

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ A23K 1/165 A23K 1/18	(45) 공고일자 2001년11월30일 (11) 등록번호 10-0307654 (24) 등록일자 2001년08월22일
(21) 출원번호 10-1997-0709998 (22) 출원일자 1997년12월31일 번역문제출일자 1997년12월31일 (86) 국제출원번호 PCT/CA1996/00451 (86) 국제출원일자 1996년07월05일 (81) 지정국 국내특허 : 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 북한 대한민국 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 리투아니아 라트비아 마다가스카르 마케도니아 몽고 멕시코 AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 룩셈부르크 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고	(65) 공개번호 특1999-0028675 (43) 공개일자 1999년04월15일 (87) 국제공개번호 WO 1997/01967 (87) 국제공개일자 1997년01월23일
(30) 우선권주장 08/497,913 1995년07월05일 미국(US)	
(73) 특허권자	허 매지스티 더 퀸 인 라이트 오브 캐나다, 레프리젠티드 바이 더 디파트먼트 오브 애그리컬처 앤드 애그리-푸드 캐나다 스테판 데이빗 모건 존스 캐나다 앨버타 티1제이 4비1,메인,리스브리지 피.오.박스 3000, 리스브리지 리서치 스테이션
(72) 발명자	보슈멩, 카렌 에이. 캐나다, 앨버타 티1케이 4에이치3, 리스브리지, 3701 오크 드라 이브 사우스 로드, 라일 캐나다, 앨버타 티1케이 2비이1, 리스브리지, 1315-28 스트리트 사우스 시월트, 빈세트 제이. 에이치. 미합중국, 오클라호마 73402, 아드모어, 피. 오. 박스 2180, 2510 샘노블 파크웨이
(74) 대리인	김성규, 김태규

심사관 : 홍순표

(54) 반추동물사료용효소보충제, 이를 함유한 사료 혼합체 및 이 사료 혼합체의 생산방법

명세서

[발명의 명칭]

반추동물 사료용 효소 보충제, 이를 함유한 사료 혼합체 및 이 사료 혼합체의 생산 방법

[기술분야]

본 발명은 크실라나제와 셀룰라제를 포함하고 있는 반추동물 사료구성에 관한 것이다.

[배경기술]

공과류마초와 곡물사료는 반추동물을 위한 통상적인 사료이다. 비록 공과 류마초 및 곡물사료가 모두 목초 사료보다도 더 높이 소화되는 물질의 구성을 포함하고 있지만 공과류마초와 곡물사료는 모두 부분적으로 소화가 되던가 아니면 어떤 조각들은 소화가 되지 않는 그러한 요소들을 포함하고 있는데 특히 식물세포벽으로 만들어진 그러한 부분들이 그러하다. 사료의 세포벽요소는 가끔 전체 섬유부분으로 묘사되기도 한다.

공과류마초는 약 40% 정도의 섬유를 포함하고 있다. 곡물사료의 전체섬유요소는 일반적으로 사료의 전체 건조사료물질의 20% 정도를 점유하고 있다(Van Soest, 1982). 사료의 건조물질의 나머지는 비구조적 탄수화물로 이루어져 있는데 이는 반추동물에 의하여 쉽게 소화된다.

공과류마초와 곡물사료 양자에 있어서 사료의 비구조적인 탄수화물요소는 90-100% 정도 소화가 되며 동물성장에 필요한 에너지로 변환된다. 곡물사료에 있어서 전체섬유요소는 오직 25% 정도가 소화가 되며 이에 반하여 공과류마초는 전체 섬유요소중 약 40%가 소화가 된다(Van Soest, 1982).

공과류마초 또는 곡물사료의 세포벽 또는 전체섬유부분은 기본적으로 분해되기 어려운 셀룰로스, 헤미셀룰로스 그리고 리그닌으로 이루어져 있다.

비록 반추동물이 이러한 물질들을 소화할 수 있는 효소를 분비하지 아니함에도 불구하고 반추동물의 제1반추위(胃)의 박테리아와 균류는 세포벽을 분해할 수 있는 효소를 생산하고 있다.

반추의 섬유소화의 범위는 매우 다양한데 이는 사료의 종류와 그리고 반추위의 미세조직의 섬유세포를 용해하는 활동에 의존하고 있다.

공과류마초와 곡물사료의 전체섬유의 셀룰로스와 헤미셀룰로스요소는 반추의 박테리아에 의하여 생산된 셀룰라제와 크실라나제에 의하여 소화된다.

헤미셀룰로스와 셀룰로스의 소화는 다른것들 가운데에서도 특히 소화되지 않는 리그닌과의 헤미셀룰로스와 셀룰로스의 연관성과 연관성의 정도 및 성격에 의하여 좌우되고 있다.

셀룰라제와 크실라나제는 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 당으로 용해시키는데 이것은 순차적으로 반추의 박테리아에 의하여 여러 가지의 지방산으로 신진대사화되며 반추동물은 이를 직접적으로 에너지원으로 사용할 수 있게 된다. 고성유 마초의 경우 마초의 절반보다 적은 양이 소화될 수 있으며 소화되지 아니한 부분은 배설된다. 이것은 결과적으로 많은 양의 비료생산의 결과를 낳는다.

사료소화에 있어서의 개선은 그들이 결과적으로 빠른 동물의 성장과 감소된 비료산출물의 결과를 가져다주기 때문에 바람직하다. 공과류마초와 곡물사료의 비구조적 탄수화물부분이 이미 높은 소화능력을 가짐에 따라서 진보의 여지는 매우 적어졌다.

그러므로 사료소화를 개선시키는 데 있어서 가장 큰 진보의 기회는 잘 소화가 되지 않는 전체섬유부분의 소화능력을 향상시킴으로서 얻어질 수 있는 것이다.

현재 반추동물을 위한 섬유질 사료의 소화능력을 향상시키는데 라이선스된 사료첨가제는 없는 실정이다.

식물세포벽을 분해할 수 있는 효소의 반추위로의 전달은 반추위의 높은 단백질 가수분해의 반추환경 때문에 난해한 문제라고 할 수 있다.

만약 섬유질을 용해할 수 있는 효소 이를 테면 셀룰라제나 크실라나제같이 그 자체가 단백질인 효소를 단순히 사료에 첨가하기만 한다면 섬유질을 용해하는 효소는 그들이 섭취된 사료의 섬유질 소화를 증가시키기 이전에 벌써 반추위에서 급속하게 소화되어 버릴 것이다(Chesson, 1994, McAllister et al., 1994).

반추위 환경에서의 섬유를 용해하는 효소의 직접적인 투입은 반추위에 어떤 환경에서도 존재하는 것으로 알려진 가장 활동적으로 셀룰로스와 크실라나제를 생산하는 박테리아 및 균류 또는 원생동물이 포함되어 있기 때문에 별로 바람직한 것 같지 않다(Gilbert, 1992).

그러므로 반추동물에게 섬유질을 용해하는 효소를 주입하는 잇점은 거의 고도 수준의 효소가 사용되었을 때만 그 실현을 기대해 볼 수가 있을 것이다.

오직 고도 수준의 효소정도일 때만이 반추에서 일어나는 자연적인 섬유질을 용해하는 활동을 증가시키는 데 충분한 정도로 급속히 가수분해되지 않는 것은 첨가된 효소의 약간의 비율만이 될 것이다.

이러한 접근방법은 그러나 비 실제적이며 비경제적이다.

효소로서 마초를 사전소화하는 것은 마초사일로에 저장되어 있는 동안 사료의 영양가를 높이고 보존하는 기술로 이용되어 왔다.

PCT 출원 번호 PCT/F191/00118(SSV-Development OY, 1991년 4월 18일에 출원된)는 사일로에 저장할 때 펙티나제(pectinase), 셀룰라제(cellulase), 크실라나제(xylanase), 아밀라제(amyase), 아라비노시다제(arabinosidase), 큐티나제(cutinase), 리파제(lipase) 그리고 에스테라제(esterase)로 이루어진 그룹중에서 선택한 하나 또는 그 이상의 섬유질을 용해하는 효소를 목초(수분함량 50%-75%)에 첨가하는 것에 대해 설명하고 있다.

이것은 세포벽의 사전소화와 그리고 더불어 락틱산박테리아의 생산성능력을 높이는 결과를 가져온다. 마초의 pH는 불필요한 박테리아 중의 번식을 배제하면서 4.0이하에서 4.5까지의 범위를 유지하게 된다.

이와 유사한 것으로 독일 특허출원 제 DD296407 A5는 사일로에 저장할 때 신선한 목초에 대하여 섬유질을 용해하는 효소 혼합체를 적용시키는 것을 설명하고 있다.

일본특허출원 제6,075,238호는 미생물번식을 하도록 진공패키징안에 저장된 고습도를 가진 사료에 효소 또는 미생물의 접종물을 투여하는 방법을 묘사하고 있다.

사료의 사전소화는 효소의 활동을 가능케하도록 요구되는 사료의 고습도(30% 보다 큰) 때문에 바람직하지 않다.

습한 사료는 원래 오염의 경향이 있고 곰팡이 성장에 의한 부패에 민감하기 때문에 늘 불안정하다. 나아가 고습도 내용물 때문에 사료의 증가된 중량은 또 이송을 불편하게 하며 과도한 습도는 가공 이전에 추가적인 건조공정을 요구하게 된다. 이러한 한계는 사료의 사전소화를 사료의 소화능력을 증가시키는 데 있어서 바람직하지 않은 접근방법이 되게 만든다. 그러므로 사료를 낮은 습도로 유지시키면서 사료의 소화능력을 증대시키는 것이 바람직하다.

위 또는 반추의 무기력으로 효소를 보호하는 기술이 또한 알려져 있다.

캐나다 특허출원 제1322159호(Ying, 1993년 9월 14일 등록사정)은 반추위 통해서 효소의 이동을

보장할 수 있도록 산 비용해 중합체로 효소를 감싸거나 코팅하는 방법을 설명하고 있다. 또 이와 유사하게 아미노폴리아미드수지코팅방법은 미국 특허 제3492398호에 의하여 잘 알려져 있다(Macro et al., 1970년 1월 27일 특허사정). 선택된 균류의 스트레인으로 부터 추출된 셀룰라제/크실라나제 사료첨가제는 가금에 대하여 흡수불량증후군을 치료하기 위해서 사용되어 왔다(PCT 출원 번호 PCT/DK90/00256(Novo Nordisk A/S 1990년 10월 5일 출원).

반추동물의 사료 소화능력을 증가시키기 위한 시도는 사료에 직접적으로 섬유질을 용해하는 효소를 첨가하거나 혹은 사료에 효소보충제를 투여하는 방법으로 제한된 성공을 거두며 시도되어 왔다.

종래기술에서 설명된 대부분의 보충제는 여러단계의 가공을 요하는 데 이를 테면 사료에 습기를 부여하고 열처리를 행하고 건조하고 또 다른 첨가제나 혹은 안정제를 투여하는 방법같은 것이다.

유럽특허출원 제88105409.2호(Suomen Sokeri, 1988년 4월 4일 출원)는 100°C이하의 온도에서 열작용과 효소가공이 적절하게 가해진 15%-60%사이의 수분함량을 가진 가축사료에 비공개의 효소 보충제를 첨가하는 것에 대해 언급하고 있다.

미국 특허출원 제5,314,692호(Haarasilta et al., 1994년 5월 24일 특허사정)는 아밀라제(amyloses), 셀룰라제(cellulase), 헤미셀룰라제(hemicellulase), 글루카나제(glucanases), 리파제(lipases), 프로티나제(proteinases) 또는 이와 유사한 것들의 집단으로부터 선택된 1-60%의 전체 효소와 소액분 또는 전분 40%-99%를 포함하고 있는 사전혼합된 열안정효소를 설명하고 있다.

효소 사전혼합물은 작은 알로 만들어지고 0.01-0.05%의 농도로 다른 사료와 혼합되도록 하였다. 효소 사전혼합물은 열에 안정적이고 사료가공온도에서 효소의 심각한 분해현상을 보이지 않는다.

영국특허출원 제2261877호(kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd 1992년 11월 18일자 출원)은 결체조직 파괴효소 및 적어도 밀크일드를 증가시키고 밀크질을 개선하며 성장을 촉진시키고 고기질을 향상시키고 양육효율을 증가시키는 하나의 필수아미노산을 포함하는 농축된 동물사료첨가제를 설명하고 있다.

독일특허출원 제 DD296407호 A5는 라이밀곡물의 기질에 균류의 푸른곰팡이의 성장하는 특수 스트레인 과정을 묘사하고 있다. 이 과정은 25% 이상의 습도 그리고 15°와 60° 사이의 온도에서의 사전가수분해를 포함한다.

결과로서 나타나는 효소복합체는 셀룰라제(cellulase), 헤미셀룰라제(hemicellulase), 아밀라제(amylose), 펙티나제(pectinase), 프로티아제(protease), 그리고 β -1, 4글루카나제(glucanase)를 포함된다. 이 물질은 사료 보충제로 제공하기 위해 뿜아진다.

Feng et al(1992, No.1)은 셀룰라제(cellulase), 크실라나제(xylanase) 그리고 헤미셀룰라제(hemicellulase)를 포함하는 특정되지 아니한 고도수준의 효소 혼합체를 건조한 성숙 목초 적용한 것이 시험관 건조물질(DM)과 중성세정섬유(NDF) 소화능력을 각각 12와 20퍼센트 증가시킨다는 것을 시사하였다.

낮은 수준의 셀룰라제와 헤미셀룰라제는 시험관에서의 DM 소화능력을 8%증가시켰다. 원래의 DM 그리고 NDF 소화능력은 측정되었으나 결과는 보고되지 않았는데 아무것도 아무런 효과가 관찰되지 않았기 때문일 것이다.

참조는 효소는 3개의 분류의 조합이 성숙한 마른 목초더미의 소화능력을 개선시키기 위하여서는 고도 수준에서일 것이 요구된다는 것을 보여주고 있다. 효소는 즉시 시험관에서 그리고 본래의 장소에서의 소화연구 바로 이전에 첨가되었다.

Feng et al.(1992, No.2)은 사료로 먹이기 바로 이전에 즉시 셀룰라제(cellulase), 헤미셀룰라제(hemicellulase) 그리고 크실라나제(xylanase)를 포함하는 상업적인 효소를 성숙한 건 목초에 적용하는 것을 설명하고 있다.

저자와의 개인적인 통신을 통하여 발명자는 사용된 효소 혼합체가 Grass-Zyme라는 볼리우는 상업적인 상품이며 이것을 셀룰라제, 헤미셀룰라제 그리고 크실라나제에 더하여 글루코스 옥시다제(glucose oxidase)나 아밀라제(amylose)같은 다른 종류의 효소를 포함하고 있다고 생각하게 되었다. 사전처리는 처리되지 아니한 건조와 관련하여 DM 섭취량을 12% 증가시켰다.

DM 그리고 NDF의 소화능력은 또한 효소 사전처리에 의하여 진보되었다. 원래의 NDF 소화율은 사료로 먹이기 바로이전에 직접적으로 효소 혼합체를 가진 사전처리건초에 의하여 증가되었다.

처리되지 아니한 건초가 사전처리된 건초를 소비하는 거세 숫송아지의 반추위인 원래의 장소에서 인큐베이트될 때에 아무런 이점이 없는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 효소처리가 부분적으로 반추에서의 효소활동의 증가가기 보다는 섭취 이전에 목초의 부분적인 소화라는 결과를 가져다 준다는 것을 시사하고 있다.

종래의 기술에 비추어 볼 때, 반추동물을 위한 곡물 그리고 콩과류 사료의 소화능력을 향상시키는 데 있어 효소 보충제의 필요성이 남아 있음이 명백하다. 그러한 보충제는 사료에 쉽게 적용할 수가 있어야 하며 복잡하거나 비용이 비싸거나 가공단계를 거치는 데 있어서 시간이 들지 않아야 한다. 이상적으로 말하면 그러한 첨가제는 사료의 가공을 상업적으로 받아들일 수 있는 형식으로 될 수 있도록 사료의 투여시간 가까이나 혹은 그보다 일찍이 사료에 첨가될 수 있어야 할 것이다.

그러한 보충제는 그러므로 사전소화되거나 혹은 사료를 가수분해하여서는 안될 것이며 오히려 사료 혼합체의 저장이나 보존이 잘 될 수 있도록 하면서 사료와 함께 안정된 혼합체로 존립되어야 한다.

보충제는 실제적이면서 동시에 경제적이기 위하여 낮은 또는 현대적인 효소수준에서 마초의 소화능력을 최적화하여야 할 것이다.

[발명의 상세한 설명]

발명자는 섬유분해효소가 특별한 비율과 활동수준일때, 즉 셀룰라제와 크실라나제 효소가 콩과류 마초와 곡물사료(사료물질)를 발명자가 발견한 방법에 의하여 처리될 때 놀랍게도 사료물질 소화능력과 동물성장 결과에 있어서 상당한 증대를 가져온다는 사실을 발견하였다.

바람직한 결과는 초과된 효소의 양이 적용되었을 때보다 오히려 특정의 바람직한 범위내에서 효소의 양이 이용될 때 달성된다.

사료물질소화능력과 동물의 성장을 개선하는 데에 크실라나제와 셀룰라제의 활동사이의 기대하지 못했던 시너지효과는 본 발명의 효소 혼합체의 적용으로 부터 결과로서 나타나는 사료물질소화능력과 동물 성장에 있어서의 개선이 단순한 크실라나제와 셀룰라제의 첨가가 별개로 적용되었을 때 보다도 커짐에 따라 시사되어져 왔다.

우수한 시너지 결과는 본 발명의 효소 혼합물이 발명자에 의하여 발견된 것과 다른 방법에 의하여 곡물에 적용되었을 때는 발견되지 아니하였다.

본 발명은 반추동물에 투여될 안정된 사료혼합체를 생산하기 위하여 섬유분해효소의 혼합체를 건조의 가공된 또는 미가공된 사료물질에 통합하는 방법을 제공하고 있다.

이러한 방법은 반추동물에게 투여될 사료의 소화능력을 제고시킨다. 본 발명은 섬유질분해효소의 특정한 혼합체를 포함하고 있는 효소 보충재와 그리고 본 발명의 방법에 따라 효소 보충재로서 사료를 가공함에 의하여 생산되는 사료 구성까지 연장되고 있다.

여기서 사용되는 반추동물은 소와 양, 염소, 사슴, 들소, 물소 그리고 낙타를 포함하고 있다.

사료물질의 증가된 소화능력은 수유와 밀크의 진보율, 좀더 효과적인 곡물 에너지의 고기와 우유로의 전환, 같은 생산량을 얻는데 드는 적은 곡물량으로 달성되는 향상된 동물 퍼포먼스, 높은 에너지 섭취를 요구하는 동물에 의하여 이루어지는 높은 곡물 섭취, 곡물 그리고 지방과 같은 보충 에너지의 필요성 감소 그리고 감소된 비료 생산과 같은 것으로 특징지워지는 증가된 동물퍼포먼스의 결과를 가져온다.

하나의 바람직한 구체적 실시예에서, 본 발명의 효소는 수용액에 용해되어 사료가공시에 건조 사료물질에 적용된다. 효소는 별개의 용액으로서 적용될 수도 있고 또는 효소 혼합체를 포함하는 단일용액으로 적용될 수도 있다. 바람직하게는 수용액은 4.5-7.0사이의 PH를 가진 약한 완충용액이다. 효소 수용액은 사료물질을 코팅하도록 그리고 사료물질위에 수용액을 평균적으로 배분하도록 사료물질에 적용된다.

통상적으로 효소용액은 사료물질이 효소용액의 배분을 복돋아주기 위하여 혼합되는 동안에 사료물질 위에 뿌려질 것이다.

효소는 사료물질을 미리 소화하거나 가수분해하지 아니하며 오히려 안정된 효소/사료 혼합체(사료구성)를 형성하면서 사료물질에 부착된다.

효소는 사료물질이 사료물질에의 비용해된 효소를 포함하는 수용액의 실질적인 흡수를 허용하도록 충분히 건조하기만 한다면 사료물질에만 부착할 것이다.

사료물질은 더 나은 흡수가 일어나도록 바람직하게는 15%(w/w)이하의 습기 내용물(수분 함량)을 가져야 할 것으로 결정되어져 있다.

습기가 증발하면, 동공들이 사료에서 형성되며 이 안으로 본 발명의 효소 보충재가 흡수되며 그로서 보충재는 습기자리를 차지하게 된다.

만약 사료의 습기 내용물(수분 함량)이 실질적으로 15% 위라면, 효소 보충재는 사료에 흡수되지 아니할 것이다. 나아가, 만약 사료의 수분 함량이 대략 18%-20%를 상회한다면, 그것은 공팡이 상해를 일으키는 것이 쉬울 것이다.

들판에서 건조된 콩류사료 또는 곡물사료는 전통적으로 대략 12%의 수분 함량을 가지고 있다.

효소 수용액의 흡수 그리고 안정된 효소/사료혼합체의 형성은 5°C와 80°C 사이의 온도에서 적어도 3시간 더욱 바람직하게는 적어도 8시간 동안 효소 수용액으로 사료를 숙성시키는 것이 요구된다. 결과로서 나타나는 효소/사료 혼합체는 적어도 1년간 안정하다.

이러한 사료물질은 가공후나 전에 롤링(rolling), 초핑(chopping), 템퍼링(tempering), 그라인딩(grinding), 그랙킹(cracking), 포핑(popping), 익스트루딩(extruding), 마이크로나이징(micronizing), 로스팅(roasting), 플레이킹(flaking), 쿡킹(cooking) 또는 익스플로딩(exploding)에 의하여 가공되거나 가공후에 펠리팅(pelleting), 큐빙(cubing) 그리고 베링(baling)에 의하여 가공된다. 사료물질은 콩과류, 견초, 곡식 잔류물 그리고 곡물을 포함한다.

효소 보충재는 특정한 바람직한 비율과 농도의 셀룰라제와 크실라나제를 포함하고 있다. 그것은 또 펙티나제(pectinases), 에스터라제(esterases), 아라비노시다제(arabinosidases) 그리고 β -1, 3글루카나제(glucanases)를 포함할 수 있으나 프로티아제(proteases), 리파제(lipases) 또는 아밀라제(amyloses)를 요구하지 않는다. 셀룰라제와 크실라나제는 넓게 질량수으로 정렬된 셀룰라제와 크실라나제들로서 구성되어 있으며 바람직하게는 미생물 원천으로부터 표준화된 활동도 수준에서 적용된 것들로 구성되어 있다.

셀룰라제의 활동은 여과지 분해의 기초로 표준화되었으며 여과지 단위(FPU)활동(분당 단위효소당 여과지부터 생산된 μ moles 글루코스)으로 표시된다.

크실라나제 활동은 오프 스피트 크실란의 크실로스로의 가수분해에 기초하고 있으며 국제단위(IU)(분당 ml 당 단위효소당 생산된 μ mole 분해당)으로 표시된다. 셀룰라제와 크실라나제 활동을 결정하는 분석은 실시예 6, 7 그리고 8에서 설명되어 있다.

위에서 논한 바와 같이 셀룰라제의 활동은 외향 셀룰라제를 언급하고 있으며 그리고 FPU들로 측정된다. 본 발명에 따른 셀룰라제로서 역시 적절히 사용되는 내향 셀룰라제는 실시예 7에서 설명된 바와 같이 IU들로 측정된다. 내향 셀룰라제 25 IU의 활동은 1 FPU 외향 셀룰라제 활동과 동일하다.

사료 혼합체를 생산하는 묘사된 방법은 셀룰라제와 크실라나제가 사료의 소화능력과 동물 퍼포먼스를 최대화시킬 수 있도록 100 IU 크실라나제당 대략 2 그리고 5 FPU 셀룰라제 사이의 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율을 제공하기에 충분한 양으로 사료 혼합체에 제공되어 있을 때 가장 효과적이다.

발명자는 섬유질소화와 동물퍼포먼스의 증가는 사료물질에 첨가되는 효소의 전체량(사료건조물질 매Kg마다 전체효소활동으로서 표현됨)과 그리고 크실라나제에 대한 셀룰라제의 관련비율에 의존하고 있음을 발견하였다.

효소농도와 동물반응사이의 관계는 비선형이며 콩류마초사료와 곡물사료에서 서로 다르다는 것이 발견되었다.

자주개자리와 같은 콩과류마초인 경우 매 건조 Kg당 16-120 보다 바람직하게는 18-72 FPU 셀룰라제 그리고 800-6000 사이 보다 바람직하게는 900-3600 IU 크실라나제의 효소농도가 퍼포먼스를 최대화하고 있다.

곡물사료의 경우는 동물의 최대 퍼포먼스는 사료건조물질 Kg당 10-200에서 보다 바람직하게는 40-160 FPU 셀룰라제 그리고 500-10,000 사이에서 보다 바람직하게는 2000-8000 IU 크실라나제의 효소농도에서 얻어진다.

또 다른 넓은 면에서 본 발명은 특수한 반추동물의 사료 혼합체까지 연장된다. 광범위하게는 사료 혼합체는 안정한 사료/효소혼합체를 제공하기 위하여 셀룰라제와 크실라나제의 혼합체와 밀접한 관계에 있는 저습도 내용물(저수분 함량) 사료로 이루어져 있다.

사료 혼합체에서 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율은 바람직하게는 100 IU 크실라나제 당 2-5 FPU 셀룰라제이다.

하나의 구체적 실시예에서 사료 혼합체는 안정된 효소/사료 혼합체인데 여기에서 효소는 바람직하게는 매 사료 Kg당 60-120 보다 바람직하게는 18-72의 FPU 셀룰라제 활동과 800-6000 보다 바람직하게는 900-3600 IU 크실라나제 활동을 제공하며 그리고 여기에서 사료물질은 건조의 콩과류마초이다.

또다른 바람직한 실시예에서는 사료 혼합체는 안정한 효소/사료인데 여기에서 효소는 바람직하게는 매 사료물질 Kg당 10-200 그리고 보다 바람직하게는 40-160 FPU 셀룰라제 활동과 500-10,000 그리고 보다 바람직하게는 2000-8000 IU 크실라나제 활동을 제공하며 여기서 사료물질은 건조한 곡물사료이다.

이러한 사료 혼합체는 숙성되고 알갱이로 형성되고 초프(chopped), 베일(baled), 롤(rolled), 템퍼드(tempered), 그라운드(ground) 크랙(cracked), 팝(propped), 익스트루드(extruded), 마이크로나이즈(micronized), 로스트(roasted), 플레이크드(flaked) 쿡(cooked) 또는 익스플로드(exploded)의 형태가 된다.

또 다른 구체적 실시예에서 본 발명은 전술한 방법에서 사용될 수 있는 효소 보충재와 사료 혼합체를 공급한다. 효소 보충재는 셀룰라제와 크실라나제의 혼합체인데 여기서 효소는 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제의 비율이 100 IU 크실라나제당 2-5 FPU 셀룰라제이도록 하는 양안에 포함되어 있다. 효소 보충재는 사료물질에로의 적용을 위하여 수용액에 용해될 것이다. 바람직하게는 수용액은 4.5-7.0사이의 PH를 가진 약한 완충용액이 될 것이다.

위에 구축됨이 없이 발명자는 효소 보충재에 제공된 크실라나제와 셀룰라제사이의 시너지스틱 관계를 일으키는 본 발명에 의한 메카니즘이 이러한 효소의 단순한 섬유질을 용해하는 활동의 결과로서 생겨나는 것이 아님을 믿는다.

여기 실시예에서 시사된 사료변환비율(건조물질섭취(DMI)/평균 매일 얻음(ADG))에서의 개선은 콩과류마초와 곡물사료안에 포함된 전체섬유질의 비율적으로 적은 양에 너무나 큰 관련성이 있어서 적용된 낮은 수준의 효소활동에 그 원인이 있다고는 할 수 없다.

어떤 사람은 만약 고도 효소수준이 목초에 적용된다면 사료 소화능력에서의 진보가 가능하다고 기대할 지도 모른다(Feng et al., 참조에서 보는 바와 같이). Feng et al.에 의하여 테스트된 것과 같은 목초는 콩과류마초와 곡물사료보다도 전체 섬유에서 더 높았다. 대략 건조더미에서의 전체섬유질의 약 50%는 헤미셀룰로스(예를들면 크실란)였다. 건조더미의 전체섬유질 중 남아 있는 50%는 리그닌과 셀룰로스(Van Soest, 1982)이다.

예를 들어 태양 건조한 티모시건초(국제 참조 번호 1-04-885)같은 것은 29%의 헤미셀룰로스와 34%의 셀룰로스(National Research Council, 1982)로 구성된 전체 섬유 70%를 포함하고 있다.

위에서 설명한 바와 같이, 콩과류마초와 곡물사료는 건조더미는 그것과는 다르다. 자주개자리와 같은 콩과류마초(국제 참조 No. 1-00-068)는 11%의 헤미셀룰로스와 28%의 셀룰로스로 이루어진 50% 전체 섬유질을 포함하고 있다. 콩과류마초가 건조더미보다 비율적으로 낮은 헤미셀룰로스를 포함하고 있으므로 콩과류마초를 셀룰라제와 크실라나제로 보충하는 것은 반추동물에서의 성장을 또는 사료소화능력을 상당한 정도로 진보시킬 것이라는 것은 기대할 수 없다.

이와 유사하게 보리(국제 참조 No. 4-00-549)같은 곡물사료는 상대적으로 작은 양의 섬유질(19%의 전체 섬유질 중 5%는 헤미셀룰로스)를 포함하고 있는데 그것들은 반추에서 급속하게 소화된다.

곡물사료에서 높은 규정식을 소화하는 반추동물은 효소 보충재로부터 상당한 정도의 잇점을 얻는다고 기대할 수는 없을 것이다.

목초마초는 콩과류마초와 형태적 구조로나 혹은 화학적 구성에 있어서 서로 다르다.(Nelson et al., 1994). 목초의 낮은 구조적기능 그리고 신진대사기능을 제공하는 반면에 콩과류에서의 낮은 오직 신진대사의 기능만을 제공한다.

곡물사료의 형태학상의 구조는 곡물에서의 상대적으로 작은 섬유량이 껍데기에 위치하고 있으며 딱딱한 배전을 둘러싸고 있다는 점에서 목초더미와는 매우 다르다.

목초의 영양가를 높이는 사전소화의 방법은 콩과류마초의 영양가를 높이는 데에는 결코 효율적이지 않다. 예를 들면 단자엽곡물잔류물로 실시한 24h 연구에서 DM 섭취량은 수산화 나트륨 가공의 결과로 22% 증가되었는데 이에 대해 쌍떡잎식물 곡물잔류물의 두 연구에서 DM 섭취량은 단지 6%만 증가하는 것으로 나타났다(Berger et al., 1994).

목초와 콩과류마초의 셀룰로스 구성은 일반적으로 유사하다. 그러나 콩과류마초와 관련하여 목초의 셀룰로스는 크실란-리그닌 연대의 높은 농도를 가지고 있다. 콩과류마초에서는 폴리사카라이드(크실란과 셀룰로스) 그리고 리그닌들은 더욱 엄격하게 구획되어 있다.

결과적으로 리그닌은 목초에서 보다도 콩과류마초에 있어서 섬유질소화에 커다란 장애로서 기능하게 된다. 섬유질화학에 있어서의 상기와 같은 차이점은 목초로 하여금 콩류사료보다도 더 화학가공에 더욱 반응하게 한다.

건초더미의 영양가를 증가시키는 효소의 가공은 콩류사료나 혹은 곡물사료에 있어서 효과적인 것으로 기대되지 않는다. 통상의 목초에서 헤미셀룰로스 : 셀룰로스의 비율은 콩과류에서 0.57-0.70 대 0.32-0.40 이다.

콩과류마초에서 주요한 헤미셀룰로스의 폴리사카라이드는 아라비노크실란, 크실로글리칸, 아라비난 그리고 갈락탄인데 대해 목초에서의 주요한 헤미셀룰로스의 폴리사카라이드는 크실로글루칸과 아라비노크실란이다.

크실로스는 목초헤미셀룰로스에서는 30%의 당으로 구성되며 콩과류마초헤미셀룰로스에서는 20%의 당으로 구성된다. 콩과류사료의 헤미셀룰로스가 목초의 헤미셀룰로스보다도 더욱 복잡한 당복합체로 구성되어 있기 때문에 섬유질을 용해하는 효소의 좀더 복잡한 구조가 콩류사료의 헤미셀룰로스의 분해를 위하여 요구된다.

전술한 바와 같이 종래기술의 노력에 기초하여서 반추가 높은 단백질가수분해의 환경이기 때문에 그리고 이미 고효율 섬유질효소를 생산하는 미생물의 높게 진화된 것을 가지고 있기 때문에 특히 낮은 전체 섬유질내용물을 가지고 콩과류마초와 곡물사료에 있어서 매우 높은 고수준의 섬유질을 용해하는 효소가 사료물질의 소화능력을 실질적으로 증가시키도록 하는 것이 요구된다.

상대적으로 전체 섬유질의 작은 비율을 제공하는 콩과류마초와 곡물사료는 목초보다도 소화능력에 있어서 진보를 나타내 보이는 것 같지 않다.

앞에서 언급한 것에도 불구하고 발명자는 상대적으로 낮은 효소첨가수준에서 콩과류마초와 곡물사료소화능력의 실질적인 진보를 시사하여 왔다.

보리사료곡물에 있어서 관찰된 사료전환비율은 곡물의 전체 섬유요소의 소화능력에서 2배를 암시하면서 12%(보기에서 표3)로 증가하였다. 자주개자리(콩과류마초)에 있어서 관찰된 사료전환비율은 전체 섬유소화능력의 실질적인 증가를 가리키면서 17%(가공되지 아니한 케이의 경우 9.92 Kg 사료/Kg, 건초 매 Kg당 3600IU 크실라제 와 148 FPU 셀룰라제로서 처리된 자주개자리의 경우 8.48Kg 피드/Kg)로 증가하였다.

소화능력에서의 이러한 놀라운 진보는 첨가된 셀룰라제와 크실라나제의 단순한 첨가 효소효과로부터 결과되어진 것은 아닐 것이다. 위에 구속됨이 없이, 발명자는 본 발명의 효소 보충제는 처리된 사료 입자위의 반추의 박테리아를 위한 부착장소를 창출하고 그래서 고유의 반추위 박테리아에 의한 사료입자의 연속적인 소화와 콜로니를 향상시킨다고 믿는다.

사료로서 유용하게 쓰이기 위하여 식물은 들에서 성장하는 동안 박테리아의 공격에 저항하지 아니하면 안되며 그러나 침투나 콜로니 형성 그리고 반추내에서 미생물에 의한 소화에는 약하여야만 한다고 알려져 왔다.

들에서 박테리아의 공격에 대하여 방어를 하는 물질 그리고 보호장애물(예를 들면 큐티클이나 혹은 페놀산)은 반추위내에서 식물물질의 소화를 방해하게 된다. 반추의 미세조직은 이러한 방어를 예를 들면 기공같이 비교적 방어가 낮은 식물의 조직을 통하여거나 혹은 씹거나 혹은 기계적 과정을 통한 보호장애물의 파열을 통해서 이러한 방어를 우회하게 된다.

한번 접근이 성공하면 반추 박테리아는 내부조직에 부착하고 생물학적 막을 형성하며 소화를 개시하게 된다. 최초의 콜로니아저는 소화상품을 방출하는 데 이것은 차례로 추가의 박테리아를 소화의 장소로 유인하여 내부의 식물조직을 소화할 수 있는 박테리아의 복잡한 콘소시엄을 구성한다.

그래서, 반추위에서의 사료의 소화가 내부로부터 진행되는 데 사료물질의 소화의 비율과 정도는 가끔 반추의 미세조직이 내부조직을 액세스할수 있는 범위에 의하여 말해진다(McAllister et al., 1994).

본 발명의 효소 보충제는 사료물질에 흡수되는데 여기서 그들은 단백질 가수분해의 반추 환경에서 용해될 가능성으로부터 보호된다. 발명자는 사료물질의 내부에서 효소가 반추의 미생물에 의한 최초의 콜로니를 위한 부착장소를 창조한다고 믿는다.

그것은 또한 더 높은 효소처리수준은 비효율적이라는 가설을 세울 수 있는데 왜냐하면 형성된 부착장소는 섬유질 효소의 과도한 량 때문에 깨지게 된다. 초과 효소미립자는 부착장소의 위에서 묶어서 미생물의 부착과 활동에 장애물을 생성하게 된다.

발명자의 놀라운 발견은 매우 유용한 것으로 그것은 사료물질에 전체 섬유질 소화능력에 진보를 가져다 준다는 것인데 이것은 그렇지 않으면 상대적으로 단순하고 편리한 방법으로 적용된 매우 특정한 비율과 활동에서 비용대비 효과적인 효소의 양을 사용한 효소처리에 대해 상대적으로 무반응할 것이기 때문이다.

본 발명은 건공류사료와 건곡물사료가 반추동물에 투여될 때 이의 소화능력을 향상시키기 위한 효소 보충재를 제공하며 또한 안정된 효소/사료 복합체를 형성하도록 하기 위하여 효소 보충재로서 공류사료와 곡물사료를 처리하는 방법을 제공하고 있다.

여기서, "건조한"이라는 단어는 사료에 적용되는 것으로 15%(W/W)이하의 습도내용을 가진 사료물질을 말하는 것이다.

여기서 콩과류마초라는 것은 잘라진 그리고 저장된 동물의 사료로서 사용되는 식물의 공기지점을 뜻하는 것으로 이것은 식물의 분류학상 Leguminosae에 속하는 쌍떡잎 식물종이다. 예를 들어 제한없이 자주개자리, 사인포인, 클로버, 베치등을 포함하고 있다. 콩과류마초는 Leguminosae에 속하는 식물물질 50% 이상과 그리고 49% 이하의 다른 종의 식물물질로 구성되는 마초를 포함한다.

여기서 사용되는 곡물사료는 종자의 껍질을 포함하거나 혹은 포함하지 아니한 것으로 통상적으로 반추동물에게 투여되는 식물의 씨앗을 뜻한다. 곡물사료의 예로서는 제한없이 보리, 밀, 옥수수, 사탕수수, 라이밀, 호밀, 카노라, 소야콩을 포함한다.

여기서 사용되는 셀룰라제는 셀룰로스로부터 당을 용해하는 효소이며 크실라나제는 헤미셀룰로스부터 당을 용해하는 효소를 말한다.

여기서 사용되는 사료물질은 콩과류마초와 곡물사료를 뜻한다.

여기서 사용되는 "안정한"이라는 것은 본 발명의 사료구성에서 적용되고 있는데 크실라나제와 셀룰라제가 활동상태로 남아 있으며 사료물질은 곰팡이 슬거나 썩거나 사전 삭임이 진행되거나 그렇지 않으면 처리후 최소한 대략 1년동안 부패하지 않는 것을 말한다.

여기서 사용되는 "코팅"이라는 것은 사료물질에 적용되는 효소용액에 적용되고 있는데 효소용액이 실질적으로 공평하게 사료물질에 배분되는 것을 뜻한다.

효소용액의 사료물질에의 적용범위는 비연속적이다. 그러나 평균적으로 효소용액의 배분은 실질적으로 일정하다.

효소 보충재는 특정한 비율과 농도에 있는 셀룰라제와 크실라나제를 포함한다. 그것은 또한 펙티나제(pectinases), 에스테라제(esterases), 아라비노시다제(arabinosidases) 그리고 β 1-3 글루카나제를 포함하고 있다. 프로테아제(proteases), 리파제(lipases) 또는 아밀라제(amylases)는 요구되지 않는다.

효소 보충재는 크실라나제와 셀룰라제가 효소활동과 농도의 바람직한 비율로 제공되었을 때 사료 소화능력을 향상시키는 데 매우 효과적인 것으로 결정되어져 왔다. 여기서 사용되는 농도는 사료물질에 첨가되는 효소의 농도를 언급한것으로 이는 효소 보충재로 처리된 사료물질로 구성된 사료 혼합체의 건조물질 매 Kg당 효소의 활동수준을 뜻한다.

셀룰라제의 활동은 여과지 분해에 근거하여 표준화되며 여과지단위(FPU) 활동(분당 단위효소당 여과지부터 생산된 μ mole 글루코스)으로 표시된다. 크실라나제 활동은 오투스펠트 크실라나 크실로스로의 가수분해에 기초하며 국제단위(IU)(분당 ml 당 생산된 μ mole 분해당)로 표시된다.

셀룰라제와 크실라나제활동의 분석은 실시예에서 설명된다.

셀룰라제와 크실라나제가 바람직한 비율과 농도 범위내에서 효소 보충재에 실재하고 있을 때 효소 보충재로 처리된 사료물질의 소화능력에 대한 셀룰라제와 크실라나제의 활동사이의 시너지 효과가 관찰된다. 소화능력에 있어서 결과로서 나타나는 개선점은 개별적으로 셀룰라제와 크실라나제로 사료를 처리함에 의하여 기대되는 소화능력의 진보에 의하여 예견되는 것보다 크다. 시너지효과는 셀룰라제와 크실라나제가 본 발명에서 제공하는 것보다 위나 또는 아래의 범위에서의 비율과 농도에서의 효소 보충재에 제공된 셀룰라제와 크실라나제인 경우에는 발견되지 아니하였다.

자주개자리건초와 같은 콩과류마초의 경우, 처리된 사료물질의 소화능력에 있어서의 최대개선은 셀룰라제와 크실라나제가 효소 보충재가 100 IU 크실라나제 당 2-5 FPU 셀룰라제의 비율에 현재할 때 관찰되었다.

효소 보충재에서의 셀룰라제와 크실라나제 활동의 바람직한 양은 본 발명의 방법에 따라 건조한 콩과류마초에 적용될 때 건조물질 Kg당 16에서 120 보다 바람직하게는 18-72, FPU 셀룰라제 활동 그리고 800에서 6000 보다 바람직하게는 900에서 3600 IU 크실라나제 활동이다.

곡물사료의 경우 크실라나제에 대한 최적의 셀룰라제는 100 크실라나제 당 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제이다. 효소 보충재는 바람직하게는 100-200 그리고 바람직하게는 40-60 FPU 셀룰라제 활동 그리고 500-10000 보다 바람직하게는 매 사료 건조물질 Kg당 2000-8000 IU 크실라나제를 제공하기 위한 충분한 양의 셀룰라제와 크실라나제를 포함하고 있다.

사료물질의 원하는 시너지 효과의 개선을 달성하기 위하여 셀룰라제와 크실라나제 효소는 특정한 절차와 파라미터로서 사료물질에 적용되어야 한다.

그러므로 본 발명은 사료물질의 소화능력을 향상시키기 위하여 효소로서 사료물질을 처리하는 방법까지 연장된다.

크실라나제와 셀룰라제의 개선된 소화능력과 시너지 효과는 효소가 pH 4.0과 그리고 7.0 사이에 있는 수용 완충용액에서 용해될 때 최대화된다. 효소는 별개의 용액이 될 수 있는데 바람직하게는 혼합물

로 그리고 또 하나의 수용액이 될 수 있다.

수용액은 5°C 및 80°C 사이의 공기온도에서 약 15% 이하의 습기 내용물(수분함량)을 가진 건조사료물질에게 평균적으로 적용된다. 습기를 가진 사료물질은 그런다음 최소 3시간동안 인큐베이트되며 보다 바람직하게는 결과로서 생기는 사료/효소 혼합체(사료혼합체)를 안정화 하기 위한 목적으로 최소 8시간동안 인큐베이트된다.

본 발명에 따른 콩과류마초와 곡물사료의 처리는 효소처리 이전과 이후에 발생할 수 있는 여러 가지 전통적인 사료처리단계와 조화될 수 있다. 그러한 공정단계는 제한없이 사료를 템퍼링, 프롭핑, 로스팅, 쿠킹, 익스플로링 하는 것을 포함한다. 만약 가공단계가 사료를 효소 보충재가 사료물질에 흡수되도록 하는 것을 금지시키는 사료의 압밀 또는 조밀의 과정이라면 바람직하게는 효소처리는 가공이전에 수행된다.

그러한 가공단계는 제한없이 사료를 펠리팅, 큐빙 그리고 베링하는 것을 포함한다. 가공단계가 높은 온도를 포함하고 있을 때 효소는 바람직하게는 가공후에 적용된다.

본 발명의 방법에 따라 사용된 셀룰라제와 크실라나제는 분말 형태건 수용형태건 모두 바람직하다. 만약 수용형태라면 4.5-7.0 사이의 pH에서의 수용완충용액에 녹아있는 것과 같이 바람직하게는 효소는 수용액으로 제공될 것이다.

본 발명의 방법에 따르면, 콩과류마초와 곡물사료는 바람직하게는 15%보다 적은 습도 내용을 가지는 건조한 상태로 제공된다.

황야의 건조법이 건조의 그러한 수준을 달성할 수 있지만 추가의 곡물건조기나 그밖의 건조기에 서의 건조도 필요할 것이다. 콩과류마초 또는 곡물사료의 집단과 관련하여 충분한 분말의 또는 액체의 크실라나제 그리고 셀룰라제는 매 Kg의 사료물질당 셀룰라제와 크실라나제의 원하는 활동수준과 크실라나제에 대한 셀룰라제의 원하는 비율을 제공하기 위하여 물이나 완충용액에서 희석될 수 있다.

효소는 별개로 추가될 수도 있으며 또는 특정한 형태의 비율에서 미리 혼합된 형태로 제공될 수 있다. 효소를 희석시키기 위해 사용될 물이나 완충용액의 부피는 사료의 습기 내용물(수분함량)을 대략 15-18%를 상회하도록 그렇게 많은 부피를 사용하지 않는 한 그다지 그렇게 중요한 것은 아니다.

희석된 효소용액은 사료물질위에 배분(예를들면 스프레이)되게 공평하게 적용된다. 처리된 사료 혼합체는 그런다음 바람직하게는 5°C 그리고 80°C사이의 온도에서 최소 3시간 동안 인큐베이트되며, 더욱 바람직하게는 효소가 사료물질에 흡수되고 고착하도록 또 초과 습기가 증발되도록 그리고 또 안정된 사료/효소혼합체가 형성되도록 최소한 8시간동안 인큐베이트한다. 결과로서 나타나는 사료 혼합체는 최소 1년간 안정하게 유지된다.

나아가 본 발명의 특정한 형태의 구체적 실시예와 용도는 아래의 제한없는 실시예에 의하여 나타난다.

[도면에 관한 간단한 설명]

도 1은 매 Kg 사료물질당 효소활동 수준의 기능으로서 건조한 자주개자리 마초의 규정식이 제공되는 거세한 소의 매일당 Kg에서의 평균 매일 얻음(ADG)을 그린 그래프이다. 오직 크실라나제 수준만이 보이고 있다. 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제의 비율은 매 100 IU 크실라나제 활동당 4 FPU 셀룰라제 활동에서 일정하다.

도 2는 매 Kg 사료물질당 효소활동수준의 기능으로서 건조한 티모시마초의 규정식이 투여된 거세한 소의 매일당 Kg에서의 평균 매일 얻음(ADG)을 그린 그래프이다. 오직 크실라나제 수준만이 보이고 있다. 크실라나제활동에 대한 셀룰라제의 비율은 매 100 IU 크실라나제 활동당 4 FPU 셀룰라제 활동에서 일정하다.

도 3은 매 Kg 사료물질당 효소활동수준의 기능으로서 건조한 보리 저장사료의 규정식이 제공된 거세한 소의 매일당 Kg에서의 평균 매일 얻음(ADG)을 그린 그래프이다. 오직 크실라나제 수준만이 보이고 있다. 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제의 비율은 매 100 IU 크실라나제 활동에 대한 4 FPU 셀룰라제 활동에서 일정하다.

도 4는 효소비율 2세트에서 효소 보충재의 셀룰라제 : 크실라나제 활동 비율의 기능으로서 반추위 용액에서 인큐베이트 되는 건조한 자주개자리 건조의 중성제체섬유질(NDF)의 사라짐을 그린 그래프이다.

도 5는 1U 크실라나제 : 1 FPU 셀룰라제로서 표현된 효소 보충재의 셀룰라제 : 크실라나제활동비율과 건조사료 Kg당 1U 크실라나제 활동으로서 표현된 첨가된 효소 수준의 기능으로서 반추위용액에서 인큐베이트된 건조한 자주개자리 더미의 3부분의 NDF 사라짐을 그린 그래프이다.

도 6은 효소처리후 효소처리된 자주개자리의 부화시간의 기능으로서 반추위용액에서 인큐베이트된 건조한 자주개자리건초의 건조물질소화능력(NDF 사라짐)을 그린 그래프이다.

[실시예]

[실시예 1]

건조 콩과류마초에 대한 크실라나제 그리고 셀룰라제의 특정비율의 적용은 개선된 동물퍼포먼스의 결과를 가져온다.

무게가 300 Kg(235Kg-367Kg 범위 사이)이 나가는 72마리의 성장 거세소를 각각의 축사에 가두어 두고 3개의 마초를 배정하였다(24마리씩/각 규정식당).

1. 자주개자리 건조

2. 티모시 건초

3. 보리저장사료

이 3개의 마초는 3가지 마초 규정식을 대표하도록 선택되었는데 각각 콩류건초(자주개자리), 목초건초(티모시) 그리고 목초저장사료(보리 사료)이다. 각각의 규정식에는 상업적인 엑소셀룰라제(Spezyme CP, Genencor, Rochester, NY) 그리고 크실라나제(Xylanase B, 효소발전회사, New York, NY)의 수성혼합체의 등급된 수준이 3 X 6 팩토리얼 배열 (3 규정식 X 6 효소농도)로 첨가되었다. 각 규정식에는 4마리의 동물의 각 효소수준(n=4)에 배정되었다. 효소는 여러 가지 수준(표 1)으로 큐빙과정동안에 자주개자리와 티모시건초에 첨가되었다. 효소는 먹이주입전 최소 7일동안에 사료에 적용되었다. 보리사료에는 효소가 적당한 농도로 투여되어 먹이투입에 앞서서 혼합되었다.

단백질/미네랄 보충제는 최소 12%의 원 단백질, 적당한 반추비분해 프로틴, Ca, P 그리고 미세 미네랄(NRC, 1984)을 제공하기 위하여 각 다이어트에 첨가되었다. 왜냐하면 자주개자리의 큐브의 원 단백질 내용물은 실질적으로 티모시큐브 또는 보리사료의 그것보다 크기 때문에 또 이러한 동물의 단백질 섭취는 더 크나 반추의 분해되지 아니한 단백질은 거의 유사하기 때문이다.

동물들은 1000 h에 매 일일당 사료가 주입된다. 사료허용은 자발적인 섭취를 초과하여 5%-10%이다.

동물은 7 또는 14-d 주기로 0800 h에 무게가 재어진다. 개별적인 자발적인 사료섭취는 실험을 통하여 결정된다. 건초큐브를 받은 동물은 손으로 먹여진다. 보리사료를 받은 동물은 자동 사료믹서를 사용하여 먹여진다. 사료거부는 수거되어 매 월, 수, 금에 투여되기에 앞서서 무게가 재어진다. 매주의 거부 혼합물은 건조물질(DM)을 결정하기 위하여 72h 동안 55°C에서 건조된다.

평균 매일의 얼음(ADG)는 선행의 후퇴에 의하여 생체중으로부터 계산된다. 데이터는 주요소로서 규정식과 효소첨가라는 것으로 변수의 두가지 분석을 하게 된다. 일관적인 규정식 x 효소 상호작용 때문에 효소효과는 각 사료안에서 주요소로서 효소첨가라는 변수로서 그리고 이에 협력하는 변수로서 최초의 중량으로 일반분석을 하게 된다.

다음의 비직각대조가 테스트되었다. 즉 낮은 효소 수준(수준 1, 2 그리고 3) 대 조절과 높은 효소수준(수준 5) 대 모든 다른 효소수준(조절-제로 효소).

마초의 화학적구성은 표2에서 요약된다. 섬유를 용해하는 효소의 첨가는 콩과류사료는 해당되지 아니하지만 목초의 섭취이전에 부분적인 섬유질 가수분해를 가리키면서 자주개자리에 해당되지는 않고 티모시 큐브에서 NDF 그리고 ADF를 약간 감소시킨다. 평균매일얼음은 자주개자리(P=.15)와 티모시큐브(P=.0.65)의 경우 효소의 첨가에 의하여 증가되었으나 보리저장사료(표 1)의 경우는 해당되지 아니하였다(P=.67). 그런데 효소첨가에 대한 반응은 비선형이었다(도 1, 2 그리고 3 참조).

콩과류사료인 자주개자리의 경우, ADG는 낮은 수준의 섬유를 용해하는 효소로 증가하였다. 고수준의 섬유질을 용해하는 효소는 비효율적이다. ADG에서의 최대의 반응은 kg DM(도 1) 당 3600 IU에서 관찰되었다. 이 수준에서 ADG는 조절(1.34 대 1.03 kg/d)보다 상당히 더 높았으나(P=.021) 고수준에서는 ADG와 유사(P=.57)하였다. 조절에 대해서 상호 대비되었을 때 3개의 낮은 효소농도는 ADG를 증가(P=.015)시켰다.

목초인 티모시의 경우, ADG에서의 최대반응은 가장 높은 효소농도(12,000 IU 크실라나제/kg DM)(도 2)에서 일어났다. 이 수준(1.66 kg/d)에서의 ADG는 조절(1.22 kg/d) 그리고 모든 낮은 효소수준보다도 더 높았다(P<.01). 티모시건초의 결과는 종래기술에서 관찰된 것과 일관성을 가진다.

기대된대로 마초(표 1)중에서 현저하게 서로 다른 (P<.001) DM 섭취("DMI")는 보리저장사료에서 가장 낮았으며 자주개자리에서 가장 높았다. 효소 첨가제는 자주개자리(P=.60) 또는 보리저장사료(P=.23)의 DMI에 영향을 주지 않았다. 티모시의 경우 효소의 가장 높은 농도를 받은 동물을 조절이나 모든 다른 효소수준의 그것들보다도 높은(P=.043) DMI를 가진다. 반대로 보리저장사료를 투여받은 동물은 먹이투여이전에 막 첨가된 섬유를 용해하는 효소로부터 아무런 이점을 얻지 못하였다(도 3).

[표 1]

각각 다른 마초를 소비하는 거세 숫소에서 평균매일얼음(ADG ; kg/d)과 건조물질섭취(DMI ; kg/d)에서의 효소 수준의 효과

효소수준	마초					
	자주개자리		티모시		보리저장사료	
	ADG	DMI	ADG	DMI	ADG	DMI
0	1.03	10.2	1.22	8.8	1.11	7.4
900 IU* 37FPU**	1.27	10.8	1.31	8.3	1.16	8.2
1,800 IU 74 FPU	1.28	10.6	1.12	7.5	0.99	6.8
3,600 IU 148 FPU	1.34	11.5	1.24	9.3	1.03	7.9
7,200 IU 296 FPU	1.19	11.1	1.27	8.6	1.11	7.0
14,400 IU 592 FPU	1.11	10.3	1.66	9.4	1.12	7.4

*IU = kg건조물질당 크실라나제의 국제단위

**FPU = kg DM 당 셀룰라제의 여과지 단위

[표 2]

각각 다른 효소수준으로 처리된 자주개자리와 티모시와 티모시에 있어서 산세정섬유(ADF) 및 중섬세정섬유(NDF)

kg 건조물질당	자주개자리		티모시	
효소수준	ADF(%)	NDF(%)	ADF(%)	NDF(%)
0	29.8± 1.0	44.7± 1.6	28.2± 0.3	55.5± 1.1
1800 IU 크실라나제 74 FPU 셀룰라제	32.2± .03	44.1± 0.1	26.3± 0.0	53.6± 0.1
14400 IU 크실라나제 592 FPU 셀룰라제	28.4± 3.0	42.6± 4.0	26.0± 0.5	52.8± 0.8

[실시에 2]

건조물사료에 대한 크실라나제와 셀룰라제의 특정한 비율의 적용은 개선된 동물 퍼포먼스 결과를 가져온다.

410Kg 나가는 19마리 거세황소가 각각의 우리에 저장되어 있고 각각 3개의 가축사육장 규정식이 배정되었다.

1. 보리곡물 - - - 효소없음
2. 6000 IU 크실라나제와 Kg/DM 당 200 FPU셀룰라제를 가진 보리곡물
3. 2400 IU 크실라나제와 Kg/DM 당 420 FPU셀룰라제를 가진 보리곡물

규정식은 93%의 보리농축과 7%의 보리사료(DM 베이스)로 이루어져 있다. 상업적인 엑소셀룰라제(Spezyme CP, Genecor, Rochester, NY)와 크실라나제(Xylanase B, Enzyme Development Corporation, New York, NY)의 수성혼합체가 사료투입에 앞서서 최소 24시간에 건 보리곡물에 첨가되었다. 보리곡물은 투입에 앞서서 증기에 롤링된 다음 이어서 보리사료에 혼합되었다.

프로틴/미네랄 보충제는 최소한 12%의 날 프로틴, 수성의 반추의 화학적으로 분해할 수 없는 프로틴, Ca, P 그리고 미세미네랄(NRC, 1984)을 제공하기 위하여 각 규정식에 첨가되었다.

동물은 1000h에 일일당 한번 규정식이 제공되었다. 사료허용은 자발적인 섭취량을 초과하여 5%-10%였다.

동물은 7 또는 14-d 간격으로 0800 h에 무게가 재어졌다. 개개의 자발적인 사료섭취량은 실험을 통하여 결정되었다. 건조큐브를 받는 동물은 손으로 먹여졌고 보리사료를 받는 동물은 자동 사료믹서를 사용하여 먹여졌다. 사료거부는 수거되었고 매 월, 수, 금에 투입에 앞서서 중량되어 졌다. 거부 혼합체는 DM을 결정하기 위하여 72h 동안 55°C에서 건조된다.

평균의 매일 얻음(ADG)은 주입 98일 후에 선형 후퇴에 의하여 생중량으로 부터 계산되었다. 데이터는 주요소로서 효소 첨가제로서 일방 변수분석을 하였다. 결과(표 3)는 곡물사료에 보충된 효소가 6.3%로 평균매일얻음과 그리고 12.3%($P < 0.05$)로 곡물변환효율을 증가시킨다는 것을 보여준다.

가장 우수한 결과는 17.5 FPU 셀룰라제 : 100IU 크실라나제 보충재라기 보다는 3.3 FPU 셀룰라제 : 100 IU 크실라나제 보충재로서 달성된다.

[표 3]

섬유를 용해하는 효소로 처리된 93% 보리곡물(DM 베이스)를 포함하는 규정식을 소비하는 가축사육장 거세숫소에서 평균매일 얻음

처리	평균매일얻음 (kg/d)	사료효율 (kg 사료/kg 얻음)
0	1.43	7.11
6000 IU* 200 FPU**	1.52	6.33
2400 IU 420 FPU	1.40	7.13

*IU = kg/DM 당 크실라나제 국제단위

**FPU = kg DM 당 셀룰라제 여과지 단위

[실시에 3]

크실라나제와 셀룰라제의 특징한 비율은 진보된 사료소화의 결과를 가져온다. 이와 다른 비율의 사용은 소화에 있어서 부정적 효과를 가져오거나 개선효과를 가져다 주지 않는다.

3번의 실험중 처음 두 실험에서 실험관에서의 건조 자주개자리건초의 중성세제섬유질(NDF)의 사라짐은 인큐베이션의 24h 후에 결정되었다. 오븐 건조된 자주개자리 건초, 샘플은 완충된 반추의 액체(20% 반추위액, 80% 완충용액)에서 인큐베이트되었는데 여기에 섬유질을 용해하는 효소가 위와 같이 첨가되었다. 전체효소(엔도셀룰라제+크실라나제)농도는 여러 가지 엔도셀룰라제 : 크실라나제비율(0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 그리고 100:0)로 하여 6000 IU/Kg였다.

두번째 실험에서, 다른 엔도셀룰라제 : 크실라나제 비율이 사용(0:100, 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75 그리고 100:0)되었다는 것을 제외하고는 같은 프로토콜이 사용되었다.

세번째 실험에서 CEP 엔도셀룰라제 대신에 Spezyme CP 엑소셀룰라제가 사용되었다는 것을 제외하고는 같은 프로토콜이 사용되었다. 이 실험을 위해 효소수준이 표 5와 같이 제공되었다.

모든 실험에서 반추위의 완충용액은 Goering과 Van Soest(1970)의 인산염/중탄산염완충용액이었다. 매크로 미네랄, 마이크로미네랄, 펩톤 그리고 환원제가 완충용액에 투여되었고 완충용액은 반추용액과 혼합되기전에 완전히 환원될 때까지 CO₂ 의 거품이 만들어졌다. 39°C에서 24시간 인큐베이션 후에, 튜브내용물은 끓는 중성세제용액에서 1시간 동안 추출되었으며 잔류물은 105°C에서 밤새껏 건조되거나 혹은 39°C에서 24시간 인큐베이션후에 튜브내용물은 미리 중량된 도가니를 통해서 여과하고 DM소화를 측정하기 위하여 105°C에서 밤새껏 건조하였다.

실험실에서의 결과는 통계적으로 주요소로서 마초와 효소처리라는 2방향 ANOVA를 사용하여 검사하였다. 효소효과는 조절(효소없음)대 효소(비율에 관계없이)의 대비로서 분리되었다.

[실험 1 과 2]

섬유질을 용해하는 효소의 첨가는 상당한 정도로 NDF 사라짐($P < .01$)을 증가시켰다. 섬유사라짐은 감소되는 셀룰라제 : 크실라나제의 비율과 함께 증가하였는데 다른 효소비율보다도 25:75 셀룰라제 : 크실라나제 혼합체에 대한 반응이 더 크면서 증가하였다. 크실라나제 효소 단독의 적용은 100% 더욱 효과적인 셀룰라제와 함께 NDF 사라짐을 향상시키는데 효과적이었다. 그러나 셀룰라제와 크실라나제 적용사이에는 관련 시너지 효과가 있었다. 셀룰라제 단독이 크실라나제 단독보다 효과적인 반면에 적은 량의 셀룰라제(전체 효소활동의 5%-25%)는 NDF소화(도 4)에서 커다란 진보결과를 보여주었다.

전체적으로 전체활동의 75%를 구성하는 크실라나제 그리고 25%를 구성하는 엔도셀룰라제를 구비한 섬유를 용해하는 효소 혼합체는 실험 1과 2에서 각각 26% 그리고 8.2%의 진보라는 결과를 가져왔다.

[표 4]

자주개자리의 실험실 NDF소화(24시간)에 대한 크실라나제와 셀룰라제의 효과

셀룰라제 (kg DM 당 IU CMCase)	크실라나제 (kg DM 당 IU)	24-시간 소화성(%)
0	0	39.1
6000	0	47.8
4500	1500	46.0
3000	3000	47.3
1500	4500	49.3
0	6000	49.9

[실험 3]

이러한 실험에서의 결과는 크실라나제와 셀룰라제의 연관효과를 시사하고 있다(표 5와 도 5). 방법은 엑스셀룰라제(Spezyme CP)가 사용된 것을 제외하고는 실험 1과 2를 위해서 사용된 것과 같다.

야생 자주개자리는 크실라나제 그리고 셀룰라제의 다른 수준과 조합을 가지고 실험실에서 인큐베이트되었다.

칼럼 4는 크실라나제가 단독으로 사용되었을 때 관찰된 DM소화를 위한 값을 포함하고 있다. 칼럼 5는 셀룰라제가 단독으로 사용되었을 때 관찰된 값을 포함하고 있다. 칼럼 6은 크실라나제와 셀룰라제가 자주개자리(셀룰라제 단독 플러스 크실라나제 단독으로부터 관찰되는 소화에 있어서의 총합)의 DM소화에 있어서 그들의 효과에 첨가제인 경우에 예상되는 기대되는 DM소화를 포함하고 있다.

칼럼 7은 관찰된 실제적인 DM 소화를 포함하고 있다. 퍼센트로 표시되는 관찰된 그리고 기대되는 DM소화(칼럼 8)사이의 차이점은 연관 그리고 시너지의 방법에서 활동하는 셀룰라제와 크실라나제의 활동에 기인한 변화이다.

[표 5]

자주개자리의 실험실 DM소화에 대한 개별적인 효소의 첨가와 비교하여 크실라나제와 셀룰라제의 조합을 첨가하는 연관효과

크실라나 제	셀룰라제	크실라나 제 셀룰라제 비율	크실라나 제로부터 기대된 %DMD	셀룰라제 로부터 기 대된 %DMD	기대된 전 % DMD	관찰된 % DMD	시너지에 기인한 % 진보
0	0	0	0	0	40.11	40.11	0
500	10	50:1	41.19	42.37	43.45	45.02	3.9122851
500	12.5	40:1	41.19	42.45	43.53	46.45	7.2763519
500	16.66667	30:1	41.19	42.09	43.17	50.29	17.742337
500	25	20:1	41.19	43.56	44.64	51.62	17.393471
1000	20	50:1	42.44	44	46.33	48.86	6.3045103
1000	25	40:1	42.44	43.56	45.89	54.61	21.72938
1000	33.33333	30:1	42.44	44.87	47.2	58.09	27.136805
1000	50	20:1	42.44	45.6	47.93	57.61	24.121605
1500	30	50:1	43.98	44.09	47.96	53.82	14.602542
1500	37.5	40:1	43.98	44.67	48.54	59.11	26.339397
1500	50	30:1	43.98	45.6	49.47	63.14	34.064291
1500	75	20:1	43.98	47.54	51.41	63.25	29.504112
2000	40	50:1	44.79	45.31	49.99	56.85	17.094443
2000	50	40:1	44.79	45.6	50.28	64.95	36.556192
2000	66.66667	30:1	44.79	46.27	50.95	65.16	35.409918
2000	100	20:1	44.79	49.11	53.79	63.91	25.218041
4000	80	50:1	45.82	48.62	54.33	60.48	15.325193
4000	100	40:1	45.82	49.11	54.82	66.39	28.831298
4000	133.3333	30:1	45.82	50.24	55.95	66.53	26.364316
4000	200	20:1	45.82	51.32	57.03	64.71	19.137802
8000	160	50:1	44.05	50.65	54.59	56.77	5.4323449
8000	200	40:1	44.05	51.32	55.26	56.31	2.6164964
8000	266.6667	30:1	44.05	53.02	56.96	53.64	-8.273112
8000	400	20:1	44.05	54.28	58.22	53.35	-12.13556

크실라나제 그리고 셀룰라제의 수준이 증가함(도 5는 오직 크실라나제의 활동의 수준을 보여주고 있다)에 따라 효소의 연관효과는 증가하게 된다.

최대의 연관효과는 크실라나제가 2,000 IU/Kg의 수준에서 첨가되었을 때 발생한다. 연관효과는 크실라나제 : 셀룰라제의 비율에 의하여 역시 영향을 받는다. 최대의 연관효과는 크실라나제 : 셀룰라제 (IU:FPU)의 비율이 30:1 과 40:1(100 IU 크실라나제 마다 2.5-3.3 FPU 셀룰라제)사이에서 발생한다.

예를 들어, 매 Kg DM마다에 1,500 IU 크실라나제 그리고 50 FPU 셀룰라제를 적용하는 것은 처리 되지 아니한 자주개자리의 경우 40.1%에 비하여 53.4%의 DM소화능력의 진보결과를 보여주고 있으며 8000 IU/0 FPU 셀룰라제로 처리된 자주개자리는 44.5% 그리고 0 IU 크실라나제/400 FPU 셀룰라제로 처리된 자주개자리는 54.3%의 소화능력진보결과를 보여주고 있다.

이러한 발견은 자주개자리의 소화를 개선하기 위해서는 크실라나제와 셀룰라제의 최적의 수준과 비율이 존재하고 있음을 시사해준다.

특정한 비율을 벗어난 비적당한 비율과 수준은 아무런 반응을 나타내지 아니함은 물론 심지어 부정적 효과를 나타내게 된다.

[실시에 4]

효소는 건조에 적용되어야 하며 그안에 흡수되어 섭취이전에 사료물질에 부착되어야 한다. 효소 사료 혼합체를 안정화시키는데 최소길이의 시간이 요구된다.

실험은 건조의 섭취량과 소화상에서 섬유질효소혼합체를 자주개자리 저장사료에 첨가하는 효과를 결정하기 위하여 그리고 효소혼합물이 건조한 사료 대젓은 사료에 동일하게 효과적인가를 결정하기 위하여 실시되었다.

두개로 자른 자주개자리는 잘라지고 대략 저장사료 700Kg을 가지고 있는 각각의 실험용 직립사료 저장고 3개를 저장고로 사용하여 보존되었다. 저장사료의 위치에서 Lethbridge에 있는 앨버타 농기계 연구소(Alberta Farm Machinery Research Institute)에 의하여 실험용 목적으로 구축된 작은 규모의 회전 드럼건조기를 사용하여 건조되었다.

대략 젓은 사료의 850Kg(대략 33%의 젓은 내용물)이 대략 6-8시간동안 60°C-70°C사이에서 건조되어 각각 3개의 다른 더미에서 15% 보다 낮은 습도를 갖게 되었다.

다섯마리의 거세한 숫양이 5개의 14-d 실험기간과 함께 5X5 변형된 라틴사각형으로 설계된 실험에 사용되었다. 규정식은 실험의 마지막에 모든 규정식을 받을 수 있도록 배분되었다.

5개의 규정식은

- 1). 자주개자리 저장사료
- 2). 섬유질을 용해할 수 있는 효소를 가진 자주개자리 저장사료
- 3). 건조한 자주개자리 저장사료
- 4). 섬유질을 용해할 수 있는 효소를 가진 건조한 자주개자리 저장사료
- 5). 자주개자리 저장사료 큐브

본 연구에서 사용된 섬유질 효소 혼합체는 건조 사료물질의 매 그램마다 크실라나제 3.75 국제 단위(IU) 그리고 셀룰라제 0.25 여과지 단위(FPU : Filter Paper Unit)로 적용된 크실라나제(Xylanase B, Enzyme Development Corporation, New York, NY)와 셀룰라제(Spezyme CP, Genencor, Rochester, NY)의 혼합체이다. 효소혼합체는 사료투여시에 적용되었다.

습한 자주개자리 규정식은 부패 변질을 방지하기 위하여 처음 2주기동안 제공되었다. 사료는 자발적인 섭취량의 110%로 매일 2회 제공되었다. 사료거부는 매일 수거되었으며 자발적인 섭취량을 결정하기 위한 화학적 분석을 위하여 보존되었다.

양은 전체 매일 수거를 용이하게 하기 위하여 매 주기 10-d 동안 대바구니 상자에 가두어 졌다.

매일의 건조섭취량과 마초의 전체 건조소화를 위한 데이터는 양과 모델에서의 규정식으로 일반적인 선형모델을 사용하여 분석되었다.

주기효과는 모델에 포함되어 있지 아니한데 이는 왜냐하면 규정식은 라틴장방향설계에 따라 진실로 무작위화되지 않았기 때문이다.

첨가된 효소는 효과성은 저장사료가 젓었나 아니면 건조하냐에 따라 좌우된다. 건조한 저장사료의 경우 효소의 첨가는 건조사료소화능력은 2.9%(63.1 대 61.3% ; $P < .04$; 표 6) 증가시켰지만 젓은 저장사료의 효과성에는 아무런 효과가 없었다.

건조한 저장사료가 투여된 동물은 젓은 사료가 투여된 것보다도 더 많이 소비하였다. 그런데 효소 첨가는 건조섭취량에서는 아무런 효과($P < .05$)도 얻지 못했다. 소화되는 건조의 섭취량은 효소첨가에 기초하여 한계적으로 증가하였다.

이러한 결과는 효소첨가제는 효소가 기질에 부착하는 방법뿐만 아니라 사료소화능력을 증가시킨다는 것을 가르킨다. 건조한 저장사료의 경우 액체효소혼합체는 사료에 적용될 때 즉시 흡수되는데 이에 반하여 젓은 저장사료의 고습도 내용은 효소의 흡수를 방해하게 된다.

효소는 반추액과의 접촉으로 또는 동물에 의한 침식음으로 쉽게 젓은 사료로부터 용해될 것이다.

실시에 1에서 소에 보리저장사료가 투여되었는데 투입에 앞서서 적용된 효소는 동물퍼포먼스에게

아무런 효과도 가져다 주지 못하였다. 그러한 연구에서, 가공시 건조 사료(예를들면 티모시와 자주개자리 큐브)에 적용된 효소는 효과적이었다.

실시에 1과 실시에 4는 효소는 반드시 건조 사료에 적용되어야 함을 가르키고 있다.

[표 6]

자주개자리저장사료건조물질의 소화능력에 대한 섬유질을 용해하는 효소의 효과

자주개자리 저장사료	효소	섭취		소화능력 (%)
		DM	소화의 DM	
습한	-	1.50	.93	61.8
	+	1.58	.97	61.8
건조한	-	1.75	1.07	61.3 a
	+	1.73	1.09	63.1 b

건조한 저장사료에 첨가된 사료의 a, b 효과는 중요하다.($P < .04$).

[실시에 5]

효소/사료혼합체가 안정화되기 위해서는 최소한의 인큐베이션 주기가 요구된다.

실험은 자주개자리 건조의 소화능력에 섬유질 효소혼합체를 위한 안정화 시간의 효과를 결정하기 위하여 실시되었다.

자주개자리 건조의 혼합물 샘플은 2mm의 스크린을 지나가도록 빨아졌다. 크실라나제(Xylanase B, Enzyme Development Corporation, New York, NY), 셀룰라제(Spezyme, Genencor, Rochester, NY) 그리고 10mM 아세테이트 완충용액(pH8)로 이루어진 섬유질 효소용액이 각각의 사료에 뿌려졌다. 용액은 사료의 0.09mL/g의 비율(as-is 베이스)로 적용되었다. 자주개자리의 경우 크실라나제의 2000 IU 그리고 셀룰라제의 67 FPU가 건조의 Kg 마다에 첨가되었다.

효소는 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 그리고 32 h 동안에 사료에서 안정화되었다. 처리된사료는 Georing과 Van Soest(1970)의 방법에 따라서 완충된(pH6.8) 반추용액(20% 반추용액, 80% 완충용액)에서 인큐베이트되었다. 완충된 반추용액은 효소용액에 적용의 5분내에 0h 처리로 첨가되었다.

마지막 처리는 반추용액의 사료에의 첨가후에 효소용액의 첨가로 이루어진다. 각각의 안정화시간에, 효소가 없는 사료의 샘플은 인큐베이트되었으며 안정화시간을 위한 조절로서 사용되었다.

이러한 조절은 복제들사이에 반추용액접종물의 변수성격을 제거하는데에 필요하다.

모든 인큐베이션은 39°C에서 24h 3차례에 실시되었다. 인큐베이트 후에 샘플은 건조소화능력을 결정하기 위해서 여과되었다.

잔류물은 섬유소화능력을 결정하기 위한 중성세제섬유(NDF)를 위해 분석되었다. 소화능력의 결과는 각각의 조절인큐베이션의 퍼센티지로서 보고되었다.

연구의 결과는 도 6에 나타나 있다. 건조물질 사라짐은 24시간이 될 때까지 인큐베이션의 각각의 증가에 상기 미처리된 조절을 넘어서 증가한다.

이러한 결과는 명백히 한 주기의 필요성을 시사하고 있으며 그래서 효소/사료혼합체는 안정화시킬 수 있다. 2시간 까지의 주기동안 거기에는 DM소화능력의 근소한 증가가 있었다. 만족스런 안정화는 3시간 안에 달성되었다. 안정화효과의 대부분은 최대안정으로 8시간 안에 달성되었으며 DM소화는 안정화의 24시간과 함께 일어났다. 자주개자리는 건조한 것이므로 아무런 사전 소화는 포함되어 있지 않다. 관찰된 반응은 효소의 사료에의 결합에 기초하고 있으며 시간은 이러한 안정된 혼합체를 형성하는데 필요하다.

[실시에 6]

여과지 단위(FPU : Filter Paper Unit)로 표현된 엑소-셀룰라제활동의 분석

[원리]

샘플에서의 셀룰라제는 기질, 여과지, 분해당을 가수분해하며 그렇게 방출된 것을 살리실이질산(dinitrosalicylic acid)을 사용하여 측광(測光)으로 분석되었다.

[활동의 단위]

여과지 활동의 단위는 FPU이다(계산을 참조).

[분석조건]

기질	여과지
pH	4.8
인큐베이션 온도	50℃
인큐베이션시간	60분
[장비]	
물용기	50℃
물용기	100℃

테스트 튜브믹서(와류)

측광기

[시약]

모든 용액은 이온이 제거된 물, Milli-Q 또는 이와 균등물로 준비되었다.

1. 구연산 완충용액(0.05M, pH 4.8)

물에 구연산($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 10.51g/l) 그리고 구연산나트륨($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 14.71g/l)의 수용액 0.05 M을 준비한다. 0.05M 구연산용액의 pH를 0.05M 구연산용액으로 4.8로 조절한다(구연산나트륨용액 1 리터마다 약 667ml의 구연산 용액이 요구된다).

2. 기질

Whatman No.1 여과지 스트립, 5mm x 120mm L(49.6-50.5 mg).

주의 : 이 무게는 달성되어야 하며 그것은 스트립의 코너를 잘라내어 무게를 달성하여야 한다.

3. DNS 시약

약 4리터의 물에 2-히드록시-3, 5-이질소벤조산(또는 3,5 디니트로살리시릭산-Merck 800141로도 알려져 있음)의 5.0g을 용해한다. 끓임없는 자석의 휘저음과 함께, 서서히 NaOH 8.0g을 첨가하면서 그것이 용해되도록 한다.

끓임없는 휘저음과 함께 작은 부분에 Rochelle 소금(Kna-tartrate, Merck 8087) 150g을 추가한다.

이 용액은 조심스럽게 최대온도 45℃까지 가열된다. 실내온도까지 차거워지면 물로 500ml로 용량 플라스크에서 희석된다.

용액이 깨끗하지 않으면 Whatman 1 여과지로 여과한다. 실내온도에서 검은병에 저장한다.

4. 글루코스 표준

구연산완충용액에 글루코스 1.00g을 용해하며 용량 플라스크에서 부피를 250ml까지로 만든다. 이 용액은 0.5ml에서 글루코스 2.0mg을 포함하고 있다.

[샘플]

이 샘플은 구연산완충용액에서 희석된다. 최소한 2개의 희석이 조사된 각 효소샘플에 만들어진다. 반응조건에서 하나의 희석은 2.0mg의 글루코스(글루코스와 같이 분해당과 동등)보다 약간 많게 그리고 하나는 약간 적게(절대 량) 방출한다.

[분석]

여과지를 긴밀하게 감아서 말고 건조검사튜브(25ml)에 놓인 다음 여과지에 스며들도록 유지하기 위해 피펫을 사용하여 구연산 완충용액 1.0ml를 첨가한다. 5분간 50℃에서 균형을 유지하게 한다. 제로의 시간에 샘플 0.5ml를 검사튜브에 첨가하고 혼합한다(스트립은 용액표면 아래에 머물러야 한다. 정확하게 60분 인큐베이트 후에 3.0ml의 시약을 첨가하고 혼합한다. 모든 튜브(모든샘플, 효소블랭크, 글루코스표준 그리고 시약블랜드)를 끓는물용기에 한번 넣는다. 정확하게 5분간 끓인후에 튜브를 제거하고 실내온도로 냉각한다. 20ml의 물을 첨가한다. 서너번에 걸쳐서 튜브를 완전히 거꾸로 하여 혼합한다. 펄프가 잘 정착되었을 때 예를 들면 최소 20분후에 용액은 피펫으로 큐벳에 옮겨지고 형성된 색깔은 540nm에서 시약블랭크에 대하여 측정된다.

효소 블랭크	1.0ml 완충용액	시약블랭크	1.5 ml 완충용액
	0.5ml 샘플		3.0 ml DNS
	3.0ml DNS		
	글루코스 표준	1.0 ml 완충용액	
		0.5 ml 표준	
		3.0 ml DNS	

5분간 끓이고 20ml 물을 첨가한다. 시약 540nm에서 샘플, 효소블랭크 그리고 글루코스 표준의 흡수를 측정한다.

[계산]

FPU 단위는 국제 단위에 기초하고 있다(주의 : FPU분석은 선형이 아니며 국제단위 per se의 사용은 부정확하다).

$$1 \text{ IU} = \text{변화된 기질의 } 1 \mu \text{ mol min}^{-1}$$

$$= \text{형성된 } 1 \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ 제품(글루코스 같은 분해당, 블루코스분자량은 } 180 \text{g mol}^{-1})$$

임계희석에서의 FPU 분석에서 방출된 글루코스의 절대량은 2.0mg이다. 이 글루코스의 양은 가수 분해반응에서 0.5ml에 의해 60분에 얻어지며 다음과 동등하다.

$$\frac{2.0 \text{mg}}{0.18 \text{mg } \mu \text{ mol}^{-1} \cdot 0.5 \text{ml} \cdot 60 \text{분}} = 0.37 \mu \text{ mol 분}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

준대수그래프용지에 효소희석(희석의 효소부피로 나눈 희석의 전체부피)에 대한 샘플흡수율(효소 블랭크의 서브스트랙션후)을 그린다. 표준흡수에 해당하는 각 샘플의 희석을 읽는다.

$$\text{FPU/ml} = \text{임계희석 } 0.37$$

[실시에 7]

국제단위로 표시된 엔도-셀룰라제(카르복실-메틸셀룰로스)의 분석

[원리]

샘플에서 CMCase는 기질, 카르복실메틸셀룰로스(CMC)를 가수분해하며 그렇게 방출된 분해당은 디니트로살리시릭산을 사용하여 측광으로 분석된다.

[활동의 단위]

단위는 국제단위(IU)로 표시된다. 활동의 1 IU는 분석조건에서 1분에 1 μ mole의 분해당을 유리시킨다.

[분석조건]

기질 카르복실메틸셀룰로스

pH 4.8

인큐베이션온도 50 $^{\circ}$ C

인큐베이션시간 60분

[장비]

물용기 50 $^{\circ}$ C

물용기 100 $^{\circ}$ C

테스트 튜브믹서(와류)

측광기

[시약]

모든 용액은 이온이 제거된 물, Milli-Q 또는 이와 균등물로 준비되었다.

1. 구연산 완충용액(0.05M, pH 4.8)

물에 구연산($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10.51g/l) 그리고 구연산나트륨($\text{C}_6\text{H}_7\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14.71g/l)의 수용액 0.05을 준비한다. 0.05M 구연산용액의 pH를 0.05M 구연산용액으로 4.8로 조절한다(구연산나트륨용액 1리터마다 약 667ml의 구연산용액이 요구된다).

2. 기질-1% 카르복실메틸셀룰로스

중간의 점도(Sigma No. C-4888) CMC 1.0g을 바람직하게는 가열 자성휘젓기를 사용하여 0.05M 구연산 80ml에 용해한다. 끓는점까지 가열하고 난후 계속 휘저으면서 식힌다. 밤새껏 천천히 휘저도록 한다. 구연산으로 부피를 100ml가 되게한다. 최대 1주일간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 저장된다.

3. DNS 반응력

약 4리터의 물에 2-히드록시-3, 5-이질소벤조산(또는 3, 5 디니트로살리시릭산-Merck 800141로도 알려져 있음)의 5.0g을 용해한다. 끓임없는 자석의 휘저음과 함께, 서서히 NaOH 8.0g을 첨가하면서 그것이 용해되도록 한다.

끓임없는 휘저음과 함께 작은 부분에 Rochelle 소금(Kna-tartrate, Merck 8087) 150g을 추가한다.

이 용액은 조심스럽게 최대온도 45 $^{\circ}$ C까지 가열된다. 실내온도까지 차가워지면 물로 500ml로 용량 플라스크에서 희석된다.

용액이 깨끗하지 않으면 Whatman 1 여과지로 여과한다. 실내온도에서 검은병에 저장한다.

[샘플]

이 샘플은 0.05 M의 구연산나트륨 완충용액에서 희석된다. 적당한 희석은 흡수율 0.3-0.5의 흡수율을 한다.

[분석]

두개의 튜브에 1.8ml 기질용액을 첨가하고 5분간 50℃에서 균형을 유지하게 한다. 적당하게 희석된 200 μ l의 효소용액을 하나의 튜브에 첨가하고 와류 혼합기로 혼합한다. 50℃에서 정확하게 5분후에 양 튜브에 3.0ml DNS 시약을 첨가하고 혼합한다. 샘플(효소블랭크)이 없는 인큐베이트된 튜브에 샘플용액 200 μ l을 첨가한다. 두개의 튜브를 한번 끓는 물에 넣는다. 정확하게 5분간 끓인 후에 튜브를 제거하고 냉각수에서 실내온도로 식힌다. 540nm에서 효소블랭크의 그것에 대한 샘플흡수를 측정한다. 표준라인으로 부터 활동을 읽어 희석요소로 승한다.

[표준]

100ml의 완충용액에 글루코스의 0.180g(Merck 8337 ; store in dessicator)를 용해시킨 0.01M 스투용액을 준비한다. 스투용액은 영하 -20℃의 작은 약수에서 결빙된다. 녹인후 튜브는 조심스럽게 혼합된다. 구연산 완충용액에서 스투용액으로부터 아래기재의 희석을 만든다.

희석	글루코스 (μ mol/ml)
1:1	10.0
1:2	5.0
1:4	2.5
1:5	2.0

효소블랭크로서 같은 방법으로 각 표준희석의 3개의 분석을 실시한다. 테스트 튜브에 1.8ml 기질을 피펫으로 옮기고 50℃에서 5분간 인큐베이트하며 3.0ml DNS를 첨가하고 200 μ l 표준희석을 한다. 표준의 희석대신에 200 μ l 구연산 버퍼를 첨가하여 시약블랭크를 준비한다. 튜브를 딱 5분간 끓이고 냉각시킨다음 540nm에서 시약블랭크에 대한 흡수를 측정한다. 모든 분석의 연속을 위하여 기준선을 구성한다.

[실시에 8]

국제단위로 표시된 크실라나제 활동의 분석

[원리]

샘플에서 크실라나제는 기질을 가수분해한다. 귀리 방출된 감소탄수화물의 양은 오디니트로살리릭산을 사용하여 측광으로 결정된다.

[활동의 단위]

하나의 크실라나제단위(국제단위; IU)는 분석조건에서 오투스펠트 크실란으로부터 μ mole 크실란에 해당하는 반응력을 가진 반응 탄수화물을 생산하는 효소의 양으로 정의된다.

[분석조건]

기질	귀리 스펬트 크실란
pH	5.3
온도	50℃ \pm 0.5℃
인큐베이션시간	5분

[장비]

물용기	50℃
물용기	100℃

테스트 튜브믹서(와류)

광도계

[시약]

1. 0.05M 구연산나트륨 완충용액, pH 5.3 구연산($C_6H_8O_7 \times H_2O$) 10.5g을 이온을 제거한 물 1 리터에 넣고 또 구연산나트륨($C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$) 14.7g을 이온을 제거한 물 1리터에 넣어 0.05M 용액을 준비한다. 구연산용액은 혼합체의 pH가 5.3이 될 때 까지 구연산나트륨용액에 첨가된다.

2. 기질-1% 귀리 스펬트 크실란

바람직하게는 크실란 1.0g(Sigma No. X-0627)을 가열 마크네틱 휘젓는 기기를 사용하여 약 0.05M 구연산 완충용액 80ml에 용해한다. 끓는점까지 가열하고 계속 휘저음과 함께 냉각하며 덮고나서 밤새 휘젓는다. 구연산 버퍼로 100ml까지 부피를 올리도록 한다. 그리고 일주일의 최대로 4℃에서 저장될 수 있다.

3. DNS 시약

20.0g 2-히드록시-3, 5-디니트로벤조익산(Merck 800141)을 약 400ml 이온을 제거한 물에 부유하게 한다. 끊임없는 자석의 휘저음과 함께 서서히 이 부유 수산화나트륨용액(300ml의 이온을 제거한 물에 32.0g 수산화나트륨)에 첨가한다. 용액은 물용기에서 완전히 투명해질 때까지 최대 45°C의 온도까지 가열된다.

끊임없는 휘저음과 함께 작은 위치에 Rochelle 소금(Kna-tartrate, Merck 8087) 600g을 첨가한다. 마지막으로 용액을 이온을 제거한 물로 2000ml이 될 때까지 희석한다. 만약 용액이 맑지 않으면, 여과지(Whatman NO.1)로 여과한다. 실내온도로 검은병에 저장한다.

[샘플]

이 샘플은 0.05 구연산나트륨 완충용액에서 희석된다. 적당한 희석은 0.3-0.5의 흡수율이다.

[분석]

1.8ml의 기질용액을 두개의 테스트 튜브에 첨가하고 5분간 50°C로 평균화한다. 200 μ l의 적당한 희석한 효소용액을 튜브의 하나에 첨가하고 와류믹서기로 혼합한다. 50°C에서 딱 5분후에 3.0ml DNS시약을 양 튜브에 첨가하고 혼합한다. 샘플(효소블랭크)없이 인큐베이트된 튜브에 200 μ l의 용액을 첨가한다. 양튜브를 한번 끓는 물 용기에 집어넣는다. 딱 5분간 끓인 후에 튜브를 제거하고 차가운 물에서 냉각하여 실내온도가 유지되게 한다. 540nm에서 효소블랭크의 그것에 대한 샘플흡수를 측정한다. 기준선에서 활동을 읽어서 희석요소로 승한다.

[표준]

100ml의 완충용액에 크실로스 0.150g을 용해한 크실로스 0.01M 스투용액을 준비한다. 스투용액은 작게 나누어 영하 -20°C에서 냉동될 수 있다. 녹인후 튜브는 조심스럽게 혼합된다. 구연산 완충용액에서 스투용액으로부터 아래의 희석을 한다.

희석	크실로스(μ mol/ml)
1:1	10.0
1:2	5.0
1:4	2.5
1:5	2.0

효소블랭크로서 같은 방법으로 각 표준희석의 3개의 분석을 행한다. 테스트 튜브에 1.8ml 기질을 피펫하고 50°C에서 5분간 인큐베이트하고 3.0ml DNS 그리고 200 μ l 표준희석을 첨가한다. 기준 희석대신에 200 μ l 구연산 버퍼를 첨가함으로써 시약블랭크를 준비한다. 튜브를 딱 5분간 끓이고 냉각하여 540nm에서 시약블랭크에 대한 흡수를 측정한다.

[실시에 9]

ml 당 90 FPU 셀룰라제 활동과 4300 IU 크실라나제 활동을 제공하는 효소용액이 습기 내용물(수분함량) 10%를 가지는 자주개자리건초 1000Kg을 가공하는데 사용된다. 250ml의 효소 혼합체는 물 50 l에서 희석되며 권물에 앞서서 자주개자리위에 뿌려진다. 마지막 사료구성은 15%의 수분함량을 가질 것이고 Kga사료 DM 당 25 FPU 셀룰라제 활동과 1194 크실라나제 활동을 제공하기 위한 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함한다.

[실시에 10]

아세테이트 완충용액(100mM 소듐 아세테이트 ; pH 5.0)에서 ml당 8000 IU 크실라나제와 200 FPU 셀룰라제를 포함하는 200ml 효소용액이 아세테이트 버퍼로 1.0 l 까지 만들어졌다. 최종의 용액은 1600 IU 크실라나제/ml과 40 FPU 셀룰라제/ml를 포함하고 있다. 용액은 톤당 1.0 l의 비율로 전체 보리곡물에 뿌려졌다. 가공된 곡물사료는 Kg 곡물사료당 40 FPU 셀룰라제 그리고 Kg곡물사료당 1600 IU 크실라나제를 제공하기 위하여 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함할 것이다. 곡물은 이어서 상업 롤러 밀에서 롤링에 의하여 가공될 것이다.

[실시에 11]

g당 10000 IU 크실라나제 활동을 가지는 분말의 4개의 부분은 g당 1000 FPU 셀룰라제 활동을 가지는 분말 1부분과 혼합된다. 최종혼합물은 8000 IU 크실라나제/g 그리고 200 FPU 셀룰라제/g를 포함하고 있다. 400g의 분말은 5.0 l의 구연산 완충용액(50mM 구연산나트륨 ; pH 4.5)에 용해되었다. 효소용액은 자주개자리 건초더미 위에 톤당 5.0의 비율로 뿌려진다(8% 수분함량).

결과의 사료혼합물은 자주개자리 사료 Kg당 80 FPU 셀룰라제/g 그리고 3200 IU 크실라나제/Kg을 제공하기 위한 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함할 것이다. 결과의 사료 혼합체는 그런다음 큐브를 형성하기 위하여 상업적인 큐빙밀에서 다이를 통해 강제적으로 형성된다.

이 명세서에서 언급한 모든 공개된 것은 본 발명이 속한 분야의 일반 기술자의 기술수준을 가리키고 있다. 모든 공개된 것은 참조에 의하여 만약 각각의 개별적인 공개들이 특별하게 그리고 개별적으로 참조에 의하여 통합되도록 가리켜지는 것과 같은 범위로 통합될 것이다.

비록 본 발명이 이해의 명확을 위한 목적으로 보기와 예시로 자세한 설명을 한 것이지만 특정한 변화 그리고 변형이 부속되는 청구범위의 범위안에서 실시될 수 있다는 것은 명약관화한 것일 것이다.

[참조]

1. Feng, P., C. W. Hunt, W.E. Julien, K. Dickinson and T.Moen. 1992. Effect of enzyme

additives on in situ and in vitro degradation of mature cool-season grass forage. J. Anim. Sci 70(Suppl. 1):309

2. Feng, P., C.W. Hunt, W.E. Julien, S.C. Haeny and G.T. Pritchard. 1992. Effect of enzyme additives to cool-season grass forage on voluntary intake and digestive function in mature beef steers. J. Anim. Sci 70(Suppl. 1):310

3. Chesson, A. 1994. Manipulation of fibre degradation — an old theme revisited. Pages 83-98 in T.P. Lyons and K.A. Jacques (Eds.). Biotechnology in the feed industry. Nottingham University Press. Loughborough, UK.

4. McAllister, T.A., H.D. Bae, L.J. Yanke, K.-J. Cheng and J.K. Ha. 1994. A review of the microbial digestion of feed particles in the rumen. Asian J. Animal Sci. 7:303-316.

5. Gilbert, H.J., G.P. Hazlewood, J.I. Laurie, C.G. Orpin and G.P. Xue. 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungus xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. Molec. Microbiology 6: 2065.

6. Van Soest, P.J. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O&B Books. Corvallis, OR.

7. National Research Council. 1982. United States-Canadian Tables of Feed Composition. National Academy Press. Washington, D.C.

8. Nelson, C.J. and L.E. Moser. 1994. Plant factors affecting forage quality. Pages 115-154 in G.C. Fahey (ed.) Forage Quality and Utilization. American Society of Agronomy Inc., Madison, WI.

9. Berger, L.L., G.C. Fahey, L.D. Bourquin and E.C. Titgemeyer. 1994

Modification of forage quality after harvest. In G.C. Fahey (ed.) Forage Quality and Utilization. American Society of Agronomy Inc., Madison, WI.

10. Bailey, M.J. and K. Poutanen. 1989. Production of xylanase by strains of *Aspergillus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:5-10

11. National Research Council. 1984. Nutrient Requirements of Beef Cattle (6th ed.) National Academy Press. Washington, D.C.

12. Goering, H.K. and P.J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses. Agriculture No. 379. Agriculture Research Service. United States Department of Agriculture.

(57) 청구의 범위

청구항 1

셀룰라제와 크실라나제 효소의 혼합물로 구성되며, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 국제단위 (IU) 크실라나제 활동에 대하여 2에서 5 여과지 단위 (FPU : filter paper unit) 셀룰라제 활동이 되게 하는 양으로 셀룰라제와 크실라나제가 포함된, 반추동물에 위한 건조한 콩과류마초 또는 곡물사료용 효소 보충제.

청구항 2

제1항에 있어서, 건조콩과류마초의 관리를 위해 적용되는 투여단위 효소 보충제는 매 Kg 건조 콩과류마초당 16에서 120 FPU 셀룰라제 활동과 800에서 6000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하며, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 효소 보충제.

청구항 3

제1항에 있어서, 건조콩과류마초의 관리를 위해 적용되는 투여단위 효소 보충제는 매 Kg 건조 콩과류마초당 18에서 72 FPU 셀룰라제 활동과 900에서 3600 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하며, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 효소 보충제.

청구항 4

제1항에 있어서, 곡물사료의 관리를 위해 적용되는 투여단위 효소 보충제는 매 Kg당 10에서 200 FPU 셀룰라제 활동과 500에서 10000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하며, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 효소 보충제.

청구항 5

제1항에 있어서, 곡물사료의 관리를 위해 적용되는 투여단위 효소 보충제는 매 Kg 곡물사료당 40에서 160 FPU 셀룰라제 활동과 2000에서 8000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하며, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 효소 보충제.

청구항 6

a) 콩과류마초, 곡물사료, 또는 상기 콩과류마초와 곡물사료의 혼합물 중 하나로 구성되고, 수용액 상태의 셀룰라제와 크실라나제가 잘 흡수되고 부착되도록 15%(중량/중량)이하의 수분 함량을 갖는 사료물질과;

b) 안정된 반추동물용 사료혼합체를 형성하기 위해 사료물질에 흡수되며 부착되고, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제활동의 비율이 매 100 국제단위(IU:international units) 크실라나제활동에 대해 약 2에서 5까지의 여과지단위(FPU:filter paper units) 셀룰라제 활동이 되게 하는 양으로 구성되는 셀룰라제와 크실라나제의 혼합물;

로 이루어진 사료 혼합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 사료물질은 콩과류마초인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 매 Kg 건조콩과류마초에 16에서 120 FPU 셀룰라제 활동과 800에서 6000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율은 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 9

제7항에 있어서, 매 Kg 콩과류마초에 약 18에서 72 FPU 셀룰라제 활동과 900에서 3600 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 콩과류마초는 자주개자리인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 11

제6항에 있어서, 사료물질은 곡물사료인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 12

제11항에 있어서, 매 Kg 콩과류마초에 약 10에서 200FPU 셀룰라제 활동과 약 500에서 10000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 13

제11항에 있어서, 매 Kg 곡물사료에서 40에서 160 FPU 셀룰라제 활동과 2000에서 8000IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제를 포함하되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 곡물사료는 보리인 것을 특징으로 하는 사료 혼합체.

청구항 15

a) 별개로 또는 혼합물로 셀룰라제와 크실라나제 효소를 포함하는 하나 이상의 수용액을 준비하는 단계와;

b) 콩과류마초, 곡물사료, 또는 콩과류마초와 곡물사료의 혼합물 중 어느 하나로 구성되고, 셀룰라제와 크실라나제를 함유하는 수용액이 첨가할 때 셀룰라제와 크실라나제가 잘 흡수되고 부착되도록 15%(중량/중량) 이하의 수분 함량을 갖는 사료물질을 준비하는 단계와;

c) 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제활동의 비율이 매 100 국제단위(IU:international units) 크실라나제활동에 대해 약 2에서 5까지의 여과지단위(FPU:filter paper units) 셀룰라제 활동이 되게 하는 양으로 셀룰라제와 크실라나제를 함유하는 하나 또는 그 이상의 수용액을, 사료물질을 코팅하기 위해 사료물질에 첨가하는 단계와;

d) 안전한 반추동물용 사료혼합체를 제공하기 위해 크실라나제와 셀룰라제가 사료물질에 흡수되고 부착될 때까지 상기 수용액으로 코팅된 사료물질을 인큐베이트하는 단계;

로 이루어지는 사료혼합체 생산 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 사료물질의 수분 함량이 18% 이상으로 증대되지 않도록 적은 양의 수용액이 사료물질에 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 사료물질은 최소한 3시간동안 인큐베이트되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 사료물질은 최소한 8시간동안 인큐베이트되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 사료물질은 콩과류마초인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 매 Kg 콩과류마초에서 16에서 120 FPU 셀룰라제 활동과 800에서 6000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제가 사료물질에 첨가되되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동이도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 매 Kg 콩과류마초에서 18에서 72 FPU 셀룰라제 활동과 900에서 3600 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제가 사료물질에 첨가되되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율이 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동이도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 콩과류마초는 자주개자리인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 사료물질은 곡물사료인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 매 Kg 곡물사료당 10에서 200 FPU 셀룰라제 활동과 500에서 10000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제가 사료물질에 첨가되되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율은 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동이도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 매 Kg 곡물사료에서 40에서 160 FPU 셀룰라제 활동과 2000에서 8000 IU 크실라나제 활동을 제공하기에 충분한 셀룰라제와 크실라나제가 사료물질에 첨가되되, 크실라나제 활동에 대한 셀룰라제 활동의 비율은 매 100 IU 크실라나제 활동에 대해 2에서 5까지의 FPU 셀룰라제 활동이도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 곡물사료는 보리인 것을 특징으로 하는 방법.

요약

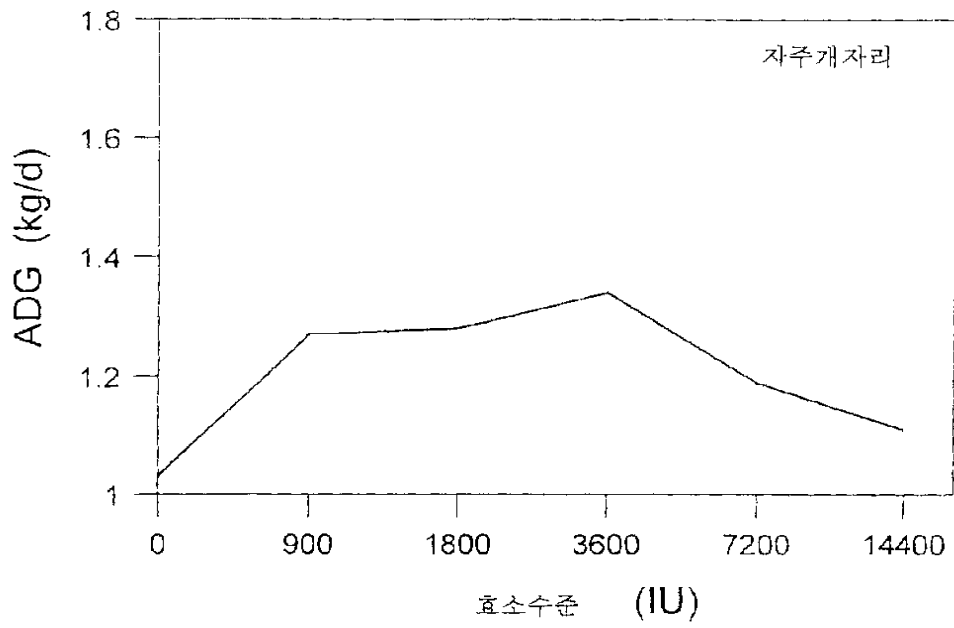
반추동물을 위한 콩과류마초와 곡물사료의 소화능력을 증가시키기 위한 섬유를 용해하는 효소 보충재와 섬유질을 용해하는 효소로서 콩과류마초와 곡물사료를 처리하는 방법, 그리고 섬유를 용해하는 효소의 혼합체로 처리된 사료물질로 구성된 사료구성이 제공되어 있다. 섬유를 용해하는 효소 보충재는 섬유를 용해하는 효소 보충재 처리될 사료물질에 의존하는 특정한 비율과 수준에서의 셀룰라제와 크실라나제의 혼합체로 이루어진다. 셀룰라제와 크실라나제는 완충용액에 용해되고 건조한 콩과류마초나 곡물사료 위에 뿌려진다. 그런다음 사료물질은 효소가 사료물질에 흡수되고 부착되도록 최소한 3시간동안 인큐베이트된다. 결과로서 생기는 사료구성은 사전소화에 대하여 최소한 1년간 안정하다. 셀룰라제와 크실라나제가 본 발명에서 제공하는 특정한 비율과 수준으로 콩과류마초와 곡물사료에 적용될 때 낮은 효소수준에서 사료물질의 소화능력을 크게 개선하면서 효소사이의 시너지 효과가 발생한다.

대표도

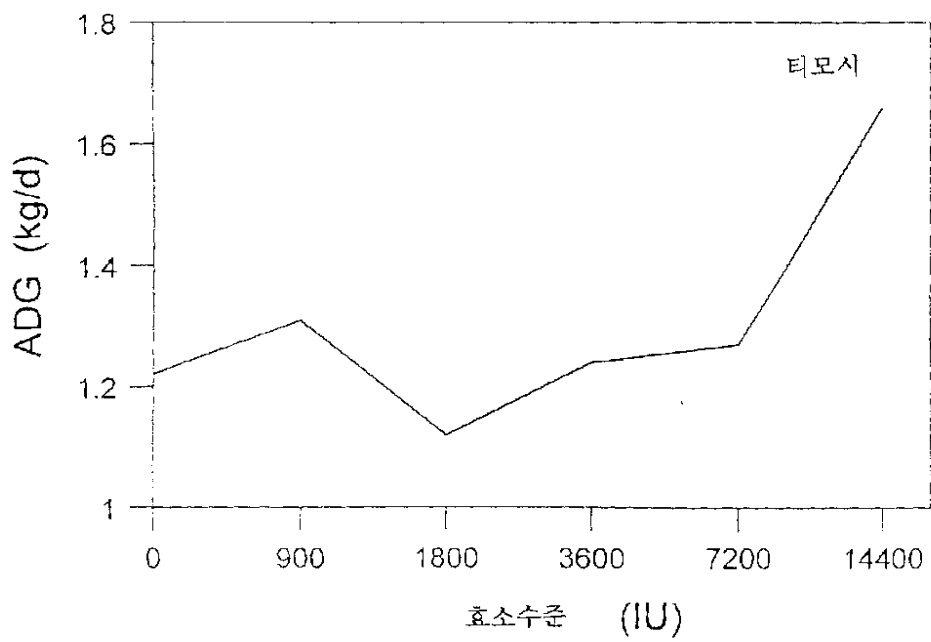
도1

도면

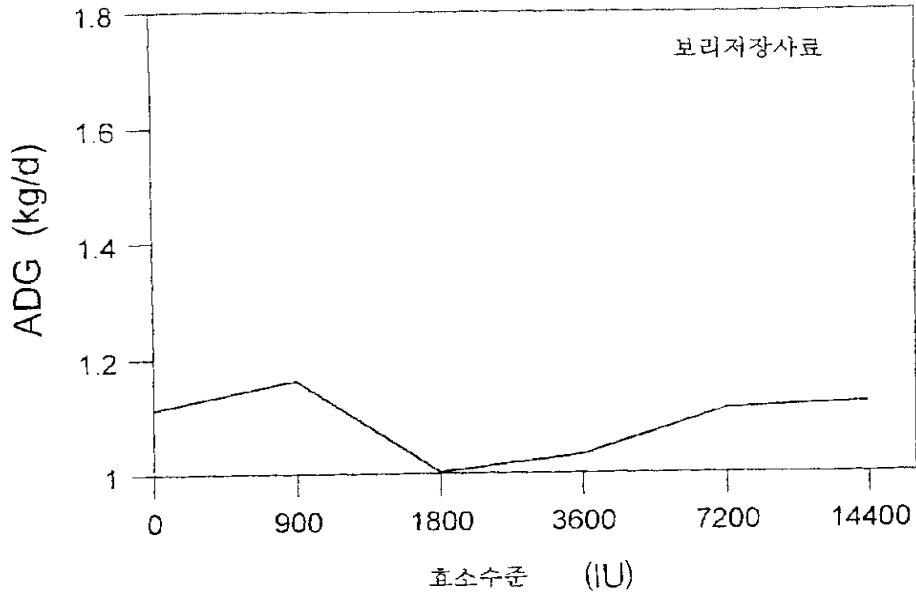
도면1



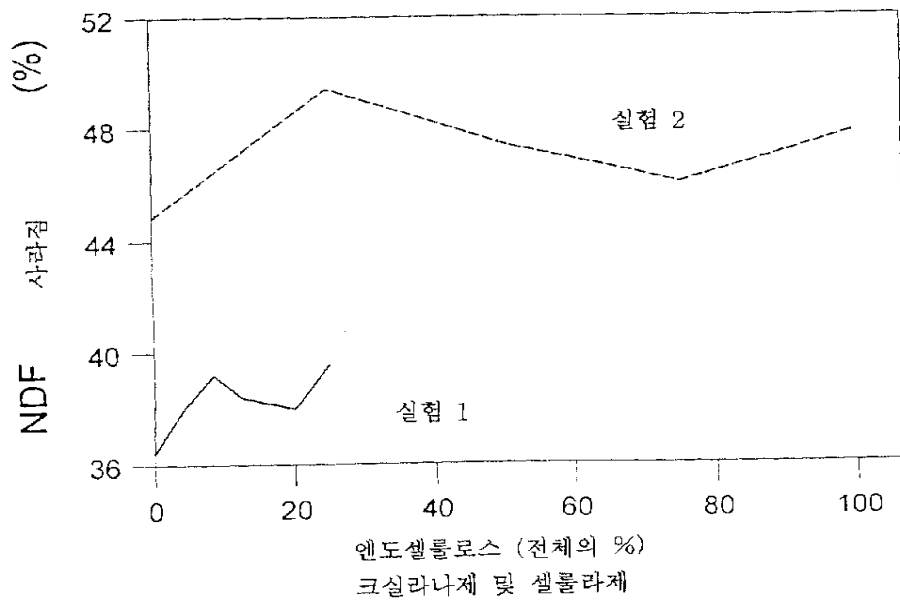
도면2



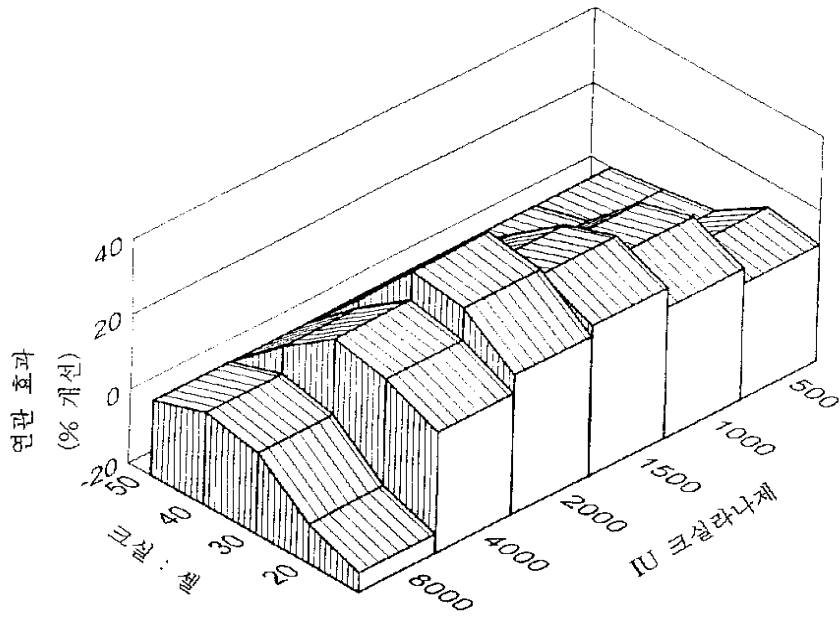
도면3



도면4



도면5



도면6

