

최 종
연구보고서

미생물발효에 의한
대두단백 제품 생산기술 개발에 관한 연구

Studies on Soypeptide Manufacturing
Technology Based on Microbial Fermentation

주관연구기관 : 강원대학교

협동연구기관 : (주)진바이오텍

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물발효에 의한 대두단백 제품 생산기술 개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 10 월 15 일

주관연구기관명 강원대학교
총괄연구책임자 채병조
세부연구책임자 권명상
협동연구기관명 (주)진바이오텍
협동연구책임자 이동규

요 약 문

I. 제 목

미생물발효에 의한 대두단백 제품 생산기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

사료원료 중 식물성 단백질원료로서 대두박이 주종을 이루고 있지만 대두에 함유되어 있는 각종 항영양인자(ANF's)의 잔류로 인하여 어린 자돈에서 소화장애를 일으키기 때문에 어린 자돈사료에서는 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 어린 자돈사료에는 유제품(전지분유, 탈지분유 그리고 유청 등)이나 분무건조혈장단백(SDPP), 혈분, 고품질 어분, 돼지의 건조내장분말(DPS) 등과 같은 값비싼 단백질 원료가 사용되고 있다. 그러나 이러한 고가의 단백질 제품의 사용은 가축생산에 있어서 큰 부담이 되고 있다.

현재 대두제품으로서는 항영양인자(TI, CTI, urease 등)나 항원인자(β -conglycinin)를 제거한 정제 대두단백(ISP)이나 농축 대두단백(SPC)을 사용하고 있다.

그러나 근래 우리나라에서는 가공대두단백 생산이 그리 어려운 기술이 아님에도 불구하고 연간 9,600톤을 수입에 의존하고 있으며, 이를 금액으로 환산하면 159억원이 된다. 가공대두단백에서 주종을 이루고 있는 것은 ISP와 SPC인데, ISP는 에탄올로 탄수화물을 일부 추출한 후 열처리하여 생산하고, SPC는 추출한 단백질을 침전과정을 거쳐 중화처리한 후 분무건조시킴으로써 단백질 함량이 각각 90%와 67% 정도가 되도록 제조한 것이다. 또한 HP300과 같이 효소처리한 제품이 생산되어 상대적으로 저렴한 가격으로 수입되고 있기는 하나 사료회사와 축산농가에서 사용하기에는 경제적인 부담이 되고 있다. 따라서 효율적이고 경제적으로 대두단백제품을 생산할 수 있는 새로운 가공방법이 요구되며, 단백질 함량을 높이기 위한 새로운 방법들이 개발되어야 한다. 본 연구의 목적은 수입에 의존하고 있는 가공대두제품을 대체할 수 있는 고품질 대두제품을 개발하여 생산함으로써 외화절감은 물론 사료업계에 보다 저렴한 가격의 고품질 대두단백제품을 공급하기 위함이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 미생물을 이용하여 대두박을 발효시킴으로써 대두박 내 탄수화물이 발효과정에 필요한 에너지원으로 이용되어 상대적으로 단백질 함량을 증가시키고, 단백질은 단백질 분해효소에 의하여 크기가 작은 펩타이드 형태로 농축함으로써 사료 이용성을 극대화시키고자 한다. 또한, 이러한 과정에서 대두박에 함유된 트립신 억제인자나 raffinose와 stachyose와 같은 유해 올리고당의 함량을 낮추는 공법을 개발하고, 발효과정을 거치면서 생산되는 발효대두단백의 가공정도에 따른 효과도 구명함으로써 가능한 생산비가 저렴한 수준에서 제품을 생산할 수 있는 방안을 강구하고자 한다.

이러한 방법에 의해 생산된 발효대두단백제품을 이유자돈사료에 사용하여 성장능력, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 그리고 면역반응을 조사함으로써 사료 및 영양적 가치를 평가하기 위하여 아래와 같이 실험을 수행하였다.

- 발효대두단백의 첨가에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 관한 연구
- 균주를 달리한 발효대두단백의 급여에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 관한 연구
- 발효대두단백 제품의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 관한 연구
- 균주를 달리한 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율 및 소화기의 형태학적 발달에 관한 연구
- 발효대두단백 제품과 수입대두제품과의 급여효과 비교에 관한 연구
- 발효대두단백 제품과 수입 동·식물성 단백질 원료와의 급여효과 비교에 관한 연구
- 미생물에 의한 고품질 대두단백질사료생산을 위한 최적조건 확립 및 시제품제작에 관한 연구
- 고품질 대두 단백질사료의 대량생산 및 제형화에 관한 연구

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 세부과제: 자돈사료 내 발효대두단백의 첨가가 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

옥수수-유장분말 위주의 사료에 SBM, SPC, HP300 그리고 FSP-A를 8% 첨가하여 사양실험을 실시한 결과 급여 2주 동안 각 처리구간의 ADG, ADFI, F/G는 유의적인 차이는 보이지 않았으나($p>0.05$), 대체로 가공대두단백 처리구가 SBM 처리구보다 수치적으로 높게 나타났다. 전체 사양시험기간을 보면 SBM처리구의 ADG는 가공 대두단백 처리구들보다 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). 영양소 소화율에 있어서도 SBM 처리구는 가공대두단백 처리구들에 비하여 유의적으로($p<0.05$) 또는 수치적으로 낮게 나타났다. 일반 영양소 소화율과 마찬가지로 SBM 처리구의 외관상과 진정 아미노산 회장소화율이 가공대두단백 처리구들보다 낮게 나타났으며, 대부분의 아미노산에 있어 가공대두단백 처리구간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

용모 높이, 용와 깊이 그리고 용모 높이와 용와 깊이의 비율은 처리구간에 유의적인 차이가 없었으나 SBM 처리구가 가공대두단백 처리구에 비하여 용모 높이:용와 깊이가 수치적으로 낮게 나타났다. 이는 용모 높이에 비하여 용와 깊이가 깊어짐을 의미하므로 SBM 처리구의 자돈이 가공대두단백 처리구에 비하여 좋지 않은 영향을 받은 것으로 판단된다.

면역관련 세포, 혈액 생화학치 그리고 효소치에 있어 각 처리구간에 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았고($P>0.05$), 특히 본 실험에서 관심을 갖는 호염기성세포 즉 basophil의 출현은 전 대두제품 투여군에서 전혀 관찰되지 않았다. 또한, 다형핵 백혈구 (polymorphonuclear granulocytes)인 호중구 및 basophil의 면역 반응에 의하여 발현되는 chemiluminescence도 SBM 처리구를 기준으로 하여 비교하면 각종 가공 대두단백제품군간에 유의성 있는 변화나 특이한 영향은 관찰되지 않았다.

2) 세부과제: 균주를 달리한 발효대두단백내 항영양인자 및 올리고당의 함량 변화와 이에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달, 면역 반응에 미치는 영향에 관한 연구

옥수수-유장분말 위주의 사료에 SBM, SPC, HP300, FSP-A와 FSP-B를 각각 8% 첨가하여 사양실험을 실시한 결과 전체 사양실험기간(15~35일)에서 SPC 처리구가 다른 처리구들의 ADG에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며, SBM 처리가 유의적으로 가장 낮게 나타났다($p<0.05$). 대체로 가공대두단백 처리구들은 SBM 처리구보다 사양성적을 개선시키는 경향을 나타냈으나, 가공대두단백 처리구간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. SBM 처리구의 영양소 소화율은 가공대두단백 처리구들보다 낮은 경향을 나타냈다. FSP-A 처리구와 FSP-B 처리구를 비교하여 볼 때, 두 처리구간의 사양성적에는 유의적인 차이가 없었지만 FSP-B 처리구가 수치적으로 다소 높았고 영양소 소화율에 있어서도 유의적 또는 수치적으

로 다소 높게 나타나는 것으로 보아 FSP-B가 FSP-A보다 다소 우수하다고 사료되어진다. SBM 처리구의 외관상과 진정 아미노산 회장소화율이 가공대두단백 처리구보다 대체로 낮게 나타났으며, 대부분의 아미노산에 있어 가공대두단백 처리구간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$).

이전의 결과와는 달리 SBM과 SPC 처리구의 용와 깊이가 다른 처리구들에 비하여 수치적으로 다소 높게 나타났고, 용모 높이:용와 깊이의 비율도 낮게 나타났으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p>0.05$).

면역관련 세포, 혈액 생화학치 그리고 효소치에 있어 각 처리구간에 유의성은 관찰되지 않았고, chemiluminescence도 SBM 처리구를 기준으로 하여 비교하여보면 각종 가공 대두단백 처리구간에 유의성 있는 변화나 특이한 영향은 관찰되지 않았다.

3) 세부과제: 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

옥수수-유장분말 위주의 사료에 FSP-B를 0, 3, 6 그리고 9% 배합하여 사양실험을 실시한 결과 FSP-B 첨가수준을 증가시킴에 따라 사양성적이 유의적으로 개선되는 경향을 나타냈다($p<0.05$). 급여 2주 동안 6%와 9% 첨가구가 3% 첨가구에 비하여 ADG가 높게 나타났으나($p<0.05$), 일반 크럼블사료 급여기간에는 유의적인 차이가 나타내지 않았다($p>0.05$). 전 기간에서 6%와 9% 첨가구간의 사양성적은 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 영양소 소화율에 있어서는 미첨가구가 FSP-B 첨가구에 비하여 대부분 유의적으로 낮게 나타났으나($p<0.05$), 첨가구간에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p>0.05$). 일반 영양소 소화율도 마찬가지로 FSP-B 첨가는 외관상 아미노산 회장소화율을 개선시키는 것으로 나타났다.

용모 높이, 용와 깊이 그리고 용모 높이:용와 깊이 비율은 시험구간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나($p>0.05$), FSP-B 미첨가구의 용모 높이:용와 깊이 비율이 첨가구에 비하여 수치적으로 낮게 나타났다. 그러나 장의 morphology를 관찰한 결과 미첨가구와 첨가구간의 특이적인 차이는 관찰하지 못하였다.

면역관련 세포, 혈액 생화학치 그리고 효소치에 있어 FSP-B 미첨가구에 비하여 첨가구에서 약간의 감소가 다소 관찰되었으나, 대부분 정상 범위내에서의 차이였으며 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다($p>0.05$). FSP-B 미첨가구를 기준으로 하여 각 첨가구의 chemiluminescence는 모든 시험군에서 뚜렷한 차이를 관찰하지 못하였다. 대두단백에 대한 IgG 항체의 양성율과 항체역가(titer)는 모든 첨가구에서 전혀 관찰되지 않았으며, 알러지에 의하여 혈청내에 유리될 수 있을 것으로 추정된 혈청내 히스타민 역시 측정되지 않았다. 또한, 이는 본 시험에 사용된 대두단백이 항원성 또는 allergen 으로서의 작용을 나타 내지 않

음을 시사한다고 할 수 있다.

4) 세부과제: 2가지 발효대두단백의 상대적 가치제고를 위한 연구

옥수수-유장분말 위주의 사료에 FSP-A와 FSP-B를 각각 3%와 6% 첨가한 사료를 급여한 결과, 급여 2주(0~14일)동안 FSP 미첨가구의 ADG는 FSP 첨가구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며, 전체 사양기간의 F/G에서도 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 사양 시험기간 내내 FSP 첨가구의 사양성적은 미첨가구에 비하여 대체로 높게 나타났다. FSP-A 첨가구(3%와 6%)와 FSP-B 첨가구(3%와 6%)간에 직교비교를 실시한 결과 첨가수준보다는 균주에 따른 영향이 사양성적에 더 많은 영향을 미친 것으로 나타났다. 영양소 소화율과 아미노산 회장 소화율에 있어서도 사양성적과 마찬가지로 FSP 첨가구가 미첨가구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), 첨가수준보다는 균주의 종류가 더 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

용모 높이, 용와 깊이 그리고 용모 높이:용와 깊이 비율은 시험구간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나($p > 0.05$), FSP-B 첨가구의 용모 높이:용와 깊이 비율은 다른 첨가구에 비하여 수치적으로 높게 나타났다. 그러나 장의 morphology를 관찰한 결과 미첨가구와 첨가구간의 특이적인 차이는 관찰하지 못하였다.

면역관련 세포, 혈액 생화학치 그리고 효소치에 있어 FSP-A 6% 첨가구에서 호중구와 호산구의 유의성 있는 감소가 관찰되었으며($P < 0.05$). FSP-B 6% 첨가구에서도 호산구의 유의적인 감소가 관찰되었다($p < 0.05$). 아울러 basophil의 감소가 대두단백 투여 대조구에 비하여 FSP 첨가군에서 경우 전반적으로 관찰되었으나 통계적인 유의성은 없었다($p > 0.05$). FSP-A 첨가구들의 경우 전반적으로 헤모글로빈(Hb) 수치와 hematocrit 수치가 낮아짐이 관찰되었고, FSP-B 첨가구들의 경우 혈소판이 전반적으로 증가되는 결과가 관찰되었으나 통계적으로 유의성은 없었다. 사양시험 종료 시 발효대두단백 첨가구들은 미첨가구에 비하여 상대적으로 혈소판 수치가 증가되는 것이 관찰되었다. 발효대두단백 미첨가구를 기준으로 하여 각 첨가구의 혈청내 효소치의 변화를 관찰하였으나 생리학적인 정상범위였으며, chemiluminescence는 모든 시험구에서 뚜렷한 차이를 관찰하지 못하였다. 대두단백에 대한 IgG 항체의 양성율과 항체역가(titer)는 모든 첨가구에서 전혀 관찰되지 않았으며, 알러지에 의하여 혈청내에 유리될 수 있을 것으로 추정된 혈청내 히스타민 역시 측정되지 않았다. 또한, 시험에 사용된 대두단백의 경우 항원성 또는 allergen 으로서의 작용을 나타 내지 않음을 시사한다고 할 수 있다.

5) 세부과제: 개발한 발효대두단백의 동물성 단백질원에 대한 상대적 가치평가

옥수수-유장분말 위주의 사료에 SBM, FSP-B, RPC, WPC 그리고 FM을 각각 6% 배합한 시험사료를 이유자돈에게 급여한 결과, FSP-B의 사양성적은 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), RPC 처리구와는 유의적인 차이가 없었으며($p > 0.05$), 동물성 단백질(WPC와 FM) 처리구보다는 대체로 낮은 경향을 나타냈다. 그리고 식물성 단백질(FSP-B와 RPC) 처리구는 동물성 단백질(WPC와 FM) 처리구보다 ADG와 ADFI가 유의적으로 낮게 나타났으나($p < 0.05$), F/G는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 사양성적과 마찬가지로 일반 영양소 소화율에 있어서 FSP-B 처리구는 RPC 처리구와 유사하게 나타났으나, 동물성 단백질 처리구 보다는 다소 낮은 경향을 나타냈다. 그러나 아미노산의 분과 회장 소화율에 있어서는 RPC, WPC, 그리고 FM 처리구와 대체로 유사하게 나타났다.

십이지장, 공장 그리고 회장의 용모 높이와 용와 깊이는 처리구에 따라 일치된 경향을 나타내지 않았으나, 상대적으로 동물성 단백질 처리구보다 식물성 단백질 처리구의 용와 깊이가 깊어진 것으로 나타났다. 그러나 장의 morphology를 관찰한 결과 처리구간의 특이적인 차이가 관찰되지는 않았다. 장내 총 미생물 군수는 FSP-B 첨가구가 가장 많은 것으로 측정되었으며, 유산균수도 가장 많은 것으로 나타났다. 식물성 단백질 처리구는 동물성 단백질 처리구에 비하여 총 균수, 유산균수 그리고 *Cl. perfringens*가 많은 것으로 나타났다.

6) 협동과제: 미생물에 의한 고품질 대두단백질사료 생산을 위한 최적조건 확립 및 시제품 제작에 관한 연구

한국 전통메주로부터 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis* 균주를 분리하여 amylase 효소 역가가 매우 높은 변이주를 개량하였고 조단백질 함량이 46%인 탈피대두박을 침지→저온 증자→미생물 접종→고상발효→건조 과정을 거치는 미생물 고상발효 기법을 개발하여 전형적으로 조단백질 함량이 55%인 대두 단백질사료 생산을 위한 최적조건을 확립하였다.

대두박에 함유된 항영양인자인 trypsin inhibitor, 올리고당인 raffinose 및 stachyose를 미생물 발효과정중 생성된 protease와 glucoamylase에 의하여 가수분해되는 대두박 가공 기법을 개발하였다.

본 연구에서 기존의 대두단백질사료 생산방법과는 전혀 다른 미생물 발효법으로 대두박을 가공하여 고품질 대두단백질사료를 생산할 수 있는 조건을 확립하였고, 상기의 조건으로 제조된 시제품은 기존의 수입 대두단백질 제품보다 항영양인자가 낮고 단백질의 용해도가 우수하였으며 미생물 발효과정 중 생성된 protease에 의하여 대두단백질 70% 이상이 25kDa이하의 작은 펩타이드 분자로 가수분해된 고품질의 대두단백질 사료원료를 생산할 수 있었다.

7) 협동과제: 고품질 대두단백질사료의 대량생산 및 제형화에 관한 연구

고품질 대두단백질사료의 생산을 위한 최적 배양조건을 확립하였다. 미생물 발효조건상 대두박과 밀기울을 1:2의 비율로 배합함으로써 최적의 효소활성을 유도할 수 있었으며 대량 생산을 위한 최적배지로 이용할 수 있었다. 최적 조건은 단백질분해효소와 전분분해효소역가를 기준으로 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 50:50의 비율로 혼합하여 발효시킨 결과 가장 우수한 조단백질 증가효과를 가져왔다. Pilot scale 형태와 packed-bed type 고체 발효기(10톤/batch)를 이용하여 대두단백을 대량생산하기 위한 연구에서 최적 수분함량을 40%로 고정하였을 때 안정적인 고급대두단백질을 생산할 수 있었다. 항영양인자를 최소화하기 위한 방안으로 온도와 미생물처리방법을 이용하였을 때 고온의 열처리하는 단백질 변성을 가져오므로 대두발효 시 품질에 영향을 주었으며 따라서 적정 온도는 80℃가 가장 적절한 온도로 조사되었다. 대량생산을 위한 미생물의 배양은 초기 결과와 마찬가지로 혼합배양 시 단백질분해효소와 전분분해효소의 활성이 최대화되는 결과를 가져왔다. 보존온도와 기간은 실온에서 장기간 보관 시 전혀 문제가 되지 않았다. 이와 같은 결과를 통해 고급 대두단백질을 생산하기 위한 최적 조건을 확립할 수 있었다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 기존의 대두단백질원료 생산방법과는 전혀 다른 한국 전통메주로부터 분리한 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis* 균주로 미생물 발효기법을 통해 고품질 대두단백원료를 생산할 수 있는 조건을 확립하였다. 그러한 방법으로 생산된 대두단백원료는 기존의 수입 대두단백제품보다 항영양인자가 매우 낮고 단백질의 용해도가 우수하며 작은 펩타이드 분자로 가수분해된 고품질의 대두단백원료이다.

이렇게 하여 생산된 발효대두단백 원료의 자돈사료내 사용은 수입 가공대두단백과 비교하여 볼 때 자돈의 성장능력, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 그리고 면역반응에 유사한 결과를 나타내었다. 또한, 동물성 단백질원료와 비교하여 볼 때도 성장능력과 영양소 소화율 측면에서 차이를 나타내지 않았다. 발효균주를 달리하여 생산한 두 발효대두단백 제품 모두 대두박에 비하여 높은 성장능력과 영양소 소화율을 나타내었으며 효소처리 대두단백제품보다 유사하거나 높은 결과를 나타냈다.

따라서 발효대두단백은 일반 대두박의 자돈사료내 사용에 따른 항영양인자와 항원물질의 문제점을 최소화하고 수입에 의존하고 있는 고가의 가공 대두단백제품의 상당량을 대체할 수 있을 것으로 사료되며 고가의 동물성 단백질 원료의 일부대체가 가능할 것으로 판단된다.

현재로서는 대량생산이 FSP의 생산비용을 줄일 수 있는 한가지 방법이다. 근래 연간 9,600톤의 수입대두단백이 사료용으로 사용되고 있는데 가격은 kg당 1,150~2,600원이다. 그러나 이 량은 FSP의 생산비를 떨어뜨리면 증가하게 된다. 가까운 장래에 국내판매량을 늘리고 수출이 가능하기 때문에 대량생산으로 이것의 생산비를 낮출 수 있을 것으로 생각한다.

SUMMARY

I. Title

Studies on Soypeptide Manufacturing Technology Based on Microbial Fermentation

II. Research Objectives and Background

The weaning pigs need high quality proteins. Though vegetable proteins like soybean meal are cheaper as compared with animal proteins; soybean meal is unsuitable for consumption as it contains anti-nutritional factors. The use of animal protein sources like spray-dried plasma proteins and dried porcine soluble makes the pig production uneconomical because of their higher cost. Hence soybean meal can be a cheaper alternative if its anti-nutritional factors are removed. One of such products like isolated soy proteins (ISP) is being used in pigs feed after removing its trypsin inhibitors, chymotrypsin, urease, β -conglycinin and other anti-nutritional factors.

The production of processed soy products is not difficult in our country; but the amount of raw soybeans imported to the extent of 9,600 tons needs additional revenue of 15.9 billion Wons. The commonly used processed soy products are ISP, SPC and HP300. ISP is produced by removing some of the carbohydrates from meal by using ethanol and then heat-treated. SPC is produced by extracting proteins from the soybean meal, then neutralization with alkali and spray-dried to contain around 67% crude protein. The HP300 though comparatively cheaper, but still it has economic impact on pig production. The objectives of the present research were therefore to manufacture some alternative cheaper processed soy products with high protein value to reduce feed cost in the pig production in our country by using microbial fermentation method.

III. Research Scope and Contents

The methodology is based on the principle that microorganisms utilize carbohydrates and hence the proteins are concentrated and since microbes are also protein in nature, it ultimately increases the protein content of the product after fermentation. The unwanted sugars like raffinose and stachyose are also removed and products with different levels of protein content can be prepared. The process of developing processed soy product containing higher levels of protein was selected. After developing such product, experiments were conducted to know the nutritive value and effects on performance, nutrients digestibility, intestinal morphology, and immunity in weaning pigs. The following series of experiments were conducted in order to study the efficacy of the processed soy-product developed by microbial fermentation. The microbes used for fermentation were *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis*.

- 1) Effects of processed soy protein developed by fungal fermentation on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs.
- 2) Effects of processed soy proteins developed by either fungal or bacterial fermentation on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs.
- 3) Effect of different levels of processed soy proteins developed by bacterial fermentation on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs.
- 4) Comparative evaluation of the efficacy of processed soy protein developed by either bacterial or fungal fermentation.
- 5) Comparative evaluation of the processed soy protein developed by bacterial fermentation with plant and animal protein sources.
- 6) Development and characterization of optimal processing conditions for producing high quality processed soy proteins by microbial fermentation.
- 7) Standardization and mass production of high quality fermented soy proteins.

IV. Research Results and Proposal for Practical Use

1. Research Results

1) Effects of processed soy protein developed by fungal fermentation on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs.

In this experiment different protein sources like SBM, SPC, HP300 and processed soy protein developed by fungal fermentation (FSP-A) at 8% level each, were fed for 2 weeks and then a common commercial diet was fed to all groups for 15 to 35 d. During 0 to 14 d there was no significant difference in the average daily gain, average daily feed intake or feed to gain ratio among the treatments but the processed soy products showed improved growth than SBM though it was not significant. For total period(5 weeks) the ADG was significantly ($p<0.05$) lower in SBM fed group than other processed soy products tested, because of lower ($p<0.05$) nutrients digestibility in this particular group. Apparent and true amino acid digestibility was also lower ($p<0.05$) in SBM fed group, but the processed soy products remained comparable.

The villi height and crypt depth were not affected by the dietary treatments but SBM treated group had lower villi height to crypt depth ratio as compared with other groups.

The immune cell populations, erythrocytic and thrombocytic counts or hematological enzymes were not affected by dietary protein sources tested. The basophil concentration was also not increased by feeding the dietary protein sources. The polymorphonuclear granulocytes induced chemiluminescence also remained unchanged in the present study.

2) Effects of processed soy proteins developed by either fungal or bacterial fermentation on growth performance, nutrients digestibility, morphological development and immune response in early-weaned pigs.

In this experiment different protein sources like SBM, SPC, HP300, FSP-A and processed soy protein developed by bacterial fermentation (FSP-B) at 8% level each, were fed during 0 to 14 d and for 15 to 35 d a common commercial diet was fed. The ADG was significantly ($p<0.05$) higher in SPC fed pigs than other diets at all phases of measurement. All the processed soy products tested in this experiment showed improved ($p<0.05$) growth than SBM during all phases of study. The nutrient digestibility for some of the nutrients showed lower ($p<0.05$) values in SBM fed group. FSP-A and FSP-B did not differ with respect to weight gain but FSP-B showed higher nutrients

digestibility than FSP-A. The apparent and true amino acid digestibilities were also lower ($p<0.05$) in the SBM fed group than other protein sources, but when compared among processed soy products most of the amino acids digestibility's remained comparable.

The morphological studies conducted with respect to villi height, crypt depth and their ratio did not reveal any effect due to dietary treatments though the villi height to crypt depth ratio was numerically lowest in SBM and SPC fed diets as compared with other protein sources.

The immune cells population, erythrocytic and thrombocytic counts or hematological enzymes were not different among the dietary treatments. The chemiluminescence induced by polymorphonuclear granulocytes did not reveal any special effect in processed soy product fed diets.

3) Effect of different levels of processed soy proteins developed by bacterial fermentation on growth performance, nutrients digestibility, morphological development and immune response in early-weaned pigs.

In this experiment the effect of different levels of FSP-B at 3, 6, and 9 % of the diet was compared. The ADG was higher ($p<0.05$) in the FSP-B added diet as compared with non-added diet at all phases. During 0 to 14 d, 6% and 9 % FSP-B added diet showed higher ($p<0.05$) ADG as compared with 3 % diet. During whole period, a linear trend was noticed with respect to ADG. In 6% and 9% FSP-B added diets there were no significant differences noted on growth performance. The nutrient digestibility was significantly higher ($p<0.05$) in FSP-B added groups than non FSP-B added diet. It was noticed that the apparent ileal amino acid digestibility was improved ($p<0.05$) by addition of FSP-B at higher levels.

Villi height, crypt depth and their ratio remained unaffected by dietary treatments though the ratio was numerically lower in FSP-B non-added diet. No special effect on morphology was noticed between added and non-added diets.

During the experiment, the population of some of the immune cells was significantly ($p<0.05$) lower in FSP-B added diets than non-added diets. The erythrocytic and thrombocytic counts and hematological enzymes were little lower in added diets as compared with non FSP-B added diet, but the values were within the normal range.

The polymorphonuclear granulocytes induced chemiluminiscence did not reveal any change in added diets. The serum antibody IgG titers were not detected in the treatment diets. Also the different levels of FSP-B did not have any effect on serum histamine release. This draw the conclusion that the processed soy proteins used in this experiment did not contain any allergen and antigen

4) Comparative evaluation of the efficacy of processed soy protein developed by either fungal (FSP-A) or bacterial (FSP-B) fermentation.

FSP-A and FSP-B were added at the levels of 3 and 6% level each in the diets of weaning pigs during 0 to 14 d and a common commercial diet was fed during 15 to 35 d. The ADG in non-added diet was significantly ($p<0.05$) lower than FSP added diets during 0-2 week and 0-5 week study. The F/G ratio was improved ($p<0.05$) in added diets as compared with non-added diet. The different processed soy products when compared, irrespective of levels, did not reveal any effect during 0-2 week study on the growth performance. But at 15 to 35 d and overall study (0-5 week), significantly higher ($p<0.05$) ADG and ADFI were noted in the bacterial fermented soy proteins (FSP-B) than fungal fermented protein diets. When levels (3 and 6%) were compared irrespective of the source, the ADG was higher ($p<0.05$) at 6% level than 3 % fed groups only during overall study, but the ADFI and F/G ratio were comparable. The nutrient digestibility and ileal amino acid digestibility was significantly ($p<0.05$) improved in FSP added diet than non-added diet, showing higher digestibility in bacterial fermented soy proteins than the fungal fermented sources but when the levels of FSP were compared the digestibility remained unaffected.

The villi height, crypt depth and their ratio were not affected by dietary treatments but in FSP-B added diet the villi height to crypt depth ratio was numerically higher than non-added diet and no special effect was noticed on intestinal morphology in added diet than non-added one.

During the experiment most of the immune cell population did not reveal any effect of processed soy protein sources. The erythrocytic and thrombocytic counts and hematological enzymes though significantly affected by dietary treatments but no particular trend was noticed. The serum enzymes were not affected at 35th day of measurement. The polymorphonuclear granulocytes inducedchemiluminiscence did not

reveal any change in added diets. The serum antibody IgG titers were not detected in the treatment diets. Also the different levels of FSP-A and FSP-B did not have any effect on serum histamine release. This again draw the conclusion that the processed soy proteins used in this experiment did not contain any allergen and antigen

5) Comparative evaluation of the processed soy proteins developed by bacterial fermentation with vegetable and animal protein sources.

SBM, FSP-B, RPC, WPC and FM were added at 6% level each and were fed to weaning pigs. During the experiment, the growth performance was significantly higher ($p < 0.05$) in plant and animal protein sources than SBM fed diets. The ADG and ADFI were significantly lower ($p < 0.01$) in vegetable protein sources (FSP-B, RPC) than the animal protein sources (FM, WPC). The F/G ratio was not significantly ($p > 0.05$) different among treatments except during 0–14 day. The ADG was significantly higher ($p < 0.05$) in FSP-B diet than SBM at all phases of study. But it was not different when compared with RPC and was lower ($p < 0.05$) than WPC and FM diet only during 0–7 and 0–14 d study. The nutrient digestibility between RPC and FSP-B was similar as like growth performance, however the digestibility of some of nutrients was lower than animal protein sources. The ileal and fecal amino acid digestibility for most of the amino acids were similar among RPC, WPC and FM fed diets.

The villi height in duodenum, jejunum and ileum and villous height: crypt depth ratio was significantly higher in animal protein sources than to plant proteins. Total bacterial count and *lactobacillus* were higher in FSP-B diet than other diets. The TBC, *Lactobacillus* and *Cl. perfringens* count were higher in vegetable protein sources than animal protein sources.

6) Development and characterization of optimal processing conditions for producing high quality processed soy proteins by microbial fermentation.

A. oryzae and *B. subtilis* were isolated from traditional soybean malt and the amylase activity was improved by mutation. The processing method contains dehulled soybean meal steeping low temperature sterilization Microbial inoculation Fermentation and enzymatic degradation drying at low temperature grinding. This is one of the

methods of fermentation using microbes at high temperature. This increased the CP content to 55%. Various strains of fungus *A. oryzae* and bacteria *B. subtilis* were tested for their efficacy in increasing the CP content after fermentation. *A. oryzae* GB-107 increased the CP content to 54.6% after fermentation and also showed higher amylase activity.

The trypsin inhibitor, oligosaccharides like raffinose and stachyose in soybean meal were removed during microbial fermentation by protease and amylase causing hydrolysis and the proteins were concentrated thereby increasing the CP content of the soy proteins.

In this experiment the high quality soy proteins were produced by microbial fermentation, which was different and unique compared with conventional methods. The product developed by this method is better than other commercial processed soy products, as anti-nutritional factors were low and protein was better dissolved and concentrated. The microbial protease can produce the peptides with 25 Kda sizes, which contributes to 70% hydroxylation of SBM as studied by electrophoresis

7) Standardization and mass production of high quality fermented soy protein

The optimal cultivation and standardization for producing high quality soy proteins was studied. The microbial fermentation condition was soybean meal to wheat bran in the 1:2 ratio and they induce optimal enzyme activity that can be used for large-scale production. Optimal conditions were established after measuring the protease and amylase activity when *Aspergillus oryzae* and *Bacillus* sp. were mixed in 50:50 ratios and it increased the crude protein after fermentation. Pilot scale type and packed-bed type (10 tons/batch) was used for production and moisture was fixed at 40% and stable high quality protein was produced. To minimize the anti-nutritional factor, the temperature and microbes were tested which can effectively increase the protein quality. The best temperature condition was 80°C. The large-scale cultivation of microbes was done so that the amylase and protease activity were concentrated. There were no effects on the quality when it was stored at room temperature for long period. By repeated trials we have standardized the method of production of high quality proteins.

2. Proposal for Practical Use

Through these series of experiments we have developed processed soy proteins by fermentation using *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* isolated from Korean traditional Meju. Superior quality proteins can be produced by this technology as compared with imported soy proteins by reducing the anti-nutritional factors; and as it contains small peptides these can be easily hydrolyzed by digestive proteases.

The processed soy proteins (FSP) produced by this method has similar growth performance, nutrient digestibility and intestinal morphology when compared with imported soy products tested. Also, as compared with animal protein sources the growth response and nutrient digestibility were almost comparable. The two FSP products produced by using different microbial fermentation have higher growth performance and nutrient digestibility than SBM fed diets.

As these fermented products have less anti-nutritional factors and antigens, they could be an alternative to the expensive imported soy protein sources and could partly replace the use of animal protein sources.

Mass production is one of the ways to reduce production cost of FSP at this moment, which is more competitive to imported products. Currently, 9,600 MT/year of imported processed soy products are used as feeds in our country with the price of 1,150~2,600 Wons/kg. However, the domestic consumption could be increased if production cost of FSP is reduced. In the near future, if we could be able to produce processed soy products at large scale, there can be a possibility of increasing the domestic consumption and exporting it to other Asian countries thereby generating additional revenue.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	22
Section 1. Research Objectives and Background	22
Section 2. Research Scope and Contents	24
Chapter 2. Literature Review and Information	26
Chapter 3. Research Results and Discussion	32
Section 1. Effects of fermented soy protein on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs	32
Section 2. Effects of fermented soy proteins by different microbes on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs ·	47
Section 3. Effect of using level of fermented soy proteins by different microbes on growth performance, digestibility of nutrients, morphological development and immune response in early-weaned pigs	62
Section 4. Evaluation of relative value between two fermented soy proteins	81
Section 5. Evaluation of relative value between fermented soy protein and animal protein sources	99
Section 6. Production of sample products and establishment of optimal processing conditions for producing high quality fermented soy proteins by microbes	112

Section 7. Standardization and mass production of high quality fermented soy protein	128
Chapter 4. Achievement and contribution to related industry	149
Section 1. Achievement of the study	149
Section 2. Contribution to related industry	152
Chapter 5. Practical Using and Field Application	153
Chapter 6. References	154
Appendix I. Specification of fermented soy protein	161

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적	22
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	32
제 1 절 세부과제: 자돈사료 내 발효대두단백의 첨가가 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구	32
제 2 절 세부과제: 균주를 달리한 발효대두단백 내 항영양인자 및 올리고당의 함량 변화와 이에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역 반응에 미치는 영향에 관한 연구	47
제 3 절 세부과제: 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구	62
제 4 절 세부과제: 2 가지 발효대두단백의 상대적 가치제고를 위한 연구	81
제 5 절 세부과제: 개발한 발효대두단백의 동물성 단백질원에 대한 상대적 가치평가	99
제 6 절 협동과제: 미생물에 의한 고품질 대두 단백질사료 생산을 위한 최적조건 확립 및 시제품 제작에 관한 연구	112
제 7 절 협동과제: 고품질 대두 단백질사료의 대량생산 및 제형화에 관한 연구	128

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	149
제 1 절 목표달성도	149
제 2 절 관련 산업에의 기여도	152
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	153
제 6 장 참고문헌	154
부록 I FSP의 성분	161

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적

최근 들어 광우병, 돼지 콜레라, 가금인플루엔자 등의 질병과 웰빙에 대한 관심증가로 인하여 축산물 수요가 감소하여 전체적으로 가축사육두수가 감소됨에 따라 국내 사료생산량이 감소하고 있다. 인간에게 치명적인 질병을 일으키는 광우병과 같은 질병이 동물성 단백질 사용에 기인한 결과로 판명되면서 전 세계적으로 동물성 단백질을 식물성 단백질로 대체하려는 움직임이 급속도로 진행되고 있다. 사료시장에서 어분, 육골분, 혈장 등의 동물성 단백질은 대두박을 비롯한 식물성 단백질로 대체되고 있다. EU를 비롯한 북미를 중심으로 동물성 사료인 육골분 사용을 제한하고 있으며 앞으로 이러한 동물성 단백질 사료를 사용하지 않는다는 방침이 발표되고 있어 식물성 단백질 원료의 가격이 상승하고 있다. 또한, 기후변화에 따른 곡물 생산량 감소와 대두유 소비량의 감소에 따른 대두박 생산량 감소로 인한 식물성 단백질 원료의 가격 상승으로 국내 축산농가 및 사료산업에 전체적으로 큰 타격을 주고 있다.

사료원료 중 식물성 단백질사료로서 주종을 이루고 있는 원료는 대두박이지만 어린 자돈사료에서 사용에 제한을 받고 있다. 이는 대두에 함유되어 있는 각종 항영양인자(anti-nutritional factor; ANF's)가 잔류하고 있어 어린 자돈에서 소화장애를 일으키기 때문이다. 따라서 어린 자돈에서는 값비싼 유제품(전지분유, 탈지분유 그리고 유장분말 등)이나 분무건조혈장단백(spray dried plasma protein; SDPP), 혈분, 고품질 어분, 돼지의 건조내장분말(dried porcine soluble; DPS) 등이 활용되고 있다. 대두단백제품으로서는 항영양인자(trypsin inhibitor; TI, chymotrypsin inhibitor; CTI, urease 등)나 항원인자(β -conglycinin)를 제거한 정제대두단백(isolated soy protein; ISP)이나 농축대두단백(soy protein concentrate; SPC)을 활용하고 있다.

우리나라에서는 가공대두단백 생산이 그리 어려운 기술이 아님에도 불구하고 ISP나 SPC와 같은 가공 대두제품을 개발하지 않고 수입에 의존하고 있다. 우리나라에 수입되고 있는 이들 대두제품의 양은 연간 9,600톤으로서 금액으로 환산하면 159억원이 된다. 따라서 본연구의 목적은 수입에 의존하고 있는 가공대두단백제품을 대체할 수 있는 고품질 대두단

백제품을 개발하여 생산함으로써 외화절감은 물론 사료업계에 보다 값싼 고급 대두단백제품을 공급하기 위함이다.

1. 기술적 측면

가공대두단백의 생산은 사실 어려운 일은 아니다. 가공대두단백에서 주종을 이루는 것은 ISP와 SPC인데, ISP는 에탄올로 탄수화물 일부를 추출한 후 열처리하여 생산하고, SPC는 단백질을 추출하여 침전시킨 후 중화처리 하여 분무건조시킴으로써 단백질함량을 높인 제품이다. 근래 사료용으로 수입되고 있는 것 중에서 HP300과 같은 제품은 효소 처리를 한 것으로 일단 품질에는 문제가 없는 것으로 알려지고 있으나 가격이 비교적 비싼 편이다.

본 연구에서는 미생물을 이용하여 발효과정을 거침으로써 대두박내 탄수화물이 발효과정에 필요한 에너지원으로 이용되어 단백질 함량이 상대적으로 증가하게 되며 단백질은 단백질 분해효소에 의하여 크기가 작은 펩타이드 형태로 농축함으로써 이용성을 극대화시키고자 하는데 주안점을 두고 있다.

또한, 이러한 과정에서 대두박에 함유된 트립신 억제인자나 유해 올리고당인 raffinose나 stachyose함량도 낮추는 공법을 개발할 계획이다. 이러한 과정을 거쳐 생산된 대두단백은 가격도 저렴할 뿐만 아니라 어린 자돈에서 소화이용성도 매우 높을 것으로 사료된다. 발효과정을 거치면서 생산되는 발효대두단백의 가공정도에 따른 효과도 구명함으로써 가능한 생산비가 저렴한 수준에서 제품을 생산할 수 있는 방안을 강구하고자 충분한 사양시험과 면역 및 생리적 반응을 조사하고자 한다.

2. 경제·산업적 측면

위에서 지적한바와 같이 우리나라에서 수입하는 사료용 대두단백의 연간 수입량은 9,600톤으로 적은 양이 아니다. 이것을 금액으로 환산하면 연간 159억 원으로서 상당한 외화가 낭비되는 셈이다. 따라서 이러한 대두제품을 국산화한다면 외화절감은 물론이고, 저렴한 고급대두단백을 다량 공급할 수 있어 국내 사료 및 축산업계에 큰 도움이 되리라 사료된다.

본 연구에서 개발될 고급 대두단백은 수입품을 전량 대체할 수 있다는 가능성에 큰 의미를 두고 있다. 근래 전 산업분야에서 수입품을 대체할 국산품의 개발에 박차를 가하고 있는데 국제경쟁력이 열악한 사료부문에서 국산화가 늦어진다는 것은 안타까운 일이 아닐 수 없다. 국내 자원이 부족하여 수입할 수밖에 없는 옥수수나 같은 곡류는 수입해야 하지만, 국

내에서 생산량이 충분한 대두박으로 고급 대두단백제품을 생산하는 것은 당연한 일임에 틀림없다.

3. 사회적 측면

사료산업은 2차 가공산업이지만 1차산업에 많은 영향을 미친다. 사료가격의 상승은 결과적으로 1차 산업에 종사하는 양축농가에 부담으로 작용한다. 최근, 국제곡물가와 물류비용의 상승으로 인하여 국내 사료가격은 약 40% 정도 상승하여 가축 생산비의 약 25%가 상승한 것으로 판단된다. 따라서 사료원료를 국산화하여 비교적 저렴한 가격의 원료로 대체하여 사료비를 감소시키는 것이 양축농가에 도움이 될 것이다.

또한, 광우병과 같이 인간에게 치명적인 질병의 원인이 될 수 있는 동물성 단백질 원료에 대한 식물성 단백질 원료로의 대체를 통하여 소비자에게 안전한 축산물을 제공함으로써 축산물 소비 증진에 도움이 될 것으로 사료되며, 본 연구에서 개발된 발효대두단백은 좀 더 연구한다면 식품용으로도 활용이 가능할 것으로 사료된다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

에탄올로 탄수화물을 추출하여 중화처리하거나 효소처리하여 대두박내 단백질을 농축시키는 방법과 달리 미생물에 의해 대두박을 발효시킴으로써 탄수화물 함량을 낮추고 상대적으로 단백질 함량을 높이는 방법으로 대두단백제품을 생산하여 발효과정에서 미생물이 분비하는 단백질분해효소에 의해 단백질을 작은 펩타이드 형태로 농축함으로써 고품질 대두단백제품을 생산하고자 한다. 이렇게 하여 생산된 발효대두단백제품의 어린 가축사료 특히 자돈 사료에 대한 이용성을 평가하고 적정 사용수준을 설정하며 트립신 억제인자나 raffinose와 stachyose 같은 유해 올리고당의 함량을 낮추는 공법을 개발하여 가공정도에 따른 효과도 구명하고자 한다. 이를 위해 아래와 같이 사양실험과 면역 및 생리적인 반응실험을 실시하였다.

1. 세부과제 1차 년도

- 자돈사료 내 발효대두단백의 첨가가 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 관한 연구
- 발효대두단백의 회장 소화율의 비교를 통한 영양사료적 가치 평가에 관한 연구
- 균주를 달리한 발효대두단백내 항영양인자 및 올리고당의 함량변화와 이에 따른 자돈의 성장 및 소화기의 형태학적 발달에 미치는 영향에 관한 연구
- 균주를 달리한 발효대두단백내 항영양인자 및 올리고당의 함량변화와 이에 따른 영양소의 회장 소화율 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

2. 세부과제 2차 년도

- 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장 및 소화기의 형태학적 발달에 관한 연구
- 발효대두단백의 사용수준이 사료내 영양소의 회장소화율 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구
- 2가지 발효대두단백의 상대적 가치제고를 위한 연구
- 개발한 발효대두단백의 동물성 단백질원에 대한 상대적 가치 평가를 위한 연구

3. 협동과제 1차 년도

- 대두박의 단백질함량을 농축할 수 있는 미생물의 고체 발효기법 연구
- 대두박의 항영양인자 제거에 관한 연구
- 대두단백질의 펩타이드화에 관한 연구
- 미생물에 의한 고품질 대두 단백질사료 시제품 생산

4. 협동과제 2차 년도

- 고품질 대두 단백질사료의 대량생산에 관한 연구
- 발효에 의한 농축 대두단백질 사료의 분말 제형화 연구
- 발효에 의한 농축 대두 단백질 사료의 안정성 시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

대두박은 열처리정도, 추출방법, 추출용매 등에 따라 영양가가 크게 달라지고 대두피의 함유(탈피)여부에 따라서도 조성분 함량이 달라진다. 일반 대두박은 약 44%의 조단백질, 6% 이상의 조섬유를 함유하는 반면에 탈피 대두박은 약 48%의 조단백질, 약 3%의 조섬유를 함유한다.

대두박의 열처리는 대두박의 품질과 영양소 이용성에 영향을 미칠 수 있다(Rudolph 등, 1983; Vandergtift 등, 1983; Chag 등, 1987). 열처리가 저온일 경우, 성장능력을 저해할 수 있는 생리활성물질을 함유하게 된다(Anderson 등, 1979). 대두박은 착유공정상에서 열처리를 받게 되는데 이러한 열처리는 일부 성장저해인자들을 제거하는데 효과적이다(Charg 등, 1987; Herkelman 등, 1991; Cheeke, 1998). 그러나 대두박의 과열처리는 아미노산과 탄수화물의 결합으로 그 이용률이 저하되는 결과를 초래한다(Maillard, 1916; Warnick 등, 1968; Aherne와 Kennelly, 1985).

대두유를 착유하는 방법은 기계적인 압착과 용매추출법이 있다. 근래 대두로부터 기름의 기계적인 추출을 용이하게 하기 위하여 건식 익스트루전이 사용되고 있다(Nelson 등, 1987). 대두를 익스트루전할 경우 대두의 지방입자가 파괴되고 지방입자는 지방분해 효소의 공격을 받아 익스트루전한 대두의 에너지가 올라간다. 익스트루전에 의한 지방입자의 파괴에 따른 소화율의 향상은 단백질에서도 발생한다(Hancock 등, 1991a, b). 건식 익스트루전 추출방법에 의한 대두박의 지방함량(약 5%)은 용매추출 대두박(약 1%)보다 높아 ME가 높게 나타났으나, TI value는 유사하였다(Woodworth 등, 2001).

용매추출방법은 기름을 추출하기 위하여 용매를 사용한다. 주로 사용되는 용매는 hexane으로 가장 경제적인 용매이기는 하나, 인화성이 강하고 인체에 유해할 뿐만 아니라 (Johnson과 Lusas, 1983) 공해물질로서 사용상 규제를 받는다. 그로 인하여 위험성이 적고 독성이 적은 용매를 필요로 하게 되었으며, ethanol(Hron 등, 1994)과 isopropyl alcohol (Lusas 등, 1990)이 hexane을 대체할 수 있는 용매로 사용되기 시작하였다. Ethanol은 많은 량의 탄수화물을 용해시키므로 고단백 대두박을 생산할 수 있게 한다. Fukushima(1969)와 Dre'au 등(1994)은 비항원성 대두단백제품을 생산하는데 뜨거운 ethanol을 사용하였다. Ethanol로 추출한 대두박은 열처리하여 hexane으로 추출한 대두박에 비해 자돈의 성장능력을 개선시켰으며(Hancock 등, 1990), 이유자돈의 장내 변화를 최소화시키는 것으로 나타났다(Dre'au 등, 1994). 그러나 isopropyl alcohol로 추출한 대두박은 hexane으로 추출한 대두

박과 비슷한 N와 건물 소화율을 나타냈으며, 28일령 이유자돈의 소장내 형태학적 변화도 차이가 없었다(O'Quinn 등, 1997).

대두박은 조기 이유자돈에서 낮은 단백질 소화율(Hartman 등, 1961)과 일시적인 과민성 반응(Newby 등, 1984; Li 등, 1990; Qin 등, 1996)을 일으키는 단백질분해효소 억제인자와 항원을 함유하고 있다. 이유자돈사료의 항원성 물질은 조기 이유자돈의 영양소 흡수를 저해하는 역할을 하여(Miller 등, 1984), 성장능력을 떨어뜨린다(Li 등, 1990). Hall과 Byrne(1989)는 대두단백에 대한 항원이 이유 후 자돈의 혈청내에서 발견되었으며, 장의 손상이 대두단백에 대한 항원 전달 면역반응에 의해 유발될 수 있다고 하였다. Li 등(1991b)은 유단백 제품을 급여한 이유자돈에 비하여 대두박을 급여한 자돈의 용모 높이(villus height)는 짧고, 용와 깊이(crypt depth)는 깊었으며, 항 대두 IgG 역가는 높았다고 보고하였다.

단백질 소화율의 감소는 대두단백을 급여한 자돈의 성장률을 감소시킨다(Walker 등, 1986; Sohn 등, 1994; Qin 등, 1996). 자돈급여에 대한 대두박의 문제점을 개선하고 효율적으로 이용하기 위하여 여러 가공방법들이 개발되었다. ISP, SPC 그리고 HP300은 그러한 목적으로 개발된 대두단백 제품들이다. 이들 가공대두단백은 기호성이나 소화율이 탈지분유(dried skim milk; DSM)와 유사하여(Sohn 등, 1994) 자돈사료내 유제품을 대체하기에 좋은 원료들이나 일반 대두박에 비하여 값이 비싸기 때문에 육성돈사료에 사용하지는 못한다.

ISP는 탈피 대두와 탈지 대두후레이크로부터 비단백태화합물을 추출하여 단백질을 분리한다(Kolar 등, 1985; Figure 2-1). ISP는 단백질과 아미노산의 함량이 높으며(Table 2-1), 조섬유와 ANF's가 거의 없다. Lysine 함량은 5.26%로 88.0%의 회장 아미노산 소화율을 나타낸다(NRC, 1998). Pond 등(1971)은 유단백질을 ISP로 대체할 수 있는가를 실험한 결과 그 가능성을 확인하였으며, Sohn 등(1994)은 이유자돈 사료내 ISP와 DSM 급여구간에 일당 증체량(average daily gain; ADG)의 유의적인 차이가 없었으나, 대두박에 비해서 우수하게 나타났다고 보고하였다. Chae 등(1997)은 ISP를 급여한 자돈의 일일사료섭취량(average daily feed intake; ADFI)은 DSM을 급여한 자돈에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으나, ADG는 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.

SPC는 물, 수용성 alcohol 또는 isoelectric leaching에 의해 탈지 대두후레이크로부터 용해성 탄수화물을 선택적으로 제거함으로써 생산한다(Figure 2-1). SPC는 Figure 2-1에서 보는 바와 같이 일반 SPC, textured SPC 그리고 low antigen SPC의 세 가지 형태가 가축 사료에 사용되고 있다. 일반 SPC는 탈지 대두후레이크를 수용성 alcohol로 추출하여 만든다. Low antigen SPC는 수용성 alcohol 혼합액, 가공온도 그리고 가공시간을 조절하여 항영양인자를 감소시킨다. Textured SPC는 일반 SPC에 익스트루전 기술을 사용하여 생산한다. 익스트루전 가공은 수분 20~30%와 온도 120~180°C에서 가압 하에 이루어지며, 이러한 가공조건은 단백질을 기능적인 구조형태로 변형시킨다.

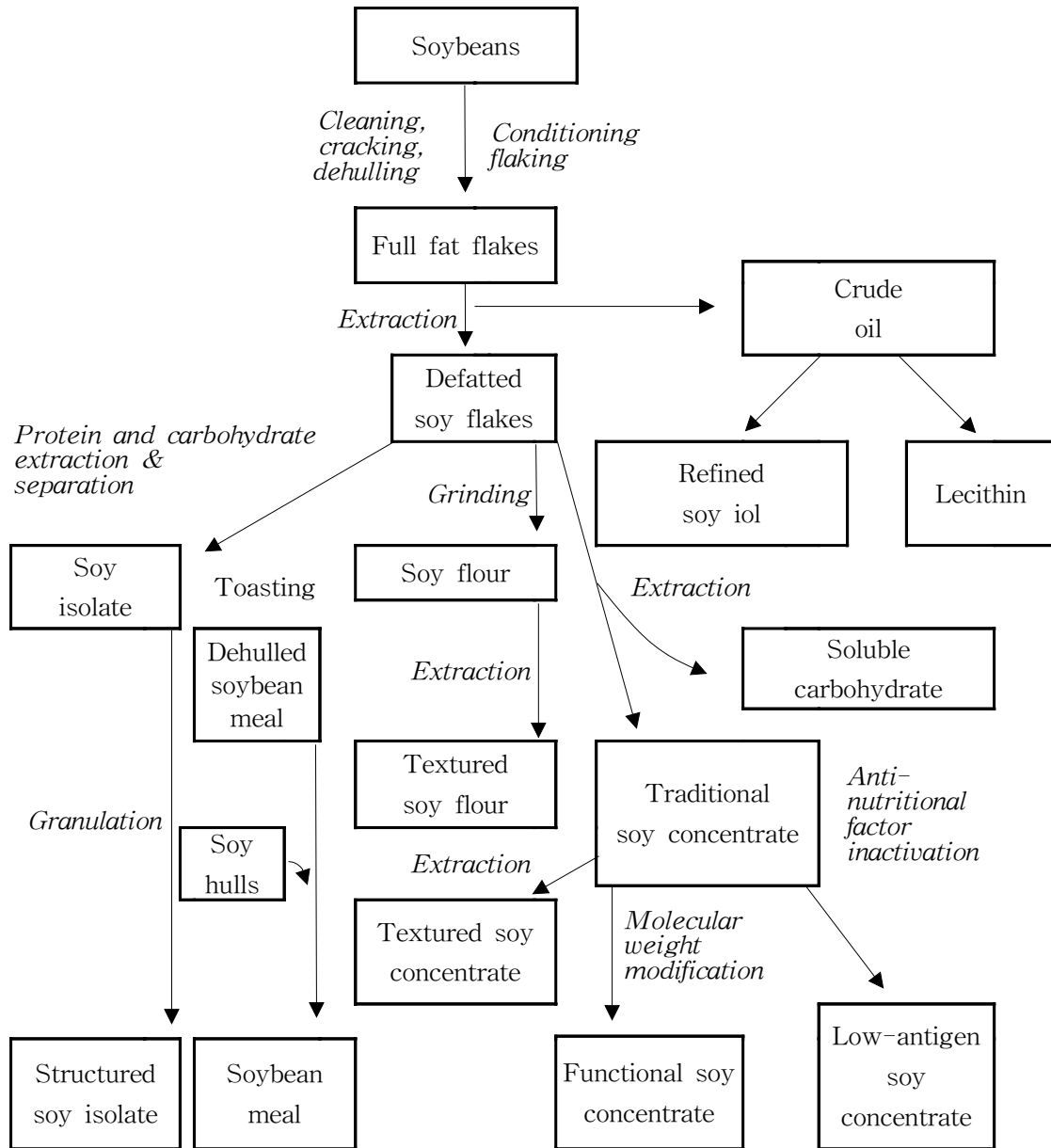


Figure 2-1. Processing flow chart of SBM, SPC and ISP (Central Soya, 1999).

SPC는 ISP에 비하여 단백질 함량이 낮고(64.0%와 85.8%), 전체적인 아미노산 함량도 낮다(Table 2-1). 그러나 SPC의 아미노산 회장소화율은 ISP에 비하여 높게 제시되고 있다

(NRC, 1998; Sohn 등, 1994). Sohn과 Maxwell(1990a)은 SPC의 영양소 소화율은 SBM에 비하여 월등히 높으며, DSM보다는 다소 낮으나 거의 비슷한 것으로 보고하였다. 또한, Sohn과 Maxwell(1990b)의 연구에서 SPC의 아미노산 이용율은 DSM의 이용율보다 다소 낮지만 큰 차이를 나타내지는 않았으며, SBM에 비하여 상당히 높은 이용성을 나타내었다고 보고하였다. Lenehan 등(2003)은 이유자돈 사료내 SBM을 lysine 기준으로 SPC로 대체하여 성장능력상에 미치는 영향을 평가하였다. 이유자돈 사료내 SBM의 1/2 대체(14.3%)는 ADG를 개선시켰으나, 전량 대체(28.6%)는 성장능력에 긍정적인 영향을 미치지 못하였다. 이는 SBM 전량을 SPC로 대체했을 때 ADFI가 낮게 나타나는 것으로 보아 사료의 기호성에 문제를 야기시키는 것으로 사료된다.

근래, SPC는 여러 가지 가공방법을 사용하여 생산하고 있으며, 가공방법에 따른 영양적 가치가 평가되었다. Li 등(1991b)은 사료내 대두단백에 대한 과민성 반응과 성장능력과의 상호관계를 조사하기 위하여 SBM, 일반 SPC 그리고 extruded SPC(ESPC)를 이유자돈사료내 각각 38%, 24% 그리고 24%를 배합하여 급여하였다. ESPC를 급여한 자돈의 ADG는 SBM을 급여한 자돈보다 높게 나타났으며, F/G는 SBM과 일반 SPC 보다 개선되는 것으로 나타났다. Friesen 등(1991; 1992)은 여러 대두단백제품에 대한 습식 익스트루전이 이유자돈의 성장능력에 미치는 영향을 조사하였다. 습식 ESPC는 일반 SPC에 비하여 ADG와 F/G가 개선되는 것으로 나타났으며, 습식 익스트루전 가공에 의해 N와 건물(dry matter; DM) 소화율이 증가하였다고 보고하였다. 또한, Tokach 등(1991)도 일반 SPC에 비하여 습식 ESPC가 ADG를 향상시키는 것으로 보고하였다. Burnham 등(1994)은 생산비용을 절감하고자 알코올 추출 대신 물을 이용하여 추출한 SPC가 이유자돈의 성장능력과 영양소 소화율을 떨어뜨리지 않고 대체할 수 있는 가를 조사한바, 알코올-추출 SPC를 급여한 자돈의 ADG와 ADFI는 물-추출 SPC보다 높았으나, 사료효율(feed/gain; F/G)은 유사하였다. 물-추출 SPC는 알코올-추출 SPC에 비하여 DM 소화율이 높았지만, N 소화율은 비슷하였다고 보고하였다.

최근, ISP나 SPC의 열처리나 알코올추출에 따른 영양소 변성을 최소화하고 ANF's와 항원물질을 효과적으로 감소시키기 위하여 효소나 효모를 이용한 새로운 가공방법이 개발되어져 왔다. Classen 등(1993)은 대두박내 항원성 단백질을 감소시킬 수 있는 효과적인 방법으로서 단백질분해효소 처리를 제시하였다. Rooke 등(1998)은 단백질분해효소의 처리는 대두박내 항원물질 함량을 낮추었으며, SPC와 DSM에 비하여 이유 후 7일령까지의 증체량이 유의적으로 높게 나타났다고 보고하였다. Caine 등(1997a,b)은 단백질분해효소 처리한 대두박과 미처리 대두박을 함유하는 사료를 급여한 신생이유자돈의 외관상 및 진정 아미노산 소화율에 차이가 없었다고 보고하였다.

Table 2-1. Nutrient composition of various soy protein products (as fed)

	ISP		SPC		HP300
	NRC (1998)	Central Soya (1999)	NRC (1998)	Central Soya (1999)	Zhu et al. (1998)
DE, kcal/kg	4,150	-	4,100	4,355	-
ME, kcal/kg	3,560	-	3,500	3,745	-
NE, kcal/kg	2,000	-	2,000	2,280	-
DM, %	92.00	95.00	90.00	91.50	92.00
CP, %	85.80	92.00	64.00	65.00	55.00
Fat, %	0.60	0.50	3.00	0.80	2.50
Amino acids, %					
Lys	5.26	5.26	4.20	4.23	6.2
Met	1.01	1.01	0.90	0.91	1.5
Cys	1.19	1.01	1.00	0.98	1.5
Thr	3.17	3.31	2.80	2.80	4.0
Try	1.08	1.47	0.90	0.91	1.3
Ile	4.25	4.05	3.30	3.25	4.8
Leu	6.64	6.99	5.30	5.33	7.8
Val	4.21	4.14	3.40	3.44	5.2
His	2.25	2.21	1.80	1.76	-
Arg	6.87	-	5.79	-	-
Phe	4.34	4.88	3.40	3.38	5.0
Tyr	3.10	3.31	2.50	2.54	-

(Han, 1999)

HP300은 탈지대두박을 수화처리하고 효소처리한 후 효모를 첨가하는 일련의 생물공학 적 방법으로 생산되며, 약 55%의 단백질을 함유하며, 항영양인자를 감소시킨 대두단백제품 이다. HP300은 SPC에 비하여 단백질 함량이 낮고(55%와 65%), lysine과 methionine 등 아미노산의 함량은 높다(Table 2-1). 그러나 HP300의 상대적인 아미노산 조성은 SPC의 아미노산 조성과 유사하므로 유사한 생물학적 가치를 가지는 것으로 예상된다. 또한, HP300은 SPC에 비하여 TI의 함량이 다소 낮지만, 단백질의 함량이 낮기 때문에 더 많은 량을 사용 해야 함을 고려하여 볼 때 사료내 TI의 함량은 별다른 차이가 없다.

SPC에 비해 HP300에 대하여 보고된 연구자료는 거의 없다. HP300과 SPC의 ME는 비

슷한 것으로 각각의 제조업자들은 제시하고 있다(3,745kcal/kg와 3,724kcal/kg). HP300의 회장 lysine 소화율은 프랑스에서 실시한 연구결과를 토대로 85~86%정도 되는 것으로 추정하고 있다. Decuyperre 등(1998)은 3주령 이유자돈을 대상으로 ISP, SPC 그리고 HP300의 급여실험을 실시하였다. 그 결과 HP300은 SPC에 비하여 ADG는 낮았으나, ADFI는 유사한 것으로 나타나 결과적으로 F/G가 높게 나타났다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 세부과제: 자돈사료 내 발효대두단백의 첨가가 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역 반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

신생자돈은 출생 후 이유시까지 모유로부터 각종 영양소와 생리활성물질 및 면역물질을 공급받으며(Mosenthin, 1998), 이유 후 그러한 영양소들은 이유자돈 사료로부터 공급받게 된다. 이유자돈사료는 모유로부터 고품질사료로의 갑작스런 변화에 대한 스트레스를 최소화하기 위하여 영양소 소화율과 기호성이 높고 유해물질을 최소화한 원료들로 배합된다(Lee, 2000).

자돈사료에 사용하고 있는 식물성 단백질 원료는 밀단백(wheat protein; WP), 농축 감자단백(potato protein concentrate; PPC), 정제 대두단백(isolated soy protein; ISP), 농축 대두단백(soy protein concentrates; SPC), HP300 등이 있다. 이들 원료들 중 ISP나 SPC와 같은 대두단백제품들은 대두박내 트립신 억제인자(trypsin inhibitor; TI), 키모트립신 억제인자(chymotrypsin inhibitor; CTI), 유레아제(urease), 렉틴(lectins), 사포닌(saponins), 이소플라빈(isoflavones) 등과 같은 항영양인자(anti-nutritional factor; ANF's)의 함량을 낮추거나 제거한 고품질 대두단백제품이다. 그러나 이러한 대두단백제품들은 아쉽게도 국내에서 개발되지 못하고 대부분 수입에 의존하고 있으며, 비교적 고가의 원료로서 사료공장과 양돈농가에서 사용하는데 경제적 부담이 되고 있다.

따라서 본 실험은 발효대두단백제품의 급여가 이유자돈의 성장능력, 영양소 소화율, 아미노산 회장소화율, 장의 형태학적 발달 및 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 가공대두단백 제품으로서의 사료적 가치를 평가하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시동물, 시험설계 및 사료

1) 사양시험

사양시험을 위해 이유자돈(L×Y×D, 21±2일령; 4.85±0.66kg) 168두를 공시하여(4처리, 3반복, 반복당 14두), 이유 후 2주(0~14일)와 3~5주(15~35일)로 총 5주(35일)간 사양시험을 실시하였다. 자돈은 성별과 체중에 따라 각각의 처리구에 완전 임의배치하였다.

시험사료는 옥수수, WP(38%) 그리고 SDPP(7.8%) 위주의 사료에 SBM, SPC, HP300 그리고 FSP-A(A. *Oryzae*에 의한 발효대두단백)를 각각 8%씩 함유하였으며, 합성 아미노산을 첨가하여 동등한 량의 CP, lysine 그리고 methionine를 함유하도록 배합하였다(Table 3-1-1). 시험사료는 3,300kcal/kg ME, 20.0% CP, 24.7% lactose, 1.55% lysine, 0.80% Ca 그리고 0.40% Av. P를 함유하였으며, 비타민과 미량 광물질은 NRC(1998) 요구량을 충족하거나 초과하도록 하였다. 영양소 소화율을 측정하기 위하여 산화크롬(Cr₂O₃)을 불소화지시제로 첨가하였다.

자돈들에게 포유기간 동안 처리구 구분없이 일반 시판용 대용유를 급여하였으며, 이유 후 0~14일 까지 시험사료를 급여한 후, 이유 후 15~35일 까지 모든 처리구에 일반 시판용 크럼블 사료를 급여하였다. 자돈은 바닥의 절반이 슬랫인 돈방(1.9m×2.54m)에서 사육하였으며, 돈사의 환기는 팬을 이용하여 강제환기시켰다. 사료와 물은 자유채식 시켰고 첨가제나 약품은 일절 사용하지 않았다. 기타 자돈의 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

2) 회장소화율 시험

회장소화율측정을 위해 이유자돈(L×Y×D, 21±2일령, 5.53±0.54kg) 15두(5처리 3반복)를 공시하여 Walker 등(1986)의 방법에 따라 simple T-cannula를 장착한 후 각각의 처리구에 완전임의 배치하였다. 처리구는 SBM, SPC, HP300 그리고 FSP-A였으며, 이들 단백질원료 이외에 다른 원료들은 반정제 원료들을 사용하였다. 진정 아미노산 회장소화율 측정을 위해 반정제 원료들로만 배합한 무질소 사료(nitrogen-free diet)를 급여하였다. 시험사료는 단백질 수준에 근거하여 각각의 단백질 원료와 corn starch의 사용량을 결정하였으며, 사료내 섬유소 수준을 고려하기 위하여 α-cellulose(Sigma[®])를 사용하였다(Table 3-1-2). Simple T-cannula 장착 후 각각 6시간 절수와 12시간의 절식을 시행하였다. 이후 사료와 물은 자유채식 시켰으며, 대사케이지에서 사육하였다. 시험기간은 시험사료에 대한 3일간의 적응기간과 3일간의 회장내용물 채취기간을 두었다.

Table 3-1-1. Formula and calculated compositions of experimental diets for feeding trials (day 0 to 14)

	SBM	SPC	HP300	FSP-A
Ingredients, %				
Whey powder	38.00	38.00	38.00	38.00
Corn	36.64	37.05	36.89	36.92
Deh-SBM (48%)	8.00	-	-	-
SPC	-	8.00	-	-
HP300	-	-	8.00	-
FSP-A	-	-	-	8.00
SDPP	7.80	7.80	7.80	7.80
Fish meal	5.00	5.00	5.00	5.00
Soy oil	2.00	1.80	1.80	1.80
Limestone	0.60	0.60	0.60	0.60
ZnO	0.34	0.34	0.34	0.34
Vitamin premix ¹	0.28	0.28	0.28	0.28
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin	0.15	0.15	0.15	0.15
L-lysine (78%)	0.15	0.02	0.13	0.12
DL-methionine (50%)	0.14	0.06	0.11	0.09
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
Sulfathiazol	0.10	0.10	0.10	0.10
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition				
ME, kcal/kg	3,300	3,300	3,300	3,300
CP, %	20.00	20.00	20.00	20.00
Lactose, %	24.70	24.70	24.70	24.70
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.55	1.55	1.55	1.55
Met+Cys, %	0.85	0.85	0.85	0.85

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg Pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18 mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49 mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

Table 3-1-2. Formula and calculated composition of experimental diets for ileal digestibility trials

	N-free	SBM	SPC	HP300	FSP-A
Ingredients, %					
Deh-SBM (48%)	-	45.70	-	-	-
SPC	-	-	31.00	-	-
HP300	-	-	-	37.00	-
FSP-A	-	-	-	-	38.00
Corn starch	40.75	8.59	21.75	15.83	15.10
Cellulose	3.00	0.40	1.75	1.70	1.45
Lactose	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Glucose	20.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Sucrose	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Corn oil	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Limestone	0.80	1.46	1.40	1.62	1.45
DCP	2.55	0.95	1.20	0.95	1.10
Vitamin premix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Chromic oxide	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,494	3,340	3,496	3,396	3,400
CP, %	0.24	20.13	20.00	20.12	20.28
CF, %	2.97	2.96	2.97	2.98	2.96
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
T. P, %	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Lys, %	0.00	1.29	1.30	1.28	1.29
Met, %	0.00	0.28	0.28	0.31	0.24

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18 mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49 mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

나. 체중측정 및 시료 채취

체중측정은 시험개시와 시험사료 급여 2주 후 그리고 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 시험사료 급여 2주 후와 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 급이통 으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 분시료의 채취는 시험사료 급여 2주 후 각각의 돈방별로 채취하였다. 분시료는 채취 후 60℃의 열풍건조기에서 72시간 건조시켜 1mm 망사 Wiley mill로 분쇄 후 분석할 때까지 냉장 보관하였다.

소장내 용모의 이화학적 변화를 관찰하기 위하여 사양시험을 개시하기 전에 처리구 구분없이 4두를 도살하였으며, 시험사료 급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 1두(처리당 4두, 총 16두)씩 도살 후 개복하여 소장의 25%, 50%, 75% 부분을 적출하여 식염수로 세척 후 10% formalin 용액에 침지하여 주사현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

회장 내용물은 시험사료 급여 3일 후부터 캐놀라로부터 채취하여 -10℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm망사 wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

면역특성을 분석하기 위하여 시험개시전 돈방구분 없이 6두의 자돈과 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각각 처리당 6두(총 24두)의 자돈으로부터 경정맥에서 혈액을 채취하여 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

다. 실험적 측정 및 분석

1) 사양성적, 영양소 소화율 및 장의 형태학적 특성 분석

사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 그리고 사료효율(F/G)을 분석하였다. 사료와 분의 일반성분 분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 에너지는 단열폭발열량측정기(Model 1241, Parr Instrument Co., Molin, IL)로 측정하였으며, 크롬은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다.

Villus height와 crypt depth를 측정하기 위하여 10% formalin용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988).

회장 내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유 아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

2) 혈액 및 면역특성 분석

가) 면역관련 세포, 혈액화학치 및 효소치 분석

면역관련세포 분석을 위한 혈액학적 검사는 자돈의 경정맥으로부터 채혈하여 얻은 혈액을 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 잘 보관한 다음 자동혈액 분석기(Hemacyte™, oxford science, INC. USA)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 호중구(NE), 임파구(LY), 단핵구(MO), 호산구(EO), 호염구(BA), 헤모글로빈(Hb), 헤마토크릿(HCT), 혈소판(PLT), 평균 적혈구용적(MCV), 평균 적혈구혈색소량(MCH), 평균 적혈구색농도(MCHC) 등 혈액기본치를 측정하였다. 아울러 혈청내 존재하는 효소중 중요한 알라닌 전이효소(ALT), 아스파티산 전이효소(AST), 알부민(ALB) 및 혈중 요소태질소(BUN)의 변화를 측정하여 대두단백의 변화에 따른 영향을 관찰하였다.

나) 다형핵 백혈구의 chemiluminescence 측정

자돈의 경정맥으로부터 heparin(10U/ml)이 포함된 vacutainer를 이용하여 혈액을 채취한 후 Double-density Percoll을 이용하여 상층으로부터는 다형핵 백혈구를 분리하고 하층의 mononuclear cell로부터는 monocyte를 분리하여 chemiluminescence 측정용 media인 pheno red가 함유되지 않은 1%의 BSA가 첨가된 RPMI-1640 배지에 각각 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 과 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 세포를 고정한 후 탐식능력의 변화에 따른 respiratory burst시 생성하는 reactive oxygen(RO)를 측정하기 위하여 luminol을 amplifier로 하여 사전에 5분간 O_2^- 의 발생을 증폭시켰으며 보체 C3b와 opsonization시킨 zymosan particle을 stimulator로 하여 40분간 Luminometer(Berthold LB-9505, Germany)를 이용하여 chemiluminescence를 측정하였다.

라. 통계적 분석

측정된 사양성적과 영양소 소화율 데이터는 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 최소유의차 검정을 실시하였고 완전 임의배치법으로 분석하였다. 측정된 혈액성분과 면역데이터들은 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 Duncan의 다중검정으로 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적

이유 후 0~14일간 시험사료를 급여하였다. 각 대두제품간 성장성적에 유의적인 차이는

없는 것으로 나타났으나($p>0.05$), ADG의 경우 SBM 처리구가 가공 대두단백 처리구에 비하여 수치적으로 낮게 나타났다(Table 3-1-3). 일반 시판용 크럼블 사료를 급여한 15~35일 간의 사양성적 또한 각 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 그러나 전체 사양시험기간(0~35)의 사양성적을 보면, SBM의 사용은 전체적인 사양성적을 떨어뜨리는 것으로 나타났다. 전체기간을 볼 때, ADG는 HP300 처리구가 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p<0.05$), 가공대두제품간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p>0.05$). F/G는 각 처리구간 유의적인 차이를 나타내지는 않았지만($p>0.05$), SBM 처리구는 가공대두제품(SPC, HP300 그리고 FSP)에 비하여 수치적으로 높게 나타났다.

Table 3-1-3. Effects of various soy products on growth performance in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	SEM ¹
Day 0~14					
ADG, g	315	331	337	327	11.10
ADFI, g	474	461	476	470	3.82
F/G	1.51	1.42	1.41	1.45	0.05
Day 15~35					
ADG, g	404	443	447	439	6.41
ADFI, g	657	649	665	659	5.95
F/G	1.63	1.47	1.49	1.51	0.03
Day 0~35					
ADG, g	368 ^b	398 ^{ab}	403 ^a	394 ^{ab}	5.11
ADFI, g	584	574	589	584	4.21
F/G	1.59	1.45	1.46	1.48	0.02

^{ab} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p<0.05$).

¹ Pooled standard error means.

나. 영양소 소화율

영양소 소화율은 Table 3-1-4와 같다. HP300 처리구만이 SBM 처리구의 건물, 에너지 그리고 단백질 소화율에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), 각 가공대두단백 처리구간에는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). SBM의 영양소 소화율은 가공대두단백과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나($p < 0.05$) 수치적으로 낮게 나타났다. 영양소 소화율에 있어서도 가공대두단백 처리구간에 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 SPC와 HP300의 일부를 FSP-A로 대체가 가능한 것으로 나타났다. 하지만, SPC와 FSP-A 처리구와 SBM 처리구간에 유의적인 차이가 없었던 것은 의외의 결과였으며 이는 아마도 탈피 대두박의 사용으로 인하여 사양성적에 많은 영향을 받지 않은데서 비롯된 것으로 사료된다.

외관상과 진정 아미노산 회장소화율의 결과는 각각 Table 3-1-5와 Table 3-1-6과 같다. 외관상 아미노산 회장소화율에 있어, SPC 처리구는 histidine, isoleucine, alanine 그리고 HP300 처리구는 isoleucine, threonine, valine, alanine, glycine, proline 그리고 FSP-A는 histidine, alanine, glycine의 외관상 회장소화율이 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).

Table 3-1-4. Effects of various soy-products on fecal digestibility of nutrients in early-weaned pigs (at day 14)

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	SEM ¹
DM	78.76 ^b	79.62 ^{ab}	82.09 ^a	80.41 ^{ab}	0.51
GE	78.02 ^b	78.71 ^{ab}	81.73 ^a	79.31 ^{ab}	0.57
CP	73.68 ^b	77.49 ^{ab}	78.97 ^a	75.51 ^{ab}	0.85
EE	64.62	69.35	71.80	68.71	1.50
Ash	43.45 ^b	46.03 ^{ab}	53.41 ^a	48.74 ^{ab}	1.52
Ca	40.30	46.38	49.72	45.87	2.41
P	41.49	47.36	49.15	44.46	1.91

^{ab} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

Table 3-1-5. Effects of various soy products on apparent ileal digestibility of amino acids in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	SEM ¹
Essential amino acids					
Arg	81.27	83.61	86.42	87.01	1.07
His	72.40 ^b	84.20 ^a	76.65 ^{ab}	82.57 ^a	1.79
Ile	67.70 ^b	81.74 ^a	79.98 ^a	77.85 ^{ab}	2.23
Leu	80.00	86.52	84.76	85.21	1.41
Lys	79.35	86.44	78.54	82.40	1.55
Met	77.74	77.77	77.78	77.61	1.17
Phe	72.96	75.78	78.94	74.40	1.43
Thr	66.60 ^c	69.41 ^{bc}	79.55 ^a	76.22 ^{ab}	1.82
Val	64.68 ^b	74.26 ^{ab}	79.86 ^a	75.45 ^{ab}	2.17
Sub-mean	73.63	79.97	80.27	79.86	1.38
Non-essential amino acids					
Ala	67.86 ^b	78.92 ^a	81.46 ^a	79.84 ^a	2.09
Asp	86.93	88.08	86.49	88.60	0.08
Cys	78.88	77.50	79.80	80.10	1.13
Glu	85.80	91.06	86.91	89.31	0.93
Gly	64.51 ^b	71.14 ^{ab}	78.29 ^a	77.16 ^a	2.07
Pro	76.58 ^c	79.05 ^{bc}	87.35 ^a	86.29 ^{ab}	1.73
Ser	81.27	83.58	80.54	79.43	1.31
Tyr	77.18	79.71	77.16	80.51	1.83
Sub-mean	77.16	81.65	82.60	83.02	1.19
Total-mean	75.18	80.70	81.29	81.24	1.28

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

¹ Pooled standard error means.

진정 아미노산 회장소화율에 있어, SPC 처리구는 histidine, isoleucine, lysine, alanine 그리고 HP300 처리구는 isoleucine, methionine, threonine, valine, alanine, glycine 그리고 FSP-A는 alanine의 회장소화율이 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다

($p < 0.05$). 외관상과 진정 아미노산 회장소화율은 SBM 처리구와 가공대두단백과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나($p > 0.05$), 수치적으로 가공대두단백 처리구가 높게 나타나는 경향을 나타냈다. 또한, 외관상과 마찬가지로 진정 아미노산 회장소화율에 있어서도 가공대두단백 처리구간에 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

Table 3-1-6. Effects of various soy-products on true ileal digestibility of amino acids in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	SEM ¹
Essential amino acids					
Arg	90.66	91.40	92.25	92.87	0.57
His	80.55 ^b	91.20 ^a	82.62 ^b	87.32 ^{ab}	1.52
Ile	72.70 ^b	86.39 ^a	83.42 ^a	81.29 ^{ab}	2.04
Leu	83.13	90.07	87.44	87.34	1.32
Lys	84.54 ^{ab}	91.24 ^a	82.05 ^b	86.31 ^{ab}	1.45
Met	88.13 ^b	88.26 ^b	95.00 ^a	87.07 ^b	1.26
Phe	81.99	83.79	84.34	80.95	1.05
Thr	91.02 ^a	85.87 ^b	90.56 ^a	86.16 ^b	0.91
Val	81.44 ^b	89.47 ^a	90.26 ^a	86.87 ^{ab}	1.31
Sub-mean	83.80	88.63	87.55	86.24	0.92
Non-essential amino acids					
Ala	77.49 ^b	86.43 ^a	86.88 ^a	85.43 ^a	1.52
Asp	89.28	90.46	88.33	90.39	0.71
Cys	81.50	86.82	82.88	85.44	1.56
Glu	88.02 ^b	93.44 ^a	88.76 ^{ab}	91.22 ^{ab}	0.89
Gly	92.72 ^b	95.62 ^{ab}	96.88 ^a	94.77 ^{ab}	0.63
Pro	86.34	86.81	92.90	92.44	1.24
Ser	95.16 ^{ab}	96.26 ^a	90.17 ^b	90.06 ^b	1.11
Tyr	92.91	92.64	89.11	92.64	1.24
Sub-mean	88.85	91.67	90.43	90.99	0.75
Total-mean	86.01	89.96	88.81	88.32	0.82

^{ab} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

다. 장의 형태학적 발달

용모 높리와 용와 깊이는 Table 3-1-7과 같다. 용모 높리는 각 처리구간에 유의적인 차이가 없었으나($p>0.05$), 수치적으로 가공대두단백 처리구가 SBM 처리구에 비하여 다소 높게 나타났다. 용와 깊이에 있어서도 용모 높리와 마찬가지로 처리간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 또한, 용모 높리:용와 깊이의 비율에 있어서도 처리간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 비록 처리상호간에 용모 높리:용와 깊이의 비율에 유의적인 차이는 없었지만, SBM 처리구가 가공 대두단백 처리구에 비하여 다소 낮게 나타났다. 이는 SBM 처리구의 용와 깊이는 가공 대두단백 처리구들에 비하여 상대적으로 깊어짐을 나타내며 SBM이 가공 대두단백에 비하여 장의 발달에 좋지 않은 영향을 미친 것으로 사료된다.

Table 3-1-7. Effect of various soy products on ileal villus height, crypt depth and villus height : crypt depth ratio of early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	SEM ¹
Villus height, μm	317	327	324	319	5.23
Crypt depth, μm	217	218	214	213	3.06
Villus height: Crypt depth	1.47	1.50	1.51	1.51	0.04

¹ Pooled standard error means.

라. 면역반응

1) 면역관련 세포, 혈액 생화학치 및 효소치

각 처리구별 혈중 백혈구의 측정결과는 Table 3-1-8과 같다. 시험개시시 혈중의 총 백혈구 수의 각 대두제품간의 유의적 차이는 관찰되지 않았고, 아울러 호중구, 림파구, 단핵구, 호산구의 수에 있어서도 유의성 있는 변화를 찾아 볼 수 없었다($p>0.05$). 특히, 본 실험에서 관심을 갖는 호염기성세포 즉, basophil의 출현은 전체 대두단백제품 투여군에서 전혀 관찰되지 않았다.

또한, 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각 처리구별로 측정된 혈중의 총 백혈구 수도 각 대두단백 처리간에 유의적인 차이가 없었으며($p>0.05$), 아울러 호중구, 림파구, 단핵구, 호산구의 수에 있어서도 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었다($p>0.05$). 그리고 본 연구

에서 관심을 갖는 발효대두단백에 대한 알러지 반응에 의하여 출현될 수 있는 호염기성세포 즉, basophil의 출현은 전혀 관찰되지 않았다. 발효대두단백을 비롯한 각 대두단백의 경우 자돈에서 특별한 알러지반응을 일으키지 않는 것으로 나타났다.

Table 3-1-8. Effects of various soy products on the immune cell population in early-weaned pigs

Items	Leukocytes ¹			
	SBM	SPC	HP300	FSP-A
Initial				
WBC, k/ μ l	13.67±3.63 ^{NS)}	12.82±3.65	12.98±3.58	13.18±1.59
NE, k/ μ l	3.91±0.77 ^{NS)}	3.87±0.71	3.55±0.62	3.74±0.81
LY, k/ μ l	5.95±0.99 ^{NS)}	6.00±0.91	5.99±0.98	5.94±1.01
MO, k/ μ l	2.98±0.64 ^{NS)}	3.07±0.71	2.87±1.19	3.01±1.03
EO, k/ μ l	0.30±0.08 ^{NS)}	0.28±0.07	0.29±0.08	0.29±0.08
BA, k/ μ l	0.03±0.02 ^{NS)}	0.04±0.01	0.04±0.02	0.04±0.02
After day 14				
WBC, k/ μ l	14.01±1.75 ^{NS)}	13.34±2.57	13.99±2.09	13.27±2.15
NE, k/ μ l	6.54±1.59 ^{NS)}	6.22±1.41	6.13±1.44	6.02±1.68
LY, k/ μ l	5.90±1.78 ^{NS)}	6.11±0.98	5.92±1.09	5.81±0.91
MO, k/ μ l	2.17±0.88 ^{NS)}	2.72±1.01	2.58±0.99	2.37±1.12
EO, k/ μ l	0.33±0.07 ^{NS)}	0.34±0.09	0.33±0.13	0.34±0.10
BA, k/ μ l	0.05±0.02 ^{NS)}	0.04±0.02	0.05±0.03	0.04±0.02
After day 35				
WBC, k/ μ l	13.13±3.44 ^{NS)}	14.12±2.35	14.06±1.86	12.62±3.54
NE, k/ μ l	4.15±0.99 ^{NS)}	3.89±0.97	4.34±1.58	3.90±0.89
LY, k/ μ l	6.01±0.98 ^{NS)}	5.95±1.01	5.78±1.23	5.69±1.41
MO, k/ μ l	2.45±0.70 ^{NS)}	2.85±0.67	3.06±0.90	2.73±0.56
EO, k/ μ l	0.30±0.09 ^{NS)}	0.29±0.07	0.30±0.09	0.29±0.08
BA, k/ μ l	0.05±0.03 ^{NS)}	0.04±0.01	0.04±0.02	0.05±0.03

¹ Values are mean ± S.D., N=6.

^{NS)} Values within the row are not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3-1-9. Effect of various soy products on hematological values in early- weaned pigs

Items	Erythrocytes and Thrombocyte			
	SBM	SPC	HP300	FSP-A
Initial				
RBC, $10^6/\text{mm}^3$	3.20	2.90	3.34	3.02
MCV, μm^3	56.50	55.60	52.70	57.49
RDW, %	24.61	23.47	25.73	27.12
HCT, %	16.75	18.35	15.21	17.03
PLT, $10^4/\text{mm}^3$	15.36	19.24	15.52	17.32
MPV, μm^3	8.39	7.50	8.07	8.94
WBC, $10^3/\text{mm}^3$	12.37	13.59	14.64	13.73
Hb, g/dl	5.24	5.34	5.67	4.93
MCH, pg	15.86	16.14	15.47	15.92
MCHC, g/dl	25.82	26.97	27.05	28.15
After day 14				
RBC, $10^6/\text{mm}^3$	3.00	3.12	3.12	3.12
MCV, μm^3	58.50	54.91	54.91	54.91
RDW, %	26.12	29.20	29.20	29.20
HCT, %	18.15	16.23	16.23	16.23
PLT, $10^4/\text{mm}^3$	19.65	19.33	19.33	19.33
MPV, μm^3	8.98	8.41	8.41	8.41
WBC, $10^3/\text{mm}^3$	13.72	13.35	13.35	13.35
Hb, g/dl	4.74	5.31	5.31	5.31
MCH, pg	15.90	15.82	15.82	15.82
MCHC, g/dl	26.28	25.85	25.85	25.85
After day 35				
RBC, $10^6/\text{mm}^3$	3.43	3.39	3.39	3.39
MCV, μm^3	49.30	50.93	50.93	50.93
RDW, %	20.57	21.20	21.20	21.20
HCT, %	16.99	17.27	17.27	17.27
PLT, $10^4/\text{mm}^3$	12.75	22.53	22.53	22.53
MPV, μm^3	7.95	9.47	9.47	9.47
WBC, $10^3/\text{mm}^3$	11.97	14.37	14.37	14.37
Hb, g/dl	5.02	5.10	5.10	5.10
MCH, pg	14.62	15.17	15.17	15.17
MCHC, g/dl	29.67	29.83	29.83	29.83

혈중 적혈구계와 혈소판계 수치를 분석한 결과는 Table 3-1-9와 같다. 시험개시시 혈중 적혈구와 혈소판은 각 대두단백 제품간에 유의적인 차이가 없었으며($p>0.05$), 급여 2주 후와 시험종료시의 수치에 있어서도 유의적인 차이가 없는 것으로 측정되었다($p>0.05$). 혈액 내 아미노산의 전이효소 함량을 분석한 결과 Table 3-1-10과 같으며 백혈구계와 적혈구계의 분석치와 마찬가지로 혈중 효소치에 있어서도 각 대두단백 처리구간에 유의성 있는 차이를 관찰하지 못하였다.

Table 3-1-10. Effect of various soy products on change of hematological enzyme in early-weaned pigs

Items	SBM	SPC	HP300	FSP-A
Initial				
AST, μ/ℓ	46.70	49.80	52.50	47.70
ALT, μ/ℓ	46.60	45.70	43.80	46.80
ALB, g/dl	2.23	2.10	2.41	2.23
BUN, mg/dl	6.39	7.12	6.56	5.97
After 14 day				
AST, μ/ℓ	42.70	40.80	42.20	37.70
ALT, μ/ℓ	40.60	47.80	46.80	40.20
ALB, g/dl	3.43	3.11	3.89	2.96
BUN, mg/dl	8.25	8.15	7.89	8.92
After 35 day				
AST, μ/ℓ	48.30	63.5	54.50	51.50
ALT, μ/ℓ	39.70	50.5	45.00	48.50
ALB, g/dl	2.65	2.45	2.70	2.30
BUN, mg/dl	7.50	8.50	7.03	7.00

2) 호중구의 chemiluminescence

자돈 사료내 발효대두단백의 첨가에 따른 자돈의 다형핵 백혈구(polymorphonuclear

granulocytes)인 호중구 및 basophil의 면역 반응에 의하여 발현되는 chemiluminescence에 미치는 영향을 분석할 결과 Table 3-1-11과 같다. 시험개시시 SBM을 기준으로 하여 비교하며 보면 급여 2주 후와 시험종료시 모두 각각의 가공 대두단백 처리구간의 유의성 있는 변화나 특이한 영향은 관찰되지 않았다($p>0.05$).

Table 3-1-11. Effect of various soy-product on the polymorphonuclear granulocytes(%) induced chemiluminescence¹ in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A
Initial	100*	102.6±4.5	99.4±8.5	103.9±3.4
After 14 day	98.3±11.3	104.9±9.3	105.3±3.2	102.1±11.1
After 35 day	100.8±8.1	106.7±12.8	106.1±5.7	106.8±8.9

¹ Values are means ± S.D., n=3.

* 100% = 4.044 ± 10^9 cpm (cpm = count per million).

4. 요약

SBM 처리구와 가공 대두단백 처리구들에 비하여 사양성적과 영양소 소화율에 있어 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 대체로 가공 대두단백 처리구들이 SBM 처리구들에 비하여 수치적으로 높게 나타나는 경향을 보였다. 또한, 장내 형태학적 발달과 면역에 관여하는 혈중 백혈구, 적혈구 그리고 혈소판의 수치도 각 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. SBM 처리구와 가공 대두단백 처리구간에 유의적인 차이가 없는 이유는 아마도 각각의 대두단백 원료의 사용량이 8%로 시험사료내 대두박의 사용에 따른 영향이 상대적으로 적었기 때문으로 사료되어진다. 무엇보다도 각각의 가공 대두단백 처리간에는 유의적인 차이가 없어 기존의 가공대두단백을 발효대두단백으로 대체가 가능한 것으로 나타났다.

제 2 절 세부과제: 균주를 달리한 발효대두단백 내 항영양인자 및 올리고당의 함량 변화와 이에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역 반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

대두박은 가축에게 급여하는 가장 경제적인 고품질의 식물성 단백질 원료로서 옥수수와의 적절한 배합은 돼지사료의 훌륭한 아미노산 조성을 갖게 한다(Seerley, 1991). 그러나 어린 가축의 사료에는 사용량이 제한된다. 이유자돈에 있어 대두박은 낮은 단백질 소화율을 가지며 일시적인 과민성 반응(Li 등, 1990; Qin 등, 1996)을 일으키는 단백질분해효소 억제인자와 항원을 함유하고 있다. 대두박내 단백질분해효소 억제인자는 열처리에 의하여 쉽게 파괴될 수 있다. 100℃에서 15분정도 가열하면 열에 약한 TI는 95%이상이 파괴되나(Cheeke, 1998), 어린 자돈에서 과민반응을 일으키는 allergen은 열에 비교적 안정하다(Li 등, 1991a). 또한, 열처리는 대두박내 lectin을 감소시킬 수 있으나, raffinose와 stachyose 등과 같은 올리고당(oligo-saccharides; OS)과 항원성 단백질은 효과적으로 감소시키지 못한다(Lalles, 1993).

최근, ISP, SPC, HP300 등과 같이 열처리나 알코올추출에 따른 영양소 변성을 최소화하고 ANF's와 항원물질을 효과적으로 감소시키기 위하여 효소나 효모를 이용한 새로운 가공방법이 개발되어져 왔다. 본 실험에 사용된 발효대두단백은 TI를 불활성화시키고 OS를 제거하기 위하여 *A. oryzae*와 *B. subtilis* 균주에 의한 발효방법을 사용하였다. 발효과정에서 두 균주는 endopeptidase와 glucoamylase를 분비하고 이 효소들의 가수분해 작용에 의해 각각 TI와 OS가 제거된다. 대두박의 발효과정에서 *A. oryzae*는 *B. subtilis*보다 TI와 OS를 제거하는데 더 효과적인 것으로 나타났다. 또한, 단백질의 함량에 있어서도 두 제품간에 각각 53%와 58%로 나타났다. 따라서 본 실험은 두 균주로부터 생산된 발효대두단백내 항영양인자 및 올리고당의 함량 변화와 이에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역 반응에 미치는 영향을 조사하여 기존의 대두단백과 발효대두단백의 상대적 가치를 평가하고자 실시하였다.

1. 재료 및 방법

가. 공시동물, 시험설계 및 사료

1) 사양시험

사양시험을 위해 이유자돈(L×Y×D, 23±3일령; 5.86±0.45kg) 210두를 공시하여, 성별과 체중에 따라 5처리 3반복(반복당 14두씩)에 완전임의 배치하였다. 시험기간은 이유 후 2주(0~14일)와 3~5주(15~35일)로 나누어 총 5주(35일)간 실시하였다.

시험사료는 옥수수과 WP위주의 사료에 SBM, SPC, HP300, FSP-A(*A. oryzae*에 의한 발효대두단백)와 FSP-B(*A. oryzae*와 *B. subtilis*의 복합균주에 의한 발효대두단백)를 각각 8%씩 배합하였으며, 동등한 양의 CP, lysine 그리고 methionine를 함유하도록 합성 아미노산을 사용하였다(Table 3-2-1). 시험사료의 원료조성에 따른 영향을 최소화하기 위하여 옥수수, 대두유 그리고 합성아미노산을 제외한 모든 원료들은 동등한 양을 사용하였다. 시험사료의 영양수준은 3,300kcal/kg ME, 20.0% CP, 24.7% lactose, 0.80% Ca, 0.40% Av. P, 1.55% lysine과 0.85% Met+Cys이었으며, 기타 비타민과 광물질은 NRC(1998) 요구량을 충족하거나 초과하도록 배합하였다. 영양소 소화율을 측정하기 위하여 산화크롬(Cr_2O_3)을 불소화지시제로 첨가하였다.

포유기간 동안 처리구 구분없이 일반 시판용 대용유를 급여하였으며, 이유 후 0~14일까지 시험사료를 급여한 후, 15~35일 까지 모든 처리구에 일반 시판용 크럼블 사료를 급여하였다. 자돈은 바닥의 절반이 슬랏인 돈방(1.9m×2.54m)에서 사육하였으며, 돈사의 환기는 팬을 이용하여 강제 환기하였다. 사료와 물은 자유채식 시켰고, 첨가제나 약품은 일절 사용하지 않았다. 기타 자돈의 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

2) 회장 소화율 시험

회장소화율측정을 위해 이유자돈(L×Y×D, 22±2일령, 5.48±0.39kg) 18두(6처리 3반복)를 공시하여 Walker 등(1986)의 방법에 따라 simple T-cannula를 장착한 후 각각의 처리구에 완전임의 배치하였다. 처리구는 SBM, SPC, HP300, FSP-A 그리고 FSP-B였으며, 이들 단백질원료 이외에 다른 원료들은 반정제 원료들을 사용하였다. 진정 회장 아미노산 소화율을 측정하기 위해 반정제 원료들로만 배합한 무질소 사료(nitrogen-free diet)를 급여하였다. 시험사료는 동등한 수준의 단백질(20.39%)을 함유하도록 하였으며, 단백질 수준차이에 따른 차이는 corn starch로 대체하였다(Table 3-2-2). Simple T-cannula 장착 후 각각 6시간 절수와 12시간의 절식을 시행하였다. 이후 사료와 물은 자유채식 시켰으며, 각각의 대사케이지에서 사육하였다.

Table 3-2-1. Formula and calculated compositions of experimental diets for feeding trials

	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B
Ingredients, %					
Whey powder	38.00	38.00	38.00	38.00	38.00
Corn	36.64	37.05	36.89	36.92	36.97
Deh-SBM (48%)	8.00	-	-	-	-
SPC	-	8.00	-	-	-
HP300	-	-	8.00	-	-
FSP-A or B	-	-	-	8.00	8.00
SDPP	7.80	7.80	7.80	7.80	7.80
Fish meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Soy oil	2.00	1.80	1.80	1.80	1.80
Limestone	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
ZnO	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
Vitamin premix ¹	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Bactacid	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-lysine (78%)	0.15	0.02	0.13	0.12	0.08
DL-methionine (50%)	0.14	0.06	0.11	0.09	0.08
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Sulfathizol	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,300	3,300	3,300	3,300	3,300
CP, %	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Lactose, %	24.70	24.70	24.70	24.70	24.70
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Met+Cys, %	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18 mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

Table 3-2-2. Formula and calculated composition of experimental diets for ileal digestibility trial

	N-free	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B
Ingredients, %						
FSP-A or B	-	-	-	-	37.58	35.36
HP300	-	-	-	37.00	-	-
SPC	-	-	31.20	-	-	-
Deh-SBM (48%)	-	45.66	-	-	-	-
Corn starch	31.15	6.95	25.37	18.01	17.12	19.67
Cellulose	3.00	-	-	-	-	-
Lactose	30.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Glucose	20.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Sucrose	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Corn oil	2.60	4.70	0.60	2.20	2.40	2.00
Limestone	0.80	1.44	1.40	1.63	1.46	1.48
DCP	2.55	1.00	1.20	0.95	1.10	1.05
Vitamin premix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
L-lysine (78%)	-	0.21	0.19	0.22	0.22	0.30
DL-methionine (50%)	-	0.14	0.14	0.09	0.22	0.24
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Chromic oxide	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition						
ME, kcal/kg	3,470	3,464	3,494	3,464	3,465	3,459
CP, %	0.24	20.39	20.39	20.39	20.39	20.39
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
T. P, %	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
Lys, %	0.00	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Met, %	0.00	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

나. 체중측정 및 시료 채취

체중측정은 시험개시와 시험사료 급여 2주 후 그리고 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 시험사료 급여 2주 후와 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 급이통 으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 분시료의 채취는 시험사료 급여 2주 후 각각의 돈방별로 채취하였다. 분시료는 채취 후 60℃의 열풍건조기에서 72시간 건조시켜 1mm 망사 Wiley mill로 분쇄 후 분석할 때까지 냉장 보관하였다.

소장내 용모의 이화학적 변화를 관찰하기 위하여 사양시험 개시전에 실험돈구에서 무작위로 4두를 도살하였으며, 시험사료 급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 1두(처리당 4두, 총 20두)씩 도살 후 개복하여 소장의 25%, 50%, 75% 부분을 적출하여 식염수로 세척 후 10% formalin 용액에 침지하여 주사현미경으로 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

회장 내용물은 3일간의 적응기간이 끝난 후 4일째 되는 날부터(3일간) 케놀라로부터 채취하여 -10℃의 냉동고에 즉시 보관하였다. 회장 내용물의 채취가 모두 끝난 후 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm망사 wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

면역특성을 분석하기 위하여 시험개시전 돈방구분 없이 4두의 자돈과 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각각 처리당 4두씩(총 20두) 경정맥으로부터 혈액을 채취하여 heparin 으로 항응고처리한 vial에 넣어 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

다. 실험적 측정 및 분석

1) 사양성적, 영양소 소화율 및 장의 형태학적 특성 분석

사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 그리고 사료효율(F/G)을 분석하였다. 사료와 분의 일반성분 분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 에너지는 단열폭발열량측정기(Model 1241, Parr Instrument Co., Molin, IL)로 측정하였으며, 크롬은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다.

Villus height와 crypt depth를 측정하기 위하여 10% formalin용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988).

회장 내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105℃에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유 아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

2) 혈액 및 면역특성 분석

가) 면역관련 세포, 혈액화학치 및 효소치 분석

면역관련세포 분석을 위한 혈액학적 검사는 자돈의 경정맥으로부터 채혈하여 얻은 혈액을 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 잘 보관한 다음 자동혈액 분석기(Hemacyte™, oxford science, INC. USA)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 호중구(NE), 임파구(LY), 단핵구(MO), 호산구(EO), 호염구(BA), 헤모글로빈(Hb), 헤마토크릿(HCT), 혈소판(PLT), 평균 적혈구용적(MCV), 평균 적혈구혈색소량(MCH), 평균 적혈구색농도(MCHC) 등 혈액기본치를 측정하였다. 아울러 혈청내 존재하는 효소중 중요한 알라닌 전이효소(ALT), 아스파티산 전이효소(AST), 알부민(ALB) 및 혈중 요소태질소(BUN)의 변화를 측정하여 대두단백의 변화에 따른 영향을 관찰하였다.

나) 다형핵 백혈구의 chemiluminescence 측정

자돈의 경정맥으로부터 heparin(10U/ml)이 포함된 vacutainer를 이용하여 혈액을 채취한 후 Double-density Percoll을 이용하여 상층으로부터는 다형핵 백혈구를 분리하고 하층의 mononuclear cell로부터는 monocyte를 분리하여 chemiluminescence 측정용 media인 pheno red가 함유되지 않은 1%의 BSA가 첨가된 RPMI-1640 배지에 각각 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 과 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 세포를 고정한 후 탐식능력의 변화에 따른 respiratory burst시 생성하는 reactive oxygen(RO)를 측정하기 위하여 luminol을 amplifier로 하여 사전에 5분간 O_2^- 의 발생을 증폭시켰으며 보체 C3b와 opsonization시킨 zymosan particle을 stimulator로 하여 40분간 Luminometer(Berthold LB-9505, Germany)를 이용하여 chemiluminescence를 측정하였다.

라. 통계적 분석

측정된 사양성적과 영양소 소화율 데이터는 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 최소유의차 검정을 실시하였고, 완전임의배치법으로 분석하였다. 측정된 혈액성분과 면역데이터들은 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 Duncan의 다중검정으로 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적 및 영양소 소화율

사양성적 분석결과 Table 3-2-3과 같다. 시험사료 급여기간(0~14일) 동안 SBM 처리구의 ADG는 가공 대두단백 처리구들에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며 SPC 처리구의

ADG는 다른 가공대두단백에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). ADFI에 있어 SPC와 HP300 처리구는 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), 발효대두단백 처리구(FSP-A와 FSP-B)는 SBM 처리구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 그리고 SPC 처리구는 다른 처리구에 비하여 F/G가 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$) 발효대두단백 처리구들의 F/G는 SBM 처리구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 일반 시판용 크럼블 사료급여기간(15~35일)에 있어서 가공대두단백 처리구는 SBM 처리구에 비하여 대체로 사양성적을 개선시키는 것으로 나타났다.

전체 사양기간에서 SBM 처리구의 ADG는 가공 대두단백 처리구들에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으며 ADFI는 FSP-A 처리구를 제외하고, 가공 대두단백 처리구들이 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). F/G는 FSP-B 처리구를 제외한 가공 대두단백 처리구들이 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 개선되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 발효대두단백 처리구간(FSP-A와 FSP-B)의 사양성적을 비교하여 보면, 유의적인 차이가 없었으나($p > 0.05$), 사료섭취량에 있어서는 FSP-B 처리구가 FSP-A 처리구보다 다소 높게 나타났다.

Table 3-2-3. Effects of soy proteins fermented by different microbes on growth performance in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B	SEM ¹
Day 0~14						
ADG, g	267 ^c	291 ^a	282 ^b	280 ^b	281 ^b	2.21
ADFI, g	430 ^c	446 ^{ab}	449 ^a	431 ^{bc}	443 ^{abc}	2.79
F/G	1.60 ^{ab}	1.53 ^c	1.57 ^b	1.60 ^a	1.61 ^a	0.01
Day 15~35						
ADG, g	430 ^c	477 ^a	461 ^{ab}	453 ^b	469 ^{ab}	4.69
ADFI, g	684 ^b	711 ^a	700 ^{ab}	685 ^b	704 ^a	3.56
F/G	1.56 ^a	1.49 ^b	1.52 ^{ab}	1.51 ^{ab}	1.53 ^{ab}	0.01
Day 0~35						
ADG, g	369 ^c	403 ^a	391 ^b	389 ^b	390 ^b	3.02
ADFI, g	582 ^b	605 ^a	599 ^a	584 ^b	599 ^a	2.71
F/G	1.58 ^a	1.50 ^c	1.53 ^{bc}	1.54 ^{bc}	1.55 ^{ab}	0.01

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

나. 영양소 소화율

일반 영양소 소화율 측정결과는 Table 3-2-4에 제시되어 있다. SPC와 FSP-B 처리구는 에너지와 건물 소화율에 있어 다른 처리구들에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), 단백질의 소화율은 SBM과 FSP-B 처리구가 다른 처리구들에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). SBM 처리구는 가공 대두단백 처리구보다 영양소 소화율에 있어 대체로 낮은 경향을 나타냈다.

FSP-A 처리구는 SPC 처리구에 비하여 대체로 낮은 영양소 소화율을 나타냈으나, HP300 처리구와는 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). FSP-B 처리구의 경우 HP300 처리구에 비하여 단백질 소화율을 제외하고, 거의 모든 영양소 소화율에서 유의적인 차이를 나타냈다($p < 0.05$). SBM과 FSP-A 처리구에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$).

FSP-A와 FSP-B 처리구를 비교하여 볼 때, FSP-B 처리구가 FSP-A 처리구에 비하여 에너지, 조단백질 그리고 인의 소화율이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 비록 FSP-A와 FSP-B 처리구간의 사양성적은 유의적인 차이는 없었지만($p > 0.05$), 영양소 소화율에 있어서는 수치적으로 다소 높게 나타났다.

Table 3-2-4. Effects of soy proteins fermented by different microbes on fecal digestibility of nutrients in early-weaned pigs (at day 14)

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B	SEM ¹
GE	79.10 ^c	82.57 ^a	80.79 ^b	78.90 ^c	82.52 ^a	0.46
DM	79.85 ^b	82.80 ^a	80.47 ^b	80.34 ^b	82.66 ^a	0.36
CP	66.72 ^b	73.85 ^a	71.49 ^a	68.20 ^b	73.49 ^a	0.84
EE	51.65 ^{ab}	58.58 ^{ab}	40.92 ^b	49.09 ^{ab}	62.24 ^a	2.98
Ash	50.10 ^{ab}	57.07 ^a	48.87 ^b	55.54 ^{ab}	56.35 ^a	1.25
Ca	43.44 ^b	50.21 ^a	45.91 ^b	45.50 ^b	52.41 ^a	0.95
P	44.01 ^{bc}	48.50 ^{ab}	40.84 ^c	51.61 ^a	47.87 ^{ab}	1.20

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

Table 3-2-5. Effects of soy proteins fermented by different microbes on apparent ileal digestibility of amino acids in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B	SEM ¹
Essential amino acids						
Arg	79.01 ^b	82.92 ^{ab}	85.62 ^a	87.15 ^a	84.40 ^{ab}	1.01
His	75.27 ^b	83.53 ^a	75.28 ^b	81.43 ^{ab}	82.74 ^a	1.26
Ile	70.99 ^b	81.62 ^a	79.96 ^a	79.97 ^a	79.33 ^a	1.12
Leu	77.59	85.95	83.87	82.16	83.14	1.26
Lys	78.91	85.87	77.28	82.57	84.10	1.34
Phe	80.40 ^{ac}	83.56 ^{ab}	85.99 ^a	82.34 ^{bc}	82.48 ^{bc}	0.60
Thr	65.41 ^b	75.22 ^a	78.36 ^a	74.24 ^a	78.45 ^a	1.42
Val	72.05 ^b	75.37 ^b	79.88 ^a	79.39 ^a	81.41 ^a	1.01
Met	75.06 ^b	77.64 ^b	75.26 ^b	76.92 ^b	83.49 ^a	2.80
Sub-mean	74.96 ^c	81.30 ^{ab}	77.72 ^{bc}	80.68 ^{ab}	82.17 ^a	0.88
Non-essential amino acids						
Ala	72.80 ^b	77.33 ^a	81.05 ^a	78.86 ^a	82.60 ^a	1.60
Asp	85.36	87.58	85.70	86.98	85.74	0.76
Cys	77.22	82.56	80.35	80.67	83.64	1.05
Glu	84.08 ^b	90.68 ^a	86.14 ^{ab}	89.42 ^a	83.59 ^b	0.98
Gly	60.22 ^c	69.93 ^{bc}	77.02 ^{ab}	77.39 ^{ab}	80.19 ^a	2.26
Pro	73.75 ^b	78.17 ^{ab}	86.61 ^a	86.43 ^a	74.19 ^b	1.93
Ser	79.01	82.89	84.24	81.67	80.56	0.85
Tyr	74.43	78.85	78.00	78.58	80.91	1.03
Sub-mean	75.36 ^b	81.00 ^a	82.39 ^a	82.50 ^a	81.43 ^a	0.98
Total	75.16 ^b	81.15 ^a	80.05 ^a	81.59 ^a	81.80 ^a	0.88

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

외관상 아미노산 회장소화율은 Table 3-2-5와 같다. 외관상 아미노산 회장소화율에 있어 SBM 처리구는 가공대두단백 처리구들보다 대체로 높게 나타나는 경향을 보였지만, 가공 대두단백 처리구들 간에는 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 가공 대두단백 처리구들은 SBM 처리구에 비하여 isoleucine, threonine 그리고 alanine의 외관상 회장

소화율이 유의적으로 높게 나타났으나($p<0.05$), leucine, lysine, aspartic acid, cystine는 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). FSP-A와 FSP-B 처리구의 외관상 아미노산 회장소화율을 비교하여 보면, methionine에 있어서는 FSP-B 처리구가 유의적으로 높게 나타났으며 glutamic acid와 proline에 있어서는 FSP-A가 유의적으로 높게 나타났다 ($p<0.05$).

Table 3-2-6. Effects of soy proteins fermented by different microbes on true ileal digestibility of amino acids in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B	SEM ¹
Essential amino acids						
Arg	85.61 ^b	88.91 ^{ab}	90.48 ^a	90.88 ^a	87.91 ^{ab}	0.75
His	81.14 ^b	88.59 ^a	82.33 ^b	83.84 ^b	84.57 ^{ab}	0.87
Ile	75.61 ^c	84.76 ^a	82.81 ^{ab}	81.36 ^{ab}	80.23 ^b	0.97
Leu	81.40 ^b	85.31 ^a	84.15 ^{ab}	85.65 ^a	84.18 ^{ab}	0.60
Lys	83.42 ^b	88.48 ^a	84.96 ^{ab}	86.13 ^{ab}	85.27 ^{ab}	0.71
Met	83.48	88.37	86.52	84.04	86.81	0.89
Phe	80.11 ^b	82.57 ^{ab}	86.62 ^a	79.61 ^b	81.41 ^b	0.78
Thr	80.30 ^c	86.43 ^a	84.28 ^{ab}	80.15 ^c	82.03 ^{bc}	0.85
Val	79.79 ^b	82.62 ^{ab}	86.20 ^a	84.27 ^{ab}	84.55 ^{ab}	0.97
Sub-mean	81.21 ^b	86.23 ^a	85.37 ^a	83.99 ^{ab}	84.11 ^{ab}	0.59
Non-essential amino acids						
Ala	76.56 ^b	83.19 ^{ab}	85.76 ^a	82.17 ^{ab}	85.60 ^a	1.27
Asp	87.37	89.19	86.95	87.30	86.07	0.71
Cys	82.03	86.55	84.82	82.34	84.67	1.12
Glu	86.79 ^{bc}	92.77 ^a	88.12 ^{ab}	90.51 ^{ab}	84.55 ^b	0.95
Gly	78.05 ^b	86.95 ^a	91.24 ^a	88.72 ^a	90.23 ^a	1.65
Pro	81.11 ^b	84.56 ^{ab}	91.19 ^a	90.29 ^a	79.37 ^b	1.66
Ser	87.82 ^{ab}	91.82 ^a	91.71 ^a	88.30 ^{ab}	86.03 ^b	0.84
Tyr	81.32	85.85	84.34	83.02	84.00	0.74
Sub-mean	82.63 ^b	87.61 ^a	88.02 ^a	86.58 ^{ab}	85.07 ^{ab}	0.77
Total	81.92 ^b	86.92 ^a	86.69 ^a	85.29 ^{ab}	84.59 ^{ab}	0.64

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p<0.05$).

¹ Pooled standard error means.

진정 아미노산 회장소화율은 Table 3-2-6에서 보는 바와 같다. SBM 처리구의 진정 아미노산 회장소화율은 대부분의 아미노산에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 ($p>0.05$), 가공대두단백 처리구들에 비하여 수치적으로 낮게 나타나는 경향을 보였다. 필수 아미노산 회장소화율은 SPC와 HP300 처리구가 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p<0.05$) 발효대두단백(FSP-A와 FSP-B) 처리구와는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 외관상 아미노산 소화율과는 달리 leucine과 lysine의 소화율에서 유의적인 차이가 관찰되었는데 SPC 처리구만이 SBM 처리구와 유의적인 차이를 나타내었다($p<0.05$). 또한 가공 대두단백 처리구들은 SBM 처리구에 비하여 isoleucine과 glycine의 진정 회장소화율에서 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 가공 대두단백 처리구간의 진정 아미노산 회장소화율은 처리구간에 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 두 발효대두단백 처리구(FSP-A와 FSP-B)의 진정 아미노산 회장소화율을 비교하여 보면, FSP-A 처리구의 proline을 제외하고, 대부분의 아미노산에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다($p>0.05$).

다. 장의 형태학적 발달

회장의 용모 높이와 융와 깊이를 측정된 결과는 Table 3-2-7과 같다. 용모 높이는 각 처리구간에 유의적으로나 수치적으로도 차이가 없었으며, 융와 깊이는 이전의 결과와는 달리 SBM과 SPC 처리구가 다른 처리구들에 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 수치적으로 다소 높게 나타났다. 또한, SBM과 SPC 처리구의 용모 높이:융와 깊이 비율도 낮게 나타나 용모 높이에 비하여 상대적으로 융와 깊이가 깊은 것으로 관찰되었다. 그러나 이전의 결과와 마찬가지로 유의적인 차이가 나타나지는 않았다($p>0.05$).

Table 3-2-7. Effect of soy proteins fermented by different microbes on ileal villus height, crypt depth and villus height : crypt depth ratio of the early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B	SEM ¹
Villus height, μm	310	312	314	311	315	4.32
Crypt depth, μm	221	222	215	215	217	2.45
Villus height : Crypt depth	1.41	1.40	1.46	1.44	1.45	0.02

¹ Pooled standard error means.

라. 면역반응

1) 면역관련 세포, 혈액 생화학치 및 효소치

각 처리구별 혈중 백혈구의 측정결과는 Table 3-2-8과 같다. 시험개시시 혈중의 총 백혈구 수의 각 대두제품간의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았고, 아울러 호중구, 림파구, 단핵구, 호산구의 수에 있어서도 유의성 있는 변화를 찾아 볼 수 없었다($p>0.05$). 특히, 본 실험에서 관심을 갖는 호염기성세포 즉, basophil의 출현은 전 대두제품 투여군에서 전혀 관찰되지 않았다.

또한, 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각 처리구별로 측정된 혈중의 총 백혈구 수도 각 대두단백 처리간에 유의적인 차이가 없었으며 아울러 호중구, 림파구, 단핵구, 호산구의 수에 있어서도 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었다($p>0.05$). 그리고 본 연구에서 관심을 갖는 발효대두단백에 대한 알러지 반응에 의하여 출현될 수 있는 호염기성세포 즉, basophil의 출현은 전혀 관찰되지 않았다. 발효대두단백을 비롯한 각 대두단백의 경우 자돈에서 특별한 알러지반응을 일으키지 않는 것으로 나타났다.

혈중 적혈구계와 혈소판계 수치를 분석한 결과는 Table 3-1-9와 같다. 시험개시시 혈중 적혈구와 혈소판은 각 대두단백 제품간에 유의적인 차이가 없었으며 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시의 수치에 있어서도 유의적인 차이가 없는 것으로 측정되었다($p>0.05$).

2) 호중구의 chemiluminescence

자돈 사료내 발효대두단백의 첨가에 따른 자돈의 다형핵 백혈구(polymorphonuclear granulocytes)인 호중구 및 basophil의 면역 반응에 의하여 발현되는 chemiluminescence에 미치는 영향을 분석한 결과 Table 3-1-10과 같다. 시험개시시 SBM을 기준으로 하여 비교하며 보면 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 모두 각각의 가공 대두단백 처리구간의 유의성 있는 변화나 특이한 영향은 관찰되지 않았다($p>0.05$).

4. 요약

장내 형태학적 발달과 면역에 관여하는 혈중 백혈구, 적혈구 그리고 혈소판의 수치는 각 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만($p>0.05$), 가공 대두단백 원료의 사용은 대두박을 사용한 처리구에 비하여 사양성적이 향상되는 것으로 나타났으며 영양소 소화율을 개선시키는 경향을 보였다. FSP-A 처리구는 SBM 처리구와 많은 분석결과에서 유사하게 나타난 반면 FSP-B 처리구를 비롯한 가공 대두단백들은 SBM 처리구보다 좋은 결과를 나타내었다. 이는 아마도 FSP-A 처리구의 경우 단백질 함량(53%로 분석됨)이 상대적으로 다

른 가공 대두단백질 원료들에 비하여 낮았고, 각각의 대두단백 원료간 품질의 차이가 있는 만큼 상대적으로 다른 가공 대두단백질에 비하여 탈피 대두박과 큰 차이가 없었고, 시험사료내 전체 대두단백 원료의 사용량이 8%로 영향을 줄 만한 사용수준이 아니었을 수도 있다.

Table 3-2-8. Effects of soy proteins fermented by different microbes on the immune cell population in early-weaned pigs

Items	Leukocytes ¹				
	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B
Initial					
WBC, k/ $\mu\ell$	13.78±3.34 ^{NS)}	13.24±4.35	13.41±3.86	12.82±1.09	13.64±1.83
NE, k/ $\mu\ell$	3.81±0.68 ^{NS)}	3.70±0.96	3.85±0.45	3.42±0.49	3.84±1.00
LY, k/ $\mu\ell$	6.15±1.09 ^{NS)}	6.05±0.77	5.97±0.79	5.91±0.96	6.00±1.11
MO, k/ $\mu\ell$	2.80±0.55 ^{NS)}	3.07±0.77	2.37±1.19	2.93±1.01	2.77±1.28
EO, k/ $\mu\ell$	0.31±0.09 ^{NS)}	0.29±0.08	0.27±0.08	0.29±0.09	0.33±0.06
BA, k/ $\mu\ell$	0.03±0.01 ^{NS)}	0.03±0.01	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.02
After day 14					
WBC, k/ $\mu\ell$	13.99±1.51 ^{NS)}	14.19±2.64	13.65±1.93	14.10±2.24	14.46±1.45
NE, k/ $\mu\ell$	6.03±1.53 ^{NS)}	6.01±1.58	6.53±1.40	6.52±1.85	6.04±2.03
LY, k/ $\mu\ell$	5.52±1.12 ^{NS)}	6.04±1.88	5.80±0.78	5.36±1.12	5.63±1.43
MO, k/ $\mu\ell$	2.15±0.76 ^{NS)}	2.44±0.51	2.28±1.33	1.99±0.48	2.13±0.45
EO, k/ $\mu\ell$	0.32±0.06 ^{NS)}	0.32±0.10	0.32±0.20	0.35±0.14	0.40±0.31
BA, k/ $\mu\ell$	0.04±0.02 ^{NS)}	0.05±0.02	0.05±0.04	0.06±0.04	0.05±0.02
After day 35					
WBC, k/ $\mu\ell$	11.32±2.71 ^{NS)}	11.61±1.84	11.06±0.86	11.62±5.87	11.77±3.24
NE, k/ $\mu\ell$	4.25±1.02 ^{NS)}	4.63±0.87	4.46±1.72	4.60±1.85	4.43±1.46
LY, k/ $\mu\ell$	5.75±1.15 ^{NS)}	5.82±1.21	5.51±1.50	5.57±2.09	5.36±0.85
MO, k/ $\mu\ell$	2.01±0.43 ^{NS)}	1.99±0.55	1.93±0.35	2.12±0.23	1.96±0.37
EO, k/ $\mu\ell$	0.29±0.15 ^{NS)}	0.30±0.06	0.34±0.10	0.33±0.19	0.36±0.05
BA, k/ $\mu\ell$	0.06±0.04 ^{NS)}	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02

¹ Values are mean ± S.D., N=6.

^{NS)} Values within the row are not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3-2-9. Effect of soy proteins fermented by different microbes on hematological values in early-weaned pigs

Items	Erythrocytes and Thrombocyte				
	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B
Initial					
RBC, M/ $\mu\ell$	6.08±0.47 ^{NS)}	5.60±1.14	5.75±0.65	5.98±0.72	6.32±0.71
Hb, M/dL	10.47±1.24 ^{NS)}	10.60±2.14	10.88±1.23	10.99±1.38	11.40±0.74
HCT, %	37.42±4.70 ^{NS)}	37.85±8.15	38.98±3.56	38.69±5.01	39.95±5.83
MCV, fL	56.48±4.60 ^{NS)}	57.84±6.00	57.70±5.28	58.02±3.96	57.68±5.21
MCH, pg	16.18±1.21 ^{NS)}	16.99±1.79	16.52±1.17	16.62±0.86	16.63±1.37
MCHC, g/dL	28.75±2.21 ^{NS)}	28.97±2.05	29.01±2.21	28.77±0.99	28.91±1.60
RDW, %	22.16±1.76 ^{NS)}	20.40±1.15	21.72±2.91	21.17±1.49	21.29±2.20
PLT, k/ $\mu\ell$	340±72 ^{NS)}	326±59	337±81	336±42	348±42
MPV, fL	11.83±1.89 ^{NS)}	12.23±3.17	11.78±1.37	12.62±2.35	11.52±1.36
After day 14					
RBC, M/ $\mu\ell$	6.10±0.86 ^{NS)}	5.71±0.77	5.76±0.87	6.41±0.63	6.57±0.86
Hb, M/dL	11.52±1.24 ^{NS)}	11.18±1.59	10.47±2.30	10.98±1.13	11.78±1.70
HCT, %	36.9±4.52 ^{NS)}	36.23±4.94	35.2±6.46	37.48±2.32	37.38±3.25
MCV, fL	60.68±3.04 ^{NS)}	63.50±2.68	60.82±2.45	61.17±5.99	62.20±5.21
MCH, pg	19.05±1.97 ^{NS)}	19.65±1.90	18.05±1.83	17.25±2.29	17.98±1.71
MCHC, g/dL	29.63±5.21 ^{NS)}	30.88±1.91	29.67±2.75	28.22±2.28	28.93±1.60
RDW, %	21.32±1.23 ^{NS)}	21.35±1.62	21.27±1.88	21.00±1.08	21.47±1.41
PLT, k/ $\mu\ell$	340±37 ^{NS)}	345±39	343±31	350±87	338±68
MPV, fL	11.30±1.87 ^{NS)}	11.53±1.87	12.22±0.78	13.03±1.93	12.27±0.92
After day 35					
RBC, M/ $\mu\ell$	5.97±1.35 ^{NS)}	5.70±0.66	6.09±1.45	6.14±0.98	5.92±1.36
Hb, M/dL	9.62±1.35 ^{NS)}	9.33±1.15	8.95±1.12	9.13±1.76	9.45±1.54
HCT, %	34.47±2.56 ^{NS)}	32.40±4.92	34.82±4.15	34.03±6.02	33.95±6.51
MCV, fL	53.52±2.39 ^{NS)}	55.68±3.47	53.17±3.47	54.35±4.92	55.50±3.32
MCH, pg	16.27±1.35 ^{NS)}	16.02±1.80	16.17±2.72	16.20±4.14	15.80±4.28
MCHC, g/dL	27.8±4.80 ^{NS)}	28.3±2.90	27.05±4.12	28.38±7.15	28.28±6.51
RDW, %	25.75±5.38 ^{NS)}	26.10±3.34	28.05±5.33	28.63±4.98	27.28±6.35
PLT, k/ $\mu\ell$	324±74 ^{NS)}	329±76	338±87	339±199	324±99
MPV, fL	10.52±0.77 ^{NS)}	11.95±3.68	10.35±1.67	11.03±1.14	10.33±0.94

Table 3-2-10. Effect of soy proteins fermented by different microbes on the polymorphonuclear granulocytes (%) induced chemiluminescence in early-weaned pigs

Item	SBM	SPC	HP300	FSP-A	FSP-B
Initial	100*	99.6 ± 3.7	103.9 ± 7.9	110.2 ± 9.2	108.1 ± 8.3
After day 14	108.2 ± 8.5	104.9 ± 9.3	105.3 ± 3.2	99.2± 6.7	105.2 ± 7.1
After day 35	105.8 ± 11.3	98.9 ± 5.3	100.8 ± 7.6	103.2 ± 5.0	100.6 ± 6.2

1) Values are means ± S.D., n=3.

2) * 100% = 5.174 ± 10^9 cpm.

제 3 절 세부과제: 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 및 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구

1. 서 론

어린 자돈사료에는 유제품(전지분유, 탈지분유 그리고 유장분말)이나 분무건조혈장단백(SDPP)과 같은 동물성 단백질 원료 그리고 정제대두단백(ISP)과 농축대두단백(SPC)과 같은 식물성 단백질 원료를 사용한다. 유제품들은 자돈의 소화생리에 가장 적합하고, 유당을 함유하고 있어 가장 많이 사용하고 있으며 SDPP와 같은 동물체로부터 유래된 동물성 단백질은 단백질 함량이 높고 아미노산 조성도 우수하여 많이 사용하고 있으나, 식물성 단백질 원료에 비하여 비교적 고가이고 최근의 광우병과 같은 인간에게 치명적인 질병으로 인하여 사용이 제한되고 있어 SPC와 같은 대두단백제품들로 주로 대체되고 있다.

기존의 대두단백질 가공방법은 비단백질 성분을 제거하기 위하여 여러 복잡한 공정을 사용하여 생산단가가 매우 높아 저렴한 가격으로 공급되지 못하고 있다. 본 실험에 사용된 발효대두단백은 수입 가공대두단백에 비하여 가격이 저렴하고, 일반 대두단백에 비하여 단백질 함량이 높아 자돈사료에 적당할 것으로 사료된다. 하지만, 발효대두단백이 자돈사료에 사용하기 적당하다고 하더라도 품질과 가격면을 고려하여 볼 때 사용수준에 따라 경제적이지 않을 수도 있다. 본 실험은 고단백 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 그리고 면역반응에 미치는 영향을 조사함으로써 적절한 사용수준을 검토하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 공시동물, 시험설계 및 사료

사양시험을 위해 이유자돈(L×Y×D, 22±3일령; 5.16±0.90kg) 240두를 공시하여(4처리, 4반복, 반복당 15두) 2주(0~14일)와 3~5주(15~35일)로 총 5주(35일)간 사양시험을 실시하였다. 자돈은 성별과 체중에 따라 각각의 처리구에 완전임의 배치하였다.

시험사료는 옥수수과 WP 위주의 사료로서 SBM(12, 9, 6, 그리고 3%)을 FSP-B(*A. oryzae*와 *B. subtilis* 복합균주에 의한 발효대두단백)로 각각 0, 3, 6, 그리고 9% 대체하였으

며, SBM(48%)과 FSP-B(58%)의 단백질 함량 차이로 인하여 나타나는 시험사료내 단백질 함량 차이는 어분과 합성아미노산을 사용하여 같은 수준을 유지하도록 하였다(Table 3-3-1). 시험사료는 3,300kcal/kg ME, 21.0% CP, 24.7% lactose, 1.55% lysine, 0.80% Ca 그리고 0.40% Av. P를 함유하였으며, lysine을 기준으로 methionine+cystine과 threonine의 수준은 각각 55와 59%를 유지하도록 배합하였다. 그리고 비타민과 광물질은 NRC(1998) 요구량을 충족하거나 초과하도록 하였다. 영양소 소화율을 측정하기 위하여 산화크롬(Cr_2O_3)을 불소화지시제로 첨가하였다.

자돈들에게 포유기간 동안 처리구 구분없이 일반 시판용 대용유를 급여하였으며, 이유 후 0~14일 까지 시험사료를 급여한 후, 이유후 15~35일 까지 모든 처리구에 일반 시판용 크럼블 사료를 급여하였다. 자돈은 바닥의 절반이 슬랫인 돈방(1.9m×2.54m)에서 사육하였으며, 팬을 이용하여 강제환기시켰다. 사료와 물은 자유채식 시켰고, 첨가제나 약품은 일절 사용하지 않았다. 기타 자돈의 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

나. 체중 측정 및 시료 채취

체중 측정은 시험개시와 시험사료 급여 2주 후 그리고 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 시험사료 급여 2주 후와 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 급이통으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 분시료의 채취는 시험사료 급여 2주 후 각각의 돈방별로 채취하였다. 분시료는 채취 후 60℃의 열풍건조기에서 72시간 건조시켜 1mm 망사 Wiley mill로 분쇄 후 분석할 때까지 냉장 보관하였다.

소장내 용모의 높이(villus height)와 용와 깊이(crypt depth)를 측정하기 위하여 시험사료급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 1두(처리당 4두, 총 16두)씩 도살 후 개복하여 맹장과 회장 연결부위로부터 약 15cm의 상단부위를 적출하여 식염수로 세척 후 10% formalin용액에 침지하여 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

회장 내용물은 시험사료 급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 처리당 4두씩 총 16두를 도살하여 개복후 소장하단의 약 25%부위에서 소장내용물을 채취하여 -10℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm망사 wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

면역특성을 분석하기 위하여 시험개시전 돈방구분 없이 4두의 자돈과 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각각 처리당 4두씩(총 16두) 경정맥으로부터 혈액을 채취하여 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

Table 3-3-1. Formula and calculated compositions of experimental diets for feeding trialsn (day 0~14)

	Control	FSP-B level, %		
		3	6	9
Ingredients, %				
Whey powder	38.00	38.00	38.00	38.00
Corn	30.38	30.90	31.15	31.35
SDPP	4.00	4.00	4.00	4.00
Biscuit byproduct	4.00	4.00	4.00	4.00
Deh-SBM (48%)	15.00	12.00	9.00	6.00
FSP-B	0.00	3.00	6.00	9.00
Fish meal	3.81	3.18	2.87	2.64
Animal Fat	2.00	2.00	2.00	2.00
L-Lysine (78%)	0.32	0.34	0.34	0.34
DL-Methionine (100%)	0.13	0.15	0.15	0.16
Limestone	0.75	0.84	0.89	0.92
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamin premix ¹	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
Apramycin	0.15	0.15	0.15	0.15
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10
Sulfathiazol	0.10	0.10	0.10	0.10
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20
ZnO	0.25	0.25	0.25	0.25
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition				
ME, kcal/kg	3,306	3,306	3,306	3,305
CP, %	21.00	21.00	21.16	21.35
Lactose, %	24.70	24.70	24.70	24.70
Ca, %	0.82	0.82	0.82	0.82
Av. P, %	0.41	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.55	1.55	1.55	1.55
Met+Cys, %	0.85	0.85	0.85	0.85
Thr, %	0.91	0.91	0.92	0.93

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18 mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

다. 실험적 측정 및 분석

1) 사양성적, 영양소 소화율 및 장의 형태학적 특성 분석

사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 그리고 사료효율(F/G)을 분석하였다. 사료와 분의 일반성분 분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 에너지는 단열폭발열량측정기(Model 1241, Parr Instrument Co., Molin, IL)로 측정하였으며, 크롬은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다.

Villus height와 crypt depth를 측정하기 위하여 10% formalin용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988). Morphology를 측정하기 위하여 회장의 시료크기를 2mm²로 하여 절단하였으며 절단된 시료를 0.4 M KCl 용액에 세척하여 내용물을 완전히 제거한 후 고정액(0.1 M collidine buffer, pH7.3; 3% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 1.5% acrolein)에 보존하였다. 보존된 시료는 Liepens와 DeHaven(1978)의 방법에 따라 ethanol-preon series로 가수분해 시킨 후 platinum coating 처리하여 ISI scanning electron microscope (Hitachi S-3500N, JAPAN)에 의해 측정하였다.

회장 내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105 $^{\circ}$ C에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유 아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

2) 혈액 및 면역특성 분석

가) 면역관련 세포, 혈액화학치 및 효소치 분석

면역관련세포 분석을 위한 혈액학적 검사는 자돈의 경정맥으로부터 채혈하여 얻은 혈액을 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 잘 보관한 다음 자동혈액 분석기(HemacyteTM, oxford science, INC. USA)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC) 호중구(NE), 임파구(LY), 단핵구(MO), 호산구(EO), 호염구(BA), 헤모글로빈(Hb), 헤마토크릿(HCT), 혈소판(PLT), 평균 적혈구용적(MCV), 평균 적혈구혈색소량(MCH), 평균 적혈구색농도(MCHC) 등 혈액기본치를 측정하였다. 아울러 혈청내 존재하는 효소중 중요한 알라닌 전이효소(ALT), 아스파티산 전이효소(AST), 알부민(ALB) 및 혈중 요소태질소(BUN)의 변화를 측정하여 대두단백의 변화에 따른 영향을 관찰하였다.

나) 다형핵 백혈구의 chemiluminescence 측정

자돈의 경정맥으로부터 heparin(10U/ml)이 포함된 vacutainer를 이용하여 혈액을 채취한 후 Double-density Percoll을 이용하여 상층으로부터는 다형핵 백혈구를 분리하고 하층의 mononuclear cell로부터는 monocyte를 분리하여 chemiluminescence 측정용 media인

pheno red가 함유되지 않은 1%의 BSA가 첨가된 RPMI-1640 배지에 각각 $1 \times 10^6/ml$ 과 $5 \times 10^5/ml$ 로 세포를 고정한 후 탐식능력의 변화에 따른 respiratory burst시 생성하는 reactive oxygen(RO)를 측정하기 위하여 luminol을 amplifier로 하여 사전에 5분간 O_2^- 의 발생을 증폭시켰으며 보체 C3b와 opsonization시킨 zymosan particle을 stimulator로 하여 40분간 Luminometer(Berthold LB-9505, Germany)를 이용하여 chemiluminescence를 측정하였다.

다) 혈청내 대두 단백질에 대한 IgG 역가 측정

혈청내 대두 단백질에 대한 IgG 역가 측정은 Li 등의 방법에 의하여 다음과 같이 수행하였다. ① 96-well microtiter plate를 carbonate-bicarbonate buffer(0.05M, pH 9.6)로 희석한 순수한 soy bean ($50\mu g/ml$)으로 $1ml/well$ 로 1시간 coating 한 후 PBS-1% Tween 20(pH 7.4)로 3회 세척하였다. ② 그리고 coating 되지 않은 부분은 3% PBS-bovine serum albumin을 $100\mu l$ 씩 분주한 후 $37^\circ C$ 배양기에서 1시간 감작시키고 PBS-1% Tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. ③ 혈청을 PBS-Tween 20으로 2배 단계희석하여 각 well에 $100\mu l$ 씩 분주하고 $37^\circ C$ 배양기에 1시간 감작시킨 후 PBS-1% Tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. ④ 효소 표시 항체(horse radish peroxidase- labeled anti-porcine igG(dilution 1: 3,000, $1ml/well$))을 3% BSA에 희석한 후 각 well에 $100\mu l$ 씩 분주하고 $37^\circ C$ 배양기에 1시간 감작시킨 후 PBS-1% Tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. ⑤ 0.05% ortho-penylenediamine(OPD)과 0.006% H_2O_2 가 함유 되도록 제조한 0.1M phosphate-citrate buffer (ph 5.0)를 각 well에 가하고 암실에 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 2.5M H_2SO_4 를 각 well에 $50\mu l$ 씩 넣은 후 반응을 중지시켰다. ⑥ ELISA reader(Molecular divices)를 사용하여 492nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

라) ELISA 기법을 이용한 유리된 히스타민의 측정

혈청을 micro tube에 넣고 각각의 시료를 첨가하여 30분 동안 $37^\circ C$ 항온수조에서 배양시킨 다음, $800 \times g$ 로 5분간 원침시켜 얻은 상층액에서 히스타민을 정량하였다. 대두 단백질처리군의 혈청에 각 시료대신에 Ca^{++} -Locke 용액을 첨가한 군을 정상대조군으로 간주하였다. 히스타민 측정은 Song등의 방법을 변형, 보완하여 다음과 같이 정량하였다. 즉, 반응액 $500\mu l$ 를 $4^\circ C$ 에서 $800 \times g$ 로 5분간 원심분리하여 상층액 $400\mu l$ 를 첨가하여 약 20초간 혼합한 후 n-butanol $1ml$ 를 첨가하여 3분간 혼합시킨 뒤 $800 \times g$ 로 5분간 원심분리하였다. 피펫으로 하층액 $750\mu l$ 정도를 제거한 뒤 salt-saturated 0.1N-NaOH $500\mu l$ 를 첨가하고 1분 동안 혼합하여 $800 \times g$ 로 5분간 원심 분리하였다. 상층액 $800\mu l$ 를 얻어 0.1N-KCl $450\mu l$ 와 n-Heptane $1.5ml$ 를 혼합하여 1분간 반응시킨 뒤 $800 \times g$ 로 5분간 원침시켜 하층액 $400\mu l$ 를 얻어 0.1N-HCl $1.6ml$ 를 첨가하였다. 1N-NaOH $400\mu l$ 를 재첨가하여 혼합한 뒤 1% o-phthalaldehyde(o-PT) $100\mu l$ 를 부과하여 냉수조에서 4분간 반응시킨 다음 3N-HCl $200\mu l$

를 혼합하여 Shore등의 방법에 의하여 spectrofluorometer(Berthold, Germany)로 438nm (excitation at 353nm)에서 측정하여 히스타민을 정량하였다. 모든 유리 히스타민량은 아래의 공식에 의하여 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였다.

$$\text{유리 히스타민량 (\%)} = \{(\text{대두단백 투여군의 유리 히스타민량} - \text{각 시험군의 유리 히스타민량}) / \text{대두단백 투여군의 유리 히스타민량}\} \times 100.$$

라. 통계적 분석

측정된 사양성적과 영양소 소화율 데이터는 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 최소유의차 검정을 실시하였고 완전임의배치법으로 분석하였다. 발효대두단백의 적정 사용수준을 예측하기 위하여 linear effect와 quadratic effect에 대해 분석하였다. 측정된 혈액성분과 면역데이터들은 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 Duncan의 다중검정으로 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적

사양성적은 Table 3-3-2에서 보는 바와 같다. 시험사료 급여 2주(0~14일)동안 발효대두단백을 첨가한 처리구는 탈피 대두박을 첨가한 대조구에 비하여 ADG가 유의적으로 높게 나타났으며, ADFI는 3% 첨가한 처리구를 제외하고 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 또한, F/G는 ADFI와 마찬가지로 발효대두단백 6%와 9%첨가구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05). 발효대두단백의 사용수준에 따라 사양성적에 linear effects가 나타났으나(p<0.05), quadratic effects는 나타나지 않았다(p>0.05).

일반 시판용 크럼블 사료를 급여한 3주(15~35일)동안 사양성적은 시험사료 급여 2주간의 사양성적과 유사한 결과를 나타냈다. 발효대두단백 3% 첨가구의 사양성적은 탈피 대두박만을 사용한 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았으나(p>0.05), 6%와 9% 첨가구는 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 또한, 사용수준에 따른 linear effects가 있는 것으로 나타났다(p<0.05). 이는 처음 2주 동안의 사양성적의 향상이 이후 3주 동안의 사양성적에 영향을 미치고 있으며 사용수준이 증가함에 따라 성장능력의 개선효과가 있음을 나타내고 있다.

전체 시험기간의 사양성적을 살펴보면, 발효대두단백 첨가구의 ADG와 ADFI는 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며(p<0.05), F/G는 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05). 또한, 이전의 사양단계와 마찬가지로 linear effects는 나타났으나 quadratic effects는 나타나

지 않았다($p>0.05$). 발효대두단백 6%와 9% 첨가구간에는 전 기간 내내 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 따라서 발효대두단백을 6%이상 사용할 경우 사양성적을 유의적으로 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 시험사료 2주 동안 ADG에 linear effects가 고도의 유의성이 있는 것으로 나타나($p<0.001$) 초기 이유자돈의 성장능력을 상당히 개선시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3-3-2. Effect of level of fermented soy protein on growth performance in early-weaned pigs

Item	Control	Level, %			SEM ¹	Probability(P<) ²	
		3	6	9		L	Q
Day 0~14							
ADG, g	262 ^c	274 ^b	286 ^a	286 ^a	3.35	*** ³	NS ⁴
ADFI, g	394 ^b	406 ^{ab}	414 ^a	412 ^a	3.19	*	NS
F/G	1.51 ^a	1.48 ^{ab}	1.45 ^{bc}	1.44 ^c	0.01	**	NS
Day 15~35							
ADG, g	407 ^b	421 ^{ab}	430 ^a	434 ^a	3.89	**	NS
ADFI, g	631 ^b	638 ^{ab}	649 ^a	653 ^a	3.40	*	NS
F/G	1.55 ^a	1.52 ^{ab}	1.51 ^b	1.50 ^b	0.01	*	NS
Day 0~35							
ADG, g	349 ^c	362 ^b	372 ^a	375 ^a	3.29	***	NS
ADFI, g	537 ^c	545 ^b	555 ^a	557 ^a	2.58	***	NS
F/G	1.54 ^a	1.50 ^b	1.49 ^b	1.48 ^b	0.01	*	NS

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p<0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² L : linear effects; Q : quadratic effects.

³ * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

⁴ Not significant($p>0.05$).

발효대두단백의 사용수준 증가에 따른 사양성적의 개선효과를 좀 더 알아보기 위하여 Figure 3-3-1과 같이 표현하였다. 그림에서 보는 바와 같이 시험사료 급여기간과 전체 시험기간에서 ADG와 ADFI는 6% 첨가시 일직선상으로 증가하다가 이후 다소 감소하거나 완만

이 증가하는 것으로 나타났다.

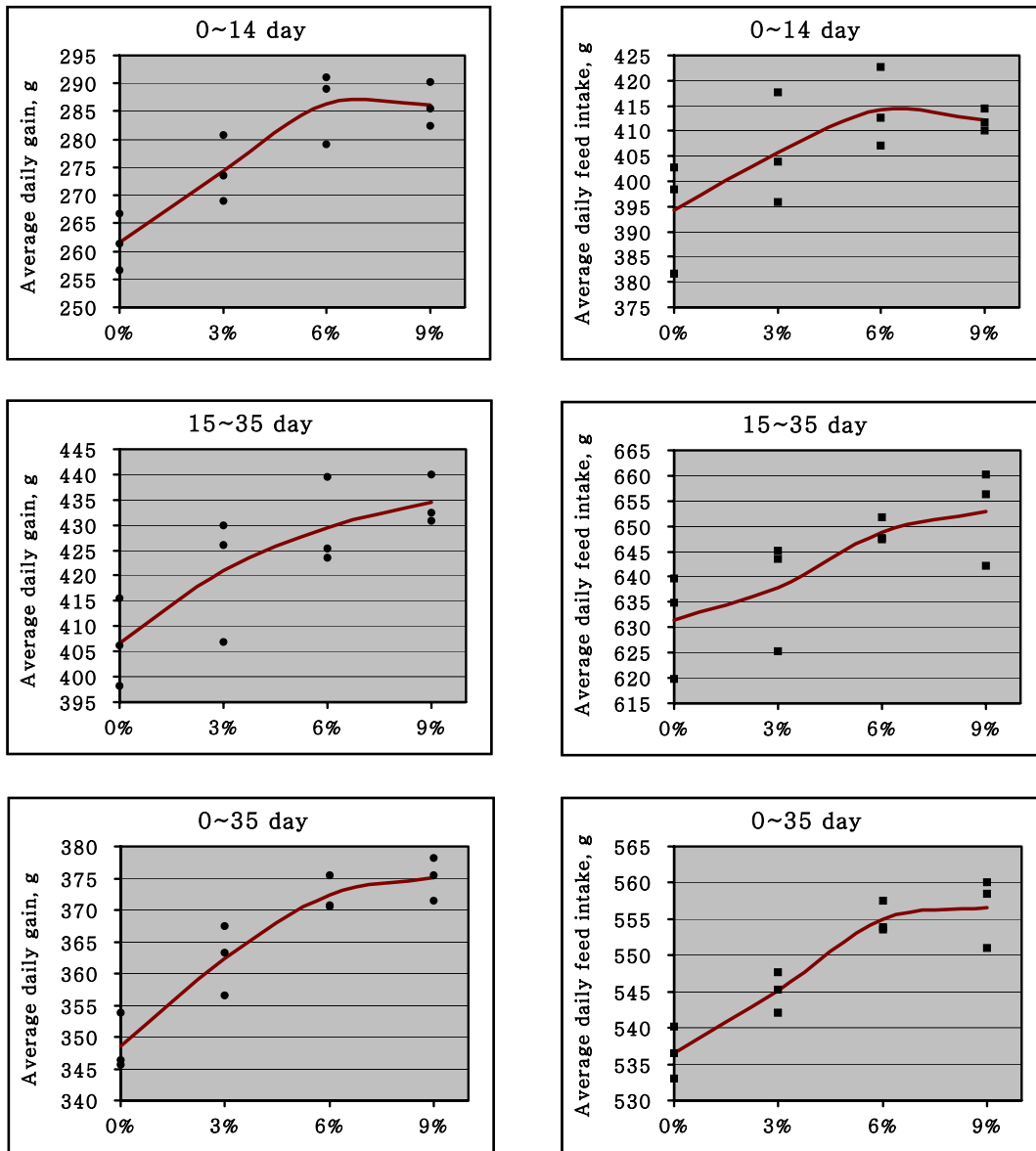


Figure 3-3-1. Effect of level of fermented soy protein on growth performance in early-weaned pigs.

나. 영양소 소화율

발효대두단백 사용수준에 따른 영양소 소화율은 Table 3-3-3과 같다. 에너지, 단백질 그리고 지방 등 거의 모든 영양소 소화율에 있어서 대조구에 비하여 발효대두단백 첨가구들이 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), 발효대두단백 첨가구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 사양성적은 발효대두단백 3%와 9% 첨가구간에 유의적인 차이가 대부분 나타났으나 영양소 소화율은 상대적으로 유의적인 차이가 적게 나타났다. 사양성적과 마찬가지로 거의 모든 영양소 소화율에서 발효대두단백 사용수준에 따라 linear effects가 나타났으며($p < 0.05$), quadratic effects는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

Table 3-3-3. Effect of level of fermented soy protein on fecal digestibility of nutrients in early-weaned pigs (at day 14)

Item	Control	Level, %			SEM ¹	Probability(P<) ²	
		3	6	9		L	Q
DM	82.14 ^b	83.84 ^a	83.76 ^a	84.33 ^a	0.29	** ³	*NS ⁴
GE	82.05 ^b	83.49 ^a	83.92 ^a	84.30 ^a	0.31	**	NS
CP	73.75 ^c	77.31 ^b	78.68 ^{ab}	80.84 ^a	0.86	***	NS
EE	63.09 ^b	66.66 ^a	68.40 ^a	67.35 ^a	0.70	**	*
Ash	54.18 ^b	57.73 ^a	58.22 ^a	59.14 ^a	0.67	**	NS
Ca	56.93 ^b	56.45 ^b	57.83 ^{ab}	58.52 ^a	0.31	*	NS
P	48.73 ^b	53.43 ^a	50.86 ^b	49.77 ^b	0.60	NS	**

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² L : linear effects; Q : quadratic effects.

³ * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

⁴ Not significant($p > 0.05$).

시험사료의 아미노산 회장소화율은 Table 3-3-4와 같다. 필수 아미노산의 회장소화율에 있어 발효대두단백 6%와 9% 첨가구는 대조구에 비하여 대부분 유의적으로 높게 나타났으며, 비필수 아미노산의 경우도 몇몇 아미노산을 제외하고 유의적으로 높게 나타났다

($p < 0.05$). 그러나 발효대두단백 3% 처리구의 필수 및 비필수 아미노산 회장소화율은 대조구에 비하여 대부분 유의적인 차이가 없었으며, 발효대두단백 처리구간의 아미노산 소화율에 있어서도 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$).

Table 3-3-4. Effect of level of fermented soy protein on apparent ileal digestibility of amino acids in early-weaned pigs

Item	Control	Level, %			SEM ¹
		3	6	9	
Essential Amino Acids					
Arg	77.20 ^b	81.30 ^{ab}	83.09 ^a	84.38 ^a	1.00
His	66.88 ^c	70.64 ^{bc}	76.97 ^a	73.78 ^{ab}	1.30
Ile	72.77 ^b	75.90 ^{ab}	79.00 ^a	78.62 ^a	0.95
Leu	73.76 ^c	77.39 ^b	80.24 ^{ab}	81.23 ^a	0.98
Lys	70.47 ^b	73.78 ^{ab}	77.30 ^a	75.27 ^{ab}	1.02
Met	74.04 ^b	76.84 ^{ab}	79.37 ^a	78.84 ^a	0.76
Phe	74.27 ^b	75.57 ^{ab}	79.47 ^a	76.73 ^{ab}	0.79
Thr	65.55 ^b	68.87 ^{ab}	73.23 ^a	69.88 ^{ab}	1.08
Val	72.67 ^b	75.55 ^{ab}	78.12 ^a	78.99 ^a	0.97
Sub-mean	71.96 ^b	75.09 ^{ab}	78.53 ^a	77.52 ^a	0.90
Non-essential Amino Acids					
Ala	70.62 ^c	72.65 ^{bc}	78.04 ^{ab}	76.77 ^a	1.13
Asp	71.93	74.84	76.74	75.47	0.96
Cys	55.69 ^c	58.81 ^{bc}	63.63 ^{ab}	65.73 ^a	1.38
Glu	75.87 ^b	78.68 ^{ab}	79.42 ^{ab}	81.24 ^a	0.81
Gly	59.02 ^b	62.98 ^{ab}	65.41 ^a	63.92 ^{ab}	1.37
Ser	73.67	74.31	78.13	77.69	0.98
Sub-mean	67.80 ^b	70.38 ^{ab}	73.56 ^a	73.47 ^a	0.97
Total	69.88 ^b	72.74 ^{ab}	76.05 ^a	75.50 ^a	0.93

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

다. 장의 형태학적 발달

회장의 용모 높이와 융와 깊이를 측정된 결과는 Table 3-3-5와 같다. 용모 높이는 각 처리구간에 유의적인 차이가 없었으나($p>0.05$), 수치적으로 약간의 차이가 있었으며 융와 깊이 또한 유의적인 차이가 없었으나 수치적으로는 약간의 차이가 나타났다. 발효대두단백 처리구에 비하여 대조구의 용모 높이는 다소 낮았으며 융와 깊이는 다소 깊었다. 따라서 용모 높이:융와 깊이 비율은 상대적으로 낮게 나타나 용모 높이에 비하여 상대적으로 융와 깊이가 깊은 것으로 나타났다. 하지만, 용모 높이:융와 깊이 비율은 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p>0.05$).

이유 후 14일령의 이유자돈 사료내 대두박의 첨가는 용모 높이의 감소를 일으키며 가공 대두단백(SPC, extruded SPC 등)의 첨가는 대두박에 비하여 용모 높이의 감소를 줄일 수 있다고 보고된 바 있으나(Li 등, 1991b), 본 실험에서 발효대두단백의 첨가는 대두박 첨가와 많은 차이를 나타내지는 않았다. 용모 높이의 감소는 용모의 흡수면적을 감소시키고 불충분한 소화효소 농도를 가져와 용모 표면에서의 영양소 전이를 감소시킨다고 보고되고 있다(Cera 등, 1988; Li 등, 1990).

Table 3-3-5. Effect of level of fermented soy protein on ileal villus height, crypt depth and villus height : crypt depth ratio in early-weaned pigs

	Control	Level, %			SEM ¹
		3	6	9	
Villus height	326	335	329	336	4.96
Crypt depth	223	218	215	213	3.96
Villus height: Crypt depth	1.47	1.54	1.53	1.58	0.03

¹ Pooled standard error means.

회장 용모의 morphology를 전자현미경으로 관찰한 SEM 사진은 Figure 3-3-2와 같다. Figure 3-3-2를 살펴보면, 용모 수를 측정하지는 않았지만 대조구에 비하여 발효대두단백 처리구의 용모 수가 다소 많이 관찰되어지며, 대조구의 용모 형태가 발효대두단백 처리구에 비하여 다소 넓게 보여지고 있다.

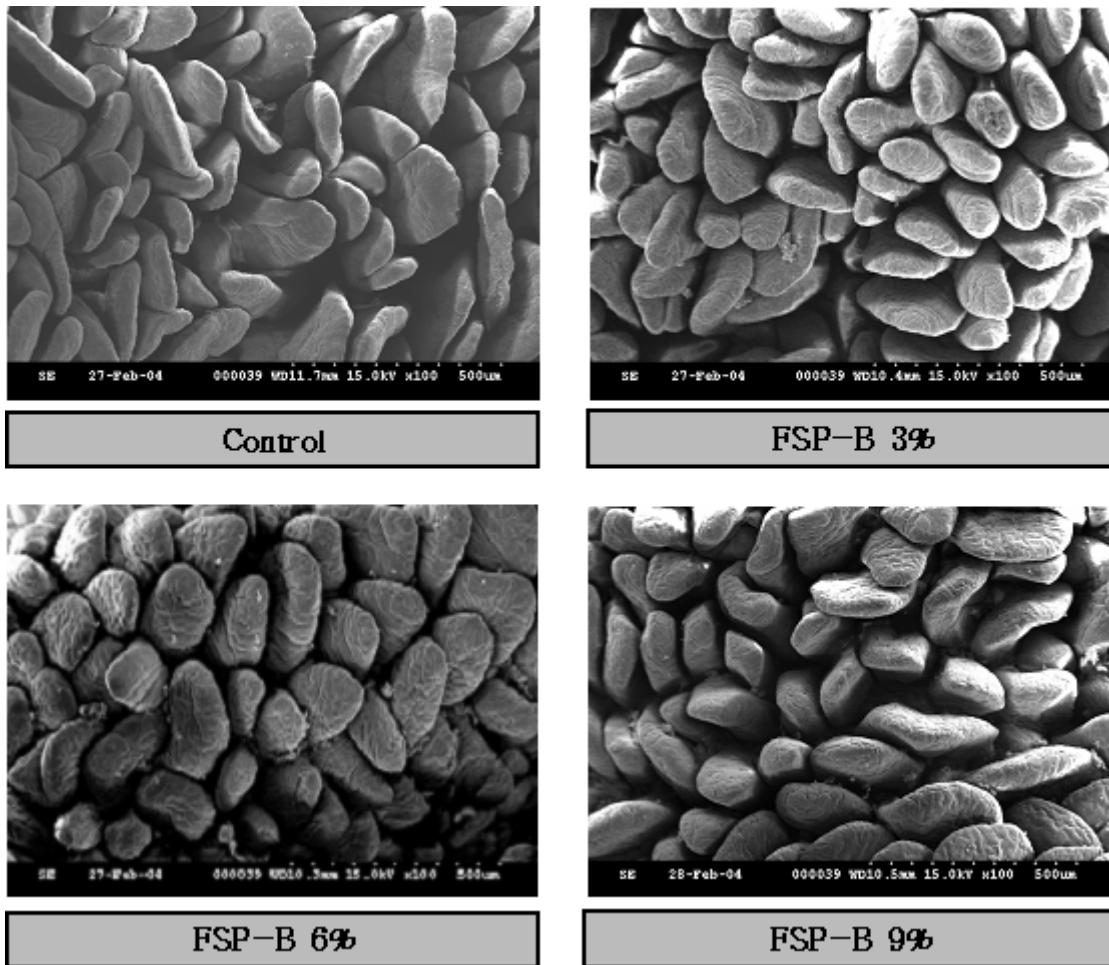


Figure 3-3-2. Effect of level of fermented soy protein on ileal morphology in early-weaned pigs.

라. 면역반응

1) 면역관련 세포 및 혈액 생화학치의 분석

면역과 관련되는 세포와 혈액의 생화학치 분석결과는 Table 3-3-6과 같다. 시험개시시 면역관련세포들 변화를 대두박 첨가구(대조구)와 각 처리구를 비교 분석하여 보면 발효대두 단백질 6%와 9% 첨가구에서 총 백혈구수의 감소가 관찰되었고 또한, 호중구 및 림파구 그리고 단핵구의 감소도 관찰되었으나 이는 정상 범위내에서의 차이이며 또한, 통계적인 유의성도 관찰되지 않았다($p>0.05$). 또한 본 연구의 관심사인 basophil의 감소도 대조구에 비하여 모든 발효대두단백 처리구에서 관찰되었으나 통계적인 유의성은 없었다($p>0.05$).

Table 3-3-6. Effects of level of fermented soy protein on the immune cell population in early-weaned pigs

Items	Leukocytes ¹			
	Control	Level, %		
		3	6	9
Initial				
WBC, k/ $\mu\ell$	22.46±4.24 ^{NS)}	19.66±3.53	13.61±1.84	14.49±2.63
NE, k/ $\mu\ell$	11.78±2.66 ^{NS)}	8.26±1.87	8.52±1.57	7.98±2.27
LY, k/ $\mu\ell$	6.55±1.42 ^{ab}	9.21±1.60 ^a	3.25±0.40 ^b	4.13±1.05 ^b
MO, k/ $\mu\ell$	2.01±0.48 ^a	1.10±0.19 ^b	1.41±0.19 ^{ab}	1.48±0.22 ^{ab}
EO, k/ $\mu\ell$	2.01±0.78 ^a	1.03±0.45 ^{ab}	0.40±0.10 ^b	0.83±0.21 ^{ab}
BA, k/ $\mu\ell$	0.11±0.04 ^{NS)}	0.07±0.03	0.03±0.01	0.07±0.02
After day 14				
WBC, k/ $\mu\ell$	24.44±5.60 ^{NS)}	25.21±2.77	22.52±3.13	17.44±2.28
NE, k/ $\mu\ell$	10.71±1.58 ^{NS)}	9.23±1.17	11.51±1.93	9.23±1.35
LY, k/ $\mu\ell$	7.78±0.98 ^{NS)}	7.03±0.45	8.76±0.87	6.93±0.75
MO, k/ $\mu\ell$	1.63±0.50 ^{ab}	2.17±0.35 ^a	1.34±0.25 ^{ab}	0.76±0.24 ^b
EO, k/ $\mu\ell$	1.33±0.34 ^a	3.27±1.02 ^b	0.83±0.19 ^a	0.48±0.16 ^a
BA, k/ $\mu\ell$	0.22±0.15 ^{NS)}	0.24±0.07	0.08±0.02	0.04±0.02
After day 35				
WBC, k/ $\mu\ell$	27.02±4.70 ^{NS)}	25.53±1.84	21.62±2.11	18.05±1.38
NE, k/ $\mu\ell$	12.89±2.25 ^a	8.73±1.10 ^{ab}	8.57±1.62 ^{ab}	7.03±0.49 ^b
LY, k/ $\mu\ell$	8.28±1.63 ^{NS)}	7.18±1.66	6.56±0.79	6.58±0.47
MO, k/ $\mu\ell$	2.42±0.44 ^a	2.24±0.22 ^a	4.17±0.69 ^b	2.92±0.32 ^{ab}
EO, k/ $\mu\ell$	3.26±0.88 ^a	7.16±1.77 ^{ab}	2.24±0.42 ^a	1.47±0.66 ^b
BA, k/ $\mu\ell$	0.17±0.07 ^{NS)}	0.22±0.07	0.09±0.04	0.06±0.02

¹ Values are mean ± S.D., N=5.

^{ab} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

^{NS)} Values within the row are not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

시험사료 급여 14일 후에 측정된 면역관련세포들 변화를 대조구와 발효대두단백 첨가구 간에 비교분석하여 보면 9% 첨가구에서 총 백혈구수의 감소가 관찰되었고 또한, 호중구 및 림파구 그리고 단핵구의 감소도 관찰되었으나 이 역시 통계적인 유의성은 없었다($p>0.05$). 또한 본 연구의 관심사인 알러지 반응과 관련된 호염기구 즉, basophil의 감소가 대조구에 비하여 발효대두단백 첨가구에서 전반적으로 관찰은 되었으나 통계적으로 유의성은 없었다($p>0.05$). 시험종료시 측정된 면역관련세포들 변화를 대조구와 발효대두단백 첨가구간에 비교분석하여 보면 3, 6 그리고 9% 첨가구에서 총 백혈구수의 감소가 시험개시와 시험사료 급여 종료 시와 유사하게 관찰되었다. 그리고 호중구 및 림파구, 단핵구의 감소도 관찰되었으나 이 역시 통계적인 유의성은 없었다. 또한 본 연구의 관심사인 알러지 반응과 관련된 호염기구 즉, basophil의 감소가 대조구에 비하여 발효대두단백 6%와 9% 첨가구에서 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다($p>0.05$).

시험개시시 혈액화학적 검사치를 대조구와 비교하여보면(Table 3-3-7) 모든 발효대두단백 처리구와 대조구간에 차이가 나타나지 않았다. 시험사료 급여 2주 후에 측정된 혈액화학적 검사치에 있어서 대조구와 발효대두단백 처리구를 비교분석하여 보면 모든 발효대두단백 처리구에서 혈소판 수의 증가가 관찰되었으며 발효대두단백을 9%첨가한 처리구의 경우 특히 평균혈소판용적이 줄어들어 고농도의 발효대두단백의 경우 오히려 적합하지 않은 것으로 사료된다. 시험종료시에 측정된 혈액화학적 검사치에 있어서 발효대두단백 6%와 9% 처리구에서 HCT 및 MCV 그리고 PLT의 감소가 관찰되었으나 이는 모두 정상 범위에 속하는 생리학적인 변화이었다.

그리고 시험개시시 측정된 간 기능과 관련된 주요한 효소인 AST의 분석결과에 있어서는(Figure 3-3-3) 발효대두단백을 6% 첨가한 처리구의 경우 대조구에 비하여 다소 낮은 값을 보였으나 이는 생리학적으로 정상 범위내에서의 차이로 보여진다. ALT의 경우 발효대두단백을 6% 첨가한 처리구가 대조구에 비하여 다소 낮은 값을 나타냈으며 이 역시 생리학적으로 정상 범위내에 속하므로 특별한 의미를 부여할 필요는 없는 것으로 사료된다. 시험사료 급여 2주 후에 측정된 AST와 ALT의 비교 분석에서는 발효대두단백을 급여한 처리구에서 공히 증가되었으며 특히 AST의 경우 유의성 있는 증가를 관찰할 수 있었다($p<0.05$). 시험종료시 측정된 주요 간 기능 관련 효소의 비교분석결과 발효대두단백을 급여한 처리구들은 대두박을 급여한 대조구에 비하여 AST와 ALT의 증가가 관찰되었으나 각 시험군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다($p>0.05$).

Table 3-3-7. Effect of level of fermented soy protein on hematological values in early-weaned pigs

Items	Erythrocytes and Thrombocyte			
	Control	Level, %		
		3	6	9
Initial				
RBC, M/ μ l	8.05 \pm 1.09 ^{NS)}	8.51 \pm 1.08	8.17 \pm 1.17	8.94 \pm 0.31
Hb, M/dL	15.68 \pm 1.84 ^{NS)}	12.90 \pm 0.46	13.18 \pm 0.46	13.92 \pm 0.78
HCT, %	55.18 \pm 7.80 ^{ab}	57.06 \pm 2.50 ^{ab}	60.04 \pm 4.98 ^a	62.86 \pm 2.76 ^a
MCV, fL	68.36 \pm 1.24 ^{NS)}	67.32 \pm 1.53	62.00 \pm 10.71	70.50 \pm 3.13
MCH, pg	19.82 \pm 1.34 ^{ab}	15.26 \pm 0.54 ^b	16.58 \pm 0.90 ^{ab}	16.40 \pm 1.53 ^{ab}
MCHC, g/dL	28.94 \pm 1.70 ^{ab}	22.66 \pm 0.41 ^{bc}	22.16 \pm 1.08 ^{bc}	21.84 \pm 0.84 ^{bc}
RDW, %	22.12 \pm 1.15 ^b	24.14 \pm 0.99 ^{ab}	19.68 \pm 0.52 ^b	21.10 \pm 0.48 ^b
PLT, k/ μ l	2323 \pm 333 ^{bc}	1700 \pm 234 ^{cd}	3282 \pm 217 ^a	2810 \pm 265 ^{ab}
MPV, fL	2.66 \pm 0.15 ^{NS)}	3.00 \pm 0.38	2.66 \pm 0.25	2.28 \pm 0.12
After day 14				
RBC, M/ μ l	8.59 \pm 0.90 ^a	9.79 \pm 0.9 ^b	9.11 \pm 0.73 ^b	8.31 \pm 0.29 ^a
Hb, M/dL	16.70 \pm 1.39 ^{NS)}	18.62 \pm 1.54	17.22 \pm 1.31	15.12 \pm 1.15
HCT, %	58.78 \pm 5.15 ^a	66.00 \pm 5.91 ^b	61.28 \pm 4.56 ^b	57.22 \pm 3.35 ^a
MCV, fL	68.58 \pm 1.74 ^{NS)}	67.94 \pm 2.65	67.42 \pm 2.29	68.66 \pm 2.40
MCH, pg	19.70 \pm 1.34 ^{NS)}	19.24 \pm 1.02	18.96 \pm 0.80	18.14 \pm 1.12
MCHC, g/dL	28.58 \pm 1.44 ^a	28.32 \pm 0.89 ^a	28.18 \pm 0.84 ^a	26.40 \pm 0.90 ^b
RDW, %	24.53 \pm 0.65 ^{ab}	25.20 \pm 0.82 ^a	22.16 \pm 0.74 ^b	22.74 \pm 0.63 ^{ab}
PLT, k/ μ l	660 \pm 173 ^b	1504 \pm 488 ^{ab}	1409 \pm 323 ^{ab}	2148 \pm 384 ^a
MPV, fL	9.38 \pm 2.17 ^a	6.88 \pm 2.16 ^{ab}	6.12 \pm 1.82 ^{ab}	2.94 \pm 0.46 ^b
After day 35				
RBC, M/ μ l	7.81 \pm 0.97 ^a	12.11 \pm 1.30 ^{ab}	7.19 \pm 0.64 ^b	6.47 \pm 0.61 ^b
Hb, M/dL	14.65 \pm 1.57 ^{NS)}	18.00 \pm 2.47	14.40 \pm 0.67	12.00 \pm 1.19
HCT, %	49.55 \pm 6.58 ^a	75.88 \pm 4.73 ^c	40.55 \pm 2.92 ^a	36.33 \pm 2.91 ^b
MCV, fL	63.30 \pm 1.64 ^{NS)}	63.50 \pm 2.76	56.68 \pm 1.74	56.45 \pm 1.52
MCH, pg	18.90 \pm 0.68 ^{ab}	15.05 \pm 0.72 ^b	20.28 \pm 1.11 ^a	18.58 \pm 0.57 ^{ab}
MCHC, g/dL	29.93 \pm 1.41 ^a	23.78 \pm 0.90 ^d	35.70 \pm 1.03 ^c	32.90 \pm 0.75 ^{ab}
RDW, %	22.78 \pm 0.81 ^{NS)}	23.05 \pm 0.58	20.68 \pm 0.69	22.10 \pm 0.84
PLT, k/ μ l	611 \pm 155 ^{ab}	2720 \pm 111 ^b	379 \pm 115 ^a	538 \pm 123 ^{ab}
MPV, fL	9.05 \pm 1.65 ^a	2.88 \pm 0.08 ^b	11.60 \pm 0.90 ^a	9.80 \pm 1.03 ^a

¹ Values are mean \pm S.D., N=5.

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

^{NS)} Values within the row are not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

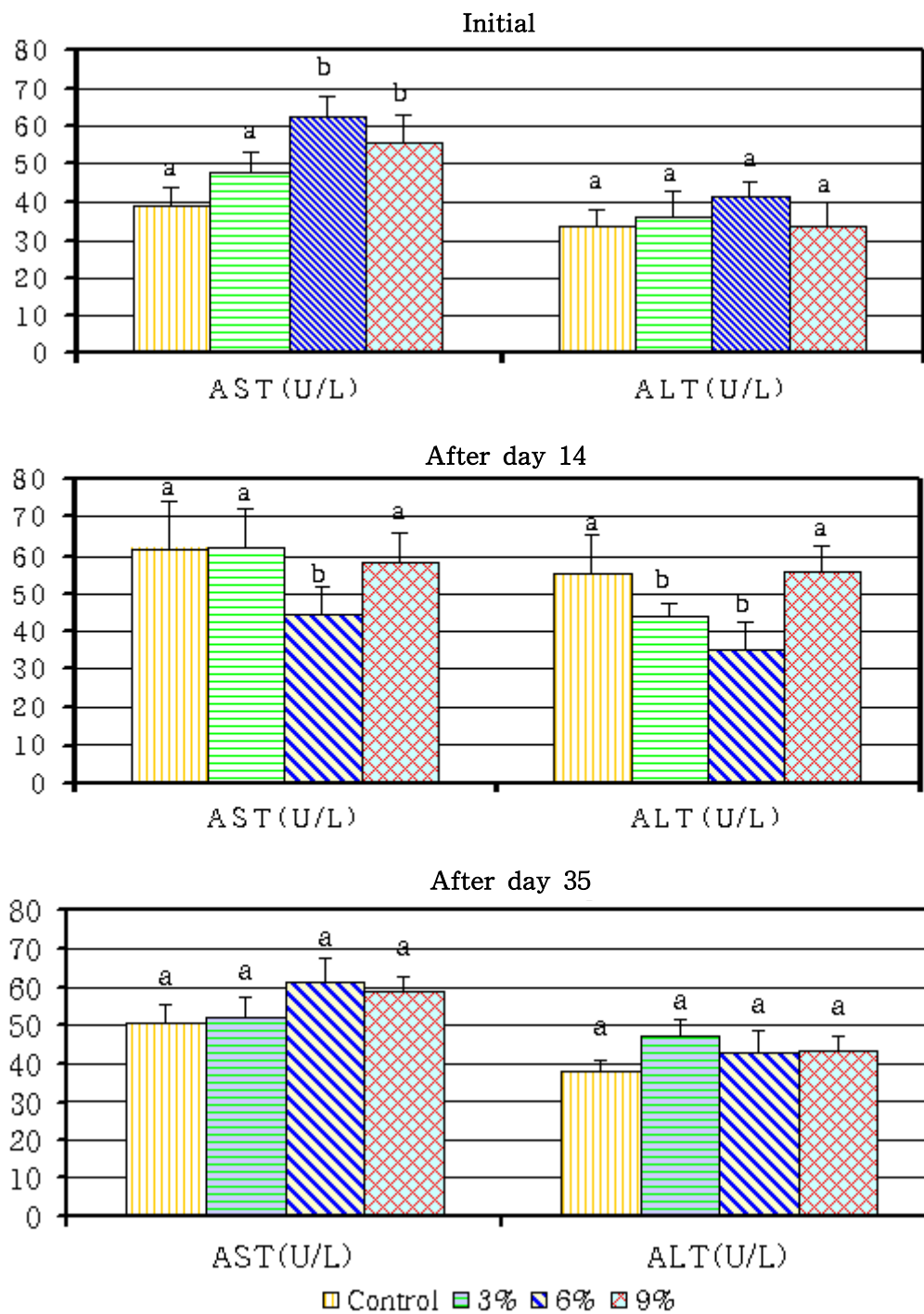


Figure 3-3-3. Effect of level of fermented soy protein on AST and ALT enzyme in serum in early-weaned pigs.

2) 다형핵 백혈구의 chemiluminescence

시험개시에 측정된 대조구를 기준으로 하여 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각 처리구들과 비교하여 보면(Table 3-3-8), 발효대두단백 처리구간에 유의성 있는 변화나 특이한 영향은 관찰되지 않았다. 즉, 대조구를 기준으로 하여 발효대두단백 처리구의 chemiluminescence 변화는 관찰되지 않았으며 모든 처리구에서의 뚜렷한 차이가 없었다.

Table 3-3-8. Effect of level of fermented soy protein on the polymorphonuclear granulocytes¹ (%) induced chemiluminescence in early-weaned pigs

Item	Control	Level, %		
		3	6	9
Initial	100*	106.6±5.4	101.5±3.8	99.8±5.6
After day 14	100**	105.8±6.8	98.9±5.4	108.8±4.8
After day 35	100***	98.5±6.8	106.1±6.8	104.2±5.4

¹ Values are means ± S.D., N=3.

* 100% = $4.427 \pm 0.657 \times 10^9$ cpm.

** 100% = $4.283 \pm 0.495 \times 10^9$ cpm.

*** 100% = $4.519 \pm 0.872 \times 10^9$ cpm.

3) 혈청내 대두 단백질에 대한 IgG 역가 측정

혈청내에 존재할 것으로 기대한 대두 단백질에 대한 IgG 항체의 양성율은 시험개시 2주 후 그리고 시험종료시 모든 처리구에서 전혀 관찰되지 않았으며(Table 3-3-9) 이에 따른 혈청내의 항체역가(titer) 역시 시험개시 2주 후 그리고 시험종료시의 대조구를 비롯하여 모든 처리구에서 측정되지 않았다(Table 3-3-10). 이러한 결과는 본 시험에 사용된 대두단백의 경우 항원성 또는 allergen 으로서의 작용을 나타내지 않음을 시사한다고 할 수 있다.

4) ELISA 기법을 이용한 유리된 히스타민의 측정

본 연구에 사용된 양성대조군인 대두박의 사용에 의하여 발생될 수 있는 알러지에 의하여 혈청내에 생성 유리될 수 있으리라고 추정된 히스타민과 이에 대한 개선 효과를 기대하는 각 처리구에서의 히스타민량을 조사한 결과 발효대두단백 처리구들은 물론이고 대조구에

서 조차 시험사료 급여 2주 후 그리고 시험종료시의 혈청내에서 히스타민이 전혀 검출되지 않았다(Table 3-3-11).

Table 3-3-9. Effects of level of fermented soy protein on IgG antibody for test sera by micro-ELISA in early-weaned pigs

Item	Criterion	Control	Level, %		
			3	6	9
Initial	No. of positive	0/5	0/5	0/5	0/5
After day 14		0/5	0/5	0/5	0/5
After day 35		0/5	0/5	0/5	0/5

Table 3-3-10. Effect of level of fermented soy protein on serum antibody IgG titers to soy proteins in early-weaned pigs

Reciprocal titer	Control	Level, %		
		3	6	9
Initial				
1 ×	1/5	ND	ND	ND
2 ×	ND ¹	ND	ND	ND
4 ×	ND	ND	ND	ND
After day 14				
1 ×	ND	ND	ND	ND
2 ×	ND	ND	ND	ND
4 ×	ND	ND	ND	ND
After day 35				
1 ×	1/5	ND	ND	ND
2 ×	ND	ND	ND	ND
4 ×	ND	ND	ND	ND

¹ No detectable.

Table 3-3-11. Effects of level of fermented soy protein on histamine release (%) in early-weaned pigs

Item	Control	Level, %		
		3	6	9
Initial	ND ¹	ND	ND	ND
After day 14	ND	ND	ND	ND
After day 35	ND	ND	ND	ND

¹ No detectable.

4. 요약

발효대두단백의 사용은 자돈의 사양성적과 영양소 소화율을 개선시키는 것으로 나타났다. 비록 발효대두단백의 3% 첨가는 대조구에 비하여 사양성적과 영양소 소화율에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만($p>0.05$). 6%와 9%의 첨가는 유의적인 차이를 나타냈으며 사용수준에 따라 linear effects가 나타났다($p<0.05$). 사양성적 곡선을 보면 발효대두단백 6% 첨가구에서 기울기가 완만해 지는 것이 관찰되었다. 이러한 결과를 볼 때, 발효대두단백을 6~9% 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

또한, 면역에 관여하는 혈중 백혈구, 혈중 적혈구나 혈소판 그리고 효소치는 사용수준에 따라 변화되는 경우가 있었으나 대부분 정상범위의 생리적인 반응에 기인한 것으로 자돈사료내 사용시 별다른 문제가 되지 않을 것으로 사료되며 IgG와 히스타민의 측정결과 각 처리구간에 특이한 변화를 관찰할 수 없었던 것으로 보아 공장이나 회장내에서 알러지 반응을 일으키는 기존의 대두단백과 구조상의 차이가 있을 것으로 판단된다.

제 4 절 세부과제: 2가지 발효대두단백의 상대적 가치제고를 위한 연구

1. 서 론

자돈사료에 주로 사용하고 있는 대두단백 제품으로는 정제 대두단백(ISP)과 농축 대두단백(SPC)을 들 수 있다. ISP는 알칼리 조건에서 단백질 성분을 용해하여 수거한 후 산성 조건에서 단백질을 침전하는 방법으로 대두박의 비단백질 성분을 제거하고 분무건조하여 제조하며, SPC는 가용성 비단백질 구성성분을 약 78°C의 65% 에탄올로 추출하여 제거한 다음 특수 열처리하여 제조하는 방법으로 생산한다.

발효대두단백은 *Aspergillus oryzae* 균주 및 *Bacillus subtilis* 균주를 저온 침지한 대두박에 접종하여 대두박내 탄수화물을 미생물 성장에 필요한 에너지원으로 소진시킴으로써 상대적으로 단백질 함량을 농축시키는 방법으로 제조된다. 본 실험에 사용된 발효대두단백(fermented soy protein; FSP)은 *A. oryzae* 균주에 의한 발효대두단백(FSP-A)과 *B. subtilis* 균주에 의한 발효대두단백(FSP-B)으로 단백질 함량이 각각 53%와 58%로 나타났다. 본 연구에서는 균주를 달리한 발효대두단백(FSP-A와 FSP-B)의 사용수준을 달리하였을 때, 이유자돈의 성장능력, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 그리고 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 적절한 사용수준을 알아보고, 경제적인 사용수준을 설정하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시동물, 시험설계 및 사료

사양시험을 위해 이유자돈(L×Y×D, 23±3일령; 5.56±1.21kg) 300두(5처리, 4반복, 반복당 15두)를 공시하여, 성별과 체중에 따라 각각의 처리구에 완전임의 배치하였다. 이유 후 2주(0~14일)와 3~5주(15~35일)로 총 5주(35일)간 사양시험을 실시하였다.

시험사료는 옥수수과 WP 위주의 사료로서 대조구 사료는 12%의 SBM을 함유하였으며, 처리구 사료는 FSP-A(*A. oryzae*에 의한 발효대두단백)와 FSP-B(*A. oryzae*+*B. subtilis* 복합균주에 의한 발효대두단백)로 각각 3%와 6%씩 대체하였으며, 그로 인해 발생된 시험사료내 단백질, lysine 그리고 methionine+cystine의 차이는 어분과 합성아미노산을 사용하여

동일한 수준을 유지하도록 배합하였다(Table 3-4-1). 시험사료내 영양소 함량은 3,300kcal/kg ME, 21.0% CP, 24.7% lactose, 1.55% lysine, 0.80% Ca 그리고 0.40% Av. P 이었으며, lysine을 기준으로 methionine+cystine과 threonine의 수준은 각각 55%와 59%를 유지하도록 배합하였다. 그리고 비타민과 광물질은 NRC(1998) 요구량을 충족하거나 초과하도록 하였다. 영양소 소화율을 측정하기 위하여 산화크롬(Cr_2O_3)을 불소화지시제로 첨가하였다.

자돈들에게 포유기간 동안 처리구 구분없이 일반 시판용 대용유를 급여하였으며, 이유 후 0~14일 까지 시험사료를 급여한 후, 15~35일 까지 모든 처리구에 일반 시판용 크럼블 사료를 급여하였다. 자돈은 바닥의 절반이 슬랫인 돈방(1.9m×2.54m)에서 사육하였으며, 돈사의 환기는 팬을 이용하여 강제환기시켰다. 사료와 물은 자유채식 시켰고, 첨가제나 약품은 일절 사용하지 않았다. 기타 자돈의 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

나. 체중 측정 및 시료 채취

체중 측정은 시험개시와 시험사료 급여 2주 후 그리고 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후 측정하였으며, 사료섭취량을 측정하기 위하여 시험사료 급여 2주 후와 일반 시판용 크럼블사료 급여 3주 후에 급이통 으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 분시료의 채취는 시험사료 급여 2주 후 각각의 돈방별로 채취하였다. 분시료는 채취 후 60℃의 열풍건조기에서 72시간 건조시켜 1mm 망사 Wiley mill로 분쇄 후 분석할 때까지 냉장 보관하였다.

소장 용모의 형태학적 발달을 관찰하기 위한 회장 시료는 시험사료급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 1두(처리당 4두, 총 20두)씩 도살 후 개복하여 맹장과 회장 연결부위로부터 약 15cm의 상단부위를 적출하여 식염수로 세척 후 10% formalin용액에 침지하여 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

시험사료의 아미노산 회장소화율을 측정하기 위한 회장 내용물은 시험사료 급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 처리당 4두씩 총 20두를 도살하여 개복 후 소장하단의 약 25%부위에서 소장내용물을 채취하여 -10℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 냉동시킨 시료를 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm망사 wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

면역특성을 분석하기 위하여 시험개시전 돈방구분 없이 4두의 자돈과 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 각각 처리당 4두씩(총 20두) 경정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈액을 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

Table 3-4-1. Formula and calculated compositions of experimental diets for feeding trials(day 0~14)

	Control	FSP-A, %		FSP-B, %	
		3	6	3	6
Ingredients, %					
Whey powder	38.00	38.00	38.00	38.00	38.00
Corn	30.38	30.70	31.03	30.90	31.15
SDPP	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Biscuit byproduct	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Deh-SBM (48%)	15.00	12.00	9.00	12.00	9.00
FSP-A or B	0.00	3.00	6.00	3.00	6.00
Fish meal	3.81	3.40	2.99	3.18	2.87
Animal Fat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
L-Lysine (78%)	0.32	0.34	0.35	0.34	0.34
DL-Methionine (100%)	0.13	0.14	0.16	0.15	0.15
Limestone	0.75	0.81	0.87	0.84	0.89
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamin premix ¹	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline Chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Apramycin	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Sulfathiazol	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
ZnO	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,306	3,304	3,303	3,306	3,306
CP, %	21.00	21.00	21.00	21.00	21.16
Lactose, %	24.70	24.70	24.70	24.70	24.70
Ca, %	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
Av. P, %	0.41	0.41	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Met+Cys, %	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
Thr, %	0.91	0.91	0.91	0.91	0.92

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18 mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

다. 실험적 측정 및 분석

1) 사양성적, 영양소 소화율 및 장의 형태학적 특성 분석

사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 그리고 사료효율(F/G)을 분석하였다. 사료와 분의 일반성분 분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 에너지는 단열폭발열량측정기(Model 1241, Parr Instrument Co., Molin, IL)로 측정하였으며, 크롬은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다.

Villus height와 crypt depth를 측정하기 위하여 10% formalin용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988). Morphology를 측정하기 위하여 회장의 시료크기를 2mm²로 하여 절단하였으며 절단된 시료를 0.4 M KCl 용액에 세척하여 내용물을 완전히 제거한 후 고정액(0.1 M collidine buffer, pH7.3; 3% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 1.5% acrolein)에 보존하였다. 보존된 시료는 Liepens와 DeHaven (1978)의 방법에 따라 ethanol-preon series로 가수분해 시킨 후 platinum coating 처리하여 ISI scanning electron microscope(Hitachi S-3500N, JAPAN)에 의해 측정하였다.

회장 내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105 $^{\circ}$ C에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유 아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

2) 혈액 및 면역특성 분석

가) 면역관련 세포, 혈액화학치 및 효소치 분석

면역관련세포 분석을 위한 혈액학적 검사는 자돈의 경정맥으로부터 채혈하여 얻은 혈액을 heparin으로 항응고처리한 vial에 넣어 잘 보관한 다음 자동혈액 분석기(HemacyteTM, oxford science, INC. USA)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC) 호중구(NE), 임파구(LY), 단핵구(MO), 호산구(EO), 호염구(BA), 헤모글로빈(Hb), 헤마토크릿(HCT), 혈소판(PLT), 평균 적혈구용적(MCV), 평균 적혈구혈색소량(MCH), 평균 적혈구색농도(MCHC) 등 혈액기본치를 측정하였다. 아울러 혈청내 존재하는 효소중 중요한 알라닌 전이효소(ALT), 아스파티산 전이효소(AST), 알부민(ALB) 및 혈중 요소태질소(BUN)의 변화를 측정하여 대두단백의 변화에 따른 영향을 관찰하였다.

나) 다형핵 백혈구의 chemiluminescence 측정

자돈의 경정맥으로부터 heparin(10U/ml)이 포함된 vacutainer를 이용하여 혈액을 채취한 후 Double-density Percoll을 이용하여 상층으로부터는 다형핵 백혈구를 분리하고 하층의 mononuclear cell로부터는 monocyte를 분리하여 chemiluminescence 측정용 media인

pheno red가 함유되지 않은 1%의 BSA가 첨가된 RPMI-1640 배지에 각각 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 과 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 세포를 고정화한 후 탐식능력의 변화에 따른 respiratory burst시 생성하는 reactive oxygen(RO)를 측정하기 위하여 luminol을 amplifier로 하여 사전에 5분간 O_2^- 의 발생을 증폭시켰으며 보체 C3b와 opsonization시킨 zymosan particle을 stimulator로 하여 40분간 Luminometer(Berthold LB-9505, Germany)를 이용하여 chemiluminescence를 측정하였다.

다) 혈청내 대두 단백질에 대한 IgG 역가 측정

혈청내 대두 단백질에 대한 IgG 역가 측정은 Li 등(1990)의 방법에 의하여 다음과 같이 수행하였다. ① 96-well microtiter plate를 carbonate-bicarbonate buffer(0.05M, pH 9.6)로 희석한 순수한 soy bean ($50\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 $1\text{ml}/\text{well}$ 로 1시간 coating 한 후 PBS-1% Tween 20(pH 7.4)로 3회 세척하였다. ② 그리고 coating 되지 않은 부분은 3% PBS-bovine serum albumin을 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 37°C 배양기에서 1시간 감작시키고 PBS-1% Tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. ③ 혈청을 PBS-Tween 20으로 2배 단계희석하여 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 37°C 배양기에 1시간 감작시킨 후 PBS-1% Tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. ④ 효소 표시 항체(horse radish peroxidase-labeled anti-porcine IgG(dilution 1: 3,000, $1\text{ml}/\text{well}$))을 3% BSA에 희석한 후 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 37°C 배양기에 1시간 감작시킨 후 PBS-1% Tween 20으로 5분간 3회 세척하였다. ⑤ 0.05% ortho-penylenediamine(OPD)과 0.006% H_2O_2 가 함유 되도록 제조한 0.1M phosphate-citrate buffer (ph 5.0)를 각 well에 가하고 암실에 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 2.5M H_2SO_4 를 각 well에 $50\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 반응을 중지시켰다. ⑥ ELISA reader(Molecular divices)를 사용하여 492nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

라) ELISA 기법을 이용한 유리된 히스타민의 측정

혈청을 micro tube에 넣고 각각의 시료를 첨가하여 30분 동안 37°C 항온수조에서 배양시킨 다음 $800 \times \text{g}$ 로 5분간 원심시켜 얻은 상층액에서 히스타민을 정량하였다. 대두 단백질처리군의 혈청에 각 시료대신에 Ca^{++} -Locke 용액을 첨가한 군을 정상 대조군으로 간주하였다. 히스타민 측정은 Song등의 방법을 변형, 보완하여 다음과 같이 정량하였다. 즉, 반응액 $500\mu\text{l}$ 를 4°C 에서 $800 \times \text{g}$ 로 5분간 원심분리하여 상층액 $400\mu\text{l}$ 를 첨가하여 약 20초간 혼합한 후 n-butanol 1ml 를 첨가하여 3분간 혼합시킨 뒤 $800 \times \text{g}$ 로 5분간 원심분리하였다. 피펫으로 하층액 $750\mu\text{l}$ 정도를 제거한 뒤 salt-saturated 0.1N-NaOH $500\mu\text{l}$ 를 첨가하고 1분 동안 혼합하여 $800 \times \text{g}$ 로 5분간 원심 분리하였다. 상층액 $800\mu\text{l}$ 를 얻어 0.1N-KCl $450\mu\text{l}$ 와 n-Heptane 1.5ml 를 혼합하여 1분간 반응시킨 뒤 $800 \times \text{g}$ 로 5분간 원심시켜 하층액 $400\mu\text{l}$ 를 얻어 0.1N-HCl 1.6ml 를 첨가하였다. 1N-NaOH $400\mu\text{l}$ 를 재첨가하여 혼합한 뒤 1% \square -phthalaldehyde(\square -PT) $100\mu\text{l}$ 를 부과하여 냉수조에서 4분간 반응시킨 다음 3N-HCl $200\mu\text{l}$

를 혼합하여 Shore등의 방법에 의하여 spectrofluorometer(Berthold, Germany)로 438nm (excitation at 353nm)에서 측정하여 히스타민을 정량하였다. 모든 유리 히스타민량은 아래의 공식에 의하여 히스타민 총량에 대한 백분율로 표시하였다.

$$\text{유리 히스타민량 (\%)} = \{(\text{대두단백 투여군의 유리 히스타민량} - \text{각 시험군의 유리 히스타민량}) / \text{대두단백 투여군의 유리 히스타민량}\} \times 100.$$

라. 통계적 분석

측정된 사양성적과 영양소 소화율 데이터는 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 최소 유의차 검정을 실시하였고, 완전임의배치법으로 분석하였다. 군주를 달리한 발효대두단백(FSP-A와 FSP-B)의 사용수준가 상대적 가치평가를 위하여 수준과 군주별 직교비교를 실시하였다. 측정된 혈액성분과 면역데이터들은 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 Duncan의 다중검정으로 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적

두 군주의 발효에 의한 발효대두단백의 사용수준에 따른 사양성적은 Table 3-4-2와 같다. 시험사료 급여 2주(0~14일) 동안 대조구의 ADG는 발효대두단백 처리구보다 보다 유의적으로 낮게 나타났으며($p < 0.05$), ADFI는 FSP-A 3% 처리구를 제외하고 모든 발효대두단백 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 그리고 발효대두단백 FSP-A 3%와 FSP-B 6% 처리구의 F/G가 대조구보다 유의적으로 낮게 나타났으나($p < 0.05$), FSP-A 6%와 FSP-B 3% 처리구는 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 군주와 수준에 따른 사양성적의 유의성 검정에 있어 이 기간에서는 군주와 사용수준에 의한 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$).

일반 시판용 크럼블 사료급여 3주(15~35일) 동안 FSP-B 처리구의 ADG는 대조구에 비하여 유의적인 차이를 나타냈으나($p < 0.05$), FSP-A 처리구는 대조구와 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). ADFI는 FSP-B 6% 처리구만이 대조구와 유의적인 차이를 나타냈으며 FSP-A 3%와 6% 처리구와 FSP-B 3% 처리구간에 유의적인 차이는 없었다($p > 0.05$). 군주와 사용수준에 따른 영향에 있어 군주는 ADG와 ADFI에 유의적인 영향을 미쳤으며(각각 $p < 0.01$ 과 $p < 0.05$), 사양성적에 사용수준이 미치는 유의적인 영향은 없었다($p > 0.05$).

전체 사양기간(0~35일)의 사양성적을 살펴보면, 발효대두단백 처리구의 ADG는 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.05$), FSP-B 6% 처리구가 유의적으로 가장 높

게 나타났다($p<0.05$). ADFI는 FSP-A 6% 그리고 FSP-B 3%와 6% 처리구가 FSP-A 3% 처리구와 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며, F/G는 모든 발효대두단백 처리구들이 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 또한, FSP-B 6% 처리구와 FSP-A 3% 처리구도 유의적인 차이를 나타냈다($p<0.05$). 발효대두단백의 균주와 사용수준에 따른 영향에 있어 ADG는 균주와 사용수준에 따라 영향을 받는 것으로 나타났으며(각각 $p<0.001$ 과 $p<0.01$), ADFI는 균주에 따라서 영향을 받은 것으로 나타났으나($p<0.01$), 사료효율(F/G)은 균주와 사용수준에 모두 영향을 받지 않은 것으로 나타났다($p>0.05$).

Table 3-4-2. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on growth performance in early-weaned pigs

	Control	FSP-A, %		FSP-B, %		SEM ¹	Probability($P<$) ²	
		3	6	3	6		microbes	Level
Day 0~14								
ADG, g	269 ^b	284 ^a	297 ^a	295 ^a	293 ^a	3.22	NS ³	NS
ADFI, g	405 ^c	411 ^{bc}	435 ^a	432 ^a	426 ^{ab}	4.12	NS	NS
F/G	1.50 ^a	1.45 ^b	1.46 ^{ab}	1.47 ^{ab}	1.45 ^b	0.01	NS	NS
Day 15~35								
ADG, g	428 ^c	438 ^{bc}	444 ^{bc}	451 ^{ab}	463 ^a	3.67	** ⁴	NS
ADFI, g	674 ^b	673 ^b	675 ^b	685 ^{ab}	688 ^a	2.23	*	NS
F/G	1.57 ^a	1.54 ^b	1.52 ^{bc}	1.52 ^{bc}	1.49 ^c	0.01	NS	NS
Day 0~35								
ADG, g	365 ^d	376 ^c	385 ^b	389 ^{ab}	395 ^a	2.99	***	**
ADFI, g	566 ^b	568 ^b	579 ^a	584 ^a	583 ^a	2.24	**	NS
F/G	1.55 ^a	1.51 ^b	1.50 ^{bc}	1.50 ^{bc}	1.48 ^c	0.01	NS	NS

^{abcd} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p<0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² Microbes : *A. oryzae* vs *B. subtilis*; Level : 3% vs 6%.

³ Not significant ($p>0.05$).

⁴ * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

사양성적을 종합하여 볼 때 발효대두단백의 자돈사료내 사용은 성장능력을 향상시킬 수 있으며 발효대두단백 3%의 첨가는 다소 낮은 사용수준으로 개선효과가 높지 않을 것으로

생각된다. 비록 사양성적에 미치는 발효균주와 사용수준간의 유의성 검정에 있어서 대체로 발효균주에 따라 유의성이 나타났지만 각각의 발효대두단백 처리구간내 사료효율은 사용수준에 따라 다소의 영향은 있는 것으로 사료된다.

나. 영양소 소화율

발효대두단백의 균주와 사용수준에 따른 영양소 소화율 측정결과는 Table 3-4-3과 같다. 대체로 발효대두단백 처리구의 영양소 소화율은 대조구에 비하여 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며 특히 단백질 소화율에 있어 모든 발효대두단백 처리구는 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 그리고 모든 영양소 소화율은 사용수준에 따라 영향을 받지 않았으나 단백질, 지방, 칼슘 그리고 인의 경우 발효균주에 따라 유의적인 차이를 나타냈다($p < 0.01$).

Table 3-4-3. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on digestibility of nutrients in early-weaned pigs (at day 14)

Item	Control	FSP-A, %		FSP-B, %		SEM ¹	Probability(P<) ²	
		3	6	3	6		microbes	Level
DM	82.18 ^b	83.80 ^{ab}	84.29 ^a	85.28 ^a	84.33 ^a	0.36	NS ³	NS
GE	82.29 ^b	83.05 ^{ab}	83.69 ^{ab}	84.85 ^a	84.64 ^a	0.37	NS	NS
CP	73.61 ^d	77.21 ^c	77.82 ^{bc}	79.16 ^{ab}	79.75 ^a	0.62	** ⁴	NS
EE	63.64 ^b	68.70 ^a	65.69 ^b	70.35 ^a	70.37 ^a	0.77	**	NS
Ash	52.97 ^b	59.35 ^a	60.26 ^a	61.31 ^a	60.06 ^a	0.90	NS	NS
Ca	56.94 ^b	58.08 ^b	57.03 ^b	60.63 ^a	60.74 ^a	0.54	**	NS
P	48.26 ^c	52.77 ^b	53.81 ^b	56.90 ^a	53.58 ^b	0.81	*	NS

^{abcd} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² Microbes : *A. oryzae* vs *B. subtilis*; Level : 3% vs 6%.

³ Not significant ($p > 0.05$).

⁴ * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

아미노산의 회장소화율을 살펴보면(Table 3-4-4), FSP-A와 FSP-B 6% 처리구의 아미노산 소화율이 대부분 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며($p<0.05$), 발효대두단백 처리구간에는 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 그러나 FSP-B 6% 처리구의 histidine, leucine, methionine, threonine 그리고 cystine의 회장소화율은 FSP-A 3% 처리구에 비하여 유의적으로 개선됨을 관찰할 수 있었다($p<0.05$).

Table 3-4-4. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on apparent ileal digestibility of amino acids in early-weaned pigs

Item	Control	FSP-A, %		FSP-B, %		SEM ¹
		3	6	3	6	
Essential Amino Acids						
Arg	78.78 ^b	80.91 ^{ab}	82.05 ^a	82.71 ^a	81.81 ^a	0.49
His	71.59 ^c	72.50 ^{bc}	75.42 ^{ab}	72.01 ^c	76.93 ^a	0.68
Ile	74.66 ^b	75.18 ^{ab}	76.65 ^{ab}	76.23 ^{ab}	78.56 ^a	0.57
Leu	76.08 ^c	77.26 ^{bc}	78.15 ^{abc}	79.4a ^b	79.94 ^a	0.48
Lys	74.76 ^b	76.47 ^{ab}	78.59 ^a	78.37 ^a	77.56 ^{ab}	0.56
Met	77.21 ^c	79.17 ^{bc}	81.94 ^{ab}	79.03 ^c	82.66 ^a	0.64
Phe	74.43 ^b	76.60 ^{ab}	77.00 ^{ab}	75.09 ^b	79.15 ^a	0.59
Thr	66.30 ^c	68.21 ^{bc}	71.23 ^{ab}	69.49 ^{bc}	73.14 ^a	0.75
Val	72.89 ^c	74.70 ^{bc}	77.55 ^{ab}	76.34 ^{ab}	78.64 ^a	0.67
Sub-mean	74.08 ^c	75.67 ^{bc}	77.62 ^{ab}	76.52 ^{ab}	78.71 ^a	0.51
Non-essential Amino Acids						
Ala	72.34 ^b	74.84 ^{ab}	77.10 ^a	75.44 ^{ab}	76.74 ^a	0.62
Asp	73.34 ^b	74.77 ^{ab}	77.02 ^a	75.62 ^{ab}	77.23 ^a	0.53
Cys	57.34 ^c	61.33 ^b	64.12 ^{ab}	61.59 ^b	65.90 ^a	0.90
Glu	73.29 ^b	77.96 ^{ab}	80.52 ^a	79.10 ^{ab}	79.35 ^{ab}	1.03
Gly	58.16	60.19	62.63	62.91	64.16	0.96
Ser	70.46 ^b	73.71 ^{ab}	75.48 ^a	74.10 ^{ab}	77.37 ^a	0.76
Sub-mean	67.49 ^c	70.46 ^b	72.81 ^{ab}	71.46 ^{ab}	73.46 ^a	0.66
Total	70.78 ^c	73.07 ^b	75.22 ^{ab}	73.99 ^{ab}	76.08 ^a	0.56

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p<0.05$).

¹ Pooled standard error means.

다. 장의 형태학적 발달

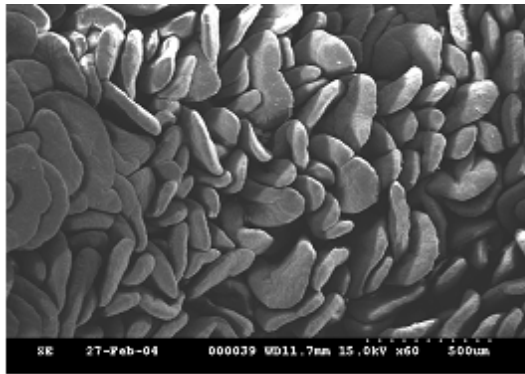
회장의 용모 높이와 융와 깊이를 측정된 결과는 Table 3-4-5와 같다. 용모 높이는 각 처리구간에 유의적으로 차이가 없었으나 FSP-B 처리구는 대조구에 비하여 수치적으로 약간 높게 나타났으며, 융와 깊이는 각각의 처리구간 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다 ($p>0.05$). FSP-B 처리구는 대조구에 비하여 용모 높이는 다소 낮았으며 융와 깊이는 거의 차이가 없었다. 용모높이:융와 깊이 비율은 상대적으로 대조구에 비하여 낮게 나타나는 경향이 있었으나 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$). 용모 높이의 감소는 용모의 흡수면적을 감소시키고 소화효소의 농도를 감소시켜 용모 표면에서의 영양소 전이를 감소시킨다. 비록 본 실험에서 유의적인 차이는 없었으나, 대조구에서 그러한 영향을 받을 수도 있을 것으로 사료된다.

회장 용모의 morphology를 전자현미경으로 관찰한 SEM 사진은 Figure 3-4-1과 같다. Figure 3-4-1을 살펴보면, 용모 수를 측정하지는 않았지만 대조구에 비하여 발효대두단백 처리구의 용모가 다소 많은 것으로 관찰된다. 또한, 발효대두단백 처리구의 용모는 비교적 두툽한 형태를 취하고 있으나 대조구의 용모는 발효대두단백 처리구에 비하여 얇고 넓은 형태로 관찰되었다.

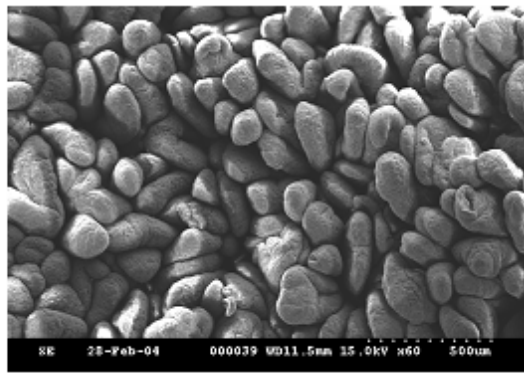
Table 3-4-5. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on ileal villus height, crypt depth and villus height : crypt depth ratio in early-weaned pigs

	Control	FSP-A, %		FSP-B, %		SEM ¹
		3	6	3	6	
Villus height, μm	329	335	337	346	340	5.08
Crypt depth, μm	215	222	216	211	213	3.52
Villus height : Crypt depth	1.54	1.51	1.57	1.65	1.61	0.03

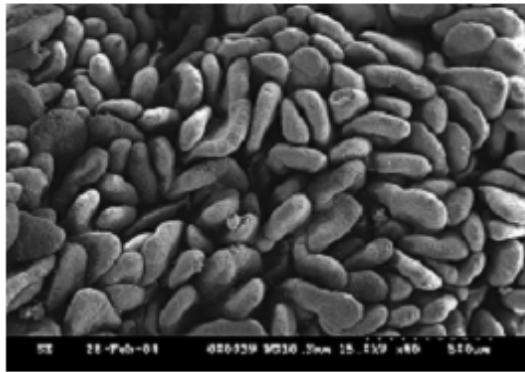
¹ Pooled standard error means.



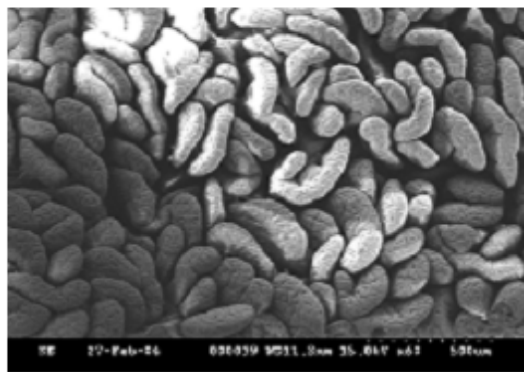
Control



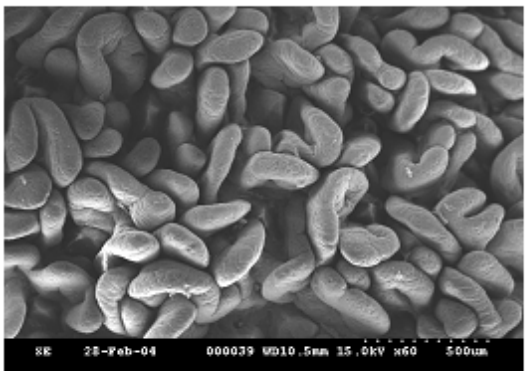
FSP-A 3%



FSP-A 6%



FSP-B 3%



FSP-B 6%

Figure 3-5-1. Effect of level of Soy proteins fermented by different fungi on ileal morphology in early weaned pigs.

라. 면역반응

1) 면역관련 세포 및 혈액 생화학치의 분석

면역과 관련되는 세포와 혈액의 생화학치 분석결과는 Table 3-4-6과 같다. 시험개시시 면역관련세포들 변화를 대두박 처리구(대조구)와 각 처리구를 비교 분석하여 보면 FSP-B 6% 처리구에서 총 백혈구수의 감소가 관찰되었고 또한, 호중구, 림파구와 단핵구의 감소도 관찰되었으나 이는 정상 범위내에서의 차이로 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다($p>0.05$). 또한 본 연구의 관심사인 basophil의 감소도 대조구에 비하여 모든 발효대두단백 처리구에서 관찰되었으나 통계적인 유의성은 없었다($p>0.05$). 시험사료 2주 후에 측정된 면역관련 세포들의 변화를 보면 FSP-A 6%를 급여한 처리구의 경우 호중구와 본 연구의 관심사인 호산구의 유의성 있는 감소가 관찰되었고 FSP-B 6%를 급여한 처리구의 경우도 총백혈구수의 변화는 없었으나 호산구의 유의성 있는 감소가 관찰되었다($p<0.05$). 아울러 대두박을 급여한 대조구에 비하여 발효대두단백을 급여한 처리구의 경우 전반적으로 basophil의 감소도 관찰되었으나 통계적으로 유의성은 없었다($p>0.05$). 시험종료시 측정된 면역관련 세포의 변화에 대한 결과를 비교분석하여 보면 FSP-B를 급여한 처리구의 경우 전반적으로 총백혈구수의 수치가 감소하였으며 아울러 호중구와 림파구 등이 감소되었으나 통계학적인 유의성은 관찰되지 않았다($p>0.05$).

그리고 시험개시시 측정된 혈액화학적 검사치를 비교분석하여 보면(Table 3-4-7) FSP-B 6% 처리구에서 혈소판 수의 유의성 있는 증가가 관찰되었으나 이는 생리학적으로 정상범위에 속하는 것이었다. 시험사료급여 2주 후에 측정된 혈액화학적 결과를 비교분석하여 보면 FSP-A를 급여한 처리구의 경우 전반적으로 헤모글로빈(Hb)의 수치와 hematocrit 수치가 낮아짐이 관찰되었고 혈소판의 경우는 FSP-B를 급여한 처리구에서 전반적으로 증가된 결과가 관찰되었으나 통계적으로 유의성은 없었다. 시험종료시 측정된 혈액화학적 검사치를 보면, 발효대두단백을 급여한 모든 처리구에서 대두박을 급여한 대조구에 비하여 상대적으로 증가된 혈소판 수치가 관찰되었으나, 마찬가지로 생리학적으로 정상범위에 속하는 것이었다.

주요 간 기능과 관련된 효소의 분석결과(Figure 3-4-2), 시험개시시 혈청내의 AST의 경우 전반적으로 FSP-A 3%를 급여한 처리구에서 대두박을 급여한 대조구에 비하여 유의적으로 감소하였으며, ALT의 경우도 발효대두단백을 급여한 처리구들에서 대조구에 비하여 유의적으로 감소되는 것을 관찰하였다($p<0.05$). 시험사료 급여 2주 후에 측정된 혈청내 AST는 전반적으로 발효대두단백을 급여한 처리구에서 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나 이러한 증가폭은 생리적인 정상범위에 속하였다. 시험종료시 측정된 AST의 경우, FSP-A를 급여한 처리구가 다소 증가되었고 ALT의 경우는 FSP-B를 급여한 처리구에서 다소 감소되었으나 이는 모두 생리적인 정상범위에서의 차이인 것으로 사료된다.

Table 3-4-6. Effects of level of soy proteins fermented by different microbes on the immune cell population in early-weaned pigs

Items	Leukocytes ¹				
	Control	FSP-A, %		FSP-B, %	
		3	6	3	6
Initial					
WBC, k/ μ l	19.68±4.14 ^{ab}	22.89±2.94 ^a	23.49±2.94 ^a	17.34±3.43 ^{ab}	12.27±1.61 ^b
NE, k/ μ l	1 0.40±2.94 ^{NS)}	12.75±2.71	11.19±2.25	6.81±1.52	7.57±1.61
LY, k/ μ l	5.56±1.31 ^{ab}	6.69±1.18 ^{ab}	9.80±1.80 ^a	8.43±1.81 ^a	2.89±0.22 ^b
MO, k/ μ l	1.71±0.49 ^{NS)}	1.49±0.10	1.37±0.22	0.98±0.18	1.37±0.24
EO, k/ μ l	1.92±1.00 ^{NS)}	1.86±0.74	1.05±0.16	1.08±0.57	0.42±0.12
BA, k/ μ l	0.09±0.04 ^{NS)}	0.10±0.03	0.10±0.03	0.04±0.01	0.03±0.01
After day 14					
WBC, k/ μ l	24.44±5.60 ^{NS)}	22.54±2.94	21.72±3.22	27.61±1.81	25.14±2.21
NE, k/ μ l	10.71±1.58 ^{ab}	10.37±1.15 ^{ab}	8.06±0.37 ^b	10.31±0.62 ^{ab}	13.10±1.42 ^a
LY, k/ μ l	7.78±0.98 ^{NS)}	8.72±1.64	7.29±0.69	6.92±0.56	9.40±0.75
MO, k/ μ l	1.63±0.50 ^{NS)}	1.56±0.35	1.69±0.49	2.37±0.38	1.54±0.20
EO, k/ μ l	4.10±2.75 ^{ab}	1.80±0.24 ^b	2.90±0.90 ^b	7.73±1.29 ^a	1.01±0.09 ^b
BA, k/ μ l	0.22±0.15 ^{NS)}	0.09±0.02	0.17±0.08	0.29±0.06	0.10±0.02
After day 35					
WBC, k/ μ l	27.02±4.70 ^{NS)}	18.80±5.85	27.68±3.60	25.53±1.84	21.62±2.11
NE, k/ μ l	12.89±2.25 ^{NS)}	7.06±2.50	13.24±1.53	8.73±1.10	8.57±1.62
LY, k/ μ l	8.28±1.63 ^{NS)}	5.66±1.46	6.12±0.51	7.18±1.66	6.56±0.79
MO, k/ μ l	2.42±0.44 ^a	1.22±0.55 ^a	2.13±0.45 ^a	2.24±0.22 ^a	4.17±0.69 ^b
EO, k/ μ l	3.26±0.88 ^{NS)}	4.71±2.40	5.94±2.30	7.16±1.77	2.24±0.42
BA, k/ μ l	0.17±0.07 ^{NS)}	0.15±0.07	0.25±0.09	0.22±0.07	0.09±0.04

¹ Values are mean ± S.D., N=5.

^{ab} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

^{NS)} Values within the row are not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3-4-7. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on hematological values in early-weaned pigs

Items	Erythrocytes and Thrombocyte ¹				
	Control	FSP-A, %		FSP-B, %	
		3	6	3	6
Initial					
RBC, M/ μ l	7.43±0.15 ^{NS)}	9.26±1.45	7.17±0.43	8.94±0.30	8.13±0.67
Hb, M/dL	14.70±2.01 ^{NS)}	16.18±2.31	13.26±0.96	13.25±0.39	13.03±0.56
HCT, %	50.58±8.13 ^{NS)}	50.53±1.70	44.64±3.15	59.40±1.15	58.70±6.19
MCV, fL	67.98±1.53 ^{NS)}	69.80±4.49	70.62±5.57	66.63±1.76	72.25±4.00
MCH, pg	20.13±1.68 ^{ab)}	17.58±0.52 ^{ab)}	21.52±3.23 ^{a)}	14.85±0.46 ^{b)}	16.25±1.09 ^{ab)}
MCHC, g/dL	29.53±2.06 ^{a)}	25.45±1.74 ^{ab)}	29.92±2.03 ^{a)}	22.03±0.25 ^{b)}	22.58±1.28 ^{b)}
RDW, %	21.58±1.31 ^{b)}	24.15±0.67 ^{ab)}	30.28±4.61 ^{a)}	25.03±0.58 ^{ab)}	19.45±0.60 ^{b)}
PLT, k/ μ l	2171±383 ^{b)}	1851±87 ^{c)}	1427±39 ^{bc)}	1468±39 ^{bc)}	3258±260 ^{a)}
MPV, fL	2.78±0.13 ^{NS)}	3.83±0.63	2.92±0.29	3.20±0.42	2.83±0.25
After day 14					
RBC, M/ μ l	8.59±0.90 ^{ab)}	6.31±0.79 ^{b)}	7.15±0.95 ^{b)}	10.61±0.66 ^{a)}	9.73±0.50 ^{a)}
Hb, M/dL	16.70±1.39 ^{ab)}	13.18±2.19 ^{b)}	13.48±2.13 ^{b)}	20.05±0.74 ^{a)}	18.38±0.79 ^{ab)}
HCT, %	58.78±5.15 ^{ab)}	41.76±6.30 ^{b)}	48.20±7.95 ^{ab)}	71.15±3.75 ^{a)}	65.80±0.76 ^{a)}
MCV, fL	68.85±1.74 ^{NS)}	65.32±1.92	66.48±3.10	67.50±3.37	68.05±2.84
MCH, pg	19.70±1.34 ^{NS)}	20.62±1.85	18.68±0.92	19.10±1.31	18.98±1.03
MCHC, g/dL	28.58±1.44 ^{NS)}	31.46±2.45	28.12±0.97	28.30±1.15	27.93±1.03
RDW, %	24.53±0.65 ^{ab)}	23.28±0.85 ^{ab)}	24.06±0.94 ^{ab)}	26.00±0.23 ^{a)}	21.70±0.75 ^{b)}
PLT, k/ μ l	660±173 ^{NS)}	651±236	963±482	1776±523	1662±259
MPV, fL	9.38±2.17 ^{NS)}	4.68±1.66	8.28±2.25	7.43±2.70	5.38±2.14
After day 35					
RBC, M/ μ l	7.81±0.97 ^{NS)}	7.61±2.27	10.64±1.81	12.11±1.30	7.19±0.64
Hb, M/dL	14.65±1.57 ^{NS)}	12.80±3.51	16.55±2.60	18.00±1.24	14.40±0.67
HCT, %	49.55±6.58 ^{a)}	44.08±12.72 ^{a)}	62.48±10.09 ^{ab)}	75.88±4.73 ^{b)}	40.55±2.92 ^{a)}
MCV, fL	63.30±1.64 ^{NS)}	57.78±1.86	59.30±3.62	63.50±2.76	56.68±1.74
MCH, pg	18.90±0.68 ^{ab)}	17.25±1.77 ^{ab)}	15.65±0.72 ^{ab)}	15.05±0.72 ^{b)}	20.28±1.11 ^{a)}
MCHC, g/dL	29.93±1.41 ^{b)}	29.78±2.27 ^{b)}	26.90±2.90 ^{bc)}	23.78±0.90 ^{c)}	35.70±1.03 ^{a)}
RDW, %	22.78±0.81 ^{NS)}	22.35±0.46	22.48±1.64	23.05±0.58	20.68±0.69
PLT, k/ μ l	611±155 ^{a)}	892±549 ^{a)}	2150±347 ^{b)}	2889±162 ^{b)}	1379±115 ^{a)}
MPV, fL	9.05±1.65 ^{a)}	5.30±1.90 ^{b)}	2.50±0.08 ^{b)}	2.88±0.08 ^{b)}	11.60±0.90 ^{a)}

¹ Values are mean ± S.D., N=5.

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

^{NS)} Values within the row are not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

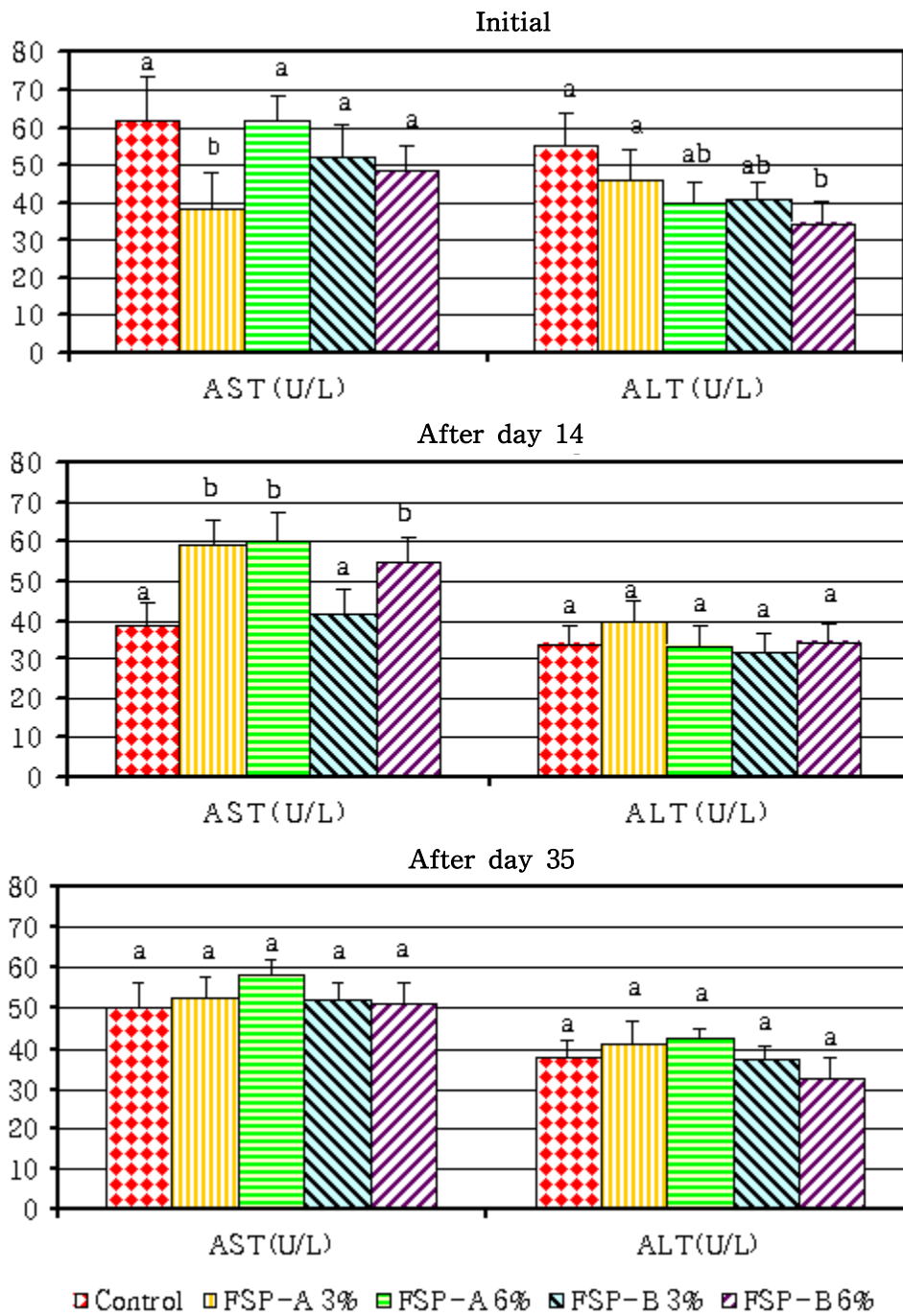


Figure 3-4-2. Effects of level of soy proteins fermented by different microbes on AST and ALT enzyme in serum in early-weaned pigs.

2) 다형핵 백혈구의 chemiluminescence

시험개시, 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 측정된 결과를 분석하여 보면 Table 3-4-8과 같다. 대두박을 급여한 대조구와 각각의 발효대두단백을 급여한 처리구들간에 유의성 있는 변화나 특이한 영향은 관찰되지 않았다($p>0.05$). 즉, 대두박을 급여한 대조구를 기준으로 하여 각 발효대두단백 처리구의 다형핵 백혈구의 탐식작용능력 변화를 평가하기 위한 호염기구에 의한 chemiluminescence 변화는 관찰되지 않았고 모든 처리구들에서 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다.

Table 3-4-8. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on the polymorphonuclear granulocytes (%) induced chemiluminescence¹ in early-weaned pigs

Items	Control	FSP-A, %		FSP-B, %	
		3	6	3	6
Initial	100*	107.8±6.5	101.2±3.2	105.2±5.1	99.8±5.6
After day 14	100**	104.9±9.3	99.5±8.3	102.1±5.3	108.8±4.8
After day 35	100***	99.6±5.7	103.8±5.1	101.5±4.6	104.2±5.4

¹ Values are means ± S.D., N=3.

* 100% = $4.278 \pm 0.699 \times 10^9$ cpm.

** 100% = $4.712 \pm 0.849 \times 10^9$ cpm.

*** 100% = $4.891 \pm 0.867 \times 10^9$ cpm.

3) 혈청내 대두 단백질에 대한 IgG 역가

혈청내에 존재할 것으로 기대한 대두단백에 대한 IgG 항체의 양성율은 시험사료 급여 2주 후와 시험종료시 모든 대조구에서 전혀 관찰되지 않았으며 아울러 발효대두단백을 급여한 모든 처리구에서도 IgG에 대한 항체가 전혀 관찰되지 않았다(Table 3-4-9). 한편, 이에 따른 혈청내의 항체 역가 역시 대두박을 급여한 대조구를 비롯하여 발효대두단백을 급여한 처리구에서 모두 전혀 측정되지 않았다(Table 3-4-10). 이러한 결과는 본 시험에 사용된 대두 단백질이 항원성 또는 allergen 으로서의 작용을 나타 내지 않는 것으로 사료된다.

Table 3-4-9. Effects of level of fermented soy protein on IgG antibody for test sera by micro-ELISA in early-weaned pigs

Item	Criterion	Control	FSP-A, %		FSP-B, %	
			3	6	3	6
Initial	No. of positive	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
After day 14		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
After day 35		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Table 3-4-10. Effect of level of soy proteins fermented by different microbes on serum antibody IgG titers to soy proteins in early-weaned pigs

Reciprocal titer	Control	FSP-A, %		FSP-B, %		
		3	6	3	6	
Initial						
1 ×	1/5	ND	ND	ND	ND	
2 ×	ND ¹	ND	ND	ND	ND	
4 ×	ND	ND	ND	ND	ND	
After day 14						
1 ×	ND	ND	ND	ND	ND	
2 ×	ND	ND	ND	ND	ND	
4 ×	ND	ND	ND	ND	ND	
After day 35						
1 ×	1/5	ND	ND	ND	ND	
2 ×	ND	ND	ND	ND	ND	
4 ×	ND	ND	ND	ND	ND	

¹ No detectable.

4) ELISA 기법을 이용한 유리된 히스타민

본 연구에 사용된 양성대조군인 대두박의 사용에 의하여 발생될 수 있는 알러지에 의하여 혈청내에 생성 유리될 수 있으리라고 추정된 히스타민과 이에 대한 개선 효과를 기대하는 각 처리구에서의 히스타민량을 조사한 결과 발효대두단백 처리구들은 물론이고 대조구에서도 혈청내에서 히스타민이 전혀 검출되지 않았다(Table 3-4-11).

Table 3-4-11. Effects of level of soy proteins fermented by different microbes on histamine release (%) in early-weaned pigs

Item	Control	FSP-A, %		FSP-B, %	
		3	6	3	6
Initial	ND ¹	ND	ND	ND	ND
After day 14	ND	ND	ND	ND	ND
After day 35	ND	ND	ND	ND	ND

¹ No detectable.

4. 요 약

균주를 달리한 2가지 발효대두단백(*A. oryzae*와 *A. oryzae*+*B. subtilis* 복합균주)의 사용은 자돈의 성장능력과 영양소 소화율을 개선시키는 것으로 나타났다. 두 발효대두단백은 사용수준보다는 발효균주에 의해 대체로 유의적인 차이가 나타나는 경향이 있었으므로 복합균주에 의한 발효대두단백(FSP-B)이 단일균주에 의한 발효대두단백(FSP-A)보다는 다소 좋은 원료로 생각된다. 사용수준에 있어서도 비록 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 두 발효대두박의 3% 사용보다는 6% 사용시 성장능력이 향상되는 것으로 보여 진다.

그리고 면역에 관여하는 혈중 백혈구, 적혈구, 혈소판 그리고 효소치는 발효균주나 사용수준에 따라 변화되는 경우가 다소 관찰되었으나, 대부분 정상범위의 생리적인 반응에 기인한 것으로 별다른 문제가 발생하지 않을 것으로 사료되며 IgG와 히스타민의 측정결과도 발효대두단백에 대한 알러지 반응을 관찰할 수 없었던 것으로 보아 기존의 대두단백과 구조상의 차이가 있을 것으로 판단된다.

제 5 절 세부과제: 개발한 발효대두단백의 동물성 단백질원에 대한 상대적 가치평가

1. 서 론

양돈사료에 주로 사용하고 있는 단백질 공급원으로는 동물성 단백질 원료인 어분, 유장분말과 농축 유장분말, 탈지분유, 혈분 그리고 육골분 등이 있으며, 식물성 단백질 원료인 대두박, 면실박, 케놀라밀, 루핀 등이 있으나, 자돈사료에는 양질의 어분, 분무건조혈장단백(SDPP), 건조 내장분말, 농축 유장분말(WPC), 탈지분유, 농축 대두단백(SPC), 정제 대두단백(ISP) 등과 같은 고품질 원료를 사용하고 있다.

일반적으로 동물성 단백질 원료는 lysine과 methionine 등의 아미노산 함량이 대체로 높고, 아미노산 조성이 우수하며, 미지성장인자(un-known growth factor: UGF)도 함유하고 있으나 식물성 단백질 원료에 비하여 고가이다. 반면에 식물성 단백질 원료는 동물성 단백질 원료에 비하여 가격은 저렴한 편이나 아미노산 특히 lysine과 methionine의 함량이 낮고, 갈슘과 인의 함량도 낮으며, 조섬유 함량은 높다. 또한, 식물성 단백질 원료에는 여러 가지 성장유해인자가 함유되어 있어 사용에 제약을 받는다. 특히, 소화기와 면역체계가 미성숙한 어린 자돈에 급여시 소화장애를 일으킨다. 발효대두단백은 그러한 문제를 최소화하기 위하여 항영양인자(ANF's)와 항원물질을 미생물 발효에 의해 제거시키거나 낮추고 단백질 함량을 높인 원료이다. 본 실험의 목적은 발효대두단백과 여러 동·식물성 단백질 원료의 자돈사료내 사용이 성장능력, 영양소 소화율, 소화기의 형태학적 발달 그리고 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 발효대두단백의 동물성 단백질 원료에 대한 상대적 가치를 평가하기 위함이다.

2. 재료 및 방법

가. 공시동물, 시험설계 및 사료

사양시험을 위해 이유자돈(L×Y×D, 22±3일령; 5.67±0.78kg) 240두(5처리, 3반복, 반복당 16두)를 공시하여, 성과 체중에 따라 각각의 처리구에 완전임의 배치하였다. 이유 후 2주(0~14일)와 3~4주(15~28일)로 총 4주(28일)간 사양시험을 실시하였다.

시험사료는 옥수수과 WP 위주의 사료로서 대조구 사료는 15%의 SBM을 함유하였으

며, 처리구 사료는 FSP-B, 쌀 단백질(rice protein concentrate; RPC), 어분(fish meal; FM) 그리고 농축 유장분말(WPC)로 대조구사료의 SBM을 각각 6%씩 대체하였으며, 이로 인한 시험사료내 단백질, lysine 그리고 methionine+cystine의 차이는 농축대두단백(SPC)과 합성아미노산으로 보충하였다(Table 3-5-1). 시험사료내 영양소 함량은 Table 3-5-1과 같으며, 비타민과 광물질은 NRC(1998) 요구량을 충족하거나 초과하도록 하였다. 영양소 소화율을 측정하기 위하여 산화크롬(Cr_2O_3)을 불소화지시제로서 첨가하였다.

자돈들에게 포유기간 동안 처리구 구분없이 일반 시판용 대용유를 급여하였으며, 이유 후 0~14일 까지 시험사료를 급여한 후, 15~28일 까지 모든 처리구에 일반 시판용 크럼블 사료를 급여하였다. 자돈은 바닥의 절반이 슬랫인 돈방(1.9m×2.54m)에서 사육하였으며, 돈사의 환기는 팬을 이용하여 강제환기 하였다. 사료와 물은 자유채식 시켰고, 첨가제나 약품은 일절 사용하지 않았다. 기타 자돈의 사양관리는 본 연구실의 관행에 준하여 실시하였다.

나. 측정 및 시료 채취

체중 측정은 시험개시와 시험사료 급여 후 매주 그리고 일반 시판용 크럼블사료 급여 2주 후 총 4회 측정하였으며 사료섭취량을 측정하기 위하여 시험사료 급여 2주 후와 일반 시판용 크럼블사료 급여 2주 후에 급이통 으로부터 사료잔량의 무게를 측정하였다. 분시료의 채취는 시험사료 급여 2주 후 각각의 돈방별로 채취하였다. 분시료는 -10℃의 냉장고에 보관한 후 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm망사 wiley mill로 분쇄한 후 일반 영양소와 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

소장 용모의 형태학적 발달을 관찰하기 위한 회장 시료는 시험사료급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 1두(처리당 4두, 총 20두)씩 도살 후 개복하여 십이지장, 공장 그리고 회장 부위를 식염수로 세척 후 10% formalin 용액에 침지하여 관찰할 때까지 냉장 보관하였다.

소장 내용물의 미생물 균수와 회장 아미노산 소화율을 측정하기 위하여 시험사료 급여 2주 후에 각각의 돈방으로부터 1두씩 총 20두(처리당 4두)를 도살하여 개복 후 십이지장, 공장 그리고 회장 내용물(맹장과 회장연결부로부터 15cm 부분)을 채취하여 십이지장과 공장 부위의 내용물은 각각의 반복구별로 혼합한 후 -10℃의 냉장고에 즉시 보관하였다. 십이지장과 공장의 내용물은 미생물 분석 전까지 냉장고에 보관하였으며, 아미노산 분석을 위하여 회장 내용물은 -80℃의 냉동건조기(Samwon Inc., Korea)에서 냉동 건조하였다. 건조된 시료는 1mm망사 wiley mill로 분쇄한 후 아미노산을 분석하기 전까지 냉장 보관하였다.

Table 3-5-1. Formula and calculated compositions of experimental diets for feeding trials (day 0 to 14)

Treatments	SBM	FSP-B	RPC	WPC	FM
Ingredients (%)					
Corn	28.88	29.79	29.92	30.82	31.01
Whey powder	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
FSP-B	-	6.00	-	-	-
RPC	-	-	6.00	-	-
WPC	-	-	-	6.00	-
Fish meal	-	-	-	-	6.00
Deh-SBM (48%)	15.00	9.00	9.00	9.00	9.00
SDPP	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Lactose	15.00	15.00	15.00	12.24	15.00
SPC	4.99	4.00	4.00	6.00	4.00
Biscuit byproduct	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Animal fat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Limestone	1.30	1.39	1.36	1.27	0.81
MCP	0.57	0.53	0.56	0.48	0.46
ZnO	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamin premix ¹	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Acidifier	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Apramycin	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-lysine(78%)	0.31	0.33	0.39	0.17	0.28
DL-methionine (50%)	0.35	0.36	0.17	0.42	0.30
Choline chloride (25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Sulfathiazol	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mecadox	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition					
ME, kcal/kg	3,365	3,357	3,419	3,367	3358
CP, %	21.00	21.06	21.83	21.00	21.19
Ca, %	0.80	0.82	0.82	0.80	0.82
Av. P, %	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lys, %	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Met+Cys, %	0.85	0.85	0.85	0.86	0.85

¹ Supplied per kg diet: 9,600IU vitamin A, 1,800IU vitamin D₃, 24mg vitamin E, 1.5mg vitamin B₁, 12mg vitamin B₂, 2.4mg vitamin B₆, 0.045mg vitamin B₁₂, 1.5mg vitamin K₃, 24mg Pantothenic acid, 45 mg niacin, 0.09mg biotin, 0.75mg folic acid, 18 mg ethoxyquin.

² Supplied per kg diet: 162mg Fe, 96mg Cu, 72mg Zn, 46.49 mg Mn, 0.9mg I, 0.9mg Co, 0.3mg Se.

다. 실험적 측정 및 분석

사양시험에서 얻어진 체중과 사료섭취량으로 일당증체량(ADG), 일일사료섭취량(ADFI) 그리고 사료효율(F/G)을 분석하였다. 사료와 분의 일반성분 분석은 AOAC(1990)의 방법에 따라 분석하였고, 에너지는 단열폭발열량측정기(Model 1241, Parr Instrument Co., Molin, IL)로 측정하였으며, 크롬은 원자흡광도계(Contron 942, Italy)를 사용하여 측정하였다.

Villus height와 crypt depth를 측정하기 위하여 10% formalin용액에 보존되어 있던 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 6 μ m크기로 절단하여 azure A와 eosine으로 염색하였다. 염색된 시료는 40배 비율의 microscope에서 측정하였다(Cera 등, 1988). Morphology를 측정하기 위하여 회장의 시료크기를 2mm²로 하여 절단하였으며 절단한 시료를 0.4 M KCl 용액에 세척하여 내용물을 완전히 제거한 후 고정액(0.1 M collidine buffer, pH7.3; 3% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 1.5% acrolein)에 보존하였다. 보존된 시료는 Liepens와 DeHaven(1978)의 방법에 따라 ethanol-preon series로 가수분해 시킨 후 platinum coating 처리하여 ISI scanning electron microscope(Hitachi S-3500N, JAPAN)에 의해 측정하였다.

분과 회장 내용물의 아미노산 분석은 시료를 24시간 동안 105 $^{\circ}$ C에서 6N HCl 용액으로 가수분해 시킨 후 HPLC(Waters 486, USA)를 사용하여 분석하였으며, 황함유 아미노산은 24시간 동안 가수분해 시킨 후 cold performic acid용액으로 산화처리하여 분석하였다(Moore, 1963).

장내용물의 미생물은 총균수(total bacteria count; TBC), 유산균(lactic acid bacteria), 클로스트리듐속균(*Clostridium perfringens*)을 검사하였으며, 희석액은 Peptone(0.5%)+L-cysteine(0.02%)용액을 사용하였고 희석과정중 희석액 표면을 Paraffin oil로 coating하여 혐기상태를 유지하였다. TSC배지는 Egg Yolk Emulsion을 5%, Cycloserine을 0.04% 첨가하였다. 유산균과 *CL. perfringens*는 가스팩에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 72시간동안 혐기배양하여 측정하였다.

라. 통계적 분석

모든 측정된 데이터는 SAS(1998)의 GLM 절차를 이용하여 최소유의차 검정을 실시하였고, 완전임의배치법으로 분석하였다. 실험에 사용된 동·식물성 단백질 원료들의 상대적 가치평가를 위하여 동물성 단백질원료(FM와 WPC)와 식물성 단백질 원료(FSP-B와 RPC)에 대하여 직교비교를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사양성적

동·식물성 단백질 원료의 상대적 가치평가를 위한 사양성적 결과는 Table 3-5-2와 같다. 시험사료 급여 1주(0~7일)동안 FSP-B 처리구의 ADG는 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), RPC 처리구와는 유의적인 차이가 없었으며($p > 0.05$), WPC와 FM 처리구보다는 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). FSP-B 처리구의 ADFI는 SBM과 RPC 처리구와 유의적인 차이는 없었으나($p < 0.05$), WPC와 FM 처리구보다는 유의적으로 낮게 나타났다($p > 0.05$). 하지만, FSP-B 처리구의 F/G는 SBM과 RPC에 비하여 유의적으로 낮았고($p < 0.05$), WPC와 FM 처리구와는 차이가 없었다($p > 0.05$). 식물성 단백질(FSP-B와 RPC)과 동물성 단백질(WPC와 FM) 처리구간의 ADG와 ADFI는 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다($p < 0.001$).

시험사료 급여 8~14일 동안 FSP-B 처리구의 ADG는 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높았으나($p < 0.05$), 다른 처리구들과는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며($p > 0.05$), ADFI는 SBM 처리구보다 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$) RPC와 WPC 처리구와는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). 그리고 FSP-B 처리구의 F/G는 SBM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나 다른 처리구들과는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). 식물성과 동물성 단백질 처리구간의 유의성 검정에 있어서도 처음 1주 동안과 마찬가지로 ADG와 ADFI에서 유의적인 차이가 관찰되었다($p < 0.01$).

시험사료 급여기간(0~14일)동안 FSP-B 처리구의 ADG와 ADFI는 SBM 처리구보다는 유의적으로 높게 나타났으나, WPC와 FM 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). F/G에 있어서 WPC 처리구만이 FSP-B 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 이 기간에서 사양성적은 동물성 단백질 처리구들이 식물성 단백질 처리구들에 비하여 유의적으로 높은 것으로 나타났다($p < 0.01$).

일반 시판용 크럼블 사료급여기간(15~28일) 동안 FSP-B 처리구의 ADG는 SBM 처리구보다는 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$) 다른 처리구들과는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). ADFI에 있어서 FSP-B 처리구는 WPC와 FM 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났으나($p < 0.05$). F/G는 FM 처리구와는 유의적인 차이가 없었으나 다른 처리구들보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이 기간동안 ADFI에서만 동물성과 식물성 단백질 처리구간에 유의성을 관찰할 수 있었다($p > 0.05$).

전체 시험기간(0~28일)의 사양성적을 살펴보면, FSP-B 처리구의 ADG와 F/G는 SBM 처리구를 제외하고 다른 처리구들과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며($p > 0.05$), ADFI는 동물성 단백질인 WPC와 FM 처리구보다는 유의적으로 낮게 나타났으나($p < 0.05$). 그리고 시험

사료 급여 1주와 2주 동안과 마찬가지로 동물성과 식물성 단백질 처리구간에 유의성이 있는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

Table 3-5-2. Effect of different protein sources on growth performance in early-weaned pigs

Item	SBM	Vegetable		Animal		SEM ¹	Contrast, $P < ^2$ V vs A
		FSP-B	RPC	WPC	FM		
Day 0 ~7							
ADG, g	187 ^c	207 ^b	201 ^b	236 ^a	225 ^a	4.90	0.0001
ADFI, g	265 ^b	279 ^b	276 ^b	315 ^a	305 ^a	5.52	0.0003
F/G	1.42 ^a	1.35 ^c	1.38 ^b	1.34 ^c	1.36 ^{bc}	0.01	NS ³
Day 8~14							
ADG, g	271 ^c	307 ^{ab}	296 ^b	326 ^a	322 ^a	5.73	0.0043
ADFI, g	417 ^d	452 ^{bc}	430 ^{cd}	470 ^{ab}	474 ^a	6.49	0.0012
F/G	1.54 ^a	1.47 ^b	1.45 ^b	1.45 ^b	1.47 ^b	0.01	NS
Day 0~14							
ADG, g	229 ^c	257 ^b	248 ^b	281 ^a	273 ^a	5.17	0.0002
ADFI, g	339 ^c	370 ^b	357 ^{bc}	397 ^a	389 ^a	5.83	0.0002
F/G	1.49 ^a	1.44 ^b	1.44 ^b	1.42 ^c	1.42 ^{bc}	0.01	0.0096
Day 15~28							
ADG, g	337 ^b	376 ^{ab}	367 ^{ab}	400 ^a	390 ^a	8.40	NS
ADFI, g	509 ^d	523 ^{cd}	529 ^c	584 ^a	553 ^b	7.38	0.0001
F/G	1.51 ^a	1.40 ^c	1.46 ^b	1.46 ^b	1.42 ^{bc}	0.01	NS
Day 0~28							
ADG, g	283 ^c	316 ^{ab}	307 ^{bc}	340 ^a	332 ^{ab}	6.19	0.0155
ADFI, g	425 ^d	447 ^c	443 ^c	491 ^a	471 ^{ab}	6.22	0.0001
F/G	1.50 ^a	1.42 ^b	1.45 ^b	1.44 ^b	1.42 ^b	0.01	NS

^{abcd} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² Contrast: Vegetable (FSP-B and RPC) vs Animal (WPC and FM).

³ Not significant ($p > 0.05$).

나. 영양소 소화율

일반 영양소의 소화율은 Table 3-5-3과 같다. SBM 처리구의 영양소 소화율은 대부분 다른 처리구들에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). FSP-B 처리구의 에너지와 단백질 소화율은 RPC 처리구와 유의적인 차이를 나타내지 않았으나($p > 0.05$), 동물성 단백질 원료인 WPC와 FM 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 기타 지방, 칼슘 그리고 인의 소화율은 SBM 처리구를 제외하고, 다른 처리구들과 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). 동물성과 식물성 단백질 처리구들간의 비교에 있어 건물, 에너지 그리고 단백질의 영양소 소화율은 유의적인 차이가 있었으나($p < 0.05$), 지방, 칼슘 그리고 인의 소화율은 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$).

외관상 아미노산 분과 회장소화율은 각각 Table 3-5-4와 Table 3-5-5와 같다. FSP-B 처리구의 외관상 아미노산 분과 회장소화율은 SBM 처리구보다는 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), 다른 처리구들과는 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). FSP-B 처리구의 isoleucine의 외관상 회장 소화율만이 유일하게 WPC와 FM 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$). 그리고 arginine, histidine, isoleucine, leucine, valine, glutamic acid의 분 소화율과 isoleucine, leucine, methionine, threonine 그리고 aspartic acid의 회장소화율에서 동물성과 식물성 단백질 처리구간의 유의성이 관찰되었다($p < 0.05$).

Table 3-5-3. Effect of different protein sources on nutrient digestibility in early-weaned pigs(at day 14)

Item	SBM	Vegetable		Animal		SEM ¹	Contrast, $P < ^2$ V vs A
		FSP-B	RPC	WPC	FM		
DM	84.19 ^c	86.43 ^b	86.41 ^b	87.56 ^a	86.99 ^{ab}	0.31	0.0062
GE	83.66 ^d	85.74 ^c	85.98 ^{bc}	87.37 ^a	86.43 ^b	0.33	0.0001
CP	71.09 ^c	77.87 ^b	77.22 ^b	80.27 ^a	79.37 ^a	0.87	0.0002
EE	53.05 ^b	61.30 ^a	62.08 ^a	62.79 ^a	64.43 ^a	1.28	NS ³
Ca	54.34 ^b	61.30 ^a	59.75 ^a	60.63 ^a	57.72 ^a	0.88	NS
P	50.89 ^c	58.18 ^{ab}	56.40 ^b	60.21 ^a	57.72 ^{ab}	0.92	NS

^{abcd} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p < 0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² Contrast: Vegetable (FSP-B and RPC) vs Animal (WPC and FM).

³ Not significant ($p > 0.05$).

Table 3-5-4. Effect of different protein sources on apparent faecal amino acid digestibility in early-weaned pigs(at day 14)

Item	SBM	Vegetable		Animal		SEM ¹	Contrast, P< ²
		FSP-B	RPC	WPC	FM		V vs A
Essential amino acids							
Arg	75.91 ^{bc}	78.37 ^a	78.89 ^a	74.73 ^c	77.18 ^{ab}	0.49	0.0048
His	67.13 ^d	73.36 ^a	70.95 ^{bc}	72.49 ^{ab}	69.72 ^c	0.61	0.0714
Ile	66.00 ^c	74.94 ^a	72.02 ^{ab}	70.52 ^b	69.92 ^b	0.89	0.0181
Leu	70.05 ^c	72.98 ^{bc}	75.08 ^{ab}	77.69 ^a	76.65 ^{ab}	0.87	0.0325
Lys	69.68 ^b	74.79 ^a	75.04 ^a	74.60 ^a	73.86 ^a	0.65	NS ³
Met	70.40 ^b	73.93 ^a	74.93 ^a	74.83 ^a	73.89 ^a	0.49	NS
Phe	71.22 ^c	76.76 ^a	72.38 ^{bc}	74.37 ^{ab}	72.82 ^{bc}	0.59	NS
Thr	63.40 ^b	70.66 ^a	70.93 ^a	70.54 ^a	69.95 ^a	0.83	NS
Val	62.17 ^d	69.90 ^{bc}	67.45 ^c	73.04 ^a	72.22 ^{ab}	1.09	0.0008
Sub-mean	68.44 ^b	73.97 ^a	73.07 ^a	73.65 ^a	72.91 ^a	0.61	NS
Non-essential amino acids							
Ala	64.90 ^b	72.35 ^a	71.67 ^a	73.27 ^a	70.67 ^a	1.01	NS
Asp	72.24 ^c	75.33 ^b	74.45 ^{bc}	78.61 ^a	73.73 ^{bc}	0.66	NS
Cys	59.91 ^b	63.69 ^a	62.97 ^a	64.50 ^a	63.44 ^a	0.52	NS
Glu	73.84 ^c	77.04 ^b	77.03 ^b	79.14 ^a	71.89 ^c	0.73	0.0431
Gly	60.09 ^b	63.42 ^{ab}	66.58 ^a	67.69 ^a	64.92 ^a	0.88	NS
Pro	66.83 ^{ab}	69.58 ^{ab}	69.87 ^a	68.43 ^{ab}	66.29 ^b	0.57	NS
Ser	71.17 ^b	74.57 ^a	73.56 ^{ab}	72.68 ^{ab}	72.28 ^{ab}	0.50	NS
Tyr	64.01 ^b	67.71 ^{ab}	68.32 ^{ab}	69.16 ^a	65.43 ^{ab}	0.77	NS
Sub-mean	66.62 ^c	70.46 ^{ab}	70.56 ^{ab}	71.69 ^a	68.58 ^{bc}	0.60	NS
Total	67.53 ^b	72.21 ^a	71.82 ^a	72.67 ^a	70.75 ^a	0.59	NS

^{abcd} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

¹ Pooled standard error means.

² Contrast : Vegetable (FSP-B and RPC) vs Animal (WPC and FM).

³ Not significant (p>0.05).

Table 3-5-5. Effect of different protein sources on apparent ileal amino acid digestibility in early-weaned pigs(at day 14)

Item	SBM	Vegetable		Animal		SEM ¹	Contrast, P< ²
		FSP-B	RPC	WPC	FM		V vs A
Essential amino acids							
Arg	77.01	79.53	80.46	77.42	79.05	0.57	NS
His	69.71 ^b	74.64 ^a	71.72 ^{ab}	74.13 ^{ab}	71.29 ^{ab}	0.75	NS ³
Ile	69.71 ^c	76.67 ^a	76.65 ^a	73.40 ^b	73.45 ^b	0.75	0.0035
Leu	72.42 ^c	76.41 ^b	76.45 ^b	79.20 ^a	78.26 ^{ab}	0.67	0.0092
Lys	71.62 ^c	79.00 ^a	76.20 ^{ab}	78.15 ^{ab}	76.13 ^b	0.75	NS
Met	73.82 ^c	78.38 ^{ab}	76.85 ^{bc}	81.41 ^a	79.12 ^{ab}	0.77	0.0269
Phe	73.16 ^c	79.77 ^a	76.54 ^b	79.46 ^a	75.88 ^b	0.72	NS
Thr	68.10 ^d	73.21 ^{bc}	72.38 ^c	75.35 ^{ab}	76.36 ^a	0.83	0.0058
Val	68.87 ^b	74.49 ^a	73.03 ^a	74.42 ^a	74.62 ^a	0.67	NS
Sub-mean	71.60 ^b	76.90 ^a	75.59 ^a	76.99 ^a	76.02 ^a	0.59	NS
Non-essential amino acids							
Ala	72.81 ^c	76.75 ^b	75.57 ^b	79.28 ^a	75.20 ^b	0.59	NS
Asp	75.19 ^c	79.73 ^{ab}	76.84 ^{bc}	80.75 ^a	80.68 ^a	0.71	0.0409
Cys	61.67 ^c	65.40 ^{ab}	63.19 ^{bc}	67.16 ^a	62.32 ^{bc}	0.67	NS
Glu	75.87 ^d	80.07 ^{ab}	78.49 ^{bc}	81.62 ^a	75.97 ^{cd}	0.67	NS
Gly	62.82 ^b	68.29 ^a	68.70 ^a	70.90 ^a	67.99 ^a	0.85	NS
Pro	71.78 ^b	75.05 ^a	77.31 ^a	75.33 ^a	75.72 ^a	0.61	NS
Ser	73.14 ^c	78.39 ^a	74.91 ^c	77.75 ^{ab}	75.68 ^{bc}	0.59	NS
Tyr	69.47 ^b	71.42 ^{ab}	72.13 ^{ab}	73.42 ^a	70.04 ^b	0.52	NS
Sub-mean	70.34 ^c	74.39 ^{ab}	73.39 ^b	75.78 ^a	72.95 ^b	0.55	NS
Total	70.97 ^b	75.64 ^a	74.49 ^a	76.39 ^a	74.48 ^a	0.56	NS

^{abcd} Values with different superscripts of the same row are significantly differ (p<0.05).

¹ Pooled standard error means.

² Contrast : Vegetable (FSP-B and RPC) vs Animal (WPC and FM).

³ Not significant (p>0.05).

다. 장의 형태학적 발달

십이지장, 공장 그리고 회장 부위의 용모 높이와 융와 깊이를 측정된 결과는 Table 3-5-6과 같다. FSP-B 처리구의 용모 높이, 융와 깊이 그리고 용모 높이:융와 깊이는 SBM 처리구와 대체로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며($p>0.05$), WPC 처리구의 용모 높이는 SBM과 FSP-B 처리구에 비하여 모든 부위에서 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). FSP-B 처리구의 용모 깊이는 십이지장을 제외하고 공장과 회장에서 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). FSP-B 처리구의 용모 높이:융와 깊이는 WPC 처리구에 비하여 모든 부위에서 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). 이는 대두단백의 첨가는 유단백 원료에 비하여 용모 높이를 감소시킨다고한 Li 등(1991b)의 결과와 일치하였다. 그리고 동물성과 식물성 단백질원료 간에 용모 높이의 유의성이 모든 부위에서 유의적인 차이가 관찰되었다($p<0.05$). 따라서 식물성 단백질 원료가 동물성 단백질 원료에 비하여 용모 높이를 더 감소시키는 것으로 보여진다.

Table 3-5-6. Effect of different protein sources on villus height and crypt depth of the intestinal region in early-weaned pigs

	SBM	Vegetable		Animal		SEM ¹	Contrast, $P<^2$ V vs A
		FSP-B	RPC	WPC	FM		
Villus height, μm							
Duodenum	319 ^b	327 ^b	343 ^{ab}	363 ^a	358 ^a	5.43	0.0097
Jejunum	310 ^c	322 ^{bc}	330 ^{abc}	351 ^a	345 ^{ab}	5.00	0.0217
Ileum	301 ^c	312 ^{bc}	318 ^{bc}	344 ^a	327 ^{ab}	4.65	0.0113
Crypt depth, μm							
Duodenum	218 ^{ab}	222 ^a	214 ^{ab}	203 ^b	207 ^{ab}	2.91	0.0447
Jejunum	218	219	212	213	216	2.04	NS ³
Ileum	211	212	205	206	210	1.93	NS
Villus height:Crypt depth							
Duodenum	1.47 ^b	1.48 ^b	1.61 ^{ab}	1.79 ^a	1.73 ^a	0.04	0.0067
Jejunum	1.43 ^c	1.48 ^{bc}	1.56 ^{abc}	1.65 ^a	1.60 ^{ab}	0.03	0.0338
Ileum	1.42 ^b	1.47 ^b	1.55 ^{ab}	1.67 ^a	1.56 ^{ab}	0.03	0.0335

^{abc} Values with different superscripts of the same row are significantly differ ($p<0.05$).

¹ Pooled standard error means.

² Contrast : Vegetable (FSP-B and RPC) vs Animal (WPC and FM).

³ Not significant ($p>0.05$).

회장 용모의 morphology를 전자현미경을 통하여 관찰한 SEM 사진은 Figure 3-5-1과 같다. Figure 3-5-1에서 볼 수 있듯이, 각 처리구간에 용모 형태의 특이적인 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 아마도 각 시험원료간의 영향보다는 시험사료 급여자체가 더 큰 영향을 미쳤기 때문인 것으로 사료된다.

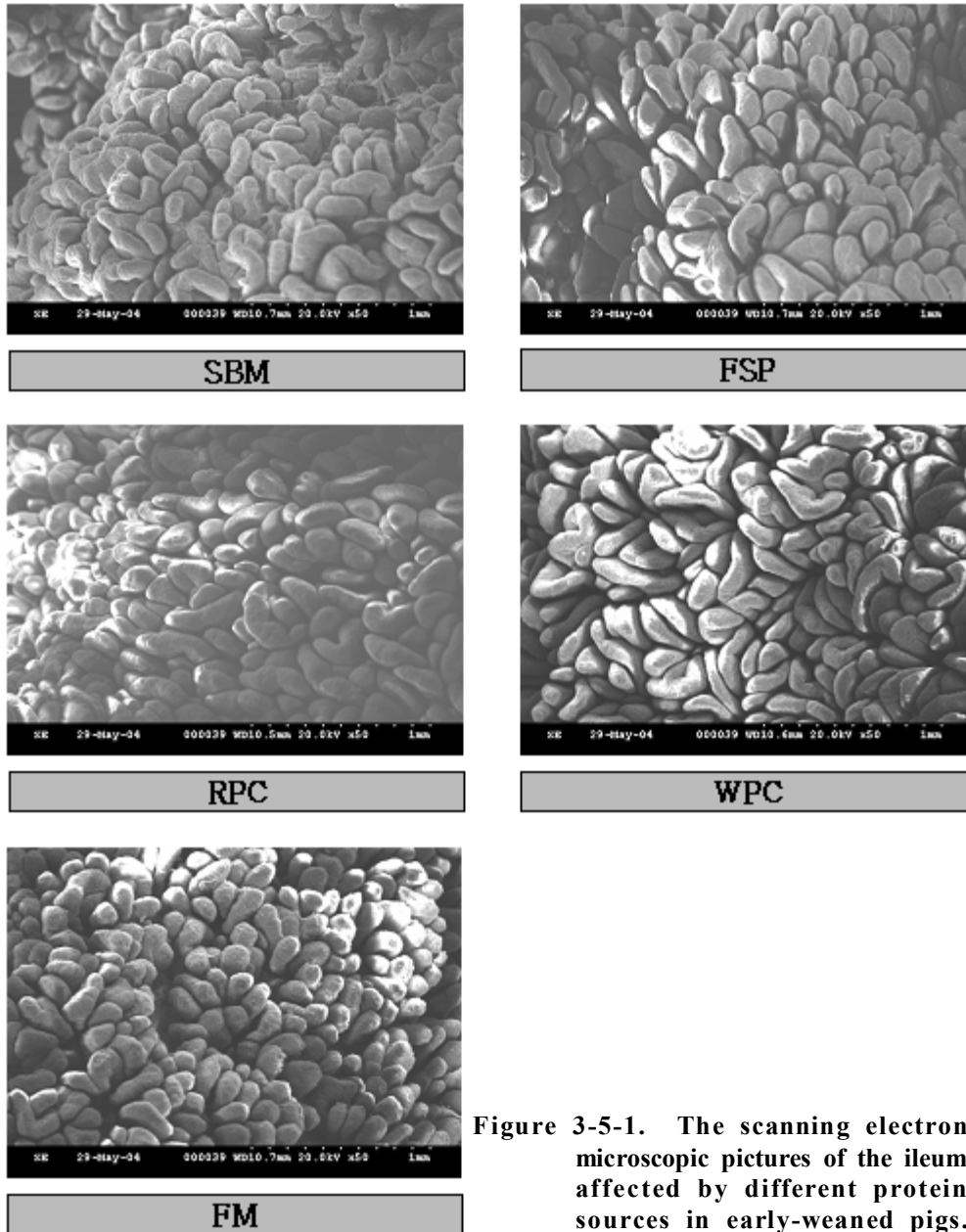


Figure 3-5-1. The scanning electron microscopic pictures of the ileum affected by different protein sources in early-weaned pigs.

라. 장내 미생물

소장 내용물의 미생물 수를 측정한 결과는 Table 3-5-2와 같다. 장내용물의 총 미생물 균수는 FSP-B 처리구가 가장 많은 것으로 측정되었으며, 유산균수도 다른 처리구에 비해 많은 것으로 나타났다. 병원성 미생물인 *Cl. perfringens*의 수는 RPC 처리구가 다른 처리구들에 비하여 높게 나타났으며 WPC 처리구가 가장 낮게 나타났다. 식물성 단백질 처리구는 동물성 단백질 처리구에 비하여 총 균수, 유산균수 그리고 *Cl. perfringens*가 많은 것으로 측정되었다. 이는 식물성 단백질 원료가 동물성 단백질 원료에 비하여 장내 미생물의 증식에 유리하게 장내 환경을 조성하기 때문인 것으로 사료된다.

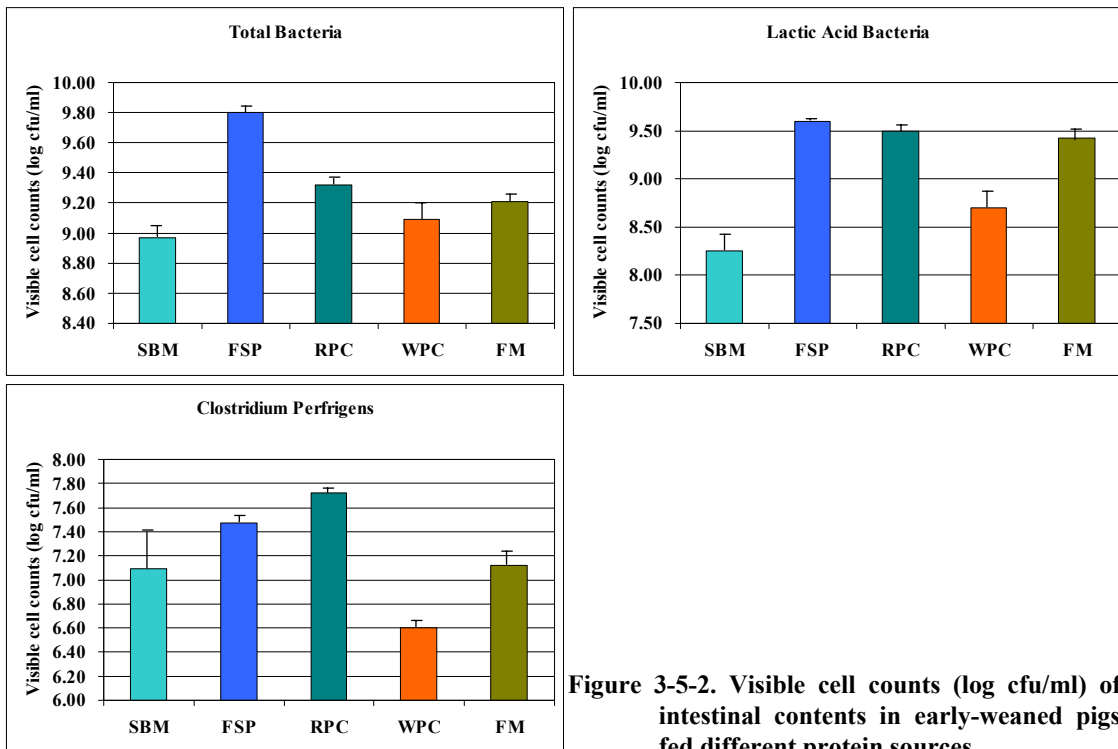


Figure 3-5-2. Visible cell counts (log cfu/ml) of intestinal contents in early-weaned pigs fed different protein sources.

4. 요약

발효대두단백의 사용은 대두박 보다 사양성적과 영양소 소화율을 개선시켰으나 같은 식물성 단백질 원료인 농축 쌀 단백질과는 대체로 비슷한 결과를 얻었으며, 동물성 단백질 원료인 농축 유장분말과 어분에 비해서는 다소 낮은 성장능력과 영양소 소화율 개선효과를 나타냈다.

본 실험결과 식물성 단백질 원료인 농축 쌀 단백질도 단백질 함량이 높고 소화율이 높은 원료임에도 불구하고 농축 유장분말과 어분에 비하여 낮은 성장능력과 영양소 소화율을 나타냈다. 이는 아마도 이유자돈의 경우 소화체계가 동물성 단백질 원료에 유리하도록 발달되어 있어 이유시 식물성 원료에 대한 적응이 동물성 단백질 원료에 비해 떨어졌기 때문에 나타나는 것으로 사료된다. 따라서 이유초기에는 식물성 단백질 원료에 대한 적응력이 떨어지지만 점차적으로 이용성이 증가된다는 점을 감안해 볼 때 동물성 단백질 원료를 충분히 대체할 수 있을 것으로 판단된다.

제 6 절 협동과제: 미생물에 의한 고품질 대두 단백질사료 생산을 위한 최적조건 확립 및 시제품 제작에 관한 연구

1. 서 론

최근 들어 국내 사료생산량은 지난해에 비해 약 10%이상 감소하였다. 이는 광우병, 돼지 콜레라, 조류독감 등의 영향으로 소비자에 의한 축산물 수요가 감소하고, 전체적으로 가축사육두수 감소가 사료생산량에 영향을 주었기 때문인 것으로 보인다. 또한 기후변화에 따른 곡물의 생산량 감소와 사료의 주원료가 되는 대두박, 옥수수 등의 국제곡물가의 상승은 축산농가 및 사료산업계에 전체적으로 큰 타격을 주고 있다.

인간에게 치명적인 질병을 일으키는 광우병과 같은 질병이 동물성 단백질 사용에 기인한 결과로 판정되면서 전 세계적으로 동물성 단백질을 식물성 단백질로 대체하려는 움직임이 급속도로 진행되고 있다. 사료시장에서 어분, 육골분, 혈장 등의 동물성단백질은 대두박을 비롯한 식물성 단백질로 대체되고 있다. 2003년 11월에는 프랑스 정부가 동물성 사료인 육골분 사용을 전면 금지하였으며 이후 모든 유럽국가에서 동물성단백질 사료인 육골분과 어분사용을 금지시켰고 앞으로도 이들 동물성 단백질을 사료를 사용하지 않는다는 방침을 발표하였다.

특히 동물성 단백질의 대체품목으로 사용 중인 식물성 단백질 원료 중에서 대두박이 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 일반적으로 식물성 단백질 사료는 동물성 단백질 사료에 비해 1) 단백질 함량이 비교적 낮고, 2) 가축에게 필요한 필수아미노산조성이 동물성 단백질원료보다 좋지 않으며, 3) 일부 비타민, 광물질 및 UFG 함량이 우수하지 못하다. 따라서 동물성단백질을 대체하기 위한 식물성 단백질원의 개량과 개선이 필요한 실정이다.

현재 생산되고 있는 고급 가공대두단백질은 물리·화학적 처리를 통하거나, 효소처리방식을 이용하여 생산하고 있다. 이들 단백질사료는 가격이 비싸며 사료회사와 축산농가에서 사용하는데 경제적인 부담을 주고 있다. 이에 효율적이고 저렴한 가공방법이 요구되며, 단백질함량을 높이기 위한 새로운 방법들이 제시되어야 한다.

따라서 본 연구는 미생물 고체발효기법을 이용하여 대두박에 포함된 탄수화물 부분을 미생물발효에 필요한 에너지원으로 이용하게 함으로써 조단백 함량을 55% 수준으로 높이고, 대두박에 포함된 항영양인자를 최소화하며, 발효과정에서 생성되는 단백질분해효소로 대두단백을 크기가 작은 펩타이드 형태로 농축함으로써 가축의 사료이용성을 극대화한 고품질의 대두단백 사료의 대량 생산기술을 개발하고자 한다.

2. 연구방법

가. 미생물 발효에 사용한 균주

전통메주 1g을 10ml의 멸균 생리식염수(0.85% NaCl)에 현탁하여 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 의 비율로 희석하여 100 μ l를 chloramphenicol 100 μ g/ml을 포함하는 PDA(potato dextrose agar)배지에 도말하고 30 $^{\circ}$ C에서 48~56시간동안 배양한 후 황색에서 녹색 포자를 형성하는 콜로니(colony)를 분리하여 발효에 사용하였다.

또한, 전통메주 시료 1g을 10ml의 멸균 생리식염수(0.85% NaCl)에 현탁하여 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 의 비율로 희석하여 100 μ l를 LB 한천배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양한 후 생성된 균주를 그람염색 후 현미경 상의 형태를 관찰하여 *Bacillus* 속으로 판단되는 균주들만을 1차 선발하였다. 분리된 균주는 수용성 전분 또는 탈지분유를 기질로 하는 평판배지에서 한천확산법으로 가수분해효소의 활성이 우수한 균주를 선발하여 "Bergey's manual of systematic bacteriology"의 기준에 준하여 동정한 후 사용하였다.

A. oryzae 선발을 위한 대조균으로 *A. oryzae* Rip40을, *B. subtilis* 대조균으로 *B. subtilis* KCTC1028을 한국유전자은행으로부터 분양 받아서 사용하였다.

나. 대두박의 고상발효 방법

대두박을 이용한 고상발효는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 전통메주로부터 분리한 *A. oryzae* 균주 및 *B. subtilis* 균주를 배양한 후 원료 배지를 증자하고 여기에 각 균주를 동시에 접종하여 40시간 동안 발효를 수행하였다(Figure 3-6-1).

다. 조단백질 측정방법

시료의 조단백질 함량은 스위스 Buchi사의 켈달장치(Kjeldahl system)를 이용하여 AOAC (1984)방법에 의해 측정하였다.

라. 효소 역가 측정방법

효소 활성도를 측정하기 위한 조효소액으로는 시료 10g을 막자사발로 분쇄하여 매스 플라스크에 담은 후 증류수를 100ml까지 채우고 30분간 교반하고 2시간 정지한 후 10분간 원심분리(10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C)하여 얻은 상등액을 사용하였다. Amylase 역가는 가용성 전분 {20mM phosphate buffer(pH 7.0)내 1%}을 기질로 하여 생성된 총환원당을 DNS(dinitrosalicylic acid)법으로 측정하였고, 효소 1U(unit)는 분당 1 μ mol의 생성물을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다. Protease 역가는 casein{20mM Tris-HCl buffer.(pH 8.0)내 0.7%}을 기질로 사용하여 효소반응 후 생성된 tyrosine을 Folin법으로 측정하였고, 효소

1U(unit)는 분당 1 μmol 의 생성물을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

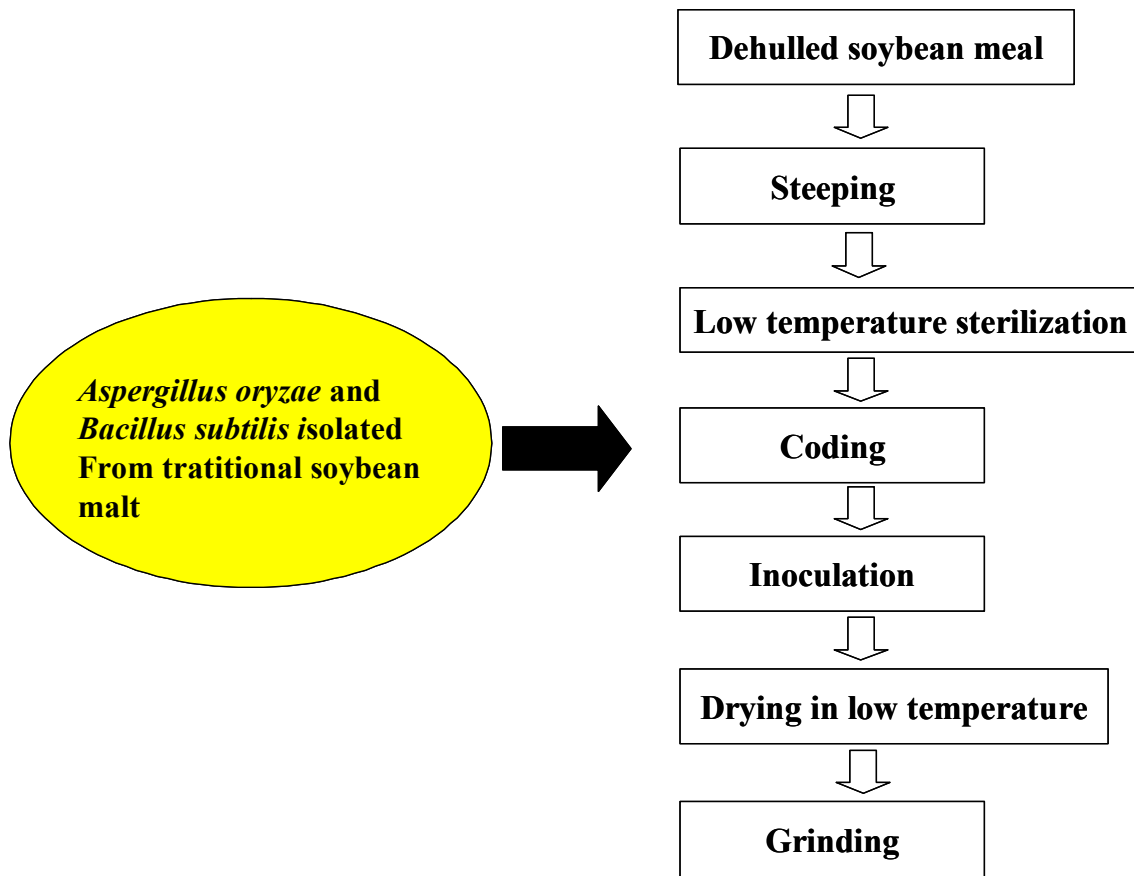


Figure 3-6-1. Fermenting method by *A. oryzae* and *B. subtilis* isolated from traditional soybean malt.

마. Trypsin inhibitor 역가 측정방법

AACC Method 71-10(Kakade 등, 1974)에 따라 trypsin(TPCK-treated)을 USB사로부터 구입하여 사용하였다. TI mg/g는 TIU/mg sample/1.9×0.001로 환산하였다.

바. KOH 용해도 및 PDI 측정방법

KOH 용해도는 시료 1.5g을 정량하여 150ml의 0.2% KOH 용액에 넣고 20분간 stirring 한 후 여과한 여액의 조단백질 함량을 결정하여 시료 조단백질 함량의 백분율로 계산하였다. PDI는 시료 1.5g을 정량하여 증류수 150ml에 넣고 균질기(Ika, Japan)로 13,000 rPM에서 10분간 분산시킨 다음 여과한 여액의 조단백질 함량 결정하여 시료 조단백질 함량의 백분율로 계산하였다.

사. Raffinose 및 stachyose 함량측정

Raffinose 및 stachyose 함량측정은 국가공인 전문분석기관에 의뢰하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 미생물발효방법을 이용한 대두박의 조단백질 함량을 상대적으로 농축하는 고체발효기법 개발

1) 대두박 발효에 이용한 미생물 균주 선발

미생물 발효에 의한 방법으로 대두박의 탄수화물을 제거하기 위하여 사료용 미생물로 사용가능하며 전분 당화력이 뛰어난 *A. oryzae*, *B. subtilis* 균주를 전통메주에서 분리하였다. 분리한 곰팡이 균주의 균사 형태, 분생포자경(conidiophore), 경자(phialide), 분생포자의 모양을 관찰하여 *A. oryzae* 균주를 동정한 후, 셀렌산나트륨(Sodium selenate, Na_2SeO_4)를 0.5%(w/v) 및 불용성 전분 5%(w/v)를 포함하는 한천배지에 1×10^6 의 상기 균주 분생포자를 도말한 다음 자외선을 조사한 후, 30°C에서 48시간 배양하여 전분 분해환이 큰 변이균주를 선발하였고, 균주간의 특성 비교를 Table 3-6-1에 나타내었다.

분리한 균주는 80°C에서 15분 증탕 후 LB 한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 생성된 colony를 그람염색 후 현미경 상에서 Gram+, rod, endospore-forming 인 *Bacillus* 속 균주들만을 1차 선발하였고, 수용성 전분과 탈지분유를 기질로 하는 평판배지에서 한천확산법으로 가수분해효소의 활성이 우수한 균주를 2차 선발하였다. 상기균주에 대하여 형태학적, 배양학적, 생리 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergy's manual of systematic bacteriology의 기준에 의하여 *B. subtilis*를 동정하였다.

2) 미생물 균주가 대두박 발효 후 조단백질 함량 변화에 미치는 영향

Aspergillus oryzae GB-107 변이균주를 수분함량 40%로 침지하여 살균한 대두박에 접종 후 30°C에서 48시간 배양한 다음 amylase 역가가 높고 대두박의 조단백질 함량을 가장 많이 변화시킨 균주를 최종 선발하였다(Table 3-6-2).

Table 3-6-1. *Aspergillus oryzae* GB-107 변이주의 생리적 특성

특 성	<i>A. oryzae</i> 친주	<i>A.oryzae</i> GB-107 변이주
포자색상	녹색	황색
셀렌산나트륨 0.002% 농도에서 생육정도	+	+++
셀렌산나트륨 0.01% 농도에서 생육정도	-	+++
셀렌산나트륨 1% 농도에서 생육정도	-	++
셀렌산나트륨 5% 농도에서 생육정도	-	+
전분을 포함하는 한천배지에서 48시간 배양했을 때 분해환의 직경	8mm	20mm
대두박을 배지로 사용하여 고체배양 시 전분(starch)가수분해효소 역가	+(33U/g)	+++ (202U/g)
대두박을 배지로 사용하여 고체배양 시 카제인(casein)가수분해효소 역가	+(1.5U/g)	++ (3.5U/g)

-:전혀 안됨, +:보통, ++:잘됨, +++:매우 잘됨

야생형의 *A. oryzae* GB-105와 한국 유전자은행으로부터 분양 받은 대조균 *A. oryzae* Rip 40으로 발효하였을 때 조단백질 함량이 약 51% 수준이었으나 *A. oryzae* GB-107 변이주로 발효하였을 때 54.6%로 발효하지 않은 대두박보다 약 8.4% 조단백질 함량이 농축되었다. Table 3-6-2에서 대두박의 단백질은 amylase의 역가가 높은 균주에서 많이 농축되므로, 균주의 amylase 생성작용과 단백질 농축이 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 대두박의 단백질이 농축되는 현상은 대두박에 함유된 탄수화물이 곰팡이의 균사가 확산되는 과정에서 생성된 glucoamylase에 의하여 가수분해 된 후 미생물의 성장에 필요한 영양분으로 사용됨으로서 상대적으로 단백질이 농축된 것으로 사료된다.

Table 3-6-2. 발효 균주에 따른 대두박 조단백질의 함량 변화

Strains	Cell number (CFU/g)	Amylase activity(U/g)	Protease activity(U/g)	Crude protein Contents(%)
Control				46.2±0.3
<i>A.oryzae</i> GB-105	2.6×10 ⁸	73.5±3.2	3.8±0.1	51.1±0.5
<i>A.oryzae</i> GB-107	2.2×10 ⁸	266.8±2.6	5.1±0.2	54.6±1.1
<i>A.oryzae</i> GB-215	2.1×10 ⁸	161.4±4.3	5.2±0.2	53.0±0.9
<i>A.oryzae</i> Rip40	2.5×10 ⁸	43.0±6.6	4.8±0.1	51.0±1.0
<i>A.niger</i> GB-10	2.6×10 ⁸	11.4±0.5	1.4±0.2	50.2±0.6
<i>Bacillus</i> sp. GB-102	3.2×10 ⁸	13.5±3.2	4.97±0.14	52.0±0.5
<i>Bacillus</i> sp. GB-109	1.4×10 ⁷	21.8±2.6	434±0.12	52.6±0.6
<i>Bacillus</i> sp. GB-111	2.2×10 ⁸	83.4±4.3	5.10±0.2	54.0±0.6
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1028	3.6×10 ⁸	20.9±6.6	2.44±0.11	51.6±0.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	8.4×10 ⁵	2.0±0.5	0	49.2±0.6



Figure 3-6-2. 대두박 배지를 이용하여 *A. oryzae* GB-107 변이주를 40시간 배양한 현미경 사진(×40).

본 연구에서 분리하여 *B. subtilis* GB-111로 동정된 균주로 수분함량 40%로 침지한 대두박을 발효하였을 때 대두박의 조단백질 함량이 54%로서 발효하지 않은 대두박에 비하여 7.8% 농축되었으며 한국유전자 은행으로 분양 받은 *B. subtilis* KCTC 1028 보다 2.6% 높았다.

3) 대두박 원료배지의 수분함량이 대두박 발효 후 조단백질 함량에 미치는 영향

대두박의 수분 함량에 따른 *A. oryzae* GB-107의 발효 후 효소 생성 및 조단백질 함량의 변화를 조사하기 위하여 대두박의 수분함량을 30%, 40%, 50%, 60%로 분생포자 현탁액($5 \times 10^8/ml$) 5ml을 각 배지에 분사하여 골고루 섞어 30℃ 배양기에서 40시간 배양 후 50℃ 건조기에서 수분함량 8%가 될 때까지 건조하여 각 샘플의 amylase, protease 활성도 및 조단백질 함량을 조사하여 Table 3-6-3에 나타내었다.

Table 3-6-3. 대두박의 수분 함량이 *A. oryzae* GB-107 발효에 의한 amylase, protease 생성 및 조단백질 함량의 변화에 미치는 영향

대두박의 초기수분함량(%)	생균수 (CFU/g)	amylase (U/g)	protease (U/g)	조단백질 함량 (%)
30	$3.3 \pm 0.5 \times 10^7$	31.2 ± 0.5	3.2 ± 0.3	51.8 ± 0.5
40	$3.2 \pm 0.7 \times 10^8$	223.6 ± 1.5	7.4 ± 0.5	55.4 ± 0.5
50	$9.3 \pm 1.0 \times 10^7$	348.3 ± 1.5	6.4 ± 0.5	56.0 ± 0.5
60	$7.8 \pm 0.5 \times 10^6$	41.6 ± 0.7	4.6 ± 0.4	52.5 ± 0.5

A. oryzae GB-107의 생균수 및 protease 역가는 대두박의 초기수분함량이 40%일 때 가장 높았지만 amylase 역가 및 발효 대두박의 조단백질 함량은 초기 수분함량이 50%일 때 가장 높게 나타났다. 또한, Table 3-6-3에서 발효 대두박의 조단백질 함량은 amylase 역가에 따라 변화하고 *A. oryzae*의 생균수와는 일치하지 않는 것으로 나타났다. 이것은 amylase가 대두박의 탄수화물을 가수분해하여 미생물이 성장에 필요한 에너지로 소진하는데 중요한 역할을 하고 있음을 보여주었다.

4) 배양온도가 발효 후 조단백질 함량에 미치는 영향

A. oryzae 균주는 전형적으로 30℃에서 성장이 왕성하지만 대두박의 조단백질 함량을 향상시키는데는 적당하지 않았다. 대두박의 *A. oryzae* 발효에서 배양초기에는 30℃를 유지하다가 배양 30시간부터 40℃로 조절하였을 때 발효 후 조단백질함량은 55% 수준으로 올라갔다. 배양초기에 30℃에서 균사성장을 왕성하게 한 다음 포자생성으로 넘어가는 배양 30시간에서 배양온도를 40℃로 올리면 포자성장이 저해되고 효소가 지속적으로 생성되어 조단백질의 함량을 증가시키는 결과를 가져온 것으로 사료된다(Figure 3-6-3).

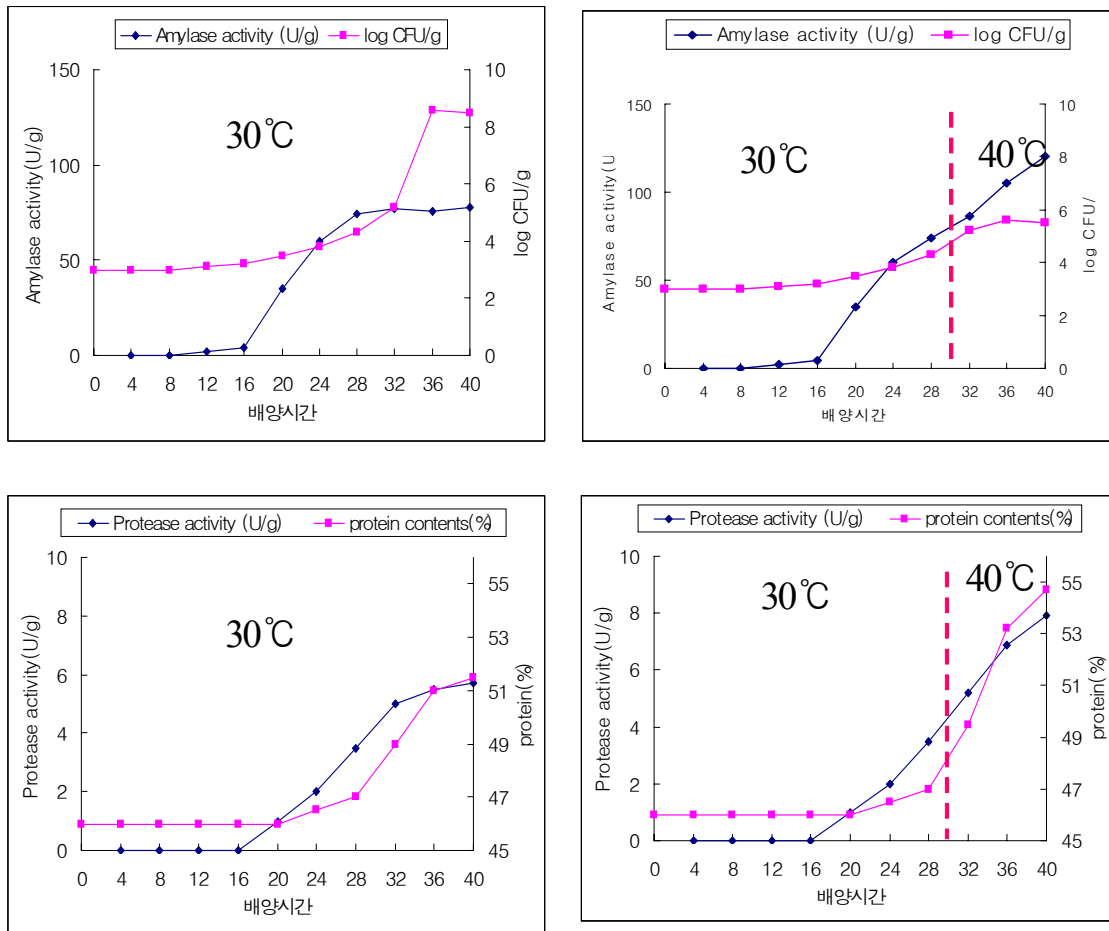


Figure 3-6-3. 대두박 발효시 배양온도의 변화에 따른 효소 생성 및 조단백질 함량 변화.

나. 대두박에 함유된 항영양인자인 trypsin inhibitor를 제거하는 방법개발

1) 대두박의 침수를 이용한 trypsin inhibitor 활성 제거

대두박의 함유된 trypsin inhibitor를 제거하는 기존의 방법은 열처리에 의한 열변성이 다. 그러나 대두박을 열처리 가공했을 때 trypsin inhibitor 뿐만 아니라 대두단백질의 변성이 동시에 일어나므로 과열 처리될 경우 가축의 영양소 이용률이 현저히 떨어진다. 따라서 대두박 가공에서 과열처리에 대한 지표로 단백질분산지수(protein dispersibility index, PDI)와 KOH 용해도를 조사하였다. 본 연구에서는 대두박 발효 공정에서 원료대두박의 침수, 저온 증자 및 미생물의 발효가 trypsin inhibitor 활성제거에 미치는 영향을 PDI, KOH 용해도 변화와 함께 조사하였다.

대두박의 침수가 trypsin inhibitor 활성억제에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대두박을 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 수분함량으로 1시간 동안 침지한 후 실온에서 건조하여 조단백질 함량을 조사하여 Table 3-6-4에 나타내었다. 국내산 대두박은 건조 과정중 다소의 열처리에 의하여 이미 상당량 제거되었으며 평균 3.6 TI mg/g 이었고 발효에 이용되는 40~50% 침지량에서는 0.1~0.3 TI mg/g 낮아졌다.

Table 3-6-4. 대두박의 침수량이 trypsin inhibitor 활성 제거에 미치는 영향

Water content (%)	Trypsin inhibitor (TI mg/g)	KOH solubility (%)	PDI (%)
Control (0)	3.6	84.5	16.3
20	3.6	85.4	15
30	3.5	84.6	15.4
40	3.5	86.6	16
50	3.3	86.9	16.4
60	3.1	84.3	18.2

국내산 대두박의 경우 이미 열처리 가공을 거쳐 상당량 trypsin inhibitor 활성이 파괴되어 침수에 의한 trypsin inhibitor의 파괴가 불분명하여 열처리 과정을 거치지 않은 인도산 대두박으로 상기와 같은 조건으로 처리 후 조단백질 함량을 조사하여 Table 3-6-5에 나타내었다. 인도산 대두박의 trypsin inhibitor는 평균 15.9 TI mg/g 이었고 발효에 이용되는 40-50% 침지량에서는 0.9-1.1 TI mg/g 낮아졌다.

Table 3-6-5. 인도산 대두박의 침수량이 trypsin inhibitor 활성 제거에 미치는 영향

Water content (%)	Trypsin inhibitor (TI mg/g)	KOH solubility (%)	PDI (%)
Control (0)	15.9	97	65.5
20	14.8	97.7	68.4
30	15.2	98.9	68.3
40	15	99	67
50	14.8	99	66.3
60	14	97.5	65.2

2) 열처리에 의한 대두박의 trypsin inhibitor 활성 제거

대두박을 발효하기 위해서는 대두박에 포함된 오염미생물을 제거하고 항영양인자를 제거하기 위해서는 열처리 공정이 반드시 필요하다. 그러나 과열처리에 의한 영양소 파괴를 막기 위해서 적절한 수분, 열처리 온도 및 시간 조절이 필요하다. 국내산 및 인도산 대두박을 40%로 침지하여 60, 80, 100, 120℃에서 30분 및 60분간 열처리 후 trypsin inhibitor 활성을 조사하여 Table 3-6-6에 나타내었다.

Table 3-6-6. 열처리 조건에 따른 국내산 및 인도산 대두박의 trypsin inhibitor 활성의 변화

Heating conditions	국 내 산			인 도 산		
	KOH solubility (%)	PDI (%)	Trypsin inhibitor (mg/g)	KOH solubility (%)	PDI (%)	Trypsin inhibitor (mg/g)
Control	84.5	17.3	3.6	97	65.5	15.9
60℃, 30분	80.4	21.9	2.6	98	66.6	15
60℃, 60분	79	24.8	2.4	97.6	66.7	12.3
80℃, 30분	80.9	24.6	2.3	95.8	60.2	12.1
80℃, 60분	73.1	23.5	2.1	84.1	42.3	8.1
100℃, 30분	60.5	12.4	1.1	75	16.8	1.3
100℃, 60분	59.7	12.3	1.0	64.4	14.6	1.1
120℃, 30분	34.9	12.3	1.0	38.3	14.4	1.1
120℃, 60분	33.8	11.9	1.0	37.4	18.7	1.0

Table 3-6-6에서 80℃에서 30분 열처리되었을 때 trypsin inhibitor 역가가 국내산 대두박 경우 1.3 TI mg/g 낮아지고, 인도산 대두박의 경우 3.8 TI mg/g 낮아지지만 단백질용해도는 대조구에 비하여 큰 차이가 없었다. 그 이상 열처리되었을 때 대두박의 trypsin inhibitor 역가도 낮아지지만 단백질의 용해도도 급격히 떨어져 단백질의 영양소 파괴가 우려되어 열처리 방법으로 적절치 않은 것으로 사료된다. 게다가 120℃에서 60분간 열처리하여도 1 TI mg/g 정도의 잔여활성이 남으므로 열처리에 의해서만 trypsin inhibitor를 완전히 제거하기 어렵다.

3) 미생물 발효에 의한 대두박의 trypsin inhibitor 활성 제거

대두박의 항영양인자인 trypsin inhibitor를 제거하는 방법으로 열처리 방법 대신에 미생물 발효과정에 생성되는 protease에 의한 가수분해 방법을 개발하였다. 본 연구에서 선발한 *A. oryzae* GB-107과 *B. subtilis* GB-111은 다량의 endopeptidase를 분비한다. 이 효소를 이용하여 대두박 속에 trypsin inhibitor를 가수분해하여 불활성화 시키는 방법이다. 미생물 발효에 의한 대두박의 trypsin inhibitor 활성 제거효과를 Table 3-6-7에 나타내었다.

Table 3-6-7. 미생물 발효에 의한 대두박의 trypsin inhibitor 활성 제거

Strains	Trypsin inhibitor (TI mg/g)	KOH solubility(%)	PDI(%)
Control	22±0.2	84.1±2.1	25.4±0.3
<i>A. oryzae</i> GB-105	0.5±0.1	84.0±0.9	49.4±1.6
<i>A. oryzae</i> GB-107	0.4±0.2	87.4±1.3	55.5±1.1
<i>A. oryzae</i> GB-215	0.5±0.2	80.3±1.2	44.9±0.9
<i>A. oryzae</i> Rip40	0.5±0.2	84.3±0.8	50.7±1.9
<i>A. niger</i> GB-10	0.6±0.2	80.7±1.4	21.8±0.6
<i>Bacillus</i> . sp GB-102	0.7±0.1	80.1±1.5	75.9±2.3
<i>Bacillus</i> . sp GB-109	1.6±0.3	76.5±0.8	53.6±1.0
<i>Bacillus</i> . sp GB-111	0.7±0.4	89.2±0.7	75.0±1.2
<i>Bacillus</i> . <i>Subtilis</i>	1.11±0.2	81.1±1.2	54.3±0.4
KCTC 1028			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1.8±0.2	77.1±0.9	9.2±0.2

Table 3-6-7에서 대조구는 수분 40%로 침지하여 70℃에서 30분간 열처리한 시료이며, 각 시험구는 대조구와 같이 전처리하여 각각의 균주로 30℃에서 40시간 발효한 대두박을 분석한 결과이다. *A. oryzae*로 발효했을 때 *Bacillus* 속 균주보다 효과적으로 trypsin inhibitor를 실험 시켰으며, 침지, 저온증자 및 미생물 발효과정을 통하여 trypsin inhibitor를 0.5 TI mg/g 수준으로 낮추었고, 단순 열처리만 했을 때(120℃, 60분)보다 더욱 효과적으로 trypsin inhibitor를 제거하였다.

다. 대두박에 함유된 올리고당인 raffinose 및 stachyose 제거 기법 개발

Raffinose는 sucrose에 furactose가 α -1,6 glucosidic bond를, stachyose는 raffinose에 furactose가 α -1,6 glucosidic bond를 형성하고 있어서 가축이 분비하는 효소에 의하여 가수분해 되지 않으므로 어린 가축의 소화장애를 일으키는 주요 원인이 된다. Raffinose와 stachyose는 열에 매우 안전한 구조이므로 열처리에 의하여 전혀 제거되지 않는다. 기존의 이들 물질의 제거방법은 65%에탄올로 추출하여 제거하는 방법이지만 추출과정 중에 수용성 아미노산의 소실되는 문제점이 있다. 본 연구에서는 raffinose와 stachyose 미생물 발효과정에서 생성되는 효소로 가수분해하여 제거하는 방법이다.

Table 3-6-8. 미생물 발효에 의한 raffinose와 stachyose의 제거효과

Strains	Raffinose(%)	Stachyose(%)
Control	1.34	3.60
<i>A.oryzae</i> GB-105	0	0
<i>A.oryzae</i> GB-107	0	0
<i>A.oryzae</i> GB-215	0	0
<i>A.oryzae</i> Rip40	0.02	0.04
<i>A.niger</i> GB-10	0.02	0.04
<i>Bacillus. sp</i> GB-102	0.06	0.15
<i>Bacillus. sp</i> GB-109	0.42	0.97
<i>Bacillus. sp</i> GB-111	0.07	0.18
<i>Bacillus. Subtilis</i>	0.11	0.24
KCTC 1028		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.02	0.89

국내산 대두박을 수분함량 40%로 침지하여 70℃에서 30분간 저온 증자 후 각각의 미생물 균주로 40시간 배양한 다음 발효 대두박의 raffinose와 stachyose 함량을 조사하여 Table 3-6-8에 나타내었다. Table 3-6-8에서 *A. oryzae*로 발효되었을 때 raffinose와 stachyose는 완전히 제거되었다. *Bacillus* 속 균주에 의해서도 raffinose와 stachyose가 제거되는 효과가 있지만 *A. oryzae* 만큼 효과적이지 않았다. 이것은 *A. oryzae*에 의해서 생성되는 강력한 glucoamylase의 가수분해 작용에 기인된 것으로 사료된다.

라. 미생물 발효과정중 대두단백질의 펩타이드화

가축에 급여된 대두단백질은 위와 장에서 소화효소에 의하여 가수분해 되어 펩티드 혹은 아미노산 형태로 흡수된다. 따라서 단백질의 소화 흡수율을 높이기 위해서는 가수분해된 펩티드 형태의 단백질사료를 급여하는 것이 매우 유리하다. 본 연구에서는 미생물 발효과정 중에 생성되는 protease에 의하여 대두단백질을 가수분해하여 펩타이드화 하였다.

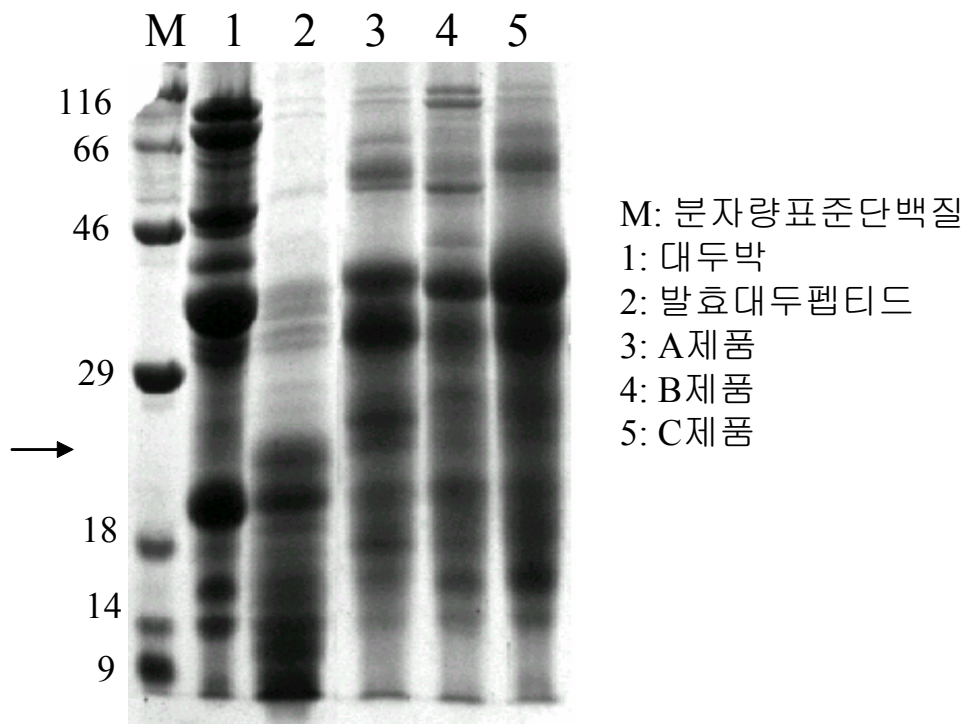


Figure 3-6-4. 단백질의 가수분해화 정도를 보여주는 단백질 전기영동 젤 사진.

대두박과 대두박을 *A. oryzae* GB-107로 발효한 발효대두펩티드 및 종래의 수입 대두 단백질 가공제품들을 증류수에 용해하여 단백질을 추출한 다음, 12.5% 단백질 전기영동 겔에 전기영동하여 그 결과를 Figure 3-6-4에 나타내었고, 전기영동 겔을 밀도계(Densitometer)로 분자량 25,000kDa 이상 및 이하의 밀도분포를 정량화하여 Figure 3-6-5에 나타내었다.

본 연구의 발효 대두단백질은 Figure 3-6-4에서 대두박과 비교하였을 때 대두박의 단백질이 작은 크기의 펩티드 형태로 전환되었음을 보여준다. 또한 기존의 제품에 비해서도 단백질의 밀도가 크기가 작은 분자 쪽으로 치우쳐져 있다. Figure 3-6-5에서도 발효대두단백질의 분자량 25,000kDa 이하 크기의 펩티드가 전체 단백질의 70%이며 대두박 및 타제품보다 25~30% 높게 분포하고 있음을 보여준다.

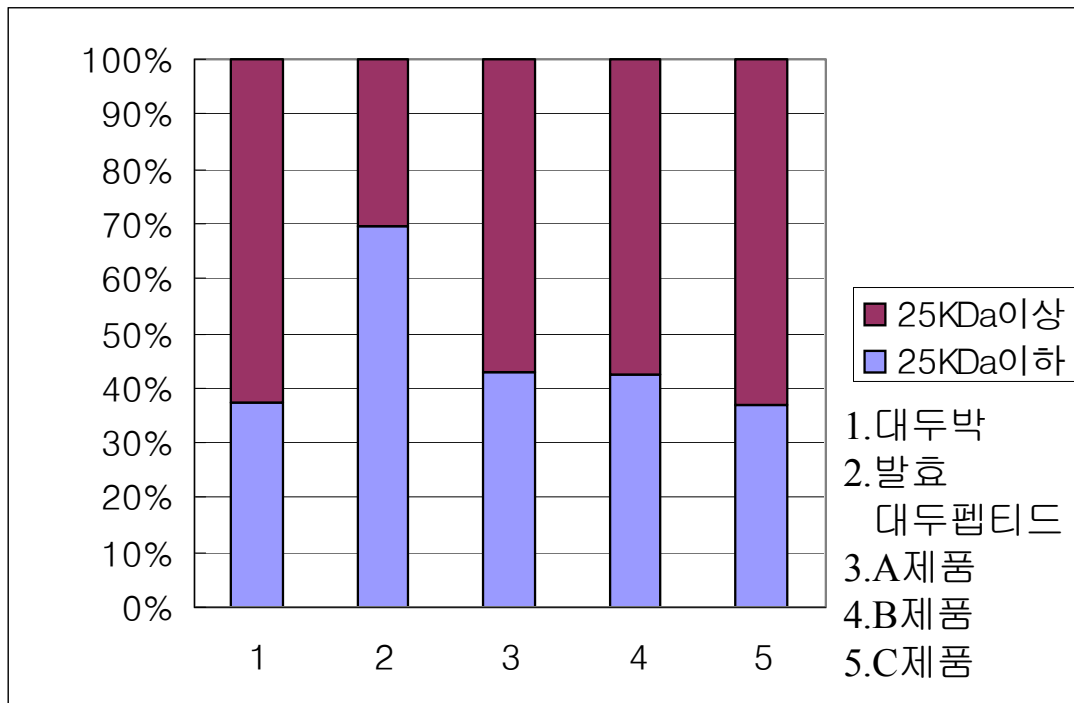


Figure 3-6-5. 대두박과 대두박 발효 발효대두단백질 및 타제품의 단백질 전기영동 겔에서 25,000kDa 이하 크기로 가수분해 된 펩티드의 밀도분포.

마. 미생물에 의한 고품질 대두 단백질사료 시제품 제작

상기의 결과를 종합하여 기존의 대두박 가공방법과 전혀 다른 미생물 발효에 의한 고품질의 대두박 제품을 실험실에서 시제품을 제작하였다(Figure 3-6-6).

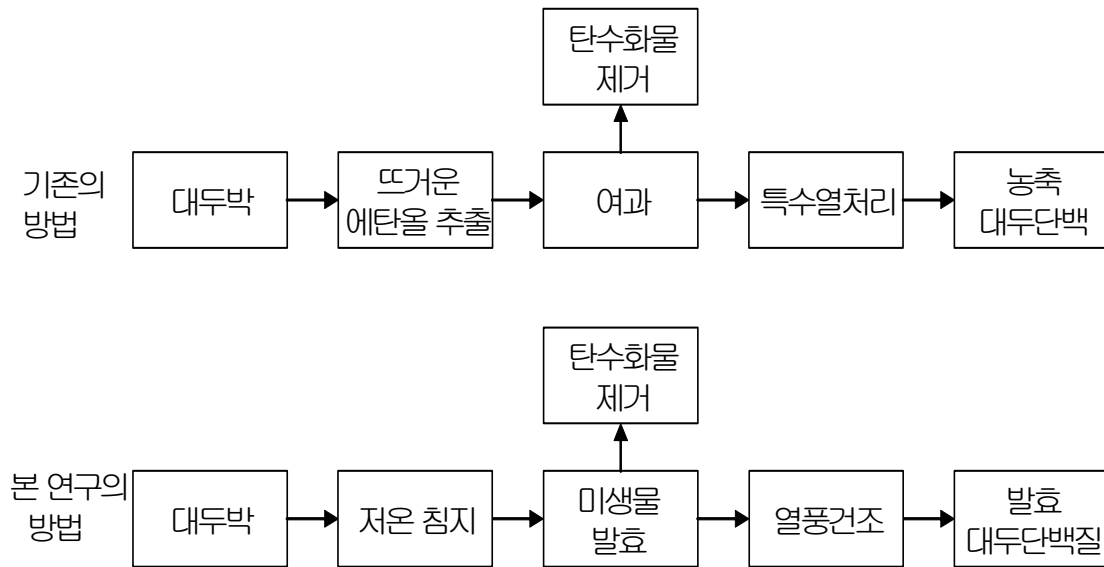


Figure 3-6-6. 기존의 농축대두단백질 생산방법과 *A. oryzae* GB-107을 이용한 발효대두 단백질 생산방법의 비교.

조단백질 함량이 45~46%인 대두박을 수분함량을 40~50%정도로 조정하여 30분 동안 침지한 후 70℃에서 30분 저온 증자하고 품온이 30℃가 될 때까지 식힌다. 대두박 원료가 식으면 *A. oryzae* GB-107의 종 배양한 종국을 대두박 원료 kg당 2g 넣어 골고루 섞은 다음 발효상자에 대두원료의 두께를 약 5cm로 하여 평평하게 고른 후 30℃로 유지시키면서 12시간동안 분생포자를 발아시킨다. 분생포자의 발아가 완료되면 상기의 대두박 원료를 배지 품온이 30~33℃가 되게 유지시키면서 24시간 배양한 후 다음 품온을 40℃로 유지시켜 12시간 더 배양한다. 배양이 완료된 대두박은 50℃에서 열풍 건조한 후 분쇄하여 발효에 의한 대두단백질 시제품을 제조하였다.

본 연구의 시제품과 국외에서 수입된 기존 대두단백질 견본들을 구입하여 대두단백질의 특성을 나타내는 조단백질 함량, trypsin inhibitor, PDI, KOH 용해도를 조사하여 Table 3-6-9에 나타내었다. 본 시제품은 트립신저해제 역가가 현저히 낮고, 단백질의 용해도가 중

래의 대두단백질 제품보다 월등히 높으며, 특히 PDI는 약 2~5배 높은 것으로 나타났다 (Table 3-6-9).

Table 3-6-9. 본 연구의 시제품과 기존 대두단백질 제품의 특성 비교

Samples	trypsin inhibitor (TI mg/g)	PDI(%)	KOH solubility(%)	Crude protein contents(%)
본 연구의 시제품	0.4	25.3	80.2	55.1
A제품	3.3	5.1	75.1	65.4
B제품	1.9	4.3	70.4	65.1
C제품	1.4	11.2	69.4	55.1

4. 요약

한국 전통메주로부터 *A. oryzae*와 *B. subtilis* 균주를 분리하여 amylase 효소 역가가 매우 높은 변이주를 개량하였고 조단백질 함량이 46%인 탈피 대두박을 침지→저온 증자→미생물 접종→고상발효→건조 과정을 거치는 미생물 고상발효 기법을 개발하여 전형적으로 조단백질 함량이 55%인 대두 단백질사료 생산을 위한 최적조건을 확립하였다.

대두박에 함유된 항영양인자인 trypsin inhibitor, 올리고당인 raffinose 및 stachyose를 미생물 발효과정중 생성된 protease와 glucoamylase에 의하여 가수분해 되는 대두박 가공기법을 개발하였다.

본 연구에서 기존의 대두 단백질사료 생산 방법과는 전혀 다른 미생물 발효법으로 대두박을 가공하여 고품질 대두 단백질사료를 생산할 수 있는 조건을 확립하였고, 상기조건으로 제조된 시제품은 기존의 수입 대두단백질 제품보다 항영양인자가 매우 낮고 단백질의 용해도가 우수하며 미생물 발효과정 중 생성된 protease에 의하여 대두단백질 70% 이상 25kDa 이하의 작은 펩타이드 분자로 가수분해된 고품질의 발효 대두단백 시제품을 제조할 수 있었다.

제 7 절 협동과제: 고품질 대두 단백질사료의 대량생산 및 제형화에 관한 연구

1. 서 론

축산분야에서 단백질 사료원료 중 가장 경제적이고 고품질의 식물성 단백질로 대두박을 많이 이용하고 있지만 어린 가축의 사료에는 사용량을 제한하고 있다. 특히 대두박을 어린 돼지에 사용하면 대두박에 포함된 항영양인자들에 의해 소화가 잘 안되기 때문에 소화가 저해된다. 대두박의 항영양인자로는 단백질 소화를 방해하는 트립신저해인자, 혈구 응집소인 헤마글루티닌(hemagglutinin), 가축의 설사·복통을 유발하는 라피노스, 스타키오스 등의 올리고당이 있다. 이들 중 일부는 열처리에 의해서 파괴되지만 이 과정에서 대두단백질이 변성되어 용해도가 감소하고 라이신(lysine)등의 필수 아미노산이 소실될 수 있다. 따라서 대두의 단백질을 보다 효율적으로 이용하기 위하여 항영양인자를 제거하여 효율성을 증대시키는 가공법들이 개발되고 있다.

대두박은 건물을 기준으로 하였을 때 단백질이 55~56%, 가용성탄수화물이 13~14%, 불용성탄수화물이 21~22%이며 이밖에 1%정도의 조지방과 46%정도의 회분으로 구성되어 있다. 기존 대두박 가공제품 중 농축대두단백질(soy protein concentrates, SPC)은 가용성 비단백질 구성성분을 약 78°C의 65% 에탄올로 추출하여 제거한 다음 특수 열처리를 하여 제조하고, 분리정제 대두단백질(isolated soy proteins, ISP)은 알칼리 조건에서 단백질성분을 용해하여 수확한 후 산성 조건에서 단백질을 침전하는 방법으로 대두박의 비단백질 성분을 제거하고 분무건조(spray dry)공법으로 건조하여 제조하였다. 상기의 방법으로 제조된 농축 대두단백질과 분리정제 대두단백질을 사료로 사용하면 가축의 성장을 촉진하는 것으로 보고되었다.

그러나 종래의 대두단백질 가공 방법은 생산 단가가 매우 높기 때문에 저렴한 생산비용이 요구되는 생산재인 사료에 충분한 양을 공급할 수 없는 문제점이 있다. 뿐만 아니라 이들 방법은 제조과정 중 열처리, 화학적 처리, 열 건조 등으로 인하여 단백질 변성, 수용성 아미노산의 소실 등이 일어나 실제 단백질의 용해도는 낮다. 따라서 종래의 방법은 단백질의 극심한 변성이 일어나지 않을 정도에서 열처리를 하기 때문에 항영양인자인 트립신저해인자도 상당량 존재하는 문제점이 있다.

본 연구에서는 대두박의 사료가공에서 생산단가가 매우 저렴하며 상기의 문제점을 해결할 수 있는 새로운 생물학적 가공 방법을 개발하고, 아밀라제 활성이 매우 높은

Aspergillus oryzae 균주 및 *Bacillus* 균주를 저온 침지한 대두박에 접종하여 대두박 속에 탄수화물을 미생물 성장에 필요한 에너지원으로 소진시킴으로써 대두박 속에 단백질을 상대적으로 농축하여 약 55%의 조단백질을 포함하고, trypsin inhibitor와 raffinose, stachyose 등의 올리고당을 감소시키는 제조방법을 확립하는데 있다.

2. 연구방법

가. 고품질 대두단백질 사료의 대량생산

1) 대량 고체발효를 위한 starter제조에 관한 연구

가) *Aspergillus oryzae* 종균제조

A. oryzae 종균제조를 위한 배지조성 및 최적 수분함량이 균 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 최적 배지를 선발하기 위해 Table 3-7-1와 같이 배지조성을 달리하여 배양하였을 때 균수 및 효소역가가 우수한 배지를 종균 제조를 위한 배지로 선정하였다.

나) *Bacillus* 종균 제조

Bacillus 종균은 14L 액상 발효기를 이용하여 생산하였으며 *Bacillus* 배양을 위한 배지 조성은 Yeast extracts 10g/L, Glucose 10g/L, NaCl 10g/L 의 배지를 제조하여 종균생산에 이용하였다.

다) 최적 배양을 위한 조건 설정

A. oryzae 및 *Bacillus* 최적 배양을 위한 조건을 설정하였다. 배양시간별 균수 변화, 배지에 따른 균수 변화, 배양 온도 및 배양시 수분함량에 따른 균수 변화에 대한 조사를 실시하였다.

2) 파일럿 단계(0.1ton/batch)의 발효대두 단백질 사료 생산에 관한 연구

고체 발효기(10ton)를 이용한 사료 생산 전 단계로 발효 조건을 확립하기 위해 파일럿 단계 실험을 실시하였다. 배지는 대두박을 사용하였으며, 균주는 *A. oryzae* 균 및 *Bacillus* 균을 혼합배양하였다. 100kg 생산을 위해 종균의 최적 농도를 결정하였으며, 배지의 최적 수분함량을 결정하였다. 최종 제품의 조단백질 함량 및 배양시간에 따른 조단백질 함량변화를 조사하여 조단백질 함량 증가를 위한 최적 조건을 확립하였다.

3) Pack-bed 타입의 고체발효기(10ton/batch)를 이용한 대두단백질 사료의 대량생산에 관

한 연구

파일럿 단계의 실험을 바탕으로 10ton 발효기에서 대두단백질 사료를 생산하는 방법을 확립하였다.

가) 대두박의 단백질 함량을 농축할 수 있는 미생물의 고체발효 조건

미생물 배양시 배양온도 및 수분함량에 따른 균성장 속도 및 균성장율을 조사하였다.

나) 대두박에 함유된 항영양인자의 함량을 최소화 할 수 있는 조건설정

발효를 통한 항영양인자를 최소화시키는 방법을 최종제품의 항영양인자 분석을 통해 확립하였다.

다) 유효미생물수, 각종 소화효소활성을 최적화할 수 있는 조건 설정

대량 고체 발효시 발효과정 중 오염 미생물을 차단하는 방법을 조사하였으며, 각종 소화효소의 활성을 최적화할 수 있는 조건을 확립하였다.

나. 발효에 의한 농축대두 단백질사료의 분말 제형화 연구

1) 발효 후 건조조건에 제품의 특성변화 및 건조비용 최소화하는 건조조건설정 발효과정이 끝나면 수분함량을 10% 미만으로 건조시키는 과정이 필요하다. 이 과정에서 제품의 특성변화를 조사하고 건조시간을 최소화 할 수 있는 방법을 모색한다.

2) 수분함량에 따른 제품의 물리화학적 특성 조사

3) 발효대두 단백질의 입자도에 따른 제품의 물리화학적 특성변화 조사

다. 발효에 의한 농축 대두 단백질 사료의 안정성 시험

1) 보존기간에 따른 제품의 안정성 시험

2) 보존온도에 따른 제품의 안정성 시험

3) 제품의 열안정성 시험

3. 연구결과

가. 고품질 대두단백질 사료의 대량생산

1) 대량 고체발효를 위한 starter제조에 관한 연구

가) *Aspergillus oryzae* 최적 배양조건 확립

AO 포자를 sprayer로 접종하여 30~36℃에서 40시간 배양하였다. *A. oryzae* 성장은 대두박 : 밀기울(1:2)를 배합하여 배양하였을 때 가장 우수하였다. 배지에 밀기울이 첨가되었을 때 amylase의 역가가 증가하였는데, 이는 밀기울 첨가가 AO의 amylase 생성을 유도하

는 것으로 생각된다(Table 3-7-1).

대두박을 포함하는 배지에서 protease 역가가 높게 나타났으며, 대두박 밀기울 혼합배지가 대두박 또는 밀기울로만 사용한 배지보다 효소역가 및 생균수가 높게 나타났다. 상기 결과를 통해 최적배지를 대두박 : 밀기울 = 1 : 2로 배합한 배지로 선정하였다.

Table 3-7-1. 배지조성에 따른 *A. oryzae*의 효소역가 및 균수 변화

원료 배합	Amylase activity (u/g)	Portease activity (u/g)	AO 생균수 (cfu/g)
대두박	157.0±0.4	53±0.1	1.2×10 ⁸
밀기울	395.6±3.7	28±0.3	1.7×10 ⁸
대두박:밀기울 (1 : 1)	359.1±2.3	46±0.3	2.4×10 ⁸
대두박:밀기울 (1 : 2)	381.2±6.0	56±0.2	5.3×10 ⁸
대두박:밀기울 (2 : 1)	284.4±0.7	35±0.6	2.9×10 ⁸
대두박:과채미 (2 : 1)	165.5±0.4	48±0.5	2.6×10 ⁸

배지의 수분함량을 달리하여 *A. oryzae*를 배양한 결과는 Figure 3-7-1과 같다. 배지의 수분함량을 30, 40, 50, 60%로 조절하여 증자 후 균을 접종하고 배양 온도를 30℃로 조절한 후 배양시간별 균수 변화를 조사하였다. 수분함량이 높을수록 균 성장이 양호하였으나 40% 이상의 수분함량에서는 성장이 수분함량과 관계없이 비슷하였다. 따라서 최적 수분함량을 40%로 선정하였다.

나) *Bacillus* 종균 제조

Bacillus 종균은 14L 액상 발효기를 이용하여 생산하였으며 *Bacillus* 배양을 위한 배지 조성은 Yeast extracts 10g/L, Glucose 10g/L, NaCl 10g/L 의 배지를 제조하여 종균생산에 이용하였다. 배양 후 최종 균수는 10⁹ 수준이었다.

다) 혼합 배양을 위한 최적조건 설정

A. oryzae 및 *Bacillus* 혼합 배양을 위한 최적조건은 *A. oryzae*의 최적 조건으로 하여 즉, 배지의 수분함량 40%, 배양온도 30~35℃로 하여 pilot 실험에 이용하였다.

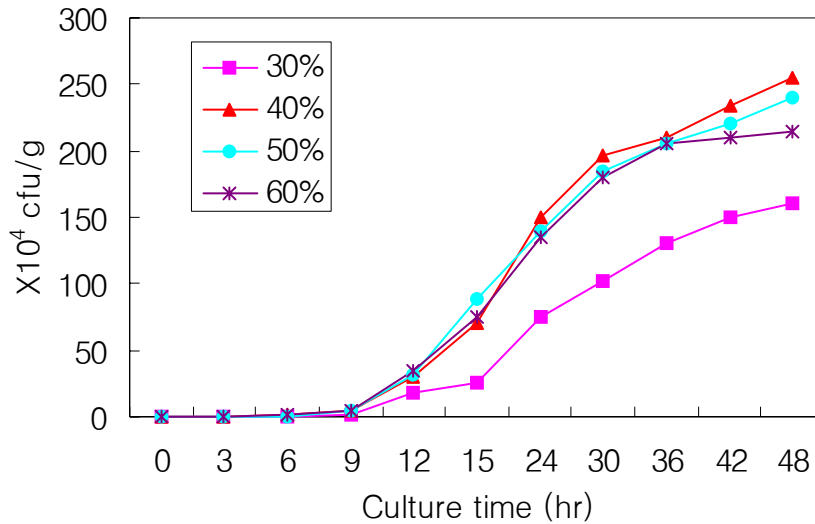


Figure 3-7-1. 배지의 수분함량에 따른 *A. oryzae*의 성장.

2) 과일롯 단계 (0.1ton/batch)의 발효대두 단백질 사료 생산에 관한 연구

고체 발효기 (10ton)를 이용한 대량생산을 위한 발효 조건을 확립하였다. 배지는 식물성 단백질 원료인 대두박을 사용하였으며, 최적 조건의 기준은 최종 발효물의 조단백질 함량이 우수하며 항영양인자가 최소화되는 조건을 최적 발효 조건으로 선정하였다.

가) *A. oryzae* 및 *Bacillus* 최적 중균 비율 결정

대두박을 이용하여 *A. oryzae* 및 *Bacillus sp.*의 혼합배양을 위한 중균의 최적 비율을 결정하였다.

조단백질 함량이 47%인 대두박의 수분함량을 40%로 조정하여 배양 시 두 균주의 최적 첨가 비율은 *A. oryzae*와 *Bacillus sp.*를 각각 50 : 50의 비율로 혼합하여 배양하였을 때가 가장 우수한 조단백질 증가 효과를 나타내었다. 따라서 두 균주의 적정 첨가 비율을 50 : 50으로 결정하였다(Table 3-7-2).

Table 3-7-2. *A. oryzae* and *Bacillus sp.* 의 혼합배양시 조단백질 함량 변화

분석항목 \ 첨가량	AO 100%	<i>Bacillus</i> 100%	AO 80% + <i>Bacillus</i> 20%	AO 50% + <i>Bacillus</i> 50%	AO 20% + <i>Bacillus</i> 80%
수분(%)	11.4	11.6	11.4	11.4	11.5
조단백질(%)	51.55	52.55	52.55	54.40	53.80

나) 배지의 수분함량에 따른 조단백질 함량 변화

배지의 수분함량을 달리하여 최종 발효물의 조단백질 함량을 측정한 결과는 Figure 3-7-2과 같다. 수분함량이 40% 이상일 경우는 서로간의 유의성있는 차이를 보이지 않았으며 54%수준으로 나타났다. 따라서 혼합배양 시 배지의 최적 수분함량을 40%로 결정하였다.

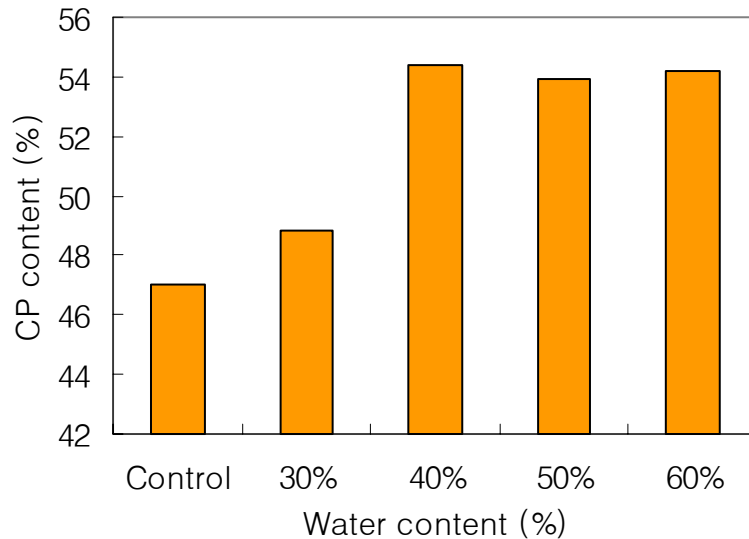


Figure 3-7-2. 침지수분함량에 따른 조단백질 함량 변화(%).

다) Pilot 생산 실험

상기 조건을 바탕으로 하여 Pilot 생산 실험을 실시하였다. 배지는 조단백질 함량이 47%인 대두박을 사용하였으며, 배지의 수분함량은 40%로 조정하였다. Pilot 생산을 위한 최종 공정도는 Figure 3-7-3과 같다.

배양시간별 조단백질 함량 변화는 Table 3-7-3에 나타내었다. 배양을 시작하고 약 20시

간 이후부터는 조단백질 함량이 50% 이상 유지되었으며, 24시간 이후에는 53% 이상을 유지하였다.

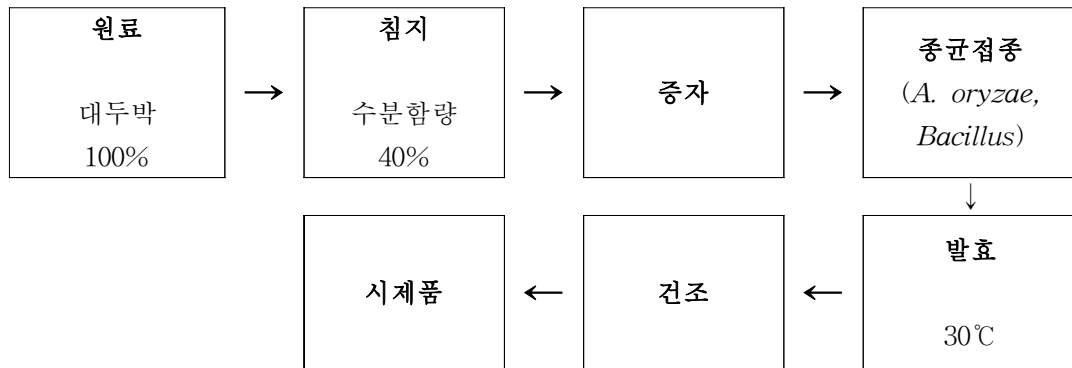


Figure 3-7-3. 대량생산을 위한 공정.



Figure 3-7-4. Pilot-scale 발효.

Table 3-7-3. 배양시간에 따른 조단백질 함량 변화

배양시간	조단백질 함량(%),수분 10%보정
12	48.1±0.3
16	48.3±0.5
20	52.2±0.2
24	53.7±0.3

3) Pack-bed 타입의 고체발효기(10ton/batch)를 이용한 대두단백질 사료의 대량생산에 관한 연구

원료배지를 대두박으로 하여 N.K 증자관(증자솥, Figure 3-7-5)으로 배지를 완전 멸균한 후 35℃까지 냉각시켰다. 냉각이 완료된 후 미생물접종방법을 이용하여 대두발효를 위해 *A. oryzae* 및 *Bacillus* 균주를 접종하였다(Figure 3-7-6).



Figure 3-7-5. 스팀탱크에서 원료배지 멸균.



Figure 3-7-6. 원료배지의 냉각 및 균 접종.

가) 대두박의 단백질 함량을 농축할 수 있는 미생물의 고체발효 조건

고체발효기(10ton/batch)를 이용하여 수분함량별 균 성장을 조사하였다(Figure 3-7-7과 3-7-8). AO 및 *Bacillus* 균수는 초기 10^5 수준에서 24시간 후 10^7 수준으로 증가하였으며, 수분함량을 40%와 50%로 달리하였을 때 수분함량 50%가 균 성장속도가 약간 더 빠른 것으로 나타났으나, 최종 제품에서 균수의 차이는 없었다. 또한, 수분함량 조절 후 증가하여 이송라인을 따라 이동시 이동의 용이성을 감안하여 최적 수분함량을 40%로 맞추는 것이 유리하였다.

배지의 수분함량을 40%로 조정 후 발효기 내의 온도 변화를 조사하였다(Figure 3-7-9). 초기 시작온도를 27°C로 조절하여 발효를 시작하였으며, *A. oryzae* 와 *Bacillus* 혼합배양 시 약 18시간부터 온도가 올라가기 시작하여 최종 26시간 쯤 47°C까지 온도가 증가하였다. 이때의 균수는 *A. oryzae* 및 *Bacillus* 가 각각 10^7 수준이었다. 건조 후 최종제품의 조단백질 함량은 54%였다. 그렇지만, 24~26시간 발효 시 온도가 50°C 이상 올라간 경우는 조단백질 함량이 53% 이하로 나와, 발효 시 온도가 균성장애 영향을 미치며, 결과적으로 조단백질 함량을 저하시키는 원인이 된다.

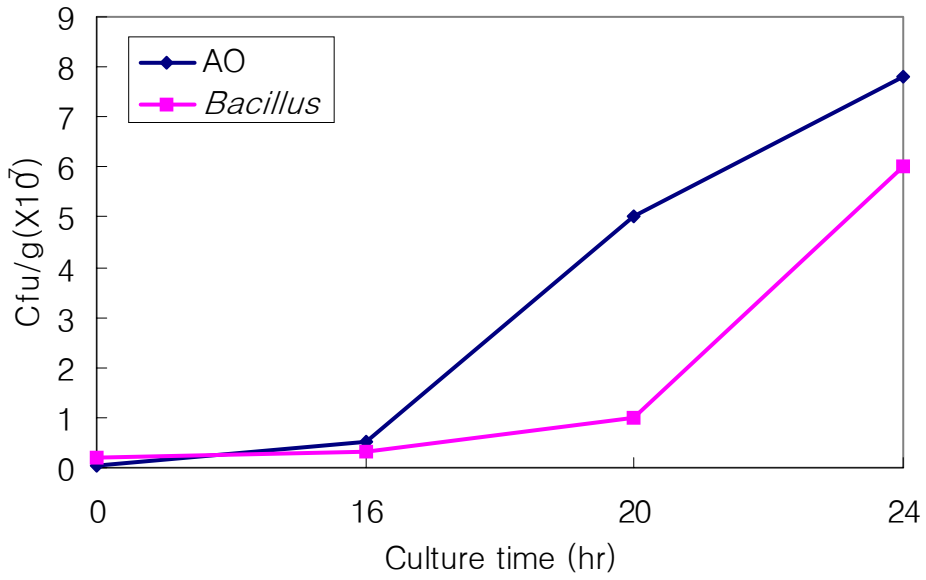


Figure 3-7-7. 수분 40%수준에 의한 미생물발효상태변화.

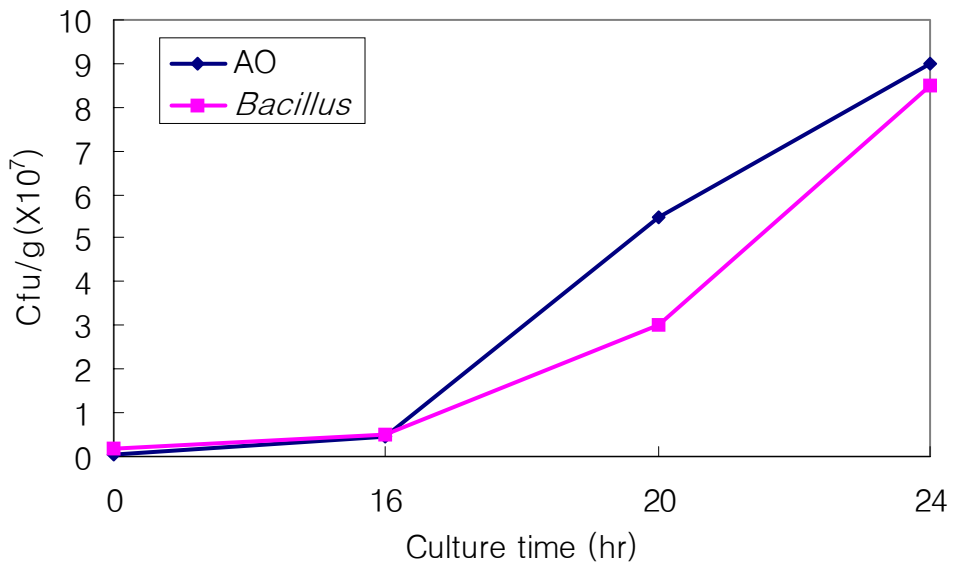


Figure 3-7-8. 수분 50%수준에 의한 미생물발효상태변화.

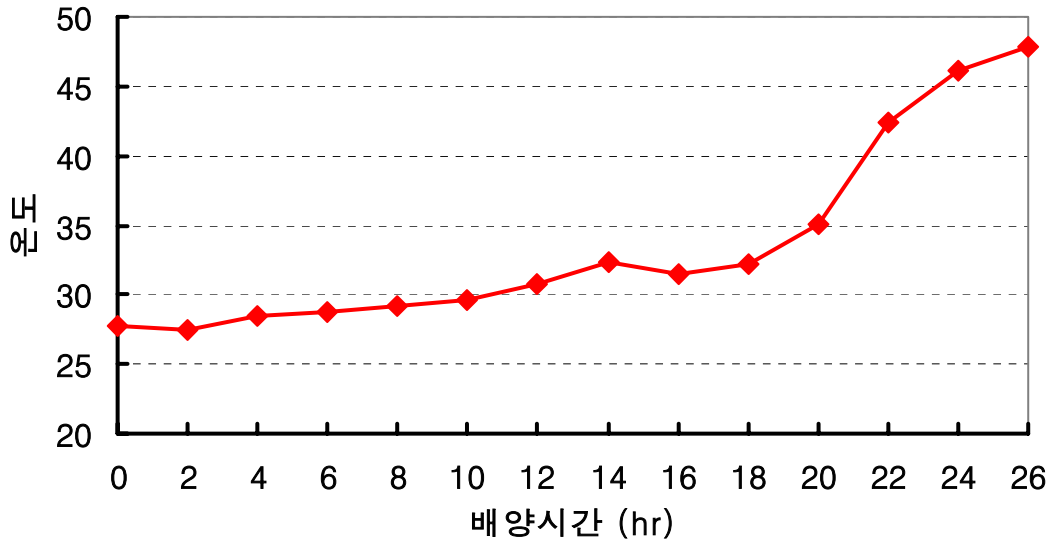


Figure 3-7-9. 고상배양시 발효실 온도변화.

나) 대두박에 함유된 항영양인자의 함량을 최소화 할 수 있는 조건설정

대두박의 항영양인자 함량을 최소화시키기 위해 증자온도를 100°C 이상 올릴 경우 앞서 조사한 바와 같이 TI 값을 1mg/g이하로 떨어뜨리기가 어려우며, 오히려 대두웹타이드의 소실을 가져오게 된다. 따라서 증자온도를 최소화 시켜 단백질의 변성을 막으면서, 발효를 통해 항영양인자를 최소화 시키는 작업이 필요하다. 앞서 알아본바와 같이 침지량을 40~50%로 조절할 때 TI 값이 약 0.1~0.3mg/g 정도 감소하였으며, 100°C로 30분간 열처리시 TI 값이 약 1mg/g으로 감소하였다. 따라서 침지량을 40%로 맞추고 열처리 온도를 80°C로, 30분간 열처리 하였을 때 TI 값은 약 2.3 mg/g으로 조사되었다. *A. oryzae* 및 *Bacillus* 혼합 발효에 의한 TI 값의 감소를 조사하여 Figure 3-7-10에 나타내었다.

발효과정 중에 나타난 항영양인자의 감소는 발효과정 중에 trypsin inhibitor의 활성을 충분히 감소시킬 수 있으므로 다른 처리과정이 필요하지 않았다. 최종 개발제품의 단백질 전기영동 사진은 Figure 3-7-11과 같다. Trypsin inhibitor는 21.5kDa로 상기 방법으로 개발한 제품에는 밴드를 확인할 수 없어 발효를 통해 완전히 저분자로 분해된 것을 확인할 수 있다.

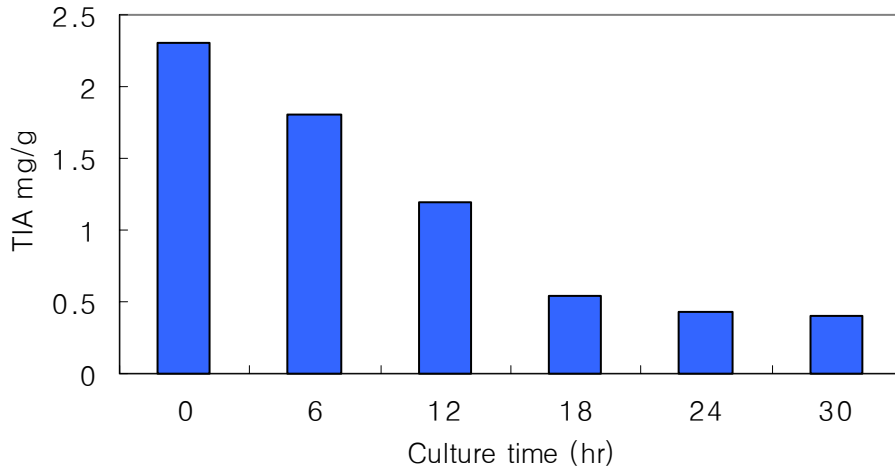


Figure 3-7-10. 배양시간에 따른 trypsin inhibitor 함량 변화.

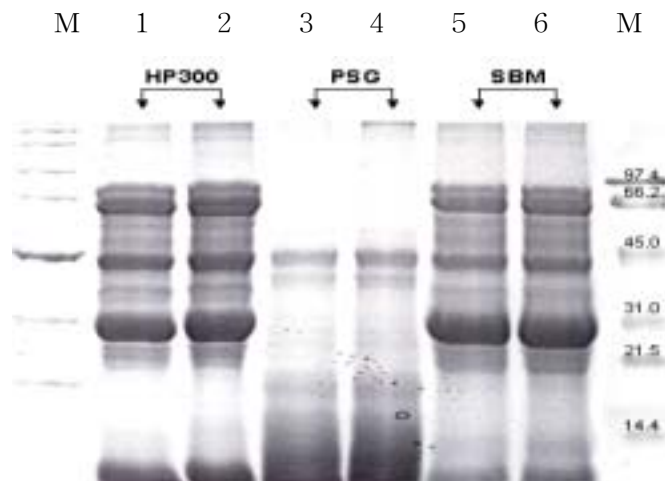


Figure 3-7-11. 최종제품의 단백질 전기영동 패턴.

1, 2: 경쟁제품(H), 3, 4: 개발제품, 5, 6: 대두박
(21.5kDa ; trypsin inhibitor)

다) 각종 소화효소활성을 최적화할 수 있는 조건 설정

소화 효소활성을 최적화 하기위해 대두박의 수분함량을 40%로 조정하여 *A. oryzae* 와 *Bacillus*를 혼합 배양한 결과 배양물의 amylase와 protease활성을 조사하여 Table 3-7-4에

나타내었다. Amylase activity는 *A. oryzae* 와 *Bacillus* 혼합배양 시 *A. oryzae* 단독 배양에 비해 약 2배 이상 낮은 수치를 나타내었으며, protease activity 역시 *Bacillus* 단독 배양보다 약 2배가 낮았다. 혼합 배양 시 각각의 소화효소의 분비를 늘리기 위해서 배지의 수분함량, 배양온도 및 초기 접종 종균의 균수 등에 대한 영향을 조사하였다.

우선, 배지의 수분함량별로 배양하여 효소활성을 조사한 결과를 Figure 3-7-12에 나타내었다. 배지의 수분함량이 50%일 때 amylase activity 및 protease activity가 가장 우수하였다. 따라서 *A. oryzae* 와 *Bacillus*의 혼합배양시 효소 활성을 최대화 하기 위해서는 배지의 수분함량은 50%가 가장 효과적이다.

Table 3-7-4. *A. oryzae* and *Bacillus sp.* 혼합배양 시 효소 활성 비교

첨가량 분석항목	<i>A.O</i> 100%	<i>Bacillus</i> 100%	<i>A.O</i> 80% + <i>Bacillus</i> 20%	<i>A.O</i> 50% + <i>Bacillus</i> 50%	<i>A.O</i> 20% + <i>Bacillus</i> 80%
Amylase activity(u/g)	105	46	25	45	15
Protease activity(u/g)	17.48	37.16	15.71	19.57	20.37

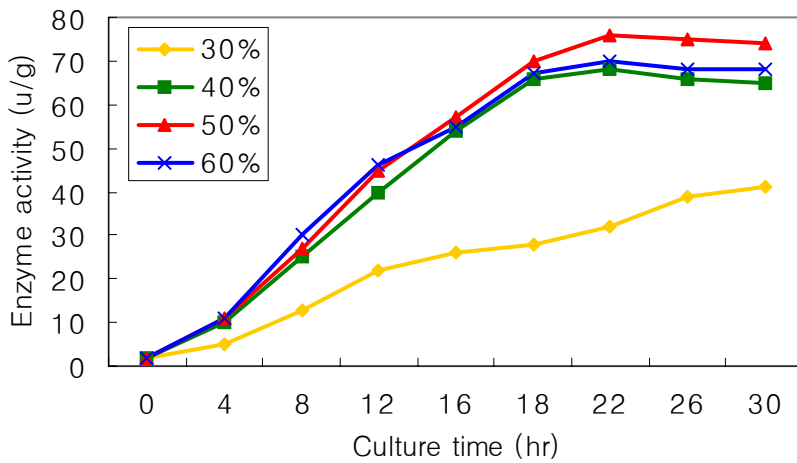


Figure 3-7-12. 배지의 수분함량이 효소활성에 미치는 영향 (amylase activity + protease activity).

발효온도가 효소 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 발효온도가 높을수록 amylase + protease activity가 높게 나타났다. 이는 *A. oryzae*와 *Bacillus* 혼합배양시 온도가 높아지면 *Bacillus* 성장이 왕성해져 그에 따른 효소 활성화도 높아지는 결과를 나타내었다(Figure 3-7-13).

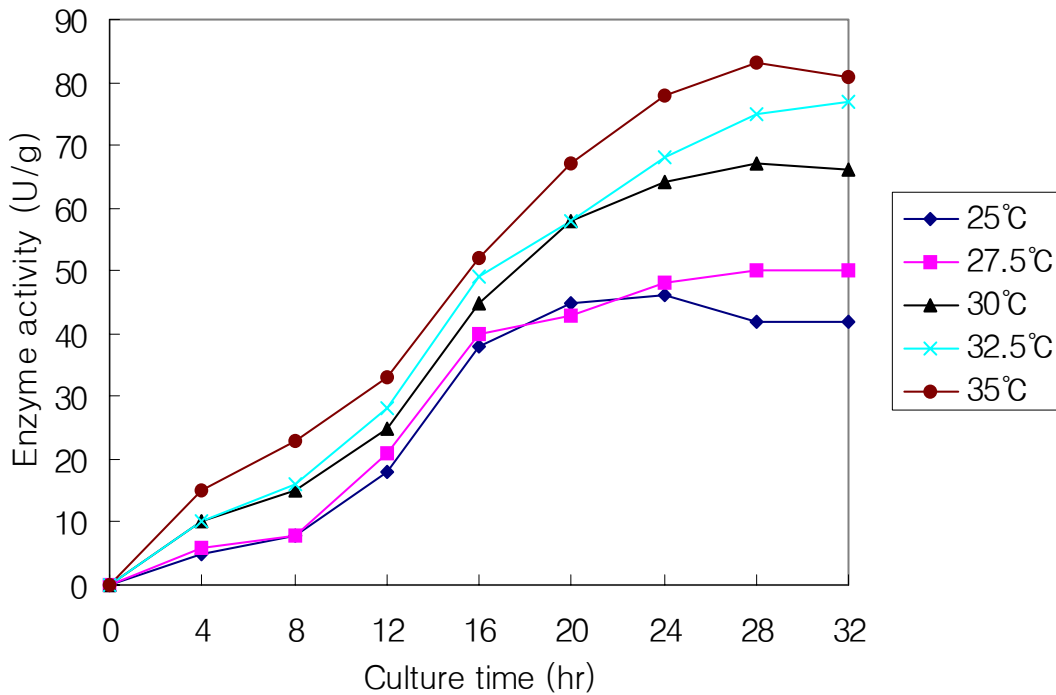


Figure 3-7-13. 배양온도에 따른 효소활성 비교.

A. oryzae 및 *Bacillus* 종균 접종량이 enzyme activity에 미치는 영향을 조사하기 위해 종균의 균수를 각각 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 /g 농도로 조절하여 50 : 50의 비율로 *A. oryzae*(2g/200g) 및 *Bacillus* 종균(2ml/200g)을 접종한 후 35°C에서 3일 동안 배양한 결과를 Table 3-7-5에 나타내었다. 초기 접종균수가 높을수록 효소역가가 높게 나타났다. 이는 최종 발효 후 제품의 균수가 10^9 수준일 경우 효소역가가 100u/g을 넘는 것으로 나타나 효소역가를 증가시키기 위해서는 초기 접종균수를 1×10^6 이상으로 접종하는 것이 효과적이다.

Table 3-7-5. *A. oryzae* 및 *Bacillus* 초기 접종량이 enzyme activity에 미치는 영향

Initial inoculum (cfu/g)	Final product (cfu/g)		Enzyme activity (U/g)
	AO	<i>Bacillus</i>	
1×10^3	1.5×10^6	5×10^6	45±7
1×10^4	8.2×10^6	3×10^7	60±9
1×10^5	5.4×10^8	7×10^8	80±10
1×10^6	9.2×10^8	1×10^9	95±15
1×10^7	1.0×10^9	3×10^9	105±14

라) 최적 발효조건에서 시험생산

지금까지 조사된 발효조건으로 대두박을 발효시 온도 및 조단백질 함량의 변화를 Figure 3-7-14에 나타내었다. *A. oryzae*균은 22시간 배양에서 peak를 나타내었으며 *Bacillus*균은 28시간 배양에서 높은 균수를 나타내었다. 이는 초기 발효온도를 30℃ 이하로 발효를 시작하여 초기 성장이 *A. oryzae*를 중심으로 이루어지며 발효 중 온도상승으로 인한 *Bacillus*균의 성장이 18시간 이후부터 왕성해지는 결과를 나타내었다. 조단백질 함량 변화 역시 22시간 이후부터 52%를 넘어서 28시간에 최대인 54%를 나타내었다. 이는 균 성장이 조단백질 증가와 명백한 관련이 있음을 보여준다.

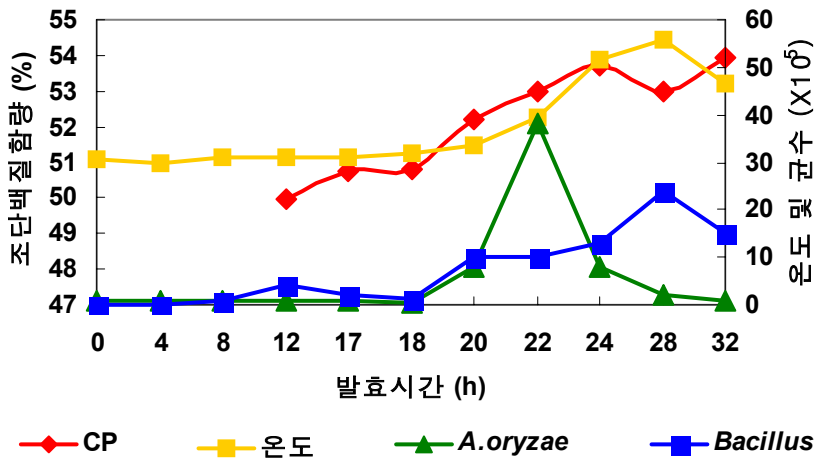


Figure 3-7-14. 미생물고체발효에 의한 조단백질함량 변화.

나. 발효에 의한 농축대두 단백질사료의 분말 제형화 연구

1) 발효 후 건조조건에 제품의 특성변화 및 건조비용을 최소화하는 건조조건설정

건조 온도에 따른 제품의 조단백질 함량 변화를 조사하였다(Table 3-7-6). 건조온도가 높을수록 건조시간은 짧아지지만, 70℃ 이상에서는 조단백질 함량의 변화를 관찰할 수 있었다. 이는 열처리 및 건조 시 *A. oryzae*포자 등의 소실과 열처리에 따른 단백질의 변성에 의해 조단백질 함량이 감소한 것이다.

건조시간은 건조온도를 올릴수록 감소하지만 제품의 색깔이 진해져 기호성이 떨어진다. 따라서 상기 결과를 종합하면, 조단백질 함량의 변화를 최소화 하기위해 60℃로 건조하는 것이 효과적이다.

Table 3-7-6. 미생물고체발효에 의한 조단백질함량 변화

건조온도(℃)	건조시간	조단백질(%)
건조후	-	54.3
50	15	54.3
60	10	54.3
70	8	53.8
80	5	52.4

2) 제품의 제형화 연구

제품의 제형화를 위해 건조 완료 후 발효대두 제품을 입자도별(1, 2, 3, 4, 5Φ)로 각각 분쇄하였다. 이들 분쇄한 제품을 다른 원료와 혼합하였을 때 2Φ로 분쇄한 원료가 가장 잘 혼합되었으며, 색상 및 입자도가 안정화되었다.

다. 발효에 의한 농축 대두 단백질 사료의 안정성 시험

1) 보존기간에 따른 제품의 안정성 시험

최종제품의 보존기간에 따른 제품의 안정성을 시험하기 위해 포장이 완료된 제품을 실

온상태에서 건조한곳에 보관하면서 매달 조단백질 변화를 조사하였다(Figure 3-7-15). 보관 8개월 후 보관 제품의 조단백질 함량이 약 0.1% 가량 감소하였으며, 보관중 제품의 수분함량 변화 및 오염이나 이 물질의 혼입은 없었다.

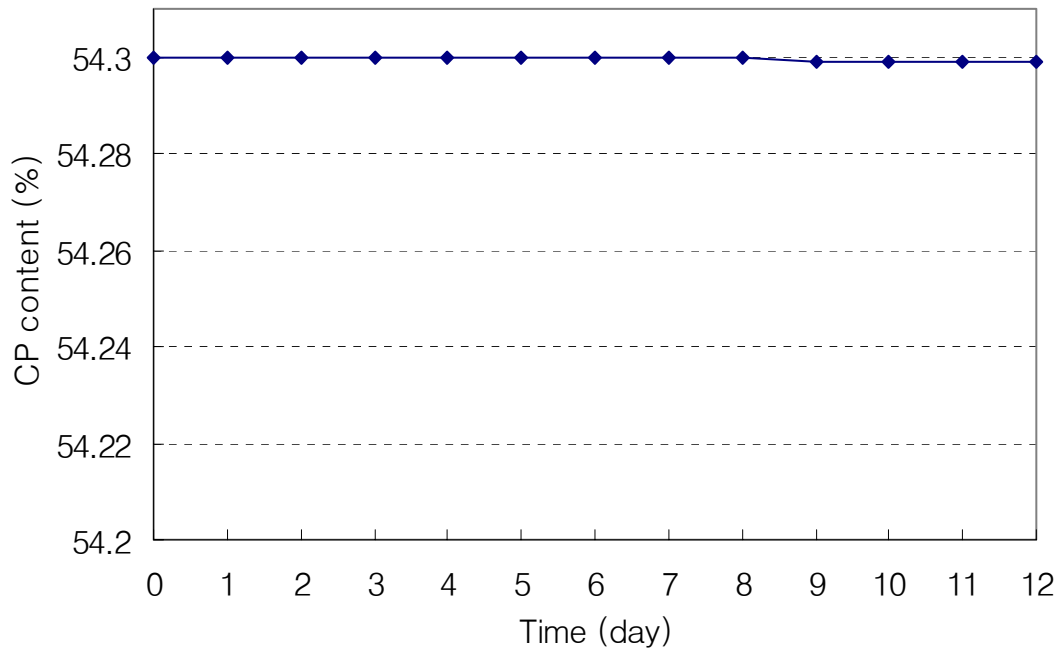


Figure 3-7-15. 보존기간에 따른 제품의 안정성.

2) 보존온도에 따른 제품의 안정성 시험

보존 온도별로 제품의 보관에 따른 안정성을 테스트 하였다. 최종 제품을 건조 온도 10, 20, 30, 40℃로 달리하여 보관기간중 제품의 안전성을 실험실상의 incubator를 이용하여 조사하였으며, 수분함량의 변화는 초기 8~10%범위에서 변화가 없었다.

보관온도 10, 20, 30℃는 보관 기간 동안 조단백질 함량의 변화가 거의 없었으며, 40℃로 보관한 샘플은 8개월 이후부터 조단백질 함량이 감소하기 시작하였다. 따라서 실온에서 보관 시 10개월 동안 조단백질 함량에 변화가 없을 것으로 판단되며, 보관과정상의 문제가 없을 것으로 판단된다.

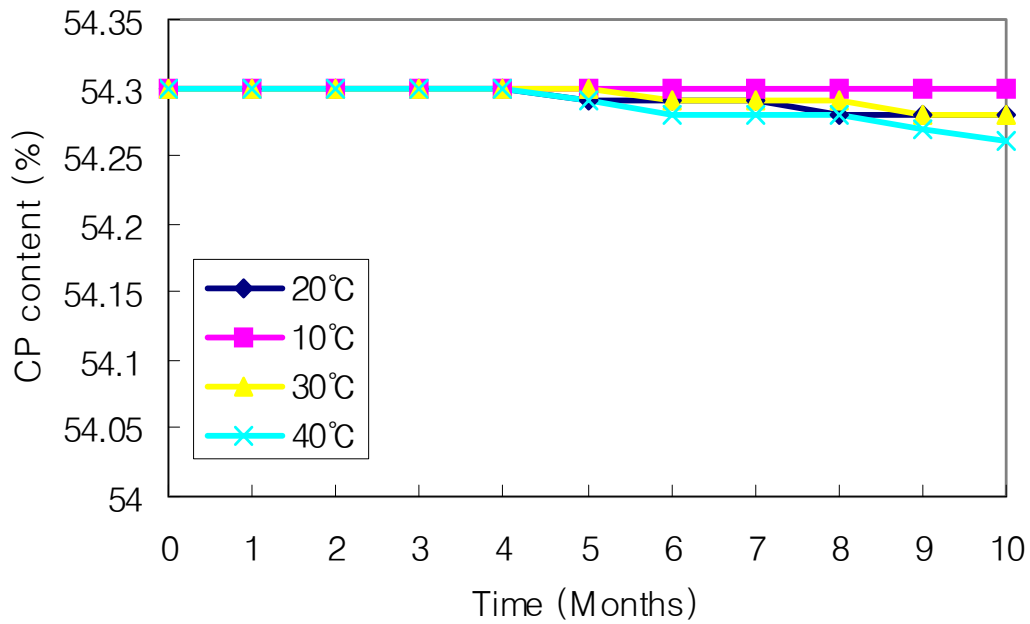


Figure 3-7-16. 보관온도에 따른 제품의 안정성.

3) 제품 가공 시 열안정성 시험

펠릿 사료에 첨가되어 사용되어질 경우 펠릿 제조과정 중 발생하는 열에 의한 제품의 품질변화가 일어날 수 있다. 이를 조사하기 위해 제품을 80°C~120°C로 5분, 10분간 열처리 하여 열에 대한 안정성을 조사하였다.

실험결과 100°C/10분간 열처리 하여도 단백질 패턴의 변화는 거의 없었으며, 110°C 이상의 온도에서 열처리 시 단백질의 급격한 degradation이 일어났다(Figure 3-7-17).

열처리에 따른 균수 변화를 조사한 결과는 Table 3-7-7과 같다. 초기 10^6 수준의 균수는 90°C/10분간 열처리를 하여도 10^6 수준을 유지하였으나, 100°C 열처리부터는 균수가 감소하여 최종 10^1 이하까지 감소하였다.

열처리에 따른 제품의 효소역가 변화를 조사한 결과는 Table 3-7-8과 같다. Amylase 및 protease activity는 열처리에 따라 조금씩 감소하는 경향을 나타내었으며, amylase activity는 100°C/5분, protease activity는 100°C/10분간 열처리 상황에서도 초기 역가의 80% 이상의 활성을 유지하였으며, 110°C 이상에서는 단백질 패턴의 변화에서 보는바와 같이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

열처리 조건에 따른 trypsin inhibitor activity는 열처리를 함에 따라 감소하는 경향을 나타내었고 초기 비열처리 시에도 0.47 mg/g으로 충분히 낮은 값을 나타내었으나, 120℃로 열처리 시 단백질의 소실로 인해 0.25 mg/g의 낮은 값을 나타내었다(Table 3-7-9).

지금까지 결과를 종합하면, 안전한 열처리 조건은 90℃/10분 까지 열처리를 하여도 제품의 품질에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다. 또한, 100℃/5분간 열처리 하여도 균수를 제외한 부분에서는 열안정성을 갖는 것으로 판명되었다.

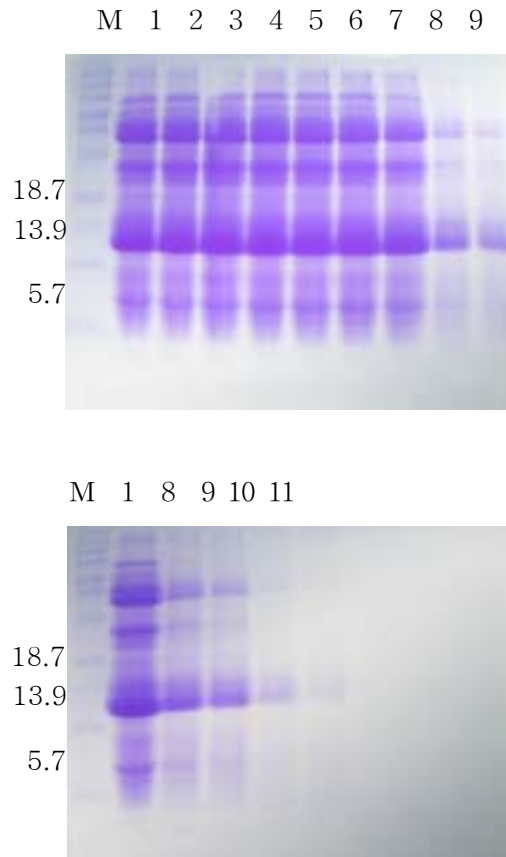


Figure 3-7-17. 열처리에 따른 단백질 패턴 (15% acrylamide gel).

M: Marker, 1: Control, 2: 80℃ 5min, 3: 80℃ 10min,
 4: 90℃ 5min, 5: 90℃ 10min, 6: 100℃ 5min, 7: 100℃ 10min,
 8: 110℃ 5min, 9: 110℃ 10min, 10: 120℃ 5min, 11: 120℃ 10min

Table 3-7-7. 열처리 조건에 따른 균수 변화

Temp.	열처리시간(min)	AO 균수(cfu/g)	<i>Bacillus</i> 균수(cfu/g)
Control		4.6×10^6	7.8×10^6
80°C	5	3.5×10^6	4.5×10^6
	10	3.0×10^6	3.5×10^6
90°C	5	1.8×10^6	1.8×10^6
	10	1.0×10^6	1.2×10^6
100°C	5	2.6×10^5	5.1×10^5
	10	1.3×10^4	1.5×10^4
110°C	5	1.5×10^4	6.5×10^4
	10	10^4 이하	10^4 이하
120°C	5	1.0×10^2	2.3×10^2
	10	10^1 이하	10^1 이하

Table 3-7-8. 열처리 조건에 따른 효소 역가 변화

Treatments	Amylase	Protease
Control	42.76	24.7
80°C 5min	37.68	23.8
80°C 10min	36.39	23.5
90°C 5min	36.25	23.2
90°C 10min	34.25	23.3
100°C 5min	34.68	22.2
100°C 10min	24.02	21.5
110°C 5min	4.78	13.5
110°C 10min	3.575	11.9
120°C 5min	2.42	10.3
120°C 10min	1.77	9.7

Table 3-7-9. 열처리 조건에 따른 TI 값 변화

Treatments	TI(mg/g)
Control	0.47
80℃ 5min	0.46
80℃ 10min	0.39
90℃ 5min	0.36
90℃ 10min	0.35
100℃ 5min	0.34
100℃ 10min	0.33
110℃ 5min	0.27
110℃ 10min	0.27
120℃ 5min	0.26
120℃ 10min	0.25

4. 요약

고품질 대두단백질 사료의 생산을 위한 최적 배양조건을 확립하였다. 미생물 발효조건상 대두박과 밀기울을 1 : 2의 비율로 배합함으로써 최적의 효소활성을 유도할 수 있었으며 대량생산을 위한 최적배지로 이용할 수 있었다. 최적 조건은 단백질 분해효소와 전분분해효소역가로 기준으로 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus sp.*를 50 : 50의 비율로 혼합하여 발효시킨 결과 가장 우수한 조단백질 증가효과를 가져왔다. Pilot scale 형태와 packed-bed type 고체발효기(10톤/batch)를 이용하여 대두단백질을 대량생산하기 위한 연구에서 최적 수분함량은 40%로 고정하였을 때 안정적인 고급대두단백질을 생산할 수 있었다. 항영양인자를 최소화하기 위한 방안으로 온도와 미생물처리방법을 이용하였을 때 고온의 열처리는 단백질 변성을 가져오므로 대두발효 시 품질에 영향을 주었으며 따라서 적정 온도는 80℃가 가장 적정한 것으로 조사되었다. 대량생산을 위한 미생물의 배양은 초기 결과와 마찬가지로 혼합배양 시 단백질분해효소와 전분분해효소의 활성이 최대화되는 결과를 가져왔다. 보존온도와 보존기간은 실온에서 장기간 보관 시 전혀 문제가 발생되지 않았다. 이와 같은 결과를 통해 고급 대두단백질을 생산하기 위한 최적 조건을 확립할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 제 1 세부과제

기존의 수입제품과 발효대두단백 제품(FSP)을 실질적으로 이유자돈사료에 적용하여 사양성적, 소화기의 형태학적 발달 및 영양소 소화율을 평가하였다. 발효대두단백은 탈피 대두박보다 성장능력과 영양소 소화율을 개선시켰으며 수입 가공대두단백 제품과 유사한 성적을 얻었다. 또한, 이유자돈의 회장말단부에 single-T cannula를 장착하여 아미노산의 이용성을 평가하였다. 외관상 및 진정 아미노산 소화율을 측정된 결과 기존의 수입 가공대두단백 제품과 이용성에 있어서 차이가 없는 것으로 조사되었다. 따라서 발효대두단백은 가공 대두단백으로서 가치가 있으며 기존의 수입 가공대두단백제품을 대체할 수 있는 원료로 판단된다.

발효대두단백은 미생물의 발효과정에서 생산된다. 우리나라의 메주로부터 분리한 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus oryzae* + *Bacillus subtilis* 복합균주에 의해 생산된 두 발효대두단백의 사료적 가치를 평가하기 위하여 이유자돈의 성장능력, 소화기의 형태학적 발달 및 영양소 소화율에 미치는 영향을 조사하였다. 두 균주에 의한 발효대두단백 모두 탈피 대두박에 비하여 성장능력과 영양소 소화율을 개선시켰으며, 기존의 수입 가공대두단백 원료에 비하여 유사하거나 다소 낮은 사용효과를 얻었다. 또한, 두 발효대두단백 원료의 아미노산 이용성을 평가하기 위하여 아미노산의 외관상과 진정 회장소화율을 조사하였다. 두 균주를 달리한 발효대두단백은 사양성적, 영양소 소화율과 마찬가지로 탈피 대두박 보다는 유의적으로 개선되며 가공 대두단백과는 대체로 유사한 것으로 나타났다. 따라서 두 발효대두단백 모두 수입가공대두단백 원료를 대체할 수 있는 원료로 사료되며 복합균주에 의한 발효대두단백의 단백질 함량이 단일균주에 의해 생산한 발효대두단백에 비하여 높고 사양성적이나 영양소 소화율에 있어 다소 향상되는 경향이 있었다.

이상의 실험에서 발효대두단백은 대두박이나 기존의 가공대두단백을 충분히 대체할 수 있는 원료로 평가되어졌다. 하지만 자돈사료에 사용하기 적당하다고 하더라도 품질과 가격측면을 고려해 볼 때 사용수준에 따라 경제적이지 않을 수도 있다. 따라서 발효대두단백의 적절한 사용수준을 검토하고자 발효대두단백의 사용수준에 따른 자돈의 성장, 소화기의 형태학적 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 발효대두단백의 사용수준에 따라 성장능력과 영양소 소화율에 개선효과가 증가하는 경

향이 있었다. 하지만, 6%이상을 사용할 때 그러한 효과의 증가는 둔화되는 것이 관찰되었다. 또한, 사용수준에 따른 아미노산의 소화율도 조사하여 이용성을 평가하였다. 아미노산의 소화율은 6%와 9% 사용시 별다른 차이가 없었다. 따라서 사용효과와 가격적인 측면을 고려해 볼 때, 발효대두단백은 6~9%로 사용하는 것이 좋을 것을 판단된다.

위에서 실시한 두 균주에 의한 발효대두단백은 자돈사료내 단백질 원료로서 가치가 있는 것으로 나타났다. 그러므로, 두 발효대두단백의 상대적 가치와 적절한 사용수준을 평가하기 위하여 이유자돈의 성장능력과 영양소 소화율을 평가하였다. 두 발효대두단백의 사용은 사용수준에서 보다는 균주에 의하여 더 많은 영향을 미쳤으며 두 발효대두단백 모두 6%수준으로 사용할 경우 성장능력과 영양소 소화율을 개선시키는 것으로 사료되었다. 아미노산 소화율에 있어서는 두 균주와 사용수준에 따라서 유의적인 차이점을 관찰할 수 없었다. 그러나 *Aspergillus oryzae*에 의한 발효대두단백보다는 *Aspergillus oryzae* + *Bacillus subtilis*에 의한 발효대두단백의 품질이 다소 좋은 것으로 판단된다.

마지막으로 발효대두단백의 동물성 단백질 원료에 대한 상대적 가치를 평가하기 위하여 발효대두단백과 동물성 단백질 원료의 사용이 이유자돈은 성장과 영양소 소화율에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. 발효대두단백의 사용은 동물성 단백질 원료인 농축 유장분말과 어분에 비하여 사양성적과 영양소 소화율에 있어 상대적으로 낮은 결과를 나타냈다. 하지만 이들 원료들은 고품질의 단백질 원료로 가격이 비교적 고가의 원료들이다. 초기 이유자돈의 소화체계는 식물성 원료보다는 동물성 원료에 맞는 소화효소체계를 갖고 있다. 급여시기가 지날수록 본 실험에서 나타난 차이는 점차적으로 개선될 것으로 사료되므로, 발효대두단백 원료는 동물성 단백질 원료의 일부분을 대체할 수 있을 것으로 판단되며 또한, 여러 동물성 단백질 원료와의 상대적 가치를 평가하기 위한 좀 더 많은 연구가 수행되어져야할 것으로 보여진다.

2. 제 2 세부과제

발효대두단백의 자돈사료내 사용이 자돈의 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 혈액내 면역관련 세포와 혈액 생화학치 그리고 chemiluminescence를 측정하였다. 이유자돈 사료내 발효대두단백의 사용은 면역관련 세포와 혈액 생화학치 그리고 chemiluminescence의 변화에 영향을 미치지 않은 것으로 보아 기존의 대두박에 대한 알리지 반응은 없는 것으로 판단된다. 또한, 균주를 달리한 발효대두단백내 항영양인자와 올리고당의 함량 변화에 따른 자돈의 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 혈중 면역관련 세포와 혈액 생화학치 그리고 chemiluminescence를 조사하였다. 위와 마찬가지로 평가항목에 있어서 특이적인 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 발효대두단백의 이유자돈사료내 사용은 예전에 보고된 특이

적인 알러지 반응을 일으키지 않을 것으로 판단된다.

이전의 조사에서 발효대두단백은 이유자돈에게 알러지 반응을 일으키지 않는 것으로 나타났다. 하지만 사용수준에 따라서 알러지 반응을 일으킬 수 있는 소지가 여전히 남아있기 때문에 자돈의 면역반응을 조사함으로써 발효대두단백의 적절한 사용수준을 검토하였다. 발효대두단백은 사용수준에 따라 면역관련 세포수와 혈액생화학적 수치, 효소치 그리고 chemiluminescence의 변화가 다소 관찰되었으나 이러한 변화는 대부분 정상적인 생리학적인 정상범위내에서의 변화였으며, IgG 역가와 항히스타민은 거의 검출되지 않았다. 또한, 2가지 발효대두단백의 상대적 가치와 적절한 사용수준을 검토하고자 실시한 실험에서도 사용수준에 따른 면역반응과 유사한 결과를 얻었다. 이상의 결과를 종합하여보면 발효대두단백은 자돈의 공장이나 회장 내에서 알러지를 유발하는 대두단백과는 분자구조상의 차이가 있을 것으로 사료된다.

3. 협동과제

한국 전통메주로부터 *A. oryzae*와 *B. subtilis* 균주를 분리하여 amylase효소 역가가 매우 높은 변이주를 개량하였고 조단백질 함량이 46%인 탈피대두박을 침지→저온 증자→미생물 접종→고상발효→건조 과정을 거치는 미생물 고상발효 기법을 개발하여 전형적으로 조단백질 함량이 55%인 대두 단백질사료 생산을 위한 최적조건을 확립하였다.

대두박에 함유된 항영양인자인 trypsin inhibitor, 올리고당인 raffinose 및 stachyose를 미생물 발효과정에 생성된 protease와 glucoamylase에 의하여 가수분해 되는 대두박 가공기법을 개발하였다.

개발 제품은 조단백질 함량이 54~55%수준이며, 발효과정을 통해 trypsin inhibitor를 3.6mg/g에서 0.4mg/g으로 감소시켰으며, raffinose 및 stachyose 함량을 0.1% 미만으로 감소시켰다. 또한, KOH 용해도 및 PDI(단백질 분산지수)는 각각 76.18% 및 19.48%로 우수한 식물성 단백질 공급원이다.

본 연구에서 기존의 대두 단백질사료 생산 방법과는 전혀 다른 미생물 발효법으로 대두박을 가공하여 고품질 대두 단백질사료를 생산할 수 있는 조건을 확립하였고, 상기조건으로 제조된 시제품은 기존의 수입 대두단백질 제품보다 항영양인자가 매우 낮고 단백질의 용해도가 우수하며 미생물 발효과정 중 생성된 protease에 의하여 대두단백질 70% 이상 25kDa 이하의 작은 펩타이드 분자로 가수분해 된 고품질의 대두단백질 사료원료이다. 고품질 대두 단백질 사료의 생산을 위한 최적 배양조건을 확립하였다. *A. oryzae* 종균 생산시 미생물 발효조건상 대두박과 밀기울을 1 : 2의 비율로 배합함으로써 최적의 균수 및 효소역가를 유도할 수 있었으며 대량생산을 위한 최적배지로 이용할 수 있었다.

최적 배양 조건은 단백질 분해효소와 전분분해효소역가의 기준으로 *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus sp.*를 50 : 50의 비율로 혼합하여 발효시킨 결과 가장 우수한 조단백질 증가효과를 가져왔다. Pilot scale형태와 packed-bed type고체발효기 (10톤/batch)를 이용하여 대두단백질을 대량생산하기위한 연구에서 최적 수분함량은 40%로 고정하였을 때 안정적인 고급 대두단백질을 생산할 수 있었다. 항영양인자를 최소화하기위한 방안으로 온도와 미생물처리방법을 이용하였을 때 고온의 열처리는 단백질 변성을 가져오므로 대두발효시 품질에 영향을 주었으며 80℃가 가장 적절한 온도로 조사되었다. 대량생산을 위한 미생물의 배양은 초기 결과와 마찬가지로 혼합배양 시 단백질분해효소와 전분분해효소의 활성이 최대화되는 결과를 가져왔다. 보존온도와 보존기간은 실온에서 장기간 보관 시 전혀 문제가 발생되지 않았다. 이와 같은 결과를 통해 고급 대두단백질을 생산하기 위한 최적 조건을 확립할 수 있었다.

제 2 절 관련 산업에의 기여도

본 연구를 통해 개발된 발효대두단백은 일반 대두박의 자돈사료내 사용에 따른 항영양인자와 항원물질의 문제를 최소화하고, 수입에 의존하고 있는 고가의 가공 대두단백제품을 대체할 수 있을 것으로 사료되며, 또한 고가의 동물성 단백질 원료의 일부대체가 가능할 것으로 판단된다.

다만, 발효대두단백의 생산비를 얼마나 경제적으로 저렴하게 할 수 있느냐가 관건인데 이는 생산량과도 밀접한 관계가 있으므로 국내 수요를 충족시킬 수 있을 정도로 대량생산한다면 수입되고 있는 가공 대두단백제품과 분명히 가격 경쟁력이 있으며 차별화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 최근 사료시장이 확대되고 있는 아시아 국가에 수출하는 방안을 모색한다면 대량생산에 많은 어려움은 없을 것으로 판단된다.

현재 국내에서 유통되고 있는 사료용 수입 가공대두제품의 가격은 kg당 1,150~2,600원 정도이다. 이 가격에서 사용량은 9,600톤이며 이를 금액으로 환산하면 연간 199억원으로서 상당한 외화절감이 가능하며 저렴한 고급 대두단백을 다량 공급한다면 국내 사료 및 축산업계에 큰 도움이 되리라 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 기존에 수입에 의존하고 있는 고품질 가공대두단백을 국산화하여 비교적 저렴한 가격의 고품질 대두단백제품을 국내에 공급함으로써 외화절감은 물론 사료업계와 축산농가의 경제적인 부담을 줄여주고자 실시하였다. 본 연구에서 발효대두단백을 대량 생산하고자 최적의 가공조건과 효과적인 생산방법을 조사하였으며 개발된 발효대두단백의 자돈사료내 이용성을 평가하였다.

본 연구과정을 통해 평가되어진 연구결과는 국내외 각종 학회지나 저널지 등에 게재하여 발효대두단백에 대한 영양·사료적 가치를 홍보할 계획이다. 이미 한국동물자원과학회지에 게재한바 있으며 한국농화학회 학술회의에서 발표된 바 있다. 또한, 우리나라 전통 메주로부터 분리해낸 *Aspergillus oryzae* GB-107(KCTC102581BP)를 한국유전자은행에 기탁하였으며 “*Aspergillus oryzae* 변이균주 GB-107을 이용한 사료용 발효대두펩티드의 생물학적 가공방법”으로 특허출원하였다.

본 연구에서는 기존의 대두단백질사료 생산방법과는 전혀 다른 미생물 발효법으로 대두박을 가공하여 고품질 대두 단백질사료를 생산할 수 있는 조건을 확립하였으므로 앞으로 이 기술을 활용하여 발효대두단백 생산공정과 기술을 개발하여 양산화 체계를 갖추어 대량 생산함으로써 저렴한 가격의 고품질 대두단백을 국내 축산업계에 공급할 계획이다. 이렇게 될 경우 상당한 외화절감은 물론 어린 가축용 사료의 원가 절감과 양축농가의 사료비 절감에 도움이 될 것으로 사료된다. 더 나아가 개발된 발효대두단백의 생산방법은 각종 실험동물 사료생산뿐만 아니라 좀 더 연구한다면 식품용 원료를 생산하는데 활용이 가능할 것으로 사료된다.

제 6 장 참고문헌

- Anderson, R. L., J. J. Rackis and W. H. Tallent. 1979. Biologically active substances in soy products. In *Soy Protein and Human Nutrition*, Wilcke, H. L., D. T. Hopkins, and D. H. Waggle, Eds., Academic Press New York, 209.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis (15th Ed.)*. Association of Official Analytical Chemist. Washington D. C., USA.
- Barrio, J. R., A. L. Goetsch and F. N. Owens. 1986. Effect of dietary concentrate on in situ dry matter and nitrogen disappearance of a variety of feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 69:420-431.
- Burnham, L. L., J. D. Hancock, M. R. Cabrera, I. H. Kim and R. H. Hines. 1994. Alcohol- and water-extracted soy protein concentrates for early-weaned pigs. *Swine Day*. Kansas State University. Manhattan, KS, USA. pp. 72-75.
- Caine, W. R., W. C. Sauer, S. Tamminga, M. W. A. Verstegen and H. Schulze. 1997a. Apparent ileal digestibility of amino acids in newly weaned pigs fed diets with protease-treated soybean meal. *J. Anim. Sci.* 75:2962-2969.
- Central Soya. 1999. Processing flow chart and composition of soybean products. <http://www.centalsoya.com>.
- Cera, K. R., D. C. Mahan, R. F. Cross, G. A. Reinhart and R. E. Whitmoyer. 1988. Effect of age, weaning and post-weaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J. Anim. Sci.* 66:574.
- Chae, B. J., In K. Han, J. H. Kim, C. J. Yang, J. D. Hancock, I. H. Kim and D. A. Anderson. 1999. Effects of dietary protein sources on ileal digestibility and growth performance for early-weaned pigs. *Livest. Prod. Sci.* 58:45-54.
- Chang, C. J., T. D. Tanksley, D. A. Knabe and T. Zebrowska. 1987. Effects of different heat treatments during processing on nutrient digestibility of soybean meal in growing swine. *J. Anim. Sci.*, 65:1273-1282.
- Contrill, B. R., D. G. Beever, A. R. Austin and D. F. Osbourn. 1982. The effect of the protein and non-protein nitrogen supplements to maize silage in total amine acid supply in young cattle. *Br. J Nutr.* 48:527.

- Cook, D. R., T. S. Stahly and P. M. Murphy. 2000. The effect of dietary soybean iso-flavones on carcass muscle content and body growth in pigs fed from 6 to 30kg BW. In: Soy swine nutrition. National Soybean Research Laboratory. Uni. of Illinois, Urbana-Champaign, IL. pp. 3-12.
- Crenshaw, M. A. and D. M. Danielson. 1985. Raw soybeans for gestating swine. *J. Anim. Sci.* 60:163-170.
- Cromwell, G. L. 2000. Utilization of soy products in swine diets. In: Soy in animal nutrition (J. K. Drackley ed.). Federation of Anim. Sci. Soc. pp. 258-282.
- Dre'au, D., J. P. Lalle's, V. Philouze-Rome, R. Toullec and H. Salmon. 1994. Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 72:2090.
- Dunsford, B. R., D. A. Knabe and W. E. Haensly. 1989. Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 67:1855-1863.
- Ericson, J. 1988. Lupines: A potential source of protein for swing. *Feedstuffs*. Dec. 5. pp.15.
- Friesen, K. G., R. D. Goodband, J. L. Nelssen, M. D. Tokach, and L. J. Kats. 1992. The effect of dietary soybean meal level in phase I on subsequent phase II growth performance. Report of Progress. KSU. Manhattan, KS. pp.59-62.
- Foetisch K., S. Westphal, I. Lauer, M. Retzek, F. Altmann, D. Kolarich, M. Scheurer and S. Vieths. 2003. Biological activity of IgG specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J. Allergy Clin. Immunol.* April. : 889-896.
- Garlich, J. D. 1987. Urease-trypsin inhibitor relationship in commercially produced soybean meals. *Pout. Sci.* 66(supp)103A.
- Hammerstrand, G. E., L. T. Black and J. D. Glover. 1981. Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chem.* 58:42.
- Hancock, J. D., E. R. Peo, A. J. Lewis and J. D. Crenshaw. 1990a. Effects of ethanol extraction and duration of heat treatment of soybean flakes on the utilization of soybean protein by growing rats and pigs. *J. Anim. Sci.* 68:3233.
- Hancock, J. D., E. R. Peo, A. J. Lewis and R. A. Maxley. 1990b. Effects of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. *J. Anim. Sci.* 68:3244.
- Hansen, B. C., E. R. Flores, T. D. Tanksely and D. A. Knabe. 1987. Effects of different

- treatments during processing of soybean meal on nursery and growing performance. *J. Anim. Sci.* 65:1281-1291.
- Jones, D. B., J. D. Hancock, P. G. Reddy, R. D. Klemm and F. Blecha. 1990. Effect of replacing dried skim milk with specially processed soy products on digestibility of nutrients and growth performance of nursery pigs. *Swine day*. Kansas State University. Manhattan, KS, USA. pp. 37-40.
- Kiercgm, S. C., K. K. Bergerm, D. Guabika and G. C. Fahey, Jr. 1983. Effect of dietary protein source and energy level on in situ nitrogen disappearance of various protein sources. *J. Anim. Sci.* 56910:206-216.
- Kolar, C. V., S. H. Richert, C. D. decker, F. H. Steinke and R. J. Vander Zanden, 1985. Isolated soy protein. *New Protein Foods.* 5:261.
- Kueber, I. E. and M. L. Kakade. 1980. Protease Inhibitors. *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.* pp. 7-71.
- Kwon, M. S. 1992. Comparison of highly purified isolation of polymorphonuclear granular neutrophil by use of chemiluminescence. *Kor. J. of Immunol.* 14(2) : 181-185.
- Main, M. A. and J. D. Garlich. 1987. Metabolizable energy of soybeans meals with different urease and trypsin inhibitor values. *Poult. Sci.* 66(Supp):29A.
- Miller, B. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Misir, R., W. C. Sauer and R. Cichon. 1984. Chemical composition and protein quality evaluation of high lysine barleys fed to growing rats and pigs. *J. Anim. Sci.* 59:1011.
- Latunde-Dadam, Y. and R. J. Neale. 1984. Effect of soyabean protein on chicken meat iron absorption. *Proc. Nutr. Soc.* 43:131A.
- Lenehan, N. A., R. D. Goodband, M. D. Tokach, S. S. Dritz, J. L. Nelssen, M. R. Barker, N. Z. Frantz, C. N. Groesbeck, T. Iwasawa, T. P. Keegan and K. R. Lawrence. 2003. Evaluation of different soy protein concentrate sources on growth performance of weanling pigs. *Swine day*. Kansas State University. Manhattan, KS, USA. p. 81-89.
- Li, D. F., J. Jianyang, Y. Ganfeng, Q. Shiyan, Z. Chuntian, W. Johnson and In K. Han. 1998. Effects of different levels of rapeseed meal on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in growing-finishing pigs. *Biennial Research Report*. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon,

Kor. pp. 250-252.

- Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, J. D. Hancock, G. L. Alle, R. D. Goodband and R. D. Klemm. 1990. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig, *J. Anim. Sci.*, 68:1790.
- Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, R. D. Klemm, D. W. Giesting, J. D. Hancock, G. L. Allee and R. D. Goodband. 1991a. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pig with immunological criteria. *J. Anim. Sci.* 69:3299-3307.
- Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, R. Klemm and R. D. Goodband. 1991b. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 69:4062-4069.
- Li, D. F., Q. Shiyan, C. T. Zheng, G. F. Yi, X. Xuexin and In K. Han. 1998. Effects of different levels of sesame seed meal on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in growing-finishing pigs. Biennial Research Report. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon, Kor. pp. 261-263.
- Li, D. F., Q. Shiyan, W. Johnson, Z. Xinhong, Q. Qingyan and In K. Han. 1998. Effects of different levels of sunflower seed meal on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in growing-finishing pigs. Biennial Research Report. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon, Kor. pp. 255-256.
- Li, D. F., Q. Shiyan, Z. Chuntian, X. Xuexin, W. Johnson and In K. Han. 1998. Effects of different levels of cottonseed meal on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in growing-finishing pigs. Biennial Research Report. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon, Kor. pp. 253-254.
- Li, D. F., Q. Shiyan, Z. Chuntian, X. Xuexin, W. Johnson and In K. Han. 1998. Effects of different levels of linseed meal on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in growing-finishing pigs. Biennial Research Report. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon, Kor. pp. 257-258.
- Li, D. F., X. Xuexin, Q. Shiyan, J. Jianyang, C. Yong and In K. Han. 1998. Effects of different levels of peanut meal on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in growing-finishing pigs. Biennial Research Report. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon, Kor. pp. 259-260.
- Moon, H. K., J. H. Kim, W. T. Cho, I. S. Shin and In K. Han. 1998. Effect of roasted soybean meal incorporation level in the phase I high nutrient dense diet on the

- performance of early-weaned piglets. *Korean J. Anim. Nutr. Feed.* 22(3):147-156.
- Moon, H. K., J. W. Kim, K. N. Heo, Y. H. Kim, S. W. Kim, C. H. Kwon, I. S. Shin and In K. Han. 1996. Growth performance and amino acid digestibility affected by various protein sources in growing-finishing pigs. Biennial Research Report. Division of Nutritional Sciences, Seoul National University. Suwon, Kor. pp. 202-207.
- Moore, S. 1963. On the determination of cystine as cystic acid. *J. Biol. Sci.* 238:235-237.
- NRC. 1998. Nutrient Requirement of Swine (10th Ed.). National Academy Press. Washington D. C.
- O'Quinn, P. R., D. A. Knabe, E. J. Gregg and E. W. Lusas. 1997. Nutritional value for swine of soybean meal produced by iso-propyl alcohol extraction. *J. Anim. Sci.* 1997. 75:714-719.
- Parsons, M. J. 1991. Soybean protein solubility in potassium hydroxide: an in vitro test of in vivo protein quality. *J. Anim. Sci.* 69:2918-24.
- Qin, B., M. W. Bosch and A. F. Poel. 1996. Thermal processing of whole soya beans: studies on the inactivation of anti-nutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 57:313.
- SAS. 1998. User's Guide: Statistics, SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sohn, K. S. and C. V. Maxwell. 1990a. Effect of dietary protein source on nutrient digestibility in early-weaned pigs. Oklahoma State University Animal Science Research Report.
- Sohn, K. S. and C. V. Maxwell. 1990b. Effect of dietary protein source on ileal amino acid availability in early-weaned pigs. Oklahoma State University Animal Science Research Report.
- Sohn, K. S., C. V. Maxwell, D. S. Buchanan and L. L. Southern. 1994. Improved soybean protein sources for early-weaned pigs: I. Effects on performance and total tract amino acid digestibility. *J. Anim. Sci.* 72:622-630.
- Vandergrift, W. L., D. A. Knabe, T. D. Tanksley and S. A. Anderson. 1983. Digestibility of nutrients in raw and heated soyflakes for pigs. *J. Anim. Sci.* 57(5):1215-1224.
- Walker, W. R., C. V. Maxwell, F. N. Owens and D. S. Buchanan. 1986. Milk versus soybean protein sources for pigs. I. Effects on performance and digestibility. *J. Anim. Sci.*, 63:505.
- Walker, W. R., G. L. Morgan and C. V. Maxwell. 1986. Ileal cannulation in baby pigs

- with a simple T-cannula. *J. Anim. Sci.* 63:407-411.
- Woodworth, J. C., M. D. Tokach, R. D. Goodband, J. L. Nelssen, P. R. O'Quinn, D. A. Knabe and N. W. Said. 2001. Apparent ileal digestibility of amino acids and the digestible and metabolizable energy content of dry extruded-expelled soybean meal and its effects on growth performance of pigs. *J. Anim. Sci.* 79:1280-1287.
- Zijlstra, R. T., K. Y. Whang, R. A. Easter and J. Odle. 1996. Effects of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition and small intestinal morphology compared with suckled littermates. *J. Anim. Sci.* 74:2948-2959.
- 박홍석. 1999. 대두박의 품질과 경제적 가치. 제 8회 사료가공 단기과정. 한국영양사료학회. 서울. pp. 324-341.
- 사료협회. 1987. 대두박성분함량비교 및 중공산대두박의 처리별 비교. 협회단신.
- 한인규. 1994. 사료자원핸드북. 한국사료협회. pp. 123-124.
- 한인규. 1998. 식물성 단백질사료. 사료가공학. 선지문화사. pp. 67-107.

부록 I

개발제품 시험성적서

문서번호: 한단분석 제2004-1333호

사료검정(분석)결과서

검수번호	기9-66	검수년월일	2004년 09월 13일
사료명	PSG(9/8)	제조일자	
의뢰(업체)명	(주)진마이오텍		
주 소	충남 공주시 계룡면 경천리 3113-3번지		
전화번호	(041)852-4029	팩스번호	(041)852-9683
용 도	기타		

분 석 결 과

분 석 항 목	단 위	분 석 결 과	비 고
수 분	%	7.08	
조단백질	%	54.39	
조지방	%	2.71	
조섬유	%	4.90	
조회분	%	7.80	

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험결과이며 용도 이외의 상업적인 광고 및 선전등에 사용할 수 없습니다.

2004년 09월 20일

사단법인 한국단미사료협회
사료분석소장 (인)

대전광역시 대덕구 덕암동 36-13, 3층
TEL : 042) 936-0636 FAX : 042) 936-0637

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개 하여서는 아니됩니다.