

최 종
연구보고서

기능성 한우육 생산을 위한 반추위 미생물의
지방대사 조절 연구

Studies on the control of lipid metabolism
by rumen microbes for the production
of functional Hanwoo beef

주관연구기관
충북대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 한우육 생산을 위한 반추위 미생물의 지방대사 조절 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 8 일

주관연구기관명 : 충북대학교
총괄연구책임자 : 송 만 강
세부연구책임자 : 송 만 강
연 구 원 : 왕 제 휘
연 구 원 : 김 기 훈
협동연구책임자 : 손 용 석
연 구 원 : 최 병 렬
연 구 원 : 리 시 연
연 구 원 : 윤 진 아
협동연구책임자 : 장 문 백
연 구 원 : 배 귀 석
연 구 원 : 남 경 표
연 구 원 : 김 혜 숙

요 약 문

I. 제 목

기능성 한우육 생산을 위한 반추위 미생물의 지방대사 조절 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

脂質(lipids)은 대체로 고 능력 가축의 에너지 보충제로서, 또는 곡류사료를 대체할 수 있는 低價의 에너지원으로서 그리고 축산물의 지방산 조성을 변화시키려는 목적에서 사용되어 왔다. 최근에 반추가축을 대상으로 하는 지질관련 연구는 ω -3 지방산과 conjugated linoleic acid(CLA)의 생산 및 그들 지방산의 효과에 초점이 맞추어져 왔다. CLA는 반추위 내 미생물의 불완전한 hydrogenation의 중간 대사물질이며, 인체의 건강에 유익한 효과를 주는 것으로 밝혀져 이 물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러한 유익한 효과에 암 발생 억제(Pariza와 Hargraves, 1985), 당뇨의 치료(Houseknecht 등, 1998), 면역기능의 개선(Michal 등, 1992) 그리고 고혈압 감소(Kritchevsky, 2000) 등이 포함된다.

반추가축 생산물에 CLA 함량을 높이려는 다양한 시도가 이루어져 왔다. 그러한 시도는 방목(Timmen과 Patton, 1988)이나 많은 양의 식물성 기름을 급여하는 방법 등(Tesfa 등, 1991)이라 할 수 있다. 우유나 쇠고기 내 CLA는 2가지로부터 기원된다고 할 수 있는데, 하나는 반추위 내에서 linoleic acid($C_{18:2}$)의 hydrogenation 과정에서 생성되는 것이고(Kepler 등, 1966) 다른 하나는 유선세포를 비롯한 체조직 내 *trans*- C_{18} 로부터(Griinari와 Bauman, 1999) 기원되는 것이다.

지금까지 실시된 CLA관련 많은 연구는 젖소를 대상으로 이루어진 것이며 그 효과는 매우 긍정적인 것으로 알려져 있다. 그러나 육우의 경우 쇠고기 내 CLA 함량이 매우 다양하며, 우유에 비해 그 함량이 상대적으로 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Madron 등, 2002). 우유와 쇠고기에 간 CLA 함량에서의 차이는 반추위 내에서의 CLA 생성 조건이 같아야 된다는 전제가 성립될 때, 쇠고기의 경우 반추위 내에서 생성된 CLA가 체지방 축적 부위 전체에 걸쳐 분포되는 것에 비하여 우유의 경우 대부분의 CLA가 우유에 포함되어 분비되기 때문으로 보인다.

앞에서 지적한 바와 같이 반추위 내 CLA 생성에 영향을 주는 다수의 요인이 존재하며, 그 요인의 대부분이 반추위 내 발효 상태와 밀접한 관계를 이루고 있고 대부분의 CLA 관련 연구가 젖소를 대상으로 실시된 바 있다. 이에 반하여 보다 다양한 발효 조건과 CLA 생성과의 관계에 대한 규명이 부족함은 물론 기초시험 결과를 거세 한우

에 적용하는 연구가 국내에서는 이루어진 바 없다. 이에, 현재보다 CLA 함량이 증가된 기능성 한우고기 생성에 필요한 다양한 발효조건을 구명하고, 아울러 이들 발효조건이 체내에서의 지질 대사와 CLA의 반추가축 체내 축적상태 등을 조사할 필요가 있는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 CLA 함량이 증가된 기능성 한우고기 생성에 필요한 다양한 발효조건을 구명하고, 아울러 이들 발효조건이 체내에서의 지질 대사와 CLA의 반추가축 체내 축적상태 등을 조사하기 위해 일련의 in vitro 시험과 대사시험 및 사양시험을 실시하였는 바, 연구개발 목표에 따른 주요 연구 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 반추위미생물의 Hydrogenation Activity 조절을 통한 기능성 한우 고기 생산에 관한 연구 (충북대)

1) 특정 지질자원을 선택하여 지방산 조성을 분석하고 그 후 mixed ruminal bacteria를 이용하여 각종 발효 환경이 C₁₈-계 불포화지방산의 hydrogenation과 T-FA(trans-C_{18:1} 등)의 생성에 미치는 효과를 조사하고자 in vitro 방법으로 기초 시험 실시

2) 대사시험을 통하여 2종류 지질사료 내 C₁₈-불포화지방산으로부터 trans-C₁₈ fatty acids의 생성과 hydrogenation 정도에 미치는 효과와 일련의 체내 대사작용을 조사하고 아울러 면양을 대상으로 특정 지질사료 내 불포화지방산의 체내 이용을 조사

3) 실제로 거세한우 대상으로 앞의 시험의 결과를 적용하여 체지방 내 T-FA와 불포화지방산(CLA 포함)의 축적 상태를 조사

2. Ionophore가 반추위미생물의 기능성지방산 생산에 미치는 효과 연구(고려대)

1) 반추위 내 기능성지방산의 생산 조절을 위한 Ionophore 첨가효과 구명
잠재력이 높은 식물성 지방사료 결정하고 Ionophore의 첨가를 통한 최적 생산조건

결정

2) Ionophore가 반추동물의 기능성지방산 생산에 미치는 효과

In Vitro 실험을 통하여 얻어진 결과를 생체에서 재현시키고, 생체 동물에서의 Ionophore 응용의 생리적 반응과 CLA 생산 극대화를 위한 최적조건을 결정함

3. 사료 내 지방첨가에 따른 반추위 내 미생물 대사에 미치는 영향 (중앙대)

1) Batch culture와 Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 조성에 미치는 영향 조사

① Batch culture를 이용한 지방첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향 조사

② Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향 조사

2) 한국재래산양의 대사실험을 통한 지방첨가가 반추위내 대사에 미치는 영향 조사

한국재래산양 대사실험을 통한 반추위 내 미생물 대사 혈액 내 지방산 조성에 미치는 영향 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. *In vitro* 시험

가. 반추위미생물의 Hydrogenation Activity 조절을 통한 기능성 한우고기 생산에 관한 연구

지방산 조성이 다른 oil이 각종 발효 조건에 따른 반추위 내 지방산 조성의 변화와 *trans* fatty acid 및 CLA 생산에 미치는 효과를 조사하기 위해 일련의 *in vitro* 실험과 대사시험, 그리고 사양시험을 실시하였는 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 일반 사료자원의 탄수화물 성 에너지 수준이 반추위미생물에 의한

cis-unsaturated fatty acid로부터 *trans*-11 octadecenoic acid(*t*11-C_{18:1})

생성과 hydrogenation 정도에 미치는 효과

분쇄된 아마씨 및 유채씨를 *in vitro* 방법으로 배양할 때 농후사료 첨가수준이 반추위 박테리아에 의한 발효특성과 c9,t11-CLA 및 total *trans*-C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사하였다. 4 수준(0.83, 1.25, 1.67 그리고 2.08%, w/v)의 농후사료와 분쇄된 oilseeds(linseed 또는 rapeseed; 0.83%, w/v)를 반추위액과 인공타액을 1:1(v/v)로 혼합한 용액과 혼합한 후 stirrer가 장착된 발효기에서 혐기적인 방법으로 39°C에서 24시간 배양하였다.

농후사료 첨가 수준이 배양 시간에 따라 두 종류의 oil 모두에서 배양액의 pH와 암모니아 농도에 다소 영향하였다. 배양액의 휘발성 지방산(VFA) 농도는 배양시간 및 농후사료 첨가 수준에 따라 점진적으로 증가되었다. Rapeseed의 경우 배양액의 CLA 비율은 농후사료 첨가수준이 높을수록 배양시간이 지남에 따라 현저히 감소하는 ($P<0.031$) 경향을 보였으며, t-FA/CLA 값은 CLA 함량의 증가로 인하여 linseed 배양에서보다 rapeseed 배양에서 더 낮았다.

2) 섬유소(일반 조사료) 첨가 수준이 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

Rapeseed 배양 시 알팔파 건초 첨가수준이 반추위 박테리아에 의한 *in vitro* 발효특성과 long-chain 지방산 조성, 특히 c9,t11-CLA and total *trans*-C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사하였다. 3수준(0.25, 0.50 그리고 0.75%(w/v)의 분쇄된 알팔파 건초와 분쇄된 rapeseed를 반추위액과 인공타액을 1:1(v/v)로 혼합한 용액 600ml와 혼합한 후 stirrer가 장착된 발효기에서 혐기적인 방법으로 39°C에서 24시간 배양하였다.

알팔파 건초의 첨가수준은 배양액의 pH, 암모니아 농도 및 VFA 농도에 영향하지 않았으나, 12시간 이상 배양의 경우 알팔파 첨가수준이 증가함에 따라 박테리아 성장은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 3시간 배양에 있어 대조구 및 3% 첨가수준에 비하여 알팔파 첨가수준이 높을(0.50 및 0.75%) 경우 CLA 비율이 증가하는 경향을 보인 반면 t-FA/CLA 값은 감소하는 경향을 보였다. 배양 12시간 및 24시간의 경우 알팔파 건초 첨가수준이 증가함에 따라 C_{18:0} 비율은 감소하는 반면 C_{18:2} 및 C_{18:3}의 비율은 증가하는 경향을 보였다.

3) 지질자원의 첨가형태가 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

Rapeseed 또는 rapeseed oil이 반추위 박테리아에 의한 발효특성, c9,t11-CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 *in vitro* 시험을 실시하였다. 농후사료(1%, w/v)와 rapeseed(배양액의 0.6%, w/v) 또는 rapeseed oil(1.225 g)을 반추위액과 인공타액을 1:1(v/v)로 혼합한 용액 600ml와 혼합한 후 stirrer가 장착된 발효기

에서 혐기적인 방법으로 39°C에서 24시간 배양하였다.

Oil source의 형태는 배양액의 pH와 암모니아 농도에 영향하지 않았으나, 배양 12시간까지 C_{18:2} 및 C_{18:3} 함량이 감소된 반면 C_{18:0} 함량은 증가되는 경향을 보였다. 분쇄된 rapeseed보다 rapeseed oil을 첨가한 경우에서 C_{18:0}, C_{18:1} 그리고 C_{18:2} 함량이 높았으나(P<0.0001~0.033) CLA 함량은 오히려 더 낮은(P<0.0008~0.0032) 것으로 나타났다.

4) 배양액의 pH가 반추위미생물에 의한 *cis*-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

Oilseed(linseed 또는 rapeseed) 배양 시 배양액의 pH가 반추위 박테리아에 의한 발효특성, c9,t11- CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사하기 위해 *in vitro* 시험을 실시하였다. 농후사료(1%, w/v)와 분쇄된 linseed(0.6%, w/v) 또는 rapeseed(0.5%, w/v)를 반추위액과 인공타액을 1:1(v/v)로 혼합한 용액 600ml와 혼합한 후 stirrer가 장착된 발효기에서 혐기적인 방법으로 39°C에서 12시간 배양하였다. 전체 배양기간에 걸쳐 배양액의 pH가 4.5, 5.3, 6.1 그리고 6.9로 유지될 수 있도록 H₂SO₄ 또는 30% NaOH으로 조절하였다.

배양액의 pH가 증가됨에 따라 두 종류의 oilseed 모두에서 암모니아 및 VFA 농도가 증가되었으며, pH가 4.5인 경우 배양액의 발효는 일어나지 않았다. 두 종류의 oilseed 모두에서 pH가 증가될수록 배양액의 acetate(C₂) 비율은 감소했지만 propionate(C₃) 비율은 증가되었다. pH의 범위가 4.5 ~ 5.3인 경우 hydrogenation 속도가 매우 느렸지만, 6.1 ~ 6.9 때에는 hydrogenation 속도가 상대적으로 빠른 것으로 나타났다. 두 종류의 oilseed 모두에서 pH가 높을 경우 oleic acid와 t-FA 함량이 증가되었으나 linoleic acid 및 linolenic acid 함량은 감소되었다. Rapeseed의 경우 pH가 증가됨에 따라 CLA 함량도 증가되었으나 linseed의 경우 CLA가 거의 탐지되지 않았다.

나. Ionophore가 반추위미생물의 CLA 생산에 미치는 효과 연구

Ionophore 첨가가 oil 배양 시 발효 특성과 지방산 조성의 변화에 미치는 효과를 조사하고자 *in vitro* 시험을 실시하였다. 처리구로는 oil과 Monensin이 첨가되지 않은 대조구, Monensin을 0.8ppm 수준으로 첨가한 구, 대두유를 5% 첨가한 구 그리고 대두유 5%와 Monensin 0.8ppm 첨가구 등 5처리구를 두었다. 각각의 처리구에 대한 배양액은 0, 3, 6 및 9시간 배양하였다.

Monensin과 대두유 첨가는 총 VFA 농도에 영향하지 않았지만 acetate:propionate

비율을 현저히 감소시켰으며($P < .05$) *cis* C_{18:1}, *trans* C_{18:1}, 및 CLA의 축적을 증가시켰다. 그러나 배양액의 C_{18:0} 축적을 감소시켰다. 대조구의 경우 C_{18:3}과 C_{18:2} 비율을 감소시켰으나($P < .05$) Monensin 첨가는 배양시간이 길어짐에 따라 C_{18:3}과 C_{18:2}의 disappearance를 지연시켰다. 다른 처리구에 비하여 Monensin과 대두유 첨가로 인하여 *trans* C_{18:1}과 CLA 농도가 증가되었으나 C_{18:0} 농도는 현저히($P < .05$) 감소되었다. 모든 처리구 중 Monensin과 대두유 첨가구에서 CLA 생성량이 가장 높은 것으로 나타났다.

다. Batch culture와 Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 조성에 미치는 영향

1) Batch culture를 이용한 지방첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향

본 실험은 4종류의 반추위 미생물과 mixed culture를 이용하여 각각 다른 oil source인 linseed oil과 Calcium salts of palm oil (CSPO)을 첨가하여 반추위 미생물의 발효특성을 알아보기 위하여 *in vitro* 시험이 실시되어졌다. pH는 전체 처리구에서 적정 수준을 유지하였으나 pure culture에서 전체적으로 다소 낮은 pH를 유지하였다 ($p < 0.05$). 미생물단백질 함량은 전체적으로 oil sources 처리구에서 통계적 유의성 없이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 linseed oil 처리구는 모든 미생물 처리구에서 CSPO 처리구 보다 낮은 결과 나타내었다. NH₃-N 함량은 각각의 미생물 처리구에서 유의적인 차이를 나타내었으며 linseed oil과 CSPO 처리구에서 높았고 ($p < 0.05$), mixed culture에서 특히 높은 결과를 나타내었다 ($p < 0.05$). Total VFA 함량은 control 구에서 유의적으로 낮았으며 ($0 < 0.05$), oil source 처리구에서 acetate 함량이 감소하는 경향을 보였으나 mixed culture에서는 전체 처리구에서 total VFA 함량이 비슷한 경향을 보였다. acetate/propionate 비율은 control 구에 비해 다소 감소하는 경향을 보였다. acetate/propionate 비율은 control 구에서 다소 감소하는 경향을 보다. 배양후 각각의 미생물단백질 내에 지방산 함량은 oil 처리구에서 통계적 유의성 없이 다소 감소하였다. 그러나 C_{18:1}, C_{18:2} n-6와 C_{18:3} n-3의 함량은 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). Mixed culture에서는 oil 처리구에서 유의적으로 지방산 함량이 증가하였고 특히 C_{18:1} *cis*, *trans*는 control 구에 비해 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). Linseed oil 처리구에서 biohydrogenation은 *trans*-C_{18:1} (41.97%) *cis*-C_{18:1} (54.97%), C_{18:2} (68.96%), C_{18:3} (50.78%)였으며, CSPO 처리구는 *trans*-C_{18:1} (31.58%) *cis*-C_{18:1} (45.45%), C_{18:2} (59.92%), C_{18:3} (66.63%)을 나타내었다. 반추위미생물에 의한 biohydrogenation 비율은 C_{18:3} > C_{18:2} > C_{18:1} 순서로 나타났다.

2) Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향

본 실험은 4대의 Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시하였다. pH는 I 과제와 비슷한 경향을 보였으며, 전체적으로 반추위 적정 pH를 나타내었고, control구에서 가장 낮았다. Oil source처리구에서는 sunflower oil 처리구에서 다소 높은 경향을 나타냈다. NH₃-N 함량은 전체적으로 oil 처리구에서 차이가 없었으나, control구에서 통계적 유의성 없이 다소 낮은 경향을 나타내었다. 미생물백질함량은 전체 배양기간 동안 control구에서 다소 높은 경향을 보였고 oil source처리구에서는 soybean oil구에서 유의적인 차이는 없이 다소 높은 결과를 나타내었다. Total VFA함량은 control구와 soybean oil구에서 다소 높은 경향을 보였고, A/P ratio는 control구에서 유의적으로 높은 경향을 나타내었다 ($p < 0.05$). 각각 처리구별 oil source의 fatty acid함량 중 unsaturated fatty acid는 sunflower oil처리구에서 가장 높았다. 배양 종료후 배양 마지막 3일 동안의 suspension fluid와 vessel content에서의 bacterial cells의 지방산 함량은 sunflower oil 처리구에서 C18:0과 C18:1의 함량이 유의적 차이는 없이 가장 높았으며, C18:2의 경우 vessel content내의 미생물단백질 내의 C18:2의 함량은 유의적으로 차이 높았으며 suspension fluid내의 미생물에서는 유의적 차이없이 soybean oil처리구에서 높았고, C18:3함량 또한 비슷한 경향을 나타내었다. Biohydrogenation의 비율은 sunflower oil처리구에서 가장 높게 나타났는데, 전체 처리구에서 suspension fluid 내의 반추위 미생물에서 C18:0의 함량은 유의적 차이가 없었으나 C18:3함량의 감소 비율이 가장 높은 결과를 나타내었다.

2. 대사 시험

가. Oleic 또는 linoleic acid 함량이 높은 oil 급여 시 농후사료와 조사료의 비율이 면양의 반추위 내 및 혈액 내 *trans*-11 C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 함량에 미치는 효과

Oleic 또는 linoleic acid 함량이 높은 oil(soybean oil 또는 rapeseed oil) 급여 시 농후사료와 조사료의 비율(70:30 vs. 85:15)이 면양의 반추위 내 및 혈액 내 *trans*-11 C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 함량에 미치는 효과를 조사하기 위해 반추위 fistula가 장착된 4두의 면양을 대상으로 4 x 4 Latin square 방법에 의해 시험을 실시하였다. Oil 첨가 수준은 농후사료의 5%(DM basis)였으며 조사료 자원으로 세절한 rye grass 건초를

사용하였다.

농후사료 비율이 높을 경우 반추위액의 pH가 다소 낮아진 반면 암모니아 농도는 다소 증가하였다. Rapeseed oil의 첨가로 인하여 pH와 암모니아 농도가 다소 높아졌다. 농후사료 비율의 증가는 VFA 농도를 증가시켰으나 oil의 종류는 VFA 농도와 조성에 영향하지 않았다. 건물, 조단백질, 조지방, NDF 및 유기물의 전장소화율은 농후사료 비율이 증가됨에 따라 증가하는 경향을 보였다. 반추위액의 oleic acid(C_{18:1})와 linoleic acid(C_{18:2}) 함량은 oil의 종류에 의한 영향을 받았으나, *trans*11-ODA 및 *cis*9, *trans*11-CLA 함량에는 영향하지 않았다. 그러나 조사료 비율이 증가됨에 따라 두 종류의 oil 모두에서 *trans*11-ODA와 *cis*9, *trans*11-CLA 함량이 증가되는 경향을 보였다. 농후사료와 조사료 비율 그리고 oil의 종류는 plasma의 *trans*11-ODA와 *cis*9, *trans*11-CLA 함량에 크게 영향하지 않았다.

나. Ionophore가 반추동물의 제1위내 CLA 생산에 미치는 효과 연구

반추위 cannula가 장착된 수양 5두를 이용하여 사료에 대한 여러 종류의 oil(5%, DM) 및 Monensin(33ppm) 첨가가 반추위 내 발효 특성, 불포화지방산의 hydrogenation 그리고 CLA 생성에 미치는 효과를 조사하였다. 본 시험은 5x5 Latin Square design으로 실시되었는데, 이 때 처리구는 세절한 화분과와 알팔파의 혼합조사료 60%와 농후사료(중송아지 용 펠렛) 40%로 구성된 기초사료(대조구)와 기초사료의 펠렛에 corn oil이나 soybean oil 첨가한 사료, 그리고 각각의 oil 첨가 사료를 급여하고 Monensin을 33ppm 수준으로 반추위 누관에 주입하는 등 총 5처리를 두었다.

식물성 기름이나 Monensin의 반추위 내 투여는 장쇄지방산의 반추위 내 hydrogenation을 감소시켰다(P<.05). 대두유와 Monensin 투여구로 인하여 반추위 내 용물의 CLA 함량이 크게 증가되었다. 옥수수 기름의 경우 반추위 내에서 CLA 생성이 적었으나 높은 *trans*-C18:1을 생성하였는데, 이러한 *trans*-C18:1은 체내의 조직에서 CLA 합성을 위한 전구물질로 이용될 수 있는 것으로 보인다.

다. 한국재래산양 대사실험을 통한 지방 첨가가 반추위 내 대사에 미치는 영향

12개월령의 cannula가 장착된 한국재래산양을 이용하여 사료에 대한 여러 종류의 oil 첨가가 반추위 내 발효 특성 및 반추위 미생물과 혈액의 지방산 조성에 미치는 효과를 조사하였다. 본 시험은 4x4 Latin Square design으로 실시되었는데, 이 때 시험사료는 농후사료 60%와 조사료(벼짚) 40%로 구성된 기초사료(대조구)와 기초사료에 linseed oil, soybean oil 및 sunflower oil을 5% 수준(건물 기준)으로 첨가한 시험사료를 면양에 급여하였다.

반추위 내 미생물지방산 함량은 sunflower oil처리구에서 C18:2함량이 가장 높았으나 C18:1과 C18:3함량은 control구 보다 낮았다($P<0.05$). 한국재래산양 혈액 내 지방산 함량은 sunflower oil처리구에서의 가장 높았다. Oil source에 따라 반추위 내 발효 특성에는 큰 차이를 보이지 않았으나 control구에 비해 다소 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 결과는 혈액 내 지방산 조성과 일치하였다. 또한 전체적으로 반추위미생물과 혈액 내에 존재하는 C18계 unsaturated fatty acid는 control구에서 보다 지방첨가구에서 전체적으로 hydrogenation이 높았으며, 특히 반추위 내에서의 미생물들에 의한 biohydrogenation은 증가하는 경향을 보였다.

3. 사양시험

가. 대두유 첨가가 면양의 지방조직 내 c9,t11-CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 함량에 미치는 효과

대두유 첨가가 면양의 지방조직 내 c9,t11-CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 함량에 미치는 효과를 조사하기 위해 10두의 면양 암컷을 대상으로 12주 동안 사양시험을 실시하였다. 5두를 대상으로 한 시험구의 경우 대두유를 사료(1.3kg/두/일, DM basis)의 5% 수준(DM basis)으로 첨가하여 급여하였다. 조사료와 농후사료의 비율은 20% : 80%였으며, 조사료로는 rye grass 건초를 급여하였다.

대두유의 첨가는 면양의 plasma 내 total cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량을 동시에 증가시켰다. 그러나 대두유 첨가로 인하여 근내지방의 C_{16:1}, C_{17:0} 및 C_{17:1} 함량이 감소된($P<0.05$) 반면 C_{18:0} 및 total t-FA 함량이 증가되었다($P<0.05$). 피하지방의 경우 단지 C_{18:0} 함량이 대두유의 첨가로 인하여 증가되었을($P<0.05$) 뿐이었다. 신지방에 있어서는 대두유의 첨가가 C_{15:0} 및 C_{18:0} 함량을 증가시킨($P<0.05$) 반면 C_{16:1} 및 t-FA 함량을 감소시켰다($P<0.05$). 대두유의 첨가로 인하여 근내지방과 피하지방의 CLA 함량이 다소 증가되었다.

나. 지질사료의 최적 급여조건을 통한 기능성 한우고기의 생산

사료 내 oil 혼합물과 monensin 첨가가 한우 거세우의 혈액과 지방조직 내 c9,t11-CLA 함량에 미치는 효과를 조사하고자 24두의 한우 거세우(20개월령, 평균 개시체중 567±18kg)를 대상으로 5개월에 걸쳐 사양시험을 실시하였다. 체중에 따라 거세우를 5 그룹으로 나누었으며, 대조구의 경우 사료는 시험 목장에서 관행적으로 사용해 온 시판 사료를 이용했으며, 시험구의 경우 linoleic acid(C_{18:0}) 함량이 높은 oil

혼합물(45% soybean oil, 20% sunflower oil, 20% safflower oil 및 15% fish oil, 농후사료의 6%, As-fed 기준)과 monensin(20ppm)을 농후사료에 첨가하였다. 시험구의 경우 거세우에 oil 혼합물과 monensin 첨가 사료(MOPM)를 출하 시까지 각각 2.5개월 및 5개월간 급여하였다.

5개월간에 걸친 MOPM의 급여로 인하여 일당증체량과 사료효율이 현저히 증가되었다($P < 0.049$). MOPM 사료는 거세 한우의 등지방 두께와 등심근 면적을 다소 증가시켰으며, MOPM 첨가사료 급여만으로도 plasma의 cholesterol 농도(TC, $P < 0.0001 \sim 0.0007$), HDL-C 농도($P < 0.0001$) 및 HDLC/TC($P < 0.004 \sim 0.034$)를 증가시켰다. MOPM 첨가사료 급여는 거세 한우의 plasma c9,t11-CLA 함량을 현저히 증가시켰다. 다른 처리구에 비하여 5개월간에 걸친 MOPM 첨가사료 급여로 인하여 근내지방($P < 0.015$), 근간지방($P < 0.039$) 및 피하지방($P < 0.001$)의 CLA 함량과 총 불포화지방산 함량이 증가되었으며 포화지방산 함량은 감소되었다($P < 0.008$).

SUMMARY

1. In vitro studies

1) Effect of energy level on the formation of *trans*-C_{18:1} acid and the degree of hydrogenation from cis-unsaturated fatty acids by rumen microbes

An *in vitro* study was conducted to examine the effect of addition level of concentrate on fermentation characteristics and long-chain unsaturated fatty acids composition, especially conjugated linoleic acid(CLA) and *trans*-octadecenoic acid(t-FA) by mixed ruminal bacteria when incubated with linseed or rapeseed. Four levels(0.83, 1.25, 1.67 and 2.08%, w/v) of concentrate and ground oilseeds(linseed or rapeseed; 0.83%, w/v) were added to mixed solution of strained rumen fluid with artificial saliva(1:1, v/v) in the glass jar with a glass lid equipped with stirrer, and was incubated anaerobically for 24 hours at 39°C. Addition level of concentrate slightly reflect on pH and ammonia concentration of the culture solution at the various incubation times when incubated with both linseed and rapeseed. Total VFA concentration slightly increased with incubation times and concentrate levels for incubations with oilseeds. Percent CLA had a clearly decreasing trend with concentrate level throughout incubation times with significances at 24h incubations when incubated with rapeseed(P<0.031). The t-FA/CLA ratios was lower for rapeseed with increased proportion of CLA and decreased t-FA proportion than for linseed.

2) Effect of roughage level on on the formation of *trans*-C_{18:1} acid and the degree of hydrogenation from cis-unsaturated fatty acids by rumen microbes

An *in vitro* study was conducted to examine the effect of different level of alfalfa hay on fermentation characteristics and long-chain unsaturated fatty acids composition, especially conjugated linoleic acid(CLA) and *trans*-octadecenoic acid(t-FA) with rapeseed supplementation by mixed ruminal bacteria. Three levels alfalfa hay were added to 600 ml ruminal culture at the level of 0.25, 0.50 and 0.75%(w/v), respectively. A semi-continuous ruminal fermentation system was

used in the present study. Addition of alfalfa hay to the culture at different levels did not affect significantly the pH, ammonia concentration and volatile fatty acid(VFA) concentration in ruminal culture. Bacteria growth in culture solution had a decreasing trend with alfalfa hay level at 12h incubation.

The clear increased trends on CLA proportion, while decreased trends on t-FA/CLA ratio were found from the treatments containing 0.50 and 0.75% alfalfa addition than those control and 0.25% alfalfa addition which were similar at 3h incubation. There were decrease trends in C_{18:0} proportion, while the proportion of C_{18:2} and C_{18:3} tended to increase with alfalfa hay level at 12h and 24h incubation.

3) Effect of pH in incubation solution on on the formation of *trans*-C_{18:1} acid and the degree of hydrogenation from *cis*-unsaturated fatty acids by rumen microbes

An effect of pH on the fermentation characteristics and the formation of *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid(CLA) and *trans*-11 octadecenoic acid (t-FA) by mixed ruminal bacteria was examined *in vitro* when incubated with linseed or rapeseed. Concentrate(1%, w/v) with ground linseed(0.6%, w/v) or rapeseed(0.5%, w/v) was added to 600 ml mixed solution of strained rumen fluid with artificial saliva(1:1, v/v), and was incubated anaerobically for 12 hours at 39°C. The pH of culture solution was maintained at close levels of 4.5, 5.3, 6.1 and 6.9 with 30% of H₂SO₄ or 30% NaOH solution.

pH increment resulted in increases of ammonia and total VFA concentration in culture solutions containing both oilseeds. Fermentation was not proceeded at pH 4.5. Molar proportion of acetate(C₂) decreased but that of propionate(C₃) increased as pH increased when incubated with oilseeds. While hydrogenating process was very slow at the pH range of 4.5 to 5.3, rapid hydrogenation was found from the culture solutions of pH 6.1 and 6.9 when incubated with linseed or rapeseed. As pH in culture solution of linseed or rapeseed increases proportions of oleic acid and t-FA increased but those of linoleic acid and linolenic acid decreased. The CLA proportion increased with pH in culture solution containing rapeseed but CLA was not mostly detected from the incubation of linseed.

4) Effect of addition type of oil source the formation of *trans*-C_{18:1} acid

and the degree of hydrogenation from cis-unsaturated fatty acids by rumen microbes

The effects of addition type of oil source on fermentation characteristics and long-chain unsaturated fatty acids composition, especially the formation of conjugated linoleic acid (CLA) and octadecenoic acid (*trans*-11 C_{18:1}, *t*-C_{18:1}) by mixed ruminal bacteria were examined *in vitro*. Concentrate (1% of culture solution, w/v, as-fed basis) with ground linseed (0.6% of culture solution, w/v, DM basis) or linseed oil as absorbed into the ground alfalfa hay were added to 600 ml mixed solution consisting of strained rumen fluid and artificial saliva at the ratio of 1:1 in the glass culture jar. The culture jar was covered with a glass lid equipped with stirrer and was placed into a water-bath (39°C) and was incubated anaerobically up to 24hrs. Addition type of oil source did not affect the pH and ammonia concentration. Decreasing trends in the compositions of C_{18:2} and C_{18:3} but increasing trends of C_{18:0} compositions were clearly found from culture contents up to 12h incubation when incubated with both ground rapeseed and RSO (Table 25). The effects of oil addition type on FA composition in culture solution were clear from 3h incubation. The compositions of C_{18:0}, C_{18:1} and C_{18:2} were greater (P<0.0001~0.033) but CLA were smaller (P<0.0008~0.0032) in a culture solution containing RSO than those in a culture solution of ground rapeseed.

5) Studies on the effect of Ionophore on CLA production by rumen microbes

An incubation with rumen fluid was conducted in a 2×2 factorial arrangement of treatments. Treatments were 1) control, 2) 0.80ppm monensin, 3) 5% soybean oil, and 4) 0.8 ppm monensin + 5% soybean oil which were added to rumen fluid and incubated for 0, 3, 6 and 9h.

Monensin and soybean oil treatments decreased acetate to propionate ratio significantly (P<.05) without changing total VFA concentrations. Monensin and soybean oil treatments also increased accumulation of *cis* C_{18:1}, *trans* C_{18:1}, and CLA but decreased that of C_{18:0} in incubation contents. Significant (P<.05) decreases in C_{18:3} and C_{18:2} were observed in the control, whereas the monensin treatment showed delayed disappearance of C_{18:3} and C_{18:2}, as incubation time proceeded. Supplementation of both monensin and soybean oil increased the concentrations of *trans* C_{18:1} and CLA but decreased C_{18:0} significantly (P<.05) in

the rumen contents when compared to other treatments. Yield of CLA in rumen contents was also significantly ($P < .05$) higher for the monensin + soybean oil treatment among all treatments.

6) Effect of oil addition on fatty acid composition of rumen microbes by batch culture

The present study was to determine the fatty acid composition of four common rumen bacteria species and mixed culture with additional oil sources on ruminal fermentation *in vitro*. pH was optimally maintained but pure culture was lower than additional oil sources. $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was important factor synthesis of microbial protein synthesis. However, this result was related to microbial protein synthesis in ruminal culture. Additional oil sources with mixed culture were lower $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration. Additional oil sources decreased concentration of total VFA according as acetate content in mediums during incubation time, but mixed culture was similar concentration of total VFA. A/P ratio was shown amount of propionic acid lower than decreased amount of acetic acid of four common rumen bacteria species.

Microbial dry matter was incubated in additional oil sources lower than pure culture and mixed substrate. Especially, linseed oil treatments of all cultures were more little microbial dry matter than CSPO treatment. The effect of rumen microbes in a 24 h incubation showed that the linseed oil was biohydrogenation trans-C18:1 (41.97%), cis-C18:1 (54.97%), C18:2 (68.96%) and C18:3 (50.78%). Although biohydrogenation of CSPO was significantly different, the rumen microbes hydrogenated the trans-C18:1 (31.58%), cis-C18:1 (45.45%) and C18:2 (59.92%), C18:3 (66.63%), there was a corresponding increase in C18:0 . C18:0 of linseed oil was higher than CSPO, which effect of CSPO was protected hydrogenation by rumen microbes and higher value of C18 UFA . Biohydrogenation percent had the highest followed by $\text{C18:3} > \text{C18:2} > \text{C18:1}$. The end-products of C18 unsaturated fatty acid by rumen microbes were stearic acid and *trans*-octadecanoic isomers, which is an associated with effects of ruminal lipolysis and hydrogenation.

7) Effect of oil addition on fatty acid composition of rumen microbes by continuous culture

An experiment with a 4×4 Latin square design was conducted to determine the effects of supplemental dietary fat on rumen microbial fermentation in continuous culture. pH was optimally maintained but pure culture was lower than additional oil sources and sunflower oil treatment high pH of oil source treatment. NH₃-N concentration was not significant different lower at control than oil source treatments. Microbial protein synthesis was not significant different higher control than oil source treatment. However, this result was related to microbial protein synthesis in ruminal culture. Additional soybean oil treatment and control increased concentration of total VFA(P<0.05). A/P ratio was significantly higher control than oil source treatments(P<0.05). Unsaturated fatty acid concentration of oil source treatments was highest in sunflower oil treatment. C18:0, C18:1 and C18:3 of fatty acid composition of bacteria in suspension fluid and vessel content was not significantly different high on sunflower oil treatment. Biohydrogenation ratio not significantly different was highest sunflower oil treatment.

2. Metabolism studies

1) Effects of concentrate to roughage ratio on the lipid metabolism in rumen and fatty acid composition of plasma in sheep

A metabolism trial with four ruminally fistulated sheep was conducted in a 4 x 4 Latin square design to examine the effect of concentrate to roughage ratio(70:30 vs. 85:15) and oil source(soybean oil vs. rapeseed oil) on the ruminal fermentation pattern and C₁₈-fatty acids composition including *trans*11-C_{18:1}(*trans*11-ODA) and *cis*9, *trans*11-C_{18:2}(*cis*9, *trans*11 -CLA) in the rumen fluid and plasma. Oil was added to the concentrate at 5% level of the total diet(DM basis) and chopped rye grass hay was fed as roughage.

An increased level of concentrate(85%) within supplemented oil slightly lowered pH but increased ammonia concentration. Supplementation of rapeseed oil relatively increased pH and ammonia concentration. Higher concentrate level resulted in increased tendencies of total VFA concentration while oil source did not affect the total VFA concentration and VFA proportion. Whole tract digestibilities of DM, CP, EE, NDF and OM in diets slightly increased at higher concentrate level. Proportions of oleic acid(C_{18:1}) and linoleic acid(C_{18:2}) in the rumen fluid were

influenced by the fatty acid composition of oil source but oil source did not affect the *in vitro* formations of *trans*11-ODA and *cis*9, *trans*11-CLA. Slightly increased *trans*11-ODA and *cis*9, *trans*11-CLA proportions, however, were observed from the sheep fed high roughage diet supplemented with both soybean oil and rapeseed oil. The C_{18:1} and C_{18:2} composition in supplemented oils responded to those in plasma of sheep. Effects of concentrate to roughage ratio and oil source on *trans*11-ODA and *cis*9, *trans*11-CLA proportions in plasma were found to be small. Proportion of *cis*9, *trans*11-CLA in plasma tended to be increased from the sheep fed high roughage diet and collection time at 9h post feeding.

2) Effect of Ionophore on the production of CLA in the rumen of ruminants

Five ruminally cannulated rams were used in a 5x5 Latin square design experiment to study the effects of plant oil added with or without monensin on the changes of fermentation pattern and long chain fatty acids including CLA. The treatments were 1) Control, 2) Corn oil, 3) Corn Oil+Monensin, 4) Soybean Oil, and 5) Soybean Oil+Monensin. The animals were fed 60 part grass hay and 40 part mixed concentrates. and plant oils were given in a form adsorbed in concentrate pellet. Monensin-Na was given at 33ppm through the rumen cannula.

Feeding plant oil or monensin significantly (P<.05) inhibited ruminal biohydrogenation of long chain fatty acids fed with concentrate feed. Soybean oil + monensin treatment showed the highest yield of CLA in the rumen content. Even if corn oil showed less yield of CLA in the rumen, formed higher concentration of *trans*-C_{18:1} could later used within the tissue being used as precursor for an endogenous synthesis of CLA.

It was concluded from the results of *in vitro* and *in vivo* experiments that monensin fed with plant oils increased CLA accumulation in the rumen by inhibiting complete biohydrogenation of respective C_{18:3} and C_{18:2} to C_{18:0}. Supplementation of both soybean oil and monensin in a diet will be a useful feeding practice to increasing CLA contents in ruminants' products.

3) Effect of oil supplementation on lipid metabolism in Korean native goat

Metabolism study was conducted with four ruminally cannulated Korean native goats to examine the effects of oil supplementation on fermentation characteristics, fatty acid composition of rumen microbes and blood by 4 x 4 Latin Square design. Basal diet consisted of 60% concentrate and 40% rice straw(DM basis). Experimental diets were basal diet as a control, supplementations of linseed oil, soybean oil, and sunflower oil at 5% level(DM basis) of basal diet.

Concentration of C18:2 in rumen microbes was significantly highest($P<0.05$) for sunflower oil treatment, but concentrations of C18:1 and C18:3 were lower than those of control. This results similar to blood fatty acid composition and unsaturated fatty acid was higher than control. Biohydrogenation of unsaturated fatty acid on rumen and blood tend to increased in oil source treatment.

3. Feeding studies

1) Effect of soybean oil supplementation on *trans*-11 octadecenoic acid and *cis*9,*trans*11-CLA content in the tissues of sheep

A feed trial was conducted with sheep for 12weeks to examine the effect of soybean oil(SBO) supplementation on long-chain fatty acids composition, especially *trans*-11 octadecenoic(t-FA) and *cis*9,*trans*11-CLA (c9,t11-CLA) in various tissues. Sheep were fed either a SBO supplemented diet(5%, DM basis) or a control diet without SBO. Chopped rye grass hay was fed as roughage. Concomitant increases in contents of TC and HDLC in the plasma of sheep were observed from the SBO supplementation, resulting in the increased ratio of HDLC/TC. The supplementation of SBO reduced($P<0.05$) the proportions of C_{16:1}, C_{17:0} and C_{17:1} but increased ($P<0.05$) the proportions of C_{18:0} and total t-FA in the intramuscular fat. The C_{18:0} proportion only in the subcutaneous fat was increased($P<0.05$) by the SBO supplementation. Proportions of C_{15:0} and C_{18:0} in the kidney fat were also increased($P<0.05$) while those of C_{16:1} and t-FA were reduced ($P<0.05$) by the SBO supplementation. The SBO supplementation slightly increased CLA proportion in the intramuscular fat and subcutaneous fat.

2) Production of functional Hanwoo beef by the optimal feeding of dietary

lipid

Twenty-four Hanwoo steers(20 months old, 567±18kg body weight) were divided into three groups of eight animals each according to body weight. Hanwoo steers in control group had the commercial concentrate for the late fattening stage. The other groups of steers were fed the same diet as control steers, but the concentrate was supplemented with high-C_{18:2} oil mixture(45% SBO, 20% sunflower oil, 20% safflower oil and 15% fish oil) at 6% level of concentrate(DM basis) and monensin(20ppm). The second and third group of steers were fed the oil mixture supplemented diet with monensin for last 2.5months and 5months, respectively, before they were being slaughtered.

Average daily gain(ADG) of Hanwoo steers during the 5month of experiment was higher($P<0.049$) for 5 month feeding of diet supplemented with oil mixture and monensin(MOPM) than for the other groups of steers, thus improved feed efficiency was observed from 5month feeding group. No difference in ADG was found between control and 2.5month feeding group of steers.

Fat thickness and *longissimus* muscle area tended to be greater in steers fed the diet supplemented with MOPM than in control steers. The MOPM supplementation for 2.5 months increased the pH($P<0.006$), decreased the CIE a* value($P<0.04$) compared to control. Feeding the MOPM supplemented diet for 5month improved quality grade while lowered the quantity grade of Hanwoo steers compared to control.

The MOPM supplementation increased total cholesterol(TC, $P<0.0001\sim0.0007$), HDL-C ($P<0.0001$) and HDLC/TC($P<0.004\sim0.034$) ratio in plasma after steers were fed for 3 month and 5 month compared with control steers. Steers fed MOPM had approximately twice the level of the c9,t11-CLA in plasma(0.84% vs. 0.44%) than the control steers.

Supplementation of MOPM for 5 month increased the content of CLA in intramuscular($P<0.015$), intermuscular($P<0.039$) and subcutaneous($P<0.001$) fat tissues compared with those of steers fed control diets and diets supplemented for 2.5 months which were similar, respectively. Total UFA was increased, while SFA was decreased($P<0.008$) due to the increased($P<0.001$) C_{18:2} and decreased($P<0.002$) C_{18:0} proportions in subcutaneous tissue when steers were fed diets supplemented with MOPM for 5 month compared with those of steers fed control diets and diets supplemented for 2.5 months which were similar.

CONTENTS

Chapter 1. Brief concept for the research and development	22
Section 1. Objectives of the research and development	22
1. Technological side	22
2. Economical and industrial side	23
3. Social and cultural side	23
Section 2. Objectives and contents of the research and development	24
Chapter 2. Status of technology development in domestic and foreign countries	26
Chapter 3. Results of the researches	33
Section 1. In vitro studies	33
1. Studies on the control of biohydrogenation activity by rumen microorganisms	33
2. Studies on the effects of Ionophore supplementation on the production of functional fatty acids	60
3. Effect of lipid supplementation on the lipid metabolism by rumen microbes	81
Section 2. Metabolism studies	98
1. Study on the effect of feeding condition of dietary lipid on the hydrogenation and T-FA production from unsaturated fatty acids and their availability	98
2. Effect of Ionophore supplementation on the CLA production in the rumen	106
3. Effect of lipid supplementation to the diet on the lipid metabolism in the rumen of Korean native goat	117
Section 3. Feeding studies	126
1. Effect of lipid supplementation to the diet on the composition of T-FA and fatty acids in fat tissues of the body of sheep	126
2. Production of functional Hanwoo beef by the optimal feeding of dietary lipid	131
Section 4. Overall results	143

Chapter 4. Achievement in research objectives and contribution to the related field	147
Chapter 5. Application plan of the research results	152
Chapter 6. Information of foreign technology	154
Chapter 7. References	155

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	22
1. 기술적 측면	22
2. 경제·산업적 측면	23
3. 사회·문화적 측면	23
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	33
제 1 절 <i>In vitro</i> 시험	33
1. 반추위미생물의 Hydrogenation Activity 조절에 관한 연구	33
2. 반추위 내 기능성지방산의 생산 증가를 위한 Ionophore 첨가효과 구명	60
3. 사료 내 지방첨가에 따른 반추위 내 미생물 대사에 미치는 영향	81
제 2 절 대사 시험	98
1. 지질사료의 급여조건에 따른 불포화지방산의 hydrogenation 및 T-FA 생성과 이들 물질의 체내 이용성에 관한 연구	98
2. Ionophore가 반추동물의 제1위 내 CLA 생산에 미치는 효과 연구	106
3. 한국재래산양 대사실험을 통한 지방 첨가가 반추위 내 대사에 미치는 영향	117
제 3 절 사양 시험	126
1. 지질의 첨가가 체지방의 T-FA 및 지방산 조성에 미치는 효과	126
2. 지질사료의 최적 급여조건을 통한 기능성 한우고기의 생산	131
제 4 절 결과 종합	143
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	147
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	152
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	154
제 7 장 참고문헌	155

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

반추가축 사료를 통하여 섭취한 지방 내 불포화지방산이 반추위미생물의 bio-hydrogenation 작용에 의해 포화지방산으로 전환된다는 연구결과가 보고된 바 있다 (Wu 등, 1991; Ashes 등, 1992; 송과 손, 1997; 송과 최, 1998). 이러한 현상 때문에 ω -3 또는 ω -6 지방산과 같이 인체에 바람직한 불포화지방산으로 구성된 지질 자원을 사료에 첨가하여 소에게 급여한다 하더라도 거의 대부분이 본래의 목적만큼 소의 체내에 이용(축적)되지 못하는 것이다.

한편, 근래에 들어 conjugated linoleic acid(CLA)가 암 발생 억제(anticarcinogenic activity), 면역기능 증진, 성장촉진 및 체지방 감소 효과 등의 연구 결과가 발표되어 왔다 (Pariza 등, 1998; Ha 등, 1987; Belury, 1995). 이와 같이 인체의 건강에 이로울 작용을 하는 것으로 알려짐에 따라 이에 대한 관심이 높아지고 있는데, 여러 종류의 CLA isomer 중 *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid가 측면에서 가장 active한 것으로 알려지고 있다. 일반적으로 CLA는 *trans*-fatty acids의 경우와 같이 반추위내에서 미생물에 의한 linoleic acid의 hydrogenation 과정에서 생성되는 것으로서, 반추위 미생물의 지방산 대사기능의 조절에 따라 CLA를 보다 많이 생성시킬 수 있다고 여겨진다. 낙농제품 및 쇠고기와 같은 반추가축으로부터 생산된 식품이 CLA를 포함하는 주요 자원임을 말할 필요도 없다.

또한 반추위미생물의 hydrogenation activity는 불포화지방산의 포화지방산화에 그치지 않고 자연계에서 특수한 경우를 제외하고는 포함되지 않은 매우 특이한 지방산을 생성한다. 그 중 한 가지가 *trans*-fatty acids(T-FA)이다. 지금까지 조사한 결과에 의하면 T-FA가 인체의 건강에 해로운 작용을 할뿐만 아니라 유지율을 낮추는 원인의 하나이며 쇠의 지방대사에 영향을 주고 있다는 점이다. 일정량 이상 T-FA를 섭취할 경우 혈장의 total 및 LDL-cholesterol 함량과 lipoprotein을 증가시키는 반면 HDL을 낮추는 것으로 알려져 왔으며, 이론적으로는 포화지방산의 경우와 같이 coronary heart disease를 유발하는 것으로 알려져 있다. 물론 LDL- 또는 HDL-cholesterol에 대한 T-FA의 효과는 섭취량과 직접 관련된다. 소의 반추위내 미생물, 특히 박테리아에 의한 hydrogenation 과정에서 T-FA가 생성되는 만큼 우리가 섭취하는 쇠고기가 T-FA의 주요 source가 된다. 따라서 인체의 건강 측면에서 이들 축산물(쇠고기) 내에 축적되는 T-FA의 양을 최소화시키는 기술의 개발이 필요하다.

현재까지 진행되어온 연구는 대부분 T-FA 또는 CLA의 섭취가 인체의 건강에 미치는 효과에 중점을 둔 것이었다. 이에 비하여 소와 같은 반추가축의 사육 여건이나 반추위 내 발효환경과 T-FA 또는 CLA 생성간의 관계에 관한 정보는 매우 제한되어 왔다. 앞에서 지적한 바와 같이 일반적으로 불포화지방산에 대한 반추위미생물의 hydrogenation activity는 소가 섭취하는 사료의 종류 및 섭취량, 그리고 지질(fat 또는 oil)의 종류와 가공 방법 및 첨가량 등에 따라 달라지는 발효 환경에 의해 크게 영향을 받을 수 있다. 이런 점으로 미루어 보아 반추위 내에서의 T-FA 또는 CLA 생성량 역시 비육우의 성장 단계나 젖소의 비유 단계에 따른 사료급여 형태 등에 의해 크게 영향을 받을 것으로 여겨져 이에 대한 연구가 요구된다.

2. 경제·산업적 측면

반추위 미생물에 의한 hydrogenation 작용, T-FA 또는 CLA 생성에 관한 연구 결과로 미루어 보아 쇠고기 등에 포함되는 생성량은 급여하는 사료의 종류나 섭취량 또는 각종 지질의 첨가와 관련이 있는 것으로 보인다. 앞에서 지적한 바와 같이 포화지방산과 T-FA를 일정량 이상 섭취할 경우 인체의 건강에 좋지 못한 작용을 할 수 있다. 이에 반하여 CLA는 암 발생을 억제하거나 동맥경화증의 발생을 억제하고 체지방의 축적을 감소시키는 등 인체에 이로운 작용을 하는 것으로 알려진다. 따라서 쇠고기 내의 포화지방산과 T-FA 함량을 감소시킬 수 있는 기술을 개발하여 산업화시킴으로써 이들 식품을 섭취하는 소비자들의 건강에 이로움을 주고 부가가치 증진을 통한 소 사육농가의 수익 증대를 높일 필요가 있다.

3. 사회·문화적 측면

인체에 보다 안전하거나 이로운 쇠고기 생산을 위한 기술을 개발하는 것은 연구하는 사람들의 책임이다. 한편으로는 이러한 식품을 직접 생산하는 사육농가의 소득을 개선시켜줌으로써 소 사육기반을 다지는 효과도 낼 수 있다. 따라서 반추위 미생물의 지질대사 관련 작용을 조절함으로써 앞에서 지적한 물질들을 생체(소) 내에서 자연적으로 생산될 수 있도록 하여 인체의 건강을 유지시킬 수 있는 기술의 개발이 사회적으로 절실히 요구되는 시점이다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

본 연구의 최종 목표는 지방대사와 관련된 반추위 미생물의 각종 activity를 조절함으로써 자연적인 방법에 의한 지방산 관련 기능성 한우육을 생산하기 위함이다. 이러한 목적을 달성하기 위해 크게 in vitro 시험(1차년도), in vivo 대사시험(2차년도) 그리고 최종적으로 한우를 대상으로 하는 사양시험(3차년도) 등 3단계에 걸쳐 연구를 수행하였다. 아울러 각 과제별로 반추위 미생물의 각종 지방대사 작용을 각종 발효조건 하에서의 hydrogenation activity에 미치는 효과(충북대 송만강), ionophore가 반추위미생물의 지방대사에 미치는 효과(고려대 손용석) 그리고 그와 관련된 주요 미생물의 분포 및 작용을 조사(중앙대 장문백)하는 등 가장 기본적인 연구를 수행함으로써(1차년도) 실제 반추동물에서의 지방(산)대사와 미생물과의 관계를 구명하였다. 그 이후에는 각 과제별 1차년도의 결과를 실제 동물에 적용하여 확인하는 단계의 대사시험을 실시하고(2차년도), 도출된 결과를 한우에 적용함으로써 실질적인 목적을 확인하는 최종 사양시험을 실시하였다(3차년도). 이에 대한 구체적인 세부계획은 다음과 같다.

1. In vitro 시험 (1차년도)

가. 반추위미생물(위액)을 이용하여 in vitro 방법으로 각종 발효 환경(조건)이 지질 사료 내 C₁₈-계 불포화지방산의 hydrogenation과 이 과정 중 T-FA의 생성에 미치는 효과를 조사하고자 기초 시험 실시 (충북대)

- 1) 일반 사료자원의 탄수화물 성 에너지 수준이 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 trans-11 octadecenoic acid(t11-C_{18:1}) 생성과 hydrogenation 정도에 미치는 효과
- 2) 섬유소(일반 조사료) 첨가 수준이 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과
- 3) 지질자원의 첨가형태가 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과
- 4) 배양액의 pH가 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA

생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

나. Ionophore가 반추위미생물의 기능성지방산 생산에 미치는 효과 연구 (고려대)

- 1) 반추위 내 기능성지방산의 생산 조절을 위한 Ionophore 첨가효과 구명
(잠재력이 높은 식물성 지방사료 결정하고 Ionophore의 첨가를 통한 최적
생산조건 결정)

다. Batch culture와 Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의
조성에 미치는 영향 (1차년도, 중앙대)

- 1) Batch culture를 이용한 지방첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향
- 2) Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향

2. 대사시험 및 사양시험 (2차년도)

가. 대사시험

- 1) 지질사료의 급여조건에 따른 불포화지방산의 hydrogenation 및 T-FA 생성과
이들 물질의 체내 이용성에 관한 연구 (충북대)
- 2) Ionophore가 반추동물의 기능성지방산 생산에 미치는 효과 (고려대)
- 3) 한국재래산양 대사실험을 통한 지방 첨가가 반추위 내 대사에 미치는 영향
(중앙대)

나. 사양시험

- 1) 지질의 첨가가 체지방의 T-FA 및 지방산 조성에 미치는 효과

3. 한우 사양시험 (3차년도)

가. 지질사료의 최적 급여조건을 통한 기능성 한우고기의 생산 (충북대)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

반추위 미생물의 hydrogenation activity에 관한 연구가 불포화지방산을 이용하거나 (Wu 등, 1991; 송과 손, 1997; 송과 최, 1998)과 종실(Middaugh 등, 1988)을 이용하여 실시된 바, 발효 여건 및 시험 방법에 따라 20 - 95% 정도가 hydrogenation 되었음을 알 수 있었다.

또한 불포화지방산이 hydrogenation되는 과정에서 *cis*-불포화지방산으로부터 T-FA가 생성된다는 사실도 발견하였다(Mensink 등, 1990; Zock 등, 1992; Nestel 등, 1992). 아울러 일정량 이상의 포화지방산이나 *trans*-FA를 섭취할 경우 순환기 질병의 발생 요인으로 작용할 가능성이 높은 것으로 판명된 바 있다(Troisi 등, 1992; Willett 등, 1993; Siguel 등, 1993; Ascherio 등, 1994; Willett 등, 1994; Siguel 등, 1994; Judd 등, 1994; Aro 등, 1995; Katan 등, 1995; Samman, 1995; British Nutrition Foundation, 1995; Precht와 Molkentin, 1995; Van de Vijver 등, 1996). 자연적으로는 사료를 통하여 섭취된 불포화지방산이 소의 반추위내 미생물, 특히 박테리아에 의한 hydrogenation 과정에서 *trans*-FA가 생성되는데(Katan 등, 1995; Pedersen 등, 1998), Lake 등(1996)에 의하면 butter의 지방산 100g 당 6.4g의 *trans*-FA가 함유되어 있다고 하였다.

식품 중 CLA 공급원은 유지방, 육류지방 및 식물성 기름이며, 동물성 식품 중에서는 비반추동물에서보다 반추동물에서 유래하는 식품에서 함량이 높게 나타난다. C18:2_{n-6} 지방산의 경우 불완전한 hydrogenation이 일어날 때 CLA를 형성하고, 이것이 소장으로 유입 흡수되어 조직으로 공급되므로 유지방이나 육지방에서 CLA가 발견된다. 일반적으로 유지방 내에 CLA의 농도는 3-6mg/g fat의 범위로 우군에 따라 차이가 있으며, 육지방 내 농도는 대체로 유지방보다 낮은데, 이것은 전통적인 사양방법상 육우에 공급되는 사료 중에 농후사료의 비율이 높은 때문인 것 같다(Bauman 등, 1999).

근래에 동물성 식품 중에 CLA의 농도를 높이려는 연구는 젖소를 중심으로 많이 수행되어 왔다. 그러나 반추위미생물이 관여하고 조직에서의 지방산 대사가 관여하는 한, 유선조직에서 일어날 수 있는 지방산 변화는 육조직에서도 마찬가지로 기대할 수 있다(Bauman 등, 1999). Kelly 등(1997)은 oleic acid가 풍부한 낙화생유, linoleic acid가 풍부한 해바라기유, linolenic acid가 풍부한 아마인유를 사료에 첨가하여 우유지방 내 CLA의 함량 변화를 조사한 바 있는데, 우유지방 내 CLA농도 낙화생유, 해바라기유, 아마인유 첨가 시 13.3%, 24.4%, 그리고

16.7%로 나타나 다가불포화지방산(PUFA)의 보충급여가 유지방 내 CLA 농도를 증가시키는 것으로 나타났다.

CLA의 생산을 극대화하기 위해서는 C18:2 지방산의 함량이 높은 사료 지방의 급여가 효과적이다(Kelly 등, 1998a), Dhiman 등(1997)의 연구에 의하면, linoleic acid와 linolenic acid가 풍부한 사료를 급여하였을 때 유지방 내 CLA 농도가 증가되었다. 중성지방은 반추위미생물에 의하여 가수분해가 일어난 후 hydrogenation이 서서히 일어남으로써, 빠른 속도로 hydrogenation이 일어나는 유리지방보다 유지방 내의 CLA의 농도를 증가시킨 것으로 보인다. Pariza 등(1996)은 방목시킨 젖소가 저장조사료를 급여한 젖소와 비교 시 유지방 내 CLA의 농도가 유의적으로 증가되었음을 보고하였다. 이는 방목시킨 젖소가 CLA의 전구체인 linoleic acid를 더 많이 섭취하였음을 의미하고, 많은 양의 목초를 섭취할 수 있으므로 반추위 내 사료통과속도가 증가되어 CLA가 반추위 내 미생물들에 의하여 hydrogenation되는 시간이 감소되었음을 암시한다.

Lawless 등(1998)은 전지대두 또는 채종유를 급여하여 우유 내 CLA의 농도를 관찰한 결과, 채종유를 급여하였을 때에는 사료 내 C₁₈ 다가 불포화지방산의 CLA의 전환이 최적수준으로 진행되지 않았으며, *trans*-11 C18:1의 생성량도 낮았는데, 이것은 채종유의 이용성이 높지 않았음을 의미한다. 이러한 현상은 사료지방의 불포화도가 증가될 때 나타나는 것으로 알려져 있으며 지방급여에 의한 미생물 활성의 억제 현상과는 상관이 없는 것으로 보인다.

한편, Hawke와 Silcock(1970)는 반추위에서 다가 불포화지방산들의 완전한 hydrogenation은 사료입자와 밀접한 관계를 지니고 있음을 증명하였다. 사료입자를 원심분리하여 제거시킨 뒤 *in vitro* 배양을 실시한 결과 불포화지방산들의 완전한 hydrogenation은 일어나지 않았다. 이는 곧 불포화지방산들의 hydrogenation이 주로 사료입자에 부착되어 있는 반추위미생물들에 의하여 일어남을 암시한다.

유지방 내 CLA와 *trans*-11 C18:1의 농도간에는 높은 상관관계가 있다(Lawless, 1998). *Trans*-11 C18:1은 사료 내 linoleic acid가 stearic acid로 hydrogenation이 진행되는 과정에서 생성되는 중간산물이다. Dhiman 등(1999)은 사료 내 익스트루전 처리를 한 전지대두와 전지면실을 첨가 급여하여 우유와 치즈내의 CLA의 함량을 조사한 바 있는데, 전지대두를 첨가 급여시가 전지면실 급여시보다 우유 내 CLA의 함량이 더 증가되었다. 이것은 전지대두의 불포화지방산들이 전지면실의 불포화지방산들에 비하여 반추위 내 hydrogenation이 더 많이 일어났음을 나타낸다. 따라서 반추위미생물에 의한 불포화지방산의 hydrogenation 효율이 지방공급원에 따라 다르게 나타남을 보여

주고 있다. Choulinard 등(1997)은 120℃, 130℃, 140℃에서 열처리시킨 전지대두와 무처리 전지대두를 *in vivo*와 *in situ* 방법에 의하여 반추위내용물과 우유지방산들의 조성 변화를 관찰하였던 바, C18:2 및 C18:3과 같은 불포화지방산들은 열처리 전지대두보다 무처리 전지대두에서 빠르게 사라졌다. 또한 C18:0의 감소와 *trans*-11 C18:1 생성 저하가 나타난 것으로 미루어 무처리 전지대두 중의 불포화지방산 감소는 활발한 hydrogenation에 기인한 것이 아니라 고 저자들은 판단하였다.

한편, Bauman 등(1999)은, CLA의 합성과 관련한 기존 연구들을 종합할 때, CLA 양적 생산의 가능성은, 첫째, 공급하는 사료지방의 조절에 의하여 달성할 수 있으며, 또 다른 한 가지는 반추위미생물의 환경을 변화시켜 달성할 수 있다고 하였다. 근래에 육우를 비롯한 일부 반추동물에 허용되고 있는 Ionophore의 응용은 후자인 반추위 내 발효환경을 변화시키는 것과 관련이 있다. Monensin과 Lasalocid는 반추동물에 많이 사용하는 Ionophore로서 박테리아의 세포막을 정상적으로 이동하는 cation gradient를 낮추어 미생물의 활성을 전환시키는 것으로 알려져 왔다(Bergen 등, 1984; Schelling, 1984; Russell, 1987).

Monensin은 본래 Coccidiostat인 *Streptomyces cinnamonensis*에서 생성된 생리활성이 높은 화합물로서, 반추동물에 급여 시 발효패턴을 변화시킬 수 있다는 사실이 지난 20여 년간의 많은 연구를 통하여 알려져 있는데, Richardson 등(1976)의 연구에 의하면, 프로피온산의 생성이 50%증가하며 초산과 낙산의 생성은 감소하였다. 반추위 내 발효과정에서는 사료에너지의 약 12%가 메탄으로 손실이 될 수 있는데, Ionophore는 메탄 생성을 30%까지 감소시켜 에너지이용효율을 높여준다. 반추위는 혐기적 환경이므로 기질의 산화는 환원반응과 밀접하게 연결되어 있다. 메탄생성이 감소되었을 때 반추위 내에서 프로피온산 생성이 초산보다 상대적으로 증가한다. 왜냐하면 전자는 후자보다 CH₄형성에 이용되는 수소를 포집할 수 있는 능력이 더 크기 때문이다.

Monensin은 1970년대 중반 이후 반추위 발효환경에 영향을 주기 위하여 사용되어져 왔는데, 이때 Monensin은 미생물세포 세포막의 integrity를 방해(파괴)하는 Ion carrier로 작용한다. Ionophore의 일반적인 작용기작과 마찬가지로, Monensin은 보통 세포막을 따라 H⁺와 N⁺를 용이하게 1대 1 교환형식으로 투과시키는 antiporter임과 동시에, 세포막에서의 K⁺와 H⁺의 교환을 중재한다(Pressman and Fahim, 1982). Monensin을 첨가하지 않았을 때에는 세포 내에 H⁺, Na⁺, K⁺의 농도가 세포 밖보다 높지만, Monensin을 통해 Na⁺, K⁺의 유출은 가능한데, 이것은 모넨신은 K⁺만큼 Na⁺에 대한 친화력이 높기 때문이다(Pressman and Fahim, 1982). K⁺의 농도차는 Na⁺의 농도차보다 25배 더 높다. K⁺유출은

H⁺의 축적을 유도하며 세포 내의 pH를 낮춘다. 또한 세포 내의 pH가 세포외보다 낮아지면 Na⁺의 유입은 H⁺의 유출에 의해 이루어진다. 그러므로 *S. bovis*는 pH 5.4의 환경에서도 살아남을 수 있었다(Russell and Hino, 1985).

그러므로 Ionophore의 응용은 반추위 내 발효환경에 변화를 줌으로써 CLA 생성량을 증가시킬 가능성이 있다. 상당한 연구에서 Ionophore를 사료에 첨가하면 지방의 가수분해와 hydrogenation의 활성이 저해됨이 보고되었다. Van Nevel 등(1995)의 *In vitro* 연구에서 반추위미생물의 활성은 항생제들의 첨가로 확실히 감소되었는데, Lasalocid sodium을 제외하고는 유리지방산들의 hydrogenation에 영향을 주지 않았다. Linoleic acid의 hydrogenation은 Ionophore의 첨가로 다소 감소되었으며, *In vivo*로 관찰한 반추위 내 지방의 가수분해에서도 유사한 효과를 보였다. Ionophore를 다량의 불포화지방산과 함께 급여하였을 때 지방조직과 유지방에 불포화지방산이 증가하였는데, 이는 Ionophore에 의한 지방의 hydrogenation이 보다 낮은 수준으로 일어났음을 암시하는 것이다. Fellner 등(1997)은 순수C18:2_{n-6}와 Nigericin, Monensin, Tetronasin 등을 반추위액으로 연속 배양시켜 C18:2_{n-6}의 hydrogenation 정도를 관찰한 바 있는데, Nigericin, Monensin과 Tetronasin을 첨가하였을 때 대조구에 비하여 C2/C3 비율이 감소하였으며, CH₄, butyrate, valerate, isobutyrate, isovalerate의 생성비율도 감소하였고, 전체 지방산의 methyl ester 함량이 배양액 ml당 1.4mg 증가하였다. Nigericin, Monensin과 Tetronasin의 첨가에 의해 C18:0의 농도는 각각 36%, 32% 그리고 36%로 감소되었는데, 저자는 C18:2_{n-6}의 hydrogenation에 관여하는 G(+)-균인 *B. fibrisolvens*와 *Ruminococcus albus*의 성장이 이들 Ionophore들에 의해 억제됨으로써 수소의 생성이 감소되었을 것으로 보며, 따라서 hydrogenation에 이용될 수 있는 수소의 농도가 줄어들었으므로 C18:2_{n-6}의 hydrogenation이 덜 일어난 것으로 해석하였다.

Callaway 등(1997)은 cellobiose와 Monensin를 첨가하여 *In vitro* 배양시 유기산(L-aspartate, fumarate, DL-malate)의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 미생물에 의한 유기산의 이용률이 증가하였다. 전체 VFA의 농도는 cellobiose를 첨가함으로써 증가하였고, 유기산이 박테리아에게 이용되기 전에 Monensin에 대한 lag time(≤8 h)이 있었다. Monensin의 첨가로 총 VFA의 농도는 증가하였으나, 초산:프로피온산 비율은 감소하였으며, Monensin과 cellobiose를 동시에 첨가하였을 때, 유기산이 이용되면서 프로피온산의 생산이 증가하였다. Cellobiose와 Monensin의 첨가는 탄소와 에너지를 미생물에게 공급하며, electron disposal에 영향을 줌으로써 *In vitro* 배양시 미생물의 유기산 발효에 영향을 주었다. Bergen과 Bate(1984)는 Monensin이 반추위

electron acceptors를 선택하기 위해 H₂를 재분배한다고 하였고, Ionophores는 lactate의 생성을 억제하고 유기산이 lactate의 uptake를 자극한다고 하였다.

Masaaki 등(1989)에 의하면 Monensin은 반추위미생물의 지방산을 변화시킬 수 있다고 하였다. 일반적인 박테리아의 지방산 구성은 C15:0, C16:0, C18:0 그리고 C18:1이고, 섬모충은 C16:0, C18:0, C18:1 그리고 C18:2인데, 그 평균함량은 C15:0, C16:0, C18:0 그리고 C18:1이 각각 5.4%, 21.4%, 52.7% 그리고 9.5%로 나타났으며, Monensin을 첨가시에는 C18:0과 C18:1의 비율이 감소하는 변화가 생겼으나, C15:0 및 C16:0의 비율의 변화는 크지 않았다.

대부분 Monensin은 G(+)인 미생물에 그 기능이 발현되며, G(-)균에서는 그렇지 못하다(Rusell, 1989). Hydrogenation수소첨가반응은 섬모충보다 박테리아에서 더 활발하게 일어나므로 박테리아를 먹이로 하는 섬모충의 지질의 구조는 박테리아의 지방구조에 달려 있으며, 이것은 지방산의 사슬길이를 단축시키는 섬모충의 제한된 β -oxidation으로 지방산 대사가 영향을 받기 때문이다(Emmanuel 등, 1974). *In vitro*에서 Monensin은 수소와 formate를 생성하는 박테리아를 억제하였으며, succinate와 propionate를 생성하는 박테리아의 성장을 도와줌으로써 메탄의 생성과 초산의 생성을 감소시키면서 반대로 프로피온산의 생성을 증가시켰다(Chen 등, 1979).

Monensin의 첨가로 인해 미생물의 지방산조성이 변화하는 이유는, 부분적으로 반추위 내 hydrogenation이 Monensin에 의해 억제되기 때문이다. 그러나 Monensin이 직접 hydrogenation을 억제시키는지, 아니면 간접적으로 수소의 생성을 감소시키는지 아직 알려지지 않다. Marmer 등(1985)에 의하면 사료에 첨가한 Monensin은 반추가축 도체의 지방산 조성을 변화시켰다고 하였다. 즉 Monensin을 급여한 조직 내에서 불포화지방산의 총량이 감소하였는데, 이것은 반추위 내 hydrogenation이 저해되었음을 의미하며, 반추위 내 박테리아 성장이 억제된 것과 관련이 있다.

Karl 등(1987)은 Monensin과 Lasalocid의 antimicrobial 활성을 조사하기 위하여 K⁺의 농도를 달리하면서 반추위액으로 배양실험을 하였다. *B. ruminicola*, *S. ruminantium* 그리고 *S. bovis* S1은 높은 Monensin 농도(40mg/liter)에서도 저항력이 있었으며, 반면에 *B. flbrisolvnes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 그리고 *E. ruminantium*는 저수준의 Monensin(≤ 0.16 mg/liter)에서 성장이 억제되었다. Chen 등(1979)의 연구에서 Butyrate-, formate-, 그리고 hydrogen-producing 박테리아는 Monensin에 의해 성장이 크게 변화되지 않았다. 고수준의 Ionophore가 배양액에 첨가되었을 때 세포의 최대생산을 감소시키거나 lag time이 증가하였고, *Bacteriodes ruminicola*의 1종과 *Selenomonas ruminantium* 2종을 함께 배양하였을 때 위의 두 현상이 모두 나타났다. 하지만 이 미생물들의 성장을 완전히 억제시키지는 못했다. 배양액의 K⁺ 농도가 증가할수록(7.9에서 23.3mM) lag time 또는 세포의 생산을 증가시켰으며, 반면에 이들

미생물들에 대해서 Monensin과 Lasalocid의 활성은 저수준(1.3mM)의 K^+ 을 함유한 배양액에서 증가하였다. 이 연구를 통해 세포외의 K^+ 농도가 반추위 내 Ionophore의 antimicrobial 활성에 영향을 줌이 확인되었다. 세포 내의 K^+ 농도는 protons의 흐름과 연관이 있으며 *Streptococcus bovis*속에 있어서 Na^+ 은 Monensin에 의해 노출된다(Russell, 1987). 세포 내의 이온농도 변화는 Ionophore의 antimicrobial의 활성으로 간주된다.

Van 등(1977)은 단백질과 탄수화물을 대사하는 반추위미생물과 함께 배양하여 Monensin의 효과를 알아보았다. 통계적으로는 차이는 없었지만 메탄생성의 억제와 프로피온산 생성의 증가가 관찰되었고, Monensin에 대한 메탄생성의 억제는 메탄생성 미생물에 대한 특별한 독소작용보다는 오히려 formate로부터의 수소생성을 억제하기 때문이다. 전체 미생물의 성장은 Monensin첨가로 상당히 감소하였으나 발효된 기질은 변화하지 않았으며 미생물 성장효율은 낮아졌다. Casein과 함께 배양시 Monensin은 단백질 분해를 저하시켜 암모니아의 생성을 감소시켰으며 반면에 α -amino N이 조금 축적되었다.

Bartley 등(1979)은 Monensin sodium, Lasalocid sodium, 그리고 niacin의 첨가가 *In vitro*에서 반추위 내 발효에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. Monensin과 Lasalocid를 11에서 66ppm수준으로 첨가하였을 때 단백질의 합성이 감소되었다. 176ppm에서는 아주 심하게 단백질의 합성을 억제시켰으나 niacin 첨가시에는 단백질 합성이 증가하였다. Monensin과 Lasalocid는 반추위내 프로피온산 농도를 증가시키고 초산농도를 감소시켰으며, Monensin의 경우에는 반추위 내 lactate를 증가시켰다. 이 두 Ionophore는 가스생성을 억제시켰으며, niacin의 단독첨가 역시 가스생성을 억제하였으나 항생제의 억제효과 만큼은 못했다. Monensin을 *In vitro*에서 배양시 반추위 액과 제4위액 내에서 비교적 안정하였으며, 배양 후 10일이 지나가면 처음에 4.5ppm이었던 것이 2.6ppm으로 감소하였다(Donoho, 1978).

이상과 같은 기존 연구결과들을 종합해 볼 때, Ionophore의 하나인 Monensin은 반추위 내 수소이온의 재분배에 영향을 미치거나, 미생물상의 변화를 주거나, 또는 미생물의 지방산 조성을 변화시킴으로써 반추동물이 섭취한 사료지방을 대사에 영향을 미친다. 관련 연구보고들은 특히 섭취된 지방의 가수분해와 hydrogenation의 속도를 지연시킴으로써 궁극적으로 기능성지방산인 CLA의 생성에 영향을 줄 수 있음을 암시하고 있다.

한편, 어유를 사료에 첨가할 경우에도 유지방의 CLA 농도가 증가되었다는 보고가 있다(Chouinard *et al.*, 1998). Dhiman 등(1999)이 췌소에 55% alfalfa silage와 45% 곡류 사료를 급여하거나 그 사료에 어유를 3% 수준으로 첨가 또는 Monensin을 1일

두당 250 mg 첨가할 경우, 그리고 어유와 Monensin을 동시에 첨가하여 급여했을 때 각 사료를 급여한 젖소의 우유 내 CLA 농도는 각각 우유 g 당 5.3, 8.6, 6.8 및 8.9 mg/g이었다고 발표하였다. 그러나 사실상 사료에 어유나 어분을 첨가함으로써 반추위 내에서 *trans*-fatty acid의 농도가 증가되었는데(Borsting 등, 1992; Scollan 등, 1997), 이와 같은 *trans*-fatty acid의 축적이 아마도 유지방 조성에 반영된 것으로 보인다(Wonsil 등, 1994; Mansbridge와 Blake, 1997).

Trans-FA의 경우와 같이 반추위 내에서 미생물에 의한 linoleic acid의 hydrogenation 과정에서 생성되는(Kepler와 Tove, 1967) CLA는 인체 내에서 매우 이로운 작용을 하는 것으로 알려진다(Ip 등, 1994). 우유의 CLA 함량이 사료의 종류 또는 섭취량(Jiang 등, 1996; Lawless 등, 1996; Stanton 등, 1997), 첨가하는 oil의 형태와 종류(Dhiman 등, 1996; Dhiman 등, 1997; Kelly와 Bauman, 1996; Lawless 등, 1996; Murphy 등, 1995; Stanton 등, 1997) 등에 의해 달라질 가능성이 있는 것으로 보고되기도 하였다.

앞에서 제시한 대부분의 연구가 포화지방산이나 *trans*-FA 또는 CLA 섭취에 따른 효과를 인체를 대상으로 조사한 것이거나 이들 물질의 양적인 측면만을 조사한 것이었다. 특히, 이와 관련된 연구의 대부분이 외국의 일부 축산 선진국에서 집중적으로 실시되었을 뿐 반추위 미생물의 hydrogenation 작용에 관한 기초시험(송과 손, 1997; 송과 최, 1998)을 제외하고는 국내에서는 거의 실시된 바 없다. 식품(유제품 및 쇠고기)과 함께 섭취할 수밖에 없는 지질이 인체의 건강에 해로운 경우가 흔히 발생되는데, 이러한 문제를 방지하기 위한 기초연구는 물론 이들 물질의 생성량을 조절하는 기술이 국내에서 속히 개발되어야 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 *In vitro* 시험 결과

1. 연구 제목 : 반추위미생물의 Hydrogenation Activity 조절에 관한 연구 (충북대)

가. 일반 사료자원의 탄수화물 성 에너지 수준이 반추위미생물에 의한 *cis*-unsaturated fatty acid로부터 *trans*-11 octadecenoic acid(*t*11-C_{18:1}) 생성과 hydrogenation 정도에 미치는 효과

1) 재료 및 방법

가) 반추위액의 준비

1일에 5kg의 옥수수 사일리지(60%)와 농후사료(40%)를 2회에 걸쳐 섭취한 반추위 fistula가 장착된 Holstein 젖소 2두로부터 사료 급여 30분 후에 반추위 내용물을 채취하였다. 그 후 실험실에서 Waring blender로 20초간 높은 속도에서 blending 한 다음 12겹의 가제로 여과시켰다. 이때 CO₂ gas를 flushing 하였다.

나) 배양액의 준비 및 배양

CO₂ gas를 flushing 하면서 반추위액을 McDougalls 인공 타액(1948)과 1:1의 비율로 혼합하였으며, 4 수준(0.83, 1.25, 1.67 and 2.08%, w/v)의 분쇄한 농후사료와 분쇄된(1mm) 아마씨(linseed, *L. usitatissimus*) 또는 채종(rapeseed, *B. napus*)를 0.83%(w/v) 수준으로 600ml 혼합 배양액이 들어있는 1.8L culture jar(Figure 1-1)에 넣었다. 그 후 3분간에 걸쳐 CO₂ gas를 flushing 하였으며, 39°C의 stirrer가 장착된 water bath에서 24시간까지 배양하였다(Figure 1 및 2). 이때 stirring 속도는 분 당 120 회였다. Oil과 농후사료의 C₁₈-계 지방산 조성은 Table 1-1에서 보는 바와 같다. 본 시험은 비슷한 조건에서 3회 반복하여 실시되었다.

다) Total viable bacteria 수 조사

배양액 내의 살아있는 박테리아 수는 Hungate(1966)의 혐기적 배양 방법에 따라 배양 12시간 및 24시간에서 조사하였다. 1ml의 배양액을 취한 다음 Bryant and Robinson's diluting solution(1961)으로 10⁵~10⁷ 까지 희석하였고, non-selective artificial medium(Scott and Dehority, 1965)이 들어있는 roll tube에 1ml를 접종하여

39°C의 배양기에서 5일간 배양하였다.



Figure 1-1. Culture jar for the in vitro study



Figure 1-2. Process of *in vitro* fermentation

Table 1-1. Lipid contents and C₁₈-fatty acids of oilseeds and concentrate

Feed Components	Lipid (% DM)	Composition of C ₁₈ -fatty acids			
		Stearic acid (C _{18:0})	Oleic acid (C _{18:1})	Linoleic acid (C _{18:2})	Linolenic acid (C _{18:3})
Linseed	34.04	2.75	16.9	13.9	59.2
Rapeseed	43.83	3.22	31.1	22.3	34.0
Concentrate	6.42	4.77	23.5	43.1	4.5

라) 시료 채취 및 분석

배양액은 배양 3, 6, 12 및 24시간에서 각각 5ml 씩 채취하여 암모니아 농도 및 VFA 분석에 사용하였으며, pH 역시 동일한 시간에 측정하였다. 암모니아 농도의 경우 Fawcett과 Scott(1960) 방법으로 전 처리한 다음 spectrophotometer(DU-650)를 이용하여 농도를 분석하였다. VFA의 경우 배양액 4ml와 25% phosphoric acid 1ml를 혼합하고 여기에 internal standard로 pivalic acid 용액(2%, w/v)을 0.5ml 첨가한 다음 15,000xg에서 15분간 원심분리한 후 gas chromatograph(GC, HP 5890II, Hewlett Packard Co.)로 분석하였다. 또한 동일한 채취시간에 각각 200ml의 배양액을 채취하

여 동결건조를 한 다음 Folch's solution(Folch et al. 1957)으로 lipid를 추출하였다. 추출된 lipid는 Lepage와 Roy(1986)의 방법에 따라 methylation 시킨 다음 GC로 분석하였다. 이때 fused silica capillary column(100m×0.25 mm, i.d.×0.20μm thickness, Supelco, SPTM-2560; USA)을 사용하였으며, injector와 detector 온도는 모두 250℃에서 유지시켰으며, initial column 온도는 175℃(held for 30 min)였고 그 이후로 분당 15℃ 씩 220℃(held for 40 min) 까지 상승시켰다. Carrier gas로는 ultra pure helium을 사용하였다.

마) 통계 분석

본 연구로부터 얻은 성적은 SAS(1985)의 general linear models에 따라 최소 분산 분석을 하였으며, 처리간 평균치는 S-N-K Test(Steel and Torrie, 1980) 방법으로 비교하였다.

2) 결과

농후사료 첨가수준이 여러 배양시간 대에서 배양액의 pH에 크게 영향하지는 않았으나, linseed and rapeseed의 배양 모두에서 농후사료 첨가수준이 높을수록 pH는 낮은 경향을 보였다(Figure 1-3). 암모니아 농도의 경우 linseed and rapeseed 모두에서 처리간 차이를 보이지 않았다(Figure 1-4). 배양시간이 길어짐에 따라, 그리고 농후사료 첨가수준이 높아짐에 따라 VFA 농도가 증가되는 경향을 보였다(Tables 1-2 및 1-3). 예상했던 바와 같이 linseed(Table 1-2) 및 rapeseed(Table 1-3)에서 배양시간이 증가하고 농후사료 첨가수준이 높아짐에 따라 acetate(C₂) 비율이 감소된 반면 propionate(C₃) 비율은 증가하는 경향을 보였다. 비록 처리간 뚜렷한 차이는 없었지만 가장 높은 농후사료 첨가수준에서의 C₃ 비율은 linseed를 12시간(P<0.029) 및 24시간(P<0.030) 하였을 때 증가된 것으로 나타났다. 배양 24시간(linseed, Table 1-2) 또는 12시간(rapeseed, Table 1-3)에서 농후사료 첨가 수준이 높아짐에 따라 배양액 내 박테리아 수도 증가하는 경향을 보였다.

두 종류의 oil source 모두에서(linseed, Table 1-4; rapeseed, Table 1-5) 배양시간이 증가됨에 따라 배양액의 C_{18:1}, C_{18:2} 및 C_{18:3} 비율이 감소된 반면 C_{18:0} 및 t11-C_{18:1} 비율은 증가된 경향이였다. Linseed를 배양했을 경우 농후사료 수준은 C_{18:0} 및 C_{18:1} 조성 비율에 영향하지 않았으나 모든 배양시간 대에서 농후사료 수준이 증가함에 따라 C_{18:2} 비율은 증가하는 경향인 반면 C_{18:3} 비율은 배양 6시간까지 감소하다가 그 이후로는 증가하는 경향을 보였다(Table 1-4).

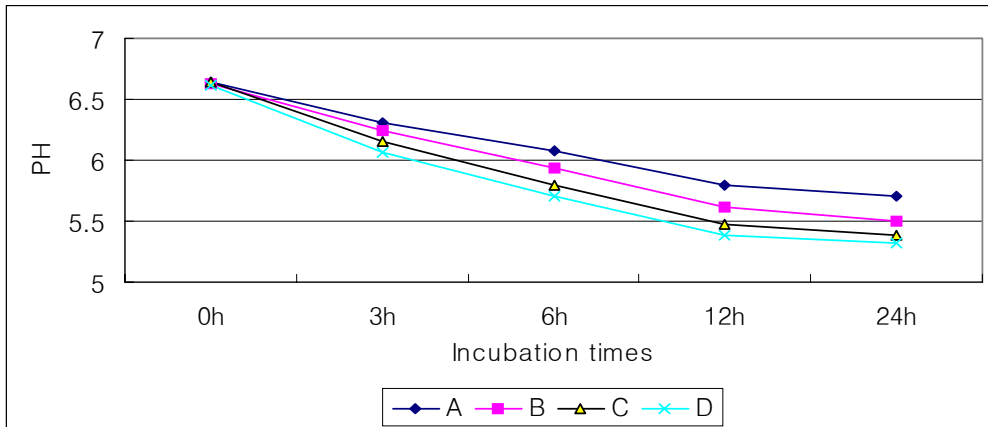


Figure1-3. pH of culture at various sampling times as influenced by the addition levels of concentrate (Concentrate levels : A, 0.83%; B, 1.25%; C, 1.67%; and D, 2.08%).

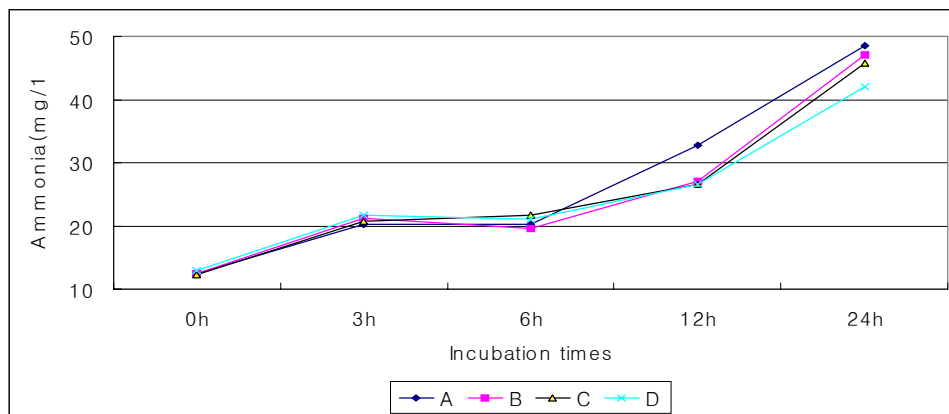


Figure 1-4. Ammonia concentration of culture solution as influenced by the addition levels of concentrate (Concentrate levels : A, 0.83%; B, 1.25%; C, 1.67%; and D, 2.08%).

그러나 rapeseed를 배양했을 때는 배양 6시간까지 농후사료 수준이 증가할수록 C_{18:2}와 C_{18:3} 비율은 증가하는 경향이였다(Table 1-5). 농후사료 수준 간 t₁₁-C_{18:1} 비율에 있어서의 차이는 상대적으로 작았으나 rapeseed의 경우 배양이 진행됨에 따라 t₁₁-C_{18:1} 비율은 감소되는 경향이였다(Table 1-5). CLA 비율의 경우 농후사료 수준과는 반대의 경향을 보였는데, 24시간 동안 rapeseed를 배양할 경우 가장 높은 농후사료

수준에서 CLA 비율이 현저히 낮았다(P<0.031, Table 1-5). Rapeseed를 배양했을 때의 농후사료 수준에 따른 c9,t11-CLA 비율에서의 차이는 Figure 1-3에서 보는 바와 같다.

Table 1-2. Concentration, molar proportion of VFA and number of viable

Items	Concentrate level ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	0.83	1.25	1.67	2.08		
3h						
Total VFA(mmoles/100ml)	51.77	57.44	63.02	64.37	6.759	0.586
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	50.87	50.01	49.52	48.35	1.866	0.813
Propionate(C ₃)	26.11	27.46	28.41	29.72	0.923	0.178
C ₂ /C ₃	1.95	0.83	1.75	1.63	0.126	0.432
6h						
Total VFA(mmoles/100ml)	63.48	70.06	73.95	81.14	7.415	0.482
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	49.81	48.93	47.98	46.76	2.011	0.746
Propionate(C ₃)	26.38	27.46	28.53	29.93	1.055	0.247
C ₂ /C ₃	1.88	1.79	1.69	1.57	0.137	0.466
12h						
Total VFA(mmoles/100ml)	74.84	87.34	90.44	97.44	6.323	0.226
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	48.55	46.62	46.43	44.39	1.692	0.475
Propionate(C ₃)	26.56	27.95	27.84	29.48	0.963	0.335
C ₂ /C ₃	1.83	1.67	1.67	1.51	0.116	0.398
Bacteria (×10 ⁷)	33.15	42.75	48.75	51.40	14.51	0.817
24h						
Total VFA(mmoles/100ml)	87.16 ^b	94.30 ^{ab}	108.39 ^{ab}	115.37 ^a	4.276	0.023
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	47.62	45.95	44.74	42.46	1.785	0.347
Propionate(C ₃)	25.79	26.81	27.59	28.55	0.808	0.241
C ₂ /C ₃	1.85	1.72	1.62	1.49	0.116	0.297
Bacteria (×10 ⁷)	12.55	13.55	14.80	16.80	6.340	0.965

bacteria in culture solution when incubated with linseed

¹⁾ Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

Table 1-3. Concentration, molar proportion of VFA and number of viable

Items	Concentrate level ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	0.83	1.25	1.67	2.08		
3h						
Total VFA(mmoles/100ml)	62.05	63.28	69.99	69.34	3.922	0.503
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	48.62	47.87	47.34	46.41	1.155	0.628
Propionate(C ₃)	26.85	28.05	28.96	29.96	0.816	0.189
C ₂ /C ₃	1.81	1.71	1.64	1.55	0.088	0.325
6h						
Total VFA(mmoles/100ml)	66.71 ^b	74.03 ^{ab}	81.14 ^a	83.60 ^a	2.314	0.022
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	47.85	46.60	45.60	44.37	1.409	0.443
Propionate(C ₃)	26.79	28.02	29.09	30.10	0.683	0.096
C ₂ /C ₃	1.79	1.67	1.57	1.48	0.088	0.221
12h						
Total VFA(mmoles/100ml)	85.1	92.97	97.08	102.67	6.140	0.354
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	46.79	45.74	44.44	42.92	1.070	0.203
Propionate(C ₃)	26.58 ^b	27.57 ^{ab}	28.50 ^{ab}	29.35 ^a	0.393	0.029
C ₂ /C ₃	1.76	1.66	1.56	1.46	0.059	0.087
Bacteria (×10 ⁷)	56.75	33.65	46.75	41.85	21.20	0.886
24h						
Total VFA(mmoles/100ml)	99.69	108.13	113.69	121.06	5.911	0.216
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	45.17	43.80	41.81	40.13	1.169	0.124
Propionate(C ₃)	26.25 ^b	27.18 ^{ab}	27.51 ^{ab}	28.58 ^{ab}	0.323	0.031
C ₂ /C ₃	1.72 ^a	1.61 ^{ab}	1.52 ^{ab}	1.40 ^b	0.053	0.054
Bacteria (×10 ⁷)	12.65	22.25	44.15	48.90	13.44	0.309

bacteria in culture solution when incubated with rapeseed

¹⁾ Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

Table 1-4. Composition (%) of C₁₈-FAs in culture solution when incubated with linseed

Fatty acids	Concentrate level				SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
	0.83	1.25	1.67	2.08		
----- 3h -----						
C _{18:0}	26.31	27.14	26.67	26.82	1.373	0.967
C _{18:1}	14.92	14.84	14.71	14.94	0.595	0.991
t11-C _{18:1} (T)	6.03	6.72	6.50	6.80	0.855	0.916
CLA(C) ³⁾	0.43	0.39	0.41	0.37	0.043	0.811
T/C	14.01	17.44	15.84	18.40	1.881	0.463
C _{18:2}	9.06	9.49	10.62	10.72	0.441	0.128
C _{18:3}	26.27	24.90	24.49	23.59	2.343	0.873
----- 6h -----						
C _{18:0}	28.32	27.46	29.19	28.76	3.427	0.984
C _{18:1}	14.33	15.79	15.12	15.60	0.683	0.511
t11-C _{18:1}	6.60	6.11	8.14	6.68	0.480	0.138
CLA	0.61	0.47	0.60	0.45	0.256	0.951
T/C	10.86	14.82	15.06	14.84	4.263	0.661
C _{18:2}	8.28	9.28	9.08	9.85	0.808	0.622
C _{18:3}	25.35	24.73	21.03	22.10	2.449	0.593
----- 12h -----						
C _{18:0}	39.37	38.82	36.10	37.68	5.885	0.978
C _{18:1}	13.90	13.17	13.89	11.84	1.746	0.819
t11-C _{18:1}	10.58	9.35	9.93	10.86	1.808	0.971
CLA	0.66	0.76	0.39	0.34	0.153	0.277
T/C	15.84	12.99	26.69	34.26	4.476	0.081
C _{18:2}	4.94	5.90	6.71	6.42	1.010	0.651
C _{18:3}	12.51	14.65	15.87	15.90	2.646	0.785
----- 24h -----						
C _{18:0}	41.15	41.03	38.06	41.39	1.295	0.348
C _{18:1}	9.33	12.94	14.02	10.98	2.153	0.501
t11-C _{18:1}	13.48	15.59	16.08	14.25	2.331	0.849
CLA	0.31	0.31	0.32	0.10	0.084	0.330
T/C	49.04	59.94	52.99	80.00	22.014	0.863
C _{18:2}	3.69	3.56	4.13	4.36	0.646	0.803
C _{18:3}	7.98	7.77	9.06	10.78	1.877	0.681

¹⁾ Standard error of the mean.

²⁾ Probability levels.

³⁾ *cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA

Table 1-5. Composition (%) of C₁₈-FAs in culture solution when incubated with rapeseed

Fatty acids	Concentrate level ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	0.83	1.25	1.67	2.08		
	----- 3h -----					
C _{18:0}	27.47	27.27	30.17	30.16	2.676	0.784
C _{18:1}	20.93	20.46	19.09	17.30	2.589	0.763
t11-C _{18:1} (T)	3.60	3.63	4.96	6.28	0.572	0.077
CLA(C) ⁴⁾	1.60	1.52	1.29	1.02	0.223	0.382
T/C	2.27	2.38	4.10	6.20	0.738	0.054
C _{18:2}	15.39	15.85	14.58	14.15	1.110	0.715
C _{18:3}	13.10	12.58	10.50	12.37	2.313	0.864
	----- 6h -----					
C _{18:0}	32.01	32.28	30.12	25.71	2.077	0.239
C _{18:1}	20.75	18.88	19.41	20.52	1.892	0.875
t11-C _{18:1}	7.01	7.51	7.35	5.88	1.200	0.775
CLA	1.64	1.43	1.39	1.47	0.241	0.882
T/C	4.44	5.31	5.31	3.95	0.769	0.569
C _{18:2}	10.72	11.35	12.58	16.02	1.019	0.069
C _{18:3}	10.36	9.97	10.03	11.92	3.298	0.969
	----- 12h -----					
C _{18:0}	32.29	33.28	32.34	31.66	1.307	0.851
C _{18:1}	19.32	18.83	19.00	17.76	1.085	0.769
t11-C _{18:1}	12.20	9.75	9.11	7.75	1.934	0.504
CLA	1.81	1.57	1.51	1.32	0.272	0.674
T/C	6.80	6.13	5.99	5.83	0.369	0.378
C _{18:2}	7.26	9.10	10.88	11.70	1.065	0.131
C _{18:3}	8.09	8.69	9.13	12.47	3.204	0.775
	----- 24h -----					
C _{18:0}	35.98	36.18	36.15	33.17	1.078	0.276
C _{18:1}	15.83	16.15	17.57	16.73	0.865	0.662
t11-C _{18:1}	13.81	11.92	11.45	9.83	1.515	0.425
CLA	2.43 ^a	1.96 ^b	1.57 ^c	1.28 ^c	0.297	0.031
T/C	5.77	6.15	7.30	7.62	0.513	0.157
C _{18:2}	2.74	5.27	7.16	8.94	1.180	0.075
C _{18:3}	10.78	10.93	7.34	11.51	1.883	0.476

¹⁾ Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

⁴⁾ *cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA.

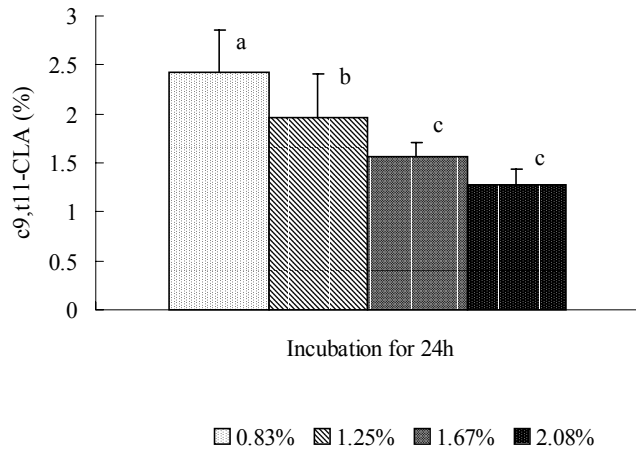


Figure 1-5. Effect of concentrate level on c9,t11-CLA content in culture when incubated with rapeseed(P<0.031).

3) 고찰

농후사료와 oilseed의 분해 및 C₁₈-불포화지방산의 hydrogenation은 배양액 내 프로토조아가 거의 존재하지 않았기 때문에 본 연구에서는 대부분 박테리아만의 작용인 것으로 보인다. 배양액의 pH(Figure 1-3), 암모니아 농도(Figure 1-4) 그리고 VFA 생성(Tables 1-2 and 1-3)으로 미루어 보아 발효특성은 두 종류의 oilseed 모두에서 농후사료 수준에 의한 영향을 받았으나 배양시간에 따른 VFA 농도는 rapeseed 보다는 linseed에서 다소 높은 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 linseed를 포함한 배양액의 발효가 더 많이 이루어졌기 때문인 것으로 보인다.

배양시간에 따른 t11-C_{18:1} 및 CLA 생성은 oilseed를 포함한 배양액에 대한 초기의 hydrogenation 과정이 빠르게 일어나지만 높은 농후사료 수준은 C_{18:2}와 C_{18:3}의 hydrogenation 폭과 C_{18:2}의 isomerization을 감소시켜 결과적으로 t11-C_{18:1}과 CLA(Tables 1-4 and 1-5)의 비율을 감소시켰다. 감소된 t11-C_{18:1} 및 CLA 비율은 농후사료 천가 수준이 증가함에 따라 낮아진 pH(Figure 1-3) 때문인 것으로 보인다. CLA 생산에 있어 pH의 효과는 Hughes 등(1982)에 의해 밝혀진 바 있는데, 이 때 *Butirivibrio fibrisolvens*의 c9,t11-octadecadienoate reductase activity가 높은 pH에서 촉진되고 7.2-8.2의 pH 범위에서 maximum activity를 보였다고 하였다. 이와 비슷한 결과가 Kelly와 Bauman(1996)에 의한 시험으로부터 보고되었는 바, 조사료와 농후사료 비율이 50:50에서 20:80으로 변화되었을 때 우유의 CLA 함량이 반감되었다고 하였

다. Chouinard 등(1998b) 및 Kelly 등(1998a)은 대부분의 CLA가 사료 내의 C_{18:2}로부터 유래된다고 하였다. 본 연구의 결과에서 CLA가 linsed보다는 rapeseed 배양에서 더 높은 경향을 보였는데, rapeseed의 C_{18:2} 비율이 linseed 보다 더 높았다.

본 연구의 결과로 미루어보아 발효특성과 C₁₈-PUFA의 hydrogenation 정도 특히, *t*11-C_{18:1}과 CLA 비율은 어느 정도 oilseed의 종류와 농후사료 첨가수준에 의한 영향을 받은 것으로 보인다. CLA는 C_{18:2} 함량이 높은 rapeseed에서 더 많이 생성되었다.

나. 섬유소(일반 조사료) 첨가 수준이 반추위미생물에 의한 cis- unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

1) 재료 및 방법

가) 반추위액의 준비 : *in vitro* 시험 가와 동일한 방법으로 준비

나) 배양액의 준비 및 배양

CO₂ gas를 flushing 하면서 반추위액을 McDougalls 인공 타액(1948)과 1:1의 비율로 혼합하였으며, 3 수준(0.25, 0.50 및 0.75%, w/v)의 분쇄한(1mm) 알팔파 건초를 600ml 혼합 배양액에 첨가하였다. 아울러 분쇄한 유채씨(rapeseed, *B. napus*; 31.1% oleic acid, 22.3% linoleic acid 및 34.0% linolenic acid)를 0.5%(w/v) 수준으로 배양액이 들어있는 culture jar에 넣었다. 이 후의 과정은 *in vitro* 시험 가와 동일한 방법으로 진행하였다. 반추위액의 준비 및 배양과정은 Figure 1-6 및 Figure 1-6에서와 같다.



Figure 1-6. Straining process of rumen fluid



Figure 1-6. Process of *in vitro* fermentation

다) Total viable bacteria 수 조사 : *in vitro* 시험 가와 동일한 방법 이용

라) 시료 채취 및 분석 : *in vitro* 시험 가와 동일한 방법으로 분석

마) 통계 분석 : *in vitro* 시험 가와 동일한 방법 이용

2) 결과

분쇄한 알팔파 건초의 첨가 수준이 배양액의 pH에 영향하지 않았으나 낮은 수준에 비하여 pH를 다소 낮춘 것으로 보였다(Figure 1-8). 암모니아 농도 역시 알팔파 수준에 의한 영향을 받지 않았다(Figure 1-9). 알팔파 수준에 의한 영향을 받지 않은 것으

로 나타났으나 배양시간과 알팔파 첨가수준의 증가로 VFA 농도가 다소 증가된 경향을 보였다(Table 1-6). 6시간까지의 배양시간과는 반대로 대조구에 비하여 12시간 및 24시간에서의 C₂ 비율이 증가된(P<0.013~0.023) 반면 C₄ 비율은 감소되었다(P<0.024~0.049). 배양 12시간의 경우 알팔파 수준이 증가함에 따라 살아있는 박테리아 수는 감소되는 경향을 보였다(Table 1-6).

배양시간이 증가됨에 따라 배양액의 C_{18:0} 및 t11-C_{18:1} 비율이 증가된 반면 C₁₈-불포화지방산 비율은 감소된 것으로 나타났다(Table 1-7). 알팔파 첨가 수준은 배양 3시간에서 t11-C_{18:1} 및 CLA 비율에 다소 영향하였는데, 알팔파 수준이 증가할수록 t11-C_{18:1}와 CLA 비율은 감소하는 경향을 보였다(Table 1-7).

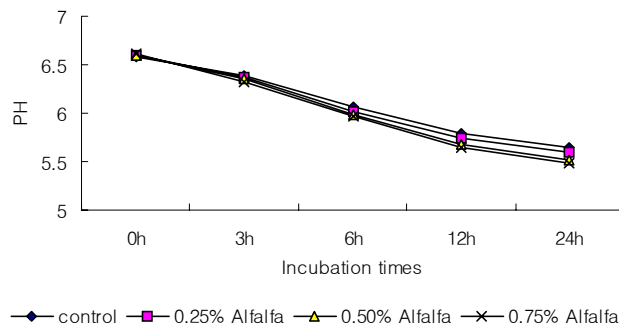


Figure 1-8. pH of culture solution at various sampling times

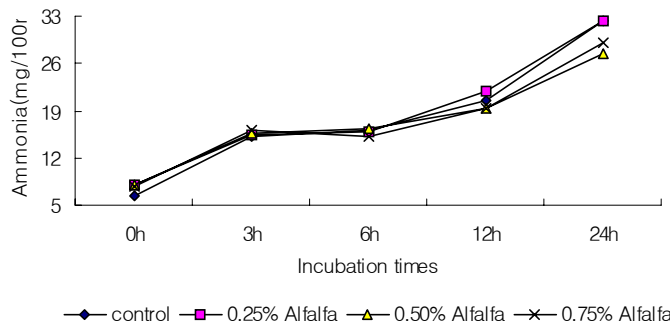


Figure 1-9. Ammonia concentration in culture solution at various sampling times

Table 1-6. Concentration, molar proportion of VFA and number of

viable bacteria in culture solution when incubated with ground rapeseed

Items	Alfalfa hay level(% _{w/v}) ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	0.00	0.25	0.50	0.75		
3h						
Total VFA(mmoles/100ml)	58.26	60.10	65.53	61.13	2.593	0.361
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	49.51	49.72	50.16	49.92	0.711	0.922
Propionate(C ₃)	29.69	29.66	30.02	30.33	0.301	0.448
Butyrate (C ₄)	15.17	14.96	14.39	14.20	0.450	0.464
C ₂ /C ₃	1.67	1.68	1.67	1.65	0.040	0.948
6h						
Total VFA(mmoles/100ml)	70.09	74.49	78.62	75.62	3.443	0.461
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	48.42	48.91	48.90	49.31	0.213	0.164
Propionate(C ₃)	29.84	29.98	30.37	30.42	0.300	0.512
Butyrate (C ₄)	15.99	15.55	15.24	14.95	0.270	0.178
C ₂ /C ₃	1.62	1.63	1.61	1.62	0.020	0.908
12h						
Total VFA(mmoles/100ml)	80.61	81.80	93.07	82.48	6.044	0.511
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	46.88 ^b	47.78 ^a	48.42 ^a	48.21 ^a	0.178	0.013
Propionate(C ₃)	29.40	29.43	29.81	29.93	0.278	0.505
Butyrate (C ₄)	17.58 ^a	16.83 ^b	16.10 ^b	16.12 ^b	0.273	0.049
C ₂ /C ₃	1.59	1.62	1.62	1.61	0.013	0.411
Bacteria (×10 ⁷)	63.15	57.80	54.95	47.80	51.45	0.997
24h						
Total VFA(mmoles/100ml)	88.76	96.54	104.28	100.31	6.186	0.433
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	45.32 ^b	46.53 ^a	47.01 ^a	47.00 ^a	0.246	0.023
Propionate(C ₃)	28.11	28.34	28.57	28.77	0.237	0.351
Butyrate (C ₄)	18.44 ^a	17.57 ^b	17.13 ^b	17.06 ^b	0.199	0.024
C ₂ /C ₃	1.61	1.64	1.65	1.63	0.014	0.466
Bacteria (×10 ⁷)	24.60	17.60	21.45	17.00	13.40	0.973

¹⁾ Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

Table 1-7. Composition (%) of C₁₈-FAs in culture solution when incubated with rapeseed

Fatty acids	Alfalfa hay level(%, w/v)				SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
	0.00	0.25	0.50	0.75		
	----- 3h -----					
C _{18:0}	31.31	31.88	32.75	34.39	2.006	0.732
C _{18:1}	17.05	16.80	15.88	15.28	0.639	0.313
t11-C _{18:1} (T)	3.88	4.22	4.14	4.35	0.250	0.642
CLA(C) ³⁾	0.68	0.69	1.42	1.14	0.212	0.166
T/C	5.93	6.38	2.99	3.98	0.868	0.133
C _{18:2}	13.88	13.90	13.16	13.09	1.055	0.907
C _{18:3}	13.69	12.18	12.89	11.30	1.261	0.623
	----- 6h -----					
C _{18:0}	35.23	35.24	35.30	36.03	1.957	0.988
C _{18:1}	15.78	15.46	15.04	14.57	0.748	0.706
t11-C _{18:1}	5.71	5.69	5.74	5.53	0.491	0.989
CLA	1.43	1.54	1.42	1.38	0.267	0.976
T/C	3.99	3.83	4.20	3.99	0.452	0.947
C _{18:2}	10.27	10.34	10.20	10.20	1.600	0.999
C _{18:3}	12.17	12.00	11.55	11.19	0.856	0.846
	----- 12h -----					
C _{18:0}	41.54	41.42	40.14	40.29	1.985	0.932
C _{18:1}	13.75	13.60	13.91	13.58	0.888	0.992
t11-C _{18:1}	8.66	8.30	8.06	7.42	0.793	0.744
CLA	1.30	1.17	1.35	1.22	0.131	0.775
T/C	6.65	7.06	6.05	6.41	1.102	0.926
C _{18:2}	5.59	5.89	6.66	7.13	1.669	0.905
C _{18:3}	8.80	8.96	8.96	8.99	0.791	0.997
	----- 24h -----					
C _{18:0}	49.79	49.29	46.94	45.00	3.840	0.803
C _{18:1}	9.31	9.43	11.00	10.75	1.753	0.858
t11-C _{18:1}	10.49	10.48	9.10	11.73	1.862	0.801
CLA	1.32	1.31	1.35	1.17	0.122	0.725
T/C	7.83	7.88	6.75	10.15	1.169	0.343
C _{18:2}	1.94	2.14	3.17	3.55	1.007	0.647
C _{18:3}	5.85	5.65	6.08	6.36	0.820	0.931

¹⁾ Standard error of the mean.

²⁾ Probability levels.

³⁾ *Cis*-9,*trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid.

3) 고찰

증가된 경향의 VFA 농도는 무엇보다도 알팔파 건초 첨가수준이 증가함에 따른 발효 가능한 물질의 양에 대한 반응인 것으로 보이는데, 그 이유는 농후사료와 rapeseed 량이 모든 처리에 걸쳐 동일하기 때문이다. 배양 12시간에서의 증가된 C_2 비율 역시 알팔파 수준과 첨가된 알팔파의 분해율이 낮기 때문인 것으로 여겨진다. Jenkins (1993)는 섬유소의 농도가 빠르게 성장하는 미생물의 조건을 이롭게 한다고 하였는데, 그 미생물은 대체로 지질의 분해와 hydrogenation에 관계가 깊은 그룹이라 하였다. 그러나 본 연구에서는 높은 수준의 알팔파가 배양 12시간 및 24시간에서(Table 1-6) 박테리아 수를 감소시킨 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 조사료 섭취량이 증가함에 따라 박테리아 성장이 감소되었다는 보고(Kalscheur 등, 1997)와 일치하였다.

본 연구에서 사용된 알팔파 건초는 소량(2.45% EE, DM basis)의 지질을 포함하고 있는 만큼 배양액의 C_{18} -지방산 조성에 크게 영향하지는 않을 것으로 보인다. 그러나 알팔파 수준의 증가에 따라 배양 초기(3시간)에서 증가된 CLA 및 $t11-C_{18:1}$ 비율은 본 시험이 끝날 때까지 C_{18} -불포화지방산의 발효 및 hydrogenation, 그리고 $t11-C_{18:1}$ 이 축적되었기 때문에 현재로서는 그 이유를 설명하기 어렵다. Jenkins(1993)는 C_{18} -UFA의 bio-hydrogenation 반추위 내에서 완전하게 진행되지 않는다고 보고한 바 있다. 그러나 증가된 $t11-C_{18:1}$ 및 CLA 비율에 대한 설명이 가능한 것은 rapeseed로부터 oil의 releasing rate와 관계가 있을 수 있다는 점이다. 그와 같이 rapeseed를 분쇄함으로써 그 표면에 노출된 oil이 초기 배양시 박테리아에 의한 oil의 분해와 hydrogenation을 위한 주요 target이 될 수 있는 것이며, 그 후의 oil 방출율은 박테리아의 분해작용에 의해 영향을 받을 수 있는 것으로 보인다. 따라서 본 시험에서 $t11-C_{18:1}$ 및 CLA 비율에 있어서의 알팔파 첨가수준 효과는 초기 배양에서만 나타난 것으로 여겨진다. 본 연구의 결과로 미루어 보아 $t11-C_{18:1}$ 및 CLA 비율은 특정 배양 시간대에서 만이 알팔파 수준에 의해 영향을 받았으며, 이러한 결과는 현재의 배양 조건하에서 분쇄된 rapeseed의 분해율과 관계가 있는 것으로 여겨진다.

다. 지질자원의 첨가형태가 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

1) 재료 및 방법

가) 반추위액의 준비 : *in vitro* 시험 가와 동일한 방법으로 준비

나) 배양액의 준비 및 배양

CO₂ gas를 flushing 하면서 반추위액을 McDougalls 인공 타액(1948)과 1:1의 비율로 혼합하였으며, 혼합된 600ml 배양액에 6g의 분쇄한 농후사료(배양액의 1%, w/v, as-fed basis)와 3.6g의 분쇄한(1mm) 아마씨(linseed, 배양액의 0.6%, w/v, DM basis) 또는 2.25g의 분쇄된 알팔파 건초에 흡착시킨 아마유(linseed oil)를 첨가하였다. 이 후의 배양 과정은 *in vitro* 시험 1과 동일한 방법으로 진행하되 본 시험에서는 12시간까지만을 배양하였다.

iii) Total viable bacteria 수 조사 : *in vitro* 시험 가와 동일한 방법 이용

iv) 시료 채취 및 분석 : *in vitro* 시험 1과 동일한 방법으로 분석

v) 통계 분석 : *in vitro* 시험 1과 동일한 방법 이용

2) 결과

배양액에 첨가된 농후사료의 lipid 양이 분쇄한 유채씨나 유채씨 oil에 비하여 상대적으로 적은(0.18g) 량이라 할 수 있다. 첨가한 알팔파 건초 1.8g의 lipid 함량 역시 낮아(0.04g) 알팔파 건초가 모두 분해된다 하더라도 이런 정도의 양은 배양시 lipid metabolism에 크게 영향하지 않을 것으로 여겨진다. 또한 배양액 내 반추위액의 lipid 함량 역시 매우 작을 것으로 예상된다. 그럼에도 불구하고 특정 배양 시간대에서 채취한 시료에는 그런 첨가 물질들이 모두 포함되어 있어 이들의 지방산 조성도 동시에 분석되었다.

Oil의 첨가 형태는 비록 분쇄한 유채씨의 첨가로 인하여 pH를 다소 낮추었고 배양 12시간에서 암모니아 농도를 다소 증가시켰으나 전체적으로 배양액의 pH와 암모니아 농도에 영향하지 않았다(Figures 1-10 및 1-11). 배양시간이 경과됨에 따라 VFA 농도가 높아졌으며, 유채 oil 첨가는 분쇄한 유채씨의 경우에 비하여 VFA 농도를 감소시킨 경향이였다(Table 1-8). VFA 조성 비율에 있어 oil 첨가형태에 따른 차이는 없었으나 유채 oil 첨가로 인하여 C₂ 비율이 다소 증가된 반면 C₃ 비율은 다소 감소된 경향을 보였다(Table 1-8).

Oil의 첨가 형태에 관계없이 배양 12시간까지 C_{18:2}와 C_{18:3} 비율이 감소된 반면 C_{18:1} 비율은 증가된 경향을 보였다(Table 1-9). 분쇄한 유채씨에 비하여 유채씨 oil의 첨가

는 C_{18:0}, C_{18:1} 및 C_{18:2} 비율을 증가시켰으나(P<0.0001~0.033) CLA 비율은 오히려 낮아진(P<0.0008~0.0032) 것으로 나타났다.

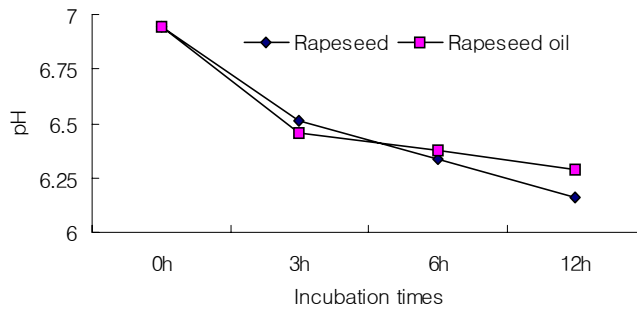


Figure 1-10. pH of culture solution.

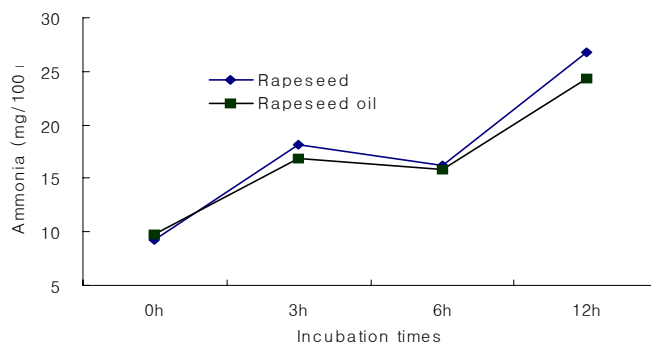


Figure 1-11. Ammonia concentration in culture solution.

Table 1-8. Concentration and molar proportion of VFA in culture solution

Items	Type of oil source ¹⁾		SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	Ground rapeseed	RSO		
3h				
Total VFA(mmoles/100ml)	56.00	52.69	9.998	0.836
Molar proportion(mmoles/100mmoles)				
Acetate(C ₂)	49.71	54.47	4.258	0.511
Propionate(C ₃)	24.76	18.69	4.866	0.471
Butyrate	18.62	19.78	0.651	0.335
C ₂ /C ₃	2.01	3.49	1.121	0.450
6h				
Total VFA(mmoles/100ml)	64.77	64.52	8.602	0.985
Molar proportion(mmoles/100mmoles)				
Acetate(C ₂)	49.19	50.05	1.660	0.749
Propionate(C ₃)	25.13	24.69	1.386	0.843
Butyrate	19.09	18.95	0.207	0.667
C ₂ /C ₃	1.97	2.04	0.178	0.804
12h				
Total VFA(mmoles/100ml)	75.66	75.15	8.671	0.970
Molar proportion(mmoles/100mmoles)				
Acetate(C ₂)	48.51	49.08	1.479	0.811
Propionate(C ₃)	24.83	24.32	1.273	0.802
Butyrate	19.76	19.96	0.115	0.354
C ₂ /C ₃	1.96	2.03	0.163	0.803

when incubated with ground rapeseed or rapeseed oil

¹⁾ Ground rapeseed, seed-associated oil; RSO, rapeseed oil.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

3) 고찰

본 시험에서 종실과 oil의 분해, 그리고 C18-불포화지방산의 bio-hydrogenation은 반추위액을 12점의 가제로 여과시켰기 때문에 대부분 박테리아의 작용인 것으로 여겨진다. 배양액의 pH(Figure 1-10)와 암모니아 농도(Figure 1-11) 그리고 VFA 생산(Table 1-8)으로 미루어 보아 발효특성은 oil의 첨가형태에 의한 영향을 받지 않은 것으로 보인다. 그러나 oil의 첨가로 인하여 다소 증가된 C₂ 및 감소된 C₃ 비율은 oil을 흡착시킨 알팔파 건조의 부분적인 분해와 관계가 있는 것으로 여겨진다.

Table 1-9. Composition (%) of C₁₈-FAs in culture solution when incubated with ground rapeseed or rapeseed oil

Fatty acids	Type of oil source ¹⁾		SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	Ground rapeseed	RSO		
----- 3h -----				
C _{18:0}	34.94 ^b	36.58 ^a	0.214	0.032
C _{18:1}	13.56 ^b	32.35 ^a	0.156	0.0001
C _{18:2}	6.19 ^b	8.98 ^a	0.398	0.038
c9,t11-CLA	3.68 ^a	0.89 ^b	0.057	0.0008
t10,t12-CLA	0.38	0.39	0.143	0.966
C _{18:3}	1.80	2.23	0.112	0.112
----- 6h -----				
C _{18:0}	36.55 ^b	47.80 ^a	1.483	0.033
C _{18:1}	12.37 ^b	23.47 ^a	0.916	0.013
C _{18:2}	5.36 ^b	7.62 ^a	0.268	0.027
c9,t11-CLA	3.40 ^a	0.88 ^b	0.100	0.003
t10,t12-CLA	0.23	0.40	0.062	0.193
C _{18:3}	1.44	1.45	0.104	0.976
----- 12h -----				
C _{18:0}	40.99 ^b	51.13 ^a	0.256	0.001
C _{18:1}	9.14 ^b	22.74 ^a	0.415	0.001
C _{18:2}	4.12 ^b	7.30 ^a	0.278	0.015
c9,t11-CLA	3.52 ^a	0.90 ^b	0.062	0.001
t10,t12-CLA	0.09	0.32	0.064	0.130
C _{18:3}	0.41	1.23	0.214	0.114

¹⁾ Ground rapeseed, seed-associated oil; RSO, rapeseed oil.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ significantly.

본 시험에서 배양액 내 C₁₈-불포화지방산의 bio-hydrogenation 속도는 매우 빠른 것으로 보인다(Table 1-9). 이와 비슷한 연구 결과가 발표된 바(Song과 Choi, 1998; Huang 등, 1999; Wang과 Song, 2001) 있다. 사료 lipid는 C₁₈-다중불포화지방산의 hydrogenation에 앞서 분해되어야 하기 때문에 oil의 첨가 형태가 CLA의 반추위 내 합성에 영향할 수 있는 것으로 여겨진다. Kepler 등(1970)은 oleic acid를 CLA로 변형시키는데 촉매 역할을 하는 효소인 c12,t11-octadecenoic acid isomerase가 free COOH radical을 필요로 한다고 보고하였는데, 이러한 점은 isomerization이 일어나기 전에 lipid fraction의 분해가 우선된다는 점을 지시해 준다. 본 시험에 있어서 분쇄한

유채씨에 비하여 유채씨 oil은 C_{18:2}의 hydrogenation 정도를 증가시켰으며, 결과적으로 CLA의 감소와 C_{18:0} 비율의 증가를 유발시켰다(Table 1-9). 이러한 결과는 분쇄한 유채씨에 비하여 oil의 분해율이 상대적으로 높았기 때문인 것으로 여겨진다.

뿐만 아니라 Kim 등(2000)은 C_{18:2} 농도가 bio-hydrogenation을 저해할 만큼 충분히 높지 않을 경우 미생물이 상당한 량의 CLA를 생산하지 않는다고 하였다. C_{18:2}의 이러한 저해 효과는 CLA의 동시적인 생산을 조절하기 어려운 생물학적인 제한 요인이 있는 것으로 보인다. 배양 초기에 유채씨 oil로 인한 C_{18:2} 비율(19.9%)이 분쇄한 유채씨의 경우(25.8%)에 비하여 상대적으로 낮음으로서(Table 1-8) 12시간까지 축적된 CLA가 적은 것으로 보인다(Table 1-9). 그러나 batch culture로부터 나타나는 이러한 현상은 oil 자원의 retention time에 의존하기 때문에 oil의 분해뿐만 아니라 bio-hydrogenation에서도 동일하게 나타날 수 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 결론적으로 oil 자원의 첨가 형태가 *in vitro* C18-불포화지방산의 bio-hydrogenation, 특히 CLA의 생성에 영향을 주는 것으로 나타났는데, 이러한 효과는 oil의 분해율과 관계가 있는 것으로 여겨진다. 또한 분쇄한 유채씨의 첨가가 oil 형태의 첨가에 비하여 CLA의 생성량에서 높았다.

라. 배양액의 pH가 반추위미생물에 의한 cis-unsaturated fatty acid로부터 T-FA 생성과 Hydrogenation 정도에 미치는 효과

1) 재료 및 방법

가) 반추위액의 준비 : *in vitro* 시험 1과 동일한 방법으로 준비

나) 배양액의 준비 및 배양

CO₂ gas를 flushing 하면서 반추위액을 McDougalls 인공 타액(1948)과 1:1의 비율로 혼합하였으며, 혼합된 600ml 배양액에 6g의 분쇄한 농후사료(배양액의 1%, w/v, as-fed basis)와 3.6g의 분쇄한(1mm) 아마씨(linseed, 배양액의 0.6%, w/v, DM basis) 또는 3.0g의 분쇄된 유채씨(rapeseed, 배양액의 0.5%, w/v, DM basis)를 첨가하였다. 배양액의 pH(4.5, 5.3, 6.1 및 6.9)는 30% H₂SO₄ or NaOH 용액을 이용하여 20분 간격으로 조절하였다. 그 밖의 배양 조건 및 배양과정은 *in vitro* 시험 1과 동일한 방법으로 진행하되 본 시험에서는 12시간까지만을 배양하였다.

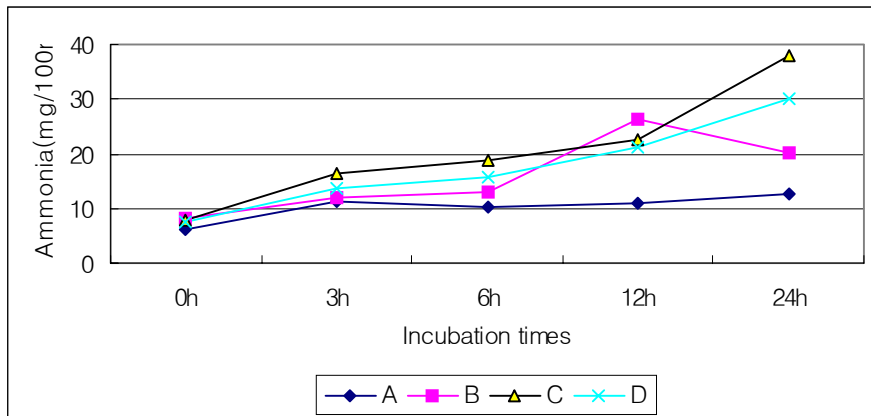
다) 시료 채취 및 분석 : *in vitro* 시험 1과 동일한 방법으로 분석

라) 통계 분석 : *in vitro* 시험 1과 동일한 방법 이용

2) 결과

배양액의 pH가 증가됨에 따라 암모니아 농도는 다소 증가되었으나 아마씨 및 유채씨 모두에서 pH 6.1에서 가장 높은 농도를 보였다(Figure 1-12). 변화가 가장 작았던 pH 4.5를 제외하고는 배양시간이 길어지고 배양액의 pH가 높아짐에 따라 총 VFA 농도는 크게 증가하였다(Table 1-10 and 1-11). 아마씨 및 유채씨 모두에서 배양액의 pH가 높아짐에 따라 C₂ 비율 및 C₂/C₃ ratio가 감소된 반면 C₃ 비율은 증가되었다.

분쇄한 oilseed를 배양하였을 때 배양액의 pH는 배양액의 C₁₈-지방산의 구성에 영향하였다. 아마씨의 경우 pH의 범위가 4.5-5.3이었을 때 hydrogenating process가 매우 낮았던 반면 6.1-6.9였을 경우 매우 빠르게 진행되었는데(Table 1-12), 이러한 현상은 유채씨의 경우에도 비슷하였다(Table 1-13). 한편, 유채씨의 경우 배양액의 pH가 높아짐에 따라 CLA 비율이 증가되었으나, 아마씨 배양에서는 CLA가 거의 탐지되지 않았다.



Figure

1-12. Ammonia concentration in culture solution as influenced by the PH.
(pH : A, 4.5; B, 5.3; C, 6.0; D, 6.8)

3) 고찰

배양액의 pH는 30% H₂SO₄ or NaOH 용액을 이용하여 20분 간격으로 조절한 결과 거의 의도된 수준으로 유지될 수 있었다. 또한 농후사료의 lipid 함량이 낮아 농후사료가 oilseed를 포함하는 배양액의 지방산 조성에 미치는 효과는 매우 작은 것으로 나타났다.

배양액의 암모니아 농도(Figure 1-12), VFA 생산(Table 1-10 and 1-11) 그리고 C₁₈-지방산의 조성(Tables 1-12 및 1-13, Figure 1-12)으로 미루어 보아 상대적으로 낮은 pH(4.5 and 5.3)는 높은 pH 범위(6.1 and 6.9)에 비하여 두 종류의 oilseed 모두에서 발효 및 hydrogenation 정도를 억제시켰다. 이와 같이 pH에 의해 영향을 받은 발효 특성은 이미 발표된 보고에서도 비슷한 것으로 보인다. 반추위액의 pH가 6.0 이하일 경우 섬유소 분해율이 낮아지고 반추위 미생물의 분포에 영향을 하였다는 보고가 있다 (Stewart, 1977). Kopecny와 Wallace(1982) 또한 혼합 박테리아의 단백질 분해를 위한 적정 pH 범위가 5.5~7.0이라고 보고한 바 있다. 지방 분해 역시 6.0 이하에서 감소된 것으로 알려진 바 있다(Van Nevel과 Demeyer, 1996).

C9,t11 CLA isomer는 가장 중요한 CLA라 할 수 있는데(Chin 등, 1992; Sehat 등, 1998), 그 CLA는 반추위 박테리아의 isomerization에 의해 주로 *cis*-9, *cis*-12 C_{18:2}로부터 생성되며, 지속적인 환원 작용에 의해 *trans*-불포화지방산이 생성된다(Harfoot와 Hazlewood, 1988). 그 CLA는 유채씨를 포함한 배양액에서 탐지되었으나 아마씨의 배양액에서는 거의 탐지되지 않았는데(Tables 1-12 및 1-13), 이러한 현상은 아마도 아마씨보다 유채씨에서 C_{18:2} 함량이 더 높았기 때문인 것으로 보인다. 이와 같이 lipid

원료의 C18:2 함량이 CLA 생산에 매우 중요한 요인이 된다(Chouinard 등, 1998b; Kelly 등, 1998a). 그러나 본 연구에서는 *trans*-지방산이 유채씨와 아마씨 모두에서 생성되었는데, 이는 Kemp와 Lander(1984)가 지적한대로 *trans*-지방산이 pathway는 다르지만 C_{18:2} 및 C_{18:3} 모두에서 생성될 수 있는 것으로 보인다.

Table 1-10. Concentration and molar proportion of VFA in culture solution when incubated with ground linseed

Items	pH of culture solution ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	4.5	5.3	6.1	6.9		
3h						
Total VFA(mmoles/100ml)	34.59 ^c	42.25 ^b	52.70 ^a	55.38 ^a	0.322	0.001
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	55.82 ^a	51.77 ^{ab}	49.05 ^b	49.79 ^b	1.060	0.035
Propionate(C ₃)	27.65 ^b	29.14 ^{ab}	31.04 ^a	31.30 ^a	0.428	0.011
Butyrate (C ₄)	15.25	16.86	15.19	14.11	1.093	0.454
C ₂ /C ₃	2.02 ^a	1.78 ^b	1.58 ^b	1.59 ^b	0.054	0.013
6h						
Total VFA(mmoles/100ml)	34.44 ^c	49.68 ^b	64.89 ^a	68.45 ^a	1.590	0.0004
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	56.10 ^a	48.29 ^b	47.24 ^b	48.58 ^b	1.393	0.032
Propionate(C ₃)	27.44 ^b	30.81 ^{ab}	31.84 ^a	32.05 ^a	0.851	0.044
Butyrate (C ₄)	15.18	17.92	15.76	14.11	1.104	0.241
C ₂ /C ₃	2.05 ^a	1.57 ^b	1.49 ^b	1.52 ^b	0.075	0.017
12h						
Total VFA(mmoles/100ml)	34.95 ^c	59.07 ^b	79.35 ^a	77.81 ^a	2.195	0.0004
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	56.87 ^a	41.83 ^b	45.82 ^b	47.94 ^b	1.342	0.006
Propionate(C ₃)	27.08 ^b	33.68 ^a	31.57 ^{ab}	32.12 ^{ab}	1.142	0.056
Butyrate (C ₄)	14.77	21.49	16.86	14.00	1.608	0.094
C ₂ /C ₃	2.10 ^a	1.24 ^b	1.45 ^b	1.49 ^b	0.053	0.001

¹⁾ pH of ruminal culture was adjusted with 30% of H₂SO₄ or NaOH solution. Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

Table 1-11. Concentration and molar proportion of VFA in culture

Items	pH of culture solution ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	4.5	5.3	6.1	6.9		
3h						
Total VFA(mmoles/100ml)	37.28 ^c	46.60 ^b	56.26 ^a	57.26 ^a	1.135	0.0007
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	54.90	51.14	49.26	49.52	1.535	0.167
Propionate(C ₃)	23.40 ^c	25.93 ^b	27.36 ^a	27.86 ^a	0.246	0.0007
Butyrate (C ₄)	19.39	19.68	18.09	16.96	1.167	0.429
C ₂ /C ₃	2.35 ^a	1.97 ^b	1.80 ^b	1.78 ^b	0.051	0.004
6h						
Total VFA(mmoles/100ml)	34.80 ^c	54.00 ^b	68.47 ^a	68.94 ^a	1.141	0.0001
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	54.99	47.89	48.04	48.96	1.401	0.061
Propionate(C ₃)	23.33 ^b	27.72 ^a	27.75 ^a	28.65 ^a	0.248	0.0004
Butyrate (C ₄)	19.40	20.44	18.89	16.92	1.329	0.407
C ₂ /C ₃	2.36 ^a	1.73 ^b	1.73 ^b	1.71 ^b	0.044	0.001
12h						
Total VFA(mmoles/100ml)	37.52 ^c	62.42 ^b	78.88 ^a	78.35 ^a	0.877	0.0001
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	56.05 ^a	42.26 ^c	46.91 ^b	48.93 ^b	1.102	0.004
Propionate(C ₃)	23.04 ^b	31.18 ^a	27.67 ^a	28.61 ^a	0.760	0.007
Butyrate (C ₄)	18.63	22.82	19.75	16.53	1.325	0.110
C ₂ /C ₃	2.43 ^a	1.35 ^c	1.70 ^b	1.71 ^b	0.044	0.0003

solution when incubated with ground rapeseed

¹⁾ pH of ruminal culture was adjusted with 30% of H₂SO₄ or NaOH solution. Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

Table 1-12. Composition (%) of C₁₈-FAs in culture solution when incubated with linseed

Fatty acids	pH of culture solution ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	4.5	5.3	6.1	6.9		
	----- 3h -----					
C _{18:0}	25.05	21.93	24.32	23.33	1.529	0.563
C _{18:1}	14.25 ^b	15.53 ^a	15.32 ^a	16.08 ^a	0.213	0.016
t-FA	2.66 ^c	3.74 ^c	6.67 ^b	8.69 ^a	0.360	0.0001
CLA ⁴⁾	ND ⁵⁾	0.03	0.08	0.06	0.052	0.743
C _{18:2}	13.05 ^a	13.04 ^a	11.03 ^{ab}	10.08 ^b	0.486	0.027
C _{18:3}	27.95 ^{ab}	29.78 ^a	26.65 ^{ab}	25.20 ^b	0.701	0.038
	----- 6h -----					
C _{18:0}	25.02	22.82	30.66	28.23	1.793	0.118
C _{18:1}	14.44	15.53	15.43	16.87	0.745	0.288
t-FA	2.77 ^b	4.46 ^b	8.18 ^a	10.57 ^a	0.785	0.007
CLA	ND	ND	ND	ND		
C _{18:2}	12.81 ^a	12.49 ^a	8.75 ^b	7.89 ^b	0.376	0.001
C _{18:3}	27.55 ^a	28.20 ^a	21.53 ^b	18.72 ^b	0.752	0.002
	----- 12h -----					
C _{18:0}	25.92 ^b	23.23 ^b	39.95 ^a	28.98 ^b	1.870	0.011
C _{18:1}	13.93	15.09	15.52	17.44	0.632	0.070
t-FA	2.73 ^b	5.33 ^b	15.19 ^a	16.30 ^a	1.164	0.002
CLA	ND	ND	0.05	ND	0.027	0.478
C _{18:2}	12.71 ^a	11.54 ^a	4.25 ^b	5.42 ^b	0.412	0.0001
C _{18:3}	27.21 ^a	27.69 ^a	8.22 ^b	11.77 ^b	1.075	0.0004

¹⁾ pH of culture solution was adjusted with 30% of H₂SO₄ or NaOH solution. Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

⁴⁾ *Cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA.

⁵⁾ Not detected.

Table 1-13. Composition (%) of C₁₈-FAs in culture solution when incubated with rapeseed

Fatty acids	pH of culture solution ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	4.5	5.3	6.1	6.9		
----- 3h -----						
C _{18:0}	40.08	40.91	36.38	26.44	3.807	0.155
C _{18:1}	13.25	12.88	15.07	18.36	1.757	0.252
t-FA	3.95	5.85	5.53	7.47	0.614	0.066
CLA ⁴⁾	0.80	0.79	1.12	1.48	0.206	0.200
C _{18:2}	12.00	10.39	11.63	13.02	1.675	0.749
C _{18:3}	8.19	7.59	10.68	13.59	1.906	0.249
----- 6h -----						
C _{18:0}	41.37 ^a	40.57 ^a	39.95 ^a	24.45 ^b	2.596	0.025
C _{18:1}	12.62 ^b	12.24 ^b	14.10 ^b	19.87 ^a	1.158	0.028
t-FA	4.08 ^c	6.12 ^b	6.93 ^b	11.12 ^a	0.442	0.001
CLA	0.70 ^c	0.78 ^c	1.18 ^b	1.70 ^a	0.093	0.005
C _{18:2}	11.37	10.40	8.70	9.64	1.222	0.471
C _{18:3}	7.41	7.73	9.62	13.08	1.226	0.090
----- 12h -----						
C _{18:0}	40.55	40.29	43.05	32.64	2.194	0.099
C _{18:1}	12.88	12.80	13.29	15.13	0.837	0.303
t-FA	4.04 ^d	7.59 ^c	9.98 ^b	15.18 ^a	0.354	0.0001
CLA	0.71 ^c	0.70 ^c	1.42 ^b	2.01 ^a	0.069	0.0002
C _{18:2}	11.87 ^a	8.77 ^a	4.22 ^b	3.32 ^b	1.002	0.012
C _{18:3}	7.54	7.34	8.54	10.98	1.019	0.181

¹⁾ pH of culture solution was adjusted with 30% of H₂SO₄ or NaOH solution. Means in the same row with different superscripts differ.

²⁾ Standard error of the mean.

³⁾ Probability levels.

⁴⁾ *Cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA.

본 연구 결과는 유채씨 배양액에서 높은 pH가 CLA 생산을 증가시켰는데, 발효특성(Figure 1-12, Tables 1-10 및 1-11)으로 미루어 보아 그러한 발효 특성은 배양액의 pH에 의해 영향을 받아 달라진 oilseed의 분해율과 관련이 있는 것으로 보인다. Wang과 Song(1999, 2001)은 탄수화물 첨가수준이 높아짐에 따라 낮아진 pH 때문에 oilseed로부터의 C_{18:2} 방출율이 낮아졌다고 보고하였다. Van Nevel과 Demeyer(1996) 역시 6.0 이하에서의 pH가 in vitro lipid 분해를 감소시켰으며, hydrogenation으로 인하여 배양 후 C_{18:2}가 거의 탐지되지 않았다고 하였는데, 이러한 현상은 초기 배양과정에서 지방 분해가 그 이상의 hydrogenation에 매우 필수적인 절차라 하였다.

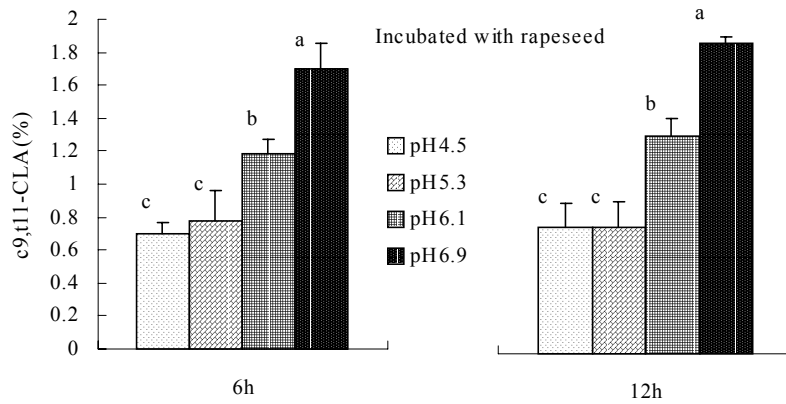


Figure 4-3. Effect of pH on c9,t11-CLA content in culture when incubated for 6 and 12h(P<0.0002~0.005).

그러나 지방분해에서의 pH 효과는 생성된 C₁₈-다중불포화지방산으로부터의 CLA 생성이 pH에 의해 제한된다는 것을 의미하지는 않는다. Romo(1995)는 pH를 6.8에서 5.8로 낮춤에 따라 trans0지방산이 축적되었다고 하였다. 뿐만 아니라 Hughes 등 (1982)은 *Butirivibrio fibrisolvens*가 c9,t11-octadecadienoic acid reductase를 포함하고 있으며, 중성 pH 범위에서 그 박테리아의 최대 작용이 일어났다고 하였다.

2. 연구 제목 : 반추위 내 기능성지방산의 생산 증가를 위한 Ionophore 첨가효과
구명 (고려대)

가. Ionophore가 반추위미생물의 CLA 생산에 미치는 효과 연구

1) Inoculum 공여축의 사양관리

제1위에 fistula가 시술된 체중 약 55±5kg의 Corriedale 면양(♂) 2두를 공시하여 14일간 알팔파 건초만을 자유 채식시킨 후 15일째에 제1위 내용물을 채취하였다.

2) *In vitro* 배양시험 I

In vitro 배양실험은 Goering과 Van Soest 방법(1970)을 일부 변형하여 실시하였는데, CO₂ gas를 배양시험 전체기간 동안 처리하기보다는 배양시험 개시직전 배양 flask(100ml)에 CO₂를 처리하는 과정이 변형된 점이다. 사용한 배양용액의 조성은 Table 2-1에 제시된 바와 같다.

Table 2-1. Composition of medium used in the experiment.

50% 증류수	
<u>25% macromineral solution</u>	(g/L)
Na ₂ HPO ₄	5.7
KH ₂ PO ₄	6.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6
<u>25% buffer solution</u>	(g/L)
NH ₄ HCO ₃	4.0
NaHCO ₃	35

실험 당일 2두의 면양으로부터 채취한 제1위 내용물을 1:1로 혼합하여 3겹의 cheese cloth로 거른 다음 1ℓ 정도를 취하였다. 채취한 위액은 CO₂ gas를 주입하면서 38℃로 유지시킨 다음, 분젠 밸브가 장착된 100ml 용량 배양 flask에 위액10ml, 배양액 40ml와 처리된 알팔파분말(0.5g)을 투입한 다음, CO₂ gas를 처리하고 밸브를 봉하였다.

3) 실험 설계 및 처리 방법

In vitro 배양시험은 공시 사료지방을 달리하여 총 2차에 걸쳐 다음과 같이 수행하였다.

제1차로 공시 사료지방을 옥수수유(Corn oil)로 하여, 지방첨가구, Ionophore 및 무첨가구의 3개 처리를 조합하여 2x2 요인배치법으로 설계하였다. 처리구는 1) 대조구(지방 무첨가) 2) Corn oil 첨가구, 3) Corn oil+Monensin첨가구의 3개구를 두고 처리당 각 6반복으로 배양을 실시하였다. Ionophore는 Sodium Monensin을 에칠알콜에 용해시켜 40ppm수준(0.80 ppm/ml 배양액)으로 첨가하고, 지방첨가는 5%(건물기준) 수준으로 처리하였다. 각 처리구의 flask를 38℃와 150rpm으로 유지되는 shaking incubator에서 배양하면서 0, 6, 12, 24시간 간격으로 시간을 달리하여 시료를 채취하였으며, 시료채취 및 분석은 각 처리당 총 6반복으로 수행하였다. 0시간째 배양물들은 곧바로 -27℃로 냉동시켜 발효를 정지시켰으며, 각 시간별로 배양물 내의 VFA 및 장쇄지방산의 변화를 조사하였다. 각 시간별로 flask의 분젠밸브를 열어 공기에 노출시키고 곧바로 -27℃에서 냉동시켜 추가발효를 억제시켰다(LaChanda 등, 1998).

4) 결과

가) pH

배양에 들어가기 전에 측정된 반추위액의 pH는 평균 6.54로 나타났으며, 배양액과 혼합한 다음에는 6.88로 약간의 상승을 보였다.

나) Volatile fatty acids (VFA)

각 처리구간 배양시간 별 배양액 중 휘발성지방산의 Mol 농도비의 변화는 Table 2-2에 제시되었다. 식물성 지방 및/또는 Monensin의 첨가는 VFA의 종류별 농도에 별다른 영향을 미치지 않았다. Wang 등(2002)은 농후사료에 아마인유 또는 아마인 유래지방을 첨가하여 *In vitro* 배양을 실시하였는데, 아마인유의 첨가로 총 VFA 농도가 감소하였으며, 지방산별 농도에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다고 보고하였는바, 본 배양실험에서도 VFA 조성에 있어 별다른 차이를 발견할 수 없었다.

Table 2-2. Concentration of volatile fatty acids in the ruminal content of sheep after incubation.

		Treatment ¹																			
Hr VFA		0					3					6					9				
Trt.		C	S	M	S M	S E M ²	C	S	M	S M	S E M	C	S	M	S M	S E M	C	S	M	S M	S E M
C ₂		63.3	63.0	63.5	62.9	0.6	61.0	59.6	60.2	59.5	2.6	63.0	57.9	60.3	59.3	2.8	63.4	55.8	61.7	60.6	4.4
C ₃		23.3	24.0	23.5	23.8	0.8	27.6	28.6	29.2	28.6	2.9	26.8	31.2	29.7	30.3	2.8	26.0	28.8	32.9	29.3	4.1
C ₄		13.5	13.1	13.0	13.4	0.7	11.8	11.4	11.0	11.9	0.8	10.4	10.9	10.0	10.7	1.1	10.7	10.2	9.8	10.2	1.0
C ₂ / C ₃		2.7	2.6	2.7	2.7	0.2	2.3	2.1	2.1	2.1	0.4	2.4	1.9	2.0	2.0	0.3	2.0	2.6	2.2	2.1	0.6

¹ Treatment were control(C), soybean oil(S), Monensin(M), Soybean oil+Monensin.

² Standard error mean.

한편, 각 처리구간 배양시간 별 배양액 중 장쇄지방산 함량의 변화는 Table 2-3에 제시되었다.

다) Octadecatrienoic acid (C18:3)

배양물 내 총 지방산 중 C18:3 지방산의 조성비는 전반적으로 대두유 첨가구들에서 대두유 무첨가구들에 비하여 유의적 낮은 수준($P < .05$)으로 있었으며 Monensin처리 및 대두유와 Monensin의 상호작용에 의한 변화는 유의적이지 않았다. 배양시간, 배양시간과 지방의 상호작용, 배양시간과 Monensin의 상호작용, 그리고 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원상호작용에 의한 C18:3 농도비율의 변화는 미미하였다.

배양 0시간 째 농도 대비 C18:2의 배양시간별 상대적 증감을 추이를 살펴보면 배양시간이 경과함에 따라 C18:3의 농도가 유의적으로($P < .01$) 감소하였으나, 배양시간과 지방의 상호작용, 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용 효과들은 유의적이지 않았던 반면, 배양시간과 Monensin의 상호작용은 유의성을 지니는 경향($P < .05$)을 보였다.

Table 2-3. Concentration of long chain fatty acid in dried ruminal incubation content of sheep.

		Treatment ¹														
hr	FA	3					6					9				
Trt.		C	S	M	S M	S E M ²	C	S	M	S M	S E M	C	S	M	S M	S E M
C _{15:0}		3.2	1.2	3.2	1.3	0.4	3.4	1.1	3.3	1.1	0.3	3.5	1.0	3.9	0.9	0.9
C _{16:0}		37.3	18.7	36.0	18.5	2.7	32.5	18.3	34.5	18.5	4.9	34.9	18.9	34.3	16.8	4.3
C _{18:0}		22.5	11.0	26.4	11.7	4.2	28.3	14.1	24.5	11.1	5.2	34.0	15.2	27.0	11.4	7.0
<i>Cis</i> C _{18:1}		3.3	16.8	4.4	14.9	1.9	3.3	15.6	3.6	17.6	1.5	3.1	16.9	4.7	18.6	1.0
<i>Trans</i> C _{18:1}		1.6	1.9	1.1	2.0	0.6	1.5	2.4	3.7	2.3	1.1	2.6	5.6	1.9	11.4	2.5
C _{18:2}		10.0	37.5	41.1	9.8	2.2	9.8	40.2	37.6	9.9	2.2	9.1	31.1	31.6	9.1	3.1
C _{18:3}		8.9	8.3	12.9	8.7	5.2	10.4	8.0	12.0	7.8	2.1	10.3	6.2	11.3	5.2	2.8
C _{20:0}		6.0	0.8	1.3	0.5	2.9	5.7	1.0	2.4	1.0	2.2	0.9	1.6	2.1	1.5	0.7
con		4.0	2.0	4.9	2.7	1.5	5.0	2.1	6.2	1.9	1.6	2.5	3.1	6.1	3.0	4.0

¹ Treatment were control(C), soybean oil(S), Monensin(M), Soybean oil+Monensin (SM).

² Standard error of mean.

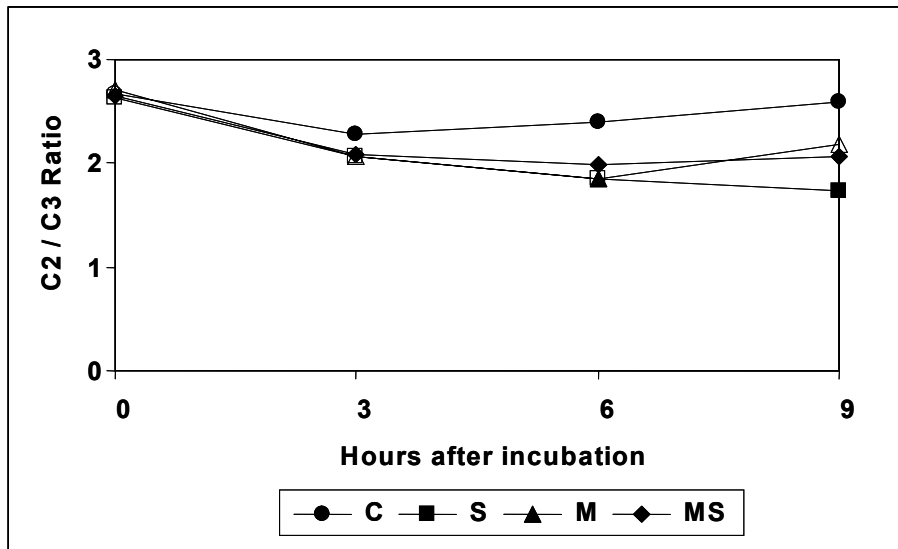


Fig. 2-1. *In vitro* changes in C2/C3 ratio in incubation solution after incubation.

Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+mpnensin(MS)

즉 배양시간이 경과함에 따라 moenesin처리에 의하여 C18:3의 감소율이 Monensin 무첨가구에 비하여 증가하는 경향이 있었다. 9시간 배양완료 후 지방 + Monensin첨가구에서 타 처리구에 비하여 C18:3의 감소율이 현저하게 증가하는 경향이 있었다 ($P < .05$). 동일 시간대의 C18:2의 증감율을 보면 Monensin 처리구들에서 Monensin 무처리구들에 비하여 감소율이 낮았다. 이는 C18:3의 감소율 증가와 연관이 있을 것으로 사료된다. 일반적으로 반추가축의 제1위 미생물에 의한 C18:3의 hydrogenation의 주요산물은 CLA가 아닌 C18:2로서(Viviani, 1970), Monensin 무처리구들에 비하여 Monensin 처리구들에서 나타난 상대적으로 낮은 C18:2 감소율은 C18:3의 hydrogenation 과정의 중간산물인 C18:2의 유입이 증가한 데 기인한 것으로 사료된다. 본 실험에서 배양물 내 총 지방산 중 C18:3와 C18:2의 조성비 간에 유의적인 부의 상관관계($r = -0.37$, $P < .05$)가 있었다. 일반적으로 Monensin을 제1위액에 첨가할 경우 불포화지방산들의 hydrogenation에 관여하는 *Butyrivibrio fibrisolvens* 등과 같은 미생물의 활성 또는 성장을 억제하여 C18:3의 수소화 반응이 억제되는 것으로 보고되어 왔다(Viviani, 1970). 그러나 Novel과 Demeyer(1995)이 실시한 제1위액을 이용한 *In vitro* 연구에서 Monensin 첨가에도 불구하고 C18:3의 hydrogenation은 대조구에 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 실험에서 나타난 Monensin에 의한 C18:3의 감소율의 증가는 Monensin의 작용에 의한 것이 아닌 대두유+Monensin 처리

구에서의 현저한 C18:3 감소율 증가로 인하여 Monensin의 효과가 과대평가 된 것으로 사료된다(Fig. 2-2).

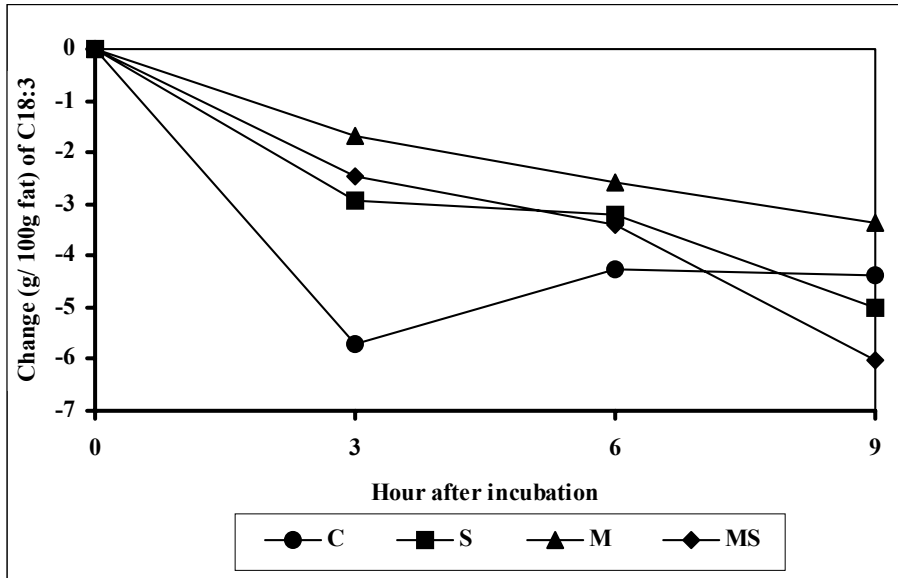


Fig. 2-2. *In vitro* changes of C18:3 in dried incubation media after incubation.

Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

라) Octadecadienoic acid (C18:2)

Fig. 2-3에 도시된 바와 같이, 배양물 내 총 지방산 중 linoleic acid의 조성비는 전반적으로 대두유 첨가구들에서 대두유 무첨가구들에 비하여 유의적으로 높은 수준 ($P < .01$)을 유지하였으나 Monensin처리 및 대두유와 Monensin의 상호작용에 의해서 변하지 않았다. 그리고 배양시간이 경과함에 따라 전반적으로 C18:2 농도비율은 유의적으로 감소($P < .05$)하였는데 이는 배양시간 경과에 따른 미생물들에 의한 C18:2에 대한 hydrogenation이 증가되었음을 의미한다. 특히 배양시간과 대두유 첨가에 의한 상호작용에 의하여 C18:2 농도비율의 변화가 유의적으로 나타났다 ($P < .05$); 배양시간이 경과함에 따라 대두유 첨가구들의 C18:2 조성비가 감소하는 반면, 대두유 무처리구들에서는 비교적 변화가 미미하였다. 배양 0시간 째 농도 대비 C18:2의 전반적인 증감율을 살펴보면 지방첨가 효과($P < .01$) 및 상호작용 효과가($P < .05$) 유의적으로 나타났다. 대두유 첨가시 C18:2의 감소율이 대조구에 비하여 크게 증가하였다. 그리고 지방

과 Monensin의 전반적인 상호작용을 살펴보면 C18:2의 감소율이 대두유와 Monensin 처리구에서 전반적으로 대두유 단독 처리구에 비하여 낮았으며($P < .05$) Monensin 단독 처리구 보다는 전반적으로 유의적이지는 않았지만 약간 증가하는 경향을 보였다. 배양시간별 상대적 증감을 추이를 살펴보면 배양시간이 경과함에 따라 C18:2의 농도가 감소($P < .01$)하였으나 배양시간과 지방의 상호작용, 배양시간과 Monensin의 상호작용은 유의적이지 않았던 반면 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용은 유의성을 지니는 경향($P < .05$)을 보였다. 즉 대조구의 경우 C18:2의 농도는 배양 첫 6시간까지 유의적이지는 않지만 완만하게 증가하다가 배양 9시간째에 감소하였고 지방 처리구에서는 배양시간이 경과함에 따라 처리구들 중 가장 큰 폭으로 감소하였다. 이러한 현상은 다른 연구자들의 보고와 일치하는데 Wu 등(1991)에 의하면 C18:2가 풍부한 동·식물성 혼합 지방을 사료건물 중량의 3%와 6% 수준으로 유우에게 급여하였을 때 제1위액 내에서의 C18:2의 감소율이 6% 처리구에서 유의적으로 증가되었다. 또한 식물성 지방 (Hussein 등, 1996; 송과 최, 1998)과 동물성지방 (Zinn, 1988)을 첨가하였을 때 C18:2의 hydrogenation이 증가되었음을 보고하였다. Monensin 처리 효과를 살펴보면 Monensin 단독처리구보다 Monensin+대두유 처리구에서의 감소 폭이 증가하였다. 이는 앞서 C18:3의 경우와 마찬가지로 Monensin에 의한 C18:2의 hydrogenation의 증가라기보다는 대두유처리에 의한 효과로 보인다. 실제로 지방과 지방 + Monensin 처리구들을 비교하였을 때 배양시간 경과에 따른 C18:2의 감소율이 지방 단독 처리 시에 유의적으로 증가하였다($P < .01$). 따라서 대두유 첨가 시 C18:2의 hydrogenation이 Monensin에 의하여 감소되었음을 알 수 있다(Fellner 등, 1997; Maemer 등, 1985; Zinn, 1988). Monensin은 반추가축의 제1위 내에서 불포화지방산들의 hydrogenation에 관여하는 Gram 양성균들인 *Ruminococcus albus*와 *Butyrivibrio fibrisolvens* 등에 독성을 발현하여 그들의 활성 및 성장을 저해하여(Chen과 Wolin, 1979; Dawson과 Boling, 1987) 불포화지방산들에 대한 hydrogenation을 억제한다.

Linoleic acid와 C18:3의 조성비가 유의적으로 감소된 것으로 보아 짧은 시간의 *in vitro* 배양이라 하더라도 반추가축의 제1위액 내 미생물들에 의한 불포화지방산들의 수소화 반응이 매우 빠르게 일어났음을 보여주고 있다. 여러 연구보고들에 의하면 정제 대두유 급여 시 지방의 가수분해가 신속히 일어나 불포화지방산들의 hydrogenation이 빠르게 진행된다고 하였다(Hawke와 Silcock, 1970; Bates와 Jenkins, 1998).

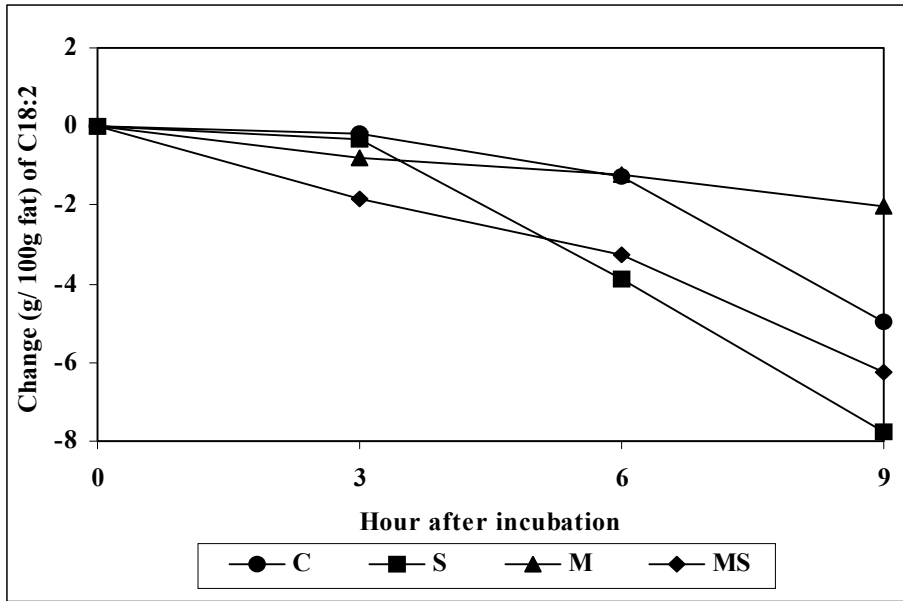


Fig. 2-3. *In vitro* changes of C18:2 in dried incubation media after incubation.

Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

마) Octadecenoic acid (*Cis* C18:1)

Oleic acid의 총 지방산 중 비율은 전반적으로 대두유 첨가구들에서 대두유 무첨가 구들에 비하여 높았으나($P < .01$), Monensin 처리 및 대두유와 Monensin의 상호작용에 의한 변화는 유의적이지 않았다(Fig. 2-4). 배양시간, 배양시간과 지방의 상호작용, 배양시간과 Monensin의 상호작용이 나타나는 경향이 있었지만 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용 효과가 유의적으로($P < .05$) 나타났다. 즉 배양시간이 경과함에 따라 Monensin 처리구에서 *cis* C18:1는 배양 6시간째부터 증가하였으나 Monensin 무처리구들에서는 배양 종료시에도 증가가 없었다. 대부분의 처리구에서는 배양 9시간째에 *cis* C18:1의 농도가 0시간 농도와 비교하여 볼 때 증가하였으나, 대조구에서만 감소하는 현상이 나타났다. 이는 *trans* C18:1의 경우와 유사하여 결국 대조구에서는 이들 불포화지방산들이 stearic acid로의 hydrogenation이 진행되고 있음을 말해 주고 있다. 실제로 배양 9 시간째 대조구의 C18:0의 증가율이 타 처리구들에 비하여 높게 나타나 이를 뒷받침해 주고 있다(Fig. 2-4).

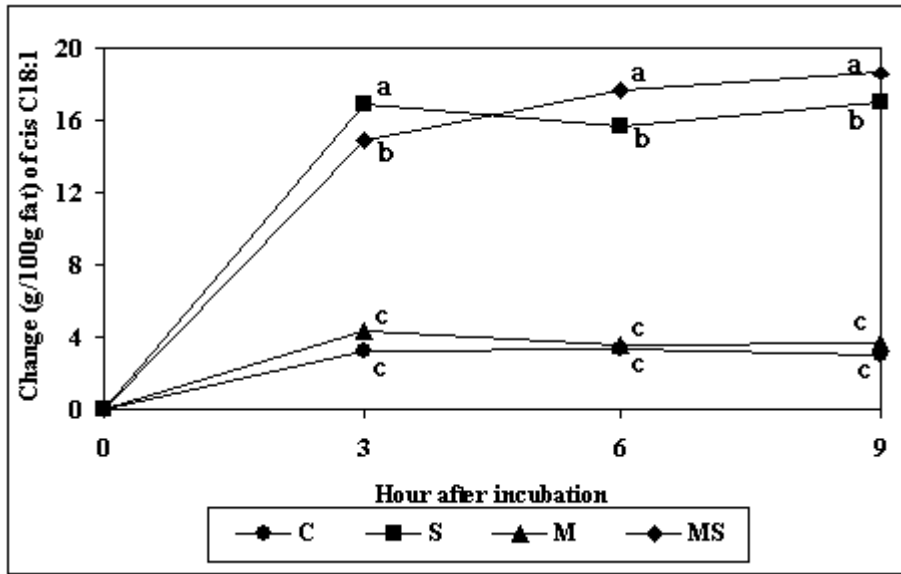


Fig. 2-4. *In vitro* changes of *cis* C18:1 in dried incubation media after incubation.

a, b, c Values in a row with different alphabet significantly differ at $p < .05$.
Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

바) Vaccenic acid (*Trans* C18:1)

배양물 내 총 지방산 중 *trans* C18:1의 조성비는 전반적으로 대두유 첨가구들에서 대두유 무첨가구들에 비하여 유의적으로($P < .01$) 높은 수준을 보였다(Fig. 2-5). 또한 Monensin 처리에 의하여 조성비가 증가되는 경향($P < .05$)을 보였다. 배양시간이 경과함에 따라 전반적으로 *trans* C18:1의 조성비가 유의적으로 증가하였는데($P < .01$) 이는 C18:3와 C18:2의 수소화반응이 증대되었음을 의미한다. 전반적으로 *trans* C18:1의 조성비는 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용에 의하여 현저하게 영향을 받았다 ($P < .05$). 즉 Monensin 단독 처리 시 배양 6시간째의 *trans* C18:1의 조성비가 최고치에 이른 뒤 감소 추세를 보인 반면 다른 처리구들에서는 배양 9시간째에 최고치를 나타내었다. 특히 대두유 + Monensin 처리구의 경우 배양 9 시간째에 배양물 내 *trans* C18:1의 축적이 타 처리구들에 비하여 현저하게 증가되었다. 배양 0 시간째 농도 대비 *trans* C18:1의 배양시간별 상대적 증감을 또한 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용에 의하여 현저한 영향($P < .05$)을 받았다. 즉 대조구의 경우 *trans* C18:1의 농도는 배양 9 시간째에 121.50% 증가하였고, 대두유 처리구에서는 배양 3, 6 시간째에 감소하였다가 9 시간배양 완료 시 287.79%로 증가하였다. Monensin 단독

처리 시 배양 3 시간째에 *trans* C18:1의 감소가 있었으나 배양 6 시간째에 176%의 증가율을 보였다. 대두유 + Monensin 처리구의 경우 6시간 배양 완료 시까지 *trans* C18:1의 감소가 있었으나 배양 9시간째에 662%의 증가율을 나타내었다. 전반적으로 대두유 처리구들에서는 배양 6시간까지 *trans* C18:1의 감소가 있는 뒤 배양 9 시간째에 높은 증가율을 보인 반면 대두유 무처리구들에서는 6시간째부터 증가율이 대두유 처리구들보다 낮았다($P < .01$). 대두유 무처리구에서 배양 첫 6시간 동안의 *trans* C18:1의 감소는 곧 이 지방산이 C18:0로 hydrogenation에 의하여 전환되었음을 의미하고, 9 시간째의 *trans* C18:1의 대폭적인 증가율은 이 지방산이 C18:0로의 완전한 hydrogenation이 억제되었음을 암시한다. Bates와 Jenkins(1998)는 대두유의 급여량을 증가시켰을 때 젖소의 제1위 내 *trans* C18:1의 농도가 유의적으로 증가하였음을 보고하였고, Wu 등(1991)도 대조구에 비하여 지방을 급여한 유우의 제1위 내 *trans* C18:1이 증가하는 경향을 보고하였다. 이처럼 배양액 내 *trans* C18:1의 축적은 hydrogenation이 불완전하게 종료되기 때문에 일어나는 것으로 유리지방산 형태의 C18:2의 농도가 증가할 경우 *trans* C18:1이 C18:0로의 전환이 억제되기 때문이다 (Jenkins, 1993).

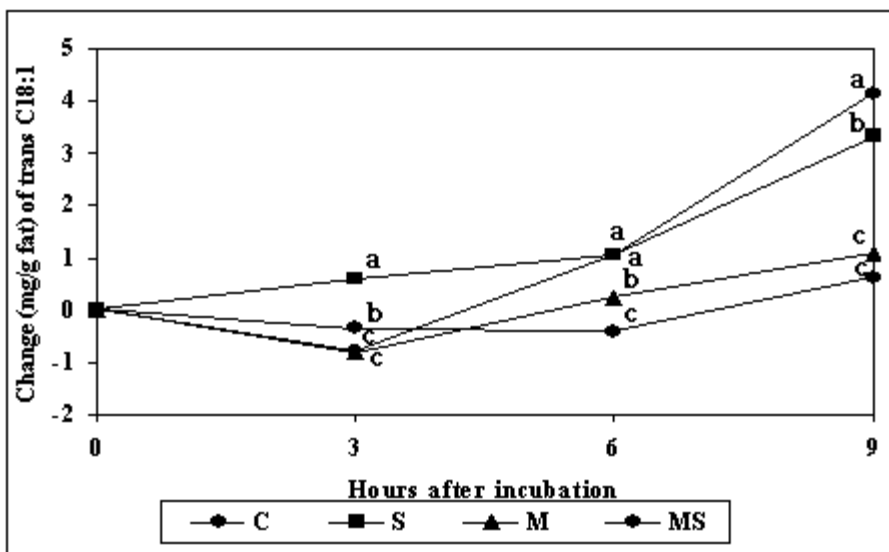


Fig. 2-5. *In vitro* changes of *trans* C18:1 in dried incubation media after incubation.

a, b, c Values in a row with different alphabet significantly differ at $p < .05$. Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

본 실험에서도 배양 시간별로 보았을 때 *trans* C18:1의 증가율의 증가할 때 C18:0의 증가율이 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 따라서 대두유 첨가에 의한 C18:2의 불완전한 hydrogenation이 일어난 것으로 사료된다. Fig. 2-5에서 보는 바와 같이, Monensin 첨가시 배양 3시간 이후부터 *trans* C18:1의 증가가 나타난 반면 Monensin 무처리구에서는 9 시간 배양 종료시점에는 증가를 보였다. 이는 곧 Monensin 첨가에 의하여 C18:2의 hydrogenation이 지연되었음을 의미한다. Monensin 첨가에 의한 C18:2 및 *trans* C18:1의 hydrogenation의 억제현상은 여러 연구자들에 의하여 보고되고 있다(Zinn, 1988; Nevel과 Demeyer, 1995; Fellner 등, 1997).

사) Octadecanoic acid (C18:0)

C18:0(Stearic acid)의 조성비는 전반적으로 대두유 첨가구들에서 대두유 무첨가구들에 비하여 유의적으로 높았으며($P<.01$), Monensin처리 및 대두유와 Monensin의 상호작용에 의한 변화는 없었다. Stearic acid의 조성비는 배양시간이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였고($P<.05$), 배양시간과 Monensin의 상호작용($P<.05$)에 의하여 유의적인 영향을 받았지만 배양시간 + 지방의 상호작용, 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용에 의한 변화는 없었다. 배양시간이 증가함에 따라 Monensin 첨가는 C18:0의 증가를 억제한 반면 Monensin 무첨가구에서는 C18:0의 지속적인 축적이 일어났다. 이는 여러 연구자들의 연구 결과들과 일치하였다(Nevel과 Demeyer, 1995; Fellner 등, 1997). 즉 Monensin에 의하여 불포화지방산들의 hydrogenation이 억제되어 C18:0의 생성이 저하된 것이다. 배양 0시간 째 농도 대비 C18:0의 배양시간별 상대적 증감을 추이를 살펴보면 배양시간이 경과함에 따라 C18:0의 농도가 유의적으로 증가하였으며($P<.05$), 배양시간과 지방의 상호작용에 의하여 C18:0의 농도가 유의적으로 변화하였다($P<.05$). 즉 대두유 첨가 시 배양 6시간 이후에는 C18:0의 증가가 지속되었지만 대두유 무첨가구에서는 배양 6 시간까지 감소하다 배양 9시간째에 현저하게 증가하였다. 이러한 C18:0의 증감율의 변화는 전적으로 불포화지방산들의 hydrogenation의 정도에 따른 것이다. 본 실험에서는 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용에 의한 C18:0 증감율의 변화는 관찰 되지 않았다(Fig. 2-6).

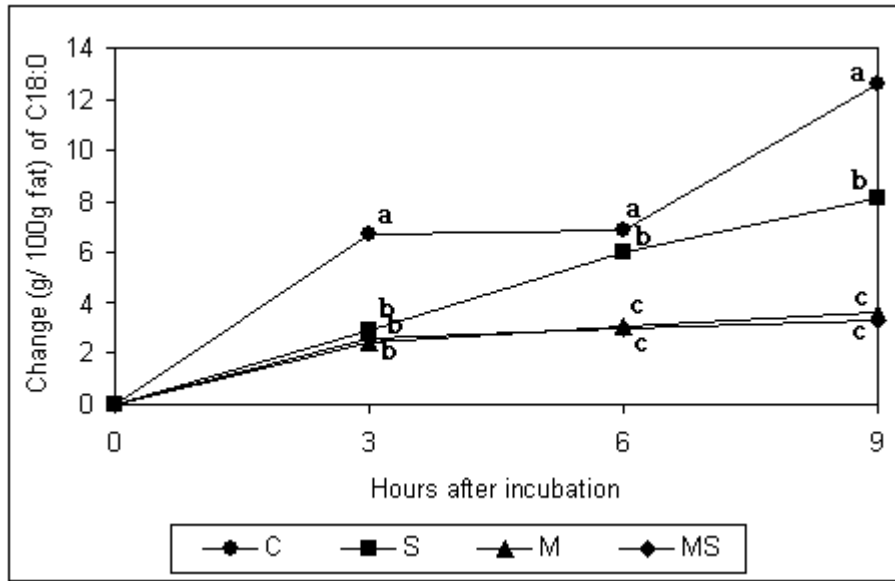


Fig. 2-6. *In vitro* changes of C18:0 in dried incubation media after incubation.

a, b, c Values in a row with different alphabet significantly differ at $p < 0.05$.

Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

아) Conjugated linoleic acid(CLA)

Fig. 2-7에 도시된 바와 같이 Linoleic acid의 hydrogenation에 의하여 생성되는 conjugated linoleic acid(CLA, *cis*-9, *trans*-11, octadecaenoic acid)의 배양물 내 총 지방산 중 조성비는 전반적으로 대두유 무첨가구들에서 대두유 첨가구들에 비하여 유의적으로 높은 수준($P < 0.05$)이었으나, 이는 대두유 첨가에 의한 희석효과 때문이었다. 전반적으로 Monensin 처리 효과 및 대두유와 Monensin의 상호작용 효과에 의한 CLA의 조성비 변화는 없었다. 배양시간이 경과함에 따라 전반적으로 CLA 조성비는 유의적으로($P < 0.05$) 감소하였는데 이는 CLA가 C18:1 계열(*cis* 및 *trans* C18:1)의 불포화지방산들과 C18:0로의 hydrogenation이 진행되고 있음을 의미한다.

Conjugated linoleic acid의 조성비는 배양시간 + 지방 + Monensin의 3원 상호작용($P < 0.05$)에 의하여 현저한 변화를 보였다. 배양시간이 경과함에 따라 대조구의 경우 6시간 배양 완료 후 CLA 조성비가 증가되었다가 9시간 배양 완료 시에는 감소한 반면 대두유 처리구에서는 배양시간이 경과 함에 따라 CLA의 조성비가 점진적으로 증가하였다.

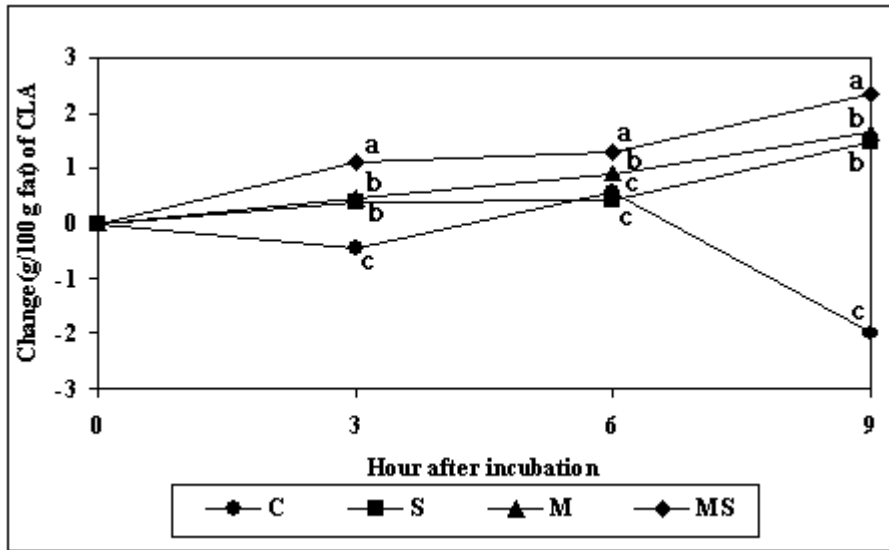


Fig. 2-7. *In vitro* changes of C18:1 in dried incubation media after incubation.

a, b, c Values in a row with different alphabet significantly differ at $p < .05$.
Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

또한 대두유 단독 처리 시 CLA의 조성비가 배양시간이 경과함에 따라 증가한 반면 대두유 + Monensin 처리구에서는 6시간 배양 완료 시에 약간 감소하였다가 9시간 배양 완료 시에 약간 증가하는 경향을 보였다. 배양 0시간째 농도 대비 CLA의 배양시간별 상대적 증감을 추이를 살펴보면 배양시간이 경과함에 따라 증가율이 증가하는 경향($P < .05$)을 보였으며 배양시간과 지방의 상호작용($P < .05$) 및 배양시간과 Monensin의 상호작용($P < .05$)에 의하여서도 현저하게 영향을 받았다. 배양시간이 경과함에 따라 대두유 첨가 시 CLA의 증가율이 계속 증가된 반면 대두유 무처리구들에서는 6시간째에 최고의 증가율을 보인 뒤 증가율의 정도가 감소하였다. 현재 식물성 지방 첨가에 따른 제1위 내에서의 CLA의 생성 정도를 측정할 실험이 보고된 바가 없지만 C18:2가 풍부한 해바라기씨유 아마인유 등(Kelly 등, 1998)과 전지대두(Lawless 등, 1998) 급여 시 유지방 내 CLA의 농도가 증가됨이 보고되고 있다. 유유의 유선조직에서 합성되어 총 유지방 내 CLA 함량에 영향을 미치는 정도가 크지 않으므로 유지방 내 CLA의 함량 변화는 제1위에서 생성, 흡수되어 유지방으로 분비된 것으로 보아도 무방하다. 따라서 유지방 내 CLA의 증가로 미루어 보아 C18:3 함량이 높은 지방 급여 시 제1위 내 CLA의 생성이 증가되는 것으로 사료된다. Monensin 첨가 시 배양시간이 경과함

에 따라 CLA의 농도가 현저하게 증가된 반면 Monensin 무처리구들에서는 배양 6시간째에 최고의 증가율에 도달한 뒤 배양 3 시간째의 증가율로 저하되었다. Monensin 처리에 의한 CLA의 증가는 CLA의 C18:0로의 완전한 hydrogenation이 억제되어 축적이 된 결과이다. Fellner 등(1997)에 의하면 Monensin을 C18:2와 함께 연속배양을 실시하였을 때 CLA의 생성이 증가하였다. 본 실험에서의 배양물 내 C18:2와 CLA 조성비 간에 유의적인 부의 상관관계($r = -0.4510, P < .001$)가 있었다. 특기할 점은 배양 9 시간 완료 시 기타 처리구들과는 반대로 대조구에서 CLA가 56.7% 감소하였다. 이는 CLA에 대한 hydrogenation이 대조구에서는 증대된 반면 기타 처리구에서는 감소되었음을 나타내어 주고 있다. Monensin 처리구와 대두유 처리구에 비하여 대두유 + Monensin 처리구에서 각각 유의적이지는 않지만 CLA의 증가율이 증가하는 경향을 보였다.

각 배양물 내 CLA의 실제 생산량의 증감을 살펴보았을 때 전반적으로 배양시간과 지방의 상호작용($P < .008$)에 의하여 유의적인 영향을 받았다. 즉 배양시간이 증가함에 따라 CLA의 생산량도 지속적으로 큰 폭으로 증가한 반면 대두유 무처리구에서는 낮은 증가율을 보였다. 배양 0 시간 대비 CLA의 증감율을 비교하여 보았을 때 배양시간이 증가함에 따라 CLA의 생산량이 증가하는 경향($P < .05$)을 보였다. 배양시간과 지방의 상호작용은 없었지만 배양시간과 Monensin의 상호작용($P < .01$)에 의하여 CLA의 생산량 증가율이 유의적으로 변하였다(Figure 2-7).

자) 전체적인 처리 효과

실험 전체적으로 보았을 때 대두유 첨가시 장쇄지방산들의 조성이 유의적으로 ($P < .01$) 변하는 것을 관찰하였다(Fig. 2-8). 대두유 첨가한 경우, 총 지방산 대비 C15:0, C16:0, C18:0 및 CLA의 농도비율이 감소한 반면, *cis* C18:1, *trans* C18:1 및 C18:2의 농도 비율은 증가하였다. 이는 일차적으로 대두유 첨가시 대두유 내 지방산들의 공급에 의하여 배양물 내 장쇄지방산들의 조성이 변하였기 때문이며, *trans* C18:1 농도의 증가는 C18:2의 공급이 증가하였을 때 나타나는 일반적인 현상이다(Fellner 등, 1995). Monensin 처리 시 *trans* C18:1 및 CLA 농도가 증가하는 경향을 보였다.

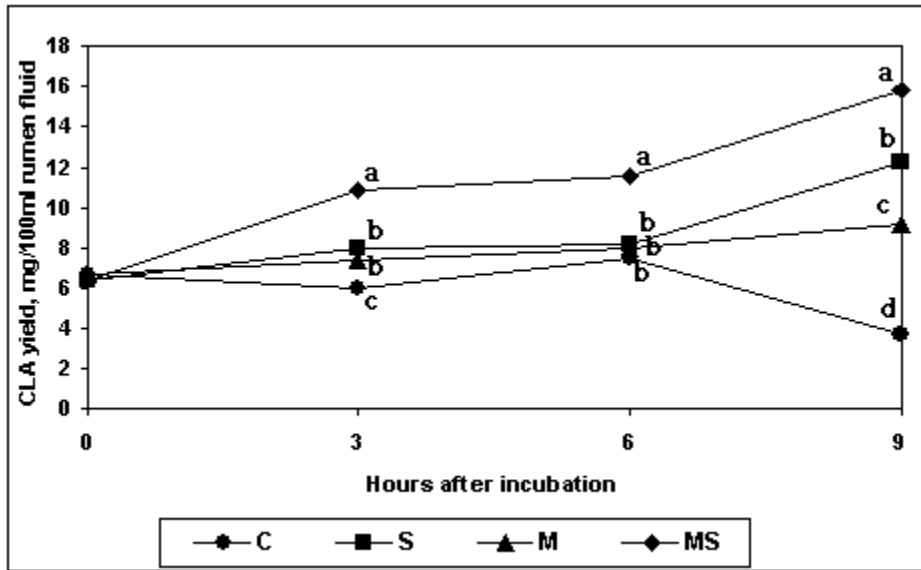


Fig. 2-8. *In vitro* yield of CLA in incubation media after incubation.

a, b, c Values in a row with different alphabet significantly differ at $p < .05$.

Control(C), Soybean oil(S), Monensin(M), Soybean+Monensin(MS)

나. *In vitro* 배양시험 II

제2차 배양시험에서는 공지 사료지방을 면실유(Cotton seed oil)로 하여, 처리구는 Cotton seed oil, Ionophore 및 무첨가구의 3개 처리를 조합하여 2x2 요인배치법으로 설계하였다. 처리구는 1) 대조구(지방 무첨가) 2) Cotton seed oil 첨가구, 3) Cotton seed oil+Monensin첨가구의 3개구를 두고 처리당 각 6 반복으로 배양을 실시하였으며, 나머지 실험방법은 제1차 실험에서와 같다.

1) pH 측정

Fistula를 장착한 면양에서 채취한 위액을 cheese cloth를 이용하여 여과한 뒤 pH를 측정하되, 배양액과 혼합한 뒤와 배양 flask에 분주하기 전에 pH를 재측정하였다.

2) 배양액의 VFA(Volatile fatty acid)와 지방산 조성 측정

VFA의 분석은 각 시간별로 배양액 중 시료 5ml을 채취하여 1ml의 25% metaphosphoric acid와 internal standard로 1ml의 500ppm cyclohexane을 넣어

2000×g에서 20분간 원심분리 시킨 다음 여기서 상정액을 1ml를 채취하여 FID가 장착된 GLC (Hewlett Packard 5890II, 2m × 1/8" stainless steel, 4% CARBOWAX 20M 80/120 CARBOPACK · BDA, SUPELCO Co., U.S.A)를 이용하여 실시하였다. 이때 carrier gas로 N₂를 30psi로 유입시키며 GLC의 분석조건은 oven 온도 170℃, injector 온도 200℃, 그리고 detector 온도 210℃로 조절한 뒤, 0.4μl의 시료를 주입하였다.

배양용액 중의 장쇄지방산 측정을 위하여 -70℃로 냉동 후 건조시킨 다음, 1ml의 internal standard(C_{19:0}, 4mg/ml benzene)를 혼합한 뒤 methylation을 실시하였다. Methylation을 위하여 냉동건조 시킨 배양액 시료 1g에 1.75% methanolic H₂SO₄를 15ml를 가한 다음, 80℃ water bath에서 60분간 가열시킨 후 냉각시켰다. 이어서 2ml hexane과 15ml saturated NaCl을 가한 후, 2500rpm에서 15분간 원심분리 시키고, 상층액을 0.3g의 sodium sulfite 처리한 tube에 10분간 방치 후 GLC용 vial에 옮겨 지방산분석에 이용하였다.

지방산 분석은 FID가 장착된 GLC (Thermo quest trace2000 series, Supelco-24082 column)를 이용하여 실시하였다. Carrier gas로 N₂를 80psi로 유입시키고, Column flow rate는 5ml/min이고, injector의 온도는 230℃, detector의 온도는 250℃, oven은 initial temp. 50℃, initial time 3min, ramp5, final temp. 210℃, run time 50min로 각각 설정하였다.

3) 통계분석

본 실험에서 얻어진 data의 통계처리는 2x2 요인배치법(Factorial Design)에 의거하여 GLM(General Linear Model)의 repeated measures로 SAS[®](SAS Institute, Carry, NC, USA)를 이용하였다.

4) 급여사료의 일반영양소 및 지방산 조성

배양시험에 inoculum을 제공한 면양에 급여한 사료의 일반영양소 분석결과를 Table 2-4에 제시하였다. 주 조사료로 사용된 옥수수사일리지는 pH 4.09의 비교적 우수한 품질의 것이었으며, 알팔파건초 역시 1등급의 품질에 해당하는 것을 급여하였다. 농후사료는 중중아지용 펠렛으로 CP 함량이 비교적 높은 것이었다.

Table 2-4. Nutrient composition of various feeds fed to sheep in the experiment.
(%, DM basis)

Items	mixed concentrates	alfalfa hay	timothy hay	corn silage*
Dry matter	90.35	93.0	88.5	33.2
Crude ash	8.98	10.7	5.4	4.50
Crude protein	20.09	23.9	7.80	8.14
Ether extracts	5.16	4.40	2.80	3.10
ADF	19.88	28.7	42.1	28.7
NDF	25.72	39.4	71.3	51.3

5) 결과

본 배양실험의 목적은 면실유(cotton seed oil) 및 Monensin의 첨가효과를 관찰하고자 실시하는 것이었다. Table 2-5에 제시된 바와 같이, C18 계열의 지방산들은 배양 시간이 경과하면서 처리구에 따라 변화 양상에 차이를 보여주었다. Table 2-5 및 Fig. 2-9에서 보는 바와 같이, C18:0 지방산은 배양과 함께 꾸준히 증가하여 6시간에 최고치를 보이고 그 이후에는 서서히 감소하기 시작하였다. 지방 첨가구와 Monensin의 첨가구는 아무것도 첨가하지 않은 대조구에 비하여 낮은 수준을 보였으나, C18:1(Fig. 2-10)과 C18:2(Fig. 2-11)의 경우에는 반대로 대조구보다 높은 수준에서 변화하였다.

특히 대조구의 경우에는 C18:1 및 C18:2 지방산은 배양개시 6시간까지 꾸준히 증가를 보인 반면에 C18:0(Stearic acid)가 상대적으로 감소하는 경향을 보임으로써 반추위미생물에 의한 가수분해와 수소화반응을 보여주고 있는데, 이때 면실유(CSO) 단독 또는 Monensin(MON)과 병행하여 첨가한 처리구에서는 변화의 폭이 상당히 작음을 발견할 수가 있다. Monensin 무처리구들에 비하여 Monensin 처리구들에서의 C18:2의 상대적으로 낮은 감소율은 첨가된 지방의 가수분해에서 유리된 C18:3(Fig. 2-12)이 수소화 되는 과정에서 C18:3의 수소화반응 산물인 C18:2의 유입이 증가한 데 기인된 것으로 사료되며, 배양실험 I 에서도 관찰된 바 있다.

그러나 적어도 Monensin의 처리로 C18:1과 C18:2 지방산 농도의 감소폭이 적어지고, 상대적으로 C18:0 농도의 증가폭이 크게 낮아지는 경향으로 미루어 볼 때, *In vitro*상으로 반추위미생물이 사료지방을 대사시키는 수 시간 동안, Monensin의 존재는 사료지방의 자연적인 가수분해나 수소화 반응을 억제하는 방향으로 작용할 수 있

음을 암시하고 있으며, Ionophore의 이러한 성질은 기존의 유사 연구보고들(Fellner 등, 1997; Van Nevel 등, 1995)과 일치하는 결과이다.

Table 2-5. Changes of C18 fatty acids during the incubation with cotton seed oil(CSO) with or without monensin(MON)¹

C18:0					
	<u>0h</u>	<u>3h</u>	<u>6h</u>	<u>9h</u>	<u>12h</u>
CONT	21.7 ^a	28.73 ^a	37.77 ^a	30.04 ^a	34.21 ^a
CSO	13.92 ^b	21.72 ^b	25.84 ^b	17.75 ^b	24.6 ^b
CSO+MON	12.26 ^b	13.97 ^c	14.9 ^c	10.57 ^c	11.92 ^c
C18:1					
	<u>0h</u>	<u>3h</u>	<u>6h</u>	<u>9h</u>	<u>12h</u>
CONT	15.28 ^b	11.12 ^b	9.28 ^b	10.43 ^b	6.56 ^b
CSO	27.41 ^a	29.7 ^a	29.52 ^a	32.68 ^a	27.17 ^a
CSO+MON	27.55 ^a	28.63 ^a	28.34 ^a	28.6 ^a	29.08 ^a
C18:2					
	<u>0h</u>	<u>3h</u>	<u>6h</u>	<u>9h</u>	<u>12h</u>
CONT	21.44 ^a	14.76 ^c	10.23 ^c	11.97 ^c	6.53 ^c
CSO	22.89 ^a	23.21 ^b	20.97 ^b	26.56 ^b	22.57 ^b
CSO+MON	23.01 ^a	28.89 ^a	28.51 ^a	30.54 ^a	28.97 ^a
C18:3					
	<u>0h</u>	<u>3h</u>	<u>6h</u>	<u>9h</u>	<u>12h</u>
CONT	2.55 ^c	3.3 ^a	2.6 ^a	1.96 ^c	1.25 ^b
CSO	3.33 ^b	1.86 ^c	1.76 ^b	2.15 ^b	2.47 ^a
CSO+MON	3.76 ^a	2.21 ^b	2.42 ^a	2.52 ^a	2.42 ^a
CLA					
	<u>0h</u>	<u>3h</u>	<u>6h</u>	<u>9h</u>	<u>12h</u>
CONT	0.65 ^c	0.87 ^c	0.98 ^b	0.72 ^b	0.64 ^b
CSO	1.34 ^b	1.6 ^b	1.11 ^b	0.98 ^a	0.7 ^b
CSO+MON	1.69 ^a	2.48 ^a	2.54 ^a	2.75 ^b	2.23 ^a

¹ Control(CONT), Cotton seed oil(CSO), Monensin(MON)

배양시간의 경과와 함께 공시 식물성지방인 면실유의 첨가는 C18:3 및 C18:2은 빠른 감소율을 보인 반면, 총지방산 대비 C15:0, C16:0, C18:0 및 C18:2 및 CLA의 농도 비율을 증가시켰으며, 배양시간 6~9시간째에 가장 많은 양의 CLA가 생산되었다(Fig.

13). 면실유+SM 처리구는 나머지 구에 비하여 기능성지방산 CLA의 농도에 있어 유의적으로 높은 수준을 유지하였으며, 농도의 변화양상은 C18:2와 유사한 경향을 보였다. 이로써 Ionophore의 급여는 반추위미생물에 의한 C18:0로의 수소첨가반응을 지연시키는 과정에서 CLA의 생성을 증가시킬 수 있음을 볼 수 있다.

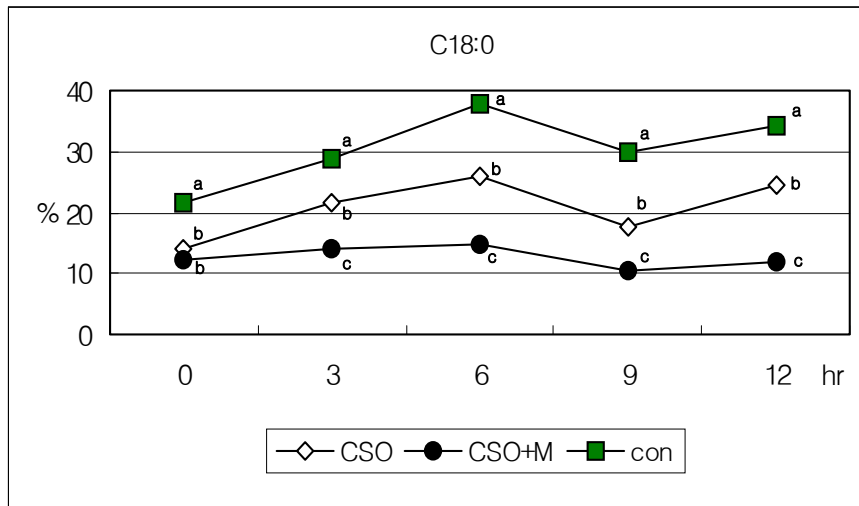


Fig. 2-9. Changes of C18:0 concentration in incubation media.

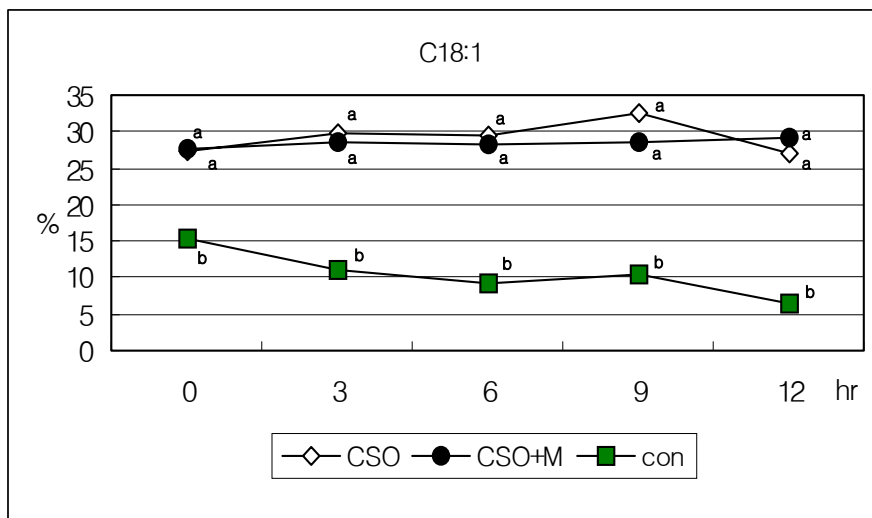


Fig. 2-10. Changes of C18:1 concentration in incubation media.

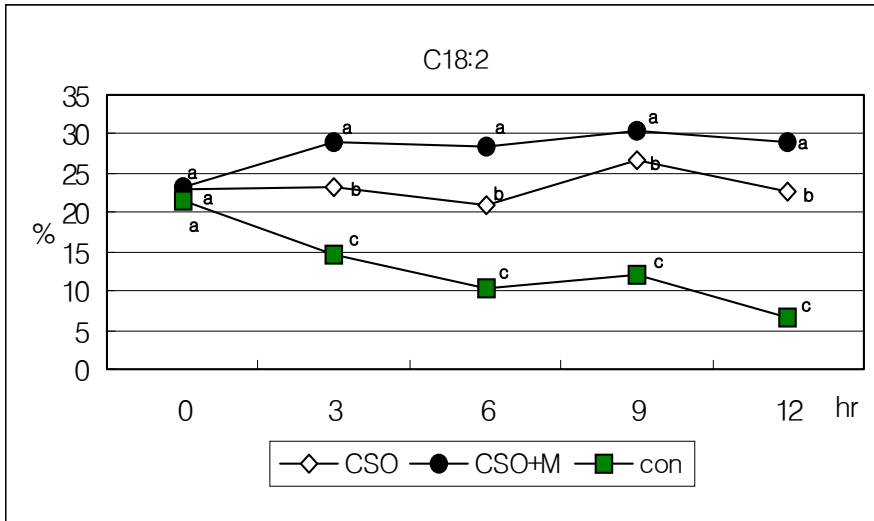


Fig. 2-11. Changes of C18:2 concentration in incubation media.

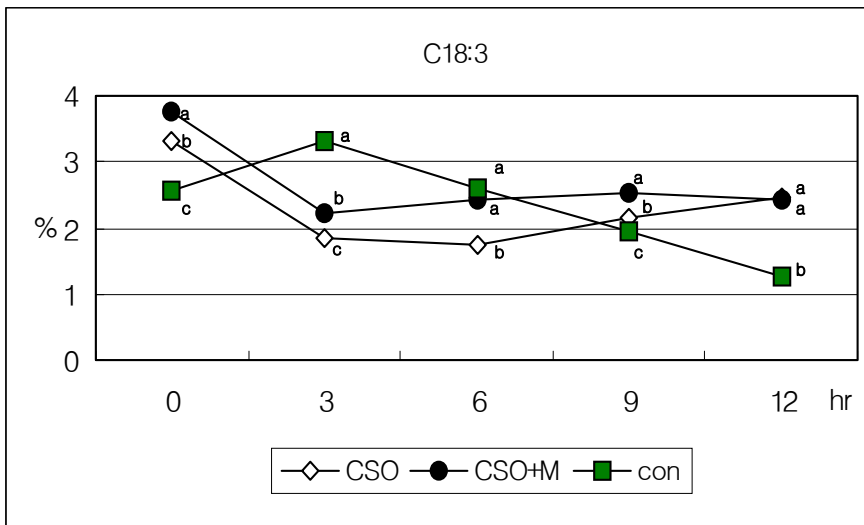


Fig. 2-12. Changes of C18:3 concentration in incubation media.

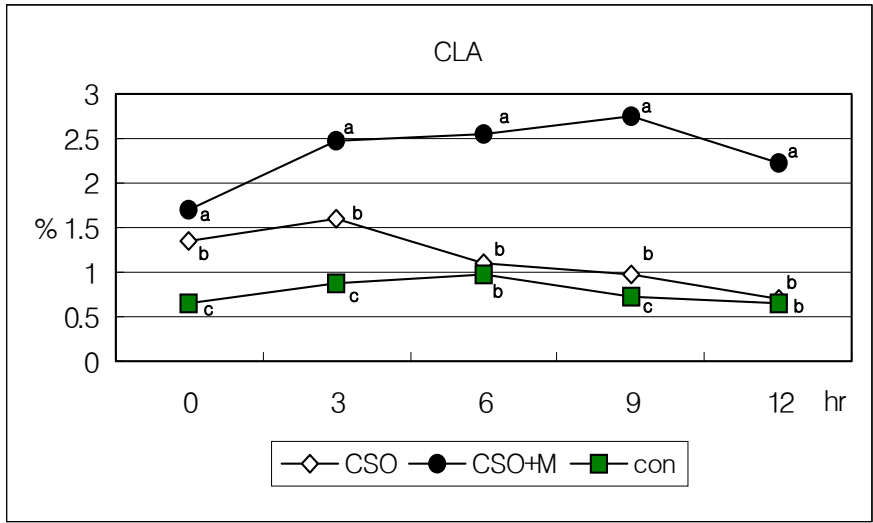


Fig. 2-13. Changes of CLA concentration in incubation media.

3. 연구 제목 : 사료 내 지방첨가에 따른 반추위 내 미생물 대사에 미치는 영향 (중앙대)

가. Batch culture를 이용한 지방첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향
Individual bacteria (*Streptococcus bovis*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Rumonococcus albus*, *Prevotella ruminocola brevis*, Mixed culture) 이용한 batch culture 실험

1) 실험설계

알팔과 건초를 기질로 하여 serum bottle에 지방원료 처리별로 무첨가인 control(T₁), linseed oil(T₂), soybean oil(T₃), sunflower oil(T₄)을 첨가 후 4개의 처리구를 두고 4×4 Latin square법을 이용하여 수행하였다. Batch culture 방법으로 39℃의 혐기배양장치에서 배양을 하였다. 실험용 oil 처리는 Dong *et al.*(1997)의 방법에 의하여 1mm Wiley mill로 분쇄한 후 분무기를 이용하여 사료 중에 뿌려주었다. 오일을 첨가한 사료는 3일 동안 4℃에서 사용하기 전까지 보관 후 실험에 사용하였다. 한국 재래산양의 반추위 미생물에서 분리 동정 한 *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, ATCC 균주 4 종류와, Holstein 젖소에서 추출한 mixed bacteria을 실험에 사용하였다.

2) 반추위액 채취 및 Inoculum 준비

본 실험의 배양액 제조를 위해 도살장에서 도살 직후 반추위 내에 존재하고 있던 내용물을 4겹의 cheese cloth로 여과하고, 보존병에 담아 39℃를 유지하여 실험실로 운반하여 다시 한번 4겹의 cheese cloth로 여과시킨 반추위액 50%와 McDougall's buffer solution 50%에 베타진 (200g / l)을 혼합 후 24시간 동안 예비 배양을 하였다. 강화 배양 후 다시 8겹의 cheese cloth로 거른 배양 반추위액을 취하여 25,000×g에서 15분간 원심분리 후 이것을 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 125ml serum bottle를 이용하여 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 시간 배양하였다. 사용배지는 Maczulak *et al.*(1981)이 이용한 완전배지배양액 중에 Mineral mix B를 20% 줄여서 사용하였다.

3) 분석항목

시험관 내 시간대 별 (0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 72hrs) 발효성상 :

가) 시험관 내 pH 측정

샘플을 채취하여 pH meter를 이용하여 측정하였다.

나) 시험관 내 Ammonia-nitrogen (NH₃-N) 측정
샘플을 1300rpm으로 원심분리 시킨 후 Chaney and Marbach 분석 방법으로 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

다) 시험관 내 반추위 미생물 단백질 함량 측정
샘플에 알칼리성 동용액을 첨가 실온에 방치 후 folin-ciocalteau phenol을 첨가 후 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

라) 시험관 내 Volatile Fatty Acids (VFA's) 측정
샘플을 1300rpm으로 원심분리 시킨 후 단백질 제거제에 metaphosphoric acid를 첨가한 후 Gas chromatography를 이용하여 측정하였다.

마) 시험관 내 미생물의 아미노산 조성
50ml test tube에 시료 40~80mg을 넣은 후 6N HCl을 시료 20mg당 5ml씩 취하고 약 5분간 Nitrogen gas를 충전하였다. 뚜껑을 단단히 막아서 110°C dry oven에서 24시간 정도 두었다. 55°C waterbath에서 evaporating한 후 2회 정도 증류수로 반복하여 완전히 건조시켰다. pH 2.2 dilution buffer로 희석하였다. 그리고 filtering하고 아미노산분석기에 injection하여 함량을 구하였다.

바) suspension fluid and bacterial cells의 지방산 분석
지방산분석을 위한 bacterial suspension sample은 실온에서 3000 rev/min (2520g)에 원심분리 하였다. 상층액과 수집된 bacterial cells의 지질 추출은 Hara and Radin (1978)의 방법에 기초하였다. 추출된 지질은 ethanol에 2ml의 2mol l⁻¹ KOH를 추가 함으로서 유리 지방산에 가수 분해되고 50°C에 30분 동안 가열하였다. Methyl esters는 암흑에서 methanol에 14% boron trifluoride와 함께 준비하였다. 지방산의 methyl esters의 GC 분석은 Jiang *et al.* (1996)에 의해서 묘사된 방법에 준하였다 (J. Jiang, *et al.* 1998).

사) 사료의 지방산 분석
Folch *et al.* (1957)의 방법에 따라 지질을 추출하였다. 추출된 지질은 Lepage와 Roy(1986)의 방법에 따라 methylation 하였다. Methylation후 시료들을 GC에 injection하였다.

아) 사료 중 DM, CP, EE, NDF, ADF, Cellulose 함량 분석

A.O.A.C. (1993)의 방법 및 Van Soest와 Goering (1973)의 방법에 준하여 분석하였다.

4) 결과 및 고찰

본 실험은 4종류의 반추위 미생물과 mixed culture를 이용하여 각각 다른 oil source인 linseed oil과 Calcium salts of palm oil (CSPO)을 첨가하여 반추위 미생물의 발효특성을 알아보기 위하여 *in vitro* 시험이 실시되어졌다. pH와 NH₃-N함량, VFA함량은 초기 반추위 미생물 발효특성에 대한 연구와 비슷한 결과를 나타내었다 (Hungate, 1966, Table 3-1). pH는 전체 처리구에서 적정 수준을 유지하였으나 pure culture에서 전체적으로 다소 낮은 pH를 유지하였다(P<0.05). 이와 같은 결과는 oil source첨가가 반추위 미생물의 발효를 억제하는 역할을 하였고(Czerkawski 등, 1996a), 또한 *in vitro*시험에서 반추 미생물에 의한 biohydrogenation활력이 감소하였다는 연구결과와 일치하였다(Demeyer 등, 1967; Viviani 등, 1968b; Hughes 등, 1982).

미생물단백질 함량은 전체적으로 oil sources처리구에서 통계적 유의성 없이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 linseed oil처리구는 모든 미생물처리구에서 CSPO처리구보다 낮은 결과를 나타내었는데, 이는 unsaturated fatty acid에 의한 미생물군의 physico-chemical효과와 미생물체 외벽에 unsaturated fatty acid에 의한 coating effect에 의해 미생물체 세포벽에 영향을 미쳐 미생물단백질합성에 방해로 받은 것으로 사료되며(Jenkins, 1993; Luvisetto 등, 1987), CSPO에서의 미생물단백질 합성량의 다소 증가는 Ca이 보호지방산의 효과를 나타낸 것으로 사료된다(Galbraith 등, 1971).

NH₃-N 함량은 각각의 미생물처리구에서 유의적인 차이를 나타내었으며 linseed oil과 CSPO처리구에서 높았고(P<0.05), mixed culture에서 특히 높은 결과를 나타내었는데 (P<0.05) 이는 inoculum내에 존재하는 소량의 탄소화물원이 존재하기 때문으로 사료된다(Russell, 1998). Total VFA함량은 control구에서 유의적으로 낮았으며 (P<0.05), oil source 처리구에서 acetate 함량이 감소하는 경향을 보였다(Czerkawski 등, 1975) 그러나 mixed culture에서는 전체 처리구에서 total VFA함량이 비슷한 경향을 보였다. Acetate/propionate 비율은 control구에 비해 다소 감소하는 경향을 보였는데, 이는 실험에 사용된 반추미생물들이 섬유소분해와 WSC와 lactate, succinate를 이용하는 특징 때문으로 사료된다. Wu 등(1991)에 의하면 long chain fatty acid의 경우 반추미생물 대사에 의해 에너지원으로 이용이 되어 다소의 VFA와 CO₂를 생산하였다고 하였는데 그럼에도 불구하고 linseed oil 처리구에서 propionate의 함량이 acetate의 감소량보다 낮았다. 이는 long chain fatty acid에 의해 미생물 단백질 합성이 방해되어지며, 특히 섬유소분해 특성을 가지고 있는 반추위미생물들의 경우 더욱

영향을 받은 것으로 사료된다. 또한 이러한 결과는 unsaturated fatty acid의 첨가시 propionate가 pyruvate에서 생산되어지게 하고 간접적으로 methane생성을 억제하는 경향을 나타낸다(Demeyer 등, 1967, Table 3-2).

배양후 각각의 미생물단백질 내에 지방산 함량은 oil처리구에서 통계적 유의성 없이 다소 감소 증가하였으나 C18:1, C18:2 n-6와 C18:3 n-3의 함량은 증가하였다($P < 0.05$). Mixed culture에서는 oil 처리구에서 유의적으로 지방산 함량이 증가하였고 특히 C18:1 cis, trans는 control구에 비해 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). Linseed oil처리구에서 biohydrogenation은 trans-C18:1 (41.97%) cis-C18:1 (54.97%), C18:2 (68.96%), C18:3 (50.78%)였으며, CSPO 처리구는 trans-C18:1 (31.58%) cis-C18:1 (45.45%), C18:2 (59.92%), C18:3 (66.63%)을 나타내었다. 이와 같은 결과는 보호지방산인 Megalac을 처리하였을 경우 C18:0함량이 증가하였다는 Gulati 등(1997)의 보고와 일치하였으며, Megalac 처리시 hydrogenation의 비율이 47% 정도의 비율이었다는 보고와 비슷한 경향을 보였다(Wu and Palmquist, 1991, Table 3-3a 및 3-3b). C18:0 함량은 CSPO에서 높은 경향을 보였는데 이는 반추위미생물에 의한 hydrogenation작용에서 보호된 것으로 사료된다(Sukhija와 Palmquist, 1988; Ferlay 등, 1992).

반추위미생물에 의한 biohydrogenation 비율은 C18:3>C18:2>C18:1 순서로 나타났으며(Harfoot과 Hazlewood, 1988), 반추위미생물의 lipolysis와 hydrogenation에 의해 최종산물인 C18은 stearic acid와 trans-octadecanoic isomer의 형태로 존재하였다(Dawson과 Kemp, 1970; Keeney, 1970). Ashes 등(1979)과 Gulati 등(1997)의 시험에 의하면 oil source첨가에 의한 *in vitro*시험은 *in vivo*시험 보다 반추위미생물에 의한 biohydrogenation의 비율이 높은 것으로 타나 났는데, 본 시험에서도 같은 결과를 나타내었다.

Table 3-1. Effect of oil sources on pH, NH₃-N concentration and microbial protein of incubation solution incubated for 24 hours *in vitro*

	Streptococcus bovis 26	Ruminococcus flavefaciens 17	Ruminococcus albus 16	Prevotella ruminicola brevis B14	Mixed culture	SEM ¹	P value ²
pH							
Control	6.51 ^c	6.67 ^b	6.57 ^b	6.52 ^c	6.60 ^c	0.05	NS
Linseed oil	6.74 ^a	6.76 ^a	6.71	6.69 ^a	6.71 ^a	0.06	NS
CSPO ³	6.70 ^b	6.71 ^{ab}	6.68	6.60 ^b	6.64 ^b	0.04	NS
NH ₃ -N							
Control	11.20 ^b	27.34 ^c	15.05 ^b	14.19 ^c	13.34 ^c	5.62	**
Linseed oil	33.65	33.40 ^a	30.36	28.61 ^a	25.75 ^a	4.59	*
CSPO ³	32.92	31.57 ^b	29.28	25.42 ^b	24.68 ^b	4.70	***
Microbial dry matter (g/100ml)							
Control	0.33 ^a	0.13 ^a	0.20 ^a	0.26 ^a	2.13 ^a	0.31	*
Linseed oil	0.08 ^c	0.09 ^c	0.18 ^b	0.17 ^c	1.03 ^c	0.29	**
CSPO ³	0.12 ^b	0.11 ^b	0.09 ^c	0.21 ^b	1.05 ^b	0.30	*

¹Standard error of the mean.

²*, ** and *** refer to significance levels P>0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

³Calcium salts of palm oil.

^a, ^b, ^cMean in the same column with different superscript are significantly different (p<0.05).

Table 3-2. Effect of oil sources on concentration and composition of VFA in incubation solution *in vitro*

	Streptococcus bovis 26	Ruminococcus flavefaciens 17	Ruminococcus albus 16	Preyotella ruminicola brevis B14	Mixed culture	SEM ¹	P value ²
Total VFA (mmoles/100ml) :							
Control	71.41 ^a	43.08 ^a	43.75 ^a	58.37 ^a	89.89	15.69	**
Linseed oil	30.09 ^b	18.82	19.38 ^c	18.60 ^c	73.32 ^b	18.95	*
CSPO ³	21.07 ^c	20.71	22.94 ^b	21.20 ^b	85.50	23.13	*
Molar proportion (mmples/100mmoles) :							
Acetate							
Control	60.73 ^a	46.24 ^a	46.47 ^a	64.45 ^a	36.78 ^b	10.75	***
Linseed oil	21.34 ^c	22.64 ^c	22.70 ^c	27.20	37.19 ^a	9.79	*
CSPO ³	34.60 ^b	33.90 ^b	36.01 ^b	30.85	35.11 ^c	9.39	*
Propionate							
Control	31.63 ^a	43.45 ^a	44.98 ^a	28.88	25.79 ^b	8.57	*
Linseed oil	77.97	60.57	59.13 ^c	55.97	28.90 ^a	14.37	*
CSPO ³	30.52	47.75	45.51 ^b	49.10 ^b	32.06 ^c	8.16	*
i-Butyrate							
Control	0.49	0.81	0.64 ^c	0.53 ^c	4.81 ^c	1.52	*
Linseed oil	5.15	1.28	1.24 ^b	1.08 ^b	2.77	0.72	**
CSPO ³	10.28 ^a	4.78 ^a	3.88 ^a	4.25 ^a	2.90 ^a	1.67	*
Butyrate							
Control	4.54	7.54 ^b	6.19	4.85	19.29 ^c	4.98	*
Linseed oil	19.59	12.59 ^{ab}	13.05	12.37	19.39 ^b	4.31	*
CSPO ³	11.96	10.43 ^a	11.94	12.97 ^a	18.69 ^a	3.61	*
i-Valerate							
Control	1.67	1.07 ^a	0.96	0.81 ^a	9.63	3.06	**
Linseed oil	6.19	1.65 ^b	2.12	1.94	7.42	2.40	***
CSPO ³	6.54	1.59 ^c	1.31	1.32	7.65 ^a	2.69	*
Valerate							
Control	0.53	0.88	1.75 ^{ab}	0.48	3.69	1.12	**
Linseed oil	10.31	1.33	1.70 ^b	1.45 ^b	4.34 ^a	3.25	*
CSPO ³	4.67	1.55	1.39 ^a	1.51	3.60	1.42	**
Acetate/Propionate							
Control	1.92 ^a	1.06	1.03	2.23 ^a	1.43 ^a	0.61	**
Linseed oil	0.27 ^c	0.37 ^b	0.38 ^b	0.49 ^c	1.29	0.37	*
CSPO ³	1.13 ^b	0.71	0.79	0.63 ^b	1.10 ^c	0.21	*

¹Standard error of the mean.

²*, ** and *** refer to significance levels P>0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

³Calcium salts of palm oil.

^a, ^b, ^cMean in the same column with different superscript are significantly different (p<0.05).

Table 3-3a. Fatty acid composition of bacteria in medium C added control, linseed

Fatty acids	Source	Rumen microbes						SEM ¹	P value ²
		S. ruminantium HD4	S.bovis 26	R. flavefaciens 17	R.albus 16	P. ruminicola brevis B14	Mixed culture		
C12:0	Control	0.16 ^b	3.26	0.49 ^b	0.07	0.14	0.14 ^b	1.10	*
	Linseed	0.27	4.27	0.83	0.20	0.24	0.32 ^a	1.41	*
	CSPO ³	0.22	3.96	0.75	0.20	0.24	0.28 ^{ab}	1.30	*
i-14:0	Control	0.93	5.91 ^b	1.24 ^c	3.40 ^b	4.62 ^b	1.34	2.65	*
	Linseed	1.15	7.61 ^a	1.73 ^a	4.90 ^a	6.61 ^a	1.71 ^a	3.27	**
	CSPO ³	1.10 ^c	0.85 ^b	1.47 ^c	1.60 ^c	1.93 ^c	1.39	1.05	NS
C14:0	Control	0.77 ^c	3.26 ^c	2.78 ^{ab}	2.09	4.86	9.75 ^b	3.65	*
	Linseed	1.15 ^b	4.27 ^b	3.04 ^a	2.32	5.43 ^a	13.35	4.57	*
	CSPO ³	1.43 ^a	4.74 ^a	2.48 ^b	1.73 ^b	4.86	12.34	4.33	***
i-C15:0	Control	5.32 ^c	2.80	3.72 ^b	6.66 ^c	7.88 ^b	3.97 ^c	1.78	**
	Linseed	6.58 ^a	3.34 ^a	5.04 ^a	9.41 ^a	13.03 ^a	5.50 ^a	3.12	*
	CSPO ³	5.98 ^b	2.64	1.13 ^c	7.32 ^b	10.71 ^{ab}	4.76 ^b	3.10	*
a-C15:0	Control	1.70	3.42 ^b	3.65 ^c	6.80 ^c	7.03 ^c	5.91 ^b	1.88	*
	Linseed	2.36 ^a	4.12 ^a	5.41 ^a	9.80 ^a	8.92 ^a	8.92	2.90	*
	CSPO ³	1.86	3.65 ^{ab}	4.89 ^b	8.20 ^b	7.69 ^b	7.90	2.63	**
C15:0	Control	9.98	3.57 ^c	4.36 ^c	4.21 ^b	5.05 ^b	9.38	3.18	NS
	Linseed	10.91	15.85 ^a	6.88 ^a	5.72	8.31	11.51 ^a	3.57	NS
	CSPO ³	7.13 ^b	13.75 ^b	6.09 ^b	5.65	7.83	9.84	3.13	*
i-C16:0	Control	1.15 ^b	0.47 ^b	2.48 ^b	2.68 ^b	2.69 ^b	1.71 ^c	1.27	*
	Linseed	8.06	12.35	7.44	6.17	3.63 ^a	6.28 ^a	2.98	**
	CSPO ³	7.57	10.10	6.73	5.36	2.93 ^{ab}	5.50 ^b	2.69	*
C16:0	Control	6.58 ^c	13.60 ^b	5.52 ^b	7.64 ^b	2.45 ^b	6.33 ^b	3.54	*
	Linseed	18.31 ^a	22.22	8.76	15.06	13.03	13.26	4.53	*
	CSPO ³	11.46 ^b	20.82	8.42	13.03	11.75	11.14	4.40	***
a-C17:0	Control	2.67	3.54 ^c	1.67 ^b	2.31	1.08 ^c	4.67	1.36	*
	Linseed	2.68 ^a	7.21 ^b	2.89	3.64	4.04 ^a	4.75 ^a	2.02	*
	CSPO ³	3.47	5.31 ^a	3.41	2.81 ^a	6.14 ^b	6.21	1.54	*
i-C17:0	Control	1.78	4.08	2.84	1.76 ^c	2.07 ^c	5.31	1.43	*
	Linseed	2.47	7.21 ^a	2.47 ^b	2.18 ^b	4.03 ^b	7.95 ^a	2.53	NS
	CSPO ³	4.62 ^a	3.64	3.04	2.83 ^a	6.72 ^a	5.27	1.37	NS

¹Standard error of the mean.

²NS, * and ** refer to significance levels P>0.05, P<0.05 and P<0.01, P<0.001 respectively.

³Calcium salts of palm oil.

^{a, b, c, ab}Mean in the same column with different superscript are significantly different (p<0.05).

oil and CSPO after incubation for 24 hours(g/kg DM)

Table 3-3b. Fatty acid composition of bacteria in medium C added control, linseed oil and CSPO after incubation for 24 hours(*g/kg DM*)

Fatty acids	Source	Rumen microbes						SEM ¹	P value ²
		S. ruminantium HD4	S.bovis 26	R. flavefaciens 17	R.albus 16	P. ruminicola brevis B14	Mixed culture		
C17:0	Control	3.47 ^b	5.31	3.41 ^b	2.81 ^b	6.14 ^b	6.21 ^{ab}	1.54	*
	Linseed	7.46	13.05	6.73	7.22	10.85	10.12 ^a	3.35	*
	CSPO ³	4.82	8.94	4.51	4.67	3.45	12.15 ^b	3.35	***
C18:0	Control	5.54 ^b	7.85 ^b	5.45 ^b	7.02 ^b	7.17 ^b	12.34 ^b	2.80	NS
	Linseed	14.42	21.52	11.35 ^a	12.54	14.91	18.62	3.70	*
	CSPO ³	13.65	20.51	10.64 ^{ab}	12.48	13.64	17.10	3.17	NS
C 18 : 1 trans	Control	6.41 ^a	2.56 ^b	2.93 ^b	1.40 ^b	7.88 ^b	9.15 ^a	3.08	*
	Linseed	13.21	11.89	7.37	5.78	12.55 ^a	16.82	4.05	*
	CSPO ³	12.77	11.34	6.46	5.13	11.18 ^{ab}	15.39	4.14	*
C 18 : 1 cis	Control	5.81 ^b	9.09	2.41 ^b	1.96 ^b	0.19 ^b	6.93 ^b	4.36	**
	Linseed	13.87	15.15 ^a	7.10	6.08	11.28	16.59	4.20	**
	CSPO ³	13.32	11.03	6.35	5.42	10.57	15.16	3.69	**
C 18 : 2 n-6	Control	2.14	7.15	1.62 ^b	1.67	1.79 ^b	4.39 ^b	1.94	*
	Linseed	2.36	9.79	3.72 ^a	3.40	3.45	8.13	2.69	*
	CSPO ³	2.25	9.32	2.56 ^{ab}	2.81	3.16	7.99	2.79	*
C 18 : 3 n-3	Control	5.87 ^b	12.82 ^b	1.43 ^b	0.95 ^b	2.31	4.25 ^b	4.06	*
	Linseed	15.68	29.84	3.61	2.32 ^a	5.00 ^a	9.20	9.30	**
	CSPO ³	14.64	28.90	3.31	1.99 ^{ab}	3.16	7.99	9.21	***
C20:0	Control	0.99	0.70	0.26	7.48 ^b	0.85	4.25	2.53	*
	Linseed	1.32	0.85	0.53	10.09 ^a	1.04	8.46	3.83	*
	CSPO ³	1.04	0.62	0.41	9.02 ^{ab}	0.66	2.96	3.09	*

¹Standard error of the mean.

²NS, *, ** and *** refer to significance levels P>0.05, P<0.05 and P<0.01, P<0.001 respectively.

³Calcium salts of palm oil.

^{a, b, c, ab}Mean in the same column with different superscript are significantly different (p<0.05).

나. Continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향

1) 실험설계

본 실험에서 사용한 CC system은 Merry *et al.* (1987)이 고안한 RSCC를 수정하였고 4개의 연속배양장치를 이용하였으며, 유기로 된 용기의 볼륨은 500ml이다. 사료의 주입은 펠렛 형태로 24시간 연속 급여하며, 배양은 12일간 실시하였다. 배양 9일까지는 적응기간으로 하고, 10일부터 12일까지는 main sampling period로 하여 분석 결과를 사용하였다. 마지막 3일 동안 09:00에 채취하여 분석에 사용하였다. 지방원료 처리별로 무첨가인 control(T₁), linseed oil(T₂), soybean oil(T₃), sunflower oil(T₄)를 첨가해 4개의 처리구를 두어 4×4 Latin square법을 이용하여 수행하였다.

2) 반추위액 채취 및 Inoculum 준비

본 실험의 배양액 제조를 위해 도살장에서 도살 직후 반추위 내에 존재하고 있던 내용물을 4겹의 cheese cloth로 여과하고, 보온병에 담아 39℃를 유지하여 실험실로 운반하여 다시 한번 4겹의 cheese cloth로 여과시켜 사료입자를 제거한 후 배양장치의 용기 안에 넣어 실험을 실시하였다.

3) Continuous culture system 운용

본 실험에 적용한 배양은 dual phase flow rate incubation system으로서 particle phage와 liquid phage의 flow rate를 60:40의 비율로 조절하였으며 peristaltic pump를 이용해 용기 밖으로 배출시킨다. 총 buffer의 flow rate는 시간당 5%로 조절하였다. Buffer는 60:40의 비율로 희석한 McDougal buffer (1948)를 사용하며, 70ml/h를 공급하였고, 30ml/h를 filtered effluent하였다. 모든 처리구는 분쇄하여 1mm screen으로 통과시킨 후 협착제로 methyl cellulose (10g/kg)를 이용하여 펠렛으로 만든 다음 사용하였다. 사료는 연속적으로 28g DM/day을 자동 급여기를 이용하여 용기 안으로 급여하였다.

4) 분석항목

배양 초기부터 적응기간 및 main sampling까지 매일 아침 09:00에 주사기를 사용하여 배양액을 샘플링하여 측정하였다. [실험 I의 연구내용과 동일함]

5) 결과 및 고찰

Continuos culture 시험을 위해 사료는 각각의 지방 첨가 후 pellet으로 하여 사용하였다(Table 3-4). pH는 I 과제와 비슷한 경향을 보였으며, 전체적으로 반추위 적정 pH를 나타내었고, control구에서 가장 낮았다. Oil source 처리구에서는 sunflower oil 처리구에서 다소 높은 경향을 나타내었는데($P < 0.05$), sunflower oil의 경우 다른 oil source 보다 unsaturated fatty acid 중 C18:3함량이 낮기 때문에 사료되어진다(Harfoot and Hazlewood, 1988, Figure 3-1). $\text{NH}_3\text{-N}$ 함량은 전체적으로 oil 처리구에서 차이가 없었으나, control구에서 통계적 유의성 없이 다소 높은 경향을 나타내었으며(Figure 3-2), I 과제에서 oil source 첨가시 전체적으로 반추위미생물 합성량의 감소에 의해 $\text{NH}_3\text{-N}$ 함량이 다소 증가하는 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 미생물단백질함량은 전체 배양기간 동안 control구에서 다소 높은 경향을 보였고 oil source 처리구에서는 soybean oil구에서 유의적인 차이는 없이 다소 높은 결과를 나타내었다(Figure 3-3). 이와 같은 결과는 soybean oil이 시험에 사용된 다른 oil source보다 다소 높은 C18:2의 함량이 높았지만 전체적으로 다른 oil source보다 반추위미생물 합성량에 변화에 큰 영향을 미칠 만큼의 수준이 아닌 것으로 사료된다(Kelly 등, 1998b). Total VFA함량은 control구와 soybean oil구에서 다소 높은 경향을 보였고(Figure 3-4), A/P ratio는 control구에서 유의적으로 높은 경향을 나타내었는데($P < 0.05$, Figure 3-5), 이는 Madron 등(2002)의 전지대두를 이용한 시험에서 반추위미생물에 의한 biohydrogenation 비율과 미생물단백질 합성량이 증가하였다는 보고와 일치하였고, I 과제에서의 oil첨가 효과와 비슷한 경향을 나타내었다. 각각 처리구별 oil source의 fatty acid함량 중 unsaturated fatty acid는 sunflower oil 처리구에서 가장 높았으며(Table 3-5), 시험사료의 fatty acid함량 또한 비슷한 결과를 나타내었다(Table 3-6).

배양 종료 후 배양 마지막 3일 동안의 suspension fluid와 vessel content에서의 bacterial cells의 지방산 함량은 sunflower oil 처리구에서 C18:0과 C18:1의 함량이 유의적 차이는 없이 가장 높았으며, C18:2의 경우 vessel content내의 미생물단백질 내의 C18:2의 함량은 유의적으로 높았으며 suspension fluid내의 미생물에서는 유의적인 차이 없이 soybean oil 처리구에서 높았고, C18:3함량 또한 비슷한 경향을 나타내었다(Table 3-7). 이와 같은 결과는 C18:2가 많이 존재하고 있는 soybean oil 처리구가 다른 oil source 처리구에 비하여 반추위미생물에 의해 C18:2의 함량이 유의하게 감소하지 않는다는 Enjalbert 등(1994)의 보고와 일치하였다. Biohydrogenation의 비율은 sunflower oil 처리구에서 가장 높게 나타났는데, 전체 처리구에서 suspension fluid내의 반추위 미생물에서 C18:0의 함량은 유의적 차이가 없었으나 C18:3함량의 감소

비율이 가장 높은 결과를 나타내었다.

Table 3-4. Formula and composition of experiment diets

Ingredients	Treatments			
	Control	SBO	RSO	SFO
	----- % -----			
Rice straw	55.00	55.00	55.00	55.00
Beet pulp	3.00	3.00	3.00	3.00
Wheat bran	13.20	7.20	7.20	7.20
Corn ground	3.00	3.00	3.00	3.00
Soybean meal	21.00	23.00	23.00	23.00
Soybean oil		5.00		
Rapeseed oil			5.00	
Sunflower oil				5.00
Wheat ground	4.00	3.00	3.00	3.00
Dicalcium phosphate	0.11	0.11	0.11	0.11
Limestone	0.49	0.49	0.49	0.49
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Total	100	100	100	100
<i>Calculated composition</i>				
Dry matter	91.71	92.22	92.22	92.34
Crude protein	13.80	13.64	13.59	13.61
Ether extract	2.79	6.59	6.59	6.54
NDF	48.8	45.9	45.7	47.2
ADF	26.6	25.8	26.4	26.9
Crude ash	10.12	9.76	9.76	9.76

¹⁾ Abbreviations used: SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil; SFO, sunflower oil.

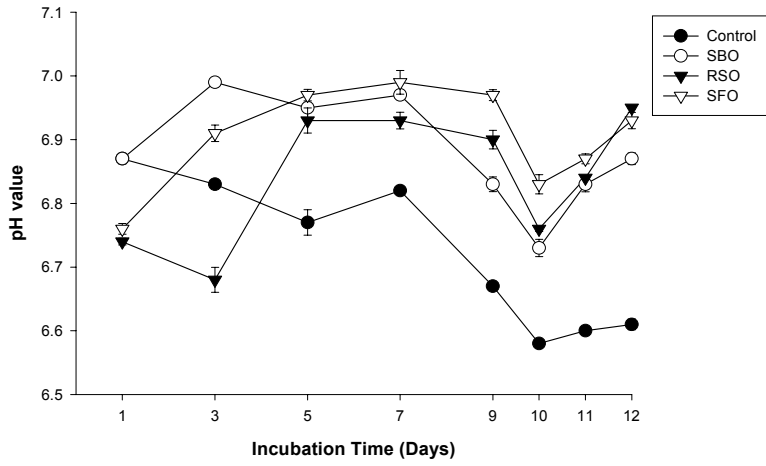


Figure 3-1. Changes in pH by the addition of oil in continuous culture system

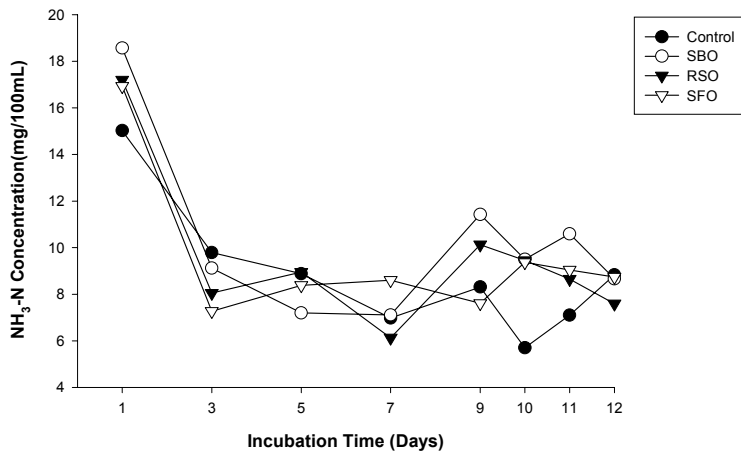


Figure 3-2. Changes in NH₃-N concentration by the addition of oil in continuous culture system

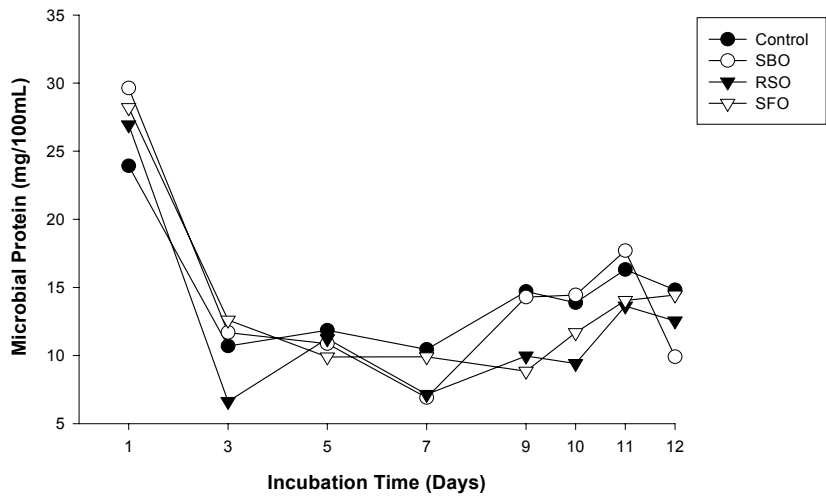


Figure 3-3. Changes in microbial protein by the addition of oil in continuous culture system

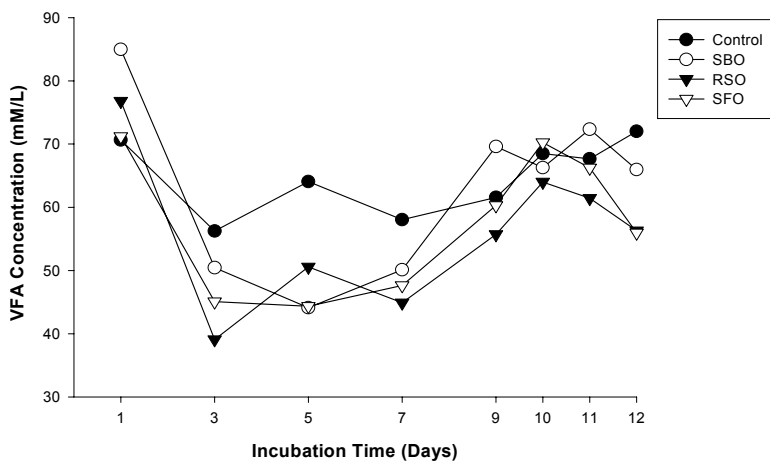


Figure 3-4. Changes in total VFA by the addition of oil in continuous culture system

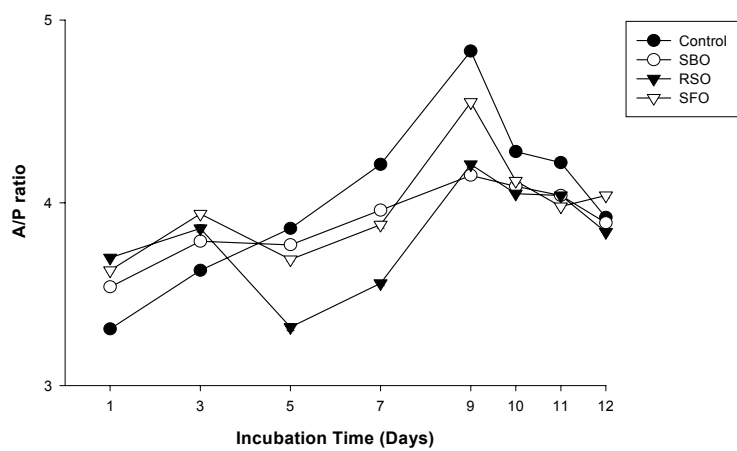


Figure 3-5. Changes in A/P ratio by addition oil in continuous culture system

Table 3-5. Fatty acid composition (% of total FA) of rice straw and oil sources

Fatty acids	Control	SBO	RSO	SFO	SEM ¹
C8:0 (caprylic acid)	7.04 ^a	0.01 ^b	0.00 ^b	0.03 ^{ab}	3.51
C10:0 (capric acid)	2.35 ^a	0.01 ^b	0.01 ^b	0.02 ^{ab}	1.17
C16:0 (palmitic acid)	29.98 ^a	9.87 ^{ab}	4.67 ^b	6.39 ^b	0.38
C12:0 (lauric acid)	0.80 ^a	0.01 ^b	0.01 ^b	0.12 ^{ab}	0.59
C14:0 (myristic acid)	1.26 ^a	0.09 ^b	0.06 ^b	0.12 ^{ab}	11.70
C16:1 (palmitoleic acid)	3.02 ^a	0.10 ^b	0.14 ^b	0.12 ^b	1.45
C18:0 (stearic acid)	6.90 ^a	3.92 ^{ab}	0.35 ^b	3.68 ^{ab}	2.68
C18:1 (oleic acid)	25.77 ^{ab}	21.51 ^b	57.93 ^a	26.16 ^{ab}	16.86
C18:2 (linoleic acid)	12.76 ^b	56.02 ^a	24.89 ^{ab}	61.76 ^a	23.77
C18:3 (linoenic acid)	0.94 ^{ab}	7.45 ^a	9.92 ^a	0.38 ^b	4.75
C20:0 (arachidic acid)	4.05 ^a	0.40 ^b	1.34 ^{ab}	0.27 ^b	1.76
C22:0 (behenic acid)	3.22 ^a	0.41 ^b	0.34 ^b	0.69 ^{ab}	1.38
C22:1 (erucic acid)	0.00 ^b	0.02 ^b	0.16 ^a	0.04 ^{ab}	0.07
C24:0 (lignoceric acid)	1.92 ^a	0.18 ^b	0.19 ^b	0.22 ^{ab}	0.86

¹ Standard error of the mean.

^{a, b, ab} Means in the same column with different superscript are significantly different (P<0.05).

Table 3-6. Fatty acid composition(% of total FA) of experimental diets

¹Standard error of the mean.

^{a, b, ab}Means in the same column with different superscript are significantly different (P<0.05).

Fatty acids	Control	SBO	RSO	SFO	SEM ¹
C8:0 (caprylic acid)	0.79 ^a	0.19 ^{ab}	0.18 ^{ab}	0.12 ^b	0.31
C10:0 (capric acid)	1.57 ^a	0.43 ^{ab}	0.40 ^{ab}	0.21 ^b	0.62
C16:0 (palmitic acid)	0.21 ^a	0.04 ^b	0.03 ^b	0.05 ^b	0.09
C12:0 (lauric acid)	0.45 ^a	0.16 ^{ab}	0.15 ^b	0.16 ^{ab}	0.15
C14:0 (myristic acid)	17.6 ^a	12.46 ^{ab}	8.84 ^b	9.32 ^b	4.03
C16:1 (palmitoleic acid)	0.89 ^a	0.37 ^b	0.46 ^{ab}	0.32 ^b	0.26
C18:0 (stearic acid)	3.92 ^a	3.89 ^a	2.59 ^b	3.40 ^{ab}	0.62
C18:1 (oleic acid)	20.72 ^b	21.05 ^b	46.14 ^a	20.76 ^b	12.65
C18:2 (linoleic acid)	45.74 ^{ab}	53.41 ^{ab}	32.59 ^b	61.90 ^a	12.44
C18:3 (linoenic acid)	5.64 ^a	6.86 ^a	6.97 ^a	2.27 ^b	2.19
C20:0 (arachidic acid)	0.96 ^a	0.53 ^b	0.74 ^{ab}	0.43 ^b	0.24
C22:0 (behenic acid)	0.66 ^a	0.46 ^b	0.44 ^b	0.59 ^a	0.11
C22:1 (erucic acid)	0.30 ^a	0.06 ^b	0.17 ^{ab}	0.11 ^b	0.10
C24:0 (lignoceric acid)	0.54 ^a	0.09 ^b	0.30 ^{ab}	0.36 ^{ab}	0.19

Table 3-7. Fatty acid composition(% of total FA) of bacteria cell on sampling days and vessel contents

Fatty acids		Control	SBO	RSO	SFO	SEM
C8:0	S	0.13 ^a	0.08 ^b	0.07 ^b	0.10 ^{ab}	0.005
	V	0.07 ^{AB}	0.08 ^A	0.06 ^B	0.04 ^C	0.0008
C10:0	S	0.17	0.13	0.13	0.14	0.009
	V	0.12 ^A	0.08 ^B	0.09 ^B	0.05 ^C	0.001
C12:0	S	1.13	1.08	1.15	1.53	0.065
	V	0.95 ^A	0.83 ^A	0.79 ^A	0.37 ^B	0.008
C14:0	S	2.92	2.27	2.32	2.52	0.141
	V	2.79 ^A	1.57 ^B	1.55 ^B	0.95 ^C	0.008
C16:0	S	22.04	21.08	19.28	20.17	0.435
	V	22.22 ^A	15.53 ^B	14.77 ^B	15.12 ^B	0.089
C16:1	S	0.44	0.42	0.49	0.52	0.200
	V	0.36 ^A	0.30 ^B	0.35 ^A	0.17 ^C	0.002
C18:0	S	62.74	63.59	67.63	67.05	0.958
	V	62.46 ^B	74.66 ^A	75.07 ^A	75.13 ^A	0.339
C18:1	S	2.69	3.85	3.41	3.56	0.292
	V	2.24	2.08	2.92	4.16	0.436
C18:2	S	4.74	5.18	3.02	3.74	0.278
	V	5.60 ^A	3.07 ^B	1.90 ^D	2.25 ^C	0.004
C18:3	S	0.46 ^a	0.49 ^a	0.34 ^{ab}	0.13 ^b	0.037
	V	0.46 ^a	0.10 ^b	0.19 ^b	0.16 ^b	0.023
C20:0	S	1.23 ^{ab}	0.94 ^{ab}	1.28 ^a	0.63 ^b	0.060
	V	1.33 ^B	0.68 ^D	1.51 ^A	0.80 ^C	0.002
C22:0	S	0.64 ^a	0.47 ^b	0.44 ^b	0.57 ^{ab}	0.019
	V	0.61 ^A	0.61 ^A	0.40 ^C	0.47 ^B	0.001
C22:1	S	0.04	0.01	0.04	0.00	0.009
	V	0.02 ^{ab}	0.00 ^b	0.05 ^a	0.00 ^b	0.03
C24:0	S	0.63	0.41	0.39	0.35	0.080
	V	0.77 ^A	0.41 ^B	0.35 ^B	0.35 ^B	0.005

S: sample for last 3days, V: vessel contents of last day

^{A-B}Means in the same row with different superscript are significantly different (p<0.01).

^{a-b}Means in the same row with different superscript are significantly different (p<0.05).

제 2 절 대사시험 결과

1. 연구 제목 : 지질사료의 급여조건에 따른 불포화지방산의 hydrogenation 및 T-FA 생성과 이들 물질의 체내 이용성에 관한 연구 (충북대)

가. 재료 및 방법

1) 시험동물 및 시험사료

반추위 fistula가 장착된 4두의 Corriedale 수 면양(평균 체중 62±6kg)을 시험동물로 이용하였는데, 이들 면양에 조사료와 농후사료 비율이 다른(85:15 and 70:30, DM basis) 사료를 준비하였고 아울러 대두유(soybean oil, SBO) 또는 채종유(rapeseed oil, RSO)를 총 사료의 5% 수준으로 첨가하여 급여하는 등, 총 4종류의 사료를 이용하였다. 본 대사시험은 4×4 Latin square 방법으로 실시하였다. 시험기간 동안 각각의 면양은 대사실에서 사육하였고, 정해진 조사료 : 농후사료 비율과 각 oil이 첨가된 사료는 NRC(1985) 면양의 영양소 요구량에 따라 하루에 두당 1.3kg(DM)을 2회(0800 and 1800h)로 나누어 급여하였으며, 각 period는 사료 적응기간 7일, 채취 기간 4일로 구성되었다. 물과 mineral block는 자유로이 섭취토록 하였다. 조사료는 세절한 rye grass 건초를 이용하였다. 각각의 oil과 농후사료의 지방산 조성은 Table 1-1에서와 같고, 농후사료와 rye grass 건초의 일반성분은 Table 1-2에서와 같다.

Table 1-1. FA composition(% of total FA) of oils and concentrate

Items	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Soybean oil	12.3	6.1	23.8	51.0	5.4
Rapeseed oil	5.1	2.3	61.5	20.0	7.6
Concentrate	25.7	5.9	25.5	31.0	1.7

2) 시료 채취 및 분석

각 period의 10일 째 날부터 2일간에 걸쳐 전장소화율을 조사하기 위해 사료 잔량을 조사하고 배설된 분을 수거하였다. 사료의 일반성분은 AOAC(1984) 방법에 따라 분석하였고, NDF 함량은 Goering과 Van Soest(1970) 방법에 준하여 분석하였다. 시험 개시 후 8일 날부터 2일간에 걸쳐 시험사료 급여 30분전과 급여 후 2, 4 및 7h간에 반추위액을 채취하여 즉시 pH를 측정하였으며, 아울러 그 일부를 이용하여

Fawcett와 Scott(1960)의 방법에 따라 발색 반응을 시킨 다음 spectrophotometer (DU-650)로 암모니아 농도를 분석하였다. 또한 4ml의 strained 반추위액과 1ml의 25% phosphoric acid 그리고 internal standard로서 0.5 ml pivalic acid 용액(2%, w/v)을 혼합하고 15,000 x g에서 15분간 원심 분리한 다음 상층액의 VFA 농도를 gas chromatograph(GC, HP 5890II, Hewlett Packard Co.)로 분석하였다. 반추위액의 일부는 냉동 건조한 다음 Folch 용액(Folch 등, 1957)으로 lipid를 추출한 다음 Lepage 와 Roy(1986)의 방법에 준하여 methylation 시켰으며, VFA의 경우와 같이 gas chromatograph로 지방산을 분석하였다. 이 때 fused silica capillary column(100m×0.25 mm, i.d.×0.20 µm thickness, SPTM-2560, Supelco)을 이용하였으며, 초기의 column 온도는 175℃에서 30분간 유지한 다음 분당 15℃로 220℃까지 올린 후 40분간 유지시켰다. 이 때 carrier gas로 ultra pure helium을 사용하였다.

10일째 되는 날부터 2일 연속으로 사료 급여 1시간 전 및 급여 후 3시간에 sodium heparin이 들어있는 vacutainer를 이용하여 경정맥으로부터 약 30ml의 혈액을 채취하였으며, 3000 rpm에서 10분 간 원심 분리하였다. 분석 시까지 상층 액(plasma)을 냉동(-40℃) 저장하였으며, 그 후 지방의 추출과 methylation, 그리고 지방산 분석은 사료와 위액 등의 분석과 동일한 방법으로 진행하였다.

Components	Concentrate	Ryegrass hay
Crude protein	16.04	5.43
Ether extract	3.75	0.89
Neutral detergent fiber	40.64	74.84
Ash	7.67	3.08
Ca	0.75	0.16
P	0.35	0.25

Table 1-2. Chemical composition of diet(% , DM basis)

3) 통계 분석 : *In vitro* 시험 가와 방법과 동일

나. 결과

1) 발효특성 및 영양소 소화율

사료에 oil을 첨가하였음에도 불구하고 반추위액의 pH는 사료 급여 2시간 후까지 빠르게 낮아졌다(Figure 1-1). 반추위액의 pH에 대한 농후사료와 조사료 비율의 반응은 첨가된 oil의 종류에 따라 다르게 나타났는데, 대체로 첨가된 oil 내에서 농후사료 비율이 높을 경우(85%) 반추위액의 pH가 다소 낮아진 경향을 보였으며(Figure 1-1), 암모니아 농도는 다소 증가되었다(Figure 1-2). 대두유의 경우에 비하여 채종유 첨가로 인하여 pH 및 암모니아 농도가 상대적으로 증가되었다. 높은 수준의 농후사료 급여는 VFA 농도를 증가시킨 경향이었으나 각 지방산의 조성 비율은 농후사료와 조사료 급여 비율에 의한 영향을 받지 않은 것으로 나타났다(Table 1-3). Oil 종류는 총 VFA 농도와 지방산 조성에 영향하지 않았다.

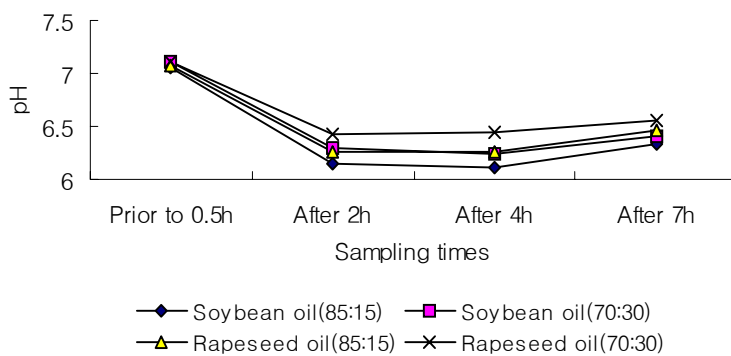


Figure 1-1. pH of rumen fluid at various sampling times

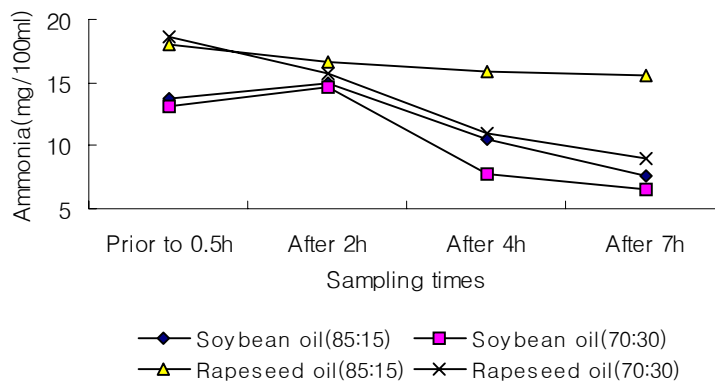


Figure 1-2. Ammonia concentration in rumen fluid at various sampling times

Table 1-3. Concentration(mmoles/100ml) and molar proportion(%) of VFA

Items	Concentrate to roughage by oil source ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	SBO		RSO			
	85:15	70:30	85:15	70:30		
2h post feeding						
Total VFA(mmoles/100ml)	56.88	48.43	62.51	54.94	6.970	0.602
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	39.94	39.19	41.69	40.55	0.492	0.088
Propionate(C ₃)	38.18	38.46	33.57	38.30	2.378	0.478
Butyrate	15.94	17.28	18.92	16.35	1.678	0.638
C ₂ /C ₃	1.05	1.03	1.25	1.06	0.066	0.217
4h post feeding						
Total VFA(mmoles/100ml)	62.07	52.69	58.06	41.61	4.304	0.098
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	44.22	42.91	40.94	44.14	1.534	0.480
Propionate(C ₃)	34.55	36.20	31.89	34.92	2.599	0.711
Butyrate	16.25	16.62	21.39	16.72	1.928	0.329
C ₂ /C ₃	1.28	1.21	1.29	1.27	0.111	0.955
7h post feeding						
Total VFA(mmoles/100ml)	43.62	41.27	41.39	37.04	1.218	0.074
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	44.65	44.43	43.55	46.13	1.124	0.511
Propionate(C ₃)	31.15	34.03	30.27	31.47	2.236	0.690
Butyrate	18.90	17.45	21.71	17.23	1.620	0.317
C ₂ /C ₃	1.44	1.33	1.45	1.48	0.118	0.819
9.5h post feeding						
Total VFA(mmoles/100ml)	30.79	25.71	30.32	26.72	4.898	0.844
Molar proportion(mmoles/100mmoles)						
Acetate(C ₂)	48.60	50.02	47.42	49.76	2.617	0.886
Propionate(C ₃)	28.31	29.66	25.42	28.35	1.323	0.282
Butyrate	17.03	16.93	19.97	18.53	1.485	0.501
C ₂ /C ₃	1.73	1.72	1.97	1.67	0.155	0.592

in the rumen fluid

¹⁾ SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil.

²⁾ Standard error of the means.

³⁾ Probability levels.

면양에 급여한 사료 내 건물, 조단백질, 조지방, NDF 및 유기물의 전장 소화율은 농후사료 비율이 높을 때, 그리고 동일한 급여 비율에서는 채증유를 첨가한 처리구에서 다소 높았다(Table 1-4).

Table 1-4. Whole tract digestibility(%) of dietary components in sheep

Components	Concentrate to roughage ratio				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	by oil source ¹⁾					
	SBO		RSO			
85:15	70:30	85:15	70:30			
DM	69.02	64.86	72.19	68.12	2.541	0.363
CP	65.56	59.41	69.93	67.18	2.297	0.116
EE	90.59	90.01	93.25	92.26	1.527	0.494
NDF	51.61	48.56	60.20	57.41	5.342	0.482
OM	72.46	66.94	74.42	69.63	2.743	0.360

¹⁾ SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil.

²⁾ Standard error of the means.

³⁾ Probability levels.

2) 반추위액과 혈장 내 지방산 조성

모든 처리구의 사료 급여 4시간 후에서 반추위액의 C_{18:0}, t11-C_{18:1} 그리고 c9,t11-CLA 비율이 다소 증가된 반면 C_{18:2} 및 C_{18:3} 비율은 다소 감소되었다(Table 1-5). 반추위액의 C_{18:1} 및 C_{18:2} 비율은 첨가한 oil의 지방산 조성에 의한 영향을 받았으나 t11-C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 비율은 oil 종류에 의한 영향을 받지 않았다. 그러나 2 종류의 oil 첨가구 모두에서 조사료 비율이 높았을 때 t11-C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 비율은 다소 증가된 경향을 보였다.

첨가된 oil의 C_{18:1} 및 C_{18:2}은 면양의 혈장 내 동일한 지방산 조성에도 영향을 하였지만, 농후사료와 조사료의 비율 및 oil 종류는 혈장의 t11-C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 비율에 크게 영향하지 않은 것으로 나타났다(Table 1-6). 그러나 사료 급여 9시간 후에서의 혈장 내 t11-C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 비율은 다소 증가되었다. 또한 사료 급여 9시간 후에서의 혈장 내 c9,t11-CLA 비율은 농후사료 수준이 높을 때 증가하는 경향이였다.

Table 1-5. Composition(%) of C₁₈-fatty acids in rumen fluid

Fatty acids	Concentrate to roughage ratio by oil ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	SBO		RSO			
	85:15	70:30	85:15	70:30		
----- 2h post feeding-----						
C _{18:0}	49.73	48.65	64.83	49.51	5.004	0.243
C _{18:1}	12.14	10.90	7.99	10.24	2.649	0.184
t-FA	7.63	8.45	6.20	8.27	1.620	0.763
CLA ⁴⁾	0.24	0.38	0.33	0.39	0.241	0.964
C _{18:2}	10.62	7.54	7.76	6.94	2.944	0.330
C _{18:3}	0.59	0.89	1.18	0.63	0.352	0.653
----- 4h post feeding-----						
C _{18:0}	53.89	50.70	65.71	55.29	3.200	0.102
C _{18:1}	11.23	15.37	7.62	14.99	2.088	0.155
t-FA	9.76	11.14	7.08	10.61	1.738	0.191
CLA	0.32	0.59	0.38	0.49	0.174	0.460
C _{18:2}	5.85	3.45	2.69	2.61	1.338	0.291
C _{18:3}	0.35	0.47	0.98	0.75	0.177	0.196
----- 7h post feeding-----						
C _{18:0}	56.02	58.04	65.70	57.39	2.932	0.229
C _{18:1}	9.68	10.43	8.01	14.92	2.347	0.326
t-FA	10.27	10.17	6.52	8.47	1.653	0.435
CLA	0.29	0.40	0.16	0.30	0.091	0.423
C _{18:2}	3.25	3.46	1.74	2.46	0.423	0.131
C _{18:3}	0.81	0.60	1.10	1.32	0.377	0.591
----- 9.5h post feeding-----						
C _{18:0}	69.28	61.91	65.05	67.09	1.853	0.168
C _{18:1}	5.48	5.59	8.50	6.51	1.906	0.679
t-FA	4.18	6.48	4.97	4.02	0.508	0.079
CLA	0.04	0.36	0.11	0.14	0.271	0.553
C _{18:2}	1.92	2.26	1.40	1.49	0.316	0.322
C _{18:3}	0.26	1.17	0.93	0.63	0.300	0.299

¹⁾ SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil.

²⁾ Standard error of the means.

³⁾ Probability levels.

⁴⁾ *Cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA.

Table 1-6. Composition(%) of C₁₈-fatty acids in plasma

Fatty acids	Concentrate to roughage ratio by oil source ¹⁾				SEM ²⁾	Pr>F ³⁾
	SBO		RSO			
	85:15	70:30	85:15	70:30		
----- 3h post feeding-----						
C _{18:0}	31.98	33.22	36.56	35.99	2.399	0.499
C _{18:1}	15.04	15.06	18.32	19.47	2.620	0.543
t-FA	2.90	1.82	2.22	1.60	0.372	0.124
CLA ⁴⁾	0.38	0.27	0.35	0.25	0.079	0.600
C _{18:2}	23.08	20.71	19.92	18.97	2.998	0.794
C _{18:3}	1.52	1.07	0.97	1.09	0.144	0.081
----- 9h post feeding-----						
C _{18:0}	37.06	36.04	36.94	34.64	2.635	0.907
C _{18:1}	15.85	14.69	16.43	19.47	2.489	0.482
t-FA	1.79	2.06	1.56	2.99	0.474	0.213
CLA	0.44	0.68	0.44	0.80	0.253	0.682
C _{18:2}	17.35	19.65	16.20	16.68	2.152	0.540
C _{18:3}	1.09	1.05	1.83	1.19	0.265	0.178

¹⁾ SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil.

²⁾ Standard error of the means.

³⁾ Probability levels.

⁴⁾ *Cis*-9, *trans*-11 isomer of CLA.

다. 고찰

발효특성(pH, Figure 1-1; 암모니아 농도, Figure 1-2 그리고 VFA, Table 1-3)은 대체로 농후사료와 조사료의 비율에 의한 영향을 받은 것으로 보인다. 이러한 결과는 Wang과 Song(2001)이 실시한 *in vitro* 시험의 결과를 뒷받침하였는데, 배양액에 첨가된 탄수화물 수준이 높을수록 pH가 높아지고 VFA 농도 역시 증가한 것이다. 그러나 대두유와 채종류의 지방산 조성이 상당 부분 달랐음에도 불구하고 반추위 내 발효에 있어서 oil 종류의 효과는 상대적으로 작았다(Table 1-3). Jenkins(1987)는 oil의 불포화도가 높을수록 반추위 내 사료의 발효가 감소된다고 하였다.

Oil이 첨가된 높은 조사료 수준을 섭취한 면양의 반추위액에서 증가된 경향을 보인 t11-C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 비율은 조사료 수준이 증가함에 따라 반추위액의 pH 역시 증가했기 때문인 것으로 보인다. 조사료 수준과 우유의 CLA 함량과의 관계에 대한 연구가 폭넓게 실시되어 왔다. Kelly와 Bauman(1996)에 의하면 사료에 지방을 첨가하고, 조사료와 농후사료의 비율을 50:50에서 20:80으로 할 경우 우유의 CLA 함량이 반

감되었다고 하였다.

한편, Kim 등(2000)은 사료 내 반추위 박테리아의 성장을 저해할 정도로 $C_{18:2}$ 함량이 높을 때 CLA 생성량 또한 증가된다고 하였으며, CLA 생성에 영향을 미치는 중요한 요인은 사료 내 $C_{18:2}$ 의 농도라 하였다(Chouinard 등, 1998; Kelly 등, 1998). 본 연구에서 총 급여사료의 5% 수준으로 첨가된 대두유의 $C_{18:2}$ 비율(51%)은 채종유의 경우(20%)보다 더 높았다(Table 1-1). 그러나 대두유와 채종유 간 c9,t11-CLA 비율에서의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

면양의 혈장 내 $C_{18:1}$ 및 $C_{18:2}$ 비율은 oil의 종류에 의한 영향을 받은 반추위액의 경우와 비슷하였으나, 본 연구에서는 c9,t11-CLA 함량에 영향을 받지 않았다. Looor와 Herbein(2002) 역시 젖소에 캐놀라유와 대두유를 급여한 결과에서 혈장의 c9,t11-CLA 함량에 있어 아무런 차이를 발견할 수 없었다고 보고한 바 있다. 그러나 사료 급여 후 9시간에 채취한 혈액에서 조사료 수준이 증가하였을 때 c9,t11-CLA 함량이 다소 증가된 경향을 보였다.

본 시험의 결과로 미루어 보아 사료에 oil을 첨가하였을 때 농후사료와 조사료의 비율이 c9,t11-CLA 함량에 미치는 효과는 크지 않았다. 비록 반추위액과 혈장의 지방산 조성이 oil에 의한 영향을 받았음에도 불구하고 c9,t11-CLA 함량에서는 oil의 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아마도 처리간 농후사료와 조사료의 급여비율이 낮고 아울러 oil 첨가수준 역시 높지 않았기 때문인 것으로 여겨진다.

2. 연구 제목 : Ionophore가 반추동물의 제1위 내 CLA 생산에 미치는 효과 연구 (고려대)

가. 재료 및 방법

1) 공시동물 및 실험설계

제1위 누관이 시술된 평균 체중 $50 \pm 5\text{kg}$ 의 만 2세의 숫 면양 5두를 5x5 Latin Square design으로 배치하였으며, 이때 처리구는 다음과 같다:

- 가) 대조구(CON)
- 나) Corn oil구(CO),
- 다) Corn Oil + Monensin 구(COM),
- 라) Soybean Oil 구(SO)
- 마) Soybean Oil + Monensin 구(SOM)

각 시험기간은 처리사료별 적응기간을 포함 총 16일로 구성하여 최종 2일 동안 시료(위 내용물 및 분)를 채취하였다.

2) 공시사료 및 Ionophore 급여

공시동물은 개체별로 대사시험틀에 수용하고, 사료는 체유지 및 최소한의 증체(1일 20g)에 요구되는 수준으로 공급하되, 조농비를 60:40 기준으로 조사료는 화본과와 콩과(알팔파) 건초를 세절하여 급여하고, 농후사료는 중송아지용 펠릿(CP는 15.5%)으로 공시한 식물성 지방을 제외하고는 각 시험구가 에너지와 N수준이 동일하도록 적용하였다. 음수는 자유섭취 시켰으며, 기타 사양관리는 관행 방법에 준하여 실시하였다.

공시 지방은 시판 Corn Oil 및 Soybean Oil을 전체사료 DM의 5% 수준으로 농후사료 펠릿에 흡착시켜 급여하였으며, Ionophore는 Monensin-Na((Eli Lilly & Co, RS0188)을 사료 DM의 33ppm 수준으로 1일 2회로 나누어 농후사료 급여 직후에 제1위 누관을 통하여 투여하였다.

3) 시료 채취 및 분석 항목

시료 채취는 각 실험의 최종일인 15일과 16일째 오전에 실시하였으며, 사양직전을 기준으로 사양 후 매 2시간 간격으로 반추위액을 채취하여 분석시까지 시료를 냉동 보관하였다. 시료의 pH 측정은 시험 당일 채취 즉시 측정하였으며, VFA 역시 채취 즉시 전처리 하였다. C18계열 지방산 분석용 시료는 모두 냉동 보관한 후 최종 period 실험이 종료됨과 동시에 3반복으로 분석하였다. GC 등의 조건은 제1차 실험에서와 같다.

4) 통계 처리

얻어진 수치에 대한 통계처리는 SAS(1997)의 GLM으로 분석한 다음, Duncan의 다중검정으로 처리구 평균치간 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

나. 결과

1) 공시 사료지방

본 연구의 *In vitro* 실험에서는 대두유 및 면실유를 공시하여 반추위미생물에 의한 지방산 대사과정을 관찰한 바 있으나, CLA 생산효율면에서 대두유의 경우가 더 우수하고 가격에 있어서도 유리한 관계로, 면양을 이용한 *In vivo* 대사실험에서는 대두유와 옥수수유를 중심으로 지방산 대사와 CLA 생산효과를 연구하였다.

공시동물에 급여된 사료별 지방산 분석 결과를 Table 2-1에서 살펴보면, 공시 식물성 지방에는 C18:2 지방산이 가장 많은 것으로 나타났다. 농후사료 펠렛은 조사료들에 비하여 더 높은 함량을 보였으며, 알팔파와 화본과 건초는 C18계열의 불포화지방산 조성에 있어 상당히 유사한 함량을 보였다.

한편, 공시한 식물성 지방의 종류별 지방산 조성을 보면(Table 2-2), 공히 C18:2 계열 지방산은 대두유와 옥수수유는 50%가 넘는 가장 높은 농도를 보였으나, 면실유는 이 둘보다 낮은 함량을 가졌다. C18:3 지방산은 3가지 식물성 지방 공히 C18:2 지방산에 비해 훨씬 낮은 농도로 존재하였으나, 대두유는 옥수수유에 비해 더 높은 함량을 가졌으며, 면실유는 가장 낮은 농도를 보였다. CLA를 양적으로 증가시키기 위해서는 C18:2 지방산의 함량이 높은 사료 지방의 급여가 효과적인데(Kelly 등, 1998a), 이러한 측면에서 대두유와 옥수수유는 그 중 높은 잠재력을 가진 식물성 지방으로 여겨진다.

2) 대사시험 결과 및 제1위 내 pH

면양은 수일 내에 고수준의 식물성 지방 급여에 적응을 함으로써, 5% 수준까지 별 문제 없이 섭취 할 수 있었다. 전반적으로 지방의 급여는 반추위내용물의 pH를 다소 저하시킴이 관찰되었다. 배양 전(0시간)의 pH는 6.8에서 7.0 사이를 나타내었으나, 사료 급여 후 1시간 이내에 대조구를 비롯하여 모든 처리구에서 6.2에서 6.4사이로 급격하게 떨어진 후 시간이 지남에 따라 서서히 다시 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2-1). Van Soest(1994)는 감소된 pH는 박테리아 군의 변화를 가져와 결과적으로 발효의 패턴을 변화시킬 수 있다고 하였는데, 이것은 특히 지속적인 pH 환경과 관련이 있을 것으로 생각된다.

Table 2-1. Fatty acid profiles of alfalfa hay, grass hay and concentrates.
(g/100g fat)

Fatty acids	alfalfa hay	Klein grass hay	mixed concentrates
C16:0	22.25	27.56	17.95
C18:0	5.91	3.93	4.01
C18:1	20.08	20.91	25.90
C18:2	36.77	34.46	47.18
C18:3	12.12	10.69	4.53
Other	2.86	2.46	0.43

Table 2-2. Fatty acid profiles of plant oils used in the experiment (g/100 fat)

Fatty acids	Corn oil	Soybean oil	Cotton seed oil
C _{16:0}	15.84	11.80	8.91
C _{18:0}	2.59	4.77	2.54
C _{18:1}	25.25	18.99	38.04
C _{18:2}	55.27	52.81	41.93
C _{18:3}	0.64	5.74	2.34
Other	0.42	5.89	6.24

기존 연구에 의하면, 대체로 지방 급여시 pH 변화상으로 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 보고들이 많다(Jenkins 등, 2003; Bateman 등 1998; Maurizio 등, 1997).

3) 반추위 내 VFA 패턴

Table 2-3에서 보는 바와 같이, 총 VFA 생성량은 대조구와 지방급원 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이에 비해 Monensin 첨가구는 지방만 급여한 처리구에 비해서는 낮은 결과를 나타내었으며, 총 VFA 생성량은 대조구, 지방급여구(CO, SO), COM, SOM 순으로 나타났다.

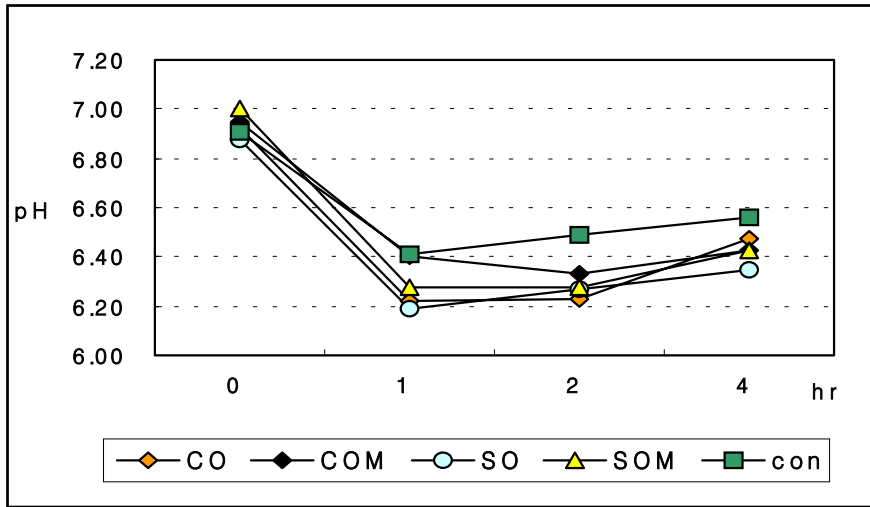


Fig. 2-1. Effects of fat source and/or Monensin on the change of ruminal pH.

그러나 VFA 별로 볼 때, 기존의 연구들(Jenkins 등, 2003; Bateman, 1998 등; Bartley 등 1979)에 의하면 Monensin 급여는 *In vitro*와 *In vivo*에서 공히 제1위 내 초산농도를 감소시키고 프로피온산 농도를 증가시킨다고 보고하였는데, 본 실험에서는 초산의 molar %에 있어서는 처리구간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, 프로피온산에 있어서는 대조구보다 지방 처리구가 유의적으로($P < .05$) 높게 나타났으며, 지방과 Monensin의 병행 처리구에 있어서는 지방만 처리한 구보다 더 높은 값을 나타내었다. 이에 반해 낙산은 SO의 경우 대조구와 별다른 차이가 없었고, CO의 경우는 더 낮았으며, 다음에는 SOM, COM의 순으로 낮은 값을 나타내었다.

일반적으로 Monensin을 사료에 첨가 급여하면 섬유질 소화율이 저하되어 C2/C3 비율이 감소하는 경향이 있는바(Russell과 Strobel, 1987), 본 실험에서도 마찬가지로의 경향이 나타났다. C2/C3(또는 A:P) 비율은 모든 처리구가 대조구보다 낮은 값을 보였으며, 지방만 처리한 구에서는 SO가 CO보다 더 낮았지만, Monensin 처리구간 차이에 유의성은 없었고, 지방만 처리한 경우보다는 Monensin과 지방을 병용 급여한 구에서 C2/C3 비율이 더 낮게 나타났다($p < .05$). 이러한 결과는 다른 기존연구에서 보고된 것과 일치하는 것으로, Jenkins와 Jenny(1992)는 착유우의 사료에서 경화지방(Prilled fat)을 canola oil로 대체 급여하였을 때 대체수준에 따라 C2/C3 비율이 꾸준히 낮아짐을 관찰하였다.

Table 2-2. Effects of fat source and/or Monensin feeding on VFA production

in the rumen.

	CO	COM	SO	SOM	con
Total VFA (mM)	69.82 ^a	50.23 ^c	63.75 ^a	58.35 ^b	65.2 ^a
Acetate(A)*	41.33	40.88	39.57	39.4	43.36
Propionate(P)*	28.6 ^b	35.84 ^a	28.93 ^b	36.76 ^a	24.82 ^c
Butyrate*	19.89 ^b	16.91 ^d	23.85 ^a	18.11 ^c	23.03 ^a
A:P ratio	1.45 ^b	1.14 ^d	1.37 ^c	1.07 ^d	1.63 ^a

* Molar %

a, b, c, d Values in a row with different alphabet significantly differ at p<.05.

본 실험에서 나타난 반추위 내 VFA 농도는 50~69 mM의 범위였고, C2/C3 비율은 1.07~1.63을 나타내었는데, 이 수치들은 기존에 보고된 실험결과들(Vasquez-Anon 등, 2001; Fellner 등, 1997)에 비해 다소 낮은 값이다. 즉 Monensin과 soybean oil을 첨가한 경우 총 VFA 농도는 54~56 mM의 범위로 이들의 결과보다 약간 낮았으며, C2/C3 비율에 있어서도 더 낮은 1.7~2.0의 범위를 나타냈는데(Fig. 2-2), 이는 C2/C3 비율에 영향을 줄 수 있는 조농비와 관련이 있고, 사료의 종류와 급여방식의 차이로 인한 반추위내 발효속도의 차이에서 기인한 결과로 보여진다.

실험기간 동안의 사료 급여방법을 보면, 농후사료에 흡착시킨 지방을 다 먹이고 사료 급여시간을 일정하게 유지할 목적으로, 농후사료(끼니 당 240g + 3%지방)을 먼저 급여하여 완전한 채식을 확인 한 뒤에 조사료를 제공하는 방식을 취하였다. 이럴 경우, 이전 사료를 섭취한 후 약 12시간 후인 공복상태에서 일차적으로 섭취된 농후사료의 빠른 발효가 일어나므로, 조농비율이 60:40 이었음에도 불구하고, 마치 농후사료를 과량으로 급여한 경우와 같은 비율이 나왔을 것으로 해석된다. Bateman 등(1998)은, 건유우에 고조사료와 대두유를 급여한 실험의 경우 5% 수준으로 지방을 첨가 급여하였을 때 제1위 내 pH는 영향을 받지 않았고, 총 VFA 농도도 영향을 받지 않았으며, C2/C3 비율은 감소하였는데, 이때 지방첨가구의 초산 농도는 대조구에 비해 별 차이가 없었으나, 프로피온산 농도가 증가함으로 인해 C2/C3 비율이 낮아졌다고 한다. 해바라기유를 급여한 Ivan 등(2001)의 실험에서도 지방 첨가는 VFA 총량을 높이고 프로피온산 양을 증가시킴으로써 C2/C3 비율을 저하시키는 효과가 관찰되었다.

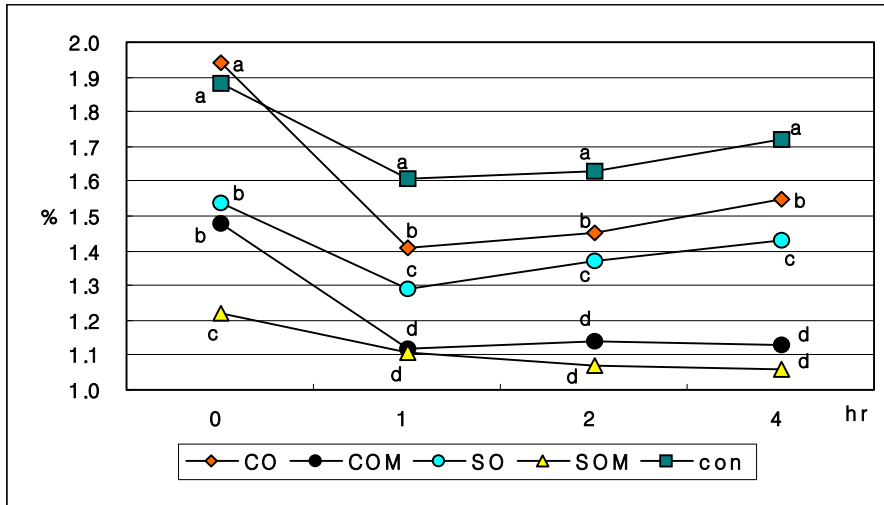


Fig. 2-2. Effects of fat source and/or Monensin on the change of C2/C3 ratio produced in the rumen.

a, b, c, d Values with different alphabet significantly differ at $p < .05$.

4) Octadecadienoic acid (C18:2)

C18:2 계열의 지방산은 몇 가지의 이성체를 포함하고 있으며, GC를 통하여 분석한 반추위액 내 지방산 농도변화를 보면 Fig. 2-3에 도시된 바와 같다. 사료를 급여한지 1시간 경과하여 C18:2 지방산은 가수분해로 인해 다량으로 출현하였으며, 대조구보다 높은 농도를 보인 다음 서서히 감소하는 경향을 나타내어 *In vitro* 실험에서와 유사한 변화경향을 보여주었다. 시험처리별로는 옥수수유 및 대두유구가 높은 농도를 보였고, Monensin과 병행함으로써 유의적으로($P < .05$) 더 높은 수준을 보였으나, 약 4시간 경과 후에는 그 차이가 사라졌다.

5) Conjugated linoleic acid (CLA)

반추위 내에서 C18:2 지방산은 일차적으로 *cis*-9, *trans*-11 형의 CLA로 이성화 되고 나서 hydrogenation을 겪게 되는데, 생리적 활성을 나타내는 CLA는 *cis*-9, *trans*-11 이성체로서 약 80~90%를 차지한다(Chin 등, 1992; Sehat 등, 1998).

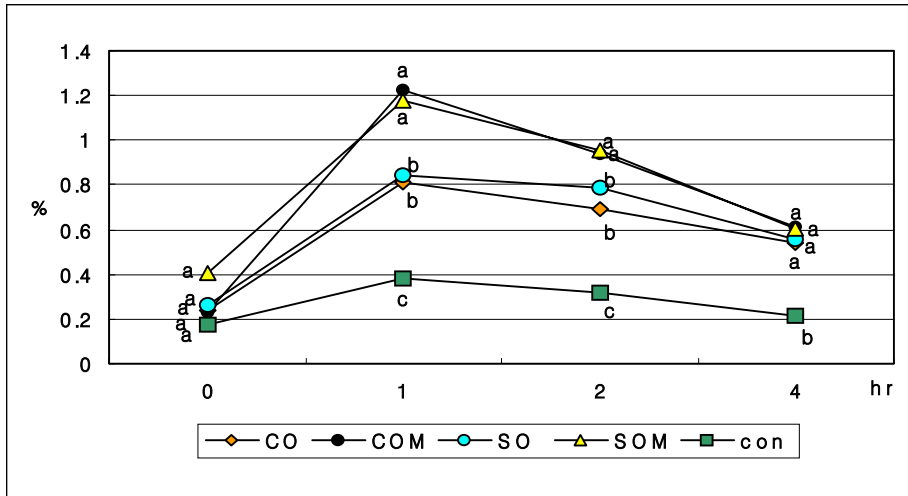


Fig. 2-3. Effects of fat source and/or Monensin on the change of C18:2 in the rumen.

a, b, c, d Values with different alphabet significantly differ at $p < .05$.

Fig. 2-4에서 보는 바와 같이, 대두유를 Monensin과 병행 급여한 처리구가 나머지 처리구에 비하여 유의적으로($P < .05$) 높은 농도의 CLA를 생성하였다. 옥수수유의 경우에는 대조구보다는 높은 농도를 나타내었으나, 대두유와는 달리, Monensin 처리에 의한 상승효과는 관찰되지 않았다.

6) *Trans* C18:1과 *Cis* C18:1

지방 섭취 후 반추위 내 C18:1 계열의 지방산 총량의 변화는 Fig. 2-5에 나타낸 바와 같이, 1시간 경과 후부터 꾸준히 상승함으로써 C18:2 지방산의 hydrogenation으로부터 유입되는 농도를 반영하였다.

C18:1 지방산에 속하는 이성체(geometric isomer) 중에서, *Cis*-9 C18:1 지방산(Oleic acid)은 전형적으로 사료나 동물성 조직에 다량 존재하지만, *Trans*-11 C18:1 지방산은 지방대사에 의존하는 반추위 박테리아의 'A군'에 의하여 C18:2 지방산이 hydrogenation 과정에서 출현하는 최종산물이라고 할 수 있다(Kemp와 Lander, 1984). 불포화지방에 대한 hydrogenation 과정에서 자연적으로 출현하는 이 지방산은 경우에 따라서는 유선조직 내에서 유지방 합성을 저해하는 인자로 작용하여 유지율 저하의 원인이 되기도 한다(Griinari 등, 1998).

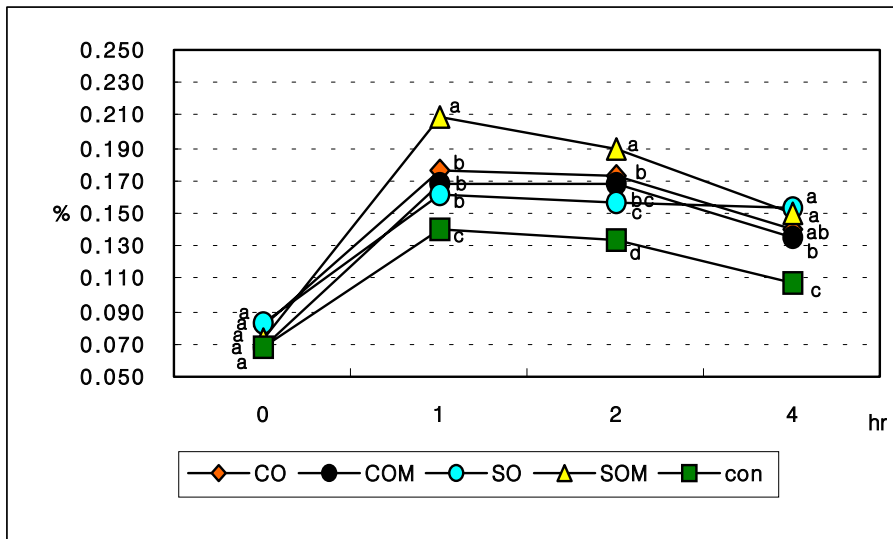


Fig. 2-4. Effects of fat source and/or Monensin on the change of CLA produced in the rumen.

a, b, c, d Values with different alphabet significantly differ at $P < .05$.

* Values significantly differ at $p < .05$.

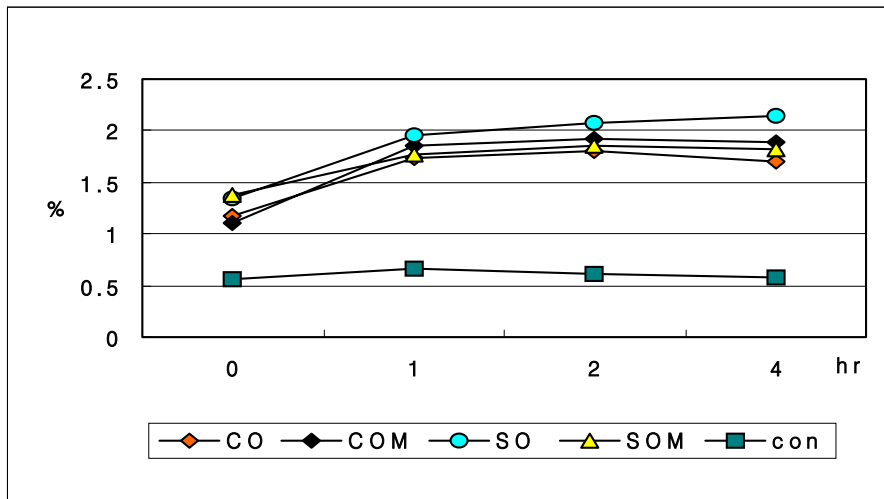


Fig. 2-5. Effects of fat source and/or Monensin on the change of C18:1 in the rumen.

a, b, c Values with different alphabet significantly differ at $p < .05$.

또 한편, 이 지방산은 조직으로 흡수된 후에 자체의 효소(Δ^9 -desaturase)의 촉매작용으로 *cis*-9, *trans*-11 형의 CLA로 재합성되어 궁극적으로 반추위내에서 중간체로 생성되어 흡수되는 CLA와 마찬가지로의 생리적 활성을 발휘할 수 있는 지방산이므로 중요한 의미를 갖는다(Bauman 등, 1999).

Fig. 2-6에 제시된 바와 같이, C18:1 지방산은 *Cis*-와 *Trans*- 공히 식물성 지방의 첨가로 크게 높아졌으며, 지방급원의 종류에 관계없이 사료섭취 4시간 후까지 *cis*-C18:1의 농도가 꾸준한 증가를 보인 반면에, *Trans*- C18:1 지방산은 1시간 후에 최고치를 보인 후 점차 감소를 나타내었다. 이것은 'B군' 박테리아에 의해 후자가 2차적 hydrogenation에 이용되어 궁극적으로 C18:0의 포화지방산으로 전환되기 때문이라고 할 수 있다(Harfoot와 Hazlewood, 1988).

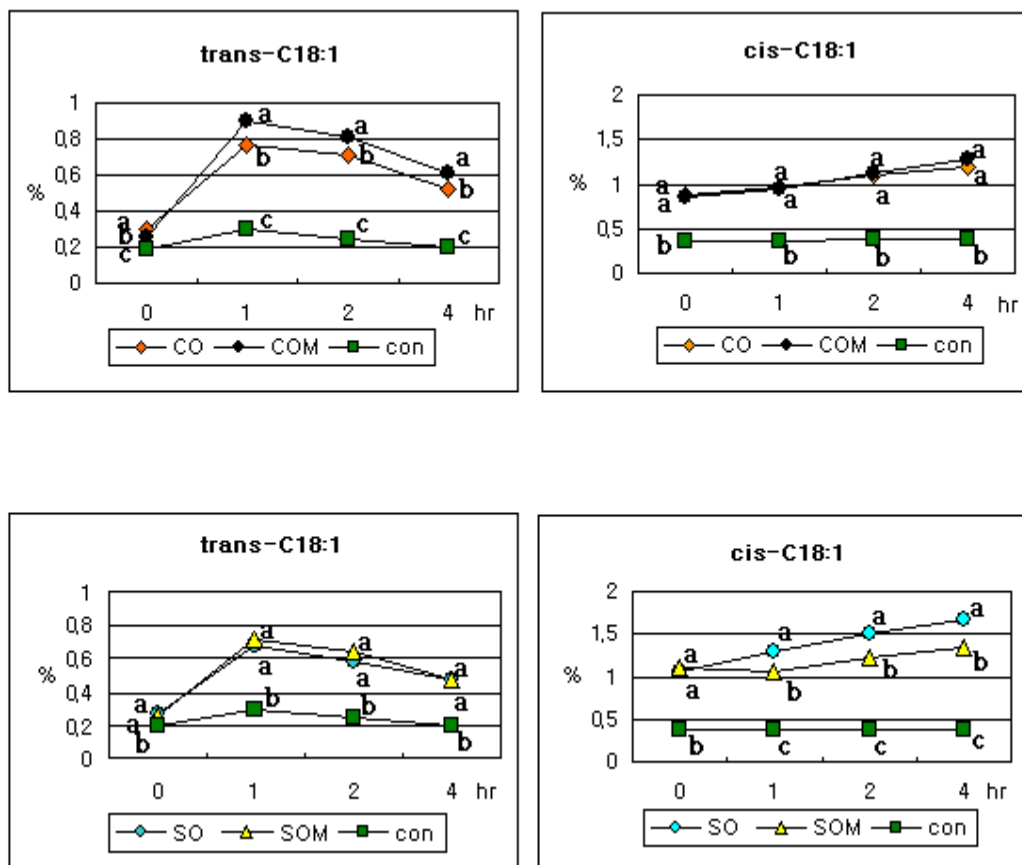


Fig. 2-6. Comparison of changes in ruminal *trans*- and *cis*- C18:1 concentrations affected by oil source and monensin.

a, b, c Values with different alphabet significantly differ at $p < .05$.

한편, 옥수수수유를 Monensin과 함께 급여한 경우, *trans* C18:1이 유의적으로(P<.05) 더 높은 농도를 보임으로써 Monensin과의 조합으로 *cis* C18:1이 유의적으로(P<.05) 더 높게 나타난 대두유 첨가구(SOM)와 대조를 보이고 있음은 흥미로운 결과이다. Bauman 등(1999)이 주장한 바와 같이, 흡수된 *trans-11* C18:1을 전구체로 조직 내에서 광범위한 CLA 합성이 일어난다고 할 경우, 반추위 내에서 생성되는 CLA 농도면에서 대두유보다 더 낮은 수준을 나타냈던 옥수수수유는 2차적으로 조직 내 재합성을 통하여 대두유와 대등한 수준의 생리활성을 발휘할 수도 있음을 암시하는 것이기 때문이다.

7) Stearic acid (C18:0)

C18:2의 수소첨가반응에서 생성되는 *trans-11* C18:1이 stearic acid(C18:0)로 완전히 hydrogenation이 이루어지지 않을 경우에는, 반추위 내에 축적되어 하부기관으로 이행, 소장에서 체내로 흡수된다(Dawson과 Kemp, 1970). Polan 등(1964)은 C18:2를 낮은 수준으로 배양 시 C18:0이 생성되었으며 C18:2를 고수준으로 배양시켰을 때에는 C18:0의 생성이 감소된 반면, C18:1의 생성이 증가하였다. 이것은 C18:2의 conjugated diene으로의 반응과 C18:1의 C18:0로의 hydrogenation 과정에서 C18:2와 C18:1이 수소화 반응에 필요한 수소이온에 대하여 경쟁이 발생하였기 때문으로 분석할 수 있다. Nobel 등(1974)은 C18:2를 *In vitro* 배양시, C18:0까지 완전히 포화되는 정도가 감소하였으며, 그와 동시에 *trans-11* C18:1의 축적이 증가하였음을 보고하였다.

Fig. 2-7에서 보는 바와 같이, 처리구별 *trans-11* C18:1 농도의 변화는 마지막 단계의 hydrogenation이라는 측면에서 C18:0 농도 변화에 반영됨을 볼 수 있는데, 전체적 농도가 C18:1 농도에 비해 높은 것은 미생물에 의해 대사되지 않아 체류시간(retention time)이 더 긴 때문일 것으로 판단된다.

8) 종합 결론

면양 대사시험을 통하여 얻어진 C18 계열의 지방산 변화를 이해하기 위하여 도시한 Fig. 2-8은 대두유와 Monensin의 병합효과를 보여주는 것으로, 식물성 지방과 함께 급여한 Monensin은 전체적으로 C18 계열의 대사속도를 지연시킴을 볼 수 있으며, 이 과정에서 유의적으로 더 많은 양의 CLA가 생성될 수 있었음을 알 수가 있다. 원천적으로 동물에게 급여한 대두유와 옥수수수유는 매우 비슷한 수준의 C18:2 지방산 농도를 가지고 있음에도 불구하고, 반추위 내 미생물에 의한 지방산 대사에는 후자가

더 활발한 변화를 받는 것으로 나타났으며, 반면에 옥수수수유는 *Trans*- C18:1 지방산의 생산이 높으므로, 경우에 따라서는 흡수된 후 조직에서의 2차적 CLA 합성에 이용됨으로써 궁극적으로 대두유와 대동소이한 생리적 활성을 기대할 수도 있다고 사료된다. 그러나 이것은 어디까지나 CLA 합성이라는 측면만을 기준으로 한 것이므로, 기타 영양적, 경제적 가치에 대한 관정이 부수적으로 이루어져야 할 것이다.

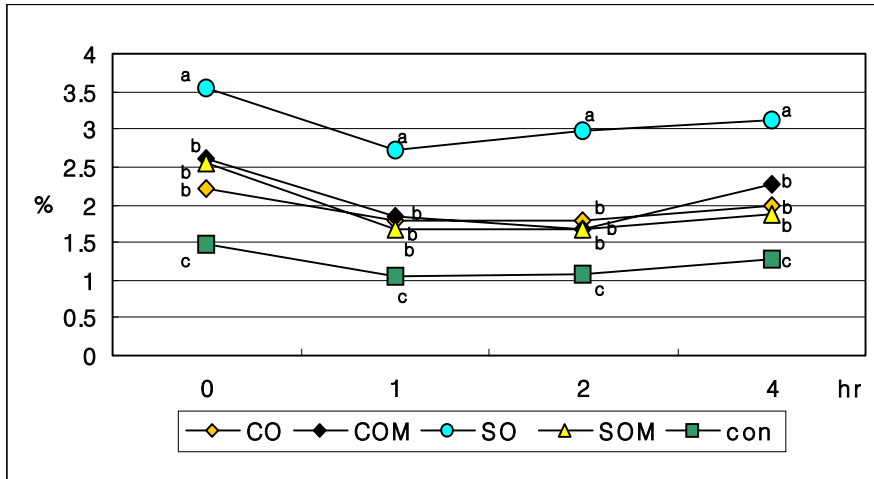


Fig. 2-7. Effects of fat source and/or Monensin on the change of C18:0 in the rumen.

a, b, c Values with different alphabet significantly differ at $p < 0.05$.

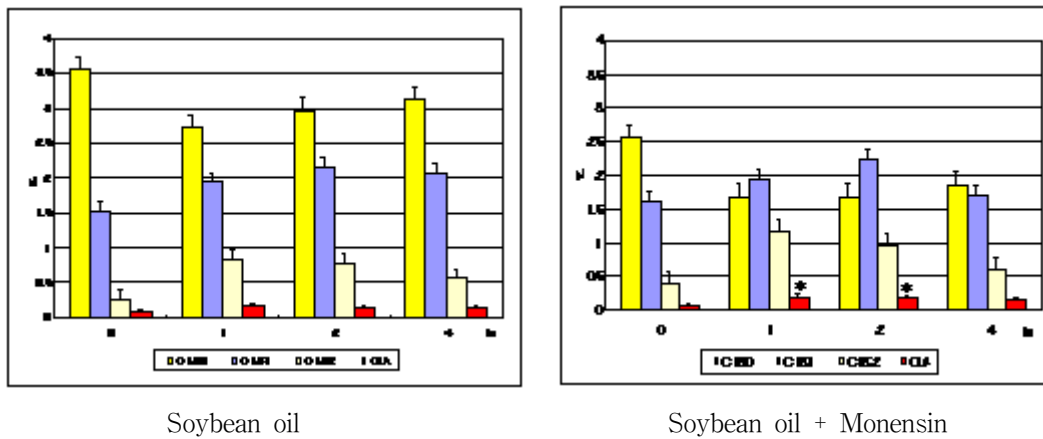


Fig. 2-8. Effect of feeding soybean oil with or without Monensin on the changes of C18 fatty acids in the rumen.

3. 연구 제목 : 한국재래산양 대사실험을 통한 지방 첨가가 반추위 내 대사에 미치는 영향 (중양대)

가. 재료 및 방법

1) 공시동물 및 시험설계

12개월령의 한국재래산양을 구입하여 metabolism cage에 적응시키고, 제 1위에 외과적으로 cannula를 부착하였다. Cannula는 rubber stopper로 막아 외부의 공기가 들어가지 않도록 하여 반추위 내의 혐기적인 상태를 유지하도록 하였다. 한국 재래 산양을 대사 cage (130 ×144 × 55 cm)에 적응시키고, 시험 사료에 대한 반추위 내 미생물의 적응기간을 위하여 약 14일 간 시험사료와 동일한 사료를 급여하였다. 조사료 : 농후사료의 비율을 6:4로 조정하여 지방원료 처리별로 무첨가인 control(T₁), linseed oil(T₂), soybean oil(T₃), sunflower oil(T₄)를 급여하는 4개의 처리구를 두고 각 처리마다 1두씩 배치하여 4×4 Latin square법을 이용하여 시험을 수행하였다.

2) 분석항목 :

- 가) 반추위 내 pH 측정
- 나) 반추위 내 Ammonia-nitrogen (NH₃-N) 측정
- 다) 반추위 내 반추위 미생물 단백질 함량 측정
- 라) 반추위 내 Volatile Fatty Acids (VFAs) 측정
- 마) 전자현미경 검정 (SEM: Scanning Electron Micrographs)
- 바) TEM (Transmission Electron Microscopy)
- 사) 혈액 내 지방산 조성 분석

헤파린이 처리된 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 산양의 경정맥에서 약 10ml의 혈액을 채혈하였다. 혈액 내 지방산 조성분석을 위하여 혈액을 채취 즉시 4℃에서 보관하였다. 혈액 샘플을 원심분리기를 이용하여 4℃, 220×10g에서 15분간 분리하며, 이후 혈장을 취하여 Folch *et al.* (1957)의 방법에 따라 지질을 추출하였다. 추출된 지질은 Lepage and Roy(1986)의 방법에 따라 methylation 하였다. Methylation후 시료들을 GC에 injection하였다.

나. 결과 및 고찰

시험기간 중 반추위 내 pH는 1차년도 실험 *in vitro* 시험 3의 가에서 oil source처리

에 의한 pH변화와 *in vitro* 시험 3의 나에서의 각각의 oil source처리 의한 결과와 비슷한 경향을 나타내었으며, control구에서 적정 pH를 유지하였으며, oil 처리구에서 다소 높은 경향을 보였고 특히, sunflower oil 처리구에서 가장 높았었는데, 이는 continuous culture를 이용한 1차년도 *in vitro* 시험 3의 나와 같은 결과였다(P<0.05, Figure 3-1). 반추위 내 NH₃-N함량은 control구에서 가장 낮았으며(P<0.05), 각각의 oil 처리구에서는 비슷한 경향을 보는데, 이는 1차년도 *in vitro* 시험 3의 나와 같은 결과를 나타내었다(Figure 3-2). 반추위 내 반추위 미생물 단백질 함량 control구에서 가장 높았으며(P<0.05), 각각의 oil 처리구에서는 유의적 차이는 없었으나 1차년도 *in vitro* 시험 3의 나에서와 같이 soybean oil첨가구에서 다소 높은 경향을 나타내었다(Figure 3-3). 반추위 내 VFA함량은 control구에서 가장 높았고 (p<0.05), oil 처리구에서는 soy bean oil 처리구에서 가장 높았는데 이는 1차년도 *in vitro* 시험 3의 나와 같은 결과이다(P<0.05, Figure 3-4).

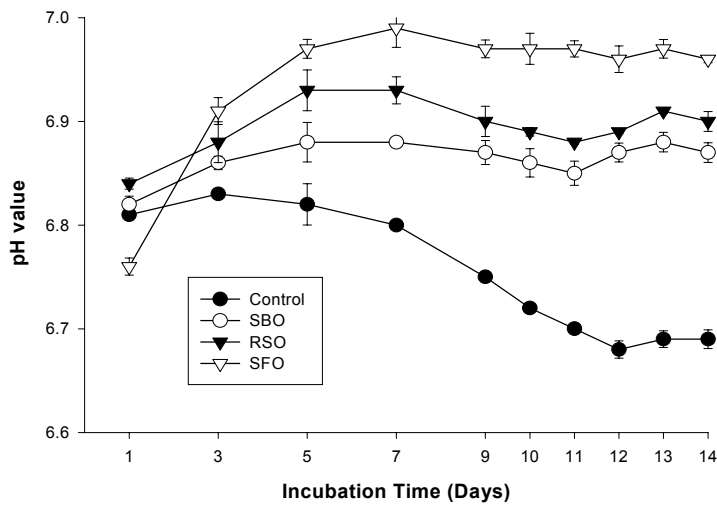


Figure 3-1. Change in pH by addition of oil in the rumen of Korean native goat

반추위 내 미생물 발효특성은 전체적으로 1차년도 *in vitro* 시험 3의 가 및 나와 비슷한 경향을 나타냈으며, 미생물단백질함량이 처리간에 변화는 없었으나 다소 높은 경향을 보였고, control구와 처리구간에 차이가 다소 감소하였는데, Ashes 등(1979)과 Gulati 등(1997)의 시험에 의하면 oil source첨가에 의한 *in vitro* 시험은 *in vivo* 시험보다 처리구간의 미생물 발효특성이 더 잘 이루어진다는 보고와 일치하였다. SEM(Figure 3-5)과 TEM(Figure 3-6)을 이용한 전자현미경 관찰에서는 1차년도 *in vitro* 시험 3의 가 및 나에서의 결과와 같이 oil 첨가에 의해 반추위 내 발효성상이 감소한다는 것을 미생물 함량의 감소에서 볼 수 있으며 또한 이러한 결과는 미생물 내 지방산의 침착에서도 볼 수 있었다.

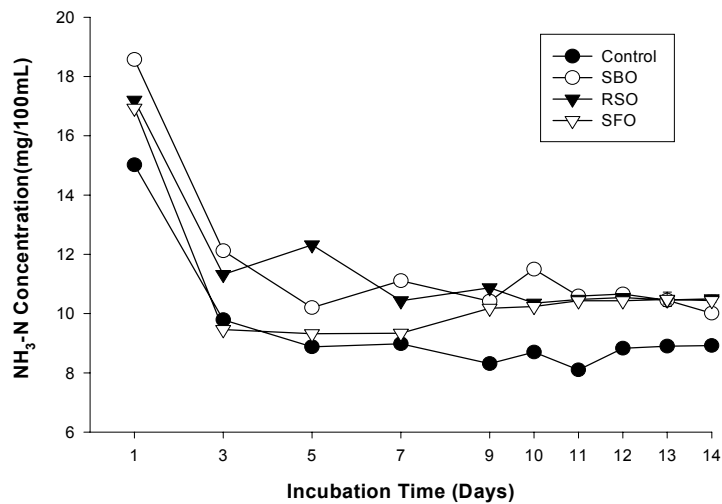


Figure 3-2. Changes in NH₃-N concentration by addition of oil in the rumen of Korean native goat

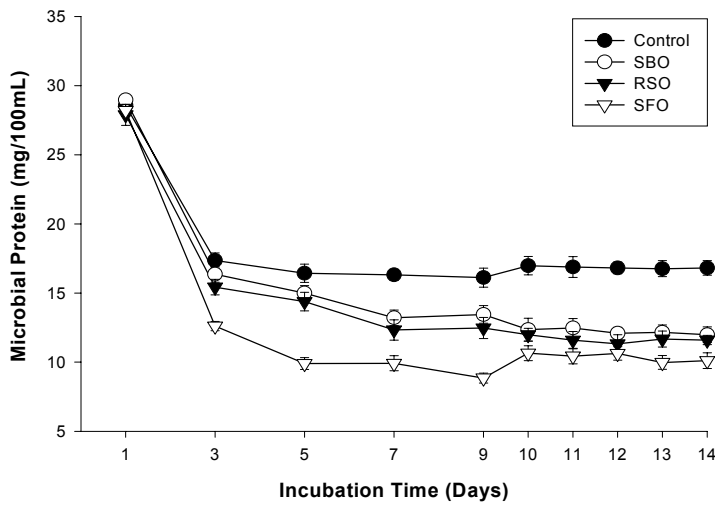


Figure 3-3. Changes in microbial protein by addition of oil in the rumen of Korean native goat

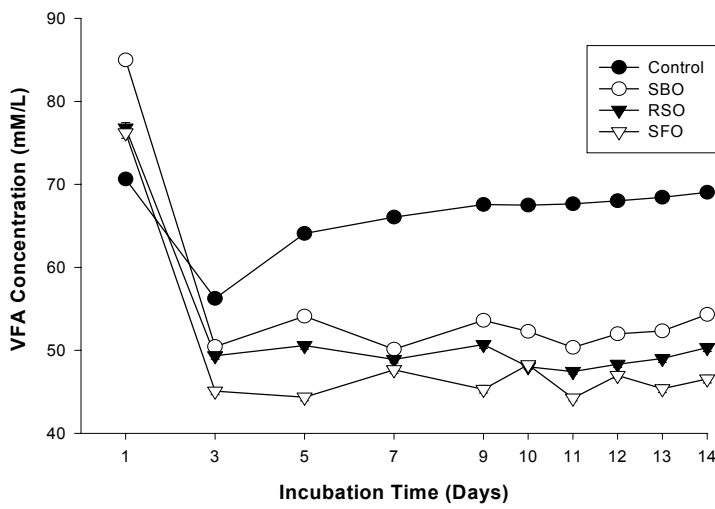


Figure 3-4. Changes in total VFA by addition of oil in the rumen of Korean native goat

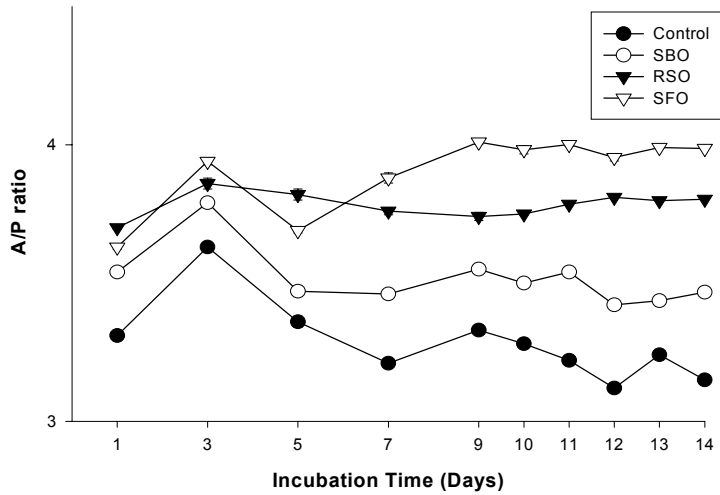


Figure 3-5. Changes in A/P ratio by addition oil in the rumen of Korean native goat

반추위 내 미생물지방산 함량은 sunflower oil 처리구에서 C18:2함량이 가장 높았으나 C18:1과 C18:3함량은 control구 보다 낮았는데, 이와 같은 결과는 1차년도 반추위 내 미생물 발효특성은 전체적으로 1차년도 *in vitro* 시험 3의 가 및 나와 비슷한 경향을 나타냈으며, 미생물단백질함량이 처리간에 변화는 없었으나 다소 높은 경향을 보였고, control구와 처리구간에 차이가 다소 감소하였는데, Ashes 등(1979)과 Gulati 등(1997)의 시험에 의하면 oil source첨가에 의한 *in vitro* 시험은 *in vivo* 시험 보다 처리구간의 미생물 발효특성이 더 잘 이루어진다는 보고와 일치하였다. SEM(Figure 3-5)과 TEM(Figure 3-6)을 이용한 전자현미경 관찰에서는 1차년도 *in vitro* 시험 3의 가 및 나에서의 결과와 같이 oil 첨가에 의해 반추위 내 발효성상이 감소한다는 것을 미생물 함량의 감소에서 볼 수 있으며 또한 이러한 결과는 미생물 내 지방산의 침착에서도 볼 수 있었다.

한국재래산양 혈액 내 지방산 함량 또한 반추위 미생물 내에 지방산 함량과 비슷한 경향은 보였는데(Table 3-2), sunflower oil 처리구에서의 결과와 일치하였다. 따라서 sunflower oil 처리구에서 반추위 미생물에 의한 불포화 지방산인 C18:3에서 C18:1의 biohydrogenation 작용이 활발히 일어난 것으로 사료되어지며, 특히 볏짚만 처리된

control구보다 oil source 처리구에서 전체적으로 bionydrogenation 작용이 높았다. 1차년도와 2차년도의 시험 결과로 볼 때 공급되어지는 oil source에 따라 반추위 내 발효 특성에는 큰 차이를 보이지 않았으나 control구에 비해 다소 감소하는 경향을 보였으며(Palmquist와 Jenkins, 1980), 이러한 결과는 혈액 내 지방산 조성 과 일치하였다. 또한 전체적으로 반추위미생물과 혈액 내에 존재하는 C18계 unsaturated fatty acid는 control구에서 보다 지방 첨가구에서 전체적으로 hydrogenation이 높았으며, 특히 반추위 내에서의 미생물들에 의한 biohydrogenation은 증가하는 경향을 보였다.

Table 3-1. Fatty acid composition(% of total FA) of rumen microbes

Fatty acids	Control	SBO	RSO	SFO	¹ SEM
C8:0 (caprylic acid)	0.34 ^a	0.23 ^{ab}	0.17 ^{ab}	0.09 ^b	0.11
C10:0 (capric acid)	1.67 ^a	0.35 ^{ab}	0.25 ^{ab}	0.15 ^b	0.71
C12:0 (lauric acid)	0.27 ^a	0.08 ^{ab}	0.05 ^b	0.04 ^b	0.11
C14:0 (myristic acid)	0.56 ^a	0.18 ^{ab}	0.11 ^b	0.15 ^{ab}	0.21
C16:0 (palmitic acid)	19.46 ^a	15.57 ^a	7.56 ^b	8.14 ^b	5.81
C16:1 (palmitoleic acid)	0.67 ^a	0.15 ^b	0.24 ^b	0.51 ^{ab}	0.24
C18:0 (stearic acid)	4.42 ^a	2.56 ^{ab}	1.35 ^b	1.45 ^b	1.43
C18:1 (oleic acid)	22.35 ^{ab}	23.53 ^{ab}	31.56 ^a	18.40 ^b	5.52
C18:2 (linoleic acid)	35.36 ^a	35.26 ^a	29.09 ^b	38.59 ^a	3.97
C18:3 (linoenic acid)	4.25 ^{ab}	6.36 ^a	5.36 ^{ab}	3.45 ^b	1.27
C20:0 (arachidic acid)	0.46 ^{ab}	0.32 ^b	0.33 ^b	0.56 ^a	0.11
C22:0 (behenic acid)	0.79 ^a	0.32 ^b	0.31 ^b	0.41 ^{ab}	0.23
C22:1 (erucic acid)	0.25 ^a	0.05 ^b	0.13 ^{ab}	0.09 ^{ab}	0.09
C24:0 (lignoceric acid)	0.51 ^a	0.03 ^b	0.42 ^a	0.31 ^{ab}	0.21

Abbreviations used: SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil; SFO, sunflower oil

¹Standard error of the mean

^{a, b, ab}Mean in the same column with different superscript are significantly different (p<0.05).

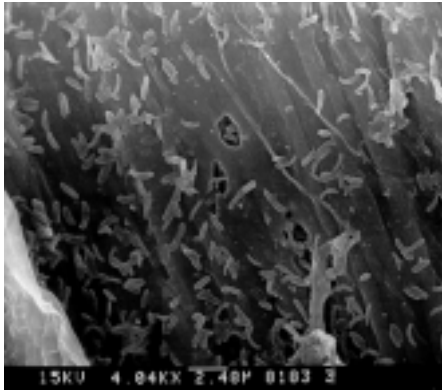
Table 3-2. Fatty acid composition (% of total FA) of blood sample

Fatty acids	Control	SBO	RSO	SFO	¹ SEM
C8:0 (caprylic acid)	0.34 ^a	0.11 ^{ab}	0.07 ^b	0.03 ^b	0.14
C10:0 (capric acid)	2.35 ^a	0.86 ^{ab}	0.76 ^{ab}	0.35 ^b	0.87
C12:0 (lauric acid)	0.32 ^a	0.05 ^b	0.03 ^b	0.04 ^b	0.14
C14:0 (myristic acid)	0.33 ^a	0.18 ^b	0.18 ^b	0.20 ^{ab}	0.072
C16:0 (palmitic acid)	19.08 ^a	11.35 ^{ab}	7.54 ^b	8.32 ^b	5.27
C16:1 (palmitoleic acid)	0.97 ^a	0.41 ^{ab}	0.32 ^b	0.31 ^b	0.31
C18:0 (stearic acid)	4.52 ^a	3.67 ^{ab}	2.75 ^b	3.08 ^b	0.78
C18:1 (oleic acid)	25.45 ^a	19.97 ^b	23.45 ^a	18.76 ^b	3.84
C18:2 (linoleic acid)	32.54 ^b	35.73 ^a	29.41 ^b	36.25 ^a	3.17
C18:3 (linoenic acid)	4.24 ^b	5.36 ^a	5.24 ^a	3.01 ^{ab}	1.09
C20:0 (arachidic acid)	0.88 ^a	0.34 ^b	0.61 ^{ab}	0.07 ^b	0.35
C22:0 (behenic acid)	0.74 ^a	0.32 ^b	0.65 ^{ab}	0.39 ^b	0.20
C22:1 (erucic acid)	0.26 ^a	0.07 ^b	0.26 ^a	0.17 ^{ab}	0.09
C24:0 (lignoceric acid)	0.45 ^a	0.07 ^b	0.23 ^{ab}	0.12 ^b	0.17

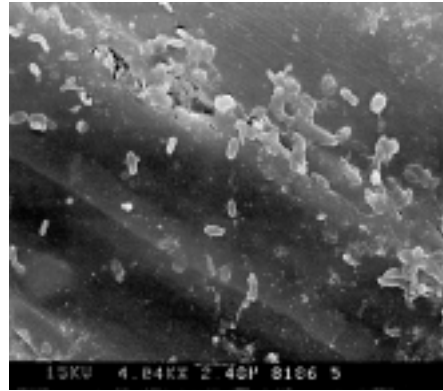
Abbreviations used: SBO, soybean oil; RSO, rapeseed oil; SFO, sunflower oil

¹Standard error of the mean

^{a, b, ab}Mean in the same column with different superscript are significantly different (p<0.05).

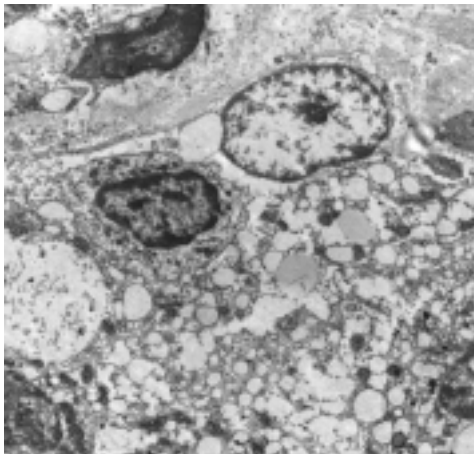


(A)

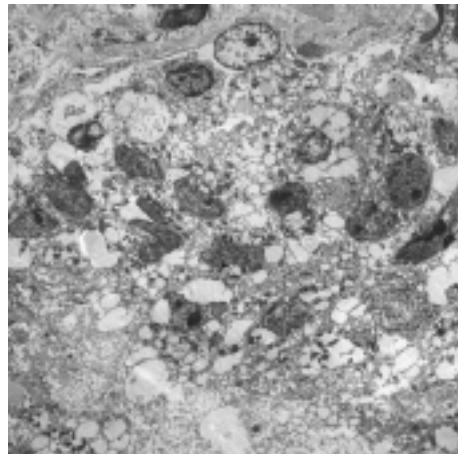


(B)

Figure 3-5. SEM of non-treated (A) and sunflower oil treated (B) of rice straw (mid-portion) incubated for 24 h in rumen of Korean native goat



(A)



(B)

Figure 3-6. TEM of sunflower oil treated (A, B) of rice straw incubated for 24 h in rumen of Korean native goat

다. 요약

전체 실험결과로 살펴볼 때 control구에서 보다 oil source처리구에서 미생물에 발효 특성에 의한 unsaturated fatty acid의 변화가 높았으며, 특히 sunflower oil처리구에서 가장 높았다. 또한 1차년도 실험 (나)에서의 continuous culture시험에서 배양시간이 증가함에 따라 oil source 처리구에서 C18:3, C18:2, C18:1가 C18:0으로의 변화가 높아지는 것을 관찰 할 수 있었는데, 이는 사료 내에 존재하는 unsaturated fatty acid의 함량은 반추위 내의 발효 조건과 미생물단백질의 발효 특성에 많은 영향을 미치고 또한 사료로부터 공급되어진 unsaturated fatty acid 반추위 내 미생물 발효조건, 반추위 미생물과 혈액 내에서의 unsaturated fatty acid 함량의 변화와 아주 밀접한 관계가 있다고 사료된다. 이러한 반추동물의 반추위 내에서의 biohydrogenation이라는 소화 생리 특성, 특히 반추위 내 미생물들에 의해 CLA라는 기능성 물질을 생산하고, 궁극적으로 CLA를 함유하고 있는 반추동물의 생산물에 의해 인간의 건강식품으로의 전환이 유리하다 할 수 있다.

제 3 절 사양시험 결과

1. 연구 제목 : 지질의 첨가가 체지방의 T-FA 및 지방산 조성에 미치는 효과 (충북대)

가. 재료 및 방법

1) 시험동물 및 시험사료

총 10두의 Corriedale 중 암 면양(평균 체중 58±5.4kg)를 시험동물로 이용하였는데, 이들 면양에 농후사료와 조사료의 비율을 80 : 20으로 하여 혼합하였고(control), 여기에 대두유(soybean oil, SBO)를 총 사료의 5% 수준으로 첨가하여 급여하였다(시험구). 시험기간 동안 각 처리 당 면양은(5두씩) 처리별 pen에서 사육하였고, 혼합 사료는 하루에 두당 1.3kg(DM)으로 정하여 1일 2회(0800 and 1800h)로 나누어 급여하였다. 본 시험은 12주간 실시되었으며, 조사료는 계절한 rye grass 건초를 이용하였고 물과 mineral block는 자유로이 섭취토록 하였다. 각각의 oil과 농후사료의 지방산 조성은 Table 1-1에서와 같고, 농후사료와 rye grass 건초의 일반성분은 Table 1-2에서와 같다.

Table 1-1. Major fatty acid composition(% of total fatty acid) of soybean oil and concentrate

Items	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Soybean oil	12.3	6.1	23.8	51.0	5.4
Concentrate	25.7	5.9	25.5	31.0	1.7

2) 혈액의 cholesterol 함량 분석

시험 개시 후 3, 6, 9 및 12주에 시험동물인 면양의 경정맥으로부터 혈액을 채취하였는데, 그 채취 방법은 시험 5에서와 동일하였다. 혈액 채취 후 3000rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 SpotchemTM II cholesterol reagent strip(ARKRAY, Inc. Japan)으로 Spotchem Analyzer(SP-4410, KAK Corp.)를 이용하여 상층액(혈장) 내 total cholesterol(TC) 농도 및 고밀도 lipoprotein cholesterol(HDLC)의 농도를 분석하였다.

3) 면양의 지방조직 지방산 분석

12주간에 걸친 사양시험이 종료된 후 면양을 도축한 후 *longissimus dorsi* 부분과 신지방 및 등지방을 채취하였다. 지방조직과 등심근의 지방으로부터 시험 5에서와 같은 방법으로 지방을 추출하고 methylation을 한 다음 지방산을 분석하였다.

Table 1-2. Chemical composition of diet(% , DM basis)

Components	Concentrate	Ryegrass hay
Crude protein	16.04	5.43
Ether extract	3.75	0.89
Neutral detergent fiber	40.64	74.84
Ash	7.67	3.08
Ca	0.75	0.16
P	0.35	0.25

4) 통계 분석 : 1차년도 *In vitro* 실험 가의 1) 방법과 동일

나. 결과

사료 내 대두유 첨가는 대조구에 비하여 일당 증체량을 다소 증가시켰으며(Table 1-3), 혈액의 TC와 HDLC 농도를 동시에 증가시켰다(Table 1-4). 혈액의 total cholesterol($P<0.034$)과 HDL cholesterol 농도($P<0.013$)에서의 차이는 시험 개시 6주 후에 섭취한 면양에서 더 큰 것으로 나타났다. 대두유의 첨가로 인하여 면양 근내지방의 $C_{16:1}$, $C_{17:0}$ 및 $C_{17:1}$ 함량이 감소된($P<0.05$) 반면 $C_{18:0}$ 및 $t11-C_{18:1}$ 함량은 증가되었다($P<0.05$). 피하(등)지방의 경우 대두유 첨가로 인하여 $C_{18:0}$ 함량 만이 증가된 것으로 나타났다($P<0.05$). 신지방(Table 1-5)의 경우 대두유 첨가가 $C_{15:0}$ 및 $C_{18:0}$ 함량을 증가시켰으나($P<0.05$) $C_{16:1}$ 및 $t11-C_{18:1}$ 함량을 감소시켰다($P<0.05$). 그러나 대두유 첨가는 $c9,t11-CLA$ 및 $C_{18:2}$ 함량을 현저히 증가시키지는 않았다.

다. 고찰

혈액의 cholesterol 농도와 지방산 조성은 oil 첨가로 인하여 체내 지방산 대사에서의 변화를 추정하는 지표로 사용되어 왔다. 본 시험에서 대두유 첨가로 인하여 혈액의 TC와 HDLC가 증가되었는데(Table 1-4), 일찍이 Keys 등(1965) 및 Hegsted 등(1965)의 연구 역시 oil 섭취, 특히 주로 포화지방산이 TC 및 HDLC 농도를 증가시켰다고 보고한 바 있다. 또한 Nestel 등(1992) 및 Wood 등(1993)은 $t11-C_{18:1}$ 가 혈

장 내 TC 농도를 증가시킬 수 있다고 하였다. 따라서 본 시험에서의 증가된 TC 농도는 일련의 *in vitro* 시험 및 대사시험을 통하여 본 바와 같이 비록 불포화지방산 함량이 높은 대두유를 급여했다 하더라도 반추위 내에서 미생물에 의해 hydrogenation되어 증가된 C_{18:0} 함량과 그 과정 중에 생성된 t11-C_{18:1} 때문인 것으로 여겨진다.

Table 1-3. Growth performance of sheep as influenced by soybean oil

Item	Control	SBO	SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
Initial BW, kg	59.2	57.8	0.412	0.786
Final BW, kg	66.7	66.8	1.622	0.447
Total body gain, kg	7.05	9.00	1.285	0.395
Average daily gain, kg	0.08	0.11	0.015	0.394
Daily DMI, kg	1.30	1.36	-	-
DMI / ADG	15.51	13.22	1.909	0.486

supplementation

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

대두유 첨가로 인하여 지방 조직 내에서의 증가된 C_{18:2} 함량에 대해서는 홍화유 (Mir 등, 2000) 또는 홍화씨(Kott 등, 2003)를 섭취한 면양의 경우에서와 비슷하였는데, 여러 지방조직에서 증가된 C_{18:2} 함량은 대두유의 높은 C_{18:2} 함량을 반영하는 것이라 할 수 있다. 또한 C_{18:2}가 사람의 식품에서 발견할 수 있는 주요한 n-6 PUFA이고 체내의 LDLC 농도를 낮추는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데 (McPherson과 Spiller, 1996), 이러한 면에서 본 연구에서 대두유 첨가로 인하여 체지방 내 C_{18:2} 함량에서의 증가는 매우 바람직한 것으로 보인다. 본 시험에서 대두유 첨가로 C_{18:3} 함량이 다소 높아졌는데, 이러한 결과는 사료에 6% 수준으로 홍화유를 첨가한 Ivan 등(2001) 및 15% 수준으로 홍화씨를 첨가한 Kott 등(2003)의 시험 결과와는 대조적이었다. 체조직 내 C_{18:3} 함량의 증가는 그 지방산이 동맥경화증 발병의 위험을 줄일 수 있다는(Roche, 1999) 점에서 바람직한 일이다.

대두유 첨가로 인하여 근내지방에서 다소 증가된 c9,t11-CLA 및 t11-C_{18:1} t-FA 함량은 C_{18:2}가 반추위 내에서 c9,t11-CLA의 전구물질이라는 것이다. Mir 등(2000)은 반추위 내에서 C_{18:2}의 isomerization으로 생성된 CLA가 체조직의 CLA 함량을 증가시키는데 있어 효과적인 방법이라 하였다. 아울러 우유(Kelly 등, 1998a; Mir 등,

1999b) 또는 면양의 조직(Ivan 등, 2001; Kott 등, 2003) 내의 CLA 함량은 C_{18:2} 함량이 높은 oil 자원을 급여함으로서 증가되었다. 그러나 근내지방 및 피하지방의 c9,t11-CLA 함량은 0.84%를 초과하지 않았으며(Mir 등, 2000), 또 다른 연구에서는 홍화유를 첨가, 급여한 면양에서 피하지방의 c9,t11-CLA 함량이 1.69%였다고 보고된 바(Banni 등, 1996) 있다.

Table 1-4. Effect of soybean oil supplementation on total- and HDL cholesterol(mg/100ml) in plasma of sheep

Items	Control	SBO	SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
	 3 week		
TC(T) ³⁾	118.5	142.5	22.896	0.535
HDLC(H) ⁴⁾	67.0	83.5	24.405	0.679
H/T	0.56	0.57	0.085	0.957
	 6 week		
TC	111 ^b	155.5 ^a	10.920	0.034
HDLC	25.5 ^b	99.0 ^a	6.174	0.013
H/T	0.35 ^b	0.64 ^a	0.058	0.037
	 9 week		
TC	98.0	143.0	12.529	0.126
HDLC	49.0	100.5	12.869	0.104
H/T	0.50	0.70	0.062	0.147
	 12 week		
TC	97.0	154.0	13.601	0.097
HDLC	43.0	102.0	13.892	0.095
H/T	0.45	0.66	0.055	0.112

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

³⁾ Total cholesterol.

⁴⁾ High density lipoprotein-cholesterol.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ significantly.

Table 1-5. Effect of SBO supplementation on fatty acid composition(%) in

Fatty acids	Control			SBO			SEM ¹⁾	Contrasts (Control <i>vs.</i> SBO)		
	Intra.	Sub.	Kid.	Intra.	Sub.	Kid.		Intra.	Sub.	Kid.
C _{14:0}	3.54	4.95	4.13	2.47	4.77	3.76	1.21	NS ²⁾	NS	NS
C _{14:1}	0.20	ND ³⁾	ND	0.05	ND	ND	0.10	NS	-	-
C _{15:0}	0.37	0.37	0.68	0.31	0.41	1.55	0.12	NS	NS	*
C _{15:1}	0.04	ND	ND	0.05	ND	ND	0.02	NS	-	-
C _{16:0}	25.14	26.71	27.34	25.18	28.60	26.05	1.78	NS	NS	NS
C _{16:1}	2.63	2.50	2.88	2.02	1.84	1.58	0.46	*	NS	*
C _{17:0}	0.76	1.43	1.37	0.63	1.18	1.59	0.15	*	NS	NS
C _{17:1}	0.59	0.91	1.02	0.38	0.54	1.48	0.14	*	NS	NS
C _{18:0}	11.64	12.99	16.25	15.32	23.24	34.91	1.98	*	*	*
t-FA	2.36	7.21	8.23	4.20	7.50	5.44	0.81	*	NS	*
C _{18:1n-9}	37.29	41.54	37.04	32.22	30.64	24.54	3.62	NS	NS	NS
CLA ⁴⁾	0.33	0.23	ND	0.42	0.35	ND	0.03	NS	NS	-
C _{18:2n-6}	6.59	1.28	1.05	8.29	1.38	1.59	0.81	NS	NS	NS
C _{18:3n-3}	0.19	ND	ND	0.28	ND	ND	0.04	NS	-	-

the intramuscular, subcutaneous and kidney fat

* P<0.05.

¹⁾ Standard error of the mean.

²⁾ Not significant.

³⁾ Not detected.

⁴⁾ C9,t11-isomer of CLA.

2. 연구 제목 : 지질사료의 최적 급여조건을 통한 기능성 한우고기의 생산 (충북대)

가. 재료 및 방법

1) 시험동물, 시험사료 및 사양관리

총 24두의 10개월령에 거세한 20개월령 한우(평균 체중, $567 \pm 5.8\text{kg}$)를 체중에 따라 3그룹으로 분류하였다. 대조구(control)의 비육 후기의 한우에게는 일반 시판용 배합사료를 급여했으며, C_{18:2} 함량이 높은 여러 종류의 oil(45% 대두유, 20% 해바라기유 및 20% 홍화유)과 어유(15%)를 혼합하고 배합사료의 6% 수준으로 배합사료에 첨가한 다음 모넨신(Monensin)을 20ppm 수준으로 첨가하여(mixed oil plus Monensin, MOPM) 도축하기 전까지 2.5개월 또는 5개월간 급여하였다.

5 x 8m 크기의 pen에 4두씩을 수용하고 벧짚과 물 및 mineral block은 자유로이 섭취토록 하였다. 대조구 거세한우에 있어 시험 개시 초기에는 하루에 두당 9.6kg (as-fed basis)의 배합사료를 급여했으며, 그 이후에는 배합사료 급여량을 월별로 0.15kg씩 증가시켰다. 2.5개월간 또는 5개월간 MOPM을 첨가한 사료를 급여한 거세한우는 시험이 종료될 때까지 대조구의 한우에 비하여 배합사료를 13% 적게 급여하였다. 모든 한우에게는 주어진 량의 배합사료를 2회로 나누어 급여하였다. 본 시험은 농협중앙회 한우개량사업소에서 실시되었다. 대조구 사료와 MOPM 처리구 사료의 lipid 함량은 각각 4.03 및 9.91%(DM basis)였다. 각 oil의 지방산 조성은 Table 2-1에서 보는 바와 같으며, 배합사료와 벧짚의 일반 성분 함량은 Table 2-2 에서와 같다.

2) 사료 섭취량과 체중 측정 및 시료 분석

사료 섭취량은 주별로 조사하였으며, 한우의 체중은 4주 간격으로 측정하였다. 배합사료와 벧짚은 1개월 간격으로 채취하여 AOAO(1984) 방법에 의해 일반성분을 분석하였으며, 사료의 NDF 함량은 Goering과 Van Soest(1970) 방법에 따라 분석하였다. 또한 시험 개시 1, 3 및 5개월 후에 대사시험에서와 같은 방법으로 모든 시험축으로부터 혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액 역시 앞에서와 동일한 방법으로 전처리를 한 다음 cholesterol 농도와 지방산을 분석하였다.

5개월간의 사양시험이 종료된 후 도축된 시험축에서 육량 및 육질 등급을 포함하여 도체 특성(dressing percent, fat thickness and *Longissimus* muscle area) 등을 조사하였다. 뿐만 아니라 등심근(*Longissimus* muscle)의 pH, 보수력(WHC), 전단력(Shear force) 및 육색 등을 조사하였다. 이 때 보수력은 Miller와 Harrison(1965)의 방법으로, 전단력은 Rheo meter를 이용하여, 그리고 육색은 CIE L*a*b*(1976) 방법으로 측정하였다. 또한 *Longissimus* muscle의 일반 성분은 AOAC(1984) 방법에 따라

분석하였다. 근내(*longissimus dorsi*)지방 및 피하지방의 지방산 조성은 앞에서 실시된 지방 추출방법, 지방산의 methylation 및 지방산 분석 과정과 동일하게 실시되었다.

3) 통계 분석 : 면양 사양시험의 방법과 동일

나. 결과

1) 증체 및 도체 특성

5개월에 걸친 사양기간 동안 거세 한우의 일당 증체량은 다른 처리구에 비하여 MOPM 첨가사료를 5개월 동안 섭취한 처리구에서 더 높은($P<0.049$) 것으로 나타났으며, 이에 따라 사료 효율 역시 더 개선되었다.(Table 2-3). 그러나 MOPM첨가사료를 2.5개월간 섭취한 한우와 대조구의 한우 사이에 일당 증체량의 차이는 없었다.

지육율과 등지방 두께 및 배최장근 단면적은 처리간 차이가 없었으나, 등지방 두께와 배최장근 단면적은 대조구의 한우에 비하여 MOPM을 섭취한 한우에서 다소 높았다(Table 2-4). 보수력과 전단력 그리고 가열 감량과 및 배최장근의 화학적 조성은 MOPM의 첨가에 의한 영향을 받지 않았으나, 2.5개월간의 MOPM 급여는 대조구의 경우에 비하여 배최장근의 pH를 증가시킨($P<0.006$) 반면 CIE a^* 값을 낮추었다($P<0.04$, Table 2-4). 또한 근내지방도, 육색 및 조직감도 MOPM의 첨가 및 급여기간에 의한 영향을 받지 않았다(Table 2-4). 그러나 다른 처리구에 비하여 5개월간의 MOPM 첨가, 급여로 인하여 육질 등급이 개선된 반면 육량 등급은 낮아진 결과를 보였다(Table 2-4).

2) 혈액의 cholesterol 농도 및 지방산 조성

배합사료에 대한 MOPM 첨가는 TC($P<0.0001\sim0.0007$)와 HDLC ($P<0.0001$) 농도 및 HDLC/TC($P<0.004\sim0.034$) 비율을 증가시켰다(Table 2-5). 또한 MOPM은 시험 개시 1개월 후에 있어 $C_{14:1}$ ($P<0.004$)과 불포화지방산(UFA, $P<0.03$), 그리고 포화지방산(SFA)에 대한 불포화지방산(UFA)의 비율을 증가시켰으나($P<0.03$) $C_{17:0}$ ($P<0.01$)과 SFA($P<0.03$) 함량을 감소시켰다. MOPM을 섭취한 거세 한우의 혈액 내 c9,t11-CLA 함량(0.84%)은 대조구의 경우(0.44%)보다 약 2배 높았으나 $C_{18:2}$ 및 $C_{18:3}$ 함량은 MOPM을 섭취한 경우가 대조구에 비하여 다소 높았지만 큰 차이는 없었다(Table 2-6).

3) 지방조직의 CLA 및 다른 지방산의 함량

5개월간에 걸친 MOPM 첨가사료의 섭취는 근내지방($P < 0.015$, Table 2-7)과 근간지방($P < 0.039$, Table 2-8), 그리고 피하지방($P < 0.001$, Table 2-9)의 CLA 함량을 증가시켰으나 2.5개월간의 급여 및 대조구 간에는 차이가 없었다. 또한 근내지방에 있어 5개월간에 걸친 MOPM 첨가사료의 섭취로 인하여 $C_{18:3}$ 와 heptadecanoic acid($C_{17:0}$) 함량이 증가되었으나($P < 0.003$), pentadecanoic acid($C_{15:0}$)와 palmitoleic acid($C_{16:1}$) 함량은 감소되었다($P < 0.03$, Table 2-6). 뿐만 아니라 피하지방에 있어 동일한 처리구의 지방조직에서 총 UFA 함량이 증가된 반면 SFA 함량은 감소되었는데($P < 0.008$), 이러한 결과는 $C_{18:2}$ 의 증가($P < 0.001$) 및 decreased $C_{18:0}$ 함량의 감소($P < 0.002$)와 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나 2.5개월간의 MOPM 사료 및 대조구간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

3) 고찰

5개월간에 걸친 MOPM 첨가, 급여로 인한 일당 증체량의 개선 효과는 에너지와 Monensin의 복합적인 결과로 여겨진다. 옥수수를 위주로 한 사료에 lipid를 4% 첨가했을 때 사료 효율이 개선된 결과가 보고된 바 있다(Krehbiel 등, 1995). Vonghia 등(1997) 및 Kott 등(2003) 역시 홍화씨를 첨가한 사료를 섭취한 feedlot 면양에서 일당 증체량과 사료효율의 개선 효과를 얻었다고 하였다. 그러나 Zinn(1992) 및 Mir 등(2000)은 lipid 첨가가 소와 면양의 사료 효율은 개선하였지만 일당 증체량에서의 차이는 없었다고 하였다. Palmquist와 Jenkins(1980)는 lipid 첨가로 인하여 개선된 사료 효율이 에너지 함량이 높은 lipid가 섭취한 사료의 에너지 밀도를 증가시켰기 때문이라 하였다. 뿐만 아니라 Monensin은 비육우에 있어 C_3 / C_2 비율을 낮추고(Russell, 1987) 에너지 효율을 높인다고(Spears와 Harvey, 1984) 보고된 바 있다.

본 시험에서 MOPM 사료의 섭취가 처리간 도체 특성에 영향하지 않았는데, 이러한 결과는 Vonghia 등(1997) 및 Kott 등(2003)의 시험 결과와 일치하였다. 즉, 그들이 사료의 5% 수준으로 홍화씨를 급여하였으나 도체 성분에는 거의 영향하지 않았다. 그러나 본 시험에 있어 혈액 내 HDLC 및 HDLC/TC 값의 증가가 대두유를 첨가(5%), 급여한 면양 사양시험 결과와 비슷한 결과를 보였는데, 이러한 결과는 $C_{18:2}$ 함량이 혈액의 HDLC를 증가시키는 중요한 요인이 되는 것으로 판단된다.

대조구의 한우에 비하여 MOPM 첨가사료를 5개월간 섭취한 한우의 혈액에서 2배 정도 증가된 $c9,t11$ -CLA 함량 및 기타 지방산 함량으로 미루어 보아 증가된 $c9,t11$ -CLA 함량이 섭취한 MOPM so 불포화지방산의 불포화도가 증가했기 때문인 것으로 추정된다. 이에 관련하여 특정 지방산의 생성물질과 기질(substrate)의 비율을과의 관계를 조사할 수 있는 것으로 D9D activity가 있는데, 반추동물의 조직에는 4종

류의 주요 D9D activity 생성물질이 있는 것으로 알려지고 있다. 즉, Lock와 Garnsworthy(2003)에 의하면 C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:19} 그리고 c9,t11-CLA이 각각 C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} 및 t11-C_{18:1}로부터 생성된다고 하였다.

일반적으로 쇠고기 내의 CLA 함량은 지방 g 당 1.7 - 8.5 mg이며, 조성으로는 대략 0.17 - 0.85%이다(Shantha 등, 1994; Mir 등, 1999a). 그러나 Lawless 등(1998)은 *cis*-9,*trans*-11 CLA 함량이 유지방 g 당 6.8에서 25.7이라 하였다. Bauman 등(2000)은 전형적으로 *cis*-9,*trans*-11 C_{18:2}가 전체 CLA의 80 - 90% 정도 된다고 하였으나 쇠고기 내의 그 함량은 매우 적다. 본 연구에서 MOPM을 섭취함으로써 거세 한우의 CLA 함량이 증가되었지만 그 증가량에는 한계가 있는 것으로 보인다.

본 연구에서 어유(전체 oil의 15%)와 Monensin(20ppm)이 추가로 첨가되었는데, 이러한 어유의 첨가로 인하여 반추위 내에 t11,C_{18:1}이 축적된다는 것이 잘 알려져 있으며(Borsting 등, 1992; Scollan 등, 1997), 이것은 체내에서의 c9,t11-CLA 합성을 위한 부가적인 substrate가 될 수 있는 것으로 보인다. 더욱이, 어유는 다른 식물성 oil보다 우유에서 더 많은 양의 CLA를 생성할 수 있는 것으로 보고된 바도 있다(Chouinard 등, 1998a). 한편, Monensin은 UFA의 hydrogenation을 저해할 수 있으며 아울러 CLA 함량을 증가시킬 수 있는 것으로 보고된 바도 있다(Fellner 등, 1997).

우유와 쇠고기 CLA 함량에 있어서의 차이는 반추위 내에서의 환경이 서로 다르기 때문일 수도 있다. 즉, 거세우의 경우 대체로 다량의 농후사료를 섭취함으로써 반추위액의 pH가 낮아지고 박테리아의 분포에 커다란 변화가 일어날 수 있다는 점이다. 이미 알려진(Kalscheur 등, 1997) 대로 반추위액의 pH는 반추위 내에서 UFA의 hydrogenation과 관련된 매우 중요한 요인이다. Griinari 등(1998a)에 의하면 배합사료 중심의 급여가 반추위액의 pH를 낮추었지만 총 *trans* 지방산 생성에는 변화가 없었다고 하였다. 그러나 그들은 *trans* 지방산의 profile이 달라졌고 *trans*-10 C_{18:1}이 가장 중요한 *trans*-C_{18:1} isomer였다고 보고하였다. 이와 같은 *trans*-C_{18:1} profile에서의 변화는 역시 섬유소 함량이 낮고 oil 함량이 높은 사료를 섭취할 때 많이 관찰되었다. 유지방 내에 CLA 함량이 낮은 것은 t11-C_{18:1} 함량에서의 감소 및 *trans*-10 C_{18:1}의 증가와 관련이 있다고 하였다(Griinari 등, 1999).

Bauman 등(2000)은 우유 내 CLA 함량에 영향을 주는 요인이 성장하는 반추동물의 체지방 내 CLA 함량에 영향을 주는 요인과 같다고 하였다. 그러나 거세 한우의 체지방 조직 내 CLA 함량에 있어서의 MOPM 효과는 우유에 비하여 상대적으로 작았는데, 이들 사이에서의 그러한 차이는 체내에서의 생리적인 작용과 대사 작용 때문인 것으로 보인다. 즉, 반추위 내에서의 CLA 생성은 사양관리와 oil 급여량 등에서 동일하다면 기본적으로 비육우와 젖소 간 차이가 없으나 대체로 젖소의 경우 우유를 생성하는데 대부분의 에너지와 영양소가 소모되는 반면 비육 후기의 비육우의 경우 체내에 지방

을 축적하는데 대부분의 에너지가 이용된다. 따라서 CLA는 체지방이 축적되는 모든 부위에 널리 분포되기 때문에 지방 g 당 CLA 함량이 낮은 것으로 추정될 수 있는 것이다.

Table 2-1. Composition(% of total fatty acid) of major fatty acids of oils

Items	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:5}	C _{22:6}
Soybean oil	12.3	6.1	23.8	51.0	5.4	-	-
Sunflower oil	8.7	2.6	31.1	51.6	0.7	-	-
Safflower oil	9.4	3.3	17.8	62.5	0.4	-	-
Fish oil	23.6	6.3	28.2	3.2	1.0	1.7	8.0

Table 2-2. Chemical composition of diet(% , DM basis)

Components	Concentrate	Rice straw
Crude protein	13.03	3.92
Ether extracts	4.25	3.15
Neutral detergent fiber	35.95	80.96
Ash	6.43	10.73
Ca	0.75	0.16
P	0.36	0.25

Table 2-3. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on growth

Items	Control	Oil + Monensin		SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
		2.5 month	5 month		
Growth performances :					
Initial BW, kg	566.6	568.7	566.6	4.906	0.939
Final BW, kg	652.9	646.5	657.6	8.402	0.649
DMI, kg	10.3	9.81	9.62	-	-
ADG, kg	0.48 ^b	0.43 ^b	0.62 ^a	0.051	0.049
DMI/ADG	21.6 ^a	25.1 ^a	16.5 ^b	1.925	0.018

performance of Hanwoo steers

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ.

Table 2-4. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on carcass characteristics, chemical composition of *longissimus* muscle and beef

Items	Control	Oil + Monensin		SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
		2.5 month	5 month		
Dressing percent, %	67.04	66.31	66.57	0.839	0.912
Fat thickness, mm	13.25	15.25	15.50	1.953	0.677
<i>Longissimus</i> muscle area, cm ²	83.38	86.75	89.13	2.561	0.300
pH	5.24 ^b	5.29 ^a	5.24 ^b	0.011	0.006
WHC, %	65.54	70.41	71.25	1.280	0.645
Shear force, g	3144	3572	3308	307.9	0.618
Cooking loss, %	29.10	28.34	27.92	0.711	0.506
CIE <i>L</i> * value	35.04	33.87	35.61	0.702	0.228
CIE <i>a</i> * value	18.19 ^a	16.30 ^b	17.63 ^{ab}	0.502	0.040
CIE <i>b</i> * value	8.31	7.64	8.54	0.450	0.359
Marbling score	3.50	3.25	4.13	0.733	0.690
Meat color	4.88	4.88	5.13	0.125	0.285
Texture	1.50	1.75	1.63	0.178	0.620
Chemical composition:					
DM	31.81	31.39	33.03	0.773	0.317
CP (% of DM)	58.79	59.85	58.68	2.078	0.904
EE (% of DM)	37.34	37.71	36.25	2.489	0.911
Ash (% of DM)	3.02	2.97	2.82	0.138	0.582
Grade, heads :					
Quantity, A : B : C	3:2:3	2:1:5	1:4:3	-	-
Quality, 1 ⁺ : 1 : 2 : 3	1:2:3:2	2:0:5:1	3:1:3:1	-	-

grade of Hanwoo steers

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ.

Table 2-5. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on total- and HDL-cholesterol(mg/100ml) of plasma in steers

Items	Control	Oil + Monensin	SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
.....1 month feeding.....				
TC	145.31 ^b	182.56 ^a	6.701	0.001
HDLC	89.44	102.63	6.782	0.190
H/T	0.61	0.56	0.028	0.201
.....3 months feeding.....				
TC	119.00 ^b	235.25 ^a	18.84	0.0007
HDLC	54.50 ^b	128.25 ^a	9.967	0.0001
H/T	0.44 ^b	0.55 ^a	0.034	0.034

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ.

Table 2-6. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on composition(%) of fatty acids of plasma

Fatty acids	Control	Oil + Monensin	SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
----- 1 month feeding -----				
C _{14:0}	1.08	0.82	0.119	0.132
C _{14:1}	0.20 ^b	0.40 ^a	0.044	0.004
C _{14:1} /C _{14:0}	0.21 ^b	0.50 ^a	0.045	0.001
C _{15:0}	0.25	0.26	0.032	0.938
C _{16:0}	17.25	16.44	0.392	0.143
C _{16:1}	0.51	0.79	0.142	0.160
C _{17:0}	1.04 ^a	0.72 ^b	0.078	0.008
C _{18:0}	31.84	30.60	0.813	0.281
C _{18:1n-9}	15.86	15.93	0.958	0.960
C _{18:2n-6}	30.62	32.42	1.302	0.384
C _{18:3n-3}	0.81	0.75	0.109	0.736
c9,t11-CLA	0.44	0.84	0.128	0.065
t10,c12-CLA	0.09	0.14	0.010	0.071
Total CLA	0.53	0.98	-	-
SFA(S)	51.47 ^a	48.84 ^b	0.681	0.029
UFA(U)	48.53 ^b	51.16 ^a	0.681	0.029
U/S	0.94 ^b	1.05 ^a	0.026	0.028
----- 3 months feeding -----				
C _{14:0}	1.15	1.02	0.073	0.234
C _{14:1}	0.28 ^b	0.49 ^a	0.066	0.049
C _{14:1} /C _{14:0}	0.25 ^b	0.48 ^a	0.058	0.013
C _{15:0}	0.31	0.42	0.058	0.237
C _{16:0}	18.70	17.66	0.491	0.172
C _{16:1}	0.25 ^b	0.76 ^a	0.035	0.000
C _{17:0}	0.80	0.95	0.049	0.061
C _{18:0}	30.88	31.60	0.688	0.467
C _{18:1n-9}	17.98 ^a	14.12 ^b	0.832	0.004
C _{18:2n-6}	28.31	31.23	1.595	0.203
C _{18:3n-3}	0.71	0.73	0.147	0.933
c9,t11-CLA	0.50	0.85	0.123	0.060
t10,c12-CLA	0.11	0.17	0.081	0.062
Total CLA	0.61	1.02	-	-
SFA(S)	51.85	51.64	0.974	0.901
UFA(U)	48.15	48.36	0.971	0.911
U/S	0.93	0.94	0.036	0.844

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ.

Table 2-7. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on fatty

Fatty acids	Control	Oil + Monensin		SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
		2.5 month	5 month		
C _{14:0}	2.71	2.64	2.90	0.172	0.563
C _{14:1}	0.88	0.80	1.03	0.109	0.346
C _{14:1} /C _{14:0}	0.32	0.30	0.35	0.027	0.386
C _{15:0}	0.54 ^a	0.43 ^{ab}	0.37 ^b	0.041	0.033
C _{16:0}	29.39	27.70	28.27	0.597	0.689
C _{16:1}	4.66 ^a	4.39 ^{ab}	3.87 ^b	0.198	0.031
C _{17:0}	0.66 ^b	0.53 ^c	1.11 ^a	0.039	0.0004
C _{18:0}	11.71	11.99	11.21	0.390	0.412
C _{18:1n-9}	41.00	41.42	41.92	0.880	0.901
C _{18:2n-6}	8.91	9.47	9.09	0.878	0.902
C _{18:3n-3}	0.23 ^b	0.25 ^b	0.33 ^a	0.020	0.003
c9,t11CLA	0.30 ^b	0.32 ^b	0.37 ^a	0.012	0.015
t10,c12-CLA	0.00 ^b	0.07 ^a	0.10 ^a	0.002	0.041
Total CLA	0.30	0.39	0.47	-	-
SFA(S) ³⁾	44.01	43.30	43.87	0.719	0.783
UFA(U) ⁴⁾	55.99	56.70	56.13	0.719	0.783
U/S	1.27	1.31	1.28	0.038	0.807

acid composition(%) of intramuscular fat

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

³⁾ Saturated fatty acid.

⁴⁾ Unsaturated fatty acid.

^{a,b,c} Means in the same row with different superscripts differ.

Table 2-8. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on fatty acid composition(%) of intermuscular fat

Fatty acids	Control	Oil + Monensin		SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
		2.5 month	5 month		
C _{14:0}	3.46	3.40	3.37	0.224	0.958
C _{14:1}	1.17	1.13	1.07	0.143	0.883
C _{14:1} /C _{14:0}	0.37	0.33	0.32	0.055	0.746
C _{15:0}	0.51	0.43	0.43	0.025	0.059
C _{16:0}	28.38	26.39	26.94	0.644	0.101
C _{16:1}	4.99	5.17	4.60	0.317	0.438
C _{17:0}	1.09	0.95	1.05	0.048	0.132
C _{18:0}	13.13	12.53	13.19	0.674	0.765
C _{18:1n-9}	44.65	47.48	46.66	0.947	0.117
C _{18:2n-6}	2.16	1.96	2.14	0.111	0.398
C _{18:3n-3}	0.07	0.06	0.02	0.017	0.148
c9,t11-CLA	0.36 ^b	0.41 ^{ab}	0.44 ^a	0.020	0.039
t10,c12-CLA	0.03 ^b	0.08 ^a	0.08 ^a	0.001	0.028
Total CLA	0.39	0.49	0.52	-	-
SFA(S) ³⁾	46.57	43.70	44.98	1.134	0.233
UFA(U) ⁴⁾	53.43	56.30	55.02	1.134	0.233
U/S	1.15	1.29	1.22	0.053	0.256

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

³⁾ Saturated fatty acid.

⁴⁾ Unsaturated fatty acid.

^{a,b}Means in the same row with different superscripts differ.

Table 2-9. Effect of mixed oil plus monensin supplementation on fatty

Fatty acids	Control	Oil + Monensin		SEM ¹⁾	Pr>F ²⁾
		2.5 month	5 month		
C _{14:0}	4.04	3.57	3.55	0.193	0.152
C _{14:1}	1.71	1.45	2.01	0.270	0.361
C _{14:1} /C _{14:0}	0.42	0.41	0.53	0.063	0.324
C _{15:0}	0.59 ^a	0.47 ^b	0.62 ^a	0.033	0.010
C _{16:0}	28.78	27.58	27.35	0.568	0.186
C _{16:1}	6.41	6.18	7.54	0.476	0.120
C _{17:0}	1.04	0.91	0.94	0.038	0.066
C _{18:0}	8.78 ^a	9.29 ^a	6.69 ^b	0.467	0.001
C _{18:1n-9}	45.99	48.06	47.87	0.882	0.207
C _{18:2n-6}	2.21 ^b	1.95 ^b	2.74 ^a	0.129	0.001
c9,t11-CLA	0.41 ^b	0.43 ^b	0.59 ^a	0.031	0.001
t10,c12-CLA	0.07	0.11	0.10	0.001	0.063
Total CLA	0.48	0.54	0.69	-	-
SFA(S) ³⁾	43.20 ^a	41.82 ^a	39.17 ^b	0.822	0.007
UFA(U) ⁴⁾	56.80 ^b	58.18 ^b	60.84 ^a	0.822	0.007
U/S	1.31 ^b	1.39 ^b	1.55 ^a	0.049	0.009

acid composition(%) of subcutaneous fat

¹⁾ Standard error of the means.

²⁾ Probability level.

³⁾ Saturated fatty acid.

⁴⁾ Unsaturated fatty acid.

^{a,b} Means in the same row with different superscripts differ significantly.

제 4 절 결과 종합

본 과제는 3년간에 걸쳐 수행되었다. 1차년도에는 지방산 조성이 다른 oil을 사용하거나 oil 사용 시 발효조건을 달리했을 경우, 그리고 oil 배양 시 Monensin의 첨가가 반추위 미생물(박테리아)에 의한 발효특성과 지방산 조성의 변화 및 *trans*-fatty acid 및 CLA 생성 및 반추위 미생물의 지방산 조성 변화 등을 조사하기 위해 일련의 *in vitro* 기초시험이 실시되었다. 2차년도에는 1차년도의 *in vitro* 시험을 근거로 하여 특정 조건에서 oil을 반추가축에 급여할 경우 반추위 및 체내에서의 CLA 생성 및 이용 등에 관한 조사를 대사시험(총 3회)을 통하여 실시하였으며, 아울러 면양을 이용하여 체지방에서의 CLA 축적에 관한 사양시험도 실시하였다. 3차년도에는 1차년도 및 2차년도의 시험에서 얻은 결과를 거세 한우를 상대로 확인하는 사양시험을 실시한 바 있다. 그 결과를 *trans*-fatty acid 및 CLA 생성 측면에서 종합하면 다음과 같다.

1. *In vitro* 시험

분쇄된 아마씨 및 유채씨를 *in vitro* 방법으로 배양할 때 농후사료 첨가수준이 c9,t11-CLA 및 total *trans*-C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사한 결과 유채씨의 아마씨를 배양한 경우보다 CLA 함량이 증가되었다. 또한 유채씨 배양 시 알팔파 건조 첨가수준이 반추위 박테리아에 의한 c9,t11-CLA and total *trans*-C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사한 바, 배양 시간에 따라 다르긴 하였지만 알팔파 첨가수준이 높을(0.50 및 0.75%) 경우 CLA 비율이 증가하는 경향을 보인 반면 t-FA/CLA 값은 감소하는 경향을 보였다. 분쇄한 유채씨 또는 채종유가 c9,t11-CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사한 결과 분쇄된 유채씨 보다 채종유를 첨가한 경우에서 CLA 함량은 오히려 더 낮은(P<0.0008~0.0032) 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, oilseed(아마씨 또는 유채씨) 배양 시 배양액의 pH가 반추위 박테리아에 의한 c9,t11-CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 생성에 미치는 효과를 조사한 바, pH의 범위가 4.5 ~ 5.3인 경우 hydrogenation 속도가 매우 느렸지만, 6.1 ~ 6.9 때에는 hydrogenation 속도가 상대적으로 빠른 것으로 나타났다. 두 종류의 oilseed 모두에서 pH가 높을 경우 oleic acid와 t-FA 함량이 증가되었으며 유채씨의 경우 pH가 증가됨에 따라 CLA 함량도 증가되었으나 아마씨의 경우 CLA가 거의 탐지되지 않았다.

한편, Ionophore 첨가가 oil 배양 시 지방산 조성의 변화에 미치는 효과를 조사한 결과, Monensin과 대두유 첨가로 인하여 *trans*-C_{18:1}과 CLA 농도가 증가되었으며, 모든 처리구 중 Monensin과 대두유 첨가구에서 CLA 생성량이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 지방(oil)첨가가 반추위미생물의 대사에 미치는 영향을 batch culture 방법

으로 조사한 결과, 첨가한 oil 종류에 따라 그리고 미생물에 따라 지방산의 농도와 조성이 달랐으며, 반추위미생물에 의한 biohydrogenation 비율은 C18:3>C18:2>C18:1 순서로 나타났음을 알 수 있었다. 아울러 continuous culture 방법의 경우 oil 첨가로 인하여 미생물 단백질 함량이 다소 낮아졌으며, 미생물의 지방산 조성이 oil의 종류에 따른 지방산 조성의 영향을 받은 것으로 조사되었다.

2. 대사 시험

Oleic 또는 linoleic acid 함량이 높은 oil(대두유 또는 채종유) 급여 시 농후사료와 조사료의 비율이 면양의 반추위 내 및 혈액 내 *trans*-11 C_{18:1} 및 c9,t11-CLA 함량에 미치는 효과를 조사한 바, oil의 종류가 *trans*11-ODA 및 *cis*9, *trans*11-CLA 함량에는 영향하지 않았지만 조사료 비율이 증가됨에 따라 두 종류의 oil 모두에서 *trans*11-ODA와 *cis*9, *trans*11-CLA 함량이 증가되는 경향을 보였음을 알 수 있었다. 또한 여러 종류의 oil 및 Monensin 첨가가 반추위 내 CLA 생성에 미치는 효과를 조사한 결과, 대두유와 Monensin 투여구로 인하여 반추위 내용물의 CLA 함량이 크게 증가되었다. 아울러 여러 종류의 oil 첨가가 반추위 미생물과 혈액의 지방산 조성에 미치는 효과를 조사한 바, 전체적으로 반추위미생물과 혈액 내에 존재하는 C18계 불포화지방산은 oil 첨가구에서 반추위 내 미생물들에 의한 biohydrogenation이 증가하는 경향을 보였음을 알 수 있었다.

3. 사양시험

대두유 첨가가 면양의 지방조직 내 c9,t11-CLA 및 *trans*-11 C_{18:1} 함량에 미치는 효과를 조사한 결과 대두유의 첨가는 면양의 plasma 내 total cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량과 total t-FA 함량을 동시에 증가시켰으며, 근내지방과 피하지방의 CLA 함량을 다소 증가시켰다. 끝으로, 사료 내 oil 혼합물과 monensin 첨가가 한우 거세우의 혈액과 지방조직 내 c9,t11-CLA 함량에 미치는 효과를 조사한 결과, 혼합유(대두유+해바라기유+홍화유+어유) 및 Monensin(MOPM) 첨가사료 급여만으로도 plasma의 cholesterol 농도와 HDL-C 농도 그리고 plasma c9,t11-CLA 함량을 증가시켰다. 또한 MOPM 첨가사료를 5개월간에 걸쳐 급여했을 경우 근내지방, 근간지방 및 피하지방의 CLA 함량과 총 불포화지방산 함량이 증가되었음을 알 수 있었다.

일련의 *in vitro*, 대사시험 및 사양시험으로 미루어 보아 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다 :

1) 반추위 내 pH를 낮추는 환경 조건(농후사료의 다급, 농후사료와 조사료의 비율 등)에서는 높은 CLA 생성을 기대하기 어렵다는 점이다.

2) 사료에 첨가하는 oil의 종류이다. 즉, oil의 지방산 조성에서 C18:2 함량이 높을수록 더 많은 CLA 생성을 기대할 수 있다는 것이다. 이러한 측면에서 볼 때 어렵지 않게 구할 수 있는 oil인 채종유, 대두유 및 아마유 중 C18:2 함량이 가장 높은 대두유가 가장 바람직한 oil 자원인 것으로 여겨진다.

3) oil 자원의 첨가 형태 또한 CLA 생성에 중요한 요인이 될 수 있는 것으로 보인다. 즉, CLA는 반추위 박테리아에 의한 oil을 구성하는 특정 불포화지방산의 hydrogenation 과정에서 생성되는 것이므로 무엇보다도 oil의 분해로 인한 특정 지방산의 반추위 미생물에 대한 노출이 중요하다. 이러한 측면에서 볼 때 분쇄된 oilseed의 경우 그 자체가 완전히 분해되지 않는 한 특정 지방산의 노출이 불가피 하기 때문에 oilseed보다는 oil을 첨가하는 형태가 바람직한 것으로 여겨진다.

4) Monensin은 반추위 내 미생물의 분포에 크게 영향하며, 반추위 내에서 생성된 수소 이온의 이용에도 크게 관여하는 것으로 알려져 왔다. 따라서 Monensin은 반추위 미생물에 의한 hydrogenation 과정에 필연적으로 관여함으로써 불포화지방산의 포화 지방산화에 크게 영향하는 것이다. CLA 생성 그 자체가 불포화지방산의 불완전한 hydrogenation 생성물질 중 하나이므로 Monensin을 첨가할 경우 CLA 생성량이 증가 될 수 있음을 알 수 있었다.

5) Oil의 종류나 첨가 형태, 그리고 배양 방법에 따라 반추위미생물의 성장과 미생물체 지방산의 조성이 달라짐을 알 수 있었는데, 이런 점으로 미루어 보아 미생물의 지방 합성이 de novo 뿐만 아니라 외부의 지방산을 직접 incorporation하여 체지방을 합성한다는 사실을 알 수 있었다.

6) 어유(fish oil)의 첨가 역시 CLA 생성량을 증가시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 예측되었지만, 그것에 대한 mechanism은 알 수 없었다.

7) 비록 지방산 조성이 다르기는 하지만 C18:2 함량이 50% 이상 되는 대두유, 헤바라기유 및 홍화유(safflower oil) 등과 함께 어유 및 Monensin(20ppm)을 혼합하여 사료에 급여함(배합사료의 6% 수준, 건물 기준)을 한우의 체지방 내 CLA 축적을 극대화시키기 위한 최적 급여 조건으로 하였다. 최장 5개월간을 급여했으나 예상보다는

체지방의 CLA 함량이 매우 높게 증가되지는 않았는데, 그 이유는 생성된 CLA의 대부분이 우유를 통하여 배출하는 젖소의 경우와 달리 한우는 체지방이 몸 전체에 걸쳐 축적되기 때문임을 알 수 있었다.

8) 그러나 한우에 대한 적정 투여 시기와 기간을 예측하기는 어려웠다. 본 연구에서는 출하(25개월령) 전 최대 5개월 동안 oil을 급여했으나, 대부분의 경우 비육 후기에 농후사료를 다급하기 때문에 반추위액의 pH가 낮을 가능성이 높아 CLA 생성량 자체도 감소될 가능성이 있는 것이다. 그렇다면, 한우의 체지방 내에 CLA 축적량을 높이기 위해서는 조사료를 다량 급여하는 육성기에 oil을 첨가, 급여하는 것이 바람직한 것으로 보이나, 체지방 축적 시기 및 출하시기를 감안하면 그 또한 모순되는 점을 가지고 있다고 보아야 할 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표 및 연구개발 내용과 달성도

구 분	연구개발목표	연구개발 내용	달성도
1차년도 (2000)	○ 반추위미생물의 hydrogenation activity 조절에 관한 연구	1) 일반 사료자원의 탄수화물성 에너지 수준 : 에너지 수준이 높을수록 pH가 낮아 CLA 생성률이 저하됨 2) 섬유소(일반 조사료) 첨가 수준 : 섬유소 첨가수준이 CLA 생성에 크게 영향하지 않았음 3) 지질자원의 첨가형태 : oil 자원의 종류 및 oil 또는 oilseed의 첨가 형태에 따라 CLA 생성률이 다르게 나타났음 4) 배양액의 pH : 배양액의 pH가 높을수록 CLA 생성량이 증가되었음	100%
	○ 반추위내 기능성지방산의 생산 증가를 위한 Ionophore 첨가효과구명	1) oil 배양시 Monensin 첨가로 인하여 CLA 생성량이 증가되었음 2) oil의 종류에 따른 불포화지방산의 hydrogenation 정도가 달랐음	100%
	○ Batch culture와 continuous culture를 이용한 지방 첨가가 반추위 미생물의 조성에 미치는 영향	1) oil 종류와 미생물에 따라 지방산의 농도와 조성이 달랐음 2) 반추위미생물에 의한 biohydrogenation 비율이 C18:3 > C18:2 > C18:1 순서로 나타났음 3) continuous culture 방법의 경우 oil 첨가로 인하여 미생물 단백질 함량이 다소 낮아졌으며, 미생물의 지방산 조성이 oil의 종류에 따른 지방산 조성의 영향을 받았음	100%

구 분	연구개발목표	연구개발 내용	달성도
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지질사료의 급여조건에 따른 불포화지방산의 hydrogenation 및 T-FA 생성과 이들 물질의 체내 이용성에 관한 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 대사시험 - 사양시험 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 조사료 비율이 증가됨에 따라 두종류의 oil 모두에서 <i>trans</i>11-ODA와 <i>cis</i>9, <i>trans</i>11-CLA 함량이 증가되는 경향을 보였음 2) 그러나 농후사료와 조사료 비율, 그리고 oil의 종류는 plasma의 <i>trans</i>11-ODA와 <i>cis</i>9, <i>trans</i>11-CLA 함량에 크게 영향하지 않았음 3) 대두유의 첨가는 면양의 plasma 내 total cholesterol 및 HDL-cholesterol 함량을 증가시켰음 4) 대두유의 첨가로 인하여 근내지방과 피하지방의 CLA 함량이 다소 증가되었음 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ionophore가 반추동물의 기능성지방산 생산에 미치는 효과 연구- 대사시험 	<p><i>In Vitro</i> 실험을 통하여 얻어진 결과에 대한 생체에서의 재현을 조사한 결과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 식물성 기름이나 Monensin의 반추위 내 투여로 장쇄 지방산의 반추위 내 hydrogenation을 감소되었음 2) 대두유와 Monensin 투여로 인하여 반추위 내용물의 CLA 함량이 크게 증가되었음 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한국재래산양 대사시험을 통한 지방첨가가 반추위 내 대사에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> - 대사시험 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 반추위미생물과 혈액 내에 존재하는 C18계 unsaturated fatty acid가 지방첨가로 인하여 hydrogenation이 높았음 2) Oil의 첨가로 인하여 반추위 미생물의 성장이 둔화되었음 	100%

구 분	연구개발목표	연구개발 내용	달성도
3차년도 (2002)	○ 지질사료의 최적 급여조건을 통한 기능성 한우고기의 생산 - 사양시험	1) 5개월간에 걸친 oil 혼합물 + Monensin(MOPM)의 급여로 인하여 일당증체량과 사료효율이 현저히 증가되었음 2) MOPM 사료는 거세 한우의 등지방 두께와 등심근 면적을 다소 증가시켰음 3) MOPM 첨가사료 급여로 plasma의 cholesterol 농도와 HDL-C 농도 그리고 HDLC/TC 비율을 증가시켰음 4) MOPM 첨가사료 급여는 거세 한우의 plasma c9,t11-CLA 함량을 현저히 증가시켰음 5) 5개월간에 걸친 MOPM 첨가사료 급여로 인하여 근내지방, 근간지방 및 피하지방의 CLA 함량과 총 불포화지방산 함량이 증가되었으며 포화지방산 함량은 감소되었음	100%

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 1) 각종 혐기적 발효 환경 하에서 반추위 미생물의 지질 자원 종류별 및 첨가 형태별로 발효특성과 불포화 지방산의 hydrogenation 특성을 trans-fatty acid 및 CLA 생성 측면에서 포괄적으로 조사함으로써 CLA 생성량에 영향을 주는 조건을 구명하였음
- 2) 반추위 미생물에 의한 지질 자원 배양시 Monensin을 첨가할 경우 첨가된 Monensin이 불포화지방산의 hydrogenation에 영향을 미치고, 이에 따라 CLA 생성량이 증가된다는 사실을 알게 되었음
- 3) 지질 자원의 종류 및 배양 방법에 따른 지질대사 관련 미생물의 분포와 지방산 조성의 변형, 그리고 반추위 미생물의 성장량을 구명하는데 기여하였음

- 4) *In vitro* 기초 실험을 통하여 습득한 결과를 *in vivo* 실험에서 확인하고, 반추위에서 생성된 CLA 등의 지방산이 체내로 흡수된 상태를 혈액의 지방산 분석을 통하여 파악하였음
- 5) 먼저 실시된 *in vitro* 시험이나 *in vivo* 대사시험의 결과는 궁극적으로 반추가축의 체내에서 CLA 등이 얼마나 축적되며, 이들이 cholesterol 종류 및 농도에 어떻게 영향을 미치는 등의 실질적인 적용 유무에 달려있다는 점에서 실제로 면양과 거세 한우를 상대로 그 효과를 확인하였음.
- 6) 본 연구과제와 관련된 일련의 시험은 반추위 미생물은 물론 실제 동물의 체내에서의 지질 대사에 관한 폭넓은 기초 및 대사작용을 이해하고 구명함은 물론, 축산 선진국 못지 않은 계획과 연구수행으로 이 분야의 선도적 역할을 한 것으로 판단됨

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

앞에서 지적한 바와 같이 본 연구과제의 목표가 성공적으로 달성된 것으로 판단된다. 그러나 다음과 같은 측면에서 보와 내지는 검증시험이 요구된다고 하겠다.

1. 한우 고급육을 생산하기 위해서는 근내지방의 충분한 축적을 위해 일반적으로 장기 비육을 해야 하는 것으로 알려진다. 본 시험에서는 시험 당시의 여건(시험축 사육기간 등)으로 인하여 비육 후기에 접어든 한우를 출하하기 전 최대 5개월간 시험사료를 급여하였다.
그러나 대부분의 비육 후기에 접어든 한우의 사양관리는 배합사료를 거의 무제한으로 급여하는 형식을 취하는데, 이로 인하여 반추위액의 pH가 크게 낮아질 가능성이 있다. 예상과 같이 pH가 낮아질 경우 반추위 내에서의 CLA 생성이 현저히 감소될 가능성도 있다는 점을 간과할 수 없다.
2. 따라서 CLA의 체지방 내 효율적인 축적을 위해 급여기간도 중요하지만 급여 시기 또한 매우 중요한 것으로 보이는데, 차후에는 이러한 측면에서 시험을 수행할 필요가 있는 것으로 사료된다.
3. 젖소의 경우 체내로 흡수된 trans-fatty acid로부터 유선조직의 desaturase 작용에 의하여 상당량의 CLA가 생성되는 것으로 알려지는데, 한우의 경우 이러한 측면이 조사되지 못하고 대부분 반추위 내 CLA 생성량과 체지방 조직의 CLA 함량과의 관계를 비교한 정도로 마치게 된 점이 아쉬워 이에 대한 차후의 연구가 필요한 것으로 여겨진다.
4. CLA 생성 및 이용(축적) 측면에서 거세 한우를 이용하여 확인한 결과 5개월간에 걸쳐 C18:2 함량이 높은 oil 혼합물과 CLA 생성에 유리하게 적용될 수 있는 어유의 첨가, 그리고 hydrogenation에 관여할 수 있는 Monensin을 첨가하여 사료를 급여했음에도 불구하고 체조직(체지방)에 축적된 CLA 함량은 기대한 수준(1% 이상)에 달하지 못했다(물론 통계적으로는 그러한 물질을 급여하지 않은 처리구의 한우에 비하여 크게 증가되었음). 이러한 결과는 생성된 CLA가 우유를 통하여 거의 전량이 배출되는 젖소의 경우와 달리 체내에서 생성된 CLA가 몸 전체의 체지방 축적 부위에 분포되어 있기 때문이라 여겨진다.

일부 시험 방법을 개선함으로써 CLA 함량을 증가시킬 수는 있겠으나, 본 연구 결과로부터 얻은 CLA 함량(0.5% 정도, 급여하지 않은 한우의 경우는 0.25-0.3% 수준)으로는 기능성 한우고기 생산용 산업화를 위한 기술 이진이 쉽지 않을 것으로 여겨진다. 다행스러운 점은 본 연구 결과가 한우고기 내의 CLA 함량의 증가뿐만 아니라 고밀도(HDL) cholesterol 함량의 증가라는 측면에서 인체에 이로운 작용을 할 수 있는 기능성 한우고기 생산 방법으로 활용될 수 있다는 점이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하기 전에 또는 수행하는 동안 본 연구와 관련된 해외의 정보를 다음과 같이 수집하였다.

1. 반추위 내 미생물의 hydrogenation 관련 연구결과를 파악했으며, 필요하지만 수행되지 못한 부분을 파악할 수 있었다.
2. 반추위 미생물과 체조직에서의 CLA 생성 및 축적에 관한 정보를 부분적으로 수집할 수 있었으며, 이러한 정보를 통하여 보완되어야 점들을 파악하였다.
3. 반추위 내의 발효 조건과 oil 중심의 시험 사료 급여 조건을 확립할 수 있는 정보를 수집하고, 이를 한국의 실정에 맞도록 변형할 수 있는 기틀로 확립하였다.

제 7 장 참고문헌

- Allen, L. H. 1993. The Nutrition CRSP: What is the marginal malnutrition, and does it affect human function? *Nutr. Rev.* 51:255-267.
- Aro, A., J. Van Amelsvoort., W. Becker., M. A. Van Erp-Baart., A. Kafatos., T. Leth. and G. Van Poppel. 1998. *Trans* fatty acids in dietary fats and oils from 14 european countries: The TransFair Study. *Journal of Food and Analysis.* 11:137.
- Ascherio, A., C. H. Hennekens., J. Buring., C. Master., M. J. Stampfer. and W. C. Willett. 1994. *Trans*-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation* 89:94.
- Ashes, J. R., Gulati, S. K., Cook, L. J., Scott, T. W. and Donnelly, J. B. 1979. Assessing the biological effectiveness of protected lipid supplements for ruminants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 56:522-527.
- Ashes, J. R., B. D. Siebert., A. Z. Cuthbertson and T. W. Scott. 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids.* 27(8):629.
- Banks, W., Clapperton, J. L., Kelly, M. E., Wilson, A. G. and Crawford, R. J. M. 1980. The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding soya oil to dairy cows. *J. Sci. Food Agric.* 31:368.
- Banni, S., and J. C. Martin. 1998. Conjugated linoleic acid and metabolites. In: J. J. Sebedio and W. W. Christie (Ed.) *Trans Fatty Acids in Human Nutrition.* pp 261-302. Oily Press, Dundee, Scotland.
- Bartlett, J. C., and D. G. Chapman. 1961. Detection of hydrogenated fats in butter fat by measurement of *cis-trans* conjugated unsaturation. *Agric. Food. Chem.* 9:50-53.
- Bartley, D. K., and S. D. Farlin. 1977. Effects of antibiotics on apparent lactate and volatile fatty acid production: in vitro rumen fermentation studies. *J. Anim. Sci.* 45:385.
- Bateman II, H. G., and T. C. Jenkins. 1998. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated FA and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 81:2451-2458.
- Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, and J. M. Griinari. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminant. *Proceedings of the American Society of Animal Science:*1-15.

- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 278:R179–R184.
- Bessa, R. J. B., J. Santos-Silva, J. M. R. Ribeiro, and A. V. Portugal. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest. Prod. Sci.* 63:201–211.
- Belury, M. A. 1995. Conjugated dienoic linoleate: A polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr. Rev.* 53:83–89.
- Bickerstaffe, R., and E. F. Annison. 1970. The desaturase activity of goat and sow mammary tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 35:653–665.
- Bickerstaffe, R., and A. R. Johnson. 1972. The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis. *Br. J. Nutr.* 27:561–570.
- Booth, R. G., S. K. Kon, W. J. Dann, and T. Moore. 1935. A study of seasonal variation in butter fat. A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. *Biochem. J.* 29:133–137.
- British Nutrition Foundation. 1995. *Trans* fatty acids, The Report of the British Nutrition Foundation Task Force. British Nutrition Foundation, London.
- Callaway, T. R. and Martin, S. A. 1997. Effects of cellobiose and Monensin on *in vitro* fermentation of organic acids by mixed ruminal bacteria. 80:1126–1135.
- Cameron, P. J., M. Rogers, J. Oman, S. G. May, D. K. Lunt, and S. B. Smith. 1994. Stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity and mRNA levels are not different in subcutaneous adipose tissue from Angus and American Wagyu steers. *J. Anim. Sci.* 72:2624–2628.
- Chang, J. H. P., D. K. Lunt, and S. B. Smith. 1992. Fatty acid composition and fatty acid elongase and stearoyl-CoA desaturase activities in tissues of steers fed high oleate sunflower seed. *J. Nutr.* 122:2074–2080.
- Chilliard, Y., J. M. Chardigny, J. Chabrot, A. Ollier, J. L. Sebedio, and M. Doreau. 1999. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on conjugated linoleic acid (CLA) content of cow milk fat. *Proc. Nutr. Soc.* 58:70A (Abstr.).
- Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha, and M. W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5:185–197.
- Chin, S. F., J. M. Storkson, K. J. Aibright, M. E. Cook, and M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J. Nutr.* 124:2344–2349.
- Chouinard, P. Y., V. Girard, and G. J. Brisson. 1995. Influence of calcium salts of

- fatty acids(CSFA) with varying unsaturation on yield, composition, and fatty acid profile in Holstein milk. *Can. J. Anim. Sci.* 75:656.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. E. Bauman, W. R. Butler, Y. Chilliard, and J. K. Drackley. 1998a. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different sources of dietary fat. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl. 1):233 (Abstr.).
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, M. L. Kelly, J. M. Griinari, and D. E. Bauman. 1998b. Effect of dietary manipulation on milk conjugated linoleic acid concentrations. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl. 1):233 (Abstr.).
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbario, L. E. Metzger, and D. E. Bauman. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. S[~]b, and D. E. Bauman. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2737-2745.
- Corl, B. A., P. Y. Choulnard, D. E. Bauman, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, and K. V. Nurmela. 1998. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originates in part by endogenous synthesis from trans-11 octadecenoic acid. *J. Dairy. Sci.* 81(Suppl. 1):233 (Abstr.).
- Corl, B. A., S. H. Lacy, L. H. Baumgard, D. A. Dwyer, J. M. Gniinari, B. S. Phillips, and D. E. Bauman. 1999. Examination of the importance of Δ^9 -desaturase and endogenous synthsis of CLA in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 1):118 (Abstr.).
- Czerkawski, J. W, Blaxter K. L, Wainman F. W. (1966a). The effect of linseed oil and of linseed oil fatty acids incorporated in the diet on the metabolism of sheep. *British Journal of Nutrition* 20: 485-94.
- Czerkawski, J. W, Christie W. W., Breckenridge G, Hunter M. L. 1975. Changes in the rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *British. Journal. Nutrition* 34: 25-44.
- Davis, C. L., and R. E. Brown. 1970. Low-fat milk syndrome. In: A. T. Phillipson (Ed.) *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant.* pp 545-565. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, U.K.
- Dawson, R. M. C., and P. Kemp. 1970. Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. In A. T. Phillipson (Ed.) *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant.* pp 504-518. One! Press, Newcastle upon Tyne, U.K.
- Dawson, R. M. C., N. Hemington, D. Grime, D. Lander, and P. Kemp. 1974. Lipolysis and hydrogenation of galactolipids and the accumulation of phytanic acid

- in the rumen. *Biochem. J.* 144:169-171.
- Dawson, R. M. C., N. Hemington, and G. P. Hazlewood. 1977. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis grass lipids. *Br. J. Nutr.* 38:225-232.
- DeLany, J. P., F. Blohm, A. A. Truett, J. A. Scimeca, and D. B. West. 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am. J. Physiol.* 276: R1172-R1179.
- Demeyer, D. I., H. K. Henderickx. 1967. Effect of fatty acids on methane production. *Biochemistry. Biopsychology. Acta* 137(3): 184-197.
- Dhiman, T. R., G. R. Anand, L. D. Satter, and M. Pariza. 1996. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci* 79(Suppl. 1):137 (Abstr.).
- Dhiman, T. R., E. D. Helmink, D. J. McMahon, R. L. Fife, and M. W. Pariza. 1999a. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *J. Dairy Sci* 82:412-419.
- Dhiman, T. R., K. C. Olson, I. S. MacQueen, and M. W. Pariza. 1999b. Conjugated linoleic acid content of meat from steers fed soybean oil. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):84 (Abstr.).
- Dhiman, T. R., L. D. Satter, M. W. Pariza, M. P. Gaul, and K. Albright. 1997. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 80(Suppl. 1):184(Abstr.).
- Donoho, A., J. Manthey, J. Occolowitz, and L. Zornes. 1978. Metabolism of monensin in the steer and rat. *J. Agr. Food Chem.* 26:1090.
- Doreau, M., D. I. Demeyer, and C. J. Van Nevel. 1997. Transformations and effects of unsaturated fatty acids in the rumen. Consequences on milk fat secretion. In: R. A. S. Welch, D. J. W. Bums, D. R. Davis, A. I. Popay, and C. G. Prosser (Ed.) *Milk Composition, Production and Biotechnology.* pp 73-92. CAB International Wallingford, U.K.
- Dugan, M. E. R., J. L. Aalhus, A. L. Schaefer, and J. K. G. Kramer. 1997. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 77:723-725.
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Vernay, M., Moncoulon, R. and Griess, D. 1994. Effect of different forms of polyunsaturated fatty acids on duodenal and serum fatty acid profiles in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 74:595-600.
- Enoch, H. G., A. Catala, and P. Strittmatter. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.* 251:5095-5103.

- Fellner, V., F. D. Sauer, and J. K. G. Kramer. 1995. Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 78:1815-1823.
- Fellner, V., F. D. Sauer, and J. K. G. Kramer. 1997. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *J. Dairy Sci.* 80:921-928.
- Fritsche, S., and J. Fritsche. 1998. Occurrence of conjugated linoleic acid isomers in beef. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:1449-1451.
- Fritsche, J., and H. Steinhart. 1998. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 206:77-82.
- Galbraith, H., T. B. Miller, A. M. Paton, and J. K. Thompson. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology* 34: 803-813.
- Gaynor, P. J., R. A. Erdman., B. B. Teter., A. V. Capuco. and D. R. Waldo. 1996. Glucose and norepinephrine challenges during abomasal infusion of *cis* or *trans* octadecenoates in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 79(9): 1590.
- Gerson, T., A. John, and A. S. D. King. 1985. The effects of dietary starch and fiber on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *J. Agric. Sci., Camb.* 105:27-30.
- Giesy, J. G., S. Viswanadha, T. W. Hanson, L. R. Falen, M. A. McGuire, C. H. Skarie, and A. Vinci. 1999. Effects of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on estimated energy balance in Holstein cows early in lactation. *J. Dairy Sd.* 82(Suppl. D):74 (Abstr.).
- Griinari, J. M., and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson (Ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1. pp 180-200. AOCS Press, Champaign, IL.
- Griinari, J. M., P. Y. Chouinard, and D. E. Bauman. 1997. *Trans* fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. In: *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, Ithaca, NY. pp 208-216.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.* 130 (In press).
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist and K.

- V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Griinari, J. M., K. Nurmela, D. A. Dwyer, D. M. Barbano, and D. E. Bauman. 1999. Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage is associated with a change in ruminal biohydrogenation. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 1):117-118 (Abstr.).
- Gulati. S. K., T. W. Scott, J. R. Ashes. 1997. In-vitro assessment of fat supplements for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:127-132.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm, and M. W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8:1881-1887.
- Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: P. N. Hobson (Ed.) *The Rumen Microbial Ecosystem* pp. 285-322. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Harfoot, C. G., R. C. Noble, and J. H. Moore. 1973a. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.* 24:961-970.
- Harfoot, C. G., R. C. Noble, and J. H. Moore. 1973b. Food particles as a site of biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem. J.* 132:829-832.
- Harfoot, C. G., and Hazlewood, G. P. 1988. Lipid metabolism in the rumen. Page 285 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, ed. Elsevier Appl. Sci., London and NY.
- Houseknecht, K. L., J. P. Vanden Heuvel, S. Y. Moya-Camarena, C. P. Portocarrero, L. W. Peck, K. P. Nickel, and M.A. Belury. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:678-682.
- Hughes, P. E., Hunter, W. J. and Tove, S. B. 1982. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9, trans-11-octadecadienoate reductase. *J. Biol. Chem.* 257: 3643-3647.
- Hungate, R. E. (1966). *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. J. Thompson D. Barbano, and D. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129:2135-2142.
- Jahreis, G., J. Fritsche, and H. Steinhart. 1997. Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutr. Res.* 17:1479-1484.
- Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863.

- Jiang, J., L. Bjoerck, R. Fonden, and M. Emanuelson. 1996. Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.* 79:438-445.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter., L. S. Piperova. and R. A. Erdman. 1997. Effect of fat source on duodenal flow of *trans*-C_{18:1} fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80(9): 2115.
- Katan, M. D., P. L. Zock. and R. P. Mensink. 1995. *Trans* fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annu. Rev. Nutr.* 15:473.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter, L. S. Piperova, and R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-C_{18:1} fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114.
- Keeney, M. 1970. Lipid metabolism in the rumen. in: A. T. Phil(Ed.) *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant.* pp 489-503. Oriel Press, Newcastle upon Tyne. U.K.
- Kellens, M. J., H. L. Goderis, and P. P. Tobback. 1986. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by a mixed culture of rumen microorganisms. *Biotech. Bioeng.* 28:1268-1276.
- Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Chouinard, P. Y., Van Amburgh, M. E. and Bauman, D. E. 1998b. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows, *J. Nutr.* 128:881-885.
- Kelly, M. L, and D. E. Bauman. 1996. Conjugated linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. In: *Proc. Cornell Nutr. Conf., Ithaca, NY.* pp 124-133.
- Kelly, M. L., I. R. Berry, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, P. Y. Chouinard. M. E. Van Amburgh, and D. E. Bauman. 1998a. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128:881-885.
- Kelly, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh, and L. D. Muller. 1998b. Effect of intake of pasture on concentration of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1630-1636.
- Kemp, P., and D. J. Lander. 1984. Hydrogenation *in vitro* of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130:527-533.
- Kemp, P., D. J. Lander, and F. D. Gunstone. 1984. The hydrogenation of some *cis*-

- and *trans*-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus sp.* Br. J. Nutr. 52:165-170.
- Kepler, C. R., K. P. Hirons, J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 241:1350-1354.
- Kepler, C. R., and S. B. Tove. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 242:5686-5692.
- Kepler, C. R., W. P. Tucker, and S. B. Tove. 1970. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 245:3612-3620.
- Kinsella, J. E. 1972. Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. Lipids 7:349-355.
- Knekt, P., R. Järvinen, R. Seppänen, E. Pukkala, and A. Aromaa. 1996. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. Br. J. Cancer 73:687-691.
- Kramer, J. K. G., P. W. Parodi, R. G. Jensen, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, and R. O. Adlof. 1998a. Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. Lipids 33:835.
- Kramer, J. K. G., N. Sehat, M. E. R. Dugan, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. A. G. Roach, K. Eulitz, J. L. Aalhus, A. L. Schaefer and Y. Ku. 1998b. Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high performance liquid chromatography. Lipids 33:549-558.
- Lake, R. J., B. Thomson, G. Devane, and P. Scholes. 1996. *Trans* fatty acid content of selected new zealand foods. Journal of Food Composition and Analysis. 9:365.
- Lawless, F., J. J. Murphy, D. Harrington, R. Devery, and C. Stanton. 1998. Elevation of conjugated *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. J. Dairy Sci. 81:3259-3267.
- Leat, W. M. F., P. Kemp, R. J. Lysons, and T. J. L. Alexander. 1977. Fatty acid composition of depot fats from gnotobiotic lambs. J. Agric. Sci. 88:175-179.
- Lin, H., I. U. Boylston, M. J. Chang, L. O. Luedecke, and T. D. Shultz. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. J. Dairy Sci. 78:2358-2365.
- Loor, J. J., and J. H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers

- reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128:2411-2419.
- Luvisetto, S., D. Pietrobon, and G. F. Azzone. 1987. Uncoupling of oxidative phosphorylation: 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. *Biochemistry* 26: 7332-8.
- Madron, M. S., Peterson, D. G., Dwyer, D. A., Corl, B. A., Baumgard, L. H., Beermann, D. H. and Bauman, D. E. 2002. Effect of extruded full-fat soybeans on conjugated linoleic acid content of interamuscular, intermuscular, and subcutaneous fat in beef steers. *J. anim. Sci.* 80:1135-1143.
- Mahfouz, M. M., A. J. Valicenti, and R. T. Holman. 1980. Desaturation of isomeric trans-octadecenoic acids by rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 618:1-12.
- Martin, Ci. S., D. K. Lunt, K. G. Britain, and S. B. Smith. 1999. Postnatal development of stearoyl coenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 77:630-636.
- Masters, N., M. A. McGuire, and M. K. McGuire. 1999. Conjugated linoleic acid supplementation and milk fat content in humans. *FASEB J.* 13:A697(Abstr.).
- McGuire, M. A., and M. K. McGuire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1999[online publication].
- McGuire, M. A., M. K. McGuire, M. A. Guy, W. K. Sanchez, T. D. Shultz, L. Y. Harrison, D. E. Bauman, and J. M. Griinari. 1996. Short-term effect of dietary lipid concentration on content of conjugated linoleic acid (CLA) in milk from dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):266(Abstr.).
- Mensink, R. P. and M. B. Katan. 1990. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N. Engl. J. Med.* 323:439.
- Middaugh, R. P., R. J. Baer., D. P. Casper., D. J. Schingoethe. and S. W. Seas. 1988. Characteristics of milk and butter from cows fed sunflower seeds. *J. Dairy Sci.* 71:3179.
- Milner, J. A. 1999. Functional foods and health promotion. *J. Nutr.* 129:1395S-1397S.
- Molkentin, J. 1999. Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk. *Nahrung.* 43:185-189.
- Nestel, P. J., M. Noakes., B. Belling., R. McArthur., P. Clifton., E. Janus. and M. Abbey. 1992. Plasma lipoprotein lipid and Lp(a) changes with substitution of

- elaidic acid for oleic acid in the diet. *J. Lipid. Res.* 33:1493.
- NRC. 1988. *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. National Academy Press, Washington, D. C.
- NRC. 1994. *Opportunities in the Nutrition and Food Sciences*. National Academy Press, Washington D. C.
- NRC. 1996. *Carcinogens and Anticarcinogens in the Human Diet*. National Academy Press. Washington, D. C.
- Ntambi, J. M. 1995. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* 34:139-150.
- Ostrowska, E., M. Muralitharan, R. F. Cross, D. E. Bauman, and F. R. Dunshea. 1999. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J. Nutr.* 129:2037-2042.
- Page, A. M., C. A. Sturdivant, D. K. Lunt, and S. B. Smith. 1997. Dietary whole cottonseed depresses lipogenesis but has no effect on stearoyl coenzyme desaturase activity in bovine subcutaneous adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B:79-84.
- Palmquist, D. L. and Jenkins, T. C. 1980. Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.
- Pariza, M. W., S. H. Ashoot, F. S. Chu, and D. B. Lund. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan fried hamburger. *Cancer Lett.* 7:63-69.
- Pariza, M. W., and W. A. Hargraves. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 6:591-593.
- Park, Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook, and M. W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32:853-858.
- Park, Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu, and M. W. Pariza. 1999. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34:235-241.
- Parodi, P. W. 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* 60:1550-1553.
- Parodi, P. W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.* 127:1055-1060.
- Pedersen, J. I., L. Johansson and D. S. Thelle. 1998. *Trans*-fatty acids and health.

- Tidsskr Nor Laegeforen. 118(22): 3474.
- Polan, C. E., J. J. McNeil, and S. B. Tove. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 88:1056-1064.
- Pollard, M. R., F. D. Gunstone, A. T. James, and L. J. Morris. 1980. Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids* 15:306-314.
- Precht, D., and J. Molkentin. 1997. Effect of feeding on conjugated cis- Δ 9, trans- Δ 11 octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats. *Nahrung* 41:330-335.
- Precht, D. and J. Molkentin. 1995. *Trans* fatty acids: implications for health, analytical methods, incidence in edible fats and intake. *Die Nahrung.* 39:343.
- Rid, R. R. 1963. Physico-chemical characteristics of Canadian milk fat unsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 46:102-106.
- Romo, G. A. 1995. *Trans* fatty acids: rumen *in vitro* production and their subsequent metabolic effects on energy metabolism and endocrine responses in the lactating dairy cow. Ph. D. Diss. Univ. Maryland, College Park.
- Russel, J. B., and T. Hino. 1985. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*. A spiraling effect that leads to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.* 68:1712.
- SAS© System for Windows. Version 8. 1999. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sauer, F. D., V. Fellner, R. Kinsman, J. K. G. Kramer, H. A. Jack, A. J. Lee, and S. Chen. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *J. Anim. Sci.* 76:906-914.
- Samman, S. 1995. Dietary *trans* fatty acids and coronary heart disease. In *Which fatty acids?* University of Sydney Nutrition Research Foundation Annual Symposium (A. S. Truswell., O. W. R. Laws. and J. F. Kefford, Eds.), Food Aust. 47:S10-S13.
- Scimeca, J. A., H. J. Thompson, and C. Ip. 1995. Effect of conjugated linoleic acid on carcinogenesis. *Adv. Exp. Biol. Med.* 364:59-65.
- Sehat, N., J. K. O. Kramer, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. A. O. Roach, K. Eulitz, K. M. Morehouse, and Y. Ku. 1998. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 33:963-971.
- Sehat, N., R. Rickert, M. M. Mossoba, I. K. G. Kramer, M. P. Yurawecz, J. A. G. Roach, R. O. Adlof, K. M. Morehouse, J. Fritsche, K. D. Eulitz, H. Steinhart, and Y. Ku. 1999. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by

- silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 34:407-413.
- Shantha, N. C., A. D. Crum, and E. A. Decker. 1994. Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. *J. Agric. Food Chem.* 42:1757-1760.
- Shantha, N. C., W. O. Moody, and Z. Tabeidi. 1997. A research note: conjugated linoleic acid concentration in semimembranous muscle of grass- and grain-fed and Zeranol-implanted beef cattle. *J. Muscle Foods* 8:105-110.
- Shantha, N. C., L. N. Ram, J. O'Leary, C. L. Hicks, and E. A. Decker. 1995. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *J. Food Sci.* 60:695-697.
- Singh, S., and i. C. Hawke. 1979. The *in vitro* lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglycerides by whole rumen contents and its fractions. *J. Sci. Food Agric.* 30:603-6 12.
- Siguel, E. N. and R. H. Lerman. 1993. *Trans* fatty acid patterns in patients with angiographically documented coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 71:916.
- Siguel, E. N., R. H. Lerman. and P. W. F. Wilson. 1994. Relationship of PUFA and *trans* fatty acids patterns with total/HDL cholesterol in the Framingham Offspring. *Circulation.* 90: 1-613.
- Smith, L. M., W. L. Dunkley., A. Franke. and T. Dairiki. 1978. Measurement of *trans* and other isomeric unsaturated fatty acids in butter and margarine. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55:257.
- Solomon, R., L. E. Chase, D. Ben-Ghedaiia, and D. E. Bauman. 2000. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of fell fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:(in press).
- Stanton, C., F. Lawless, G. Kjellmer, D. Hamngton, R. Devery. J. F. Connolly, and J. Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk *cis-9*, *trans-11*-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62:1083-1086.
- St. John, L. C., D. K. Lunt, and S. B. Smith. 1991. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *J. Anim. Sci.* 69:1064-1073.
- Sukhija, P. S. and Palmquist, D. L. 1998. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agri. Food. Chem.* 36: 1202-1206.
- Tanaka, K., and K. Shigeno. 1976. The biohydrogenation of liacid by rumen micro-organisms. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 47:50-53.
- Tesfa, A. T., M. Tuori, and L. Syrjalh-Qvist. 1991. High rapeseed oil feeding to

- lactating dairy cows and its effect on milk yield and composition in ruminants. *Finn. J. Dairy Sci.* 49:65–81.
- Timmen, H., and S. Patton. 1988. Milk fat globules: fatty acid composition, size and in vivo regulation of fatty liquidity. *Lipids* 23:685–689.
- Tocher, D. R., M. J. Leaver, and P. A. Hodgson. 1998. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog. Lipid Res.* 37:73–117.
- Troisi, R., W. C. Willett. and S. T. Weiss. 1992. *Trans* fatty acid intake in relation to serum lipid concentration in adult men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:1019.
- Ulberth, F., and M. Henninger. 1994. Quantitation of *trans* fatty acids in milk fat using spectroscopic and chromatographic methods. *J. Dairy Res.* 61:517–527.
- Van de Vijver, L. P. L., G. Van Poppel., A. Van Houwelingen., D. A. C. M. Kruyssen. and G. Hornstra. 1996. *Trans* unsaturated fatty acids in plasma phospholipids and coronary heart disease: a case-control study. *Atherosclerosis.* 126:155.
- Van Nevel, C., and D. I. Demeyer. 1995. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: Inhibition by antimicrobials. *J Dairy Sci.* 78:2797–2806.
- Van Nevel, C. J. and D. I. Demeyer. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:53–65.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* (2nd Ed.), Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Poppel, G., Van Erp-Baart, M-A., T. Leth., E. Gevers., J. Van Amelsvoort., D. Lanzmann-Petithory., A. Kafatos. and A. Aro. 1998. *Trans* fatty acids in Foods in Europe: The Transfair Study. *Journal of Food and Analysis.* 11:112.
- Viviani R, Borgatti AR, Matteuzzi D. 1968b. Isolation of typical rumen bacteria acting on biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 31;44(24): 2185–2189.
- Wahle, K. W. J. 1974. Desaturation of long chain fatty acids by tissue preparations of the sheep, rat and chicken. *Comp. Biochem. Physiol.* 48B:87–105.
- Wang, J. H., M. K. Song, Y. S. Son, and M. B. Chang. 2002. Addition effect of seed-associated or free linseed oil on the formation of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid and octadecenoic acid by ruminal bacteria *in vitro*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15(8) :1115–1120.
- Ward, R. J., M. T. Travers, S. E. Richards, R. O. Vernon, A. M. Salter, P. J. Buttery, and M. C. Barber. 1998. Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed

- from a single gene in the ovine genome. *Biochim. Biophys. Acta* 1391:145-156.
- West, D. B., J. P. DeLany, P. M. Camet, F. Blohm, A. A. Truett, and J. Scimeca. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.* 275:R667-R672.
- Willett, W. C. and A. Ascherio. 1994. *Trans* fatty acids: Are the effects only marginal? *Am. J. Publ. Health.* 84(5): 722.
- Willett, W. C., M. J. Stampfer., J. E. Manson., G. A. Colditz., F. E. Speizer., B. A. Rosner., L. A. Sampson. and C. H. Hennekens. 1993. Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet.* 341:581.
- Wonsil, B. j., J. H. Herbein. and B. A. Watkins. 1994. Dietary and ruminally derived *trans*-C_{18:1} fatty acids alter bovine milk lipids. *J. Nutr.* 124:556.
- Wu, Z., and D. L. Palmquist. 1991. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science* 74: 3025-3046.
- Wu, Z., O. A. Ohazuruka. and D. L. Palmquist. 1991. Ruminal synthesis biohydrogenation and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3025.
- Yokoyama, M. T. and C. L. Davis. 1971. Hydrogenation of unsaturated fatty acids by *Treponema (Borrelia)* strain B₂₅, a rumen spirochete. *J. Bacteriol.* 107:519-527.
- Yurawecz, M. P., J. A. G. Roach, N. Sehat, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, J. Fritsche, H. Steinhart, and Y. Ku. 1998. A new conjugated linoleic acid isomer, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33:803-809.
- Zegarska, Z., B. Paszczyk, and Z. Borejszo. 1996. *Trans* fatty acids in milk fat. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 5:89-96.
- Zock, P. L. and M. B. Katan. 1992. Hydrogenation alternatives: effects of *trans* fatty acids and stearic acid versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans. *J. Lipid. Res.* 33:399.
- 송만강, 손호진. 1997. Oil의 종류와 처리방법이 반추위미생물에 의한 *in vitro* 발효특성 및 C₁₈-불포화지방산의 hydrogenation에 미치는 효과. *한국영양사료학회지* 21:463.
- 송만강, 최성호. 1998. Oil의 종류 및 첨가수준이 반추위 미생물에 의한 C₁₈-불포화지방산의 hydrogenation 및 반추위박테리아의 oleic acid 이용에 미치는효과. *한국축산학회지* 40:31.
- 왕제휘, 송만강. 1999. Dextrose 첨가수준이 반추위박테리아에 의한 oleic acid의 hydrogenation 및 incorporation에 미치는 효과. *한국영양사료학회지* 23:335.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.