

발간등록번호

11-1543000-001234-01

**친환경 기능성 사료첨가제 개발을 통한 웰빙 원료육의
생산 및 산업화**

(Production and industrialization of well-being source meat
through development of environment-friendly functional
feed additives)

서울대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “친환경 기능성 사료첨가제 개발을 통한 웰빙 원료육의 생산 및 산업화” 과제
의 보고서로 제출합니다.

2016년 1월 17일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 최 윤 재 교수

세부연구책임자 : 강 상 기 교수

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 이 홍 구 교수

요 약 문

I. 제 목

친환경 기능성 사료첨가제 개발을 통한 웰빙 원료육의 생산 및 산업화

II. 연구성과 목표 대비 실적

본 과제의 연구성과 목표는 특허출원 3건, 특허등록 1건, SCI급 논문 2편, 기술거래 3건, 교육지도 3명, 사업화 6건, 홍보전시 2건이다. 이에 대하여 특허 4건을 출원하였고 SCI급 논문 2편을 게재하였다. 본 과제를 통해 개발된 4건의 기술을 참여기업에 이전하였으며 6건의 교육지도를 실시하였고 5명의 석박사급 인력을 본 과제를 통하여 배출하였다. 또한 이미 시중에 판매 중인 “오메가 밸런스 달걀”[㈜삼립식품, 2014년 11월]과 피톤치드 함유 사료첨가제 (무력무력) 및 시제품 제작을 포함하여 6건의 상품화를 진행하였고 방송, 신문 등의 매체를 통해 29건의 홍보전시를 진행하였다. 이 외에도 비SCI급 논문 1편 게재, 학술발표 8건 등의 추가 성과를 거두었다.

III. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제의 연구개발 최종목표는 “선행 생명산업기술산업화지원사업 (바이오사료첨가제 사업단) 연구과제 결과에 기반한 후속 산업화 추진”으로 복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산물부산물물을 이용한 친환경 기능성 사료첨가제 및 오메가 지방산 균형사료 개발과 이를 이용한 웰빙 원료육과 가공육제품의 생산 및 산업화를 목표로 한다.

세부 연구 목표로는 1) **선행 3개년** 연구개발사업 (바이오사료첨가제 사업단) 도출 결과에 대한 **후속 2개년** 과제를 통한 전략적 산업화, 2) 축종 맞춤형 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 최적 생산체계 개발, 3) 생리활성 화합물의 원료육 내 전이율 증진을 위한 사료첨가제 최적 생산체계 개발, 4) 기능성 농림수산물부산물물을 활용한 사료첨가제 최적 생산체계 개발, 5) 복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산물부산물물을 기반으로 하는 친환경 기능성 사료첨가제 최적 조성비 확립, 6) 친환경 기능성 사료첨가제 및 오메가 지방산 균형사료를 이용한 웰빙 원료육과 비선호 부분육을 활용한 가공 육제품의 생산 및 산업화, 7) 비선호 부분육을 활용한 기능성 가공육제품 생산을 통한 축산물 자급률 제고 및 축산농가의 소득 향상이 있다.

현재 세계 사료첨가제 시장 및 생균제 시장의 규모는 지속적으로 성장하고 있으며, 국내에서도 사료첨가용 항생제의 규제에 의한 생균제가 각광받고 있다. 하지만 효과와 기능성이 명확히 밝혀진 신뢰성 높은 생균제는 부족한 실정이다. 이에 효과와 기능이 명확히 규명된, 축종에 적합한 항생제 대체 미생물 생균제 개발을 통한 축산경쟁력 재고가 필요하다. 따라서 본 과제에서는 항생제 대체 복합 미생물 생균제를 개발하고 이를 이용하여 친환경 축산물의 생산을 도

모하고자 한다.

또한, 세계적인 웰빙 트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 기능성 식품 시장이 지속적인 성장세를 보이고 있으며, 소비자들도 영양과 맛뿐만 아니라 건강에 도움이 되며 안전한 축산식품에 대한 수요가 증가하고 있다. 이에 따라 고기능성 축산식품의 생산이 절실하게 필요한 상황이다. 더불어, 우육 및 돈육의 정육 중, 비선호 부위의 비율은 각각 31.5%, 42.4%를 차지하고 있으며 구이용 부위를 선호하는 국내 소비자들의 성향으로 인한 수급 불균형은 축산물의 자급률을 낮추는 원인이 되고 있다. 따라서 본 과제에서는 기능성 사료첨가제를 개발하여 선호부위 원료육 뿐만 아니라 비선호 부위를 이용하여 다양한 기능성 가공 육제품을 개발하고자 한다.

농림수산부산물이란 농업, 수산업, 축산업의 생산물 중 실제 이용한 생산물 외의 나머지 것을 의미하는 것으로, 연간 수천 톤의 농림수산부산물이 발생하며 이것을 활용하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 여기에 더불어 항생제를 대체할 수 있는 천연물질을 탐색하는 연구가 함께 진행되고 있다. 따라서 본 과제에서는 환경오염을 야기하는 농림수산부산물에 함유되어 있는 천연물질을 이용하여 항생제를 대체할 수 있는 연구를 진행하고 산업화를 통하여 환경문제와 친환경 축산물 생산을 도모하고자 한다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

본 과제는 3개의 세부과제로 구성되어 있다. 제1세부과제 (서울대학교 농생명공학부)에서는 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 최적 생산체계 개발을, 제2세부과제 (서울대학교 그린바이오과학기술연구원)에서는 기능성 생리활성 물질의 전달효율을 높인 기능성 첨가제 개발을, 제1협동과제 (건국대학교 동물자원과학과)에서는 생리활성 성분 함유 농림수산부산물을 활용한 친환경-웰빙 사료첨가제 개발을 통해 친환경 기능성 축산물 생산과 이를 이용한 가공육제품 개발을 목표로 한다. 또한, 본 과제는 연구개발 수행기관인 대학과 참여기업들 [(주)삼립식품, (주)팜스토리, (주)기장물산, (주)피러스, (주)대덕바이오, (주)푸른들이엠사료]과의 유기적 역할분담 및 협력체계를 구축하여 과제를 통해 발생한 연구 성과가 산업화로 이어지도록 구성되었다.

각 세부과제별 연구내용은 다음과 같다. 제1세부과제에서는 선행 연구 과제를 통해 확보된 축종별 병원균 방어에 특화된 유산균과 효모, 바실러스 등을 이용한 복합 미생물 생균제의 최적 조성 확립, 소화장관 전달효율을 높이는 제형과 대량생산체계 확립을 연구한다. 제2세부과제에서는 다양한 후보 생리활성 화합물에 대해 고분자 전달체를 활용하여 원료육 내 전이율을 높일 수 있는 사료첨가제 최적 생산체계 개발을 연구한다. 제1협동과제에서는 선행 연구과제로 효과가 검증된 기능성 농림수산부산물을 활용하여 축종 맞춤형 기능성 사료첨가제의 개발 연구 및 농가 실증 실험을 통한 기능성 축산물 생산 효과 검증 및 제품화를 연구한다.

연차별로 보면 1차년도에 항생제 대체 복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산부산물을 활용하여 친환경 기능성 사료첨가제의 최적 생산체계를 개발하고 최적 조성비를 확립하는 연구를 진행하였다. 이를 기반으로 2차년도에는 친환경 기능성 사료첨가제를 개발하고 오메가 지방산 함량이 균형을 이루고 기능성이 강화된 웰빙 원료육을 생산하고 가공육제품을 산업화하는 연구를 수행하였다.

V. 연구개발결과

본 과제는 선행 “바이오사료첨가제 사업단”의 연구 성과를 적극 활용하여 연구를 진행하였다.

제1세부과제에서는 유산균, 효모, 바실러스가 포함된 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 조성 및 산업적으로 이용 가능한 생산 방식을 최적화하였다. 이에 따른 내용으로 유산균은 *Pediococcus acidilactici* GS1과 *Lactobacillus plantarum* GS1, 효모는 *Saccharomyces boulardii* 796, 바실러스는 *Bacillus licheniformis* T2와 *Bacillus thuringiensis* T3가 선정되었으며, 각각의 균주에 맞는 최적 배지와 건조 방법, 건조 시 최적부형제 등을 선정하고 복합 미생물 생균제 시제품을 생산하여 동물실험을 수행하였다.

또한 생균제의 경구 투여를 통한 소화장관 전달 효율을 높이고자 HPMCP를 이용한 타블렛을 제조하여 그 특성을 검정하였다. HPMCP 타블렛에 담지된 생균제는 *in vitro*에서 위장과 소장 환경에서 높은 생존율을 나타냈다. 또한 장기간 저장 시, 저장성도 높아지는 것을 확인하였다. 육계에서의 *in vivo* 시험을 통해, 타블렛 제형의 소화장관 내 보호 효과와 전달 효율을 확인하였다.

제2세부과제에서는 기능성 사료첨가제의 후보물질을 선정하고 그 특성을 검정하였다. 기능성 사료첨가제 후보물질로서 오메가지방산 균형을 위한 아마종실, 비타민 E, 베타인, CLA를 선정하였으며 ALA와 베타인이 근육 성장에 미치는 효과를 *in vitro*에서 검정함으로써 ALA와 베타인을 동시에 처리하였을 때, 근육 성장과 분화에 시너지 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

기능성이 강화된 계란 생산 시, 비타민 E의 전달 효율을 증진시키기 위하여 베타-사이클로덱스트린을 담지체로 하고 Span 80과 Tween 80 혼합 유화제를 사용하여 기능성 첨가제를 만들고 아마종실과 혼합 급여한 산란계 사양시험을 진행하였다. 그 결과 난황 내 알파-토코페롤의 함량은 알파-토코페롤 급여에 따라 증가하였고 콜레스테롤 수치에는 영향이 없었다. 또한 난황 내 ω -3 지방산의 증가로 인해 ω -3: ω -6 비율이 이상적인 1:4 수준으로 개선되는 것을 확인하였다.

제1,2세부과제에서 개발한 친환경 기능성 사료첨가제의 효과를 비육돈 사양시험을 통하여 검정한 결과 돈육 및 가공육에서 오메가 지방산 ω -3: ω -6의 비율이 1:4 이하 수준으로 개선되는 것을 확인할 수 있었으며, 베타인도 처리그룹에서 유의적으로 돈육 및 가공육 내 함량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. CLA 또한 돈육 내 이행이 잘 되었다. 그리고 복합 미생물 생균제 급여는 장내 유익균을 증가시키고 병원균을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 친환경 기능성 돈육 생산 시, 기능성 물질로는 오메가 지방산, 베타인, CLA를 선택할 수 있다.

제1협동과제에서는 축종 맞춤형 기능성 농림부산물 사료첨가제를 개발하고자 부산물 후보를 선정하고 그 효과를 검정하였다. 생리활성 성분을 함유한 농림수산물 부산물 후보로 잣 구과, 미역줄기, 폐마늘을 선정하였고, 각각 추출한 원액 단독 혹은 혼합한 복합제제가 우수한 항균 활성, 항산화능, 항염증 효과 등을 보였다.

더불어 안정적인 가축사료화와 기능성 평가를 목적으로, 비반추동물 (산란계, 돈육)과 반추동물 (홀스타인 젖소)을 이용해 농림수산물 부산물 추출액을 사료로 급여하는 동물실험을 진행

하였다. 농림수산물 부산물 각 추출액의 사료화를 위한 안전성을 확인하였으며, 비반추동물에서는 부산물 추출액의 단독급여가, 반추동물에서는 부산물 각 추출액의 1:1:1 혼합급여가 생산성 증진 및 면역능력 향상을 가져와 산업화의 가능성을 확인하였다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제를 통해 개발된 복합 미생물 생균제의 경우, 사료첨가용 항생제의 사용 금지와 친환경 축산물을 원하는 소비자들의 요구에 맞춰 친환경 가축 사양에 활용할 수 있어 친환경 기능성 육제품 생산 시, 기본 첨가제로 출시가 가능할 것이다. 특히 본 과제를 통해 출원된 특허인 “경구 투여용 가축 생균제의 효율 증진을 위한 타블렛 제조기술”을 활용하여 보다 전달 효율이 증진된 제형의 생균제 상용화에 적용을 검토하고 있다.

본 과제를 통해 출원된 특허인 “알파-토코페롤 및 베타-사이클로텍스트린 포접체와 아마유 또는 아마종실을 포함하는 사료첨가제 조성물”과 노하우 “오메가 지방산 균형 계란생산 기술”을 함께 참여기업인 (주)삼립식품에 기술이전 하였고 이를 통하여 “오메가 밸런스 달걀” 제품을 출시하여 시중에서 유통되고 있다. 또한, 본 과제를 통해 출원된 특허인 “오메가 지방산의 균형과 베타인이 강화된 기능성 돈육 및 가공육 생산과 그 생산방법”을 이용하여 기업체에 기술이전 함으로써 베타인 강화 오메가 밸런스 돈육 제품 및 가공육 제품 (햄 및 소시지)의 생산이 가능할 것으로 보인다. 이를 통해 돈육 비선호부위의 소비 진작을 일으킬 수 있을 것으로 기대된다.

본 과제를 통해 개발된 노하우 “잣나무 부산물 추출액을 이용한 피톤치드 오일 함유 산란계용 사료첨가제”와 노하우 “젓소용 저스트레스 기능성지방산 우유 생산을 위한 피톤치드 첨가제”는 기술이전 되었고 이를 통하여 신규 산란계용 사료첨가제 제품이 개발되었으며 추가적인 상품화 및 농림수산물 부산물로 발생하는 사회적비용의 감소가 기대된다.

SUMMARY

I. Title

Production and industrialization of well-being source meat through development of environment-friendly functional feed additives

II. Research performance

The index for research performance evaluation was three applications and one registration of patent, two SCI research papers, three technology transfer deals, education of three graduate students, six cases of industrialization and two cases of promotion. In this project, we applied for four patents and published two SCI-level papers. In addition, we contracted four technology transfer agreements and five graduate students got their degrees. We produced six farm products and promoted through the media including broadcasting and newspaper for 29 times. And one non-SCI paper and 8 meeting presentations were performed.

III. The purpose and need of R & D

The final goal of this research is to proceed further development phase following the previous 3 year project "Bio-Feed Additives Research Center (BFARC)". We mainly focused on developing environment-friendly functional feed additives and omega fatty acid-balanced feed using multi-species probiotics, bio-active compounds and functional agricultural and marine by-products to produce and industrialize well-being source meat and processed meat.

The detailed research goals are: 1) Industrialization of the results of previous BFARC project, 2) Optimization of production system of multi-species probiotics as an alternatives of antibiotics, 3) Development of feed additives to increase transfer rate of bio-active compounds to source meat, 4) Development of feed additives using functional agricultural and marine by-products, 5) Establishment of optimal composition ratio of environment-friendly functional feed additives containing multi-species probiotics, bio-active compounds and agricultural and marine by-products, 6) Production and industrialization of processed meat products using non-preferred meat part and fat, and 7) An increase of domestic meat sales and income of livestock farms through increased consumption of non-preferred meat part.

Nowadays, worldwide feed additives and probiotics market have been continuously growing. In addition, probiotics have drawn attention in South Korea due to the strict regulation of antibiotics as a growth promotor. However, probiotics that clearly proven its

effect and function are rare. We developed multi-species probiotics as an alternatives of antibiotics and for environment-friendly livestock production.

Furthermore, functional food market has been increasingly growing because of the global spread of well-being trend and the influence of aging society. There has been increasing demand for safe livestock products that not only have taste and nutrition, but improve consumer's health. Additionally, high rate of non-preferred retail cut lower the self-sufficiency ratio of domestic livestock products. Therefore, our group is trying to produce environment-friendly and functional livestock products and their processed products using preferred and non-preferred parts.

In addition, there has been various research to utilize agricultural and marine by-products, along with the research investigating natural materials as alternatives of antibiotics. To solve the environment problems and produce environment-friendly livestock products, our team developed antibiotics alternatives using the natural substance in agricultural and marine by-products.

IV. Contents of research

This project consists of three sub-projects. (1) Sub-project 1: Commercialization and production of environment-friendly livestock products using multi-species probiotics as an alternatives of antibiotics, (2) Sub-project 2: Commercialization and production of functional livestock products using bio-active compound-containing feed additives, and (3) Cooperative project 1: Development of environment-friendly and well-being feed additives using agricultural and marine by-products.

This project was organized to facilitate the technology transfer and successful commercial production through cooperation between university and involved companies.

The followings are contents of each project. Project I: Establishment of optimal composition of multi-species probiotics, including lactic acid bacteria (LAB), yeast and *Bacillus* that specialized to defense against pathogen; Establishment of large-scale production system and formulations that enhance delivery efficiency across the gastrointestinal tract, Project II: Development of feed additives that increase transfer rate of bio-active compounds in source meat, using polymeric carrier, and Cooperative project I: Development of functional feed additives using agricultural and marine by-products that was confirmed those effects through the previous project.

V. Results

Project I, multi-species probiotics team: The main goal of this team is 1) to develop the optimal composition of multi-species probiotics including LAB, yeast and *Bacillus* as antibiotic alternatives and 2) to optimize the industrial production process. For this goal, two strains (*Pediococcus acidilactici* GS1, *Lactobacillus plantarum* GS1), *Saccharomyces*

boulardii 796 and two strains (*Bacillus licheniformis* T2, *Bacillus thuringiensis* T3) were selected from the LAB, yeast and *Bacillus*, respectively. And species-specific medium (*P. acidilactici* - MRS/ *L. plantarum* - CM/ Yeast - YSM1/ *Bacillus* - BSM3-1), drying method (LAB - freeze drying/ Yeast and *Bacillus* - hot spray drying) and excipient (LAB - skim milk 98% + MSG 2%/ Yeast - rice bran / *Bacillus* - zeolite) were established and through this method, we have finally produced multi-species probiotic samples.

Probiotics were encapsulated into HPMCP in the form of tablet to increase the delivery of probiotics to the gastrointestinal tract when administered by oral route. Encapsulated model probiotics was well-protected from *in vitro* stomach and showed high survival rate from *in vitro* intestine conditions. Also, the stability of the encapsulated formulation were improved during prolonged storage. The same results were observed in *in vivo* feeding experiment tested on chicken.

In Project II, bio-active compound-containing feed additives team: In this project, selection of candidates for functional feed additives and its characterization was conducted. Multi-species probiotics, flaxseed, vitamin E, betaine and CLA were listed as candidates for functional feed additives. It is expected that many advantages, such as improvement of immunity and productivity of livestock, achievement of ideal proportion of ω -3/ ω -6 fatty acids, synergistic effect on livestock productivity and acquisition of new functionality, can be achieved by feeding livestock. In this regard, the study was carried out to investigate the effect of ALA and betaine on myoblast proliferation and differentiation *in vitro*. As a result, it is confirmed that there is a synergistic effect of ALA and betaine on muscle development and muscle differentiation when treated together *in vitro*.

To produce functional eggs by supplementing laying hens with functional feed additives, α -tocopherol, a subtype of vitamin E, was encapsulated into β -cyclodextrin carrier for better delivery efficiency. And surfactant mixture system (two distinct types of surfactant, Span 80 and Tween 80) was used to enhance solubility and control the release rate of the loaded materials. Then feeding experiment with laying hens was conducted to determine whether encapsulated α -tocopherol can enhance accumulation of α -tocopherol in egg yolks. As a result, supplementation of encapsulated α -tocopherol enhanced content of α -tocopherol in the yolks and there was no significant influence on yolk cholesterol level. It was confirmed that ω -3: ω -6 fatty acids ratio was improved at an ideal ratio of 1:4 due to the elevated content of ω -3 fatty acids in egg yolks.

Effect of feeding of the environment-friendly functional feed additives developed by Project I & II on performance and characteristics of finishing pigs was investigated. Such feeding exhibited improved omega fatty acids ω -3: ω -6 balance less than a ratio of 1:4 and significantly increased the content of betaine in pork and processed pork products. Also, it was proved that an increase in the number of intestinal beneficial bacteria and the inhibition effect on the growth of pathogenic bacteria were observed in multi-species probiotics-fed pig groups.

Cooperative Project I : Development of animal-specific functional agricultural and marine by-products as the feed additives. In this project, selection of candidates for functional feed additives from agricultural and marine by-products and its evaluation was conducted. Phytoncide, seaweed midrib, wasted garlic were selected for functional feed additives candidates containing bio-active compounds and an each extract or the mixture of extracts showed excellent antibacterial activity against various pathogenic bacteria, radical scavenging activity and anti-inflammation effect.

Furthermore, animal trial in non-ruminant (laying hens, pigs) and ruminant (Holstein dairy cows) animals was conducted in order to evaluate the effectiveness of these feed additives on functionality and the safety of by-products as feed additives. By identifying that these by-products did not affect the livestock performance and animal metabolism, single or mixed feeding of by-products improves the livestock productivity and immune responses, convincing of the potential of industrialization. Besides, it was identified that feeding of agricultural and marine by-products enhanced the content of CLA and ω -3 fatty acids in egg and ALA and ω -3 fatty acids in milk from dairy cow, resulting in balanced ω -3/ ω -6 fatty acids ratio.

VI. Further Prospect

Multi-species probiotics developed in this study will be used as antibiotic alternatives to meet the customer's needs for the environment-friendly livestock products. Especially, the patent-pending technology of probiotics coating formula for better protection & delivery efficiency will be applied for the production of new probiotics.

Moreover, the patents and the know-how for the production of functional egg were transferred to the involved company and they have launched functional egg products in the market. Also, it is expected to produce betaine-enriched omega fatty acid-balanced pork and processed products by transferring the patent to a company. Consequently, it is anticipated to stimulate the consumption of non-preferred retail cut of porks.

Other knowhow developed in this project were transferred to a company and new feed additives product for laying hens was launched in the market. We anticipate the more commercialization and the reduction of the agricultural and marine by-product disposal costs.

CONTENTS

Summary	2
1. Summary of Research	12
2. Present State of Technologies at Home and Abroad	25
3. Research Contents and Results	32
1) Project I	33
2) Project II	48
3) Evaluation of Effect of Environment-friendly functional feed additives through animal trials	65
4) Cooperative Project I	85
4. Degree of Accomplishment in Research and Contribution to Related Fields	128
5. Achievements of Research and Further Prospect	130
6. Information of Related Technologies Abroad	138
7. Current Research Facilities and Equipments	146
8. Results of Laboratory Safety Management	148
9. Reference	152
<Attachment> Patent, Paper and Market Analysis Report	158

목 차

요약문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	32
제1절 제1세부과제	33
제2절 제2세부과제	48
제3절 제1,2세부과제 공동 사양시험	65
제4절 제1협동과제	85
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	128
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	130
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	138
제 7 장 연구시설·장비 현황	146
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	148
제 9 장 참고문헌	152
<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서	158

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제1절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발의 목표

가. 연구 최종 목표

“선행 생명산업기술산업화지원사업 (바이오사료첨가제 사업단) 연구과제
결과에 기반한 후속 산업화 추진”

복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산물부산물을 이용한 친환경 기능성 사료첨가제 및 오메가 지방산 균형사료 개발과 이를 이용한 웰빙 원료육과 가공육제품의 생산 및 산업화

나. 세부 연구 목표

- 선행 3개년 연구개발사업 (바이오사료첨가제 사업단) 도출 결과에 대한 후속 2개년 과제를 통한 전략적 산업화
- 축종 맞춤형 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 최적 생산체계 개발
- 생리활성 화합물의 원료육 내 전이율 증진을 위한 사료첨가제 최적 생산체계 개발
- 기능성 농림수산물부산물을 활용한 사료첨가제 최적 생산체계 개발
- 복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산물부산물을 기반으로 하는 친환경 기능성 사료첨가제 최적 조성비 확립
- 친환경 기능성 사료첨가제 및 오메가 지방산 균형사료를 이용한 웰빙 원료육과 비선호 부분육을 활용한 가공 육제품의 생산 및 산업화
- 비선호 부분육을 활용한 기능성 가공육제품 생산을 통한 축산물 자급률 제고 및 축산농가의 소득 향상
- 과제 평가위원의 의견을 수용하여 돈육 원료육과 가공육제품 외의 축산물 (우유, 계란)에 대한 연구까지 범위를 확장하여 제1협동과제에서 관련 연구 진행

2. 연구개발의 범위

가. 세부과제별 연구내용

- (1) 제1세부 과제: 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 최적 생산체계 개발을 통한 제품화 및 브랜드 친환경 축산물 생산

■ **수행기관 (기관유형) :** 서울대학교 농생명공학부 (대학)

■ **주요연구내용 :** 선행 바이오사료첨가제 사업단 연구 과제를 통해 확보된 축종별 병원균 방어에 특화된 유산균주와 효모, 바실러스 등을 이용한 복합 미생물 생균제의 최적 조성 확립, 소화장관 전달효율을 높이는 제형과 대량생산체계 확립

(2) 제2세부 과제: 생리활성 화합물 활용 사료첨가제의 최적 생산체계 개발을 통한 제품화 및 브랜드 기능성 축산물 생산

■ **수행기관 (기관유형) :** 서울대학교 그린바이오과학기술연구원 (대학)

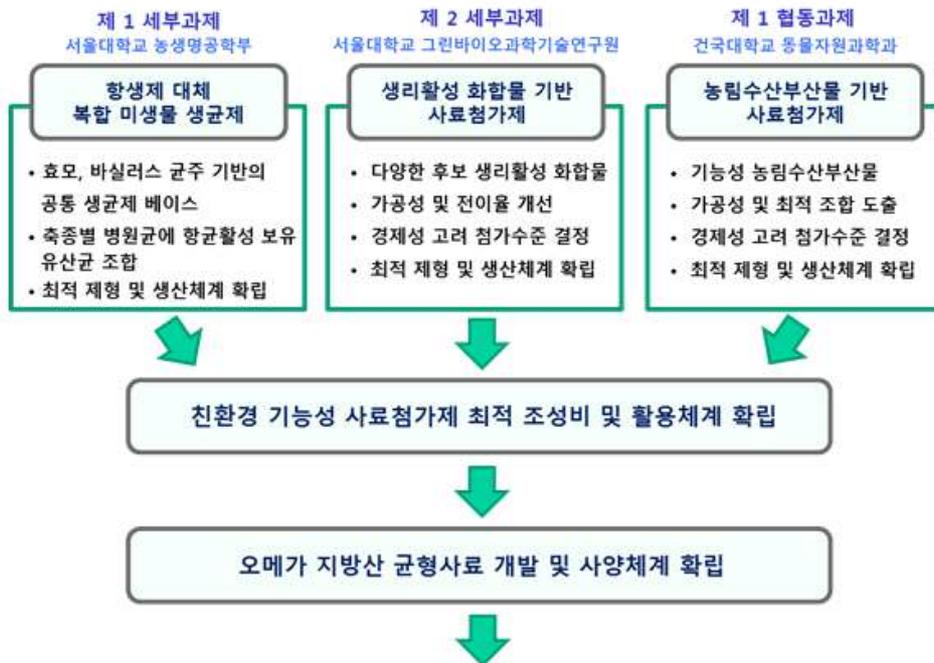
■ **주요연구내용 :** 다양한 후보 생리활성 화합물에 대해 선행 바이오사료첨가제 사업단 연구 과제를 통해 효율이 검증된 고분자 전달체를 활용하여 원료육 내 전이율을 높일 수 있는 사료첨가제 최적 생산체계 개발

(3) 제1협동 과제: 생리활성 성분 함유 농림수산물부산물을 활용한 친환경-웰빙 사료첨가제 개발 및 브랜드 기능성 축산물 생산

■ **수행기관 (기관유형) :** 건국대학교 동물자원과학과 (대학)

■ **주요연구내용 :** 선행 바이오사료첨가제 사업단 연구 과제로 효과가 검증된 기능성 농림수산물부산물의 활용을 통한 축종 맞춤형 기능성 사료첨가제의 개발 연구 및 농가 실증 실험을 통한 기능성 축산물 생산 효과 검증 및 제품화

“선행 바이오사료첨가제 개발사업단 연구결과 및 기술 활용 후속 산업화 과제”



“친환경-기능성-웰빙 원료육과 기능성 축산물 (계란, 우유) 생산 및 산업화”

그림 1. 본 연구의 세부과제 구성 및 연구개발 계획 요약

나. 연차별 연구내용

(1) 1차년도 연구내용: 친환경 기능성 사료첨가제 최적화/생산체계 확립

- 항생제 대체 복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산물 부산물 활용 친환경 기능성 사료첨가제 최적 생산체계 개발
- 복합 미생물 생균제, 생리활성 화합물, 기능성 농림수산물 부산물을 기반으로 하는 친환경 기능성 사료첨가제 최적 조성비 확립

(2) 2차년도 연구내용: 친환경 기능성 사료첨가제-친환경 기능성 사료-웰빙 원료육 및 가공식품 연쇄 산업화

- 친환경 기능성 사료첨가제 및 이를 활용하는 오메가 지방산 균형사료 개발 및 산업화
- 친환경 기능성 사료 기반 사양체계에 의한 웰빙 원료육 생산과 가공육제품의 산업화

“연구개발 수행기관 - 참여기업 간 유기적 역할분담 및 협력체계 구축”

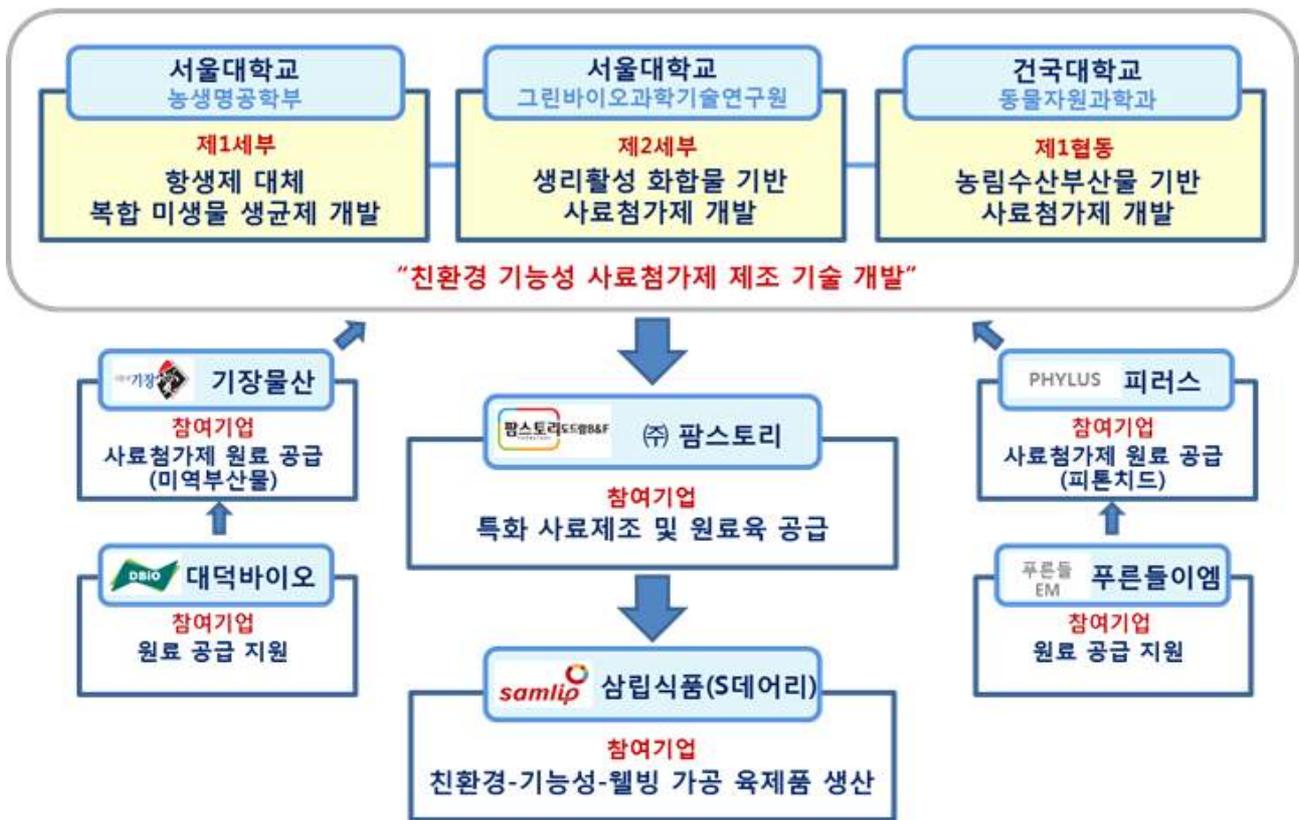


그림 2. 본 연구의 연구개발 수행기관 - 참여기업 간 유기적 역할분담 및 협력체계 모식도

제2절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 국내외 기능성 사료첨가제 시장 동향

- 사료첨가제는 가축의 생산성 향상을 목적으로 배합사료에 첨가하는 제제로서 영양성분 강화를 위한 ‘일반 사료첨가제’와 면역력 향상, 소화율 향상, 성장작용, 항균작용 등 가축의 건강 증진이나 그 밖의 특수 용도를 위한 ‘기능성 사료첨가제’로 구분할 수 있다.
- 세계 사료첨가제 시장은 2010년 155억 달러 규모에서 2017년에는 약 276억 달러로 성장할 것으로 전망되고 있으며, 개별 제품군 중에서는 일반 사료첨가제로 양돈 사료에 많이 사용되는 아미노산 제제의 시장규모와 성장률이 가장 높을 것으로 예상되고 있고 비타민제제 및 미네랄 제제 등이 그 뒤를 따르고 있다. 한편, 대표적인 기능성 사료첨가제로써 2010년 기준 1천 600만 달러 규모이던 생균제 (효모제) 시장이 최근의 전 세계적인 항생제 사용 저감 노력 및 친환경 축산에 대한 국제적 추세를 반영하듯 2017년에는 7억 3천만 달러 규모로 무려 40배의 성장이 예상되고 있는 것은 주목될 만한 점이다 (표 1).

표 1. 세계 주요 사료첨가제 시장 전망 표

제품군	2010년 (\$ millions)	2017년 (\$ millions)
아미노산 제제	9,600	18,800
비타민 제제	2,900	3,800
미네랄 제제	2,000	3,000
생균제 (효모제)	16	730
효소제	540	720
안료 및 착색료	477	559
계	15,533	27,609

출처: 세계 배합사료시장: 기술발전과 시장변화, BCC Research (2012)

- 현재 국내 기능성 사료첨가제 산업은 약 130여개의 회사가 각축하고 있는 완전경쟁 시장으로 생산품이 거의 전량 국내 축산업에 소요되는 전형적인 내수시장 지향 산업의 성격을 띠고 있으며, 일부 가공된 원료만을 수출하고 있어 아직까지 국제경쟁력이 낮은 산업분야라고 할 수 있다 (표 2-3).

표 2. 동물용 의약품 내수시장 현황

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
국내생산 (억 원)	2,912	3,207	3,706	3,615	3,355
수입완제 (억 원)	1,296	1,468	1,739	2,185	2,482
합 계 (억 원)	4,208	4,675	5,445	5,800	5,837

출처 : 축산경제신문 : 동물용의약품 수출 현황과 과제 (상) (2013.06.22 기사)

표 3. 동물용 의약품 수출 현황

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
업체수 (개소)	28	31	38	35	42
품목수 (개)	421	495	534	621	736
수출액 (억 원)	598	854	846	1,172	1,584

출처 : 축산경제신문 : 동물용의약품 수출 현황과 과제 (상) (2013.06.22 기사)

- 기능성 사료첨가제 분야는 본질적으로 기능성 원료 발굴과 효과 규명이 중요한 기술 의존형 산업이지만, 대부분의 국내 기업은 원재료를 수입하여 제형가공 후 출시하는 수준이 대부분이며, 특수목적에 부합하는 ‘기능성’ 유무가 시장경쟁력의 핵심임에도 불구하고 국내에서 유통되는 제품의 대다수는 주장하는 기능성을 증명할 수 있는 객관적인 근거가 미약하여 제품의 단가가 경쟁력의 주요 변수로 작용하고 있는 실정이다.
- 최근 들어 항생제 남용과 동물성 사료에 따른 광우병 우려 등으로 인해 천연제제가 새롭게 주목받고 있는데, 천연제제 복합물의 성격을 가지며 화학합성 제제와는 달리 일반적으로 대량생산 체제가 어려운 측면이 있다. 천연제제는 국내외 공통적으로 태동기 산업인데다가 기능성 사료첨가제 산업이 기술력에 의해 신규 시장이 창출되는 특성이 있기 때문에, 효과적인 천연제제를 발굴하여 대량생산이 가능할 수 있다면 기능성 사료첨가제 산업 분야에서 새로운 시장을 형성할 가능성이 있을 것으로 예상된다.
- ‘세계 자유무역 협정 (FTA)’에 의한 농축산물 시장개방을 통해 무한경쟁에 돌입한 국내 축산업은 선진국 대비 약한 산업 경쟁력에 의한 위기의식이 한층 고조되고 있다. 세계적인 환경보전 움직임과 FTA 등 급변하는 세계시장 변화에 능동적으로 대처하기 위해서는 국내 축산업도 자연환경과의 조화 및 산업 지속성 등 질적 성장에 초점을 둔 ‘생명사회’ 패러다임으로의 전면적 전환이 요구되며, 안전성과 품질 및 국가경쟁력을 갖춘 고부가가치 축산물 생산 기술 연구에 총력을 기울여야 할 필요가 있다. 특히 전술한 바와 같이 기능성이 과학적으로 증명된 대량생산이 가능한 천연제제와 같은 사료첨가제의 개발 및 활용기술이 앞으로의 축산업 발전을 견인하는 중요한 요인이 될 것으로 전망된다.

나. 사료첨가용 항생제 대체 미생물 생균제

- 전 세계적으로 많은 국가들에서 축산에서의 성장촉진용 항생제의 사용이 금지되고 있으며 국내에서도 2011년 7월부터 배합사료 내 항생제의 첨가가 금지됨에 따라 사료첨가용 항생제 대체제의 개발의 필요성이 강조되고 있다. 그러나 치료용 항생제 사용량은 전년대비 근소하게 증가하는 추세를 보이고 있으며, 양돈을 필두로 농가생산성 감소가 진행 중이다. 또한 슈퍼박테리아 등 항생제로 인한 2차적인 문제점이 많이 발생함에 따라 소비자들의 무항생제 친환경 축산물에 대한 수요가 확대되고 있으며 이에 따라 효과적인 항생제 대체제의 개발의 필요성이 강조되고 있다. 이에 따라 우리나라에서도 2011년에 농림축산식품부에서 ‘농생명소재산업화기술개발사업요약보고서’를 발간하여 ‘향 후 세계시장 선점 가능 10대 농생명소재’를 선정하면서 그 중 하나로 ‘천연 항생제 대체제’를 들고 있다. 이 카테고리 안에는 미생물 생균제, 허브추출물, 농산가공부산물 및 박테리오파지 등이 포함되고 있다 (그림 3).



- 현재 광의의 항생제 대체제는 단순히 항생제가 하던 역할을 대신할 수 있는 제품이 아닌, 기존 항생제가 지닌 단점을 극복하면서 항생제가 사용되지 않는 무항생제 사육시대에 적용 가능한, 가축의 생산성과 건강 증진에 도움이 될 수 있는 다양한 기술들을 의미하게 되었다. 특히, 병원균에 대한 항균작용과 비특이적인 성장촉진 작용을 동시에 구현할 수 있는 미생물 생균제 및 면역기능 활성인자와 같은 비항생제성 바이오 사료첨가제가 최근 주목을 받고 있다.
- 최근 축산분야에서 생균제를 활용하여 가축의 면역력을 증진시키고 질병을 예방하려는 시

도가 이루어지고 있지만, 기능이 명확하고 유용한 생균제가 부족한 실정이다. 이에 본 연구 과제에서는 선행연구를 통하여 효과와 기능이 명확히 규명된, 축종에 적합한 생균제를 이용하여 항생제 대체 가능한 복합 미생물 제제를 개발하여 농가에 보급함으로써 축산경쟁력을 제고하고자 한다.

다. 기능성 농림수산물부산물의 자원화 필요성

- ‘유엔환경개발회의’, ‘비엔나협약’, ‘교토의정서’ 등 국제사회의 환경오염 통제 강화에 따라 우리나라에서도 1990년대 중반 이후 정부를 주축으로 친환경 농업 육성을 위한 제도적 장치를 마련하는 등 적극적인 노력을 기울이고 있으나, 제한된 국토에 비해 높은 부양인구, 급속한 도시화와 이농현상에 따른 농/축산업 인구의 감소, 절대 다수를 차지하는 소규모 영세농가 등 현실적인 문제로 인해 친환경 농업 정책은 아직 큰 진전을 나타내지 못하고 있는 실정이다. 그러나 이러한 산업 현실과는 대조적으로 최근 국민소득 증가와 함께 소비자의 농축산물에 대한 인식도 변화하여 과거의 가격우선의 양적 판단기준에서 현재에는 웰빙 붐과 함께 안전성과 품질 중심의 질적 기준으로 급변하고 있는 추세이다.
- 현재까지 가축의 질병 예방, 치료 및 성장 촉진을 위한 목적으로 사용되고 있는 항생제의 경우 내성균 출현 등, 남용의 폐단에 대한 해결책 마련은 한국뿐만 아니라 세계적인 현안으로, 이미 선진국에서는 동물산업에서의 항생제 사용에 대한 강력한 규제법령을 시행 중이다. 동물산업 중 현재 항생제의 의존도가 가장 높았던 양돈 산업을 예로 들 때 무항생제 양돈농가에서는 사양성적이 보장되지 않고 밀집사양에 의한 여러 가지 질병 및 부작용들이 수반되어 나타나는 것을 감안하면 이러한 난점을 극복하기 위해서는 기존의 항생제 효과를 대체하고 축산물 안전성을 보증할 수 있는 효과적인 천연 항생물질이 절실한 실정이다.

(1) 부존사료 자원 이용의 필요성

(가) 수입 축산물에 대한 경쟁력 확보

WTO/FTA 체결이 이루어짐에 따라서 사료원료의 대부분을 수입에 의존하고 있는 사료산업의 취약성과 값싼 외국 축산물과의 가격경쟁에서 상대적으로 열등한 산업구조를 가지고 있다 (Hong 등, 2008). 그러므로 국내의 부존자원의 효율적인 활용을 통한 가축의 생산성 향상 및 고부가가치 축산물 생산 기술개발이 그 어느 때보다도 절실히 요구되어진다. 농림축산식품부에서는 농업의 생산비 절감 방향으로 정책을 펴고 있으며, 지속 가능한 농업의 실현을 위하여 비용 절감을 바탕으로 적게 투입함과 효율을 높이는 농업에 힘을 기울이고 있다 (Chae 등, 2012). 더 나아가 축산물 소비자들의 의식수준의 향상으로 축산물의 안전성을 고려한 환경 친화적이면서도 안전한 축산물의 고급화를 위한 천연 사료원료의 개발이 시급한 시점이다.

(나) 폐기되는 농림수산물부산물의 활용

농촌경제연구원의 보고에 따르면 우리나라의 농산물 현황에 있어 주 재배작목인 벼는 1995

년에 비해 2005년에는 재배면적이 1.1% 감소하였으나, 생산량은 0.9% 증가하였다. 이외에 보리, 옥수수, 유채, 고추의 재배면적은 평균 1.2% 감소하였으며 콩, 감자, 고구마는 재배면적이 증가하였다. 이에 따른 농림부산물 발생량은 단위면적당 (10 a) 부산물이 가장 많이 발생하는 것은 벼로서 10 a 당 771 kg (짚과 왕겨포함)이며, 고구마 줄기는 646 kg, 유채는 460 kg 순이었다. 임산물 현황의 경우 2004년 21백만 m³에 이르고 있으며, 연 평균 20백만 m³ 수준으로 임산부산물은 2004년 숲가꾸기 사업으로 6,272천 m³이 발생하였고, 주벌, 간벌, 수종갱신으로 각각 69.16천 m³, 638.00천 m³, 51.42천 m³ 발생하였으며, 임목벌채에서는 간벌이 대부분을 차지하였다. 또한 해양수산부의 수산통계에 따르면 2012년도 국내 수산물 생산량은 약 318만 톤으로 원양에서 약 58만 톤, 연근해수산물 약 111만 톤, 양식수산물 약 149만 톤으로 구성된다. 이 중 식품가공 후, 부산물 발생량은 원료의 약 40%에 달하며 머리, 내장 등의 생선 부산물은 연간 약 100만 톤 정도가 버려진다.

(다) 부존사료 자원 개발의 현황

① 미역

예로부터 우리나라에서 해조류는 식용 및 약용 그리고 해조공업의 원료로 많이 이용하여 왔다. 최근에는 건강식품으로 인정받으면서 본격적인 식량자원으로 활용하려는 움직임이 많아 바다의 채소라는 이름을 사용할 정도로 우리의 식생활에 밀접한 관계가 있다. 미역에는 다당류의 알긴산이 풍부하여 항산화효과, cytokine의 분비 증가와 면역시스템 활성화시키는 작용이 있는 것으로 보고되었다. 그리고 미역은 갑상선 호르몬 분비 개선을 통한 대사 활성화, 유선발달과 비유축진과 더불어 혈중 IGF-1 (insulin-like growth factor 1) 분비도 촉진 시키는 등 비유와 관련된 내분비 대사를 활성화 시킬 수 있을 것으로 알려져 있다. 하지만 해조류 중 미역은 양식을 통하여 얻어지는데 채취 시 미역의 밑 부분은 그대로 바다에 버려지고 육상에서 가공 중에도 많은 부분이 폐기물로 버려지고 있어 환경오염 문제가 다른 해조류에 비해 높은 편이다. 바다에 폐기되는 미역은 전체 생산량의 약 40~60%로 우리나라에서만 4~21만 톤이 매년 남해안에 폐기되어 바다오염과 미역 양식 시 좁쌀 병 등을 발생시키는 원인이 된다고 보고하였다. 폐기되는 미역 부산물을 수거 해와도 육상에서 활용할 방법이 없어 또 다른 환경오염을 만들고 있는 실정이다.

하지만 이들 폐미역의 대부분은 줄기이며, 약간의 포자엽 뿌리로 식용으로 미용되는 미역 잎과 조성이 비슷하여 여러 용도로 활용될 수 있다. 알긴산 분해 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있는 DS-01 균주를 이용하여 미역 중 부패의 원인이 되는 알긴산을 저분자화 함으로 부패를 막고 저장기간을 연장시킴으로 건조하지 않고 생포 발효미역부산물 그대로를 젓소용 TMR (total mixed ration) 사료에 수준 별로 첨가하여 산유량과 유성분, 혈중 면역글로블린 및 비유 관련 혈중호르몬의 변화양상, 혈중 대사산물을 조사하여 홀스타인 착유우의 유생산량 증가 또는 유성분 강화용 사료로의 이용 가능성을 규명하고자하는 연구가 실시된 바 있다.

② 마늘 부산물

마늘은 동서양 음식에서 선호되는 양념으로 식용뿐만 아니라 민간 치료제로 오래전부터 사

용되어져 왔으며, 최근 높은 사망률을 나타내는 암이나 고혈압, 동맥경화, 심장질환, 뇌졸중 등의 질환 예방이나 치료에 효능이 있다고 알려지면서 많은 연구가 진행되고 있다 (Amagase 등, 2001; Essman, 1984; Wu와 Sheen, 2001). 마늘의 유효성분으로 보고된 allicin은 마늘 특유의 향기 성분으로 마늘 조직이 파괴될 때 자체 효소인 allinase에 의해 allin이 분해되어 생성된다 (Fenelli 등, 1998). Allicin은 그 자체가 혈중 지질 저하 효과를 가지고 있어 사람의 혈청 중에 함유된 콜레스테롤 및 중성 지방의 함량을 감소시키고 (Simons 등, 1995), 죽상동맥경화증의 발생을 억제시키는 것으로 보고되었다 (Effendy 등, 1997). Qureshi 등 (1983)은 마늘 분말을 육계 사료에 첨가하면 HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase와 fatty acid synthetase의 활성을 감소시켜 혈중 LDL-cholesterol을 감소시키고 HDL-cholesterol에는 영향을 주지 않는다고 하였다. 윤 등 (1996)은 육계 사료에 마늘을 급여하면 콜레스테롤 함량이 저하되고 복강 지방이 감소한다고 하였으며, Skan 등 (1992)은 육계에 2%의 마늘을 2주 동안 급여하면 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시킨다고 하였다. 그러나 마늘 가공 후 생기는 마늘 껍질과 마늘대는 그대로 폐기되고 있는 실정이며, 마늘 껍질에는 마늘 육질과 마찬가지로 polyphenols, flavonoid 및 항산화 비타민 등 항산화 성분이 다량 함유되고 있는 것으로 보고되고 있다 (Nuria 등, 1999). Nuutila 등 (2002)의 연구에 의하면 마늘 육질의 총 polyphenols의 함량이 육질의 7배 정도 되며, 껍질의 자유기 포착능 (radical scavenging activity)이 육질보다 1.5배 높다고 보고하였다. 또한 Kim 등 (2009)은 마늘 육질과 껍질을 육계에 급여함으로 계육의 조지방 함량이 낮아지고, 지방의 산화를 지연시키며, 불포화지방산이 증가된다고 보고하면서 마늘 육질보다는 껍질이 이러한 효과는 우수하다고 보고하였다.

③ 잣나무 구과 부산물

잣나무는 우리나라 중부 이북과 경남 지역 등에서 널리 성장하고 있으며, 만주 동부, 시베리아 및 일본 일부까지 분포하고 있다. 잣나무에서 생산되는 잎과 송이는 약리적 가치가 높고, 일본에서는 항산화제로서의 기능이 있는 것으로 알려져 있다 (고 등, 2006). 잣나무에는 영양물질 이외에 항균, 살충 효과 및 타감 작용을 하는 약리적인 성분들이 함유되어 있으며, 이 화학 성분은 피부 자극제, 소염제, 소독제, 완화제 및 보향제로 이용되고 있다고 한다 (Cimanga 등, 2002; Baricevic 등, 2001; 임 등, 2001; 양 등, 2002). 또한, 잣나무 진에는 terpenoid계 성분, phenol계 성분, 타닌 및 알칼로이드 성분이 함유되어 있으며 (홍 등, 2002), terpinolene과 borneol 성분은 담즙 분비를 촉진하여 콜레스테롤 수치를 낮추는 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Kim 등, 1986). 농림부 통계에 의하면 2010년 국내 수실류 중 잣 생산액은 498억 원으로 대추에 이어 두 번째이며, 6,720 톤의 잣이 생산되고 있으며, 잣은 수확 후 잣 알갱이만 식용으로 사용되며, 그 외의 부산물은 그대로 버려지고 있는 실정이다. 따라서 환경 오염원으로 방치되고 있는 잣 부산물을 활용은 국내 부존 사료 자원의 개발 차원 및 사료 원가 절감뿐만 아니라 환경 오염원의 배출량을 감소시키는 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료되며, 잣 껍질에는 여러 생리활성 물질들이 함유되어 있어서 이 등 (2007)은 잣 부산물에서 정유 물질을 추출한 후 남은 것으로 산란계 사료 내 잣 부산물의 첨가가 산란율, 계란 품질, 혈청 콜레스테롤 및 난황 내 총 콜레스테롤과 지방산 함량에 미치는 영향에 대한 규명하였다.

○ 현대 소비자의 의식수준은 식품생산에서 단순한 고기능성 뿐 아니라 환경과의 공존도 고려

하고 있다. 이러한 소비자의 요구에 맞추어 축산식품 개발에 있어서 ‘기능성’과 ‘친환경-웰빙’이라는 키워드를 동시에 충족시킬 수 있는 효과적인 전략이 필요하다. 이러한 전략의 일환으로서 수요처가 없어서 폐기되는 기능성분 함유 농림수산물부산물을 효율적으로 자원화하여 이용하는 방안을 마련하는 것이 필요하다.

- 이러한 요구에 발맞추어 본 연구에서는 기 수행해 온 환경오염을 야기하는 농산, 임산, 수산업의 부산물에 함유되어 있는 기존 항생제를 대체할 수 있는 우수한 천연 항생제 대체제를 제품화할 수 있도록 체계화시켜 환경문제와 축산물의 고품질화 및 안전성 확보를 도모하고자 한다.

라. 고기능성 축산식품의 수요 확대

- 건강에 대한 관심이 증가하고 웰빙을 추구하는 소비자층이 증가함에 따라 기능성 식품에 대한 수요가 확대되고 있다. 기능성 식품이란 식품의 1차 기능인 영양과 2차 기능인 맛에 더불어 건강에 도움이 되는 생체조절 기능까지 지닌 식품을 말한다. 기능성 식품은 대상으로 하는 질병 또는 생체조절효과가 명확하게 그 기능성이 증명되어 있어야 하며 생체방어, 생체리듬 조절, 질병예방 및 회복, 노화방지 등의 기능이 있어야 한다. 생체조절 기능을 나타내는 것이 기능성 식품의 특성이지만 영양과 맛의 기능도 동시에 지니고 있어야 하며 안전성이 증명되어야 한다. 축산식품은 전체 식품 중에서 큰 비중을 차지하는 부문으로써 소비자의 기능성 식품에 대한 수요의 증가는 곧 고기능성 축산식품에 대한 수요의 확대를 의미하며 그에 따라 고기능성 축산식품의 생산이 절실히 필요하다 (표 4).

표 4. 세계 건강기능식품 분류별 매출액 현황

(단위 : 백만 달러)

구분	2004	2005	2006	2007	2008
식이보조식품 (Dietary Supplements)	61,104	64,957	68,275	72,231	76,545
유기식품 (Natural&Organic Foods)	44,865	50,058	56,064	63,235	70,799
유기상품 (Natural&Organic Products)	17,006	18,841	21,043	24,309	27,099
기능성식품 (Functional Foods)	73,705	79,505	85,196	90,112	95,354
계	196,679	213,361	230,578	249,886	269,797

출처 : Nutrition Business Journal, NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report (2010)

마. 고기능성 축산식품을 위한 사료첨가제 개발의 필요성

- 고기능성 축산식품은 가축을 사육하는 단계에서 사료 급여의 조절을 통해 축산물 내의 조성을 변화시킴으로써 생산이 가능하다. 하지만 사료의 조성을 변화시키는 것만으로는 원하는 기능을 나타내는 물질을 축적시키는 것이 어렵기 때문에 축산물 내에 우리가 원하는 특정 기능성 물질을 많이 축적시키기 위한 첨가제를 사료 내에 혼합함으로써 사료 외에 추가

로 가축에게 급여하는 방법이 필요하다.

- 기능성 사료첨가제는 고기능성 축산식품을 필요로 하는 소비자의 요구를 충족시킬 뿐 아니라 가축의 성장에 있어서도 유익한 효과를 가지고 올 수 있다. 일례로 CLA (conjugated linoleic acid)의 경우 항암성, 비만해소, 다이어트의 기능성으로 소비자들에게 크게 각광받고 있는데, 돼지에게 급여 시 면역증진에 도움이 되고 betaine과 혼합 급여 시, 일당증체량이 증가했다는 연구결과도 존재한다. 이처럼 기능성 사료첨가제는 최종적으로 육 내 함량을 높여 소비자의 기호를 만족시킴과 동시에 가축 사양에 있어서도 긍정적인 효과를 가지고 올 수 있지만 전이효율 및 보존성이 취약한 단점이 있다.
- 따라서 본 연구를 통해 전이율과 보존성을 높이고 가축에게 보다 효과적으로 기능성 성분을 축적시키며 농가에 보급 시 축산 경쟁력을 높일 수 있는 기능성 사료첨가제를 개발함으로써 고기능성 축산식품의 생산을 도모하고자 한다.

바. 비선호 부분육을 활용한 기능성 가공육제품 개발의 필요성

- 우육 및 돈육의 정육 중, 비선호 부위의 비율은 각각 31.5%, 42.4%를 차지한다. 특히, 구이용 부위를 선호하는 국내 소비자들의 성향으로 인한 수급 불균형은 축산물의 자급률을 낮추는 원인이 되고 있다. 축산업의 균형 잡힌 소비를 통한 안정적인 발전을 도모하고 자급률을 높이기 위해서는 이러한 비선호 부위를 이용하여 다양한 가공 육제품을 개발할 필요가 있다 (그림 4).

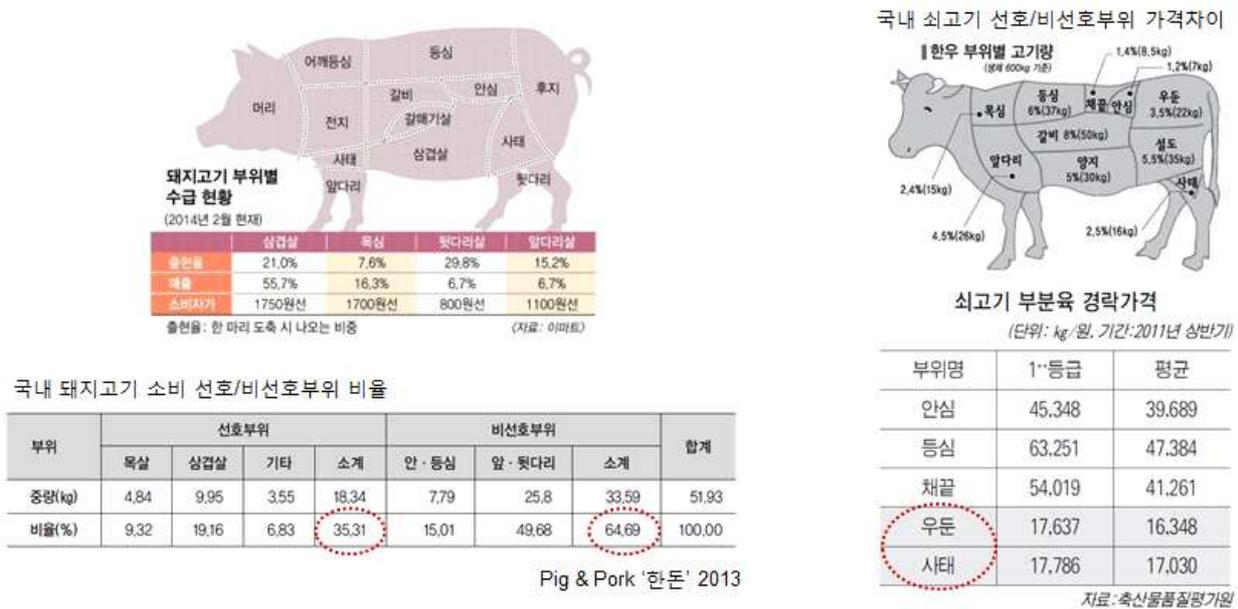


그림 4. 정육 중 비선호 부위의 비율 (서울신문 2014. 2. 7. 기사; Pig & Pork ‘한돈’, 2013년 8월호; 농민신문 2011. 7. 20. 기사)

2. 연구 개발에 따른 기대효과

- 항생제 대체 고기능성 사료첨가제 및 오메가 지방산 균형사료를 급여한 축산물 브랜드 제품 산업화
- 건강지향, 웰빙 및 고기능성 축산식품에 대한 소비자 욕구 충족
- 축산식품 개발 전략에 ‘기능성’과 ‘친환경-웰빙’을 동시에 만족시키는 새로운 패러다임 제시
- 폐기되는 농림수산부산물의 효율적인 자원화 방안 제시 및 신산업 분야 창출
- 건강한 가축사양을 통한 동물복지 구현 및 환경과 공존하는 지속가능한 축산의 방향 제시
- 기존 선행연구 기반 기술을 토대로 과제 참여기업 연계 적극적인 상품개발 및 사업화 추진 예정
- 육제품의 프리미엄화를 통한 국내 축산물 해외진출 확대 및 성장 추진



그림 5. 연구 개발에 따른 기대효과 요약

제3절 연구성과 목표 대비 실적

본 과제의 연구성과 목표는 특허출원 3건, 특허등록 1건, SCI급 논문 2편, 기술거래 3건, 교육지도 3명, 사업화 6건, 홍보전시 2건이다. 이에 대하여 특허 4건을 출원하였고 SCI급 논문 2편을 게재하였다. 본 과제를 통해 개발된 4건의 기술을 참여기업에 이전하였으며 6건의 교육 지도를 실시하였고 5명의 석박사급 인력을 본 과제를 통하여 배출하였다. 또한 이미 시중에 판매 중인 “오메가 밸런스 달걀”[(주)삼립식품, 2014년 11월]과 피톤치드 함유 사료첨가제 (무력무력, 2015년 10월) 및 시제품 제작을 포함하여 6건의 상품화를 진행하였고 방송, 신문 등의 매체를 통해 29건의 홍보전시를 진행하였다. 이 외에도 비SCI급 논문 1편 게재, 학술발표 8건, 수상실적 1건 등의 추가 성과를 거두었다. 연구성과는 “제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획”에 자세히 기술하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

- 사료첨가제의 경우 배합기술, 가공기술, 품질 확보 및 평가 기술에 의해 제조되기 때문에 사료첨가제 원료의 경우에는 수년 이상의 개발 기간이 소요되지만, 원료 조합 및 배합 기술의 경우 높은 수준의 기술을 요구하지 않는 산업이기 때문에 몇 개의 선두 업체를 제외한 다수의 경우는 중소기업들이 경쟁하고 있는 실정이며 국내 업체의 생산품은 거의 전량이 내수시장에 이용되고 있고, 수출에 있어서는 일부 가공되어진 원료에만 해당되어 국제적 경쟁력이 부족한 상황이다.
- 국내 사료첨가제 시장은 약 2,587 억의 규모 (2013년 기준)이며, 해외 시장에 대비하였을 때 약 2%의 시장 비율을 보인다. 뿐만 아니라, 한국은 사료첨가제 분야에서 특히 출원이 활발한 국가에 속하며, 90년대 이후 꾸준히 증가하는 추세를 보이고 있다. 중국을 제외하고는 사료첨가제 부분에서 특허출원이 가장 활발하다 (농림수산식품교육문화정보원, 2014).
- 국내 사료첨가제 기업의 경우, 이지바이오, CTC바이오, 진바이오텍, 제일바이오 등이 사료첨가제 업계를 이끌고 있는 선두업체이며, 최근 들어 국내업체의 경우, 발전된 기술 및 연구로 인해 해외 유명 업체들의 기술수준의 70~80%까지에 이르는 수준에 도달하였으며, 이와 관련한 제품의 매출도 계속적으로 증가하고 있는 추세를 보인다. 이 중 한 업체는 생균제 및 효소제 계통의 면역 강화제와 주정제조 부산물에 생균제를 접종한 생균제, 효모제를 개발하였으며, 또 다른 업체의 경우 발효 및 천연제제를 독자적으로 개발하여 면역력 증강 및 항생제를 대체하는 제품을 개발 중에 있다 (이종택, 2014).

가. 항생제 대체제

- 최근 국내 축산분야에서는 2011년 7월 성장 촉진용 항생제의 사료 내 배합 금지 이후, 가축의 성장 증진 및 질병 예방을 위해 생균제를 활용하고자하는 시도가 이어지고 있으나 기능이 명확하고 유용한 생균제가 부족한 실정이다.
- 항생제를 대체하는 미생물 생균제는 숙주동물에 유익한 효과와 더불어 비병원성이며 독성이 없어야한다. 뿐만 아니라 살아있는 균주로서 그 균수가 많아야하며, 낮은 pH와 유기산으로 이루어진 장내환경에서 생존하고 대사할 수 있는 균으로 장기간동안 안정해야하며 생존능력이 유지되어야 한다는 조건을 충족시켜야한다.
- 항생제 사용이 전면 금지됨에 따라 대체제의 개발이 시급한 실정이다. 전반적으로 항생제 대체제를 개발하는 회사들은 매출 경향이 감소하는 추이를 보이며, 이는 항생제 대체제의 개발이 항생제 매출액의 감소를 따라가지 못하기 때문에 발생하는 것으로 보인다. 현재 항

생체 대체 생균제를 개발하는 회사로는 진바이오텍, 이지바이오, CJ 사료, 농협, 쏘주바이오, 바이오&그린텍, 네오그린 등이 있으며, 대체제로는 박테리오파지, 생균제, 단미·보조사료 등이 있다. 지속적으로 이 분야에 대한 더 많은 연구와 제품생산이 필요하다.

- 구체적인 연구 예를 살펴보면, *Bacillus* spp.를 이용해 세균성 설사의 원인균인 대장균, 살모넬라, 리스테리아, 포도상구균 등을 억제하며, 위액의 강한 산에서도 견딜 수 있는 내산성의 유산균 (*Streptococcus thermophilus*)은 유효균의 증식, 병원성균인 대장균, 살모넬라, 포도상구균 등 유해균에 대한 생육억제 효과를 가져다주기 때문에 생균제로서 연구되고 있다 (출처: www.koreabiotec.com).
- 또한, 콩물 유래의 바실러스 속 균주, 락토바실러스 속 균주, 코니박테리움 속 균주, 슈도모나스 속 균주 등을 이용한 생균제 사료용 복합 미생물 제제의 경우 열에 강한 내열성 균주를 포함하고 있기 때문에 가열을 처리하여도 미생물들이 생존할 수 있으며, 내산성 균주를 포함하고 있기 때문에 장까지 도달해 제 기능을 발휘하게 한다. 이로 인해 동물들의 사료 섭취량이 증가되고 이어 증체량을 증가시키는 효과가 있는 제제로 특히 출원이 되어있다 (출원번호 10-2013-0053454. 2013. 대한민국 특허청).

나. 기능성 축산물

- 아미노산의 일종인 L-카르니틴은 세포의 에너지 대사를 촉진시키고 지방 연소에 도움이 되는 기능성 성분으로서, L-카르니틴이 고함유된 사료를 이용하고 이것의 전이 효율을 증가시켜, L-카르니틴 강화 우유 등의 기능성 축산물을 생산하는 연구가 기대되고 있다 (등록번호 1005528000000, 2006. 대한민국 특허청).
- 오메가-3 지방산이 풍부한 아마인유를 HTMT (high temperature micro time) 공법으로 사료 내 강화함으로써 오메가-3:오메가-6 지방산을 이상적 비율인 1:4 이내로 조절한 (등록번호 1004319060000. 2004. 대한민국 특허청) 유제품과 식빵인 Milk plus 우유와 Yogurt Plus 요거트, Milk plus를 이용한 우유 식빵이 이미 국내에 시판되어 판매되고 있다.

다. 오메가 지방산 균형 사료첨가제

- 아마씨유, 정제어유, 팜오일 분말을 성분으로서 이용해 오메가-3 지방산을 함유하는 돈육 생산용 사료 첨가제 조성물이 국내에 특허로 출원이 되어있다. 이러한 조성물들을 포함하는 첨가제를 급여함으로써 고농도의 오메가-3 지방산이나 다가 불포화 지방산을 다량으로 함유한 돈육을 생산이 가능하다.
- 본 과제를 통해 연구되어진 알파-토코페롤 및 베타-사이클로덱스트린 포집체와 아마유 또는 아마종실을 포함하는 사료첨가제 조성물을 이용하여, 오메가 지방산이 균형을 이루는 계란 생산기술을 통해 오메가-3:오메가-6 지방산 함량의 비율의 이상적 균형인 1:4 이내의 비율을 가진 오메가밸런스 달걀이 시중에 제품화되어 판매되어지고 있다.

라. 농림수산부산물 사료첨가제

- 기존 항생제를 대체하기 위하여 해양이나 식물 등에서 antimicrobial material을 탐색하는 시도가 이어지고 있다. 이러한 신규 항생물질들은 기존 항생제의 내성문제를 해결하는데 효과가 있을 것으로 기대하고 있다.
- 농림수산부산물을 이용한 시장은 산업화 되어 있는 것이 없으며 대부분이 농장 자체적으로 부산물을 이용하여 급여하고 효과가 있다고 과대 포장하여 광고를 하는 식으로 이루어지고 있다. 따라서 과학적인 근거를 제시하기 위하여 효과검정 실험이 필요한 실정이다.
- 농림수산부산물을 사료대체제로 이용할 경우 젖소에서 산유량이 하루 최대 1.15 kg까지 증가된다는 보고가 있으며, 마리당 사료비에 있어 하루 1,061 원의 절감효과가 있으며 분석결과 마리당 2,505 원의 수익이 발생할 것으로 예측하고 있다. 또한 농림수산부산물을 이용할 경우 300억 원의 사료비 절감을 가져올 수 있다.
- 국내의 농림수산부산물 사료첨가제의 연구에서는 봉독, 홍 단풍잎 및 해송나무껍질의 추출물과, 황토-난각칼슘-목초산 혼합분말 및 발효 황국균을 포함하는 천연 성분의 조성으로 이루어진 천연 사료첨가제, 양파발효 조성물을 이용한 사료 첨가제 등을 이용하여 신진대사를 촉진하거나 면역력 증가와 같은 다양한 기능을 강조한 사료첨가제들의 개발이 이어지고 있다. 현재까지 출간된 국내 논문에 따르면 농림수산물 또는 농림수산부산물을 단순 추출 또는 발효에 의해 얻어진 단일추출액에 대한 기능성효과 논문이 주로 출간되어 있으며, 이들 추출액의 조합에 따른 축종맞춤형 기능성효과 연구는 미비한 상태이다.
- 기존 농림수산부산물 관련 특허는 단순히 농림수산부산물의 사료화 또는 천연물 자체를 단독 추출하여 이들 추출물들의 성분에 대한 특허만 다수 출원되었다. 하지만 기존 특허 내 추출물의 기능성은 항생제를 대체 할 정도의 수준이 되지 않으며 경제적인 면을 고려할 때 가축에 대한 사료화로서 용이 불가한 것들이 대부분이다.

마. 기능성 사료첨가제

- 국내의 기능성 첨가제의 경우는 1998년 이후 꾸준히 특허 출원이 증가하고 있다. 그 분야로서는 면역, 성장촉진, 항생 전 분야의 특허 출원이 최근까지 증가하고 있고, 그 중에서도 면역부분이 가장 활발하게 특허 출원이 진행되고 있다. 항생 분야의 경우도 꾸준히 성장하고 있으며, 성장 촉진 분야의 경우, 특허 출원량이 가장 저조하다.
- 기능성 사료첨가제의 한 분야인 효소제로서 파이테이스 (phytase)는 양돈 사료에 가장 대표적으로 사용되고 있는 효소제이며, 이 외에는 비전분성 다당류를 분해 가능하게 하는 효소제인 베타-글루카네이스 (β -glucanase)가 주를 이루고 있다. 이외에도 아밀레이즈 (amylase)가 자돈의 전분 이용성을 높이기 위해 사료에 첨가되며, 갈락토만난 (galactomannan)을 분해시키는 효소들이 시중에 판매되어지고 있다.

제2절 해외 기술개발 현황

- 해외의 사료첨가제 시장은 약 127.4억 달러의 규모를 가지고 있으며 약 5.1%의 성장률을 나타낸다. 또한 2019년에는 약 173억 달러의 규모를 나타낼 것으로 예측되고 있다. 생균제 시장의 경우에는 2010년 약 1천 6백만 달러의 규모를 가진 것으로 보고되고 있으며 2017년에는 7억 3천만 달러의 규모로 약 40배의 성장이 예상되고 있다.
- 북미와 유럽이 세계 사료첨가제 시장의 85% 이상을 차지하고 있으며, 아시아-태평양 지역의 경우에는 지속적으로 시장의 규모가 커지고 있는 추세이다. 이는 소득 수준 상승과 육류 소비량의 증가에 따른 것으로 보인다 (이종택, 2014).
- 해외 사료첨가제 시장의 특징은 애완동물 관련사업과 밀접하게 연관되어 있다는 것이다. 2010년 이후 이어진 경기 침체기에도 고급화된 소비자의 취향에 영향을 받아 애완동물의 고품질 사료 산업은 꾸준히 그 규모가 증가하였고, 이는 증가된 사료첨가제 시장의 원인 중 하나로 꼽히고 있다 (이종택, 2014).
- 특히, 중국의 경우 사료첨가제 분야는 특히 출원이 매우 활발하다. 2004년 이후 급격하게 특허 출원량이 증가하고 있는데 이것의 이유로는 경제성장에 따른 육류소비의 증가와 멜라민 파동 이후 첨가제에 대한 관심의 증가로 인한 것으로 보인다 (농림수산식품교육문화정보원, 2014).
- 미국은 1972년 기준으로 사료첨가제에 대한 특허 출원을 시작한 이후 2002년 이전에는 가장 활발한 특허 출원량을 보였다. 그 이후에도 꾸준히 특허를 출원하고 있다. 유럽의 경우는 특허 출원량은 높지 않으나 2000년 이후에 꾸준한 출원량을 보이고 있다 (농림수산식품교육문화정보원, 2014).

가. 항생제 대체제

- 전세계 항생제 시장은 260억 달러에 이르고, 연평균 약 4.2% 성장률을 보이고 있다. 미국의 경우 동물용 항생제 시장의 규모는 미화 39억 달러 (2007년 기준)에 이르며, 2010년에는 미화 42억 달러의 규모의 시장으로 성장하였다. 하지만 세계적으로 사료첨가용 항생제의 사용을 금지하면서 항생제 대체제와 관련한 산업들에 많은 투자가 이루어지고 있는 상황이다.
- 세계 미생물 사료첨가제 시장의 규모는 2011년 1.9조원이고, 2018년에는 3조원에 이를 것으로 예상되고 있으며, 연평균 성장률은 6.7%가 될 것으로 예측하고 있다 (Transparency Market Research, 2013). 사료첨가용 항생제의 사용 금지로 인해 미생물 사료첨가제 시장이 빠르게 성장하고 있다.

- 항생제를 대체하는 생균제의 경우, 미국의 경우에는 2000년대에 특허 출원이 집중되어 있고 2007년을 정점으로 특허출원이 감소하는 경향을 보이고 있다. 일본의 경우에는 1990년 초반부터 2008년까지 특허출원이 증가하는 추세였지만, 역시 2008년 이후로는 특허 출원이 감소하고 있는 추세를 보인다. 유럽의 경우에는 사료 첨가제 시장이 크고, 경쟁의 강도가 높기 때문에 특허 출원률이 높다 (농림수산식품교육문화정보원, 2014).
- 해외의 대표적인 미생물사료 제조업체로는 네덜란드의 DSM, 독일의 BASF Corporation, 미국을 Alltech 등이 효소 사료첨가제 대표제품을 가지고 있으며, 생균제를 주력으로 내세우는 기업으로는 덴마크의 Chr Hansen A/S, 프랑스의 LeSaffre, BioArmor Development SARL 등이 있다.
- 유럽연합에서는 양돈용 13개의 생균제를 인증하고 있으며, 대부분 호모, 바실러스, 유산균류이며 Bioplus 2B만 2종의 바실러스를 포함하고 있다. 유럽의 경우, 특히 사료첨가용 항생제 사용을 오래전부터 금하고 있었고 앞으로도 항생제 사용에 대한 정도가 전면적으로 금지될 예정이기 때문에 시장규모는 계속적으로 커질 것으로 예상하고 있고, 그 규모는 현재 한국 시장규모의 50배 정도로 예측하며 약 5조 달러의 규모를 구성할 것으로 예측되고 있다.

나. 기능성 축산물

- 유럽이나 오세아니아 등의 선진국에서는 기능성 물질을 사료에 급여해 육질이나 영양 조성을 개선하거나, 가축의 생산관리 및 환경을 조절하는 동물복지를 강조하여 고품질의 축산물을 생산하는 경우로 나누어 볼 수 있다. 가장 일반적인 기능성 식육제품의 형태는 기능성 성분을 가진 특정 물질을 원료육에 첨가해 기능성을 부여하는 방법이며, 이에 대한 예로서는 아질산염을 감소시킨 가열소시지나 식이섬유의 첨가로 지방을 대체하는 저지방/저칼로리 소시지 등이 해당된다. 카놀라유 (canola oil)나 해바라기유 (sunflower oil)와 같은 식물성유를 이용해 원료육의 지방산 조성을 개선시키거나, 불포화도가 높은 어유 (fish oil)나 식물유 (vegetable oil)를 이용해 포화도가 높은 동물성 지방유를 대체한 식육제품이 있다. 또한, 나트륨 염 대신 대체염을 이용하여 그 기능성을 개선시킨 제품도 출시되고 있다 (최 등, 2010).
- 유럽의 경우, 일부 영양소가 강조된 육제품이나 계란이 판매되고 있지만 그 규모는 미비한 편이며, 호주나 뉴질랜드의 경우에도 기능성 사료를 급여해 제조까지 이어진 제품보다는 청정지역의 이점을 이용한 미네랄이 강화된 제품, 높은 함량의 ω -3 지방산 및 비타민이 강조된 제품들이 주력으로 판매되어지고 있는 실정이다. 이외에는 식이섬유를 활용한 저지방/저칼로리 제품, 천연항산화제를 활용한 제품, 견과류, 꿀 등을 제품에 첨가하여 기능성을 높인 제품이 일부 유통되고 있다. 최 등 (2010)의 연구에 따르면 글루텐 무첨가 (gluten-free), 저지방/무지방 (low-fat/fat free), 자연향 (naturally wood smoke), 인공착색료 및 향신료 무첨가 (no artificial color, no artificial flavor)를 이용한 제품들이 유행하고 있다.

- 동물복지를 통한 기능성을 강조할 수 있는 연구도 많이 진행되어 지고 있는데, 이를 통해 vitamin류 (vitamin A, B group, C, E), fatty acid류 [conjugated linoleic acid (CLA), 오메가-3 지방산 (DHA, EPA)], mineral류 (Ca, Mg) 등 다양한 지표물질들이 강화된 육제품들이 결과로 도출되고 있다 (최 등, 2010).
- 이외에는 천연항산화 물질, 불포화지방산, 기능성 식물이나 곡류 등이 기능성 식육제품에 이용되는 기능물질의 후보로 연구되고 있으나 아직까지 제품 출시로는 이어지지 않고 연구에만 그치고 있는 실정이다.

다. 오메가 지방산 균형 사료첨가제

- 유럽이나 오세아니아에서는 건강에 유익한 고기라는 개념으로서 건강육에 대한 연구가 진행되고 있으며 이러한 관심은 고기의 지방에 대한 연구로 이어지고, 주로 식육의 지방 총량 감소, 불포화지방산의 함유량을 증가시킨 지방산 조성 변화 등의 주제로 연구가 진행되고 있다.
- 고기의 지방산 구성비를 변화시키기 위해 불포화지방산이나 CLA를 사료를 통해 급여하는 연구와, 목초를 급여하는 등의 방법을 통해 오메가-3 지방산 강화 육제품 생산 연구, 육제품의 지방 안전성을 증진시키고 고기의 색깔을 위해 비타민 E와 셀레늄 급여에 대한 연구 등이 진행되어지고 있다.

라. 농림수산물 부산물 사료첨가제

- 기존 해외 특허의 경우 농림수산물 부산물을 활용한 대다수의 사료첨가제는 이들 추출액을 단독으로 활용한 특허가 주를 이루고 있다. 또한 추출액 조합을 통한 특허의 경우 농림수산물 부산물의 조합을 통한 복합제제의 개발도 진행되고 있으나, 농산물과 해산물 또는 임산물과 해산물 유래 추출액의 조합에 따른 복합제제의 활용성은 낮은 실정이다. 아울러 일부 임산물 (오레노)와 갑각류 (키토산) 유래 추출액의 조합에 따른 특허 출원이 있으나 그 복합제제의 기능성은 항생제를 대체 할 정도의 수준에 미치지 않는 것으로 사료된다.
- 프로폴리스, 생강 뿌리, 초유 등을 조합한 사료첨가제를 이용해 면역 능력을 증가시켜 병원균에 대한 저항성을 강화시키는 가금류 사료첨가제 제품이 특허로 출원되어 있다 (US 2009/0226558 A1, 2009. United States Patent Application Publication Pub). 이뿐만 아니라, 아스파라거스, 마코파 등의 허브로부터 추출된 유용물질을 이용하여 우유의 생산성과 품질을 개선시키기 위한 제품이 연구되어 특허로 출원되어 있다 (US 8,663,623 B2, 2014. United States Patent Application Publication Pub).
- 국외논문 분석에 따르면 임엽 유래 추출물 (2,392건), 수산물 유래 추출물 (1,221건) 및 농업 유래 추출물 (432건) 순으로 논문이 출간되어 임엽분야의 사료첨가제 활용이 가장 높은 것으로 나타났다 (pubmed, sciencedirect). 이들 논문은 다수가 추출액을 단독으로 사용한 것이

며, 추출액의 조합의 경우에 있어서는 대다수가 식물추출물 형태로 이들 조합에 따른 가축 동물의 기능성을 평가하였다.

마. 기능성 사료첨가제

- 2011년 기준으로 동물약품 사업부 분야에서 차지하는 동물 사료첨가제 비율은 42.7%이며, 전세계 동물 사료첨가제 시장의 2011년 수익은 150억 달러로 2017년에는 195억 달러로 증가 될 것으로 예상된다. 이는 연평균 성장률이 2012년에서 2017년까지 3.8%씩 증가됨을 의미한다.
- 아시아태평양과 북아메리카는 세계적으로 사료첨가제의 소비량이 제일 큰 국가이며, 이외에도 중국, 인도, 브라질 등의 나라에서도 1인당 소득이 증가됨에 따라 고기 소비량이 증가되고 있어 세계 시장에 큰 비중을 차지하고 있다.
- 세계적인 동물 사료첨가제 회사로는 네덜란드의 DSM, 일본의 Ajinomoto Co. Inc., 덴마크의 Evonik와 Chr. Hansen A/S, 독일의 BASF SE, 미국의 Lextron Inc., Archer Daniels Midland Company와 Cargill Inc. 등이 있다 (단국대학교, 2013).
- 동물 사료첨가제 시장은 새로운 기술과 제품의 혁신을 통해 효율적인 가축 생산품의 증가에 초점을 두어 급격히 발달하고 있으며, 선도적인 회사들은 지역을 넘어선 사업 확대와 새로운 시설을 도입한 제품 생산라인의 효율적인 공급에 초점을 두고 있다. 주로 유럽의 회사들이 증가하는 아시아인의 축산물 수요를 맞추기 위해 아시아태평양 지역에 많은 투자를 함으로써 새로운 제품을 개발하려 노력하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 과제에서는 항생제 대체 복합 미생물 생균제 (유산균, 바실러스, 효모), 기능성 생리활성 화합물 (alpha-linolenic acid, ALA; betaine; vitamin E; conjugated linoleic acid, CLA), 기능성 농림수산부산물 (마늘, 미역, 피톤치드)을 이용하여 친환경 기능성 사료첨가제를 개발하고자 하였다. 제1세부과제에서는 ‘항생제 대체 복합 미생물 생균제 최적 생산체계 개발을 통한 제품화 및 브랜드 친환경 축산물 생산’을 목표로, 제2세부과제에서는 ‘생리활성 화합물 활용 사료첨가제 최적 생산체계 개발을 통한 제품화 및 브랜드 기능성 축산물 생산’을 목표로, 제1협동과제에서는 ‘생리활성 성분 함유 농림수산부산물을 활용한 친환경-웰빙 사료첨가제 개발 및 브랜드 기능성 축산물 생산’을 목표로 연구를 진행하였다. 개발된 사료첨가제를 이용하여 오메가 지방산 함량이 균형을 이루고 기능성 생리활성 물질이 축적된 형태의 웰빙 원료육과 이를 이용한 가공육 제품을 생산하고 산업화 하는 것을 목표로 연구를 진행하였다. 본 과제의 참여기업과 함께 연구개발 성과를 이용하여 단계적으로 친환경 기능성 웰빙 축산물 및 가공품의 생산 및 산업화를 진행하였다 (그림 6).

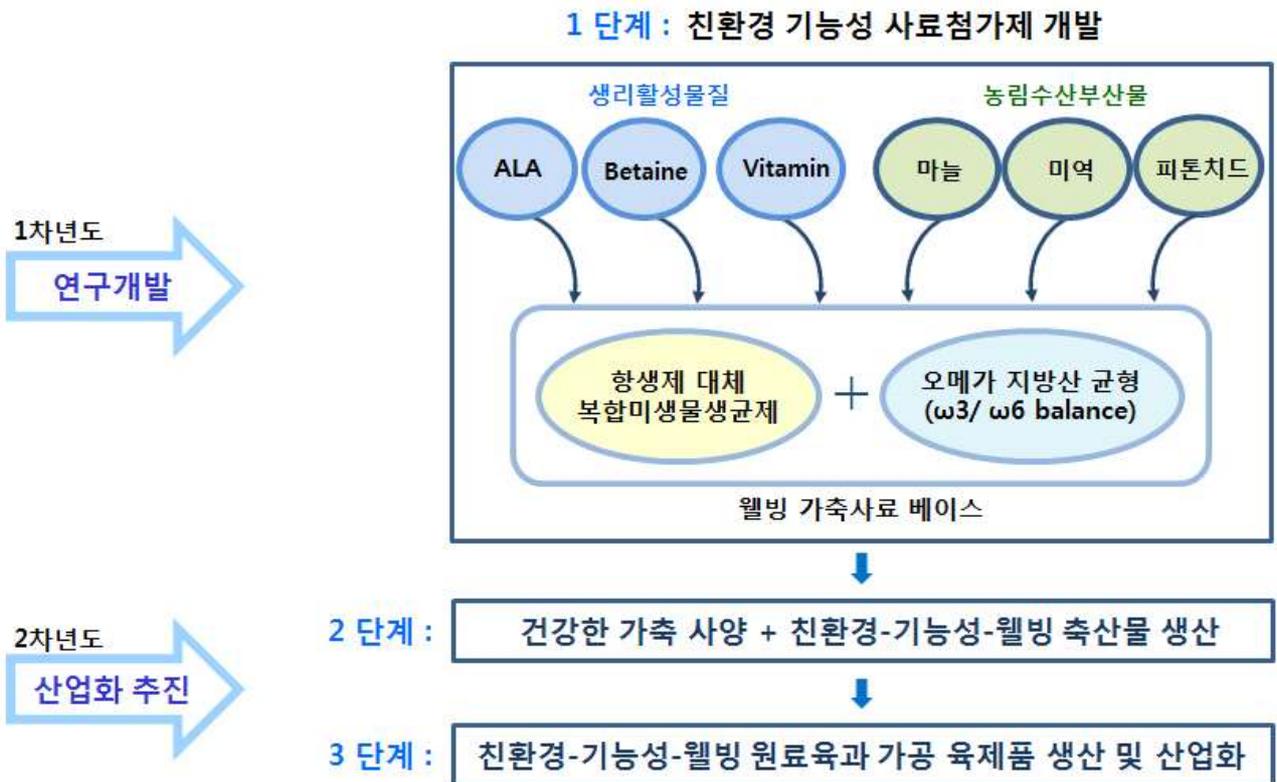


그림 6. 연구개발 단계별 추진체계

제1절 제1세부과제: 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 최적 생산 체계 개발을 통한 제품화 및 브랜드 친환경 축산물 생산

1. 복합 미생물 생균제의 조성 및 생산 방식 최적화

가. 복합 미생물 생균제의 조성 확립

제1세부과제 연구실에서 기 선발한 생균제 후보균주를 조합하여 복합 미생물 생균제 조성을 설정하고 각 균주의 생산배지와 건조방법을 최적화하는 연구를 수행하였다.

(1) 복합 미생물 생균제의 조성

생균제 조성은 각 균주의 특성을 조합하여 생균제 효과를 높이도록 설계하였고 조성에 사용한 균주는 제1세부과제의 선행연구에서 밝혀진 생화학적 생물학적 효과에 기반하여 선정하였다. 각 균주의 특성과 기대효과를 정리하면 표 5와 같다.

표 5. 복합 미생물 생균제 균주의 특성과 기대효과

	종 명	특 정	비 고
유산균	<i>Pediococcus acidilactici</i> PA-GS1	<i>Salmonella gallinarum</i> 특이적으로 항균력 증진	“바이오사료첨가제 사업단” 연구 수행으로 선발 특허등록 10-0937301-0000
	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP-GS1	<i>E. coli</i> K99 특이적으로 항균력 증진	“바이오사료첨가제 사업단” 연구 수행으로 선발 특허등록 10-1378673-0000
효모	<i>Saccharomyces boulardii</i> 796	인축용 생균제로 널리 활용	ATCC 분양
바실러스	<i>Bacillus licheniformis</i> T2	축분 냄새저감 효과 확인	자체 분리 동정
	<i>Bacillus thuringiensis</i> T3	파리 유충 생육억제 효과 확인	자체 분리 동정

(2) 복합 미생물 생균제 균주 최적배지 선정

각 균주의 배양실험에 사용한 배지 중, 우수한 성능을 발휘하였던 배지 종류를 선택하여 최종 성능을 검증하였다.

(가) Seed culture media

- ① 유산균 : MRS (Lactobacilli MRS broth, Difco 288130)
- ② 효모 : YPD (yeast extract, peptone, and dextrose broth, Difco 242820)
- ③ 바실러스 : TSB (tryptic soy broth, Bacto 211825)

(나) 생산용 배지 (표 6)

표 6. 균주 배양을 위한 생산배지 조성

균주	배지	조성 (g/L)
유산균	MRS	Commercial MRS 사용
	CM-2m	Corn steep-solid, 50; molasses, 50; yeast extract, 5; MnSO ₄ , 0.08; Sodium citrate, 0.2; K ₂ HPO ₄ , 4; Tween 80, 1 ml; pH 7.0
효모	2X YPD	Yeast extract, 20; Peptone, 20; Dextrose, 20
	YSM1	Corn steep-solid, 20; yeast extract, 10; peptone, 20; molasses, 30; soluble-starch, 20; pH 6.0
바실러스	BSM3-1	Corn steep-solid, 17; molasses, 18.6; soluble-starch, 14; pH 7.0
	BSM-9	Corn steep-liquid, 30 ml; molasses, 30; NaCl, 5; KH ₂ PO ₄ , 0.5; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.2; CaCO ₃ , 1; pH 7.0

(3) 생균제 배양 실험

(가) 접종원 준비

- 균주 stock을 해당 1.5% agar plate에 각각 streaking 후, 배양한다.

- ① 유산균 : MRS, 37 °C, 48시간
- ② 효모 : YPD, 30 °C, 48시간
- ③ 바실러스 : TSA, 37 °C, 24시간

멸균된 250 ml baffled flask에 각 해당 멸균 broth를 40 ml씩 분주하고, 집락 하나를 접종하고 shaking incubator에서 overnight culture한다.

(나) 접종 및 배양

- 2 L baffled flask에 400 ml 생산 배지 분주 후, 멸균하고 식힌 후, overnight 배양액 4 ml (1%)을 접종한 다음, 200 rpm으로 적정 온도에서 shaking incubation 진행한다.

- ① 유산균 : 37 °C, 24시간
- ② 효모 : 30 °C, 48시간
- ③ 바실러스 : 30 °C, 72시간

(다) 생균수 측정

- 1 ml 배양액을 6,000 rpm, 4분 동안 원심분리 후, PBS 1 ml로 washing 2회 진행한다.
- PBS로 10 배씩 희석하여 agar plate에 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} 희석액 100 μ l 도말 후 배양한다.
- 바실러스 포자수 측정 시, 80 °C에서 30분 열처리한다.

표 7. 유산균 생산을 위한 최적배지 선정

균주	배지	균수 (cfu/ml)
<i>L. plantarum</i> (Lp)	CM-2m	1.02×10^9
	MRS	2.25×10^8
<i>P. acidilactici</i> (Pa)	CM-2m	1.97×10^9
	MRS	3.27×10^9

- 결과: Lp 유산균은 CM 배지에서, Pa 유산균은 MRS 배지에서 높은 생균수를 나타냈다.

표 8. 효모 생산을 위한 최적배지 선정

균주	배지	균수 (cfu/ml)
<i>Saccharomyces boulardii</i> (Sb)	2X YPD	8.3×10^8
	YSM1	1.24×10^9

- 결과: Sb균은 YSM1 배지에서 생산성이 더 우수하였다.

표 9. 바실러스 생산을 위한 최적배지 선정

균주	배지	균수 (cfu/ml)	포자수 (cfu/ml)
<i>B. licheniformis</i> T2	BSM3-1	3.3×10^9	2.5×10^9
	BSM9	1.78×10^9	1.16×10^9
<i>B. thuringiensis</i> T3	BSM3-1	3.29×10^7	3.04×10^7
	BSM9	1.69×10^7	1.39×10^7

- 결과: T2, T3 두 균주 모두 BSM3-1 배지에서 균수와 포자수 모두 우수하였다.

(4) 배양액 건조 방법 연구

건조 후 생존율이 가장 높은 부형제와 건조법을 조사하였다.

(가) 유산균

미생물 배양액 4,000 rpm, 4분 동안 원심분리 후, pellet의 무게가 총 현탁액의 40%가 되도록 상등액으로 재현탁한다. 건조 후, 총고형물 [DCW (dry cell weight) + 부형제 (skim milk/MSG)]이 30%가 되도록 부형제를 첨가한다. [예: 100 ml 현탁액 40% WCW (wet cell weight)] = ~14 g DCW + 16 g 부형제 (15.68 g skim milk + 0.32 g MSG) = 30 g/100 ml). -80 °C에서 예비동결 후, 동결건조한다.

(나) 효모

배양액을 6,000 rpm, 20분 동안 원심분리 후, pellet을 회수하고, 총 배지량의 1/10 PBS로 washing 진행한다. 효모 현탁액을 생미강, talc, 또는 zeolite와 섞은 후, 37 °C에서 overnight 열풍 건조한다.

표 10. 효모 배양액을 건조시키기 위한 최적 부형제 선정

균주	부형제	생균총수 (cfu)	생존율 (%)
<i>Saccharomyces boulardii</i> (Sb)	Talc	사멸	0
	Zeolite	사멸	0
	생미강	5.8×10^9	70

- 결과: 생미강으로 건조시킨 효모만 생존하고 나머지 부형제에서는 모두 사멸하여, 효모의 건조공정의 부형제로 생미강을 선택하였다.

(다) 바실러스

배양액을 6,000 rpm, 20분 동안 원심분리 후, pellet을 회수하고, 총 배지량의 1/10 PBS로 washing 진행한 후, 최소 volume으로 PBS나 증류수로 현탁한다 (통상 1/20 vol.). 배양액을 부형제와 혼합한 후 [6 ml (T2) or 10 ml (T3) 농축균액 + 10 g 부형제], spatula로 잘 혼합하여 50 °C에서 overnight 건조한다.

표 11. 바실러스 배양액을 건조시키기 위한 최적 부형제 선정

균주	부형제	농축 균액 (cfu/ml)	건조물 (cfu/g)	건조중량 (g)	건조생존율 (%)
<i>B. licheniformis</i> T2	Talc	1.56×10^{10}	8.3×10^9	10.11	>99
	Zeolite		7.4×10^9	12.63	90
<i>B. thuringiensis</i> T3	Talc	5.2×10^9	0	-	0
	Zeolite		3.8×10^9	13.67	>99

- 결과: T2는 부형제의 종류와 상관없이 건조물의 총균수가 비슷하지만 T3는 talc를 사용하여

건조하였을 때, 균이 모두 사멸하였다. 따라서 바실러스의 건조 공정에는 zeolite를 부형제로 사용하였다.

- Talc에서 T2균과 달리 T3균이 선별적으로 사멸하는 원인을 알아보기 위하여 각 부형제의 특성 (pH, 발열여부, 균 발아여부)을 조사하였다. 아래 표 12에서 보는 바와 같이 발열이나 pH, 또는 포자의 발아와 관계없이 일부 부형제후보물질의 경우 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 현재로서는 원인을 알 수 없다.

표 12. 부형제 물질 (5% in PBS)의 특성 조사 (Test 균 = *Bacillus* T3)

부형제명	pH		발열여부	발아여부
	0분	30분		
PBS (Cont)	7.87	7.86	-	-
Talc purum	8.06	8.05	-	사멸 (포자 사라짐)
Talc 10um	8.24	8.47	-	사멸 (포자 사라짐)
Zeolite	9.99	10.32	-	-
Kaolin	7.16	7.09	-	사멸 (포자 사라짐)
Skim milk	6.74	6.8	-	약 20%
Starch	7.46	7.46	-	-

- * 발아여부: T3 배양액을 5% 부형제 용액에 1/10부피로 접종 후 37 °C, 1시간 후 현미경관찰.
사멸은 현미경내 포자나 발아한 세포를 찾을 수가 없으며 도말시 생균이 검출 안 됨.
- * - : 발열현상이나 발아현상 없음.



그림 7. 생균제 미생물 건조 부형제 실험. 각 부형제와 균 농축액을 희석하여 50 °C에서 건조한 후 생균수를 측정하여 생존율이 높은 부형제 선정.

나. 복합 미생물 생균제 시제품 생산

복합 미생물 생균제 시제품을 생산하기 위하여 효모, 유산균, 바실러스 균주를 각각 개발된 생산용 배지에 배양하고 건조 후, 건조물의 생균수를 측정하였다. 이들 균주의 건조물을 혼합하여 복합 미생물 생균제 시제품을 제조하고 비육돈 사양 시험을 위하여, 사료제조를 담당하는 참여기업인 이지바이오그룹 (주)팜스토리 사료 공장으로 송부하여 시험사료를 제조하였다.

(1) 유산균

- *P. acidilactici* 175 (6 L), *L. plantarum* 177 (6 L) 균주를 액상배지에서 배양하여 각 85 g씩의 pellet을 수확한다.
- 각 균주에서 수확한 85 g씩의 pellet을 상등액으로 재현탁하여 40% cell suspension이 되게 한다 (~127 ml 상등액에 현탁. 총 무게가 213 g).
- 34 g 부형제 (33.32 g skim milk + 0.68 g MSG)를 각 병에 첨가하여 잘 혼합한다.
- 샘플 박스를 준비하고 측량한다.
- 4개의 샘플 박스를 은박지로 덮어 -80 °C 초저온냉장고에 overnight동안 예비동결한다.



그림 8. 유산균 동결건조 후 사진



그림 9. 유산균 동결건조물의 분쇄 전 성상

표 13. 복합 미생물 생균제 생산을 위한 유산균 배양

균주	배지	cfu/ml	total culture vol.	total cfu
<i>L. plantarum</i>	CM-2m	1.02×10^9	2.7 L	3.36×10^{12}
	MRS	2.25×10^8	2.7 L	
<i>P. acidilactici</i>	CM-2m	1.97×10^9	2.7 L	1.41×10^{13}
	MRS	3.27×10^9	2.7 L	

표 14. 복합 미생물 생균제 생산을 위한 유산균 동결건조

균주	부형제	cfu/g	DCW (g)	total cfu	생존율 (%)
<i>L. plantarum</i>	98% skim milk,	1.13×10^{10}	69.5	7.85×10^{11}	23.4
<i>P. acidilactici</i>	2% MSG	1.04×10^{11}	63.2	6.57×10^{12}	46.6

(2) 효모

2 L baffled flask에 YSM1배지를 400 ml 분주하고 접종원을 총 배지량의 1/100로 접종한다. 총 6개의 flask를 30 °C, 200 rpm 조건에서 48시간 동안 진탕 배양한다. 배양액을 모아 500 ml로 농축한 후에 480 ml의 농축균액을 800 g의 미강과 혼합하여 37 °C에서 overnight 건조하였다.

표 15. 복합 미생물 생균제 생산을 위한 효모 배양

균주	배지	cfu/ml	total culture vol.	total cfu
<i>Saccharomyces boulardii</i>	YSM1	5.4×10^8	2.4 L	1.3×10^{12}

표 16. 복합 미생물 생균제 생산을 위한 효모 건조

균주	부형제	cfu/g	DCW (g)	total cfu	생존율 (%)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	미강	1.23×10^9	831	1.02×10^{12}	81.8

(3) 바실러스

2 L baffled flask에 BSM-3배지를 400 ml 분주하고 접종원을 총 배지량의 1/100로 접종한다. 총 6개의 flask를 30 °C, 200 rpm 조건에서 72시간 동안 배양한다. 배양액을 모아 400 ml로 농축한 후에 200 g의 농축균액을 200 g의 zeolite와 섞어 50 °C에서 overnight 건조하였다. 포자수는 80 °C에서 10~30분 처리한 후 생균수로 계산하였다.

표 17. 복합 미생물 생균제 생산을 위한 바실러스 배양

포자수				
균주	배지	cfu/ml	total culture vol.	total cfu
<i>B. licheniformis</i> T2	BSM-3	4.7×10^8	2.4 L	1.13×10^{12}
<i>B. thuringiensis</i> T3	BSM-3	1.27×10^8	2.4 L	3.05×10^{11}

표 18. 복합 미생물 생균제 생산을 위한 바실러스 건조

균주	부형제	cfu/g	DCW (g)	total cfu	생존율 (%)
<i>B. licheniformis</i> T2	Zeolite	4.5×10^9	253.7	1.14×10^{12}	100
<i>B. thuringiensis</i> T3	Zeolite	1.48×10^9	259	3.83×10^{11}	124

(4) 복합 미생물 생균제 시제품 생산

- 위 결과들을 바탕으로 복합 미생물 생균제 시제품을 제조하였다 (그림 10).

표 19. 복합 미생물 생균제 조성 및 시제품 제작

균주명		각원료 생균수 (cfu/g)	첨가량 (g)	최종균수 ($\times 10^7/g$)
유산균	<i>L. plantarum</i>	1.13×10^{10}	40	11.3
	<i>P. acidilactici</i>	1.04×10^{11}	40	100
효모	<i>S. boulardii</i>	1.23×10^9	400	12.3
바실러스	<i>B. licheniformis</i> T2	4.5×10^9	176	20
	<i>B. thuringiensis</i> T3	1.5×10^9	160	6
부형제 (미강)			3,184	
총 무게			4,000	



그림 10. 복합 미생물 생균제 시제품

2. 복합 미생물 생균제의 제형 확립

생균제의 소화장관 전달효율과 저장성을 증진시키기 위해 pH-sensitive hydroxypropyl methylcellulose phthalate 55 (HPMCP 55)를 이용하여 파우더 제형, 타블렛 제형 (경도 3, 6, 10 KP)의 HPMCP의 특성을 조사하고, 가금에서의 주요병원균인 *Salmonella gallinarum*에 항균활성을 지닌 유산균인 genome shuffled *Pediococcus acidilactici* (GS1)을 담지하여 생균제 보호 효과와 *in vivo* 활성을 검증함으로써 전달효율이 높은 생균제의 제형을 확립하였다.

가. HPMCP 타블렛 제조 및 특성조사

GS1 유산균과 HPMCP 파우더를 1:1의 중량비로 혼합 후, 3~10 KP의 경도 (hardness)를 갖는 직경 4 mm의 타블렛을 제조하였다. 타블렛 제조 시, 제조압력을 증가시켜 타블렛 경도를 증가시킬 수 있으며 경도에 따른 타블렛의 생균제 보호 특성을 조사하였다. 그림 11에서와 같이, 타블렛 제형에서 담지된 GS1이 90% 이상 생존하는 것을 확인하였으며, 타블렛 제조 시, 압력이 증가함에 따라 발생하는 열로 인하여 생균제의 생존율이 약간 감소하는 경향을 나타냈다. 또한, 그림 12에서와 같이 경도 10 KP의 HPMCP 타블렛은 pH 2의 위장 환경에서 붕괴 (disintegration)되지 않고 완전한 형태를 유지하였다.

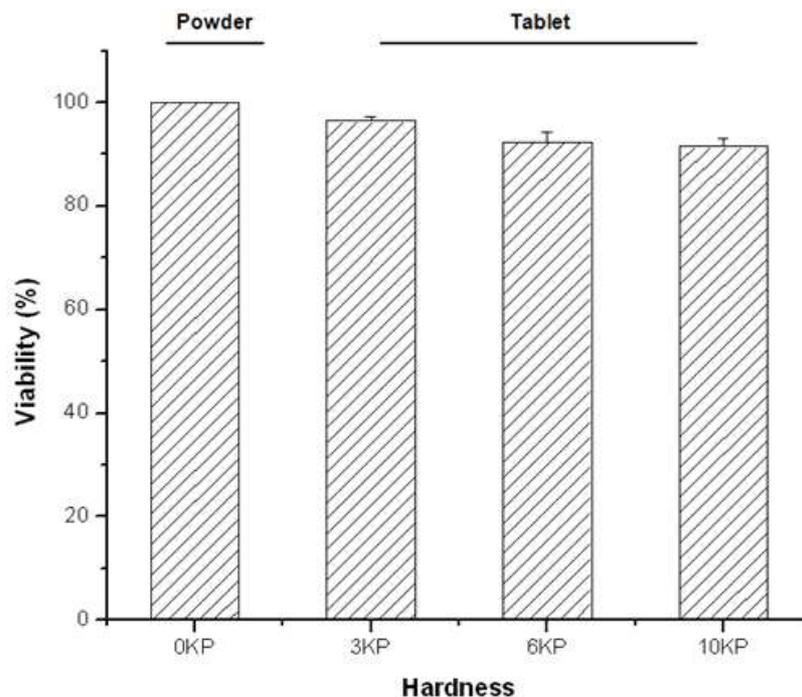


그림 11. 타블렛 제조 시 압력에 따른 유산균의 생존율

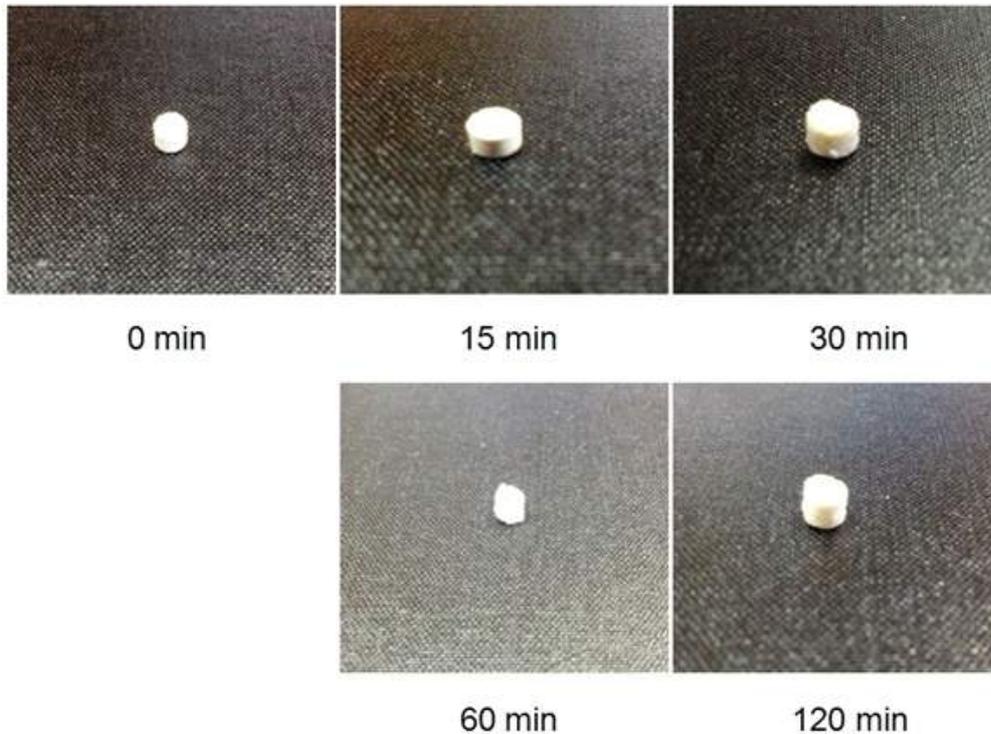


그림 12. Simulated gastric fluid (SGF)에서 HPMCP 타블렛 (10 KP)의 시간에 따른 형태 변화

나. HPMCP 타블렛에 담지된 생균제의 *in vitro* 특성 조사

(1) *In vitro* 위장 환경에서의 생균제 보호 효과

타블렛에 담지되지 않은 유산균은 그림 13(A)에서와 같이 동물의 위장 내 환경인 pH 2에서 2시간 배양 시, 급격히 생존율이 감소하였고, 펩신이 추가로 존재하는 환경에서는 그림 13(B)에서와 같이 90분 후, 모두 사멸하였다. 그러나 HPMCP 타블렛에 담지된 유산균은 pH 2 환경과 펩신이 포함된 환경에서 모두 보호되었으며, 타블렛 제조시의 압력이 증가할수록 보호효과가 높았다. 특히 10 KP의 HPMCP 타블렛에 담지된 유산균은 위장 환경에서 2시간 노출되어도 70% 이상 보호되었다.

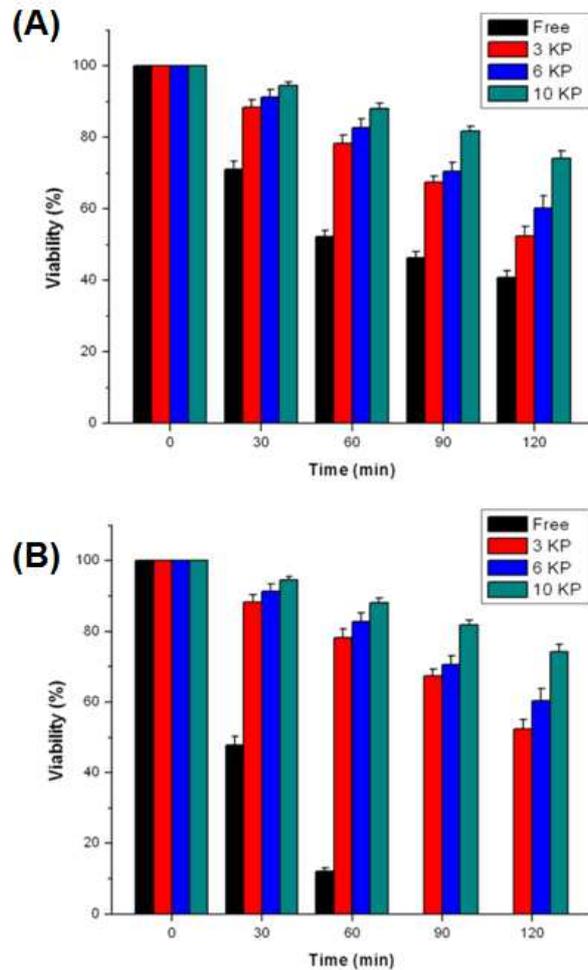


그림 13. 위장내 환경에서 HPMCP 타블렛의 GS1 보호효과. (A) Simulated gastric fluid (SGF), pH 2 환경에서의 생균수, (B) 펩신이 추가된 SGF, pH 2 환경에서의 생균수.

(2) *In vitro* 소장 환경에서의 HPMCP 타블렛의 경도에 따른 붕괴시간 비교

HPMCP 타블렛의 pH-sensitivity를 검정하기 위해 소장 환경 (pH 7.2)에서 타블렛 제조시의 압력에 따른 붕괴 시간을 측정된 결과, 그림 14에서 나타낸 바와 같이 3 KP로 제조한 타블렛은 30분 내에 붕괴되는 반면, 10 KP로 제조한 타블렛은 1시간 동안 형태를 유지하였다. 따라서 타블렛 제조 시, 압력이 높을수록 타블렛이 붕괴되는데 걸리는 시간이 증가하는 특성을 확인하였다.

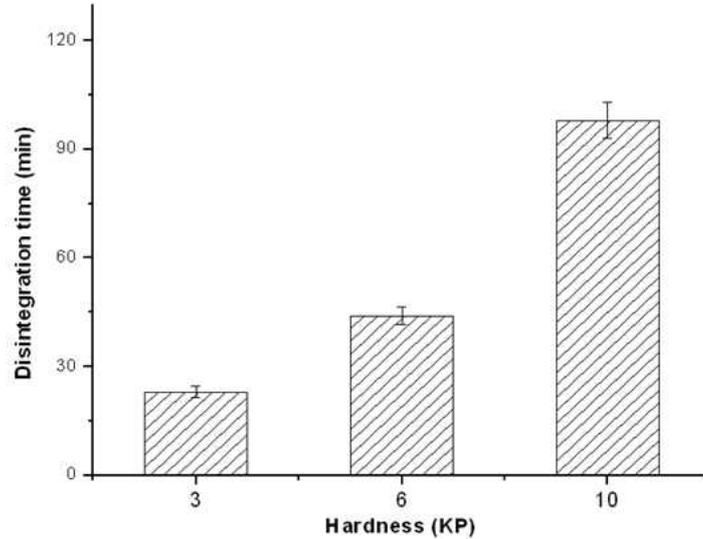


그림 14. *In vitro* 소장 환경 (pH 7.2)에서 HPMCP 타블렛의 제조 압력에 따른 붕괴시간 비교

(3) HPMCP 타블렛에 담지된 생균제의 *in vitro* 방출 특성

가축의 소화생리를 mimic하여 *in vitro* 위장 환경 (simulated gastric fluid, SGF)과 소장 환경 (simulated intestinal fluid, SIF)에서 타블렛에 담지된 생균제의 방출현상을 관찰하였다. 그림 15와 같이 SGF에서 1시간 동안 생균제가 보호되었고, SIF에서 30분 경과 후, 타블렛의 경도에 따라 20~50%의 생균제가 방출되었으며, 5시간 이후에는 거의 100% 방출되었다. HPMCP 타블렛의 경도가 높을수록 생균제의 방출이 느리게 나타났다.

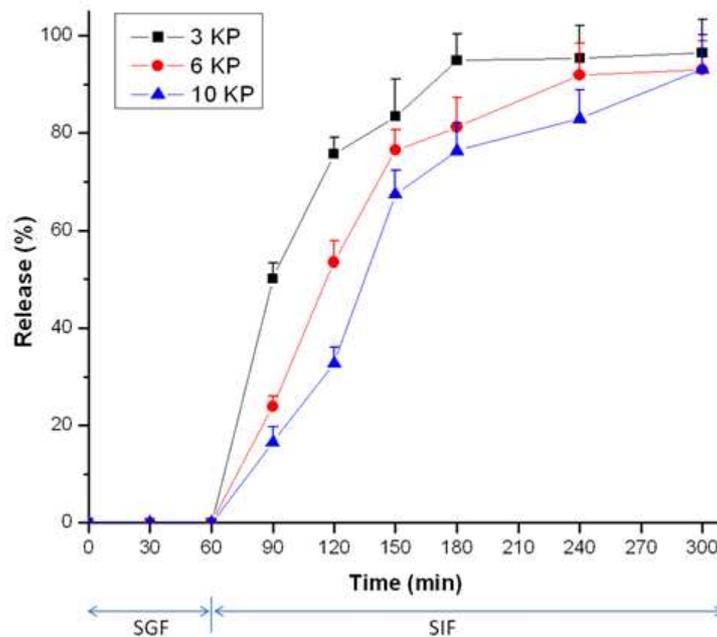


그림 15. SGF와 SIF에서 HPMCP 타블렛의 생균제 방출효과

(4) HPMCP 타블렛에 담지된 생균제의 *in vitro* 생존율

SGF, SIF에서 HPMCP 타블렛의 생균제 보호효과를 검정한 결과, 그림 16에서와 같이 SGF에서 생존율은 시간에 따라 감소하였으며, SIF에서는 6시간 동안 담지된 생균제의 생존율이 높게 나타났다. 타블렛 제조 시의 압력이 높을수록 SGF와 SIF에서 보호효과가 높게 나타났다.

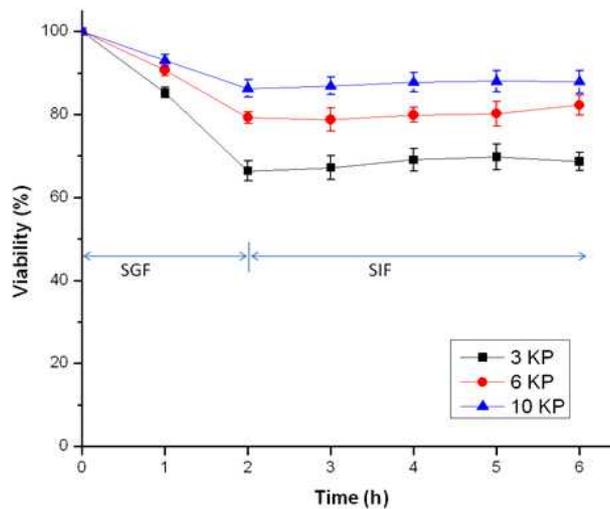


그림 16. SGF와 SIF에서 HPMCP 타블렛의 생균제 보호효과

다. 생균제가 담지된 HPMCP 타블렛의 저장성 검정

유산균이 담지된 HPMCP 타블렛의 저장 기간 동안의 안정성을 평가하기 위해 타블렛을 냉장환경 (4 °C)과 실온에서 각각 6개월간 저장한 후, 담지된 유산균의 생존율을 측정하였다. 그림 17에서와 같이 실온저장 시, 냉장저장 시보다 미생물의 생존율이 감소하였다. 6개월간 냉장저장 시, 높은 경도의 타블렛이 유산균 보호 효과가 높음을 확인하였다.

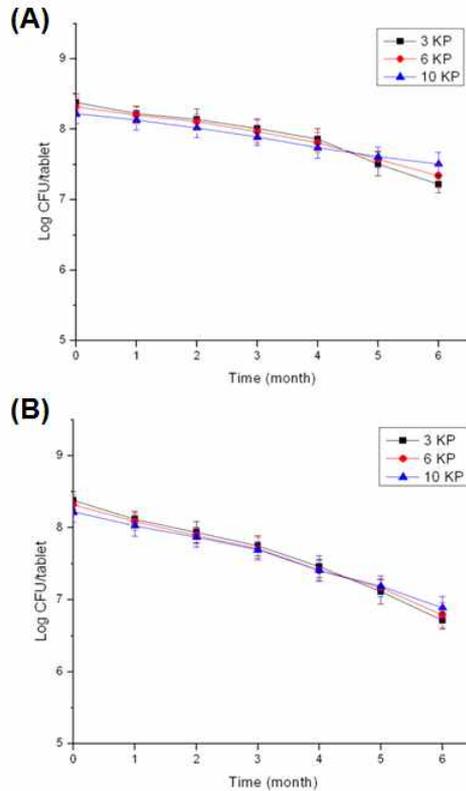


그림 17. 생균제가 담지된 HPMCP 타블렛의 저장성. (A) 6개월간 4 °C 냉장보관 시, (B) 6개월간 실온 보관 시, HPMCP 타블렛에 담지된 생균제의 생존율.

라. HPMCP 타블렛에 담지된 생균제의 *in vivo* 검정

HPMCP 타블렛에 담지된 생균제의 *in vivo* 전달 효율을 조사하기 위하여 11일령의 육계를 이용하여 그룹당 6 수씩 배치하여 HPMCP 타블렛 경구 투여 시, 소화장관 내 생존율을 측정하였다.

(1) HPMCP 타블렛 담지 생균제의 육계 경구 투여 시험 설계

시험구는 control (PBS) 구, GS1 solution 처리구, GS1-HPMCP 타블렛 처리구로 구성하였고, GS1 유산균은 회당 2×10^8 cfu의 양으로 총 5회 (0, 4, 24, 28, 48시간) 투여하였다 (그림 18). 닭의 소화장관 내 사료 통과시간은 근위에서 5~12분, 소장에서 130~150분, 맹장에서 24시간이므로, 이를 고려하여 마지막 투여 후, 3시간 및 6시간 후, 육계의 근위, 소장, 맹장을 적출하고 내용물을 *Pedococcus* 선택배지에서 배양하여 각 소화장관 내 생존율을 측정하였다.

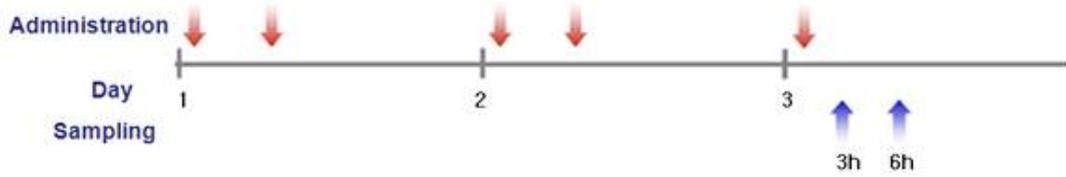


그림 18. HPMCP 타블렛 담지 생균제의 육계 경구 투여 시험 스케줄

(2) 경구 투여 HPMCP 타블렛 담지 생균제의 *in vivo* 전달 효율

HPMCP 타블렛에 담지된 GS1 유산균을 육계에 5회 경구 투여 후, 3시간과 6시간 후에 육계의 근위, 소장, 맹장을 분리하고 각 소화장관 내 GS1 유산균의 생균수를 측정하였다. 그림 19와 같이 경구 투여 3시간과 6시간 이후, 소장하부와 맹장에 생균수가 높게 나타났으며, GS1 solution 처리구보다 GS1-HPMCP 타블렛 처리구에서 소화장관 내 생균제의 전달효율이 높게 나타났다.

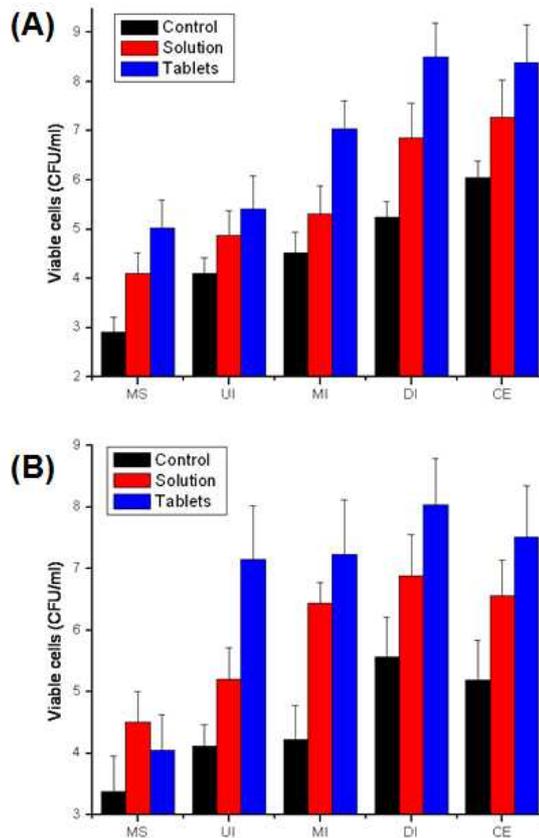


그림 19. HPMCP 타블렛에 담지된 GS1의 경구 투여 후 육계 소화장관 내 생균수. (A) 마지막 경구 투여 3시간 후, (B) 6시간 후의 육계 소화장관 부위 별 (MS: muscular stomach, UI: up portion of small intestine, MI: middle portion of small intestine, DI: down portion of small intestine, CE: cecum) 생균수.

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 개선시킬 수 있는 것으로 확인되었다. HPMCP 타블렛 제형은 특히 쪼아 먹는 습성이 있는 양계용이나, 대용유를 급여하는 송아지보다는 양돈용으로 적합할 것으로 생각된다.

3. 동물 실증 실험을 통한 복합 미생물 생균제의 효과 검증

동물 실증 실험을 통한 복합 미생물 생균제의 효과를 보기 위해 제2세부과제와 함께 비육돈 사양시험을 수행하였다. 실험 내용 및 결과는 제2세부과제의 동물 실증 실험 내용과 함께 ‘제3절 제1,2세부과제 공동 사양시험’ 부분에 제시하였다.

제2절 제2세부과제: 생리활성 화합물 활용 사료첨가제의 최적 생산체계 개발을 통한 제품화 및 브랜드 기능성 축산물 생산

1. 기능성 사료첨가제 후보물질 선정 및 특성조사

가. 기능성 사료첨가제 후보물질 탐색

(1) 기능성 사료첨가제 후보물질 선정기준

본 과제를 통해 기능성 원료육을 생산하기 위한 사료첨가제에 활용할 후보 생리활성물질을 선별하기 위해 아래와 같은 기준을 설정하였다.

- (가) 사료첨가제 생리활성물질은 가축의 사양관리 기간 동안에는 가축의 정상적인 생리기전 유지와 함께 건강과 성장에 도움을 주며, 최종적으로는 축산물에 전이되어 축산물을 소비하는 소비자의 건강증진에 기여해야 한다.
- (나) 사료첨가 생리활성물질은 원료육의 오메가 지방산 균형을 개선하여 소비자의 건강증진에 기여하는 물질이어야 한다.
- (다) 사료첨가 생리활성물질은 가축의 면역기능을 활성화하여 항병력 증진에 도움을 주어야 한다.
- (라) 사료첨가 생리활성물질은 경제적인 가격에 원료수급이 원활하여 축산물 생산비 증진에 부담이 적은 물질이어야 한다.
- (마) 사료첨가 생리활성물질은 복합적으로 사용하였을 때, 상호 시너지 작용에 의해 효과가 더욱 증진될 수 있는 조합이어야 한다.

(2) 기능성 사료첨가제 후보물질 선정

위에서 제시한 생리활성물질 선발기준에 의해 기능성 사료첨가제 후보물질을 선발하여 ‘표 20’에 제시하였다.

표 20. 본 과제를 통해 선정한 기능성 사료첨가제 후보물질의 특성 및 기대효능

후보물질	물질특성	기대효능	비고 (경제성) ¹⁾
복합 미생물 생균제	<ul style="list-style-type: none"> 유산균, 효모, 바실러스가 조합된 복합미생물 생균제 	<ul style="list-style-type: none"> 각 축종별 주요 병원균 방어에 특화된 유산균과 효모, 바실러스 등 생균제 베이스의 혼합형태로 가축의 생육증진, 면역증진 및 항병력 강화 	<ul style="list-style-type: none"> 10,000원/kg으로 생산가능, 사료 내 0.1% 첨가시 10원/kg
아마종실	<ul style="list-style-type: none"> 오메가-3 지방산 함량이 높은 가공 아마종실 	<ul style="list-style-type: none"> Extruded whole seed linseed로서 오메가-3 지방산인 ALA (alpha-linolenic acid)를 17% 이상 함유하고 있어 축산물의 오메가 지방산 균형 유지에 기여 	<ul style="list-style-type: none"> 1,600원/kg으로 수급 원활, 사료 내 2% 미만 첨가로 오메가 지방산 균형 유지
Vitamin E	<ul style="list-style-type: none"> 토코페롤, 항산화 지용성 비타민 	<ul style="list-style-type: none"> 가축사양시 Se와 함께 면역력 및 항염증작용, 축산물에 전이되어 항산화 작용 및 암과 심장질환 발생 억제 	<ul style="list-style-type: none"> 10% 원료 3,200/kg으로 수급가능
Betaine	<ul style="list-style-type: none"> 체내에서 methionine, carnitine, creatine 등의 생리활성 물질로 전변 가능 	<ul style="list-style-type: none"> 가축사양시 methionine의 대체제로 축산물 내 carnitine, creatine 등 생성 및 축적 기대, 혈압강하, 항혈당작용, 지방간 치료 및 해독작용, 혈중 콜레스테롤 농도 저하 	<ul style="list-style-type: none"> Betaine-HCl 형태의 원료를 1,500원/kg으로 수급가능
CLA	<ul style="list-style-type: none"> 공액 리놀렌산, 특징적인 이중결합을 갖는 기능성 생리활성 지방산 	<ul style="list-style-type: none"> Betaine과 함께 근육 성장 촉진 효과 기대 cis-9, trans-11 : 항암성 cis-10, trans-12 : 비만해소/다이어트 	<ul style="list-style-type: none"> 35,000원/kg, 소규모 주문생산으로 가격 높음, 대량생산으로 극복 가능

¹⁾ 원료가격은 수급현황, 시기, 공급처에 따라 변동이 있을 수 있음

나. 선정된 기능성 사료첨가제 후보물질 특성

(1) 복합 미생물 생균제

이번 연구개발에 활용된 복합 미생물 생균제는 본 연구팀이 2010년 6월부터 2013년 6월까지 3년 동안 진행했던 농림축산식품부 ‘바이오사료첨가제 사업단’ 과제를 통해 개발된 결과물로, 양돈, 양계, 축우 산업에 특화된 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 생산을 목표로 특정 병원균 방어에 특화된 유산균, 바실러스, 효모 및 생균제 활용가능 대장균 등 유용 미생물의 복합 구성을 통해 각 미생물이 지닌 다양한 장점에 의해 생균제의 기능을 극대화 하는 전략을 취하고 있다. 각 구성 미생물의 특성 및 그 기대효과는 아래와 같다.

(가) 유산균: 분자육종기법을 이용하여 양돈, 양계, 축우산업에 빈번하게 발생하는 병원균에 항균력을 강화시킨 특허 유산균 (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*)

(나) 효모: 인축용 생균제로 널리 이용, 단백질 및 미네랄 공급원, 면역체계 활성화 (*Saccharomyces boulardii*)

(다) 바실러스: 유용 소화효소 분비, 사료효율 개선, 다양한 병원균에 대한 항균효과

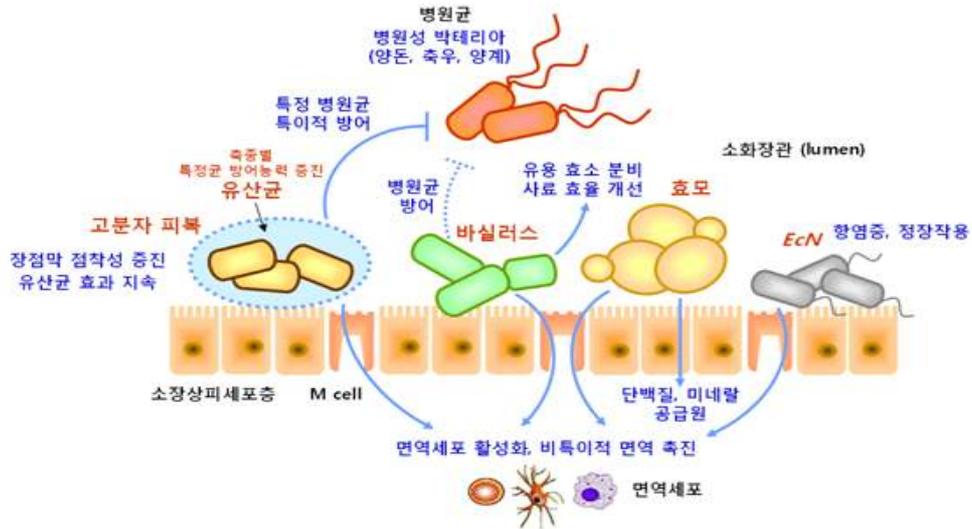


그림 20. 항생제 대체 복합 미생물 생균제 작용 모식도
(바이오사료첨가제 사업단 최종보고서, 2013)

(2) 아마종실

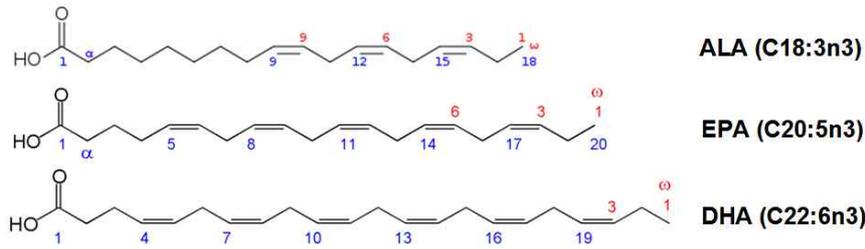
(가) 오메가-3, 오메가-6 지방산 (ω -3, ω -6 fatty acid)

지방산은 우리 몸에서 세포막의 구성성분, 지질계 호르몬의 전구체, 체지방 에너지원 등으로 활용되는 필수적인 영양물질이다. 구조적으로 이중결합의 유·무에 따라 불포화지방산과 포화지방산으로 구분하고, 영양적으로는 동물 체내에서 생성되지 않아 반드시 식이를 통해 섭취해야 하는 지방산을 필수지방산, 그 외의 것을 비필수지방산으로 분류한다. 이중결합이 여러 개 존재하는 다가 불포화지방산은 대부분 포유동물에 필수지방산으로 대표적인 것으로는 오메가-3 (ω -3) 계열 지방산과 오메가-6 (ω -6) 계열 지방산이 있다. 오메가 지방산의 번호 구분은 지방산의 알킬 사슬구조 중 가장 말단에 위치하는 메틸기 (CH_3) 탄소(오메가 탄소)로부터 원자번호를 부여할 때 최초로 나타나는 이중결합이 몇 번째 위치하는가에 따라 정해진다.

대표적인 오메가-3 지방산으로는 ALA (alpha-linolenic acid), EPA (eicosapentaenoic acid), DHA (docosahexaenoic acid) 등이 있고, 오메가-6 지방산에는 LA (linoleic acid), GLA (gamma-linolenic acid), AA (arachidonic acid) 등이 있다 (그림 21).

오메가-3 지방산은 신생아 및 어린이의 시력과 뇌 발육에 필수요소로 임산부나 수유부의 경우 충분히 섭취하는 것이 좋고, 항염증, 혈액 항응고, 심혈관 질환 예방 및 완화와 같은 다양한 생리작용을 가지고 있다. 오메가-6 지방산 역시 생체에 필수적인 지방산으로 피부, 모발, 손톱 등의 건강을 유지하고 호르몬 및 감정 균형을 유지하는데 도움을 준다.

Omega-3 fatty acids



Omega-6 fatty acids

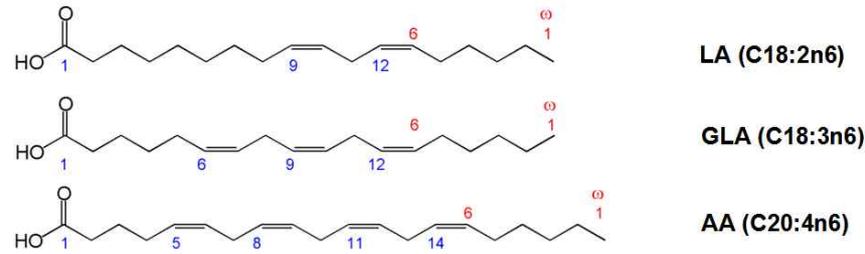


그림 21. 대표적인 오메가-3 및 오메가-6 지방산

(나) 알파리놀렌산 (alpha-linolenic acid, ALA)

알파리놀렌산은 오메가-3 계열의 지방산으로 필수지방산 중 하나이다. 18:3(n-3)로 표현형을 나타내며 cis-9, 12, 15 이중결합을 가지는 탄소수 18개의 지방산이다. 주로 치아씨, 아마씨, 호두 등에 다량 함유되어 있다 (그림 22).

알파리놀렌산과 리놀레산은 생리적으로 중요한 불포화 지방산 합성에 서로 경쟁하기 때문에 리놀레산을 많이 섭취하면 EPA, DHA 보다는 아라키돈산의 합성이 많아지게 된다.

많은 염증성 질환이 아라키돈산을 매개로 하여 진행되는데 류마티스 관절염, 궤양성 대장염이나 크론병과 같은 염증성 장질환, 천식, 면역성 콩팥질환 (IgA nephropathy) 등에서 오메가-3 지방산 복용이 효과가 있었으며 생선을 많이 섭취하면 유방암, 전립샘암, 대장암, 직장암 등의 예방효과가 있음이 알려져 있다.

2002년 미국의학협회 식품영양위원회는 성인 남성은 하루 1.6 g, 여성은 1.1 g의 알파리놀렌산을 섭취하는 것이 적정수준이라고 권장하고 있다. 바람직한 오메가-3/오메가-6 비율에 대한 다양한 제안들이 있었는데, 캐나다에서 1990년 처음으로 1:6의 섭취 권장량을 설정하였고, 이후 일본은 1:4 비율을 유지할 것을 제안하였다.

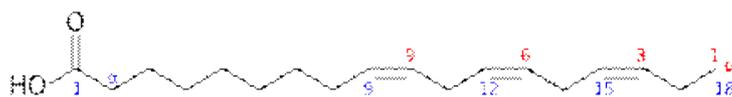


그림 22. 알파리놀렌산 (ALA)의 구조

(다) 가공아마종실 (extruded linseed)

가공 아마종실은 종실의 껍질이 단단한 아마씨 (linseed)를 가축의 기호성을 높이고 소화흡수가 용이하도록 extrusion 가공한 형태의 첨가제이다 (그림 23). 중량대비 약 17%의 알파리놀렌산 (ALA)을 함유하고 있어서 상대적으로 저렴한 비용으로 활용 가능한 오메가-3 지방산 원료로, 다양한 축종에서 축산물 내 오메가 지방산 균형 유지에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

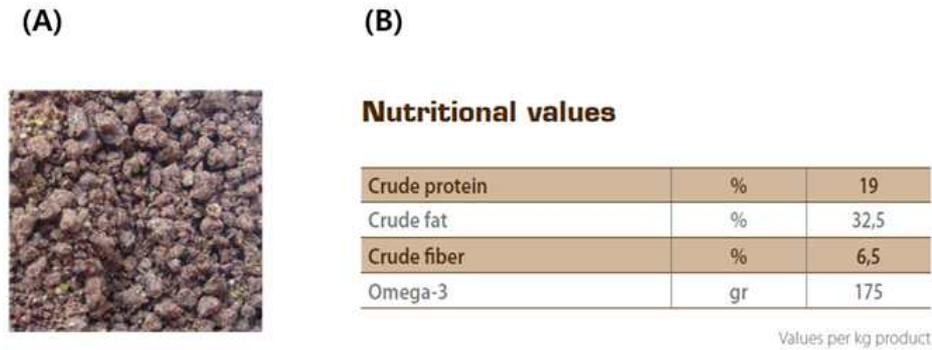


그림 23. 가공아마종실 정상 (A), 영양소 함량 (B)
(Nutex 85 제품정보, Dumoulin Co. Belgium)

(3) 비타민 E (vitamin E)

(가) 비타민 E

비타민 E는 담황색의 액상 지용성 비타민의 일종으로 화학명은 토코페롤이다 (그림 24). 비타민 E가 많이 함유된 음식으로는 식물성 기름, 견과류 (아몬드, 해바라기씨 등), 토마토, 감귤, 키위, 브로콜리, 현미, 무, 호박 등과 생선 등이 있다.

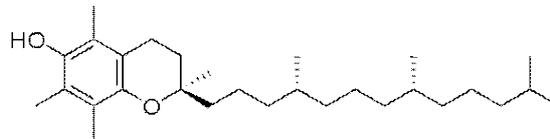


그림 24. 비타민 E의 구조

(나) 비타민 E의 효과

비타민 E는 각종 독소와 발암물질의 체외 배출을 돕고 혈관의 탄력을 유지하며 생체막에서 지방질의 산화를 억제하여 세포막의 산화를 억제하는 강력한 항산화, 항노화 물질이며, 또한 적혈구 보호, 세포호흡, 헤모글로빈 합성 및 혈소판 응집 등에 관여하여 심혈관질환 예방 및 면역력 강화에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 성인의 하루 비타민 E 권장섭취량은 15 mg으로 비타민 E가 장기간 결핍될 경우, 피부노화, 빈혈, 세포손상, 기미/주근깨, 신경세포 및 근육 손상, 위치감각 저하 등의 증상이 나타날 수가 있다.

(4) 베타인 (betaine)

(가) 베타인

화학식 $C_5H_{11}NO_2$ 인 아미노산 (glycine) 유도체로 흰색의 결정, 약간의 냄새와 단맛이 있다 (그림 25). 명아주와 사탕무의 당밀을 분리·정제하여 betaine을 얻을 수 있는데, 이는 주로 식품첨가물로 사용된다. 동식물계에 널리 분포하고 있으며 무척추동물인 오징어, 문어, 새우 등의 근육이나 비트나 두류, 무, 구기자 등에 많이 함유되어 있다.

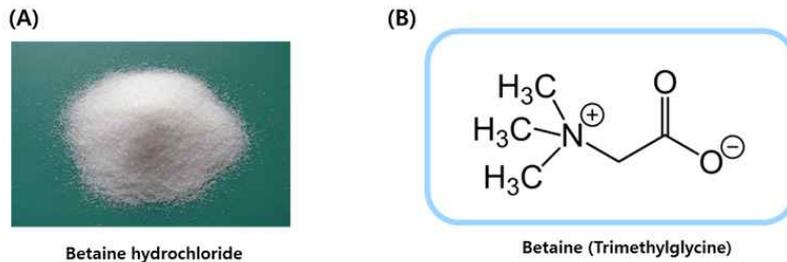


그림 25. Betaine-HCl의 정상 (A), betaine의 구조 (B)

(나) 베타인의 기능

베타인은 대사작용 중 콜린 (choline)의 산화로 생성되는 중간대사체로서, 콜린은 phosphatidyl choline (세포막 인지질)과 acetylcholine (신경전달물질)의 전구체이다. 베타인은 생리기작 중 메틸기를 공급하는 methyl donor로써 체내 단백질/지질/핵산 대사에 결정적 역할을 수행한다 (그림 26). 베타인의 이러한 methylation 기전은 체내 DNA, 단백질, 지질대사 항상성 유지에 매우 중요하다. 한편, 베타인은 세포내 삼투압에 영향을 주어 세포내 함수율을 조절하여 ionic/osmotic stress를 저감하는 osmolyte 기능을 수행한다.

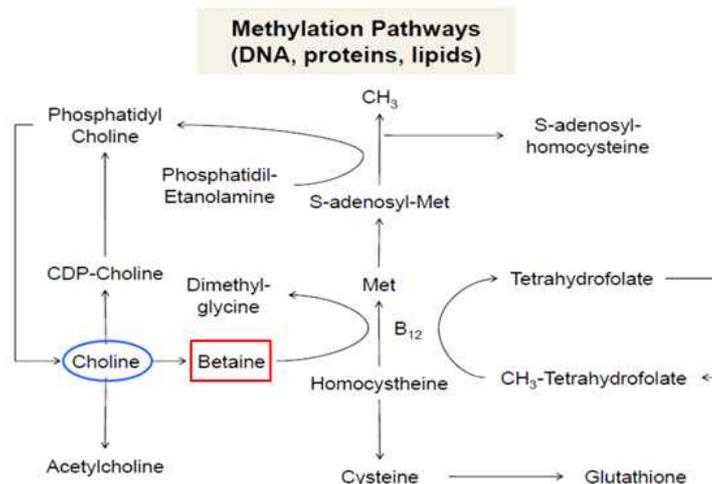


그림 26. 콜린과 베타인에 의한 체내 methylation pathway (University of Florida, 2009)

(다) 사료첨가제로써의 베타인

현재 베타인은 비타민, 미네랄, 효소 등과의 혼합제제로 시중에 사료첨가제/음수첨가제로 보급되고 있으며 최근 관련시장이 급신장하고 있는 추세이다. 현재 시중에서 판매되고 있는 베타인제제의 경우 삼투/이온조절 작용에 의한 고온스트레스, 탈수, 면역저하, 번식능력 저하 예방 등의 효능과 메틸기 공급 작용에 의한 세포대사 향상, 에너지 이용률 향상, 육량, 유량, 산란율 증진 및 도체품질 증진의 목적으로 축우, 낙농, 양돈, 양계 등 주요 축종에서 사용량이 증가하고 있다.



그림 27. 시중에 판매 중인 다양한 베타인 사료첨가제 제품군

(5) CLA (conjugated linoleic acid)

(가) 공액리놀레산 (CLA)

공액리놀레산 (conjugated linoleic acid, CLA)은 리놀레산 (linoleic acid) 또는 리놀렌산 (linolenic acid)과 같은 지방산으로부터 합성되는 중간대사산물로서 반추동물의 육류나 유즙에 많이 함유되어 있으며, 식물성 유지에는 상대적으로 낮은 농도로 존재하는 지방산이다. 그러나 상업적으로 판매되는 대부분의 CLA는 리놀레산이 풍부한 홍화유 (safflower oil)나 대두유 (soybean oil)와 같은 식물성 유지를 원료로 알칼리 촉매반응에 의해 화학적으로 변형하여 합성한 제품이 주를 이룬다. 자연계에서는 주로 cis9, trans11-CLA (c9,t11-CLA 또는 9,11-CLA)와 trans10, cis12-CLA (t10,c12-CLA 또는 10,12-CLA)와 같은 2종의 이성질체가 대부분을 차지하고 있다. 리놀레산과 CLA는 모두 18개의 탄소와 2개의 이중결합을 보유한 지방산 (C18:2)으로, 리놀레산이 두개의 cis형 (cis9, cis12) 이중결합 사이에 두개의 단일결합을 가지고 있는 것과 달리 9,11-CLA와 10,12-CLA의 경우에는 cis형과 trans형 이중결합 사이에 한 개의 단일결합을 가지고 있는 것이 특징이다 (그림 28).

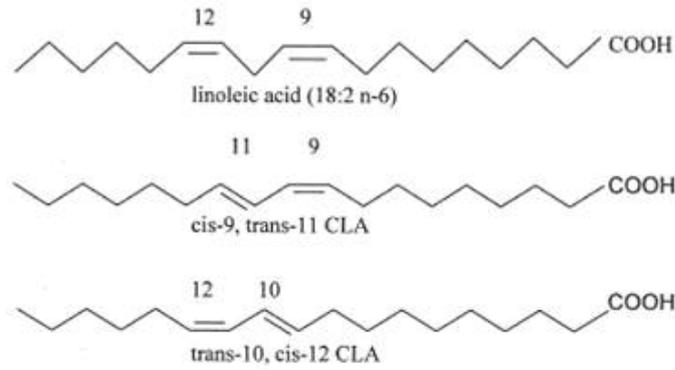


그림 28. 리놀레산 (LA)과 공액리놀레산 (CLA)의 구조

(나) CLA의 생리활성 효과

공액리놀레산 (CLA)이 생체에 미치는 효과에 대해 활발하게 연구가 진행되기 시작한 것은 1980년대 후반으로, 현재까지 많은 실험동물 및 인체 임상실험을 통해 다양한 생리활성 및 건강증진 기능이 보고되고 있으며 그 중에 특히 주목할 만한 작용으로는 항암, 항비만, 항산화, 면역증진 효과 등이다 (표 21). 2008년 7월에 CLA는 미국 FDA로부터 식용으로서의 안전성의 기준이 되는 GRAS (generally recognized as safe)로 지정됨에 따라 우유, 두유, 과일쥬스, 요구르트, 식사대용 셰이크, 영양식 등의 식품군에 식품첨가물로 활발히 이용되고 있다.

표 21. CLA의 생리활성 효과

작용 구분	보고된 생리활성 작용
항암작용	유방암 피부암 진립선암 대장암 간암
항비만작용	체지방감소/근육량 증가
면역증진작용	면역세포 활성화/항염증
기타	항산화 당뇨 동맥경화

다. 기능성 사료첨가제 기대효과

(1) 가축 면역력 및 생산성 증가

FTA 및 국제 곡물 가격 상승과 같은 축산 경영 환경의 악화로 인하여 가격 및 품질 경쟁력

확보가 절실하게 요구되는 상황에서 항생제가 사용된 축산물의 국제 교역의 걸림돌이 되고 있다. 효과적인 항생제 대체 소재를 개발하여 가축의 생산성 향상 및 가축의 건강을 증진시키고, 사료첨가용 면역제제를 통하여 가축의 소모성 질병 예방이 가능하다면 생산성 향상 및 소요 비용 감소를 통해 생산비 절감으로 이어지며, 가축의 건강증진으로 인하여 축산물의 품질 경쟁력을 확보할 수 있다. 최근 축산분야에서 생균제를 활용하여 가축의 면역 증진과 질병 예방을 위한 시도가 이루어지고 있지만, 기능이 명확하고 유용한 생균제가 부족한 실정으로, 본 과제에서는 선행연구를 통해 개발된 기능이 명확하고 유용한 생균제만을 선별하여 각 축종에 적합한 항생제 대체 복합미생물을 제조하여 활용함으로써 가축 면역력 및 생산성 증가가 기대된다.

(2) 오메가-3 / 오메가-6 지방산의 이상적인 비율 달성

오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산은 체내에서 서로 상보적인 반응을 통해 건강을 유지시켜주며, 대표적인 작용으로는 에이코사노이드 (eicosanoid)라고 불리는 지질계 호르몬의 생성 및 조절을 들 수 있다. 최근의 많은 연구에 따르면 필수 다가 불포화지방산은 절대량뿐만 아니라 체내에 균형 잡힌 비율로 존재하는 것이 중요하며, 통상적으로 오메가-3:오메가-6 지방산의 비율이 1:4 이하일 경우가 신체 건강에 있어서 가장 이상적인 것으로 보고되고 있다. 그러나 현대의 육식 위주의 서구 식단은 오메가-3 지방산에 비해 오메가-6 지방산의 함량이 지나치게 높아 둘의 비율이 1:10~1:30으로 편중되어 있으며, 점차 서구화 되어가고 있는 우리나라의 식단도 오메가-6 지방산의 함량 비율이 점차 증가하는 것으로 나타나고 있다. 이러한 오메가 지방산의 불균형은 심장마비, 뇌졸중, 암, 비만, 당뇨, 천식, 관절염, 알레르기 (allergy) 등의 신체적 질병 뿐 아니라 우울증, 정신분열, 과잉행동장애, 치매와 같은 정신적 질환과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

현대의 축산식품은 다른 식품에 비해 오메가 지방산의 불균형이 훨씬 두드러지는데, 이는 대부분의 가축 사료를 오메가-6 지방산 함량이 매우 높은 옥수수를 기반으로 제조하여 급여하는데 따른 부작용으로 알려지고 있다. 따라서 옥수수에 대한 의존도를 점진적으로 낮추고 오메가-3 지방산 함량이 높은 사료작물을 발굴하여 축산식품의 지방산 조성이 이상적인 균형을 유지하도록 하는 것이 향후 축산업의 중요한 과제 중 하나이다.

(3) 가축 생산성 시너지 (synergy) 효과 및 기능성 부여

비타민 E, CLA 및 베타인 등의 기능성 생리활성 물질은 가축의 사양기간동안에는 가축의 건강한 성장과 생리기작 향상성 유지에 도움을 주며, 축산물에 전이됨으로써 궁극적으로 소비자의 건강에 기여할 수 있다. 한편, 각각의 생리활성 물질의 상호작용에 의한 시너지 효과 또한 기대할 수 있는데, 한 예로 베타인과 같은 methyl donor와 기능성 지방산을 함께 급여할 경우에는 베타인의 지방대사 활성화 기전에 의해 기능성 지방산의 체내축적과 체성장 촉진을 유도하는 것이 가능할 것으로 기대된다 (Fernández-Fígares 등, 2008).

2. 기능성 사료첨가제 후보의 전이율 향상을 위한 연구

가. ALA와 베타인이 가축 근육성장에 미치는 효과 검증

다중불포화지방산과 베타인이 각각 근육세포의 성장에 미치는 영향에 대해서는 그동안 많은 연구들이 이루어져 왔고, 일부 지방산의 경우 베타인과 함께 급여했을 때, 근육성장에 시너지 효과를 지닐 수 있다는 연구 결과도 발표되어 왔다. 하지만 오메가-3계 다중불포화 지방산인 ALA와 베타인의 시너지 효과에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없기에 본 연구를 통해 두 기능성 물질이 가축의 근육 성장에 미치는 시너지 효과를 밝혀내어 성장촉진용 사료첨가제 개발에 이용하고자 하며 이에 대한 과학적 근거를 제시하기 위해 mouse myoblast cell line인 C2C12 cell을 이용한 *in vitro* 실험을 진행하였다.

(1) ALA와 베타인이 myoblast의 증식에 미치는 영향에 대한 *in vitro* 검증

C2C12 cell의 증식 (proliferation)에 ALA와 베타인이 미치는 영향을 검증하기 위하여 cell 수의 변화와 증식에 관여하는 유전자 발현 변화를 살펴보았다. 우선, C2C12 cell을 매우 낮은 밀도로 plate에 seeding하고, 24시간 후, ALA와 베타인을 각각 배지에 혼합하여 처리하였고, 48시간 배양 후, cell 수를 hemocytometer로 측정하였다. 그림 29에서 알 수 있듯, ALA의 경우 단독 처리 시 20 μ M의 농도에서 대조구 대비하여 확연하게 cell 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 40 μ M ALA 처리구에서는 오히려 cell 수가 감소하였는데 이것을 통해 20 μ M 수준에서 ALA에 의한 성장촉진 효과가 포화상태였다고 예상할 수 있다. 반면 베타인 처리구의 경우, 베타인의 농도 증가에도 cell 수에는 아무런 변화가 나타나지 않았다.

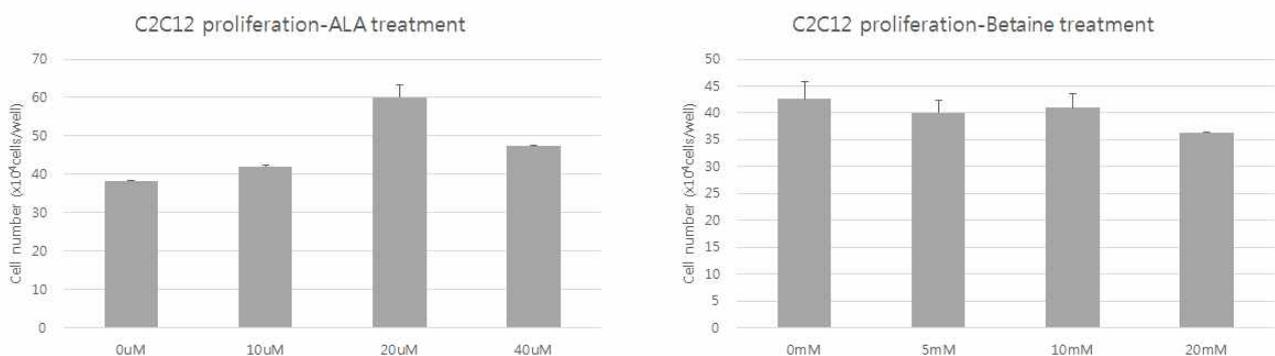


그림 29. ALA와 베타인의 농도별 처리에 의한 C2C12 cell 수 변화

다음으로는 ALA와 베타인이 C2C12 cell의 증식에 미치는 시너지 효과를 검증하기 위해, cell 수 증가에 영향을 미치는 것으로 확인된 20 μ M의 ALA와 각각의 베타인 농도를 동시에 처리해 봄으로써 cell 수가 어떻게 변화하는 지를 확인하였다. 그림 30에 나타난 결과를 살펴보면, ALA 단독 처리시보다 ALA와 베타인을 동시에 처리했을 때, cell 수가 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. 그림 29에서 베타인 단독으로는 cell 수 변화에 영향을 미치지 못했던 결과와 비교해 보았을 때, ALA와 베타인을 함께 처리하면 시너지 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

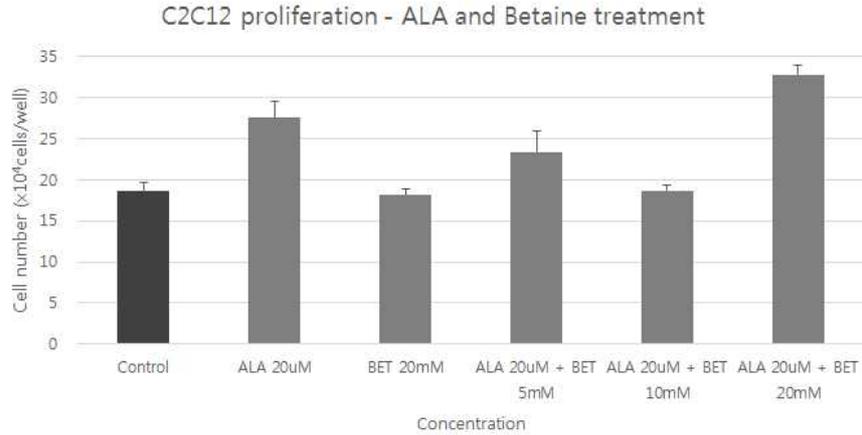


그림 30. ALA와 베타인을 동시에 처리했을 때 C2C12 cell 수 변화

Cell 수의 변화가 유전자 발현과 어떠한 관련이 있는지를 검정해보기 위해 qRT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 발현 양상을 살펴보았다. 근육세포 성장 시 관여하는 것으로 알려진 PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Fgfr1 (fibroblast growth factor receptor)과 근육세포가 분화할 때 발현량이 증가하는 transcription factor인 MyoD1과 Cdkn1a (p21)를 살펴보았다. 그림 31에서 살펴볼 수 있듯이, PCNA와 Fgfr1의 경우, ALA와 베타인을 각각 처리하였을 때에는 차이가 없었으나 ALA 20 μ M과 베타인 20 mM을 동시에 처리했을 때 mRNA 발현량이 증가하였다. 이를 통해 mRNA 수준에서도 ALA와 베타인이 myoblast 증식에 영향을 준다는 것을 확인하였다. 다만, MyoD1과 Cdkn1a의 경우, 베타인 단독 처리구에서만 높게 나타나고 다른 처리구들에서는 차이가 나타나지 않았는데, 이에 대해서는 실험했던 조건이 세포 증식의 초기~중기 단계이기 때문에 후기 단계에서 발현이 증가하는 유전자들의 양상을 확인할 수 없었을 것으로 예상된다.

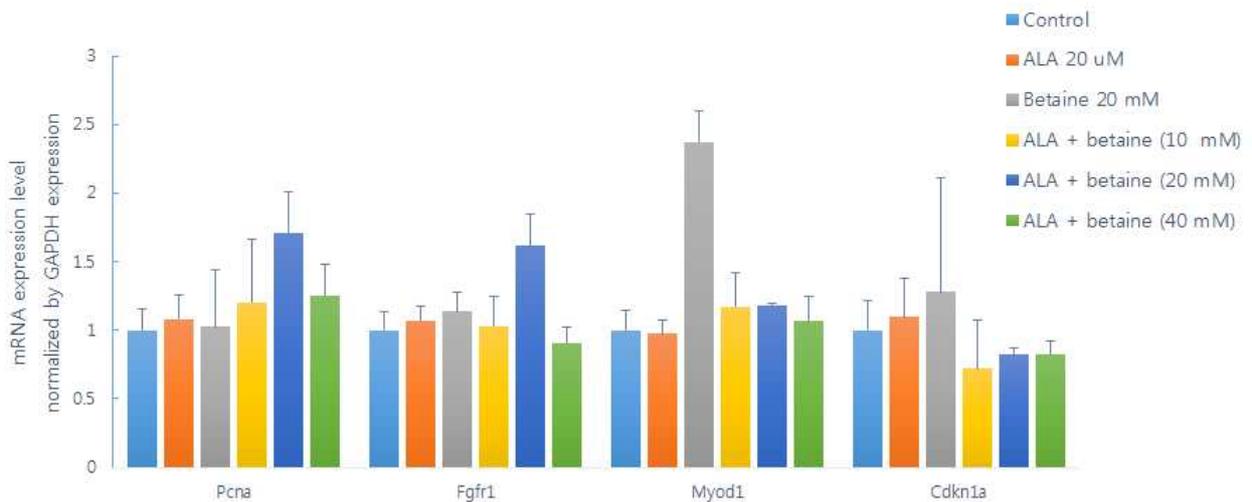


그림 31. ALA와 베타인 처리에 따른 C2C12 cell 증식 관련 mRNA 발현양상 변화

(2) ALA와 베타인이 myoblast의 분화에 미치는 영향에 대한 *in vitro* 검증

C2C12 cell의 분화 (differentiation)에 ALA와 베타인이 미치는 영향을 검증해 보기 위해 C2C12 cell의 분화와 관련된 유전자들의 발현 양상을 확인해보았다. 우선 C2C12 cell을 매우 높은 농도로 plate에 seeding하여 24시간 후, confluent 상태가 되면 분화배지로 배지를 교체한다. 분화배지를 매일 교환하면서 72시간 동안 초기 분화를 유도한 후, ALA와 베타인을 각각 농도별로 분화배지에 혼합하여 cell에 처리하고 24시간 후에 RNA를 extraction하여 분화와 관련된 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 확인하였다. 대상 유전자로는 세포 분화 시, myotube를 형성하기 위해 발현량이 증가하는 구조단백질인 Actn2 (actinin)와 Cdh2 (n-Cadherin), 근육세포 분화 유도 transcription factor인 Myf6 (MRF-4)와 Myog (myogenin), 근육세포 분화에 관여하는 membrane protein Igf1r (insulin like growth factor 1 receptor)을 살펴보았다. 그림 32에서 확인할 수 있듯, C2C12 cell 분화 단계에서 ALA와 베타인을 각각 농도별로 처리하였을 때, ALA 첨가구에서는 별다른 유전자 발현 양상의 변화가 없었으나 베타인 처리구에서는 일부 유전자에서 발현량의 변화가 있었다. Actn2의 경우, 베타인 5 mM 이상의 농도에서 모두 mRNA 발현량이 증가하였고, Myf6와 Igf1r의 경우, 각각 베타인 20 mM과 40 mM부터 발현량이 증가하였다. 이를 통해 ALA 단독으로는 C2C12 분화에 영향을 미치지 않지만, 베타인은 C2C12 분화에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

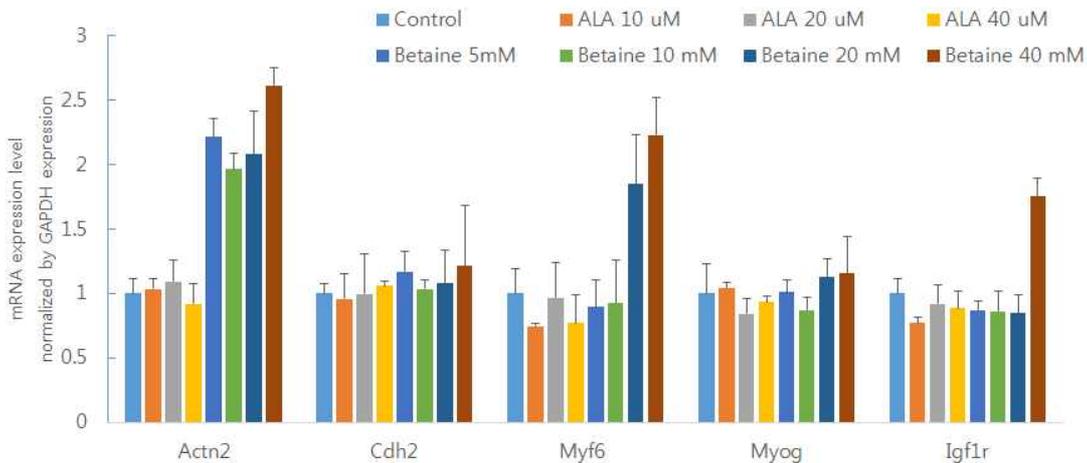


그림 32. ALA와 베타인 처리에 따른 C2C12 cell 분화 관련 유전자들의 발현 변화

다음으로, ALA와 베타인이 C2C12 cell 분화에 미치는 시너지 효과가 있는지를 검증하였다. 단독 처리 실험과 동일한 방법으로 진행하되, 분화 유도에 영향을 미치는 베타인 20 mM에 ALA를 농도별로 함께 처리한 후, qRT-PCR로 동일하게 mRNA 수준에서 유전자 발현 양상을 확인하였다. ALA 단독으로는 분화 유도 능력이 없었지만, 베타인에 ALA를 함께 처리하면 ALA의 농도 증가에 따라 분화와 관련된 유전자들의 발현이 증가하였다. 또한 그림 32에서 베타인 단독으로 처리했을 때 발현 증가가 확인되지 않았거나 (Cdh2, Myog), 높은 농도에서만 발현이 증가한 유전자들 (Myf6, Igf1r) 또한 ALA와 베타인을 함께 처리하게 되면 발현이 증가하는 양상을 나타냈다 (그림 33).

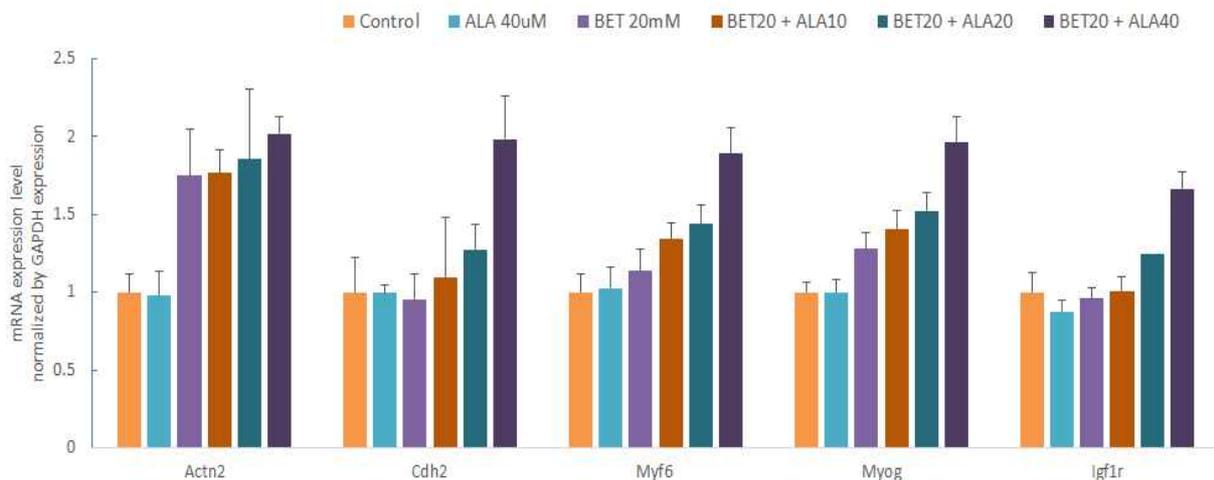


그림 33. ALA와 베타인을 동시에 처리했을 때 C2C12 cell 분화 관련 유전자들의 발현 변화

이러한 결과들을 토대로, ALA와 베타인을 동시에 처리하게 되면 myoblast의 증식과 분화에 모두 시너지 효과가 있음을 *in vitro*에서 확인하였다. 또한, 이러한 과정에서 어떠한 유전자들이 관여하는지도 mRNA 수준에서 확인할 수 있었다.

나. 알파-토코페롤 및 베타-사이클로덱스트린 포접체를 포함한 사료첨가제의 개발

기능성 축산물을 생산하기 위해서는 사료에 기능성 물질을 첨가하고 이 기능성 물질이 소장까지 도달하여 흡수되고 이것이 계란, 고기, 우유 등에 포함되도록 하여야 한다. 따라서 기능성 축산물을 생산하기 위해 가장 중요한 것은 효과적인 기능성 물질 전달 기술을 지니는 것이다. 사료에 첨가되는 대표적인 기능성 물질로써 강한 항산화 작용을 지니고 있는 비타민 E가 가장 대표적이다. 본 연구에서는 기능성 물질인 비타민 E의 한 종류인 알파-토코페롤을 혼합 유효용액 상에서 스프레이드라이 방법으로 베타-사이클로덱스트린과 함께 포접체를 형성하여 항산화 기능이 강화된 계란 생산을 위한 기능성 사료첨가제 조성을 개발하는 것을 목표로 한다.

기능성 물질이 사료로 이용되고 가축 체내에 축적되기까지는 많은 장벽들이 존재한다. 우선 기능성 물질이 사료에 이용되기까지 혹은 사료에 혼합된 기능성 물질이 가축에게 급여되기까지의 보관 및 운송기간동안 빛, 온도 등의 외부 환경으로부터의 안정성 문제가 있다. 알파-토코페롤은 벤젠고리와 2중 결합을 지니고 있는 구조적 특성상, 외부 환경에 의해 화학적 구조가 쉽게 변성될 수 있고, 이럴 경우 고유의 생리적 기능을 잃게 된다. 따라서 기능성 물질의 보관, 운송기간동안 물질의 변성을 최소화하는 것이 중요하다.

외부로부터 보호된 기능성 물질을 포함한 사료를 가축에게 급여하게 된다 하더라도, 가축의 체내에서도 거치게 되는 장벽들이 존재한다 (그림 34). 우선 사료가 위를 지나면서 위산에 의한 낮은 pH에 의해 그 구조가 변성될 수가 있고, 이러한 물질이 소장에 도달하게 되면 다양한 소화 효소에 의해 분해될 수 있다. 또한 알파-토코페롤은 다른 많은 기능성 물질들과 마찬가지로 강한 소수성 물질이기 때문에 물에 대한 수용성이 낮고, 이러한 낮은 수용성으로 인해 소장에서의 흡수율이 매우 낮다. 물론 소수성 물질의 흡수를 위해 체내에는 담즙산이라는 천연 유효제를 분비하고 있어 지방과 같은 물질들을 일차적으로 작은 덩어리로 나누어 소화효소의 접

근을 높이거나 흡수율을 증진시킨다. 하지만, 기능성 물질을 임의로 다량 사료에 첨가한 경우, 이러한 천연 유화 기능으로는 그 흡수율 증진에 한계가 있기에 추가적인 흡수율 증진 전략이 필요하다.

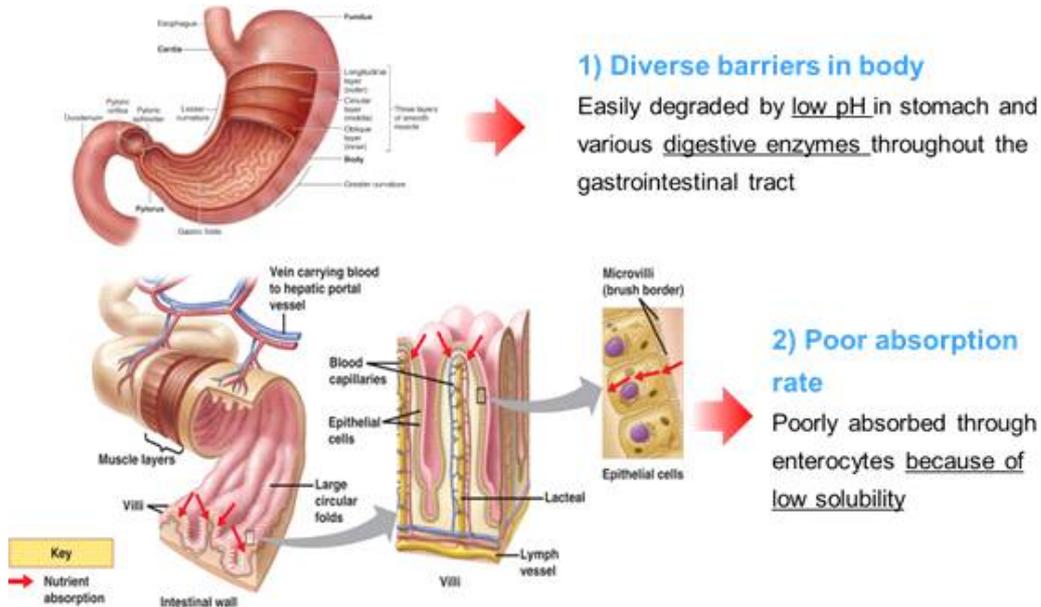


그림 34. 기능성 물질 전달 과정 중 체내에서 거치게 되는 장벽들
(출처: Campbell 등, 2005. 의 그림을 수정하여 사용)

본 연구에서는 이러한 저장운송과정 혹은 체내 전달과정 중의 장벽들을 극복하여 안정성과 흡수효율을 증진할 수 있는 기능성 사료첨가제를 개발하고자, 알파-토코페롤을 유화용액 상에서 스프레이드라이 방법으로 베타-사이클로덱스트린과 포접체를 형성하고, 이와 함께 아마종실을 이용하여 항산화효과와 오메가-3 지방산의 증진을 동시에 향상시킬 수 있는 축산물 생산에 이용하고자 한다.

베타-사이클로덱스트린은 이미 제약업계, 식품업계, 화장품업계, 사료업계 등에서 널리 쓰이고 있는 안전성이 검증된 허가된 첨가물질이다. 그동안 베타-사이클로덱스트린에 기능성 물질(주로 소수성 물질)을 담지시키는 기술은 많이 시도되어왔다. 하지만 베타-사이클로덱스트린에 기능성 물질을 담지한 포접체를 형성하더라도 여전히 물에 대한 수용성이 불충분하며 담지된 물질이 체내에서 포접체로부터 빠져나오는 방출 효율이 떨어진다는 한계점을 지니고 있다. 따라서 본 연구에서는 새롭게 혼합유화용액을 함께 사용하는 방식으로 포접체를 형성함으로써 그 수용성 및 방출 효율을 보완한 포접체를 이용하고자 한다. 이 때, 혼합유화제는 소수성 유화제인 Span 80과 친수성 유화제인 Tween 80을 함께 이용함으로써 담지효율, 방출효율 및 소장에서의 흡수효율이 최적화된 유화제 formula를 찾고자 하였다.

본 연구에서는 알파-토코페롤을 혼합유화제 용액 상에서 베타-사이클로덱스트린에 포접시킴으로써 외부환경으로부터의 보호효과와 수용성 증진을 통한 생체이용률 증진효과를 동시에 달성하고자 하였다. 따라서 혼합 유화제 용액 상에서 베타-사이클로덱스트린과 알파-토코페롤을 24시간 stirring을 통해 충분히 녹여 equilibrium을 형성하게 하고 이렇게 골고루 형성된 액상의 포접체를 스프레이드라이 방법으로 빠르게 건조시킴으로써 유화제가 함께 포함된 알파-토

코페롤 포접체를 분말형태로 얻을 수가 있다. 결과적으로 예상되는 포접체의 구성은 그림 35와 같다. 베타-사이클로덱스트린 외부 및 내부에 유화제가 함께 끼어들어감으로써, 수용성은 더욱 높이고 동시에 방출 효율 또한 높일 수 있다.

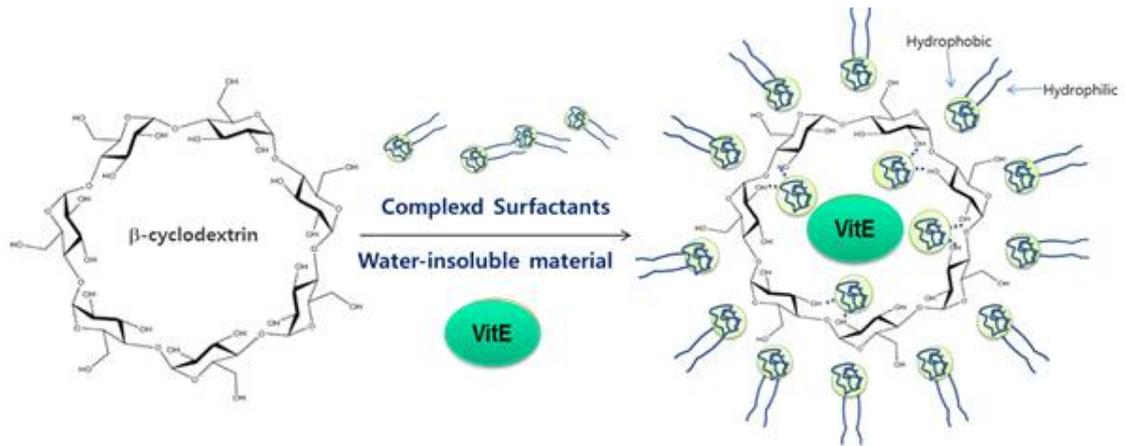


그림 35. 혼합유화제와 베타-사이클로덱스트린을 이용한 알파-토코페롤 포접체의 모식도

(1) 유화제 조성에 따른 알파-토코페롤과 베타-사이클로덱스트린 포접체의 담지율 변화

담지체 제조 과정에 이용되는 유화용액의 유화제로는 친수성 유화제인 Tween 80과 소수성 유화제인 Span 80이 각각 혹은 혼합되어 이용되었다. Tween 80과 Span 80의 혼합 비율에 따라 유화용액의 HLB (hydrophile-lipophile balance)값이 변화하게 되고, 이것은 결국 포접체의 담지율에 영향을 주게 된다. 표 22는 스프레이드라이 방법으로 제조한 담지체가 유화제의 비율에 따라 각각 어떠한 담지율을 보이는지를 HPLC를 통해 분석한 것이다. 여기서 확인할 수 있듯이 유화제를 사용하지 않았을 경우 담지율이 매우 낮음 (17.96%)을 확인할 수 있으며 Span 80만을 이용한 경우에도 담지율이 상대적으로 낮음 (41.05%)을 확인할 수 있었다. 그러나 혼합 유화제의 경우 유사하게 대략적으로 60~70% 사이의 담지율을 나타냈다.

표 22. 유화제 조성에 따른 포접체의 담지율 변화

Tween 80 : Span 80	Encapsulation efficiency%
0:0	17.96
1:0	60.36
1:1	59.17
1:2	67.74
1:4	69.55
0:1	41.05

(2) 산란계 시험을 통한 알파-토코페롤의 계란 내 전이효과 검정

(가) 시험 목적: 알파-토코페롤/베타-사이클로텍스트린 포접체의 계란 내 전이효과 검정

(나) 시험 내용

- 난황 내 알파-토코페롤 전이율 조사
- 난황 내 콜레스테롤 함량 변화 조사
- 난황 내 지방산 조성 변화 조사

(다) 공시축: 갈색 산란계 60주령 70수 (시험구 당 10수, 7 시험구)

(라) 시험기간: 산란기간 1개월 (2014. 10. ~ 2014. 11.)

(마) 시험장소: 서울대학교 그린바이오과학기술연구원

표 23. 산란계 기능성 사료첨가제 사양시험 설계

시험구	ALA 함량 (g/사료 kg)	비타민E 함량 ¹⁾ (mg/사료 kg)	β-CD ²⁾ (mg/사료 kg)	유화제 2종 ³⁾	실험 수 ⁴⁾
대조구	1.5	20	-	-	10
T1	1.5	120	-	-	10
T2	1.5	220	-	-	10
T3	1.5	120	439	-	10
T4	1.5	220	878	-	10
T5	1.5	120	439	32	10
T6	1.5	220	878	64	10
계					70

1) 비타민E 함량은 기본사료(대조구)에 포함된 20 mg/사료 kg을 기본으로 하며, T1~T6의 경우, 여기에 추가로 첨가제 형태로 비타민E를 첨가

2) β-CD 첨가는, T3 및 T4의 경우, 단순 물리적 혼합이며, T5와 T6는 포접체 형태로 제조

3) 유화제는 Tween80 및 Span80을 1:2로 혼합하여 이용

4) 시험구 당 10수 (5수/cage × 2 cage × 7 처리구 = 총 70수)

(바) 시험 결과

알파-토코페롤의 함량이 높을수록 난황 내 전달이 많이 되는 것으로 나타났으며, 알파-토코페롤/베타-사이클로텍스트린 포접체를 급여한 경우, 알파-토코페롤 단독 급여나 단순 혼합 급여에 비하여 높은 수준의 난황 내 전달 효율을 나타냈다. 또한 난황 내 콜레스테롤의 함량은 알파-토코페롤의 급여량이나 형태에 영향을 받지 않는 것을 확인하였다.

알파-토코페롤/베타-사이클로텍스트린 포접체를 급여한 경우, ALA 단독 급여나 알파-토코페롤/베타-사이클로텍스트린 단순 혼합 급여에 비하여 ALA를 비롯한 ω-3 지방산의 함량이 증가하며, 난황 내 ω-3 지방산의 증가로 인해 ω-3:ω-6 지방산의 비율이 이상적인 수준으로 알려진 1:4 수준으로 개선되는 것을 확인하였다.

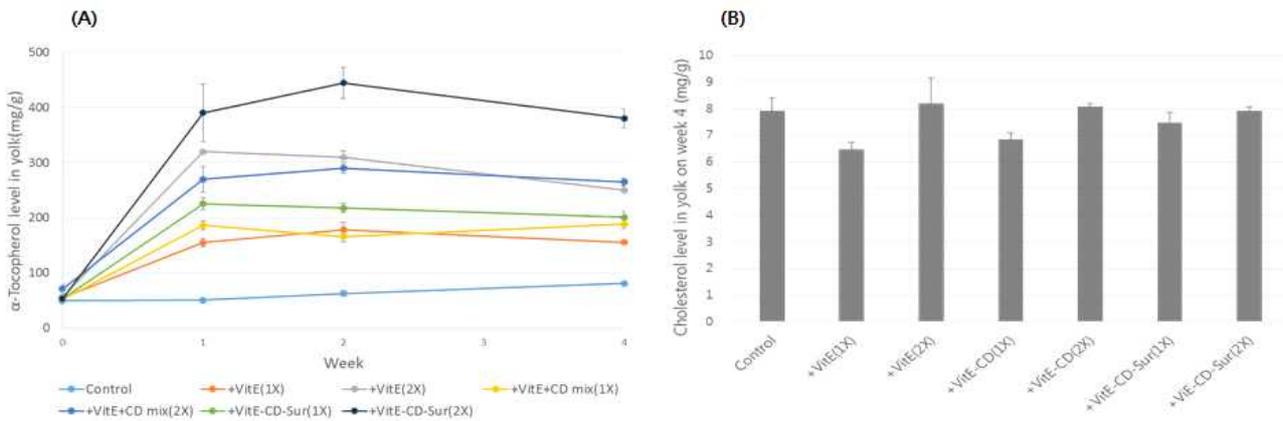


그림 36. 난황 내 알파-토코페롤(A)과 콜레스테롤(B) 함량 변화 검정

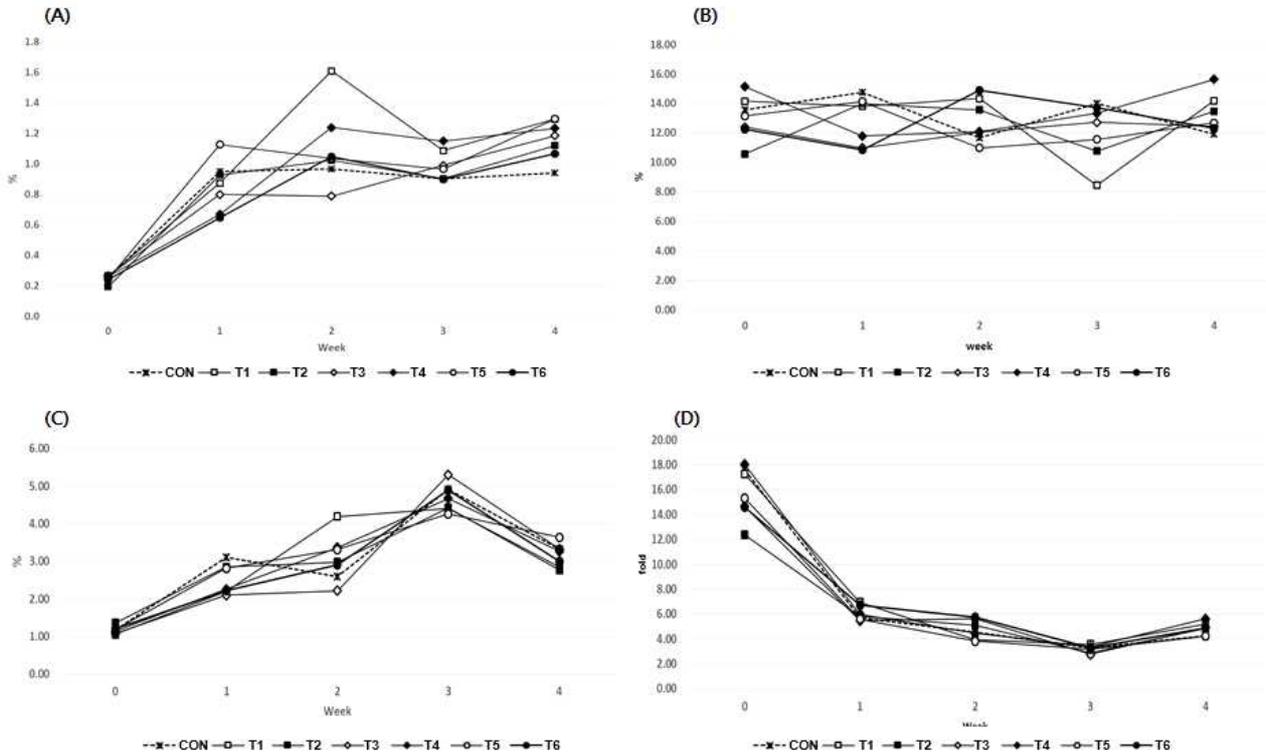


그림 37. 난황 내 지방산 조성 변화 검정. (A) ALA, (B) omega-6 지방산, (C) omega-3 지방산, (D) omega-6/omega-3 지방산 비율.

3. 동물 실증 실험을 통한 기능성 사료첨가제의 효과 검정

동물 실증 실험을 통한 기능성 사료첨가제의 효과를 보기 위해 제1세부과제와 함께 비육돈 사양시험을 수행하였다. 실험 내용 및 결과는 제1세부과제의 동물 실증 실험 내용과 함께 ‘제3절 제1,2세부과제 공동 사양시험’ 부분에 제시하였다.

제3절 제 1,2 세부과제 공동 사양시험: 동물 실증 실험을 통한 복합 미생물 생균제 및 기능성 사료첨가제의 효과 검정

제1세부과제의 항생제 대체 복합미생물 생균제 및 제2세부과제의 생리활성 물질 고함유 오메가 밸런스 사료첨가제의 효과를 알아보기 위해 비육돈을 활용한 동물실증시험을 수행하였다.

1. 시험목적

“비선택성 돈육부위 소비촉진을 위한 생리활성 물질 고함유 기능성 원료육 생산”

- 가. 항생제 대체 복합미생물 생균제 활용 **친환경** 돈육 생산
- 나. 오메가 3/6 지방산 균형 **웰빙** 돈육 생산
- 다. 생리활성 물질 고함유 **기능성** 돈육 생산

2. 시험설계

가. 1차 비육돈 사양시험 (실험농장)

(1) 시험기간 : 비육돈 출하 전 2개월 (2014. 7. 14. - 9. 4.)

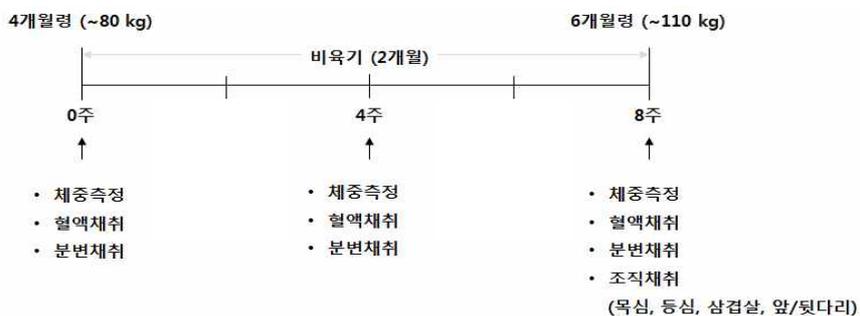


그림 38. 1차 비육돈 사양시험 및 시료채취 일정

(2) 공시축 : (주)이지바이오 종돈회사에서 생산된 켄토 (3원교잡종) 비육돈 4개월령 69두
(시험구 당 13-14두, 5시험구)

(3) 시험장소 : 이지바이오 추풍령 연구농장 (충북 영동군 추풍령면 신안리 283-1)

(4) 시험목적: 기능성 사료첨가제 첨가수준 결정

(5) 시험구 배치 (표 24와 그림 39 참조)

(가) 대조구 (Control): 기본사료 (1.58% 아마종실, 0.6% 비타민 E 첨가)

(나) 시험구 1 (Test 1): 기본사료 + 0.1% 복합 미생물 생균제

(다) 시험구 2 (Test 2): 기본사료 + 0.5% betaine

(라) 시험구 3 (Test 3): 기본사료 + 0.5% CLA

(마) 시험구 4 (Test 4): 기본사료 + 0.5% betaine + 0.5% CLA

표 24. 1차 비육돈 사양시험 설계

시험구	첨가제	첨가량 ¹⁾ (사료중량 %)	두수	비고
Control	-	-	13	아마종실 ⁵⁾ 1.58%, Vitamin E ⁶⁾ 0.6% (시험사료 내 기본첨가)
Test 1	복합 미생물 생균제 ²⁾	0.1	14	
Test 2	Betaine ³⁾	0.5	14	
Test 3	CLA ⁴⁾	0.5	14	
Test 4	Betaine + CLA	0.5 + 0.5	14	

1) 모든 첨가제의 첨가량 (%)은 purity를 고려하지 않은 각 첨가제 제품 중량 기준임.

2) 복합 미생물 생균제: $\sim 10^9$ cfu/kg. 3) Betaine: $\sim 98\%$ Betain-HCl. 4) CLA: $\sim 50\%$ CLA (conjugated linoleic acid).

5) 아마종실: 17.4% ALA (alpha-linolenic acid)함유. 6) Vitamin E: $\sim 10\%$ Vit E



그림 39. 1차 비육돈 사양시험을 위한 시험구당 돈방 번호 및 전경

나. 2차 비육돈 사양시험 (일반농장)

- (1) 시험기간 : 비육돈 출하 전 2개월 (2015. 5. 15. - 7. 23.)
- (2) 공시축 : 비육돈 4개월령 ~147두 (3시험구): 58일 또는 68일 급여 후 도축
- (3) 시험장소 : 자연농장 (전남 강진군 신전면 영관로 6-111)
- (4) 시험목적: 기능성 사료첨가제 효과에 대한 일반농가 재현성 시험
- (5) 시험구 배치
 - (가) 대조구 (Control): 기본사료 (0.6% 비타민E 첨가)
 - (나) 시험구 1 (Test 1): 기본사료 + 0.1% 복합 미생물 생균제 + 0.5% betaine + 2.5% 아마종실 Nutex85
 - (다) 시험구 2 (Test 2): 기본사료 + 0.1% 복합 미생물 생균제 + 0.5% betaine + 5% 아마종실 Nutex85

표 25. 비육돈 2차 일반농장 사양시험 설계

시험구	첨가제	첨가량 ¹⁾ (사료중량 %)	두수
Control	-	-	35
Test 1	복합 미생물 생균제	0.1%	52
	Betaine	0.5%	
	아마종실 Nutex85	2.5%	
Test 2	복합 미생물 생균제	0.1%	49
	Betaine	0.5%	
	아마종실 Nutex85	5%	

1) 모든 첨가제의 첨가량 (%)은 purity를 고려하지 않은 각 첨가제 제품 중량 기준임.
 2) 복합 미생물 생균제: ~10⁹ cfu/kg. 3) Betaine: ~98% Betain·HCl.
 4) 아마종실 Nutex85: ~17.4% ALA (alpha-linolenic acid)함유

다. 3차 비육돈 사양시험 (실험농장)

- (1) 시험기간 : 2015. 9. 17. - 10. 20.
- (2) 공시축 : 비육돈 5개월령 38두 (3시험구): 33일 급여 후 도축
- (3) 시험장소 : 이지바이오 추풍령 연구농장 (충북 영동군 추풍령면 신안리 283-1)

(4) 시험목적 : 기능성 사료첨가제 급여기간 단축에 대한 효과 검정

(5) 시험구 배치

- (가) 대조구 (Control): 기본사료 (0.6% 비타민E 첨가)
- (나) 시험구 1 (Test 1): 기본사료 + 0.1% 식물추출물
- (다) 시험구 2 (Test 2): 기본사료 + 0.1% 복합 미생물 생균제
- (라) 시험구 3 (Test 3): 기본사료 + 2.5% 아마종실 + 0.5% betaine
- (마) 시험구 4 (Test 4): 기본사료 + 5% 아마종실 + 0.5% betaine

표 26. 비육돈 3차 사양시험 설계

시험구	첨가제	첨가량 ¹⁾ (사료중량 %)	두수	기타
Control	-	-	13	
Test 1	식물추출물 (제1협동과제)	0.1	12	비타민E 0.6% (10% 원료)
Test 2	복합 미생물 생균제	0.1	12	
Test 3	아마종실/Betaine	2.5%/0.5%	13	
Test 4	아마종실/Betaine	5%/0.5%	12	

1) 모든 첨가제의 첨가량 (%)은 purity를 고려하지 않은 각 첨가제 제품 중량 기준임
 2) 복합 미생물 생균제: ~10⁹ cfu/kg. 3) Betaine: ~98% Betain·HCl
 4) 아마종실 Nutex85: ~17.4% ALA (alpha-linolenic acid)함유

3. 시험방법

가. 비육돈 혈액성분 분석

(1) 혈액채취

- (가) 채혈도구: BD Vacutainer[®] PrecisionGlide[™] multiple sample needle (21G × 1.5")
 BD Vacutainer[®] Holder
 BD Vacutainer[®] K2 EDTA 5.4 mg (REF 367856, 3 ml) - 혈구분석
 SST[™] II Advance (REF 367953, 8.5 ml) - 생화학분석
 Sodium fluoride potassium oxalate 10 mg/8 mg (REF 367922, 4 ml)
 - glucose분석
- (나) 채혈 시 보정기구를 통해 비육돈 입안 (송곳니)에 단단히 보정하여 시험구당 무작위 5
 두씩 경정맥에서 채혈한다.
- (다) 채혈 후, 샘플을 아이스박스에 보관하여 이동한다.

(2) 혈청분리

- (가) SST II Advance gel tube와 NaF tube를 3,000 rpm, 4 °C에서 10분 동안 원심분리한다.
- (나) 상층액을 new 1.5 ml tube에 옮겨 -80 °C에 보관한다.

(3) 혈구분석

- (가) EDTA tube를 혈구분석 직전까지 shaker를 통해 천천히 shaking한다.
- (나) MS9-5H Automatic hematology analyzer (MELET SCHLOESING Laboratoires, France)를 통해 혈구분석을 실시한다.
- (다) 각 분석항목에 대한 평균과 표준편차를 통해 하한과 상한가를 구하여 범위를 측정한다.



그림 40. 비육돈 혈액채취 및 체중측정

나. 성장성적 및 도체성적에 대한 시험구간 비교분석

(1) 비육돈 일당증체량 및 성장측정

- (가) 성장측정 : 실험개시를 기점으로 4주, 8주 2회에 거쳐 체중을 측정한다.
- (나) 일당증체량 : 위 내용을 바탕으로 일당증체량을 계산한다.
- (다) 측정방법 : 시험축 돈방의 전체 비육돈 체중측정 후 한 마리씩 저울에서 빼내며 무게를 측정한다.

(2) 도체성적 수집

(가) 105 kg이상 개체를 출하 시 문신 위치에 따라 시험구를 구분하였다.

(대조구: 문신 없음, Test 1: 좌측둔부, Test 2: 우측둔부, Test 3: 좌측전지, Test 4: 우측전지)

(나) 도축성적: 돼지 축산물등급판정 기준에 의해 성별, 등급, 지육중량, 등지방 두께를 수집한다.

(3) 통계분석

(가) 수집된 비육돈 체중과 도체성적에 대한 시험축 돈방 비교분석을 위해 SPSS v21 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 일반선형모형 (GLM)을 이용하여 유의성 검정을 실시한다.

(나) 시험구를 처리요인으로 하여 최소 유의차 (LSD) 다중검정법에 의해 처리한 결과를 비교분석한다.

다. 비육돈 부위별 지방산 함량 측정

(1) 지방산 추출 과정

- ① -20 °C에 얼린 돈육을 잘게 썰어 2일간 동결 건조한다.
- ② 정밀저울에 glass tube 놓고 건조 돈육 0.3 g을 측정하고 증류수 0.7 ml 넣는다.
- ③ C13:0과 methanol을 1:100 비율로 섞어 sample tube에 100 µl 넣는다.
- ④ 10N KOH 700 µl 넣고, methanol 5.3 ml 넣는다.
- ⑤ 1시간 30분 동안 55 °C 설정된 water bath에 넣어 반응시킨다. 20분에 한 번씩 vortexing을 실시한다.
- ⑥ 24N H₂SO₄ 580 µl 넣고 1시간 30분 동안 55 °C 설정된 water bath에 넣어 반응시킨다. 20분에 한 번씩 vortexing을 실시한다..
- ⑦ 3 ml hexane을 첨가한 후 5분 동안 vortexing을 실시한다.
- ⑧ 3,000 rpm, 20 °C에서 10분간 원심 분리한다.
- ⑨ 상층액을 GC vial에 담는다.

(2) 실험 기기조건

- Column : BR-2560 (ID 0.25mm x length 100m)
- Oven temp : 140 °C for 5 min
Ramp to 240 °C at 4 °C/min and hold for 28 min
- Injector temp : 260 °C
- Detector temp : 260 °C

- Split ratio : 1/30

라. 기능성분 이행을 분석

(1) 기능성분 (betaine, homocysteine) 추출 과정

(가) 돈육, 가공육

- ① 동결건조 돈육 0.3 g + D.W. 0.7 ml/가공육 1 g을 잘게 썰어 15 ml tube에 넣는다.
- ② 50 mM KH_2PO_4 4 ml (pH4.6) 첨가 후 동결건조 돈육 vortexing/가공육 homogenization
- ③ 4 ml ACN 넣고 vortexing을 실시한다.
- ④ 얼음에서 20분 동안 두고, 5분마다 vortexing을 실시한다.
- ⑤ Centrifuge (2 ml tube, 14,000 rpm, 5 min)
- ⑥ Filtration (0.2 μm) (분석 시 까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 보관)

(나) 혈청

- ① 혈청 300 μl 에 D.W. 700 μl 를 섞는다.
- ② 50 mM KH_2PO_4 1 ml (pH4.6) 첨가 후 vortexing을 실시한다.
- ③ ACN 1 ml 넣고 vortexing을 실시한다.
- ④ 얼음에서 20분 동안 두고, 5분마다 vortexing을 실시한다.
- ⑤ Centrifuge (2 ml tube, 14,000 rpm, 10 min, 2번)
- ⑥ Filtration (0.2 μm) (분석 시 까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 보관)

(2) 실험 기기조건

(가) Homocysteine

- Column : AQUITY UPLC BEH C18 column, 50 mm x 2.1 mm, 1.7 μm
- Column temp. : 30 $^{\circ}\text{C}$
- Flow rate : 0.4 ml/min
- Injection vol. : 1 μl
- Mobile phase : A. D.W. (0.2% formic acid),
B. MeOH (0.2% formic acid)
- Isocratic (3 min), A:B (97%:3%)

(나) Betaine

- Column : AQUITY UPLC BEH HILIC column, 100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm
- Column temp. : 30 $^{\circ}\text{C}$
- Flow rate : 0.4 ml/min
- Injection vol. : 1 μl

- Mobile phase : A. 0.1% formic acid in 15 mM ammonium formate (pH3.5),
B. 0.1% formic acid in acetonitrile
- Gradient (8 min) : 0.0~3.5min (12.5% A), 3.5~4.5min (20% A), and 4.6~8min (12.5% A)

마. 장내 미생물 영향성 분석

최근 동물과 장내 미생물 사이가 편리공생 관계가 아니라 상리공생 관계를 이루고 있어 장내 미생물의 분포가 숙주 동물의 대사 및 성장에 영향을 준다는 연구 결과들이 계속 발표되고 있다. 이에 따라 본 연구에서 복합 미생물 생균제의 급여가 비육돈의 장내 미생물의 분포에 어떠한 영향을 주는지를 살펴보기 위하여 비육돈 분변 내 미생물 분석을 실시하였다.

실험개시를 기점으로 4주, 8주에 시험구마다 무작위 분변 5 샘플을 채취하여 -20 °C에 보관하였다. Illumina MiSeq 시스템을 이용하여 sequencing하기 위하여 분변 샘플에서 전체 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA에서 bacterial genomic DNA만을 분리하고 sequencing 후에 bacterial identification을 위하여 bacteria 16S ribosomal RNA 유전자의 V4 region을 PCR하여 증폭시켰다. 전기영동을 통하여 PCR 결과를 확인하여 PCR이 제대로 수행되었음을 확인하였다. 각 PCR products를 샘플마다 double-strand DNA를 정량하여 샘플마다 일정한 양씩 pooling을 진행하였다. 그 후, DNA library를 구축하고 Illumina MiSeq으로 sequencing을 진행한다. Bioinformatics tool을 이용하여 sequencing 결과를 분석하고 이를 통해 복합 미생물 생균제 및 기능성 사료첨가제의 급여가 비육돈의 장내 미생물 군총 변화에 어떠한 영향을 주는지에 대해 분석한다.

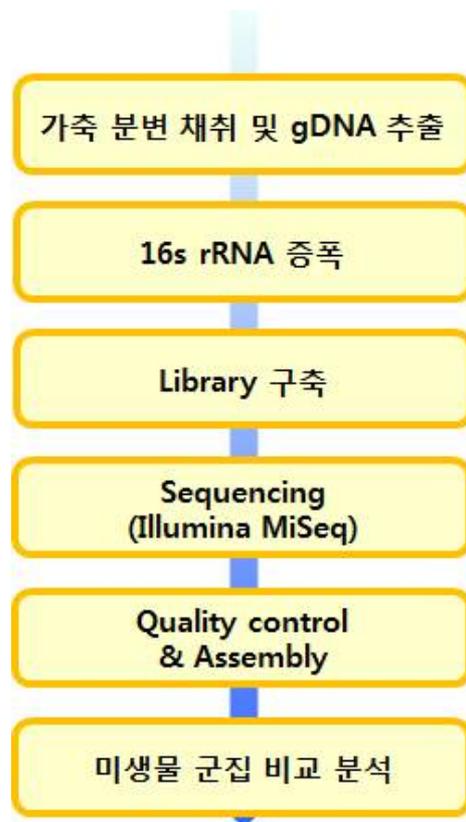


그림 41. 장내 미생물 군집 분석 흐름도

4. 시험결과

가. 비육돈 혈액성분 분석

4개월령 비육돈 사양시험 설계에 따라 시험구당 무작위 5두를 대상으로 3번 (1차: 2014년 7월 14일, 2차: 2014년 8월 11일, 3차: 2014년 9월 3일) 채혈하였으며 비육돈에 생리활성 사료첨가제 급여 시 정상생리 상태를 확인하기 위해 이를 자동혈구분석기로 혈액성분을 분석하였다. 표 27에서와 같이 채혈시기별로 각 혈액 분석항목에 대해 평균과 표준편차를 제시하였으며 이를 바탕으로 하한 (평균-표준편차)과 상한 (평균+표준편차)을 구하여 돼지 혈액성분 정상범위와 비교하였다. 채혈시기별 각 혈액분석 항목에서는 돼지 혈액성분 정상범위에서 크게 벗어나지 않았으며 이는 생리활성 사료첨가제가 돼지의 정상생리를 저해하지 않은 것을 확인하였다.

표 27. 자동혈구분석기 (MS9-5H)를 이용한 비육돈 혈액성분 분석 결과 (1차 사양시험)

분석항목	단위	0주 (7월14일)		4주 (8월11일)		8주 (9월3일)		정상범위 ¹	
		평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차	하한	상한
Wite Boold Cell	10 ³ /ul	12.83	4.70	15.03	3.05	17.28	4.02	11	22
Lymphocyte	%	56.55	20.50	63.22	6.24	62.82	6.65	35	75
	10 ³ /ul	7.22	3.13	9.44	1.89	10.79	2.47	3.8	17
Monocyte	%	7.96	3.19	11.21	1.98	8.41	1.83	0	10
	10 ³ /ul	1.08	0.57	1.69	0.46	1.44	0.41	0	1
Neutrophil /Granulocytes	%	19.10	8.17	24.10	5.03	27.50	6.13	20	70
	10 ³ /ul	2.70	1.71	3.66	1.16	4.82	1.85	2	15
Eosinophil	%	0.72	0.42	0.63	0.43	0.53	0.22	0	15
	10 ³ /ul	0.09	0.07	0.10	0.07	0.10	0.04	0	1.5
Basophil	%	2.47	1.36	0.35	0.06	0.21	0.08	0	3
	10 ³ /ul	0.31	0.17	0.06	0.05	0.02	0.04	0	0.5
Red Blood Cell	10 ⁶ /ul	5.53	2.06	6.44	0.48	6.67	0.48	5	7
Mean corpuscular volume	fl	50.52	19.13	59.41	3.02	60.90	2.83	52	62
Hematocrit	%	32.03	12.01	38.20	2.45	40.55	2.66	36	43
Mean Corpuscular Hemoglobin	pg	15.86	5.99	18.16	0.92	16.90	0.75	17	24
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	g/dl	27.32	10.46	30.58	0.96	27.76	0.71	29	34
Hemoglobin	g/dl	10.01	3.80	11.68	0.80	11.26	0.70	9	13
Thrombocyte (Platelets)	10 ³ /ul	222.63	96.73	304.88	85.41	304.20	70.92	200	500

¹Adapted, with permission, in part of from Latimer K. S., Mahaffey E. A., and Prasse K. W., Duncan and Prasser's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 4th ed., Wiley-Blackwell, 2003. Reference ranges vary between laboratories. Using value supplied by the laboratory that is routinely used is recommended.

나. 성장성적 및 도체성적에 대한 시험구간 비교분석

비육돈의 시험구간 성장성적을 비교하기 위해 실험개시 체중과 출하체중을 근거로 증체량 및 일당 증체량을 조사하였다. 1-3차 비육돈 사양시험에서 증체량 및 일당증체량은 각 시험구간, 또는 사료첨가제의 첨가수준에 따른 유의적 차이가 나타나지 않았다. 따라서 본 과제에서 개발한 기능성 사료첨가제의 사용이 비육돈의 정상적인 성장을 저해하지 않는 것으로 판단할 수 있었다. 2차 사양시험에서 T1 시험구의 경우 대조구나 T2 구에 비해 일당증체량이 낮은 경향을 보였는데, 2차 시험은 일반농장에서 진행한 시험으로 상업농장 특성상 군 분류를 무작위로 진행하지 못하고 무리에서 성장률이 저조한 개체군이 T1 시험구로 설정되어 나타난 결과로 보인다.

표 28. 비육돈 성장성적 (1차 사양시험: 56일 급여)

	Control	T1	T2	T3	T4
공시두수 (두)	13	14	14	14	14
개시체중 (kg)	73.50	74.00	73.17	72.17	72.83
4주차 체중 (kg)	94.67	96.50	96.17	96.00	93.83
출하체중 (kg)	110.17	111.67	113.17	114.83	110.50
증체량 (kg)	36.67	37.67	40.00	42.67	37.67
ADG(kg/d)	0.71	0.73	0.78	0.84	0.74

Control: 기본사료 (0.5% 아마유, 0.6% 비타민 E 첨가), T1: 기본사료 + 0.1% 복합 미생물 생균제, T2: 기본사료 + 0.5% Betaine, T3: 기본사료 + 0.5% CLA, T4: 기본사료 + 0.5% Betaine + 0.5% CLA.

표 29. 비육돈 성장성적 (2차 사양시험: 58일 급여)

	Control	T1	T2
공시두수 (두)	46	52	49
개시체중 (kg)	71.59	55.3	65.5
출하체중 (kg)	120.37	93.7	109.1
증체량 (kg)	48.78	38.4	43.6
ADG(kg/d)	0.841	0.662	0.758

Control: 기본사료 (0.1% 복합 미생물 생균제, 0.5% Betaine 첨가), Test 1: 기본사료 + 2.5% 아마종실, Test 2: 기본사료 + 5% 아마종실

표 30. 비육돈 성장성적 (3차 사양시험: 33일 급여)

	Control	T2	T3	T4
공시두수 (두)	13	12	13	12
개시체중 (kg)	84.7	84.3	84.5	84.8
출하체중 (kg)	109.15	107.58	107.38	111.42
증체량 (kg)	24.46	23.33	22.92	26.67
ADG(kg/d)	0.741	0.707	0.695	0.808

Control: 기본사료 (0.6% 비타민E 첨가), T2: 기본사료 + 0.1% 복합 미생물 생균제, T3: 기본사료 + 2.5% 아마종실 + 0.5% Betaine, T4: 기본사료 + 5% 아마종실 + 0.5% Betaine

다. 비육돈 부위별 지방산 함량측정

(1) 1차 (추풍령) 비육돈 사양시험

(가) 처리구별 돈육 내 ALA와 CLA 함량 비교

시험 사료의 급여가 돈육 내 지방산 함량에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 서울대 평창캠퍼스 인근 지역에서 판매되는 돈육 [아마유(-)]을 구매하여 지방산 분석한 후 실험구와 비교하였다 (그림 42). 돈육 삼겹살 부위의 경우 지역 돈육 [아마유(-)]보다 시험구 (아마유 사료중량의 1.58%)에서 ALA 함량이 2배 정도 높게 나타났으며 비선호부위 (앞다리, 뒷다리)에서는 ALA 함량이 약간 증가하는 경향을 보였다. 이를 통해 돈육 내 삼겹살 부위를 제외한 다른 돈육 부위에서 ALA 함량 증가를 위해서는 기본사료에 아마종실의 추가적인 첨가가 필요하다는 결과를 얻을 수 있었다.

처리구별 돈육 내 CLA 함량을 분석한 결과, CLA를 0.5% 첨가한 Test 3와 Test 4에서 돈육 모든 부위의 CLA함량이 다른 처리구들에 비해 4-5배 증가하는 것을 확인하였다 (그림 43).

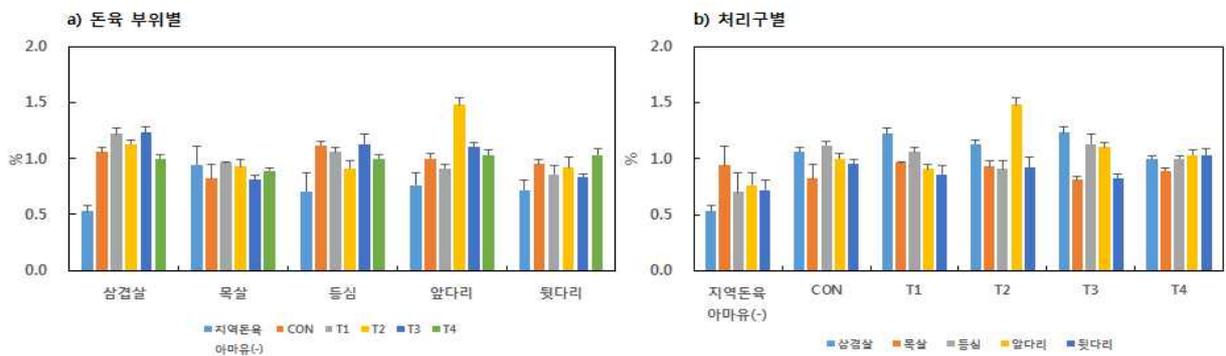


그림 42. 처리구별 돈육 내 ALA (α -linolenic acid) 함량 비교 (1차 사양시험). CON: 기본사료 (아마종실 1.58% 함유), T1: 복합 미생물 생균제, T2: betaine, T3: CLA, T4: betaine+CLA.

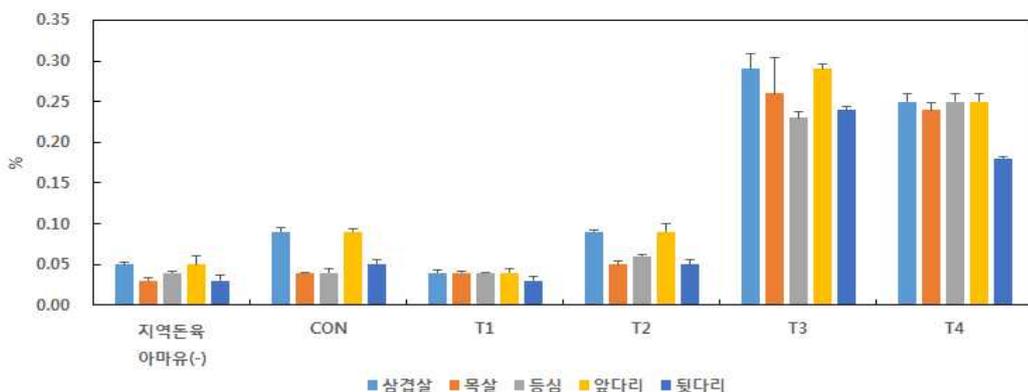


그림 43. 처리구별 돈육 내 CLA (conjugated linoleic acid) 함량 비교 (1차 사양시험). CON: 기본사료 (아마종실 1.58% 함유), T1: 복합 미생물 생균제, T2: betaine, T3: CLA, T4: betaine+CLA.

(나) 처리구별 돈육 내 오메가 지방산 비율 비교

비육돈 사료 내 기능성 물질의 첨가가 돈육 내 오메가 지방산의 균형에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 처리구별 돈육 내 ω -6/ ω -3 지방산 비율을 분석하였다. 삼겹살의 경우, 지역 돈육 [아마유(-)]보다 아마유를 사료중량의 1.58%만큼 첨가한 시험구에서 ω -6/ ω -3 지방산 비율이 2.5-3.5배 감소하였다. 등심, 목살, 비선호 부위 (전지, 후지)에서는 지역 돈육보다 ω -6/ ω -3 비율이 감소추세를 보였다. 전체적으로 각 처리구·돈육 부위별로 지역 돈육 [아마유(-)]보다 ω -3: ω -6 지방산 비율이 1:10정도로 감소됨을 확인하였지만 연구목표치 (1:4이하)에 도달하지 못하였다.

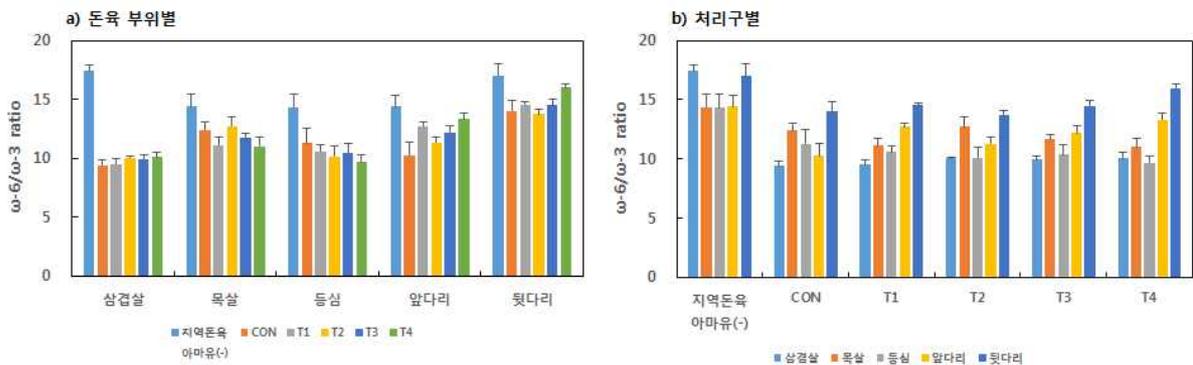


그림 44. 처리구별 돈육 내 오메가-6/-3 지방산 비율 비교 (1차 사양시험). CON: 기본사료 (아마종실 1.58% 함유), T1: 복합 미생물 생균제, T2: betaine, T3: CLA, T4: betaine+CLA.

표 24에 제시된 첨가제 급여량에 따라 비육돈 사양실험을 한 결과, 돈육 내 ALA 함량의 증가를 확인하지 못하였지만 CLA는 돈육에서 4-5배 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 돈육 내 ω -3: ω -6 비율이 감소되었지만 연구목표치 (1:4이하)에 도달하지 않아 비육돈 2차 사양시험에서는 아마종실을 2.5%와 5%로 추가 첨가하였다.

(2) 2차 (전남 강진군)·3차 (추풍령) 비육돈 사양시험

(가) 처리구별 돈육 내 오메가 지방산-6/-3 비율 개선 (그림 45)

시험사료를 처리구별로 58일 동안 급여 시, 원료육 중 삼겹살의 오메가 지방산 비율 (ω -6: ω -3)은 대조구에서 22.7:1이었으나, 2.5% 아마종실 처리구 (Test 1)에서는 7.27:1, 5% 아마종실 처리구 (Test 2)에서는 4.3:1로 개선되었다. 시험사료를 68일 급여 시, 2.5% 아마종실 처리구 (Test 1)에서는 6.5:1이며, 5% 아마종실 처리구 (Test 2)에서는 3.9:1로 개선되었다.

원료육 중 후지의 경우, 58일 급여 시, 오메가 지방산 비율 (ω -6: ω -3)은 대조구에서 32.7:1이었으나, 2.5% 아마종실 처리구 (Test 1)에서는 10.2:1, 5% 아마종실 처리구 (Test 2)에서는 7.4:1로 개선되었다. 시험사료를 68일 급여 시, 2.5% 아마종실 처리구 (Test 1)에서는 11.3:1, 5% 아마종실 처리구 (Test 2)에서는 7.1:1로 개선되었다.

시험사료를 단기 급여 시, 원료육 내 오메가 지방산 비율에 미치는 영향을 알아보기 위하여

3차 비육돈 사양시험을 진행하였다. 시험사료를 33일간 단기급여 하였을 경우, 원료육 중 삼겹살의 오메가지방산 비율 (ω -6: ω -3)은 대조구 22.2:1에서 2.5% 아마종실 처리구 (Test 1)에서 11.3:1, 5% 아마종실 처리구 (Test 2)에서 6.1:1로 개선되었다. 또한 원료육 중 후지의 오메가지방산 비율 (ω -6: ω -3)은 대조구 34.0:1에서 2.5% 아마종실 처리구 (Test 1)에서 14.8:1, 5% 아마종실 처리구 (Test 2)에서 8.5:1로 개선되었다 (표 32).

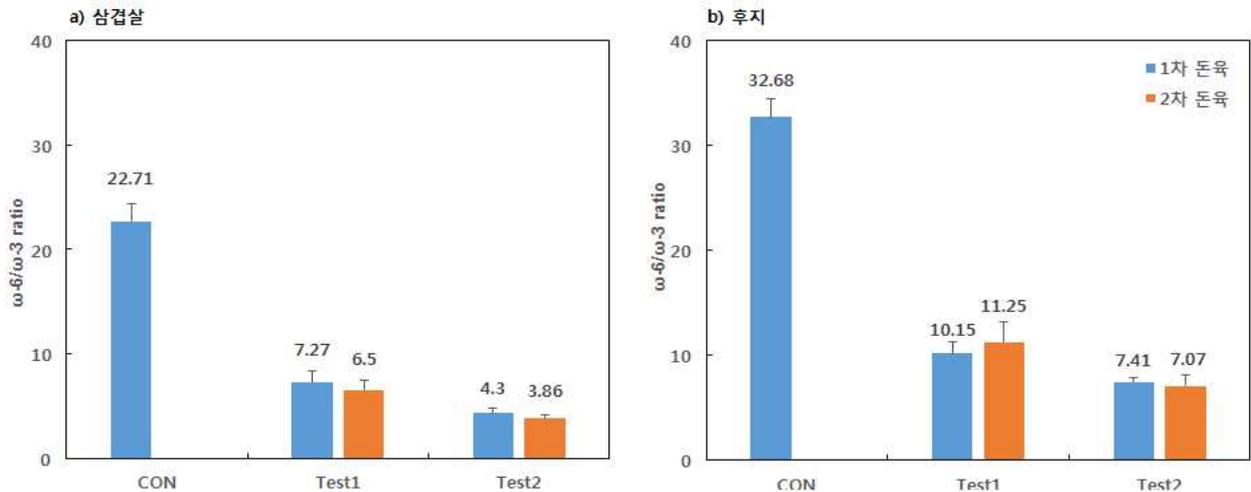


그림 45. 시험 돈육 (삼겹살, 후지)의 오메가 지방산 비율 (ω -6/ ω -3) (2차 사양시험). Control: 기본 사료 (0.1% 복합 미생물 생균제, 0.5% Betaine 첨가), Test 1: 기본사료 + 2.5% 아마종실, Test 2: 기본 사료 + 5% 아마종실. 1차 돈육: 58일 급여, 2차 돈육: 68일 급여.

(3) 가공육 내 오메가 지방산 함량 분석

(가) 시험 돈육 샘플링

시험 돈육을 그룹별로 5두씩 무작위로 선택하여 돈육 샘플 약 100 g씩을 도축장 (청원소재 팜스토리한냉)에서 예냉 후, 부위별로 채취하여 실험실로 냉장 이송하고 냉동 보관 하였다.

(나) 가공육(소시지, 햄) 시제품 제조

- ① Test 2 시험구 후지와 A지방 구입 : 1. 비육돈 2차 사양시험 샘플: 68일 급여 돈육과 지방
2. 비육돈 3차 사양시험 샘플: 33일 급여 돈육과 지방

*Test 2 시험구 - 복합 미생물 생균제/0.5% betaine/5% 아마종실 (Nutex85) 함유

- ② 소시지 및 햄 제조: 후지 및 A지방을 주재료로 **Test2 소시지와 햄 제조**

- ③ 캔햄 조성비: 후지돈육 73.35%/지방 16.29%/10.36% 기타부재료

- ④ 소시지 조성비: 후지돈육 56.79%/지방 21.19%/22.02% 기타부재료

(다) 가공육 (소시지, 햄) 내 오메가 지방산 비율

시험사료를 68일 급여한 원료육으로 가공육제품 제조 시, 햄의 경우 오메가지방산 비율 ($\omega-6:\omega-3$)은 일반 햄에서 16.23:1이었으나, Test 2 햄의 경우, 3.63:1로 개선되었다. 소시지의 경우는 일반 소시지의 경우, 16.31:1에서 Test 2 소시지의 경우, 3.8:1로 개선되었다 (그림 46).

시험사료를 단기 급여 시, 원료육 내 오메가 지방산 비율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3차 비육돈 사양시험을 진행하였다. 시험사료를 33일간 단기 급여한 원료육으로 가공육제품 제조 시, 햄의 경우 오메가 지방산 비율 ($\omega-6:\omega-3$)은 일반 햄에서 20.1:1이었으나, Test 2 햄의 경우, 5.2:1로 개선되었다. 소시지의 경우는 일반 소시지의 경우, 20.3:1에서 Test 2 소시지의 경우, 5.1:1로 개선되었다 (표 32).

표 31. 68일 급여 가공육의 오메가지방산 ($\omega-6/\omega-3$) 조성 비율 종합 (2차 사양시험)

샘플 #	일반 소시지	Test2 소시지	일반 햄	Test2 햄
1	16.23	3.82	17.70	3.65
2	14.86	3.81	17.01	3.60
3	16.98	3.88	16.88	3.62
4	17.18	3.78	13.71	3.61
5		3.73	15.86	3.67
평균±표준편차	16.31±1.05	3.81±0.05	16.23±1.56	3.63±0.03

* 지방산 함량은 샘플의 전체지방산 중 각 지방산의 함량비(%)로 표시한 것임.

* Test 2: 아마종실 5% 첨가구

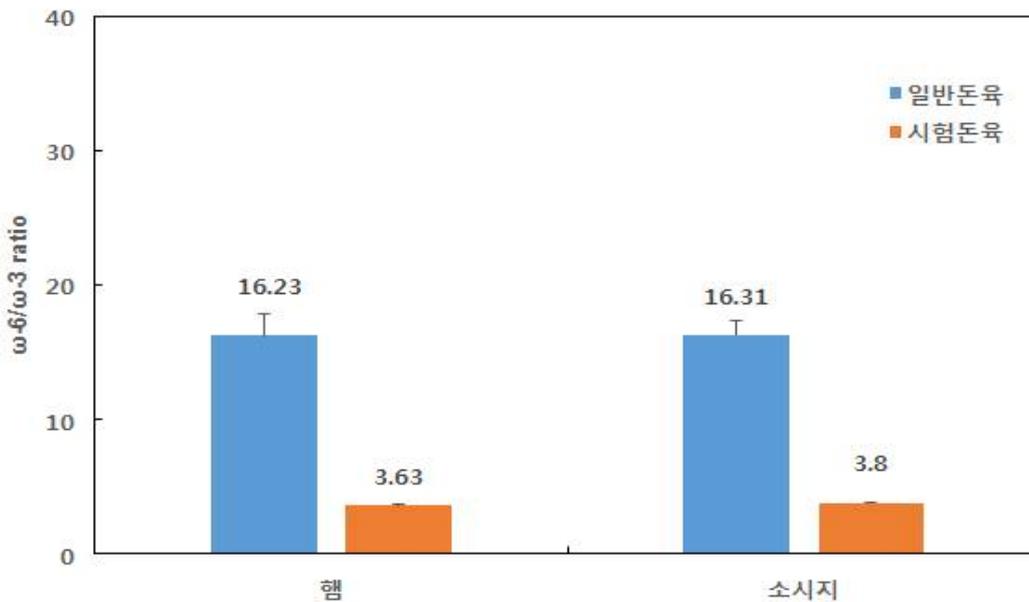


그림 46. 68일 급여 가공육의 오메가지방산 ($\omega-6/\omega-3$) 조성 비율 종합 (2차 사양시험)

표 32. 비육돈 2차, 3차 사양시험 돈육 및 가공육의 오메가-6/-3 비율

	Control (무처리구)		Test 1 (2.5% 아마종실)			Test 2 (5% 아마종실)		
	33일	58일	33일	58일	68일	33일	58일	68일
후지	34.0	32.7	14.8	10.2	11.3	8.5	7.4	7.1
삼겹살	22.2	22.3	11.3	7.3	6.5	6.1	4.3	3.9
햄	20.1	16.2				5.2	3.63	
소시지	20.3	16.3				5.1	3.8	

* 비육돈 2차 시험 샘플 - 58일, 68일 돈육 샘플

* 비육돈 3차 시험 샘플 - 33일 돈육 샘플

(4) 비육돈 급여시험 오메가 지방산 비율 종합 결과

종합적으로 사료 내 5% 아마종실 첨가한 원료육과 지방으로 가공육을 제조할 경우, 오메가 지방산 비율 (ω -6: ω -3)을 건강에 좋다고 알려진 4:1이하로 개선할 수 있으며, 돈육의 오메가 지방산 균형은 아마종실의 급여량이 높아질수록 그리고 급여일수가 길어질수록 비율이 개선되었다. 삼겹살 기준으로, 오메가 지방산의 비율 (ω -6: ω -3)을 4:1 이하로 낮추기 위해서는 68일 이상 5% 급여하여야 한다. 가공육의 경우 5% 급여량을 68일 급여 시, 햄과 소시지에서 모두 3.8:1 이하로 떨어지기 때문에 가공육 기준 5% 아마종실을 2달 급여가 바람직할 것으로 보인다.

라. 기능성분 이행을 분석

(1) 1차 (추풍령) 비육돈 사양시험

사료 내 10% 원료의 비타민 E를 0.6% 처리하였을 경우, 돈육 내 비타민 E 함량이 지역 돈육에 비해 4배 증가하였으며, 0.5% betaine 처리구인 T2와 T4에서 돈육 내 betaine 함량이 betaine 미처리구에 비하여 3~5배 증가하였다 (그림 47).

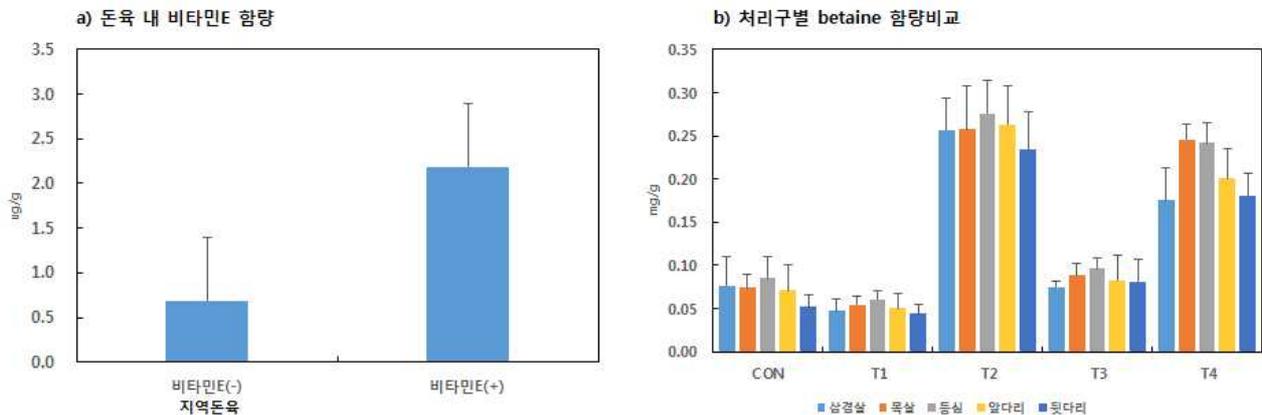


그림 47. 처리구별 돈육 내 기능성 생리물질 (비타민E, betaine) 함량 비교 (1차 사양시험). CON: 기본사료 (아마종실 1.58% 함유), T1: 복합 미생물 생균제, T2: betaine, T3: CLA, T4: betaine+CLA.

시험 사료를 급여하였을 경우, 기본사료 대비하여 모든 처리구에서 삼겹살 부위의 carnitine 함량이 감소하는 추세를 나타냈으며, 삼겹살을 제외한 다른 부위에서는 큰 차이를 보이지 않았다 (그림 48).

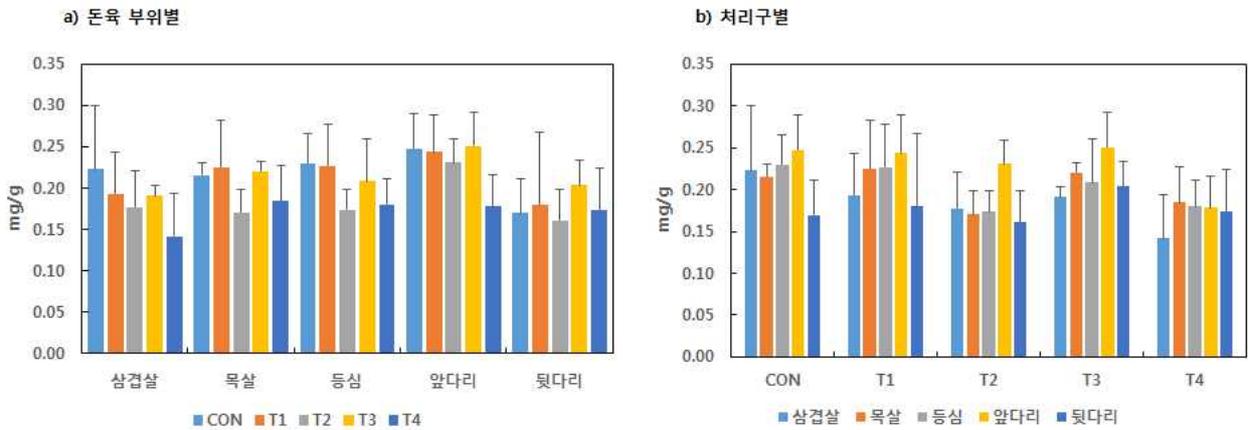


그림 48. 처리구별 근육 내 carnitine 함량 비교 (1차 사양시험). CON: 기본사료 (아마종실 1.58% 함유), T1: 복합 미생물 생균제, T2: betaine, T3: CLA, T4: betaine+CLA.

(2) 2차 (전남 강진군)·3차 (추풍령) 비육돈 사양시험 (원료육)

(가) 비육돈 2차 사양시험 (68일 급여)

비육돈 사료 내 0.5% betaine을 첨가하여 68일 급여할 경우, 후지 내 betaine 함량이 대조구 대비하여 124.95 µg/g에서 467.68 µg/g (Test 1), 415.42 µg/g (Test 2)으로 약 3.3~3.7배 증가하였다 (그림 49).

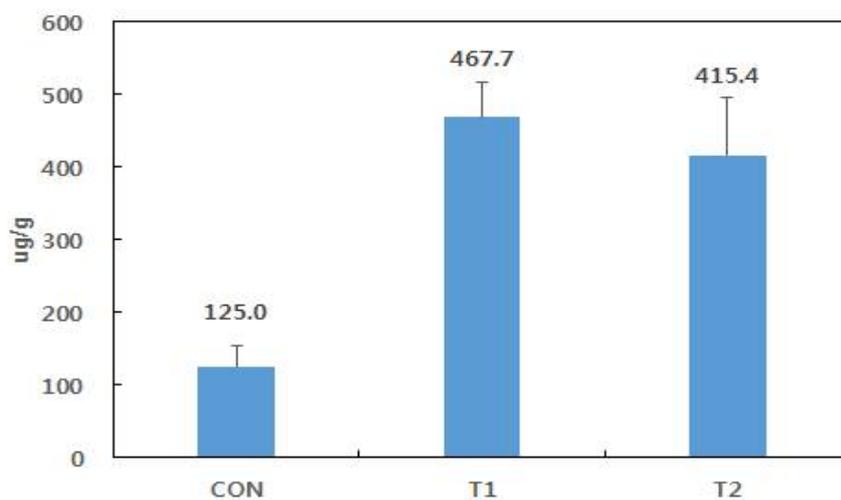


그림 49. 처리구별 근육 (후지) 내 betaine 함량 (2차 사양시험). Control: 기본사료 (0.1% 복합 미생물 생균제, 0.5% Betaine 첨가), Test 1: 기본사료 + 2.5% 아마종실, Test 2: 기본사료 + 5% 아마종실.

(나) 비육돈 3차 사양시험 (33일 급여)

비육돈 사료 내 0.5% betaine을 첨가하여 33일 동안 급여할 경우, 목살 내 betaine 함량은 97.1 µg/g에서 427.1 µg/g으로 약 4.4배 증가하였으며, 후지 내 betaine 함량은 78.6 µg/g에서 325.1 µg/g으로 대조구 대비 약 4.1배 증가하였다 (그림 50).

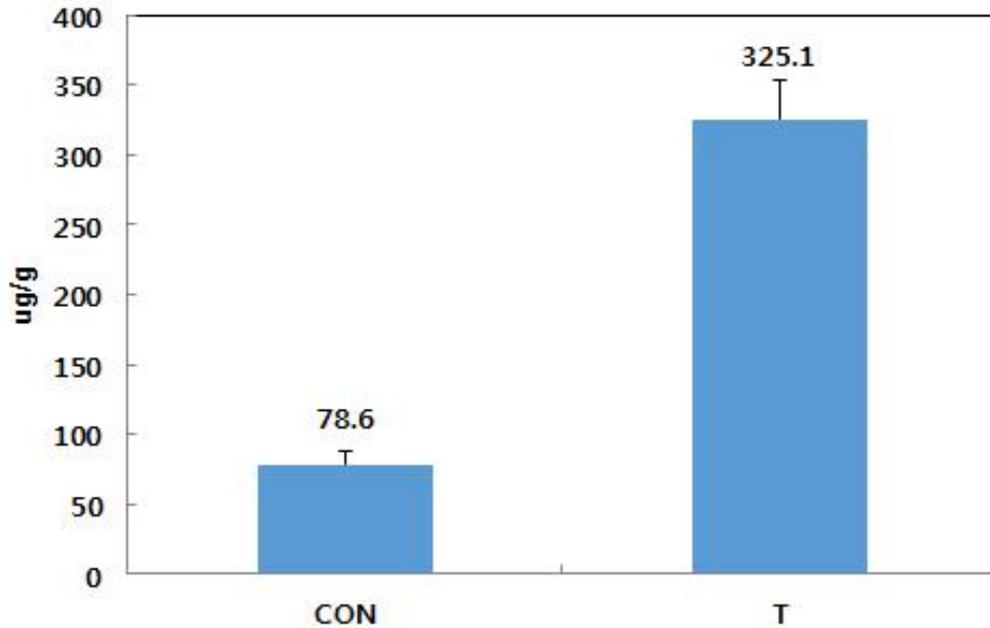


그림 50. 33일 급여 후, 돈육 내 betaine 함량 (3차 사양시험)

(3) 2차 (전남 강진군)·3차 (추풍령) 비육돈 사양시험 (가공육제품)

(가) 비육돈 2차 사양시험 (68일 급여)

비육돈 사료 내 0.5% betaine을 첨가하여 68일 급여한 원료육으로 가공육제품 제조 시, 햄의 경우 betaine 함량은 일반 햄에서 94.28 µg/g이었으나, Test 2 햄의 경우, 290.21 µg/g으로 약 3.1배 증가하였다. 소시지의 경우는 일반 소시지의 경우, 65.95 µg/g에서 Test 2 소시지의 경우, 185.09 µg/g으로 약 2.8배 증가하였다 (그림 51).

표 33. 68일 급여 가공육 시제품 내 betaine 함량 분석 결과 (2차 사양시험)

가공육	집단(평균)		평균의 표준오차	유의확률
	대조구	처리구		
햄	94.28	290.21	32.71	0.000
소시지	65.95	185.09	19.92	0.000

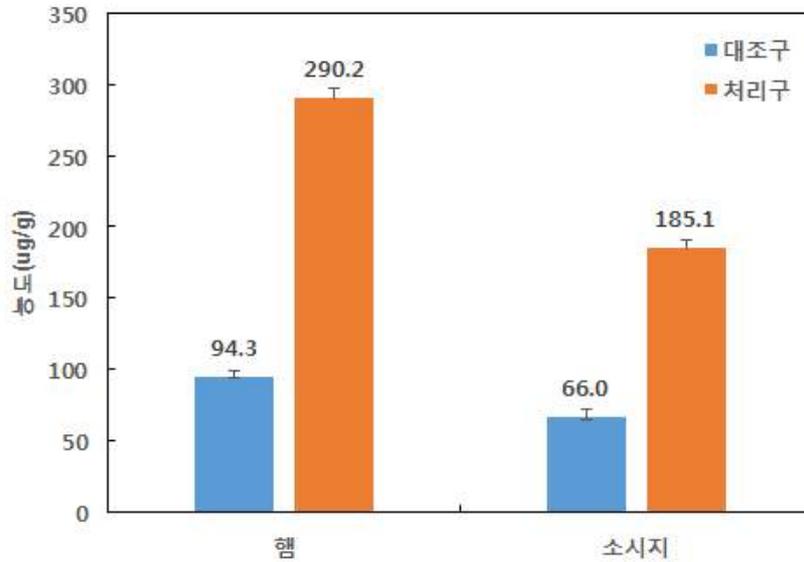


그림 51. 68일 급여 가공육 내 betaine 함량 (2차 사양시험)

(나) 비육돈 3차 사양시험 (33일 급여)

① 가공육 내 betaine 함량

시험사료를 단기 급여 시, 가공육 내 betaine 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3차 비육돈 사양시험을 진행하였다. 0.5% betaine이 포함된 시험사료를 33일간 단기 급여한 원료육으로 가공육제품 제조 시, 햄의 경우 betaine 함량이 일반 햄에서 119.2 $\mu\text{g/g}$ 이었으나, Test 2 햄의 경우, 241.5 $\mu\text{g/g}$ 으로 약 2배 증가하였다. 소시지의 경우는 일반 소시지의 경우, 86.5 $\mu\text{g/g}$ 에서 Test 2 소시지의 경우, 234.3 $\mu\text{g/g}$ 으로 약 2.7배 증가하였다 (그림 52).

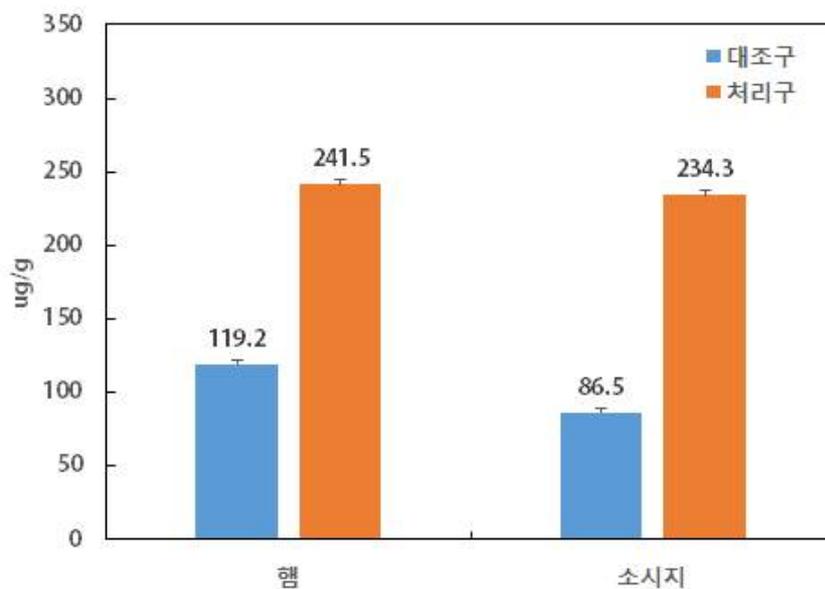


그림 52. 33일 급여 가공육 내 betaine 함량 (3차 사양시험)

② 혈청 내 기능성 물질 함량

0.5% betaine이 포함된 시험 사료를 33일간 단기 급여 시, 비육돈 혈청 내 기능성 물질 함량 변화를 알아보기 위하여 혈청 내 betaine 함량 및 homocysteine (심혈관계 질환 마커 중 하나) 함량을 분석하였다. 혈청 내 betaine 함량은 대조구에서 18.8 µg/ml이었으나, 처리구에서 79.7 µg/ml로 약 4.2배 증가하였다. 혈청 내 homocysteine 함량은 대조구에서 18.3 ng/ml이었으나, 처리구에서 14.8 ng/ml로 약 19% 감소하였다 (그림 53).

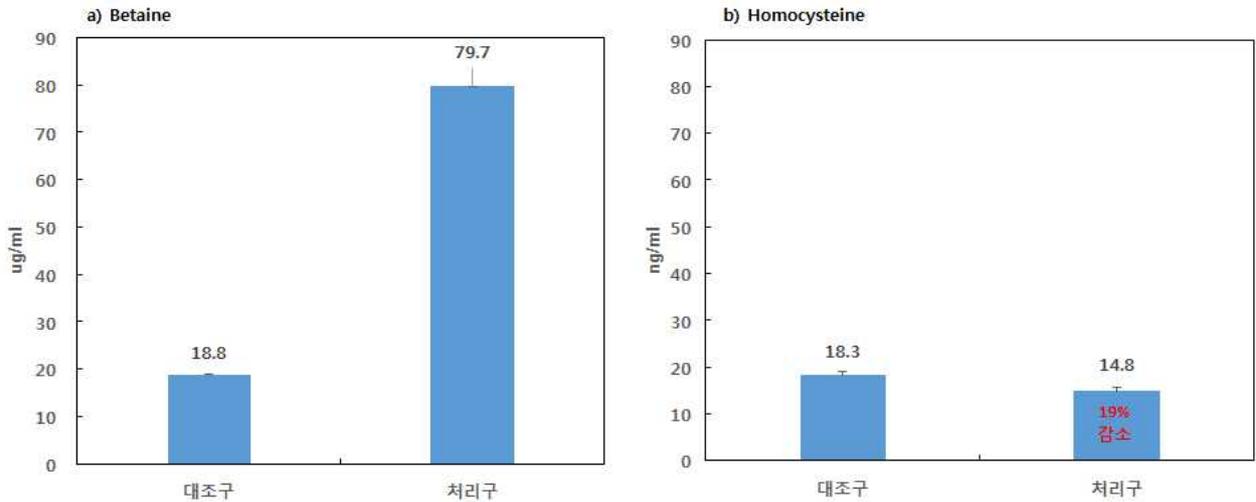


그림 53. 33일 급여 후, 혈청 내 betaine과 homocysteine 함량 (3차 사양시험)

(4) 비육돈 급여시험 기능성 물질 함량 종합 결과

Betaine을 0.5% 수준으로 첨가하여 급여할 경우, 33일 급여만으로도 돈육 내 betaine 함량이 4배 이상 증가하였으며, 68일 급여 시, 햄과 소시지에 betaine 함량이 각각 약 3배, 약 2.8배 증가하였고, 33일 급여만으로도 햄과 소시지에 betaine 함량이 각각 약 2배, 약 2.7배 증가하였다. 또한 betaine을 0.5% 수준으로 첨가하여 급여할 경우, 33일 급여 후, 혈액 내 betaine 함량이 4.24배 증가하고, 심혈관계 질환마커의 하나인 homocysteine이 19% 감소하였다.

마. 장내 미생물 영향성 분석

(1) Phylum 수준

복합 미생물 생균제 및 기능성 물질을 급여하는 것이 비육돈의 장내 미생물에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 장내 미생물 균집을 분석하였다. 먼저 phylum 수준에서 분석을 진행하였다. 0주차에는 모든 처리구에서 유사한 경향을 나타냈으나, 8주차에는 복합 미생물 생균제 급여구인 Test 1과 0.5% CLA 급여구인 Test 3에서 대조구 대비 Proteobacteria가 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다 (그림 54). Proteobacteria는 병원균 혹은 기회성 병원균인 *E. coli*,

Salmonella spp., *Vibrio* spp. 등이 포함된 phylum으로 복합 미생물 생균제의 처리가 기회성 병원균을 억제하는 효과가 있는 것으로 보인다.

0, 4 주차에 복합 미생물 생균제 급여구인 Test 1에서 대조구 대비 Firmicutes가 적고 Bacteroidetes가 많았으나, 8주차에 Test 1에서 Firmicutes가 증가하고 Bacteroidetes가 감소하는 영향을 나타냈다. Firmicutes는 체중 증가와, Bacteroidetes는 체중 감소와 관련 있다는 연구 결과가 다수 존재하며, 이를 통해 복합 미생물 생균제의 급여가 장내 미생물 군집에 영향을 주어 비육돈의 증체에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

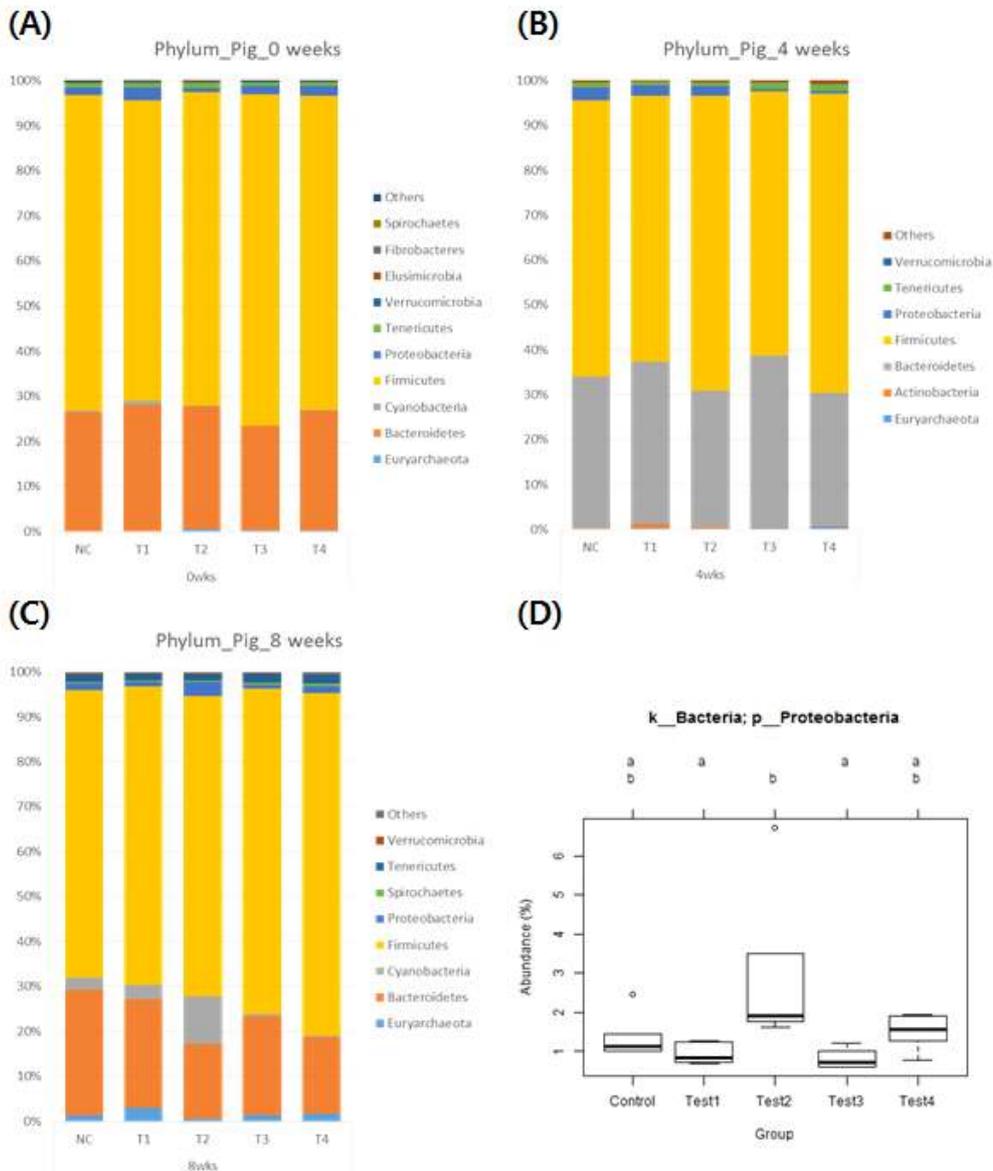


그림 54. 시험구별 phylum 수준에서의 미생물 군집 분석 (1차 사양시험).
(A) 0주차, (B) 4주차, (C) 8주차, (D) 8주차 시험구당 Proteobacteria의 비율.

(2) Genus 수준

다음으로 genus 수준에서 비육돈 장내 미생물 영향성을 분석하였다. 복합 미생물 생균제를

급여한 Test 1에서 *Lactobacillus*와 *Pediococcus*가 0주차에는 대조구 대비 낮은 수준을 나타냈으나, 8주차에는 대조구 대비 높은 수준을 나타냈다 (그림 55). 이는 복합 미생물 생균제의 급여가 비육돈의 장내 미생물 군집에 영향을 주며 급여한 유산균이 장내에서 증가하는 것으로 보인다. 위 결과들을 종합하여 보았을 때, 복합 미생물 생균제의 급여는 장내 유익균을 증가시키며 병원균을 억제하는 효과가 있는 것으로 보인다.

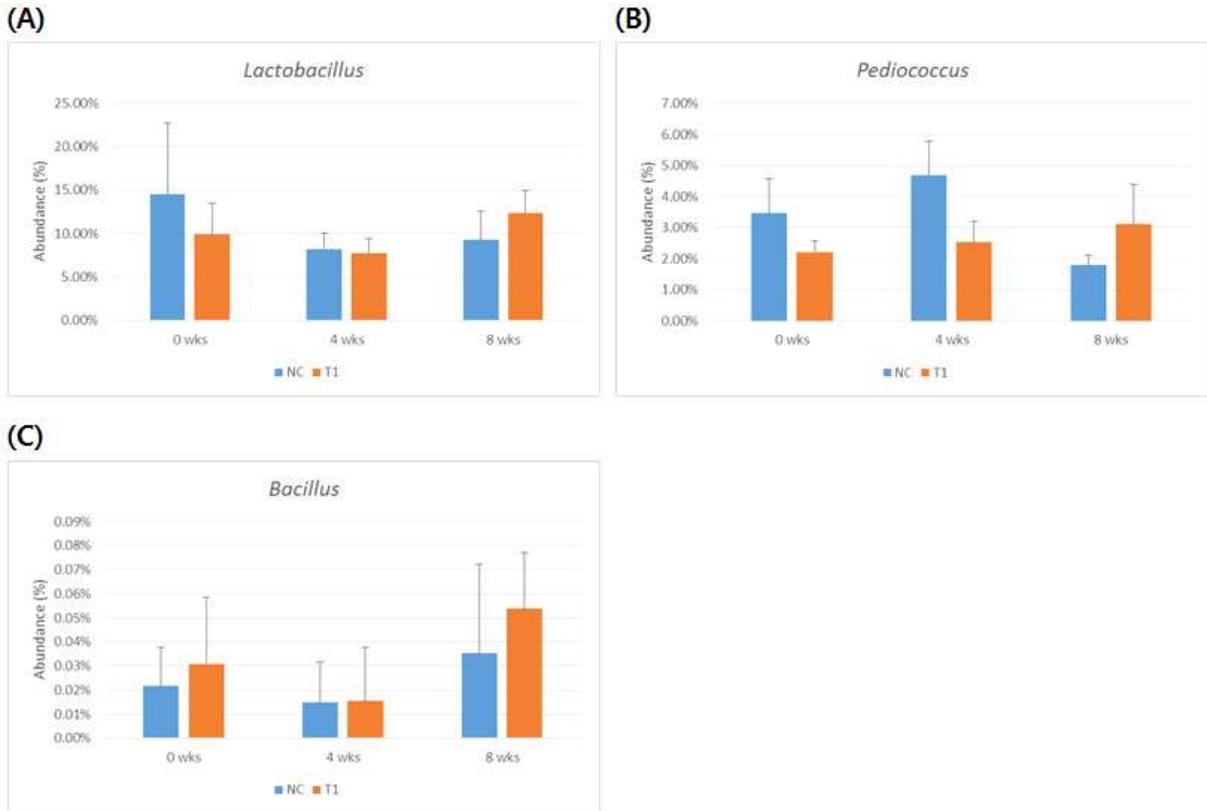


그림 55. 복합 미생물 생균제 급여에 따른 genus 수준에서의 장내 균총 변화 (1차 사양시험).
(A) *Lactobacillus*, (B) *Pediococcus*, (C) *Bacillus*.

제4절 제1협동과제: 생리활성 성분 함유 농립수산부산물을 활용한 친환경-웰빙 사료첨가제 개발 및 브랜드 기능성 축산물 생산

1. 기능성 농립수산부산물의 추출공정 및 제형화 기술 구축

가. 기능성 농립수산부산물의 최적 첨가수준 확립

“바이오사료첨가제 사업단”, “농립기술개발사업” 및 “부산대학교 산학협력 선도대학 육성 사업단”을 통해 기 수행된 연구 성과는 다음과 같다.

(1) 잣 구과 (피톤치드)

표 34. 잣 구과 부산물 추출액(피톤치드)을 활용한 선행 연구

완료 항목	대상동물
병원성 미생물에 대한 항균력	소, 돼지, 닭
면역반응 증진효과	닭, 랫
생균제와의 복합효과 시험	닭, 랫
사양시험을 통한 첨가수준 시험	닭
사양시험을 통한 축산물 (계란) 내 기능성 물질 전이	닭

기존 선행연구에서 피톤치드첨가제 (0.002 ~ 0.008%/kg feed)를 산란계 큰병아리의 사료 내 급여한 결과 생리/면역적 지표에 유의적 변화가 있음을 제시하였다 (표 34). 따라서 기 수행된 연구결과를 토대로 현 과제에 적용 범위를 결정하였다.

(2) 미역

표 35. 미역부산물을 활용한 선행 연구

완료 항목	대상동물
성장, 번식, 내분비생리 및 혈중 대사산물	젓소
비유성적 및 내분비생리	젓소
발효미역을 통한 비유성적, 혈액성상 및 비유생리	젓소
미역 제품 첨가에 따른 단백질과 에너지 대사	닭
혈액 항산화 균형 및 면역반응증진 효과	닭
알긴산분해균을 통한 폐미역의 저장성 확보 및 사료화	닭, 젓소

기존 선행연구에서 미역 (2%/kg feed)을 젓소 및 산란계의 사료 내 급여한 결과 생리/면역적 지표에 유의적 변화가 있음을 제시하였다 (표 35). 따라서 기 수행된 연구결과를 토대로 현 과제에 적용 범위를 결정하였다.

(3) 마늘

표 36. 폐마늘 추출액을 활용한 선행 연구

완료 항목	대상동물
병원성 미생물에 대한 항균력	소, 돼지, 닭
면역반응증진 효과	닭, 랫
생균제와의 복합효과 시험	닭, 랫
사양시험을 통한 첨가수준 시험	닭

기존 선행연구에서 마늘알갱이 추출물첨가제 (0.002%/kg feed)를 산란계 큰병아리의 사료 내 급여한 결과, 생리/면역적 지표에 유의적 변화가 있음을 제시하였다 (표 36). 따라서 기 수행된 연구결과를 토대로 현 과제에 적용 범위를 결정하였다.

나. 효과적인 농림수산물부산물의 수집/보관/건조 방법 수립

(1) 잣 구과



그림 56. 잣 구과 부산물의 수집, 저장 및 건조 과정

참여기업인 (주)피러스는 잣나무 부산물 추출물인 피톤치드를 이용하여 향균제품군 및 식품제조물허가서를 보유한 기업으로 참여기업과 공동으로 현재까지 피톤치드를 추출하기 위해 가평 및 홍천 지역에서 잣 탈곡 후 남은 잣나무 부산물 (구과, 잎, 가지, 및 뿌리 등)을 수집 후, 보관 및 건조 작업 실시하는 일련의 과정을 확립하였다. 따라서 잣 구과 추출물 (피톤치드)을 이용하여 본 연구를 진행하였다.

(2) 미역부산물 (미역줄기, 미역귀)

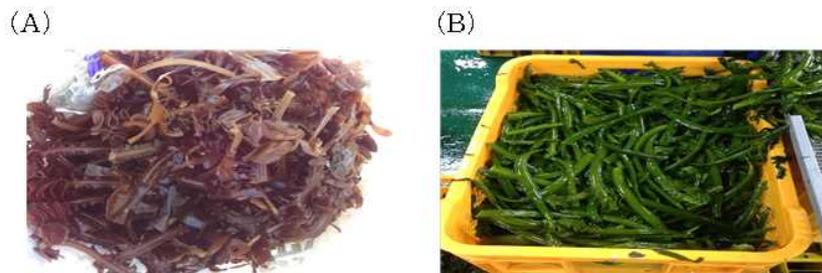


그림 57. 미역부산물인 미역줄기 (A)와 미역귀 (B)의 수집

미역부산물인 미역줄기 [그림 57(A)]와 미역귀 [그림 57(B)]를 사료화하기 위한 전통적인 건조방법이 있으나, 미역 채취시기가 2~4월에 집중되어 있기 때문에 건조설비를 이용해야 하고 이런 건조설비의 연가동률은 1/4정도밖에 되지 않기 때문에 다른 대안이 제시되어야 한다. 따라서 본 연구는 우선 추수된 미역부산물을 바로 냉동보관 (-80 ℃) 후, 이를 참여기업인 (주)피러스와 공동으로 수집된 미역부산물 추출 방법을 설정하여 이를 이용하여 실험에 사용하였다.

(3) 마늘부산물 (폐마늘, 마늘뿌리)

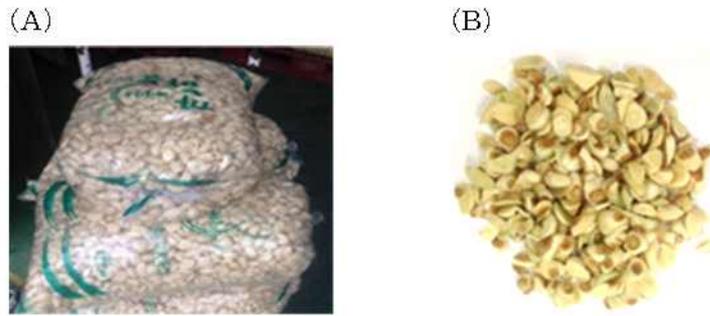


그림 58. 폐마늘알갱이 (A)와 마늘뿌리 (B) 수집

S기업의 산하 대형마트에서 판매되고 있는 마늘알갱이는 미리 선별 및 가공된 것으로 폐기 처분되는 폐마늘 [그림 58(A)]과 마늘뿌리 [그림 58(B)]를 사료하기 위하여 이용하였다. 본 연구는 폐기되는 마늘과 마늘뿌리를 참여기업인 (주)피리스와 공동으로 수집하여 냉동보관 (-80℃) 후, 추출과정을 통하여 마늘부산물 (폐마늘, 마늘뿌리) 추출액을 각각 얻었다.

다. 축종별 이용성 증진을 위한 제형 이용성 증진 연구

(1) 다양한 추출 방법 및 제형화

(가) 농림수산물부산물의 추출 방법 확립

본 연구는 농림수산물부산물 (잣 구과, 미역, 폐마늘)에서 높은 수율로 추출물을 얻기 위해 수증기 증류법을 적용하였다 (그림 59).

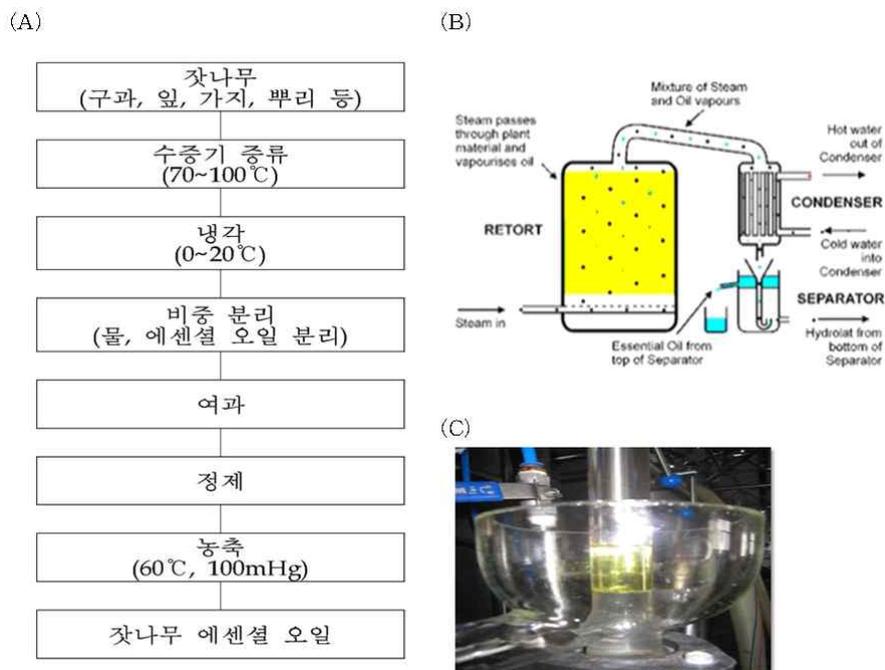


그림 59. 수증기증류법의 공정 (A), 원리 (B) 및 잣 구과 부산물 추출액인 피톤치드 오일 (C)

해당재료 (잣 구과, 미역, 폐마늘)를 오일 추출기에 투입 및 교반기에 교환수를 주입하고 그 다음 정제 아라비아고무 분말을 소량씩 투입하면서 작동한다. 분말고무가 잘 용해되도록 서서히 투입하여 전량 용해 후 텍스트린 분말을 다시 소량씩 투입하여 균일하게 전량 용해시킨 후 나머지 피톤치드 오일을 주입하여 재차 작동하여 예비유화를 한 후 본유화를 2회 정도 하고 필요에 따라 100 메쉬 금망으로 여과하여 분무 후 최종적으로 추출물을 얻을 수 있다 [그림 59(A)].

이 수증기 증류법은 재료를 채운 용기 하단부로 수증기를 불어 넣음으로써 재료의 조직세포를 파괴하거나 또는 삼투압의 조성을 통하여 유리하게 된 성분을 수증기와 함께 증발시키고 이것을 다시 냉각 응축함으로써 유효 성분을 회수하는 방법으로 [그림 59(B)], 재료가 항상 포화된 수증기에 접촉됨으로써 과열 수증기 또는 열 공기에 의하여 일어날 수 있는 성분의 변화를 방지할 수 있다는 장점 및 재료가 물 속에 잠겨 있는 상태에서 가열되므로 수증기를 직접 접하면 재료가 수축하여 고화됨으로써 추출이 어려운 재료 (예를 들면, 국화꽃, 잣나무, 마늘, 미역 등)에 적합하므로 이 추출법을 적용 및 확립하였다 [그림 59(C)].

(나) 마이크로캡슐 조합 및 제조공정 확립

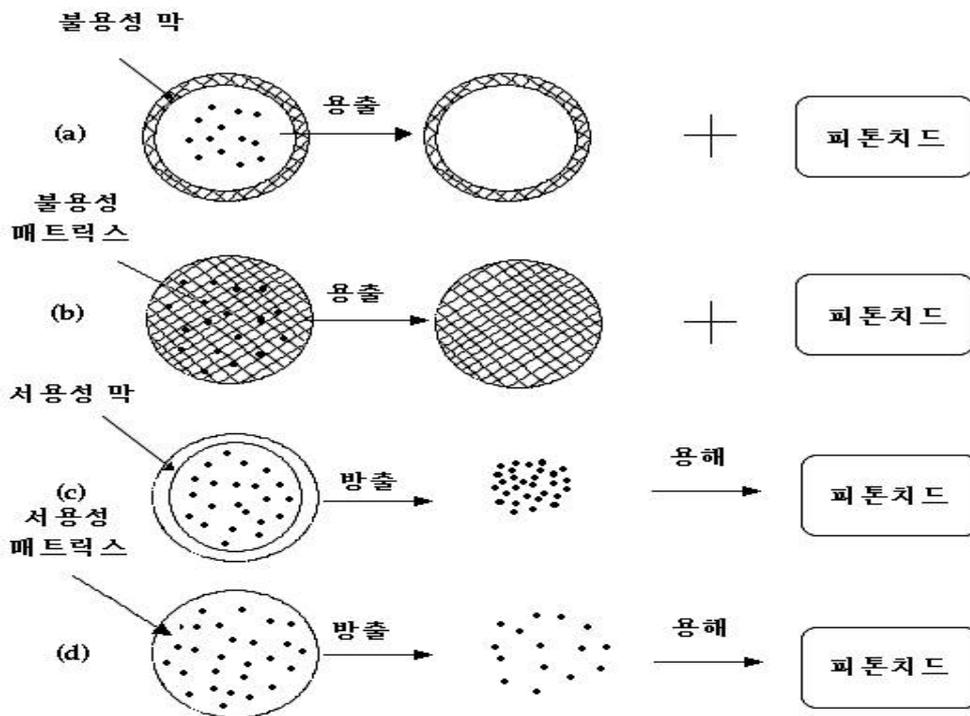


그림 60. 잣 구과 부산물 유래 피톤치드 오일의 마이크로캡슐 제조 방법

본 연구의 농림수산부산물 (잣 구과, 미역, 폐마늘) 추출물은 휘발성이 강한 성분물질로 이루어져 있기 때문에 가축의 사료화 시 생리활성 성분의 효과의 지속성 유지의 단점을 가지고 있었다. 이 단점을 해결하기 위해 농림수산부산물 추출물의 마이크로캡슐화를 통해 추출물들의 방출속도 및 양을 조절하여 그 효과를 지속시키기 위한 제조공정을 확립하였다 (그림 60).

(다) 농림수산물 부산물 추출물의 제형화 기술 확립



그림 61. 농림수산물 부산물 추출액의 제형화 공정도

마이크로캡슐화로 제형화된 각 농림수산물 부산물 (잣 구과, 미역, 폐마늘) 추출액을 이용하여 축종별 사료첨가제로 이용 가능한 분말화 및 펠렛화 제조공정기술을 확립하였다 (그림 61).

2. 가축 사료로의 이용성 평가

가. 축종별 병원균 특이적 항균력 조사 (*in vitro*)

본 연구는 소, 돼지, 닭 유래 병원성 미생물 (*E. coli* K88, *E. coli* K99, *Salmonella enteritidis*)에서 농림수산물 부산물 추출액의 항균효과를 검증함으로써 가축 사료로의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

(1) 농림수산물 부산물 유래 추출액 단독 항균력 효과

(가) 연구재료 및 방법

① 샘플 준비

농림수산물 부산물 추출액 [참여기업인 (주)피러스 제공]을 본 연구에 사용하였다 (그림 62). 항균력 측정을 위해 잣 구과 추출물 (피톤치드, phytoncide), 미역줄기 (seaweed midrib)와 미역귀 (seaweed sporopyll) 및 폐마늘 (wasted garlic)과 마늘뿌리 (garlic root)의 추출원액 각각을 멸균된 0.45 μm bottle top filter (Corning, USA)로 여과한 후, 여액을 즉시 실험에 사용하였다. 상기 조작은 가급적 무균 상태에서 신속하게 실시하였다.



그림 62. 농림수산부산물 추출액 샘플 사진

② 축종별 병원성 미생물 선정

농림수산부산물 추출액의 항균력 조사를 위하여 현재 문제가 되고 있는 소, 돼지, 닭 유래 병원성 미생물 3종 (*Escherichia coli* K99, *E. coli* K88, *Salmonella enteritidis*)을 선정하였다.

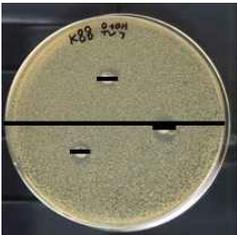
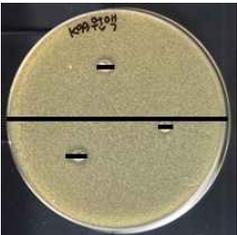
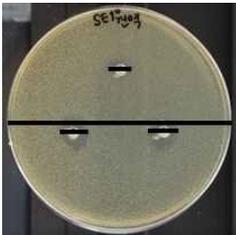
③ Agar diffusion assay

축종별 병원성 미생물에 대한 농림수산부산물 추출액의 항균효과를 검증하기 위하여 구축된 agar diffusion assay 방법을 이용하였다. Agar diffusion assay 방법은 다음과 같이 진행하였다. Bottom agar (MRSa)를 먼저 분주하여 굳힌 후 top agar (TSB + 0.7% agarose)를 제조하여 병원균 희석액 10^{-3} (K99, K88, SP), 10^{-2} (SE, ST, SG)을 넣고 bottom agar 위에 분주하여 굳혔다. 굳힌 후 plate 3부분에 well을 cork bore로 뚫고 천연물 추출액을 40 μ l 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, overnight 배양하였다. 배양 후 clear zone이 형성되면, plate를 스캔하고 clear zone을 제어 수치화 시켰다. 수치는 측정 불가(-), 15 mm보다 작음(+), 15~25 mm(++), 26~35 mm(+++), 35 mm보다 큼(++++)으로 표현하였다.

(나) 실험 결과 및 고찰

① 피톤치드의 항균력 효과

표 37. 축종별 병원성 미생물에 대한 피톤치드의 항균 활성도

Antibacterial activity of phytoncide		
<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> 99	<i>S. Enteritidis</i>
		
+ ¹⁾	+	+

¹⁾Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

축종별 병원성 미생물에 대한 잣 구과 추출액 (피톤치드)의 항균력 조사를 한 결과 전체적인 병원성 미생물에서 골고루 항균력을 보였으나, 그 효과는 강하지 않은 것으로 나타났다 (표 37).

② 미역부산물 (미역줄기, 미역귀) 추출액의 항균력 효과

미역부산물 추출액의 축종별 병원성 미생물에 대한 항균활성을 조사한 결과, 미역줄기 (midrib) 추출액에서는 항균력을 보이지 않았지만 미역귀 (sporophyll) 추출액은 3가지 축종별 병원성 미생물에 대한 15mm 이하의 약한 항균력을 보였다 (data not shown).

③ 마늘부산물 (폐마늘, 마늘뿌리) 추출액의 항균력 효과

마늘부산물 추출액의 항균활성을 조사 한 결과도 마늘뿌리 (root) 추출액의 경우에는 전혀 항균활성이 없었으나 폐마늘 (wasted garlic) 추출액의 경우 3가지 축종별 병원성 미생물에 대한 15mm 이하의 약한 항균력을 보였다 (data not shown).

(2) 농림수산부산물 유래 추출액 복합제제의 항균력 효과

(가) 연구재료 및 방법

① 샘플 준비

각 시료는 (주)피러스에서 제공받은 농림수산부산물 추출액을 본 연구에 사용하였다. 항균력 측정을 위해 피톤치드 (phytoncide), 폐미역 (wasted seaweed), 폐마늘알갱이 (wasted garlic)의 추출원액 각각을 멸균된 0.45 µm bottle top filter (Corning, USA)로 여과한 후, 이들 각 추출액을 1:1 볼륨비로 혼합하여 이용하였다. 복합제제는 피톤치드+폐미역, 피톤치드+폐마늘, 폐미역+폐마늘, 피톤치드+폐마늘+폐미역으로 구분지어 (총 4종) 실험하였다. 상기 조작은 가급적 무균 상태에서 신속하게 실시하였다.

② 병원균 배양

각 추출물의 조합에 따른 복합제제의 병원균에 대한 항균력 조사를 위한 병원성 미생물은 표 37과 동일한 균주를 사용하였다.

(나) 실험 결과

표 38. 축종별 병원성 미생물에 대한 농림수산물 부산물 추출 복합제의 항균 활성도

Sample	Pathogen		
	<i>E. coli</i> K99	<i>E. coli</i> K88	<i>S. Enteritidis</i>
피톤치드+폐미역	-	-	-
피톤치드+폐마늘	+	+	-
폐미역+폐마늘	-	+	-
피톤치드+폐미역+폐마늘	-	-	-

Growth inhibition size of clear zone: -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++, large than 35mm.

농림수산물 부산물 추출액의 항균력이 대체적으로 낮게 나타났다 (표 38). 축우용 병원균에서는 피톤치드+폐마늘 혼합 시료에서 항균력을 보였으며, 양돈용 병원균에 대해서는 피톤치드+폐마늘, 폐미역+폐마늘 혼합 시료에서 항균력을 나타내었다. 세 가지 농림수산물 부산물 추출액을 혼합 시에는 병원성 미생물에 대한 항균력이 나타나지 않았다.

(3) 농림수산물 부산물 유래 추출액과 생균제와의 혼합 적정성 평가

(가) 연구재료 및 방법

① 샘플 준비

생균제와의 혼합 적정성 측정을 위해 피톤치드 (phytoncide), 폐미역 (wasted seaweed), 폐마늘 (wasted garlic)의 추출원액 각각을 멸균된 0.45 µm bottle top filter (Corning, USA)로 여과한 후 1:1 볼륨비로 혼합하여 이용하였다. 상기 조작은 가급적 무균 상태에서 신속하게 실시하였다. 시료는 농림수산물 추출액 단독, 이들 각 추출액의 혼합별로 구분 지었으며, 농림수산물 부산물 추출액 단독은 피톤치드, 폐마늘, 폐미역으로 구분 지었으며 (총 3종), 혼합제제는 피톤치드+폐미역, 피톤치드+폐마늘, 폐미역+폐마늘, 피톤치드+폐마늘+폐미역으로 구분지어 (총 7종) 실험하였다.

② 생균제 제조

주관기관인 서울대학교에서 제공한 축종별 3가지의 생균제를 본 실험에 이용하였다. 균주는 10 µl/ml broth에 넣고 37 °C에서 240 rpm으로 배양하였으며 (효모: 30 °C), 유산균은 10⁹까지 배양 후 broth로 희석하여 사용하였다. 각 배양시간이 되면 4 °C 냉장고에 차례로 보관하였으며 혼합비율은 각 균수에 맞도록 적절히 배양 후 1:1:1의 볼륨비로 혼합하였다. 배양한 생균제는 밀봉하여 4 °C에 보관 후 사용하였으며, 각 생균제에 따른 배양조건은 다음과 같다.

표 39. 축종별 생균제의 배양조건

종축	유산균 (MRS)	최종균수 ($x > 10^7/g$)	배양 시간	효모 (YPD)	최종균수 ($x > 10^7/g$)	배양 시간	바실러스 (TSB)	최종균수 ($x > 10^7/g$)	배양시간
축우용	LP-GS1	50	20	SB-796	10	24	BS-T4	10	32
	PA-GS4	100	16						
양돈용	PA-GS4	100	16	SB-796	10	24	BS-T4	10	32
	LP-GS1	10	20						
양계용	PA-GS1	100	16	SB-796	10	24	BS-T4	10	32
	LP-GS1	10	20						

③ Agar well diffusion assay

축종별 병원성 미생물에 대한 농림수산부산물 추출액의 항균효과를 검증하기 위하여 구축된 agar well diffusion assay 방법을 이용하였다. Agar well diffusion assay 방법은 이전과 동일하다.

(나) 실험 결과

표 40. 축종별 생균제와 농림수산부산물 추출 단독 또는 복합제의 교배양에 따른 혼합 적정성 평가

Sample	Probiotics	PA-GS1 (유산균)	PA-GS4 (유산균)	LP-GS1 (유산균)	SB796 (효모)	BS-T4 (바실러스)
피톤치드		-	-	-	+	+
페미역		-	-	-	-	+
페마늘		-	-	-	+	+
피톤치드+페미역		+	+	-	++	+
피톤치드+페마늘		+	+	+	++	+
페미역+페마늘		-	-	-	+	+
피톤치드+페미역+페마늘		+	+	+	++	+

Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++, large than 35mm.

농림수산부산물 추출액의 생균제 구성 균들에 대한 살균력이 나타났다 (표 40). 유산균 중 PA-GS1와 PA-GS4에서는 피톤치드+마늘, 피톤치드+미역, 세 가지 혼합 시료에서 살균력을 보였으며, LP-GS1에서는 피톤치드+마늘, 세 가지 혼합 시료에서 살균력을 보였다. 효모 (SB-796)에서는 미역을 제외한 모든 혼합물에서 살균력을 보였으며, 바실러스 (BS-T4)에서는 모든 시료에서 살균력을 보였다. 단독처리보다 혼합 시 생균에 대한 살균력이 높은 것으로 나타났다. 따라서 농림수산부산물 추출액은 전반적으로 생균제로 이용되는 균주에 대하여 살균력을 보이고 있어 생균제의 혼합제제 평가는 본 연구에서는 고려하지 않기로 하였다.

본 연구에서 나타난 결과는 선행 연구의 결과와 비교하여 볼 때, 각 농림수산부산물 추출액은 축종 유래 병원성 미생물에 대한 항균 활성이 기대치에 미치지 못한 것으로 나타났다. 이는 선행 연구에 사용된 부산물의 추출법은 본 연구에 사용된 추출액의 추출법 (수증기증류법)에 의한 것으로 강한 항균활성을 가지는 것으로 알려진 마늘 성분인 알리신이 추출제조공정에 의

해 상대적으로 감소되어 위 결과를 얻은 것으로 판단된다 (Noori 등, 2007). 이 추출법으로 얻어진 복합제재의 경우에 있어서도 병원성 미생물에 대한 항균력이 대체적으로 낮게 나타났다. 아울러 생균제와의 혼합에 따른 병원성 미생물에 대한 항균력 조사 결과와 비슷하게 농림수산부산물 추출액 단독은 생균제에 대해 대체적으로 억제 효과를 보이지 않았다. 하지만, 각 추출액의 조합에 따른 복합제재의 경우에 생균제에 대한 살균효과를 보였으며, 특히 효모 (SB796)의 경우 그 효과가 뚜렷하게 나타났다.

(4) 농림수산부산물 추출액의 세포 생존율, 항산화 및 항염증효과 조사 (*in vitro*)

각 농림수산부산물 추출액의 항균력 조사 결과 그 효과가 기대치에 미치지 못하게 낮은 결과를 나타냈으나, 선행연구의 보고 (Song 등, 2001; Emily 등, 2007; Cox 등, 2010; Antonio 등, 2001; Ganesan 등, 2008; Qing 등, 2006; Hiroaki 등, 2009)에 따르면 생리적 효과에 긍정적인 효과들이 보고 된 바 (특히, 마늘의 경우) 이에 농림수산부산물 추출액의 세포 생존율 (독성)과 항산화 및 항염증 효과를 측정함으로써 가축 사료로의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

(가) 연구재료 및 방법

① 샘플 준비

세포 생존율 (세포독성) 및 항산화효과 측정을 위해 잣 구과 추출물 (피톤치드, phytoncide), 미역줄기 (seaweed midrib)와 미역귀 (seaweed sporopyll) 및 폐마늘 (wasted garlic)과 마늘뿌리 (garlic root)의 추출원액 각각을 멸균된 0.45 μm bottle top filter (Corning)로 여과한 후, 여액을 즉시 실험에서 사용하였다. 세포 생존율 실험 시에는 이 여과 여액을 DMEM으로 희석하여 사용하였고, 항산화효과 측정 시에는 PBS로 희석하여 사용하였다. 상기 조작은 가급적 무균 상태에서 신속하게 실시하였다.

② 세포배양

본 실험에 사용한 동물세포는 소 유선상피세포유래의 MAC-T 세포를 세포 생존율 (MTT) 실험에 이용하였다. 세포는 DMEM, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), hydrocortisone (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 배양액을 사용하였다.

③ Cell viability by MTT assay

96-well plate에 MAC-T 세포를 $5 \times 10^5/\text{well}$ 로 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 시료를 포함한 세포배양액 100 μl 를 처리 후 24시간 배양 후 각 well 당 10 μl MTT 용액을 처리하였다. CO₂ 배양기에서 3시간 배양 후 isopropanol을 200 μl 처리하여 생성된 결정을 용해시켰다. 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

④ Anti-oxidant by ABTS assay

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 7.2 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 실온, 암소에서 24시간 동안 반응시켜 ABTS cation(+)을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.7-0.8이 되도록 PBS로 희석시켜 사용하였다. 96-well plate에 희석된 ABTS+ 용액 190 μ l에 시료 10 μ l을 첨가하여 실온, 암소에서 10분 동안 반응시킨 후 흡광도 값을 734 nm에서 측정하였다. 대조구로서 L-ascorbic acid를 사용하였으며 blank 값으로 증류수를 사용하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 $1-(OD\ blank - OD\ sample)/OD\ blank$ 의 수식으로 radical 소거 능력을 수치화하였다.

⑤ Anti-inflammation by Western blot analysis

96-well plate에 MAC-T 세포를 5×10^5 /well로 접종한 후 시료 또는 LPS (0, 1 and 25 μ g)를 포함한 세포배양액 100 μ l를 처리 후 24시간 배양하였다. 이들 각 시료를 RIPA-buffer 136 containing 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium 137 deoxycholate, 0.1% SDS, and a protease inhibitor mixture (2 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL 138 leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin A, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM sodium 139 fluoride and 1 mM sodium orthovanadate)로 cell lyse 시킨 후, Bradford reagent를 통해 단백질 농도를 분석하였다. Protein samples (30 μ g per treatment)을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리 후, 니트로셀로로스 멤브레인에 이동시켰다. 5% non-fat milk buffer로 블록 시킨 후 1차 항체 (1:4,000)를 첨가하여 배양하였다. 배양된 멤브레인을 세척 후, 2차 항체 (1:4,000)를 첨가하여 이를 ECL detection reagents를 통해 가시화 시켰다.

⑥ 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 means \pm SD으로 표현 하였고, JMP 5.0 software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 student's t 검정 및 Tukey HSD test를 이용하여 두 그룹 및 다중그룹간의 5% 수준에서 유의성 검정을 각각 실시하였다.

(나) 실험 결과

① MTT assay

가축 사료화에 따른 각 농림수산부산물 추출액의 안전성평가를 위하여 MTT 시험을 수행하였다. 각 농림수산부산물 추출물에서 폐마늘, 마늘뿌리, 미역줄기 및 미역귀 추출물은 원액과 희석액을 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320로 세포배양액에 준비하여 소 유선상피세포 (MAC-T)에 첨가하고 24시간 배양하였다. 피톤치드의 경우에는 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200으로 희석하여 MTT 시험에 사용하였다.

표 41. MTT 분석법에 의한 농림수산물추출액의 독성평가

MTT cell viability (% of control)						
	Dilution ratio					
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Wasted garlic	72.2±16.3*	82.0±3.0*	84.8±8.9*	86.4±5.1*	95.5±4.0*	109.2±7.9
Garlic root	3.4±0.6*	1.0±1.5*	59.5±6.5*	94.4±3.8	97.7±8.7	96.3±2.8
Seaweed midrib	90.2±4.4*	93.4±8.0*	88.4±3.3*	92.8±11.5*	97.4±4.1	96.6±11.5*
Seaweed sporopyll	46.3±3.3*	75.7±10.1*	84.4±4.5*	95.9±4.7	101.2±7.7	116.1±7.5*
Phytoncide	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
	0*	88.6±4.4*	77.7±6.7*	84.4±1.8*	84.9±5.3*	101.0±5.1

Each values are expressed as mean±SD(n=3). *vs. control(vehicle alone; P<0.05, by turkey test)

먼저 단일 농림수산물추출액의 세포생존력을 평가하였다. 세포배양액만으로 키운 대조구 (vehicle)와 비교하였을 때 그 결과는 표 41과 같다. 폐마늘 추출액은 1:320 희석액부터, 마늘뿌리 추출액은 1:80 희석액부터, 미역줄기 추출물은 1:160 희석액부터, 미역귀 추출물은 1:80 희석액부터 생존율이 대조구와 비슷하여 독성이 없는 것으로 확인되었다. 피톤치드의 경우 1:3200 희석비율 이상일 때 세포 생존율에서 대조구와 통계적 유의성이 없었다. 결과적으로 가축 사료화의 안전성을 위해서는 사료 kg 내 첨가 적정수준은 폐마늘 추출액 (1:320 이상), 마늘뿌리 추출액 (1:80 이상), 미역줄기 추출액 (1:160 이상), 미역귀 추출액 (1:80 이상), 피톤치드 (1:3200 이상)로 확인되었다.

다음으로, 각 농림수산물추출액의 조합을 통한 복합제제의 혼합적정성 및 세포생존력/독성을 MTT 방법을 이용하여 평가하였다. 다섯 가지의 농림수산물 복합제제를 원액, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1,280, 1:2,560으로 세포배양액에 희석하여 세포 (MAC-T)에 첨가하고 24시간 배양하였다. 세포생존력을 세포배양액만으로 키운 대조구와 비교하였을 때, 복합1 (피톤치드:미역줄기:폐마늘뿌리)의 경우 세 가지 부산물의 혼합비에 따라서 세포생존력에 다소 차이가 있었으나 1:1,280 또는 1:2,560의 희석농도에서 대조구와 같은 생존력을 보여 독성이 없는 것으로 판단된다. 복합2 (피톤치드:폐마늘알갱이:미역줄기)의 경우 대조구와 같은 생존력은 1:2:1과 1:1:2 혼합비의 1:2,560 희석액에서 관찰되었다. 복합3 (피톤치드:폐마늘알갱이)의 경우 1:1, 2:1의 혼합비에서 1:1,280 이상의 희석액에서 대조구 또는 그 이상의 생존력을 보이며, 1:2의 경우에는 1:640부터 대조구 수준의 생존력을 보였다. 복합4 (피톤치드:미역줄기)의 경우 1:1의 혼합비에서 1:640 희석액부터 대조구 수준의 생존력을 나타내었다. 복합5 (폐마늘알갱이:미역줄기)의 경우, 2:1과 1:2의 혼합비에서 1:160 희석액부터 대조구 수준의 세포 생존력을 보였다. 따라서 복합제제의 구성과 비율에 따라 약간의 차이가 있지만 대체로 1:2,560 이상의 희석비율에서 복합제제를 적용 할 경우의 사양시험은 대상동물에게 독성을 유발하지 않음을 확인하였다.

② ABTS 라디컬 소거능 (항산화능) 평가

각 농림수산물부산물 추출액의 가축사료화에 대한 안정성을 평가하기 위해 수행된 세포생존력 실험 결과를 기반으로 이들 각 농림수산물부산물 추출액 및 이들 복합제제의 항산화능력 (ABTS)을 평가하였다. 항산화능력을 나타내는 항목 중 라디컬 소거능을 평가한 결과는 다음과 같다.

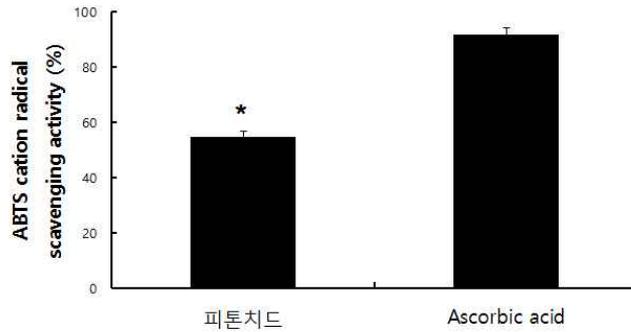


그림 63. 피톤치드의 라디컬 소거능 평가

Each values are expressed as means±SD(n=3). *ascorbic acid(P<0.05, by student's t-test)

실험결과 피톤치드 추출물은 54.9%의 라디컬 소거능을 보였으며 대조구로 사용한 ascorbic acid (1 mg/ml)는 91.7%의 라디컬 소거능을 나타내었다 (그림 63).

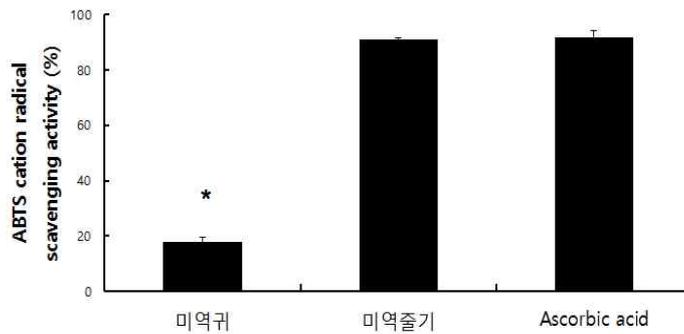


그림 64. 미역귀 및 미역줄기의 라디컬 소거능 평가

Each values are expressed as means±SD(n=3). *vs. ascorbic acid(P<0.05, by turkey test)

미역부산물인 미역귀의 라디컬 소거능은 18%이며, 미역줄기는 91.1%의 라디컬 소거능을 나타내었다 (그림 64).

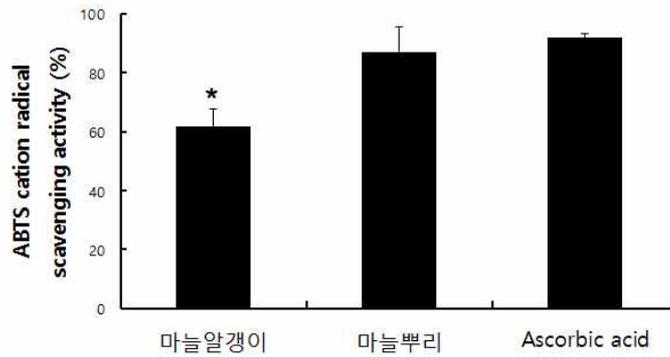


그림 65. 폐마늘 및 마늘뿌리의 라디칼 소거능 평가

Each values are expressed as means±SD(n=3). *vs. ascorbic acid(P<0.05, by turkey test)

마늘부산물인 폐마늘 추출액의 라디칼 소거능은 61.9%이며 마늘뿌리 추출액은 87.1%의 라디칼 소거능을 나타내었다 (그림 65).

결과적으로 미역줄기 원액의 경우 91.1%의 라디칼 소거능을 나타내었다. 이는 ascorbic acid 1 mg/ml (91.7%)과 비슷한 수준으로 농림수산부산물 중 가장 우수하였다 (그림 64). 마늘뿌리 원액의 경우 87.1%의 라디칼 소거능을 보였다 (그림 65). 다음으로 폐마늘 추출액 (61.9%), 피톤치드 (54.9%), 미역귀 추출액 (18%)의 순서로 라디칼 소거능이 우수하였다 (그림 63-65).

다음으로, 라디칼 소거능을 활용한 복합제제의 혼합적정성을 평가하였다 (표 42). 각종 농림수산부산물 중 피톤치드, 미역줄기, 마늘뿌리 및 폐마늘 추출액을 다양한 비율로 혼합한 후 원액 및 희석액의 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 복합제제는 원액, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 희석액으로 만들어 라디칼 소거능을 측정하였으며, 대조군으로 ascorbic acid 1.0 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml을 사용하였다.

표 42. 농림수산부산물 추출 복합제의 라디컬 소거능 평가

	ratio	ABTS radical scavenging activity(%)							
		Undiluted	dilution ratio				Ascorbic acid (mg/ml)		
			1:160	1:320	1:640	1:1280	1.0	0.1	0.01
Combination 1 phytoncide: seaweed midrib: garlic root	1:1:1	89.3±1.2 ^{aC}	12.2±1.5 ^{aB}	11.7±2.3 ^{aA}	10.8±0.8 ^{aA}	10.5±3.7 ^{aA}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	2:1:1	88.5±1.7 ^{bC}	8.1±3.1 ^{aB}	9.1±3.6 ^{aB}	5.0±9.2 ^{aB}	6.7±5.2 ^{aB}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^d	10.3±13.3 ^e
	1:2:1	90.4±1.1 ^{bC}	11.6±2.2 ^{aB}	6.1±7.0 ^{aB}	7.0±10.0 ^{aB}	3.7±7.1 ^{aB}	95.5±0.7 ^b	54.4±5.0 ^c	10.3±13.3 ^d
	1:1:2	55.7±5.1 ^b _B	7.6±10.4 ^{aB}	12.3±5.1 ^{aB}	10.2±13.0 ^a _B	12.6±0.7 ^{aB}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^d	10.3±13.3 ^e
Combination 2 phytoncide: wasted garlic: seaweed midrib	1:1:1	84.2±11.3 ^c _{AB}	5.5±2.8 ^{aBC}	2.5±9.6 ^{aAB}	0.4±1.0 ^{aA}	0	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	2:1:1	87.3±4.2 ^{cB}	7.9±5.9 ^{aC}	9.0±4.6 ^{aB}	0.4±5.0 ^{aA}	0	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	1:2:1	69.1±4.7 ^b _A	0	0	0	0	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	1:1:2	84.5±0.8 ^c _{AB}	0	0	0	0	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
Combination 3 phytoncide: wasted garlic	1:1	66.8±13.8 ^b _{AB}	0	0	0	0	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	2:1	83.2±5.2 ^{dB}	0	0	0	0	95.5±0.7 ^d	54.4±5.0 ^c	10.3±13.3 ^b
	1:2	49.3±7.0 ^b _A	0	0	0	0.05±3.6 ^{aA}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
Combination 4 phytoncide: seaweed midrib	1:1	92.4±1.8 ^d _A	2.6±6.0 ^{abA}	12.5±4.0 ^{ab} _A	14.3±7.9 ^{ab} _A	28.7±21.3 ^b _{cA}	95.5±0.7 ^d	54.4±5.0 ^c	10.3±13.3 ^a
	2:1	91.9±0.8 ^d _A	17.3±1.9 ^{ab} _B	16.7±13.8 ^a _{bA}	13.7±8.3 ^{ab} _A	24.5±8.9 ^{bA}	95.5±0.7 ^d	54.4±5.0 ^c	10.3±13.3 ^a
	1:2	93.1±0.4 ^c _A	16.4±2.0 ^{aB}	23.6±3.1 ^{aA}	21.5±17.2 ^a _A	14.4±7.8 ^{aA}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
Combination 5 wasted garlic: seaweed midrib	1:1	94.8±0.1 ^c _A	3.7±0.5 ^{aA}	10.2±8.3 ^{aA}	6.7±12.0 ^{aA}	5.4±3.4 ^{aA}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	2:1	94.8±0.1 ^c _A	10.0±9.1 ^{aA}	6.7±6.6 ^{aA}	6.8±6.7 ^{aA}	2.9±0.9 ^{aA}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a
	1:2	94.8±0.1 ^c _A	3.9±1.6 ^{aA}	12.3±13.2 ^a _A	5.6±8.5 ^{aA}	1.6±2.3 ^{aA}	95.5±0.7 ^c	54.4±5.0 ^b	10.3±13.3 ^a

Each values are expressed as means±SD(n=3). ^{a,b,c} values different among diluted group in a row are significantly different(P<0.05, by turkey test). ^{A,B,C} values different among mixture rate in a column are significantly different(P<0.05, by turkey test).

라디컬 소거능이 높은 복합제제는 복합1 (피톤치드:미역줄기:마늘뿌리), 복합4 (피톤치드:미역줄기), 복합5 (폐마늘추출액:미역줄기)등 세 종류로서 비슷한 수준의 높은 활성을 보였다 (1:1,280 희석비율에서 ascorbic acid 0.01 mg/ml와 비슷하거나 높은 수준의 항산화 활성을 나타내었다). 각각의 복합제제는 각 성분의 비율을 달리하여 라디컬 소거능을 평가하였다. 아울러, 높은 희석농도에서도 라디컬 소거능이 가장 높은 복합물은 복합4 (피톤치드:미역줄기)이며

각 성분의 혼합비율에 따른 라디컬 소거능은 비슷한 수준으로 나타났다.

최상의 항산화 효과를 위해서는 피톤치드와 미역줄기를 혼합하여 사용하는 것이 바람직하며 이는 추후 원료의 가격 및 추출비용을 고려하여 가장 경제적인 혼합비율을 결정해야 할 것으로 사료된다.

③ Cox-2 발현 (항염증능) 평가

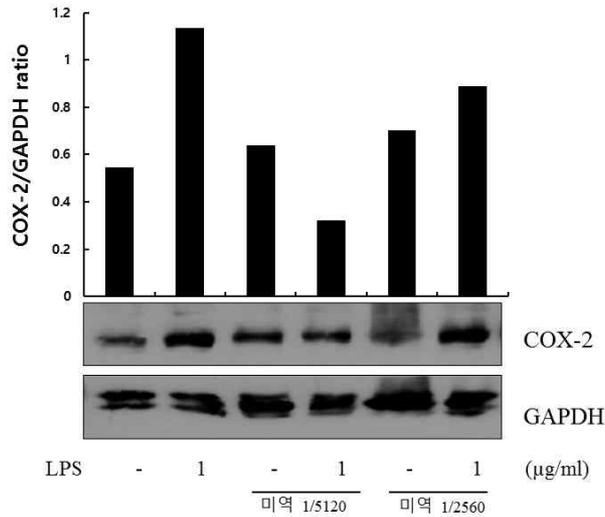


그림 66. 폐미역 추출액의 Cox-2 발현 평가

MAC-T 세포에 폐미역을 1:5,120과 1:2,560 비율로 DMEM medium에 희석하여 6시간 배양 후 LPS (1 μg/ml)로 12시간 처리하여 Cox-2와 단백질 발현 정도를 Western blot을 이용하여 측정한 결과, 폐미역과 LPS로 유도 된 MAC-T의 Cox-2 발현은 동일 조건의 LPS 처리 한 대조구와 비교하여 발현 정도가 낮게 나타났다.

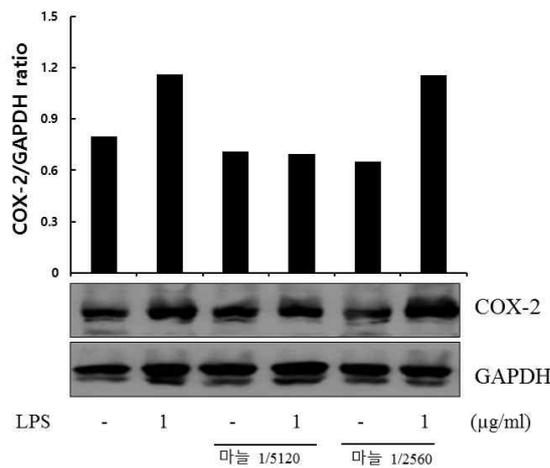


그림 67. 폐미역 추출액의 Cox-2 발현 평가

LPS로 유도 된 MAC-T의 Cox-2 발현은 폐미역 희석액 (1:5,120) 처리에도 불구하고, LPS

비처리 대조구와 동일한 Cox-2 발현을 보였으며, 이런 발현은 보다 고농도의 폐마늘 희석액 (1:2,560)의 처리에도 불구하고 LPS를 처리한 대조구와 비교하여 발현 정도에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

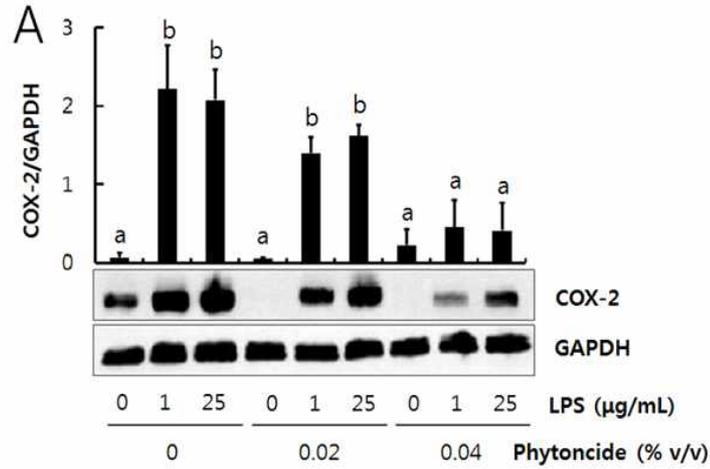


그림 68. 피톤치드의 Cox-2 발현 평가

LPS를 단독으로 처리한 세포에서는 COX-2의 발현량이 크게 증가하였지만 피톤치드 (0.02%, 0.04%)를 전 처리한 세포에서는 그 발현량이 LPS 처리농도 의존적으로 감소하였다.

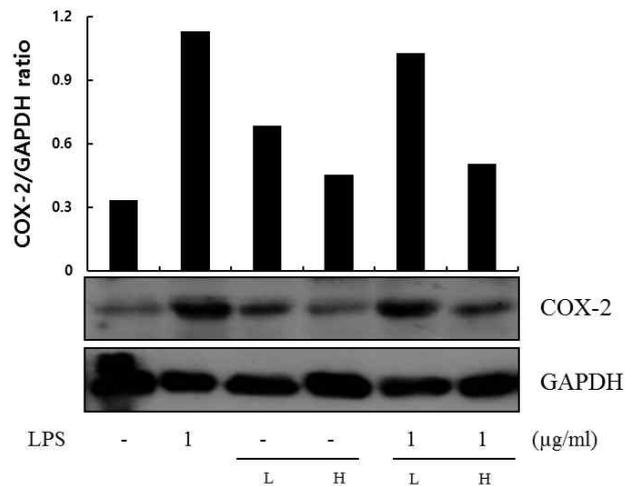


그림 69. 농림수산부산물 추출 복합제 (피톤치드, 폐마늘, 폐미역)의 농도별 Cox-2 발현 평가. L, low dilution rate (1:2,560); H, high dilution rate (1:5,120).

농림수산부산물 각 추출액의 복합제제 (피톤치드, 폐마늘 및 폐미역)의 단독처리는 농도 의존적으로 Cox-2 발현이 감소하는 결과를 보였으나, 대조구와 비교하여 그 발현정도는 높은 것으로 나타났다. LPS를 처리한 MAC-T 세포에서는 Cox-2 발현이 그것의 대조구와 비교하여 복합제제의 처리 농도에 의존적으로 감소되어지는 것으로 나타났다. 하지만, 복합제제 처리구

의 LPS 비처리 세포의 Cox-2 발현 수준과 비교 시 뚜렷한 항염증 효과를 보이지 않는 것으로 나타났다.

결론적으로 MTT 세포생존력 측정으로 확인한 세포독성은 일반적으로 사료에 첨가하는 수준의 농도에서는 실험에 사용한 모든 농림수산부산물 추출물과 이들 복합제제에서 독성이 없는 것으로 나타났다. 한편, ABTS 라디칼 소거능으로 측정된 항산화능력을 보면 단일 추출액의 경우 미역줄기와 마늘뿌리가 높았고 복합제제의 경우에는 피톤치드와 미역줄기 추출액을 혼합한 복합제제가 가장 우수하였다. 항염증 효과에 있어서 LPS 처리 유무에 따른 MAC-T 세포 내 Cox-2의 발현 수준을 Western blot을 통해 분석한 결과 폐미역, 폐마늘 및 복합제제(피톤치드, 폐미역 및 폐마늘)에서는 뚜렷한 Cox-2 발현 억제효과를 볼 수 없었다. 하지만, LPS로 유도된 MAC-T 세포에서 피톤치드는 농도 의존적으로 감소함을 보여 항염증효과에 가장 우수한 것으로 나타났다.

3. 동물 실증 실험을 통한 기능성 농림수산부산물 효과 검증

본 연구는 *in vitro* 연구를 기반으로 농림수산부산물 유래 각 추출액의 가축 사료첨가제로서 이용성을 평가한 결과, 피톤치드는 항산화 및 항염증성, 폐마늘 및 폐미역은 항산화에서 우수한 효과를 나타냈다. 따라서 실증 실험을 통해 농림수산부산물 추출액의 단독 및 복합제제 급여에 따른 반추(젓소) 및 비반추(산란계, 양돈) 동물에 따른 생산성, 생리적 변화 및 이들 생산물에 미치는 효과를 조사하였다.

가. 산란계에 대한 기능성 농림수산부산물의 급여 실험 평가

(1) 재료 및 방법

(가) 시험설계

① 공시 동물 및 시험장소

본 실험에서는 50주령의 Hy-Line Brown 산란계를 이용하여 동일한 면적의 케이지에 모두 4개 처리구에 5반복, 반복당 20수씩 총 600수를 선발하여 2주간 일반 시판사료로 예비 사육하였으며, 처리구별 산란율, 난중과 체중이 유사하도록 재배치 한 후 실험에 이용하였다. 사료와 물은 자유 채식 및 자유음수 시켰으며, 정확한 사료 섭취량을 측정하기 위해 각 반복간의 급이기를 구분하는 칸막이를 설치하였으며, 점등은 16시간으로 일정하게 유지하였으며, 기타 사양관리는 건국대학교 실험동물윤리위원회 규정에 의거하여 진행하였으며, 일반적인 국내 사양관리법에 준하여 실시하였다.

② 기초 사료 및 사료첨가제 준비

실험에 사용된 산란계용 사료는 옥수수, 소맥, 주정박을 기초로 하여 대사에너지 2,740 kcal/kg, 조단백질 16%에 NRC와 KRC에 기타 영양소 수준을 맞추거나 상회하여 배합되었다

(표 43). 각 추출물은 미강 (60%) 및 옥수수분말 (40%)을 일정비율로 혼합 후 분사, 교반, 숙성 및 건조하여 포장한 것을 부형제화 시켰다. 이들 부형제는 조단백 (crude protein) 11.26%, 조지방 (crude fat) 8.74%, 조섬유 (crude fiber) 4.78%, 조회분 (crude ash) 4.50%로 구성되어 있다.

표 43. 기초사료의 조성

Ingredients	%
Yellow corn	53.40
Wheat	5.00
Beef tallow	0.80
DDGS(USA)	10.77
Corn gluten	2.35
Soybean meal	8.95
Canola meal	2.38
Rape seedmeal	4.00
Lysine-sulfate	0.28
Methionine	0.08
Tryptophan	0.10
Limestone	10.82
MDCP(18/21)	0.50
Salt	0.20
Sodium bicarbonate	0.10
Min. mixture1)	0.11
Vit. Mixture2)	0.10
Choline chloride	0.05
Total	100.0
Calculated values	
ME, kcal/kg	2,740
Crude protein, %	16.00
Crude fat, %	4.24
Crude fiber, %	3.52
Crude ash, %	13.89
Ca, %	4.20
Available P, %	0.68
Lys	0.79
Met + Cvs, %	0.66
Threonine	0.60

ME : metabolic energy

③ 시험구 배치

시험구는 무침가 대조구와 피톤치드 농도별 3가지, 미역분말, 폐마늘 추출액 총 6가지 처리구이며, 피톤치드와 폐마늘은 원액을 부형제에 분무하여 제조하였다. 미역의 경우 미역 제조과정 중 폐기되는 미역부산물을 분말화하여 기초사료에 첨가하였다. 폐미역 추출물은 미역 수확시기가 제한된 관계로 추출방법확립이 늦어져 본 실험에는 이용되지 못하였으나, 가공과정 중 폐기되는 미역 또한 좋은 사료자원으로 판단되어 이를 이용하여 실험을 실시하였다.

- C : 대조구 + 부형제 0.2%
- T1 : 대조구 + 1% 피톤치드 첨가제 0.2% (0.002%/kg feed)
- T2 : 대조구 + 2% 피톤치드 첨가제 0.2% (0.004%/kg feed)
- T3 : 대조구 + 4% 피톤치드 첨가제 0.2% (0.008%/kg feed)
- T4 : 대조구 + 1% 폐마늘 추출액 0.2% (0.002%/kg feed)
- T5 : 대조구 + 100% 폐미역 분말 2% (2%/kg feed)

(나) 조사 항목

① 생산성

사료섭취량은 매주 마다 급여한 총 양에서 잔량을 제외하여 측정하였고 실험기간동안 매일 오후 2시에 계란을 수집 하여 산란개수와 난중, 파란율 및 산란율을 조사하였다.

② 혈중 대사산물 분석

28일간 급여 한 산란계 성계의 wing vein으로부터 혈액을 직접 채혈하였다. 채혈된 혈액은 혈청 tube (BD Vacutainer CAT)를 사용하여 채혈 직후 4 °C에 보관, 원심분리기 (3,000 rpm, 20분, 4 °C)를 이용하여 혈청분리를 실시 후, -70 °C deep-freezer에 보관하였다. MPT (metabolic profile test) 검사 시, 혈청을 가지고 blood analyzer (Toshiba acute biochemical analyzer)를 이용하여 각 항목의 수치를 분석하였다.

③ 장내 균총 변화

시험사료 급여 후 4주차에 각 처리구별 10수씩 선발하여 도축을 실시하였다. 맹장 내용물을 분리하여 무게 측정 후, 50 ml tube에 담아 분석까지 -80 °C에 보관하였다. 균수 측정은 PBS 로 10^{-1} ~ 10^{-7} 까지 희석하였다. 균수를 측정하기 위해 총 세균수에는 total plate agar (Difco, BD science, USA)를 *E. coli*에는 MacConkey agar (Difco, BD science, USA)를, lactic acid bacteria에는 MRS agar (Difco, BD science, USA)를 사용하여 도말하였으며 37 °C incubator 에서 24시간 배양 후 colony수를 측정하였다.

(다) 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 means±SEM으로 표현 하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 피톤치드의 첨가량 검증은 Tukey HSD 검정을 이용하였으며, 폐마늘 추출물과 미역분말의 효과는 student's t 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(2) 시험 결과

(가) 산란계 생산성 분석

사료 내 피톤치드 (T1-T3), 폐마늘 추출액 (T4) 및 미역분말 (T5) 첨가 급여가 사료 섭취량 (feed intake), 사료 효율 (feed efficiency), 난 생산성 (egg production) 및 조직 (spleen, liver) 의 상대적 중량에 미치는 영향에 대해 분석한 결과 (data not shown), 사료 섭취량은 시험기간 동안 126 g~130 g으로 각 실험구간에 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 산란율은 T3 (4% 증가)과 T4 (3%증가)에서 유의적으로 높게 나타났다 ($P<0.05$). 난중은 T4 (2.7%증가)에서 유의적으로 높게 나타났으며 ($P<0.05$), 사료효율은 전체 시험구 간에 유의성 차이는 관찰 되지 않았다. 또한, 비장과 간의 상대적 중량도 대조구와 처리구간에 유의적 차이는 보이지 않았다.

(나) 혈중 대사산물 분석 (MPT)

28일간 산란계에 사료 내 피톤치드 (T1-T3), 폐마늘 추출액 (T4) 및 미역분말 (T5) 처리 한 후 급여한 결과 (data not shown), 피톤치드 (T1-T3) 처리구는 대조구와 비교하여 T3 처리구의 NEFA 수치 (66% 감소)는 피톤치드의 농도에 의존적으로 감소하는 결과를 보였다 ($P<0.05$). T4 처리구도 NEFA (68% 감소)에서 대조구 대비 감소함을 보였고 ($P<0.05$). T5 처리구도 대조구 대비 NEFA가 61% 감소하여 ($P<0.05$), 부산물 추출물 급여 시, 공통적으로 NEFA가 획기적으로 감소하였다. 다른 혈중 대사산물은 특별한 차이를 보이지 않았다.

숙주 간 기능의 실질장애의 지표인 γ -GTP는 알코올이나 약물로 인하여 간장애가 생기면 혈중에 증가하게 되는 효소이다. 피톤치드 (T1-T3), T4 및 T5 첨가 사료를 급여한 산란계의 혈중 내 γ -GTP의 수준은 대조구와 비교하여 유의적 차이를 보이지 않았다. 다시 말해, 산란계에 있어 농림수산부산물 추출액의 가축 사료화에 있어 안정성을 보여주는 결과이다.

(다) 장내 균총 변화

28일간 피톤치드 (T1-T3), 폐마늘 추출액 (T4) 및 미역분말 (T5)을 급여한 산란계의 맹장 내용물 내 일반세균수, 대장균 및 유산균의 균총 변화를 조사하였다 (그림 70). 일반세균수는 T3와 T4에서 대조구 (C) 대비 유의적으로 차이를 보였으며 ($P<0.05$), 대장균수는 T1, T2, T3 처리구에서 C 대비 유의적으로 수가 감소하였다 ($P<0.05$). 유산균수는 T3에서 대조구 대비 유의적으로 높아지는 경향을 보였다 ($P<0.05$). 이 결과 피톤치드의 경우는 일반세균수와 대장균수가 감소, 유산균수가 증가하는 경향이 나타났으며, 폐마늘 추출액 처리구의 장관에서는 일반세균수가 감소하는 결과를 보였지만 대장균수와 유산균의 개선에는 아무런 영향을 주지 않았다. 미역분말 처리구에서는 총균, 대장균 및 유산균의 변화에 아무런 영향이 나타나지 않았다.

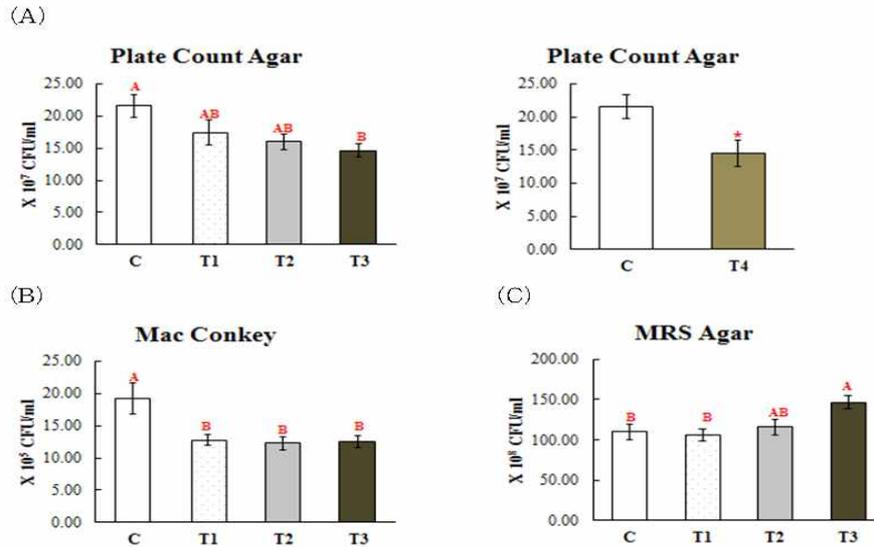


그림 70. 농도별 피톤치드 (T1-T3) 또는 폐마늘 추출액 (T4) 처리에 따른 산란계 맹장 내 총균 (A), 대장균 (B) 및 유산균 (C)의 균총 변화 평가

Values are expressed as means \pm SEM (n = 10). ^{AB}vs. control (p<0.05 by Tukey HSD),

*vs. control (p<0.05 by Student's t-test). C: control, T1: phytoncide(0.002%/feed), T2: phytoncide(0.004%/feed), T3: phytoncide(0.008%/feed). T4: wasted garlic extract(0.002%/feed).

결과적으로, 비반추동물인 산란계에 농립수산부산물 (피톤치드, 폐마늘) 추출액을 사양실험에 적용하였을 때, 피톤치드 첨가는 난 생산성 (egg production) 증가, 혈중 NEFA 감소, 장관 내 대장균 (*E. coli*) 감소 및 유산균 (*Lactobacillus*) 증가의 결과를 나타냈다. 폐마늘 추출액 처리는 난 생산성 (egg production) 증가, 난중 (egg weight) 증가, NEFA 감소 및 총 균수의 감소 결과를 보였으나, 미역분말 처리는 NEFA의 감소 효과만 보였다. 또한 산란계의 혈중 γ -GTP의 수치는 대조구와 비교하여 피톤치드, 폐마늘 추출액 및 미역분말 처리 급여 후에도 유의적인 차이를 보이지 않았다.

나. 홀스타인 성우에 대한 농립수산부산물의 급여 시험

(1) 잣구과 (피톤치드), 폐미역 및 폐마늘 추출액 단독 급여 효과

(가) 재료 및 방법

① 시험설계

㉠ 공시 동물 및 시험장소

총 74두의 착유중인 홀스타인 성우 중 총 20두를 대상으로 1, 2차 시기에 피톤치드와 폐마늘 추출액 급여 효과를 실시하였으며, 또한 총 40두를 대상으로 3차에 폐미역 추출액 급여 효과를 실시하였다. 각 급여시험기간 동안 물은 자유 채식시켰으며, 유량은 매일 기록하였다. 사양시험은 건국대학교 부속실습목장 (충북 충주)에서 진행되었다.

㉔ 기초 사료 및 사료첨가제 준비

실험에 사용된 사료는 TMR, 연맥건초, 농후사료로 NRC (2001) 사양표준에 맞추거나 상회하도록 급여하였고, 사양관리는 건국대학교 실험동물윤리위원회 규정에 의거하여 진행하였으며, 사료의 화학 성분은 표 44와 같다. 각 피톤치드와 페마늘 추출액은 참여기업인 푸른들EM사료의 시설을 이용하여 미강 (60%) 및 옥수수분말 (40%)을 일정비율로 혼합 후 분사, 교반, 숙성 및 건조하여 포장한 것을 부형제화 시켰다. 이들 부형제는 조단백 (crude protein) 11.26%, 조지방 (crude fat) 8.74%, 조섬유 (crude fiber) 4.78%, 조회분 (crude ash) 4.50%로 구성되어 있다. 각 10% 농도의 첨가제 (피톤치드 및 페마늘 추출액)를 0.16% 기초사료에 혼합하여 최종농도 0.016%가 되도록 급여하였으며 대조구에는 같은 양의 부형제를 첨가 급여하였다. 페미역 추출액은 부형제화를 거치지 않고 TMR 사료 제조 시 첨가하여 기초 사료 kg 당 최종농도 0.016%가 되도록 급여하였다.

표 44. 기초사료의 조성

Item	Diets		
	Concentration	Roughage	TMR
DM ¹⁾ , %	88.72	92.36	62.46
Crude protein, %	19.6	5.62	9.61
Ether extract, %	4.75	1.44	3.71
Crude fiber, %	8.54	39.34	15.68
Crude ash, %	8.46	5.11	4.86
NDF ²⁾ , %	25.66	72.96	29.52
ADF ³⁾ , %	11.1	43.6	18.08
Ca, %	1.27	0.17	0.52
P, %	0.64	0.14	0.27
ME, kcal/kg	3948	4743	2876

¹⁾DM: Dry matter, ²⁾NDF: Neutral detergent fiber, ³⁾ADF: Acid detergent fiber

㉕ 시험구 배치

총 74두의 착유중인 홀스타인 성우 중 총 20두 (1, 2차 급여시험)를 유량 [평균 유량; 34.9 kg/d (1차), 30.3 kg/d (2차)], 유성분 [평균 체세포 수; 151.9 (1차), 120.5 (2차)], 산차 [평균 산차; 2.7 (1,2차)] 등을 고려하여 처리구별 10두씩 두 그룹으로 나누어 1, 2차 급여시험을 실시하였으며, 3차 급여시험은 총 40두를 유량 (평균 유량; 35.4 kg/d), 유성분 (평균 체세포 수, 133.6), 비유기 (평균 비유단계; 120), 산차 (평균 산차; 2.4)를 고려하여 처리구별 20두씩 두 그룹으로 나누어 실시하였다. 1차 급여시험은 대조구와 피톤치드 (0.016%/kg feed) 처리구로 나누어 30일간 급여, 2차 급여시험은 대조구와 페마늘 추출액 (0.016%/kg feed) 처리구로 나누어 24일간 급여시험을 실시하였다. 3차 급여시험은 대조구와 페미역 추출액 (0.016%/kg feed)으로 나누어 30일간 급여시험을 수행하였다.

② 조사 항목

㉠ 유량 분석

매회 산유량 측정은 1일 2회 (오전 4시 및 오후 4시)로 오전과 오후 산유량을 합산한 후 총량을 산출 하였으며, 1차 급여시험 (피톤치드)은 10일 간격으로, 2차 급여시험 (폐마늘 추출액)은 12일 간격으로, 3차 급여시험 (폐미역 추출액)은 10일 간격으로 합산한 후 평균 산유량을 산출하였다.

㉡ 혈액채취 및 분석

모든 급여시험은 시험 종료일에 아침 사료를 급여하고 3시간이 지난 후, 성우의 경정맥을 통해 혈액을 채취한 후 전혈은 HM2 (VetScan HM2 Hematology System)를 이용하여 CBC (complete blood cell) 검사를 수행하였다. 또한 3차 급여시험은 혈중 항산화 수준을 조사하기 위해 혈청 튜브를 원심분리 (15분, 3,000 rpm) 후 혈청을 분리하여 ELISA 분석방법을 통해 항산화 (TAC, GSH, albumin, TBARS)관련 지표를 분석하였다. 아울러 혈중 면역세포 분포를 조사하기 위해 전혈 튜브에 hypertonic solution을 첨가하여 적혈구를 제거시킨 후, 40%와 70% Percoll solution를 이용하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구를 trypan blue로 cell counting 후, 세포용액 샘플 (10^5 cells/80 μ l) 당 anti-bovine CD4, CD8, 및 CD25 antibodies를 10 μ l 첨가하여 flow cytometry를 통해 혈중 cytotoxic T 세포의 분포를 조사하였다.

㉢ 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 means \pm SEM으로 표현 하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 student's t 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(나) 시험 결과

① 유량 분석

각 급여 기간 동안 기초사료 kg 당 0.016% 피톤치드, 폐마늘 및 폐미역 처리에 따른 산유량 변화를 표 45-47에 나타냈다.

표 45. 사료 내 피톤치드 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 유량변화

Period	C ¹⁾	T(phytoncide)
day	Milk yield, kg	Milk yield, kg
0	34.6±0.75	35.1±1.87
10	34.0±1.00	35.9±1.60
20	34.4±0.85	35.3±1.37
30	34.0±1.11	33.3±1.52
0-10(AVG)	34.5±0.88	35.4±1.57
11-20(AVG)	34.1±0.86	34.4±1.29
21-30(AVG)	33.3±1.11	34.3±1.49
1-30(AVG)	33.9±0.90	34.7±1.42

Values are expressed as means±SEM(n=10).

¹⁾C: control, T: phytoncide(0.016%/kg feed)

조사 결과, 30일간의 실험기간동안 처리구간 일별 산유량의 변화 및 기간별 평균산유량은 유의적 차이는 나타나지 않았다.

표 46. 사료 내 폐마늘 추출액 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 유량변화

Period	C ¹⁾	T(garlic)
day	Milk yield, kg	Milk yield, kg
0	30.7±2.25	29.9±2.05
12	30.2±2.34	30.7±1.81
24	30.0±2.19	29.4±2.01
0-12(AVG)	30.5±2.02	30.0±1.81
13-24(AVG)	30.6±2.27	30.6±1.97
1-24(AVG)	30.5±2.10	30.3±1.86

Values are expressed as means±SEM(n=10).

¹⁾C: control, T: wasted garlic extract(0.016%/kg feed).

24일간의 실험기간동안 처리구간 산유량의 유의적 차이는 나타나지 않았으며 착유일수가 경과할수록 산유량이 감소하는 경향을 보였다. 실험 종료 시, C는 2.3%, T 처리구는 약 1.7%의 산유량이 감소율을 보였다. 이는 비유기간이 경과함에 따라 산유량 감소가 발생하게 되는데, T 처리구에서 C에 비해 감소비율이 낮은 결과를 보였다. 따라서 폐마늘 추출액 첨가 급여는 비유 지속시간에 따른 산유량 감소비율을 효과적으로 억제 할 것으로 판단된다.

표 47. 사료 내 폐미역 추출액 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 유량변화

Period	C ¹⁾	T(seaweed)
day	Milk yield, kg	Milk yield, kg
0	35.3±1.57	35.5±1.57
10	36.4±1.51	36.7±1.38
20	30.1±1.33	39.7±1.41
30	31.3±1.32	31.7±1.18
0-10(AVG)	36.3±0.51	36.4±0.45
11-20(AVG)	34.4±0.49	34.5±0.49
21-30(AVG)	31.6±0.45	32.3±0.43
1-30(AVG)	34.2±0.29	34.7±0.27

Values are expressed as means±SEM(n=20).

¹⁾C: control, T: wasted seaweed extract(0.016%/kg feed).

조사 결과, 30일간의 실험기간동안 폐미역 추출액 급여에서 처리구간 일별 산유량의 변화 및 기간별 평균산유량은 유의적 차이는 나타나지 않았다.

② 혈액성상 분석

30일간 젖소의 사료 내 피톤치드 첨가 급여한 혈중 CBC 분석 결과, T 처리구는 C와 비교하여 백혈구 (WBC), 적혈구 (RBC), 헤모글로빈 (hemoglobin), 헤마토크릿 (hematocrit), 평균적혈구용적 (MCV), 평균적혈구색소량 (MCH) 및 평균적혈구혈색소농도 (MCHC)에 아무런 영향을 주지 않았다.

24일간 폐마늘 추출액을 급여한 젖소와 30일간 폐미역 추출액 첨가 급여한 젖소에서도 혈중 CBC 분석 결과 대조구와 차이를 보이지 않아 이들 추출물의 급여는 특이적인 질병학적 변화를 유도하지 않는 것으로 사료된다.

③ 혈중 항산화 수준 평가

한편 폐미역 처리구의 백혈구 수치의 감소와 관련 요인들을 조사하고자 혈중 산화스트레스 및 면역세포 분포 관련 지표들을 분석하였다. 각 이들의 분석 결과는 그림 71과 표 48에 나타났다.

30일간 기초사료 kg 당 0.016%의 폐미역 급여한 젖소의 혈액을 시험개시일 (0일)과 시험종료일 (30일) 채혈 후 혈중 산화스트레스 지표들을 조사 한 결과, GSH, albumin, TBARS 항목에서는 그룹 및 처리구간 유의적 차이를 보이지 않았다. 한편 혈중 TAC 분석 결과 그룹 간 시험개시일 대비 유의적 차이를 보이지 않았으나, 시험 종료일의 처리구간 비교에 있어 대조구 대비 혈중 TAC가 낮은 수준으로 나타남으로서 결과적으로 폐미역 급여는 기존 선행 연구결과 (Zule 등, 2001)에 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이는 수증기증류법에 의한 폐미역 추출액과 기존 선행 연구에 서술된 추출법과의 차이에서 오는 것으로 판단된다.

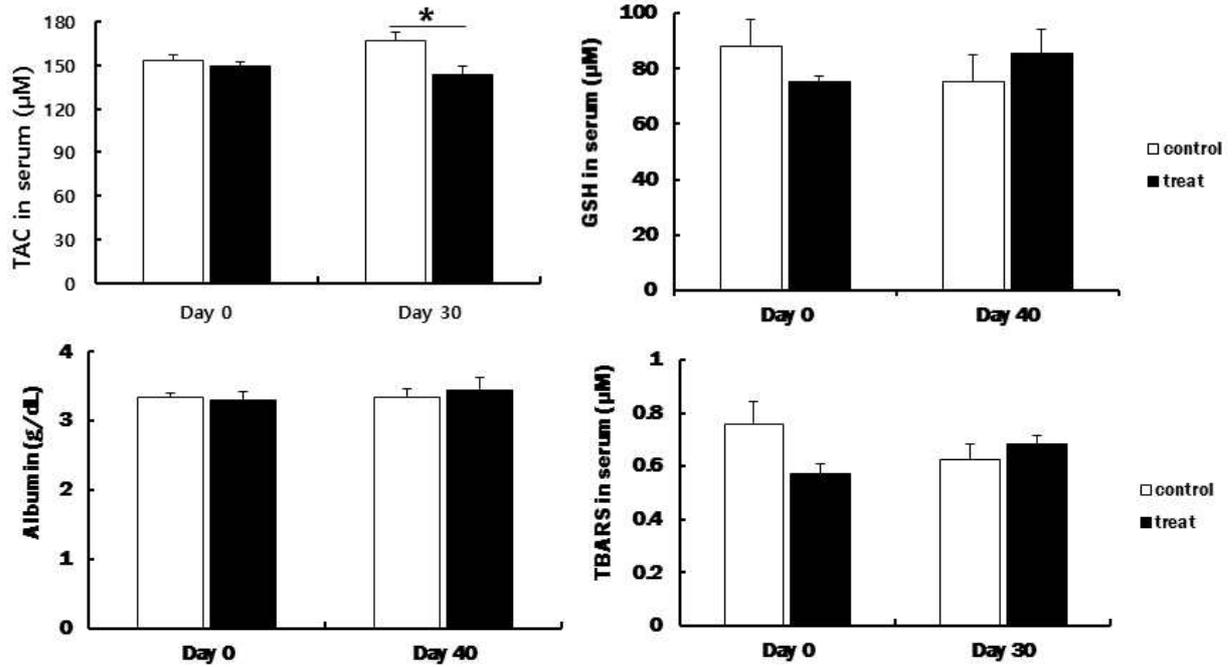


그림 71. 사료 내 폐미역 추출액 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 혈중 항산화 수준 평가

Values are expressed as means±SEM(n=20).

¹C: control, T: wasted seaweed extract(0.016%/kg feed)

*p < 0.05, by student's t-test, control vs seaweed extract(0.016%/kg feed) at 30 d

Abbreviations: TAC, total antioxidant capacity; GSH, glutathione; TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances.

④ 혈중 면역세포의 분포

표 48. 사료 내 폐미역 추출액 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 혈중 면역세포 분포율 변화

Items	C ¹⁾	T(seaweed)
CD4 subpopulation		
CD4+CD25-	39.3±0.69	38.8±0.67
CD4+CD25+	17.5±1.09	24.0±1.93* ²⁾
CD4-CD25+	8.5±0.14	8.7±0.14
CD8 subpopulation		
CD8+CD25-	42.3±0.69	44.8±0.41*
CD8+CD25+	16.4±1.25	15.6±1.69
CD8-CD25+	7.4±0.07	6.8±0.10

Values are expressed as means±SEM(n=20).

¹C: control, T: wasted seaweed extract(0.016%/kg feed)

²⁾p < 0.05 by student's t-test, control vs seaweed extract(0.016%/kg feed) at 30 d

시험 종료일 혈액 내 면역세포의 분포를 조사 한 결과, CD4+CD25+ 조절 T 세포 및 CD8+CD25- 세포독성 T 세포의 분포가 대조구 대비 폐미역 처리구에서 높은 수준을 보였다 ($P<0.05$). 이는 백혈구 수치 감소에 따른 조절 T 세포의 분화가 이루어진 것으로 보인다. 또한 암세포 또는 바이러스 감염 세포를 죽일 수 있는 체액성 세포의 종류의 하나인 세포독성 T 세포의 분포가 폐미역 처리구에서 유의적으로 증가하였다 ($P<0.05$). 이를 통해 비록 백혈구의 수치가 감소되었음에도 불구하고 폐미역 처리는 숙주의 외부 침입에 대한 방어능이 증가한 것으로 판단된다. 결과적으로 젖소의 사료 내 피톤치드 및 폐미역 단독 처리는 산유량 변화에 아무런 영향을 주지 않았으나, 폐마늘 추출액의 단독 처리는 산유량 감소를 다소 억제시키는 경향을 보여주었다. 또한 젖소의 혈중 CBC분석 결과 피톤치드와 폐마늘추출액은 모든 분석항목에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. 하지만, 폐미역은 백혈구 수의 감소 및 항산화능 저감에도 불구하고 대조구 대비 면역반응 증진을 보였다.

이상과 같이 비반추 (산란계)와 반추 (홀스타인 성우) 동물의 사양 실증 시험 결과를 종합적으로 살펴보았을 때, 농림수산물추출액 단독 급여는 비반추 동물의 경우 생산성 증진 효과를 가져왔으나, 반추동물 적용 시 농림수산물추출액 (피톤치드, 폐마늘, 폐미역분말 및 추출액)의 가축 사료화에 대한 안전성을 보여 주었으나 생산성 증진에는 뚜렷한 효과를 보이지 않은 것으로 확인되었다. 따라서 젖소에 이들 농림수산물추출액 (피톤치드, 폐마늘, 폐미역분말 및 추출액)의 복합효과를 검증하고자 다음 실험을 실시하였다.

(2) 농림수산물추출 복합제 (피톤치드, 폐마늘, 및 폐미역)의 급여효과 검증

(가) 재료 및 방법

① 시험설계

㉠ 공시 동물 및 시험장소

총 74두의 착유중인 홀스타인 성우 중 총 40두를 대상으로 농림수산물추출 복합제 (피톤치드, 폐마늘, 폐미역)의 급여 효과를 실시하였다. 각 급여시험기간 동안 물은 자유 채식시켰으며, 유량은 매일 기록하였다. 사양시험은 건국대학교 부속실습목장 (충북 충주)에서 진행되었다.

㉡ 사료첨가제 준비

실험에 사용된 기초사료는 TMR, 연맥건초, 농후사료로 NRC (2001) 사양표준에 맞추거나 상회하도록 급여하였으며 사양관리는 건국대학교 실험동물윤리위원회 규정에 의거하여 진행하였다. 본 과제의 참여기업인 (주)피러스의 시설을 통해 폐마늘알갱이, 잣나무 부산물 및 폐미역줄기를 수증기증류법으로 얻어졌으며, 이들 각각의 추출액을 *in vitro* 실험에서 가장 효과가 좋았던 1:1:1의 볼륨비로 혼합한 복합제제를 TMR 제조 시 혼합하여 급여하였다. 복합제제 함유 사료첨가제의 최종농도는 기초사료 kg 당 0.016%가 되도록 제조하였다.

㉢ 시험구 배치

총 72두의 착유 중인 홀스타인 성우 중 총 40두를 유량 (평균유량; 37.4 kg/d), 비유기 (평균

비유단계; 115), 산차 (평균 산차; 2.4), 유성분 (평균 체세포 수, 151) 등을 고려하여 처리구별 20두씩 대조구와 복합제제 (0.016%/kg feed) 처리구로 나누어 40일간 급여시험을 실시하였다.

② 조사 항목

㉠ 유량 분석

매회 산유량 측정은 1일 2회 (오전 4시 및 오후 4시)로 오전과 오후 산유량을 합산하여 10일간 평균 산유량 및 총량을 산출 하였다.

㉡ 혈액채취 및 분석

혈액샘플은 아침 사료를 급여하고 3시간이 지난 후, 성우의 경정맥을 통해 혈청과 전혈 튜브에 채취하였다. 항산화효과를 조사하기 위해 혈청 튜브를 원심분리 (15분, 3,000 rpm)를 후 혈청을 분리하여 ELISA 분석방법을 통해 항산화 (TAC, GSH, albumin, TBARS) 관련 지표를 분석하였다. 아울러 혈중 면역세포 분포를 조사하기 위해 전혈 튜브에 hypertonic solution을 첨가하여 적혈구를 제거시킨 후, 40%와 70% Percoll solution를 이용하여 백혈구를 분리하였다. 분리 된 백혈구를 tryphan blue로 cell counting 후, 세포용액 샘플 (10^5 cells/90 μ l) 당 anti-bovine CD4, CD8 antibody를 10 μ l 첨가하여 flow cytometry를 통해 혈중 cytotoxic T 세포의 분포를 조사하였다.

㉢ 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 means \pm SEM으로 표현 하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 student's t 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(나) 시험 결과

① 유량 분석

기초사료 kg 당 0.016% 복합제제 함유 사료첨가제를 40일간 급여에 따른 산유량 변화 결과를 표 49에 제시하였다. 10일 간격의 평균산유량 변화에 있어 대조구는 일정한 산유량을 보이는 반면, 복합제제 처리구에서는 시험개시일 (0일)에 대비하여 30일에 증가하는 추세를 보였으며, 40일에는 시험개시일과 동일한 산유량을 보였다. 아울러 10일간의 기간별 평균산유량의 변화에 있어 복합제제 처리구는 11-20일 및 21-30일 기간에 대조구 대비 유의적으로 증가 ($P<0.05$)하는 결과를 보였으며, 이런 유량 증가는 40일간의 시험 기간 동안 총 산유량에서도 유의적 증가 결과를 나타냈다.

표 49. 사료 내 농림수산물 부산물 추출 복합제 (피톤치드, 페미역 및 페마늘 추출액) 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 유량변화

Period	C ¹⁾	T
days	Milk yield(kg/head)	Milk yield(kg/head)
0	37.9±1.85	37.0±1.81
10	37.4±1.77	38.6±1.56
20	37.0±1.72	39.6±1.67
30	37.7±1.74	40.0±1.68
40	37.1±1.67	37.4±1.63
1-10(AVG)	38.3±0.55	38.6±0.53
11-20(AVG)	36.8±0.63	39.5±0.52*
21-30(AVG)	37.4±0.54	39.3±0.52*
31-40(AVG)	37.2±0.53	38.6±0.48
1-40(AVG)	37.4±0.28	39.4±0.25*

Values are expressed as means±SEM(n=20).

¹⁾C: control, T: mixture of phytoncide, garlic, and seaweed extracts(1:1:1, v/v; 0.016%/kg feed).

*p <0.05 by student's t-test, control vs mixture at 40 d

② 혈액성상 분석

40일간 젖소의 사료 내 복합제제 (피톤치드, 페마늘, 페미역 추출액) 첨가는 대조구와 비교하여 백혈구 (WBC) 수치 감소 (15.8 vs 11.6)를 제외한 적혈구 (RBC), 헤모글로빈 (hemoglobin), 헤마토크릿 (hematocrit), 평균적혈구용적 (MCV), 평균적혈구색소량 (MCH) 및 평균적혈구혈색소농도 (MCHC)에 아무런 영향을 주지 않았다.

③ 혈중 항산화 수준 평가

그림 72에서 보는 바와 같이 대조구는 시험개시일 (0일)과 시험 종료일 (40일)의 혈중 TBARS 농도를 비교 시, 산화스트레스 시 발생하는 TBARS 수치가 증가된 반면 (P<0.05), 복합제제 처리구에서는 시험개시일 대비 유의적 차이를 보이지 않았다. 이는 복합제제 처리는 반추동물에 있어 산화스트레스에 대한 조절기능을 가지고 있는 것으로 사료된다.

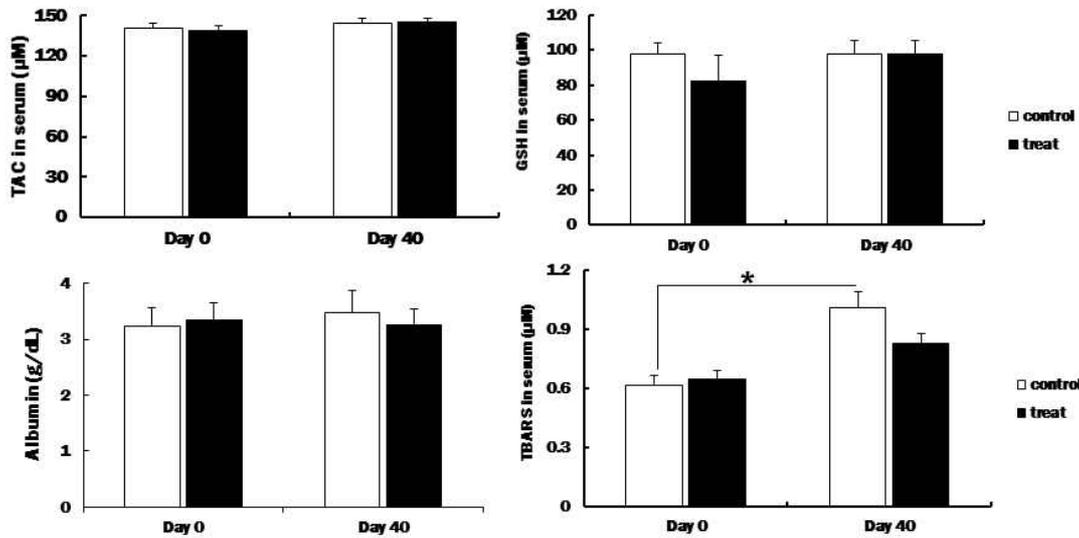


그림 72. 사료 내 농림수산물 부산물 추출 복합제 (피톤치드, 폐미역 및 폐마늘 추출액) 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 혈중 항산화 수준 평가

Values are expressed as means±SEM(n=20).

¹C: control, T: mixture of phytoncide, garlic, and seaweed extracts(1:1:1, v/v; 0.016%/kg feed)

*p < 0.05 by student's t-test, zero vs 40 d in a control group.

Abbreviations: TAC, total antioxidant capacity; GSH, glutathione; TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances.

④ 혈중 면역세포의 분포

표 50. 사료 내 농림수산물 부산물 추출 복합제 (피톤치드, 폐미역 및 폐마늘 추출액) 첨가에 따른 홀스타인 젖소의 혈중 면역세포 분포율 변화

Items	C ¹⁾	T
CD4 subpopulation		
CD4+CD25-	31.5±0.88	24.5±1.41* ²⁾
CD4+CD25+	13.4±1.07	14.7±0.74
CD4-CD25+	1.6±0.24	2.9±0.39
CD8 subpopulation		
CD8+CD25-	19.9±0.48	24.5±1.43*
CD8+CD25+	6.8±0.80	7.7±0.77
CD8-CD25+	1.2±0.41	2.5±0.67

Values are expressed as means±SEM(n=20).

¹C: control, T: mixture of phytoncide, garlic, and seaweed extracts(1:1:1, v/v; 0.016%/kg feed)

²P < 0.05 by student's t-test, control vs mixture at 40 d.

시험 종료일 혈액 내 면역세포의 분포를 조사 한 결과, 대조구 대비 T 처리구에서 혈중 CD4+CD25- helper T 세포 분포율 감소 (P<0.05) 및 CD8+CD25- 세포독성 T 세포 분포율 증가 (P<0.05)가 나타났다. Helper T 세포의 감소에 대한 명확한 이유를 밝혀지지 않았지만, 이는 백혈구 수치 감소에 따른 helper T 세포의 분화가 유도되지 않은 것으로 사료된다. 하지만,

암세포 또는 바이러스 감염 세포를 죽일 수 있는 체액성 세포의 종류의 하나인 세포독성 T 세포의 분포가 복합제재 처리구에서 유의적 증가로 외부침입에 대한 방어능력이 촉진된 것으로 나타났다. 결론적으로 반추동물 (홀스타인 성우)에 대한 복합제재 처리는 산화스트레스 조절과 외부 병원균에 대한 방어능을 가진 면역세포 분포 증가로 인한 면역증진 효과를 나타냈으며, 이런 생리적, 면역적 조절/촉진능력은 홀스타인 성우의 생산성 유지/증진에 직결되는 것으로 판단된다.

이상의 젖소를 이용한 피톤치드, 폐마늘 및 폐미역의 볼륨비 (1:1:1) 조합에 의한 복합제의 처리는 젖소의 생산성 증진 효과, 혈중 백혈구 수와 산화스트레스 (TBARS)의 조절, 및 면역 반응 촉진 효과를 보여 단독처리 보다는 젖소용 첨가제로 산업화 가능성이 높다는 것이 입증되었다.

다. 비육돈에 대한 기능성 농립수산물부산물물의 급여 실험 평가

(1) 재료 및 방법

(가) 시험설계

① 공시 동물 및 시험장소

주관기관인 서울대학교와 공동으로 출하 2개월 전의 비육돈을 대상으로 농립수산물부산물 추출 복합제 (폐마늘, 폐미역) 처리 급여 효과를 조사하였다. 각 급여시험기간 동안 물과 사료를 자유 배식시켰다. 사양시험은 (주)이지바이오 연구농장 (충북 영동군 추풍령면)에서 실시하였다. 사양관리는 서울대학교 실험동물윤리위원회 규정에 의거하여 진행하였으며 급여수준은 한국양돈사양표준에 의거하여 결정하였다.

② 사료첨가제 준비

실험에 사용된 기초사료의 조성은 옥수수 80.90%, 대두박 0.09%, 비타민E (100,000 IU/kg) 0.09%, Lys 0.656%, Met 0.243%, 및 DE (kcal/kg) 3,361로 NRC (2001) 사양표준에 맞추거나 상회하도록 급여하였다. 수증기증류법으로 얻어진 폐마늘과 폐미역줄기 추출액 (피러스 제공)을 *in vitro* 실험에서 결과가 우수했던 조합인 1:1 볼륨비로 혼합하여 이들 복합제제를 기초사료 kg 당 0.008%의 최종농도가 되도록 제조하였다.

③ 시험구 배치

총 25두의 비육돈 (5개월령)을 대상으로 시험개시일 전 체중 (평균 체중; 84.5kg)을 고려하여 대조구 (13두)와 복합제 처리구 (12두)로 나누어 33일간 급여실험을 실시하였다.

(나) 조사 항목

① 성장성적 조사

비육돈의 성장성적은 시험개시일 (0일)과 시험 종료일 (33일) 두 번에 걸쳐 각 개체별 무게를 측정하여 증체량, 및 전체 평균 일당 증체를 산출하였다.

② 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 means±SEM으로 표현 하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 student's t 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(2) 시험 결과

(가) 성장성적 분석

표 51. 사료 내 농립수산부산물 추출 복합제 (폐마늘 및 폐미역 추출액) 첨가에 따른 비육돈의 성장성적 분석

	C ¹⁾	T
Body weight, kg/head		
0 d	84.7±8.07	84.3±6.85
33 d	109.2±7.79	111.1±10.01
BW gain, kg/head	24.5±8.20	26.8±6.35
ADG ²⁾ , kg/d	0.741±0.2485	0.813±0.1925
Gain rate ³⁾ , %	-	9.70

Values are expressed as means±SEM(n=12-13).

¹⁾C: control, T: mixture of garlic, and seaweed extracts(1:1, v/v; 0.008%/kg feed)

²⁾ADG, average daily gain

³⁾C Gain rate (%) = {(26.8 - 24.5)/24.5} x 100

사료 kg 당 0.008% 복합제 (폐미역, 폐마늘)를 33일간 비육돈에 급여한 결과 통계적 유의차는 나타나지 않았으나 대조구 대비 증체량 (BW gain)이 증가하는 경향을 보였으며, 또한 전체 평균 일당 증체량 (ADG) 에서도 대조구 대비 증가하는 경향을 나타냈다. 아울러 증체율 (gain rate)을 비교한 결과 대조구 대비 복합제 처리구에서 9.7%의 증가율을 보이는 것으로 나타났다.

4. 농립수산부산물 급여에 따른 축산물의 품질 검증

가. 기능성 농립수산부산물의 급여가 계란의 품질에 미치는 영향

(1) 시험 방법

(가) 난질 및 난각질 분석

실험사료 급여하여 생산된 계란 중 평균 난중과 비슷한 계란을 매주 수집하여 각각의 방법에 따라 난각색도, 난각강도, 난각두께 및 Haugh unit, 난황색 등 난질 및 난각질 관련 항목들을 측정하였다. 난각색도는 난각 색도계를 이용하여 측정하였으며 (QCM+, Technical Services and Supplies Ltd., York, England), 난각강도는 난각강도계 (FHK)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로하고 수직으로 고정시킨 후 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각강도 측정 후, 난백의 높이를 조사하여 난중을 대비한 Haugh unit 수치를 구하였다 (QCM+, Technical Services and Supplies Ltd., York, England). 난각두께는 계란의 중앙부 난각 파편을 채취하여 난각 후도계 (digimatic micrometer)를 이용하여 측정하였다. 난황색은 Roche egg yolk color fan과 대조한 색도로써 수치화 하였다.

(나) 저장 기간별 신선도 측정

실험 6주째 계란을 각각 수거하여 15 °C에 보관하면서 7일째, 14일째, 21일째 처리구별 20구씩 할당하여 난중 (g)과 난백높이 (mm)를 측정하여 저장 기간별 호우 유닛 (Haugh unit)을 산출하였다.

(다) 지방산 분석

실험 6주째 수집한 계란을 급속 냉동하여 노른자를 분리 후, Folch method (Folch 등, 1957)를 이용하여 지방산을 추출하였으며, Gas Chromatography (HP 6890 series GC System)를 이용하여 FAME Mix STANDARD (Sigma-Aldrich/47885-U)에 의한 지방산 함량 분석과 ω -3, ω -6 지방산 비율 및 주요 지방산 함량을 분석하였다.

(라) 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 means \pm SEM으로 표현하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 student's t 검정과 Tukey HSD 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(2) 시험 결과

(가) 산란계의 난질 분석

산란계에 대한 피톤치드 (T1-T3), 페마늘 추출액 (T4) 및 미역분말 (T5) 첨가 급여가 난각강도 (eggshell strength), 난각두께 (eggshell thickness), 난각색 (eggshell color), 난황색 (yolk color) 및 호우 유닛 (Haugh unit)의 변화에 관한 계란 품질을 나타내는 지표에 미치는 영향에

대한 결과를 표 52에 나타내었다. 그 결과 전 처리구에서 난각강도, 난각두께, 난각색에 대해 아무런 유의적 차는 나타나지 않았다. 난황색의 경우 T2, T3, T5 처리구에서 유의적인 차를 보였으며 ($P<0.05$), 피톤치드의 첨가수준이 높아질수록 호우 유닛은 차이가 없으나, 난황색이 진해지는 것을 볼 수 있었다 ($P<0.05$).

표 52. 식물추출물 첨가가 계란품질에 미치는 영향

Items	C ¹⁾	T1	T2	T3	T4	T5
Eggshell color, unit	27.0±0.79	27.7±0.22	27.2±0.25	27.3±0.28	27.4±0.20	26.6±0.46
Yolk color, Roche yolk color fan	9.0±0.05 ^b	9.2±0.04 ^{ab}	9.4±0.07 ^a	9.4±0.06 ^a	9.2±0.08	10.1±0.16*
Eggshell strength, kg/cm ²	2.92±0.05	2.85±0.058	2.75±0.061	2.81±0.100	2.88±0.080	2.98±0.090
Eggshell thickness, 0.01mm	39.8±0.16	40.3±0.10	39.7±0.15	39.8±0.34	39.6±0.22	39.6±0.44
Haugh unit	90.7±0.75	93.3±0.87	92.8±0.63	92.9±0.77	90.3±0.54	90.0±0.82

Values are expressed as means±SEM(n=10).

^{ab}vs. control($p<0.05$ by Tukey test),

¹⁾C: control, T1: phytoncide(0.002%/feed), T2: phytoncide(0.004%/feed), T3: phytoncide(0.008%/feed).

T4: wasted garlic extract(0.002%/feed), T5: seaweed powder(2%/feed).

(나) 저장 기간에 따른 계란의 신선도 분석

계란의 보존성이나 신선도 등의 계란 내부의 난질을 나타내는 Haugh unit은 산란 후 외부에 노출되는 시간이 경과함에 따라 감소한다. 피톤치드 (T1-T3), 폐마늘 추출액 (T4) 및 미역분말 (T5) 첨가 급여가 저장기간별 Haugh unit에 어떤 영향을 미치는지에 대해 표 53에 나타내었다. 21일 보관 후 T1, T3, T4에서 유의적 차이를 나타냈으며, 보관 시 Haugh unit이 개선되었다.

표 53. 식물추출물 첨가구의 저장 기간에 따른 계란의 신선도 분석

Items	C ¹⁾	T1	T2	T3	T4	T5
Haugh unit	90.9±1.58	92.2±1.36	92.8±1.20	92.4±1.43	89.1±1.66	90.9±1.13
Changes in haugh unit with storage time.						
7 days	79.9±2.05	80.2±1.13	79.8±1.24	76.6±1.78	76.3±1.24	76.6±2.41
14 days	76.1±1.91	72.2±1.21	73.0±1.67	75.4±1.63	73.9±2.23	72.7±2.10
21 days	62.6±1.56 ^C	72.1±1.37 ^A	66.1±1.90 ^{BC}	69.1±1.20 ^{AB}	67.1±1.73*	63.0±1.99

Values are expressed as means±SEM(n=10)

^{ab}vs. control($p<0.05$ by Tukey test).

¹⁾C: control, T1: phytoncide(0.002%/feed), T2: phytoncide(0.004%/feed), T3: phytoncide(0.008%/feed).

T4: wasted garlic extract(0.002%/feed), T5: seaweed powder(2%/feed).

(다) 난황 내 지방산 함량 분석

표 54. 식물추출물 첨가에 따른 난황 내 지방산 함량 분석

Fatty acids (% of total fatty acid)	C ¹⁾	T1	T2	T3	T4	T5
C14:0(Myristic)	0.46±0.029 ^a	0.37±0.014 ^b	0.34±0.014 ^b	0.42±0.017 ^{ab}	0.42±0.010	0.36±0.0198 [*]
C14:1(Myristoleic)	0.10±0.010 ^a	0.07±0.005 ^{bc}	0.06±0.004 ^c	0.09±0.005 ^{ab}	0.10±0.008	0.07±0.006 [*]
C15:0(Pentadecanoic)	0.07±0.006	0.07±0.002	0.06±0.002	0.07±0.007	0.08±0.006	0.06±0.002
C16:0(Palmitic)	26.76±0.426	26.66±0.252	25.82±0.176	26.32±0.123	26.96±0.282	27.14±0.543
C16:1(Palmitoleic)	2.62±0.083 ^b	2.51±0.093 ^b	2.58±0.160 ^b	3.21±0.052 ^a	3.05±0.229	2.69±0.182 [*]
C17:0(Heptadecanoic)	0.16±0.006	0.16±0.012	0.16±0.009	0.16±0.009	0.16±0.015	0.14±0.017
C17:1(cis-10-Heptadec)	0.12±0.007	0.12±0.007	0.11±0.005	0.13±0.008	0.13±0.003	0.11±0.008
C18:0(Stearic)	9.68±0.262	10.53±0.265	10.50±0.280	10.32±0.375	9.43±0.285	10.56±0.384
C18:1n9t(Elaidic)	0.19±0.004 ^a	0.15±0.008 ^b	0.16±0.007 ^{ab}	0.17±0.006 ^a	0.18±0.008	0.15±0.007 [*]
TVA(Trans vaccenic acid)	0.07±0.007 ^a	0.06±0.006 ^{ab}	0.05±0.002 ^b	0.06±0.006 ^{ab}	0.07±0.005	0.06±0.004
C18:1n9c(Oleic)	38.23±0.319 ^b	39.65±0.558 ^a	41.12±0.694 ^{ab}	40.06±0.984 ^{ab}	38.13±0.517	39.04±0.808
C18:2n6c(Linoleic)	16.26±0.252 ^a	14.09±0.479 ^b	13.41±0.717 ^b	13.25±0.266 ^b	15.91±0.615	13.15±0.6248
C18:3n6(γ-Linolenic)	0.14±0.012	0.12±0.004	0.10±0.005	0.10±0.011	0.11±0.002 [*]	0.09±0.008 [*]
C20:1n9	0.10±0.001 ^a	0.09±0.003 ^b	0.10±0.006 ^{ab}	0.10±0.003 ^{ab}	0.10±0.004	0.08±0.004 [*]
C18:3n3(α-Linolenic)	0.32±0.016 ^b	0.31±0.017 ^b	0.35±0.008 ^{ab}	0.39±0.005 ^{ab}	0.35±0.020	0.29±0.020
cis-9, trans-11-CLA	0.06±0.003	0.06±0.002	0.06±0.001	0.06±0.003	0.07±0.003	0.06±0.004
trans-10, cis-12-CLA	0.04±0.001 ^b	0.05±0.003 ^b	0.05±0.002 ^b	0.06±0.005 ^a	0.06±0.003 [*]	0.06±0.005 [*]
C20:2	0.17±0.007	0.17±0.013	0.15±0.012	0.16±0.004	0.18±0.008	0.16±0.008
C22:0(Behenic)	0.10±0.005	0.09±0.010	0.09±0.004	0.11±0.006	0.09±0.006	0.12±0.012
C20:3n6	0.24±0.009 ^a	0.21±0.013 ^{ab}	0.18±0.004 ^{bc}	0.18±0.001 ^c	0.20±0.007 [*]	0.22±0.018
C20:4n6(Arachidonic)	3.21±0.114	3.49±0.178	3.54±0.174	3.47±0.238	3.24±0.235	3.88±0.219 [*]
EPA	0.05±0.002	0.05±0.003	0.05±0.002	0.05±0.004	0.05±0.004	0.06±0.006
DHA	0.85±0.020 ^b	0.94±0.056 ^{ab}	0.96±0.049 ^{ab}	1.05±0.054 ^a	0.94±0.071	1.42±0.105 [*]
Total %	100	100	100	100	100	100
CLA	0.10±0.003 ^b	0.10±0.005 ^b	0.10±0.002 ^b	0.12±0.007 ^a	0.13±0.004 [*]	0.12±0.009 [*]
ω-3	1.23±0.025 ^b	1.30±0.050 ^{ab}	1.36±0.054 ^{ab}	1.49±0.056 ^a	1.34±0.060	1.78±0.100 [*]
ω-6	19.85±0.199 ^a	17.90±0.475 ^{ab}	17.24±0.671 ^b	17.00±0.458 ^b	19.46±0.721	17.35±0.605 [*]
ω-6/ω-3	16.24±0.319 ^a	13.84±0.441 ^b	12.71±0.390 ^{bc}	11.44±0.228 ^c	14.67±0.685	9.96±0.676 [*]

Values are expressed as means±SEM(n=30).

^{a,b,c}vs. 대조구(p < 0.05 by Tukey HSD)

¹⁾C: control, T1: phytoncide(0.002%/feed), T2: phytoncide(0.004%/feed), T3: phytoncide(0.008%/feed)

T4: wasted garlic extract(0.002%/feed), T5: seaweed powder(2%/feed).

피톤치드 첨가 수준 (T1-T3)과 폐마늘 추출액 및 미역분말 첨가에 따른 계란 난황 내 지방산 함량에 대한 결과는 표 54에 나타내었다. 기능성 지방산인 CLA의 함량이 T3에서 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, ω-3 지방산의 함량 또한 T3에서 대조구에 비해 유의적으로 높게 나왔다 (P<0.05). 이는 ω-3 지방산 중 DHA 함량이 대조구에 비해 증가하였기 때문이다. ω-6 지방산의 경우 T2와 T3에서 대조구에 비해 유의적으로 함량이 낮아 졌으며 (P<0.05), 이는 ω-6 지방산인 C18:2n6c와 C20:3n6의 함량이 낮아졌기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 대

조구에 비해 T1, T2, T3에서 ω -6: ω -3 지방산 비율이 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다 ($P < 0.05$).

또한 기능성 지방산인 CLA의 함량이 T4와 T5에서 모두 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), T5의 경우 ω -3 지방산의 함량이 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), 이는 ω -3 지방산 중 DHA의 함량이 크게 증가하였기 때문이다. ω -6 지방산의 경우, 대조구에 비해 유의적으로 함량이 낮아졌으며 ($P < 0.05$), 이는 ω -6 지방산인 C18:3n6의 함량이 낮아졌기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 대조구에 비해 ω -6: ω -3 지방산 비율이 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다 ($P < 0.05$).

결과적으로, 농립수산부산물 (피톤치드, 페마늘, 미역분말) 추출액 처리는 계란의 난각강도, 난각두께, 난각색 항목에는 그 효과가 없으나, 피톤치드와 미역분말 처리구의 경우 그 첨가수준이 높아질수록 난황색이 진해지는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 소비자의 계란 선호도를 증진시킬 것으로 사료되어 진다. 또한 계란 내부의 난질을 나타내는 지표인 Haugh unit는 21일 보관 후 피톤치드 및 페마늘 추출액 처리구에서 높게 유지되었다. 즉, 이들 피톤치드와 페마늘 추출액 첨가 급여한 산란계의 계란의 보존성이나 신선도가 개선될 것으로 사료되어진다.

계란 난황 내 주요 지방산 함량에 변화에 있어 모든 처리구에서 대조구에 비해 기능성 지방산인 CLA의 함량이 증가되었으며, 피톤치드 처리구와 미역분말 처리구에서 ω -3 지방산의 함량 또한 대조구에 비해 유의적으로 높아졌다. 이는 ω -3 지방산 중 DHA 함량이 대조구에 비해 증가하였기 때문이다. 따라서 산란계에 있어서 피톤치드, 페마늘 추출액, 미역분말은 계란의 난황 내 지방산 중 기능성 지방산인 CLA의 함량을 증진시키며, 특히 피톤치드와 미역분말은 ω -3 지방산인 DHA의 함량을 증진시키고 난황 내 ω -6: ω -3 지방산의 비율을 개선시키는 등 계란의 품질향상에 효과적인 제제임을 입증하였다.

나. 기능성 농립수산부산물의 급여가 우유의 품질에 미치는 영향

(1) 잣구과 (피톤치드), 페미역 및 페마늘 추출액 단독 급여 효과

(가) 시험 방법

① 유성분 분석

1차 (피톤치드; 0.016%/kg feed)는 0일, 10일, 20일, 30일에서, 2차 (페마늘 추출액; 0.016%/kg feed)는 0일, 12일, 24일에, 3차 급여시험 (페미역 추출액; 0.016%/kg feed)은 0일, 10일, 20일, 30일에 오전, 오후 수집한 우유를 pooling하여 보존제와 함께 50 ml tube에 샘플링하여 4 °C에서 보관한 후, MilkoScan (MilkoScanTM Ft1; Foss Inc., Eden Prairie, MN)으로 유성분 [유지방(milk fat), 유단백 (milk protein), 무지고형분 (solid-not-fat, SNF), 체세포 수 (somatic cells), 요소태질소 함량 (milk urea nitrogen, MUN)] 및 베타-하이드록시-뷰틸레이트 (beta-hydroxybutyrate, BHB)을 분석하였다.

② 지방산 분석

지방산 분석은 이전과 동일하게 수행하였다.

(나) 시험 결과

① 유성분 분석

30일간의 피톤치드 (T)를 급여 한 젖소의 유성분을 분석 한 결과, 대조구와 비교하여 유지방 (milk fat), 유단백 (milk protein), 무지고형분 (solid-not-fat), 체세포 수 (somatic cells), 요소태질소 함량 (milk urea nitrogen) 및 베타-하이드록시-뷰틸레이트 (beta-hydroxybutyrate)에서 차이가 없었다. 유당 (lactose)과 유증 아세톤 (acetone)의 수치는 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하는 결과를 보였으나 ($P < 0.05$), 이들 수치는 정상범위 내에 속한 범위임으로 피톤치드의 급여는 젖소의 생리적 변화에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단된다 (data not shown).

24일간의 폐마늘 추출액 (T) 첨가 급여한 젖소의 유성분을 분석한 결과도 대조구와 비교하여 유지방 (milk fat), 유당 (lactose), 요소태질소 함량 (milk urea nitrogen) 및 아세톤 (acetone) 수치등 차이가 없었고 시험개시일 (0일)의 조단백질 (crude protein)과 무지고형분 (solid-not-fat) 수치는 유의적 차이가 없으나, 이들 수치 결과가 시험 종료일 (24일)에 대조구 대비 유의적 차이를 보이지만 ($P < 0.05$), 수치변화량은 상대적으로 매우 낮은 감소 경향을 보였다. 한편, 유증 폐마늘 추출액 처리구의 체세포 (somatic cells) 수는 시험 개시일에는 유의적 차이를 보이지 않았으나, 점차적으로 그 수치가 증가하는 변화를 보였다 ($P < 0.05$). 하지만, 이들 체세포 수는 유증 ml 당 20만 이하에 속한 범위임으로 폐마늘추출액은 젖소의 유증성분에 변화를 주지 않는 것으로 나타났다.

30일간의 폐미역추출액 (T) 첨가 급여한 젖소의 유성분을 분석한 결과도 조사한 전 항목에서 뚜렷한 유의적 차이를 보이지 않았다.

② 지방산 분석

피톤치드 (T) 첨가 급여에 따른 유증 지방산 함량에 대한 분석결과 기능성 지방산인 CLA의 함량이 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), 대조구에 비해 ω -3: ω -6 지방산 비율이 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다 ($P < 0.05$). 이는 ω -3 지방산 중 EPA의 함량이 증가하였기 때문이다. ω -6 지방산의 경우 대조구에 비해 함량이 낮아 졌으나, 유의적인 차이는 없었다. 본 실험에 사용한 피톤치드의 유효성분인 테르펜류는 예비 시험결과 유의성 차이를 보이지 않아 분석에서 제외하였으며, 마늘의 주요 성분인 알리신은 현재 분석 중에 있다.

결과적으로, 젖소를 통한 농림수산물 (피톤치드, 폐미역 및 폐마늘추출액) 추출액 단독 첨가 급여는 대조구와 비교하여 유지방 (milk fat), 유단백 (milk protein), 무지고형분 (solid-not-fat), 체세포 수 (somatic cells), 요소태질소 함량 (milk urea nitrogen)등 유성분에는 크게 영향을 미치지 않았으며, 유의차를 보이는 수치들 역시 정상범위 내에 속하므로 피톤치드 및 마늘 부산물의 급여는 젖소의 생리적 변화에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

하지만 피톤치드 첨가 급여는 유중 기능성 지방산인 CLA의 함량과 ω -3 지방산 중 EPA의 함량을 증진시키며, 이로 하여금 유중 ω -6: ω -3 지방산의 비율을 개선시켜 기능성 우유생산이 가능한 첨가제로의 개발 가능성을 입증하였다.

(2) 농림수산부산물 추출 복합제 (피톤치드, 폐마늘, 폐미역)의 급여 효과

(가) 시험 방법

① 유성분 분석

복합제제 (피톤치드, 폐마늘 및 폐미역 추출액; 1:1:1, v/v; 0.016%/kg feed) 처리 급여에 따른 0일, 10일, 20일, 30일, 40일에 오전, 오후 수집한 우유를 pooling하여 보존제와 함께 50 ml tube에 샘플링하여 4 °C에 보관한 후, MilkoScan으로 유성분 [유지방 (milk fat), 유단백 (milk protein), 무지고형분 (SNF, solid-not-fat), 체세포 수 (somatic cells), 요소태질소 함량 (MUN, milk urea nitrogen)] 및 베타-하이드록시-뷰틸레이트 (BHB, beta-hydroxybutylate)을 분석하였다.

② 지방산 분석

실험 종료 시 오전, 오후 수집한 우유를 pooling하여 보존제와 함께 50 ml tube에 샘플링하여 4 °C에 보관한 후, Folch method (Folch 등, 1957)를 이용하여 지방산을 추출하였으며, Gas Chromatography (HP 6890 series GC System)를 이용하여 FAME Mix STANDARD (Sigma-Aldrich/47885-U)에 의한 지방산 함량 분석과 ω -3, ω -6 지방산 비율 및 주요 지방산 함량을 분석하였다.

③ 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 mean \pm SEM으로 표현 하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 student's t 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(나) 시험 결과

① 유성분 분석

40일간의 기초사료 kg 당 0.016% 복합제제 첨가 급여 젖소의 유성분을 분석 한 결과, 대조구 대비 유지방 (milk fat), 유당 (lactose), 요소태질소 함량 (milk urea nitrogen) 및 아세톤 (acetone) 수치 등 모든 분석항목에 있어서 유의적 차이를 보이지 않았다.

② 지방산 분석

40일간 복합제제 (T) 첨가 급여에 따른 유중 지방산 함량에 대한 정성분석 결과 대조구 대비 유중 기능성 지방산인 CLA의 함량에 변화를 보이지 않았으나, ALA 및 오메가-3의 수준이 증가하는 것으로 나타났다 ($P<0.05$). 이 복합제제 함유 사료첨가제 급여에도 불구하고 대조구와 비교하여 ω -6: ω -3 지방산 비율이 유의적 차이를 보이지 않았다.

결론적으로 젖소를 통한 농림수산부산물 (피톤치드, 폐미역 및 폐마늘 추출액) 추출액의 복합 급여는 대조구 대비 유중 유지방 (milk fat), 유단백 (milk protein), 무지고형분 (solid-not-fat), 체세포 수 (somatic cells), 요소태질소 함량 (milk urea nitrogen) 등 유성분에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 아울러 복합제제 처리 급여는 대조구 대비 유중 기능성 지방산 CLA 함량 증진효과를 보이지 않았으나, ALA 및 ω -3 지방산 함량 수준을 유의적으로 증진시키는 것으로 나타났다.

다. 기능성 농림수산부산물의 급여가 돈육의 품질에 미치는 영향

(1) 시험 방법

(가) 지방산 분석

시험 종료일 (33일)에 농림수산부산물 추출 복합제 (폐마늘, 폐미역) 급여한 도체로부터 후지 (pork leg)와 삼겹살 (pork belly)을 샘플링하여 4 °C보관한 후 Folch method (Folch 등, 1957)를 이용하여 지방산을 추출하였으며, Gas Chromatography (HP 6890 series GC System)를 이용하여 FAME Mix STANDARD (Sigma-Aldrich/47885-U)에 의한 ω -3, ω -6 지방산 함량 분석과 비율을 조사하였다.

(나) 통계분석

분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 $\text{mean}\pm\text{SEM}$ 으로 표현 하였고, 실험 결과에 대한 통계처리는 JMP 5.0 프로그램을 이용하여 raw data를 토대로 student's t 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의성을 두고 통계처리를 실시하였다.

(2) 시험 결과

(가) 지방산 분석

33일간 사료 kg 당 0.008% 복합제 급여 비육돈의 후지와 삼겹살의 ω -3, ω -6 지방산 함량을 분석 한 결과는 표 55와 같다. 복합제 처리구의 삼겹살 내 지방산 함량 변화에 아무런 영향을 주지 않았다. 아울러, 비육돈 후지의 지방산 함량 변화에 있어 대조구 대비 LA의 함량이 복합제 처리구에서 증가 경향을 보였으며, 이는 ω -6/ ω -3 비율에 있어 유의적 증가를 나타냈다 ($P<0.05$).

표 55. 사료 내 농립수산물부산물 복합제 (폐마늘 및 폐미역 추출액) 첨가에 따른 돈육의 지방산 함량 분석

Fatty acids (%)	C ¹⁾	T	p-value
Pork leg			
C18:26(linoleic acid, LA)	19.69	22.88	0.37
C18:36(gamma-linolenic acid, GLA)	0.19	0.17	0.53
C18:33(alpha-linolenic acid (ALA))	0.47	0.40	0.11
C20:36(Dihomogamma-linolenic acid)	0.64	1.04	0.07
C20:46(arachidonic acid, AA)	5.50	6.84	0.34
C20:53(Eicosapentaenoic acid, EPA)	0.22	0.23	0.90
C22:63(Docosahexaenoic acid, DHA)	0.15	0.13	0.71
ω -3	0.84	0.76	0.47
ω -6	26.01	30.93	0.33
ω -6/ ω -3	31.04	40.77*	0.004
Pork belly			
C18:26(linoleic acid, LA)	10.41	7.37	0.15
C18:36(gamma-linolenic acid, GLA)	0.07	0.04	0.13
C18:33(alpha-linolenic acid (ALA))	0.47	0.28	0.09
C20:36(Dihomogamma-linolenic acid)	0.18	0.18	0.97
C20:46(arachidonic acid, AA)	0.93	0.90	0.90
C20:53(Eicosapentaenoic acid, EPA)	0.04	0.03	0.22
C22:63(Docosahexaenoic acid, DHA)	0.05	0.03	0.07
ω -3	0.56	0.34	0.08
ω -6	11.59	8.49	0.18
ω -6/ ω -3	20.54	25.11	0.16

Values are expressed as means(n=3-5).

*p<0.05 by Student's t-test, control vs. mixture.

¹⁾C: control, T: mixture of garlic, and seaweed(0.008%/feed)

이상으로 본 과제를 통하여 입증된 각 축종별 급여효과 및 축산물의 품질에 미치는 연구 결과를 요약하면 표 56과 같다.

표 56. 축종별 농림수산물추출물 추출 단독 및 복합제의 기능성 효과

	공시동물	기초사료 kg 당 첨가율	기능성 효과
잣 구과 (피톤치드)	산란계	0.002%	○ <i>in vitro</i> - 항산화 - 항염증
		0.004%	○ 장관 내 균총 개선 - 대장균(<i>E. coli</i>) 감소 ○ 계란 - 신선도 유지 능력 증진 - 난황의 ω-6/ω-3 비율 개선
	홀스타인	0.008%	○ 장관 내 균총 개선 - 대장균(<i>E. coli</i>) 감소 ○ 계란 - 난황색 증진 - 난황의 ω-6/ω-3 비율 개선
		0.016%	○ 생산성 - 산란율 증가 ○ 장관 내 균총 개선 - 대장균(<i>E. coli</i>) 감소 - 유산균(<i>Lactobacillus</i>) 증가 ○ 계란 - 난황색 증진 - 신선도 유지 능력 증진 - CLA 증가 - ω-3 증가 - ω-6/ω-3 비율 개선
폐마늘	산란계	0.002%	○ 우유 - CLA 증가 - ω-6/ω-3 비율 개선
	홀스타인	0.016%	○ <i>in vitro</i> - 항산화(페마늘 알갱이) ○ 생산성 - 산란율 증가 - 난중 증가 ○ 장관 내 균총 개선 - 총균 수 감소 ○ 계란 - 신선도 유지 능력 증진 - CLA 증가
폐미역	산란계	2%(분말형)	-
	홀스타인	0.016% (액상형)	○ 면역반응 증진 - 백혈구 수치 유지 - 면역세포 분포율 증가
폐마늘+폐미역	비육돈	0.008%	○ <i>in vitro</i> - 항산화 ○ 생산성 - 증체율 개선 경향(9.7%)
피톤치드+폐마늘 +폐미역	홀스타인	0.016%	○ <i>in vitro</i> - 항산화 ○ 생산성 - 산유량 증가 ○ 면역반응 증진 - 백혈구 수치 유지 - 산화스트레스 억제 - 면역세포 분포율 증가 ○ 우유 - ω-3 증가

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 목표달성도

1. 연도별 목표달성도

가. 1차년도 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	제1세부과제	복합 미생물 생균제의 조성, 생산 방식 최적화 및 제형 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복합 미생물 생균제의 조성 확립 ○ 복합 미생물 생균제의 제형 확립 ○ 복합 미생물 생균제의 대량 생산 방식 확립
		동물 실증 실험을 통한 복합 미생물 생균제의 효과 검정	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복합 미생물 생균제의 가축에게의 효과 검정 ○ 복합 미생물 생균제에 의한 안전 축산물 생산 효과 검정
	제2세부과제	기능성 사료첨가제 후보물질 선정, 특성조사 및 전이율 향상을 위한 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 사료첨가제 후보물질 탐색 ○ 기능성 사료첨가제 후보의 전이율 향상을 위한 연구 ○ 기능성 사료첨가제 후보군들의 시너지 효과 연구 및 최종 첨가 수준 확정
		동물 실증 실험을 통한 기능성 사료첨가제의 효과 검정	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 사료첨가제의 가축에게의 효과 검정 ○ 기능성 사료첨가제에 의한 기능성 축산물 생산 효과 검정
	제1협동과제	기능성 농림수산부산물의 추출 공정, 제형화 기술 구축 및 가축 사료로의 이용성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가축 사료화를 위한 기능성 농림수산부산물의 추출법 확립 ○ 가축 사료화를 위한 기능성 농림수산부산물의 제형화 기술 구축 ○ 가축 사료로의 이용성 평가
		동물 실증 실험을 통한 기능성 농림수산부산물의 효과 검정	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 농림수산부산물의 <i>in vivo</i> 효과 검정 및 최종 첨가 수준 확정 ○ 기능성 농림수산부산물 급여에 의한 기능성 축산물 생산 효과 분석

나. 2차년도 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2014)	제1세부과제	복합미생물 생균제 실용화를 위한 사양 시스템 구축	100	○ 참여기업과 공동으로 실제 사료첨가제를 포함한 시험사료를 제조하고 이를 동물 실증 실험을 통해 효과 유무 검정 (비육돈 시험 2회)
		축종별 복합미생물 생균제 제품 등록 및 친환경 브랜드 축산물 생산	100	○ 복합미생물 생균제의 제품 등록 및 브랜드 축산물 산업화를 위한 프로세스 제시 ○ 양돈용, 축우용, 산란계용 항균력 증진 복합미생물 생균제 ○ 친환경 돈육, 계란
	제2세부과제	개발 제품의 실용화를 위한 사양 시스템 구축	100	○ 참여기업과 공동으로 실제 사료첨가제를 포함한 시험사료를 제조하고 이를 동물 실증 실험을 통해 효과 유무 검정 (비육돈 시험 2회) ○ 동물 실증 실험을 통해 기능성 사료첨가제의 최적 첨가수준 확립 및 시너지 효과 검정
		기능성 사료첨가제를 이용한 기능성 축산물 및 이들 가공품의 산업화	100	○ 개발된 기능성 사료첨가제 제형의 산업적 제조 프로세스 제시 ○ ALA, betaine, 비타민류 강화 사료첨가제 ○ ALA, betaine, 비타민류 강화 돈육, 계란 ○ ALA, betaine, 비타민류 강화 소시지, 햄
	제1협동과제	축종별 복합 사료첨가제의 안전성 조사 및 기능성 축산물 생산 효과 검증	100	○ 복합제제의 안전성 조사 ○ 복합제제 이용 사료첨가제의 <i>in vivo</i> 효과 조사 ○ 축산물 내 유효성분의 전이도 조사 ○ 생산물 내 항영양인자 (콜레스테롤, 면역유발물질)의 조사
		기능성 사료 첨가제를 이용한 기능성 축산물 및 이들 가공품의 산업화	100	○ 기능성 축산물 및 이들 가공품에 대한 브랜드 개발

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발 성과

1. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분		지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
		출원	등록	SCI	비 SCI									
1차년도	목표	1												
	실적	1			1		2		1				29	
2차년도	목표	2	1	2			3	3	6				2	
	실적	3		2			2	6	5		5			1
최종	목표	3	1	2			3	3	6				2	
	실적	4		2	1	8	4	6	6		5		29	1

가. 지식재산권

구 분	지식재산권 명칭	국 명	출원인	출원일	출원번호
특허출원	경구 투여용 가축 생균제의 효율 증진을 위한 타블렛 제조기술	대한민국	서울대학교 산학협력단	2015	10-2015-0146385
특허출원	알파-토코페롤 및 베타-사이클로텍스트린 포집체와 아마유 또는 아마종실을 포함하는 사료첨가제 조성물	대한민국	서울대학교 산학협력단 및 주식회사 삼립식품	2014	10-2014-0117692
특허출원	오메가 지방산의 균형과 베타인이 강화된 기능성 돈육 및 가공육 생산과 그 생산방법	대한민국	서울대학교 산학협력단	2015	10-2015-0187693
특허출원	잣나무 부산물 추출물을 포함하는 산란계용 사료첨가제 조성물	대한민국	건국대학교 산학협력단 및 ㈜피러스	2015	10-2015-0084405

나. 논문

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2015	Influence of flaxseed oil on fecal microbiota, egg quality and fatty acid composition of egg yolks in laying hens	Jun-Yeong Lee	Yun-Jaie Choi, Eun Bae Kim	Sang-Kee Kang, Yun-Jeong Heo, Do-Woon Shin, Tae-Eun Park, Geon Goo Han, Gwi-Deuk Jin, Ho-Bin Lee, Eojin Jung, Hee Sung Kim, Yerim Na	Current Microbiology	Online Publi sh	국외	SCI
2015	Phytoncide extracted from pinecone decreases LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells	Sukyung Kang	Sung Gu Han	Jae-Sung Lee, Hai-Chon Lee, Michael C. Petriello, Bae Yong Kim, Jeong-Tae Do, Dae-Seog Lim, Hong-Gu Lee	Journal of Microbiology and Biotechnology	25(9)	국내	SCI(E)
2014	Effects of dietary fermented <i>Flammulina velutipes</i> mycelium on performance and egg quality in laying hens	Sang-Bum Lee	Hong-Gu Lee	Jintaek Im, Seon-Ku Kim, Youn-Chil Kim, Min-Jeung Kim, Jae-Seung Lee	International Journal of Poultry Science	13(11)	국외	비SCI

다. 학술발표

- (1) Yunjeong Heo et al., 2014. Development of encapsulation system by dual strategy using β -cyclodextrin and surfactant-mixture to enhance stability and bioavailability of functional feed additives. Proceedings of 2014 Annual Congress of Korean Society of Animal Sciences and Technology, Kangwon, Korea, p. 35.
- (2) Junyeong Lee et al., 2014. Manipulating n-3 fatty acids composition of chicken eggs with flaxseed oil. Proceedings of 2014 Annual Congress of Korean Society of Animal Sciences and Technology, Kangwon, Korea, p. 228.
- (3) Min-Jung Kim et al., 2014. Effects of dietary phytoncide on productive performance and intestinal microflora in laying hens. Proceedings of 2014 Annual Congress of Korean

Society of Animal Sciences and Technology, Kangwon, Korea, p. 244.

- (4) Jae-Sung Lee et al., 2014. Effect of dietary natural resource by-product on growth traits, immune responses and productivity of Hy-line brown chickens. 16th Congress of Asian Australasian Animal Production, Yogyakarta, Indonesia.
- (5) 강수경 외, 2015. Phytoncide decreases LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells, 한국식품과학회 국제학술대회, 부산 벅스코
- (6) 한성구 외, 2015. Effects of phytoncide in LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells, 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대학교, 서울
- (7) 김민정 외, 2015. Effect of dietary phytoncide extracted from discarded Korean pine (pinus koraiensis) nut cone as feed additive in dairy cow, 한국동물자원과학회 학술발표회, 건국대학교, 서울
- (8) Junyeong Lee et al., 2015. Effects of flaxseed oil on eggs and fecal microbiota in laying hens. Proceedings of 2015 Annual Congress of Korean Society of Animal Sciences and Technology, Seoul, Korea, p. 33.

라. 기술거래

- (1) 노하우: 오메가 지방산 균형 계란생산 기술.
- (2) 알파-토코페롤 및 베타-사이클로텍스트린 포집체와 아마유 또는 아마종실을 포함하는 사료첨가제 조성물 (2014. 대한민국 10-2014-0117692).
- * (1), (2)의 기술을 함께 (주)삼립식품과 연계하여 (주)에스엔마니커에 기술이전 완료. (2014. 11. 1. 선급기술료 1,000만원, 경상기술료 매출액의 1%).
- (3) 노하우: 잣나무 부산물 추출액을 이용한 피톤치드 오일 함유 산란계용 사료첨가제 (2015. 6. 24. (주)피러스에 기술이전 완료, 선급기술료 1,000만원, 경상기술료 매출액의 1%)
- (4) 노하우: 잣소용 저스트레스 기능성지방산 우유 생산을 위한 피톤치드 첨가제 (2015. 12. 4. (주)선농바이오에 기술이전 완료, 선급 기술료 500만원, 경상기술료 매출액의 2%)

마. 교육지도

- (1) 2014. 3. 14. 해양바이오연구원 특강. “페미역을 이용한 잣소 및 가금용 기능성 사료 개발“.
- (2) 2014. 7. 18. 축산물 바로 알리기 연구회 제1차 심포지움. “축산 식품에 대한 올바른 이해와 고찰“.

- (3) 2015. 1. 15. 축산물 바로 알리기 연구회 제2차 정기총회 및 심포지움. “축산식품과 국민건강 : 오해와 진실“.
- (4) 2015. 6. 26. 중국 천진농학원 특강. “건강 기능성 축산식품 생산을 위한 신소재와 신기술“.
- (5) 2015. 11. 5. 한국동물자원과학회 제1회 축산과 건강 심포지움. “한국 축산의 현실과 과제“.
- (6) 2015. 11. 5. (주)웰빙프리덕츠 특강. “건강 기능성 축산식품 생산을 위한 신소재와 신기술“.

바. 사업화

- (1) 오메가 밸런스 달걀. (주)삼립식품 상품화 완료 (2014. 11.)
 - ω -3: ω -6 지방산 비율 1:4



그림 73. 오메가 밸런스 달걀 시판제품

- (2) 피톤치드 함유 사료첨가제 (무력무력). (주)피러스 제품화 완료 (2015 .10.)
 - 잣나무 피톤치드 오일 함유 사료첨가제



그림 74. 피톤치드 함유 사료첨가제 ‘무력무력’ 제품

- (3), (4) 가축 경구 투여용 생균제 타블렛 및 사료첨가 복합 미생물 생균제 시제품 제조
- 타블렛: 지름 4mm, 위내 환경 (pH 2.0)에서 미생물 보호, 장내 환경 (pH 7.2)에서 미생물 방출
 - 사료첨가용 생균제: 병원성 미생물 방어 특히 유산균, 효모, 바실러스 복합 미생물 생균제



그림 75. (A) 타블렛형 생균제, (B) 사료첨가 파우더형 생균제

- (5), (6) 베타인 강화 오메가 밸런스 햄 및 소시지 시제품
- 오메가-3/-6 지방산 비율 1:4, 베타인 함량 일반제품 대비 약 3배



그림 76. (A) 캔타입 햄, (B) 가공 소시지

사. 인력양성

- (1) 제1세부과제 - 1명 (서울대학교 농생명공학부, 2015. 2. 박사학위 취득 장도)
- (2) 제2세부과제 - 2명 (서울대학교 농생명공학부, 2015. 2. 석사학위 취득 허윤정, 2015. 8. 석사학위 취득 신도운)
- (3) 제1협동과제 - 2명 (건국대학교, 2015. 2. 석사학위 취득 김민정, 2016. 2. 석사학위 취득 강수경)

아. 홍보전시

<오메가 밸런스 달걀>

- 뉴스 보도 1건 (MBN 뉴스, 2014. 11.)
- 교양 프로그램 보도 1건 (SBS 생활경제, 2014. 11.)
- 출시 기사 (지면보도 3건, 온라인 11건, 2014. 11.)
- 수능 기획 기사 (온라인 13건, 2014. 11.)



삼립식품, '수험생 응원 오메가 밸런스 달걀 행사' 진행

삼립식품이 수능을 앞두고 있는 전국의 모든 수험생들을 응원하는 '수험생 응원 오메가 밸런스 달걀 행사'를 진행한다고 3일 밝혔다.

'수험생 응원 오메가 밸런스 달걀 행사'는 기존 6천300원(15구)에 판매되는 '오메가 밸런스 달걀'을 기존 가격보다 20% 할인된 가격인 4천980원에 제공해 수험생을 응원하는 행사로 수능 전날인 11일까지 진행된다. 서울 홈플러스 월드컵점에서 모델들이 오메가 밸런스 달걀로 수험생을 응원하고 있다.

(연합뉴스 2015.11.3)

그림 77. 오메가 밸런스 달걀 홍보행사 보도자료

자. 기타

<수상 실적>

- 2015 한국동물자원과학회 발표 우수상 수상
Junyeong Lee et al., 2015. Effects of flaxseed oil on eggs and fecal microbiota in laying hens. OCI5001.

제2절 성과활용 계획

- 사업화는 연구개발 기간인 2년과 추가적으로 본 과제가 종료된 후의 2년을 포함하여 2013년부터 2016년까지 총 4년간 단계별로 진행될 예정이다. 1차년도에서 최적화된 친환경 기능성 사료첨가제 생산 공정을 이용하여 2차년도에는 산학연계를 통해 친환경 기능성 사료첨가제, 친환경 기능성 사료첨가제를 이용한 오메가 지방산 균형사료, 오메가 지방산 균형사료를 이용해 생산한 웰빙 원료육을 연계적으로 산업화한다. 3차년도에는 생산된 웰빙 원료육과 이를 가공한 가공육의 효과적인 사업화를 위해 기술의 상용화 기반을 구축하며 제품 판매를 실시한다. 4차년도에는 본 연구과제에서 진행된 내용을 확장하여 고부가 축산물 생산에 따른 부가가치 창출 및 경제적 파급 효과 증대를 유도할 예정이다.
- 단계별 사업화 전략을 통해 산업화를 체계적으로 진행하며, 완성된 제품은 즉시 사업화하여 경제성을 증대시킬 예정이다. 국내에서의 제품 판매는 친환경, 기능성, 웰빙이라는 키워드를 중심으로 하여 마케팅을 실시하며 제품의 공신력을 확보하는 것이 중요하다. 국내에서의 제품 공신력과 참여 기업체의 마케팅 능력을 이용하여 해외로의 수출 추진 예정이다. 현재 구축된 해외 기반의 수요국을 중심으로 추진 후 점진적으로 국가를 확대해나갈 예정이다.
- 본 과제를 통해 개발된 복합 미생물 생균제의 경우, 사료첨가용 항생제의 사용 금지와 친환경 축산물을 원하는 소비자들의 요구에 맞춰 친환경 가축 사양을 이룰 수 있을 것으로 보이며, 이에 따라 친환경 축산물의 생산 및 제품 출시가 가능할 것으로 보인다. 특히 본 과제를 통해 출원된 특허인 “경구 투여용 가축 생균제의 효율 증진을 위한 타블렛 제조기술”을 활용하여 보다 전달 효율이 증진된 제형의 생균제 개발이 가능할 것으로 보이며 후속 생균제 제형 연구가 기대된다.
- 본 과제를 통해 출원된 특허인 “알파-토코페롤 및 베타-사이클로텍스트린 포접체와 아마유 또는 아마종실을 포함하는 사료첨가제 조성물”과 노하우 “오메가 지방산 균형 계란생산 기술”을 함께 참여기업인 (주)삼립식품에 기술이전 하였고 이를 통하여 “오메가 밸런스 달걀” 제품을 출시하여 시중에서 유통되고 있다. 또한, 본 과제를 통해 출원된 특허인 “오메가 지방산의 균형과 베타인이 강화된 기능성 돈육 및 가공육 생산과 그 생산방법”을 이용하여 기업체에 기술이전 함으로써 베타인 강화 오메가 밸런스 돈육 제품 및 가공육 제품(햄 및 소시지)의 생산이 가능할 것으로 보인다. 이를 통해 돈육 비선호부위의 소비 진작을 일으킬 수 있을 것으로 기대된다.
- 오메가 밸런스 돈육 제품의 경우, 선호 부위는 신선육 제품으로 유통, 판매할 예정이며 비선호 부위의 경우 가공육제품 (햄 및 소시지)으로 판매할 계획이다. 신선육 제품은 친환경·기능성 생산 돈육에 대한 소비자의 수요 증가에 따라 친환경 (무항생제, 동물복지인증)과 기능성 (건강을 고려한 오메가 밸런스 축산물)을 특징으로 하여, 축산물 시장에서 차별화가 가능할 것으로 보인다. 육가공 제품의 경우 선물세트로 시장에 선진입 후, 시장 수요

를 예측하여 후속 사업화를 진행할 예정이다. 이를 통해 돈육 뿐만 아니라 향후 친환경 기능성 한우/육우 제품으로의 확대도 가능할 것으로 기대된다.

- 본 과제를 통해 개발된 농림수산물 부산물 활용 사료첨가제를 통해 항생제 대체 효과 뿐만 아니라 부산물로 발생하는 사회적 비용의 감소가 기대되어 친환경 축산이 가능할 것으로 기대된다. 또한, 본 과제를 통해 개발된 노하우 “잣나무 부산물 추출액을 이용한 피톤치드 오일 함유 산란계용 사료첨가제”와 노하우 “젓소용 저스트레스 기능성지방산 우유 생산을 위한 피톤치드 첨가제”는 기술이전 되었고 이를 통하여 신규 산란계용 사료첨가제 제품이 개발되었으며 추가적인 상품화가 기대된다.



그림 78. 단계별 사업화 추진 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 생균제 관련 해외과학기술 정보

가. 소화장관 전달효율을 높이는 제형과 대량생산체계

생균제가 작용을 할 수 있는 위장관 하부까지 전달되는 것은 probiotics의 급여 효과에 있어서 매우 중요한 요소이다. 그 전달률을 높이는 데에 고분자 기술을 응용하는 연구들이 많이 진행되고 있다. 최근 국제 학술지인 *Journal of Functional Foods*에 발표된 논문에는 probiotic (*L. casei*)과 오메가-3 지방산 (tuna oil)을 single whey protein isolate (WPI) - gum Arabic 와 오메가-3 지방산의 산화 안정성을 기존의 방법들에 비해 높였다는 연구가 있다.

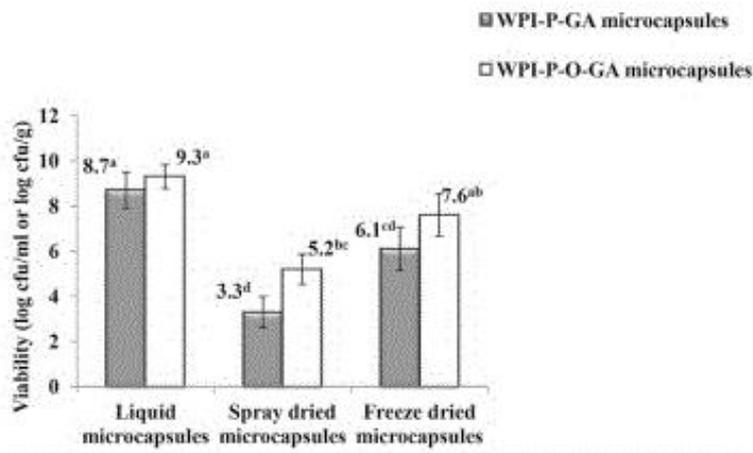


그림 79. *L. casei*의 viability가 tuna oil에 의해 증가하는 효과 (Eratte 등, 2015)

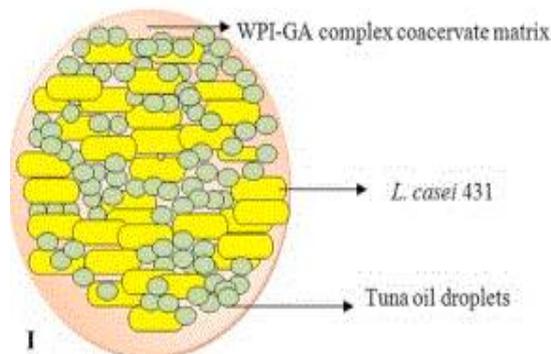


그림 80. WPI-GA와 *L. casei*, tuna oil이 혼합된 마이크로캡슐의 도식도 (Eratte 등, 2015)

Aggregation된 oil droplet을 WPI-GA 중합체가 감싸면서 *L. casei*가 산에 의한 스트레스로

부터 보호받게 되어 viability가 증가할 수 있었는데, lipid matrix를 이용하여 특정 균의 저장성을 증가시켰다는 결과는 좀 더 고부가가치의 생균제 및 기능성 식품을 개발하는 데에 응용될 수 있다.

나. 효모를 이용한 생균제 연구

여러 가지 probiotics 중에서 yeast를 사용하여 젖소의 생산실적을 늘리는 연구가 2015년 *Journal of Applied Animal Nutrition* 저널에 소개되었다. 이 연구에서는 yeast의 strain중 하나인 *Saccharomyces cerevisiae*를 12주 동안 1×10^9 cfu/day 수준으로 사료에 첨가하여 급여한 효과를 평가하였다.

Milk parameter	Control	Yea-Sacc [®]	P value
Milk production (kg/d)	35.9 ^a	36.7 ^b	0.003
Energy corrected milk [†] (kg/d)	34.3 ^a	35.7 ^b	<0.0001
Fat (g/kg)	39.8 ^b	38.7 ^a	0.0002
Protein (g/kg)	32.5 ^a	32.8 ^b	0.009
Log ₁₀ somatic cell count	1.95 ^b	1.79 ^a	0.0001
Lactose (g/kg)	49.8 ^a	50.6 ^b	<0.0001
Urea (mg/l)	0.248 ^b	0.239 ^a	0.004
Fat total (g/day)	1401	1400	0.916
Protein total (g/d)	1153 ^a	1189 ^b	0.001
Cow weight (kg)	662 ^b	656 ^a	0.08
Body condition score	2.18 ^b	2.12 ^a	0.09
Average daily gain	330	300	0.64

[†]ECM corrected for 4% fat and 3.4% protein according to the equation:
ECM (4% fat, 3.4% protein) = Milk × (0.124% fat + 0.073% CP + 0.256)
Means in rows not sharing a superscript differ significantly (P < 0.05)

그림 81. Yeast probiotics 급여가 젖소의 유량, 우유 질에 미치는 영향
(Tristant와 Moran, 2015)

Yeast probiotics를 급여한 젖소의 경우 대조군에 비해 소 한 두당 하루에 0.8 kg의 우유를 더 생산하는 것으로 나타났으며, 이는 305일 우유 생산량으로 환산했을 때 매우 큰 이익을 가져다 줄 것으로 예상된다.

유량 뿐만 아니라, 우유의 질에서도 큰 변화가 있다. 유단백질의 경우 소 한 두당 하루에 36 g이 증가했고, 요소의 양은 0.09 mg이 감소하여 우유의 질이 올라갔음을 알 수 있다.

이러한 변화는 궁극적으로 농가의 경제적 이익을 확대시켰는데, 메탄 발생량을 4% 줄였고, 우유 생산에 필요한 젖소의 필요량을 4% 감소시켰으며, 농가의 순이익을 1.4% 증가시킬 것으로 예상되었다.

Equivalent tonnes of CO ₂ per year	Control	Yea-Sacc [®]	Variation
Enteric methane	471	451	-4.2%
Manure management	412	398	-3.4%
Mineral fertilisers	488	489	0.3%
Machinery	250	249	-0.2%
Other	150	152	0.9%
TOTAL	1,771	1,739	-1.8%
Other parameters/inputs			
Labour (hours/yr)	10,609	10,350	-2.4%
Number of people fed according the energetic needs (n)	5,871	5,933	1.1%
Fossil energy consumption (100 MJ/yr)	8,487	8,394	-1.1%
Number of dairy cows	119	114	-4.2%
Milk production (limited by quota) x 1000 litres/yr	1,188.76	1,188.76	0.0%
Economic margin (0.16€ /cow/day for Yea-Sacc) €/year	123,715	125,443	1.4%

그림 82. Yeast probiotics 급여가 실험농가의 경제에 미친 영향 (Tristant와 Moran, 2015)

다. 복합 미생물 생균제 투여의 가축 성장 촉진 및 면역 증진 효과

생균제는 가축의 사료이용률 증진, 성장촉진 효과와 더불어 가축 건강 증진 및 질병에 대한 저항성 향상의 복합적 이점을 지니고 있으며, 친환경축산 및 동물복지의 필요성에 따른 성장촉진용 항생제 투여 금지가 전세계적으로 확산되고 있는 현 시점에 생균제에 대한 관심이 높아지고 있다. 생균제 투여에 따른 가축의 생리학적, 면역학적 특성 변화의 상관관계를 숙주동물의 장내 균총 변화로부터 원인을 규명하고자 하는 과학적 연구가 활발히 이루어지고 있다.

2011년 *Journal of The Chemical Society Of Pakistan*에 발표된 Lutfullah 등의 연구에 따르면, 육계에 생균제 (Protexin[™], Hilton Pharma社)를 투여하였을 경우 육계의 성장률이 증진되는 것을 밝혀내었다. 특히 이 연구에서 생균제의 투여량과 육계의 성장률, 소장 세포 crypt cell의 증식도 (crypt cell proliferation, CCP)간의 상관관계를 도출해내고자 시행되었다. 결론적으로, Protexin[™]을 사료 10 kg 당 1.0g 수준으로 첨가한 그룹에서 사료 섭취량이 증가하였으며, 그 원인으로는 생균제 투여에 따른 장내 균총의 개선으로 인해 섭취한 사료의 소화가 촉진된 것으로 설명된다. 이는 생균제 투여에 따라 장내 균총이 변하여 장내 fermentation 과정이 촉진되며 CCP를 증가시켰었고 그 결과 육계의 성장률이 증가한 것으로 보인다.

Table-3: Mean weekly feed consumption of chicks fed various doses of probiotic (Protexin).

Feed Consumed (g)	Groups with doses of Protexin g/ 10 kg feeds			
	Group-A (0.0)	Group-B (0.5)	Group-C (1.0)	Group-D (1.5)
Week 1	1357 ± 14 ^a	1384 ± 19 ^a	1367 ± 19 ^a	1334 ± 20 ^a
Week 2	3266 ± 27 ^a	3276 ± 17 ^a	3246 ± 22 ^a	3299 ± 11 ^a
Week 3	3000 ± 10 ^a	3017 ± 28 ^a	3075 ± 47 ^a	3075 ± 47 ^a
Week 4	8144 ± 12 ^{ab}	8057 ± 10 ^a	8121 ± 25 ^{ab}	8052 ± 70 ^a
Week 5	10450 ± 32 ^b	10495 ± 12 ^b	12492 ± 50 ^c	10327 ± 36 ^a

그림 83. 생균제 급여량에 따른 육계 병아리의 사료 섭취량 변화 (Lutfullah 등, 2011)

Table-4: Mean weekly live body weight (g) of chicks fed various doses of probiotic (Protexin).

Body Weight (g)	Groups with doses of Protexin g / 10 kg feeds			
	Group-A (0.0)	Group-B (0.5)	Group-C (1.0)	Group-D (1.5)
Initial Weight	447 ± 10 ^a	443 ± 10 ^a	446 ± 10 ^a	443 ± 10 ^a
Week 1	1284 ± 46 ^a	1308 ± 70 ^a	1325 ± 30 ^a	1282 ± 27 ^a
Week 2	3000 ± 10 ^a	3017 ± 28 ^a	3075 ± 47 ^a	3075 ± 47 ^a
Week 3	5712 ± 25 ^a	6100 ± 40 ^a	6125 ± 85 ^a	5587 ± 24 ^a
Week 4	10650 ± 29 ^{ab}	11275 ± 28 ^b	10650 ± 23 ^{ab}	10225 ± 29 ^a
Week 5	13625 ± 49 ^b	14350 ± 50 ^b	14650 ± 23 ^c	13120 ± 48 ^a

그림 84. 생균제 급여량에 따른 육계 병아리의 체중 변화 (Lutfullah 등, 2011)

뿐만 아니라 2012년 파키스탄의 Naseem 등에 따르면 broiler chicks에 생균제 (Protexin™, Hilton Pharma社) 첨가 사료를 급여하여 육계의 성장 촉진 효과 및 가축 질병 백신 투여에 대한 immunomodulation 효과가 있음을 확인하였다. 350일령의 육계를 50 수씩 7 그룹으로 나누어 각각 생균제 혹은 면역억제제 (cyclophosphamide)를 사료와 함께 급여한 결과, 생균제를 섭취한 그룹에서 더 향상된 사료요구율 (1.938, 1.959)을 보이고 더 높은 체중을 나타내었다. 생균제가 면역력 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 생균제 급여 그룹의 IBDV (infectious bursal diseases virus)에 대한 항체역가를 측정해본 결과, 35일 차에 사료 1 톤당 각각 50 g, 150 g의 생균제를 급여한 그룹에서 941과 832로 유의적으로 높은 항체가가 검출되었다.

Table 3 - Geometric mean Titer (GMT) using indirect hemagglutination inhibition (IHA) antibody titer against IBDV in different treatments.

Day	IHA Antibody Titers against IBDV per Treatment Group						
	P50-C3	P50	P150-C3	P150	C3	Cont V	Cont NV
7	78 ^a	79 ^a	77 ^a	78 ^a	79 ^a	79 ^a	79 ^a
14	60 ^a	59 ^a	42 ^a	52 ^a	45 ^a	37 ^a	52 ^a
21	137 ^a	111 ^{ab}	194 ^{bc}	147 ^{bc}	128 ^a	239 ^c	37 ^d
28	84 ^a	181 ^b	97 ^a	147 ^b	45 ^a	119 ^b	20 ^c
35	162 ^a	832 ^b	194 ^c	941 ^b	111 ^a	675 ^d	27 ^c
42	56 ^{ab}	160 ^c	34 ^{bd}	147 ^{bc}	69 ^a	84 ^a	18 ^d
49	128 ^a	181 ^b	73 ^c	111 ^a	82 ^c	97 ^c	12 ^d

P 50 C3 = Group fed 50 g probiotics/ton of feed & 3 mg cyclophosphamide/bird
 P50 = Group fed 50 g probiotics/ton of feed
 P 150 C3 = Group received 150 g probiotics/ton of feed & 3 mg cyclophosphamide/bird
 P150 = Group received 150 g probiotics/ton of feed
 C3 = Group treated with cyclophosphamide at 3 mg/bird
 Cont V = non-treated group
 Cont NV = Non-treated and non-vaccinated group
 Each value indicates the IHA GMT of the five samples repeated three times.
 a,b,c,d Any two means carrying the same superscript are not significantly different from each other.

그림 85. 일반 사료, 생균제 및 면역 억제제 급여 그룹과 항체가 (Lutfullah 등, 2011)

이와 같은 결과를 통해, 가축에 생균제를 사료와 함께 급여할 경우 가축의 사료섭취효율 증진 및 성장촉진 효과와 더불어 가축질병에 대한 면역력을 높여 전염성 질병에 대해 방어율을 높일 수 있음을 시사하고 있다.

표 57. Protexin™의 구성 성분 (Lutfullah 등, 2011)

제품명: PROTEXIN™

제품설명:

① 파키스탄 Hilton Pharma社에서 출시
 ② Multi-Strain probiotics 제품

Table 1 - Composition of Protexin™, Hilton Pharmaceuticals, Private, Limited-Pakistan.

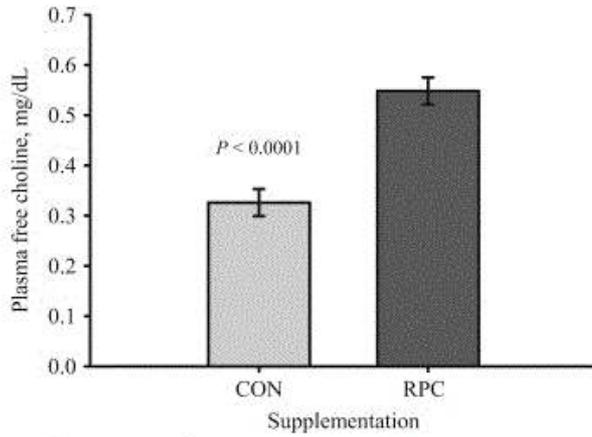
Sr No	Composition (100 Gm)	Concentration
1	Lactobacillus plantarum	1.89 x 10 ¹⁰ cfu/kg
2	Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus	3.09 x 10 ¹⁰ cfu/kg
3	Lactobacillus acidophilus	3.09 x 10 ¹⁰ cfu/kg
4	Lactobacillus rhamnosus	3.09 x 10 ¹⁰ cfu/kg
5	Bifidobacterium bifidum	3.00 x 10 ¹⁰ cfu/kg
6	Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus	6.15 x 10 ¹⁰ cfu/kg
7	Enterococcus faecium	8.85 x 10 ¹⁰ cfu/kg
8	Aspergillus oryza	7.98 x 10 ¹⁰ cfu/kg
9	Candida pintolopesii	7.98 x 10 ⁹ cfu/kg

2. 기능성 생리활성 물질 관련 해외과학기술 정보

가. 기능성 생리활성 물질의 전이

기능성 생리활성 물질을 축산물에 전이, 축적시킴으로써 고부가가치의 축산물을 생산하고자 하는 전략들이 있다. 주로 축적시키는 물질은 식육 내 지방이나 유지방으로 쌓일 수 있는 지용성 비타민 혹은 지방산 중 항염증 등의 작용이 있는 오메가-3 지방산이 대표적이다. 최근 학술지 *Livestock Science*에 게재된 논문에서는 반추위 보호 콜린 (rumen-protected choline, RPC)을 급여함으로써 유지방 내 오메가-3 지방산 비율을 높인 결과가 게재되었다. 9주간 진행된 이 실험에서는 RPC를 급여 받는 그룹 (115 g/cow/d)과 일반식을 급여 받는 그룹 (CON)으로 나뉘어 매일 우유생산량과 건물 섭취량, 매주 체중과 신체충실도 (body condition score, BCS)를

측정하였다. 또 3, 6, 9주차에 주 2회 우유 샘플링을 하여 유지방, 유단백, 요소질소 (BUN), 체세포 수, 지방산 조성, 유리 콜린 농도 등을 측정하였다.



	Supplementation ^a		SEM ^b	Lactation stage		SEM ^b	Trit ^c	p-Value ^c			
	CON	RPC		Middle	Late			P	LS	Trit × LS	P × LS
DML ^d (kg/d)	23.64	23.43	0.24	-	-	-	0.54	< 0.0001	-	-	-
BW ^e (kg)	703.6	703.3	3.03	703.2	703.8	3.68	0.92	0.02	0.90	0.76	0.12
BCS ^f	2.86	2.90	0.06	2.91	2.85	0.06	0.65	< 0.0001	0.50	0.004	0.82
Milk yield (kg/d)											
Milk yield	36.72	36.81	1.69	38.06	35.48	1.76	0.81	< 0.0001	0.01	0.72	0.77
3.5% FCM	36.76	37.09	1.40	41.61	32.23	1.58	0.60	< 0.0001	< 0.0001	0.17	0.80
ECM	36.21	36.39	1.38	40.38	32.22	1.53	0.75	< 0.0001	< 0.0001	0.21	0.68
Milk composition											
Fat (%)	3.63	3.63	0.08	3.57	3.70	0.10	0.97	0.001	0.31	0.46	0.35
Fat (kg/d)	1.29	1.29	0.05	1.51	1.07	0.05	0.91	< 0.0001	< 0.0001	0.46	0.37
Protein (%)	3.06	3.03	0.04	3.03	3.06	0.04	0.04	< 0.0001	0.35	0.32	0.006
Protein (kg/d)	1.10	1.09	0.04	1.18	1.01	0.05	0.33	< 0.0001	< 0.0001	0.97	0.21
Lactose (%)	4.74	4.72	0.06	4.78	4.68	0.06	0.06	< 0.0001	0.007	0.13	0.05
Lactose (kg/d)	1.77	1.74	0.08	1.86	1.66	0.09	0.22	< 0.0001	0.001	0.80	0.16
Urea nitrogen ^g (mg/dL)	15.4	16.1	0.31	15.9	15.6	0.31	0.05	< 0.0001	0.40	0.62	0.03
SCC ^h log transformed	4.70	4.83	0.18	4.72	4.80	0.19	0.31	0.07	0.65	0.88	0.99
3.5% FCM/DMI (kg/kg)	1.59	1.66	0.06	1.83	1.42	0.07	0.01	< 0.0001	< 0.0001	0.07	0.74
ECM/DMI (kg/kg)	1.57	1.62	0.06	1.77	1.42	0.07	0.02	< 0.0001	< 0.0001	0.14	0.78

그림 86. 반추위 우회 급여가 혈중 콜린 농도에 미치는 영향 (Pineda와 Cardoso, 2015)

이 때 RPC를 만들기 위해 사용한 방법은 칼슘염과 장쇄 오메가 지방산을 이용하여 코팅하는 방식으로써, 급여 실험 결과 혈장 내 콜린 농도를 높였고 유지방 내 조성 또한 변화가 있었다. 주된 변화는 MUFA와 *cis* PUFA를 늘렸다는 것과 ALA (alpha linolenic acid), eicosapentaenoic, docosapentaenoic, docosahexaenoic acid와 같은 오메가-3 지방산의 비율이 높아졌다는 것이다. 특히나 이 실험의 경우, 유량이나 유지방 등이 점점 떨어져가 상품가치가 떨어지는 비유 중기와 후기의 소들을 이용한 실험이었기에 축산물의 가치를 극대화시킬 수 있는 전략으로 응용이 될 수 있다.

Summations ^f											
De Novo	22.08	21.24	0.37	22.39	20.94	0.53	0.001	0.001	0.004	0.48	0.20
Preformed	45.12	47.41	0.58	45.27	46.91	0.73	0.0004	0.001	0.001	0.84	0.005
Mixed (both)	32.65	31.84	0.31	32.44	32.05	0.37	< 0.0001	0.01	0.28	0.58	0.13
Σ SFA	66.68	65.36	0.53	67.03	65.00	0.61	< 0.0001	0.93	0.002	0.57	0.34
Σ MUFA <i>cis</i>	24.44	25.13	0.44	23.89	25.68	0.51	0.004	0.17	0.002	0.37	0.34
Σ PUFA <i>cis</i>		3.356	3.524	0.07	3.443	3.447	0.09	< 0.0001	0.14	0.76	0.17

그림 87. 반추위 우회 급여에 따른 지방산 조성의 변화 (Pineda와 Cardoso, 2015)

나. 기능성 생리활성 물질 후보

아주 오래전부터 효과적인 생리활성 물질을 찾기 위해 다양한 출처의 생리활성 물질들을 추출해 그 효과를 연구하려는 노력이 있었다. 특히 2015년 노벨생리의학상 수상자가 이런 흐름 속에서 기생충약 ‘아버멕틴’을 발견한 것을 주목할만하다. 비단 기생충약 뿐만 아니라 가축 혹은 고기를 섭취한 사람의 생리활성을 높이는 compound 테마에 있어서도 연구가 활발히 진행되고 있다.

2015년 *Journal of Functional Food*에 게재된 논문에서는 chamomile extract의 항산화 및 항생제 효과를 설명하고 있다. Chamomile extract의 경우 free radical scavenging activity를 증가시키고, lipid peroxidation을 줄임으로써 항산화 효과를 보이며, bacteria와 fungi에 대해 항생제 효과를 가지고 있음이 밝혀졌다.

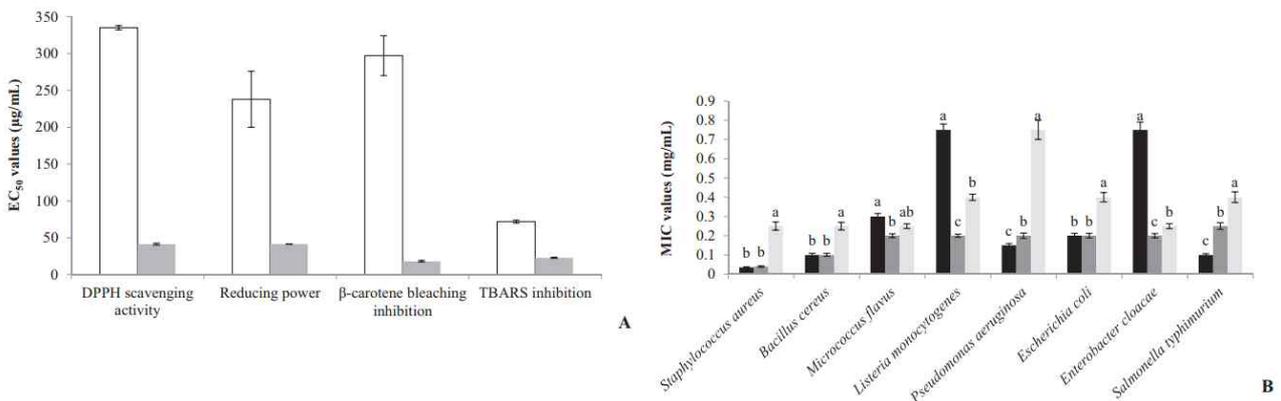


그림 88. chamomile extract의 항산화 및 항생제 효과. (A) □ : chamomile extract, ■ : standard trolox, (B) ■ : chamomile extract, ▒ : standard streptomycin, □ : standard ampicillin (Caleja 등, 2015)

주목할만한 점은 chamomile extract의 경우, 첨가 시에 feed 자체의 유통기한 또한 늘렸다는 점이다. 이런 장점들을 봤을 때 좋은 사료첨가 생리활성 물질이 될 수 있을 것이다. 꼭 chamomile을 쓰지 않더라도, 다양한 출처의 compound를 통해 사료첨가 생리활성 물질을 탐색할 수 있을 것이다.

다. 생리활성물질 (합성 vitamin E)의 허용가능 급여량 및 안전성 연구

첨가제로 이용되는 알파 토크페롤은 순수한 all-rac-alpha-tocopherol로 이루어져 있으며, alpha tocopherol (vitamin E)는 물질이 지니는 항산화능력 덕분에 인간에게 이로운 뿐만 아니라 가축에게도 항산화효과를 위해 급여되고 있는 생리활성 물질 중에 하나이다. 2012년 유럽 식품 안전 당국 (European Food Safety Authority)에서는 전 축종에 대한 합성 vitamin E의 사용에 대한 안전성 및 효능에 대해 의문을 제기하였고, FEEDAP (panel on additives and products or substances used in animal feed)의 위원단에서 전 축종에서 사료에 항산화제로 이용되고 있는 합성 alpha tocopherol에 대하여 전 축종뿐만 아니라 소비자와 환경에 미치는 안전성을 평가하였다.

합성 alpha-tocopherol은 항산화제로서의 역할로 식품 첨가제 승인을 받은 바 있으며, 영유아 음식에도 식품첨가제로 첨가되고 있다. 또한 생리학적 활성 물질로써 수의학제품으로 등록되어 있으며 식품을 생산하는 동물에서의 사용에 관해서는 최대 허용량이 정해져 있지 않아 그 사용량이 가축 및 실제 소비자에게 미치는 영향에 대한 검증이 필요하였다. 그 결과, all-rac-alpha-tocopherol의 항산화제으로써의 사용에 관하여 사료에서 소비자 및 환경에 이르기 까지 우려할 바가 없다는 입장을 표명하였다.

이와 같은 결과는 가축사료에 첨가되는 생리활성물질 후보를 발굴함에 있어서 해당 물질이 지니는 효과 자체뿐만 아니라 실제 사료에서 가축, 소비자 그리고 최종적으로 환경에 노출되었을 때 안전성이 높은 합성 vitamin의 사용 가능성에 대해서 충분히 고려해볼 만한 가치를 지닌다. 더불어 이 연구는 사료 첨가제로 이용된 생리활성물질이 소비자에게 미치는 영향을 평가함으로써 그 의의를 지닌다.

3. 농림수산부산물 활용 관련 해외과학기술 정보

숙주의 면역계는 외부 이물질로부터 생체를 방어하며 그 중 면역세포들은 외부 자극이 있지 않은 이상 휴지기에 머무르고 있으며 다양한 종류의 자극에 의해 증식, 분화 및 작용기전이 조절되고 활성화된다. 이런 관점에서 질병상태는 면역 반응성이 저하된 상태라고 전제되며 이 면역반응을 증진시킬 수 있는 물질, 즉 면역 증강제를 적용하여 면역반응성을 활성화시킴으로써 질병을 예방 또는 치료할 수 있다. 1970년대 이후 균체, 균사체, glucan 등이, 1980년대부터는 cytokine, lymphokines, growth factor 등이 연구되어 왔으나, 기대 이하의 효과와 독성 등 많은 문제점들이 제기되었다. 이에 독성이 거의 없고 여러 면역세포를 자극하여 cytokine을 유도할 수 있는 천연물을 주목하게 되었다. 국외의 경우에 있어 미역의 알긴산 (Otterlei 등, 1991), 마늘의 알리신 (Keiss 등, 2003), 표고버섯 다당체의 lentinan (Murata 등, 2002), 칩엽수의 피톤치드 (Li 등, 2009), 미네랄 등 무수한 연구자들이 인수공통을 대상으로 면역 증강제 개발을 진행하고 있다. 특히 이들 천연물 중 농림수산부산물은 환경문제를 유발하기 때문에 이들을 이용한 가축의 면역증진 개선은 물론 기능성 축산물을 생산하고자 하는 시도가 활발하게 진행되고 있다. 따라서 본 과제에서 연구된 농림수산부산물 활용 단독/혼합제제는 휴지기의 면역세포들을 자극하여 숙주 면역력의 향상성을 포함하여 외부 병원성 항원에 대한 외부 침입의 방어체를 활성화시킴으로써 질병을 예방할 수 있는 가능성을 제시하였으며, 이 면역반응 및 대사기능 촉진을 통해 생산성 증진을 포함하여 축산물의 안전성 확보 및 건강기능성 고품유 축산물 생산의 결과를 얻고 있다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

제1절 주요활용 시설 및 장비 현황

1. 주요 활용 시설

시설명	면적(평)	위치	활용가능내용
동물세포공학연구실	25	서울대학교 200동 4204호	생균제 및 동물세포배양 관련 연구
동물세포공학연구실	15	서울대학교 200동 1034호	미생물 코팅 및 제형 관련 연구
조직배양실	5	서울대학교 200동 4206호	동물세포배양 전용 연구
세미나실	25	서울대학교 200동 4213호	연구보고, 연구회의 개최
농생명과학공동기기원(NICEM)	300	서울대학교 201동	NMR, DLS, AFM, confocal microscope, SEM, TEM, Sequencing
동물소재공학연구실	29	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	생균제 관련 연구
공동분석기기실	29	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	LCMS, GC
공동기기실	22	그린바이오과학기술연구소 102동 214호	미생물배양 연구 및 시료 저장
발효기실	22	그린바이오과학기술연구소 102동 215호	미생물배양 및 건조 연구
동물영양생리 및 단백질 실험실	20	건국대학교 504호	혈액 분석연구, 단백질 분석연구, 면역세포 분리, 미생물 배양 실험
배양실	10	건국대학교 504호	세포 배양
세미나실	10	건국대학교 504호	실험실 임원 과제 수행 점검 및 발표
건국대학교 부속농장	50	충북 충주	사양실험
합계	562		

2. 주요 활용 연구기기

구분 (보유/활용)	기기현황			기기책임자	
	기기명	수량	설치장소	성명	과제참여
보유	Thermal Cycler	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	전기영동장치	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	광학 현미경	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	Shaking incubator	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	Incubator	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	Deep freezer	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	Chemidoc	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여
보유	원심분리기	1	서울대학교 농생대 200동 4204호	최운재	참여

보유	CO ₂ -humidified incubator	3	서울대학교 농생대 200동 4206호	최윤재	참여
활용	Confocal microscope	1	서울대학교 농생대 201동	이승연	미참여
활용	DLS	1	서울대학교 농생대 201동	오한진	미참여
활용	SEM	1	서울대학교 농생대 201동	권오경	미참여
활용	TEM	1	서울대학교 농생대 201동	장근애	미참여
활용	발효기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 215호	강상기	참여
활용	동결건조기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 215호	강상기	참여
활용	교반 배양기	2	그린바이오과학기술연구소 102동 214호	강상기	참여
활용	고압증기멸균기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 214호	강상기	참여
활용	초저온냉동고	1	그린바이오과학기술연구소 102동 214호	강상기	참여
보유	제빙기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	의료용면역형광측정장치	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	요화학분석기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	세포분석기 (FACS)	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	Microplate Reader	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	혈구계수기세트	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
활용	대형냉장고	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	입자계수기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
활용	가스크로마토그래피	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	가스크로마토그래피/질량분석기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	중합효소연쇄반응(PCR)	2	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	Rear-time PCR	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
활용	액체크로마토그래피/질량분석기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
보유	ICP-MS	1	그린바이오과학기술연구소 102동 213호	강상기	참여
활용	미량냉장원심분리기	2	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	회전식진탕기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
활용	의료용인큐베이터	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	실험용진공펌프	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	실험용세척기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
활용	실험용저울	2	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	단백질크로마토그래피시험관	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
활용	광학현미경	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	Heating block	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	조직분쇄기	1	그린바이오과학기술연구소 102동 212호	강상기	참여
보유	자동혈액분석기	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	가스크로마토그래피	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	ELISA 분석기	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	원심분리기	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	Clean Bench	2	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	Shaking Incubator	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	이산화탄소배양기	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	미량원심분리기	2	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	형광디지털카메라	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
보유	실체 현미경	1	건국대학교 동생대 504호	이홍구	참여
활용	압출기	1	(주)피러스	김배용	참여
합계		61			

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- 아래의 서울대학교 환경안전원의 안전관리 기준 하에 연구를 진행하였음.

제1조(목적)

이 규정은 서울대학교 환경 안전을 위한 환경오염방지·환경안전교육·안전 점검·안전사고대책 등에 관하여 필요한 사항을 규정함을 목적으로 한다.

제2조(적용 범위)

이 규정은 실험·실습을 수행하는 대학(원), 연구소 및 부속기관 (이하“관리기관”이라 한다)과 이에 종사하는 교직원, 학생 및 연구원에 적용한다.

제3조(환경안전관리위원회)

①환경 및 방사선안전관리에 관한 중요 사항을 심의하기 위하여 환경안전관리위원회(이하 ‘위원회’라 한다)를 둔다.

②위원회는 다음 사항을 심의한다.

③위원회는 15인 이내의 위원으로 구성하되, 부총장을 위원장으로 하고, 환경안전원장(이하 “안전원장”이라 한다)을 부위원장으로 하며, 연구처장, 시설관리국장, 생물안전위원회 위원장을 당연직 위원으로 하고, 그 밖의 위원은 본교 교수 중에서 위원장의 추천으로 총장이 임명한다.

④위원장은 위원회를 소집하고, 그 의장이 된다.

⑤위원회는 다음 각 호의 사항을 심의한다.

1. 환경안전교육에 관한 사항
2. 실험·실습실 안전 점검 및 사용제한에 관한 사항
3. 실험폐액의 처리 및 관리에 관한 사항
4. 중대한 안전사고의 처리에 관한 사항
5. 관리기관의 장 및 환경안전관리자의 제재에 관한 사항
6. 기타 환경 및 방사선안전관리에 필요한 제반 사항

⑥위원회는 재적위원 과반수의 출석으로 개최하며, 출석위원 과반수의 찬성으로 의결한다.

제4조(관리기관)

관리기관의 장은 환경안전관리를 위하여 다음 각 호의 업무를 수행한다.

1. 환경안전관리자의 지정
2. 환경안전교육 대상자 선정
3. 실험·실습관련 유해물질의 관리
4. 실험실 안전사고 발생시 원인, 경위 조사, 사후처리 및 대책강구
5. 기타 환경안전관리에 관한 업무

제5조(관리기관별 환경안전위원회)

①관리기관의 장은 제4조 규정의 업무수행을 위하여 관리기관별 환경안전위원회(이하‘관리기관

위원회'라 한다)를 두고 동 위원회의 위원장이 된다.

②관리기관위원회 위원은 관리기관의 장이 임명한다

③관리기관위원회는 다음의 사항을 심의한다.

1. 환경안전관리 준수사항 제정
2. 실험·실습실, 안전관리시설의 정기점검에 관한 사항
3. 안전교육 미 이수자의 제재에 관한 사항
4. 실험실 안전사고 대책
5. 기타 실험실 안전관리에 필요하다고 인정하는 사항

제6조(환경안전관리자)

①관리기관의 장은 실험·실습실별로 당해 실험실을 사용하는 전임교수 중에서 환경안전관리자(이하 “관리자”라 한다)를 지정하여야 한다.

②관리자는 실험·실습실 자체 안전 점검, 실험실 종사자의 환경안전교육 이수 조치, 안전사고의 예방, 폐기물의 관리, 기타 환경안전과 관련된 업무를 담당한다.

제7조(환경안전교육)

①안전원장은 환경안전교육을 주관한다.

②교육대상자는 관리기관에 종사하는 교직원, 학생 및 연구원으로 한다. 다만 관리기관의 장은 환경안전교육이 필요하지 않다고 인정되는 자에 한하여 교육대상에서 제외할 수 있다.

③관리기관의 장은 교육대상자 명단을 안전원장에게 제출하고, 안전원장은 교육일정 등을 관리기관에 통보한다.

④관리기관의 장은 교육대상자 중 교육을 미 이수한 자에 대하여 실험·실습실의 출입을 제한하여야 한다.

제8조(실험·실습실 안전점검)

①안전원장은 실험·실습실의 안전관리상태를 점검한다.

②안전원장은 실험·실습실의 안전관리가 미흡한 경우, 일정기간 해당 실험·실습실의 사용을 제한할 수 있다.

③안전원장이 안전점검에 필요한 행정적 편의를 요청할 경우 관리기관의 장은 이에 협조하여야 한다.

제9조(실험폐기물의 수집 및 처리)

①안전원장은 실험폐기물의 수집 및 처리에 관한 지침(이하 “처리지침”이라 한다)을 정한다.

②관리자는 처리지침에 의거 실험폐액을 분별 수집하여 그 처리를 안전원장에 의뢰하여야 한다.

제10조(실험폐기물 등 처리 부담금)

①안전원장은 실험폐기물 등의 관리업무를 수행하는데 필요한 비용을 해당기관에 부과할 수 있다.

②제1항과 관련된 부과금액·부담금 사용 등 세부사항은 위원회의 심의를 거쳐 정한다.

제11조(오염도 측정 및 배출규제)

- ① 안전원장은 환경오염물질을 배출하는 기관의 오염도를 측정, 매년 총장에게 보고하여야 한다.
- ② 안전원장은 환경오염물질을 배출하는 기관이 교직원 및 학생의 건강과 지역환경에 위해를 가져올 우려가 있다고 인정될 때에는 당해 배출기관의 실험·실습실 사용을 제한할 수 있다.

제12조의1(안전사고처리)

- ① 안전사고가 발생한 경우 관리자는 사고경위서를 3일 이내에 관리기관의 장 및 안전원장에게 제출하여야 한다. 다만, 사망, 신체장해 또는 1억원 이상의 대물피해 등 중대한 안전사고가 발생한 경우 관리자는 관리기관의 장 및 안전원장에게 사고내용을 즉시 보고하여야 한다.
- ② 중대한 안전사고 이외의 사고가 발생한 경우 해당 관리기관의 장은 관리기관위원회를 소집하여 사고처리를 하고, 그 결과를 안전원장에게 15일 이내에 보고하여야 한다.
- ③ 안전원장은 제2항의 사고처리 결과보고가 미흡한 경우 해당 관리기관의 장에게 보완을 요구할 수 있다.
- ④ 중대한 안전사고가 발생한 경우 해당 관리기관장, 위원회의 당연직 위원 및 전문가 약간 명으로 사고 대책위원회를 구성 운영하되 그 위원장은 부총장이, 부위원장은 관리기관의 장이 된다.
- ⑤ 안전원장은 안전사고의 경위 또는 사후처리 결과를 검토한 후 필요하다고 판단되는 경우에는 사고내용을 연구위원회에 보고하고 공개할 수 있다.

제12조의2(시정요구 등)

- ① 위원장은 관리기관의 장 및 관리자가 안전관리에 관하여 다음 각 호와 같이 그 업무를 소홀히 한 때에는 그 위반의 정도에 따라 경고 또는 시정요구를 할 수 있다.
 - 1. 안전사고가 발생한 경우 관리자가 사고경위서를 3일 이내에 관리기관의 장 및 안전원장에게 제출하지 아니한 경우
 - 2. 관리기관의 장이 부적격자를 관리자로 임명한 경우
 - 3. 관리기관의 장이 환경안전교육 미 수료자의 실험실 출입을 방치한 경우
 - 4. 관리기관의 장이 안전사고 처리 결과를 15일 이내에 보고하지 아니한 경우
- ② 안전원장은 관리기관 및 관리자가 「처리지침」을 위반한 경우 관리기관의 장 또는 관리자에게 위반사항을 통보하고, 다음 각호의 필요한 조치를 할 수 있다. 다만, 조속한 시일 내에 위원회의 추인을 받아야 한다.
 - 1. 실험폐액 및 방사성폐기물 수집 중단
 - 2. 관리기관의 장에게 해당 실험실의 경고 또는 폐쇄 요구

제13조(보험가입 의무)

관리기관의 장은 위원회에서 정한 보험금액 이상의 책임보험에 가입하여야 한다.

제14조(시행세칙)

이 규정 시행에 필요한 세부사항은 위원회의 심의를 거쳐 따로 정한다.

부칙(제1656호, 2008. 2. 19.)

이 규정은 공포한 날부터 시행한다.

제 9 장 참고문헌

- Amagase H., Petesch B. L., Matsuura H., Kasuga S. and Itakura Y. 2001. Recent Advances on the Nutritional Effects Associated with the Use of Garlic as a Supplement: Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *Journal of Nutrition* 131(S3):955S-962S.
- Antonio V., Gonzalo P., Angela B., Angeles C. and Julian G. 2001. Screening of Antimicrobial Activities in Red, Green and Brown Macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology* 4(1):35-40.
- Baricevic D., Milevoj L. and Borstnik, J. B. 2001. Insecticidal Effect of Oregano *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* Inter. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 7:84-88.
- Caleja C., Barros L., Antonio A. L., Ciric A., Barreira J. C., Sokovic M., Oliveira M. B., Santos-Buelga C. and Ferreira I. C. 2015. Development of a Functional Dairy Food: Exploring Bioactive and Preservation Effects of Chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Journal of Functional Foods* 16:114-124.
- Campbell E. J., Reece N. A., Taylor J. B. and Simon M. R. 2005. *Biology: Concepts and Connections*, 5th Edition, Pearson Education Inc.
- Chae, H. S., Choi, H. C., Na, J. C., Kim, M. J., Kang, H. K., Kim, D. W., Kim, J. H., Jo, S. H., Kang, G. H. and Seo, O. S. 2012. Effect of Raising Periods on Amino Acids and Fatty Acids Properties of Chicken Meat. *Korean Journal of Poultry Science* 39(2):77-85.
- Cho S. H., Kang S. E., Cho J. Y., Kim A. R., Park S. M., Hong Y. K. and Ahn D. H, 2007. The Antioxidant Properties of Brown Seaweed (*Sargassum siliquastrum*) Extracts. *Journal of Medical Food* 10(3):479-85.
- Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L. and Vlietinck A. J. 2002. Correlation Between Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Some Aromatic Medicinal Plants Growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79:213-220.
- Cox S., Abu-Ghannam N. and Gupta S. 2010. An Assessment of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Six Species of Edible Irish Seaweeds. *International food*

Research Journal 17:205-220.

- Effendy J. L., Simmons D. L., Campbell G. R. and Campbell I. H. 1977. The Effect of Aged Garlic Extract on the Development of Experimental Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 132:37-42.
- Emily A. W. and Barbara D. A. 2007. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimicrobial Properties of Garlic and Onions. *Nutrition & Food Science* 37(3):178-183.
- Eratte D., McKnight S., Gengenbach T. R., Dowling K., Barrow C. J. and Adhikari B. P. 2015. Co-Encapsulation and Characterisation of Omega-3 Fatty Acids and Probiotic Bacteria in Whey Protein Isolate - Gum Arabic Complex Coacervates. *Journal of Functional Foods* 19:882-892.
- Essman E. J. 1984. The Medical Uses of Herbs. *Fitoterapia* 55:279-289.
- European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. 2012. Scientific Opinion on the safety and efficacy of synthetic alpha-tocopherol for all animal species. *EFSA Journal* 10(7):2784.
- Fenelli S. L., Castro G. D., Toranzo E. G. and Castro J. A. 1998. Mechanism of the Preventive Properties of Some Garlic Compounds in the Carbon Tetrachloride Promoted Oxidative Stress. Diallyl sulfide. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 110(2):163-169.
- Fernández-Figares, I., Conde-Aguilera, J. A., Nieto, R., Lachica, M., and Aguilera, J. F. 2008. Synergistic Effects of Betaine and Conjugated Linoleic Acid on the Growth and Carcass Composition of Growing Iberian Pigs^{1, 2}. *Journal of Animal Science*, 86(1):102.
- Ganesan K., Suresh K. and Subba Rao P. V. 2008. Antioxidant Potential of Solvent Extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An Edible Seaweed. *Food Chemistry* 107(1):289-295.
- Hong, B. J., Oh, J. S., Kim, B. W. and Park, B. S. 2008. Effect of Feeding Dietary Pitamin as a Organic Livestock Feed Additives in Laying Hens. *Korean Journal of Organic Agriculture* 16(2):205-218.
- Ivana C., Jovalekic M. and Jegorovic B. 2012. In vitro Antibacterial Activity of Garlic and Synergism Between Garlic and Antibacterial Drugs. *Archives of Biological*

Sciences(Belgrade) 64(4):1369–1375.

- Keiss H. P., Dirsch V. M., Hartung T., Haffner T., Trueman L., Auger J., Kahane R. and Vollmar A. M. 2003. Garlic (*Allium sativum* L.) Modulates Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Activated Human Blood Thereby Inhibiting NF- κ B Activity. *Journal of Nutrition* 133:2171–2175.
- Kim Y. J., Jin S. K. and Yang H. S. 2009. Effects of Dietary Garlic Bulb and Husk on the Physicochemical Properties of Chicken Meat. *Poultry Science* 88:398–405.
- Kim Y. K., Chung K. N., Hirosh I. and Shigeru M. 1986. Volatile Components of Pinenut. *Korea Journal of Food Science and Technology* 18(2):105–109.
- Kobayashi M., Inagaki H., Katsumata M., Hirata Y., Hirata K., Suzuki H., Li Y. J., Wakayama Y. and Kawada T. 2008. Visiting a Forest, but Not a City, Increases Human Natural Killer Activity and Expression of Anti-Cancer Proteins. *International Journal of Immunopathology & Pharmacology* 21(1):117–127.
- Li Q., Kobayashi M., Wakayama Y., Inagaki H., Katsumata M., Hirata Y., Hirata K., Shimizu T., Kawada T., Park B. J., Ohira T., Kagawa T. and Miyazaki Y. 2009. Effect of Phytoncide from Trees on Human Natural Killer Cell Function. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 22:951–959.
- Lutfullah G., Akhtar T., Ahmad I., Khattak M. A. K., Durrani F. -E. -R. and Qureshi M. S. 2011. Effects of Probiotic on the Intestinal Morphology with Special Reference to the Growth of Broilers. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 33(1):129–133.
- Murata Y., Shimamura T., Tagami T., Takatsuki F. and Hamuro J. 2002. The Skewing to Th1 Induced by Lentinan is Directed Through the Distinctive Cytokine Production by Macrophages with Elevated Intracellular Glutathione Content. *International Immunopharmacology* 2:673–689.
- Nagaki M., Narita T., Hiroaki I., Jun K. and Akio N. 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Isoprenoids. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* 36(1):55–58.
- Naseem S., Rahman S. U., Shafee M., Sheikh A. A. and Khan A. 2012. Immunomodulatory and Growth-Promoting Effect of a Probiotic Supplemented in the Feed of Broiler Chicks Vaccinated Against Infectious Bursal Disease. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 14(2):109–113.

- NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report. 2010. Nutrition Business Journal.
- Nuria M. C., Goni I. and Larrauri J. A. 1999. Reduction in Serum Total and LDL-Cholesterol Concentration by a Dietary Fiber and Polyphenol-Rich Grape Product in Hypercholesterolemia Rats. *Nutrition Research* 9:1371-1381.
- Nuutila A. M., Puupponen-Pimia R., Aarmi M. and Oksman-Caldentey M. 2002. Comparison of Antioxidant Activities of Onion and Garlic Extracts by Inhibitory of Lipid Peroxidation and Radical Scavenging Activity. *Food Chemistry* 81:485-493.
- Otterlei M., Ostgaard K., Skjåk-Braek G., Smidsrød O., Soon-Shiong P. and Espevik T. 1991. Induction of Cytokine Production from Human Monocytes Stimulated with Alginate. *Journal of Immunotherapy*. 10:286-291.
- Pineda A. and Cardoso, F. C. 2015. Effects of Rumen-Protected Choline with Calcium Salts of Long Chain Fatty Acids on Milk Yield and Milk Composition of Middle and Late Lactation Holstein cows, *Livestock Science* 175:47-58.
- Qureshi A. A., Abuimeileh N., Din Z. Z., Elson C. E. and Burger W.C. 1983. Inhibition of Cholesterol and Fatty Acid Biosynthesis in Liver Enzymes and Chicken Hepatocytes by Polar Fraction of Garlic. *Lipids* 18:343-348.
- Simons L. A., Balasubramanian S. and von Konigsmark M. 1995. On the Effect of Garlic on Lipids and Lipoproteins in Mild Hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 113:219-225.
- Skan D., Bermer Y. N. and Rabinowitch H. 1992. The Effect of Dietary Onion and Garlic on Hepatic Lipid Concentrations and Activity of Antioxidative Enzymes in Chicks. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3:322-325.
- Song K. and Milner J. A. 2001. The Influence of Heating on the Anticancer Properties of Garlic. *Journal of Nutrition* 131(3):1054S-7S.
- Strategic analysis of animal feed ingredient market in North America. 2013. Frost and Sullivan.
- Transparency Market Research web site (www.transparencymarketresearch.com/).

- Tristant D. and Moran C. A. 2015. The Efficacy of Feeding a Live Probiotic Yeast, Yea-Sacc®, on the Performance of Lactating Dairy Cows, Journal of Applied Animal Nutrition 3:e12; 1-6.
- University of Florida, 2009, Feeding Ruminally-Protected Choline to Transition Dairy Cows, The cattle site.
- Wu C. C. and Sheen L. Y. 2001. Effects of Organosulfur Compounds from Garlic Oil on the Antioxidation System in Rat Liver and Red Blood Cells. Food and Chemical Toxicology 39:563-569.
- 고용균, 신종서, 김창혁, 홍병주, 박재인, 라창식. 2006. 잣송이를 이용한 축사환경개선제 및 사료첨가제 개발에 관한 연구 보고서. 강원대학교 농림부.
- 농생명소재산업화기술개발사업요약보고서. 2011. 농림축산식품부.
- 단국대학교. 2013. 해외생명산업 육성정책 현황과 국내 생명산업 발전방안. 농림축산식품부.
- 동물용의약품 수출 현황과 과제 (상). 2013. 축산경제신문 (2013.06.22. 기사).
- 박화춘. 2013. 한돈 산업의 중장기 정책 및 안정화 방안에 대한 제언. Pig & Pork 한돈, 2013.8.:216-218.
- 비선호 부위별 가격차 최대 3배. 2011. 농민신문 (2011.07.20. 기사).
- 사료 첨가제 특허분석 보고서. 2014. 농림수산식품교육문화정보원.
- 서울대학교. 2013. 바이오사료첨가제 사업단 최종보고서. 농림축산식품부.
- 세계 배합사료시장: 기술발전과 시장변화. 2012. BCC Research.
- 수제 소시지로 삼겹살값 잡는다. 2014. 서울신문(2014.07.07. 기사).
- 양재경, 강범국, 김태홍, 홍성철, 서원택, 최명석. 2002. 침엽수 잎으로부터 효율적인 정유 추출법 탐색 및 정유 성분 분석. 한국생물공학회지 17:357-364.
- 윤병선, 남기택, 김창원, 강창원. 1996. 육계 사료 내 마늘의 첨가가 육계의 생산성과 HMG-CoA reductase에 미치는 영향. 한국가금학회지 23:129-134.
- 이정호, 김규식, 신승오, 조진호, 진영걸, 김인호. 2007. 산란계 사료 내 잣 부산물의 첨가가

산란율, 계란 품질, 혈청 콜레스테롤 및 난황 내 총 콜레스테롤과 지방산 함량에 미치는 영향. 한국가금학회지 34:223-229.

- 이종택. 2014. 사료첨가제 제조기술과 시장동향 분석. 한국콘텐츠학회 2014 추계종합학술대회 409-410.
- 임용숙, 박경남, 백만중, 이신호. 2001. 병원성 미생물에 대한 소나무 추출물의 항균효과. 농산물저장유통학회지 8(4):462-468.
- 최지훈, 최운상, 김학연, 김현욱, 김진만, 김천제. 2010. 유럽 및 오세아니아의 기능성 축산물과 식육제품에 대한 운영현황 및 관리방안. 한국축산식품학회지 30(5):703-716.
- 한우 선호·비선호 부위별 가격차 최대 3배. 2011. 농민신문 (2011.07.20. 기사).
- 홍원택, 고경민, 이재곤, 장희진, 곽재진. 2002. 소나무 잎 추출물의 휘발성 성분. Journal of Korea Society of Tobacco Science 24:53-59.

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

과제명	친환경 기능성 사료첨가제 개발을 통한 웰빙 원료육의 생산 및 산업화		
주관연구책임자	최운재	주관기관	서울대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
면역증강 기능성 생균제 생산 기술	미국	80%	70%('13) → 95%('15)	95%	
생리활성 기능성 물질 활용 축산물 생산	유럽	70%	70%('13) → 90%('15)	90%	
농림수산물부산물 활용 친환경 사료	일본	80%	80%('13) → 100%('15)	100%	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	항생제대체 복합 미생물 생균제	농림수산물부산물 이용 사료첨가제	마늘부산물 이용 사료첨가제
Keyword	probiotics, antibiotics alternative, feed additive	feed additive, aquacultural by product, agricultural by product, livestock animal	garlic, feed additive
검색건수	1539('13) → 1687('15)	43('13) → 65('15)	169('13) → 185('15)

유효특허건수		129('13) → 142('15)	11('13) → 19('15)	14('13) → 18('15)
핵심특허 및 관련성	특허명	Delivery of disease control in aquaculture and agriculture using microbes containing bioactive proteins	Reduction or elimination of microbial growth and biofouling of salted wet biomass byproducts	흑마늘을 주재료로 하는 사료첨가제 제조방법 및 이에 의해 제조된 흑마늘을 주재료로 하는 사료첨가제 A manufacturing process of additive using black garlic
	보유국	US	US	KR
	등록년도	출원, 2012	출원, 2007	출원, 2010
	관련성(%)	70%	50%	90%
	유사점	생균제를 이용한 질병관리	bacterial control	마늘이용 사료첨가제
	차이점	bioactive protein	biofouling	마늘을 발효한 흑마늘이용
핵심특허 및 관련성	특허명	A farm animal feed product with probiotic enterococcus bacteria	Improved additive for livestock feeds	마늘 줄기를 함유하는 동물용 사료첨가제 및 그 제조 방법 Feed additive compositions containing garlic stems for animal and method thereof
	보유국	EP	EP	KR
	등록년도	출원, 2003	출원, 2011	출원, 2011
	관련성(%)	80%	70%	100%
	유사점	생균제효과	feed additive for live stocks	마늘부산물 이용 사료첨가제
	차이점	Enterococcus bacteria 사용	광범위한 내용을 다룸	없음
핵심특허 및 관련성	특허명	병원성 미생물의 항균활성을 가진 신규한 유산균과 유기물분해 활성을 갖는 신규 유용 미생물을 유효성분으로 함유하는 가금류용 발효사료 첨가제 조성물 Poultry fermented additive feed composition containing the novel Lactic acid bacteria having anit-pathogenic microorganism and Organic matter decomposition activity microorganism	버섯 부산물을 이용한 저콜레스테롤 사료 첨가제 및 그의 제조 방법 Animal feed additive with mushroom byproducts and process for preparation thereof	흑마늘 박 및 흑마늘 엑기스를 포함하는 어류 또는 가축용 사료 및 그의 제조 방법 A fish or livestock feed including Black garlic' husk and essence and manufacturing method thereof

	보유국	KR	KR	KR
	등록년도	출원, 2014	출원, 2013	출원, 2012
	관련성(%)	80%	90%	80%
	유사점	생균제의 항균 효과	농업부산물 이용	마늘이용 사료첨가제
	차이점	가금류용 발효사료	저콜레스테롤 사료첨가제	마늘을 발효한 흑마늘 엑기스 및 흑마늘 박 이용

개발기술명		친환경 기능성 축산물	생리활성 사료첨가제
Keyword		eco-friendly, functional animal product	physiological active substance, feed additive, animal product, 생리활성물질, 사료첨가제, 축산물
검색건수		298('13) → 358('15)	344('13) → 580('15)
유효특허건수		3('13) → 8('15)	97('13) → 120('15)
핵심특허 및 관련성	특허명	흑돈의 고품질화 및 브랜드 돈육 생산을 위해 허브를 활용한 기능성이 강화된 사료 Functional enhanced feed to produce the black pig meat by using herbs	항생제 대체효과가 있는 뽕나무가지 유래 레스베라트롤 함유 사료첨가제, 사료조성물 및 그 급여방법 Feed additive including resveratrol from mulberry stem as a antibiotic alternative and its feeding method
	보유국	KR	KR
	등록년도	출원, 2010	출원, 2008
	관련성(%)	90%	100%
	유사점	친환경 사료를 통한 고품질 기능성 축산물 생산	생리활성물질 이용 사료첨가제
차이점	콜레스테롤 수치감소	없음	
핵심특허 및 관련성	특허명	microorganisms having odor control activity and uses thereof	Microbially-expressed thermotolerant phytase for animal feed
	보유국	US	US
	등록년도	출원, 2006	출원, 2009
	관련성(%)	40%	50%
	유사점	생균제를 이용한 사료첨가제로 사용가능	생리활성물질 이용 사료첨가제
차이점	odor control microorganism	성장촉진효과	
핵심특허 및 관련성	특허명	천연 추출물이 포함된 가축사료 첨가제를 이용한 축산 방법 Livestock Method using Additive for Stock Feed with Natural Extract	공액 리놀레인산 또는 그의 유도체를 함유하는 리포솜을 포함하는 사료 조성물 feed composition comprising liposomes containing conjugated linoleic acid or its derivative
	보유국	KR	KR
	등록년도	출원, 2010	출원, 2009
	관련성(%)	80%	100%
	유사점	친환경 사료첨가제를 통한 친환경 고품질 안전 축산물 생산	생리활성물질 이용 사료첨가제
차이점	잣나무 인편 등 나무유래 천연 추출물 추출	없음	

1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미

- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	Worldwide
논문 DB	NCBI (National Center for Biotechnology Information), Google scholar
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록, 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명	항생제 대체 복합미생물 생균제	생균제 생산 공정 최적화
Keyword	<i>antibiotics alternative, probiotics</i>	<i>optimize mass product probiotics</i>
검색건수	7905('13) → 33,300('15)	2725('13) → 15,700('15)
유효논문건수	73('13) → 150('15)	5('13) → 20('15)
핵심논문 및 관련성	논문명	A direct fed microbial containing a combination of three-strain Bacillus sp. can be used as an alternative to feed antibiotic growth promoters in broiler production
	학술지명	Journal of Applied Animal Nutrition
	저자	Yueming Dersjant-Li et al.
	게재년도	2013
	관련성(%)	80%
	유사점	Broiler chicken에 적용가능한 probiotics를 이용한 tablet실험
핵심논문 및 관련성	논문명	Modelling Growth and Bacteriocin Production by Lactobacillus plantarum BC-25 in Response to Temperature and pH in Batch Fermentation
	학술지명	Applied Biochemistry and Biotechnology
	저자	Kang Zhou. et al.
	게재년도	2015
	관련성(%)	65%
	유사점	유산균에서 항균 박테리오신 생산 공정 최적화
핵심논문 및 관련성	논문명	Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an Eimeria challenge
	학술지명	Poultry Science
	저자	Miranda M. Ritzi et al.
	게재년도	2014
	관련성(%)	80%
	유사점	Broiler chicken에 적용가능한 probiotics을 이용하여 생균제로써의 효과 검증
핵심논문 및 관련성	논문명	Purification of Bacteriocin produced by <i>Lactobacillus pentosus</i> RL2e isolated from fermented cow milk of Kinnaur region of Himachal Pradesh
	학술지명	International journal of food and fermentation technology
	저자	BhallaTek Chand. et al.
	게재년도	2015
	관련성(%)	55%
	유사점	생균제의 항생물질 생성 능력을 최대화하기 위한 최적 조건 탐색
핵심논문 및 관련성	논문명	Effects of feeding Bacillus subtilis to heat stressed broiler chickens with or without an antibiotic growth
	학술지명	International journal of food and fermentation technology
	저자	Miranda M. Ritzi et al.
	게재년도	2014
	관련성(%)	80%
	유사점	한가지 병원균의 방어외에 복합 생균제를 이용하여 다양한 병원균에 효과적인 복합생균제 연구
핵심논문 및 관련성	논문명	Mass production을 위해 온도 이외의 다양한 요소를 확인하여 생산 공정 최적화를 연구
	학술지명	International journal of food and fermentation technology
	저자	Miranda M. Ritzi et al.
	게재년도	2014
	관련성(%)	80%
	유사점	생균제의 항생물질 생성 능력을 최대화하기 위한 최적 조건 탐색
핵심논문 및 관련성	논문명	Improvement of cell mass production of Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus WICC-B-02: A newly
	학술지명	International journal of food and fermentation technology
	저자	Miranda M. Ritzi et al.
	게재년도	2014
	관련성(%)	80%
	유사점	생균제의 항생물질 생성 능력을 최대화하기 위한 최적 조건 탐색

		promoter	isolated probiotic strain from mother's milk
학술지명		Asian Journal of Medical and Biological Research	Journal of Applied Pharmaceutical Science
저자		Bibek Chandra Roy et al.	Elsayed A. Elsayed et al.
게재년도		2015	2014
관련성(%)		50%	80%
유사점		단일 균종의 probiotic을 활용한 생균제로써의 효과를 검증	probiotic potential을 가지고 있는 유산균주를 동정하고 유산균주의 대량 생산 공정을 확립하기 위한 연구 수행
차이점		Heat stress를 저감할 수 있는 균주외에 다양한 균주를 최적화하여 broiler의 육량증진 및 다양한 이점에 초점을 맞춘 연구	단일 균주 뿐만이 아닌 여러 축종별 맞춤형 생균제 개발을 위한 생산 공정 개발 및 산업화
기술명		생리활성 사료첨가제 개발	기능성 축산물 개발
Keyword		<i>Physiological active substance feed additive</i>	<i>functional animal product</i>
검색건수		489('13) → 11,800('15)	1099('13) → 24,000('15)
유효논문건수		12('13) → 95('15)	153('13) → 120('15)
핵심논문 및 관련성	논문명	Impact of a Novel Phytase Derived from <i>Aspergillus nidulans</i> and Expressed in Transgenic <i>Lemna minor</i> on the Performance, Mineralization in Bone and Phosphorous Excretion in Laying Hens	Effect of feeding CLA on plasma and granules fatty acid composition of eggs and prepared mayonnaise quality
	학술지명	Pakistan Veterinary Journal	Food Chemistry
	저자	Mrinmoy Ghosh et al.	Sara Elizabeth Shinn et al
	게재년도	2015	2016
	관련성(%)	70%	90%
	유사점	사료첨가제로써 phytase를 이용함으로써 산란계의 영향을 연구하고 이로써 사료첨가제로써의 가능성을 제시	CLA를 함유하는 기능성 계란 및 계란 품질 향상을 위한 연구
차이점	생리 활성을 가진 물질의 최종 첨가 수준까지 확인하여 즉각적인 산업화가 가능하도록 함	단순히 CLA를 첨가한 후 계란의 구성뿐 아니라 다양한 기능성 물질의 최종 첨가 수준을 결정하는 산업화 수준의 연구	
핵심논문 및 관련성	논문명	Effects of Novel Feed Ingredients and Additives on Feed Quality and Broiler Performance	Attempts to increase inosinic acid in broiler meat by using feed additives
	학술지명	ProQuest Dissertations Publishing	Poultry Science
	저자	Ashley Marie Evans	X. F. Wang et al.
	게재년도	2014	2014
	관련성(%)	60%	50%
	유사점	생리활성 물질 및 phytase등을 탐색하여 축산업에의 사용 가능성을 연구	다양한 기능성 물질을 첨가하여 기능성 닭고기 생산
차이점	다양한 생리활성 사료첨가제 후보군들을 생리활성 및 사료형태 개선을 위한 효과 검증진행	Betaine 등의 기능성 물질을 축산물에 적용하여 동물의 생리적 특성 검증 뿐 아니라 직접적인 기능성 물질을 함유한 축산 식품 생산	
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of Dietary Supplementation of Garlic (<i>Allium Sativum</i>) Powder as Herbal Feed Additives on Growth Performance in Broilers	Effects of dietary supplementation of guanidinoacetic acid and combination of guanidinoacetic acid and betaine on postmortem glycolysis and meat quality of finishing pigs
	학술지명	Journal of animal food science and technology	Animal Feed Science and Technology
	저자	Rinkesh Makwana et al.	Y. Liu et al.

	계재년도	2014	2015
	관련성(%)	80%	80%
	유사점	생리활성물질인 garlic powder을 이용한 양계에서의 사용 가능성을 검정	Betaine 등 에너지를 첨가한 사료 효율 및 육질 검정
	차이점	마늘부산물 이외의 다양한 생리활성 물질 후보군을 선정하고 이들의 시너지효과를 검정하며 다양한 축종에서 확인하는 연구	산업화가 가능한 기능성 물질들을 적용하여 동물의 생리 활성 증진을 도모하고 이후 축산물에 기능성까지도 부여하도록 하는 연구
기술명		농업부산물을 이용한 사료첨가제 개발	수산업부산물을 이용한 사료첨가제 개발
Keyword		<i>agricultural by-product feed additive</i>	<i>marine by-product feed additive</i>
검색건수		155('13) → 4,390('15)	39('13) → 1,420('15)
유효논문건수		27('13) → 50('15)	3('13) → 10('15)
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of citron b-product fermented with beneficial bacteria as a funtional feed additive for Korean native steers	Effect of Dietary Marine Microalgae (Schizochytrium) Powder on Egg Production, Blood Lipid Profiles, Egg Quality, and Fatty Acid Composition of Egg Yolk in Layers
	학술지명	African journal of microbiology research	Asian-Australasian Journal of Animal Sciences
	저자	Ji-Ae Hwang et al.	J. H. Park et al.
	계재년도	2014	2015
	관련성(%)	70%	80%
	유사점	농산물 부산물을 이용한 사료첨가제로써 축산물에 적용	수산 부산물을 이용하여 산란계 사료 첨가제로 사용
	차이점	산업화가 쉽게 가능한 부산물을 사용한 친환경적인 사료첨가제 개발 및 축산 적용 가능성	사료첨가제로 사용하기 위한 공정 단축 및 생산 단순화를 기반으로 합과 동시에 더욱 접근성이 용이하고 수량이 충분한 수산업 부산물을 신규 동정 및 효과 검정
핵심논문 및 관련성	논문명	Fermented Apple Pomace as a Feed Additive to Enhance Growth Performance of Growing Pigs and Its Effects on Emissions	Influence of level and duration of feeding polysaccharide (laminarin and fucoidan) extracts from brown seaweed (Laminaria digitata) on quality indices of fresh pork
	학술지명	Agriculture	Meat Science
	저자	Chandran M. Ajila. et al.	N.C. Moroney. et al.
	계재년도	2015	2015
	관련성(%)	50%	50%
	유사점	농산물을 이용한 사료첨가제 개발	해조류를 원료로 사용하여 가축의 육질 증진
	차이점	공정 단축을 통한 부산물을 활용하여 사료첨가제로써의 이용성 검정 실험	육질 뿐 아니라 성장 촉진을 유도할 수 있는 수산물을 사료첨가제로써 탐색 및 적용
핵심논문 및 관련성	논문명	Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination	In vitro screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation
	학술지명	Journal of the Science of Food and Agriculture	Journal of the Science of Food and Agriculture
	저자	Alejandra Londero. et al.	Alejandro Belanche. et al.
	계재년도	2014	2015
	관련성(%)	60%	70%
	유사점	농업 부산물을 이용하여 동물 질병 예방	seaweed등 수산물 추출물에서 사료첨가제로써의 기능을 <i>in vitro</i> test로 수행

	차이점	농업 부산물을 이용한 사료 원료의 실제 사용 가능성과 사용 수준까지 검정된 산업화를 목표로 하는 연구	성장 촉진을 유도할 수 있는 수산 부산물을 탐색하고 이를 <i>in vivo</i> test를 거쳐 적용할 수 있는 산업화 수준까지 연구
--	-----	----------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 생균제 시장은 배합사료 내 항생제 사용 중단과 정부의 친환경 축산 육성 및 안전 축산물 생산에 발 맞춰 매년 성장세를 보이고 있으며, 시판중인 생균제는 크게 동물용의약품과 사료첨가제를 목적으로 사용되는 보조사료 (사료첨가제)로 대별된다. 동물용의약품의 경우에는 ‘동물용의약품 취급규칙 (농림부령) 제 5조’에 의거 안전성과 유효성에 대한 기술적인 검토과정을 거쳐 판매를 허가하고 있으며 약 90여종이 유통되고 있다. 현재 소, 돼지, 닭에 적용되는 동물용의약품으로 허가된 주요 생균제제의 생균종류는 유산균, 효모, 바실러스 등이 있다.



그림 89. 국내 동물약품시장 사료첨가제 매출 현황 (출처: 한국동물약품협회)

국내 동물용의약품 시장은 축산업의 환경규제 및 사용규제 강화 등으로 인해 침체 국면에 빠져있어 동물용의약품 내수시장 총 매출액은 2014년 말 5,959억 원으로 지난 2012년에 비해 15억 원이 감소하였다. 위 그림은 국내 동물약품시장에서 사료첨가제의 매출현황을 나타낸 것으로 2011년 이후 항생제 사용 규제와 더불어 사료첨가제로 사용되는 동물용의약품 시장이 계속적으로 감소하는 것으로 나타난다. 특히 항생제의 경우 2011년 성장 촉진용 항생제 사용이 전면 금지된 이후 지속적으로 감소하고 있으며 [936 톤('12)→ 820 톤('13) → 635 톤('14)], 이를 대체하기 위한 방안으로 생균제가 각광을 받고 있으며 그 시장은 더욱 성장할 것으로 전망

된다. 단미사료협회 통계에 따르면 지난 5년간 국내 생균제 판매량은 지속적으로 성장하고 있으며, 연 평균 3.2%의 성장률을 보이고 있다.

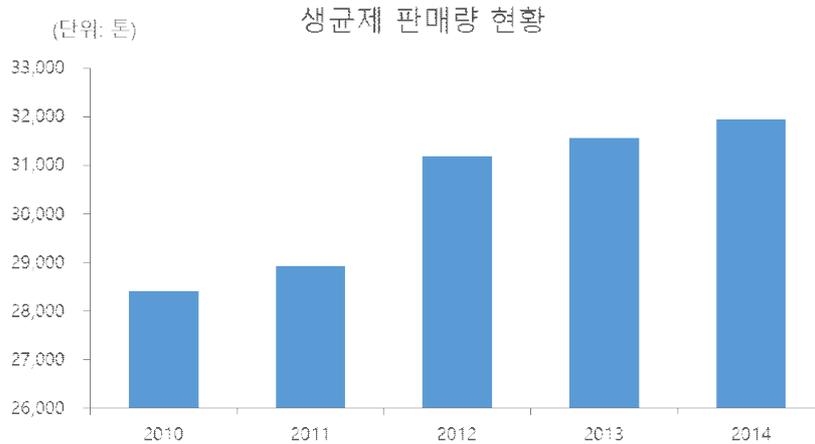


그림 90. 국내 생균제 판매량 현황 (출처: 단미사료협회)

전반적으로 항생제 대체제를 개발하는 회사들은 아래 자료에서처럼 매출 경향이 감소하는 추이를 보이며, 이는 항생제 대체제의 개발이 항생제의 매출액의 감소를 따라가지 못하기 때문에 발생한다. 여러 항생제 대체제 중 생균제는 오래전부터 장내의 이상 발표, 설사, 소화불량, 변비 감소 등에 효과가 이전되어 인체용으로 사용되어 왔는데 최근에 와서는 동물의 장내 환경 개선, 생산성 개선, 설사발생 감소, 항생제 대체제 등의 목적으로 사료에 많이 사용되고 있다. 국내에 항생제 대체 생균제를 개발하는 회사로는 진바이오텍, 이지바이오, CJ 사료, 농협, 쓸주바이오, 바이오&그린텍, 네오그린 등이 있다. 대체제로는 박테리오파지, 생균제, 단미·보조사료 등이 있으며, 이 분야에 대한 더 많은 연구와 제품생산이 필요할 것이다.

[항생제, 대체제 매출현황]

(단위: 백만원)

구분	2012년 3분기	2011년 3분기	2011년	2010년	2009년
항생제	7,585	8,768	11,504	16,474	17,310
박테리오파지	2,276	1,152	1,901	21	0
생균제	507	2,027	2,287	942	3,355
단미, 보조사료	1,685	1,203	1,703	3,063	448
항생제 대체제 합계	4,467	4,381	5,892	4,025	3,803
합계	12,053	13,150	17,395	20,499	21,113

그림 91. 항생제, 대체제 매출현황 (출처: CTC바이오)

농림수산물부산물물을 이용한 시장은 산업화 되어 있는 것이 없으며 대부분이 농장 자체적으로 부산물을 이용하여 급여하고 효과가 있다고 과대 포장하여 광고를 하는 식이다. 그렇기 때문에 과학적인 근거를 제시하기 위하여 효과검정 실험을 할 필요가 있다. 2012년 농촌진흥청에서 포도부산물을 사료첨가제로 활용할 경우 젖소에서 산유량이 하루 최대 1.9 kg까지 증가하였으며, 체세포수는 32만 1천/ml에서 7만 4천/ml로 줄어 생산량뿐만 아니라 품질도 개선되었다는 보고가 있으며, 분석결과 한 마리당 연간 29만 원의 수익이 발생할 것으로 보고 있다 (농촌진흥청,

2012).

요즘 사람들의 웰빙에 대한 욕구가 높아짐에 따라 건강기능성 식품의 소비 추이가 증가하고 있다. 이를 반영하듯 식품의약품안전처의 2015년도 자료에 의하면, 2014년에 비해 건강기능식품의 국내 시장 규모는 1조 4,946억 원으로 2012년의 시장 규모인 1조 3,490억 원 대비 10.8%가 증가하였다. 또한, 건강기능식품 수출액은 2012년도에 585억 원에 비했던 것으로 비해 2014년은 670억 원으로 14.5%가 증가된 것으로 나타났다.

국내 건강기능식품 생산현황 (2009~2013)

구분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)*	생산량(톤)
2009	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
2010	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
2011	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
2012	14,091	34,599	13,507	33,735	584	864
2013	14,820	31,446	14,066	30,490	754	956
증감률 (*13/12, %)	5.2	△9.1	4.1	△9.6	29.1	10.6

출처: 식품의약품안전처, '건강기능식품 생산실적 분석결과(2013)

* 1\$ = 1,095원(2013)

그림 92. 국내 건강기능식품 생산현황 (출처: 식품의약품안전처, 2013)

건강기능식품의 연도별, 품목별 상위 품목의 생산액은 홍삼제품이 5,869억 원으로 전체의 39.6%를 점유하며 1위를 차지했고, 그 다음으로는 개별인정형 제품 (2,324억 원), 비타민 및 무기질 (1,747억 원), 프로바이오틱스 (804억 원), 알로에 제품 (628억 원)의 순이었다. 특히 프로바이오틱스 제품은 804억 원으로 전년대비 55.2%나 늘어나 괄목할만한 성장세를 나타내며 상위 5개 품목에 포함되었다. 그러므로 축산물에 있어서도 건강기능성에 대한 제품을 생산하여 우리나라 축산물의 차별화를 도모하여야 하며, 그 중 높은 성장세를 보이는 프로바이오틱스 시장이 더욱 성장할 것으로 전망된다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

2011년을 기준으로 동물약품 사업부 분야에서 동물 사료첨가제 비율은 42.7%로 항목 내 다른 세 분야인 동물 진단 (animal diagnostics), 동물 의약품 (animal biologics), packed pharmaceuticals의 세 분야보다 월등히 높은 것으로 조사되었다 (Transparency Market Research, 2011). 세계 사료첨가제 시장은 2013년 조사에 의하면 127억 달러 규모인 것으로 조사되었으며 시장 성장률은 연평균 5.1%를 기록하며 2019년에는 173억 달러 규모로 성장할 것으로 예상된다 (Frost and sullivan, 2013).

현재 세계 사료 첨가제 3대 시장은 미국, 유럽과 아시아로 전세계 시장의 75% 이상을 차지하고 있고, 그 중 미국이 가장 큰 규모를 가지고 있다. 일본, 멕시코 그리고 브라질 같은 나라에서도 인구 1인당 소득이 증가하면서 고기 소비량이 증가하는 추세에 있고, 항생제 및 성장촉진제 사용에 대한 국가 방침의 변화에 따라 사료첨가제 시장 규모는 지속적으로 증가할 것으로 예상된다 (Lee, 2013).

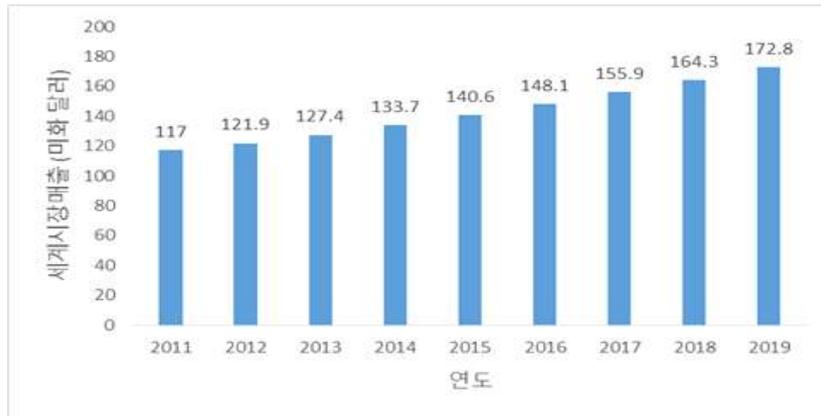


그림 93. 세계 사료첨가제 시장 규모 (Frost and Sullivan, 2013)

세계적인 동물 사료첨가제 회사로는 네덜란드의 DSM, 독일의 BASF SE, 덴마크의 Evonik 와 Chr. Hansen A/S, 일본의 Ajinomoto Co. Inc. 그리고 미국의 Lextron Inc., Archer Daniels Midland Company와 Cargill Inc. 등이 있다. 이들 기업은 증가하고 있는 축산물 소비 수요에 부합하는 고품질 축산물 생산을 위해 새로운 기술과 제품의 혁신을 이루어나가고 있으며, 이 중 유럽의 회사들은 증가하는 아시아인의 축산물 수요를 맞추기 위해 아시아태평양 지역에 많은 투자를 함으로써 새로운 제품을 개발하려 노력하고 있다.

A BROAD CLASSIFICATION OF BASIC ANIMAL FEED ADDITIVES

Nutritional feed additives	Non-nutritional feed additives
Amino acids	Antibiotics
Minerals	Hormones
Vitamins	Enzymes
	Immunomodulators
	Probiotics & Prebiotics
	Feed acidifiers

Source: Transparency Market Research

그림 94. 사료첨가제 분류 (출처: Transparency Market Research)

위 자료에서와 같이 영양적 사료첨가제와 비영양적 사료첨가제로 나누어 여러 종류의 자원을 이용하려는 연구가 진행 중이며, 주사제, 펠렛, 액상, 파우더 등의 다양한 형태로 가축에게 공급하는 방식을 취하고 있다.

**GLOBAL FEED ADDITIVES MARKET REVENUE, BY PRODUCTS,
2009 – 2016 (\$MILLION)**

Product	2009	2010	2011	2016	CAGR % (2011-2016)
Antibiotics	3,300.0	4,185.0	4,400.0	5,120.4	3.08
Vitamins	1,080.0	1,536.0	1,559.0	1,685.0	1.57
Antioxidants	133.0	138.0	142.0	175.0	4.27
Amino Acids	3,748.2	3,973.1	4,211.4	5,250.0	4.51
Feed Enzymes	442.0	552.5	585.7	740.0	4.79
Acidifiers	938.6	1,150.0	1,207.5	1,610.0	5.92
Others (Trace minerals, NPN and so on)	2,358.3	3,465.5	3,494.4	4,214.6	3.82
Total	12,000.0	15,000.0	15,600.0	18,795.0	3.80

그림 95. 세계 사료첨가제 시장 가치 현황 및 전망 (Market and Market, 2009)

위 표와 같이 사료첨가제 분야에서 시장 가치가 높은 분야는 항생제, 아미노산 제제, 비타민과 산미제, 효소제 그리고 향산화제 순서인 것으로 조사되었다. 이 중 아미노산 제제의 시장규모는 육류 소비 증가와 소비자의 고품질육류에 대한 소비 성향이 나타나면서 꾸준히 증가할 것으로 예상된다 (Market and Market, 2009).

또한 현재까지 항생제 시장의 규모가 사료첨가제 시장의 큰 부분을 차지하고 있으나 세계적으로 항생제 사용 금지 및 동물 복지를 고려한 친환경 축산의 추세에 있어 생균제 (효모제) 시장이 2010년 기준 1,600만 달러에서 2017년 7억 3,000만 달러 규모로 현재 가장 큰 규모인 아미노산 제제의 2010년-2017년간 예상되는 약 2배의 성장률과 비교하였을 때, 40배 가까이 성장할 것으로 예상된다 (BCC Research, 2012).

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향 (제품의 특징, 대상 등)

○ 육가공 제품의 프리미엄화 가속

- 저급제품 (프레스 햄)의 매출비중 하락
- 고급햄, 소시지 등 고급제품의 매출 비중 증가

○ 무항생제 사양 구현을 통한 친환경 축산물 생산

→ 복합 미생물 생균제 조성, 급여 제형, 가공방식 및 대량 생산의 최적화를 통한 효율적인 축종별 항생제 대체 복합 미생물 생균제 확립

○ 식품성분의 영양적 가치뿐 아니라 개별물질의 건강증진에 대한 특별효과가 구명되고 있음
→ ALA, 비타민, betaine, CLA 등의 기능성 물질이 축적된 축산물의 생산

○ 폐기되는 농림수산물부산물의 효율적인 자원화 방안 제시 및 신산업 분야 창출
→ 마늘, 미역, 피톤치드 등의 농림수산물부산물을 이용한 동물사료 생산

2) 산업화를 통한 기대효과

○ 고부가 축산물을 생산에 따른 축산 농민의 소득 증가

본 연구의 목표는 육제품을 판매하는 기업의 이익 창출에 그치지 않는다. 웰빙 원료육을 생산하는 것은 제품의 판매자뿐만 아니라 생산자에게도 고부가 가치를 창출하기 때문이다. 따라서 본 연구는 축산 농민의 소득을 증가시키는 역할을 할 것으로 기대되며, 나아가 축산업 발전을 견인하는 중요한 요인이 될 것으로 보인다.

○ 웰빙 원료육 생산에 따른 축산물 자급률 제고

건강에 대한 관심이 증가하고 웰빙을 추구하는 소비자층이 증가함에 따라 기능성 식품에 대한 수요가 확대되고 있다. 따라서 본 연구를 통해 개발 및 산업화된 웰빙 원료육에 대한 수요가 많을 것임을 예상할 수 있다. 따라서 본 연구는 축산물 자급률을 제고시키는 효과를 가져올 것으로 전망된다.

○ 수출 경쟁력 향상에 따른 축산물 수출량 증진

세계 자유무역 협정 (FTA)에 의한 농축산물 시장개방에 따른 축산선진국과의 무한경쟁은 국내 축산업의 산업 경쟁력에 의한 위기의식 고조로 이어졌다. 그러나 본 연구를 통한 안전성과 품질이 증명된 웰빙 원료육의 생산은 농축산물 시장개방을 위기가 아닌 기회로 만들 수 있다. 수출 경쟁력 향상된 고부가 축산물의 생산은 축산물 수출량을 증진 시키는 효과를 가져올 것으로 예상된다.

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 2013년에 비해 2015년의 경우 항생제 대체 복합 미생물 생균제, 농림수산물부산물 이용 사료첨가제, 친환경 기능성 축산물 및 생리활성 사료첨가제 관련 특허가 증가하였다. 이는 전세계적인 친환경·기능성 축산물에 대한 수요 증가 현황에 따른 것이라고 볼 수 있다. 그러나 여전히 기존의 특허들은 항생제를 대체할 수 있는 생균제를 이용한 친환경 사료첨

가제 또는 농림수산부산물을 이용, 생리활성물질을 제공하는 기능성 사료첨가제 중 한 분야에만 집중되어 주로 등록되고 있다. 하지만 본 연구에서는 “바이오사료첨가제 개발사업단”과제의 연구 성과를 응용하여 한 분야에 한정하지 않고 생균제 등을 이용한 친환경 사료첨가제를 통해 친환경 축산물을 생산함과 더불어 농수산부산물을 이용한 기능성 축산물을 개발하는 데에 집중하였다. 이와 같은 연구들을 이용, 활용하여 친환경-기능성-웰빙 축산물을 생산, 공급하고 이러한 친환경-기능성-웰빙 축산물과 가공품들을 산업화하기 위한 생균제의 대량생산체계를 개발, 기능성 부산물 혹은 사료첨가제의 최적 조합을 도출과 같은 산업화에 초점을 맞춘 연구를 이어나갈 것이다.

이와 더불어 “바이오사료첨가제 사업단”과제의 연구성과를 이용해 개발된 (주)에스테어의 Milk Plus, Yogurt Plus 그리고 (주)에스엔마니커의 닭터의 자연과 같은 기능성 제품 및 친환경 제품이 시판된 것에 이어 본 연구에서도 추가적인 제품을 산업화하기 위한 연구를 진행하였다.

2) 논문분석 측면

- 기존 2013이전까지의 논문들은 대개 각 생균제가 어떤 균주 혹은 각 농수산부산물 및 생리활성물질이 어떤 축종에 대해서 효과를 갖는지에 관한 연구로 집중되어 있었다. 또한, 연구의 폭이 적은 편에 속해있었는데, 2010년 이후로부터 최근까지 점점 복합 미생물 생균제 및 복합 사료첨가제 등의 장점을 극대화시키기 위한 복합시너지 효과에 대한 많은 연구가 시작되는 추세이다. 또한, 한 축종으로 한정되지 않고 여러 축종에서의 생리적 기능을 극대화하기 위한 논문이 나오고 있다. 연구가 시작되기 이전 매우 적은편수의 논문들이 기능성사료첨가제분야에서 확인될 수 있었던 반면, 연구가 시작된 이후 생균제 분야의 연구뿐만 아니라 각종 생리활성 물질 및 부산물을 이용한 논문들이 각종 축종분야에서 빠르게 증가하고 있는 추세이다. 기능성 사료첨가제 시장의 중요성이 커지고 있는 만큼 이와 맞물리는 결과로 보인다. 하지만 아직까지 생균제 등의 생산을 늘리기 위한 대량생산 방법 및 생리활성물질 등을 이용한 사료첨가제 등의 제품개발과 관련되어 있는 논문은 매우 적은 실정이며, 생리활성물질의 비용, 방법 등 아직은 산업화까지 고려하는 측면은 부족하다. 이번 연구에서는 이러한 최근 트렌드와 맞물리게 복합 미생물 생균제, 생리활성물질 및 농수산부산물을 이용한 사료첨가제의 개발을 위한 연구를 진행하였다. 본 연구에서 개제한 논문에서는 생리활성물질을 복합적으로 사용하여, 최적의 조성으로 가장 극대화된 효과를 보이는지 확인하는 실험을 진행하였고, 실제 생리활성물질이 축산물로의 전이율을 높이는 연구가 완료되었다. 이렇게 개발된 사료첨가제를 급여한 기능성 친환경 축산물을 생산하고 이를 브랜드화를 시켰다. 따라서 본 연구에서는 기존의 논문들과 같이 사료첨가제를 개발하는 것과 더불어서 복합적인 친환경 기능성 사료첨가제를 개발함과 동시에 친환경-기능성-웰빙 축산물의 생산에 대한 연구를 진행하여 이러한 성과를 SCI급 학술지에 게재하였다.

3) 제품 및 시장분석 측면

○ 국내는 물론 세계 축산업의 흐름은 지속가능한 친환경 축산업으로 나아가고 있다. 한국의 경우는 특히 과거 급속한 양적 성장에 치중해왔기 때문에 이러한 흐름의 변화가 더욱 급격하게 나타나고 있다. 미래 축산의 목표 중 하나로 서구권에서는 이미 항생제 사용이 금지되었으며, 한국도 2011년 7월 이후 성장축진을 목적으로 한 항생제 사용의 금지를 추진하였다. 국내 및 국외시장 분석결과 현재 사료 첨가제 중 가장 큰 부분을 차지하고 있는 아미노산 제제 외에도 항생제 대체제로 사용되는 생균제 (효모제)와 같은 분야의 수요가 크게 증가할 것으로 예상된다. 이러한 세계의 요구에 부합하기 위한 항생제 대체제의 개발 및 생산이 시급한 실정이라고 할 수 있다. 특히 사료첨가용의 경우 사용허가가 동물 의약품에 비해 간편한 보조 사료의 경우, 그 규모가 급격하게 성장할 것으로 기대된다. 생균제 이외에도 농림수산부산물을 이용하여 축산업에서 발생하는 부산물을 자원으로 이용하기 위한 노력이 이루어지고 있는데 농림수산 부산물 효과를 검증하여 첨가제를 개발함으로써 사료비를 절감하고 더불어 잠재적 환경오염을 감축할 수 있을 것으로 예상된다. 소비자의 입장에서는 과거 축산물의 양과 가격이 구매의 최우선시가 되던 시대에서 점차 축산물의 질과 축산물이 주는 부가 기능을 중요시하고 있는 추세이므로 ‘기능성’ 축산물 시장도 현재보다 크게 성장할 것이라 예상된다. 본 연구에서는 이러한 시장 분석을 바탕으로 농림수산부산물 및 생리활성물질을 이용한 사료첨가제를 개발하여 유용물질이 전이된 축산물을 생산함으로써 ‘친환경’에 더해 ‘기능성’을 부가한 축산물 즉, 친환경-기능성-웰빙 축산물의 산업화를 진행하였다. 본 과제에서 개발된 연구를 기업체에 기술이전을 통해서 (주)에스테어리의 ‘Milk Plus’, ‘Yogurt Plus’ 그리고 (주)에스엔마니커의 ‘닭터의 자연’과 같이 산업화를 진행하였고, 본 연구 성과를 토대로 하여 앞으로도 지속적인 제품화가 이루어질 수 있도록 할 것이다.

6. 참고문헌

- 1) All about feed magazine, The poultry site, ICIS, Primary Interviews. 2009. Market and Market.
- 2) Animal Feed and Feed Additives Market - Global Industry Size, Market Share, Trends, Analysis, and Forecast 2011 - 2018, <http://www.transparencymarketresearch.com>.
- 3) CTC바이오: 증권신고서. 2013. CTC바이오.
- 4) Lee J. T. 2013. 사료첨가제 제조기술과 시장동향 분석: Analysis for Manufacturing Technology and Market Trend of Feed Additive. Korea Institute of Science and Technology Information.
- 5) Strategic analysis of animal feed ingredients market in North America. 2013. Frost and Sullivan.
- 6) 건강기능식품 생산실적 분석결과. 2013. 식품의약품안전처.
- 7) 단미사료협회: 판매현황. 2015. 단미사료협회.
- 8) 동물약품통계. 2015. 한국동물의약품협회.
- 9) 세계 배합사료시장: 기술발전과 시장변화. 2012. BCC Research.
- 10) 포도부산물을 활용한 젖소 사료첨가제 개발. 2012. 농촌진흥청.

주 의

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