

최 종  
연구보고서

기능성 물질 CPP-H의 실용화를 위한  
대량생산체계 확립에 관한 연구

Commercialization and mass production  
of CPP-H

건국대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 물질 CPP-H의 실용화를 위한 대량 생산 체계 확립에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 21 일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 한 상 기

세부연구책임자 : 김 준 선

# 요 약 문

## I. 제 목

기능성 물질 CPP-H의 실용화를 위한 대량생산체계 확립에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

21세기 미래의 축산산업은 생명공학의 첨단과학을 이용한 기능성 물질의 탐색 및 고부가가치의 신제품 개발이 요구된다. 지금까지 신물질은 거의 화학적 합성 또는 미생물을 이용하여 개발되었으나 축산분야에서의 신물질 개발은 안정성 및 효율성이 높아 경제적, 산업적 가치가 높다. 본 연구는 축산분야에서 개발된 신물질 casein phosphopeptide H (CPP-H, 칼슘을 가용화하여 흡수를 촉진시켜주는 기능성 물질)의 실용화를 위한 대량생산 체계를 확립하고자 한다.

### CPP의 특징

Casein은 우유나 모유와 같은 유즙에 존재하는 단백질로서  $\alpha, \beta, \kappa$  형이 있고, 이중에서 우유의 beta casein은 다시 A1, A2, A3, B, C 및 D 변이체가 있으며, 그 일차구조가 보고되어 있다(Eigel. et al., 1984).

Casein phosphopeptide (CPP)는 casein을 구성하는 peptide이며 casein이 소화효소에 의해 분해되었을 때 분리되는 단편으로서, 그 생리적 기능에 대해 많은 연구 보고가 있다. 영양소의 과잉 섭취가 문제가 되고 있는 현대의 식생활에서 미네랄 특히 칼슘과 철의 결핍보다는 과잉섭취가 더 큰 문제로 대두되고 있다. 이 대책으로 식품에 미네랄을 강화하는 방법은 오히려 타 미네랄의 이용성을 저해할 우려가 있으며, 따라서 칼슘이나 철분과 같은 미네랄의 섭취량을 늘리지 않고 미네랄의 흡수효율을 높이는 방법이 필요하다. 이러한 관점에서 CPP는 아주 중요한 물질로 인식되고 있다.

일반적으로 미네랄 성분이 생체 내에서 흡수 되기 위해서는 가용성 상태로 소장관내

에 존재하는 것이 필수적 조건이다. 그러나, 소장관내에서는 pH가 중성에서 알칼리성으로 바뀌기 때문에 미네랄이 침전, 불용화되는 환경이 된다. 칼슘의 경우 소장 내에서 이동할 때 pH가 상승하면 가용성의 비율이 감소하게 되는데, CPP를 함유한 casein을 섭취하였을 때는 가용성 칼슘의 비율이 유의할 정도로 높아진다. 칼슘은 소장 상부에서는 능동수송으로, 하부에서는 농도 균배에 따른 수동수송되며, 그 흡수는 비타민 D 및 유당에 의해서 촉진된다.

#### CPP와 CPP H의 구조

Beta casein의 CPP성분은 beta casein A1, A2, A3, B, C 및 D의 유전적 변이체에 관계없이 각 변이체 전부 동일한 구조를 하고 있으며, 그들 각각의 변이체를 트립신으로 처리하였을 때 생성되는 CPP의 아미노산 서열은 다음과 같다.

그림 1.

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg

\* Ser은 phosphoserine임.

그림 1에서 보는 바와 같이 CPP는 N말단의 Arg으로부터 C말단의 Arg까지 25개의 아미노산으로 구성되며, Ser-P 잔기가 3개 연속된 후 2개의 Glu잔기가 연결되는 강함음이온성 영역을 지니며 이 부위가 칼슘에 대한 활성발현영역으로 알려져 있다(Sato et al., 1986)

본 연구에서 대량생산 하고자 하는 물질인 CPP H는 세계의 소 품종 중에서도 한우에서만 유일하게 존재하는 유전자로서 그 출현 빈도는 0.01로 매우 낮은 희귀한 유전자이다(Han et al., 2000). CPP H는 기존의 CPP와는 상이한 아미노산 서열 및 구조를 가지는 것으로서 beta casein H형으로 명명하였으며, 이 beta casein H 및 CPP H의 DNA 및 amino acid sequencing를 실시하여 그 구조를 규명하였다(GenBank accession # AF104928 & # AF104929; Swiss Prot accession # P02666; PIR accession # A59068 & # B59068). 이 beta casein H로부터 정제되는 CPP H는 이황화결합에 의해 이량체(dimer)를 구성하여 기존의 CPP보다 칼슘의 가용화 능력이 월등함을 입증하였다(Han et al., 2000).

칼슘의 가용화 능력이 우수한 CPP H의 아미노산 서열은 다음과 같다.

그림 2.

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Cys-Ile-Asn-Lys

\* Ser은 phosphoserine임.

CPP-H는 N말단에서 25번째의 Arg이 Cys으로 치환되어 이량체를 형성함으로써 기존의 CPP(그림 1.)와는 상이한 구조를 나타낸다.

단백질은 칼슘, 철 등과 같은 미네랄과 각종 형태의 결합을 하는 성질이 있다. 이것은 아미노산의 종류, 서열 및 단백질의 2차, 3차 고차구조에 따라 크게 영향을 받는다고 하였다.(Naito, 1986) 따라서 이량체의 CPP-H 및 그것을 포함하는 casein은 아미노산의 종류, 서열 및 고차구조(특히 s-s bond)로 볼 때 소장관 내에서 소화효소에 대한 안정성이 높아 칼슘의 가용화 능력이 기존의 것보다 우수하여 소장관내에서 칼슘의 흡수를 증가시킬 수 있다.

이 기능성 신물질 CPP-H로 미네랄 부족으로 인한 골다공증의 치료 및 예방제, 각종 유제품 및 건강식품의 첨가제, 치석방지물의 첨가제, 모발 또는 피부용 화장품 및 사료 첨가제등 다양한 상품을 개발할 수 있다.

#### CPP H의 대량생산

지금까지의 축산은 식품단백질의 생산 위주였으나 국제화, 개방화 시대에 대비한 국제 경쟁력 제고를 위하여 생명공학의 첨단 기술을 이용하여 기능성 단백질의 생산체계를 동물공장 형태로 개발하여 미래 지향적 축산산업으로 전환하여야 한다.

한우는 유량이 적어 Holstein과 같은 유량이 많은 품종과 교배하여 천연우유 중에서 CPP H를 대량생산함으로써 화학적 합성법이나 미생물에 의한 방법에 비해 안정성이 높고 경제적인 신물질을 생산할 수 있다.

CPP H를 가진 한우와 Holstein간에 태어나는 F1이 CPP H를 대량 생산하는 동시에 육질도 좋고 질병에 대한 저항성도 높은 형질을 가지게 된다면 21세기 환경 친화적 유육 겸용 신품종의 개발을 가능하게 할 수 있을 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1) 공시우의 선정

- CPP H 유전자를 가진 한우 종모우 선발
  - 한우 종모우의 beta casein H type 확인
- 종빈우로 이용할 Holstein 개체의 선발
  - 선발된 개체의 beta-casein 유전자형 분석

#### 2) 선발된 개체들의 개체식별

- Microsatellite좌위를 분석
  - International Society for Animal Genetics (ISAG)에서 개체식별을 위해 권장한 9개의 microsatellite 좌위 분석

\* 본 연구에서 실시하는 개체식별 및 친자판정을 위한 유전자 분석의 국제표준화를 위해 2001-2002년도 ISAG(International Society for Animal Genetics)에서 시행한 cattle DNA comparison test에 참가한 결과 우수한 성적을 획득하여 소 품종의 DNA 분석에 대한 국제 표준화의 기반을 확립하였다.

- 혈액 단백질좌위 분석
- 유단백질좌위 분석

#### 3) CPP H 유전자를 보유한 한우와 Holstein을 교배

#### 4) F1의 생산 및 관리

- F1의 생산 및 F1의 가계정립
  - Microsatellite, 혈액단백질 및 유단백질 좌위의 분석에 의한 가계 정립

#### 5) CPP H함유 우유의 생산 및 우량계통의 F2 생산을 위한 F1간의 교배

#### 6) F2의 생산 및 CPP H를 생산하는 계통 구축

7) CPP H의 대량생산

- CPP H 유전자를 소유한 F1으로 부터 착유
- 착유된 우유를 acidic starch gel electrophoresis법을 이용하여 유단백질의 CPP H 확인
- CPP H의 정제 및 대량생산

8) 능력검정

- F1의 산유량, 육질 및 질병 저항성 검정

9) F1 및 F2의 능력검정 및 상품화 검증 후 농가보급의 기초자료 확보

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

우리나라 재래가축의 대표인 한우가 지니고 있는 다양한 유전자는 첨단 생명공학적인 유전자 자원은 물론 생리활성물질 개발 차원에서도 유용한 source로 활용성이 크다. 그러나 이러한 연구가 우리나라에서는 전무한 실정인바 21세기 생물학 시대에 대비한 유전자 자원의 활용방안에 대한 대책이 시급하다. 본 연구는 한우의 유전자로부터 개발된 생리활성물질 CPP-H의 실용화를 위한 대량생산체계를 확립하여 축산산업의 첨단 기술화를 도모하고자 본 연구를 수행 하였다.

CPP H 유전자는 한우에만 존재한다. 한우는 유량이 적어 유량이 많은 Holstein 품종과 교배하여 천연우유 중에서 CPP-H를 대량생산하기 위하여 F1을 생산하였다. 생산된 F1은 모두 건강하고 정상적으로 성장하여 F2를 생산함과 동시에 CPP-H가 함유된 우유를 대량생산 하는데 성공하였다.

○F1의 생산

선발된 CPP-H 유전자를 가진 2두의 한우 종모우와 89두의 Holstein 종반우를 교배하여 암소 27두, 수소 35두. 총 62두의 F1을 생산하였다. 그중 CPP H 유전자를 소유한 소는 27두로 암소가 14두 수소가 13두이다.

생산된 송아지들의 모색은 대부분 흑색이며 극히 일부에 백색 반점을 가진 모색의 형태를 나타내었으나 2두에서 한우와 같은 갈색을 나타내었다. 이는 추후 모색유전자와

관련된 연구에 매우 유용한 자원으로 활용할 예정이다.

#### ○F2의 생산 및 CPP H의 대량 생산

CPP H 유전자를 소유한 27두의 F1 개체 (♂ 13, ♀ 14두)중 선발된 2두의 종모우와 교배가 완료된 799, 800, 809, 810, 813, 815, 816, 812, 826등 9두는 임신기간을 거쳐 2003년 2월 16일에서 4월 14일에 거쳐 건강한 F2 송아지를 출산하였으며 동시에 CPP H를 함유한 우유를 생산하기 시작하였다. 출산된 9두의 송아지 중 1두의 송아지의 모색은 어미와 동일하게 갈색을 나타내었다. 출산된 9두의 송아지는 모두 건강하며 동시에 이들의 어미인 F1 9두 모두 아주 건강한 상태로 우유의 생산량도 기대치보다 많은 양을 생산하고 있다. 산유량은 799번의 경우 최대 일일 16.6kg에 도달하였으며 이들 F1의 1일 평균 유생산량은 10.1kg으로써 이는 한우의 유생산량을 하루 평균 약 1~1.5kg으로 볼 때 약 5~10배에 가까운 수치를 나타내고 있다.

이들 성적은 초산우의 성적으로써는 기대치 이상의 결과라고 생각되며 이들 F1의 비유 성적은 2산에서부터 유생산량은 더욱 증가될 것으로 기대되어 본연구의 유생산량 측면에서 성공적인 결과라고 고찰된다.

#### ○F1이 생산한 우유의 $\beta$ -casein H 확인

각각 9두의 F1 어미소에서 생산되는 우유에 본연구의 목적인 기능성 물질 CPP H가 함유되어있는지를 확인하기 위하여 전기영동방법으로  $\beta$ -casein 형을 분석한 결과, 9두의 우유 sample 모두는  $\beta$ -casein H형으로 확인되었다.

이 실험의 목적인 한우의 H유전자가 Holstein과의 교배에 의해서 생산된 F1개체에 정상적으로 유전되어 그 CPP-H유전자에 의해서 CPP-H 물질이 합성 생산되는 사실이 확인된 것이다. 이 결과로 이 유전자의 유전양식이 공우성의 대립 유전자에 의해서 지배되는 정상적인 유전자라는 사실이 재입증되었으며 이들 F1들은 CPP H가 함유되어 있는 우유를 대량 생산할 수 있다는 사실이 확인되었다.

한편 한우와 Holstein간에 생산된 개체는 물론 F1과 F1사이에서 태어난 F2 모두 임신, 출산간은 물론 출산 후 성장과정에서도 매우 건강하였고, transgenic animal이나, 복제동물에서 나타나는 부작용 및 질병의 증상은 일체 나타나지 않았고 오히려 일반적인 한우나 젖소 또는 교잡우 수준보다 더 훨씬 건강한 상태로서, 질병에 대한 저항성이 강한 것으로 추찰되어 이것 또한 본 연구 목적의 성공적인 결과라고 고찰할 수 있다.



CPP H유전자는 한우에서만 존재하는 유전자로써 한우는 유량이 적기 때문에 한우에서 이것을 대량생산하는 것은 매우 힘든 일이다. 따라서 Holstein과 같이 유량이 많은 품종과 교배를 하여 생산된 F1에게 이 유전자가 정상적으로 유전이 되어 이 유전자에 의해서 code되는 CPP H 물질이 천연우유 중에서 대량생산하게 되는 것이다. 이 방법은 미생물이나 화학적 합성방법이 아닌 동물공장 방법에 의해서 천연의 신물질을 안정성이 높게 그리고 경제적으로 생산할 수 있게 된 것이다. 이 방법은 형질전환 동물이나 또는 특수 사료를 급여하여야만 비로소 생산되는 DHA의 경우와 같은 복잡한 생산방법과는 달리 정상적인 기능성 유전자의 기능에 의해서 생산할 수 있는 안정성이 높고 경제적인 동물공장이 개발된 것이다.

본 연구에서 개발된 연구개발의 활용계획은 CPP H의 상품화 및 신품종 개발이다.

#### ○CPP H의 상품화

CPP H의 상품화를 위해서는 시제품 제조, 임상실험, marketing등에 대한 지속적인 연구의 필요성이 강조되며 CPP H의 용도로서는 식음료, 제약, 기능성 화장품, 구강 조성물 및 특수 사료 첨가제로서 그 용도는 다양하며 그 시장 또한 막대하다.

#### ○신품종 개발

21세기는 국제화, 개방화 시대로 수입 쇠고기에 대한 대책은 물론 21세기 바이오 산업 시대에 대비한 동물 genome에 관련된 연구가 요망된다. 본 연구결과 생명공학의 첨단 과학을 이용한 기능성물질을 대량생산 할 수 있는 기술이 개발되었고 동시에 한우 유전자의 우수성이 밝혀졌다.

세계 어느 품종에서도 존재하지 않는 CPP-H 유전자를 이용하여 경제적이고 안전한 동물공장(F1)을 개발하는데 성공하였다.

이 동물공장은 CPP-H를 대량 생산하면서 질병에 저항성이 높고 동시에 산육능력 및 육질이 우수하여 유육 겸용종으로 개발할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

현재 Holstein을 비롯한 개량종은 유전자 구성의 편중으로 질병과 관련된 유전자가 자연 도태되어 면역기구가 약화되었고 그에 따른 질병으로 인한 항생물질의 남용 및 잔여 항생제 문제가 세계적인 문제로 대두되고 있다.

본 연구에서 개발된 F1은 이러한 문제의 근본 해결책이 될 수 있다. 21세기 친환경적이고 안전성이 높은 건강한 축산물을 생산하는 신품종이 될 것이다.

앞으로 지속적인 지원이 있을 때 이 품종의 농가 보급이 가능할 것이며 이 품종의 농가보급이 이루어질 때 기능성 물질이 함유된 우유와 고기를 동시에 생산하는 다목적 낙농경영의 신모델을 구축할 수 있어 안정된 낙농산업의 기반을 조성할 수 있다.

## Summary

### I. Commercialization and mass production of CPP H

### II. Purpose and necessity

The animal husbandry industry of the 21st century needs research of functional substances using high technology of biotechnology and new breeds development of high value added. Up to date, new substances have been developed mostly by chemical synthesis or use of micro organism, but for the new substances development in the animal husbandry has high stability and efficiency, it has high economic and industrial value. The purpose of this research is establishing mass production system for putting the substance CPP H(casein phosphopeptide H, functional substance which helps the absorption of Ca as making Ca available) into practical use.

#### ○CPP

A casein is one kind of protein contained in bovine or human milk, and  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\kappa$  types have been reported. In particular,  $\beta$ -casein have A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, C, D and E variants whose primary structures have been already suggested. (Eigel. et al., 1984) Being a peptide contained in a casein and a fragment isolated from a casein by digestive enzymes, CPP's physiological functions have been reported. Since excessively taking of nutrients is becoming an issue in today's dietary life, lack of minerals, especially a Ca and an Fe, is getting conspicuous. Fortifying minerals into foods as a countermeasure can hinder use of other minerals, therefore the method improving efficiency of mineral absorption without raising mineral intake is needed. At this point CPP is considered as a very important substance.

In general, minerals should be kept in a soluble state to be absorbed into animals. However, as contents moves through the small intestine in animals, a pH thereof shifts from a neutral to an alkaline state. In accordance with the change of pH in the small intestine, a large portion of minerals becomes insoluble to cause a precipitation. Concerning a Ca absorption, as a Ca moves through the small intestine, a portion of soluble Ca decreases in inverse proportion to an increase of pH therein. A Ca is actively transported in the upper small intestinal track and passively transported in the lower track, and the Ca absorption can be accelerated by vitamin D and lactose.

○Structures of CPP and CPP H

Irrespective of A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, C and D variants of  $\beta$  casein, their structure and amino acid sequence of CPP produced therefrom remain same, the sequence of which is shown as follows.

fig.1

Asn-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg

\* wherein Ser(P) represents a phosphorylated serine.

As illustrated above, a conventional CPP has 25 amino acids; and three successive phosphoserines and two glutamic acid residues coming thereafter form a strong negative charge area, thereby providing an active site with respect to a Ca.

CPP H this research tries to mass-produce only exists in Korean bull among the world's bulls and its appearance frequency is very low as 0.01. So, it is very rare gene. As CPP H has different amino acid sequence and structure from existing CPP, it is named beta casein H. Conducting DNA and amino acid sequencing of beta casein H and CPP H, the structure is closely examined. (GenBank accession # AF104928 & # AF104929; Swiss Prot accession # P02666; PIR accession # A59068 & # B59068) This CPP H refined from beta casein H

forming dimer by disulfide bond, it is proved to have better Ca soluble ability than existing CPP. The sequence, which has the excellent Ca soluble ability, is shown as follows.

fig.2

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Lue-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Cys-Ile-Asn-Lys

\* wherein Ser(P) represents a phosphorylated serine.

Since the 25th Arg from N-terminal in the conventional CPP is substituted by Cys, forming dimer, CPP H shows different sequence from the existing CPP. Proteins and minerals like Ca and Fe generally tend to be bound to each other and strength of such couplings are largely dependent upon their higher structures i.e., secondary or tertiary structure. Due to differences of the amino acid sequence and primary structure, the inventive CPP and the beta casein H containing same show an improved ability to solubilize minerals including calcium in the small intestine; and, therefore, it naturally entails an enhancement of mineral absorption in animals. These new functional substances can be developed as osteoporosis cure, preventive medicines, all kinds of dairy product, health foods additives, tarter prevention additives, beauty products and feeds additives.

#### ○Mass production of CPP H

Various genes of Korean bull, in the dimension of developing physiological activity matters which are high biotechnological resources, have great utility value as a useful source. However, these kinds of researches are wholly lacking in the field of Korean animal husbandry industry; preparing for 21st century's biological era the countermeasure about utilizing scheme of genetic resources is urgent. This research is contriving high technological improvements of animal husbandry utilizing the genes of Korean bull by mass-producing physiological activity matter, CPP developed from the genes of Korean bull.

Korean bull has low milk production, so cross-breeding with breeds producing more milk such as Holstein CPP H can be mass-produced from natural milk. We can produce more stable and economical new substances than chemical synthesis or microorganism. IF F1 cross-bred between Korean bull having CPP and Holstein mass-produces CPP H ,and has traits like better quality of meat or good resistance to disease, the 21st century's development of new environment related breed both for milk and meat will be possible.

### III. Subject matter and extent

#### 1)Animals on trial

- Selecting the elite bull having CPP H gene
- verifying beta casein H type of Korean elite bull
- Selecting the elite cow among Holstein individuals
- analyzing beta-casein genotype of selected individuals

#### 2)Individual identification

- Microsatellite
- Analyzing 9 microsatellite loci which ISAG(International Society for Animal Genetics)
- blood and protein typing
- milk protein typing

#### 3)Cross-breeding Holstein and Korean bull (CPP H)

#### 4)F1 production and management

- F1 production and beta-casein type analysis
- Setting F1 family

-family set by analyzing the 9 loci of Microsatelite, blood protein and milk protein

5)CPP H containing milk produce and cross-breeding among F1 to produce excellence lineage's F2

6)F2 produce and CPP H producing lineage construction

7)Mass production of CPP H

○Milking from F1 which has CPP H gene

○Detection of CPP H type by using acidic starch gel electrophoresis

8)Performance test

○F1's milk production, meat quality and resistance to disease examination

#### IV. Usage of result

Various genes of Korean bull, in the dimension of developing physiological activity matters which are high biotechnological resources, have great utility value as a useful source. However, these kinds of researches are wholly lacking in the field of Korean animal husbandry industry; preparing for 21st century's biological era the countermeasure about utilizing scheme of genetic resources is urgent. This research is contriving high technological improvements of animal husbandry utilizing the genes of Korean bull by mass-producing physiological activity matter, CPP developed from the genes of Korean bull.

CPP H gene researches only can be in Korean bull. However, since Korean bull has low milk production, to mass-produce CPP H from natural milk we produced F1 and F2 by cross-breeding with Holstein which has high milk production.

#### ○Production of F1

By cross-breeding 2 heads of Korean elite bull and 89 heads of Holstein elite cow, total 62 heads of F1 (27 cows, 35 bulls) are produced. Among them 27 heads had CPP H gene(27 cows, 14 bulls)

Produced calves were mostly black, but very some of them had white spots and 2 heads were brown just like Korean bull. This will be used as a important resource about the research relating to hair color genes later on.

#### ○Production of F2 and mass-production of CPP

Among 27 F1 individuals possessing CPP H, 9 heads(799, 800, 809, 810, 813, 815, 816, 812, 826) finished cross-breeding delivered F2 calves from 16th Feb 2003 to 14th Apr 2003 and started to produced milk containing CPP H. Among 9 delivered calves, 1 head had brown hair like it's mother. Those delivered 9 calves are all healthy ,and their mother 9 F1's are also healthy and produce more milk than expected. In case of 799, the milk production reached to maximum 16.6kg per day, 1 day average production is about 10.1kg whereas Korean bull produces 1~1.5kg per day.

These results are regarded more than expectation as the first delivering cow and also the milk production from secondary delivery is expected to be increased, so this research is successful in the respect of the quantity of milk production.

#### ○Detection of $\beta$ -casein H from the milk produced by F1

As the result of analysis of  $\beta$ -casein by electrophoresis, to verify if the functional substance, CPP H is contained in the milk produced by each 9 heads of F1 mother cows, all 9 samples of milk was confirmed as  $\beta$ -casein H. It is confirmed that Korean bull's gene is orderly transmitted to F1 born by cross-breeding with Holstein and CPP H substance is synthesized by that CPP H gene, which was the purpose of this research.

On the other hand, individuals born between Korean bull and Holstein, and F2's



born between F1 and F1 were healthy during pregnancy period, delivery, and growing after delivery. They didn't have any symptoms of diseases which appears in transgenic animal or animal clone and were even healthier than Korean bull, cow, and mixed cow. Also it is conjectured that they have strong resistance to diseases, and this is another successful result of this research purpose.

As CPP H is the gene which only exists in Korean bull, since Korean Bull has low milk production, it is very difficult to mass-produce CPP H. Therefore, when this gene is normally transmitted to F1 produced by cross-breeding with the breed which has large milk production like Holstein, CPP H substance coded by that gene can be mass-produced in the natural milk. By this animal factor method, not likely microbic or chemical synthesis, new natural substances can be produced stably and economically.

This method is different from complex production method like DHA produced only by trans-formatted animals or special feed supply but it is the invention of stable and economic animal factory we can produce substance by the code of the normal functional gene.

The utilizing plan of the R&D developed in this research is commercialization of CPP H and development of new substances.

#### ○Commercialization of CPP H

For commercialization of CPP H, production of current price products, clinical experiment and more studies about marketing are strongly needed. As the use of CPP H, production of food, beverage, medicine and functional cosmetic can be possibly produced, and also like the oral compositions such as gargle and special feed additive the use of CPP H is various and the market is wide.

#### ○Improvement of new breed

As 21st century is a globalized and open era, not only the countermeasure about

imported beef but also the researches concerned with animal genome are demanded in the bio industrial period.

As the result of the research, biotechnology, which can mass-produce functional substances using high technology of life engineering, is developed and at the same time excellencies of Korean bull's gene is proved.

By using CPP H gene which doesn't exist in any other breeds of the world, economic and stable animal factory is successfully developed.

This animal factory shows the possibility that we can develop milk and meat producing breed with high resistance to the disease and mass production of milk and meat.

Now, the immune system of improved breeds such as Holstein became weak because of genes related to diseases laying disproportion of gene composition. For the derived disease, the abuse of antibiotic and residual antibiotic is worldwidedly conspicuous. F1 developed in this research can be the fundamental solution. This will be the new breed producing 21st century environment relating and stable healthy stock farm products.

In the future, with continuous support, farm spread of this breed will be possible and when it comes true, for the multipurpose dairy management producing functional milk and meat at once, we can formate the foundation of stable dairy industry.

# CONTENTS

I. Summary .....	2
II. Introduction .....	20
Mass production of CPP H .....	20
Improvement of new breed .....	20
CPP H .....	21
III. Current status of domestic and overseas development .....	23
F1 with CPP H gene .....	23
IV. Process and result .....	29
Materials and methods .....	29
Contents and result .....	31
V. Goal achievement ratio and contribution to the related area .....	105
Goal and evaluation criteria .....	107
VI. Usage of result .....	109
Mass production of CPP H from F1 .....	109
Commercialization of CPP H .....	110
Improvement of new breed .....	110
VII. Overseas technology .....	112
VIII. Reference .....	114

# 목 차

제1장 연구개발 과제의 개요 .....	20
제1절 CPP-H의 대량 생산 .....	20
제2절 신제품 개발 .....	20
제3절 기능성 물질 CPP-H .....	21
제2장 국내외 기술 개발 현황 .....	23
제1절 기능성 유전자를 가진 F1 개발 .....	23
제3장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	29
제1절 연구수행 방법 .....	29
제2절 연구수행 내용 및 결과 .....	31
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	105
제1절 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점 .....	105
1. 연구개발 목표 .....	105
2. 연구평가의 착안점 .....	106
제2절 연구개발 목표 달성도 .....	107
제5장 연구개발 결과의 활용계획 .....	109
1. 동물공장을 통한 CPP-H의 대량 생산 .....	109
2. CPP-H의 상용화 .....	110
3. 신제품 개발 .....	110
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	112
제7장 참고문헌 .....	114

## 1 장 연구개발과제의 개요

- 21세기 미래의 축산산업은 생명공학의 첨단과학을 이용한 기능성물질의 탐색 및 고부가가치의 신제품 개발이 요구된다.
- 지금까지 신물질은 거의 화학적 합성 또는 미생물을 이용하여 개발되었으나 축산분야에서의 신물질 개발은 안정성 및 효율성이 높아 경제적, 산업적 가치가 높다.
- 본 연구는 축산분야에서 개발된 신물질 casein phosphopeptide H(CPP-H, 칼슘을 가용화하여 흡수를 촉진시켜주는 기능성 물질)의 실용화를 위한 대량생산 체계를 확립하고자 한다.

### 제 1절 CPP-H의 대량 생산

- 지금까지의 축산은 식품단백질의 생산 위주였으나 국제화, 개방화 시대에 대비한 국제경쟁력 제고를 위하여 생명공학의 첨단 기술을 이용하여 기능성 단백질의 생산체계도 부가되어 미래 지향적 축산산업으로 전환하여야 한다.
- 또한 산업적으로 유용한 특정 단백질을 생산할 수 있는 재래 가축의 유전자들을 효율적으로 이용할 수 있도록 재래가축 유전자의 보존 및 활용에 대한 대책이 시급하다.
- 본 연구는 DNA의 marker를 이용한 분자유종들의 새로운 기술을 이용하는 것이다. 즉 특정 gene(CPP-H)을 이용하여 기능성의 물질을 대량생산하는 방법으로서 품종이 가지고 있는 특이한 유전자의 변이체를 이용하여 기능성 물질을 탐색한 후 유량이 많은 Holstein 품종과 교배하여 특정한 물질을 대량생산한다. 즉, 한우의 CPP-H gene을 Holstein에 도입(gene introgression) 함으로서 기능성 물질을 대량생산한다.

### 제 2절 신제품 개발

- 동물산업분야에서 유전자를 변형한 형질전환 동물을 이용하여 신물질을 개발하고 있으나 이 방법은 안정성, 부작용등의 검증기간이 길어 실용화 단계에서의 문제점이

제기되고 있다. 본 연구는 품종간 교배에 의한 것으로서 안정성이 높은 천연의 기능성 물질을 저렴한 가격에 생산할 수 있는 것으로 대량생산 체계가 완료되면 즉시 실용화가 가능하다.

- Holstein과 같은 개량종은 유전자 구성의 편중으로 면역기구가 약화되어 질병으로 인한 항생물질의 남용과 오염 문제가 심각하다. 항생제의 과다사용으로 인한 안정성 문제의 근본적 해결방안은 우리나라의 기후풍토에 가장 잘 적응되어 질병에 대한 저항력이 강한 재래가축(한우)의 다양한 유용유전자를 이용하여 항병성 및 환경적응력이 강한 그리고 고품질의 안전한 축산물을 생산 할 수 있는 환경 친화적 신품종의 개발을 가능하게 할 수 있다.
- 국제화, 개방화시대에서 한우 산업의 육성 및 수입 소고기에 대한 대책 방안으로 한우의 우수한 유전자를 이용한 육종기술개발 및 실용화 사업으로 본 연구에서 부산물로 생산된 F1의 솟소를 이용한 비육우의 개발을 기대할 수 있다.
- 지금까지의 한우 개량사업은 순수육종에 의한 개량으로 개량속도가 느린 것이 특징이다. 그러나 시대의 요구에 따라서 순수육종과 병행하여 한우의 혈통을 보존하면서 한우의 우수한 유전자를 활용하는 측면에서의 Holstein종과 한우와의 F1이 CPP-H를 대량생산 할 수 있게 된다면 기능성 물질을 생산하면서 산육능력 및 항병성이 강한 고능력 유육겸용 품종의 개발을 기대할 수 있다.

### 제 3절 기능성 물질 CPP-H

- 우유나 유제품을 섭취했을 때 생성되는 CPP는 인산칼슘의 과포화 상태에서 인산칼슘의 침전을 방지하여 소장 장관내 가용화 칼슘의 농도를 증가시켜 칼슘의 흡수를 촉진시켜주는 물질이다.
- CPP는 N말단의 Arg으로부터 C말단의 Arg까지 25개의 아미노산으로 구성되며, Ser-P잔기가 3개 연속된 후 2개의 Glu잔기가 연결되는 강한 음이온성 영역을 지니며 이 부위가 칼슘에 대한 활성발현영역으로 알려져 있다(Sato et al., 1986; Li et al., 1989; Meisel & Frister, 1989).
- 본 연구에서 산업적 실용화를 위하여 대량생산 하고자 하는 기능성 물질은 우리나라 한우의 유즙에서 발견한 새로운 CPP-H로서 이 구조는 N 말단에서 25번째의

Arg이 Cys으로 치환되어 이황화 결합에 의해서 이량체를 형성함으로써 기존의 CPP보다 소화효소에 대한 안정성이 높고 활성발현영역이 커서 칼슘의 가용화 능력이 우수하여 소장관 내에서 칼슘의 흡수를 CPP 보다 월등히 증가시킬 수 있다.

- 이 기능성 신물질 CPP-H는 한국(특0140248) 및 미국(5834424), 유럽, 일본 등 세계 각국에서 물질특허를 획득하였으며 그 용도는 미네랄 부족으로 인한 골다공증의 치료 및 예방제, 각종 유제품 및 건강식품의 첨가제, 치석방지물의 첨가제, 모발 또는 피부용 화장품 및 사료첨가제등 다양한 상품을 개발할 수 있다.
- 신물질의 개발 및 대량생산을 지금까지는 주로 화학적 합성방법 및 미생물을 이용하고 있으나 축산분야에서는 최근 transgenic animal법에 의해 몇종류의 기능성물질의 개발을 시도하고 있지만 transgenic animal 방법은 종이 서로 다른 유전자를 사용하므로 특히 시간과 비용이 많이 들며 독성, 안정성 및 부작용등 실용화 단계까지는 여러 가지 문제점이 있다.
- 따라서 CPP H의 실용화를 위하여 안정성이 우수하고 부작용이 없으며 시간과 비용면에서 경제적인 방법, 즉 CPP H 유전자를 가진 한우와 유량이 많은 Holstein 종과의 품종간 교배를 통하여 F1의 천연우유에서 CPP H를 대량 생산하는 기술 체계를 개발하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 기능성 유전자를 가진 F1 개발

한우가 지니고 있는 다양한 유전자는 첨단 생명공학적 자원인 생리활성물질 개발 차원에서 유용한 source로 활용성이 크다. 그러나 이러한 연구가 우리나라 축산분야에서는 전무한 실정이어서 21세기 생물학 시대에 대비한 유전자 자원의 활용방안에 대한 대책이 시급하다. 본 연구는 한우의 유전자로부터 개발된 생리활성물질 CPP H를 대량 생산함으로써 한우의 유전자를 활용하는 방안을 모색하여 축산산업의 첨단기술화를 도모한다.

CPP H 유전자를 가진 한우는 유량이 적어 Holstein과 같은 유량이 많은 품종과 교배하여 천연우유 중에서 CPP H를 대량생산함으로써 안정성이 높고 정제가 간단하여 고순도의 신물질을 경제적으로 생산할 수 있다.

#### 1. CPP

casein은 우유나 모유와 같은 유즙에 존재하는 단백질로서  $\alpha, \beta, \kappa$  형이 있고, 이 중에서 우유의 beta casein은 다시 A1, A2, A3, B, C 및 D 변이체가 있으며, 그 일차구조가 보고되어 있다(Eigel. et al., 1984).

Casein phosphopeptide (CPP)는 casein을 구성하는 peptide이며 casein이 소화효소에 의해 분해되었을 때 분리되는 단편으로서, 그 생리적 기능에 대해 많은 연구 보고가 있다. 영양소의 과잉 섭취가 문제가 되고 있는 현대의 식생활에서 미네랄 특히 칼슘과 철의 결핍이 더 큰 문제로 대두되고 있다. 이 대책으로 식품에 미네랄을 강화하는 방법은 오히려 타 미네랄의 이용성을 저해할 우려가 있으며, 따라서 미네랄의 섭취량을 늘리지 않고 미네랄의 흡수효율을 높이는 방법이 필요하다. 이러한 관점에서 CPP는 아주 중요한 물질로 인식되고 있다.

일반적으로 미네랄 성분이 생체 내에서 흡수 되기 위해서는 가용성 상태로 소장관내에 존재하는 것이 필수적 조건이다. 그러나, 소장관내에서는 pH가 중성에서 알칼리성으로 바뀌기 때문에 미네랄이 침전, 불용화되는 환경이 된다. 칼슘의 경우 소장 내에서



이동할 때 pH가 상승하면 가용성의 비율이 감소하게 되는데, CPP를 함유한 casein을 섭취하였을 때는 가용성 칼슘의 비율이 유의할 정도로 높아진다. 칼슘은 소장 상부에서는 능동수송으로, 하부에서는 농도 균배에 따른 수동수송되며, 그 흡수는 비타민 D 및 유당에 의해서 촉진된다. 소장의 각 부위에서의 흡수율은 소장 상부의 십이지장에서 가장 높지만 체류시간이 짧기 때문에 흡수량이 많지는 않으며, 흡수 총량이 가장 많은 부위는 소장 하부의 회장으로 rat의 경우 전체 흡수량의 62 내지 88%에 달하고 사람의 경우 회장을 절제하면 칼슘의 흡수량이 현저하게 감소되므로, 회장이 칼슘의 흡수에 중요한 부위임을 알 수 있다. 칼슘의 가용화에 기여하는 성분으로서 인산기를 포함하고 있는 CPP가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Sato et al., 1986).

인산기의 작용에 관한 비교실험으로서 casein, 인산기를 제거한 casein, 글루텐, 젤라틴을 각각 랫트에 급여한 후 소장관내에서의 가용성 칼슘의 양 및 흡수율을 측정 한 결과, 인산기를 제거하지 않은 casein을 급여한 랫트군에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, 이 결과 CPP의 인산기가 칼슘의 가용화에 중요한 역할을 한다는 사실을 입증하였다. 또한, 우유 casein을 트립신으로 분해하면 CPP가 분리되며 이것이 칼슘 또는 다른 미네랄의 침전을 방지한다고 보고하였다(Sato et al., 1986).

## 2. CPP와 CPP H의 구조

Beta casein의 CPP성분은 beta casein A1, A2, A3, B, C 및 D의 유전적 변이체에 관계없이 각 변이체 전부 동일한 구조를 하고 있으며, 그들 각각의 변이체를 트립신으로 처리하였을 때 생성되는 CPP의 아미노산 서열은 다음과 같다.

그림 1.

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg

\* Ser은 phosphoserine임.

그림 1에서 보는 바와 같이 CPP는 N말단의 Arg으로부터 C말단의 Arg까지 25개의 아미노산으로 구성되며, Ser-P 잔기가 3개 연속된 후 2개의 Glu잔기가 연결되는 강한 음이온성 영역을 지니며 이 부위가 칼슘에 대한 활성발현영역으로 알려져 있다(Sato et al., 1986)

본 연구에서 대량생산 하고자 하는 물질인 CPP H는 세계의 소 품종 중에서도 한우에 서만 유일하게 존재하는 유전자로서 그 출현 빈도는 0.01로 매우 낮은 희귀한 유전자이다(Abe et al., 1968; Han et al., 2000). CPP H는 기존의 CPP와는 상이한 아미노산 서열 및 구조를 가지는 것으로서 beta casein H형으로 명명하였으며, 이 beta casein H 및 CPP H의 DNA 및 amino acid sequencing를 실시하여 그 구조를 규명하였다(GenBank accession # AF104928 & # AF104929; Swiss Prot accession # P02666; PIR accession # A59068 & # B59068). 이 beta casein H로부터 정제되는 CPP H는 이황화 결합에 의해 이량체(dimer)를 구성하여 기존의 CPP보다 칼슘의 가용화 능력이 월등함을 입증하였다(Han et al., 2000).

칼슘의 가용화 능력이 우수한 CPP H의 아미노산 서열은 다음과 같다.

그림 2.

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Cys-Ile-Asn-Lys

\* Ser은 phosphoserine임.

CPP H는 N말단에서 25번째의 Arg이 Cys으로 치환되어 이량체를 형성함으로써 기존의 CPP(그림 1.)와는 상이한 구조를 나타낸다.

단백질은 칼슘, 철 등과 같은 미네랄과 각종 형태의 결합을 하는 성질이 있다. 이것은 아미노산의 종류, 서열 및 단백질의 2차, 3차 고차구조에 따라 크게 영향을 받는다고 하였다.(Naito, 1986) 따라서 이량체의 CPP H 및 그것을 포함하는 casein은 아미노산의 종류, 서열 및 고차구조로 볼 때 소장관 내에서 소화효소에 대한 안정성이 높아 칼슘의 가용화 능력이 기존의 것보다 우수하여 소장관내에서 칼슘의 흡수를 증가시킬 수 있다.

### 3. CPP H의 생체내 가용화 실험

CPP H와 기존의 CPP와의 칼슘흡수율을 비교하기 위하여 rat를 이용한 실험을 실시하였다. 그 결과 CPP H를 포함하는 casein을 급식한 제 1군 랫트의 소장관내 가용화 칼슘량은 58.48ppm(평균)로서, 기존의 casein을 급식한 제 2 군 랫트의 소장관내 칼슘의 양 50.60ppm(평균)에 비하여 약 15% 가량 증가되었으며 또한 CPP H를 급식한 제 3 군 랫트의 소장관내 가용화 칼슘량은 68.2ppm(평균)로서, 기존의 CPP를 급식한 제 4

군의 랫트의 소장관내 칼슘의 양 55.38ppm(평균)에 비하여 23%가량 증가되어 casein을 급식한 군보다 높은 가용화 능력을 나타내었다. 특히 가용화 칼슘의 80%정도가 흡수되는 소장하부에서의 가용화 칼슘은 제 1 군이 42.23ppm 이고 제 2 군이 35.11ppm으로 약 20%정도 증가 되었으며, 신규 CPP H를 급식한 제 3군이 51.01ppm이고 제 4 군이 39.33ppm으로 신규 CPP H를 섭취한 군에서 약 30% 가량 증가되었음을 알 수 있다 (Han et al., 2000; 한국특허 특0140248, 1998; 미국특허 5834424, 1998).

이상과 같은 결과, CPP H 및 그것을 포함하는 casein은 25번째의 아미노산 Arg이 Cys으로 치환되어 이량체를 형성하므로 기존의 것에 비해 아미노산의 종류, 서열 및 고차구조가 상이하어 소장관내에서의 칼슘 가용화 능력이 향상되었음을 의미하는 것이므로, 칼슘의 흡수 증가와 관련하여 CPP H 및 그것을 포함하는 casein은 여러 용도로 사용될 수 있다.

#### 4. CPP 및 CPP H의 정제방법

우유에서 casein을 제조하는 방법은 널리 공지 되어 있다. 우유의 지방을 제거한 후 , 염산을 첨가함으로써 용액의 pH를 4.6으로 조절하여 casein을 침전시키고, 침전된 casein을 원심분리한 후 탈수, 동결건조하는 방법이 보고되었다(Gordon et al., 1974). 또한 염산 대신에 스트렙토코커스 락티스가 생산하는 락트산을 첨가하여 침전시키는 방법(Spellacy, 1953), 렌넷(rennet)을 첨가하여 침전시키는 방법(Fox, 1970)등이 보고되어 있다.

이와 같이 얻어진 beta casein H 형을 함유하는 casein에 단백질 분해효소를 첨가하여 가수분해하고, 얻어진 가수 분해물을 크로마토그래피하여 본 발명의 신규 peptide(CPP H)를 제조 할 수 있다. 가수분해 효소로는 공지된 단백질 분해효소, 예컨대 트립신, 판크레아틴, 키모트립신 또는 펩신을 사용할 수 있다. 상기 크로마토그래피 방법으로는 HPLC 또는 젤 여과 크로마토그래피를 사용할 수 있다.

상기 방법에서 크로마토그래피하는 대신에 얻어진 가수분해물에 무기이온을 가하여 peptide를 침전시키고, 침전된 peptide를 회수하는 방법으로 신규 peptide(CPP H)를 제조할 수 있다.

즉, 무기이온으로서 Fe를 최종농도는 20mM이 되도록 첨가하고, 에탄올을 최종농도 50% 되도록 첨가하여 peptide를 침전시켜 침전된 peptide를 동결건조하여, CPP H를 생성할 수 있다. 이때의 젤 여과 크로마토그래피에 의해 확인된 순도는 각종 무기이온

에 의한 생성물에서 90%이었고, 생성량은 1.2g이었다. 또한, 상기 무기이온 Fe 대신에 Ca, Ba, Cu, Zn, Mn, 및 Co 이온을 사용하였을 때도 유사한 결과가 얻어졌다. 상기 침전 반응에서 무기이온과 동시에 에탄올을 첨가하였으나, 에탄올을 첨가하지 않고 FeCl<sub>3</sub>만을 첨가 (최종농도 20mM)한 경우에도 신규 peptide(CPP H)가 정제되었다. 이상과 같은 제조방법은 한국 및 미국 특허(한국특허 특0140248, 1998; 미국특허 5834424, 1998)에 의해 제조권리를 획득하였으므로 상기 방법에 따라 상업용의 CPP H를 정제할 수 있다.

#### 5. CPP H의 대량생산 방법

CPP H 또는 이를 포함하는 casein을 대량 생산하기 위해서는 beta casein H유전자를 가진 소의 유즙을 대량 생산하게 하는 것이 필요하다. 이를 달성하기 위해서, beta casein H형 유전자를 가진소 (한우 수소)를 선별하고, 이 소와 비유량이 많은 소 (Holstein 암소)를 교배하여 자손 1대를 얻은 후, beta casein H형의 유전자를 가진 암소를 선별하고, 선별된 암소로부터 우유를 채취하고, 상기 우유로부터 앞에서의 방법에 의하여 beta casein H형을 정제할 수 있다.

최근 우유단백질의 유전자형을 빠르게 구별하기 위한 PCR-RFLP 기술의 발달은 어떠한 상태에서라도 동물의 양쪽성에서 모두 유전자형을 결정할 수 있게 하였다. Pinder 등은 PCR을 이용하여 소의 casein 유전자들의 다형현상을 분석하였고 beta casein B와 kapa casein B 사이에 연관관계가 있다고 제안하였다. Lien 등은 created restriction site의 증폭에 의해 다중 beta casein 대립유전자 (A1, A2, A3, B)의 검출방법을 보고하였다. Lien과 Rogne(1993)는 casein haplotype들의 수와 빈도를 보고하였으며 PCR-RFLP를 이용한 새로운 beta casein 대립유전자의 유전자형의 확인을 위해 단순하며 빠른 방법을 개발하였다.

본 연구에서도 새로운 beta casein H유전자의 검출을 위하여 primer를 개발하였으며 그 sequence는 다음과 같다((Han et al., 2000; 한국특허 특0140248, 1998; 미국특허 5834424, 1998).

Sense strand : 5' -CAACAGCCTTATTCAGAAGAGTGG-3'

Antisense strand : 3' -CAGTGGGATGACAGAAAGTAGTCGTATAGG-5'

이 primer에 의해 생산된 PCR product을 Nsi I 효소에 의해 가수분해하였다. 그 결과 beta casein H 유전자를 함유한 DNA 단편은 182와 458bp의 절편으로 분리되었다. 이 가수분해된 절편들은 2% agarose gel을 지지체로하는 전기영동에 의해 검출되었다. 또한 이 CPP H 유전자의 유전양식은 공우성 대립유전자임이 확인되었다(Han et al., 2000).

이와 같이 CPP H의 대량생산을 위하여 CPP H 유전자의 typing를 위한 primer, 전기영동법에 의한 단백질형 typing 및 CPP H 유전자의 유전양식, CPP H의 구조 및 기능, 정제법 등 모든 기초적 기술이 국제적 수준으로 개발 완료된 상태이다.

따라서, 기능성물질의 대량생산 체계만 확립된다면 즉시 실용화가 가능한 단계까지 모든 기술의 개발 및 유전자를 확보한 상태임

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구수행 방법

#### 1. 공시우의 선정

##### 가. CPP H 유전자를 가진 한우 종모우 선발

1) 한우연구목장에서 12년간 교배를 거쳐 확보한 CPP H 유전자를 가진 80여두의 순수 한우 집단중 종모우 개체 20두 선발

2) 한우 종모우의 beta casein H type 확인 (PCR-RFLP 법)

: PCR-RFLP법 이용 : beta casein H에 특이적인 primer (beta-CN 2 primer)를 개발 하였으며 이 primer로 DNA를 PCR 방법에 의해 증폭한 후 Nis I 제한효소로 절단. 2% agarose gel electrophoresis하여 beta casein H형을 확인.

· beta casein H형은 458bp와 182bp로 구성된 두 개의 band로 발현.

##### 나. 종빈우로 이용할 Holstein 개체의 선발

1) 건국대학교 축산대학 실습농장에서 산유량 및 개체기록이 확실한 종빈우 100두를 선발

※ 구제역 파동으로 계획한 10개 일반 목장에서 함께 실시할 예정이 변경되어 건국대학교 파주 실습농장에서만 교배를 실시하였다.

2) 선발된 개체의 beta-casein 유전자형 분석

: 각 개체의 유즙으로부터 acidic starch gel electrophoresis법을 이용하여 beta-casein 유단백질형 분석

#### 2. 선발된 개체들의 개체식별

##### 가. Microsatellite좌위를 분석

1) International Society for Animal Genetics (ISAG)에서 개체식별을 위해 권장한 9개의 microsatellite 좌위 분석(ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126, TGLA227, BM1824, BM2113, SPS115)

나. 혈액 단백질좌위 분석

- 1) Starch gel 및 acrylamide gel electrophoresis법을 이용하여 분석
- 2) Hemoglobin(HB), Albumin(ALB), Transferrin(TF), Post-transferrin-2(PTF-2), Post-albumin(PA) 및 Amylase(AMY) 좌위 분석

다. 유단백질좌위 분석

- 1) acidic 및 alkaline starch gel electrophoresis법을 이용하여 분석
- 2) alpha S1 casein, beta casein, kappa casein, beta lactoglobulin 및 alpha lactoglobulin좌위 분석

3. 한우 × Holstein 교배

가. CPP H 유전자를 보유한 한우와 Holstein을 교배

나. 각 개체의 분석된 유전자형을 기초로 근친교배를 방지하여 유전적 다형현상의 다양성이 유지되도록 교배조합 작성

다. 인공수정 및 자연교배에 의하여 교배 실시

4. F1의 생산 및 관리

가. F1의 생산 및 beta casein형 분석

나. 생산된 F1중 beta casein을 PCR-RFLP법을 이용하여 분석.

다. F1의 분류

	CPP H	non CPP H
Female	25%	25%
Male	25%	25%

라. F1의 가계정립

- 1) Microsatellite, 혈액단백질 및 유단백질 좌위의 분석에 의한 가계 정립
- 2) F1의 성장기간 동안 가계별 사료효율, 증체량 및 질병저항성에 대한 능력검정 실시

5. CPP H함유 우유의 생산 및 우량계통의 F2 생산을 위한 F1간의 교배

가. CPP H를 소유한 F1 암소 및 수소를 선발하여 교배

나. 교배계획 설정

- 1) 유전적 다형현상의 다양성 유지 및 근친의 방지를 위한 F1간의 가계간 계획 교배
- 2) 능력검정에 의해 선발된 우수한 개체간의 교배

다. F2의 생산 및 CPP H를 생산하는 상품화 계통 구축

- 1) 생산된 F2의 beta casein 유전자형 분석 (PCR-RFLP법을 이용하여 분석)
- 2) F2의 가계확립 (Microsatellite, AFLP, 혈액단백질 및 유즙단백질 분석)

## 6. CPP H의 대량생산

가. CPP H 유전자를 소유한 F1으로 부터 착유

나. 착유된 우유를 acidic starch gel electrophoresis법을 이용하여 유단백질의 CPP H 확인

다. CPP H의 정제 및 대량생산

- 1) 산 침전법에 의해 우유로부터 beta casein을 정제한 후 인산완충액에 용해한 후 트립신을 첨가하여 가수분해한다(온도: 35-60°C, pH 7-9, 5-24hrs).
- 2) 가수분해물의 pH를 4.6으로 조절하여 침전된 미반응 casein을 제거한다.
- 3) 이 용액에 무기이온으로서 Fe를 최종농도가 20mM이 되도록 첨가하고 에탄올을 최종농도 50%가 되도록 첨가하여 peptide를 침전시킨다.
- 4) 침전된 peptide를 동결건조하여 CPP H를 생산한다.

## 7. 능력검정

가. F1 암소의 산유량 및 수소의 육질판정

나. F1 및 F2의 능력검정 및 상품화 검증 후 농가보급의 기초 자료 수집

## 2절 연구수행 내용 및 결과

한우가 지니고 있는 다양한 유전자는 첨단 생명공학적 자원인 생리활성물질 개발 차원에서 유용한 source로 활용성이 크다. 그러나 이러한 연구가 우리나라 축산분야에서



는 전무한 실정이어서 21세기 생물학 시대에 대비한 유전자 자원의 활용방안에 대한 대책이 시급하다.

· 21세기 미래의 축산산업은 생명공학의 첨단과학을 이용한 기능성 물질의 탐색 및 고부가가치의 신제품 개발이 요구된다. 지금까지 신물질은 거의 화학적 합성 또는 미생물을 이용하여 개발되었으나 축산분야에서의 신물질 개발은 안정성 및 효율성이 높아 경제적, 산업적 가치가 높다. 본 연구에서는 축산분야에서 개발된 신물질 casein phosphopeptide H의 실용화를 위한 대량생산 체계를 확립하였다.

### 1. 연구수행 결과

#### 가. CPP H 유전자를 소유한 한우 수소 선발

1) PCR-RFLP법을 이용하여 Holstein과 교배에 이용할 CPP H 유전자를 소유한 한우 후보 종모우 20두 중 2개체를 선발하였다.(Fig 1.)

- 선발된 개체들의 경정맥으로부터 각각 30ml의 혈액을 채취한 후 백혈구로부터 Genomic DNA를 추출하였다.
- CPP H 유전자를 확인하기 위하여 beta casein H에 특이적인 primer (beta-CN 2 primer)를 이용하여 PCR을 실시하여 540bp의 증폭산물을 생산하였다. 생산된 PCR 증폭산물을 2% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여 확인하였다.
- CPP H형을 확인하기 위하여 생산된 540bp의 증폭산물을 Nsi I 제한효소로 절단 한 후 2% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시한 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 CPP H형은 458bp와 182bp인 두 개의 band로 검출되었고 CPP H형이 아닌 개체의 증폭산물은 절단되지 않은 540bp의 band로 검출되었다 (Fig. 2). CPP H형으로 확인된 한우 종모우들 중 2두를 Holstein과의 교배에 이용하였다.

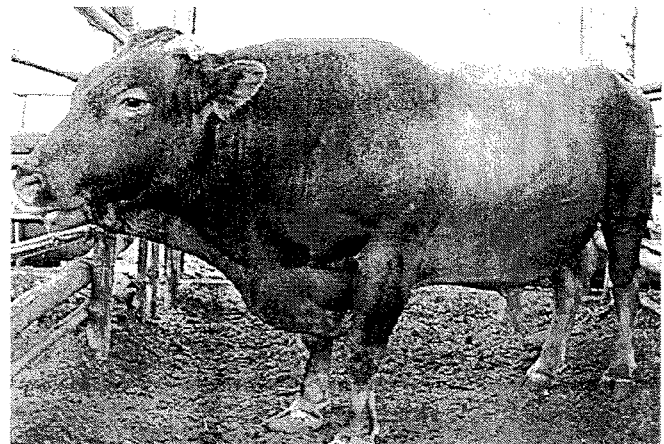
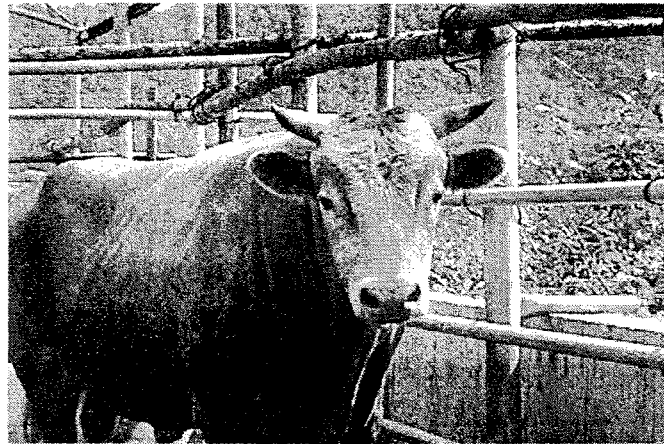
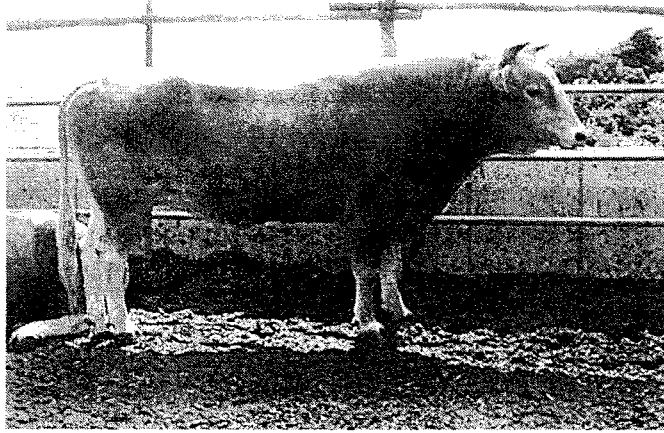


Fig 1. CPP-H type korean cattle sires

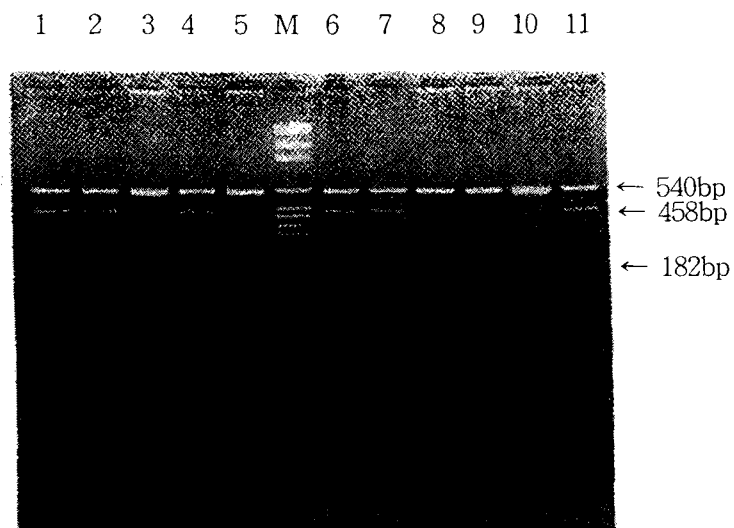


Figure 2. The result of PCR-RFLP with Nsi I enzyme to identify CPP H gene  
 lane 1, 2, 4, 6, 7, 11 : CPP H type  
 lane 3, 5, 8, 9, 10 : Non CPP H type  
 Ma : pGem DNA size marker

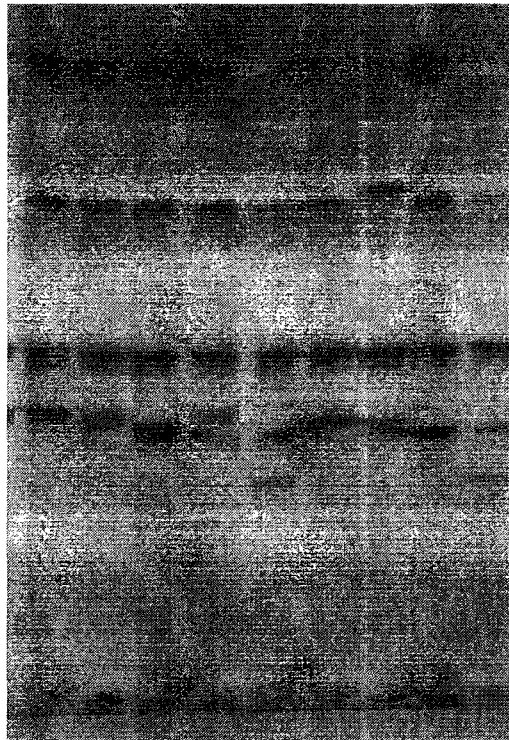
나. 종빈우로 이용할 Holstein 개체의 선발

1) 건국대학교 축산대학 실습농장에서 산유량 및 개체기록이 확실한 종빈우 100두를 선발

2) 선발된 개체의 beta-casein 유전자형 분석

: 선발된 Holstein 종빈우 각 개체로부터 유즙을 채취한 후 acidic starch gel electrophoresis법을 이용하여 beta-casein 유단백질형 분석하였다 (Fig. 3).

분석결과 Holstein 종빈우에서 beta casein A1, A2 및 B 유전자형이 검출되었으며, H 유전자형은 존재하지 않았다.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig. 3. Electrophoregram of  $\beta$ -casein phenotypes

Lane 1, BB; 2, BA1; 3, A1A2; 4, BA2; 5, A2H;

6, A1A1; 7, A1A2; 8, A2A2; 9, A2H

Lane 5 and 9 : Korean Cattle, Others : Holstein

#### 다. 선발된 개체들의 개체식별

선발된 개체들의 DNA, 혈액 및 유즙으로부터 Microsatellite 좌위, 혈액단백질 좌위 및 유즙단백질 좌위를 분석하여 개체식별을 실시하였다.

##### 1) Microsatellite좌위 분석

한우 종모우 및 Holstein 종빈우의 개체식별을 위하여 International Society for Animal Genetics (ISAG)에서 개체식별을 위해 권장한 microsatellite 좌위인 ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126, TGLA227, BM1824 및 BM2113 좌위의 분석을 실시하였다.

- 선발된 한우 및 Holstein 개체의 혈액으로부터 Genomic DNA를 추출하였다.
- PCR 증폭을 위한 반응액의 조성은 25ng의 genomic DNA와 각각 200 $\mu$ M의 dNTP, 1unit의 Taq polymerase, 1X PCR reaction buffer 및 primer를 첨가하여 최종 반응액을 12 $\mu$ l로 조절하였다.
- 각 microsatellite 좌위의 대립유전자의 genotype의 판정을 위하여 각 개체당 3 $\mu$ l의 PCR product를 이용하였다. 각 PCR product들을 7M의 urea가 첨가된 8% acrylamide gel 및 1X TBE의 running buffer를 이용하여 1500V에서 전기영동하였다.
- silver staining을 실시하여 유전자형을 확인하였다 (Fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Fig 4. Seven alleles of ETH3 microsatellite locus in Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 117/117; Lane2 & 3, 119/119; Lane4, 122/122; Lane5, 127/129  
Lane6, 127/129; Lane7, 119/127; Lane8, 125/125; Lane9, 117/119  
Lane10, 117/117; Lane11, 117.119; Lane12, 121/121

1 2 3 4 5 6 7

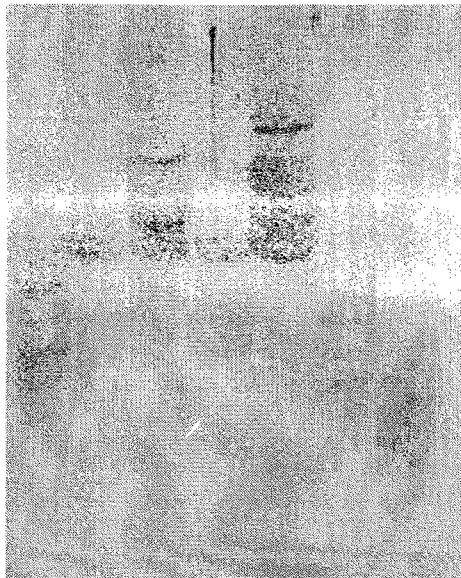


Fig 5. Nine alleles of ETH10 microsatellite locus in Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 215/215; Lane2 217/217; Lane3, 219/223; Lane4, 217/217  
Lane5, 221/225; Lane6, 213/213; Lane7, 209/211

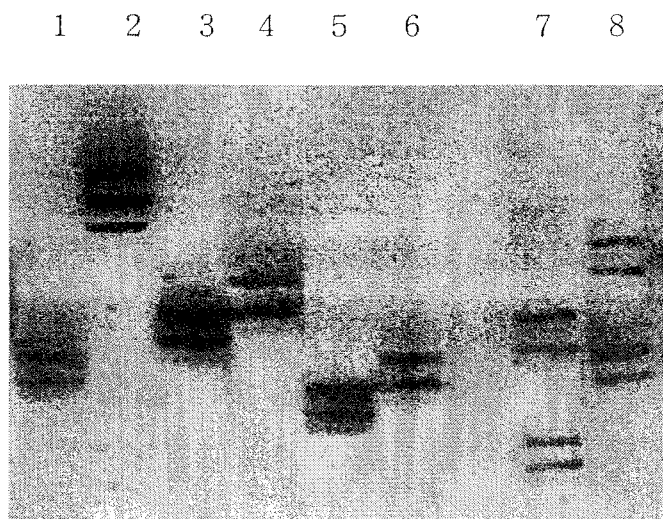


Fig 6. Seven alleles of ETH225 microsatellite locus in  
Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 150/150; Lane2 140/142; Lane3, 148/148; Lane4, 146/146;  
Lane5, 152/152; Lane6, 150/150; Lane7, 148/156; Lane8, 150/144



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

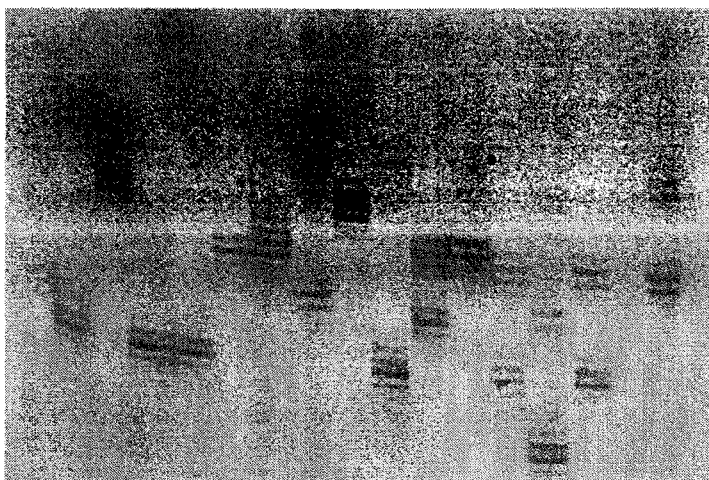


Fig 7. Thirteen alleles of TGLA122 microsatellite locus in Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 171/171; Lane2 135/143; Lane3, 171/171; Lane4, 171/171;  
Lane5, 151/151; Lane6, 147/151; Lane7, 159/159; Lane8, 141/145;  
Lane9, 171/171; Lane10, 149/163; Lane11, 149/149; Lane12, 151/171  
Lane13, 161/181; Lane14, 151/171 ; Lane15, 135/153

1 2 3 4 5 6 7 8

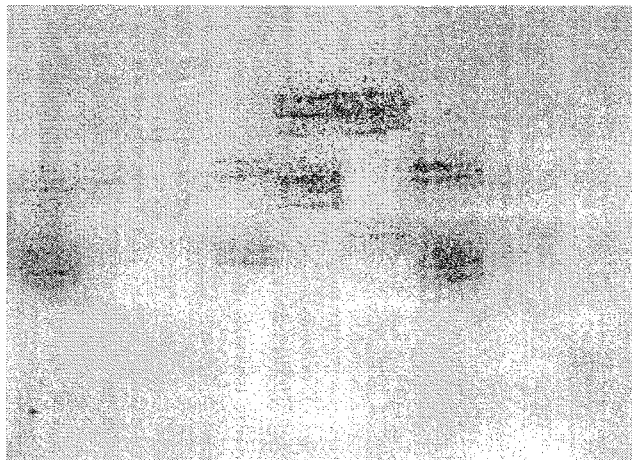


Fig 8. Seven alleles of TGLA126 microsatellite locus in  
Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 115/115; Lane2 125/125; Lane3, 121/121; Lane4, 119/119;  
Lane5, 125/125; Lane6, 123/125; Lane7, 117/117; Lane8, 113/113

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

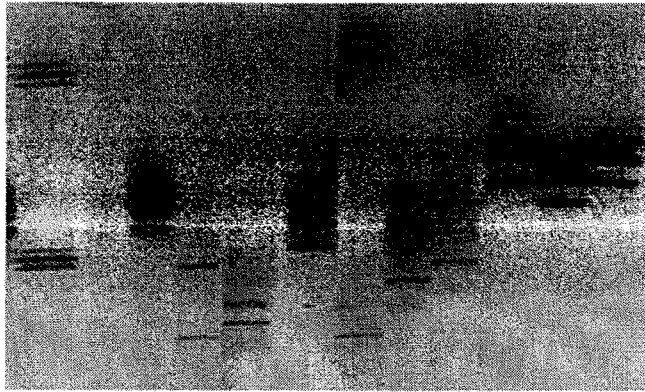


Fig 9. Twelve alleles of TGLA227 microsatellite locus in Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 91/93; Lane2 79/87; Lane3, 81/83; Lane4, 89/91;  
Lane5, 79/105; Lane6, 85/89; Lane7, 87/93; Lane8, 95/99  
Lane9, 93/95; Lane10, 95/97

1 2 3 4 5 6 7            8 9 10 11 12 13

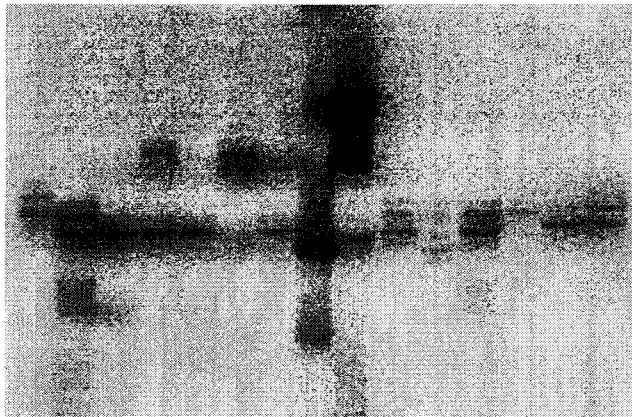


Fig 10. Six alleles of BM1824 microsatellite locus in  
Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 182/184; Lane2 182/180; Lane3, 180/180; Lane4, 180/190;  
Lane5, 180/180; Lane6, 188/190; Lane7, 180/188; Lane8, 180/182;  
Lane9, 178/182; Lane10, 180/182; Lane11, 182/182; Lane12, 180/180  
Lane13, 180/182

1 2 3 4 5 6 7 8 9

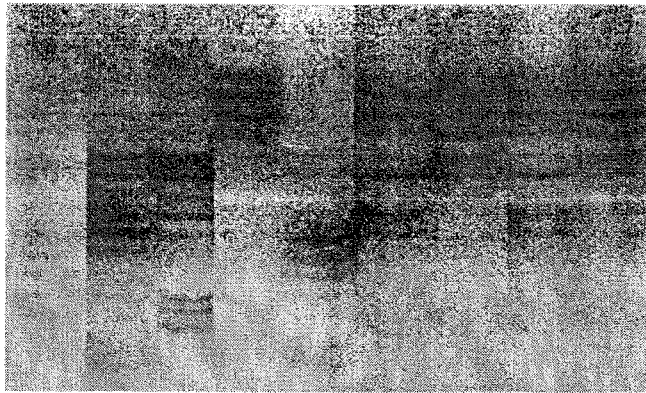


Fig 11. Nine alleles of BM2113 microsatellite locus in Korean native cattle and Holstein breed.

Lane1, 125/127; Lane2 133/137; Lane3, 125/137; Lane4, 145/147;  
Lane5, 133/137; Lane6, 135/145; Lane7, 141/145; Lane8, 135/145  
Lane9, 143/145

2) 혈액 단백질좌위 분석

각 개체의 개체식별을 위하여 혈구단백질 좌위인 Hemoglobin(HB)좌위를 Starch gel electrophoresis법에 의하여 분석하였고 (Fig. 12), 혈청단백질 좌위인 , Transferrin(TF), Post-transferrin-2(PTF-2), Albumin(ALB) 및 Post-albumin(PA)좌위를 Starch gel 및 acrylamide gel electrophoresis법을 이용하여 분석하였다 (Fig. 13, 14 and 15).



Fig. 12. Electrophoregram of *HB* protein phenotypes

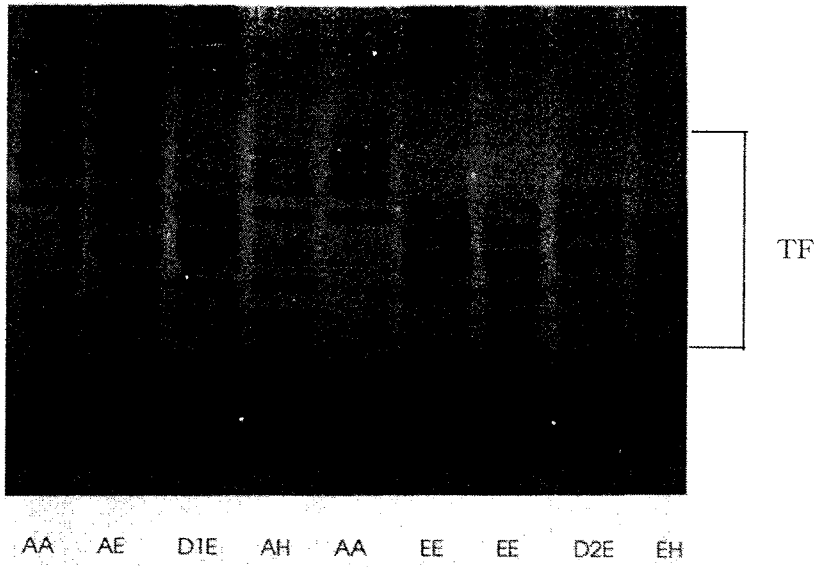


Fig. 13. Electrophoregram of *TF* protein phenotypes

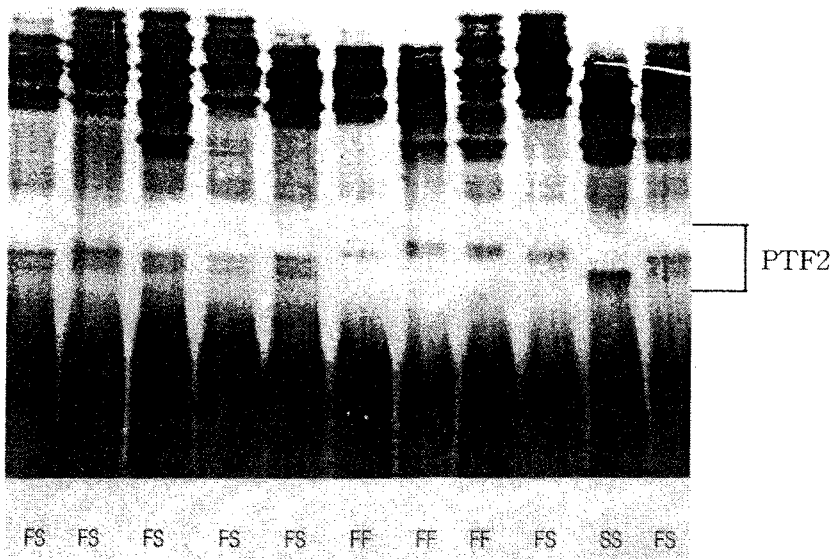


Fig. 14. Electrophoregram of *PTF* protein phenotypes

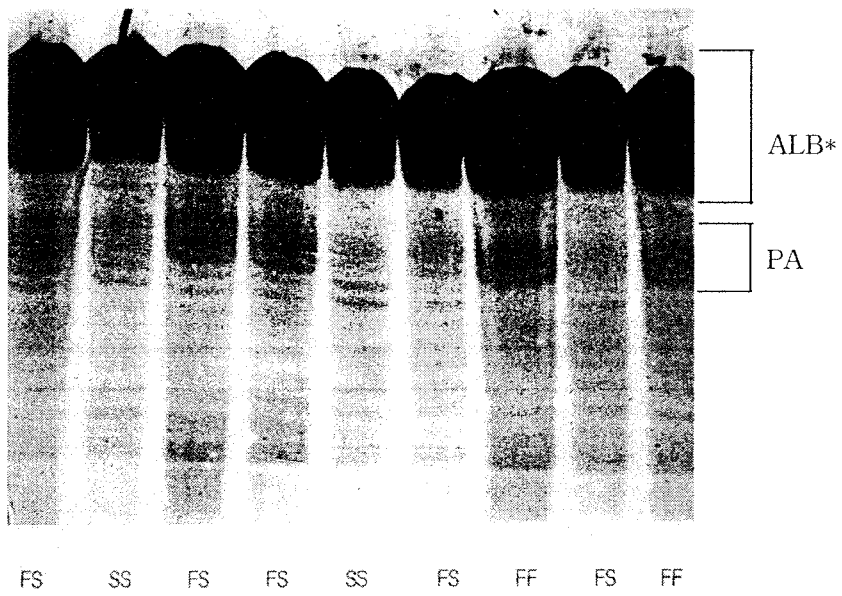


Fig. 15. Electrophoregram of *ALB* and *PA* protein phenotypes  
 \* non polymorphism



3) 유단백질좌위 분석

acidic 및 alkaline starch gel electrophoresis법을 이용하여 beta casein, alpha S1 casein, kappa casein, beta lactoglobulin 및 alpha lactoglobulin좌위를 분석하였다 (Fig. 3, 16 and 17)

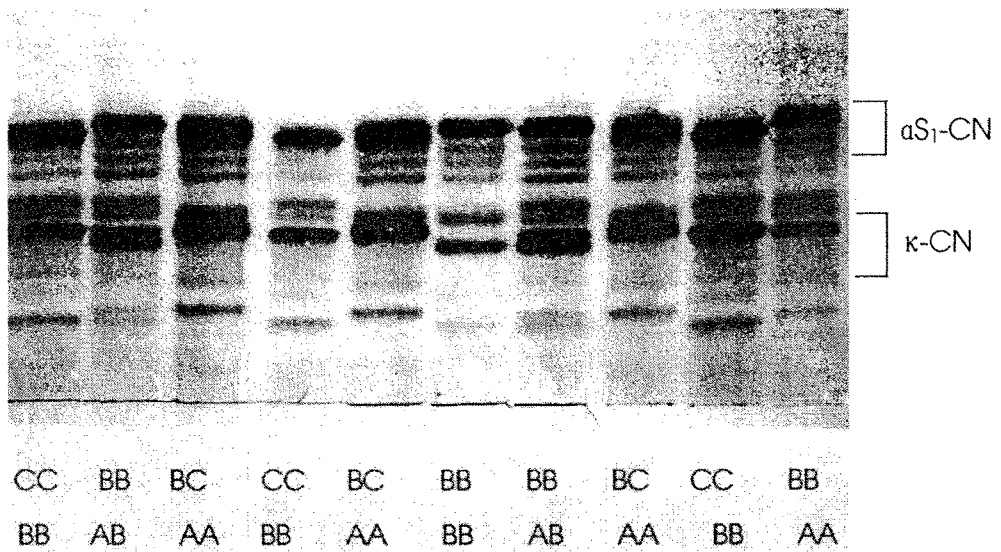


Fig. 16. Electrophoregram of  $\alpha_{S1}$ - and  $\kappa$ -casein phenotypes

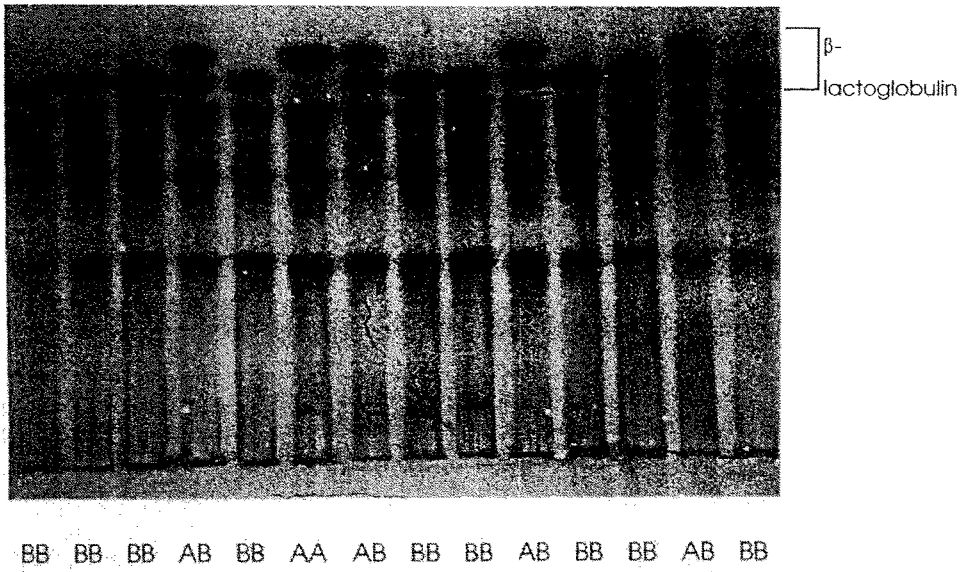


Fig. 17. Electrophoregram of  $\beta$ -lactoglobulin phenotypes in Korean cattle  
 \* alpha lactoglobulin locus was not presented polymorphism

#### 라. F1의 생산

1차년도에 2두의 한우 종모우와 50두의 Holstein 종빈우를 교배하여 23두의 F1 송아지를 생산하였으며 이들 중 13두가 수송아지이고 10두가 암송아지였다. 이들 중 1두는 급성식체로 인하여 폐사하였고, 1두는 홀스타인으로 의심되어 실험에서 제외하였다.

추가로 2차년도에 1차년도와 동일한 2두의 한우 종모우와 39두의 새로 선발한 Holstein 종빈우를 교배하여 39두의 F1 송아지를 추가로 생산하였다. 이들 중 22두가 수송아지이고 17두가 암송아지였다.

PCR-RFLP에 의해 총 62두의 F1 송아지중 27마리의 송아지가 CPP H유전자를 소유한 것으로 확인되었다. 이중 수송아지 13두 및 암송아지 14두이다 . (Fig. 18).

생산된 송아지들은 대부분 흑색이며 극히 일부에 백색 반점을 가진 모색의 형태를 나타내었으나 2두에서 한우와 같은 갈색을 나타내었다. 이는 추후 모색유전자와 관련된 연구에 매우 유용한 자원으로 활용할 예정이다 (Fig. 19).

1차년도의 교배실험에 이용된 한우 종모우와 Holstein 종빈우의 사진과 생산된 F1 송아지들은 Figure 20과 21에서 보는 바와 같고 이들의 육성 비육단계의 사진은 Fig 22에 나타내었다. 2차년도에 추가생산된 송아지의 일부는 Fig 23에서 보는 바와 같다.

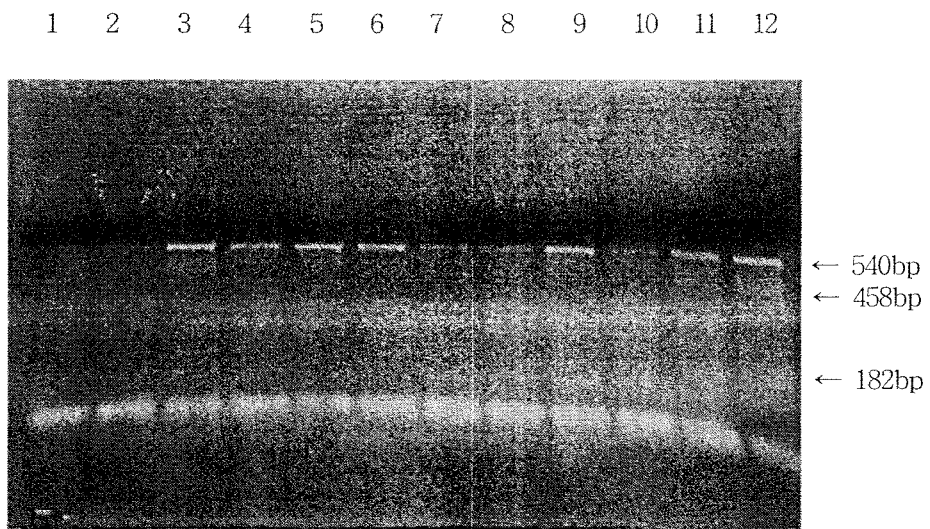


Fig. 18. The results of PCR-RFLP of F1 offsprings  
Lane 1, 2, 7, 8, 11 and 12 are CPP H types

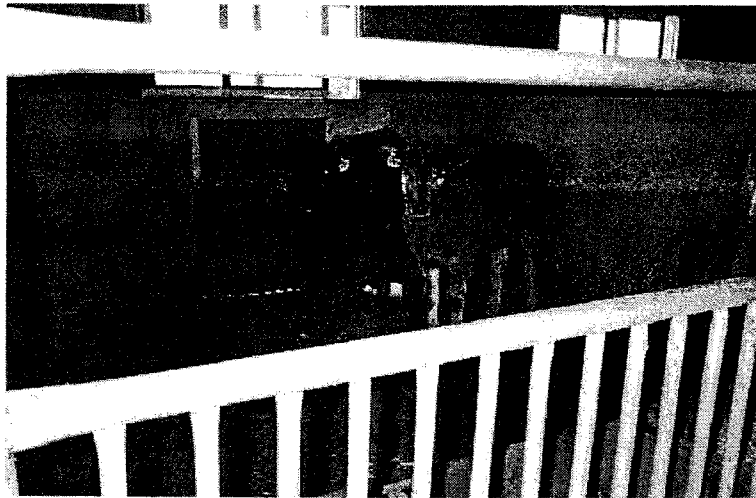


Fig. 19. Two F1 Offsprings of brown hair



Fig. 20. Korean Cattle sires and Holstein dams using mating system





Fig. 21. F1 offsprings



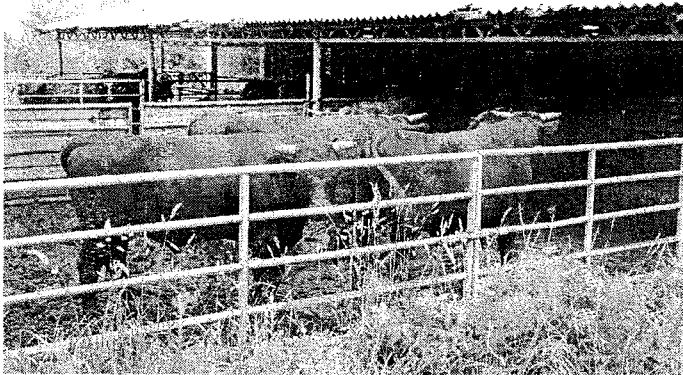


Fig. 22. 육성 및 비육시기의 F1



Fig. 23. 어린송아지 시기의 추가생산된 F1

마. CPP H 유전자를 소유한 새로운 계통의 확립

F1의 개체식별 및 친자판정을 위한 혈액단백질 및 microsatellite 좌위의 분석  
생산된 F1 개체들의 DNA Microsatellite 좌위와 혈액단백질 좌위를 분석하여 개체식별  
및 친자판정을 실시하였다.

#### 1) Microsatellite좌위 분석

F1의 개체식별 및 친자판정을 위하여 INRA023, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126, TGLA227, BM1824, BM2113 및 SPS115 좌위의 분석을 실시하였다.

- 가계구축을 위하여 부, 모, 자의 혈액을 채취하여 Genomic DNA를 추출하였다.
- PCR 증폭을 위한 반응액의 조성은 25ng의 genomic DNA와 각각 200 $\mu$ M의 dNTP, 1unit의 Taq polymerase, 1X PCR reaction buffer 및 primer를 첨가하여 최종 반응액을 12 $\mu$ l로 조절하였다.
- 각 microsatellite 좌위의 대립유전자의 genotype의 판정을 위하여 각 개체당 3 $\mu$ l의 PCR product를 이용하였다. 각 PCR product들을 7M의 urea가 첨가된 8% acrylamide gel 및 1X TBE의 running buffer를 이용하여 1500V에서 전기영동하였다.
- silver staining을 실시하여 유전자형을 확인하였다 (Fig. 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 and 32).

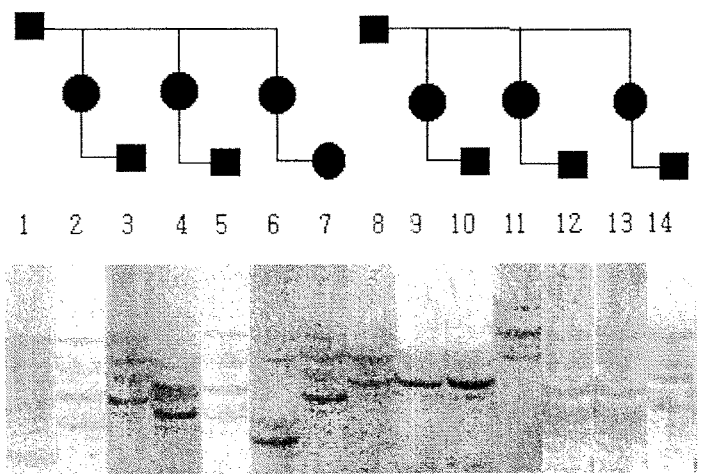


Fig 24. The results of parentage test with INRA023

lane 1, 208/214; lane 2, 206/214; lane 3, 206/214;  
 lane 4, 206/210; lane 5, 206/214; lane 6, 206/214;  
 lane 7, 206/214; lane 8, 210/214; lane 9, 210/210;  
 lane10, 210/210; lane11, 214/218; lane12, 210/214;

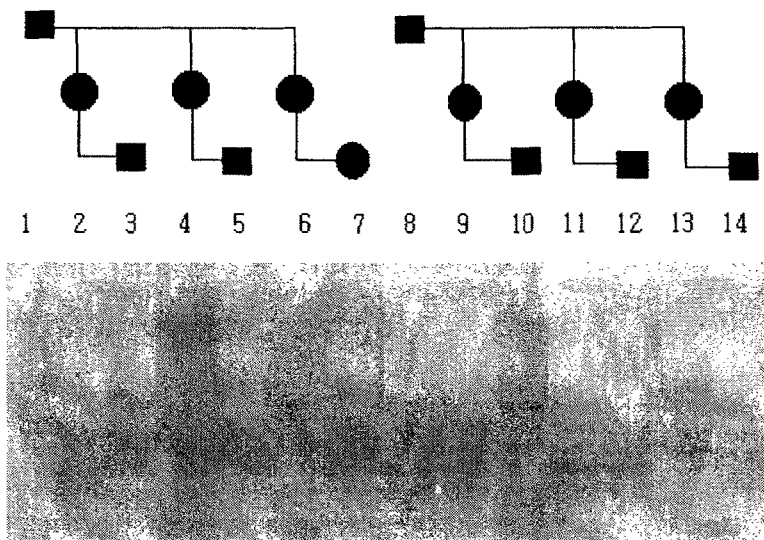


Fig. 25. The results of parentage test with ETH10

lane 1, 117/117; lane 2, 117/113; lane 3, 117/117;  
 lane 4, 117/125; lane 5, 117;119; lane 6, 119/127;  
 lane 7, 117/119; lane 8, 117/119; lane 9, 117/119;  
 lane10, 119;119; lane11, 117/117; lane12, 117/119;

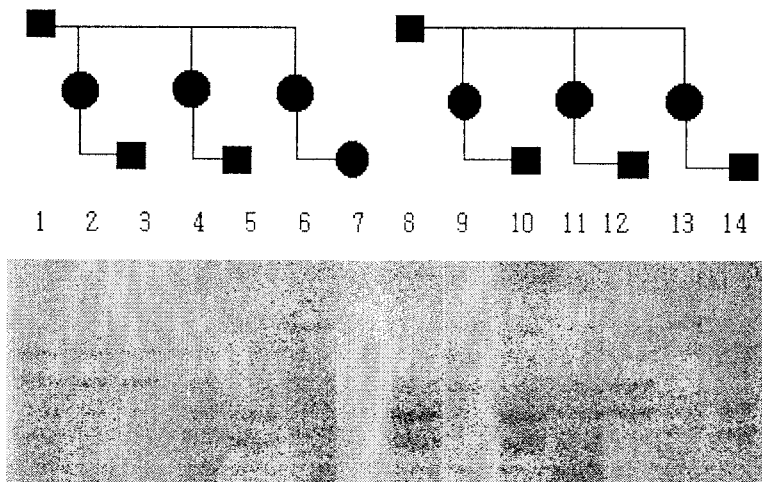


Fig. 26. The result of parentage test with ETH225

lane 1, 148/150; lane 2, 148/148; lane 3, 148/148;  
 lane 4, 148/150; lane 5, 144/150; lane 6, 150/152;  
 lane 7, 148/150; lane 8, 144/146; lane 9, 148/150;  
 lane10, 144/150; lane11, 146/150; lane12, 146/150;

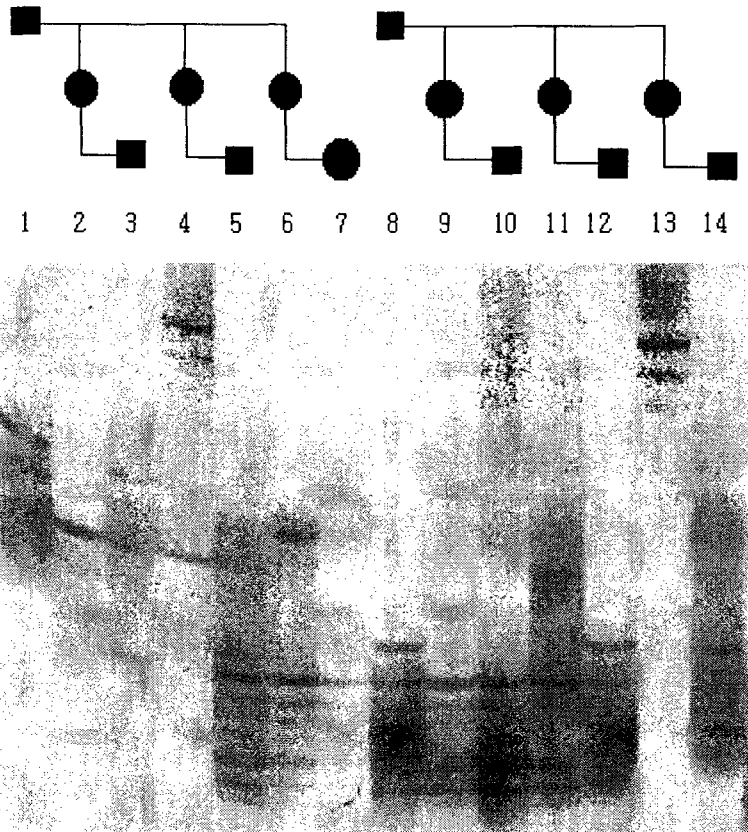


Fig. 27. The result of parentage test with TGLA122

lane 1, 153/153; lane 2, 149/149; lane 3, 149/153;  
 lane 4, 149/161; lane 5, 143/149; lane 6, 143/151;  
 lane 7, 143/153; lane 8, 143/145; lane 9, 143/143;  
 lane10, 143/143; lane11, 143/149; lane12, 143/145;  
 lane13, 163/163; lane14, 145/151

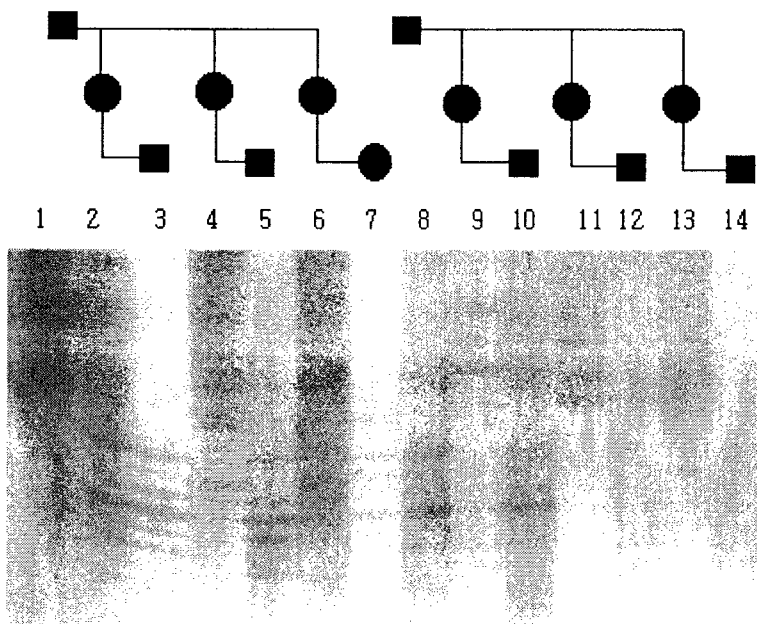


Fig. 28. The result of parentage test with TGLA126

lane 1, 119/119; lane 2, 119/119; lane 3, 119/119;  
 lane 4, 117/121; lane 5, 117/119; lane 6, 117/121;  
 lane 7, 119/121; lane 8, 119/119; lane 9, 119/127;  
 lane10, 119/119; lane11, 121/125; lane12, 119/125;  
 lane13, 117/125; lane14, 117/119



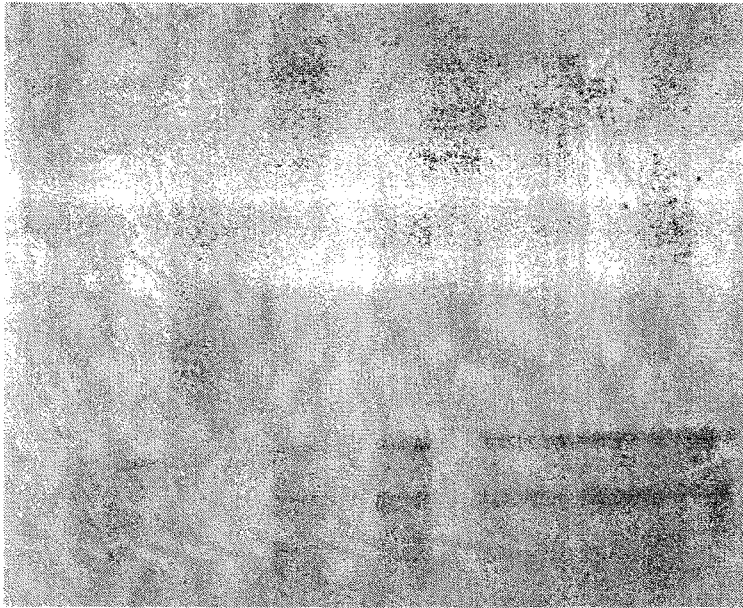
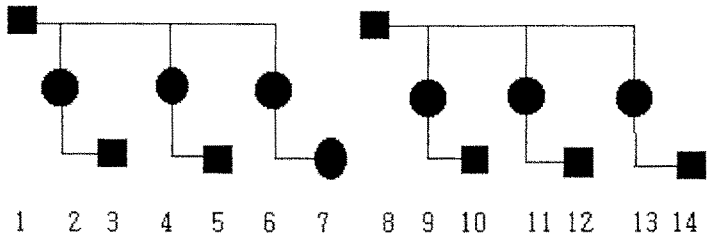


Fig. 29. The result of parentage test with TGLA227

lane 1, 91/97; lane 2, 81/91; lane 3, 81/97;  
 lane 4, 89/91; lane 5, 89/93; lane 6, 81/97;  
 lane 7, 91/97; lane 8, 81/93; lane 9, 91/97;  
 lane10, 81/97; lane11, 81/97; lane12, 81/81;

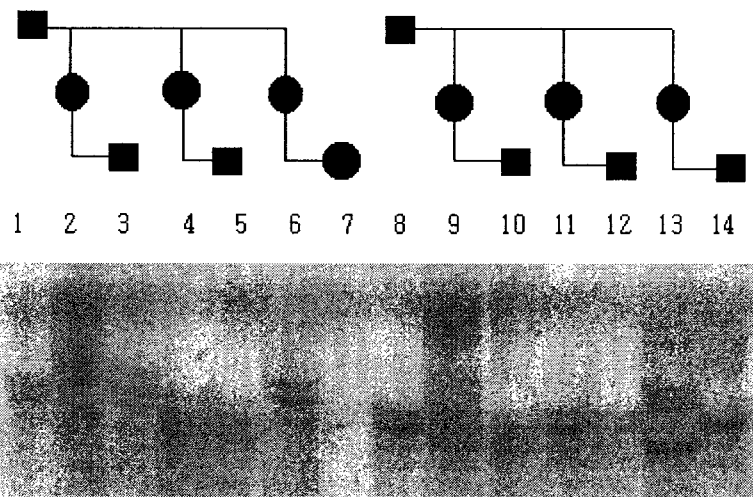


Fig. 30. The result of parentage test with BM1824

lane 1, 178/178; lane 2, 180/188; lane 3, 178/180;  
 lane 4, 176/178; lane 5, 176/178; lane 6, 180/180;  
 lane 7, 178/180; lane 8, 180/180; lane 9, 178/188;  
 lane10, 178/180; lane11, 180/180; lane12, 180/180;

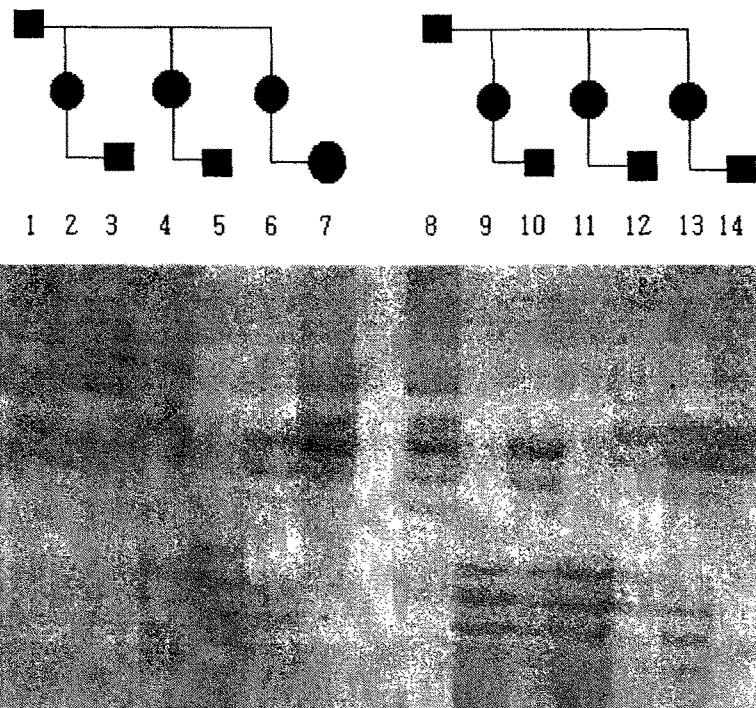


Fig. 31. The result of parentage test with BM2113

lane 1, 135/139; lane 2, 135/139; lane 3, 139/139;  
 lane 4, 125/139; lane 5, 125/127; lane 6, 125/135;  
 lane 7, 135/139; lane 8, 135/139; lane 9, 125/127;  
 lane10, 127/135; lane11, 127/127; lane12, 127/139;

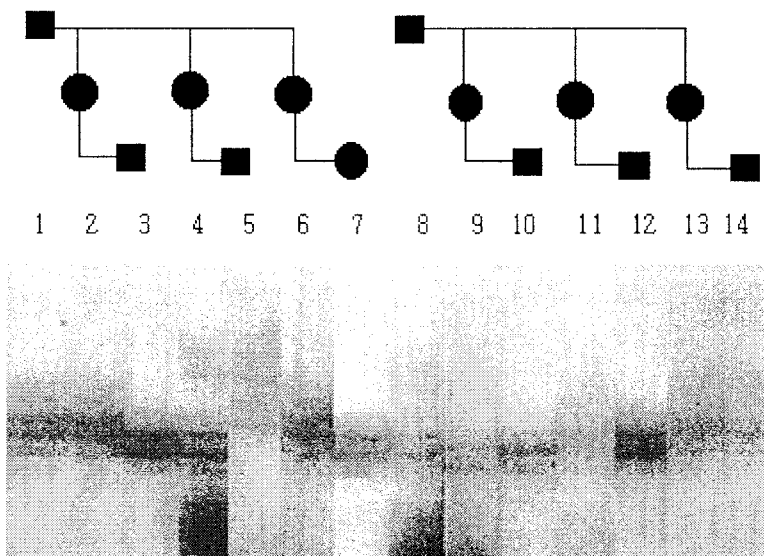


Fig.32. The result of parentage test with SPS115

lane 1, 248/252; lane 2, 248/252; lane 3, 252/252;  
 lane 4, 248/260; lane 5, 252/260; lane 6, 252/260;  
 lane 7, 248/252; lane 8, 248/258; lane 9, 246/256;  
 lane10, 246/248; lane11, 248/256; lane12, 248/248;

2) F1 개체의 개체식별 및 친자관정을 위한 혈액 단백질좌위 분석

- 가계구축을 위하여 부, 모, 자의 혈액을 채취하여 혈액단백질 좌위를 분석하였다.
- 각 개체의 개체식별 및 친자관정을 위하여 혈구단백질 좌위인 Hemoglobin(HB) 좌위와 혈청효소좌위인 Amylase(AMY) 좌위를 Starch gel electrophoresis법에 의하여 분석하였고 (Fig. 33 and 34), 혈청단백질 좌위인 , Transferrin (TF), Post-transferrin-2 (PTF-2), Albumin(ALB) 및 Post-albumin(PA)좌위를 Starch gel 및 acrylamide gel electrophoresis법을 이용하여 분석하였다 (Fig. 35).

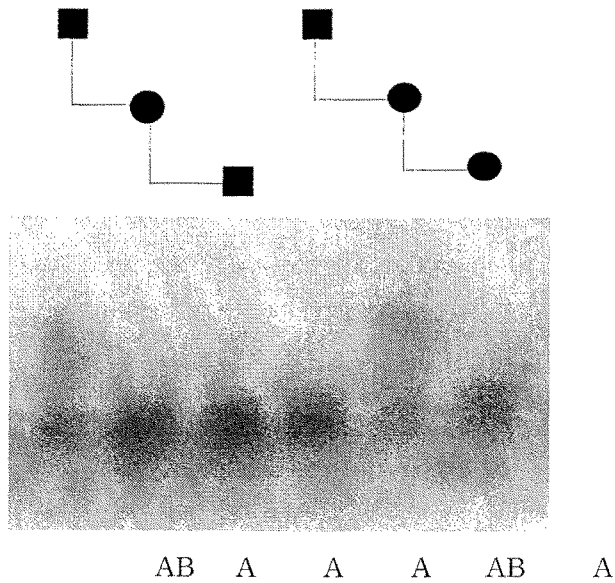


Fig. 33. Electrophoregram of *HB* protein phenotypes

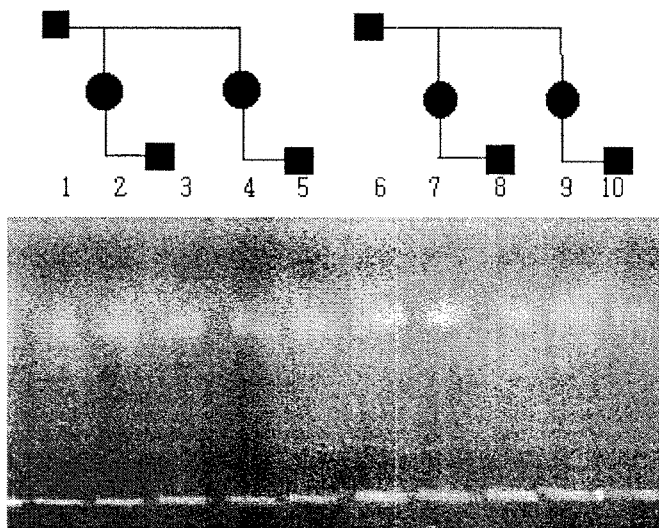


Fig. 34. The result of parentage test for AMY  
Polymorphisms was not identified

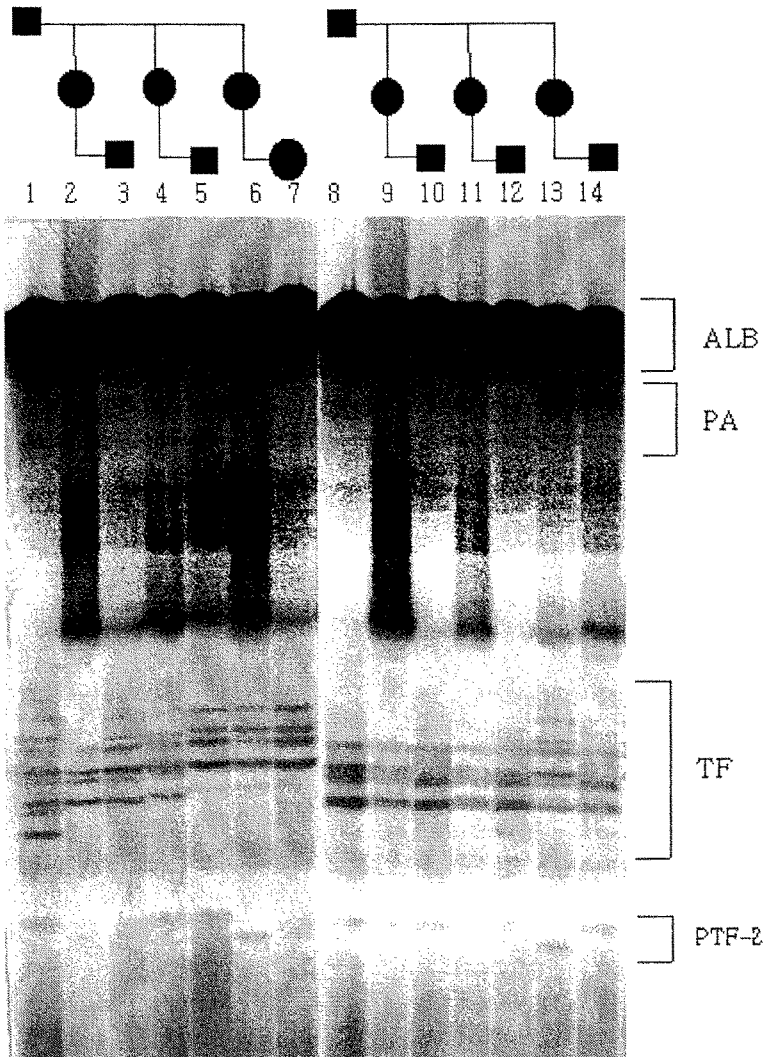


Fig. 35. The results of parentage test for ALB, pre-ALB, TF and post-TF

PA : lane 1, B; lane 2, B; lane 3, B; lane 4, B; lane 5, B; lane 6, B;  
lane 7, B; lane 8, A; lane 9, B; lane 10, AB; lane 11, B; lane 12, AB;  
lane 13, B; lane 14, AB

TF : lane 1, AE; lane 2, D2; lane 3, AD2; lane 4, AD1; lane 5, A;  
lane 6, A; lane 7, A; lane 8, D1D2; lane 9, D1D2; lane 10, D1D2;  
lane 11, D1D2; lane 12, D1D2; lane 13, AD2; lane 14, D1D2

PTF-2 : lane 1, A; lane 2, AB; lane 3, AB; lane 4, A; lane 5, A;  
lane 6, B; lane 7, AB; lane 8, A; lane 9, A; lane 10, A; lane 11, A;  
lane 12, A; lane 13, B; lane 14, A

ALB : Polymorphisms was not identified

바. F2 생산을 위한 F1간의 교배

1) 친자판정에 의한 가계 설정

생산된 F1 개체들의 친자판정을 9개의 microsatellite 좌위와 6개의 혈액단백질 좌위를 이용하여 실시하였으며 그 결과에 따라 교배를 위한 가계를 설정하였다 (Table 1 and 2).

DNA microsatellite 좌위의 분석 결과 2 가계의 경우 친자가 아님이 확인되어 (Table 1의 REJECT) 이 개체들은 F2 생산을 위한 교배에서 제외되었으며 현재 친자관계가 성립되는 종모우 및 종번우를 확인하였다. 그러나 혈액단백질 좌위의 분석결과는 모든 개체가 친자임으로 나타나 DNA microsatellite 좌위가 혈액단백질 좌위보다 친자판정 효율에 있어 매우 우수함을 나타내었다.

Table 1. The results of parentage test using 9 microsatellite loci

Loci Family		Loci									Result
		INRA023	ETH10	ETH225	TGLA122	TGLA126	TGLA227	BM1824	BM2113	SPS115	
Family 1	Sire	208/214	117/117	148/150	153/153	119/119	91/97	178/178	135/139	248/252	ACCEPT
	Dam	206/214	117/113	148/148	149/149	119/119	81/91	180/188	135/139	248/252	
	Offspring	206/214	117/117	148/148	149/153	119/119	81/97	178/180	139/139	252/252	
	Dam	206/210	117/125	148/150	149/161	117/121	89/91	176/178	125/139	248/260	REJECT
	Offspring	206/214	117/119	144/150	143/149	117/119	89/93	176/178	125/127	252/260	
	Dam	206/214	119/127	150/152	143/151	117/121	91/97	180/180	125/135	252/260	ACCEPT
	Offspring	206/214	117/119	148/150	143/153	119/121	91/97	178/180	135/139	248/252	
Family 2	Sire	210/214	117/119	144/146	143/145	119/119	81/93	180/180	135/139	248/258	ACCEPT
	Dam	210/210	117/119	148/150	143/143	119/127	91/97	178/188	125/127	246/256	
	Offspring	210/210	119/119	144/150	143/143	119/119	81/97	178/180	127/135	246/248	
	Dam	214/218	117/117	146/150	143/149	121/125	81/97	180/180	127/127	248/256	ACCEPT
	Offspring	210/214	117/119	146/150	143/145	119/125	81/81	180/180	127/139	248/248	
	Dam	210/214	119/121	150/152	163/163	117/125	81/91	182/188	125/137	248/252	REJECT
	Offspring	210/214	117/119	144/150	145/151	117/119	81/81	180/188	137/139	248/252	



Table 2. The results of parentage test using 6 blood protein loci

Loci		HB	*AMY	*ALB	PA	TF	PTF	Result
Family 1	Sire	A	A	A	B	AE	A	ACCEPT
	Dam	A	A	A	B	D2	AB	
	Offspring	A	A	A	B	AD2	AB	
	Dam	A	A	A	B	AD1	A	ACCEPT
	Offspring	A	A	A	B	A	A	
	Dam	A	A	A	B	A	B	ACCEPT
	Offspring	A	A	A	B	A	AB	
Family 2	Sire	AB	A	A	A	D1D2	A	ACCEPT
	Dam	A	A	A	B	D1D2	A	
	Offspring	AB	A	A	AB	D1D2	A	
	Dam	A	A	A	B	D1D2	A	ACCEPT
	Offspring	AB	A	A	AB	D1D2	A	
	Dam	A	A	A	B	AD2	B	ACCEPT
	Offspring	A	A	A	AB	D1D2	A	

\* ALB & AMY : polymorphisms was not identified

○ 본 연구에서 실시하는 개체식별 및 친자판정을 위한 유전자 분석의 국제표준화를 위해 2001-2002년도 ISAG(International Society for Animal Genetics)에서 시행한 cattle DNA comparison test에 참가한 결과 우수한 성적을 획득하여 소 품종의 DNA 분석에 대한 국제 표준화의 기반을 확립하였다.(Fig 36)



## 2) CPP H의 대량 생산을 위한 교배

CPP H를 함유한 우유를 대량생산하기 위해 F2의 계획 교배를 설정하였다. 교배 조합은 유전적 다형현상의 다양성 유지를 고려하고 혈통분란 및 근친교배를 방지하여 가계의 혈통확립을 완벽하게 하도록 F1간의 계획교배를 실시하였다. 선발된 F1 종모우 2두의 사진을 Fig. 37에 나타냈다.

동시에 선발된 F1 종빈우의 교배중인 사진을 Fig 38.에 나타내었다.

생산된 62두의 F1 송아지 (♂ 35두, ♀ 27두)중 CPP H 유전자를 소유한 27두의 개체 (♂ 13, ♀ 14두)중 교배월령에 도달한 개체를 선발하여 친자판정 결과를 바탕으로 혈통을 유지하기 위한 계통별 자연 교배를 실시하였다 그 일부의 예를Table 3.에 표시하였으며 본 실험의 대상이 된 개체번호는 799, 800, 809, 810, 813, 815, 816, 812, 826등 9두이다.

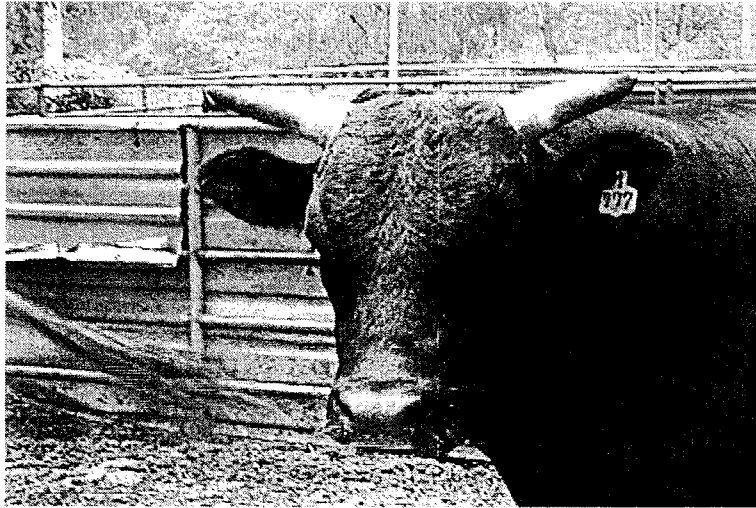


Fig 37. 선발된 CPP-H를 가진 F1 종모우

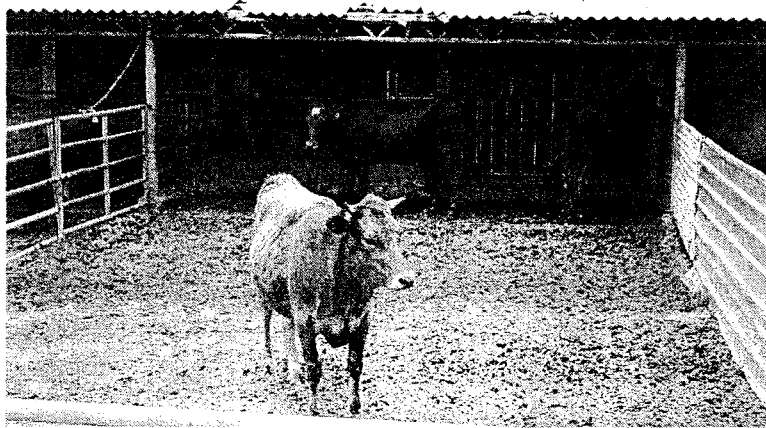


Fig. 38. F2 생산을 위해 교배중인 F1

Table 3. Breeding system to product F2

System	♂		♀
1	773 (Family 1)	×	816 (Family 2)
2	777 (Family 2)	×	812 (Family 1-1)
3	777 (Family 2)	×	826 (Family 1-2)

#### 사. F2의 생산 및 CPP H의 대량 생산

CPP H 유전자를 소유한 27두의 F1 개체 (♂ 13, ♀ 14두)중 교배월령에 도달하여 교배가 완료된 799, 800, 809, 810, 813, 815, 816, 812, 826등 9두는 임신기간을 거쳐 2003년 2월 16일에서 4월 14일에 걸쳐 건강한 F2 송아지를 출산하였으며 동시에 CPP H를 함유한 우유를 생산하기 시작하였다. 출산된 송아지의 사진을 Fig 39.에 나타내었으며 9두의 어미소들은 Fig 40.에 나타내었다. 출산된 9두의 송아지 중 1두의 송아지의 모색은 갈색을 나타내었다. 갈색을 나타내는 송아지의 어미 역시 826번 갈색이다. 출산된 9두의 송아지는 모두 건강하며 동시에 이들의 어미인 F1 9두 모두 아주 건강한 상태로 우유의 생산량도 기대치보다 많은 양을 나타내고 있다. 이들 9두의 F2를 생산한 날짜 및 비유량은 Table 4.에 나타난 바와 같다. 산유량은 799번의 경우 최대 일일 16.6kg에 도달하였다. 한편 812번, 826번 및 800번은 분만 후, 초기에는 정상적인 유량을 나타내었고 특히 826번은 분만초기 8Kg로서 다른개체에 비해 월등한 비유량을 나타내고 있었으나 우군 이동을 통하여 받은 스트레스로 인하여 유량이 급격히 감소되었다. 따라서 이 3개체를 통계성적에서 제외하였으며 3두를 제외한 나머지 6두의 1일 평균 유생산량은 10.1kg으로써 이는 한우의 유생산량을 하루 평균 약 1~1.5kg으로 볼 때 약 10배에 가까운 수치를 나타내고 있다.

이들 성적은 초산우의 성적으로써는 기대치 이상의 결과라고 생각되며 이들 F1의 비유 성적은 2산에서부터 유생산량은 더욱 증가될 것으로 기대되어 본연구의 유생산량 측면에서는 성공적인 결과라고 고찰된다.

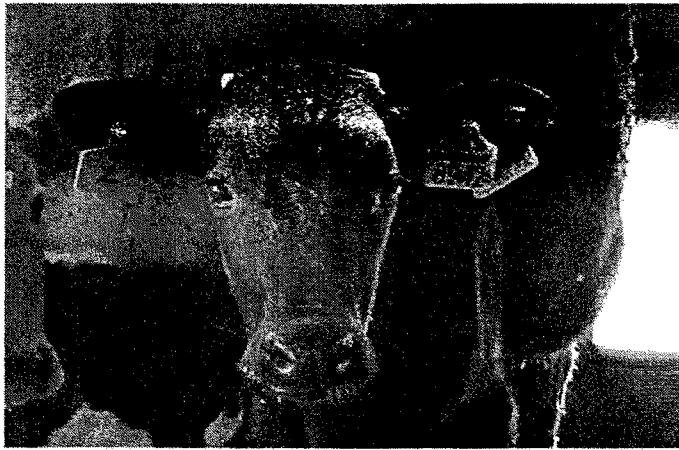


Fig 39. 생산된 F2 송아지







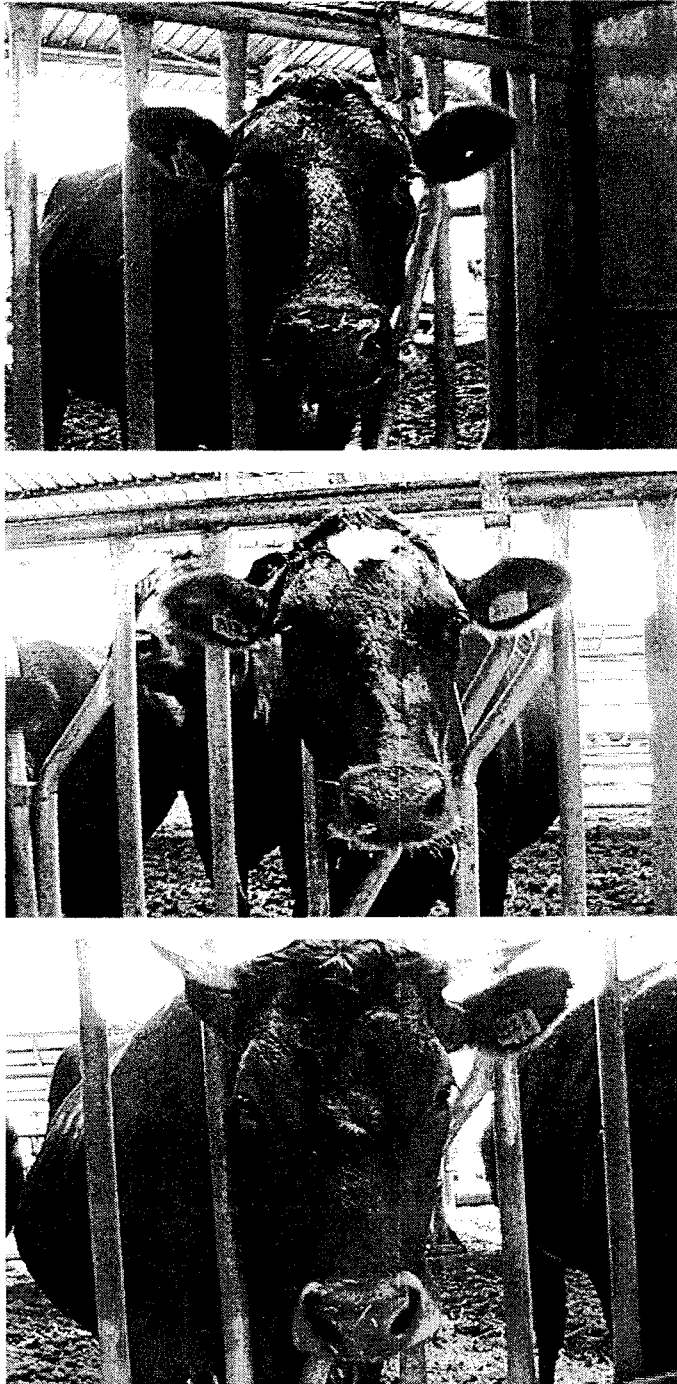


Fig 40. CPP H를 대량생산하는 F1 어미소

Table 4. F2를 생산한 분만우 F1의 현황 및 산유 성적

개체번호	812	826	799	800	809	810	813	815	816
분만일	03.03.19	03.02.16	03.03.12	03.03.22	03.03.16	03.03.20	03.03.09	03.03.30	03.04.14
최대비유량	3.3	7.9	16.6	8.2	13.8	13.6	13.8	13.4	11.7
평균비유량	-	-	12.9	-	8.89	9.62	11.4	9.11	8.7

812, 826, 800번 개체는 착유 3,4일 후 별도의 우군에 이동, 합류하였기 때문에 스트레스를 받아 유량이 급격하게 감소되었기 때문에, 평균유량에서 제외함

아. F1이 생산한 우유의  $\beta$ -casein H 확인

각각 9두의 F1 어미소에서 생산되는 우유에 기능성 물질 CPP H가 함유되어있는지를 확인하기 위하여 전기영동방법으로  $\beta$ -casein 형을 분석한 결과, 9두의 우유 sample 모두는  $\beta$ -casein H형으로 확인되었다.  $\beta$ -casein 형의 분석방법 및 전기영동상은 Fig 41.에 제시하였다.

1) 전기영동에 의한  $\beta$ -casein H형의 확인.

Starch Gel Electrophoresis의 buffer system 및 영동 조건

○Buffer-(pH1.7)

30ml Formic acid + 120ml Acetic acid + 750ml D.W

○Gel

Buffer(70ml) : starch(14g) : Urea(21g)

○Gel Plate

20 : 13 : 0.2cm

○Voltage Condition (+ → -)

100V 20mA (20분후 제거)

제거 후 150V 25mA running time is 15 ~17hr

○Sample Treatment

10g Urea를 100ml D.W에 용해하고 Skim milk와 동량으로 희석하여 사용한다.

○Sample insert the Anodic end 3.5cm

1    2    3    4    5    6    7    8

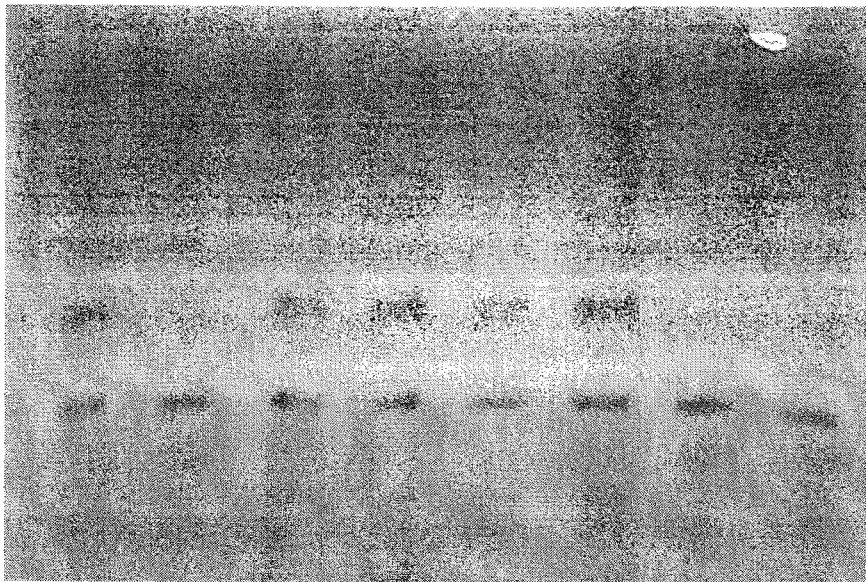


Fig. 41. Electrophoregram of  $\beta$ -casein phenotypes

1, 3, 4, 5, 6 = H type

2, 7, 8 = None H type

이 실험의 목적인 한우의 H유전자가 Holstein과의 교배에 의해서 생산된 F1개체에 정상적으로 유전되어 그 CPP H유전자에 의해서 CPP H 물질이 합성 생산된 사실이 확인된 것이다. 이 결과로 이 유전자의 유전양식이 공우성의 대립 유전자에 의해서 지배된다는 사실이 입증되었으며 이들 F1이 생산하는 우유에는 CPP H가 함유되어 있다는 사실이 확인되었다.

한편 한우와 Holstein간에 생산된 개체는 물론 F1과 F1사이에서 태어난 F2 모두 임신, 출산간은 물론 출산후 성장과정에서 건강하였고, transgenic animal이나, 복제동물에 나타나는 부작용 및 질병의 증상은 일체 나타나지 않았고 오히려 일반적인 한우나 젖소 또는 교잡우 수준보다 더 훨씬 건강한 상태로서, 질병에 대한 저항성이 강한 것으로 추찰되어 이 것 또한 본 연구 목적의 성공적인 결과라고 고찰할 수 있다.

CPP H유전자는 한우에서만 존재하는 유전자로써 한우는 유량이 적기 때문에 한우에서 이것을 대량생산하는 것은 매우 힘든 일이다. 따라서 holstein과 같이 유량이 많은 품종과 교배를 하여 생산된 F1에게 이 유전자가 정상적으로 유전이 되어 그 유전자에 의해서 code되는 CPP H 물질이 천연우유 중에서 대량생산하게 되는 것이다. 이 방법은 미생물이나 화학적 합성방법이 아닌 동물공장 방법에 의해서 천연의 신물질을 안정성이 높게 그리고 경제적으로 생산하는 것이다. 이 방법은 형질전환 동물이나 또는 특수 사료를 급여함으로써 비로소 생산되는 DHA의 경우와 같은 복잡한 생산방법과는 달리 정상적인 기능성 유전자의 code에 의해서 생산할 수 있는 안정성이 높고 경제적인 동물공장이 성공적으로 개발된 것이다.

자. 착유된 우유로부터 CPP H를 함유한 casein 정제

1) F1으로부터 착유를 실시.

건국대학교 파주목장에서 CPP H를 소유한 개체를 별도로 관리하면서 착유를 실시.

CPP H를 함유한 우유를 건국대학교 분자유전학 실험실에 운송하여 Cream 분리, 산 침전 후 Casein 정제를 한 후 냉동고에 보관하고 있다.(Fig 42. 43.)

크로마토그래피하는 대신에 얻어진 가수분해물에 무기이온을 가하여 peptide를 침전시키고, 침전된 peptide를 회수하는 방법으로 신규 peptide(CPP H)를 제조하였다.

즉, 무기이온으로서 Fe의 최종농도는 20mM이 되도록 첨가하고, 에탄올을 최종농도 50% 되도록 첨가하여 peptide를 침전시킨 후 peptide를 동결건조하여, CPP H를 생성할 수 있다. 이때의 젤 여과 크로마토그래피에 의해 확인된 순도는 각종 무기이온에 의한 생성물에서 90%이었고, 생성량은 1.2g이었다. 또한, 상기 무기이온 Fe 대신에 Ca, Ba, Cu, Zn, Mn, 및 Co 이온을 사용하였을 때도 유사한 결과가 얻어졌다. 상기 침전 반응에서 무기이온과 동시에 에탄올을 첨가하였으나, 에탄올을 첨가하지 않고 FeCl<sub>3</sub>만을 첨가 (최종농도 20mM)하여 신규 peptide(CPP H)를 정제하였다.

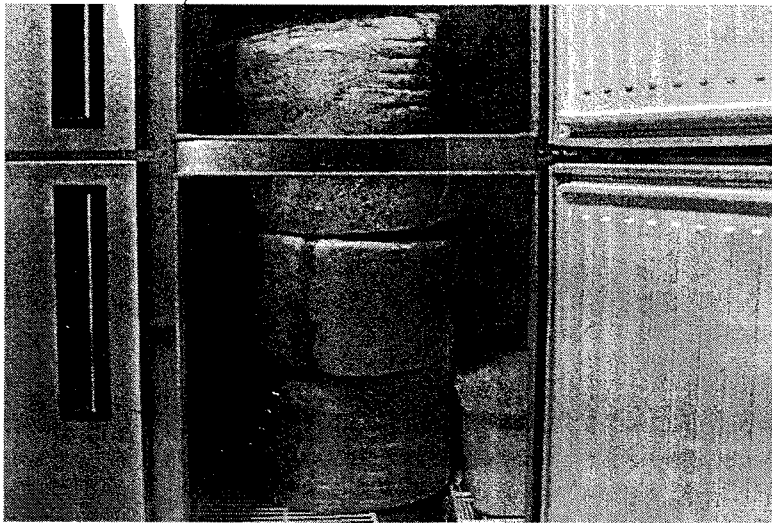
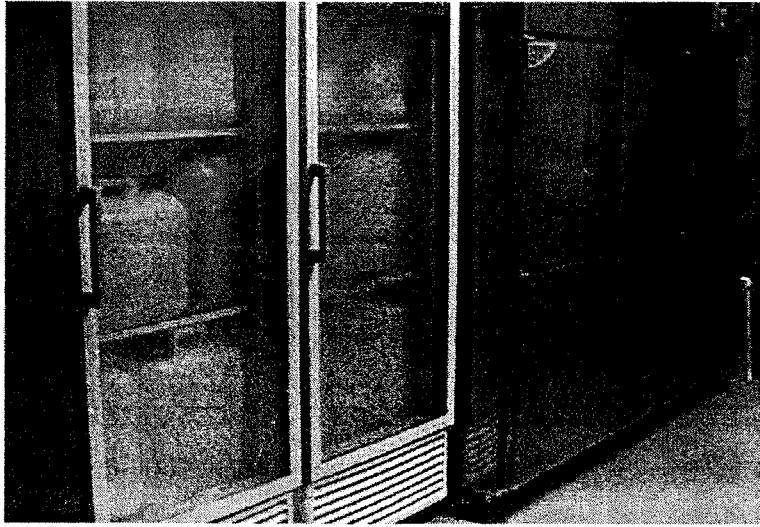


Fig 42. CPP-H가 함유된 우유 및  $\beta$ -casein H



차. Beta casein H 유전자를 소유한 집단을 가계별로 분류하여 CPP H를 생산하는 strain을 구축

1) CPP H의 대량생산을 위한 strain을 구축

1차 년도와 동일한 방법으로 H 유전자를 분석하였으며, 동시에 단백질형도 분석하여 개체식별 및 부자판정을 완료하여 CPP H strain을 구축하였다.

가) 생산된 F1의 beta casein형 분석

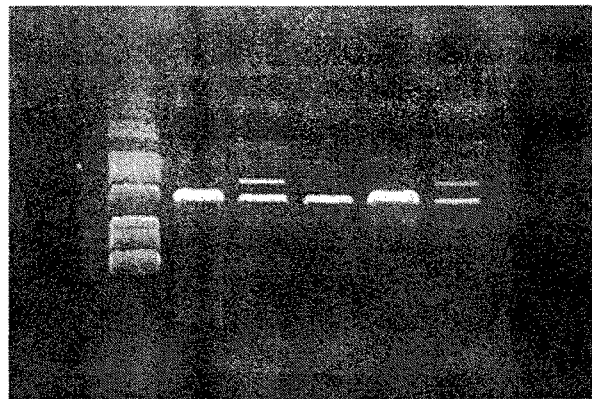
- 생산된 F1중 beta casein을 PCR-RFLP법을 이용하여 분석하였다. (Fig 43.)

- 혈액 단백질형 및 DNA의 9개 좌위를 이용한 개체식별 및 친자판정법 확립

나) F1의 가계정립

- Microsatellite, 혈액단백질 및 유단백질 좌위의 분석에 의한 가계 정립

- CPP H를 소유한 F1 암소 및 수소와 F2 송아지를 확보하고 있다.



1 2 3 4 5 6

Fig 43. PCR RFLP방법에 의하여 분석한 CPP-H type

3. 6 CPP-H type

	번호	성별	분만일	생시 체중	분만우	사육 목적	현황	CPP H
1	769	수	00/10/13	32.0	737	비육	02/06/29 출하	
2	771	수	00/10/24	26.0	738	비육	02/06/29 출하	
3	772	수	00/10/31	26.0	3877	비육	02/06/29 출하	
4	773	수	00/10/31	24.5	748	종모우		H
5	774	수	00/11/2	25.0	717	비육	02/06/29 출하	
6	777	수	00/12/16	25.0	666	종모우		H
7	779	수	01/1/2	28.0	752	비육	02/06/29 출하	
8	781	수	01/2/9	24.0	2385		02/03/04 도태	
9	789	수	01/6/21	26.0	755	비육	03/04/25 출하	
10	790	수	01/6/26	31.0	741	비육	03/04/25 출하	
11	792	수	01/7/10	29.0	747	비육	03/04/25 출하	
12	793	수	01/7/11	26.0	70	비육	03/04/25 출하	
13	794	수	01/7/18	28.0	6335	비육		H
14	798	수	01/8/4	24.0	712	비육		
15	799	수	01/8/7	27.0	69	비육		H
16	802	수	01/8/14	25.0	716	종모우	쌍태	H
17	803	수	01/8/17	26.0	64	비육		H
18	807	수	01/8/26	25.0	703	비육	쌍태	H
19	811	수	01/9/12	32.0	67		02/01/25 도태	
20	812	수	01/10/12	24.0	761	종모우		H
21	814	수	01/10/27	25.0	760	비육		
22	826	수	02/1/17	25.0	102	비육		H
23	827	수	02/1/17	26.0	768	비육		H
24	828	수	02/1/19	26.0	739	비육		
25	829	수	02/1/19	25.0	83	비육		
26	830	수	02/1/24	32.0	72	비육		
27	833	수	02/2/4	20.5	74	비육		
28	839	수	02/2/19	30.5	772	비육		H
29	840	수	02/2/22	26.5	53	비육		
30	844	수	02/3/10	28.0	650	비육		
31	846	수	02/3/21	38.5	45	비육		
32	850	수	02/4/18	45.0	791	비육		
33	851	수	02/5/9	35.0	786	비육		H
34	852	수	02/5/19	36.5	778	비육		H
35	853	수	02/5/21	34.0	767	비육		
평균				28.2				
표준편차				4.9				

Table 5. 한우 및 교잡우의 개체관리 현황(숫소)

	번호	성별	분만일	생시 체중	분만우	사육 목적	현황	
1	805	암	00/9/28	24.0	732	비육	02/09/12 출하	
2	806	암	00/10/5	21.0	744	비육	02/09/12 출하	
3	807	암	00/10/5	22.0	722	비육	02/09/12 출하	
4	808	암	00/10/12	23.0	745	비육	02/09/12 출하	
5	812	암	00/10/17	25.0	721	번식우		H
6	816	암	00/11/14	19.0	731	번식우		H
7	817	암	00/11/23	22.0	734		01/01/25 폐사	
8	823	암	00/12/28	17.0	756	비육	02/09/12 출하	
9	826	암	01/1/6	22.0	753	번식우		H
10	831	암	01/6/25	21.0	743	번식우		H
11	832	암	01/8/5	25.0	686	번식우		H
12	833	암	01/8/11	23.0	62	번식우		H
13	834	암	01/8/14	24.0	716	번식우	쌍태	
14	837	암	01/8/26	24.0	703	번식우	쌍태	H
15	839	암	01/9/19	25.0	766	번식우		H
16	840	암	01/10/21	27.0	757	번식우		H
17	843	암	01/12/11	32.0	699	번식우		
18	848	암	01/12/19	28.0	765	번식우		
19	852	암	02/1/20	28.0	86	번식우		H
20	854	암	02/1/26	29.0	769	번식우		
21	855	암	02/1/30	28.0	774	번식우		H
22	856	암	02/1/30	27.0	694	번식우		H
23	857	암	02/2/6	32.0	2385	번식우		
24	864	암	02/2/16	28.5	698	번식우		
25	866	암	02/2/25	25.5	779	번식우		H
26	868	암	02/3/28	29.0	775	번식우		
27	872	암	02/4/23	31.5	780	번식우		H
평균				25.3				
표준편차				3.9				

Table 6. 교잡우 암소의 개체관리 현황

## 카. F1의 능력검정

### 1) 연구 목표

기능성 물질 CPP H의 대량생산을 위하여, H 유전자를 소유한 한우 종모우와 일반 홀스타인 젖소사이에서 생산된 F1의 사육성적의 확보 및 유 생산 가능성을 점검하여, CPP H를 함유한 우유를 대량 생산하기 위한 사육 체계를 개발하는데 그 목적이 있다.

### 2) 재료 및 방법

#### 가) 공시축

건국 대 과주 종합 실습목장에서 사육 중인 홀스타인 착유우를 대상으로, CPP-H 유전자 보유의 한우 종모우 2두와의 자연 교배를 통하여 2000년 9월부터 2002년 5월 까지 생산된 송아지 62 두(수 35두, 암 27두)를 대상으로 하였다.

#### 나) 시험기간

생산된 F1 송아지는 생후부터 사육관리를 진행, 본 연구의 마감 시점인 2003년 7월 초 까지 자료 수집을 진행하였다.

#### 다) 사양관리

생산된 F1 송아지는 모유를 이용한 포유(생 후 6-8주 령 까지)후, 일반 상업용 배합 사료(어린 송아지 사료 및 중 송아지 사료)의 제한 급여 (일일 약 3kg/두)와 조사료 (3개월 령 까지는 알팔파 베일 , 이후 티모시 짚)의 자유 급여를 통하여 생 후 6개월 령 까지 사육되었다.

태어난 송아지는 유전자 감식을 통하여 CPP-H 보유 여부를 확인 한 후, 성에 따라 그 사육 목적을 결정, 6개월 령 이 후부터, 각각의 사육 목적에 맞도록 사육 되었으며, 이용된 사료는 각 가축의 사육 목적에 따라 상업용 배합사료 (육성/근소 비육 사료 및 큰 송아지 사료)와 조사료 (이탈리안 라이그라스 짚)을 급여 하였다. 시험에 이용된 사료 (배합사료 및 조사료)의 영양소 함량은 (Table 7)에 나타나 있다.

		함량 (% 풍건)						
		조단백	조지방	조섬유	조회분	칼슘	인	TDN
배합 사료	어린 송아지	16	2	10	9	0.5	0.3	69
	중송아지	15	1.5	10	9	0.5	0.3	69
	큰송아지	13	1.5	10	10	0.6	0.4	68
	육성비육	14	1.5	15	10	0.6	0.4	69
	큰소비육	12	1.5	15	10	0.6	0.3	70
조사료	알팔파 건초*	20.27	0.38	20.1	14.1			
	티모시 짚*	4.25	0.61	33.27	6.68			

Table 7. 이용사료의 성분함량

\*분석치. 그 외는 등록치(조단백, 조지방, 칼슘, 인, TDN: 이상, 조섬유, 조회분: 이하)

송아지의 사육은 포유 기간 동안은 개체별 사양 틀에서 사육 되었으며, 이유 후 3개월 령에 이르기 까지는 송아지 우사에서 각 우리 (2\*3M) 당 2두 씩 사육 되었다. 3개월 령 이 지난 후 부터는 육성우사로 이동되어, 각 우리(5\*10M) 당 6-8두 씩 사육 되었다.

CPP-H 유전자 비 보유의 암, 수송아지는 비육 목적으로 배합사료 자유 급여체 제(조사료 제한 급여)로 사육, 일부는 출하 되었으며, CPP-H 유전자 보유의 암, 수 송아지는 번식을 목적으로 배합사료 제한 급여체제(조사료 자유 급여)로 사육되었다. CPP-H 유전자 보유의 암 송아지는 18개월 령에 이르러, 선정된 CPP-H 유전자 보유의 수송아지와의 계획 교배를 통하여 F2를 생산하였으며, 분만 후 과주 종합실습목장의 착유우 관리 프로그램에 의해 관리 되었다.

#### 라) 주요 조사항목

- . 체중 ; 각 개체의 체중은 생 시 와 3개월 령 이 후부터 매 4주 마다, 배합사료 급여 전 오전 10시에 측정 하였다.
- . 사료 섭취량 ; 배합사료 및 조사료는 각 우방 별로 일일 1회 (오전 11시) 급여하였으며, 급여 전 잔량을 측정하여, 매 2주 단위로 두 당 일일 평균 섭취량을 추정하였다.
- . 질병 발생 상황 ; 각 개체의 질병 발생 상황을 육안 적 관찰에 의해 기록, 필요 시 수의사 진단을 통하여, 관리하였다.
- . 유량 ; 분만 후 일일 유 생산은 알파라벨 착유 시스템을 통하여, 오전 오후 생산량이 개체 별 로 기록 되었다.
- . 도체 성적; 비육 목적으로 사육된 개체는 비육이 완료된 후, 도축장으로 출하되어 일 반적으로 관행되는 도체 등급(육량 및 육질)으로 판정 되었다.

### 3) 결과 및 고찰

#### 가) F1 생산 현황

건국 대 파주 종합실습목장의 착유우 80두를 대상으로, CPP-H 유전자 보유의 한우 종모우 2두와 자유교배한 결과, 총 62두의 송아지가 생산되었으며, 이 중 수송아지가 35두, 암 송아지가 27두로 나타났다. 수 송아지의 평균 체중은  $28.2 \pm 4.9\text{kg}$  이며, 암 송아지의 평균체중은  $25.3 \pm 3.9\text{kg}$ 으로 수송아지보다 약 3kg 정도 적은 것으로 나타났다

태어난 송아지 중 3두는 시험기간 중 도태 및 폐사 되었으며, 그 이유는 다리부상등으로 인한 사고사 이었으며, 설사등 기타 질병에 의한 것은 아니었다.

#### 나) 발육 형질

생산된 송아지는 CPP-H 유전자의 보유 여부 및 성에 따라, 4가지 형태의 사육 목적(수-비육, 암-비육, 수-번식, 암-번식 및 )으로 분류, 사육되었으며 발육 형질은 다음과 같이 나타난다.

##### (1) 수-비육

생산된 송아지 중 총 31두가 비육 목적으로 사육 되었으며, 이 중 9두는 정상적인 비육이 완료되어 2차에 걸쳐 출하되었으며, 구체적인 내용은 (Table 8)에 나타나 있다.

0-3개월령의 31두를 대상으로 어린 송아지 시기의 사육성적은 일일 증체는  $0.64\text{kg/일}$ 으로 나타났다.

육성시기 (3-6개월령)의 일일 증체는  $0.96\text{kg}$  이며, 이때 배합사료의 평균 일일 섭취량은  $2.89\text{kg}$ , 조사료의 평균 일일 섭취량은  $1.18\text{kg}$ 으로, 총 사료 섭취량은  $4.07\text{kg}$  나타났다. 총 31두의 평균 체중은  $132\text{kg}$ 으로, 총 사료 건물 섭취량은 체중의 2.8% (각 사료의 수분함량 10% 가정 시,  $= (4.07 * 0.9 / 132)$ ) 정도인 것으로 추정되며, 이 기간의 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로  $3.82\text{kg} (= (4.07 * 0.9) / 0.96)$ 으로 다소

높은 결과를 나타내었다. 0-6개월 령의 일일 증체는  $0.80\text{kg/일}$ 로써, 홀스타인 수송아지 및 교잡우 수송아지의 일일 증체인  $0.75\text{kg/일}$ 에 비해 다소 높은 것으로 나타났다.

이 후 6-12개월 령의 성적은 일일 증체  $0.97\text{kg/일}$ 으로, 비교적 높은 것으로 나타났다. 총 사료의 평균 일일 섭취량은  $7.21\text{kg/일}$  (배합사료  $4.88\text{kg/일}$ , 조사료  $2.33\text{kg/일}$ )으로, 이 기간의 평균 체중 ( $261\text{kg}$ )을 고려 시, 총 사료의 건물 섭취량은 체중의

2.5% $(=(7.21*0.9)/261)$ , 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 6.69kg $(=(7.21*0.9)/0.97)$ 으로 나타났다.

12-18개월 령의 일일 증체는 1.08kg으로써, 이는 주로 배합사료의 섭취량 증가(9.83kg/일)에 기인 한 것으로 판단된다. 이 시기의 조사료 섭취는 위축되어 일일 1.61kg으로 나타나, 전체 사료 섭취량은 11.44kg  $(=9.83+1.61)$ 으로, 이 시기의 평균 체중 448kg 고려 시 건물기준으로 체중의 2.3% $(=(11.44*0.9)/448)$ 로 나타났다. 이 시기의 높은 증체량은 이용되는 배합사료의 이용량 증가에 기인 한 것으로 나타난다. 이 기간 동안의 사료효율은 9.53 $(=(11.44*0.9)/1.08)$ 으로 나타났다.(Fig 44.)

이 후 18-24개월 령의 기간에는 일일 증체가 1.03kg로 나타났으며, 사료 섭취량은 12.65kg (배합사료 11.66kg, 조사료 0.99kg)으로, 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 11.05 $(=(12.65*0.9)/1.03)$ 로 나타난다. 이 기간의 평균 체중은 596kg으로 사료 건물 섭취량은 체중의 1.9% $(=(12.65*0.9)/596)$ 으로 나타나, 비육이 진행 될 수록 체중 대비 사료 섭취량은 감소하며, 증체를 위한 사료 효율 또한 저하되는 것으로 나타난다. 이 시기에 목격된 일일 증체 (1.03kg)는 다소 높은 것으로 추정된다.



Fig 44. 검정 사육중인 F1



항목	생후 월령					
	0-3	3-6	6-12	12-18	18-24	24 이후
대상 두수 (두)	31	31	31	20	14	
이용 배합사료	어린 송아지	중 송아지	육성비육	큰소비육	큰소비육	
개시 체중* (kg)	평균	29	87	175	351	538
	최소	21	65	142	289	476
	최대	45	117	222	436	615
평균 체중	평균	54	132	261	448	596
	최소	43	99	212	399	516
	최대	73	163	328	510	670
일일 증체 (kg/일)	평균	0.64	0.96	0.97	1.08	1.03
	최소	0.44	0.65	0.54	0.86	0.71
	최대	0.83	1.38	1.18	1.34	1.31
농후사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		2.89	4.88	9.83	11.66
	최소		2.00	3.38	7.80	10.74
	최대		4.00	9.54	12.39	12.50
조사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		1.18	2.33	1.61	0.99
	최소		0.89	1.67	1.00	0.48
	최대		1.69	2.79	2.64	1.43
사료 섭취량 (건물기준, 체중 %)			2.80	2.50	2.30	1.90
사료 효율 (사료 건물 kg/kg 증체)			3.82	6.69	9.53	11.05

Table 8 수-비육의 기간별 조사항목

(2) 암-비육

생산된 송아지 중 총 5두가 비육목적으로 사육 되어, 시험 종료 이전 모두 출하되었으며. 그 사육 결과는 (Table 9.)에 표시 되어 있다.

0-3개월령의 사육성적은 일일 증체는 0.56kg/일 같은 시험에서의 수송아지 (비육 0.64kg/일, 번식 0.61kg/일)에 비하여 낮은 것으로 나타났다.

육성시기(3-6개월령)의 일일 증체는 0.92kg 이며, 이때 배합사료의 평균 일일 섭취량은 3.57kg/일, 조사료의 평균 일일 섭취량은 1.29kg으로, 총 사료 섭취량은 4.86kg/일로 나타났다. 총 5두의 평균 체중은 117kg으로, 총 사료 건물 섭취량은 체중의 3.7% (각 사료의 수분함량 10% 가정 시, = (4.86\*0.9)/117)정도인 것으로 추정되며, 이 기간의 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 4.75kg(=(4.86\*0.9)/0.92)으로 나타나, 같은 시

협의 수송아지-비육(3.82kg)과 비교 시, 사료 효율이 떨어지는 것으로 나타났다.

0-6개월 령의 일일 증체는 0.74kg/일으로써, 홀스타인 암송아지(0.69kg/일) 및 교잡우 암송아지(0.71kg/일)에 비해 다소 높은 것으로 나타나나, 이 시기 사료 섭취량의 자료 부재로 직접적인 원인파악은 불가능하며, 배합사료의 섭취량 차이 혹은 이용 조사료의 품질 차이에 의한 섭취량 차이 등에 따른 영양소 섭취량의 차이가 원인일 것으로 추정된다.

이 후 6-12개월 령의 성적은 일일 증체 0.78kg/일이며, 총 사료의 평균 일일 섭취량은 7.41kg/일 (배합사료 4.19kg/일, 조사료 3.22kg/일)으로, 이 기간의 평균 체중 (235kg)을 고려 시, 총 사료의 건물 섭취량은 체중의 2.8%( $= (7.41 \times 0.9) / 235$ ), 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 8.55kg( $= (7.41 \times 0.9) / 0.78$ )으로 사료 효율이 다소 우수한 것으로 나타났다.

12-18개월 령의 일일 증체는 0.59kg/일으로써, 이는 낮은 배합사료의 섭취량(6.01kg/일)에 기인한 것으로 판단된다. 이 시기의 조사료 섭취는 일일 3.38kg으로 나타나, 전체 사료 섭취량은 9.39kg( $= 6.01 + 3.38$ )으로, 이 시기의 평균 체중 350kg 고려 시 건물기준으로 체중의 2.4%( $= (9.39 \times 0.9) / 350$ )로 나타났다. 이 시기부터는 약간 떨어지는 경향을 보이고 있다.

이 후 18-24개월 령의 기간에는 일일 증체가 0.78kg로 나타났으며, 사료 섭취량은 10.2kg (배합사료 9.20kg, 조사료 1.00kg)으로, 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 11.76( $= (10.2 \times 0.9) / 0.78$ )로 나타난다. 이 기간의 평균 체중은 477kg으로 사료 건물 섭취량은 체중의 1.9%( $= (10.2 \times 0.9) / 477$ )로 나타났다. 이 결과는 사료의 영양소 농도의 차이에 기인할 것으로 추정된다.

항목		생 후 월령					
		0-3	3-6	6-12	12-18	18-24	24 이후
대상 두수 (두)		5	5	5	5	5	
이용 배합사료		어린 송아지	중 송아지	육성비육	큰소비육	큰소비육	
개시 체중* (kg)	평균	21	72	156	299	405	
	최소	17	59	141	279	377	
	최대	24	81	178	310	452	
평균 체중	평균	42	117	235	350	477	
	최소	38	102	217	328	455	
	최대	46	135	249	366	495	
일일 증체 (kg/일)	평균	0.56	0.92	0.78	0.59	0.78	
	최소	0.38	0.86	0.65	0.44	0.09	
	최대	0.77	0.99	0.89	0.85	0.98	
농후사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		3.57	4.19	6.01	9.20	
	최소		3.37	4.06	5.36	8.72	
	최대		3.96	4.55	7.84	9.35	
조사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		1.29	3.22	3.38	1.00	
	최소		1.08	2.87	2.26	1.00	
	최대		2.00	3.93	3.77	1.00	
사료 섭취량 (건물기준, 체중 %)			3.70	2.80	2.40	1.90	
사료 효율 (사료 건물 kg/kg 증체)			4.75	8.55	14.32	11.76	

Table 9. 암-비육의 기간별 조사항목

### (3) 수-번식

생산된 송아지 중 총 4두가 번식 목적으로 사육 되었으며, 구체적인 성적은 (Table 10.)에 나타나있다.

0-3개월령 기간의 4두의 평균 일일 증체는 0.61kg/일로 나타났다.

3-6개월령의 일일 증체는 0.96kg 이며, 이때 배합사료의 평균 일일 섭취량은 3.16kg, 조사료의 평균 일일 섭취량은 1.14kg으로, 총 사료 섭취량은 4.3kg 나타났다. 4두의 평균 체중은 128kg으로, 총 사료 건물 섭취량은 체중의 3.0% (각 사료의 수분함량 10% 가정 시, = (4.3\*0.9/128))정도인 것으로 추정되며, 이 기간의 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 4.03kg=(4.3\*0.9)/0.96)으로 나타난다 .

0-6개월 령의 일일 증체는 0.78kg/일로써, 홀스타인 수송아지 및 교잡우 수송아지의 일일 증체인 0.75kg/일에 비해 다소 높은 것으로 나타났다.

이 후 6-12개월 령의 성적은 일일 증체 1.13kg/일로, 홀스타인 0.75kg, 교잡우

0.79kg와 비교 시, 다소 높은 것으로 나타난다. 총 사료의 평균 일일 섭취량은 8.27kg/일 (배합사료 5.71kg/일, 조사료 2.56kg/일)으로, 이 기간의 평균 체중 (270kg)을 고려 시, 총 사료의 건물 섭취량은 체중의 2.8%( $= (8.27 * 0.9) / 270$ ), 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 6.59kg( $= (8.27 * 0.9) / 1.13$ )으로 홀스타인 및 교잡우보다 사료 효율이 우수한 것으로 나타났다.

12-18개월 령의 일일 증체는 1.04kg, 일일 배합사료의 섭취량은 10.27kg/일, 조사료 섭취량은 일일 1.75kg으로 나타나, 전체 사료 섭취량은 12.02kg ( $= 10.27 + 1.75$ )으로, 이 시기의 평균 체중 482kg 고려 시 건물기준으로 체중의 2.2%( $= (12.02 * 0.9) / 482$ )로 나타났다. 이 시기의 높은 증체량은 홀스타인 1.07kg/일, 교잡우 1.11kg/일과 거의 동일하다.

이 후 18-24개월 령의 기간에는 일일 증체가 0.59kg로 나타났으며, 이러한 저하의 원인은 번식 목적의 사육을 위하여, 배합사료의 이용량을 감소시킨데 기인한다. 일일 평균 사료 섭취량은 10.31kg (배합사료 5.67kg, 조사료 4.64kg)으로, 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 15.7kg( $= (10.31 * 0.9) / 0.59$ )로 나타난다. 이 기간의 평균 체중은 604kg으로 사료 건물 섭취량은 체중의 1.5%( $= (10.31 * 0.9) / 604$ )으로 나타나, 같은 시기의 수-비육의 체중의 1.9%에 비해 낮은 것으로 나타났으며, 이는 사료의 구성(조사료 함량의 증가)이 건물 섭취량에 영향을 끼치는 것을 나타내었다. 이 시기에 목격된 일일 증체 (0.59kg)는 홀스타인 일일 증체 0.88kg, 교잡우 일일증체 0.84kg 와 비교 시, 낮은 것으로 나타나, 이는 배합사료 이용량의 감소에 의한 것으로 판단된다.

24개월 령 이 후의 사육 성적은 2두에 국한되며, 이 시기의 일일 증체는 0.21kg, 일일 평균 사료 섭취량은 10.41kg(배합사료 5.37kg, 조사료 5.04kg)로써, 증체를 위한 사료 효율은 44.61kg( $= (10.41 * 0.9) / 0.21$ )로 나타나며, 이는 이용되는 사료가 거의 현 체중 유지에 사용되었음을 나타낸다. 2두의 평균체중이 744kg임으로, 이 시기의 전체사료의 섭취량은 체중의 1.3%( $= (10.41 * 0.9) / 744$ )로 나타난다.

항목	생 후 월령						
	0-3	3-6	6-12	12-18	18-24	24 이후	
대상 두수 (두)	4	4	4	4	4	2	
이용 배합사료	어린 송아지	중 송아지	큰송아지	큰송아지	큰송아지		
개시 체중 (kg)	평균	25	80	167	373	563	722
	최소	24	75	144	350	526	719
	최대	25	85	181	396	583	725
평균 체중 (kg)	평균	43	128	270	482	604	744
	최소	32	112	239	443	535	739
	최대	50	137	296	506	655	750
일일 증체 (kg/일)	평균	0.61	0.96	1.13	1.04	0.59	0.21
	최소	0.55	0.75	1.05	0.97	0.36	0.11
	최대	0.66	1.14	1.18	1.19	0.77	0.31
농후사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		3.16	5.71	10.27	5.67	5.37
	최소		2.32	4.56	9.27	5.00	5.34
	최대		3.78	7.09	11.65	6.90	5.40
조사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		1.14	2.56	1.75	4.64	5.04
	최소		0.72	2.18	1.01	4.04	5.03
	최대		1.39	2.78	2.10	5.00	5.04
사료 섭취량 (건물기준, 체중 %)			3.00	2.80	2.20	1.50	1.30
사료 효율 (사료 건물 kg/kg 증체)			4.03	6.59	10.40	15.70	44.61

Table 10. 수-번식의 기간별 조사항목

#### (4) 암-번식

생산된 송아지 중 총 21두가 번식목적으로 사육 중 이며, 이 중 3두가 시험기간 중 분만, 착유가 진행되었다. 사육기간 동안의 구체적 성적은 (Table 11.)에 나타나 있다.

0-3개월령의 사육성적은 일일 증체는 0.57kg/일 같은 시험에서의 수송아지 (비육 0.64kg/일, 번식 0.61kg/일)에 비하여 낮은 것으로 나타났다.

육성시기(3-6개월령)의 일일 증체는 0.77kg 이며, 이때 배합사료의 평균 일일 섭취량은 2.77kg/일, 조사료의 평균 일일 섭취량은 1.34kg으로, 총 사료 섭취량은 4.11kg으로 나타났다. 총 21두의 평균 체중은 116kg으로, 총 사료 건물 섭취량은 체중의 3.2% (각 사료의 수분함량 10% 가정 시, = (4.11\*0.9)/116)정도인 것으로 추정되며, 이 기간의 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 4.80kg(=(4.11\*0.9)/0.77)으로 나타나, 같은 시험의 수송아지-비육(3.82kg) 및 수송아지-번식 (4.03kg)과 비교 시, 사료 효율이 낮은 것으로 나타났다.

0-6개월 령의 일일 증체는 0.68kg/일이다.

이 후 6-12개월 령의 일일 증체 0.70kg/일이며, 총 사료의 평균 일일 섭취량은 6.62kg/일 (배합사료 3.47kg/일, 조사료 3.15kg/일)으로, 이 기간의 평균 체중 (218kg)을 고려 시, 총 사료의 건물 섭취량은 체중의 2.7% $(=(6.62*0.9)/218)$ , 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 8.51kg $(=(6.62*0.9)/0.70)$ 으로 나타나, 암-비육의 경우(2.8%, 8.55kg)와 유사하게 나타났다.

12-18개월 령의 일일 증체는 0.53kg으로써, 이는 번식 목적의 사육을 위하여 배합사료의 섭취량을 낮게 유지(4.13kg/일)한 것에 기인 한 것으로 판단된다. 이 시기의 조사료 섭취는 일일 4.29kg으로 나타나, 전체 사료 섭취량은 8.42kg $(=4.13+4.29)$ 으로, 이 시기의 평균 체중 335kg 고려 시, 건물기준으로 체중의 2.3% $(=(8.42*0.9)/335)$ 로 나타났다.

이 후 18-24개월 령의 기간에는 일일 증체가 0.54kg로 나타났으며, 사료 섭취량은 9.82kg (배합사료 4.92kg, 조사료 4.90kg)으로, 증체를 위한 사료 효율은 건물 기준으로 16.37 $(=(9.82*0.9)/0.54)$ 로 나타난다. 이 기간의 평균 체중은 452kg으로 사료 건물 섭취량은 체중의 2.0% $(=(9.82*0.9)/452)$ 으로 나타났다.

24개월 령 이 후의 성적은 2두를 대상으로 파악되었으며, 이 시기의 일일 증체는 0.4kg, 전체 사료 섭취량은 10kg(배합사료 5kg, 조사료 5kg)으로, 사료 효율은 22.5kg $(=(10*0.9)/0.4)$ 로 나타났다. 이 시기의 평균체중이 565kg임을 고려 시, 사료의 건물섭취량은 체중의 1.6% $(=(10*0.9)/565)$ 로 나타났다.

항목	생 후 월령						
	0-3	3-6	6-12	12-18	18-24	24 이후	
대상 두수 (두)	21	21	21	17	7	2	
이용 배합사료	어린 송아지	중 송아지	큰송아지	큰송아지	큰송아지	큰송아지	
개시 체중 (kg)	평균	26	78	149	277	386	536
	최소	19	62	126	214	319	491
	최대	32	94	181	339	455	582
평균 체중 (kg)	평균	49	116	218	335	452	565
	최소	39	101	175	286	395	558
	최대	59	142	262	383	520	572
일일 증체 (kg/일)	평균	0.57	0.77	0.70	0.53	0.54	0.40
	최소	0.47	0.41	0.43	0.26	0.28	0.21
	최대	0.75	1.08	0.89	0.80	0.79	0.60
농후사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		2.77	3.47	4.13	4.92	5.00
	최소		2.07	2.96	3.66	4.69	5.00
	최대		3.76	4.58	5.00	5.00	5.00
조사료 섭취량 (kg/일/두)	평균		1.34	3.15	4.29	4.90	5.00
	최소		0.93	2.19	4.02	4.74	5.00
	최대		2.26	3.96	4.68	5.00	5.00
사료 섭취량 (건물기준, 체중 %)			3.20	2.70	2.30	2.00	1.60
사료 효율 (사료 건물 kg/kg 증체)			4.80	8.51	14.30	16.37	22.50

Table 11. 암-번식의 기간별 조사항목

다) 도체 형질

전체 사육 두 수 중 총 14두가 3차례에 걸쳐 출하되었으며, 그 도체 성적은 (Table 12.)에 나타냈다.

육량등급에 대하여는 수소가 암소에 비해 다소 높게 나타났으며, 이는 수소가 암소에 비해 등지방 두께가 얇고, 등심단면적이 넓은데 기인한다고 보며 이외에 지방색, 조직감, 성숙도 등은 정상적이었으며 전체적으로 나타난 낮은 육질 등급은 등지방 두께를 기준 시, 암·수 모두 비육이 아직 완성되지 않은 상태였기 때문으로 추정된다. 특히 육색, 지방색등은 매우 우수한 편이며 단지 전체적으로 지방이 적다는 것이 단점으로 나타나고 있다. 그러나, 수소는 모두 비거세우였으며, 성숙도가 완전치 못한 개체였기 때문에 지방의 부족은 앞으로 비육시기 및 후기사료를 조정함으로써 개선될 것이라고 기대된다.

판정일자	도축일자	도축 번호	생체중	성별	등지방	등심 단면적	도체중	육량 지수	육량 등급	근내 지방도	1차 등급	육색	지방색	조직감	성숙 도	육질 등급	최종 등급
03.04.28	03.04.26	111	620	수	2	81	340	69.45	A	1		5	2	2	2	3	A3
03.04.28	03.04.26	112	630	수	2	78	344	69.16	A	1		5	2	2	2	3	A3
03.04.28	03.04.26	113	610	수	2	80	347	69.31	A	1		5	2	2	2	3	A3
03.04.28	03.04.26	114	570	수	2	81	323	69.59	A	1		5	2	2	2	3	A3
02.07.02	02.06.29	115	620	수	3	83	358	69.09	A	1	3	5	2	2	2	3	A3
02.07.02	02.06.29	116	580	수	2	80	331	69.44	A	1	3	4	2	2	2	3	A3
02.07.02	02.06.29	117	620	수	4	68	334	67.57	B	1	3	4	2	2	2	3	B3
02.07.02	02.06.29	118	650	수	4	82	373	68.49	B	1	3	4	2	2	2	3	A3
02.07.02	02.06.29	119	540	수	2	79	297	69.62	A	1	3	5	2	2	2	3	A3
02.09.14	02.09.13	233	520	암	8	82	286	67.61	B	2	2	4	2	2	2	2	B2
02.09.14	02.09.13	234	540	암	4	71	283	68.24	B	1	3	4	2	2	3	3	B3
02.09.14	02.09.13	235	520	암	7	81	289	67.89	B	1	3	4	2	2	2	3	B3
02.09.14	02.09.13	236	540	암	4	85	299	69.35	A	1	3	4	2	2	2	3	B3
02.09.14	02.09.13	237	450	암	8	70	239	66.93	B	1	3	5	3	2	2	3	B3

Table 12. 출하된 F1의 도체 성적

라) 산유 형질

본 연구를 통하여 생산된 F1 9두의 분만 후 현황 및 산유 성적은 (Table 13.)에 나타나 있다. 또한

산유량은 799번의 경우 최대 일일 16.6kg 11.4kg, 13.6kg, 13.7kg, 13.4kg, 11.7kg 등이었으며 특히 812번 및 800번 2두는 최초에는 타 개체와 동일하게 비유가 시작되었으나 착유 3,4일 후 즉시 우군 이동을 통하여 받은 스트레스로 인해 유량이 급격하게 감소되었다. 특히 826번 개체는 분만일로부터 8kg의 비유량을 나타내었으나(다른 개체는 분만일에 보통 2,3 - 5kg의 비유량) 그 이후 스트레스에 의해 급감하는 현상을 나타내어 매우 아쉬운 감이 있다. 그러나 이 개체는 2산에 그 능력이 기대된다. 그래서 본연구의 비유량 성적에는 이 세 마리 개체를 제외한 6두의 유생산량만을 비교, 검토 하였다.



이 3개체를 제외한 6두의 1일 평균 유생산량은 10.1kg으로써 이는 한우의 유생산량을 하루 평균 약 1~1.5kg으로 볼 때 약 5~10배에 가까운 수치를 나타내고 있다.

이 성적은 이들 9마리의 시험군의 F1 어미들은 초산 성적이다. 이들 성적은 2산에서 부터 유생산량은 더욱 증가될 것으로 기대되어 유생산량에서는 성공적인 결과라고 고찰된다. 일반 우유와는 다른 CPP H를 함유한 우유라는 점에서 CPP H를 대량 생산할 수 있다는 점으로 보아 기대효과가 크다.

개체번호	812	826	799	800	809	810	813	815	816
분만일	03.03.19	03.02.16	03.03.12	03.03.22	03.03.16	03.03.20	03.03.09	03.03.30	03.04.14
최대비유량	3.3	7.9	16.6	8.2	13.8	13.6	13.8	13.4	11.7
평균비유량	-	-	12.9	-	8.89	9.62	11.4	9.11	8.7

Table 13. 분만우에 대한 현황 및 산유성적

마) 질병 발생 조사

본 시험의 기간 동안, 총 3두의 폐사가 발생하였으며, 이에 대한 원인으로서는 다리 부상으로 인한 도태가 2두, 송아지 시기의 원인 모를 이유로 인한 폐사가 1두 발생한 것을 제외하고는, 특이한 질병의 발생이 목격되어지지 않았다. 총 대상 두수가 62두인 관계로, 결론 짓기는 어려우나, 본 시험을 통하여 생산된 F1은 질병에 대한 저항력이 높은 것으로 사려된다.

## 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점

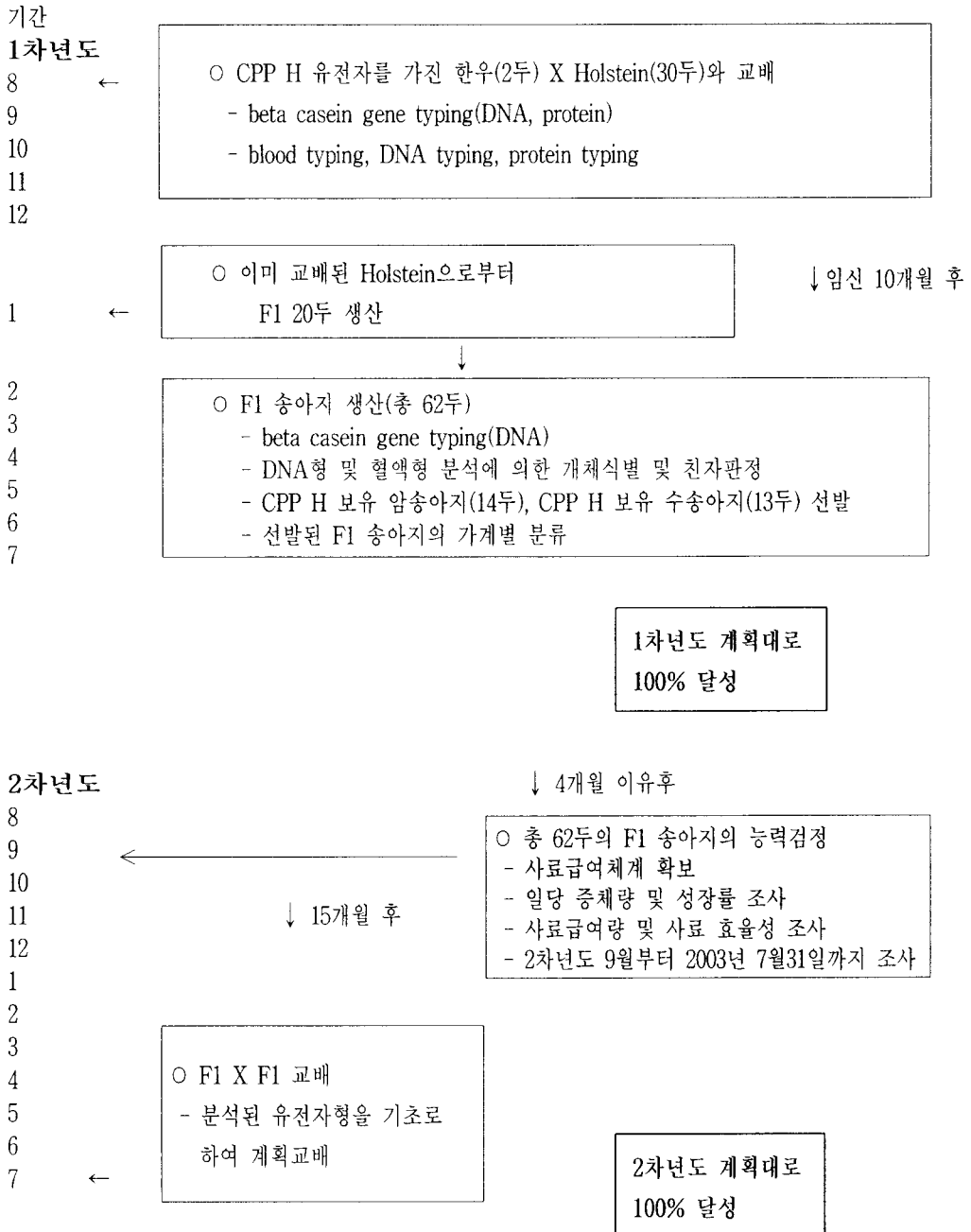
#### 1. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 ( 2000 )	○ CPP H를 소유한 F1의 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한우 수소 20두 선발</li> <li>- PCR-RFLP법에 의한 CPP H형 분석</li> <li>- CPP H형의 한우 수소 선발</li> <li>○ 종빈우로 이용될 Holstein 암소 30두 선발</li> <li>- 각 종빈우의 <math>\beta</math>-casein type을 분석</li> <li>- <math>\beta</math>-casein type별로 30두 선발</li> <li>○ 선발된 종모우 및 종빈우의 개체식별</li> <li>- 혈액단백질 좌위 분석</li> <li>- 유즙단백질 좌위 분석</li> <li>- Microsatellite 좌위 분석</li> <li>○ F1의 생산</li> <li>- 한우 수소와 Holstein 암소의 교배</li> <li>- 이미 교배된 20두의 종빈우로부터 F1 송아지 생산</li> <li>- CPP H 유전자 보유여부 확인</li> <li>- CPP H를 보유한 암송아지, 수송아지 및 CPP H 유전자를 보유하지 않은 집단으로 분류</li> </ul>
	○ 능력검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생산된 F1 30두의 능력검정</li> <li>- 평균 사료섭취량 조사</li> <li>- 평균 증체량 조사</li> <li>- 평균 사료효율 조사</li> <li>- 질병(설사발생빈도) 조사</li> </ul>
2차 년도 ( 2001 )	○ F1간의 교배	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ F1의 개체식별 및 친자판정을 통한 유전자형별 가계설정</li> <li>- 혈액단백질 좌위 분석</li> <li>- 유즙단백질 좌위 분석</li> <li>- Microsatellite 좌위 분석</li> <li>○ 생산된 F1에서 CPP H가 함유된 우유를 착유하기 위하여 F1간의 교배를 실시</li> <li>- CPP H를 소유한 F1 암소와 수소의 교배</li> <li>- 생산된 F1의 DNA형 분석, CPP H 유전자 확인</li> <li>- F1의 개체식별 및 친자판정</li> <li>- 개체의 친자관계를 조사 하여 가계설정</li> <li>- F1의 증체량, 사료효율성 능력검정</li> </ul>
3차 년도 ( 2002 )	○ CPP H의 대량 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 임신한 F1으로부터 F2 송아지를 생산한 후 CPP H가 함유된 우유를 대량생산</li> <li>- F1으로부터 착유를 실시</li> <li>- 착유된 우유의 유즙 단백질형 확인</li> <li>- F1 암소의 산유량 및 질병저항성 능력검정</li> <li>- 무기이온 침전법에 의한 CPP H의 정제</li> <li>- F1의 육질에 대한 능력검정</li> <li>- 다음 세대를 위한 우수한 계통을 선발</li> <li>- CPP H의 대량생산을 위한 상품화계통을 확보</li> </ul>

## 2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도( 2000 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Beta casein gene typing (DNA)</li> <li>○ Beta casein gene typing (Protein)</li> <li>○ 한우(22두)X Holstein(50두)교배 후 송아지(F1) 50두 생산 (CPP H)확인</li> </ul>	20 20 60
2차년도( 2001 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자형별 가계 분류 및 FIXF1계획 교배</li> <li>○ 사료급여체계 확보</li> <li>○ 일당 증체량 및 성장률 조사</li> <li>○ 사료급여량 및 사료 효율성 조사</li> </ul>	40 10 30 20
3차년도( 2002 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ F2 생산</li> <li>○ F1 암소에서 착유 (CPP H 확인)</li> <li>○ 유생산 능력검정- 일당 산유량 측정</li> <li>○ F1수소의 도축 및 육질 판정</li> </ul>	40 30 20 10

## 제2절 연구개발 목표달성도



3차년도

8  
9  
10  
11  
12  
1  
2  
3  
4 ←  
5  
6  
7

↓ 교배 후 10개월

- F2 생산(총 9두)
  - beta casein gene typing(DNA)
- F2 송아지를 생산한 어미소
  - F1 9두로부터 착유
  - beta casein typing(CPP H 확인)
  - CPP-H 유전자의 유전양식이 정상적인 공우성의 대립유전자임을 재확인
  - CPP H의 대량생산 및 정제

- CPP-H 물질이 함유된 우유 생산 확인
- CPP-H를 함유한 우유를 생산하는 각 개체의 능력검정 (F1 9마리의 일당산유량 측정)
- F1의 능력검정
  - 총 F1 62두의 능력검정
- F1 수소의 도축 및 육질 판정

3차년도 계획대로  
100% 달성

- ① CPP-H의 대량 생산 체제 기반구축 성공
- ② 한우와 Holstein 종의 교배에서 태어난 F1에서 기능성물질 CPP-H가 대량생산 되는 것을 확인
- ③ F1 수소의 능력검정인 육질판정결과, 육질이 우수한 경향을 확인
- ④ 질병 저항성의 검정결과 F1은 62두 전체 질병에 대한 저항성이 높게 평가됨
- ⑤ 이상의 결과로 유육검용종의 신품종 개발의 가능성이 높게 사료됨

## 제5장 연구개발 결과의 활용계획

### 1. 동물공장을 통한 CPP H의 대량생산

- 지금까지의 축산은 식품단백질의 생산 위주였으나 국제화, 개방화 시대에 대비한 국제경쟁력 제고를 위하여 생명공학의 첨단 기술을 이용하여 기능성 단백질의 생산체계를 동물공장 형태로 개발하여 미래 지향적 축산산업으로 전환하여야 한다.
- 미생물이나 화학적 합성 방법에 의한 신물질 개발은 안정성, 비용 면에서 그 효율이 떨어진다. 따라서, 축산분야에서 안정성이 높고 독성이 없으며 생산비가 저렴한 동물공장을 통하여 천연의 기능성 물질을 대량생산하는 기술의 개발이 요구된다고 연구과제 계획서에서 언급하였다.
- 본 연구 개발 결과 연구 계획서에서 언급한 대로 DNA의 marker를 이용한 분자육종의 새로운 기술을 창출하여 기능성 peptide의 대량생산 체계를 확립하는데 성공하였다.
  - 본 연구에서 특정 gene(CPP H)을 이용하여 기능성의 물질을 대량생산하는 방법으로서 품종이 가지고 있는 특이한 유전자의 변이체를 이용하여 기능성 물질을 탐색한 후 유량이 많은 Holstein 품종과 교배하여 특정한 물질을 대량생산하는 것이다. 즉, 한우의 CPP H gene을 Holstein에 도입(gene introgression) 함으로서 기능성 물질을 대량생산하는 것이다.
- 동물산업분야에서 유전자를 변형한 형질전환 동물을 이용하여 신물질을 개발하고 있으나 이 방법은 독성, 안정성, 부작용등의 검증기간이 길어 실용화 단계에서의 문제점이 제기되고 있다. 특히 유전적으로 형질을 전환하는 방법은 차세대에 유전하지 않는 어려운 점이 있다. 본 연구는 품종간 교배에 의한 것으로서 안정성이 높은 천연의 기능성 물질을 저렴한 가격에 생산할 수 있는 것으로 대량생산 체계가 완료되면 다양한 용도로 사업화가 가능하다.
- 산업적으로 유용한 특정 단백질을 생산할 수 있는 재래 유전자들을 효율적으로 이용할 경우 새로운 특성을 갖는 유용단백질 산물을 대량생산 할 수 있게 되어 생물반응기로서의 가축의 이용성을 높일 수 있다. 이 연구결과 세계에서 최초로 동물공장을 통하여 기능성 peptide CPP H의 대량생산 체계를 확립하게 되었다.

## 2. CPP-H의 상품화

- 본연구에서 기능성 물질 CPP-H(칼슘흡수 촉진 물질)의 대량생산 체계가 확립되었기 때문에 CPP-H의 상품화를 단시일내에 추진할 수 있다.
- CPP-H의 용도는 칼슘 흡수 촉진제로써 골다공증의 치료 및 예방, 건강식품 및 음료의 첨가제, 모발 및 피부용 화장품, 구강세척제 및 사료 첨가제로 다양한 분야에서 실용화를 할 수 있다.
- 특히 미생물이나 화학적 방법이 아닌 축산에서 품종간 교배에 의하여 대량생산기술이 개발되면 독성 및 부작용이 없어 안정성이 높고, 시간과 비용이 절감되기 때문에 이 단시일내에 실용화가 가능하다.
- 특히 축산과 관련된 사료첨가제 부문
  - Ca 결핍으로 인하여 달걀의 난각이 약해져 파란(깨진 계란)이 발생하는 비율이 20-30%로서 양계산업의 커다란 문제점으로 지적되고 있다.
  - CPP-H를 양계사료에 첨가함으로써 칼슘의 흡수를 촉진시켜 난각이 강화됨으로서 파란율이 줄어들어 양계농장의 경제적 이익이 증가될 수 있다.
  - 이 CPP-H는 사료의 첨가제 용도로 특허를 획득하였으므로 양계사료뿐 아니라 경주마와 같은 특수 축종의 사료 및 애완용 사료에 칼슘흡수를 촉진시켜 주는 물질을 첨가할 수 있으므로 막대한 사료시장을 주도할 수 있다.

## 3. 신품종 개발

국제화, 개방화시대에서 한우 산업의 육성 및 수입 소고기에 대한 대책 방안으로 한우의 우수한 유전자를 이용한 육종기술개발 및 실용화 사업으로 본 연구에서 부산물로 생산된 F1의 숫소를 이용한 비육우의 개발을 기대할 수 있는 성적을 얻었다.

- 국내 Holstein 으로부터 생산되는 숫송아지는 육질이 나빠 그 가치가 낮게 평가되어 낙농가의 수익 향상에 저해요인이 되고 있다. 본 연구결과 F1을 환경 친화적 유육 겸용종으로 개발한다면 Holstein 숫소의 경제적 가치를 높일 수 있다.
- Holstein과 같은 개량종은 유전자 구성의 편중으로 면역기구가 약화되어 질병으로 인한 항생물질의 남용과 오염 문제가 심각하다. 항생제의 과다사용으로 인한 안정성 문제의 근본적 해결방안은 우리나라의 기후풍토에 가장 잘 적용되어 질병에 대한 저항력이 강한 재래한우의 다양한 유전적 변이를 이용하여 항병성 및 환경적응력이 강한 그리고 고품질의 안전한 축산물을 생산 할 수 있는 환경 친화적 신품종의 개

발이 시급하다고 연구 계획서에서 언급하였으나, 본 연구 결과 신품종 개발의 가능성이 확인되었다.

- 지금까지의 한우 개량사업은 순수육종에 의한 개량으로 개량속도가 느린 것이 특징이다. 그러나 시대의 요구에 따라서 순수육종과 병행하여 한우의 혈통을 보존하면서 한우의 우수한 유전자를 활용하는 측면에서의 Holstein종과 한우와의 F1을 개발하여 기능성 물질 CPP-H를 함유한 우유를 대량 생산하면서 우수한 고급육의 생산 및 항병성이 강한 다기능적 유육겸용 품종의 개발을 기대할 수 있다. 앞으로 지속적인 연구지원이 이루어진다면 우리나라 농가의 보급은 물론 세계적으로 널리 보급할 수 있는 신품종을 개발할 수 있다.
- 한우 및 Holstein의 F1 및 F2의 생산으로 Reference Family를 구축하여 유량 및 육질에 관한 유전자육종의 연구를 추진할 수 있다.
- 신품종 개발과 동시에 Animal Genome 연구에 필요한 Reference Family의 기초확립이 시급하다.
- QTL 개발
  - 질병관련 유전자 탐색
  - 경제형질과 관련된 유전자의 탐색
- 농가보급을 위한 F1의 브랜드화로 종자산업, 식품산업등을 위한 지원이 시급.
- 이 CPP H 유전자를 이용한 우량종축을 선발하여 상품화계통을 개발하여 농가에 보급한다.
- 개발된 F1의 상품화 검증이 완료되면 농가에 보급하여 우유와 고기를 동시에 생산하는 다목적 낙농경영의 신모델을 구축할 수 있어 안정된 낙농산업의 기반을 조성할수 있다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 우유단백질의 유전자형을 빠르게 구별하기 위한 PCR-RFLP 기술의 발달은 어떠한 상태에서라도 동물의 양쪽성에서 모두 유전자형을 결정할 수 있게 하였다. Pinder 등은 PCR을 이용하여 소의 casein 유전자들의 다형현상을 분석하였고 beta casein B와 kapa casein B 사이에 연관관계가 있다고 제안하였다. Lien 등은 created restriction site의 증폭에 의해 다중 beta casein 대립유전자 (A1, A2, A3, B)의 검출방법을 보고하였다. Lien과 Rogne(1993)는 casein haplotype들의 수와 빈도를 보고하였으며 PCR-RFLP를 이용한 새로운 beta casein 대립유전자의 유전자형의 확인을 위해 단순하며 빠른 방법을 개발하였다.

본 연구에서도 새로운 beta casein H 유전자의 검출을 위하여 상기의 선행자들의 방법을 인용하여 primer를 제작. 제작된 primer에 의해 생산된 PCR product을 Nis I 효소에 의해 가수분해하였다. 그 결과 beta casein H 유전자를 함유한 DNA 단편은 182와 458bp의 절편으로 분리되었다. 이 가수분해된 절편들은 2% agarose gel을 지지체로 하는 전기영동에 의해 검출되었다. 또한 이 CPP H 유전자의 유전양식은 공우성 대립유전자임이 확인되었다(Han et al., 2000).

이와 같이 CPP H의 대량생산을 위하여 CPP H 유전자의 typing를 위한 primer, 전기영동법에 의한 단백질형 typing 및 CPP H 유전자의 유전양식, CPP H의 구조 및 기능, 정제법 등 모든 기초적 기술이 국제적 수준으로의 과학기술에 대한 기초적인 정보를 수집하여 본 연구를 완성하였다.

한편 CPP의 상용화를 위한 용도 및 제조방법과 관련된 특허의 일부를 Table 14에 나타내었다.

개발자	내용
모리나가유업	내산성 casein CPP 혼합물제조법, 그 혼합물을 함유하는 건강식품 제조 (특개평 5-336894, 1993년)
멜번대학	Phosphopeptide 제조 (WO87107615, 1987년) 치석처리용 Phosphopeptide (WO93103707, 1993년)
일본 제분	CPP를 함유하는 식품 (특개평 5-176712, 1993년)
메이지제과	CPP의 정제법 (소 59-159793, 1984년)
성화	Casein peptide의 제조방법특허(평 1-269499, 1989년)
본연구의 CPP H	신규한 카제인 포스포펩타이드, 그것을 포함하는 카제인 및 제조방법 (한국 특허 0140242, 1998년) Caseinphosphopeptide, casein containg same and process for the preparation thereof (US patent 5,834,427, 1998년)

Tabel 14. CPP와 관련된 특허의 일부

## 제 7 장   참고문헌

- Abe, T., Oishi, T. Suzuki, S., Amano, T., Kondo, K., Nozawa, K., Namikawa, T., Kumazaki, k., Koga, O., Hayashida, S. and Oyuska, I. 1968. Studies on the native farm animals in Asia(I). Jpn. j. Zoothce. Sci. 39:523.
- Barrefors, P., B. Ekstrand, L. Fagerstem, M. Larsson-Raznikiewicz, J. Schaar and P. Steffner. 1985. Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. Milchwissenschaft. 40:257.
- Bonsing, J., J.M. Ring, A.F. Stewart and A.G. Mackinlay. 1988. Complete nucleotide sequence of the bovine  $\beta$ -casein gene. Aust. J. Sci. 41:527.
- Carles, C and B. Ribadeau-Dumas, 1986. Determination of gradient elution conditions for the separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography : bovine  $\beta$ -casein tryptic digest. J. Dairy Res. 53:595.
- Cho K.H. 1981. A comparison of economic efficiencies between Korean cattle Charolais cross bred and Korean native cattle. Korean J Anim. Sci. 23, 469-477.
- Eigle W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A. et al. (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk : Fifth revision. journal of Dairy Science 67, 1599-31
- Grosclaude F., Mahe M.-F., Mercier J.-C. & Ribadeau Dumas B. (1972) Caracterisation des variants genetiques des caseine  $\alpha$ - et  $\beta$  bovines. European Journal of Biochemistry 26, 328-37
- Grosclaude F., Mahe M.-F., Mercier J.-C. & Ribadeau Dumas B. (1972) Caracterisation des variants genetiques des caseine  $\alpha$ - et  $\beta$  bovines. Annales de Gnetique et de Selection Animale 6, 305-29
- Grosclaude F., Mahe M.-F., & Voglino G,-F. (1974b)Le variant  $\beta$ E et le code de phosphorylation des caseines bovines. FEBS Letters 45, 3-5
- Han, S.K., Shin, Y.C. and Byun, H.D. 2000. Biochemical, molecular and physiological characterzation of a new beta-casein variant detected

- in Korean Cattle. Animal Genetics. in press
- Hirayama M., Toyota K., Hidaka H. & Naito H.(1992) Phosphopeptide in rat intestinal digests after ingesting casein phosphopeptides. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 56, 1128-9
- Hollar C.M., Law A.JR., Dalgleish D.G. & Brown R.J.(1991) separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography. Journal of Dairy science 74, 2403
- Kang W.S, Kim S.K. Baek B.H. and Yun S.G. 1991. Milk yield of F-1 crossbreed between male holstein and female Korean native cattle. Res. Rep. Rural Dev. Adm (suweon), 33, 12-16.
- Kumosinski, T.F., E.M. Brown and H.M. Farrell. 1993. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized  $\beta$ -casein structure. J. Dairy Sci. 76:931.
- Li Y., Tom D. & Desjeux I.F. (1989) Indirect effect of casein phosphopeptides on calcium absorption in rat ileum in vitro. Reprod. Nutr. Dev. 29, 227-233.
- Lien, S., S. Rogne. 1993. Bovine casein haplotypes: number, frequencies and applicability as genetic markers. Anim. Genet. 24:373.
- Meisel, H. & Frister H. (1989) Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein. J. Dairy Research. 56, 343-349.
- Naito, H. 1986. The mechanism of enhancement in Intestinal calcium absorption with phosphopeptides derived during casein digestion. Japanes J of Food Processing and Nutrition. 39, 433-439.
- Namikawa, T., O. Takenaka and K. Takahashi. 1983. Haemoglobin Bali(bovine):  $\beta^A$  8(B1)Lys->His:one of the missing links between  $\beta^A$  and  $\beta^B$  of domestic cattle exists in the Bali(Bovine. Bos banteng). Biochem. Genet. 21:787.
- Peterson, R.F. 1963. High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. J. Dairy Sci., 46:113.
- Ribadeau-Dumas B., Brignon G., Grosclaude F. & Mercier J.-C(1972) Structure

primaire de la casein  $\beta$  bovine. *European Journal of Biochemistry* 25, 505–14

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York.

Sato R., Noguchi T. & Naito H. (1986) Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32, 67–76.