

발간등록번호

11-1541000-001218-01

곤충유래 기능성 사료소재 개발

Development of functional animal feed
materials from insect resources

한국생명공학연구원

농림수산식품자료실



0004536

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농림수산식품 연구개발사업” 과제(세부과제 “곤충유래 기능성 사료소재 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 30 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원
주관연구책임자 : 손 광 희
세부연구책임자 : 손 광 희
연 구 원 : 박 호 용, 김 성 욱, 정 태 숙
" : 오 현 우, 조 한 영, 김 도 영
" : 기 전, 김 효 정, 강 지 현
" : 남 미 경, 송 강 미, 송 민 규
" : 이 현 주, 이 화, 김 성 은
" : 한 중 민
위탁연구기관명 : 한경대학교
위탁연구책임자 : 남 기 택
위탁연구기관명 : 건국대학교
위탁연구책임자 : 김 법 균
위탁연구기관명 : (주)인섹트바이오텍
위탁연구책임자 : 신 동 하

요 약 문

I. 제 목 : 곤충유래 기능성 사료소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

<목적>

축산사료원료 소화흡수효율의 향상 및 동물건강을 위해 일반사료는 물론 난분해성 사료도 효과적으로 분해할 수 있는 곤충 및 관련 생물자원 유래의 고효율 효소 및 기능성소재를 이용한 친환경 동물사료첨가제를 개발, 사업화를 위한 원천기술을 확보함.

<필요성>

지구온난화 및 자원 고갈에 따른 녹색 기술 필요성:

온난화 및 기후변화 대응을 위한 바이오매스 자원의 활용성 제고 및 인구 거대국가의 식량자원 수요의 폭발로 촉발된 전 세계적 애그플레이션은 사료의 주원료로서 옥수수과 같은 양질의 단미사료 공급에 문제가 있음. 지구자원 활용의 균형적 배분 및 축산 사료업계의 채산성 및 경제성 확보를 위해 난분해성 원료를 포함한 저급 사료의 현장적용이 선택이 아닌 필수적인 시장 상황이 되었고 이는 대부분의 곡물 자원을 수입에 의존하는 국내에도 동일하게 적용되고 있음. 이로 인해 저급 사료 원료의 활용을 위한 분해 보조제의 산업계 도입이 필요하게 되어 선진국을 중심으로 효소 기반의 사료 첨가제 시장이 급성장하는 추세임.

선행과제와 연계한 고효율 효소 및 천연소재 자원의 원천기술화의 필요성:

대부분의 관련 기술 및 제품이 외국에 의존하는 국내 사료업계 상황에서 사료첨가제 기술의 국내 기술 개발은 절실한 필요성을 확보하고 있음. 당 연구팀은 다음의 두 가지 기술을 확보하여 이들 필요성에 대응함. 첫째, 생물자원의 섭식특성에 근거한 고효율 효소 개발의 선행과제를 통해서 목질부를 비롯한 난분해성 기질을 효과적으로 분해할 수 있는 생물자원의 활용 및 현장 적용 가능 역량을 충분히 확보하고 있으며, 둘째, 식물 천연물 기반의 유용 바이오소재의 기능 연구 및 활용소재의 발굴을 통해서 첨가제 주요성분을 구성할 수 있는 생물소재군을 확보하여 산업화에 대응하고 있음. 이를 활용한 후속 원천기술 개발은 국가 산업계의 대외 경쟁력 확보 및 가격 경쟁성 확보에 필수적이며 향후 기술 및 제품의 수출을 통한 시장 확대를 위해서도 매우 필요한 기반 기술 분야임.

III. 연구개발 내용 및 범위

곤충 등 생물다양성으로부터 분리한 미생물 자원을 이용한 고효율 효소 개발: 이전에는 사용치 않았던 저급의 사료 원료, 예컨대 곡물의 껍질 및 열매 이외의 지상부를 비롯한 농림 부산물은 반추성 가축 이외에는 그 활용이 거의 불가능하며 특히 어린 가축의 경우 그대

로 사용 에너지화는 사실상 불가능하여 소화보조제로서 효소를 활용하여 자원을 효율적으로 활용함.

효소제형의 보조 성분으로서 곤충 유래 또는 식물 천연물 유래의 기능성소재 등을 이용한 사료첨가제 및 기능보조제 개발 : 이들 난분해성 원료를 포함한 저급 사료원료는 분해의 어려움 뿐 아니라 영양학적 측면에서도 필수 성분의 부족을 초래하거나 분해 이용 스트레스로 인한 가축의 생리적 부진을 초래한다. 이의 보완을 위해서 곤충 유래 또는 식물 천연물 유래의 보조 소재의 적용을 위한 기술적 접근을 시도함.

축산 동물(양돈/양계) 사료소화흡수효율 개선용도의 효소 사료첨가제 개발 : 돼지 및 가금류는 비반추 동물로써 난분해성 사료 원료를 그대로 급이에 사용할 수 없고, 대부분 해외 수입된 '아비자임'등의 사료첨가제를 사용하는 영농형태를 가진다. 국내 생물공학 기술 수준에 비해 터무니없는 기술적 의존도를 개선하기 위해서 국내 생물자원 유래의 효소 및 천연물 관련된 선행기술을 현장에 적용하여 사료첨가제를 국내 원천기술로 구성함.

실제적인 대상 동물을 이용한 현장 사양실험을 통한 우수성 입증 자료 확보 : 이미 효소 및 천연물의 사업화를 추진하고 있는 전문기업(주인섹트바이오텍)의 제형화 기술을 통해 시험 제형을 구성하여 이를 두 군데의 현장 사양실험팀 (건국대, 한경대)을 활용하여 동물 수준에서의 사양실험을 통해 기술 개발 방향을 설정하고 향후 시장 경쟁성 확보, 제품 개발, 용도 개발을 위한 다양한 연구결과를 확보함.

기술이전 및 사업화를 통하여 국내외 관련시장에서 매출 실현 : 제품 구성 등록 등의 후속 절차를 통해서 당해 연도 혹은 후속년도에 시장 진출을 통해 시장 반응을 피드백하고 원천기술의 가치를 제고하여 기술 이전하여 본격 대량 생산 및 시장 진입을 시도함.

IV. 연구개발 결과

저급사료의 난분해성 장벽을 이루는 자일란 분해 미생물을 확보하였다. 우선 퇴비자원에서 분리된 HY-22는 고초균의 일종으로 효소 개질의 분자도구 및 산업용 균주 구성에 필요한 미생물 자원으로 배양조건은 탄소원으로 밀기울 (80메시 통과) 2.0%, 질소원으로 효소추출물 0.9%, 펩톤 0.9% 및 KNO_3 0.2%의 배지에 미량 성분으로는 마그네슘 이온과 올리브유를 첨가하여 229 unit/ml 의 XylC 효소를 생산할 수 있었다.

자일란 분해효소 XylC는 암모늄염 석출 및 2단계의 크로마토그래피 과정인 DEAE Sephadex A-50와 Superdex G-75을 거쳐 전기영동상 단일밴드로 정제하여 분자량을 확인하였다 (24 kDa). XylC는 버치우드 자일란을 기질로 최대의 활성을 나타내었으며 이때의 조건은 pH 6.5와 50°C였다. 이 효소는 트립토판 아미노산 잔기의 저해제인 수은 및 브로모숙신산에 의해 크게 활성이 줄어들었다. 효소 XylC는 귀리부산물, 버치우드 및 버치우드 자일란에는 활성을 보였으나 결정형 셀룰로스인 아비셀이나 만난을 함유한 로커서트빈검에서는 가

수분해 활성을 보이지 않았다.

베타 만난아제 유전자(1,272 염기)를 지렁이(*Eisenia fetida*)의 장에서 분리된 미생물 (*Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13)로부터 클로닝하여 대장균에서 발현하였다. 발현된 재조합 만난아제 (rManH, β -1,4-mannanase)는 분자량 44.0 kDa이었고 기존의 *Micromonospora* sp. β -1,4-mannosidase와 상동률 65%의 관련성을 보이는 GH5 패밀리에 속하는 효소로 밝혀졌다. 이 효소는 50°C와 pH 6.0의 조건에서 기질 만난에 대해 최대 활성을 보였으며, ivory nut mannan과 locust bean gum 기질에 대해 각각 14,711 IU mg⁻¹ 과 8,498 IU mg⁻¹ 의 최대의 비(比)활성을 나타내었으나, 구조적으로 관련이 없는 다당류 및 유도체인 mannobiose 나 *p*-nitrophenyl sugar derivatives에는 활성을 보이지 않았다. 만난아제 rManH는 ivory nut mannan, Avicel, chitosan과 chitin에는 강하게 결합하였으나, curdlan, insoluble oat spelt xylan, lignin, or poly(3-hydroxybutyrate)에는 결합치 않았다. rManH가 pH 6에서 최대활성을 보이는 특성으로 인해 액체 대량배양에 사용한 안전한 숙주의 활용성에 유리한 점이 있다고 판단된다. (예, Hemicell®, ChemGen Corp., USA; 송아지처럼 초식동물의 장내 효소 작용 조건과 유사한 GRAS (genetically recognized as a safe) 균주 활용.)

자일라나제와 만난아제를 이용한 복합효소제인 조아자임은 양돈 및 양계를 대상으로 현장 실험을 진행하여, 육계 및 산란계 사료의 효율을 증가시켰으며, 장내 암모니아 감소에도 기여하였음을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

<연구성과>

관련 논문 2편, 신규 효소 자원관련 특허 출원 1건, 선행과제로 확보된 특허의 PCT 진입 1건, 제품 등록 1건을 정량적 성과로 확보하였다. 또한 적용범위 및 안정성 범위가 좁은 효소자원 및 단일물질 분리가 어려운 천연소재의 사료 적용을 위한 제형화 및 시험 제형 구성을 위한 노하우 및 실행 네트워크에 관한 기술을 정성적 성과로 확보하였음.

1. 논문발표 2건

(1) Mannanase 관련 논문 발표

저널명 : *Bioresource Technology* 102, 9185-9192. 2011. (IF : 4.365)

논문명 : Cloning and characterization of a modular GH5 β -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13.

관련내용 : 난분해성 목질부 및 특히 초본류 사료 원료의 주요한 구조적 성분을 이루는 만난 분해효소 mannanase의 유전자를 무척추동물 자원을 기원으로 하는 유전자원으로 부터 확보하고 효소의 특성을 규명한 연구결과를 발표하였음. 장내 점도개선을 위해 활용할 수 있음.

(2) Xylanase 관련 논문 발표

저널명 : *Bioresource Technology* 107, 25-32. 2012. (IF : 4.365)

논문명 : Novel modular endo- β -1,4-xylanase with transglycosylation activity from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes.

관련내용 : 분해가 어려운 사료원료의 셀룰로오스 파트를 묶어주는 역할을 하는 자일란을 끊어서 셀룰로오스를 노출시키고 자일란 또한 에너지원으로 활용하는 데 첫 단계를 담당하는 자일라나제 효소 단백질의 구조 특성 상 신규한 활성 도메인을 갖는 xylanase에 관한 것으로 효소 생화학적 특성을 규명하고 기질특이성을 이용한 신규한 도메인의 활성에 관한 연구결과를 발표하였다. 이는 향후 외국의 사료용 효소와의 변별력 및 협상력 증강 그리고 궁극적으로는 시장 진입을 위한 차별적 기술의 핵심을 포함하고 있음.

2. 특허출원 : 신규 특허 출원 1건, 선행기술 특허 PCT 진입 1건

(1) 신규 특허 출원 1건

특허명 : 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 생산되는 신규한 활성 도메인을 갖는 자일라나제

출원번호 : 10-2011-0146600

관련내용 : 본 발명은 셀룰로시마이크로비움 속(*Cellulosimicrobium* sp.) HY-13 균주에서 분리된 글리코시드 하이드롤라제-6 유사 도메인(glycoside hydrolase 6-like domain; GH6-like domain)을 가지는 신규한 자일라나제에 관한 것이다. 원료의 신규성 및 효소의 개질에 필요한 분자생물학적 도구를 확보한 원천기술을 포함하고 있음.

(2) PCT 특허 진입 1건

특허명 : 셀룰로시마이크로비움 속(*Cellulosimicrobium* sp.) HY-13 균주로부터 생산된 신규한 만난아제

출원번호 : PCT/KR2011/010245

관련내용 : 지렁이 공생 박테리움인 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 신규한 만난아제의 구조적 및 생화학적 특성, 및 특이적 활성을 갖는 최적의 조건과 함께, 높은 특이적 활성이 나타내는 GH5 β -1,4-만난아제임을 규명하여 산업적 유용성이 기대되는 특허. 사료 성분중 점도로 인해서 장폐색 및 어린 가축의 소화율을 감소시킬 수 있는 만난성분을 선택적으로 분해하여 사료의 활용도 및 에너지 대사에 도움을 줌으로써 궁극적으로 경제성 제고에 필요한 효소에 관한 기술을 포함함.

3. 제품등록 1건

(1) 효소제 '조아자임(Joazyme)' 성분등록

성분등록번호 : 제 IIB4C0029호

제품분류 : 보조사료 - 효소제

제조원/판매원 : (주)인섹트바이오텍

<성과 활용계획>

위탁기업을 통한 사료첨가제 제품 라인의 다양화, B2B 위주의 판로개척을 통한 매출 발생 노력을 지속할 것이며, 에센셜오일 및 식물 천연물을 첨가제로 하는 신규 제품의 개발 및 효소자원의 용도개발을 위한 파생기술 확보 및 활용을 위한 기업 내부 과제 운용에 활용할 계획임.

1. 곤충소재 응용사업단 설립 기획

- 곤충유래 생물자원 확보 연구의 경험 및 노하우를 바탕으로 지속적인 생물자원확보
- 다양한 생물자원(곤충 생체, 공생미생물 등)으로부터 유용 산업바이오소재 개발
- 유용한 생물자원의 발굴 및 관련 산업군 창출

2. 상용화의 조기 실현

- 개발된 시험제형의 안정화를 통한 후속 제품의 출시
- 양돈, 양계 현장에 필요한 각각의 제품 스펙을 구성하여 차별화된 응용제품 출시
- 해외 마케팅을 통한 제품의 수출 추진

3. 제품의 차별화 및 마케팅

- 다양한 현장환경에 대한 효능 평가 및 비교 시험을 통한 제품의 우수성 입증 자료 확보
- 현장 평가 자료를 바탕으로 한 국내외 축산박람회 및 바이오관련 전시회 홍보

SUMMARY

I. Title : Development of functional animal feed materials from insect resources

II. Purpose and Needs

<Purpose>

Feed enzymes have been introduced to feed market and livestock raisers to improve feed efficiency of feed stocks such as NSP (non-starch polysaccharides) and recalcitrant agricultural residues. At the same time, some natural products including plant-derived natural products or essential oils have also gained interest for use in the formulation of brand new feed additives.

<Needs>

Global warm and green technology issues:

Due to issues associated with global warming and climate change ever increase demand for food from China and India and the phenomena of Agflation, neglected biomass has emerged as new energy sources because of its non-food merit. However the new biomass and material have several issues, including recalcitrance hard to cut-down and digest. To solve the recalcitrance, feed enzymes such as Avizyme containing multi-enzymes have been used by a major part of the livestock industry. However our country does not have sufficient platform technologies or related additive candidates. Most of the feed enzymes are imported and blended.

Relay project for the application of enzyme technology and natural products;

In 2011, feed enzyme technology and products in the domestic market were dependent upon a few large foreign multi-national companies. To obtain our own national technology and products, we adapted two key technologies from precedent projects, enzymes from natural resources, such as symbiotic pool of insects and invertebrates and enzymes from natural products technology. The combination of the technologies with low-grade feed stock will be an essential part of application, industrialization and launching of brand new feed additives.

III. Research scope and contents

Identification of high performance microbial enzymes from insects and bio-diversity: Low-grade, recalcitrant, hard-to-digestive agricultural by-products were blended with appropriate enzymes to feed non-ruminants, such as pig and poultry.

Development of a second ingredient, low molecular weight functional materials from natural sources such as insects and plants: Application of low-grade feeds resulted in physiological stress

as well as nutritional problems. To reduce the stress, bio-functional natural products were tested using new ingredients. In addition, brand-new products can be developed based on this new concept.

Feed enzyme additives to improve the digestion rate of livestock (pig and poultry): Non-ruminants applicable feed additives with multi-enzymes. To increase energy metabolism and feed efficiency, xylanase and mannanase were added as ingredients to digest the structural hemicellulose and release C5 and C6, which could then be used as part of the nutritional metabolism

Field test data from for swine and chicken: With the help of a feed company (InsectBiotech Co. Ltd, Daejeon, Korea), a test formulation was constructed and delivered to the field testers.

Technology transfer, commercialization and entry into domestic market.

IV. Results

- A xylanolytic microorganism, strain HY-22 was isolated from a compost sample and phylogenetically identified as a Gram-positive bacterium belonging to the genus *Bacillus*. When cultivated on a liquid medium that contained 2.0% wheat bran (80 mesh passed), 0.9% yeast extract, 0.9% peptone, 0.2% KNO₃, 0.01% MgSO₄, and 0.1% olive oil, *Bacillus* sp. strain HY-22 produced xylanase (XylC) a ta yield of approximately 228 IU/ml.
- XylC was purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulfate precipitation and two consecutive rounds of column chromatography using DEAE Sephadex A-50 and Superdex G-75 resins. The relative molecular mass of the purified enzyme was approximately 24 kDa, as determined by SDS-PAGE.
- XylC exhibited the highest catalytic activity toward birchwood xylan when it was reacted with the substrate at pH 6.5 and 50°C. Of the evaluated chemical compounds, Trp-directed modifiers, Hg²⁺ (1 mM) and *N*-Bromosuccinimide (5 mM) were highly toxic to XylC.
- XylC displayed a high catalytic activity towards oat spelt xylan, birchwood xylan, and beechwood xylan, but avicel and locust bean gum were not hydrolyzed.
- The gene (1,272-bp) encoding a β-1,4-mannanase from a gut bacterium of *Eisenia fetida*, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 was cloned and expressed in *Escherichia coli*.
- The recombinant β-1,4-mannanase (rManH) was approximately 44.0 kDa and contained a catalytic GH5 domain that was 65% identical to that of the *Micromonospora* sp. β-1,4-mannosidase.
- The enzyme exhibited the highest catalytic activity toward mannans at 50°C and pH 6.0. rManH displayed a high specific activity of 14,711 IU mg⁻¹ and 8,498 IU mg⁻¹ towards ivory nut mannan and locust bean gum, respectively; however it could not degrade structurally unrelated polysaccharides, mannobiose, or *p*-nitrophenyl sugar derivatives.

- rManH was strongly bound to ivory nut mannan, Avicel, chitosan, and chitin but did not attach to curdlan, insoluble oat spelt xylan, lignin, or poly(3-hydroxybutyrate).
- Considering its physico-chemical and catalytic properties, ManH, which displayed a maximum activity at pH 6.0, can be exploited as a liquid fermentation product [e.g. Hemicell® (ChemGen Corp., USA)] since it is genetically recognized as a safe (GRAS) organism for herbivorous animals, such as calves, in the feed industry because fibrolytic enzymes in the rumen of herbivorous animals display the highest hydrolytic activity between pH 6.0 and 6.5.
- Mixed enzyme complex, Joazyme improved the feed conversion and egg production in broiler and layer. In addition, it reduced the amount of ammonia nitrogen in the cecum.

CONTENTS

Chapter 1 Overview	12
Chapter 2 State of the Art Report (domestic and global)	16
Chapter 3 Results	21
Chapter 4 Achievement and Contribution	85
Chapter 5 Application Plan	87
Chapter 6 Related Informations	90
Chapter 7 References	91
Appendix 1	94
Appendix 2	114
Appendix 3	134

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	21
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	85
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	87
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	90
제 7 장	참고문헌 -----	91
별 첨 1	제 1 위탁과제 (건국대학교) -----	94
별 첨 2	제 2 위탁과제 (한경대학교) -----	114
별 첨 3	제 3 위탁과제 (주인섹트바이오텍) -----	134

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구목표

축산사료원료 소화흡수효율의 획기적 향상 및 동물건강을 위해 일반사료는 물론 난분해성 사료도 효과적으로 분해할 수 있는 곤충유래 고효율 효소 및 기능성소재를 이용한 친환경 동물사료첨가제를 개발, 제품화하여 기술이전 및 기술사업화를 위한 원천기술 확보를 목표로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 사료 원료물질의 국산화를 위한 원천기술의 확보에 필요함 (기술의 전주기적 활용)

가. 국내시장 잠재성 높음: 우리나라의 효소 소비량은 국력에 비해 상대적으로 작아서 향후 효소 소비에 대한 잠재성이 큰 매우 유망한 시장으로 소개하고 있음(World Enzymes, 프리도니아). 실제 국내 사료용 효소 대부분은 완제품 형태의 수입품이며, 기타 식음료, 의 료용 및 산업용 효소의 상당수도 수입에 의존하고 있다.

나. 높은 시장 진입장벽이 현실: 다양한 효소군을 조합한 사료 경쟁품(아비자임 라인, 포자임 제품들)이 국내 시장을 차지한 현실에서 매우 보수적인 축산 농가 및 사료공장의 문턱은 매우 높아서 신규 진입은 쉽지 않은 것이 현실이다.

다. 독자적 원천기술로 극복: 이러한 시장 상황을 극복할 수 있는 대안은, 지적재산권을 포함한 경쟁력 있는 원천기술을 국내 기술로 확보하는 것임. 지난 10여 년간 국내에서는 과 기부 프런티어 사업 등을 통해 상당한 기초연구 성과를 확보하였으나 관련 실용화는 미흡한 실정이다. 따라서 이들 기초연구 외에 농림수산식품부 주도의 중개연구 및 실용화 연구를 더하여, 시장과 현장중심의 기술로 숙성시키는 것이 필요하다.

2. 국내 농업 자원의 활용성 창출에 필요함

가. 자원의 원리적 특성 활용

난분해성의 비전분 탄수화물을 먹이로 삼는 하늘소의 섭식특성, 외부의 저온 상황에서 도 먹이를 잘 소화시키는 거미의 강력한 소화력 등 국내 무척추 동물의 섭식 및 생태 특성을 생물공학적인 기술로 활용하는 것은 기술의 실현 가능성을 높일 수 있는 방안으로 필요하다.

나. 실현 가능성 높은 접근법

농업생물자원의 실용화에는 생산 시스템의 확보가 중요하며, 이러한 관점에서 섭식특성이 독특한 곤충류의 공생미생물 및 그 유전자를 활용한 미생물 분자생물학적 선행 기초 기술은 기술의 완성도를 높이는 데 매우 중요하며, 국내 자원의 부가가치 상승에도 매우 필요한 접근법이다.

다. 국내 자원의 능동적 보호를 위한 선점적 활용법 제시

곤충은 '신약 보고(寶庫)'라는 인식이 급속하게 확산되고 있으며, ABS 국제레짐 제정 움

직업 등 각국의 유전자원 보호 및 선점 경쟁에 능동적으로 대응할 수 있는 생물자원임. 우리나라는 양잠, 양봉 등 곤충산업에 대한 풍부한 경험과 최신 생명공학기술과 첨단인프라를 보유한 바 이의 능동적 활용이 시장 경쟁력 확보에 도움이 될 것이다.

3. 국내외적 녹색기술 정책 기조에 부응하는 산업군으로써의 필요성

가. 기후변화 대응기술

전 세계적 곡물가 급등 및 저급 사료의 사용 압력에 따라 난분해성 곡물조직을 효과적으로 분해하는 동물사료용 고기능 효소제 및 기능성 소재 원천기술이 절실히 요청되며, 반추동물류의 장내가스 및 분변 악취의 해소 및 비반추류의 사료 이용률 제고는 국가적 요구분야임 (농업분야 기후변화 대응기술 개발, 녹색성장위원회, 2010).

나. 녹색성장에 필요한 채산성 확보

축산농가의 사료는 경우 전체 소요 경영비용에서 60% 이상을 차지함. 그러나 염가의 저급 사료 원료의 경우 소화되지 않은 찌꺼기가 장내 용모에 그대로 남아 있음으로 인해서 설사 및 질병의 문제를 거쳐 생산성, 채산성 악화의 요인임. 현재 이러한 저급 원료를 이용하는 측면으로 효소제를 이용하는 방향이 새로운 대안으로 대두되어 다양한 제품군(거의 모두 수입품)이 시장을 차지하고 있다.

4. 기술적 측면에서의 필요성

가. 난분해성 자원의 활용

자연계에 존재하는 fixed carbon의 최대 저장고인 식물 세포벽은 다음과 같은 3가지의 중요한 합성물, [Cellulose (불용성 beta-1,4-glucan fiber), hemicellulose (glucan, mannan, xylan을 포함하는 noncellulosic polysaccharides), 그리고 lignin (a complex polyphenolic structure)]로 구성되어 있음. 이러한 구조로 인하여 식물의 세포벽을 리그노셀룰로즈 (lignocellulose)라고 부르는데, 구성성분 중에서 셀룰로즈(cellulose)가 가장 많이 존재하고 그 다음으로 xylan이 주 성분인 헤미셀룰로즈(hemicellulose)가 많이 존재하여 이들 두 성분이 전체 plant biomass의 50% 이상을 차지한다.

나. 축종 맞춤형 기술

돼지나 닭 같은 단위 동물은 이러한 식물 세포벽을 분해 할 수 있는 효소를 가지고 있지 않아서 세포벽 내에 들어있는 곡물의 전분이나 단백질 이용 효율이 매우 떨어지게 됨. 사료내 영양소의 이용률을 높이기 위해서 사료 첨가제로 효소를 많이 사용하고 있다. (Bedford 등, 1992; Lindemann 등 1986).

다. 규제를 만족시키는 글로벌 기준 제시

2006년부터 사료내 항생제 첨가 전면금지를 시행한 EU의 경우, 발 빠른 대처를 통하여 한방 사료첨가제, 생약제 등의 항생제 대체물질 개발 연구를 집중적으로 진행하고 있음. 국내에서도 가축 사료내 항생제 첨가 금지로 면역증강제 및 사료용 효소제 개발수요가 증대되고 있는 상황임. 또한 축산과학원을 중심으로 생균제, 유기산, 효소, 식물추출물, 면역강화제 등의 개발 등 사료첨가용 항생제 전면 사용금지에 따른 대안을 찾기 위해 노력하고 있다.

라. 따라서 곤충유래 고효율 효소와 함께 가축의 사료효율 개선 및 질병예방에 상승효과를 나타낼 수 있는 기능성소재를 발굴하고, 이를 효과적으로 활용할 수 있는 관련 연구개발의 필요성이 절실히 요청되고 있다.

5. 축산산업에 있어서의 필요성

2006년 하반기부터 국제 원유가 상승 및 곡물가, 곡물수송비 상승, 외화 환율 급등 등 여러 가지 원자재비 상승으로 인하여 국내 사료업계에서는 사료생산의 비용 절감에 대한 많은 압박을 받고 있다. 옥수수, 소맥과 같은 곡물 및 대두박 등 사료생산에 중요한 역할을 하는 단미 원료 가격이 폭등하고 있으며, 특히 옥수수-대두박 위주의 가금 사료에 있어서는 가격 경쟁력이 있는 원료 사용의 필요성이 급격히 증가하고 있다. 옥수수는 높은 에너지가와 상대적으로 낮은 가격 때문에 사료의 주요 원료로 사용하고 있다. 그러나 최근 옥수수가 바이오 에탄올 생산의 주요 원료로 사용되면서 그 수급이 어려워지고 가격이 폭등함에 따라 다른 대체 곡물의 이용 요구가 크게 높아지고 있다. 따라서 옥수수, 대두박에 비해 상대적으로 이용성이 낮은 원료의 이용성 증대 방안으로 효소제의 사용이 더욱 확대 이용되고 있다 (Bedford 등, 1992; Lindemann 등, 1986).

단위동물에 있어서 사료 원료에 따른 영양소 이용률이 다르다는 것을 감안할 때 사료 내 소화효소의 첨가는 상대적으로 소화율이 낮은 원료의 사용을 제고 시킬 수 있으며, 소화율 향상에 의한 미소화 영양소 배출을 감소시킴으로써 환경오염을 감소시키는 효과를 얻을 수 있기 때문에 현재에도 이에 대한 많은 연구들이 수행되고 있다 (Bedford, 2000a; Selle 등, 2000; Cowieson, 2005; Cowieson과 Ravindran, 2008).

Hasting(1946)에 따르면 효소제를 조섬유 함량이 높은 양계사료에 첨가하였을 때 성장률과 사료효율이 향상되었다고 보고하였고, Berg(1959)는 육계사료에 효소제를 첨가하였을 때 사료효율이 향상되었다고 보고하였으며, Matti(1988)는 산란계에 효소복합제를 급여하였을 때 산란율과 사료효율이 개선되고, 산란말기에는 산란율 및 사료효율이 개선되었다고 보고하였다.

옥수수와 대두박 외에 사료 원료로 많이 사용되고 있는 보리, 귀리, 호밀 및 소맥 등과 같은 곡물의 대부분은 섬유소를 비롯한 비가용성 영양소함량이 높아 소화기관내에서의 이용성이 떨어지기 때문에 가축의 성장률이 감소되는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해서 β -glucanase, xylanase, pectinase, protease, cellulase, phytase, amylase 등과 같은 외인성 분해효소가 NSP(Non-starch polysaccharide, 비전분성 다당류)의 이용성 제고를 위한 효소제로 사용되고 있으며, 사료 내에 적절한 외인성 효소를 첨가함으로써 사료 내 영양소를 최대한 이용할 수 있고, 사료 단가를 줄이며, 가금의 생산성 개선 및 가축 분노발생 경감을 통한 환경적 부담을 감소할 수 있다 (Campbell과 Bedford, 1992; Bedford와 Schulze, 1998; Cowieson과 Ravindran; 2008).

또한, 최근 항생제 남용으로 인해 가축의 체내에서 저항성이 있는 유기체를 생성하여 내성을 증가시키는 등 유해성에 관한 연구들이 보고되면서 AAFCO (Association Of American Feed Control Officials, Inc. 1986)와 유럽연합 등 세계 각국에서 항생제의 사용 규제를 심화하고 있다. 또한 소비자들은 식품안전에 대한 욕구 증진, 양보다는 질 위주의 기능성 고급육제품을 선호하는 경향으로 급격히 전환되고 있어 항생제를 대체할 수 있는 비항생제적 생물학 제제 개발이 시급히 요구되어 항생제를 대체할 수 있는 천연물질, 생균제, 효소제, 효모제 등 그 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

6. 부처간 기술 교류 및 산학연 협력을 통한 단기 융합과제의 필요성

생물기술은 개발부터 현장적용까지 상당한 시간이 요하는 과정으로 특히 산업화와 관련한 기술의 실용화를 위해서는 많은 시간과 비용을 필요로 한다. 이러한 기술에 대한 수요는 지속적으로 발생하였지만, 글로벌 기업의 시장선점으로 인하여 국내 기술의 실용화에 대한 부분은 아직도 미흡한 실정이다. 이러한 생물자원에 대한 글로벌 효소 기업에 대응하는 국내 회사가 없는 현실에서, 우리나라의 발달된 생명공학기술을 선행기술로 활용하여 기술 중심의 기업과 출연연, 대학 간의 공동연구를 통한 이를 실용화하는 기술이 필요하다. 이는 닭이나 오리와 같은 비교적 짧은 기간으로 가능한 가축부터, 양돈 산업과 오랜 기간의 평가가 필요한 반추동물에 대한 현장평가에는 특히 필요한 부분이다. 현장실증시험을 통하여 여러 가지 환경적인 요인 등에 대한 지속적인 데이터를 축적하고, 이를 바탕으로 안정화와 제형화를 통하여 완제품 수준의 최적의 수준의 사용모델을 개발할 필요가 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 효소를 이용한 사료첨가제 기술개발 현황

1. 사료첨가제 관련 특허 분석

- 2001년부터 2010년까지 최근 10년간 효소를 이용한 사료 및 사료첨가제 관련 특허를 검색한 결과 그림 1. 과 그림 2. 와 같은 양상의 자료를 얻을 수 있었다.
- 효소의 사료산업에서 응용을 위해서는 효소의 다양성을 확보하고, 그 기초연구의 자료를 요구하고 있다. 따라서 곡물/식물 부산물을 이용하기 위하여 다양한 헤미셀룰라제에 대한 기술을 확보하는 것이 우선 요구된다.
- 사료산업에 있어서 효소를 이용하기 위한 다양한 시도가 있었고, 그에 따른 사료첨가제의 개발은 지속적으로 증가 추세에 있다. (그림 3, 그림 4) 이러한 연구는 지역적으로 편중되어 주로, 미국과 유럽의 다국적 기업이 주도하고 있으며, 국내의 기술개발은 아직 부족한 것이 현실이다.

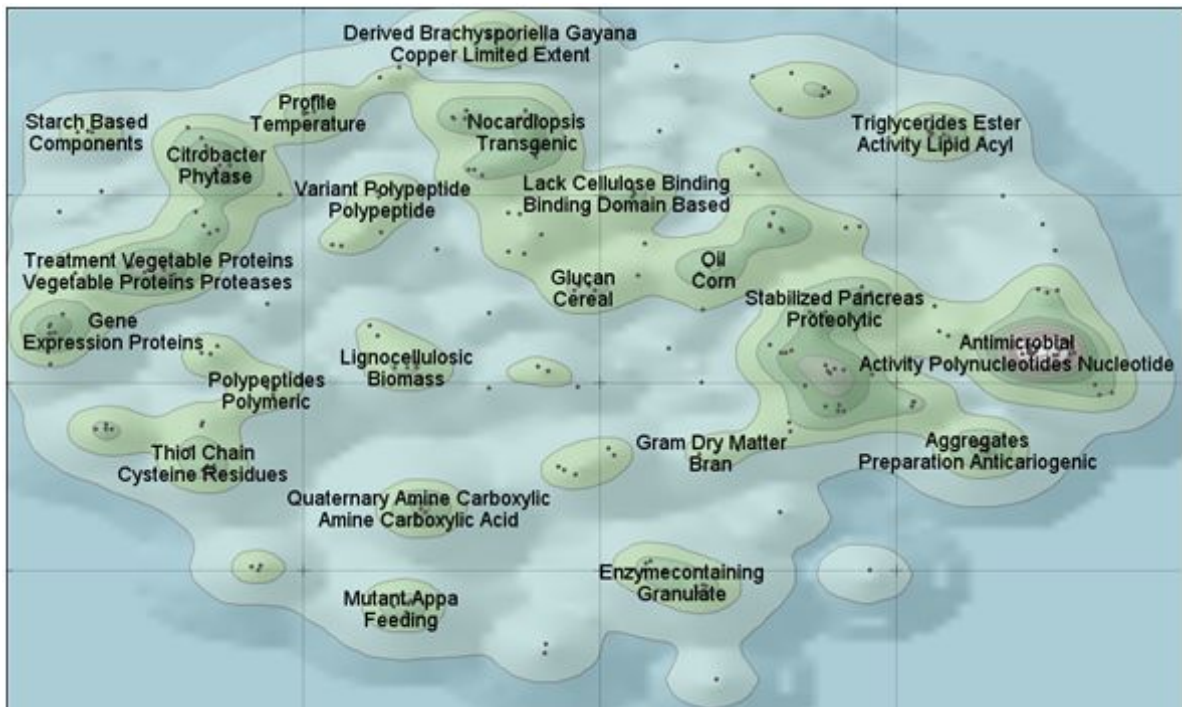


그림 1. 효소를 이용하는 사료첨가제의 관련 특허 분석 지도

표 1. 효소를 이용한 사료첨가제 관련 특허 권리 현황

Basic Report: Documents By Top Assignees

source document list: feed additive a ProEoXyIE

[Print-Friendly](#)















Assignee	Doc Count	Percentage
NOVOZYMES AS	75	 12.6%
UNKNOWN	32	 5.4%
GENENCOR INT	11	 1.9%
BASF AG	8	 1.3%
FINNFEEDS INTERNAT LTD	8	 1.3%
LASSEN SOEREN FLENSTED	7	 1.2%
OESTERGAARD PETER RAHBEK	7	 1.2%
DANISCO	6	 1.0%
DIVERSA CORP	6	 1.0%
SJOEHOLM CARSTEN	6	 1.0%
Number of assignments in Top 10 assignees	166	
Total number of assignments	596	
Number of documents after filter	251	
Total number of documents in group	251	

표 2. 효소를 이용한 사료첨가제 관련 특허 지역별 현황

Basic Report: Documents by Publishing Organization

source document list: feed additive a ProEoXyIE

[Print-Friendly](#)

Publishing Organization	Doc Count	Percentage
US	124	 49.4%
WO	85	 33.9%
EP	40	 15.9%
JP	2	 0.8%
Total number of documents in group	251	

2. 글로벌 산업용 효소 시장

가. 생산 및 시장현황

- 2010년 전세계 효소 시장규모는 3.3 billion US\$(한화 33조원)규모로 성장하였으며, 다국

적 기업인 Novozymes, Danisco, DSM 등의 주요기업들이 차지하는 비중이 70% 이상을 차지하고 있다.

○ 사료용 효소시장 규모는 2012년 378 million US\$(3,780 억 원)로 추산하고 있다.

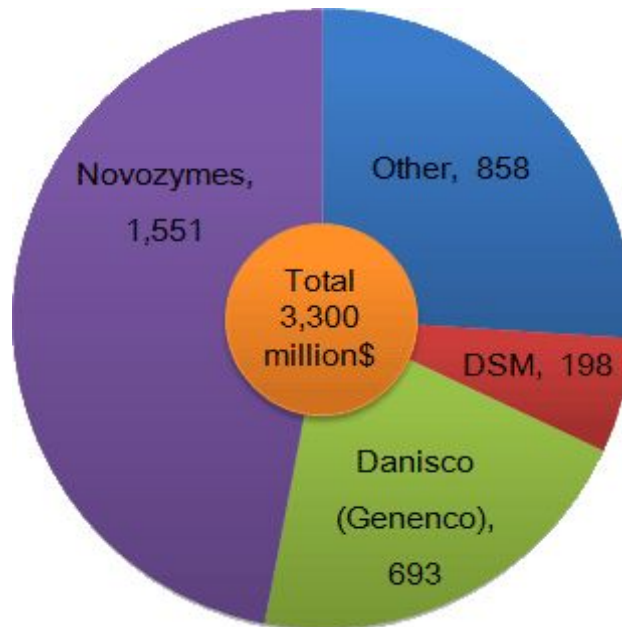


그림 2. 2010년 주요 업체별 글로벌 산업용 효소 매출액
* 출처 : The Novozymes report

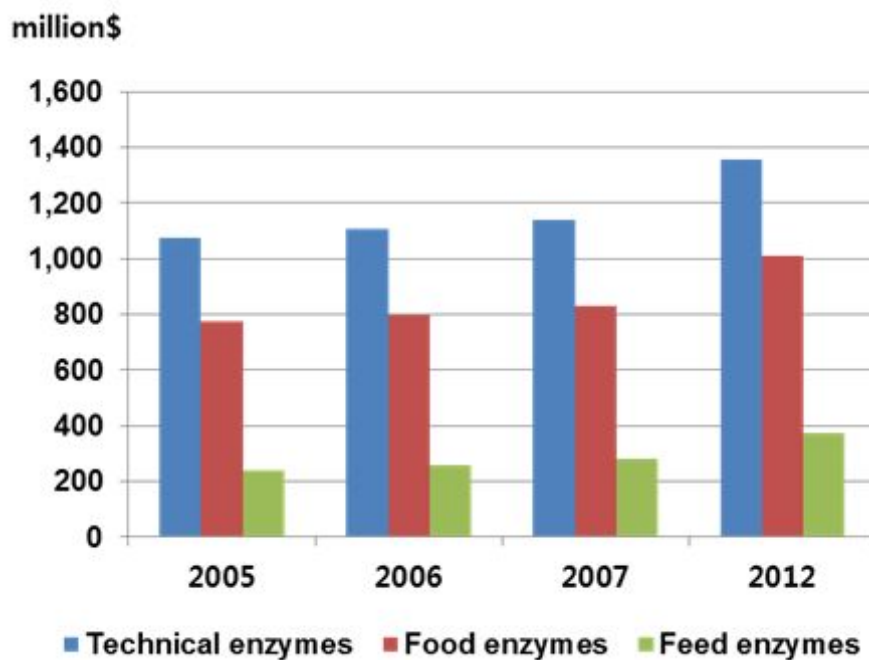


그림 3. 산업용 효소 주요 3분류 글로벌 시장 규모
* 출처 : BBC Research 2008

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 사료 시장에 유통되고 있는 xylanase를 중심으로 하는 사료용 효소제는 Danisco Animal Nutrition에서 생산해서 CTC BIO에서 판매를 하고 있는 Avizyme 1500이며 현재 90% 이상의 시장점유율을 가지고 있음.
- 현재 바이오 에탄올 생산으로 인한 옥수수 수급의 불균형으로 인해 사료원료가격이 상승됨으로 인해서 저급사료원료를 효율적으로 사용하기 위한 효소제의 수요가 급속히 증가 추세.
- 2009년 현재 국내 사료용 효소제 시장은 연간 약 134억원 규모이며, 이지바이오시스템, 바이넥스, CJ 제일제당, CTC 바이오, (주)인섹트바이오텍 등이 주요 점유기업임.(매일경제신문사, 한국산업기술진흥협회 자료)
- 또한 2011년 7월부터 국내에서도 사료첨가용 항생제 전면 사용금지가 시행될 예정이어서 이에 대한 대책으로 면역증강제 및 사료용 효소제 개발수요가 증대되고 있으며, 생균제, 유기산, 효소, 식물추출물, 면역강화제 등의 개발도 수행하려 하고 있기에, 효과적이고 친환경적인 사료용 기능성 소재 개발의 시장 잠재력이 매우 클 것으로 판단함.






표3. 국내 사료 첨가제(효소제) 시장 상황

제품명	제품회사	제품에서의 주요 특징	주요 성분
CTCzyme	CTC바이오	<ul style="list-style-type: none"> • 만난 성분을 분해해주는 효소. 국내 최초로 생산된 manannase 	효소제 (mannanase)
메가자임	우진비엔지	<ul style="list-style-type: none"> • 소화율 향상에 의한 사료효율 개선 • 식욕증진 및 소화기 기능 강화 • 각종 효소들의 상승작용으로 항영양물질 이용성 향상 • 원료비 절감 가능 :총에너지량 증가 및 광물질 이용증진으로 사료배합비 조정가능 • 환경개선 효과 : 질소(N) 및 인(P)의 배설량과 분변량 감소 	효소제(Phytase, Amylase, Xylanase, β-glucanase, Cellulase, Pectinase, Protease)
메가포스		<ul style="list-style-type: none"> • 소화율 향상에 의한 사료효율 개선 • 식욕증진 및 소화기 기능 강화 • 각종 효소들의 상승작용으로 항영양물질 이용성 향상 • 환경개선 효과 : 질소(N) 및 인(P)의 배설량과 분변량 감소 • 활성효모균의 첨가로 정장작용 	효소제 (Phytase, Xylanase, β-Glucanase)
프로텍신 바이오프리미엄	(주)제인바이오텍	<ul style="list-style-type: none"> • 전분과 섬유질의 소화를 돕고 식욕을 돋움. • 사료를 변화시킬 때 흔히 발생하는 소화장애를 감소 	효소제(Xylanase, glucanases), 생균제
로바바이오	한국썸벤	<ul style="list-style-type: none"> • 영양소 소화 및 이용 촉진 • 증체량 및 사료 효율 증가 • 개체간 변이 감소 및 저체중 개체 감소 - 사육환경개선 	효소제(Xylanase, β-glucanases)

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- Diversa, Finnfeeds Int., Novo Nordisk, Genencor, Mitsubishi Paper 등의 기업들에서 다양한 효소제의 탐색 및 분자적 개량과 더불어 사료흡수효율 증가 및 폐사율 감소를 위한 사료첨가제, 음료산업과 제과 제빵과정에서의 이용, 제지의 표백 및 탈묵과정, 섬유상 생물소재 또는 부산물로부터 에탄올제조, xylose의 향미생물제 활성을 활용하는 각종 구강 care 관련제품 등 다양한 산업에서 활용하고 있음.
- 사료 첨가용 효소제는 크게 xylanase와 xylanase를 포함하는 효소복합제제가 있음. 이들 효소제 및 복합제제의 생산에 사용되고 있는 미생물은 곰팡이가 대부분을 차지함.
- 그 중에서도 *Trichoderma* 속 균주들이 주로 이용되는데 이들의 효소 생산성은 세균의 효소 생산성에 비해 대체로 우수하며 주로 산성 조건에서 활성을 보임.
- Alltech은 endo-glucanase를 중심으로 파우더 타입과 액상타입형태로 돼지와 가금을 위한 Allzyme 8종이 출시되고 있음.
- Danisco의 동물 관련 효소제로 양계를 위한 Avizyme 12종(효소의 역가를 달리한 상품)과 양돈을 위한 Porzyme 13종, 돼지와 가금을 위한 Grindazym 6종, 인 관련 제품 Phyzyme XP 2종이 출시되고 있음.
- 2006년부터 사료내 항생제 첨가 전면금지를 시행한 EU의 경우, 질병으로 인한 생산성 저하와 질병치료용 항생제 사용량 증가 등 문제가 발생하여 현재, 한방사료첨가제, 생약제 등의 항생제 대체물질 개발 연구를 집중적으로 진행하고 있음.

표 4. 해외 다국적 기업의 사료첨가제 제품의 특징

제품명	제품이미지	제품에서의 주요 특징	주요 성분
Avizyme 1200		<ul style="list-style-type: none"> - 육계용 사료첨가제 - 밀(wheat)/보리(barley) 부산물에 적합한 제품 - 상대적으로 높은 자일라나제로 구성된 제품 - 프로테아제 역가 낮음 	100U/g glucanase 2500U/g xylanase 800U/g protease
Avizyme 1300		<ul style="list-style-type: none"> - 육계, 산란계, 오리용 사료첨가제 - 범용 제품으로 상대적으로 저가의 제품 - 자일라나제와 프로테아제로 구성 	2500U/g xylanase 800U/g protease
Avizyme 1500		<ul style="list-style-type: none"> - 육계, 산란계, 오리 육성용 사료첨가제 - 단백질공급을 용이하게 하기위한 제품 - 저접도 다당으로 구성된 사료에 적합 - 상대적으로 높은 프로테아제 활성의 제품 	100U/g glucanase, 300U/g xylanase, 4,000U/g protease, 등
Porzyme 9100		<ul style="list-style-type: none"> - 양돈용 사료첨가제 - 보리(barley)/귀리(oat) 부산물에 적합한 제품 - 글루카나제, 자일라나제로 구성 - 급여기준 : 0.1% 사용 	400U/g glucanase 400U/g xylanase
Porzyme 9300		<ul style="list-style-type: none"> - 양돈용, 양계용 사료첨가제 - 밀(wheat) 부산물에 적합한 제품 - 높은 역가의 자일라나제로 구성 - 급여기준 : 0.1% 사용 	4,000U/g xylanase

* 다니스코(Danisco)사의 자료 참조

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 목표 및 주요내용

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

<연구개발의 최종 목표>

- 축산사료원료 소화흡수효율의 획기적 향상 및 동물건강을 위해 일반사료는 물론 난분해성 사료도 효과적으로 분해할 수 있는 곤충유래 고효율 효소 및 기능성소재를 이용한 친환경 동물사료첨가제를 개발함.
- 개발된 기술을 이용하여 1차년도 기간 중 1건 이상의 제품화를 실현함.

<연구개발의 주요 내용>

- 곤충 등 생물다양성으로부터 분리한 미생물 자원을 이용한 고효율 효소 개발
- 곤충유래 기능성소재를 이용한 사료첨가제 및 기능보조제 개발
- 축산 동물(양돈/양계) 사료소화흡수효율 개선용도의 효소 사료첨가제 개발
- 실제적인 대상 동물을 이용한 현장 사양실험을 통한 우수성 입증 자료 확보
- 기술이전 및 사업화를 통하여 국내외 관련시장에서 매출 실현을 위한 원천기술 확보

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

구분	연구개발의 목표	내용
주관 (한국생명공학연구원)	사료용 효소 및 기능성 원료의 확보, 활성조사, 등록	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고효율 효소의 선별, 특성분석 및 저급사료 분해양상 조사 ○ 사료용 효소제 제형완성 ○ 기존 다국적기업 제품과 비교실험을 통한 본 고효율 효소제의 우수성 평가
위탁 (한경대, 건국대)	축종별 활성 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물 소화율 및 사양 실험을 통한 첨가 수준 결정 ○ 사양 실험을 통한 복합효소제의 효능 평가 ○ 소화율 및 사양실험을 통한 생산성 및 경제성 평가
기업 (주)인섹트바이오텍	대량생산 시스템 규격 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고효율 효소 등 기능성 사료첨가제의 산업적 대량생산시스템 개발 ○ 개발된 곤충유래 기능성 소재를 이용한 사료첨가제 등록 및 사업화 추진

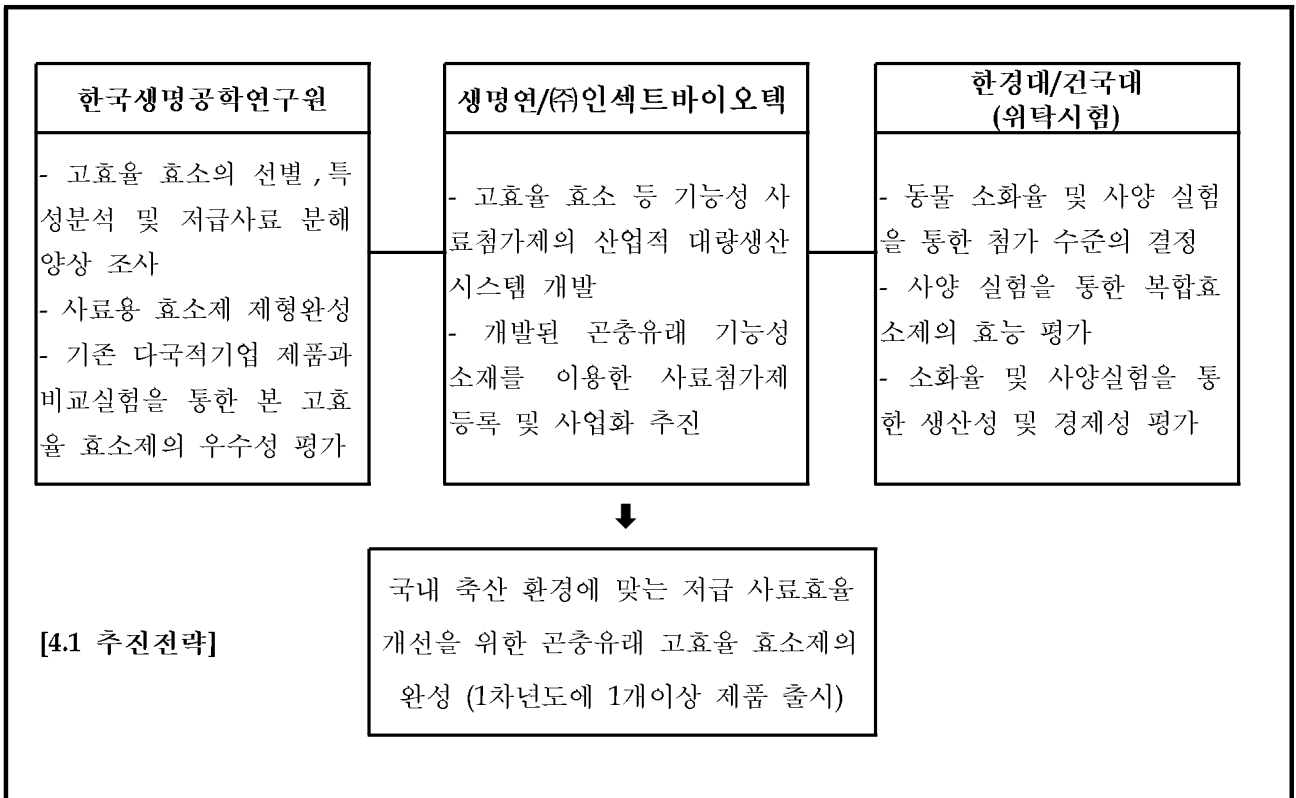
주관기관 (한국생명공학연구원, 손광희)

- 효소: 곤충, 생물다양성 자원유래 미생물 자원을 이용한 고효율 효소 개발
- 소재: 곤충유래 기능소재 및 천연소재 이용한 사료첨가제 및 기능성보조제 개발
- 사업화: 기술이전 및 사업화를 통하여 국내외 관련시장에서 매출 실현

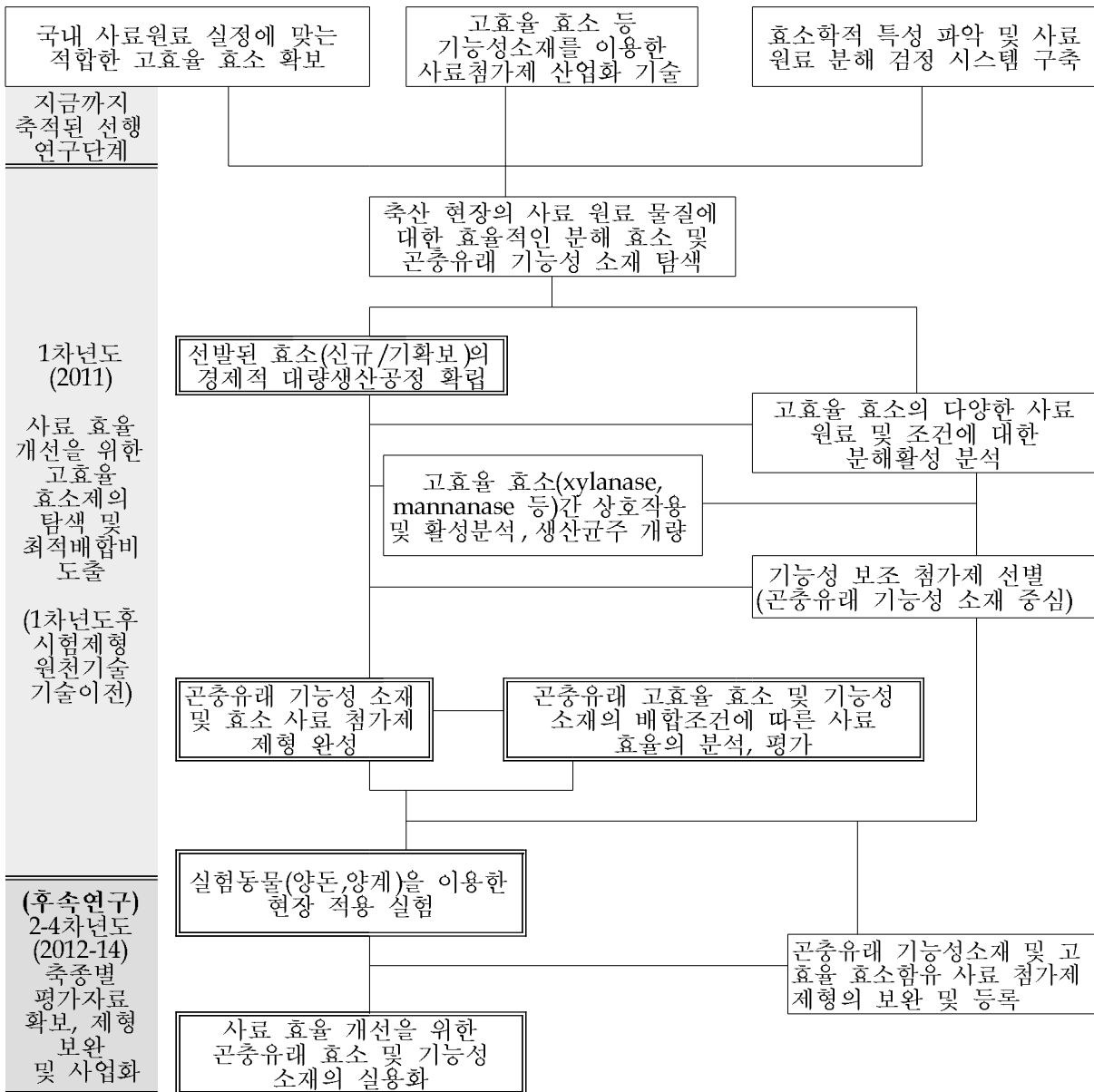
위탁기관 - 실제 대상 동물을 이용한 현장 사양실험을 통한 우수성 입증 자료 확보

- 제1위탁기관 (주)인섹트바이오텍, 신동하): 소화흡수효율 개선용도의 사료용 효소복합 제형 개발, 사양실험 제형 구성.
- 제2위탁기관 (건국대학교, 김법균): 양돈에 대한 기능성 사료소재 효능검정
- 제3위탁기관 (한경대학교, 남기택): 양계에 대한 기능성 사료소재 효능검정

3. 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계



[4.2 추진체계]



4. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2011	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충미생물 유래 고효율 효소 등 사료효율 향상 기능성 소재 선발 ○ 선발된 고효율 효소 및 바이오 소재의 산업적 대량생산 공정 시스템 개발 및 사료첨가제 시험제형 완성 ○ 사료내 고효율 효소 및 기능성 소재의 첨가 조건 결정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기 확보된 우수균주 및 생산 효소 검정 및 신규효소 발굴 병행, 각 생산효소 (xylanase, mannanase)의 효소학적 특성 (최적 pH, 온도, 열안정성 등) 분석. 실험실 규모의 배양을 통한 산업 타당성 검토, 다환경 효소의 특성 파악, 기존 상업적 사료 및 저급 사료 원료 물질의 분해 양상 및 분해를 파악 ○ 다양한 사료 원료 분해 실험을 통한 최적 효소 선별; 상업적으로 이용되고 있는 사료와 저가 사료군에 대한 선발 효소 개별 및 효소 복합제를 통한 조사. 사료원료로는 옥수수, DDGS, 체종박, 면실박, 배아박, 소맥피, 대두, 야자박, 루핀, 어분 등을 중심으로 조사 ○ 시장에서 유통되고 있는 효소제와의 비교 실험을 통한 효소제 선별; 다국적 대기업의 효소제의 구성 기능 관련 조사 ○ 실험실 규모의 배양 실험을 통한 물질 생산의 물리·생화학적 특성 분석; Flask 배양을 통한 기존 data 확립. 5L 발효조를 통한 발효양상 조사(pH, 온도, RPM, 용존산소량 등)에 대한 변화 조사. ○ 생산균주 개량, 산업용 배지·환경 조성을 통한 공장용 생산 공정 자료 확보; 산업용 배지조성을 통한 최적 배양 조건 선별 (C/N Ratio의 변화, 배지 조성의 변화에 의한 생산량 및 경제성 검토) ○ 양돈(65일령 육성돈) 및 양계를 공시하여 장 내용물의 영양소 소화물(건물, 질소, 에너지 등)평가 ○ 돼지, 닭을 공시하여 이용, 생산성 및 경제성 평가 ○ 곤충유래 고효율 효소 및 기능성 소재를 이용한 시제품 개발 (편이상)
(후속 연구) (2-4차년도)	2012-2014	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효소의 기능성 및 사료원료별 분해양상 조사 ○ 사료효율 개선 기능성소재 선발/조합비 완성 ○ 사료효율개선제의 대량생산 시스템 ○ 부산물을 이용한 저가 사료 내 소화율 및 생산성 평가 ○ 사료의 영양소 수준 및 고효율 효소제의 첨가 급여에 따른 이용성 사양평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소규모 비교 사양 실험; 선발된 효소 (개별 또는 혼합형태) 와 다국적 대기업 상품과의 비교 (사료효율, 미소화변, 기간별 체중 조사) ○ 실험실 규모 scale up을 통한 대량 생산; 산업적 배지 조성을 바탕으로 5 L, 30 L, 3,000 L 규모 배양관련 물리 생화학적 현상 조사 ○ 선발된 효소제제의 제형 및 첨가효소를 달리한 복합효소제의 개발 ○ 효소 등 기능성소재의 기능성 조사; 면역증강, 항균, 항염 및 기타 효능 효과에 대한 검증(양돈 장내 유해 미생물에 대한 항균효과 검증) ○ 각 사료원료에 대한 분해양상 및 최적 분해 조건 조사; 효소제를 이용한 대표사료원료에 대한 분해 산물에 대해 아미노산 분석, 분자량 분포 등을 통해 분해 양상 파악. 효소제 단독 또는 복합 이용을 통한 사료원료 가공 부분에 대한 실험(최적 공정 조건의 확립) ○ 1차년도 실험 결과를 바탕으로 제제의 조성 및 관련 자료 완성. ○ 효소학적 자료, 구성조성, 다국적 기업 효소제와의 비교자료, 동물 사양실험들을 바탕으로 사료효율향상 기능성소재의 조성 및 동물 투여량의 확립. ○ 사양시험; 이용성, 생산성, 경제성 평가 ○ 이전기술, 제품화(3건이상) 및 국내외 시장에 판매

제 2 절 곤충미생물 유래 고효율 효소 등 사료효율 향상 기능성 소재 선별

1. 생물다양성으로부터 고효율 효소자원의 확보








현존 지구상의 생물 중 가장 많은 종인 곤충을 포함하여 다양한 생물자원에서 고효율 효소 및 기능성 소재를 발굴하고 확보하는 일에 주력하고 있다. 특히 곤충은 독특한 섭식환경을 고려하여 털두꺼비 하늘소, 벌, 메뚜기, 흰개미 등을 이용하여 유용효소자원을 탐색하여 왔고 무척추동물인 지렁이를 포함하여, 발효퇴비, 쓰레기 매립지와 같은 생물자원이 존재하는 장소를 골라 여러 가지 시료를 채취하여 다양한 생물자원을 확보하였다. (그림 4)



그림 4. 곤충 및 생물자원에서부터 유용효소 자원의 탐색

확보한 생물 자원중 난소화성 헤미셀룰라제를 산업적으로 유용하게 활용하기 위하여 xylanase와 mannanase를 비롯한 다양한 효소들을 스크리닝하였다. 특히 xylanase와 mannanase는 산업적으로 유용하게 이용될 수 있는 효소자원이지만, 아직까지 국내에서 이를 이용한 기술을 개발하여 상용화한 사례가 극히 드물고, 주로 해외에서 수입해서 사용하고 있는 것이 현실이다. 이번 연구에서는 기 확보된 선행기술들을 바탕으로 효소자원을 확보하면서 이와 동시에 산업적으로 이용 가능한 고효율 효소를 대량생산하여 제품화 연구를 진행하였다. 표 와 같이 기확보된 생물자원과 효소자원들을 이용하여 그 특성을 규명하고, 연구결과를 바탕으로 해외 저널에 논문을 투고하였다. (그림 5)

표 5. 곤충 및 생물 자원으로부터 고효율 효소 생산 균주의 분리 및 효소 자원 확보

Characteristic	XyIA	XyIF	XyIK1	XyIK3	XyIP	XyIG	lXyIC	ManK	ManH	XyIK2
Source of hemicellolytic microorganism										
Isolated strain	<i>Paenibacillus</i> sp. HY-8	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-12	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-13	ND	<i>Bacillus</i> sp. HY-20	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> sp. HY-15	<i>Cohnella laeviribosi</i> HY-21	ND	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-13	
Gene (amino acids)	636-bp (211)	1,188-bp (395)	1671-bp (556)	ND	687-bp (228)	1,182-bp (393)	1,023-bp (340)	ND	1,272-bp (423)	2,304-bp (767)
Domain structure	GH11	GH10	GH10- Fn3-CBM 2	ND	GH11	GH10	GH10	ND	GH5-CBM 10- CBM10	GH6-like domain- Fn3-CBM2
The highest amino acid sequence identity	88% (GH11)	52% (GH10)	67% (GH10) 64% (Fn3) 70% (CBM 2)	ND	97% (GH11)	69% (GH10)	70% (GH10)	ND	65% (GH5) (CBM 10) (CBM 10)	70% (GH6-like domain) 90% (Fn3) 79% (CBM 2)
Molecular mass (Da)	22,900	42,925	58,296	36,000	25,522	43,962	39,330	34,926	41,300	79,611
Specific activity (substrate)	147.8 IU/mg (birchwood xylan)	21.2 IU/mg (beechwood xylan)	193 IU/mg (oat spelt xylan)	1092 IU/mg (oat spelt xylan)	2136 IU/mg (oat spelt xylan)	87.3 IU/mg (oat spelt xylan)	88.6 IU/mg (oat spelt xylan)	71090 IU/mg (locust bean gum)	14711 IU/mg (ivory nut mannan)	109.20 IU/mg (oat spelt xylan)
Journal	<i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> (2006)	<i>Antonie van Leeuwenhoek</i> (2008)	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> (2009)	<i>Proc. Biochem.</i> (2009)	<i>Kor. J. Microbiol.</i> (2009)	<i>J. Mol. Catal. B: Enzym.</i> (2010)	<i>Bioresour. Technol.</i> (2010)	<i>Enzyme Microb. Technol.</i> (2011)	<i>Bioresour. Technol.</i> (2011)	<i>Bioresour. Technol.</i> (2012)

2. 곤충 장내미생물로부터 고효율 자일라나제 개발

가. *Bacillus* sp. HY-22 균주가 생산하는 xylanase 확보

쓰레기 매립장에서 시료를 채취하여 분리한 *Bacillus* sp. HY-22 균주가 생산하는 고효율 xylanase의 클로닝 및 특성규명을 수행하였다.

HY-22 균주는 쓰레기 매립장에서 가져온 시료를 생리식염수에 현탁하여 0.2% Azo-xylan이 포함된 R2A 고체배지를 이용하여 37°C에서 배양하며 콜로니 주변에 halo를 형성한 미생물 중 xylan 분해 활성이 매우 우수한 균주로서 분리하였다.(McKie et al., 2001) 분리한 균주는 16S rDNA 분석결과 *Bacillus* 속에 속하는 미생물로 동정되었고, 이를 *Bacillus* sp. HY-22로 명명하였다.

Bacillus sp. HY-22이 생산하는 xylanase를 인코딩하는 유전자를 확보하기 위하여 GH11 xylanases의 conserved region을 기초로 디자인된 PCR primers (Bp-F: CATCATCARCTKGGCAACAT; Bp-R: TTCATACATTTTRCCCATYGG)를 이용하여 PCR를 수행하여 xylanase gene을 확인하였고, genomic walking과 nested PCR 법을 이용해 클로닝하여 염기서열을 확인하였다. 클로닝된 xylanase(xylC)의 염기서열은 그림 5와 같으며, 클로닝된 XylC 유전자는 687-bp로 구성되어 있으며, 228개의 아미노산으로 구성된 GH11 xylanase를 인코딩하는 것을 확인되었다.(Luo et al., 2010; Collins et al., 2005; Shallom and Shoham, 2003).

Xylanase의 활성 측정은 birchwood xylan을 기질로 하여 3,5-dinitrosalicylic acid reagent를 이용하는 DNS method(Miller, 1959)에 따라 환원당량을 측정하였고, 효소

1unit은 1분 동안 1 μ g 환원당을 생산하는 효소의 량으로 정의하였다.

효소의 반응은 0.4 ml 1.0% birchwood xylan, 50 μ l 0.5 M potassium phosphate buffer (pH 6.0), 50 μ l 효소액을 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응한 다음, 0.5 ml DNS reagent를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응 시킨 후, 냉각하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

```

ATGAATTTAAGAAAATTAAGACTGTTGTTTGTGATGTGTATTGGACTGACGCTTATACTG 60
M N L R K L R L L F V M C I G L T L I L
ACGGCTGTACCAGCCCATGCGAGAACCATTACGAATAATGAAATGGGTAACCATAGCGGG 120
T A V P A H A R T I T N N E M G N H S G
ACGATTATGAATTATGGAAGGATTATGGAACACCTCGATGACTCTCAATAACGGCGGG 180
Y D Y E L W K D Y G N T S M T L N N G G
ACATTTAGTGCAGGCTGGAACAATATTGAAATGCTTTATTTTCGAAAAGGAAAAAGTTT 240
A F S A G W N N I G N A L F R K G K K F
ACATCCACTAGAACTCACCATCAACTTGGCAACATCTCCATCAATTACAACGCAAGTTTT 300
D S T R T H H Q L G N I S I N Y N A S F
ACCCAGTCGGGAATTCCTATTTATGTGTCTATGGCTGGACACAATCTCCATTAGCAGAA 360
N P V G N S Y L C V Y G W T Q S P L A E
ACTACATTGTTGATTTCATGGGGCACATATCGTCCAACAGGCACACATAAAGGAACATTT 420
Y Y I V D S W G T Y R P T G T H K G T F
ACATGCAGACGGGGGCACATATGACATTTATGAAACAACCCGTGTCAATCAGCCTTCCATT 480
Y A D G G T Y D I Y E T T R V N Q P S I
ACCGGATCGCAACCTTCAAGCAATATTGGAGTGTACGTCAAACGAAACGTACAAGCGGA 540
I G I A T F K Q Y W S V R Q T K R T S G
ACGGTCTCCGTCAAGTGCATTTTAAAAATGGGAAAGCTTAGGGATGCCAATGGGGAAA 600
T V S V S A H F K K W E S L G M P M G K
ACATGTATGAAACGGCATTACTGTAGAAAGCTACCAAAGCAGCGGAAGTGCAAATGTGATG 660
M Y E T A F T V E G Y Q S S G S A N V M
ACCAATCAGCTGTTTATTGGCAACTAA 687
T N Q L F I G N *

```

그림 5. *Bacillus* sp. HY-22 균주로부터 유래된 xylanase의 유전자 서열

Bacillus sp. HY-22 균주를 50 ml LB broth를 포함하는 250 ml 삼각플라스크에 균주를 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 170 rpm 조건으로 16시간동안 배양한 배양액을 종균으로 이용하였다. 종균 배양액을 2.0%(w/v) wheat bran, 0.9%(w/v) yeast extract, 0.9%(w/v) bacto peptone, 0.2%(w/v) potassium nitrate, 0.1%(w/v) potassium dihydrophosphate, 0.01%(w/v) magnesium sulfate를 포함하는 배지를 이용하여, 5 L 발효조에서 37 $^{\circ}$ C, 600 rpm, 그리고 1.0 vvm 통기량의 조건으로 배양하였다. xylanase의 활성은 배양 12시간에 최대 275 unit/ml의 xylanase 활성을 확인하였다.

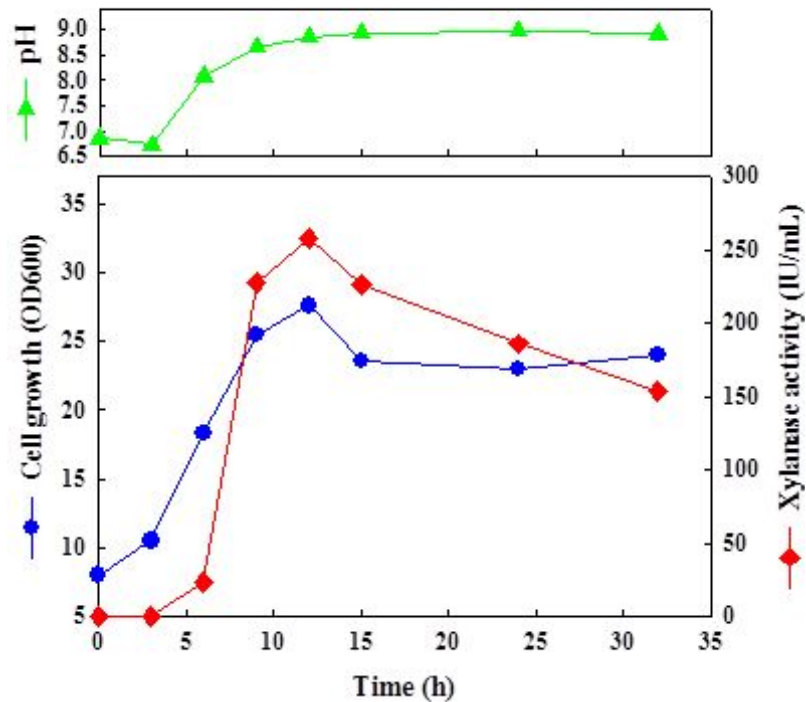


그림 6. *Bacillus* sp. HY-22 균주를 이용한 xylanase 배양

분리 균주로부터 xylanase를 정제하기 위하여 배양액을 확보하여 원심분리기를 이용하여 7000 rpm에서 20분간 원심분리하여 배양상등액을 회수하였다. 배양상등액에 25% 염화암모늄을 첨가하여 4℃에서 15시간 동안 침전시킨 후, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다.

침전물을 50 mM 인산완충용액(pH 6.5)에 녹인 다음, 4℃에서 12시간 동안 투석하여 조효소액을 얻었다.

조효소액은 음이온 교환수지를 이용한 크로마토그래피(DEAE Sephadex A-50 ion-exchange column chromatography)와 겔 컬럼 크로마토그래피(Hiload HR 16/60 Superdex G-75 FPLC)를 통하여 정제하였다.

최종 정제된 효소는 분자량 약 24 kDa으로 확인되었고, SDS-PAGE 상에서 단일밴드의 정제효소를 확인할 수 있었다.

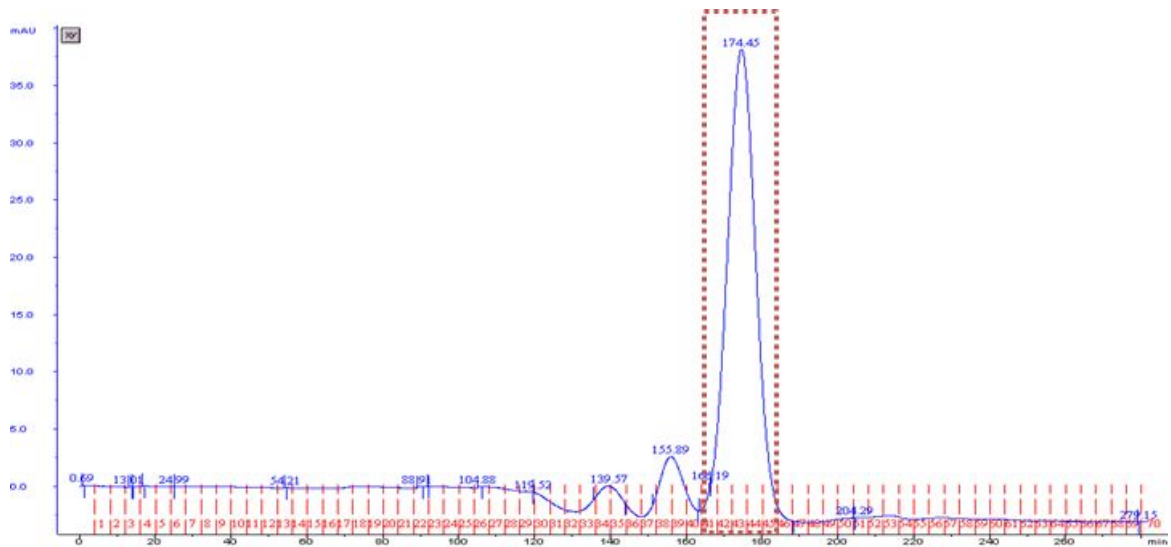


그림 7. Hiload 16/60 HR Superdex G-75 컬럼 크로마토그래피를 통한 xylanase 고순도 정제

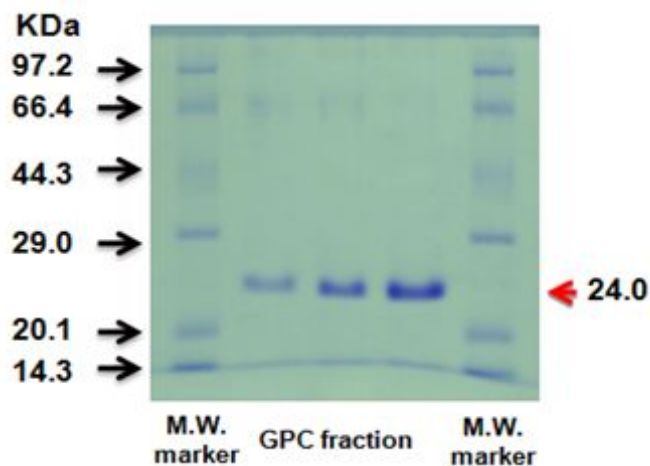


그림 8. SDS-PAGE 상에서의 정제된 xylanase의 분자량 검토

Xylanase의 최적 반응온도는 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 및 70℃에서 각각의 온도에서의 활성을 측정함으로써 확인하였고, 온도 안정성은 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 잔존활성을 측정하여 비교하였다. 최적 반응 pH는 4.0 ~ 10.0 범위에서 sodium citrate buffer(pH 4.0 ~ 5.5), sodium phosphate buffer, potassium phosphate buffer(pH 5.5 ~ 7.5), Tris-HCl buffer(pH 7.5 ~ 9.0), 및 glycine-NaOH buffer(pH 9.0 ~ 10.0)을 각각 50 mM의 농도로 50℃에서 10분간 처리하여 효소 반응을 측정함으로써 확인하였다.

그 결과, 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.5에서 50℃의 온도 하에 버치우드 자일란(birchwood xylan)과 반응할 때 기질에 대한 xylanase의 분해활성이 최대값을 나타냈다. 효소의 온도에 대한 영향은 40~60℃에서 60%이상의 활성을 나타내었고, pH 5.0~9.0 사이에서 80% 이상의 활성을 나타내었다.

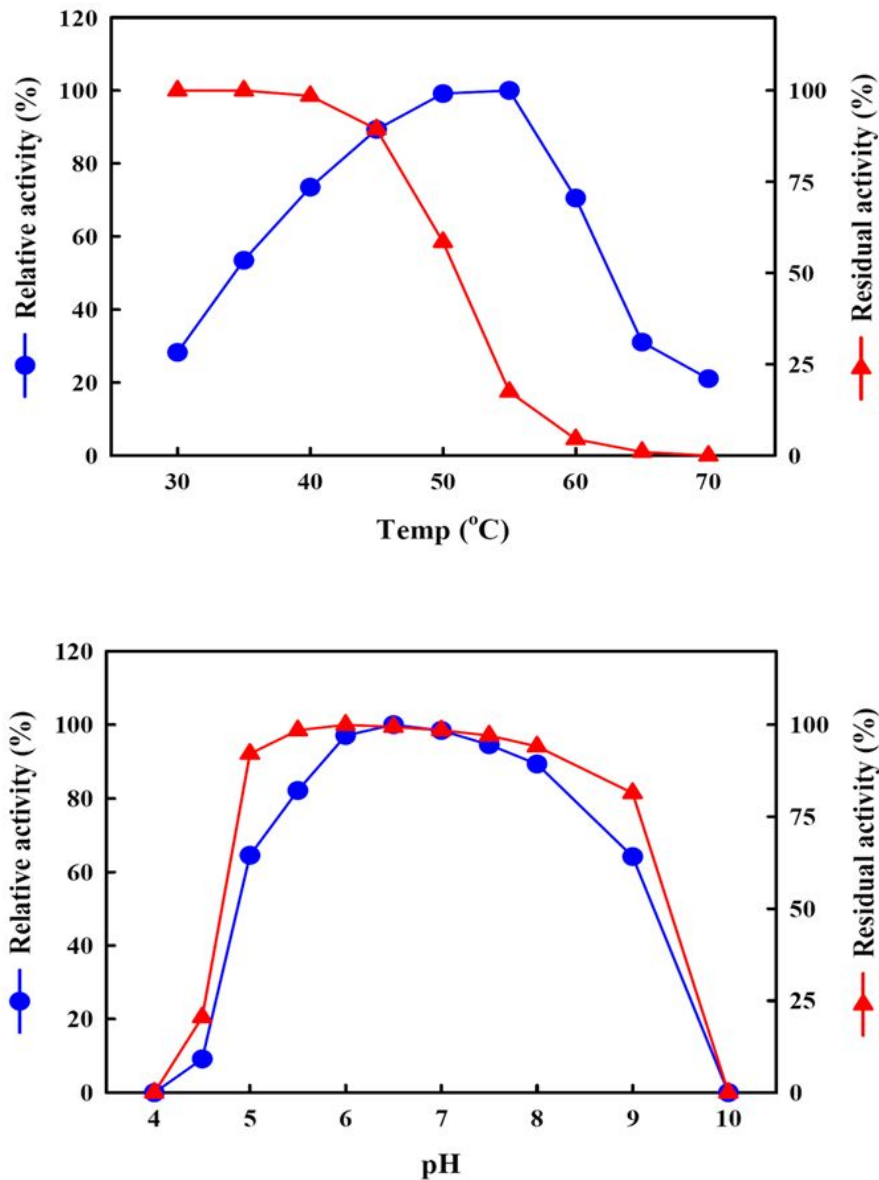


그림 9. HY-22 균주 유래의 xylanase의 최적반응 온도, pH 및 안정성 검토

Xylanase의 활성에 대한 metal ion 및 chemical compounds의 영향을 확인하기 위해, 각각의 metal ion(1 mM)과 chemical compounds(5 mM)을 이용하여 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 함유한 반응액에 50°C 에서 10분 동안 처리하고 birchwood xylan에 대한 효소활성을 확인하였다.

XylIC는 1 mM Hg^{2+} 와 5 mM *N*-bromosuccinimide에 10min간 노출될 때 완전히 불활성화 되었으며, Cu^{2+} 에 의해 부분적으로 활성이 저해 받는 것으로 확인되었음. 그러나 본 효소는 sodium azide, EDTA, 및 Triton X-100에 의해 10~20% 가량의 효소활성이 증대될 수 있음이 확인되었지만, 대부분의 양이온에 의해서는 거의 활성면에서 이들에 의해 증가나 저해를 받지 않았다. (표 6)

표 6. XylC의 metal ion과 chemical compound에 대한 활성 검토

Compound	Relative activity (%)
Control	100.0
BaCl ₂	105.8
CaCl ₂	96.0
CoCl ₂	118.6
CuCl ₂	70.2
HgCl ₂	<5.0
MgCl ₂	96.0
MnCl ₂	131.5
ZnCl ₂	97.8
FeSO ₄	104.3
NiSO ₄	93.5
<i>N</i> -Bromosuccinimide	<5.0
Sodium azide	107.5
EDTA	98.2
Tween 80 (0.5%)	104.5

XylC의 다양한 기질에 대한 활성을 비교 검토하기 위하여 xylanase 활성을 검토하는 birchwood xylan, beechwood xylan, 및 oat spelt xylan, cellulase 활성을 검토하는 Avicel, mannanase 활성을 검토하는 locust bean gum 등을 이용하여 가수분해율을 비교하였다. XylC는 oat spelt xylan에서 가장 높은 활성을 나타내었고, birchwood xylan과 beechwood xylan에서는 oat spelt xylan에 비하여 84.2%와 81.2% 상대적인 활성을 나타내었으며, 그 외의 Avicel과 locust bean gum에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. 따라서 본 효소는 xylanase에 대한 활성을 갖는 효소임을 확인할 수 있었다. (표 7)

표 7. XylIC의 다양한 기질에 대한 활성 비교

Substrate	Relative activity (%)
Birchwood xylan	84.2
Beechwood xylan	81.2
Oat spelt xylan	100.0
Avicel	0.0
Locust bean gum	0.0

3. 무척추 동물 장내미생물로부터 만난아제 개발

가. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주 분리 및 mannanase 유전자원의 확보

무척추 동물로 분류되는 지렁이 장내세균 중, 만난아제(mannanase) 활성을 나타내는 균주를 아조 만난(Azo-mannan)을 함유한 LB 한천배지상에서 균총을 확보하였고, 셀룰로시마이크로비움 펀케이(*Cellulosimicrobium funkei*) ATCC BAA-886균주와 99.8% 이상의 높은 상동성을 나타내어 본 균주를 셀룰로시마이크로비움 속으로 동정하였으며 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13으로 명명하였다.

셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 크로모솜(chromosome) DNA를 추출하여 GH5 endo-베타-1,4-만난아제(endo- β -1,4-mannanase)의 공통된 유전자 서열에 대한 PCR 반응을 수행하였다. 상기의 PCR 산물은 pGEM-T 벡터(Promega)를 클로닝하여 전체 mannanase 유전자 서열을 얻었다. Mannanase gene과 다른 유사 효소들의 서열을 멀티플 시퀀스 얼라인먼트(multiple sequence alignment)한 결과, mannanase가 세포외 GH5 endo- β -1,4-만난아제와 매우 유사한 것으로 확인됨으로써 endo- β -1,4-만난아제의 분자 구조를 가지는 효소임을 확인하였다.

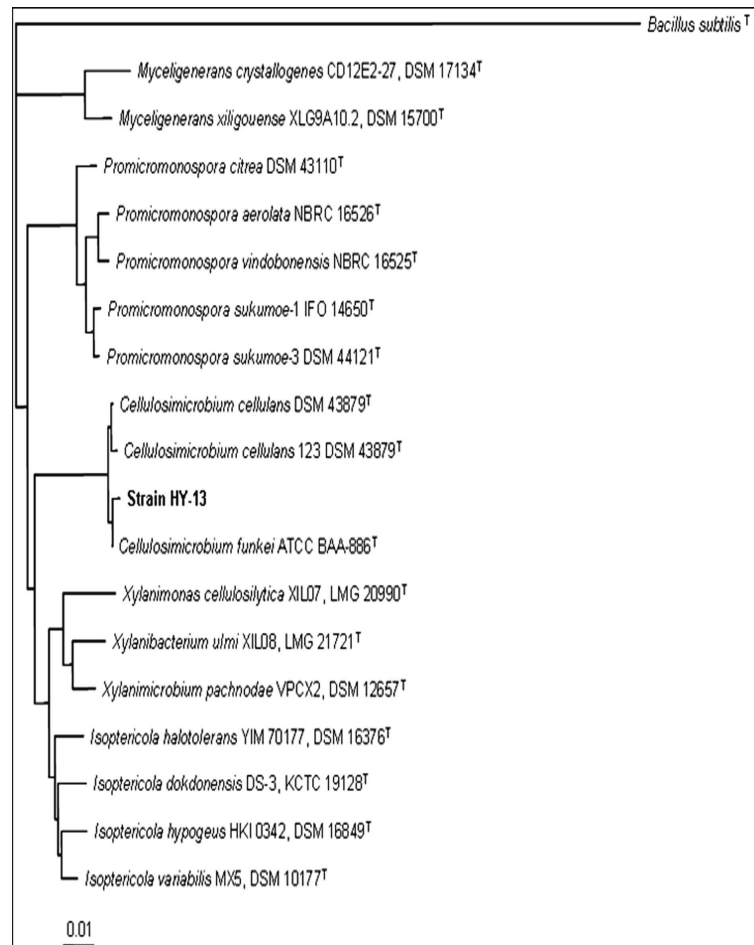


그림 10. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주의 16S rDNA 동정 결과

```

1 ATGAGACGACTGTTCCGCATCGTCCTGGGCGCGGTGCTCGCCCTTGCTCGCCGCTGCCGGCG 60
M R R L F A I V L G A V L A L L A V P A
61 CTCGCGCAGGGGGCGAGCGTCCGCGAGCGACGGGTTCTCCGTCCAGGACGGGAGGATCTAC 120
L A Q G A S V A S D G F S V Q D G R I Y
121 GACGGGAACGGCAACCGCTTCGTGCCGGTCCGGCGTCAACCACGGCGCACGCTGGTACCCG 180
D A N G N R F V P V G V N H A H A W Y P
181 TCGCAGACGCAGTCCTTCGCGGACATCCGCGCCCGCGGGCGGGAACACCGTCCGCGTCCGTG 240
S Q T Q S F A D I R A A G A N T V R V V
241 CTGTCCGGGCGCGGTACGGGACGAGCTCGGGCGCGACGTGAGCGCCGTGGTTCGAGCGC 300
L S G G R Y G T S S A A D V S A V V E R
301 TGCAAGCAGAACCAGCTCGTGTGCATCCTCGAGAACCACGACACGACGGGCTACGGCGAG 360
C K Q N Q L V C I L E N H D T T G Y G E
361 GACGGCAGCGCCCGGTTCGCTCGCGAGCGCGGGCGCAGTACTGGACCAGCATCCGCGTCCGTC 420
D G S A R S L A S A A Q Y W T S I A S V
421 CTGCGCGGCCAGGAGCGGTACGTGATGATCAACATCGGCAACGAGCCCTTCGGCAACTCC 480
L R G Q E R Y V M I N I G N E P F G N S
481 GGCTTCCAGAGCTGGACGACGGACACGATCGCGGGGATCCGGGACCCTGCGCGCGGGCGGGC 540
G F Q S W T T D T I A A I R T L R A A G
541 CTCGACCACACGCTCGTTCGTGGACGCCCGAAGTGGGGACAGGACTGGTTCGTTCCACCATG 600
L D H T L V V D A E N W G Q D W S F T M
601 CGCGACAACGCCCGGACGGTCCGCGCGCGGGACGGGAACGTGGTCTTCTCCGTCCACATG 660
R D N A P T V A A A D G N V V F S V H M
661 TACGGCGTCTTCGACACCGGGGCGGAGGTGCGCGGTACCTCGACTCCTTACAGAGCCGA 720
Y G V F D T G A E V R A Y L D S F T S R
721 GGGTTCGCCGATCATGGTTCGCGGAGTTCGGTGACAACCACCTCGGACGGGAACCCGGACGAG 780
G L P I M V G E F G D N H S D G N P D E
781 GCCACGATCATGAGCTACACGGGTCCGAGGGGATCGGGATGCTCGGCTGGTGGTCC 840
A T I M S Y T R S Q G I G M L E K S W S
841 GGCAACGGGGGCGCGTCCGAGTACCTGGACATGGTGAACGGGTTCTCCGCGAGCTCGCTC 900
S N G G G V E Y L D M V N G F S A S S L
901 ACGCCGTGGGGGCGAGCGGTTCGTCCACGGCGCCGACGGGCTCAGGGCCCGCAACGGCGCC 960
T P W G Q R F V H G A D G L R A R N A P
961 GCGGCTCCGTGTACGGGGGCGACGGCGCGGATGGAGACGGCGGAGCCGGTACGGCACCC 1020
A A S V Y G G D G G D G D G G A G T A P
1021 AACGGGTACCCGTACTGCGCGAGCGCGTTCGTCCGACCCGGACGGGGACGGGTGGGGCTGG 1080
N G Y P Y C A S A S S D P D G D G W G W
1081 GAGAGCAGCGCGTTCGTGCGTGGTGCAGCGGCTCCTCCGCGGACACGGGTTCCGGCGGTGGC 1140
E S S A S C V V R G S S A D T G S G G G
1141 TCCGGGAGCGGGAGCACGGCACCGAACGGGTACCCGTACTGCGCGAGCGCGTTCGTCCGAC 1200
S G S G S T A P N G Y P Y C A S A S S D
1201 CCGGACGGGGACGGGTGGGGCTGGGAGAGCAGCGCCTCGTGGCTCGTGGCGGGCTCGTCC 1260
P D G D G W G W E S S A S C V V R G S S
1261 GCCGACCGCTGA 1320
A D R *

```

그림 11. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주 유래의 mannanase 유전자서열

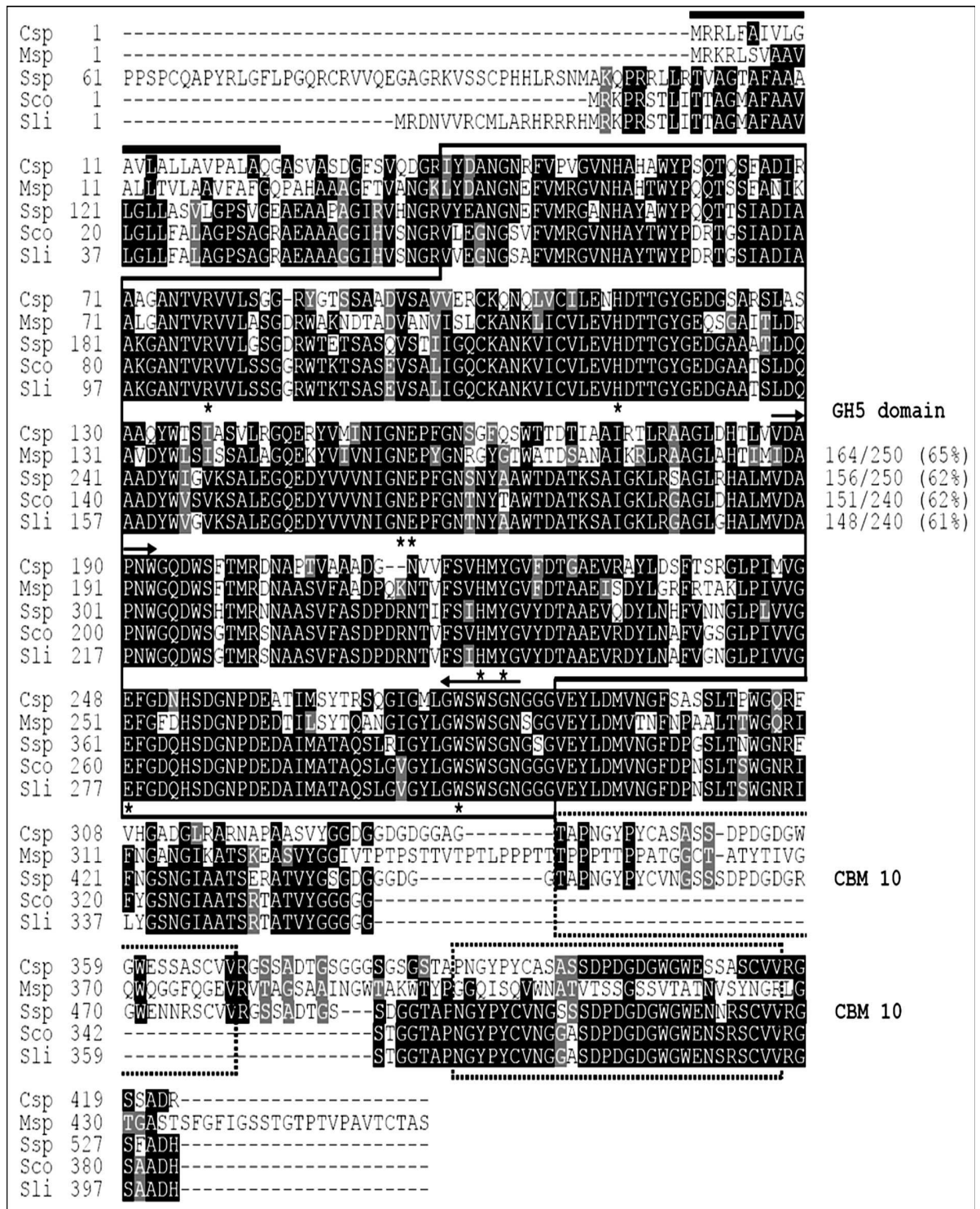


그림 12. *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 균주 유래의 mannanase domain 분석

Csp : *Cellulosimicrobium* sp. HY-13 mannanase

Msp : *Micromonospora* sp. β -1,4-mannosidase (GG657738);

Ssp : *Streptomyces* sp. s6-204 β -1,4-mannanase (ABY90130);

Scs : *S. coelicolor* A3 β -1,4-mannosidase (CAA20610)

Sli : *S. lividans* TK24 β -1,4-mannanase (EFD65759)

나. Mannanase의 발현, 정제 및 분석

유전자 서열이 확인된 mannanase gene을 발현하여 효소를 분리 정제하기 위하여 NdeI/HindIII의 제한효소를 이용하여 발현벡터인 pET-28a(+) 벡터를 절단하여 준비하였고, pGEM-T 벡터에 재조합된 mannanase gene은 N-말단과 C-말단에 각각 NdeI/HindIII 제한효소 사이트를 포함하는 DNA 프라이머를 제작하여 PCR 중합반응으로 DNA 단편을 획득하였다. pGEM-T(+) 발현벡터와 중합된 mannanase gene을 재조합하고, E.coli BL21 균주에 형질 전환하여 콜로니를 획득하였다. 형질 전환된 균주는 500 ml의 Luria-Bertani 배지를 포함하는 2 l baffled-플라스크에서 30°C 온도와 180 rpm의 회전수에서 7시간 동안 배양하였다. 만난아제(mannanase)의 과발현을 유도하기 위하여 배지에는 1 mM의 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)를 첨가하였다. 배양물의 흡광도 (A600)가 0.4 ~ 0.5에 이르면, 배양액을 7000 rpm에서 20분간 원심분리하여 배양상등액을 버리고 침전물(세포)을 -20°C에서 1시간 동안 보관하였다. 분리된 세포는 버그버스터(BugBuster) 단백질 분리 용액(Novagen)을 처리하여 12000 rpm에서 20분간 원심분리하여 조효소액을 획득하였다. 수득된 조효소액은 HisTrap HP 친화성 컬럼 크로마토그래피(affinity column chromatography)에 처리하여 제조사의 제품사용 방법에 따라 수행하였으며 재조합된 효소를 용출하였다. 활성이 있는 분획물을 얻은 후 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) 조건에서 HiPrep 26/10 탈염 컬럼(desalting column)에 처리하여 염을 제거하였다. 염이 제거된 분획물은 사전에 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) 으로 평형화된 Hiload 26/60 Superdex 200에 로딩(loading)하였다. 더 정제를 하기 위해서 수득된 활성 분획물을 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 크로마토그래피(anion-exchange column chromatography)에 로딩(loading)하였고 결과적으로, 1.0 M NaCl의 농도와 2.0 ml/min의 조건에서 정제된 mannanase를 수득하였다. 12.0% 젤(gel) 조건에서 SDS-PAGE(sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였고 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue) R-250 염색으로 단백질을 확인하였다. 친화성 크로마토그래피(chromatography)를 통해 정제된 재조합 단백질의 자이모그래피(Zymography) 분석을 0.5% locust bean gum을 포함한 12.0% 폴리아크릴아마이드 젤(polyacrylamide gel) 조건에서 수행하였다. SDS-PAGE 후에 50°C 하에 15분 동안 생분해 반응을 수행하였으며, 반응 후 β -1,4-만난아제의 활성은 콩고 레드(Congo red)염색으로 확인하였다.

그 결과, mannanase는 약 44 kDa의 분자량을 갖는 효소임을 확인하였다. 이미 보고된 바 있는 미생물의 β -1,4-만난아제와 비교하였을 때 재조합된 mannanase의 분자량은 아스퍼질러스 액쿨레투스(*Aspergillus aculeatus*)의 엔도 β -1,4-만난아제와 가장 유사하였다. 하지만 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13(*Cellulosimicrobium* sp. HY-13)균주의 ManK(35.0 kDa) 및 S. 리비단스(*S. lividans*) 66의 β -만난아제(36.0 kDa) 보다는 큰 것으로 나타난다. 또한 재조합된 유전자의 분자량은 상대적으로 큰 분자량을 갖는다고 알려진 다기능이 없는 GH-5 β -만난아제 (>60.0 kDa)보다는 작았다.

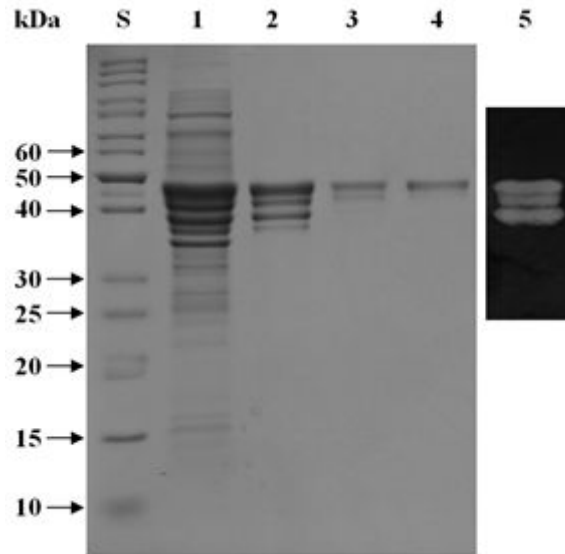


그림 13. 정제된 mannanase(manH)의 SDS-PAGE 및 zymography
 lane S : 기준 마커 단백질 ; lane 1 : cell extract ; lane 2 :
 affinity chromatography ; lane 3 : gel permeation
 chromatography ; lane 4 : anion exchange chromatography ;
 lane 5 : zymography (staining congo-red)

다. Mannanase의 생화학적 특성 검토

(1) Mannanase의 최적 온도, pH 및 화학적 특성

Mannanase의 최적 반응온도는 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65 및 70°C에서 각각의 온도에서의 활성을 측정함으로써 확인하였고, 온도 안정성은 각각의 온도에서 15, 30, 및 60분간 열처리한 후 잔존활성을 측정하여 비교하였다. 최적 반응 pH는 4.0 ~ 10.0 범위에서 구연산염 완충용액(pH 4.0 ~ 5.5), 인산염 완충용액(pH 5.5 ~ 7.5), Tris-HCl 완충용액(pH 7.5 ~ 9.0), 및 glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0 ~ 10.0)을 각각 50 mM의 농도로 50°C에서 15분간 처리하여 효소 반응을 측정함으로써 확인하였다.

그 결과, pH 6.0에서 50°C의 온도하에 locust bean gum과 반응할 때 기질에 대한 mannanase의 분해활성이 최대값을 나타냈다(도 5의 a 및 b). 또한, mannanase의 열불안정성의 지표로서, 최적 온도(50°C)에서 효소의 반감기가 약 15분으로 나타났고, 55°C에 노출된 경우 mannanase의 열 불활성이 급격히 증가하였다. (Kim et al., 2009a)

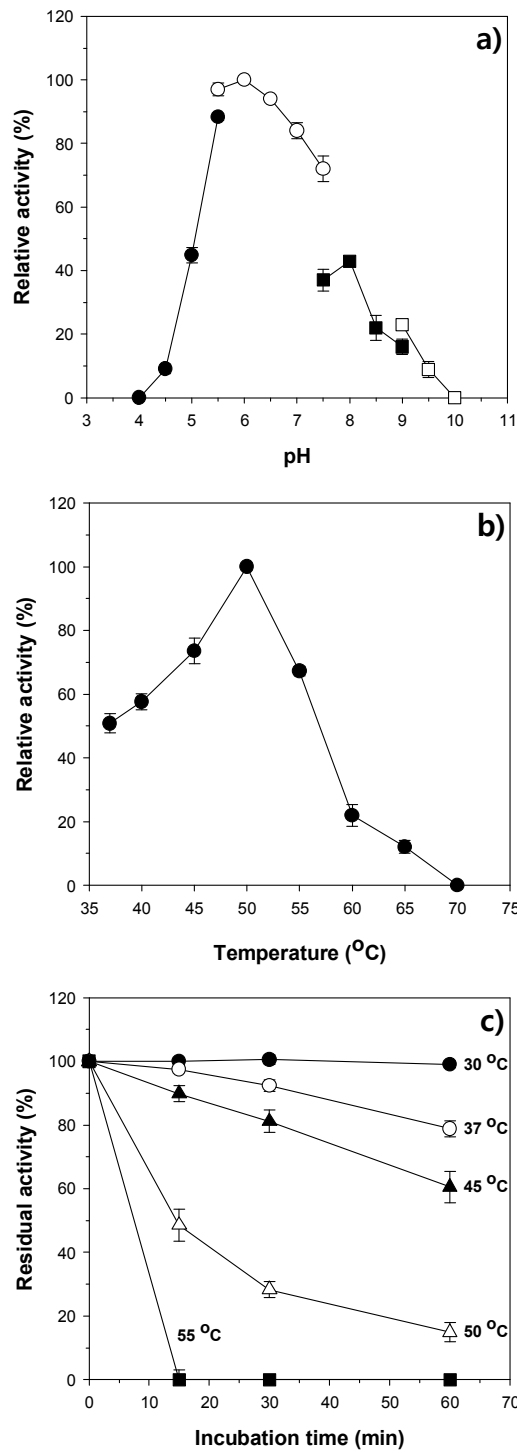


그림 14. Mannanase 활성에 대한 온도 및 pH에 의한 영향

(2) Mannanase의 활성에 대한 금속이온 및 화학 물질의 영향

Mannanase의 활성에 대한 금속이온 및 화학 물질의 영향을 확인하기 위해, 각각의 금속이온(1 mM)과 화학 물질(5 mM)을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)안에서 50°C 에서 10분 동안 처리하고 mannanase의 분해 효소 활성을 확인하였다.

그 결과, mannanase의 촉매 활성은 Ca^{2+} 의 존재 하에서 약 1.4배 이상 증가하였고, Mn^{2+} 및 Ba^{2+} 와 같은 이가양이온 존재 시 효소의 활성은 약 1.2배 증가하였으며, Mg^{2+} 또는 Sn^{2+} 는 효소 활성에 영향을 주지 않았다. 반면에, Hg^{2+} 및 N-bromosuccinimide와 같은 강력한 Trp 조절물질은 효소를 불활성화 시켰고, Cu^{2+} , Zn^{2+} 및 Fe^{2+} 와 같은 금속 이온은 mannanase 활성을 50% 이상 현저히 억제하였다. (Zolotnitsky et al., 2004)

표 8. Mannanase 활성에 대한 metal ion 및 chemical compound에 의한 영향

Metal ion and chemicals	Relative activity(%)
None	100.0
HgCl_2	0
CaCl_2	146.9
NiSO_4	67.1
CuCl_2	16.7
ZnSO_4	47.4
MgSO_4	99.9
MnCl_2	125.2
SnCl_2	103.7
BaCl_2	118.5
CoCl_2	111.9
FeSO_4	42.2
N-Bromosuccinimide	0
Iodoacetamide	113.3
Sodium azide	145.7
N-Ethylmaleimide	121.4
EDTA	19.0
Tween 80 (0.5%)	103.5
Triton X-100 (0.5%)	98.9

라. Mannanase의 기질특이성 및 가수분해 산물 분석

(1) Mannanase의 기질 특이성 확인

다양한 기질에 대한 mannanase의 활성을 비교하기 위하여, locust bean gum, 상아야자 열매 만난(ivory nut mannan) 및 구아검(guar gum)의 기질을 이용하여 상기 정제된

mannanase의 활성을 비교하였다.

β -1,4-만난아제 활성은 3,5-디나이트로살리실릭산(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)을 이용하여 locust bean gum에서 분리되는 감소하는 당의 양을 측정함으로써 분석하였다. 이때 D-mannose를 표준물질로 사용하였다. 0.5% locust bean gum으로 구성된 기준 분석 혼합물 0.5 ml과 효소 수용액 0.05 ml의 생분해 반응을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 에서 50°C 15분 동안 수행하였다. 만난 기질에 대한 1 IU의 재조합된 mannanase 활성은 표준 분석 조건하에서 1분당 1 μ mol의 환원당이 분비되기 위해 필요한 단백질의 양인 것으로 정의하였다. 크로모제닉 PNP-당 유도체는 재조합된 효소의 다른 분해활성을 측정하기 위해 쓰였다. 크로모제닉 기질에 대한 재조합된 mannanase의 분해 활성은 β -1,4-만난아제 활성의 기준 분석에서 쓰인 반응 조건에서 측정되었다. PNP-당 유도체에 대한 1 IU의 분해 활성은 표준 분석 조건하에서 1분 동안 1 μ mol의 PNP를 생산하기 위해서 필요한 단백질의 양인 것으로 정의하였다.

그 결과, 본 연구의 mannanase는 ivory nut mannan에 대해 14,711 IU/mg의 고활성을 나타내는 효소이며, locust bean gum 및 gua gum에 대해서 각각 8,498 IU/mg 및 967 IU/mg의 분해활성을 나타냈다. 이러한 결과를 통하여 상아야자 열매 만난에 대한 만난아제의 특이적 활성은 locust bean gum 및 구아검에 대한 효소 활성에 비하여 각각 1.7 배 및 15.2배 높은 것을 알 수 있었다(표 9 및 표 10). 아울러, 카복시메틸셀룰로스 (Carboxymethylcellulose), 버치우드 자일란(Birchwood xylan), 가용성 녹말(soluble starch), 및 펙틴(pectin)과 같은 탄수화물은 만난아제에 의해 분해되지 않았으므로, 만난아제는 글리코시드 가수분해효소 활성이 결여된 엄격한 GH5 β -1,4-만난아제임을 알 수 있었다.

표 9. Bacterial β -1,4-mannanases의 기질에 대한 상대활성 비교

균주	효소	M.W. (kDa)	Opt. pH	Opt. temp. (°C)	Specific activity (IU/mg)	Reference
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-13	rManH ^a	44.0	6.0	50	14,711 ^c	This study
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-13	rManHa	44.0	6.0	50	8,498 ^d	This study
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-13	ManK	35.0	7.0	50	7,109 ^d	Keim et al., 2011
<i>Streptomyces</i> sp. S27	Man5S27 ^a	43.0	7.0	65	2,107 ^d	Shi et al., 2010
<i>Bacillus circulans</i> CGMCC1554	Man5A ^a	32.0	7.6	60	4,839 ^d	Yang et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> WY34	Mannanase ^b	39.6	6.0	65	8,302 ^d	Jiang et al., 2006

a : Recombinant GH5 β -1,4-mannanase produced in *E.coli*

b : Wild type β -1,4-mannanase

c : Specific activity toward insoluble ivory nut mannan

d : Specific activity toward locust bean gum

표 10. Mannanase의 다양한 기질에 대한 활성 비교

기질	특이적 활성(IU mg ⁻¹)
Locust bean gum	8,498±105
Guar gum	967±18
Insoluble ivory nut mannan	14,711±183
Pectin	ND ^b
Birchwood xylan	ND
Soluble starch	ND
Carboxymethylcellulose	ND
PNP-cellobioside	ND
PNP-glucoopyranoside	ND
PNP-xylopyranoside	ND
PNP-mannopyranoside	ND

^a Specific activity was obtained from the three repeated experiments.

^b Not detected.

(2) 분해 산물의 분석

만노올리고머(M₂ 내지 M₅ 각 1 mg/100 μℓ)와 locust bean gum(1.4 mg/100 μℓ)을 재조합 만난아제 1 μg이 포함된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)와 30℃ 하에서 12시간 동안 반응시켜 분해 산물을 확인하였다. HPLC(High performance liquid chromatography, HPLC) 분석은 Asahipak NH2P-50 2D 컬럼(column) (5 μm, 2.0 × 150 mm, Shodex)이 장착되어 있고, Xcalibur software (version 1.3 SP2, Thermo Electron Co.)로 운영되는 Finnigan Surveyor™ Modular HPLC systems (Thermo Electron Co.)을 이용하여 수행하였다. 용출용액 A(0.05% 포말산/멸균수)와 용출용액 B(0.05% 포말산이 첨가된 아세토니트릴 및 메탄올 (7:3) 이동상을 이용하였다. Finnigan LCQ Advantage MAX ion trap mass spectrometer (Thermo Electron Co.)을 이용하여 LC-MS/MS(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)를 수행하였다.

HPLC 분석을 통하여 만난아제의 만난 가수분해 산물을 확인한 결과, locust bean gum에 대하여 만난 폴리사카라이드는 M₆ 이상(39.4%)의 만노올리고머(mannooligomer)와 더불어 일차적으로 M₅(44.2%)로 분해되었고, 소량의 M₁(1.1%), M₂(6.4%), M₃(1.5%) 및

M₄(7.4%)로 효율적으로 분해됨을 확인하였다. 한편, 상아야자열매 만난은 주로 M₄(25.2%)로 분해되었다. 또한, M₃ 내지 M₅는 만난아제에 의해 대부분 M₂로 분해되었고, 기질로서 M₂는 만난아제에 분해되지 않는 것을 확인하였다(표 11). 이러한 결과를 통하여 만난아제는 2 보다 큰 중합으로 주로 만노스 물질의 주요 백본 내 β-1,4-만노스 결합을 분해할 수 있는 유일한 endo-β-1,4-만난아제인 것을 확인하였다. (Jiang et al., 2006.; Benech et al., 2007.)

표 11. 정제된 mannanase를 이용한 mannose-based materials에 대한 가수분해 양상 분석

기질	Composition (%) of products formed by hydrolysis reaction							
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈
M ₂		100.0						
M ₃	3.5	60.1	31.6	4.0	0.8			
M ₄	3.9	55.5	28.8	9.9	1.9			
M ₅	4.1	46.9	21.8	16.6	7.9	2.8	0.9	
Locust bean gum	1.1	6.4	1.5	7.4	44.2	16.1	21.4	1.9
Ivory nut mannan	3.3	17.5	13.9	25.2	19.7	12.9	7.5	2.9

^a LC 면적(LC area%)

4. 천연물 추출물 검토

가. 삼백초 추출의 확보

삼백초는 삼백초과에 속하는 다년생 초본식물로 학명은 *Saururus chinensis*로 동양에서는 한약재로 널리 이용되고 있는 식물 중에 하나이다. 그 효능은 항암효과와 순환계 질환에 효능이 있는 것으로 잘 알려져 있다.

삼백초를 전초와 뿌리로 나누어서 그 추출물을 부원료로 이용하기 위하여 진행하였다.

삼백초 뿌리(SCR)는 10X(V/W) 70~95% 에틸알콜을 이용하여 실온에서 60시간 동안 추출한 다음, 여과지를 이용하여 고형분을 제거하고 추출액을 분리하였다. 추출액은 감압건조기를 이용하여 농축액을 확보하였다. 삼백초 농축액은 10%(W/V) 부형제(lactose, 야자유, 유청분말 등)를 첨가하여 동결건조공정을 이용하여 삼백초 추출분말을 확보하였다.

삼백초 전초(SCA)는 10X(V/W) 70~95% 에틸알콜을 이용하여 실온에서 60시간 동안 추출하여 1차 추출액을 확보하고, 4X(V/V) 70% 에틸알콜을 이용하여 실온에서 48시간 동안 2차 추출하여 추출액을 확보하였다. 추출액은 감압건조기를 이용하여 농축액을 확보하였다. 삼백초 농축액은 10%(W/V) 부형제(lactose, 야자유, 유청분말 등)를 첨가하여 동결건조공정을 이용하여 삼백초 추출분말을 확보하였다.

표 12. 에틸알코올 농도에 따른 삼백초 부위별 추출액 회수율

시료 (각 5 g)		추출 방법	회수추출액 (ml)	Dry w.t.. (/ml)	총 추출물 (g)	회수율 (%)
삼 백 초	뿌리 (지하부)	70% EtOH 100 ml For 22 hr at R.T. with stirring	91	15.6	1.420	28.4
	지상부		90	8.4	0.756	15.1
	뿌리	95% EtOH 100 ml For 22 hr at R.T. with stirring	84	10.2	0.857	17.1
	지상부		88	5.6	0.493	9.9

상기의 결과를 바탕으로 최종 70% 에틸알코올을 이용하여 추출한 시료를 이용하여 삼백초 추출분말을 확보하였다. 삼백초 추출분말은 HPLC 분석 및 활성 측정용으로 사용하고, 동물 시험용 시료로 이용하였다.

나. 삼백초추출물의 부위별 LDL-oxidation 활성 측정

(1) 혈장으로부터 LDL(low-density lipoprotein)의 분리

적십자 혈액원에서 가져온 사람의 혈장으로부터 초원심분리기(Beckman Optima L-100K Ultracentrifuge)를 이용하여 low-density lipoprotein (LDL)을 분리한다. 먼저 혈장에 0.04% EDTA, 0.05% NaN₃, 0.015% phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF)를 넣어 혈장에 있는 지단백질의 변성을 막는다. 8444× g(55.2 Ti, 38,000 rpm), 4℃에서 20시간동안 초원심분리하였다. 상층에 떠 있는 chylomicron과 VLDL을 걸어내고 나머지 하층은 다음과 같은 식에 의해 NaBr (heavy density solution)을 이용해서 밀도를 1.063 g/ml로 맞추었다. 다시 8444× g, 4℃에서 21시간 동안 초원심분리한 후 최상층의 yellow top layer에 분리된 LDL을 수거하였다. 분리된 LDL을 10mM PBS pH 7.4로 투석하여 고농도의 NaBr을 제거하고, 4℃에서 보관하면서 1개월 이내에 사용하였다.

[계산식]

$$V_2 = V_1 \times [D - D_1 / D_2 - D]$$

V₂ : volume of heavy density solution

V₁ : initial volume of solution

D : required density (1.063)

D₁ : original density

D₂ : density of heavy solution (1.40)

(2) Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) assay

Gu²⁺은 저밀도 지질 단백질의 산화를 유도(Gu²⁺-mediated LDL-oxidation)한다. 따라서 이 때 생성된 불포화 지방산의 산화산물인 디알데하이드(dialdehyde)를 TBA(thiobarbituric acid)법으로 측정하여, 생리활성물질들의 항산화 활성을 측정한다. (Ahn, et al., 2001)

DMSO에 녹인 시료용액 10 μ l, 사람의 혈액으로부터 초원심분리기를 이용해 분리한 LDL 10 μ l (100~200 μ g protein), 10 mM, pH 7.4 PBS 230 μ l를 혼합한 후에 0.125 mM CuSO₄ 10 μ l를 첨가함으로써 반응을 시작한다. 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, 20% trichloroacetic acid (TCA)용액 1ml을 첨가하여 반응을 중단시킨다. 0.05 N NaOH 용매에 녹인 0.67% thiobarbituric acid (TBA) 1 ml을 첨가하고 교반한 후, 발색반응이 일어나도록 95°C에서 15분간 가열하고 얼음물에 냉각한다. 반응액을 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후, 상등액을 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 계산한다. 한편, tetramethoxypropane malonaldehyde bis (dimethylacetal)의 저장용액을 이용하여 0~10 nmol 말론디알데하이드를 포함하는 PBS 표준용액 250 μ l씩 만든다. 이 표준용액을 상기와 같은 방법으로 발색시켜 540nm에서의 흡광도를 측정하고, 말론디알데하이드의 표준곡선을 구한다.

양성 대조군으로는 buthylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

표 13. 삼백초 추출물의 LDL-oxidation 활성 비교

Extracts of <i>S. Chinensis</i>	Inhibition of LDL-oxidation (%)		
	2011-07-21	2011-07-28	
	20 μ g/ml	10 μ g/ml	5 μ g/ml
Root - 70% EtOH Ex	59.0 \pm 0.7	15.7 \pm 0.3	2.8 \pm 2.2
Root - 95% EtOH Ex	43.8 \pm 1.4	25.3 \pm 2.9	6.2 \pm 0.7
Aerial part - 70% EtOH Ex	91.1 \pm 0.9	90.1 \pm 0.4	81.8 \pm 0.4
Aerial part - 95% EtOH Ex	89.8 \pm 1.0	82.37 \pm 1.6	48.1 \pm 1.5
Positive control (BHT 2 μ M)	63.7 \pm 1.7	65.8 \pm 0.8	
LDL-항산화이 매우 높으며, 뿌리추출물에 비해 전초추출물의 활성이 더 높음. 다른 활성은 아직 검색하지 못하였음. 동물실험용 시료는 대량 공정을 고려하여 70% EtOH 로 추출하였음.			

다. HPLC를 이용한 삼백초 추출액의 유용성분 분석

상기의 방법으로 확보한 삼백초 추출액의 LDL-oxidation 활성을 갖는 유용성분을 분석하기 위하여 HPLC(Shimadzu 10A vp) 분석법을 이용하여 물질을 분석하였다.

추출액을 물질을 비교하기 위하여 $4.6 \times 150\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$ Cosmosil 5C18-MS-II 컬럼을 이용하였고, 시료는 Auto injector(Shimadzu SIL-10A vp)를 이용하고, 254 nm의 파장에서 PDA detector(Shimadzu SPD-M10A vp)를 이용하여 피크를 비교 분석하였다. 0.1% acetic acid (A)와 acetonitrile (B)를 이동상 용매로 이용하여 gradient method (EGML-old-100 min)를 이용하여 전개하였다.

용매 추출을 통한 유용물질의 분리는 HPLC 분석상에서 70%와 95%를 비교하였을 경우 그 농도의 차이가 별로 없음을 알 수 있었고, 앞에서 나타난 각각의 용매의 농도에서 70% 에틸알콜의 농도에서 많은 량의 추출물을 획득할 수 있었으므로, 최종 추출 용매의 농도를 70% 에틸알콜로 추출을 진행하였다.

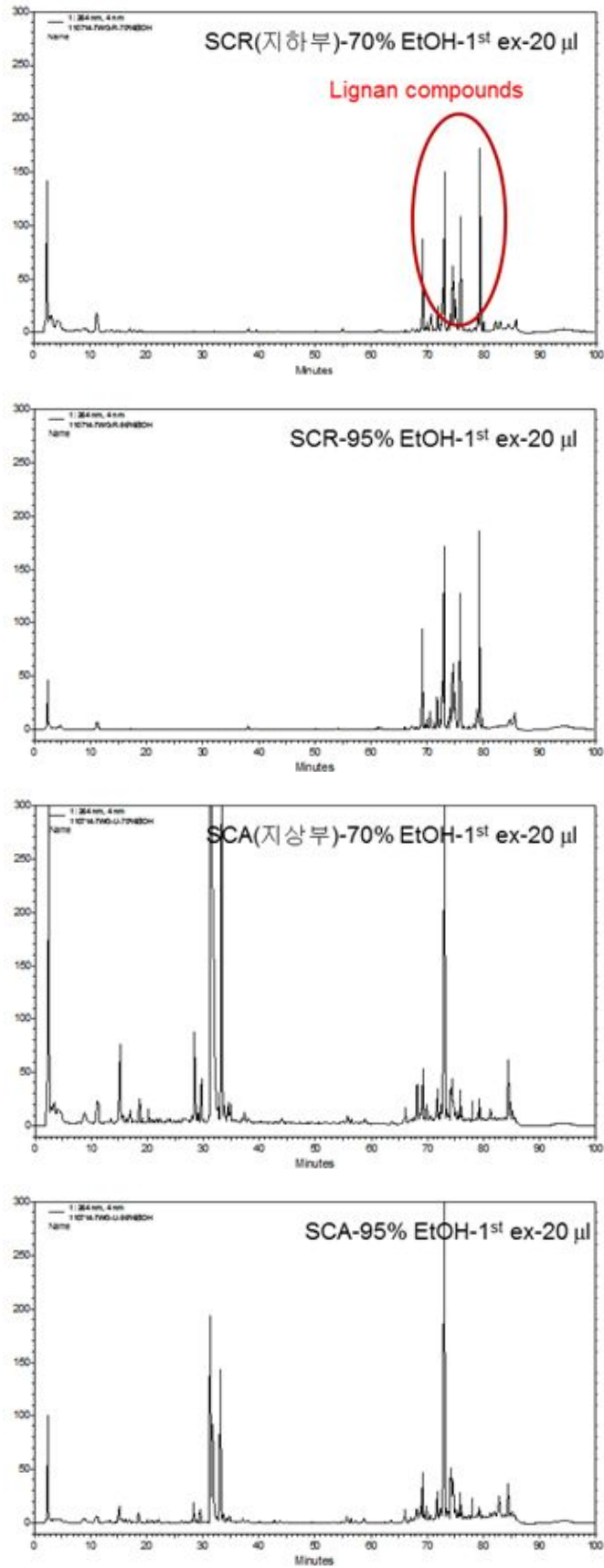


그림 15. 에틸알콜 농도별 삼백초 추출액의 HPLC 분석결과

제 3 절 산업적 대량생산 공정 시스템 개발 및 사료첨가제 시험제형 완성

1. 산업용 대량생산 균주 개발 및 배양 조건의 검토

가. *Bacillus* sp. host를 이용한 발현 시스템 개발

기 확보한 셔틀벡터를 발현벡터로 이용하여 *Bacillus subtilis* DB431 균주에 xylanase, mannanase를 과발현 시키기 위하여 사용하였다.

각각의 효소를 promoter 영역, terminator 영역, shuttle vector 서열을 중첩서열을 포함하는 PCR primer를 제작하여 PCR을 수행하여 expression gene cassette를 제작하고 Infusion cloning method를 사용하여 발현벡터를 구성하였다.

Xylanase 발현벡터는 primer 영역은 5'-TTCCTTAAGGAATTCTGTTTCCTGTGTGAAAT-3' promoter F primer와 5'-CAAAGTCAGAAAAAATAGTATAGGAGGTAACAT-3' promoter R primer, xylanase 영역은 5'-TATAGGAGGTAACATTCTAGTAGTGAGTGGGGCAT-3' xylC F primer와 5'-TCAGCTGTTTATTGGCAACTAACAGCTC-3' xylC R primer, terminator 영역은 5'-GGCAACTAACAGCTCATCTTTAATGAGGGGCAG-3' terminator F primer와 5'-TTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAG-3' terminator R primer를 준비하여 PCR을 수행하여 expression gene cassette를 준비하였다. 이를 이용하여 셔틀벡터의 정확한 위치에 삽입하기 위하여 Infusion HD cloning kit(Clontech Lab., Inc.)를 이용하여 ligation 후 *Bacillus subtilis* DB431 균주에 형질전환하였다 (그림 16).

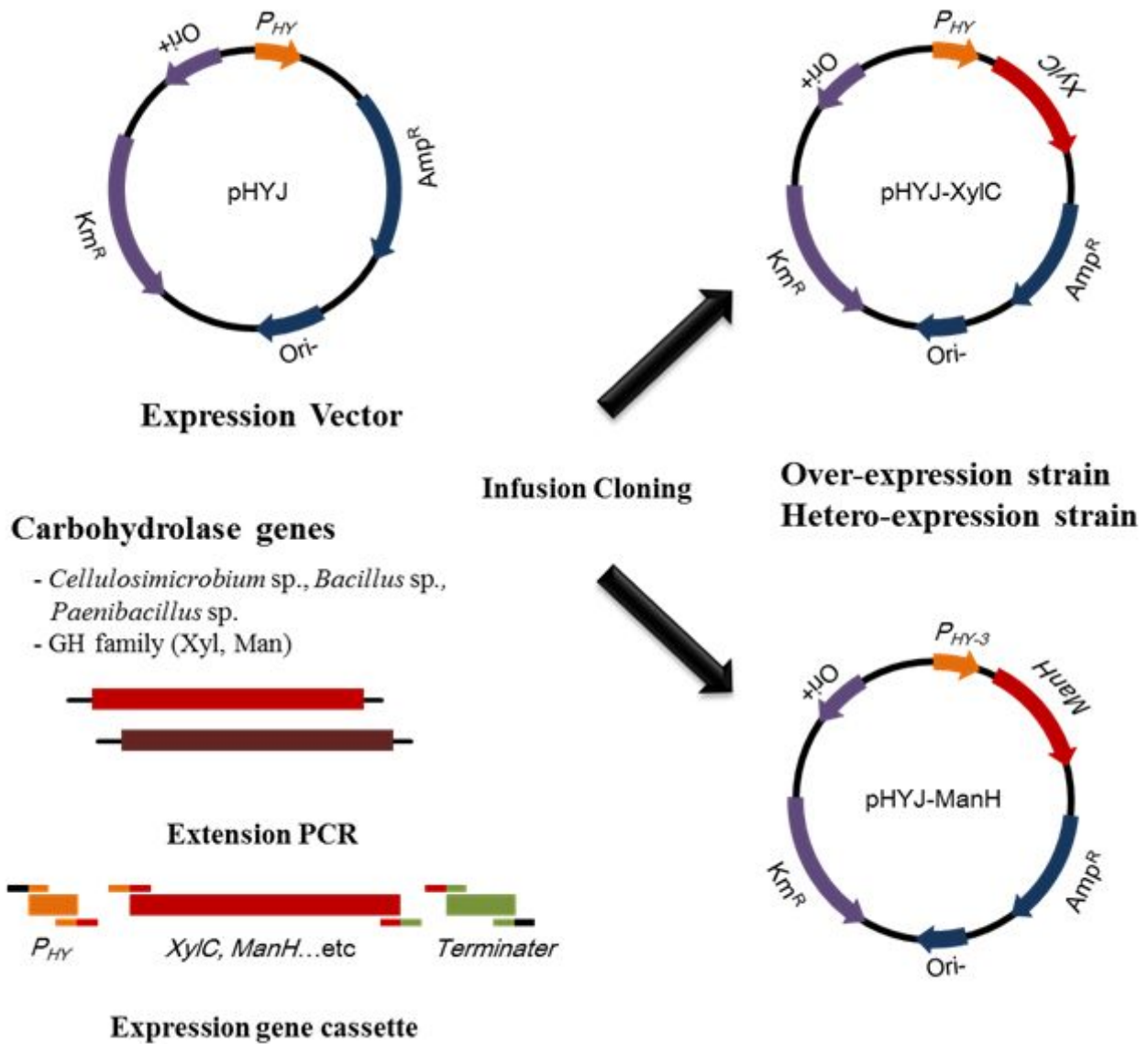


그림 16. *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 over-expression 균주 개발

나. Jar fermentor를 이용한 xylanase 생산 배지 조성 검토

대량생산을 위한 전단계로 5 L jar fermentor를 이용하여 효소의 배양 조건을 검토하였다. 형질전환된 *Bacillus* sp. *pHYJ-XylC* 균주는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 kanamycin을 포함하는 LB broth를 이용하여 50 ml/250 ml 삼각플라스크에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 16시간 동안 배양하여 종균으로 사용하였다. 본 배양 배지 조성은 2.0% maltose, 2.0% yeast extract, 1.05% M9 basal medium을 이용하여 3 L medium/5 L jar에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 500 rpm, 0.5 vvm의 조건으로 배양하였다. 배양 중 DO 레벨을 모니터링하여 최대 1.0 vvm으로 통기량을 올려주었다.

상기의 배양조성을 이용하여 22시간에서 약 1,670 unit/ml의 xylanase를 생산함을 알 수 있었고, 이는 초기 wild type strain에서의 275 unit/ml 보다 6배가량 증가하였음을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 대량생산을 위한 배지 조성을 검토하였다.

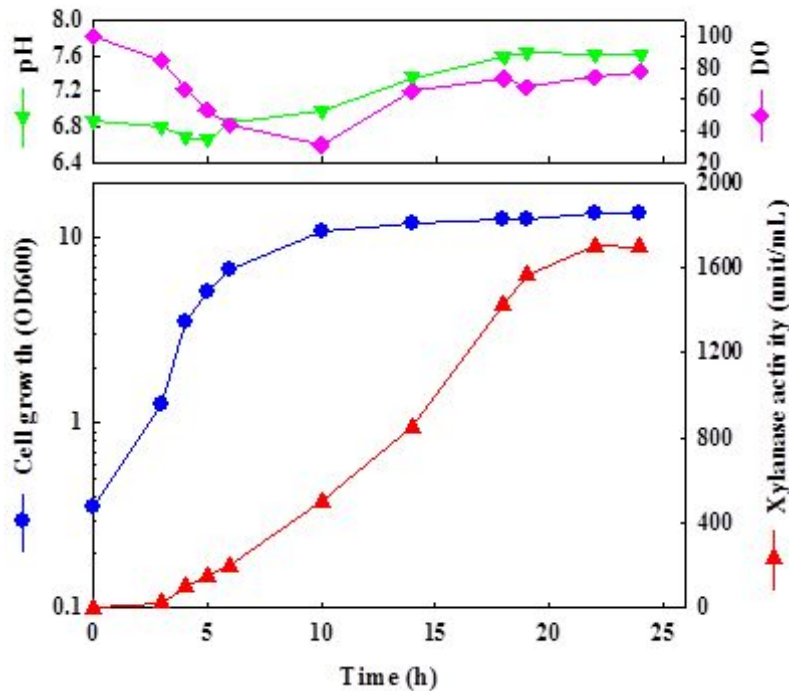


그림 17. 5 L jar fermentor를 이용한 xylanase 생산조건 검토

상기의 5 L jar fermentor 배양 profile을 토대로 대량생산을 위한 scale-up 공정 개발을 수행하였다. 사용되는 배지 조성을 산업용 수준의 원료로 대체하고 5 L jar fermentor를 이용하여 지속적으로 효소의 생산성을 높이기 위하여 여러 단계를 거쳐서, 배지 조성을 검토하고, 배양 공정상의 feeding 공정 등을 검토 하였다. 초기 회분식 배양(batch culture)에서는 약 700 unit/ml의 효소의 생산을 보였으나, 배양 중에 원료를 추가로 feeding하여 유가식 배양(fed-batch culture) 공정으로 전환하여 그 배지 조성을 검토하였다. 이때의 배지 조성은 50 g/L maltose, 30 g/L yeast extract, 20 g/L soy peptone, 5 g/L sodium chloride, 기타 mineral medium을 이용하였고, 37°C에서 500 rpm, 0.5~1.0 vvm의 조건에서 배양을 수행하여 최종 2,929 unit/ml의 xylanase를 생산할 수 있었다.

대량생산으로 가기 전 단계에서의 배양조건을 최적화하여 향후 scale-up 공정 개발의 기초자료로 활용할 수 있다. 20 ton 이상의 대량생산 시스템을 위해서는 300 L, 3 ton, 20 ton의 각각의 scale 단계별 공정의 최적화가 필요하며 향후 이에 대한 후속연구가 필요하다고 사료된다.

현장평가를 위한 시험제형을 개발용 효소 원료를 확보하기 위하여 다음의 대량생산 공정을 수행하였다.

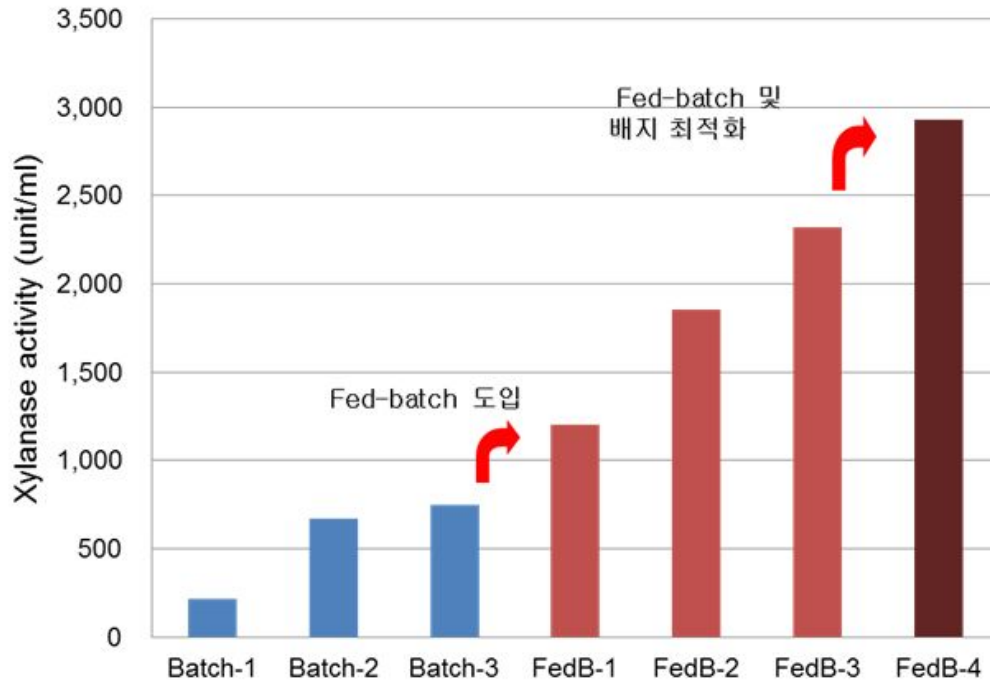


그림 18. Xylanase의 배양 최적화 공정 개발 단계별 효소 활성

2. 사료첨가제용 효소제 시험제형의 개발

가. 산업용 효소제 분말 생산

산업용 효소의 대량생산에 있어서는 그 효소의 정제 공정을 단순화하여 최적화할 필요가 있다. 따라서 기 확보되어 있는 know-how를 최대한 활용하여 효소원제를 생산하는 공정을 수립하였다.

종균을 액체배양한 다음, 3대의 3 L/5 L jar fermentor를 이용하여 seed culture를 수행하고, 그 중에서 가장 우수한 배양액을 large scale의 seed로 활용하였다. 3 ton 발효조를 이용하는 scale-up 단계를 통하여 시험 생산하였다. 획득한 배양액을 ammonium sulfate를 이용하여 1차 침전을 실시하고 filter press 공정을 거쳐 균체를 분리한 배양액을 회수하였다. 회수된 배양액을 다시 ammonium sulfate를 이용하여 2차 침전을 실시하여 ultrafiltration 공정을 이용하여 ammonium sulfate를 제거하고 농축 효소액을 확보하였다. 농축 효소액에 부형제(dextrin, lactose, 유청분말, 식물성 크림 등)를 첨가하여 급속동결건조 공정을 거쳐 최종 효소분말을 생산하였다.

상기의 결과를 바탕으로 해당 균주의 대량생산이 가능할 것으로 판단되며, 보다 큰 발효조를 이용한 scale-up 기술을 개발하여 생산성을 검토할 필요가 있다고 사료된다.

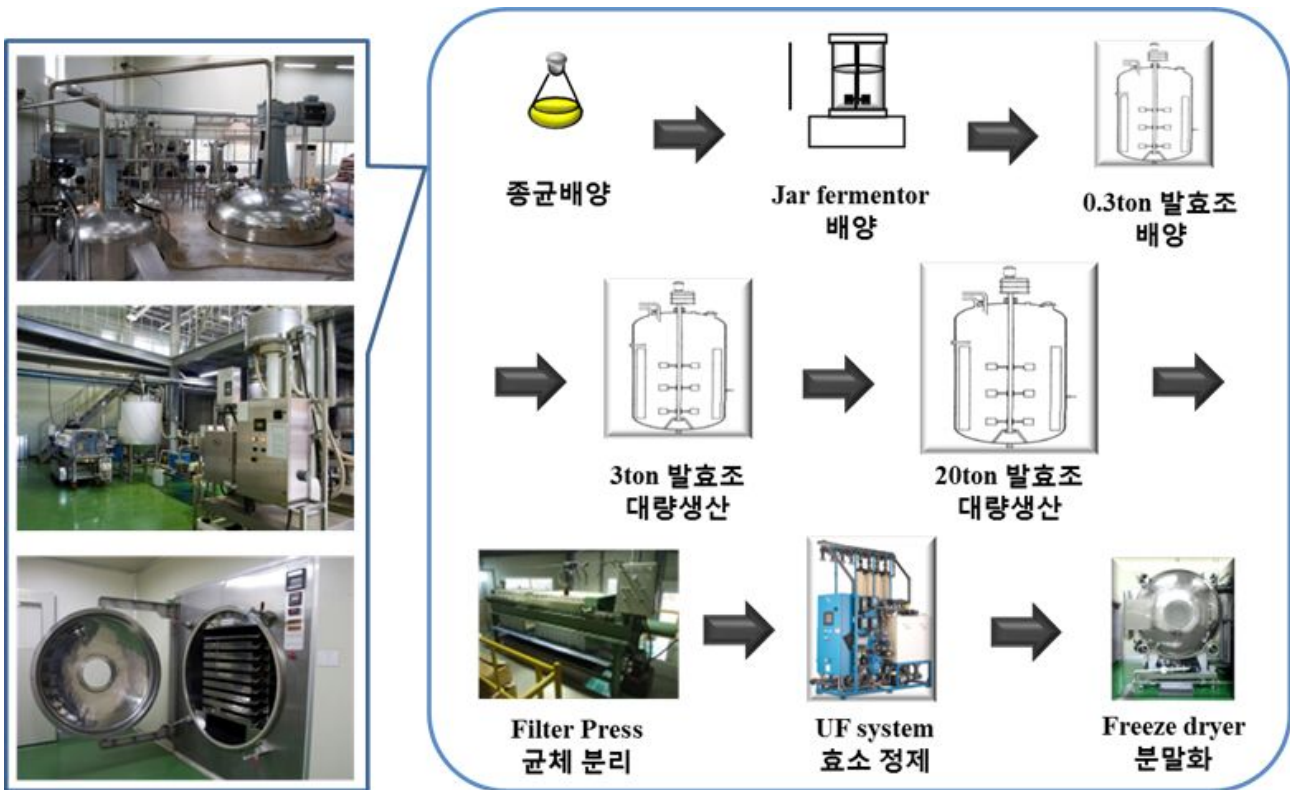


그림 19. 산업용 효소생산 대량생산 공정도

나. 현장평가용 사료첨가제 배합검토

In vivo, in vitro 실험을 위한 사료첨가제 시험 제형의 배합비를 표 와 같이 구성하였다. 동물 급이시험에 앞서 혼합된 복합효소제를 이용하여 사료용으로 사용되는 곡물부산물물을 이용하여 가수분해율을 검토하였다.

대표적인 사료용 곡물부산물(박류)인 밀(wheat), 옥수수(corn), 면실박(cotton seed meal), 야자박(coconut kernel meal)에 대한 가수분해후 환원당량을 분석하였다. 환원당량은 DNS method를 이용하여 측정하였고, 표준곡선은 xylose를 이용하여 DNS method를 이용하여 측정한 측정값을 이용하여 측정하였다. 0.1% Enzyme B를 함유한 곡물부산물을 50 mL의 50 mM 인산완충용액 (pH6.0)을 함유한 250 mL 삼각플라스크에 2%(w/v)의 농도로 각각 현탁한 다음, 40℃에서 100 rpm으로 교반하면서 0, 1, 2, 4, 8 시간별로 시료를 채취하여 반응액의 환원당량을 측정하였다.

표 14. 현장평가용 사료첨가제 시험 배합비

	Enzyme A (/Kg)	Enzyme B (/Kg)	Enzyme C (/Kg)
Protease	800,000 unit	800,000 unit	800,000 unit
Xylanase	2,000,000 unit	2,000,000 unit	2,000,000 unit
Mannanase	-	500,000 unit	500,000 unit
SC-powder	-		60g

Enzyme B 복합효소제는 난분해성 헤미셀룰로스를 많이 함유하고 있는 밀(wheat)에 대하여 높은 활성을 나타내었다. 또한 옥수수를 포함하는 사료용 박류로 일부 사용되는 면실박, 야자박 등에서도 시간이 지남에 따라 가수분해율이 상승하는 것을 확인하였다.

이러한 결과는 사료의 이용효율에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정되며, 특히 난분해성 헤미셀룰로스 계열에서 많은 양을 차지하고 있는 xylan에 대한 효율이 높은 것은 가축의 소화효율에 직접적으로 영향을 줄 수 있을 것으로 판단하여 상기의 배합비를 이용하여 동물 급이 시험에 이용하였다.

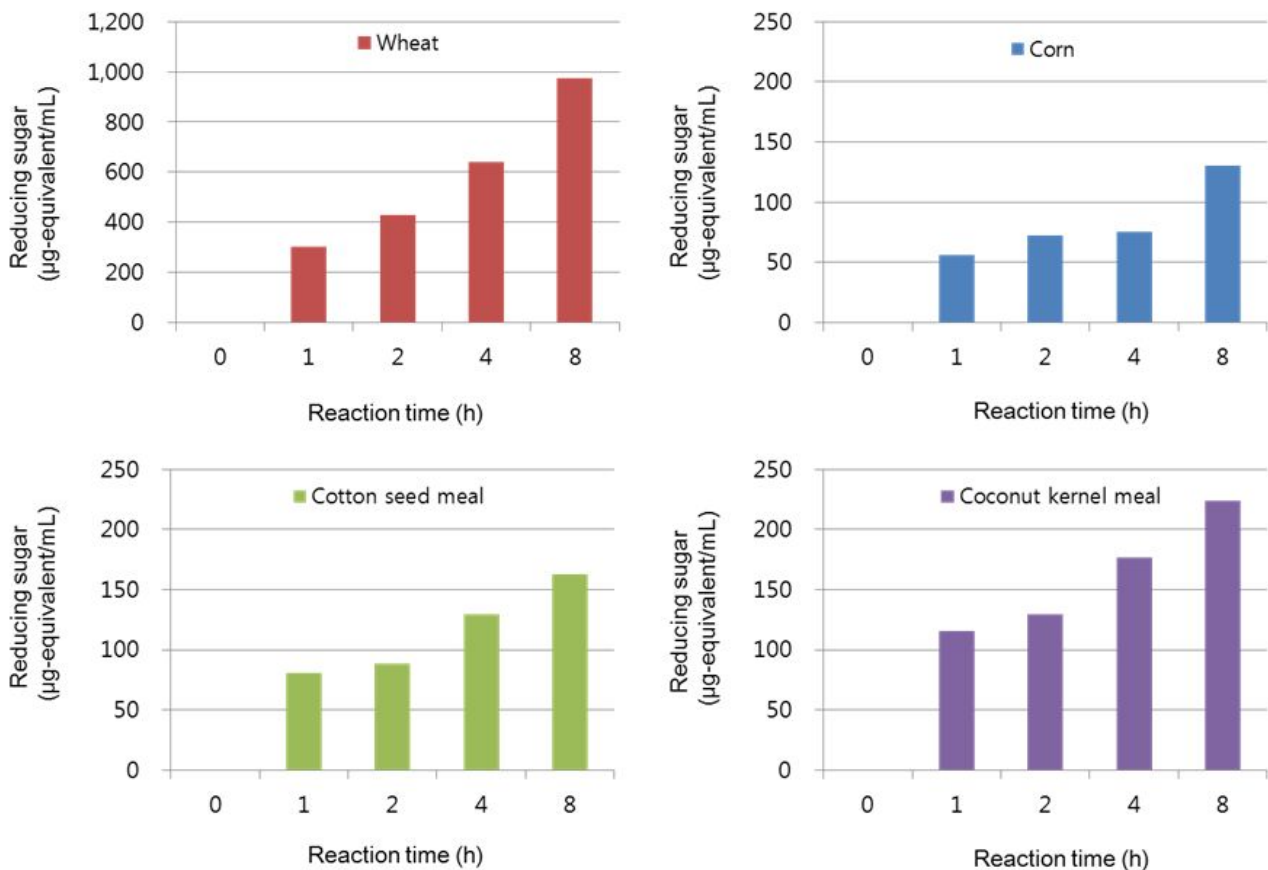


그림 20. 복합효소를 이용한 사료용 박류 가수분해율 검토

다. 시판 제품과의 활성 검토

시험배합비와 시판중인 타사 제품과의 활성을 비교하기 위하여 대표적인 난소화성 물질인 xylan과 mannan에 대한 효소 활성을 검토하였다.

Xylanase activity는 1.0% beechwood를 기질로 사용하였고, mannanase activity는 0.5% locust bean gum을 기질로 하여 각각의 활성을 측정하였다. 비교 대상이 되는 시료는 국내 배합사료사로부터 원료를 공급 받았으며, 국내 'A'사, 'B'사, 'C'사의 제품과 해외 'D'사의 제품을 각각 비교하였다. 가격적인 부분은 국내 제품은 3,500원~6,000원 사이에 있으며, 해외 시료는 10,000원 정도의 가격으로 시판되고 있다.

국내 제품의 경우 xylanase와 mannanase가 복합으로 이용된 사료첨가제 제품이 없으

며, 각각의 제품의 활성역시 외국제품에 비하여 낮은 수준의 제품이다. 이는 국내 시장의 저가제품으로 인한 왜곡된 상황을 그대로 반영하고 있다.

본 과제를 통하여 개발된 조아자임(Joazyme)은 국내와 해외시장을 함께 겨냥한 제품으로 그 각각의 효소 성분은 높은 수준으로 유지되고 있음을 확인할 수 있다.

국내 A사 제품은 330 unit/g xylanase 활성을 나타내었고, mannanase는 확인할 수 없었고, B사와 C사는 xylanase 활성은 확인할 수 없었고, mannanase 활성은 450 unit/g 과 550 unit/g으로 각각 측정되었다. 해외 제품 중 xylanase를 주성분으로 한 D사는 1,900 unit/g의 xylanase 활성을 나타내었다. 조아자임은 2,250 unit/g xylanase 활성과 585 unit/g 의 mannanase 활성을 확인할 수 있었다 (그림 21).

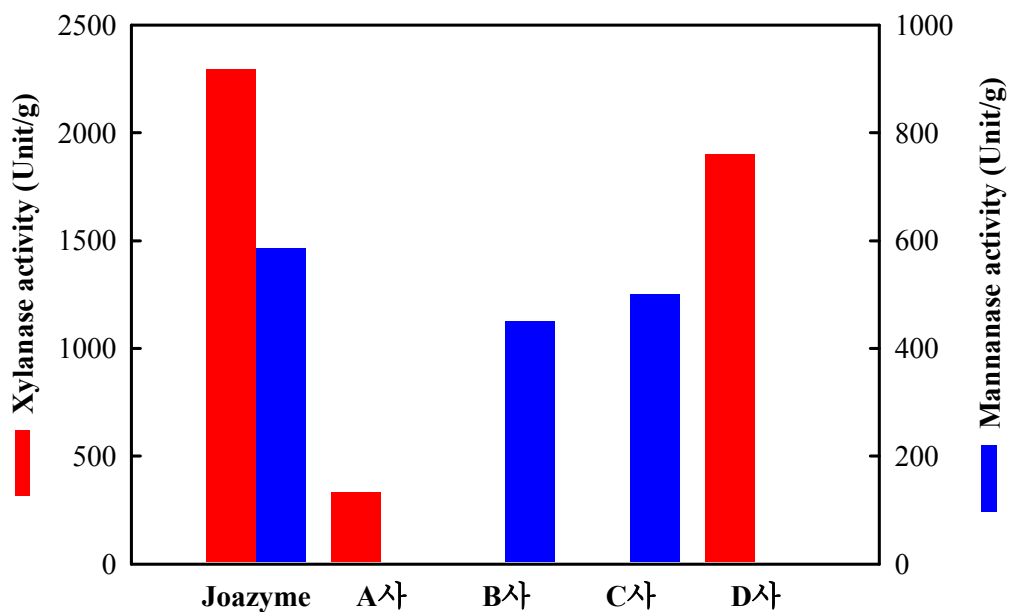


그림 21. 시험제형과 시판 제품과의 xylanase, mannanase 활성 비교

라. 사료첨가제 시험제형 네이밍 및 제품 등록

상기의 배합비로 된 사료첨가제의 시험제형은 조아자임(Joazyme)으로 명명하였고, 사료 첨가제의 보조사료의 효소제 규격에 따라 품목을 등록하였다.

성분등록번호 : 제 IIB4C0029호

제품분류 : 보조사료 - 효소제

<h1>조아자임(Joazyme)</h1>	
Feed enzymes	
성분등록번호	실중량
• 제 IIB4C0029호	• 1Kg
사료의 명칭 및 형태	유통기한
• 효소제(조아자임) 분말	• 제조일로부터 2년까지
사료의 성분량	제조년월일
<ul style="list-style-type: none"> • 키시라나제 1,500,000 IU/Kg • 알칼리성프로테아제 800,000 IU/Kg • 만나나제 500,000 IU/Kg 	• 별도표기
사료의 용도	주의사항
• 배합사료 원료 및 양축가용	<ul style="list-style-type: none"> • 운반 또는 사용 중에 파손될 수 있으므로 주의하십시오. • 피부에 직접 닿지 않도록 하십시오. • 취급 부주의로 분진이 발생될 수 있으므로 작업시 보안경이나 마스크를 착용하여 흡입하지 않도록 하십시오.
용법 및 용량	보관방법
<ul style="list-style-type: none"> • 사료톤당 0.5~1.0Kg(0.05~0.1%) 비율로 혼합하여 지속 급이 또는 두당 10~20g/일 씩 급이합니다. • 약품이 아니므로 급이기준을 임의로 조정할 수 있고, 어떠한 첨가제와 병행하여 사용하여도 축산물 잔류성 문제가 전혀 없습니다. 	<ul style="list-style-type: none"> • 직사광선을 피하고 서늘하고 통풍이 잘되는 실온에 보관하여 주십시오. • 개봉한 제품은 벌레, 이물, 냄새흡착 등에 의해 오염될 염려가 있으므로 개봉부위를 밀봉하여 보관하시고, 보관중 덩어리가 발생하더라도 품질에는 이상이 없습니다. • 이상 발생시 구입처에 문의하여 주십시오.
제조원	
 (주)인섹트바이오테크 Insect Biotech Co., Ltd. 305-811 대전시 유성구 유성대로 1628번길 3 Tel : 042-862-8440 / Fax: 042-860-8472	
기술개발	
 한국동물산업진흥위원회	

제 4 절 양돈에 대한 기능성 사료 소재 효능 검증

1. In vitro 건물 소화율 측정 실험

가. 복합 효소제 (Enzyme A) 실험

(1) 실험적 접근

본 실험은 전 과정 모두 Boison and Fernandez (1995)의 실험에 기초를 두고 있으며, 실험 기기와 시료 건조 온도에서 변화를 두었다. 실험은 위와 소장에서의 소화단계로 나누었으며, 대장에서의 소화는 생략하고 회장 건물 소화율로 효소의 활성을 확인하였다. Boison and Fernandez (1997)의 실험에서는 대장을 포함한 총 3단계의 과정으로 실험을 진행하였지만, 대장의 소화 단계에서 사용하는 복합 효소제 (Viscozyme® L, Sigma No. V2010)에 의해 첨가한 효소제의 효과가 확인되지 않을 가능성을 고려하여 회장 건물 소화율을 통하여 효소제의 활성 유무 및 정도를 확인하였다.

(2) 실험 사료 및 효소제

실험 사료는 에너지 사료 3종류 (옥수수, 보리, 소맥), 단백질 사료 4종류 (대두박, 채종박, 면실박, 팜박)로 실시하였으며, 복합 효소제는 Enzyme A (표 15)를 사용하였다. 복합 효소제의 첨가량은 0.5% 수준에서 10% 수준까지 각각의 원료사료별로 실험을 실시하였다 (표 16).

표 15. 실험 별 첨가 효소 종류 및 역가

효소제	역가, Unit/kg
Enzyme A	
Protease	800,000
Xylanase	2,000,000
Enzyme B	
Protease	800,000
Xylanase	2,000,000
Mannanase	500,000
Cellulase	500,000
Enzyme C	
Protease	80,000
Xylanase	2,000,000
Mannanase	500,000

(3) 실험 방법

(가) Step 1

균일한 크기로 분쇄된 원료사료 1 g (<1 mm)을 100 ml 삼각 플라스크에 투입하였다. 대조구에는 원료사료만 투입하고, 복합 효소제 처리구에서는 첨가 수준만큼의 효소제를 추가로 투입하였다. 각각의 반복마다 blank를 포함하여 실험하였다. Step 1은 위에서의 소화를 모방한 것으로 우선 0.1 M의 완충용액 (pH 6.0) 25 ml 와 0.2 M의 HCl 10 ml 를 시료가 들어있는 플라스크에 넣었다. 그 후, 1 M의 NaOH 용액과 HCl 용액을 이용하여 분석 시료를 pH 2.0으로 조절한 후, 미리 준비된 pepsin 용액(porcine, ≥ 250 units/mg, Sigma No. P7000)을 1 ml씩 넣었다. 박테리아의 성장을 억제하기 위해 chloramphenicol 0.5 ml를 넣고, 뚜껑을 덮은 후 39°C로 예열된 교반 배양기에 넣고 6시간 동안 교반하였다.

(나) Step 2

- ① Step 2는 소장에서의 소화과정을 모방한 것으로 교반이 끝난 분석 시료에 0.2 M의 완충용액 (pH 6.8) 10 ml와 0.6 M의 NaOH 5 ml를 넣었다. 그 후, 1 M의 NaOH 용액과 HCl 용액을 이용하여 분석 시료를 pH 6.8로 조절한 후, 미리 준비된 pancreatin 용액(porcine, grade IV, Sigma No. P1750) 1 ml를 넣고, 뚜껑을 덮은 후 39°C로 예열된 교반 배양기에 넣고 18시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 시료는 상온에서 5% 설포살리실산 용액 5 ml를 첨가한 후 30분 동안 소화되지 않은 아미노산을 침전시켰다.
- ② 위의 과정을 모두 거친 분석 시료의 잔유물을 소화되지 않고 배설되는 원료사료의 건물로 가정하고 이는 0.5 g의 celite를 포함하는 glass filter crucible을 이용하여 조섬유 분석장치 (Fibertec System M, Tecator)를 통해 회수하였다. 삼각 플라스크는 1% 설포살리실산 용액으로 2회 씻어서 glass filter crucible에 투입하여 남아있는 잔유물이 없도록 하였고, 에탄올과 아세톤을 10 ml씩 각각 2회 glass filter crucible에 주입하여, 남아있는 지방 성분을 용해하였다. 잔유물의 회수를 마친 glass filter crucible은 건조기를 이용하여 105°C에서 6시간 동안 건조하였다. 이렇게 회수된 잔유물의 무게와 분석에 사용된 원료사료와의 무게차를 이용하여 회장 건물 소화율을 추정하였다.

(4) 회장 건물 소화율 계산 및 통계분석

분석에 사용된 원료 사료 내 건물 함량은 Sauvante et al. (2004)에 명시된 함량을 기준으로 하였으며, 위 실험을 통해 얻은 결과를 아래 계산식에 적용하여 회장 건물 소화율을 추정하였다.

$$\text{회장건물소화율(\%)} = \frac{\text{원료사료건물함량} - \text{잔유물건물함량}}{\text{원료사료건물함량}} \times 100$$

실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 효소제의 첨가처리가 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산한 후 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 이 과정에서 산출된 P-values를 영문자로 전환하기 위해 매크로 프로그램을 이용하였다

(Saxton, 1998). 통계적인 유의성은 P -value가 0.05 이하일 때로 하였다.

(5) 실험 결과

각각의 원료사료에서 효소제의 첨가에 따른 회장 건물 소화율의 변화량을 측정하였다 (표 16). 소맥의 경우에 효소제 첨가수준 0.5%에서 건물 소화율이 향상되었다 ($P < 0.05$). 하지만, 보리 및 옥수수를 포함한 다른 원료사료의 소화율은 효소제의 첨가에 의해 달라지지 않았다.

표 16. Effects of an enzyme complex (Enzyme A) on dry matter digestibility (%) of various ingredients¹

Ingredient	Control	Enzyme inclusion rate, %				SEM ²	P-value
		0.5	1	5	10		
Wheat	85.6 ^b (4) ³	87.4 ^a	86.2 ^{ab} (6)	86.6 ^{ab}	86.4 ^{ab}	0.34	0.018
Barley	79.5 (4)	79.9	79.5	80.0	-	0.45	0.754
Corn	71.1	-	70.8	-	-	0.13	0.179
Soybean meal	77.9	-	-	77.9	-	0.66	0.942
Palm kernel meal	25.3 (4)	24.6	25.0	-	-	0.22	0.192
Rapeseed meal	60.1 (6)	61.7	60.8	-	-	0.95	0.505
Cottonseed meal	60.1	59.8	-	-	-	0.62	0.791

¹Each mean represents 2 observations unless indicated in the parenthesis.

²The number of observations are in the parenthesis.

^{a,b}Means within a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

나. 복합 효소제 (Enzyme B) 실험

(1) 실험적 접근

본 실험의 접근 및 계획은 위의 실험 (실험 가.)과 동일한 방법으로 진행하였다.

(2) 실험 사료 및 효소제

실험 사료는 에너지 사료 3종류 (옥수수, 보리, 소맥), 단백질 사료 5종류 (대두박, 채종박, 면실박, 팜박, 야자박)로 실시하였으며, 복합 효소제는 Enzyme B (표 15)를 사용하였으며, 효소제의 첨가수준은 1%로 하였다.

(3) 실험 방법

실험 방법은 위 실험 (실험 가.)과 모두 동일하게 진행하였다.

(4) 회장 건물 소화율 계산 및 통계분석

계산 과정은 위 실험 (실험 가.)과 동일한 계산 방법을 적용하였다. 실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 효소제의 첨가처리가 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들 간의 차이를 검정하였다. 통계적인 유의성은 *P*-value가 0.05 이하일 때로 하였다.

(5) 실험 결과

각각의 원료사료에서 효소제의 첨가에 따른 회장 건물 소화율의 변화량을 측정하였다 (표 17). 효소제의 첨가효과는 소맥 및 보리에서 두드러지게 나타났다 ($P < 0.05$). 소맥 및 보리의 건물소화율은 약 1.9 및 1.4% unit 향상되었으나, 단백질 사료들을 포함한 다른 원료사료들의 건물소화율은 효소제의 첨가에 의해 크게 달라지지 않았다. 본 실험을 바탕으로 동물 실험 (실험 2.)에 사용할 원료 사료에 소맥 및 보리를 포함시켰으며, 가장 널리 이용되는 원료사료인 옥수수도 동물실험에 포함시켰다.

표 17. Effects of an enzyme complex (Enzyme B) on dry matter digestibility (%) of various ingredients¹

Ingredient	Control	Enzyme B, 1%	SEM	<i>P</i> -value
Wheat	85.8	87.7	0.43	0.036
Barley	80.3	81.7	0.16	0.004
Corn	73.6	74.6	1.56	0.660
Soybean meal	74.8	75.2	1.22	0.826
Palm kernel meal	29.2	29.3	0.20	0.773
Rapeseed meal	62.1	62.2	0.58	0.921
Cottonseed meal	52.8	50.8	0.75	0.971
Copra meal	50.8	50.4	0.64	0.682

¹Each mean represents 3 observations.

²SEM = standard error of the means.

다. 복합 효소제 (Enzyme C) 실험

(1) 실험적 접근

본 실험의 접근 및 계획은 위의 실험 (실험 가.)과 동일한 방법으로 진행하였다.

(2) 실험 사료 및 효소제

실험 사료는 소맥, 보리, 옥수수, 대두박 및 팜박을 이용하였으며, 복합 효소제는 Enzyme C (표 15)를 사용하였다. 복합 효소제의 첨가량은 1%로 하였다.

(3) 실험 방법

실험 방법은 위 실험 (실험 가.)과 모두 동일하게 진행하였다.

(4) 회장 건물 소화율 계산

계산 과정은 위 실험 (실험 가.)과 동일한 계산 방법을 적용하였다. 실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 효소제의 첨가처리가 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 통계적인 유의성은 *P*-value가 0.05 이하일 때로 하였다.

(5) 실험 결과

각각의 원료사료에서 효소제의 첨가에 따른 회장 건물 소화율의 변화량을 측정하였다 (표 18). 효소제의 첨가효과는 소맥 및 보리에서 두드러지게 나타났다 ($P < 0.05$). 소맥 및 보리의 건물소화율은 약 2.2 및 1.8% unit 향상되었다. 하지만 다른 원료사료들의 건물소화율은 효소제 첨가에 의해 크게 달라지지 않았다. 이 결과는 앞서 수행된 Enzyme B에 관한 실험결과와 일치한다. 이는 Enzyme C는 효소 종류 및 역가에 있어서 Enzyme B와 크게 다르지 않기 때문인 것으로 보인다. 또한 본 결과는 Enzyme C에 대한 동물실험에 소맥 및 보리를 포함시키는 것이 적절함을 보여준다. 팜박의 소화율이 효소제의 첨가에 의해 수치상으로는 2.4% unit 향상되었으나, 비교적 큰 변이 때문에 통계적인 유의성이 나타나지 않았다. 팜박의 경우에 기본적으로 소화율이 낮게 나타났음을 알 수 있는데 (표 18과 표 19), 이는 그만큼 소화율이 향상될 수 있는 폭이 크다는 것을 의미한다. 팜박에서 소화되지 않는 에너지 성분을 분해시킬 수 있는 효소를 개발하는 것은 큰 의미를 가질 수 있을 것으로 보인다.

⌘ 18. Effects of an enzyme complex (Enzyme C) on dry matter digestibility (%) of various ingredients¹

Ingredient	Control	Enzyme C, 1%	SEM ²	P-value
Wheat	86.1	88.3	0.35	0.011
Barley	79.8	81.6	0.09	<0.001
Corn	84.6	83.8	0.41	0.219
Soybean meal	76.1	73.0	1.30	0.161
Palm kernel meal	25.7	28.1	0.88	0.134
Rapeseed meal	61.6	63.7	1.21	0.289
Cottonseed meal	57.2	56.2	1.06	0.526
Copra meal	52.0	52.5	0.21	0.153

¹Each mean represents 3 observations.

²SEM = standard error of the means.

⌘ 19. Analyzed chemical composition of corn, wheat, and barley, as-fed basis

Item	Corn	Wheat	Barley
Gross energy, kcal/kg	4,015	4,080	4,046
Dry matter, %	86.1	89.3	88.0
Crude protein, %	7.31	11.68	12.56
Ether extract, %	3.27	1.61	1.39
Crude fiber, %	1.88	2.53	5.12
Neutral detergent fiber, %	11.22	13.80	23.68
Acid detergent fiber, %	2.48	2.70	7.84
Ash, %	1.65	1.81	2.42
Calcium, %	0.16	0.14	0.14
Phosphorus, %	0.26	0.30	0.31

2. 복합 효소제 (Enzyme C)를 첨가한 사료를 급여한 돼지의 에너지 소화율 변화 측정 실험

가. 실험적 접근

복합 효소제 (Enzyme C) 첨가 (표 19)에 의한 원료사료의 에너지 소화율 변화를 돼지에게 급여 후, 가소화 에너지, 대사 에너지를 측정하여 분석하였다.

나. 동물, 사료 및 실험설계

(1) 동물 및 사료

교잡종 거세 수돼지 6두 (개시체중 약 35.8 ± 3.3 kg)를 사료급이기가 설치된 대사틀에서 개체별로 사양하였으며, 6개의 실험사료로 구분하여 옥수수, 소맥, 보리 3개의 원료사료에 대해 복합 효소제 (Enzyme C)를 첨가한 처리구와 첨가하지 않은 대조구로 각각 구분하여 실험을 진행하였다 (표 20). 복합 효소제에 사용된 부형제는 옥수수를 사용하였으며, 대조구에서는 효소제 첨가량에 대응하는 옥수수를 첨가하였다. 비타민과 광물질은 NRC (1998)에 제시되어 있는 영양소 요구량 이상이 되도록 배합하였다.

(2) 실험 설계

실험설계는 6×6 Latin square design으로 모든 동물이 각 실험사료에 한 번씩 할당될 수 있도록 하였으며, Balanced Latin Square Designer (Kim and Stein, 2009)를 이용하여 존재할 수 있는 전이효과를 최소화하였다 (표 20).

다. 사료 급여 및 시료채취

일당 사료섭취량은 각 돼지의 유지에너지의 2.5배 수준으로 급여하였으며, 같은 양을 오전 7시 30분과 오후 3시 30분으로 나누어 2회 급여하였다. 사료급이기에 잔량이 있을 경우에는 수거하여 실제 사료섭취량 계산에 적용하였으며, 사료에 대한 적응기 3일이 지난 이후, 4일간 분비되는 분과 뇨를 전분 채취법으로 수거하였다. 분의 채취는 표시제법을 이용 (Adeola, 2001)하여 수거하였다. 각 실험기간의 4일째 오전, 사료에 표시제 (산화크롬)를 섞어서 급여하고 분에 표시제의 색깔이 나타나는 시점부터 채취를 시작하였으며, 8일째 오전에 사료에 표시제를 섞어서 급여한 후, 표시제의 색깔이 분에 다시 나타나면 그 직전까지의 분을 채취하였다. 뇨의 채취는 4일째 오후 2시 부터 8일째 오후 2시까지 수거하였다. 그 이외의 동물실험과정은 Kim et al. (2009)에 서술된 방법에 따랐다.

라. 화학 분석

원료사료와 배합사료, 분, 뇨 시료는 bomb calorimeter를 이용하여 총 에너지를 측정하였다. 채취된 분은 건조기를 이용하여 55°C 에서 72시간동안 건조한 후 분쇄하여 총 에너지를 측정하였다. 그 이외의 화학적 분석과정은 Kim et al. (2009)에 서술된 방법을 따랐다.

마. 에너지 소화율 계산 및 통계분석

섭취된 에너지의 양과 분과 뇨로 분비된 에너지의 양을 이용해 에너지 소화율을 계산하였다. 분 중 에너지를 측정하여 섭취한 사료 내 에너지에서 공제하여 가소화에너지를

측정하였다.

$$\text{가소화에너지 (kcal/kg)} = \text{사료내총에너지 (kcal/kg)} - \text{분중에너지 (kcal/kg)}$$

그 후, 가소화 에너지에서 뇨 중 에너지를 공제하여 대사에너지를 측정하였다.

$$\text{대사에너지 (kcal/kg)} = \text{가소화에너지 (kcal/kg)} - \text{뇨중에너지 (kcal/kg)}$$

시험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 사료처리로 원료사료에 의한 main effect, 효소첨가에 의한 main effect, 및 interaction이 포함되었다. 임의변수로는 동물 및 기간이 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 interaction이 존재하는 경우에는 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 이 과정에서 산출된 P-values를 영문자로 전환하기 위해 매크로 프로그램을 이용하였다 (Saxton, 1998). 실험단위는 동물로 하였으며, 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하일 때로 하였다.

㉔ 20. Ingredient and chemical composition of experimental diets, as-fed basis

Items	Diet					
	Corn	Corn + Enzyme	Wheat	Wheat + Enzyme	Barley	Barley + Enzyme
Corn	97.00	96.80	0.20	-	0.20	-
Wheat, soft red winter	-	-	96.65	96.65	-	-
Barley	-	-	-	-	96.80	96.80
Limestone	1.00	1.00	0.90	0.90	0.75	0.75
Dicalcium phosphate	1.10	1.10	1.35	1.35	1.35	1.35
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Vitamin-mineral mix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Enzyme	-	0.20	-	0.20	-	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition						
Metabolizable energy, kcal/kg	3,311	3,311	3,194	3,194	2,817	2,817
SID ² -Lys, %	0.196	0.196	0.297	0.297	0.314	0.314
SID-Met + Cys, %	0.306	0.306	0.426	0.426	0.400	0.400
SID-Thr, %	0.230	0.230	0.317	0.317	0.274	0.274
SID-Trp, %	0.049	0.049	0.226	0.226	0.085	0.085
Crude protein, %	8.03	8.03	11.11	11.11	10.94	10.94
Calcium, %	0.629	0.629	0.620	0.620	0.624	0.624
Total phosphorus, %	0.475	0.475	0.250	0.250	0.589	0.589
Available phosphorus, %	0.236	0.236	0.244	0.244	0.244	0.244

¹Provided the following quantities of vitamins and microminerals per kilogram of complete diet: vitamin A, 25,000 IU; vitamin D₃, 4,000 IU; vitamin E, 50 IU; vitamin K, 5.0 mg; thiamine, 4.90 mg; riboflavin, 9.99 mg; pyridoxine, 4.93 mg; vitamin B₁₂, 0.062 mg; d-pantothenic acid, 37.5 mg; niacin, 62 mg; folic acid, 1.10 mg; biotin, 0.06 mg; Cu, 25 mg as copper sulfate; Fe, 268 mg as iron sulfate; I, 4.96 mg as potassium iodate; Mn, 125 mg as manganese sulfate; Se, 0.38 mg as sodium selenite; Zn, 313 mg as zinc oxide; and butylated hydroxytoluene, 50 mg.

²SID = standardized ileal digestibility.

㉟ 21. Analyzed chemical composition of experimental diets, as-fed basis

Ingredient: Items	Diet					
	Corn	Corn + Enzyme	Wheat	Wheat + Enzyme	Barley	Barley + Enzyme
Gross energy, kcal/kg	3,798	3,852	3,951	3,931	3,887	3,928
Dry matter, %	86.1	85.9	89.2	89.1	87.8	88.6
Crude protein, %	7.28	7.03	11.58	11.44	13.11	13.12
Ether extract, %	3.08	3.23	1.60	1.67	1.88	1.53
Crude fiber, %	1.80	1.80	2.38	1.98	4.37	4.82
Neutral detergent fiber, %	17.28	19.96	16.24	20.47	23.22	27.96
Acid detergent fiber, %	2.17	2.67	2.98	3.37	5.42	6.87
Ash, %	3.63	3.80	4.19	4.53	4.94	5.09
Calcium, %	0.69	0.69	0.73	0.77	0.73	0.76
Phosphorus, %	0.46	0.46	0.52	0.58	0.60	0.59

㉟ 22. Treatment allocations for a balanced 6×6 Latin square design¹

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Period 1	Wheat + E ²	Corn + E	Barley	Corn	Wheat	Barley + E
Period 2	Corn + E	Barley	Corn	Wheat	Barley + E	Wheat + E
Period 3	Barley + E	Wheat + E	Corn + E	Barley	Corn	Wheat
Period 4	Barley	Corn	Wheat	Barley + E	Wheat + E	Corn + E
Period 5	Wheat	Barley + E	Wheat + E	Corn + E	Barley	Corn
Period 6	Corn	Wheat	Barley + E	Wheat + E	Corn + E	Barley

¹First-order carryover effects are balanced.

²E = enzyme addition.

바. 실험 결과

에너지 소화율 실험에서 원료사료에 따른 조사항목에서의 차이는 두드러지게 나타났으나 ($P < 0.05$) 효소제의 첨가에 의한 주효과는 발견되지 않았다 (표 23). 사료섭취량은 옥수수 및 소맥에 비해 보리 처리구에서 상당히 적었으며, 이는 에너지 섭취량 및 에너지 배설량에서도 마찬가지로 나타났다 ($P < 0.05$). 하지만 에너지 소화율은 보리에 비해서 옥수수 및 소맥에서 높았다 ($P < 0.05$).

일반적으로 보리와 같이 섬유소 함량이 높은 사료에서 소화율이 낮게 나타난다. 하지만, 사료 섭취량이 적을 경우에는 소화물의 장 통과시간이 길어져 소화율이 다소 향상될 수 있다 (Kim et al., 2007). 본 연구에서 보리처리구에서 낮은 사료 섭취량에도 불구하고 보리의 에너지 소화율이 다른 두 원료사료에 비해 낮게 나타난 것은 사료 섭취량이 낮아짐에 따른 에너지 소화율의 향상 폭이 크지 않았음을 시사한다. 또한 보리사료의 가소화 에너지가는 소맥사료보다는 낮았으나 옥수수사료에 비해서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 보리의 에너지 소화율이 옥수수에 비해 낮기는 하지만 보리의 총에너지 함량이 옥수수에 비해 높기 때문인 것으로 보인다.

에너지 소화율 실험에서 원료사료 및 효소제간의 상호작용은 나타나지 않았다 (표 24). 효소제의 첨가가 옥수수 및 소맥의 에너지 소화율을 약 3% 단위 미만의 폭으로 향상시키기는 하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 소화율의 표준오차가 1.1% 인 경우에 효소제의 효과가 통계적 유의성을 보이기 위해서는 적어도 3.3% 이상의 차이를 보여야 된다. 앞선 *in vitro* 실험결과에서 효소제에 의한 건물 소화율의 향상폭이 3% 미만이었음을 고려할 때, 동물실험에서 에너지 소화율이 효소제 첨가에 의한 효과가 유의적으로 나타나기 위해서는 더 많은 수의 반복이 필요할 것으로 보인다.

㉔ 23. Main effects of ingredient and enzyme supplementation on energy digestibility of diets fed to growing pigs^{1,2}

Ingredient: Items	Ingredient			SEM ³	P-value	Enzyme		SEM	P-value
	Corn	Wheat	Barley			-	+		
Diet intake, g	5,578 ^a	5,628 ^a	2,383 ^b	213	<0.001	4,566	4,494	207	0.549
GE ⁴ in diet, kcal/kg	3,865	3,870	3,940			3,867	3,915		
GE intake, kcal	21,568 ^a	20,542 ^a	9,240 ^b	1374	<0.001	16,865	17,368	1272	0.676
Fecal output, g	703 ^a	654 ^a	428 ^b	35	<0.001	613	577	33	0.253
GE in feces, kcal/kg	4,447 ^a	4,152 ^b	4,224 ^b	54	0.003	4,317	4,231	48	0.158
Fecal GE output, kcal	3,153 ^a	2,539 ^b	1,794 ^c	199	<0.001	2,571	2,419	180	0.449
GE digestibility, %	85.3 ^a	87.4 ^a	80.9 ^b	0.8	<0.001	84.1	84.9	0.8	0.374
DE ⁴ in diet, kcal/kg	3,264 ^b	3,435 ^a	3,158 ^c	35	<0.001	3,259	3,313	31	0.137

^{a,b,c}Means within a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹Each least squares mean represents 4 observations.

²Diet intake, and fecal output data are based on 4 d of collection.

³SEM = standard error of the means.

⁴GE = gross energy, DE = digestible energy.

㉔ 24. Interaction between ingredient and enzyme supplementation on energy digestibility of diets fed to growing pigs^{1,2}

Ingredient: Items	Corn		Wheat		Barley		SEM ³	P-value
	-	+	-	+	-	+		
Diet intake, g	5,520	5,635	5,703	5,554	2,474	2,292	235	0.513
GE ⁴ in diet, kcal/kg	3,798	3,852	3,951	3,931	3,887	3,928		
GE intake, kcal	21,176	21,960	19,484	21,600	9,936	8,544	1697	0.477
Fecal output, g	726	680	698	610	415	441	43	0.310
GE in feces, kcal/kg	4,470	4,424	4,247	4,058	4,235	4,213	73	0.439
Fecal GE output, kcal	3,285	3,021	2,639	2,438	1,790	1,798	258	0.834
GE digestibility, %	84.4	86.1	86.1	88.6	81.8	79.9	1.1	0.117
DE ⁴ in diet, kcal/kg	3,209	3,319	3,390	3,480	3,179	3,138	45	0.170

¹Each least squares mean represents 4 observations.

²Diet intake, and fecal output data are based on 4 d of collection.

³SEM = standard error of the means.

⁴GE = gross energy, DE = digestible energy.

제 5 절 육계에 대한 기능성 사료 소재 효능 검증

1. 재료 및 방법

가. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 1일령의 Ross broiler 초생축 수컷 300수를 공시하여 1주일간(시판 초생축 배합사료) 예비 사육한 후 체중을 측정하여 평균체중에 해당하는 180수를 선발하여 4개 처리구에 3반복으로 총 12개 pen에 15수씩 임의로 배치하였다.

나. 실험동물사육

사양시험은 국립 한경대학교 부속 농장 내 육계용 평사에서 예비사육 1주일 후 2011년 10월 4일부터 동년 11월 8일까지 5주간 사육하였다. 사육방법은 관행적인 일반 육계 사육 방법으로 사육하였고, 실험 기간 동안 물과 사료는 자유 채식시켰으며 24시간 점등하였다.

다. 실험설계

실험설계는 Control Diet(대조구)와 대조구 사료에 Enzyme A 0.1% 첨가구(T1), Enzyme A 0.1% + mannamase 0.1% 첨가구(T2), 대조구 사료에 Enzyme A 0.1% + Mannamase 0.1% + Saururus chinensis extract 0.1% 첨가구(T3)로 총 4개 처리구를 두었다.

라. 분석항목 및 분석방법

(1) 복합효소의 급여가 육계 생산성에 미치는 영향

(가) 사료 섭취량, 체중, 일당증체량, 사료효율

매주 일정한 시간에 사료급여량과 사료잔량을 이용하여 사료섭취량을 측정하였고, 체중 변화를 조사하여 일당증체량을 측정하였다. 사료효율은 일당증체량을 일당사료 섭취량으로 나누어 계산하였다.

(나) 도체율, 정육율, 생산지수

실험 5주째에 입추수와 생존개체수를 이용하여 육성률을 계산하였으며, 육성률, 평균체중, 사료요구율, 사육일수를 이용하여 생산지수를 계산하였다. 또한, 각 처리구별 3수씩 총 18수를 경정맥 절단법을 이용해 방혈하여 도살한 후 비가식부위를 제거하여 도체중을 측정하여 도체율을 계산하였고, 가슴부위와 다리부위의 근육무게를 측정하여 부위별 정육율을 계산하였다.

$$\text{육성율} = \frac{\text{생존 수수}}{\text{입추수}} \times 100 \quad \text{생산지수} = \frac{(\text{육성율} \times \text{평균체중})}{(\text{사료요구율} \times \text{사육일수})} \times 100$$

$$\text{도체율} = \frac{\text{도체중}}{\text{생체중}} \times 100 \quad \text{정육율} = \frac{\text{부위별 정육무게}}{\text{도체중}} \times 100$$

(2) 복합효소의 급여가 장기의 길이 및 무게에 미치는 영향

장기의 발달상황을 관찰하기 위하여 실험 5주차에 처리구별로 평균체중에 가까운 개체를 3수씩 총 18수를 경정맥 절단법을 이용하여 방혈하여 도제하였다.

(가) 소장 및 대장의 길이 및 무게

소장(small intestine)을 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ileum)으로, 대장(large intestine)을 맹장(cecum)과 직장(rectum)으로 구분하여 절단한 후, 0.9% saline을 이용하여 장내 내용물을 제거하고 길이와 무게를 측정된 후, 생체중 100g당 무게로 환산하여 계산하였다. 맹장의 경우에는 장내 내용물을 제거하지 않고, 양쪽 맹장의 길이를 합하여 평균을 내어 측정하였고, 무게는 양쪽 맹장의 무게의 합으로 측정하였다.

(나) 간, 선위, 근위, 무게

간(liver)과 선위(proventriculus), 근위(gizzard)의 무게를 측정하여 생체중 100g당 무게로 환산하여 측정하였다. 선위와 근위의 내용물을 0.9% saline을 이용하여 제거한 후에 무게를 측정하였다.

(3) 복합효소의 급여가 육질에 미치는 영향

(가) 육색, pH, 가열감량, 전단력, 보수력

질검사는 가슴근육과 다리근육을 발골하여 각 분석항목별 분석방법에 따라 실시하였다.

① 육색(Meat color)

육색은 육색측정기(Minolta CM-5081, Japan)를 이용하여 L(Lightness), a(Redness), b(Yellowness)를 측정 하였다. 이 때 White standard plate는 L = 98.88, a = -0.21, b = -0.43로 calibration plate를 표준으로 사용하였다.

② pH

Sample 2g을 1차 증류수(18ml)에 넣고 homogenizer로 10,000 rpm 에서 60초간 균질한 후 pH meter(HM-30G, Japan)를 이용하여 측정하였다.

③ 가열감량(Cooking loss)

Sample 10g이상을 덩어리로 취하여 polypropylene bag에 넣고 75℃의 water bath에서 30분간 가열 후 desiccator에서 20분간 방랭한 후 무게를 측정하여 아래의 식과 같이 가열감량을 계산하였다.

$$\text{가열감량(\%)} = \frac{(\text{가열 전 Sample Weight} - \text{가열 후 Sample Weight})}{\text{가열 전 Sample Weight}} \times 100$$

④ 전단력(Shear value)

가열감량을 측정된 Sample을 이용하여 이를 다시 desiccator에서 10분간 방랭한 후

Rheometer(Rheotech, RT-2005D · D Co, Japan)를 이용하여 Chart speed 120/mm/min, 측정 속도 30 mm, 시료 높이 60 mm, adapter No. 4로 전단력 측정을 하였다.

⑤ 보수력(Water holding capacity, WHC)

2장의 Plastic Plate 사이에 filter paper(Whatman No.2)와 시료 0.2g를 넣고 1.5kg의 무게로 5분간 압력을 가한 후 유출 육즙 면적과 육 조직 면적을 Planimeter (Tamiya, Super Planix-a, Japan)로 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{보수력(\%)} = 1 - \frac{\text{육조직면적}}{\text{육즙 유출 면적}} \times 100$$

2. 결과 및 고찰

가. 일당 사료섭취량

사료섭취량 표 25에는 사료내 기능성사료소재 첨가에 따른 실험 5주간의 사료섭취1개량의 변화를 나타내었다. 전체적으로 통계적 유의점은 없었으나 T2처리구에서 가장 높은 사료섭취량을 나타내었다. Yu(1997)등의 효소제 첨가가 broiler의 생산성에 미치는 영향에 관한 연구에 따르면 육계에 효소제를 첨가하여도 사료섭취량에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 그러나 김재황(2001)등의 연구에 의하면 복합 효소제를 육계사료에 첨가하여 급여하였을 때 2주차에서는 다른 처리구에 비해서 높았으나 유의차는 없었고, 5주차에서는 다른 첨가구에 비해서 감소하는 경향이 있었다고 보고하였다. 그러나 본 연구결과 사료섭취량의 감소는 없었다.

표 25. Effect of functional feed materials supplementation on Feed Intake in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/head/day			
1 week	64.85 ± 2.83	61.27 ± 1.25	68.43 ± 2.12	67.17 ± 2.64
2 weeks	106.06 ± 3.45	106.90 ± 1.81	102.75 ± 6.84	108.63 ± 5.05
3 weeks	123.98 ± 9.09	116.91 ± 14.24	128.21 ± 2.99	129.59 ± 9.07
4 weeks	182.32 ± 5.37	182.13 ± 7.48	185.54 ± 0.92	173.20 ± 10.88
Total	119.30 ± 2.05	116.80 ± 4.87	121.23 ± 1.79	119.65 ± 3.46

Mean ± SE

¹⁾C : Control Diets

T1 : Control Diets + Enzyme A 0.1%

T2 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1%

T3 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1% + Saururus chinensi 0.1%

나. 체중

표 26 에는 체중변화를 나타내었다. 1주일 예비사육후 각 처리구는 평균 207g이었으나. 시험 시작 1주에서는 대조구와 T1처리구로 비슷하였으나 T2, T3처리구는 대조구에 비하여 높은 체중을 나타내어 이러한 경향은 시험 전기간에 걸쳐 비슷하였다. 본 연구에서 사용된 기능성 사료소재의 첨가에 따른 긍정적인 효과가 나타났다.

표 26. Effect of functional feed materials supplementation on Body Weight in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/head			
Initial	207.11 ± 0.44	207.56 ± 0.89	207.56 ± 0.44	207.56 ± 0.89
1week	504.86 ± 16.47	500.44 ± 8.92	522.10 ± 18.97	539.56 ± 20.80
2weeks	1011.52 ± 30.93	985.87 ± 17.87	1037.33 ± 26.41	1038.51 ± 58.62
3weeks	1392.25 ± 106.86	1376.44 ± 97.11	1518.17 ± 49.19	1511.78 ± 34.12
4weeks	2022.73 ± 102.49	2004.89 ± 72.35	2138.02 ± 17.47	2038.79 ± 89.00

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

다. 일당증체량

표 27 에는 일당증체량의 변화를 나타내었다. 일당증체량은 시험기간 전체 평균은 T2 처리구에서 가장 높은 값을 나타내었다. 그러나 대조구 및 T1,T2 처리구에서는 비슷한 값이었다. 따라서 본 연구결과 Enzyme A 과 Mannamase 0.1% 처리구에서 가장 우수한 결과를 나타내었다.

표 27. Effect of functional feed materials supplementation on Body Weight Gain in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g / head / day			
1 week	42.54 ± 2.37	41.84 ± 1.23	44.93 ± 2.77	47.43 ± 3.10
2 weeks	72.38 ± 2.38	69.35 ± 2.26	71.91 ± 1.38	71.28 ± 6.08
3 weeks	54.39 ± 17.50	55.80 ± 15.06	68.69 ± 10.78	67.61 ± 11.30
4 weeks	90.07 ± 0.72	88.32 ± 3.36	94.27 ± 4.41	75.29 ± 13.21
Total	64.84 ± 3.67	63.83 ± 2.82	69.95 ± 1.55	65.40 ± 3.21

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

라. 사료효율

기능성사료소재 첨가에 따른 사료요구를 나타내었다. 시험기간 전체 평균에서 일당증체량의 변화와 마찬가지로 T2처리구에서 가장 낮은 사료요구율(11.73%)을 나타내었다 (표 28).

Classen 등(1988)이 보고한 β -glucanase를 육계에 급여했을 때 증체량이 개선되는 결과를 나타내는 것과 일치하는 것을 관찰할 수 있었다. Yuben B.와 Wu, Velmurugu Ravindran(2004)은 whole wheat와 ground wheat에 xylanase를 첨가하였을 때 두 급여 형태 모두에서 증체량이 개선되는 것을 보고하였으며, F. Gao 등(2008)도 밀을 기초로한 육계사료에 xylanase를 첨가 급여하였을 때 증체량과 사료요구율이 개선되는 결과를 보고하였다. 또한 T. Mushtaq 등(2009)의 연구에 의하면 sunflower meal을 기초로한 사료에 endo-1,4- β xylanase와 endo-1,3- β glucanase를 첨가하여 급여하였을 때, 증체량과 사료효율이 개선되었다. 이와 같은 보고에 따르면, 결론적으로 효소제를 첨가하면 증체량이 개선되는 것으로 보고되고 있다. 이들 연구결과와 같이 본 연구결과 복합효소 첨가에 따라 증체량이 개선되는 것으로 사료된다.

이상은 결과로부터 T2처리구 (Enzyme A + Mannamase 0.1%)에서 높은 일당증체량과 낮은 사료요구를 나타내어 사료의 이용성을 증징시키는 것으로 사료된다.

표 28. Effect of functional feed materials supplementation on Feed Conversion in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
1 week	1.53 ± 0.06	1.47 ± 0.01	1.53 ± 0.09	1.42 ± 0.04
2 weeks	1.47 ± 0.05	1.55 ± 0.08	1.43 ± 0.11	1.53 ± 0.06
3 weeks	2.63 ± 0.56	2.26 ± 0.33	1.97 ± 0.33	2.01 ± 0.29
4 weeks	2.03 ± 0.08	2.07 ± 0.16	1.98 ± 0.09	2.59 ± 0.32
Total	1.91 ± 0.12	1.84 ± 0.04	1.73 ± 0.08	1.89 ± 0.03

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

마. 도체율, 정육율, 생산지수

도체율, 정육율, 생산지수를 나타내었다. 정육율에서 대조구에 비하여 기능성소재첨가구 모두에서 높은 정육율을 나타내었다. 또한 생산지수에서도 대조구에 비해 모든 처리구에서 높은 생산지수를 나타내었고 T2처리구에서 가장 높은 생산지수를 나타내었다. 이는 앞의 결과에서 나타난 바와같이 높은 체중과 사료요구율의 개선에 따른 결과로 진단된다. 위의 결과로부터 Enzyme A와 Mannamase의 첨가에 따라 생산능력이 향상되고 사료내 영양소와 에너지 이용성 향상에 따른 것으로 판단된다 (표 29).

표 29. Effect of functional feed materials supplementation on carcass characteristics and production index in broiler chicken.

	Treatment ¹⁾				
	C	T1	T2	T3	
Carcass Percent (%)	70.79 ± 1.23	73.27 ± 0.44	72.91 ± 0.99	72.71 ± 0.90	
Meat Percent (%)	Breast Muscle	26.05 ± 1.09	24.65 ± 0.98	25.57 ± 1.23	24.99 ± 1.16
	Tight Muscle	8.70 ± 0.49	8.10 ± 0.18	8.19 ± 0.26	8.02 ± 0.29
Production index	376.21 ± 32.04	382.44 ± 16.63	393.66 ± 12.66	378.52 ± 18.90	

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

바. 육질평가

표 30 에는 기능성사료소재 첨가에 따른 다리근육에 대한 육질평가 결과를 나타내었다. pH는 T1처리구가 가장 높았고 대조구에서 가장 낮은 값을 보였으며 육색은 모든 처리구에서 차이가 없었다. 전단력에서는 T1처리구가 가장 높았고 다른 처리구는 비슷한 값이었다. 보수력에서는 T3처리구가 가장 높은 값을 나타내었으나 통계적 유의차는 없는 것으로 나타났다.

표 31 에는 가슴근육에 대한 육질평가를 나타냈다. 가슴근육에서는 대조구에서 가장 낮은 값을 나타내었고 육색은 이렇다 할 경향을 도출할 수 없었다. 가열감량, 전단력 및 보수력에서도 통계적 유의점 없이 비슷한 값을 나타내었다.

표 30. Effect of functional of feed materials supplementation on thigh muscle quality in broiler chicken

	Treatment ¹⁾				
	C	T1	T2	T3	
Ph	8.12 ± 0.16 ^b	8.76 ± 0.18 ^a	8.28 ± 0.10 ^b	8.27 ± 0.08 ^b	
L	49.90 ± 2.32	52.46 ± 1.95	50.74 ± 1.00	51.50 ± 2.02	
Meat color ²⁾	a	4.18 ± 0.86	3.19 ± 0.99	2.90 ± 0.52	3.62 ± 0.80
	b	10.83 ± 1.95	10.33 ± 0.73	11.24 ± 1.21	11.06 ± 1.15
Cooking loss (%)	26.49 ± 1.85	26.24 ± 1.09	24.51 ± 2.67	24.90 ± 2.98	
Shear value (kg/cm ²)	4.02 ± 0.014 ^b	4.08 ± 0.008 ^a	4.03 ± 0.010 ^b	4.01 ± 0.02 ^b	
Water-holding capacity (%)	73.99 ± 1.73	73.95 ± 1.47	73.76 ± 3.92	76.99 ± 2.70	

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

²⁾L: Brightness; a: Redness; b: Yellowness

표 31. Effect of functional of feed materials supplementation on breast muscle quality in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
Ph	7.86 ± 0.12 ^b	8.39 ± 0.19 ^a	8.30 ± 0.12 ^a	8.74 ± 0.16 ^a
L	49.31 ± 1.00 ^{ab}	46.37 ± 1.03 ^b	50.87 ± 1.13 ^a	49.21 ± 1.44 ^{ab}
Meat color ²⁾	a	1.60 ± 0.42 ^a	1.12 ± 0.29 ^{ab}	0.29 ± 0.16 ^b
	b	10.99 ± 0.95 ^a	8.80 ± 0.87 ^{ab}	6.35 ± 1.25 ^b
Cooking loss (%)	26.41 ± 1.71	22.53 ± 2.90	22.78 ± 2.19	23.31 ± 2.24
Shear value (kg/cm ²)	4.08 ± 0.01	4.07 ± 0.01	4.07 ± 0.02	4.07 ± 0.02
Water-holding capacity (%)	77.91 ± 1.73	79.48 ± 2.85	75.66 ± 2.82	75.44 ± 1.59

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

²⁾L: Brightness; a: Redness; b: Yellowness

사. 혈액성분

표 32 에는 실험종료시 혈액성분변화를 나타내었다. 혈중 Glucose 함량은 대조구에 비하여 모든 처리구에서 낮은 값을 나타내었지만 통계적 유의차는 없었다. 총 콜레스테롤, BUN, Total Bilirubin, GOT, GPT 함량에서도 차이가 나타나지 않아 기능성사료첨가제 급여에 따른 악영향은 발견되지 않았다.

표 32. Effect of Functional of feed materials supplementation on blood characteristics of broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
glucose (mg/dl)	276.20 ± 12.72	249.00 ± 9.27	243.33 ± 12.84	245.17 ± 15.88
Total cholesterol (mg/dl)	147.80 ± 6.65	137.17 ± 5.87	140.33 ± 3.26	139.33 ± 4.54
BUN (mg/dl)	>5 ± 0.00	>5 ± 0.00	>5 ± 0.00	>5 ± 0.00
Total Bilirubin (mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02
GOT (IU/L)	214.40 ± 10.87	257.50 ± 24.65	255.67 ± 17.44	260.00 ± 20.12
GPT (IU/L)	16.00 ± 5.28	16.33 ± 3.84	20.67 ± 3.59	16.33 ± 2.79

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

아. 장기의 길이 및 무게에 미치는 영향

표 33 와 34에는 시험종료후 도살한후 측정된 장기의 길이와 무게의 변화를 나타내었다. 십이지장, 공장, 치장 및 소장 전체길이에서 기능성소재첨가구에서 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 맹장, 직장 및 총길이에서도 기능성사료 첨가제구에서 짧아지는 경향을 나타내었다. 표 34의 결과에서 보듯이 무게 또한 길이의 결과와 유사하게 감소하는 경향을 나타내었다.

☿ 33. Effect of Functional of feed materials supplementation on intestinal length in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	cm / 100g BW			
Small intestine				
Duodenum	1.32 ± 0.03 ^a	1.27 ± 0.03 ^{ab}	1.14 ± 0.06 ^b	1.25 ± 0.08 ^{ab}
Jejunum	3.31 ± 0.15	3.07 ± 0.15	3.32 ± 0.28	3.22 ± 0.08
Ileum	3.48 ± 0.09	3.17 ± 0.14	3.18 ± 0.19	3.33 ± 0.19
Total length	8.11 ± 0.23	7.51 ± 0.29	7.64 ± 0.47	7.79 ± 0.31
Large intestine				
Cecum	0.81 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.79 ± 0.04
Rectum	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Total length	1.20 ± 0.03	1.15 ± 0.04	1.17 ± 0.04	1.14 ± 0.05

Mean ± SE

¹⁾See the ☿ 25.

표 34. Effect of Functional of feed materials supplementation on intestinal weight in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g / 100g BW			
Small intestine				
Duodenum	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Jejunum	1.05 ± 0.07	0.96 ± 0.09	0.92 ± 0.04	1.00 ± 0.06
Ileum	0.92 ± 0.07	0.84 ± 0.09	0.77 ± 0.04	0.82 ± 0.05
Total weight	2.39 ± 0.15	2.21 ± 0.17	2.08 ± 0.09	2.23 ± 0.13
Large intestine				
Cecum	0.73 ± 0.07	0.69 ± 0.10	0.55 ± 0.04	0.76 ± 0.07
Rectum	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Total weight	0.88 ± 0.08	0.85 ± 0.11	0.70 ± 0.05	0.90 ± 0.08

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

자. 간, 선위, 근위의 무게에 미치는 영향

표 31에는 간, 선위, 2위, 비장, 췌장의 무게변화를 나타내었다. 전위와 비장은 기능성사료소재첨가구보다 대조구에서 높은 무게를 나타내었으나 다른 장기에서는 비슷한 점을 나타내어 장기 무게에 미치는 영향도 관찰되지 않았다.

표 35. Effect of Functional of feed materials supplementation on organs weight in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g / 100g BW			
Liver	2.60 ± 0.23	2.52 ± 0.16	2.42 ± 0.08	2.57 ± 0.14
Proventriculus	0.40 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.02 ^{ab}	0.36 ± 0.02 ^{ab}	0.34 ± 0.02 ^b
Gizzard	1.53 ± 0.08	1.59 ± 0.05	1.50 ± 0.08	1.57 ± 0.05
Spleen	0.14 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.009 ^b	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.12 ± 0.010 ^{ab}
Pancreas	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.02

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

차. 분비 암모니아 함량변화

표 36에는 맹장 내 암모니아 함량변화를 나타내었다. 맹장 내 암모니아 함량도 대조구에 비하여 모든 처리구에서 감소하였고 특히 T3 처리구에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 맹장내 암모니아 함량도 대조구에 비하여 모든 처리구에서 가장 낮은 함량을 나타내어 *Saururus Chinensi*의 성분이 분비 암모니아 저장에 효과가 있는 것으로 사료되나 이에대한 연구를 좀더 진행해야 할 필요가 있을 것으로 판단된다.

표 36. Influence of Dietary Supplementation of Fermented onion on Ammonia nitrogen in broiler chicken Cecum feces.

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	ppm			
NH3-N	584.56 ± 52.36	527.74 ± 108.22	564.72 ± 25.91	477.15 ± 53.08

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

제 6 절 기능성 사료 소재의 사료내 첨가가 산란계의 생산성에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 80주령의 Hy-Line Brown 암컷 144수를 공시하여 5주일 간 4개 처리구에 3반복으로 A형 3단 6열 Cage(2수 수용 Cage)에 X수씩 4개 처리구로 나누어 3반복으로 12수씩 임의 배치하였다.

나. 실험동물사육

사양시험은 국립 한경대학교 부속 농장 내 육계용 평사에서 예비사육 1주일 후 2011년 10월 4일부터 동년 11월 8일까지 5주간 사육하였다. 사육방법은 시험 기간 동안 사료는 수당 일일 120g 급여하였으며, 음수는 자유 섭취하게 하였다. 점등 관리는 조명 16 hr점등 + 8 hr소등 하였다.

다. 실험설계

실험설계는 Control Diet(대조구)와 대조구 사료에 Enzyme A 0.1% 첨가구(T1), Enzyme A 0.1%와 mannamase 0.1% 첨가구(T2), 대조사료에 Enzyme A 0.1%와 Mannamase 0.1%와 Saururus chinensis extract 0.1% 첨가구(T3)등 총 4개 처리구를 두었다.

라. 분석항목 및 분석방법

(1) 복합효소의 급여가 육계 생산성에 미치는 영향

(가) 사료 섭취량, 계란 산란율

매주 일정한 시간에 사료급여량과 사료잔량을 이용하여 사료섭취량을 측정하였고, 산란율은 사양 시험 기간 중 매일 동일한 시간에 채집하여 처리구별로 총 산란수를 사육수수로 나누어 백분율로 표시하였다.

(나) 난중, 난각 두께, 난강도, 난각무게, Haugh Unit

계란 품질을 측정하기 위하여 시험 시작 후, 1주단위로 생산된 계란을 처리구당 30개의 계란을 수집하여 난각색, 난각강도, 난각두께, 난각무게, 난황색을 측정하였으며, 난각색은 난각색 측정기(QCR, shell colour reflectometer, England)를 이용하여 계란의 중앙부에서 측정하였고, 난각강도는 난각 강도계(FHK CO., Japan)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로 하여 수직으로 고정하고 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각두께는 계란의 중앙부에서 난각 파편을 채취하여 측정하였으며(QCT, shell thickness micrometers, England), 난각무게는 계란의 난각을 전량 수집하여 내부에 남아있는 난백을 제거하고 무게를 측정하여 난중으로 나누어 환산하여 산출하였다. 난황색은 QCC yolk colorimeter(England)를 이용하여 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

표 37에는 사료내 Enzyme A 첨가구(T1), Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2), Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3)등 총 4개 처리구를 두었다. 첨가에 따른 실험 5주간의 사료섭취량 변화를 나타내었다.

실험 전 기간에서 무처리구와 처리구간의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았으며, 효소제의 첨가에 따른 섭취량에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다.

표 37. Effect of dietary enzyme supplementation on Feed intake in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/head/day			
1week	117.00 ± 1.326	117.36 ± 0.950	117.94 ± 0.600	116.86 ± 0.976
2week	115.45 ± 1.865	116.88 ± 0.559	116.49 ± 1.907	117.29 ± 0.824
3week	114.27 ± 1.786	116.15 ± 0.247	117.01 ± 0.946	115.09 ± 0.734
4week	118.20 ± 0.735	118.38 ± 0.202	118.39 ± 0.648	118.14 ± 0.183
5week	114.49 ± 2.165	113.88 ± 1.319	114.50 ± 1.154	113.07 ± 3.313
Total	115.88 ± 1.474	116.53 ± 0.435	116.98 ± 0.902	116.09 ± 0.817

Mean ± SE

¹⁾C : Control Diets

T1 : Control Diets + Enzyme A 0.1%

T2 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1%

T3 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1% + Saururus chinensi 0.1%

표 38는 5주간의 산란율을 나타내었다. 산란율의 경우 섭취기간에 따른 각 주차별 산란율의 변화는 나타나지 않았으나, 무처리구(C)와 비교했을 때 Enzyme A 첨가구(T1), Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2), Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3) 모두 뛰어난 산란율을 나타내었고, 그 중 Enzyme A 첨가구(T1), Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2)가 가장 높은 수준의 산란율을 나타내었다.

표 38. Effect of dietary enzyme supplementation on Egg production in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	%			
1week	82.41 ± 6.432	85.19 ± 7.187	85.65 ± 4.630	82.87 ± 3.036
2week	79.37 ± 6.533	80.16 ± 6.237	84.92 ± 3.785	87.70 ± 3.527
3week	80.16 ± 5.339	87.70 ± 3.785	88.89 ± 1.431	84.52 ± 2.062
4week	77.78 ± 1.730	84.13 ± 4.576	84.92 ± 2.209	81.35 ± 2.778
5week	81.25 ± 5.512	86.46 ± 2.756	77.78 ± 2.842	79.51 ± 1.252
Total	80.19 ± 0.792	84.73 ± 1.290	84.43 ± 1.818	83.19 ± 1.398

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

실험 주간 산란한 계란의 무게는 표 39에 나타내었다. 효소제의 섭취기간에 따른 각 주 차별 산란율의 변화는 나타나지 않았으며, 무처리구(C)와 효소제 첨가구(T1, T2, T3)간의 난중의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

표 39. Effect of dietary enzyme supplementation on Egg weight in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/egg			
1week	67.02 ± 1.038	65.76 ± 1.108	65.89 ± 0.724	66.38 ± 0.327
2week	65.67 ± 2.244	66.64 ± 0.846	65.53 ± 1.234	66.57 ± 0.060
3week	65.98 ± 1.135	65.65 ± 1.106	66.14 ± 0.245	66.80 ± 0.543
4week	67.73 ± 0.386	65.84 ± 1.226	66.62 ± 0.566	63.64 ± 2.575
5week	67.57 ± 0.534	66.84 ± 1.096	67.64 ± 0.584	69.13 ± 2.104
Total	66.79 ± 0.417	66.15 ± 0.247	66.36 ± 0.366	66.50 ± 0.872

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

난각 두께는 표 40에 나타내었다. 난 각의 두께는 계란의 강도를 결정짓는 요인으로써, 모든 처리구에서 실험의 진행에 따라 난각의 두께가 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 이는 산란계(80주령)의 노화에 기인하였다고 사료되어지며, 두께가 무처리구와 Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2)는 비슷한 수준을 나타내었으나, Enzyme A 첨가구(T1)와 Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3)는 0.403mm~0.405mmtnwns으로 상대적으로 두께가 증가하는 것으로 나타났다.

표 40. Effect of dietary enzyme supplementation on egg shell thickness in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	mm			
1week	0.440 ± 0.0099	0.415 ± 0.0105	0.422 ± 0.0113	0.403 ± 0.0191
2week	0.371 ± 0.0063	0.405 ± 0.0141	0.383 ± 0.0091	0.398 ± 0.0137
3week	0.376 ± 0.0255	0.411 ± 0.0110	0.382 ± 0.0124	0.407 ± 0.0108
4week	0.380 ± 0.0110	0.392 ± 0.0087	0.397 ± 0.0101	0.436 ± 0.0189
5week	0.412 ± 0.0135	0.401 ± 0.0068	0.387 ± 0.0076	0.369 ± 0.0160
Total	0.396 ± 0.0074	0.405 ± 0.0042	0.394 ± 0.0024	0.403 ± 0.0090

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

표 41은 난강도를 나타내었으며, 표 40에 나타난 난각 두께의 수준의존 적으로 난 강도가 증가 하는 것으로 나타났으며, 무첨가구와 비교하여 모든 첨가구에서 35.77~36.18kg/cm²의 범위에서 난 강도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

표 41. Effect of dietary enzyme supplementation on egg shell breaking in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	kg/cm ²			
1week	36.50 ± 4.617	37.75 ± 2.535	37.38 ± 3.622	40.63 ± 5.378
2week	29.72 ± 4.572	31.13 ± 4.671	30.73 ± 3.627	34.05 ± 3.743
3week	32.23 ± 2.963	37.63 ± 3.377	36.50 ± 3.321	32.53 ± 4.757
4week	33.08 ± 1.670	35.82 ± 2.097	37.17 ± 3.955	41.48 ± 3.595
5week	27.23 ± 4.462	36.50 ± 2.217	38.60 ± 2.302	32.23 ± 4.355
Total	31.75 ± 1.335	35.77 ± 1.333	36.08 ± 2.200	36.19 ± 1.897

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

계란의 무게 중 난각무게가 차지하는 비율은 표 42에 나타내었으며, 대조구에 비하여 효소 첨가구에서 7.36~7.50%의 수준으로 높게 나타났으며, 이는 표 36, 표 37의 결과와의 연관성을 찾을 수 있었다.

표 42. Effect of dietary enzyme supplementation on egg shell weight in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	%/egg			
1week	7.37 ± 0.076	6.95 ± 0.192	7.08 ± 0.181	6.58 ± 0.279
2week	7.55 ± 0.368	8.20 ± 0.171	8.62 ± 0.264	8.19 ± 0.118
3week	7.09 ± 0.488	7.82 ± 0.291	7.19 ± 0.317	7.40 ± 0.308
4week	6.90 ± 0.170	7.42 ± 0.137	7.20 ± 0.192	7.66 ± 0.316
5week	7.00 ± 0.338	7.12 ± 0.248	6.85 ± 0.229	6.99 ± 0.173
Total	7.18 ± 0.110	7.50 ± 0.099	7.39 ± 0.122	7.36 ± 0.107

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

Haugh unit의 경우 표 39에 나타내었으며, 무처리구와 Enzyme A + Mannamase 첨가구 (T2)는 비슷한 수준을 나타내었으나, Enzyme A 첨가구(T1)와 Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3)는 87.96mm~88.61의 범위를 나타내며 상대적으로 Haugh unit가 증가하는 것으로 나타났다.

표 43. Effect of dietary enzyme supplementation on Haugh unit in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	H U			
1week	91.94 ± 1.610	95.04 ± 1.637	88.49 ± 2.497	91.78 ± 2.456
2week	87.75 ± 1.522	86.76 ± 4.612	88.75 ± 1.057	87.65 ± 3.548
3week	89.64 ± 1.680	90.68 ± 2.804	87.89 ± 2.413	91.50 ± 1.002
4week	86.37 ± 2.022	90.54 ± 2.724	87.05 ± 1.189	85.96 ± 1.870
5week	78.85 ± 1.897	80.04 ± 2.412	79.90 ± 2.327	82.91 ± 2.734
Total	86.91 ± 0.722	88.61 ± 1.551	86.42 ± 1.500	87.96 ± 1.476

Mean ± SE

¹⁾See the 표 25.

3. 연구 결과 및 고찰

이상의 모든 결과로부터 Enzyme A (T1), Enzyme A + Mannamase(T2), Enzyme A + mannamase + Saururus chinensis extract(T3)의 육용계 및 산란계 사료내 첨가는 사료섭취량과 육질에서는 변화를 주지 않았으나 증체량, 사료요구율, 생산지수, 산란율, 난강도, Haugh unit가 개선되는 효과를 나타내었으며, 혈액 성분분석 결과 모든 항목에서 효소제 첨가에 따른 악영향을 미치지 않았고, 장기의 길이 및 무게가 감소하는 경향이 나타났으며, 특히 맹장 내 암모니아태 질소의 함량의 감소효과가 나타남으로써 기능성사료 첨가제로써의 개발 가능성이 제시되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 최종 목표 및 달성도

1. 최종 세부 목표

가. 축산사료원료 소화흡수효율의 획기적 향상 및 동물건강을 위해 일반사료는 물론 난분해성 사료도 효과적으로 분해할 수 있는 곤충유래 고효율 효소 및 기능성소재를 이용한 친환경 동물사료첨가제를 개발한다.

- (1) 곤충미생물 유래 고효율 효소 등 사료효율 향상 기능성 소재 선발
- (2) 선발된 고효율 효소 및 바이오소재의 산업적 대량생산 공정 시스템 개발 및 사료첨가제 시험제형 완성
- (3) 사료내 고효율 효소 및 기능성 소재의 첨가 조건 결정

나. 개발된 기술을 이용하여 1차년도 기간 중 1건 이상의 제품화를 실현한다.

- (1) 사료첨가제 제품등록

2. 달성도

가. 난분해성 헤미셀룰로오스를 효과적으로 분해하는 효소를 발굴하고 특성분석 및 고효율 발현시스템을 확보하였음. 대량배양 공정을 개발하고 시험제형을 완성하여 동물 급이시험을 수행하였다.

- (1) 고효율 xylanase와 mannanase의 특성을 규명하고, 관련 연구결과를 SCI급 논문에 게재하였다. (100% 달성)
- (2) *B. subtilis* 균주를 이용한 과발현 시스템을 확보하였다. (100% 달성)
- (3) 대량생산을 위한 배지를 최적화하여 시험제형을 완성하였다. (100% 달성)
- (4) 생산된 시험제형을 이용한 동물급이 시험을 수행하였다. (100% 달성)

나. 제품화 실현

- (1) 기능성 사료첨가제 '조아자임(Joazyme)' : 성분등록번호 - IIBC40027호 등록 (100% 달성)

제 2 절 관련분야의 기여도

1. 연구개발 성과의 우수성에 따른 기여

곤충 및 생물다양성으로부터 고효율 효소자원을 확보 및 그 특성에 대한 연구는 상당히 부족한 실정이다. 특히 국내에는 이와 같은 연구를 수행한 결과가 없는 것이 현실이다. 특히 곤충의 장내미생물이 가지는 효소는 기존의 다른 미생물들이 가지는 특성과는 차별화된 분자구조 및 생화학적 특성을 가지고 있다.

본 연구를 통하여 확보된 고효율 효소 자원의 산업화에 대한 결과는 사료 및 사료첨가제에만 국한되는 것이 아니라, 2세대 바이오에너지 산업을 비롯한 다른 산업용 효소에도 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 분야 관련성이 높은 대표성과

본 연구에 활용한 xylanase와 mannanase의 연구결과를 바탕으로 해외 유명 저널인 *Bioresource Technology* 저널에 2건의 논문을 투고하였고, 관련 내용을 특허(국외 특허 1건, 국내 특허 1건)화하여 지적재산권을 확보하였다.

가. Mannanase 관련 논문 발표

- 저널명 : *Bioresource Technology* 102, 9185-9192. 2011.(IF : 4.365)
- 논문명 : Cloning and characterization of a modular GH5 β -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13.

나. Xylanase 관련 논문 발표

- 저널명 : *Bioresource Technology* 107, 25-32. 2012. (IF : 4.365)
- 논문명 : Novel modular endo- β -1,4-xylanase with transglycosylation activity from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes.

다. 신규 특허 출원 1건

- 특허명 : 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 생산되는 신규한 활성 도메인을 갖는 자일라나제
- 출원번호 :
- 관련내용 : 본 발명은 셀룰로시마이크로비움 속(*Cellulosimicrobium* sp.) HY-13 균주에서 분리된 글리코시드 하이드롤라제-6 유사 도메인(glycoside hydrolase6-like domain; GH6-like domain)을 가지는 신규한 자일라나제에 관한 것이다.

라. PCT 특허 진입 1건

- 특허명 : 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 생산된 신규한 만난아제
- 출원번호 : PCT/KR2011/010245
- 관련내용 : 지렁이 공생 박테리움인 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 신규한 만난아제의 구조적 및 생화학적 특성, 및 특이적 활성을 갖는 최적의 조건과 함께, 높은 특이적 활성이 나타내는 GH5 β -1,4-만난아제임을 규명하여 산업적 유용성이 기대되는 특허. 사료 성분중 점도로 인해서 장폐색 및 어린 가축의 소화율을 감소시킬 수 있는 만난성분을 선택적으로 분해하여 사료의 활용도 및 에너지 대사에 도움을 줌으로써 궁극적으로 경제성 제고에 필요한 효소에 관한 기술을 포함함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구실적

가. 연구 논문 발표 : 2건

(1) Mannanase 관련 논문 발표

- 저널명 : *Bioresource Technology* 102, 9185-9192. 2011. (IF : 4.365)
- 논문명 : Cloning and characterization of a modular GH5 β -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13.
- 관련내용 : 고효성 mannanase의 유전자를 확보하고 효소의 특성을 규명한 연구결과를 발표하였다.

(2) Xylanase 관련 논문 발표

- 저널명 : *Bioresource Technology* 107, 25-32. 2012. (IF : 4.365)
- 논문명 : Novel modular endo- β -1,4-xylanase with transglycosylation activity from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13 that is homologous to inverting GH family 6 enzymes.
- 관련내용 : 신규한 활성 도메인을 갖는 xylanase에 관한 것으로 효소 생화학적 특성을 규명하고 기질특이성을 이용한 신규한 도메인의 활성에 관한 연구결과를 발표하였다.

나. 지적재산권 확보 : 신규 특허 출원 1건, 선행기술 특허 PCT 진입 1건

(1) 신규 특허 출원 1건

- 특허명 : 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 생산되는 신규한 활성 도메인을 갖는 자일라나제
- 출원번호 : 제2011-0146600호
- 관련내용 : 본 발명은 셀룰로시마이크로비움 속(*Cellulosimicrobium* sp.) HY-13 균주에서 분리된 글리코시드 하이드롤라제-6 유사 도메인(glycoside hydrolase 6-like domain; GH6-like domain)을 가지는 신규한 자일라나제에 관한 특허

(2) PCT 특허 진입 1건

- 특허명 : 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 생산된 신규한 만난아제
- 출원번호 : PCT/KR2011/010245
- 관련내용 : 지렁이 공생 박테리움인 셀룰로시마이크로비움 속 HY-13 균주로부터 신규한 만난아제의 구조적 및 생화학적 특성, 및 특이적 활성을 갖는 최적의 조건과 함께, 높은 특이적 활성이 나타내는 GH5 β -1,4-만난아제임을 규명하여 산업적 유용성이 기대되는 특허

2. 실용화 및 산업화 계획

가. 제품 성분 등록

(1) 효소제 '조아자임(Joazyme)' 성분등록

- 성분등록번호 : 제 IIB4C0029호
- 제품분류 : 보조사료 - 효소제
- 제조원/판매원 : (주)인섹트바이오텍

(2) 사업화계획

등록한 시험제형을 완성하여 2012년 제품의 홍보 및 판매를 실시함.

국내외 동시 홍보를 진행하며, 국내 및 해외 축산박람회, 바이오관련 전시회에 효소의 판촉활동을 진행함

예상 매출액 : 2012년 5억, 2015년 50억, 2018년 이후 약 100억 이상의 매출 기대

3. 경제적 파급효과

전세계 효소 시장규모는 3.3 billion US\$(한화 33조원)규모로 그 중에서 사료용 효소시장 규모는 2012년 378 million US\$(3,780 억원)로 추산하고 있다. 제품화 연구개발을 통하여 확보한 기술을 바탕으로 시장확보 가능성은 매우 높으며, 특히 국내 기업의 효소 산업화가 절실하다 (표 44).

표 44. 제품화의 경제적 기대효과 예시 - 사료용 효소시장

		국내 사료용 효소 시장	해외 사료용 효소 시장
직접적 효과	시장규모	150 억원	3,780 억원(3.5억 달러)
	매출액	22.5억원 (점유율 15% 기준)	94.5억원 (점유율 2.5% 기준)
간접적 효과	사료효율 개선을 통한 농가 소득향상 (사료전환율 0.2 감소시 사료 Kg당 50원 이상 이익이 발생) 수입대체 효과 Global 기업이 국내 시장 선점(Danisco, DSM 등) 곡물가격 상승으로 인한 사료가격 지속적 인상 - 곡물부산물의 활용 범위 확대를 통한 가격 완충효과		

4. 추가연구개발 계획

가. 다국적 기업 제품과의 비교 시험

경쟁력있는 제품의 효능에 대한 자료를 지속적으로 확보하기 위하여 해외 다국적 기업의 제품과 시험제형을 비교 분석하여 차별화된 마케팅 자료를 확보할 필요가 있음.

나. Large scale 배양 공정 확보

(주)인섹트바이오텍의 기존 배양 공정 기술의 Know-how를 바탕으로 20ton 이상의 대량

생산을 위한 공정개발이 필요함. 대량생산 기술을 완성하기 위하여 보다 저렴하고 안정적인 효소를 생산할 수 있는 산업용 배지조성을 최적화하여 경제성을 평가하여 시장에서의 경쟁력을 확보할 필요가 있음.

다. 제형의 안정화 및 현장 평가 자료의 지속적 확보

Green technology의 일환으로 최근 효소 시장은 온도에 민감하지 않으며 보다 안정적인 효소를 개발하기 위한 시도가 진행되고 있다. 시장의 요구에 부합하는 안정한 효소의 개발을 위한 제형의 안정화를 통한 제품의 품질향상을 수행할 필요가 있음.

동물을 이용한 현장평가는 계절적인 요인과 축사 환경적인 요인 등의 여러 가지 고려해야 할 요소가 있다. 이는 차별화된 마케팅을 위한 제품의 기술력과 연관되는 부분으로 지속적인 현장평가 자료가 제품의 기술력을 입증하는 중요한 자료로 활용할 수 있다.

라. 후속제품의 개발 및 기술이전

양돈, 육계, 산란계 등 다양한 축종에 따른 효소제의 배합비 역시 다양하게 요구되고 있다. 따라서 향후 추가 연구개발 결과를 바탕으로 후속제품을 개발하고 이를 기술이전하여 시장의 Needs에 맞는 제품을 국내외 시장에 판매할 계획을 가지고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 산업용 효소와 관련된 연구개발 진행방향은 녹색기술을 바탕으로, chemical 사용 환경에서 biological 사용환경으로 점차 변화되고 있기 때문에, 에너지를 최소화한 상태에서 효소를 이용하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있다. 기존의 효소에서 중요시 되었던 안정성 뿐만아니라, 보다 저온에서 오랫동안 안정한 효소를 이용하여 공정에 이용되는 화석에너지를 최소화하여 CO₂ 발생을 감소시키기 위하여 노력하고 있다.

따라서, 효소의 산업적 이용성이 점차 부각되고, 그에 따른 효소의 특성의 개질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Bio-E 산업에 있어서의 경우에도, 기존의 1차 바이오에너지에서 문제시되었던, 사탕수수나 옥수수과 같은 cellulose 계열의 biomass는 전세계에 물가 상승에 막대한 영향을 주었다. 하지만, 2세대 바이오에너지의 경우 효소의 개발을 통하여 난분해성인 hemicellulose 계열의 biomass를 이용하기 위한 xylanase, mannanase 등의 효소 개발이 수반되었다 (그림 22).

결과적으로 국가적 CO₂ gas 감축을 위한 에너지 절감 뿐만 아니라, 효소의 산업적 활용을 위한 기초기술을 확보하고 산업에 부합되는 특성의 개질을 통한 이용성의 증대는 녹색기술에 중요한 한 요소이다.

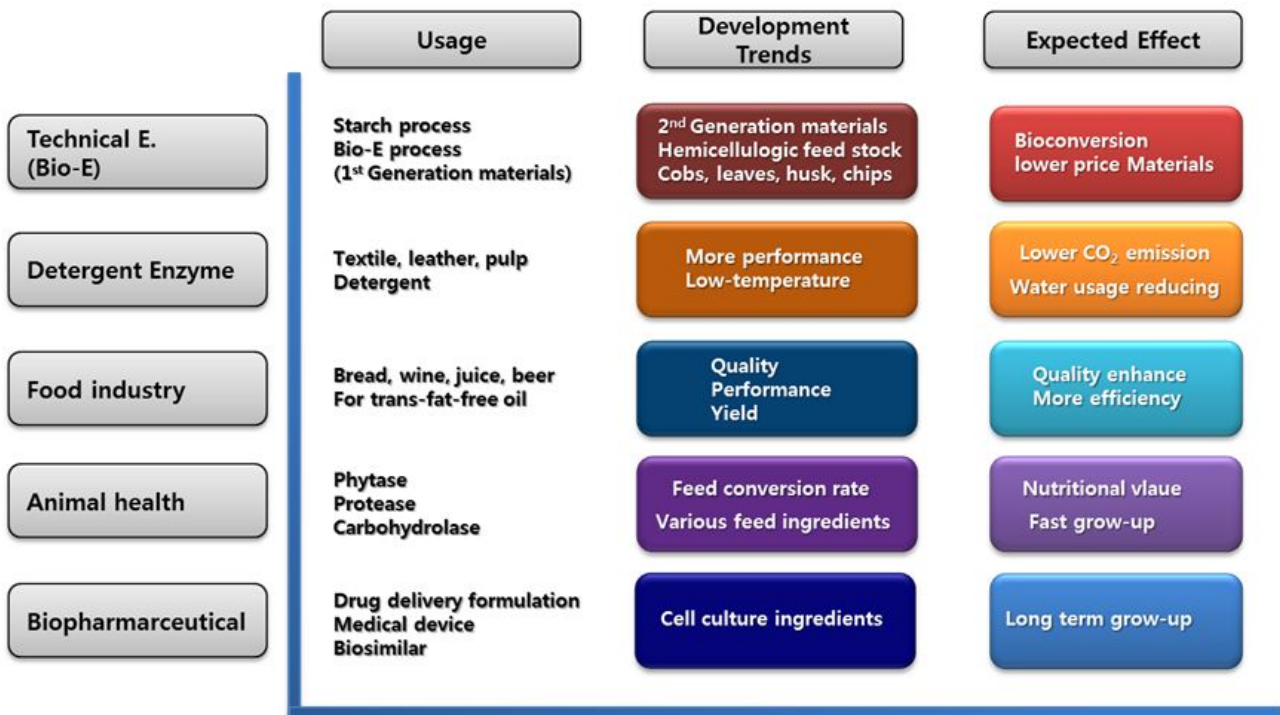


그림 22. 산업용 효소의 기술 개발 현황

출처 : The Novoymes report

제 7 장 참고문헌

1. Adeola, L. 2001. Digestion and balance techniques in pigs. Pages 903-916 in Swine Nutrition. A. J. Lewis and L. L. Southern, ed. CRC Press, Washington, DC, USA.
2. Bedford, M. R., and H. L. Classen, 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *J. Nutr.* 122:560-569.
3. Bedford, M.R., and H. Schulze, 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.* 11:91-114.
4. Bedford, M. R., 2000a. Exogenous enzymes in monogastric nutrition-Their current value and future benefits. *Ani. Feed Sci. Technol.* 86:1-13.
5. Benech, R.-O., Li, X., Patton, D., Powlowski, J., Storms, R., Bourbonnais, R., Paoce, M., Tsang, A., 2007. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochate chrysosporium*endo- β -1,4-mannanase. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 740-747.
6. Berg, L. R., 1959. Enzyme supplementation of barley diets for laying hens. *Poult. Sci.* 38:1132-1139
7. Boison, S., and J. A. Fernandez. 1995. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51:29-43.
8. Boison, S., and J. A. Fernandez. 1997. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Animal Feed Sci. Technol.* 68:277-286.
9. Campbell, G. L., and M. R. Bedford, 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Ani. Sci.* 72:449-466
10. Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3-23.
11. Cowieson, A. J., and V. Ravindran, 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acid. *Brit. Poult. Sci.* 49:37-44
12. Diebold, G., R. Mosenthin, H.-P., Piepho, and W. C. Sauer. 2004. Effect of supplementation of xylanase and phospholipase to a wheat-based diet for weanling pigs on nutrient digestibility and concentrations of microbial metabolites in ileal digesta and feces. *J. Animal Sci.* 82:2647-2656.
13. Hasting, W. H., 1946. Enzyme supplements to poultry feeds. *Poultry Sci.* 37:372.
14. Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Li, L., Chai, P., Kusakabe, I., 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydr. Polym.* 66, 88-96.
15. Kiarie, E., A. Owusu-Asiedu, P. H. Simmins, and C. M. Nyachoti. 2010. Influence of

- phytase and carbohydrase enzymes on apparent ileal nutrient and standardized ileal amino acid digestibility in growing pigs fed wheat and barley-based diets. *Livest. Sci.* 134:85-87.
16. Kim, B. G., J. Z. Tian, J. S. Lim, D. Y. Kil, H. Y. Jeon, Y. K. Chung, and Y. Y. Kim. 2004. Influences of enzyme complex supplementation on growth, ileal and apparent fecal digestibility, and morphology of small intestine in pigs. *Asian-Aust. J. Animal Sci.* 17:1729-1735.
 17. Kim, B. G., and H. H. Stein. 2009. A spreadsheet program for making a balanced Latin square design. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 22:591-596.
 18. Kim, B. G., G. I. Petersen, R. B. Hinson, G. L. Allee, and H. H. Stein. 2009. Amino acid digestibility and energy concentration in a novel source of high-protein distillers dried grains and their effects on growth performance of pigs. *J. Animal Sci.* 87:4013-4021.
 19. Kim, D.Y., Ham, S.-J., Lee, H.J., Kim, Y.-J., Shin, D.-H., Rhee, Y.H., Son, K.-H., Park, H.-Y., 2011. A highly active endo- β -1,4-mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 365-370.
 20. Kim, D.Y., Han, M.K., Lee, J.S., Oh, H.-W., Park, D.-S., Shin, D.-H., Bae, K.S., Son, K.-H., Park, H.-Y., 2009a. Isolation and characterization of a cellulase-free endo- β -1,4-xylanase produced by an invertebrate-symbiotic bacterium, *Cellulosimicrobium* sp. HY-13. *Proc. Biochem.* 44, 1055-1059.
 21. Kim, J. H. and Pack, M. Y. 1993. Overproduction of extracellular endoglucanase by genetically engineered *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* 15, 133-138.
 22. Lindemann, M. D., Comelius, S. G., Kandelgy, S. M. E., Moser, R. L. and J. E. Pettigrew, 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Animal Sci.* 62:1298
 23. Luo, H., Yang, J., Li, J., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., Fan, Y., Yao, B., 2010. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1829-1839.
 24. Matti, Nasi., 1988. Enzyme supplementation of laying hen diets based on barley and oat. Department of Animal Husbandary University of Helsinki. 00710 Helsinki. Finland.
 25. McKie, V.A., Vincken, J.-P., Voragen, A.G.J., van den Broek, L.A.M., Stimson, E., Gilbert, H.J., 2001. A new family of rhamnogalacturonan lyases contains an enzyme that binds to cellulose. *Biochem. J.* 355, 167-177.
 26. Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
 27. NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA.
 28. Pirgozliev, V., M. R. Bedford, and T. Acamovic. 2010. Effect of dietary xylanase on energy, amino acid and mineral metabolism, and egg production and quality in laying

- hens. *Brit. Poult. Sci.* 51:639-647.
29. Sauvant, D., J. M. Perez, and G. Tran. 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials. 2nd rev. ed. INRA, Paris, France.
 30. Saxton, A. M. 1998. A macro for converting mean separation output to letter groupings in Proc Mixed. Pages 1243-1246 in Proc. 23rd SAS Users Group Intl., SAS Institute Inc., Cary, NC.
 31. Shallom, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219-228.
 32. Selle, P. H., V. Ravindran, R. A. Caldwell, and W. L. Bryden, 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutr. Res. Rev.*, 13:255-278
 33. Shi, P., Yuan, T., Zhao, J., Huang, H., Luo, H., Meng, K., Wang, Y., Yao, B., 2010. Genetic and biochemical characterization of a protease-resistant mesophilic β -mannanase from *Streptomyces* sp. S27. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 451-458.
 34. Wang, M. Q., Z. R. Xu, J. Y. Sun, and B. G. Kim. 2008. Effects of enzyme supplementation on growth, intestinal content viscosity, and digestive enzyme activities in growing pigs fed rough rice-based diet. *Asian-Aust. J. Animal Sci.* 21:270-276.
 35. Widyaratne, G. P., J. F. Patience, and R. T. Zijlstra. 2009. Effect of xylanase supplementation of wheat distillers dried grains with solubles on energy, amino acid and phosphorus digestibility and growth performance of grower-finisher pigs. *Can. J. Animal Sci.* 89:91-95.
 36. Yang, P., Li, Y., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, T., Bai, Y., Zhan, Z., Yao, B., 2009. A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC 1554 : gene cloning, expression and enzymatic characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 85-94.
 37. Zolotnitsky, G., Cogan, U., Adir, N., Solomon, V., Shoham, G., Shoham, Y., 2004. Mapping glycoside hydrolase substrate subsites by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 11275-11280.

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 3절. 양돈에 대한 기능성 사료 소재 효능 검증

최근 원료사료의 가격이 상승함에 따라 양돈 생산비에서 사료비가 차지하는 비중이 50%를 넘어서고 있다. 따라서 사료회사 및 양돈농가에서는 사료비를 절감하기 위해 다양한 노력을 하고 있다. 원료사료에서 에너지가는 사료가격을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 작용하며, 사료 배합비 작성을 위해서 총에너지보다 더 정확한 개념인 가소화에너지, 대사에너지 및 정미에너지 등을 사용한다. 원료사료의 에너지 소화율은 일반적으로 90% 미만인 경우가 대부분인데, 이는 사료 내에 존재하는 탄수화물 및 인이 돼지의 소화기관에서 완전하게 소화되지 못하기 때문이다. 특히, 탄수화물 중 일부는 돼지의 장관에서 분비하는 효소가 분해하지 못하는 기질로 구성되어 있기 때문에 소화되지 못한 채 분으로 배설된다. 이와 같이 소화되지 않는 탄수화물을 소화시킬 수 있는 효소를 사료와 함께 급여하면, 탄수화물의 소화율이 높아져서 결국 원료사료의 가소화에너지가가 높아지게 된다.

본 연구개발과제의 목적은 미생물을 이용하여 생산된 효소제를 양돈 사료에 적용하여 사료의 가치 향상 정도를 확인하는 것으로, 활성이 확인된 효소제를 양돈 사료 내 적용 가능 유무와 적용 범위, 정도를 확인하기 위해 계획되었다. 먼저 *in vitro* 건물 소화율 측정 실험을 통하여 개발된 효소제가 어떤 원료사료에 적합한지를 시험하였다. *In vitro* 건물 소화율 실험에 사용된 원료사료는 소맥, 보리, 옥수수, 대두박, 팜박, 채종박, 면실박, 및 야자박이었다. 실험결과 본 연구에서 개발된 효소제의 효과는 소맥 및 보리에서 가장 잘 나타났다. 따라서, 동물실험에서는 소맥 및 보리를 실험사료에 포함시켰으며, 가장 널리 이용되는 옥수수도 실험에 이용하였다. 동물실험에서는 효소제의 첨가에 따른 원료사료의 가소화에너지가 및 대사에너지를 측정하였다.

본 연구의 결과는 효소제의 효과가 나타나는 원료사료들을 정성적으로 선별하는 데에 이용될 수 있으며, 또한 효소제의 첨가효과를 정량적으로 평가하는 데에도 이용될 수 있다. 결과적으로는 양돈 생산비의 절감에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3절. 양돈에 대한 기능성 사료 소재 효능 검증

In vitro 건물 소화율 실험은 Boison and Fernandez (1995)에 의해 개발되어 현재 지속적으로 사료 가치 평가에 적용되고 있고, 본 실험에서는 소장에서의 소화 단계까지 설립된 회장 소화율 추정을 본 실험에 적용하여 효소제에 의한 건물 소화율 변화를 측정하였다.

다량의 섬유소를 함유하고 있는 원료사료를 급여할 경우, 섬유성 탄수화물이 돼지의 체내에서 활용되지 못하고 배설된다. 이러한 섬유성 탄수화물은 분해하여 활용할 경우 원료 사료의 영양적 가치를 향상시킬 수 있다. 사료 내 xylanase의 첨가는 산란계 실험을 통하여 증체량에서 그 효과가 확인된 바 있다 (Pirgozliev et al., 2010). 양돈 사료의 경우에는 소맥 및 보리 위주의 사료에 xylanase를 첨가한 결과 회장 아미노산의 소화율이 향상되었다는 보고가 있다 (Kiarie et al., 2010). 하지만, Kim et al. (2004)은 옥수수 및 대두박 위주의 양돈사료에 beta-glucanase 및 xylanase를 포함한 복합효소제를 첨가한 결과 영양소 소화율 및 사양성적에서 큰 변화가 없었다고 보고하였다. 이외에도 많은 양돈 연구에서 탄수화물 분해 효소제의 첨가효과에 관련된 연구들이 보고되었으나 (Dietbold et al., 2004; Wang et al., 2008; Widyaratne et al., 2009), 효소제의 첨가효과는 원료사료내 효소기질의 함량, 효소제의 첨가수준, 및 돼지의 성장단계를 포함하는 다양한 요인들의 영향을 받는 것으로 보인다.

현재 국내에서도 많은 종류의 효소제가 배합사료에 첨가되어 활용되고 있으며, 유럽지역에서 많이 이용되는 원료사료인 소맥, 보리에는 옥수수에 비해 다량의 조섬유가 존재하여, 이에 적합한 효소제는 국내뿐만 아니라 유럽지역 및 전 세계적으로도 다양하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 3절. 양돈에 대한 기능성 사료 소재 효능 검증

1. *In vitro* 건물 소화율 측정 실험

가. 복합 효소제 (Enzyme A) 실험

(1) 실험적 접근

본 실험은 전 과정 모두 Boison and Fernandez (1995)의 실험에 기초를 두고 있으며, 실험 기기와 시료 건조 온도에서 변화를 두었다. 실험은 위와 소장에서의 소화단계로 나누었으며, 대장에서의 소화는 생략하고 회장 건물 소화율로 효소의 활성을 확인하였다. Boison and Fernandez (1997)의 실험에서는 대장을 포함한 총 3단계의 과정으로 실험을 진행하였지만, 대장의 소화 단계에서 사용하는 복합 효소제 (Viscozyme® L, Sigma No. V2010)에 의해 첨가한 효소제의 효과가 확인되지 않을 가능성을 고려하여 회장 건물 소화율을 통하여 효소제의 활성 유무 및 정도를 확인하였다.

(2) 실험 사료 및 효소제

실험 사료는 에너지 사료 3종류 (옥수수, 보리, 소맥), 단백질 사료 4종류 (대두박, 채종박, 면실박, 팜박)로 실시하였으며, 복합 효소제는 Enzyme A (Table 1. 1)를 사용하였다. 복합 효소제의 첨가량은 0.5% 수준에서 10% 수준까지 각각의 원료사료별로 실험을 실시하였다 (Table 1. 2).

(3) 실험 방법

(가) Step 1

균일한 크기로 분쇄된 원료사료 1 g (<1 mm)을 100 ml 삼각 플라스크에 투입하였다. 대조구에는 원료사료만 투입하고, 복합 효소제 처리구에서는 첨가 수준만큼의 효소제를 추가로 투입하였다. 각각의 반복마다 blank를 포함하여 실험하였다. Step 1은 위에서의 소화를 모방한 것으로 우선 0.1 M의 완충용액 (pH 6.0) 25 ml 와 0.2 M의 HCl 10 ml 를 시료가 들어있는 플라스크에 넣었다. 그 후, 1 M의 NaOH 용액과 HCl 용액을 이용하여 분석 시료를 pH 2.0으로 조절한 후, 미리 준비된 pepsin 용액(porcine, ≥ 250 units/mg, Sigma No. P7000)을 1 ml 씩 넣었다. 박테리아의 성장을 억제하기 위해 chloramphenicol 0.5 ml를 넣고, 뚜껑을 덮은 후 39°C로 예열된 교반 배양기에 넣고 6시간 동안 교반하였다.

(나) Step 2

① Step 2는 소장에서의 소화과정을 모방한 것으로 교반이 끝난 분석 시료에 0.2 M의 완충용액 (pH 6.8) 10 ml와 0.6 M의 NaOH 5 ml를 넣었다. 그 후, 1 M의 NaOH 용액과 HCl 용액을 이용하여 분석 시료를 pH 6.8로 조절한 후, 미리 준비된 pancreatin 용액(porcine, grade IV, Sigma No. P1750) 1 ml를 넣고, 뚜껑을 덮은 후 39°C로 예열된 교반 배양기에 넣고

18시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 시료는 상온에서 5% 설포살리실산 용액 5ml를 첨가한 후 30분 동안 소화되지 않은 아미노산을 침전시켰다.

② 위의 과정을 모두 거친 분석 시료의 잔유물을 소화되지 않고 배설되는 원료사료의 건물로 가정하고 이는 0.5 g의 celite를 포함하는 glass filter crucible을 이용하여 조섬유 분석 장치 (Fibertec System M, Tecator)를 통해 회수하였다. 삼각 플라스크는 1% 설포살리실산 용액으로 2회 씻어서 glass filter crucible에 투입하여 남아있는 잔유물이 없도록 하였고, 에탄올과 아세톤을 10 ml씩 각각 2회 glass filter crucible에 주입하여, 남아있는 지방 성분을 용해하였다. 잔유물의 회수를 마친 glass filter crucible은 건조기를 이용하여 105℃에서 6시간 동안 건조하였다. 이렇게 회수된 잔유물의 무게와 분석에 사용된 원료사료와의 무게차를 이용하여 회장 건물 소화율을 추정하였다.

(4) 회장 건물 소화율 계산 및 통계분석

분석에 사용된 원료 사료 내 건물 함량은 Sauvante et al. (2004)에 명시된 함량을 기준으로 하였으며, 위 실험을 통해 얻은 결과를 아래 계산식에 적용하여 회장 건물 소화율을 추정하였다.

$$\text{회장건물소화율(\%)} = \frac{\text{원료사료건물함량} - \text{잔유물건물함량}}{\text{원료사료건물함량}} \times 100$$

실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 효소제의 첨가처리가 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 이 과정에서 산출된 P-values를 영문자로 전환하기 위해 매크로 프로그램을 이용하였다 (Saxton, 1998). 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하일 때로 하였다.

(5) 실험 결과

각각의 원료사료에서 효소제의 첨가에 따른 회장 건물 소화율의 변화량을 측정하였다 (Table 1. 2). 소맥의 경우에 효소제 첨가수준 0.5%에서 건물 소화율이 향상되었다 ($P < 0.05$). 하지만, 보리 및 옥수수를 포함한 다른 원료사료의 소화율은 효소제의 첨가에 의해 달라지지 않았다.

나. 복합 효소제 (Enzyme B) 실험

(1) 실험적 접근

본 실험의 접근 및 계획은 위의 실험 (실험 가.)과 동일한 방법으로 진행하였다.

(2) 실험 사료 및 효소제

실험 사료는 에너지 사료 3종류 (옥수수, 보리, 소맥), 단백질 사료 5종류 (대두박, 채종박, 면실박, 팜박, 야자박)로 실시하였으며, 복합 효소제는 Enzyme B (Table 1. 1)를 사용하였으며, 효소제의 첨가수준은 1%로 하였다.

(3) 실험 방법

실험 방법은 위 실험 (실험 가.)과 모두 동일하게 진행하였다.

(4) 회장 건물 소화율 계산 및 통계분석

계산 과정은 위 실험 (실험 가.)과 동일한 계산 방법을 적용하였다. 실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 효소제의 첨가처리가 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 통계적인 유의성은 P -value가 0.05 이하 일 때로 하였다.

(5) 실험 결과

각각의 원료사료에서 효소제의 첨가에 따른 회장 건물 소화율의 변화량을 측정하였다 (Table 1. 3). 효소제의 첨가효과는 소맥 및 보리에서 두드러지게 나타났다 ($P < 0.05$). 소맥 및 보리의 건물소화율은 약 1.9 및 1.4% unit 향상되었으나, 단백질 사료들을 포함한 다른 원료사료들의 건물소화율은 효소제의 첨가에 의해 크게 달라지지 않았다. 본 실험을 바탕으로 동물 실험 (실험 2.)에 사용할 원료 사료에 소맥 및 보리를 포함시켰으며, 가장 널리 이용되는 원료 사료인 옥수수도 동물실험에 포함시켰다.

다. 복합 효소제 (Enzyme C) 실험

(1) 실험적 접근

본 실험의 접근 및 계획은 위의 실험 (실험 가.)과 동일한 방법으로 진행하였다.

(2) 실험 사료 및 효소제

실험 사료는 소맥, 보리, 옥수수, 대두박 및 팜박을 이용하였으며, 복합 효소제는 Enzyme C (Table 1. 1)를 사용하였다. 복합 효소제의 첨가량은 1%로 하였다.

(3) 실험 방법

실험 방법은 위 실험 (실험 가.)과 모두 동일하게 진행하였다.

(4) 회장 건물 소화율 계산

계산 과정은 위 실험 (실험 가.)과 동일한 계산 방법을 적용하였다. 실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 효소제의 첨가처리가 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 통계적인 유의성은 P -value가 0.05 이하 일 때로 하였다.

(5) 실험 결과

각각의 원료사료에서 효소제의 첨가에 따른 회장 건물 소화율의 변화량을 측정하였다

(Table 1. 4). 효소제의 첨가효과는 소맥 및 보리에서 두드러지게 나타났다 ($P < 0.05$). 소맥 및 보리의 건물소화율은 약 2.2 및 1.8% unit 향상되었다. 하지만 다른 원료사료들의 건물소화율은 효소제 첨가에 의해 크게 달라지지 않았다. 이 결과는 앞서 수행된 Enzyme B에 관한 실험 결과와 일치한다. 이는 Enzyme C는 효소 종류 및 역가에 있어서 Enzyme B와 크게 다르지 않기 때문인 것으로 보인다. 또한 본 결과는 Enzyme C에 대한 동물실험에 소맥 및 보리를 포함시키는 것이 적절함을 보여준다. 팜박의 소화율이 효소제의 첨가에 의해 수치상으로는 2.4% unit 향상되었으나, 비교적 큰 변이 때문에 통계적인 유의성이 나타나지 않았다. 팜박의 경우에 기본적으로 소화율이 낮게 나타났음을 알 수 있는데 (Table 1.3 and 1.4), 이는 그만큼 소화율이 향상될 수 있는 폭이 크다는 것을 의미한다. 팜박에서 소화되지 않는 에너지 성분을 분해시킬 수 있는 효소를 개발하는 것은 큰 의미를 가질 수 있을 것으로 보인다.

2. 복합 효소제 (Enzyme C)를 첨가한 사료를 급여한 돼지의 에너지 소화율 변화 측정 실험

가. 실험적 접근

복합 효소제 (Enzyme C) 첨가 (Table 1. 1)에 의한 원료사료의 에너지 소화율 변화를 돼지에게 급여 후, 가소화 에너지, 대사 에너지를 측정하여 분석하였다.

나. 동물, 사료 및 실험설계

(1) 동물 및 사료

교잡종 거세 수돼지 6두 (개시체중 약 35.8 ± 3.3 kg)를 사료급여기가 설치된 대사실에서 개체별로 사양하였으며, 6개의 실험사료로 구분하여 옥수수, 소맥, 보리 3개의 원료사료에 대해 복합 효소제 (Enzyme C)를 첨가한 처리구와 첨가하지 않은 대조구로 각각 구분하여 실험을 진행하였다 (Table 1. 5, 1. 6, 및 1. 7). 복합 효소제에 사용된 부형제는 옥수수를 사용하였으며, 대조구에서는 효소제 첨가량에 대응하는 옥수수를 첨가하였다. 비타민과 광물질은 NRC (1998)에 제시되어 있는 영양소 요구량 이상이 되도록 배합하였다.

(2) 실험 설계

실험설계는 6×6 Latin square design으로 모든 동물이 각 실험사료에 한 번씩 할당될 수 있도록 하였으며, Balanced Latin Square Designer (Kim and Stein, 2009)를 이용하여 존재할 수 있는 전이효과를 최소화하였다 (Table 1. 8).

다. 사료 급여 및 시료채취

일당 사료섭취량은 각 돼지의 유지에너지의 2.5배 수준으로 급여하였으며, 같은 양을 오전 7시 30분과 오후 3시 30분으로 나누어 2회 급여하였다. 사료급여기에 잔량이 있을 경우에는 수거하여 실제 사료섭취량 계산에 적용하였으며, 사료에 대한 적응기 3일이 지난 이후, 4일간 분비되는 분과 노를 전분 채취법으로 수거하였다. 분의 채취는 표시제법을 이용 (Adeola, 2001)하여 수거하였다. 각 실험기간의 4일째 오전, 사료에 표시제 (산화크롬)를 섞어서 급여하고 분에 표시제의 색깔이 나타나는 시점부터 채취를 시작하였으며, 8일째 오전에 사료에 표시제를 섞어서 급여한 후, 표시제의 색깔이 분에 다시 나타나면 그 직전까지의 분을 채취하였다. 뇨의

채취는 4일째 오후 2시 부터 8일째 오후 2시까지 수거하였다. 그 이외의 동물실험과정은 Kim et al. (2009)에 서술된 방법에 따랐다.

라. 화학 분석

원료사료와 배합사료, 분, 뇨 시료는 bomb calorimeter를 이용하여 총 에너지를 측정하였다. 채취된 분은 건조기를 이용하여 55°C에서 72시간동안 건조한 후 분쇄하여 총 에너지를 측정하였다. 그 이외의 화학적 분석과정은 Kim et al. (2009)에 서술된 방법을 따랐다.

마. 에너지 소화율 계산 및 통계분석

섭취된 에너지의 양과 분과 뇨로 분비된 에너지의 양을 이용해 에너지 소화율을 계산하였다. 분 중 에너지를 측정하여 섭취한 사료 내 에너지에서 공제하여 가소화에너지를 측정하였다.

$$\text{가소화에너지}(kcal/kg) = \text{사료내총에너지}(kcal/kg) - \text{분중에너지}(kcal/kg)$$

그 후, 가소화 에너지에서 뇨 중 에너지를 공제하여 대사에너지를 측정하였다.

$$\text{대사에너지}(kcal/kg) = \text{가소화에너지}(kcal/kg) - \text{뇨중에너지}(kcal/kg)$$

실험 데이터는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 MIXED procedure를 이용해서 분석하였다. 고정변수로는 사료처리로 원료사료에 의한 main effect, 효소첨가에 의한 main effect, 및 interaction이 포함되었다. 임의변수로는 동물 및 기간이 포함되었다. 각 처리의 최소자승평균을 계산 한 후 interaction이 존재하는 경우에는 PDIFF option 및 Tukey's adjustment를 통해 평균값들간의 차이를 검정하였다. 이 과정에서 산출된 P-values를 영문자로 전환하기 위해 매크로 프로그램을 이용하였다 (Saxton, 1998). 실험단위는 동물로 하였으며, 통계적인 유의성은 P-value가 0.05 이하일 때로 하였다.

바. 실험 결과

에너지 소화율 실험에서 원료사료에 따른 조사항목에서의 차이는 두드러지게 나타났으나 ($P < 0.05$) 효소제의 첨가에 의한 주효과는 발견되지 않았다 (Table 1. 9). 사료섭취량은 옥수수 및 소맥에 비해 보리 처리구에서 상당히 적었으며, 이는 에너지 섭취량 및 에너지 배설량에서도 마찬가지로 나타났다 ($P < 0.05$). 하지만 에너지 소화율은 보리에 비해서 옥수수 및 소맥에서 높았다 ($P < 0.05$).

일반적으로 보리와 같이 섬유소 함량이 높은 사료에서 소화율이 낮게 나타난다. 하지만, 사료 섭취량이 적을 경우에는 소화물의 장 통과시간이 길어져 소화율이 다소 향상될 수 있다 (Kim et al., 2007). 본 연구에서 보리처리구에서 낮은 사료 섭취량에도 불구하고 보리의 에너지 소화율이 다른 두 원료사료에 비해 낮게 나타난 것은 사료 섭취량이 낮아짐에 따른 에너지 소화율의 향상 폭이 크지 않았음을 시사한다. 또한 보리사료의 가소화에너지가는 소맥사료보다는 낮았으나 옥수수사료에 비해서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 보리의 에너지 소화율이

옥수수에 비해 낮기는 하지만 보리의 총에너지 함량이 옥수수에 비해 높기 때문인 것으로 보인다.

에너지 소화율 실험에서 원료사료 및 효소제간의 상호작용은 나타나지 않았다 (Table 1. 10). 효소제의 첨가가 옥수수 및 소맥의 에너지 소화율을 약 3% 단위 미만의 폭으로 향상시키기는 하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 소화율의 표준오차가 1.1% 인 경우에 효소제의 효과가 통계적 유의성을 보이기 위해서는 적어도 3.3% 이상의 차이를 보여야 된다. 앞선 *in vitro* 실험결과에서 효소제에 의한 건물 소화율의 향상폭이 3% 미만이었음을 고려할 때, 동물실험에서 에너지 소화율이 효소제 첨가에 의한 효과가 유의적으로 나타나기 위해서는 더 많은 수의 반복이 필요할 것으로 보인다.

Table 1. 1. 실험 별 첨가 효소 종류 및 역가

효소제	역가, Unit/kg
Enzyme A	
Protease	800,000
Xylanase	2,000,000
Enzyme B	
Protease	800,000
Xylanase	2,000,000
Mannanase	500,000
Cellulase	500,000
Enzyme C	
Protease	80,000
Xylanase	2,000,000
Mannanase	500,000

Table 1. 2. Effects of an enzyme complex (Enzyme A) on dry matter digestibility (%) of various ingredients¹

Ingredient	Control	Enzyme inclusion rate, %				SEM ²	P-value
		0.5	1	5	10		
Wheat	85.6 ^b (4) ³	87.4 ^a	86.2 ^{ab} (6)	86.6 ^{ab}	86.4 ^{ab}	0.34	0.018
Barley	79.5 (4)	79.9	79.5	80.0	-	0.45	0.754
Corn	71.1	-	70.8	-	-	0.13	0.179
Soybean meal	77.9	-	-	77.9	-	0.66	0.942
Palm kernel meal	25.3 (4)	24.6	25.0	-	-	0.22	0.192
Rapeseed meal	60.1 (6)	61.7	60.8	-	-	0.95	0.505
Cottonseed meal	60.1	59.8	-	-	-	0.62	0.791

¹Each mean represents 2 observations unless indicated in the parenthesis.

²The number of observations are in the parenthesis.

^{a,b}Means within a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

Table 1. 3. Effects of an enzyme complex (Enzyme B) on dry matter digestibility (%) of various ingredients¹

Ingredient	Control	Enzyme B, 1%	SEM	<i>P</i> -value
Wheat	85.8	87.7	0.43	0.036
Barley	80.3	81.7	0.16	0.004
Corn	73.6	74.6	1.56	0.660
Soybean meal	74.8	75.2	1.22	0.826
Palm kernel meal	29.2	29.3	0.20	0.773
Rapeseed meal	62.1	62.2	0.58	0.921
Cottonseed meal	52.8	50.8	0.75	0.971
Copra meal	50.8	50.4	0.64	0.682

¹Each mean represents 3 observations.

²SEM = standard error of the means.

Table 1. 4. Effects of an enzyme complex (Enzyme C) on dry matter digestibility (%) of various ingredients¹

Ingredient	Control	Enzyme C, 1%	SEM ²	P-value
Wheat	86.1	88.3	0.35	0.011
Barley	79.8	81.6	0.09	<0.001
Corn	84.6	83.8	0.41	0.219
Soybean meal	76.1	73.0	1.30	0.161
Palm kernel meal	25.7	28.1	0.88	0.134
Rapeseed meal	61.6	63.7	1.21	0.289
Cottonseed meal	57.2	56.2	1.06	0.526
Copra meal	52.0	52.5	0.21	0.153

¹Each mean represents 3 observations.

²SEM = standard error of the means.

Table 1. 5. Analyzed chemical composition of corn, wheat, and barley, as-fed basis

Item	Corn	Wheat	Barley
Gross energy, kcal/kg	4,015	4,080	4,046
Dry matter, %	86.1	89.3	88.0
Crude protein, %	7.31	11.68	12.56
Ether extract, %	3.27	1.61	1.39
Crude fiber, %	1.88	2.53	5.12
Neutral detergent fiber, %	11.22	13.80	23.68
Acid detergent fiber, %	2.48	2.70	7.84
Ash, %	1.65	1.81	2.42
Calcium, %	0.16	0.14	0.14
Phosphorus, %	0.26	0.30	0.31

Table 1. 6. Ingredient and chemical composition of experimental diets, as-fed basis

Items	Diet					
	Corn	Corn + Enzyme	Wheat	Wheat + Enzyme	Barley	Barley + Enzyme
Corn	97.00	96.80	0.20	-	0.20	-
Wheat, soft red winter	-	-	96.65	96.65	-	-
Barley	-	-	-	-	96.80	96.80
Limestone	1.00	1.00	0.90	0.90	0.75	0.75
Dicalcium phosphate	1.10	1.10	1.35	1.35	1.35	1.35
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Vitamin-mineral mix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Enzyme	-	0.20	-	0.20	-	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition						
Metabolizable energy, kcal/kg	3,311	3,311	3,194	3,194	2,817	2,817
SID ² -Lys, %	0.196	0.196	0.297	0.297	0.314	0.314
SID-Met + Cys, %	0.306	0.306	0.426	0.426	0.400	0.400
SID-Thr, %	0.230	0.230	0.317	0.317	0.274	0.274
SID-Trp, %	0.049	0.049	0.226	0.226	0.085	0.085
Crude protein, %	8.03	8.03	11.11	11.11	10.94	10.94
Calcium, %	0.629	0.629	0.620	0.620	0.624	0.624
Total phosphorus, %	0.475	0.475	0.250	0.250	0.589	0.589
Available phosphorus, %	0.236	0.236	0.244	0.244	0.244	0.244

¹Provided the following quantities of vitamins and microminerals per kilogram of complete diet: vitamin A, 25,000 IU; vitamin D₃, 4,000 IU; vitamin E, 50 IU; vitamin K, 5.0 mg; thiamine, 4.90 mg; riboflavin, 9.99 mg; pyridoxine, 4.93 mg; vitamin B₁₂, 0.062 mg; d-pantothenic acid, 37.5 mg; niacin, 62 mg; folic acid, 1.10 mg; biotin, 0.06 mg; Cu, 25 mg as copper sulfate; Fe, 268 mg as iron sulfate; I, 4.96 mg as potassium iodate; Mn, 125 mg as manganese sulfate; Se, 0.38 mg as sodium selenite; Zn, 313 mg as zinc oxide; and butylated hydroxytoluene, 50 mg.

²SID = standardized ileal digestibility.

Table 1. 7. Analyzed chemical composition of experimental diets, as-fed basis

Ingredient: Items	Diet					
	Corn	Corn + Enzyme	Wheat	Wheat + Enzyme	Barley	Barley + Enzyme
Gross energy, kcal/kg	3,798	3,852	3,951	3,931	3,887	3,928
Dry matter, %	86.1	85.9	89.2	89.1	87.8	88.6
Crude protein, %	7.28	7.03	11.58	11.44	13.11	13.12
Ether extract, %	3.08	3.23	1.60	1.67	1.88	1.53
Crude fiber, %	1.80	1.80	2.38	1.98	4.37	4.82
Neutral detergent fiber, %	17.28	19.96	16.24	20.47	23.22	27.96
Acid detergent fiber, %	2.17	2.67	2.98	3.37	5.42	6.87
Ash, %	3.63	3.80	4.19	4.53	4.94	5.09
Calcium, %	0.69	0.69	0.73	0.77	0.73	0.76
Phosphorus, %	0.46	0.46	0.52	0.58	0.60	0.59

Table 1. 8. Treatment allocations for a balanced 6×6 Latin square design¹

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
Period 1	Wheat + E ²	Corn + E	Barley	Corn	Wheat	Barley + E
Period 2	Corn + E	Barley	Corn	Wheat	Barley + E	Wheat + E
Period 3	Barley + E	Wheat + E	Corn + E	Barley	Corn	Wheat
Period 4	Barley	Corn	Wheat	Barley + E	Wheat + E	Corn + E
Period 5	Wheat	Barley + E	Wheat + E	Corn + E	Barley	Corn
Period 6	Corn	Wheat	Barley + E	Wheat + E	Corn + E	Barley

¹First-order carryover effects are balanced.

²E = enzyme addition.

Table 1. 9. 21Main effects of ingredient and enzyme supplementation on energy digestibility of diets fed to growing pigs^{1,2}

Ingredient: Items	Ingredient			SEM ³	P-value	Enzyme		SEM	P-value
	Corn	Wheat	Barley			-	+		
Diet intake, g	5,578 ^a	5,628 ^a	2,383 ^b	213	<0.001	4,566	4,494	207	0.549
GE ⁴ in diet, kcal/kg	3,865	3,870	3,940			3,867	3,915		
GE intake, kcal	21,568 ^a	20,542 ^a	9,240 ^b	1374	<0.001	16,865	17,368	1272	0.676
Fecal output, g	703 ^a	654 ^a	428 ^b	35	<0.001	613	577	33	0.253
GE in feces, kcal/kg	4,447 ^a	4,152 ^b	4,224 ^b	54	0.003	4,317	4,231	48	0.158
Fecal GE output, kcal	3,153 ^a	2,539 ^b	1,794 ^c	199	<0.001	2,571	2,419	180	0.449
GE digestibility, %	85.3 ^a	87.4 ^a	80.9 ^b	0.8	<0.001	84.1	84.9	0.8	0.374
DE ⁴ in diet, kcal/kg	3,264 ^b	3,435 ^a	3,158 ^c	35	<0.001	3,259	3,313	31	0.137

^{a,b,c}Means within a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹Each least squares mean represents 4 observations.

²Diet intake, and fecal output data are based on 4 d of collection.

³SEM = standard error of the means.

⁴GE = gross energy, DE = digestible energy.

Table 1. 10. Interaction between ingredient and enzyme supplementation on energy digestibility of diets fed to growing pigs^{1,2}

Ingredient: Items	Corn		Wheat		Barley		SEM ³	P-value
	-	+	-	+	-	+		
Diet intake, g	5,520	5,635	5,703	5,554	2,474	2,292	235	0.513
GE ⁴ in diet, kcal/kg	3,798	3,852	3,951	3,931	3,887	3,928		
GE intake, kcal	21,176	21,960	19,484	21,600	9,936	8,544	1697	0.477
Fecal output, g	726	680	698	610	415	441	43	0.310
GE in feces, kcal/kg	4,470	4,424	4,247	4,058	4,235	4,213	73	0.439
Fecal GE output, kcal	3,285	3,021	2,639	2,438	1,790	1,798	258	0.834
GE digestibility, %	84.4	86.1	86.1	88.6	81.8	79.9	1.1	0.117
DE ⁴ in diet, kcal/kg	3,209	3,319	3,390	3,480	3,179	3,138	45	0.170

¹Each least squares mean represents 4 observations.

²Diet intake, and fecal output data are based on 4 d of collection.

³SEM = standard error of the means.

⁴GE = gross energy, DE = digestible energy.

제 7 장 참고 문헌

- Adeola, L. 2001. Digestion and balance techniques in pigs. Pages 903-916 in Swine Nutrition. A. J. Lewis and L. L. Southern, ed. CRC Press, Washington, DC, USA.
- Boison, S., and J. A. Fernandez. 1995. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. Anim. Feed Sci. Technol. 51:29-43.
- Boison, S., and J. A. Fernandez. 1997. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. Anim. Feed Sci. Technol. 68:277-286.
- Diebold, G., R. Mosenthin, H.-P. Piepho, and W. C. Sauer. 2004. Effect of supplementation of xylanase and phospholipase to a wheat-based diet for weanling pigs on nutrient digestibility and concentrations of microbial metabolites in ileal digesta and feces. J. Anim. Sci. 82:2647-2656.
- Kiarie, E., A. Owusu-Asiedu, P. H. Simmins, and C. M. Nyachoti. 2010. Influence of phytase and carbohydrase enzymes on apparent ileal nutrient and standardized ileal amino acid digestibility in growing pigs fed wheat and barley-based diets. Livest. Sci. 134:85-87.
- Kim, B. G., and H. H. Stein. 2009. A spreadsheet program for making a balanced Latin square design. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 22:591-596.
- Kim, B. G., G. I. Petersen, R. B. Hinson, G. L. Allee, and H. H. Stein. 2009. Amino acid digestibility and energy concentration in a novel source of high-protein distillers dried grains and their effects on growth performance of pigs. J. Anim. Sci. 87:4013-4021.
- Kim, B. G., J. Z. Tian, J. S. Lim, D. Y. Kil, H. Y. Jeon, Y. K. Chung, and Y. Y. Kim. 2004. Influences of enzyme complex supplementation on growth, ileal and apparent fecal digestibility, and morphology of small intestine in pigs. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17:1729-1735.
- Kim, B. G., M. D. Lindemann, G. L. Cromwell, A. Balfagon, and J. H. Agudelo. 2007. The correlation between passage rate of digesta and dry matter digestibility in various stages of swine. Livestock Science. 1009:81-84.
- NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA.
- Pirgozliev, V., M. R. Bedford, and T. Acamovic. 2010. Effect of dietary xylanase on energy, amino acid and mineral metabolism, and egg production and quality in laying hens. Br. Poult. Sci. 51:639-647.
- Sauvant, D., J. M. Perez, and G. Tran. 2004. Tables of composition and nutritional value

of feed materials. 2nd rev. ed. INRA, Paris, France.

- Saxton, A. M. 1998. A macro for converting mean separation output to letter groupings in Proc Mixed. Pages 1243-1246 in Proc. 23rd SAS Users Group Intl., SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Wang, M. Q., Z. R. Xu, J. Y. Sun, and B. G. Kim. 2008. Effects of enzyme supplementation on growth, intestinal content viscosity, and digestive enzyme activities in growing pigs fed rough rice-based diet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21:270-276.
- Widyaratne, G. P., J. F. Patience, and R. T. Zijlstra. 2009. Effect of xylanase supplementation of wheat distillers dried grains with solubles on energy, amino acid and phosphorus digestibility and growth performance of grower-finisher pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 89:91-95.

기능성사료소재의 사료내 첨가가 양계생산성에 미치는 영향

Effect of Dietary supplementation of functional feed materials in chicks

제 1 장 연구개발과제의 개요

2006년 하반기부터 국제 원유가 상승 및 곡물가, 곡물수송비 상승, 외화 환율 급등 등 여러 가지 원자재비 상승으로 인하여 국내 사료업계에서는 사료생산의 비용 절감에 대한 많은 압박을 받고 있다. 옥수수, 소맥과 같은 곡물 및 대두박 등 사료생산에 중요한 역할을 하는 단미 원료 가격이 폭등하고 있으며, 특히 옥수수-대두박 위주의 가금 사료에 있어서는 가격 경쟁력이 있는 원료 사용의 필요성이 급격히 증가하고 있다. 옥수수는 높은 에너지가와 상대적으로 낮은 가격 때문에 사료의 주요 원료로 사용하고 있다. 그러나 최근 옥수수가 바이오 에탄올 생산의 주요 원료로 사용되면서 그 수급이 어려워지고 가격이 폭등함에 따라 다른 대체 곡물의 이용 요구가 크게 높아지고 있다. 따라서 옥수수, 대두박에 비해 상대적으로 이용성이 낮은 원료의 이용성 증대 방안으로 효소제의 사용이 더욱 확대 이용되고 있다(Bedford 등, 1992; Lindemann 등, 1986).

단위동물에 있어서 사료 원료에 따른 영양소 이용률이 다르다는 것을 감안할 때 사료내 소화효소의 첨가는 상대적으로 소화율이 낮은 원료의 사용을 제고 시킬 수 있으며, 소화율 향상에 의한 미소화 영양소 배출을 감소시킴으로써 환경오염을 감소시키는 효과를 얻을 수 있기 때문에 현재에도 이에 대한 많은 연구들이 수행되고 있다(Bedford, 2000a; Selle 등, 2000; Cowieson, 2005; Cowieson과 Ravindran, 2008).

옥수수와 대두박 외에 사료 원료로 많이 사용되고 있는 보리, 귀리, 호밀 및 소맥 등과 같은 곡물의 대부분은 섬유소를 비롯한 비가용성 영양소함량이 높아 소화기관내에서의 이용성이 떨어지기 때문에 가축의 성장률이 감소되는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해서 β -glucanase, xylanase, pectinase, protease, cellulase, phytase, amylase 등과 같은 외인성 분해 효소가 NSP(Non-starch polysaccharide, 비전분성 다당류)의 이용성 제고를 위한 효소제로 사용되고 있으며, 사료 내에 적절한 외인성 효소를 첨가함으로써 사료 내 영양소를 최대한 이용할 수 있고, 사료 단가를 줄이며, 가금의 생산성 개선 및 가축 분노발생 경감을 통한 환경적 부담을 감소할 수 있다(Campbell과 Bedford, 1992; Bedford와 Schulze, 1998; Cowieson과 Ravindran; 2008).

복합효소제는 (주)인섹트바이오텍은 무당거미와 풍뎅이 유충으로부터 분리한 미생물에서 생산

한 복합효소제이며, 기존의 사료첨가제로 사용되고 있는 단백질분해효소와 다른 성질을 가지고 있는 metallo-protease(금속성 단백질 분해효소)와 xylanase를 포함하고 있는 복합 효소제이다. 무당거미에서 분리한 *Serratia proteamaculans* 박테리아에서 분비되는 금속성 단백질 분해효소는 넓은 범위의 온도와 pH에서 생물학적 활성이 높은 것으로 알려져 있다(이 등, 2004).

또한, 최근 항생제 남용으로 인해 가축의 체내에서 저항성이 있는 유기체를 생성하여 내성을 증가시키는 등 유해성에 관한 연구들이 보고되면서 AAFCO (Association Of American Feed Control Officials, Inc. 1986)와 유럽연합 등 세계 각국에서 항생제의 사용 규제를 심화하고 있다. 또한 소비자들은 식품안전에 대한 욕구 증진, 양보다는 질 위주의 기능성 고급육제품을 선호하는 경향으로 급격히 전환되고 있어 항생제를 대체할 수 있는 비항생제적 생물학 제제 개발이 시급히 요구되어 항생제를 대체할 수 있는 천연물질, 생균제, 효소제, 효모제 등 그 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

Hasting(1946)에 따르면 효소제를 조섬유 함량이 높은 양계사료에 첨가하였을 때 성장률과 사료효율이 향상되었다고 보고하였고, Berg(1959)는 육계사료에 효소제를 첨가하였을 때 사료효율이 향상되었다고 보고하였으며, Matti(1988)는 산란계에 효소복합제를 급여하였을 때 산란율과 사료효율이 개선되고, 산란말기에는 산란율 및 사료효율이 개선되었다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 xylanase와 Mannanase 및 *Saururus chinensis extract*를 조합하여 사료내 첨가시 육계와 산란계의 생산성에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 안정성을 확보한 고품질 축산물 생산에 있어 항생제사용의 규제가 더욱 심화될 예정으로 가축의 생산성 향상을 위한 항생제 대체제 연구가 활발하게 진행되고 있으나 아직 이렇다할 연구성과는 없는 실정에 있다.

본 연구는 곤충에서 유래된 기능성소재를 개발하여 사료첨가제를 개발하는데 있으며 현재 공충유래의 강력한 효소제 개발은 유용자원의 사업화하는데도 많은 도움이 될것으로 사료된다. 또한 현재 이러한 생물자원 유래의 효소제 개발에 많은 연구가 진행되어있으나 성과역시미흡한 실정에 있으며, Glucanase, Xylanase, phylase 등이 개발되어있으나 제품효능면에서는 의문점이 제기되고있다.

3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기능성 사료 소재의 사료내 첨가가 육계의 생산성에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 1일령의 Ross broiler 초생축 수컷 300수를 공시하여 1주일 간(시판 초생축 배합사료) 예비 사육한 후 체중을 측정하여 평균체중에 해당하는 180수를 선발하여 4개 처리구에 3반복으로 총 12개 pen에 15수씩 임의로 배치하였다.

나. 실험동물사육

사양시험은 국립 한경대학교 부속 농장 내 육계용 평사에서 예비사육 1주일 후 2011년 10월 4일부터 동년 11월 8일까지 5주간 사육하였다. 사육방법은 관행적인 일반 육계 사육방법으로 사육하였고, 실험 기간 동안 물과 사료는 자유 채식시켰으며 24시간 점등하였다.

다. 실험설계

실험설계는 Control Diet(대조구)와 대조구 사료에 Enzyme A 0.1% 첨가구(T1), Enzyme A 0.1% + mannamase 0.1% 첨가구(T2), 대조구 사료에 Enzyme A 0.1% + Mannamase 0.1% + Saururus chinensis extract 0.1% 첨가구(T3)로 총 4개 처리구를 두었다.

라. 분석항목 및 분석방법

(1) 복합효소의 급여가 육계 생산성에 미치는 영향

(가) 사료 섭취량, 체중, 일당증체량, 사료효율

매주 일정한 시간에 사료급여량과 사료잔량을 이용하여 사료섭취량을 측정하였고, 체중변화를 조사하여 일당증체량을 측정하였다. 사료효율은 일당증체량을 일당사료 섭취량으로 나누어 계산하였다.

(나) 도체율, 정육율, 생산지수

실험 5주째에 입추수와 생존개체수를 이용하여 육성률을 계산하였으며, 육성률, 평균체중, 사료요구율, 사육일수를 이용하여 생산지수를 계산하였다. 또한, 각 처리구별 3수씩 총 18수를 경정맥 절단법을 이용해 방혈하여 도살한 후 비가식부위를 제거하여 도체중을 측정하여 도체율을 계산하였고, 가슴부위와 다리부위의 근육무게를 측정하여 부위별 정육율을 계산하였다.

$$\text{육성율} = \frac{\text{생존 수수}}{\text{입추수}} \times 100 \quad \text{생산지수} = \frac{(\text{육성율} \times \text{평균체중})}{(\text{사료요구율} \times \text{사육일수})} \times 100$$

$$\text{도체율} = \frac{\text{도체중}}{\text{생체중}} \times 100 \quad \text{정육율} = \frac{\text{부위별 정육무게}}{\text{도체중}} \times 100$$

(2) 복합효소의 급여가 장기의 길이 및 무게에 미치는 영향

장기의 발달상황을 관찰하기 위하여 실험 5주차에 처리구별로 평균체중에 가까운 개체를 3수씩 총 18수를 경정맥 절단법을 이용하여 방혈하여 도제하였다.

(가) 소장 및 대장의 길이 및 무게

소장(small intestine)을 십이지장(duodenum), 공장(jejenum), 회장(ileum)으로, 대장(large intestine)을 맹장(cecum)과 직장(rectum)으로 구분하여 절단한 후, 0.9% saline을 이용하여 장내 내용물을 제거하고 길이와 무게를 측정하고, 생체중 100g당 무게로 환산하여 계산하였다. 맹장의 경우에는 장내 내용물을 제거하지 않고, 양쪽 맹장의 길이를 합하여 평균을 내어 측정하였고, 무게는 양쪽 맹장의 무게의 합으로 측정하였다.

(나) 간, 선위, 근위, 무게

간(liver)과 선위(proventriculus), 근위(gizzard)의 무게를 측정하여 생체중 100g당 무게로 환산하여 측정하였다. 선위와 근위의 내용물을 0.9% saline을 이용하여 제거한 후에 무게를 측정하였다.

(3) 복합효소의 급여가 육질에 미치는 영향

(가) 육색, pH, 가열감량, 전단력, 보수력

육질검사는 가슴근육과 다리근육을 발골하여 각 분석항목별 분석방법에 따라 실시하였다.

①육색(Meat color)

육색은 육색측정기(Minolta CM-5081, Japan)를 이용하여 L(Lightness), a(Redness), b(Yellowness)를 측정하였다. 이 때 White standard plate는 L = 98.88, a = -0.21, b = -0.43로 calibration plate를 표준으로 사용하였다.

②pH

Sample 2g을 1차 증류수(18ml)에 넣고 homogenizer로 10,000rpm 에서 60초간 균질한 후 pH meter(HM-30G, Japan)를 이용하여 측정하였다.

③가열감량(Cooking loss)

Sample 10g이상을 덩어리로 취하여 polypropylene bag에 넣고 75℃의 water bath에서 30분간 가열 후 desiccator에서 20분간 방랭한 후 무게를 측정하여 아래의 식과 같이 가열감량을 계산하였다.

$$\text{가열감량(\%)} = \frac{(\text{가열 전 Sample Weight} - \text{가열 후 Sample Weight})}{\text{가열 전 Sample Weight}} \times 100$$

④전단력(Shear value)

가열감량을 측정한 Sample을 이용하여 이를 다시 desiccator에서 10분간 방랭한 후 Rheometer(Rheotech, RT-2005D · D Co, Japan)를 이용하여 Chart speed 120/mm/min, 측정 속도 30mm, 시료 높이 60mm, adapter No. 4로 전단력 측정을 하였다.

⑤보수력(Water holding capacity, WHC)

2장의 Plastic Plate 사이에 filter paper(Whatman No.2)와 시료 0.2g를 넣고 1.5kg의 무게로 5분간 압력을 가한 후 유출 육즙 면적과 육 조직 면적을 Planimeter (Tamiya, Super Planix-α, Japan)로 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{보수력(\%)} = 1 - \frac{\text{육조직면적}}{\text{육즙 유출 면적}} \times 100$$

2.결과 및 고찰

가. 사료섭취량 Table 1 에는 사료내 기능성사료소재 첨가에 따른 실험 5주간의 사료섭취1개량의 변화를 나타내었다. 전체적으로 통계적 유의점은 없었으나 T2처리구에서 가장 높은 사료섭취량을 나타내었다.

Yu(1997)등의 효소제 첨가가 broiler의 생산성에 미치는 영향에 관한 연구에 따르면 육계에 효소제를 첨가하여도 사료섭취량에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 그러나 김재황(2001)등의 연구에 의하면 복합 효소제를 육계사료에 첨가하여 급여하였을 때 2주차에서는 다른 처리구에 비해서 높았으나 유의차는 없었고, 5주차에서는 다른 첨가구에 비해서 감소하는 경향이 있었다고 보고하였다. 그러나 본 연구결과 사료섭취량의 감소는 없었다.

Table 1. Effect of functional feed materials supplementation on Feed Intake in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/head/day			
1 week	64.85 ± 2.83	61.27 ± 1.25	68.43 ± 2.12	67.17 ± 2.64
2 weeks	106.06 ± 3.45	106.90 ± 1.81	102.75 ± 6.84	108.63 ± 5.05
3 weeks	123.98 ± 9.09	116.91 ± 14.24	128.21 ± 2.99	129.59 ± 9.07
4 weeks	182.32 ± 5.37	182.13 ± 7.48	185.54 ± 0.92	173.20 ± 10.88
Total	119.30 ± 2.05	116.80 ± 4.87	121.23 ± 1.79	119.65 ± 3.46

Mean ± SE

¹⁾C : Control Diets

T1 : Control Diets + Enzyme A 0.1%

T2 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1%

T3 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1% + Saururus chinensi 0.1%

나. 체중

Table 2 에는 체중변화를 나타내었다.

1주일 예비사육후 각 처리구는 평균 207g이었으나. 시험 시작 1주에서는 대조구와 T1처리구로 비슷하였으나 T2, T3처리구는 대조구에 비하여 높은 체중을 나타내어 이러한 경향은 시험 전기간에 걸쳐 비슷하였다. 본 연구에서 사용된 기능성 사료소재의 첨가에 따른 긍정적인 효과가 나타났다.

Table 2. Effect of functional feed materials supplementation on Body Weight in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/head			
Initial	207.11 ± 0.44	207.56 ± 0.89	207.56 ± 0.44	207.56 ± 0.89
1week	504.86 ± 16.47	500.44 ± 8.92	522.10 ± 18.97	539.56 ± 20.80
2weeks	1011.52 ± 30.93	985.87 ± 17.87	1037.33 ± 26.41	1038.51 ± 58.62
3weeks	1392.25 ± 106.86	1376.44 ± 97.11	1518.17 ± 49.19	1511.78 ± 34.12
4weeks	2022.73 ± 102.49	2004.89 ± 72.35	2138.02 ± 17.47	2038.79 ± 89.00

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

다. 일당증체량

Table 3 에는 일당증체량의 변화를 나타내었다. 일당증체량은 시험기간 전체 평균은 T2 처리구에서 가장 높은 값을 나타내었다. 그러나 대조구 및 T1,T2 처리구에서는 비슷한 값이었다. 따라서 본 연구결과 Enzyme A 와 Mannamase 0.1% 처리구에서 가장 우수한 결과를 나타내었다.

Table 3. Effect of functional feed materials supplementation on Body Weight Gain in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g / head / day			
1 week	42.54 ± 2.37	41.84 ± 1.23	44.93 ± 2.77	47.43 ± 3.10
2 weeks	72.38 ± 2.38	69.35 ± 2.26	71.91 ± 1.38	71.28 ± 6.08
3 weeks	54.39 ± 17.50	55.80 ± 15.06	68.69 ± 10.78	67.61 ± 11.30
4 weeks	90.07 ± 0.72	88.32 ± 3.36	94.27 ± 4.41	75.29 ± 13.21
Total	64.84 ± 3.67	63.83 ± 2.82	69.95 ± 1.55	65.40 ± 3.21

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

라. 사료효율

Table 4 에는 기능성사료소재 첨가에 따른 사료요구를 나타내었다. 시험기간 전체 평균에서 일당증체량의 변화와 마찬가지로 T2처리구에서 가장 낮은 사료요구율(11.73%)을 나타내었다.

Classen 등(1988)이 보고한 β -glucanase를 육계에 급여했을 때 증체량이 개선되는 결과를 나타내는 것과 일치하는 것을 관찰할 수 있었다. Yuben B.와 Wu, Velmurugu Ravindran(2004)은 whole wheat와 ground wheat에 xylanase를 첨가하였을 때 두 급여형태 모두에서 증체량이 개선되는 것을 보고하였으며, F. Gao 등(2008)도 밀을 기초로한 육계사료에 xylanase를 첨가 급여하였을 때 증체량과 사료요구율이 개선되는 결과를 보고하였다. 또한 T. Mushtaq 등(2009)의 연구에 의하면 sunflower meal을 기초로한 사료에 endo-1,4- β xylanase와 endo-1,3- β glucanase를 첨가하여 급여하였을 때, 증체량과 사료효율이 개선되었다. 이와 같은 보고에 따르면, 결론적으로 효소제를 첨가하면 증체량이 개선되는 것으로 보고되고 있다. 이들 연구결과와 같이 본 연구결과 복합효소 첨가에 따라 증체량이 개선되는 것으로 사료된다.

이상은 결과로부터 T2처리구 (Enzyme A + Mannamase 0.1%)에서 높은 일당증체량과 낮은 사료요구를 나타내어 사료의 이용성을 증정시키는 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of functional feed materials supplementation on Feed Conversion in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
1 week	1.53 ± 0.06	1.47 ± 0.01	1.53 ± 0.09	1.42 ± 0.04
2 weeks	1.47 ± 0.05	1.55 ± 0.08	1.43 ± 0.11	1.53 ± 0.06
3 weeks	2.63 ± 0.56	2.26 ± 0.33	1.97 ± 0.33	2.01 ± 0.29
4 weeks	2.03 ± 0.08	2.07 ± 0.16	1.98 ± 0.09	2.59 ± 0.32
Total	1.91 ± 0.12	1.84 ± 0.04	1.73 ± 0.08	1.89 ± 0.03

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

마. 도체율, 정육율, 생산지수

Table 5 에는 도체율, 정육율, 생산지수를 나타내었다. 정육율에서 대조구에 비하여 기능성소재 첨가구 모두에서 높은 정육율을 나타내었다. 또한 생산지수에서도 대조구에 비해 모든 처리구에서 높은 생산지수를 나타내었고 T2처리구에서 가장 높은 생산지수를 나타내었다. 이는 앞의 결과에서 나타난 바와같이 높은 체중과 사료요구율의 개선에 따른 결과로 진단된다. 위의 결과로부터 Enzyme A 와 Mannamasedml 첨가에 따라 생산능력이 향상되고 사료내 영양소와 에너지 이용성 향상에 따른 것으로 판단된다,

Table 5. Effect of functional feed materials supplementation on carcass characteristics and production index in broiler chicken.

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
Carcass Percent (%)	70.79 ± 1.23	73.27 ± 0.44	72.91 ± 0.99	72.71 ± 0.90
Meat Breast Muscle Percent (%)	26.05 ± 1.09	24.65 ± 0.98	25.57 ± 1.23	24.99 ± 1.16
Tight Muscle	8.70 ± 0.49	8.10 ± 0.18	8.19 ± 0.26	8.02 ± 0.29
Production index	376.21 ± 32.04	382.44 ± 16.63	393.66 ± 12.66	378.52 ± 18.90

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

마. 육질평가

Table 6 에는 기능성사료소재 첨가에 따른 다리근육에 대한 육질평가 결과를 나타내었다. pH 는 T1처리구가 가장 높았고 대조구에서 가장 낮은 값을 보였으며 육색은 모든 처리구에서 차이가 없었다. 전단력에서는 T1처리구가 가장 높았고 다른 처리구는 비슷한 값이었다. 보수력에서는 T3처리구가 가장 높은 값을 나타내었으나 통계적 유의차는 없는 것으로 나타났다.

Table 7 에는 가슴근육에 대한 육질평가를 나타냈다. 가슴근육에서는 대조구에서 가장 낮은 값을 나타내었고 육색은 이렇다 할 경향을 도출할 수 없었다. 가열감량, 전단력 및 보수력에서도 통계적 유의점 없이 비슷한 값을 나타내었다.

Table 6. Effect of functional of feed materials supplementation on tight muscle quality in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
Ph	8.12 ± 0.16 ^b	8.76 ± 0.18 ^a	8.28 ± 0.10 ^b	8.27 ± 0.08 ^b
L	49.90 ± 2.32	52.46 ± 1.95	50.74 ± 1.00	51.50 ± 2.02
Meat color ²⁾				
a	4.18 ± 0.86	3.19 ± 0.99	2.90 ± 0.52	3.62 ± 0.80
b	10.83 ± 1.95	10.33 ± 0.73	11.24 ± 1.21	11.06 ± 1.15
Cooking loss (%)	26.49 ± 1.85	26.24 ± 1.09	24.51 ± 2.67	24.90 ± 2.98
Shear value (kg/cm ²)	4.02 ± 0.014 ^b	4.08 ± 0.008 ^a	4.03 ± 0.010 ^b	4.01 ± 0.02 ^b
Water-holding capacity (%)	73.99 ± 1.73	73.95 ± 1.47	73.76 ± 3.92	76.99 ± 2.70

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

²⁾L: Brightness; a: Redness; b: Yellowness

Table 7. Effect of functional of feed materials supplementation on breast muscle quality in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
Ph	7.86 ± 0.12 ^b	8.39 ± 0.19 ^a	8.30 ± 0.12 ^a	8.74 ± 0.16 ^a
L	49.31 ± 1.00 ^{ab}	46.37 ± 1.03 ^b	50.87 ± 1.13 ^a	49.21 ± 1.44 ^{ab}
Meat color ²⁾				
a	1.60 ± 0.42 ^a	1.12 ± 0.29 ^{ab}	0.29 ± 0.16 ^b	1.38 ± 0.23 ^a
b	10.99 ± 0.95 ^a	8.80 ± 0.87 ^{ab}	6.35 ± 1.25 ^b	9.89 ± 1.73 ^{ab}
Cooking loss (%)	26.41 ± 1.71	22.53 ± 2.90	22.78 ± 2.19	23.31 ± 2.24
Shear value (kg/cm ²)	4.08 ± 0.01	4.07 ± 0.01	4.07 ± 0.02	4.07 ± 0.02
Water-holding capacity (%)	77.91 ± 1.73	79.48 ± 2.85	75.66 ± 2.82	75.44 ± 1.59

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

²⁾L: Brightness; a: Redness; b: Yellowness

사. 혈액성분

Table 8 에는 실험종료시 혈액성분변화를 나타내었다. 혈중 Glucose함량은 대조구에 비하여 모든 처리구에서 낮은 값을 나타내었지만 통계적 유의차는 없었다. 총 콜레스테롤, BUN, Total Bilirubin, GOT, GPT함량에서도 차이가 나타나지 않아 기능성사료첨가제 급여에 따른 악영향은 발견되지 않았다.

Table 8. Effect of Functional of feed materials supplementation on blood characteristics of broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
glucose (mg/dl)	276.20 ± 12.72	249.00 ± 9.27	243.33 ± 12.84	245.17 ± 15.88
Total cholesterol (mg/dl)	147.80 ± 6.65	137.17 ± 5.87	140.33 ± 3.26	139.33 ± 4.54
BUN (mg/dl)	>5 ± 0.00	>5 ± 0.00	>5 ± 0.00	>5 ± 0.00
Total Bilirubin (mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02
GOT (IU/L)	214.40 ± 10.87	257.50 ± 24.65	255.67 ± 17.44	260.00 ± 20.12
GPT (IU/L)	16.00 ± 5.28	16.33 ± 3.84	20.67 ± 3.59	16.33 ± 2.79

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

아. 장기의 길이 및 무게에 미치는 영향

Table 9 와 10에는 실험종료후 도살한후 측정된 장기의 길이와 무게의 변화를 나타내었다. 십이지장, 공장, 치장 및 소장 전체길이에서 기능성소재첨가구에서 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 맹장, 직장 및 총길이에서도 기능성사료 첨가제구에서 짧아지는 경향을 나타내었다. Table 10의 결과에서 보듯이 무게또한 길이의 결과와 유사하게 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 9. Effect of Functional of feed materials supplementation on intestinal length in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	cm / 100g BW			
Small intestine				
Duodenum	1.32 ± 0.03 ^a	1.27 ± 0.03 ^{ab}	1.14 ± 0.06 ^b	1.25 ± 0.08 ^{ab}
Jejunum	3.31 ± 0.15	3.07 ± 0.15	3.32 ± 0.28	3.22 ± 0.08
Ileum	3.48 ± 0.09	3.17 ± 0.14	3.18 ± 0.19	3.33 ± 0.19
Total length	8.11 ± 0.23	7.51 ± 0.29	7.64 ± 0.47	7.79 ± 0.31
Large intestine				
Cecum	0.81 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.79 ± 0.04
Rectum	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Total length	1.20 ± 0.03	1.15 ± 0.04	1.17 ± 0.04	1.14 ± 0.05

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

Table 10. Effect of Functional of feed materials supplementation on intestinal weight in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g / 100g BW			
Small intestine				
Duodenum	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Jejunum	1.05 ± 0.07	0.96 ± 0.09	0.92 ± 0.04	1.00 ± 0.06
Ileum	0.92 ± 0.07	0.84 ± 0.09	0.77 ± 0.04	0.82 ± 0.05
Total weight	2.39 ± 0.15	2.21 ± 0.17	2.08 ± 0.09	2.23 ± 0.13
Large intestine				
Cecum	0.73 ± 0.07	0.69 ± 0.10	0.55 ± 0.04	0.76 ± 0.07
Rectum	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Total weight	0.88 ± 0.08	0.85 ± 0.11	0.70 ± 0.05	0.90 ± 0.08

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

차. 간, 선위, 근위의 무게에 미치는 영향

Table 11에는 간, 선위, 2위, 비장, 췌장의 무게변화를 나타내었다. 전위와 비장은 기능성사료소 재첨가구보다 대조구에서 높은 무게를 나타내었으나 다른 장기에서는 비슷한 점을 나타내어 장기 무게에 미치는 영향도 관찰되지 않았다.

Table 11. Effect of Functional of feed materials supplementation on organs weight in broiler chicken

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g / 100g BW			
Liver	2.60 ± 0.23	2.52 ± 0.16	2.42 ± 0.08	2.57 ± 0.14
Proventriculus	0.40 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.02 ^{ab}	0.36 ± 0.02 ^{ab}	0.34 ± 0.02 ^b
Gizzard	1.53 ± 0.08	1.59 ± 0.05	1.50 ± 0.08	1.57 ± 0.05
Spleen	0.14 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.009 ^b	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.12 ± 0.010 ^{ab}
Pancreas	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.02

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

차. 분비 암모니아 함량변화

Table 12에는 맹장 내 암모니아 함량변화를 나타내었다. 맹장 내 암모니아 함량도 대조구에 비하여 모든 처리구에서 감소하였고 특히 T3 처리구에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 맹장내 암모니아 함량도 대조구에 비하여 모든 처리구에서 가장 낮은 함량을 나타내어 *Saururus Chinensi*의 성분이 분비 암모니아 저장에 효과가 있는 것으로 사료되나 이에대한 연구를 좀더 진행해야 할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Table 12. Influence of Dietary Supplementation of Fermented onion on Ammonia nitrogen in broiler chicken Cecum feces.

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	ppm			
NH3-N	584.56 ± 52.36	527.74 ± 108.22	564.72 ± 25.91	477.15 ± 53.08

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

제 2 절 기능성 사료 소재의 사료내 첨가가 산란계의 생산성에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 80주령의 Hy-Line Brown 암컷 144수를 공시하여 5주일간 4개 처리구에 3반복으로 A형 3단 6열 Cage(2수 수용 Cage)에 X수씩 4개 처리구로 나누어 3반복으로 12수씩 임의 배치하였다.

나. 실험동물사육

사양시험은 국립 환경대학교 부속 농장 내 육계용 평사에서 예비사육 1주일 후 2011년 10월 4일부터 동년 11월 8일까지 5주간 사육하였다. 사육방법은 시험 기간 동안 사료는 수당 일일 120g 급여하였으며, 음수는 자유 섭취하게 하였다. 점등 관리는 조명 16 hr 점등 + 8 hr 소등 하였다.

다. 실험설계

실험설계는 Control Diet(대조구)와 대조구 사료에 Enzyme A 0.1% 첨가구(T1), Enzyme A 0.1%와 mannamase 0.1% 첨가구(T2), 대조사료에 Enzyme A 0.1%와 Mannamase 0.1%와 Saururus chinensis extract 0.1% 첨가구(T3)등 총 4개 처리구를 두었다.

라. 분석항목 및 분석방법

(1) 복합효소의 급여가 육계 생산성에 미치는 영향

(가) 사료 섭취량, 계란 산란율

매주 일정한 시간에 사료급여량과 사료잔량을 이용하여 사료섭취량을 측정하였고, 산란율은 사양 시험 기간 중 매일 동일한 시간에 채집하여 처리구별로 총 산란수를 사육수수로 나누어 백분율로 표시하였다.

(나) 난중, 난각 두께, 난강도, 난각무게, Haugh Unit

계란 품질을 측정하기 위하여 시험 시작 후, 1주단위로 생산된 계란을 처리구당 30개의 계란을 수집하여 난각색, 난각강도, 난각두께, 난각무게, 난황색을 측정하였으며, 난각색은 난각색 측정기(QCR, shell colour reflectometer, England)를 이용하여 계란의 중앙부에서 측정하였고, 난각강도는 난각 강도계(FHK CO., Japan)를 이용하여 계란의 둔단부를 위로하여 수직으로 고정하고 압력을 가하여 파각되는 순간의 압력을 측정하였다. 난각두께는 계란의 중앙부에서 난각 파편을 채취하여 측정하였으며(QCT, shell thickness micrometers, England), 난각무게는 계란의 난각을 전량 수집하여 내부에 남아있는 난백을 제거하고 무게를 측정하여 난중으로 나누어 환산하여 산출하였다. 난황색은 QCC yolk colorimeter(England)를 이용하여 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

Table 1에는 사료내 Enzyme A 첨가구(T1), Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2), Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3)등 총 4개 처리구를 두었다. 첨가에 따른 실험 5주간의 사료섭취량 변화를 나타내었다.

실험 전 기간에서 무처리구와 처리구간의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았으며, 효소제의 첨가에 따른 섭취량에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of dietary enzyme supplementation on Feed intake in Laying hens

	Treatment ¹⁾							
	C		T1		T2		T3	
	g/head/day							
1week	117.00	± 1.326	117.36	± 0.950	117.94	± 0.600	116.86	± 0.976
2week	115.45	± 1.865	116.88	± 0.559	116.49	± 1.907	117.29	± 0.824
3week	114.27	± 1.786	116.15	± 0.247	117.01	± 0.946	115.09	± 0.734
4week	118.20	± 0.735	118.38	± 0.202	118.39	± 0.648	118.14	± 0.183
5week	114.49	± 2.165	113.88	± 1.319	114.50	± 1.154	113.07	± 3.313
Total	115.88	± 1.474	116.53	± 0.435	116.98	± 0.902	116.09	± 0.817

Mean ± SE

¹⁾C : Control Diets

T1 : Control Diets + Enzyme A 0.1%

T2 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1%

T3 : Control Diets + Enzyme A 0.1% + Mannanase 0.1% + Saururus chinensi 0.1%

Table. 2는 5주간의 산란율을 나타내었다. 산란율의 경우 섭취기간에 따른 각 주차별 산란율의 변화는 나타나지 않았으나, 무처리구(C)와 비교했을 때 Enzyme A 첨가구(T1), Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2), Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3) 모두 뛰어난 산란율을 나타내었고, 그 중 Enzyme A 첨가구(T1), Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2)가 가장 높은 수준의 산란율을 나타내었다.

Table 2. Effect of dietary enzyme supplementation on Egg production in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	%			
1week	82.41 ± 6.432	85.19 ± 7.187	85.65 ± 4.630	82.87 ± 3.036
2week	79.37 ± 6.533	80.16 ± 6.237	84.92 ± 3.785	87.70 ± 3.527
3week	80.16 ± 5.339	87.70 ± 3.785	88.89 ± 1.431	84.52 ± 2.062
4week	77.78 ± 1.730	84.13 ± 4.576	84.92 ± 2.209	81.35 ± 2.778
5week	81.25 ± 5.512	86.46 ± 2.756	77.78 ± 2.842	79.51 ± 1.252
Total	80.19 ± 0.792	84.73 ± 1.290	84.43 ± 1.818	83.19 ± 1.398

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

실험 주간 산란한 계란의 무게는 Table 3에 나타내었다. 효소제의 섭취기간에 따른 각 주차별 산란율의 변화는 나타나지 않았으며, 무처리구(C)와 효소제 첨가구(T1, T2, T3)간의 난중의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

Table 3. Effect of dietary enzyme supplementation on Egg weight in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	g/egg			
1week	67.02 ± 1.038	65.76 ± 1.108	65.89 ± 0.724	66.38 ± 0.327
2week	65.67 ± 2.244	66.64 ± 0.846	65.53 ± 1.234	66.57 ± 0.060
3week	65.98 ± 1.135	65.65 ± 1.106	66.14 ± 0.245	66.80 ± 0.543
4week	67.73 ± 0.386	65.84 ± 1.226	66.62 ± 0.566	63.64 ± 2.575
5week	67.57 ± 0.534	66.84 ± 1.096	67.64 ± 0.584	69.13 ± 2.104
Total	66.79 ± 0.417	66.15 ± 0.247	66.36 ± 0.366	66.50 ± 0.872

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

난각 두께는 Table 4에 나타내었다. 난 각의 두께는 계란의 강도를 결정짓는 요인으로써, 모든 처리구에서 실험의 진행에 따라 난각의 두께가 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 이는 산란 계(80주령)의 노화에 기인하였다고 사료되어지며, 두께가 무처리구와 Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2)는 비슷한 수준을 나타내었으나, Enzyme A 첨가구(T1)와 Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3)는 0.403mm~0.405mmtnwns으로 상대적으로 두께가 증가하는 것으로 나타났다.

Table 4. Effect of dietary enzyme supplementation on egg shell thickness in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	mm			
1week	0.440 ± 0.0099	0.415 ± 0.0105	0.422 ± 0.0113	0.403 ± 0.0191
2week	0.371 ± 0.0063	0.405 ± 0.0141	0.383 ± 0.0091	0.398 ± 0.0137
3week	0.376 ± 0.0255	0.411 ± 0.0110	0.382 ± 0.0124	0.407 ± 0.0108
4week	0.380 ± 0.0110	0.392 ± 0.0087	0.397 ± 0.0101	0.436 ± 0.0189
5week	0.412 ± 0.0135	0.401 ± 0.0068	0.387 ± 0.0076	0.369 ± 0.0160
Total	0.396 ± 0.0074	0.405 ± 0.0042	0.394 ± 0.0024	0.403 ± 0.0090

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

Table 5.는 난강도를 나타내었으며, Table 4에 나타난 난각 두께의 수준의존 적으로 난 강도가 증가 하는 것으로 나타났으며, 무첨가구와 비교하여 모든 첨가구에서 35.77~36.18kg/cm²의 범 위에서 난 강도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Effect of dietary enzyme supplementation on egg shell breaking in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	kg/cm ²			
1week	36.50 ± 4.617	37.75 ± 2.535	37.38 ± 3.622	40.63 ± 5.378
2week	29.72 ± 4.572	31.13 ± 4.671	30.73 ± 3.627	34.05 ± 3.743
3week	32.23 ± 2.963	37.63 ± 3.377	36.50 ± 3.321	32.53 ± 4.757
4week	33.08 ± 1.670	35.82 ± 2.097	37.17 ± 3.955	41.48 ± 3.595
5week	27.23 ± 4.462	36.50 ± 2.217	38.60 ± 2.302	32.23 ± 4.355
Total	31.75 ± 1.335	35.77 ± 1.333	36.08 ± 2.200	36.19 ± 1.897

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

계란의 무게 중 난각무게가 차지하는 비율은 Table 6에 나타내었으며, 대조구에 비하여 효소 첨가구에서 7.36~7.50%의 수준으로 높게 나타났으며, 이는 Table 4, Table 5의 결과와의 연관성을 찾을 수 있었다.

Table 6. Effect of dietary enzyme supplementation on egg shell weight in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	%/egg			
1week	7.37 ± 0.076	6.95 ± 0.192	7.08 ± 0.181	6.58 ± 0.279
2week	7.55 ± 0.368	8.20 ± 0.171	8.62 ± 0.264	8.19 ± 0.118
3week	7.09 ± 0.488	7.82 ± 0.291	7.19 ± 0.317	7.40 ± 0.308
4week	6.90 ± 0.170	7.42 ± 0.137	7.20 ± 0.192	7.66 ± 0.316
5week	7.00 ± 0.338	7.12 ± 0.248	6.85 ± 0.229	6.99 ± 0.173
Total	7.18 ± 0.110	7.50 ± 0.099	7.39 ± 0.122	7.36 ± 0.107

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

Haugh unit의 경우 Table 7에 나타내었으며, 무처리구와 Enzyme A + Mannamase 첨가구(T2)는 비슷한 수준을 나타내었으나, Enzyme A 첨가구(T1)와 Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract 첨가구(T3)는 87.96mm~88.61의 범위를 나타내며 상대적으로 Haugh unit가 증가하는 것으로 나타났다.

Table 7. Effect of dietary enzyme supplementation on Haugh unit in Laying hens

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
	H U			
1week	91.94 ± 1.610	95.04 ± 1.637	88.49 ± 2.497	91.78 ± 2.456
2week	87.75 ± 1.522	86.76 ± 4.612	88.75 ± 1.057	87.65 ± 3.548
3week	89.64 ± 1.680	90.68 ± 2.804	87.89 ± 2.413	91.50 ± 1.002
4week	86.37 ± 2.022	90.54 ± 2.724	87.05 ± 1.189	85.96 ± 1.870
5week	78.85 ± 1.897	80.04 ± 2.412	79.90 ± 2.327	82.91 ± 2.734
Total	86.91 ± 0.722	88.61 ± 1.551	86.42 ± 1.500	87.96 ± 1.476

Mean ± SE

¹⁾See the Table 1.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

이상의 모든 결과로부터 Enzyme A(T1), Enzyme A + Mannamase(T2), Enzyme A + Mannamase + Saururus chinensis extract(T3)의 육용계 및 산란계 사료내 첨가는 사료섭취량과 육질에서는 변화를 주지 않았으나 증체량, 사료요구율, 생산지수, 산란율, 난강도, Haugh unit가 개선되는 효과를 나타내었으며, 혈액 성분분석 결과 모든 항목에서 효소제 첨가에 따른 악영향을 미치지 않았고, 장기의 길이 및 무게가 감소하는 경향이 나타났으며, 특히 맹장 내 암모니아태 질소의 함량의 감소효과가 나타남으로써 기능성사료 첨가제로써의 개발 가능성이 제시되었다.

제 7 장 참고문헌

1. Bedford, M. R., and H. L. Classen, 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *J. Nutr.* 122:560-569.
- Lindemann, M. D., Comelius, S. G., Kandelgy, S. M. E., Moser, R. L. and J. E. Pettigrew, 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Ani. Sci.* 62:1298
2. Bedford, M.R., and H. Schulze, 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.* 11:91-114.
3. Bedford, M. R., 2000a. Exogenous enzymes in monogastric nutrition-Their current value and future benefits. *Ani. Feed Sci. Technol.* 86:1-13.
- Selle, P. H., V. Ravindran, R. A. Caldwell, and W. L. Bryden, 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilization. *Nutr. Res. Rev.*, 13:255-278
4. Berg, L. R., 1959. Enzyme supplementation of barley diets for laying hens. *Poult. Sci.* 38:1132-1139
5. Campbell, G. L., and M. R. Bedford, 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Ani. Sci.* 72:449-466
6. Cowieson, A. J., 2005. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Ani. Feed Sci. Technol.* 119:293-305.
7. Cowieson, A. J., and V. Ravindran, 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acid. *Br. Poult. Sci.* 49:37-44
8. Hasting, W. H., 1946. Enzyme supplements to poultry feeds. *Poultry Sci.* 37:372.
9. Matti, Nasi., 1988. Enzyme supplementation of laying hen diets based on barley and oat. Department of Animal Husbandary University of Helsinki. 00710 Helsinki. Finland.

[별첨 3] 제 3 위탁과제 연구결과(주인섹트바이오텍)
- 본문에 삽입 -

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

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