

116086-3

미생물학적 접근기술을 통한 국내 젖소·한우의 산중독증 예방 저감 사양관리기술 산업화 최종보고서

(견고닥 14p)

2019

(견고닥13p)

소 전  
관 문  
부 기  
처 관  
명 명

(견고닥 17p)

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

**농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종 보고서**(견고닥 13p)

발간등록번호

11-1543000-002599-01

(견고닥31p)

**미생물학적 접근을 통한 국내 젖소·한우의  
산중독증 저감 사양관리기술 산업화  
최종보고서**

2019.02.14.

(견고닥15p)

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / (주)셀텍  
협동연구기관 / 중앙대학교  
협동연구기관 / 한경대학교  
협동연구기관 / 경북대학교

(견고닥 15.5p)

**농림축산식품부**

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(견고닥 20p)

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화”(개발기간 : 2016. 09. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 14.

주관연구기관명 : (주)셀텍

(문병헌)



협동연구기관명 : 중 앙 대 학 교

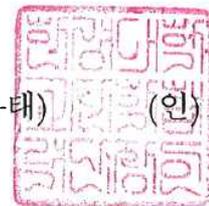
(김원용)



한 경 대 학 교

(김용태)

(인)



경 북 대 학 교

(임기병)

(인)



주관연구책임자 : 문 병 헌

협동연구책임자 : 장 문 백

협동연구책임자 : 김 창 현

협동연구책임자 : 김 은 중

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	116086-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05. ~2018.12.31. (3년)	단 계 구 분	3 / 3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명				
연구과제명	대 과 제 명	미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화			
	세부 과제명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 젓소, 한우의 산중독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 체계 구축</li> <li>- 반추동물 산중독증 저감 및 치료를 위한 사료첨가제에 대한 <i>in vitro</i> 시험</li> <li>- 산중독증 예방 미생물 균주 선발 및 배양 조건 확립</li> <li>- 혐기 미생물 사료첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축</li> </ul>			
연구책임자	문 병 현	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 16명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 285,000천원 민간: 20,000천원 계: 305,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 27명 내부: 27명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)셀텍 중앙대학교 산학협력단 한경대학교 산학협력단 경북대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반, 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음
-------------------------	---------------------------------------------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 혐기성 박테리아 배지내에 반추위액의 첨가와 무첨가하고 2% sodium lactate를 첨가한 배지 조성하여 미생물 분리
- 한우 반추위내의 lactic acid 이용균과 lactic acid 분비 속도가 느린 전분분해 미생물 분리
- Lactic acid를 이용하는 2종, 전분을 이용하여 lactic acid 발생이 느린 2종의 균주를 분리하였으며, 총 4종의 미생물을 분리
- 분리된 4종의 미생물에 대하여 동정 및 발효특성을 확인하였으며, 새로운 미생물로 확인
- 분리된 미생물을 *in vitro* 실험을 통하여 lactic acid 저감효과 검증
- 저가형 sodium lactate를 이용한 저가형 배지를 조성
- 미생물 동정과 발효특성 조사하여 미생물 특성확인, 용혈성실험을 통하여 안정성 실험 확인
- 안정성 평가를 위해 사료첨가제, 동결보존제, 부형제의 최적조합(glucose, zeolite)을 규명
- *In vitro* 실험을 통해 미생물 첨가제 효과를 검증하였으며, 첨가 수준에 따라 효과가 다르게 나타남을 확인
- 흑염소를 공시동물로 실험을 수행하였으며 본 과제에서 개발된 혐기성 미생물 첨가 시 반추위 발효에 긍정적인 효과를 나타내는 것으로 확인

보고서 면수

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농가현장 젖소·한우의 실시간 반추위 내 pH 데이터를 활용한 산중독증 예방 사양관리체계 확립</li> <li>○ 산중독증 예방 미생물 균주 선발 및 현장 접목형 배양 조건 확립</li> <li>○ 국내 젖소·한우 농가현장의 산중독증 실태조사를 통한 산중독증 원인 구명</li> <li>○ 반추위내 lactic acid 이용성이 높은 혐기미생물의 분리</li> <li>○ 반추위내 lactic acid 분해 속도가 느린 전분분해 혐기미생물의 분리</li> <li>○ 분리 미생물의 특성구명 및 산중독증 예방효과 검증</li> <li>○ 산중독증 예방 사료 첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축</li> <li>○ 산중독증 예방 사료 첨가제의 단독 사용 및 사료가공과정에 이용 가능한 가공 방법 구축</li> <li>○ 산중독증 예방 미생물 첨가제 개발 delivery system 구축을 통한 대량 생산체계 확립 및 산업화 방안 구축</li> <li>○ 반추가축용 산중독증 예방 사양관리체계 구축</li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혐기성 박테리아 배지내에 반추위액의 첨가와 무첨가하고 2% sodium lactate를 첨가한 배지 조성하여 미생물 분리</li> <li>○ 한우 반추위내의 lactic acid 이용균과 lactic acid 분비 속도가 느린 전분 분해 미생물 분리</li> <li>○ Lactic acid를 이용하는 2종, 전분을 이용하여 lactic acid 발생이 느린 2종의 균주를 분리하였으며, 총 4종의 미생물을 분리</li> <li>○ 분리된 4종의 미생물에 대하여 동정 및 발효특성을 확인하였으며, 새로운 미생물로 확인</li> <li>○ 분리된 미생물을 <i>in vitro</i> 실험을 통하여 lactic acid 저감효과 검증</li> <li>○ 저가형 sodium lactate를 이용한 저가형 배지를 조성</li> <li>○ 미생물 동정과 발효특성 조사하여 미생물 특성확인, 용혈성실험을 통하여 안정성 실험 확인</li> <li>○ 안정성 평가를 위해 사료첨가제, 동결보존제, 부형제의 최적조합 (glucose, zeolite)을 규명</li> <li>○ <i>In vitro</i> 실험을 통해 미생물 첨가제 효과를 검증하였으며, 첨가 수준에 따라 효과가 다르게 나타남을 확인</li> <li>○ 흑염소를 공시동물로 실험을 수행하였으며 본 과제에서 개발된 혐기성 미생물 첨가 시 반추위 발효에 긍정적인 효과를 나타내는 것으로 확인</li> </ul>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혐기미생물 분리·동정 및 특성 데이터베이스 이용 혐기미생물로부터 발현되는 효소 발현 유전자 조사 및 재조합 대장균으로부터 대량 생산 연구 및 제품화</li> <li>○ 부형제, 사료 저장 기간 등의 데이터베이스 활용 혐기성 미생물 제형화 및 상업적 보존 연구, 혐기성 미생물의 상업적 생산 기여</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유익균 범위 내 반추위 유래 혐기미생물 생명자원 등록</li> <li>○ 개발 미생물 첨가제 상품화에 따른 매출 창출</li> <li>○ 농가에 대한 개발 미생물 첨가제의 경제적인 이익 및 우리나라와 유사한 사양관리 체계를 유지하는 국가에 수출을 통한 국익의 증대 예상</li> <li>○ 분리된 균주의 사료용미생물제제 상품화에 의한 국내 농가의 산중독증 질병 예방 증진</li> <li>○ 산중독증 예방 사료첨가제 개발에 따른 젖소의 경제수명 연장, 젖소 및 한우의 사료효율, 생산성 향상 기대</li> <li>○ 분리된 균주의 반추동물 산중독증 예방 사료첨가미생물제제로서의 이용</li> <li>○ 젖산 이용 또는 분해 혐기성 미생물의 분리, 동정 기술력을 바탕으로 추가적인 유용한 미생물 자원 확보 기여</li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	산중독증	반추가축	한우	젖소	
영문핵심어 (5개 이내)	Acidosis	Ruminant	Hanwoo	Dairy cow	

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	4
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	157
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	160
붙임. 참고 문헌 .....	162

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 농가현장 젖소·한우의 실시간 반추위 내 pH 데이터를 활용한 산중독증 예방 사양관리체계 확립
- 산중독증 예방 미생물 균주 선발 및 배양 조건 확립
- 젖소·한우의 산중독증 저감 사료첨가제 산업화
- 산중독증 예방 미생물 첨가제 개발 delivery system 구축을 통한 대량 생산체계 확립
- 국내 젖소·한우 농가현장의 산중독증 실태조사를 통한 산중독증 원인 구명
  - 무선 pH 및 온도감지기를 활용한 반추위 내 pH 실시간 측정방안 및 데이터베이스 구축
  - 반추가축 산중독증 주요원인 반추위 내 pH 조건에 따른 현장적용 지표 구축
- 반추위내 lactic acid 이용성이 높은 혐기미생물의 분리(1종)
- 반추위내 lactic acid분해 속도가 느린 전분분해 혐기미생물의 분리(1종)
- 분리 미생물의 특성구명 및 산중독증 예방효과 검증
- 산중독증 예방 미생물 균주의 현장 접목형 배양 배지 조건 확립
- 산중독증 예방 사료 첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축
- 산중독증 예방 사료 첨가제의 단독 사용 및 사료가공과정에 이용 가능한 가공 방법 구축
- 반추가축용 산중독증 예방 사료 첨가제의 대량 생산 체계 및 산업화 방안 구축
- 국내 젖소·한우의 산중독증 예방 사양관리체계 및 개발 사료 첨가제의 산업화 방안 구축
  - 개발 반추가축 사료 및 사료첨가제의 *in vitro* 반추위 내 미생물 발효특성 검증
  - 개발 반추가축 사료 및 사료첨가제의 *in vivo* 시험을 통한 현장애로 해결 방안 구축

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 현재 국내 농가현장에서는 젖소·한우에서 발생하는 산중독증의 진단은 가축의 사료섭취량 변화, 분변과 행동의 변화 등 한정된 사양관리 방법에 의해 판단하고 있는 실정임
- 그러나 이러한 한정된 증상으로 산중독증을 파악하는 것은 정확한 판별방법이 되지 못하며, 반추위 내 pH를 직접적으로 모니터링하는 것이 산중독증을 판단하는 가장 정확한 방법이 되고 있음
- 현재 반추위 내 pH 측정 방법은 위액튜브(Ruminal stomach tube)와 1위 천자(Rumenocentesis)를 통해 위액을 채취하여 측정하거나, cannulae가 장착된 소의 위에 pH 미터를 삽입하여 직접적으로 측정하는 방법이 있으나 현장에 적용하기 어려운 특징을 가지고 있어 최근 반추위 체류형 pH 미터(indwelling pH probe)를 사용하여 측정하는 방법이 지속적으로 발전하고 있음(Plaizier, 2009)
- 최근 반추위내에서 무선통신이 가능한 작은 크기의 체류형 pH 측정장치가 지속적으로 개발되어 비수술적 방법을 통해 pH 측정뿐 아니라 pH probe와 데이터 연동 시스템을 통해

실시간 반추위 pH의 측정이 농가현장에서도 가능하게 되었음.

- 따라서, 반추위 내 pH 측정을 위한 위액 채취 방법에 따라 SARA 판단 기준이 달리 설정되어 있으며, 1위 천자를 이용하여 채취한 위액은 5.5, cannulae에서 채취한 위액은 5.8 그리고 위액튜브를 이용하여 채취한 위액은 5.9로 명시하였다(Plaizier, 2009). 그러므로 실제 반추위 내 반추가축 사료 종류에 따른 실시간 정확한 pH측정에 대한 모니터링 데이터 확보는 사료 및 가축 생산성 증진에 큰 역할을 할 것임.
- 또한 많은 연구에서 SARA의 판단 기준이 될 pH 수준을 5.5(Hibbard, 1995), 5.6(Cooper and Klopfensentein, 1996), 5.8(Beauchemin, 2001), 6.0(Kriehbiel, 1995)로 설정하거나, 반추위 pH가 하루에 3시간 이상 5.2~5.6으로 낮게 유지되는 것 (Gozho,2005)으로 명시하기도 하였음.
- 위와 같이 현재 SARA를 판단하기 위한 반추위 pH 기준은 현재까지도 많은 논란이 되고 있으며(Gozho,2005), 산중독증을 예측하고 미연에 방지하기 위해서는 산중독증의 진단에 활용할 수 있는 반추위 pH 기준 설정 및 활용방법에 대한 연구가 시급한 실정임.
- 그러나 현재 국내에서의 산중독증에 대한 발생 현황 및 사회·경제적 파급효과에 대한 조사는 전무한 상태이며, 산중독증 측정 및 기준에 대한 정확한 메뉴얼 또한 없는 실정임.
- 따라서, 반추가축의 사양단계 및 젖소·한우의 정확한 반추위 내 pH측정에 따른 급여사료에 의한 산중독증 발생 현황 파악 및 반추위 내 pH를 기초로 한 데이터베이스 구축에 의한 활용은 산중독증 예방 프로그램의 개발 및 반추가축 사료 개발 및 산업화를 통한 반추가축의 생산성 향상에 크게 기여할 것임.
- 산중독증 예방 사양방법이 다양하게 시도되고 있으나, 국내의 한우 고급육 생산과 젖소의 유량 증가와 유성분 개선을 위해 사양 단계에 따라 농후사료를 과다 급여하는 사양 방법을 피할 수 없는 상황임.
- 또한 사료 첨가제로 중조를 적정 수준 이상으로 사용하는 경우 사료 섭취량이 감소함에 따른 증체량의 감소, 노 발생량 증가에 따른 깔짚의 교체 회수 증가, 대부분 중조 사용량의 중국 수입에 따른 경제적 손실이 유발됨.
- 이러한 생산성 향상 위주의 사양관리방법을 유지할 수밖에 없는 현 농가현장의 상황을 극복하고 반추동물의 산중독증을 예방하기 위한 산업화가 가능한 현장 중심의 종합적인 사양방법의 개발이 시급한 상황임.
- Lactic acid를 이용하는 *M. elsdenii* strain NCIMB41125 (Meissner et al., 2010)등이 산중독증을 줄이는 생균제용 박테리아 균주로 활용 및 관심을 끌고 있지만, 젖소의 비유단계, 유생산량, 사료의 종류에 따라 반추위내 pH 및 유생산성에 미치는 효과가 다양하게 나타나고 있어 지속적인 추가 연구가 필요하며, 단순히 lactic acid를 이용하여 감소하려는 방법 이외에 lactic acid의 생산자체를 줄이는 미생물에 대한 연구도 필요함.
- 산중독증을 예방하기 위해 반추위내 lactic acid 축적을 줄일 수 있는 미생물 생균제 연구와 관련하여 lactic acid의 발생자체를 줄일 수 있는 연구가 진행되고 있음. Chiquette et al. (2007)은 반추위내에서 분리된 *Prevotella bryantii* 25A를 10주 동안 젖소의 사료에 첨가 급여한 결과 lactate의 반추위내 농도가 50%이상 감소되었음. 하지만 본 균주의 이용

시 단백질 이용효율이 감소되는 단점이 있어 이에 대한 추가 연구가 필요함.

- 결국, 반추위내 고농도의 전분질 사료 급여 시 발생하는 lactic acid를 저감하기 위해서는 단순히 한 균주를 이용한 생균제의 개발도 필요하나, 다양한 사육환경과 반추위내 조건을 고려하고 특히 우리나라의 사육환경에 적합한 반추위내 서식하는 미생물을 분리하고 이들을 이용한 국내에 적합한 미생물생균제의 개발과 현장에 바로 적용할 수 있는 상품의 개발이 필요함.
- 또한 산중독증에 대한 연구가 젖소를 대상으로 하고 있으나, 국내의 경우 한우의 비육말기 조건에서 산중독증 또한 우려되기에 이들 축종에 대한 산중독증 예방을 위한 사료첨가제의 개발 분야도 고려되어야 할 것임.

### 1-3. 연구개발 범위

- 2협동에서 분리된 미생물의 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사
- 3협동에서 확립된 미생물 저장 처리 방법을 이용한 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사
- 인위적 pH 조절을 통한 제2협동과제 개발 미생물 사료첨가제의 효능검정
- 한우를 활용한 ebolus(pH 및 온도센서)를 활용한 반추위 내 pH 데이터 확보
- 분리된 미생물의 반추위내 lactic acid 저감 능력 검증 및 선발(2종 이상 선발)
- 선발된 미생물의 동정 및 발효특성 조사
- 반추위 내 서식 젖산균 또는 통성 혐기성 균주를 이용하여 저장처리 방법
- 국내 보유 혐기성 균주의 활용
- 새롭게 반추위 내에서 분리, 동정 된 균주의 활용
- 반추위 내에서 서식하며 급격한 pH 저하에 원인이 되는 lactate를 이용하는 균주의 추가적인 접종을 통한 lactate 농도 경감 효과 검증
- 새롭게 분리, 동정된 균주를 반추 위 환경에 첨가 시 pH 저하가 둔화되고 lactate의 농도가 저하되는가를 실험

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### <제 1세부 : (주)셀텍 (문병헌)>

#### 세부 과제명 : 혐기 미생물의 대량생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성조사

#### 1. 젖소, 한우의 산중독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 체계 및 산업화에 대한 조사

##### 1) 젖소, 한우의 산중독증 예방사료첨가제의 종류 및 생산

###### (1) 완충제의 작용기전

반추가축의 생산성을 높이기 위해서는 반추위내의 미생물이 정상적인 발효대사를 수행할 수 있도록 해야 하는데 이러한 미생물의 활동은 pH의 영향을 크게 받는다. 특히 우리나라와 같이 양질의 조사료가 부족하고 고 에너지 사료 위주로 사육을 해야 하는 경우에는 반추위내의 pH 저하에 따른 미생물의 활력이 저하되기 쉽고 사료를 소화시킬 수 있는 소화효소의 생산이 감소되며 그 결과로 소화불량 및 산독증과 같은 대사성 질환을 일으킬 수 있다. 사료 내에서 농후사료 의주의 사료급여는 반추위내에 영향을 주어 propionate 미생물이 우점하게 하고 해리도가 낮은 acetate 농도를 감소시키고 해리도가 높은 propionate 생성량을 많게 하는 등 반추위내 휘발성 지방산의 농도와 조성에도 변화를 일으키게 된다. 한편 타액생성 분비량이 감소되어 buffering capacity를 떨어뜨리고 반추위내 pH와 소화율이 감소되는 결과를 초래한다. 따라서 반추위 발효조건을 정상화하고 안정적인 사료발효 조건을 유지하기 위하여 buffer제를 첨가하는 것이 필요하며 buffer제는 약화된 반추위내의 buffering capacity를 증가시키는 중요한 역할을 하게 된다.

###### (2) 완충제의 종류

사료관리법의 사료공정규격에 따른 반추가축의 완충제는 산화마그네슘(magnesium oxide), 소다회, 중조(sodium bicarbonate)와 그 합제로 규정하고 있으며, 중탄산칼륨(potassium bicarbonate), 탄산칼륨(potassium carbonate), 탄산마그네슘(magnesium carbonate), 마그네슘 옥사이드(magnesium oxide), 나트륨 벤토나이트(sodium bentonite) 등이 반추가축용 완충제로서 단독 또는 합제 형태로써 유통되고 있다.

###### (3) 산업적인 대량생산

###### ① 중조(sodium bicarbonate)

일명 암모니아소오다법 또는 솔베이법(Solvay Process)이라고 하며 La Blanc 법에 비해 에너지가 적게 들고 공정도 단순하다. 또한 고 순도의 제품을 얻을 수 있으므로 현재의 소

오다회 제조는 거의 이 방법에 의존하고 있다. 전체적인 과정은 원료가스인 NH<sub>3</sub>와 CO<sub>2</sub> 그리고 H<sub>2</sub>O로부터 제조된 중탄산암모늄(NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>)을 포화 소금물과 반응시켜 중조(NaHCO<sub>3</sub>)를 얻고, 이를 다시 하소(calcination)시켜 소오다회(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)를 제조하는 과정에서 생산될 수 있다.

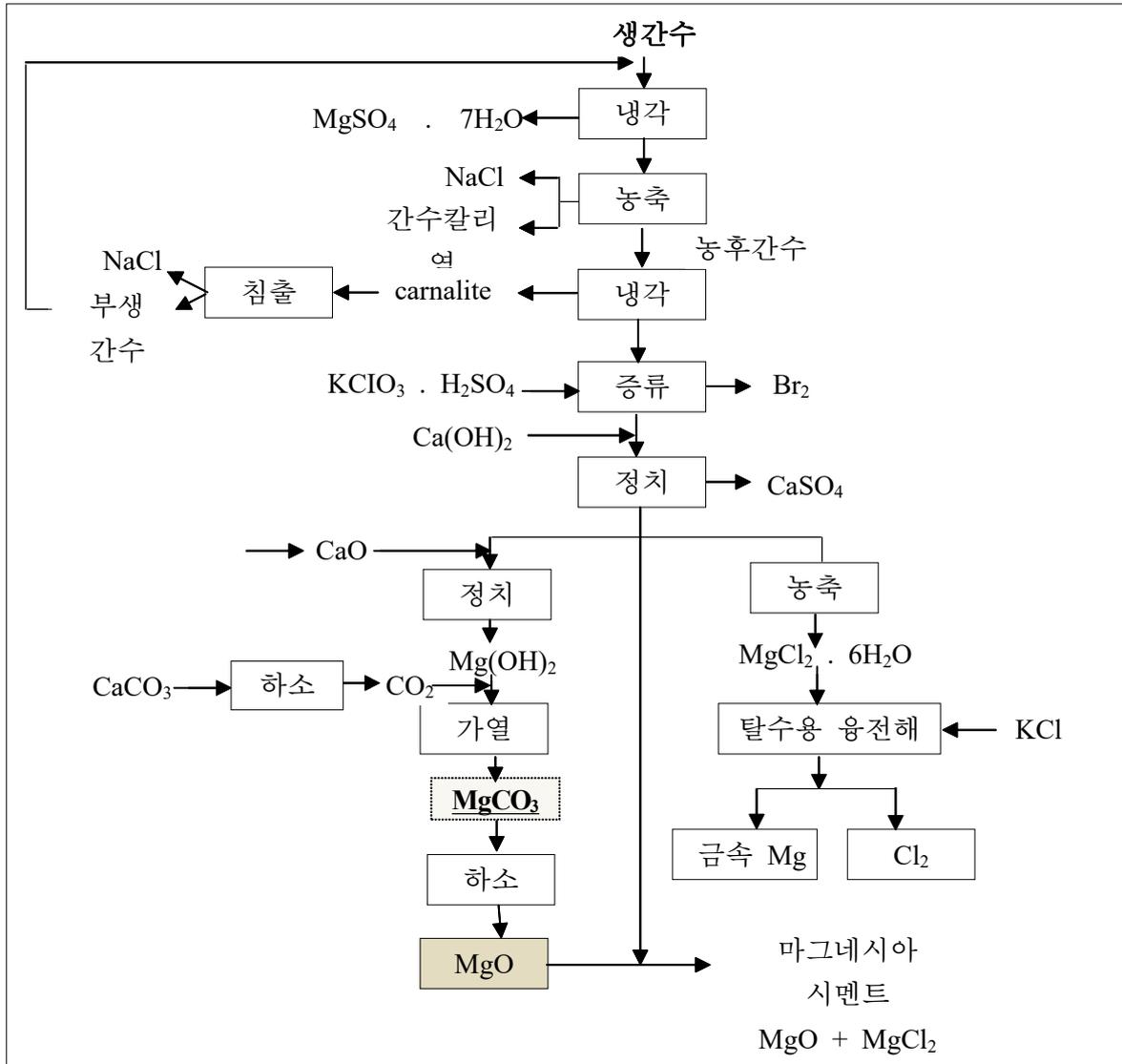
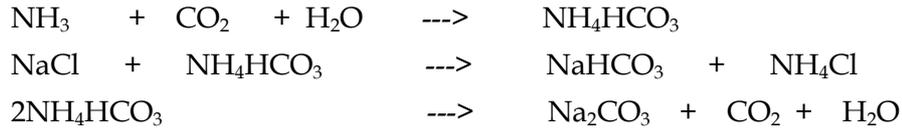


그림 1. 암모니아소다법의 공정도, 인용 : 설수덕 외 (2004)

② 마그네슘 옥사이드(magnesium oxide)

해수를 증발 농축하여 소금을 석출한 후의 모액을 간수 도는 고즙이라고 하는데 Mg 염류와 HCl, 회수되지 않은 NaCl 등이 포함되어 있다. 이 간수를 처리하여 각종 성분을 회

수할 수 있다. 공업적으로는 마그네사이트( $MgCO_3$ ), 수산화마그네슘 또는 공업용 염기성 탄산마그네슘 등을 원료로 열분해함으로써 제조할 수 있다.

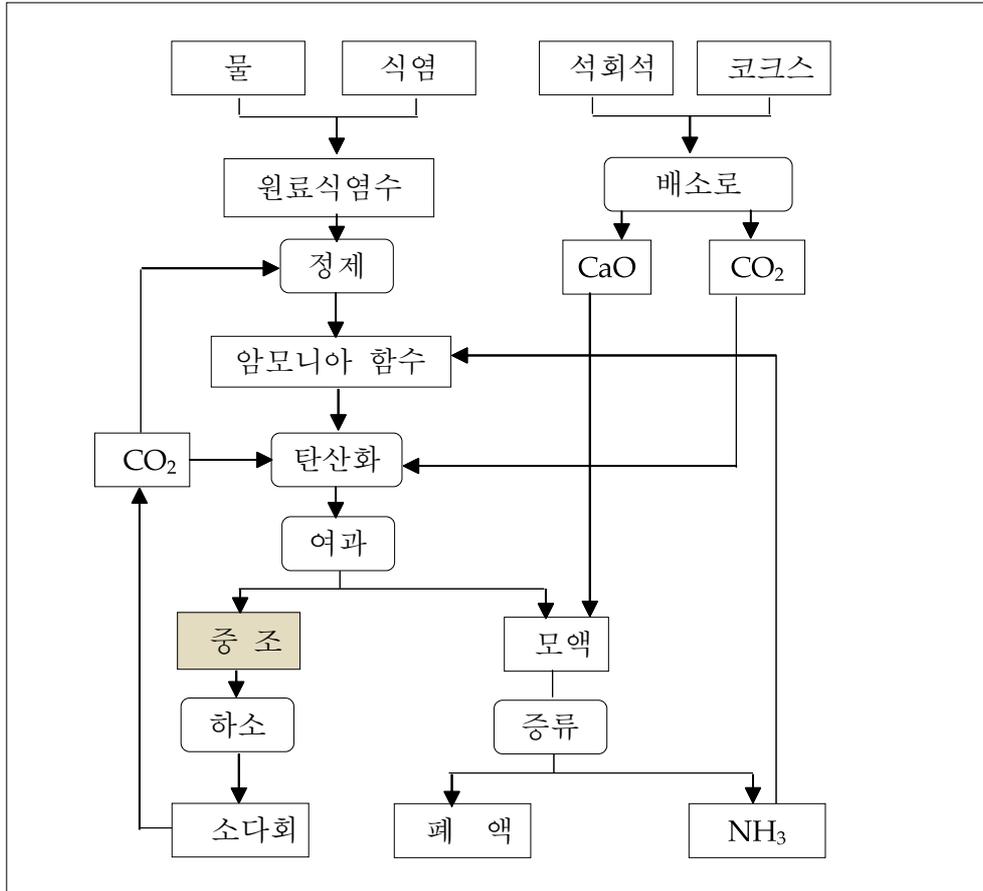
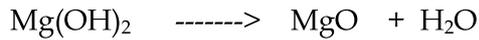
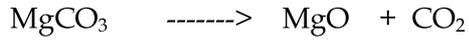


그림 2. 간수의 처리공정에 의한 생산, 인용 : 배장순 (2013)

### ③ 탄산마그네슘(magnesium carbonate : $MgCO_3$ )

$MgCO_3$ 이 천연적으로 산출되는 것은 마그네사이트, 백운석이 있으며 해양성 암염광 상에서 발견되는 각종 염류 및 복염, 규산염이 있다.

마그네슘염의 수용액에  $CO_2$  가스를 가하면서  $Na_2CO_3$ 를 가하면 일반적으로 3수염의 결정이 침전하게 된다. 이것을  $CO_2$  기류중에서 건조 탈수하면 무수염이 얻어지고 또는 히드록시 탄산마그네슘과 탄산수소나트륨의 수용액을 방치하든가 가열하면 결정수를 가진 침전을 얻게 된다. 탄산마그네슘을 가열하면 분해하여  $CO_2$  가스와  $MgO$ 를 생성한다.

### ④ 탄산칼륨(potassium carbonate : $K_2CO_3$ )

공업적으로는 탄산칼리라고도 부르며, 주로 목회 중에 비교적 많이 함유하고 있으므로 옛

날에는 물로 침수한 잿물을 세제로 사용하거나 목회를 칼륨을 공급하는 비료 원으로서 사용하였다.

공업적으로는 KCl 혹은  $K_2SO_4$ 로부터 르블랑법에 의한 NaCl 또는  $Na_2SO_4$ 로부터  $Na_2CO_3$ 를 만들 때와 같은 원리에 의해서 만들 수 있으나 현재에는 KCl 용액의 전해에 의해서 생성된 KOH 용액을  $CO_2$ 로 중화하는 방법이 널리 사용되고 있다. 이 방법에는 두 가지가 있는데  $40^\circ B\acute{e}$  정도의 KOH 용액에 정제  $CO_2$  가스를 통하여  $K_2CO_3$  용액으로 하고 증발조에서 탈수하여 만드는 방법과 KOH 용액에  $CO_2$  가스를 통하여  $K_2CO_3$ 를 생성시켜 이 용액을 여과하여 불순물을 제거한 다음, 다시  $CO_2$  가스를 통하면  $KHCO_3$ 가 생성된다. 생성한  $KHCO_3$ 는  $K_2CO_3$ 보다 용해도가 적으므로 결정으로 석출된다. 이 결정을 원심 분리하여 회전로에서 하소하면  $K_2CO_3$ 를 얻을 수 있다. 또 다른 방법으로는 염화칼륨 수용액에 탄산마그네슘을 현탁시키고 여기에  $CO_2$  가스를 통하면 복탄산염이 침전하게 된다.

## 2) 젖소, 한우의 산중독증 예방제로서 $\alpha$ -amylase 및 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해작용이 있는 식물 추출물의 활용 가능성

### (1) 반추위 조절제로서의 식물추출물

산중독증은 농후사료와 같은 가용성 탄수화물이 많은 함유된 사료를 한 번에 다량으로 섭취한 경우에 반추미생물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase에 의하여 급격하게 전분분해가 일어나면서 젖산과 같은 유기산이 과잉 생성되고 반추위 pH가 급격히 떨어져서 소화 장애를 일으키는 대사성 질병이다. 반추위내의 정상적인 발효대사가 유지되기 위해서는 반추미생물의 안정화가 중요하다. 그러나 이러한 반추미생물의 활동은 사료의 원료조성에 따라 반추위내 미생물의 군중에 변화가 생김으로서 파생된 pH에 의해서 크게 영향을 받는다. 이와 같은 산중독증 예방에는 전통적인 완충제( $NaHCO_3$ , bentonite, MgO, Zeolite)를 사료에 첨가하여 급여하는 것이 효과적이나 또 다른 방법으로서 인간의 당뇨병에 대한 치료 및 완화에 효과가 있는 것으로 알려진 acarbose의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase의 활성 저해효과를 이용하여 반추동물의 탄수화물의 분해속도를 억제시킬 수 있다고 보고하였다 (McLaughlin et al., 2009). 하지만 acarbose를 소에게 처리한 결과 급성 및 아급성 산중독의 예방 및 감소효과는 우수하지만 지속적인 복용 또는 급여 시에는 설사와 복통의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2007; Lim et al., 2005).

### (2) $\alpha$ -amylase 및 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해작용이 있는 식물 추출물의 작용과 효과

국내에서는 식물추출물의  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 저해작용을 이용하여 소의 급성 및 아급성 산중독증의 감소효과를 연구한 사례는 아직까지 없는 실정이다. 하지만 인체에서는 국내 자생 목본류에 대한  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 저해작용을 이용하여 당의 소화 및 흡수를 제어함으로써 인슐린 비의존형 당뇨병 치료 목적으로 활발한 연구가 이루어지고 있다. 최근까지 연구된 결과를 살펴보면 김 등(2007)은 산사 추출물로부터  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 물질 분리 및 동정을 하였고 임 등(2005)은 말채나무 추출물의  $\alpha$ -amylase의 저해 활성, 김 등(2011)은 강원도 자생 산채 추출물의  $\alpha$ -amylase 및

$\alpha$ -glucosidase 효소 저해활성을 탐색하고 이를 보고하였다. 또한 이 등(2008)은 제비꽃 추출물의 항산화 활성 및  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 활성과 김 등(1997)은 왕겨 추출물의  $\alpha$ -amylase의 활성 저해효과와 허 등(2009)은 미세조류의 혈당상승 억제 효과를 보고하였다. 한편 국내 연구자에 의하여 브라질산 식물 추출물로부터  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 효소 저해활성을 연구하고 이들 열대 식물추출물이 반추동물의 산중독 예방 치료 목적으로 활용의 가능성을 보고한 바가 있다(김 등, 2010).

반추위 내에서  $\alpha$ -amylase는 주로 전분분해에 관여하는 박테리아로부터 생성된 효소로서 사료로부터 공급받는 탄수화물의  $\alpha$ -D-(1,4)-glucan 결합을 분해하여 반추위 발효 성상의 변화에 직접적으로 관여한다. 특히 우리나라와 같이 양질의 조사료 부족하고 젖소의 경우에는 산유량을 증가시키기 위해 많은 양의 농후사료를 급여하면서 농후사료와 조사료의 비율이 불균형 상태가 되거나 한우 사육에서 육성기 이후 비육단계에 농후사료 과다급여에 의해 도축 전까지 만성 산중독증이 지속적으로 발생하여 사료섭취량 감소에 따라 일당중체량 감소하는 경우가 많다. 따라서  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성저해 효과가 있는 자생 식물을 활용하여 일정부분을 급여하는 사료원료 또는 사료첨가제로서 활용한다면 반추동물의 급성 및 아급성 산중독증 예방 및 감소에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 아직까지는 따라서  $\alpha$ -amylase 및  $\alpha$ -glucosidase 활성저해 효과가 있는 식물은 주로 인간의 당뇨병환자의 치료와 완화차원에서 연구가 이루어졌을 뿐 반추가축의 산중독증 완화효과에 대한 연구는 매우 빈약한 실정이다. 따라서 산업화 차원에서 유용한 식물군을 탐색하고 반추동물에 대한 급여효과와 경제성 및 가공방안을 포함하여 면밀한 연구가 필요하다.

### 3) 미생물 사료첨가제의 저장성 및 정착성 향상에 관한 조사

#### (1) 사료에 사용하는 미생물 제제의 배양 방법과 대량 생산 체계에 관한 조사

사료첨가제로서 미생물제제는 가축에게 급여효과를 얻기 위하여 저가의 비용과 유효한 급여량을 첨가할 수 있도록 생산비용 측면에서 충분한 경제성을 확보하는 것이 매우 중요하다. 따라서 동물산업에서는 미생물제제의 산업적 생산방식은 저비용의 대량 생산하는 방법으로 생산되고 있으며 인간을 위한 식품이나 의료약품 산업과 같이 복잡하고 고도의 생산비용이 소요되는 생산방식은 적용되기 어렵다.

##### ① 사료첨가제로서 이용되는 상업용 미생물의 범위

사료공정규격에서 사료첨가제로서 규정된 미생물 균주의 범위는 표 1과 같다.

표 1. 사료공정 규격에 따른 생균제의 범위(사료공정서 별표 3)

종류	균주의 명칭
유익균	락토바실러스 락티스, 락토바실러스 루테리, 락토바실러스 불가리쿠스, 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 살리바리우스, 락토바실러스 애시도필러스, 락토바실러스 카제이, 락토바실러스 커바투스, 락토바실러스 크리스

	파투스, 락토바실러스 파라카제, 락토바실러스 퍼멘텀, 락토바실러스 페롤렌스, 락토바실러스 프란타럼, 락토바실러스 헬베티쿠스, 로돕슈도모나스 캡슐레이타, 모나스커스 퍼퓨리어스, 바실러스 렌투스, 바실러스 리체니포미스, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 세레우스(도요이에 한함), 바실러스 코아글란스, 바실러스 클라우지, 바실러스 폴리프멘티쿠스, 바실러스 푸밀루스, 비피도박테리움 롱검, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 서모필럼, 비피도박테리움 인판티스, 엔테로코커스 락티스, 엔테로코커스 썬모필러스, 엔테로코커스 웨시엄, 클로스트리듐 브티리컴, 페디오코커스 세레비지아, 페디오코커스 애시디락티시, 페디오코커스 펜토사세우스
유익곰팡이	아스퍼질러스 나이저, 아스퍼질러스 오리제
유익효모	맥주효모, 양조효모, 산토필로마이세스 텐드로하우스, 제빵효모, 조사건조효모, 토룰라효모, 피키아 파리노사, 효모배양물
박테리오파지	살모넬라 갈리나룸 박테리오파지, 살모넬라 엔테라이티디스 박테리오파지, 살모넬라 티피뮤리움 박테리오파지, 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지
합제	(1)부터 (3)의 합제

## ② 미생물 제제의 상업적인 대량 생산

미생물제제의 생산방식은 배양형식에 따라 미생물의 적당한 영양원과 기타 조건을 조절 한 액체배지에서 생육시키는 액체배양과 적당한 수준을 함유하는 고체배지에서 생육시키는 고체배양으로 크게 대별되며, 발효형식은 회분배양과 연속배양 또는 유가배양 등으로 구분된다. 그러나 대부분의 사료첨가제 생산업체는 액체배지에서 균체를 대량으로 생육시키고 이를 다시 저가의 사료곡물에 일정량을 접종하고(5-30%) 일정한 발효 조건하에서 고체 발효하는 방식을 선택하고 있다. 이와 같이 고체 발효한 사료첨가제는 저가의 생산비용으로 생산할 수 있고 가축에게는 생균과 배양배지, 그리고 발효과정에서 생성된 미생물의 대사산물을 함께 공급하는 장점이 있다(그림 3). 또 다른 방법으로서 균체를 분리 건조하는 방식으로서 배양액을 기계적 또는 물리적 방법으로 분리 및 동결건조 또는 분무 건조하는 방식이 있으나 복잡한 생산설비와 유지비용, 폐수처리 비용 등 생산 비용이 높은 단점이 있지만 단시간 내에 고도의 높은 생균수를 생산할 수 있는 장점도 있다. 이와 같이 생산된 것은 상대적으로 안정성이 낮은 유산균을 공급하거나 중균용으로 사용되고 있다.



그림 3. 미생물 사료첨가제의 제조공정도와 생산현장(예)

### ㉔ 액체배양

액체배양은 표면배양법과 진탕배양법 그리고 심부배양법이 있다. 표면배양법은 호기적 정치배양법으로서 배양액량의 표면적을 크게 하여 표면에서 액체 층으로 산소 이동을 촉진시켜 배양하는 방법이며 진탕배양법은 주로 소량의 미생물을 배양하는 방식으로 배양액을 연속 진탕함으로써 배양하는 방법이다. 또 다른 방법으로서 심부배양법으로서 발효조를 이용하여 교반과 무균공기를 강제주입하고, 열분산과 pH조절을 통하여 배양하는 방식인데 대부분의 사료첨가제 생산업체에서는 발효조의 기계적인 구성과 정밀도만 다를 뿐 심부배양법으로 생산하고 있다. 본 조사에서는 생산업체의 생산여건이나 조건, 기술력에 따라 다르지만 대부분의 사료첨가제 생산업체가 선택하고 있는 일반적인 경우의 생산방식을 기술하였다.

- 접종원의 준비방법 : 균주 stock을 해당 1.5% agar plate에 각각 streaking한 다음과 같은 조건에서 incubator에서 배양한다.
  - 유산균 : MRS, 37 °C, 48시간
  - 효모 : YPD, 30 °C, 48시간
  - 바실러스 : TS broth, 37 °C, 24시간
 baffled flask에서 각각의 broth medium 40ml를 121°C에서 15분 동안 멸균하고 40 ml씩

분주하고, 집락 하나를 접종하고 shaking incubator에서 overnight culture한다.

- 접종 및 배양 : baffled flask에 각각의 broth medium 400 ml 멸균하고 식힌 후 배양액 4 ml (1%)을 접종한 다음, 200 rpm으로 적정 온도에서 shaking incubation 진행한다. 균주의 종류별 배양조건에 따라 다르나 대체적으로 유산균은 37 °C에서 24 시간 동안, 효모는 30 °C에서 48시간 동안 배양을 실시하며 바실러스의 경우에는 30 °C에서 24시간 동안 실시한다.
- 대량의 액체배양 : 미생물을 대량 생산하기 위해서는 주로 발효조를 이용하는 경우가 많다. 발효조는 기능적인 측면에서 기본은 미생물의 증식시키기 위해 충족되어야 할 환경을 조절하는 것이다. 따라서 몇 가지 조건을 갖추어야 하는데 첫째 무균 조작에 의해 필요한 기간 동안 가동되어야 하고 둘째 미생물 증식과 대사생성물의 생성을 위해서 충분한 통기와 교반을 할 수 있어야 하며 셋째 배양조건에 맞는 온도와 pH조절이 가능해야 하고 넷째 유지관리의 편리성이 고려되어야 한다(그림 4).

#### ㉞ 고체발효

고체배양은 적당한 수분을 가지는 고체기질의 표면에 미생물을 직접 배양하는 방법이다. 사료첨가제로서 미생물의 고체배양 방식은 고체기질로서 저가의 사료곡물을 이용하여 이들에서는 미생물 세포내의 삼투압과 균형이 맞는 조건을 만들기 어려우므로 모든 미생물이 잘 생육하지는 못한다. 고체배양에는 여러 가지 방식이 있다. 첫째 정치배양으로서 배지를 수 cm 이하의 얇은 층으로 하고 배양실에서 배양하는 방식, 둘째 통기 배양으로서 금망 또는 다공판에 수십 cm의 두께로 퇴적하고 일정 온도의 풍온의 바람을 상향 또는 하향으로 불어넣으면서 배양하는 방식, 셋째 유동층으로서 배지의 층을 수 m 두께로 금망 또는 다공판에 실어서 유동층 상태로 배양하는 방법, 다섯째 교반배양으로서 일정한 발효조건을 유지할 수 있도록 설계된 고체발효기를 이용하여 배양하는 방식이 있다(그림 5).



그림 4. 액체 배양을 위한 발효조



그림 5. 고체 발효를 위한 고체발효기

#### ㉔ 균체의 분리 및 건조

- 유산균 : 미생물 배양액 4,000 rpm, 4분 동안 원심분리 후, pellet의 무게가 총 현탁액의 40%가 되도록 상등액으로 재현탁한다. 총고형물 [(Dry cell weight) + 부형제 (skim milk)]이 30%가 되도록 부형제를 첨가한다. -80 °C에서 예비동결 하고 본 동결건조를 실시한다.
- 바실러스: 배양액을 6,000 rpm, 20분 동안 원심분리하여 pellet을 회수하고, 총 배지량의 1/10 PBS로 washing한 후, 최소 PBS나 증류수로 현탁한다(통상 1/20 vol). 배양액을 부형제와 혼합한 후에 50 °C에서 overnight 건조한다.
- 효모 : 배양액을 6,000 rpm, 20분 동안 원심분리하여 균체를 분리하고 안정제와 혼합한 다음, 분무 건조하여 과립의 형태로 생산한다.

#### (2) 미생물 사료첨가제의 장기 저장성에 관한 조사

사료첨가제로서 유통되고 있는 미생물제의 종류에서 알 수 있듯이 유산균, 바실러스균, 효모균, 황곡균류 등이 대부분이다. 이와 같은 이유는 혐기균류는 생산이 까다롭고 상품화 이후에도 균수를 유지하는 것이 어려운 반면에 호기성 균류는 상대적으로 배양조건의 관리와 제품의 안정성을 유지하기가 용이하며 또한 현행 사료관리법에 의한 사료공정규격에서도 사용원료의 종류나 발효산물의 생성 또는 생산방법이 아니라 최종제품의 보증균수로써 규제하고 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고 사료첨가제로서 미생물제제는 생산방법, 부형물질의 종류, 저장조건과 유통기간, 포장상태에 따라서 안정성은 크게 달라진다. 따라서 미생물의 사료첨가제의 품질기준과 유통 제품의 품질을 두고 생산자와 소비자 간의 논란이 지속되고 있는 실정이다.

#### ① 미생물제제의 저장성 향상의 필요성

미생물제제의 품질과 보관에 미치는 요인을 살펴보면 제품내의 수분함량, 부형물질의 종류, 보관온도, 습도, 햇빛 등이 영향을 미칠 수 있다. 생산업체에서 생산된 이후, 사용하기 전까지 제품의 보관조건과 사용 후에 남은 잔량의 보관방법에 대해서도 주의하여야 한다. 농가에서 보관하여 사용할 경우에는 저온창고에 저장하는 것이 바람직하지만 현실적으로 매우 어렵다. 따라서 햇빛이 들지 않는 서늘한 곳에서 보관하면서 유통기간 내에 사용하여야 한다. 그러나 여름철의 높은 온도와 습도에서는 세균의 밀도는 빠르게 떨어질 가능성이 높고, 특히 해외 수출의 경우에는 장기간 동안 밀폐된 철재의 컨테이너 속에서 해상운송을 해야 하기 때문에 고온에 노출될 가능성이 높다. 따라서 미생물 제제의 안정성이 높이기 위하여 혼합균주의 선별, 포자형 균주 선별 및 규산염제의 첨가, 미세캡슐, 진공포장 등의 다양한 방법이 강구되고 있다.

## ② 미생물 저장 처리방법에 대한 검증 및 평가

### ㉠ 액상제형의 저장성

사료첨가제로서 액상제형은 투여 및 약제관리의 편리성 때문에 양계농가에서는 선호하는 제형이다. 그러나 액상의 제형은 음수공급라인의 막힘 현상이 없어야 할 뿐 만 아니라 제조 및 보관과정에 있어서 건조된 형태의 제형에 비하여 품질을 유지하는 것이 매우 어렵다. 특히 액상 제형은 균주의 종류나 보관온도에 따라 영향을 많이 받는데 유산균의 경우에는 5℃에서 8일까지는 90%, 유산구균의 경우에는 5℃와 15℃에서 6일까지 100%의 생존할 수 있다고 보고된 바가 있다(최연재, 2010). 그러나 이와 같은 결과는 단기적인 보관기간 동안에 발생한 미생물의 생존율을 조사한 결과이며 일반적으로 사료첨가제의 유통기간은 생산과 운송 및 유통 단계별 보존기간을 고려하면 최소한 6개월에서 1년 이상의 기간이 필요한 바, 액상 제형의 저장성의 향상을 위한 균주의 개발과, 포장 방법 및 저장조건 등 다양한 부분에서 종합적인 검토가 필요하다.

### ㉡ 규산염제 및 다공성 물질의 첨가

고체발효생균제의 규산염제 및 다공성 물질(Elvan, Zolite, Bionit, Calcium phosphate, Activated carbon, Germanium)의 첨가수준에 따른 안정성을 연구한 결과에 따르면 규산염제 및 다공성 물질의 첨가는 안정성이 높아지는 결과를 보고하였다. 특히 Activated carbon 0.1%, 0.3% 처리구에서 *B. subtilis*은 보관기간 60일에 생존율100% 였으며, *L. palantarum*의 경우에도 98.09% 생존하였다고 보고한 바 있다(최연재, 2010). 이외에도 Talc, Kaolin 등이 첨가물질로서 사용될 수 있으나 자세한 원인은 알 수 없지만 미생물의 종류에 따라 생존율이 크게 차이가 나는 결과가 보고된 바가 있다(최윤재, 2016). 한편 사료첨가제를 제조하고 있는 생산업체에서는 고체발효 생균제에 silica나 석회석을 일정량을 혼합하는 경우가 있다. 이는 유통 과정에서 제품의 적재에 의한 하중으로 인한 짓눌림으로 caking현상이 일어나는데 이를 방지하고 제품의 물리적인 물성을 유연하게 하는 목적으로 사용되고 있다.

### ㉢ HPMCP 타블렛 제형의 저장성

배양액으로부터 분리 및 건조된 유산균류와 HPMCP 파우더를 혼합한 후에 3-10KP의 경도(hardness)를 갖는 직경 4mm의 타블렛으로 제조하는 방법으로서 가금류의 *Salmonella gallinarum*에 황균활성을 지닌 특정 유산균류를 탐지하여 특정소화기관으로 전달효율을 높이고자 연구된 바 있다. 연구결과에 따르면 *In vitro, in vivo*검정을 통하여 보았을 때에 HPMCP 타블렛 제형은 파우더 형태나 solution 형태에 비하여 생균제의 소화장관 내 보호 효과와 전달 효율을 증가시켰고, 저장성 또한 개선되었고 HPMCP 타블렛 제형은 특히 쪼아 먹는 습성이 있는 양계용이나 양돈용으로 적합한 것으로 제시하였다(최윤재, 2016).

### ㉣ 열풍건조처리에 따른 제형의 저장성

미생물제제를 생산하는 제조업체에서 가장 많이 선택하는 방법으로서 적당한 수분을 가지는 고체기질을 이용하여 미생물을 직접 배양하고 이를 저온(40-55℃)의 열풍으로 건조하는 방법이다. 이와 같이 열풍으로 건조하는 방식은 저가의 생산비용으로 대량생산할 수 있고 가축에게는 생균과 배양배지, 그리고 발효과정에서 생성된 미생물의 대사산물을 함께 공급하는 장점이 있다. 그러나 혐기성 조건이 필요한 미생물이나 미생물의 밀도가 높은 제품의 생산 방법으로는 한계가 있다. 따라서 주로 혐기성 미생물 보다는 호기성 균류로서 유산균, 바실러스균, 효모균, 황곡균과 같은 미생물을 발효하여 사료첨가제를 제조하는 경우에 적용하고 있다.

#### ㉞ 동결건조처리에 따른 제형의 저장성

배양된 배양액으로부터 기계적 또는 물리적 방법으로 분리하고 이를 동결 건조하는 방식이다. 동결건조는 복잡한 생산설비와 유지비용, 폐수처리 등 생산 비용이 높아지는 단점이 있지만 상대적으로 안정성이 낮은 유산균을 고밀도로 생산할 수 있는 방법이다. 따라서 동결건조 방식으로 생산된 미생물 제제는 주로 유산균을 직접 가축에게 급여하거나 미생물 배양을 위한 종균용으로 유통되고 있다.

#### ㉟ 캡슐화 처리에 따른 제형의 저장성

캡슐이란 고체(solids), 액체(liquids) 또는 기체상의 물질이 특정 조건에서 외부로 유출될 수 있도록 미세한 캡슐내로 저장하는 기술이다. 캡슐화를 위한 조건으로는 내부 물질을 보호할 수 있을 만큼 안전성 및 견고성을 지녀야 한다. 또한 미생물에 손상을 주지 않는 성분으로서 미생물의 대사산물도 함께 캡슐화 되어야 하며 대사산물이 통과할 수 있도록 반투과성이어야 한다. 미생물을 캡슐화하는 주요 목적은 저장기간과 저장조건에 따른 수분과 산소와의 영향을 최소화하여 미생물의 생존율을 향상시키는데 있다. 따라서 캡슐화의 소재와 기능에 대해서 면밀한 검토가 필요하다. 대표적으로 alginate 이용한 캡슐화는 열처리 과정이 없고 수용액 상태에서 이루어지기 때문에 수분 손실에 따른 미생물 사멸의 손실을 적은 장점이 있다. 그러나 alginate 캡슐은 비교적 산 및 열, 인산염에 불안정한 특징이 있어서 이를 보완하기 위한 방안으로서 키토산(chitosan)을 이용하여 2중막 코팅을 형성함으로써 안정성을 높이는 연구가 보고된 바 있다(김 등, 2017).

Chitosan은 양이온의 전하를 가지고 있어 alginate와 같은 음전하의 다당류와는 다전해질성 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 김 등, (2002)의 연구결과에 의하면 alginate capsule에 1%의 chitosan을 사용하여 코팅처리하고 표면을 관찰한 결과, Chitosan 처리 후 가교 결합에 의하여 더욱 촘촘한 막이 형성되었으며 alginate capsule에서 여러 군데 보이던 미세 구멍이 줄어들었을 뿐 만 아니라 chitosan으로 처리한 capsule은 alginate capsule에 비해 *L. fermentum* YL-3의 저장성은 3주 후 약 24% 정도로 생존율이 높았다고 보고 하였다. 그러나 미세캡슐화 제형의 생산은 고가의 생산비용이 소요되는 공정이므로 특수한 목적으로 하부 소화기관에 전달기술을 활용해야 할 경우에 한하여 적용될 수 있을 것이다.

### (3) 반추위 혐기 미생물의 생산방법 및 장기 저장성에 관한 조사

#### ① 산중독증 예방에 이용 가능한 반추위 혐기미생물

반추동물에서 산중독증(lactic acid acidosis)의 예방을 위해 반추위 젖산이용균(Lactate utilizing bacteria)이 많이 이용된다(Home et al.,2009). Chiquette et al. (2008)은 선행연구에서 착유우의 반추위에 *Prevotella bryantii*(25A)를 접종하여 산중독증을 예방하는 연구를 진행하였다. 실험에 사용된 균주는 100L 발효기에서 성장시킨 후 hollow fiber system(Amicon DC 10L, Amicon, Beverly, MA)을 사용하여 농축하여 원심분리 하였다. 원심분리 후 가라앉은 부유물의 10% 를 2.5 L의 상층액에 접종 후  $-86^{\circ}\text{C}$ 에 동결시켰다. 시험 전 anaerobic chamber(Bactron 1, Sheldon Manufacturing Inc, Cornelius, OR)에서 생존 가능한 농도를 결정한 후 착유우의 반추위에 접종하여 산중독증을 예방하는 효과를 보았다.

반추위 미생물 중 *Megasphaera elsdenii*는 반추위내 젖산을 이용하여 VFA를 생성시키는데, 이런 미생물의 작용으로 위내에 젖산이 많이 존재하지 않게 되어 산중독증의 위험을 줄일 수 있다. Klieve et al. (2003)은 산중독증 예방효과를 확인하기 위해 젖산 이용균으로 *M. elsdenii* YE34(lactic acid degrader)와 *Butyrivibrio fibrisolvens* YE44(alternative starch utilizer to *Streptococcus bovis*)를 사용하였다. *M. elsdenii* 는 Rumen Fluid lactate broth에 *B. fibrisolvens*는 Rumen Fluid starch broth에 접종 후  $39^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 후, 배양균 500 mL를 육우의 캐놀라에 접종하여 산중독증의 예방효과를 보았다. 또한 Aikman et al. (2011)은 SARA 발생 위험이 높은 착유우에서 *M. elsdenii* NCIMB 41125 를  $39^{\circ}\text{C}$ 의 온도에 24시간 배양 후, 배양균 250 mL를 반추위 캐놀라에 접종하여 pH저하 효과를 확인하였다.

#### ② 반추위 혐기 미생물의 상업적인 생산

최근에 사료에서 성장촉진 목적으로 항생제 혼입이 금지되면서 미생물제제의 첨가에 관한 관심이 대두되고 있다. 가축의 생산성 향상을 위하여 미생물 제제의 급여효과를 조사한 연구결과는 매우 다양하다. 대표적인 연구사례를 살펴보면 *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*를 젖소에게 급여한 연구결과를 보면 건물, 유기물, 조단백질의 소화율이 개선된 것으로 나타났다고 보고하였다(Gomez와 Alarcon, 1990; Newbold 등, 1995). 착유우의 경우 산유량이 증가하고(박 등, 1996; 김 등, 2001), 한우 육성 비육우의 경우는 일당증체량의 증가와 경제성이 향상되며(강 등, 1993), 송아지의 경우에는 질병예방 및 일당 증체량, 사료효율 등이 개선되었다(Theodoriu, 1990; 최 등, 1991). 또한 *Bacillus subtilis*를 포함한 상업용 미생물 제제의 급여는 반추위내의 미생물 군집의 변화, 반추위내 pH의 안정화, 휘발성 지방산 생성량의 증가, 소화율이 개선된다고 보고된 바 있다. 그러나 한편으로는 미생물 제제의 첨가가 소화율 향상에 영향을 주지 않는다는 연구가 있는 등(Martin과 Nisbet, 1990; Denigan, 1992) 미생물 제제의 사용효과에 대한 연구결과는 일관적이지 못하다. 따라서 반추동물에 급여하는 미생물 제제로서 이용 가능한 후보미생물은 반추위 내 생

존성 및 정착성, pH에서의 안정성, 높은 계대능력 및 효소역가의 조건을 충분히 검증해야 할 것이다. 이와 같은 조건을 만족하기 위해서는 후보미생물을 장내에서 분리하는 것이 가장 효과적일 것으로 생각된다.

상업용 호기성 미생물제제가 아니라 반추미생물을 배양하여 반추동물에게 급여한 연구결과를 살펴보면 반추위로부터 분리한 곰팡이를 양에게 급여하였을 때 반추위내 미생물수가 증가하였고 반추위내 pH의 안정화 및 영양소 소화율의 증가하고 질소 축적율이 높아진 것으로 보고된 바 있다(Lee 등, 1996). 또한 산소 저항성을 갖는 젖산 이용 박테리아가 분리 동정한 *Megasphaera elsdenii* 와 *Enterococcus faecium*를 조합하여 혐기 및 호기적 조건에서 배양하여 급여효과를 규명한 실험에서 분리 동정한 균의 급여는 반추위 내의 젖산 농도 및 acetic acid와 propionic acid의 농도가 감소하고 butyric acid와 valeric acid의 생성은 증가되었으며 pH가 높아진 것으로 보고되었다. 또한 젖산중독증 (Lactic acidosis)을 인위적으로 유도한 *In vivo*시험에서 미생물제제의 첨가는 반추위내 전체 휘발성 지방산 (VFA)의 생성을 증가되었고 혈중 이산화탄소압 (pCO<sub>2</sub>)이 감소되고 산소압 (pO<sub>2</sub>)은 증가되었으며 혈중 pH가 높아지는 경향을 보였다고 보고하였다. 그러나 반추위 유래 미생물제제의 많은 효용성에도 불구하고 계대배양의 어려움과 배지조건상 경제성이 낮다는 문제점이 있어 아직까지는 반추미생물을 대량으로 배양하여 미생물의 밀도가 높고 안정성과 저장성이 우수한 제품이 없는 실정이다. 현재까지 국내에서 반추미생물 또는 반추위액을 활용하여 산업화된 방법은 두 가지로 분류할 수 있는데 첫째, fistula가 장착된 축우로부터 반추위액을 채취하여 대량으로 혐기배양하고 이를 다시 사료곡물과 혼합한 다음, 상업용 유용 미생물을 접종하여 고체 발효한 제품이다(그림 6). 하지만 특수한 목적과 기능을 가진 미생물을 동정분리하고 계대 배양하여 대량으로 생산하지 않고 Rumen과 비슷한 조건을 제공하도록 설계된 정밀한 배양기를 이용하여 반추미생물을 혼합배양(mixed fermentation)하는 방법이다. 둘째 직접 반추위 내용물을 활용하는 방법으로서 도축장에서 반추위 내용물을 수거하고 이를 선별한 다음, 사료용 곡물과 혼합하여 호기성 미생물의 발효를 위한 배지로 활용하여 발효하고 건조한 제품이 유통되고 있다(그림 6). 하지만 언급한 방법들은 활성상태의 반추미생물을 급여하여 반추위내에서 정착하는 것을 목표로 하기 보다는 단순히 상업용 미생물의 발효를 위한 고체배지로 활용하는 것이다. 반추위 내용물을 직접 가축에게 사용하지 못하는 이유는 냄새로 인하여 사료의 기호성이 크게 떨어지는 사례가 많고 인위적으로 배양기에서 대량 배양한 활성상태의 반추미생물을 직접 가축에게 급여하지 못하는 이유는 반추위 미생물의 특성상 상업용 미생물제제에 비해 크게 안정성이 떨어져서 유통 상에 여러 가지 문제점이 있기 때문이다.



그림 6. 반추위 혐기 미생물 및 내용물의 산업적 생산방법

### ③ 반추위 혐기 미생물의 저장성 검토 및 미생물 첨가제의 delivery system 구축

곡류위주의 고 에너지 사료 위주로 사육을 하는 경우에는 반추위 내에 존재하는 그람양성 박테리아에 의하여 빠른 속도로 젖산을 생성되어 반추위내 pH의 저하되고 심한 경우에는 폐사에 이르게 된다. 전통적으로 완충제와 같은 화학제를 사료에 첨가하거나 급여하는 것은 반추위 내의 발효 안정화에 빠른 효과가 있으나 대체적으로 기호성이 떨어지고 음수량이 증가되어 깔집의 교체시기가 빨라지는 단점이 있다. 따라서 이와 같은 문제점을 해결하기 위한 반추동물의 반추위 내에서 분리된 미생물을 대량배양하고 사료첨가제로 제형화하여 반추가축에게 급여하는 방안이 강구되고 있다. 반추위 내에서 분리된 미생물의 급여와 관련된 연구를 보면 *Megasphaera elsdenii*를 속효성 사료기질에 적용하여 시험한 결과, 젖산의 축적이 감소되는 것으로 보고되었다(Kung and Hession, 1995). 한편 젖산을 이용하는 미생물 외에도 반추미생물은 섬유소 분해하는 대표적인 박테리아로서 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flaeaciens* 그리고 *Ruminococcus albus*가 반추위내의 발효 안정화에 관여한다. 본 연구에서는 반추위 내에서 분리한 미생물로서 속효성 탄수화물로부터 생성된 젖산을 이용하는 반추미생물(예: *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*)대량으로 배양하는 기술을 개발하고 기존의 혐기미생물의 장기저장을 위한 처리기술을 조사하고 검토하였다. 검토 결과, 반추위 유래 미생물의 대량배양 방법은 그림 7과 같이 설계된 제조공정으로 고밀도 생산이 가능하며 대량으로 배양된 반추미생물은 기존의 혐기미생물의 저장처리 방법에 따라 제형을 완성함으로써 안정성과 저장성이 확보된 사료첨가제 제조가 가능할 것으로 판단된다. 그러나 사료첨가제로서 미생물제제는 고도의 비용이 소요되는 생산방식으로서 상용화가 어렵다. 따라서 복잡하고 고도의 생산설비가 소요되는 생산 공정

을 단순화하고 저가의 원료를 최대한 이용하여 경제성을 확보하는 것이 매우 중요하다.

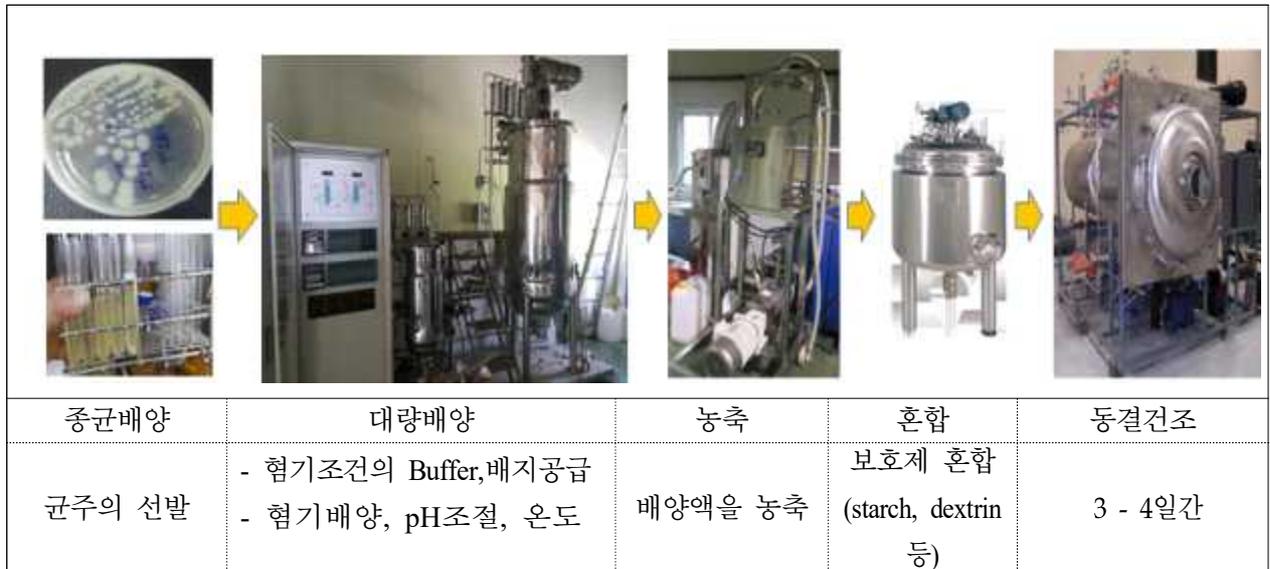


그림 7. 혐기 미생물의 대량생산 공정(산업화)

㉔ 타블렛 제형 또는 타정

건조된 유산균류와 HPMCP 파우더를 혼합한 후에 일정한 경도(hardness)를 갖도록 하는 타블렛으로 제조하거나 또 다른 방법으로서 타정하는 방법으로서 보조제로서 수산화칼슘, 이산화규소, 유당, 전분과 혼합하여 일정한 크기와 경도를 갖도록 생산할 수 있다. 타블렛이나 타정하는 방법은 특정 유산균류를 탐지하여 반추위내로 전달할 수 있으며 외부의 산소나 온도 습도에 따른 영향을 적게 받을 수 있으므로 저장성 향상에 도움을 줄 수 있다.

㉕ 코팅처리

코팅방법으로서 캡슐화 처리에 의한 제형을 생산할 수 있으나 비교적 고가의 생산비용이 소요되는 공정이므로 특수한 목적으로 약물의 전달기술을 활용해야 할 경우에 한하여 적용될 수 있다. 내열성을 가진 균주라면 건조된 균주를 유동층을 형성시키고 코팅소재를 고압으로 미세하게 분무하여 코팅하는 방법으로 생산할 수 있다.

㉖ 포화지방 또는 경화지방으로 압출성형

열에 취약한 미생물제제를 코팅할 수 있는 방법으로서 건조된 균주를 포화지방 또는 경화지방과 혼합하고 이를 지름 2-3mm의 타공 die를 통하여 roller로 밀어내는 방식으로서 압축력만으로도 일정한 크기의 코팅된 제형을 생산할 수 있다. 생산 공정측면에서 단순하고 저렴한 비용으로 생산할 수 있다. 그러나 경화지방으로 코팅하기 때문에 반추위 내에서 반추 미생물이 방출되지 않고 췌장의 lipase에 의해서 제형이 붕괴되어 하부소화기관에서 방출될 가능성이 있다.

㉔ 호화전분으로 압출성형

내열성이 약한 미생물을 효과적으로 제형화할 수 있는 방법으로 건조된 균체를 호화 된 알파전분과 혼합하고 일정량의 수분을 첨가한 다음 미세하게 타공된 die를 통하여 roller로 압출시키는 방식이다. 열을 가하지 않고 압축력으로 일정한 크기로 제형화하는 방법으로서 생산 공정이 매우 단순하고 저렴한 생산방법이다. 그러나 die을 통과할 때 강한 압축력으로 고온 고압상태가 될 수 있으므로 미생물의 생존율이 급격하게 감소가 일어나지 않도록 압축력을 정확히 예측하는 것이 필요하다. 반추위 내에서 분리 동정된 특정균류를 탐지하여 반추위내로 전달할 수 있으며 저장성 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

㉕ 분무건조마이크로캡슐기술(spray drying —technique)

생균제 사용 시 미생물의 생존에 불리한 환경조건에서 살아남기 위한 방법으로 보호막이 사용된다(Kailasapathy, 2002). 미세캡슐형성(Microencapsulation)방법은 프로바이오틱스 제조에 일반적으로 사용되며, 1 마이크론 미만에서 수백 마이크론까지의 생산되고 마이크로미터와 밀리미터 사이의 직경을 가진다(Jyothi et al., 2012). 마이크로 캡슐은 구형의 얇고 강한 반투과성막으로 구성되어 있으며, 박테리아 세포는 이런 반투과성막 내에 보호된다(Jankowski et al., 1997). 많은 양분과 대사산물이 쉽게 확산될 수 있는데, 반투과성막이 장벽역할을 하고 마이크로 캡슐의 직경이 작아 박테리아 세포를 전달할 때의 오염을 최소화 할 수 있다(Franjione and Vasishtha, 1995).

Fritzen-Freire et al.(2012)는 prebiotics inulin, oligofructose, 및 oligofructose- enriched inulin을 분무건조하여 마이크로 캡슐을 제조하고 Bifidobacterium BB-12의 생존능력을 확인하였다. 분무건조 전 프로바이오틱 원액을 37 °C에서 2 시간 배양 후 Ananta et al. (2005)방법으로 접종하였다. 분무건조기의 공기유입온도는 150±2 °C였고 출구의 온도는 55± 3 °였다. 그 결과 bifidobacteria를 함유한 분무건조마이크로캡슐은 4°C와 -18°C에서 최대 180일 동안 높은 생존율을 나타냈다. 또한, oligofructose-enriched inulin과 oligofructose을 혼합하여 마이크로 캡슐을 제조하면 저장기간 동안 bifidobacteria의 생존율을 더 높일 수 있었다.

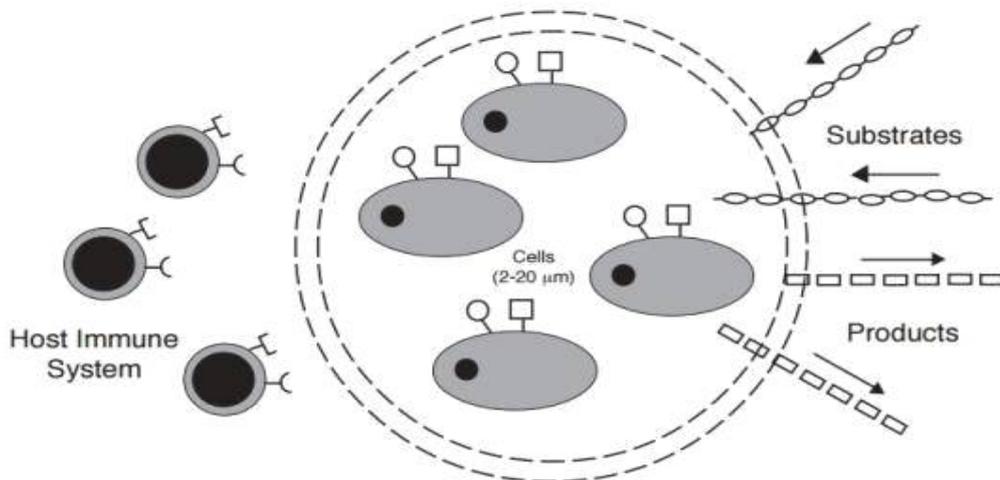


그림 8. Principle of encapsulation: Membrane barrier isolates cells from the host immune system while allowing transport of metabolites and extracellular nutrients. Membrane with size selective pores (30-70 kDa) (Kailasapathy, 2002)

㉞ 압출성형기술(extrusion technique)

Krasaekoopt et al., 2004는 압출성형기술(extrusion technique)을 이용하여 마이크로 캡슐을 제조하였다. 캡슐 제조를 위해 프로바이오틱 박테리아(Lactobacillus acidophilus 547, Bifidobacterium bifidum A TCC1994, Lactobacillus casei 01)를 다양한 코팅재로 코팅하여 캡슐화 한 뒤 생존효과를 보였다.

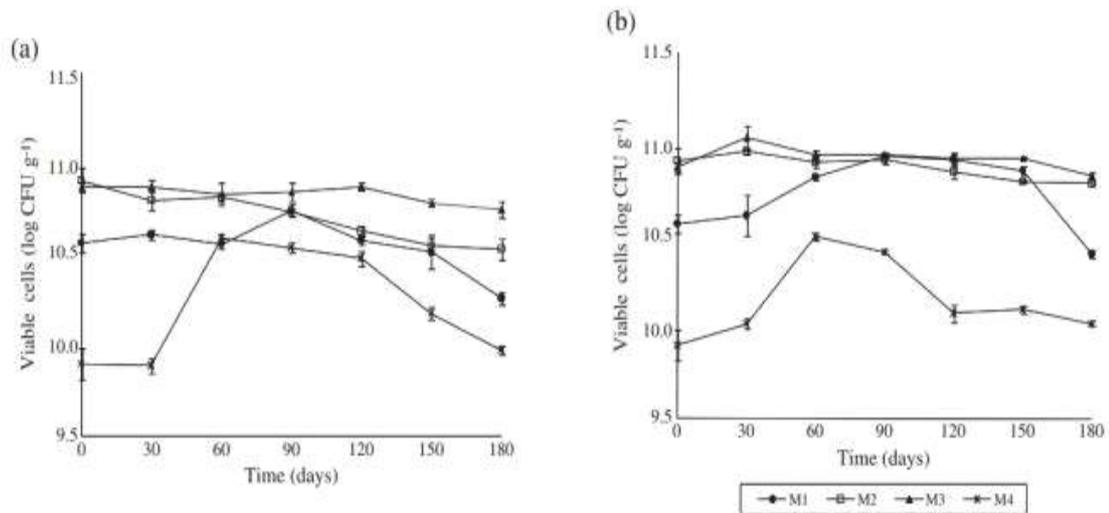


그림 9 . Effect of different encapsulating agents on the viability of Bifidobacterium BB-12 microcapsules during storage time, at 4 °C (a) and at -18 °C (b). (M1): microcapsules with reconstituted skim milk (RSM), (M2): microcapsules with RSM and inulin, (M3): microcapsules with RSM and oligofructose-enriched inulin, (M4): microcapsules with RSM and oligofructose. Error bars represent standard deviations of the mean of experiment. (Fritzen-Freire et al., 2012)

캡슐화에 쓰인 코팅재로는 chitosan, sodium alginate, 및 poly-l-lysine이 쓰였으며, 코팅했을 때 두께가 코팅하지 않았을 때 보다 약 17% 증가했다. 세가지 코팅재 중 chitosan이 코팅 된 프로바이오틱 캡슐의 생존성이 제일 좋았는데, pH 1.55의 환경에서 L. acidophilus, B. bifidum, 및 L. casei의 생존시간이 코팅하지 않은 것보다 1.5, 4.7, 및 4.2배 더 증가했다. 이에 따라 산중독증을 예방하기 위한 미생물 사료첨가제 개발시 위의 미생물의 종류와 접종방법, 마이크로 캡슐화 방법을 참조하여 제조한다면 반추위 내에서 미생물의 생존을 도와 산중독증 예방에 도움이 될 것으로 보인다.

## 2. 혐기 미생물의 대량생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성조사

### 1) 제 2협동에서 분리된 미생물의 대량생산 및 대량생산에 따른 발효특성 조사

균주를 이용한 제제의 산업화에는 많은 양의 균체가 필요하며 한정된 조건에서 대량으로 생산할 수 있는 기술 개발이 필수불가결한 부분이다. 또한 대량생산 조건에서 경제적인 생산비용의 절감과 생산의 편리성과 용이성이 함께 고려되어야 한다. 본 연구에서는 경제적인 측면을 고려한 대량생산 조건을 규명하기 위하여 제 2협동 연구기관으로부터 분리된 반추위내 유래 혐기미생물 균주를 대상으로 산업용 발효기를 이용하여 미생물의 성장과 발효특성을 조사하였다.

#### (1) 재료 및 방법

##### ① 종균의 배양(Seed culture)

종균배양을 위하여 사용된 5Liter의 배양기는 혐기미생물의 배양조건을 최대한 충족할 수 있도록 Purified CO<sub>2</sub>를 공급하는 용기와 공급조절장치를 부착하였다(그림 1). 순차적으로 Scale-up배양된 종균을 액체배양기를 사용하여 배양을 수행하였고 이를 통해 Growth curve 점검하였다. 이때 균주의 배양을 위해 사용된 배지의 조성은 DA(Dehority's artificial medium(표 1)을 사용하였으며 선발균주의 배양은 37℃에서 39 시간 동안 진행하여 정지기와 사멸기에 도달까지의 생육곡선을 확인하였다. 배양조건은 최종배양의 5%에 해당되는 양을 접종하였고 초기의 pH는 6.65, 교반기 속도는 38rpm으로 유지하였다.



그림 10. 혐기조건을 갖춘 미생물배양기(5리터 용량)

##### ② 주 배양(Main culture)

본 연구에서 사용된 미생물 배양기는 고온 고압의 멸균(105℃~130℃)기능과 pH, DO,

Anti-Foam 및 온도 자동조절 장치가 구비되어 있으며 혐기조건을 유지하기 위하여 배양기 하단의 air sparger를 통하여 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> 가스를 배양기 내부로 유입하여 분산시키는 방법으로 용존산소를 제거하였다(그림 1).



그림 11. 종배양기(50L) 및 주배양기(500L)

균주의 배양에 사용된 배지는 종균배양과 동일한 DA(Dehority's artificial) medium을 사용하였고, 단일배양법은 배양종료시까지 혐기배양을 진행하면서 혐기미생물의 발효특성을 조사였고, 간헐적 유가배양법은 혐기미생물의 생육곡선이 정지기(stationary phase)에 도달하기 전에 간헐적으로 feeding medium을 주입하는 방법으로 배양을 진행하였다. feeding medium의 공급방법은 DA(Dehority's artificial) medium을 3배의 농도로 농축하여 배양시간 27시간부터 33시간까지 총 6시간에 걸쳐서 pH의 변화에 영향을 주지 않도록 임의로 공급량을 조절하였다. 이때 feeding medium주입된 양은 최종배양의 약 5.7%에 해당하였다. 배양조건은 초기의 pH는 6.41, 배양시간은 53시간, 교반기 속도는 38rpm이었다.

## (2) 시험결과

### ① 단일 배양법에 의한 혐기미생물의 생육곡선의 변화

혐기미생물은 배양시의 변화 및 pH 증식변화는 그림 2과 같다. 혐기미생물의 생육은 다른 산업용 호기성 또는 혐기성 미생물에 비하여 다소 느리게 성장하는 것으로 판단된다. 본 실험에 따른 혐기미생물의 생육은 유도기로서 배양 후 6시간 경과까지는 성장에 변화가 없었으며, 배양 후 9시간부터 30시간까지 지속적으로 성장하는 경향을 보였고, 배양 후 33시간 이후부터는 사멸기로 판단된다.

㉔ 2. DA(Dehority's artificial) medium

Component	Amounts		
	Seed fermentation (Working. vol. 3.5L)	Second seed fermentation (Working. vol. 20L)	Main fermentation (Working. vol. 180L)
Mineral I solution <sup>1)</sup>	700ml	4,000ml	36,000ml
Mineral II solution <sup>1)</sup>	700ml	4,000ml	36,000ml
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	35ml	200ml	1,800ml
VFA solution <sup>3)</sup>	235ml	1,340ml	12,060ml
Hemin solution <sup>4)</sup>	4ml	20ml	180ml
Resazurine(0.1%)	4ml	20ml	180ml
Acid-hydrolysed casein(Amicase)	7g	40g	360g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	14g	80g	720g
Cystein-HCl·H <sub>2</sub> O	4g	20g	180g
Rumen fluid <sup>5)</sup>	1,400ml	8,000ml	72,000ml
Sodium lactate	70g	400g	3,600g
Distilled water	350ml	2,000ml	17,900ml

1) Mineral solution I	:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5g
		Distilled water	1,000ml
Mineral solution II		NaCl	4.5g
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5g
		CaCl <sub>2</sub>	0.25g
		MgSO <sub>4</sub>	0.25g
		MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.10g
		ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.10g
		COCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01g
		Distilled water	1,000ml
2) Vitamin mixture	:	Pyridoxine HCl	0.2g
		Riboflavine	0.2g
		Thiamine HCl	0.2g
		Nicotinamide	0.2g
		Ca-D-pantothenate	0.2g
		<i>p</i> -Amino benzoic acid	0.01g
		Stock solution*	1ml
	Distilled water	1,000ml	

\*stock solution : 0.125g of folic acid, 0.125g of biotin, 0.125g of cobalamine dissolved in 25ml of D.W

3) Acetic acid, 17ml; propionic acid 6ml; n-valeric acid 1ml; Iso-valeric acid 1ml; Iso-butyric acid 1ml;

DL- $\alpha$ -methylbutyric acid 1ml each, plus distilled water to 1,000ml

4) 10ml of hemin dissolved in 100ml of ethanol plus 1ml of 1N NaOH.

5) Rumen fluid can be replaced with D.W.

㉕ 간헐적 유가배양법(interval feeding culture)에 따른 혐기미생물의 생육곡선의 변화

간헐적 유가배양법에 따른 혐기미생물은 배양시의 변화 및 pH 증식변화는 그림 3과 같다. feeding medium의 주입에 따른 혐기미생물의 생육은 단일배양법과는 달리 배양 후반기까지 지속적으로 성장을 하는 경향을 나타내었다. 그러나 feeding medium의 공급에 따른 미생물의 성장은 33시간대에서 약간 감소하는 경향을 보였는데 이와 같은 결과는 feeding medium의 농도와 공급량 및 주입속도와 직접적인 관련이 있는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 산업용 배양기의 운용적인 측면에서 배양 53시간 경과시점에서 배양을 종료하였으나 이후에도 혐기미생물은 지속적으로 성장하였을 것으로 추정된다. 따라서 경제적이고 효율적인 대량생산 방법을 규명하기 위하여 feeding medium의 농도와 조성과 공급량과 배양종료시점에 대한 추가적 연구가 필요한 것으로 판단된다.

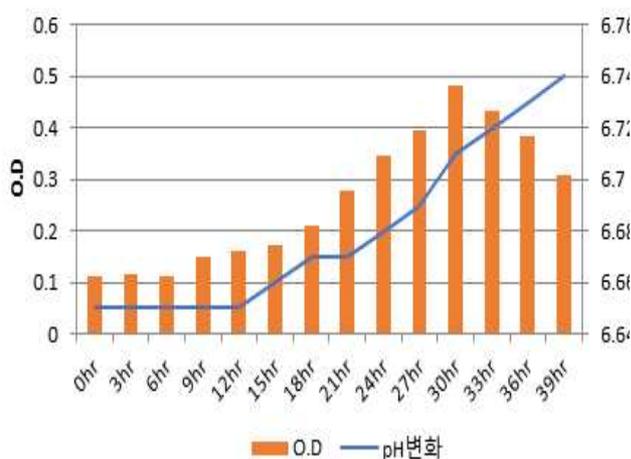


그림 12. 단일배양법에 의한 미생물성장 및 pH의 변화

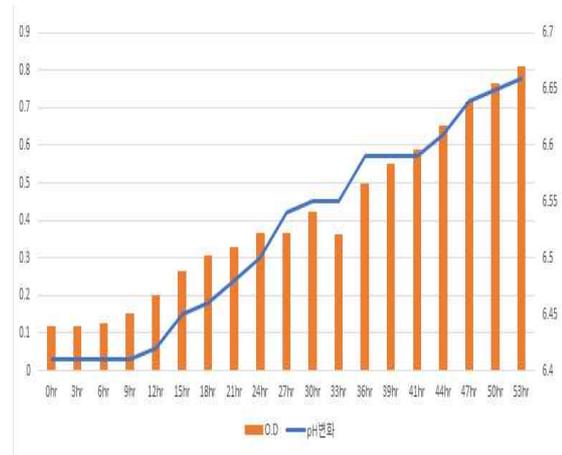


그림 13. 간헐적 유가배양법에 의한 미생물의 성장 및 pH의 변화

2) 제 3협동에서 확립된 저장처리 방법을 이용한 대량생산 체계 구축 및 대량생산에 따른 발효특성 조사

반추위 유래의 혐기미생물을 일반적인 상업적인 호기성 또는 통성혐기성 세균에 비하여 생산조건이 매우 까다롭고 증식속도가 다소 느린 것으로 판단된다. 따라서 효과적으로 산업화하기 위해서는 생산현장에 적합하게 적용할 수 있는 기술 개발이 매우 중요한 부분이다. 따라서 본 연구에서는 경제적 측면과 생산의 편리성을 고려하여 산업현장에 적용할 수 있는 대량생산 체계 구축과 산업화를 위한 제형의 특성을 조사하였다.

(1) 혐기미생물의 배양

혐기미생물의 배양은 제 2협동기관으로부터 배양된 균주를 공급받아서 종균배양기(seed fermentor)와 종배양기(second seed fermentor)에서 각각 48시간동안 배양하여 scale-up한 다음 주배양기(main fermentor)에서 배양하는 방법으로 본 연구를 수행하였다. 본 연구에서 사용

된 산업용발효기는 그림 1과 같이 혐기조건을 제공할 수 있도록 개조되었으며 배양배지와 배양장치는 121℃ 고온 고압으로 완전 멸균하였고 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 강하게 분사하여 용존산소를 완전히 제거된 상태를 확인한 다음, 종균의 접종과 혐기배양을 실시하였다. 본 연구에서 사용된 혐기배양을 위한 배양배지는 DA(Dehority's artificial) medium를 사용하였고, 배양온도는 37℃, 초기 pH는 6.83, 교반기 속도는 38rpm으로 유지하였다. 최종적으로 배양이 완료된 배양액의 균수는  $6.0 \times 10^8$ /g으로 나타났다. 균체의 생산량은 건조 균체량을 측정하였는데, 즉 채취한 배양액을 -5℃로 급냉하고 12,000 x g에서 5분간 원심분리하여 균체 pellet을 회수하여 80℃의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조하여 무게를 측정하였다. 이때 미생물의 건조중량은 1.114g/Liter로 조사되었다.

## (2) 균체의 분리

균체분리에는 원심분리와 여과방법이 주로 사용된다. 각 배양액의 특성, 균체의 침강성과 응집성, 균체의 종류에 따라 적절한 균체분리 방법과 장치를 선정하는 것이 중요한데 곰팡이나 효모배양액으로부터 균체를 분리하는 데는 여과기로서 회전원통 진공여과기(rotary drum vacuum filter), 압력여과기(filter press, plate-and-frame-press filter)등이 사용된다. 곰팡이의 경우에는 균사가 적당한 여과매체층을 형성하게 되고, 효모는 3-6 $\mu$ 으로 세균(간균, 0.5 x 2.6 $\mu$ )에 비하여 크기 때문에 여과분리가 가능하다. 그러나 공업적으로 여과할 때는 여과속도가 빨라야 하므로 규조토 등의 여과조제(filter aid)를 병용하기도 한다. 세균과 방선균의 입자크기는 다른 균에 비하여 훨씬 미세하기 때문에 여과조제 없이 균체를 여과 분리하는 것은 거의 불가능하므로 보통은 원심분리 방법으로 균체를 회수하는 경우가 많다.

본 연구에서는 혐기성 미생물의 균체의 입자의 크기와 산소에 노출되는 시간을 최소화하기 위하여 원심분리방법을 선택하여 수행하였으며 사용된 원심분리기는 회전수가 10,000-20,000rpm이며 원심분리기 내부의 온도가 4℃내외로 유지되도록 고안된 관형원심분리기(tubular bowl centrifuge)를 사용하였다. 이 형식의 원심분리기는 원심분리기 안에 가늘고 긴 원통형의 보울(bowl)이 윗부분에 매달려 고속으로 회전하게 되어 있다. 원액은 하부에서 공급되며 동심층으로 분리된 두 액은 상부의 환상дук을 넘쳐 나가 고정된 뚜껑으로 배출된다. 본 연구에서 수행된 혐기 미생물 균체 분리과정은 다음과 같다.

- ㉠ 배양기로부터 배양액을 500리터 용량의 저장탱크로 이송한다.
- ㉡ 배양액에 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 강하게 분사하여 용존산소를 제거하면서 원리분리기 내부로 배양액을 이송시킨다.
- ㉢ 관형원심분리기를 가동하여 12,000rpm에 도달하도록 점차적으로 회전수를 높인다.
- ㉣ 원심분리가 완료되면 장치를 해체하고 내부의 보울(bowl)을 빼낸다.
- ㉤ 보울(bowl)내부의 표면에 붙어 있는 균체를 신속하게 긁어낸다.
- ㉥ 회수된 균체는 재현탁한 다음 동결건조 보호제와 혼합하여 -50℃에서 동결시키고 동결 건조기에서 건조한다.



그림 14. 혐기미생물 균체분리 장면

### (3) 혐기 미생물의 동결건조

미생물의 장기보존을 위한 동결건조는 미생물 균체를 냉동 건조시킴으로써 저장하는 방법이며 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다. 동결건조는 오염의 방지, 저장기간, 수송 및 다른 원료와 혼합 등에서 장점이 있는 반면 동결건조과정에서 균체의 손상을 받아 활성과 생존율에 많은 영향을 미치게 되므로 미생물 균체의 활성과 생존율을 최대한 높이기 위하여 적절한 동결건조 보호제(cryoprotectant agents)의 사용이 매우 중요하다. 동결보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결건조의 시간 및 조건 등에 따라 다르다. 따라서 본 연구에서는 다음과 같이 동결보호제의 종류 별로 생산조건에 따라 동결보호효과를 조사하였다.

#### ① 동결건조 제형의 생산

##### ㉠ 실험 1.

본 실험에서는 혐기미생물의 동결건조에 따른 동결보호제로서 skim milk, whole milk, whey 3종류를 선정하여 동결건조에 따른 보호 효과를 비교하였다. 실험방법은 혐기조건 하에서 배양된 균체를 고속원심분리하여 균체슬러지를 회수하여 상등액으로 재현탁하여 20% cell suspension하고 총 무게 대비 10%와 20%수준으로 동결건조 보호제와 혼합하여 균질화한 후  $-50^{\circ}\text{C}$ 에서 동결시킨 다음 실험용 동결건조기(FDS-12012; OPERON, Korea)에 넣어서 0.1-0.07 atm상태에서 건조하였다.

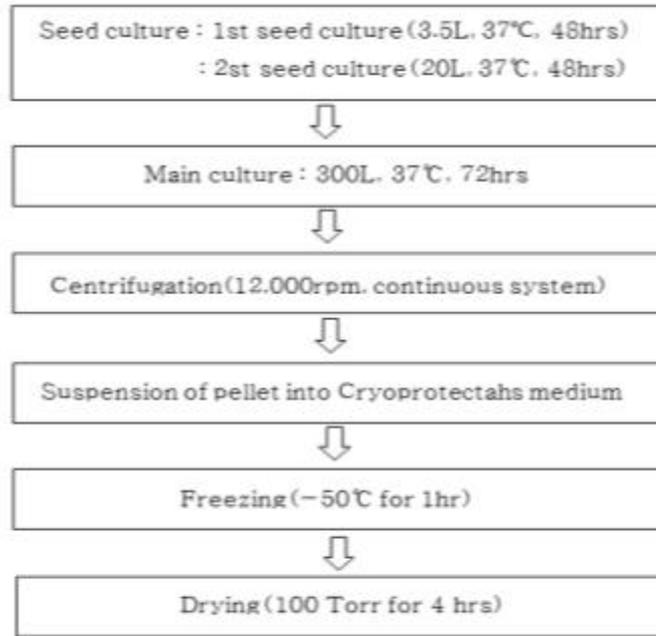


그림 15. procedure for freeze-drying

표 3. 동결 보호제 종류에 따른 동결건조 제형의 혐기미생물의 균수변화(Exp.1)

Cryoprotectant agents		건조 전 total counts <sup>a</sup>	건조 후 total counts <sup>b</sup>	생존율 (%) <sup>c</sup>
Skim milk	10% <sup>d</sup>	$5.25 \times 10^{11}$	$2.90 \times 10^{10}$	5.51
	20%	$7.40 \times 10^{11}$	$2.51 \times 10^{10}$	3.39
Whole milk	10%	$5.69 \times 10^{11}$	$2.78 \times 10^{10}$	4.89
	20%	$4.50 \times 10^{11}$	$4.63 \times 10^{10}$	10.29
Why	10%	$7.80 \times 10^{11}$	$4.98 \times 10^{10}$	6.39
	20%	$7.75 \times 10^{11}$	$3.43 \times 10^{10}$	4.43

<sup>a</sup>count of before drying x total wet cell weight. <sup>b</sup>count of after drying x total dry cell weight.

<sup>c</sup>100x(mean value of count before drying/count after drying).

<sup>d</sup>concentrations of freeze-drying protectants(w/v).

동결 보호제의 종류와 농도를 달리하여 동결 건조를 수행한 결과에서 처리에 따른 생존율의 수준은 4 - 10%로 측정되었으나 처리구별로 생존율의 차이가 너무 크고 처리에 따른 의미 있는 경향을 발견하기 어려웠다. 그러나 혐기미생물의 동결건조에 따른 생존율은 일반적인 상업적인 유산균류와 비교할 때 다소 낮은 생존율을 나타낸 것으로 생각된다.

#### ㉞ 실험 2.

혐기미생물의 동결보호제로서 4종의 당류(Sucrose, Dextrin, Fructose, Glucose)를 선정하여 따른 보호 효과를 조사하였다. 실험 1과 동일한 방법으로 혐기조건하에서 대량으로

배양된 균체를 고속원심분리하여 균체슬러지를 회수하여 재현탁하여 20% cell suspension 하고 총 무게 대비 10%와 20%수준으로 동결건조 보호제와 혼합하여 균질화한 다음 산업용 동결건조기(MG-VFD 50; MG Industry Co, Korea)를 이용하여 3일 동안 건조를 시행하였다. 생존율의 계산방법은 측정된 생균수를 건조전과 후의 총무게를 곱하여 총 생균수를 계산하고 이를 건조전과 건조후의 차이를 비교하는 방법으로 조사하였다.



그림 16. 동결건조에 사용된 생산용 동결건조기

표 4. 동결 보호제 종류에 따른 동결건조 제형의 혐기미생물의 균수변화(Exp. 2)

Cryoprotectant agents		건조 전 total counts <sup>a</sup>	건조 후 total counts <sup>b</sup>	생존율 (%) <sup>c</sup>
Glucose	10% <sup>d</sup>	1.60 x 10 <sup>12</sup>	1.74 x 10 <sup>11</sup>	10.88
	20%	1.76 x 10 <sup>12</sup>	1.12 x 10 <sup>11</sup>	6.34
Sucrose	10%	1.60 x 10 <sup>12</sup>	1.43 x 10 <sup>11</sup>	8.94
	20%	1.85 x 10 <sup>12</sup>	1.24 x 10 <sup>11</sup>	6.72
Dextrin	10%	1.64 x 10 <sup>12</sup>	1.64 x 10 <sup>11</sup>	9.97
	20%	2.25 x 10 <sup>12</sup>	2.15 x 10 <sup>11</sup>	9.55
Fructose	10%	1.68 x 10 <sup>12</sup>	1.06 x 10 <sup>11</sup>	6.29
	20%	2.03 x 10 <sup>12</sup>	1.25 x 10 <sup>11</sup>	6.17

<sup>a</sup>count of before drying x total wet cell weight. <sup>b</sup>count of after drying x total dry cell weight.

<sup>c</sup>100x(mean value of count before drying/count after drying).

<sup>d</sup>concentrations of freeze-drying protectants(w/v).

동결 보호제로서 당류를 종류와 농도를 달리하여 동결 건조를 수행한 결과에서 처리에 따른 생존율의 수준은 6.17- 10.88% 수준으로 조사되었다. 그러나 동결보호제로서 glucose를 사용하여 혐기미생물을 동결 건조를 수행한 경우에는 하절기의 고온다습한 외부환경에 노출되면 쉽게 굳거나 끈적거리는 현상이 자주 발생하여 생산 작업에 어려움

이 많았다. 당류의 사용에 따른 동결건조 제형의 안정성이나 작업의 편리성 및 경제적 측면에서는 Dextrin이 가장 양호한 것으로 판단되었다.

㉔ 실험 3.

혐기 미생물의 산업화를 위한 대량생산은 경제성과 생산의 편리성이 함께 고려해야 한다. 따라서 본 실험에서는 동결보호제로서 비교적 값싼 dextrose를 선정하였고 혐기미생물의 생존율을 높이기 위하여 Vitamin C를 첨가하여 대량생산을 실시하였다. 산업현장에서는 Vitamin C를 동결건조 시에 미생물의 생존율을 높이기 위하여 일정량을 첨가하는 방법이 활용되기도 한다.

실험방법은 혐기조건하에서 대량으로 배양된 균체를 고속원심분리하여 약 500g의 균체 슬러지를 회수하여 8.5리터의 상등액으로 재현탁하였고 총무게의 10%수준의 dextrose와 30g의 Vitamin C 를 혼합하여 균질화한 다음 산업용 동결건조기(MG-VFD 50; MG Industry Co, Korea)에서 3일 동안 동결건조를 시행하였다. 생존율의 계산방법은 측정된 생균수를 건조전과 후의 총무게를 곱하여 총 생균수를 계산하고 이를 건조전과 건조후의 차이를 비교하는 방법으로 조사하였다.

표 5. Vitamin C 첨가에 따른 동결건조 제형의 혐기미생물의 균수변화(Exp. 3)

Cryoprotectant agents	건조 전 total counts <sup>a</sup>	건조 후 total counts <sup>b</sup>	생존율 (%) <sup>c</sup>
Dextrose 10% <sup>d</sup> + Vit.C	2.1 x 10 <sup>13</sup>	2.0 x 10 <sup>12</sup>	9.60

<sup>a</sup>count of before drying x total wet cell weight. <sup>b</sup>count of after drying x total dry cell weight.

<sup>c</sup>100x(mean value of count before drying/count after drying).

<sup>d</sup>concentrations of freeze-drying protectants(w/v).



그림 17. 동결 후 사진



그림 18. 동결건조물의 분쇄 전 성상

(4) 타블릿 제형의 생산

타블릿 제형은 미생물의 장기저장과 수송 및 오염의 방지 측면에서는 편리하고 적합하지  
 만, 생산 공정은 매우 까다롭고 대량생산의 측면에서는 적합하지 않은 방법이다. 그러나  
 타블릿 생산 공정과는 달리 펠렛 생산 공정은 고열의 steam을 사용하고 성형다이(die)를 통  
 과할 때 고도의 압력과 마찰력이 발생하는 만큼 혐기미생물의 제형생산 공정으로는 부적  
 합하다. 혐기미생물은 살아있는 생균이며 생존율이 우수한 제형의 생산방법의 개발이 우선  
 시되어야 하며 농가에서 급여하는 사료위에 뿌려주는 방법(topdressing)으로 급여가 가능하  
 다는 측면에서 본 실험을 실시하였다. 본 실험은 동결 건조한 파우더를 결정 셀룰로오스와  
 혼합한 후 10KP 경도(Hardness)를 갖는 10mm의 타블릿을 제조하였고(Model : KTP-05,  
 Korea medi Co., Ltd. Korea) 가공전후의 생균수를 측정하여 생존율을 계산하였다.

표 6. 타블릿 가공에 따른 혐기미생물의 균수변화

Cryoprotectant agents	10% <sup>a</sup>		20% <sup>a</sup>	
	가공 전 (cfu/g)	가공 후 (cfu/g)	가공 전 (cfu/g)	가공 후 (cfu/g)
Skim milk	1.75 x 10 <sup>8</sup>	1.20 x 10 <sup>8</sup>	7.50 x 10 <sup>7</sup>	7.53 x 10 <sup>7</sup>
Whloe milk	1.20 x 10 <sup>8</sup>	7.50 x 10 <sup>7</sup>	5.10 x 10 <sup>7</sup>	1.30 x 10 <sup>8</sup>
Why	1.50 x 10 <sup>8</sup>	5.10 x 10 <sup>7</sup>	1.75 x 10 <sup>8</sup>	1.20 x 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup>concentrations of freeze-drying protectants(w/v).

타블릿으로 제형한 실험결과에서는 동결 건조 보호제의 종류와 농도에 따른 외관상의 차  
 이와 균수의 생존율에도 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 타블릿 타정공정에서는 압축력  
 과 마찰열의 발생이 크지 않기 때문에 미생물의 생존율에는 거의 영향을 미치지 않는 것  
 으로 생각된다.

(5) 분말제형

동결 건조된 혐기미생물을 분쇄 및 혼합한 후에 부형제와 혼합하여 분말제품을 제조하였다.

표 7. 분말제형의 조성 및 혐기 미생물 균수

구 분	혼합량 (g)	최종균수 (x 10 <sup>8</sup> /g)
혐기미생물 동결건조 분말	40	6.25
옥분, 대두박(1: 1)	4,960	
총중량	5,000g	

3. 젖소, 한우의 산 증독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 및 산업화

1) 제 3협동에서 확립된 처리방법과 다양한 방법을 통한 대량 생산 및 개발된 미생물 사료 첨가제의 제품화

본 연구과제에서 개발된 혐기미생물은 반추동물의 반추위에서 선발된 신 균주로서 사료의 종류는 보조사료(미생물제)에 해당되지만 미생물제의 사용가능한 유익균주의 범위에는 해당되지 않는다. 그러나 본 연구과제에서 선발된 혐기미생물은 사료의 분해와 대사 작용이 활발하게 일어나는 반추위 내에서 분리되었고 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 젖소 및 한우의 산 증독증 예방에 긍정적인 결과가 도출되었을 뿐만 아니라 안전성이 높은 균주로 판단된다. 따라서 개발된 혐기미생물을 산업현장에서 보다 광범위하게 활용될 수 있도록 하기 위해서는 보조사료의 유익균주로서 채택이 될 수 있도록 제도개선이 필요한 상황이다.

(1) 산업화를 위한 대량생산

선발된 혐기미생물을 이용하여 확립된 처리방법 및 제조방법에 따라 사료첨가제로서 원료의 조성을 설정하고 생산현장에서 최적화된 생산체계를 구축하였다.

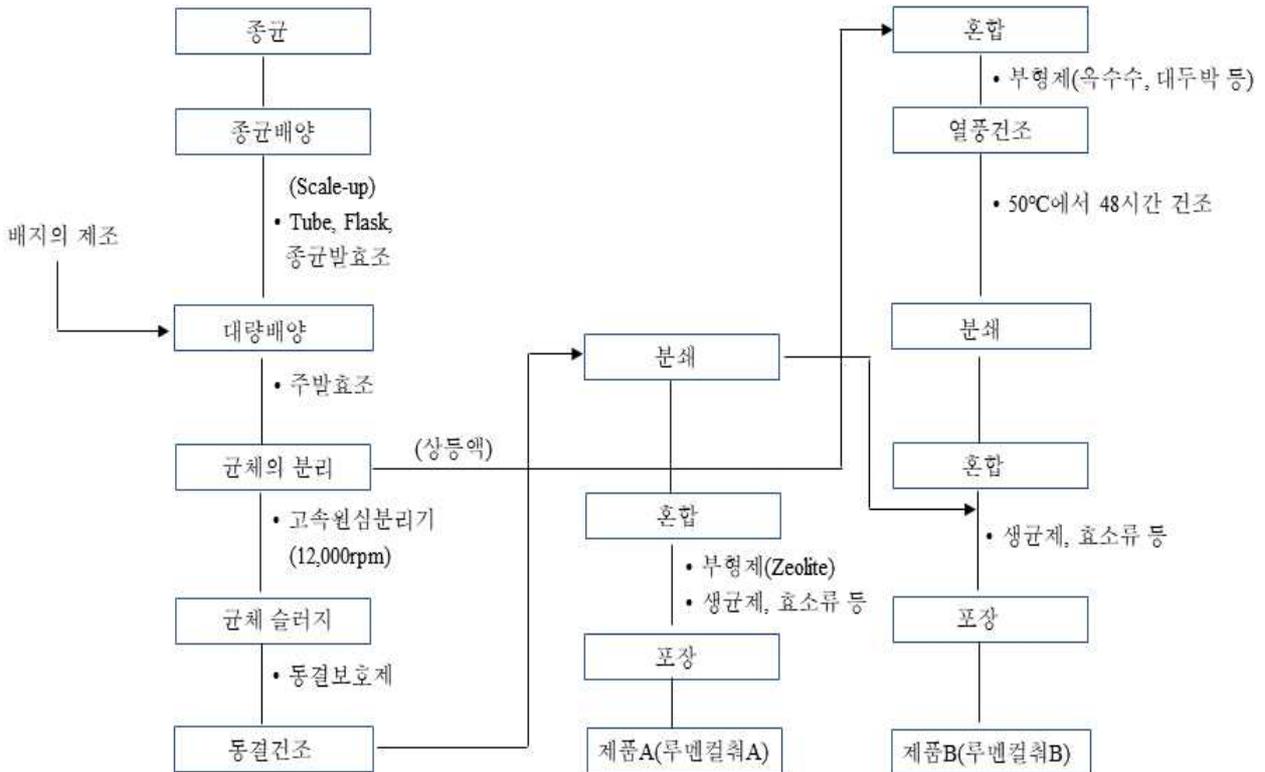


그림 19. 혐기미생물의 대량생산 체계도

본 연구의 혐기미생물을 보조사료의 유익균으로서 채택될 수 있도록 등록을 추진하는 것과는 별개로 기존의 보조사료(미생물제)의 조성물 조합과 혐기미생물을 부가적인 원료로서 함께 활용하는 방안을 모색하였다. 구체적인 방안으로서는 기존의 사료첨가제의 원료로서 활용되고 있는 상업용 생균제, 효소제와 건조된 혐기미생물을 부가적으로 첨가하여 사용효과를 높이는 방안과 생균제, 효소제 및 건조 혐기미생물 뿐 만 아니라 균체 분리 시에 발생하는 고농도의 영양원(폐액)을 함께 활용하여 사료첨가제를 생산하는 방안이 강구될 수 있을 것이다.

## (2) 사료첨가제의 제품화

그림 7과 같이 본 연구과제에서 선발된 혐기미생물을 사료첨가제로서 대량생산 공정을 구축하였고 기존의 보조사료(미생물제)의 조성물과 혐기미생물을 부가적으로 첨가하여 활용함으로써 신속하게 산업화가 달성될 수 있도록 진행하였다.

표 8. 시제품의 원료조성 및 성분내역

시제품의 명칭	사용원료의 내역(%)			최종균수 (x 10 <sup>8</sup> /g)
	원료명	사용비율	합계	
루멘컬취A	Zeolite	93.6	100	6.25
	Slica	0.5		
	Dried anaerobic bacteria	0.8		
	Dried bacillus subtilis	0.1		
	Complete enzyme	5.0		
루멘컬취B	Corn powder	40.0	100	6.50
	Soybean meal	20.0		
	Wheat bran	25.0		
	Limestone	3.9		
	Dried anaerobic bacteria	1.0		
	Dried bacillus subtilis	0.1		
	Complete enzyme	5.0		

시제품은 사료의 종류는 보조사료(미생물제-유익균)이며, 사료의 명칭 또는 용도는 사료원료용, 양축농가용으로 사료성분등록을 진행하였다. 시제품에 대한 화학적 및 유해 미생물의 오염 등 안정성을 확인하기 위하여 그림 8과 같이 유해물질(수은, 납, 비소, 카드뮴, 대장균 균류, 대장균, 살모넬라)분석을 시행하였다. 또한 시제품의 포장방법은 수송 또는 장기저장에 따른 외부로부터 오염 또는 습기의 유입에 의한 변질을 방지하기 위하여 열선압착 방법으로 알루미늄 포장지를 밀봉(sealing) 하고 다시 박스에 담는 방법으로 생산하였다(그림 9).



그림 20. 유해물질 분석결과서(중금속, 유해미생물)



(시제품의 명칭 : 루멘컬취A)



(시제품의 명칭 : 루멘컬취B)

그림 21. 시제품의 사진

(3) 반추 미생물을 활용한 상업용 제품의 사례

본 연구의 혐기미생물의 생산방법과는 차이가 있지만 건조된 반추위 내용물의 급여가 가축의 성장과 생산성에 긍정적인 효과가 있었다는 다수의 연구결과가 발표된 바 있다. 주요 연구사례를 살펴보면, ZIOLECKI A 등(1984)은 반추위 내용물(SRE ; Stabilized rumen extract)의 급여는 소 뿐 만 아니라 돼지의 성장촉진효과가 있었다고 보고하였으며, KUCUKERSAN K 등(2002)은 Verginiamycine과 SRE를 육계에 급여한 연구에서 SRE는 육계의 성장과 계육의 생산에 긍정적인 영향이 있다고 발표한 바가 있다. 또한 국내에서는 하 등(1990)도 젓소의 소화율과 산유량 및 유조성의 변화에 긍정적인 효과를 발표한 바 있다.

국내에서는 반추위 추출물 또는 내용물을 이용하여 제품화된 사료첨가제는 많지는 않은 실정이다. 대부분의 국내 도축장에서는 HACCP관리체제로 운영됨에 따라 반추위 내용물의 반출과 수거가 어려워진 측면도 있지만, 반추위 내용물의 수거과정에서 질병감염과 위생적인 측면을 고려해야 하는 부담이 있기 때문으로 생각된다.

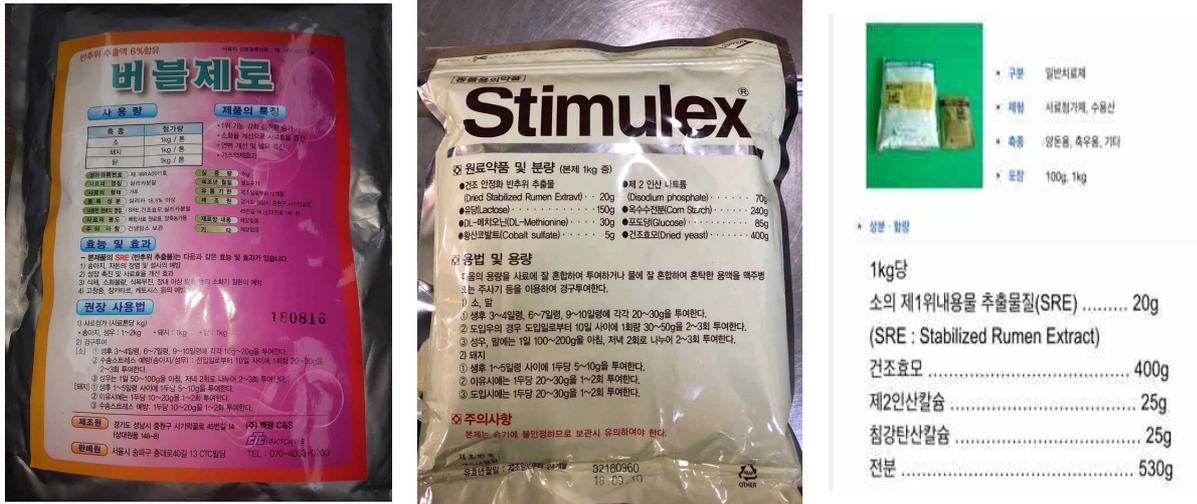


그림 22. 반추위 내용물을 활용한 제품의 사례

<제 1협동 : 중앙대학교 (장문백)>

세부 과제명 : 반추동물 산중독증 저감 및 치료를 위한 사료첨가제에 대한 *in vitro* 시험

1. pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)를 이용한 반추위 내 pH 및 온도 측정

1) pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)

반추동물의 반추위 내 환경을 모니터링하기 위해 영국의 eCOW co.에서 제조한 pH 및 온도 측정 기구인 ebolus 3개 및 정보를 읽는 역할을 하는 handset을 구입하여 실험에 이용하였다 (그림 1).

- ebolus 의 장점

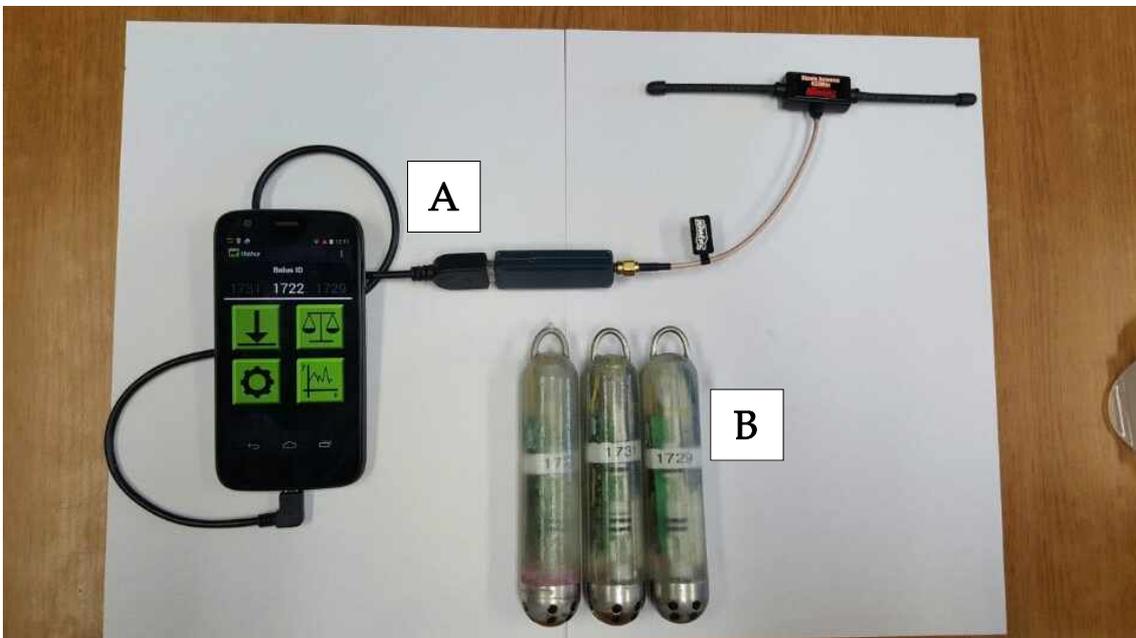


그림 1. Handset(A)과 반추위 내 pH 및 온도 측정 장치(B).

(1) ebolus(삽입용 측정장치)와 handset(데이터저장 장치) 장비의 구성

본 시험에서 사용된 ebolus는 직접 반추위 내에 삽입되어 pH 및 온도를 실시간으로 측정하여 데이터를 저장하는 장치이며, handset은 서로 일치하는 주파수를 통해 ebolus와 pairing이 된 후 측정된 온도 및 pH를 ebolus에 저장되게 된다. 저장된 각 데이터는 양방향 통신을 통해 스마트폰으로 전송되고 해당 어플리케이션을 통해 데이터의 변화를 실시간 관측할 수 있다. 또한 측정된 pH와 온도는 제조회사 자체 서버에 자동 저장되게 되고, 함께 제공된 소프트웨어를 통해 컴퓨터에서 측정값들에 대한 상세한 변화를 관찰할 수 있다(그림 2,3).



그림 2. 반추위 내 환경 측정 장치(ebolus)

1. 금속고리 - bolus의 상단 부위에 금속고리가 있다. 이 고리에 줄을 연결해 반추위에 bolus를 집어넣고 줄을 *cannulae* 뚜껑에 묶어 고정시킬 수 있다.
2. 몸체 - 내부 구조를 반추위 내 위액으로부터 보호하는 역할을 한다.
3. Endcap - pH와 온도 센서가 있는 부위이다. bolus의 센서가 반추위 내에서 수직으로 위치하고 전부 잠겨있어야 데이터를 읽을 수 있다.



그림 3. Handset

1. 안테나 - bolus의 신호를 수신한다.
2. Dongle - ebolus의 데이터를 인식하고 휴대용 핸드폰으로 정보를 송신한다.
3. Power/Activity light - 안테나가 활성화되었을 때 초록색 불빛이 깜박거린다.
4. USB dongle connector - Dongle 과 휴대용 핸드폰을 연결해주는 부분이다.

## (2) eBolus 초기 설정

eBolus를 이용한 실험에 앞서 초기 설정을 실시해야 한다. ebolus가 활성을 시작하는 적정 온도는 32℃이며, 이하의 온도에서는 비활성 상태로 데이터를 읽지 않는다. 오랜 시간 비활성 상태였던 ebolus는 반드시 사용 전 초기 설정 및 calibration 과정을 거쳐야 한다. 초기 설정 과정은 다음과 같다.

- ① ebolus를 빈 통에 담는다.
- ② ebolus를 담은 통에 80℃이상의 온수를 넣어준다.
- ③ ebolus가 데워질 때까지 15~20분 정도 기다린다.
- ④ ebolus가 데워지는 동안 headset을 켜서 'Hathor' 어플을 실행한다.  
(이때 dongle이 연결하고자 하는 모든 ebolus와 pairing되어있어야 한다.)
- ⑤ 'Configuration' 아이콘을 누른다.
- ⑥ 'Bolus ID'를 선택하고 OK를 누른다.
- ⑦ 'Cow ID'를 설정하고 'Cow ID'로 들어간다. OK를 눌러 설정을 마친다.
- ⑧ 다른 ebolus에서도 6, 7번 과정을 반복한다.
- ⑨ ebolus가 데워지면 test download를 실시한다.
- ⑩ handset 화면 상단의 bolus ID를 선택한다.
- ⑪ download 버튼을 클릭한다.
- ⑫ 다른 ebolus에서 10, 11번 과정을 반복한다.
- ⑬ dongle을 handset으로부터 분리시키면 데이터 업로드가 시작된다.  
OK를 누르면 초기 설정이 완료된다.

## (3) ebolus의 calibration 실시(그림 4)

ebolus를 활성화시키기 위해 ebolus를 실험하기에 앞서 정확한 pH 측정을 위한 calibration을 실시해야 한다. 또한 다음 실험과의 간격이 2주 이상일 경우, 다음 실험 전 반드시 calibration을 실시해야 한다. Calibration 과정은 다음과 같다.

- ① 'Hathor' 어플을 켜고 측정을 원하는 bolus ID를 선택한다.
- ② 'Calibration' 아이콘을 클릭한다.
- ③ ebolus를 pH 4 buffer에 넣고 거품이 생기게 살짝 흔들어주어 bolus endcap부위에 스며들도록 한다. 5분 정도 기다린다. 'Low point'를 누른다. 프로그램이 ADC데이터를 수용하고 화면에 나타난다. pH 결과가 안정적인 때까지 5회 이내로 반복한다.
- ④ ebolus end cap부위를 물로 깨끗이 세척한다.
- ⑤ ebolus를 pH 7 buffer에 넣고 거품이 생기게 살짝 흔들어주어 bolus endcap부위에 스며들도록 한다. 5분 정도 기다린다. 'High point'를 누른다. 프로그램이 ADC데이터를 수용하고 화면에 나타난다. pH 결과가 안정적인 때까지 5회 이내로 반복한다.
- ⑥ pH값이 제대로 잡혔다면 'Store settings'을 누른다.



그림 4. ebolus 의 calibration 과정

(3) ebolus의 fistula를 통한 반추위 내 삽입

ebolus를 fistula가 장착된 한우의 반추위 내에 직접 삽입하는 모습이다(그림 5).

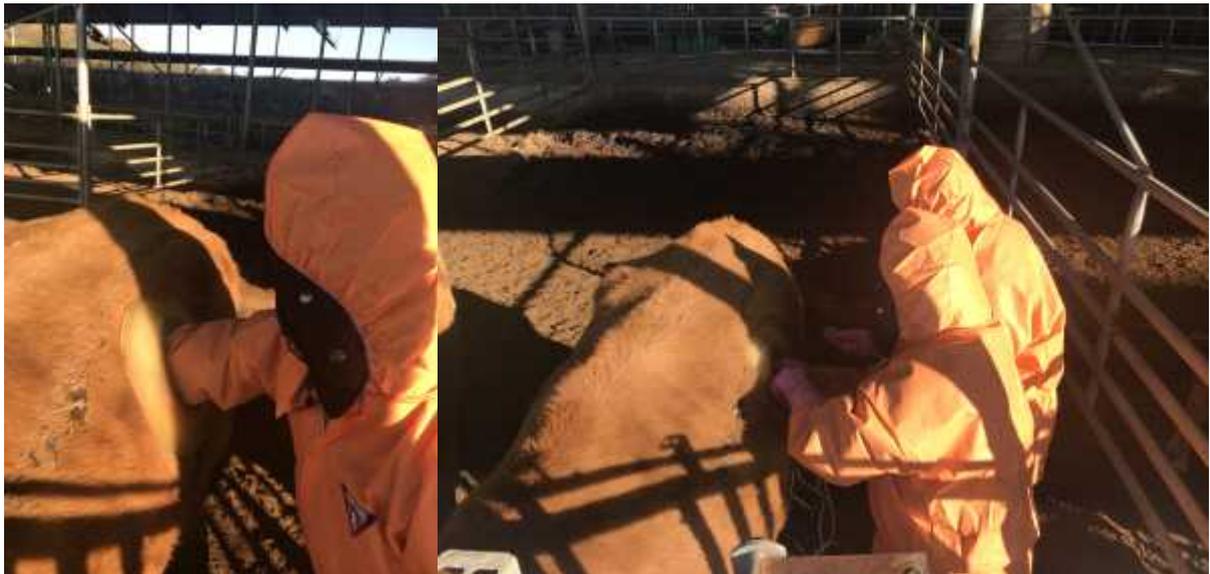


그림 5. ebolus 의 반추위 내 삽입 과정

(4) Data Download and Upload

ebolus가 직접 반추위 내에 삽입되어 pH 및 온도를 실시간으로 측정하여 데이터를 저장하며, 저장한 데이터를 다운로드 받기 위해선 handset이 필요하다. Handset은 서로 일치하는

주파수를 통해 ebolus와 pairing 됨으로써, ebolus에 저장되어있는 데이터를 읽어 휴대용 핸드폰에 데이터를 저장할 수 있다. Handset을 이용해 데이터 다운 및 서버에 업로드하기 위한 과정은 다음과 같다(그림 6).

- ① 'Hathor' 어플을 실행하기 전에 handset에 안테나를 먼저 연결한다.
- ② 측정을 원하는 ebolus ID를 선택한다.
- ③ 'Download' 아이콘을 클릭한다.
- ④ 프로그램이 ebolus와 연결을 시도한다.
- ⑤ 연결이 되면 다운로드가 시작된다.
- ⑥ 다운로드 하는 도중 100%가 될 때까지 안테나를 움직이지 않고 기다린다.  
(다운로드가 완전히 완료되면 읽어들이는 정보에 대한 그래프가 뜬다.)
- ⑦ 다운로드가 완료되면 ebolus상의 시간과 날짜가 저장된다.
- ⑧ 다운로드 된 데이터는 eCow 회사에서 관리하는 서버로 업로드가 된다.
- ⑨ 데이터 다운로드 과정을 모두 마치고 안테나를 분리하면 즉시 업로드 할 것인지 나중에 할 것인지 묻는 알림창이 뜬다.
- ⑩ 즉시 업로드를 하고자 할 때는 OK 버튼을 누르면 된다.  
(이때 즉시 업로드를 하기 위해선 인터넷에 연결되어 있어야 한다.)
- ⑪ 만약, 나중에 업로드를 할 때에는 오른쪽 상단의 (■) 버튼을 누른 뒤 'Upload Data'를 누르고 원하는 업로드 데이터를 선택하면 서버로 업로드가 진행된다.



그림 6. Handset을 이용하여 ebolus 데이터를 다운로드 하는 과정

#### (5) The eCOW client software를 이용한 데이터 분석

Handset에 다운로드 된 데이터는 PC를 이용하여 eCow 회사에서 제공하는 eCow Client software를 통해 저장된 데이터를 확인하고 분석을 진행할 수 있으며, software의 구성은 다음과 같다.

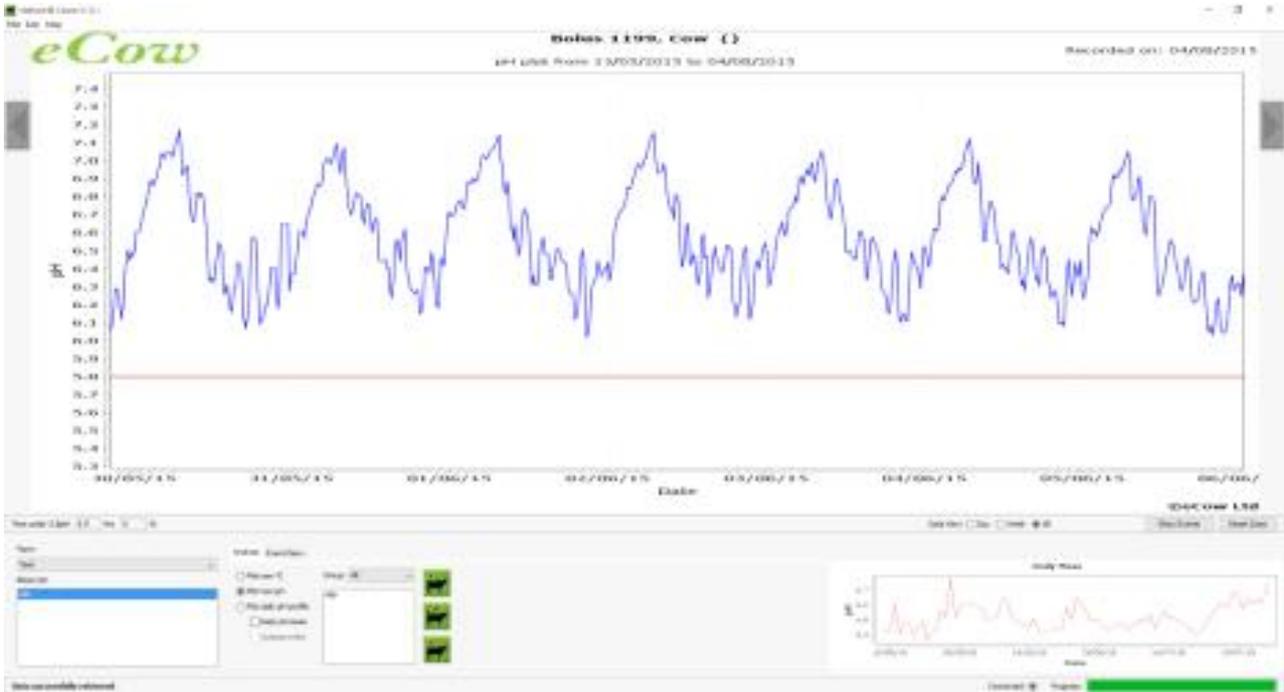


그림 7. eCow client software

- The farm and bolus selection box

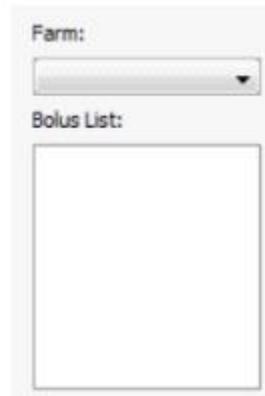


그림 8. eCow client software (The farm and bolus selection box)

원하는 농장의 ebolus list를 검색할 수 있다. Farm을 선택한 뒤 나타난 ebolus list에서 원하는 ebolus를 선택하여 클릭하면 그래프가 나타난다.

- The analysis and events box

그래프 및 분석 유형을 변경할 수 있고(그림 9), 그래프에 나타낼 사항을 조정할 수 있다(그림 10).



그림 9. eCow client software(Analysis box)



그림 10. eCow client software(Events box)

- The graph section

저장된 데이터를 그래프 형태로 볼 수 있다.

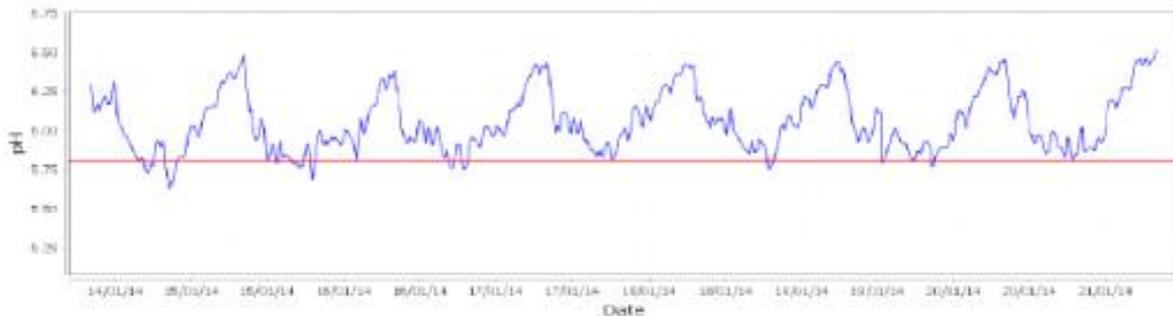


그림 11. eCow client software(Graph section)

2. Cannulae 장착 한우를 활용한 인위적 반추위 내 pH 조절을 통한 반추위 내 pH 데이터 확보 및 반추위 내 미생물발효 특성 검정

1) 시험 방법

(1) 시험 설계

본 시험은 전분 함량 차이에 따른 인위적인 반추위 내 pH 조절을 통해 산중독증을 유발하여 실증적인 pH 데이터 확보 및 급여사료와 산중독증과의 유의성을 구명하고자 실시하였다. 본 시험의 공시동물은 평균 체중 630kg의 *cannulae*가 장착된 한우 번식우 3두를 이용하였으며, pH sensor는 *cannulae*를 통해 반추위 내에 직접 삽입하였으며, 실시간으로 반추위 내 pH 및 온도 데이터를 측정하였다. 사료 급여 형태는 조사료와 농후사료의 비율을 5:5(벧짚 급여량: 4kg/day, 제조된 농후 사료 급여량: 4kg/day)로 급여하였으며, 음수는 자유롭게 섭취할 수

있도록 하였다.

(2) 시험 사료 제조

본 시험에 사용된 시험 사료는 전분 함량의 차이에 의해 배합비를 작성 후 각 사료원료의 혼합하여 가루형 농후 사료를 제조하였다. 각 시험 사료의 전분함량은 대조구 20%, T1은 30% 그리고 T2는 40%로 하였으며, 본 시험을 위해 제조된 농후사료의 배합비와 일반성분은 각 Table 1과 Table 2와 같다.

(3) ebolus(pH 및 온도센서) 반추위 내 삽입 및 데이터 확보

최초 ebolus 삽입은 ebolus를 노끈으로 고정 후 반추위 캐놀라를 통하여 손으로 직접 2위 부근까지 ebolus를 삽입하였다. ebolus삽입 후 흉부 부위에 handset을 가까이하여 pairing을 실시하였고, 이후 데이터 전송 유·무를 확인하였다. 다음 단계로 데이터의 전송을 위하여 handset을 wifi와 연결 후 제조 회사 서버에 접속하여 handset에 저장된 데이터 전송 유·무를 확인하였다.

표 1. 실험 농후사료 배합비

사료원	원물(수분포함), %		
	Control	T1	T2
옥수수가루	9.0	20.0	47.7
소맥분	4.6	12.7	8.0
대두피	8.0	-	-
단백피	13.6	15.0	-
소맥피	41.9	34.9	21.1
전지대두	-	4.2	14.2
팜박	20.0	7.7	-
당밀	2.0	2.0	2.0
소금	-	0.5	1.0
석회석	0.9	3.0	6.0

표 2. 실험 농후사료 일반 성분

항목	Control	T1	T2
		-----%-----	
Crude protein	14.0	14.0	14.0
Ether extract	4.0	3.2	2.7
Ash	5.2	6.9	9.5
Ca	0.5	1.2	2.3
P	0.7	0.7	0.4
Total digestible nutrients	70.0	70.0	70.0
Ruminal undegradable protein	4.4	4.4	4.9
Crude fiber	12.6	7.4	3.6
Acid detergent fiber	19.5	12.0	6.2
Neutral detergent fiber	41.9	29.6	15.5
Nitrogen free extract	52.4	56.2	57.1
Non-fiber carbohydrate	23.0	33.8	45.2
Starch	20.0	30.0	40.0



그림 12. 실험 사료 제조 과정

(3) 분석 방법

(가) ebolus를 이용한 pH 데이터 확보 및 분석

ebolus를 이용한 반추위 내 pH 및 온도 데이터 확보는 상기 1-1) pH & TEMP SENSOR 장

치(ebolus)활용 방법과 동일한 방법을 이용하여 실시하였다. ebolus내에 저장된 데이터는 2일간격으로 2016년 11월 2일부터 2016년 11월 29일까지 27일 동안 handset을 이용하여 확보하였다. 확보된 pH 및 온도 데이터는 해당 서버에 저장하기 위해 wifi가 활용되었으며, 서버에 저장된 데이터는 eCowClient software(Hathor HBClient 1.81, eCow co., UK)를 이용하여 연구실에서 확인하였으며, handset에 저장된 원본 데이터를 활용하여 MS office Excel 소프트웨어를 이용하여 데이터 분석 및 그래프 작업을 실시하였다.

적용기간 2016년 11월 7일부터 2016년 11월 21일 12일 동안 pH변화와 이후 시험종료 최종 3일 동안의 pH변화는 SAS 통계프로그램을 이용하여 통계처리를 실시하였다.

#### (나) 반추위 내 발효 특성 분석

##### ① 반추위 내용물 확보

시험사료에 대한 반추위 내 발효특성을 알아보기 위해 cannulae가 장착된 2년생 한우 번식 암소의 반추위 내에서 오전 사료급여 2시간 후에 채취한 내용물을 각 2개의 coning tube에 50mL씩 확보 후 각 액체질소를 이용하여 현장에서 동결하였고, 다른 샘플은 보온병을 이용하여 실험실로 즉시 운반후 동결된 샘플은 동결건조를 실시하였으며, 다른 샘플은 원심분리 (1,500g × 15분)를 실시하여 상층액과 내용물을 분리하였다.

##### ② 시료분석

동결건조된 시료는 DGGE분석 및 반추위 내 미생물 유전체 분석을 위해 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하였으며, 각 상층액과 반추위 내용물은 건물함량은 분석 직전 60℃ dry oven에서 72시간 동안 건조하였으며, 건물소화율은 Van Soest 등(1967)의 방법을 이용하였다. NH<sub>3</sub>-N 농도는 Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 spectrophotometer (Spectrouc PC system 4D-5210, Thermo scientific, USA)를 이용하여 측정하였다. 미생물단백질 합성량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였다.

#### (다) 반추위 내 미생물 군집 분석

각 처리구별 반추위 내용물에서 추출 및 증폭된 반추위 내 미생물 DNA PCR products을 이용하여 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)를 통하여 미생물 군집 분석을 실시하였다. PCR products는 purification을 한 후, 35-45%의 농도구배를 갖춘 8% acrylamide gel에 동일한 농도로 로딩하였다. 다음으로, gel은 D-code system(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 전기영동이 16시간동안 실시되었다. 전기영동을 마친 gel은 staining을 한 후 Gel Doc XR+(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 촬영되었다. 촬영된 사진은 미생물 군집 분석에 이용되었으며, gel에서 특이적인 변화를 보인 band는 추출하여 sequencing 분석을 실시하였다.

## 2) 실험 결과 및 고찰

### (1) 사료 내 전분 함량에 따른 반추위 내 pH 변화

전체 시험기간 동안 cannula장착 한우에 대하여 반추위 내 ebolus 삼입에 의한 pH측정 결과

는 그림13과 같다. 시험기간 28일 동안 각 처리구별 평균 pH는 대조구에서  $6.26\pm 0.29$ , T1에서  $6.17\pm 0.35$  그리고  $6.03\pm 0.40$ 로 급여사료 내 전분함량이 증가할수록 감소하는 결과를 나타내었다.

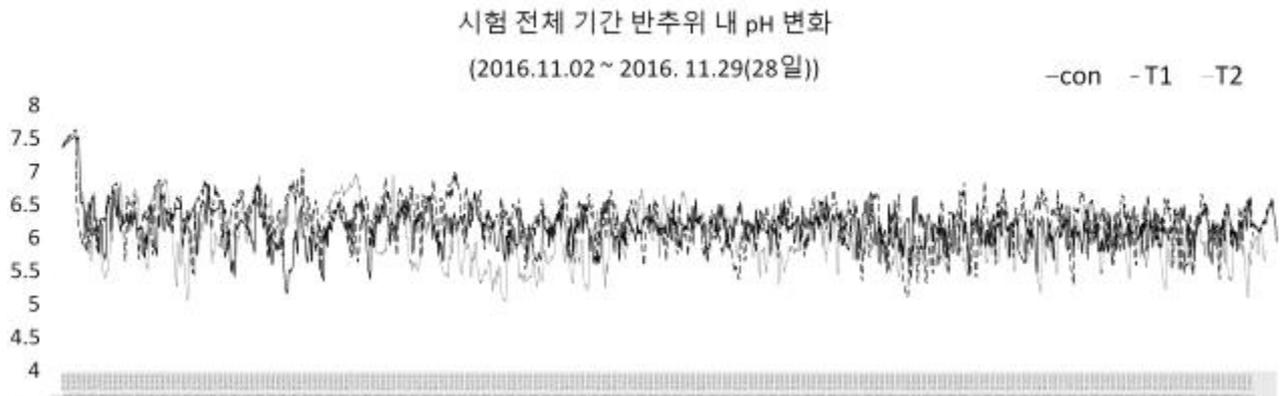


그림 13. 시험 전체 기간 28일 동안 반추위 내 pH 변화

시험사료 급여 후 샘플링 3일전 14일 적응기간 동안 pH 수준의 변화는 대조구에서  $6.25\pm 0.251$ ,  $6.22\pm 0.321$  그리고  $6.00\pm 0.384$ 를 나타내었고, 대조구와 T1은 차이가 없었으며, T2는 가장 낮은 pH 수준을 나타내었다(그림 14). 이와 같은 결과는 사료급여 전체기간 동안 pH수준 변화와 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서, 급여사료에 대한 반추위 내 미생물 발효 조건이 각 처리구별로 안정화 되었다고 사료되며 이후 3일 동안 각 처리구에 대한 반추위내 미생물발효 정상 및 균세를 알아보기 위해 이후 3일 동안 샘플링을 실시 할 수 있었다.

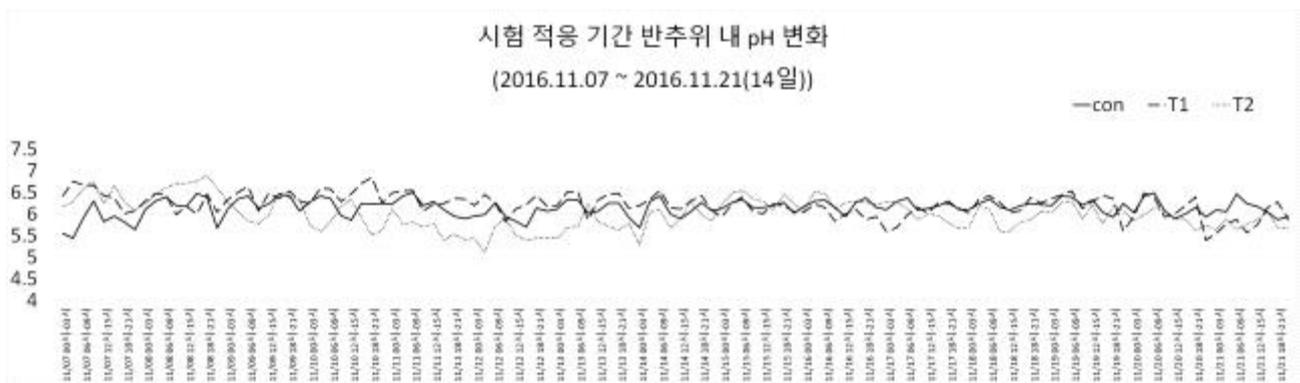


그림 14. 시험 적응 기간 14일 동안 반추위 내 pH 변화

시험종료 3일 동안의 반추위 내 pH 수준 변화는 대조구  $6.17\pm 0.191$ , T1  $6.15\pm 0.303$  그리고 T2  $5.90\pm 0.278$ 를 나타내었으며, 각 처리구 별로 적응기간 동안 pH 수준과 비슷한 경향을 나타내었다(그림 15). T2의 경우 전체와 적응기간 pH수준 보다 다소 낮은 경향을 나타내었으며, 산중독증이 유발될 수 있는 반추위 조건이 유지된 것으로 사료된다.

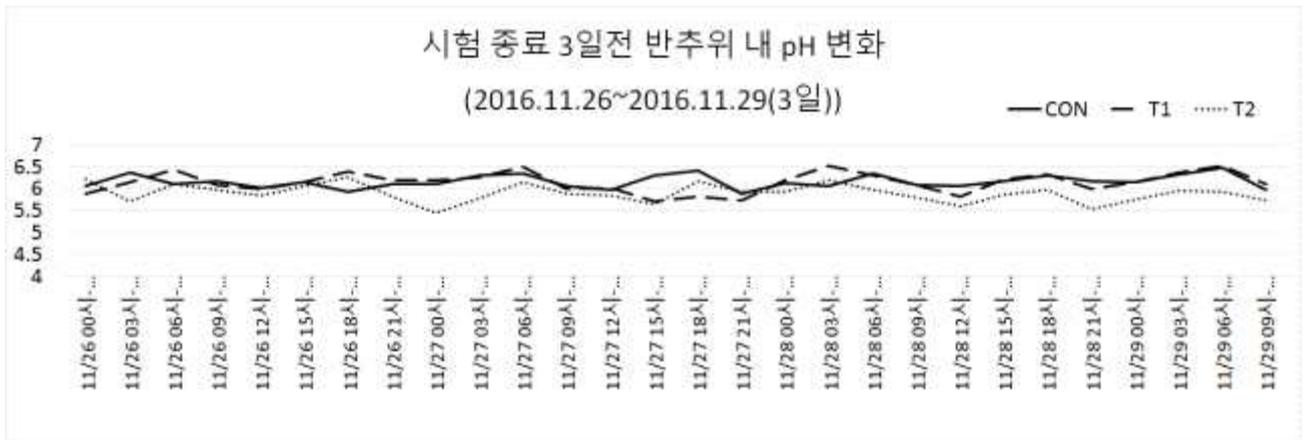


그림 15. 시험 종료 3일 전 반추위 내 pH 변화

(2) 시험 종료일 채취한 반추위액 발효특성 분석

시험 종료일 오전 사료급여 2시간 후 cannulae를 통해 각 처리구에 대해 채취한 샘플의 반추위 내 미생물 발효특성은 table 3과 같다. pH는 대조구에서  $6.42 \pm 0.045$ , T1은  $6.15 \pm 0.065$  그리고 T2는  $5.80 \pm 0.015$ 를 나타내었다. 이와 같은 결과는 전분 함량이 높아 질수록 pH가 낮아지는 경향을 나타내었으며, 특히 T2는 산중독증 증상이 가능한 pH수준을 나타내었다. Total VFA함량은 T1에서 가장 높은 결과를 나타내었으며, acetate/propionat 비율은 T2에서 가장 높은 결과를 나타내었다. 반추위 내 미생물단백질 합성량은 대조구에서  $350.15 \pm 5.101$ , T1은  $339.72 \pm 0.001$  그리고  $233.47 \pm 0.001$  mg/100mL로 사료내 전분함량이 높아질수록 감소하는 경향을 나타내었다. 반면  $\text{NH}_3\text{-N}$ 함량은 사료 내 전분 비율 높을수록 증가하였으며 T2처리구에서  $5.79 \pm 0.387$  mg/100mL를 나타내었다.

따라서, 본 시험에서 전분함량에 따른 반추위 내 미생물 발효특성은 전분함량이 증가할수록 pH수준 감소와 반추위내 미생물 합성량이 감소하는 결과를 나타내었으며, 특히 T2에서 pH 감소에 따른 반추위 내 미생물 군세 변화가 나타났을 것으로 사료되며, 향후 2차년도에 관련 샘플에 대한 산중독증 환경에서 반추위 내 미생물 군세에 대한 연구가 진행될 것이다.

표 3. 시험종료 3일 동안 오전 사료 급여 2시간 후 반추위 내용물 발효특성

pH	
Control	6.42±0.045
T1	6.15±0.065
T2	5.80±0.015
Total VFA (mmol)	
Control	46.66±1.831
T1	60.76±1.276
T2	46.46±5.460
Acetate (mmol)	
Control	29.11±2.056
T1	38.45±0.732
T2	32.36±5.562
Propionate (mmol)	
Control	10.24±0.120
T1	12.51±0.308
T2	8.68±0.098
Butyrate (mmol)	
Control	7.30±0.116
T1	9.80±0.246
T2	5.42±0.049
A/P Ratio	
Control	2.84±0.232
T1	3.07±0.023
T2	3.73±0.677
Microbial protein synthesis (mg/100 mL)	
Control	350.15±5.101
T1	339.72±0.001
T2	233.47±0.001
NH <sub>3</sub> -N concentration (mg/100mL)	
Control	0.73±0.019
T1	1.02±0.670
T2	5.79±0.387

Control: starch 20%, T1: starch 30%, T3: starch 40%

### (3) 시험 종료일 채취된 반추위액의 미생물 군집 분석

시험 종료일 오전 사료급여 2시간 후 cannulae를 통해 각 처리구에 대해 채취한 샘플의 DNA를 추출하여 DGGE기법을 통한 반추위 내 미생물 군집 분석 결과는 그림 16와 같다. 각 샘플의 band pattern의 변화를 통하여 대조구와 처리구간의 similarity를 분석한 결과, 대조구와 T1간의 85.9%로 가장 높은 similarity를 나타내었다. 또한 대조구와 T2간의 similarity는 47.2%, T1과 T2는 43.8%로 나타났다. 이와 같은 결과는 전분 함량 수준이 가장 높은 T2

처리구의 미생물 군집 양상이 대조구와 T1과는 큰 차이를 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 대조구와 처리구간의 특이적으로 변화를 보이는 band를 총 19개를 추출하여 sequencing를 진행중이며, sequencing 결과를 통하여 산중독증과 반추위내 미생물 군집간의 관계를 구명할 수 있을 것이다.

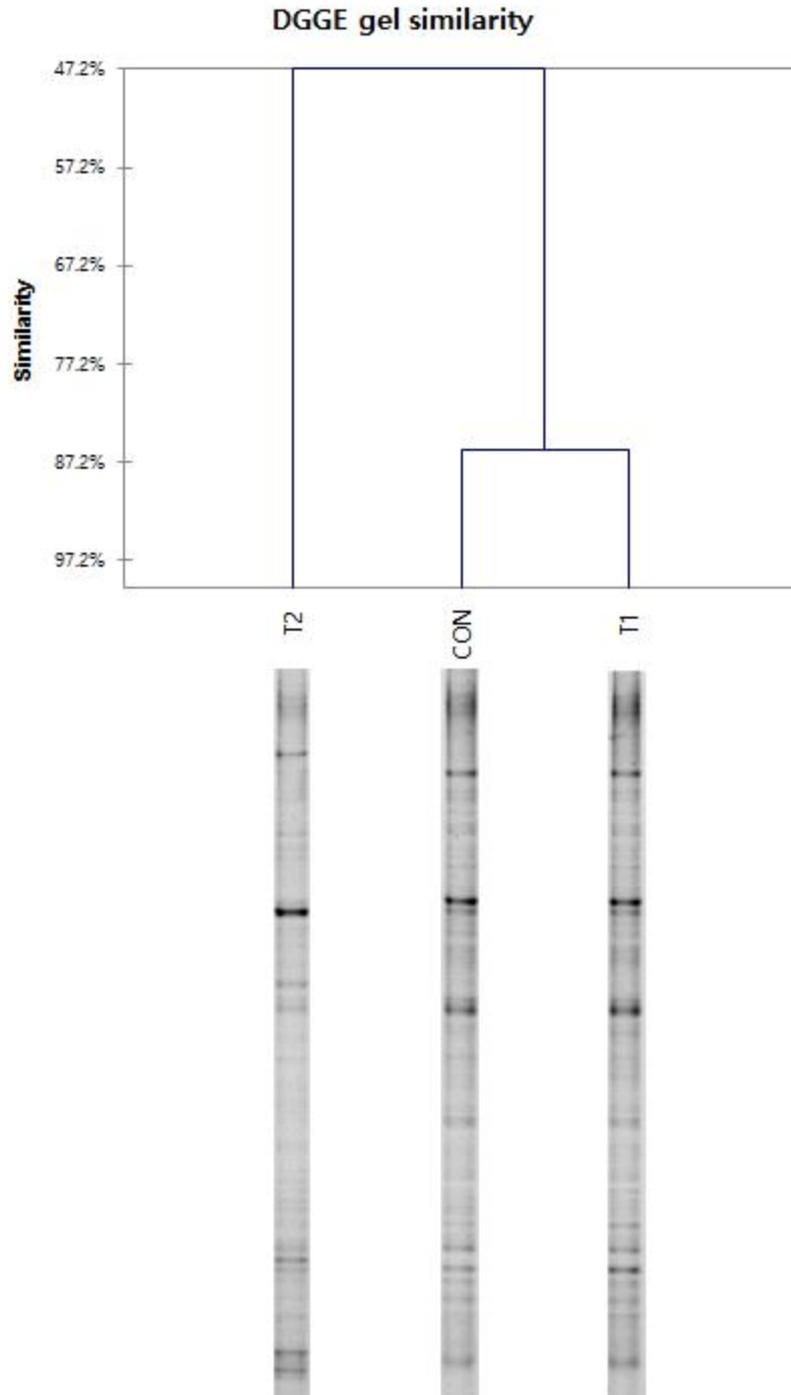


그림 16. DGGE gel 분석을 통한 dendrogram

2. 제 2협동에서 분리된 미생물의 반추위 내 미생물 발효 특성 검정

1) 시험방법

(1) 시험설계

(가) 시험 사료 제조(시험 1)

본 시험을 사용된 시험 사료는 1차년도 cannulae장착 한우의 pH센서 장치를 이용한 시험과 동일한 사료이며, 전분 함량의 차이에 의해 배합비를 작성 후 각 사료원료의 혼합하여 가루형 농후 사료를 제조하였다(표 4). 각 시험 사료의 전분함량은 대조구 20%, T1은 30% 그리고 T2는 40%로 하였으며, 본 시험을 위해 제조된 농후사료의 배합비와 일 반성분은 표 5와 같다.

표 4. 실험 농후사료 배합비

사료원	원물(수분포함), %		
	Control	T1	T2
옥수수가루	9.0	20.0	47.7
소맥분	4.6	12.7	8.0
대두피	8.0	-	-
단백피	13.6	15.0	-
소맥피	41.9	34.9	21.1
전지대두	-	4.2	14.2
팜박	20.0	7.7	-
당밀	2.0	2.0	2.0
소금	-	0.5	1.0
석회석	0.9	3.0	6.0

표 5. 실험 농후사료 일반 성분

항목	Control	T1	T2
		-----%-----	
Crude protein	14.0	14.0	14.0
Ether extract	4.0	3.2	2.7
Ash	5.2	6.9	9.5
Ca	0.5	1.2	2.3
P	0.7	0.7	0.4
Total digestible nutrients	70.0	70.0	70.0
Ruminal undegradable protein	4.4	4.4	4.9
Crude fiber	12.6	7.4	3.6
Acid detergent fiber	19.5	12.0	6.2
Neutral detergent fiber	41.9	29.6	15.5
Nitrogen free extract	52.4	56.2	57.1
Non-fiber carbohydrate	23.0	33.8	45.2
Starch	20.0	30.0	40.0

(나) 인위적 산중독증 유발 및 미생물첨가제 *in vitro* 시험(시험 2)

본 시험에서 인위적인 산중독증 유발을 위한 배지 조건은 표 6과 같으며 시험 사료는 pure compound를 이용하여 제조하였으며(표 7), *in vitro* 시험을 실시하였다. *In vitro* 시험 조건은 시험사료 0.75g에 반추위 내용물을 15mL 접종하였으며, 인위적으로 산중독증 pH를 조절하기 위해 buffer solution은 제외하였다. 접종과 동시에 2협동과제에서 개발된 미생물 첨가제를 0.5% 첨가하였으며, 혐기상태를 유지하여 39°C에서 배양을 실시하였으며, 각 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24, 36시간대에 pH 및 lactate함량 변화를 측정하였다.

표 6. 산독증 유발을 시험을 위한 *in vitro* 시험 배지조건

항목	합량
Distilled water	1.0 L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,anhydrous	5.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,anhydrous	6.2 g
MgSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.6 g
<i>In vitro</i> rumen micromineral solution	
Added to volumetric and bring volume to 100 mL with distilled water	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	13.2 g
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	10.0 g
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	1.0 g
FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	8.2 g
Prepare medium	
Sample (20 mesh or 1 mm)	0.5 g
Trypticase	2.0 g
Distilled water	400.0 mL
Micromineral solution	0.1 g
<i>Agitate to dissolve</i>	
Macromineral solution	200.0 mL
Resazurin	1.0 mL

표 7. 산독증 유발을 시험을 위한 *in vitro* 시험사료

항목	합량
Soluble starch	0.4125g
Glucose	0.1950g
Cellulose	0.0450g
Cellobiose	0.0525g
Trypticase	0.0450g

2). 전분질 함량 차이에 따른 *in vitro* 반추위 내 미생물발효특성 변화

1) 전분함량 차이에 따른 반추위 내 미생물발효특성 변화

(1) *In vitro* 반추위 내 미생물 발효 특성

전분함량에 따른 반추위 내 발효특성은 표 8과 같다. 배양기간 동안 pH의 변화는 배양 2 시간대부터 대조구가 T2에서 유의적인 차이를 나타내었으며(p<0.05), 전체적으로 T2의 pH가 가장 낮았으나 24시간대에 대조구가 다른 처리구에 비해 낮은 경향을 나타내었다. Gas 생성량은 배양 3시간대부터 T1이 다른 처리구에 비해 유의적으로 높았으나(p<0.05) 마지막 24시간대에는 각 처리구간에 큰 차이가 없었다. 또한 6시간대에 T2에서 105.53로 유의적으로 가장 낮았지만(p<0.05) 이후 12시간대에서는 215.33로 유의적으로 가장 높았다. CH<sub>4</sub> 생성량은 배양 6시간대에 T2에서 4.21로 유의적으로 가장 낮았고, T1이 6.98로 가장 높았다

( $p < 0.05$ ). Total VFA 함량은 3시간대에서 T1, T2가 유의적으로 높았고( $p < 0.05$ ), 6시간대에서 T2가 유의적으로 가장 낮았다( $p < 0.05$ ) 그러나 12시간 이후부터 T2가 증가하여 24시간에서 유의적으로 가장 높았다( $p < 0.05$ ). 건물소화율은 전체 배양기간 동안 T1이 다른 처리구에 비해 높은 경향을 나타내었다. 미생물단백질합성량은 24시간대를 제외하고는 전체적으로 대조구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내었다( $p < 0.05$ ).  $\text{NH}_3\text{-N}$  함량은 배양 6시간대부터 T2가 다른 처리구에 비해 높은 경향을 나타내었다.

사료내 전분함량이 각 대조구(20%), T1(30%), T2(40%)에 따른 lactic acid 함량은 표 9와 같으며, 대조구에 비해 T1과 T2 처리구에서 배양 24시간대를 제외하고 유의적으로 높은 결과를 나타내었으며( $p < 0.05$ ), T2가 T1에 비해 lactic acid 함량이 유의적으로 높은 결과를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

표 8. 전분함량 차이에 따른 반추위 내 미생물 발효특성

Items	Incubation time (h)							
	0	1	2	3	4	6	12	24
<b>pH</b>								
Control	6.75	6.61	6.54 <sup>b</sup>	6.49 <sup>b</sup>	6.40 <sup>b</sup>	6.34	6.25 <sup>a</sup>	6.15 <sup>a</sup>
T1	6.76	6.63	6.60 <sup>ab</sup>	6.51 <sup>ab</sup>	6.42 <sup>b</sup>	6.35	6.20 <sup>b</sup>	6.11 <sup>ab</sup>
T2	6.70	6.65	6.65 <sup>a</sup>	6.59 <sup>a</sup>	6.52 <sup>a</sup>	6.38	6.26 <sup>a</sup>	6.07 <sup>b</sup>
S.E.M.	0.021	0.028	0.022	0.026	0.012	0.018	0.008	0.020
<i>p</i> value	0.1729	0.5872	0.0353	0.0804	0.0008	0.3046	0.0061	0.0886
<b>Total Gas Production (mL)</b>								
Control	-	10.07	30.30	48.73 <sup>ab</sup>	88.77 <sup>a</sup>	126.77 <sup>b</sup>	176.50 <sup>b</sup>	246.97
T1	-	9.70	30.70	53.17 <sup>a</sup>	93.50 <sup>a</sup>	134.13 <sup>a</sup>	184.20 <sup>b</sup>	247.53
T2	-	11.13	29.10	45.93 <sup>b</sup>	77.20 <sup>b</sup>	105.53 <sup>c</sup>	215.33 <sup>a</sup>	244.47
S.E.M.	-	0.620	0.726	1.876	1.377	1.481	4.846	4.392
<i>p</i> value	-	0.2981	0.3357	0.0866	0.0004	<.0001	0.0029	0.8738
<b>CH<sub>4</sub> Production (mL)</b>								
Control	-	0.20	0.54	1.42	2.98	6.04 <sup>b</sup>	6.74 <sup>b</sup>	31.98
T1	-	0.08	0.33	0.97	2.17	6.98 <sup>a</sup>	2.56 <sup>b</sup>	27.22
T2	-	0.06	0.32	1.10	2.53	4.21 <sup>c</sup>	24.51 <sup>a</sup>	21.62
S.E.M.	-	0.047	0.135	0.345	0.636	0.2564	1.174	4.253
<i>p</i> value	-	0.1670	0.4914	0.6581	0.6824	0.0007	0.0002	0.2988
<b>CO<sub>2</sub> Production (mL)</b>								
Control	-	8.89	27.00	42.81	77.21	109.81 <sup>b</sup>	155.23	202.09
T1	-	8.68	17.80	31.05	54.56	116.06 <sup>a</sup>	136.87	207.75
T2	-	9.41	17.05	40.36	67.06	90.99 <sup>c</sup>	177.56	217.85
S.E.M.	-	0.714	7.148	9.108	15.794	1.250	21.305	6.860
<i>p</i> value	-	0.7649	0.5786	0.6498	0.6211	<.0001	0.4500	0.3268
<b>Total VFA (mmol)</b>								
Control	5.74	4.23	5.48	7.18 <sup>b</sup>	10.79	16.79 <sup>a</sup>	27.59	36.37 <sup>b</sup>
T1	3.62	4.16	5.63	7.90 <sup>a</sup>	11.28	17.21 <sup>a</sup>	29.34	39.12 <sup>a</sup>
T2	3.67	4.31	5.76	8.25 <sup>a</sup>	10.26	14.66 <sup>b</sup>	31.07	40.09 <sup>a</sup>
S.E.M.	1.151	0.045	0.1588	0.100	0.336	0.4157	1.087	0.641
<i>p</i> value	0.3920	0.1352	0.4928	0.000	0.1819	0.0102	0.1565	0.0154

Acetate (mmol)								
Control	3.25	2.18 <sup>ab</sup>	2.85	3.69 <sup>c</sup>	5.72	8.17 <sup>a</sup>	10.95 <sup>b</sup>	17.30
T1	1.82	2.17 <sup>b</sup>	2.94	4.08 <sup>b</sup>	6.08	8.53 <sup>a</sup>	10.85 <sup>b</sup>	17.30
T2	1.88	2.28 <sup>a</sup>	3.00	4.51 <sup>a</sup>	5.50	7.14 <sup>b</sup>	15.18 <sup>a</sup>	17.29
S.E.M.	0.782	0.027	0.071	0.051	0.193	0.222	0.661	0.613
<i>p</i> value	0.4011	0.0608	0.3942	<.0001	0.1746	0.0106	0.0055	0.9999
Propionate (mmol)								
Control	1.37	1.12	1.51	2.09 <sup>b</sup>	7.42 <sup>a</sup>	8.60 <sup>a</sup>	11.10 <sup>b</sup>	18.88 <sup>ab</sup>
T1	0.92	1.09	1.59	2.31 <sup>a</sup>	5.31 <sup>b</sup>	8.21 <sup>a</sup>	10.95 <sup>b</sup>	17.40 <sup>b</sup>
T2	0.93	1.12	1.60	2.27 <sup>a</sup>	5.30 <sup>b</sup>	9.28 <sup>a</sup>	11.82 <sup>a</sup>	20.26 <sup>a</sup>
S.E.M.	0.025	0.020	0.036	0.031	0.397	0.416	0.161	0.533
<i>p</i> value	0.4165	0.5770	0.2561	0.0064	0.0036	0.1656	0.0226	0.0320
A/P Ratio								
Control	2.23	1.95	1.88	1.76 <sup>b</sup>	1.75 <sup>b</sup>	1.35 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>	1.51 <sup>a</sup>
T1	1.99	1.99	1.85	1.77 <sup>b</sup>	1.81 <sup>a</sup>	1.40 <sup>a</sup>	0.74 <sup>b</sup>	1.18 <sup>ab</sup>
T2	2.01	2.03	1.88	1.99 <sup>a</sup>	1.78 <sup>ab</sup>	1.34 <sup>b</sup>	1.41 <sup>a</sup>	1.07 <sup>b</sup>
S.E.M.	0.187	0.059	0.019	0.016	0.017	0.014	0.051	0.167
<i>p</i> value	0.4316	0.4266	0.2634	<.0001	0.0304	0.0368	<.0001	0.0872
Dry matter digestibility (%)								
Control	16.35	14.54 <sup>ab</sup>	17.32	21.01 <sup>ab</sup>	23.63	26.16 <sup>ab</sup>	33.74 <sup>b</sup>	34.31
T1	15.33	16.8 <sup>a</sup>	12.31	26.81 <sup>a</sup>	25.94	28.82 <sup>a</sup>	36.53 <sup>a</sup>	41.85
T2	11.24	14.34 <sup>b</sup>	12.16	19.51 <sup>b</sup>	23.36	23.04 <sup>b</sup>	31.88 <sup>b</sup>	34.25
S.E.M.	3.499	0.673	5.905	2.436	3.093	1.463	0.820	4.308
<i>p</i> value	0.3664	0.0861	0.6328	0.0527	0.6751	0.0213	0.0058	0.2086
Neutral detergent fiber digestibility (%)								
Control	21.64 <sup>b</sup>	25.64	21.45 <sup>b</sup>	21.76 <sup>b</sup>	23.72 <sup>b</sup>	22.03 <sup>b</sup>	16.82 <sup>b</sup>	17.91
T1	29.07 <sup>ab</sup>	27.42	26.25 <sup>ab</sup>	26.13 <sup>ab</sup>	27.86 <sup>b</sup>	25.35 <sup>ab</sup>	17.49 <sup>b</sup>	18.23
T2	31.49 <sup>a</sup>	24.88	30.91 <sup>a</sup>	31.28 <sup>a</sup>	33.35 <sup>a</sup>	30.61 <sup>a</sup>	25.97 <sup>a</sup>	26.92
S.E.M.	2.743	1.692	2.071	2.411	1.417	1.637	0.472	3.725
<i>p</i> value	0.0981	0.5898	0.0486	0.0820	0.0086	0.0271	0.0001	0.2317
Microbial protein synthesis (mg/100 mL)								
Control	1.24 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	1.19 <sup>b</sup>	1.24 <sup>a</sup>	1.19 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.23
T1	1.19 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.23 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	1.20 <sup>a</sup>	1.26
T2	0.98 <sup>b</sup>	0.99 <sup>b</sup>	0.97 <sup>c</sup>	0.97 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.92 <sup>b</sup>	0.89 <sup>b</sup>	1.13
S.E.M.	0.027	0.038	0.001	0.044	0.033	0.033	0.057	0.049
<i>p</i> value	0.0012	0.0075	<.0001	0.0124	0.0021	0.0113	0.0013	0.2265
NH <sub>3</sub> -N concentration (mg/100 mL)								
Control	0.10	0.15	0.14	0.12	0.06	0.04 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>
T1	0.11	0.18	0.13	0.10	0.09	0.02 <sup>ab</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>
T2	0.11	0.13	0.09	0.07	0.06	0.01 <sup>b</sup>	0.01 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>
S.E.M.	0.020	0.020	0.018	0.015	0.009	0.006	0.003	0.017
<i>p</i> value	0.8067	0.3615	0.2562	0.1725	0.1563	0.0354	<.0001	0.0001

<sup>a,b</sup>Mean with different letter differ significantly between treatments ( $p < 0.05$ ).

Control(벧짚 + Starch 20% 농후사료), T1(벧짚 + Starch 30% 농후사료), T2(벧짚 + Starch 40% 농후사료)

S.E.M. = standard error of the mean.

표 9. 전분함량 차이에 따른 반추위 내용물의 lactic acid 함량

Items	Incubation time (h)							
	0	1	2	3	4	6	12	24
Lactic acid (mg/L)								
Control	267.19 <sup>b</sup>	394.40 <sup>a</sup>	696.19 <sup>ab</sup>	931.29 <sup>b</sup>	1004.31 <sup>a</sup>	884.88 <sup>b</sup>	330.75	424.55
T1	154.21 <sup>c</sup>	273.92 <sup>b</sup>	615.97 <sup>b</sup>	765.21 <sup>c</sup>	704.56 <sup>b</sup>	818.53 <sup>b</sup>	334.55	165.00
T2	293.62 <sup>a</sup>	387.13 <sup>a</sup>	729.20 <sup>a</sup>	1068.23 <sup>a</sup>	1126.99 <sup>a</sup>	1122.08 <sup>a</sup>	432.10	264.38
S.E.M.	6.286	7.136	24.258	33.388	39.194	44.912	56.106	53.378
pvalue	<.0001	<.0001	0.0401	0.0020	0.0006	0.0071	0.4069	0.0368

<sup>a,b</sup>Mean with different letter differ significantly between treatments (p < 0.05).

Control(벧짚 + Starch 20% 농후사료), T1(벧짚 + Starch 30% 농후사료), T2(벧짚 + Starch 40% 농후사료)

S.E.M. = standard error of the mean.

### 3) 산독증 유발 *in vitro* 발효 조건에 대한 lactic acid 저감 미생물 첨가제 효과

#### (1) 반추위 내 미생물 발효특성

배양 초기 2시간대까지 대조구에서 처리구에 비해 낮은 pH수준을 나타내었으나, 이후 배양 24시간대까지 비슷한 경향을 나타내었다. 이후 배양 24시간대 이후 lactic acid저감 미생물처리구에서 pH가 높아지는 경향을 나타내었으며, 배양 36시간대에 유의적으로 높은 결과를 나타내었다(그림 17). Total VFA함량은 배양 6시간대를 제외하고 모든 시간대에서 lactic acid 저감 미생물 처리구가 낮은 경향을 나타내었다(그림 18). 배양시간에 따른 Acetate/Propionate ratio 변화는 배양 4시간대부터 8시간대 까지 대조구에서 유의하게 높았다(p<0.05), 배양 12시간대 이후 36시간대 까지 대조구와 처리구의 차이가 커지는 경향을 나타내었으며, 특히 대조구는 지속적으로 증가하는 반면 처리구는 서서히 감소하는 경향을 나타내었다(그림 19). Lactic acid함량은 대조구의 경우 배양 8시간대까지 일정 수준을 유지하였으나 lactic acid 저감 미생물처리구에서는 lactic acid가 측정되지 않았다. 또한 대조구의 경우 배양 8시간대까지 lactic acid함량이 급격히 증가하는 경향을 나타내었으며, lactic acid 저감 미생물 처리구에서 배양 12시간대 이후 대조구에 비해 유의적으로 낮은 수준으로 증가하는 경향을 나타내었다(그림 20).

결과적으로 2협동과제에서 분리·동정된 lactic acid 저감 미생물 첨가제는 *in vitro*시험에서 반추위 내에서 산독증이 유발될 수 있는 pH조건에서 미생물 발효 작용에 의한 VFA 농도와 pH에는 영향을 미치지 않았으나, lactic acid의 발생량은 현저히 감소시키는 결과를 나타내었다.

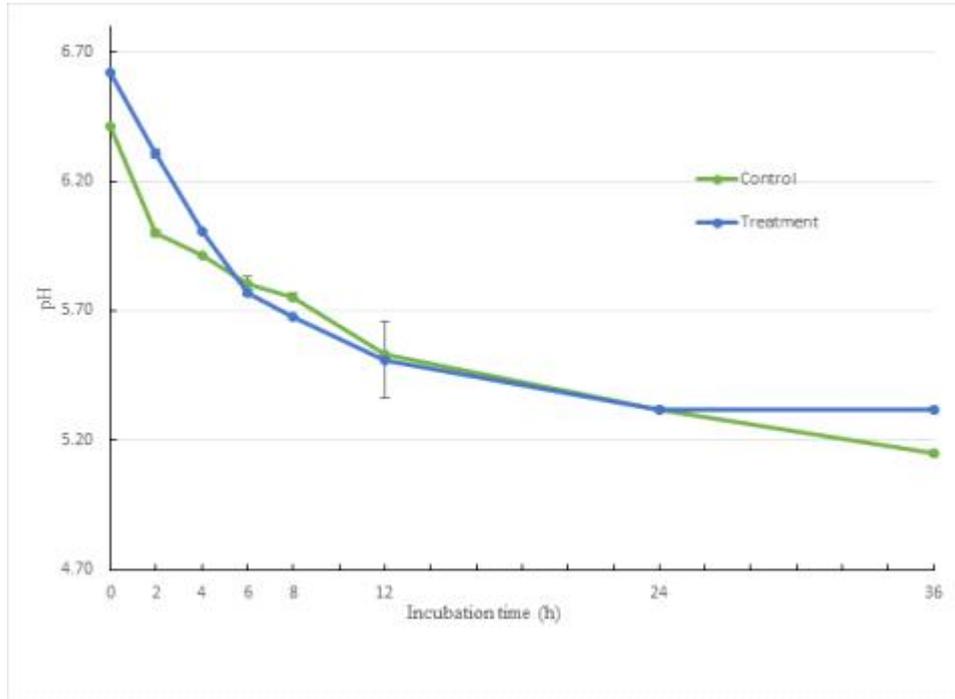


그림 17. 산중독증 유발 *in vitro* 발효조건에 대한 lactic acid 저감 미생물 첨가에 따른 반추위 내 pH 변화

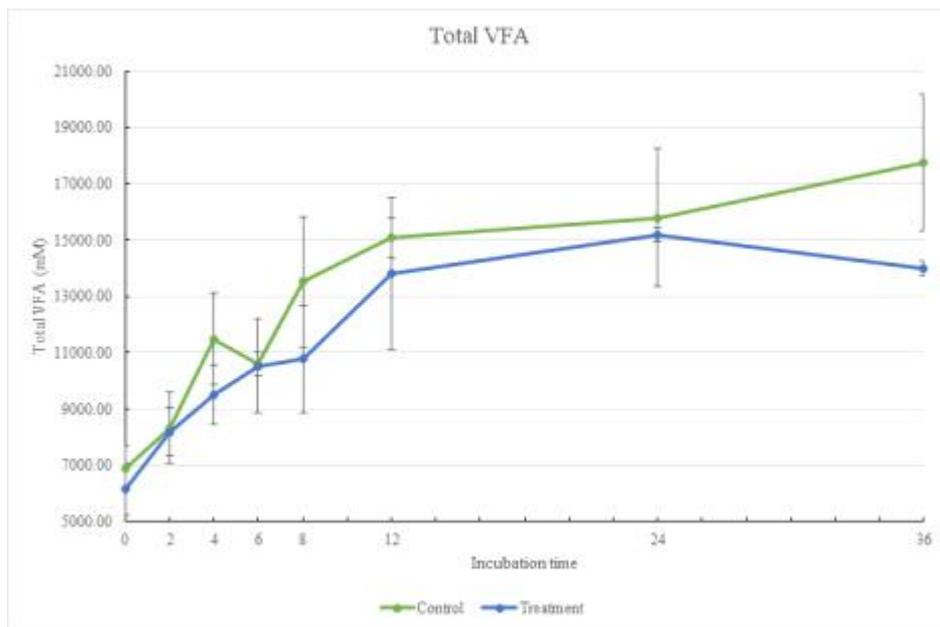


그림 18. 산중독증 유발 *in vitro* 발효조건에 대한 lactic acid 저감 미생물 첨가에 따른 반추위 내 total VFA 농도 변화

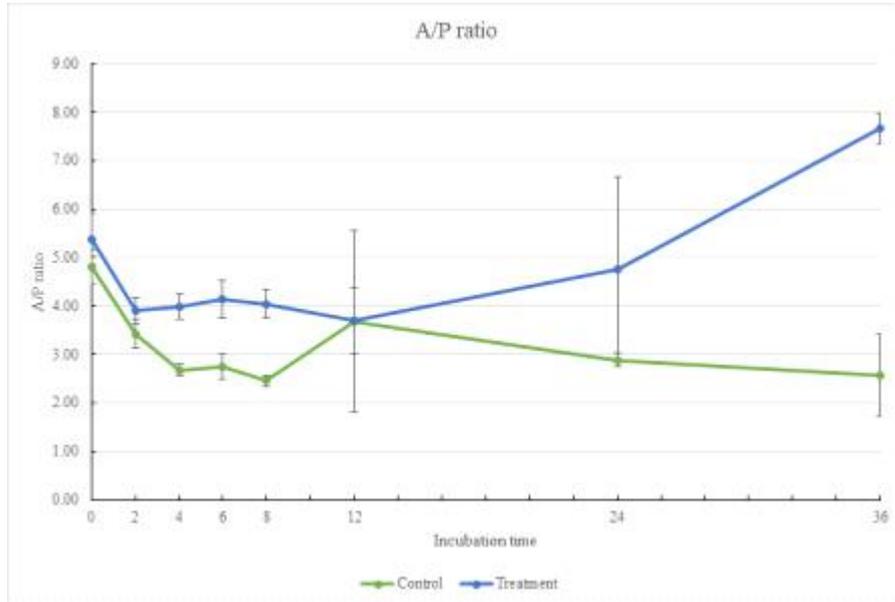


그림 19. 산중독증 유발 사료원에 대한 lactic acid 저감 미생물 첨가에 따른 반추위 내 A/P ratio 변화

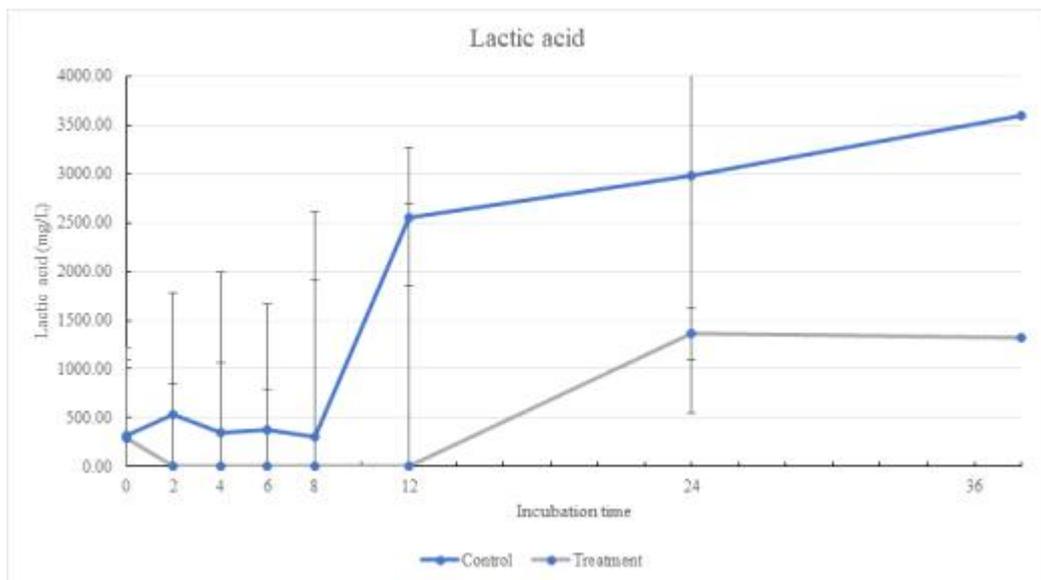


그림 20. 산중독증 유발 사료원에 대한 lactic acid 저감 미생물 첨가에 따른 반추위 내 lactic acid 함량 변화

4) 한우를 이용한 lactic acid 저감 미생물 급여에 따른 산중독증 저감 효과 검증을 위한 *in vivo* 시험

(1) lactic acid 저감 미생물 급여량에 따른 산중독증 저감 효과 검증

(가) 시험 설계

lactic acid 저감 혐기성 미생물 급여량에 따른 산중독증 저감 효과를 검증하기 위하여 안정시 보개면에 위치한 우진목장에서 한우 암소 3두를 대상으로 *in vivo* 시험을 실시하였다. 사료는 한우 번식우 농후사료와 조사료를 5:5로 급여하였으며, 시험사료는 lactic acid 저감 미생물인 *Pseudoramibacter (P) boviskoreani* K12 미생물을 급여하였다. 모든 처리구는 기본 사료를 동일하게 급여하였으며, T1 group은 *P. boviskoreani* K12 미생물을 현재 사료 급여량의 0.05%(500 mL/d, DM)를, T2 group은 *P. boviskoreani* K12 미생물을 현재 사료 급여량의 0.1%(1,000 mL/d, DM)를 cannulae를 통하여 직접 공급하였다. 시험 시작 후 10일간 적응기간을 두었으며, 시험 시작 11일째 부터 0시간 반추위 내용물 샘플링후 사료와 미생물 공급 이후 2, 4, 6, 8, 그리고 12시간대에 반추위 내용물을 채취하여 즉시 pH를 측정하였으며, 4겹의 cheese cloth를 이용하여 반추위액만을 분리하여 lactic acid 및 DGGE 분석을 실시하였다.

#### (나) 시험 결과

대조구에 비해 lactic acid 저감 미생물 500 mL 급여구의 lactic acid 함량이 전반적으로 낮은 경향을 나타내어 lactic acid 저감 효율이 검증되었다(그림 22). 0, 2시간대에서는 500mL 급여구가 대조구에 비해 더 높은 함량을 보였으며, 1,000 mL 급여구는 대조구에 비해 lactic acid의 함량이 유의적으로 높은 경향을 나타내었다. 이는 lactic acid 저감 미생물을 lactic acid를 함유하는 액체배지에 배양한 상태 그대로 급여하였기 때문으로 예상되며, 그림 21에서도 같은 경향을 나타내었다.

lactic acid 저감 미생물 급여에 따른 반추위 내 미생물 군집 변화 양상을 규명하기 위한 DGGE 분석 결과 해당 미생물 급여에 따른 미생물 군집 변화는 유의적으로 나타나지 않았으며, *P. boviskoreani* K12 미생물이 나타내는 band와 비교하였을 때, 해당 미생물 500mL 급여구 (T1)의 band가 상대적으로 열게 형성되는 경향을 나타내었다(그림 23).

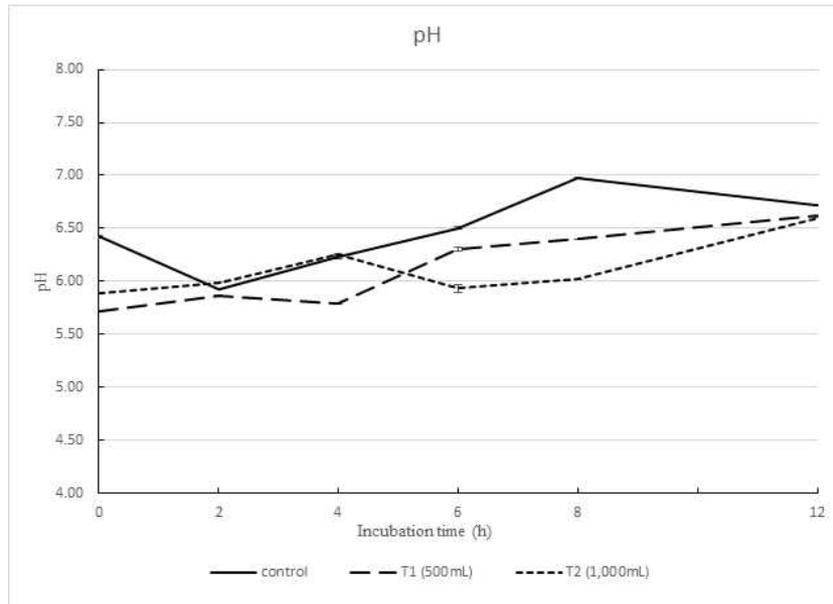


그림 21. 한우 반추위 내 lactic acid 저장 미생물 급여에 따른 사료급여 후 pH 변화

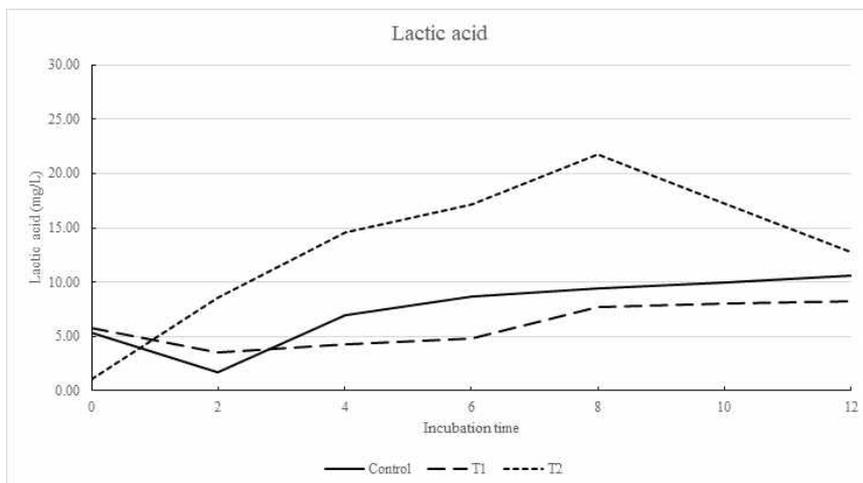


그림 22. lactic acid 저장 미생물 급여에 따른 반추위 내 lactic acid 함량 변화

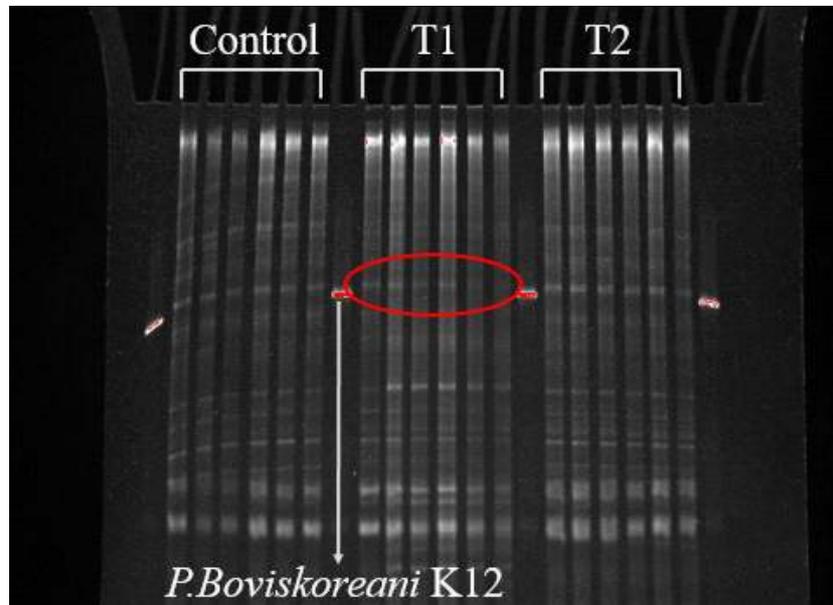


그림 23. lactic acid 저감 미생물 급여에 따른 반추위 내 미생물 군집 변화 양상 (DGGE)

(2) lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여에 따른 산중독증 저감 효율 검증

(가) 시험 설계

*P. boviskoreani* K12 혐기성 미생물의 lactic acid 저감 효과가 이전 *in vivo* 시험으로 검증되었으며, 이후 해당 미생물을 첨가한 개발 사료첨가제의 *in vivo* 시험을 실시하였다. 충남 천안시에 위치한 새삼목장에서 cannulae 장착 한우 암소 3두 대상으로 3×3 latin square design을 이용하여 *in vivo* 시험을 실시하였으며, 산중독증 유발 상태에서의 산중독증 저감 효율을 검증하기 위하여 비육후기 TMR사료(15kg/d)를 원물기준 급여하였다. 시험 사료는 *P. boviskoreani* K12 혐기성 미생물 1%, 부용제로써 silica 1%와 zeolite 98%를 혼합하여 제조하였으며, lactic acid 저감 효과를 검증하기 위한 *in vivo* 시험의 미생물 급여량과 동일한 양으로, T1 group은 사료(비육후기 TMR) 급여량의 0.05%(8g/d), T2 group은 사료 급여량의 0.1%(16g/d)에 해당하는 양의 개발 사료첨가제를 cannulae를 통하여 직접 공급하였다.

표 10. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 *in vivo* 시험을 위한 3×3 latin square 시험설계

개체번호	2468	3222	1298
1차 시험	Control	T1	T2
2차 시험	T2	Control	T1
3차 시험	T1	T2	Control

개발 사료첨가제의 산중독증 예방 효율을 검증하기 위하여 *in vivo* 시험 간 영국 Mole Valley Farmers Ltd. 에서 제조한 SMAXTEC Smart Bolus(반추위 내 pH, 온도, 음수량 및 개체 활동량 측정기)를 반추위 내에 투입 후 pH 데이터 확보 및 해석을 실시하였다. Smart Bolus(그림 24)는 cannulae를 통하여 반추위 내에 삽입하여 실시간으로 반추위 내 pH 데이터를 측정하였으며, 측정된 pH 데이터는 SMAXTEC MESSENGER를 이용하여 회사 서버에 접속하여 확인하였다.



그림 24. SMAXTEC Smart Bolus

1, 2차년도에 이용하였던 eCOW co.의 pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)는 반추위 내에 삽입 후 pH 및 온도 측정 데이터를 측정 및 저장해주며, 데이터를 송신하기 위해 서로 일치하는 주파수가 설정된 handset을 반추위 근처에 두어 데이터를 양방향 통신을 진행하는 방식이었지만, 본 시험에서 사용된 SMAXTEC Smart Bolus는 양방향 무선 통신 장비인 Base Station을 우사 내 설치하여 pH, 온도, 음수량, 활동량 데이터를 자동 측정 및 회사 서버로의 자동 업로드 되며, 업로드된 데이터는 스마트폰 어플리케이션 혹은 SMAXTEC Messenger 사이트에 접속하여 다운로드 받을 수 있다. 기존 ebolus보다 데이터 송수신 범위가 넓으며, 보다 정확한 pH, 온도, 음수량 및 활동량 데이터를 제공한다.

SMAXTEC Smart Bolus는 전문 수의사가 직접 반추위 내에 삽입하였으며, 삽입 이후 즉시 pH, 온도, 음수량 및 개체 활동량 데이터가 10분 간격으로 측정 및 축적되었다.



1298 - Con



그림 25. SMAXTEC Messenger 웹사이트

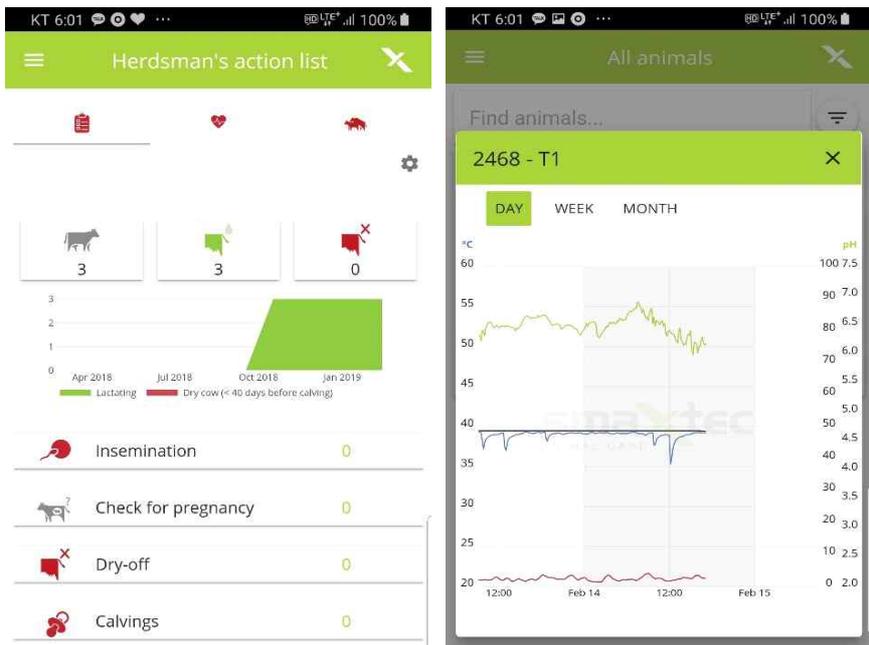


그림 26. SMAXTEC Messenger 어플리케이션

(나) 시험 결과

본 실험은 3×3 Latin square design을 이용하여 총 3차 시험을 진행하였으며, 시험 기간 동안 측정된 전체 pH 데이터는 다음과 같다.

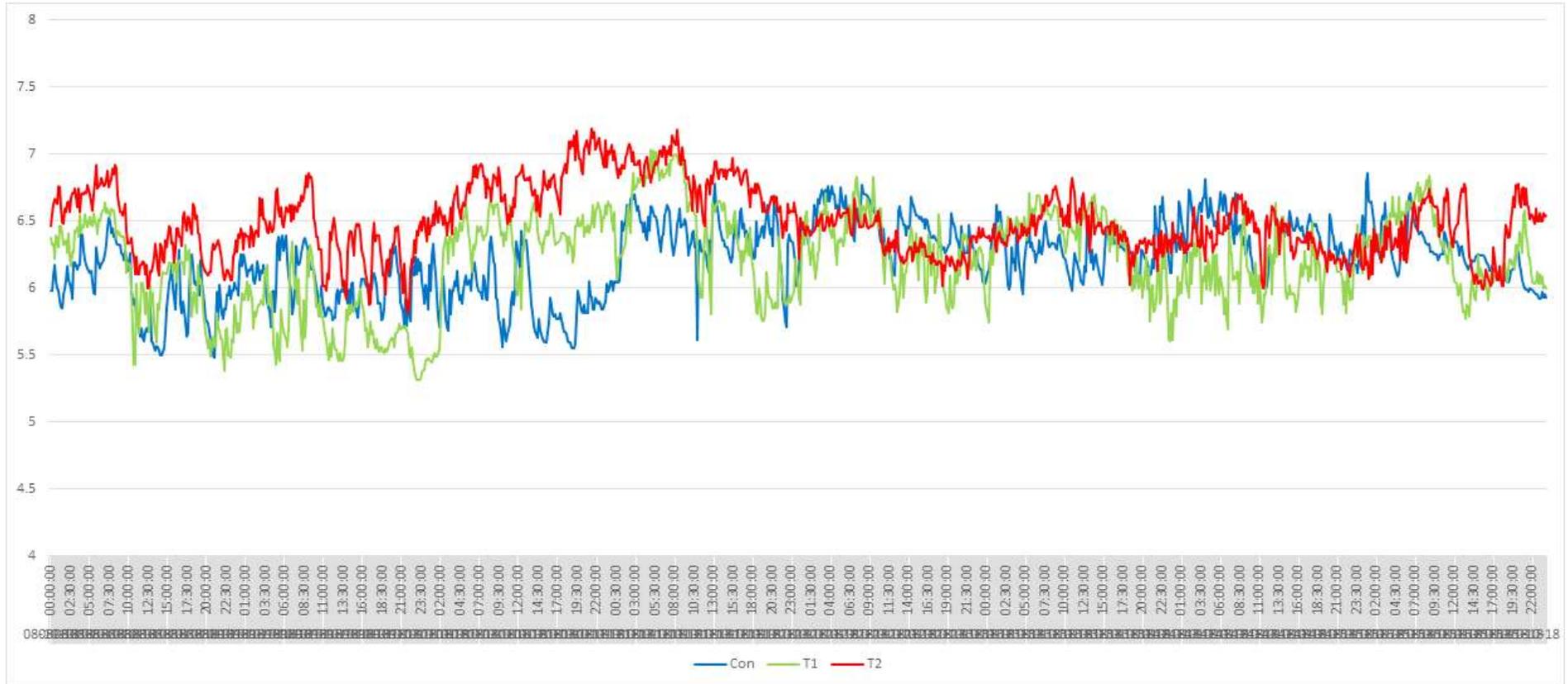


그림 27. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 1차 시험 전기간 pH 변화 양상

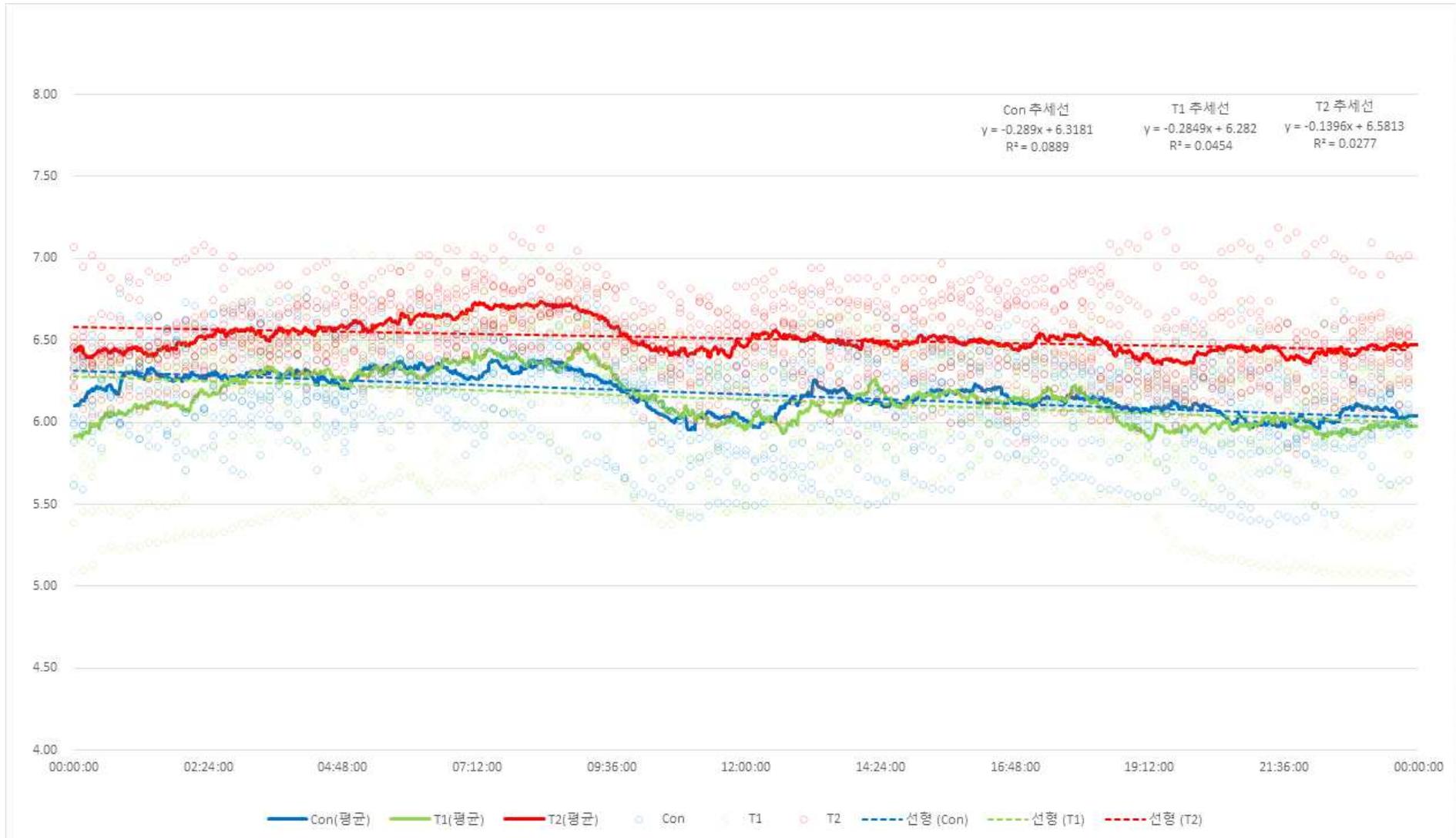


그림 28. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 1차 시험  
 시간별 평균 pH 변화 양상

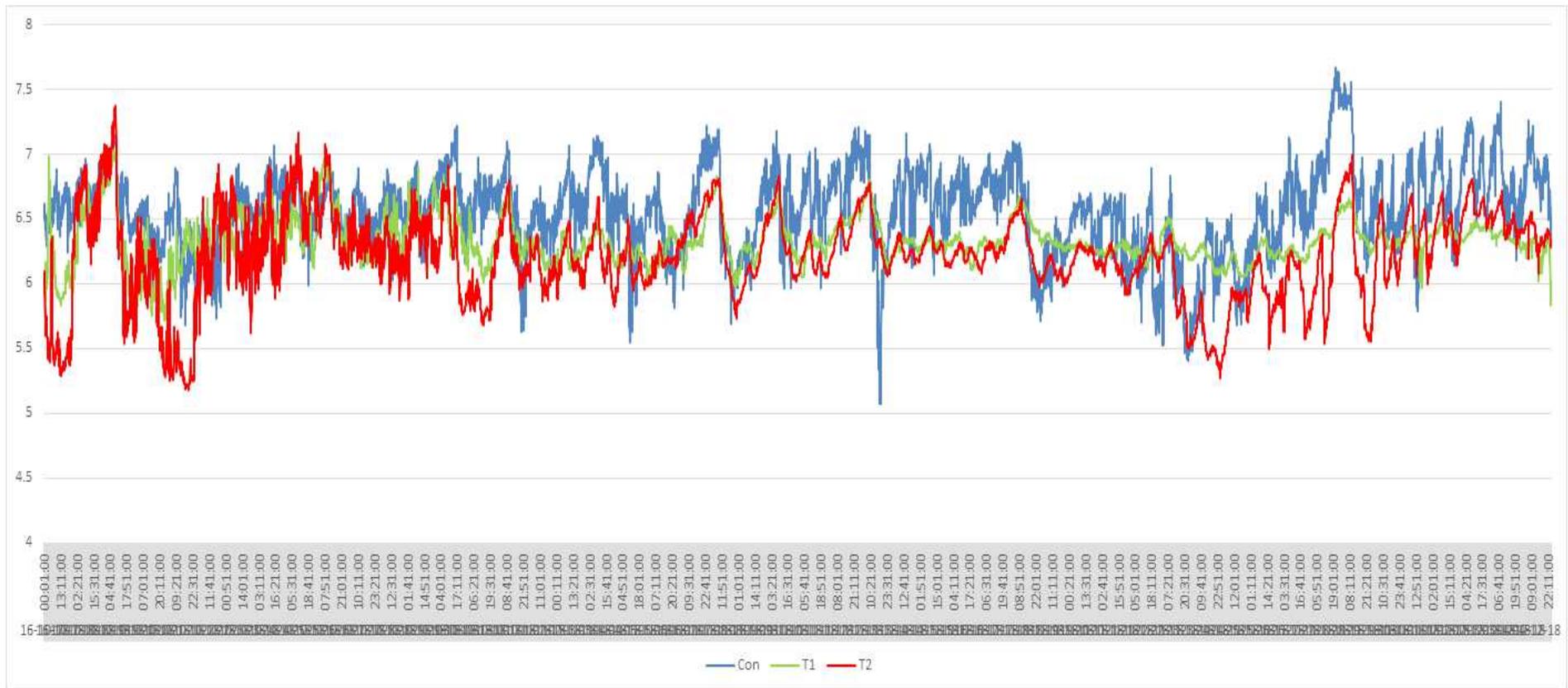


그림 29. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 2차 시험 전기간 pH 변화 양상

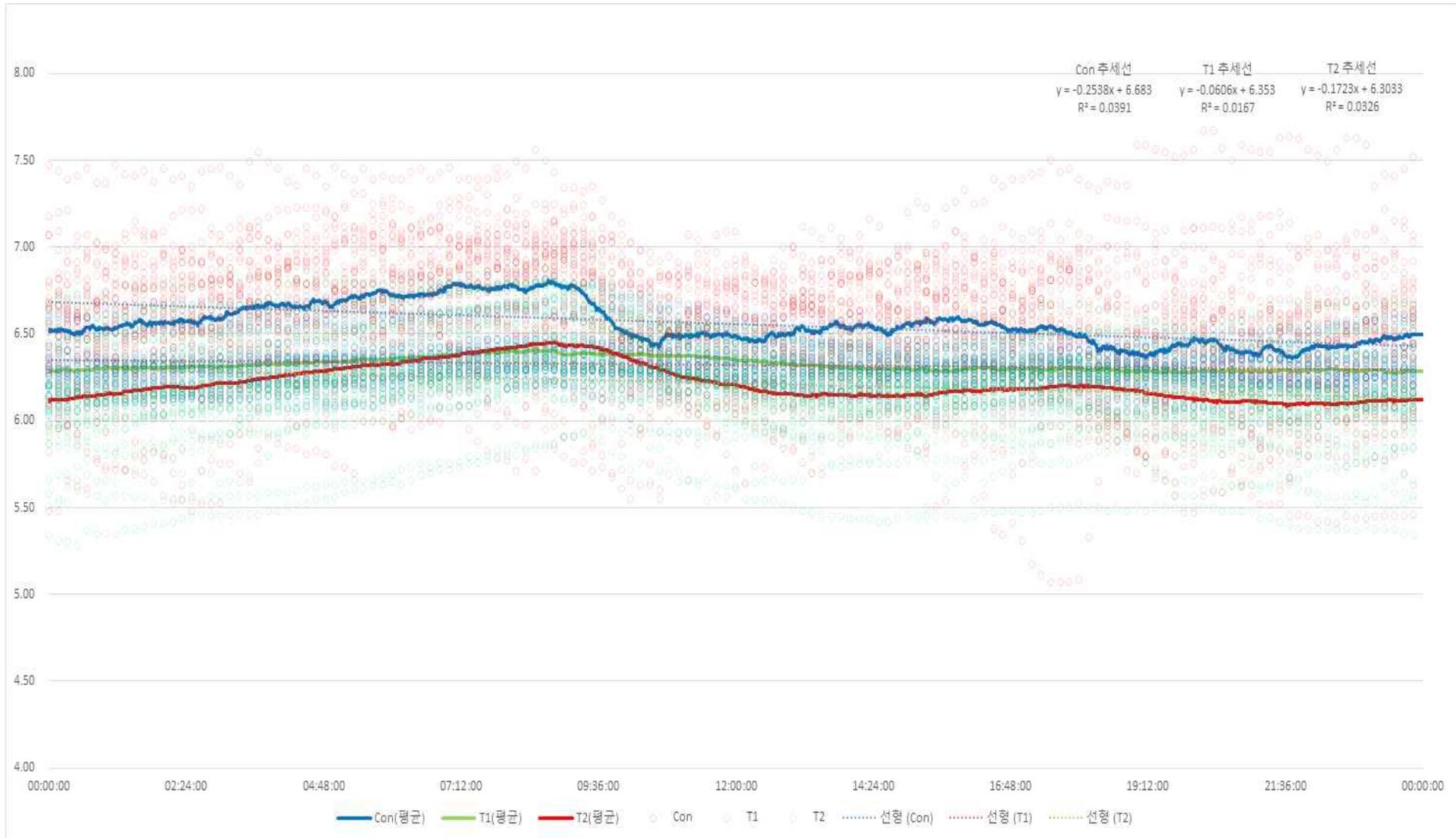


그림 30. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 2차 시험 시간별 평균 pH 변화 양상

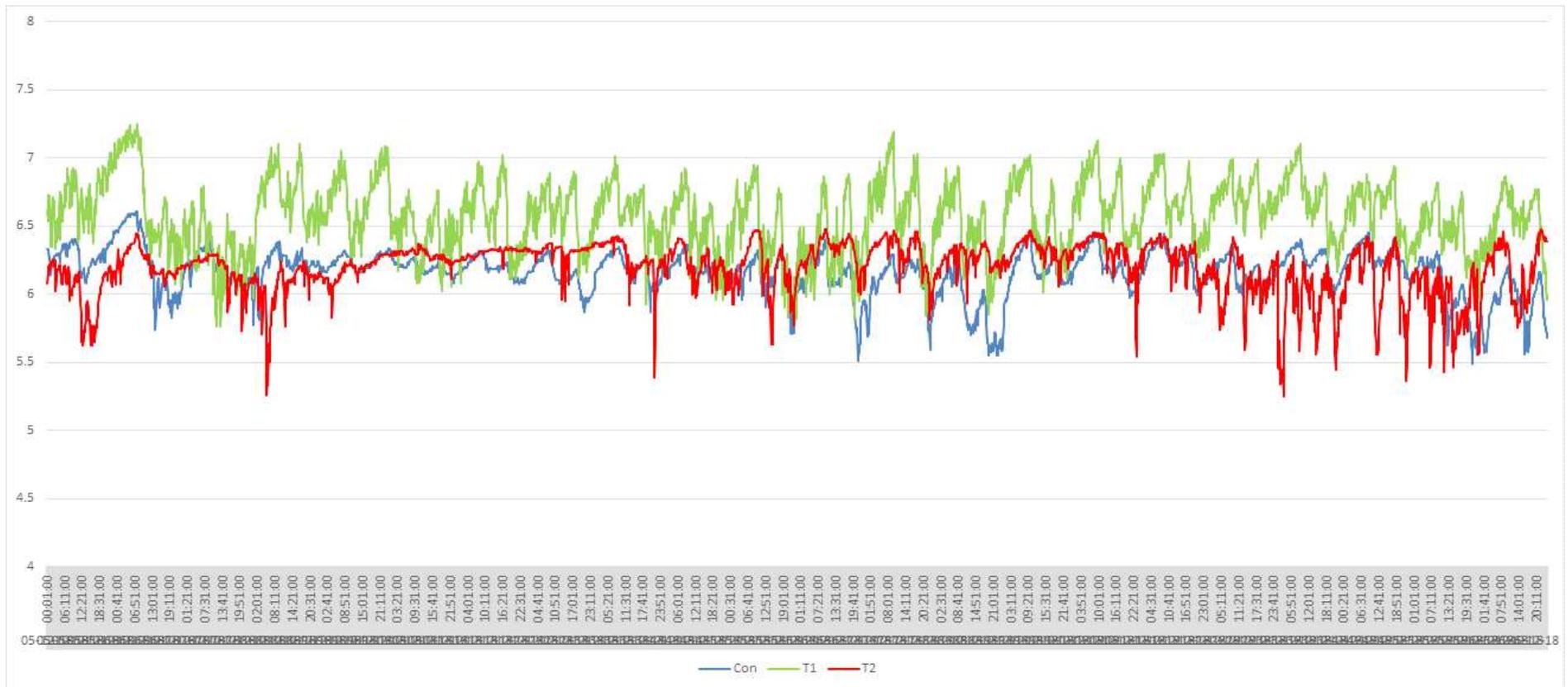


그림 31. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 3차 시험 전기간 pH 변화 양상

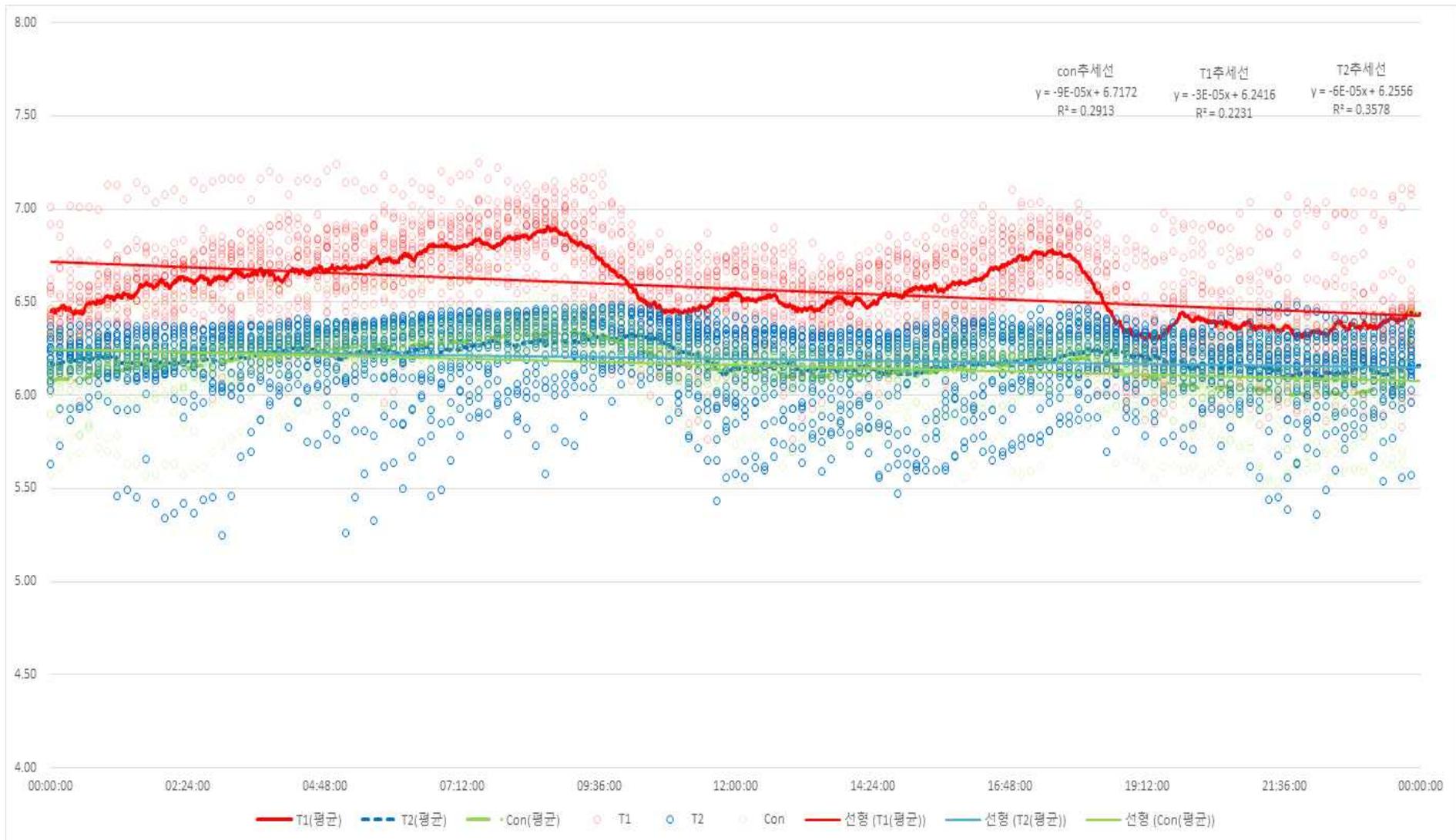


그림 32. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 3차 시험  
시간별 평균 pH 변화 양상

반추위 내용물 sampling시 측정된 pH 값은 T1 group(개발 사료첨가제 8g/d 급여구)이 유의적으로 높은 경향을 나타내었으며, 대조구의 pH는 가장 낮은 경향을 나타내었다 (그림 33). Lactic acid와 VFA 함량 분석 그래프에서 대조구가 가장 높은 경향을 나타내었으며, T2 group(개발 사료첨가제 16g/d 급여구)이 가장 낮은 경향을 나타내었다. 종합적으로 T1 group의 pH는 가장 높은 경향을 나타내었으며, 가장 낮은 경향을 나타내었던 대조구와 비교하여 lactic acid와 VFA 함량은 비슷한 경향을 나타내어 사료 급여량의 0.05%(DM)에 해당하는 양의 개발 사료첨가제 급여구의 산중독증 예방 효율이 가장 높게 나타났다 (그림 34, 35). 개발 사료첨가제 급여에 따른 반추위 내 미생물 군집 변화 양상을 확인하기 위하여 DGGE 시험 진행 결과 그림 7과 차이가 없음을 확인하였다.

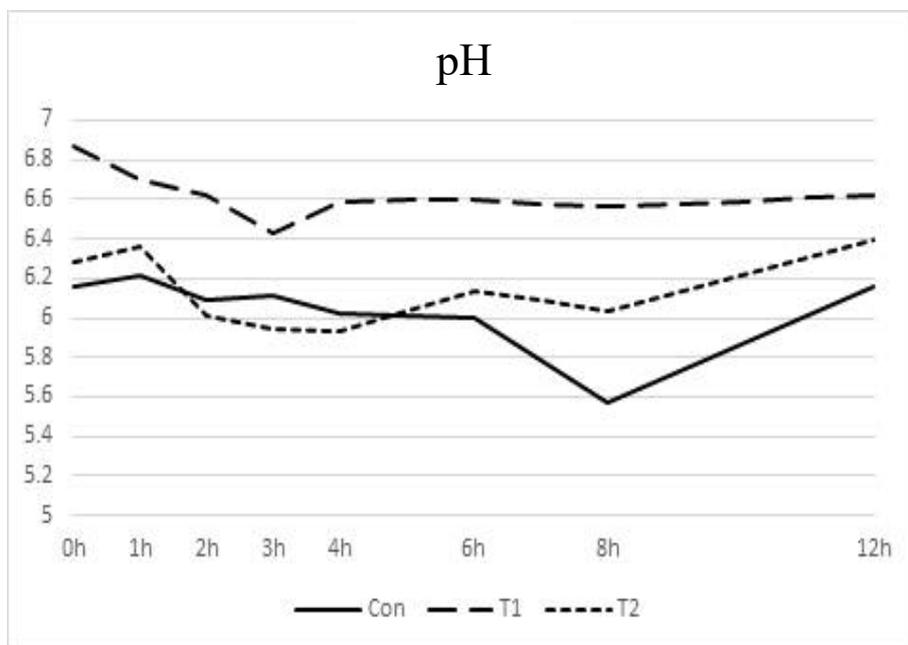


그림 33. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 시험 sampling 당일 아침 사료 급여 이후 pH

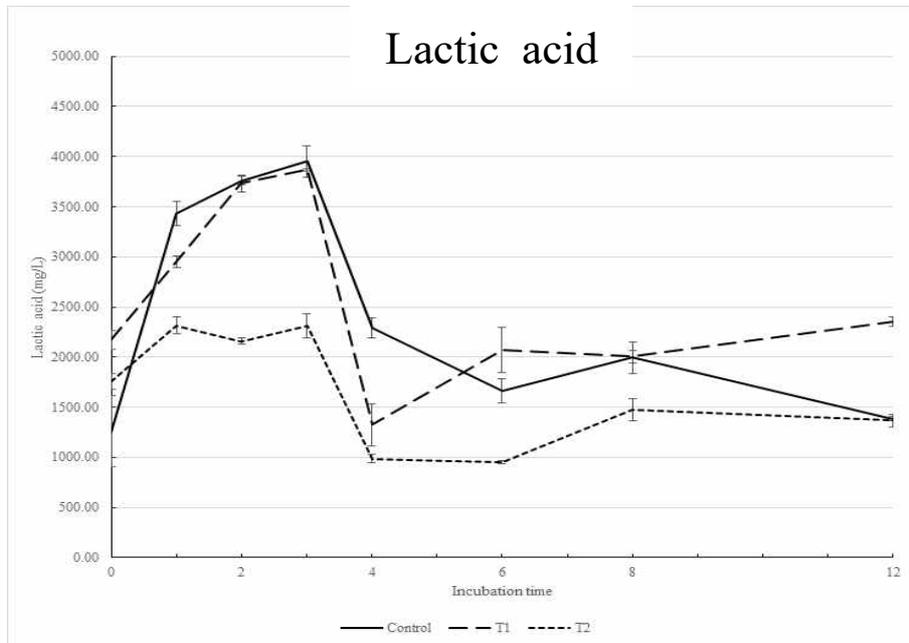


그림 34. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 시험 반추위 내 lactic acid 함량 변화 양상

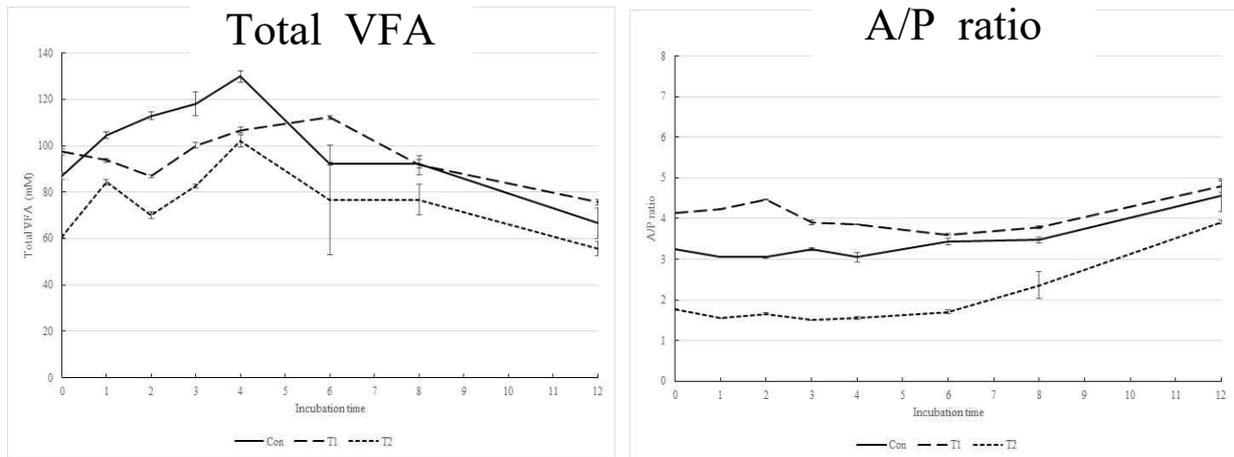


그림 35. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 시험 반추위 내 total VFA 함량 및 A/P ratio 변화 양상

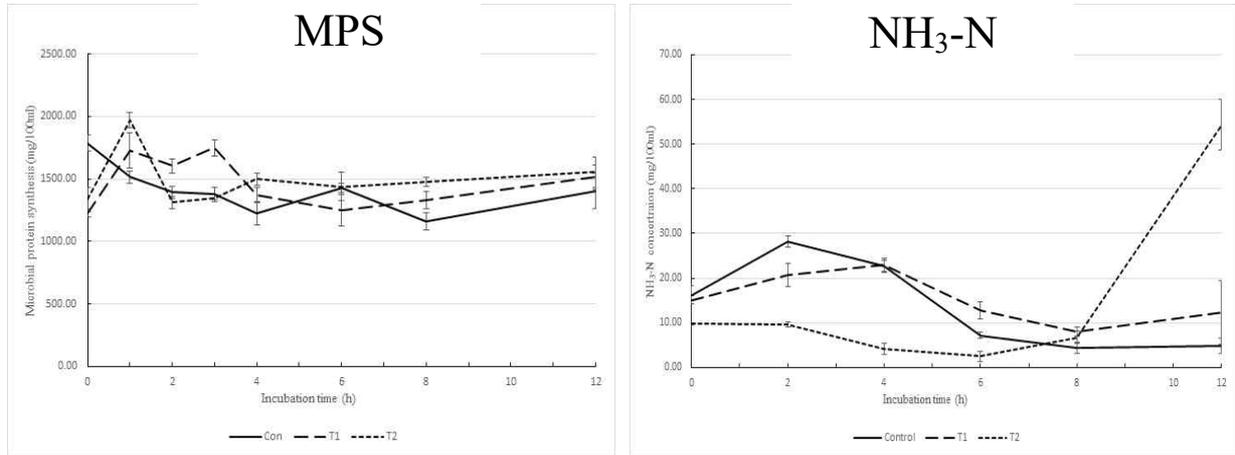


그림 36. Lactic acid 저감 미생물 첨가 개발 사료첨가제 급여 *in vivo* 시험 반추위 내 microbial protein synthesis (MPS) 및 NH<sub>3</sub>-N 함량 변화 양상

<제 2협동 : 한경대학교 (김창현)>

세부 과제명 : 산중독증 예방 미생물 균주 선발 및 배양 조건 확립

1. 반추위 내 lactic acid 이용성이 높은 혐기 미생물 분리

1) 반추위 내 혐기 미생물 배양

반추위 내 lactic acid 이용성이 높은 혐기 미생물을 분리하기 위하여 Dehority 등(1965)이 사용한 medium(Dehority's artificial(DA) medium)에 기초하여 탄소공급원으로 sodium lactate를 2%만을 첨가하여 medium을 제조하였다. 제조 후 최종 pH는 6.7로 조정하였다. DA medium의 조성은 표 1과 같다.

접종원으로 쓰인 반추위액은 cannula가 장착된 평균 체중 630kg 한우 번식암소의 반추위 내에서 채취하였으며, 채취해온 위액은 4겹의 거즈로 이물질을 거른 후, DA+2% sodium lactate medium에 접종하였다.

표 1. Dehority's artificial(DA) medium (per 100ml)

Component	DA medium
Mineral I solution <sup>1)</sup>	20ml
Mineral II solution <sup>2)</sup>	20ml
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.0ml
VFA solution <sup>4)</sup>	6.7ml
Hemin solution <sup>5)</sup>	0.1ml
Resazurine(0.1%)	0.1ml
Acid-hydrolysed casein	0.2g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4g
Cystein-HCl·H <sub>2</sub> O	0.1g
Rumen fluid <sup>6)</sup>	40ml
Starch	0.3g
Distilled water	10ml

1) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g in 1,000ml distilled water(DW).

2) NaCl 4.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.25g, MgSO<sub>4</sub> 0.25g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, COCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01g in 1,000ml DW.

3) Pyridoxine HCl 0.2g, Riboflavine 0.2g, Thiamine HCl 0.2g, Nicotinamide 0.2g, Ca-D-pantothenate 0.2g, p-Amino benzoic acid 0.01g, Stock solution(folic acid 0.125g, biotin 0.125g, cobalamine 0.125g in 25ml DW) 1.0ml in 1,000ml DW.

4) Acetic acid 17ml, Propionic acid 6ml, n-Valenic acid 1ml, Iso-Valenic acid 1ml, Iso-Butyric acid 1ml, DL- $\alpha$ -methylbutyric acid 1ml.

5) Dissolve 50mg hemin in 1ml 1N NaOH and make to 100ml with DW.

6) Centrifuged 27,000 x g for 20min after centrifuged at 13,000 x g for 30min and autoclave just before media were prepared.

반추위액을 접종한 배지는 38°C incubator에서 48시간동안 혐기배양 시켰다. 48시간동안 배양 후, 동일한 배지로 0.2ml씩 접종하여 계대배양 해 주었으며, 48시간 간격으로 총 5회에 걸쳐 계대배양을 진행하였다.

## 2) 반추위 내 혐기 미생물 분리

DA+2% sodium lactate medium에서 배양한 반추위액 내 혐기 미생물 분리를 위하여 혐기 희석액(Bryant와 Burkey, 1953)에서 배양액을 10<sup>-1</sup>~10<sup>-9</sup>까지 희석하여 희석액을 혐기성 미생물 분리를 위한 roll tube용 배지에 접종액으로 이용하였다. 혐기 미생물 분리는 희석된 접종액 0.6ml을 1.8% agar가 함유된 5.4ml의 DA+2% sodium lactate medium에 접종한 후, 시험관을 cold water에서 회전시켜 agar를 굳혔다. 희석액이 접종된 agar배지는 38°C incubator에서 일주일이상 배양하여 자라난 colony의 색상, 형태와 크기 등을 기준으로 각기 다른 모양의 colony 12개를 선정하여 혐기상태 하에서 분리하여 액상의 DA+2% sodium lactate medium에 각각 접종하여 배양하였다. 분리한 12개의 colony의 특성은 표 2와 같다.

분리한 12개의 colony는 임의로 K-1~12 까지 번호를 부여하여 DA+2% sodium lactate medium에 접종하여 38°C incubator에서 배양한 배양액에 멸균된 glycerol을 20% 첨가하여 -70°C deep-freezer에 보관하였다.

Table 2. The growth characteristics of colonies isolated from the rumen of Hanwoo beef cattle

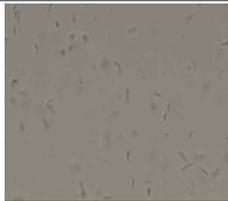
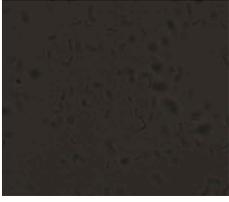
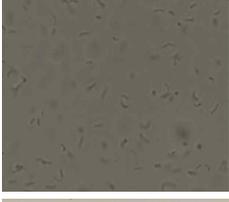
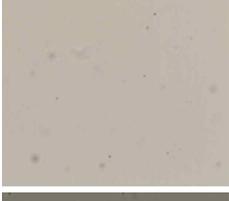
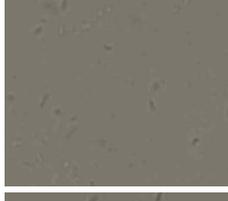
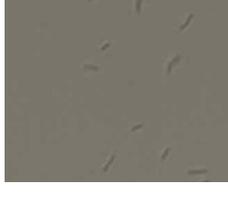
Colony	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	1.5	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	White
	2.5	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	White & Yellow
	3	Round	Lobate	Smooth	Raised (Convex)	White & Yellow
	13	Fillamentous (Irregular and Spreading)	Fillamentous (Branching)	Smooth	Flat	White
	2	Round	Entire	Smooth	Umbonate	White & Yellow
	2	Round	Entire	Smooth	Umbonate	White & Yellow

Colony	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	3	Round	Little Lobate	Smooth	Raised (Convex)	White & Yellow
	1.5	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Dark White
	3	Round	Entire	Smooth	Umbonate	White & Yellow
	2	Semicircular	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Yellow white
	2	Round	Entire	Smooth	Flat	White
	1.5	Round	Entire	Smooth	Flat	Dark white

### 3) 분리한 혐기 미생물의 morphology 특성 조사

반추위 내에서 분리한 K-1~K12 colony들의 물리적 형태(모양)를 확인하기 위하여 DA+2% sodium lactate medium에 각각 접종하여 배양한 뒤, 현미경 (BX41TF, Olympus, Japan) 을 이용하여 400배에서 관찰하였다(표 3). 대부분 rod(간균)와 spirillum(나선균) 형태를 띠고 있었으며, 일부 coccus(구균)이 관찰되었으나, 1차 분리단계에서 순수균이 분리되지 않았다고 판단하여 roll tube법을 통하여 2~3차 순수 분리과정의 진행이 필요하였다.

표 3. Microbial morphology of isolated bacteria utilizing lactic acid from the rumen of Hanwoo cattle

Colony no.	Photomicrograph	Cell form	Colony no.	Photomicrograph	Cell form
K-1		short rod & coccus	K-7		short rod
K-2		spirillum & coccus	K-8		short rod
K-3		spirillum & coccus	K-10		rod & coccus
K-4		coccus	K-11		rod
K-5		rod & coccus	K-12		rod
K-6		spirillum			

4) 분리한 혐기 미생물의 volatile fatty acid(VFA) 및 lactic acid 이용성

반추위 내에서 분리한 K-1~K12의 lactic acid 이용성을 조사하기 위해 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)로 배지 내 잔류하는 sodium lactate의 농도를 측정하였다. 분리한 혐기 미생물을 접종하기 전 2% sodium lactate를 첨가한 DA medium 내 sodium lactate의 농도는 261 mM 이었다. 분리한 혐기 미생물 중 자라지 않았던 K-9를 제외한 K-1~K12를 계대 배양하여 48시간동안 38°C incubator에서 배양한 뒤 배양액내 남아 있는 sodium lactate의 농도는 표 4과 같다. K-3에서 60.44%의 감소율을 보였으며, K-10, K-11, K-12에서는 70% 이상

sodium lactate가 감소하는 결과를 보였다. 각 분리된 균들의 TVFA(Total VFAs)는 13~16mM 사이의 값을 나타내었다(표 5).

표 4. Sodium lactate concentrations in the 48h cultures of the lactic acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Colony no.	Sodium lactate (mM)	Reduction rate (%)
Blank	261.35	-
K-1	208.69±731.9	20.15±3.1
K-2	170.38±37.1	34.81±0.2
K-3	103.38±203.7	60.44±0.9
K-4	259.12±123.7	0.85±0.5
K-5	153.88±567.6	41.12±2.4
K-6	157.15±140.4	39.87±0.6
K-7	150.36±306.0	42.47±1.3
K-8	174.98±215.9	33.05±0.9
K-10	71.27±77.2	72.73±0.3
K-11	73.73±83.8	71.79±0.4
K-12	56.06±66.1	78.55±0.3

표 5. VFAs and total VFA concentrations (mM) in the 48h cultures of the lactic acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle

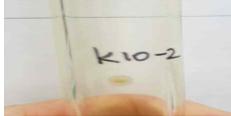
Colony no.	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFAs
K-1	10.16±0.19	1.98±0.03	0.46±0.01	2.38±0.06	0.60±0.01	1.07±0.02	16.65±0.32
K-2	8.60±0.19	1.43±0.02	0.41±0.01	2.73±0.09	0.53±0.01	1.10±0.04	14.80±0.35
K-3	7.78±0.07	1.08±0.00	0.39±0.00	2.89±0.09	0.50±0.01	1.13±0.05	13.78±0.23
K-4	11.41±0.44	2.69±0.11	0.46±0.01	1.19±0.05	0.56±0.03	0.37±0.01	16.67±0.66
K-5	9.25±0.62	1.46±0.07	0.41±0.01	2.73±0.12	0.51±0.03	1.12±0.04	15.47±0.88
K-6	9.32±0.58	1.43±0.04	0.42±0.01	2.87±0.21	0.54±0.03	1.22±0.11	15.81±0.76
K-7	9.20±0.39	1.34±0.01	0.42±0.00	3.06±0.08	0.55±0.03	1.17±0.05	15.74±0.27
K-8	9.26±0.26	1.41±0.03	0.41±0.01	2.72±0.16	0.52±0.02	1.12±0.08	15.43±0.56
K-10	7.27±0.17	1.02±0.01	0.39±0.01	2.92±0.13	0.49±0.01	1.02±0.05	13.11±0.37
K-11	8.25±0.17	1.06±0.01	0.41±0.00	3.19±0.08	0.52±0.01	1.12±0.03	14.54±0.15
K-12	7.75±0.07	1.01±0.00	0.40±0.00	3.05±0.08	0.50±0.01	1.06±0.03	13.76±0.20

## 2. 반추위 내 lactic acid 이용성이 높은 혐기 미생물의 2차 순수분리

### 1) Lactic acid 이용성이 가장 높았던 균주의 순수 분리

반추위액 내에서 분리한 K-1~K12 균주 중 lactic acid 이용율이 가장 높은 K-3, K-10, K-11, K-12 균주를 대상으로 2차 순수 분리를 위해 roll tube법을 진행하였다. 기존 채취하였던 colony 특성을 기초로 가장 비슷한 colony를 채취하여 DA+2% sodium lactate medium에 배양하였다. 2차 roll tube법을 통하여 채취한 colony의 특성은 표 6와 같다.

표 6. Growth characteristics of colonies cultured in the agar medium for the further isolation of the lactic acid utilizing bacteria from the rumen of Hanwoo cattle

Colony	NO.	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	K-3_1	2	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Dark White (Yellow White)
	K-3_2	2	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Dark White (Yellow White)
	K-10_1	2	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Yellow White
	K-10_2	3	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Yellow White
	K-11_1	2	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Yellow White
	K-11_2	2	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Yellow White
	K-12_2	2	Round	Entire	Smooth	Raised (Convex)	Dark White (Yellow White)

2) 2차 분리한 lactic acid bacteria의 lactic acid 이용성

1차에서 50% 이상 lactic acid를 이용하였던 K-3, K-10, K-11, K-12 균주를 2차 순수분리과정을 통하여 총 7개의 colony를 분리하였다. 분리한 7개 균주의 lactic acid 이용율을 확인하기 위하여 DA medium에 38℃ incubator에서 24시간 배양 후 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)로 sodium lactate의 잔류농도를 분석하였다. K-11\_2 균주를 제외한 6개의 균주에서 60% 이상 이용율을 보였으며, K-12\_2에서 97%로 가장 높은 이용율을 보였다. Lactic acid의 분석 결과는 표 7에 나타내었다.

표 7. Sodium lactate concentrations in the 24h cultures of the secondly isolated lactic acid utilizing bacteria from the rumen of Hanwoo cattle

Colony no.	Lactic acid (mM)	Reduction rate (%)
Blank	250.32	
K-3_1	89.47±0.5	64.3±0.2
K-3_2	90.97±1.3	63.7±0.5
K-10_1	72.52±1.3	71.0±0.5
K-10_2	89.71±1.1	64.2±0.5
K-11_1	87.73±1.9	65.0±0.8
K-11_2	205.11±3.4	18.1±1.3
K-12_2	6.29±0.0	97.5±0.0

3. 분리된 미생물의 반추위내 lactate 저감 능력 검증 및 선발

1) 반추위 내 lactic acid 이용 미생물 분리 및 이들 미생물의 volatile fatty acid(VFA) 및 lactic acid 이용성 분석

(1) 2차 순수분리 균의 VFA 및 lactic acid 이용성

2차 roll-tube법을 통해 순수분리된 7개 균의 lactic acid 이용율을 확인하기 위해 38℃에서 48시간 배양 후 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)로 배양액내 lactate의 농도를 분석하였다. 초기 배양전 배지내 lactic acid의 농도대비 배양 후 감소된 양을 계산하여 이용율을 분석하였다. K11을 제외한 모든 균에서 90% 이상의 이용율을 나타내었다(표 8). 분리된 균들의 TVFA는 13~16mM 사이의 값을 나타내었다(표 9).

표 8. Lactic acid concentrations in the cultures of the secondly isolated lactic acid utilizing bacteria from the rumen of Hanwoo cattle after 48h incubation

Strain No.	Lactic acid (mM)	Reduction rate (%)
Blank	250.32±1.32	-
K3-1	1.57±0.00	99.4±0.00
K3-2	1.57±0.00	99.4±0.00
K10-1	6.52±0.17	97.4±0.07
K10-2	19.87±0.45	92.1±0.18
K11-1	40.25±0.37	83.9±0.15
K11-2	35.98±0.13	85.6±0.05
K12-2	1.60±0.03	99.4±0.01

표 9. VFAs and total VFA concentrations (mM) in the cultures of the lactic acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 48h incubation

Strain No.	Acetate	Propionate	Isobutyrate	mM			TVFAs
				Butyrate	Isovalerate	Valerate	
K3-1	7.43±0.09	0.96±0.00	0.38±0.01	3.03±0.10	0.48±0.01	0.88±0.04	13.16±0.22
K3-2	7.26±0.22	0.95±0.01	0.38±0.01	2.99±0.19	0.48±0.02	0.96±0.02	13.02±0.53
K10-1	10.04±0.47	1.98±0.07	0.43±0.01	2.12±0.12	0.57±0.03	0.98±0.03	16.13±0.78
K10-2	7.78±0.16	0.95±0.00	0.39±0.01	2.97±0.07	0.51±0.01	1.11±0.03	13.72±0.27
K11-1	8.68±0.09	1.01±0.03	0.41±0.00	3.52±0.07	0.55±0.01	1.26±0.03	15.42±0.22
K11-2	8.95±0.17	1.53±0.03	0.40±0.01	2.33±0.08	0.51±0.01	1.03±0.04	14.74±0.32
K12-2	7.85±0.11	0.95±0.00	0.39±0.00	3.22±0.05	0.50±0.01	1.04±0.03	13.95±0.17

(2) Lactic acid 이용성이 높은 균의 최종선발 및 선발 균들의 VFA 생산 및 lactate 이용 특성  
 2차 순수 분리된 균주에서 lactic acid 이용율이 높았던 K3-1, K10-1, K11-2, K12-2 균주에 대하여 3차 roll-tube법을 진행하였다. 총 12개의 균을 순수 분리하였다. 분리된 colony의 특성은 표 12와 같다. 분리된 균을 24시간 배양 후 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 lactic acid의 농도를 분석하였다. 각 분리된 균들 중 lactic acid 이용율이 가장 높은 K3-1-3(K3), K10-1-2(K10), K11-2-2(K11), K12-2-1(K12) 등의 총 4균을 선발하였다(표 10). 선발된 균 4종 중 K10과 K11은 K13과 동일한 균이기에 K3과 K12를 최종 선발하였다. 분리된 균들의 TVFA는 13~15mM 사이의 값을 나타내어 2차 순수분리과정에서 측정된 값과 유사하였다(표 10).

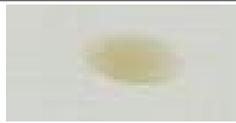
표 10. Lactic acid concentrations in the cultures of the lactic acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 24h incubation

Strain No.	Lactic acid (mM)	Reduction rate (%)
Blank	262.75±1.44	-
K3-1-1	97.20±5.02	63.0±1.91
K3-1-2	79.50±0.32	69.7±0.12
K3-1-3	18.38±0.59	93.0±0.23
K10-1-1	39.22±1.79	85.1±0.68
K10-1-2	8.15±0.08	96.9±0.03
K10-1-3	79.64±1.64	69.7±0.63
K11-2-1	7.19±0.12	97.3±0.04
K11-2-2	6.81±0.08	97.4±0.03
K11-2-3	79.39±1.37	69.8±0.52
K12-2-1	19.22±0.58	92.7±0.22
K12-2-2	46.62±0.28	82.3±0.11
K12-2-3	88.54±1.52	66.3±0.58

㉟ 11. VFAs and total VFA concentrations (mM) in the cultures of the lactic acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 24h incubation

Strain No.	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFAs
	mM						
K3-1-1	7.52±0.06	1.15±0.05	0.49±0.00	3.33±0.03	0.56±0.02	1.35±0.05	14.40±0.14
K3-1-2	7.79±0.03	1.27±0.00	0.51±0.01	3.60±0.01	0.68±0.01	1.32±0.01	15.16±0.07
K3-1-3	7.61±0.05	1.27±0.02	0.46±0.01	3.47±0.02	0.67±0.03	1.29±0.02	14.76±0.09
K10-1-1	8.38±0.04	1.15±0.05	0.43±0.04	3.35±0.05	0.56±0.00	1.35±0.04	15.23±0.09
K10-1-2	8.50±0.02	1.12±0.02	0.47±0.03	3.19±0.03	0.56±0.01	1.22±0.02	15.05±0.10
K10-1-3	8.44±0.05	1.13±0.02	0.45±0.02	3.28±0.04	0.52±0.01	1.29±0.01	15.12±0.11
K11-2-1	8.85±0.03	1.60±0.01	0.38±0.01	2.93±0.04	0.49±0.01	0.92±0.01	15.16±0.07
K11-2-2	8.75±0.05	1.71±0.27	0.46±0.01	2.74±0.06	0.43±0.04	0.83±0.04	14.91±0.20
K11-2-3	9.22±0.62	1.59±0.02	0.46±0.04	2.75±0.09	0.43±0.01	0.91±0.01	15.35±0.48
K12-2-1	7.88±0.06	0.92±0.01	0.42±0.02	2.66±0.04	0.49±0.01	1.13±0.05	13.49±0.11
K12-2-2	8.73±0.35	1.17±0.07	0.44±0.01	2.82±0.02	0.49±0.01	1.18±0.05	14.82±0.30
K12-2-3	7.99±0.03	0.95±0.02	0.43±0.01	2.72±0.02	0.46±0.02	1.11±0.03	13.66±0.07

㉔ 12. Growth characteristics of colonies cultured in the agar medium for the isolation of the lactic acid utilizing bacteria from the rumen of Hanwoo cattle

Colony	NO.	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	K3-1-1	2	Round	Smooth	Smooth	Flat	Yellow & white
	K3-1-2	2	Round	Smooth	Smooth	Convex	Yellow & white
	K3-1-3	2	Round	Smooth	Smooth	Flat	Yellow
	K10-1-1	3	Round	Smooth	Smooth	Convex	Yellow
	K10-1-2	2	Round	Smooth	Smooth	Convex	Yellow & white
	K10-1-3	2	Round	Smooth	Smooth	Convex	Yellow & black
	K11-2-1	2	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	K11-2-2	2	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	K11-2-3	2	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	K12-2-1	2	Round	Smooth	Smooth	Raised (Convex)	Yellow & White
	K12-2-2	2.5	Round	Smooth	Smooth	Raised (Convex)	Yellow & White
	K12-2-3	2	Round	Smooth	Smooth	Raised (Convex)	Yellow & White

2) 반추위내 전분분해 미생물의 lactic acid 및 발효산물 생산성

(1) 반추위 내 전분을 이용하는 혐기미생물 배양 및 분리

반추위 내 전분을 이용하는 혐기 미생물을 분리하기 위하여 Dehority 등(1965)이 사용한 medium(Dehority's artificial(DA) medium)에 starch를 0.3% 첨가하여 medium을 제조하였다. 제조 후 최종 pH 는 6.7로 조정하였다. DA medium의 조성은 표 13과 같다.

접종원으로 사용한 반추위액은 cannula가 장착된 평균 체중 630kg 한우 번식암소의 반추위 내에서 채취하였으며, 채취해온 위액은 4겹의 거즈로 이물질을 거른 후, 0.3% starch DA medium에 접종하였다

표 13. DA(Dehority's artificial) medium (per 100ml)

Component	DA medium
Mineral I solution <sup>1)</sup>	20ml
Mineral II solution <sup>2)</sup>	20ml
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.0ml
VFA solution <sup>4)</sup>	6.7ml
Hemin solution <sup>5)</sup>	0.1ml
Resazurine(0.1%)	0.1ml
Acid-hydrolysed casein	0.2g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4g
Cystein-HCl·H <sub>2</sub> O	0.1g
Rumen fluid <sup>6)</sup>	40ml
Starch	0.3g
Distilled water	10ml

1) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g in 1,000ml distilled water(DW).

2) NaCl 4.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.25g, MgSO<sub>4</sub> 0.25g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, COCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01g in 1,000ml DW.

3) Pyridoxine HCl 0.2g, Riboflavine 0.2g, Thiamine HCl 0.2g, Nicotinamide 0.2g, Ca-D-pantothenate 0.2g, p-Amino benzoic acid 0.01g, Stock solution(folic acid 0.125g, biotin 0.125g, cobalamine 0.125g in 25ml DW) 1.0ml in 1,000ml DW.

4) Acetic acid 17ml, Propionic acid 6ml, n-Valenic acid 1ml, Iso-Valenic acid 1ml, Iso-Butyric acid 1ml, DL- $\alpha$ -methylbutyric acid 1ml.

5) Dissolve 50mg hemin in 1ml 1N NaOH and make to 100ml with DW.

6) Centrifuged 27,000 x g for 20min after centrifuged at 13,000 x g for 30min and autoclave just before media were prepared.

반추위액을 접종한 배지는 38℃ incubator에서 24시간동안 혐기배양 시켰다. 24시간동안 배양 후, 동일한 배지로 0.2 ml씩 접종하여 계대배양 하였다.

DA+0.3% starch medium에서 배양한 반추위액 내 혐기 미생물의 분리를 위하여 혐기 희석

액(Bryant와 Burkey, 1953)에서 배양액을  $10^{-1}$ ~ $10^{-9}$ 까지 희석하여 희석액을 roll tube법을 위한 접종액으로 이용하였다. 혐기 미생물 분리는 희석된 접종액 0.6ml을 1.8% agar가 함유된 5.4 ml의 DA+0.3% starch medium에 접종한 후, 시험관을 cold water에서 회전시켜 agar를 굳혔다. 희석액이 접종된 agar배지는 38°C incubator에서 일주일이상 배양하여 자라난 colony의 색상, 형태와 크기 등을 기준으로 각기 다른 모양의 colony 13개를 선정하여 혐기상태 하에서 분리하여 DA+0.3% starch medium에 각각 접종하여 배양하였다. 분리한 13개의 colony의 특성은 표 14와 같다.

분리한 13개의 colony는 임의로 KS-1~13 까지 번호를 부여하여 DA+0.3% starch medium에 접종하여 38°C incubator에서 배양한 뒤, 20% glycerol 에 접종하여 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다.

표 14. Growth characteristics of colonies utilizing starch isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Colony	NO.	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	KS-1	1	Round	Smooth	Flat	Smooth	Black
	KS-2	1	Round	Smooth	Flat	Smooth	White
	KS-3	4	Irregular	Undulate	Flat	Smooth	White
	KS-4	6	Irregular	Undulate	Flat	Smooth	White
	KS-5	7	Irregular	Undulate	Flat	Smooth	White
	KS-6	5	Rhizoid	Lobate	Hilly	Smooth	White
	KS-7	6	Irregular	Wavy	Flat	Smooth	White
	KS-8	4	Round	Entire (smooth)	Flat	Smooth	White
	KS-9	3	Rhizoid	Lobate	Hilly	Smooth	White

	KS-10	4	Irregular	Lobate	Convex	Smooth	White
	KS-11	3	Irregular	Lobate	Flat	Smooth	White
	KS-12	3	Irregular	Wavy	Flat	Smooth	Yellow
	KS-13	3	Irregular	Lobate	Convex	Smooth	White

(2) 분리한 미생물의 VFA 및 lactate 분석

반추위 내에서 분리한 KS-1~KS-13의 lactic acid 농도분석을 위해 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)로 lactic acid 농도를 분석하였다. 분리한 혐기 미생물 중 자라지 않았던 KS-1, KS-12를 제외한 KS-2~KS-13을 계대 배양하여 24시간동안 38℃ incubator에서 배양한 뒤 배양 액내에 생산된 lactic acid의 농도는 표 15과 같다.

KS-6, 8, 9, 11은 lactic acid가 낮은 농도로 나타났으며, KS-10과 KS-13에서는 lactic acid가 발생되지 않았다. 각 분리된 균들의 TVFAs(Total VFAs)는 KS-6, 8, 10, 11, 13에서 46~49mM 사이의 높은 값을 나타내었다(표 16).

표 15. Lactic acid concentration in the 24h cultures of the starch utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Colony no.	Lactic acid (mM)
KS-2	38.75±0.80
KS-3	40.28±0.49
KS-4	38.58±0.17
KS-5	38.03±0.16
KS-6	3.60±0.11
KS-7	36.47±0.20
KS-8	1.51±0.02
KS-9	2.77±0.17
KS-10	-
KS-11	7.69±0.07
KS-13	-

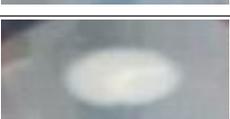
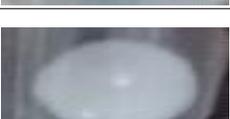
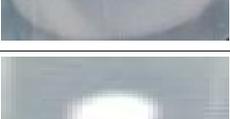
표 16. VFAs and total VFA concentrations (mM) in the 24h cultures of the starch utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Colony no.	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
	-----			mM	-----		
KS-2	10.94±0.05	0.89±0.01	1.20±0.00	-	1.66±0.01	1.28±0.00	15.98±0.05
KS-3	10.89±0.11	0.90±0.02	1.20±0.00	-	1.67±0.01	1.28±0.00	15.94±0.13
KS-4	10.00±0.11	0.71±0.01	1.17±0.00	-	1.60±0.00	1.24±0.00	14.72±0.12
KS-5	10.12±0.07	0.76±0.02	1.06±0.21	-	1.61±0.00	1.25±0.00	14.80±0.19
KS-6	24.16±0.20	5.40±0.06	1.40±0.01	14.28±0.12	2.07±0.01	1.77±0.01	49.08±0.40
KS-7	6.98±0.07	0.50±0.01	0.79±0.00	-	1.08±0.00	0.84±0.00	15.28±0.09
KS-8	29.52±0.55	5.93±0.10	1.45±0.00	5.16±0.04	2.16±0.01	1.81±0.01	46.04±0.70
KS-9	10.74±0.04	0.69±0.01	1.20±0.00	8.68±0.01	1.65±0.00	1.45±0.01	24.42±0.04
KS-10	30.31±0.07	5.53±0.02	1.44±0.00	5.01±0.01	2.11±0.01	1.78±0.01	46.16±0.11
KS-11	26.15±0.09	6.37±0.02	0.97±0.72	10.12±0.01	2.04±0.00	1.80±0.01	47.45±0.78
KS-13	28.31±0.01	5.63±0.01	1.44±0.00	5.10±0.00	2.12±0.00	1.82±0.00	44.41±0.02

(3) Lactic acid의 농도가 낮은 전분이용균의 순수분리

반추위액 내에서 분리한 KS-1~KS-13 균주 중 lactic acid의 농도가 낮은 KS-6, KS-8, KS10, KS11, KS13 균주를 순수 분리하기 위해 2차 roll-tube법을 진행하였다. 기존에 채취하였던 colony 특성과 가장 비슷한 colony를 채취하여 DA+0.3% starch medium에 24시간 배양하였다. 채취한 colony의 특성은 표 17과 같다.

Fig. 17. Growth characteristics of colonies utilizing starch isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Colony	NO.	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	KS6-1	3	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	KS6-2	5	Irregular	Wavy	Smooth	Hilly	White
	KS6-3	10	Irregular	Lobate	Smooth	Flat	White
	KS8-1	3	Round	Smooth	Smooth	Flat	Yellow & White
	KS8-2	3	Round	Smooth	Smooth	Umbonate	White
	KS8-3	3	Round	Smooth	Smooth	Convex	White
	KS8-4	3	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	KS10-1	4	Round	Smooth	Smooth	Raised	White
	KS10-2	5	Round	Smooth	Smooth	Umbonate	Yellow & White
	KS10-3	9	Round	Smooth	Smooth	Umbonate	White
	KS10-4	13	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	KS11-1	1	Round	Smooth	Smooth	Convex	Yellow & White
	KS11-2	2	Irregular	Lobate	Smooth	Flat	White

	KS11-3	2	Round	Smooth	Smooth	Umbonate	White
	KS11-4	2	Round	smooth	Smooth	Flat	White
	KS13-1	3	Round	Wavy	Smooth	Flat	Yellow
	KS13-2	3	Round	Wavy	Smooth	Flat	Yellow
	KS13-3	2.5	Round	Smooth	Smooth	Umbonate	White

(4) 2차 분리된 전분 이용균의 Volatile fatty acid(VFA) 및 lactic acid 생산특성

1차에서 lactic acid를 발생시키지 않았던 KS-6, KS-8, KS10, KS11, KS13 균주를 2차 roll-tube법을 진행하여 총 18개의 colony를 분리하였다. 분리된 균에서 잘 자라지 않은 KS10-4, KS11-2, -3 및 -4를 제외한 나머지 14개의 균주의 lactic acid 발생량은 DA medium에 38°C incubator에서 24시간 배양 한 후 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)을 이용하여 lactic acid를 분석하였다(표 18). KS10-1의 균주는 Lactic acid 생성 시키지 않았으면 KS13-2, KS13-3은 0.47mM로 가장 낮은 발생량을 보였다. TVFA(Total VFAs)는 50mM정도로 차이가 없었다(표 19).

㉟ 18. Lactic acid concentrations in the cultures of the starch utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 24h incubation

Colony no.	Lactic acid (mM)
KS6-1	6.05±0.03
KS6-2	2.50±0.04
KS6-3	6.89±0.08
KS8-1	4.78±0.01
KS8-2	4.31±0.04
KS8-3	4.87±0.01
KS8-4	4.63±0.03
KS10-1	-
KS10-2	0.47±0.00
KS10-3	0.47±0.00
KS11-1	2.99±0.09
KS13-1	6.85±0.19
KS13-2	0.47±0.00
KS13-3	0.47±0.00

㉟ 19. VFAs and total VFA concentrations (mM) in the cultures of the starch utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 24h incubation

Colony no.	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFAs
	mM						
KS6-1	26.40±0.16	5.38±0.03	1.36±0.00	13.25±0.04	1.95±0.00	1.69±0.00	50.04±0.22
KS6-2	23.97±0.37	4.90±0.06	1.36±0.01	14.81±0.11	1.97±0.01	1.73±0.01	48.73±0.57
KS6-3	28.69±1.70	6.34±0.52	1.45±0.04	14.93±0.88	2.13±0.08	1.82±0.06	55.36±3.29
KS8-1	31.01±0.26	6.68±0.06	1.51±0.11	5.69±0.04	2.26±0.01	1.88±0.01	49.03±0.39
KS8-2	29.69±0.10	6.06±0.04	1.45±0.00	5.28±0.02	2.15±0.00	1.80±0.00	46.44±0.15
KS8-3	30.59±0.11	6.51±0.04	1.49±0.00	5.55±0.01	2.23±0.01	1.85±0.01	48.22±0.16
KS8-4	33.67±0.17	6.78±0.05	1.51±0.00	5.63±0.03	2.23±0.01	1.86±0.01	51.68±0.28
KS10-1	34.17±1.88	6.68±0.51	1.50±0.04	5.66±0.28	2.24±0.08	1.87±0.06	52.11±2.85
KS10-2	33.41±0.46	6.49±0.12	1.49±0.01	5.60±0.06	2.23±0.02	1.87±0.02	51.09±0.69
KS10-3	33.42±0.10	6.42±0.02	1.48±0.00	5.52±0.01	2.20±0.00	1.84±0.00	50.88±0.13
KS11-1	32.24±0.08	8.45±0.02	1.46±0.00	5.52±0.01	2.16±0.00	1.87±0.01	51.69±0.11
KS13-1	32.45±0.14	5.43±0.03	1.43±0.00	5.23±0.02	2.06±0.01	1.80±0.01	48.40±0.21
KS13-2	32.18±0.20	6.34±0.05	1.51±0.01	5.71±0.03	2.25±0.01	1.93±0.02	49.92±0.32
KS13-3	30.46±0.15	5.78±0.05	1.43±0.01	5.17±0.03	2.08±0.01	1.79±0.01	46.70±0.25

표 20. Growth characteristics of colonies isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Colony	NO.	Size (mm)	Shape	Margin	Surface	Elevation	Color
	KS10-1-1	3	Irregular	Wavy	Smooth	Flat	White
	KS10-1-2	2	Round	Smooth	Smooth	Flat	White
	KS10-1-3	3	Round	Smooth	Smooth	Convex	White
	KS10-1-4	2	Round	Smooth	Smooth	Umbonate	White
	KS13-2-1	1	Round	Smooth	Smooth	Convex	White
	KS13-2-2	2	Round	Smooth	Smooth	Convex	White
	KS13-2-3	1	Round	Smooth	Smooth	Flat	Yellow & White
	KS13-2-4	1.5	Round	Smooth	Smooth	Raised	White

(5) Lactic acid 발생 농도가 낮은 균주의 순수분리 특성과 Volatile fatty acid(VFA) lactic acid 이용성분석 및 최종선발

2차 순수 분리된 균주에서 lactic acid의 농도가 낮았던 KS10-1, KS13-2 균주를 3차 roll-tube 법을 진행하여 총 8개의 균주를 분리하였다. 분리된 colony의 특성은 표 20과 같다. 분리된 균주는 24시간 배양 후 HPLC(Series 200, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 lactic acid를 분석하였다. 분리된 균의 lactic acid가 적게 발생된 균으로 KS10-1-1, KS10-1-4, KS13-2-2, KS13-2-3 총 4종 선발하였다(표 21). 분리된 균들의 TVFAs(Total VFAs)는 50mM정도로 차이가 없었다(표 22).

표 21. Lactic acid concentrations in the cultures of the starch utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 24h incubation

Colony no.	Lactic acid (mM)
KS10-1-1	0.31±0.00
KS10-1-2	5.50±0.10
KS10-1-3	-
KS10-1-4	-
KS13-2-1	0.32±0.00
KS13-2-2	0.32±0.00
KS13-2-3	0.32±0.00
KS13-2-4	-

표 22. VFAs and total VFA concentrations (mM) in the cultures of the starch utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle after 24h incubation

Colony no.	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFAs
	mM						
KS10-1-1	33.43±2.10	6.63±0.66	1.51±0.12	4.31±0.06	2.31±0.04	1.75±0.02	49.93±2.96
KS10-1-2	36.16±6.26	4.70±2.80	2.10±1.11	4.02±0.66	2.32±0.02	1.76±0.00	51.06±5.01
KS10-1-3	32.74±0.31	5.72±0.14	1.47±0.01	4.39±0.04	2.34±0.02	1.77±0.01	48.43±0.53
KS10-1-4	33.08±0.10	6.49±0.02	1.47±0.00	4.39±0.01	2.34±0.00	1.76±0.00	49.52±0.13
KS13-2-1	32.24±0.39	6.64±0.15	1.44±0.01	4.51±0.04	2.25±0.02	1.76±0.01	48.83±0.60
KS13-2-2	33.17±0.17	8.15±0.05	1.46±0.00	4.61±0.02	2.27±0.01	1.78±0.01	51.44±0.25
KS13-2-3	32.54±0.24	10.08±0.11	1.48±0.01	4.53±0.03	2.33±0.01	1.79±0.00	52.76±0.40
KS13-2-4	31.59±0.24	7.33±0.08	1.454±0.01	4.34±0.02	2.26±0.01	1.74±0.01	48.70±0.35

#### 4. 선발된 미생물의 동정 및 발효특성 조사

##### 1) 분리된 lactic acid 이용균과 전분분해균의 DNA 추출 및 16S rRNA(sequence) 분석과 BLAST 결과

최종선발된 lactic acid 이용균 K3 및 K12와 전분분해균 KS10 및 KS13의 DNA 추출을 위해 soil kit를 이용하여 진행하였다. 추출된 DNA는 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 진행하였다. 사용된 Primer는 337F, 785F, 805R을 사용하여 진행하였다. PCR의 진행 조건은 표 23과 같다. PCR진행된 product의 DNA sequencing을 진행하여 K3, K12, KS10와 KS13의 16S rRNA full sequence는 표 24와 같다.

Sequence의 BLAST 결과 lactic acid 이용균 K3, K12는 *Pseudoramibacter alactolyticus* ATCC23263와 가장 밀접한 관계가 있었으며, *Pseudoramibacter alactolyticus* 사이의 16S rRNA 유전자 유사성은 94% 나타났다. 전분분해균 KS10, KS13은 *Ruminococcus bromii* strain

ATCC27255와 가장 밀접한 관계에 있었고, *Ruminococcus bromii* strain 사이의 16S rRNA 유전자 유사성은 95% 나타났다.

표 23. PCR Progress condition

PCR condition	Time	
95 °C	15min	
95 °C	20sec	
50 °C	40sec	30cycle
72 °C	1min 30sec	
72 °C	5min	

㉔ 24. 16S rRNA full sequences of K3, K12, KS10 and KS13 of isolated bacteria

	Full sequence
K3	<p>GTTTGGATTATTGCTCATGACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGAAGCTGTCTAATGAACCTTCGGGC  GATTTAGAGAGTGGATAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCTTTCGGAGCGGAATAGCCTCGGGAAACGGG  AGTAAAGCCGCATAACATTATTTTTTCGCATGAAGAGATAATCAAACCTCCGGTGCCGAAAGATGGGCCCCGCGTCCTATTAGCTG  GTTGGTGAGGCAACGGCTCACCAAGGCGACGATAGGTAGCCGGTCTGAGAGGGCGAACGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC  CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAATACCGCGTGAGTGAAGAAGGT  TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTGGGGAAGAAGAAGTGACGGTACCCAATGAGGAAGTCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCC  GCGGTAATACGTAAGGGACGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGTTTTATAAGTCAGATGTGAAAG  GTACCGGCTCAACCGGTGACGTGCATTTGAAACTGTAAGACTTGAGTACTGAAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAA  ATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCGAGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGC  GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGCAGTTATGTCAGTGCCACAGTAAACACA  ATAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTG  GTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCCTTGACATCCTCTGACCTCTTAGAGATAAGACTTTCCTTCGGGGACAG  AGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTCGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGATTAG  TTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAACAGACTGCCGTAGACAATAACGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCC  TTATGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCTGAACAGAGGGCAGCGAAACCGTGAGGCGGAGCGAATCCCACAAAACAGA  TCTCAGTTCGGATTGTAGCTGCAACCCGCCTACATGAAGATGGAGTTGCTAGTATCGCGGATCAAATGCCGCGGTGAATGCGTTC  CCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTCGTACACCCGAAGCCAGTGTGACAACCGTAAGGAGTCAGCTGTGCAA  GTGGGATCGGTATGGGGTGAAGTCGTAACGGTTACCGTTAAAT</p>
K12	<p>GTTTTTATGATATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGAAGCTGTCTAATGAACCTTCGGGC  GATTTAGAGAGTGGATAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCTTTCGGAGCGGAATAGCCTCGGGAAACGGG  AGTAAAGCCGCATAACATTATTTTTTCGCATGAAGAGATAATCAAACCTCCGGTGCCGAAAGATGGGCCCCGCGTCCTATTAGCTG  GTTGGTGAGGCAACGGCTCACCAAGGCGACGATAGGTAGCCGGTCTGAGAGGGCGAACGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC  CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAATACCGCGTGAGTGAAGAAGGT  TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTGGGGAAGAAGAAGTGACGGTACCCAATGAGGAAGTCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCC  GCGGTAATACGTAAGGGACGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCCGTTTTATAAGTCAGATGTGAAAG  GTACCGGCTCAACCGGTGACGTGCATTTGAAACTGTAAGACTTGAGTACTGAAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAA  ATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCGAGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGC  GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGCAGTTATGTCAGTGCCACAGTAAACACA  ATAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTG  GTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCCTTGACATCCTCTGACCTCTTAGAGATAAGACTTTCCTTCGGGGACAG  AGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTCGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGATTAG  TTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAACAGACTGCCGTAGACAATAACGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCC  TTATGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCTGAACAGAGGGCAGCGAAACCGTGAGGCGGAGCGAATCCCACAAAACAGA  TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACCCGCCTACATGAAGATGGAGTTGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATGCG  TTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGTGACAACCGTAAGgAGTCAGCTG  TCGAAGTGGGATCGGTAATTGGGGTGAAGTCGTAACGGTTACCGTTAAAT</p>

---

Full sequence

---

KS10

ATTTGGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAACCTATTTTGAAGGATCTCTTCGGA  
GTGACGGATTTTTAGTTTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGCTGAGTAACCTGCCTCTGAGAGGGGAATAACGTTCTGAAAAGAA  
CGCTAATACCGCATAACATATATTTGCCGCATGACAGATATATCAAAGATTTTATCGCTCAGAGATGGACTCGCGTCCGATTAGTT  
AGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGACCGCGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCaACGCCGCGTGAAGGACGAAGG  
TCTTCGGATTGTAAACTTCTTTTGTGAGGGACGAAATTTGACGGTACCTGACGAATAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAGGGGTGCGTAGGCCGGCTTTGTAAGTCAGATGTGAAATCT  
ATGGGCTCAACCCATAAACTGCATTTGAAACTATAGAGCTTGAGTGAAGTAGAGGCAGGCCGAATTCCCTGTGTAGCGGTGAAAT  
GCGTAGAGATAGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGGCTTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAA  
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATTACTAGGTGTGGGGGGACTGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACA  
CAATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGTATG  
TGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAACCTAACGAAGTAGAGATACATTAGGTGCCCTTCGGG  
GAAAGTTGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGC  
TATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATAGGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCC  
CTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCATCAACAGAGGGAAGCAAATAGCGATATGGAGCAAACCCCTAAAAATG  
GTCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACCCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC  
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCCGGTAATACCCGAAGTCAGTAGCTTAACCGCAAGGAGAGCGCT  
GCCGAAGGTAGGATTGGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTTAACCGTA

KS13

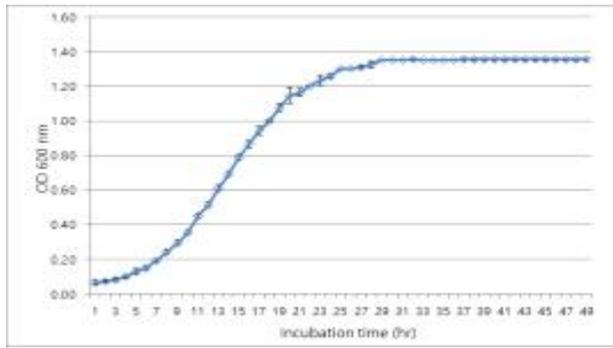
TTTGGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAACCTGACGCCGGTTCTTCGGAACCAT  
TGTCAGTTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGCTGAGTAACCTGCCTCTGAGAGGGGAATAACGTTCTGAAAAGAACGCTAATAC  
CGCATAACATATAGAAGTCGCATGGCTTTTATATCAAAGATTTTATCGCTCGGAGATGGACTCGCGTCCGATTAGTTAGTTGGTGA  
GGTAACGGCTACCAAGACCGCGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGTTTTTCGGAT  
TGTAAACTTCTTTTATCAGGGACGAATATTGACGGTACCTGATGAATAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAGGGGTGCGTAGGCCGGCTTGGTAAGTCAGATGTGAAATCTATGGGCTC  
AACCCATAAACTGCATTTGAAACTATCGAGCTTGAGTGAAGTAGAGGCAGGCCGAATTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
ATAGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGGCTTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATT  
AGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGATTACTAGGTGTGGGGGGACTGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACACAATAAG  
TAATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTA  
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAACCTAACGAAGTAGAGATACATCAGGTGCCCTTCGGGGAAAGTT  
GAGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGCTATTAGTT  
GCTACGCAAGAGCACTCTAATAGGACTGCCCTTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG  
CCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCATCAACAGAGGGAAGCGAAATGGCGACATGGAGCAAACCCCTAAAAATGGTCTCAG  
TTCAGATTGCAGGCTGCAACCCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCCGGTAATACCCGAAGTCAGTAGCCCAACCGCAAGGAAGGCGCTGCCGAA  
GGTAGGATTGGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTTAACCGTAA

---

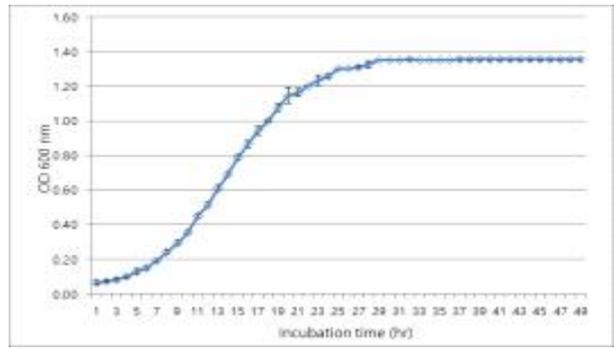
## 2) 분리된 균의 성장 및 생리적 특성

분리된 K3, K12, KS10 그리고 KS13의 성장율을 확인하기 위하여 DA medium에서 배양한 후 배양액을 spectrophotometer(Spectronic 20, Milton Roy Company, USA)를 이용하여 파장 600nm에서 48시간 동안 1시간 단위로 OD값으로 배양액 혼탁도를 측정하였다. 측정결과 K3, K12, KS10, KS13는 배양 30시간에 최대성장을 나타내었다(그림 1). Lactic acid 이용균의 배양액 OD값 1.0일 때, 전분이용균은 배양액 OD값 0.7일 때 균수를 측정하기 위해 roll-tube법을 진행한 결과 K3과 K12는  $\sim 10^8$ cfu/ml과 KS10은  $\sim 10^9$ , KS13은  $\sim 10^7$  cfu/ml로 조사되었다(표 25).

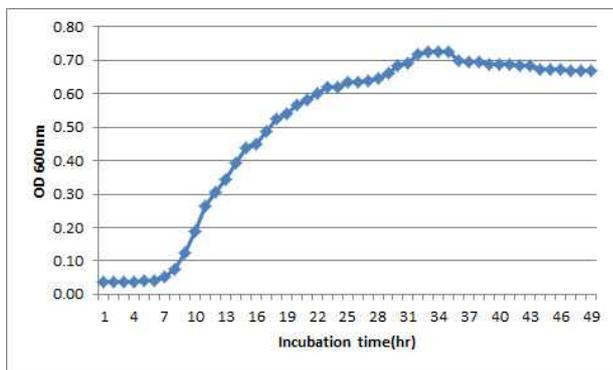
분리된 균주의 최적 성장을 위한 온도를 조사한 결과 38~45°C에서 최적 성장을 하였고, 최적 성장을 위한 pH는 K3과 K12는 6.0~6.5, KS10과 KS13은 6.0~7.0 이었다(그림 2). Lactic acid 이용균인 K3, K12의 API 20A의 분석을 통하여 기질 이용성을 조사한 결과 lactic acid 뿐만 아니라 D-glucose, D-mannitol, D-saccharose 및 D-sorbitol을 이용할 수 있었으며, 전분분해균인 KS10과 KS13의 API 20A의 기질 이용성을 조사한 결과 starch뿐만 아니라 KS10은 D-saccharose을 KS13은 L-arabinose를 이용할 수 있었으며, 공통으로 D-glucose, D-lactose, D-martose 그리고 D-mannose를 이용할 수 있었다(표 26). 분리된 균주 K3, K12, KS10 그리고 KS13의 DNA G+C content 분석결과 55.2mol%, 52.2mol%, 50.3mol% 그리고 54.3mol%로 나타났다. 분리된 균주의 지방산 조성은 유사한 것으로 나타났다(표 27, 28). 배양 특성조사와 16S rRNA sequence를 조사하여 결과적으로 두 균주는 *Pseudoramibacter* 속의 새로운 종으로 *Pseudoramibacter boviskoreani* K3과 K12로 명명하였다(그림 3). 또한 K3과 K12의 sequence는 GenBank database에 MF926251과 MF926250으로 등록되었다. 전분분해균 KS10, KS13의 16S rRNA sequence를 분석결과 두 균주는 *Ruminococcus* 속의 새로운 종으로 *Ruminococcus boviskoreani* KS10과 KS13으로 명명하였으며(그림 4), KS10과 KS13의 sequence는 GenBank database에 MG859238과 MG859247로 등록되었다.



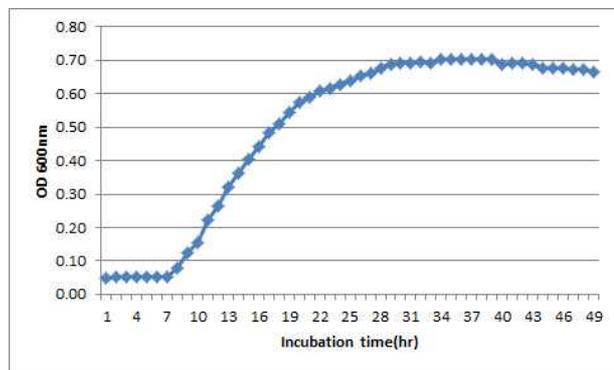
K3



K12



KS10

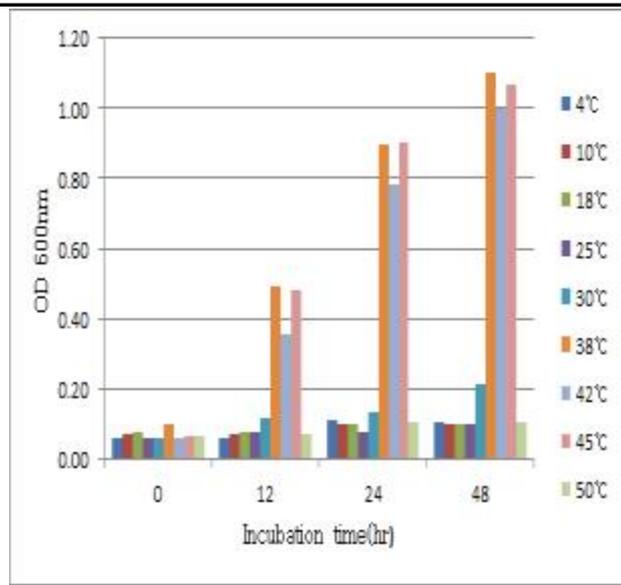


KS13

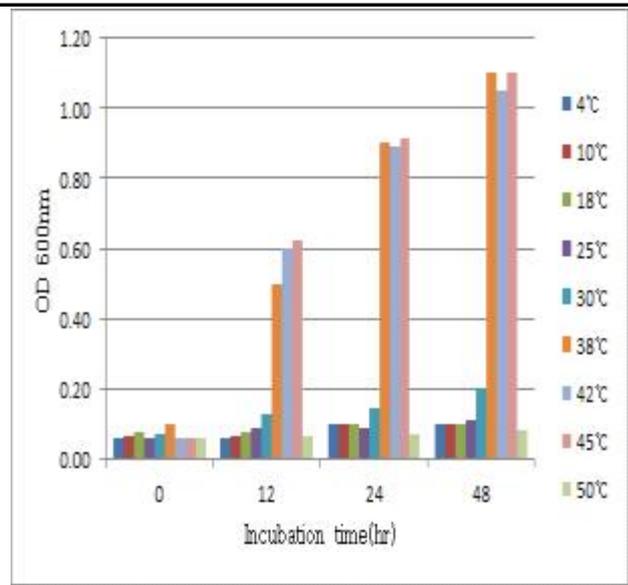
그림1. Growth covers of K3, K12, KS10 and KS13 grown in DA medium with rumen fluid

표 25. Cell numbers of the lactic acid utilizing bacteria strains of K3 and K12, and the starch utilizing bacterial strains of KS10 and KS13 at OD values of 1.0 and 0.7, respectively, cultured in DA medium

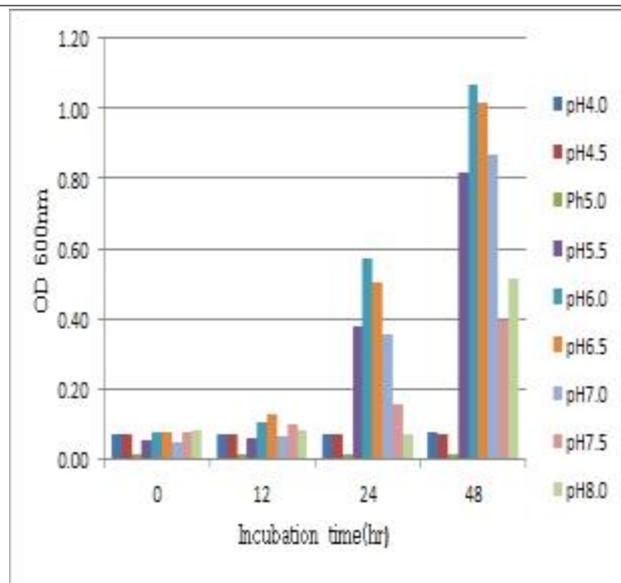
Strain	Cell numbers (log cfu/ml)
K3	8.66
K12	8.70
KS10	9.45
KS13	7.86



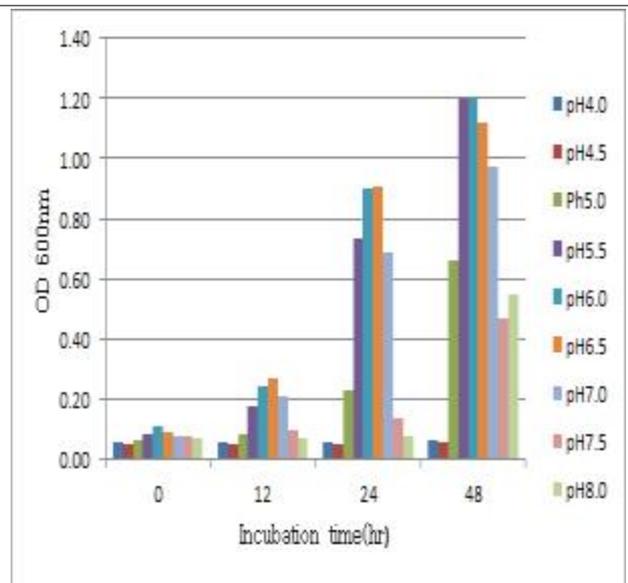
K3



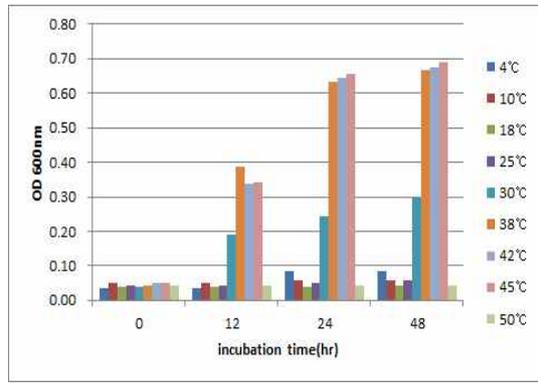
K12



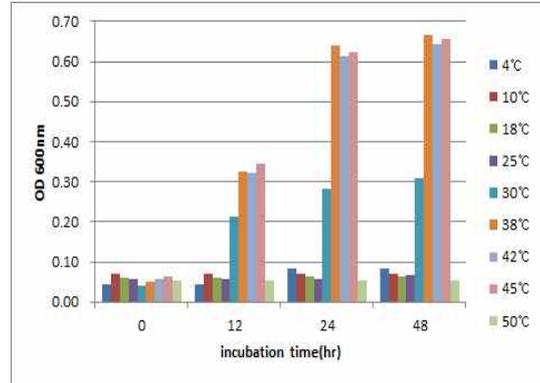
K3



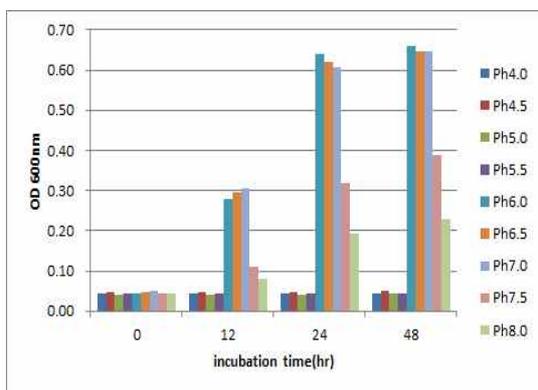
K12



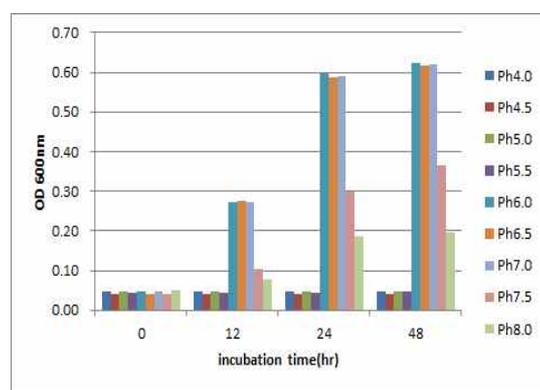
KS10



KS13



KS10



KS13

그림 2. Growth conditions of bacteria by different incubation temperatures and pH in the medium

표 26. Substrate utilization of anaerobic bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle

Substrate	K3	K12	KS10	KS13
L-tryptophane	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	-	-
D-lactose	-	-	+	+
D-saccharose	+	+	+	-
D-maltose	-	-	+	+
salicin	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	+
Gelatin	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	-	-
D-mannose	-	-	+	+
D-melezitose	-	-	-	-
D-raffinose	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-

Table 27. Fatty acid contents(%) of K3 and K12 bacterial cells

	K3	K12
Fatty acid		
Saturated		
C9:0	3.19	2.81
C10:0	0.78	0.64
C12:0	0.89	0.7
C14:0	30.09	32.67
C16:0	33.25	35.2
C17:0	1.04	0.89
C18:0	0.53	TR
Branched-chain fatty acid		
C18:1isoH	0.86	0.77
C19:1isoI	0.58	TR
Alcohol		
C16:0NAlcohol	3.82	3.32
Summed feature		
2;C12:0aldehyde/unknown	10.928	1
4;C17:1isoI/anteisoB	22.31	20
Total	98.9	98

Table 28. Fatty acid contents(%) of KS10 and KS13 bacterial cells

	KS10	KS13
Fatty acid		
Saturated		
C12:0	2.22	2.26
C14:0	1.80	1.80
C16:0	6.73	5.86
C17:0	1.42	0.97
C18:0	2.49	2.93
Unsaturated		
C16:0Nalcohol	TR	1.04
C18:1	1.15	1.02
Branched -chain fatty acid		
C14:0iso3OH	2.62	1.85
C15:0iso	6.44	4.50
C16:0iso	1.35	2.09
C17:0iso	3.70	2.55
C18:1isoH	0.78	0.51
C19:1isoI	1.08	1.04
C15:0anteiso	12.65	16.77
C15:1anteisoA	0.75	0.75
C17:0anteiso	35.39	35.74
Hydroxy fatty acids		
C14:02OH	4.79	6.69
Summed feature		
2;C12:0	6.92	4.71
4;C17:1	2.23	2.07
5;C18:2	1.68	1.48
8;C18:1	2.45	1.96
Total	98.64	98.59

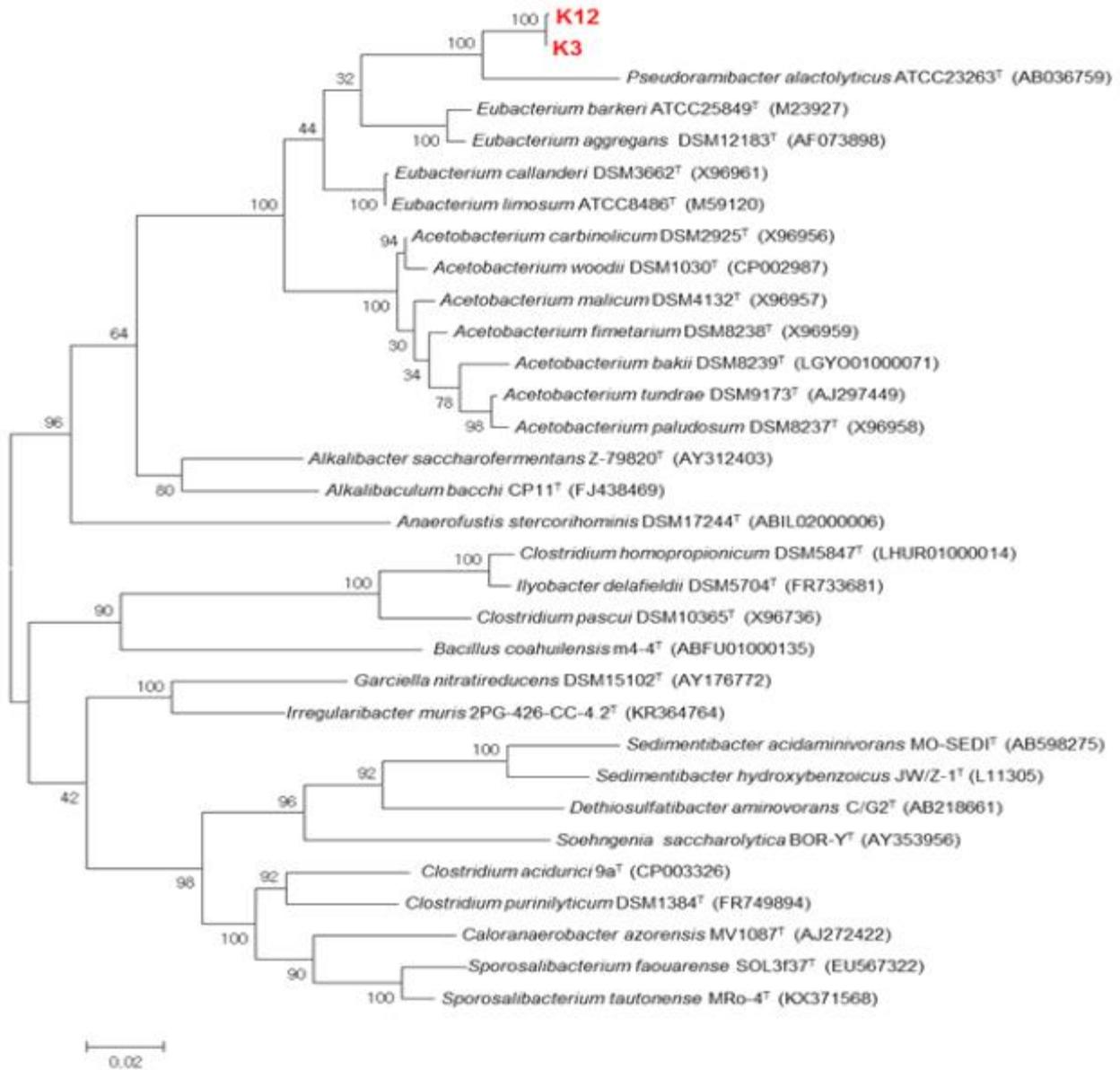


그림 3. Phylogenetic tree of 16S rRNA of lactic acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle.

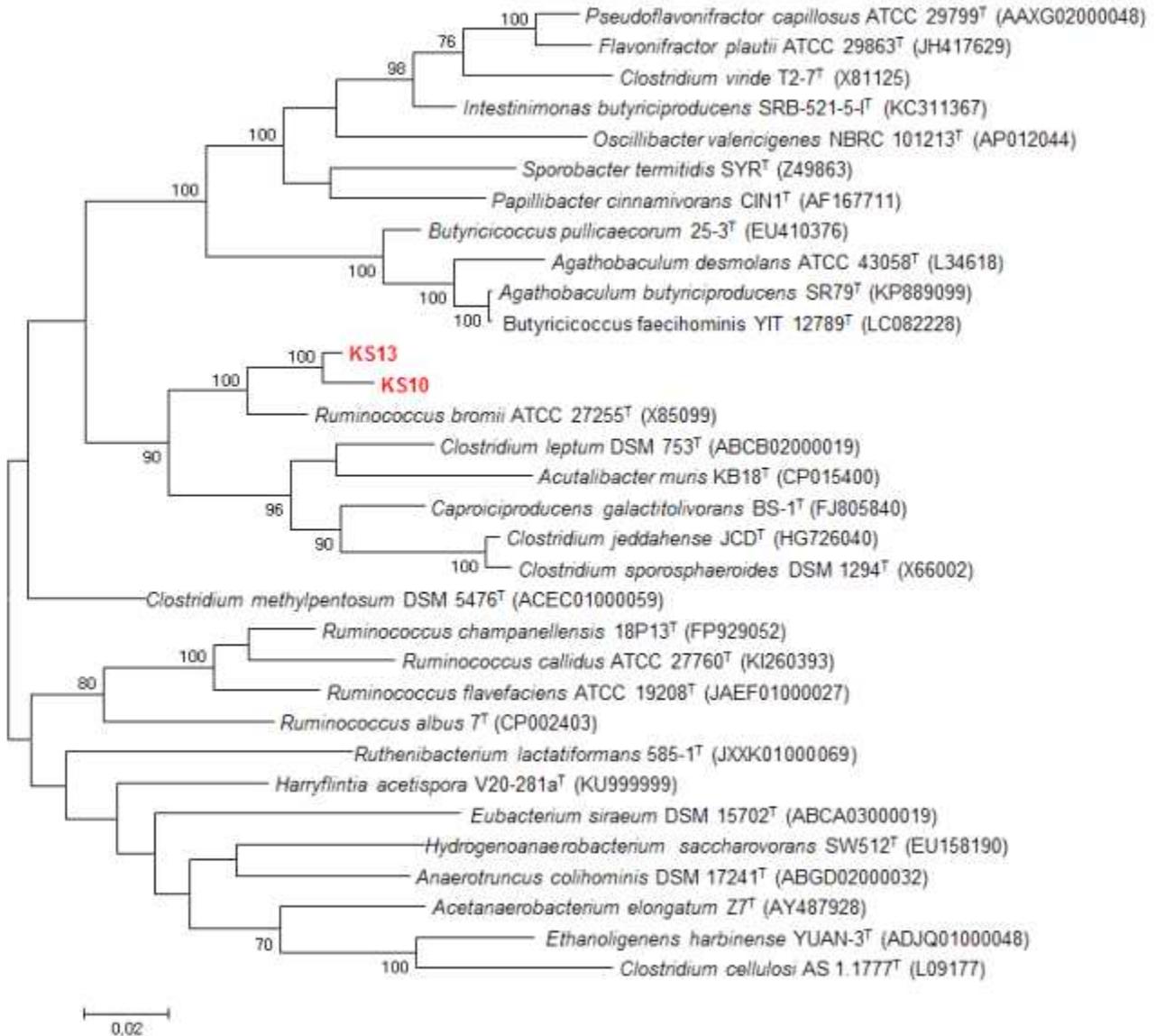
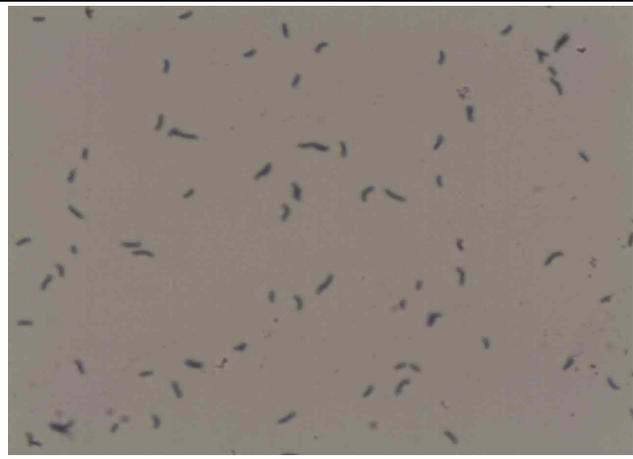


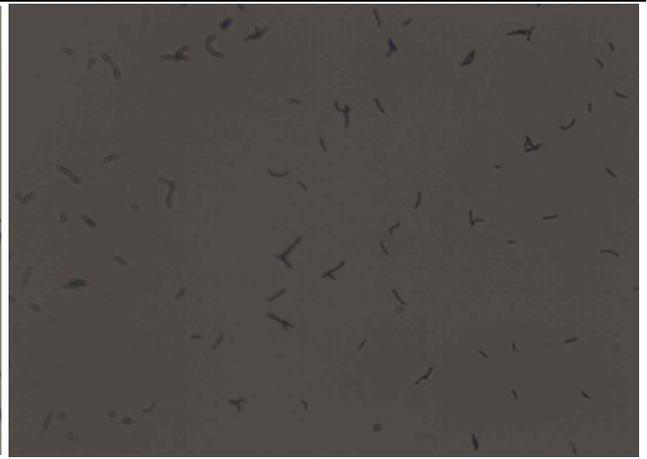
그림 4. Phylogenetic tree of 16S rRNA of starch utilizing acid utilizing bacteria isolated from the rumen of Hanwoo cattle.

##### 5. 분리된 균의 형태 및 용혈성

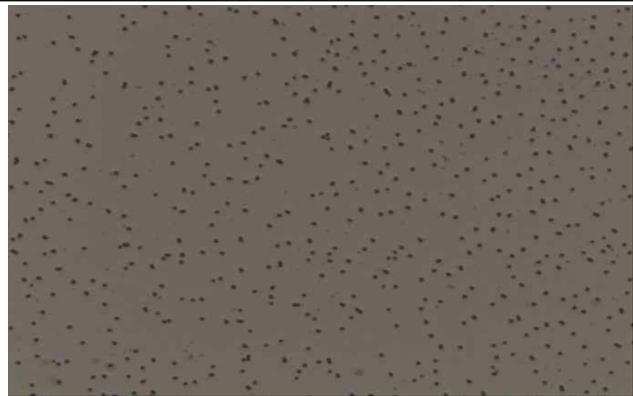
분리된 lactic acid 이용균 K3, 12와 전분분해균 KS10, KS13의 gram 염색을 진행하여 gram-positive로 나타났다. 각균의 형태는 lactic acid 이용균인 K3과 K12는 비운동성의 rods 형태 이었으며, 전분분해균인 KS10와 KS13은 cocci와 stretococci 형태를 나타냈다(그림 5). 분리된 각 균의 안전성 여부를 조사하기 위해 액상배지와 agar배지에 sheep blood 5%를 첨가하여 두 가지 방법으로 용혈성 분석을 진행하였다. 두 가지 방법으로 진행결과 용혈성 반응을 보이지 않았으며, 분리된 균주의 안전성을 확인 할 수 있었다(그림 6, 7). 용혈성에서 반응이 없었으므로 사료용 미생물제제로 사용이 가능할 것으로 판단된다.



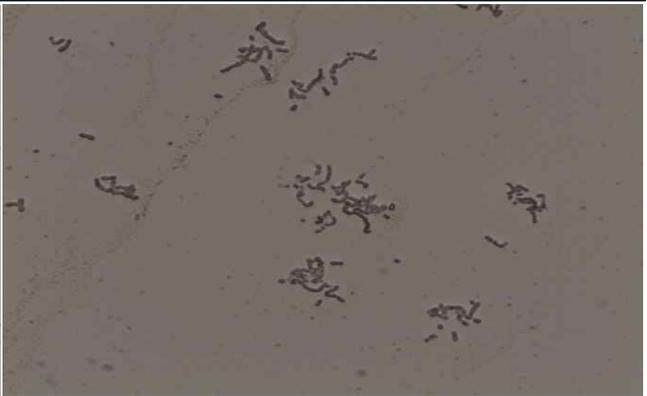
K3



K12



KS10



KS13

그림 5. Phase-contrast microscopy of isolated strains K3, K12 and KS10, KS13



K3



K12



KS10

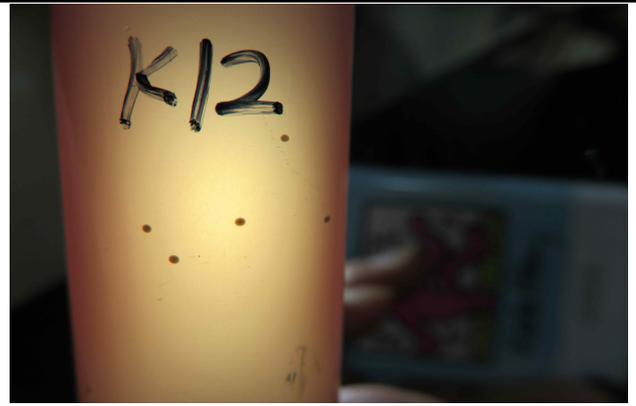


KS13

그림 6. Hemolysis test of K3, K12, KS10 and KS13 cultured in broth medium.



K3



K12



KS10



KS13

그림 7. Hemolysis test of K3, K12, KS10 and KS13 cultured in gar medium.

#### 6. 분리된 균의 저가형 배지개발

기존 Dehority's artificial(DA) medium(표 29)을 기본으로 사용하여 lactic acid와 starch를 첨가하여 배양하였다. 배지 조성시 사용되는 고가의 시약을 저렴한 시약으로 대체하기 위하여 시약을 제외하거나 그 조성을 바꿔 실험을 진행하였다. Lactic acid 이용균인 K3과 K12의 경우 98% sodium lactate를 2% 첨가하여 배지를 조성하였다. 98% sodium lactate의 경우 시중의 금액이 50g의 70만원에 유통되고 있어 사료용첨가제를 만들어 사용하기에는 경제성이 낮기에 식용으로 사용되어지는 60% sodium lactate로 대체하였다. 식용 60% sodium lactate는 20kg 기준으로 9만원에 유통되고 있어 첨가제에 사용에 적합하다고 판단되어 이를 대체하여 균을 배양한 결과 기존에 사용되는 98% sodium lactate와 비교하여 성장에 차이가 없는 것으로 나타났다. Lactic acid를 대체제로 이용하여 1%, 1.5%, 2% 첨가하여 배양한 결과 성장이 되지 않는 것으로 나타나 lactic acid는 sodium lactate를 대체할 수 없는 것으로 확인되었다(표 30). 산성인 lactic acid를 첨가하면 pH가 낮아져 NaOH를 이용하여 pH조성시 많은 양이 들어가 배지 농도가 희석되어 배양시 미생물이 성장하지 못하는 것으로 판단되었다. 질소공급원인 casein의 경우 기존배지의 0.2%를 첨가하여 배지를 조성하는데 casein도 시중의 단가가 높아 미생물제제에 사용하기에 부담을 주기 때문에 배지 내 첨가농도를 낮추어 성장특성을 조사하였다. Casein

무첨가, 0.05% 그리고 0.1%로 48시간 배양하여 진행하였다. 무첨가시 미생물이 자라지 않았으며, 0.05%의 OD값 K3은 0.41, K12는 0.44로 나타났으며, 0.1%의 OD값 K3 0.83, K12 1로 나타났다.(표 31) 결과적으로 0.1%의 casein을 첨가해줘야 미생물 성장에 영향이 없는 것으로 나타났다. 전분분해균인 KS10과 KS13은 배지조성에서 rumen fluid를 이용하여 배양이 가능하다. 기존에 40%정도의 rumen fluid를 첨가하여 배지 조성하여 배양하였으나, 현재 rumen fluid 10%까지 낮춰 첨가하여 배양이 가능한 것으로 나타났다. 전분분해균의 배양시에도 casein을 0.2%를 첨가하여 배양 하고 있으며. casein 무첨가, 0.05% 그리고 0.1%를 48시간 배양하여 OD 값 측정 결과 무첨가에서는 성장이 안 되는 것으로 나타났으며, 0.05%에서의 OD값은 KS10은 0.64, KS13은 0.62로 나타났으며, 0.1%에서 OD값은 KS10은 0.65, KS13은 0.65로 나타났다(표 31). 0.05%나 0.1%로 둘 다 성장이 좋은 것으로 나타났다. 최종 결과로 lactic acid이용균 K3과 K12는 60% sodium lactae와 casein 0.1%를 이용하는 것이 좋다고 판단되었으며, 전분분해균인 KS10과 KS13은 rumen fluid 10%와 casein 0.05%를 이용하였을 때 고가의 기존배지와 유사한 성장을 유지할 수 있는 것으로 판단된다(표 32).

분리된 K3, K12, KS10과 KS13의 균주의 기질이용성 분석결과에서 모든 균주에서 glucose를 이용할 수 있는 것으로 나타나 실험을 진행하였으며, 진행결과 glucose만을 첨가하여 배지제조 시 미생물이 성장하지 않는 것으로 나타났으며, K3과 K12의 경우는 lactate와 glucose를 0.5%씩 혼합 첨가하여 배양시 OD값 0.7 ~ 0.8로 나타나는 것을 확인하였으며, KS10과 KS13의 경우 starch와 glucose 경우 혼합하여 배양시 성장을 하지 않는 것으로 나타났다(표 33).

표 29. DA(Dehority's artificial) medium (per 100ml)

Component	DA medium
Mineral I solution <sup>1)</sup>	20ml
Mineral II solution <sup>2)</sup>	20ml
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.0ml
VFA solution <sup>4)</sup>	6.7ml
Hemin solution <sup>5)</sup>	0.1ml
Resazurine(0.1%)	0.1ml
Acid-hydrolysed casein	0.2g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4g
Cystein-HCl·H <sub>2</sub> O	0.1g
Rumen fluid <sup>6)</sup>	40ml
Starch or lactate	0.3g or 2g
Distilled water	10ml

1) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g in 1,000ml distilled water(DW)

2) NaCl 4.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.25g, MgSO<sub>4</sub> 0.25g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, COCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01g in 1,000ml DW

3) Pyridoxine HCl 0.2g, Riboflavine 0.2g, Thiamine HCl 0.2g, Nicotinamide 0.2g, Ca-D-pantothenate

0.2g, p-Amino benzoic acid 0.01g, Stock solution(folic acid 0.125g, biotin 0.125g, cobalamine 0.125g in 25ml DW) 1.0ml in 1,000ml DW

4) Acetic acid 17ml, Propionic acid 6ml, n-Valenic acid 1ml, Iso-Valenic acid 1ml, Iso-Butyric acid 1ml, DL- $\alpha$ -methylbutyric acid 1ml

5) Dissolve 50mg hemin in 1ml 1N NaOH and make to 100ml with DW

6) Centrifuged 27,000 x g for 20min after centrifuged at 13,000 x g for 30min and autoclave just before media were prepared

卅 30. Effects of casein supplementation levels in DA medium on the growth (OD value) of lactic acid utilizing bacteria k3 and k12

	lactic acid		
	1%	1.5%	2%
K3	0.07	0.06	0.06
K12	0.06	0.05	0.06

卌 31. Effects of casein supplementation levels in DA medium on the growth (OD value) of lactic acid utilizing bacteria (K3 and K12) and starch utilizing bacteria (KS10 and KS13)

	casein	
	0.05%	0.10%
K3	0.41	0.83
K12	0.44	1
KS10	0.64	0.65
KS13	0.62	0.65

㉔ 32. Modified DA medium composition(per 100 ml) for the growth of strains of K3 and K12, KS10 and KS13

Component	K3 and K12 medium	KS10 and KS13 medium
Mineral I solution <sup>1)</sup>	20ml	20ml
Mineral II solution <sup>2)</sup>	20ml	20ml
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	1.0ml	1.0ml
VFA solution <sup>4)</sup>	6.7ml	6.7ml
Hemin solution <sup>5)</sup>	0.1ml	0.1ml
Resazurine(0.1%)	0.1ml	0.1ml
Acid-hydrolysed casein	0.1g	0.05g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4g	0.4g
Cystein-HCl·H <sub>2</sub> O	0.1g	0.1g
Rumen fluid <sup>6)</sup>	-	10ml
60% sodium lactate	1.2ml	-
Starch	-	0.3g
Distilled water	50ml	42ml

1) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g in 1,000ml distilled water(DW)

2) NaCl 4.5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.25g, MgSO<sub>4</sub> 0.25g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.1g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, COCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01g in 1,000ml DW

3) Pyridoxine HCl 0.2g, Riboflavine 0.2g, Thiamine HCl 0.2g, Nicotinamide 0.2g, Ca-D-pantothenate 0.2g, p-Amino benzoic acid 0.01g, Stock solution(folic acid 0.125g, biotin 0.125g, cobalamine 0.125g in 25ml DW) 1.0ml in 1,000ml DW

4) Acetic acid 17ml, Propionic acid 6ml, n-Valenic acid 1ml, Iso-Valenic acid 1ml, Iso-Butyric acid 1ml, DL- $\alpha$ -methylbutyric acid 1ml

5) Dissolve 50mg hemin in 1ml 1N NaOH and make to 100ml with DW

6) Centrifuged 27,000 x g for 20min after centrifuged at 13,000 x g for 30min and autoclave just before media were prepared

㉔ 33. Effects of supplementation of the mixture of carbohydrate sources in DA medium on the growth (OD value) of lactic acid utilizing bacteria (K3 and K12) and starch utilizing bacteria (KS10 and KS13)

	glucose	lactate(0.5%)+glucose(0.5%)	starch+glucose
K3	0.04	0.74	-
K12	0.05	0.82	-
KS10	0.06	-	0.04
KS13	0.06	-	0.05

#### 7. 분리된 전분분해균의 *in vitro* 실험

분리된 전분분해균인 KS10과 KS13의 두 균주를 이용하여 반추위내에서 lactic acid 생산을 줄일 수 있는지를 조사하기 위해 *in vitro* 실험을 진행하였다. 사용된 기질은 산중독증을 유도할

수 있는 고농후사료급여시를 고려하여 표 34과 같이 반추위에서 분해가 빠른 starch를 주 기질로 사용하였다. 35ml의 serum bottle을 이용하여 Prepared pure compound 0.75g과 반추위액 15ml을 첨가하여 두 균의 배양액 각각 2ml을 첨가하였으며, control은 공배지 2ml을 첨가하여 36시간동안 배양하였다. Buffer는 산중독증 유도(pH 저하)를 위하여 첨가하지 않고 접종제로 반추위액만을 사용하여 진행하였다. 배양기간 동안 pH의 변화는 전체적으로 차이를 보이지 않았으며, 최초 pH 5.8에서 시간에 경과함에 따라 점점 감소하여 36시간에서 pH 4.5까지 감소하는 것으로 나타났다(표 35). Lactic acid의 분석결과 T1과 T2의 시간이 지남에 따라 발효과정에서 lactic acid가 발생하여 증가하는 것을 알 수 있었다. 두 균주 T1과 T2의 lactic acid의 차이는 크게 나타나지 않았다(표 36). TVFA발생량은 처리구간의 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(표 37). Acetate는 체내로 흡수된 후에는 지방산의 합성으로 산화되어 에너지 공급원으로 이용되며, propionate는 체내로 흡수된 후에는 간에서 glucose로 전환되어 에너지원으로 이용된다. 대조구와 T1은 Acetate와 propionate의 차이가 없으며, T2의 경우 다른 대조구와 T1의 비해 높은 Acetate와 propionate의 발생량을 보였다. Acetate와 propionate 발생량이 높다는 것은 반추위내에서 체내로 흡수하는 에너지원이 높아지므로, VFA 결과로는 처리구 T2가 효과가 다른 처리구에 비해 좋은 것으로 판단된다.

표 34. Prepared pure compound

Soluble starch	0.4125 g
Glucose	0.1950 g
Cellulose	0.0450 g
Cellobiose	0.0525 g
Trypticase	0.0450 g
Total	0.75 g

표 35. pH changes on supplementation of culture of starch utilizing bacterial strain in *in vitro* incubation

	blank	control	KS10(T1)	KS13(T2)
0 h	5.83	5.86 ± 0.05	5.83 ± 0.02	5.76 ± 0.02
2 h	5.76	5.66 ± 0.02	5.59 ± 0.03	5.61 ± 0.04
4 h	5.73	5.26 ± 0.05	5.28 ± 0.02	5.27 ± 0.01
6 h	5.70	5.17 ± 0.01	5.17 ± 0.01	5.17 ± 0.02
8 h	5.68	5.08 ± 0.00	5.10 ± 0.02	5.10 ± 0.00
12 h	5.63	4.95 ± 0.02	4.92 ± 0.01	4.93 ± 0.02
24 h	5.65	4.52 ± 0.00	4.47 ± 0.02	4.49 ± 0.00
36 h	5.58	4.53 ± 0.02	4.48 ± 0.06	4.51 ± 0.00

⌘ 36. Lactic acid on supplementation of culture of starch utilizing bacterial strain in *in vitro* incubation

	mM			
	Blank	control	KS10(T1)	KS13(T2)
0 h	0.16	1.93 ± 0.12	2.74 ± 0.15	4.41 ± 0.93
2 h	0.00	0.99 ± 0.02	1.92 ± 0.11	3.26 ± 0.61
4 h	0.00	5.63 ± 0.72	5.87 ± 0.34	6.24 ± 0.49
6 h	0.00	8.15 ± 0.79	6.48 ± 0.35	7.34 ± 0.29
8 h	0.17	10.12 ± 0.36	9.33 ± 0.05	10.33 ± 0.15
12 h	0.00	25.23 ± 0.66	22.51 ± 1.85	26.03 ± 0.72
24 h	0.00	31.42 ± 1.67	38.22 ± 1.67	40.01 ± 1.51
36 h	0.00	50.71 ± 2.64	50.13 ± 2.46	54.21 ± 3.99

⌘ 37. VFA concentrations on supplementation of culture of starch utilizing bacterial strain in *in vitro* incubation

Incubation time (h)	Blank mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	69.58	17.12	1.79	19.01	2.91	3.41	113.82
2	65.65	14.92	1.74	17.77	2.92	3.33	106.33
4	56.25	12.53	1.60	15.81	2.50	2.92	91.61
6	74.74	17.69	1.89	21.36	3.11	3.61	122.41
8	65.39	15.42	1.77	19.35	2.88	3.23	108.04
12	49.16	9.80	1.60	15.53	2.69	2.92	81.70
24	57.77	11.92	1.86	17.92	3.49	3.38	96.35
36	62.34	12.89	2.14	21.37	4.33	3.89	106.97

Incubation time (h)	Control mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	57.21±1.81	13.46±0.53	1.60±0.02	15.40±0.47	2.56±0.02	2.96±0.02	93.19±2.86
2	71.34±21.32	18.94±6.15	1.75±0.28	19.31±5.57	2.96±0.66	3.27±0.73	117.58±34.71
4	63.07±4.03	18.55±1.93	1.58±0.04	21.19±1.30	2.58±0.10	2.95±0.11	109.92±7.50
6	66.90±1.02	20.36±0.31	1.60±0.03	24.54±1.22	2.66±0.06	3.05±0.06	119.11±2.44
8	79.84±15.05	26.14±5.45	1.71±0.19	29.92±5.93	3.01±0.47	3.41±0.52	144.04±27.59
12	48.14±10.54	14.15±4.02	1.38±0.12	21.21±4.35	2.31±0.27	2.66±0.32	89.85±19.62
24	56.67±10.75	17.95±4.41	1.44±0.12	19.69±3.59	2.42±0.26	2.65±0.28	100.81±19.41
36	63.06±1.33	15.96±0.88	1.48±0.02	24.18±0.86	2.54±0.05	2.92±0.05	110.13±3.02

Incubation time (h)	T1 mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	55.54±2.28	12.43±0.99	1.56±0.05	14.23±0.93	2.47±0.10	2.82±0.11	89.05±4.46

2	54.83±2.47	13.38±0.97	1.53±0.04	14.84±0.95	2.46±0.08	2.73±0.11	89.77±4.61
4	58.24±3.64	15.49±1.64	1.53±0.05	19.15±1.50	2.48±0.11	2.81±0.13	99.70±7.04
6	64.54±3.19	18.63±1.36	1.58±0.04	22.96±1.36	2.64±0.06	2.96±0.06	113.31±6.05
8	67.24±2.26	20.38±1.38	1.61±0.03	25.17±1.10	2.74±0.08	3.04±0.09	120.17±4.91
12	46.66±5.59	13.37±2.61	1.38±0.11	19.64±3.43	2.27±0.25	2.55±0.28	85.86±12.27
24	51.84±0.44	14.77±0.42	1.40±0.01	16.74±0.48	2.33±0.03	2.50±0.03	89.58±1.15
36	62.10±4.10	13.80±1.74	1.45±1.74	20.49±2.38	2.36±0.16	2.66±0.20	102.85±8.02

Incubation time (h)	T2 mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	60.20±1.68	14.22±0.74	1.61±0.02	15.55±0.41	2.57±0.03	2.97±0.04	97.13±2.85
2	62.33±9.60	15.80±3.03	1.63±0.12	17.00±2.84	2.73±0.27	3.05±0.33	102.53±16.17
4	62.79±6.48	17.76±2.03	1.58±0.08	20.79±1.96	2.63±0.20	2.97±0.23	108.51±10.98
6	83.78±1.85	26.14±0.60	1.97±0.28	30.07±0.99	3.17±0.01	3.58±0.07	148.72±3.70
8	77.67±5.68	24.44±1.91	1.73±0.07	29.66±2.05	3.03±0.16	3.39±0.18	139.92±10.01
12	41.13±1.14	11.30±0.46	1.30±0.02	17.72±0.46	2.10±0.04	2.40±0.03	75.94±1.89
24	56.74±3.11	18.22±1.09	1.53±0.03	19.79±1.07	2.65±0.08	2.83±0.08	101.76±5.41
36	73.51±5.54	18.94±1.67	1.58±0.03	26.31±1.00	2.70±0.10	3.09±0.10	126.14±8.40

#### 8. 분리된 균의 혼합첨가에 대한 *in vitro* 실험

Lactic acid 이용균과 전분분해균을 혼합하여 반추위에 첨가하였을 때 산중독증 저감효과를 조사하기 위해 lactic acid 이용균 K12와 전분분해균 KS10과 KS13의 배양액을 혼합하여 *in vitro* 실험을 진행하였다. 사용된 기질은 표 31과 같다. 35ml의 serum bottle을 이용하여 Prepared compound 0.75g과 반추위액 15ml을 첨가하였다. 처리구는 control은 lactate공배지와 starch공배지를 각각 1ml씩을 첨가하였으며, T1은 K12균 배양액 2ml, T2은 배양된 K12와 KS10 배양액을 각각 1ml씩 첨가하였고, T3은 배양된 K12와 KS13 배양액을 각각 1ml씩 첨가하여 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 및 36시간 동안 배양하여 진행하였다. Buffer는 산중독증 유도(pH 저하)를 위하여 첨가하지 않고 반추위액만을 사용하여 진행하였다. 배양기간 동안 pH의 변화는 전체적으로 차이를 보이지 않았으나, 처리구에서 시간이 경과할수록 pH가 미약하게 감소폭이 대조구보다 낮은 것으로 나타났다(표 38). Lactic acid의 분석 결과 4시간까지는 lactic acid의 발생량이 증가하다 6시간 감소하였으나, 이후 lactic acid발생량은 점점 증가하는 것으로 나타났다. T1의 초기 lactic acid 함량이 높았던 이유는 배지 내에 lactate가 있기 때문에 높았던 것으로 나타난다(표 39). TVFA발생량 분석결과 대조구에 비하여 처리구에서 전반적으로 발생량이 높았으나, 대조구와 처리구 T1과 T3는 acetate와 propionate의 차이는 없는 것으로 나타났다. T2는 다른 처리구에 비해 acetate와 propionate의 발생량이 높게 나타났다. 대조구나 다른 처리구에 비해 발생량이 많다는 것은 반추위에서 체내로 많은 에너지원으로 이용이 가능할 것으로 판단된다. *In vitro* 결과 lactate 이용균 K12와 전분분해균인 KS10을 혼합하여 사용하는 것이 반추위내에 좋은 효과가 있을 것으로 판단된다(표 40).

⌘ 38. pH changes on supplementation of culture of lactic acid utilising and starch utilizing bacterial strains in *in vitro* incubation

Incubation (h)	Control	T1(K12)	T2(K12+KS10)	T3(K12+KS13)
0	5.57 ± 0.00	5.56 ± 0.02	5.54 ± 0.01	5.53 ± 0.02
2	5.20 ± 0.01	5.24 ± 0.02	5.21 ± 0.01	5.20 ± 0.01
4	5.01 ± 0.01	5.06 ± 0.01	5.03 ± 0.01	5.03 ± 0.01
6	4.88 ± 0.01	4.92 ± 0.01	4.89 ± 0.01	4.89 ± 0.01
8	4.81 ± 0.01	4.83 ± 0.01	4.81 ± 0.01	4.83 ± 0.02
12	4.75 ± 0.01	4.75 ± 0.01	4.76 ± 0.01	4.74 ± 0.01
24	4.73 ± 0.01	4.76 ± 0.02	4.74 ± 0.01	4.76 ± 0.00
36	4.67 ± 0.01	4.70 ± 0.01	4.69 ± 0.01	4.70 ± 0.01

⌘ 39. Lactic acid changes on supplementation of cultrue of lactic acid utilizing and starch utilizing bacterial strains in *in vitro* incubation

Incubation (h)	mM				
	Blank	control	T1(K12)	T2(K12+KS10)	T3(K12+KS13)
0	26.12	10.86 ± 4.91	20.87 ± 0.78	12.46 ± 0.86	11.38 ± 1.30
2	27.80	17.32 ± 0.70	26.32 ± 1.91	19.31 ± 1.61	18.87 ± 0.16
4	20.31	21.86 ± 1.58	30.62 ± 0.52	20.90 ± 1.33	20.20 ± 1.72
6	10.17	13.62 ± 0.32	18.45 ± 0.14	12.53 ± 0.40	12.52 ± 1.22
8	12.58	19.68 ± 2.44	20.99 ± 0.97	13.33 ± 1.14	13.97 ± 0.27
12	13.14	21.97 ± 0.74	26.23 ± 1.13	21.74 ± 0.20	24.04 ± 1.46
24	6.82	27.38 ± 0.98	27.81 ± 1.48	27.03 ± 1.12	22.67 ± 2.32
36	6.29	35.74 ± 0.20	40.43 ± 0.56	34.11 ± 3.14	33.05 ± 2.47

⌘ 40. VFA concentrations on supplementation of cultrue of lactic acid utilizing and starch utilizing bacterial strains in *in vitro* incubation

Incubation (h)	Blank mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	64.63	20.31	1.94	31.72	4.82	5.27	128.68
2	56.63	16.51	1.82	28.21	4.37	4.91	112.45
4	49.67	13.23	1.69	24.54	3.90	4.36	97.39
6	69.34	21.48	2.05	34.47	5.11	5.72	138.17
8	72.41	22.36	2.19	3.73	5.53	6.06	112.28
12	81.55	25.71	2.39	42.38	6.44	6.89	165.37
24	60.71	16.74	2.45	30.60	6.02	6.75	123.26
36	84.98	27.54	3.67	43.90	10.13	10.67	180.89

Incubation (h)	Control mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA

0	54.55±5.67	15.94±2.66	1.75±0.11	26.95±2.82	4.49±0.40	4.71±0.39	111.75±12.05
2 H	72.59±2.53	29.60±1.55	1.97±0.05	36.84±1.71	5.06±0.32	6.14±0.23	152.20±3.25
4 H	53.61±5.04	22.80±3.10	1.49±0.08	26.49±2.95	3.40±0.33	4.67±0.49	112.46±11.96
6	79.73±0.07	45.11±0.10	1.84±0.01	44.89±0.14	4.68±0.03	7.87±0.01	184.12±0.23
8	67.64±1.75	35.47±0.76	1.53±0.02	36.40±1.00	3.50±0.09	6.30±0.15	150.84±1.46
12	80.88±5.77	53.95±5.89	1.65±0.11	49.79±6.19	4.00±0.45	8.59±1.10	198.85±19.49
24	64.92±4.45	36.67±5.27	1.48±0.12	40.49±6.18	3.17±0.46	7.46±1.33	154.19±5.92
36	79.63±1.00	53.91±0.67	1.65±0.02	56.52±2.51	3.95±0.12	10.25±0.36	205.89±11.57
Incubation				T1			
(h)	mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	54.55±3.03	15.94±1.39	1.75±0.05	26.95±2.34	4.49±0.74	4.71±0.21	108.40±6.99
2	69.21±8.56	28.76±4.98	1.95±0.19	36.81±5.48	4.96±0.56	6.55±0.89	148.25±20.62
4	65.30±5.43	28.06±1.07	1.60±0.04	30.96±1.77	3.83±0.13	5.70±0.27	135.46±5.15
6	78.89±1.55	43.72±0.61	1.82±0.03	44.17±0.63	4.60±0.08	8.30±0.12	181.49±2.93
8	76.80±2.47	43.08±2.94	1.68±0.06	43.61±2.73	4.06±0.25	8.03±0.53	177.26±8.99
12	82.23±2.42	55.40±2.29	1.68±0.05	53.03±2.57	4.17±0.19	9.80±0.47	206.31±7.97
24	72.96±0.10	44.55±0.80	1.66±0.03	51.50±1.93	3.92±0.16	10.29±0.51	184.89±3.47
36	78.69±4.13	53.03±4.08	1.67±0.04	58.80±2.72	4.05±0.14	11.44±0.31	207.68±11.35
Incubation				T2			
(h)	mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	54.53±1.79	16.22±0.59	1.77±0.02	26.52±0.51	4.16±0.07	4.64±0.07	107.84±3.00
2	67.71±3.20	26.90±1.90	1.87±0.06	33.85±1.85	4.78±0.16	5.89±0.25	140.99±7.39
4	74.33±5.11	35.81±4.43	1.83±0.12	38.54±4.19	4.69±0.45	6.75±0.71	161.96±15.01
6	80.69±0.72	45.12±1.13	1.86±0.01	45.26±1.11	4.84±0.12	8.20±0.17	185.97±3.12
8	81.41±2.09	45.94±1.82	1.77±0.04	46.33±1.56	4.42±0.16	8.31±0.32	188.19±5.99
12	82.03±0.52	54.27±1.17	1.68±0.02	51.55±1.38	4.17±0.09	9.13±0.28	202.83±3.37
24	75.80±1.04	47.14±0.20	1.73±0.02	54.20±0.50	4.19±0.07	10.26±0.19	193.32±1.86
36	82.32±1.32	56.47±0.49	1.71±0.01	60.16±1.00	4.14±0.03	11.10±0.14	215.90±0.74
Incubation				T3			
(h)	mM						
	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	TVFA
0	65.27±3.98	20.50±1.83	1.97±0.13	31.44±3.17	4.80±0.47	5.33±0.51	129.31±9.72
2	65.18±2.62	25.22±1.61	1.84±0.06	32.70±1.62	4.65±0.20	5.74±0.23	135.33±6.30
4	77.58±1.98	38.36±1.45	1.89±0.04	40.72±1.54	4.90±0.18	7.14±0.26	170.59±5.44
6	78.43±2.39	43.01±2.47	1.81±0.07	43.20±3.14	4.58±0.27	7.81±0.56	178.85±8.86
8	84.29±0.54	49.60±1.41	1.84±0.03	48.32±0.99	4.63±0.11	8.76±0.25	197.44±2.43
12	86.46±1.48	56.57±0.80	1.72±0.01	52.29±0.57	4.27±0.05	9.11±0.07	210.43±2.78
24	77.69±4.45	51.52±5.27	1.81±0.12	58.34±6.18	4.48±0.46	11.09±1.33	204.90±17.79
36	78.18±1.00	52.14±0.67	1.65±0.02	55.97±2.51	3.81±0.12	9.80±0.36	201.55±4.09

### <제 3협동 : 경북대학교 (김은중)>

세부 과제명 : 혐기 미생물 사료첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축

#### 1. *In vitro* 실험(2협동 개발 균주의 젖산균 이용 성능 실험)

##### 1) 서론

아급성 산중독증(Subacute ruminal acidosis; SARA)은 급성과 만성 사이의 pH가 지속적으로 5.5-5.0까지 떨어지는 시기를 말한다. SARA는 흔히 발생하는 질병으로 반추동물에 있어 복잡한 대사성 질병이다. SARA는 소화가 빠른 곡물을 많이 섭취하거나 입자도가 작고 적은 양의 조사료를 섭취하게 되는 경우 1위내 휘발성 지방산(Volatile fatty acid; VFA), 젖산의 축적과 함께 타액생산이 감소하게 된다. 따라서 유기산 축적과 중화능력간의 불균형으로 pH가 감소하게 되면서 발생한다. 이는 반추위 기능과 동물의 생산성에 영향을 줄 수 있다. 실제로 SARA와 제염염, 1위염의 발생과 관련이 있는 것으로 나타났으며, 섬유소 소화율 및 사료 섭취량 감소, 유량 및 유지방이 감소되는 등 우유성분의 변화에 영향을 끼치는 것으로 나타났다(Plaizier et al., 2008). 이 때문에 많은 연구에서 SARA를 예방하고 치료하기 위해 해결방안을 찾고 있다. 그 중 현장에서 많이 이용하는 해결방안 중 하나로 중화제 첨가가 있다. 중화제를 사료에 규칙적으로 사용하게 되면 pH가 떨어지는 것을 방지해 SARA 예방에 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Santra, et al., 2003). 하지만 최근 중화제인 중조 수급이 어려워지고 가격이 상승되어 농가에서의 사용에 많은 어려움을 겪고 있다. 최근 연구에 따르면 DFM (Direct-fed microbials)의 활용 또한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Robinson et al., 1992). 반추위 속 bacteria는 젖산의 축적을 줄임으로써 SARA를 예방할 수 있지만, 아직까지 SARA를 예방하기 위한 DFM 사용에 대한 효과는 매우 미진하며, 특히 국내에서는 보고된 바가 없고, 이용 가능한 제품이 개발되지 않았다. 따라서 본 연구는 제2협동과제에서 분리, 동정한 혐기성 균주, 특히 젖산을 이용하는 미생물(Lactic acid-utilizing bacteria; LUB)로 밝혀진 strain K12을 이용해 반추위 *in vitro* 실험에서 pH, gas, 건물소화율(Dry matter degradability; DMD)을 평가함으로써 SARA를 완화시키는 미생물제제 첨가제를 개발하기 위해 수행되었다.

##### 2) 재료 및 방법

###### (1) 실험 1. *In vitro* 반추위 발효 실험 1

본 실험에 이용된 사료기질로 조사료의 경우 벧짚을 이용하였고, 농후사료의 경우 비육말기의 사료를 이용하였다. 첫 번째 실험에서 조사료와 농후사료의 비율을 1:9 (0.085 g:0.765 g)로 하였으며 농후사료는 전분 함량이 20%와 40%인 사료를 사용하였다. 대조구는 조사료:농후사료(전분함량 20%)=1:9로 구성되었고 미생물을 첨가하지 않았다. 처리구 1은 조사료:농후사료(전분함량 40%)=1:9로 구성되었고 미생물을 첨가하지 않았다. 처리구 2는 조사료:농후사료(전분함량 40%)=1:9비율로 구성되었으며 0.0425 g의 미생물을 첨가하였다. *In vitro* 실험을 위해 농후사료 및 조사료를 screen mill을 이용하여 1 mm로 분쇄한 후 이용하였다. 실험 1에 이용된 농후사료의 배합비율과 일반성분 분석 결과는 표 1과 표 2와 같다.

본 실험에 이용된 반추위액은 경북대학교 부속목장에서 한우의 반추위액을 이용하였으며, stomach tube를 이용하여 채취한 반추위액은 39℃로 유지되는 보온병에 담아 즉시 실험실로 운반하였다. 실험실에서 사료입자를 제거하기 위해 4겹의 muslin을 이용하였고, 여과된 반추위액을 다시 4겹의 muslin을 이용하여 여과하였다. 여과하는 동안 반추위 속 혐기성 미생물을 보호하기 위해 CO<sub>2</sub> 가스를 주입해 혐기적 환경을 유지하였다.

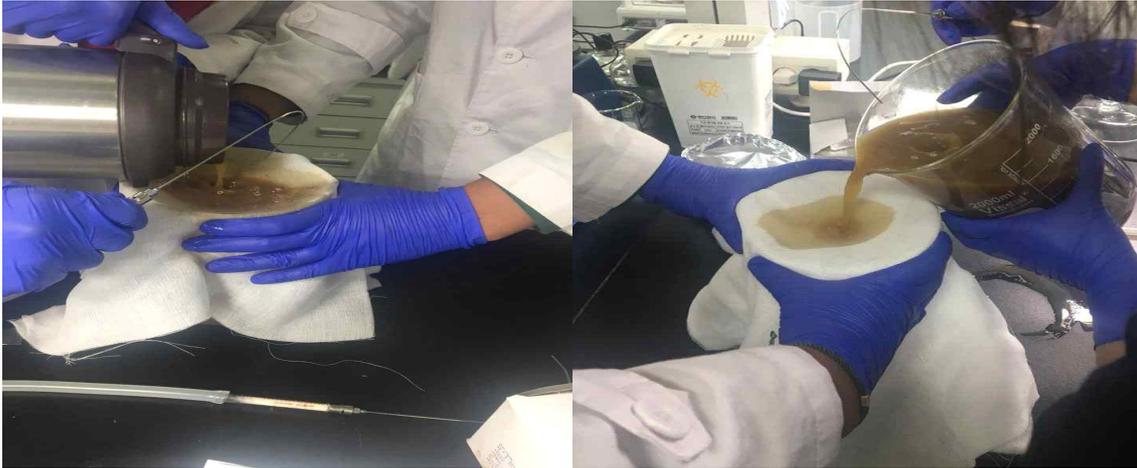


그림 1. Muslin을 이용한 반추위액 여과

한우 반추위액과 McDougall's buffer (표 4)와 혼합하여 *in vitro* 실험에 이용될 반추위 inoculum을 제조하였다. 반추위 inoculum을 기질 사료가 들어있는 serum bottle에 옮겨 담아 rubber stopper와 aluminium cap으로 밀봉하였다. 밀봉된 serum bottle은 39℃에서 각각 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간으로 배양하였다. 실험구는 모두 4반복으로 진행되었으며, blank 3개를 포함하여 총 87개 배양병의 pH, 가스발생량, DMD, 그리고 lactate를 측정하였다.



그림 2. serum bottle 밀봉

⌘ 1. Formulation of the experimental diets

<b>Ingredient</b>	<b>Concentrate</b>	
	<b>Low starch (LS)</b>	<b>High starch (HS)</b>
Corn flour	9.0	47.7
Wheat	4.6	8.0
Soybean hull	8.0	-
Gluten feed	13.6	-
Wheat bran	41.9	21.1
Whole soybean	-	14.2
Kernel meal	20.0	-
Molasses	2.0	2.0
Salt	-	1.0
Limestone	0.9	6.0

⌘ 2. Chemical composition of the experimental concentrates

<b>Nutrient content</b>	<b>Low starch (LS)</b>	<b>High starch (HS)</b>
Crude protein	14.0	14.0
Ether extract	4.0	2.7
Crude ash	5.2	9.5
Ca	0.5	2.3
P	0.7	0.4
Total digestible nutrients	70.0	70.0
Ruminal undegradable protein	4.4	4.9
Crude fiber	12.6	3.6
Acid detergent fiber	19.5	6.2
Neutral detergent fiber	41.9	15.5
Nitrogen free extract	52.4	57.1
Non-fiber carbohydrate	23.0	45.2
Starch	20.0	40.0

실험 1에 사용된 미생물 인공 배지(DA medium)의 성분은 표 3과 같다.

표 3. Chemical composition of Dehority's artificial medium

<b>Dehority's artificial medium</b>	
Per 100 mL:	
Mineral I solution	20 mL
Mineral II solution	20 mL
Vitamin mixture	1.0 mL
VFA solution	6.7 mL
Hemin solution	0.1 mL
Resazurine (0.1%)	0.1 mL
Casein	0.2 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4 g
Casein-HCl. H <sub>2</sub> O	0.1 g
Sodium lactate	2%
Adjust with 2 N NaOH solution to reach pH 6.7	

표 4. Chemical composition of McDougall's buffer

<b>Ingredients</b>	<b>Amount per 2 L</b>
NaHCO <sub>3</sub>	19.6 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	9.24 g
KCl	1.14 g
NaCl	0.94 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.24 g
Distilled water	2000 mL
CaCl 4%	2 mL

가스발생량 측정은 배양시간에 맞춰 배양한 serum bottle의 aluminium cap을 열어준 후 50 mL glass syringe를 이용하여 가스압력에 의해 변화된 눈금을 읽어 측정하였으며 시간별로 발생된 가스량을 합하여 총 가스발생량(mL)을 측정하였다.



그림3. 가스발생량 측정

pH측정의 경우 발효가 종료된 후 즉시 pH meter를 이용하여 측정하였으며, 나일론백(Nylon bag, ANKOM Technology, USA, pore size 50 um)에 여과한 후 여과된 배양액의 pH를 측정하였다.



그림 4. pH 측정

pH 측정 후 남은 배양액을 1 mL씩 채취하여 3개의 eppendorf tube에 담고, 다른 1개의 eppendorf tube에는 VFA측정을 위해 25% metaphosphoric acid 200 uL를 담았다. 여분의 용액은 15 mL conical tube에 담아 -20°C에 냉동보관 하였다. 가스 발생량 측정이 끝난 배양병은 5 cm × 10 cm 나일론백(Nylon bag, ANKOM Technology, USA, pore size 50 um)에 배양액을 전부 옮긴 후 시료를 걸러주고, 깨끗한 물이 나올 때까지 세척하여 105°C 건조기에서 24시간 건조시켜주었다. 건조된 나일론백은 데시케이터에서 30분간 방냉하여 무게를 측정한 뒤 건물분해율(Dry matter digestibility)을 구하였다.

(2) 실험 2. *In vitro* 반추위 발효 실험 2

두 번째 실험은 조사료:농후사료=1:9로 동일하게 설정하고 미생물을 첨가하지 않은 대조구, 5%(사료의 건물 함량 기준)의 미생물을 첨가한 처리구1, 10%의 미생물을 첨가한 처리구2로 구성하여 *in vitro* 발효성상을 조사하였다. 두 번째 실험에 사용된 반추위액은 중앙대학교(제1협동) 부속목장의 캐놀라가 장착된 한우 3두에서 채취하였다. 미생물은 한경대학교(제2협동)에서 DA medium에서 접종되어 39℃에서 48시간 동안 배양된 rumen LUB인 strain K12를 이용하였다. 그리고 SARA 환경을 유도하기 위해서 pH 6.75인 위액과 pH 6.75인 McDougall's buffer (표 4)를 혼합하여 만든 pH 6.42의 반추위 inoculum을 serum bottle에 옮겨 담은 후 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 배양하였다. 두 번의 실험 모두 3개의 실험구로 구성하였으며, 각 실험구당 4반복으로 수행하였다. 본 실험에서 blank 3개를 포함해 총 87개의 배양병을 이용하여 pH, 가스발생량, 그리고 건물소화율을 측정하였다. pH와 가스발생량, 건물소화율 측정방법은 실험 1과 같다.

3) 결과 및 고찰

(1) 실험 1.

표 5. Effect of 5% (v/g feed) rumen lactic acid-utilizing bacteria inoculation on *in vitro* rumen fermentation characteristics

Item (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
pH					
0	7.09	7.10	7.11	0.005	0.110
2	7.01	7.00	7.02	0.006	0.378
4	6.94	6.96	6.94	0.005	0.096
6	6.83 <sup>b</sup>	6.83 <sup>b</sup>	6.81 <sup>a</sup>	0.005	0.049
8	6.80	6.68	6.75	0.027	0.219
12	6.66	6.67	6.67	0.022	0.987
24	6.73 <sup>b</sup>	6.55 <sup>a</sup>	6.55 <sup>a</sup>	0.034	0.007
Dry matter degradability, %					
0	34.31	20.26	29.31	2.745	0.166
2	38.91	28.36	27.02	2.151	0.105
4	33.08	29.28	23.06	1.566	0.120
6	37.45	35.78	36.74	0.557	0.970
8	43.25	45.25	43.70	0.671	0.431
12	49.29	56.65	52.84	1.455	0.061
24	52.64 <sup>a</sup>	68.15 <sup>b</sup>	69.17 <sup>b</sup>	2.956	0.016
Total gas production, mL					
0	-	-	-	-	-
2	24.37 <sup>b</sup>	19.43 <sup>ab</sup>	15.67 <sup>a</sup>	1.449	0.015
4	52.10 <sup>b</sup>	44.37 <sup>a</sup>	42.80 <sup>a</sup>	1.462	0.000
6	71.20	69.67	52.27	7.310	0.567
8	92.50	104.90	88.37	4.354	0.307
12	178.33	131.40	127.33	16.900	0.449
24	125.63	174.23	171.80	12.842	0.240

Lactate concentration, mg/mL

0	222 <sup>b</sup>	82 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	23.265	0.000
2	457 <sup>b</sup>	293 <sup>a</sup>	309 <sup>a</sup>	28.902	0.006
4	580 <sup>b</sup>	292 <sup>a</sup>	302 <sup>a</sup>	53.080	0.009
6	390 <sup>b</sup>	153 <sup>a</sup>	196 <sup>a</sup>	37.336	0.000
8	235	202	173	12.389	0.105
12	198 <sup>b</sup>	104 <sup>a</sup>	116 <sup>a</sup>	18.905	0.057
24	57	-	-	12.628	0.086

CON = concentrate contains 20% of starch, T1 = concentrate contain 40% of starch, T2 = concentrate contain 40% of starch with 5% rumen LUB.

a,b = Means with different superscripts within the row differ significantly ( $P < 0.05$ ), SEM = Standard error of the mean.

그림 5는 각 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간대별 배양액의 pH를 나타낸 그래프이다. pH의 값을 측정한 결과 배양 0시간에서 2시간까지 실험구들 간 pH 값은 유의적으로 차이가 없었으나, 배양 4시간대에서 유의적 차이를 보였으며 6시간대의 배양에서 유의적 차이가 가장 크게 나타남을 볼 수 있었다. 전체적인 pH의 변화는 배양초기 pH 7.0대로 대조구 처리구가 비슷하였으나 배양시간에 따라 감소하는 추세를 보였으며 control에 비해서 처리구 T1, T2의 pH가 낮았다. 이는 처리구의 높은 함량의 starch의 분해가 단시간 내에 빨리 이루어진 것으로 판단된다(Bae et al. 2002).

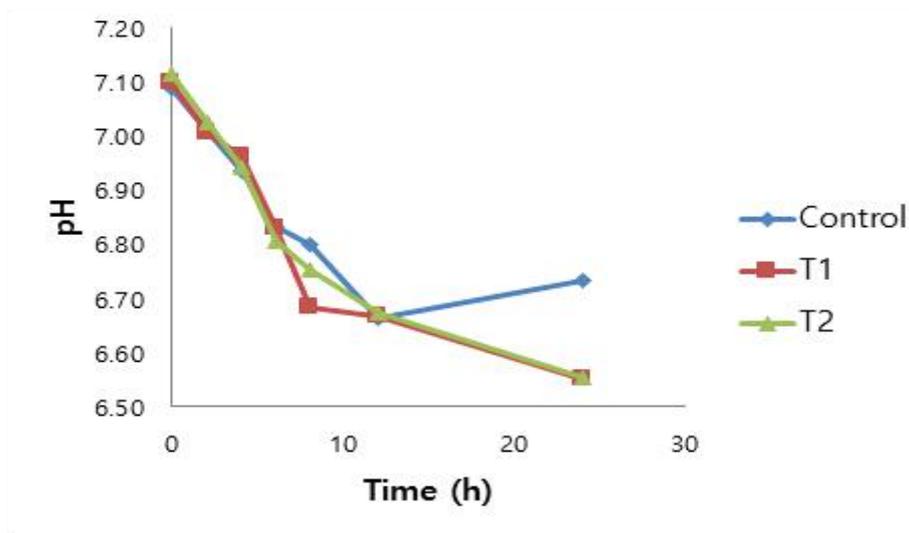


그림 5. 배양 시간에 따른 pH 변화

DMD의 측정은 각 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간대별로 이루어졌다(그림 6). 대조구와 처리구 간에 유의적 차이는 크지 않았으며 마지막 배양 12시간 이후 유의적인 차이를 보였다. 전체적인 DMD함량의 변화는 큰 차이는 없었으나 배양초기 처리구 T1, T2가 Control에 비해 낮은 값을 보인 반면 배양 8시간 이후 Control보다 증가하게 되었다. 반추위내 소화율은 사료입자의 표면적이 넓어짐으로써 소화율이 증가되기 때문(Son et al. 2003)이라고 하였다. 따라서 처리구에 첨가되어 있는 높은 전분함량의 빠른 용해와 분해가 가져온 결과(Son et al. 2003)로 사료된다.

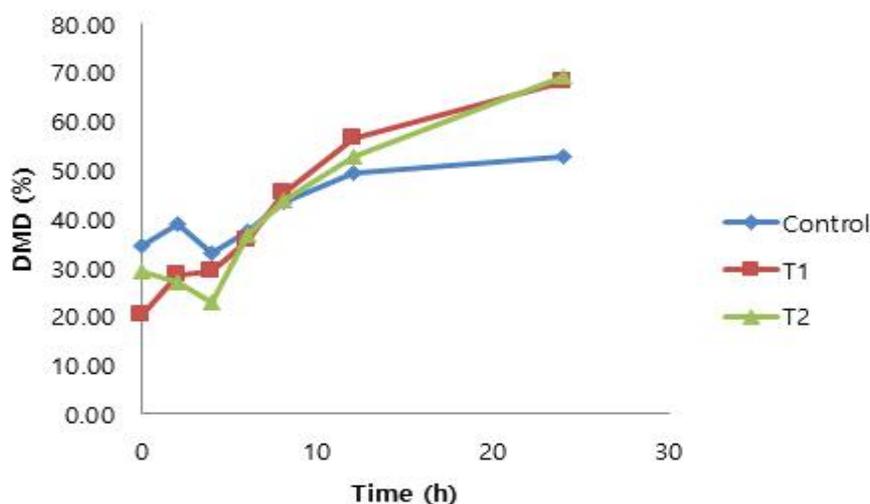


그림 6. 배양시간에 따른 건물 소화율

Total gas production 측정은 각 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간대별로 이루어졌다(그림 7). 6시간까지는 가스발생량이 유의적으로 차이가 나지 않았지만 6시간에 미생물을 첨가한 T2의 가스발생량이 가장 낮은 것으로 나타났으며 12시간 이후부터 Control에서 가스발생량이 감소하는 반면 T1과 T2에서는 가스발생량이 증가하는 경향을 보였다.

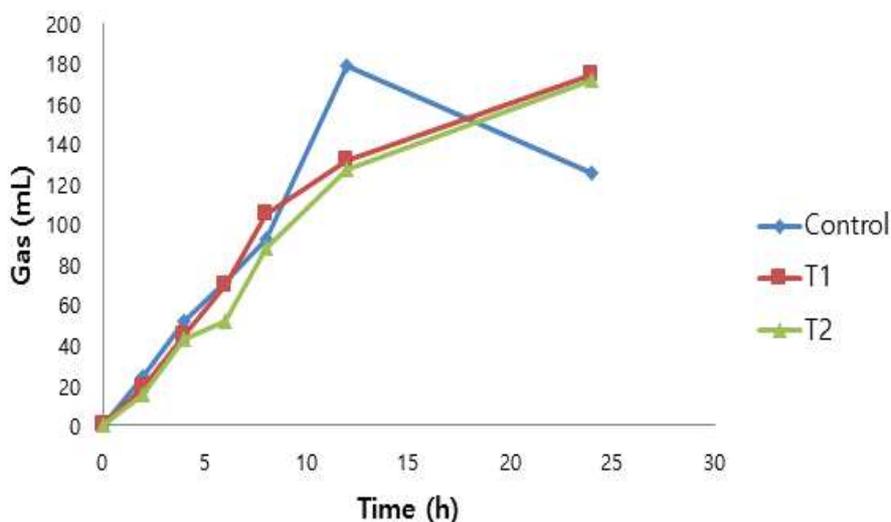


그림 7. 배양 시간에 따른 가스발생량

Lactate 함량 측정은 각 시간대별로 측정이 이루어졌다. 초기 배양 시 Control은 높은 값을 나타내는 반면 처리구는 비교적 낮은 농도로 검출되었다. 전체적으로 lactate 함량의 변화는 배양 시간에 따라 감소하는 경향을 보였으며 배양 24시간이 되는 지점에서 처리구 모두 0의 값을 나타내었다. 이는 처리구에 첨가된 미생물 K12 때문에 미생물 균총에 변화가 일어났고 그 결과 lactate의 감소가 일어났다고 사료된다.

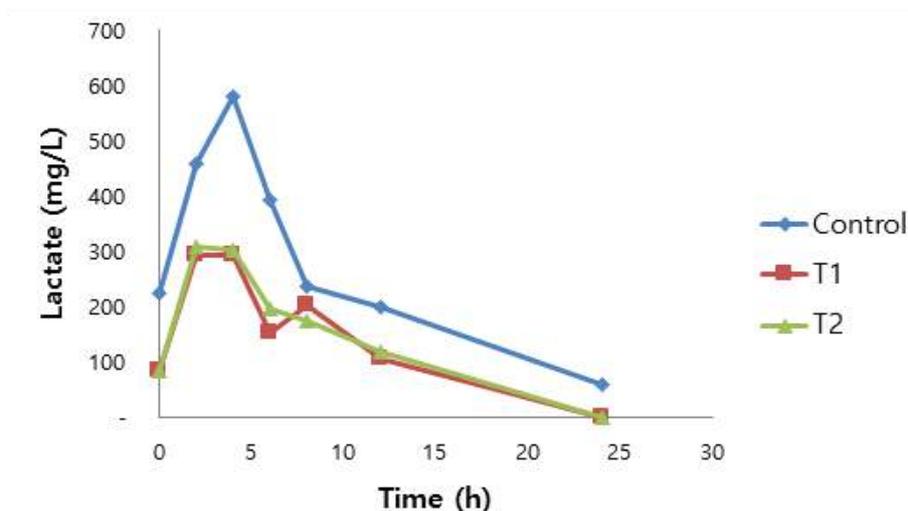


그림 8. 배양 시간에 따른 lactate 변화

(2) 실험 2

시료는 각 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 각 시간대별 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였다(표 6). pH의 값을 측정한 결과 배양 0시간에서 24시간까지 처리구에서 pH 값은 통계적으로 차이가 없었으나 배양 24시간대에서 수치적으로 T1, T2가 Control보다 높게 나왔다. DMD의 경우 배양 8시간 때 T1, T2가 Control보다 소화율이 유의적으로 낮게 나왔다. 이는 미생물의 효과 때문에 발효가 천천히 일어나는 것으로 사료된다.

표 6. Effect of 5% and 10% (v/g feed) rumen lactic acid-utilizing bacteria inoculation on *in vitro* rumen fermentation characteristics

Item (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
pH					
0	6.68	6.68	6.70	0.010	0.580
2	6.71	6.77	6.69	0.023	0.382
4	6.67	6.61	6.63	0.015	0.302
6	6.65	6.60	6.65	0.013	0.267

8	6.60	6.63	6.60	0.013	0.679
12	6.54	6.56	6.54	0.010	0.656
24	6.32	6.33	6.36	0.008	0.107
<hr/>					
Dry matter degradability, %					
0	31.35	29.36	28.52	1.016	0.571
2	31.36	30.55	29.20	1.626	0.891
4	29.31	26.89	28.33	1.130	0.738
6	30.27	28.43	31.33	0.808	0.381
8	36.37 <sup>b</sup>	34.30 <sup>ab</sup>	29.85 <sup>a</sup>	1.193	0.043
12	43.19	42.84	40.74	1.041	0.647
24	57.72	57.65	57.16	1.108	0.982
<hr/>					
Total gas production, mL					
0	-	-	-	-	-
2	17.00	15.00	16.17	0.377	0.068
4	35.00	32.17	33.50	0.502	0.059
6	58.17	57.33	58.17	0.477	0.767
8	87.67	85.33	83.17	0.853	0.074
12	112.50	111.67	113.00	0.985	0.888
24	170.67	168.17	169.39	0.893	0.585

CÓN = concentrate contains 20% of starch, T1 = concentrate contain 40% of starch, T2 = concentrate contain 40% of starch with 5% rumen LUB.

a,b = Means with different superscripts within the row differ significantly (P<0.05), SEM = Standard error of the mean.

## 2. 산중독증세가 의심되는 Holstein 비육우의 반추위 단면 관찰

### 1) 서론

산중독증은 반추동물이 쉽게 발효되는 탄수화물을 과다하게 섭취했을 경우에 발생하는 대사 장애로 우리나라와 같이 양질의 조사료가 부족하고 고에너지의 농후사료를 사용하여 낙농이나 비육을 할 시 쉽게 발생한다. 산중독증이 발생하였을 시 임상적 증세로는 식욕부진, 설사, 갈증, 반추위 운동감소와 같은 경증을 띄는 것과 중증으로 보행실조 또는 기립불능, 식욕전폐, 신맛이 나는 수양성 설사, 호흡수증가와 탈수, 반추위 운동정지, 청진시 부글부글 거리는 소리, 급성제염염 및 무뇨증과 같은 증세를 보인다(Lee, 1990).

본 실험은 경기 안성시 소재의 비육우 농장에서 사육 중인 Holstein 비육우 중 식욕부진의 증상과 다리가 붓고 기립하기를 힘들어하여 산중독증이 의심되었기에 반추위의 모습을 관찰하기 위해 실시하였다. 실험에 사용될 비육우는 충북 음성에 위치한 도축장에서 도축되었으며 농장 및 도축장의 협조를 구하여 반추위가 부패되지 않도록 얼음과 아이스박스를 이용하여 실험실로 옮긴 후 즉시 실시하였다. 반추위를 펼친 후 cranial, ventral, caudal, dorsal 부분의 반추위 조직을 채취하여 분석에 사용하였다.



그림 9. 산 중독증이 의심되는 Holstein 거세비육우

### 2) 재료 및 방법

#### (1) Hematoxyline eosin으로 염색한 조직의 단면 관찰

Hematoxyline eosin으로 염색한 조직의 단면을 관찰하기 위해 다음과 같은 전처리가 실시되었다. 먼저 펼친 반추위의 절개 부위를, 4%의 Paraformaldehyde가 담긴 50 mL의 conical tube에 넣은 후 25°C의 shaking incubator에 24시간 동안 샘플을 보관하였다. 이후 조직 분석을 위해 경북대학교병원 생명의학연구소로 시료를 보낸 후 분석을 실시하였다.



그림 10. 산 중독증이 의심되는 Holstein 비육우의 반추위와 그 단면

표 7. 4% Paraformaldehyde composition

4 % Paraformaldehyde contents	
Paraformaldehyde	20 g
1XPBS	500 mL
1.25 M NaOH	250 uL



그림 11. 반추위 조직을 관찰하기 위한 시료채취

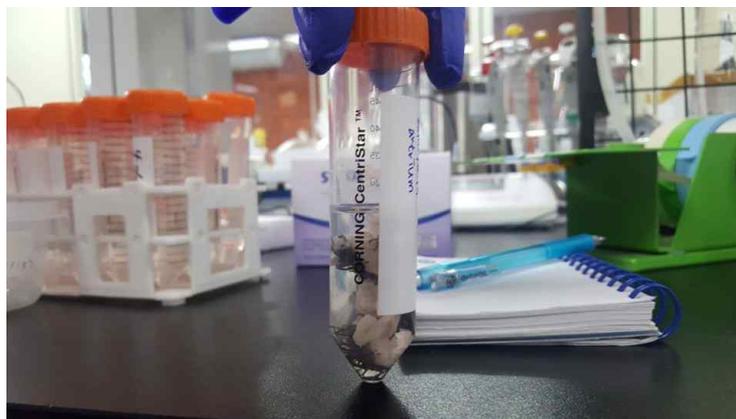


그림 12. 전처리를 완료한 반추위 조직 시료

(2) 동결조직절편기(CryoMicrotome)를 이용한 조직관찰

동결조직절편기를 이용하여 조직관찰을 위하여 다음과 같은 절차가 시행되었다(그림 13). 우선 절개한 조직을 저온상태로 유지하기 위해 액화질소를 이용하여 급속동결을 시킨 후 동결조직절편기를 이용하여 조직을 8 um로 cross section을 하고 조직의 슬라이드를 제작하였다. 이후 광학현미경을 이용하여 조직의 모습을 관찰하였다.



(A)



(B)

그림 13. 반추위 조직 유두 상 부분 시료 채취와 Cryo micro tube에 보관된 시료(A) 액화질소를 이용한 조직의 급속 동결과 동결조직절편기를 통한 슬라이드 제작 및 광학현미경을 통한 조직관찰(B)

3) 결과 및 고찰

실험결과 해부한 반추위의 모습의 색깔이나, 유두상 돌기의 형태 등을 조합하여 보면 정상적인 반추위 모습과 크게 다른 점은 나타나지 않았다(그림 14). 또 동결조직절편기를 이용하여 만든 조직 시료들의 모습을 보았을 때 정상적인 소의 반추위 모습과 크게 다른 점은 나타나지 않았다. 따라서 더 자세히 알아보기 위해 반추위 조직을 Hematoxyline eosin으로 염색을 하였으며, 염색된 조직은 그림 15와 같다.

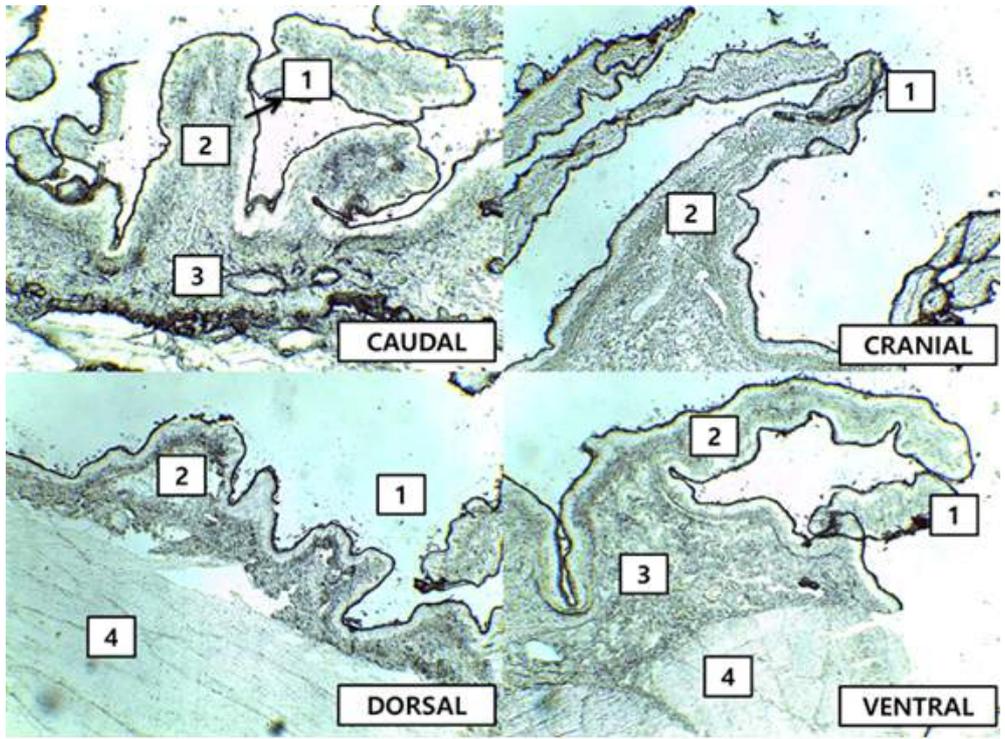


그림 14. SARA가 의심되는 Holstein 비육우의 반추위 조직(염색 전)을 광학현미경으로 관찰한 모습; 1 - 케라틴층화 편평상피, 2 - 프로피리아층, 3 - 점막하조직층, 4 - 내근육층

그림 15는 Hematoxyline eosin으로 염색을 한 조직시료의 모습이다. Hematoxyline eosin으로 염색된 조직을 보면 stratum corneum과 stratum granulosum가 두껍고, strata 사이사이에 공간이 있는 것을 볼 수 있다. 이러한 조직의 상태는 100%의 조사료에서 79% 농후사료로 사료를 교체하여 급여한 젖소의 조직과 같았다(Steele, et al., 2009). 또한 (Nocek, 1997)에 따르면 이러한 조직을 가지게 될 때 영양분의 흡수과정이 지연되고 미생물과 대사물질들이 portal vein쪽으로 확산이 되기가 쉬운데 이러한 확산은 동물 체내에 문제를 일으킬 수 있다고 하였다.

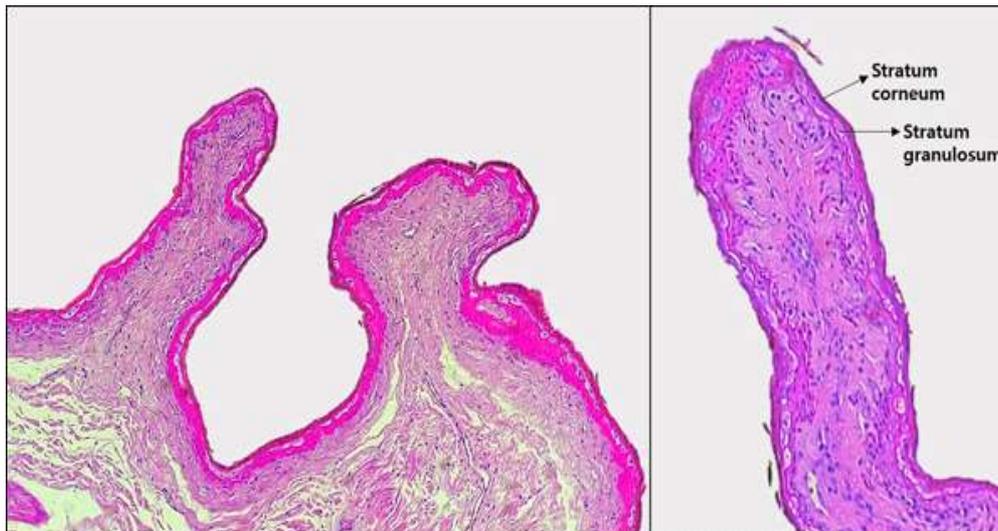


그림 15. The rumen papillae taken by 40x and 100x magnification

#### 4. SARA 예방 및 치료를 위해 이용되는 첨가제 비교

##### 1) 서론

아급성 산중독증(Sub-acute ruminal acidosis; SARA)은 반추동물에게 자주 발생되지만 복잡한 소화장애를 말하며 반추위의 기능과 반추동물의 생산성에 영향을 미친다(Nagaraja and Titgemeyer., 2007; Plaizier et al., 2008). 이 때문에 SARA의 예방 및 치료를 위해 많은 방법들이 고안되었다. 현장에서 영양학적 접근방법으로서 buffer, alkalizer, 그리고 direct-fed microorganism (DFM)과 같은 사료첨가제를 반추동물에게 급여하는 방법들이 알려져 있다. Buffer는 SARA가 진행되는 동안 반추위의 buffering capacity를 증가시켜 pH가 증가되는 효과를 나타낸다(Santra et al., 2003, Calsamiglia et al., 2012). Alkalizer는 반추위 내에서 생성된 산을 중화시켜 반추위 내 pH를 안정하게 유지한다(Shaver et al., 1988). Direct-fed microbes (DFM)는 DFM 자체가 반추위 발효생성물을 이용하거나 또는 발효 생성물을 이용할 수 있는 미생물을 자극하여 반추위 내 상태를 조정한다(Nocek et al., 2002). 최근 SARA를 치료하기 위한 잠재적인 대안으로써 고려되는 DFM중의 하나는 젖산을 이용하는 박테리아(lactic acid utilizing bacteria; LUB)가 있으며 특히 반추위 내에서 분리, 동정된 미생물을 이용할 경우 화학적 방법을 통한 산중독증을 예방하거나 또는 저감하는 방법보다 동물친화적이며 환경친화적인 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다. LUB는 SARA가 진행되는 동안 반추위 내 유기산 축적을 감소시켜 반추위 상태를 향상시킬 수 있다(Counotte and Prins., 1982; Rodríguez., 2003). 따라서 본 실험은 buffer ( $\text{NaHCO}_3$ , sea mineral), alkalizer (MgO), DFM (yeast)와 비교하여 반추위 LUB가 *in vitro*상에서 SARA에 미치는 효과를 조사하기 위해 수행하였다.

##### 2) 재료 및 방법

###### (1) *In vitro* 실험 설계

본 실험에서는 한경대학교(제1협동)에서 제공받은 LUB를 사용하였으며, 사용된 LUB의 농도는  $10^8$  CFU/g이었다. 또한 시중에 판매되고 있는 sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), magnesium oxide (MgO), yeast, 그리고 sea mineral을 사용하여 효과를 비교하였다. 125 mL serum bottle에 티모시 0.05 g과 농후사료 0.45 g (Timothy:농후사료=1:9, 총 0.5 g)을 넣어주었다. 실험구로는 본 사료만 들어 있는 대조구와 급여사료 기준 1%의  $\text{NaHCO}_3$  (0.005 g)가 첨가된 처리구1, 0.8%의 MgO (0.004 g)이 첨가된 처리구2, 0.4%의 yeast (0.002 g)가 첨가된 처리구3, 0.5%의 sea mineral (0.0025 g)이 첨가된 처리구4, 0.1 g의 LUB가 첨가된 처리구5까지 총 6개의 실험구로 이루어졌다. Timothy와 농후사료의 영양성분은 표 8과 같다.

표 8. Chemical composition of feed used during this study

Item	Concentrate	Timothy
Dry matter, %	86.49	92.98
Organic matter, % of DM	95.24	96.93
Crude protein, % of DM	13.51	9.76
Neutral detergent fiber, % of DM	24.97	71.14
Acid detergent fiber, % of DM	10.07	42.59
Ether extract, % of DM	3.52	0.93

(2) *In vitro* 배양

반추위액은 대구대학교의 부속목장에서 아침사료 급여 3시간 후 캐놀라가 장착된 한우 1두와 수컷 Holstein 1두에서 10 L의 채취하였으며 CO<sub>2</sub>를 주입해가면서 4겹의 muslin으로 2번 걸러내어 buffer의 첨가 없이 위액으로만 본 실험에 이용하였다. 그런 다음 위액 50 mL를 각 serum bottle에 분주한 후 rubber stopper와 aluminium cap으로 동봉하여 39°C에서 0, 3, 6, 12, 24시간 배양하였다. 실험은 3반복으로 진행되었으며 분석항목으로 pH, 가스발생량, 건물소화율, ammonia (NH<sub>3</sub>)-N, 휘발성 지방산, lipopolysaccharide (LPS) 농도를 분석하였다.

(3) 조사항목 및 분석방법

① 가스발생량, pH, 건물소화율 분석

가스발생량 측정은 배양이 끝난 serum bottle을 꺼내어 aluminium cap을 연 후 50 mL의 유리 syringe를 꽂아 발생된 가스의 압력에 의해 변화되는 주사기의 이동 부피를 눈금으로 읽어 가스발생량을 측정하였다.

pH측정의 경우 발효가 끝난 serum bottle을 연 후 nylon bag (ANKOM Technology, USA, pore size 50 um)에 걸러내어 나온 배양액을 pH meter (Ohaus, USA)로 측정하였다.

② Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 분석

Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 분석은 Chaney and Marbach (1962) 방법으로 분석하였다. Nylon bag에서 걸러 나온 배양액을 원심분리기(Labogene, Korea)로 10분간 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 유리 실험관에 상층액 20 uL와 phenol color reagent (phenol 50 g, sodium nitroferricyanide dehydrate 0.25 g/L)와 alkali-hypochlorite reagent (NaOH 25 g, sodium hypochlorite 16.8 mL/L)를 각 1 mL씩 넣어 혼합한 후 30분간 정치하였다. 정치가 끝난 후 배양액을 일회용 큐벳(Ratiolab cuvette, Germany)에 담아 분광광도계(Optizen pop,

Korea)로 측정하여 나온 값을 이용해 분석하였다.

### ③ 휘발성 지방산 분석

휘발성 지방산 분석은 Erwin et al (1961) 방법으로 분석하였다. 배양액 1 mL에 metaphosphoric acid 200 uL를 넣어 30분간 정치한 후 원심분리기를 이용하여 10분간 10,000 rpm으로 원심분리 하였다. 원심분리한 배양액을 1 mL syringe에 담은 후 0.45 uL syringe filter (Rephile, China)를 이용해 여과하여 gas chromatography (GC) vial (Bruker Inc, Germany)에 담아 분석하였다. 이용된 컬럼은 BR-Wax fame (BR87503, Germany)을 이용하였으며 표준용액으로 volatile fatty acid standard solution (Sigma-aldrich, USA)를 사용하였다. Injector와 detector (FID, Flame Ionization Detector)의 온도는 250°C, oven의 온도는 100°C로 설정해주었으며, 질소, 수소, 고순도 에어의 유속은 각각 29 mL/min, 30 mL/min, 300 mL/min으로 설정하여 분석하였다.

### ④ Lipopolysaccharide (LPS) 분석

LPS 분석을 위해 The Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 이용하였다. 96 well microplate를 Heating plate를 이용해 37°C에서 가열한 후 원심분리한 배양액 50 uL와 amebocyte lysate reagent 50 uL를 넣어 37°C에서 14분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 예열한 chromogenic substrate solution 100 uL를 넣어 다시 37°C에서 6분간 배양하였다. 그런 다음 25% acetic acid 50 uL를 각각의 well에 넣어 반응을 멈춘 후 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였으며, 이때 endotoxin standard의 선형그래프를 이용하여 LPS 농도를 분석하였다.

3) 결과 및 고찰

본 실험의 pH의 범위는 Beauchemin, et al. (2001) and Krause and Oetzel (2005)가 다량의 농후사료 급여로 SARA를 유도하기 위해 수행한 연구의 pH와 비교하였다. 반추위 inoculum pH는 첫 배양 시 6.18에서 시작하여 배양 24시간대까지 계속해서 감소하였다. 모든 실험구의 pH는 배양3시간대 이후 pH 6이하로 떨어졌으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 하지만 배양 6시간대에 대조구와 비교하여 LUB를 포함한 처리구들에서 높은 pH를 보였으며( $P<0.05$ ), 이 상태는 배양 24시간대까지 같은 양상을 보였다(표 9).

표 9. Effect of buffer, alkalizer and direct fed microbials on rumen pH during *in vitro* rumen fermentation

Time (h)	Treatment						SEM	P-value
	CON	T1	T2	T3	T4	T5		
3	5.82	5.84	5.86	5.84	5.81	5.81	0.010	0.621
6	5.68 <sup>a</sup>	5.69 <sup>a</sup>	5.74 <sup>b</sup>	5.70 <sup>a</sup>	5.74 <sup>b</sup>	5.73 <sup>b</sup>	0.006	0.000
12	5.52 <sup>a</sup>	5.53 <sup>a</sup>	5.59 <sup>b</sup>	5.54 <sup>a</sup>	5.54 <sup>a</sup>	5.52 <sup>a</sup>	0.008	0.057
24	5.47 <sup>a</sup>	5.58 <sup>b</sup>	5.56 <sup>b</sup>	5.51 <sup>ab</sup>	5.56 <sup>b</sup>	5.50 <sup>ab</sup>	0.013	0.058

CON = control (no additive), T1 = 1% NaHCO<sub>3</sub> addition, T2 = 0.8% MgO addition, T3 = 0.4% yeast, T4 = 0.5% sea mineral addition, T5 = 0.1 g of freeze drying microbes from Celltech. SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b,c</sup> = Means with different superscripts within the row differ significantly ( $P<0.05$ ).

가스발생량의 경우 초기 발효 시에 LUB를 첨가한 처리구(T5)에서 다른 처리구들과 비교하여 가장 높은 가스발생량을 보여주었으나(P<0.05), 발효에 따른 pH와 배양 6시간에서 12시간대까지의 가스발생량은 대조구보다 낮지 않았다. 가스발생량은 소화율과 반추위 발효를 평가하는 지표로 이용된다(Menke, et al., 1979). 따라서 이 결과들을 바탕으로 다량의 농후사료에 LUB를 첨가한 처리구(T5)에서 발효 속도가 천천히 일어나는 것을 확인할 수 있었으며 이는 반추위 inoculum의 pH에서 보여준다(표 10).

표 10. Effect of buffer, alkalizer and direct fed microbials on gas production (mL) during *in vitro* rumen fermentation

Time (h)	Treatment						SEM	P-value
	CON	T1	T2	T3	T4	T5		
3	24.7 <sup>a</sup>	27.2 <sup>ab</sup>	25.3 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>	25.3 <sup>a</sup>	30.3 <sup>b</sup>	0.67	0.047
6	49.8 <sup>d</sup>	50.2 <sup>d</sup>	45.5 <sup>cd</sup>	42.0 <sup>bc</sup>	34.7 <sup>a</sup>	38.8 <sup>ab</sup>	1.46	0.000
12	80.2 <sup>c</sup>	78.0 <sup>bc</sup>	75.7 <sup>abc</sup>	74.8 <sup>ab</sup>	71.8 <sup>a</sup>	79.0 <sup>bc</sup>	0.84	0.013
24	133.8 <sup>b</sup>	90.7 <sup>a</sup>	100.3 <sup>ab</sup>	108.0 <sup>ab</sup>	122.8 <sup>ab</sup>	128.2 <sup>b</sup>	5.35	0.106

CON = control (no additive), T1 = 1% NaHCO<sub>3</sub> addition, T2 = 0.8% MgO addition, T3 = 0.4% yeast, T4 = 0.5% sea mineral addition, T5 = 0.1 g of freeze drying microbes from Celltech. SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b,c,d</sup> = Means with different superscripts within the row differ significantly (P<0.05).

초기 발효가 시작되는 배양 3시간대에서 12시간대까지 NH<sub>3</sub>-N 농도(mg/100 mL)의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 LUB를 첨가했을 때 배양 12시간대까지 유의적인 차이가 날만큼 효과를 주지 않는 것을 의미한다. 이러한 결과는 SARA에 젖산을 생성하는 bacteria와 젖산을 이용하는 bacteria가 포함된 probiotic을 이용한 Goto, et al. (2016)의 결과와 유사한 결과를 나타냈다. 하지만 배양 24시간 이후 다른 처리구들과 비교하여 LUB를 첨가한 처리구(T5)에서 가장 높은 NH<sub>3</sub>-N 농도를 보였다(P<0.05). NH<sub>3</sub>-N는 반추위에서 단백질대사를 나타내는 지표로 미생물체 단백질합성에 중요한 질소공급원이다(Pilgrim, et al., 1970). 따라서 LUB 처리 배양 24시간이후 NH<sub>3</sub>-N의 농도의 증가는 반추위 발효상태가 향상된 것으로 해석될 수 있다(표 11).

표 11. Effect of buffer, alkalizer and direct fed microbials on NH<sub>3</sub>-N concentration (mg/100 mL) during *in vitro* rumen fermentation

Time (h)	Treatment						SEM	P-value
	CON	T1	T2	T3	T4	T5		
3	28.95	27.83	30.95	29.02	33.69	24.68	1.680	0.804
6	48.93	54.22	54.60	49.75	53.54	54.51	1.213	0.655
12	46.26	45.87	45.77	47.13	47.81	49.07	1.143	0.973
24	57.38 <sup>a</sup>	49.37 <sup>a</sup>	54.51 <sup>a</sup>	55.48 <sup>a</sup>	59.55 <sup>ab</sup>	68.29 <sup>b</sup>	1.821	0.030

CON = control (no additive), T1 = 1% NaHCO<sub>3</sub> addition, T2 = 0.8% MgO addition, T3 = 0.4% yeast, T4 = 0.5% sea mineral addition, T5 = 0.1 g of freeze drying microbes from Celltech.

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b,c,d</sup> = Means with different superscripts within the row differ significantly (P<0.05).

배양시간동안 각 실험구들의 VFA 조성은 표 12와 같다. 배양시간동안 전체 VFA 생성률은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 *in vitro*상에서 SARA 치료를 위해 *Megasphaera elsdenii*를 이용한 Umucaliar et al. (2014)의 결과와 유사하였다. 배양 6시간대에 LUB를 첨가한 처리구의 propionate의 농도는 대조구보다 높았고 AP ratio는 대조구보다 낮았다(P<0.05). 이러한 결과는 LUB 첨가가 영양소 발효 시에 발효생성물로 젖산을 생성하는 것 보다 propionate 생성하도록 하는 능력이 있는 것으로 사료된다(Aikman, et al., 2011).

표 12. Effect of buffer, alkalizer and direct fed microbials on volatile fatty acid concentration during *in vitro* rumen fermentation

Time (h)	Treatment						SEM	P-value
	CON	T1	T2	T3	T4	T5		
Total VFA (mmol)								
3	206.9	179.7	216.6	253.0	231.6	238.5	9.23	0.256
6	198.0	214.0	197.8	200.8	190.9	211.9	4.03	0.594
12	255.1	244.3	241.4	203.4	230.9	261.0	6.54	0.117
24	315.8	326.4	338.7	337.4	336.5	368.4	6.71	0.356
Acetate (% of total VFA)								
3	58.4	58.9	59.0	58.3	58.9	58.5	0.14	0.599
6	59.2	59.0	59.3	59.3	59.1	58.4	0.11	0.135
12	60.2	61.3	61.5	61.3	60.3	59.8	0.30	0.529
24	57.9 <sup>b</sup>	57.9 <sup>b</sup>	58.4 <sup>b</sup>	57.9 <sup>b</sup>	58.3 <sup>b</sup>	56.5 <sup>a</sup>	0.18	0.002
Propionate (% of total VFA)								
3	21.5	21.2	21.2	21.5	21.2	21.3	0.06	0.277
6	21.4 <sup>ab</sup>	21.5 <sup>ab</sup>	21.2 <sup>a</sup>	21.4 <sup>ab</sup>	21.6 <sup>b</sup>	22.0 <sup>b</sup>	0.07	0.001
12	20.1	20.0	20.0	20.1	20.3	20.3	0.10	0.898
24	20.5	21.9	20.6	20.6	20.1	20.2	0.24	0.312
AP ratio								
3	2.71	2.78	2.78	2.72	2.77	2.75	0.013	0.389

6	2.77 <sup>bc</sup>	2.75 <sup>bc</sup>	2.80 <sup>c</sup>	2.77 <sup>bc</sup>	2.73 <sup>b</sup>	2.65 <sup>a</sup>	0.013	0.002
12	3.01	3.07	3.08	3.05	2.97	2.95	0.027	0.724
24	2.83	2.66	2.83	2.82	2.91	2.80	0.034	0.451

Butyrate (% of total VFA)

3	15.9	16.0	15.7	16.1	15.8	16.1	0.08	0.658
6	15.1	15.4	15.3	15.2	15.1	15.2	0.06	0.819
12	15.6	14.8	14.7	14.7	15.3	15.6	0.18	0.496
24	17.2 <sup>ab</sup>	16.0 <sup>a</sup>	16.4 <sup>a</sup>	17.0 <sup>a</sup>	17.1 <sup>a</sup>	18.5 <sup>b</sup>	0.24	0.021

Valerate (% of total VFA)

3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	0.01	0.603
6	1.5	1.4	1.4	1.4	1.3	1.5	0.02	0.091
12	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.5	0.03	0.252
24	1.5	1.3	1.4	1.4	1.4	1.	0.02	0.007

CON = control (no additive), T1 = 1% NaHCO<sub>3</sub> addition, T2 = 0.8% MgO addition, T3 = 0.4% yeast, T4 = 0.5% sea mineral addition, T5 = 0.1 g of freeze drying microbes from Celltech.

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b,c,d</sup> = Means with different superscripts within the row differ significantly (P<0.05).

통계적으로 digestible organic matter (DOM)는 실험구들간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 사료 첨가제의 첨가가 소화율에 유의적인 영향을 주지 않았다는 것을 의미한다. 하지만 LUB를 첨가한 처리구(T5)에서 수치적으로 다른 처리구들보다 가장 높은 DOM을 보여주었다.

표 13. Effect of buffer, alkalizer and direct fed microbials on digestible organic matters (g/kg DM) during *in vitro* rumen fermentation

Time (h)	Treatment					SEM	P-value
	T1	T2	T3	T4	T5		
3	216.68	219.88	219.35	222.16	218.01	1.637	0.904
6	237.38	246.72	252.11	253.00	257.50	3.488	0.467
12	281.65	292.03	300.26	316.20	321.92	5.892	0.153
24	320.38	340.17	355.87	386.25	397.17	11.235	0.153

T1 = 1% NaHCO<sub>3</sub> addition, T2 = 0.8% MgO addition, T3 = 0.4% yeast, T4 = 0.5% sea mineral addition, T5 = 0.1 g of freeze drying microbes from Celltech.

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b,c</sup> = Means with different superscripts within the row differ significantly (P<0.05).

\*According Menke et al. (1979) formulation

*In vitro* 반추위 내 LPS농도는 표14와 같다. SARA는 반추위내에서 LPS농도를 상당히 증가시킬 수 있으며(Gozho, et al., 2005), 반추위 내 상태가 산성일 동안 높은 LPS농도는 반추위벽의 투과성을 변형시켜 감염 위험을 증가시킬 수 있다(Kleen, et al., 2003). 본 실험에서 LUB를 첨가했을 때 LPS의 농도는 초기배양 때 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 배양 12시간대까지 증가되었다가 24시간 때 다시 농도가 떨어지지만 배양 24시간대에 LPS농도는 대조구보다 유의적으로 더 낮았다(P<0.05).

표 14. Effect of buffer, alkalizer and direct fed microbials on lipopolysaccharide concentration (EU/mL) during *in vitro* rumen fermentation

Time (h)	Treatment						SEM	P-value
	CON	T1	T2	T3	T4	T5		
3	113.2 <sup>b</sup>	99.2 <sup>a</sup>	105.0 <sup>a</sup>	144.1 <sup>c</sup>	115.8 <sup>b</sup>	112.9 <sup>b</sup>	3.71	0.000
6	114.7	104.9	118.2	115.1	124.0	131.1	2.98	0.168
12	137.9 <sup>a</sup>	131.3 <sup>a</sup>	141.3 <sup>a</sup>	138.4 <sup>a</sup>	166.0 <sup>b</sup>	163.3 <sup>b</sup>	4.00	0.018
24	158.7 <sup>bc</sup>	142.1 <sup>a</sup>	147.2 <sup>ab</sup>	152.1 <sup>abc</sup>	169.4 <sup>c</sup>	148.7 <sup>ab</sup>	2.38	0.038

CON = control (no additive), T1 = 1% NaHCO<sub>3</sub> addition, T2 = 0.8% MgO addition, T3 = 0.4% yeast, T4 = 0.5% sea mineral addition, T5 = 0.1 g of freeze-drying microbes from Celltech.

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b,c,d</sup> = Means with different superscripts within the row differ significantly (P<0.05).

5. 개발된 혐기미생물 사료첨가제의 저장조건에 따른 안정성 평가(계절에 따른 온·습도 조건 등에 따른 안정성 및 미생물 생존성 평가)

1) 서론

SARA의 예방 및 치료를 위해 많은 연구들이 수행되었으며 그 중 하나는 Lactic acid-utilizing bacteria (LUB)를 이용하는 방법이 있다. SARA의 경우 젖산 축적이 가장 큰 원인이 되는 데 본 연구과제에서 분리, 동정한 반추위 유래 미생물인 LUB는 SARA를 해결하기 위한 해결책이 될 수 있을 것으로 사료된다. LUB가 안정된 pH를 유지시키면서 SARA 위험성을 감소시킨다는 사실은 많은 연구에서 증명되었다(Henning et al., 2010). 예를 들어 *Megasphaera elsdenii*는 반추위 pH를 높이는 데 효과를 보여주었다. 그러면서 반추위 내 젖산 농도를 낮은 수준으로 유지하게 하고 조사료에서 농후사료로 빠르게 대체될 동안 반추위가 사료변화를 적응할 수 있도록 한다(Hession and Kung, 1992, Robinson et al., 1992). LUB는 DFM (Direct fed microbials)에 속하는 데 저장온도와 저장기간이 DFM의 품질에 영향을 미치는 주요한 문제가 된다. 따라서 본 연구는 제1협동 연구기관에서 분리, 동정하고 주관연구기관[(주) 셀텍]에서 대량 배양에 성공한 LUB의 저장성과 안정성을 규명하기 위해서 수행하였다.

2) 재료 및 방법

(1) 실험설계 및 실험방법

본 실험은 4종류의 요인을 분석하는 요인분석법으로 동결보호제, 저장 온도, delivery medium을 평가하였다. Fructose, dextrose, glucose와 dextrin을 동결보호제로서 사용하였고, delivery medium으로는 전분(starch), 석회석(limestone), 질석(vermiculite) 그리고 zeolite를 사용하였다. 이러한 방법으로 제형화된 시료를 4℃와 25℃로 설정, 저장하여 1, 2, 3, 6개월 후 균수를 측정하는 방법으로 실험을 수행하였다. 그러나 동결건조보호제로 glucose와 dextrin을 사용할 경우 동결건조 후 끈적거리는 물성으로 인하여 균체의 제형화에 어려움이 발견되었고 따라서 glucose와 dextrin은 실험요인에서 제외하였다. 따라서 실험구는 총 16개의 실험구로 설계되었으며 모든 실험구는 3반복으로 진행하였다.

(2) Rumen-origin lactic acid utilizing bacteria 선정

LUB의 분리 및 동정은 한경대학교(제1협동)에서 수행되었으며 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 *Pseudoramibacter boviskoreani* sp. nov. (NCBI, gene bank registration number: MF926250)로 등록되었다. LUB는 고농도의 농후사료(high concentrate)를 급여한 한우에서 채취되었으며 본 실험에 이용하기 위해 2%의 sodium lactate가 첨가된 Dehority's artificial (DA) medium이 들어있는 roll tube에서 50 colony 이상이 배양된 것을 선택하였다. 이 bacterium은 48시간 동안에 다른 bacteria와 비교해 젖산을 감소시키는 능력이 높은 순으로 선정되었다. 본 실험에 이용된 bacterium의 colony는 원형모양에 납작하며, 표면이 매끄럽고 누르스름한 모습을 나타내며 그람양성의 간균이며 운동능력이 없다. 탄소공급원으로 glucose, mannitol, saccharose 그리고 sorbitol을 이용할 수 있다. 이 bacterium의 최적 성장 온도는 38℃에서 45℃범위이며 최적 성장 pH는

6에서 6.5이하이다.

(3) Freezing-drying

동결건조 과정의 경우 균체와 동결보호제(fructose, dextrose, glucose, dextrin)와 혼합하여 FDS-12012(OPERON, Korea)에 넣은 후 0.1-0.07 atm에서 건조하였다.

(4) Delivery medium and packaging

동결건조된 시료는 mixer를 이용하여 균질화하였다. 균질화된 시료와 delivery medium, silica를 1:98:1 비율로 함께 혼합하였다. 혼합물은 mixer를 이용하여 1분 동안 균질화하였으며 1분의 간격을 둔 후 한번 더 균질화하였다. 그런 다음 시료 15 g을 덜어 진공용 팩(6 cm × 20 cm)에 담아 진공포장기(Roll-pack, VP-900, Korea)를 이용하여 포장하였다.

(5) Storage

포장된 시료는 4℃와 25℃에 따라 보관되었으며, 보관장소의 온도와 습도는 Thermo-hygrometer (Daihan, Korea)를 이용하여 매 15분마다 기록하였다. 시료의 저장기간은 1, 2, 3, 그리고 6개월로 총 4개의 저장기간으로 나누어 측정하였다.

(6) 분석방법

시료는 저장기간에 맞춰 개봉하였으며, saline 9 mL에 시료 1 g을 넣어 희석한 후 bacteria 농도를 확인하였다. 희석된 용액의 10 uL을 일회용 혈구계산기 (DHC-N01, NanoEntek, INC., Korea)안에 넣어 미생물의 농도를 계산하였다. Bacteria의 수는 혈구계수판 격자의 한 사각형 내에 살아있는 미생물의 수에 따라 계산하였다.

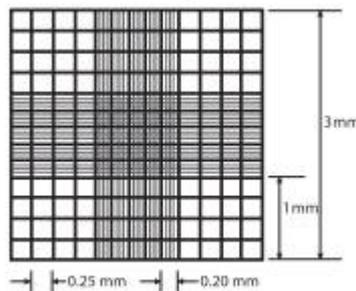


그림 16. 혈구계수판 격자(grid) 모양

### 3) 결과 및 고찰

동결건조 후, glucose와 dextrin를 섞은 LUB는 fructose와 dextrose를 섞은 LUB 보다 품질면에서 떨어지는 것을 알 수 있었다. 그림 17번과 같이 동결건조된 시료는 끈적끈적한 물성을 가지고 있었다. 따라서 dextrose와 fructose를 섞은 시료만을 delivery medium과 혼합하여 저장기간(1, 2, 3, 6개월)동안 보관하였고, 이를 본 실험에서 이용하였다.



그림 17. Sticky texture of the mixture of rumen LUB with glucose and dextrin

저장성 평가는 표 15와 같다. 동결보호제는 생물의 세포와 조직 그리고 기관이 동결건조 중 손상되는 것을 방지하기 위해 첨가된다(Joshi, 2016). 표 15에 따르면 동결건조 중에 이용된 동결보호제는 1개월과 3개월간 보관한 LUB의 농도에 영향을 미쳤으며( $P < 0.05$ ), Fructose와 dextrose를 비교했을 때, fructose를 동결보호제로 이용한 LUB의 농도가 유의적으로 더 높았다( $P < 0.05$ ). Fructose는 보통 동결보호제로 이용되는 당 중 하나로 미생물 보존뿐만 아니라 정자와 같은 세포에도 이용되며(Yildiz et al., 2007), 동결건조 중에 얼음이 생성되는 것을 방지하고 세포 내 손상을 주는 것 없이 세포 밖이 탈수되는 것을 방지한다(Joshi, 2016).

이용된 delivery medium의 종류는 보존기간동안 보존한 후 LUB 농도에 상당한 영향을 주었다. Delivery medium의 종류 중 전분은 실험구 중 가장 낮은 LUB 농도를 보여준 반면 zeolite는 가장 높은 LUB 농도를 보여주었다( $P < 0.05$ ). 지금까지 반추동물에서 zeolite를 이용한 연구들이 많이 수행되었는데, 이전에 수행된 연구에서 zeolite가 어린 반추동물의 장내질병 및 배설물의 냄새를 줄여주고 어린 양의 일당증체량을 높여주는 등 반추동물에서 여러 효과들을 보여주었다(Mumpton and Fishman, 1977; Petkova et al., 1983). 반추동물에서의 효과 외에도 zeolite는 우수한 delivery medium으로 입증되었다. Vilaça et al. (2013)가 수행한 연구에서 5-fluorouracil (5-FU)와 대장암에도 zeolite가 안전하게 이용될 수 있다는 것을 보여주었으며, Burns et al. (2014)가 수행한 연구에서는 유통기한이 길고 생존력이 높은 *Pseudomonas* sp.의 immobilization agent로써도 zeolite가 이용될 수 있다고 하였다.

저장온도 또한 LUB의 농도에 상당한 영향을 주었다. 온도는 미생물 성장을 조절하는 데 가장 중요한 요인 중 하나이다(Sakyi and Asare, 2012). 4°C에서 보관한 LUB 중 대부분이

25℃에서 보관한 LUB보다 더 높은 농도를 보여주었다( $P<0.05$ ). Dehority and Grubb (1980)의 연구에 따르면 냉온에서 저장할 시 미생물의 대사 작용을 저하시키고 반추위 미생물 군집의 변화시킨다고 하였다. 동결보호제, delivery medium, 저장온도 간 조합은 동결보호제와 유사한 패턴을 보여주었으며 1개월과 3개월 저장기간 동안에 상당한 효과를 나타냈다( $P<0.05$ ).

⌘ 15. The rumen LUB concentration (log CFU) of rumen origin lactic acid utilizing bacteria during several months storage period on several cryoprotectants, delivery medium and storage temperature

Treatments																P-value																																					
Fructose								Dextrose								SEM	C	D	T	C*D	D*T	C*T	C*D*T																														
starch	limestone	zeolite	vermiculite	starch	limestone	zeolite	vermiculite	starch	limestone	zeolite	vermiculite	starch	limestone	zeolite	vermiculite																																						
4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°																																				
1 Month																																																					
8.4	8.3	9.1	9.3	9.4	9.5	9.2	9.3	8.2	8.2	9.3	9.0	9.4	9.3	9.4	9.3	0.06	0.047	0.018	0.047	0.001	0.014	0.000	0.001																														
2 Months																																																					
8.3	8.2	9.3	9.0	9.7	9.7	9.4	9.4	8.5	8.3	9.4	9.2	9.5	9.7	9.3	9.3	0.09	0.308	0.000	0.000	0.000	0.001	0.823	0.130																														
3 Months																																																					
8.4	8.3	9.1	8.8	9.6	9.6	9.5	9.6	8.4	8.3	8.9	8.9	9.6	9.4	9.6	9.4	0.07	0.020	0.000	0.000	0.475	0.221	0.162	0.000																														
6 Months																																																					
8.5	8.4	9.1	9.1	9.7	9.8	9.7	9.6	8.5	MS	9.2	9.3	9.7	9.7	9.7	9.5	0.07	0.297	0.000	0.477	0.003	0.000	0.850	0.123																														

C =cryoprotectants (fructose, dextrose), D =delivery medium (starch, limestone, zeolite, vermiculite), T =temperature (4°, 25°), C\*D = the interaction between cryoprotectant, and delivery medium, D\*T = the interaction between delivery medium and storage temperature, C\*T = the interaction between cryoprotectant, and storage temperature, C\*D\*T = the interaction between cryoprotectant, delivery medium and storage temperature. MS = Missing samples.

표 16의 결과로 보아 3개월까지 개봉하기 전 LUB 농도가 original 시료와 유사하였다. 이러한 결과는 LUB가 공기의 노출에도 안정하며, 개봉 후에도 품질을 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

⌘ 16. The rumen LUB concentration (log CFU) of rumen origin lactic acid utilizing bacteria of 1 months sample after aerobic storage period on several cryoprotectants, delivery medium and storage temperature

Treatments																P-value							
Fructose								Dextrose								SEM	C	D	T	C*D	D*T	C*T	C*D*T
starch		limestone		zeolite		vermiculite		starch		limestone		zeolite		vermiculite									
4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°	4°	25°								
Original																0.06	0.047	0.018	0.047	0.001	0.014	0.000	0.001
After 1 Month																0.08	0.596	0.000	0.015	0.001	0.004	0.729	0.169
After 2 Months																0.09	0.189	0.000	0.212	0.000	0.895	0.609	0.025
After 3 Months																0.08	0.663	0.000	0.001	0.000	0.002	0.196	0.013

C =cryoprotectants (fructose, dextrose), D =delivery medium (starch, limestone, zeolite, vermiculite), T =temperature (4°, 25°), C\*D = the interaction between cryoprotectant, and delivery medium, D\*T = the interaction between delivery medium and storage temperature, C\*T = the interaction between cryoprotectant, and storage temperature, C\*D\*T = the interaction between cryoprotectant, delivery medium and storage temperature.

6. 개발된 혐기미생물 첨가제의 단독 사용방법 및 사료가공 중 첨가에 따른 안정성 및 효과 검증(열, 수분, 부형제 등에 따른 안정성 및 첨가제의 효과 검증)

1) 연구목적

본 연구는 SARA상태를 유도시킨 반추위 유래 LUB 제제가 *in vitro* 반추위 발효성상에 SARA 상태를 완화하는 영향을 평가하고자 수행되었다.

2) 재료 및 방법

(1) 실험설계 및 실험구

실험구는 대조구를 포함한 총 3개의 실험구(CON, T1, T2)로 구성하였으며, 1%의 zeolite (w/w feed)를 대조구와 처리구에 첨가하였다. 따라서 1%의 zeolite를 첨가한 대조구, 처리구는 1%의 zeolite와 0.5%의 반추위 유래 LUB 제제를 첨가한 T1 처리구, 그리고 1%의 zeolite와 1%의 반추위 유래 LUB 제제를 첨가한 T2 처리구로 구성하였다. 본 연구에서 이용된 반추위 유래 LUB제제의 농도는  $4.3 \times 10^9$  CFU/g이었다.

(2) 실험동물 및 반추위액의 준비

반추위액은 충북 청주에 위치한 충북대학교 부속목장에서 캐놀라가 장착된 한우 2두를 이용하여 오전 사료 급여 3시간 후에 캐놀라를 통해 채취하였다. 4겹의 muslin를 이용하여 반추위액을 여과한 후 보온병에 보관하였으며, 채취가 끝난 반추위액은 실험실로 이동하였다. 반추위액은 4겹의 muslin을 이용하여 한번 더 여과하였으며, 39°C의 항온수조에서 미리 준비한 McDougall's buffer (McDougall, 1948)와 4:1의 비율로 혼합하였다. 인공 반추위액이 만들어지는 모든 과정은 CO<sub>2</sub>를 이용하여 혐기성 상태를 유지하며 수행하였다.

(3) 실험사료의 준비

실험에 사용된 실험사료는 다음과 같이 준비되었다. 0.1 g의 timothy와 0.9 g의 착유우용 농후사료를 serum bottle에 1:9의 조:농 비율로 칭량한 후 실험에 사용하였다. 실험구의 시간대별 반복은 3반복으로 하였다.

(4) *In vitro* 배양

*In vitro* 반추위 발효실험은 Tilley and Terry (1963)의 방식을 기초로 하여 진행하였다. 각 배양병마다 실험사료와 첨가제가 들어있는 배양병에 100 mL의 인공 반추위액을 분주하였다. 분주가 끝난 serum bottle은 rubber stopper와 aluminium cap을 이용하여 밀봉을 한 후 39°C의 배양기에서 0, 3, 6, 12, 24시간으로 시간대를 설정하여 배양을 실시하였다. 분석항목으로는 pH, 총 가스 발생량, 휘발성지방산 및 ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 농도, lipopolysaccharide (LPS)농도를 분석하였다.

(5) 조사항목 및 분석 방법

① 가스발생량, pH 분석

가스 발생량의 50 mL의 glass syringe와 gas transducer 및 주사바늘을 3-way cock으로

연결한 후 주사바늘을 배양병의 rubber stopper에 삽입하여 glass syringe의 눈금을 읽어 측정하였다.

pH는 pH meter (Ohaus, Starter 2100, USA)를 이용하여 시간대별 pH의 변화량을 측정하였다.

#### ② Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 분석

Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N은 Chaney and Marbach (1962)의 방식으로 분석하였다. 각 배양병 마다 1 mL의 여과된 위액을 eppendorf tube에 담은 후 원심분리기로 10,000 rpm으로 10분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리가 끝난 시료의 상층액 20 uL와 1 mL의 phenol reagent (phenol 50 g, sodium nitroferricyanide dehydrate 0.25 g/L)와 1 mL의 alkali-hypochlorite reagent (NaOH 25 g, sodium hypochlorite 16.8 mL/L)을 assay tube에 넣은 상태에서 voltex machine (Daihan, Korea)을 이용하여 혼합한 후 30분간 상온에서 정치하였다. 배양이 끝난 시료는 파장이 630 nm로 설정된 spectrophotometer (Optizen pop, Korea)를 이용하여 NH<sub>3</sub>-N의 농도를 분석하였다. 관측된 농도는 표준 선형그래프를 통해 농도를 산출하였다.

#### ③ 휘발성 지방산 분석

휘발성지방산의 분석은 gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였으며 Erwin et al., (1961)의 방법에 따라 분석을 실시하였다. 1 mL의 위액 시료가 담긴 eppendorf tube에 metaphosphoric acid (25%, Wako, Japan)을 200 uL 첨가한 후 30분간 4°C에서 정치하였다. 정치 후 원심분리기(Labogene, 1730MR, Korea)를 이용하여 10분간 10,000 rpm으로 설정하여 원심분리를 진행하였다. 원심분리를 끝마친 시료는 1 mL의 syringe를 이용하여 시료의 상층액만 채취한 후 0.45 um syringe filter (Rephile, RjNH1345NH, China)를 이용하여 2 mL의 vial (Vivagen, V2022-1239, Korea)에 담은 후 gas chromatography (Bruker Inc, 450-GC, Germany)를 이용하여 분석을 진행하였다. 분석에 사용된 칼럼은 BR-Wax fame (BR87503, Germany)을 이용하여 분석을 진행하였으며 detector는 Flame ionization detector (FID)를 사용하였다. Injector와 detector의 온도는 250°C로 설정하였으며, 오븐의 온도는 100°C로 설정하였다. 운반기체로 질소, 수소, 고순도 에어를 사용하였으며, 유속은 각각 29 mL/min, 30 mL/min 및 300 mL/min으로 설정하여 분석하였다.

#### ④ Lipopolysaccharide (LPS) 분석

Endotoxin의 농도는 각 시료의 상층액을 이용하여 lipopolysaccharide (LPS)를 통해 분석하였다. Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 이용하여 반추위액 내의 LPS 농도를 분석하였으며, 시료 50 uL를 96 wells microplate에 첨가하여 37°C로 설정된 가열판에 올려 둔 후 50 uL amebocyte lysate reagent를 첨가하여 14분간 배양을 진행하였다. 배양이 끝난 후 미리 데워진 100 uL의 chromogenic substrate solution을 추가하고 6분간 37°C에서 배양을 진행하였다. 반응을 멈추기 위해 50 uL의 25% acetic acid를 각 well에 추가하였으며 용액은 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였고, LPS 농도는 endotoxin 표준의 선형회귀에 의해 형성된 표준 곡선에 따라 계산하였다.

3) 결과 및 고찰

반추위액의 pH는 배양 3시간대에 실험구간 유의적인 차이를 보였다( $P < 0.05$ ). 0.5%의 LUB를 첨가한 처리구에서 가장 높은 pH를 보였으며 배양 12시간대에 LUB를 0.5%와 1%를 첨가한 처리구 T1, T2 모두 반추위액 pH가 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). 이러한 결과는 LUB의 첨가가 반추위액의 pH를 증가시키는 데 효과가 있다는 것을 보여준다(표 17).

표 17. Effect of lactic acid-utilizing bacteria product on *in vitro* rumen pH

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
0	6.80	6.79	6.88	0.023	0.189
3	6.45 <sup>a</sup>	6.48 <sup>b</sup>	6.44 <sup>a</sup>	0.007	0.021
6	6.39	6.38	6.38	0.003	0.593
12	6.22 <sup>a</sup>	6.28 <sup>b</sup>	6.28 <sup>b</sup>	0.010	0.011
24	6.00	5.99	5.99	0.004	0.946

CON = control (1% pure zeolite), T1 = 0.5% zeolite + 0.5% rumen LUB, T2 = 1% rumen LUB product

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b</sup> = Means with different superscripts within the column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

가스발생량에 대한 결과는 표 18과 같다. 가스 발생량은 실험구별 유의적인 차이를 보이지 않았으나 배양 후 3시간 및 12시간대에 LUB를 0.5%와 1%를 첨가한 처리구 모두 대조구와 비교하여 가장 낮은 가스발생량을 보여주었다. 앞선 2차년도 *in vitro* 실험에서 보여주었던, LUB의 첨가는 반추위 발효 속도를 늦춰주는 효과가 있는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 배양 12시간대에 LUB를 첨가한 처리구에서 높은 pH를 나타내는 것에서 보여준다.

표 18. Effect of lactic acid-utilizing bacteria product on *in vitro* gas production (mL)

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
3	57.6	57.8	56.7	0.36	0.466
6	93.9	89.4	91.7	1.12	0.294
12	185.3 <sup>a</sup>	167.8 <sup>b</sup>	165.1 <sup>b</sup>	3.83	0.031
24	229.5	234.3	234.7	2.26	0.642

CON = control (1% pure zeolite), T1 = 0.5% zeolite + 0.5% rumen LUB, T2 = 1% rumen LUB product.

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b</sup> = Means with different superscripts within the column differ significantly (P<0.05).

Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 농도는 첫 배양 0시간대부터 24시간대까지 LUB첨가에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반추위 내 NH<sub>3</sub>-N의 농도는 특히 미생물체 합성과 관련이 있다(Pilgrim et al., 1970). LUB를 첨가한 처리구에서 안정된 NH<sub>3</sub>-N 농도를 보여주었는데 이는 LUB가 반추위 첨가제로써 반추위 내 안전성을 가지고 있는 것으로 사료된다(표 19).

표 19. Effect of lactic acid-utilizing bacteria product on *in vitro* rumen NH<sub>3</sub>-N concentration (mg/100mL)

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
0	4.65	4.64	4.40	0.066	0.251
3	6.30	6.61	6.62	0.153	0.685
6	8.11	7.93	8.64	0.141	0.078
12	10.92	11.38	10.72	0.224	0.533
24	18.85	19.10	18.67	0.145	0.535

CON = control (1% pure zeolite), T1 = 0.5% zeolite + 0.5% rumen LUB, T2 = 1% rumen LUB product.

SEM = Standard error of the mean.

Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 농도 외에 VFA 농도 또한 LUB를 첨가하였을 때 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 표 20의 결과로 보아 LUB의 첨가가 반추위 발효에 변화를 주지 않는다고 사료된다. 이러한 결과는 SARA를 치료하기 위해 *Megasphaera elsdenii*을 첨가한

Umucalilar et al. (2014)과 유사한 결과를 나타내었다.

표 20. Effect of lactic acid-utilizing bacteria product on *in vitro* rumen volatile fatty acid concentration

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
Total VFA (mmol)					
0	96.2	89.8	100.6	2.40	0.185
3	115.8	108.3	137.9	7.15	0.233
6	132.4	125.7	127.0	1.57	0.185
12	142.0	138.9	137.7	1.62	0.612
24	160.6	157.4	157.6	1.30	0.600
Acetate (% of total VFA)					
0	69.5	69.1	69.4	0.12	0.452
3	67.9	67.7	68.4	0.19	0.314
6	66.5	66.4	66.1	0.10	0.258
12	66.3	66.3	66.9	0.09	0.103
24	65.8	65.8	65.4	0.13	0.423
Propionate (% of total VFA)					
0	16.9	17.1	16.9	0.07	0.457
3	18.8	18.8	18.6	0.07	0.542
6	19.4	19.3	19.4	0.03	0.535
12	19.0	18.9	19.1	0.04	0.065
24	18.7	18.7	19.1	0.10	0.264
AP ratio					
0	4.1	4.0	4.1	0.02	0.380
3	3.6	3.6	3.7	0.02	0.461
6	3.4	3.5	3.4	0.01	0.374
12	3.5	3.5	3.4	0.01	0.072
24	3.5	3.5	3.4	0.02	0.252
Butyrate (% of total VFA)					
0	10.4	10.4	10.2	0.06	0.385

3	10.1	10.2	9.9	0.08	0.311
6	10.8	10.9	11.1	0.07	0.205
12	11.2	11.2	11.4	0.05	0.140
24	11.7	11.6	11.6	0.03	0.790
Valerate (% of total VFA)					
0	1.3	1.4	1.5	0.08	0.750
3	1.4	1.4	1.3	0.02	0.208
6	1.4	1.5	1.5	0.01	0.124
12	1.5	1.5	1.5	0.01	0.524
24	1.6	1.6	1.6	0.01	0.597

CON = control (1% pure zeolite), T1 = 0.5% zeolite + 0.5% rumen LUB, T2 = 1% rumen LUB product.

SEM = Standard error of the mean, <sup>a,b</sup> = Means with different superscripts within the column differ significantly (P<0.05).

LPS농도에 대한 결과는 표 21과 같다.  $10^7$  CFU/g까지의 LUB를 첨가하였을 때 LPS 농도에 변화를 주지 않았다. 이는 2차년도에 수행한 *in vitro* 실험에 의해 입증되었다( $10^8$  CFU/g의 LUB를 첨가하였을 때 LPS 농도에 유의적인 결과를 보여주었다).

표 21. Effect of lactic acid-utilizing bacteria product on *in vitro* rumen lipopolysaccharides concentration (EU/mL)

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	CON	T1	T2		
0	96.0	97.2	96.4	0.91	0.903
3	163.4	172.5	165.8	2.95	0.486
6	183.9	217.3	211.6	7.01	0.096
12	241.7	268.3	245.9	10.92	0.628
24	222.0	239.8	226.3	4.29	0.229

CON = control (1% pure zeolite), T1 = 0.5% zeolite + 0.5% rumen LUB, T2 = 1% rumen LUB product.

SEM = Standard error of the mean.

3. 중소 반추동물 모델을 이용하여 개발된 미생물 첨가제의 적용시험(재래산양에 산중독증 유발 사료와 대조구 사료를 급여한 후, 반추위 pH 및 미생물의 변화를 측정함으로써 미생물 첨가제의 효과 검증)

#### 1) 연구목적

본 연구는 반추위 LUB (lactic acid-utilizing bacteria) 첨가가 아급성 산중독증(SARA)에 미치는 영향에 대해 조사하기 위해 수행하였다.

#### 2) 재료 및 방법

##### (1) 실험동물

본 실험에서는 평균체중  $58.1 \pm 4.64$  kg의 흑염소(재래 흑염소×보아교잡종) 4두를 실험동물로 공시하였다. 실험 전 급여사료는 timothy를 이용하였으며 물은 자유채식 하도록 하였다.

##### (2) 실험설계 및 방법

###### ① 실험구 및 실험설계

본 실험에서 2×2 crossover design을 사용하였으며 실험구로는 10 g의 zeolite를 첨가한 대조구와 10 g의 LUB를 첨가한 처리구로 구성되었다. 이때 사용된 LUB의 농도는  $8.67 \times 10^9$  CFU/g이다. 실험기간은 총 period 1과 2로 이루어졌으며 period 1 종료 후 실험사료를 교체하여 동일한 실험을 반복한다. period 2의 경우 현재 분석진행 중에 있다.

###### ② 실험사료의 준비

본 실험에 이용한 첨가제는 zeolite 990 g, silica 3.31 g, LUB 10 g을 혼합한 후 mixer를 이용하여 1분동안 균질화 하였으며 총 3번에 걸쳐 균질화하였다. 균질화된 시료 10 g을 진공용 팩(6 cm × 20 cm)에 담아 진공포장기(Roll-pack, VP-900, Korea)를 이용하여 포장한 후 4℃에 보관하였다.

###### ③ 실험사료의 급여

사료급여는 염소 체중의 1.5%로 급여하였다. 흑염소용 농후사료와 timothy를 1일 1회 오전 8시에 급여한 후 다음날 오전에 남은 잔량을 수거하여 사료섭취량을 조사하였다. 본 실험에서는 SARA 유도를 위해 mineral block은 공급하지 않았으며, 물은 자유채식 하도록 하였다.

④ 실험의 진행

1	2	3	4	5	6	
Adaptation period			SARA challenge			
Timothy 90%, 농후사료 10%			Timothy 80% 농후사료 20%	Timothy 60% 농후사료 40%	Timothy 40% 농후사료 60%	
7	8	9	10	11	12	13
SARA challenge				Sampling period		
Timothy 20% 농후사료 80%		Timothy 10% 농후사료 90%		Timothy 10% 농후사료 90%		

그림 18. 동물실험 일정표

본 실험은 period당 chamber (1 m × 2 m)에 적응하는 기간 3일, SARA를 유도하기 위한 7일, 위액 및 혈액 채취를 위한 3일 총 13일동안 수행하였으며, 급여사료 비율은 그림 18과 같다. 그림 18과 같이 timothy의 비율은 점점 줄이고 흑염소용 농후사료의 비율을 늘리면서 SARA를 유도하였다. 첨가제(LUB, zeolite)의 경우 모두 섭취하도록 하기 위해서 그림 19와 같이 먼저 급여한 농후사료에 top dressing하여 잘 섞어주었다. 공시동물이 농후사료를 먹도록 기다린 후 timothy를 급여하였다.



그림 19. Rumen LUB was top dressed on concentrate

10일의 적응기간 및 SARA유도기간을 거친 후 Sampling기간이 3일 동안 진행되었다. Sampling 1일째에는 첨가제가 섞인 농후사료만을 급여하여 급여 6시간 후 공시동물의 위액과 혈액을 채취하였으나, 1일차 위액 pH의 경우 반추위 buffer작용으로 인해 높게 측정되었다. 따라서 Sampling 2일째와 3일째에는 첨가제가 섞인 농후사료 급여 2시간 후에 위액만을 채취하였으며, 급여 5시간 후에는 위액과 혈액채취를 하였다. 위액채취는 공시동물을 chamber에서 꺼내어 stomach tube를 사용하여 위액을 채취한 후 pH를 측정하였으며, 혈액의 경우 공시동물의 경정맥(jugular vein)쪽의 혈액을 채취하였다.



그림20. 흑염소 *in vivo* chamber

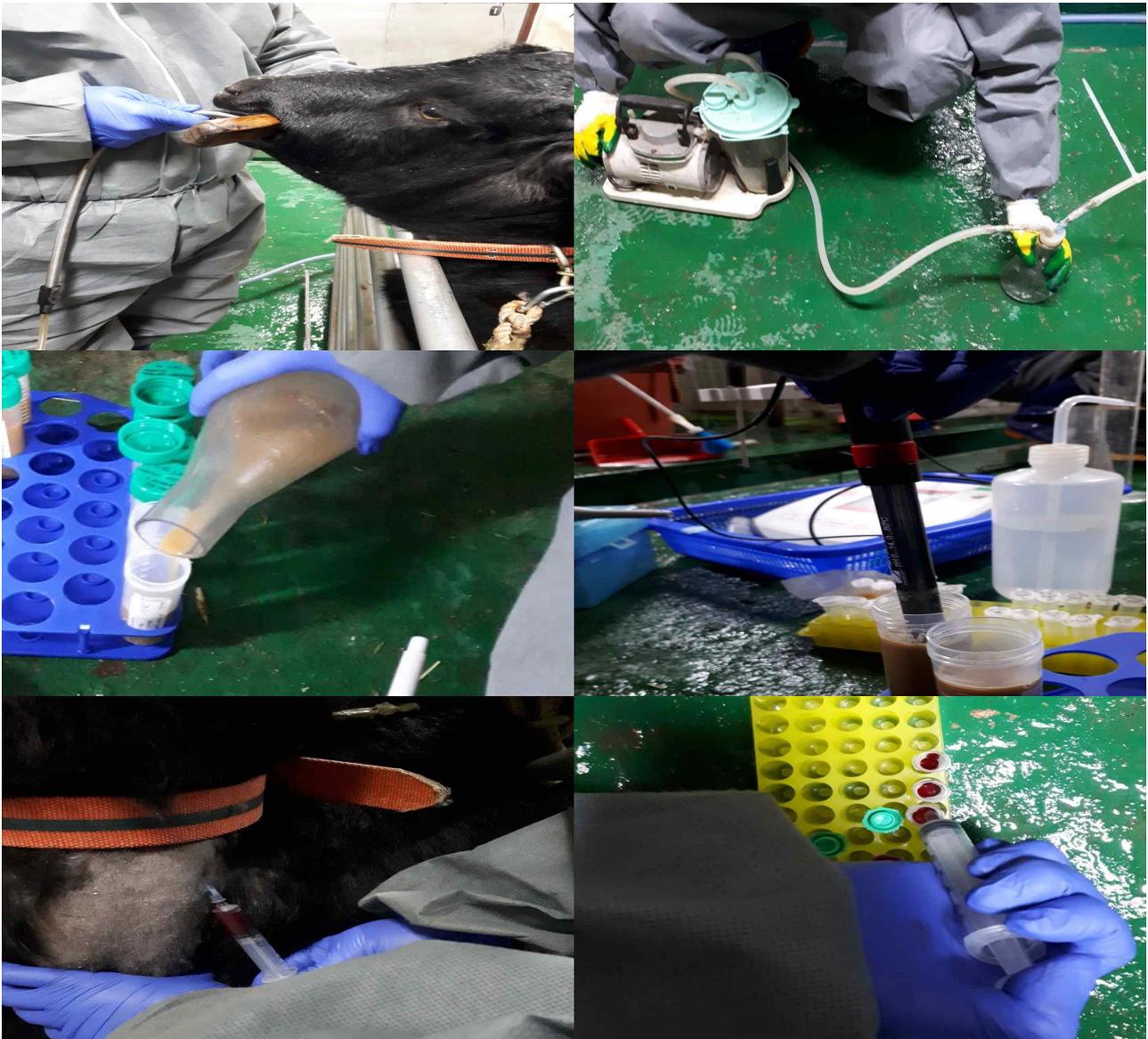


그림 21. 흑염소 위액 및 혈액채취 과정

### (3) 조사항목 및 분석 방법

조사항목으로는 pH, NH<sub>3</sub>-N, 혈액을 분석하였으며, pH와 NH<sub>3</sub>-N은 위의 방법과 동일하게 분석하였다. LPS와 VFA는 현재 분석진행 중에 있다.

#### ① 혈액분석

혈액은 Vetscan HM2와 VS2 (Abaxis, USA)를 이용하여 분석하였다. 혈액채취는 5 mL syringe를 이용하여 농후사료 급여 6시간 후에 채혈하였으며(시료 채취 2일과 3일의 경우, 급여 5시간 후 채혈), 채혈 즉시 lithium heparin과 EDTA가 있는 0.5 mL의 blood capillary collection tube (Greiner Bio-One, Austria)에 옮겨 담은 후 분석을 위하여 실험실로 운반하였다. 혈액성분의 경우 K3E EDTA minitube안에 있는 혈액을 Vetscan HM2 (Abaxis, USA)를 이용하여 분석하였으며, 혈액 대사산물은 lithium heparin이 있는 minitube안의 혈액을 Vetsan VS2 (Abaxis, USA)를 이용하여 분석하였다. 또한 혈액 대사산물 분석을 위해 large animal profile (#8054AC3, Abaxis, Germany)과 Preventive care profile plus (#8343AB0, Abaxis, Germany) 두 개의 rotor를 이용하여 분석하였다.

3) 결과 및 고찰

혈액분석결과는 표 22와 같다. 백혈구 수치와 림프구 수치는 대조구보다 처리구에서 높게 나온 반면 과립구(granulocyte) 수치의 경우 처리구보다 대조구에서 높게 나왔다. ALT, ALP, 그리고 AST와 같은 혈액 대사산물은 처리구보다 대조구에서 높게 나왔다. 이 혈액 대사산물들은 에너지와 단백질대사, 그리고 간 건강을 반영하는 지표로 이용될 수 있다(Cozzi et al., 2011). Nasrollahi et al. (2019)는 AST는 SARA의 생체마커로 이용될 수 있다는 점과, 낮은 pH가 혈액 내 AST농도를 높일 수 있다는 점을 보여주었다.

표 22. Effect of rumen LUB products on blood composition and metabolites of goat fed by high concentrate

Variables	Control	Treatment
WBC ( $\times 10^9/L$ )	9.62 $\pm$ 2.407	12.60 $\pm$ 0.534
LYM ( $\times 10^9/L$ )	3.55 $\pm$ 0.566	8.11 $\pm$ 1.170
MON ( $\times 10^9/L$ )	0.30 $\pm$ 0.107	0.13 $\pm$ 0.035
GRA ( $\times 10^9/L$ )	5.77 $\pm$ 2.794	4.37 $\pm$ 0.614
LY (%)	43.43 $\pm$ 10.680	58.88 $\pm$ 4.487
MO (%)	2.73 $\pm$ 1.322	1.18 $\pm$ 0.471
GR (%)	53.87 $\pm$ 11.944	39.92 $\pm$ 3.996
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	16.34 $\pm$ 1.129	16.61 $\pm$ 0.258
HGB (g/L)	125.39 $\pm$ 25.814	142.67 $\pm$ 2.072
HCT (%)	29.84 $\pm$ 3.686	31.13 $\pm$ 1.252
MCV (fl)	17.60 $\pm$ 2.412	18.83 $\pm$ 0.816
MCH (pg)	80.77 $\pm$ 101.918	8.55 $\pm$ 0.071
MCHC (g/L)	385.60 $\pm$ 105.328	458.17 $\pm$ 12.259
RDWc (%)	30.00 $\pm$ 0.432	29.52 $\pm$ 0.361
BUN (mg/dL)	18.67 $\pm$ 1.027	18.50 $\pm$ 0.612
CRE (mg/dL)	0.93 $\pm$ 0.062	1.00 $\pm$ 0.035
ALT (U/L)	23.00 $\pm$ 1.080	12.05 $\pm$ 1.225
ALP (U/L)	581.83 $\pm$ 15.173	421.67 $\pm$ 1.021
AST (U/L)	80.33 $\pm$ 8.957	66.83 $\pm$ 11.081
TBIL (mg/dL)	0.28 $\pm$ 0.024	0.30 $\pm$ 0.000
GLU (MMOL/L)	4.72 $\pm$ 0.249	4.85 $\pm$ 0.584
Ca (mg/dL)	9.58 $\pm$ 0.062	9.53 $\pm$ 0.213
TP (g/dL)	6.98 $\pm$ 0.085	7.65 $\pm$ 0.035
ALB (g/dL)	3.87 $\pm$ 0.024	3.28 $\pm$ 0.041
GLOB (g/dL)	3.13 $\pm$ 0.062	4.37 $\pm$ 0.020
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	144.67 $\pm$ 1.027	142.67 $\pm$ 2.677
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4.78 $\pm$ 0.125	5.05 $\pm$ 0.281
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	105.17 $\pm$ 1.546	104.50 $\pm$ 1.225
TCO <sub>2</sub> (mmol/L)	24.83 $\pm$ 1.288	28.67 $\pm$ 1.633

WBC = white blood cell, LYM = lymphocytes, MON = monocyte, GRA = granulocytes, RBC = red blood cells, HGB = hemoglobin, HCT = hematocrit, MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular hemoglobin, MCHC = Mean corpuscular hemoglobin concentration, RDWc = red cell distribution width concentration. BUN = blood urea nitrogen, CRE = creatinine, ALT = Alanine Aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase, AST = Aspartate Aminotransferase, TBIL = total bilirubin, GLU = blood glucose, Ca = Calcium, TP = total protein, ALB = albumin, GLOB = globulin, Na<sup>+</sup> = Sodium, K<sup>+</sup> = potassium, Cl<sup>-</sup> = chloride, CTCO<sub>2</sub> = total carbon dioxide.

위액분석과 NH<sub>3</sub>-N의 결과는 표 23과 같다. 위액 채취는 다량의 농후사료를 통해 반추위 내 pH를 낮추기 위해 오전 농후사료 급여 2시간과 5시간 후에 실시하였다. 표 23을 보면 LUB를 첨가한 처리구에서 zeolite를 첨가한 대조구보다 더 높은 pH를 보였다. 이 결과는 동물이 90%까지 농후사료를 급여했을 때 LUB가 반추위 내 pH를 유지하는 능력을 가지고 있다는 것을 의미한다.

Ammonia(NH<sub>3</sub>)-N농도의 경우 농후사료 급여 2시간 후에는 대조구보다 처리구에서 더 높게 나왔으나, 농후사료 급여 5시간 후에는 대조구가 처리구보다 더 높게 관찰되었다.

표 23. Effect of rumen LUB products rumen pH and NH<sub>3</sub>-N concentration of goat fed by high concentrate

Variable	Control	Treatment
Rumen pH		
2 hours after feeding	6.51 ± 0.110	6.83 ± 0.065
5 hours after feeding	6.42 ± 0.135	6.71 ± 0.080
NH <sub>3</sub> -N (mg/100 mL)		
2 hours after feeding	30.25 ± 5.25	35.71 ± 4.43
5 hours after feeding	38.96 ± 4.32	32.37 ± 5.22

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

- 2협동에서 분리된 미생물의 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사
- 3협동에서 확립된 미생물 저장 처리 방법을 이용한 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사
- 인위적 pH조절을 통한 제2협동과제 개발 미생물 사료첨가제의 효능검정
- 한우를 활용한 ebolus (pH 및 온도센서)를 활용한 반추위 내 pH 데이터 확보 및 해석
- 분리된 미생물의 반추위 내 lactic acid 저감 능력 검증 및 선발(2종 이상 선발)
- 선발된 미생물의 동정 및 발효특성 조사
- 산중독증 예방 사료첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축

#### 3-2. 목표 달성여부

성과목표	달성도	자 체 평 가
젖소, 한우의 산중독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 체계 및 산업화에 대한 조사	100	○ 산중독증 예방 사료첨가제의 종류별 생산 방법에 관한 문헌조사 ○ 산업현장에서 적용되고 있는 사료첨가용 미생물 제제 및 혐기미생물의 대량생산 방법과 생산체계에 대하여 조사함
혐기미생물의 사료첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상에 관한 조사	100	○ 미생물 제제의 저장처리 및 처리방법에 대하여 조사하고 평가함 ○ 혐기미생물의 생산 방법 및 저장성 향상을 위한 가공방법에 대하여 조사하고 반추위 정착성 향상을 한 방안을 검토함
젖소, 한우의 산중독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 및 산업화	100	○ 혐기미생물을 보조사료의 부가적인 원료로서 활용하는 방안으로 2종류의 시제품을 생산하고 산업화를 달성함(제품등록을 완료함)
2협동에서 분리된 미생물의 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사	100	○ 산업용 미생물 생산설비를 이용하여 대량 생산 방법에 따른 혐기미생물의 발효특성을 조사함(단일배양 및 유가배양방법) ○ 발효특성을 조사함으로써 대량배양에 따른 배양시간과 배지의 조성 및 농도 설정을 위한 조건을 규명함
3협동에서 확립된 미생물 저장 처리 방법을 이용한 대량 생산	100	○ 대량생산에 따른 생산성에 미치는 혐기미생물의 특성을 조사함

체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사		○ 대량배양, 균체분리 및 저장처리를 위한 동결건조와 제형의 제작 등 대량생산에 따른 생산체계의 구축을 완료함
인위적 pH조절을 통한 제2협동과제 개발 미생물 사료첨가제의 효능검정	100	○ Lactic acid 저감 혐기성 미생물의 산중독증 예방 효능 검정을 위해 <i>in vitro</i> 시험 결과 산중독증 저감 효과가 검증되었음 ○ Cannulae 장착 한우 암소 3두 대상으로 개발 미생물 사료첨가제 급여 <i>in vivo</i> 시험을 통하여 산중독증 저감 효율 검증 완료함
한우를 활용한 ebolus (pH 및 온도센서)를 활용한 반추위 내 pH 데이터 확보 및 해석	100	○ 한우 암소 3두를 대상으로 1, 2차년도 <i>in vivo</i> 시험 간 영국의 eCOW co.에서 제조한 pH 및 온도 측정 기구인 ebolus를 cannulae를 통해 삽입하여 반추위 내 pH 데이터 확보함 ○ 3차년도 개발 미생물 사료첨가제의 효능검정을 위한 <i>in vivo</i> 시험 간 영국 Mole Valley Farmers Ltd.,에서 제조한 SMAXTEC Smart Bolus(반추위 내 pH, 온도, 음수량 및 개체 활동량 측정기)를 한우 암소 3두 대상으로 cannulae를 통해 삽입하여 데이터 확보함
공시 반추동물 및 혐기배양장치를 이용하여 산중독증 저감 목표 미생물 분리를 위한 enrichment 시스템 구축	100	○ 혐기성 박테리아 배지내에 반추위액의 첨가와 무첨가하고 2% sodium lactate를 첨가한 배지 조성하여 미생물 분리
반추위에서 lactic acid 이용성이 높은 혐기 미생물과 lactic acid 분비 속도가 느린 전분분해 미생물 분리	100	○ 한우 반추위내의 lactic acid이용균과 lactic acid 분비 속도가 느린 전분분해 미생물 분리하였음
분리된 미생물의 반추위 내 lactic acid 저감 능력 검증 및 선발(2종 이상 선발)	100	○ Lactic acid를 이용하는 2종, 전분을 이용하여 lactic acid 발생속도가 느린 2종의 균주를 분리하였으며, 총 4종의 미생물을 분리하였음
선발된 미생물의 동정 및 발효 특성 조사	100	○ 분리된 4종의 미생물의 대하여 동정 및 발효특성을 확인하였으며, 새로운 미생물로 확인하였음
선발된 미생물의 혼합 미생물제에 대한 반추위내 lactic acid 저감 능력검증	100	○ 분리된 미생물을 <i>in vitro</i> 실험을 통하여 lactic acid 저감효과 검증함
선발된 미생물의 대량생산을 위한 저가의 배양 배지 조건 탐색	100	○ 저가형 sodium lactate를 이용한 저가형 배지를 조성하였음

선발된 미생물의 동정, 안정성, 위해요소 및 발효특성 조사	100	○ 미생물 동정과 발효특성을 조사하여 미생물 특성확인, 용혈성실험을 통하여 안정성 실험 확인함
산중독증 예방 사료첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축	100	○ 대량 생산한 미생물의 보존을 위한 동결건조보존제 성능 구명 ○ 향상된 delivery를 위한 부형제 구명 ○ 제형화된 미생물 첨가제의 저장성 구명

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		SCI	비 SCI	논문 평균 IF	학술 발표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	2	4	2		2						2	4		5	3				
1차 년도	목표	1																		
	실적	1																		
2차 년도	목표			2								2	3		1					
	실적			2								1	2		1					
3차 년도	목표	1	1	2	2		2					2	1		2	2				
	실적		2	2	2		5								5	5				
소 계	목표	2	1	4	2		2					2	3		5	3				
	실적																			
종료 1차년도		1											1							
소 계		1											1							
합 계		2	2	4	2		2					2	4		5	3				

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

- 사업화는 연구개발 기간인 3년과 추가적으로 본 과제가 종료된 후의 2년을 포함하여 총 5년간 단계별로 진행될 예정이다. 연구개발 1년차와 2년차는 혐기미생물의 분리동정 및 특성을 조사하였고 3년차는 혐기미생물의 대량생산을 위한 생산방법 및 저장처리에 등 산업화를 위한 대량생산 체계의 구축을 완료하였으며, 또한 사료첨가제로서 시판용 제품개발이 완료되었다. 과제 종료 1년차는 혐기미생물로부터 발현되는 효소 발현 유전자를 조사하고 재조합 대장균으로부터 대량으로 생산하는 추가 연구를 추진하고 관련된 제품을 생산할 예정이다. 과제 종료 후 2년차는 사료공정규격에 따라 반추위 유래 혐기미생물을 유익균의 범위 내로 활용이 가능하도록 관련절차에 따라 등록을 신청할 예정이다.
- 단계별 사업화 전략을 통해 산업화를 체계적으로 진행하며, 완성된 제품은 즉시 사업화하여 경제성을 증대시킬 예정이다. 국내에서의 제품 판매는 젖소 및 한우의 산중독증 예방을 위한 차별화된 제품임을 부각시켜 제품의 신뢰도를 확보하는 것이 중요하다. 해외수출은 현재 구축된 해외 기반의 수요국을 중심으로 추진 후 점진적으로 국가를 확대해나갈 예정이다.
- 본 과제를 통해 개발된 산 중독증 예방 사료첨가제를 통해 젖소의 경제수명을 연장하고 젖소 및 한우의 사료효율 향상 및 생산성이 높아질 것으로 기대된다. 또한 중소 등 산 중독증 예방을 위한 화학제의 수입을 대체하는 효과가 있을 뿐만 아니라 깔짚의 교체시기가 줄어들어 실질적으로 농가의 소모성 비용의 감소가 기대된다.
- 예상되는 연구 결과의 활용분야 및 활용방안
  - 반추위 유래 미생물은 대개 혐기성 균이므로 생물학적, 경제적 우수성이 입증되어도 산업적 배양이 매우 어려움. 본 연구과제에서는 이러한 혐기성균의 대량배양에 성공하고 적절한 동결건조보존제와 안전한 delivery를 위한 부형제 등이 규명되어 이를 다른 혐기성 균에 적용하거나 시도할 수 있을 것으로 사료됨.
  - 추가적인 연구가 필요하다고 판단되지만 산중독증 또는 이와 관련된 증상에 적용(사료첨가제로 급여)이 가능하며 따라서 축산업 현장에 적용 가능함.
  - 산중독증은 비단 국내뿐만 아니라 농후사료를 다급하는 사양관리 체계의 모든 반추동물에게 해당되는 대사성 질병이므로 국내와 유사한 사양체계를 유지하는 국가(중국, 일본 등)에 수출이 가능할 것으로 사료됨.
- 추가연구의 필요성
  - 반추동물 산업에 있어서 산중독증(과산증, 아급성산중독증)의 문제는 동물의 복지는 물론 산업현장에서 심각한 경제적 손실을 초래하고 있음이 여러 연구를 통해 밝혀진 바 있음
  - 이러한 문제점들은 화학적 방법을 통해 쉽게 해결될 수 없음이 또한 밝혀지고 있으므로 (예, 증조의 생산 감소 및 수입 감소 그리고 이의 증산에 따르는 환경파괴 문제, Personal communication) 보다 환경 친화적인, 생물학적 방법이 요구됨.
  - 본 연구에서 분리, 동정된(제1협동) 반추위 유래 젖산 이용 미생물은 세계 최초로 분리, 동정되어 생물종 보존의 관점에서 그 중요성이 인정되며 따라서 비록 연구과제를 통하여 시제품을 제작하기는 하였으나, 이를 실제적으로 현장에 활용할 수 있는 방안에 대한 추가적인 후속 연구가 필요하다고 판단됨.
- 타 연구에의 응용
  - 본 연구를 통하여 규명된 부형제, 저장 기간 등의 결과는 추후 혐기성을 균을 제형화하

거나 상업적으로 보존하는데 자료를 제시할 수 있을 것으로 판단되며, 이를 통하여 배양 및 대량 생산이 어려운 혐기성 균의 상업적 생산에 기여할 수 있을 것으로 사료됨.

○ 기술이전

- 본 연구를 통하여 얻어진 Delivery system에 대한 연구 결과는 주관연구기관에 기술이전을 시행하였으며, 현재 특허 출원을 준비하고 있음.

## 붙임. 참고문헌

- Aikman, P. C., Henning, P. H., Humphries, D. J. and Horn, C. H. (2011). Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. *Journal of Dairy Science* 94:2840-2849.
- Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D. 2005. Cellular Injuries and Storage Stability of Spray-Dried *Lactobacillus Rhamnosus* Gg. *International Dairy Journal*. 15: 399-409.
- Bae, G. S., Bae J. S., Yoon S. J., Chang, M. B., Ko, J. Y., Ha, J, K. (2002). 반추가축영양: 통옥수수 및 steam-flaked 옥수수 기초사료가 반추위미생물 발효성상과 한국재래산양 반추위대사 특성에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지* 44: 757-768.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. (2001). Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. *Journal of Animal Science* 79(7): 1925-1936.
- Calsamiglia, S., Blanch, M., Ferret, A., and Moya, D. (2012). Is subacute ruminal acidosis a pH related problem: causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology* 172(1): 42-50.
- Chaney, A. L. and E. P. Marbach (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry* 8(2): 130-132.
- Chiquette, J., Allison, M. and Rasmussen, M. 2008. *Prevotella Bryantii* 25a Used as a Probiotic in Early-Lactation Dairy Cows: Effect on Ruminal Fermentation Characteristics, Milk Production, and Milk Composition. *Journal of dairy science*. 91: 3536-3543.
- Counotte, G. and R. A. Prins (1982). Regulation of lactate metabolism in the rumen.
- Cozzi, G., Ravarotto, L., Gottardo, F., Stefani, A. L, Contiero, B., Moro, L., Brscic, M., Dalvit, P. (2011). Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: effects of parity, stage of lactation, and season of production. *Journal of Dairy Science* 94(8): 3895-3901.
- David J. Nisbet and Scott A. Martin. 1990. Effect of Dicarboxylic Acids and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract on Lactate Uptake by the Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(11) 3515-3518.
- Dehority, B. A. and J. A. Grubb (1980). Effect of short-term chilling of rumen contents on

- viable bacterial numbers. *Applied and Environmental Microbiology* 39(2): 376-381.
- Denigan. 1992. Influence of Tallow and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract in Dairy Cattle Rations. *Journal of Dairy Science* 80(6):1179-84 · July 1997 with 13 Reads.
- Erwin, E. S., Marco, G. J., Emery, E. M., (1961). Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 44: 1768-1771.
- Franjione, J. and Vasishtha, N. 1995. *The Art and Science of Microencapsulation. Technology Today.* 2: 1-6.
- Fritzen-Freire, C.B., Prudêncio, E.S., Amboni, R.D., Pinto, S.S., Negrão-Murakami, A.N. and Murakami, F.S. 2012. Microencapsulation of Bifidobacteria by Spray Drying in the Presence of Prebiotics. *Food Research International.* 45: 306-312.
- Gomez-Alarcon, R. A., Dudas, C. and Huber, J. T. 1990. Influence of cultures of *Aspergillusoryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* 73:703
- Goto, H., Qadis, A. Q., Kim, Y.-H., Ikuta, K., Ichijo, T. and Sato, S. (2016). Effects of a bacterial probiotic on ruminal pH and volatile fatty acids during subacute ruminal acidosis (SARA) in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* 78:1595-1600.
- Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, A. D., Kennedy, A. D., Wittenberg, K. M. (2005). Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science* 88(4): 1399-1403.
- Havenar, R. and Huisin't Veid, J.M. 1992. Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease.* Elsevier Applied Science Publishers. 1:151-171.
- Henning, P. H., Horn, C. H., Steyn, D. G., Meissner, H. H., and Hagg, F. M. (2010). The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Animal Feed Science and Technology* 157(1): 13-19.
- Hession, A. and L. Kung (1992). Altering ruminal fermentation by microbial inoculation with lactic acid-utilizing microorganism. *Journal of Animal Science* 70(Suppl 1): 311.
- Horn, C., Kistner, A., Fouché, G., Chilliard, Y., Glasser, F., Faulconnier, Y., Bocquier, Y., Veissier, I. and Doreau, M. 2009. Selective Enrichment, Isolation and Characterization of Fast-Growing Acid-Tolerant and Ionophores-Resistant Lactate Utilisers from Rumen Contents of Animals on High-Energy Diets. *Ruminant*

Physiology-Digestion, Metabolism and Effects of Nutrition on Reproduction and Welfare. Eds Chilliard, Y., Glasser, F., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Veissier, I. & Doreau, M., Wageningen Academic Publishers. 216-217.

Jankowski, T., Zielinska, M. and Wysakowska, A. 1997. Encapsulation of Lactic Acid Bacteria with Alginate/Starch Capsules. *Biotechnology Techniques*. 11: 31-34.

Joshi, A. (2016). A review and application of cryoprotectant: The science of cryonics. *PharmaTutor* 4(1): 12-18.

Jyothi, S., Seethadevi, A., Prabha, K.S., Muthuprasanna, P. and Pavitra, P. 2012. Microencapsulation: A Review. *Int J of Pharma & Bio Sciences*. 3: 509-531.

Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current issues in intestinal microbiology*. 3: 39-48.

Kermanshahi, H., Heravi, R. M., Attar, A., Pour, A. R., Bayat, E., Zadeh, M. H. and Ibrahim, S. A. (2017). Effects of acidified yeast and whey powder on performance, organ weights, intestinal microflora, and gut morphology of male broilers. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 19(2), 309-316.

Kim, H.Y. 1997. In vitro inhibitory on rat intestinal mucosa  $\alpha$ -glucosidase by rice hull extract. *Korean. J. Food Sci. Technol.*, 29, 601-608.

Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., and Noordhuizen, J. P. T. M. (2003). Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 50(8): 406-414.

Klieve, A., Hennessy, D., Ouwerkerk, D., Forster, R., Mackie, R. and Attwood, G. 2003. Establishing Populations of *Megasphaera Elsdenii* Ye 34 and *Butyrivibrio Fibrisolvens* Ye 44 in the Rumen of Cattle Fed High Grain Diets. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 621-630.

Krasakoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2004. The Influence of Coating Materials on Some Properties of Alginate Beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *International dairy journal*. 14: 737-743

Krause, K. and G. Oetzel (2005). Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88(10): 3633-3639.

Krause, K. M. and G. R. Oetzel (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126(3):

215-236.

- KUCUKERSAN K., TUNCER S.D, SANLI Y, MIDILLI M, GONCUOGLU E, KUCUKERSA S and TAN H. : The effects of dietary stabilized rumen extract(SRE) and viginiamycine on performance and carcass yield of broilers. *Revue Med. Vet.*, 2002, 153, 11. 723-726.
- Lim, C.S., Li, C.Y., Kim, Y.M., Lee, W. Y.and Rhee, H.I. (2005) The inhibitory effect of *Corus walteri* extract against  $\alpha$ -amylase. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.*, 48, 103-108.
- M. L. Eastridge. 2018. Oral administration of *Megasphaera elsdenii* to Jersey cows during early lactation.
- Mark A. Rasmussen. 1993. Isolation and Characterization of *Selenomonas ruminantium* Strains Capable of 2-Deoxyribose Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(7) 2077-2081
- Martin, S. A. and Nisbet, D. J. 1990. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch bymixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* 68:2142.
- McDougall, E. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical journal* 43(1): 99.
- McLaughlin, C.L., Thompson, A., Greenwood, K., Sherington, J. and Bruce, C. 2009. Effect of acarbose on milk yield and composition in early lactation dairy cattle fed a ration to induce subacute ruminal acidosis. *J. Dairy sci.*, 92, 4481-4488.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., and Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science* 93(1): 217-222.
- Milan Marounek, Katerina Fliegrova and Stanislav Bartod. 1989. Metabolism and Some Characteristics of Ruminal Strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(6) 1570-1573.
- Mumpton, F. and P. Fishman (1977). The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. *Journal of Animal Science* 45(5): 1188-1203.
- Nagaraja, T. and E. Titgemeyer (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current

microbiological and nutritional outlook 1, 2. Journal of Dairy Science 90: E17-E38.

- Nasrollahi, S. M., Zali, A., Ghorbani, G. R., Kahyani, A., & Beauchemin, K. A. (2019). Short communication: Blood metabolites, body reserves, and feed efficiency of high-producing dairy cows that varied in ruminal pH when fed a high-concentrate diet. Journal of Dairy Science 102(1): 672-677.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. and McIntosh, F.M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. J. Anim.Sci. 73:1811-1818.
- Nisbet, D. J., Martin, S. A. 1994. Factors affecting L-lactate utilization by *Selenomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. 72:1355.
- Nocek, J. E. (1997). Bovine acidosis: implications on laminitis. Journal of Dairy Science 80: 1005-1028.
- Nocek, J. E., Kautz, W. P., Leedle, J. A. Z., and Allman, J. G. (2002). Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. Journal of Dairy Science 85(2): 429-433.
- Petkova, E., Venkov, T., and Stanchev, K. H. (1983). Effect of Bulgarian potassium-calcium zeolites on the assimilation of macro-and trace elements in lambs. Veterinarno-meditsinski nauki 20(8): 36-40.
- Pilgrim, A. F., Gray, F. V., Weller, R. A. and Belling, C. B. (1970). Synthesis of microbial protein from ammonia in the sheep's rumen and the proportion of dietary nitrogen converted into microbial nitrogen. British Journal of Nutrition. 24: 589-598.
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N., and McBride, B. W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. The Veterinary Journal 176(1): 21-31.
- Rius, A. G., Kittelmann, S., Macdonald, K. A., Waghorn, G. C., Janssen, P. H., and Sikkema, E (2012). Nitrogen metabolism and rumen microbial enumeration in lactating cows with divergent residual feed intake fed high-digestibility pasture. Journal of Dairy Science 95(9): 5024-5034.
- Robinson, J. A., Smolenski, W. J., Greening, R. C., Ogilvie, M. L., Bell, R. L., Barsuhn, K., and Peters, J. P. (1992). Prevention of acute acidosis and enhancement of feed intake in the bovine by *Megasphaera elsdenii* 407A. Journal of Animal Science 70(Suppl 1): 310.

- Rodríguez, F. (2003). Control of lactate accumulation in ruminants using *Prevotella bryantii*. Microbiology. Ames, Iowa, Iowa State University. Doctor of Philosophy: 114.
- Sakya, P. A. and R. Asare (2012). Impact of temperature on bacterial growth and survival in drinking-water pipes. Research Journal of Environmental and Earth Sciences 4(8): 807-817.
- Santra, A., Chaturvedi, O. H., Tripathi, M. K., Kumar, R., and Karim, S. A. (2003). Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal population in rumen of lambs. Small Ruminant Research 47(3): 203-212.
- Shah, N. and R. Ravula (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. Australian Journal of Dairy Technology, 55(3): 139.
- Shaver, R. D., Armentano, L. E., and Crowley, J. W. (1988). Dietary buffers for dairy cattle, University of Wisconsin – Extension.
- Steele, M. A., AlZahal, O., Hook, S. E., Croom, J. and McBride, B. W. (2009). Ruminal Acidosis and the Rapid Onset of Ruminal Parakeratosis in a Mature Dairy Cow: A Case Report. Acta veterinaria Scandinavica 51:39-44.
- Stelting, S. A., Burns, R. G., Sunna, A., and Bunt, C. R. (2014). Survival in sterile soil and atrazine degradation of *Pseudomonas* sp. Strain ADP Immobilized on Zeolite AU - Stelting, Scott A. Bioremediation Journal 18(4): 309-316.
- Stewart, C. S. and Bryant, M, P. 1988. The rumen bacteria. In Rumen Microbial Ecosystem ed. Hobson, P.N. pp. 21-75.
- Theodorii. 1990. Use of zoospore concentrations and life cycle parameters in determining the population of anaerobic fungi in the rumen ecosystem Applied and Environmental Microbiology. 56(4) 1073-1078.
- Tilley, J. and R. Terry (1963). A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Grass and Forage Science 18(2): 104-111.
- Umucalilar, H. D., Gulsen, N., Guner, A., Hayirli, A. and Cital, O. B. (2014). Alteration in Ruminal Fermentation: The Effect of *Megasphaera Elsdenii* Inoculation on Subacute Ruminal Acidosis (Sara) in Vitro. Scientific Papers: Series D, Animal Science-The

Willems, A. and Collins, M. D. 1996. Phylogenetic relationships of the Genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* *Sensu Stricto* and Reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. Nov. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, Oct. p. 1083-1087.

ZEBROWSKA T., ZIOLECKA A and ZIOLECKI A. : The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 3. Digestion in small intestine. *J.Anim. Physiol. Anim. Ntr.*, 1989,61, 245-254.

ZIOLECKA A., OSTRICKA Z. and ZIOLECKI A. : The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 1. Liveweight gain and efficiency of feed utilization. *Zeitschr. Tierphysiol. Futtermittelkunde*. 1984, 51, 13-20.

김광립, 최선규, 최성호, 송만강 2007. 미생물제제의 첨가가 면양의 반추대사 및 젖소의 유생 산성에 미치는 영향. *한국동물자원과학회*. 49(6) 819-828.

김혜영. 1997. 왕겨 추출물의 쥐소장점막  $\alpha$ -glucosidase에 대한 *in vitro*에서의 저해효과. *한국식품과학회지*. 29(3):601-608.

김재황, 김창현, 고영두. 2001. 복합생균제(Economix®)의 사료내 첨가가 착유우의 생산성 및 경제성에 미치는 영향. *동물자원학회지*. 43(3): 369-380.

김정환 외 2007. 산사(*Crataegi Fructus*) 추출물로부터  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 저해 물질 분리 및 동정J. *Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. 50(3): 204-209.

김미선 외 2010. 100종 브라질 식물 추출물로부터 반추동물 산독증 예방치료를 위한  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 선별. *한국식품저장유통학회지*. 17(2): 290-296.

김희연 외 2011. 강원도 자생 신체 추출물의  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase효소 저해활성 탐색. *한국식품영양과학회지*. 40: 308-315.

김지연. 2017. 알긴산 나트륨을 이용한 유산균 캡슐화의 상업화 공정 개발. *Korean Chem. Eng. Res.*, 55(3), 313-321

배장순 외 2004. 무기공업화학. 동명사. p144.

손혜인, 백성광, 문주연, 안의영, 이현준, 손용석. 2013. 젖소에 있어 아급성제1위과산증(SARA)의 강도가 혈장 Lipopolysaccharide(LPS)의 농도에 미치는 효과. *Journal of*

the Korean Society of Grassland and Forage Science. 33(4) 313-318.

설수덕 외 2004. 무기공업화학. 대영사. p88.

이보배 외 2008. 제비꽃 추출물의 항산화 활성 및  $\alpha$ -Amylase와  $\alpha$ -Glucosidase에 대한 저해 활성. 한국식품영양과학회지37(4): 405-409.

이성훈, 서인준. 2005. 반추가축영양에 있어서 액상미생물제제의 첨가가 In vitro 발효성상과 섬유소분해효소활성에 미치는 영향. 동물자원지. 47(5). 789-804.

하종규 등. 1990. Artificial Saliva(AS)+Stabilized Rumen Extract(SRE)의 반추동물에 대한 효과 규명 연구. 한국영양사료학회 학술발표회 및 세미나자료집 1990권

최연재. 2010. 축산 생균제의 품질관리 연구. 순천대학교 석사학위논문.

최윤재외 2016. 친환경 기능성 사료첨가제 개발을 통한 웰빙 원료육의 생산 및 산업화. 농림 축산식품부 연구보고서.

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화 (영문) Microbiology-Driven Approach to Alleviate Acute and Sub-Acute Ruminant Acidosis in Hanwoo and Holstein Dairy Cattle				
주관연구기관	(주)셀텍		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)셀텍	
참 여 기 업				(성명) 문 병 현	
총연구개발비 ( 880,000천원 )	계	880,000,000	총 연 구 기 간	2016.09. ~ 2018.12. (2년 4개월)	
	정부출연 연구개발비	660,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	27
	기업부담금	220,000,000		내부인원	27
	연구기관부담 금			외부인원	0

○ 연구개발 목표 및 성과

- 농가현장 젓소·한우의 실시간 반추위 내 pH 데이터를 활용한 산중독증 예방 사양관리 체계 확립
- 산중독증 예방 미생물 균주 선발 및 현장 접목형 배양 조건 확립
- 국내 젓소·한우 농가현장의 산중독증 실태조사를 통한 산중독증 원인 구명
- 반추위내 lactic acid 이용성 높은 혐기미생물 및 lactic acid 분해 속도가 느린 전분분해 혐기미생물의 분리
- 분리 미생물의 특성구명 및 산중독증 예방효과 검증
- 개발 미생물 이용 산중독증 예방 첨가제 제품화
- 산중독증 예방 사료 첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축, 대량 생산 체계 확립 및 산업화 방안 구축
- 반추가축용 산중독증 예방 사양관리체계 구축

○ 연구내용 및 결과

- lactic acid 이용균과 전분분해균 lactic acid 저감에 의한 산중독증 예방효율 검증
- 현장에 맞는 저가형 배지 조성에 의한 경제성 증진
- 혐기성 미생물의 대량 배양 및 동결건조보존제와 부형제 혼합에 따른 안정성, 생존성 평가에 따른 최적의 조합(fructose, zeolite) 규명
- 미생물 첨가제 (LUB) 농도 *in vivo* 실험 결과 LPS(산중독증 증상으로 인한 endotoxin)의 농도에 정(positive)의 효과 규명
- 농가에서 사료첨가제의 단독 사용 용이하도록 타블릿 또는 분말제형(2종)의 시제품 생

#### 산 및 가공방법 구축

- 사료가공과정 또는 생산과정에서 원료사료와 높은 혼합도를 갖춘 입자도, 원료조성 조건 확립
- 산업용 생산설비 이용 대량생산 방법에 따른 발효특성, 대량생산 조건 조사
- 사료첨가제의 대량생산 체계 및 산업화 방안 구축
- 제품화에 따른 경제성 증진을 위한 60% sodium lactate 이용 배지 조성(98% sodium lactate 대체)
- 경제성 및 효율성 증진을 위한 사료첨가제 생산방안, 시제품 생산 및 산업화 구축
- 반추위 유래 미생물 첨가제의 산중독증 저감 효과 구명을 위한 흑염소 대상 *in vivo* 실험 초기 결과 LUB 첨가구에서 안정적인 반추위 발효특성 나타남

#### ○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 혐기미생물 분리·동정 및 특성 데이터베이스 이용 혐기미생물로부터 발현되는 효소 발현 유전자 조사 및 재조합 대장균으로부터 대량 생산 연구 및 제품화
- 부형제, 사료 저장 기간 등의 데이터베이스 활용 혐기성 미생물 제형화 및 상업적 보존 연구, 혐기성 미생물의 상업적 생산 기여
- 유익균 범위 내 반추위 유래 혐기미생물 생명자원 등록
- 개발 미생물 첨가제 상품화에 따른 매출 창출 기여
- 개발 미생물 첨가제의 경제적 이익 및 수출을 통한 국익의 증대
- 분리된 균주의 사료용미생물제제 상품화에 의한 국내 농가의 산중독증 질병 예방 증진
- 분리된 균주의 반추동물 산중독증 예방 사료첨가미생물제제로서의 이용
- 젖산 이용 또는 분해 혐기성 미생물의 분리, 동정 기술력을 바탕으로 추가적인 유용 미생물 자원 확보 기여

# 자체평가의견서

## 1. 과제현황

	과제번호			116086-3	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	수의 / 수의예방 / 동물질병관리			과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화			과제유형	응용
연구기관	(주)셀텍			연구책임자	문병헌
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 09. 05. ~ 2016. 12. 31.	15,000	30,000	45,000
	2차연도	2017. 01. 01. ~ 2017. 12. 31.	20,000	95,000	115,000
	3차연도	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31.	50,000	95,000	145,000
	계	2016. 09. 05. ~ 2018. 12. 31.	85,000	220,000	305,000

2. 평가일 : 2019. 02. 11.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)셀텍	대표	문병헌

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약 

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

- 반추위 유래 혐기미생물의 대량 생산기술의 확립과 생산시스템을 구축을 통하여 젓소 및 한우의 산중독증 저감을 위한 사료첨가제 제조기술을 개발하는 시도는 매우 독창적이며 사료첨가제 산업의 경쟁력 제고에도 도움이 될 것으로 판단됨.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

- 본 연구의 기술적 개발을 통하여 반추위 유래 유익균주에 대한 연구가 확산될 것으로 기대되며 사료첨가제 산업의 경쟁력 제고에 기여할 것으로 예상됨
- 반추위 유래 유익균주의 대량생산을 위한 최적 조건 및 생산 시스템 확립을 확립함으로써 관련산업에 대한 기술적 파급 효과가 예상됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 국내에서 산중독증 저감을 위하여 수입되는 중조의 수입대체 제품으로서 활용
- 국내 사료첨가제 산업의 경쟁력 제고 및 수출 육성제품으로서 활용
- 중조 급여를 대체함으로써 중조급여에 따른 반추 가축의 생리적 부작용으로 인하여 깔짚의 교체시기 단축 등, 발생하는 분뇨처리 비용을 감소시켜 농가의 비용절감

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

- 젓소, 한우의 산중독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 체계 및 산업화에 대한 데이터베이스를 이용하여 제 2협동에서 분리된 미생물의 대량생산에 따른 발효특성을 조사하였으며, 제 3협동에서 확립된 저장처리 방법을 이용한 대량생산 체계를 구축하였음
- 제 3협동에서 확립된 처리방법과 혐기성 미생물 동결건조 등 다양한 방법을 통한 개발 미생물 사료첨가제의 제품화에 성공하였으며, 대량 생산 체계 또한 구축하였음.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

- 연구개발성과의 정량적 목표는 대부분 성실히 수행되었으며, 개발 미생물 사료첨가제의 매출창출 증대 및 수출액 발생이 기대됨

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
젖소, 한우의 산중독증 예방 사료첨가제의 대량 생산 체계 및 산업화에 대한 조사	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산중독증 예방 사료첨가제의 종류별 생산방법에 관한 문헌조사</li> <li>○ 산업현장에서 적용되고 있는 사료첨가용 미생물 제제 및 혐기미생물의 대량생산 방법과 생산체계에 대하여 조사함</li> </ul>
혐기미생물의 사료첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상에 관한 조사	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미생물 제제의 저장처리 및 처리방법에 대하여 조사하고 평가함</li> <li>○ 혐기미생물의 생산 방법 및 저장성 향상을 위한 가공방법에 대하여 조사하고 반추위 정착성 향상을 한 방안을 검토함</li> </ul>
2협동에서 분리된 미생물의 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산업용 미생물 생산설비를 이용하여 대량생산 방법에 따른 혐기미생물의 발효특성을 조사함(단일배양 및 유가배양방법)</li> <li>○ 발효특성을 조사함으로서 대량배양에 따른 배양시간과 배지의 조성 및 농도 설정을 위한 조건을 규명함</li> </ul>
3협동에서 확립된 미생물 저장 처리 방법을 이용한 대량 생산 체계 구축 및 대량 생산에 따른 발효특성 조사	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대량생산에 따른 생산성에 미치는 혐기미생물의 특성을 조사함</li> <li>○ 대량배양, 균체분리 및 저장처리를 위한 동결건조와 제형의 제작 등 대량생산에 따른 생산체계의 구축을 완료함</li> </ul>

젖소, 한우의 산중독증 예방 사료 첨가제의 대량 생산 및 산업화	20	100	○ 혐기미생물을 보조사료의 부가적인 원료로서 활용하는 방안으로 2종류의 시제품을 생산하고 산업화를 달성함(제품등록을 완료함)
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 국내 젖소, 한우 및 육우의 반추위 내 lactic acid 이용 및 lactic acid 분비 속도가 느린 전분분해 미생물의 산업화 기술 확보, 산중독증 저감 미생물 사료첨가제의 대량 생산을 위한 최적 조건 및 혐기배양 대량 생산 시스템 확립 등 세부연구목표를 성실히 수행하였으며, 정량적 성과 또한 전반적으로 성실히 수행하였음

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 현재 개발된 혐기미생물로부터 pyruvate dehydrogenase 발현 유전자를 분리하고, 이를 대장균에서 발현시키는 방법으로 산중독증 예방용 사료첨가제의 대량생산 체계를 구축할 계획으로 추가 연구가 지속적으로 이루어져야 하며, 이에 따른 제품화, 매출 창출 등 경제적 측면에 대한 증대가 예상됨

○ 국내에서 산중독증 저감을 위해 수입되는 중조의 수입대체효과, 국내 사료첨가제 경쟁력 제고 및 수출 제품으로 육성, 산중독증의 예방을 위한 중조 급여에 따른 반추 가축의 생리적 부작용으로 깔짚의 교체시기 단축 등 분뇨처리 추가 비용 절감이 예상됨

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 젖소 및 한우의 산중독증 저감을 위한 사료첨가제로서 활용하며 중조의 수입대체 및 농가의 소모성 비용의 절감을 위한 방안으로 적극적으로 활용할 것임.

○ 반추위 유래 유익균에 대한 지속적인 연구와 적극적이고 활발한 산업화를 위하여 관련제도의 개선이 필요한 상황임.

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	116086-3		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	수의 / 수의예방 / 동물질병관리		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			협동	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화		과제유형	응용	
연구기관	중앙대학교		연구책임자	장 문 백	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 09. 05. ~ 2016. 12. 31.	55,000		55,000
	2차연도	2017. 01. 01. ~ 2017. 12. 31.	105,000		105,000
	3차연도	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31.	75,000		75,000
	계	2016. 09. 05. ~ 2018. 12. 31.	235,000		235,000

2. 평가일 : 2019 .02. 08.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
중앙대학교	교수	장문백

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문가관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약 [Red Seal]

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

- 반추동물에서 흔히 발생하는 대표적 대사성 질병인 산중독증은 급여된 사료, 사육환경 등에 따라 그 원인이 매우 다양하므로 정확한 원인을 찾기란 쉽지 않기 때문에 산중독증 질병은 예방이 중요함
- 산중독증 발병시 사료 섭취량이 낮아지거나 후지가 약해지는 증상을 보이며, 농가에서는 산중독증 발병시 도태시키는 실정으로 산중독증 예방 연구에 대한 중요성이 대두되었음
- Lactic acid는 VFA에 비해 10배 이상 산성이 강하여 산중독증의 주요 원인으로 알려져 있음
- Lactic acid 저감 혐기성 미생물 사료첨가제 개발에 따른 산중독증 효능 검정 결과 우수하였음

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

- Lactic acid 저감 혐기성 미생물 사료첨가제 개발에 따라 국내외 산중독증 발병을 저감에 따른 경제적 증대, 제품화에 따른 매출창출 및 수출 증대가 기대됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

- 반추위 내 삽입된 ebolus에 의해 축적된 pH 데이터베이스는 산중독증 원인 규명 및 예방을 위한 추가적인 연구에 활용될 수 있음.
- 개발 미생물 사료첨가제의 제품화에 따른 경제성 증대, 산중독증 발병을 감소에 따른 경제적 이익 증대 효과가 기대됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

- Lactic acid 저감 혐기성 미생물의 lactic acid 저감 효과를 검증하기 위하여 *in vitro* 시험을 진행하였으며, 산중독증 저감 효과를 확인하였음
- 해당 미생물 급여량에 따른 lactic acid 저감 효율을 검증하기 위한 *in vivo* 시험을 통하여 미생물 급여량 설정하였음
- 개발 미생물 사료첨가제 급여 *in vivo* 시험 결과 산중독증 저감 효율을 검정을 검정하였으며, 개발 미생물 사료첨가제 최적 급여량을 확립하였음

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

○ 연구개발 기간동안 정량적 성과 목표치에 대비하여 전반적으로 성실히 수행하였음

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
반추위 내 pH 및 온도 감지기 삽입에 의한 각 급여 사료 농장에 대한 산중독증 조사	20	100	○ 반추동물의 산중독증 실태 조사를 위해 pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)를 cannulae를 통하여 반추위 내에 삽입하였으며, 전분 함량 차이에 의한 산중독증 발병 영향을 규명하기 위하여 반추위 내 pH 변화 양상 확인하였음
반추동물의 pH 및 온도 감지기 데이터 확보 및 통계적 접근방법에 의한 상관관계 확인	20	100	○ 반추동물의 산중독증 실태 조사를 위해 삽입된 pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)를 이용하여 반추위 내 pH 데이터를 추적하였음
인위적 pH 조절을 통한 제2협동과제 개발 미생물 사료첨가제의 효능검정	30	100	○ 산중독증 유발 상태에서 미생물 사료첨가제의 효능을 검증하기 위하여 한우 암소 3두 대상으로 <i>in vivo</i> 시험 진행 간 비육후기 TMR 사료를 급여하였으며, 개발 미생물 사료첨가제의 산중독증 저감 효율을 검정 완료하였음
개발 미생물첨가제의 안정성, 효능 및 정착성 규명	30	100	○ 개발 미생물첨가제의 안정성 및 효능을 규명하기 위하여 <i>in vivo</i> 시험 후 pH, lactic acid, VFAs, MPS, NH <sub>3</sub> -N 함량 분석 실시함 ○ lactic acid, VFAs, MPS, NH <sub>3</sub> -N 함량 분석 결과 개발 미생물첨가제 급여에 따른 산중독증 예방 효능 및 안정성을 검정하였음
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 반추동물에서 흔히 발생하는 대표적 대사성 질병인 산중독증은 급여된 사료, 사육환경 등에 따라 그 원인이 매우 다양하며, 농가에서는 산중독증 발병시 도태시키는 실정으로 산중독증 예방 연구의 중요성이 대두되고 있는 실정임
- Lactic acid 저감 혐기성 미생물의 산중독증 예방 효과가 검증되었고, 개발 미생물 사료첨가제 급여에 따른 *in vivo* 시험 결과 산중독증 예방 효율이 검증되었음
- 개발 미생물 사료첨가제의 제품화에 따른 매출 창출, 농가의 경제적 증대, 국외 수출에 의한 경제성 증대가 기대됨

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 산중독증 개발 미생물에 대한 현장 실험에 의한 실증 데이터 확보
- 반추위 내 연속 pH 및 온도 측정 장치를 활용한 측정 데이터 확보 방법 확립
- 개발 산중독증 저감 미생물의 제품화를 위한 최적 조건 규명
- 한우를 이용한 개발 제품에 대한 효과 검증 및 개발 제품들에 대한 효과 검증
- 개발제품의 매출 증진 향상을 위한 마케팅 데이터 확보

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 반추위 내 삽입된 ebolus에 의해 축적된 pH 데이터베이스는 추후 산중독증 관련 추가적인 연구에 활용될 수 있음
- 개발 미생물 사료첨가제의 제품화에 따른 경제성 증대가 기대됨

## 자체평가의견서

### 1. 과제 현황

		과제번호	116086-3		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	수의 / 수의예방 / 동물질병관리		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			협동	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산증독증 저감 사양관리기술 산업화		과제유형	응용	
연구기관	한경대학교		연구책임자	김창현	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 09. 05. ~ 2016. 12. 31.	20,000,000		20,000,000
	2차연도	2017. 01. 01. ~ 2017. 12. 31.	80,000,000		80,000,000
	3차연도	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31.	80,000,000		80,000,000
	계	2016. 09. 05. ~ 2018. 12. 31.	180,000,000		180,000,000

2. 평가일 : 2019 .02. 08.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한경대학교	교수	김창현

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---------------------------------------------------------------------------------------

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

- 국내의 축산농가의 산중독증은 농후사료를 급하여 발생하는 대사성 질병임. 이 질병을 예방하기 위하여 미생물제제를 제품화를 목표로 연구를 진행하였으며, 연구를 통하여 반추위내 혐기성 박테리아를 분리하여 제품화를 진행되었으며, 연구개발에 대한 결과는 우수하였음

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

- 분리된 균주의 실험을 통하여 산중독증을 예방 할 수 있는 것으로 나타났으며, 이는 사료용미생물제제로 개발하여 상품화시 국내 농가의 산중독증 질병을 예방 할 수 있을 것으로 판단됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

- 반추위내에서 분리된 균주의 특성과 *in vitro* 실험결과 분리된 균주는 반추동물의 산중독증을 예방 할 수 있는 사료첨가미생물제제로서 이용 가치가 높을 것으로 판단됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

- 연구목표인 성과지표의 맞게 성실이 실험을 수행하였음. 성과지표에 의한 실험이 아닌 국내 비육우의 대사성 질병인 산중독증을 예방 할 수 있는 미생물제제를 보급할 수 있도록 성실히 연구과제에 임하였음

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

- 논문 및 국내·국외 학회에서 연구에 대한 학술발표를 진행하였으며, 학술발표의 우수포스터 수상하였으며, 연구과제에 대하여 충실히 이행하였음

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
공시 반추동물 및 혐기배양장치를 이용하여 산중독증 저감 목표 미생물 분리를 위한 enrichment 시스템 구축	5	100	○ 혐기성 박테리아 배지내에 반추위액의 첨가와 무첨가하고 2% sodium lactate를 첨가한 배지 조성하여 미생물 분리
반추위에서 lactic acid 이용성이 높은 혐기 미생물과 lactic acid 분비 속도가 느린 전분분해 미생물 분리	10	100	○ 한우 반추위내의 lactic acid 이용균과 lactic acid 분비 속도가 느린 전분분해 미생물 분리 하였음
분리된 미생물의 반추위 내 lactic acid 저감 능력 검증 및 선발(2종 이상 선발)	20	100	○ Lactic acid를 이용하는 2종, 전분을 이용하여 lactic acid 발생이 느린 2종의 균주를 분리하였으며, 총 4종의 미생물을 분리하였음
선발된 미생물의 동정 및 발효특성 조사	5	100	○ 분리된 4종의 미생물의 대하여 동정 및 발효특성을 확인 하였으며, 새로운 미생물로 확인하였음
선발된 미생물의 혼합 미생물제에 대한 반추위내 lactic acid 저감 능력 검증	15	100	○ 분리된 미생물을 <i>in vitro</i> 실험을 통하여 lactic acid 저감 효과 검증함
선발된 미생물의 대량생산을 위한 저가의 배양 배지 조건 탐색	25	100	○ 저가형 sodium lactate를 이용한 저가형 배지를 조성하였음
선발된 미생물의 동정, 안정성, 위해요소 및 발효특성 조사	20	100	○ 미생물 동정과 발효특성 조사하여 미생물 특성확인, 용혈성실험을 통하여 안정성 실험 확인함
합계	100%	100점	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 산중독증 예방을 위한 미생물제제 제품화 연구를 통하여 반추위 내 혐기성 박테리아 중 반추동물의 산중독증을 예방할 수 있는 사료첨가미생물제제로서 이용 가치가 높은 균주를 분리하여 제품화를 진행하였으며, 경제적 증대가 기대됨

## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 연구수행 기간동안 정량적 성과 목표를 충실히 달성하였으며, 성과지표 외에 국내 비육우의 산중독증 예방을 위한 미생물제제를 보급할 수 있도록 성실히 연구 수행함

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 연구수행 기간동안 발생된 데이터베이스 활용 반추동물의 대사성 질병을 예방할 수 있는 사료첨가미생물제제에 대한 추가적인 연구가 필요함
- 산중독증 예방 사료첨가미생물제제 개발에 따른 국내 반추동물 산중독증 발병율 감소 및 경제적 이익 증대

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	116086-3		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	수의 / 수의예방 / 동물질병관리		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			협동	
총관과제	기제하지 않음		총관책임자	기제하지 않음	
과제명	미생물학적 접근을 통한 국내 젖소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화		과제유형	응용	
연구기관	경북대학교		연구책임자	김 은 중	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 09. 05. ~ 2016. 12. 31.			
	2차연도	2017. 01. 01. ~ 2017. 12. 31.	80,000		80,000
	3차연도	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31.	80,000		80,000
	계	2016. 09. 05. ~ 2018. 12. 31.	160,000		160,000

2. 평가일 : 2019. 02. 08.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경북대학교	부교수	김은중

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	---------------------------------------------------------------------------------------

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

○ 본 연구 과제를 통하여 국내에서 사육되는 반추동물에서 분리, 동정된 혐기성 미생물은 새로운 균주로 등록이 가능한 균주여서 그 우수성이 입증되며 반추위 유래 미생물을 이용한 산중독증 저감 시도는 국내에서 아직 시도된 바 없는 창의적인 연구로 판단됨.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

○ 젖산을 이용 또는 분해하는 혐기성 미생물을 국내에서 사육하는 반추동물에서 분리, 동정 한바 이러한 기술력을 바탕으로 추가적인 유용한 미생물 자원의 확보에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

○ 본 연구 과제를 통하여 제형화된 미생물 첨가제는 산중독증(과산증)을 예방 또는 저감하기 위해 개발된 미생물로서 추가적인 연구를 통하여 그 실증적 효과가 입증될 경우 비육 말기 한우 및 전환기, 비유초기 착유우에 적용이 가능하고 따라서 농가에 경제적인 이익이 예상되며 우리나라와 유사한 사양관리 체계를 유지하는 국가에 수출을 통한 국익의 증대가 예상된다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 보통

○ 본 연구 과제를 성실하게 수행하기 위하여 노력하였으나 최종 보고서 제출 현재 동물실험이 완료되어 분석업무를 수행해야 하는 상황이며 따라서 목표에 달성하지 못하고 미진한 바를 인정함.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 보통

- 3년차 과제에 있어서 연구 논문의 게재 실적이 미진하지만 최종 보고서 제출 현재 1편은 투고 예정 중이고 과제 종료 후 특허와 논문 투고가 진행될 예정임. “특허를 신청한 후 논문을 발표해야 하므로 논문 투고는 종료 후 1년 이내 진행할 예정임”

[학술발표]

Marbun et al., 2018, Effect of feed additives on induced ruminal acidosis in vitro, Tabita Dameria Marbun, Proceedings of 2018 Annual Congress of KSAST Vol.(II), p.127

Marbun et al., 2018, Supplementing Lactic Acid-utilizing Bacteria Isolated from the Rumen May Improve Conditions of Ruminal Acidosis *In Vitro*, Tabita Dameria Marbun, The 18th Asian-Australasian Animal Production Congress, p.254

[인력양성]

강주희 석사학위 취득(2017년 2월 졸업 2017년 9월 30일까지 해당과제에서 연구원으로 근무)

권순모, 박진우, 김경진 학사학위 취득(2018년 2월 졸업)

소상훈 학사학위 취득(2019년 2월 졸업예정)

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 개발된 혐기미생물 사료 첨가제의 저장 조건에 따른 안정성 평가	30	100	○ 안정성 평가를 위해 사료첨가제, 동결보존제, 부형제의 최적조합(glucose, zeolite)을 규명하였음.
○ 개발된 혐기미생물 첨가제의 단독 사용 및 사료가공 중 첨가에 따른 안정성 및 효과 검증	40	80	○ <i>In vitro</i> 실험을 통해 미생물 첨가제 효과를 검증하였으며, 첨가 수준에 따라 효과가 다르게 나타남을 확인. ○ 사료가공 중 첨가에 따른 안정성 및 효과는 검증하지 못함
○ 중소 반추동물 모델을 이용하여 개발된 미생물 첨가제의 적용시험	30	100	○ 흑염소를 공시동물로 실험을 수행하였으며 본 과제에서 개발된 혐기성 미생물 첨가 시 반추위 발효에 긍정적인 효과를 나타내는 것으로 확인됨. 그러나 실험이 현재 진행 중이고(period 1 종료, period 2 진행 중) 실험 종료 후 완전한 결과를 얻을 수 있음. ○ 또한 첨가제 급여와 동시에 가축이 섭취하는 행동을 보이는 것으로 판단하여 기호성은 우수한 것으로 사료됨. 동물 실험은 2월 중으로 종료됨.
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- LUB의 제품화(안정성 및 저장성 평가)를 위한 동결보존제, 부형제의 조합을 규명하였으며, 본 첨가제를 이용한 *in vitro* 연구에서 기존에 사용하던 화학적 완충제 등과 비교하여 첨가제 효과 검증을 완료하였음.
- *In vitro*의 결과를 바탕으로 흑염소를 이용하여 비육말기 사육조건을 유지하고 (조:농 비율

= 1:9) 산중독증을 유발하여 개발, 제형화된 미생물 첨가제의 효과를 규명 중입니다. 일부 결과이지만 반추위 발효에 긍정적인 효과를 보이고 있음.

- 아직 그 효과가 완벽하게 밝혀지지는 않았으나 국내에서 사육되는 반추동물의 반추위에서 유래한 미생물을 분리, 동정하여 산중독증 저감에 필요한 효능을 검증하고 이를 대량 배양하는 배지를 개발하여 배양이 매우 어려운 혐기성 미생물의 대량 배양에 성공하였고 제형화 및 시제품 제작에 성공하였으며, 일부 실험이 여전히 진행되고 있고 논문 발표 등의 실적이 다소 부족하지만 2년 3개월의 수행연구 결과로 판단하건대 경쟁력이 있는 연구로 판단됨

## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 국내 최초 젖산 분해(이용) 혐기성 미생물의 분리, 동정 - 국내 사육 반추동물에서 분리
- 혐기성 미생물의 대량 배양 성공 - 혐기성 미생물의 대량 배양은 배지 및 발효 조건을 맞추기가 어려워 전 세계적으로도 성공이 쉽지 않음
- 대량 배양된 미생물의 동결건조, 부형제 혼합, 저장성의 구명 - 산업화, 농가 현장 판매, 수출에 대한 대책 마련
- 미생물 종의 발견으로 인한 국내 생물종 발견, 보존 - 특히 한우에서 분리, 동정된 미생물은 보고된 바 없음
- 주관기관인 (주)셀텍은 발효와 관련하여 축산/업계를 대표하는 중견기업으로 산중독증과 관련하여 국내뿐만 아니라 수출 증대로 수익 창출이 기대됨
- 중조, 산화마그네슘 등의 완충제 수입 대체 효과
- 화학적 완충제가 아닌, 생물학적 제제의 사용으로 환경친화적이고 지속가능한 효과 기대

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 젖소, 한우 농가의 현장 컨설턴트와 협력하여 LUB 첨가제의 현장 활용 홍보 및 확대필요
- 국내의 첨가제 생산을 통해 중조 및 첨가제 수입 비용 절감 효과 기대
- 미생물 제제 첨가제의 장기 급여에 따른 SARA 예방, 치료 효과를 검증하기 위한 추가 연구 필요
- 첨가제 첨가 결과 현장 활용 및 농가에 교육 확대
- 국내,외 학술지에 논문 투고

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	수의 / 수의예방 / 동물질병관리	
연구과제명	미생물학적 접근을 통한 국내 젓소·한우의 산중독증 저감 사양관리기술 산업화			
주관연구기관	(주)셀텍		주관연구책임자	문 병 헌
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	660,000,000	220,000,000		880,000,000
연구개발기간	2016. 09. 05. - 2018. 12. 31.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 반추위 내 pH 및 온도 감지기 삽입에 의한 각 급여 사료 농장에 대한 산중독증 조사	○ 반추동물의 산중독증 실태 조사를 위해 pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)를 cannulae 를 통하여 반추위 내에 삽입하였으며, 전분 함량 차이에 의한 산중독증 발병 영향을 규명하기 위하여 반추위 내 pH 변화 양상 확인하였음
② 반추동물의 pH 및 온도 감지기 데이터 확보 및 통계적 접근방법에 의한 상관관계 확인	○ 반추동물의 산중독증 실태 조사를 위해 삽입된 pH & TEMP SENSOR 장치(ebolus)를 이용하여 반추위 내 pH 데이터를 축적하였음
③ 인위적 pH 조절을 통한 제2협동과제 개발 미생물 사료첨가제의 효능검정	○ 산중독증 유발 상태에서 미생물 사료첨가제의 효능을 검증하기 위하여 한우 암소 3두 대상으로 <i>in vivo</i> 시험 진행 간 비육후기 TMR 사료를 급여하였으며, 개발 미생물 사료첨가제의 산중독증 저감 효율을 검정 완료하였음
④ 개발 미생물첨가제의 안정성, 효능 및 정착성 규명	○ 개발 미생물첨가제의 안정성 및 효능을 규명하기 위하여 <i>in vivo</i> 시험 후 pH, lactic acid, VFAs, MPS, NH <sub>3</sub> -N 함량 분석 실시함 ○ lactic acid, VFAs, MPS, NH <sub>3</sub> -N 함량 분석 결과 개발 미생물첨가제 급여에 따른 산중독증 예방 효능 및 안정성을 검정하였음

<p>⑤ 반추위내 lactic acid 이용성이 높은 또는 lactic acid 분해 속도가 느린 전분분해 혐기 미생물의 분리 및 산중독증 예방효과 검증 및 현장 접목형 배양 배지 조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ lactic acid 이용균과 전분분해균을 최종선발하여 <i>in vitro</i> 실험을 통하여 lactic acid를 저감 시키는 것으로 산중독증 예방효과가 있는 것으로 판단하였으며, 경제성이 있는 저가형 배지를 조성할 수 있는 배지를 완료하였으며, 현장 맞는 저가형 배지를 조성하였음</li> </ul>
<p>⑥ 산중독증 예방 사료 첨가제의 저장성, 반추위내 정착성 향상을 위한 delivery system 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대량 배양에 성공한 혐기성 미생물에 동결 건조보존제와 부형제를 혼합하여 저장온도, 저장기간에 따라 안정성 및 생존성을 평가하였으며, 최적의 조합(fructose, zeolite)을 규명함.</li> <li>○ 제형화된 미생물 첨가제를 이용한 <i>in vitro</i> 실험 결과, 무첨가구에 비해 반추위 pH가 유의하게 높게 나타났음(산중독증 저감 효과)</li> <li>○ 미생물 첨가제 (LUB) 농도를 다르게 설정하여 <i>in vivo</i> 동물 실험을 수행할 결과, LPS (산중독증 증상으로 인한 endotoxin)의 농도에 정(positive)의 효과를 보이는 것으로 나타남</li> </ul>
<p>⑦ 산중독증 예방 사료 첨가제의 단독 사용 및 사료가공과정에 이용 가능한 가공 방법 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농가에서 사료첨가제의 단독 사용이 용이도록 타블릿 또는 분말제형(2종)의 시제품을 생산하였고 가공방법을 구축함.</li> <li>○ 사료가공과정 또는 생산과정에서 원료사료와 높은 혼합도를 가질 수 있도록 입자도 및 원료조성 조건을 설정함</li> </ul>
<p>⑧ 반추 가축용 산중독증 예방 사료 첨가제의 대량 생산 체계 및 산업화 방안 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산업용 생산설비를 이용하여 대량생산 방법에 따른 발효특성을 조사하고, 대량생산 조건을 조사함</li> <li>○ 사료첨가제의 대량생산 체계를 구축하고 산업화 방안을 제안함</li> <li>○ 제품화를 위하여 배지를 조성하는 시약의 단가를 확인하여 고가의 98% sodium lactate를 대체 할 수 있는 식용용 60% sodium lactate로 대체 하여 경제성 있는 배지 조성을 하였음</li> </ul>
<p>⑨ 국내 젖소·한우의 산중독증 예방 사양관리 체계 및 개발 사료 첨가제의 산업화 방안 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효율적인 측면과 경제적인 측면을 고려하여 사료첨가제의 생산방안과 시제품 생산을 통한 산업화를 달성함.</li> </ul>

<p>⑩ 개발 반추 가축 사료 및 사료첨가제의 반추위 내 미생물 발효특성 검증 및 <i>in vivo</i> 시험을 통한 현장애로 해결 방안 구축</p>	<p>○ 본 과제를 통하여 개발, 제형화된, 반추위 유래 미생물 첨가제의 산중독증 저감 효과를 구명하기 위해서 흑염소 4두를 공시동물로 이용하여 조:농 비율 1:9의 실험사료를 급여, 산중독증을 야기하고 첨가제의 효과를 조사하는 <i>in vivo</i> 실험을 진행 중이며 2019년 2월 현재 Period 2가 진행 중임</p> <p>○ 초기 분석 결과에 의하면(Period 1 결과), 90% 이상 농후사료 다급 시, 대조구보다 LUB를 첨가하는 실험구에서 더 안정적인 반추위 발효특성을 보이는 것으로 나타남</p>
---------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과				교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	2	4	2		2					2	4		5		3				
연7간내 달성실적	1	2	4	2	3	2	1.5					1		6		6				
달성율(%)																				

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	반추위 유래 혐기미생물의 대량생산 및 사료첨가제 제조기술
②	가축의 체내 체류형 감지장치 및 이를 이용한 사료 공급시스템
③	우수한 Lactic acid 이용균 <i>Pseudoramibacter boviskoreani</i> K12 확보
④	우수한 Lactic acid 이용균 <i>Pseudoramibacter boviskoreani</i> K3(KCTC 13641BP) 확보
⑤	반추동물 유래 혐기성 미생물의 저장 및 부형제 혼합 기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v					v			
②의 기술						v				
③의 기술		v								
④의 기술		v				v				
⑤의 기술										

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사업화는 본 과제가 종료된 후의 2년을 포함하여 총 4년간 단계 별로 진행될 예정이다. 연구개발 1년차와 2년차는 혐기미생물의 분리 동정 및 특성을 조사하였고 3년차는 혐기미생물의 대량생산을 위한 생산방법 및 저장처리에 등 산업화를 위한 대량생산 체계의 구축을 완료하였으며, 시판용 제품개발이 완료되었다. 과제 종료 1년차는 혐기미생물로부터 효소 발현 유전자를 조사하여 재조합 대장균으로부터 대량의 효소를 생산하는 기술 개발을 추진할 예정이다.</li> <li>○ 단계별로 산업화를 체계적으로 진행하며, 완성된 제품은 즉시 사업화하여 경제성을 증대시킬 예정이다. 국내에서의 제품 판매는 젓소 및 한우의 산중독 예방을 위한 차별화된 제품임을 부각시켜 제품의 신뢰도를 확보하는 것이 중요하다. 해외수출은 현재 구축된 해외 기반의 수요국을 중심으로 추진 후 점진적으로 국가를 확대해나갈 예정이다.</li> <li>○ 본 과제를 통해서 개발된 산 중독증 예방 사료첨가제를 통해 젓소의 경제수명을 연장하고 젓소 및 한우의 사료효율 향상 및 생산성이 높아질 것으로 기대된다. 또한 중소 등 산 중독증예방을 위한 화학제의 수입을 대체하는 효과가 있을 뿐만 아니라 깔짚의 교체시기가 줄어들어 실질적으로 농가의 소모성 비용의 감소가 기대된다.</li> </ul>
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반추가축의 위내에서 pH, 온도, 심박수, 걸음수를 측정할 수 있어서 가축의 상태를 실시간 모니터링 할 수 있으며, 무선으로 충전과 데이터 송신이 가능하여 가축의 상태를 실시간으로 확인 가능하여 가축사육 및 산중독증 예방에 효과가 높을 것으로 판단됨</li> </ul>
③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반추위 내에서 분리된 lactic acid 이용균으로 추후 산중독증을 예방을 할 수 있는 미생물제제로써 기대효과가 큰 박테리아로 확인됨</li> </ul>
④의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반추위 내에서 분리된 lactic acid 이용균으로 추후 산중독증을 예방을 할 수 있는 미생물제제로써 기대효과가 큰 박테리아로 특허등록으로 확보</li> </ul>
⑤의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 가축용 혐기성 미생물의 대량 생산, 보존 및 타 혐기성 균주에 적용</li> <li>○ 기대효과: 반추동물의 산중독증 저감, 농가수익 증대, 수입대체 효과</li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	2	2	4	2		2					2	4		5		3			
연구기간내 달성실적	1	2	4	2	3	2	1.5					1		6		6		1	
연구종료후 성과창출 계획												2							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	산중독증 예방 미생물의 배양 조건 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	2,000 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타( 대량생산을 위한 미생물 배양 조건에 대한 기술이전 )		
이전소요기간	1주일	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	미생물 배양 조건에 따른 배양 기술에 관하여 기술지도, 미생물 배양이 가능한 대용량 배양기 사용		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	반추동물용 혐기성 미생물의 부형제 혼합에 관한 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	3,000 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( 대량생산을 위한 미생물 배양 조건에 대한 기술이전 )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	연구기간 내
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당 사항 없음		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리

통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)