%	2.E+09	141	1.E+09	57	2.E+08	8.62	4.E+04	0.002	8.E+08	34	6.41
	0.05%	2.E+09	121	6.E+07	3	1.E+09	48.5	4.E+06	0.20	1.E+09	48	6.38
	0.10%	2.E+09	127	2.E+08	8	2.E+08	11.5	3.E+06	0.14	2.E+09	81	6.21
GMP	0.01%	2.E+09	122	8.E+08	42	4.E+08	22.0	4.E+04	0.00	7.E+08	36	6.46
	0.05%	2.E+09	105	1.E+09	58	2.E+08	11.6	8.E+05	0.05	5.E+08	30	6.47
	0.10%	2.E+09	110	5.E+08	26	7.E+08	40.0	4.E+06	0.22	6.E+08	33	6.54
CaZn-GHAC	0.01%	2.E+09	102	8.E+07	5	1.E+09	57.1	2.E+06	0.10	6.E+08	38	6.52
	0.05%	1.E+09	80	8.E+07	5	2.E+08	12.1	8.E+06	0.61	1.E+09	82	6.50
	0.10%	1.E+09	82	7.E+07	5	2.E+08	11.9	8.E+05	0.06	1.E+09	83	6.41
IMP	0.01%	2.E+09	112	4.E+08	22	6.E+08	34.8	4.E+05	0.02	8.E+08	43	6.45
	0.05%	2.E+09	93	8.E+07	5	1.E+09	63.2	8.E+06	0.53	5.E+08	32	6.51
	0.10%	2.E+09	100	2.E+08	10	7.E+08	43.9	8.E+05	0.05	8.E+08	46	6.44
CaZn-IHAC	0.01%	1.E+09	83	3.E+08	24	6.E+08	44.1	8.E+04	0.01	4.E+08	32	6.47
	0.05%	2.E+09	115	7.E+08	38	2.E+08	8.51	8.E+04	0.004	1.E+09	53	6.43
	0.10%	3.E+09	166	1.E+09	35	2.E+08	5.88	2.E+05	0.01	2.E+09	59	6.32

- \$: 일반균 증감률, (시험군별 일반균 검출균수/control 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100

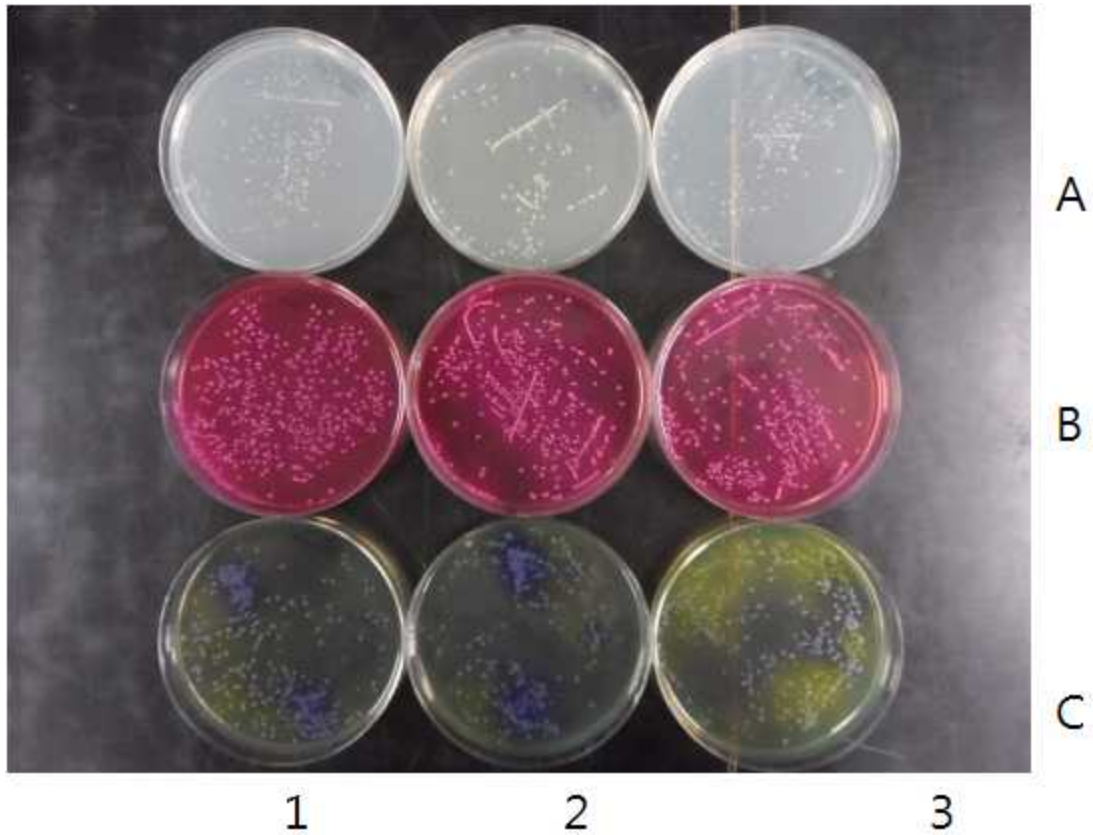


Fig 13. WPS소재류를 야외분리 3종 혼합균(대장균 및 살모넬라균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능평가 결과

1: Control , 2 : WPS, 3 : Ca-WPS

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConkey배지), C : 유산균수(BCP배지)

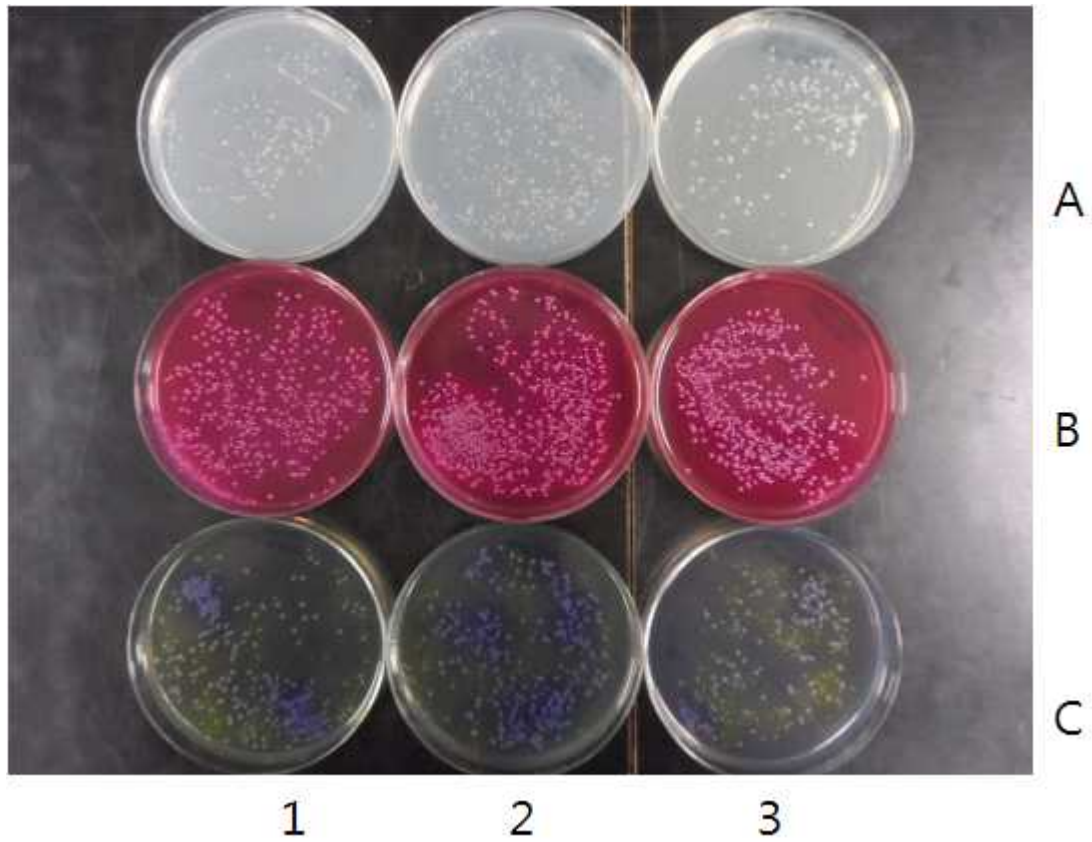


Fig 14. GMP계열 소재류를 야외분리 3종 공시균(대장균 및 살모넬라균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1 : Control , 2 : GMP, 3 : CaZn-GAHC

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConKey배지), C : 유산균수(BCP배지)

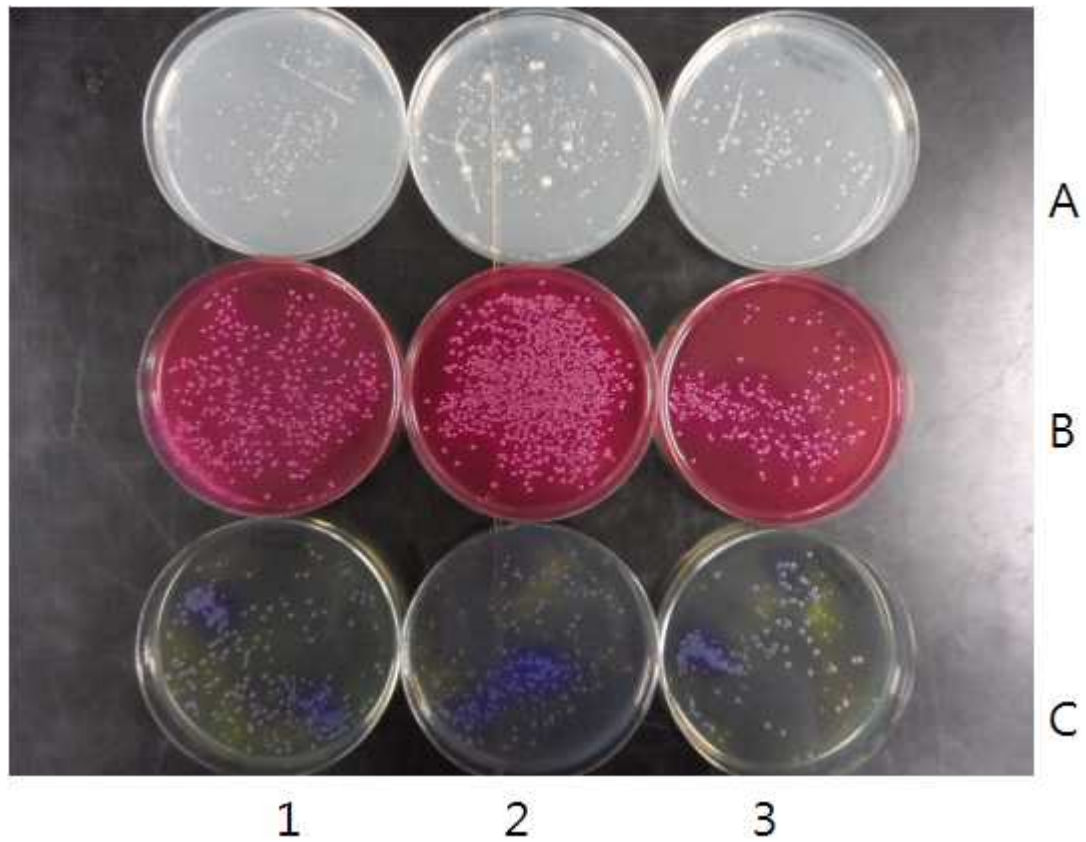


Fig 15. IMP계열 소재류를 야외분리 3종 혼합균(대장균 및 살모넬라균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1: Control , 2 : IMP, 3 : CaZn-IHAC

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConKey배지), C : 유산균수(BCP배지)

Table 13. 단일균(살모넬라균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가결과

시험군		단일 공시균별 대조균 대비 성장률조사					
		일반균군 (PC)		살모넬라갈리나룸 (MacConkey)		유산균수 (BCP)	
		검출균수	성장률#	검출균수	성장률#	검출균수	성장률#
Control		6.E+08	100	8.E+08	100	1.E+09	100
WPS	0.01%	6.E+09	1,040	8.E+08	105	2.E+09	187
	0.05%	1.E+09	200	8.E+08	105	1.E+09	93
	0.10%	1.E+09	187	7.E+08	89	3.E+09	213
Ca-WPS	0.01%	9.E+08	147	8.E+08	105	1.E+09	107
	0.05%	2.E+09	307	1.E+09	137	2.E+09	157
	0.10%	1.E+09	193	9.E+08	116	2.E+09	153
GMP	0.01%	8.E+08	127	2.E+08	32	2.E+09	150
	0.05%	8.E+08	140	2.E+08	32	1.E+09	110
	0.10%	1.E+09	240	8.E+08	100	1.E+09	107
CaZn-GHAC	0.01%	1.E+09	240	6.E+08	74	1.E+09	80
	0.05%	2.E+09	260	4.E+08	53	5.E+08	43
	0.10%	1.E+09	193	6.E+08	74	1.E+09	90
IMP	0.01%	6.E+08	100	5.E+08	68	2.E+09	147
	0.05%	2.E+09	367	6.E+08	79	1.E+09	97
	0.10%	1.E+09	173	5.E+08	63	9.E+08	77
CaZn-IHAC	0.01%	8.E+08	133	5.E+08	63	1.E+09	107
	0.05%	9.E+08	153	8.E+08	105	1.E+09	83
	0.10%	6.E+08	93	7.E+08	95	1.E+09	80

- # : 일반균 증감률, (시험군별 일반균 검출균수/control 총균수)x100

Table 14. 복합균(살모넬라균 기준)에 대한 시험소재별 및 농도별 Prebiotic효과 평가결과

시험구		복합균에 대한 성장률조사							pH
		일반균군 (PC)			살모넬라 갈리나룸 (MacConkey))		유산균군 (BCP)		
		검출균수	점유률#	증감률\$	검출균수	점유률#	검출균수	점유률#	
Control		1.E+09	0.0	100	4.E+07	2.7	2.E+09	108	5.87
WPS	0.01%	1.E+09	0.0	70	6.E+07	5.4	2.E+09	150	5.83
	0.05%	1.E+09	0.0	75	5.E+07	4.7	2.E+09	180	5.53
	0.10%	2.E+09	15.6	121	8.E+07	4.4	1.E+09	80	5.38
Ca-WPS	0.01%	1.E+09	0.0	97	8.E+07	5.6	2.E+09	139	5.89
	0.05%	2.E+09	0.0	105	5.E+07	3.3	2.E+09	138	5.79
	0.10%	2.E+09	0.0	110	4.E+07	2.7	2.E+09	132	5.84
GMP	0.01%	1.E+09	0.0	81	5.E+07	4.3	2.E+09	127	5.88
	0.05%	1.E+09	0.0	94	9.E+07	6.6	2.E+09	131	5.87
	0.10%	1.E+09	0.0	73	3.E+08	28.9	1.E+09	115	5.76
CaZn-GHAC	0.01%	1.E+09	0.0	89	3.E+07	2.4	2.E+09	127	5.88
	0.05%	1.E+09	0.0	70	8.E+07	8.1	2.E+09	162	5.84
	0.10%	9.E+08	32.9	62	6.E+07	6.1	6.E+08	61	5.77
IMP	0.01%	1.E+09	0.0	73	7.E+07	6.3	1.E+09	133	5.87
	0.05%	1.E+09	0.0	97	7.E+07	4.7	1.E+09	103	5.85
	0.10%	1.E+09	0.0	89	3.E+08	21.8	1.E+09	82	5.73
CaZn-IHAC	0.01%	2.E+09	0.0	102	4.E+07	2.9	2.E+09	103	6.05
	0.05%	1.E+09	2.5	92	5.E+07	3.5	1.E+09	94	5.86
	0.10%	1.E+09	0.2	89	8.E+07	5.8	1.E+09	94	5.71

- \$: 일반균 증감률, (시험군별 일반균 검출균수/control 총균수) x 100

: (대장균균수 혹은 유산균수/총균수) x 100

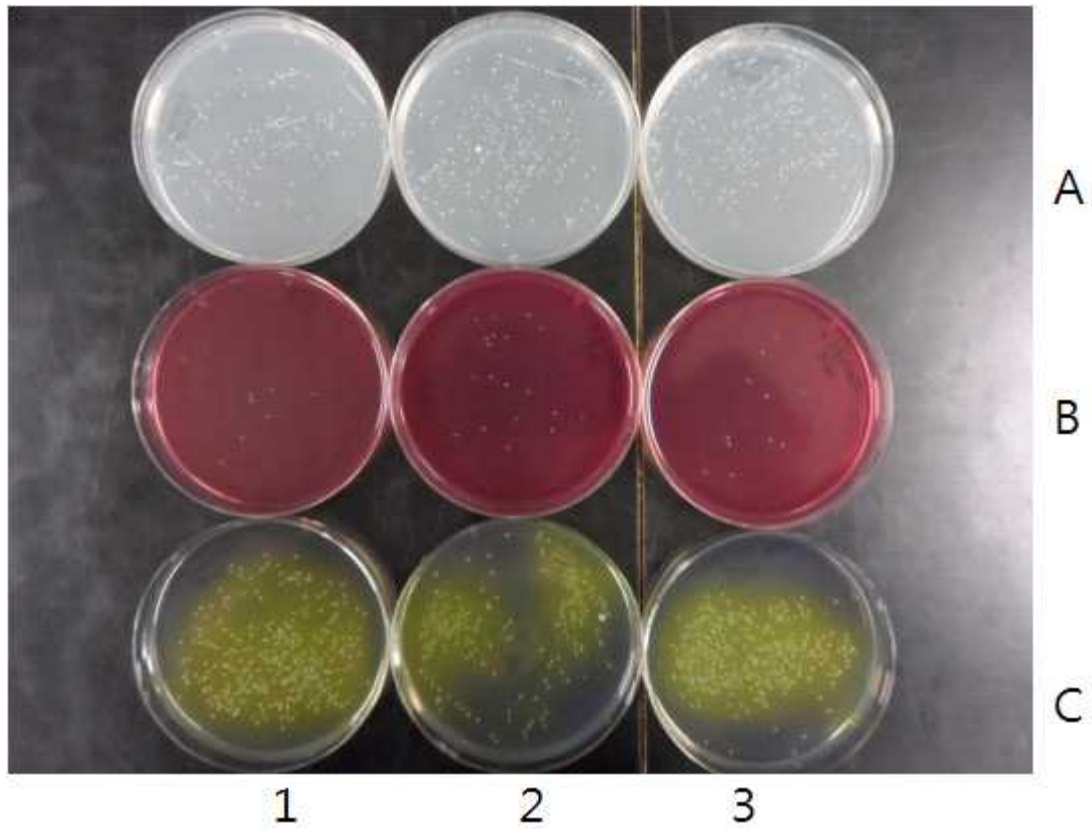


Fig 16. WPS소재류를 야외분리 3종 혼합균(살모넬라균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능평가 결과

1: Control , 2 : WPS, 3 : Ca-WPS

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConkey배지), C : 유산균수(BCP배지)

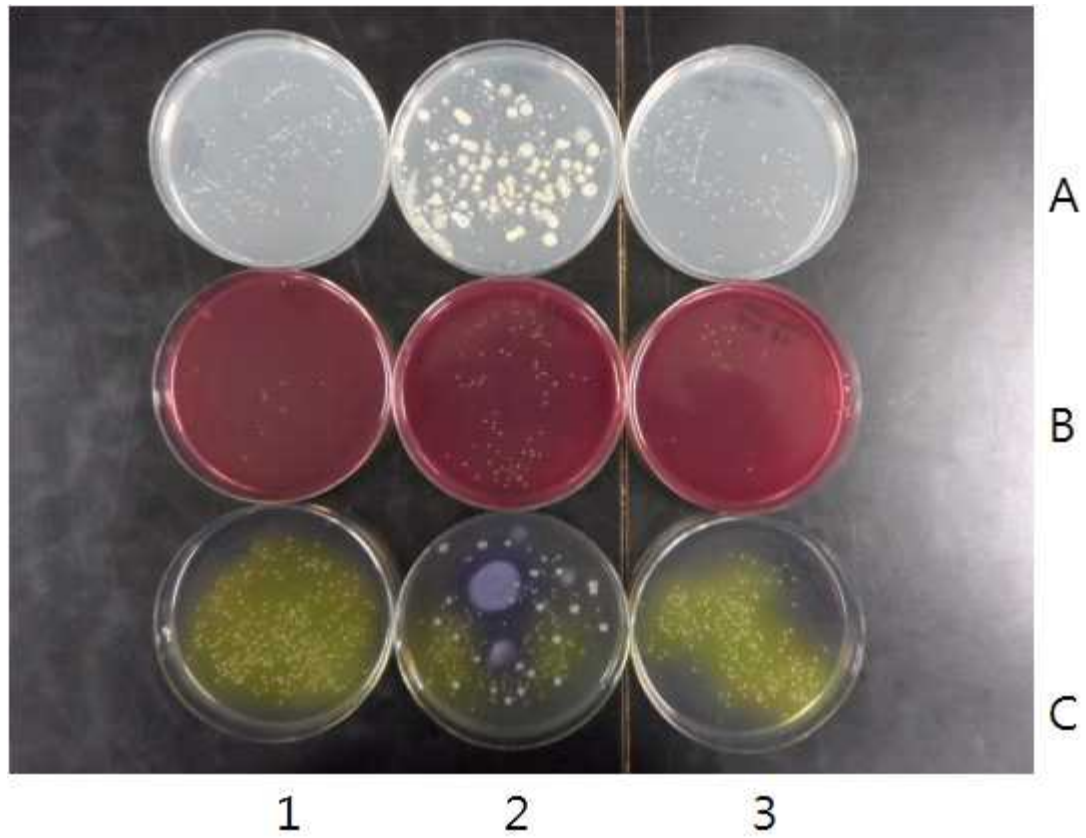


Fig 17. GMP계열 소재류를 야외분리 3종 혼합균(살모넬라균 기준 평가)에 대하여 농도별 처리시 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1: Control , 2 : GMP, 3 : CaZn-GHAC

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConkey배지), C : 유산균수(BCP배지)

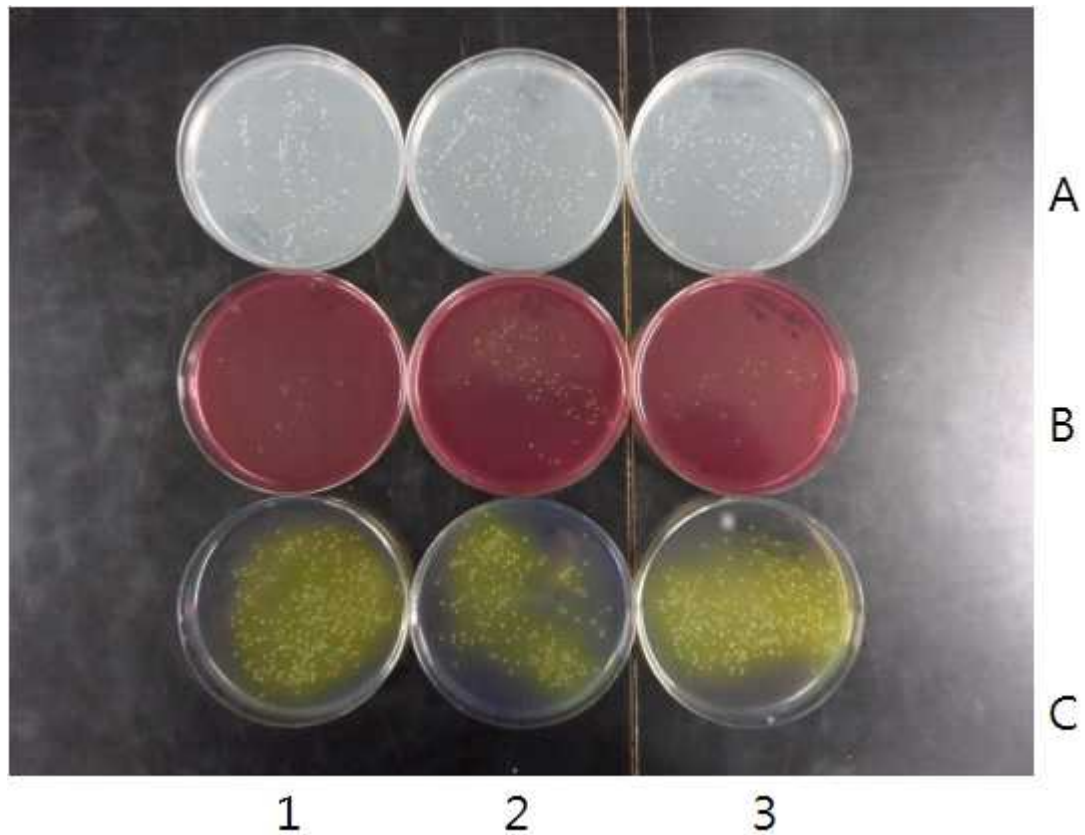


Fig 18. IMP계열 소재류를 야외분리 3종 혼합균(살모넬라균 기준평가)에 대하여 농도별 처리 시 총균수 대비 공기균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과

1: Control , 2 : IMP, 3 : CaZn-IHAC

A : 총균수(PC배지), B : 대장균구수(MacConkey배지), C : 유산균수(BCP배지)

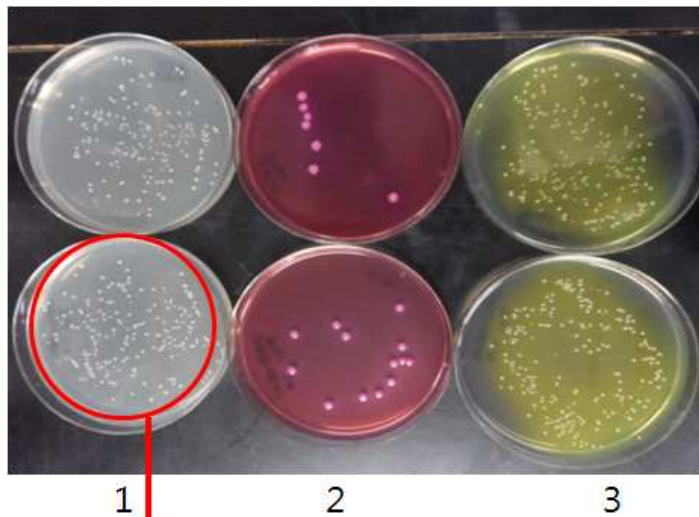


Fig 4. GMP 기질화 제조한 유기태화 미네랄 소재류인 CaZn-GAHC를 야외분리 3종 혼합균(일반균+대장균+살모넬라균+유산균)에 대하여 농도별 처리시, 총균수 대비 공시균 점유율 비교를 통한 Prebiotic효능 평가결과
 A : 대조구, B : GMP, 3 : CaZn-GHAC
 1: 총균수 (PC 배지), 2 : 대장균구수 (MacConKey배지), 3 : 유산균(BCP배지)

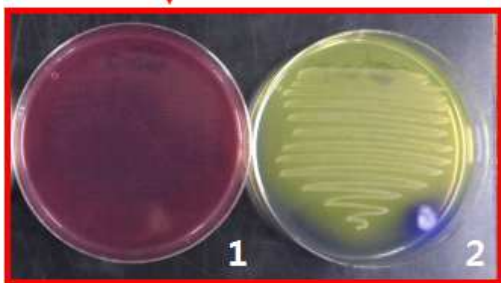


Fig 19. 3종 혼합균(살모넬라균 기준평가)의 유기태화 소재류 처리 후, 육즙고체배지(PC)내 생존 콜로니균 규명을 통한 Prebiotic(유산균 우점평가)효능 확인 결과(1: MacConkey배지, 2 : BCP배지)

하여 안전성을 평가하였다. 유기태 미량 광물질의 첨가한 사료를 급여한 계군의 혈액을 채취하여 조성 비율을 검사하였다. 혈액채취는 닭의 액와정맥에서 전혈을 약 3ml 채취하여 항응고제(EDTA-3k)가 함유된 진공채혈병에 3ml분주한 다음 잘 혼합하여 혈구성분을 측정하였다. 혈구성분은 Multi-species blood analyzer (HEMA Vet 950, CDC, USA)를 사용하여 WBC, 백혈구 감별계산과 백분율 그리고 RBC, hemoglobin (Hb), hematocrite, MCV, MCH, MCHC, RDW 및 Platelete를 측정하였다. 각 시기별 처리구와 대조구의 비교는 paired와 unpaired t test 및 Fisher's exact test로 유의성을 검정하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의차가 있는 것으로 하였다(Table 1)

5) 급여군의 총세균수와 대장균의 정량평가

유기태 미량 광물질 첨가 사료를 급여한 닭의 총세균수와 대장균의 조성에 어떠한 변화를 주는지를 비교 평가하여 안전성을 평가하였다. 시험구별로 분변 1g을 채취하여 PBS 10ml에 희석한 것을 원액으로 삼아 PBS에 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 까지 희석하여 agar에 접종하였다. 총균수는 Plate Count agar에, 장내세균은 MacConkey agar에 접종하여 확인하였다. 접종한 agar는 CO2 Incubator에서 37°C에서 24시간 배양한 후 세균의 집락 수를 계수하였다.

6) 급여군의 총세균수와 대장균의 정량평가

유기태 미량 광물질 첨가 사료를 급여한 닭의 총세균수와 대장균의 조성에 어떠한 변화를 주는지를 비교 평가하여 안전성을 평가하였다. 각 시험구별로 분변 1g을 채취하여 PBS 10ml에 희석한 것을 원액으로 삼아 PBS에 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 까지 희석하여 agar에 접종하였다. 총균수는 Plate Count agar에, 장내세균은 MacConkey agar에 접종하여 확인하였다. 접종한 agar는 CO2 Incubator에서 37°C에서 24시간 배양한 후 세균의 집락 수를 계수하였다.

7) Flowcytometer를 이용한 닭의 말초혈액내 림프구 증식력 평가

유기태 미량광물질 첨가 사료를 급여한 닭의 림프구 증식 유형을 비교하여 면역원성을 비교하였다. 닭의 익하 정맥에서 3ml씩 채혈하여 EDTA 들어있는 튜브를 이용하여 수집하였다. 채혈한 혈액을 Histopaque(1119, 1077)과 동량으로 섞어 700g로 30분간 원심분리하여 PBMC간의 결합을 분리하였다. PBMC는 PBS로 400g에서 5분간 원심분리하여 2회 washing한다. RBC lysis buffer로 실온에서 10분간 lysis한 후 PBS로 400g에서 5분간 원심분리하여 2회 washing하였다. PBS 1ml로 suspension하여 cell수를 1×10^8 cell/ml로 맞춘다. FITC anti-chicken CD4 (SouthernBiotech, USA)과 R-PE anti-chicken CD8(SouthernBiotech, USA)를 100배 희석한 용액과 혼합하여 암실에서 30분간 반응시켜 염색한다. 반응 후에 2회 원심 세척하고 PBS 200 μ l를 분주하여 유세포분석기 (FACSCalibur FACS, BD Biosciences, USA)로 CD4 T cell 및 CD8 T cell의 population도 R-PE와 FITC-conjugated monoclonal antibodies를 사용하여 유세포분석기로 측정하였다.

8) 닭의 면역 매개에 관련되는 사이토카인의 ELISA 정량 평가

유기태 미량광물질을 첨가한 사료를 급여한 시험구별 닭의 사이토카인을 측정함으로써 면역 매개에 관여하는 사이토카인의 활성 여부를 평가하고자 하였다. 이를 위하여 닭의 면역반

응에 관여하는 사이토카인 성분인 interleukin 2, interferon γ , Prostaglandin E2의 양을 측정하기 위해 ELISA방법을 실시하였다. 사이토카인 사이토카인의 양을 측정하기 위해 아래와 같이 Indirect ELISA 방법을 실시하였다. 특히, PGE2는 ProstaGlandin-E2라고 하며, 프로스타글란딘 계통의 신호분자로써 발열을 포함한 염증반응에 관여하며 INF- γ 과 IL-2는 Th1 사이토카인으로서 세포성 면역 반응에 관여한다.

* Indirect ELISA protocol

가) 항원을 coating buffer로 희석하여 ELISA plate에 100 μ l씩 분주한 후 plate를 sealing

film으로 덮어 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 배양한다.

나) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.

다) coating된 well에 blocking buffer 150 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1hour 동안 배양한다.

라) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.

마) primary antibody를 PBS에 희석하여 모든 well에 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한다.

바) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.

사) HRP-conjugated secondary antibody를 PBS에 희석하여 well에 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한다.

아) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.

자) plate의 모든 well에 TMB solution을 100 μ l씩 분주하여 어두운 곳에서 30분 배양한다.

차) plate의 모든 well에 stop buffer를 50 μ l씩 분주하여 450nm에서 흡광도를 측정한다.

9) 닭의 면역 매개관련 사이토카인의 생성에 관한 RT-PCR의 정량평가

연구에서는 일반사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미량 광물질 첨가 사료를 급여한 산란계에서의 면역 증강의 효과 유무를 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6과 Th1과 Th2 regulatory cytokine인 IFN- γ 의 mRNA 발현량의 비교를 통해 평가하였다. 각 시험구별로 닭의 사이토카인 생산에 관련 된 유전자의 발현 능력을 측정함으로써 급여된 유기태 미량 광물질의 면역 활성 여부를 평가하고자 하였다. 이를 위하여 그룹별 닭의 IL-1 β , IL-6, IFN- γ 유전자의 발현의 변화를 RT-PCR를 통해 평가 하였다. 닭의 혈액에서 적혈구 lysis buffer를 이용하여 혈중 백혈구를 분리하고 PBS로 세척한 후 RPMI1640 배지에서 하룻밤 증식시킨다. 다음날 plate를 PBS 로 washing하여 부착되지 않은 세포들은 버리고 부착되어 있는 macrophage를 LPS로 자극하고 4시간 후에 macrophage를 수거하여 total RNA를 추출한다. total RNA추출은 RNeasy Mini kit(Qiagen, USA)를 사용하여 제품설명서에 따라 수행한다. total RNA로부터 SuperScriptTM First-Strand synthesis system(Invitrogen, USA)를 이용하여 제품설명서에 따라 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 이용하여 IL-1, TNF- α 의 cytokine gene expression을 Real time-PCR방법으로 측정한다. IL-1과 TNF- α mRNA의 상대적인 정량을 위한 real-time PCR은 qTower2.2(analytikjena, Germany)을 사용하duTek. 전체 25 μ l 반응액에는 12.5 μ l의 Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG와 0.5 μ l의 ROX Reference Dye(Invitrogen, USA)를 넣고 1 μ g/1 μ l의 cDNA, 0.5 μ M/0.5 μ l의 Forward primer와 Reverse primer 그리고 0.5 μ M/0.25 μ l의

Fluorogenic probe가 포함되고, 나머지는 9.75 μ l의 DEPC-treated water로 채운다. 반응 조건은 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분의 과정을 40회 반복하여 행해진다. β -actin으로 표준화 및 측정된 chicken TNF- α 와 IL-1 mRNA의 상대적 정량은 상대적 Ct method(Livak and Schmittgen, 2001)에 의해 계산되고, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold)로 나타났다. RT-PCR를 위한 chicken IL-1 β , IL-6 그리고 IFN- γ 의 primer의 염기서열에 대한 내용은 Table 6과 같다.

10) 마크로파지 활성화 평가

급여된 유기태 미량광물질의 면역 활성화 여부를 평가하고자 각 시험구별로 닭의 비특이적 면역 반응인 마크로파지의 활성화를 측정함으로써 하였다. 이를 위하여 Zymosan A (form saccharomyces cerevisiae), PBS buffer (pH 7.2), Earle's balanced salt solution (without phenol red) Hank's balanced salt solution (HBSS) with 25mM Hepes, Luminol 그리고 Dimethyl sulfoxide의 재료를 준비하였다. 그리고 zymosan과 luminol, HBSS 25mM Hepes stock solution을 다음과 같이 조제하였다. 1g의 zymosan A를 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 끓이고, 1250 \times g에서 20분간 원심분리 한다. 상층액을 제거 하고, 2번 과정을 반복한다. 다시 상층액 제거하고, EBSS 40ml 첨가 (zymosan 25mg/ml stock) Luminol은 2.5 mg luminol을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹이고 4.96 ml의 PBS를 첨가한다. 녹인 luminol을 0.45 μ m의 크기의 필터에 통과시킨다(사용량 만큼 나누어 -20 $^{\circ}$ C의 어두운 냉동고에 보관한다). HBSS 25mM Hepes는 HBSS solution 100ml에 Hepes 59.6 mg을 넣는다. 유기태 미량 광물질을 사료에 첨가하여 사육된 닭에서 채혈된 혈액 sample 30~50ul 씩을 96 well plate에 넣고, HBSS containing 25mM Hepes를 200ul blood가 들어있는 plate에 첨가한 후 plate를 37 $^{\circ}$ C 어두운 배양기에 5분간 배양하였다. 배양이 끝난 plate에 luminol 10ul를 넣은 후 (조건에 따라서 5~10분간 배양하기도 한다). 다시 10ul의 zymosan을 추가로 넣은 후 luminometer로 측정하였다.(측정간격을 2분으로 하고 10번 측정). 측정된 값중 최고치의 값이 나온 것들의 평균과 표준편차를 구하고 이를 정리하여 결과를 분석하였다. Neutrophil function test 결과, 측정 시간(30분)후에 Se-Wps 대조군 대비 활성도가 증가하였으며 Ca-Wps의 경우 가장 빠른 시간내에 가장 높은 활성도를 보였다. 활성도 도달에 필요한 시간대별 비교에서 CuWps, FeWps, ZnWps 투여군은 대조군대비 비교할 때 비교적 동일한 시간 안에 활성도를 나타내었다.

11) 유기태 미량 광물질 급여시 계란내 면역글로브린 증대 효과 평가

각 시험구별로 닭의 면역 반응에 관련된 면역 글로블린의 발현 능력을 측정함으로써 급여된 유기태 미량 광물질의 면역 활성화 여부를 간접적으로 평가하고자 하였다. 계란 내 면역글로브린 IgY의 수준 평가를 ELISA로 실시하였다. IgY의 양을 측정하기 위해 아래와 같이 Indirect ELISA 방법을 실시하였다.

가) 항온을 coating buffer로 희석하여 ELISA plate에 100 μ l씩 분주한 후 plate를 sealing

film으로 덮어 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 배양한다.

나) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.

다) coating된 well에 blocking buffer 150 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1hour 동안 배양한다.

- 라) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.
- 마) primary antibody를 PBS에 희석하여 모든 well에 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한다.
- 바) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.
- 사) HRP-conjugated secondary antibody를 PBS에 희석하여 well에 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한다.
- 아) plate의 모든 well을 washing buffer 200 μ l씩 분주하여 3반복 wash한다.
- 자) plate의 모든 well에 TMB solution을 100 μ l씩 분주하여 어두운 곳에서 30분 배양한다.
- 차) plate의 모든 well에 stop buffer를 50 μ l씩 분주하여 450nm에서 흡광도를 측정한다.

2. 연구수행결과

가. 혈액 화학치 분석

미네랄 사료 첨가제의 투여군의 혈구성분변화에서 백혈구의 경우 대조군의 경우 $1508 \pm 254/\mu$ l였으며, Cu-Wps 첨가군에서는 $2320 \pm 348/\mu$ l개였으며, Fe-Wps 투여군에서는 $1772 \pm 478/\mu$ l였으며. 미량 광물질 종류별 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 미량 광물질별 Neutrophil, eosinophil, Basophil의 백분비를 각각 대조군과 비교하였다. neutrophil과 Eosinophil그리고 Basophil의 경우 Cu-Wps 첨가군에서 2017 ± 219 , 157 ± 12.9 그리고 100 ± 8.16 로 높았으며 monocyte와 혈소판의 경우 Ca-WPS 첨가군에서 408 ± 91.1 와 58666.67 ± 15534.91 로 가장 높았다 (p 0.05).

나. 급여군의 총세균수와 대장균의 정량평가

1) 총균수

분변 1g당 총균수의 비교 평가에서, 유기태 광물질을 투여한 계군의 경우 Se-Wps의 경우 평균 5×10^8 , Ca-Wps의 경우 5.6×10^8 , Fe-Wps의 경우 7.5×10^8 , Cu-Wps의 경우 8×10^8 이었다 이러한 결과는 일반사료를 급여한 대조군의 평균 총세균수인 1.1×10^8 보다 월등히 높았으며 그 중에서도 Cu-WPS의 총균수가 가장 높았다.

2) 대장균군

분변 1g당 *E.coli* 수는 대조군에서 가장 높았으며 시험군의 대장균수의 비교 평가에서 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 평균 1.3×10^5 , Ca-Wps의 경우 7.46×10^5 , Fe-Wps의 경우 2.65×10^4 , Cu-Wps의 경우 1.3×10^5 이었다. 이러한 결과는 일반사료를 급여한 대조군의 평균 총세균수인 2.0×10^5 보다는 낮았으며 그 중에서도 Se-Wps, Zn-Wps, 그리고 Cu-WPS의 경우 비교적 낮은 수의 대장균이 검출되었다.

다. Flowcytometer를 이용한 닭의 말초혈액내 림프구 증식력 평가

말초 혈액내 CD+4는 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 36.252 ± 8.788 이었으며 Fe-Wps의 경우 35.026 ± 7.520 로서 대조군 대비 비교적 높은 비율로 나타났다. 그리고 Zn-Wps, Ca-Wps

Cu-WPS의 경우 대조군 대비 비교적 낮은 비율로 분포하였다 (Table 2). 말초 혈액내 CD+8는 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 9.038 ± 4.059 이었으며 Fe-Wps의 경우 8.262 ± 2.531 , Zn-Wps의 경우 7.623 ± 0.886 로서 대조군 대비 비교적 높은 비율로 나타났다. 그러나, Ca-Wps와 Cu-WPS의 경우 6.277 ± 2.499 와 4.558 ± 1.949 로 대조군 대비 비교적 낮은 비율로 분포하였다. 그리고 CD4/CD8 비율에 있어서 Cu-WPS의 경우 대조군과 유사한 결과를 나타내었으나 다른 모든 시험구에서는 대조구보다 낮은 비율을 나타내었다.

라. 닭의 면역 매개에 관련되는 사이토카인의 ELISA 정량 평가

1) PGE2

PGE2는 ProstaGlandin-E2라고 하며, 프로스타글란딘 계통의 신호분자로서 발열을 포함한 염증반응에 관여하며 INF- γ 과 IL-2는 Th1 사이토카인으로서 세포성 면역 반응에 관여한다. 실험군의 혈청내 PGE2 양을 측정한 결과 유기태 미량 광물질 Fe-Wps에서 7.119 ± 0.166 , Zn-Wps에서 7.008 ± 0.465 , Ca-Wps에서 7.018 ± 0.437 로 대조군 대비 비교적 높은 수준의 PGE2 양이 확인되었다 그러나 Se-Wps의 경우 6.869 ± 0.064 , 그리고 Cu-WPS는 6.907 ± 0.088 로 대조군과 유사한 결과를 나타내었다 (Table 3).

2) 혈청내의 IL2양 측정

실험군의 혈청내 IL-2의 양을 측정한 결과 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 1.146 ± 0.082 이었으며 Zn-Wps의 경우 1.034 ± 0.027 그리고 Cu-Wps는 1.044 ± 0.052 는 이었다. 이러한 결과는 대조군 대비 비교적 높은 IL-2함량을 나타내었다. 그러나 Ca-Wps와 Fe-Wps의 경우엔 0.967 ± 0.028 . 그리고 0.993 ± 0.075 로서 대조군 대비 유사한 결과가 확인되었다 (Table 4).

3) IFN γ

실험군의 혈청내 IFN γ 양을 측정한 결과 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 1.625 ± 0.100 , FeWps에서 1.553 ± 0.109 , ZneWps의 경우 1.538 ± 0.027 그리고 Cu-WPS는 1.730 ± 0.200 이었다. 이러한 결과는 대조군 대비 비교적 낮은 함량을 나타내었다 (Table 5).

마. 닭의 면역 매개관련 사이토카인의 생성에 관한 RT-PCR의 정량평가

본 연구에서는 일반사료를 섭취시킨 대조군 대비 선발 유기태 미량 광물질 첨가한 사료를 급여한 산란계에서의 면역 증강의 효과 유무를 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현량의 변화 비교를 통해 평가하였다. pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 의 경우 유기태 미량 광물질 Zn-Wps 첨가군에서는 대조군 대비 비교적 높은 수준이 확인되었다. 그러나 Se-Wps, Ca-Wps, Fe-Wps, 그리고 Cu-Wps의 경우 대조군 대비 낮은 수준의 mRNA 발현이 확인되었다. pro-inflammatory cytokine인 IL-6의 경우 유기태 미량 광물질 Ca-Wps 첨가군에서는 대조군 대비 비교적 높은 수준이 확인되었다. 그러나 Zn-Wps, Cu-Wps 그리고 Fe-Wps의 경우 대조군과 유사한 발현이 확인 되었으나, Se-Wps의 경우 대조군 대비 낮은 수준의 mRNA 발현이 확인되었다. Th1과 Th2 regulatory cytokine인 IFN- γ 의 mRNA 발현량의 변화 비교의 경우 유기태 미

광물질 Fe-Wps 첨가군에서는 대조군 대비 비교적 높은 수준이 확인되었다. 그러나 Ca-Wps, Cu-Wps의 경우 대조군과 유사한 mRNA의 발현이 확인되었다. 그러나 Se-Wps과 Zn-Wps의 경우 대조군 대비 낮은 수준의 mRNA 발현이 확인되었다.

마) 마크로파지 활성화 평가

실험군의 난황내 IgY의 함량을 측정한 결과 Se-WPS 시험군은 8.163 ± 3.565 으로서 가장 높은 농도를 보였으며 Cu-Wps에서도 6.351 ± 1.588 의 수준으로 대조군 대비 비교적 높은 농도의 수준이었다. 그러나 Ca-Wps와 Fe-Wps 그리고 Zn-Wps의 경우 대조군 대비 유사한 함량을 나타내었다.

4. 고찰

본 연구는 유기태 미네랄 강화 사료 섭취가 양계 사양시 발생하는 고질적 질병의 예방 및 치료효과의 가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위해서 포함 Se-WPS(selenium 0.4ppm 첨가군), Ca-WPS(calcium 31,500ppm 첨가군), Fe-WPS(iron 900ppm 첨가군), Zn-WPS(zinc 150ppm 첨가군), 그리고 Cu-WPS(copper 22.5ppm 첨가군)으로 나누어 평가하였다.

유기태 미량광 물질 급여시 계군의 안전성 평가를 위해서 혈액학적 수치를 분석하였다. 유기태 미량광 물질 사료 첨가제의 투여군의 혈구성분 변화에서 백혈구의 경우 대조군의 경우 $1508 \pm 254/\mu\text{l}$ 였으며, Cu-Wps 첨가군에서는 $2320 \pm 348/\mu\text{l}$ 였으며, Fe-Wps 투여군에서는 $1772 \pm 478/\mu\text{l}$ 였으며. 미량 광물질 종류별 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 미량 광물질별 Neutrophil, eosinophil, Basophil의 백분비를 각각 대조군과 비교하였다. neutrophil과 Eosinophil 그리고 Basophil의 경우 Cu-Wps 첨가군에서 2017 ± 219 , 157 ± 12.9 그리고 100 ± 8.16 로 높았으며 monocyte와 혈소판의 경우 Ca-WPS 첨가군에서 408 ± 91.1 와 58666.67 ± 15534.91 로 가장 높았다 ($p < 0.05$). 이러한 결과를 종합해 볼 때 염증과 같은 비특이적인 면역 반응시 나타나는 백혈구의 상승효과는 확인되지 않았으며 염증 반응에 관여하는 neutrophil의 경우도 특이적인 상승효과는 인정되지 않았다. 그러나 Ca-WPS 첨가군에서의 경우 상대적인 증가가 인정되었다. 이러한 결과는 급여군의 총세균수와 대장균의 정량평가 결과에서 분변 1g당 총균수의 비교 평가에서, 유기태 광물질을 투여한 계군의 경우 SeWps의 경우 평균 5×10^8 , CaWps의 경우 5.6×10^8 , FeWps의 경우 7.5×10^8 , CuWps의 경우 8×10^8 이었다. 이러한 결과는 일반사료를 급여한 대조군의 평균 총세균수인 1.1×10^8 보다 월등히 높았으며 그 중에서도 Cu-WPS의 총균수가 가장 높았다. 대조군 대비 실험군에서는 공통적으로 총세균의 증가를 가져옴으로써 장관내 유해 세균총을 억제할 수 있는 가능성이 확인되었으며 숙주동물인 닭에서의 안정성도 확인되었다. 또한 분변 1g당 *E.coli* 수의 확인에서도 대조군에서 가장 높았다. 시험군의 대장균수의 비교 평가에서 유기태 광물질 SeWps의 경우 평균 1.3×10^5 , CaWps의 경우 7.46×10^5 , FeWps의 경우 2.65×10^4 , CuWps의 경우 1.3×10^5 이었다. 이러한 결과는 일반사료를 급여한 대조군의 평균 총세균수인 2.0×10^5 보다는 낮았으며 그 중에서도 SeWps, ZnWps, 그리고 Cu-WPS의 경우 비교적 낮은 수의 대장균이 검출되었다. 이러한 결과는 장내 유용세균의 증가로 병원성 대장균을 억제되었으며 산란계에서 사육시 안전할 수 있는 것으로 생각된다. 유기태 미량광물질 첨가 사료를 급여한 닭의 면역 평가를 위해서 Flowcytometer를 이용한 닭의 말초혈액내 림프구 증식력을 확인하였다. 말초혈액에 분포하는 CD4는 Th세포로서 항원을 인식하여 면역

초기 활성화에 관여하며 CD+8는 cytotoxic T세포로서 항원을 직접 사멸시키는 작용을 수행한다. 본 실험의 결과, 말초 혈액내 CD+4 비율은 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 36.252 ± 8.788 이었으며 Fe-Wps의 경우 35.026 ± 7.520 로서 대조군 대비 비교적 높은 비율로 나타났다. 따라서 Se-Wps와 Fe-Wps 첨가사료 급여는 닭에서 문제시 되고 있는 바이러스 질병의 예방에 관여하는 세포성 면역반응의 활성화에 도움을 줄 수 있으리라 생각된다. 또한 말초 혈액내 CD+8 비율은 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 9.038 ± 4.059 이었으며 Fe-Wps의 경우 8.262 ± 2.531 , Zn-Wps의 경우 7.623 ± 0.886 로서 대조군 대비 비교적 높은 비율로 나타났다. 따라서 Se-Wps, Fe-Wps 그리고 Zn-Wps의 사료내 첨가는 닭에 감염된 세균, 바이러스에 감염된 세포의 직접 사멸에 관여하는 cytotoxic T세포의 활성을 유도할 수 있으리라 생각된다. 말초혈액에서의 CD4/CD8 비율은 일반적으로 2:1의 비율로 구성되어있다 그러나 본 연구에서 확인된 결과는 Cu-WPS의 경우 대조군과 유사한 결과를 나타내었으나 다른 모든 시험구에서는 대조구보다 낮았으며 상대적으로 CD+8의 비율이 높아 세포의 직접 사멸에 관여하는 cytotoxic T세포의 역할과 관련된다고 생각된다. 닭의 면역 매개에 관련되는 사이토카인의 정량 분석을 ELISA 평가하였다 면역에 관련되는 다양한 사이토카인 중 PGE2는 ProstaGlandin-E2라고 하며, 프로스타글란딘 계통의 신호분자로서 발열을 포함한 염증반응에 관여하며 INF- γ 과 IL-2는 Th1 사이토카인으로서 세포성 면역 반응에 관여한다. 본 연구에서 확인된 PGE2의 경우 유기태 광물질 Fe-Wps에서 7.119 ± 0.166 , Zn-Wps에서 7.008 ± 0.465 , Ca-Wps에서 7.018 ± 0.437 로 대조군 대비 비교적 높은 수준의 IFN γ 양이 확인되었다. 따라서 Fe-Wps, Zn-Wps, 그리고 Ca-Wps의 사료내 첨가는 염증 반응의 조절 매개 역할을 할 수 있으리라 생각된다. 또한 혈청내의 IL2양 측정 결과 군의 혈청내 IL-2의 양을 측정한 결과 유기태 광물질 Se-Wps의 경우 1.146 ± 0.082 이었으며 Zn-Wps의 경우 1.034 ± 0.027 그리고 Cu-WPS는 1.044 ± 0.052 는 이었다. 이러한 결과는 대조군 대비 비교적 높은 IL-2함량을 나타내었다. 따라서 사료내 Se-Wps, Zn-Wps 그리고 Cu-WPS 첨가는 닭의 세포성 면역 반응을 활성화시킬 수 있으며 백신투여시 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있는 잇점이 될 수 있으리라 생각된다. 유기태 미량 광물질의 투여에 따른 혈청내 IFN γ 발현과는 대조군 대비 비교적 낮은 함량을 나타내었다. 이와같이 혈청학적인 방법을 통해서 확인된 사이토카인과 닭의 면역 증강의 효과 유무를 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6과 Th1과 Th2 regulatory cytokine인 IFN- γ 의 mRNA 발현량의 비교를 통해 평가하였다. pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 의 경우 유기태 미량 광물질 Zn-Wps 첨가군에서는 대조군 대비 비교적 높은 수준이 확인되었다. 이것은 PGE2의 농도에서 확인된 Zn-Wps의 염증매개성 반응과 동일한 결과로 확인되었다. 그러나 IL-6에서 확인된 mRNA 발현량은 Ca-Wps 첨가군에서는 대조군 대비 비교적 높은 수준이 확인되어 ELISA를 통해 확인된 결과와는 일치하지 않았다. Th1과 Th2 regulatory cytokine인 IFN- γ 의 mRNA 발현량의 변화 비교의 경우 유기태 미량 광물질 Fe-Wps 첨가군에서는 대조군 대비 비교적 높은 수준이 확인되었다. 따라서 사료내 Fe-Wps 첨가는 Se-Wps, Zn-Wps 그리고 Cu-WPS 첨가와 함께 닭의 세포성 면역 반응 활성화 역할을 유도할 수 있으리라 생각된다. 마크로파지 활성화는 동물에서 비특이적 면역 반응으로서 숙주의 방어뿐만 아니라 세균과 바이러스와 같은 항원을 표시하는 중요한 작용을 한다. 따라서 마크로파지의 활성화는 면역반응의 1단계 작용으로서 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서 확인된 유기태 미량광물질 첨가 사료를 급여한 산란계의 마크로파지 활성화 평가 결과, 측정 시간(30분)후에 Se-Wps에서 대조군 대비 활성화도가 증가하였으며

Ca-Wps의 경우 빠른 시간내에 가장 높은 활성도를 보였다. 따라서 다른 면역 활성 능력과 관련하여 공통적으로 Se-Wps 닭의 비특이적 면역 반응을 유도 할 수 있으리라 생각된다. 유기태 미량 광물질 급여시 계란내 면역글로브린 증대 효과를 평가하였다. 실험군의 난황내 IgY의 함량을 측정한 결과 Se-WPS 시험군은 8.163 ± 3.565 으로서 가장 높은 농도를 보였으며 Cu-Wps에서도 6.351 ± 1.588 의 수준으로 대조군 대비 비교적 높은 농도의 수준이었다. 따라서 사료내 Se-WPS와 Cu-Wps 첨가는 면역 반응에서 체액성 방어 작용에 관여하는 면역글로블린의 증강에 효율적으로 역할을 수행할 수 있으리라 생각된다.

결론적으로 유기태 미량광물질 Se-WPS(selenium 0.4ppm), Fe-WPS(iron 900ppm 첨가군), Zn-WPS(zinc 150ppm 첨가군), 그리고 Cu-WPS(copper 22.5ppm 첨가군)을 사료내 첨가하여 급여 할 경우 닭에서는 세포성 면역 반응 활성화와 체액성 면역 반응 활성화를 유도되어 효과적인 항병력을 제공될 수 있으리라 생각된다.

Table1. Hematological values in layers feed with organic trace minerals

\ Groups	Control	Se-WP S	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS
WBC / μ l	1508 \pm 254	1653 \pm 770	1770 \pm 129	1772 \pm 478	1641 \pm 3048	2320 \pm 348
Neutrophil / μ l	1202 \pm 323	1188 \pm 566	1190 \pm 118	1424 \pm 434	1249 \pm 2644	2017 \pm 219
Monocyte / μ l	178 \pm 115	292 \pm 207	408 \pm 91.1	186 \pm 157	241 \pm 57.7	43.3 \pm 130
Eosinophil / μ l	82 \pm 8.37	112 \pm 42.6	97.5 \pm 27.5	84 \pm 39.1	98 \pm 220	157 \pm 12.9
Basophil / μ l	44 \pm 11.4	58.3 \pm 27.9	70 \pm 36.5	72 \pm 27.7	65.9 \pm 121	100 \pm 8.16
Platelete / μ l	58600 \pm 48982.6	40333.3 \pm 20306	58666.67 \pm 15534.91	28400 \pm 1158.9	33065 \pm 12288.2	16000 \pm 21771.5

Table 2. Effect of organic trace minerals on the lymphocyte populations of blood in layers.

Lymphocyte MHC \ Groups	Control (%)	Se-WPS (%)	Ca-WPS (%)	Fe-WPS (%)	Zn-WPS (%)	Cu-WPS (%)
CD4	33.902 ±14.56	36.252 ±8.788	23.613 ±4.934	35.026 ±7.520	31.693 4.262±	25.145 ±4.233
CD8	6.336 ±2.021	9.038 ±4.059	6.277 ±2.499	8.262 ±2.531	7.623 ±0.886	4.558 ±1.949
CD4/CD8	5.634 ±2.836	4.982 ±2.720	4.071 ±0.864	4.583 ±1.668	4.165 ±0.386	5.978 ±1.676

Table 3 Effect of organic trace minerals supplementation on the PGE2 levels of layers.

Groups(pg/ml)					
Control	Se-WPS	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS
6.935±0.369	6.869±0.064	7.018±0.437	7.119±0.166	7.008±0.465	6.907±0.088

Table 4 Effect of organic trace minerals supplementation on the IL2 levels of layers.

Groups(pg/ml)					
Control	Se-WPS	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS
0.998±0.082	1.146±0.082	0.967±0.028	0.993±0.075	1.034±0.027	1.044±0.052

Table 5. Effect of organic trace minerals supplementation on the IFN- γ levels of layers

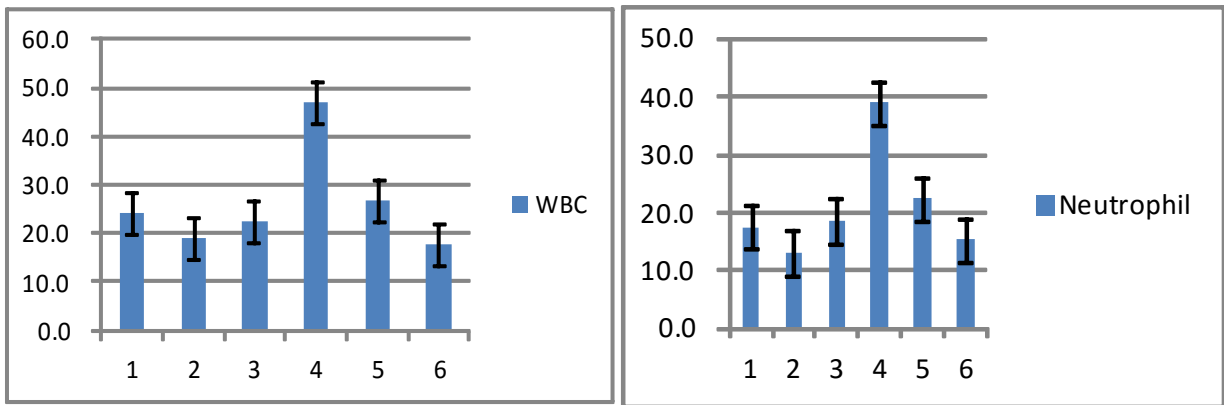
Groups(pg/ml)					
Control	Se-WPS	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS
2.239±0.985	1.625±0.100	1.479±0.00	1.553±0.109	1.538±0.027	1.730±0.200

Table 6. Primer and probe sequences for chicken IL-1, IL-6 and IFN- γ

RNA target		Sequence	Product size (bp)	Accession no.
IL-1 β	F	TGGGCATCAAGGGCTACA	244	Y15006
	R	TCGGGTTGGTTGGTGATG		
IL-6	F	CAAGGTGACGGAGGAGGAC	254	AJ309540
	R	TGGCGAGGAGGGATTTCT		
IFN- γ	F	AGCTGACGGTGGACCTATTATT	259	Y07922
	R	GGCTTTGCGCTGGATTC		

Table. 7 Effect of organic trace minerals supplementation on the IgY levels of yolk sac in layers.

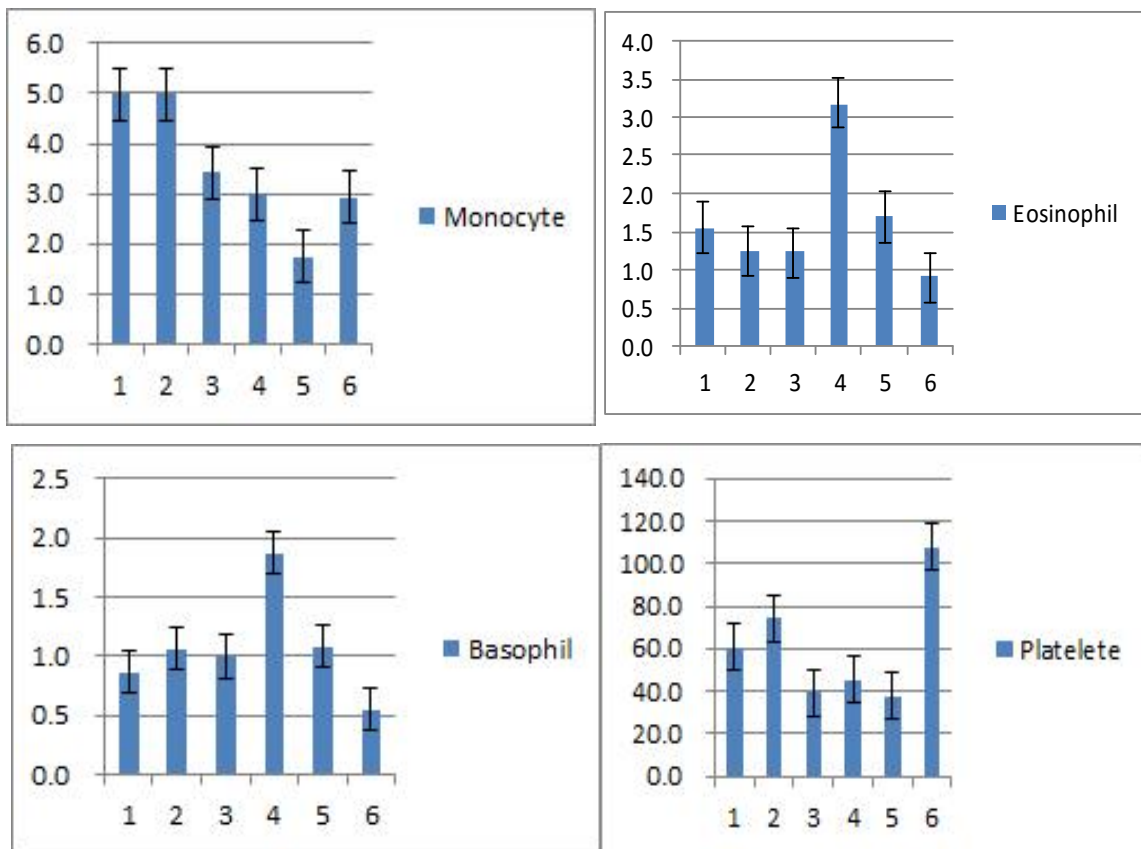
Groups($\mu\text{g/ml}$)					
Control	Se-WPS	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS
5.817 \pm 2.068	8.163 \pm 3.565	5.897 \pm 1.282	5.025 \pm 0.605	4.784 \pm 1.490	6.351 \pm 1.588



* Y 표시단위 : WBC(×10²), Neutrophil(×10²)

* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control) (p < 0.05)

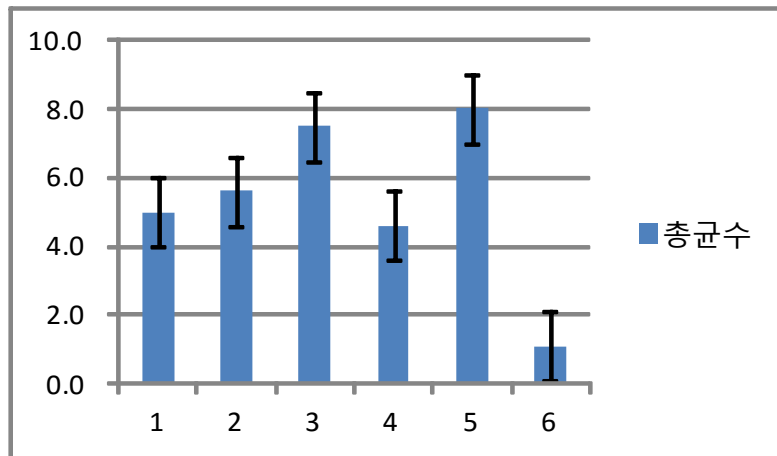
Figure 1.1 Table1. Hematological values in layers feed with organic trace minerals



* Y축 표시단위 : Monocyte(×10²), Eosinophil(×10²), Basophil(×10²), Platlete(×10³)

* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control)

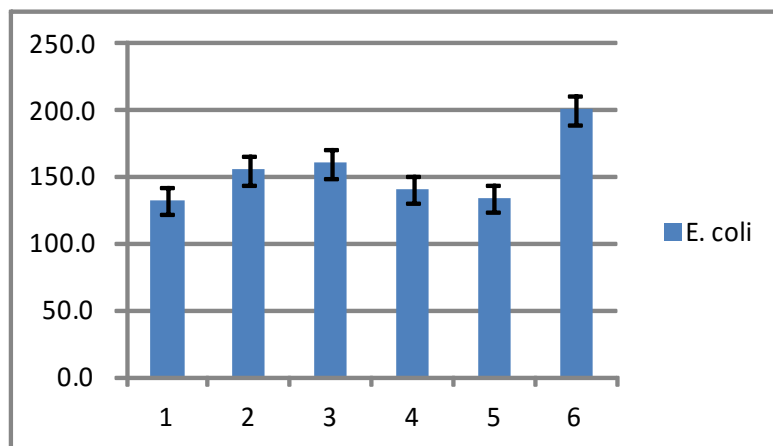
Figure 1.2. Table1. Hematological values in layers feed with organic trace minerals



* Y 표시단위 : $\times 10^8$

* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control)

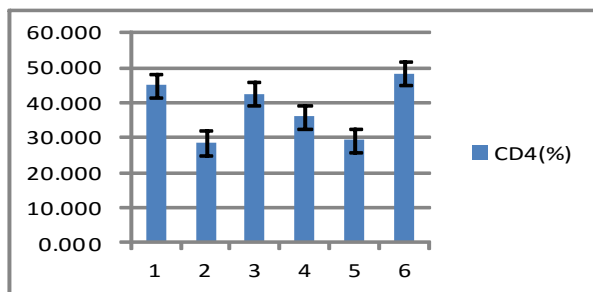
Figure 2.1. Effect of organic trace minerals on the numbers of Coli form bacteria populations in feces of the layers.



* Y축 표시단위 : $\times 10^3$

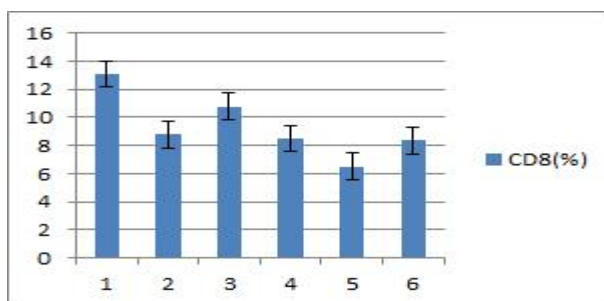
* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control)

Figure 2.2. Effect of organic trace minerals on the numbers of *E.coli* form bacteria populations in feces of the layers.



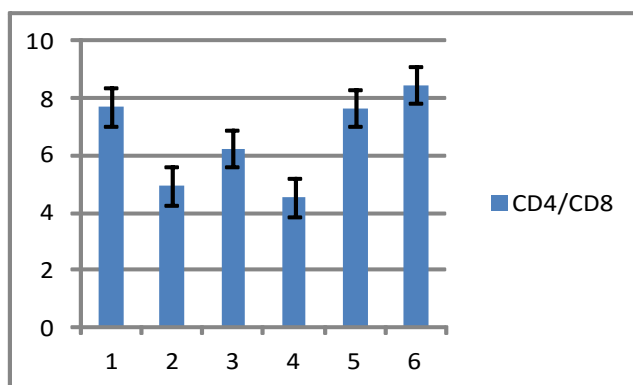
* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control) (p < 0.05)

Figure 3.1. Proportion of CD4+ Regulatory T Lymphocytes in layer feed with organic trace minerals.



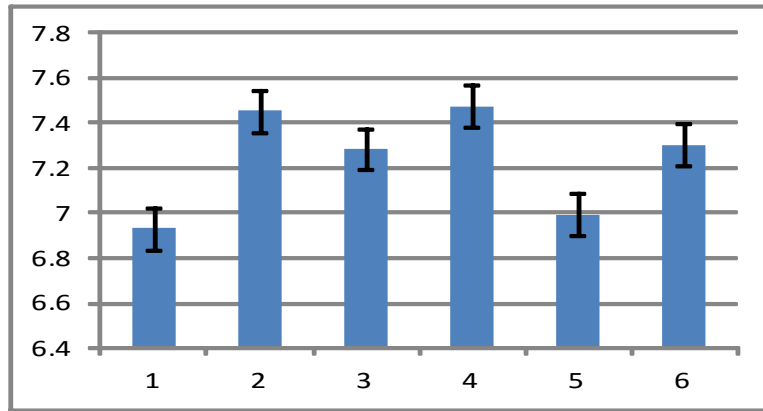
* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control) (p < 0.05)

Figure 3.2. Proportion of CD8+ Regulatory T Lymphocytes in layer feed with organic trace minerals.



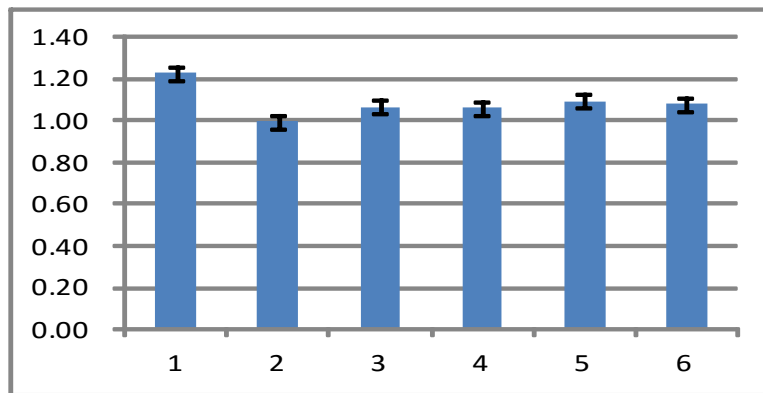
* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control) (p < 0.05)

Figure 3.3. Proportion of CD4/CD8 Regulatory T Lymphocytes in layer feed with organic trace minerals.



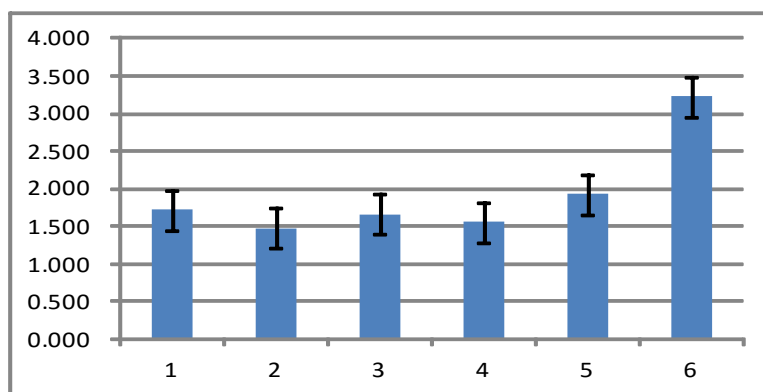
* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control) (p 0.05)

Figure 4.1 Effect of organic trace minerals supplementation on the PGE2 levels of layers.



* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control)

Figure.4.2. Effect of organic trace minerals supplementation on the IL2 levels of layers.



* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control)

Figure.4.3. Effect of organic trace minerals supplementation on the IFN- γ levels of layers.

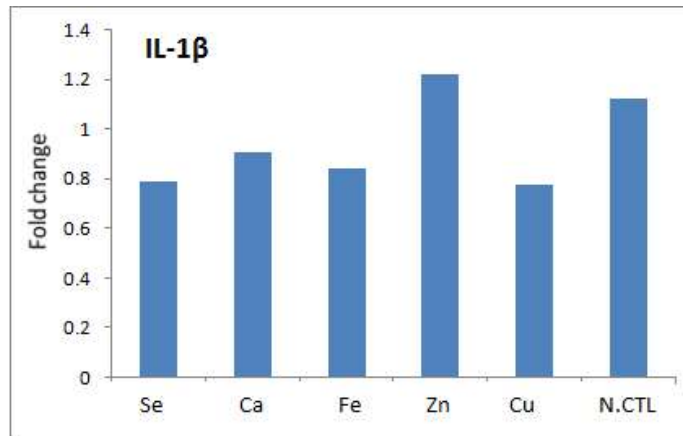


Figure 5.1 Effect of organic trace minerals supplementation on the mRNA levels of IL-1 β in layers.

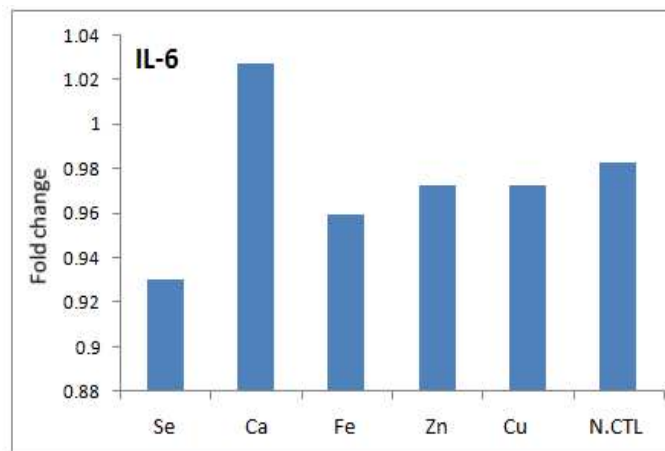


Figure 5.2 Effect of organic trace minerals supplementation on the mRNA levels of IL-6 in layers.

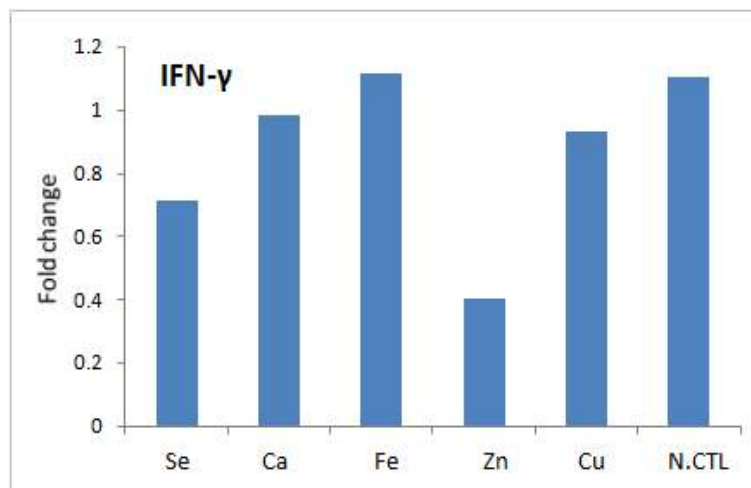


Figure 5.3 Effect of organic trace minerals supplementation on the mRNA levels of IFN- γ in layers.

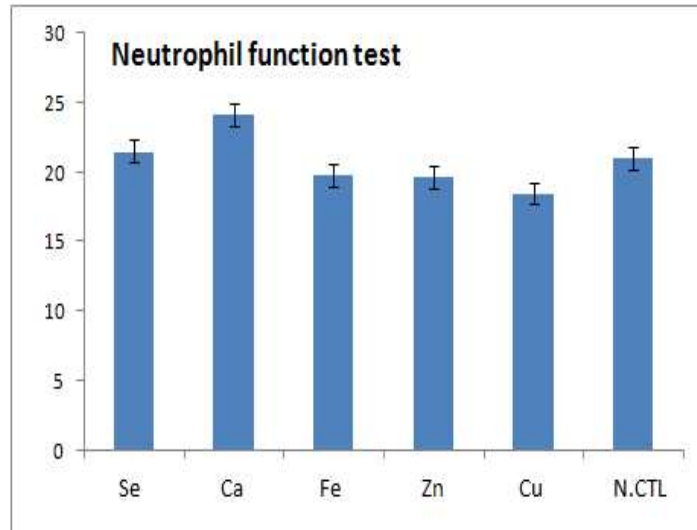
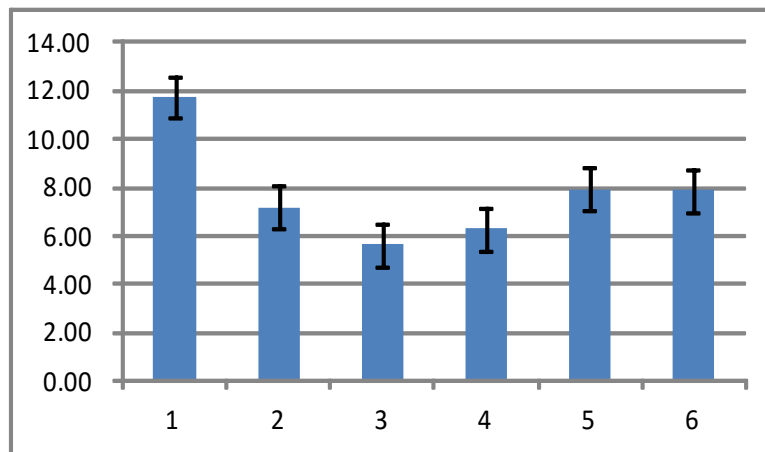


Figure 6. Effect of organic trace minerals supplementation on the Neutrophil levels of layers.



* Group : 1(Se-WPS), 2(Ca-WPS), 3(Fe-WPS), 4(Zn-WPS), 5(Cu-WPS), 6(Control)

Figure 7. Effect of organic trace minerals supplementation on the IgY levels of yolk sac in layers.

제 6 절 미네랄 사료첨가제의 급여에 의한 산란계에서의 살모넬라증에 대한 항병력 평가

1. 연구목표

가금티푸스는 오스트레일리아, 북아메리카와 대부분의 유럽 국가에서는 박멸되었으나, 아직까지 아시아와 아프리카, 남부와 중앙아메리카에서는 여전히 양계장의 중요한 문제로 남아있다. 국내에서도 양계 산업의 현장에서 가장 심각한 난계대 전염병으로서 문제가 되고 있다. 원인체인 살모넬라는 대식세포내에서 생존하기 때문에 항생제 치료에 의해 쉽게 제거되지 않으며 대표적으로 양계장의 난계대 감염증을 일으키는 질병이다. 국내에서는 가금티푸스의 예방 위해 백신이나 항생제를 사용하고 있으나 아직까지 효과적인 질병 박멸의 결과를 갖지 못하고 있다. 또한 백신이나 항생제 투여에 따른 항생제의 내성균주가 출현과 백신의 특성에 따른 방어 수준의 한계, 사료 이용율의 감소 등과 같은 부작용이 발생하고 있다.

현재와 같은 국내의 수동적인 세균성 질병치료 및 예방기술로는 살모넬라 질병의 근절이 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 기능성 미네랄 급여가 육계의 항병력에 미치는 영향을 평가하여 항생제 대체제로서의 가능성을 확인하기 위하여 육계에 *S. Gallinarum*을 인공 감염시킨 후, 육계에 대해 생존율 평가, 분변의 세균수 조사, 비장과 맹장내의 감염균주의 분리 및 부검을 통해 최종 양계생산 현장에서의 고질적인 생산 저해성 질병에 대한 예방 및 치료효과의 가능성을 확인하는데 있다. 본 연구에서는 선행 연구를 통해 선발된 유기태화 미네랄 소재 (WPS-Fe, GHAC-Ca, GHAC-CaFe, GHAC-CaZn, OCHT-Fe)를 *Salmonella Gallinarum*을 인공 감염시킨 산란계에 적용하여 계란 생산의 변화, 살모넬라 균의 배출 정도, 폐사율 등의 평가를 통해서 생산 저해성 질병에 대한 예방 및 치료효과의 가능성을 확인하고자 한다.

2. 연구수행방법

가. 실험시료

본 시험에 사용한 시험물질로 한일바이오메드 (Yeonggwang, Korea)에서 개발한 유기태화 미네랄 소재류 (WPS-Fe, GHAC-Ca, GHAC-CaFe, GHAC-CaZn, OCHT-Fe)를 제공받아 사용하였다.

나. 공시동물 및 실험기간

30주령의 Hy-Brown 산란계를 공시하여 유기태 미량광물질을 첨가한 사료를 총 6주간 급여하였으며 본 시험에서는 산란계사료에 유기태 미량광물질인 철, 아연, 구리, 셀레늄 그리고 칼슘을 Table 1의 시험설계의 내용과 같은 농도로 조성하여 첨가 .

다. 실험설계

사양지침은 전남대학교 실험동물 관리기준에 따라 사육실에서 실시하였다. 본 시험에서는 산란계사료에 유기태 미량광물질인 철, 아연, 구리, 셀레늄 그리고 칼슘을 다음과 같은 농도로 조성하여 첨가 급여하였을 때 면역력 증강 및 항질병 효과를 평가 하고자 하였다. 실험군의 편

성은 편성은 6 에 3반복 (반복당 5수)으로 나누어 실시하였다. Table 1과 같은 유기태 미네랄 농도 급이 대상군으로 나누어 실시하였다.

라. 실험 사료

기초사료로 사용된 산란계사료 (농협사료, Korea)는 Table2의 조성 성분의 사료를 급이하였다.

마. 사양관리

사양지침은 전남대학교 실험동물 관리기준에 따라 사육실의 케이지에서 실시하였으며, 실험군의 편성은 6처리군 에 3반복 (반복당 5수)으로 2단 케이지에 완전임의 배치하여 사육하였다. 실험사료와 물은 자유채식 및 음수시켰으며, 기타 사양관리는 국내에서 일반적으로 행해지고 있는 사양관리 방법에 준하여 실시하였다.

바. 현장 적용성 평가 조사

미네랄 사료첨가제의 급여에 의한 산란계에서의 살모넬라증에 대한 항병력 평가를 위하여 혈액 화학치 분석, 급여군의 총세균수와 대장균의 정량평가, Flowcytometer를 이용한 닭의 말초혈액내 림프구 증식력 평가, 닭의 면역 매개관련 사이토카인의 생성에 관한 ELISA평가 등을 실시하였다.

Salmonella Gallinarum 인공감염에 대한 생존율

실험대상 병아리는 각 처리군 당 60수씩 공시하였으며, 인공 감염균을 접종하기 전, 2주 동안 정해진 실험사료를 급여하여 적응시켰다. 이 실험에서 사용된 *S. Gallinarum*은 자연 발생한 가금티푸스 병아리에서 분리하여 전남대학교 수의과대학 수의미생물실에서 보관된 균주를 사용하였다.*S. Gallinarum*은 MacConkey agar 배지에서 1 동안에 배양한다.

일 콜로니를 선택하여 universal 병에 넣어 Luria-Bertani broth에 접종하고 37℃, 250rpm에서 16시간동안 배양하였다.Broth culture내의 생균수 측정 pour plate method 를 사용한다. 접종시킨 broth는 PBS로 희석하여 예비 실험에서 결정한 감염 농도인 1×10^8 cfu/ml 로 조정하였다.희석된 균은 각 병아리마다 3 ml씩 경구 접종한다. 병아리는 접종 후 17일간 관찰하면서 생존율을 기록하였다.

사료효율의 비교

사료의 급이 조건은 산란계 1마리당 120g/산란계 조건으로 하루 3회(오전8시, 오후2시, 오후8시)에 나누어 급이하고 잔량을 수거하여 식이량(g/day chicken)을 평가하였다. 사료효율의 계산법은 1일 1수 식이공급에서 남은양을 측정하여 계산하였으며 이를 사료효율: ((공급양-남은양)/공급양)*100로 환산하였다.

T세포의 활성평가

유기태 미량광물질 첨가 사료를 급여한 닭의 림프구 증식 유형을 비교하여 면역원성을 비교하였다. 닭의 익하 정맥에서 3ml씩 채혈하여 EDTA 들어있는 튜브를 이용하여 수집하였다. 채혈한 혈액을 Histopaque(1119, 1077)과 동량으로 섞어 700g로 30분간 원심분리

하여 PBMC간의 결합을 분리하였다. PBMC는 PBS로 400g에서 5분간 원심분리하여 2 washing한다. RBC lysis buffer로 실온에서 10분간 lysis한 후 PBS로 400g에서 5분간 원심분리하여 2회 washing하였다. PBS 1ml로 suspension하여 cell수를 1×10^8 cell/ml로 맞춘다. FITC anti-chicken CD4 (SouthernBiotech, USA)과 R-PE anti-chicken CD8(SouthernBiotech, USA)를 100배 희석용액과 혼합하여 암실에서 30분간 반응시켜 염색한다. 반응 후에 2회 원심 세척하고 PBS 200 μ l를 분주하여 유세포분석기 (FACSCalibur FACS, BD Biosciences, USA)로 CD4 T cell 및 CD8 T cell의 population도 R-PE와 FITC-conjugated monoclonal antibodies를 사용하여 유세포분석기로 측정하였다.

인공감염 후, 계사 바닥에서의 분변의 세균수 조사

살모넬라 공격 접종 후 실험계균이 사육되는 계사에서 군별로 분변 0.1g을 취하여 멸균된 BHI 액체배지 9ml에 넣고 vortexing .. MaConky agar plate에 시료액 또는 각 단계 희석액 0.1 ml를 피펫을 사용하여 평판 중앙부에 떨어뜨리고 멸균 spreader 배지 전체에 도달한다. 2시간 정도 실온에 놓아두어 배지표면을 말린 후 평판을 거꾸로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 1일 배양한 후, 즉시 집락을 계수한다. 집락 수 산정은 확산 집락이 없고 30-300 개의 집락이 있는 평판을 선택하여 계수한다. 집락수와 시료 채취량 및 희석배수를 이용하여 시료 중 균수를 산출하였다.

인공감염 후, 맹장의 세균수 조사

살모넬라 공격 접종 후 맹장의분변 0.1g을 취하여 멸균된 BHI 액체배지 9ml에 넣고 vortexing 하였다.. MaConky agar plate에 시료액 또는 각 단계 희석액 0.1 ml를 피펫을 사용하여 평판 중앙부에 떨어뜨리고 멸균 spreader로 배지 전체에 도달한다. 2시간 정도 실온에 놓아두어 배지표면을 말린 후 평판을 거꾸로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 1일 배양한 후, 즉시 집락을 계수한다. 집락 수 산정은 확산 집락이 없고 30-300 개의 집락이 있는 평판을 선택하여 계수한다. 집락수와 시료 채취량 및 희석배수를 이용하여 시료 중의 lactic acid bacteria, Fecal coli form bacteria, E.coli, Salmonella 균수를 산출하였다.

인공감염 후, 간에서 살모넬라 재분리

간 1 g을 취하여 2 ml의 PBS 틀어 있는 10 ml U bottom tube에 넣은 후, 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후, 1000 rpm에서 1분간 원심분리하여 조직을 제외한 상층액을 수거하여 계단희석하고 MaConky agar에 분주하여 24시간 배양한 후 세균 colony수를 조사한다. 맹장내용물 1 g당 살모넬라균 측정을 위하여 맹장 내용물 1 g을 2 ml의 PBS가 들어있는 10 ml tube에 넣어 1분간 혼합한 후, 1000rpm에서 1분간 원심분리하여 내용물을 제외한 상층액을 수거 하여 계단희석 하고 MaConky agar에 분주하여 24시간 배 양한 후 세균 colony수를 조사 하였다.

인공감염 후, 비장의 살모넬라 재분리

비장 1 g을 취하여 2 ml의 PBS가 틀어 있는 10 ml U bottom tube에 넣은 후, 조직 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후, 1000 rpm에서 1분간 원심분리하여 조직을 제외한 상층액을 수거하여 계단희석하고 MaConky agar에 분주하여 24시간 배양한 후 세균 colony수를 조사한다. 맹장내용물 1 g당 살모넬라균 측정을 위하여 맹장 내용물 1 g을 2 ml의 PBS가 들어있는 10 ml tube에

넣어 1분간 혼합한 후, 1000rpm에서 1분간 원심분리하여 내용물을 제외한 상층액을 수거하여 계단희석 하고 MaConky agar에 분주하여 24시간 배양한 후 세균 colony수를 조사 하였다.

Pasteurella multocida 항원 접종 항체 생성능력 측정

본 실험에서는 항원을 접종하기 전 1주일 동안 각 실험군 당 20수 썩에 대하여 정해진 실험사료를 급여한다. 항원으로는 포르말린으로 사멸시킨 *P. multocida* type A (National Veterinary Research & Quarantine Service Gyeonggi, Republic of Korea)를 이용하였다. 각 병아리는 2주 간격으로 1회 1 ml씩 2회 피하 접종한다. 첫 번째 접종은 실험개시 7일째에 Freund' complete adjuvant (Sigma-Aldrich)를 함께 접종하며, 두 번째 접종은 실험개시 21일째에 Freund incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich)와 접종한다. 혈액 채취는 항원 접종전과 실험 종료시점인 28일째에 2회 채취하며, 각 실험군의 대상 축의 날개 정맥에서 채취한다. 혈청은 4°C, 2,000Xg에서 10분간 원심 분리하여 얻고 분리된 혈청은 56°C에서 30분간 정치하여 불활성화시킨다. 항체생산수준은 ELISA 방법을 변형하여 측정한다. 96-well plates는 항원으로 사용한 20 µg 포르말린 사멸 *P. multocida* type A를 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) 1ml에 용해시킨 용액 100ul 으로 코팅하여 4°C에서 하룻밤 방치한다. 0.05% Tween 20이 첨가된 PBS는 3회 washing 한 뒤 well을 5% 탈지유 200 ul로 코팅한다. 상온에서 2시간동안 배양한 후 well을 PBS-T로 3회 washing 하며, 된 혈청시료는 PBS-T로 1:160으로 희석하여 희석한 혈청시료를 well에 분주하고 상온에서 한 시간 동안 배양한다. PBS-T로 3회 washing 후 Rabbit anti-chicken IgY (Jackson ImmunoResearch West Grove, PA, USA) 5,000배 희석액 100ul을 각각의 well에 분주한다. 상온에서 1시간동안 배양하고 washing한 뒤 0.05M citrate buffer, pH 4.0 (ABTS; Bio Basic, Markham, ON, Canada) 그리고 30% hydrogen peroxide를 각각의 well에 분주한다. 10분간 상온의 어두운 곳에서 배양하고 반응을 5% sodium dodecyl sulfate로 중단시킨다. 반응은 OD405nm에서 ELISA plate reader를 이용하여 측정한다. Pre-immunized chicks의 혈청은 negative control로 사용하며, 각각의 시료는 두 번씩 반복 실험하였다.

2. 연구수행결과

*Salmonella Gallinarum*의 인공감염에 대한 생존율

*Salmonella Gallinarum*의 인공감염에 대한 생존율은 일반 사료 급여시 20%의 폐사율을 나타내었으며 이러한 양상은 Fe-WPS, Cazn-GHAC에서도 비슷한 양상이었으나 Fe-WPS와 Fe-OCHT에서는 동일하게 폐사가 발생하지 않았다.

사료효율의 비교

살모넬라 접종 전, 유기태화미네랄 소재를 식이한 군은 control(85.8%) 대비 거의 유사한 사료효율을 보였다. 그러나 살모넬라 공격접종 후 control의 사료효율은 약13.7%(93.3%→79.6%)로 감소하였으나 CaFe-GHAC군은 살모넬라 접종 후에도 사료효율을 유지 하였고,

Ca-GHAC군에서는 약 7.6%의 식이가 줄었다. 따라서 살모넬라 공격접종에도 불구하고 사료효율을 유지하는 결과는 CaFe-GHAC, Ca-GHAC 식이군에서 확인 되었다.

계란생산과 파란율의 감소 효과

살모넬라 공격접종 전 산란율은 Fe-OCHT와 CaFe-GHAC식이 군에서는 control 군 보다 높은 산란율을 보였다(표4). 살모넬라 공격접종 후 산란율은 control(살모넬라 감염군)은 산란율은 감소하였으나, CaFe-GHAC군에서는 살모넬라 접종 전의 산란율을 유지함과 동시에 전 실험기간 동안 유일하게 파란이 발생하지 않았다. 따라서 살모넬라증의 대표적인 문제점인 산란율 감소와 파란율의 발생을 CaFe-GHAC, Ca-GHAC 급이로 극복되었다.

증체율의 비교평가

실험군의 체중변화를 비교한 결과 살모넬라 접종에 의해 약 10%의 체중감소가 control(살모넬라 감염군)에서 관찰되었으나 상대적으로 CaFe-GHAC군에서는 약 7%의 체중감소, Ca-GHAC군은 8%의 체중감소를 보여 대조군 대비 비교적 적은 비율의 체중감소를 나타내었다. 따라서 살모넬라 공격접종에 따른 체중변화의 극복을 위해 CaFe-GHAC, Ca-GHAC가 선택되었다 (Table 5).

비장중대 평가 실험결과

살모넬라 감염시 대표적인 육안 병변으로 비장의 종대를 확인 할 수 있다. 실험군의 살모넬라 공격 접종 후 비장의 무게와 직경과 높이를 실험군 별로 비교하였다(표6). 대조군을 포함한 모든 군에서 비장의 종대를 확인 할 수 있었으나, CaFe-GHAC군과 Fe-OCHT군에서는 비장의 무게와 크기를 감소되었다. 이러한 결과는 CaFe-GHAC군과 Fe-OCHT 급이가 살모넬라 공격접종시 원인균의 증식을 억제하는 것으로 추측된다(Table 6).

T세포의 활성화평가

숙주의 면역 반응에 관여하는 CD4 T세포는 MHC-classII 항원을 인식하며 이들은 주로 세포 밖의 항원인식에 관여한다. 여기서 항원이 인식될 경우 IL-2를 통해 CD8이나 NK 세포를 활성화 시키고 B 림프구가 활성화되어 항체 생산이 이루어진다. 실험군에서 살모넬라 접종에 의해 CD4, CD8의 population이 감소하였다. 그러나 CaFe-GHAC와 Ca-GHAC는 살모넬라 감염에 의한 대식세포에 의해 CD4, CD8이 activation되었으며 CaFe-GHAC는 CD4의 activation을 Ca-GHAC는 CD8의 activation(control대비)을 유도하였다(Table 7).

cytokine의 활성화

실험군에서 살모넬라 접종에 의해 IL-2의 분비가 감소하였으나 CaFe-GHAC, Fe-WPS, CaZn-GHAC 급이 군에서는 살모넬라 접종 전 보다 IL-2의 생산이 증가하였다. 그러나 Ca-GHAC와 Fe-OCHT의 경우 살모넬라 접종 전의 수준을 유지하였다. IFN- γ 의 경우 살모넬라 인공 감염시 IFN- γ 의 수치가 감소하였으나 Fe-WPS, Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC는 접종 후 IFN- γ 의 분비를 증가 시켰으나 Fe-OCHT는 살모넬라 접종 전의 수치가 유지 되었다(Table 8).

Pasteurella multocida 항원 접종 항체 생성능력 측정

백신접종 후 모든 식이군에서 IgG의 수치가 증가하였다. 특히, Fe-WPS가 IgG의 분비를 증가시키고 다음으로 Ca-GHAC, CaFe-GHAC가 IgG의 분비를 증가시켰다. 백신접종 6주차에 살모넬라 인공 감염이 실시 되었으며 IgG 수치는 전반적으로 감소하였으나 유의적인 수치변화는 없었다(Table 9)

인공감염 후, 계사 바닥에서의 분변의 세균수 조사

바닥분변 평가에서 살모넬라의 재분리를 시도하여 실험군 별로 살모넬라의 배출 유무를 비교하였다. 항균성평가기준은 배출되는 균수가 적은 순으로 우선순위를 나타내어 CaFe-GHAC > Fe-OCHT > Ca-GHAC로 평가 되었다. 바닥분변 내 살모넬라균 배출이 가장 적은 실험군은 CaFe-GHAC이었다(Fig 1, Table 10)..

인공감염 후, 맹장의 세균수 조사

실험군에 대한 항균성 평가기준은 살모넬라, 대장균군 및 대장균의 총균수가 적은 순으로 우선순위 적용하였다. 대장균군 및 대장균 수가 적은 순위는 Fe-OCHT > Fe-WPS > CaFe-GHAC이었으며 살모넬라 균 수가 적은 순위는 CaFe-GHAC > CaZn-GHAC > Ca-GHAC이었다. 또한 유산균수가 많은 순위는 Ca-GHAC > CaFe-GHAC > CaZn-GHAC이었다. 결론적으로 맹장 분변 내 살모넬라균에 대한 항균성평가는 유산균의 증식이 가장 높게 유도된 CaFe-GHAC에서 확인 되었다 (Table 11).

인공감염 후, 간에서 살모넬라 재분리

실험군에 대한 항균성 평가기준은 인공 감염된 계군의 간에서 살모넬라의 재 분리 균수가 적은 순으로 우선순위를 확인 하였다. 살모넬라의 재분리 성적이 낮은 순서는 CaZn-GHAC > Ca-GHAC > CaFe-GHAC 이었다. 결과적으로, 간 조직내 살모넬라의 증식을 가장 많이 억제한 실험군은 CaZn-GHAC 이었다 (Table 12).

인공감염 후, 비장의 살모넬라 재분리

실험군에 대한 항균성 평가기준은 인공 감염된 계군의 비장에서 살모넬라의 재 분리 균수가 적은 순으로 우선순위를 확인 하였다. 살모넬라의 재분리 성적이 낮은 순서는 Fe-OCHT > Ca-GHAC > CaFe-GHAC 이었다. 결과적으로, 비장 조직내 살모넬라의 증식을 가장 많이 억제한 실험군은 Ca-GHAC 이었다 (Table 13).

4. 고찰

유기태 미네럴 사료첨가제 Fe-WPS (172mg/kg), Ca-GHAC (72mg/Kg), CaFe-GHAC (97mg/Kg), CaZn-GHAC (169mg/Kg) 그리고 Fe-OCHT (660mg/Kg)를 급여에 의한 산란계에서의 살모넬라증에 대한 항병력 평가를 위하여 사료효율의 비교하였다. 살모넬라 접종 전, 유기태화 미네럴 소재를 식이한 군은 control(85.8%) 대비 거의 유사한 사료효율을 보였다. 그러나 살모넬라 공격접종 후 control의 사료효율은 약13.7%(93.3%→79.6%)로 감소하였으나 CaFe-GHAC군은 살모넬라 접종 후에도 사료효율을 유지하였고 Ca-GHAC군에서는 약 7.6%의 식이가 줄었다. 따라서 살모넬라 공격접종에도 불구하고 사료효율을 유

지하는 결과는 CaFe-GHAC, Ca-GHAC 식이군에서 확인 되었다.

계란생산과 과란율의 감소 효과에 대한 유기태 미량광물질 첨가 사료의 생산성 비교 평가에서 살모넬라 공격접종 전 산란율은 Fe-OCHT와 CaFe-GHAC식이 군에서는 control 군보다 높은 산란율을 보였다, 살모넬라 공격접종 후 산란율은 control(살모넬라 감염군)은 산란율은 감소하였으나, CaFe-GHAC군에서는 살모넬라 접종 전의 산란율을 유지함과 동시에 전 실험기간 동안 유일하게 과란이 발생하지 않았다. 따라서 양계장의 살모넬라증 발생시 대표적인 문제점인 산란율 감소와 과란율의 발생을 억제하기 위해서는 CaFe-GHAC, Ca-GHAC 급이를 선택할 수 있을것으로 생각된다.

유기태 미량광물질 첨가 사료의 증체율의 비교평가에서 실험군의 체중변화를 비교한 결과 살모넬라 접종에 의해 약 10%의 체중감소가 control(살모넬라 감염군)에서 관찰되었으나 상대적으로 CaFe-GHAC군에서는 약 7%의 체중감소, Ca-GHAC군은 8%의 체중감소를 보여 대조군 대비 비교적 적은 비율의 체중감소를 나타내었다. 따라서 살모넬라 공격접종에 따른 체중변화의 극복을 위해 CaFe-GHAC, Ca-GHAC가 선택되었다.

살모넬라 감염시 대표적인 육안 병변으로 비장의 종대를 확인 할 수 있다. 실험군의 살모넬라 공격 접종 후 비장의 무게와 직경과 높이를 실험군별로 비교하였다. 대조군을 포함한 모든 군에서 비장의 종대를 확인 할 수 있었으나 CaFe-GHAC군과 Fe-OCHT군에서는 비장의 무게와 크기를 감소되었다. 이러한 결과는 CaFe-GHAC군과 Fe-OCHT 급이가 살모넬라 공격접종시 원인균의 증식을 억제하는 것으로 추측된다.

다양한 세균과 바이러스에 대한 항병력의 지표는 숙주의 면역 반응에 관여하는 특이적, 비특이적 면역 반응에 의해 결정된다. 이러한 면역 반응의 기준이 되는 숙주의 면역 반응의 평가는 T세포의 활성평가에 의한다. 유기태 미량광물질 첨가 사료를 급여한 닭의 림프구 증식 유형을 비교하여 면역원성을 비교하였다. 숙주의 면역 반응에 관여하는 CD4 T세포는 MHC-classII 항원을 인식하며 이들은 주로 세포 밖의 항원인식에 관여한다. 여기서 항원이 인식될 경우 IL-2를 통해 CD8이나 NK 세포를 활성화 시키고 B 림프구가 활성화되어 항체 생산이 이루어 진다. 실험군에서 살모넬라 접종에 의해 CD4, CD8의 population이 감소하였다. 그러나 CaFe-GHAC와 Ca-GHAC는 살모넬라 감염에 의한 대식세포에 의해 CD4, CD8이 activation되었으며 CaFe-GHAC는 CD4의 activation을 Ca-GHAC는 CD8의 활성을 (control대비) 유도하였다. 이러한 T세포의 면역 반응과 관련된 cytokine의 활성을 확인 하였다. 실험군에서 살모넬라 접종에 의해 IL-2의 분비가 감소하였으나 CaFe-GHAC, Fe-WPS, CaZn-GHAC 급이 군에서는 살모넬라 접종 전 보다 IL-2의 생산이 증가하였다. 그러나 Ca-GHAC와 Fe-OCHT의 경우 살모넬라 접종 전의 수준을 유지하였다. IFN- γ 의 경우 살모넬라 인공 감염시 IFN- γ 의 수치가 감소하였으나 Fe-WPS, Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC는 접종 후 IFN- γ 의 분비를 증가 시켰으나 Fe-OCHT는 살모넬라 접종 전의 수치가 유지 되었다.

대표적인 특이면역 반응인 체액성 면역 반응의 정도를 평가하기 위해 백신 접종 후 유기태 미량광물질 첨가 사료군의 항체 생성능력 측정 하였다. 백신접종 후 모든 식이군에서 IgG의 수치가 증가 하였다. 특히, Fe-WPS가 IgG의 분비를 증가시키고 다음으로 Ca-GHAC, CaFe-GHAC가 IgG의 분비를 증가시켰다. 백신접종 6주차에 살모넬라 인공 감염이 실시 되었으며 IgG 수치는 전반적으로 감소하였으나 유의적인 수치변화는 없었다.

인공감염 후 유기태 미량광물질 첨가 사료급이에 따른 항병의 평가 기준을 감염 후 체외로

배출 되는 살모넬라의 세균수를 통해 정량 비교 분석하였다. 계사 바닥분변 평가에서 항균성 평가기준은 배출되는 균수가 적은 순으로 우선순위를 나타내어 CaFe-GHAC > Fe-OCHT > Ca-GHAC로 평가 되었다. 바닥분변 내 살모넬라균 배출이 가장 적은 실험군은 CaFe-GHAC이었다. 또한 생체내 살모넬라 존속 유무를 정량 평가하기 위해 맹장, 간, 비장의 살모넬라 세균집락의 정량 평가를 실시하였으며 이와 더불어 장관(맹장)내 세균총수, 유산균수를 비교 평가하였다.

실험군에 대한 항균성 평가기준은 살모넬라, 대장균군 및 대장균의 총균수가 적은 순으로 우선순위 적용하였다. 대장균군 및 대장균 수가 적은 순위는 Fe-OCHT > Fe-WPS > CaFe-GHAC이었으며 살모넬라 균 수가 적은 순위는 CaFe-GHAC > CaZn-GHAC > Ca-GHAC이었다. 또한 유산균수가 많은 순위는 Ca-GHAC > CaFe-GHAC > CaZn-GHAC이었다. 결론적으로 맹장 분변 내 살모넬라균에 대한 항균성평가는 유산균의 증식이 가장 높게 유도된 CaFe-GHAC에서 확인 되었다. 실험군에 대한 항균성 평가기준은 인공 감염된 계군의 간에서 살모넬라의 재 분리 균수가 적은 순으로 우선순위를 확인 하였다. 살모넬라의 재분리 성적이 낮은 순서는 CaZn-GHAC > Ca-GHAC > CaFe-GHAC 이었다. 결과적으로, 간 조직내 살모넬라의 증식을 가장 많이 억제한 실험군은 CaZn-GHAC 이었다.

실험군에 대한 항균성 평가기준은 인공 감염된 계군의 비장에서 살모넬라의 재 분리 균수가 적은 순으로 우선순위를 확인 하였다. 살모넬라의 재분리 성적이 낮은 순서는 Fe-OCHT > Ca-GHAC > CaFe-GHAC 이었다. 결과적으로, 비장 조직내 살모넬라의 증식을 가장 많이 억제한 실험군은 Ca-GHAC 이었다.

결론적으로 야외에서 살모넬라의 감염이 발생할 경우 사료효율을 유지하기 위해서는 CaFe-GHAC와 Ca-GHAC의 사료 첨가가 추천된다. 이러한 사료 첨가는 CaFe-GHAC, Ca-GHAC가 선택되었을 경우 살모넬라 감염 후 발생 되는 비장의 무게와 크기를 감소시키는 CaFe-GHAC군과 Fe-OCHT 급이가 살모넬라 공격접종시 원인균의 증식을 억제하는 것으로 추측된다. 또한 면역 반응의 증강으로 세균, 특히 양계장의 난계대 감염의 원인체인 살모넬라의 예방을 위해서 필요한 세포성 면역 반응의 지표인 CD4, CD8의 활성이 CaFe-GHAC는 CD4의 activation을 Ca-GHAC는 CD8의 활성을 (control대비) 유도하였다. 이러한 활성은 다양한 세균 바이러스에 대한 항병력의 지표가 될 수 있다고 생각된다.

맹장 분변 내 살모넬라균에 대한 항균성평가는 유산균의 증식이 가장 높게 유도된 CaFe-GHAC에서 확인 되었다. 실험군에 대한 항균성 평가기준은 인공 감염된 계군의 간에서 살모넬라의 재 분리 균수가 적은 순으로 우선순위를 확인 하였다. 살모넬라의 재분리 성적이 낮은 순서는 CaZn-GHAC > Ca-GHAC > CaFe-GHAC 이었다. 결과적으로, 간 조직내 살모넬라의 증식을 가장 많이 억제한 실험군은 CaZn-GHAC 이었다. 실험군에 대한 항균성 평가기준은 인공 감염된 계군의 비장에서 살모넬라의 재 분리 균수가 적은 순으로 우선순위를 확인 하였다. 살모넬라의 재분리 성적이 낮은 순서는 Fe-OCHT > Ca-GHAC > CaFe-GHAC 이었다. 결과적으로, 비장 조직내 살모넬라의 증식을 가장 많이 억제한 실험군은 Ca-GHAC 이었다. 이러한 결과를 종합해 보면 CaFe-GHAC와 Ca-GHAC의 사료 첨가는 양계장의 살모넬라의 예방과 치료를 위해 차선적 선택될 수 있으리라 생각된다. 이러한 결과는 2012년 사료내 항생제 사용 금지 이후 폭발적으로 증가되고 있는 세균성 감염증 그중에서도 살모넬라증의 예방과 치료로 선택될 수 있으리라 생각된다.

Fig 1. Re-isolation of Salmonella Gallinarum from litter in layer house.

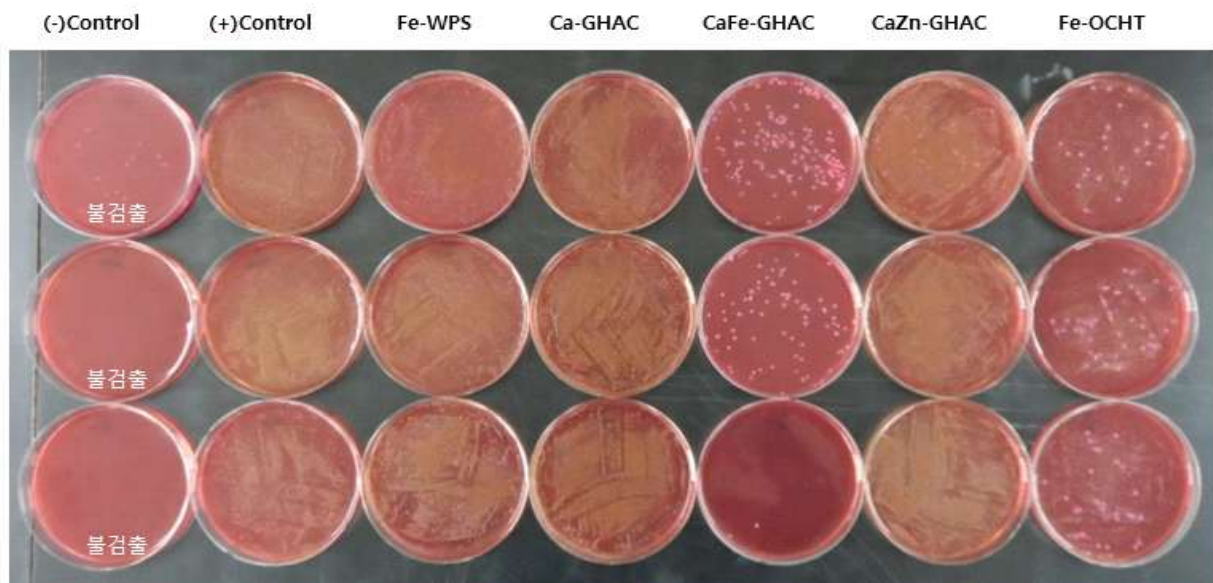


Table1. Formula of experimental group diets for feeding trial

Experimental Group	Feed	Numbers
Non inoculated Salmonella group(Normal)	General Feed	5
Inoculated Salmonella group (Control)	General Feed	5
Inoculated Salmonella group	Fe-WPS (172mg/kg)	5
Inoculated Salmonella group	Ca-GHAC (72mg/Kg)	5
Inoculated Salmonella group	CaFe-GHAC (97mg/Kg)	5
Inoculated Salmonella group	CaZn-GHAC (169mg/Kg)	5
Inoculated Salmonella group	Fe-OCHT (660mg/Kg)	5

Table 2. Composition of the basal diet.

Ingredients, %	Layer feed (30~39weeks of age)
Yellow corn	48.3
Wheat	4.39
Soybean meal	13
Distiller's dried grains with solubles	13.2
Canola meal	5
Sesame oil meal	2
Corn gluten	1.5
Oil	1
Salt	0.25
CaCO ₃	10.5
Mono-dicalcium phosphate	0.5
Dicalcium phosphate	0.1
Choline chloride	0.06
Vitamin premix ¹	0.1
Trace mineral premix ²	0.1
Chemical composition calculated, %	Normal/Control group
ME ³ (Kcal/kg)	2800
Crude protein	17
Crude ash	15.5
Ca	3.9
Available phosphorus	0.35
Methionine	0.67
Methionine+Cystine	
Ca (ppm)	—
Fe (ppm)	—

¹supplied per kg diet, IU: vit.A 13,000,000, vit.D3 4,000,000, mg: vit.B1 3,000, vit.B2 7,000, vit.B6 5,000, vit.B12 20, lysin 3,000, methionine 1,000, tryptophane 700, pantothenic acid 12,000, niacin 50,000, biotin 150, folic acid 1,500

²supplied per kg diet, mg: Fe 46, Zn 78, Cu 7, Se 0.1, Mn 87, I 1.3, Cr 0.12

³ME: metabolizable energy

⁴guanosine 5' -monophosphate (GMP)-chelated calcium (organic mineral form)

⁵guanosine 5' -monophosphate (GMP)-chelated iron (organic mineral form)

Table 2. The effect of organic minerals on mortality in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Days Post Inoculated	GroGup	Non inoculated control group	Salmonella Inoculated Group					
			control	Fe-WPS	Ca-GHAC	CaFe-GHAC	CaZn-GHAC	Fe-OCHT (A/A)
4 DPI		0	1	0	0	0	1	0
5 DPI		0	0	1	0	0	0	0
Mortality(%)		0	20	20	0	0	20	0

Table 3. The effect of organic minerals on feed efficiency in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental Items		Feed efficiency					
		Total Experimental Periods		Pre Salmonella Inoculation		Post Salmonella Inoculation	
Experimental Group		g/day chicken	Feed efficiency(%)	g/day chicken	Feed efficiency(%)	g/day chicken	Feed efficiency(%)
		Non inoculated control group		95.4±11.8	79.5±9.8	93.9±12.9	78.3±10.7
Salmonella Inoculated Group	control	105.5±16.8	89.7±12.0	110.7±4.5	93.3±3.2	91.4±29.9	79.6±21.3
	Fe-WPS	99.7±24.9	83.1±20.8	104.9±7.7	87.4±6.5	85.3±48.2	71.1±40.1
	Ca-GHAC	97.7±13.4	81.4±11.2	100.1±7.2	83.4±6.0	91.0±24.2	75.8±20.2
	CaFe-GHAC	101.1±7.4	84.3±6.2	100.8±7.0	84.0±5.8	102.1±9.5	85.1±7.9
	CaZn-GHAC	97.5±20.0	81.3±16.6	104.5±8.0	87.1±6.7	87.4±31.3	65.3±26.1
	Fe-OCHT	95.5±22.7	79.6±18.9	105.1±9.2	87.6±7.6	68.9±28.8	57.4±24.0

Table 4. The effect of organic minerals on egg production and cracked–broken egg in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental Group	Experimental Items	Total Experimental Periods		Pre Salmonella Inoculation		Post Salmonella Inoculation	
		Egg production(%)	Cracked-broken egg(%)	Egg production (%)	Cracked-broken egg(%)	Egg Production (%)	Cracked-broken egg(%)
Non inoculated control group		80.4	0.0	77.8	0.0	86.7	0.0
Salmonella Inoculated Group	control	85.3	1.0	87.5	0.0	80.0	3.3
	Fe-WPS	67.1	1.2	63.3	0.0	76.0	4.0
	Ca-GHAC	75.3	7.1	75.0	6.7	76.0	8.0
	CaFe-GHAC	83.5	0.0	83.3	0.0	84.0	0.0
	CaZn-GHAC	78.8	3.5	80.0	3.3	76.0	4.0
	Fe-OCHT	83.5	2.4	91.7	0.0	64.0	8.0

Table 5. The effect of organic minerals on growth performance in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental Items		0 DPI	5 DPI	
		(Pre <i>Salmonella</i> inoculation)	(Post <i>Salmonella</i> Inoculation)	
Experimental Group		BW(g)	BW(g)	Increasing proportion(%) (0 DPI vs 5 DPI)
		Non inoculated control group		1522.0±167.1
Salmonella Inoculated Group	control	1905.7±155.3	1741.0±125.0	91.4±6.6
	Fe-WPS	1843.2±241.9	1636.4±213.6	88.8±11.6
	Ca-GHAC	1730.0±220.5	1596.8±227.5	92.3±13.1
	CaFe-GHAC	1598.0±34.3	1493.6±59.4	93.5±3.7
	CaZn-GHAC	1767.2±152.7	1602.8±86.6	90.7±4.9
	Fe-OCHT	1761.2±213.3	1580.8±185.6	89.8±10.5

Table 6. The effect of organic minerals on the dimensional changes of spleen in experimentally infected layers with *Salmonella* Gallinarum

Experimental Items		Spleen		
		weight(g)	height(mm)	width(mm)
Non inoculated control group		1.6±0.3	19.4±0.7	12.2±1.1
Salmonella Inoculated Group	control	4.7±1.5*	26.3±3.0	17.9±2.6
	Fe-WPS	5.1±1.6	26.6±2.7	19.7±2.5
	Ca-GHAC	4.0±3.0	24.8±3.2	17.9±5.1
	CaFe-GHAC	2.6±1.6*	22.9±4.4	15.3±3.8
	CaZn-GHAC	4.2±1.9	25.0±5.5	17.9±2.7
	Fe-OCHT	3.7±1.5	23.9±3.4	17.6±3.1

* $P < 0.05$

Table 7. The effect of organic minerals on T cell populations in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental Items		T cell population(%)			
		Pre Salmonella Inoculation		Post Salmonella Inoculation	
		CD3 ⁺ /CD4 ⁺ T cells	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ T cells	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ T cells	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ T cells
Non inoculated control group				2.91±0.96	1.00±0.71
	control	3.62±0.94	2.89±1.27	1.19±0.19	0.44±0.57
	Fe-WPS	5.10±0.22	3.65±0.73	1.44±0.13	0.45±0.47
Salmonella Inoculated Group	Ca-GHAC	3.61±2.36	2.28±2.84	1.67±0.46	0.97±0.56
	CaFe-GHAC	2.81±0.04	2.05±0.87	3.11±1.57	0.74±0.24
	CaZn-GHAC	5.65±3.62	4.19±3.33	1.25±0.90	0.22±0.10
	Fe-OCHT	3.72±1.33	2.84±1.63	1.48±0.73	0.26±0.21

Table 8. The effect of organic minerals on cytokine production in experimentally infected layers with *Salmonella* Gallinarum

(unit: ng/ml)

Experimental Group	Experimental Items	IL-2		IFN- γ	
		Pre Salmonella Inoculation	Post Salmonella Inoculation	Pre Salmonella Inoculation	Post Salmonella Inoculation
Non inoculated control group		51.95 \pm 18.59	58.29 \pm 13.37	35.87 \pm 4.26	33.21 \pm 6.41
Salmonella Inoculated Group	control	33.38 \pm 7.89	38.95 \pm 7.69	29.46 \pm 4.61	31.50 \pm 3.24
	Fe-WPS	41.07 \pm 18.43	54.89 \pm 7.95	29.96 \pm 3.36	36.34 \pm 5.25
	Ca-GHAC	43.25 \pm 11.49	43.96 \pm 5.54	31.79 \pm 7.65	38.52 \pm 6.75
	CaFe-GHAC	40.47 \pm 1.46	61.25 \pm 35.71	32.54 \pm 3.96	36.88 \pm 7.37
	CaZn-GHAC	37.99 \pm 9.79	43.04 \pm 10.76	30.28 \pm 4.64	35.76 \pm 5.21
	Fe-OCHT	33.17 \pm 13.95	34.66 \pm 4.60	29.86 \pm 3.79	29.82 \pm 3.49

Table 9. The effect of organic minerals on antibodies production in experimentally infected layers with *Salmonella* Gallinarum

(Unit: OD value)

Experimental Items		IgG			
		Pre vaccination (2/2)	Post Vaccination (2/26)	Pre Samonella inoculation (3/11)	Post Salmonella vaccination (3/17)
Non inoculated control group = non vaccination group		0.63±0.02	0.58±0.08	0.50±0.01	0.51±0.06
	control	0.62±0.06	1.03±0.11	0.94±0.17	0.93±0.13
	Fe-WPS	0.65±0.05	1.32±0.43	1.17±0.30	1.04±0.25
Salmonella Inoculated Group = vaccination group	Ca-GHAC	0.64±0.05	1.20±0.32	1.10±0.37	1.05±0.30
	CaFe-GHAC	0.60±0.03	1.15±0.25	1.03±0.27	1.05±0.29
	CaZn-GHAC	0.63±0.11	1.08±0.13	0.94±0.18	0.91±0.18
	Fe-OCHT	0.62±0.06	1.18±0.28	1.30±0.43	1.21±0.25

Table 10. Distribution of Isolated Salmonella Gallinarum from litter in layer house

Experimental items		<i>Salmonella</i> inoculation 4 DPI	
		CFU/0.1g	Increasing proportion(%)
Non inoculated control group		0.0±0.0	-
Salmonella Inoculated Group	Control	1,5X10 ⁹ ±3.5x10 ⁸	100.0±22.8
	Fe-WPS	1,8x10 ⁹ ±3.4x10 ⁸	118.0±21.8
	Ca-GHAC	2x10 ⁹ ±6x10 ⁹	129.7±38.2
	CaFe-GHAC	1,5x10 ⁷ ±1.6x10 ^{6*}	0.10±0.01*
	CaZn-GHAC	7x10 ⁹ ±5.3x10 ⁸	449.3±33.9
	Fe-OCHT	4.4x10 ⁸ ±1.1x10 ⁸	28.4±7.2

**p*<0.05 compared with control

* 4 DPI: 4 days post-infection

Table 11. Distribution of Isolated lactic acid bacteria, Fecal coliform bacteria, E.coli and Salmonella spp from cecum in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental group	Experimental items	Lactic Acid Bacteria		Fecal Coliforms		E. coli		Salmonella	
		CFU/0.1g	Increasing proportion(%)	CFU/0.1g	Increasing proportion(%)	CFU/0.1g	Increasing proportion(%)	CFU/0.1g	Increasing proportion(%)
Non inoculated control group		$2.5 \times 10^8 \pm 7.9 \times 10^6$	100.0 ± 30	$2.8 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^6$	100.0 ± 85	$2.1 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^6$	11.0 ± 137	0.0 ± 0.0	-
Salmonella Inoculated Group	Control	$1.4 \times 10^9 \pm 2.8 \times 10^9$	569.7 ± 1,147	$4.7 \times 10^8 \pm 8.7 \times 10^8$	1,695.0 ± 3124	$2.9 \times 10^8 \pm 5.9 \times 10^8$	1,362 ± 2,769	$1.8 \times 10^{10} \pm 4.4 \times 10^{10}$	100 ± 244
	Fe-WPS	$5.8 \times 10^8 \pm 6.1 \times 10^8$	229.2 ± 241	$4.6 \times 10^7 \pm 9.7 \times 10^7$	164.2 ± 364	$1.3 \times 10^7 \pm 2.4 \times 10^7$	62.9 ± 116	$1.8 \times 10^{10} \pm 3.5 \times 10^{10}$	100 ± 195
	Ca-GHAC	$1.6 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^9$	637.8 ± 1,135	$2.9 \times 10^8 \pm 6.4 \times 10^8$	1,038.8 ± 2,303	$2.2 \times 10^8 \pm 4.9 \times 10^8$	1,050 ± 2,323	$1.8 \times 10^8 \pm 4.1 \times 10^8$	1.0 ± 2
	CaFe-GHAC	$3.5 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^8$	136.9 ± 73	$9.3 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^8$	333.5 ± 546	$1.5 \times 10^7 \pm 2 \times 10^6$	72.7 ± 96	$7.7 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^6$	0.0 ± 0
	CaZn-GHAC	$3.4 \times 10^8 \pm 3.4 \times 10^8$	135.9 ± 133	$2.3 \times 10^8 \pm 4.7 \times 10^8$	830.9 ± 1,698	$2.1 \times 10^8 \pm 4.3 \times 10^8$	992.7 ± 2,045	$9.4 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^8$	0.5 ± 0.
	Fe-OCHT	$1 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$	394.3 ± 392	$9.8 \times 10^6 \pm 9.7 \times 10^6$	35.0 ± 34	$7.1 \times 10^6 \pm 9.8 \times 10^6$	33.4 ± 46	$3.7 \times 10^9 \pm 8.1 \times 10^9$	20.4 ± 44

Table12. Distribution of Isolated *Salmonella Gallinarum* from liver in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental group	Experimental items	<i>Salmonella</i> inoculation 5 DPI	
		CFU/0.1g	Increasing proportion(%)
Non inoculated control group		0.0±0.0	-
Salmonella Inoculated Group	Control	9,7x10 ¹⁰ ±3,8x10 ¹⁰	100.0±39.6(기준)
	Fe-WPS	8,8x10 ¹⁰ ±4,9x10 ¹⁰	90.5±50.9
	Ca-GHAC	5,1x10 ¹⁰ ±3x10 ⁹	52.3±30.9
	CaFe-GHAC	5,7x10 ⁹ ±3,3x10 ¹⁰	59.0±34.8
	CaZn-GHAC	4,0x10 ¹⁰ ±2,3x10 ¹⁰	41.2±23.7
	Fe-OCHT	7,0x10 ¹⁰ ±5,2x10 ⁹	72.4± 54.2

* 5 DPI: 5 days post-infection

Table13. Distribution of Isolated *Salmonella Gallinarum* from spleen in experimentally infected layers with *Salmonella Gallinarum*

Experimental group	Experimental items	<i>Salmonella</i> inoculation 5 DPI	
		CFU/ml	Increasing proportion(%)
Non inoculated control group		0.0±0.0	-
Salmonella Inoculated Group	Control	7.9x10 ⁹ ±1.2x10 ⁹	100.0±43.3
	Fe-WPS	4.2x10 ⁹ ±2x10 ⁹	54.3±33.2
	Ca-GHAC	3.1x10 ⁹ ±1.6x10 ⁹	39.5±25.3
	CaFe-GHAC	3.3x10 ⁹ ±2.3x10 ⁹	42.6±31.6
	CaZn-GHAC	6.2x10 ⁹ ±2.8x10 ⁹	79.4±47.3
	Fe-OCHT	2.3x10 ⁹ ±2.8x10 ⁹	30.2±34.4

제 6 장 기능성 축산물 대량생산시스템 확립

제 1 절 유기태 미네럴 소재류(키토산 기질화) 고농도 처리조건에서 기능성 강화란 생산, 산란계 안정성 및 회복 패턴 평가

1.

선행 제조 탄수화물 기질 유기태 소재(Fe-OCHT)와 유단백질 기질 유기태 소재(Ca-WPS)와 5종 유단백질 기질화 유기태 미네럴 강화 사료의 산란계 및 계란에 대한 품질 향상 및 안전성이 있음을 확인하였다(제 2~3 절 참조). 본 연구에서는 유기태 소재 중 키토산 기질로 제조한 5종(Ca-OCHT, Fe-OCHT, Zn-OCHT, Cu-OCHT, Se-OCHT)을 고농도로 혼합한 사료 섭취가 산란계에 대하여 안전성 및 산란에 미치는 효능 등을 평가 하였다. 즉, 안전성 평가, 섭취량 기초산정, 미네럴 강화란 생산 가능성 및 생체전이 패턴조사, 질병예방 및 육질변화 등을 평가함으로써 기능성 강화란(미네럴류 및 면역글로브린 IgY)과 관련한 최적 소재를 선발 하고져 하였다.

2. 연구수행방법

실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 50주령 Hy-line 산란계를 대상으로 전남대학교 수의과대학 동물사육실에서 실험을 실시하였다.

유기태 미네럴 소재류 준비

시험에 사용된 유기태 소재는 Ca-OCHT, Fe-OCHT, Zn-OCHT, Cu-OCHT 및 Se-OCHT를 일반 산란계용 사료에 첨가하여 사용 하였으며. 소재별 미네럴 함량 및 특성은 제 3 장 2절과 동일하다.

실험군 설정 및 시료 채취

실험군 설정 및 시료 채취 기간은 다음과 같다. 일반 산란계용 사료를 섭취시킨 대조군, 일반 산란계용 사료에 유기태 소재별로 첨가한 실험군으로 총 6개 시험군을 설정하였다. 각 실험군 당 산란계 20마리씩 설정하였다.

유기태 미네럴 강화사료류 준비

일반 산란계 사료에 Ca-OCHT(농도: 40,000 ppm /1일 섭취량 120g/1수), Fe-OCHT(농도: 3,000ppm/1일 섭취량 120g/1수), Zn-OCHT(농도: 2,600ppm /1일 섭취량 120g/1수), Cu-OCHT(농도: 700ppm/1일 섭취량 120g/1수), Se-OCHT(농도: 540ppm/1일 섭취량

120g/1수)을 대상으로 산란계에 섭취시켜 현장유효성 평가(45일)를 실시하였다.

채취시료

유효성 평가를 위한 시료는 사료 급여 후 15일, 16일, 26일, 30일 경에 각 실험군별로 혈액, 계란, 분변 및 골조직(femur) 등을 채취하여 실험 항목별로 측정 하였다.

평가항목

미네랄 강화사료 섭취에 따른 안전성 및 기초효능 평가

유기태 미네랄 강화사료 섭취 후 산란계, 계란, 혈액, 가식부 근육(대퇴부, 가슴근육) 및 골조직(femur, 대퇴골) 등 성분에 미치는 영향에 대한 평가항목으로서는 총무게 변화, 계란 착색도 변화, 계란 크기(높이, 폭, 두께) 변화, 계란 난백고, 난황고 높이 변화, 계란 난황 중량 변화, 계란 가식부(난황+난백) 무게 변화, 산란계 체중 변화, 계란 산란수 변화, 고농도 약해성(산란수 및 산란을 저하) 회복패턴, 산란계 사료섭취량 변화, 산란계 골조직(femur) 강도 및 경도 변화, 혈액조성 변화 및 기능성 강화란 생산과 관련한 계란내 미네랄 수치 및 생체전이 메카니즘을 평가 하였다.

총무게 변화

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료(Ca-OCHT, Fe-OCHT), Zn-OCHT, Cu-OCHT, Se-OCHT)를 섭취시킨 실험군에서 낳은 계란을 15, 30, 45일안에 채취하여 계란 총무게 변화측정은 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

계란 착색도 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 탄수화물 기질 유기태 미네랄 사료를 섭취시킨 실험군에서 낳은 계란의 일정별로 난각 및 난황의 착색도를 KONICA MINOLTA(JAPAN, CR-400(Φ8 mm)/CR-410(Φ50 mm), JAPAN)를 이용하여 L,a,b를 측정하였다.

계란 높이, 폭, 두께 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료를 섭취 시킨 실험군에서 일정별 낳은 계란의 높이, 폭, 두께 변화 측정은 Absolute Digimatic (Model No. CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

계란 난백고, 난황고 높이 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 실험군의 계란의 난백고, 난황고 높이 변화 측정은 버지니아 캐리퍼스를 이용하여 측정하였다.

계란 난황, 난각, 난백 중량 변화 조사

사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 실험군의 계란의 난백, 난황, 난각 무게 변화측정은 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

가식부(난황+난백) 무게 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 실험군의 계란의 난백, 난황, 무게 변화측정은 실험실용 저울(Model No. EK-4100, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

산란계 체중 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 산란계 체중 변화 측정은 실험실용 저울(Model No. NC-1, CAS, Japan)를 이용하여 측정하였다. 측정은 사료 섭취 후 16일, 30일 및 45일에 실험구내 3개체를 대상으로 실시하였다.

산란율 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 산란계에서 낳은 계란 수를 측정하였으며, 전체 시험기간 수집한 산란수를 1일 평균 산란수로 환산하여 비교 하였다.

산란률 회복패턴 조사

유기태 미네랄 강화 사료류를 섭취 45일 후에 섭취를 중단하고 일반사료로 전환하여 섭취시킨 경우에서 산란계에서 낳은 계란 수를 측정함으로써 산란률 회복 패턴을 조사 하였다.

사료섭취량 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 산란계의 사료섭취율 변화를 측정 하였다.

산란계 골조직(femur) 강도 및 경도 변화 조사

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료 섭취 45일후 골조직 중 대퇴골(femur) 부위를 채취하여 근육을 완전 제거한 후, 골조직의 강도 및 경도를 SUN Scientific (Model JP/CR-500DX -S, 한국, <측정Spindle : Adaptor No.4(Ø4mm)>를 이용하여 측정하였다.

혈액조성 및 이화학 이상 유발성 평가

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료를 섭취 후 산란계 혈구 조성 변화 측정 항목은 WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, PLT, MCHC, MO, EO 및 BA 등이며, 혈구 성분의 측정은 자동혈구계수기(automatic cell counter, Sysmex K-1000, Japan)를 이용하여 측정하였다.

기능성 미네랄 강화란 생산 메카니즘 보사(계란 부위별 미네랄류 분포 변화)

사료를 섞이시킨 대조군 대비 유기태 미네랄 사료류별로 섞이시킨 실험군에서 계란의 난황, 난백, 난각 내 유기태 미네랄별 고함유 미네랄 수치 변화를 ICP-OES (THOMO사, U.S.A)를 사용하여 측정하였다.

3. 연구수행결과

계란 총무게 변화

일반사료를 섞이시킨 대조군 대비 탄수화물 기질 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섞이 시킨 산란계에서 생산한 계란을 대상으로 한 총무게 차이를 비교함으로써 계란의 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 1).

총무게에 미치는 유기태화 미네랄 소재의 효과를 평가하여 보았더니 섞이 15일 째 대조(100%기준) 대비 아연유기태화 소재는 -5.4% , 칼슘유기태화 소재류의 경우는 -7.9%가 감소하는 결과를 보였다. 섞이 26일 째에는 대조(100%기준) 대비 아연유기태화 소재는 13.9%, 칼슘유기태화 소재류의 경우는 -1.7%가 감소하는 결과를 보였다. 섞이 30일 째에는 대조(100%기준) 대비 아연유기태화 소재는 14.8%, 셀렌유기태화 소재의 경우는 -15.3%가 감소하는 결과를 보였다. 결과를 통해서 보면, 탄수화물 기질 고농도 유기태화 소재들이 계란의 총무게를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 아연유기태화 소재의 경우에는 섞이 기간이 길어지면서 초기 감소 패턴에서 증가 패턴으로 총무게가 증가하는 것으로 보아 부작용에 대한 회복이 진행되는 것으로 판단되어지는데, 이는 칼슘유기태화 소재의 경우도 마찬가지이다. 결론적으로, 대조군 대비 탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소재의 투여 농도범위에서는 산란계에 대한 안전성에 있어 문제점이 도출되었지만, 회복 패턴의 양상도 확인할 수 있었다.

계란 착색도 변화 조사

일반사료를 섞이시킨 대조군 대비 탄수화물 기질 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섞이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 난각, 난황 착색도를 측정하여 기능성 유기태화 강화란의 계란 품질 및 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 2).

섞이 15일째 난각 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 5.8%, 5.6%로 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -25.1%, -18.5%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 4.5%, 3.2%로 조사되었다.

섞이 16일째 난각 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 9.5%, 13.0%로 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -20.3%, -29.1%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 1.2%, 7.7%로 조사되었다.

섞이 26일째 난각 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 0.01%, -6.5%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -1.3%, 6.77%, 노란색

나타내는 b값의 경우 6.3%, -0.27%로 조사되었다.

섭이 30일째 난각 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 6.0%, 1.89%로 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 -12.0%, -15.7%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 5.34%, -0.5%로 조사되었다. 결론적으로, 유기태 미네랄 소재류의 투여 농도범위에서는 산란계 계란에 대한 난각 착색도 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

착색도

섭이 15일째 난황 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -1.1%, 2%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.5%, 12.4%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 5.1%, 19.4%로 조사되었다.

섭이 16일째 난황 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.7%, 0.7%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -20.3%, -29.1%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 18.6%, 3%로 조사되었다. 섭이 26일째 난황 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -0.53%, 0.73%로 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 34.6%, 34.6%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 -2.3%, 4%로 조사되었다. 섭이 30일째 난황 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 0.03%, 3.3%로 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 33.2%, -54.8%, 노란색을 나타내는 b값의 경우 9.9%, -3.6%로 조사되었다.

결과로 보면, 아연 유기태화 소재의 경우 난황 착색도는 사료의 섭이 기간이 길어질수록 L, a, b값이 증가하고, 칼슘유기태화 소재의 경우에는 L, a, b값이 감소되는 것으로 조사되었다. 이 결과를 토대로 계란 착색도 변화에 유기태화 미네랄 소재별로 차이가 있음이 판단되었다. 결론적으로, 유기태 미네랄 소재류의 투여 농도범위에서는 산란계 계란에 대한 난황 착색도 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

계란 높이, 폭, 두께 변화 조사

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 난각, 난황 착색도를 측정하여 기능성 강화란 생산 품질 및 소비자 기호성을 만족하는 제품 생산을 위한 효과를 평가하였다(Table 3 참조).

섭이 15일째 계란 높이 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 1.47%, -2.29%로 이었다. 대조(100%)대비 폭은 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.89%, -3.69%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 두께는 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -17.7%, -33.3%로 조사되었다.

섭이 16일째 계란 높이 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.89%, 3.37%로 이었다. 대조(100%)대비 폭은 아연유기태화

칼슘소재군의 경우 -2.96%, 5.17%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 두께는 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.50%, -31.2%로 조사되었다.

섭이 26일째 계란 높이 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -1.37%, -3.90%로 이었다. 대조(100%)대비 폭은 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 5.32%, 0.61%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 두께는 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 19.35%, -3.2%로 조사되었다.

섭이 30일째 계란 높이 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 3.49%, -7.12%로 이었다. 대조(100%)대비 폭은 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 5.60%, -4.31%로 조사되었다. 또한, 대조(100%)대비 두께는 아연유기태화 소재와 셀렌늄소재군의 경우 0%, 13.3%로 조사되었다. 결과로 보면, 아연유기태화 소재의 경우 섭이 기간이 길어질수록 감소되었던 계란의 높이, 폭, 두께가 증가하고, 유기태 칼슘 소재의 경우에는 감소 패턴이 일정하게 유지되는 것으로 조사되었다. 이 결과로 보면 본 실험에서 사용한 고농도 소재 아연유기태화 소재는 섭이 기간이 길어질수록 초기 감소하였던 계란의 높이, 폭, 두께가 정상 패턴으로 와서 다시 증가 형태로 가는 경향을 알 수 있고, 유기태화 칼슘은 감소하는 형태로 진행된다는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에서는 산란계 계란에 대한 높이, 폭, 두께 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

계란 난백고, 난황고 높이 변화 조사

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 생산한 계란의 난백고, 난황고 높이를 측정하여 기능성 강화란 생산 품질 및 소비자 기호성을 만족하는 제품 생산을 위한 효과를 평가하였다(Table 4참조).

섭이 15일째 계란 난백고 높이 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.98%, -8.49%로 이었다. 섭이 16일째 계란 난백고 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 9.97%, 9.31%로 증가하였다. 섭이 26일째 계란 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 56.4%, 9.8%로 이었다. 섭이 30일째 계란 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀레늄소재군의 경우 41.5%, 27.8%이었다.

섭이 16일째 계란 난황고 높이 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -0.88%, -12.45%로 이었다. 섭이 16일째 계란 난백고 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -43.01%, 0.11%이었다.

섭이 26일째 계란 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -5.75%, -5.58%로 이었으며, 30일째 계란 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀레늄소재군의 경우 -5.06%, -7.52%이었다. 결과로 보면, 아연유기태화 소재의 경우 섭이 기간이 길어질수록 감소되었던 계란의 난백고, 난황고 높이가 증가하고, 유기태화 칼슘 소재의 경우에는 난백고는 감소 패턴이 일정하게 유지되지만, 난황고 높이는 증가하는 것으로 조사되었다. 이 결과로 보면 본 실험에서 사용한 고농도 아연 및 칼슘 유기태화 소재는 계란에 섭이 기간이 길어질수록 초기 감소하였던 것을 정상적으로 회복시키면서 증가 형태로 진행하게 하는 경향을 알 수 있었

. 결론적으로, 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에서는 산란계 계란의 난백고, 난황고 높이에 영향을 주는 것을 확인하였다.

계란 난황, 난각, 난백 중량 변화 조사

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 유기태 소재 5종을 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란의 난백, 난황, 난각 중량을 생중량 대비 건조중량으로 측정하여 기능성 강화란 생산 품질 및 소비자 기호성을 만족하는 제품 생산을 위한 효과를 평가하였다(Table 5).

섭이 15일째 계란 난황 중량 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 6%, 16.3%이었다. 섭이 16일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 2.44%, -1.4%이었다. 섭이 26일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -3.7%, 6.6%이었다. 섭이 30일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀레늄소재군의 경우 19.9%, 14.3%이었다.

섭이 15일째 계란 난백 중량 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -21.4%, 4.95%이었다. 섭이 16일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -7.2%, 7.2%이었다. 섭이 26일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -7.01%, -5.2%이었다. 섭이 30일째 계란 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀레늄소재군의 경우 -7.14%, 1.78%이었다.

섭이 15일째 계란 난각 중량 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -10.9%, -13.7%이었다. 섭이 16일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -8.74%, -16%이었다. 섭이 26일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -13.0%, -8.67%이었다. 섭이 30일째 계란 높이 변화는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀레늄소재군의 경우 -6.1%, -11.8%이었다. 결과로 보면, 아연 및 칼슘 유기태화 소재의 경우 생중량 대비 건조중량 변화에서 섭이 기간이 길어질수록 감소되었던 계란의 난황 중량이 증가하고, 난각 및 난백 중량은 감소됨이 조사되었다. 하지만, 난백 중량의 경우에는 일정 수준 이하로 감소되지 않는 패턴을 본 연구를 통해서 확인할 수 있었다. 결론적으로, 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태 미네랄 소재의 투여 농도범위에서는 산란계 계란의 난백, 난황, 난각의 중량에 영향을 주는 것을 확인하였다.

계란 가식부(난황+난백) 무게 변화 조사

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 유기태 소재 5종을 첨가한 사료를 섭취 시킨 산란계에서 생산한 계란의 가식부위인 난백,과 난황 중량을 측정하여 계란의 영양성분 변화에 대한 유기태화 미네랄 소재 기능성 강화란 생산 품질 및 소비자 기호성을 만족하는 제품 생산을 위한 효과를 평가하였다(Table 6).

섭이 15일째 계란 가식부 중량 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 10.4%, -1.37%이었다. 섭이 16일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 16.7%, 1.65%이었다. 섭이 26일째는 일

경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 칼슘소재군의 경우 -2.19%, 1.65%이었다. 섭이 30일째는 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 아연유기태화 소재와 셀레늄소재의 경우 -2.2%, -5.12%이었다. 결과로 보면, 계란 가식부에 해당하는 난황과 난백 무게 변화에 대한 아연 및 칼슘 유기태화 소재의 경우 섭이 15, 16일째에는 가식부 무게가 증가하였지만, 섭이 26일 후부터는 가식부 무게가 감소하는데, 감소폭은 측정 30일째까지 비슷한 경향으로 조사되었다. 결론적으로, 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에서는 산란계 계란의 가식부 무게 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

수화물 기질 미네랄 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란계 체중 변화 조사

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 유기태 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 체중 변화를 측정하여 산란계 생산 품질 및 안전성을 연계하여 효과를 평가하였다(Table 7).

유기태 미네랄 소재를 섭이 한 모든 실험군에서 섭이 9일까지는 산란계 체중이 평균 0.3~0.7kg까지 증가하였다.

섭이 16일째 측정 시에는 모든 유기태화 미네랄 소재군에서 산란계 체중이 0~0.6kg 감소되는 것이 조사되었으며, 섭이 30일째 측정 시 일반사료를 섭이한 대조구에서는 산란계 체중 변화가 없었으나, 셀레늄 유기태화 소재군을 제외한 유기태화 미네랄 소재를 섭이한 모든 실험군에서는 0.1~0.3kg 체중 증가가 조사되었다. 그리고, 섭이 46일째 측정 시 셀레늄, 구리 유기태화 소재군의 경우 0.2~0.6kg 증가한 반면, 일반 사료를 먹인 대조구 포함 다른 유기태화 미네랄 소재군에서 0.2~0.6kg 체중 감소가 조사되었다. 결과로 보면, 산란계의 체중 변화가 15일 간격 패턴으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며, 유기태 미네랄 소재류의 고농도 투여범위에서는 산란계 체중 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

미네랄 강화사료 섭취에 따른 산란율 변화 조사

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이 시킨 산란계에서 낳은 계란수를 측정하여 산란계 생산 품질 및 안전성을 연계하여 효과를 평가하였다(Table 8). 일반사료를 섭이한 대조구의 1일 평균 산란수는 19.44개이었다. 칼슘, 철, 아연, 구리, 셀레늄 유기태화 실험군에서의 1일 평균 산란수는 2.05, 0.35, 3.55, 0.05, 0.27개이었다. 이는 일반사료를 먹힌 시험구 대조(100)%대비 유기태화 미네랄 실험군의 경우 0.21~14.6%이었다. 유기태 소재 중 산란율이 가장 높았던 군은 아연유기태화 군으로 일반사료를 먹힌 시험구 대조(100%) 대비 14.6%였으며, 가장 낮은 군은 셀레늄유기태화 군으로 일반사료를 먹힌 시험구 대조(100%)대비 0.21%이었다. 결과로 보면, 고농도 유기태 미네랄 소재 섭이는 산란계에 심각한 부작용을 일으켜 산란수를 크게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 대조구 대비 유기태 미네랄 소재류의 투여 농도범위에서는 산란계의 산란수 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다.

미네랄 강화사료 섭취에 따른 산란률 회복패턴 조사

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 탄수화물 기질 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 45일간 섭이 시킨 후, 산란수에서 심각한 문제점이 있음을 확인한 바(Table 8), 이를 해소하기 위하여 일반 사료로 전환하여 산란율의 정상 회복 패턴을 확인하여 생산 능가 대처 방안 및 산란계 품질 향상을 연계하여 효과를 평가하였다(Table 9).

섭이한 대조구 대비(100%) 유기태 사료를 섭이한 후, 일반 사료로 전환한 군에서 유기태 구리 사료군을 제외하고는 섭이 18일째 칼슘, 철, 아연, 구리, 셀레늄 실험군의 산란수는 44, 61, 59.5, 55.5%로 회복 하였으며, 섭이 21일째는 64.7%, 58.8%, 70.6% 및 58.8%의 산란수 회복 결과를 보였다. 결과로 보면 키토산을 기질로 하여 제조한 유기태 미네럴 소재가 50% 이상으로 회복하는 경우는 일반사료로 전환 후 18~21일로 조사되었으나, 유기태 구리의 경우는 산란이 이루어지지 않았다. 결론적으로, 키토산 기질화 유기태화 미네럴 소재의 섭이 시 감소했던 산란율을 일반 사료로 바꾸면 산란율이 정상 패턴으로 되돌아오는 것을 확인하였으나, 구리의 경우는 예외적이였다.

미네럴 강화사료 섭취에 따른 사료섭취량 변화 조사

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 유기태 소재 5종을 첨가한 사료를 45일간 섭이 시킨 후, 사료섭취율을 확인하여 사료 안전성 및 농도 관련 영향을 평가하였다(Table 10).

일반 사료를 공급한 대조(100%)대비 15, 30 및 45일째 Ca-OCHT 유기태 소재 사료섭취량은 100%이였다. Fe-OCHT 유기태 소재 사료섭취량은 -25, 0, 0%이였다. Zn-OCHT 유기태 소재 사료섭취량은 0, -3.3, 0%이였다. Cu-OCHT 유기태 소재 사료섭취량은 -16.6, -3.3, -10%이였다. Se-OCHT 유기태 소재 사료섭취량은 -83.3, -55.8, -64.1%로 나타나 칼슘섭이군을 제외하고는 전반적으로 크게 감소시키는 동일 패턴을 보였다. 결과로 보면, 유기태화 미네럴 소재류의 사료 섭취율을 높은 순서로 보자면 Ca > Zn > Fe > Cu > Se 순으로 조사되었다. 셀레늄과 구리 유기태 소재군의 경우 사료 섭취율이 크게 낮아 현장실험에서 농도 산정 시 고려해야 할 사항으로 판단된다. 결론적으로, 탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재에서 일부 유기태화 소재는 고농도 섭이 시 사료효율이 급격히 감소함을 확인하였다.

산란계 골조직(femur) 강도 및 경도 변화 조사

유기태 미네럴 강화용 사료를 먹인 산란계의 대퇴골을 대상으로 섭이 후 45일째 채취하여 골조직의 인장강도 및 경도 변화를 측정하였으며, 결과는 다음과 같다(Table 11).

강도는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 대조(100%)대비 아연 유기태 소재와 셀레늄 유기태화 소재는 38.7%, -3.22%이였으며, 경도는 아연과 셀레늄 유기태 소재에서 42.5%, -3.12%이였다. 결과로 보면 아연 유기태 미네럴 소재가 일반 사료를 섭이시킨 대조구에 비해 골조직의 인장 강도 및 경도를 크게 향상시켜 골조직을 단단하게 하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 셀레늄 유기태 소재는 골조직 강도 및 경도를 감소시키는 것을 확인하였다. 결론적으로, 유기태 미네럴 소재류중 아연의 경우는 시 골조직의 인장 강도 및 경도를 증가시켜 골조직을 튼튼하게 하는 효과를 확인하였다.

미네럴 강화사료 섭취에 따른 혈액조성 및 이화학 이상 유발성 평가

유기태 미네럴 강화용 사료를 먹인 산란계의 혈액 성분의 변화를 측정하였으며, 결과는 다음과 같다(Table 12 참조).

WBC 수치 변화는 섭이 16일째 일반 산란계 사료를 먹인 대조대비(100%) 탄수화물 기질 유기태 미네럴 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se,소재의 경우 -55.3%, -36.8%, -55.2%, -18.5%, -55.8%이였다. WBC 수치 변화는 섭이 30일째 일반 산란계 사료를 먹인 대조대비(100%) 유기태 미네럴 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se,소재의 경우 0%, 62.1%, 66.7%, -3.99%이였다. 백혈구 수치가 유기태 소재 섭이 기간이 길어

회복되는 결과를 확인하였다.

RBC 수치 변화는 섭이 16일째 일반 산란계 사료를 먹인 대조대비(100%) 탄수화물 기질 유기태 미네랄 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se, 소재의 경우 -52.8%, -26.4%, -50.4%, -11.1%, -33.2%이었다. RBC 수치 변화는 섭이 30일째에 18.5%, 7.40%, 14.18%, -3.33%,이었다. RBC 수치 변화는 섭이 46일째에 -6.6%, -3.3%, 23.3%, -33.9, -55.8이었다. 유기태 사료 섭이 후 아연 유기태 소재는 제외하곤, 16일째 감소되어진 적혈구 수치가 섭이 30일째 회복되었다가, 다시 46일째 감소되는 경향을 관찰하였다. HB수치 변화는 섭이 16일째에 -1.8%, -8.49%, -10.9%, -25.6%, -33.2%이었으며, HB 수치 변화는 섭이 30일째에 18.5%, 7.40%, 14.18%, -3.33%,이었고, HBC 수치 변화는 섭이 46일째에 -11.79%, -10.92%, 15.9%, 0.96%, 3.36%이었다. 그리고, 16일째 감소되어진 헤모글로빈 수치가 섭이 30일째 회복되었다가, 다시 46일째 감소되는 경향을 관찰하였다. 하지만, 셀레늄 유기태 소재는 섭이 44일째에 수치가 상승하는 것을 관찰하였다. NE 수치 변화는 섭이 16일째에 -18.5, 15.4, -17.4, -48.2, -19.4%이었고, 섭이 30일째는 39.6, 72.3, 74.8, 71.6 %이었으며, 46일째는 -14.7, 2.5, 14.0, 16.2, 5.0%였다. MO는 섭이 16일째 18.2, -16.1, -33.3, -39.4, -21.2%에서 30일째는 18.2, 3.8, -6.3, -18.7%의 수치를 보였는데, 최종 46일째는 -30.4, -23.2, -19.6, -19.6, -18.7%이었다.

EO는 섭이 16일째 -32.6, 34.8, -16.2, -58.1, -34.8%에서 30일째는 55.0, 150, 190, 195%이었으며, 46일째에는 2.3, 42.8, 61.9, 52.3, 28.5%이었다. BA는 16일째에서는 -46.6, 60, -13.3, -66.6 및 -58.6%이었는데, 30일째는 -50%, 137.5%, 237.5, 237.5%이었으며, 최종 46일째에는 30.7, 123.0, 153.8, 123.1 및 76.9%이었다. 결과를 보면 주요 혈구 수치 변화에서 유기태 소재가 일반 사료를 섭이 한 대조구에 비해 혈구수가 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 혈구 수 변화 패턴이 15일 간격으로 진행된다는 것을 확인하였으며, 이는 백혈구와 관련 있는 면역인자 요소들도 비슷한 패턴 양상을 보였다. 유기태 소재군 중 주요 혈구 수치 안전성을 가지고 있는 소재는 아연, 철 유기태 소재이었다. 혈구 수치 감소는 본 실험에 사용한 유기태화 소재 농도 고농도에 따른 부작용으로 판단되어진다. 결론적으로, 탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소재류의 섭이 시 주요 혈구성분의 수치에 영향을 준다는 것을 확인하였다.

미네랄 강화란 생산 메카니즘 조사(계란 부위별 미네랄류 분포 변화)

유기태 강화사료 (Ca-OCHT) 섭이군

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 Ca-OCHT를 첨가한 사료를 섭이시킨 산란계에서 낳은 계란 난황 내 난황, 난백, 난각 내 칼슘 이온 수치를 비교하여 계란 품질 및 미네랄 전이를 평가하였다(Table 13).

Ca-OCHT 유기태 소재 15일, 16일, 25일 섭이 후, 난황 내 Ca 수치는 일반 사료를 섭이시킨 대조(100%)대비 -61.9, 1.56%, 4.3%이었으며, 난백내 수치는 -11.3, -34.0와 -59.2%이었으며, 난각은 -11.3, 0.5% 및 -8.7%이었다. 따라서, 유기태 칼슘 소재의 섭이 기간이 길어질수록 난황 내 칼슘 전이량이 증가하면서, 난백으로의 전이량은 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며 15일 경을 기준으로 증가와 감소 패턴을 보였다. 결론적으로, 유기태 칼슘 소재는 계란내 미네랄의 고농도 축적과 더불어 미네랄 강화란을 생산 할 수 있는 소재로 평가 되었다.

강화사료 (Zn-OCHT) 섭취군

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 Zn-OCHT를 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서 낳은 계란 난황 내 난황, 난백, 난각 내 아연 이온 수치를 비교하여 계란 품질 및 미네랄 전이를 평가하였다(Table 14).

유기태 사료 섭취 8일, 15일, 28일 섭취 후, 난황 내 Zn 수치는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%) 대비 12.9, 9.19, 53.4%이었다. 난백에는 268.7와 -85.3%이었으며, 난각은 383.9, -90과 136.4%의 수치를 보였다. 따라서, 유기태 아연 소재는 섭취 기간이 길어질수록 난황 내 아연 전이량이 증가한 후 난백으로 그리고 난각으로 전이되는 메카니즘을 보였으며, 유기태 칼슘과 동일 패턴 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 대조구 대비 아연 유기태 미네랄 소재는 난황으로의 전이가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

유기태 강화사료 (Se-OCHT) 섭취군

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 Se-OCHT를 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서 낳은 계란 난황 내 난황, 난백, 난각 내 아연 이온 수치를 비교하여 계란 품질 및 미네랄 전이를 평가하였다(Table 15).

유기태 셀렌 소재를 28일간 섭취 후, 난황 내 Se 수치는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%) 대비 40%이었으며, 난백 내 Se 수치는 188.8%로 유의하게 증가 하였다. 따라서, 유기태 셀레늄 소재는 난황 및 난백 내 셀레늄 전이량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만, 셀레늄 유기태 소재의 경우 측정 결과가 대조 대비 다양하지 않아 추후 본 현장실험에서 결과 도출에 만전을 기하여야 할 것으로 판단된다. 결론적으로, 대조구 대비 난황 및 난백으로의 유의적인 Se전이가 되는 것을 확인할 수 있었다.

4. 종합결과

가. 탄수화물인 키토산을 기질로 하는 6종을 제조하였다.

나. 유기태 소재류 중 Ca-OCHT(농도: 40,000 ppm /1일 섭취량 120g/1수), Fe-OCHT(농도: 3,000ppm/1일 섭취량 120g/1수), Zn-OCHT(농도: 2,600ppm /1일 섭취량 120g/1수), Cu-OCHT(농도: 700ppm/1일 섭취량 120g/1수), Se-OCHT(농도: 540ppm/1일 섭취량 120g/1수)을 대상으로 산란계에 섭취시켜 현장유효성 평가(45일)를 실시하였다.

다. 관련 목표인 안전성 평가, 미네랄 강화란 생산 가능성 및 생체전이 패턴조사, 질병예방 및 육질에 미치는 결과를 평가한 바, 실험에 사용한 고농도 함량 탄수화물 기질 유기태화 소재가 산란계 및 계란 품질에 심각한 문제가 있음이 확인되었다. 하지만, 현장 평가에서 확인된 산란율 감소와 같은 문제점 해결 방안을 위한 회복 패턴 실험을 통해 현장 문제점을 해결할 수 있는 방안을 확인할 수 있었다.

라. 유기태 소재류에 함유된 미네랄중 Cu를 고농도로 섭취시킨 경우는 산란계의 산란시스템에 심각한 영향을 미치는 결과를 보였음에 따라 권장 혼합량 이내에서 배합함이 타당하다고 확인 되었다.

마. 전체 유기태 사료류중 Se-WPS가 우수한 전이 결과를 보였는데, 계란내 Se의 함유량은 난황보다는 난백내 188.8%를 증가 시키는 우수성을 보였다.

바. 기능성 미네럴류 강화란 생산과 관련한 메카니즘으로서, 소재는 섭이 기간이 길어질수록 난황 내 미네럴 전이량이 증가한 후 난백으로 그리고 난각으로 전이되는 메카니즘을 보였으며, 전체 유기태 미네럴 강화 사료에서 동일 패턴을 나타냄을 확인할 수 있었다. 최종 난각의 미네럴 수치의 증가보다는 난각의 두께를 증가 시키는 우수한 효능을 보였다.

Table. 1. 탄수화물 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 총무게 변화 조사

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후					비고
	산란용 계란 총무게 변화(단위: g)					
	15일	16일	26일	29일	30일	
Control	66.03 ±1.46	62.18 ±3.75	55.30 ±1.11	66.60 ±0.67	-	
Zn-OCHT	62.44 ±1.92	56.03 ±5.19	63.01 ±0.67	-	76.48 ±0.75	15-16일 비교 29-30일 비교
Ca-OCHT	60.75 ±5.83	67.85 ±1.62	54.32 ±0.80	-	-	
Se-OCHT	-	-	-	-	56.44 ±0.87	

Table. 2. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 착색도 변화

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후						계란 착색도 변화		
	Control		Zn-OCHT		Ca-OCHT		Se-OCHT		
	난각	난황	난각	난황	난각	난황	난각	난황	
급여 15일째	L	58.60 ±0.13	59.50 ±0.00	62.04 ±0.14	58.79 ±0.01	61.94 ±0.05	60.74 ±0.04	-	-
	a	9.75 ±0.08	3.22 ±0.01	7.30 ±0.19	3.14 ±0.04	7.94 ±0.04	3.62 ±0.01	-	-
	b	17.66 ±0.17	21.79 ±0.11	18.46 ±0.28	22.92 ±0.01	18.23 ±0.09	26.03 ±0.07	-	-
급여 16일째	L	56.41 ±0.39	59.69 ±0.07	61.77 ±0.06	58.02 ±0.01	63.77 ±0.31	60.12 ±0.20	-	-
	a	9.65 ±0.14	3.00 ±0.06	7.69 ±0.18	3.56 ±0.12	6.84 ±0.04	2.91 ±0.05	-	-
	b	17.40 ±0.06	22.80 ±0.73	17.61 ±0.01	21.87 ±0.01	18.75 ±0.08	21.77 ±1.29	-	-
급여 26일째	L	61.64 ±0.51	60.26 ±0.01	61.70 ±1.01	59.94 ±3.25	57.61 ±1.64	60.70 ±0.00	-	-
	a	8.41 ±0.17	2.22 ±0.01	8.30 ±0.10	2.99 ±0.71	8.98 ±0.85	2.99 ±0.00	-	-
	b	18.38 ±0.43	22.67 ±0.05	19.55 ±0.21	22.13 ±0.67	18.33 ±1.34	23.58 ±0.14	-	-
급여 29일째	L	54.24 ±0.19	59.62 ±0.01	-	-	-	-	-	-
	a	11.60 ±0.14	2.50 ±0.01	-	-	-	-	-	-
	b	17.58 ±0.18	21.24 ±0.03	-	-	-	-	-	-
급여 30일째	L	-	-	57.52 ±0.57	59.64 ±1.23	-	-	55.27 ±0.17	61.59 ±0.00
	a	-	-	10.20 ±0.24	3.33 ±0.033	-	-	9.77 ±0.35	1.13 ±0.01
	b	-	-	18.52 ±0.11	23.35 ±0.36	-	-	17.49 ±0.15	20.47 ±0.02

Table. 3. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 높이, 폭, 두께 변화 조사

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후 산란용 계란 높이, 폭, 두께 변화(단위: mm)					비고
	15일	16일	26일	29일	30일	
Control	높이	60.40±0.13	59.19±2.16	58.91±0.01	61.49±0.01	-
	폭	44.95±0.20	43.17±2.19	42.08±0.01	44.32±0.01	-
	두께	0.45±0.28	0.48±0.01	0.31±0.01	0.45±0.01	-
Zn-OCHT	높이	61.29±4.96	57.48±2.99	58.10±0.01	-	63.64±0.01
	폭	43.65±0.63	41.89±0.48	44.32±0.01	-	46.80±0.01
	두께	0.37±0.06	0.36±0.10	0.37±0.01	-	0.45±0.01
Ca-OCHT	높이	59.10±0.49	61.19±1.97	56.61±0.01	-	-
	폭	43.29±2.19	45.75±0.91	42.34±0.01	-	-
	두께	0.30±0.01	0.33±0.03	0.30±0.01	-	-
Se-OCHT	높이	-	-	-	-	57.11±0.01
	폭	-	-	-	-	42.41±0.01
	두께	-	-	-	-	0.51±0.01

15 - 16
일 비교
26 - 30
일 비교

Table. 4. 기질 미네럴 강화란 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 난백고, 난황고 높이 변화

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후 산란용 계란 난백고, 난황고 높이 변화(단위: mm)					비고
	15일	16일	26일	29일	30일	
Control	난백고	10.71 ±0.50	9.02 ±0.52	7.54 ±0	8.9 ±0	-
	난황고	17.99 ±0.57	17.42 ±1.64	18.26 ±0	18.75 ±	-
Zn-OCHT	난백고	10.39 ±2.34	9.92 ±0.62	11.8 ±0	-	12.6 ±0
	난황고	17.83 ±3.1	9.92 ±0.62	17.21 ±0.07	-	17.8 ±0
Ca-OCHT	난백고	9.8 ±0.17	9.86 ±0.26	8.28 ±0	-	-
	난황고	15.75 ±1.38	17.44 ±0.38	17.24 ±0	-	-
Se-OCHT	난백고	-	-	-	-	11.35 ±0
	난황고	-	-	-	-	17.34 ±0

15-16
일 비교
26-30
일 비교

Table. 5. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 난황, 난백, 난각 중량 변화

시험구		탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후 산란용 계란 난황, 난백, 난각 중량 변화(<건조중량/생중량>, 단위: %)					비교
		15일	16일	26일	29일	30일	
Control	난황	47.9	51.8	51.3	41.1	-	
	난백	12.1	11.1	11.4	11.2	-	
	난각	61.2	62.9	55.3	62.2	-	
Zn-OCHT	난황	51.8	50.3	49.4	-	49.3	
	난백	9.5	10.3	10.6	-	10.4	
	난각	54.5	57.4	48.1	-	66.0	-15-16 일 비교
Ca-OCHT	난황	55.7	48.4	54.7	-	-	-26-30 일 비교
	난백	12.7	11.9	10.8	-	-	
	난각	52.8	52.8	50.5	-	-	
Se-OCHT	난황	-	-	-	-	47.0	
	난백	-	-	-	-	11.4	
	난각	-	-	-	-	54.8	

Table..6. 기질 미네랄 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 가식부(난황+난백) 무게 변화

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소재 사료 섭취 후 산란용 계란 (난황+난백) 무게 변화(<건조중량/생중량>, 단위: %)					비고
	15일	16일	26일	29일	30일	
Control	87.3	84.4	84.4	89.8	-	
Zn-OCHT	96.4	98.5	82.6	-	87.8	15-16일 비교 29-30일 비교
Ca-OCHT	86.1	85.8	85.8	-	-	
Se-OCHT	-	-	-	-	85.2	

Table. 7. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란계 체중 변화 조사

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후 산란계 체중 변화(단위:kg)					비고
	0일	9일	16일	30일	46일	
Control	2.0±0.25	2.4±0.34	2.5±0.37	2.5±0.32	2.3±0.35	증감은 +,-로 표시
	증감	+0.4	+0.1	0	-0.2	
Ca-OCHT	1.9±0.10	2.2±0.30	2.2±0.29	2.4±0.32	1.9±0.18	
	증감	+0.3	0	+0.2	-0.3	
Fe-OCHT	1.9±0.17	2.6±0.24	2.2±0.26	2.5±0.27	1.9±0.21	
	증감	+0.7	-0.5	+0.3	-0.6	
Zn-OCHT	1.9±0.20	2.5±0.30	2.1±0.31	2.2±0.33	1.7±0.32	
	증감	+0.6	-0.5	+0.1	-0.5	
Cu-OCHT	1.9±0.20	2.5±0.30	2.1±0.33	2.2±0.32	2.4±0.31	
	증감	+0.6	-0.6	+0.1	+0.2	
Se-OCHT	1.9±0.40	2.2±0.40	2.0±0.38	1.7±0.26	2.3±0.32	
	증감	+0.3	-0.2	-0.3	+0.6	

Table. 8. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 수 변화 조사

산란계란수 (급여45일간)	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후 계란 수 변화(단위:개)					
	Control	Ca-OCHT	Fe-OCHT	Zn-OCHT	Cu-OCHT	Se-OCHT
총 계란 수	486	41	7	71	1	3
1일 평균산란수 (산란수/개체 수)*100	19.44	2.05	0.35	3.55	0.05	0.27

Table.9. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 계란 산란수 회복 변화

섭이일 (괄호속 숫자 는 일반사료 섭이 후 날짜)	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭이 후 계란 산란수 회복 변화(단위:개)					
	Control (총 25마리)	Ca-OCHT (20마리)	Fe-OCHT (20마리)	Zn-OCHT (20마리)	Cu-OCHT (20마리)	Se-OCHT (20마리)
고농도 유기태 미네럴 강화 사료류로 섭이간 경과일수						
15	14	3	1	5	0	0
16	8	4	0	4	0	0
19	14	1	0	0	0	0
23	14	0	0	2	0	0
24	13	2	0	0	1	0
25	15	1	0	1	0	0
26	10	1	0	0	0	0
27	14	0	0	0	0	0
28	15	1	0	0	0	0
29	13	0	0	3	0	1
30	11	1	0	3	0	0
33	10	1	0	2	0	0
34	11	0	0	1	0	0
35	12	0	0	2	0	1
36	13	0	0	3	0	1
37	11	0	0	1	0	0
38	11	0	0	1	0	0
39	16	0	0	2	0	0
44	17	0	0	3	0	0
45	16	1	0	1	0	0
일반사료로 섭이를 전환함(사료 섭이 후 날짜)						
60(15)	16	3	4	3	0	9
61(16)	16	5	6	7	0	10
62(17)	18	8	4	8	0	10
63(18)	18	8	11	10	0	10
64(19)	18	8	6	11	0	10
65(20)	18	9	11	10	0	13
66(21)	17	11	10	12	0	10
67(22)	17	6	8	7	0	10
68(23)	20	10	8	12	0	12
69(24)	18	10	8	12	0	12

Table.10. 기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란용 닭 사료섭취율 변화

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재류 사료 섭취 후 산란계 사료섭취량 변화(단위: g)			비고
	15일	30일	45일	
Control	120	120	120	
Ca-OCHT	120	120	120	
Fe-OCHT	90	92	104	
Zn-OCHT	120	116	120	
Cu-OCHT	100	116	108	
Se-OCHT	20	53	43	

사료일일섭취량: (총급여량/급여일수/개체수)*100, 120g/1일/1개체당

Table.11. 기질 미네랄 강화란의 생산용 사료 섭취 후(45일째) 산란계 골조직(femur) 강도 및 경도 변화

시험구	탄수화물 기질 유기태화 미네랄 소제 사료 섭취 후 산란계 골조직(femur) 강도 및 경도 변화	
	강도 (g/cm ²)	경도 (g/cm ²)
Control	0.0031±0.0010	0.0064±0.0021
Zn-OCHT	0.0043±0.0002	0.0091±0.0007
Se-OCHT	0.0030±0.0007	0.0062±0.0016

Table.12.

기질 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 산란계 주요 혈구요소 수치 변화

시험구	채취 날짜	탄수화물 기질 유기태화 미네럴 소재 사료 섭취 후 수치 변화							
		혈구 수치				면역관련 혈구 수치			
		WBC	RBC	HB	HCT	NE	MO	EO	BA
Control	16	72.5±18.1	4.2±0.4	10.6±0.9	10.6±0.9	25.3±10.1	9.9±3.3	4.3±2.6	1.5±1.3
	30	26.2±12.7	2.7±0.4	10.5±1.5	10.5±1.5	15.9±8.6	7.9±1.7	2.0±1.8	0.8±0.5
	46	45.1±19.9	3.0±0.5	11.9±2.2	11.9±2.2	27.8±11.7	11.2±3.6	4.2±2.6	1.3±1.3
Ca-OCHT	16	32.4±6.6	2.0±0.1	10.4±0.16	10.4±0.16	20.6±4.74	8.1±0.49	2.9±1.02	0.8±0.46
	30	26.2±12.7	3.2±0.2	25.2±2.14	21.4±2.05	22.2±2.25	8.1±0.32	3.1±1.45	0.4±0.4
	46	37.6±17.3	2.8±0.45	10.5±1.84	21.0±4.03	23.7±11.72	7.8±2.02	4.3±2.72	1.7±1.3
Fe-OCHT	16	45.8±9.72	3.1±0.92	9.7±1.46	20.0±6.17	29.2±5.81	8.3±1.41	5.8±1.95	2.4±1.14
	30	42.6±7.43	2.9±0.19	10.8±0.6	19.3±2.15	27.4±4.93	8.2±0.8	5.0±1.63	1.9±0.89
	46	46.5±4.73	2.9±0.32	10.6±1.18	18.4±1.62	28.5±2.07	8.6±1.96	6.0±0.93	2.9±0.81
Zn-OCHT	16	32.4±10.4	2.1±0.4	9.5±0.9	17.2±9.7	20.9±6.7	6.6±1.7	3.6±1.6	1.3±0.7
	30	43.8±6.2	3.1±0.24	11.2±0.9	23.9±4.43	27.8±4.05	7.4±0.87	5.8±1.49	2.7±1.03
	46	51.2±10.7	3.7±0.5	13.8±1.7	26.7±4.3	31.7±6.0	9.0±2.7	6.8±1.4	3.3±0.9
Cu-OCHT	16	21.4±11.5	2.4±0.48	7.8±0.92	16.5±3.8	13.1±7.69	6.0±1.93	1.8±1.39	0.5±0.3
	30	43.3±7.59	2.9±0.79	10.1±1.15	17.9±5.44	27.2±4.38	7.4±2.41	5.9±1.14	2.7±0.72
	46	50.5±5.67	3.1±0.53	10.5±1.14	20.3±6.3	32.3±3.54	9.0±1.65	6.4±0.86	2.9±0.75
Se-OCHT	16	32.0±9.04	2.8±0.22	9.8±0.62	18.8±2.26	20.4±6.32	7.8±0.82	2.8±1.4	0.62±0.5
	30	-	-	-	-	-	-	-	-
	46	46.0±8.02	3.2±0.33	12.3±1.18	21.1±2.64	29.2±5.26	9.1±1.33	5.4±2.01	2.3±1.45

WBC: , RBC:적혈구, HB:헤모글로블린, HCB: 헤마토크릿, NE:호중구, MO:단핵구, EO:호산구, BA:호염기구

Table.13.

기질 Ca-OCHT 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 미네럴 분포 변화

		기질 Ca-OCHT 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 미네럴 분포 변화(단위 : ppm)														
시험구		15일					16일					26일				
		Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Ca	Fe	Zn	Cu	Se
control	난황	2663±32 2	112± 14	87± 6.2	3.2± 0.4	0.9± 0.2	2239± 1115	120±8 0	65± 44	2.6± 1.3	1.0± 0.2	2693 ±9	145.8 ± 0.4	90.6± 0.3	3.3± 0.0	1.3± 0.1
	난백	478±122	2±1	3± 0.8	1.9 ±0.6	0.7± 0.2	980±10 58	32± 60	22± 43	2.1± 0.9	0.8± 0.1	1453 ±3	115± 0.0	3.3±0 .0	1.5± 0.1	0.9± 0.3
	난각	256667 ±22689	5±2	2± 2.1	ND	ND	243575 ±19797	6.7±5	0.3± 0.9	ND	ND	24500 0±47 6	3.5± 0.0	ND	ND	ND
Ca-OCHT	난황	2889±22	147± 0.2	93± 0.0	7.2± 0.1	1.1± 0.3	2274±1 48	134±1. 4	89± 7.1	2.9± 0.0	1.2± 0.2	2809 ±8	163± 0.4	108± 0.2	3.6± 0.0	0.9± 0.2
	난백	182±1.5	139± 0.0	ND	0.3± 0.2	0.4± 0.1	646± 92	2.5± 1.4	1.2± 0.5	0.9± 0.3	1.1± 0.1	118± 0.0	247± 0.0	1.7±0 .1	0.9± 0.1	0.7± 0.0
	난각	227500 ±149	931± 0.0	0.8± 0.0	ND	ND	244800 ± 24324	6.3± 3.3	2.5± 2.4	ND	ND	22360 0±95 5	128± 0.2	2.6±0 .5	0.2± 0.6	0.6± 0.1

Table.14. 기질 Zn-OCHT 미네랄 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 미네랄 분포 변화

시험구	기능성 사료 섭취 후 내 미네랄 분포 변화(단위 : ppm)															
	8일					15일					28일					
	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	
control	난황	2976±456	133±2.2	85±15	3.4±0.3	0.8±0.0	2663±322	112±14	87±6.2	3.2±0.4	0.9±0.2	2786±21	149±0.1	88±0.2	3.1±0.1	0.9±0.1
	난백	373±81	1.2±0.0	0.2±0.68	1.2±0.1	0.8±0.1	478±122	2±1	3±0.8	1.9±0.6	0.7±0.2	155±1.3	0.6±0.0	ND	0.1±0.1	0.3±0.3
	난각	249650±215	3.1±0.0	1.3±0.0	ND	ND	256667±22689	5±2	2±2.1	ND	ND	243000±948	7.2±0.1	2.9±0.0	ND	0.1±0.3
Zn-OCHT	난황	2168±16	135±0.7	96±0.4	3.3±0.2	1.1±0.0	2142±432	131±3.1	95±21	3.3±0.2	2.6±0.9	3258±2	132±0.3	135±0.3	14.3±0.0	1.1±0.1
	난백	747±5.3	1.1±0.0	0.6±0.0	0.9±0.1	0.9±0.1	958±750	1.2±0.1	0.4±0.5	0.8±0.2	2.0±0.1	857±2.7	1.4±0.0	2.2±0.0	2.7±0.0	0.7±0.1
	난각	209800±1091	15±0.1	15±0.1	2.7±0.5	ND	225078±35	166±1.2	41±0.3	1.6±0.1	2.1±0.0	239900±284	2.9±0.1	7.1±0.0	ND	ND

Table.15. 기질 Se-OCHT 미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 미네럴 분포 변화

시험구	기능성 사료 섭취 후(28일째) 내 미네럴 분포 변화(단위 : ppm)					비고
	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	
control	난황	2,786±21	149±0.1	88±0.2	3.1±0.1	0.9±0.1
	난백	155±1.3	0.6±0.0	ND	0.1±0.1	0.3±0.3
	난각	243,000±948	7.2±0.1	2.9±0.0	ND	0.1±0.3
Se-OCHT	난황	3,258±2	132±0.3	135±0.3	14.3±0.0	1.1±0.1
	난백	857±2.7	1.4±0.0	2.2±0.0	2.7±0.0	0.7±0.1
	난각	239,900±284	2.9±0.1	7.1±0.0	ND	ND

제 2 절 기능성 미네랄류 강화란 대량생산기법 정립 연구

1.

본 과제를 진행간 유기태화 소재는 기질 다변화(유단백질류 및 탄수화물류)를 기준으로 6종 미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, Se, S)를 킬레이팅화 한 유기태화 미네랄 소재를 개발함과 동시에 이를 사료에 혼합하여 산란계에 섭이과정을 통하여 기능성 미네랄가 강화된 미네랄 결핍 해소형 강화란 생산과 가공분말제품을 개발하고 국내 판매사업화에 연구개발 목적이 있다. 본 연구에서는 전체 개발예정인 유기태화 소재류는 유단백질을 기질로 하는 6종 그리고 탄수화물인 키토산을 기질로 제조되는 6종으로 총 12종이 제조 하였다. 산란계의 생육 및 계란의 품질 향상에 도움이 된다고 판단된 유기태 강화 사료 2종을 대상으로 산란계에 섭이시키는 현장유효성 평가를 실시하였다. 본 연구를 통하여 미네랄 강화란 생산기법 정립 및 생체전이 패턴조사, 질병예방 및 육질에 미치는 결과 등) 도달 가능성을 사전 평가하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

가. 실험동물

실험에 사용한 실험동물은 Hy-line 산란계(사육농장 : 형제농장, 50주령)을 사용하였다.

나. 시험사료

일반 산란용 사료를 섭이시킨 대조군 대비 유기태화 미네랄 사료(Ca-WPS, Fe-OCHT)를 섭이시킨 실험군에서 낳은 계란을 실험 15, 30, 45일만에 채취하여 계란의 난황고, 난백 높이 및 난각 두께 변화를 Absolute Digimatic (Model No.CD-15CP, Mitutoyo Corp, JAPAN)를 이용하여 측정하였다.

나. 실험군 설정 및 시료 채취

실험군 설정 및 시료 채취 기간은 다음과 같다. 일반 산란계용 사료를 섭취시킨 대조군, Fe-OCHT를 일반 산란계용 사료에 보강시킨 실험군, Ca-WPS를 일반 산란계용 사료에 보강시킨 실험군 등으로, 각 실험군 당 산란계 10마리씩 설정하였다. 각 시료 채취 기간은 사료 섭이 후 15일, 30일, 45일경에 실시하였다. 실험을 위한 시료채취는 각 실험군 별로 혈액, 계란, 분변, 가식부 근육(대퇴부, 가슴근육) 및 골조직(femur)를 채취하여 실험 항목별로 측정하는데 사용하였다.

다. 미네랄 강화사료류 섭이에 따른 현장효능 평가

유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 후 산란계, 계란, 혈액 및 골조직 성분에 미치는 영향에 대한 평가 내용은 다음과 같으며, 시험항목별 평가방법은 6장과 동일하게 실시하였다.

- 1) 계란의 난각 및 난황 착색도 변화 평가
- (2) 계란의 난각 두께, 난백고 및 난황고 변화 평가
- (3) 계란의 높이 및 폭 변화 평가

- 계란 부위별 무게 변화(생체중량) 평가
- (5) 계란 부위별 무게 변화(생체중량) 평가
 - (6) 계란 난각의 강도 및 경도 변화 평가
 - (7) 골조직(femur) 강도 변화 평가
 - (8) 골조직(femur) 무게 및 성장 변화 평가
 - (9) 총무게(기관별) 대비 가식부 및 대퇴골 순수 무게변화 평가
 - (10) 혈액 구성에 미치는 변화 평가
 - (11) 분변(똥장)내 미생물총 변화 평가
 - (12) 가식부(가슴 및 대퇴근육)색차 비교(생체조직) 평가
 - (13) 혈중 IgY, IFN- γ 생성 평가
 - (14) 계란 내 목표 미네랄 전이 및 농축효율평가
 - (15) 계란내 조지방, 조단백질, 콜레스테롤 수치 평가

3. 연구수행결과

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 계란의 난각 및 난황 착색도 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 난황 및 난각의 착색도를 조사하여 산란을 관련 계란의 품질 결과를 도출함과 동시에 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 1~2). 난각의 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료 대조(100%)대비 명도(L)값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 1.0~3.8%, 1% 정도 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값과 노란색을 나타내는 b값의 경우 명도와 비슷하게 1%정도 증가하는 것이 조사되었다. 이러한 결과는 유기태화 소재류는 난황 및 난각의 색깔 면에서 소비자의 기호성을 충족시키는 효과가 있는 것으로 판단되었다.또한, 전체 유기태화 미네랄 소재류는 계란의 색도를 향상시키면서 계란의 크기도 증가시킴으로서 산란계 생산현장의 애로를 해결 할 수 있는 중요한 단서를 제공하는 결과로 판단되었다(Fig 1.).

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 계란의 난각 두께, 난백고 및 난황고 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 난황 및 난각의 착색도를 조사하여 산란을 관련 계란의 품질 결과를 도출함과 동시에 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 3).

난각 두께 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 15.8%, -4.5%이었다. 측정 44일째 일반사료군의 경우 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 11.6%, 4.6%로 증가하였다. 난황고 높이 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 0%, 6.4%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 8.9%, -1.1%이었다. 난백고 높이 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 52.0%, 64.6%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 20.7%, 4.7% 증가하였다. 이 결과로 보면 난각 두께 증가는 칼슘 유기태 소재, 난황고 높이 변화는

유기태 소재, 난백고 높이 변화는 칼슘, 철 유기태 소재가 높게 나오는 것을 관찰할 수 있었다. 결론적으로, 유기태화 소재류가 계란의 난각 두께, 난황고 및 난백의 높이를 증가시키는 것을 확인할 수 있어 계란 영양성분 크기 및 난각 두께에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 계란의 높이 및 폭 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 계란의 높이 및 폭 변화를 조사하여 산란을 관련 계란의 품질 결과를 도출함과 동시에 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 4).

계란 높이 변화는 측정 19일째 일반사료우 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 18.8%, 17.8% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 5.1%, 4.5% 증가하였다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -2.4%, 2.3%이었다. 폭 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 9.0%, 8.2% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 6.6%, 5% 증가하였다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -1.0%, -2.1%이었다. 이 결과로 보면 계란의 높이 변화는 섭취 기간에 따라 초기에는 증가하였다가, 섭취 길수록 감소하는 경향을 관찰하였다. 이러한, 경향은 폭 변화와 일치하였다. 결론적으로, 유기태화 소재류가 계란 크기 변화에 섭취 기간이 영향을 주는 것으로 판단된다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 계란 부위별 무게 변화(생체중량)

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 계란 부위별 무게 변화를 조사하여 산란을 관련 계란의 품질 결과를 도출함과 동시에 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 5).

계란 총무게(생체중량) 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 9.2%, 20.2% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료우 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 18.1%, 13.3% 증가하였다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -4.7%, -2.6%이었다. 계란의 총 무게는 측정 32일 까지는 증가하였다가, 측정 45일째에는 감소하는 것을 확인하였다.

난각 무게 변화는 측정 19일째 일반사료우 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 6.3%, 1.8% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -8.6%, 3.8%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -0.8%, 11.4%이었다. 계란의 난각 무게는 측정 19일째는 증가하였다가, 측정 32일째에는 감소하다가 44일째 무게 감소폭이 회복되는 것을 확인하였다.

난황 무게 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 21.2%, 11.8% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 24.3%, 29.8%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 17.6%, 5.9%이었다. 계란의 난황 무게는 측정 기간 동안 증가하는 것을 확인하였다.

무게 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 2.43%, 32.0% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -2.12%, 12.4%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -13.8%, -9.0%이었다. 계란의 난백 무게는 측정 19일째 증가하였다가 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과로 보면 유기태화 소재류가 계란의 총무게를 측정 32일 까지는 증가하였다가 측정 44일째 감소하는데, 이는 난백의 무게 변화와 유사한 경향을 보여 난백 무게가 감소하기 때문에 계란 총무게가 감소하는 것으로 판단되며, 계란 성분의 무게 변화에 섭이 기간이 영향을 주는 것으로 판단된다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 계란 부위별 무게 변화(건조중량)

일반사료를 섭이시킨 대조군 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭이시킨 산란계에서의 계란 부위별 건조 무게 변화를 조사하여 산란을 관련 계란의 품질 결과를 도출함과 동시에 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 6).

계란 총무게(건조중량) 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 6.3%, 5.8% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 25.3%, 14.8% 증가하였다. 난각 무게 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -13.9%, -9.78%이었다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -1.15%, -1.15%이었다.

난황 무게 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 25.5%, 11.1% 증가하였다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 34.5%, 24.5%로 증가하였다. 난백 무게 변화는 측정 19일째 일반사료 대조(100%)대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -1.48%, 17.8%이었다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 21.7%, 17.9%로 증가하였다. 이 결과로 보면 건조중량의 경우 일반 사료군의 대조 시험군 대비 유기태화 미네랄 사료군의 난황 및 난백 무게가 높게나오는 것이 조사되었으나, 난각의 건조중량 무게는 일반 사료군보다 낮았으며, 이러한 경향은 계란 생중량 측정 결과와 비슷한 패턴을 보였다. 따라서, 전체적인 변화패턴을 대조 대비 유기태화 미네랄 소재류 섭이후 시간별 채취한 계란별 생체중 및 건조중량의 차이를 종합적으로 비교한 결과, 유기태 사료첨가군에서 계란의 실질적 영양성분인 난황과 난백의 생체중량에서 수분이 제거된 건조중량치가 더 높게 나오므로서 영양학적으로도 일반 사료군에 비해 우수하다는 것이 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 계란 난각의 강도 및 경도 변화

미네랄 강화용 사료를 먹인 산란계가 낳은 계란을 대상으로 한 현장 적용성 평가를 위해 과란율에 영향을 주는 계란의 난각 인장강도 및 경도 변화를 측정 결과는 다음과 같다(Table 7).

난각의 강도 변화는 일반사료 대조(100%)대비 값이 측정19일째 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 8%, 0%이었다. 측정 32일째 일반사료군의 경우 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -5.7%, 3.4%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이

Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 6.3%, -23.7% . 결과로 보면, 칼슘 유기태 소재가 난각 강도를 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 난각의 경도 변화는 일반사료 대조(100%)대비 값이 측정 19일째 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 0%이었다. 측정 32일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 26.4%, 17.6%이었다. 측정 44일째 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 19.2%, -8.65%이었다. 결과로 보면, 칼슘 유기태 소재가 난각 경도를 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 칼슘 유기태화 소재는 사료 섭취 초기에 강도가 증가하고, 중기에 감소하며, 섭취 말기에 다시 강도가 증가하는 경향이 조사되었다. 철 유기태화 소재는 사료 섭취 초기 변화 없고, 중기에 증가하다가 섭취 말기에 강도가 감소하는 경향이 조사되었다. 경도 변화를 보면, 칼슘 유기태화 소재는 섭취 기간 동안 증가 경향이 조사되었지만, 철 유기태화 소재는 증가 후 감소하는 경향이 조사되었다. 이를 통해서 볼 때, 칼슘 소재와 철 소재가 서로 다른 경향의 패턴으로 계란 파란울에 영향을 주는 강도 및 경도 변화가 진행된다는 것을 판단할 수 있는 중요한 자료이다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 골조직(femur) 강도 변화

본 연구에서는 일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 골조직 중 대퇴골의 강도 및 경도 변화를 조사하여 산란계 품질 결과 및 닭 농장 현장 애로사항까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 8). 대퇴골 강도 변화는 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 2.52%, 2.75% 증가하였다. 경도 변화는 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -11.7%, 20.04% 증가하였다. 결과로 보면 칼슘 및 철 유기태화 소재가 대퇴골의 강도를 증가시켜 골조직을 튼튼하게 하는 것으로 판단된다. 특히, 칼슘 유기태화 소재보다는 철 유기태화 소재가 골조직의 강도 및 경도를 더 많이 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 골조직(femur) 무게 및 생장 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 골조직 중 대퇴골의 무게 및 길이 변화를 조사하여 산란계 품질 결과를 도출함과 동시에 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table 9, Fig. 3).

대퇴골 길이 변화는 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -2.52%, 1.68%이었다. 폭 변화는 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 19.97%, 7.37% 증가하였다. 무게 변화는 일반사료 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 4.76%, 18.36% 증가하였다. 결과로 보면 유기태화 소재류가 대퇴골의 폭 및 무게를 증가시킨다는 것이 조사되었다. 특히, 칼슘 유기태화 소재보다는 철 유기태화 소재가 골조직의 강도 및 경도를 더 많이 증가시키는 결과와 동일하게 폭, 길이, 무게 변화도 칼슘보다 더 좋은 결과가 나타남이 확인되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후, 총무게(기관별) 대비 가식부 및 대퇴골 순수무게 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취(60일)시킨 산란계에

기관별 및 가식부로 구분하여 이들의 무게차이를 비교하여 생장 관련 결과를 도출함과 동시에 안전성까지 연계하여 효과를 평가하였다. 칼슘의 경우 골조직의 생장에 영향을 미치는 것으로 기보고가 되어있기 때문에 골조직 중 대퇴골만을 대상으로 무게차이를 비교함으로써 역시 유기태화 미네럴 소재류가 골조직에 미치는 영향을 평가하였다(Table 10). 우선 총무게에 미치는 유기태화 미네럴 소재류의 효과를 평가하여 보았더니 일반 사료 대조(100%) 대비 칼슘 유기태화 소재는 13%, 그리고 철분 유기태화 소재류의 경우는 7.3%가 감소하는 결과를 보였는데, 골조직에 미치는 영향은 오히려 Ca-WPS 처리구는 34% 이상, Fe-OCHT 처리구는 35% 이상이 증가되는 것으로 조사되었는데 이러한 결과는 유기태화 소재류는 지방 등의 무게를 감소시키는 효과가 있는 것이 아닌가 하고 판단되었다. 전체 유기태화 미네럴 소재류는 지속적인 산란에 의하여 골조직 내 골밀도 감소부분을 오히려 증가시킴으로서 산란계 생산현장의 애로를 해결 할 수 있는 중요한 단서를 제공하는 결과로 판단되었다. 가식부 무게 증가에 미치는 효과를 산란계 실험을 통하여 사전평 가하므로써 육계 육질고급화 브랜드 개발 연구에 적용하고자 하였는데, 대조구 대비 Ca-WPS 처리구는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았는데, Fe-OCHT 처리구의 경우는 약 4%의 증가 수치를 보여 칼슘보다는 철분소재가 골조직과 가식부 무게를 동시에 증가시키면서 체지방을 감소시키는 우수성을 나타내었다(Fig 1 참조). 기타 장기의 무게변화는 무게 측정 시 도계과정에서 분석을 위한 채혈 등을 통하여 무게감소가 이루어졌을 것으로 예상되어 시험에서 제외하였다. 결론적으로, 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재류의 투여 농도 범위에는 산란계에 대한 안전성에 있어 문제점은 도출되지 않았으며, 운동량을 극도로 제한시키면서 고지방 사료를 일반적으로 섭이시키는 산란계 생산현장의 문제인 지방축적 감소와 골조직 밀도를 증가시키는 우수성이 입증되었다.

미네럴 강화란 생산용 사료 섭취 후 혈액 조성에 미치는 변화

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭이(60일)시킨 산란계에서의 혈액의 주요 성분을 비교하므로써 소재 안정성을 평가하였다. 또한, 혈구세포 중 면역 관련 인자들의 결과를 도출하여 유기태화 소재가 면역인자 증대에 미치는 영향을 평가하였다(Table 11).

주요 혈구 세포 중 WBC(백혈구)의 경우 유기태화 미네럴 소재의 효과를 평가하여 보았더니 일반 사료 대조(100%) 대비 칼슘 유기태화 소재는 80% 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 160%가 증가하는 결과를 보였다. RBC(적혈구)의 경우 유기태화 미네럴 소재의 효과를 평가하여 보았더니 대조 대비 칼슘 유기태화 및 철분유기태화 소재는 12% 증가하는 결과를 보였다. HB(혈색소)는 대조 대비 칼슘 유기태화 소재는 12.5% 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 13.5%가 증가하는 결과를 보였다. PLT(혈소판)는 대조 대비 칼슘 유기태화 소재는 -93.7% 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 4.4%가 증가하는 결과를 보였다. 이 결과를 보면 유기태화 소재가 주요 혈구 세포 수치를 증가시키면서 안정성이 있음을 확인할 수 있었다. 혈구세포 중 면역인자들 조사 결과 NE는 대조(100%) 대비 칼슘 유기태화 소재는 90% 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 190%가 증가하는 결과를 보였다. MO는 대조(100%기준) 대비 칼슘 유기태화 소재는 62% 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 110%가 증가하는 결과를 보였다. 또한, EO와 BA도 대조(100%) 대비 칼슘 유기태화 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 200%가 증가하는 결과를 보였다. 이러한, 결과는 주요 혈구 세포 중 백혈구 활성화와 관련 깊은 수치를 유기태화 미네럴 소재가 증가시켜 결과적으로 면역 기능을 증진시킬 수 있는 중요한 작용을 할 것으로 판단된다. 결론적으로, 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 안전성에 있어 문제점은 도출되지 않았으며, 주요 혈구세포 및 면역인자 관련 혈구 성분을 증가

면역력을 증가시키는 우수성이 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 분변(맹장)내 미생물총 변화

대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취(60일)시킨 산란계에서의 분변(맹장)내 미생물총 변화를 비교함으로써 질병억제(Probiotic) 및 미생물 변화를 평가하였다(Table 12).

유기태화 사료 섭취 후 총균수의 변화를 관찰하였더니, 일반사료 대조(100%) 대비 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 457.1%, 1,128.5% 증가하였다. 유산균군 수는 일반사료군의 대조(100%) 대비 값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 40%, -48.5%이었다. 이 결과를 통해서 보면, 철 유기태화 미네랄 소재는 일반사료군과 비교하여 총균수와 대장균군 수는 증가하면서 유산균은 감소하는 형태이고, 칼슘 유기태화 소재는 총균수, 대장균군 수, 유산균군 수는 증가하는 형태로 관찰되었다. 본 실험에서 사용한 유기태화 미네랄 소재가 산란계 분변 내 probiotic 효과에 영향을 주어 질병예방 및 면역에 영향을 줄 수 있다는 중요한 자료라고 판단된다. 결론적으로, 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 Probiotic 효과가 있음이 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 가식부(가슴 및 대퇴근육)색차 비교(생체조직)

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취시킨 산란계에서의 가식부 착색도를 조사하여 산란계 육질관련 결과를 도출함과 동시에 육질관련 소비자 기호성까지 연계하여 효과를 평가하였다(Table. 13, Fig. 4). 대퇴부위 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -3.7%, -2.1% 정도 감소하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값의 경우 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 4%, 7% 정도 증가하는 것이 조사되었고, 노란색을 나타내는 b값의 경우 거의 차이가 없었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄소재가 대퇴부위 근육을 더 선명한 붉은 색을 나타내게 하는 것으로 판단된다. 가슴부위 착색도 변화는 일반 산란계용 사료를 먹인 일반사료군의 경우 대조(100%)대비 명도(L)값이 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 1.6% 정도 증가하였다. 또한, 대조(100%)대비 붉은 색을 나타내는 a값은 Ca-WPS군과 Fe-OCHT군의 경우 -14% 감소하였고, 노란색을 나타내는 b값의 경우 6.8% 정도 증가하는 것이 조사되었다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄 소재가 가슴부위 근육을 더 선명하게 만드는 것으로 판단된다. 이러한 결과를 통해 유기태화 소재류가 각 근육별 고유 색상을 부위별로 착색도를 변화시킬 수 있어 소비자 기호를 충족시키는 효과가 있는 것으로 판단되었다. 결론적으로, 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재류의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 육질의 색도를 증가시키는 효과가 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료 섭취 후 혈중 IgY, IFN- γ 생성 비교

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취(60일)시킨 산란계 혈액 내에서 생성되는 IgY와 IFN- γ 생성량을 비교하여 혈중 면역인자 생성 효과를 평가하였다(Table 14).

혈중 IgY 생성에 미치는 유기태화 미네랄 소재류의 효과를 평가하여 보았더니 일반사료 대조(100%) 대비 칼슘 유기태화 소재는 70.8% 그리고 철분유기태화 소재류의 경우는 118%가 증가하였

. 이는 유기태화 미네럴 소재류가 면역에 관여하는 IgY 생성을 유도시켜서 면역력을 증가시킨다는 중요한 결과로 판단되었다. 혈중 IFN- γ 생성에 미치는 유기태화 미네럴 소재의 효과를 평가하여 보았더니 일반사료 대조(100%) 대비 칼슘 유기태화 소재는 -27.8% 그리고 철분유기태화 소재의 경우는 -11.8%가 감소하였다. 이는 유기태화 미네럴 소재가 항암 및 염증 반응에 관여하는 IFN- γ 생성량을 억제시키는 결과로 판단되었다. 산란계 대상 기능성 면역 (난황 IgY) 강화란 생성 대량시스템정립 연구 개발에 핵심인 IgY가 유기태화 미네럴 소재에 의해 혈액 내 생성이 증가된다는 실험을 통하여 사전평가함으로서 추후 진행될 면역 강화란 개발 연구에 중요한 자료가 될 것이다. 또한, 항바이러스 역할과 항암 효과에 관련된 IFN- γ 생성량을 감소시킴으로서 유기태화 미네럴 소재가 염증반응을 억제시키면서 면역 인자를 증가시키는 것으로 판단된다.

결론적으로, 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도는 산란계에 대한 혈중 면역인자를 증가시키면서 염증반응을 완화시키는 효과가 있어 산란계 대상 기능성 면역 효과가 있음이 입증되었다.

미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 Fe, Ca 미네럴 분포 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취(60일)시킨 산란계에 서 낳은 계란의 난황, 난백, 난각의 Fe, Ca 미네럴 분포량을 비교하여 계란 품질 및 미네럴 전이를 평가하였다(Table 15). Ca-WPS, Fe-OCHT 유기태 소재 난황 내 Fe분포는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 14.6, 20.7%이었다. 난백 내 Fe분포는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 -11, -24.4%이었다. 난각내 Fe분포는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 둘 다 4%이었다. Ca-WPS, Fe-OCHT 유기태 소재 난황 내 Ca 분포는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 26.3, 27.4%이었다. 난백 내 Ca분포는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 6.4, 27.6%이었다. 난각내 Ca 분포는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 -0.4, 4.53%이었다. 칼슘과 철 유기태 소재가 난황 내 Ca, Fe 분포는 증가하면서 난백 내 분포는 감소시키는 경향이 있음을 확인할 수 있었다. 난각 내 분포는 칼슘 유기태 소재가 분포가 증가하고, 유기태 소재는 약간 감소하는 경향이 관찰되었다. 결론적으로, 계란의 실질적 영양성분인 난황과 난각내 Ca, Fe 미네럴 분포가 증가하는 관찰할 수 있었다. .

미네럴 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 조지방, 조단백, 콜레스테롤 수치 변화

일반사료를 섭취시킨 대조구 대비 선발 유기태 소재 2종을 첨가한 사료를 섭취(60일)시킨 산란계에 서 낳은 계란 난황 내 조지방, 조단백, 콜레스테롤 수치를 비교하여 계란 품질을 평가하였다(Table 16).

Ca-WPS, Fe-OCHT 소재 난황 내 조지방량은 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 5.45, 6.05%이었다. 조단백량은 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 -6.35, -7.73%이었다. 콜레스테롤 수치는 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 -2.49, 5.58%이었다. Ca-WPS, Fe-OCHT 소재 난백 내 조지방량은 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 50, 0%이었다. 조단백량은 일반 사료를 섭취시킨 대조(100%)대비 1.58, -2.68%이었다. 이 결과를 보면, 2종 유기태 미네럴 소재는 난황내 조지방량을 증가시키면서, 조단백량은 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, 칼슘 유기태 소재는 콜레스테롤 수치를 감소시키는 것을 관찰하여 효과가 우수함을 확인하였다. 결론적으로, 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도는 계란 내 품질 향상에 효과가 있음이 입증되었다.

4. 종합결과

가. 유단백질을 기질로 하는 1종 그리고 탄수화물인 키토산을 기질로 제조되는 1종을 제조하여 본 실험에 사용하였다.

나. 유기태화 소재 중 Ca-WPS(과립분산형, 농도: 30,000ppm/1일 섭취량 120g/1수) 1종과 Fe-OCHT 1종 (용매분산형, 농도: 3,000ppm/1일 섭취량 120g/1수)을 대상으로 산란계에 섭이시키는 현장유효성 평가를 실시한 결과, 미네럴 강화란 생산 가능성 및 생체전이 패턴조사, 질병예방 및 육질에 미치는 결과는 연구목표에 근접하는 결과를 보였다.

다. 기능성 강화란 생산과 관련한 생육패턴 및 고품질 계란 생산성 관련 연구결과는 다음과 같다.

- 1) 유기태화 미네럴 소재류는 계란의 색도를 향상시키면서 계란의 크기도 증가시킴으로서 산란계 생산현장의 애로를 해결 할 수 있는 중요한 단서를 제공하는 결과로 판단되었다.
- 2) 유기태화 소재류가 계란의 난각 두께, 난황고 및 난백의 높이를 증가시키는 것을 확인 할 수 있어 계란 영양성분 크기 및 난각 두께에 영향을 주는 것으로 판단되었다.
- 3) 유기태화 소재류가 계란의 총무게를 측정 32일까지는 증가하였다가 측정 44일째 감소하는데, 이는 난백의 무게 변화와 유사한 경향을 보여 난백 무게가 감소하기 때문에 계란 총무게가 감소하는 것으로 판단되며, 계란 성분의 무게 변화에 섭이 기간이 영향을 주는 것으로 판단된다.
- 4) 전체적인 변화패턴을 대조 대비 유기태화 미네럴 소재류 섭이후 시간별 채취한 계란별 생체중 및 건조중량의 차이를 종합적으로 비교한 결과, 유기태 사료첨가군에서 계란의 실질적 영양성분인 난황과 난백의 생체중량에서 수분이 제거된 건조중량치가 더 높게 나오므로 영양학적으로도 일반 사료군에 비해 우수하다는 것이 입증되었다.
- 5) 칼슘 소재와 철 소재가 서로 다른 경향의 패턴으로 계란 과란율에 영향을 주는 강도 및 정도 변화가 진행된다는 것을 알 수 있었다.
- 6) 유기태화 소재류가 대퇴골의 폭 및 무게를 증가시킨다는 것이 조사되었다. 특히, 칼슘 유기태화 소재보다는 철 유기태화 소재가 골조직의 강도 및 경도를 더 많이 증가시키는 결과와 동일하게 폭, 길이, 무게 변화도 칼슘보다 더 좋은 결과가 나타남이 확인되었다.
- 7) 대조구 대비 Ca-WPS 처리구는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았는데, Fe-OCHT 처리구의 경우는 약 4%의 증가 수치를 보여 칼슘보다는 철분소재가 골조직과 가식부 무게를 동시에 증가시키면서 체지방을 감소시키는 우수성을 나타내었다
- 8) 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 안전성에 있어 문제점은 도출되지 않았으며, 주요 혈구세포 및 면역인자 관련 혈구 성분을 증가시켜 면역력을 증가시키는 우수성이 입증되었다.
- 9) 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 Probiotic 효과가 있음이 입증되었다.
- 10) 대조구 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도는 산란계에 대한 혈중 면역인자를 증가시키면서 염증반응을 완화시키는 효과가 있어 산란계 대상 기능성 면역 효과가 있음이 입증되었다.
- 11) 칼슘과 철 유기태 소재가 난황과 난각내 내 Ca, Fe 분포는 증가하면서 난백 내 분포는 감소시키는 경향이 있음을 확인할 수 있었다.
- 12) 칼슘 유기태 소재는 콜레스테롤 수치를 감소시키는 것을 관찰하여 효과가 우수함을 확인하였다.

라. 이상의 결과를 토대로 고품질 기능성 강화란 대량 생산을 위한 현장매뉴얼을 다음과 같다.

- 1) 사료 1톤내 Ca-WPS와 Fe-OCHT의 배합량(순수 미네럴 기준)은 100,000ppm과

50,000ppm이며 무기태 미네랄 배합량과 동등성을 보유한다.

- 2) 산란계에 섭이시 1일 100g을 섭이토록 하되 기능성 강화란의 생산 기점은 15일이다.
- 3) 2)항에 의하여 전체 산란계의 사육기간 동안 섭이토록 한다.
- 4) 1)~3)항으로 섭이시킨 경우, 고품질 기능성 강화란의 대량생산이 가능하다.

Table. 1. 강화란의 생산용 사료 섭이 후 계란의 난각 착색도 변화

시험구	섭이 후 경과 일수	기능성 사료 섭이 후 난각 착색도 변화 (Hunter Value)			비고
		L	a	b	
Control	19	60.2±0.08	5.75±0.06	16.0±0.04	
	32	62.3±0.04	5.28±0.04	16.7±0.05	
	44	61.6±0.75	4.88±0.14	15.9±0.26	
Ca-WPS	19	60.6±0.03	5.65±0.03	16.2±0.02	
	21	62.5±0.02	5.21±0.04	16.9±0.07	
	31	61.2±0.01	5.21±0.01	16.6±0.02	20-32일 비교
	32	61.3±0.01	5.17±0.04	16.3±0.09	33-44일 비교
Fe-OCHT	44	63.1±0.14	5.05±0.20	16.6±0.08	
	19	60.8±0.04	5.87±0.03	16.5±0.02	
	21	61.1±0.07	5.32±0.07	16.1±0.07	
	31	61.3±0.02	5.69±0.04	16.6±0.06	
	32	61.2±0.04	5.83±0.02	16.3±0.03	
	44	61.7±0.75	4.75±0.01	16.0±0.12	

* L : 명도(=밝기), a : red~green까지 색영역(양수쪽 이면 red), B : yellow~blue까지 영역(양수쪽이면 yellow)

Table. 2. 강화란의 생산용 사료 섭이 후 계란의 난황 착색도 변화

시험구	섭이 후 경과 일수	기능성 사료 섭이 후 난황 착색도 변화 (Hunter Value)			비고
		L	a	b	
Control	19	60.8±0.53	2.35±0.11	14.5±0.93	
	32	62.4±0.02	1.73±0.08	16.2±0.06	
	44	62.7±0.12	1.90±0.19	16.3±0.49	
Ca-WPS	19	61.7±0.02	2.16±0.02	15.9±0.02	
	21	62.7±0.09	1.53±0.02	16.9±0.03	
	31	62.4±0.02	1.35±0.02	16.5±0.03	20-32일 비교
	32	62.7±0.03	1.17±0.01	16.1±0.01	33-44일 비교
	44	62.6±0.08	1.66±0.17	16.3±0.14	
Fe-OCHT	19	61.5±0.02	1.90±0.01	15.5±0.05	
	21	61.4±0.17	1.47±0.04	14.3±0.23	
	31	62.2±0.02	1.45±0.04	16.2±0.11	
	32	62.1±0.05	1.80±0.09	16.8±0.08	
	44	62.6±0.55	1.21±0.01	16.6±0.34	

* L : 명도(=밝기), a : red~green까지 색영역(양수쪽 이면 red), B : yellow~blue까지 영역(양수쪽이면 yellow)

Table. 3. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란의 난각 두께, 난황고 및 난백고 변화

시험구	섭이 후 경과일수	기능성 사료 섭취 후 부위별 계란 크기 변화(생체중량, 단위 : mm)			비고
		난각두께	난황고	난백고	
Control	19	0.66±0.09	18.6±0.58	4.98±0.18	
	32	0.44±0.01	17.9±0.51	7.05±0.60	
	44	0.43±0.04	17.9±0.53	7.86±0.68	
Ca-WPS	19	0.76±0.02	18.6±0.96	7.57±0.78	
	21	0.51±0.01	18.9±0.71	7.68±0.63	
	31	0.46±0.02	20.0±0.24	8.38±0.65	19-21일 비교
	32	0.47±0.08	19.3±1.26	8.78±2.26	
	44	0.48±0.01	19.5±0.90	9.49±0.23	33-44일 비교
Fe-OCHT	19	0.63±0.08	19.8±0.03	8.20±0.04	
	21	0.48±0.09	18.0±0.92	6.48±0.22	
	31	0.47±0.01	20.0±1.18	8.70±0.37	
	32	0.41±0.01	19.8±0.63	7.60±0.09	
	44	0.45±0.01	17.7±0.76	8.23±0.64	

Table. 4. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 높이 및 폭 변화

시험구	섭이 후 경과 일 수	기능성 사료 섭취 후 부위별 계란 크기 변화(생체중량, 단위 : mm)		비고
		높이	폭	
Control	19	49.9±2.20	41.1±2.72	
	32	54.9±0.81	42.0±1.13	
	44	60.1±1.90	45.5±2.20	
Ca-WPS	19	49.7±1.52	41.6±1.96	
	21	59.3±1.39	44.8±0.45	
	31	63.0±0.83	44.6±0.18	19-21일 비교
	32	57.7±2.34	44.8±2.35	32-44일 비교
	44	58.6±1.42	45.0±1.56	
Fe-OCHT	19	53.2±2.53	44.5±2.76	
	21	58.8±3.91	44.5±1.45	
	31	61.6±3.34	46.4±0.85	
	32	57.4±3.45	44.1±1.39	
	44	61.5±3.12	44.5±1.03	

Table. 5. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 부위별 무게 변화(생체중량)

시험구	섭이 후 경과 일수	기능성 사료 섭취 후 부위별 무게 변화 (생체중량, 단위: g)				비고
		총무게	난각	난황	난백	
Control	19	56.4±0.70	8.40±0.26	16.0±0.72	32.8±1.01	19-21일 비교 32-44일 비교
	32	54.7±3.51	8.43±0.93	14.4±0.46	33.0±1.22	
	44	68.1±5.02	8.97±0.15	17.0±0.46	41.8±4.94	
Ca-WPS	19	61.6±0.42	8.93±0.70	19.4±4.50	33.6±4.68	
	21	66.0±1.85	8.83±0.31	17.7±1.68	34.5±5.49	
	31	68.1±0.14	9.30±1.56	16.1±0.99	38.0±7.07	
	32	64.6±9.68	7.70±1.13	17.9±0.92	32.3±1.20	
	44	64.9±5.23	8.90±0.01	20.0±0.99	36.0±6.08	
Fe-OCHT	19	67.8±0.42	8.55±1.77	17.9±0.21	43.3±1.77	
	21	63.3±8.79	6.93±0.64	15.4±2.31	39.2±7.89	
	31	72.8±0.42	8.30±0.71	18.1±0.57	45.9±0.21	
	32	62.0±6.09	8.75±0.92	18.7±1.20	37.1±3.95	
	44	66.3±4.55	10.0±1.43	18.0±1.87	38.0±5.32	

Table. 6. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 부위별 무게 변화(건조중량)

시험구	섭이 후 경과일수	기능성 사료 섭취 후 부위별 무게 변화 (건조중량, 단위: g)				비고
		총무게	난각	난황	난백	
Control	19	17.30±0.22	5.93±0.72	7.33±0.06	4.03±0.15	19일 비교 32일 비교
	32	17.07±1.38	6.07±0.49	7.10±0.53	3.90±0.36	
Ca-WPS	19	18.40±0.16	5.10±0.44	9.20±0.95	3.97±0.15	
	21	19.40±1.34	6.47±0.23	10.5±1.35	4.50±0.44	
	31	19.70±1.84	6.40±0.42	10.6±1.13	4.35±0.49	
	32	21.40±1.05	6.00±0.42	9.55±0.21	4.75±0.78	
Fe-OCHT	19	18.30±0.14	5.35±0.35	8.15±0.35	4.75±0.35	
	21	17.40±1.62	3.83±1.54	8.70±0.76	4.90±0.36	
	31	18.70±1.81	6.10±0.57	7.30±2.90	5.30±0.14	
	32	19.6±1.40	6.00±2.12	8.84±1.20	4.60±0.42	

Table. 7. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 난각, 경도 변화 조사

시험구	섭이 후 경과 일수	강화란의 생산용 사료의 섭취 후 계란 난각, 경도 변화		비고
		강도(g/cm ²)	경도(g/cm ²)	
Control	19	E+05±E+04	E+05±E+04	
	32	2.94E+04±E+04	3.40E+05±E+04	
	44	3.32E+04±1.48E+03	4.62E+05±2.05E+04	
Ca-WPS	19	E+04±E+04	E+05±E+04	
	21	E+04±E+04	E+05±E+04	19일 비교
	31	2.88E+04±2.40E+03	4.30E+05±6.46E+04	32-33일 비교
	33	2.78E+04±5.52E+03	4.46E+05±2.79E+04	
	44	3.53E+04±3.22E+03	5.51E+05±1.65E+04	44일 비교
Fe-OCHT	19	E+05±E+04	E+05±E+04	
	21	2.38E+04±E+04	3.71E+05±E+04	
	31	3.04E+04±E+04	4.00E+05±E+04	
	37	3.15E+04±9.47E+03	4.90E+05±1.82E+04	
	44	2.53E+04±1.65E+03	4.22E+05±3.22E+04	

Table. 8. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 골조직(femur) 강도변화에 미치는 효과(생체중)

시험구	강화란의 생산용 사료의 섭취 후 골조직(femur) 강도변화에 미치는 효과				
	최대응력(g)	진입깊이(mm)	강도(g/cm ²)	경도(g/cm ³)	항복치(g/cm ²)
Control	10,58±191	1.80±0.07	53,43±1.00	292,73±9,59	8,54±1,23
Ca-WPS	10,69±242	2.07±0.26	54,78±1.17	258,30±27,97	7,09±1,10
Fe-OCHT	10,54±296	1.59±0.35	54,90±1.12	351,40±80,98	8,94±1,49

Table. 9. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 골조직(femur) 무게 및 성장에 미치는 효과(생체중)

시험구	강화란의 생산용 사료의 섭취 후 골조직(femur) 무게 및 성장에 미치는 효과		
	길이(mm)	폭(mm)	무게(g)
Control	119±2.32	6.96±0.67	14.7±1.98
Ca-WPS	116±2.41	8.35±1.57	15.4±2.11
Fe-OCHT	121±0.80	7.47±0.06	17.4±1.06

Table. 10. 미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후, 총무게(기관별) 대비 가식부 및 대퇴골 순수무게 변화

시험구	기관별, 가식부, 대퇴골 생체 순수 무게(단위: g)								
	총무게	기관별 순수 생체무게					가식부 생체무게		대퇴골 생체무게
		심장	신장	폐	비장	간	대퇴부위	가슴부위	
Control	2,050 ±165	10.0 ±0.5	12.0 ±1.00	15.0 ±2.6	1.0 ±0.2	44.0 ±4.6	88.0 ±23.4	297 ±21.1	17.0 ±1.2
Ca-WPS	1,783 ±116	7.00 ±0.01	12.0 ±1.00	11.0 ±1.7	2.0 ±0.01	44.3 ±4.1	66.0 ±40.4	294 ±17.0	22.8 ±1.0
Fe-OCHT	1,900 ±86.6	8.00 ±0.58	9.67 ±1.15	14.7 ±3.51	2.33 ±0.58	38.0 ±5.03	91.2 ±7.29	308 ±38.8	23.0 ±1.57

Table. 11. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 혈액 조성에 미치는 변화

시험구	강화란의 생산용 사료의 섭취 후 혈액 조성에 미치는 변화									
	혈구 수치					면역관련 혈구 수치				
	WBC	RBC	HB	PLT	NE	MO	EO	BA	NRBC	RETIC
Control	16.2	2.7	9.5	4.5	9.1	5.5±	1.1±	0.3±	NC	NC
	±9.3	±0.8	±1.5	±4.2	±6.0	2.0	0.9	0.3		
Ca-WPS	29.2	3.3	11.9	2.8	17.3	8.9±	2.2±	0.6±	NC	NC
	±10.	±0.3	±1.3	±1.0	±7.0	2.0	1.3	0.5		
Fe-OCHT	43.1	3.2	12.8	4.7	26.8	11.6	3.7	0.9	NC	NC
	±19.8	±0.3	±3.1	±2.1	±13.6	±3.7	±2.1	±0.7		

- WBC($\times 10^2/\mu\ell$): 백혈구, RBC($\times 10^4/\mu\ell$):적혈구, HB(g/dl):헤모글로블린, PLT($\times 10^4/\mu\ell$):혈소판, NE:호중구,

MO:단핵구, EO:호산구, BA:호염기구,

- NC: Not counting

Table. 12. 강화란의 생산용 사료의 섭이 후 분변(땡장)내 미생물총 및 영양원 변화

미네랄 강화란의 생산용 사료의 섭이 후 분변(땡장)내 미생물총 및 영양원 변화						
시험구	총균수 (그람양성균 TYPE+양성균 TYPE)	그람양성균 TYPE (<i>Bacillus</i> TYPE)	그람음성균 TYPE (<i>E.coli</i> TYPE)	영양원 변화 (HPLC 조사, Control 기준,%)	대장균군 TYPE	유산균군 TYPE
Control	1.40×10^7 $\pm 2.75 \times 10^2$	6.00×10^5 $\pm 1.31 \times 10^2$	1.40×10^7 $\pm 2.75 \times 10^2$	100 ± 43	2.0×10^4 $\pm 2.4 \times 10^2$	7.0×10^6 $\pm 2.5 \times 10^2$
Ca-WPS	7.80×10^7 $\pm 4.66 \times 10^2$	2.30×10^6 $\pm 9.54 \times 10^2$	7.80×10^7 $\pm 4.66 \times 10^2$	98 ± 94	7.6×10^4 $\pm 1.32 \times 10^2$	9.8×10^6 $\pm 6.1 \times 10^2$
Fe-OCHT	1.72×10^8 $\pm 1.34 \times 10^2$	5.89×10^6 $\pm 5.30 \times 10^2$	1.66×10^8 $\pm 1.29 \times 10^2$	74 ± 5	2.5×10^8 $\pm 3.63 \times 10^2$	3.6×10^6 $\pm 2.1 \times 10^2$

Table. 13. 강화란 생산용 사료(산란계, 사료 섭이 후 60일)의 섭이 후 가식부(가슴 및 대퇴근육) 색차 변화

시험구	강화란 생산용 사료 섭이 후 가식부(가슴 및 대퇴근육) 색차 변화					
	대퇴부위			가슴부위		
	L	a	b	L	a	b
Control	62.0±2.81	3.38±0.21	12.5±0.19	59.5±0.09	2.93±0.50	11.8±0.12
Ca-WPS	59.7±2.03	3.53±0.09	12.3±0.59	60.5±0.45	2.51±0.40	12.5±0.17
Fe-OCHT	60.7±1.49	3.62±0.19	12.5±0.45	60.5±0.85	2.52±0.25	12.6±0.47

Table. 14. 강화란 생산용 사료 섭취 후 혈액내 Immunoglobulin Y (IgY), Interferon- γ (IFN- γ) 변화 조사

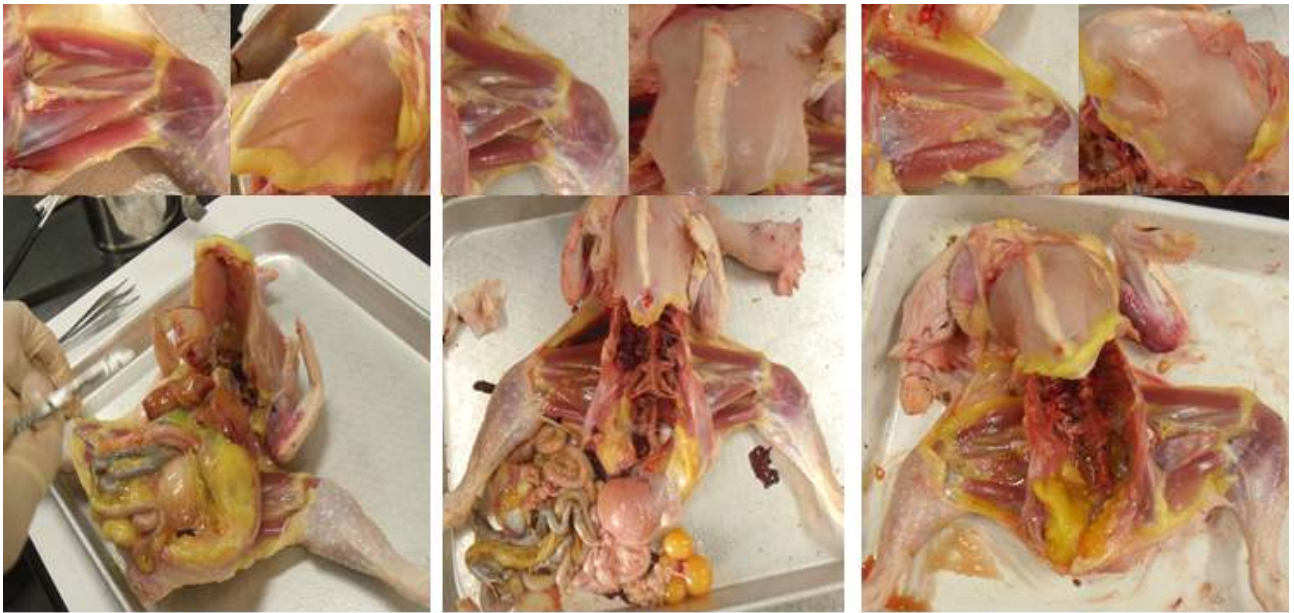
시험구	강화란 생산용 사료 섭취 후 혈액내 IgY, IFN- γ 생성 변화(단위: $\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Immunoglobulin Y (IgY)	Interferon- γ (IFN- γ)
Control	215.2 \pm 36.1	250.1 \pm 17.1
Ca-WPS	367.7 \pm 31.6	180.8 \pm 19.5
Fe-OCHT	469.3 \pm 15.2	220.4 \pm 18.0

Table. 15. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 Fe, Ca 미네랄 분포 변화

시험구	강화란 생산용 사료 섭취 후 계란 내 Fe, Ca 분포 변화 (단위: ppm)			비고
		난황	난백	
Control	Fe	13.0±1.2	0.9±0.3	2.5±0.3
	Ca	479±225	132.5±69.0	44,440±5,450
Ca-WPS	Fe	14.9±0.9	0.8±0.2	2.6±0.4
	Ca	605±158	141.0±84.9	44,265±2,797
Fe-OCHT	Fe	15.7±1.5	0.68±0.1	2.6±0.4
	Ca	610±264	169.1±39.2	46,454±2,417

Table. 16. 강화란의 생산용 사료 섭취 후 계란 내 조지방, 조단백, 콜레스테롤 수치 변화

시험구		기능성 사료 섭취 후 내 조지방, 조단백, 콜레스테롤 분포 변화(단위: mg/100g)			비고
		조지방	조단백	콜레스테롤	
Control	난황	49.5±2.2	36.2±5.9	2,438±102	
	난백	0.02±0.04	81.8±1.79		
Ca-WPS	난황	52.2±0.2	33.9±4.7	2,378±162	
	난백	0.03±0.02	83.1±2.59		
Fe-OCHT	난황	52.5±0.5	33.4±2.1	2,574±151	
	난백	0.02±0.00	79.6±4.82		



(Control, 일반사료설이구)

(Fe-OCHT설이구)

(Ca-WPS설이구)

Fig 1. 유기태화 미네랄 소재류 장기섭이가 산란계 체지방 감소에 미치는 효과

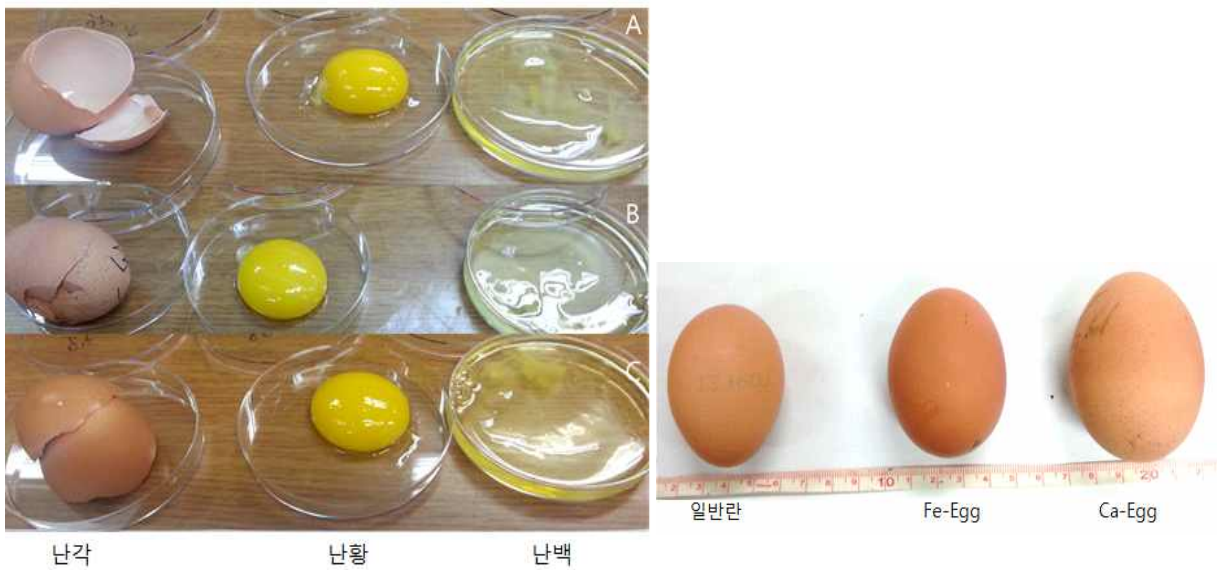


Fig. 2. 산란계용 사료내 미네럴 유기태화 첨가 및 공급 후 18~32일 경과 시, 기능성 미네럴 강화란 2종의 정상 변화 [A: 일반사료군(일반란), B:철분사료첨가제처리군 (Fe-Egg), C:칼슘 사료첨가제 처리군(Ca-Egg)]

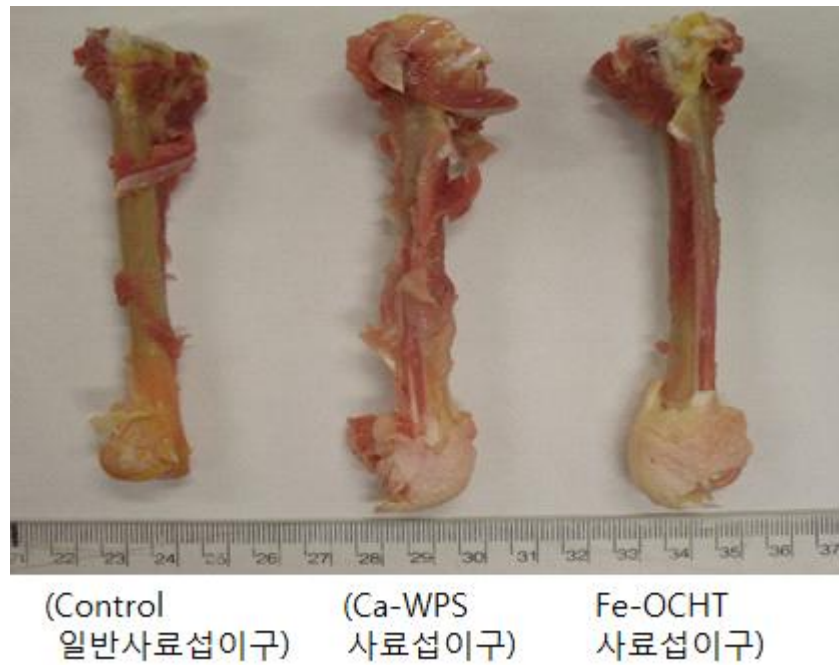


Fig. 3. 기능성 미네랄 강화란 생산용 사료(산란계) 섭이 시, 골조직(Femur) 무게 및 생장에 미치는 효과



Fig . 4. 기능성 미네랄 강화란 생산용 사료별 섭이(산란계, 60일) 후, 가식부(A: 대퇴근육, B:가슴근육)의 색차비교

제 3 절 유기태 미네럴 소재류(유단백질 기질화)의 고농도 섭취를 통한 기능성 강화란 생산, 산란계 안정성 및 회복 패턴 평가(기능성 IgY 및 미네럴 강화란 대량생산 기법 정립)

1.

선행 제조 탄수화물 기질 유기태 소재(Fe-OCHT)와 유단백질 기질 유기태 소재(Ca-WPS)가 현장 실험을 통해서 산란계 및 계란에 대한 품질 향상 및 안전성이 있음을 확인하였다(제 1 절 참조). 본 연구에서는 유기태화 소재 중 유단백질을 기질로 제조하는 소재류 5종(a-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS)을 제조하여 산란계에 고농도로 섭이시에 안전성 및 산란에 미치는 효능을 우선 평가 하였다. 즉, 안전성 평가, 섭이량 기초 산정, 생체전이 패턴조사, 질병예방 및 육질변화 등과 기능성 강화란(미네럴류 및 면역글로브린 IgY)과 관련한 최적 소재를 선발하고 자 하였다.

2. 연구수행방법

실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 50주령 Hy-line 산란계를 대상으로 전남대학교 수의과대학 동물사육실에서 실험을 실시하였다.

유기태 미네럴 소재류 준비

시험에 사용된 유기태 소재는 Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS 및 Se-WPS를 일반 산란계용 사료에 첨가하여 사용 하였으며. 소재별 미네럴 함량 및 특성은 제 3 장 2절과 동일하다.

실험군 설정 및 시료 채취

실험군 설정 및 시료 채취 기간은 다음과 같다. 일반 산란계용 사료를 섭취시킨 대조군, 일반 산란계용 사료에 유기태 소재별로 첨가한 실험군으로 총 6개 시험군을 설정하였다. 각 실험군 당 산란계 10마리씩 설정하였으며, 시료 채취는 사료 급여 후 17일 이 경과시에 실시하였다.

유기태 미네럴 강화사료류 준비

일반 산란계 사료에 Ca-WPS (농도: 50,000ppm/1일 섭이량 100g/1수), Fe-WPS(농도: 1,500ppm/1일 섭이량 100g/1수), Zn-WPS(농도: 260ppm/1일 섭이량 100g/1수), Cu-WPS(농도: 150ppm/1일 섭이량 100g/1수)와 Se-WPS(농도: 1ppm/1일 섭이량 100g/1수)를 첨가하여 섭이 시켰다.

채취시료

유효성 평가를 위한 시료는 혈액, 계란, 분변 및 골조직(femur)를 채취하여 실험 항목별로 측정하는데 사용하였다.

평가항목

면역증대에 미치는 기초효능 평가

유단백질 기질 미네랄 사료 섭취 후 계란, 혈액의 면역 관련 인자 수치에 미치는 영향에 대한 평가항목으로서는 혈액 수치 변화, 혈액내 림프구(CD 4, CD8) 수치 변화, 혈청내 림프구(IL-2, IFN- γ , PGE2) 수치 변화, 호중구 활성화 변화, 난황 내 IgY 생성량 변화, 분변내 미생물 변화, 산란패턴 및 계란품질을 조사하였다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액 수치 변화 평가

산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 사료를 섭취시킨 실험군에서 주요 혈구 세포 생성량을 Multi-species blood analyzer (HEMA Vet 950, CDC, USA)를 사용하여 측정하였다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액 내 림프구 수치 변화 평가

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태 미네랄 사료를 섭취시킨 실험군에서 유세포분석기 (FACSCalibur FACS, BD Biosciences, USA)로 CD4 T cell 및 CD8 T cell의 population를 유세포분석기(FACSCalibur FACS, BD Biosciences, USA)로 측정하였다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 혈청 내 림프구 수치 변화 평가

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 사료를 섭취시킨 실험군에서 면역반응에 관여하는 사이토카인 성분인 interleukin 2, interferon γ , Prostaglandin E2의 생성량을 ELISA방법을 이용하여 microplate reader (450 nm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)기를 사용하여 측정하였다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 호중구 활성화 변화 평가

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 사료를 섭취시킨 실험군에서 비특이적 면역 반응을 평가하고자 마크로파지의 활성화를 luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)기를 사용하여 측정하였다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 난황 내 IgY 생성량 변화 평가

일반산란용 사료를 섭취시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네랄 사료를 섭취시킨 실험군에서 난황내 IgY 생성량을 microplate reader (450 nm, Molecular Devices, Sunnyvale,

CA, U.S.A)기를 사용하여 측정하였다.

미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 분변 내 미생물 변화 평가

사료를 섭이시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네럴 사료를 섭이시킨 실험군에서 분변 내 미생물 변화를 총균수, *E.coli* 수를 측정하였다.

3. 연구수행결과

미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액 수치 변화 평가

본 연구에서는 일반사료를 섭이시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 17일간 섭이 시킨 후, 주요 혈구세포 및 면역 관련 혈구 인자들의 생성량을 평가하여 유기태화 소재의 안전성 및 면역 증대 효과를 평가하였다(Table 1 참조).

일반산란계용 사료를 섭이한 대조(100%)대비 유기태화 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se의 WBC 수치 증가율은 17.3, 17.5, 8.8, 53.8, 9.6%이었으며, 호중구(neutrophil)수치 증가율은 -0.9, 18.5, 3.9, 67.8, -1.2%이었다. 또한, 단구(monocyte)수치 증가율은 129.2, 4.49, 35.3, -75.6, 64.0%와 호산구(eosinophil)수치 증가율은 11.7, 2.4, 19.5, 91.4, 36.5%이었으며, 호염기구(basophil)수치 증가율은 59.1, 63.6, 49.7, 127.2, 32.5%이었다. 결과로 보면, 유기태화 미네럴 소재가 혈액의 주요 수치를 증가시키는 것으로 조사되었다. 염증과 같은 비특이적인 면역 반응 시 나타나는 백혈구의 상승효과는 관찰되지 않았으며 염증 반응에 관여하는 neutrophil의 경우도 특이적인 상승효과는 관찰되지 않았다. 그러나, Ca-WPS 첨가군에서는 상대적으로 혈액 수치가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 유단백질을 기질로 하는 유기태화 미네럴 소재가 혈액 수치를 증가시켜 면역 증대에 관여할 수 있다는 중요한 결과라고 판단된다. 또한, 유기태화 소재 중 Zn과 Cu소재가 다른 유기태화 소재에 비해 증가폭이 크다는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 유단백질 기질 유기태화 미네럴 소재에서 혈구 내 면역세포 활성화에 영향을 주는 것이 입증되었다.

미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액 내 림프구 수치 변화 평가

본 연구에서는 일반사료를 섭이시킨 대조군 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이 시킨 후, 혈액 내 림프구 생성량을 평가하여 유기태화 소재류의 면역 증대 효과를 평가하였다(Table 2).

일반산란계용 사료를 섭이한 대조(100%)대비 유기태화 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se의 CD 4 생성량은 -30.3, 3.3, -6.5, -25.8, 6.9%이었으며, CD 8 생성량은 -0.9, 30.4, 20.3, -28.0, 42.6%이었다. 그리고 CD4/CD8 생성량 비율은 -27.7, -18.6, -26.1, 6.1, -11.6%이었다. 결과로 보면, 유기태화 미네럴 소재류 중 철과 셀레늄 소재만이 CD 4 면역인자를 증가시켰는데, 닭에서 문제시 되고 있는 바이러스 질병의 예방에 관여하는 세포성 면역반응의 활성화에 도움을 줄 수 있으리라 판단된다. CD 8 은 철, 아연, 셀레늄 유기태화 소재가 증가시켰는데, 닭에 감염된 세균, 바이러스에 감염된 세포의 직접 사멸에 관여하는 cytotoxic T세포의 활성을 유도할 수 있으리라 판단된다. 면역인자를 모두 증가시킨 유기태화 소재는 철과 셀레늄 유기태화 소재임을 관찰되었다. 말초혈액에서의 CD4/CD8

비율은 일반적으로 2:1의 비율로 구성되어있는데, 이를 기준으로 확인된 결과는 Cu-WPS 경우만 증가를 나타냄과 동시에상대적으로 CD8의 비율이 높아 세포의 직접 사멸에 관여하는 cytotoxic T세포에 영향을 미치는 것으로 판단 되었다. 결론적으로, 유단백질 기질 유기태화 미네랄 소재에서 면역 증대 효과가 있음을 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 혈청 내 림프구 수치 변화 평가

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이시킨 후, 혈액 내 면역반응에 관여하는 사이토카인 중 interleukin 2, interferon γ , Prostaglandin E2의 생성량 평가하였다(Table 3).

일반산란계용 사료를 섭이한 대조(100%)대비 유기태화 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se의 IL-2 생성량은 -3.1, -0.5, 3.6, 4.6, 14.8%이었으며, IFN- γ 생성량은 -33.9, -30.6, -5.4, -22.7, -27.4%이었다. 그리고, PGE2 생성량은 1.2, 2.65, 1.81, 0.55, -0.95%이었다. 결과로 보면, 유기태화 미네랄 소재류 중 아연, 셀레늄, 구리 소재는 IL-2 함량이 높게 나타났다. 이 결과를 통해서 닭의 세포성 면역 반응을 활성화시킬 수 있으며 백신투여 시 효과적인 면역 반응을 유도할 수 있는 잇점이 될 수 있으리라 판단되었다. IFN- γ 의 경우에는 칼슘 유기태화 소재, PGE2는 모든 유기태화 소재가 일반 사료를 섭이시킨 대조구 대비 생성량을 정상 혹은 약간 증가시키는 것이 관찰되었다. 이 결과를 통해서 철, 아연, 칼슘 유기태화 소재 첨가가 염증 반응의 조절매개 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

결론적으로, 유단백질 기질 유기태화 미네랄 소재는 면역반응에 관여하는 사이토카인 생성에 영향을 주는 것이 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 호중구 활성화 변화 평가

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이시킨 후, 산란계의 비특이적 면역 반응 활성화에 미치는 영향을 평가하고자 마크로파지의 활성화를 평가하였다(Table 4).

일반산란계용 사료를 섭이한 대조(100%)대비 유기태화 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se의 활성화 증가율은 14.8, 5.7, 6.2, 11.9, 2.3%이었다. 결과로 보면, 유기태화 소재류 군 중 측정 시간(30분)후에 Se-WPS에서 대조군 대비 활성도가 증가하였으며 Ca-WPS의 경우 가장 빠른 시간 내에 가장 높은 활성도가 관찰되었다. 마크로파지 활성화는 동물에서 비특이적 면역반응으로서 숙주의 방어뿐만 아니라 세균과 바이러스와 같은 항원을 표시하는 중요한 작용을 한다. 따라서 마크로파지의 활성화는 면역반응의 1단계 작용으로서 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서 확인된 산란계의 마크로파지 활성화 평가 결과, 다른 면역 활성화 능력과 관련하여 공통적으로 Se-WPS 첨가는 닭의 비특이적 면역 반응을 유도 할 수 있으리라 생각된다. 결론적으로, 유단백질 기질 유기태화 미네랄 소재는 면역반응에 관여하는 마크로파지 활성화에 영향을 주는 것이 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 난황 내 IgY 생성량 변화 평가

일반사료를 섭이시킨 대조구 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭이시킨 후, 산란계의 난황내 IgY 생성량에 미치는 영향을 평가하였다(Table 5 참조).

사료를 섭취한 대조(100%)대비 유기태화 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se의 IgY 생성율은 1.38, -13.6, -17.7, 9.2, 40.3%이었으며, 유기태화 소재가 난황 내 IgY 생성량을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서 평가한 면역에 관련된 혈액인자나 면역 관련 요소들이 유기태 소재류에서 일관되게 증가하는 연구 결과와 일치하는 결과로 매우 중요한 결과로 판단된다. 또한, Se-WPS와 Cu-WPS 첨가는 면역 반응에서 체액성 방어 작용에 관여하는 면역글로블린의 증강에 효율적으로 역할을 수행할 수 있으리라 판단된다. 결론적으로, 유단백질 기질 유기태화 미네랄 소재는 난황 내 면역글로블린(IgY) 생성을 증가시킨다는 것이 입증되었다.

미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 분변 내 미생물 변화 평가

대조구 대비 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 5종을 첨가한 사료를 섭취 시킨 후, 산란계의 분변 내 총세균수, *E.coli* 수 변화를 확인하여 유기태화 소재의 미생물총 변화에 미치는 영향을 평가하였다 (Table 6 참조).

일반산란계용 사료를 섭취한 대조(100%)대비 유기태화 소재 Ca, Fe, Zn, Cu, Se의 총세균수 변화는 409.0, 581.8, 318.2, 627.2, 354.5%이었으며, *E.coli* 수 변화는 270, -87, -30, -33, -34%이었다. 유기태 소재류는 총세균수가 모두 월등히 높았는데, 특히, 구리 유기태화 소재가 가장 높음을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 통해 유해 세균총을 억제할 수 있는 가능성이 확인되었으며 숙주 동물인 닭에서의 안정성도 확인되었다.

E.coli 수는 갈습 유기태 소재는 제외하곤 다른 모든 소재에서 감소됨이 관찰되어 장내 유용세균의 증가로 병원성 대장균을 억제되었으며, 산란계에서 사용 시 안전할 수 있는 것으로 판단된다. 이 결과를 통해 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재들이 probiotic의 효과를 가지고 있다는 것을 판단할 수 있었다. 결론적으로, 유단백질 기질 유기태화 미네랄 소재는 probiotic 효과를 가지고 있음이 입증되었다.

4. 종합결과

- 가. 유단백질을 기질로 하는 유기태화 소재 6종(Ca-WPS, Fe-WPS, Zn-WPS, Cu-WPS, Se-WPS)을 제조하였다.
- 나. Ca-WPS(농도: 50,000ppm/1일 섭취량 100g/1수) Fe-WPS(농도: 1,500ppm/1일 섭취량 100g/1수), Zn-WPS(농도: 260ppm/1일 섭취량 100g/1수), Cu-WPS(농도: 150ppm/1일 섭취량 100g/1수), Se-WPS(농도: 1ppm/1일 섭취량 100g/1수)의 고농도를 대상으로 산란계에 섭취시키는 현장유효성 평가(17일)를 실시한 결과, 혈중, 난황 내 면역인자를 크게 증대시키는 결과를 확인함으로써 기능성 면역 강화란 생산 및 산란계 항질병 예방에 미치는 결과는 기본 연구방향 및 목표에 근접하는 결과를 보였다.
- 다. 체액면역 증가와 더불어 계란 난황내 면역글로브린(IgY) 가 당초 연구목표에 해당되는 기능성 면역글로브린 강화란 생산과 관련하여, 최적의 유기태 미네랄 강화 사료는 Se-WPS와 Cu-WPS 였으며, 가장 효과적인 경우는 Se-WPS 였다.
- 라. Se-WPS와 Cu-WPS를 섭취후 15일이 경과되는 시점에서 IgY의 수치가 가장 높게 나타났다.
- 마. 기능성 면역강화란 대량생산을 위한 현장적용매뉴얼은 다음과 같이 확정하였다.

- 1) 사료 1톤내 Se-WPS의 경우는 1,000ppm을 배합한다.
- 2) 산란계에 섭이시 1일 100g을 섭이토록 하되 15일 기점에서 IgY의 함량은 40%이상이 증가한다.
- 3) 3)항에 의하여 전체 산란계의 사육기간 동안 섭이토록 한다.

Table. 1. 미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액 수치 변화에 미치는 영향

평가항목/시험구	미네럴 강화란 생산용 사료 섭이 후, 혈액 수치 변화					
	Control	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS	Se-WPS
WBC(백혈구)	1,508 ±254	1,770 ±129	1,772 ±478	1,641 ±3048	2,320 ±348	1,653 ±770
Neutrophil(호중구)	1,202 ±323	1,190 ±118	1,424 ±434	1,249 ±2644	2,017 ±219	1,188 ±566
Monocyte(단핵구)	178 ±115	408 ±91.1	186 ±157	241 ±57.7	43.3 ±130	292 ±207
Eosinophil(호산구)	82 ±8.37	97.5 ±27.5	84 ±39.1	98 ±220	157 ±12.9	112 ±42.6
Basophil(호염기구)	44 ±11.4	70 ±36.5	72 ±27.7	65.9 ±121	100 ±8.16	58.3 ±27.9

Table. 2. 미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액내 림프구양 생성에 미치는 영향

시험구	미네랄 강화란 생산용 사료 섭이 후, 혈액내의 림프구생성에 미치는 영향(단위:%)		
	CD4	CD8	CD4/CD8
Control	33.90±14.5	6.33±2.02	5.63±2.83
Ca-WPS	23.61±4.93	6.27±2.49	4.07±0.86
Fe-WPS	35.02±7.52	8.26±2.53	4.58±1.66
Zn-WPS	31.69±4.26	7.62±0.88	4.16±0.38
Cu-WPS	25.14±4.23	4.55±1.94	5.97±1.67
Se-WPS	36.25±8.78	9.03±4.05	4.98±2.72

Table. 3. 미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액내의 림프구양 측정

미네럴 강화란 생산용 사료 섭이 후, 혈액내 IL-2, IFN- γ , PGE2 생성량 변화에 미치는 영향(단위:pg/ml)			
	IL-2	IFN- γ	PGE2
Control	0.99 \pm 0.08	2.23 \pm 0.98	6.93 \pm 0.36
Ca-WPS	0.96 \pm 0.02	1.47 \pm 0.00	7.01 \pm 0.43
Fe-WPS	0.99 \pm 0.07	1.55 \pm 0.10	7.11 \pm 0.16
Zn-WPS	1.03 \pm 0.02	1.53 \pm 0.02	7.00 \pm 0.46
Cu-WPS	1.04 \pm 0.05	1.73 \pm 0.20	6.90 \pm 0.08
Se-WPS	1.14 \pm 0.08	1.62 \pm 0.10	6.86 \pm 0.06

Table. 4. 미네랄 강화란 생산용 사료섭이 후 혈액 내 호중구의 활성화에 미치는 영향

시험구	미네랄 강화란 생산용 사료 섭이 후, 혈액내 호중구의 활성화 정도와 소요 시간에 미치는 영향	
	neutrophil function activity	activity time
Control	21±1.8	8±6.0
Ca-WPS	24.1±6.6	11.3±5.3
Fe-WPS	19.8±3.5	9.3±4.5
Zn-WPS	19.7±2.1	13.3±3.7
Cu-WPS	18.5±1.6	11.7±8.9
Se-WPS	21.5±7.5	12.9±7.0

Table. 5. 미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 난황 내 IgY 생성에 미치는 영향

시험구	미네럴 강화란 생산용 사료 섭이 후 난황내 IgY 생성에 미치는 영향					
	Control	Ca-WPS	Fe-WPS	Zn-WPS	Cu-WPS	Se-WPS
IgY ($\mu\text{g/ml}$)	5.81 ± 2.06	5.89 ± 1.28	5.02 ± 0.60	4.78 ± 1.49	6.35 ± 1.58	8.16 ± 3.56

Table. 6. 미네럴 강화란 생산용 사료섭이 후 분변내 미생물 변화에 미치는 영향

시험구	미네럴 강화란 생산용 사료 섭이 후, 분변내 미생물 변화에 미치는 영향	
	총균수	<i>E.coli</i> 수
Control	1.1 ± 10^8	2.0 ± 10^5
Ca-WPS	5.6 ± 10^8	7.4 ± 10^5
Fe-WPS	7.5 ± 10^8	2.6 ± 10^4
Zn-WPS	4.6 ± 10^8	1.4 ± 10^5
Cu-WPS	8.0 ± 10^8	1.34 ± 10^5
Se-WPS	5.0 ± 10^8	1.32 ± 10^5

제 4 절 최종 선발, 기질특이적 유기태 미네럴 강화사료류를 적용한 기능성 미네럴 강화란 대량생산 및 생체전이메카니즘 평가

1.

본 과제를 진행한 유기태화 소재는 기질 다변화(유단백질류 및 OCHT류 및 핵산류)를 기준으로 유기태 미네럴 소재류를 사료에 혼합하여 산란계에 섭취과정을 통하여 기능성 미네럴가 강화된 미네럴 결핍 해소형 강화란 생산과 판매사업화에 연구개발 목적이 있다.

선행연구인 제 4장, 제 1 절과 제 2절 (키토산 기질 유기태 미네럴 현장유효성 평가) 에서 선발한 Fe-OCHT, 제 3 절 및 제 4절 (유청분말 기질 유기태 미네럴 강화사료류 현장유효성 평가) 에서의 Fe-WPS, 그리고 제 5 장의 제 5절 (유기태 미네럴 소재류의 항질병 및 기능성 강화란 생산형 현장적용성 평가) 결과를 토대로 선발된 Ca-GHA, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC가 생육촉진 및 항질병 효능 보유 그리고 고품질 계란 생산능력이 우수함이 평가 되었음에 따라 이들을 기능성 강화란 생산을 위한 후보군으로 선발하였다.

최종 연구인 본 연구에서는 선발된 후보 유기태 미네럴 강화 사료류를 1배(상용 사료내 무기태 미네럴류 첨가 기준)로 섭취 시키는 조건으로 미네럴 강화란 생산기법 최종 정립 및 생체 전이 패턴조사를 통하여 기능성 계란의 대량생산을 위한 현장매뉴얼의 정립에 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

실험동물

실험에 사용한 실험동물은 Hy-line 산란계(30주령)을 사용하였다. 1개 시험군의 산란계 배정은 12수를 배정하였다.

실험사료

본 시험에 사용한 시험물질로 한일바이오메드 (Yeonggwang, Korea)에서 개발한 유기태화 미네럴 소재류 (Fe-WPS, Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC, Fe-OCHT)를 제공받아 사용하였다.

실험기간 및 사료조성

30주령의 Hy-Brown 산란계를 공시하여 일산 산란계용 사료 대비 여기에 유기태 미량광물질을 1배 수준으로 첨가한 사료를 총 15일간 급여하였으며, 본 시험에서는 산란계사료에 유기태 미량광물질인 철, 아연, 구리, 셀레늄 그리고 칼슘을 Table 1의 시험설계의 내용과 같은 농도로 조성하여 첨가

실험설계

실험군의 편성은 실험구별 5수를 대상으로 Table 1과 같은 유기태 미네럴 농도 급이 대상군으로 나누어 2단 케이지에 완전임의 배치하여 사육하였다. 실험사료와 물은 자유채식 및 음수 시켰으며, 기타 사양관리는 국내에서 일반적으로 행해지고 있는 사양관리 방법에 준하여 실시하였다.

실험사료

기초사료는 산란계사료 (농협사료, Korea)는 Table2의 조성 성분의 사료를 급이 하였다.

사양관리

사양지침은 전남대학교 실험동물 관리기준에 따라 사육실의 케이지에서 실시하였다.

실험군 설정

실험군 설정 및 시료 채취 기간은 다음과 같다. 일반 산란계용 사료를 섭취시킨 대조군, Fe-WPS, Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC 및 Fe-OCHT를 일반 산란계용 사료에 각 각 보강시킨 실험군을 설정하였다.

시료채취 및 분석

시료인 계란은 유기태 사료를 섭취 시킨후 7일후부터 1일단위로 채취하였으며, 7일과 15일에 채취한 계란을 시료로 사용하였다. 미네랄의 생체흡수 및 전이 메카니즘 평가를 위하여, 15일째에 도살한 산란계의 혈액(혈청분리), 맹장내 분변, 가식부 근육(가슴근육) 및 골조직(femur)를 채취하였다. 전체 시료는 ICP분석을 통하여 미네랄 함유량을 측정하였다.

미네랄 강화사료류 섭취에 따른 현장효능 평가

사료효율의 비교

사료의 급이 조건은 산란계 1마리당 120g/산란계 조건으로 하루 3회(오전8시, 오후2시, 오후8시)에 나누어 급이하고 잔량을 수거하여 식이량(g/day chicken)을 평가하였다. 사료효율의 계산법은 1일 1수 식이공급에서 남은양을 측정하여 계산하였으며 이를 사료효율: ((공급양-남은양)/공급양)*100로 환산하였다.

현장 적용성 평가 조사

유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 후 산란계, 계란, 혈액 및 골조직 성분에 미치는 영향에 대한 평가를 6장과 동일하게 실시하였다. 평가항목으로서는 미네랄 사료첨가제의 급여에 의한 산란계에서의 살모넬라증에 대한 항병력 평가를 위하여 혈액 화학치 분석, 급여군의 총세균수와 대장균의 정량평가, Flowcytometer를 이용한 닭의 말초혈액내 림프구 증식력 평가, 닭의 면역 매개관련 사이토카인의 생성에 관한 ELISA평가 등을 실시하였다. 이들의 평가결과는 생략 하였다(제 6장 2절 참조).

기능성 미네랄 강화란 생산 메카니즘 평가

본 연구에서는 전혈 및 혈청내 미네랄 함유량 조사, 가슴살내 미네랄 함유량 조사, (femur)내 미네랄 함유량과 계란내(난황, 난백, 난각) 미네랄 전이 및 농축효율 결과와 계란품질조사 결과만을 제시하였다.

3. 연구수행결과

사료효율의 비교

유기태 미네랄 소재를 식이한 군은 control(93.9%) 대비 전체 유기태 사료섭이군에서 최저 106.6%에서 최대 111.9%의 추가 사료효율을 보였다(제 6장 2절, Table 4).

계란생산과 과란율의 감소 효과

살모넬라 공격접종 전 산란율은 Fe-OCHT와 CaFe-GHAC식이 군에서는 control(77.8%) 군보다 높은 산란율을 보였으며, 과란율의 경우는 유의적인 차이는 없었다(제 6장 제 2절, Table 4).

증체율의 비교평가

실험군의 체중변화를 비교한 결과 control(1,522g) 대비 유기태 사료 섭이로 인한 감소효과는 나타나지 않았으며, 전체 유기태 사료섭이군에서 최저 5%에서 최대 21%의 증가 수치를 보였다 (제 6장 제 2절, Table 5).

전혈내 미네랄 함유량 조사

Table 3는. 유기태화 미네랄강화 사료 섭이 15일후 혈액(전혈)내 19종의 미네랄류 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 평가 결과이다. 결과로서, 대조(6,228ppm) 대비 유기태 소재별 차이를 보였는데, 이중 CaZn-GHAC와 CaFe-GHAC의 경우에서 9,128ppm과 8,558ppm으로 유의적으로 높은 증가 수치를 보였으며 나머지 유기태 사료는 감소하는 패턴을 보였다. 따라서, 유기태 소재별 미네랄의 생체흡수와 이용성이 다를 수 있었다. 또한, Ca-GHAC만을 대상으로 7일과 15일 섭이시에 전혈내 미네랄류 합계수치는 5,390ppm과 6,045ppm의 수치를 보였는데, 이는 생체내 흡수되는 미네랄의 생체흡수량이 15일 기점으로 점진적으로 증가되는 패턴을 보임을 알 수 있었다.

전체 합계 미네랄류 증가 수치를 기준으로 19 종의 미네랄별 증감 패턴을 비교하여 보았더니, 미네랄별 증가 패턴도 동일한 것으로 평가 되었다. 따라서, 이러한 결과는 핵산을 기질로 제조된 유기태 소재는 사료내 미네랄을 킬레이팅 시켜 체내 흡수량을 증가 시킨후 생체이용성을 증가 시키는 것으로 생각 되었으며, 또 다른 추론으로서는 생체 조직인 뼈나 근육 내 존재하는 미네랄류의 순환을 촉진시키기 때문인 것으로 판단되었다.

가슴살내 미네랄 함유량 변화 조사

Table 4은 유기태 미네랄 강화 사료류를 섭이 15일 후 가슴살내 19종의 미네랄류 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 및 생체 이용성을 평가한 결과이다.

결과로서, 대조(21,967ppm) 대비 전체 유기태 사료 섭이구에서 18,4748ppm ~ 15,005ppm으로 유의적으로 감소하는 패턴을 보였는데, 유기태 기질에 따라 감소 차이를 보였다. 이러한 경향은 전혈내 미네랄 증가 수치가 가장 높았던 CaZn-GHAC도 동일하게 감소하

는 경향을 보였는데, 근육내 미네랄이 계란으로 전이 시키는데 유기태 기능이 역할을 보였는제 혹은 미네랄의 순환을 촉진시킴으로서 이러한 결과를 보였는지는 추후 연구가 세세한 필요하다. 그러나, 핵산에 칼슘만을 칼에이팅 시켜 제조한 Ca-GHAC를 7일과 15일을 섭이 시킨 경우에서 19,715ppm에서 19,722ppm의 수치변화를 보였는데 표준편차를 감안하면 유의성은 인정되지 않았다. 따라서, 유기태 기질별 차이와 미네랄 도입수 차이에 따라 차이를 보임을 확인하였으며, 사료의 섭이에 따라 근육내 미네랄의 용탈로 인한 감소보다는 미네랄류의 생리활성 촉진에 의한 생체순환으로 인한 이유로 예상 되었고, 생체내 흡수되는 미네랄류를 동시에 15일 기점으로 미미한 수치의 증감 패턴을 보이는 것으로 판단되었다.

(femur)내 미네랄 함유량조사

Table 5는 전혈내(Table 3) 미네랄의 증가와 더불어 근육(Table 4)내 미네랄 수치는 감소하였는데, 골조직내에서도 동일한 패턴을 보이는 지를 확인함으로써, 유기태 소재의 섭이에 따른 미네랄류 체내흡수 및 생체 이용성을 평가한 결과이다.

결과로서, 19종 미네랄류의 전체 합계수치를 기준으로 대조(73,314ppm) 대비 전체 유기태 사료류 섭이구에서 82,067ppm에서 최대 91,857ppm의 범위의 증가 수치를 보였는데 CaZn-GHAC의 경우에서 가장 유의적으로 증가하였으며, 기질별 그리고 미네랄 도입에 따라 차이를 보였다. 이러한 결과는 CaZn-GHAC는 산란계의 골조직내 미네랄의 수치를 증가 시키면서 뼈의 강도 및 경도를 증가 시키는 결과를 보임을 알 수 있었다. 미네랄 종류별 증감 수치를 살펴보았더니, CaZn-GHAC는 칼슘과 Na, B 그리고 Si의 수치는 다소 감소하는 경향을 보였으나 이외의 미네랄류는 증가하였다. 따라서, 유기태 기능을 탑재한 유기태 소재류는 칼슘과 Na, B와 Si의 생리활성에 영향을 미치는 것으로 잠정적으로 평가 되었다. 이러한 경향을 확인하기 위하여 Ca-GHAC만을 7일과 15일 동안 섭이시킨 경우, 87,510ppm에서 82,679ppm으로 감소하면서 CaZn-GHAC와 동일한 미네랄류만 감소하는 결과를 보임으로서 관련 메카니즘이 확인되었다.

계란내(난황, 난백, 난각) 미네랄 전이 및 농축효율 평가

난황내 미네랄 분포량 조사

Table 6은 유기태 미네랄 강화 사료류를 섭이 15일 후 계란 난황내 19종의 미네랄류 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 및 생체 이용성을 평가한 결과이다.

결과로서, 19종 미네랄류의 전체 합계수치를 기준으로 대조 (26,087ppm) 대비 전체 유기태 사료류 섭이구에서 최저 26,230ppm에서 최대 28,486ppm의 범위의 증가 수치를 보였는데 CaZn-GHAC의 경우에서 가장 유의적으로 증가하였으며, 기질별 그리고 미네랄 도입에 따라 차이를 보였다. 이러한 결과는 CaZn-GHAC는 산란계의 장내에서 Probiotic 효능(6장 2절)과 더불어 생체 미네랄류 흡수 증진과 더불어 골조직내 미네랄의 수치를 증가 시키면서 뼈의 강도 및 경도 증가와 동시에 미네랄류 전이 메카니즘을 통하여 난황내 미네랄류를 증가 시키는 우수성을 보였다. 이러한 경향을 확인하기 위하여 Ca-GHAC만을 7일과 15일 동안 섭이시킨 경우, 28,419ppm에서 26,246ppm으로 감소하는 결과를 보임을 보면 유기태 기능 탑재에 따른 미네랄 전이 및 축적관련 관련 생리활성 메카니즘에 관여함을 알 수 있었다. 또한, 칼슘에 아연 그리고 철을 추가적으로 도입한 경우에서 난황내 미네랄류 축적량이 증가하였는데, 이는

칼슘이 촉매인자로서 역할을 수행하였고 그리고 아연과 철분이 존재하는 경우에 이들 미네랄류의 생체흡수 및 생체내 생리활성을 보다 촉진 시키는 것으로 확인 되었다.

난백내 미네랄 분포량 조사

Table 7은 유기태 미네랄 강화 사료류를 섭이 15일 후 계란 난백내 19종의 미네랄류 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 및 생체 이용성을 평가한 결과이다.

결과로서, 19종 미네랄류의 전체 합계수치를 기준으로 대조(15,152ppm) 대비 전체 유기태 사료류 섭이구에서 14,477ppm에서 최대 16,741ppm의 범위의 증가 수치를 보였는데 CaZn-GHAC의 경우에서 16,741ppm으로 가장 유의적으로 증가하였으며, 기질별 그리고 미네랄 도입에 따라 차이를 보였다. 이러한 결과는 CaZn-GHAC는 산란계의 장내에서 Probiotic 효능(6장 2절)과 더불어 생체 미네랄류 흡수증진과 더불어 골조직내 미네랄의 수치를 증가 시키면서 뼈의 강도 및 경도를 증가 시킴과 동시에 전이 메카니즘을 통하여 난황내 전체 미네랄류를 동시에 증가시키는 우수성을 보였는데 (Table 6), 난백에도 전체 미네랄류를 동시에 증가 시키는 것으로 조사되었다. 따라서, 유기태 기능의 탑재된 유기태 소재는 산란계 전이 메카니즘을 통하여 우선 난황내 최대치가 축적된 후에 다음으로 난백으로 축적되는 메카니즘을 확인 하였다. 이러한 경향을 확인하기 위하여 Ca-GHAC만을 7일과 15일 동안 섭이시킨 경우, 15,805ppm에서 14,477ppm으로 감소하는 결과를 보임을 보면 유기태 기능 탑재에 따른 미네랄 전이 및 축적관련 관련 생리활성 메카니즘에 관여함을 알 수 있었다. 또한, 칼슘에 아연 그리고 철을 추가적으로 도입한 경우에서 난황 (Table 6) 과 난백내 미네랄류 축적량이 증가하였는데, 이는 칼슘이 촉매인자로서 그리고 아연과 철분이 존재하는 경우 미네랄류의 생체흡수 및 생체내 생리활성을 보다 촉진 시키는 것으로 확인 되었다.

난각내 미네랄 분포량 조사

Table 8은 유기태 미네랄 강화 사료류를 섭이 15일 후 계란 난각내 19종의 미네랄류 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 및 생체 이용성을 평가한 결과이다.

결과로서, 19종 미네랄류의 전체 합계수치를 기준으로 대조(45,562ppm) 대비 전체 유기태 사료류 섭이구에서 48,654ppm에서 최대 50,687ppm의 범위의 증가 수치를 보였는데 CaZn-GHAC의 경우에서 가장 유의적으로 증가하였으며, 기질별 그리고 미네랄 도입에 따라 차이를 보였다. 이러한 결과는 CaZn-GHAC는 산란계의 장내에서 Probiotic 효능(6장 2절)과 더불어 생체 미네랄류 흡수증진과 더불어 골조직내 미네랄의 수치를 증가 시키면서 뼈의 강도 및 경도를 증가, 난황(Table 6) 및 난백(Table 7)내에도 전체 미네랄류를 동시에 증가 시키는 것으로 조사되었는데. 난각의 경우도 동일한 패턴을 보였다. 따라서, 유기태 기능의 탑재된 유기태 소재는 산란계 전이 메카니즘을 통하여 우선 난황내 최대치가 축적된 후에 난백으로 그리고 난각 순으로 축적되는 메카니즘을 확인 하였다. 이러한 경향을 확인하기 위하여 Ca-GHAC만을 7일과 15일 동안 섭이시킨 경우, 49,588ppm에서 54,914ppm으로 증가하는 결과를 보임을 보면 유기태 기능 탑재에 따른 미네랄 전이 및 축적관련 관련 생리활성 메카니즘에 관여함을 알 수 있었다. 또한, 칼슘에 아연 그리고 철을 추가적으로 도입한 경우에서 난황 (Table 6) 과 난백내 (Table 7) 미네랄류 축적량과 동일하게 증가하였는데, 이는 칼슘이 촉매인자로서 그리고 아연과 철분이 존재하는 경우 미네랄류의 생체흡수 및 생체내 생리활성을 보다 촉진 시키는 것으로 확인 되었다.

난각두께 변화 관련 미네랄 분포량 조사

Table 8는 유기태화 소재류 기능성 사료첨가제를 식이한 산란계의 계란의 난각의 두께(mm) 평가 결과이다.

결과로서, 대조 사료 섭취군(0.18mm) 대비 유기태 사료 섭취구 전체에서 0.20~0.24mm로 증가되어 있었다. 따라서, 유기태 기능이 탑재된 경우 생체내 미네랄 흡수증대와 더불어 혈액을 통한 전이 메커니즘을 경유 하면서 난황, 난백 및 그리고 난각으로 축적되는 메커니즘 보이면서 난각의 두께 증가에 기여하는 것으로 최종 평가되는 우수성을 보였다.

계란품질평가

계란의 상태를 유기태화 미네랄 사료첨가제별로 비교하여 계란의 품질에 미치는 영향을 비교하였다.

계란의 총 무게(g), 높이/너비(mm)

유기태화 미네랄 소재를 식이한 군의 계란 총 무게는 Ca-GHAC군이60.05g, CaZn-GHAC군이 60.30g으로 살모넬라 비감염군 Normal에 비해 최대 4g정도 무거웠다. 높이/너비는 모든 군이 살모넬라 감염군 Control과 유사한 크기를 보였다(Table 9). 따라서, 유기태화 미네랄 소재를 식이한 군의 계란의 총 무게, 높이/너비를 비교한 결과 1순위는 Ca-GHAC이다.

계란의 가식부 무게(g)

일반사료를 식이한 군(Normal, Control)과 유기태화미네랄 소재를 식이한 군의 계란의 가식부 무게를 비교했을 때 Ca-GHAC가 52.0g, CaZn-GHAC가 52.9g으로 가장 무거웠다(Table 10.). 따라서, 유기태화 미네랄 소재를 식이한 군의 계란의 가식부 무게는 CaZn-GHAC가 가장 무겁다.

난황 색차계평가

유기태 미네랄 소재를 식이한 군의 난황 색차계를 비교하였다. 색차계항목에는 L(명도), a(붉은색), b(노란색)이 있다. Normal군과 Control군의 평균치와 유기태 미네랄 소재를 식이한 군의 수치를 비교하였다(Table 11).

L(명도)는 Normal군과 Control군의 평균치 70.33보다 유기태화미네랄 소재를 식이한 군의 수치가 전체적으로 높아서 난황의 명도가 높다. 그 중에서 Ca-GHAC의 L(명도)수치가 가장 높다.

a(붉은색)의 정도는 Normal군과 Control군의 평균치 -4.54보다 유기태화미네랄 소재를 식이한 군의 수치가 전체적으로 낮은데 그 중에서 CaZn-GHAC는 Normal군과 Control군의 평균치와 비슷하고 Fe-OCHT군의 a(붉은색)의 정도가 가장 높다.

b(노란색)의 정도는 Normal군과 Control군의 평균치보다 대부분의 군의 b(노란색)수치가 더 높다. 그 중에서 Ca-GHAC의 b(노란색)수치가 가장 높다(Table 5-7-3). 따라서, 가장 밝고 노란 난황 색차계를 가진 군은 Ca-GHAC이다.

난각 색차계평가

난각 색차계를 비교하면, L(명도)는 유사한 수치를 보였, a(붉은색), b(노란색)의 정도는 모두 낮아졌다(Table 12).

난황고, 난백고(mm)

난황은 모든 군이 약 16mm로 거의 유사한 높이를 보인다. 그리고 난백은 6mm로 거의 유사하다(Table 13). 따라서, 유기태화미네럴 소재를 식이한 군간의 유의적 차이가 없었다.

산란율, 파란율(%)

산란율은 Fe-OCHT와 CaFe-GHAC식이 군이 Control 대비 높은 산란율을 보였으며, 가장 산란율이 높고 일정하면서 파란율이 낮은 군은 1순위가 CaFe-GHAC이고, 2순위가 Ca-GHAC이다(Table 14).

4. 종합결과

가. 선행 연구 결과를 토대로 기능성 미네럴 강화란 생산용 유력 후보를 기질별로 선발 하였으며, Fe-WPS, Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC 및 Fe-OCHT 였다.

나. 기능성 미네럴류 강화란 생산을 위하여 선발 유기태화 소재류를 산란계에 섭이시키는 현장 유효성 평가를 실시한 결과, 미네럴 강화란 생산 가능성이 가장 우수한 소재는 CaZn-GHAC였으며, 기질별 그리고 미네럴 도입수에 따라 효능이 다르게 나타났다.

다. CaZn-GHAC는 뼈조직을 강화시키면서 Synbiotic 효능, 항질병 효능의 증대 및 미네럴류가 강화되는 기능성 계란 생산에 가장 최적의 효능을 보였다.

라. 기능성 미네럴 강화란 생산과 관련한 섭이농도는 1배(상용 무기태이온 첨가량과 동등)를 섭이시킨 경우였다.

마. 기능성 강화란 생산과 관련한 생육패턴 및 고품질 계란 생산성 관련 연구결과는 다음과 같다.

- 1) 유기태화 미네럴 소재류는 계란의 색도를 향상시키면서 계란의 크기도 증가시킴으로서 산란계 생산현장의 애로를 해결 할 수 있는 중요한 단서를 제공하는 결과로 판단되었다.
- 2) 유기태화 소재류가 계란의 난각 두께, 난황고 및 난백의 높이를 증가시키는 것을 확인 할 수 있어 계란 영양성분 크기 및 난각 두께에 영향을 주는 것으로 판단되었다.
- 3) 전체적인 변화패턴을 대조 대비 유기태화 미네럴 소재류 섭이후 시간별 채취한 계란별 생체중 및 건조중량의 차이를 종합적으로 비교한 결과, 유기태 사료첨가군에서 계란의 실질적 영양성분인 난황과 난백의 생체중량에서 수분이 제거된 건조중량치가 더 높게 나옴으로서 영양학적으로도 일반 사료군에 비해 우수하다는 것이 입증되었다.
- 4) 칼슘 소재와 철 소재가 서로 다른 경향의 패턴으로 계란 파란율에 영향을 주는 강도 및 정도 변화가 진행된다는 것을 알 수 있었다.
- 5) 대조군 대비 유기태화 미네럴 소재의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 안전성에 있어 문제점은 도출되지 않았으며, 주요 혈구세포 및 면역인자 관련 혈구 성분을 증가시켜 면역력을 증가시키는

입증되었다.

- 6) 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재의 투여 농도범위에는 산란계에 대한 체액변역 및 Probiotic 효과가 있음이 입증되었다.
- 7) 대조구 대비 유기태화 미네랄 소재의 투여 농도는 산란계에 대한 혈중 면역인자를 증가시키면서 염증반응을 완화시키는 효과가 있어 산란계 대상 기능성 면역 효과가 있음이 입증되었다.
- 8) 난황과 난백 그리고 난각내 Ca, Fe 분포가 동시에 증가하는 패턴을 확인 하였다.

바. 기능성 강화란 생산용 최적 유기태 소재류로서 CaZn-GHAC를 최종 선발하였으며, 산업화 제품으로 “메디프리바이오-1(등록번호 LL8RR0007), 메디프리바이오-2(등록번호 LL8RR0006호)” 2종을 등록하였다.

사. " "의 유기태 미네랄의 생체흡수 및 전이 메카니즘은 다음과 같다.

- 1) 유기태 미네랄은 무기태 대비 생체 흡수능력이 우수하였다.
- 2) 흡수된 유기태 미네랄은 혈액능 통하여 최종 계란까지 전이 되었으며, 관련한 축적 메카니즘은 우선 난황내 축적이 최대치로 이루어진 후 다음으로는 난백 그리고 난각 내로 축차적으로 축적되었다. 난각내 미네랄 축적에 따라 난각두께 증가에 기여 하였다.
- 3) 유기태 소재는 근육과 골조직내 미네랄의 수치를 감소시키는 결과를 보였는데, 이는 안전성보다는 생리활성을 증가시킴으로서 미네랄의 생체 이용성을 증가 시키는 이유로 판단되었다.
- 4) 계란내 미네랄 축적과 관련하여 15일을 기점으로 최대치를 보이는 것으로 평가 되었다.

아. “메디프리바이오” 사료를 적용한 고품질 기능성 강화란 대량 생산 현장매뉴얼은 다음과 같다.

- 1) 사료 1톤내 CaZn-GHAC 배합량(순수 미네랄 기준)은 아연함량을 기준으로 첨가하며, 50,000ppm이며 무기태 미네랄 배합량과 동등성을 보유한다.
- 2) 산란계에 섭이시 1일 100g을 섭이토록 하되 기능성 강화란의 생산 기점은 15일이다.
- 3) 2)항에 의하여 전체 산란계의 사육기간 동안 섭이토록 한다.
- 4) 1)~3)항으로 섭이시킨 경우, 고품질 기능성 강화란의 대량생산이 가능하다.

Table1. Formula of experimental group diets for feeding trial

Experimental Group	Numbers
General Feed	5
Fe-WPS (172mg/kg)	5
Ca-GHAC (72mg/Kg)	5
CaFe-GHAC (97mg/Kg)	5
CaZn-GHAC (169mg/Kg)	5
Fe-OCHT (660mg/Kg)	5

Table 2. Composition of the basal diet.

Ingredients, %	Layer feed (30~39weeks of age)
Yellow corn	48.3
Wheat	4.39
Soybean meal	13
Distiller's dried grains with solubles	13.2
Canola meal	5
Sesame oil meal	2
Corn gluten	1.5
Oil	1
Salt	0.25
CaCO ₃	10.5
Mono-dicalcium phosphate	0.5
Dicalcium phosphate	0.1
Choline chloride	0.06
Vitamin premix ¹	0.1
Trace mineral premix ²	0.1
Chemical composition calculated, %	Normal/Control group
ME ³ (Kcal/kg)	2800
Crude protein	17
Crude ash	15.5
Ca	3.9
Available phosphorus	0.35
Methionine	0.67
Methionine+Cystine	
Ca (ppm)	-
Fe (ppm)	-

¹supplied per kg diet, IU: vit.A 13,000,000, vit.D3 4,000,000, mg: vit.B1 3,000, vit.B2 7,000, vit.B6 5,000, vit.B12 20, lysin 3,000, methionine 1,000, tryptophane 700, pantothenic acid 12,000, niacin 50,000, biotin 150, folic acid 1,500

²supplied per kg diet, mg: Fe 46, Zn 78, Cu 7, Se 0.1, Mn 87, I 1.3, Cr 0.12

³ME: metabolizable energy

⁴guanosine 5'-monophosphate (GMP)-chelated calcium (organic mineral form)

⁵guanosine 5'-monophosphate (GMP)-chelated iron (organic mineral form)

Table 3 . 유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 15일후 혈액(전혈)내 미네랄 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 평가 결과(n=3)

Blood Minerals	Normal		Fe-WPS		Ca-GHAC		CaFe-GHAC		CaZn-GHAC		Fe-OCHT		Ca-GHAC(-7day)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ca	505	31	373	7	540	165.5	1,225	576	1,298	51	414	263.9	354	47.8
K	0.25	0	0.39	0.65	1.27	0.6	2.65	1.17	4.43	1.26	0.92	1.12		
B	561	36	410	2	602	184.4	1,383	653	1,482	70	467	291.9	406	48.6
Zn	10	1	8	1	9	1.6	14	5	16	1	8	2.5	5	1.6
Fe	280	58	222	16	265	41.7	253	4	331	55	275	46	244	25.4
Cu														
Se														
Mg	133	7	111	11	139	28	279	121	313	24	121	43.4	94	0.1
Mn														
Mo														
Na	2,478	152	2,430	80	2,461	121.5	3,213	674	2,998	152	2,289	257.6	2,375	160.5
Co														
Si	139	7	103	11	170	57	443	224	501	41	132	97.5	75	2
S	1,070	184	958	134	933	105.4	876	7	1,087	150	939	90.8	926	59.5
P	1,052	178	949	130	925	106.5	869	7	1,098	161	935	86.7	911	58.9
As														
Cd														
Pb														
Hg														
합계	6,228	654	5,564	393	6,045	812	8,558	2,272	9,128	706	5,581	1,181	5,390	404
비고							제품:메디프리바이오							

Table 4. 유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 15일후 가식부(가슴살)내 미네랄 변화 조사를 통한 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 평가 결과(n=3)

Minerals	Normal		Fe-WPS		Ca-GHAC		CaFe-GHAC		CaZn-GHAC		Fe-OCHT		Ca-GHAC(-7day)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ca	353	15	371	44	4,006	890	346	38	365	36.4	354	29.2	349	17.3
K														
B	413	19	435	50.3	443	284	407	41	428	39.7	263	189	410	19.5
Zn	16	1	16.3	1.45	18	1.37	17	2.69	16.4	1.87	19	2.89	17	2.38
Fe	13.6	1	23.7	7.65	12.2	10.3	20.9	11	17.6	6.43	154	162	17.2	7.79
Cu														
Se														
Mg	1,255	5	1,195	139	1,261	775	1,142	92	1,194	103	1,209	119	1,259	90
Mn														
Mo														
Na	2,158	145	1,830	338	1,433	747	1,897	387	2,138	424	1,468	396	1,633	635
Co														
Si	76.9	5	75.3	5.23	60.9	29.7	70.8	4.08	76	3.58	713.7	683	73.8	2.03
S	9,038	226	8,051	954	5,748	4,036	7,830	250	8,037	480	8,011	595	8,158	922
P	8,643	227	7,725	888	5,492	3,863	7,450	210	7,691	442	2,813	306	7,798	834
As	0.04	1												
Cd														
Pb														
Hg														
합계	21,967	645	19,722	2,428	18,474	10,636	19,181	1,036	19,963	1,537	15,005	2,482	19,715	2,530
비고							제품:메디프리바이오							

Table 5. 유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 15일후 골조직내 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 조사 결과(n=3)

Minerals	Normal		Fe-WPS		Ca-GHAC		CaFe-GHAC		CaZn-GHAC		Fe-OCHT		Ca-GHAC(-7day)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ca	3,875	1,051	4,261	466	3,403	264	3,194	156	3,454	185	3,324	191	3,235	198
K														
B	2,240	559	2,509	620	1,794	167	1,699	105	1,780	97	1,747	99	1,683	113
Zn	57	4.99	56	10	53	3.38	53	4.95	66	8.42	58	7.29	58	5.68
Fe	10	3.04	16	1.02	15	3.5	14	1.42	16	3.62	14	1.55	14	2.13
Cu			25	4.69	19	0.9	18	1.25	20	0.95	18	0.85	18	1.07
Se			2.2	0.61	1.46	0.28	1.45	0.1	1.13	0.46	1.42	0.26	1.38	0.16
Mg	1,009	123	1,270	172	1,129	68	1,053	100	1,154	68	1,081	132	1,069	79
Mn														
Mo														
Na	6,178	679	6,227	583	5,995	704	5,563	373	6,472	621	6,333	693	6,082	860
Co														
Si	92	20	106	28	84	5	81	3.49	88	5	88	5.5	86	5.47
S	30,915	1,808	37,279	5,722	37,263	4,096	36,699	6,225	41,082	2,325	37,089	5,106	39,141	2,539
P	28,938	1,661	33,822	5,189	33,873	3,667	33,650	5,609	37,669	2,039	34,406	4,594	36,068	2,266
As			53	10	50	14	42	6.64	55	17	58	12	55	10
Cd														
Pb														
Hg														
합계	73,314	5,909	85,626	12,806	83,679	8,993	82,067	12,586	91,857	5,370	84,217	10,842	87,510	6,080
비고							제품:메디프리바이오							

Table 6. 유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 15일후 계란 난황내 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 조사 결과(n=3)

York Minerals	Normal		Fe-WPS		Ca-GHAC		CaFe-GHAC		CaZn-GHAC		Fe-OCHT		Ca-GHAC(-7day)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ca	2,078	17	1,942	14	1,967	3.24	2,252	15.1	2,278	12.42	1,723	12.67	2,150	3.03
K														
B	1,676	8	1,627	4.78	1,577	6.49	1,724	10.9	1,774	3.27	1,366	5.77	1,622	11.47
Zn	95	1	98	0.8	93	0.33	113	0.27	128	1.22	98	0.66	102	0.69
Fe	142	0	148	0.76	160	1	140	0.27	188	1.56	169	1.09	174	1
Cu							0.39	0.03			0.28	0.04	0.09	0.01
Se														
Mg	357	2	402	2.28	386	1.76	443	0.67	457	4.03	443	1.68	405	1.86
Mn														
Mo														
Na	1,298	18	1,682	16.03	1,219	7.7	1,175	0.3	1,715	23.17	1,289	6.38	1,555	8.71
Co														
Si	79	0	78	0.63	72	0.3	76	0.29	82	0.88	63	0.44	73	0.49
S	10,410	57	10,343	89.63	10,607	43.93	10,655	31.2	11,149	139.41	11,110	63.69	11,438	59.38
P	9,952	71	9,910	59.03	10,165	43.46	10,172	24.4	10,715	97.28	10,670	53.72	10,900	49.79
As											0.28	1.21		
Cd														
Pb														
Hg														
합계	26,087	174	26,230	188	26,246	108	26,750	83	28,486	283	26,932	147	28,419	136
비고							제품:메디프리바이오							

Table 7. 유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 15일후 계란 난백내 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 조사 결과(n=3)

albumin	Normal		Fe-WPS		Ca-GHAC		CaFe-GHAC		CaZn-GHAC		Fe-OCHT		Ca-OCHT(-7day)	
Minerals	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ca	652	7	543	5.78	674	7.05	695	2.18	593	6.95	564	1.31	575	2.71
K														
B	724	4	603	4.88	700	6.01	763	0.96	656	7.5	633	1.47	636	4.68
Zn	0.1	0												
Fe														
Cu														
Se														
Mg	1,116	10	1,043	4.51	1,080	3.06	1,194	6.78	1,134	8.59	1,164	4.64	1,128	7.88
Mn														
Mo														
Na	10,773	93	11,328	129	9,893	95.86	12,115	33.56	11,065	120.27	9,579	62.06	11,732	51.08
Co														
Si	84	1	73	1.06	60	0.83	78	0.49	80	1.28	79	0.28	70	0.37
S	918	16	973	13.1	1,055	17.28	971	6.48	880	16.58	779	0.52	846	7.61
P	885	13	941	13.8	1,015	11.61	925	5.4	848	16.99	752	3.39	818	4.93
As											0.7	1.4		
Cd														
Pb														
Hg														
합계	15,152	144	15,504	172	14,477	142	16,741	56	15,256	178	13,551	75	15,805	79
비고							제품:메디프리바이오							

Table 8. 유기태화 미네랄 강화 사료 섭취 15일후 계란 난각내 미네랄류 체내흡수 증가에 미치는 효과 조사 결과(n=3)

Shell	Normal		Fe-WPS		Ca-GHAC		CaFe-GHAC		CaZn-GHAC		Fe-OCHT		Ca-GHAC(-7day)	
Minerals	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ca	40,690	323	44,511	263	48,293	216	43,455	405	41,583	112	41,343	163	42,180	373
K	21.1	2			20.4	14.2			46.4	1.02	30.4	18.9	35.7	1.27
B	867	24	558	10.64	698	24.9	907	23.29	883	37.9	895	13.7	907	13
Zn									9.2	0.08				
Fe									1.84	0.41			0.24	0.25
Cu	1.6	0	1.29	0.05	1.36	0.11	1.69	0.21	2.7	0.04	0.63	0.14	1.25	0.16
Se														
Mg	1,915	12	1,953	4.3	2,038	4.25	2,181	3.52	2,263	7.95	2,369	9.11	2,451	4.79
Mn														
Mo														
Na	1,583	4	1,568	7.45	1,210	8.65	1,469	1.62	1,761	5.1	1,462	5.48	1,634	4.69
Co														
Si	66.2	1	55.5	0.5	64.1	0.39	71.1	0.79	66.9	0.56	67.1	0.36	68.89	0.26
S	736	2	657	4.62	1,331	2.93	1,345	7.97	959	7.06	1,287	10.6	1,192	4.61
P	682	8	615	2.7	1,258	6.17	1,257	6.65	895	8.02	1,200	5.81	1,116	1.76
As													2.21	1.74
Cd														
Pb														
Hg														
합계	46,562	376	49,919	293	54,914	278	50,687	449	48,471	180	48,654	227	49,588	406
비고							제품:메디프리바이오							

Table 8. 유기태화 소재류 기능성 사료첨가제를 식이한 산란계의 계란의 난각의 두께 (mm) 평가(n=3)

실험군	실험항목	유기태 미네랄 강화사료 섭이시 난각 두께 증가에 미치 영향 평가((mm)
control		0.18±0.02
Fe-WPS		0.21±0.03
Ca-GHAC		0.23±0.29
CaFe-GHAC		0.24±0.01
CaZn-GHAC		0.20±0.01
Fe-OCHT		0.20±0.01

Table 9. 유기태화 소재류 기능성 사료첨가제를 식이한 산란계의 살모넬라 공격접종에 따른 계란의 총무게, 높이, 너비 변화평가(n=3)

항목 실험군	실험	계란 크기변화 조사		
		총 무게(g)	높이(mm)	너비(mm)
대조구		56.65±2.50	55.49±1.60	42.71±0.60
Fe-WPS		59.67±6.09	56.00±2.14	43.49±1.74
Ca-GHAC		60.05±10.83	55.45±2.98	43.74±2.30
CaFe-GHAC		57.26±1.95	54.49±1.42	43.20±0.68
CaZn-GHAC		60.30±2.74	56.07±1.60	43.95±1.09
Fe-OCHT		58.43±3.19	54.14±1.89	43.27±1.05

Table 10. 유기태화 소재류 기능성 사료첨가제를 식이한 계란의 가식부 무게(g) 평가(n=3)

실험군	계란 가식부 무게		
	albumen	yolk	Total (albumen+yolk)
대조구	33.53±2.84	14.63±1.79	48.17±4.02
Fe-WPS	32.35±11.48	15.99±1.60	48.34±11.52
Ca-GHAC	36.65±5.72	15.35±1.42	52.00±6.16
CaFe-GHAC	34.42±1.91	15.29±0.90	49.72±2.18
CaZn-GHAC	37.28±2.86	15.62±2.77	52.90±5.17
Fe-OCHT	35.07±2.52	15.59±1.11	50.66±2.07

Table 11. 유기태화 소재류 기능성 사료첨가제를 식이한 계란의 난황 색차계 평가(n=3)

실험군	실험항목	난황 색차 변화		
		L(명도)	a(붉은색)	b(노란색)
테조구		66.22 ± 23.17	-3.97 ± 1.35	47.92 ± 16.29
Fe-WPS		73.65 ± 3.76	-4.22 ± 1.35	53.71 ± 5.25
Ca-GHAC		74.20 ± 4.44	-4.3 ± 1.11	55.32 ± 5.28
CaFe-GHAC		70.04 ± 4.08	-4.1 ± 0.93	53.49 ± 4.6
CaZn-GHAC		73.24 ± 2.25	-4.57 ± 0.68	54.11 ± 4.69
Fe-OCHT		74.06 ± 3.14	-5.05 ± 0.72	52.61 ± 4.58

Table 12 유기태화 소재류 기능성 사료첨가제를 식이한 계란의 난각 색차계 평가

실험군	실험항목	난각 색차변화		
		L(명도)	a(붉은색)	b(노란색)
대조구		73.31±3.50	16.89±2.83	35.78±1.73
Fe-WPS		69.57±4.16	19.14±2.72	37.03±2.07
Ca-GHAC		72.50±4.33	17.15±3.67	34.99±3.29
CaFe-GHAC		71.39±3.00	19.41±5.53	37.10±1.30
CaZn-GHAC		68.32±3.64	19.49±2.86	37.15±2.67
Fe-OCHT		72.24±6.18	17.94±3.83	35.77±2.79

Table 13. 유기태 사료첨가제를 식이한 산란계의 계란의 난황고, 난백고 평가(n=3)

실험군	실험항목	
	난황고 및 난백고 변화	
	yolk	Albumen
대조구	16.17±0.93	6.47±1.07
Fe-WPS	16.76±0.50	6.66±0.84
Ca-GHAC	16.16±0.60	6.63±1.08
CaFe-GHAC	16.80±0.51	6.58±0.61
CaZn-GHAC	15.73±1.72	6.46±0.64
Fe-OCHT	16.15±1.09	5.92±0.99

제 7 장 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 대량생산시스템 확립

1. 연구목표

1950년대 이후 어린 가축의 성장촉진과 사료효율을 개선하고 축산물의 생산효율을 향상시킬 목적으로 항생제가 사료첨가제로서 널리 사용되어 왔다. 항생제의 작용기전은 먼저 가축 체내에 존재하는 대장균, 살모넬라, 클로스트리디움 등과 같은 장내 병원성균의 세포막을 분해하여 사멸 시키고 소장 흡수세포벽을 얇게 하여 영양소의 흡수율을 증대시켜 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다. 그러나 가축 생산성 증대와 같은 긍정적인 효과에도 불구하고 항생물질의 축산물 내 잔류될 수 있다는 점과 내성을 유발 시킬 수 있다는 문제가 제기됨에 따라 2011년 7월부터 시행된 배합 사료 내 성장 촉진용 항생제 사용의 금지되었다.

최근, 식품에 대한 소비자의 기호와 양적인 면에서 질적인 면으로 전환되고, 식품의 안전성에 대한 소비자의 관심이 급증함에 따라 식육 내 항생제 잔류 문제에 대한 관심뿐만 아니라 기능성 제품에 대한 요구도 커지고 있어, 이러한 소비자들의 욕구를 충족시키기 위하여 천연물질을 이용한 무항생제 축산물에서 고기능성 축산물까지 다양한 제품이 선보여지고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, 따라서 병원성 미생물의 감염의 예방과 성장을 촉진시켜줄 항생제를 대체할 물질에 대한 관심이 증가하고 있다.

본 연구에서는 유기태화 미네랄 소재류를 이용한 기능성 고급브랜드 계육 (우리맛닭) 대량생산시스템 정립 및 제품화를 위해 육계 생산성 (성장) 증진 및 육질을 분석을 실시하고자 하였다. 우리맛닭 개발과 관련하여 최적소재를 제 1장 (OCHT계열 유기태화 미네랄 소재류 1종) 및 제 2장 (WPS계열 유기태화 미네랄 소재류 1종, HAC계열 유기태화 미네랄 소재류 2종) 의 연구내용 및 결과를 토대로 선발하였다. 따라서, 사전 연구를 통해 선발된 유기태화 미네랄 소재 (CaFe-GMP, CaFe-IMP, Ca-WPS과 Fe-OCHT) 평가를 통해 육계의 성장능력, 도체특성 및 육질분석을 통해 우리맛닭 생산형 효능 평가를 실시하였다.

2. 연구수행방법

가. 실험시료

본 시험에 사용한 시험물질로 한일바이오메드 (Yeonggwang, Korea)에서 개발한 유기태화 미네랄 소재류 (CaFe-GMP, CaFe-IMP, Ca-WPS, Fe-OCHT)를 제공받아 사용하였으며, 항생제 (㈜삼우메디안, Korea), Bioplex C (Alltech, Kentucky, USA)와 Bioplex poultry PAK (Alltech, Kentucky, USA)는 각 회사로부터 구입하였다.

나. 공시동물 및 실험기간

본 실험에서는 1일령 Ross 육계 무감별추를 실험동물로 공시하여, 개체별로 체중을 측정 한 후 8개 처리에 1반복으로 반복당 10수씩, 총 80수 (BW: 53.4 g \pm 2.6 g)를 선발하여 완전 임의 배치하였다. 2016년 6월 3일부터 2016년 7월 2일까지 총 30일간 사양실험을 실시하였다. 처리구는 대조군으로 육계 일반사료를 공급한 Control, 비교군으로 항생제 (Chlortetracycline 0.02%) 첨가군, Bioplex C (1g/사료 kg) 첨가군, Bioplex poultry PAK (1g/사료 kg) 첨가군으로 설정하였으며, Bioplex C는 육질향상, Bioplex poultry PAK는 생

상성 증대 비교군으로 설정하였다. 시험군으로는 CaFe-GMP 첨가군, CaFe-IMP 첨가군, Ca-WPS 첨가군, Fe-OCHT 첨가군으로 설정하였다. CaFe-GMP, CaFe-IMP, Fe-OCHT의 사료 배합기준은 Fe 55 ppm으로 각각 사료 1 kg당 2.38 g, 1.79 g, 1.46 g씩 배합하였으며 Ca-WPS는 Ca 110 ppm 기준으로 사료 1 kg당 0.92 g을 배합하여 공급하였다.

다. 실험 사료

기초사료로 사용된 육계사료 (농협사료, Korea)는 옥수수 대두박 위주의 pellet 형태로 사료의 대사에너지는 3,020 kcal/kg, 조단백질 23%, 조지방 5%, 칼슘 (Ca) 1%, 메치오닌 + 시스틴 + MHA 1%, 조섬유 6%, 조회분 8% 및 인 (P) 1% 그리고 기타 영양소의 수준은 NRC(1994) 요구량에 맞도록 설계된 사료를 대조구 사료로서 사용하였다.

사료 급여 프로그램에 따라 모든 공시 병아리에게는 1일령부터 7일령까지 육계 전기 사료 (Starter)를, 8일령부터 23일령까지 육계 증기사료 (Grower)를, 24일령부터 출하까지는 육계 후기사료 (finisher)를 각각 급여하였다. 항생제 첨가군을 제외한 시험구는 전체 시험기간 동안 항생제 무사용 조건으로 진행되었으며 항생제 첨가군은 휴약기간 설정에 따라 출하 (부검) 전 14일부터는 항생제가 첨가되지 않은 일반사료만을 공급하였다.

라. 사양관리

잘게 갈려진 톱밥을 깔짚으로 사용한 사육밀도가 4.4수/m²인 8개의 평사(가로×세로: 150cm×150cm)에 펜당 10수씩 완전 임의 배치하였다. 전 사양실험 기간 동안 24시간 종일 점등을 실시하였으며, 사육온도로 계사 내 온도를 시험 개시시 (1일령) 33 ± 1℃로 하였고, 주당 2℃씩 감온하여 유지하였다. 실험사료와 물은 자유채식 및 음수시켰으며, 기타 사양관리는 국내에서 일반적으로 행해지고 있는 사양관리 방법에 준하여 실시하였다.

마. 조사항목 및 조사방법

1) 육계 생산성 (체중변화, 증체량, 사료섭취량, 사료 요구율)

4주간의 총 시험기간 동안 격일로 측정하여 총 15회에 걸쳐서 같은 시간 (오전 9시)에 사료 섭취량 (사료 급여량 - 잔량/일)과 증체량 (개시시 체중 - 종료시 체중/일)을 측정하였으며, 사료요구율 (FCR, feed conversion rate)은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다.

2) 조직의 상대적 중량

실험 종료 후 모든 시험구를 도제한 이후 간 (liver), 비장 (spleen), 복강지방 및 가식부 (가슴살, 닭다리)를 채취하고, 생체중 100g당 상대적 중량으로 환산 표기하였다.

3) 소화장기 무게 및 길이

소화장기인 장의 길이와 근위의 발달정도를 평가하기 위해 십이지장으로부터 회장까지의 길이를 측정하여 동일 부위의 장 두께를 캘리퍼 (Mututoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 근위는 무게와 캘리퍼 (Mututoyo, Japan)를 이용하여 크기 (가로×세로×높이)를 측정하였다.

4) 혈중 콜레스테롤 농도

혈액 채취는 사양시험 종료시에 처리당 10수씩 익정맥에서 주사기를 이용하여 혈액을 채취한

후 Vacuum tube (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ)에 넣어 4°C에서 3,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 분석에 이용하였다. 분리된 혈청은 enzymatic colormetric method에 의하여 총 콜레스테롤 (total cholesterol) 농도는 총 콜레스테롤 검사 시약 (Boehringer Mannheim, Germany)에, HDL-C (high density lipoprotein-cholesterol)와 LDL-C (low density lipoprotein-cholesterol) 농도는 각각 HDC-C과 LDL-C 검사 시약 (Boehringer Mannheim, Germany)에 반응시켜 자동 생화학 분석기 (HITACHI 747, Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였다. 위와 같은 방법을 통해 (주) 녹십자 (Yongin, Korea)에 분석의뢰하여 결과를 도출하였다.

5) 장 내 균총 변화 (대장균군, 유산균군 및 살모넬라균군 측정)

실험 종료 시 (4주)에 도계한 개체에서 채집한 맹장을 적출하여 냉동 보관하였다. *Coli form* 박테리아 및 *E. coli*의 수를 측정하기 위해 보관된 맹장 내 분변 0.1 g을 취하여 buffered peptone water (BPW) 1mL에 잘 희석하여 완전히 분쇄하였다. 분쇄물 1 mL을 계단희석하여 3M PetrifilmTMEC(3M Microbiology, St Paul, MN, USA)에 접종한 후, 37°C에서 48시간 배양하여 집락을 세어 평가하였다. *Lactobacillus* spp. 는 분변 0.1g을 MRS broth (*Lactobacilli* MRS broth, BD Difco, USA) 1mL에 현탁하여 MRS broth로 계단희석한 후, 3M PetrifilmTMAC(3M Microbiology)에 1mL 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 집락을 세어 CFU/mL로 기록하였다. *Salmonella* spp. 검출은 WHO Global Foodborne Infections Network (5th Ed. June 2010) 방법에 따라 실험하였다.

분변은 0.1g을 취하여 멸균 BPW 1mL에 균일하게 분쇄 시킨 후 37°C에서 24시간 동안 Non-selective pre-enrichment 단계를 거친 후, 분쇄물 1mL을 Tetrathionate broth (TTB) 10mL에 넣고 37°C에서 24시간에서 Selective enrichment 과정을 주었다. 그리고 TTB를 계단희석하여 *Salmonella shigella* agar (SSA) plate에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양시켜 형성된 살모넬라 특징을 보인 집락을 세었다.

6) 육질분석

육질분석은 정형된 가슴살 및 다리살을 각 처리구별로 3수씩 선발하여 분석에 이용하였다. 가슴살로부터는 일반성분 분석 (수분, 조단백, 조지방, 조회분)과 물리 화학적인 성상분석 (육색, pH, 보수력, 전단력, 가열감량)을 측정하였고 다리살로부터 이화학적 특성 (지방산)을 분석을 농업기술실용화재단 (Suwon-si, Korea)으로부터 분석의뢰하여 결과를 도출하였다.

가) pH

pH는 가슴근육 1 g을 증류수 9 mL에 넣어 균질 시킨 후 (16,000 rpm, 1분) 균질액을 실온에서 pH 측정기 (Istek NeoMet 77P, Istek Inc., Korea)로 측정하였다.

나) 육색

육색은 가슴근육의 피부방향 표면을 광원 C를 이용하여 Colormeter (Model CR-400, Minolta Co., Japan)로 명도 (lightness)를 나타내는 L값, 적색도 (redness)를 나타내는 a값과 황색도 (yellowness)를 나타내는 b값을 측정하였다. 이때의 표준색은 L값이 97.69, a값이 -0.43, b값이 +1.98인 calibration plate를 사용하였다.

다) 보수력 (WHC: water-holding capacity)

보수력은 Grau와 Hamm (1953)의 filter paper press법을 응용하여 특수 제작된 plexiglass plate 중앙에 여과지 (Whatman No. 2, UK)를 놓고 가슴근육 300 mg을 취하여 그 위에 놓은 다음 plexiglass plate 1개를 그 위에 포개 놓고 일정한 압력으로 2분간 압축시킨 후 여과지를 꺼내어 고기 육편이 묻어 있는 부분의 면적과 수분이 젖어 있는 부분의 총면적을 planimeter (Type KP-21, Koizumi, Japan)를 사용하여 측정하고 그 비율을 계산하였다.

$$\text{보수력 (\%)} = \text{고기 조직에 묻어 있는 면적} \times 100 / \text{젖어 있는 부위 면적}$$

라) 전단력

전단력가는 가슴근육을 2 cm 두께로 절단하여 75°C 항온수조에서 30분간 가열하고 실온에서 30분간 냉각시킨 후 근섬유와 평행하게 시료채취기 (직경 11 mm)로 취하여 blade set (Warner-Bratzler blade)가 장착된 Texture Analyser (TA-XT2i, Stable Micro Systems, England)를 이용하여 측정하였으며, 이 때의 cross head speed는 2 mm/sec로 하였다.

마) 가열감량 (cooking loss)

가열감량은 가슴근육을 일정한 모양으로 정형 (60g ± 5g)하여 polyethylene bag에 넣어 75°C에 항온수조에서 30분간 가열하고 상온에서 30분간 방냉시킨 후 측정하였다.

$$\text{가열감량 (\%)} = \frac{\text{가열 전 시료 중량} - \text{가열 후 시료 중량}}{\text{가열 전 시료 중량}} * 100$$

바) 지방산 분석

지방산 분석은 각 처리당 3수씩 정형된 다리살을 이용하였다. 지방 추출은 Folch 등 (Folch *et al.*, 1957)의 방법으로 chloroform과 methanol로 추출하였다. 시료 50 g을 시료의 5~10배 CM (chloroform : methanol = 2 : 1)에 2시간 추출한 후 분별깔대기에 filtering 하여 담고 0.8% KCl을 첨가하여 5분간 혼합한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 하층은 funnel filter paper에 sodium anhydrous sulfate를 첨가하여 filtering 하여 분리한 후 45°C에서 진공 농축기로 농축하여 추출하였다. 추출한 지방은 NaOH/0.5N methanol 10 mL 넣고 80 ~ 90°C에서 6분간 반응, 14 % BF₃ 5mL 넣고 반응 그리고 헥산 10 mL을 넣고 1분간 반응 후 냉각시킨 후 포화 NaCl을 넣어 반응을 종결 시킨 후 GC/FID로 분석하였다.

Table. GC conditions for analysis of total fatty acids compositions

Items	Conditions
Instrument	Hewlett Packard 5890 series II Gaschromatography
Column	VARIAN CP-SIL80 (FAME)
Flow	N2
Flow rate	1 mL/min
Detector	FID (Flame Ionization Detector)
Spilt	100:01:00
Inlet temperature	220 °C
Detector temperature	240 °C
Initial oven temperature	120 °C
Final oven temperature	220 °C

7) 미네럴 분석

영양성분 분석법 중 미네럴류는 ICP분석법을 적용 (ICP-OES시스템, 모델: Optima 5300DV, Perkin Elmer사, USA) 실시하였으며, 기본분석법은 식품공전 (제 10 일반시험법, 10) 칼슘, 2009)에 준하여 실시하였다.

미네럴 분석을 위한 시료 (혈액, 혈청, 간, 비장, 뼈, 가슴살, 분변)은 마이크로웨이브 시스템을 이용하였으며 방법은 다음과 같다. 분석샘플을 0.5 g을 취하여 가수분해용액 10 mL (70% HNO₃7mL+H₂O₂3mL)을 첨가하고 유기물 제거를 위해 마이크로웨이브 190 °C, 20분 간 반응시킨 후, 꺼내서 ICP분석에 사용하였다.

연구간 사용할 ICP 분석기기의 최저검출효율 및 검출한계는 기본적으로 사용하는 ICP 분석용 표준용액을 사용하였다. 최저 검출효율 및 검출한계를 검정하기 위하여 ICP 표준용액 중 Ca, Fe 및 Mg 3종을 선별하여 이들 용액을 0.01 ppm, 0.1 pp, 1ppm 그리고 10 ppm까지 농도별로 조성한 후 이를 시료로 사용하였다.

바. 통계분석

모든 얻어진 결과에 대한 통계 분석은 Statistical Analysis System (SAS, 2002)에 의해 one-way ANOVA로 분산분석을 하였으며, 분산 분석상의 통계적인 유의차가 인정될 때 Duncan의 다중 검정을 이용하여 유의 수준 $P < 0.05$ 에서 처리 간의 유의성을 검정하였다.

3. 연구수행결과

가. 육계 생산성 (체중변화, 증체량, 사료섭취량, 사료 요구율)

유기태화 미네럴 소재류를 사료첨가제로 급여했을 때 육계 생산성에 미치는 영향을 확인하기 위해 체중변화, 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 확인한 결과는 Table 1 에 나타난 바와 같다.

모든 실험군의 시험개시 전 평균 무게는 53.4 g ± 2.6 g으로 가장 먼저 1000 g (1 kg)에 도달 한 시험구는 급여 21일째에 Alltech Bioplex C 첨가군이 1007 g ± 58 g, Alltech Bioplex poultry PAK 첨가군이 1015 g ± 62 g 그리고 CaFe-GMP 첨가군이 1034 g ± 85 g으로 평가되었다. 특히, 급여 21일 째 CaFe-GMP 첨가군 (1034 g ± 85 g)은 대조군

(947 g \pm 115 g)에 비해 유의적인 체중 차이를 보였다 (Fig , $P < 0.05$). 게다가, 국내 육계의 출하 평균체중인 1.62 ~ 1.69 kg (31.8 ~ 21.1일령)인 것을 감안할 때, 본 연구결과 급여 30일째의 군별 평균체중이 대조군은 1.68 kg \pm 0.14 kg인 것에 반해, CaFe-GMP 첨가군은 1.72 kg \pm 0.15 kg으로 평가되어 평균 무체가 29일만에 국내 육계 출하 평균 보다 훨씬 뛰어난 성적을 보였다. 초기체중 (1일령)을 기준으로 종료시 (30일령)의 체중을 측정하여 증체량으로 체중변화를 평가해 보았을 때, 대조군 (16,261 g/10수) 대비 CaFe-GMP 첨가군 (16,741 g/10수)이 약 3% 증가하였다.

체중변화 결과를 바탕으로 누적 사료 섭취량을 평가해보았을 때, 대조군은 4,010 g/1수/30일의 사료를 섭취한 반면, CaFe-GMP 첨가군은 4,055 g/1수/30일로 확인되었다. 이러한 결과는 앞서 설명된 급여 30일째의 평균체중이 대조군에 비해 CaFe-GMP 첨가군의 체중이 큰 것에 기인한 것으로 예상된다.

사료 급여 30일간의 누적 사료섭취량을 30일간의 증체량으로 나누어 사료요구율 (FCR, feed conversion rate)를 확인한 결과, 대조군은 1.63 인 것에 반해, CaFe-GMP 첨가군은 1.62로 사료 요구율이 낮은 것을 확인하였다.

결론적으로 대조군에 비해 CaFe-GMP 첨가군은 또 다른 유기태화 미네랄 소재류를 첨가한 군에 비해 유의적으로 높은 증체량과 동시에 낮은 사료요구율을 보였다. 이것은 사료요구율을 국내 평균으로 유지하면서 국내 육계 출하 평균일령보다 빠른 일령으로 출하가 가능하다고 볼 수 있다.

나. 조직의 상대적 중량

1) 간, 비장 및 지방조직 무게

유기태화 미네랄 소재류를 급여한 육계의 복강지방 축적율은 Table 2에서 나타난 바와 같이 복강지방 축적율에서 대조군은 체중대비 1.19%이었으며 모든 시험구는 대조군 (1.19%) 대비 복강지방 축적율이 감소하였다. 특히, 항생제 첨가군 (0.67%)과 Fe-OCHT 첨가군 (0.76%)은 대조군 대비 복강지방 축적율이 유의적으로 감소 ($P < 0.05$)하였으나 CaFe-GMP 첨가군 (1.16%), CaFe-IMP 첨가군 (0.88%)과 Ca-WPS 첨가군 (0.86%)은 유의적인 변화가 없었다. 이러한 결과는 앞서 서술된 증체량 결과와 연관시켜 해설해볼 때, 항생제 첨가군과 Fe-OCHT 첨가군은 대조군에 비해 체중감소를 보임에 따라 체중감소로 인한 복강지방 축적이 적었을 것으로 판단된다. 따라서, 지방의 축적으로 인한 복강지방은 육계산업에서 폐기물로 간주되며, 이러한 복강지방의 감소는 도체율을 향상시키고, 추가 공정에 필요한 비용을 줄여주며, 사료 효율을 개선한다는 점에서 육계산업에 큰 이익을 가져다 준다 (Salma *et al.*, 2007)는 관점에서 대조군 대비 체중감소를 크게 보이지 않은 시험군간의 복강지방 축적율을 확인해보았을 때, Ca-WPS 첨가군과 CaFe-IMP 첨가군의 복강지방 축적율을 감소시켰다.

간과 비장의 체중 대비 조직의 무게를 확인한 결과, 간은 모든 실험군에서 대조군 (2.07%) 대비 증가를 보였으며 항생제 첨가군 (2.39%)과 Alltech bioplex C 첨가군 (2.39%)과 CaFe-GMP 첨가군 (2.36%), Ca-WPS 첨가군 (2.34%)과 Fe-OCHT 첨가군 (2.22%)은 유의적인 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 비장은 Alltech bioplex poultry PAK 첨가군 (0.07%)을 제외하고 모든 시험군에서 대조군 (0.07%) 대비 크기가 증가하였으며, CaFe-GMP 첨가군 (0.1%), CaFe-IMP 첨가군 (0.1%)과 Ca-WPS 첨가군 (0.1%)은 유의적인 증가 ($P < 0.05$)를 보였다.

2) 가식부 (가슴살, 닭다리) 무게

시험종료 4주차에 모든 시험구를 도제한 후, 가식성 부위의 무게변화를 확인하기 위해 닭가슴살과 닭다리 (2개)의 무게를 측정하였다 (Table 3). 그 결과, 가슴살은 대조군 (378g ± 36g) 대비 Alltech bioplex C 첨가군 (379g ± 35g), Alltech bioplex poultry PAK 첨가군 (399g ± 38g), CaFe-GMP 첨가군 (418g ± 47g)과 Ca-WPS 첨가군 (389g ± 49g)의 무게가 증가하였으며 특히, CaFe-GMP 첨가군은 유의적인 증가 ($P < 0.05$)를 보였다. 또한, 닭다리는 대조군 (290g ± 32g) 대비 유일하게 CaFe-GMP 첨가군 (307g ± 37g)이 증가를 보였다. 따라서 가식부별 무게변화를 확인해 보았을 때, CaFe-GMP의 사료첨가는 일반사료를 급여한 대조군에 비해 가식부위를 증가시킴을 확인하였다.

다. 소화장기 무게 및 길이

Table 4는 유기태화 미네랄 소재류의 급여가 육계의 소장 길이와 근위의 무게 및 사이즈에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 소장의 길이는 Alltech bioplex poultry PAK 첨가군을 제외한 모든 시험구에서 대조군 (141cm ± 15cm) 대비 증가하였으며 항생제군 (169cm ± 16cm), CaFe-GMP 첨가군 (157cm ± 8cm), Ca-WPS 첨가군 (156cm ± 8cm)과 Fe-OCTH 첨가군 (158cm ± 12cm)은 유의적인 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 장 두께는 대조군 (6.4mm ± 1.1mm) 대비 항생제 첨가군 (7.1mm ± 1.4mm), CaFe-GMP 첨가군 (8.1mm ± 2.0mm), CaFe-IMP 첨가군 (6.9mm ± 0.8mm) 과 Ca-WPS 첨가군 (7.2mm ± 1.9mm) 이 두꺼워졌으며 특히, CaFe-GMP 첨가군은 가장 큰 두께 변화를 보였다 ($P < 0.07$). 또한 근위의 무게는 대조군 대비 모든 시험구에서 증가와 더불어 크기도 증가하였다. 이러한 결과는 소장은 탄수화물, 단백질, 지방 등 주요 영양소들의 소화·흡수가 이루어지는 장기이며 부화 후 2주간 병아리에 있어 선위-근위 조직과 소장 길이의 증가는 병아리의 생체중과 아주 밀접한 연관이 있다는 이전 보고 (Dror *et al.*, 1977)를 통해 해석해 볼 수 있다. 또한, 김용란 등 (김용란, 2000)은 육계 사료 내 생균제를 첨가하였을 때 십이지장, 공장 및 회장의 길이와 무게가 증가하여 소장 내 영양소를 흡수 할 수 있는 표면적이 늘어짐으로써 사료 효율을 개선시킬 수 있다고 보고하였다. 게다가, 근위의 무게는 일반적으로 치아가 없는 가금류의 소화에 가장 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다. 김창혁 등 (김창혁, 2001)은 소화율이 떨어지는 조악한 사료를 급여한 육계의 근위 중량이 높아졌다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구결과는 유기태화 미네랄 소재의 급여는 근위 내 사료의 정체 시간 증가와 근위의 운동량 증가로 이어져서 근위의 발달에 직접적인 영향을 미쳤으며, 근위에서 보다 오래 머문 소화물은 소장 내 소화 흡수를 쉽게 하여 길어진 소장길이와 두꺼워진 소장두께에 넓게 분포된 villi에 소장 내 영양소를 흡수할 수 있는 표면적을 늘어짐으로써 사료 효율을 개선시킬 수 있다고 사료된다.

라. 혈중 콜레스테롤 농도

육계에 있어서 유기태화 미네랄 소재의 급여가 혈액성상에 미치는 영향은 Table 5에 나타내었다. Total cholesterol은 대조군 대비 항생제군, CaFe-GMP 첨가군 및 Fe-OCTH 첨가군에서 유의적인 감소를 보였으나 나머지 첨가군에서는 Total cholesterol 수치가 증가하거나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면, HDL cholesterol의 함량은 대조군 대비 비교구인

Alltech bioplex C군과 CaFe-IMP 첨가군에서 유의적인 증가를 보였으며, 항생제군과 Ca-WPS 첨가군 및 Fe-OCHT 첨가군은 대조군 대비 감소하였다. LDL cholesterol은 대조군 대비 항생제군, CaFe-GMP 첨가군 및 Ca-WPS 첨가군에서 유의적인 감소를 보였다. LDL cholesterol은 동맥경화증, 고혈압 등의 심혈관 질환의 요인이 되는 과유지질혈증을 구성하는 주된 원인 물질로서 관상동맥 질환을 유발시키는 위험인자로 알려져 있다. 반면에 HDL-cholesterol은 apoprotein A의 작용에 의해 LDL-cholesterol 섭취를 억제시키는 작용이 있는 것으로 보고되고 있어 관상동맥 질환의 예방인자로 알려져 있다.

따라서, 혈액성상에서 cholesterol의 수치변화를 관찰했을 때, 대조군 대비 CaFe-GMP 첨가군은 Total cholesterol 수치를 감소 ($P < 0.05$)시키면서 HDL cholesterol을 증가시키고 LDL cholesterol은 감소($P < 0.05$)시키는 물질로 확인하였다.

마. 장 내 균총 변화 (대장균군, 유산균군 및 살모넬라균군 측정)

유기태화 미네랄의 급여가 맹장 내의 균총 변화에 미치는 영향에 대한 결과를 Table 6에 나타내었다. CaFe-GMP 첨가군에서 유익균인 lactic acid 박테리아가 유일하게 증가하는 경향이 관찰되었다. 또한, coli form 박테리아의 억제효과가 CaFe-GMP 첨가군과 Ca-WPS 첨가군에 나타났다. 하지만 *E. coli*의 경우, 항생제 첨가군, CaFe-IMP 첨가군과 Ca-WPS 첨가군에서만 대조군 대비 감소 효과를 보였다. *Salmonella* 균군은 대조군 대비 항생제 첨가군, Alltech bioplex poultry PAK 첨가군, CaFe-GMP 첨가군과 Fe-OCHT 첨가군에서 감소효과를 보였다. 주로, 장내 유해 병원성 세균은 대부분 그람 음성균 (*E. coli*, *Salmonella*, *clostridium*, *campylobacter*)으로 장내 pH 4.56 이상에서 번식이 활발하고 유산균의 경우에는 장내 pH 4.5 이하에서 활발해지는 결과가 나타난다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, CaFe-GMP의 사료 내 첨가를 통한 급여는 가축의 장내 pH를 저하시켜 유익균인 lactic acid 박테리아의 증가를 유도하고 coli form 박테리아와 *Salmonella*의 증식을 완화하여 장내 환경을 유익하게 변화시킬 수 있는 소재로 확인되었다.

바. 육질분석

1) 계육의 일반 성분 분석

유기태화 미네랄 소재류의 급여 30일 후 가슴육을 채취하여 각 처리군당 일반 성분의 함량을 조사하였다 (Table 7). 가슴육의 수분함량 평가는 가슴육에 함유된 단순수분의 함량을 나타내는 것으로 높은 수분함량은 낮은 조지방의 함량과 관련되어 있어 육질 평가항목으로 설정되었다. 대조군의 가슴육의 수분 함량은 75.3%로 나타났으며, 가슴육 수분 함량의 유의적인 감소를 보인 처리군은 항생제 첨가군 (75.5%), Alltech bioplex poultry PAK 첨가군 (74.1%), CaFe-GMP 첨가군 (74.0%), CaFe-IMP 첨가군 (73.8%)과 Fe-OCHT 첨가군 (74.1%) 이었다 ($P < 0.05$).

조단백질 함량은 대조군 (22.2%) 대비 Ca-WPS 첨가군을 제외한 나머지 처리구에서 유의적인 함량 증가 ($P < 0.05$)를 보였으나 조지방 함량은 대조군 (0.52%) 대비 Alltech bioplex poultry PAK 첨가군 (0.77%), CaFe-GMP 첨가군 (1.19%)과 CaFe-IMP 첨가군 (1.06%)에서 유의적인 증가 ($P < 0.05$)를 보였다. 조회분 함량은 대조군 대비 감소를 보인 처리군은 없었다.

2) 계육의 물리 화학적인 성상 분석

Table 8에서는 유기태화 미네랄 소재류를 급여한 후 측정된 육계 가슴육의 육색 (color), pH, 보수력, 전단력과 가열감량을 나타내었다.

육색은 구매시 소비자들의 선택에 있어 1차적인 요인으로 소비를 촉진시키는데 기여할 수 있기 때문에 육색은 소비자들의 구매력과 직결된다고 볼 수 있다. 명도 (L; lightness)는 항생제 처리군과 Alltech biplex poultry PAK 첨가군은 대조군 대비 증가한 반면, 나머지 처리군은 대조군과 유사한 수치이거나 낮아지는 경향을 보였다. CaFe-GMP 첨가군은 유일하게 대조군에 비해 적색도 (a; redness)는 증가하는 경향을 보였으며 황색도 (b; yellowness)는 감소하는 경향을 보였다.

pH는 대조군에 비해 CaFe-GMP 첨가군이 유의적인 증가 ($P < 0.05$)를 보였다. 일반적으로 가축의 도살 후 pH 변화는 육색과 보수력, 가공특성 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 (Boles *et al.*, 1993), 특히 pH 증가는 사후강직을 거쳐 서서히 강직의 해제과정을 거치면서 육의 숙성 중 근육내의 효소나 미생물이 분비한 효소들에 의해서 주로 단백질이 분해되고 유리 아미노산 및 비단백태질소화합물 등의 단백질 분해산물의 증가에 의한 것으로 알려져 있다. 따라서 CaFe-GMP의 첨가가 육계의 육질 변화에 간접적으로 영향을 주었음을 추측할 수가 있다. 또한, 일반적으로 식육의 최종 pH가 식육의 품질 특성과 밀접한 관계가 있으며, 최종 식육의 pH가 높을 때 높은 보수력을 가진다 (Zhang *et al.*, 2005).

식육의 보수력은 관능적인 품질에 큰 영향을 끼치는 요인 중 하나로 식육의 도축 후 pH, desmin과 같은 필라멘트 단백질의 가수분해 정도 및 calpain과 같은 단백질 가수분해 효소의 영향을 받는 것으로 보고되고 있으며 (Huff-Lonergan and Lonergan, 2005), 보수력의 변화는 육색에 큰 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있다 (Swatland, 2008). 연구결과에서 보수력은 대조군 (58.3%)에 비해 Fe-OCHT 첨가군 (63.6%)와 CaFe-GMP 첨가군 (61.3%)에서 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지 않았다.

가슴육의 전단력을 측정된 결과, 육질향상 비교군으로 설정된 Alltech bioplex C 첨가군이 대조군에 비해 유의적으로 감소 ($P < 0.05$)하였으나 나머지 처리군은 증가하거나 유의적인 변화를 보이지 않았다.

가열감량은 대조군에 비해 항생제 처리군과 Alltech bioplex C 첨가군, Alltech bioplex poultry PAK 첨가군, CaFe-GMP 첨가군, CaFe-IMP 첨가군과 Fe-OCHT 첨가군에서 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 감소를 보이지 않았다.

3) 계육의 이화학적 특성

유기태화 미네랄 소재가 육계 다리살의 지방산 조성에 미치는 영향은 Table 9에 나타내었다. 대조군은 포화지방산과 불포화지방산 (단일불포화지방산:다가불포화지방산)의 비율이 각각 30.07%와 69.93% (53.96%:15.97%)를 차지하였다. 반면, 유기태화 미네랄 소재류 중에서 CaFe-GMP 첨가군과 CaFe-IMP 첨가군은 대조군에 비해 포화지방산의 비율을 증가하고 불포화지방산의 비율이 감소하였다. Ca-WPS 첨가군과 Fe-OCHT 첨가군의 경우, 대조군과 포화지방산과 불포화지방산의 비율은 유사하지만 불포화지방산의 비율중에서 다가불포화지방산의 비율을 증가시킨 결과를 확인하였다.

Oleic acid는 단일불포화지방산으로 다량 섭취 시 형중 중성지방이나 콜레스테롤의 감소를 가져옴으로 동맥경화증과 같은 성인병에 유익한 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다

(Grundy, 1986). 또한 식육의 맛과 관련하여 oleic acid 함량이 높으면 고기의 맛을 좋게 한다 (St John *et al.*, 1991). 그러나 일반적으로 불포화지방산이 많을수록 산화에 민감하고 자동산화의 비율이 높고, 조리된 육에서 빠르게 풍미를 저하시킨다 (Pearson *et al.*, 1983).

사. 미네랄 분석

유기태화 미네랄 소재류 식이를 통한 육계의 생산성 및 육질분석을 통해 CaFe-GMP 첨가군의 효능을 앞선 연구결과를 통해 선별하였다. 본 결과는 CaFe-GMP 첨가군이 대조군에 비해 체내 장기 및 배출양을 확인하기 위해 채혈을 통해 혈액과 혈장을 분리하고 간 (liver), 가슴살 (breast meat), proximal phalanx 그리고 맹장 내 분변을 분리하였다. 그 결과, CaFe-GMP 첨가군은 대조군에 비해 혈액과 혈장에서 유의적으로 Ca와 Fe의 함량이 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). 또한 간과 가슴살에서는 Ca와 Fe의 함량이 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$, Table 10). 맹장 내 분변에서는 CaFe-GMP 첨가군과 대조군간의 Ca와 Fe의 함량 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 유기태화 미네랄 소재인 CaFe-GMP의 식이는 소화과정을 통해 주요 장기에 흡수되었다는 것을 확인할 수 있다.

4. 종합결과

가. 고품질 브랜드육 생산용 후보를 기질별로 선별 하였으며, Fe-WPS, Ca-GHAC, CaFe-GHAC, CaZn-GHAC 및 Fe-OCHT 였다. 가장 우수한 소재는 CaZn-GHAC였으며, 기질별 그리고 미네랄 도입수에 따라 효능이 다르게 나타났다.

나. CaZn-GHAC는 뼈조직을 강화시키면서 Synbiotic 효능, 항질병 효능의 증대 및 미네랄류가 강화되는 브랜드 계육 생산에 가장 최적의 효능을 보였다.

다. 브랜드 계육 생산과 관련한 섭취농도는 1배(상용 무기태이온 첨가량과 동등)를 섭취시킨 경우였다.

. 브랜드 계육 생산용 최적 유기태 소재류로서 CaZn-GHAC를 최종 선별하였으며, 산업화 제품으로 “메디프리바이오-1(등록번호 LL8RR0007), 메디프리바이오-2(등록번호 LL8RR0006호)” 2종을 등록하였다.

마. " "의 유기태 미네랄의 생체흡수 및 전이 메카니즘은 다음과 같다.

- 1) “메디프리바이오” 는 무기태 대비 생체 흡수능력이 우수하였으며, 사료효율 증대에 우수성을 동시에 보였다.
- 2) “메디프리바이오” 는 장내 도달 Probiotic 효능을 유발시키는 Prebiotic 소재 였으며, 장내 유산균의 증폭과 더불어 유해세균을 제어하는 Synbiotic 효능을 보였다.
- 3) “메디프리바이오” 는 유기태 기능이 탑재 됨으로서 미네랄류 생체흡수능 증진과 더불어 체액면역을 증가 시키는 항질병형 메카니즘을 보였다.
- 4) “메디프리바이오” 는 혈액내 미네랄 수치 증가와 연계하여 근육과 골조직내 미네랄의 수치를 증가시킴과 더불어 생리활성을 증가시킴으로서 미네랄의 생체 이용성을 보다 증가 시켰다.
- 5) 육계내 항질병 효능을 보이면서 브랜드 계육 생산과 관련된 기간은 15일을 기점으로 최대치를 보

것으로 평가 되었다.

바. “ ” 사료를 적용한 고품질 기능성 강화란 대량 생산 현장매뉴얼은 다음과 같다.

- 1) 사료 1톤내 CaZn-GHAC 배합량(순수 미네랄 기준)은 아연함량을 기준으로 첨가하며, 50,000ppm이며 무기태 미네랄 배합량과 동등성을 보유한다.
- 2) 육계 성장단계별로 차이를 두어 전체 사육기간 동안 섭이토록 한다.
- 3) 1)~2)항으로 섭이시킨 경우, 무항생제형 고품질 계육의 대량생산이 가능하다.

Table 1. Effects of organic minerals on productive performance in broiler chickens.

	Control	Antibiotic	Alltech Bioplex C	Alltech Bioplex poultry PAK	Ca Fe-GMP	Ca Fe-IMP	Ca-WPS	Fe-OCHT
average weight (g/bird)								
0d	54	53	53	53	53	54	54	54
07d	171	173	170	179	176	174	178	168
14d	575	547	572	598	592	577	587	560
21d	947	947	1007	1015	1034 ¹	985	987	986
28d	1337	1243	1315	1343	1368	1275	1356	1284
30d	1680	1550	1614	1633	1727	1557	1628	1504
total weight (g/10birds)								
0d	537	534	532	529	529	536	540	538
07d	1714	1733	1695	1785	1763	1740	1784	1680
14d	5751	5471	5716	5977	5918	5773	5874	5604
21d	9473	9474	10066	10149	10337 ¹	9853	9874	9857
28d	13374	12427	13147	13427	13680	12745	13556	12837
30d	16798	15501	16144	16329	17270	15569	16283	15044
weight gain (g/10birds)								
0 to 07d	1117	1199	1163	1256	1234	1204	1244	1142
08 to 14d	5214	4937	5184	5448	5389	5237	5334	5066
15 to 21d	8936	8940	9534	9620	9808 ¹	9317	9334	9319
22 to 28d	12837	11893	12615	12898	13151	12209	13016	12299
29 to 30d	16261	14967	15612	15800	16741	15033	15743	14506
feed intake (g/bird)								
0 to 07d	119	134	121	121	121	119	124	119
08 to 14d	709	641	691	724	692	695	709	669
15 to 21d	1307	1228	1294	1355	1295	1308	1318	1247
22 to 28d	2369	2198	2311	2381	2443	2302	2388	2225
29 to 30d	2656	2479	2582	2655	2721	2574	2634	2447
FCR ² (g/g)								
30d	1.63	1.65	1.65	1.68	1.62	1.71	1.67	1.68
FCR ³ (g/g)								
30d	1.50	1.66	2.29	2.28	1.45	1.70	2.30	2.61

¹Data are means of 10 replicates per treatment.

²FCR = feed conversion ratio (feed intake/body weight).

³FCR = 1.5 compensated feed conversion ratio(feed intake/body weight).

Table 2. Effects of organic minerals on weight of adipose tissue, liver and spleen of broiler chicken.

	Abdominal fat		Liver		Spleen	
	Organ weight (g)	Organ weight (g/100g of BW)	Organ weight (g)	Organ weight (g/100g of BW)	Organ weight (g)	Organ weight (g/100g of BW)
Control	18.0 ± 6.3	1.19 ± 0.41	31.7 ± 3.2	2.07 ± 0.08	1.07 ± 0.22	0.07 ± 0.01
Antibiotics	9.5 ± 4.3*	0.67 ± 0.26*	33.1 ± 5.4	2.39 ± 0.25*	1.52 ± 0.41*	0.11 ± 0.03*
Alltech bioplex C	16.4 ± 5.9	1.06 ± 0.36	34.5 ± 4.1	2.26 ± 0.21*	1.22 ± 0.49	0.08 ± 0.04
Alltech bioplex poultry PAK	14.6 ± 5.5	0.92 ± 0.35	34.1 ± 3.6	2.14 ± 0.09	1.18 ± 0.54	0.07 ± 0.04
CaFe-GMP	19.1 ± 5.0	1.16 ± 0.33	38.8 ± 4.3*	2.36 ± 0.13*	1.60 ± 0.58*	0.10 ± 0.03*
CaFe-IMP	13.2 ± 3.6	0.88 ± 0.28	31.6 ± 14.1	2.10 ± 0.99	1.45 ± 0.28*	0.10 ± 0.02*
Ca-WPS	13.2 ± 2.9	0.86 ± 0.76	36.5 ± 8.5	2.34 ± 0.24*	1.52 ± 0.49*	0.10 ± 0.02*
Fe-OCHT	11.0 ± 3.2*	0.76 ± 0.22*	31.8 ± 3.0	2.22 ± 0.14*	1.28 ± 0.32	0.08 ± 0.04

Table 3. Effects of organic minerals on weight of breast and thigh meat of broiler chickens.

	Breast meat		Thigh meat	
	Organ weight (g)	Organ weight (g/100g of BW)	Organ weight (g)	Organ weight (g/100g of BW)
Control	378 ± 36	24.7 ± 1.3	290 ± 32	18.9 ± 0.9
Antibiotics	344 ± 58	24.8 ± 0.9	245 ± 37	17.6 ± 0.4
Alltech bioplex C	379 ± 35	24.7 ± 1.0	286 ± 30	18.6 ± 0.5
Alltech bioplex poultry PAK	399 ± 38	21.7 ± 9.6	291 ± 24	18.3 ± 0.4
CaFe-GMP	418 ± 47*	25.44 ± 1.0	307 ± 37	18.6 ± 0.7
CaFe-IMP	374 ± 60	24.7 ± 4.3	287 ± 38	19.1 ± 3.4
Ca-WPS	389 ± 49	25.2 ± 1.1	279 ± 60	17.9 ± 1.1
Fe-OCHT	376 ± 30	26.2 ± 1.1	254 ± 22	17.7 ± 0.5

Table 4. Effects of organic minerals on change of intestine and gizzard of broiler chickens.

	Intestine		Gizzard(crop weight)	
	length (cm)	thickness (mm)	weight (g)	size (mm)
Control	141 ± 15	6.4 ± 1.1	33.4 ± 4.9	47×38×27
Antibiotics	169 ± 16*	7.1 ± 1.4	37.4 ± 3.6*	48×40×28
Alltech bioplex C	144 ± 11	6.0 ± 1.1	35.2 ± 3.9	48×39×26
Alltech bioplex poultry PAK	134 ± 55	5.6 ± 1.1	36.5 ± 1.8	48×40×28
CaFe-GMP	157 ± 8*	8.1 ± 2.0	36.5 ± 5.2	52×39×28
CaFe-IMP	147 ± 11	6.9 ± 0.8	38.5 ± 8.0	50×42×28
Ca-WPS	156 ± 8*	7.2 ± 1.9	35.7 ± 4.3	47×40×28
Fe-OCHT	158 ± 12*	6.2 ± 1.6	35.7 ± 6.8	49×40×27

Table 5. Effects of organic minerals on cholesterol of broiler chickens.

	Total cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	LDL-cholesterol (mg/dl)
Control	155 ± 21	116 ± 14	31.4 ± 7.9
Antibiotics	110 ± 17*	81 ± 14	25.0 ± 6.5*
Alltech bioplex C	178 ± 17	137 ± 14*	34.5 ± 6.2
Alltech bioplex poultry PAK	157 ± 22	119 ± 22	35.4 ± 6.0
CaFe-GMP	141 ± 9*	113 ± 10	26.9 ± 2.0*
CaFe-IMP	172 ± 21	133 ± 12*	34.1 ± 7.9
Ca-WPS	113 ± 27*	87 ± 22	21.7 ± 8.3*
Fe-OCHT	127 ± 14*	95 ± 11	30.6 ± 13.9

Table 6. Effects of organic minerlas on fecal microflora of broiler chickens.

	<i>Lactobacillus</i> spp. ($\times 10^7$ cfu/0.1g)	<i>coli</i> form ($\times 10^9$ cfu/0.1g)	<i>E. coli</i> ($\times 10^9$ cfu/0.1g)	<i>Salmonella</i> spp. ($\times 10^7$ cfu/0.1g)
Control	3.60 \pm 2.32	3.46 \pm 2.05	2.24 \pm 1.39	2.26 \pm 0.96
Antibiotics	3.04 \pm 2.34	3.40 \pm 4.68	1.24 \pm 1.10	1.27 \pm 1.71
Alltech bioplex C	2.30 \pm 1.37	5.19 \pm 0.64	2.07 \pm 1.72	2.36 \pm 0.49
Alltech bioplex poultry PAK	2.10 \pm 1.07	4.46 \pm 2.96	2.65 \pm 1.55	1.92 \pm 1.53
CaFe-GMP	4.55 \pm 4.17	2.83 \pm 1.52	2.62 \pm 1.02	1.83 \pm 1.39
CaFe-IMP	2.16 \pm 1.51	3.81 \pm 1.69	1.45 \pm 1.41	2.32 \pm 1.99
Ca-WPS	3.66 \pm 2.94	2.06 \pm 0.50	1.34 \pm 0.35	2.21 \pm 1.51
Fe-OCHT	1.76 \pm 1.10	4.71 \pm 3.47	4.16 \pm 3.21	1.70 \pm 1.70

Table 7. Effects of organic minerals on chemical composition of breast meat from broiler chickens.

	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude ash (%)
Control	75.3 ± 0.1	22.2 ± 0.3	0.52 ± 0.03	1.12 ± 0.02
Antibiotics	74.5 ± 0.4*	23.4 ± 0.1*	0.67 ± 0.28	1.18 ± 0.04
Alltech bioplex C	74.5 ± 0.7	23.4 ± 0.2*	0.50 ± 0.28	1.18 ± 0.02
Alltech bioplex poultry PAK	74.1 ± 0.2*	23.4 ± 0.1*	0.77 ± 0.13*	1.14 ± 0.02
CaFe-GMP	74.0 ± 0.1*	22.9 ± 0.1*	1.19 ± 0.05*	1.12 ± 0.03
CaFe-IMP	73.8 ± 0.1*	23.5 ± 0.1*	1.06 ± 0.18*	1.23 ± 0.04
Ca-WPS	75.4 ± 0.4	22.0 ± 0.9	0.28 ± 0.15	1.12 ± 0.02
Fe-OCHT	74.1 ± 0.2*	23.8 ± 0.0*	0.54 ± 0.15	1.12 ± 0.04

Table 8. Effects of organic minerals on color, pH, water holding capacity, shearing force, and cooking loss of breast meat from broiler chickens.

	Color (L/a/b)	pH	Water holding capacity (%)	Shearing force (kg / 0.5 inch ²)	cooking loss (%)
Control	56.2 / 3.97 / 5.72	5.87 ± 0.01	58.3 ± 0.8	1.45 ± 0.13	22.5 ± 1.3
Antibiotics	58.0 / 2.96 / 5.97	5.71 ± 0.00	57.3 ± 1.4	2.67 ± 0.69	22.5 ± 0.6
Alltech bioplex C	54.6 / 3.90 / 5.95	5.81 ± 0.01	59.5 ± 1.1	1.17 ± 0.07*	21.5 ± 0.7
Alltech bioplex poultry PAK	57.4 / 3.25 / 7.57	5.74 ± 0.01	57.7 ± 1.3	1.59 ± 0.17	21.3 ± 2.1
CaFe-GMP	55.7 / 4.07 / 5.08	5.90 ± 0.01*	61.3 ± 2.2	1.54 ± 0.35	21.9 ± 1.3
CaFe-IMP	55.9 / 3.11 / 6.09	5.83 ± 0.01	58.5 ± 1.4	2.00 ± 0.90	20.5 ± 2.1
Ca-WPS	55.4 / 3.75 / 6.25	5.79 ± 0.01	59.0 ± 1.8	1.61 ± 0.34	22.2 ± 0.8
Fe-OCHT	56.9 / 3.35 / 6.78	5.89 ± 0.01*	63.6 ± 2.3	1.82 ± 0.49	20.9 ± 0.5

Table 9. Effects of organic minerals on fatty acid composition of thigh meat from broiler chickens.

			Control	Antibiotics	Altech bioplex C	Altech bioplex poultry PAK	CaFe-GMP	CaFe-IMP	Ca-WPS	Fe-OCHT
SFA ¹	C14:0	Myristic acid	0.85	0.90	0.89	0.84	0.87	0.85	0.85	0.81
	C16:0	Palmitic acid	23.20	24.99	23.64	24.10	24.91	24.43	23.59	22.85
	C18:0	Stearic acid	6.02	6.51	5.99	6.49	6.57	6.75	6.26	6.88
MUFA ²	C16:n7	Palmitoleic acid	6.44	7.42	6.52	6.36	6.42	6.45	6.29	5.62
	C18:n7	Vaccenic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	C18:n9	Oleic acid	46.98	45.48	44.86	45.67	45.01	44.94	45.82	45.48
	C20:n9	Eicosenoic acid	0.54	0.56	0.58	0.59	0.57	0.58	0.58	0.65
PUFA ³	C18:2n6	Linoleic acid	14.63	12.76	14.64	14.66	14.26	14.63	15.14	16.12
	C18:3n6	γ -Linoleic acid	0.15	0.44	0.15	0.17	0.15	0.15	0.16	0.16
	C18:3n3	Linolenic acid	0.93	0.76	2.53	0.90	0.89	0.92	0.97	0.95
	C20:4n6	Arachidonic acid	0.26	0.19	0.21	0.20	0.34	0.31	0.35	0.47
	C20:5n3	Eicosapentaenoic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	C22:4n6	Docosatetraenoic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	C22:6n3	Docosahexaenoic acid (DHA)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SFA		30.07	32.40	30.51	31.43	32.35	32.03	30.70	30.54
	USFA		69.93	67.60	69.49	68.57	67.65	67.97	69.30	69.46
	MUFA		53.96	53.45	51.96	52.62	52.00	51.96	52.68	51.75
	PUFA		15.97	14.15	17.53	15.95	15.65	16.01	16.62	17.71
	Total (%)		100	100	100	100	100	100	100	100

¹SFA: Saturated fatty acid

²MUFA: Monounsaturated fatty acid

³PUFA: Polyunsaturated fatty acid

Table 10. Effects of organic minerals on mineral contents of blood, plasma, internal organs, and feces from cecum.

Group	Ca		Fe	
	Control	CaFe-GMP	Control	CaFe-GMP
Blood	193 ± 61	188 ± 8.2	210 ± 68	190 ± 35
Plasma	99.0 ± 32.0	76.7 ± 10.9*	1.58 ± 1.20	1.87 ± 0.01*
Liver	22.8 ± 10.6	40.6 ± 4.7*	80.4 ± 40.0	93.9 ± 67.3
Breast meat	130 ± 20	144 ± 24*	12.7 ± 2.7	14.7 ± 4.4*
proximal phalanx	26399 ± 4380	22893 ± 4568	1.41 ± 8.87	5.2 ± 10.4

제 8 장 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구

제 1 절 연구필요성 및 연구 개요

1. 연구필요성

가. 국내외 헬리코박터균 관련 현황분석

- 일부 병원체의 만성 감염은 암을 일으킬 수 있으며, 국제암연구소(IARC)와 미국 국립암 협회지는 암 발생자의 20% 이상이 만성 감염으로 인해 암이 발생하고 있으며, 최신의 우리나라 암 환자 중 21% 가량이 감염에 의한 것으로 추정 되고 있다.
- 국제암연구소가 1급 발암물질(Group 1 carcinogen)로 규정하는 병원체에는 B형 및 C형 간염 바이러스(hepatitis B and C virus), 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV), 헬리코박터균(Helicobacter pylori), 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 간흡충(간디스토마, chlonorchis sinensis), 인간면역결핍바이러스(Human Immunodeficiency virus, HIV), 인간 T세포 바이러스(Human T-Lymphotropic Virus-1, HTLV-1), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma herpes virus, KSHV), 주혈흡충(schistosoma haematobium), 타이간흡충(Opisthorchis viverrini)이 있으며, 이 중 B형 및 C형 간염, 인유두종바이러스, 헬리코박터균, 엡스타인바 바이러스, 간흡충 감염은 우리나라에서 비교적 흔히 발생하고 있다.
- 헬리코박터(Helicobacter pylori, H.pylori)는 위염과 소화성 궤양의 원인이 되는 위에 기생하는 나선형 모양의 세균이고, 헬리코박터는 국제보건기구(WHO) 산하의 국제암연구소(IARC)에서 위암의 원인으로 판정하였고, 인간에 대한 1등급 발암 요인으로 규정하고 있다. 서구에 비해 우리나라 국민의 헬리코박터 감염률은 매우 높으며, 우리나라의 위암 발생도 세계적으로 가장 높은 수준이다.
- 헬리코박터균에 감염된 사람은 대개 만성위염 증후를 보이고 위염이 만성화되면 위 점막이 얇아지고 주름이 생기는 '위축성 위염' 이 발생함. 위축된 위 점막은 장 점막의 상피세포가 잠식해 들어오는 '장상피화생(腸上皮花生)' 단계로 발전하는 데 이것은 위장 표면이 꽃이 핀 것처럼 거친 상태를 의미하며 이것이 발전하면 위 점막의 표층에 암 비슷한 세포가 생기는 '이형성증' (neoplasia) 단계로 넘어가서 위암으로 발전하는 병리학적 발생단계를 거친다. 만성위염의 약 50%가 위축성 위염으로 발전하고, 위축성 위염의 약 80%가 장상피화생으로, 장상피화생의 약 20%가 위암으로 발전하고 있다.
- 우리나라는 1998년과 2005년에 전국 규모의 헬리코박터 유병률 조사를 실시한 바 있음. 1998년 조사에서는 어머니로부터 태반을 통해 받은 헬리코박터 IgG 항체가 사라지는 7개월부터 9세까지의 유병률이 12.7%로 완만한 증가를 보이다가 10-12세에 27.3%로 급격히 증가했고, 이 시기부터 가장 빠른 증가를 보인 31-40세의 74%까지 매년 약 1.7%씩 증가하였다. 헬리코박터 유병률은 1998년 조사의 16세 이상 전국평균 66.9%에 비해 2005년에는 59.6%로 감소하였으며, 이는 사회, 경제적 수준 및 위생상

태의 향상에 의한 것으로 추정되고 있다.

- 우리나라에서 헬리코박터 감염은 주로 5세 이하에서 일어나 일생 지속되는 것으로 알려지고 있으며, 헬리코박터는 사람에서 사람으로 전염되며, 주로 아동기에 감염이 일어나고, 가족 내 감염이 주된 감염 경로라고 추측하고 있다. 대부분의 헬리코박터 감염자에게는 아무런 증상이 없으나 성인에게는 위염, 위십이지장 궤양의 중요한 원인임. 선진국에서는 어린이의 만성 복통, 성장지연, 만성위염, 철 결핍성 빈혈 등과 관련이 있다고 조사되고 있다.
- 일반적으로 헬리코박터균 자체가 큰 위협이 되는 것은 아니나 이것의 감염으로 인한 위암 발생율이 상당히 소화성 궤양, 조기위암, 위의 림프종이 있는 경우에는 위암 예방과 위암 진행을 막기 위해 헬리코박터균을 치료해야 한다. 그러나 치료에 앞서 이것을 예방하는 것이 더 시급하다 할 수 있다.

나. 국내 항헬리코박터 제품 개발 및 제품화 현황 분석

- 베리 마셜 박사의 헬리코박터 파이로리의 발견 이후 많은 파이로리 억제 및 예방제들이 개발되고 있으나 항생제는 기존의 항생제를 조합한 제제요법이고 파이로리에 의한 감염을 억제할 것으로 예상되는 유산균 및 천연물 유래 화합물에 그치고 있으며, 천연물 유래 화합물은 일반적인 항균작용을 가졌다고 알려진 성분들로 프로폴리스, 감초엑기스, 전차(煎茶)추출물 및 카데킨 등을 함유한 정제의 방식으로 제품화 되고 있다.
- 헬리코박터의 유해성이 알려지면서 야구르트사(월), 남양유업(위력), 매일유업(구트), 롯데우유(루테리) 및 해태유업(위화장력)등에서 유산균 또는 항헬리코박터 성분을 첨가한 상품 등을 잇달아 개발하였으나, 개별인증 절차를 거쳐 제품화까지 연계된 경우는 없으며, 제품화한 경우도 일반식품으로 판매되는 경우(과대광고 규제, 식약처)가 대부분이다.
- 국내 대표적인 관련 제품(식품)으로서, 2000년 야구르트사의 “월(비개별인증형 식품)” 이 헬리코박터 균을 치료할 수 있다고 특허 받은 유산균(HY2177, HY2743)을 발표하였으나, 이 유산균에 대한 유효성 논란이 계속 되고 있으며, 동물실험에서는 요구르트를 복용한 쥐에서 헬리코박터가 잘 감염되지 않았으며 배양실험에서는 유산균이 헬리코박터 제균효과가 있었으나 인체대상에서는 그 유효성이 입증되지 못했고, 헬리코박터 감염에 대한 치료효과가 있다는 연구결과도 일치하지 않았다(중앙일보 헬스미디어 2013. 8). 또한, 개별인증을 비확보한 식품임에 따라 관련 항헬리코박터의 효능에 대한 광고를 할 수 없도록 식약처로부터 규제를 받고 있다.
- 일동제약에서는 헬리코박터에서 나오는 독소를 중화하는 성분인 항 헬리코박터 VacA IgY를 개발 특허 등록한 바 있고, 야구르트에서는 유산균 주 2종을 특허 등록하였으나, 야구르트의 유산균을 제외하면 항원으로 한국인에서 분리된 *H. pylori*의 균종의 항원과 계란의 난황중의 면역글로블린을 이용하여 난황항체 (IgY)를 제조하고 이를 효과적으로 분리하여 *H. pylori*균 감염에 대해 항생제가 치료법으로 등록하였으나, 이의 임상적 효과는 미미한 것으로 평가되고 있다.
- 연세우유는 항헬리코 물질로서 락토펙-Y를, 삼육식품은 유산균 성분 '헬리코신-엘씨 21'을 두유에 첨가한 경우였고, 삼양식품은 칩꽃추출물, 갈슘·철분, 두릅 추출물과 매실 농축과즙을 혼합한 비개별인증을 식품이다.

다. 국내 항헬리코박터 치료관련 병원 처방 현황

- 헬리코박터의 감염에 대한 치료의 경우 주로 항생제를 이용하는 일반적으로 항생제 2개, 위산억제제 1개를 합쳐서 1주에서 2주 동안 복용하고 2주 후 치료결과를 체크하여 제균에 실패하였으면 2차 약물을 사용해 다시 시행한다. 헬리코박터 감염치료의 경우 건강보험적용 대상에서 제외 되고 있다.
- 치료에 사용되는 항생제는 크게 아목실린 (페니실린 계열) 과 Clarithromycin (퀴놀론계열) 의 항생제와 양성자 펌프 억제제의 삼제요법을 권고하고 있으나 이러한 항생제의 장기복용은 복통, 설사, 구역질, 알러지 등의 표면적인 부작용 외에 내성균을 양성할 수 있어 제균율의 감소뿐 아니라 다른 질병의 제균 효과까지 감소시킬 수 있다.. 그러한 결과로 한번에 치료가 되지 않는 경우들이 발생해 재차 다른 항생제를 바꿔 치료하는 경우도 실제로 다수 발생하고 있어 비용적인 문제와 더불어 위장내 유익균까지 모두 없어져버려 악성질환으로의 잠재성을 가지고 있다.

라. 핵심 항균 기능성분 NANA의 국내외 제품화 현황

- 본 연구에서 항균성 관련하여 핵심물질인 NANA의 경우, 특수시약으로 판매(대장균 유래)이외에 상용화가 가능한 제품화는 국내외적으로 없으며, 국제시장 가격(2013.기준)은 순도에 따라 차이는 있지만, 1Kg당 260만원에서 1,000만원을 초과하는 고가로 판매되고 있다(Table 1).
- 산업화 적용에 있어 대부분 의약품 소재로 활용(이유: 합성제품, 대장균 유래)되고 있으며, 식품산업은 적용에는 없다.
- 이러한 가장 큰 이유는 제품화시 항헬리코박터 제품의 경우는 영유아가 섭취가 용이함에 따라 합성제품의 경우와 유전자 제조합 유래의 원료의 경우는 근본적으로 식품첨가물 원료로서 규제(식약처)하고 있으며, 더욱이 안전성을 확보한 경우라 하더라도 제품화시 가장 필요한 항목인 경제성 충족이 어렵기 때문이다.

Table 1. 현재 판매되는 sialic acid의 제조방법 및 순도별 국제 시장가격 조사결과

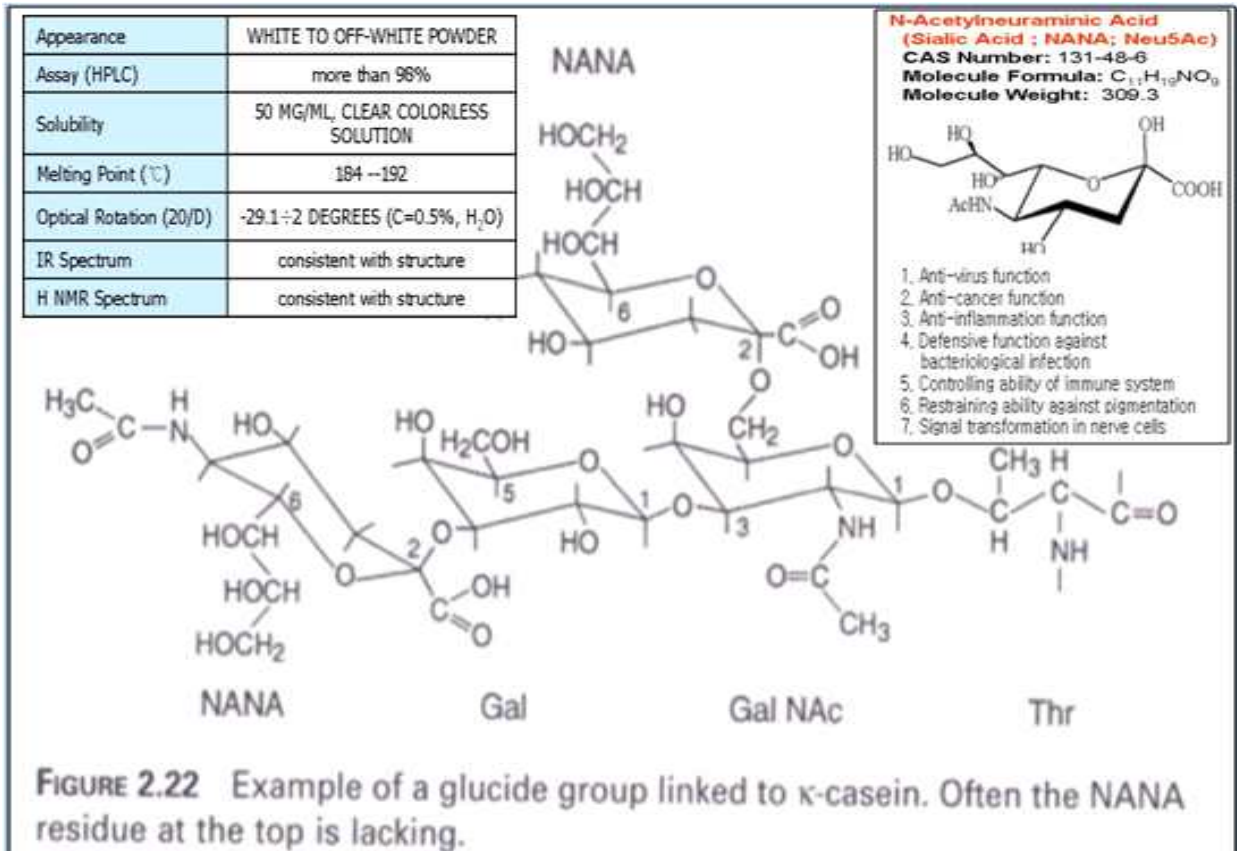
구분	소비자 가격 (원/Kg,VAT 별도)	생산국(회사)	비고
발효 sialic acid(10%)	2,600,000	중국(JK Bioteck사)	대장균 유래
발효 sialic acid(98%)	8,000,000	중국(JK Bioteck사)	대장균 유래
합성 sialic acid(99%)	10,000,000	일본(MARUKIN)	합성제품
천연sialic acid(7% 기준)	70,000	(주)메디뉴트롤	천연 유단백질 분리

마. 기존제품과의 차별성 평가

본 연구개발을 통한 최종 제품의 목표 공시균인 헬리코박터균에 대한 항균효능 관련 핵심 지표 및 기능성분은 Sialic acid(Silaic acid=NANA=N-Acetylnuraminic acid, 이하 NANA)인데, 다음과 같은 특성을 보유하고 있다.

- 본 기술관련 핵심물질인 NANA(분자량 : 309.3)는 유청단백질에서 분리한 GlycoMacroPeptide(이하 GMP)에서 효소처리 공정을 적용하여 제조한 천연유래 화합물로 수용성 당-탄수화물이다(Fig 1).

- NANA는 항바이러스, 항암, 항암, 세균감염예방, 면역증강효과, 색소침착억제, 신경전달 신호형성 등 다양한 기능을 보유하고 있으나, 항균성에 기준을 두고 연구개발 및 제품화를 시도한 경우는 본 연구진이 세계최초인 경우이다.
- NANA는 다기능성 이외에 항균성을 보유하는 것으로 본 연구진에 의하여 밝혀 졌는데, in vitro평가에서 항균성이 보장된다 하더라도 제품에 첨가 시 화학반응의 유발됨으로서 항균성이 감소하는 경우가 비일비재하지만, 이 소재는 이러한 한계를 극복한 관련 소재에서 몇 안될 정도로 우수한 물성을 보유하고 있다(선행연구결과).
- 또한, 장단기 효능 보존성 평가(유제품, 음료등 제품첨가)에서도, 2년이상 보존하는 경우(냉장 및 고온 및 상온 보존성)에서도 성분변화라든가 항균효과 감소는 미미한 결과를 선행연구에서 확보함으로서 관련 고부가 제품으로 개발가치를 충분히 입증되었다 할 수 있다.
- 현재 NANA관련 항 헬리코박터 기능에 대한 특허는 본 연구진 출원건 이외에는 없으며, 연구동향은 NANA검출방법에서 표준물질로 쓰이고 있고 검출방법에 대한 논문이 약 3,500편 정도 있으나, 본 기술과 직접적으로 관련한 연구논문 및 제품화 결과는 주관연구기관인 한일바이오메드사 연구진 이외에는 현재 없다(2014년 Pubmed 기준).
- 본 과제에서 개발 소재는 천연화합물 유래의 유청단백질중 Lactose가 완전히 제거된 GMP단백질과 이로부터 분리한 NANA소재가 함유된 자체로 항헬리코박터 제품을 개발하는 경우이므로, 90% 이상이 유당불내증이 있는 우리나라 국민에 적합한 식품보조제이고, 헬리코박터 제균효과를 항생제를 이용하지 않는다는 점에서도 경제적, 약물오남용에 대한 효과를 볼 수 있을 것으로 판단된다.
- 헬리코박터의 감염에 대한 치료의 경우 주로 항생제를 이용하는 방법의 경우 건강보험적용 대상이 아니고 항생제의 장기복용은 복통, 설사, 구역질, 알러지 등의 표면적인 부작용 외에 내성균을 양성할 수 있어 제균율의 감소뿐 아니라 다른 질병의 제균 효과까지 감소시킬 수 있다.
- 따라서, 본 기술은 항생제 내성을 줄일 수 있는 건강기능식품보조제이며 저렴한 비용으로 환자의 복지를 향상시킬 것으로 판단된다.



Walstra et al(1999) Dairy Technology(Principle of milk Properties and Processes)

Fig 1. 치즈 유청분말에서 분리한 GMP(Glycomacropeptide)의 구조, NANA의 결합형태 및 기능성 평가(근거: Walstra et al(1999) Dairy Technology(Principle of milk Properties and Processes))

2. 연구개발 개요

본 연구를 포함한 전체 최종 연구개발 목표인 “항헬리코박터 제품으로 표기가 가능한 고부가 기능성식품 제조용 개별인증 확보 원료”의 “국내외 사업화(고부가 제품화)”를 위한 해결방법으로서 건강기능식품 개별인증 허가절차(식약처)수순에 의하여 하기와 같이 총 8단계로 진행하였다. 단계별 연구개요는 다음과 같다.

- 1 단계는, 항헬리코박터형 원료의 대량생산기법 정립인데, 개별인증 신청시 필수제출사항이며 KGMP시설보유 건강기능식품 회사에서 3회 이상 시제품 제조실적 확보 및 실적 보고서를 제시하여야 하는데 기준에 준하여 완료하였다.
- 2 단계는, 목표 항균효능 관련 지표성분 및 기능성분의 표준분석법의 정립 단계인데, 이는 필수 지표 및 기능성분 확보와 개별인증 신청시 필수제시항목이다. 현재 지표 및 기능성분은 NANA로 확정 및 관련 식약처 제출용 최종 표준분석법 정립 보고서가 완료되었다.
- 3 단계로(본 연구건)는, 개발 항헬리코박터 소재류중 목표 공시균인 *H.pyroli*균에 대한 항균효능평가(in vitro)와 연계하여 실험동물(마우스)에 접종하여 최적 감염예방 또는 치료효과를 보유하는 최적 소재선발과 섭이농도 및 섭이기법을 확립하는 기초효능 평가 단계이며, GLP시스템(동물안전성 평가, 5~7단계)와 최종 인체임상(CRO시스템, 3단계) 평가를 위한 기초 유효성 평가를 핵심 목표로 하여 수행하였다. 이를 위하여, 다음과 같은 세부연구목표별로 연구를 수행되었다.
 - 1차로는, 준비된 항헬리코박터 소재류별로 공시균인 헬리코박터균에 항균효능(MIC)을 평가하였다(in vitro).
 - 2차로는, 항헬리박터균에 대한 효능평가를 통과한 소재류와 선발 Surfactant 700의 단일 및 병행처리에 따른 항균시너지 효과를 평가 하였다(in vitro).
 - 3차로는, 공시균의 실험동물에 대한 감염 전후 조건에서 선발 항헬리코박터 소재류를 경구투여시 감염예방 또는 치료효과로 구분하여 결과를 평가하였다(in vivo).
 - 4차로는, in vitro 및 in vivo 평가결과 연계, 항헬리코박터형 최적 소재류를 선발 및 항균시너지 극대화형 시제품 제조 레시피 정립함에 목표를 두었다.
 - 최종적으로 항헬리코박터 효과 극대화형 시제품 제조 및 인체유효성 평가를 위한 안전성과 기초효능 자료 확보에 세부연구목표를 부여하였다.
- 4~5단계로는, 3단계를 거쳐 선발 된 항헬리코박터 제균형 소재에 대한 동물안전성(GLP시스템 적용)평가가 설치류(마우스 및 랫트)를 대상으로 안전성 평가와 비설치류(비글견, 5단계)에 대한 평가단계이며, 다음과 같은 항목으로 진행하였다.
 - 처리농도 : 0, 1,250mg/Kg, 2,500mg/Kg 및 5,000mg/Kg
 - 공시실험동물 : mice(암수), Rat(암수)
 - 평가방법
 - 1단계 : 단회독성 평가
 - 2단계 : 유전독성시험, 미생물 : 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및: 소핵시험 평가
 - 3단계 : 4주 용량설정 시험(DRF 시험) 평가
 - 4단계 : 13주 반복투여독성시험 평가
 - 안전성 평가 결과 : 안전성 확보(섭이농도 : 5,000mg/Kg)
- 6 단계로는, 본 연구결과와 GLP(4~5단계 적용) 결과를 확인함을 연계하여 인체유효

성평가(CRO시스템)를 진행예정으로, 3단계로 하기와 같이 연계하여 진행 예정이다.

- 1단계: 시험관 시험 및 GLP결과 기준, CRO평가 규모 등 및 평가방법 확정
 - 2단계 : CRO평가기관, IRB승인 확보(선행 GLP평가결과 평가후)
 - 3단계 : 임상평가(유효성과 안전성 입증)
 - 평가항목 : 단일소재 대상, 이중맹검, 평행대조 및 무작위배정 인체적용시험 등
- 7 단계로는, 전체결과보고서 제출을 통한 개별인증 신청단계인데, 제출 서류로서는 상
기 1~6단계에서 확보된 보고서류가 해당된다. 즉, 목표 소재 대량생산시스템정립여부
(1단계, 결과물), 기능성분 및 지표성분 정립형 필수표준분석법(2단계 보고서), 소재류
시험관 시험결과(3단계 보고서, 본 연구건), 동물유효성(GLP 시스템, 설치류 부분)평
가 보고서(4단계), 동물유효성(GLP 시스템, 비설치류 부분)평가 보고서(5단계) 그리
고 인체유효성평가(CRO시스템, 6단계)보고서이다.
- 마지막 8단계 및 9단계는 최종 개별인증 확보(8단계, 신청예정일 :2017.11.) 및 산업
화 단계 (9 단계, 확보예정일 : 2018. 11.) 로 전체적인 연구를 진행하였다(Table
2). 즉, 최종 개별인증 원료는 “유청가수분해 단백질분말” 이며, 제품은 “건기식 및
식품첨가물 원료” 이고, 개별인증 확보 목표는 “2급 이상” 을 목표로 하고 있다
(Table 2).

Table 2. 본 연구결과 연계 최종 항헬리코박터제품(원료)의 기능성 인정등급 확보 목표

목표 개별인증 원료	성과물	제품화(사업화)
항헬리코박터 제품 (원료 : 유청가수분해단백분말)	건강기능식품(원료)	원료
□제품표기사항(예정목표) □• 목표 1 : 질병발생 위험감소기능(표기 : “ <u>위염발생 위험감소</u> 에 도움을 줌”) □• 목표 2 : 생리활성기능 1등급□□□□ (표기 : “ <u>헬리코박터균치료</u> 에 도움을 줌”) □• 목표 3 : 생리활성기능 2등급□□□□ (표기 : “ <u>헬리코박터균예방</u> 에 도움을 줌”)		
최종예상 목표: 개별인증(<u>생리활성 2급이상</u>)		

제 1 절 헬리코박터 제어형 원료류 개발 기법 확립

제 1-1 절 당류에 의한 생산수율 저해요인 평가(Lactose, Glucose대상)

1. 연구목적

본 연구는 당류가 제거되지 않은 유청 유래 분리 단백질 GlycoMacroPeptide(이하 GMP)에 의해 목표 NANA(이하 G-NANA)를 생산함에 있어 당류가 미치는 NANA 생산수율 저해능력을 평가하기 위해 진행되었다. G-NANA 생산을 위한 표준제조법 정립 결과에서, 당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA를 생산함에 있어 당류가 미치는 생산수율 저해능력을 평가하기 위하여 기존 당류를 제거한 GMP(이론치 NANA함유량 6% 기준)를 기질로 G-NANA를 제조한 경우에서 G-NANA의 생산효율은 약 30%였으며 이때 NANA함유량은 29.5%였음이 확인되었다. 그러나 NANA생산간 당류는 효소의 기질 반응 시 간섭효과를 유발하는 경향을 보임이 선행시험에 의해 확인되었기 때문에 본 연구에서는 당류가 다량 함유된 GMP(Lactose 45% 이상)로부터 G-NANA생산능력을 확인하였다. 따라서 본 연구의 목적은 당류가 존재하지 않는 GMP로부터 G-NANA를 생산했을 때의 생산수율로부터 당류가 존재하는 GMP로부터 G-NANA생산시의 생산수율을 비교, 분석하여 결국 당류가 G-NANA의 생산율에 끼치는 영향을 분석하고 저 함에 있다. 이를 분석하기 위하여, 당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA를 생산하기 위한 생산공정을 간략하게 진행하였으며, 분리율을 확인하기 위한 연구방법은 다음과 같다.

2. 연구수행방법

당류가 존재하는 GMP로부터 G-NANA생산 시, 생산수율을 규명하기 위하여 비교 검증할 데이터로써 선행 연구 결과를 인용하였다(Table 2, Fig. 2). 선행 연구결과, 당류가 포함되어 있는 GMP로부터 G-NANA 생산 분리율(DW 1L + GMP 70g기준)은 약 6~7%로 확인되었다. 따라서, Lactose가 G-NANA생산에 얼마만큼 영향을 끼치는지 확인해 볼 필요성이 판단되어 본 연구를 진행하였다.

1) 시료준비

기질 GMP로부터 G-NANA를 분리하기 위한 in vitro 실험은 선행연구와 마찬가지로 실시하였다. 우선 GMP 7g(정제수 대비 7%)을 분취한 후 반응기에 투입하였으며 1차 증류수를 사용하여 최종 100mL이 되게 Mess up시켰다. 기질 GMP내 결합되어 있는 목표 NANA의 분리를 위하여 가수분해효소의 사용과 관련한 pH의 조절(Adjust pH 5 ; Formic Acid)을 통하여 G-NANA의 생산효율을 증대시키는 방법을 사용하였으며, 효소 첨가 후 가수분해의 효율을 높이기 위해 선행연구 분석방법에 의해 설정되어진 42℃로 승온시켜 매 시간별 시료를 분취하고, 5시간 효소활성이 끝난 후 30분 동안 57℃에서 효소활성을 실행 시켰으며 역시 분취하여 시료로 사용하였다.

2) 시험구 조성

당류가 포함되어있는 유청 유래 분리 단백질 시료를 원료로 하여 5시간동안의 효소활성 과정과 G-NANA분리 증가율 평가과정을 진행하였다. 이를 위한 비교구로서는 효소 반응 전(SNANA 1000ppm)을 기준으로 하였고, 시험구는 효소 첨가 전(130912가0H)부터 각각 효소 첨가 1시간 후(130912가1H), 2시간 후(130912가2H), 3시간 후(130912가3H), 4시간 후(130912가4H), 5시간 후(130912가5H), 실활 후(130912가5XH)로 하여 총 7개 시험구로 설정하였다. 대조구로서는 합성 NANA인 S-NANA(Sigma, 순도 99%이상)을 1,000ppm농도로 조성한 후 이를 HPLC평가 시 100%로 하여 비교구 및 시험구의 NANA 검출량과 비교하였다.

3) 분석방법

본 연구는 당류가 제거되지 않은 GMP에 의해 목표 NANA(이하 G-NANA)를 생산함에 있어 당류가 미치는 생산수율 저해능력을 평가하였다. 실험방법은 제 1장 필수분석법 정립에 의해 실험하였다. 분석은 당류가 제거되지 않은 GMP로부터 NANA분리 및 농축 등의 일련의 제조과정 후의 시료를 대상으로 진행하였다. 효소첨가 후 매 시간별 분취하여 80% EtOH 희석액으로 제조하고 원심분리하여 상층액만을 대상으로 0.20um필터 후 HPLC 시스템 및 분석법을 적용하여 NANA함유량을 평가하였다. G-NANA의 함유량 분석은 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 사용하였으며, 대조구로서는 합성(이하 S-NANA)를 필요시 농도를 변화시키면서 비교 측정하였다. 이를 위한 HPLC 분석 기종으로는 Agilent사의 HPLC 1260모델을 적용하였고, 분석간 사용컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300×7.8mm, 컬럼온도 : 40℃)을 그리고 Mobile Phase 조성액으로서 10mM H₂ SO₄ 을 제조 활용하였으며, 관련 Flow Rate는 0.5ml/min 조건에서 분석을 실시하였다. 개발 G-NANA제품내 함유량 검정간 대조구로서는 합성NANA(이하 S-NANA)를 농도를 변화시키면서 비교 측정하였다.

다. 결과확인

NANA생산간 당류는 효소의 기질 반응시 간섭효과를 유발한다는 선행연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 당류가 다량 함유된 GMP(Lactose 45% 이상)로부터 표준제조법 대비 G-NANA생산능력을 확인한 결과는 다음과 같다.

1) 당류 함유 GMP 기질화 단계별 효소반응에 의한 G-NANA 분리율 평가

당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA생산수율 저해능력에 관한 평가로서, 시간별 G-NANA의 생산능력은 효소를 첨가한 후 1시간 경과시에는 검출되지 않았는데 2시간이 경과하면 1.3%의 NANA가 검출되었으며 3시간을 정점으로 최종 5시간이 경과하면 1.6%로 최대 분리효능과 생산효율은 26%였다. 이후 최종 반응시간인 5시간이 경과하더라도 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다(Table 1). 또한, 7% GMP 대비 G-NANA생산능력을 환산해서 계산해보면 역시 시간별 G-NANA의 생산능력은 효소 첨가 후 3시간을 정점으로 최후 최대 NANA 분리율은 1.7%임이 확인되었다(Table 1). 또한, G-NANA내 목표 기능성분인 NANA의 분리율은 2%(100% 기준) 미만이고 생산효율은 약 30%였는데, 기존

G-NANA표준제조법에서는 G-NANA의 생산효율은 30% 그리고 NANA함유량인 29.5%였음을 감안하면 당류가 함유된 경우 NANA생산관련 생산수율을 동일하였지만 NANA분리효율은 93.2%가 감소한 것으로 확인되었다(Table 1).

2) 당류 비함유 GMP 기질화 단계별 효소반응에 의한 G-NANA 분리율 평가

당류 비함유 GMP로부터 G-NANA생산능력에 관한 평가로서, 시간별 G-NANA생산능력은 효소 첨가 후 1시간이 경과하면 2.4%의 NANA가 분리되고, 이후 시간의 경과에 따라 분리율이 증가하는 경향을 보였으며 최종 6.9%까지 상승하였다(Table 2). 즉, 당류 비함유 GMP로부터 G-NANA 생산시 NANA 분리율은 7%이며 이론치 GMP내 NANA함유량이 6~7%였음을 감안하면 분리 관련 생산효율은 100%이상으로 확인 되었는데, 당류함유된 GMP를 기질로 제조된 G-NANA의 생산수율과 비교할 때 분리율은 3배이상 낮은 것으로 확인 되었다. 이는 당류가 첨가된 GMP로부터 G-NANA를 생산함에 있어 당류가 G-NANA의 생산능력을 저해하는 것을 확인할 수 있다(Table 2).

라. 결과

효소 가수 분해물로부터 NANA를 순도 높게 분리하기 위한 방법으로서 당류가 G-NANA를 생산 시 생산능력을 저해함이 확인되었다. 기존 당류를 제거하지 않은 GMP로부터 G-NANA를 생산하는 것에 비해 당류가 포함되어있는 GMP로부터 G-NANA 생산시 수율은 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. 따라서 이를 구체적으로 확인하여 당류의 포함여부에 따른 생산능력 평가를 실험실적으로 정립하고 저 함이 본 연구의 목적이다. 이를 해결하기 위하여 이미 선행연구에 의해 정립되어있는 G-NANA생산기법에 의거 당류가 포함되어 있는 GMP로부터 실험공정을 진행하였으며, 최종적으로 높은 수율을 얻기 위해서는 GMP속 당류를 제거해야 함이 판단되었다.

마. 결론

G-NANA의 생산효율을 극대화하기 위해서는 사전 유청 유래 분리 단백질로부터 유당 등 당류를 제거하는 것이 차후 생산단가 절감과 동시에 생산율이 증가함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에 의해 GMP로부터 G-NANA생산 시 유당 또는 당류를 분석한 후 이를 제거하는 공정이 필요함을 확인하였다.

Table 1. 당류가 첨가된 GMP로부터 (이론치 NANA함유량 7%)의 생산수율 저해능력 평가

시험구	RT	Area	Height	ppm	분리율	G-NANA 분리 효율 (%)
SNANA1000ppm	9.838	10941	471.7	1000.0		
I.C.G-0Hour			ND		0.0	
I.C.G-1Hour	9.861	7788.4	88.5	187.6	1.3	22.3
I.C.G-2Hour	9.845	5276.9	106.3	225.4	1.6	26.8
I.C.G-3Hour	9.843	5382.8	108.2	229.4	1.6	27.3
I.C.G-4Hour	9.843	5240.5	106.1	224.9	1.6	26.8
I.C.G-5Hour	9.84	5824	110.5	234.3	1.7	27.9
I.C.G-5Hour-X	9.837	5420.8	109.5	232.1	1.7	27.6

- I.C.G : Included Carbohydrate Glycomacropeptide

Table 2. 당류가 첨가되지 않은 GMP로부터 G-NANA(이론치 NANA함유량 7%)의 생산수율 저해능력 평가

시험구	RT	Area	Height	ppm	분리율	G-NANA 분리 효율 (%)
SNANA1000ppm	9.886	11098.2	516.2	1000		
GMP 1000ppm			ND			
N.I.C.G-0Hour	9.870	12161.6	170.2	1648.6	2.4	39.2%
N.I.C.G-1Hour	9.873	12865.4	333.2	3277.4	4.6	76.8%
N.I.C.G-2Hour	9.873	14699.9	417.7	4045.9	5.8	96.3%
N.I.C.G-3Hour	9.876	15105.4	442.5	4286.1	6.1	102%
N.I.C.G-4Hour	9.879	15068.1	466.4	4517.6	6.5	107%
N.I.C.G-5Hour	9.890	14654.8	485.4	4701.7	6.7	111%
N.I.C.G-5Hour-X	9.893	14651.9	503.4	4876.0	6.9	116%

- N.I.C.G : Not Included Carbohydrate Glycomacropetide

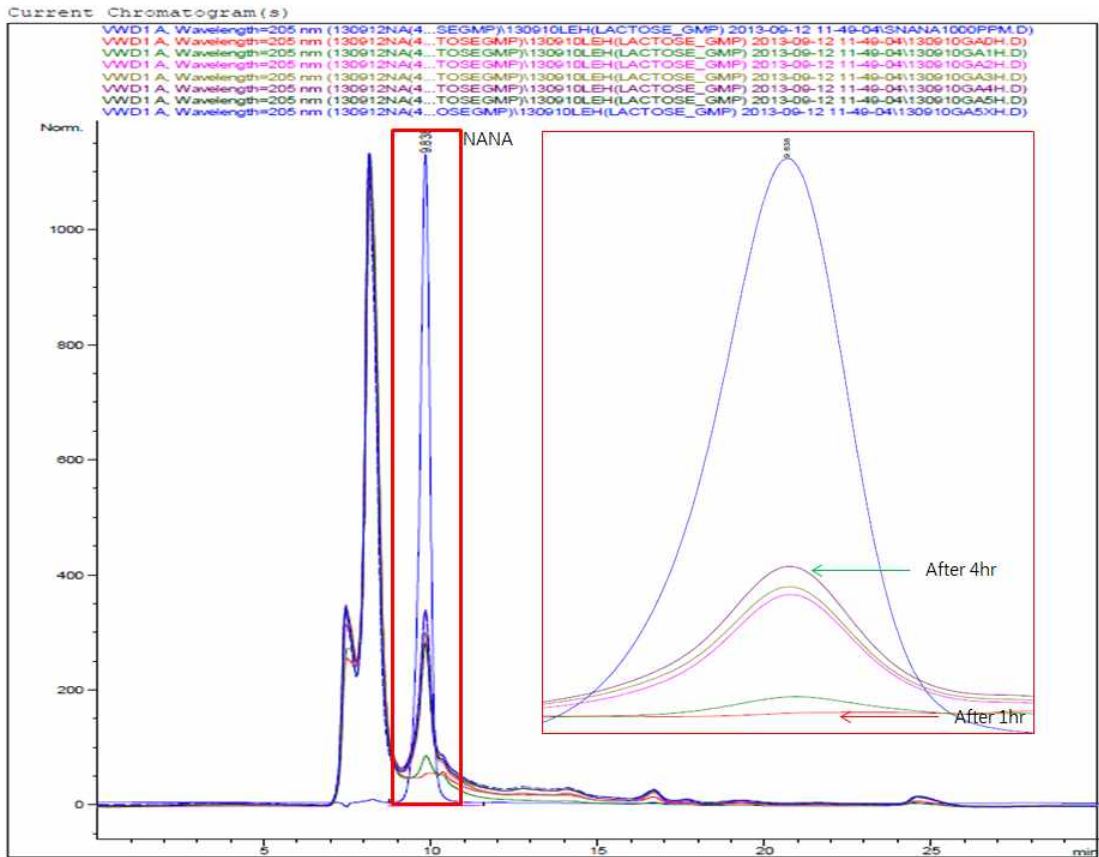


Figure 1. 당류가 첨가된 GMP로부터 생산된 NANA의 생산수율 저해능력 평가 (HPLC)

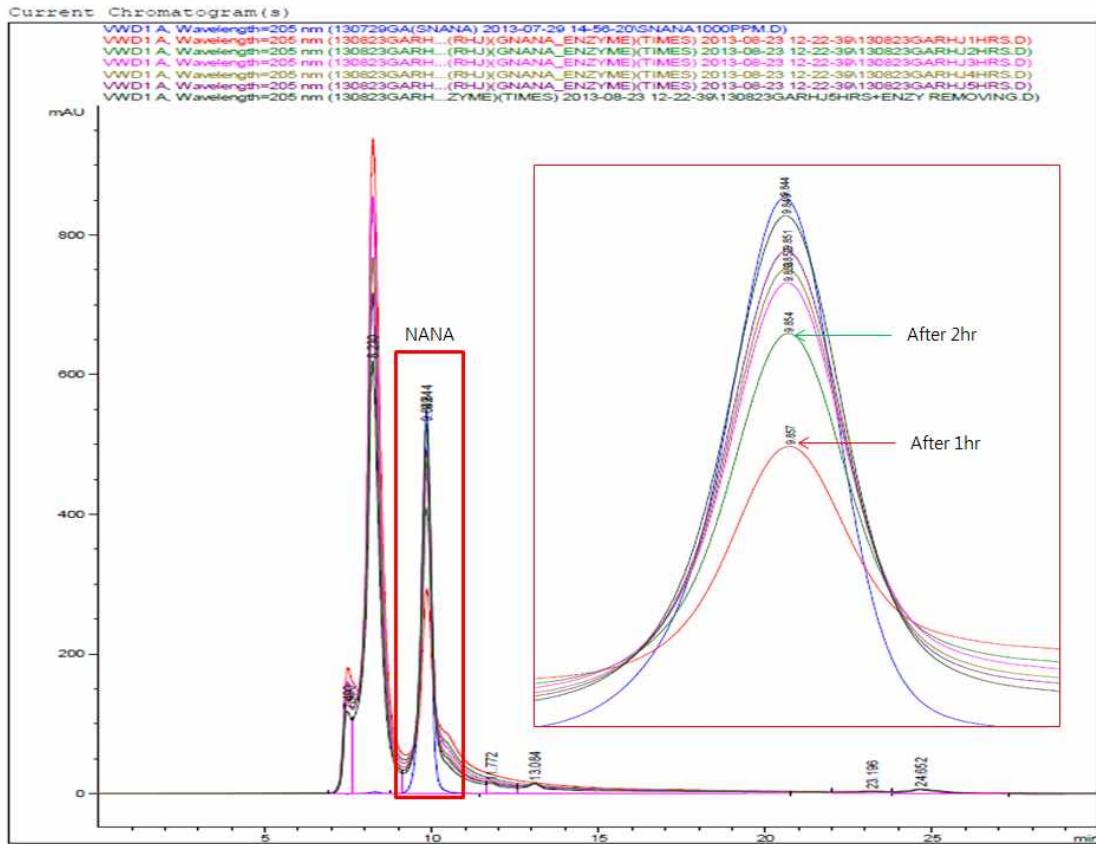


Figure 2. 당류가 첨가되지 않은 GMP로부터 생산된 NANA의 생산수율 저해능력 평가 (HPLC)

제 1-2 절 제품 안전성(오염균 제균) 확립

1. 연구목적

본 연구의 전체 연구개발 목표 중 최종은 개발제품인 G-NANA를 개발하고 이를 소재로 하여 항헬리코박터 제품 및 항균(헬리코박터) 제어제로 사용함과 동시에 추후 용도·용법 및 응용성을 신규창출함으로서 다각적인 산업화에 목적이 있다. 따라서, 개발 G-NANA의 제품화 방향은 반제품으로 사용되는 경우와 최종사용자의 제품에 기능성 및 고부가 창출을 위한 첨가물로 사용하는 경우, 그리고 G-NANA자체를 완제품으로 활용하는 부분으로 구분할 수 있다. 그러나, 본 과제와 직접적인 관련되는 부분으로서 개발 G-NANA는 목표 항헬리코박터 제품 제품화시는 첨가물로서 활용 그리고 Helicobacter pylori 제어제로 사용하는 경우는 완제품으로 활용하는 경우에 해당되는데 이중 반제품으로 사용되는 경우에는 최종사용자의 제품의 제균시스템을 경유하므로 오염균에 대한 법적 규제사항을 준수하면 되지만, 완제품으로 직접제품화 하는 경우는 인체에 대한 공중보건학적 피해를 유발할 수 있는 우려가 잠재되고 있다 할 수 있다. 또한, 본 과제의 개발목표 제품인 항헬리코박터 제품 제품의 경우, 최종 G-NANA내 오염균이 감염되는 경우, 이들 오염균으로부터 LPS(Lipopolysaccharide)가 발생하는데, 이는 항헬리코박터 제품 제품의 기능성을 면역증강에 목표를 두는 기준에서 LPS는 관련 면역을 감소시키는 역효과를 발생할 수 있다고 예상된다. 따라서, 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 예상되는 오염균에 대한 제어를 할 수 있다면 상기에서 언급한 오염균으로부터 유발되는 문제점을 사전에 차단 할 수 있을 것으로 판단되어 본 연구를 실시하였다.

2. 연구수행방법

가. 다중 특성 보유 기질물질에 대한 제균성 평가

본 연구에서는 최종 G-NANA제품화 과정 중 원료 등으로부터 감염성에 기준을 두고 이에 대한 사전 제균성을 파악하기 위하여, 기질로서 TSB(Difco사)와 표준제조법으로 제조한 G-NANA(생명의나무, 한국)를 대상으로 공시균을 감염시킨 후, 이를 제거하기 위해 Spray Dry(BUCHI사, Mini Spray Dryer B-290, 스위스)를 이용하여 온도조건을 다른 조건에서 각각의 제균성을 확인하고 저 하였다. 이를 위한 기질별 시험방법을 다음과 같다.

1) 시료준비 및 열처리 조건

준비된 기질별로 희석 및 멸균 처리후에 공시균을 오염시킨 조건을 조성 후 이들에 대한 제균성 평가를 위한 시험구 조성은 다음과 같이 준비하였다. 제균성 평가를 위한 공시균으로서는 그람음성균 *Enterobacter sakazakii* 및 그람양성균 *Bacillus cereus*을 사용하였고, 배지는 Tryptic Soy Broth(DifcoTM, Becton, Dickinson and company, USA)을 사용하였다. TSB시험구는 13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 이를 온도별 SD처리간 시료로 하였으며, 이때 대조

구는 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합균을 TSB에 첨가하여 동결건조 한 것으로 평가하였고, 실험구는 혼합균을 온도별 열처리한 구로 평가하였으며, 대조구는 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합균을 TSB시험구에 첨가하여 동결건조 한 것으로 평가하였다. G-NANA시험구 조성에 있어서는 G-NANA자체가 항균성을 보유하고 있음에 따라 정제수에 5%(w/v)되게 G-NANA를 희석 및 멸균처리를 실시한 후 이를 대상으로 TSB와 동일한 방법으로 진행하였다.

2) 기질별 감염공시균에 대한 열처리 조건

준비된 기질별로 희석 및 멸균처리후에 공시균을 오염시킨 조건하에서 SD처리시 제균성 평가를 위한 온도조건은 시험군별로 다음과 같다. TSB시험구의 SD 처리온도는 180℃, 170℃, 160℃, 150℃, 140℃, 130℃와 120℃ 8개의 온도처리군으로 하였으며, G-NANA 시험구는 120℃, 110℃, 100℃, 90℃, 85℃, 80℃ 및 70℃범위로 7개 온도처리군으로 하여 총 2개시험군, 총 15개 시험구로 조성하였다.

3) 기질별 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 확인

준비된 시험구별로 설정온도범위에서 제균효과 평가를 위하여, 각각을 50ml씩 분취 후 온도조건별 SD를 처리하였으며, 처리한 SD분말별 10%(w/v)되게 TSB에 녹여 이를 미리 준비된 TSA 배지에 50 μ l씩 도말하여 37℃에서 18시간 호기성 조건에서 배양하여 균수를 확인하였다.

3. 결과확인

본 연구는 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 항헬리코박터 제품 제품의 기능성을 면역증강에 목표를 두는 기준에서 오염균으로부터 발생하는 LPS(Lipopolysaccharide)가 관련 면역 감소시키는 역효과를 발생시키지 않도록 그 발생원인인 오염균을 제어하고자 한다. 이를 위해 우선적으로 TSB 시험구를 통하여 SD 열처리 조건에 따른 성장변화 및 제균효과의 기초자료를 정립하고 저 하였다.

가. TSB 시험구의 열처리 조건에 따른 성장변화 평가

TSB 시험구의 SD 열처리 조건에 따른 제균효과 평가에 있어 SD처리시 온도변화에 따라 Spray Cylinder 내부의 TSB 시험구 성상을 부착과 탄화현상으로 구분하여 외형변화를 관찰하여 이를 결과치로 하였으며, 이때 +++는 매우심함, ++는 심함, + 초기발생 그리고 -의 경우는 변화없음으로 구분하여 이를 최종결과로 제시하였다.

나. TSB 시험구의 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 평가

13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 온도별 SD처리를 한 시료로 TSB에 녹여 TSA 배지에 50 μ l씩 도말하여 37℃에서 18시간 호기성 조건에서 배양하여 균수를 확인하였다. 균수를 확인한 후 균의 사멸률(%)로 평가하였다.

4. 연구 결과

개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 예상되는 오염균에 대한 제어를 목적으로 TSB 시험구 Spray dry 처리시 최종분말의 성장변화의 결과를 정립하고 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과를 확인 및 정립하여 이를 G-NANA 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과실험에 적용 및 활용하고자 하였다. 이를 해결하기 위해 TSB 시험구의 열처리 조건에 따른 성장변화 평가와 감염 공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 평가 2가지를 진행하였는데 평가결과는 다음과 같다(Table 1~2, Fig 1~2).

가. TSB 시험구의 열처리 조건에 따른 성장변화 평가

TSB 시험구(13% TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합)를 대상으로 온도다양성 조건(180, 170, 160, 150, 140, 130 및 120°C)에서의 SD처리시 Spray cylinder 내부의 부착 및 탄화현상을 비교한 평가결과는 다음과 같다(Table 1). 열처리 조건이 Spray cylinder 내부에 부착 및 탄화현상이 발생하는 온도범위를 살펴보니 열처리 온도 150°C 이상에서부터 타는 현상 초기(+) 발생하기 시작하였고 온도가 상승할수록 더 심해지는 것을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구의 목표는 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 열풍건조 단계에서 예상되는 오염균을 제어하기 위한 SD조건을 사전에 정립하기 위함이므로 우선 온도조건별 성장변화(TSB 시험구 부착 및 탄화현상)에 있어 안전성을 확인하였으므로, G-NANA의 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과실험의 기초 자료로 활용예정이다.

나. TSB 시험구의 감염공시균에 대한 열처리 조건에 따른 제균효과 평가

개발 우유 유래 NANA(이하 G-NANA)의 항헬리코박터 제품 개발 및 헬리코박터 제어 제품은 Spray dry 및 동결건조 제품으로 만들어지게 되는데 제품화 되었을 때 Spray dry 제품에 대한 제균 및 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가가 필요하다. 따라서 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여 SD 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가에 대한 결과는 다음과 같다(Table 2). 13%(w/v) TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml), *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml)을 혼합하여 온도처리 한 Spray dry내에서 *B.cereus*는 120°C 및 130°C에서 사멸률 100%이었고, *E.sakazakii*는 180°C에서 100% 사멸률을 보였다. *B.cereus*는 170°C 및 180°C에서 사멸률이 0%인 것을 확인하였고, *E.sakazakii*는 120°C 및 130°C에서 사멸률이 0%였다. 즉, *B.cereus*는 내열성을 보유하고, *E.sakazakii*는 비내열성 균임을 확인하였다. 결론적으로, 공시균별 내열성 및 비내열성 온도범위를 확인했고, 그람양성균 및 그람음성균 동시사멸 온도조건은 140°C(사멸률 95%이상)이고 그람 양성균 제어온도조건은 120~160°C, 그람 음성균 제어온도조건은 140~180°C임을 확인할 수 있었다. 공시균(그람양성균, 그람음성균)에 대하여 TSB Spray dry 온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가에 대한 기초결과를 통해 공시균(그람양성균, 그람음성균)을 G-NANA에 감염시켰을 때 공시균에 대하여 TSB Spray dry 온도조건에 따른 사멸패턴과 비슷한 결과를 확인할 수 있는지 내열성, 비내열성 온도범위 확인 및 균 제어온도조건을 확인하여 개발 G-NANA의 제품화에 있어 제균조건에 대한 기초결과로 사용할 예정이다.

Table. 1. TSB시험구(13% TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합)의 온도 다양성 조건에서의 Spray dry 처리시 최종분말의 성장변화 비교평가 결과

시험구	열처리 (°C)		ASPIRATO R (%)	PUMP (%)	Q-Flow (m ³ /h)	Nozzle (mm)	성장변화 (열변성#)	결과 (SD조건 정립)	비고
	Inlet	Outlet							
SD-180	180	114	90	9	40	0.7	+	비적합	텍스트린 비함유
SD-170	170	108	90	9	40	0.7	+	비적합	텍스트린 비함유
SD-160	160	102	90	9	40	0.7	+	비적합	텍스트린 비함유
SD-150	150	104	90	9	40	0.7	+	비적합	텍스트린 비함유
SD-140	140	90	90	9	40	0.7	-	적합	텍스트린 비함유
SD-130	130	87	90	9	40	0.7	-	적합	텍스트린 비함유
SD-120	120	82	90	9	40	0.7	-	적합	텍스트린 비함유

성장변화 : +++ (타는 현상 매우 심함), ++ (타는 현상 심함), + (타는 현상 초기발생), - (변화 없음)

: Spray cylinder 내 부착 및 탄화현상 발생여부

Table. 2. 혼합 공시균(그람음성, 그람양성균)에 대하여, SD온도조건에 따른 사멸패턴 및 내열성 평가

혼합공시균		SD온도조건별 사멸패턴 조사(cfu/g)							
		대조 (동결)	180℃	170℃	160℃	150℃	140℃	130℃	120℃
<i>B.cereus</i>	생존 균수	4.0x10 ³	9.6x10 ⁴	7.6x10 ³	5.1x10 ²	5.5x10 ²	90	ND	ND
	사멸률 (%)	0 (기준)	0	0	87.25	86.25	97.75	100	100
<i>E.sakazakii</i>	생존 균수	3.1x10 ⁶	ND	300	140	2.8x10 ³	2.1x10 ⁴	2.0x10 ⁸	7.52x10 ⁸
	사멸률 (%)	0 (기준)	100	99.99	99.99	99.91	99.32	0	0

-ND : Not detect

-SD조건 : 13%(w/v) TSB 용액 멸균처리 후 *E.sakazakii*(1.0x10⁹cfu/ml), *B.cereus*(2.2x10⁷cfu/ml) 혼합

- 온도별 SD처리(8개구) : 대조(동결건조), 180℃, 170℃, 160℃, 150℃, 140℃, 130℃, 120℃

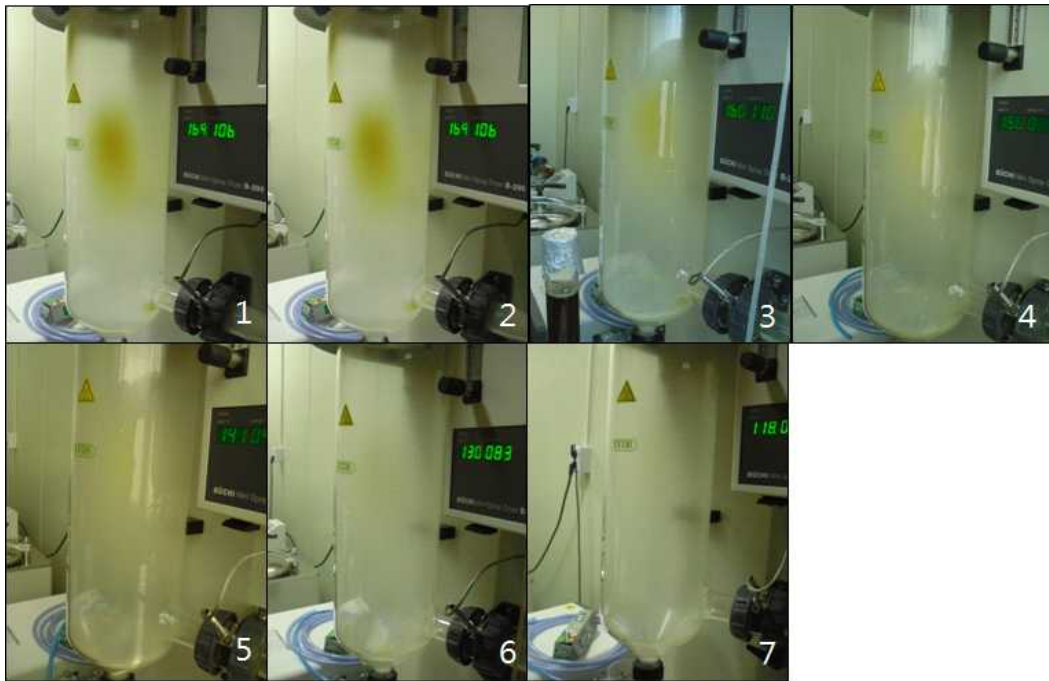


Fig. 1. TSB 시험구(13% TSB 멸균처리액 500ml 내 *E.sakazakii*, *B.cereus* 혼합)의 SD 온도조건별 제균효과 평가

(평가방법 : Spray Dryer내 Cylinder내 부착과 탄화현상)

- 1 : SD열처리 조건(180℃, 시험구 SD-180), 2 : SD열처리 조건(170℃, 시험구 SD-170)
- 3 : SD열처리 조건(160℃, 시험구 SD-160), 4 : SD열처리 조건(150℃, 시험구 SD-150)
- 5 : SD열처리 조건(140℃, 시험구 SD-140), 6 : SD열처리 조건(130℃, (시험구 SD-130)
- 7 : SD열처리 조건(120℃, 시험구 SD-120)

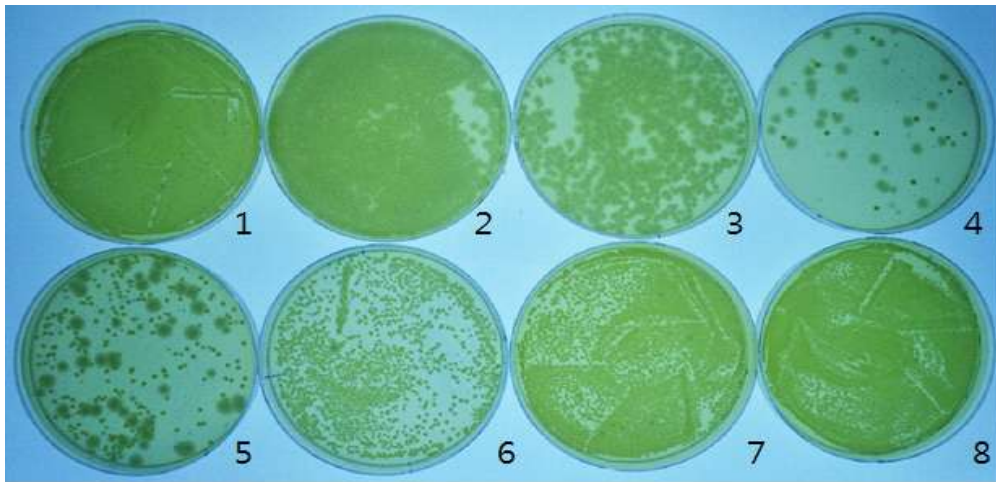


Fig. 2. 혼합 공시균(그람음성, 양성균)에 대하여, SD온도조건별 사멸패턴 및 내열성 평가
 - SD조건 : 13% (w/v) TSB 용액 멸균처리후 *E.sakazakii*(1.0×10^9 cfu/ml)., *B.cereus*(2.2×10^7 cfu/ml) 혼합
 - 온도별 SD처리(8개구) : 대조(동결건조), 180℃, 170℃, 160℃, 150℃, 140℃, 130℃, 120℃

제 1-3 절 제균 온도처리(SD)에 따른 지표 및 기능성분의 물성 및 성상변화 평가

1. 연구목적

본 연구의 연구개발 목표 중 최종은 개발제품인 G-NANA를 개발하고 이를 소재로 하여 항헬리코박터 제품 및 항균(*Helicobacter pylori*) 제어제로 사용함과 동시에 추후 용도·용법 및 응용성을 신규 창출함으로써 다각적인 산업화에 목적이 있다. 개발 G-NANA의 제품화 방향은 반제품으로 사용되는 경우와 최종사용자의 제품에 기능성 및 고부가 창출을 위한 첨가물로 사용하는 경우, 그리고 G-NANA 자체를 완제품으로 하여 신규의 제품화에 활용하는 부분으로 구분할 수 있다. 그러나, 본 과제와 직접적인 관련되는 부분으로서 개발 G-NANA는 목표 항헬리코박터 제품 제품화시는 첨가물로서 활용 그리고 *H.pylori* 제어제로 사용하는 경우는 완제품으로 활용하는 경우 등 다양성을 가지는 적용성 관련 요구에 부딪히는데, 이중 반제품으로 사용되는 경우에는 최종사용자의 목표제품은 제균시스템(열처리 조건)을 경유하여 최종 제품화 되는 단계를 밟게 된다. 이 경우 개발 G-NANA의 기능성분인 NANA가 다종의 열처리 조건에서 안전(정)하리라는 보장이 없기 때문에 실제적으로 개발G-NANA를 제품화 현장에 런칭함에 있어 반드시 관련 연구자는 열처리 등의 물리/이화학적 처리조건에 대한 안전성을 요구한다 할 수 있다. 따라서, 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 현장조건을 수용하는 조건에서 다양한 Spray Dryer시스템내 온도범위에서 개발 G-NANA내 NANA성분의 변화가 유발되는지 혹은 G-NANA의 성상(부착 및 탄화현상 등)이 변화되는지 혹은 생산수율의증감등을 평가할 필요가 제기됨에 따라 실험실적 보유한 Spray Dry시스템을 이용하여 열처리 온도조건을 더 포괄적인 범위에서 상기 조건을 충족하는 최종 열풍건조 조건의 정립을 위하여 본 연구를 실시하였다.

2. 연구수행방법

가. 시료준비

본 연구를 진행 하기 위해 사용한 GMP는 (주)트라이콤무역(한국)에서 구매하여 사용하였으며, G-NANA 제조를 위해 핵심적으로 필요로 하는 효소인 Neuraminidase(역가치 0.5unit)는 (주)생명의나무에서 자체 제조하여 사용하였다. 기질 GMP(이론치 NANA함유량 7%)를 대상으로 효소반응 5시간이 경과시에 반응을 종료하여 제조한 G-NANA는 사전정립된 EtOH(80%)용매분획 표준제조법에 준하여 제조하였는데, 본 실험에서는 이중 효소반응이 종료단계(NANA분리효율 100%)에서 이를 온도 다양성 조건별 SD처리가 기능성분 NANA함유량 변화와 G-NANA의 성상 변화 등에 미치는 영향이 있는지를 평가하기 위한 시료로 사용하였다(Fig 1).

나. 온도다양성에 따른 G-NANA의 Spray Dryer처리조건

온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화 평가의 주요항목으로서는 테스트 시스템인 Spray Dryer기종에 시료를 분말화 공정을 진행시, 현장시스템 중 실린더내 부착현상과 온도에 따른 탄화현상이 유발되는 경우 현장적용성은 어렵다고 할 수 있다.

이를 위하여, 액상상태의 GMP 가수분해물(기질 대비 이론치 NANA함유량 7%)를 대상으로 온도 다양성 조건별 SD처리가 기능성분 NANA함유량 변화와 G-NANA의 성상 변화 등에 미치는 영향이 있는지를 평가를 위하여, 준비된 시료(Stock Solution)를 다시 50ml씩 분취하여 이를 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 및 100℃로 9개 온도처리구에 대하여 설정 온도 하에서 SD를 실시하였다. 대조구로서는 역시 동일 Stock solution에서 50ml를 분취한 후 이를 열처리 전 단계를 분석하여 이를 결과로 하였다.

3. 결과확인

본 연구는 개발 G-NANA를 생산하는 과정 중 최종단계인 현장조건을 수용하는 조건에서 다양한 Spray Dryer 시스템 내 온도범위에서 개발 G-NANA내 NANA성분의 변화가 유발되는지 혹은 G-NANA의 성상(부착 및 탄화현상 등)이 변화되는지 혹은 생산수율의 증감 등을 평가할 필요가 제기됨에 따라 실험실적 보유한 Spray Dry시스템을 이용하여 열처리 온도조건을 더 포괄적인 범위에서 상기 조건을 충족하는 최종 열풍건조 조건의 정립하고 저 하였다.

가. 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화 평가

G-NANA를 제품화함에 있어 기능성분인 NANA의 함량변화가 SD처리시 온도변화에 따라 G-NANA성상을 부착과 탄화현상으로 구분하여 외형변화를 관찰하여 이를 결과치로 하였으며, 이때 +++는 매우심함, ++는 심함, + 초기발생 그리고 -의 경우는 변화없음으로 구분하여 이를 최종결과로 제시하였다.

나. 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 생산수율 변화 평가

GMP로부터 G-NANA 제품화함에 있어 Spray Dry는 G-NANA의 생산수율과 연관되어 온도별 SD처리시 50ml의 같은 양을 분취하여 최종 분말의 양의 무게를 통해 온도별 수율을 비교 및 평가하였다.

다. 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA내 NANA함유량 평가

SD처리가 기능성분 NANA함유량 변화와 G-NANA의 성상 변화 등에 영향을 미치는지는 평가하기 위해 온도별 SD처리를 거친 최종 분말을 HPLC 분석을 통해 G-NANA내 NANA함유량을 온도별로 비교 및 평가하였다.

4. 연구수행결과

Spray Dryer 시스템내 온도범위에서 개발 G-NANA내 NANA성분의 변화가 유발되는지 혹은 G-NANA의 성상(부착 및 탄화현상 등)이 변화되는지 혹은 생산수율의 증감 등을 평가하여 G-NANA 생산시 NANA의 성분 및 성상이 변하지 않는 조건에서 수율을 확보하는 것이 이번 연구의 목적이다. 이를 해결하기 위해 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화와 평가생산수율 변화, G-NANA내 NANA함유량 평가 3가지로 진행하였는데 평가결과는 다음과 같다.

가. 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 성상변화 평가

액상상태의 GMP 가수분해물(기질 대비 이론치 NANA함유량 7%)를 대상으로 온도다양성 조건(180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 및 100℃)에서의 SD처리시 G-NANA을 부착, 탄화현상 및 외형변화의 비교를 평가하여 보았다(Table 1, Fig 2).

결과로서, 열처리 조건이 Spray cylinder 내부에서 부착현상과 탄화현상이 유발되는 온도 범위를 살펴보았더니, 130℃이상에서 내부 부착 및 탄화현상이 초기(+) 발생하였는데 이는 온도가 증가하면 할수록 이들의 현상은 심하게 나타나는 것으로 확인되었다. 이는 G-NANA의 구성물인 단백질과 NANA가 주요 성분임을 고려하면, 단백질 변성을 유발하는 온도범위가 120℃이하 조건에서는 안전성을 보유하는 것으로 확인된 결과였다. 따라서, 본 연구의 목표는 추후 개발 G-NANA의 현장 대량생산에 있어 최종제품을 분말화 하므로써, 장기보관성 및 핵심성분(NANA)보존성을 확보하기 위함과 경제성 있는 분말 제품화 획득 방안을 확보하기 위한 실험실조건을 사전에 정립하기 위함이므로 우선 온도조건별 성상변화(G-NANA의 부착 및 탄화현상)에 있어 안전성을 확인하였으므로, G-NANA의 현장생산과정(OEM)에서 협의관련 기초자료로 귀중하게 활용예정이다.

나. 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA의 생산수율 변화 평가

G-NANA 생산시 Spray Dry는 G-NANA의 생산수율과 연관되어있기 때문에 온도별 SD처리시 같은 양을 분취하여 온도별 최종시료의 수율을 비교해보았다. SD 열처리 온도조건별 전체적인 생산수율을 살펴보았더니, 최초(SD전 G-NANA희석액 내 순수고형분 함유량 대비) 대비 최저 69%에서 최대 약 92%의 생산수율을 보였다. 이중 69% 생산수율을 보였던 SD-100시험구는 SD처리시 온도범위가 100℃로 낮았음에 따라 열풍건조 효율 또한 낮은 것으로 판단되었는데, 110℃ 이상의 온도처리구에서는 약 82% 이상의 생산수율을 보였다. 온도별 SD공정후 생산수율을 살펴보면 다음과 같다. 즉, 온도범위를 140℃로 설정한 시험구 SD-140의 경우 G-NANA가수분해물 대비 최종시료의 무게로 봤을 때 수율이 92.1%로 모든 시험구에서 가장 높게 측정되었다. 시험구 SD-160, -130 및 -100을 제외한 나머지 시험구 -180, -170, -150, -120 및 -110에서도 수율 80%이상으로 비교적 높은 수율이 측정되었는데, 시험구 SD-160, -130 및 -100의 경우는 오히려 수율이 80% 이하로 10~20% 정도차이로 낮아졌는데, 이러한 이유는 당초 분취시료의 SD공정중 공급량의 부족과 시험 간 오차범위로 인한 것으로 판단되었다.

다. 온도다양성 조건에서의 SD처리에 따른 G-NANA내 NANA함유량 평가

효소반응이 종료된 시점에서 GMP 가수분해물을 동량으로 분리후 이를 100~180℃범위 내에서 각각 SD처리후 최종 획득된 분말시료 내 NANA함량 변화를 검정(정립 HPLC분석 시스템)함으로서 열조건에 따른 G-NANA 내 기능성분인 NANA의 함유량의 변화를 비교함으로서 G-NANA의 최종 제품화시 안전성에 영향을 미치는지를 확인하여 보았다(Table 2). 결과로서, 대조로서 기질 GMP 대비 효소반응이 종료된 시점에서 G-NANA내 NANA 함유량은 1,963ppm(기준)의 수치를 보였는데, 이를 기준으로 전체 열처리 조건별 설정시험구의 NANA측정량을 살펴보았더니 최저 1,841ppm에서 최대 1,997ppm의 검출결과를 보였다. 이러한 결과는 SD처리시 열처리 조건을 저온의 경우는 100℃ 그리고 10℃ 단위로 증가시키면서 최대 180℃범위 조건으로 설정한 후 SD처리공정을 진행하더라도 G-NANA 내 핵심성분이 NANA의 구조 및 물성변화에 미치는 영향은 없는 것으로 평가된 결과였다.

따라서, 본 연구의 목표는 추후 개발 G-NANA의 현장 대량생산에 있어 최종제품을 분말화 하므로써, 장기보관성 및 핵심성분보존성을 확보하기 위함과 경제성 있는 분말 제품화 획득 방안을 확보하기 위한 실험실조건을 사전에 정립하기 위함이다. 이는 현장 Spray Dryer시스템의 적용에 있어 관련된 주요한 기초자료를 확보하였다 할 수 있으며, 이는 추후 G-NANA의 대량현장 생산시 기초협의 자료로 활용예정이다.

5. 결론

본 연구의 목표는 추후 개발 G-NANA의 현장 대량생산에 있어 최종제품을 분말화 하므로써, 장기보관성 및 핵심성분보존성을 확보하기 위함과 경제성 있는 분말 제품화 획득 방안을 확보하기 위한 실험실조건을 사전에 정립하였다. 결론으로서, 개발 G-NANA를 SD처리공정을 활용하여 분말제품화하려면 110~120℃의 온도조건이라면 핵심기능성분인 NANA의 성분변화에 미치는 영향이 없으면서 또한 생산수율도 83% 이상으로 나타나 적절하였으며 동시에 G-NANA 현장생산관련 가장 난점인 부착 및 탄화 현상 발생문제를 동시에 해결 할 수 있다는 결과를 본 연구를 통하여 확보하였다. 이는 현장 Spray Dryer시스템의 적용에 있어 관련된 주요한 기초자료를 확보하였다 할 수 있으며, 이는 추후 G-NANA의 대량현장 생산시 기초협의 자료로 활용예정이다.

Table. 1. GMP 가수분해물(기질 대비 이론치 NANA함유량 7%)의 온도다양성 조건에서의 Spray dry처리시 G-NANA 생산수율 및 정상변화 비교평가 결과

시험구	열처리 (°C)		ASPIRATOR (%)	PUMP (%)	Q-Flow (m ³ /h)	Nozzle (mm)	수율 (%)	정상변화 (열변성#)	결과 (SD조건 정립)	비고
	Inlet	Outlet								
SD-180	180	101	90	20	40	0.7	85.9	+	적합	
SD-170	170	96	90	20	40	0.7	82.3	+	적합	
SD-160	160	91	90	20	40	0.7	75.9	+	비적합	
SD-150	150	81	90	20	40	0.7	85.3	+	적합	
SD-140	140	74	90	20	40	0.7	92.1	+	적합	
SD-130	130	71	90	20	40	0.7	75.3	+	비적합	
SD-120	120	63	90	20	40	0.7	83.4	-	적합	
SD-110	110	59	90	20	40	0.7	81.9	-	적합	
SD-100	100	51	90	20	40	0.7	69	-	비적합	

정상변화 : +++ (타는 현상 매우 심함), ++ (타는 현상 심함), + (타는 현상 초기발생), - (변화 없음)

: Spray cylinder 내 부착 및 탄화현상 발생여부

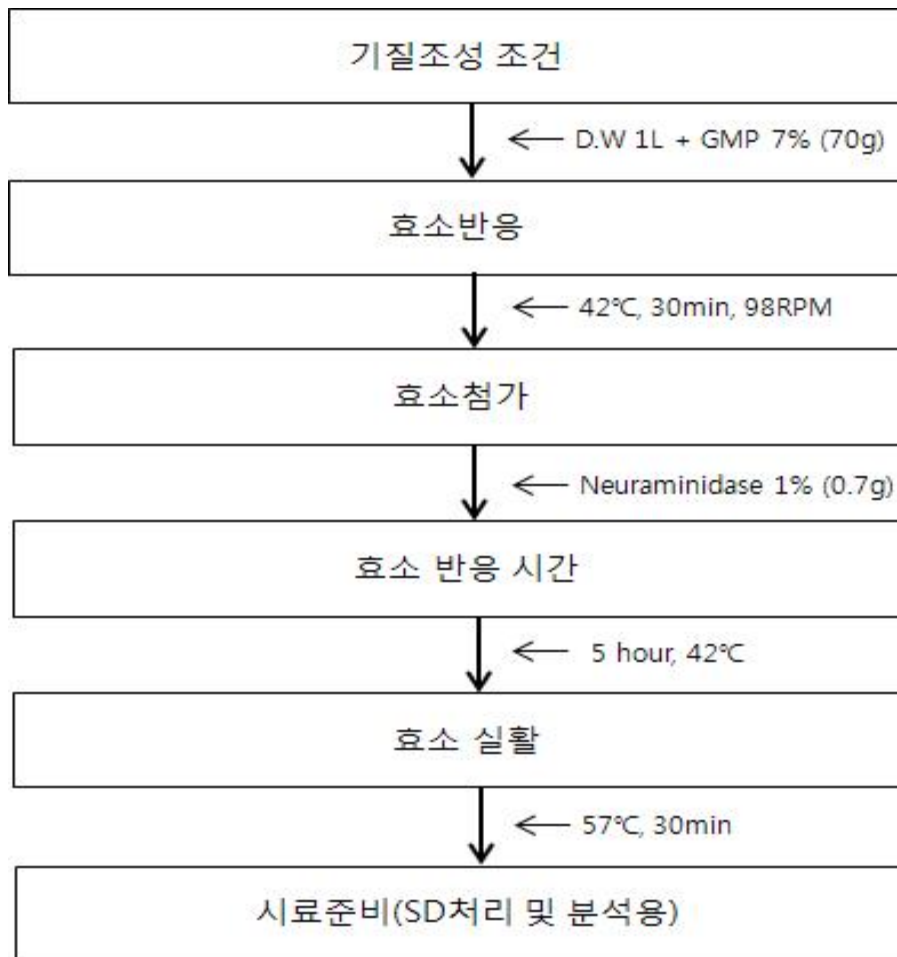


Fig 1. GMP 가수분해조성물을 이용한 온도다양성내에서 SD처리간 NANA함량 및 생산수를 변화 확인을 위한 G-NANA제조공정

GMP : 유청분리 단백질 Glycomacropeptide

Neuraminidase : 가수분해 효소

Table. 2. GMP 가수분해물 온도별 SD처리를 거친 최종 분말의 HPLC 분석을 통한 G-NANA 내 NANA 함유량 평가결과

시험구	G-NANA 내 NANA 함유량(ppm)
CNTL	1,963
SD-180	1,973
SD-170	1,936
SD-160	1,986
SD-150	1,958
SD-140	1,919
SD-130	1,997
SD-120	1,984
SD-110	1,937
SD-100	1,841

CNTL : GMP 가수분해물(5시간 효소반응 완료시료)의 분취시 함유된 NANA양(SD처리 전)
 SD-100~180 : GMP 가수분해물(5시간 효소반응 완료시료)의 50ml 분취 후 100~180℃ 온도조건에서의 Spray dry 과정실시

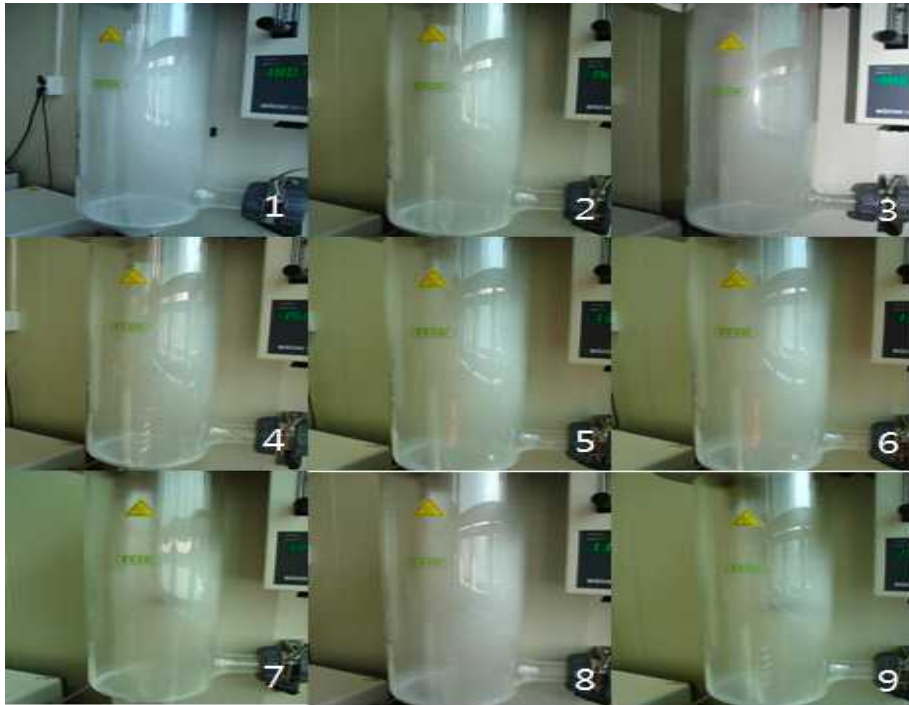


Fig. 2. 개발 G-NANA의 분말제품화 기법 정립을 위한 온도조건별 안전성 평가결과
(평가방법 : Spray Dryer내 Cylinder내 부착과 탄화현상)

- 1 : SD열처리 조건(180℃, 시험구 SD-180), 2 : SD열처리 조건(170℃, 시험구 SD-170)
 3 : SD열처리 조건(160℃, 시험구 SD-160), 4 : SD열처리 조건(150℃, 시험구 SD-150)
 5 : SD열처리 조건(140℃, 시험구 SD-140), 6 : SD열처리 조건(130℃, (시험구 SD-130)
 7 : SD열처리 조건(120℃, 시험구 SD-120), 8 : SD열처리 조건(110℃,(시험구 SD-110)
 9 : SD열처리 조건(100℃, 시험구 SD-100)

제 1-4 절 항헬리코박터 소재 대량생산기법 정립

1. 연구목적

본 연구는 유청유래 분리된 Glycomacropeptide(이하 GMP, 이론 NANA 함유량 6%)로부터 목표 NANA(이하, G-NANA)를 생산함에 있어, 추후 현장 대량생산에서 가장 중요한 항목(생산수율 및 경제성)이라 할 수 있는 정제기법 및 생산효율성을 보다 증대시킬 수 있는 표준 NANA제조법을 정립하기 위해 진행되었다. 선행연구에 의해 표준 NANA 제조법은 pH(5), 기질 GMP 대비 효소처리 농도(1%, 0.5unit) 및 반응시간(5시간)을 결정하였으며, 연계하여 효소 가수 분해물로부터 목표 NANA 정제 및 생산 수율을 위한 전체적인 조건을 확정하였다. 또한, 효소 가수 분해물로부터 NANA를 분리하기 위한 방법으로서 EtOH을 용매로 하여 농도구배별로 처리 시 NANA의 정제효율 및 생산성에 있어서 많은 차이를 보임을 알 수 있었다. 이를 세부적으로 확인함으로서 EtOH농도구배에 따른 정제기법 확립과 생산효율 증대 관련 기초자료를 실험실적으로 정립하고 저 함이 본 연구의 목적이다. 이를 해결하기 위하여, 1 단계로서는 용매인 EtOH 농도구배를 40%에서 90%까지 10% 단위를 기준으로 한 최적 농도범위에서 알아보았으며, 2 단계로서는 1 단계 실험결과에서 설정된 범위 내에서 1%단위로 구분하여 최적 첨가 농도를 평가하고 저 하였다. 이를 해결하기 위한 연구수행방법은 다음과 같다.

2. 연구수행방법

시료준비

가수분해 시 기질 GMP로부터 NANA를 분리한 EtOH 농도구배별 정제 및 생산 효율성 평가를 위한 in vitro 실험 volume은 1L 반응기조건에서 수행하였다. 우선 GMP 70g을 분취한 후 반응기에 투입하였으며 다음으로 증류수를 추가하여 최종 1,000mL 되게 Mess up시켰다. 기질 GMP내 결합되어 있는 목표 NANA의 분리를 위해서 가수분해효소의 사용과 관련한 pH의 조절을 통하여 NANA의 생산효율을 증대시키는 기본 방법을 사용하였다. 이를 위하여 Formic Acid를 적절히 첨가함으로써 pH를 5로 조절하였고, 기질 GMP내 가수분해 효율을 확보하기 위한 사전평가시험 결과를 토대로 설정된 온도인 42℃로 승온시켰다. 다음 단계로서 온도가 42℃로 승온된 기점에서 30분후에 NANA생산을 위한 가수분해 효소 Neuraminidase를 0.7g(기질 대비 1%)을 넣고 5시간동안 효소반응을 진행하였다. 효소반응이 종결된 기점으로 57℃로 승온하고 추가적으로 30분 동안 열처리 공정을 진행함으로써 효소실활 후 이를 평가용 최종시료로 준비하였다.

시험구 조성

광역농도범위 평가(1단계, 40~90%)

시험구는 준비된 GMP 가수분해물 시료를 원료로 하여 EtOH 농도구배(세부농도)에 따른 GMP 가수분해물(G-NANA)내 NANA정제 및 생산 효율성 평가과정을 진행하였다. 이를 위한 비교구로서 효소 반응전(CNTL-GMP)을 기준으로 하였고, 시험구는 5시간 효소

반응물을 기준으로 EtOH을 각각 40%(EtOH-40), 50%(EtOH-50), 60%(EtOH-60), 70%(EtOH-70), 80%(EtOH-80), 그리고 90%(EtOH-90)까지 총 7개 시험구로 설정하였다. 대조구로서는 합성NANA인 S-NANA(순도 99% 이상)를 1,000ppm농도로 조성한 후 이를 HPLC평가시 100%(기준)로 하여 비교구 및 시험구의 NANA검출량과 비교하였다.

세부농도범위(2단계, 70~80%)

본 시험은 광역농도범위에서 설정된 농도범위 기준으로, 이를 다시 세부적으로 평가하였는데, 1%단위로 세부 평가하여 최종 최적 첨가농도를 평가하였다.

분석방법

분석을 위한 시료준비는 GMP로부터 NANA분리 및 농축 등 일련의 제조과정을 거친 시료를 대상으로 EtOH을 농도구배별 처리한 Sample을 각각 원심분리(4,000rpm, 20min, 25℃)후 이를 침전물과 상층액으로 각각 구분하여 분리하였다. 이 중 상층액만을 분취하여 0.20um필터 후 정립된 HPLC 시스템 및 분석법을 적용하여 NANA함유량을 평가하였다. 침전물의 경우는 80% EtOH희석 후 역시 원심분리하여 상층액만을 분취하여 NANA함유량을 비교하였다. 이를 위한 HPLC 분석기종으로는 Aglient사의 HPLC 1260모델을 적용하였고, 분석간 사용컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300×7.8mm, 컬럼온도 : 40℃)을 그리고 Mobile Phase 조성액으로는 10mM H₂ SO₄ 을 제조 활용하였으며, 관련 Flow Rate는 0.5ml/min 조건에서 분석을 실시하였다. G-NANA 제품 내 NANA함유량 분석을 위한 대조시료로서는 S-NANA(Sigma)를 사용하였고, 이를 필요시 적당히 농도를 변화시키면서 비교 측정하였다.

결과확인

본 연구는 유청유래 분리된 GlycoMacroPeptide(이하 GMP)로 부터 목표 순도(25% 이상) 및 생산효율(20% 이상)이 확보될 수 있도록 G-NANA 생산을 위하여 GMP를 기질로 하여 1차 제조된 효소가수 분해물을 원료로 NANA 분리를 EtOH을 용매로 하여 농도구배별로 처리시 NANA의 정제효율 및 생산성에 있어서 많은 차이를 보였음을 사전 확인한 결과를 보다 세부적으로 확인함으로써 EtOH농도구배에 따른 정제기법 확립과 더불어 생산효율 증대 관련 기초자료를 실험실적으로 정립하고 저 하였다(Table 1~2, Fig 1~2).

광역농도범위 평가(1단계, 40~90%)

우선 준비된 GMP 가수분해물을 원료로 하여 EtOH 농도구배(세부농도)에 따른 최적 G-NANA 정제범위 및 시험구별 평가항목은 다음과 같이 설정 및 평가하였다(Table 1).

이를 위한 EtOH농도구배 처리 시험구별 안전성에 미치는 평가항목으로는 분리현상, 용해성, 침전현상 및 벽면 부착성으로 총 4개 항목으로 구분하여 평가하였으며 평가항목 설정 근거는 다음과 같다. 분리현상은 EtOH 농도구배에 따라 G-NANA 가수 분해물 내 NANA와 순수가수물의 최대 분리 능력을 보유한 농도범위설정은 NANA정제와 수율향상과 관련한 주요항목임에 따라 설정하였으며, 용해성은 EtOH 농도구배에 따라 G-NANA 가수 분해물 내 G-NANA의 EtOH로부터 용해도는 중요항목임에 설정하였다. 그리고, 침전현상은

EtOH 농도구배에 따라 EtOH로부터 침전되는 G-NANA 가수 분해물의 침전물과 상등액으로 구분되는데 이중 상등액은 분리된 NANA가 용해되어 있으며 침전물의 경우는 NANA 분리가 완료된 GMP단백질류의 침전물임에 따라 관련 평가는 중요항목임에 따라 설정하였으며, 또 다른 평가항목인 벽면부착성은 EtOH농도구배에 따라 벽면에 흡착되는 G-NANA 가수분해물내 NANA함량의 차이와 추후 대량생산시 현장 반응기내 부착현상을 유발하므로 이에 대한 개선방법을 사전에 확보해야 하는 차원에서 분석항목으로 설정하였다. 관련하여 물리적 성상변화 평가기준으로서, 매우 심한 경우에는 +++, 심한경우는 ++, 보통인 경우는 +, 그리고 변화가 없는 경우에는 -로 표시하여 외관평가 결과를 표시하였다. 상기 평가 결과를 기준으로 GMP가수분해물과 NANA의 분리와 직결되는 침전현상이 높으면서 부착현상(현장 생산문제 발생 사전차단)이 낮고, 용해성(상등액내 NANA 함유량 극대화)이 양호함과 동시에 목표 NANA의 분리효율과 검출효율이 가장 양호한 평가항목을 연계하여 NANA최대 검출량을 보이는 최적 EtOH농도 범위를 설정하였다.

세부농도범위(2단계, 71~80%)

G-NANA의 EtOH농도에 따른 정제 및 생산수율을 비교함으로써 최종 용매 구배에 따른 최적 조건을 정립 및 선별하기 위한 결과 확인은 다음과 같이 진행 하였다. 우선 EtOH 농도구배조건별 G-NANA 가수분해물에 대한 물리적 성상평가와 HPLC 분석을 통해 시험구별 NANA 검출효율을 연계하여 최적결과를 확정하였다, 이를 위한 평가항목으로는 물리적 성상(분리현상, 용해성, 침전현상 및 벽면 부착성)와 연계하였으며 시험구별 NANA검출은 정립된 HPLC분석법을 기준으로 1단계와 동일한 방법으로 평가하였다.

3. 연구수행결과

효소 가수 분해물로부터 NANA를 분리하기 위한 방법으로서 EtOH을 용매로 하여 농도구배별로 처리 시 NANA의 정제효율 및 생산성에 있어서 많은 차이를 보임을 알 수 있었다.

따라서 이를 세부적으로 확인하여 EtOH농도구배에 따른 정제기법 확립과 생산효율 증대 관련 기초자료를 실험실적으로 정립하고 저 함이 본 연구의 목적이다. 이를 해결하기 위하여, 총 2단계로 구분하여 진행하였는데, 그중 1 단계는 EtOH 농도구배를 40%에서 90%까지 10% 단위로 평가하므로서 최적 범위를 설정하였으며, 2 단계에서는 다시 1%단위로 구분하여 최적 첨가농도를 평가하였다. EtOH 농도구배에 따른 단계별 평가결과는 다음과 같다(Table 1).

광역농도범위 평가(1단계, 40~90%)

EtOH농도구배에 따른 GMP 효소가수물(G-NANA)의 총체적 물리적 안전성 평가결과를 육안으로 관찰해보면, 최적 EtOH 처리농도는 70~80% 범위였으며 다음순서로는 80~90%, 60%~70% 그리고 40~60% 범위 순이었다(Table 1). 이를 세부적으로 평가하면, 분리성에 대해서는 EtOH농도 90~80%, 용해성에 대해서는 EtOH농도 90~80%가, 침전성에 대해서는 EtOH농도 90~70%가, 부착성에 대해서는 EtOH농도 80~40%에서 높게 확인되었다. 따라서, 물리적 안전성 평가결과를 최적의 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 분리, 용해성 및 침전효능이 높은 조건을 수용하는 최적범위는 70~80%범위임이 확인 되었다(Table 1).

물리적 안전성 결과를 토대도 또 다른 설정조건인 NANA함유량이 높게 검출되는 결과를 시험구별 확인하여 보았더니 EtOH 농도가 높을수록 NANA의 검출량은 높게 나타났는데 반하여 EtOH농도가 낮은 경우에는 NANA검출량은 낮게 나타났다. 즉, EtOH-90 시험구의 경우는 13.5%로 가장 높게 나타났는데 EtOH-80은 9.19%, EtOH-70과 EtOH-60, EtOH-50 그리고 EtOH-40의 경우는 7.22%, 6.34%, 6.12% 및 6.77%로 나타나 EtOH의 농도가 낮을수록 NANA검출량 역시 감소하는 경향이 보였다(Table 1). 이는 본 시험의 평가조건인 물리적 안전성 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 분리, 용해성 및 침전효능이 높은 조건을 수용하는 최적범위인 70~80%범위와 관련한 최대 NANA검출량을 비교하였을 때 70~80%범위임을 볼 때 전체목표에 합당한 EtOH범위는 70~80%였음이 확인되었다.

세부농도범위(2단계, 71~80%)

1 단계 실험결과를 기준으로 선발된 농도범위인 70~80%를 다시 1%단위씩 세분하여 역시 물리적 안전성(분리성, 부착성, 침전성 및 용해성)과 HPLC 분석과정을 진행을 통해 역시 검출효율과 동일한 결과를 확인하였다(Table 2, Fig 1~2).

2 단계 평가는 1단계와 마찬가지로 EtOH 농도별 처리에 의해 일어난 물성변화를 매우 심한 경우에는 +++, 심한 경우는 ++, 보통인 경우는 +, 그리고 변화가 없는 경우에는 -로 표시하여 결과를 제시하였다. 관련된 NANA함유량 분석결과를 연계하여 EtOH농도구배별 단계별 평가결과는 다음과 같다(Table 2, Fig 1). 즉, EtOH농도별 처리에 대한 물리적 안정성을 세부적으로 평가한 결과, 침전성에 대해서는 EtOH농도 77~80%가, 부유성에 대해서는 EtOH농도 70~74%가, 부착성에 대해서는 EtOH농도 70~75%가, 응고성에 대해서는 EtOH농도 70~77%에서 높게 확인되었으며, 종합적으로는 74%의 농도가 최적 EtOH 처리농도였고, 다음으로 75%와 76% 범위였다(Table 2).

물리적 안전성 결과를 토대도 또 다른 설정조건인 NANA함유량이 높게 검출되는 결과를 시험구별 확인하여 보았더니 1 단계에서와 달리 EtOH의 농도 변화에 따라 NANA함량의 변화가 크게 달라지지 않았음을 알 수 있었다. 즉, EtOH-76 시험구의 경우는 6.9%로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로는 EtOH-74가 6.2%, EtOH-80과 EtOH-79, EtOH-78, EtOH-77, EtOH-75, EtOH-73, EtOH-72, EtOH-71 그리고 EtOH-70의 경우는 각각 6.0%, 5.9%, 5.8%, 6.1%, 6.0%, 5.9%, 6.1%, 5.7% 그리고 5.8%로 확인되었다. 이는 본 시험의 평가조건인 물리적 안전성 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 침전, 부유, 부착 그리고 응고조건을 수용하는 최적범위인 74~76%범위와 관련한 최대 NANA검출량이 74~76%범위임을 볼 때 전체목표에 합당한 EtOH범위는 74~76%였음이 확인되었다. 결론적으로, 물리적 안전성과 HPLC 분석결과를 NANA함유량이 높은 조건을 동시에 수용하는 EtOH의 농도는 74%임을 확인하였다.

4 종합결론

최종 결론으로서, G-NANA의 대량생산 목적으로는 EtOH이 적은 양을 사용함(경제성 확보)과 동시에 생산간 물리적 안전성(침전, 부착, 부유 및 응고성)과 더불어 목표 NANA의 분리효율이 가장 높은 74%농도의 EtOH를 첨가하는 조건에서 G-NANA의 표준생산법을 적용 예정이다. 따라서, 본 연구에 의해 GMP로부터 G-NANA를 단리할 때에는 EtOH의 농도를 74~80% 범위에서 처리하는 것이 가장 적절함을 확인하였다.

Table 1 . GMP로부터 효소(Neuraminidase) 처리후 분리된 NANA의 EtOH 농도구배별 분리효율 증대성 평가(HPLC, 육안 분석)

시험구	시험조성내역		EtOH농도구배별 안전성 평가결과				NANA 검출량 (%)
	GMP가수분해물 (열풍건조시료)	EtOH농도구배 (시료: EtOH)	분리	용해성	침전	부착	
CNTL-GMP	GMP 0.10g	10 : 0	+++	++	+++	+	ND
CNTL-NANA	S-NANA 0.11g	0 : 10	+++	-	+++	-	100
EtOH-90	G-NANA 0.100g	1 : 9	+++	++	+++	++	13.5
EtOH-80	G-NANA 0.105g	2 : 8	++	++	+++	+	9.19
EtOH-70	G-NANA 0.105g	3 : 7	+	-	+++	-	7.22
EtOH-60	G-NANA 0.104g	4 : 6	-	-	++	-	6.34
EtOH-50	G-NANA 0.100g	5 : 5	-	-	+	-	6.12
EtOH-40	G-NANA 0.102g	6 : 4	-	-	+	-	6.77

- EtOH 40~90 : 3rd ddH₂O 대비 EtOH 첨가농도 비율
- GMP : 유청분리 유단백질 Glycomacropeptide (이론치 NANA 함유량 : 6%)
- NANA : Sialic acid
- 분석결과 유의성 : 6% NANA 함유량 측정결과±10%

Table 2. GMP로부터 효소처리후 분리된 NANA의 EtOH 농도구배별 분리효율 증대성 평가 (HPLC, 육안 분석)

시험구	시험조성내역 EtOH농도구배 (시료 : EtOH)	EtOH농도구배별 안전성 평가결과				NANA 검출효율 (%)	분리효율 (%)	비고
		침전	부유	부착	응고			
EtOH- 100	0 : 100							NANA 불포함
EtOH - 80	20 : 80	+++	+++	+++	++	6.0	99.3	
EtOH - 79	21 : 79	+++	+++	++	++	5.9	98.2	
EtOH - 78	22 : 78	++	+++	++	+	5.8	96.8	
EtOH - 77	23 : 77	++	+++	++	-	6.1	101.1	
EtOH - 76	24 : 76	+	++	++	-	6.9	115.5	표준 NANA 제 조법 적용 최적 농도설정
EtOH - 75	25 : 75	+	++	+	-	6.0	99.7	
EtOH - 74	26 : 74	-	+	+	-	6.2	104.1	
EtOH - 73	27 : 73	-	+	-	-	5.9	99.0	
EtOH - 72	28 : 72	-	+	-	-	6.1	102.2	
EtOH - 71	29 : 71	-	-	-	-	5.7	96.0	
EtOH - 70	30 : 70	-	-	-	-	5.8	96.2	

- EtOH 70~100 : 3rd ddH₂O 대비 EtOH 첨가농도 비율
- GMP : 유청분리 유단백질 Glycomacropeptide (NANA 함유량 : 6%)
- NANA : Sialic acid
- 분석결과 유의성 : 6% NANA 함유량 측정결과±10%

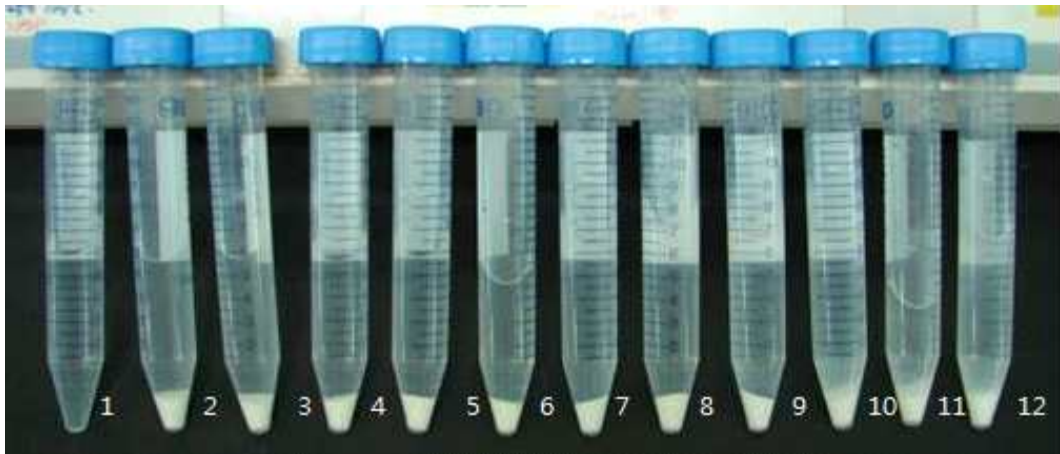


Fig. 1 . EtOH농도구배별 G-NANA의 물리적 안정성 평가(원심분리 후)

1 : EtOH 100%, 2 : EtOH 70% (DW 30%), 3 : EtOH 71% (DW 29%), 4 : EtOH 72% (DW 28%), 5 : EtOH 73% (DW 27%). 6 : EtOH 74% (DW 26%). 7 : EtOH 75% (DW 25%), 8 : EtOH 76% (DW 24%). 9 : EtOH 77% (DW 23%). 10 : EtOH 78% (DW 22%), 11 : EtOH 79% (DW 21%), 12 : EtOH 80% (DW 20%)., 원심분리조건 : 4,000rpm, 20분, 25℃, 1회

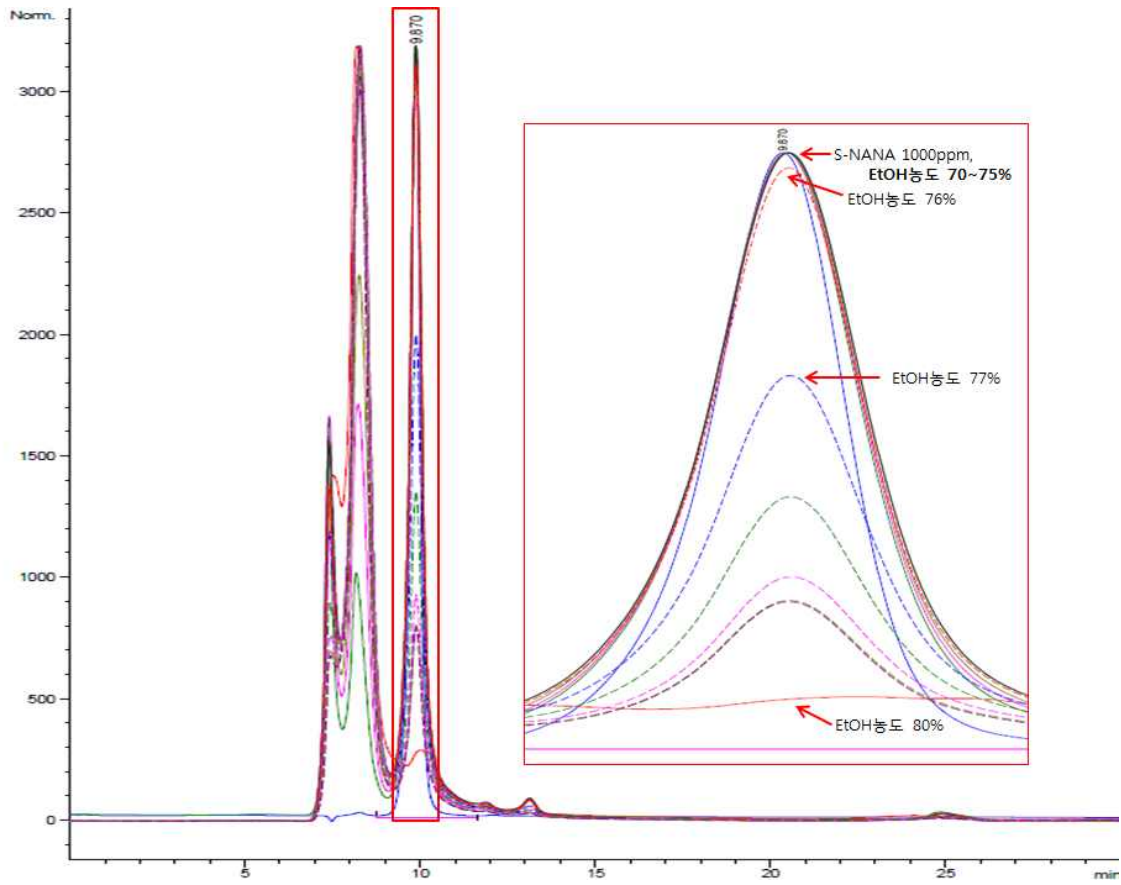


Fig 2. EtOH 농도구배별 NANA함량 HPLC 분석

제 1-4 절 항헬리코박터 제제(원료) 표준제조법 정립 (용매 농도구배법에 의한 표준제조법 정립)

1. 연구목적

전체 연구과제의 목표(면역 증강형 항헬리코박터 제제 및 헬리코박터균 제어 제제 개발) 대비 성과를 성공적으로 완료하기 위하여, 유청 유래 분리 단백질 (GMP; Glycomacropeptide)을 기질로하여 효소분해 공정을 거쳐 G-NANA를 생산하는데에 있어, 단백질과 분리 NANA가 공존하고 있는데 이를 시료로 하여 G-NANA의 생산수율과 NANA의 순도 조절을 위한 최적의 표준제조법이 필요하다. 본 연구에서는 GMP로부터 G-NANA를 생산함에 있어 생산수율과 NANA함량이 높은 순도증강법을 확보함과 동시에 불필요 공정제거 또는 개선을 통해 효율적인 G-NANA 생산 시스템관련 표준제조법을 정립하고 저 하였다. 본 연구를 진행 전, GMP 대비 반응 후 GMP 가수분해물을 원료로 단계 별 EtOH농도를 40~90%범위에서 물리적 안전성 조건인 부착효과가 낮은 조건에서 침전, 부유, 부착 그리고 응고조건을 수용하는 최적범위인 74~76%범위에서 최대 NANA 검출량이 74~76%범위임을 볼 때 전체목표에 합당한 EtOH범위는 74~76%였다. 따라서, 본 연구에서는 이를 기초로 EtOH 농도구배를 74%, 75% 및 80%로 차이를 두고 G-NANA 생산수율과 G-NANA내 NANA 함유량이 높은 최종 표준제조법을 선별하기 위하여 이중 최적 표준제조법을 정립하고 저 하였다. 이를 해결하기 위한 연구수행방법은 다음과 같다.

2. 연구수행방법

재료준비

본 연구를 진행하기 위해 사용한 GMP는 (주)트라이콤무역(한국)에서 구매하여 사용하였으며, G-NANA 제조를 위해 핵심적으로 필요로 하는 효소인 Neuraminidase(역가치 0.5unit)는 (주)생명의나무에서 자체 제조하여 사용하였다. pH조절을 위한 formic acid(Kanto, Japan)는 구입하여 사용하였고, 기질 용해용 정제수는 2차 증류수를 제조하여 사용하였다. 그리고 GMP가수분해물내 목표 핵심 지표성분인 NANA분리를 위한 용매로서 사용한 EtOH은 Fisher사의 HPLC급을 구입하여 시험 간 사용하였다.

고순도 및 고수율 G-NANA 표준제조법 정립

기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가(산성배지(pH 5)조건 기준 G-NANA제조법 평가)

GMP로부터 G-NANA의 생산성을 증가시키기 위해 용매인 EtOH 농도조절을 통한 제조법 정립을 위하여 총 6단계 과정으로 수행하였다(Fig 1).

1 단계로서, GMP 70g을 분취하여 여기에 1차 정제수를 1Kg 되게 mass-up하였으며, 기질 GMP를 용해시키고 Formic Acid를 첨가하면서 pH를 5로 조절하였다.

2 단계로, 온도를 42℃까지 승온 시킨 후 효소(Neuramidase)를 기질대비 1%인 0.7g을

넣고 효소반응을 5시간 진행하였다.

3 단계로는, 2단계 반응종결후 30분간 57℃에서 실활 시키고 20분간 Centrifuge(4000RPM, 20min, 25℃)를 통해 침전물(G-NANA와 불용성 단백질)과 상등액(목표 G-NANA)으로 각각 분리하였으며, 이중 상등액 분리물은 별도로 보관하였다. 이중 침전물에 대하여는 당초 투입된 기질인 GMP 대비 분획수율을 확인을 위하여 건조과정을 실시하였다.

4 단계는, 2 단계에서 분리된 침전물만을 반응기에 투입하고 80% EtOH 희석액을 반응물 대비 3~4배수가 되도록 첨가한 후 교반과정을 통하여 잔류하고 있는 NANA를 원심분리 과정을 통하여 세척분리 하였다.

5 단계는, 3단계 및 4단계에서 분리된 각각의 상등액을 혼합한 후, 농축과정을 통하여 25% (Brix 기준)까지의 농축과 동시에 분리용매인 EtOH제거를 진행하였다.

6 단계는, 5단계 반응후 동결과정을 수행함으로써 최종 G-NANA제조를 완료하였다.

기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가(중성배지(pH 6.8)조건 기준 G-NANA제조법 평가)

GMP로부터 G-NANA의 생산성을 증가시키기 위해 pH를 산성 및 중성조건으로 차이를 두고 역시 동일한 G-NANA 제조법(EtOH 농도구배 80% 적용)을 적용하되, 본 실험에서는 pH를 6~7범위로 기질용액을 제조 후 최종 G-NANA의 생산수율과 역시 NANA함량을 연계하여 산성조건과의 차이를 확인하였다(Fig 1). 즉, 1 단계로서, D.W 1L에 GMP 70g을 첨가 후 이를 용해시키고 이어서 pH를 6.8로 정밀하게 조절하였으며, 나머지 공정은 “① 산성배지(pH 5)조건 기준 G-NANA제조법 평가” 방법과 동일하게 진행하였다.

GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가

G-NANA 표준제조 시험법 1 (EtOH-80)

“가) ① 산성배지(pH 5)조건 기준 G-NANA제조법 ” 과 동일하게 실시하였다.

G-NANA 표준제조 시험법 2 (EtOH-75)

시험구 EtOH-75는 EtOH-80에서와 동일한 방법으로 진행하였지만, 다만 효소반응 후 제조된 GMP가수분해물 원료 대비 EtOH 사용량을 75%로 대체하는 이외의 공정은 동일하게 처리하였다.

G-NANA 표준제조 시험법 3 (EtOH-74)

시험구 EtOH-74는 표준제조법 관련 EtOH-80 및 EtOH-75와 역시 동일한 방법으로 진행하였지만, 다만 효소반응 후 제조된 GMP가수분해물 원료 대비 EtOH 사용량을 74%로 대체하는 이외의 공정은 역시 동일하게 처리하였다.

G-NANA내 NANA 함유량 분석(HPLC 분석)

분석을 위해 사용한 기기는 HPLC (high performance liquid chromatography)로 사용

한 컬럼은 BIO RAD(US)사의 HPLC Organic Acid Analysis Column(300x7.8mm, 컬럼 온도:40℃)을 사용하였으며, Mobile Phase 조성액으로서는 10mM H₂SO₄을 제조 활용하였다. 생산된 표준제조법별 G-NANA 생산단계별 분취 및 건조시료(침전물, 상등액)별 NANA함유량 분석을 위한 대조시료로 합성 NANA(sigma)를 사용하였다.

분석시료 준비

표준제조법별 채취된 시료들에 대하여 NANA함유량 검정을 위한 분석시료제조는 표준제조법별 효소반응 시작 전 및 효소반응 시작 후 시간별 일정시료를 채취하여 NANA함유량의 생성패턴과 최종 제조완료 후 침전물과 상등액을 각각 분리한 후 이들을 각각 동결건조한 뒤 생산수율을 확인하였다. 이들의 결과를 연계하여 표준제조법별 G-NANA의 최대 생산효율을 방법을 선별함과 동시에 목표 기능성분인 NANA함유량이 최대로 나타나는 제조법을 최종 표준제조법으로 선별하였다.

기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가

기질배지 pH조절에 따른 G-NANA 순도 및 함유량을 비교하기 위해 G-NANA 제조시 효소 반응 시작 전 및 효소반응 후의 시간별로 시료를 채취하였고 평가항목은 다음과 같이 설정 및 평가하였다. 효소 반응시 G-NANA의 시간별 분리율을 기준으로 순도 및 함유량을 평가하였으며 평가항목은 기질배지 온도를 42℃까지 승온 후 효소(Neuraminidase)를 넣기 전인 0Hour, 효소 투입 후 1시간 경과 후인 1Hour, 2시간 경과 후인 2Hour, 3시간 경과 후인 3Hour, 4시간 경과 후인 4Hour, 5시간 경과 후인 5Hour과 효소의 반응을 중단시키기 위해 기질배지 온도를 30분간 57℃까지 승온 시킨 실험 총 7개 실험군을 비교하였다(Table 1).

GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가

GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA 순도 및 함유량 비교를 위해 평가항목은 준비된 표준제조법을 거친 G-NANA 최종시료의 양을 통해 생산 수율과 HPLC 분석을 통해 최종시료 내 G-NANA의 순도로 2개의 항목으로 평가하였다.

그리고, EtOH-74와 EtOH-75의 경우는 표준제조법 중 불용성 단백질의 세척과정이 다르게 되었음을 확인하기 위하여 세척이 끝난 1차 침전물을 한번 더 세척한 세척액과, 이미 2번의 세척을 거친 2차 침전물을 한번 더 세척한 세척액을 HPLC로서 추가로 평가하였다(Fig. 2).

3. 연구수행결과

GMP로부터 G-NANA 생산시 기질배지의 pH차이와 G-NANA의 순도를 높이기 위한 방법으로 EtOH을 용매구배에 따라 처리 시 최종 G-NANA 시료의 수율 및 순도에 많이 차이를 보임을 알 수 있었다. 이에 따라 표준제조법에서의 PH, 용매구배에 따른 차이를 비교하여 표준제조법의 정립과 생산효율 증대를 가져오는 것이 본 연구의 목적이다. 이를 해결하기 위해 기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가와 GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가로 실험을 진행하였는데 평가결과는 다음과 같다.

기질배지 pH조절에 따른 G-NANA제조법 평가

GMP(이론치 NANA 함유량 7%)기질 배지를 조성 후 pH의 차이(pH 5 및 6.8)를 부여한 기질조건 대비 최종 효소반응 시간경과별 및 종료시점에서 시험구별 NANA 분리율을 비교해 보았다(Table 1). 효소첨가 후 1시간이 경과하는 산성배지 조건에서는 기질내 이론치 NANA 함유량(7%) 대비 61.4%였는데 이때 중성조건에서는 65.7%로 중성배지 조건에서 약 4.3%정도의 분리효율이 높은 것으로 나타났으며, 전체 시험구에서 동일하게 효소반응 시간이 경과하면 할수록 역시 NANA분리효율역시 증가하는 패턴을 보였다. 시험구별 반응 최적시간을 비교하여 보았더니 산성조건에서 3시간이 경과하면 분리율은 100% 도달하였지만 중성조건에서는 약 87%로 낮은 경향을 보였으며, 최종 반응시간이 종료되는 5시간이 경과시 두 시험구 모두 NANA분리율이 100%에 도달하는 경향을 보였다. 이러한 이유는 GMP용해액을 조성 후 pH를 산성조건으로 조절시, GMP에서 NANA가 분리된 GMP단백질이 불용성으로 전환되면서 침전되는데 이로 인하여 효소의 반응이 중성조건보다는 더 활성을 보이는 이유로 판단되었다. 그러나, 전체 연구과제의 목표가 NANA함유량이 높으면서 생산효율이 높은 G-NANA 제조법을 정립한 결과를 기초로 추후 연구진행내역으로서 NANA의 고순도 정제법 개발연구(Column 및 한외여과법 동시적용 연구)를 진행예정임에 따라 산성조건에서 진행되는 제조법을 선발하는 것이 타당하다고 판단되었다(Table 1).

GMP가수분해물 대비 용매구배에 따른 G-NANA제조법 평가

기질 GMP를 대상으로 효소(Neuraminidase) 반응종료 후 제조된 가수분해물을 대상으로 EtOH의 농도차이(EtOH 74%, 75% 및 80%)에 따른 G-NANA의 생산효율과 고함량 NANA 생산과 관련한 최적 제조법을 선발하기 위한 평가를 실시하여 보았다. EtOH의 농도차이에 따른 GMP 가수물 내 G-NANA생산효율과 관련한 NANA함유량(분리효율) 검정 결과는 다음과 같다(Table 2, Fig 2). 우선 시험구 EtOH 74%로 처리하는 시험구 EtOH-74의 경우를 살펴보았더니, GMP 1kg 대비 G-NANA 생산량이 450g으로 G-NANA 생산수율은 45%로 나타났는데 선행예비 제조법과 비교시 9.9%가 상승했지만 핵심성분인 NANA의 순도는 16.8%로 나타나 기존 순도 25.2%보다 8.4%나 떨어지는 결과를 보였다. 또한, EtOH-74와 동일 제조방법으로 제조하되 EtOH 사용량만을 75%와 80%를 변형하여 사용하였던 시험구 EtOH-75와 EtOH-80에서는 생산수율은 16.2%, 20%로 기존 실험결과보다 6~10% 상승하였고, NANA 순도역시 29.6%, 29.5%로 4%정도 상승하는 결과를 보였는데, 시험구 모두 기존 실험결과보다 높은결과가 나왔지만 실험군 EtOH-80의 생산수율이 EtOH-75의 수율보다 4%정도 높은 결과가 나왔다. 따라서, 본 연구를 통하여 G-NANA의 생산을 위한 표준제조법으로서는 EtOH-80 시험구의 제조법을 최종 표준제조법으로 확정하였다. 선정된 G-NANA 표준 정립법(EtOH-80)은 전체 연구과제의 목표가 NANA의 순도가 높으면서 생산효율이 높은 G-NANA 제조법을 정립한 결과를 기초로 추후 연구진행내역인 NANA의 고순도 정제법 개발연구를 진행예정임에 따라 G-NANA 제조시 용매처리 농도는 EtOH 80%가 타당하다고 판단되었다(Table 2).

Table. 1. 표준제조법 정립을 위한 pH조건차이(산성배지, 중성배지)를 부여한 기질용액 조건에서 효소반응 시간 경과에 따른 NANA(이론치 함유량 7%) 분리효율 비교평가결과

시험구별 효소반응시간	산성배지 (pH5)		중성배지 (pH6.8)	
	NANA함량 (ppm)	NANA분리율 (%)	NANA함량 (ppm)	NANA분리율 (%)
S NANA(1000ppm)	1,000	100	1,000	100
0 Hour	ND	ND	ND	ND
1 Hour	43,896	73.2	46,087	76.8
2 Hour	61,703	102	57,775	96.3
3 Hour	74,491	124	61,205	102
4 Hour	80,003	133	64,511	107
5 Hour	77,162	128	67,140	111
실활처리	77,797	129	69,629	116

- S NANA :표준체 NANA (1,000ppm)
- 0~5 Hour : 효소(Neuraminidase) 투입 후 반응시간

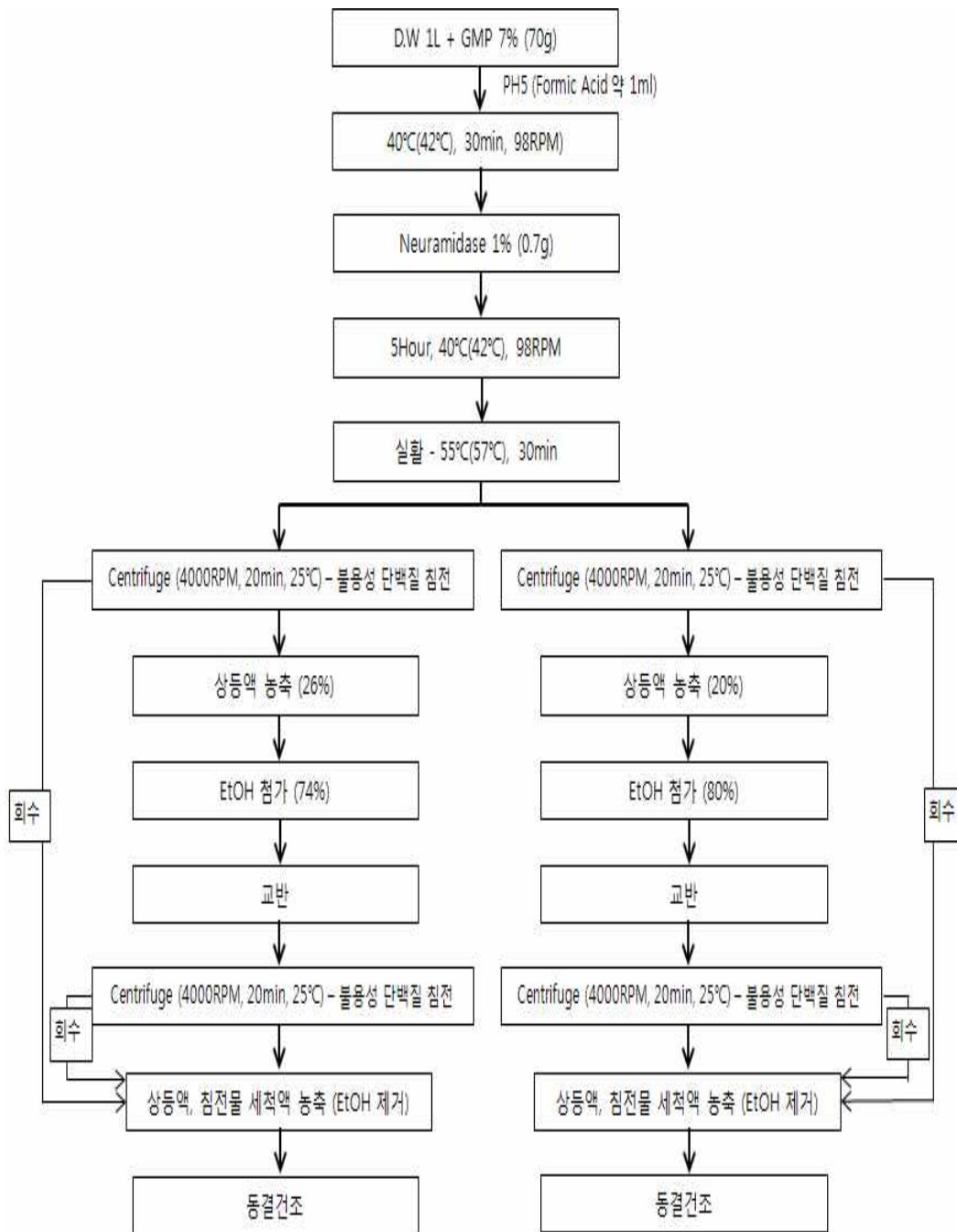


Fig. 1. 개발 G-NANA의 수율과 순도의 증가를 위한 용매 농도 구배별 (EtOH 처리량 74%, 80%) 표준제조법 정립

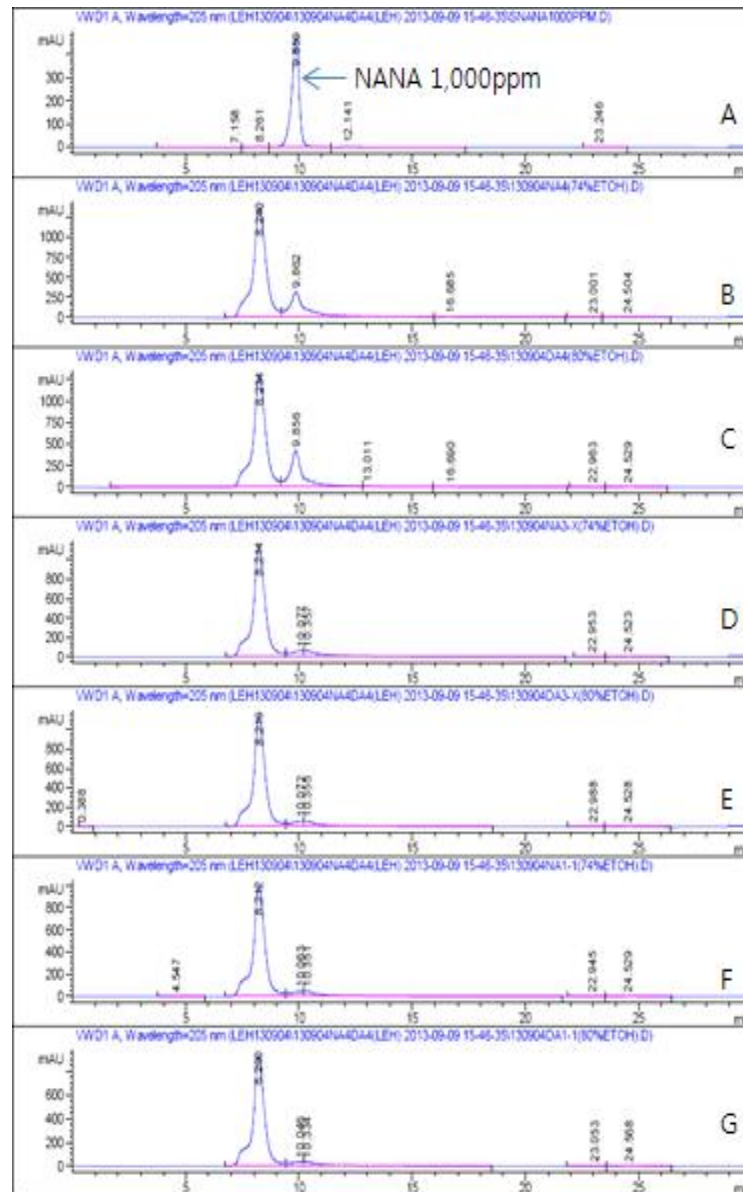


Fig. 2. 기질 GMP를 대상으로 효소(Neuraminidase) 반응종료(pH 5, 반응시간: 5시간, 반응온도 : 42°C)후 상등액(B, C)와 침전물 세척액(D~G)내 NANA함유량 분석을 통한 G-NANA 표준제조법 정립성 평가

- A : 표준채 NANA 1,000ppm
- B : 표준제조법 최종 동결건조 분말 (EtOH-74)
- C : 표준제조법 최종 동결건조 분말 (EtOH-80)
- D : 세척후 EtOH 침전물 (불용성 단백질, EtOH-74)
- E : 세척후 EtOH 침전물 (불용성 단백질, EtOH-80)
- F : 세척후 침전물 (불용성 단백질, EtOH-74)
- G : 세척후 침전물 (불용성 단백질, EtOH-80)

Table. 2. 기질 GMP를 대상으로 효소(Neuraminidase) 반응종료 후 제조된 가수분해물을 대상으로 EtOH의 농도차이(EtOH 74%, 75% 및 80%)에 따른 G-NANA의 생산효율과 NANA 함유량 비교평가결과

	GMP 1kg 대비 생산량		G-NANA내 NANA함유량 (%)
	G-NANA생산량 (g)	생산수율(%)	
기존실험 (선행제조)	99	10	25.1
EtOH-74	450	45	16.8
EtOH-75	160	16	29.6
EtOH-80	200	20	29.5

제 2 절 유청가수분해단백분말시료(지표 및 기능성분 : Sialic acid) 표준분석법 정립연구 (Validation)

1. 연구목적

Glycomacropeptide(GMP)는 안전식품인 우유를 원료로 치즈를 제조하고 남은 부산물인 유청단백질에서 분리 및 분말화 과정을 거쳐 생산 및 국내외적으로 식품 및 식품첨가물로 판매되고 있다. GMP는 우유 속 단백질의 일종인 κ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 의미하며, 생산 방법에 따라 당과 인의 함량에 상당한 차이를 가진다고 한다(Yoon *et al.*, 2000). GMP는 *Vibrio cholera*와 *Escherichia coli*의 enterotoxins과 부착하는 능력을 가지고 있고, *Bifidobacterium*의 성장을 촉진하며, 박테리아와 바이러스의 장기와의 접촉을 억제하는 효능을 가지고 있다(Brody, 2000). 또한 chymosin에 의하여 κ -casein의 phenylalanine-methionine peptide bond가 절단되면 친수성의 GMP가 유리되는데, N-acetylneuraminic acid (sialic acid), galactose(gal), N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있는데, 이때 말단에 위치한 sialic acid를 자르는 효소를 neuraminidase라고 한다(Fig. 1). Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다(Moon *et al.*, 2005; Wang and Brand-Miller, 2003). Sialic acid는 우리 몸 속의 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고(Wang and Brand-Miller, 2003; Wang and Springer-Verlag, 1984; Wang *et al.*, 2001), 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang *et al.*, 2001; Wang, 2009; Wang *et al.*, 2007). 이 밖에도 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거에 역할을 한다고 알려져 있어 현재 기능성 식품으로 연구되어지고 있다(Gorog and Kovacs, 1978; Iijima *et al.*, 2004). Sialic acid는 현재 대부분 재조합 *E. coli*에서 합성되거나, *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로 부터 합성되며, 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다(Ishikawa and Koizumi, 2010; Zimmermann *et al.*, 2007). Sialic acid는 대부분 의약품 소재로 활용되고 있으며, 유청 단백질에서 분리한 sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. 본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질의 일종인 GMP 내 결합되어 있는 sialic acid를 식품으로서 활용성을 높이기 위하여, 효소분리 과정을 거쳐 시험물질인 7%-GNANA를 제조하였다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며, 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다고 할지라도 소재에 대한 기준규격 설정 및 안전성 자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 특히 Sialic acid를 효소분리 시켜 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나, 식품공전이나 기능성 식품공전에 등록을 위해서는 지표 및 기능성분의 기준규격 설정 자료가 필수적이다.

따라서, 본 연구에서는, 유청 단백질류중 GMP단백질을 기질로 하여, GMP내 결합되어 있는 Sialic acid 를 효소적용 방법으로 분리공정 및 건조공정을 거쳐 제조한 시험물질인 유청

가수분해단백분말을 시험의뢰기관으로부터 공여 받아 기준규격설정 (표준 분석법)을 위한 Validation평가를 “생체시료분석법 밸리데이션 가이드라인 (식품의약품안전처 의약품안전국 의약품정책과, 2013년 12월)”에 준하여 실시하였다.

2. 연구수행방법(분석법 Validation 방법)

시험재료 준비

분석법 Validation을 위한 시험재료는 다음과 같다.

시험시료 준비

Whey Protein에서 분리한 Glycomacropeptide(이하 GMP)는 Sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPepGMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 제조한 유청가수분해단백분말을 시험의뢰기관으로부터 공여 받아 시험간 사용하였다. 시험시료 정보는 7% Sialic acid와 GMP단백질이 90% 그리고 수분이 3%로 구성된 물성을 보유하고 있었다.

분석기기 및 기구

분석법 Validation을 위한 분석기기는 HPLC 1200 Infinity (Agilent technologies, U.S.A.)를 사용하였다. 분석간 필요한 물은 Ultra pure water system (Milli-Q Gradient, MILLIPORE, France)의 3차 정제수를 사용하였다. 분석간 사용된 Micro pipette은 Thermo fisher Scientific (U.S.A.)의 Finnpiquette Novus10(1~10 μ L), Finnpiquette Novus 50 (5~50 μ L), Finnpiquette Novus 300 (30~300 μ L) 그리고 Finnpiquette Novus 1000 (100~1000 μ L)를 전체시험간 사용하였다. 시료별 정밀측정을 위한 Chemical balance (Mettler toledo, U.S.A.)와 용해 및 희석을 위해서는 Stirrer (Scientific Industries, U.S.A), 그리고 원심분리를 위해서 Centrifuge (Thermo Scientific, U.S.A)를 시험간 사용하였다.

시약 및 공시료

분석법 Validation을 위해서 시료의 희석을 위한 3차 증류수와 시험시료내 단백질 및 지방 침전분리를 위한 80% 에탄올 그리고 지표 및 기능 성분 분석시 이동상으로서 10mM H₂SO₄을 시약 및 공시료로 사용하였다.

이동상의 조제(10mM H₂SO₄)

1L 부피 플라스크를 이용하여 황산 (MW : 98.07) 약 0.98g 칭량한 후 10분간 초음파 하여 나머지를 초순수 물로 채운 후 이동상으로 조제하여 사용하였다.

표준원액의 조제

유청가수분해단백분말 표준품을 100mg이 되도록 정확히 무게를 측정한 후 이를 80% 에탄올 100mL에 용해 시킨 후 100mL 부피 플라스크에 넣어 채웠다. 이 액을 30분간(25℃) 초음파 처리 과정을 실시한 후에 실린지 필터로 여과한 액을 표준원액으로 사용하였는데, 예비 평가를 통하여 Sialic acid의 함량은 1000ppm이 되도록 조제하였다.

표준용액의 조제

Sialic acid 표준원액 1000ug/mL을 80% 에탄올을 사용하여 1, 5, 10, 25, 50 그리고 100 ug/mL 의 농도구배 차이를 부여하여 제조 후 분석간 사용하였다 (Table 1).

검량선 용액의 조제

유청가수분해단백분말 1g 무게를 정확히 측정하여 첨가한 후 표준용액의 제조와 같이 동일하게 사용하여 검량선 용액으로 사용하였다. 최종농도가 1, 5, 10, 25, 50 그리고 100 ug/mL 이 되도록 조제한 후 검량선 용액으로 사용하였다.

분석조건

유청가수분해단백분말 시료 분석을 위해 Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC 기기를 이용하여 분석조건을 UV 파장 210nm로 설정하였고, 컬럼은 Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column (300 x 7.8mm, 9um Bio-Rad)을 사용하였고, 컬럼온도는 40℃로 설정하였다. 이동상은 10mM H₂SO₄로 Isocratic 분석법을 이용하여 분석시간 20분동안 일정한 유속 0.5mL/min으로 시료를 20 μL 주입하도록 분석조건을 설정하여 유청가수분해단백분말 시료를 분석하였다 (Table 2).

분석법 validation 항목

시료 유청가수분해단백분말 내 함유된 지표 및 기능성분인 sialic acid의 기준규격 설정을 위한 분석법 validation 평가항목은 다음과 같다.

특이성 (Specificity)

불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력

검출한계 (Limit of detection) 및 정량한계 (Limit of quantitation)

적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량

직선성 (Linearity)

시험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력

정확성 (Accuracy)

측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도

정밀성 (Precision)

균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성 (분산정도)

범위 (Range)

적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)의 하한값 및 상한값 사이의 영역

분석법 밸리데이션 평가방법

특이성 (Specificity)

본 실험에서 시험 물질에 영향을 주는 간섭 물질이 시료 내에 존재하지 않는 것을 확인하기 위해 유청가수분해단백분말에 표준 물질을 첨가하여 최종농도가 25ug/mL이 되도록 하여 분석한 결과 시료 내에 간섭물질이 존재하지 않는 것을 확인하였다. 특이성 항목을 분석하기 위해 유청가수분해단백분말 1g을 칭량 후 100mL 부피플라스크에 넣어 80% 에탄올로 100mL 표선까지 채운 후 유청가수분해단백분말 (Placebo)로 사용하였다 (Fig 2-A). 또한, 여기에 Sialic acid를 25ug/mL이 되도록 첨가한 후 분석하였다.

검출한계 (Limit of detection) 및 정량한계 (Limit of quantitation)

본 실험에서 검출한계 및 정량한계 항목을 분석하기 위해 (Table 1)의 표에서와 같이 계열 희석한 것에 희석용매 80% 에탄올을 이용해 희석배수로 희석하여 검출한계 농도 1ug/mL, 정량한계 농도 5ug/mL으로 조제하여 분석하였다. LOD (Limit of Detection)는 signal : noise의 비를 3 : 1, LOQ (Limit of Quantitation)은 signal : noise의 비를 10 : 1로 정한 후 LOD 및 LOQ를 각각 확인하였다.

직선성 (Linearity)

본 실험에서는 유청가수 분해단백분말(Placebo)에 10ug/mL, 25ug/mL, 50ug/mL의 최종 농도가 되도록 표준품 Sialic acid를 첨가한 후 시료 전처리 방법에 기술된 바와 같이 시

료를 처리하여 HPLC로 분석하여 크로마토그램을 얻었다. 그리고, Sialic acid 표준용액의 검량선과 10ug/mL ~ 50ug/mL 범위에서 직선성을 확인하였다.

정확성 (Accuracy) 및 정밀성(Precision)

본 실험의 정확성 및 정밀성 측정을 위해 표준용액의 조제(table1)를 참고하여 각각의 농도를 제조하여 분석조건(table2)을 이용해 HPLC로 측정한 결과, 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 값을 기지의 농도를 나눈 비의 백분율(%)로 구하였다.

3. 연구수행결과(분석법 밸리데이션 평가 결과)

특이성 (Specificity)

Fig 2는 시험 물질에 영향을 주는 간섭 물질이 시료 내에 존재하지 않는 것을 확인하기 위해 Placebo인 유청가수분해단백분말과 표준 물질을 25ug/mL첨가한 후 특이성을 확인한 결과이다. 결과로서, Placebo인 시험물질내 Sialic acid는 검출되지 않았으나 (Fig 2-A), 표준물질인 Sialic acid를 첨가한 경우 표준물질 유래의 Peak만이 검출 되었으므로 시료 내에 간섭물질이 존재하지 않는 것을 확인하였다 (Fig 2-B).

검출한계 (Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantitation)

Fig 3은 본 표준물질을 대상으로 평가한 결과이다. 결과로서 본 물질의 LOD 및 LOQ는 1ug/mL (Fig 3-A), 5ug/mL (Fig 3-B) 이 되는 것을 확인하였다.

직선성 (Linearity)

Fig 4`5와 Table 3~4는 유청가수 분해단백분말(Placebo)에 표준품 Sialic acid를 농도 별로 분석한 크로마토그램 결과 및 이를 적용한 검량선과 직선성을 평가한 결과이다. 결과로서, 전체 농도에서 98.16 ~ 98.8%의 검출효율을 보였으며 (Table 3), 이때 검량선은 $y=6.7328x-0.3226$ ($R^2=1$) (Fig4) 그리고 10ug/mL ~ 50ug/mL 범위에서 직선성이 ($R^2=1$)로 나타나 좋은 직선성을 나타내었다(Table 4). 시험물질내 Sialic acid의 직선성의 객관성을 확인하기 위하여 실시한 3반복 평가결과는 다음과 같다 (Table 4, Fig 5).

본 실험의 유청가수분해단백분말에 표준용액을 첨가한 시료 분석 1차 실험에서는 10ug/mL의 Peak area(calculated concentration)는 67.45 (9.93)이며, 25ug/mL은 171.69(25.11)이고, 50ug/mL은 342.38 (49.96)이었다. 1차 실험의 Sialic acid의 검량선의 회귀방정식은 $y=6.8686x-0.7701$ ($R^2=1$)로 10ug/mL ~ 50ug/mL 범위에서의 결과가 적합하였다. 2차 실험에서는 10ug/mL의 Peak area(calculated concentration)는 67.40 (9.92)이며, 25ug/mL은 171.15 (25.03)이고, 50ug/mL은 334.11 (48.76)이었다. 2차 실험의 Sialic acid의 검량선의 회귀방정식은 $y=6.6525x+2.3989$ ($R^2=0.9997$)로 10ug/mL ~ 50ug/mL 범위에서의 결과가 적합하였다. 3차 실험에서는 10ug/mL의 Peak

area(calculated concentration)는 67.31 (9.91)이며, 25ug/mL은 172.22 (25.19)이고, 50ug/mL은 339.88 (49.60)이었다. 3차 실험의 Sialic acid의 검량선의 회귀방정식은 $y=6.8032x+0.3781$ ($R^2=0.9999$)로 10ug/mL ~ 50ug/mL 범위에서 결과가 적합하였다.

정확성 (Accuracy) 및 정밀성(Precision)

Table 5과 6은 농도별로 제조한 표준용액 (Table 1)을 HPLC로 측정 (Table 2) 한 결과를 토대로 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 값을 기질의 농도를 나눈 비의 백분율 (%)로 구한 결과는 다음과 같다. 결과로서, 10ug/mL의 농도에서는 평균 농도가 9.77이며 결과값이 91.20% ~ 99.1%이내의 양호한 결과를 나타내었고, 25ug/mL의 농도에서는 평균 농도가 24.95이며 결과값이 96.92% ~ 100.8%이내의 양호한 결과를 나타내었고, 50ug/mL의 농도에서는 평균농도가49.59로 결과값이 97.62 ~ 99.92% 양호한 결과를 나타내었다 (Table 6).

정밀성은 25ug/mL농도를 6회 반복하여 피크면적에 대한 정밀성 (RSD)을 측정한 결과 1.14%의 좋은 정밀성 결과를 나타내었다. (Table 7)

Table 1. 시료 유청가수분해단백분말내 지표 및 기능성분인 sialic acid의 표준분석법 정립을 위해 제조된 표준용액 내역

표준용액	표준원액 농도	표준액 취한양 (mL)	첨가한 회석용매 피 (mL)	부	최종 부피 (mL)	최종 농도 (ug/mL)
Sialic acid-STD-1	1000ug/mL	10	90		100	100
Sialic acid-STD-2	100ug/mL	50	50		100	50
Sialic acid-STD-3	50ug/mL	50	50		100	25
Sialic acid-STD-4	50ug/mL	20	80		100	10
Sialic acid-LOQ	50ug/mL	10	90		100	5
Sialic acid-LOD	50ug/mL	5	95		100	1

Table 2. 시료 유청가수분해단백분말내 지표 및 기능성분인 sialic acid의 표준분석을 위해 정립된 HPLC 분석 시스템 및 운용조건 내역

Detector	UV
Wavelength	210nm
Column	Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column (300 x 7.8mm, 9um)
Mobile phase	10mM H ₂ SO ₄ inwater(Isocratic)
Running time	20min
Flow rate	0.5 mL/min
I n j e c t i o n volume	20 μL
Temperature	40℃

Table 3. 표준물질인 Silaic acid를 농도별로 희석한 후 이를 대상으로 한 HPLC분석 크로마토그램 결과

TheoreticalConcentration (ug/mL)	peak area	CalculatedConcentration (ug/mL)
10	67.06	9.88
25	167.91	24.56
50	336.35	49.08

Table 4. 표준물질인 Silaic acid를 농도별로 희석한 후 직선성의 객관성을 확인하기 위한 반복평가를 통한 검출효율 및 검량선 직선식 확인결과

Norminal conc. (ug/mL)	Area counts (Calculated Concentration, ug/mL) 3회반복 (Linearity)			Mean conc. (ug/mL)
	1차	2차	3차	
10	67.45 (9.93)	67.40 (9.92)	67.31 (9.91)	67.39 (9.92)
25	171.69 (25.11)	171.15 (25.03)	172.22 (25.19)	171.69 (25.11)
50	342.38 (49.96)	334.11 (48.76)	339.88 (49.60)	338.79 (49.44)
검량선 직선식	$Y=6.8686x-0.7701$	$Y=6.6525x+2.3989$	$Y=6.8032x+0.3781$	-
R^2	1	0.9997	0.9999	0.9999

Table 5. 표준물질인 Silaic acid를 농도별로 희석한 후 정확성(Accuracy) 의 객관성을 확인하기 위한 반복평가 확인결과

Norminal conc. (ng/mL)	Calculated concentration (ng/mL) /Accuracy (%)												Mean conc. (ng/mL)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	No. 11	No. 12	
10	9.12	91.2	9.82	98.2	9.93	99.3	9.92	99.2	9.91	99.1	9.91	99.1	9.77
25	25.2	101	24.9	99.8	25.1	100	25.0	100	24.2	96.9	25.2	100	24.9
50	49.6	99.4	49.6	99.1	49.9	99.9	48.7	97.5	49.9	99.9	49.6	99.2	49.6

Table 6. 표준물질인 Silaic acid를 농도별로 희석한 후 정밀성 (Precision) 의 객관성을 확인하기 위한 반복평가 확인결과

Norminal conc. (ug/mL)	Calculated Concentration (ug/mL)						Mean conc. (ug/mL)	RSD (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6		
25	25.20	24.96	25.11	25.03	24.23	25.19	24.95	1.14

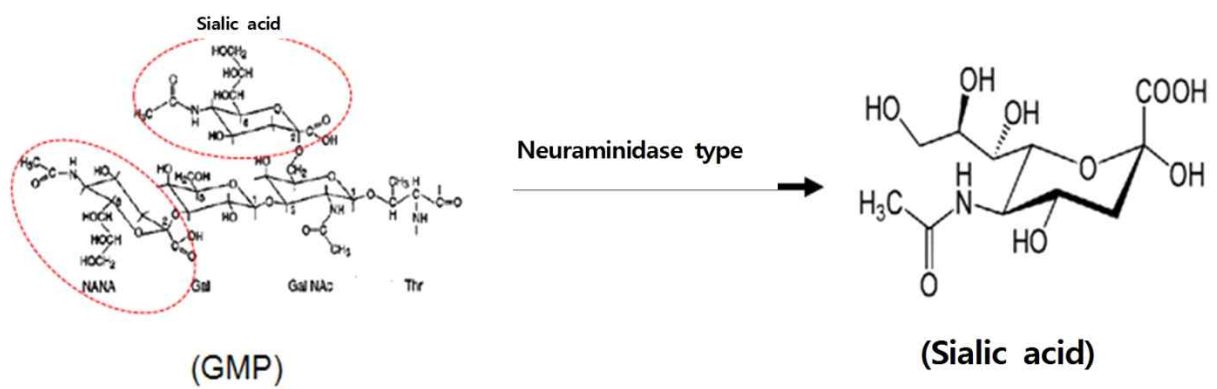


Fig. 1. 표준분석법 정립간 지표 및 기능성분인 Sialic acid(NANA= N-acetylneuramic acid)의 유청단백질인 GMP (Glycomacropeptide) 로 부터 효소 분리 후 화학구조

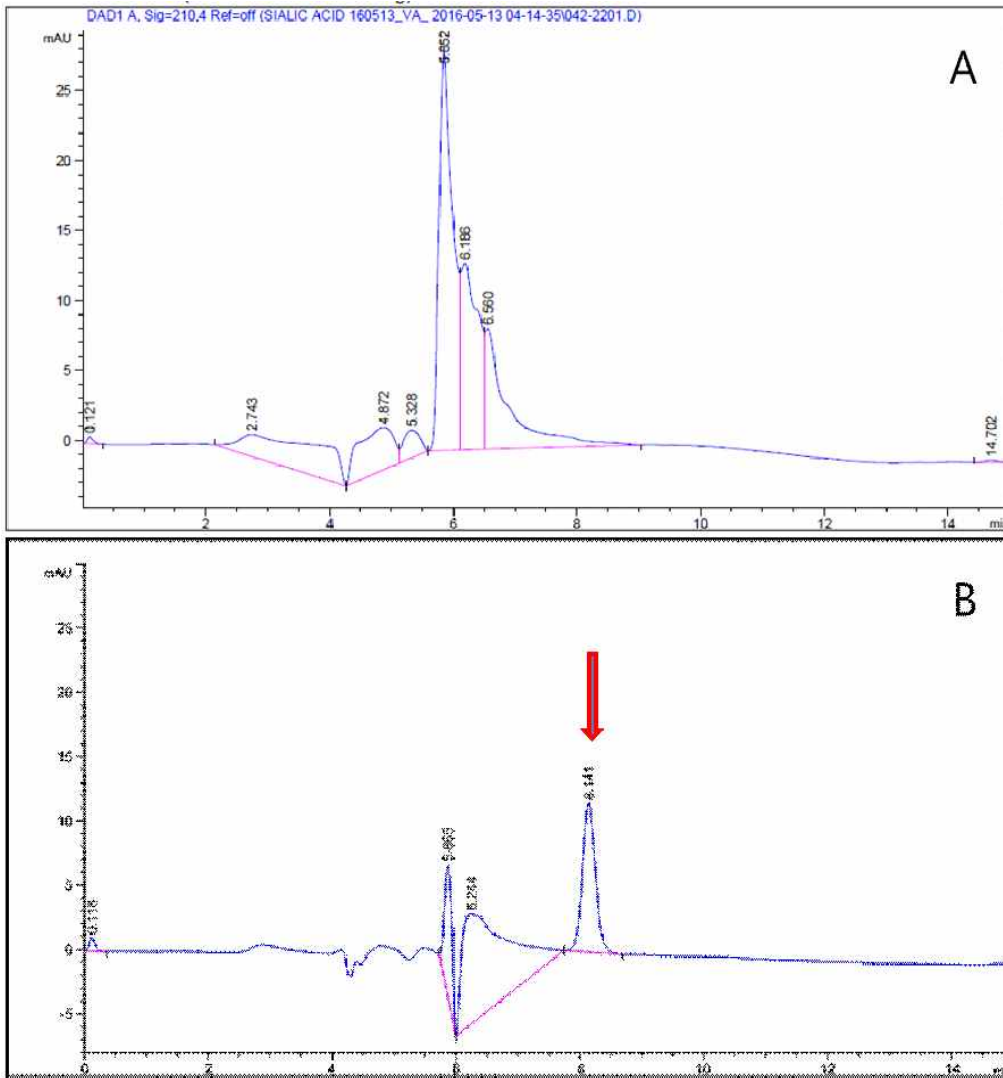


Fig 2. 시험 물질 (유청가수분해단백분말)내 분석대상 물질인 Sialic acid을 선택적으로 정확하게 측정하기 위해 실시한 표준물질 첨가(25ug/mL) 전(A) 후(B)의 특이성 정립여부 평가결과

A: Placebo chromatogram

B : Placebo +Added Standard 25ug/mL Sialic acid chromatogram

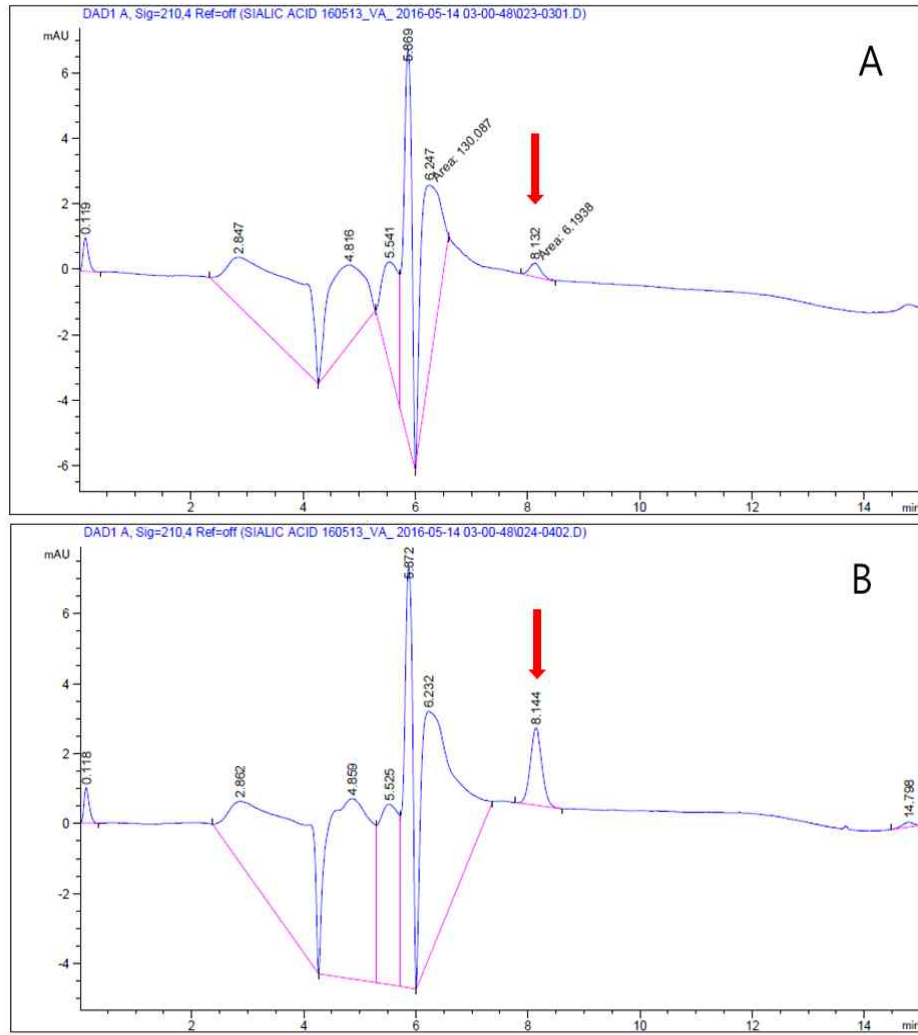


Fig 3. 표준물질인 Sialic acid를 농도별로 희석한 후 이를 대상으로 한 LOD (Limit of Detection, A)와 LOQ (Limit of Quantitation, B) 평가 결과

A : 검출한계 1 μ g/mL (Limit of detection)

B : 정량한계 5 μ g/mL (Limit of quantitation)

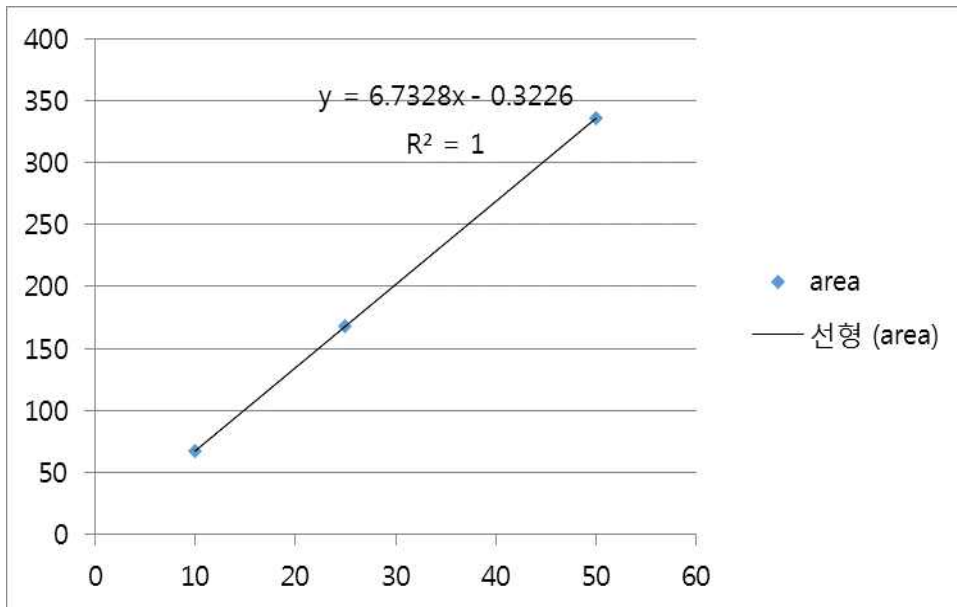


Fig 4. 표준물질인 Silicic acid를 농도별로 희석한 후 이를 대상으로 한 검량선 정리 결과

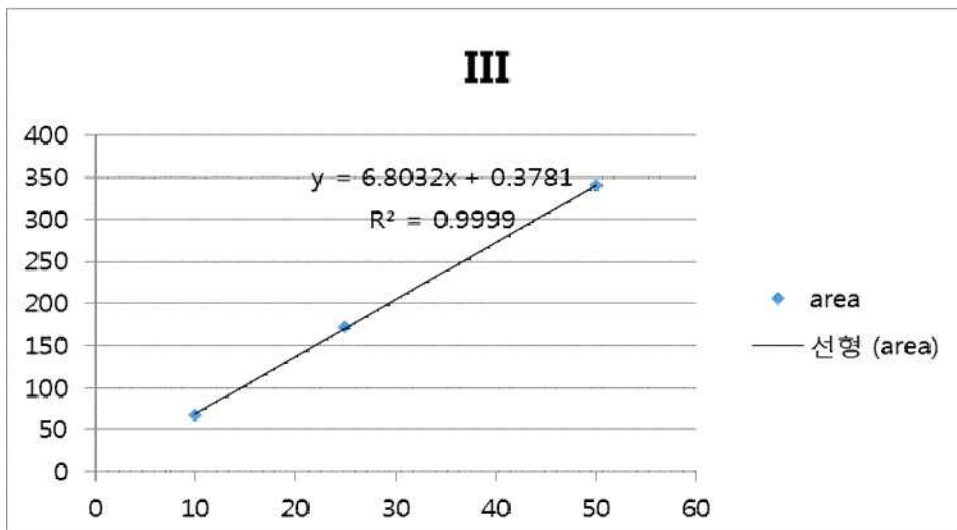
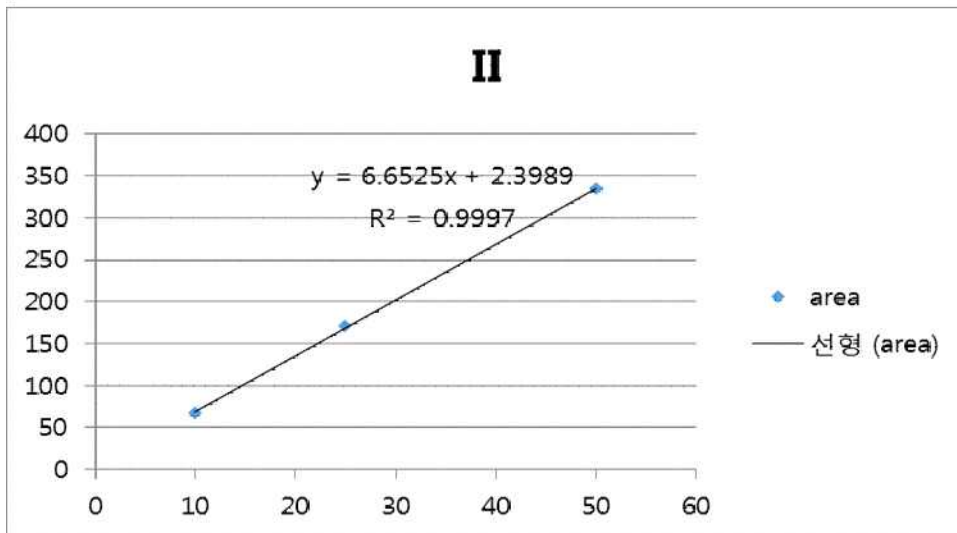
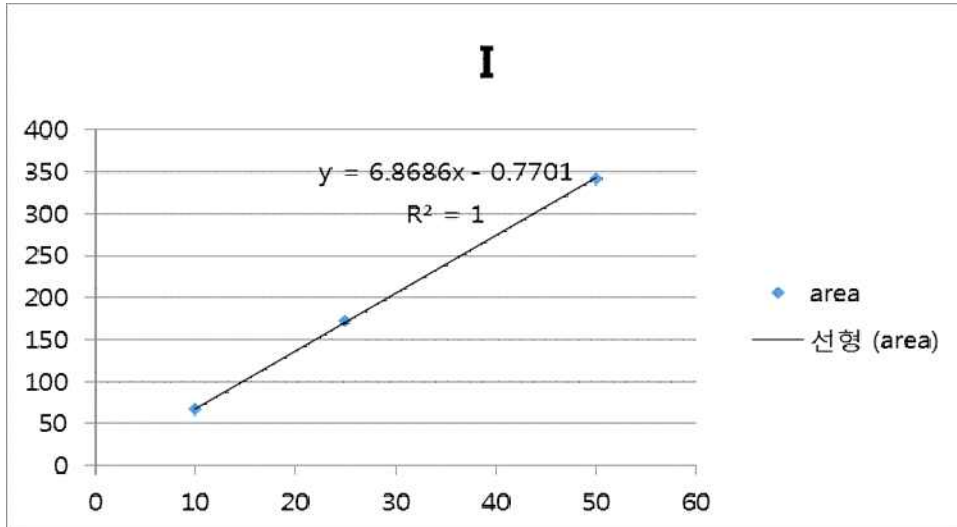


Fig. 5. 표준물질인 Silicic acid를 농도별로 희석한 후 직선성의 객관성을 확인하기 위한 반복평가를 통한 검량선 확인결과

제 3 절 헬리코박터 파이로리 감염예방 및 치료형 물질 개발

1. 연구목적

본 연구에서는 전체 8단계의 연구개발 과정중 3단계에 해당하는 연구를 진행하였다. 즉, 개발 항헬리코박터 소재류중 목표 공시균인 *H.pyroli*균에 대한 항균효능평가(*in vitro*)와 연계하여 실험동물(마우스, *in vivo*)에 접목하여 최적 감염예방 또는 치료효과를 보유하는 최적 소재선발과 섭이농도 및 섭이기법을 확립하는 기초효능 평가단계이며, GLP시스템(동물안전성 평가, 5~7단계)와 최종 인체임상(CRO시스템, 3단계) 평가를 위한 사전 기초유효성 결과 확보를 핵심 연구목표로 하여 수행하였다. 본 연구에서의 연구목표는 다음과 같다.

- 가. 후보균 항헬리코박터 소재류의 공시균(헬리코박터균)에 대한 항균효능(MIC)평가
- 나. 선발 항헬리코박터 소재의 항균시너지 증대성 연구(*in vitro*)
- 다. 선발 항헬리코박터 소재류의 감염예방 효과 평가
- 라. 선발 항헬리코박터 소재류의 치료효과 평가
- 마. 인체유효성 평가용 항헬리코박터형 시작용 제조 레시피 정립

2. 연구수행방법

가. 항헬리코박터 제균형 평가시료 제조

최종 연구목표인 “위건강형, 헬리코박터균 감염예방 및 치료에 도움을 줌(개별인증 1급)”형 기능성 식품개발을 위한, 항헬리코박터 제균형 “유청가수분해단백분말 소재류”는 총 2부류로 하여, 항생제를 제외한 6종을 준비하여 전체 시험간 사용하였다(Table 4).

1 부류는 칼슘 비혼합형 소재류인데, 목표 항균기능 및 지표성분인 NANA(7% 함유)가 고함량 결합(항균성 불인정)되어 있는 유청단백질의 일종인 GMP를 준비한 후, 이를 기질로 핵심 항균성분인 Silaic acid를 효소분리 및 함유량이 다르게 정제과정을 거쳐 각각 제조한 후 전체시험에 사용하였다. 즉, 비교물질로는 GMP를 그리고 시험물질로는 7% NANA-GMP와 정제과정을 거쳐 Sialic acid의 함유량을 23% 되게 제조한 23% NANA-GMP를 각각 준비하였다.

2 부류인 칼슘혼합형 소재류는 GMP를 기질로 칼슘을 배합한 칼슘-칼슘 혼합형 제제(Ca-GMP) 준비한 후, 이를 원료로 역시 효소분해 공정을 통하여 Sialic acid의 분리와 동시에 칼슘공급형으로 하는 칼슘을 동시에 보유토록 하면서 항균성을 보다 증대화 하는 특징을 가진 소재류로 제조하였다. 즉, 5%되게 칼슘을 기질 GMP에 킬레이팅 시켜 제조한 칼슘 혼합형 Ca-GMP(NANA 비분리형, 항균성 비보유형)를 비교물질로 준비하였으며, 이를 기질로 항균성을 부여하기 위하여 Sialic acid를 효소방법으로 분리 및 건조시킨 CaNANA-GMP를 시험물질로 준비하였다. 또한, 헬리코박터균이 위 벽내 존재함에 따라 개발 항헬리코박터형 소재류가 헬리코박터균과의 직접 접촉과 더불어 목표 항균효능을 보다 높이기 위하여, 식품첨가물공전에 등록된 안전식품인 Surfactant를 선발(700) 및 이의 비교물질로 하여 위점막의 장력해체, 침투력 및 확산성 향상을 통하여 감염예방 및 치료효과 증대성이 가능함과 동시에 효능을 평가하였다.

대조물질로는 순도 99.9%이상의 합성 Sialic acid(MARUKIN사, 일본)를 그리고 감염 헬

리코박터균에 대한 치료효과 평가는 항생제를 사용하였는데, 아목시펜, 클래시리드 및 넥시움(세균감염치료제 및 궤양용제)제제를 단국대병원 소화기내과 처방전에 준하여 준비 및 이들 3종을 혼합(삼제요법)하여 시험간 사용하였다. 고부가 기능성 식품개발을 위한 항헬리코박터 제균형 “유청가수분해단백분말 소재류”의 물성 및 특성평가는 항생제와 700을 제외한 준비된 5종 소재류에 대하여, NANA함유량은 HPLC분석법을 그리고 Ca은 ICP분석법을 그리고 GMP내 단백질 및 아미노산 분석을 통하여 지표 및 성분분석과 pH를 확인하여 전체적인 물성 및 특성을 평가하였다.

나. 효소 처리전후, 항헬리코박터 제제내 유청단백질의 물성변화(안전성) 평가

본 연구간 핵심 항헬리코박터 제균형 후보소재류는 유청단백질의 일종인 GMP를 기질로 하여 효소처리를 통하여, 항균 지표 및 기능성분인 Sialic acid를 분리 하여 이를 핵심성분으로 하는 항헬리코박터 제품의 개발을 실시한 경우이다. 따라서, 효소 처리시 목표 항균성분인 Sialic acid이외 단백질의 변형이 유발되는 경우에는 최종 항헬리코박터 제품의 안전성에 있어 문제가 될 여지가 있다. 이를 검정하기 위하여, GMP를 기준으로 기능성 항균성분인 Sialic acid의 분리를 위한 효소분해 공정전후에 항헬리코박터 소재류내 단백질의 변형유발 여부를 18종 필수 아미노산류를 대상으로 비교 평가하였다. 즉, Aspartic Acid, Threonine, Serine, Glutamic Acid, Proline, Glycine, Alanine, Cystein, Valine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phenylalanine, Histidine, Lysine, Arginine 및 Tryptophan를 대상으로 효소처리 전후의 아미노산류의 함유량 변화를 공인분석기관인 수원여자대학교 식품분석센터에 의뢰하여 식약처 기준에 준하는 아미노산분석을 실시 및 변화유무를 평가하였다.

다. 후보균 항헬리코박터 소재류의 공시균(헬리코박터균) 대한 항균효능(MIC)평가

1) 공시균(*H.pylori*) 준비 및 평가용 배지 조성

본 연구간 사용된 공시균인 헬리코박터균은 *H. pylori* SS-1-passed-5(KNRRC연구소 재은행 분양균)과 Wild Type형 공시균으로서는 *H.pylori* P1WT 및 *H.pylori* P12WT 및 *H.pylori* SS1을 전체 시험간 공시균으로 하여 사용하였다. 공시균의 배양조건으로는 Brucella medium(보성사이언스)을 기본 액체배지로 사용하였고, 실험간 균수의 확인을 위한 고체배지는 동일 액체배지에 agar를 5g되게 첨가하는 조건으로 하여 제조 및 이를 사용하였다. 공시균 배양간 오염균의 억제를 위하여 Brucella 배지를 멸균한 후 적당히 식으면 불활성화 시킨 horse serum 10%와 Premixer형 항생제를 첨가함으로써 이를 해결하였다.

이때 액체배지 500ml당 사용한 항생제는 Polymyxin B(2,500 IU), Bacitracin(12,500 IU), Nalidixic acid(2.5 mg), Nystatin(50,000 IU), Vancomycin((10 mg) 및 Natamycin((25 mg)을 첨가하는 조건으로 목표 공시균 이외의 오염균의 번식을 억제 하였다.

2) 공시균 배양조건 정립 평가

공시균(*H.pylori*) 배양시, 목표 공시균의 배양조건 설정과 더불어 순수성을 확인하기 위하

여, 혐기성 조건에서 전반적으로 배양에 소요되는 시간을 확인함과 동시에 배양균에 대한 순수성 확인은 인체용 파이로리 감염 키트(Gastrex, 프랑스)를 권장방법에 따라 확인하였다. 즉, 양성인 경우 분홍색, 음성인 경우는 노란색으로 변하는 지표를 기준으로 공시균에 대한 순수성 평가와 동시에 공시균 배양액을 흔들었을 때 실오라기 모양을 띠면서 현미경으로 관찰시 가느다란 Bacillus모양으로 자라는 기준으로 하는 외관평가를 통하여 순수 공시균의 성장패턴을 확인하였다. 또한, 준비된 배양액에 헬리코박터균을 접종 후 혐기성 조건에서 O.D수치(600nm)의 흡광도를 나타내는 기점에서 고체배지에 도말하여 성장균의 균수를 확인 하였다.

2) 최적 항헬리코박터 제균형 소재선발을 위한 항균성 평가(*in vitro*)

본 실험에서는 준비된 항헬리코박터 제균형 항균효능을 평가하기 위하여, 우선 액체배지에 공시균인 5종 *H.pylori*균별로 접종한 후 배양시킨 정상 시험균을 조성한 후 여기에 제제별 및 농도별 처리시 항균성분인 Silaic acid함량을 기준으로 항균성을 평가 하였다(Table 4). 대조물질로는 S-NANA를 배양액(10^9 cfu/mL)내 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 및 5%의 농도 구배차이를 부여한 시료를 첨가 후 48시간이 경과 시에 나타나는 집락균을 세어 시료별 및 농도구배별 항균력을 검증하였다. 즉, 혐기배양조건에서 시험물질과 공시균의 접촉이 이루어지는 시점부터 24시간 혹은 48시간이 경과시에 생존하는 콜로니수를 계측한 후 정상균 대비 100분율로 하여 항균효과를 평가하였다. 비교물질인 분말형 GMP와 Ca-GMP의 경우는, 이들 분말 자체를 100%로 하여 다만 첨가량을 0.1%, 0.25% 및 0.5% 범위에서 그리고 항생제(Antibiotics)는 병원처방방법에 준하여 제조된 Mixer형(아목시펜, 클라시리드 및 넥시움 혼합제제) 시료를 Silaic acid와 동일첨가량으로 하여 비교 평가하였다. 항헬리코박터 소재류의 항균효능 증대를 위하여 선발한 Surfactant 700의 경우는 배양액량 기준 0.01%, 0.05% 및 0.1%의 첨가 농도범위에서 항균성을 역시 평가하였다. 항균지표 및 기능성분인 NANA를 효소로 분리하여 항균성을 부여한 조건을 부여하여 제조한 시험물질류(7% G-NANA, 23% G-NANA 및 CaNANA-GMP)에 대한 항균성 평가는, 순도가 99.9% 이상이었던 S-NANA의 첨가량을 기준으로 시험제제별 검출된 Silaic acid함량을 평가한 후 동일량을 첨가하는 조건으로 무처리구 및 대조구 대비 항균성 증대성 여부를 평가 하였다. 제제별 첨가조건 이외는 정상시험균과 동일하게 전체시험간 실시하였다.

라. 선발 항헬리코박터 소재의 항균시너지 증대성 연구(*in vitro*)

본 실험에서는 공시균인 *H.pyroli*에 대하여 항헬리코박터 제균형 후보 소재류에 대한 단일 제제별 및 농도별로 실시한 선행평가 결과를 기준으로, 선발된 칼슘 비혼합형 항헬리코박터형 소재류인 7% G-NANA와 23% G-NANA 그리고 칼슘혼합형 소재류인 Ca-GMP 및 CaNANA-GMP와 Surfactant인 700을 농도별 구배차이를 부여한 조건에서 단일제제 처리 결과를 기준으로 병행처리시 항균성이 증대되는지를 평가하였다. 이를 위하여, 700의 농도는 0.005%와 0.01%를 그리고 GMP를 기질로 하여 제조된 항헬리코박터 소재류를 단일 혹은 병행처리하는 조건으로 배양액에 0.1%와 0.25%를 농도로 우선 첨가한 후, 이어서 동일량의 공시균을 접종 및 혐기조건에서 24시간 경과 시 항균시너지 효과를

O.D(600nm)를 기준으로 비교 평가 하였다.

마. 항헬리코박터 제제의 헬리코박터균 감염예방 및 치료효과 평가(*in vivo*)

1) 항헬리코박터 효능평가용 재료준비

헬리코박터균 감염예방 및 치료효과 평가를 위한 항헬리코박터 제제류는 Table 4과 같다.

2) 실험군 조성

실험동물은 6 주령된 ICR 웅성을 오리엔트 바이오(한국)로 부터 구입하여 일주일간 적응시킨 뒤 사용하였고, 단국대학교 실험동물윤리위원회의 규정법규를 준수하여 사육하였으며, 실험은 후보군 항헬리코박터 제제에 대하여 헬리코박터균에 대한 감염예방편과 치료편으로 나누어 실시하였다. 공시균으로서는 준비된 4종 헬리코박터균중 비Wild Type형 *H.pylori* SS-1-passed-5만을 선정하여 시험간 사용하였으며, 이를 위내 감염전 및 감염후에 항헬리코박터 후보 소재류의 섭취에 따른 헬리코박터균의 감염예방은 27일 동안 그리고 치료효과는 31일 동안 실시하였으며, 시험구별 공시동물인 마우스는 8개체를 1개 시험구로 하여 전체 시험을 진행하였다.

가) 헬리코박터균 감염유도

헬리코박터균의 감염을 유도하기 위하여 2×10^8 CFU/0.4mL/1mice 기준으로 구강으로 투여하여 마우스 위 내 헬리코박터균 감염을 유도하였으며, 헬리코박터균의 감염여부는 실험군별 처리후 위 조직을 취하여 인체용 파이로리 감염키트(Gastrex, France)통해 감염을 확인하였다.

나) 감염예방효과 평가

공시균인 파이로리균 감염전에 항헬리코박터 소재류 식이가 파이로리균 감염에 대한 제균성 평가는 다음과 같이 실시하였다(Table 5, Fig 2.). 공시동물에 대하여 PBS만을 경구투여한 무처리군과 대조구로서는 공시균인 *H. pylori* SS-1-passed-5만을 위내 감염시킨 처리구로, 비교구는 S-NANA(Standard, 비교구-1), Surfactant 700(비교구-2) 및 항생제(Antibiotics, 비교구-3)로 설정하였다. 항헬리코박터 제제로서 개발을 위한 후보 시험물질류는 칼슘 비혼합형 제제류와 칼슘혼합형 제제류로서 구분하여 적용하였는데, 칼슘 비혼합형 제제류는 GMP, 7% G-NANA와 23% G-NANA처리구를 그리고 칼슘혼합형 제제류는 Ca-GMP 및 CaNANA-GMP를 전체시험간 사용하였다. 헬리코박터균의 감염 및 시험구별 처리방법으로서, 우선 공시균과 시료를 1주일 동안 2일 간격으로 3회 구강투여 후, 일주일이 경과 시에 시료만을 농도별로 7일 동안 매일 구강투여 하는 조건으로 총 21일동안 실시하였다(Fig 1).

항헬리코박터 제제류의 감염예방효과 평가를 위한 처리농도는 Sialic acid함량을 기준으로 0.1%, 0.25% 및 0.5%를 최고농도로 설정하였으며, Surfactant 700은 0.01%, 0.05% 및 0.1%의 농도범위에서 단일 및 혼용 처리시로 구분하여 최종 감염예방 효과를 평가하였다.

다) 치료효과 평가

개발 항헬리코박터 소재류의 치료효과는 파이로리 감염 후의 식이가 치료효과를 나타내는지 검증해 보는데 목적을 두고 다음과 같이 실시하였다(Table 6., Fig 3.).

공시동물에 대하여 PBS만을 경구투여한 무처리군과 대조구로서는 공시균인 *H. pylori* SS-1-passed-5만을 위내 감염시킨 처리구로, 비교구는 S-NANA(Standard, 비교구-1), Surfactant 700(비교구-2) 및 항생제(Antibiotics, 비교구-3)로 설정하였다. 항헬리코박터 제제로서 개발을 위한 후보 시험물질류는 칼슘 비혼합형 제제류와 칼슘혼합형 제제류로서 구분하여 적용하였는데, 칼슘 비혼합형 제제로서는 GMP, 7% G-NANA와 23% G-NANA처리구를 그리고 칼슘혼합형 제제로서는 Ca-GMP 및 CaNANA-GMP를 시험물질로 하여 전체 시험간 사용하였다. 헬리코박터균의 감염 후 치료효과를 평가하기 위한 처리는, 우선 공시균만을 1주일 동안 2일 간격으로 3회 구강투여를 실시함으로써 위내 감염을 유도한 후, 항헬리코박터 소재류를 21일 동안 매일 농도별로 조절 및 이를 구강투여 하는 조건으로 총 31일 동안 실시하였다(Fig 2).

항헬리코박터 제제류의 치료효과 평가를 위한 처리농도는 Sialic acid함량을 기준으로 0.1%, 0.25% 및 0.5%를 최고농도로 설정하였으며, Surfactant 700은 0.01%, 0.05% 및 0.1%의 농도범위에서 단일 및 혼용 처리시로 구분하여 최종 감염예방 효과를 평가하였다.

라) 동물안전성(체중증감 기준) 평가

ICR 웅성마우스를 공시동물로 후보군 항헬리코박터 제제류에 대하여 항헬리코박터균에 대한 장기섭이에 따른 공시 헬리코박터균에 대한 위감염 예방과 치료효과 평가시, 2-3일에 한번씩 체중증감 평가를 실시함과 동시에 다음과 같은 세부항목으로 구분하여 동물 안전성을 평가하였다. 즉, 전체 시험기간 동안 사망동물 발생여부 및 외관상 일반증상관찰을 통한 특이 이상소견 유발 여부, 최종 부검 결과시 특이한 임상적 이상소견 관찰여부와 그리고 체중변화 조사를 통한 안전성을 평가하였다.

마) 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과 평가

각각의 실험군이 종료되는 시점 전날 쥐들은 절식시켰고 희생 당일 안와채혈로 혈액을 채취하고 CO₂에 질식사 시킨 후, 희생된 쥐의 위, 간 및 비장을 각각 채취하여 간과 비장은 동결처리 후 이를 전남대 수의과대학 수의임상연구실로 공여 하였다. 위 조직은 중성 포르말린에 3일 이상 두었다가 파라핀 블록으로 제조 후 이를 이용하여 항헬리코박터 소재류와 Surfactant 700의 단일 및 병행처리시 헬리코박터균에 대한 감염예방 및 치료효과를 평가를 다음과 같은 항목으로 실시하였다.

1) 면역지표 평가(ELISA분석법)

공시균인 헬리코박터균에 대한 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과를 염증저하 효과를 기준으로 평가를 위하여, TNF α , IL-1 β , IL-6 및 IL-10을 지표 항목으로 하여 ELISA분석(R&D system, Minneapolis, MN, USA)을 통하여 확인하였다. 즉, 안와채혈로 얻은 혈액을 시료로 하여 이를 2,500rpm에서 20분간 원심분리과정을 거쳐 분리 및 채취한 혈청을 -80°C에 보관하였다가 ELISA 분석 당일 각각의 분석버퍼에 4배씩 희

석하여 사용하였다.

2) 병리평가(현미경 관찰)

공시균인 헬리코박터균에 대한 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과 시험군별로 확인시 염증저하에 따른 점막조직의 이상여부를 병리학적 조직검사를 통하여 확인하였다. 이를 위하여 시험이 종결되는 시점에서 적출한 위조직을 $4\mu\text{m}$ 두께의 파라핀 절편으로 제작 및 Hematoxylin-Eosin염색 후 현미경 관찰(100배)을 통하여, 위내 헬리코박터균 감염 유도 후 형성되는 염증에 의한 점막세포 손상도를 기준으로 항헬리코박터 소재류 섭취에 따른 감소여부 결과를 감염예방 및 치료효과로 평가하였다. 이를 위한 손상도 평가수치는 0(손상 없음), 1(경한 손상) 그리고 손상도 2는 중증의 손상으로 하여 이를 결과치로 하였다.

3) 위조직내 헬리코박터균 생존성 정량평가

공시균인 헬리코박터균에 대한 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과를 면역지표 평가(ELISA분석법)와 병리조직 검사를 통하여 평가함과 동시에 위내에 존재하는 헬리코박터균의 생존수의 정량화 평가를 실시하였다. 이를 위하여 RNA 추출 및 real-time polymerase chain reaction(real-time PCR) 분석법을 적용하여 다음과 같이 평가하였다. 평가방법으로서, 항헬리코박터 소재별 예방효과 및 치료효과 평가를 위해 마우스의 위내 *H. pylori* 상재유무를 적출한 위 조직을 분쇄하여 FlaB(Flagellin genes B)를 real-time PCR로 유전자 발현 후 이를 결과치로 하였다. 결과확인을 위하여, 적출한 위 조직을 tissue lysis buffer를 이용하여 total RNA를 분리한 후 분리된 total RNA를 정량화하여 제조회사의 방법에 준하여 역전사 반응은 oligo dT primer와 AMV reverscriptase를 이용하여 0.5ug의 RNA에서 cDNA를 합성 하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 FlaB 유전자의 primer와 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-rad Laboratories Inc.)를 첨가한 후, Real-time PCR(Jena bioscience, Germany)기기를 이용하여 증폭시킨 후 정량 software를 사용하여 분석하였다(Table 7). PCR증폭 단계 및 증폭 cycle은 40cycle을 실시하였는데, Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 52°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값을 기록하였으며, 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 또한, Real Time PCR로 증폭된 산물은 comparative cycle threshold(Ct)법을 이용하여 정량화 하였으며 각 시료는 GAPDH의 발현량으로 보정하였다.

6. 통계처리

항헬리코박터 소재류의 항균성 및 마우스를 대상으로 하는 감염예방 및 치료효과 관련 유의성 평가는 통계 패키지인 SAS(Statistical Analysis System, Version 8.20)을 사용하여 평가하였으며, 유의성 검정을 위한 Procedure는 ANOVA test(Dunn's multiple comparison test)로 비교 분석하여, 평균치와 표준편차로 나타내고 5%수준에서 유의성을 표시하였다.

3. 연구수행결과

가. 공시균 및 시험재료 준비

1) 항헬리코박터 제균형 시료별 물성평가

최종 연구목표인 “위건강형, 헬리코박터균 감염예방 및 치료에 도움을 줌(개별인증 1급)”형 고부가 기능성 식품개발을 위한, 항헬리코박터 제균형 “유청가수분해단백분말 소재류”는 총 2부류로, 총 6종을 준비하였다. 그리고, 항생제와 700을 제외한 5종 소재류에 대하여 Sialic acid는 HPLC분석법을 그리고 Ca은 ICP분석을 그리고 GMP내 단백질 및 아미노산 분석을 통하여 지표 및 성분분석을 실시하여 물성 및 특성을 평가하였다 (Table 1). 우선 대조물질로 사용된 합성 NANA의 경우(S-NANA)는 Sialic acid함유량이 99.9%이상이었으며 pH는 2였다. 칼슘 비혼합형 소재류중 비교물질로 사용된 GMP는 Sialic acid가 7%되게 결합되어 있으면서 GMP가 95%함유된 물성을 보유하고 있었으며, pH는 6.8로 중성의 범위였다. 시험물질로 사용한 7%G-NANA(pH 6.5)는 7%(분리형)의 Sialic acid와 GMP가수분해물이 93%가 그리고 23% G-NANA(pH 6.8)는 분리형 Sialic acid가 23%와 GMP가수분해물이 77% 함유된 물성을 보유하고 있었다.

칼슘혼합형 소재류중 비교물질인 Ca-GMP소재는 Ca이 5% 그리고 GMP가 88%가 함유되어 있었으며, 시험물질인 CaNANA-GMP는 5%의 Ca과 GMP가 88% 그리고 분리형 Sialic acid가 7%가 함유된 물성을 보유하고 있었으며, 이들 또한 pH는 중성범위의 안정성을 보였다. 그리고, 선발한 surfactant 700(pH 7.2)은 Capric acid를 원료로 하여 에스터 반응을 통하여 제조된 지방산 에스터를 선발하여 이를 항헬리코 박터용 첨가원료로 적용하였다.

2) 효소 처리전후 항헬리코박터 제제내 유청단백질의 물성변화 평가

GMP를 기준으로 기능성 항균성분인 Sialic acid의 분리를 위한 효소분해 공정전후에 항헬리코박터 소재류내 단백질의 변형유발 여부를 18종 필수 아미노산류를 대상으로 비교 평가를 통하여 효소처리에 따른 유청단백질의 안전성을 확인하였다(Table 8).

결과로서, 효소처리전 기질인 GMP내 18종 아미노산류 중 시료내 Threonine의 경우가 11%를 보유하고 있는 특징과 총 아미노산량은 약 81%를 보유하고 있었는데, 효소처리 후 7% G-NANA제제의 총아미노산 함유량 역시 유사한 수치를 보였으며, 세부적으로 아미노산류의 수치 또한 동일패턴을 보였다. 이러한 결과는 효소 처리시 항균기능성분인 Sialic acid를 분리하는 기본효능 이외에 유청단백질에 미치는 효과는 없는 것으로 확인됨으로서 개별인증 신청 시 문제점이 될 수 있는 제제 안전성에 문제는 없는 것이 확인되었다. 그러나, 7% G-NANA를 원료로 하되 이중 Sialic acid 순도를 높이는 방법으로 제조한 23% G-NANA제제의 경우는 총아미노산 함유량은 약 50%로 감소함과 동시에 아미노산류의 감소량 또한 동일 패턴으로 감소하는 결과를 보였다. 이는 Sialic acid의 순도를 증가시키는 제조법에서 단백질 함유량을 감소시켜 Sialic acid의 순도를 증대시키는 제조법을 고려한다면, 단백질의 변화 유발성이 아닌 단백질의 감소에 의한 결과를 확인되었다. 따라서, 항헬리코박터 제균형 소재류를 제조시 적용한 효소는, 목표 Sialic acid를 분리시키는 역할 이외에 단백질의 변형을 유발하지 않는 것으로 평가되었고, 전체

적인 항헬리코박터 제제 구성물에 대한 개별인증시 안전성을 확보한 것으로 확인되었다.

3) 공시균(*H.pylori*) 배양조건 정립 결과

공시균(*H.pylori*)을 순수하게 배양함으로써 이를 전체 시험간 사용하기 위하여, 혐기성 조건에서 전반적으로 배양에 소요되는 시간을 확인하였더니, 1일 이내에 배양이 활발하게 이루어졌음에 따라 일반균의 성장패턴과 큰 차이가 없는 것으로 평가 되었다. 즉, 준비된 배양액에 헬리코박터균을 접종 후 혐기성 조건에서 O.D수치가 0.6(600nm)의 흡광도를 나타내는 기점에서 고체배지에 도말하여 성장균의 균수를 확인 하여 보았더니, 10^9 cfu/mL로 성장되는 패턴이 확인 되었다. 또한, 배양 공시균에 대한 순수성을 인체용 파이로리 감염키트(Gastrex, 프랑스)를 사용하여 확인하여 보았더니, 배양된 공시균은 양성으로서 판정되었다. 동시에 균주를 대상으로 외관상 평가를 현미경으로 관찰하여 보았더니, 시균인 *H.pylori*균의 고유형태인 실모양의 가느다란 Bacillus성상으로 성장되었음이 관찰 되었다. 따라서, 공시 헬리코박터균에 대한 배양조건이 적절하게 정립되었음을 확인 하였으며, 이 배양액을 시험시 필요에 따라 균수를 조절하면서 전체 시험간 사용하였다.

다. 항헬리코박터 소재류의 공시균(헬리코박터균) 대한 항균효능(MIC)평가

1) Sialic acid 분리전 기질류(효소 비처리)의 항균성 평가

본 실험에서는 준비된 항헬리코박터 후보균별 항균효능을 평가하기 위하여, 우선 액체 배지에 공시균인 비Wild Type형 *H. pylori* SS-1-passed-5균만을 접종한 정상 시험균 대비 제제별 및 농도별 처리시 항균성분인 Sialic acid함량을 0.1, 0.25 및 0.5%의 농도 구배차이를 부여한 시료를 첨가 후, 24시간이 경과 시에 나타나는 집락균을 세어 시료별 및 농도구배별 항균효능을 검증하였다(Fig 4). 결과로서, 시료를 첨가하지 않은 정상구(1배 기준) 대비 Sialic acid를 분리하지 않은 GMP와 칼슘을 혼합하여 제조한 Ca-GMP의 경우는 항균성은 나타나지 않았을 뿐만 아니라 오히려 제제와 농도에 상관 없이 전체가 약 1.6배가 증가되는 결과를 보였다($P<0.01$). 이러한 결과는 기질인 GMP와 Ca-GMP내 항균 유효성분인 Sialic acid가 함유되었으나 효소 비처리에 따른 Sialic acid가 분리되지 않았음을 고려하면, Sialic acid가 항균성에 직접적인 결과를 보이는 지표 및 기능성분인 것으로 확인되었다($P<0.01$).

2) 헬리코박터균에 대한 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제 및 Surfactant 700의 항균효능 및 항균 시너지 효과 평가(*in vitro*)

가) 단일 항헬리코 박터 제제별 항균성 평가

공시 헬리코박터균을 wild type 및 비wild Type으로 구분한 후 항헬리코박터 소재류가 이들 공시균별 항균효능 차이를 비교하여 보았다(Fig 5~12.). 결과로서, Wild Type형 공시균인 *H.pylori* P1WT 및 *H.pylori* P12WT, *H.pylori* SS1 및 *H.pylori felis*와 비Wild Type형 *H. pylori* SS-1-passed-5으로 하는 공시균을 구분하여 목표 항균성분인 Sialic

acid의 첨가농도를 기준으로 항균성 차이를 평가하여 보았다.

결과로서, 전체 공시균에서 Silaic acid의 첨가농도가 0.5%이상의 경우에서 전체적으로 유효 항균성을 보였으며, 농도별 처리량이 높아지면 높아질수록 비례하여 항균성 또한 비례하여 증가하였다($P < 0.01$). 그러나, 비Wild Type형인 *H. pylori* SS-1-passed-5의 경우는, Wild Type형의 공시균류에 대비 다소 항균성이 감소되는 경향을 보이는 특성을 보였다(Fig 12.). 이러한 결과는 전체 공시균류중 실험관에 적용된 비Wild Type보다는 현장 분리형인 Wild Type형 헬리코박터균류에 대한 항균성 평가에서 0.5% 이상에서 효과적인 항균범위를 보임으로서, 결국 개발 항헬리코박터 제제류의 제품화를 위한 연계시험에서 동물 및 인체 유효성 평가시 공통 항균범위를 0.5%이상으로 설정할 수 있는 유의성 관련 결과를 확보하였다($P < 0.05$).

비교물질로 사용한 S-NANA처리구는 0.1%이상의 농도로 첨가시 공시균에 대한 항균 유의성이 인정되었으며, 이러한 결과는 Sialic acid의 첨가농도가 증가하면 할수록 비례하여 항균성 역시 비례하여 증가하는 유의성일 확인되었다($P < 0.01$). 정상처리군과 S-NANA처리구를 기준으로 이들 원료 중 GMP만을 대상으로 효소처리 공정을 적용하되 항균 기능성 분인 Sialic acid를 분리 및 순도를 조정하여 제조한 7% 및 23% G-NANA 제제류의 항균 효능을 평가하여 보았다. 결과로서, GMP를 기질로 효소처리를 통한 Sialic acid를 분리한 G-NANA제제류를 처리시는 Sialic acid의 첨가농도가 0.1% 이상에서 항균성이 인정되었으며, Sialic acid 함량이 높을수록 항균성 역시 비례하여 증가하는 것으로 조사되었다($P < 0.01$). 이러한 결과를 표준 S-NANA 대비 항헬리코박터 제제류의 항균성을 평가하여 보았더니, 동일한 패턴의 항균 유효성을 보였는데, 항균성을 보이는 최적 문턱치는 Silaic acid의 처리농도가 0.1% 이상인 경우였다($P < 0.01$).

공시균류에 대하여 후보군 항헬리코박터 제제류를 처리시, 항균성 증대를 유도하기 위하여 선발한 Surfactant 700의 항균성은 공시균중에 따라 다소 차이를 보였지만 전반적으로 0.05%이상에서 99.8%이상의 높은 항균력을 보였다($P < 0.01$).

나) 비Wild Type형 헬리코박터균 대한 항균시너지 효과

공시 헬리코박터균중 비wild Type형인 *H. pylori* SS-1-passed-5를 공시균으로 하여 단일 항헬리코박터 소재류 및 여기에 Surfactant 700을 병행처리시 항균효능 증대성 차이를 비교하여 보았다(Fig 12.).

대조시료인 합성 S-NANA에 대한 항균성을 평가하여 보았더니, Silaic acid의 농도가 0.1% 이상에서 유의적인 항균효능을 보였는데, GMP를 기질로 효소처리를 통한 Sialic acid를 분리한 G-NANA제제류를 처리시는 Sialic acid의 첨가농도가 0.1% 이상에서 항균성이 인정되었으며, Sialic acid 함량이 높을수록 항균성 역시 비례하여 증가하는 것으로 조사되었다($P < 0.01$). 이러한 결과를 표준 S-NANA 대비 항헬리코박터 제제류의 항균성을 평가하여 보았더니, 동일한 패턴의 항균 유효성을 보였는데, 항균성을 보이는 최적 문턱치는 Silaic acid의 처리농도가 0.1% 이상인 경우였다($P < 0.01$). 공시균류에 대하여 후보군 항헬리코박터 제제를 처리시, 항균성 증대를 유도하기 위하여 선발한 Surfactant 700의 항균성을 평가(무처리구 : 100% 기준)하여 보았더니, 전반적으로 0.05%의 농도에서 91.8% 그리고 0.1%에서는 균의 정장이 42.9%로 감소되는 결과를 보였다.

따라서, 4종 헬리코박터균류중 *H. pylori* SS-1-passed-5를 대상으로 평가결과 단일 제제로 처리시는 항균 지표 미 기능성분인 Sialic acid는 0.1% 그리고 Surfactant 700의 경우는 0.05%이상의 농도가 최저 항균성을 나타내는 유의성을 보이는 농도범위인 것으로 평가되었다($P < 0.01$).

다) Wild Type형 헬리코박터균류에 대한 Surfactant 700와 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제 혼용시 항균성 및 항균 시너지 증대성 평가

공시균인 Wild TYPE형인 *H.pylori* P1WT, *H.pylori* SS1 및 *H.pyroli felis* 3종만을 단일균으로 각각 배양시, 칼슘 비혼합형 항헬리코박터형 소재류중 23% G-NANAP와 항균 증대성을 부여하기 위해 선발한 Surfactant 700을 대상으로 이들을 농도구배차이를 부여한 단일 및 혼용처리시 항균성이 증대되는지 여부를 평가하였다(Fig 13.).

(1) 단일제제별 항균성 평가

항헬리코박터 제제중 23% G-NANA을 대상으로 하여, G-NANA내 함유되어 있는 Sialic acid의 함량을 기준으로 0.1%와 0.25% 그리고 Surfactant 700의 경우는 0.005%와 0.01%를 농도범위에서 혼용처리시 항균시너지 효과를 평가하였다(Fig 13.).

또한, 선발 23% G-NANA의 항균성 평가는 공시균인 Wild Type 헬리코박터균 3종에 대하여 비교하므로써 균종별 항균성이 차이가 있는지를 동시에 평가하였다.

결과로서, Wild Type *H.pylori*균별 항균성을 평가하여 보았더니, 단일제제별 농도별 처리시 *H.pylori*균종별 항균성 효과는 유의성 있는 차이를 보였지만, 목표 농도에 적합한 항균성을 나타내었다.

*H.pyroli felis*경우는 항헬리코박터제제인 23% G-NANA를 첨가하지 않은 대조시험에서의 O.D수치는 1.15였음을 비교하면 0.1% 이상의 농도를 처리한 경우에는 0.05의 수치를 나타내어 가장 높은 항균성을 보였다($P < 0.01$).

그리고, *H.pyroli* P1WT의 경우는 무처리시는 0.43(O.D) 그리고 0.1% Sialic acid제제 처리시는 0.28로 감소 수치를 보였으며, *H.pyroli* SS1의 경우는 무처리시는 0.35(O.D) 그리고 0.1% Sialic acid제제 처리시는 0.26의 감소 수치를 보였다.

이를 기준으로 Sialic acid의 농도를 0.25%로 높게 처리한 경우에서 항균성 증가에 미치는 효과평가에서, *H.pyroli felis*는 성장이 이루어지지 않았는데, *H.pyroli* P1WT는 0.02 그리고 *H.pyroli* SS1는 0.06의 O.D수치를 보여 균마다 항균성의 차이는 다소 인정되었지만, 결국 0.1% 이상의 Sialic acid와 접촉한 *H.pyroli*균은 균종류 상관없이 농도에 비례하여 우수한 항균효능을 나타내는 동일한 패턴을 보였다($P < 0.01$).

결론적으로, Wild Type 3종의 헬리코박터균들을 대상으로 한 단일 항헬리코박터 제제와 Surfactant 700의 처리시 3종 Wild Type *H.pylori*균류에 대한 항균성 평가결과, Sialic acid는 0.1%이상 그리고 Surfactant 700은 0.01% 이상의 농도에서 연구목표(in vivo 및 CRO)와 연계될 수 있는 유의성이 인정되는 항균성을 보임을 확인 하였다($P < 0.01$).

(2) Surfactant 700과 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제의 항균시너지 증대성 평가

3종 Wild Type *H.pylori*균별 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제(Sialic acid 함유량 기준 처

리)와 700에 대하여 단일 및 혼용처리시 균종별 항균성 차이확인 및 항균 시너지 효과를 보이는지를 평가하여 보았다(Fig 13.).

결과로서, 단일 항헬리코박터 제제를 처리시 가장 항균효과가 높았던 *H.pyroli felis*의 경우를 우선으로 700만을 0.01% 처리시 O.D수치는 약 0.06(무처리시 1.15)이었는데, 여기에 Sialic acid를 0.1% 그리고 0.25%를 병행처리시는 균의 성장이 대부분 이루어지지 않아 700은 항균시너지 효과를 증대시키는 효능이 뛰어난 것으로 평가되었다($P < 0.01$).

H.pyroli P1WT의 경우도 무처리시 OD수치가 0.43였음을 기준으로, 23% G-NANA내 함유된 Silaic acid를 유효성분으로 하여 이를 0.1%와 0.25%를 처리시는 O.D수치는 약 0.26와 0.02로 나타났으며, 역시 700을 단일제제로 하여 0.005%와 0.01%를 처리시는 0.35와 약 2.0으로 균의 성장이 억제됨과 동시에 두 제제 공히 처리량이 증가하면 공시균에 대한 항균성 또한 동일하게 증가하는 패턴을 보였다($P < 0.01$).

이를 기준으로 23% G-NANA(Sialic acid 함량 기준)를 0.1%와 0.25%로 그리고 Surfactant 700은 0.005%와 0.01%로 하는 농도구배차를 부여하여 혼용처리시, Surfactant 700에 의한 항균 증대성 여부를 평가하여 보았다.

결과로서 Sialic acid와 700을 병행 처리시 항균 시너지 효과는 유의성 있는 증대효과를 보였는데, Silaic acid를 0.1%(OD : 0.26)를 기준으로 여기에 700을 0.005% 그리고 0.01%를 각각 혼용시 O.D수치는 0.22 그리고 0.08로 감소하였고, Sialic acid를 0.25%(OD : 0.02)로 2.5배 높게 하는 조건에서 역시 700을 0.005% 그리고 0.01%로 동일농도로 혼용시 0.018 그리고 0.01로 감소하는 결과를 보였다($P < 0.01$).

H.pyroli SS1의 경우는 역시 무처리시 OD수치는 0.35인데, 항균유효성분인 Silaic acid를 역시 0.1%와 0.25%로 하는 농도처리시 약 0.26와 0.06으로 나타났다. 또한, 동일 공시균을 대상으로 700만 0.005%로 처리시는 0.34로 나타나 무처리 시험구 대비 미미한 항균성을 보이는 경우였으나, 0.01%로 처리농도를 높힌 경우에는 0.26으로 항균성 증대 효과가 나타났다. 따라서, 항헬리코박터 제제와 700의 경우는 농도별 처리가 항균성 증대에 주요한 요인으로 작용함이 확인 되었다($P < 0.01$).

단일 제제만을 대상으로 23% G-NANA를 0.1%와 0.25%로 그리고 Surfactant 700은 0.005%와 0.01%로 하는 농도구배차를 부여하여 혼용 처리시, Surfactant 700에 의한 항균 증대성을 여부를 이중 공시균에서도 동일한 패턴을 보이는지를 평가하여 보았더니, *H.pyroli* SS1의 경우도 *H.pyroli* P1WT와 *H.pyroli felis*의 결과와 동일하게 항균 시너지 효과는 유의성 있는 증대효과를 보였다.

즉, Silaic acid를 0.1%(OD : 0.26)를 기준으로 여기에 700을 0.005% 그리고 0.01%를 각각 혼용시 O.D수치는 0.25 그리고 0.12로 감소하였고, Sialic acid를 0.25%(OD : 0.26로 2.5배 높게 하는 조건에서 700을 0.005% 그리고 0.01%로 동일농도로 혼용시는 0.04 그리고 0.02로 감소하는 결과를 보였다($P < 0.01$).

결론적으로, Wild Type 3종의 헬리코박터균들을 대상으로 한 항헬리코박터 제제와 항균성 증대를 위한 목적으로 하는 Surfactant 700의 혼용처리시는 Sialic acid의 항균성을 보다 증대시키는 동일 효능을 보이는 것으로 확인되었다($P < 0.01$).

3) 칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제의 항균 시너지 효과

본 결과는 칼슘 강화 글라이코마크로펩타이드 가수분해물을 유효성분으로 하는 헬리코박

터 파이로리 감염 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 헬리코박터 파이로리 감염 예방 또는 개선용 건강기능식품 개발 가능성을 평가하기 위하여, 칼슘 혼합형 항헬리코박터 소재류와 700을 농도구배 차이를 부여하여 단일 및 혼용처리시 헬리코박터균에 대한 항균 시너지 효과의 평가를 위하여, 공시균중 *H. pylori* SS-1-passed-5에 대하여 Sialic acid를 항균 기능성분으로 하여 평가하였다(Fig 14.).

즉, 칼슘을 혼합한 Ca-GMP의 경우는 항균 유효성이 인정되지 않았음($P < 0.01$)을 기준으로, 이를 기질로 하여 효소처리를 통하여 Sialic acid를 분리시켜 항균성을 보유토록 제조한 Ca-GMP-NANA의 항균성을 살펴보았다. 결과로서, CaNANA-GMP제제의 Sialic acid 농도가 0.1%에서는 유의성 있는 항균성 인정되지 않았는데, 이보다 높은 농도인 0.25%이상의 농도구배에서 공시균인 *H. pylori* SS-1-passed-5의 항균효능은 약 56%이상 이었다($P < 0.01$). 이를 기준으로 항균효능 증대형 제제로서 선발된 Surfactant 700 병행처리시 항균효능 극대화 유도가 가능한 적정 농도를 살펴보았더니, 0.05%이상의 농도로 병행처리시 제균력은 62%이상으로 가장 효과가 높은 것으로 평가되었다($p < 0.05$). 즉, 칼슘혼합형 항헬리코박터 후보제제들은 항균특성을 보면 Sialic acid를 분리하지 않은 비교구인 Ca-GMP제제의 경우는 처리농도에 상관없이 항균성인 인정되지 않았는데, 효소처리를 통하여 항균기능성분인 Sialic acid를 분리한 경우는 목표 항균성을 보였음과 동시에 칼슘제제를 혼합한 경우는 목표 항균효능이 보다 증가하였으며($P < 0.01$), 여기에 Surfactant 700을 병행 처리하는 이들 항균성이 보다 더 증대시킬 수 있음을 확인 하였다($P < 0.01$).

라. 항헬리코박터 소재류의 안전성 기초평가

마우스를 대상으로 항헬리코박터 소재류의 헬리코박터균에 대한 감염예방 및 치료효과 평가를 위한 전체 시험간 개발 항헬리코박터 제제류의 안전성을 평가한 결과는 다음과 같다(Fig 15~16.).

전체 시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았으며, 역시 실험 전 기간 동안 외관상 일반증상관찰에서 특이한 이상소견 또한 관찰되지 않았으며, 최종 부검결과 기관별 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다. 또한, 전체 시험기간 동안 체중변화 조사를 통한 안전성을 평가하여 보았더니, 정상군 대비 칼슘 비혼합형 소재류는 체중증가효과를 보였음에 비하여, 칼슘 혼합형 소재류의 경우는 체중감소효과 보였는데, 감염예방 및 치료효과 상관없이 전체 시험군에서 유사한 패턴을 보였다($P < 0.01$). 항헬리코박터 소재류의 제균효과를 증가시키기 위하여 식품첨가물 공전에 등록된 선발 Surfactant 700의 경우는, 단일물질을 처리한 경우는 안전성을 보유하고 있지만 칼슘혼합형 항헬리코박터 소재(NANA와 칼슘을 동시 보유형 CaNANA-GMP)와 병행처리시 체중감소효과를 보다 감소시키는 것으로 평가되었으나 안전성에 있어 유의성은 인정되지 않았다($P < 0.05$). 개별인증 신청형(4~6단계) 연구에서는 칼슘 혼합형 또는 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 소재류(0.5% 이상)와 700(0.1% 이상)을 혼합한 제형화 레시피를 적용하여 시제품을 제조하고, 이를 인체유효성평가(CRO)에 사용하는 것이 적절하다고 판단되었다.

관련하여 세부적인 평가결과는 다음과 같다.

1) 예방효과 시험군(체중증감 기준)

예방효과시험군의 경우는, 최종 27일이 경과시 다음과 같은 체중변화 차이를 보였다. 정상군($32.3 \pm 1.2g$, 100%기준) 대비 전체 시험구에서 최저 106%에서 최대 130%범위의 체중 증가 효과를 보임으로서 안전성은 인정되었다(Fig 15., $P < 0.01$).

칼슘 비혼합형 시료군의 경우는, 합성 S-NANA는 정상군 대비 98.1%수준 이었는데, 7% G-NANA는 약 104% 그리고 약 23% G-NANA는 약 101% 이상의 체중증가 효과를 보임으로 인하여 치료효과 평가군과 유사하게 우유유래 시험소재는 합성NANA에 비하여 보다 높은 안전성을 보였다($P < 0.01$). 칼슘 혼합형 시료군의 경우는, 정상군 대비 Ca-GMP는 105%의 체중증가효과를 보였음에 비하여 CaNANA-GMP소재의 경우는 85.4%의 체중감소 효과를 보임으로서, 항균성분인 NANA와 칼슘을 동시에 함유하는 경우 역시 치료효과 시험군과 유사하게 체중감소 효과가 나타났는데, 항균성분인 Sialic acid과 칼슘을 동시에 섭취시킨 경우는 체중저하에 있어 치료군과 유사하게 다소 영향을 미치는 것으로 평가되었으나, 전체적으로 안전성에 미치는 유의성은 인정되지 않았다($P < 0.1$). 항헬리코박터 효능 증대형 Surfactant 700을 단일 처리한 경우는 약 104%의 체중증가효과를 보였는데, 이를 칼슘 혼합형 시료(CaNANA-GM)와 병행 처리한 경우에는 86%의 체중감소 효과를 보였는데, 식품첨가물제제로 등록되었음을 고려하면 전체적으로 안전성에 미치는 유의성은 인정되지 않았다($P < 0.1$).

2) 치료효과 시험군(체중증감 기준)

치료효과 시험군의 경우는, 최종 31일이 경과시, 정상군(무처리구, 100%기준) 대비 단일 *H.pylori*처리구는 94.8%수준으로 나타나 공시균 감염에 따른 체중저하가 유발되었다(Fig 16., $P < 0.01$). 칼슘 비혼합형 및 칼슘혼합형 항헬리코박터 시료섭이군별 체중변화에 미치는 효과를 평가를 통하여 제제별 안전성을 평가한 결과, 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 시료섭이군 합성 S-NANA는 정상군 대비 79.1%수준 이었는데, 7% G-NANA는 105% 이상 그리고 23% G-NANA는 102% 이상의 체중증가 효과를 보임으로 인하여 우유유래 시험소재인 항헬리코박터제제류는 합성NANA에 비하여 높은 안전성을 보였다($P < 0.01$).

칼슘혼합형 시료군의 경우에는, Ca-GMP는 106%의 체중증가효과를 보였음에 비하여 CaNANA-GMP소재의 경우는 85.3%의 체중감소효과를 보임으로서, 항균성분인 Sialic acid와 칼슘을 동시에 함유하는 경우는 체중저하에 영향을 미치는 것으로 평가되었으나, 전체적인 유의성은 인정되지 않았다($P < 0.1$). 항헬리코박터 효능 증대형 Surfactant 700을 단일 처리한 경우는 약 104%의 체중증가효과를 보였는데 비하여 칼슘 혼합형 시료(CaNANA-GM)와 700을 병행처리한 경우에는 오히려 79%의 체중감소 효과를 보였다. 그러나, 항균성분인 Sialic acid, 칼슘 및 700을 동시에 섭취시킨 경우는 체중저하에 다소 영향을 미치는 것으로 평가되었으나, 전체적인 유의성은 인정되지 않았다($P < 0.1$).

항생제를 단일 처리한 경우와 정상군(무처리구, 100%기준)의 체중변화를 확인하여 보았더니, 104%의 체중증가 효과가 나타나 안전성은 인정되었다($P < 0.05$).

마. 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과 평가(*in vivo*)

1) 면역지표 평가(ELISA분석법)

마우스 위내 *H. pylori* SS-1-passed-5만을 대상으로 이를 감염 전 및 감염후에 항헬리

코박터 소재류와 Surfactant 700을 단일 및 혼용 처리시, 이들에 의한 감염예방 및 치료효과에 대한 염증저하 효과를 평가하였다. 이를 위하여 $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ 및 $IL-10$ 을 면역지표로 하여 ELISA분석(R&D system, Minneapolis, MN, USA)을 통하여 확인하였다. 즉, 헬리코박터균에 의한 점막궤양은 만성염증 및 점막세포의 섬유아세포화의 과증식으로 인해 암을 유발할 수 있으며, 이러한 만성염증에 의한 염증인자의 변화를 설정한 4종 면역지표 인자를 기준으로 평가하였다(Fig 17~18.).

가) Interleukin 6 (IL-6)

세포에 의해 염증으로 이끌어 내는 외상, 특히 화상이나 궤양같은 조직 손상에서 발견되는 대표적인 염증인자이고, Th-2세포에서 분비되는 IL-6는 정상적 면역 환경에서는 항체 생성을 적절히 자극하지만 면역체계 균형이 나빠지면(Th cell의 과잉활성) 체내 각종 염증 반응, 알러지 반응 및 자가 면역계 질환 등의 발현과정에 있어 최대 염증 반응 인자로 활약하게 된다. 특히 RA를 포함, 각종 자가 면역계 질환 발명 및 진행과정에서 IL-6는 통증과 염증을 악화시키는 강력한 Proinflammatory messenger로 작용하고 있다. 따라서, 항헬리코박터 제제류를 섭이시 위내 헬리코박터균을 제거할 수 있다면 IL-6수치는 감소할 것이고, 결국 염증저하 효과로 결과가 나타날 수 있다는 기보고 결과를 평가기준으로 하여 위내 감염전/후에 항헬리코박터 제제별 섭이가 감염예방 및 치료효과를 보이는지를 확인하였다. 결과로서, 전체 항헬리코박터 제제류 섭이에 따라 IL-6의 수치는 감염군에 비해 유의하게 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$).

예방효과와 관련하여, 단일헬리코박터균 만을 감염시킨 대조구의 IL-6수치는 7.60였는데, 제제별 처리에서 최저 1.04에서 최대 2.02로 나타나 전체 항헬리코박터 제제류는 IL-6의 발현증대에 있어 유의성 있는 효과를 보였다(Fig 17., $P<0.05$).

치료효과 관련 평가군 또한 단일헬리코박터균 만을 감염시킨 대조구가 IL-6수치가 98.1이었는데, 역시 항헬리코박터 제제류 전체 처리구에서 최저 18.6에서 최대 33.5범위까지 IL-6발현 증대성에 미치는 효과가 높은 것으로 평가되었다(Fig 18., $P<0.05$). 따라서, 항헬리코박터 제제류를 헬리코박터균의 마우스 위내 감염전 및 감염후로 구분하여 경구투여시 감염예방 및 치료효과를 헬리코박터균에 의한 점막궤양과 만성염증으로 인한 염증증감을 확인한 IL-6 발현 증대성 수치를 보면, 전체 항헬리코박터 제제류는 위내 감염전 및 감염후 헬리코박터균에 대하여 높은 항균성을 보임에 따라 위점막내 상재하는 균수를 감소시킴으로서 결국 염증저하를 유도하는 결과일 것이므로 이러한 결과가 IL-6의 발현증대성으로 나타났다고 할 수 있으므로, 최종적으로 개발 항헬리코박터 제제류는 감염예방 및 치료효과에 효과가 높은 것으로 인정되었다($P<0.01$).

나) Interleukin-1beta (IL-1 β)

면역 불균형 상태에서는 자가항체 생성을 증가시키기 때문에 이에 대한 억제는 상당히 의의를 가진다고 할 수 있다.

IL-1 β 는 염증상태에서 체온을 상승시켜 병원체 증식을 억제하거나 살상시키는 대표적 사이토카인이며 IL-1 β 가 지속적으로 증가되면 최종적으로는 염증성 사이토카인인 IL-6의 생산을 촉진하여 염증반응을 더욱 악화시킬 수 있는 물질로 알려져 있다. 또한, 과잉 생성된 IL-1 β 는 우울증, 관절염, 섬유조직염 등 염증성 병변과 밀접한 관련이 있고 염증

성 프로스타글란딘을 증가시켜 통증을 악화시킬 수 있다고 보고되고 있다. 따라서, 항헬리코박터 제제류를 섭이시 위내 헬리코박터균을 제거할 수 있다면 IL-6와 같이 IL-1 β 수치 또한 감소할 것이고 결국 염증저하 효과로 결과가 나타날 수 있다는 IL-6의 평가결과를 재확인하는 결과라고 할 수 있다.

예방편의 경우, 단일 헬리코박터 감염시험구 대비 GMP를 제외한 전체 항헬리코박터제제는 0.5%를 장기섭이한 마우스 형청내 IL-1 β 수치를 조사하였더니, 단일헬리코박터균만을 감염시킨 대조구는 7.60였는데, 제제별 처리에서 최저 1.04에서 최대 2.02로 유의성 있는 감소효과를 보였다(Fig 17., P<0.05).

치료효과에서는, 단일 헬리코박터 감염시험구(IL-1 β 수치 : 8.97) 대비 Silaic acid가 포함된 S-NANA는 3.31 그리고 Surfactant 700의 경우는 4.05으로 나타나 유의성 있는 감소효과를 보였다(Fig 18., P<0.05).

칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제류인 CaNANA-GMP과 CaNANA-GMP와 700을 혼용 처리구에서의 결과를 비교하여 보았더니 2.36과 2.50으로 역시 유의한 감소결과를 확인할 수 있었으며, 상용 항생제는 1.84의 수치를 보였는데, 이는 Sialic acid를 보유하는 항헬리코박터 제제와 비교시 평균성에 있어서 동등성이 인정될 수 있는 유의적 감소결과를 확인할 수 있었다(P<0.05). 그러나, GMP를 기질로 하여 효소분해를 통하여 Sialic acid를 분리하되 칼슘을 혼합하지 않은 Ca-GMP, 7% G-NANA 및 23% G-NANA처리구에서 IL-1 β 수치는 7.84 \pm 2.24, 5.46 \pm 2.76, 9.45 \pm 2.88 및 8.69 \pm 3.01로 나타나 Ca-GMP(P<0.1)를 제외하고는 염증저하 관련 유의성이 인정되지 않았다.

다) Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

종양 괴사 인자로 불리며 주로 염증반응에 포함되고 급성기 반응(acute-phase protein)의 구성원인 사이토카인임. TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되는데, 보조 T 세포, 자연살해세포, 그리고 뉴런 등의 다양한 세포에서도 분비된다. TNF α 는 체내 발열원으로서, 열이 나게 유도하거나, 세포 자살을 유도하거나, IL1과 IL6의 생산을 통해 패혈증을 유발하거나 감염을 유발하며 종양생성과 바이러스 복제를 억제하는 능력을 갖는 것으로 알려져 있으며 최근, 비정상적인 TNF α 의 조절은 알츠하이머, 암, 우울증, 염증성 장질환 (IBD)등에서 타깃으로 하여 치료를 실시하고 있다. 본 연구와 연계되어 면역지표 인자로 설정한 TNF α 는 상기평가 결과인 IL-6와 IL-1 β 수치가 동일 면역시스템이기 때문에 염증이 증가하는 경우는 동시에 증가하여야 하고, 염증이 감소하는 경우는 역시 동시에 감소하는 결과가 도출된다면 유의성이 인정된 다 할 수 있다. 상기 평가기준을 토대로 항헬리코박터 제제류에 대한 감염예방 효과여부를 TNF- α 의 수치와 연계하여 평가한 결과, 단일 헬리코박터 감염 시험구의 TNF- α 수치는 17.6이었는데, S-NANA의 경우만 14.1의 수치감소효과를 보인 이외에는 19에서 21.5까지 증가하는 결과를 보였다(Fig 17.).

치료효과 관련 평가결과, 단일 헬리코박터 감염시험구의 TNF- α 수치는 24.6이었는데 비하여 항생제 처리구는 13.7(P<0.01), S-NANA처리구는 15.3(P<0.01)의 수치를 나타내었다(Fig 18.).

칼슘 혼합형 항헬리코박 제제류의 TNF- α 수치를 살펴보았더니, 기질인 Ca-GMP는 23.4, CaNANA-GMP의 경우는 23.4로 나타나 유의성이 인정되지 않았지만,

CaNANA-GMP와 700을 단일 및 혼용처리한 경우에는 18.9와 19.6으로 감소하는 결과를 보였다($P < 0.1$). 이러한 결과는 위내 감염된 헬리코박터 제균형 항헬리코박터 제제의 항균성을 증대하기 위하여 혼용처리한 700이 위내 헬리코박터균의 제균과 동시에 급성염증을 저감시킬 수 있는 유효성을 보유하고 있는 이유로 평가되었다.

칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류인 7% G-NANA와 23% G-NANA의 경우는 TNF- α 수치가 21.1과 22.8로 증가하는 결과를 보였으므로, TNF- α 관련 염증저하에는 효과가 없는 것으로 잠정평가는 되었지만 상기 IL-6와 IL-1 β 평가결과에서 동일한 염증저하효과 인정되었던 결과와 비교할 때, TNF- α 증가결과는 헬리코박터 감염과 항헬리코박터 제제 처리에 따른 제균효과 유발 후 최종 염증저하효과와 연계성에서 TNF- α 발현시기와 또한 측정시기의 차이 등의 이유로 수치가 증감될 수 있기 요인이 많기 때문에 유의성 평가에서 제외하였다.

라) Interleukin-10(IL-10)

IL-10은 사이토카인 저해인자로도 알려져 있으며, Th2세포에서 생성되어 인터페론의 생성이나 항원표출을 억제하고 TNF α , IL-1 β 및 IL-6를 분비하는 대식세포의 활성을 억제하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 헬리코박터균 감염전 및 감염후 조건에서 항헬리코박터 제제류에 의해 위내 제균성을 보유하는 경우, 염증저감 효과와 관련한 IL-10의 수치는 증가하여야 감염예방 및 치료효과와 관련하여 바람직한 결과라고 할 수 있다. 이러한 평가기준을 적용하여 칼슘혼합형 및 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류로 구분하여 감염예방효과를 관련 IL-10의 발현에 미치는 영향을 평가하여 보았다(Fig 17.). 우선 단일 헬리코박터균만 감염시킨 대조구의 IL-10수치는 8.21이었음을 기준으로 비교물질인 Surfactant 700와 S-NANA를 평가하여 보았더니 7.57과 4.14로 감소하는 결과가 나타나 예방효과 관련 면역인자인 IL-10 발현에 영향을 미치는 유의성은 인정되지 않았다.

칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류만을 대상으로 하여 이들이 IL-10 발현에 미치는 효과를 살펴보았더니, GMP는 18.3, 7% G-NANA는 17.4 그리고 23% G-NANA제제는 18.1로 나타나 대조구 대비 222%, 211%와 219%로 조사되었는데, 이러한 결과는 기질을 포함한 전체 칼슘 비혼합형 헬리코박터 제제는 면역인자인 IL-10발현에 유의성 있는 영향을 미치는 것으로 평가되었다($P < 0.01$).

칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제류의 경우도 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류와 유사하게 Ca-GMP는 20.3($P < 0.01$)과 CaNANA-GMP는 8.43($P < 0.1$)로 나타나 역시 IL-10 발현에 영향을 미치는 것으로 평가되었다.

상기 감염 예방효과 관련 평가결과를 기준으로 치료효과에서의 항헬리코박터 제제류가 IL-10의 발현에 미치는 효과를 역시 비교하여 보았다(Fig 18.).

선행연구 결과에서 단일 헬리코박터균만 감염시킨 대조구의 IL-10수치는 11.6이었음을 기준으로 비교물질인 Surfactant 700과 S-NANA의 경우에는 4.08과 8.68로 감소하는 결과가 나타나 면역인자인 IL-10 발현에 영향을 미치는 유의성은 예방효과와 동일하게 인정되지 않았다. 이러한 결과는 항균성분인 Sialic acid와 항균 증대성 제제로 적용한 700의 경우는 IL-10의 경우에는 영향을 미치지 못하는 것으로 평가되었다.

칼슘 비혼합형 헬리코박터 제제류의 처리에 따라 GMP는 17.8, 7% G-NANA는 17.7

그리고 23% G-NANA제제는 18.1으로 대조구 대비 153%에서 최대 156%까지 증가되는 결과를 보임으로서 면역인자인 IL-10 발현에 영향을 미치는 것으로 평가되었으며 (P<0.01), 칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제류 처리구에서도 Ca-GMP는 17.6(P<0.01)과 CaNANA-GMP는 8.09(P<0.1)로 나타나 역시 IL-10발현에 미치는 영향이 유사하게 높은 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 비교물질로 적용한 Sialic acid가 IL-10의 발현에 있어 영향이 없었던 결과와 Sialic acid가 결합되어 있으나 효소비분리로 인하여 평균효과가 인정되지 않았던 칼슘 비혼합형 및 혼합형 항헬리코박터 제제류 제조간 기질이었던 GMP와 Ca-GMP 그리고 GMP를 기질로 하여 단순히 효소분리 공정만을 추가하여 제조함으로서, 전체 구성성분이 동일하였던 7% G-NANA 제제류와 Ca-GMP를 기질로 하여 역시 효소처리 공정만을 추가하여 제조하였던 CaNANA-GMP의 IL-10의 발현수치가 유의하게 높았던 결과를 보면, IL-10의 발현에는 Sialic acid 보다는 GMP 유래의 가수분해 단백질류가 영향을 미치는 것이 아닌가 하고 잠정적으로 판단되었다. 그러나, 700과 CaNANA-GMP를 단일 및 혼용처리시 IL-6 및 TNF- α 의 발현수치가 예방 및 치료효과 평가에서 전체적으로 높았던 결과를 기준으로, 역시 IL-10의 발현에 높은 영향을 미칠 것으로 예상하였던 700과 CaNANA-GMP를 혼용 처리시는 5.44로 나타남으로서 공시균 감염구보다 오히려 53%가 감소하는 결과를 보였다. 이러한 결과는, CaNANA-GMP과 700만을 단일제제로 각각 처리시 IL-10 수치가 8.09과 4.08의 수치를 보였던 결과를 기준으로 비교하면, 700을 혼용시 가수분해단백질 유래의 IL-10의 발현을 오히려 억제하는 역할을 하는 것으로 잠정평가 되었다.

헬리코박터 치료를 위한 병원 처방전(삼제요법)을 적용한 항생제류를 처리시, 이들이 IL-10의 발현에 미치는 결과를 확인하여 보았더니 IL-10이 수치가 1.81로 나타나 감염구 대비 약 84%가 감소하는 결과를 나타내었는데, 이는 정상군 3.42보다도 낮은 결과를 보였다. 이는 항생제는 단순히 헬리코박터균에 대한 제균효과만 보유하고 면역인자류의 발현에 있어서 미치는 영향은 없는 것으로 확인되었다.

2) 병리평가(현미경 관찰)

공시균인 헬리코박터균에 대한 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과 시험군별 로 확인시 염증저하에 따른 점막조직의 이상여부를 병리학적 조직검사를 통하여 확인 하였다.

헬리코박터균 감염에 의한 위조직은 장상피화상 및 위축성 궤양을 보이는데 개발 항헬리코박터형 제제류가 감염균에 대한 제균효과와 더불어 염증저하를 유도함과 동시에 장상피화상 및 위축성 궤양을 수복 및 궤양 완화증상을 유도할 수 있는지를 확인하기 위해 조직병리검사를 실시하였다.

만성염증시 림프구, 형질세포, 단핵구/대식세포, 소량의 호산구와 비만세포등이 다양하게 침윤되나 염증이 전 점막을 다 침범하고 선의 위축을 동반하면 만성위축성 위염이라고도 한다. 위 점막의 위축은 선을 구성하는 부위의 위축을 의미하며, 원인에 관계없이 점막의 손상이 있을 때 위축의 정도가 진행하여 점막의 두께가 얇아지게 되고, 만성위염이 오래 지속하여 심한 선 위축을 보이는 경우 염증세포의 침윤은 오히려 매우 감소되어 있다.

만성위염의 조직학적 소견이 헬리코박터균에 전부 의존한다고 할 수는 없지만 상당부분 이들에 의한 만성감염이라고 하는 기준을 설정하고 항헬리코박터 제제류별 감염예방 및 치료효과를 평가하였다(Fig 19~22).

가) 예방효과 평가

예방편의 경우, 정상군과 단일 헬리코박터균을 감염시켰을 때 위축성 위염이 심하게 나타났음을 기준으로 항헬리코박터 제제류별 차이를 비교하여 보았더니, 기질인 GMP는 일부 궤양이 보였으며, GMP와 칼슘을 혼합한 제제인 Ca-GMP는 화상장피생의 소견이 보임으로서 이들은 목표 헬리코박터균에 대한 감염예방 및 치료효과에 있어 유의성 있는 효과가 없는 것으로 평가되었다(Fig 19~20.).

표준물질로서 합성 S-NANA처리구는 정상소견을 보였음으로서 결국 항헬리코박터 제제내 항균지표 및 기능성분으로 선정된 Silaic acid는 확실히 위내 감염 헬리코박터에 제균효과를 나타내는 이유로 목표치인 예방효과가 있음이 확인 되었다($P<0.01$). 이를 기준으로 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제인 7% G-NANA와 Sialic acid함량을 높도록 정제과정을 거쳐 제조한 23% G-NANA의 경우를 살펴보았더니, 7% G-NANA처리구는 위내 점막 세포가 얇아져 있었으나 헬리코박터균만을 감염시킨 시험구에 비하여 그 정도는 심하지 않았으며, 23% G-NANA 시험구에서는 정상군에 비교하여 거의 정상 수준의 병리소견을 보였다(Fig 19.). 이러한 결과는 항균 기능성분인 Silaic acid의 함량차이에 의하여 헬리코박터균의 제균효과가 높게 나타남과 동시에 연계하여 위내 헬리코박터균에 의하여 유발된 위염으로 인한 염증감소와 더불어 세포의 침윤을 동시에 감소 시키는 것으로 평가 되었다($P<0.01$).

칼슘 비혼합제제의 예방효과 결과를 기준으로 항균성 관련 *in vitro* 평가에서 항균효과가 가장 높았던 칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제인 CaNANA-GMP의 경우를 확인하여 보았더니, 정상군 대비 일부 궤양의 소견이 보였으나, 심하지 않은 것으로 평가 되었다(Fig 20.).

이러한 결과는 칼슘 혼합형 및 칼슘 비혼합형 헬리코박터 제제류의 제제내 항균 지표 및 기능성분인 Sialic acid가 위내 헬리코박터균의 제균과 더불어 결국 감염예방 및 치료에 있어 중요한 역할을 수행하고 있음을 입증하는 결과라 할 수 있었다($P<0.01$). 또한, 항헬리코박터제제 처리시 혼용을 통하여 위점막의 장력해체효과를 유도하여 항균성분인 Silaic acid의 침투 및 확산능력을 증대시킴으로서 헬리코박터균에 대한 항균성을 증대시키기 위하여 사전 실험실적 항균성 평가에서 유의적인 효과를 보였던 700을 단일 제제로 하여 섭이시킨 경우에서 마우스 위내 궤양 감소에 효과가 있는지를 평가하여 보았더니, 정상군 대비 정상소견을 보였다. 이러한 결과는 Sialic acid와 마찬가지로 위내 활착한 헬리코박터균에 대한 제균 효과를 유발시킴으로서 위염을 예방한 결과라고 판단되었다($P<0.01$).

본 연구의 연계선상에서 최종개발 제품의 레시피가 최적 항균효능을 보유한 선발 항헬리코박터 제제와 Surfactant 700을 혼합하여 인체유효성 평가에 제공하는 것을 목표로 하고 있음에 따라 700과 칼슘혼합형 제제인 CaNANA-GMP와 700를 혼용 섭이시, 정상군 대비 병리소견을 확인하여 보았더니 모든 항헬리코박터 소재류중 가장 정상 병리임상 소견을 보였다. 이러한 결과는 선행 *in vitro*평가에서 CaNANA-GMP와 700를 혼용 처리시, 헬리코박터균류에 대하여 공통적으로 가장 항균효능이 높았던 결과와 연계하면, 결국 위 점막내 활착된 헬리코박터균에 대하여 700은 위점막의 장력을 해체역할을 수행하였고 더불어 Silaic acid의 침투 및 확산을 유도함으로써 항균력을 증대시켰을 것이고, 이에 따라 결국 위염의 발생을 사전에 차단함과 동시에 치료에 도움을 주었을 것이라고 판단되었다.

나) 치료효과 평가

마우스 위내 헬리코박터균을 사전에 감염시킨 조건을 조성후 여기에 항헬리코박터제제를 처리시 이들에 의한 제균효능과 연계되는 위염 및 위궤양 치료효과와 관련한 병리적 임상 결과를 살펴 보았다(Fig 21~22.). 우선 정상균 대비 헬리코박터균만을 감염시킨 대조구에서는 위축성 위염이 심하게 나타났음을 기준으로 제제별 차이를 비교하여 보았더니, 헬리코박터균에 대한 병원처방전을 기준으로 섭이시킨 항생제 처리구 경우는 뉴트로필과 마크로파지의 침윤이 일부 확인되었으나 정상균과 비교시 유의한 차이가 인정되지 않았다($P<0.01$). 또한, 항균 지표 및 기능성분인 Silaic acid를 단일 제제로 섭이시킨 S-NANA 처리가 위염 및 위궤양 치료에 효과가 있는지를 살펴 보았더니, 정상균과 비교하여도 차이가 없을 정도의 정상 소견을 보였다. 이러한 결과는 Sialic acid가 위내 사전 감염시킨 헬리코박터균에 대하여 우수한 항균효과를 보유하고 있음과 더불어 헬리코박터균에 의해 유발되었을 위궤양의 회복에 도움을 주었음을 확인 하였다. 이를 기준으로 Silaic acid를 효소처리에 따른 비분리로 인하여 *in vitro*평가에서 항균효과가 인정되지 않았던 기질류인 GMP와 여기에 단순히 칼슘을 혼합한 Ca-GMP제제를 섭이시의 결과를 확인 하여 보았더니, 역시 이들로 기인한 치료효과는 인정되지 않았다. 따라서, Sialic acid가 위내 사전 감염된 헬리코박터균에 대한 제균에 있어 핵심물질로 역할을 수행하였음을 재차 확인 되었다.

상기 평가결과를 기준으로 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류인 7% G-NANA와 23% G-NANA제제의 치료효과를 정상균 및 헬리코박터균 단일 제제로 처리시 결과와 비교하여 보았더니, 7% G-NANA는 위궤양 회복이 완료되지 않은 상태였고, 23% G-NANA의 경우는 일부 궤양이 발견되었다(Fig 21.). 따라서, 이들 제제에 대한 *in vitro*평가를 통하여 선별된 최적 항균농도인 0.5% (Sialic acid 기준)를 준수하여 마우스에 섭이시킨 G-NANA 제제류는 위내 활착된 헬리코박터균을 제균함과 동시에 감염 헬리코박터균에 의하여 사전에 유발되었던 위궤양을 점차적으로 회복시키는 생리활성을 보였다고 판단되었다. 이러한 결과는 Surfactant 700의 경우에서도 병리소견에서 유사하게 나타났으므로 동일한 생리활성 기전을 거쳤을 것으로 판단되었다.

칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제류인 단일 CaNANA-GMP 및 CaNANA-GMP와 700 혼용섭이구에서의 결과를 살펴보았더니, 정상균에 가까운 소견을 보였다(Fig 22.). 이러한 결과는 기질인 Ca-GMP가 치료효과가 인정되지 않았음과 더불어 Silaic acid가 핵심항균성분이었던 평가결과와 비교하면, Ca-GMP를 기질로 하여 효소처리 과정을 거쳐 항균성분인 Silaic acid의 성분을 분리 및 항균성을 부여한 제제인 CaNANA-GMP를 섭이시킨 결과에서 역시 위내 헬리코박터균의 제균효과를 유발한 이후에 역시 사전 유발된 위궤양을 치료하는 메커니즘이 연계하여 발현되었을 것이라고 판단되었으며, 700을 병행 처리한 경우도 역시 동일한 메커니즘을 보였을 것으로 평가되었다. 결과적으로 n-acetylneuramic acid를 backbone으로 한 CaNANA-GMP는 자체 제균력을 가지고 있으나 Surfactant 700과 함께 투여하였을 경우, 시너지를 더하여 유의하게 헬리코박터 파이로리를 억제하여 치료가 가능하며 비감염의 경우 예방의 효과도 있는 것으로 확인되었다($P<0.01$).

3) 위조직내 헬리코박터균 생존성 정량평가

공시균인 헬리코박터균에 대한 항헬리코박터 소재류의 감염예방 및 치료효과를 면역지표 평가(ELISA분석법)와 병리조직 검사를 통하여 평가함과 동시에 위내에 존재하는 헬리코박

터균의 생존수의 정량화를 RNA 추출 및 real-time polymerase chain reaction(real-time PCR) 분석법을 적용하여 다음과 같이 평가하였다.

가) 헬리코박터균 감염예방 효과

Fig 23은 7% G-NANA와 23% G-NANA를 1일 1회 단위로 마우스를 대상으로 일주일간 총 3회 구강으로 헬리코박터균과 함께 구강투여한 후, 개발소재의 위 내 헬리코박터균 감염 예방효과를 수치화하여 평가한 결과이다(Fig 23.). 결과로서, G-NANA의 *H. pylori* 감염에 대한 예방효과는 Sialic acid의 농도가 증가함에 따라 헬리코박터균 감염을 예방하였고, 그 수치는 각각 37%, 39%의 제균효과를 보였는데, 이러한 결과는 G-NANA내 Sialic acid의 농도가 항균성에 있어 지표 및 기능성분으로 적용하고 단백질의 경우는 항균성이 없음을 시사 하는 결과였다. 즉, 대조구로 설정된 100% GMP는 Sialic acid를 7% 함유하고 있으나 효소분리하지 않은 경우에서 헬리코박터균 감염을 예방하지 못하였던 결과를 미루어 확인 되었다. 따라서, GMP로부터 효소를 적용한 표준제조법을 적용 생산된 항헬리코박터균 제제내 Sialic acid는 헬리코박터균으로부터 위 내 감염을 예방할 수 있으며, 위 내 헬리코박터균 감염 예방효과를 나타낼 수 있는 최소한의 Sialic acid 농도는 0.1%이상인 것으로 확인되었다($P < 0.01$). 결론적으로, 유청가수분해단백(G-NANA)은 *H. pylori*로 유도된 위 내 감염을 예방할 수 있는 소재이며 Sialic acid가 지표 및 기능성분임이 확인하였다.

나) 헬리코박터균 치료효과

Fig 24는 *H. pylori*중 비Wild Type형 *H. pylori* SS-1-passed-5만을 우선 구강투여 방법으로 위내 감염시킨 후 항헬리코박터균 제제를 처리시 치료효과를 평가하여 보았다.

결과로서, 헬리코박터균만을 감염시킨 정상처리군의 Ct값을 100%로 기준으로 GMP를 처리한 경우에서의 치료효과 있는지를 우선 확인하여 보았더니, 11.0% 위내 헬리코박터균이 감소수치를 보였는데, 이는 개체간의 오차범위로 유의범위로 인정하지 않았다($P < 0.05$). 그러나, GMP를 기질로 하여 제조된 7% G-NANA와 23% G-NANA는 51%와 58%의 높은 수치의 헬리코박터균 제균 효과를 보였으며, 또한 상용화된 항생제를 투여한 시험군의 경우는 약 47%의 제균력을 보였다. 이러한 결과는 0.1% 이상의 Sialic acid를 섭이시 상용 항생제와 헬리코박터균에 대한 약효부분에서 동등성 이상의 치료효과를 보임이 확인 되었다($P < 0.01$).

Fig 24는 공시 헬리코박터균중 비wild Type형인 *H. pylori* SS-1-passed-5를 공시균으로 하여 단일 항헬리코박터균 소재류 및 여기에 Surfactant 700을 혼용처리시 항균효능 증대성 차이를 비교한 결과를 토대로, 인체에서 분리한 대표적인 Wild Type형 헬리코박터균인 *H. pylori felis*에서의 항균 및 항균 시너지 효과에 미치는 결과를 비교 평가하였다.

이를 위하여, 항헬리코박터균 소재류중 갈습 비혼합 G-NANA를 대상으로 항균 기능성분인 Sialic acid를 1% 그리고 Surfactant 700은 0.01%되게 조성 후, 이들에 대하여 단일 및 혼용 처리시 *H. pylori* 감염 마우스의 적출 위점막에 생존하는 헬리코박터균의 감소수치를 평가함으로써 추후 진행될 인체감염 헬리코박터균에 대한 감염예방 및 치료관련 인체유효성(CRO) 평가시, 최종 적용 시작품의 제조 레시피를 동시에 확정 하고 저 하였다. 결과로서, Wild Type형 헬리코박터균인 *H. pylori felis*를 감염시킨 정상처리군의 Ct값은 0.8이었음을 기준으로 G-NANA만을 1%의 농도로 섭이시킨 경우는 평균 0.2,의 감소수치를 보

였는데, 이러한 수치는 Wild Type형. *pylori felis*는 단일 G-NANA제제만의 경구투여만으로도 약 75%의 높은 항균성을 보였음을 시사한 결과였다(Fig 25.).

이러한 결과는 비Wild Type형 헬리코박터균에 대한 평가에서 G-NANA의 항균성이 51%~ 58%였음을 비교하면 Wild Type형. *pylori felis*의 항균성은 17~24%가 더 높은 수치였다. 항균성 증대효과를 보장하기 위해 선발한 700만을 0.01%로 섞이시킨 경우는 위내 Ct값은 0의 수치를 나타내어 역시 비wild Type형 헬리코박터균에 비하여 유의성 있는 감소결과를 보임을 확인 하였다($P<0.01$). 이러한 단일제제 처리결과를 토대로 이들을 혼용 처리시 위점막내 생존하는 균의 감소수치를 살펴보았더니, 역시 Ct값은 0으로 나타나 인체에서 분리한 현장형 헬리코박터균에 대하여 유의성 있는 항균효과를 나타냄과 동시에 감염 예방 및 치료효과가 높음이 확인 되었다($P<0.01$). 그러나, 비Wild Type형 헬리코박터균에 대한 평가에서 항헬리박터 제제는 0.5%(Silaic acid 함량 기준) 그리고 700은 0.05%를 섞이시켰던 경우와 Wild Type형 공시균에 대한 처리농도가 Sialic acid 1% 그리고 Surfactant 700은 0.01%였음을 고려하면 Wild 및 비Wild Type형 헬리코박터균 종류를 불문하고 항균성에 있어 크게 차이가 없을 것으로 평가되었다. 결론적으로, 유청가수분해단백을 이용한 항헬리코박터 소재 개발을 위한 연구에서 기존 항생제보다 뛰어난 제균효과를 보이는 항생제 대체형 천연항생제로 평가되었다.

바. 인체유효성 평가용, 항헬리코박터 시작품 제조 레시피 정립(제안)

본 연구는 헬리코박터균류를 공시균으로 하여 개발 항헬리코박터 제제류에 대한 기초 항균성(MIC) 평가와 이 평가결과를 적용한 기초 동물임상 평가를 통하여, 최종적으로 개발예정인 개별인증형 항헬리코박터 제품개발을 위한 인체유효성 평가(CRO)시 기초자료로 제시하고 또한 최종 고부가 제품화에 목표를 두고 기초연구를 실시하였다. 이를 위하여, 공시균으로는 인체에서 분리한 Wild Type형 3종과 비Wild Type형 헬리코박터균 1종을 분양받아 전체 시험간 사용하였다. 공시균에 대한 항헬리코박터 제제류는 칼슘 혼합형 및 칼슘 비혼합 제제류로 구분하여 전체 시험간 사용하였으며, 이때 항균 지표 및 기능성분으로는 Silaic acid를 기준으로 항균효능을 평가 하였다. 또한, 위내 감염시 헬리코박터균은 위점막내 상재하고 있으므로, Sialic acid의 접촉이 원활 할 수 있도록 위점막의 장력해체와 더불어 항균성분인 Sialic acid의 침투 및 확산능력 증대를 통한 제균능력을 향상 시킬 수 있도록 Surfactant 700(식품첨가물 등재 소재류중 선발)을 선발하여 전체시험간 적용하였다.

공시균류에 대한 항균성 평가는 항헬리박터 제제류와 700을 대상으로 농도를 조절한 후 이들을 단일 혹은 혼용방법을 적용하여, *in vitro*평가에서는 항균성(MIC)를 그리고 설정농도를 기준으로 마우스 대상 경구투여방법을 적용하여 역시 단일 또는 혼용처리를 통하여 최적 제균성 레시피를 정립하였다.

동물임상평가는 헬리코박터균을 감염전 및 감염후 단계로 구분하는 감염예방 및 치료효과로 시험균을 각 각 조성한 후, 항헬리코박터 제제류의 제균효과를 평가를 실시하였는데, 제제별 처리후 최종일에 도살한 마우스의 적출 위를 대상으로 면역인자(ELISA방법)를 지표로 하는 검정과 위내 상재하는 헬리박터균수의 정량화를 위한 PCR분석 및 병리임상 평가를 통하여 항헬리코박터 제제류의 최적 감염예방 및 치료효과를 평가하였다.

전체 연구결과 평가와 이를 토대로 인체유효성 평가(CRO)를 위한 시작품 제작을 위한 제

언을 다음과 같이 제안 한다.

1. 항헬리코박터 소재류 제조용 기질인 GMP와 Ca-GMP의 항균 유의성은 인정되지 않았다 ($P<0.01$).
2. 항헬리코박터 소재류의 목표 헬리코박터균에 대한 항균지표 및 기능성분은 Sialic acid로 확인 되었으며, 항균성은 0.1%이상인 경우에서 유의성이 인정되었다($P<0.01$).
3. 항균지표 및 기능성분인 Sialic acid는 헬리코박터균류(Wild Type 3종, 비Wild Type 1종)에 대하여 항균성에 있어 다소 차이를 보였지만 0.1%이상의 농도처리시 항균 유의성이 인정되었으며 ($P<0.01$), 비Wild Type보다 인체에서 분리한 Wild Type형 헬리코박터균에 대하여 항균 유의성이 보다 높은 것으로 확인되었다($P<0.01$).
4. 항균성 증대를 위해 선발한 Surfactant 700은 0.01%이상의 농도에서 항균성을 보유하고 있으며, 항헬리코박터 소재류의 위내 감염 헬리코박터균에 대한 항균성 증대성을 확보하기 위한 장력해체, 침투 및 확산능력이 우수함이 확인 되었다($P<0.01$).
5. 항균성분인 Sialic acid와 Surfactant 700을 혼용하여 처리하는 단일제제 처리시 보다 항균성은 유의하게 증가시킬 수 있음과 더불어 항헬리코박터 소재류의 위내 감염 헬리코박터균에 대한 제균성 또한 유의하게 증가함이 확인 되었다($P<0.01$). 헬리코박터균류 전체를 대상으로 실험실적 항균성은 Sialic acid는 0.25%이상의 그리고 700은 0.01%이상 그리고 감염예방과 치료효과에서는 Sialic acid는 0.5% 그리고 700은 0.1% 이상을 혼용처리시 유의성이 가장 높았다($P<0.01$).
6. 항헬리코박터 소재류인 칼슘 비혼합형 및 칼슘혼합형 제제류를 단일제제로 사용하는 경우, 전체 제제류는 헬리코박터균류에 대한 제균능력을 보유하고 있으며, Sialic acid 기준으로 0.25%이상인 경우에서 유효 항균성을 보유하고 있으나, 바람직하게는 0.5%이상의 농도범위를 추천한다($P<0.01$).
7. 항헬리코박터 제제류를 장기(감염예방 : 21일, 치료효과 : 31일) 섭이시, 사망사례 및 외과적 이상등은 관찰 되지 않았으나, 칼슘 혼합형 항헬리코박터 소재류에서 체중감소현상이 유발 되었으나 지속적 체중증가성을 보임으로서 안전성에 있어 문제는 없는 것으로 평가 되었다.
8. 항헬리코박터 소재류인 칼슘 비혼합형 및 칼슘혼합형 제제류를 단일제제로 사용하는 경우 보다 Surfactant 700을 혼용처리하는 경우에서 실험실적 항균성 및 동물임상에서 감염예방 및 치료효과가 유의성 있게 증가하였다($P<0.01$). 헬리코박터균류 전체를 대상으로 실험실적 항균성은 Sialic acid는 0.25%이상 그리고 700은 0.01%이상 그리고 감염예방과 치료효과에서는 Sialic acid는 0.5% 그리고 700은 0.1% 이상을 혼용처리시 유의성이 가장 높았다($P<0.01$).
9. 항헬리코박터 소재류를 헬리코박터균을 위내 감염을 유도한 후 마우스 섭이에 따라 감염 예방 및 치료효과를 평가하여 본 결과, 항헬리코박터는 유의성있는 제균능력을 보유하고 있으며, 헬리코박터균 유래 위궤양이 점진적으로 회복하는 치료효과를 보유하고 있음을 확인되었으며, 역시 혼용처리시의 효과가 유의적으로 높았다($P<0.01$).
10. 상기 결과를 종합하여, 전체 헬리코박터균류 4종에 대한 종합적인 항균시너지 효과 증대성 분석 레시피를 정립 결과,, 칼슘비혼합형 및 칼슘혼합형 항헬리코박터 전체 소재류의 선택성은 문제가 없으며, 다만 감염예방 및 치료효과를 동시에 확보할 수 있는 항균지표

및 기능성분인 Sialic acid를 기준으로 0.01% 이상 그리고 Surfactant 700은 0.1% 이상의 범위군에서 혼용처리방법을 권장하는 바이다.

11. 최종적으로, 경제성이 확보되는 전제로 자유롭게 선정하여 CRO평가 단계에서 제조 및 인체유효성 평가용 시작품의 제조 레시피를 표와 같이 권고한다(Table 9).

4. 종합결론

헬리코박터 파이로리는 사람의 위점막 조직에 정착하여 생존하면서 다양한 질병(만성위염, 소화성 위궤양, 위암)을 일으키는 병원성균으로 알려져 있으며, 한국 성인(40세이상)의 경우 헬리코박터 보균율은 70% 이상으로 주요 상부소화기 질병과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 보고되어 있다. 현재까지 알려진 헬리코박터 감염의 치료방법으로는 항생제 요법이 있으나 사용되고 있는 항생제 치료의 경우 항생제 노출에 따른 내성균의 발달과 환자의 치료 약물에 대한 적응의 어려움 등의 문제로 효과적인 치료에 제약되거나 부작용이 나타나 치료에 실패하는 경우가 대부분이다. 국내외적으로 헬리코박터균은 항생제 내성을 보유하는 패턴을 보임에 따라 천연항생제의 개발이 전 세계 연구자들에 의하여 활발하게 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 현장에서 대량 생산한 칼슘혼합형 및 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 소재류(지표 및 기능성분 : Sialic acid)는 실험실 및 동물 유효성 평가를 통하여, 헬리코박터균에 대한 치료 및 감염예방효과가 있는지를 상용 항생제와 비교하여 약효 동등성 이상의 효능을 보유하고 있음이 평가하였다. 종합결론으로서는 다음과 같다.

1. 위내 헬리코박터균의 감염예방 및 치료효과를 동시에 보유하는 칼슘 비혼합형 제제는 전체 G-NANA소재류와 칼슘혼합형 제제 CaNANA-GMP였으며, 항균성 관련 최적 농도는 0.5% 이상이였다(P<0.01).
2. 위내 헬리코박터균의 감염예방효과를 제제류는 칼슘 혼합형 제제 그리고 칼슘 비 혼합형 제제 순이였다(P<0.01).
3. 위내 헬리코박터균 감염예방 및 치료효과를 동시에 보장할 수 있는 레시피는 Sialic acid 0.5%이상 그리고 Surfactant 700을 0.01% 이상 이였으며, 700의 혼용농도가 증가하면 할수록 항균시너지 효과는 비례하여 증가하였다(P<0.01).
4. 항생제의 경우는 단순히 위내 헬리코박터를 제거하는 결과를 보유함으로써 이로 인한 염증을 감소시키는 효능을 보유함을 확인되었다(P<0.01).
5. 칼슘혼합형 및 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류는 위내 항헬리코박터균의 제거와 더불어 염증저하 효과와 더불어 관련 면역인자의 발현에 유의성 있는 영향을 미치는 것으로 평가되었다(P<0.01).
6. 위내 감염된 헬리코박터균에 대하여 항균 지표 및 기능성분은 Sialic acid이며 이들은 헬리코박터균 제거효과가 뛰어나며, 동시에 염증저감효과를 유발하면서 관련 면역인자를 유의하게 증가시키는 가능성을 보유하고 있다(P<0.01).

결과적으로, Sialic acid(Sialic Acid=NANA+N-acetylneuramic acid)를 지표 및 기능성분으로 하는 G-NANA 그리고 CaNANA-GMP는 인체분리형 Wild Type 및 비 Wild Type 헬리코박터균에 대하여 전체적으로 높은 항균력을 보유하고 있으며, 여기에 Surfactant 700

과 함께 투여하였을 경우, 보다 높은 항균시너지를 더하여 유의하게 헬리코박터 파이로리를 감염예방 및 치료가 가능하며 비감염의 경우 예방의 효과도 있는 것으로 판단되었다.

따라서, 우유 단백질인 GMP 유래의 Sialic acid는 헬리코박터 감염에 대한 예방효과와 치료 효과를 동시에 가지는 물질로 평가되며, 이는 상용되고 있는 항생제 물질보다도 뛰어난 헬리코박터 치료제로서의 제품화 가능성을 본 연구에서 평가됨으로서, 최종 헬리코박터균 제어형 위 건강식품 및 의약품으로서의 개발 가능성이 충분함인 확인하였다.

본 연구를 통하여 후보물질인 유단백질가수분해물 G-NANA제제류 및 CaNANA-GMP는 헬리코박터 파이로리에 대한 항균효과를 유의적으로 가지고 있음을 *in vitro* 및 *in vivo* 로 확인하였다.

Table 4. 전체시험간 사용된 시료별 특성 및 대표 표기명

구분	표기명	화합물 조성	함유량 (%)
무치리균	N	Normal (정상대조균)	
대조구	H.P(단일 헬리코박터균치리균)	<i>H.pylori</i> 감염 대조균	
비교구 1	S-NANA	Sialic acid	99.9%(표준체)
비교구 2	700	Surfactant (Capric acid-ester 700P2)	100%
비교구 3	Antibiotics	아목시펜+클래시리드+넥시움(세균감염치료제 및 궤양용제, 현재 단국대병원 소화기내과 처방전)	
시험구 1 (칼슘 비혼합형)	GMP	NANA(비분리형)+GlycoMacroPeptide	NANA 7%+GMP 비가수분해물93%
	7% NANA-GMP	NANA(효소분리형)+GlycoMacroPeptide	NANA 7%+GMP가수분해물 93%
	23% NANA-GMP	NANA(효소분리 및 고순도정제형)+GlycoMacroPeptide	NANA 23%+GMP가수분해물 87%
시험구 2 (칼슘 혼합형)	Ca-GMP	Calcium+NANA(비분리형)+GlycoMacroPeptide	칼슘 5%+NANA7%+GMP 비가수분해물 95%
	CaNANA-GMP	Calcium+NANA(분리형)+GlycoMacroPeptide	칼슘 5%+NANA 7%+GMP가수분해물 88% 함유

Table 5. 항헬리코박터 소재류 섭이에 따른 헬리코박터균 감염예방 효과평가를 위한 실험디자인

시험군	개체수	비고
대조군	8	PBS 만 투여
H.P 감염군	8	<i>H. pylori</i> SS-1-passed-5만 투여
GMP 투여군+HP감염	8	
S-NANA 투여+HP감염군	8	
Ca-GMP 투여+HP감염군	8	
7% G-NANA투여+HP감염군	8	<u>H.P와 시료를 1 주일 동안 3회 구강 투여함. 일주일 후 시료만 매일 구강투여함.</u>
23% G-NANA투여+HP감염군	8	
CaNANA-GMP투여+HP감염군	8	
700투여+HP감염군	8	
(CaNANA-GMP+700투여)+HP감염군	8	

Table 6. 항헬리코박터 소재류 섭이에 따른 헬리코박터균 치료효과 평가를 위한 실험디자인

시험군	개체수	비고
대조군	8	PBS 만 투여
H.P 감염군	8	H.P 만 투여
H.P감염 + Antibiotics투여군	8	
H.P감염 + GMP투여군	8	
H.P감염 + S-NANA 투여군	8	
H.P감염 + Ca-GMP 투여군	8	
H.P감염 + 7% G-NANA 투여군	8	H.P 만 1 주일 동안 3회 구강 투여하여 감염시킴. 일주일 후 <u>치료만 매일 3 주</u> 동안 구강투여함.
H.P감염 + 23% G-NANA 투여군	8	
H.P감염 + CaNANA-GMP투여군	8	
H.P감염 + 700투여군	8	
H.P감염 + (CaNANA-GMP+700) 병행 투여군	8	

Table 7. primer sequence

Gene	sense sequence	antisense sequence
FlaB	5' -TTC GAT TGG TCC TAC AGG CTC AGA-3'	5' -TTC TTG TTG ATG ACA TTG ACC AAC GCA-3'
GAPDH	5' -TCA AGA AGG TGG TGA AGC AGG-3'	5' -TAT TAT GGG GGT CTG GGA TGG-3'

Table 8. 원료 GMP 대비 효소처리후 항헬리코박터 시료내 아미노산류 변화여부 조사결과

No.	아미노산명	항헬리코박터 원료별 아미노산 함유량 조사(%)			비고
		GMP (기질)	7% G-NANA (비정제)	23% G-NANA (고순도 제조법 적용)	
1	Aspartic Acid	7.57	8.22	4.12	수원여대분석센터 (공인분석기관)
2	Threonine	11.0	10.82	6.34	
3	Serine	5.71	5.86	3.52	
4	Glutamic Acid	16.7	17.8	9.87	
5	Proline	7.80	8.16	6.35	
6	Glycine	1.11	1.10	0.60	
7	Alanine	4.10	4.26	2.55	
8	Cystein	0.053	0.056	0.50	
9	Valine	5.74	5.45	3.52	
10	Methionine	1.44	1.52	1.02	
11	Isoleucine	7.01	7.48	4.42	
12	Leucine	3.87	4.06	2.02	
13	Tyrosine	0.45	0.51	0.24	
14	Phenylalanine	0.82	0.73	0.74	
15	Histidine	0.68	0.73	0.30	
16	Lysine	5.45	5.96	3.02	
17	Arginine	0.85	0.92	0.30	
18	Tryptophan	0.26	0.26	0.02	
총아미노산(%)		80.58	83.95	48.99	

Table 9. 인체유효성 평가를 위한 시작용 제조 레시피 제안서

<i>H.pylori</i>		Surfactant 700				
		1%	0.5%	0.1%	0.001%	무처리구
Sialic acid	0.5%	NG	NG	NG	G	G
	0.25%	NG	NG	NG	G	G
	0.25%	NG	NG	NG	G	G
	0.1%	NG	NG	NG	G	G
	0.01%	NG	NG	NG	G	G
	무처리구	G	G	G	G	G

G: Growth, NG : Not Growth

FIC index : (MIC sample A in combination/MIC alone + MIC sample B in combination/MIC alone) $0.3015/2.5 + 0.3025/2.5 = 0.27$. Synergy



Fig 2. 항헬리코박터 소재류 섭취에 따른 헬리코박터균 감염예방 효능 평가를 위한 일정별 처리방법(전체시험기간 : 3주)

● NONE. ⊗ Sample only ⊗ Sample + HP



Fig 3. 항헬리코박터 소재류 섭취가 헬리코박터균 치료효과에 미치는 효능평가를 위한 일정별 처리방법(전체 시험기간 : 4주)

● NONE. ⊗ Sample only ⊗ Sample + HP ⊗ HP only

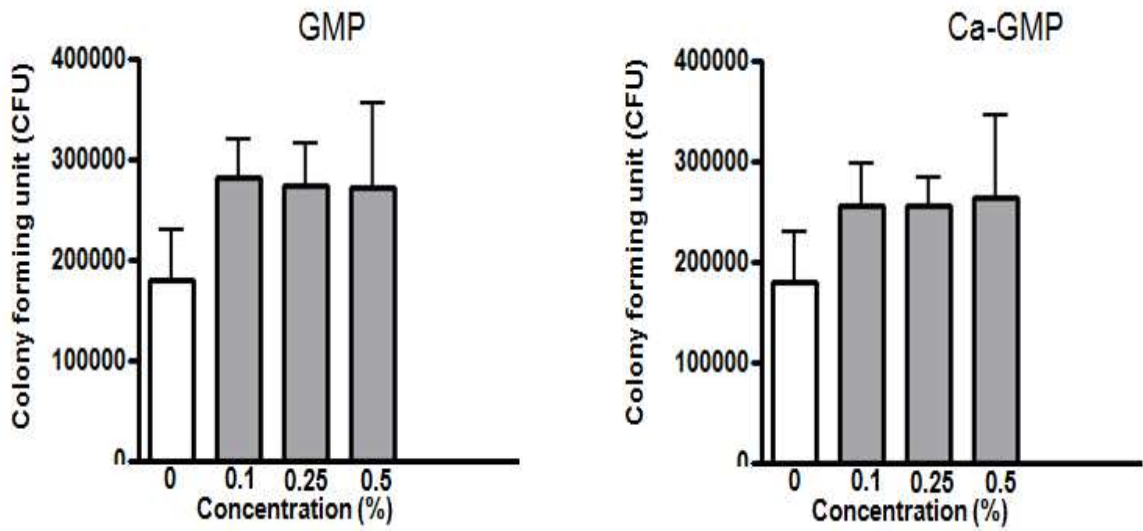


Fig 4 . 칼슘 비혼합형 기질(GMP) 및 칼슘혼합형 기질(Ca-GMP)의 항균성 보유여부 평가 결과

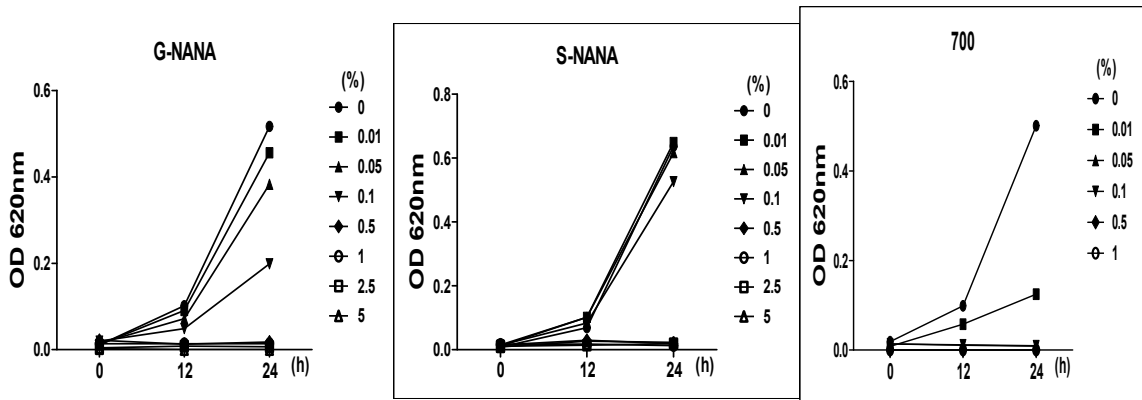


Fig 5. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(OD)

- G-NANA : 23%(Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700

- 공시균 : *Helicobacter pylori* P1WT

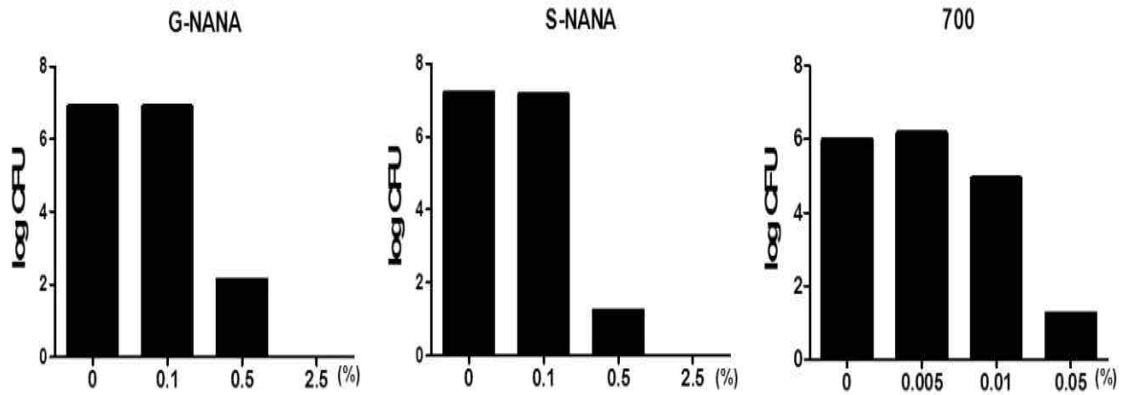


Fig 6. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(CFU/ml)

- G-NANA : 23% (Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700

- 공시균 : Wild TYPE, *H.pylori* P1WT

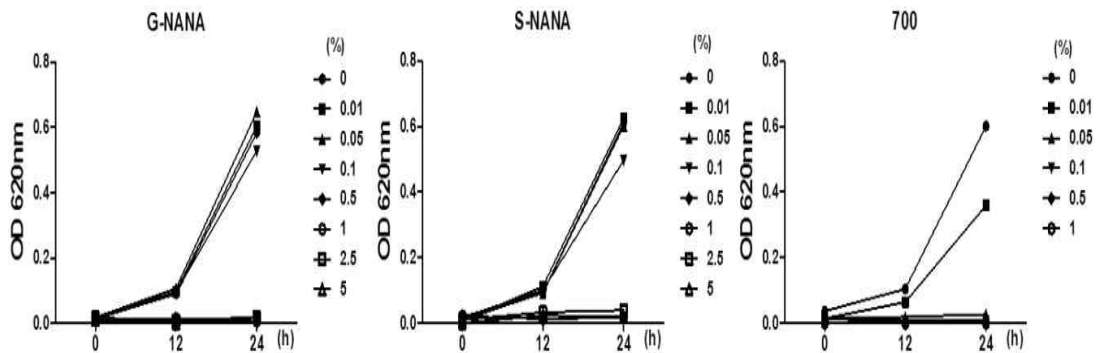


Fig 7. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(OD)

- G-NANA : 23% (Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700

- 공시균 : Wild TYPE, *H.pylori* P1WT

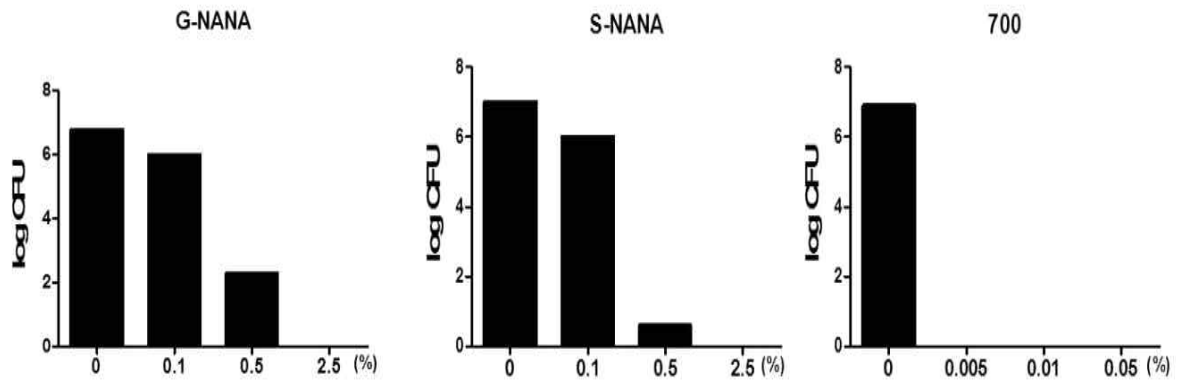


Fig 8. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(CFU/ml)

- G-NANA : 23% (Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700

- 공시균 : Wild TYPE, *H. pylori* P1WT

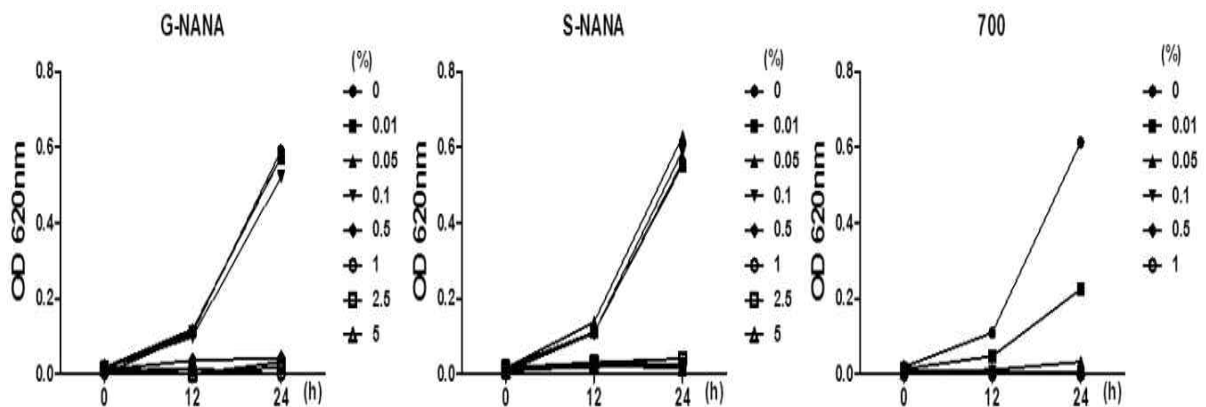


Fig 9. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(OD)

- G-NANA: 23% (Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700

- 공시균 : Wild TYPE, *H.pylori* SS1

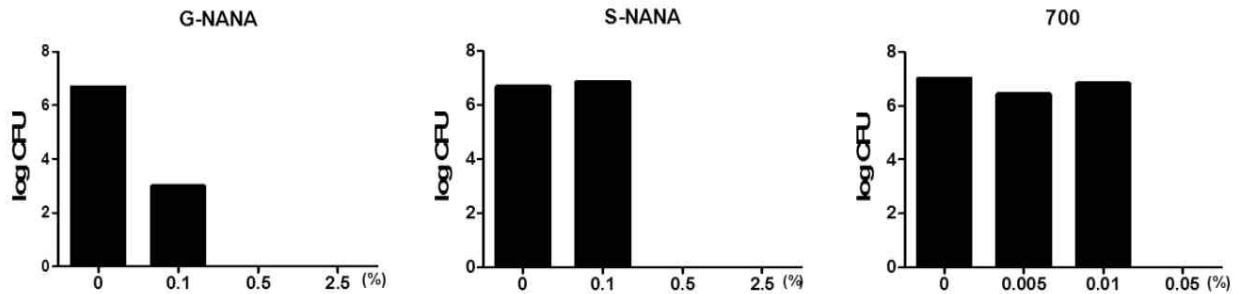


Fig 10. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(CFU/ml)
 - G-NANA : 23%(Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700
 - 공시균 : Wild TYPE, *H.pylori* SS1

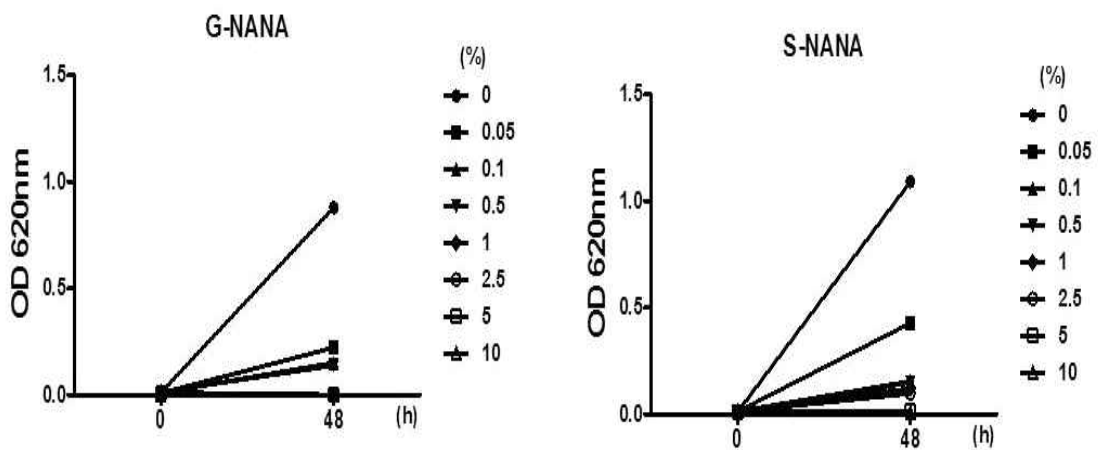


Fig 11. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과(OD)
 - G-NANA:23%(Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700
 - 공시균 : Wild TYPE, *H.pylori felis*

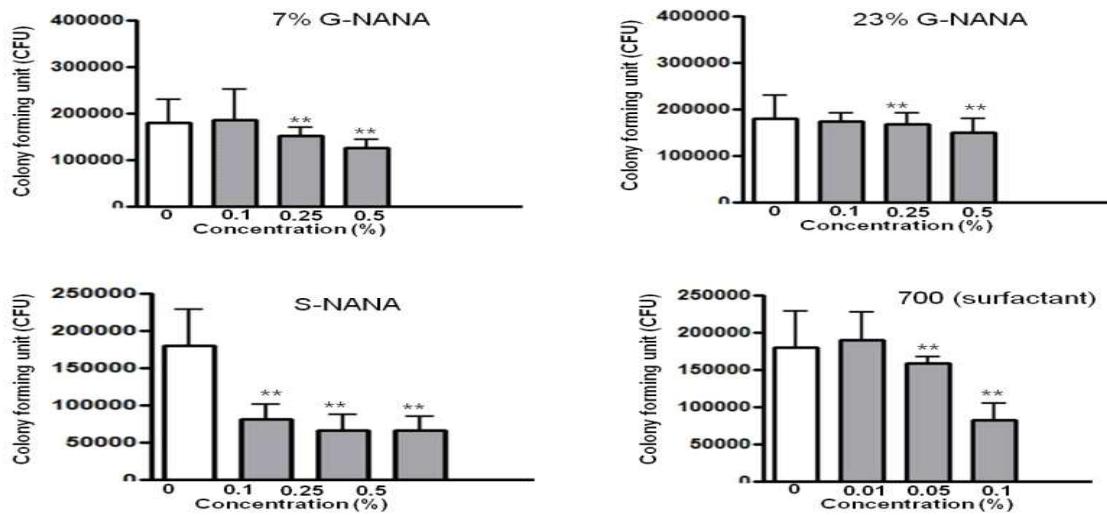


Fig 12. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과

- G-NANA : 7% 및 23%, S-NANA(Sialic acid 성분 기준) : 표준체 Sialic acid, 700 : Surfactant 700

- 공시균 : *H. pylori* SS-1-passed-5

- ** : $P < 0.01$, * : $p < 0.05$

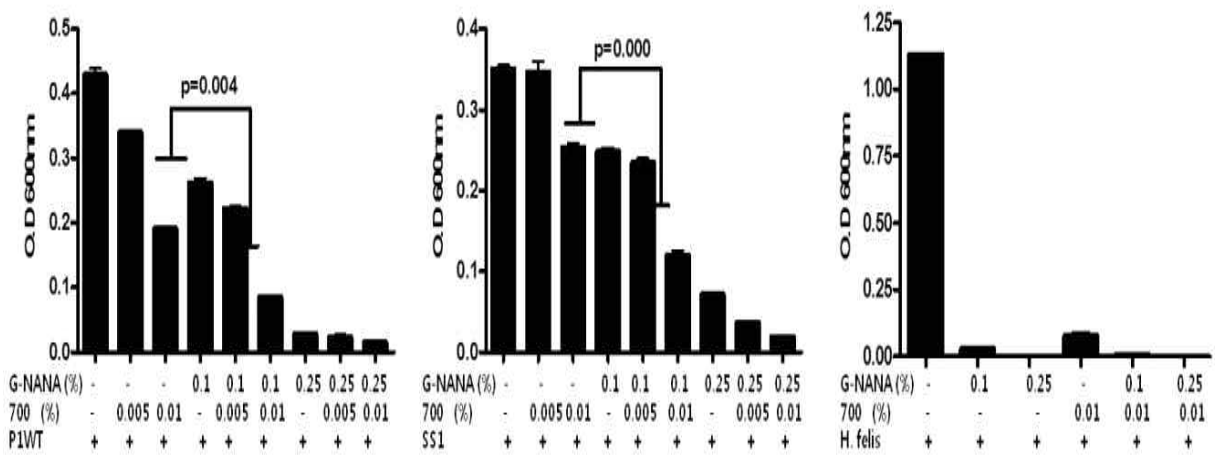


Fig 13. Wild Type형 *H. pylori* 3종에 대하여 항헬리코박터 소재류와 Surfactant 700을 농도별 및 단일 및 병행처리에 따른 항균시너지 효과 평가 결과

공시균 : *H. pylori felis* (H.felis), *H. pylori* P1WT (P1WT), *H. pylori* SS1 (SS1)

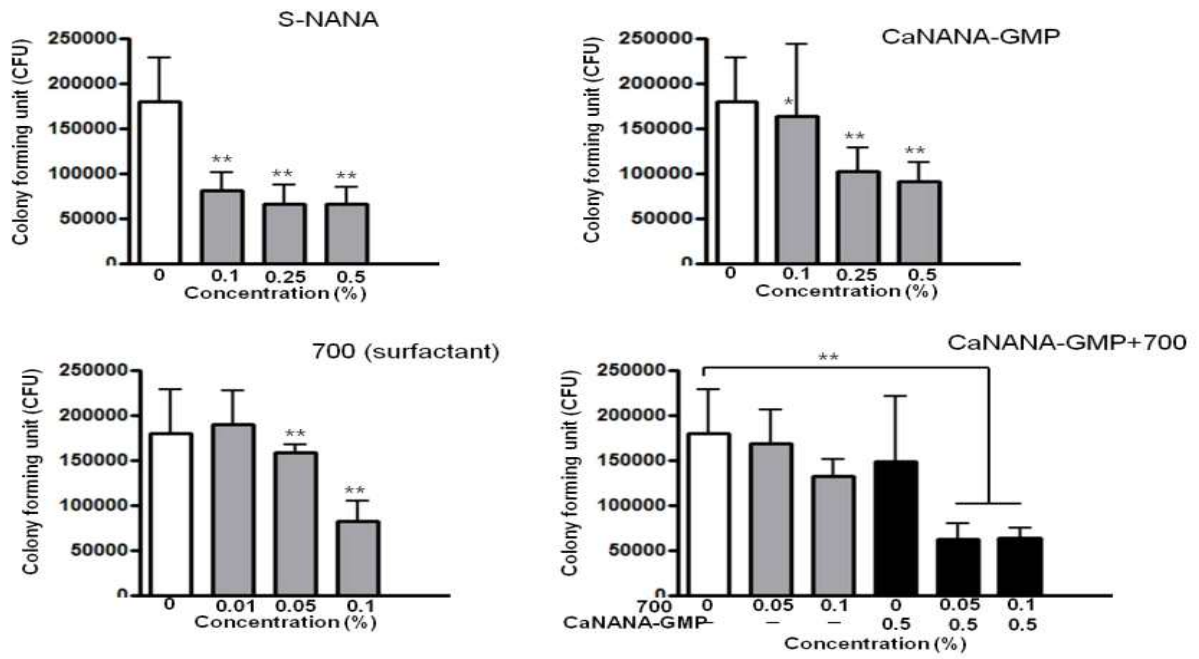


Fig 14. 칼슘 혼합형 항헬리코박터 후보 소재류별 농도별 항균성 평가 결과
 - 공시균 : *H. pylori* SS-1-passed-5
 - ** : P<0.01, * : p<0.05

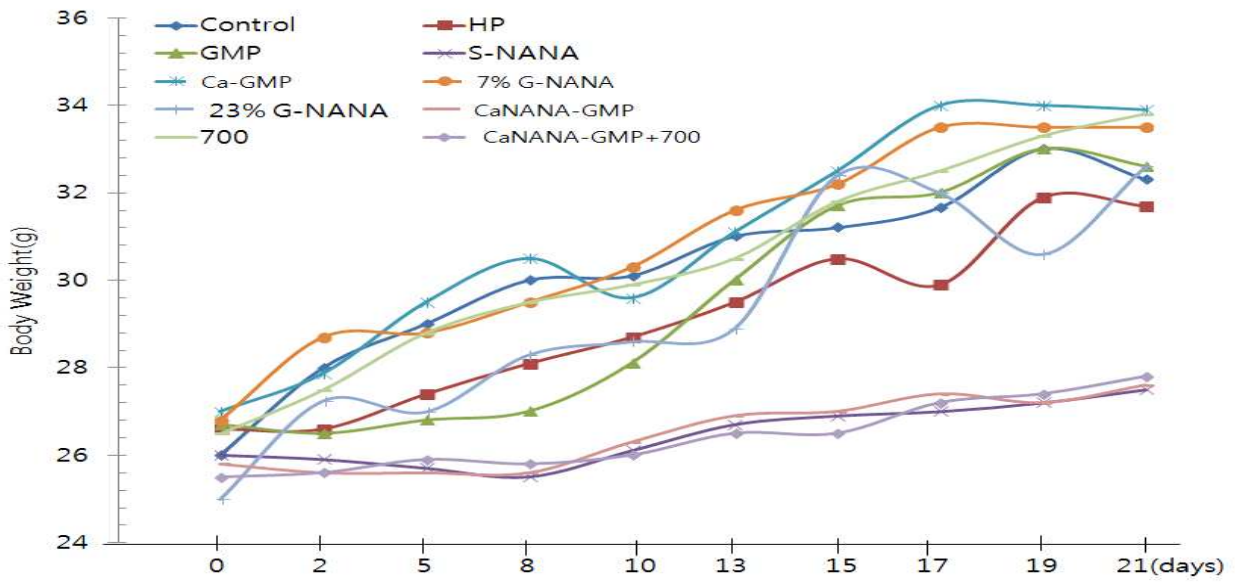


Fig 15. 항헬리코박터 소재류별 섭이시 헬리코박터균 감염예방 평가시 마우스 체중변화에 미치는 안전성 평가 결과

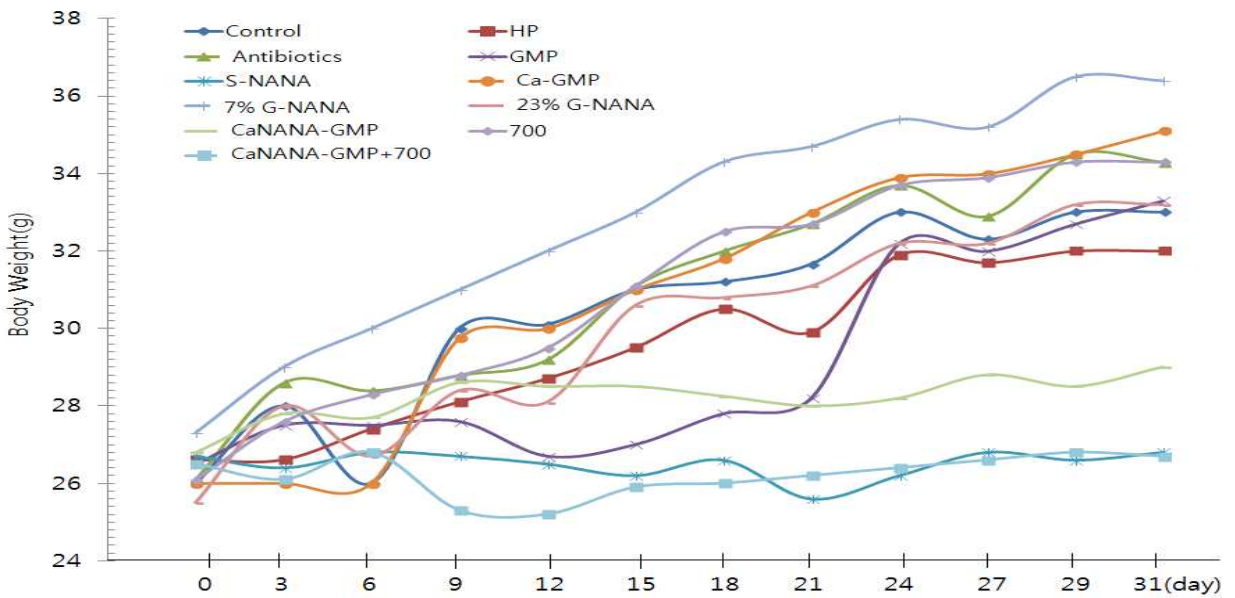


Fig 16. 항헬리코박터 소재류별 섭이시 헬리코박터균 치료효과 평가시 마우스 체중변화에 미치는 안전성 평가 결과

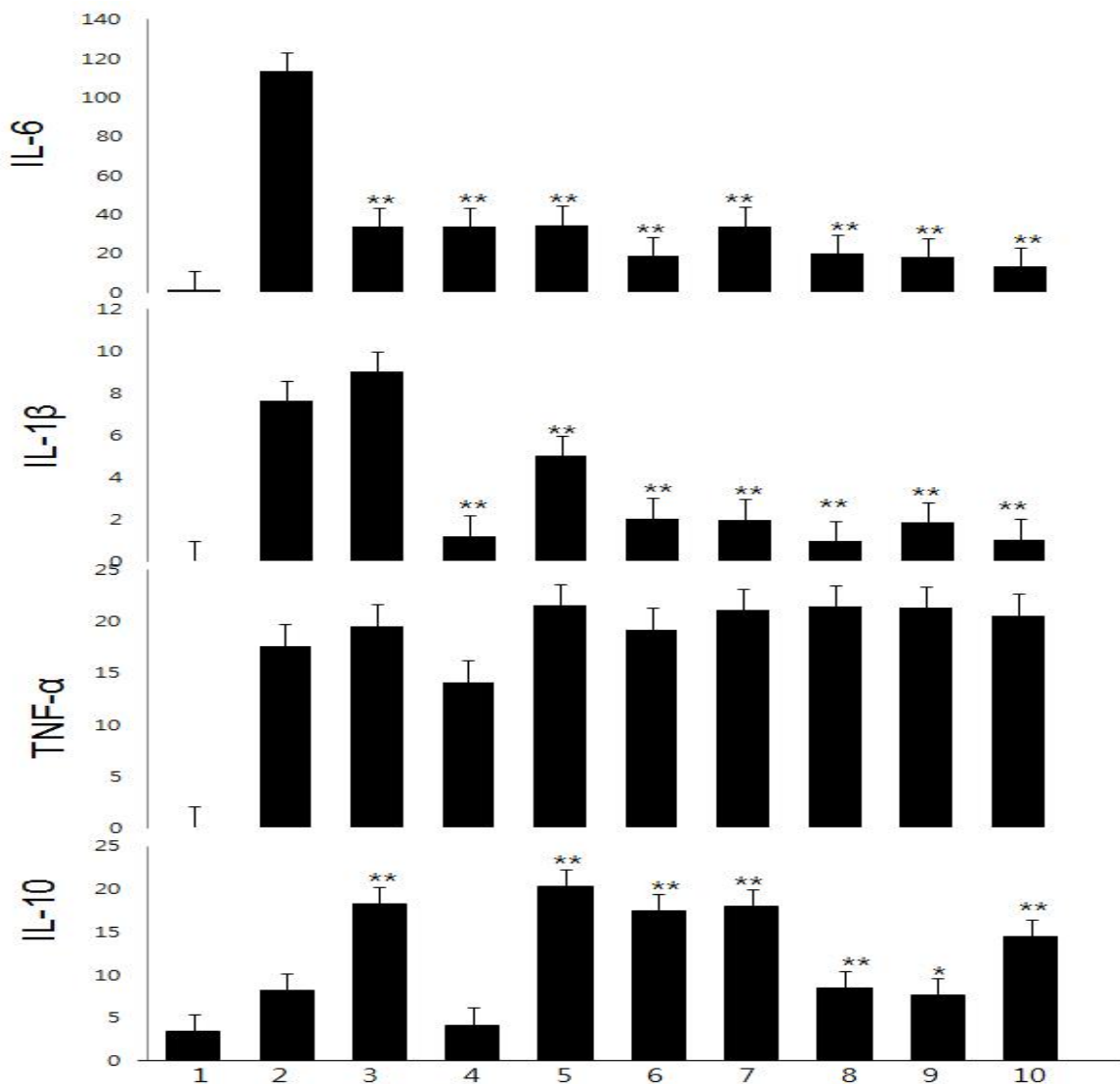


Fig 17. 헬리코박터균 위내 감염전 생쥐에 대하여 단일 갈슘 혼합형 및 갈슘비혼합형 항헬리코박터 소재류 섭이가 감염예방 효과에 미치는 효과 평가 결과

공시균 : *H. pylori* SS-1-passed-5

1: Control , 2: *H.pyroli*처리군. 3: 항생제처리군, 4: GMP처리군, 5: S-NANA처리군, 6: Ca-GMP처리군, 7: 7% G-NANA처리군, 8: 23% G-NANA처리군, 9 : CaNANA-GMP처리군, 10 : Surfactant 700처리군

* : P<0.01 (Vs *H.pyroli*처리군)

** : P<0.05 (Vs *H.pyroli*처리군)

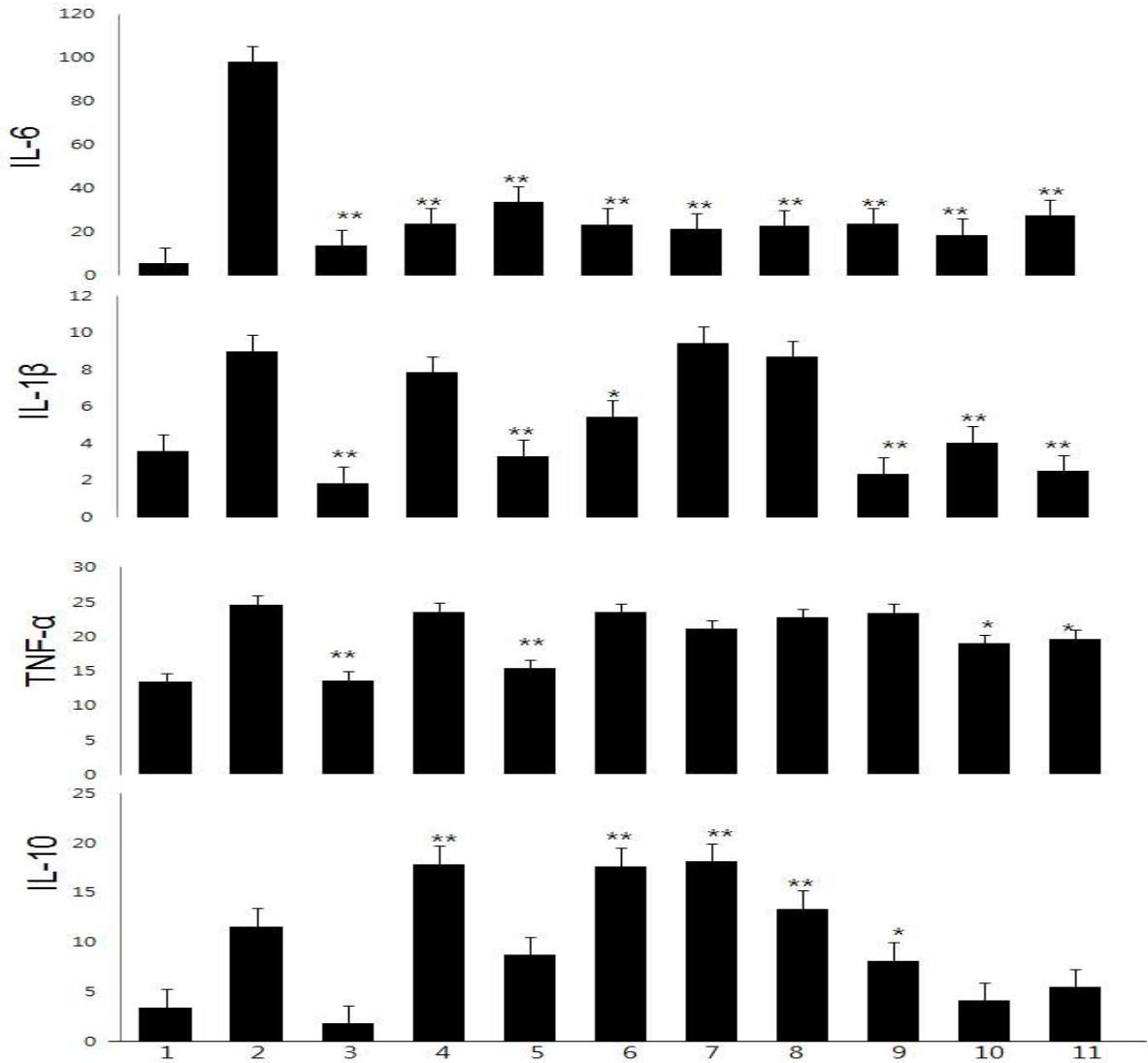


Fig 18. 헬리코박터균 위내 감염생쥐에 대하여 칼슘 혼합형 및 칼슘비혼합형 항헬리코박터 소재류의 단일제제 및 Surfactant 700의 혼용섭이가 치료에 미치는 효과 평가결과

공시균 : *H. pylori* SS-1-passed-5

1: Control , 2: *H.pylori*처리군. 3: 항생제처리군, 4: GMP처리군, 5: S-NANA처리군, 6: Ca-GMP처리군, 7: 7% G-NANA처리군, 8: 23% G-NANA처리군, 9 : CaNANA-GMP처리군, 10 : Surfactant 700처리군, 11:CaNANA-GMP+Surfactant 700처리군

* : P<0.01 (Vs *H.pylori*처리군)

** : P<0.05 (Vs *H.pylori*처리군)

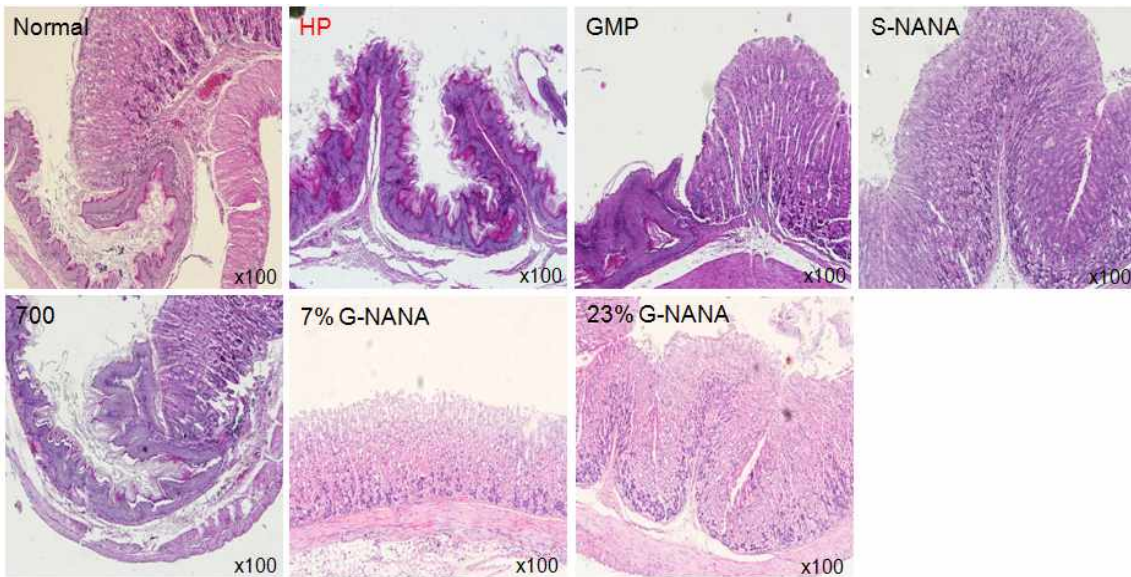


Fig. 19. 칼슘 비혼합형 항헬리코박터 제제류의 *H.pylori* 감염 마우스 모델에서의 감염예방효과 확인을 위한 병리조직학적 조사결과(21일후 위조직 적출 조사)

Normal : PBS경구투여군

HP : *H. pylori* SS-1-passed-5 경구투여군

GMP : Glycomacropeptide 경구투여군

S-NANA : 표준체 Sialic acid 경구투여군

700 : Surfactant 700경구투여군

7% NANA : 7% NANA(GMP 93% 점유)제제 경구투여군

23% NANA : 23% NANA(GMP 77%)제제 경구투여군

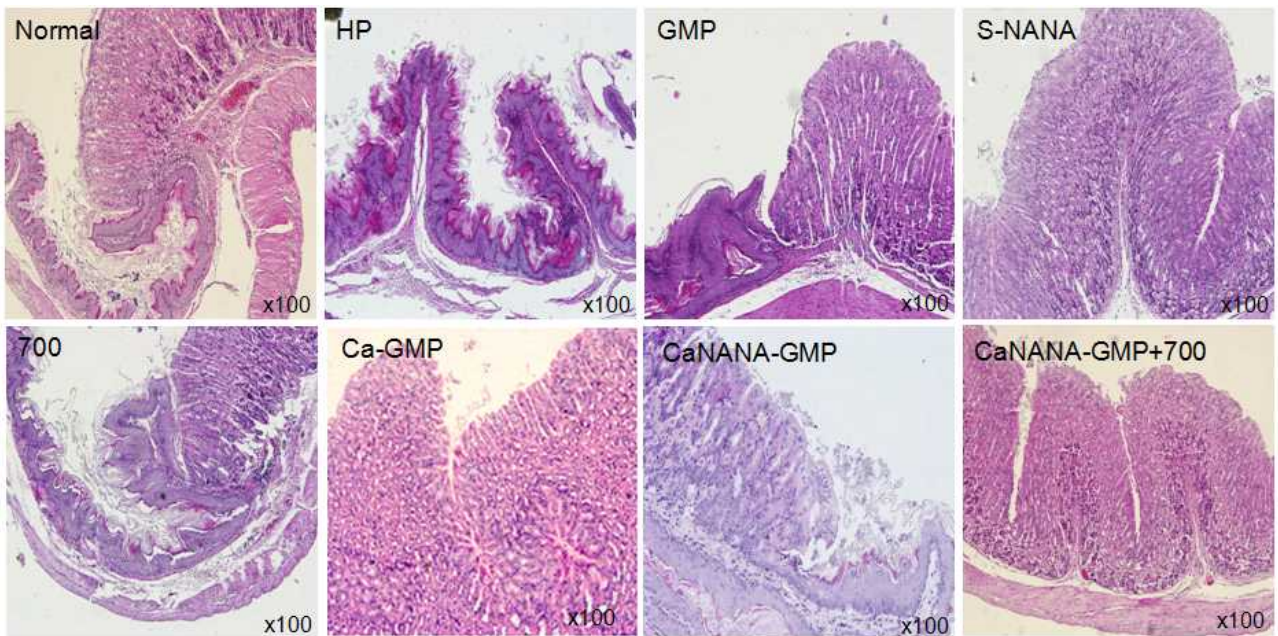


Fig 20. 칼슘 혼합형 헬리코박터 제제류의 *H.pylori* 감염 마우스 모델에서의 감염예방효과 확인을 위한 병리조직학적 조사결과(21일후 위조직 적출 조사)

Normal : PBS경구투여군

HP : *H. pylori* SS-1-passed-5 경구투여군

GMP : Glycomacropeptide 경구투여군

S-NANA : 표준체 Sialic acid 경구투여군

700 : Surfactant 700경구투여군

Ca-GMP : 5% 칼슘함유 GMP제제 경구투여군

CaNANA-GMP : 7% NANA+Ca 5% + GMP 88%)제제 경구투여군

700 : Surfactant 700 경구투여군

CaNANA-GMP+700 : 혼용(7% NANA+Ca 5%+700+GMP 88%)제제 경구투여군

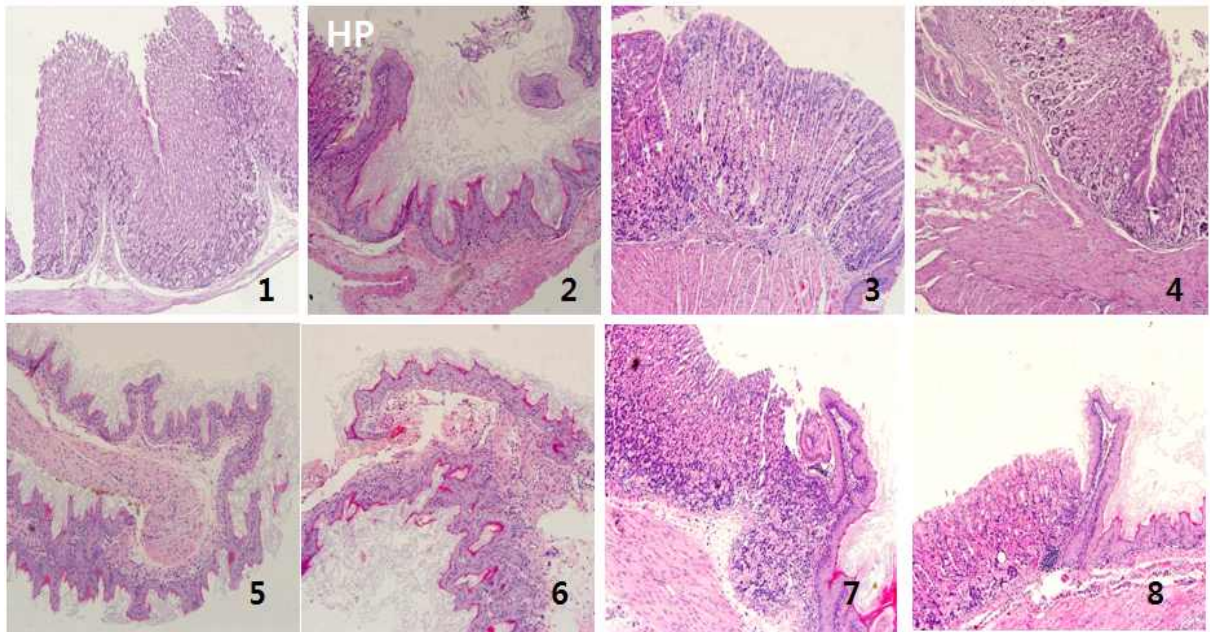


Fig. 21. 칼슘비혼합 항헬리코박터 제제류의 *H.pylori* 감염 마우스 모델에서의 치료효과 확인을 위한 병리조직학적 조사결과(31일후 위조직 적출 조사)

1(Normal) : PBS경구투여군

2(HP) : *H. pylori* SS-1-passed-5 경구투여군

3(Antibiotic) : 아목시펜+클래시리드+넥시움 경구투여군

4(S-NANA) : 표준제 Sialic acid 경구투여군

5(GMP) : Glycomacropeptide 경구투여군

6(7% NANA) : 7% NANA(GMP 93% 점유)제제 경구투여군

7(23% NANA) : 23% NANA(GMP 77%)제제 경구투여군

8(700) : Surfactant 700 경구투여군

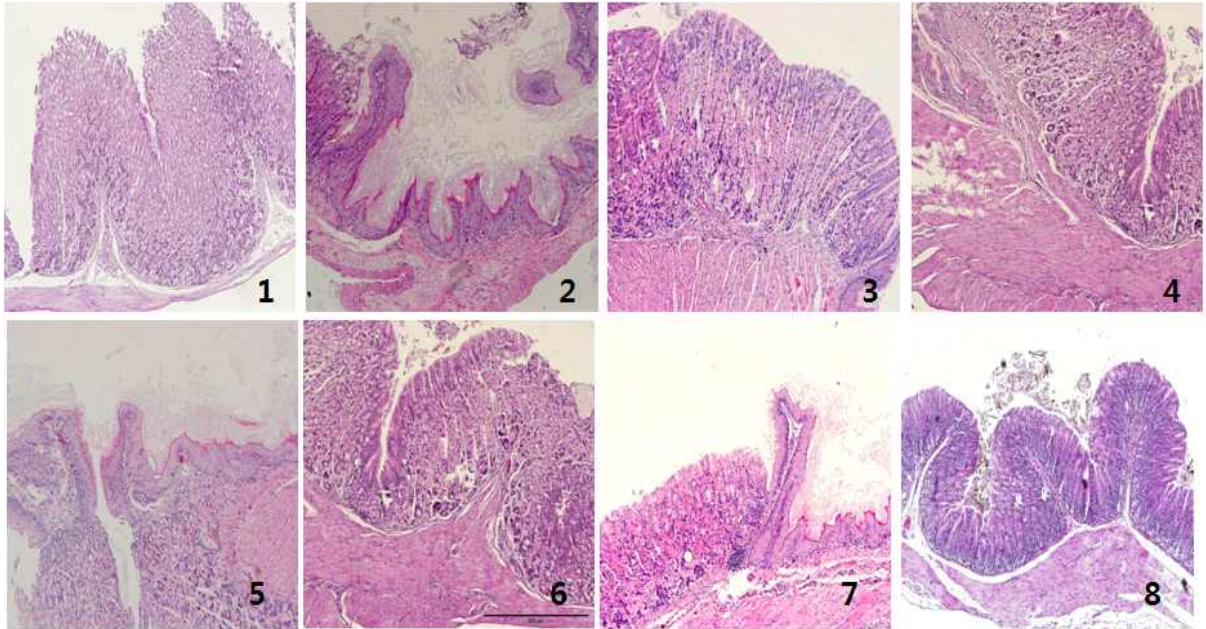


Fig 22. 칼슘 혼합형 항헬리코박터 제제류의 *H. pylori* 감염 마우스 모델에서의 치료효과 확인을 위한 병리조직학적 조사결과(31일후 위조직 적출 조사)

1(Normal) : PBS경구투여군

2(HP) : *H. pylori* SS-1-passed-5 경구투여군

3(Antibiotic) : 아목시펜+클래시리드+넥시움 경구투여군

4(S-NANA) : 표준제 Sialic acid 경구투여군

5(Ca-GMP) : 5% 칼슘항유 GMP제제 경구투여군

6(CaNANA-GMP) : 7% NANA+Ca 5% + GMP 88%)제제 경구투여군

7(700) : Surfactant 700 경구투여군

8(CaNANA-GMP+700) : 혼용(7% NANA+Ca 5%+700+GMP 88%) 경구투여군

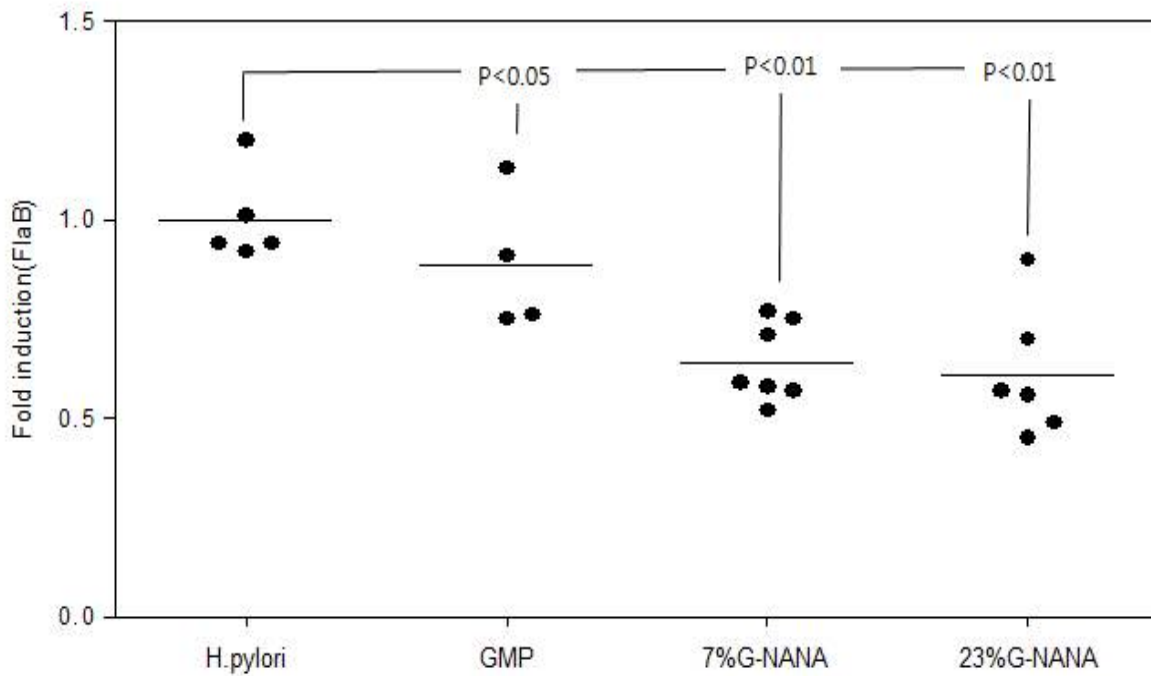


Fig. 23. 항헬리코박터 제제류의 *H. pylori* 감염 마우스 모델에서의 예방효과(PCR분석)

공시균 : *H. pylori* SS-1-passed-5

H. pylori : 단일공시균 투여구

GMP : Glycomacropeptide 투여구

7% NANA : 7% NANA와 GMP 93%혼용제 투여구

23% NANA : 23% NANA와 GMP 77% 혼용제 투여구

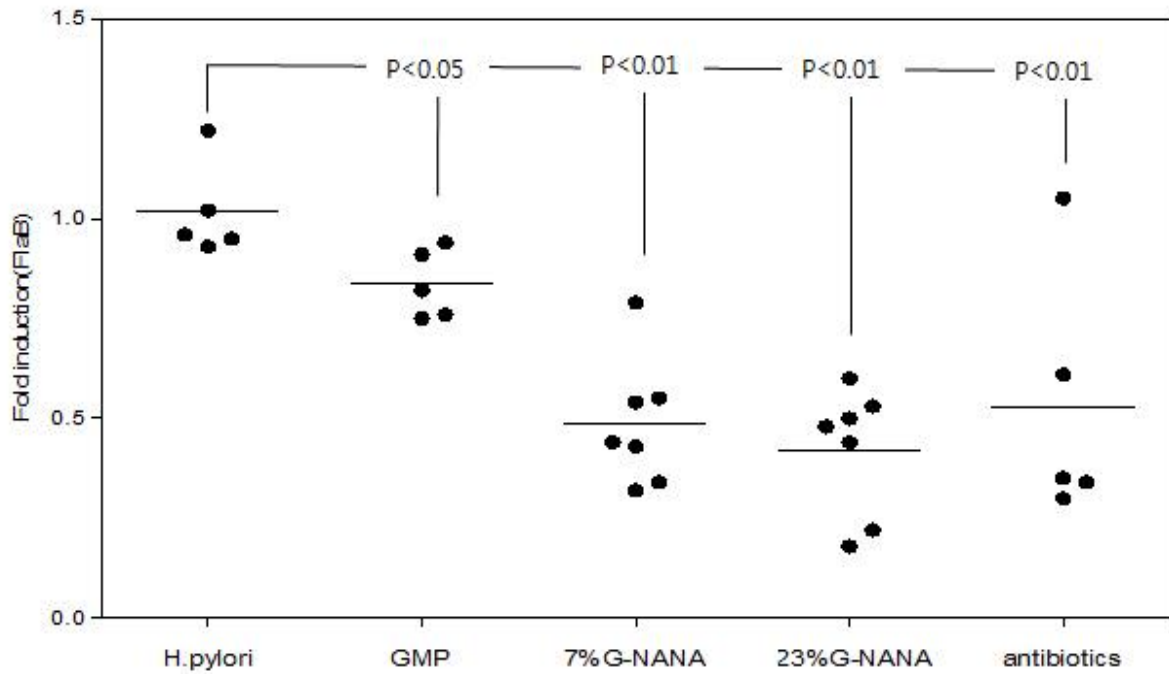


Fig. 24. 항헬리코박터 제제류 및 상용항생제의 *H. pylori* 감염 마우스 모델에서의 치료 및 약효 동등성 평가 결과(PCR분석)

공시균 : *H. pylori* SS-1-passed-5

H.pylori : 단일공시균 경구 투여구

GMP : Glycomacropeptide 경구투여구

7% sialic acid : 7% sialic acid와 GMP 93%제제 경구투여구

23% sialic acid : 23% sialic acid와 GMP 77%제제 경구투여구

Antibiotics : 아목시펜+클래시리드+넥시움 경구투여구

NANA=Sialic acid

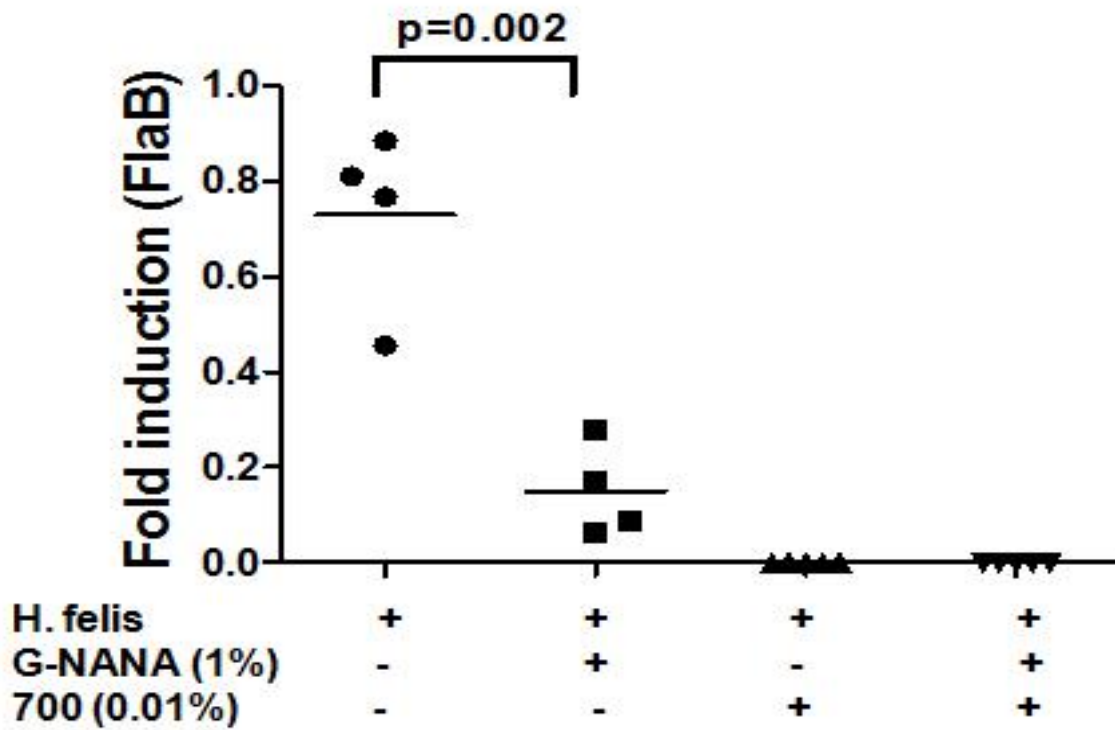


Fig. 25. 항헬리코박터 소재 및 Surfactant 700소재의 단일 및 혼용처리가 *H. pylori* 감염 마우스 모델에서의 치료효과에 미치는 효과 평가결과(PCR분석)

공시균 : *H.pylori felis*

NANA=Sialic acid

제 4 절 안전성평가(GLP)

[미생물복귀돌연변이시험을 이용한 유청가수분해단백분말(7% Sialic acid 함유)의 안전성 평가]

1. 연구목적

GMP(Glycomacropeptide)는 수용성 유청단 백질의 일종이고, 현재 영유아 식품 등에 식품 첨가제로 제품화 및 판매되고 있다. GMP는 우유 속 단백질의 일종인 κ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 일컫는다. 또한 효소에 의하여 κ -casein의 phenylalanine-methionine peptide bond가 절단되면 친수성의 GMP가 유리되는데, N-acetylneuraminic acid(Sialic acid), galactose(gal) 그리고 N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있다. Sialic acid는 다양한 기능성을 보유하고 있는데 이를 이용하기 위해서는 효소가 반드시 필요한데 neuraminidase라고 한다(Fig 1). Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다 [4]. Sialic acid는 수용기의 인지, 신경 신호전달, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고, 뇌 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Sialic acid는 현재 대부분 재조합 *E. coli* 에서 합성되거나 *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로부터 합성되며 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다 [10]. Sialic acid는 대부분 의료용 소재로 활용되고 있으며 유청 단백질에서 분리한 Sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. 건강기능성 식품원료 등록을 위하여 필수적으로 수행되는 항목인 미생물복귀돌연변이시험에서 일반적으로 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하는데 살모넬라균은 히스티딘 요구성의 변이를, 대장균은 트립토판 요구성의 변이를 지표로 한다. 이들 균주는 유전독성유발물질에 대해 높은 감수성을 나타내는 유전적 형질을 가지고 있어 유전독성시험에 널리 이용되고 있다 따라서, 본 연구에서는 안전식품 및 식품첨가물로 사용되고 있는 GMP 내 지표성분인 Sialic acid를 식품소재로 활용성을 높이기 위하여, 시험물질로서 유청가수분해단백(이하 7%-GNANA)을 미생물복귀돌연변이시험용 공시균주를 이용하여 GLP가이드라인 기준에 준하는 안전성을 평가하였다.

2. 연구수행방법

시험물질 준비

GMP는 Sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPepGMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 시험물질 제조를 위한 원료로 사용하였다. 시험물질 제조는 정제수에 7%(w/v)되게 GMP를 우선 용해시킨 후 Alcalase

2.4FL(Novozymes Co., Denmark) 효소를 기질 대비 0.2%(w/v)로 혼합 및 57°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 용액을 동결분말로 제조한 7%-GNANA(제품명 : HELICOBACTROL-7)을 MEDINUTROL사(한국)로 공여 받아 시험물질로 사용하였다(Fig 2). 시험물질내 지표성분인 Sialic acid의 분리여부 및 함유량 검정을 위한 표준체 Sialic acid는 Sigma-Aldrich사(A2090)을 구입하여 0.1ppm(w/w), 1ppm 및 10ppm 되게 희석하여 분석간 표준용액으로 사용하였다.

시험물질 내 지표성분 Sialic acid 분리 및 함유량 검정

10mM Sodium Acetate Buffer용액에 시험물질인 7%-GNANA를 완전히 용해시킨 후, 에탄올 8ml에 희석액 2ml를 혼합한 후 Sonication(25°C) 및 원심분리(3,000rpm x 20min, 25°C)과정을 거쳐 상등액만을 0.22 μ m membrane으로 여과 후 이를 최종 HPLC System(Agilent 1260, USA) 시료로 사용하였다(Table 1). 분석간 검출허용 표준편차는 90~110%범위 내에서 평가하였다(Table 1., Fig 1.).

미생물복귀돌연변이시험

시험용 균주 준비

표준균주로 *Salmonella typhimurium*계열의 돌연변이 균주인 TA98, TA100 및 TA1535, TA1537를 그리고 *Escherichia coli*의 돌연변이 균주인 WP2uvrA를 전체 시험간 이용하였으며, MOLTOX™(USA)로 부터 구입하여 전체시험간 사용하였다.

시험용 균주 시험용 배지조성

Plate배지는 Top Agar와 Vogel-Bonner최소 Glucose한천배지를 Maron 및 Ames의 방법[12]의 시험법에 준하여 제조 및 사용하였다.

시험균주의 유전형질 확인

시험균주는 Maron 및 Ames의 방법[12]에 따라 아미노산 요구성, UV 민감도, *rfa* 돌연변이 및 R-factor 유지 여부 등의 확인 시험을 수행하여 유전형질이 잘 유지되고 있음을 시험 전에 확인하였다.

양성대조물질 조성 및 처리조건

표준균주별 감수성 평가를 위한 양성대조물질로서는 Sodium azide (NaN_3), 9-aminoacridine (9-AA), 4-Nitroquinoline-N-Oxide (4-NQO) 및 2-aminoanthracene (2-AA)와 용매로서는 Dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldricd Co., USA)를 사용하였다. 대사활성계 부재조건에서 양성대조물질은 2-AA를 공시균종에 따라 0.5~10 μ g/plate범위에서 농도처리를 다르게 하였다. 대사활성계 존재조건에서 *Sal. typhimurium* TA98와 *E. coli* WP2uvrA균주는 4-NQO를 0.5 μ g/plate 그리고 *Sal. typhimurium* TA100과 TA1535는 NaN_3 를1.5 μ g/plate, *Sal. typhimurium* TA1537균주는 9-AA를 80 μ g/plate으로 양성대조물질을 처리하는 조건으로 실시하였다(Table 2.).

S9 Mixture조성

대사활성계 존재시 미생물복귀돌연변이시험을 위하여, Sprague dawley male rat에 유도물질인 Aroclor 1254을 도살 5일전 단회복강투여 후 간조직을 적출 및 균질화 한 후 - 20℃에서 보관 된 S9(MOLTOX사, USA)을 구입하여 시험에 사용하였다. S9 mixture의 조성은 Table 3과 같이 제조하였다.

시험균 구성

시험물질을 미생물복귀돌연변이시험에 일반적으로 고려되고 있는 최고투여농도인 5,000 μ g/plate를 최고농도로 설정하고, 대사활성계 존재 및 부재조건에서 공비 2로 하여, 5단계 농도군(0, 312, 625, 1250, 2500 그리고 5000 μ g/plate)에서 예비적으로 농도결정시험 결과, 모든 균주의 모든 농도에서 복귀돌연변이 집락수의 증가 또는 명백한 세포독성이 나타나지 않았다(Table 4). 따라서 OECD Guideline [15, 16]에 따라 역시 동일하게 대사활성계 존재 및 부재조건에서 5,000 μ g/plate를 최고농도로 설정하고, 공비 3으로 5단계의 농도군(0, 61.7, 185, 556, 1670, 5000 μ g/plate)을 본 시험에 적용하였다(Table 5).

표준시험방법

시험물질 처리에 따른 미생물복귀돌연변이시험은 의약품 등의 독성시험기준 [13, 14]와 OECD guideline for the testing of chemicals [15,16]에 준하여 Plate법으로 수행하였다.

평가기준

표준균주별 정상 성장범위를 *Sal. typhimurium* TA98는 15~60 cfu/plate, TA100는 60~200 cfu/plate, TA1535는 10~40 cfu/plate, TA1537는 5~20 cfu/plate 그리고 *E. coli* WP2uvrA 경우는 10~40 cfu/plate범위내에서 집락수를 나타내는 경우를 시험물질에 대하여 안전성을 보이는 정상범위로 평가하였다. 시험물질에 대한 복귀돌연변이 평가는 대사활성계 존재 유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

복귀돌연변이 평가항목

*Sal. typhimurium*TA100, TA1535와 *E. coli* WP2uvrA는 복귀돌연변이 평가시 염기치환형을 그리고 *Sal. typhimurium* TA98과 TA1537의 경우는 Frameshiht형에 대한 평가를 실시하였다.

3. 연구수행결과

시험물질내 지표성분 함유량 평가

시험물질내 Sialic acid의 분리 및 함유량을 HPLC분석법을 적용하여 평가한 결과, GMP내 결합되어 있던 Sialic acid는 100%효율로 분리(Fig 3)되었으며, 7.43 \pm 0.28%의 Sialic acid와 GMP유래의 단백질로 구성되어 있었다(Fig 1.).

시험물질의 미생물복귀돌연변이 평가

사전 실험농도 설정 평가시험

양성대조물질처리에 따른 표준균주들에 대한 표준 감수성을 검정한 후, 본 시험을 위해 시험물질을 5,000 μ g/plate를 최고농도로 하여 0, 312, 625, 1250 그리고 2500 μ g/plate에서 모든 균주에서 유의한 생육저해가 없었기 때문에 이를 기준으로 본시험은 5,000 μ g/plate을 최고농도로 설정하였다(Table 4).

미생물복귀돌연변이 평가

전체 균주에 대하여 양성대조물질 처리를 통한 표준 감수성을 확인한 결과, 대사활성계 미처리의 경우 TA100, TA1535, WP2uvrA, TA98 및 TA1537균주는 각각 442.3 ± 10.26 cfu/plate, 237.0 ± 13.53 cfu/plate, 241.3 ± 25.01 cfu/plate, 287.3 ± 15.14 cfu/plate 및 272.7 ± 9.87 cfu/plate으로 나타났으며, 대사활성계 처리 조건에서는 406.7 ± 3.51 cfu/plate, 241.0 ± 14.11 cfu/plate, 344.7 ± 9.50 cfu/plate, 265.7 ± 17.62 cfu/plate 및 290.0 ± 23.43 cfu/plate로 나타나 정상적인 감수성을 보였다. 음성 대조군 대비 시험물질을 5단계의 농도에서 처리한 본시험중 대사활성계 부재의 경우에서 복귀돌연변이네 미치는 결과를 살펴보았더니, *Sal. typhimurium* TA100균주는 최저 111.3 ± 7.77 cfu/plate에서 최대 128.7 ± 10.9 cfu/plate의 범위의 수치를 나타냈으며, TA1535 균주는 25.0 ± 2.00 cfu/plate에서 최대 28.3 ± 2.89 cfu/plate, *E. coli* WP2uvrA균주는 최저 24.0 ± 1.00 cfu/plate에서 최대 27.3 ± 2.08 cfu/plate, TA98 균주의 경우는 최저 32.0 ± 1.73 에서 최대 39.0 ± 1.00 cfu/plate범위의 수치를 보였고, *Sal. typhimurium* TA1537균주는 최저 13.0 ± 1.00 cfu/plate에서 최대 14.7 ± 2.89 cfu/plate의 범위로 나타나 전체 균주에서 정상적인 수준의 결과치를 보였다(P<0.01). 대사활성화계 존재의 경우에서 *Sal. typhimurium* TA100균주는 최저 109.7 ± 8.96 cfu/plate에서 최대 134.7 ± 0.58 cfu/plate범위의 수치를 보였으며, TA1535균주는 최저 22.0 ± 1.00 cfu/plate부터 최대 27.0 ± 2.65 cfu/plate, *E.coli* WP2uvrA균주는 최저 25.0 ± 6.93 cfu/ml에서 최대 29.7 ± 4.16 cfu/plate, *Sal. typhimurium* TA98균주는 최저 35.7 ± 1.53 cfu/plate에서 최대 38.3 ± 2.08 cfu/plate를 보였으며, TA1537균주는 12.7 ± 3.06 cfu/plate에서 최대 14.7 ± 1.53 cfu/plate범위의 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 표준 균주별로 안전성 관련 허용 범위내에서의 수치였으므로 시험물질은 농도와 상관없이 안전한 것으로 평가되었다(P<0.01). 따라서, 전체 표준균주에 대하여 시험물질인 7% -GNANA를 농도별로 처리시 미생물복귀돌연변이 평가에서는 안전한 것으로 확인되었다(Table 5., Fig 4.).

4. 고찰

우유 및 유제품에 함유된 카제인 유래 생리활성 peptide가 생체 내에서 심혈관계, 신경계, 면역계 및 영양계에 걸쳐 중요한 기능을 한다는 사실이 밝혀진 이래로 현재까지 이에 대한 여러 연구가 진행되어 왔다. 유단백질중 영양학적인 관점에서 본 생리활성 peptide로는 CPP와 GMP를 들 수 있는데, GMP는 분자량이 크기 때문에 그 자체로 흡수될 수 없어서 분자량이 작은 peptide로 분해된 후 흡수되어야 한다. GMP의 아미노산 구성성분은 방향족 아미노산이 부족한 반면, 측쇄 아미노사(UAL, ILU)과 낮은 MET 함량을 갖는 독특한 아미노산 조성은 phenylketonurine환자의 diet 소재와 간 질환의 치료 및 Hypoallegic Food등으로 개발이 가능하다 할 수 있다. GMP는 칼슘, 철 및 아연의 흡수에 도움을 주는 것으로 알려져

있는데, Kelleher 등이 Rh(Rhesus)인자를 가진 어린 원숭이에게 GMP와 조제용 분유의 α -lactalbumin 성분을 보충했을 때에 나타나는 변화를 관찰하였는데, 양쪽 모두에서 아연흡수의 증가를 관찰하였다. 영양적인 측면 이외에도 충치예방에 있어 유제품에 포함된 생리활성 peptide에 관한 기능성 연구가 진행되어 왔다. 본 연구에서는 식품첨가물로 등재가 되어 있으며 Endo-protease인 Alcalase를 사용하여 GMP내 지표성분인 sialic acid를 분리 시킴과 동시에 아미노산 형태로 가수분해 함으로서 이들의 기능성을 동시에 제품개발에 활용코저 하였다. 본 연구가 유청가수분해단백분말(7% G-NANA)소재의 기능성 유제품으로 개발을 위하여 Sialic acid를 분리 및 정제 등의 인위적인 원료 GMP의 변형 유발과 기능성 식품으로 개발을 목표로 하고 있기 때문에 관련법규에 준하는 해당 시험물질의 안전성 평가는 필수적이다 할 수 있다. 이에 따라 본 연 연구에서는 GMP를 원료로 하여 제조된 시험물질인 7%-GNANA에 대한 발암성 유발 유·무 판단에 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이시험을 실시하였다. 시험에는 *Sal. typhimurium*의 돌연변이 균주인 TA100, TA1535과 *E. coli*의 WP2uvrA의 염기치환형, *Sal. typhimurium*의 돌연변이 균주인 TA198과 TA1537의 경우는 Frameshift를 복귀돌연변이 유발여부 평가를 위한 항목으로 정하였다. 시험물질인 7%-GNANA의 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이시험을 실시한 결과, 대사활성계 존재 유무에 관계없이 모든 균주는 모든 농도에서 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며 용량의존성도 확인되지 않았음에 따라 GMP를 원료로 제조한 7%-GNANA는 복귀돌연변이 유발원이 아닌 것으로 판정되었다. 따라서, 본 시험의 목표인 안전식품인 GMP를 원료로 7% Sialic acid를 분리 및 이를 고농도로 함유토록 제조된 7%-GNANA는 단지 원료인 GMP수준의 안전한 식품소재임이 확인되었다.

5. 요약

본 시험은 GMP내 기본적으로 7%로 결합되어 있는 Sialic acid의 함유량을 그대로 보유하도록 제조한 유청단백가수분말(시험물질명 : 7%-GNANA)을 기능성 식품 원료 개발함에 최종 연구목표를 두었다. 시험물질은 GMP(7% sialic acid 함유)를 원료로 하고 여기에 식품첨가물로 허용된 효소인 Alcalase를 사용하여 지표성분인 Sialic acid를 100% 효율로 분리시킨 후 동결 건조한 7%-GNANA(7% Sialic acid와 GMP단백질로 구성, 제품명 : HELICOBACTROL-7)을 (주)한일바이오메드사(한국)에서 공여 받아 GLP가이드라인에 따라 미생물복귀돌연변이시험을 실시하였다. 미생물에 대한 돌연변이 유발성 유무를 검색하기 위해 히스티딘 요구성 균주인 *Sal. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *E.coli* WP2uvrA를 이용하였다. 미생물복귀돌연변이시험은 시험물질을 5단계의 농도군(0, 61.7, 185, 556, 1670, 5000 μ g/plate)으로 하여 평가하였다. 본시험을 통한 평가결과, 대사활성계 존재 유무와 관계없이 모든 균주에서 시험물질의 각 농도에 의한 복귀돌연변이 유발원 양성기준인 콜로니 생성수치가 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았다. 결론적으로, 시험물질인 7% G-NANA의 식품첨가물로서 등록을 위하여 수행한 미생물돌연변이시험에서 안전성이 확인되었다.

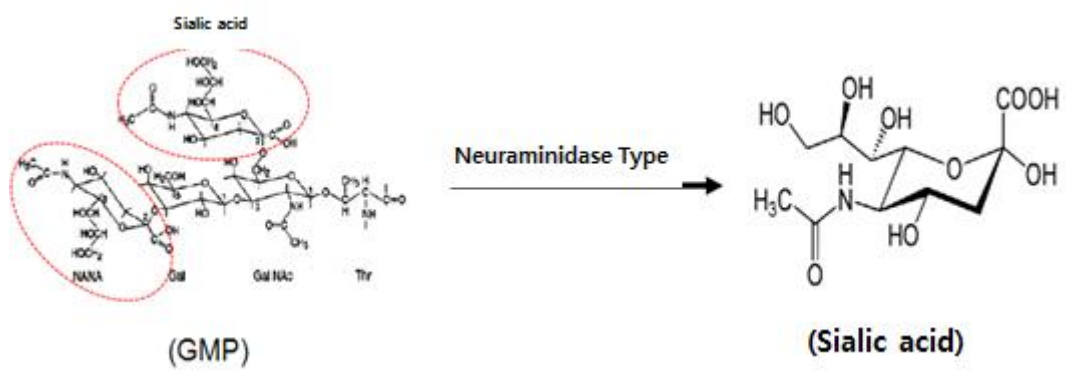


Fig. 1. Sialic acid production from GMP by a Alcalase 2.4FL(Neuraminidase Type)

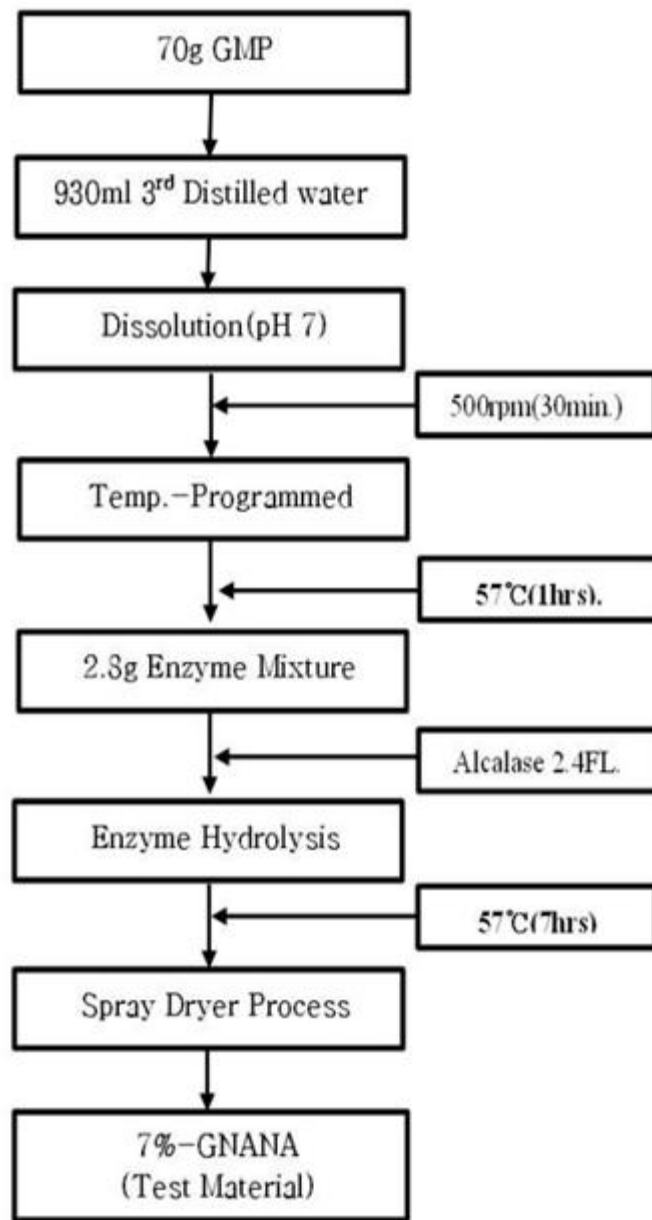


Fig. 2. Manufacturing process diagram for 7%-GNANA, a test substance containing 7% Sialic acid, through the enzyme(Alcalase 2.4 FL) separation mechanism of Sialic acid, the marker compound having the Glycomacropeptide(GMP) as a substrate.

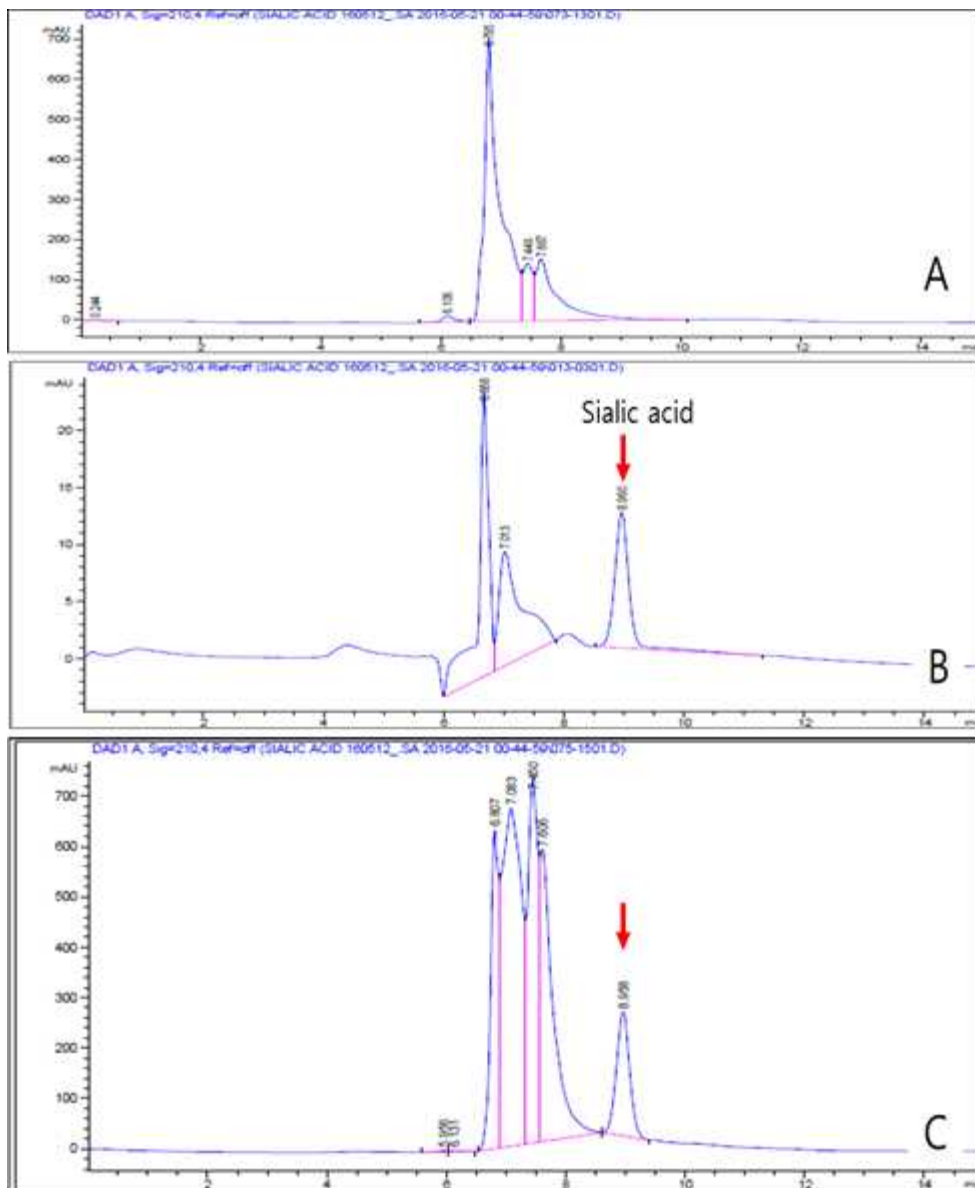


Fig. 3. Result of evaluation for separation and content of Sialic acid in hydrolyzed whey protein(7%-GNANA), a test substance, vs. the standard Sialic acid applying the HPLC analysis method.

A : Non-enzymatically Modified GMP., B : Standard Sialic acid(25ppm)., C : Result of Sialic acid detection in 7%-GNANA.was prepared through the ethanol enriching process and final hot air drying process after treating the 0.2%(v/v) Alclase for 1 hour (40°C) versus GMP.

Table 1. HPLC operation conditions for analysis of Sialic acid

1.HPLC System(Agilent 1260)	2. Analysis Conditions
Pump : G1311C Auto sampler : G1329B Column : G1316A UV detector :G1314F	Wavelength.: 205nm Column : Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column (300 × 7.8 mm, 9µm, Bio-Rad Co.,) Mobile Phase : 10mM H2SO4 Running time : 20min Flow rate : 0.5mL/min Injection volume : 10µl Temperature : 40°C Standard Sol.(w/w) :Silaic acid 0.1ppm, 1ppm, 10ppm

Table 2. Name and applied concentration of positivity comparison substance used in the evaluation of Bacterial Reverse Mutation for 7%-GNANA holding the Sialic acid as a marker compound.

Division Bacteria Name	S9Mix(+)		S9Mix(-)	
	Positive control	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Positive control	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
<i>Sal. typhimurium</i> TA98	4-NQO	0.5	2-AA	0.5
<i>Sal. typhimurium</i> TA100	NaN ₃	1.5	2-AA	1.0
<i>Sal. typhimurium</i> TA1535	NaN ₃	1.5	2-AA	2.0
<i>Sal. typhimurium</i> TA1537	9-AA	80	2-AA	2.0
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4-NQO	0.5	2-AA	10

Table 3. S9 Mixture spectrum table for evaluation of Standard Susceptibility with the treatment of 7%-GNANA by each concentration level, a test substance, effecting on Bacterial Reverse Mutation.

S-9	1		3	
S-9(ml)	2.1	2	6.3	5.5
20mM HEPES (ml)	6		15	
50mM MgCl ₂ (ml)	3		7.5	
330mM KCl (ml)	3	18	7.5	49.5
50mM G-6-P (ml)	3		7.5	
40mM NADP · Na (ml)	3		7.5	
Diatilled water(ml)	3		7.5	
SUM(ml)		20		55

Table 4. The result of concentration range setting test conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 7%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system

With and Without Metabolic Activation	Test Materials Conc. ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of Revertant Colony(cfu/plate)					
		Base Substitution Types			Frameshift Types		
		TA100*	TA1535*	WP2uvrA*	TA98*	TA1537*	
S9Mix(-)	0	109.0 \pm 3.61 [#]	19.0 \pm 2.65 [#]	32.0 \pm 2.00 [#]	46.0 \pm 2.00 [#]	12.7 \pm 3.06 [#]	
	61.7	105.7 \pm 7.51	20.3 \pm 4.73	31.0 \pm 1.00	46.0 \pm 4.36	12.7 \pm 1.15	
	185	115.3 \pm 9.29	21.0 \pm 2.00	36.0 \pm 2.00	44.7 \pm 4.16	11.0 \pm 1.00	
	556	116.0 \pm 9.54	19.7 \pm 2.52	31.0 \pm 3.61	44.3 \pm 4.04	14.0 \pm 1.73	
	1,670	105.7 \pm 7.77	21.3 \pm 1.15	31.0 \pm 1.73	46.7 \pm 4.93	15.3 \pm 1.15	
	5,000	114.3 \pm 6.03	21.0 \pm 4.00	34.0 \pm 2.00	42.7 \pm 1.15	11.7 \pm 1.53	
S9Mix(+)	0	117.0 \pm 20.22	21.0 \pm 2.65	29.7 \pm 3.06	43.0 \pm 5.20	13.0 \pm 3.00	
	61.7	113.0 \pm 11.36	18.7 \pm 3.79	33.3 \pm 4.04	46.3 \pm 3.06	13.0 \pm 1.00	
	185	121.0 \pm 11.53	20.7 \pm 4.04	30.0 \pm 2.65	50.0 \pm 1.00	14.3 \pm 2.08	
	556	126.0 \pm 6.56	21.3 \pm 4.62	32.3 \pm 4.73	44.0 \pm 3.46	12.7 \pm 0.58	
	1,670	133.3 \pm 9.87	21.0 \pm 4.00	31.0 \pm 3.61	41.7 \pm 2.89	12.3 \pm 1.15	
	5,000	133.7 \pm 11.93	19.7 \pm 3.21	35.0 \pm 3.46	45.3 \pm 3.06	14.7 \pm 1.15	
Positive control	S9Mix (-)	Materials	NaN ₃	NaN ₃	4-NQO	4-NQO	9-AA
	Conc($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1.5	1.5	0.5	0.5	80	
Positive control	S9Mix (+)	Materials	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Conc($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1.0	2.0	10	0.5	2.0	
		cfu/plate	441.7 \pm 17.95	189.3 \pm 13.50	258.3 \pm 3.06	265.3 \pm 21.55	218.0 \pm 34.70

*:TA98(*Sal. typhimurium* TA98), TA100(*Sal. typhimurium* TA100), TA1535(*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537(*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA(*E. coli* WP2uvrA)., # : Represents a significant difference at p<0.01 level compared with the vehicle control

Table 5. The result of evaluation (Main Study) conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 7%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system.

With and Without Metabolic Activation	Test Material Conc. ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of Revertant Colony(cfu/plate)					
		Base Substitution Types			Frameshiftm Types		
		TA100 [#]	TA1535 [#]	WP2uvrA [#]	TA98 [#]	TA1537 [#]	
S9Mix(-)	0	124.3 \pm 2.31 [#]	25.7 \pm 2.31 [#]	24.7 \pm 1.53 [#]	32.0 \pm 1.73 [#]	13.7 \pm 2.08 [#]	
	61.7	111.3 \pm 7.77	25.7 \pm 2.08	26.0 \pm 5.00	34.0 \pm 2.65	13.0 \pm 1.00	
	185	115.7 \pm 12.66	25.0 \pm 2.00	27.3 \pm 2.08	35.3 \pm 1.53	13.7 \pm 0.58	
	556	132.0 \pm 13.00	27.7 \pm 2.08	26.7 \pm 3.21	39.0 \pm 1.00	14.7 \pm 2.89	
	1,670	119.3 \pm 7.51	26.0 \pm 5.00	26.7 \pm 3.79	36.7 \pm 0.58	13.3 \pm 0.58	
	5,000	128.7 \pm 10.97	28.3 \pm 2.89	24.0 \pm 1.00	37.3 \pm 2.08	13.3 \pm 0.58	
S9Mix(+)	0	134.7 \pm 0.58	24.0 \pm 1.73	25.3 \pm 1.53	35.7 \pm 1.53	14.7 \pm 2.52	
	61.7	120.0 \pm 2.65	23.3 \pm 3.21	25.0 \pm 6.93	38.3 \pm 2.08	13.7 \pm 1.53	
	185	117.7 \pm 1.15	24.0 \pm 3.61	25.7 \pm 3.79	37.0 \pm 2.65	12.7 \pm 3.06	
	556	109.7 \pm 8.96	22.0 \pm 1.00	28.0 \pm 4.00	37.0 \pm 3.61	13.0 \pm 1.00	
	1,670	125.7 \pm 7.77	23.3 \pm 4.93	29.3 \pm 1.53	33.7 \pm 4.73	13.0 \pm 1.00	
	5,000	125.7 \pm 13.20	27.0 \pm 2.65	29.7 \pm 4.16	36.7 \pm 2.52	13.7 \pm 0.58	
Positive control	S9Mix (-)	Materials	NaN ₃	NaN ₃	4-NQO	4-NQO	9-AA
		Conc($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1.5	1.5	0.5	0.5	80
	S9Mix (+)	cfu/plate	442.3 \pm 10.26	237.0 \pm 13.53	241.3 \pm 25.01	287.3 \pm 15.14	272.7 \pm 9.87
		Materials	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		Conc($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1.0	2.0	10	0.5	2.0
		cfu/plate	406.7 \pm 3.51	241.0 \pm 14.11	344.7 \pm 9.50	265.7 \pm 17.62	290.0 \pm 23.43

* :TA98(*Sal. typhimurium* TA98), TA100(*Sal. typhimurium* TA100), TA1535(*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537(*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA(*E. coli* WP2uvrA), # : Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control

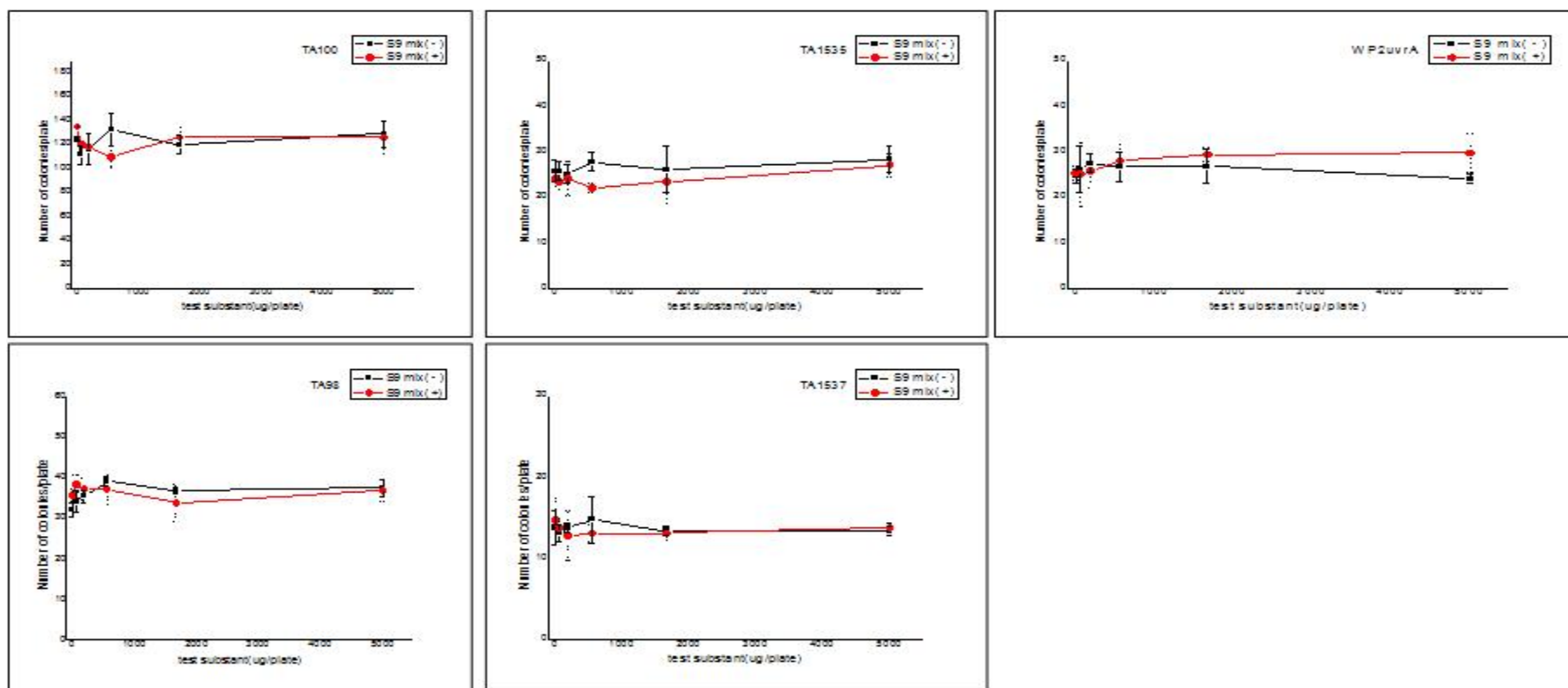


Fig. 4. The result of evaluation conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 23% -GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system versus the solvent control group.

TA98(*Sal. typhimurium* TA98), TA100(*Sal. typhimurium* TA100), TA1535(*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537(*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA(*E. coli* WP2uvrA), S9 Mix(-) : without metabolic activation, S9 Mix(+): with metabolic activation

제 5 절 안전성평가(GLP)

[랫드를 이용한 단회경구투여 독성시험]

1. 연구목적

본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질의 일종인 GMP내 결합되어 있는 Sialic acid를 식품으로서 활용성을 높이기 위하여, 효소분리 과정을 거쳐 시험물질인 7%-GNANA를 제조하였다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다 할지라도 소재에 대한 안전성자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 특히 Sialic acid를 분리시켜 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나 식품공전이나 기능성식품공전에 등록을 위해서는 독성시험을 통한 안전성자료가 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 시험물질인 7%-GNANA의 안정성 평가의 일환으로 반복투여 시 나타날 수 있는 독성의 질적, 양적인 평가를 위해 유청가수분해단백을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성과 개략치사량(ALD: Approximate Lethal Dose)을 확인하기 위함이다. 관련 시험지침은 의약품등의 독성 시험기준 (고시 제2014-136호, KFDA, 2014. 7. 30), 비임상시험관리기준 (고시 제2014-67호, KFDA, 2014. 2. 12) 및 OECD 테스트가이드라인 (No. 420)의 방법에 따라 수행하였다.

2. 연구수행방법

시험물질 준비

GMP는 Sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPepGMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 시험물질 제조를 위한 원료로 사용하였다. 시험물질 제조는 원료 GMP를 우선 정제수에 7%(w/v)로 용해시킨 후 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark) 효소를 원료 대비 0.2%(w/v)로 혼합 및 57°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 용액을 동결분말로 제조한 7%-GNANA (시험물질명: 유청가수분해 단백질분말)을 한일바이오메드사(한국)로 공여 받아 사용하였다. 부형제는 멸균증류수를 사용하였는데, 시료 제공한 정보를 바탕으로 물리적 특성실험을 수행하였으며, 그 결과 물에 용해되어 독성이 없는 멸균증류수를 부형제로 하였다.

실험동물 준비

공시동물로서는 SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드(수컷 213.0 ~ 230.5 g, 암컷 173.1 ~ 194.5 g)를 (주) 샘타코(한국)에서 구입하여 시험간 사용하였다. 선정이유로서는 랫드는 크기가 작고, 다루기가 쉬우며, 계절변동이 적은 장점이 있는 동시에 스트레스에 덜 민감하면서 병에 대한 저항력이 강하다. 또한 공급체제가 확립되어 있으며, 약물에 대한 반응이 일정하여 암수에 따른 성별 반응차이가 거의 없다. 그리고 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 사람에의 외삽(extrapolation)이 가능하므로 일반독성시험에 널리 사용되고 있다.

시험동물 검역 및 순화기간

동물 입수시 입수동물에 대한 검수검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다. 시험물질의 투여개시시의 암수는 각 8주령(수컷 241.5 ~ 262.8 g, 암컷 182.3 ~ 215.6 g)의 동물중 건강체 암수 각 10마리를 시험간 사용하였다.

군분리 방법

투여개시 전에 체중을 측정하고 순위화한 체중을 이용하여 군분리를 실시하였다.

식별법

개체식별은 꼬리마킹법을 사용하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였으며, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명 등을 기재한 'SPF실험동물실 사용기록지'를 부착하였다.

사육환경

동물실은 GLP센터의 SPF실험동물실내 사육실을 사용하였는데, 온습도 범위는 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 20\%$ 그리고 명암 cycle은 형광등조명을 12hr (08:00 점등~20:00) 단위로 점소등을 실시하였다. 조도는 150 ~ 300 Lux, 환기횟수는 10~20 회/시간 그리고 소음은 60dB 이하를 유지하였으며, 암모니아농도는 20ppm 이하로 유지하였다.

사육상자의 종류(크기)

순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자 (260W×420L×150H mm)에 수용하였다. 절식 기간에는 대사케이지(260W×420L×150H mm)에 사육상자 당 동물수를 2~3마리로 유지하였다.

사육기자재 교환

사육상자는 주 1회, 급수병은 주 2회 교환하였으며, 고압증기멸균기(121°C 20분)로 멸균하여 사용하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(제조원 : Altomin Spezialfutter GmbH & Co. KG ,GER)를 급이기에 넣어 음용수와 같이 자유섭취 시켰다. 사료내 오염물질 확인을 위한 사료의 분석은 공급원에서 제공하는 성적서를 확인하여 사용하였으며, GLP센터의 사료 및 물의 관리에 관한 SOP에 따라서 실시하였다.

동물실험법

시험물질의 투여방법은 경구방법으로 경배부 피부를 고정하고 금속제 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였으며, 오전 10시에서 11시 사이에 투여가 수행되었다.

시험 물질의 조제 및 투여량

본 시험물질은 시험물질 투여 전 1시간 이내에 준비하였으며, 순도에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하며, 시험물질을 칭량한 후 부형제에 용해하여 투여에 사용하였다. 조제된 시험물질의 투여액량은 투여 당일에 측정된 체중을 기준으로 10ml/kg으로 투여액량을 계산하였으며, 1일 1회로 투여하였다.

시험군의 구성

암수 5마씩에 단지 생리적 식염수만은 경구투여한 대조군과 시험물질을 5,000mg/Kg을 경구투여한 시험군으로 구분 하였다.

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량(ml/kg/1회)	투여량(mg/kg/1회)
G1	Male	5	1101~1105	10	0
	Female	5	2101~2105	10	
G2	Male	5	1201~1205	10	5,000
	Female	5	2201~2205	10	

G1: 대조군, G2: 시험물질 투여군

투여량 설정

본 시험물질은 건강기능식품 등록을 목적으로 개발되었으며, 의뢰자의 정보에 의하면 독성이 크게 없을 것으로 추정되고, 건강기능식품의 특성상 높은 임상예정용량이 예상되어 5,000mg/kg를 최고 용량으로 설정하였다. 따라서 예비적으로 암수 각 한 마리에 5,000mg/kg을 투여하여 한계용량시험 후 모두 생존하여 5,000mg/kg을 최고용량으로 하여 본시험의 시험물질 투여군으로 결정하였다. 본시험의 대조군으로는 멸균증류수를 투여하는 군으로 설정하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상관찰

투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째 관찰하였으며, 익일부터 부검일 까지 1일 1회 일반증상을 관찰하였다.

체중측정

체중측정은 입수시, 군분리시, 투여후 1, 3, 7 및 14일에 측정하였다.

부검소견

시험물질 투여 후 14일째 되는 날 전체 동물에 대해 체중을 측정하고 Isoflurane 마취 하에 개복하여 복대동맥에서 채혈을 한후 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 부검을 실시하였다. 육안적으로 모든 내부장기의 이상 유무를 관찰하여 그 소견을 기록하였다.

통계학적 방법

SPSS 19.0K를 이용하여 일원배치분산분석(ANOVA test)을 통해 시험군의 독성지표를 대조군과 비교하였다.

3. 연구수행결과

사망동물 및 최소치사량

전 실험기간 동안 모든 시험물질 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 랫드의 최소치사량은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 관찰되었다 (Table 1~2).

일반증상

전 실험기간 동안 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다 (Table 3~4).

체중 (Table 5~6, Appendix 1~2)

실험 전 기간의 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 수컷 대조군과 시험물질 투여군은 각각 111.0 ± 9.49 g과 118.3 ± 9.65 g 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 암컷 대조군과 시험물질 투여군은 각각 68.2 ± 12.87 g 및 73.2 ± 11.95 g 으로 군간 증체량에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 없다 (Table 5~6, $p < 0.05$).

부검소견

관찰기간 동안 생존한 동물에 대한 계획부검 시 이상소견은 관찰되지 않았다((Table 7~8).

4. 고찰 및 결론

시험물질 유청가수분해단백의 랫드에 있어서 단회투여에 의한 독성을 조사하기 위해 암수 각각에 0 및 5,000 mg/kg 용량으로 경구투여한 후 독성지표인 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰한 결과, 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 대조군과 비교하여 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었다. 사망 동물도 없었으며, 부검소견 또한 특이증상이 관찰되지 않았으므로 본 단회경구투여 독성시험에서 시험물질의 랫드에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg보다 높은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 평가되며, 투여군의 50% 사망을 초래하는 용량인 LD₅₀도 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 확인되었다.

Table 1. Mortality in male rats after single oral administration

Dose (mg/kg)	No. dead/No. dosed	Days after dosing										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14	
0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 5,000 mg/kg

Table 2. Mortality in female rats after single oral administration

Dose (mg/kg)	No. dead/No. dosed	Days after dosing										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14	
0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 5,000 mg/kg

Table 3. Incidence of clinical signs in male rats after single oral administration
(group summary)

STUDY : 15-SDOT-001 (MALE)				
DAY	SIGNS OBSERVED	DOSE LEVEL (mg/kg)		
		0	5,000	
0	No finding	5/5*	5/5	
1	No finding	5/5	5/5	
2	No finding	5/5	5/5	
3	No finding	5/5	5/5	
4	No finding	5/5	5/5	
5	No finding	5/5	5/5	
6	No finding	5/5	5/5	
7	No finding	5/5	5/5	
8	No finding	5/5	5/5	
9	No finding	5/5	5/5	
10	No finding	5/5	5/5	
11	No finding	5/5	5/5	
12	No finding	5/5	5/5	
13	No finding	5/5	5/5	
14	No finding	5/5	5/5	

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined

Table 4. Incidence of clinical signs in female rats after single oral administration
(group summary)

STUDY : 15-SDOT-001 (FEMALE)				
DAY	SIGNS OBSERVED	DOSE LEVEL (mg/kg)		
		0	5,000	
0	No finding	5/5*	5/5	
1	No finding	5/5	5/5	
2	No finding	5/5	5/5	
3	No finding	5/5	5/5	
4	No finding	5/5	5/5	
5	No finding	5/5	5/5	
6	No finding	5/5	5/5	
7	No finding	5/5	5/5	
8	No finding	5/5	5/5	
9	No finding	5/5	5/5	
10	No finding	5/5	5/5	
11	No finding	5/5	5/5	
12	No finding	5/5	5/5	
13	No finding	5/5	5/5	
14	No finding	5/5	5/5	

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined

Table 5. Body weight changes in male rats after single oral administration
(group summary)

STUDY : 15-SDOT-001 (SEX : MALE)							
DOSE (mg/kg)	ANIMAL#	BODY WEIGHTS (Grams)					
		0day	1day	3day	7day	14day	Gain
0	1101	242.8	269.2	291.2	310.3	346.7	103.9
	1102	250.7	280.3	298.0	327.5	370.8	120.0
	1103	252.1	279.4	296.0	315.4	356.8	104.7
	1104	260.3	294.9	310.9	337.4	382.9	122.6
	1105	261.1	286.5	300.2	324.2	364.9	103.7
	MEAN	253.4	282.0	299.2	323.0	364.4	111.0
	S.D.	7.6	9.5	7.3	10.6	13.8	9.49
	N	5	5	5	5	5	5
DOSE (mg/kg)	ANIMAL#	BODY WEIGHTS (Grams)					
		0day	1day	3day	7day	14day	Gain
5,000	1201	241.5	274.8	289.7	313.9	347.6	106.1
	1202	246.3	277.4	293.3	323.3	363.2	116.9
	1203	253.0	285.6	300.7	327.9	366.1	113.1
	1204	256.8	283.0	308.1	334.9	381.5	124.7
	1205	262.8	297.0	315.2	344.7	393.5	130.7
	MEAN	252.1	283.5	301.4	328.9	370.4	118.3
	S.D.	8.4	8.7	10.5	11.7	17.7	9.65
	N	5	5	5	5	5	5

Table 6. Body weight changes in female rats after single oral administration
(group summary)

STUDY : 15-SDOT-001 (SEX : FEMALE)							
DOSE (mg/kg)	ANIMAL#	BODY WEIGHTS(Grams)					
		Oday	1day	3day	7day	14day	Gain
0	2101	182.9	206.4	217.4	232.4	238.0	55.1
	2102	186.0	207.9	214.5	224.1	255.0	69.0
	2103	196.0	212.8	226.3	245.0	257.3	61.3
	2104	203.0	228.7	237.3	252.0	292.1	89.2
	2105	207.6	213.9	235.4	249.7	273.9	66.4
	MEAN	195.1	213.9	226.2	240.6	263.3	68.2
	S.D.	10.60	8.84	10.26	11.94	20.55	12.87
N	5	5	5	5	5	5	
DOSE (mg/kg)	ANIMAL#	BODY WEIGHTS(Grams)					
		Oday	1day	3day	7day	14day	Gain
5,000	2201	182.3	205.5	214.2	223.7	250.4	68.1
	2202	189.6	199.5	223.1	231.7	244.5	55.0
	2203	202.2	226.5	246.3	261.7	282.1	80.0
	2204	203.5	222.3	247.5	251.8	281.0	77.5
	2205	215.6	249.9	265.9	287.9	301.0	85.4
	MEAN	198.6	220.7	239.4	251.3	271.8	73.2
	S.D.	12.96	19.83	20.70	25.47	23.69	11.95
N	5	5	5	5	5	5	

Table 7. Gross findings in male rats after single oral administration(group summary)

STUDY : 15-SDOT-001 (SEX : MALE)				
DOSE		GROSS OBSERVATION	FREQUENCY	
(mg/kg)	LOCATION	GROSS FINDINGS	DEATH	SURVIVORS
0		NO GROSS FINDINGS	0/0	5/5*
5,000		NO GROSS FINDINGS	0/0	5/5

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined

Table 8. Gross findings in female rats after single oral administration(group summary)

STUDY : 15-SDOT-001 (SEX : FEMALE)				
DOSE		GROSS OBSERVATION	FREQUENCY	
(mg/kg)	LOCATION	GROSS FINDINGS	DEATH	SURVIVORS
0		NO GROSS FINDINGS	0/0	5/5*
5,000		NO GROSS FINDINGS	0/0	5/5

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined

제 6 절 안전성평가(GLP)

[랫드를 이용한 28일 반복경구투여 DRF독성시험]

1. 연구목적

본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질의 일종인 GMP내 결합되어 있는 Sialic acid를 식품으로서 활용성을 높이기 위하여, 효소분리 과정을 거쳐 시험물질인 7%-GNANA를 제조하였다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다 할지라도 소재에 대한 안전성자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 특히 Sialic acid를 분리시켜 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나 식품공전이나 기능성식품공전에 등록을 위해서는 독성시험을 통한 안전성자료가 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 시험물질인 7%-GNANA의 안정성 평가의 일환으로 반복투여 시 나타날 수 있는 독성의 질적, 양적인 평가를 위해 유청가수분해단백을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 90일 장기 안전성 평가전에 우선 유청가수분해단백의 4주 반복경구투여에 따른 결과-경중에 따른 분류(Weight-based Classification)를 얻기 위하여 실시하였다. 관련 시험지침은 의약품등의 독성시험기준 (고시 제2014-136호, KFDA, 2014. 7. 30), 비임상시험관리기준 (고시 제2014-67호, KFDA, 2014. 2. 12) 및 OECD 테스트가이드라인 (No. 420)의 방법에 따라 수행하였다.

2. 연구수행방법

시험물질 준비

GMP는 Sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPepGMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 시험물질 제조를 위한 원료로 사용하였다. 시험물질 제조는 원료 GMP를 우선 정제수에 7%(w/v)로 용해시킨 후 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark) 효소를 원료 대비 0.2%(w/v)로 혼합 및 57°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 용액을 동결분말로 제조한 7%-GNANA (시험물질명: 유청가수분해단백분말)을 한일바이오메드사(한국)로 공여 받아 사용하였다. 부형제는 멸균증류수를 사용하였는데, 시료 제공한 정보를 바탕으로 물리적 특성실험을 수행하였으며, 그 결과 물에 용해되어 독성이 없는 멸균증류수를 부형제로 하였다.

실험동물 준비

공시동물로서는 SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드(수컷 213.0 ~ 230.5 g, 암컷 173.1 ~ 194.5 g)를 (주) 샘타코(한국)에서 구입하여 시험간 사용하였다. 선정이유로서는 랫드는 크기가 작고, 다루기가 쉬우며, 계절변동이 적은 장점이 있는 동시에 스트레스에 덜 민감하면서 병에 대한 저항력이 강하다. 또한 공급체제가 확립되어 있으며, 약물에 대한 반응이 일정하여 암수에 따른 성별 반응차이가 거의 없다. 그리고 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 사람에의 외삽(extrapolation)이 가능하므로 일반독성시험에 널리 사용되고 있다.

시험동물 검역 및 순화기간

동물 입수시 입수동물에 대한 검수검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다. 시험물질의 투여개시시의 암수는 각 8주령(수컷 241.5 ~ 262.8 g, 암컷 182.3 ~ 215.6 g)의 동물중 건강체 암수 각 10마리를 시험간 사용하였다.

동물실험법

시험물질의 투여방법은 경구방법으로 경배부 피부를 고정하고 금속제 경구투여용 존대를 이용하여 강제 경구투여 하였으며, 오전 10시에서 11시 사이에 투여가 수행되었다.

시험 물질의 조제 및 투여량

본 시험물질은 시험물질 투여 전 1시간 이내에 준비하였으며, 순도에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하며, 시험물질을 칭량한 후 부형제에 용해하여 투여에 사용하였다. 조제된 시험물질의 투여액량은 투여 당일에 측정한 체중을 기준으로 10ml/kg으로 투여액량을 계산하였으며, 1일 1회로 투여하였다.

시험군의 구성

암수 5마씩에 단지 생리적 식염수만은 경구투여한 대조군과 시험물질을 0, 1250, 2500 그리고 5,000mg/Kg을 경구투여한 시험군으로 구분 하였다.

평가항목

일반증상 및 사망동물

4주간의 투여 및 관찰기간 동안에 특이증상이나 사망동물을 관찰하였다.

일반증상 및 사망률

투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고, 투여 다음날부터 투여 및 관찰기간 동안 매일 2회 모든 동물에 대해 일정한 시간에 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개별적으로 관찰하여 기록하였다.

체중변화

투여개시 전에 체중을 측정하였고 이후에는 주 1 회, 부검 전날 및 부검일에 측정하였다. 부검일의 체중은 부검 전일에 하루 밤 절식시킨 후의 체중을 측정하였다. 사료섭취량 측정

주기는 체중측정과 시기적으로 일치하게 이루어졌다.

사료섭취량

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리 일부터 투여개시 일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

요검사

요검사는 시험물질의 투여 마지막 주에 각 군당 5마리에 대하여 실시하였다. 동물을 대사 케이지에 수용하여 3 ~ 4 시간 동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1ml 를 취하여 요자동분석기(CliniTek Advantus™, SIEMENS, USA) 및 요침사 검사로 분석하였다. 또한 24 시간 동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다. 요분석 항목은 요당 (GLU), 빌리루빈 (BIL), 케톤체 (KET), 요비중 (SG), 잠혈 (OB), pH, 단백질 (PRO), 유로빌리노겐(URO), 아질산염 (NIT) 및 백혈구 (LEU) 등을 검사하였다.

요침사 검사

일반검사 후 남은 요를 1,500rpm 으로 5분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을 S.M(Sternheimer-Malbin)법으로 염색하여 RBC(red blood cell), WBC(white blood cell), Epithelial cell 및 Casts를 관찰하였다.

안검사

동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동제(한국알콘, Lot No.: 13C07K)를 점적 하여 안저사진기(Genesis, Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

혈액학적 검사

부검 시까지 생존한 모든 동물에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사는 랫드를 하룻밤 절식시킨 후 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle(Vacutainer 3ml, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 통해 이루어졌다. 분석항목은 백혈구(WBC)의 수, 적혈구(RBC)의 수, 혈색소량(HGB), 적혈구 백분율(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 적혈구 분포폭(RDW), 혈액소분포폭(HDW), 망상적혈구(RET), 백혈구 백분비(NEU), LYM (Lymphocyte), MONO(Monocyte), EOS(Eosinophil) BASO (Basophil) 그리고 LUC (Large unstained cells) 등이었다.

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사를 위해 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (BD, USA)에 주입하고 15 ~ 20분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이 후 3,000 rpm 으로 10분간 원심분리 (MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(KONELAB 20XT, Thermo, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정항목은 Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Alkaline phosphatase(ALP), Blood urea nitrogen(BUN), Creatinine(CRE), Glucose(GLU), Total cholesterol(CHO), Total protein(PRO), Creatine phosphokinase(CPK), Albumin (ALB), Total bilirubin(BIL), Albumin/globulin ratio(A/G), Triglyceride(TG), Inorganic phosphorus(IP), Ca²⁺ 등이었다. 또한 Na⁺, K⁺, Cl⁻등의 함량은 전해질 분석기(744 Na⁺/K⁺/Cl⁻-Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다.

혈액응고시간 검사

부검시 채혈한 혈액 중 1.8ml을 3.2% sodium citrate 0.2ml이 들어있는 vacutainer tube (Vacutainer 1.8ml, BD, UK)에 주입한 후, 3,000rpm 으로 10분 동안 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈장으로 PT(prothrombin time), APTT(activated partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액응고시간검사기:K-98(ACL 7000 Instrumentation Laboratory, USA.)를 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초(sec)단위로 측정하였다.

부검

부검 전날 절식한 랫드를 부검 당일에 Isofluran으로 흡입 마취하여 복대동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 이 후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 다음, 모든 장기를 관찰하였다.

장기중량 측정

부검 시 장기를 적출한 후 전자저울 (CP-64, Sartorius, Ger)을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기 모두를 측정하였다. 측정 장기는 난소 (ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체 (pituitary), 가슴샘 (thymus), 전립샘 (prostate), 고환 (testis), 부고환 (epididymis), 비장 (spleen), 신장 (kidney), 심장 (heart), 폐 (lung), 뇌 (brain) 및 간 (liver) 등이었다.

병리조직학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였으며 또한 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다. 고정 장기는 고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장,

공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막 림프절, 부신, 신장, 간, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 하더샘, 뇌, 뇌하수체, 피부 (젖샘) 등이었다. 고정된 장기 조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절하여 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 실시하였다. 대조군 및 고용량군(5,000mg/kg/ day)의 모든 고정 장기 조직에 대하여 검경 하였다.

3. 연구수행결과

일반증상 및 사망동물

4주간의 투여 및 관찰기간 동안에 특이증상이나 사망동물은 관찰되지 않았다.

체중

체중변화(body weight changes) 및 체중증가량(weight gains)에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

사료섭취량

4주간 사료 평균섭취량을 관찰한 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

요검사 (Table 1~2)

수컷 PRO(protein)수치와 SG(specific gravity) 수치가 중, 고용량군에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였고, KET(ketone body) 수치가 고용량군에서 감소하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p<0.05$). 그리고 pH 수치가 대조군과 비교하여 모든 시험군에서 통계적으로 유의하게 감소하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p<0.05$). 암컷 PRO(protein) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p<0.05$).

혈액학적 검사 (Table 1~2)

수컷 WBC (White blood cell)수치가 대조군과 비교하여 중용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p<0.05$). HDW(hemoglobin distribution width) 수치가 대조군과 비교하여 고용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p<0.05$).

혈액생화학적 및 전해질검사 (Table 1~2)

수컷 IP(Inorganic phosphorus) 수치가 대조군과 비교하여 중, 고용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하였지만 정상범위(historical data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p<0.05$). 암컷 Cl^- (Chlorideion) 대조군과 비교하여 고용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p<0.05$).

장기증량 (Table 1~2)

컷 가슴샘(thymus)에서 대조군과 비교하여 중용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$).

부검소견 (Table 1~2)

수컷 고용량군 1례(1401)에서 고환 왜소(undersize)가 관찰되었지만 다른 개체에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 중용량군 1례(2302)에서 자궁내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)가 관찰되었지만 성주기와 관련하여 암컷에서 흔히 나타나는 증상이며 조직병리 소견이 나타나지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

4. 결과의 요약

본 시험에서는 유청가수분해단백의 4주 반복경구투여에 따른 독성 반응 및 안전성을 평가하기 위하여 결과-경중에 따른 분류(Weight-based Classification)로 다음과 같은 결과를 얻었다. 본 시험을 통해 암수 모두에서 시험물질-유래 중요한 변화는 관찰되지 않았지만, 수컷 1250, 2500, 5000mg/kg/day 용량과 암컷 5000mg/kg/day 용량에서 시험물질-유래 경미한 변화가 확인되었다. 암컷 신장의 경우 가역적 및 적응적 변화로 추정되어 독성판단 설정 기준에 따라 암수 모두에서 NOAEL(최대무독성용량)이 고용량군(5,000 mg/kg/day)로 추정된다.

90일 반복경구투여 독성시험에서의 용량설정은 NOEL(최대무영향용량), NOAEL(최대무독성용량), LOAEL(최소독성용량)이 나타나는 것이 바람직하나 본 시험물질로 이러한 독성단계를 나타내기 위해서는 5000mg/kg/day을 포함하여 그 이상의 용량설정이 필요하다. 그러나 시험물질의 특성상 90일 반복투여를 진행하기에는 물리적인 어려움과 조제물의 균질성에 문제가 있어 본 시험물질의 90일 반복투여시험의 최고용량은 5000mg/kg/day로 하는 것이 바람직하다고 판단된다.

Table 1. 시험물질을 4주간 경구투여시 수컷의 시험물질-유래 변화

결과의 경중-따른 분류	측정지표	투여용량(mg/kg/day)
시험물질-유래 중요한 변화	없음	
시험물질-유래 경미한 변화	요검사(PRO)	2500, 5000
	요검사(SG)	2500, 5000
	요검사(KET)	5000
	요검사(pH)	1250, 2500, 5000
	혈액학(WBC)	2500
	혈액학(HDW)	5000
	장기중량(가슴샘)	2500
비시험물질-유래 변화	생화학(IP)	2500, 5000
	부검소견(고환 왜소)	5000

Table 2. 시험물질을 4주간 경구투여시 암컷의 시험물질-유래 변화 조사표

결과의 경중-따른 분류	측정지표	투여용량(mg/kg/day)
시험물질-유래 중요한 변화	없음	
시험물질-유래 경미한 변화	장기중량(양쪽 신장)	5000
비시험물질-유래 변화	요검사(PRO)	5000
	전해질(Cl ⁻)	5000
비시험물질-유래 변화	부검소견(자궁 액체 저류)	2500

제 7 절 안전성평가(GLP)

[유청가수분해단백분말(7% Sialic acid)의 랫드를 이용한 90일 반복경구투여 독성시험]

1. 연구목적

Sialic acid는 대부분 의료용 소재로 활용되고 있으며 유청단백질에서 분리한 Sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. 본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질의 일종인 GMP내 결합되어 있는 Sialic acid를 식품으로서 활용성을 높이기 위하여, 효소분리 과정을 거쳐 시험물질인 7%-GNANA를 제조하였다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다 할지라도 소재에 대한 안전성자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 특히 Sialic acid를 분리시켜 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나 식품공전이나 기능성식품공전에 등록을 위해서는 독성시험을 통한 안전성자료가 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 시험물질인 7%-GNANA의 안정성 평가의 일환으로 반복투여 시 나타날 수 있는 독성의 질적, 양적인 평가를 위해 “의약품 등의독성시험관리기준(식품의약품안전처 고시 제 2014-136호) [21]” 과 “OECD test guideline(OECD, 2008) [13]” 에 준하여 90일 반복경구투여 독성시험을 실시하였으며 유청가수분해단백분말에 대한 일반 독성의 특성을 평가하였다.

2. 연구수행방법

시험물질 준비

GMP는 Sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPepGMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 시험물질 제조를 위한 원료로 사용하였다. 시험물질 제조는 원료 GMP를 우선 정제수에 7%(w/v)로 용해시킨 후 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark) 효소를 원료 대비 0.2%(w/v)로 혼합 및 57°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 용액을 동결분말로 제조한 7%-GNANA(제품명 : HELICOBACTROL-7)을 한일바이오메드사(한국)로 공여 받아 사용하였다(Fig 2).

시험물질 내 지표성분 Sialic acid 분리 및 함유량 검정

10mM Sodium Acetate Buffer용액에 시험물질인 7%-GNANA를 완전히 용해시킨 후, 에탄올 8ml에 희석액 2ml를 혼합한 후 Sonication(25°C) 및 원심분리(3,000rpm x 20min, 25°C)과정을 거쳐 상등액만을 0.22µm membrane으로 여과 후 이를 최종 HPLC System(Agilent 1260, USA)시료로 사용하였다. 시험물질내 지표성분인 Sialic acid의 분리여부 및 함유량 검정을 위한 표준체 Sialic acid는 Sigma-Aldrich사(A2090)을 구입하여 0.1ppm(w/w), 1ppm 및 10ppm 되게 희석하여 분석간 표준용액으로

사용하였다(Table 1).

시험물질내 Sialic acid의 분리효율 및 함유량 검정을 위한 표준체는 Sigma-Aldrich사(A2090)을 구입하여 0.1ppm(w/w), 1ppm 및 10ppm 되게 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 분석간 검출허용 표준편차는 90~110%범위 내에서 평가하였다(Fig 3.).

실험동물 및 시험방법

시험법 및 동물복지와 IACUC

본 시험은 OECD(2008) [13], US FDA(2005) [14] 및 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전처 고시 제2014-136호) [21]에 따라 실시되었으며, 동물보호법(법률 제11737호, 2013, 한국)을 근거한 대구가톨릭대학교 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)심의를 통과 후 실시 하였다(승인번호 : 제IACUC-2015-009호).

실험동물 및 시험방법

시험동물은 5주령의 SPF Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드를 대한바이오링크(한국)로부터 구입한 후 7일간의 검역과 순화 과정을 거쳐 건강한 암·수 각각 40마리를 선발하여 암·수 4군으로 하고, 시험군당 10마리를 시험에 사용하였다. 사육환경 및 운영은 시험법을 준수하여 실시하였다.

시험군 구성 및 투여용량

투여용량 설정은 4주 반복경구투여 용량범위설정 (dose-range finding, DRF) 독성시험의 결과인 암수 랫드의 NOEL 5,000mg/kg/day을 적용하였다. 본시험에서는 멸균생리수를 섭이 시킨 대조군과 투여군은 5,000mg/kg/day(고용량군)을 최고용량으로, 2,500(중용량군) 및 1,250(저용량군) mg/kg/day으로 설정하였다. 시험물질인 23%-GNANA의 투여는 임상 적용 경로인 경구로 이루어졌다.

일반증상 및 사망률

투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고, 투여 다음날부터 투여 및 관찰기간 동안 매일 2회 모든 동물에 대해 일정한 시간에 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개별적으로 관찰하여 기록하였다.

체중변화

투여개시 전에 체중을 측정하였고 이후에는 주 1 회, 부검 전날 및 부검일에 측정하였다. 부검일의 체중은 부검 전일에 하루 밤 절식시킨 후의 체중을 측정하였다. 사료섭취량 측정

주기는 체중측정과 시기적으로 일치하게 이루어졌다.

사료섭취량

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리 일부터 투여개시 일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

요검사

요검사는 시험물질의 투여 마지막 주에 각 군당 5마리에 대하여 실시하였다. 동물을 대사 케이지에 수용하여 3 ~ 4 시간 동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1ml 를 취하여 요자동분석기(CliniTek Advantus™, SIEMENS, USA) 및 요침사 검사로 분석하였다. 또한 24 시간 동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다. 요분석 항목은 요당 (GLU), 빌리루빈 (BIL), 케톤체 (KET), 요비중 (SG), 잠혈 (OB), pH, 단백질 (PRO), 유로빌리노젠(URO), 아질산염 (NIT) 및 백혈구 (LEU) 등을 검사하였다.

요침사 검사

일반검사 후 남은 요를 1,500rpm 으로 5분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을 S.M(Sternheimer-Malbin)법으로 염색하여 RBC(red blood cell), WBC(white blood cell), Epithelial cell 및 Casts를 관찰하였다.

안검사

동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동제(한국알콘, Lot No.: 13C07K)를 점적 하여 안저사진기(Genesis, Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

혈액학적 검사

부검 시까지 생존한 모든 동물에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사는 랫드를 하룻밤 절식시킨 후 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle(Vacutainer 3ml, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 통해 이루어졌다. 분석항목은 백혈구(WBC)의 수, 적혈구(RBC)의 수, 혈색소량(HGB), 적혈구 백분율(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 적혈구 분포폭(RDW), 혈액소분포폭(HDW), 망상적혈구(RET), 백혈구 백분비(NEU), LYM (Lymphocyte), MONO(Monocyte), EOS(Eosinophil) BASO (Basophil) 그리고 LUC (Large unstained cells) 등이었다.

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사를 위해 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (BD, USA)에 주입하고 15 ~ 20분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이 후 3,000 rpm 으로 10 분간 원심분리 (MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(KONELAB 20XT, Thermo, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정항목은 Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Alkaline phosphatase(ALP), Blood urea nitrogen(BUN), Creatinine(CRE), Glucose(GLU), Total cholesterol(CHO), Total protein(PRO), Creatine phosphokinase(CPK), Albumin (ALB), Total bilirubin(BIL), Albumin/globulin ratio(A/G), Triglyceride(TG), Inorganic phosphorus(IP), Ca²⁺ 등이었다. 또한 Na⁺, K⁺, Cl⁻등의 함량은 전해질 분석기(744 Na⁺/K⁺/Cl⁻-Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다.

혈액응고시간 검사

부검시 채혈한 혈액 중 1.8ml을 3.2% sodium citrate 0.2ml이 들어있는 vacutainer tube (Vacutainer 1.8ml, BD, UK)에 주입한 후, 3,000rpm 으로 10분 동안 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈장으로 PT(prothrombin time), APTT(activated partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액응고시간검사기:K-98(ACL 7000 Instrumentation Laboratory, USA.)를 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초(sec)단위로 측정하였다.

부검

부검 전날 절식한 랫드를 부검 당일에 Isofluran으로 흡입 마취하여 복대동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 이 후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 다음, 모든 장기를 관찰하였다.

장기중량 측정

부검 시 장기를 적출한 후 전자저울 (CP-64, Sartorius, Ger)을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기 모두를 측정하였다. 측정 장기는 난소 (ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체 (pituitary), 가슴샘 (thymus), 전립샘 (prostate), 고환 (testis), 부고환 (epididymis), 비장 (spleen), 신장 (kidney), 심장 (heart), 폐 (lung), 뇌 (brain) 및 간 (liver) 등이었다.

병리조직학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였으며 또한 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다. 고정 장기는 고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장,

공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막 림프절, 부신, 신장, 간, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 하더샘, 뇌, 뇌하수체, 피부 (젖샘)등이었다. 고정된 장기 조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절하여 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 실시하였다. 대조군 및 고용량군(5,000mg/kg/ day)의 모든 고정 장기 조직에 대하여 검경 하였다.

통계학적 분석

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 14.0을 이용하였다. 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 등과 같은 연속적인 자료는 one-way ANOVA test로 평균치에 대한 유의성을 검정하였다.

유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test, 이분산일 경우에는 Dunnett's T-test를 이용하였다. 요검사 결과와 같이 불연속인 자료의 분석 척도변환을 통해 중증도(severity)로 나타내어 통계분석이 이루어졌다(Table 3).

독성판정기준

시험물질의 반복투여독성시험을 통해 얻어진 변화 또는 독성은 독성의 정도와 양상에 따라 weight-based classification[16, 22]에 따라 평가하였다(Table 2). Weight-based Classification은 시험물질 유래 중요한 변화(Important compound-related changes), 시험물질 유래 경미한 변화(Minor compound-related changes)와 비시험물질 유래변화(Noncompound-related changes)로 3단계로 구분하여 평가하였다. 시험물질이 비시험물질 유래변화(Noncompound-related changes)로 평가되면, 시험의 목적인 NOEL(No Observed Effect Level), NOAEL(No Observed Adverse Effect Level) 및 LOAEL(Lowest Observed Adverse Effect Level)로 구분하였다. 독성지표는 시험물질-유래 중요한 변화는 adverse 그리고 시험물질-유래 경미한 변화는 시험물질에 의한 non-adverse effect로 분류하였다. 일반적으로 NOAEL은 시험물질에 의해 심각한 독성(adverse effect)을 유발하지 않는 최대독성영향이지만 경미한 영향인 non-adverse effect를 나타내는 최대무독성용량이며 LOAEL은 adverse effect를 유발하는 최소독성용량을 의미 한다. NOEL은 시험물질에 의한 경미한 변화도 없는 최대무영향용량을 의미한다[22, 14]. 이러한 독성지표의 정의에 따라 최종 독성판정은 NOAEL과 NOEL로 구분하여 실시하였다.

3. 연구수행결과

시험물질내 지표성분 Sialic acid 검정

Table 3은 시험물질인 7%-NANA내 지표성분인 sialic acid의 함유량을 분석한 결과이다. 시험물질내 지표성분인 Sialic acid의 분리여부와 더불어 함유량을 확인결과, 7% Sialic acid와 고유 GMP단백질이 93%(수분함량 제외)로 구성되어 있었으며, 사용효소의 분해효율은 100%였다. 따라서, 시험물질로 사용에 있어 적합함을 확인하였다.

시험물질의 동물안전성 평가

일반증상 및 사망동물

Table 1와 Table 18은 시험물질인 7%-GNANA를 90일동안 투여시 일반증상변화 및 사망동물의 발생여부를 인한 결과이고, 실험기간 중 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물은 없었으며, 투여 기간 중 일반증상의 관찰에서 어떠한 이상 소견은 없었다.

체중변화

Table 5과 Table 18은 7%-GNANA를 90일간 경구투여 과정에서 일정별 체중 변화를 대조군과 비교한 결과, 암수 모두 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화는 없었다.

사료섭취량 조사

Table 6과 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 암수 랫드의 일정별 사료섭취량을 대조군과 비교한 결과이다. 암컷 평균 사료섭취량에서 대조군과 비교하여 고용량군에서 통계적으로 유의하게 감소(-6.1%)하였지만 고용량의 시험물질 투여로 인한 사료섭취량의 감소로 판단되어 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다($p < 0.05$). 수컷은 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다.

안검사

Table 7과 Table 18은 암수 랫드의 시험군 분리 시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 안저검사 결과이고, 대조구와 비교시 전체 시험구에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

장기중량

Table 14와 Table 15 및 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 암수 랫드의 장기절대중량(absolute weight) 및 상대중량(relative weight)을 대조군과 비교한 결과이다. 암수 투여군의 절대중량 및 상대중량에서 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었으나, 수컷은 고용량군에서 양쪽신장(Kidney)에서 상대중량의 증가되었다. 암컷의 경우는 고용량군에서 양쪽신장의 상대중량 증가와 더불어 가슴샘(Thymus)에서 절대중량이 통계적으로 유의하게 증가($P < 0.05$)하였으나, 그러나 이러한 유의한 차이는 용량의존성이

없어 시험물질 유래 경미한 변화로 판단되었다.

요검사

Table 8과 Table 10 및 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 요검사 결과를 나타낸 것이다. 수컷에서 SG 및 pH 중증도가 중용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하였지만($p < 0.05$) 용량 의존성이 없었으며 정상범위(historical data)내에서 변화하여 비시험물질 유래 변화로 판단되었다. 또한, PRO 중증도 수치는 저용량군에서 그리고 KET(ketone body) 및 SG(specific gravity)는 중용량군에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였지만($p < 0.05$) 정상범위(historical data)내의 변화로 추정되어 생물학적 유의성(biological significance)이 없는 비시험물질 유래 변화로 판단되었다. 암컷의 경우는 암컷의 경우는 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다.

요침사 검사

Table 9과 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 요침사 검사 결과를 나타낸 것이다. 결과로서, 암컷 및 수컷 모두에서 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사

Table 11과 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 수컷 및 암컷 랫드에 대한 혈액학적 검사를 나타낸 것이다. 암수 모두에서 대조군과 비교하여 이상소견은 관찰되지 않았다($P < 0.05$).

혈액생화학적 검사

Table 12과 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 수컷 및 암컷 랫드에 대한 혈액생화학적 이상여부를 대조군과 비교한 결과이다. 결과로서, 암컷에서만 Ca^{2+} (Calciumion) 수치가 대조군과 비교하여 저용량군 및 중용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만 용량 의존성이 없고, 정상범위(historical data)내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다($p < 0.05$).

혈액응고 검사

Table 13과 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 수컷 및 암컷 랫드의 혈액응고시간에 미치는 결과를 대조군과 비교한 결과이다. 결과로서, 암수 모두에서 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다($P < 0.05$).

부검소견

Table 16과 Table 18은 7%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 부검결과를 나타낸 것이다. 수컷 우측고환 왜소가 1레에서 관찰되었지만 다른 개체에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 또한, 저용량군 1레에서 늑골(rib)에 포도상(bortyoid)의 종양(tumor)이 관찰되었지만 다른군에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷의 경우, 가슴샘(Thymus) 발적(redness)이 중용량군 및 고용량군에서 각각 1레씩 관찰되었지만 랫드에 흔히 나타나는 자연발생적 증상으로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 그리고 자궁내 맑은 액체 저류(retention of clearfluid)는 대조군 1레에서 관찰되었지만 다른군에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 또한, 폐(lung) 발적(redness)이 대조군 2레와 저용량군 2레, 중용량군 4레 및 고용량군 2레에서 관찰되었으나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

조직병리학적 검사

Table 17과 Table18은 7%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 조직병리학적 검사 결과를 나타낸 것이다. 수컷에서의 결과는 다음과 같다. 신장(Kidney)에서 미약한(minimal) 사구체 경화(Glomerulosclerosis)가 고용량군 2레가 나타났으나, 대조군 3레에서도 같은 정도로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 신장내 미약한(minimal) 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration)이 고용량군 1레가 나타났는데, 대조군 3레에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 신장(Kidney)내 미약한(minimal) 세뇨관 세포의 재생(Regeneration)이 고용량군 1레에서 나타났으나 대조군 2레에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 간(Liver)에서 미약한(minimal) 간세포 공포변성(vacuolization)이 고용량군 1레에서 나타났으나 다른 군에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 심장(Heart)에서 미약한(minimal) 심근염(myocarditis)이 대조군 1레에서 “minimal”로 나타났으나 다른 군에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 이러한 결과는 비시험물질-유래 변화로 판단되었으며 통계적 유의성은 있지만 생물학적 유의성 (biological significance)은 없는 것으로 판단되었다. 암컷에서의 결과는 다음과 같다. 신장(Kidney)에서 미약한(minimal) 사구체경화(Glomerulosclerosis)가 대조군 1레와 고용량군 3레 나타나 이는 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 신장내 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration)이 대조군 2레에서만 미약한(minimal) 수준으로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 신장내 세뇨관 세포의 재생(Regeneration)이 고용량군 1레에서 나타났으나 대조군 1레에서도 “minimal”로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 신장(Kidney)에서 미네랄 침착(Mineralization)이 고용량군 1레에서 나타났으나, 대조군 1레에서도 “minimal”로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 방광(Urinary bladder)에서 미약한(minimal) 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration)이 대조군 1레에서만 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 간(Liver)에서 미약한(minimal) 국소적인 괴사 (Focal necrosis)가 대조군 1레에서만 나타났을 뿐 다른 군에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 비장(Spleen)에서 미약한(minimal) Hemosiderin pigment이 고용량군 1레에서 나타났으나 다른 군에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

독성판정(Result summary and Toxicity evaluation)

Table 18은 7%-GNANA를 90일동안 반복경구투여시 시험물질에 대한 암수 랫드에서 독성판정을 위한 종합결과이다. 본시험은 7%-GNANA을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 90일간 반복경구투여를 하여 나타나는 독성유무를 파악하기 위해 실시되었다. 시험결과, 시험물질투여 및 관찰기간(90일)동안 사망동물은 발생하지 않았다. 또한 일반증상조건, 체중변화, 사료섭취량, 안과학적 검사, 요 침사 및 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사 및 혈액응고 시간검사 등 에서도 특이한 변화가 관찰되지 않았다. 요 검사의 경우 수컷에서만 SG, pH, KET(ketone body) 및 SG(specific gravity) 증중도가 중용량군에서 그리고 PRO 증중도가 저용량 및 고용량군에서 유의하게 증가하였다. 그러나 용량의존성이 없고 정상범위(historical data) 내변화로 판단되었으며, 요침사 결과 이상이 없어 시험물질에 의한 독성적인 변화로 판단되지 않았다. 따라서, 요검사에서 통계적 유의성은 있지만 생물학적 유의성(biological significance)은 없는 것으로 판단되었다(Table 8). 부검소견 결과에서, 수컷에서는 우측고환 왜소, 가슴샘의 발적(redness) 및 늑골(rib)에 포도상(bortyoid)의 종양(tumor)증상이 일부 관찰되었으며, 암컷의 경우는 가슴샘의 발적(redness), 자궁 내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)와 폐(lung) 발적(redness)증상이 일부 관찰되었다(Table 16, 18). 이러한 결과는 비시험물질-유래 변화로 판단되었으며 통계적 유의성은 있지만 생물학적 유의성(biological significance)은 없는 것으로 판단되었다. 조직이상조사 결과에서, 수컷은 신장(Kidney)에서 사구체 경화(Glomerulosclerosis), 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration), 세노관 세포의 재생(Regeneration)증상이 나타났으며, 간(Liver)에서는 간세포 공포변성(vacuolization)증상과 더불어 심장(Heart)에서도 심근염(myocarditis)증상이 나타났으나 미약한(minimal)수준 이었고, 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(Table 17, 18). 암컷의 경우에서도 신장(Kidney)에서 사구체경화(Glomerulosclerosis), 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration), 세노관 세포의 재생(Regeneration), 미네랄 침착(Mineralization)증상이 나타났으나, 미약한(minimal)수준 이었다. 또한, 방광(Urinary bladder)에서 염증세포침윤(Inflammatory cells infiltration)과 비장(Spleen)에서 Hemosiderin pigment 증상이 나타났으나 역시 미약한(minimal)수준 이었다. 암수 모두에서 이러한 결과는 비시험물질-유래 변화로 판단되었으며 통계적 유의성은 있지만 생물학적 유의성(biological significance)은 없는 것으로 판단되었다(Table 17, 18). 시험물질에 의한 변화 및 독성평가 결과를 기초로 하여 weight-based classification(Table 2)를 적용한 최종독성 판정결과는 다음과 같다.

시험을 통해 암수 모두에서 시험물질-유래 중요한 변화 없이 시험물질-유래 경미한 변화만인 5,000mg/kg/day에서 확인되었다. 암컷의 경우에서 5,000mg/kg/day의 용량에서 신장의 경우에서만 시험물질-유래 경미한 변화가 나타났다. 따라서 시험의 독성 판정기준에 따라 수컷의 경우 NOEL은 5,000mg/kg/day으로 확인되었으며, 암컷의 경우 NOAEL은 5,000mg/kg/day로 확인되었다.

4. 요약

- 가. 본 시험은 Sialic acid가 7%를 함유하도록 제조한 유청가수분해단백분말제제(whey Protein of hydrolysis)의 기능성 식품 원료로 개발을 위한 동물안전성을 평가함에 연구 목표를 두었다. GMP를 원료로 제조한 시험물질은 Sialic acid 7%(v/v)와 원료인 GMP 가수분해 단백질이 93%로 구성되어 있었다(시험명 : 7%-GNANA). 시험물질의 독성유무는 한국식품의약품안전청(KFDA, 2014)과 OECD(2008)의 의약품 등의 독성시험 기준에 따라 실시하였다. 평가방법으로서, 시험물질의 투여용량을 0, 1250, 2500 및 5,000mg/kg/day으로 하여 SPF Sprague-Dawley계열 암수 랫드에 90일 동안 반복경구투여 하였을 때 나타나는 독성여부를 평가하였다.
- 나. 평가항목으로서는 사망률, 일반증상관찰, 체중변화, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검시 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사 등을 평가하였다. 90일 반복경구투여 실험결과로서, 시험물질투여 및 관찰기간 동안 사망동물은 발생하지 않았다. 또한 일반증상, 체중변화, 사료섭취량, 안과학적 검사, 요검사 그리고 혈액학적 및 혈액이화학적 이상 및 혈액응고검사에서 대조군 대비 특이한 변화는 관찰되지 않았다($P < 0.05$). 부검 및 병리조직학적 평가 결과, 암수 모두에서 시험물질-유래 중요한 변화 없이 시험물질-유래 경미한 변화(non-adverse effect)만인 5,000mg/kg/day에서 확인되었다. Weight-based classification(독성 강도에 따른 분류)를 적용한 최종 독성평가 결과, 수컷의 경우 NOEL(No Observed Effect Level)은 5,000mg/kg/day 그리고 암컷의 경우는 NOAEL(No Observed Adverse Effect Level)은 5,000mg/kg/day로 최종 확인되었다. 따라서, 암수모두에서 시험물질의 NOAEL은 투여최대용량인 5,000mg/kg/day로 확인되었다. 결론적으로, GMP를 원료로 하여 제조한 7%-GNANA(유청가수분해단백분말)는 투여 가능 최대용량에서도 독성이 없는 안전한 천연물이라는 것을 확인하였고 의약품이나 기능성 식품으로서의 개발 가능성을 확인하였다.

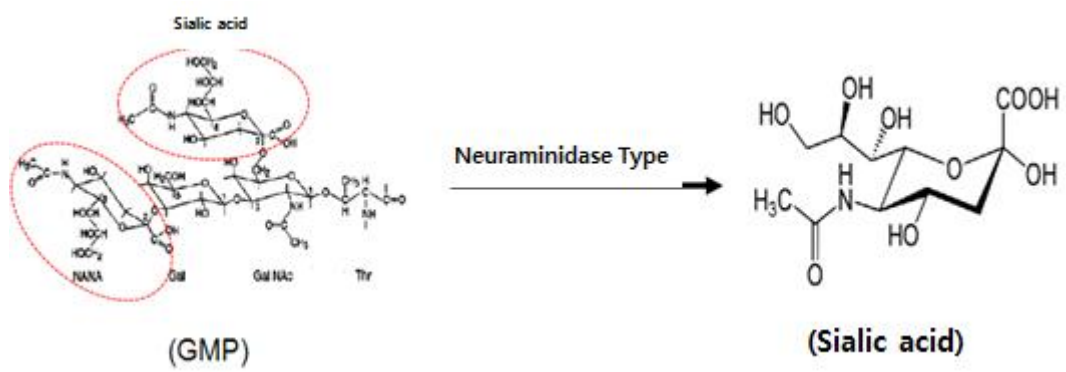


Fig. 1. Sialic acid production from GMP by a Alcalase 2.4FL(Neuraminidase Type)

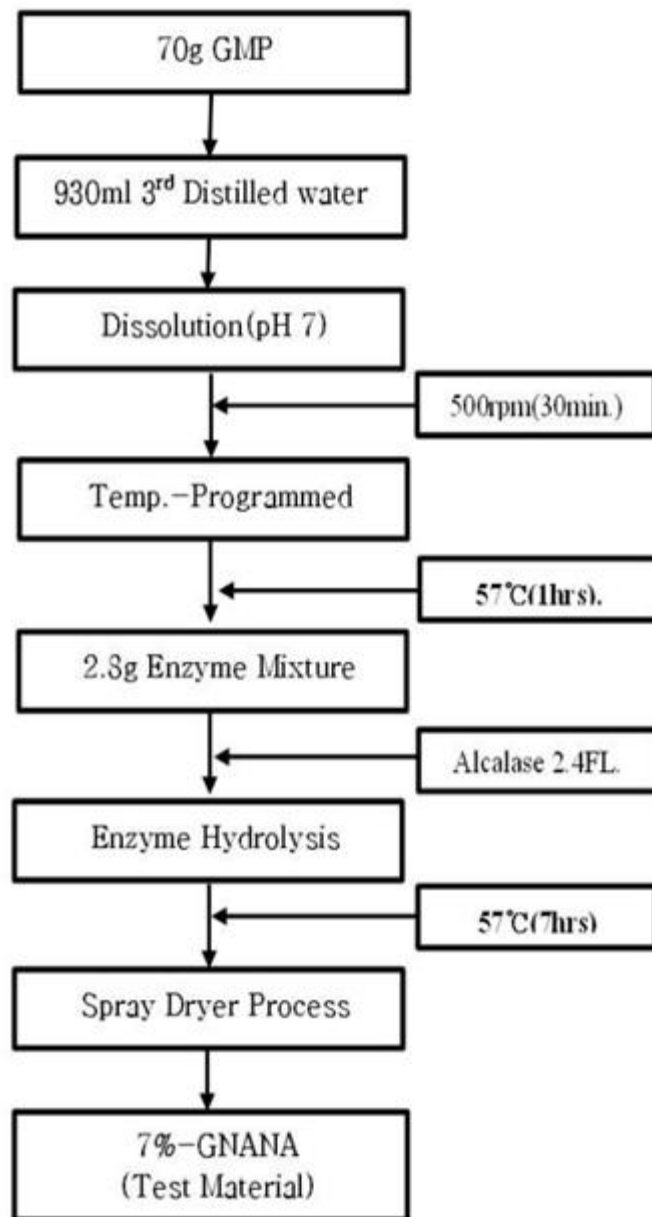


Fig. 2. Manufacturing process diagram for 7%-GNANA, a test substance containing 7% Sialic acid, through the enzyme(Alcalase 2.4 FL) separation mechanism of Sialic acid, the marker compound having the Glycomacropeptide(GMP) as a substrate.

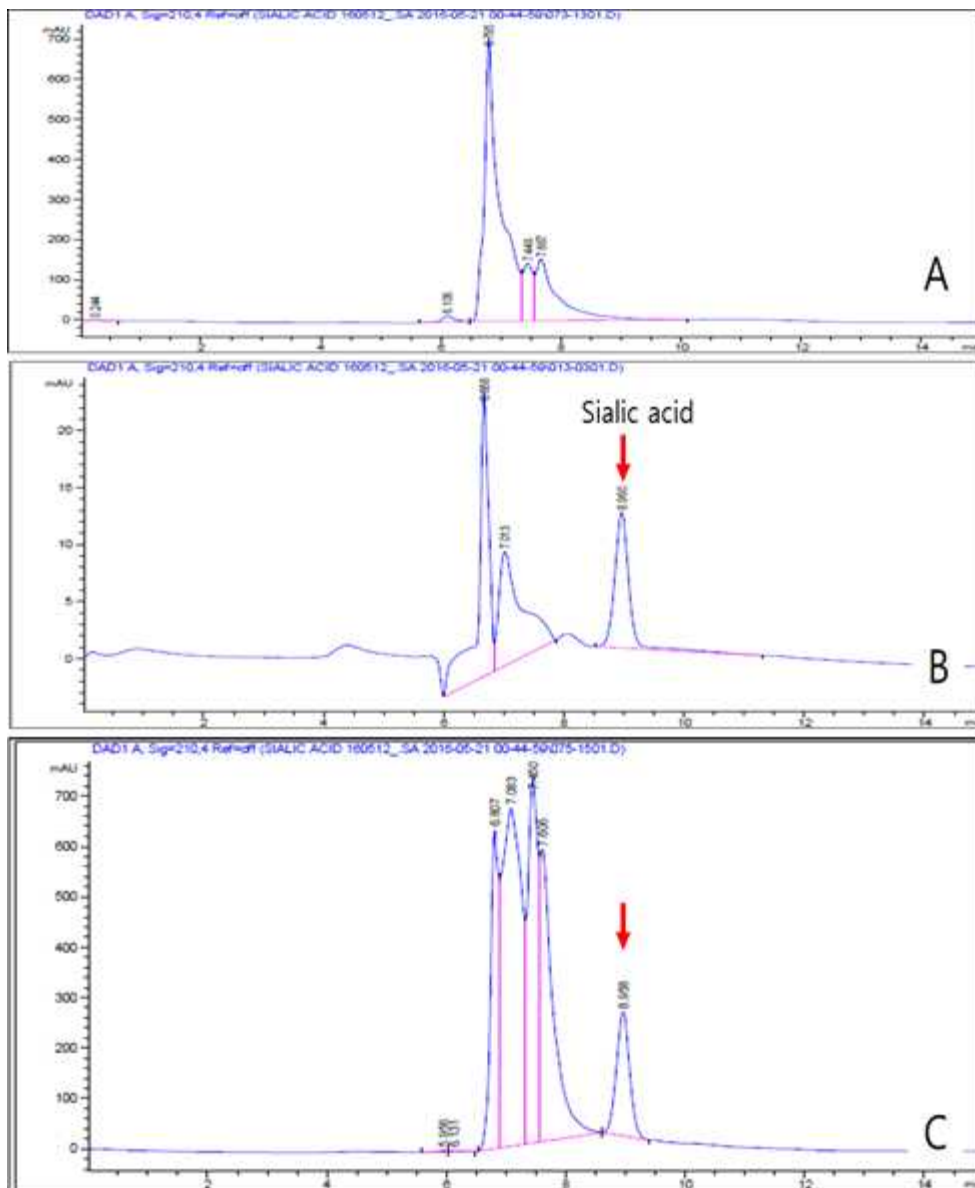


Fig. 3. Result of evaluation for separation and content of Sialic acid in hydrolyzed whey protein(7%-GNANA), a test substance, vs. the standard Sialic acid applying the HPLC analysis method.

A : Non-enzymatically Modified GMP., B : Standard Sialic acid(25ppm)., C : Result of Sialic acid detection in 7%-GNANA.was prepared through the ethanol enriching process and final hot air drying process after treating the 0.2%(v/v) Alclase for 1 hour (40°C) versus GMP.

Table 1. HPLC operation conditions for analysis of Sialic acid

2.HPLC System(Agilent 1260)	2. Analysis Conditions
Pump : G1311C Auto sampler : G1329B Column : G1316A UV detector :G1314F	Wavelength.: 205nm Column : Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column (300 × 7.8 mm, 9µm, Bio-Rad Co.,) Mobile Phase : 10mM H2SO4 Running time : 20min Flow rate : 0.5mL/min Injection volume : 10µl Temperature : 40°C Standard Sol.(w/w) :Silaic acid 0.1ppm, 1ppm, 10ppm

Table 2. Definitions of LOAEL, NOAEL and NOEL by three steps of weight-based classification in toxicity test.

Weight-based classification	Definitions of Criteria	Criteria of toxicity	Evaluation endpoints
Important compound-related changes	.The lowest exposure level at which there are statistically or biologically significant increases in the frequency or severity of adverse effects between the exposed population and its appropriate control.	Criteria of toxicity	LOAEL
Minor compound-related changes	·The highest exposure level at which there are no statistically or biologically significant increases in the frequency or severity of adverse effects between the exposed population and its appropriate control. ·Some effects may be produced at this level, but they are not considered to be adverse or precursors to adverse effects.	Non-adverse effect	NOAEL
Noncompound-related changes	·The highest exposure level at which there are no effects (adverse or nonadverse) observed in the exposed population, when compared with its appropriate control.	No effect	NOEL

Table 3. Table of severity values for statistical analysis by item of urinalysis signs during the 90 days oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the rats

Severity	0	1	2	3	4	5
GLU	-	+/-	1+	2+	3+	4+
BIL	-	+/-	1+	2+	3+	
KET	-	+/-	1+	2+	3+	4+
SG (Specific gravity)	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
PRO	-	+/-	1+	2+	3+	4+
pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>=9.0
URO (EU/dL)	0.2	1	2	4	>=8	
NIT	-	+				
OB (µmol/L)	-	+/-	1+	2+	3+	
LEU	-	+/-	1+	2+	3+	
RBC	0	+/-	1+	2+	3+	
WBC	0	+/-	1+	2+	3+	
Epithelial cell	0	+/-	1+	2+	3+	
Cast	0	+/-	1+	2+	3+	

GLU(glucose), BIL(bilirubin), KET(ketone body), LEU(leukocyte), OB(occult blood), PRO(protein), URO(urobilinogen), NIT(nitrite), SG(specific gravity)

Table 4. Investigation results of clinical signs through the autopsy after the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Days	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day) ^{b)}							
		G1 ^{%, a)}		G2		G3		G4	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	No finding	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}	0 / 10 ^{a)}
1-7	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
8-14	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
15-21	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
22-28	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
29-35	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
36-42	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
43-49	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
50-56	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
57-63	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
64-70	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
71-77	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
78-84	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
85-89	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
90	Terminal Sacrifice	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

a) Number of animals with the sign / Number of animals examined.

%; Control Group (G1) Low-dose Group (G2: 1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3: 2,500mg/10ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10ml/day)

Table 5. . Weekly investigation results of the effects on the body weight changes during the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

WEEKS	GROUPS (mg/kg/day) ^{b)}							
	G1 [%]		G2		G3		G4	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	192.2±5.46	155.1±7.00	191.3±6.42	153.8±4.71	190.4±7.92	153.6±6.47	191.2±5.05	152.2±9.99
1	248.8±11.93	174.0±11.36	249.2±9.26	171.8±11.24	244.9±12.22	171.8±9.05	248.3±9.26	172.9±12.00
2	303.6±17.49	194.5±15.46	302.3±11.12	186.6±7.28	297.1±18.25	189.0±7.08	300.0±13.58	193.1±12.05
3	348.9±23.49	211.0±14.11	346.2±14.88	202.3±10.75	336.7±23.12	206.3±10.48	339.3±18.00	211.0±12.09
4	386.3±30.30	223.5±12.21	380.4±17.54	215.2±9.40	368.9±26.04	219.4±11.90	369.4±22.63	228.0±11.19
5	418.0±34.94	238.8±16.96	412.0±21.18	224.2±8.56	395.9±29.46	230.5±12.09	397.7±22.87	237.6±12.91
6	441.6±40.03	248.5±15.74	436.9±23.61	234.9±11.48	419.3±34.58	239.0±11.83	421.1±23.72	243.7±17.51
7	461.8±45.67	257.4±18.26	455.8±24.05	244.7±12.94	439.9±38.17	246.3±9.03	441.2±21.67	255.3±14.88
8	481.3±49.84	268.6±16.75	475.2±25.78	249.5±12.84	455.1±40.38	254.0±12.17	458.3±21.57	264.7±16.73
9	497.0±53.12	276.5±21.71	494.5±28.63	253.0±11.56	472.6±43.81	259.7±12.16	472.3±20.01	267.6±15.26
10	511.6±56.97	277.3±19.02	509.8±31.12	255.8±11.47	488.4±47.95	263.8±12.80	486.3±22.67	269.8±16.88
11	523.2±59.13	282.0±19.73	521.9±33.53	263.0±13.51	501.8±53.11	268.2±8.32	497.5±24.40	277.8±17.34
12	538.3±60.81	288.7±19.99	539.3±37.42	269.7±16.83	515.6±56.08	271.7±11.61	512.1±23.62	286.0±18.24
13	538.7±62.09	295.3±24.87	541.6±37.64	272.5±17.62	517.8±59.78	276.8±9.83	513.1±23.61	287.0±17.25
Gains ^{a)}	346.5±60.02	140.2±21.30	350.3±34.53	118.6±14.55	327.4±53.78	123.1±9.04	321.8±21.62	134.8±16.20

a) Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0.

%:Control Group(G1),Low-dose Group (G2: 1,250mg/10 ml/day), Medium-dose Group (G3: 2,500mg/10 ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10 ml/day),

The data shown represent mean ± S.D. (n = 10).

Table 6. An assessment of the food consumption changes affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

WEEKS	GROUPS (mg/kg/day) ^{a)}							
	G1 [%]		G2		G3		G4	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	23.3±1.67	16.6±1.35	22.7±1.38	15.9±1.03	22.2±0.99	16.1±1.25	23.0±1.17	15.2±2.36
1	21.7±1.62	14.2±1.14	21.0±1.27	14.2±0.80	20.2±1.58	13.9±0.55	20.4±1.08	13.6±0.95
2	23.3±1.53	15.0±1.80	22.8±1.63	13.8±0.71	21.9±1.53	13.9±0.10	22.0±0.83	14.4±0.68
3	25.0±2.04	15.8±0.84	23.8±1.79	15.2±0.91	22.8±1.64	15.3±0.50	22.3±0.94	15.3±0.25
4	25.7±2.00	15.3±0.46	23.9±1.40	15.0±0.73	23.2±1.48	15.3±0.85	22.4±0.92	15.5±0.49
5	26.2±2.45	16.4±1.15	24.6±1.56	15.4±1.07	23.4±1.49	15.4±0.90	22.8±0.59	15.2±0.26
6	25.5±2.37	16.1±0.77	24.4±1.65	15.5±0.97	23.4±1.89	14.6±1.17	22.6±0.61	14.7±0.54
7	25.1±2.45	15.6±1.32	23.8±1.33	15.5±1.92	23.3±2.43	15.0±1.12	22.7±0.57	15.0±1.17
8	24.8±2.33	16.6±1.08	23.5±1.10	15.0±1.41	22.9±2.81	15.2±0.82	22.3±0.38	15.1±1.57
9	24.3±2.16	16.1±1.24	23.8±1.62	14.3±0.75	23.1±2.40	14.7±0.84	22.7±0.43	14.4±0.37
10	24.4±2.00	15.3±1.36	23.4±1.37	14.3±0.73	22.5±2.41	14.6±0.71	21.7±0.42	13.8±0.74
11	24.2±2.01	15.0±0.83	23.3±1.58	14.3±0.83	22.8±2.38	14.5±0.51	21.9±0.63	14.7±0.72
12	24.4±2.13	15.5±0.95	23.7±1.61	15.1±1.03	22.0±1.84	14.3±1.15	21.6±0.24	15.1±0.21
13	19.8±1.71	13.7±1.05	19.5±1.76	13.1±1.28	17.7±0.82	12.7±0.63	18.4±0.29	12.0±1.10
Average	24.1±1.96	15.5±0.57	23.2±1.39	14.8±0.50	22.2±1.72	14.7±0.45	21.9±0.39	14.6±0.48*

* Significantly different from the controls at levels of $p < 0.05$.

%: Control Group (G1), Low-dose Group (G2: 1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3: 2,500mg/10ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10ml/day). The data shown represent mean \pm S.D. (n = 10).

Table 7. A clinical investigation of the ophthalmic findings affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day) ^{b)}							
		G1 [%]		G2		G3		G4	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Left eye	Normal	0 / 5 ^{a)}	0 / 5 ^{a)}	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Right eye	Normal	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

a) Number of animals with the finding / Number of animals examined

%: Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3: 2,500mg/10ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10ml/day)

The data shown represent mean ± S.D. (n = 10).

Table 8. An assessment of the urinalysis changes affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

TESTS	RESULT	SEVERITY	GROUPS (mg/kg/day)								
			MALE				FEMALE				
			G1 [%] 0	G2 1250	G3 2500	G4 5000	G1 0	G2 1250	G3 2500	G4 5000	
GLU	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KET	-	0	4	2			5	5	5	5	5
	+/-	1		1		2					
	1+	2	1	2	5	3					
SG	≤1.005	0					1				
	1.010	1	4	2		1	1	4	3		
	1.015	2	1	2	4	3					4
	1.020	3		1	1	1	3	1	2	1	
pH	≤6.5	0					1				
	7.0	1							1		
	7.5	2					1		2	1	
	8.0	3	1	1	2	3	1	1	1	2	
	8.5	4	4	4	3	2	2	4	1	2	
PRO	-	0	2				3	4	3		
	+/-	1	1			1	2	1	1	3	
	1+	2	2	4	3	1					2
	2+	3		1	1	3			1		
URO ^{a)}	3+	4			1						
	0.2	0	5	5	5	5	5	5	5	3	
	1	1									2
NIT	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
OB	-	0	2	2	5	5	5	5	4	5	
	+/-	1	3	2							
	1+	2		1							
	2+	3							1		
LEU	-	0	2			1	4	5	4	4	
	+/-	1	1	3	1		1			1	
	1+	2	1	2	3	2			1		
	2+	3	1			2					
	3+	4			1						
No. of animals			5	5	5	5	5	5	5	5	5

a)The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit /dl., * Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.,%:Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10ml/day)., The data shown represent mean ± S.D. (n = 10).,GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein,URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, LEU: Leukocyte

Table 9. An assessment of the changes in urine sediments affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

TESTS	RESULT	SEVERITY	GROUPS (mg/kg/day) ^{a)}							
			MALE				FEMALE			
			G1 [%]	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
RBC	-	0	4	5	5	5	5	5	5	5
	+/-	1	1							
WBC	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	-	0	3	4	4	4	4	3	5	4
EPITHELIAL CELL	+/-	1	2	1	1	1	1	2		1
	-	0	4	4	4	5	4	4	3	4
CASTS	+/-	1	1	1			1	1	2	1
	No. of animals			5	5	5	5	5	5	5

" - " = no finding. %: Control Group (G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10ml/day)

Grade	RBC(mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Casts (mean/field)
-	0	0	0 / 20 fields	0
+/-	≤4	≤5	Few / 20 fields	1
1+	5~8	6~20	Around 1 /few field	2~5

Table 10. An assessment of the changes in urine volume and color affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

TESTS	GROUPS(mg/kg/day)							
	G1 [%]		G2		G3		G4	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
VOLUME (ml)	10.3 ±3.60	7.8 ±2.89	10.6 ±2.63	7.8 ±4.15	8.6 ±3.63	8.3 ±4.81	12 ±3.02	6.3 ±1.96
COLOR-Yellow	5	5	5	5	5	5	5	5
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5

%: Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day), High-dose Group (G4: 5,000mg/10ml/day)

Table 11. An assessment of the changes in hematological values affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)							
		G1		G2		G3		G4	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
WBC	10 ³ /μL	3.97±0.884	2.03±0.813	4.03±0.750	1.72±0.787	3.71±1.148	1.73±0.689	3.72±0.701	1.82±0.621
RBC	10 ⁹ /μL	9.03±0.282	8.26±0.405	9.44±0.510	8.32±0.407	9.20±0.481	8.34±0.462	9.27±0.498	8.31±0.358
HGB	g/dL	13.9±0.79	13.8±0.65	13.8±0.82	14.0±0.29	13.4±1.38	13.8±0.39	14.1±0.54	13.8±0.47
HCT	%	44.2±1.56	43.1±2.01	44.6±1.72	43.3±0.73	44.5±1.73	42.9±1.13	44.7±1.21	42.7±1.10
MCV	fL	49.0±2.56	52.2±1.15	47.3±2.58	52.1±2.07	48.4±2.53	51.6±2.24	48.3±2.22	51.4±2.13
MCH	pg	15.4±1.13	16.8±0.53	14.7±1.26	16.8±0.86	14.5±1.48	16.6±0.90	15.2±1.12	16.6±0.91
MCHC	g/dL	31.4±1.13	32.2±0.44	31.0±1.00	32.3±0.50	30.0±2.58	32.1±0.43	31.4±0.90	32.3±0.54
RDW	%	13.4±0.94	11.6±1.07	13.4±0.96	11.6±1.20	13.2±0.77	12.0±1.40	13.1±0.66	12.0±1.34
HDW	g/dL	3.26±0.450	2.80±0.408	3.42±0.426	2.83±0.346	3.35±0.460	2.90±0.461	3.35±0.464	2.91±0.477
PLT	10 ³ /μL	1075±252.3	977±104.1	1112±82.9	881±308.3	1076±187.3	1038±132.2	1027±86.3	1040±112.0
MPV	fL	7.6±0.28	7.7±0.43	7.7±0.50	8.0±1.04	7.7±0.37	7.9±0.52	7.6±0.36	7.7±0.30
RET	%	1.93±0.526	1.86±0.375	2.04±0.553	1.84±0.542	1.96±0.440	1.95±0.422	1.70±0.250	1.88±0.340
NEU	%	26.7±9.62	21.0±3.91	25.0±4.08	20.4±7.13	26.6±5.79	23.0±6.25	27.4±7.72	20.9±6.48
	10 ³ /μL	1.05±0.451	0.44±0.223	1.01±0.273	0.35±0.175	0.99±0.376	0.40±0.204	1.00±0.265	0.37±0.166
LYM	%	68.2±10.15	73.3±3.33	68.9±4.07	73.9±6.81	67.6±5.83	71.5±7.01	66.9±8.22	73.6±6.47
	10 ³ /μL	2.71±0.690	1.48±0.576	2.77±0.506	1.28±0.664	2.49±0.795	1.24±0.499	2.50±0.607	1.35±0.481
MONO	%	2.5±0.53	2.3±0.96	3.1±0.52	2.1±0.61	3.0±0.81	2.1±0.55	2.9±0.62	2.2±0.46
EOS	%	2.1±0.36	2.9±0.98	2.3±0.54	2.7±1.21	2.2±0.71	2.8±1.02	2.3±0.84	2.8±0.88
BASO	%	0.1±0.06	0.1±0.11	0.1±0.05	0.3±0.26	0.1±0.07	0.2±0.14	0.0±0.05	0.1±0.09
LUC	%	0.5±0.27	0.3±0.19	0.8±0.29	0.5±0.31	0.6±0.37	0.4±0.23	0.4±0.18	0.4±0.13
No. of animals		10	10	10	10	10	10	10	10

WBC (White blood cell count), RBC (Red blood cell count), HGB (Hemoglobin conc.), HCT (Hematocrit), MCV (Mean corpuscular volume), MCH (Mean corpuscular hemoglobin), MCHC (Mean corpuscular Hb conc.), RDW (Red cell distribution width), HDW (Hb conc. distribution width), PLT (Platelet), MPV (Mean platelet volume), RET (Reticulocyte)

Table 13. An assessment of the changes in plasma coagulation values affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

TESTS	GROUPS (mg/kg/day) ^{a)}							
	G1 [%]		G2		G3		G4	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
PT (sec)	8.54±0.370	8.67±0.509	8.66±0.354	8.94±0.448	8.33±0.341	8.88±0.281	8.49±0.293	8.78±0.369
APTT(sec)	17.6±1.52	17.0±1.50	16.7±1.53	17.0±1.34	17.4±1.89	16.6±1.19	18.0±1.89	16.6±2.14
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10

^{a)}:Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day)

Table 14. An assessment of the changes in absolute organ weights affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

ORGAN WEIGHT# (g)	GROUPS (mg/kg/day) ^{a)}							
	G1 [%]		G2		G3		G4	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Adrenal(L)	0.0260±0.00294	0.0634±0.01079	0.0243±0.00242	0.0609±0.00845	0.0256±0.00303	0.0602±0.00714	0.0259±0.00310	0.0655±0.00816
Adrenal(R)	0.0244±0.00347	0.0647±0.01186	0.0243±0.00202	0.0654±0.01014	0.0243±0.00237	0.0634±0.01206	0.0257±0.00275	0.0683±0.01172
Pituitary	0.0133±0.00161		0.0124±0.00141		0.0130±0.00154		0.0129±0.00174	
Thymus	0.4588±0.09823	0.3136±0.06780	0.4471±0.10037	0.2451±0.05655	0.4425±0.13683	0.2520±0.03107	0.4321±0.06935	0.2344±0.04380*
Pituitary	0.0312±0.00446		0.0319±0.00308		0.0324±0.00561		0.0334±0.00489	
Ovary(L)	0.0304±0.00361		0.0297±0.00330		0.0307±0.00416		0.0319±0.00412	
Ovary(R)	0.0163±0.00253		0.0158±0.00176		0.0173±0.00218		0.0180±0.00131	
Prostate	0.7492±0.15138		0.7916±0.12675		0.6470±0.15774		0.7047±0.11978	
Testis(L)	1.9440±0.16247		1.8693±0.18969		1.8509±0.16331		1.9046±0.18961	
Testis(R)	1.9791±0.18432		1.7446±0.35818		1.8530±0.15628		1.9120±0.19394	
Epididymis(L)	0.6816±0.05997		0.6816±0.07728		0.6609±0.06245		0.6812±0.05264	
Epididymis(R)	0.6975±0.05698		0.6495±0.08645		0.6848±0.06111		0.6982±0.04752	
spleen	1.0666±0.24859	0.5887±0.10268	1.1236±0.21456	0.5799±0.07361	1.1258±0.30077	0.5730±0.07541	0.9650±0.18379	0.5903±0.10374
kidney(L)	1.4185±0.14116	0.7994±0.06339	1.4113±0.08042	0.7903±0.06262	1.4211±0.15464	0.7757±0.06449	1.5246±0.13816	0.8581±0.04814
kidney(R)	1.4209±0.12167	0.8044±0.04636	1.4522±0.09971	0.7817±0.07460	1.4361±0.13310	0.7986±0.05700	1.5268±0.12167	0.8541±0.04648
Heart	1.4230±0.13770	0.8644±0.06959	1.4238±0.15498	0.8420±0.08140	1.3826±0.10954	0.8429±0.07471	1.3981±0.12799	0.8480±0.06259
Lung	1.8385±0.19198	1.2578±0.11501	1.7574±0.14490	1.2794±0.08861	1.7622±0.07097	1.2682±0.08068	1.7882±0.15544	1.2864±0.06129
Brain	2.2381±0.07477	2.0151±0.10113	2.2191±0.07777	1.9880±0.08094	2.1878±0.08788	2.0035±0.11266	2.1944±0.09831	2.0017±0.07320
Liver	13.8765±1.99662	6.7533±1.17137	13.7635±1.21293	6.3858±0.68144	13.4108±1.90139	6.5099±0.54514	13.5237±1.33087	6.8268±0.56704
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10

The data shown represent means ± SD (n =10).

%: Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day)

*Represents a significant difference at p < 0.05 level compared with the vehicle control.

#weight (g); unit of absolute weight of organ

Table 15. An assessment of the changes in relative organ weights (% of body weight) affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

ORGAN WEIGHT(g) [#]	GROUPS (mg/kg/day) ³⁾							
	G1 ³⁾		G2		G3		G4	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Adrenal(L)	0.0050±0.00053	0.0229±0.00380	0.0047±0.00055	0.0237±0.00415	0.0052±0.00077	0.0229±0.00286	0.0052±0.00056	0.0244±0.00374
Adrenal(R)	0.0047±0.00074	0.0234±0.00428	0.0047±0.00037	0.0255±0.00465	0.0049±0.00053	0.0241±0.00465	0.0052±0.00050	0.0252±0.00373
Pituitary	0.0026±0.00021	0.0113±0.00163	0.0024±0.00024	0.0124±0.00128	0.0026±0.00031	0.0123±0.00196	0.0026±0.00034	0.0124±0.00180
Thymus	0.0880±0.01341	0.1122±0.02049	0.0864±0.02290	0.0941±0.01688	0.0880±0.01989	0.0963±0.01479	0.0877±0.01314	0.0875±0.01979
Ovary(L)		0.0110±0.00145		0.0115±0.00097		0.0117±0.00130		0.0118±0.00170
Ovary(R)		0.0059±0.00097		0.0061±0.00078		0.0066±0.00084		0.0067±0.00050
Prostate	0.1448±0.02427		0.1513±0.02024		0.1296±0.02875		0.1432±0.02411	
Testis(L)	0.3779±0.04179		0.3583±0.03393		0.3740±0.03992		0.3865±0.03005	
Testis(R)	0.3841±0.03758		0.3340±0.06588		0.3742±0.03695		0.3882±0.03307	
Epididymis(L)	0.1323±0.01261		0.1307±0.01507		0.1334±0.01453		0.1383±0.00861	
Epididymis(R)	0.1354±0.01291		0.1249±0.01929		0.1381±0.01308		0.1419±0.00831	
spleen	0.2061±0.04519	0.2110±0.02591	0.2143±0.03298	0.2239±0.02055	0.2271±0.06144	0.2186±0.03265	0.1956±0.03444	0.2183±0.03465
kidney(L)	0.2741±0.01348	0.2891±0.03081	0.2711±0.02207	0.3063±0.02508	0.2862±0.02674	0.2949±0.01793	0.3094±0.02196*	0.3185±0.02325*
kidney(R)	0.2754±0.02132	0.2907±0.02340	0.2788±0.02398	0.3031±0.03198	0.2899±0.02872	0.3039±0.01906	0.3102±0.02247*	0.3167±0.01676*
Heart	0.2754±0.01906	0.3121±0.02798	0.2722±0.01623	0.3264±0.03347	0.2787±0.02187	0.3208±0.02791	0.2840±0.02408	0.3143±0.01968
Lung	0.3564±0.03426	0.4531±0.03020	0.3377±0.03376	0.4959±0.03694	0.3567±0.03688	0.4827±0.02846	0.3629±0.02254	0.4780±0.03868
Brain	0.4359±0.04430	0.7295±0.07218	0.4264±0.03163	0.7715±0.05495	0.4427±0.04191	0.7625±0.03782	0.4461±0.02088	0.7443±0.06426
Liver	2.6702±0.18633	2.4282±0.36368	2.6330±0.10828	2.4762±0.28171	2.6862±0.22023	2.4762±0.17913	2.7435±0.19710	2.5284±0.16711
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10

The data shown represent means ± SD (n = 10), %:Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day)., *Represents a significant difference at p < 0.05 level compared with the vehicle control., # Ratio (%) ; Relative ratio of rgan weight against body weight

Table 16. An assessment of the changes in necropsy findings affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day) ^{a)}							
		G1 ^{***}		G2		G3		G4	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Testis	undersized	0		1		0		0	
Rib	tumor	0		1		0		0	
Uterus	Retention of clear fluid		1		1		1		1
Ovary	Retention of Red fluid		1		0		0		0
Lung	Redness		2		2		4		2
Thymus	Redness		0		0		1		1
No. of animals		10	10	10	10	10	10	10	10

%: Control Group(G1), Low-dose Group (G2:1,250mg/10 ml/day), Medium-dose Group (G3:2,500mg/10ml/day)

*Represents a significant difference at p < 0.05 level compared with the vehicle control.

Table 17. An assessment of the changes in histopathological findings affected by the 90-day oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day) ^{a)}							
		G1 [%]		G2		G3		G4	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Kidney	Glomerulosclerosis	3	1					2	3
	Inflammatory cells infiltration	3	2					1	-
	Regeneration	2	1					1	1
	Mineralization		1						1
Liver	Vacuolization of hepatocytes	-	1					1	-
Urinary bladder	Inflammatory cells infiltration		1						-
Heart	Myocarditis	1						-	
Spleen	Hemosiderin pigment		-						1
No. of animals		10	10					10	10

" - " = no finding, " " = no slide

%: Control Group (G1), Low-dose Group (G2: 1,250mg/10ml/day), Medium-dose Group (G3: 2,500mg/10ml/day)

Table 18. Result of toxicity test by weight-based classification in SD rats administrated orally with 7%-GNANA for 90 days

Weight-based classification	Male		Female	
	Finding	Dose (mg/kg/day)	Finding	Dose (mg/kg/day)
Important compound-related changes	Not detected		Not detected	
Minor compound-related changes	Weigh of organ (kidney, increase)	5000	Food consumption decrease	5000
			Weight of organ(Kidney increase)	5000
			Weight of organ(Thymus, decrease)	5000
Noncompound-related changes	Urinalysis(PRO, increase)	1250	Blood chemistry(Ca ⁺ decrease)	1250, 2500
	Urinalysis (KET, SG increase)	2500	Diagnosis of autopsy (Redness of thymus)	2500, 5000
	Histological examination (Testis, dwarf)	1250	Diagnosis of autopsy (Retention of clearfluid in uterus)	0, 1250, 2500, 5000
	Histological examination (Bortyoid tumor of rib)	1250	Diagnosis of autopsy (Retention of clearfluid in ovary)	0
	Histological examination (Glomerulosclerosis of Kidney)	0, 5000	Diagnosis of autopsy(redness of Lung)	0, 1250, 2500, 5000
	Histological examination (Inflammatory cell infiltration of Kidney)	0, 5000	Histological examination(Kidney, inflammatory cellular infiltration)	0
	Histological examination (Kidney tissue regeneration)	0, 5000	Histological examination (Cytothesis of Kidney)	0, 5000
	Histological examination (Hepatocyte vacuolation)	5000	Histological examination (Kidney remain cool minereol)	0, 5000
	Histological examination (Heart myocarditis)	0	Histological examination (Cystitis Jeungsepojimyun)	0
			Histological examination (Liver, focal necrosis)	0
			Histological examination (Spleen, Hemosiderin pigment)	5000

제 8 절 안전성평가(GLP)

[효소분리법으로 제조된 7% Sialic acid 함유 유청가수분해단백분말의 마우스 골수세포의 소핵시험을 이용한 안전성 평가 연구]

1. 연구목적

미소핵이란(micronucleus), 세포가 분열하는 동안 낭핵으로 흡수되지 못한 중심체가 없는 염색체 단편이나 염색체 분열의 역기능 산물을 일컫는 말로써 어떤 독성 물질이나 방사선 등에 의해 염색체가 손상되었을 경우 염색시 주홍빛 또는 검정빛의 원형의 작은 점으로 일반적으로 적혈구의 비해 직경이 1/20 또는 1/50의 구형으로 관찰이 된다. 미소핵검사(micronuclei test)는 1973년에 최초로 도입된 유전독성 검사 방법으로 마우스 골수(bone marrow)를 채취하여 도말한 후 다염성 적혈구(PCE)를 측정하면서부터 널리 이용되어지고 있다. 미소핵은 골수, 말초혈액, 체세포 조직 등 분화하는 세포 어느 곳에서도 관찰이 가능하지만, 그 중 적혈구가 핵을 가지고 있지 않으므로 관찰이 쉬어 많이 사용되고 있다.

적혈구에서 미소핵은 May-Grünwald Giemsa stain에 의해 미성숙 적혈구인 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 성숙한 적혈구인 정염성 적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)로 구분할 수 있다. 각종 약제 또는 독성물질의 세포유전학적 독성평가에는 metaphase analysis, sister chromatid exchange(SCE)등이 많이 사용되었으나, 요즘에는 시간의 소모가 적게 들면서 비용이 절약되면서 간편하게 정확한 결과를 도출시킬 수 있는 방법중의 하나인 미소핵 검사가 널리 보편화되어 있다.

GMP(Glycomacropeptide)는 우유 속 단백질의 일종인 κ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 일컫는다. 또한 효소에 의하여 κ -casein의 phenylalanine-methionine peptide bond가 절단되면 친수성의 GMP가 유리되는데, N-acetylneuraminic acid(Sialic acid), galactose(gal) 그리고 N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있다. Sialic acid는 다양한 기능성을 보유하고 있는데 이를 이용하기 위해서는 효소인 Neuraminidase를 사용하여 분리하는 공정이 반드시 필요로 한다(Fig 1).

Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다[10]. Sialic acid는 수용기의 인지, 신경 신호전달, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고, 뇌 발달과 인지능력 향상, 항염 및 항산화 등에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Sialic acid는 현재 대부분 재조합 *E. coli*에서 합성되거나 *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로부터 합성되며 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다[16]. Sialic acid는 대부분 의료용 소재로 활용되고 있으며 유청 단백질에서 분리한 Sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다.

따라서, 본 연구에서는 안전식품 및 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질내 지표성분인 Sialic acid를 식품소재로 활용성을 높이기 위하여, 시험물질인 유청가수분해단백분말(7%-GNANA)을 GLP가이드라인에 따라 “마우스 골수세포의 소핵시험”을 통한 안전성을 평가하였다.

2. 연구수행방법

GMP는 Sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPepGMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 시험물질 제조를 위한 원료로 사용하였다. 시험물질 제조는 정제수에 7%(w/v)되게 GMP를 우선 용해시킨 후 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark) 효소를 기질 대비 0.2%(w/v)로 혼합 및 57°C에서 1시간 동안 가수분해 시킨 용액을 동결분말로 제조한 7%-GNANA(제품명 : HELICOBACTROL-7)을 MEDINUTROL사(한국)로 공여 받아 시험물질로 사용하였다(제 1절 Fig 2). 시험물질내 지표성분인 Sialic acid의 분리여부 및 함유량 검정을 위한 표준체 Sialic acid는 Sigma-Aldrich사(A2090)을 구입하여 0.1ppm(w/w), 1ppm 및 10ppm 되게 희석하여 분석간 표준용액으로 사용하였다.

시험물질 내 지표성분 Sialic acid 분리 및 함유량 검정

10mM Sodium Acetate Buffer용액에 시험물질인 7%-GNANA를 완전히 용해시킨 후, 에탄올 8ml에 희석액 2ml를 혼합한 후 Sonication(25°C) 및 원심분리(3,000rpm x 20min, 25°C)과정을 거쳐 상등액만을 0.22µm membrane으로 여과 후 이를 최종 HPLC System(Agilent 1260, USA) 시료로 사용하였다(제 1절, Table 1 참조). 분석간 검출허용 표준편차는 90~110%범위 내에서 평가하였다(제 1절 Table 1., 제 1절 Fig 1.).

일반 증상 관찰

시험물질을 투여한 동물에 대하여 투여당일 및 부검시 각 1회 관찰을 실시하여 사망동물 및 이상징후의 발생여부를 관찰하였다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

시험지침

본 연구는 한국식품의약품안전처의 “의약품 등의 독성시험기준(고시 제 2014-136호, KFDA, 2014. 7. 30)”, 비임상시험관리기준(고시 제2014-67호, KFDA, 2014. 2. 12)”에 따라 대구카톨릭대학교 GLP센터(동물실험윤리위원회 승인 : 제IACUC-2014-039호)에서 실시하였다.

시험동물 및 시험방법

시험동물은 7주령의 ICR계통의 수컷 마우스(SFP)를 (주)코아텍(한국)로부터 구입한 후 7일간의 검역과 순화 과정을 거쳐 건강한 개체만을 시험에 사용하였다. 사육환경 및 운영은 시험법을 준수하여 SPF 실험동물실 및 사육조건에서 실시하였다. 사료 및 음용수공급을 위하여 실험동물용 고품사료(Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG ,Germany)와

멸균된 음용수를 SOP규정에 따라 검사를 거쳐 자유섭취토록 하였다.

시험물질 투여량 및 투여횟수 설정

시험물질은 유청단백질을 가수분해한 경우이므로 독성이 크게 없을 것으로 추정됨에 따라 예비시험을 생략하고 마우스 2마리에 2,000 mg/kg을 투여하는 한계용량시험(limit dose test)를 실시하였다. 그 결과 2마리 모두 생존하였기에 본시험에서는 2,000 mg/kg 최고용량으로 하여 1,000 mg/kg과 500mg/kg으로 투여량을 설정하였다. 또한 본 시험물질이 체내에서 대사되는 시간을 고려하여 시험물질을 2일간 투여하였다.

시험군 구성

본시험에서 시험군을 용매대조군 1군, 투여군 3군(500mg/kg, 1000mg/kg, 2000 mg/kg투여군)과 양성대조군(Mitomycin C, 2 mg/kg)으로 구성하여 총 5군을 구성하였다. 각 군당 5마리씩 총 25마리의 마우스를 사용하였다.

시험물질의 조제 및 투여방법

시험물질의 조제 및 투여액량 시험물질의 적정량을 용매대조물질인 멸균증류수에 용해하여 각각의 농도로 조제하였다. 조제된 시험물질의 투여액량은 체중 측정일에 측정된 체중을 기준으로 10ml/kg으로 투여액량을 계산하였다. 투여횟수는 1일 1회로 하여 2일간 투여하였다. 투여경로는 사람에 대한 노출 예정경로로써 경구투여를 선택하였으며, 경배부 피부를 고정하고 금속제 경구투여용 존대를 이용하여 시험기간 중 오후 2시에 강제 경구투여 하였다.

골수세포의 회수 및 검체 제작

문헌조사로 투여농도를 결정하여 2일간 시험물질을 투여하고 최종투여로부터 약 24시간 후에 희생시켜 Fetal bovine serum(FBS)을 사용하여 대퇴골에서 골수세포를 회수하였다. 골수세포의 도말 표본을 만들어 고정한 후 광학현미경을 사용하여 도말 상태와 세포밀도를 확인 하였다. 좋은 도말 표본을 선정하여 염색한 후 형광현미경을 사용하여 전체적혈구와 PCE(Polychromatic erythrocytes)중의 소핵출현 적혈구를 계수하였다.

표본의 염색

메탄올로 고정시킨 표본에 acridine orange(40µg/ml)로 점적하여 커버글라스를 덮어 염색한 후 골수세포증식과 다염성 적혈구에 생성된 소핵을 관찰하였다.

표본의 관찰방법

맹검법(blind method)에 의해 실시하였으며, FITC filter가 장착된 형광현미경을 사용하여 관찰하였다.

표본의 관찰기준

핵이 없이 적색 형광빛을 나타내는 것을 PCE로 하였으며, NCE(normochromatic erythrocyte)는 형광빛을 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것으로 하였다. 소핵의 판정기준으로서 크기는 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2 크기의 것으로, 제일 작은

것은 식별이 가능한 것까지로 하였다. 형태는 주로 원형이나 기타 도너츠형, 반원형 등의 형태의 것을 포함시켰으며, 색깔은 Acridine 염색표본에서 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광빛을 띠는 것으로 하였다.

소핵의 계수

각 투여군의 동물로부터 제작한 검체중 염색상태가 양호한 1매를 선택하여 무직위로 코드화한 후 검경 하였다. 시험결과는 개체당 2,000개의 PCE중에 나타나는 MNPCE을 계수하여 mean±S.D로 표시하였으며 이리 소핵 유발 빈도로 하였다. 소핵 계수 후에 소핵유무와 상관없이 합계 500개의 PCE와 NCE를 계수하여 PCE/(PCE+NCE)의 비율을 산출하고 이를 세포독성의 지표로 설정하였다.

통계처리

본 소핵시험의 결과 용매대조군에 대한 시험물질 투여군의 소핵출현빈도와 전체적혈구당 다염성적혈구 비율에 대한 유의성 검정은 5%의 유의수준($p = 0.05$)에서 one-way ANOVA, multiple comparision 분석을 통해 SPSS 19.0K 통계 프로그램을 이용하여 실시하였다.

3. 연구수행결과

시험물질내 지표성분 Sialic acid 검정

시험물질인 7%-NANA내 지표성분인 sialic acid의 함유량을 분석한 결과이다. 시험물질내 지표성분인 Sialic acid의 분리여부와 더불어 함유량을 확인결과, 7% Sialic acid와 고유 GMP단백질이 93%(수분함량 제외)로 구성되어 있었으며, 사용효소의 분해효율은 100%였다. 따라서, 시험물질로 사용에 있어 적합함을 확인하였다(제 1 절 Fig 3 참조).

일반증상 및 체중의 변화

Table 1는 시험물질인 7%-NANA의 섭이에 따른 실험동물의 사망 및 일반증상 및 체중변화의 검정결과, 시험기간 동안 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상 관찰 결과 이상증상이 관찰되지 않았다. 투여에 의한 군간 체중을 관찰한 결과 모두 용매대조군에 비해 유의한 차이가 없었다($p < 0.05$).

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험 평가

적혈구 증식억제 및 소핵출현빈도

Table 2는 시험물질인 7%-NANA의 섭이에 따른 적혈구 증식억제 및 소핵출현빈도를 검정한 결과이다. 본시험에서 양성대조군은 용매대조군과의 적혈구 증식억제율과의 비교에서는 유의한 차이가 없었지만 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도에서는 유의하게 높아 시험물질의 소핵출현 빈도 확인을 위한 시험조건으로 적절한 것으로 판단된다. 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 평균 비율은 용매대조군에서 $41.4 \pm 1.08\%$, 500 mg/kg 투여군에서 $40.9 \pm 1.34\%$, 1000 mg/kg 투여군에서 $41.3 \pm 1.20\%$, 2000 mg/kg 투여군에서는

41.3±1.57%로 관찰되었다. 통계적 검정결과 모든 투여군의 평균비율이 용매대조군과 비교하여 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 시험물질 투여군들에 있어서 시험물질에 의한 용량의존성 반응이 없었다($p<0.05$). 동물개체별로 2,000개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도는 용매대조군에서 0.13±0.045%, 500 mg/kg 투여군에서 0.13±0.057%, 1000 mg/kg 투여군에서 0.13±0.076%, 2000 mg/kg 투여군에서는 0.12±0.097%로 관찰되었다. 통계적 검정결과 소핵출현 적혈구의 평균빈도는 용매대조군과 비교하여 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 시험물질 투여군들에 있어서 시험물질에 의한 용량의존성 반응이 없었다.

4. 요약

본 시험물질인 유청가수분해단백(7% Sialic acid 함유, 시험명 : 7%-GNANA)에 대해 발암성 유발 유·무 판단의 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 시험물질은 2000mg/kg을 투여 최고 농도로 하여 공비 2로 3단계 투여농도군, 용매대조군, 양성대조군을 설정하였다. 또한 시험물질의 체내 흡수 후 48시간까지의 소핵출현빈도를 관찰하기 위하여 시험물질을 2일간 투여하였다. 본 시험결과, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율 비교에 있어서 용매대조군과 시험물질 투여군간 평균차이의 유의성이 없었다($p>0.05$). 또한 동물개체별로 2,000 개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵출현 적혈구의 평균빈도 비교에 있어서 용매대조군과 시험물질 투여군간 유의성이 없었으며($p>0.05$), 시험물질 투여농도에 따른 용량의존성 반응이 없었다. 이상의 결과를 볼 때 본 7%-NANA는 응용된 조건에서 마우스 골수세포에 대해 소핵의 유발성이 없는 것으로 평가되었다.

Table 1. The body weights changes after administered once on the day of 2nd oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male mice(n=25)

Dose (mg/kg)	ANIMAL#	BODY WEIGHTS(Grams)	
		Grouping Administration	Sacrifice
0 (D.W.)	- 1101	35.7	34.6
	1102	36.4	36.0
	1103	36.6	35.6
	1104	37.1	36.6
	1105	38.5	37.4
	MEAN ± S.D.	36.9±1.05*	36.0±1.08*
500	- 1201	35.2	35.6
	1202	36.3	36.9
	1203	36.9	35.9
	1204	37.2	36.3
	1205	37.7	37.9
	MEAN ± S.D.	36.7±0.96	36.5±0.93
1000	- 1301	35.5	34.2
	1302	36.6	34.8
	1303	36.9	37.2
	1304	37.6	37.5
	1305	37.7	37.3
	MEAN ± S.D.	36.9±0.88	36.2±1.56
2000	- 1401	35.4	34.8
	1402	35.8	35.5
	1403	36.9	36.2
	1404	37.0	37.0
	1405	38.2	37.5
	MEAN ± S.D.	36.7±1.11	36.2±1.10
2 (Mitomycin C)	- 1501	34.4	34.3
	1502	36.5	35.3
	1503	36.8	35.9
	1504	36.9	37.8
	1505	38.2	37.4
	MEAN ± S.D.	36.6±1.36	36.1±1.43

0 : saline(vehicle)

*:Significantly different from the vehicle control group at p<0.05

Table 2. The observations of micronucleus after administered once on the day of 2nd oral administration of 7%-GNANA, a test substance to the male mice(n=25)

Dose (mg/kg)	ANIMAL#	MNPCE observed	MNPCE / 2,000 PCE (%)	PCE counted	PCE / 200 RBC (%)
0 (D.W.)	1101	2	0.10	85	42.5
	1102	4	0.20	82	41.0
	1103	3	0.15	80	40.0
	1104	2	0.10	82	41.0
	1105	2	0.10	85	42.5
	Mean ± SD	2.6 ± 0.89*	0.13 ± 0.045	82.8 ± 2.17	41.4 ± 1.08
500	1201	3	0.15	84	42.0
	1202	2	0.10	78	39.0
	1203	3	0.15	83	41.5
	1204	1	0.05	84	42.0
	1205	4	0.20	80	40.0
	Mean ± SD	2.6 ± 1.14	0.13 ± 0.057	81.8 ± 2.68	40.9 ± 1.34
1000	1301	5	0.25	80	40.0
	1302	1	0.05	81	40.5
	1303	3	0.15	86	43.0
	1304	2	0.10	82	41.0
	1305	2	0.10	84	42.0
	Mean ± SD	2.6 ± 1.52	0.13 ± 0.076	82.6 ± 2.41	41.3 ± 1.20
2000	1401	1	0.05	88	44.0
	1402	1	0.05	81	40.5
	1403	4	0.20	80	40.0
	1404	1	0.05	82	41.0
	1405	5	0.25	82	41.0
	Mean ± SD	2.4 ± 1.95	0.12 ± 0.097	82.6 ± 3.13	41.3 ± 1.57
2 (MMC)	1501	26	1.30	84	42.0
	1502	28	1.40	76	38.0
	1503	26	1.30	76	38.0
	1504	28	1.40	76	38.0
	1505	26	1.30	81	40.5
	Mean ± SD	26.8 ± 1.10	1.34 ± 0.055	78.6 ± 3.71	39.3 ± 1.86

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte, PCE : Polychromatic erythrocyte,

RBC : Red blood cells (polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte), MMC : Mitomycin C

*:Significantly different from the vehicle control group at $p < 0.05$

제 9 절 안전성평가(GLP)

[비설치류(비글견), 단회 단회경구투여 독성시험]

1. 연구목적

Sialic acid는 대부분 의료용 소재로 활용되고 있으며 유청단백질에서 분리한 Sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. 본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질의 일종인 GMP내 결합되어 있는 Sialic acid를 식품으로서 활용성을 높이기 위하여, 효소분리 과정을 거쳐 시험물질인 7%-GNANA를 제조하였다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다 할지라도 소재에 대한 안전성자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 특히 Sialic acid를 분리시켜 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나 식품공전이나 기능성식품공전에 등록을 위해서는 독성시험을 통한 안전성자료가 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 시험물질인 7%-GNANA의 안정성 평가의 일환으로 비글견을 대상으로 단회경구 투여시 독성의 질적, 양적인 평가를 위해 “의약품 등의독성시험관리기준(식품의약품안전처 고시 제2014-136호) [21]” 과 “OECD test guideline(OECD, 2008) [13]” 에 준하여 비설치류 독성시험을 실시하였으며 유청가수분해단백분말에 대한 독성의 특성을 평가하였다. 비설치류의 경우 단회경구투여평가만 실시하는 이유는 식약처 모듬회의를 통하여 협의 결과를 토대로 진행하였다.

2. 연구수행방법

시험물질 조제 및 분석

투여시험물질 조제방법(APPENDIX 3. CERTIFICATE OF ANALYSIS)

시험물질은 지표성분에 대한 보정 없이 중량 그대로를 사용하였으며 별도의 조제 없이 동물 체중에 맞게 각각의 시험물질을 칭량한 후 경구투여용 젤라틴 캡슐에 충전하였다. 캡슐에 시험물질을 충전하는 작업은 투여 당일 투여 직전에 수행하였다. 투여시험물질의 분석은 실시하지 않았다.

시험계 및 사육환경

시험동물정보

시험간 사용된 공시동물에 대한 정보는 다음과 같다.

종 및 계통	Beagle dog
생산자	Beijing Marshall Biotechnology Co., Ltd. (Wayao village, Liucun town, Chang Ping District, Beijing, 102204, China)

공급원	(주)우정 BSC (경기도 수원시 영통구 의의동 864-1 차세대융합기술 연구원 B 동 3 층)	
선정사유	본 시험에 사용한 Beagle dog은 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있다. 또한 본 계통의 Beagle dog은 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있기 때문에 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수시	3
	컷 투여시	2
주령	입수시	약 5-6
	컷 투여시	약 5.5-6.5
입수시 체중범위	5.10-6.18 kg	5.38-5.60 kg
컷 투여시 체중범위	5.68-6.06 kg	5.58-5.86 kg
잔여동물의 처리	다른 시험[(주)캠온 시험번호: 13-DA-015 및 13-DA-070]의 예비투여에 사용하였다.	

검역 및 순화

입수시 및 순화기간(1 회) 중 체중을 측정하였다. 입수 시 동물의 외관을 관찰하고 체중을 측정한 후 21 일간 본 시험을 실시하는 동물실내에서 사육하면서 매일 일반증상을 관찰하였다. 동물 공급처에서 제공한 예방접종 및 검역증명서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 또한, 캡슐투여에 대한 적응을 위하여 투여개시 일주일 전부터 모든 투여동물에 빈 캡슐을 투여하였다.

식별

검역 및 순화기간 중에는 귓바퀴에 새겨진 문신 번호로 식별하였고, 투여 및 관찰기간에는 귓바퀴에 유성 매직펜으로 기재한 동물번호 및 문신 번호로 식별하였으며, 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하여 구분하였다. 그리고 사용동물실의 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

사육환경

환경조건 및 측정

- 동물은 온도 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 설정한 (주)캠온 비임상 연구소 제1동물사육구역 5 호실에서 사육하였다. 온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다. 사육기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 일평균 $21.3-23.0$ °C 및 $49.5-60.8$ %이었고, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

사료, 물 및 오염물질 검사

사료는 (주)카길 에그리 퓨리나에서 생산하는 실험동물용 개사료를 공급받아 매일 약 300

g씩 제한급여를 하였다. 사료 공급처에서 제공한 사료성분 분석 성적서를 검토한 결과, 사료 조성 및 오염물질 등에서 시험에 악영향을 줄만한 요인 없었다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후, 자동급수장치를 이용하여 자유섭취 하도록 하였다. 수질검사는 시험에 앞서 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

사육상자 및 사육밀도

스테인레스제 망사육상자(W 895 x L 795 x H 765 mm)에서 1 마리/사육상자로 사육하였다

시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

시험군 구성

암수 각 1마리씩에 대하여, 1차 , 2차 그리고 3차에 걸쳐 농도를 높이면서 단계별로 이상을 조사하였다.

1 차 투여군은 다음과 같다.

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여량 (mg/kg)
G1	M / F	1 / 1	1 / 3	625
G2	M / F	1 / 1	2 / 4	1250

2 차 투여투여군은 다음과 같다.

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여량 (mg/kg)
G1	M / F	1 / 1	1 / 3	2500
G2	M / F	1 / 1	2 / 4	5000

3 차 투여군은 다음과 같다.

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여량 (mg/kg)
G1	M / F	2 / 2	1-2 / 3-4	5000

투여량의 설정

본 시험물질을 2500 및 5000 mg/kg으로 투여 전 절식을 실시한 Beagle dog 암수 각 1마리에 단회 경구투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 및 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다. 따라서, 상기의 결과 및 시험의뢰자의 요구를 반영하여 1 차 투여의 투여량을 625 및 1250 mg/kg, 2 차 투여의 투여량을 2500 및 5000 mg/kg으로 설정하였

다. 2 차 투여 시 5000 mg/kg 투여군 수컷 1 레에서 시험물질 구토가 관찰되어, 구토 발생 여부 및 독성 작용을 알아보기 위하여 3 차 투여의 투여량을 5000 mg/kg으로 설정하였다.

군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화 하고, 평균에 가까운 동물 암수 각 2 마리를 선택하여 ‘시험군 구성’ 표와 같이 무작위 분배하였다.

투여

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 또는 9 일 간격으로 총 3 회 투여하였고, 10:54 이전에 투여하였다.
투여량 산출	각각의 동물들은 투여당일에 측정된 체중을 기준으로 투여량을 산출하였다.
투여방법	투여 전에 하룻밤을 절식시켜 위 내용물을 비우게 하였다. 동물을 사육상자 내에서 자연스럽게 위치한 상태에서 입을 벌린 후 캡슐을 혀의 안쪽에 넣고 입을 다물게 한 다음, 인후두부를 부드럽게 쓰다듬어 삼키도록 하였다. 사료는 투여 후 약 4 시간째 급여하였다.

관찰 및 검사

일반증상

매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지 지속적으로, 투여 후 6 시간까지 매 시간마다 관찰하였고, 각 투여일을 Day 1로 설정하여 1 차 투여 후의 증상은 Day 7까지, 2 차 투여 후의 증상은 Day 9까지, 3 차 투여 후의 증상은 Day 15 까지 관찰하였다.

체중

1 차 투여 시에는 Day 1(투여 전), 3 및 6에, 2 차 투여 시에는 Day 1(투여 전), 2, 6 및 9에, 3 차 투여 시에는 Day 1(투여 전), 2, 4, 8 및 15에 체중을 측정하였다.

부검

3 차 투여일을 기준으로 Day 15에 모든 생존동물을 펜토바비탈(엔도발, 한림제약)을 정맥내투여하여 마취시킨 후 액와정동맥(Axillary vein & artery)을 절단하는 방법으로 방혈하여 안락사시킨 후 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 모든 시험군의 계획 도살한 동물에서 육안적 이상장기가 관찰되지 않아 고정 및 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

임상병리

채혈

순화 기간 중 실험동물의 건강상태를 확인하기 위하여 요측피정맥에서 혈액검사를 위한 채혈을 실시하였다. 동물은 채혈 전에 하룻밤 동안(16-24 시간) 절식(물은 제공)하였다. 단, 혈액검사 관련자료는 군분리시 동물의 건강을 판단하기 위한 참고자료로 활용하였고, 최종보고서에는 반영하지 않았다.

혈액학적 검사

혈액 약 1 mL를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (3 mL Vacutainer, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 검사하였다. 검사항목으로서는 백혈구(WBC), 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC), 림프구(LYM), 적혈구(RBC), 적혈구분포폭(RDW), 단핵구(MONO), 혈색소량(HGB), 헤모글로빈분포폭(HDW), 호산구(EOS), 헤마토크리트치(HCT), 혈소판수(PLT), 호염기구(BASO), 평균적혈구용적(MCV), 평균혈소판용적(MPV), 대형비염색성세포(LUC), 평균적혈구헤모글로빈량(MCH) 및 호중구(NEU)를 조사 하였다.

혈액생화학적 검사

혈액 약 2 mL를 clot activator가 들어 있는 5 mL vacutainer tube (INSEPACK,)에 주입하고 15-20 분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리(3000 rpm, 1902 RCF, Combi-514R, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(AU680, BECKMAN COULTER, USA)를 이용하여 아래 항목을 검사하였다.

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인 포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘(Ca ²⁺)
크레아틴인산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	나트륨(Na ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G)	칼륨(K ⁺)
당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소(Cl ⁻)

통계학적 방법

군별 암수 각 1 마리로 통계 분석을 위한 동물수가 충분하지 않기 때문에 통계처리는 실시하지 않았다.

3 연구수행결과

사망동물(Appendix 1-1)

사망동물은 관찰되지 않았다.

일반증상 (Appendix 1-1)

시험물질 투여에 의한 주요한 변화는 시험물질 구토(vomiting)였고, 관찰 시기는 아래 본문

Table 1과 같다. 그 외, 사료남김(remaining of food) 및 사료 구토가 용량-반응 상관성 없이 산발적으로 관찰되었고, 이는 비글견을 이용한 실험에서 자연스럽게 관찰될 수 있는 정도였다.

체중변화(Appendix 1-2)

시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

부검소견(Appendix 1-3)

시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

4. 종합 요약

본 시험은 시험물질 유청가수분해단백분말(Sialic acid 7% 함유)를 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 조사하기 위하여 수행하였다. 시험물질을 625 및 1250mg/kg으로 투여하는 시험물질 투여군을 설정하여 군당 암수 각 1 마리에 단회 경구투여(1 차)하였고, 1 차 투여 후 6 일간 관찰한 뒤 2500 및 5000 mg/kg으로 2 차 투여하였다. 2 차 투여 후 8 일간 관찰한 뒤 5000 mg/kg으로 암수 각 2 마리에 3 차 투여하였다. 시험물질을 3 차 투여한 후 2 주간 사망을 포함한 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였고, 그 결과는 다음과 같다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험조건하에서 유청가수분해단백분말를 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 시험물질의 고유특성에 의해 일반증상에서 5000 mg/kg 투여군 암수에서 시험물질 구토가 관찰되었고, 이로 인하여 정확한 독성평가 및 전신적 노출의 정도는 판단하기 어려웠다.

따라서, 본 시험조건하에서 시험물질 Sialic acid의 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량(MTD, Maximum tolerance dose)은 암수 모두 2500 mg/kg으로 판단하였다. 단, 구토를 고려하지 않았을 때, 시험물질 구토가 관찰되지 않은 5000 mg/kg 투여군 암컷 1 레에서 시험물질 투여와 관련된 어떤 증상도 관찰되지 않았으므로, 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량은 암수 모두 5000 mg/kg으로 판단하였다. 검정결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 사망동물은 관찰되지 않았다.

나. 일반증상 관찰결과, 시험물질 구토가 5000 mg/kg 투여군 수컷(2 및 3 차 투여) 및 암컷(3 차 투여)에서 투여 후 전반적으로 1-3 시간 이내에 관찰되었다.

다. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

라. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

5. 고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 유청가수분해단백분말을 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법

을 이용하여 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 조사하기 위하여 수행하였다. 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서도 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

일반증상에서 관찰된 시험물질 구토는 암컷 1 레를 제외한 5000 mg/kg 투여군 암수 모두에서 관찰되어, 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하였다. 단, 일반적으로 개에서 구토는 구토중추의 발달로 인하여 독성작용 없이 경미한 위장관의 자극에 의해서 유발하기도 하고^{1, 2)}, 본 시험에서는 전신적인 이상증상, 그리고 체중변화 및 부검소견에서의 이상이 동반되지 않았기에 독성작용에 의한 것이 아닌 시험물질 고유의 맛, 냄새 등의 물리적 특성에 의한 변화로 사료된다. 따라서, 시험물질 구토로 인하여 5000 mg/kg 투여군에 대한 정확한 독성평가 및 전신적 노출의 정도는 판단하기 어려웠다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험조건하에서 유청가수분해단백분말을 Beagle dog에 DE (dose escalation) 투여법을 이용하여 단회 경구투여 하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 시험물질의 고유특성에 의해 일반증상에서 5000 mg/kg 투여군 암수에서 시험물질 구토가 관찰되었고, 이로 인하여 정확한 독성평가 및 전신적 노출의 정도는 판단하기 어려웠다.

따라서, 본 시험조건하에서 시험물질 Sialic acid의 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량(MTD, Maximum tolerance dose)은 암수 모두 2500 mg/kg으로 판단하였다. 단, 구토를 고려하지 않았을 때, 시험물질 구토가 관찰되지 않은 5000 mg/kg 투여군 암컷 1 레에서 시험물질 투여와 관련된 어떤 증상도 관찰되지 않았으므로, 독성작용에 의한 이상이 관찰되지 않는 최대내성용량은 암수 모두 5000 mg/kg으로 판단하였다.

Appendix 1-1. Individual clinical signs

groups (mg/kg)	Animal ID	CLINICAL SIGNS [1 st]	
		SIGNS	OBSERVED ON
MALE			
G1 (625)	1	Normal	DAY 1-7
G2 (1250)	2	Normal	DAY 1-7
FEMALE			
G1 (625)	3	Normal	DAY 1-7
G2 (1250)	4	Normal	DAY 1, 3-7
		Remaining of food	DAY 2

Days are those from the 1st dosed day (DAY1).

Appendix 1-1. Individual clinical signs

groups (mg/kg)	Animal ID	CLINICAL SIGNS [2 nd]	
		SIGNS	OBSERVED ON
MALE			
G1 (2500)	1	Normal Vomiting Remaining of food	DAY 1, 3-6 DAY 2 DAY 7-8
G2 (5000)	2	Normal Vomiting	DAY 1 (2-6 hrs), 2-8 DAY 1 [1 hr]
FEMALE			
G1 (2500)	3	Normal Remaining of food	DAY 1-7 DAY 8
G2 (5000)	4	Normal	DAY 1-8

Days are those from the 2nd dosed day (DAY1).

[]: Represents the day when vomiting of test article was observed after administration.

Appendix 1-1. Individual clinical signs

		CLINICAL SIGNS [3 rd]	
groups (mg/kg)	Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
MALE			
G1 (5000)	1	Normal	DAY 1 (2-6 hrs), 2-15
		Vomiting	DAY 1 [1 hr]
		Terminal sacrifice	DAY 15
	2	Normal	DAY 1 (1-2, 4-6 hrs), 2-7
		Vomiting	DAY 1 [3 hr]
		Remaining of food	DAY 8-15
		Terminal sacrifice	DAY15
FEMALE			
G1 (5000)	3	Normal	DAY 1 (1, 3-6 hrs), 2-15
		Vomiting	DAY 1 [2 hr]
		Terminal sacrifice	DAY 15
	4	Normal	DAY 1 (2-6 hrs), 2-15
		Vomiting	DAY 1 [1 hr]
		Terminal sacrifice	DAY 15

Days are those from the 3rd dosed day (DAY1).

[]: Represents the day when vomiting of test article was observed after administration..

Table 1. Summary of vomiting in clinical signs

2 nd administration				
GROUP	G1 (2500 mg/kg)		G2 (5000 mg/kg)	
	Male (# 1)	Female (# 3)	Male (# 2)	Female (# 4)
OBSERVATION TIME	–	–	DAY 1 (1 hr)	–

3 rd administration				
GROUP	G1 (5000 mg/kg)			
	Male (# 1)	Male (# 2)	Female (# 3)	Female (# 4)
OBSERVATION TIME	DAY 1 (1 hr)	DAY 1 (3 hr)	DAY 1 (2 hr)	DAY 1 (1 hr)

–: Not applicable, The day of each administration was designated as Day 1.

Appendix 1-2. Individual body weights

BODY WEIGHTS (kg) [1 st]							
groups (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 1	Day 3	Day 6	GAINS		
MALE							
G1 (625)	1	5.68	5.96	6.18	0.50		
G2 (1250)	2	6.06	6.30	6.34	0.28		
FEMALE							
G1 (625)	3	5.58	5.86	6.02	0.44		
G2 (1250)	4	5.86	6.02	6.06	0.20		

BODY WEIGHTS (kg) [2 nd]							
groups (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 1	Day 2	Day 6	Day 9	GAINS	
MALE							
G1 (2500)	1	5.94	6.12	6.28	6.38	0.44	
G2 (5000)	2	6.02	6.28	6.48	6.38	0.36	
FEMALE							
G1 (2500)	3	5.70	5.76	6.10	6.06	0.36	
G2 (5000)	4	6.06	6.20	6.52	6.62	0.56	

BODY WEIGHTS (kg) [3 rd]							
groups (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 1	Day 2	Day 4	Day 8	Day 15	GAINS
MALE							
G1 (5000)	1	6.26	6.36	6.38	6.52	6.58	0.32
	2	6.32	6.50	6.58	6.52	6.76	0.44
FEMALE							
G1 (5000)	3	5.92	6.04	6.10	6.06	6.28	0.36
	4	6.42	6.56	6.56	6.74	6.96	0.54

Days are those from the 1st dosed day (DAY1) or 2nd dosed day (DAY1).

GAIN is body weight on day 7 - body weight on 1st dosed day or body weight on day 9 - body weight on 2nd dosed day.

Appendix 1–3. Individual necropsy findings

NECROPSY findings			
G1 (625→2500→5000 mg/kg)			MALE
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
1	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

G2 (1250→5000→5000 mg/kg)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
2	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

G1 (625→2500→5000 mg/kg)			FEMALE
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
3	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

G2 (1250→5000→5000 mg/kg)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
4	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings

제 10 절 인체유효성 평가(CRO)

1. 연구목적

동물안전성 결과를 토대로 식약처 모듬회의 과정을 거쳐 유단백가수분해물(CaSAG)의 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori)균 감염 개선에 대한 유효성과 안전성을 입증하기 위한 단일기관, 이중맹검, 평행대조, 무작위배정 인체적용시험을 CRO 전문기관(단국대 병원 임상연구소)에 의뢰하여 2011년 10월을 개별인증 획득을 목표로 진행중이다. 현재 진행중인 인체적용시험 시놉시스 내역은 다음과 같다.

2. 연구수행방법

시험목적

본 인체적용시험은 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori)균 환자를 대상으로 유청가수분해단백분말(CaSAG)을 이용한 소퇴율이 시험군, 대조군 간 차이가 있음을 확인하는 것이 주목적이다.

시험제목

유단백가수분해물(CaSAG)의 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori)균 감염 개선에 대한 유효성과 안전성을 입증하기 위한 단일기관, 이중맹검, 평행대조, 무작위배정 인체적용시험(A single-center, double-blind, parallel and randomized human study to evaluate the efficacy and safety of CaSAG for reduction of Helicobacter pylori infection)

시험단계

건강기능식품 인체적용시험

시험기간

시험 개시일로부터 10개월(2016. 12.)

시험식품

시험군: 유청가수분해단백분말(CaSAG) 적정용량

대조군: 위식품(시험식품과 동일 제형)

시험의뢰자

한일바이오메드(광주광역시 광산구 우산동 1610-2번지 2층)

시험 기관/책임자

단국대학교병원 / 소화기내과 신현덕 교수

시험대상자((선정/제외기준)

선정기준

스크리닝 검사일을 기준으로 만 19세 이상 70세 이하의 성인 남녀
내시경 검사를 통한 조직검사(Wartin -Starry Silver Stain) 헬리코박터 파일로리균
감염이 확인된 자
본 시험에 대한 자세한 설명을 듣고 자발적으로 참여에 동의한 자

제외기준

시험식품에 대한 알러지가 있는 자
즉각적인 약물 치료가 필요한 위염, 위궤양 환자
Zollinger-Ellison Syndrome 과 같은 과다분비위병증 병력이 있는 자
임신부 및 수유부

단계 및 디자인

단일기관, 이중맹검, 평행대조, 무작위배정 인체적용시험

시험대상자 수

54명 (2:1 배정, 시험군 36명, 대조군 18명)

용법 · 용량 및 투여방법

시험군: 유청가수분해단백분말(CaSAG)

대조군: 동일 제형의 위식품

** 제시한 용법 용량에 따라 투여

시험방법

스크리닝 및 연구시작	건강기능식품 복용 및 평가	
Screening Visit 1 (0 day)	Visit 2 (2 weeks : Call Visit)	Visit 3 (4 weeks)
-연구참여 동의 -선정제외기준 확인 -문진 / 신체검사 -내시경에 의한 관찰 -내시경 검사를 통한 조직검사(Wartin-Starry Silver Stain)	-이상반응 평가 -복용 순응도 평가	-요소호기 검사(UBT) -문진 평가 -이상반응 평가

유효성 평가변수

1차 평가변수

Baseline과 4주 시점에서 요소호기 검사(UBT)를 통한 시험군과 대조군의 HP(헬리코박터
파일로리균) 소퇴율 구간 비교

*소퇴율: 전체 대상자 중 HP감염이 없어진 대상자의 비율

2차 평가변수

Baseline과 4주 시점에서 시험군과 대조군의 문진에 의한 증상개선 비교

안전성평가

이상반응, 활력징후 및 신체검사

목표한 시험대상자의 수 및 산출근거

- 가. 본시험은헬리코박터파일로리(Helicobacter pylori)균 환자를 대상으로 유청가수분해단백분말(CaSAG)을 이용한 소퇴율이 시험군, 대조군 간 차이가 있음을 확인하는 것이 주 목적이다.
- 나. 제균요법으로서삼제요법(PPI+amoxicillin+clarithromycin) 시행한709명을 대상으로 한 연구인 Cho et al.(2010)에 의하면 삼제요법을 1주일 간 시행하고 4-6주 후 제균을 확인한 결과 제균율이 약 77%로 나타났다. 또한 국내 단일기관에서 5년 이상의 기간 동안 제균율을 확인한 연구인 Song et al.(2009)에 의하면 제균율은 최소 78%에서 최대 95%까지 다양하게 나타났으며 이와 유사한 여러 연구에서도 제균율은 72%에서 87%까지 다양하게 보고되었다.(Chung et al., Na et al., Choi et al.)
- 다. 위선행연구들을종합적으로고려하면제균율은평균72~95%로서 상당히 높은 제균율을 보이거나 삼제요법은 강력한 위산분비억제제인 프로톤펌프억제제를 포함하는 병합요법으로 본 인체적용시험에 사용될 유청가수분해단백분말(CaSAG)과 정상 및 기전이 다르다. 또한, 본 시험은 건강기능식품을 통한 시험인 점을 고려한다면 제균율이나 치유율보다는 HP(헬리코박터 파일로리균)의 감염이 없어지는 것을 보는 소퇴율을 보는 것으로 하여 4주 시점에서의 HP(헬리코박터 파일로리균) 소퇴율은 시험군에서 약 50%, 대조군에서 약 10%일 것으로 추정된다.
- 라. 두 군간 헬리코박터 파일로리균 소퇴율의 차이를 비교하기 위해 필요한 시험대상자의 군간 배정비율은 1:1이 보편적 시행 방법이나 본 인체적용시험은 보다 윤리적인 접근과 아래의 특성을 고려하여 2:1의 배정비율로 설계가 하였다.(Ref. Fundamentals of clinical trials(2010, Friedman)와 임상연구자를 위한 전문교재(2006, 식약처))
- 마. 2:1의 배정비율로 설정하는 경우는 크게 2가지로 나눌 수 있다.
- 바. A. 대조군 대비 시험군에서 더 많은 정보가 필요할 경우
- 사. 유청가수분해단백분말(CaSAG)은 효과가 이미 입증된 건강기능식품이나, 전향적 연구결과는 전무한 실정이므로 시험군의 배정비율을 높혀 임상결과를 얻을 수 있어야 한다. 본 연구는 시험군과 대조군의 배정비율을 2:1로 하여 시험군의 임상데이터를 더 많이 얻을 수 있도록 설계하였다.
- 아. B. 시험군이 대조군 대비 효과가 좋다고 인정된 경우
- 자. 시험군은 동일 제형의 위약을 복용하는 대조군에 비해 효과가 뛰어날 것으로 예상되므로 윤리적인 측면을 고려하여 시험군과 대조군의 배정비율을 2:1로 하여 시험군의 임상데이터를 더 많이 얻을 수 있도록 설계하였다.
- 따라서, 시험군과 대조군의 헬리코박터 파일로리균 소퇴율은 각각 50%, 10%로 가정하고 검정력 80%, 유의수준 5%, 2:1 배정으로 계산하면 시험군 30명, 대조군 15명 총 45명의 시험대상자가 필요하며, 15~20%의 중도탈락율을 고려할 경우 총 60명(시험군 40명, 대조군 20명)의 시험대상자가 본 연구에 참여하게 될 것이다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

D-06

본 연구의 전체 목표인 “기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립”의 세부 목표별 목표 달성도 및 관련분야 기여도는 다음과 같다.

4-1. 목표달성도

가. 기질 특이적 유기태화 미네랄류 표준 규격화 대량생산시스템 정립

본 연구에서(제 1 세부연구)는 천연물(단백질류 및 탄수화물류)을 기질로 무기태 미네랄류의 단점(독성, 생체흡수 저하 및 환경오염 유발 등)의 유기태 소재류(항질병, 혈중 항체 증가 및 계란내 기능성 미네랄류 및 면역글로블린 IgY 증대형)의 개발과 표준산업 대량생산시스템 정립과 산업화를 위한 제품 등록을 실시하였다. 연구계획서상 목표 대비 달성도는 다음과 같다.

Table 1. 제 1 세부연구 단계(기질 특이적 유기태화 미네랄류 표준 규격화 대량생산시스템 정립 및 산업화)의 연구계획서상 목표 대비 달성도

연구계획서상의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. 단백질 (유단백질류) 기질화 유기태 미네랄류 제조기법 개발 및 표준규격화 대량제조시스템 정립	20	100	1. 연구목표 : 유기태 효능 최적화 분자량 및 순도를 조절한 1종 키토산과 이를 기질로 미네랄(10종 대상)중 기본 사료첨가 미네랄 대상 유기태 소재류 개발(6종)을 제조를 목표로 하였다. 2. 연구성과 가. 유기태 미네랄 6종의 표준화 생산과 동시에 제품 QA를 고려한 분석법 정립을 완료 하였으며, 현장 유효성 평가에 사용 하였다. 나. 기질별 “단일 및 다종 미네랄 유기태 소재류 (Organo-mineral 형)” 및 “미네랄 강화 사료류” 현장사용에 편리 하도록 제형화 (분말형, 과립 분산형 그리고 타정형 구분) 를 표준 규격화 하였다. 3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.
2. 탄수화물 (키토산류) 기질화 유기태 미네랄류 제조기법 개발 및 표준규격화 대량제조시스템 정립	20	100	1. 연구목표 : 11종 유단백질중 최적 유기태 기질을 1종 개발과 이를 이용한 미네랄별 (10종 대상) 유기태 소재류 개발 (6종)을 목표로 하였다. 2. 연구성과 가. 유기태 미네랄 6종의 표준화 생산과 동시에 제품 QA를 고려한 분석법 정립을 완료 하였으며, 현장 유효성 평가에 사용 하였다. 나. 기질별 “단일 및 다종 미네랄 유기태 소재류

			(Organo-mineral 형)” 및 “미네럴 강화 사료류” 현장사용에 편리 하도록 제형화 (분말형, 과립 분산형 그리고 타정형 구분) 를 표준 규격화 하였다. 3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.
3.탄수화물 (핵산류)단백질류 기질화 유기태 미네럴류 제조기법 개발 및 표준규격화 대량제조시스템 정립	20	100	1. 연구목표 : 유기태 촉매로서 효능을 보유한 핵산류 (5종중) 최적물성을 보유한 1종 이상 선발 및 미네럴별 (10종 대상) 유기태 소재류 개발 (6종)을 목표로 하였다. 2. 연구성과 가. 기질로서 핵산 1종 (GMP : 5'-구아닐산이 나트륨) 선발과 유기태 미네럴 6종의 표준화 생산과 동시에 제품 QA를 고려한 분석법 정립을 완료 하였으며, 현장 유효성 평가에 사용 하였다. 나. 기질별 “단일 및 다중 미네럴 유기태 소재류 (Organo-mineral 형)” 및 “미네럴 강화 사료류” 현장사용에 편리 하도록 제형화 (분말형, 과립 분산형 그리고 타정형 구분) 를 표준 규격화 하였다. 3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.
4. “건강기능성식품 (개별인증, 헬리코박터 제어형) 원료 대량생산시스템 정립	10	100	1. 연구목표 : 총 7 단계 건강기능식품 개발과정 (식약처 기준)에 따라 우선 건기식 항헬리코박터 평가용 기능성 원료 1종 개발을 목표로 하였다. 2. 연구성과 : 최종 선발한 유단백질 (1종) 내 지표 및 항균 기능성분을 Silaic acid의 효소분리 기법개발과 이의 표준화 대량생산시스템 정립을 통한 건기식 원료 1종 (유청가수분해 단백질분말)을 완료 하였으며, 이를 전체 개별인증 연구의 평가 원료로 적용하였다. 3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.
5. 산업화 (제품등록)	30	100	1. 연구목표 : 기술실시 6건과 상품화 6건을 목표로 산업화를 진행하였다. 2. 연구성과 가. 유기태 미네럴류 10종의 식품등록 (사료전용, 전남도 축산과 승인)을 완료하였다. 나. 유기태화 소재류별 물리/이화학적 안전성 부여 기법을 정립 하였다. 2. 유기태화 소재류별 제품적용성 평가 : 5점 3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.
합계	100점	100	연구목표 대비 성과를 완료하였다.

나. 유기태화 미네럴 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 생산기법

본 연구(제 2 세부과제)에서는 유기태 미네랄 강화 사료류 제조 레시피 정립과 이들의 가금류(산란계, 육계) 현장 유효성 평가를 통한 안전성 및 생육 특성 등의 현장유효성 평가를 통한 최적 투여농도 등 설정과 기능성 축산물 생산을 위한 현장 시스템 확립 연구를 실시하였다.

Table 2. 제 2 세부연구 단계 (유기태 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 생산 기법 및 산업화)의 연구계획서상 목표 대비 달성도

연구계획서상의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1.단백질 (유단백질류) 기질화 유기태 미네랄 강화 사료류의 현장 유효성 평가	20	100	<p>1. 연구목표 : 가금류(산란계, 육계) 대상, 유기태 미네랄 강화사료 6종의 현장 유효성 평가(사료류 제조 레시피 정립, 안전성 및 생육 특성 등, 사료별 최적 투여농도 등을 설정과 기능성 축산물 생산 시스템 확립)를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과 가. 유기태 미네랄별 강화 사료류 6종 레시피 (시작품)를 확정 하였다. 나. 시작품 표준규격화 생산시스템을 확립 하였다. 다. 현장적용 매뉴얼을 확정 하였다.</p> <p>3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
2.탄수화물 (키토산류) 기질화 유기태 미네랄 강화 사료류의 현장 유효성 평가	20	100	<p>1. 연구목표 : 유기태 미네랄 강화 사료 6종의 현장 유효성 평가(사료류 제조 레시피 정립, 안전성 및 생육 특성 등, 사료별 최적 투여농도 등을 설정과 기능성 축산물 생산 시스템 확립)를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과 가. 유기태 미네랄별 강화 사료류 6종 레시피 (시작품)를 확정 하였다. 나. 시작품 표준규격화 생산시스템을 확립 하였다. 다. 현장적용 매뉴얼을 확정 하였다.</p> <p>3. 종합결과 가. 4종을 제품 등록(산업화)을 완료하였다. - 제품명 : WELL-P-FARM, EPECTROL-3(액상), EPECTROL-3(P), EPECTROL-3(L) 나. 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
3.탄수화물 (핵산류)기질화 유기태 미네랄 강화 사료의 현장 유효성 평가	20	100	<p>1. 연구목표 : 유기태 미네랄 강화 사료 6종의 현장 유효성 평가(사료류 제조 레시피 정립, 안전성 및 생육 특성 등, 사료별 최적 투여농도 등을 설정과 기능성 축산물 생산 시스템 확립)를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p>

			<p>가. 유기태 미네랄별 강화 사료류 6종 레시피 (시작품)를 확정 하였다.</p> <p>나. 시작품류 표준규격화 생산시스템을 정립하였다</p> <p>다. 현장적용 매뉴얼을 확립하였다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 2종을 제품 등록(산업화)을 완료하였다.</p> <p>나. 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
4.산업화 (제품등록)	40	100	<p>1. 연구목표 : 기술실시 6건과 상품화 6건을 목표로 산업화를 진행하였다.</p> <p>2. 연구성과 : 사료등록 6종을 완료하였다.</p> <p>3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
합계	100점	100	연구목표 대비 성과를 완료하였다.

다. 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 개발 및 현장매뉴얼 정립

본 연구 (3 세부과제)에서는 현장유효성 평가 (2 세부과제 연계) 를 통하여, 가금류 (산란계 및 육계 구분) 사육현장 내 고질적 살모넬라증 감염 예방형 최적 유기태 미네랄 소재 선발 및 사료제조 레시피 확정 및 생육특성과 항질병 효능 평가, 고품질 기능성 축산물인 “단일 및 다중 동시 고품질 기능성 미네랄 강화란” 과 “기능성 면역체 (IgY) 강화란” 의 현장 대량생산 시스템을 확립 하였으며, 최종적으로 사료첨가제 및 축산물의 시작품과 현장매뉴얼을 확정하였다.

Table 3. 제 3 세부연구 단계 (양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가와 산업화)의 연구계획서상 목표 대비 달성도

연구계획서상의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. <i>Salmonella gallinarum</i> 공격접종 산란계의 산란 회복형 제품 개발 및 현장 매뉴얼 확정	20	100	<p>1. 연구목표 : 가금류(산란계) 대상, 선발 유기태 미네랄 강화사료 5종의 현장 유효성 평가(생육특성 및 항질병 효과 등)를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. <i>in vivo</i>내 살모넬라 검정법을 정립 하였다.</p> <p>나. 항질병(Synbiotic효능, 장내 유산균 증폭 및 유해균 억제 동시 발현) 보유형 유기태 강화사료를 선발 완료 하였다.</p> <p>다. 기능성 사료류 섭취간 <i>Sal. gallinarum</i>감염예방 메카니즘 및 생육 및 산란특성을 평가 하였다.</p> <p>라. 현장적용 매뉴얼을 확정 하였다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 항질병형 2종의 사료등록 (제품명 : 메디프리바이오-1, EPECTROL-3) 을 완료하였다.</p> <p>나. 항질병예방 현장매뉴얼을 정립하였다.</p>

			다 연구목표 대비 성과를 완료하였다.
2.면역 증대형 제품 개발 및 현장 매뉴얼 확정	20	100	<p>1. 연구목표 : 가금류(산란계) 대상, 선발 유기태 미네랄 강화사료 5종의 현장 유효성 평가 (생육특성, 체내면역 증대 및 연계 항질병 효과 등) 를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 항질병(체내면역, Synbiotic효능, 장내 유산균 증폭 및 유해균 억제) 보유형 유기태 강화사료 선발다. 기능성 사료류 섭취간 <i>Sal. gallinarum</i>감염예방 효과 발현 기간, 생육 및 산란특성을 평가 하였다.</p> <p>라. 현장적용 매뉴얼을 확립 하였다</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 항질병형 2종의 사료등록을 완료하였다.</p> <p>나. 항질병 예방 (체내면역 증대성 메카니즘 규명 등) 과 현장매뉴얼을 정립하였다.</p> <p>다. 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
3.Synbiotic 효과를 나타내는 Prebiotic 효능 보유형 제품개발 및 현장 매뉴얼 확정	20	100	<p>1. 연구목표 : 가금류(산란계) 대상, 선발 유기태 미네랄 강화사료 5종의 현장 유효성 평가 (생육특성, 체내면역 증대 및 연계 항질병 효과 등) 를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 항질병(Synbiotic효능, 장내 유산균 증폭 및 유해균 억제) 보유형 유기태 강화사료를 선발 하였다.</p> <p>다. 기능성 사료류 섭취간 장내 유산균총 증대 및 유해균인 대장균 및 <i>Sal. gallinarum</i>억제 효능 발현 시간, 생육특성 및 산란특성 평가를 완료하였다.</p> <p>라. 현장적용 매뉴얼 확정을 정립하였다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 항질병(Synbiotic 발현형) 2종의 사료등록을 완료 하였다.</p> <p>나. 항질병 예방 (Synbiotic 효능 발현형 Prebiotic 효능 메카니즘 규명)과 현장매뉴얼을 정립하였다.</p> <p>다. 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
4. 기능성 (미네랄 및 면역글로브린 고함유) 계란 대량 생산시스템 개발 및 현장 매뉴얼 확정	20	100	<p>1. 연구목표 : 가금류(산란계) 대상, 유기태 미네랄 강화사료 5종의 현장 유효성 평가 (생육 및 계란 특성, 계란내 미네랄류 및 면역글로브린 생체전이 메카니즘 규명 등) 를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 기능성 축산물 (미네랄류 및 면역글로브린 IgY 고함유) 생산 메카니즘 규명을 완료 하였다.</p>

			<p>나. 현장적용 매뉴얼을 확립 하였다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 기능성 계란 생산형 2종의 사료등록 (CaZn-GHAC, Ca-WPS)을 완료하였다.</p> <p>나. 유기태 미네럴류 생체흡수와 전이 및 목표 기능성 성분의 축적 메카니즘을 정립하였다.</p> <p>다 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
5.산업화 (제품등록)	20	100	<p>1. 연구목표 : 기술실시 6건과 상품화 6건을 목표로 산업화를 진행하였다.</p> <p>2. 연구성과 : 사료등록 2종을 완료하였다.</p> <p>3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
합계	100점	100	연구목표 대비 성과를 완료하였다.

라. 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산

본 연구(4 세부과제) 에서는 산란계 실험 결과를 토대로 선발된 유기태 미네럴 강화 사료의 현장 유효성 평가를 통한 항질병 및 무항생제 고품질 계육 생산 가능성 및 대량생산 시스템 정립 [생산성 (성장) 증진 및 육질 등 분석 연구]을 통한 우리 맛닭 생산형 효능 평가를 실시하였으며, 최종 시작품과 현장 생산 매뉴얼을 확정하였다.

Table 4. 제 4 세부연구 단계 [육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산 및 산업화]의 연구계획서상 목표 대비 달성도

연구계획서상의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. 무항생제 계육 생산 가능성 현장평가 및 대량생산매뉴얼 정립	50	100	<p>1. 연구목표 : 가금류(육계) 대상, 유기태 미네럴 강화 사료 5종의 현장유효성 평가 (생육특성 및 생산성, 미네럴 축적 및 항질병 효능 평가 등)를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 무항생제형 육계 생산성과 고품질(미네럴류, 품질 등) 계육 생산효율 증대를 연계하여 정립하였다.</p> <p>나. 항질병 (Synbiotic 효능, 장내 유산균 증폭 및 유해균 억제능 연계 발현) 보유형 기능성 사료의 선발 및 관련 메카니즘을 확인 하였다.</p> <p>다. 무항생제 대체형 장내 유해균류 (대장균 및 <i>Sal. gallinarum</i>) 감염예방 Prebiotic 효능과 메카니즘을 확인 하였다.</p> <p>라. 육계 및 계육 생산관련 현장매뉴얼을 확정 하였다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 항질병형 계육 생산용 1종의 사료등록 (제품명 : 메디프리바이오-2) 을 완료하였다.</p>

			<p>나. 무항생제의 청정 및 기능성 계육 생산형 현장매뉴얼을 정립하였다.</p> <p>다 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
2.항질병 (Synbiotic 발현형 Prebiotic 효능) 보유형 제품 개발 및 현장 매뉴얼 확정	25	100	<p>1. 연구목표 : 육계 대상, 유기태 미네랄 강화사료 5종의 현장 유효성 평가 (생육특성, 체Synbiotic 효능과 연계하여 항질병 효과 등) 를 실시한다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 항질병(Synbiotic효능, 장내 유산균 증폭 및 유해균 억제) 보유형 기능성 사료를 선발 하였다.</p> <p>나. 기능성 사료류의 Synbiotic 효능(장내 유산균총 증대 및 유해균인 대장균 및 <i>Sal. gallinarum</i> 억제 효능) 발현 시간과 연계하여 생육특성 평가를 완료하였다.</p> <p>다. Prebiotic소재의 현장매뉴얼을 확립 하였다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 항질병형 (Synbiotic 효능 발현형 Prebiotic 효능 메카니즘 규명) 현장매뉴얼을 정립하였다.</p> <p>나. 항질병 (Synbiotic 발현형) 1종의 사료등록 (제품명 : 메디프리바이오-2) 을 완료하였다.</p> <p>다. 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
3.산업화 (제품등록)	25	100	<p>1. 연구목표 : 기술실시 6건과 상품화 6건을 목표로 산업화를 진행하였다.</p> <p>2. 연구성과 : 사료등록 1종(제품명 : 메디프리바이오-2)과 대량생산시스템을 완료 하였다.</p> <p>3. 종합결과 : 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
합계	100점	100	연구목표 대비 성과를 완료하였다.

마. 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구

본 연구 (제 5세부과제)에서는 항헬리코박터 관련, 유기태 기질중 유단백질을 선발한 후, 지표 및 기능성분을 Sialic acid로 하는 기능성 원료인 “유청가수분해단백분말”을 제조한 후 이를 이용한 개별인증형 건강기능식품 개발 연구를 식약처 기준(건강기능식품 개발과정 7단계)에 따라 단계적으로 실시하였다.

Table 5. 제 5 세부연구 단계 [건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구 및 산업화]의 연구계획서상 목표 대비 달성도

연구계획서상의 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1.건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터	75	100	1. 연구목표 : 선발 유기태 기질을 적용하여 유기태 기법으로 제조한 건기식 항헬리코박터 제품 (위건강,

제어형 원료) 개발 연구			<p>개별인증형) 개발 연구를 건강기능식품개발과정 (7단계, 식약처)에 준하여 순서적으로 실시 하였다.</p> <p>2. 연구성과</p> <p>가. 1 단계(소재 탐색), 유기태 기질 선발은 유단백질 중 11종중 유청 단백질을 선발하였으며, 지표 및 기능성분으로는 Silaic acid를 설정 하였다.</p> <p>나. 2 단계(기준규격 설정) : 지표물질의 Validation과 유해물질 설정을 완료 하였다.</p> <p>다. 3 단계(생산공정설정), GLP생산시설에서 규정에 따라 생산가능여부 및 경제성 등을 정립하였다. 그리고, 기능성 원료 “유청가수분해단백분말” 를 시작으로 2종을 제조 하였다.</p> <p>라. 4 단계(시험관 시험), 2종 시작품의 기초 안전성 및 효능을 평가를 통하여 최종 1종을 선발 하였다.</p> <p>마. 5 단계(설치류 대상, 동물안전성 GLP평가), 장단기 섭이, 미생물복귀돌연변이, 미소핵 검사 등의 평가를 완료하였다.</p> <p>바. 6 단계(비설치류 대상, 동물안전성 GLP평가), 비글견을 대상으로 단회독성평가를 완료 하였다.</p> <p>사. 7 단계 (인체유효성 CRO평가), 최종 7단계 CRO 평가가 진행 중이다.</p> <p>3. 종합결과</p> <p>가. 6 단계별 최종 보고서(안전성 확보)를 확보하였다.</p> <p>나. “유청가수분해단백분말” 의 현장생산 매뉴얼을 정립하였다.</p> <p>다. 연구목표 대비 성과를 완료하였다.</p>
2.산업화 (제품등록)	25	100	<p>1. 연구목표 : 개별인증 1건과 상품화 1건을 목표로 산업화를 진행하였다.</p> <p>2. 연구성과 : 식품등록 1종(제품명 : 유청가수분해단백분말)과 대량생산시스템을 완료 하였다.</p> <p>3. 종합결과: 개별인증 확보 전 연구결과를 완료하였다.</p>
합계	100점	100	연구목표 대비 성과를 완료하였다.

4-2. 관련분야 기여도

본 연구간 진행된 세부 연구목표별 성과와 관련 연구개발 KNOW-HOW의 관련분야 기여도는 다음과 같다.

세부연구목표	관련분야 기여도
1.기질 특이적 유기태 미네랄류 대량제조시스템	<p>1. 국내외 미네랄 개발 방향 제시 및 산업활성화에 기여</p> <p>2. 국내외 관련 농축수산업 분야 추가 확대방향 제시</p>

정립 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> 3. 국내외 식품 및 의약 분야 시장 확대에 기여 4. 국내외 미네럴 산업으로 용도·용법 및 적용성 확대 연구개발 방향 제시 기여
2. 유기태 미네럴 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 대량생산시스템 정립	<ul style="list-style-type: none"> 1. 기능성 유기태 강화사료 산업 런칭 및 신규 활력 기여 2. Synbiotic형 Prebiotic 제품시장 활성화에 기여 3. 항생제 저감형 식품산업 활성화 방향 제시 기여 4. 무기태 이온류 대체형 농/축/수산물 자재 개발 및 제품화 연구방향 제시에 기여
3. 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태 화 소재류 선발 및 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 1. 유기태 강화 사료류의 항질병 관련 연구에 기여 2. 미네럴 미이용 기능성 추가 발굴 기법 연구에 기여 3. 장 건강 등 Synbiotic형 Prebiotic 제품효능 증대 및 관련 제품류 추가 개발연구에 기여 4. 식품 및 축수산업분야 장건강 및 질병예방 및 치료용 식의약품 개발 연구에 신규방향 제시 기여 5. 모계 및 유정란 수직형 항질병 가금류 산업활력에 기여
4. 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산	<ul style="list-style-type: none"> 1. 가금류 무항생제형 고품질 축산물 생산 시장의 항생제 대체 Synbiotic 소재류 및 제품류 개발에 기여 2. 고품질 농산물 생산 미 유통시장 활성화에 기여 3. 항생제 저감형 항질병 축종 연구 확대 연구 4. 유산균 증폭형 장 건강 제품류 연구 및 개발방향 제시
5. “건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구	<ul style="list-style-type: none"> 1. 위 건강형 건기식 제품화 연구영역 확대에 기여 2. 천연 항균제 개발시 천연물 응용 연구에 기여 3. 건기식 개별인증 신청 및 획득 KNOW-HOW의 이중 건기식 제품 개발에 기여 4. 개별인증 연구결과를 토대로 국내외 제약회사와 연계 항헬리코박터 의약품 개발에 기여 5. 기능성 원료의 다기능성을 활용한 농축수산분야의 항미생물 제품 개발

5. 연구결과의 활용계획

D-07

본 연구 세부과제별 결과물의 산업화를 위한 활용계획, 추가연구 필요성, 타 연구로의 활용 및 기업화 추진방향은 다음과 같다.

가. 기질 특이적 유기태화 미네랄류 표준 규격화 대량생산시스템 정립 및 산업화

1) 활용계획

- 가) 국내외 미네랄 시장 런칭(기능성을 컨셉으로 하는 무기태 대체형 유기태 미네랄 소재류)
- 나) 국내외 관련 농축수산업 분야 추가 확대 활용
- 다) 국내외 식품 및 의약 분야 시장 런칭
- 라) 국내외 미네랄 산업으로 용도·용법 및 적용성 확대 연구개발에 활용

2) 추가연구 필요성

- 가) 유기태 미네랄 개발 및 기능성 확인 KNOW-HOW의 연구 확대 필요
- 나) 신규 및 진보성을 보유한 용도용법 (농업자재, 식품소재) 유기태 신제품 지속적 개발

3) 타 연구에의 응용

- 가) 기질별 유기태 미네랄류의 무기태 이온류 대체형 농업용 자재로의 응용 연구
- 나) 수산업 분야 기능성 미네랄 소재류 개발 응용연구(예 : 새우 양식)

4) 기업화 추진방향

- 가) 현재, 자체생산 공장에서 생산 및 국내외 판매 사업화를 실시할 예정이다.
- 나) 현재, 국내외 메이저급 사료회사, 식품회사 (식품 첨가제) 및 제약 회사 (의약품 미네랄 제품) 와 공동 사업을 위한 협의가 진행 중이다.

나. 유기태화 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 생산기법

1) 활용계획

- 가) 국내외 사료시장 런칭(기능성을 컨셉으로 하는 무기태 대체 유기태 미네랄 강화 사료첨가제)
- 나) 국내외 관련산업(식품/농업/축산/수산용) 용도·용법 및 응용성 확대 판매
- 다) 유기태화 미네랄 강화 사료류 : 농축/수산용 사료첨가제로 판매
- 라) 기능성 미네랄 강화란 : 성장기, 임신수유부 및 고령식 건강기능식품으로 판매
- 마) 기능성 IgY 강화란 : 항헬리코박터 및 영유아용(식) 항로타바이러스용 식품첨가제로 판매
- 바) 기능성 강화란 가공식품 : 미네랄 결핍 예방형 건기식 및 식의약품으로 판매

2) 추가연구 필요성

- 가) 유기태 기질별 제조된 미네랄 강화사료의 축종 확대 연구
- 나) 유기태 미네랄 강화사료의 기능성 추가 발굴로 고부가 제품화 개발 연구
- 다) 장 건강 등 Synbiotic형 Prebiotic 제품효능 증대 및 관련 제품류 추가 연구
- 라) 항생제 저감형 제품효능 보강 연구

3) 타 연구에의 응용

- 가) 기질별 유기태 미네랄류의 무기태 이온류 대체형 농업용 자재로의 응용 연구
- 나) 수산업 분야 기능성 사료첨가제 개발 응용연구(예 : 새우 양식)

4) 기업화 추진방향

- 가) 현재, 자체생산 공장에서 생산 및 국내외 판매 사업화를 실시할 예정이다.
- 나) 현재, 국내외 메이저급 사료회사와 공동 사업을 위한 협의가 진행 중이다.

다. 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 개발 및 현장매뉴얼 정립

1) 활용계획

- 가) 항질병 효능(체액성 면역 증진)을 컨셉으로 하는 기능성 사료첨가제 국내외 매출신장 도모
- 나) 가금류 항살모넬라증 감염억제 효능을 컨셉으로 하는 국내외 시장 런칭
- 다) 장 건강 (유산균 증폭 및 유해균 억제 효능)을 컨셉으로 하는 국내외 가축시장 런칭
- 라) 미네랄 결핍 해소형 “기능성 미네랄 강화란” 생산용 사료첨가제 국내외 계란시장 런칭
- 마) 면역글로부린(IgY) 고함유 “기능성 면역인자 강화란” 및 기능성 사료첨가제 국내외 런칭

2) 추가연구 필요성

- 1) 유기태 기질별 제조된 미네랄 강화 사료류의 항질병 관련 축종 확대 연구
- 2) 유기태 미네랄 강화사료의 기능성 추가 발굴로 고부가 제품화 개발 연구
- 3) 장 건강 등 Synbiotic형 Prebiotic 제품효능 증대 및 관련 제품류 추가 개발

3) 타 연구에의 응용

- 가) 자돈 대장균증 장건강 및 질병예방 및 치료용 기능성 사료첨가제로 개발 연구
- 나) 수산 새우 및 어류 장건강 및 질병예방 사료첨가제 개발 연구
- 다) 항질병 인자 고함유 (미네랄류 및 면역 글로브린) 우량 병아리 생산용 유정란 개발 연구

4) 기업화 추진방향

- 가) 현재, 자체생산 공장에서 생산 및 국내외 판매 사업화를 실시할 예정이다.
- 나) 현재, 국내외 메이저급 사료회사와 공동 사업을 위한 협의가 진행 중이다.

라. 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산

1) 활용계획

- 가) 육계의 가금류 시장의 항생제 대체형 Synbiotic 효능을 컨셉으로 하는 사료첨가제 시장 런칭
- 나) 가금류 및 축종 확대형 연구에 활용

2) 추가연구 필요성

- 가) 고품질 농산물 생산 관련 가금류 및 축종 확대형 연구
- 나) 항생제 저감형 항질병 축종 연구 확대 연구
- 다) 장 건강 등 Synbiotic형 Prebiotic 제품 및 관련 제품류 추가 개발 연구

3) 타 연구에의 응용

가) 오리 대상, 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 축산물 생산” 연구

나) 자돈 대상, 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 축산물 생산” 연구

4) 기업화 추진방향

가) 현재, 자체생산 공장에서 생산 및 국내외 판매 사업화를 실시할 예정이다.

나) 현재, 국내외 메이저급 육계농가 및 대형 프랜차이즈사와 공동 사업화 협의가 진행 중이다.

마. 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구

1) 활용계획

가) 위 건강형 건기식 제품화 연구영역 확대에 활용

나) 천연 항균제 개발에 천연물 선발 및 개발에 활용

다) 건기식 개별인증 신청 및 획득 KNOW-HOW의 이중 건기식 제품 개발에 적극 활용

2) 추가연구 필요성

가) 개별인증 연구결과를 토대로 국내외 제약회사와 연계 항헬리코박터 의약품 개발

나) 기능성 원료의 다기능성을 활용한 농축수산분야의 향미생물 제품 개발

3) 타 연구에의 응용

- 천연 항균 의약외품 개발에 응용

4) 기업화 추진방향

가) 현재, 진행중인 개별인증 연구가 종료 및 인증이 확보되는 시점 (예정일 : 2017. 11.)에서 자체생산공장에서 생산 및 국내외 판매 사업화를 실시할 예정이다.

나) 현재, 개별인증 확보일을 기준으로 국내외 메이저급 식품회사 및 제약회사외 공동 사업을 위한 협의가 진행 중이다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

가. 기질 특이적 유기태 미네랄류 대량생산시스템 정립 및 산업화

1) 축산 분야

농림수산식품부는 2011년 7월 배합사료 내 항생제 첨가의 전면금지를 실시하였으며, 이와 함께 “유해사료의 범위와 기준”을 고시하여 2011년 7월 1일자로 시행되고 있음에 따라 항생제를 대체하기 위한 기능성 사료첨가제 시장의 규모가 빠른 속도로 확대되어 가고 있다.

최근 국내·외 소비자들은 식품안전에 대한 관심 증가로 안전한 친환경 농축산물을 선호하는 경향이 증가되고 있다. 따라서 안전하고 친환경적인 축산물을 생산하기 위한 방안으로 기능성을 증진시키는 사료 첨가제의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

가금 사료는 옥수수-대두박 위주로 이들 사료는 무기태 광물질(minerals)을 첨가하고 있다. 하지만, 이러한 사료들은 사료비의 상승으로 이어져 경제적으로 불리할 뿐만 아니라, 배설로 인한 토양 및 수질오염, 독성이 문제 시 되고 있어 양계 산업의 양계산업의 저해 요인이 되고 있다.

미네랄은 골격 형성, 체내 삼투압조절과 체액의 산, 염기 평형 상태를 유지시키며 각종 효소의 활성제 역할과 에너지 발생 작용을 조절한다. 또한, 효소, 비타민, 호르몬, 운반 단백질 등의 구성 성분으로서 생체 내에서 일어나는 중요한 대사 작용에 관여한다.

최근에는 가금에 있어 미네랄의 흡수율을 높인 킬레이트 미네랄 또는 유기태 미네랄 개발이 전 세계적으로 활발히 진행되고 있지만, 대부분 연구에서 단일 미네랄의 첨가에 의한 단순 효과에 그치고 있는 실정이다.

가축 영양에 있어서 광물질의 흡수 이용률 향상을 위하여 무기태 보다는 유기태 광물질의 이용이 권장되고 있다. 현재 판매되고 있는 유기태 광물질들은 영양적으로 필요한 광물질을 유기물질들, 즉, 유기산(예; gluconic acid), 다당류(예; algal polysaccharide), 아미노산(예; 메치오닌, 라이신 등), peptide 등과 결합시켜 chelate 또는 complex 형태로 제조된 것을 의미한다.

대부분은 아미노산 chelate가 널리 소재로 이용되고 있으나, 근래에는 값이 비싸고 흡수력이 낮은 아미노산 대신에 소화 시킨 단백질을 이용한 펩타이드 복합체(peptide complex)가 개발되면서, 광물질 자원을 절약하고, 소화 흡수율을 높이고 배설량을 감소하면서 항생제 및 기능성 식품 생산에 효과적으로 이용이 가능해 졌다.

안전한 먹을 거리 생산에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 축산분야의 항생제 사용의 문제점이 대두됨에 따라 천연 유래 고분자 소재인 키틴과 키토산은 기능성 신소재로 각광을 받고 있다. 게, 가재, 새우 등 갑각류의 껍질로부터 얻은 키틴은 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연고분자로 탈아세틸화를 통해 키토산을 만든다.

키토산은 생체접합성이 탁월하고 생분해가 되므로 환경오염을 일으키지 않는 천연 물질로 그람양성·음성 박테리아뿐만 아니라 효소, 곰팡이 등에 대한 저해 작용도 있으며, 항바이러스 활성을 통해 상처치유에 관여한다고 알려짐에 따라 생물의학, 향장, 식품, 섬유산업 등 여러 가지 분야에 적용이 가능하다. 또한 체내 칼슘의 흡수 촉진을 위해서는 키

토산을 올리고당의 형태로 섭취하는 것이 체내흡수율 측면에서 유리하다는 보고도 있다.

핵산물질은 모든 생물의 세포에 함유되어 있는 생체 고분자 물질로 nucleotide라는 단위 물질이 중합된 polynucleotide 형태로 존재 하며, 염기, 5탄당 및 인산으로 구성되어 있다. 핵산류는 수용성으로서 N과 P를 다량 보유하고 있으며, 분자량이 300~400 Da으로서 현재는 식품첨가제로 대부분 사용되고 있다. 또한 분자 구조 특성상 미네랄과 결합할 수 있는 인산기가 많이 존재하며, 열이나 pH에 비교적 안정하기 때문에 유기태 기질로 활용하여 농축산 및 식품 소재 개발에 적용할 경우, 가공적성도 유리할 것으로 기대 된다.

핵산은 5' -GMP(N 17.2%: P 7.61%)와 5' -IMP(N 14.3% : P 7.88%), 5' -CMP(N 11.4% : P 8.44%) 그리고 5' -UMP(N 7.6% : P 8.42%)가 대표적이며, 이들이 보유하고 있는 킬레이팅 효능에 주목한 이용성 연구가 일부 수행되었으나 산업화로는 연결되지 못하였으며, 특히 사료첨가제 로서 적용된 사례는 세계적으로 없다.

나) 농업부분

각종 작물생산기술 관련하여 지난 수십 년 사이 품종 육성과 개량, 병해충 및 양액 관리 및 비료 개량과 개발 등이 지속적으로 발전해 왔으나, 비료 부분은 여전히 기존 연구 개발 범위를 벗어나지 못하고 있으며 이용효율 또한 여전히 낮은 수준이다. 비료 사용량과 단위면적당 투입량 증가 패턴이 전 세계적으로 동일함을 고려할 때, 비료과잉 사용으로 인한 토양뿐만 아니라 관련되는 생태 환경보전과 작물 및 인간의 건강 등의 측면에서 질소, 인 및 칼륨 등 비료 성분의 낮은 이용효율은 심각하게 다루어야 하는 과제이다.

화학비료 시비에 따른 질소와 인산 및 무기 이온류의 유실 조절 및 관리를 통하여 각종 문제들의 발생을 줄이는 다양한 노력이 시도되고 있지만, 근본적으로 해결할 수 있는 효과적인 수단은 없는 실정이다.

화학비료 시비에 따른 문제발생의 주요 유발원인 속효성 비료보다 완효성 (Slow-Release Fertilizers) 혹은 용출조절형 비료(Controlled-Release Fertilizers)를 사용 함으로서, 비료 성분인 질소와 인산 및 미네랄 영양원의 흡수 및 이용 효율을 높이면서 동시에 주변 환경계로의 유실을 저감시키는 방법으로 채택하고 있는 실정이다. 또한, 세계적으로 빠른 비료 효능을 얻기 위하여 완효성 또는 용출조절형 비료보다는 속효성 비료류를 대부분을 사용하고 있는데, 사용 편리성과 비료성분의 작물 이용성 증대 및 유실을 저감시킬 수 있는 방법으로 완효성 또는 용출조절형 비료의 사용 또는 질산화 억제제 처리 등을 통해 해결 하고자 하는 것이 최근의 연구 추세이다.

비료의 속효성 충족과 토양오염 해소 등을 효과적으로 구현할 수 있는 방법으로 최근 유기태 기능을 탑재 시킨 비료 개발에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있으나, 안전한 유기태화 기질의 개발, 고단가 제조 과정 및 허가 관련 제조 설비 등의 문제로 인해 완효성 비료 보다는 농업 전반에 널리 보급되지 못하고 있는 실정이다.

현재는 EDTA (E DTPA (Diethylenetriamine pentaacetic acid) 및 EDDHA (Ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic acid) 등을 기질로 하는 킬레이트 철 제품을 비료 원료로 일부 사용되고 있는데, 이들은 생체 독성을 보유함에 따라 식품 등에 사용 시는 제한을 받고 있다.

따라서, 본 연구에서는 잉여자원이면서 식품첨가물로 등재 (식약처) 되어 있는 단백질류

및 키토산 및 핵산을 기질로 미네랄 유기태화 소재류를 개발하고 이를 사료첨가제로서 가금류(산란계, 육계)에 섭이토록 하는 단순한 사양시스템을 통하여, 가축 사육 농가에는 무항생제형 항질병 등 절박한 현장애로를 해결하고, 동시에 국내외 소비자 요구성에 충족되는 “기능성 미네랄 강화란” 과 “기능성 면역체 강화란” 과 “브랜드 계육(우리 맛닭)” 및 “대량생산시스템 정립”, “양질 병아리의 생산형 항질병 강화방안” 제시와 “건강기능성식품의 영역” 까지 연계한 용도·용법 및 이용성 관련 현장 유효성 평가 연구 및 제품화로 출시된 예는 현재 국내외적으로 없다.

나. 유기태화 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 생산기법

1950년대 이후 어린 가축의 성장촉진과 사료효율을 개선하고 축산물의 생산효율을 향상시킬 목적으로 항생제가 사료첨가제로서 널리 사용되어 왔다. 항생제의 작용기전은 먼저 가축 체내에 존재하는 대장균, 살모넬라, 클로스트리디움 등과 같은 장내 병원성균의 세포막을 분해하여 사멸 시키고 소장 흡수세포벽을 얇게 하여 영양소의 흡수율을 증대시켜 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다. 그러나 가축 생산성 증대와 같은 긍정적인 효과에도 불구하고 항생물질의 축산물 내 잔류될 수 있다는 점과 내성을 유발 시킬 수 있다는 문제가 제기됨에 따라 2011년 7월부터 시행된 배합 사료 내 성장 촉진용 항생제 사용의 금지되었다.

최근, 식품에 대한 소비자의 기호와 양적인 면에서 질적인 면으로 전환되고, 식품의 안전성에 대한 소비자의 관심이 급증함에 따라 식육 내 항생제 잔류 문제에 대한 관심뿐만 아니라 기능성 제품에 대한 요구도 커지고 있어, 이러한 소비자들의 욕구를 충족시키기 위하여 천연물질을 이용한 무항생제 축산물에서 고기능성 축산물까지 다양한 제품이 선보여지고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, 병원성 미생물의 감염예방과 성장을 촉진시켜줄 항생제를 대체할 물질에 대한 관심이 증가하고 있다.

본 연구에서는 산란계 및 육계를 대상으로 일반 사료에 유청단백질, 키토산 및 핵산을 기질로 하는 유기태 미네랄류를 기존 사료에 함유되어 있는 농도 대비 혼합하여 섭이시킨 유기태 미네랄 강화 사료류의 성장특성, 유산균 증폭 효능 여부, Synbiotic형 Prebiotic 효능 보유등과 계란의 품질과 미네랄류 및 면역글로브린 고함유 기능성 계란 생산능력 보유 여부 특성을 비교 평가하였다.

결과로서, 축산 현장에서 무기태 이온류를 대체할 수 있으면서 현장 애로점을 해결 (항질병 및 고품질 축산물 생산 등) 을 유기태 미네랄 강화사료가 해결 할 수 있으며, 또한 유기태 미네랄별로 기능성이 긍정적인 다양성을 보이는 유의적인 결과를 확인 하였다.

따라서, 최근 국내외 영양학자들의 무기태 미네랄의 단점 (독성, 생체 흡수능 저하, 분변으로 인한 환경오염 유발 등) 해결형 유기태 미네랄 강화 소재류 개발과 이의 제품화에 있어 당사는 국제적으로 기술 우위를 선점하였다 할 수 있으며, 관련 산업분야의 연구개발 방향에 있어 기초 방향을 제시 하였다.

다. 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 개발 및 현장매뉴얼 정립

국내외 양계농장에서 살모넬라 감염증은 가금티푸스, 추백리가 대표적이며 이들 질병은 개발도상 국가에서 만연하고 있는 후진적인 질병으로서 아직까지도 빈번히 국내에서도 발

생하고 있다. 특히 가금티푸스는 폐사율이 90% 이상의 치명적인 질병으로 전국 양계농장의 70%가 원인체인 *Salmonella enterica* serovar Gallinarium (*S. Gallinarium*)에 오염되어 있는 것으로 파악되어 국내 양계산업의 기반을 위협하고 있는 실정이다. 또한 살모넬라 감염증은 대표적인 인수공통전염병의 하나이며, 오염된 달걀과 계육을 통해 사람에게 감염되며 사람에서 장염 및 장티푸스를 유발하는 중요한 세균성 질병이다.

동물과 사람에서 감염을 일으키는 *Salmonella* spp.는 운동성을 갖는 그람 음성 간균으로서, 숙주의 탐식세포 및 비탐식세포 내에서 증식이 가능한 세균이기 때문에 항생제로서 치료가 상당히 어려운 대표적인 난치성 질병 중 하나이다. 또한 항생제의 오남용으로 발생한 약제내성으로 *Salmonella* spp.는 공중보건학 측면에서도 심각한 문제가 되고 있다.

양계장의 살모넬라 감염증은 대표적인 난계대 감염 질병으로서 질병의 근절을 위해서는 항생제의 투여 보다는 청정한 계군 관리가 필요하기에 이를 위한 양성 계군의 적발과 도태를 위해서는 많은 비용과 노력이 필요하다. 또한 사람에게 식중독을 유발하는 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*. 등은 오염된 계육을 매개로 셀러드나 야채에 교차 오염될 가능성이 크기 때문에 근본적으로는 양계농장에서 이러한 세균에 닭이 감염되지 못하도록 하는 것이 최선의 요구이다. 또한 양계장의 살모넬라 감염은 오염된 사료에 기인하기 때문에 철저한 HACCP 관리를 통한 사료 매개성 살모넬라 오염을 최소화 시켜야 한다.

스트렙토마이신을 병아리 사료에 첨가했을 때 증체율이 개선되었다는 보고 이후 가축 생산성 개선을 위해 현재까지 가축 사료에 항생제가 첨가되고 있다. 특히, 사료 내 항생제 첨가는 질병 예방 및 치료의 효과뿐만 아니라, 사료효율 개선의 효과를 얻을 수 있다. 그러나 사료에 첨가되는 항생제로 인한 항생제 내성 문제는 세계적으로 보고되고 있으며 항생제 내성균의 뿐 아니라 축산식품 내 잔류에 의한 인체의 항생제 내성에 대해서도 우려되고 있다. 으므로 (Solomons, 1978), 멀지 않아 전 세계적으로 사료 내 항생제의 첨가가 전면 금지 될 것이다. 우리나라에서도 이미 1998년부터 '식육 중 잔류물질 검사요령 (NRP National Residues Program)' 을 제정하여 현재까지 운영한 이래 2012년부터 사료 내 항생제 첨가가 금지되었다.

현 시점에서 항생제를 대체할 수 있는 물질을 개발하는 것이 축산업계의 당면 과제이며 항생제 대체제 개발을 위해 기존의 사료원료에 대한 기능성 연구는 물론이고 다양한 동식물 자원에까지 그 영역이 확대되고 있다. 항생제의 사료첨가는 장내 소화 장애의 방지, 사료효율 개선, 질병 예방 및 동물성장 촉진 등의 효과가 있으며, 이와 같은 기능을 대체하기 위한 항생제 대체제로 고효율 미네랄제 (highly available minerals), 유기산제, 올리고당 (prebiotics), 생균제 (pro biotics), 효소제 (enzymes), 천연약용식물 등과 같은 천연 생리활성물질 (natural bioactive materials) 등이 활용되고 있다.

위에서 언급한 물질들을 (특히 천연약용식물) 직접 동물용 사료 첨가제로 활용하는 것은 경제적으로 그 효용가치가 매우 낮다고 할 수 있으며, 이를 보완하기 위해서 기능성 미네랄을 이용한 사료를 개발하여 부가가치 향상시키는 사료를 개발하여 양계농장에 적용 하였다.

본 과제와 직접적으로 연관되는 부분으로서는, 유기태 기질인 키토산 자체를 가축사양에 적용한 예와 보고는 많으나, 이외의 기질인 유단백질류 및 핵산류를 적용한 예는 없으며, 여기에 유기태 기능을 탑재하여 미네랄을 도입함에 있어 기능성 (항질병, 면역증진, 기능

성 축산물 등)을 부여한 신규한 미네랄 강화 사료첨가제로 개발 및 제품화된 예는 국내외적으로 현재 없다.

라. 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산

국내 양계산업은 대외 경쟁력에 있어 여러 가지 문제점을 지니고 있다. 무엇보다 양계농장의 규모가 90년대 이후 대형농장으로 증가하는 양적, 질적인 팽창에도 불구하고 출하체중과 출하연령에 있어서는 미국, 일본 등 선진국에 비하여 경쟁력이 떨어지고 있다.

국내외 육계는 30일에서 45일을 사육 과정을 거쳐 출하체중이 1.5 kg 전후로서 일본 2.2 kg, 미국 2.0 kg대만 2.3 kg에 비하여 매우 낮은 수준이다. 이러한 요인은 난계대 감염증과 낮은 부화율 그리고 낮은 병아리의 생존율과 같은 질병에 대한 적절한 관리가 이루어지지 못한 위생관리의 허점을 통한 악순환으로 생산성 저해요인이 되고 있다. 따라서, 국내 양계산업의 대외 경쟁력을 확보하기 위해서는 질병예방기술을 개선을 통한 생산성을 향상 방안이 절실히 요구된다.

국내에서는 가금류의 질병을 예방하기 위하여 백신이나 항생제를 사용하고 있으나, 백신이나 항생제를 장시간 투여 시 발생하는 생물학적 변이와 항생제의 내성균주가 출현하여 또 다른 종류의 백신이나 항생제를 사용하여야 됨으로 약품비가 증가와 방역대책의 한계가 되고 있다. 그러므로 현재와 같이 항생제에 의존하는 수동적인 질병 치료의 개념과 예방기술로서는 질병의 근절은 물론 양계산업의 경쟁력 확보도 어려운 실정이다.

미국과 유럽 등 양계 선진국에서는 항생제를 사용하지 않고 유용미생물과 같은 생물학적 제제를 이용하여 항생제 사용을 줄여가면서 생산성을 높이고 계육의 안전성을 확보하는 기술을 실용화하고 있다. 국내에서도 유용미생물과 천연물질을 이용한 기술을 적용하여 양계산업의 생산성을 향상시킴으로써 국제 경쟁력을 확보하여야 될 것으로 판단된다.

최근 소비자들의 청정 축산물에 대한 요구 조건과 함께, 각국의 항생제 사용에 대한 규제 조건의 강화, 세계화의 가속화로 축산물의 국제교류가 활발해지는 현시점에서 친환경적인 기술의 개발 및 도입은 국내 양계산업이 생존에 기술적 대안으로 선택되어야 할 것으로 판단된다.

최근 친환경 사양 기술의 일환으로 항생제를 대체 할 수 있는 천연 생리 활성 물질을 활용한 다양한 시도가 진행되고 있다.

본 연구에서는 유기태화 미네랄 소재류를 이용한 기능성 고급브랜드 계육 (우리맛닭) 대량생산시스템 정립 및 제품화를 위해 육계 생산성 (성장) 증진 및 육질을 분석을 실시하고자 하였다.

유기태 기질별 제조된 OCHT (키토산 기질) 계열 1종 및 WPS (유청단백질 기질) 계열 1종 그리고 HAC (핵산 기질) 계열 유기태화 미네랄 소재류 2종을 후보군으로 선발 (시험명 : CaFe-GMP, CaFe-IMP, Ca-WPS과 Fe-OCHT) 후 현장 평가결과, 항질병 효능, 장 건강, Synbiotic 형 Prebiotic 효능, 성장능력, 도체특성 및 육질 등의 무항생제 사육수준의 효과를 보였다. 이러한 결과는 유기태 미네랄 소재류 및 제품화에 있어 국내외적으로 선점화 하였다 할 수 있다.

본 과제와 직접적으로 연관되는 부분으로서는, 유기태 기질인 키토산 자체를 가축 사양에 적용한 예와 보고는 많으나, 이외의 기질인 유단백질류 및 핵산류를 적용한 예는 없으

며, 여기에 유기태 기능을 탑재하여 제조한 유기태 미네랄의 육계의 생산 및 출하 전과정에서 단계별 필요한 기능성 (항질병, 면역증진, 기능성 축산물 등)을 보이는 제품의 출시에는 국내외적으로 현재 없다.

마. 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구

Glycomacropeptide(이하 GMP)는 안전식품인 우유를 원료로 치즈를 제조하고 남은 부산물인 유청단백질에서 분리 및 분말화 과정을 거쳐 생산 및 국내외적으로 식품 및 식품첨가물로 판매되고 있다. GMP는 우유 속 단백질의 일종인 κ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 의미하며, 생산 방법에 따라 당과 인의 함량에 차이를 가진다고 한다.

GMP는 *Vibrio cholera*와 *Escherichia coli*의 enterotoxins과 부착하는 능력을 가지고 있고 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진하며, 박테리아와 바이러스의 장기와의 접촉을 억제하는 효능을 가지고 있다[2]. 또한 chymosin에 의하여 κ -casein의 phenylalanine-methionine peptide bond가 절단되면 친수성의 GMP가 유리되는데, N-acetylneuraminic acid(Sialic acid), galactose(gal), N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있는데 이때 말단에 위치한 Sialic acid를 자르는 효소를 neuraminidase라고 한다.

Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다. Sialic acid는 우리 몸 속의 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고, 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 밖에도 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거에 역할을 한다고 알려져 있어 현재 기능성 식품으로 연구되어지고 있다.

Sialic acid는 현재 대부분 재조합 *E. coli*에서 합성되거나 *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로 부터 합성되며 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다. Sialic acid는 대부분 의료용 소재로 활용되고 있으며 유청단백질에서 분리한 Sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다.

본 연구에서는 식품첨가물로 사용되고 있는 유청 단백질의 일종인 GMP내 결합되어 있는 Sialic acid를 식품으로서 활용성을 높이기 위하여, 효소분리 과정을 거쳐 시험물질인 “유청가수분해단백분말”을 제조하였다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다 할지라도 소재에 대한 안전성자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 특히 Sialic acid를 효소 분리 시켜 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나 식품공전이나 기능성식품공전에 등록을 위해서는 식약처가 정한 “건강기능식품개발과정”에 따른 자료가 필수적이다.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류 (일반과제) 에 해당	

8. 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		D-11	
<p>본 과제 결과물의 사업화를 위하여, [(주)메디뉴트롤, 2015. 10. 02.]을 신규 기술창업에 따라 자체 및 법정 이행규정에 따라 생산 공장 및 기업부설연구소의 인원에 대하여, 다음의 법정규정에 따라 안전 관리 및 감독기관의 감수를 진행하였다</p>			
<p>1. 기술적 위험요소 분석</p> <p>연구실 안전 환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진 실시, 보험가입 등) 및 당해 연구 개발사업 수행 시 필요한 연구실 안전 교육을 사규에 준하여 실시하였다.</p>			
<p>2. 안전관리대책</p> <p>가. 안전(관리감독자 교육): 대한산업안전협회(년 1 회)</p> <p>나. 환경(환경실무자 교육): 환경보건협회(년 6 회)</p> <p>다. 가스(법정교육): 가스안전공사(년 1 회)</p> <p>라. 화학약품(법정교육): 소방안전협회(년 1 회)</p>			
<p>3. 점검사항</p>			
구 분	점 검 분 야	중점 점검 사항	비 고
자 체	○담당자별 점검	○ 공조/ 유틸리티 장비 ○ 유틸리티배관, 폐수처리장	일일
	○안전관리팀 합동	○ 고압가스 사용 및 관리상태 ○ 화학약품 사용 및 관리상태	매월, 안전점검의 날 관련
	○야간 및 휴일	○ 시설운영상태	일일

		○ 24시간 가동장비 운영상태	
	○비상대응 훈련	○ 안전시설 시험동작 및 대피훈련	년 2회
외부전문 기관	○위험시설 안전진단	○ 실험실 안전관리 상태 ○ 가스 및 약품 안전관리상태	년 2회
	○안전검사 ○정기 및 자율검사 ○수시검사	○ 호이스트, 압력용기 안전검사 ○ 고압가스저장시설 안전관리상태 ○ 위험물옥내저장소 안전관리상태	2년 1회 년 5회 년 2회

4. 이행실적

- 연구실 안전점검 정기적 실시 : 연구실의 기능 및 안전을 유지 관리하기 위하여 안전점검지침에 따라 연구실에 관한 안전점검을 정기적으로 실시하였다.
- 참여 연구원의 안전관련 교육훈련 시행: 산업안전보건법 제31조 (안전보건교육) 및 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제 18조에 의거, 전 직원에 대한 안전보건교육을 매달 실시하였다. 교육 방법은 모든 직원에 대한 자체교육을 실시하고, 안전보건교육 일지를 작성하여 관리 하였다.
- 연구 내용 및 결과물 안전교육 : 정기적으로 인원 및 시설 보안 항목, 문서보안 항목 그리고 정보보안 항목의 보안점검을 실시하여 연구 내용 및 결과물의 안전을 확보하고 있다. 참여 연구원들을 대상으로 연구 결과의 안전한 관리를 위한 안전교육을 실시하였다.
- 연구실 안전 교육 : 참여 연구원들이 안전관련 각종 법규, 규정 및 지침을 준수하도록 하며, 요구되는 안전교육 및 훈련 실시와 실험에 관련된 위험 정보를 숙지하고 적절한 개인 보호 장비 착용 실험실에 노출된 위험을 안전관리책임자에게 보고, 연구실의 잠재되어 있는 위험성 발견 및 위험물질과 각종 실험장비 등 사용에 따른 안전수칙이 잘 이행될 수 있도록 지도점검 및 교육을 실시하였다.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	키토산올리고당에 혼합된 유기태화 철 (Fe-OCHT)과 유청단백 분말에 혼합된 유기태화 칼슘(Ca-WPC) 섭취가 산란계 계란 품질에 미치는 영향	한일바이 오메드	교신 저자	J. of Chitin & Chitosan		2014.09.30.	단독	비SCI
2	논문	농도 Ca, Zn, Se-유기태화 키토산올리고당 소재가 산란계 계란 품질에 미치는 영향 비교	한일바이 오메드	교신 저자	J. of Chitin & Chitosan		2014.09.30.	단독	비SCI
3	논문	chitosan을 기질로 하는 설사치료 천연항생제 개발(I.장독소 대장균증 자돈설사 치료효과 연구)	한일바이 오메드	교신 저자	J. of Chitin & Chitosan		2016.03.28.	단독	비SCI
4	논문	chitosan을 기질로 하는	한일바이	교신	J. of Chitin		2016.07.08.	단독	비SCI

		설사치료 천연항생제 개발(I.장독소 대장균증 자돈설사 치료효과 연구)	오메드	저자	& Chitosan				
5	논문	키토산을 기질로 하는 설사사치료용 천연항생제 개발(III.Chitosan Oligosaccharide의 지속적처리가 대장균의 내성형성에 미치는 영향평가	한일바이오메드	교신저자	J. of Chitin & Chitosan		2016.06.30.	단독	비SCI
6	논문	효소분리로 7% Sialic Acid가 표준적으로 함유된 유청가수분해단백분말(7%)의 랫트를 이용한 90일 반복경구투여 독성시험 평가 연구	한일바이오메드	교신저자	한국유가공기술학회지		2016.07.08.	단독	비SCI
7	논문	효소분리로 7% Sialic Acid가 표준적으로 함유된 유청가수분해단백분말의 미생물복귀돌연변이시험 연구	한일바이오메드	교신저자	한국유가공기술학회지		2016.07.08.	단독	비SCI
8	논문	효소분리 용매정제로 고농도 Sialic Acid가 함유된 유청가수분해단백분말(23%)의 랫트를 이용한 90일 반복경구투여 독성시험 평가 연구	한일바이오메드	교신저자	한국유가공기술학회지		2016.07.08.	단독	비SCI
9	논문	효소분리 및 용매정제법으로 제조한 고농도 Sialic Acid(23%)가 함유된 GMP 가수분해분말의 마우스 골수세포의 소핵시험을 이용한 안전성 평가연구	한일바이오메드	교신저자	한국유가공기술학회지		2016.07.08.	단독	비SCI
10	논문	효소분리 및 용매정제법으로 제조한 고농도 Sialic Acid(23%)가 함유된 GMP 가수분해분말의 미생물복귀돌연변이시험 연구	한일바이오메드	교신저자	한국유가공기술학회지		2016.07.08.	단독	비SCI
11	논문	무기태 칼슘 대체제로서 키토산올리고당 기질-유기태 칼슘(Ca-OCHT)섭이에 따른 산란계 계란 품질변화	한일바이오메드	교신저자	J. of Chitin & Chitosan		2015.08.31.	단독	비SCI
12	논문	무기태 철 대체제로서 키토산올리고당 기질-유기태 철(Fe-OCHT)섭이에 따른 산란계 계란 고품질 생산성 연구	한일바이오메드	교신저자	J. of Chitin & Chitosan		2014.09.30.	단독	비SCI
13	논문	Chitosan을 기질로 하는 설사 치료 천연항생제 개발(II. 말 분변에서 분리된 다제내성 대장균에 대한 철-키토산 유기태화 제제(Fe-OCHT)의 항균효능	한일바이오메드	교신저자	J. of Chitin & Chitosan		2016.03.28.	단독	비SCI
14	논문	키토산올리고당 기질-유기태 아연(Zn-OCHT)섭이에 의한 산란계 계란 고품질 생산성연구	한일바이오메드	교신저자	J. of Chitin & Chitosan		2016.4.22	단독	비SCI
15	논문	Anti-Helicobacter pylori effect of sialic acid derivates <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	한일바이오메드	참여저자	Journal of Gastroenterology	2.81	ESPS (Manuscript No. :28260)	단독	SCI
16	논문	Guanosine	5' 한일바이오	교신	Journal of	1.076	게재중	단독	SCIE

		-monophosphate-chelated Calcium and Iron Feed Additives Maintains Egg Production and Prevents Salmonella Gallinarum in Experimentally Infected Layers	메드	저자	Veterinary Science		(Submission No. 16468)		
17	논문	Anti-bacterial effects of enzymatically-isolated sialic acid from glycomacropeptide in a Helicobacter pylori-infected murine model	한일바이오 메드	교신 저자	Nutrition research and practice	1.416	게재중 (Submission No.NRP16061)	단독	SCIE
18	논문	Growth performance and immune response of organic trace minerals in layers	한일바이오 메드	참여 저자	Journal of Veterinary Science	1.076	게재중 (Submission No.)	단독	SCIE
19	논문	Genotoxicity study of Glycopeptide(G-7%NANA) form whey.	한일바이오 메드	참여 저자	Toxicological research	0.181	게재중 (Submission No.)	단독	SCIE
20	논문	Repeated Dose- 90 days Oral Toxicity test of G-7%NANA in Rats: New application of criteria for toxicity decision to test article-induced changes	한일바이오 메드	참여 저자	Regulatory Toxicology and Pharmacology	2.227	게재중 (Submission No.)	단독	SCIE
특허출원/등록									
1	특허 등록	유기태화 셀렌 강화 글라이코마크로펩타이드 가수분해물의 비가열 제조방법 (10-1631692)	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2016.06.13.	단독	
2	특허 출원	유기태화 셀렌 강화 글라이코마크로펩타이드 가수분해물의 비가열 제조방법(등록 대기중)	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2014.12.03.	단독	
3	특허 출원	유기태화 미네랄 및 핵산복합체의 제조방법(등록 대기중)	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2014.10.13.	단독	
4	특허 출원	핵산을 촉매로 하는 유기태화 미네랄 강화 유단백질 제조방법 (등록 대기중)	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2014.10.28.	단독	
5	특허 출원	헬리코박터균 제균형 유기태화 미네랄 강화 글라이코마크로펩타이드 가수분해물의 제조방법 (등록 대기중)	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2014.12.04.	단독	
6	특허 출원	유기태화 칼슘 강화 글라이코마크로펩타이드 가수분해물을 유효성분으로 하는 헬리코박터 파이로리 감염예방 및 치료용 조성물 및 그 제조방법(등록 대기중)	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2015.05.08.	단독	
7	특허 출원	유기태화 미네랄 강화 글라이코마크로펩타이드 가수분해물의 신규제조방법	한일바이오 메드	출원인	대한민국		2015.03.29.	단독	
8	특허	유기태 미네랄 및 핵산	한일바이오	출원인	대한민국		2015.08.11.	단독	

	출원	복합체의 제조방법(분할 특허)	오메드						
9	PCT 출원	Preparation method for organic mineral and nucleotide complex	한일바이 오메드	출원인	PCT/미국		2015.10.08.	단독	
10	PCT 출원	Preparation method for milk protein with high cont of organic mineral using nucleotides as an catalalyst	한일바이 오메드	출원인	PCT/미국		2015.10.27.	단독	
11	특허 출원	칼슘을 촉매로 이용한 수불용성 유기태 미네랄 및 핵산복합체의 생산수율증대방법	한일바이 오메드	출원인	대한민국		2016.08.17.	단독	
기타(보고서)									
1	기타 (보고서)	유청가수분해단백분말시료(지표 및 기능성분 : Sialic acid) 표준분석법 정립연구(Validation) 보고(호서대 VA16H0721)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2016.06.30.	단독	
2	기타 (보고서)	헬리코박터 파이로리 감염예방 및 치료형 물질 개발 (R-0001-26932)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.07.30.	단독	
3	기타 (보고서)	유청가수분해단백의 랫드를 이용한 단회경구투여 독성시험 (15-SDOT-001)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.04.27.	단독	
4	기타 (보고서)	유청가수분해단백의 랫드를 이용한 28일 반복경구투여 DRF독성시험 (15-NREO-001)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.04.27.	단독	
5	기타 (보고서)	유청가수분해단백의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 (15-GTT-MCA-001)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.04.27.	단독	
6	기타 (보고서)	유청가수분해단백의 랫드를 이용한 90일 반복경구투여 독성시험 (15-REO-002)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.12.03.	단독	
7	기타 (보고서)	유청가수분해단백의 미생물복귀돌연변이시험 (15-GTT-RMT-001)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.04.30.	단독	
8	기타 (보고서)	유청가수분해단백의 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험 (15-GTT-MNT-001)	한일바이 오메드	참여 저자	대한민국		2015.04.30.	단독	
기타(인증, 제품등록)									
1	기타 (시작품)	유기태 미네랄 원료식품 품목등록[제품명 : 철-유청분말]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.17.	단독	
2	기타 (시작품)	유기태 미네랄 원료 식품 품목등록[제품명 : 철-키토산올리고당]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.17.	단독	
3	기타 (시작품)	유기태 미네랄 원료 식품 등록[제품명 : 아연-키토산올리고당]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.17.	단독	
4	기타 (시작품)	유기태 미네랄 원료 식품 등록[제품명 : 칼슘-키토산올리고당]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.17.	단독	
5	기타	태미네랄 식품등록	한일바이	자체	대한민국		2014.07.17.	단독	

	(시작품)	[제품명 : 구리-키토산 올리고당]	오메드	사업					
6	기타 (시작품)	유기태 미네랄 원료 식품품목등록[제품명 : 칼슘-키토산올리고당]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.17.	단독	
7	기타 (시작품)	사료성분등록 [제품명: Well-P-Farm]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.17.	단독	
8	기타 (시작품)	기능성 식품원료품목등록[제품명 : 유청가수분해 단백분말]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.04.27.	단독	
9	기타 (시작품)	유기태 미네랄 원료 식품품등등록[제품명 : 철-키토산올리고당 3]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.10.21.	단독	
10	기타 (시작품)	유기태 미네랄 소재 식품품등등록[제품명 : 철-키토산올리고당 2]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.10.21.	단독	
11	기타 (시작품)	유기태 미네랄 소재 식품품등등록[제품명 : 철-키토산올라고당 1]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.10.21.	단독	
12	기타 (시작품)	사료성분등록[제품명 : EPECTROL 3(L)]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.12.09.	단독	
13	기타 (시작품)	사료성분등록[제품명 : EPECTROL3(P)]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.12.09.	단독	
14	기타 (시작품)	사료 성분 등록 [제품 명 :EPECTROL3(액상)]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2016.01.20.	단독	
15	기타 (시작품)	사료성분등록[제품명 : 메디프리바이오 2]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2016.07.19.	단독	
16	기타 (시작품)	사료성분등록[제품명 : 메디프리바이오 1]	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2016.07.19.	단독	
1	기타 (전시회)	VIVASIA2015(태국)	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2015.03.13.	단독	
2	기타 (전시회)	제12차 세계한상대회(한국)	한일바이 오메드	자체 사업	대한민국		2014.07.15.	단독	

○ 추후 진행사항

- 특허의 경우는 특허출원 성과는 달성하였으며, 등록(목표 5종)에 있어 1종은 등록이 완료되었으나 4종이 현재(2016. 07.15. 기준) 등록대기상태에 있음. 이는 당해연도에 등록이 완료될 것임. 따라서, 성과는 년차별 “연구결과 활용보고서” 제출시 제시예정임(종료).
- 논문의 경우, 비SCI(목표 12건, 달성 12건)은 게재 완료되었으나, SCI부분에서 목표(6건) 대비 1건이 게재가 완료 되었으면 나머지 5건은 게재 심사가 진행중이며, 당해연도(2016. 11.~12월)에 완료예정임. 이는 당해연도에 등록이 완료될 것임. 따라서, 관련 성과는 년차별 “연구결과 활용보고서” 제출 시 제시 예정임(종료).

11. 기타사항

D-13
<p>가. 기술이전 및 자체 사업화를 위한 신규창업 (기업부설연구소 포함)</p> <p>본 과제의 성과물은 국내외 판매를 실시할 예정이며, 초기부터 국내 내수보다는 해외수출에 치중할 예정임에 따라 생산시설이 절대적으로 필요하다. 이를 해결하기 위하여 다음과</p>

같은 준비를 완료하였다.

- 1) 개발제품(Product)류의 안정적인 생산 문제 해결을 위하여, “(주)메디뉴트롤사”를 신규창업(사업자등록번호 410-87-02166. 2014.10. 29)과 기술이전 및 자체 사업화를 실시 할 수 있는 기반 시설을 완료하였다 (농기평 보고 완료).
- 2) 신규 창업 후 신속하게 총 35억의 투자유치를 받아 2,000평 규모의 제 1 생산 공장을 신축하였으며, 추후 본 과제와 관련된 제품류의 국내외 판매 사업화가 확대시 제 2 공장을 준공 예정이며, 시설장비 및 건축면적은 제 1 공장과 동일하게 셀링 예정임에 따라 총 35억의 추가 시설자금이 투자될 예정이다 (Fig 1).
- 3) 본 연구기간을 포함한 장기간의 천연물 응용기술 개발 KNOW-HOW와 이를 연계한 사료 및 관련 분야와 용도용법 확대연구를 진행할 수 있는 연구진 및 관련 인프라 확보 및 활용을 통한 장기적 R&DB 연구기반 시설로서 기업부설연구소를 준공 한 후, 이를 미래창조과학부로부터 인정과정을 거쳐 한일바이오메드 (제 2016110695호, 2016.02.05.)와 (주)메디뉴트롤 (제 2016.11631호., 2016. 02.03.)별로 확보 하였다 (Fig 2).

나. 제품류 생산 및 판매허가 등록

생산 공장 신축 및 공장 등록 후 제품류 생산 및 판매를 위한 식품첨가제 및 사료로 구분하여 다음과 같이 완료하였다.

- 1) 유기태 미네랄 소재류의 사료첨가제로 생산 및 판매를 위한, 배합사료 제조업 등록 (제 6460000-502-0031., 2015. 11.12., 전남도지사)을 완료하였다 (Fig 3).
- 2) 유기태 미네랄 소재류의 식품첨가제로 판매를 위한, 제조 및 영업등록 (제 2015-052715호., 2015. 10.20., 영광군수)을 완료하였다 (Fig 3).

다. 제품등록

1) 식품첨가제 부분

유기태 미네랄 소재류 제조 후 이를 식품첨가제로서 등록을 하였으며, 키토산을 기질로 하는 6종과 유청단백질 3종과 헬리코박터용으로 제조된 1종으로 총 10종을 완료 하였다 (Fig 4, 5).

2) 사료첨가제 부분

가) 현장 유효성 평가를 거쳐 유기태 미네랄 소재류중 양계 (산란계 및 육계 공통) 현장의 만성적 질병인 살모넬라증 감염 예방형 사료첨가제로 제품등록을 2종을 완료하였다 (Fig 6).

나) 현장 유효성 평가를 거쳐 유기태 미네랄 소재류중 양계 (산란계 및 육계 공통) 현장의 만성적 질병인 대장균증 감염 예방형 사료첨가제로 제품등록을 4종을 완료하였다 (Fig 7).

라. 제품류 생산 계획

유기태 미네랄 소재류 및 이를 적용한 제품류 생산은 식품첨가제와 사료첨가제로 구분하고, 성상으로는 분말형과 액상형으로 이원화 체계로 생산 및 판매 사업을 진행예정이다.

- 1) 분말형 식품첨가제의 제조 및 판매는, 식품첨가물로 허가된 무기태 미네랄류를 원료로 단일 및 다종 미네랄 보유형 유기태 미네랄 소재류를 제조한 후 식품첨가제 그리고 사료첨가제 원료로 전용(허가기관 승인, 전남도 축산과)하여 제품화할 계획이다.
- 2) 배합사료로서 제품화를 위하여, 사료첨가제용 무기태 이온류를 전문 배합회사인 (주)이노바텍 (전북, 정읍) 에 OEM 생산(제품명 및 기술제공 : 주관사 확보)토록 하여 확보한 후, 당사 생산 공장에서 유기태 미네랄 소재류를 제조한 후 이를 사료첨가제로 판매할 예정이다.
- 3) 유기태 기질의 확보 계획으로서 유청단백질은 (주)매일유업 천안공장(한국), 키토산은 (주)YBBio(한국)과 핵산은 CJ제일제당(한국)에서 구입하여 사용 할 예정이다.
- 4) 당사의 분말형 제품류의 생산 능력은 10톤(8시간 조업/일/1종 기준)이며, 액상형의 경우는 단일 제품별 1일(8시간 조업기준) 생산량은 80톤의 생산능력을 보유하고 있다. 따라서, 본 연구를 통해 생산되는 제품류에 대하여 단기적인 차원에서 국내외 판매 사업화에 있어 중요조건인 수출물량 준비와 물량납기에 있어 전혀 문제가 없다.

마. 국내외적 경쟁구조 분석

- 1) 무기태 이온의 단점 (독성 보유, 생체흡수능력 저하, 환경오염 유발 등)을 해결할 수 있는 대안으로서, 유기태화 소재류를 개발하려는 연구가 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있으나 현재 직접적으로 비교되는 제품화 결과는 세계적으로 없다.
- 2) 대표적인 국내외적 경쟁사는 울텍 (미국)이 될 것으로 예상되며, 주요 예상 고객군은 국내외적 무기태 미네랄류를 관련 산업에 공급하는 영업특성을 보유하고 있다.

바. 판매전략

- 1) 주관기관은 개발 제품별 국내외 판매사업을 진행할 예정이며, 판매비율을 해외 9 대비내수 1의 비율로 사업화를 진행할 예정이다.
- 2) 현재, 주관기관은 국내외 134기업체[외(메이저급) : 115업체, 국내 18개업체]의 후보 판매처를 보유하고 있으며, 해당국과의 당사의 제품개발 현황과 추후 제품판매 일정에 대한 사전 협의를 차근차근 진행하고 있다. 또한, 본 과제와 관련하여 제품개발 진행과정 또한 해당국별 벤더들이 충분히 인지하고 있으며, 관련한 국내외 판매 전략은 다음과 같다.

가) 국내는 가금류를 포함한 축종별 시장과 관련 용도용법 확대형 시장으로 구분하고 각각 분야의 전문 업체를 선정하여 독점권을 부여하는 판매방법으로 진행 예정이다. 즉, 가금류 시장을 우선으로 런칭 후 다음으로 축종별로 확대 하고, 용도·용법 확대형 관련시장으로 확대를 통하여 수익창출을 도모할 것이다.

나) 사업화간 BM 목표는 다음과 같다.

- (1) 자체사업화 :유기태 소재류 및 제품류 국내판매 및 해외수출(현장생산시스템 포함)
- (2) 판매순위 : 1 순위(축수산 분야), 2 순위 (농업분야), 3순위 (건기식 및 식품원료)
- (3) 건기식 및 식품분야 런칭 부분 : 추후진행(개별인증 획득후)
- (4) 판매방법 : 국내외 구분, 지역별 벤더지정(판권계약)
- (5) 판 매 처 : 국내외 순위에 준한 메이저급 회사
- (6) 농가수익증대 : 미네랄 강화 농산물(연구결과 도출시, 현장적용기술 무상이전)

다) 해외 수출형 판매 전략은 다음과 같이 진행할 예정이다.

- (1) 1 Step : 국적별 수출바이어 선정(지속적 발굴)
 - 현재 국내외 바이어 134개업체 확보 및 운영중
- (2) 2 Step : 바이어와 대상 제품선정
- (3) 3 Step : 선발 제품의 현장유효성 평가(신뢰확보)
- (4) 4 Step : 국내초청(현장 방문) 혹은 대상국 방문협의
- (5) 5 Step : 해당국별 목표 제품별 제품등록허가 절차 확인
- (6) 6 Step : 해당국별 특허출원 절차 진행
- (7) 7 Step : 해당국별 등록 서류 전달 및 허가 획득
- (8) 8 Step : 수출사업화 개시

라) 해외시장(또는 고객) 발굴을 위한 정보수집 활동 계획은 다음과 같다.

- (1) 개발 제품류의 판매전략은 해외수출주도형(국내 1: 해외 9)으로 진행될 것임에 따라 해외시장(또는 고객) 발굴을 위한 정보수집 활동 계획은 매우 중요하다.
- (2) 개발 소재 및 제품에 대한 마케팅 전략은 다음과 같다 (Table 1).
 - (가) 현재 확보된 국내외 바이어 지속적 관리와 이들을 통한 실질적 메이저급 구매자 추가 발굴 및 제품화 정보를 확보 한다.
 - (나) 국내외 전시회 참가(박람회)를 통하여, 농축수산 식품으로의 영역을 확대할 수 있는 관련 기자재 발굴 및 추가 고객 후보군 확보와 등급화 관리를 실시할 것이다.
 - (다) 현재 보유한 국내외 바이어군 및 추가 발굴 메이저급 바이어에 대하여 당사는 개발 제품류 지속적 자료제공 및 공동 브랜드화를 실시하고, 제품의 특성을 표현하는 브랜드를 구축한 후 이를 국내외 마케팅으로 연계할 예정이다. 또한, 국내외에서 정기적인 기술 세미나를 개최함에 의해 판매 확대형 차원으로 관계 산업의 연구원들에게 직접적인 정보를 제공할 것이다.
 - (라) 국내외 판매증진을 위한 On/Off 홍보활동으로서, 제품류의 개발결과를 제품판매에 활용예정이며, 이 경우 법적 등록 후, 온라인쇼핑몰, 파워 블로거들의 활용, SNS 활용 등을 통해 홍보 활동을 수행할 예정이다.

마) 성과물의 판매(영업)컨셉은 다음과 같다.

- (1) 사업화 제품 : 유기태 미네랄 소재류 및 제품류
- (2) 특징 : 무기태 대체형 기능성 유기태 미네랄 첨가제 제품
- (3) 사용방법 : 상용 무기태 미네랄과 동일
- (4) 제품판매단가 (기본) : 5천원/Kg(상용 제품 대비 동등성 확보)
- (5) 현장 기본 사용량 : 1Kg /사료 1톤내 기본혼합량
- (6) 제품경쟁력 : 본 과제 관련 제품류 국내외 연구개발 및 제품화 실적은 없으며, 따

라서 국내외적 기술우위를 점유하는 제품임에 따라 국내외 소비자 확보에는 문제가 없을 것으로 평가 된다 (Table 2).

사. 성과물 매출계획

본 연구의 전체 목표인 “기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립” 간 성과물에 대한 차후 사업화 계획 및 예상 매출실적은 다음과 같다 (Table 3, 4).

- 1) 단기적인 국내외 런칭은 국내 1 대비 해외 5의 비율에서 장기적으로는 1:9의 비율로 점진적으로 증가 시킬 것이다.
- 2) 성과물의 국내외 판매는 1 차년도는 기본 국내외 영업라인과 협의하여 제품 판매를 위한 해당국별 판매허가를 획득함에 주안점을 둘 것이다.
- 3) 실제적인 매출은 3 차년도를 런칭 단계로 하여 국내 약 30억과 해외 147억으로 안정 단계로 진입 후, 4 차년도 부터는 확대 및 정착단계로 진행예정이다 (Table 3).
- 4) 기능성 유기태 미네랄 강화사료와 건기식 식품의 경우는 국내외 경쟁업체중 올텍사(미국)가 유력하고, 이외에는 미미하기 때문에 국내외 2위업체로서 위치를 점유하게 될 것이다. 따라서, 국내(외) 시장 점유율을 3년차 2(0.1)%에서 8(1)%까지 도달할 수 있을 것으로 평가 되었다 (Table 4).
- 5) 성과물의 수출에 따른 수입대체 대체 효과는 판매액의 10% (유기태 미네랄 수입)에 해당되는데, 5년차 총 133억에 달하는 것으로 평가 되었다.
- 6) 성과물의 국내외 판매 사업화가 진행시, 5 년차 전체 경제적 파급효과는 2000억 그리고 부가가치 창출액은 133억에 이를 것으로 평가되었다.

Table 1. 해외시장(또는 고객) 발굴을 위한 정보수집 활동 디자인

구분	추진계획	비고
전시회 참가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내, 농축수산업용 기자재 관련 국제 박람회 참가 예정 ○ 국외, 관련 박람회에 지속적으로 참가 예정 ○ 당사 국내외 판매라인(134개업체)업체와의 지속적 정보 제공 	
공급·유통 채널 확보를 통한 판로 개척	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우선 수출국 선발(중국, 유럽, 대만, 태국, 필리핀) 개발제품 수출라인을 구축 ○ 정기적인 해외대리점 방문으로 신제품을 소개 ○ 지속적인 전시회 참가 등을 통해 국내외 거래처를 확장 ○ 당사는 개발제품의 브랜드화를 실시하고, 제품의 특성을 표현하는 브랜드를 구축한 후 이를 마케팅에 활용할 예정임 	
판매 전략	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외에서 정기적인 기술 세미나를 개최함에 의해 판매 확대형 차원으로 관계산업의 연구원들에게 직접적인 정보를 제공할 것임. ○ 개발 제품류의 개발결과를 제품판매에 활용예정이며, 이 경우 법적 등록 후, 온라인쇼핑몰, 파워 블로거들의 활용, SNS 활용 	
On/Off 홍보활동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 법적 등록 후, 온라인쇼핑몰, 파워 블로거들의 활용, SNS 활용 등을 통해 홍보 활동을 수행할 예정임 	

Table 2. 유기태 미네랄 소재류 및 제품류의 국내외 판매를 위한 단기적 메이저급 고객군 내역

주요수요처	국가명	예상 연간 수요량(개/년)	예상 총판매금 (천원)	비고
HYDRO Co.,	노르웨이	100,000	500,000	
Haifa Co.,	이스라엘	100,000	500,000	
NSI Co.,	벨기에	100,000	500,000	
Epsom Salt Pure Co.,	독일	100,000	500,000	
TEIKOKU Chemical Co.,	일본	100,000	500,000	
US Borax Co.,	미국	100,000	500,000	
Samatec SPA Co.,	이탈리아	100,000	500,000	
Mianyang Shinyiml Chemical Co.,	중국	100,000	500,000	
PREMEX	미국	100,000	500,000	
BEIZING ZKRZ AGR-SCI-TECHCL.Co	중국	100,000	500,000	
LO SHIH ENTERPRISE Co.,	대만	100,000	500,000	
OPTIVIT	필리핀	100,000	500,000	
Rx Nutrivet	방글라데시	100,000	500,000	
WELL CON Co.,	인도	100,000	500,000	
남해화학(주)	한국	50,000	250,000	
(주)영풍	한국	50,000	250,000	
고려화학(주)	한국	50,000	250,000	
동양화학(주)	한국	50,000	250,000	
덕산약품공업(주)	한국	50,000	250,000	
경기화학(주)	한국	50,000	250,000	
합계			8,500,000	

Table 3. 연구 종료 후, 사업화 성과물의 년차별 예상매출 실적 평가표

산업화 기준	구분	판매	년차별 기대효과(단위:백만원)					계	
			1차년도 (준비단계)	2차년도 (도입단계)	3차년도 (런칭단계)	4차년도 (확대단계)	5차년도 (정착단계)		
직접 경제 효과	메디프리 바이오 (기능성사료)	국내	120	360	720	1,440	2,880	5,520	
		국외	600	1,800	3,600	7,200	14,400	27,600	
	유기태사료류 (원료)	국내	120	360	720	1,440	2,880	5,520	
		국외	600	1,800	3,600	7,200	14,400	27,600	
	기능성계란	국내	100	300	600	780	1,014	2,794	
		국외	500	1,500	3,000	6,000	12,000	23,000	
	헬리코박트륨 (건기식)	국내	150	450	900	1,800	3,600	6,900	
		국외	750	2,250	4,500	9,000	18,000	34,500	
	소 계	국내	490	1,470	2,940	5,460	10,374	20,734	
		국외	2,450	7,350	14,700	29,400	58,800	112,700	
	경제적 파급효과			4,410	13,230	26,460	52,290	103,761	200,151
	부가가치 창출액			294	882	1,764	3,486	6,917	13,343
수입대체효과			294	882	1,764	3,486	6,917	686,466	
합 계 (백만원)			7,938	23,814	47,628	94,122	186,770	360,272	

<산출근거>

1. 직접경제효과산출 : 3차년도 기준작성

가. 메디프리바이오(사료첨가제)

1) 국내 : 1제품 (질병예방형 소재+고급브랜드육생산소재)=7.2억원

2) 국외 : 7.2억원/1개국x5개국(EU, 미국, 일본, 중국, 태국)=36억원

나. 유기태 사료류

1) 국내 : 7.2억원/메이저급 1개사/1년 (1 제품)=7.2억원

2) 국외:7.2억원/1개국x5개국(EU, 미국, 일본, 중국, 태국)=36억원

다. 기능성 강화란 시장

1) 국내 :600백만원 /메이저 1개사)=6억원

2)국외 :6억/1개국(지역판권)x5개국(EU, 미국, 일본, 중국, 태국)=30억원

라. 건기식품(헬리코박트륨)

1) 국내 : 국내 시장 1300억(1개사/1제품) x 0.35%(원료첨가율)=450백만원

2) 국외:4.5억/1개국(지역판권)x5개국(EU, 미국, 일본, 중국, 태국)=2,250백만원

마. 수입대체효과 : 직접효과 x 10%(미네랄 원료)

바. 경제적파급효과 : 직접효과 x 150%

tk. 부가가치 창출액 : 직접효과 x 10%

Table 4. 사업화 성과물의 현재 및 시장진출 단계에 따른 년차별 예상매출 실적 평가표

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-억원
			향후 3년간 매출	177억원
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	177억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 2 % 국외 : 0.1%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 2 % 국외 : 0.1 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		2 위

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	177	692
	시장 점유율	단위 (%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	2	8
		국외	-	0.1	1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 농업용, 속효성 및 완료성 유기태 비료류 개발 - 가금류외 축종 확대형 기능성 유기태 사료첨가제 - 의약품 및 의약품용 Synbiotic형 Prebiotic제품개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	17억	69.2억
	수 출		-	147억	588억



Fig 1 . 개발 Product의 장단기 연구기반시설 및 판매사업화를 위해 신축한 기업부설연구소(좌)와 제 1 생산 공장 (우) 전경



Fig 2 . 장단기 연구기반 시설 신축후 확보된 기업부설연구소 인정서
 (좌 : 한일바이오메드 부분., 우 : 신규창업 “(주)메디뉴트롤 부분)



Fig 3 . 유기태 미네랄 소재류의 식품 그리고 사료첨가제로 생산 및 판매를 위한 배합사료 제조업 등록(좌) 및 식품제조 및 영업등록증(우)

The image displays six identical copies of a 'Food Item Registration Form' (식품제조보고대장) for 'Organic Mineral Supplement' (유기태 미네랄 소재류). Each form is filled with specific product details. The forms are arranged in a 2x3 grid. Each form includes a header with the product name and manufacturer, followed by a table for registration details. The table contains fields for 'Product Name', 'Manufacturer', 'Production Date', 'Production Location', 'Production Method', 'Ingredients', 'Allergens', 'Nutritional Information', and 'Safety Information'. The forms are filled with specific data for the product, including the manufacturer 'Seoul Food Co., Ltd.' and the production date '2014-01-17'. The forms are also stamped with a red seal and a date stamp.

Fig 4 . 유기태 미네랄 소재류의 식품첨가제로 판매를 위해 식품품목 등재 내역



Fig 6. 유기태 미네랄 소재중 양계현장의 만성적 질병인 살모넬라증 감염예방형 사료첨가제로 제품등록된 2종 내역

[별첨: 08호(사)]
 등록번호: 3-LLBR004 호

사료 성분등록증

제조사: 조영제 등록번호:
 제조명: (주)대우농업 제조(등록)번호: 4870000-034-2019-0003
 소재지: 경기도 수원시 영통구 영통로4길 48-8
 소재지: 서울 (서울시/강동구/신천동/신천1로)
 소재지: 서울 소재지: 서울: SPECTROL3(원주)
 제조사: 대우 소재지: 서울: 대우농업
 등록명(등록명): SPECTROL3(원주)

소재지: 원주

성분명	비율(%)	비율(%)					
원주	0.2%	0.3%					

* 주가: 사료첨가제

사료첨가제 제12호제2항 및 같은 법 시행규칙 제12호제3항에 따라
 제조·유통·사용의 안전성을 증명합니다.
 2019년 01월 20일

영광인수

[별첨: 08호(사)]
 등록번호: 3-LLBR001 호

사료 성분등록증

제조사: 조영제 등록번호:
 제조명: (주)대우농업 제조(등록)번호: 4870000-034-2019-0003
 소재지: 경기도 수원시 영통구 영통로4길 48-8
 소재지: 서울 (서울시/강동구/신천동/신천1로)
 소재지: 서울 소재지: 서울: SPECTROL3(원주)
 제조사: 대우 소재지: 서울: 대우농업
 등록명(등록명): SPECTROL3(원주)

소재지: 원주

성분명	비율(%)	비율(%)	비율(%)				
원주	0.6%	0.31%	0.14%				

* 주가: 사료첨가제

사료첨가제 제12호제2항 및 같은 법 시행규칙 제12호제3항에 따라
 제조·유통·사용의 안전성을 증명합니다.
 2019년 12월 09일

영광인수

[별첨: 08호(사)]
 등록번호: 3-LLBR002 호

사료 성분등록증

제조사: 조영제 등록번호:
 제조명: (주)대우농업 제조(등록)번호: 4870000-034-2019-0003
 소재지: 경기도 수원시 영통구 영통로4길 48-8
 소재지: 서울 (서울시/강동구/신천동/신천1로)
 소재지: 서울 소재지: 서울: SPECTROL3(원주)
 제조사: 대우 소재지: 서울: 대우농업
 등록명(등록명): SPECTROL3(원주)

소재지: 원주

성분명	비율(%)	비율(%)	비율(%)				
원주	0.14%	0.18%	0.44%				

* 주가: 사료첨가제

사료첨가제 제12호제2항 및 같은 법 시행규칙 제12호제3항에 따라
 제조·유통·사용의 안전성을 증명합니다.
 2019년 12월 09일

영광인수

[별첨: 08호(사)]
 등록번호: 3-LLBR003 호

사료 성분등록증

제조사: 조영제 등록번호:
 제조명: (주)대우농업 제조(등록)번호: 4870000-034-2019-0003
 소재지: 경기도 수원시 영통구 영통로4길 48-8
 소재지: 서울 (서울시/강동구/신천동/신천1로)
 소재지: 서울 소재지: 서울: SPECTROL3(원주)
 제조사: 대우 소재지: 서울: 대우농업
 등록명(등록명): WELLS-P-FARM

소재지: 원주

성분명	비율(%)	비율(%)	비율(%)				
원주	0.36%	0.21%	0.32%				

* 주가: 사료첨가제

사료첨가제 제12호제2항 및 같은 법 시행규칙 제12호제3항에 따라
 제조·유통·사용의 안전성을 증명합니다.
 2019년 12월 09일

영광인수

Fig 7. 유기태 미네랄 소재중 가축현장 만성적 질병인 대장균증 감염 예방형 사료첨가제로 제품등록된 4종 내역

12. 참고문헌

D-14

[제 1 세부과제] 유기태 미네랄류 대량생산시스템 정립 및 산업화

< 축산분야 >

- 1.Chen, S., et al., Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol*, 2004. 70(1): p. 1-7.
- 2.Gebreyes, W.A. and C. Altier, Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol*, 2002. 40(8): p. 2813-22.
- 3.MEGANATHAN, R.B.A.R., Biosynthesis of Vitamin K (Menaquinone) in Bacteria. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 1982: p. 241-280.
- 4.Blanco, J.E., et al., Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(8): p. 2184-5.
- 5.Ngeleka, M., et al., Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis*, 2002. 46(1): p. 143-52.
- 6.Wernicki, A., J. Krzyzanowski, and A. Puchalski, Characterization of *Escherichia coli* strains associated with canine pyometra. *Pol J Vet Sci*, 2002. 5(2): p. 51-6.
- 7.Yoon, H.J., et al., Chitosan oligosaccharide inhibits 203HgCl₂-induced genotoxicity in mice: micronuclei occurrence and chromosomal aberration. *Arch Pharm Res*, 2005. 28(9): p. 1079-85.
- 8.No, H.K., et al., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*, 2002. 74(1-2): p. 65-72.
- 9.Yoon, H.J., et al., Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 358(3): p. 954-9.
- 10.Yoon, H.J., et al., Effects of chitosan oligosaccharide (COS) on the glycerol-induced acute renal failure in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*, 2008. 46(2): p. 710-6.
- 11.Skjak, G., Anthonsen, T., and Sandford, P., Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. *Elsevier Applied Sci*, 1988.
- 12.Gordon, D.T.a.W., C. B., Chitin and chitosan; Influence on element absorption in rat, unconventional source of dietary fiber. *ACS Symposium Series* 1983: p. 156-184.
- 13.No, H.K., Park, N. Y., Lee, S. H., and Meyers, S. P., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol*, 2002. 74: p. 65-72.
- 14.Younes, I. and M. Rinaudo, Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 2015. 13(3): p. 1133-1174.
- 15.Jeon, Y., J., Kim, G. H., Park, P. J., and Kim, S. K., Calcium absorption accelerating effect of chitosan oligosaccharide prepared by ultrafiltration membrane enzymatic reactor. *J. Kor. Fish. Soc.*, 1999. 32: p. 2467-251.

16. Yoo, J.S., Kim, J. D., Cho, J. H., Chen, Y., Kim, H. J., Min, B. J., and Kim, I. h., The effect of natural mineral complex and chitosan supplementation on egg production and characteristics in laying hens. *J. Kor. Poult. Sci.*, 2006. 33: p. 309–316.
17. Han, I.K., Park, W. K., Baek, I. K., and Chi, W. J., *Feed Manufacturing Technology*. Sunjin Culture Co. , 1998: p. 200.
18. Vanessa, J.A.a.E., A. K., Effect of dietary copper source on broiler chicken performance and immune responses. *Poult, Sci*, 2004. 83: p. 107.
19. Hong, S.J., Im, H. S., and Baek, JI. K., Effects of Cu and Zn–methionine chelates supplementation on the performance of broiler chickens. *J. Kor. Anim.Sci. Technol*, 2002. 44: p. 399–406.
20. Bezkorovainy, A., Biochemistry of nonheme iron in man. II. Absorption of iron. *Clin Physiol Biochem*, 1989. 7(2): p. 53–69.
21. Finch, C.A.a.H., H. A., Iron metabolism. *Clin. Physio. Biochem*, 1986. 4: p. 5–10.

< 농업분야 >

1. Livingston, M. L. and Cory, D. C. : Agricultural nitrate contamination of ground water: An evaluation of environmental policy. *J. Am. Water Resour. Assoc.*, 1998, 34, 1311–1317.
2. Wendland, F., Bach, M. and Kunkel, R. : The influence of nitrate reduction strategies on the temporal development of nitrate pollution of soil and ground water throughout Germany – a regionally differentiated case study. *Nutr. Cycling Agroecosyst*. 1998, 50, 167–179.
3. Bockman, O. C. and Olf, H. W.: Fertilizers, agronomy and N₂O. *Nutr. Cycling Agroecosyst*. 1998, 52, 165–170
4. Guertal, E. A. : Slow–release nitrogen fertilizers in vegetable production: A review. *Hort. Technology*, 2009, 19, 16–19
5. Alexander, A. and Helm, H. U. : Ureaform as a slow–release fertilizer: A review. *Z. Pflanzenernaehr Bodenkd.*, 1990, 153, 249–255
6. Shaviv, A. and Mikkelsen, R. L. : Slow–release fertilizers for a safer environment maintaining high agronomic use efficiency. *Fert. Res.*, 1993, 35, 1–12
7. Lee, J. Y., Kim, Y. S., Kwon, Y. H., Kong, S. H., Park, S. Y., Lee, C. H. and Sung, S. H. : A Study of Heavy Metal–Contaminated Soil Remediation with a EDTA and Boric acid Composite(II): Cd and Cr. 8–14
8. Park, S. G., Cho, Y. D., Shin, T. K. and Wie, M. B. K. : Protective effects of EDTA and EGTA against CCl₄–induced acute hepatotoxicity in mice. 265–271
9. Lee, S. Tae., Kim, M. K., Lee, Y. H., Kim, Y. S. and Kim, Y. B. : Analysis of Fe–Deficient Inducing Enzyme and Required Time for Recovery of Nutritional Disorder by Fe–DTPA Treatment in the Fe–Deficient Induced Tomato Cultivars. 767–772
10. Zekri, M. and Obreza, T. A. : Micronutrient deficiencies in citrus : iron, Zinc, And manganese, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. *Sl*. 2009, 204, 1–3

11. Noh, H. J., Cho, H. H., Lee, C. K. and Kim, H. K. : Development of Chemical Fertilizer Substitute Type Organo–Mineral Fertilizer(Evaluation on the Efficiency of Fertilizer for Nutrient Solution Fertilizer OCHT–F Manufactured with Chitosan as a Substrate Targeting Lettuce (Lactuca sativa L.). J. Chitin Chitosan. 21(2), 2016, 118–127
12. Smirnoff, N. : The function and metabolism of Ascorbic acid in plants. Ann. Bot., 1996, 78, 661–669
13. Jung, H. D. and Kim, W. S. : Effects of Foliar Application of Organic Calcium and Organic Phosphate on Growth and Development of Pear(Pyrus pyrifolia Nakai). 708–708

[제 2 세부과제] 유기태 미네랄 강화사료를 이용한 기능성 강화 축산물 생산시스템 정립

1. Bounous, G., G. Batist and P. Gold. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice. Roe of glutathione. Clin. Invest. Med. 1989, 12, 154.
2. Ha, W. G. Effects of immunoenhancing property of whey protein. Kor. J. Dairy. Technol. 1995, 12(2), 17–21.
3. Lee J. H., Oh, S. J., Kim, K. S., Baek, Y. J.: Chromatographic pattern and functionalities of partially hydrolyzed milk proteins by commercial proteases. J. Kor. Dairy. Technol. 2002, 20(2), 110–115.
4. Ronsivalli, L. J. and Vieira, E. R. 1990. Elementary food science (3rd edition). AVI.
5. McIntosh, G. H., Royle, P. J., Le Leu, R. K., Regester, G. O., Johnson, M. A., Grinsted, R. L., Kenward, S. and Snithers, G. W. 1998. Whey protein as functional food ingredient. Int. Dairy J. 1998, 8:425–434.
6. Yamauchi, K. Biologically functional protein of milk and peptides derived from milk proteins. Bull. DF. 1992, 272, 51–58.
7. Ko, Y. H., Moon, Y. S., Sohn, S. H., Jung, C. H., and Jang, I. S.: Effect of dietary supplementation of plum or omija on growth performance, blood biochemical profiles and antioxidant defense system in broiler chickens. *Kor. J. Poult. Sci.* **2012**. 39(2), 121–131.
8. Park, T.S., Kim, J. Y., You, S. J., Lee, B. K., Kim, J. M., Ahn, B. K., and Kang, C. W.: Effect of dietary organic or inorganic minerals (selenium and copper) on layer' s production and their transfer into the egg. *Kor. J. Poult. Sci.* 2009. 36(2), 103–110.
9. Utterback, P. L., Parson, C. M., Yoon, I., Butler, J.: Effect of supplementation selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. *Poult. Sci.* 2005, 84, 1900–1901.
10. Kim, S. H., Yu, D. J., Park, S. Y., Lee, S. J., Park, Y. Y., and Lee, W. J.: Effect of supplemental microbial phytase and nonphytate phosphorus levels on performance, digestibility and egg quality in layer. *J. Kor. Poult. Sci.* 2000, 27(3), 243–254.
11. Han, In. Kue., Park, Won. Kue., Baek, In. Ki., and Choi, Won. Jae.: Feed

- Manufacturing Technology. Sunjin Culture Co. 1998, 200.
12. Baek, In. Kee.: Used of minerals. *Feed*. 2009, 51–55.
 13. Vanessa, J. A., and Elizabeth, A. K.: Effect of dietary copper source on broiler chicken performance and immune responses. *Poult. Sci.* 2004, *83(1)*, 107.
 14. Hong, Sung. Jin., Im, Hee. Suk., and Baek, In. Ki.: Effects of Cu and Zn–Methionine Chelates Supplementation on the Performance of Broiler Chickens. *J. Kor. Anim. Sci. Technol.* 2002, 44, 399–406.
 15. Yun, H. K., and Seo, T. C.: Effect of selenized garlic as dietary selenium sources for broiler. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 2008, 26(4), 490–494.
 16. Clark, L. C., Dalkin, A., Krongrad, G. F., Tumbull, E. H., Slate, R., Herlog, E., Janpsko, D., Borosso, S., and Rounder, J.: Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: Results of a double–blind cancer prevention trial. *Br. J. Urol.* 1998, 81, 730–734.
 17. Jun, S. Y.: Some aspects of dietary garlic, selenium and tocopherol in the nutrition of animal. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 1973, 2, 119–128.
 18. Combs, G. F.: Influences of dietary vitamin E and selenium on the oxidant defense system of the chick. *Poult. Sci.* 1981, *60*, 2098–2105.
 19. Cantor, A. H., and Scott, M. L.: The effect of selenium in the hens diet on egg production, hatchability, performance of progeny and selenium concentration in egg. *Poult. Sci.* 1974, 53, 1870.
 20. Hassan, S.: Effect of dietary selenium on the prevention of exudative diathesis in chicks, with special reference to selenium transfer via eggs. *J. vet. Med. A.* 1986, 33, 689–697.
 21. Payne, R. L., Lavergne, T. K., and Southern, L. L.: Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration. *Poult. Sci.* 2005, 84, 232–237.
 22. Na, J. C., Kim, J. H., Yu, D. J., Choi, C. H., Lee, W. J., and Lee, J. C.: Effects of Dietary Organic Selenium and Vitamin E on Performance, Selenium Retention and Quality of Egg in Laying Hens. *J. Kor. Poult. Sci.* 2007, 34(3), 157–163.
 23. Yoon, H. J., Park, H. S., Bom, H. S., Roh, Y. B., Kim, J. S., and Kim, Y. H.: Chitosan oligosaccharide inhibits $^{203}\text{HgCl}_2$ –induced genotoxicity in mice: micronuclei occurrence and chromosomal aberration. *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28(9), 1079–1085.
 24. Skjak, G., Anthonsen, T., and Sandford, P.: Chitin and chitosan : sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. Elsevier Applied Sci. 1988.

25. Gordon, D. T., and Williford, C. B.: Chitin and Chitosan; Influence on element absorption in rat, Unconventional source of dietary fiber. ACS Symposium Series. 1983. 156–184.
26. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., and Meyers, S. P.: Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiolog.* 2002, 74, 65–72.
27. Kim, H., W., and Kim, Y. H.: Effect of Chitosan Oligosaccharide on the Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines. *J. Chitin Chitosan.* 2010, 15(3), 164–169.
28. Yoon, H., J., Moon, M., E., Park, H., Soon., Im, S., Y., and Kim, Y. H.: Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem. Biophys. Res. Communicatio.* 2007, 358, 954–959.
29. Yoon, H., J., Moon, M., E., Park, H., Soon., Kim, H., W., Im, S., Y., Lee, J., H., and Kim, Y. H.: Effects of chitosan oligosaccharide (COS) on the glycerol-induced acute renal failure in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicolog.* 2008, 46, 710–716.
30. Jung, B., Y., Paik, I., K., Lee, D., M., and Seo, Sang., B.: The effects of a chitosan product supplementation on the performance of broiler breeders, broilers, pigs and dairy cattle. *J. Chitin Chitosan.* 2004, 9(4), 168–174.
31. Cho, H. H., Kim, H. K., Koh, H. B., and Kim, Y. H: Effects of dietary supplementation of organic zinc mixed chitosan oligosaccharide (Fe-OCHT) and organic calcium mixed whey powder concentration (Ca-WPC) on egg quality in laying hens. *J. Chitin Chitosan.* 2014, 19(3), 212–219.
32. Cho, H. H., Kim, H. K., Koh, H. B., and Kim, Y. H: Effects of dietary supplementation of high-level organic minerals (Ca, Zn, Se) mixed chitosan oligosaccharide on egg quality in laying hens. *J. Chitin Chitosan.* 2014, 19(3), 220–227.
33. Cho, H. H., Kim, H. K., Koh, H. B., and Kim, Y. H: A study of production on high-quality egg by dietary supplementation of chitosan oligosaccharide substrate-organic iron as substitute for inorganic iron in Laying Hens. *J. Kor Chitin Chitosan.* 2015, 20(3), 153–162.
34. Cho, H. H., Kim, H. K., Koh, H. B., and Kim, Y. H: Changes of egg quality by dietary supplementation of chitosan oligosaccharide substrate-organic calcium as substitute for inorganic calcium in laying Hens. *J. Chitin Chitosan.* 2015, 20(2), 95–105.
35. Cho, H. H., Kim, H. K., Koh, H. B., and Kim, Y. H: A study of production on

- high-quality egg by dietary supplementation of chitosan oligosaccharide substrate-organic zinc in Laying Hens. J. Kor Chitin Chitosan. 2016, 21(1), 51-60.
36. Han, C. K., Lee, B. H., Sung, K. N., and Lee, N. H.: Effects of Various Feed Additives for Hen on Laying Performance and Egg Qualities. Kor. J. Poult. Sci. 1999, 26(3), 203-211.
37. Yoo, J. S., Kim, J. D., Cho, J. H., Chen, H. Y., Kim, H. J., Min, B. J., and Kim, I. H.: The effect of natural mineral complex and chitosan supplementation on egg production and characteristics in laying hens. J. Kor. Poult. Sci. 2006, 33(4), 309-316.
38. Lee, S. H., Kim, S.H., and Kwang, B. S.: Effects of Feeding High and Low Ca Additive on Laying Performance and Egg Quality in Laying Hens. J. Kor. Poult. Soc. 1998, 25, 71-78.
39. Park, C. I., and Kim, Y. J.: Effects of dietary supplementation of powdered mulberry leaves on egg production, egg quality and blood characteristics in laying hens. J. Kor. Poult. Sci. 2012, 39(3), 215-222.
40. Kim, K. G., Jeong, Y. J., Kim, O. M., Park, N. Y., and Lee, K. H.: Effect of sea urchin shell on egg quality. J. Kor. Soc. Food. Nutr. 2002. 31(3), 373-377.
41. Shin, K. O., Kim, D. G., Lee, S. I., Oh, S. H., and Kim, S. D.: Dietary effect of *agaricus bisporus* feeds on characteristics of eggs. J. Kor. Soc. Food. Nutr. 2009. 38(9), 1195-1201.
42. Hong, J. W., Kim, I. H., Moon, T. H., Kwon, O. S., and Lee, S. H.: Effects of fermkito 50 supplementation on serum and egg yolk cholesterol levels and egg quality in laying hens. J. Kor. Poult. Sci, 2001. 1, 7-13.
43. Hansen, R. J., and Walzem, R. L.: Avian fatty liver hemorrhagic syndrome: A comparative review. Adv. Vet. Sci. Comp. Med, 1993, 37, 451-468.
44. Squires E. J., and Leeson, S.: Aetiology of fatty liver syndrome in laying hens. J. Br. Vet. 1988, 144, 602-609.
45. Shim, K. S., Park, G. H., Na, C. S., Ji, J. R., and Choe, H. S.: Effects of taurine supplementation on performance, egg quality, blood parameter and liver lipid peroxidation levels of laying hens fed high fat diet. J. Kor. Poult. Sci. 2010. 37(4), 337-345.
46. Kim, C. H., Kang, H. K., Hwangbo, J., and Kim, J. H.: Dietary effects of herbal mixture on the laying performance, blood parameters, and immune response in laying hens. Kor. J. Poult. Sci. 2015. 42(1), 61-67.

[제 3 세부과제] 양계현장의 만성적 질병 예방을 위한 유기태화 소재류 선발 및 효능 평가

1. Barrow PA. Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines. Avian Pathol 2007, 36, 1-13.
2. Barrow PA, and Freitas Neto OC. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. Avian Pathol 2011, 40, 1-13.
3. Barrow PA, and Neto OCF. Pullorum disease and fowl typhoid new thoughts on old diseases: a review. Avian Pathology 2011, 40, 1-13.
4. Basnet HB, Kwon HJ, Cho SH, Kim SJ, Yoo HS, Park YH, Yoon SI, Shin NS, and Youn HJ. Reproduction of fowl typhoid by respiratory challenge with Salmonella Gallinarum. Avian Dis 2008, 52, 156-159.
5. Boruta A, Swierczewska E, Glebocka K, and Nollet L. Trace organic minerals as a replacement of inorganic sources for layers: effects on productivity and mineral excretion. World Poultry Science Association, Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France, 26-30 August, 2007 2007, 491-494.
6. Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van Doesburg W, Witteman BJ, and Van Der Meer R. Diarrhea caused by enterotoxigenic Escherichia coli infection of humans is inhibited by dietary calcium. Gastroenterology 2003, 125, 469-476.
7. Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Weerkamp AH, Faassen-Peters MA, and Van der Meer R. Dietary calcium inhibits the intestinal colonization and translocation of Salmonella in rats. Gastroenterology 1997, 113, 550-557.
8. Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, and Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. Vet Immunol Immunopathol 2009, 128, 53-59.
9. Council NR. 1994. Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994. The National Academies Press, Washington, DC.
10. Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. Anim Biotechnol 2002, 13, 7-27.
11. Faitarone ABG, Pavan AC, Mori C, Batista LS, Oliveira RP, Garcia EA, Pizzolante CC, Mendes AA, and Sherer MR. Economic traits and performance of Italian quails reared at different cage stocking densities. Revista Brasileira de Cincia Avcola 2005, 7, 19-22.
12. Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Anim Health Res Rev 2008, 9, 149-158.
13. Hong SS, Jeong J, Lee J, Kim S, Min W, and Myung H. Therapeutic effects of bacteriophages against Salmonella gallinarum infection in chickens. J Microbiol Biotechnol 2013, 23, 1478-1483.
14. Janssens GP, Millet S, Van Immerseel F, De Buck J, and Hesta M. The impact of prebiotics and salmonellosis on apparent nutrient digestibility and Salmonella typhimurium var. Copenhagen excretion in adult pigeons (Columba livia domestica). Poult Sci 2004, 83, 1884-1890.
15. Jung BG, Ko JH, and Lee BJ. Dietary supplementation with a probiotic fermented four-herb combination enhances immune activity in broiler chicks and increases

- survivability against *Salmonella Gallinarum* in experimentally infected broiler chicks. *J Vet Med Sci* 2010, 72, 1565–1573.
16. Kamphues J. [Antibiotic growth promoters for the view of animal nutrition]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1999, 112, 370–379.
 17. Kim MS, Yoon YS, Seo JG, Lee HG, Chung MJ, and Yum DY. A study on the prevention of salmonella infection by using the aggregation characteristics of lactic Acid bacteria. *Toxicol Res* 2013, 29, 129–135.
 18. Kortman GA, Mulder ML, Richters TJ, Shanmugam NK, Trebicka E, Boekhorst J, Timmerman HM, Roelofs R, Wiegerinck ET, Laarakkers CM, Swinkels DW, Bolhuis A, Cherayil BJ, and Tjalsma H. Low dietary iron intake restrains the intestinal inflammatory response and pathology of enteric infection by food-borne bacterial pathogens. *Eur J Immunol* 2015, 45, 2553–2567.
 19. Maciel MP, Saraiva EP, Aguiar dF, Ribeiro PAP, Passos DP, and Silva JB. Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2010, 39, 344–348.
 20. Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, and Dougan G. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 2001, 161, 132–164.
 21. Murray MJ, Murray AB, Murray MB, and Murray CJ. The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *Br Med J* 1978, 2, 1113–1115.
 22. Nyakeriga AM, Troye-Blomberg M, Dorfman JR, Alexander ND, Back R, Kortok M, Chemtai AK, Marsh K, and Williams TN. Iron deficiency and malaria among children living on the coast of Kenya. *J Infect Dis* 2004, 190, 439–447.
 23. Oliveira GHd, Berchieri Junior A, and Fernandes AC. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2005, 36, 51–56.
 24. Paiva JBd, Penha Filho RAC, Argello YMS, Silva MDd, Gardin Y, Resende F, Berchieri Junior A, and Sesti L. Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella gallinarum* in commercial brown layer and broiler breeder hens. *Revista Brasileira de Cincia Avcola* 2009, 11, 65–72.
 25. Patterson JA, and Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 2003, 82, 627–631.
 26. Rasschaert G, Michiels J, Tagliabue M, Missotten J, De Smet S, and Heyndrickx M. Effect of Organic Acids on *Salmonella* Shedding and Colonization in Pigs on a Farm with High *Salmonella* Prevalence. *J Food Prot* 2016, 79, 51–58.
 27. Sazawal S, Black RE, Ramsan M, Chwaya HM, Stoltzfus RJ, Dutta A, Dhingra U, Kabole I, Deb S, Othman MK, and Kabole FM. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2006, 367, 133–143.
 28. Schaible UE, and Kaufmann SH. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2004, 2, 946–953.
 29. Seo YM, Shin KS, Rhee AR, Chi YS, Han J, and Paik IK. Effects of Dietary Fe-*soy*

Proteinate and MgO on Egg Production and Quality of Eggshell in Laying Hens. Asian Australas J Anim Sci 2010, 23, 1043-1048.

30. Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. Rev Sci Tech 2000, 19, 405-424.
31. Smith IM, Licence ST, and Hill R. Haematological, serological and pathological effects in chicks of one or more intravenous injections of Salmonella gallinarum endotoxin. Res Vet Sci 1978, 24, 154-160.
32. St Louis ME, Morse DL, Potter ME, DeMelfi TM, Guzewich JJ, Tauxe RV, and Blake PA. The emergence of grade A eggs as a major source of Salmonella enteritidis infections. New implications for the control of salmonellosis. Jama 1988, 259, 2103-2107.
33. Tompkins GR, O'Dell NL, Bryson IT, and Pennington CB. The effects of dietary ferric iron and iron deprivation on the bacterial composition of the mouse intestine. Curr Microbiol 2001, 43, 38-42.
34. Vieira S. Chelated minerals for poultry. Revista Brasileira de Cincia Avcola 2008, 10, 73-79.
35. Wang L, Johnson EE, Shi HN, Walker WA, Wessling-Resnick M, and Cherayil BJ. Attenuated inflammatory responses in hemochromatosis reveal a role for iron in the regulation of macrophage cytokine translation. J Immunol 2008, 181, 2723-2731.
36. Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. Best Pract Res Clin Haematol 2005, 18, 183-201.
37. Wigley P, Hulme S, Powers C, Beal R, Smith A, and Barrow P. Oral infection with the Salmonella enterica serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. BMC Vet Res 2005, 1, 2.
38. Yenice E, Mizrak C, Gultekin M, Atik Z, and Tunca M. Effects of Organic and Inorganic Forms of Manganese, Zinc, Copper, and Chromium on Bioavailability of These Minerals and Calcium in Late-Phase Laying Hens. Biol Trace Elem Res 2015, 167, 300-307.
39. Ziprin RL, Elissalde MH, Hinton A, Jr., Beier RC, Spates GE, Corrier DE, Benoit TG, and DeLoach JR. Colonization control of lactose-fermenting Salmonella typhimurium in young broiler chickens by use of dietary lactose. Am J Vet Res 1991, 52, 833-837.

[제 4 세부과제] 육계 대상 항질병 강화 및 고품질 “브랜드 계육 (우리 맛닭) 생산

1. Boles, J., P. Shand, J. Patience, A. McCurdy and A. Schaefer, 1993. Acid base status of stress susceptible pigs affects sensory quality of loin roasts. Journal of food science, 58(6): 1254-1257.
2. Dror, Y., I. Nir and Z. Nitsan, 1977. The relative growth of internal organs in light and heavy breeds. British poultry science, 18(4): 493-496. DOI 10.1080/00071667708416389.
3. Folch, J., M. Lees and G. Sloane-Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. The Journal of biological chemistry, 226(1): 497-509.

4. Grundy, S.M., 1986. Cholesterol and coronary heart disease: A new era. *Jama*, 256(20): 2849–2858.
5. Huff–Lonergan, E. and S.M. Lonergan, 2005. Mechanisms of water–holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1): 194–204. DOI 10.1016/j.meatsci.2005.04.022.
6. Pearson, A., J. Gray, A.M. Wolzak and N. Horenstein, 1983. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technology (USA)*.
7. Salma, U., A.G. Miah, T. Maki, M. Nishimura and H. Tsujii, 2007. Effect of dietary rhodobacter capsulatus on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poultry science*, 86(9): 1920–1926.
8. St John, L.C., D.K. Lunt and S.B. Smith, 1991. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *Journal of animal science*, 69(3): 1064–1073.
9. Swatland, H.J., 2008. How pH causes paleness or darkness in chicken breast meat. *Meat science*, 80(2): 396–400. DOI 10.1016/j.meatsci.2008.01.002.
10. Zhang, A., B. Lee, S. Lee, K. Lee, G. An, K. Song and C. Lee, 2005. Effects of yeast (*saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry science*, 84(7): 1015–1021.
11. 김용란, 2000. Effects of dietary supplementation of probiotics(ms102r) on performance, blood cholesterol level, size of small intestine and intestinal microflora in broiler chicks. *한국동물자원과학회지*, 42(6): 849–858.
12. 김창혁, 2001. Effects of feeding extruded swine manure and food waste mixture diets on growth performance, body composition and feeding behaviour of broilers. *한국동물자원과학회지*, 43(1): 91–100.

[제 5 세부과제] 건강기능성식품(개별인증, 헬리코박터 제어형 원료) 개발 연구

1. Yoon, Y. C., Cho,J.K., Song,C.H.,Lee,S., Chung, C.I.(2000). Purification of the glycomacropeptide from cheese whey. *Korean J. Food SCI. ANI. Resour.* 20 : 159–165.
2. Ernest P. Brody. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition.* 84 : S39–S46.
3. Moon, Y. I., Lee,W.J., and Sejong, O.H.(2005). Glycomacropeptide hydrolysed from bovine κ -casein ; II. Chromatographic changes of κ -casein macropeptide as related to Trichloroacetic acid concentration. *Korean J .Food Sci. Ani. Resour.* : 478–482.
4. Wang, B., Brand–Miller.(2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition.* 57 : 1351–1369.
5. R. Schauer, Springer–Verlag, Wien and New York. (1984). Sialic acids : Chemistry, metabolism and function. *Carbohydrate Research.* 129 : c5–c7.
6. Bing Wang, Janette Brand–Miller, Patricia McVeagh, and Peter Petocz. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas^{1–3}.*Am J Clin Nutr.* 74 : 510–515.
7. Wang, B.(2009). Sialic acid is and essential nutrient for brain development and

- cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29 : 177–222.
8. Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H., S., Y., McGreevy, P., Petocz, H. P., Held, S., Miller, J. B. (2007). Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets¹⁻³. *Am J Clin Nutr.* 85 : 561–569.
 9. Gorog, P., Kovacs, I. B. (1978). Anti-inflammatory effect of sialic acid. *Agents and Actions.* 8 : 543–545.
 10. Iijima, R., Takahashi, H., Namme, R., Ikegami, S., Yamazaki, M. (2004). Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Letters.* 561 : 163–166.
 11. Ishikawa, M., Koizumi, S. (2010). Microbial production of N-acetylneuraminic acid by genetically engineered *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research.* 345 : 2605–2609.
 12. Zimmermann, V., Hennemann, H. G., Daußmann, D., Kragl, U. (2007). Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine: new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76 : 597–605.
 13. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (2008). OECD Guidelines 408 for the testing of chemicals: Repeated Dose 90 day oral toxicity study in rodents. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris, France. p.1–10.
 14. United States of Food and Drug Administration (USFDA). (2005). Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *Pharmacology and Toxicology.* United States of Food and Drug Administration. Rockville, MD, USA. p.5–6.
 15. Keenan, C., Elmore, S., Francke-Carroll, S., Kemp, R., Kerlin, R., Peddada, S., Pletcher, J. (2009). Best Practices for Use of Historical Control Data of Proliferative Rodent Lesions. *Toxicol Pathol.* 37:679–693.
 16. Park YC and Cho MH. (2011). A new way in deciding NOAEL based on the findings from GLP-toxicity test. *Toxicology Research.* 27:133–135.
 17. Gikins, Mary L. A. (2006): Clinical Laboratory Parameters for Cr1:CD(SD) Rats, Charles River Laboratories.
 18. Gary, A. (2006). Boorman et al., Pathology of the Fischer rat. Academic press, INC., p 132–134.
 19. Oh, S. J., Kim, S. H., Jeon, W. M., Kim, B. C., Ki, Y. K. (1997). Glycomacropeptide Hydrolysed from Bovine κ -Casein (I. The Fractionation of Glycomacropeptide). *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 17(1):51–57.
 20. Lewis, R. W., Billington, R., Debryune, E., Gamer, A., Lang, B., Carpanini, F. (2002). Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. *Toxicologic Pathology.* 30:66–74.
 21. Ministry of Food and Drug Safety (KFDA) Notice No. 2014–136 (Jul. 30, 2014) 'Guidelines for toxicity tests in drugs, etc.' KFDA Notice No. 2014–67 (Feb. 12, 2015)