(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0063892
(43) 공개일자 2022년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 20/158 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23K 20/158 (2016.05)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2020-0149812
(22) 출원일자 2020년11월11일
심사청구일자 2020년11월11일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이신자
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동, 경상대학교)
이성실
경상남도 진주시 금산면 중천로 82, 107동 901호 (금산아이파크아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

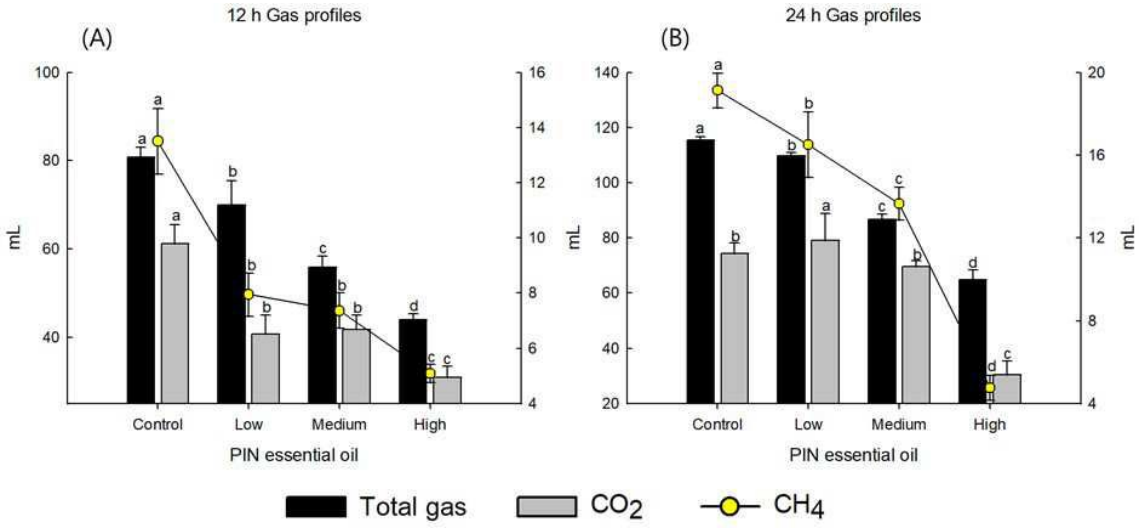
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄저감용 사료첨가제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄저감용 사료첨가제 조성물에 관한 것으로, 잣송이 부산물에서 추출한 피톤치드 오일을 in vitro에서 반추위 발효성상의 주요 지표인 휘발성지방산인 프로피오네이트(propionate)의 농도가 대조구에 비해 유의적 차이가 났으며, 뷰티레이트(butyrate)의 농도가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 피톤치드 오일의 첨가 농도가 증가함에 따라 암모니아태 질소 농도가 유의적으로 높게 나타났으며, 메탄 및 이산화탄소의 생성이 감소하는 것을 확인한 바, 상기와 같은 효과를 가지는 잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일은 가축의 생장을 촉진하고 사료 효율을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용하여도 안전한 합성 첨가제 또는 항생제 대체제로 사용될 수 있으며, 메탄가스 생성을 감소시키는 천연 메탄 저감제로서 사료 첨가제로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23K 50/10 (2016.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395064620
과제번호	PJ014778032020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신농업기후변화대응체계구축(R&D)
연구과제명	흑염소 사료 내 다양한 메탄 저감제 첨가 급여 시 메탄 저감 수준 구명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 총 가스 발생량, 메탄 발생량 및 이산화탄소 발생량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반추동물은 소, 염소, 양, 기린, 미국산 들소, 유럽산 들소, 야크(yak), 물소, 사슴, 낙타, 알파카(alpaca), 라마, 누(wildebeest), 영양, 가지뿔 영양(pronghorn) 및 닐가이 영양(nilgai)으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 사료첨가용 조성물을 포함하는 사료 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 사료첨가용 조성물은 건조사료 총 100 중량부에 대하여 0.1 내지 15 중량부로 첨가되는 것을 특징으로 하는 사료 조성물.

청구항 6

제4항에 따른 사료 조성물을 반추동물에 투여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 억제 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄저감용 사료첨가제 조성물에 관한 것으로, 반추동물의 반추위에서 생산되는 메탄가스를 저감하기 위하여 사용되고 있는 합성 첨가제, 항생제를 대체하기 위한 메탄 저감용 사료첨가제 조성물 및 그 활용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항미생물 작용을 가진 천연물질, 반합성물질 혹은 합성물질을 통틀어 항생제라고 하며, 상기 항생제는 경구 혹은 주사제로 투여 혹은 국소적으로 사용하여 미생물에 의한 질병을 치료하거나 예방하는 목적으로 사용된다. 이러한 항생제는 지난 70여년 동안 감염성 질환을 가진 환자를 치료하는데 사용되어 왔으며, 현재는 인간의 질병뿐만 아니라 동물의 질병을 치료 또는 예방하는 목적으로도 사용되고 있다.

[0003] 한편, 항생제는 동물의 질병을 치료 또는 예방하는 목적 이외에도 동물의 성장을 촉진시키기 위한 성장 촉진제로도 사용되고 있다. 우리나라 축산업에 있어서, 모넨신과 같은 이오노포(ionophore)계 항생제, 클로로포름 및 할로겐 화합물 등이 대표적인 항생물질로 이용된다. 항생물질을 생장 촉진제로서 사료에 첨가하여 동물에게 투여하면 동물의 생장을 촉진시키고, 사료 이용 효율(feed utilization)을 개선함과 동시에 집단으로 사육되고 있는 동물들에게서 세균에 의한 감염성 질환의 유병율을 낮출 수 있다. 즉, 항생제는 동물에게서 감염성 질환을 예방하여 감염성 질환에 대한 유병율 및 사망률을 감소시키고, 성장 속도를 증가시킴으로써 육류, 달걀, 우유 등의 가격을 낮출 수 있는 경제적 효과를 가져올 뿐만 아니라 항생제 소비를 증가시켜 제약산업 측면에서도 긍정적인 영향을 미친다. 또한, 성장 촉진제로서 항생물질은 동물의 위장관에서 이로운 미생물을 자극하고 해로운 미생물을 억제함으로써 장내세균에 의한 바람직하지 못한 발효산물 즉, 젖산, 휘발성 지방산, 암모니아, 아민, 메탄 등의 생성을 억제한다. 특히, 메탄(methane)은 지구 온난화 현상의 주범으로써 동물이 일 년에 배출하는

메탄가스의 양이 80~115백 만톤으로, 전 세계 메탄가스 방출량의 15~20%를 차지한다. 동물의 항생제 및 생장 촉진제인 모넨신의 경우 반추위 동물의 위에서 프로피오네이트의 발효를 증가시킴으로써 지구 온난화의 주범인 메탄가스의 생성을 감소시킨다는 것이 보고된 바 있다.

[0004] 이와 같이, 축산업에 있어서 항생제는 가축의 생산성 향상에 큰 기여를 해왔으나 최근 축산물에 항생제 잔류와 다약제 내성 슈퍼 박테리아의 출현 등의 문제로 인하여 이러한 항생제 사용이 규제되고 있는 실정이다. 특히, 치료의 목적이 아닌 가축 생산성 향상을 위하여 배합 사료 내에 항생제를 포함시키는 것은 전면적으로 금지되고 있다.

[0005] 이에 친환경 축산과 유기 축산물 생산을 위하여 기존의 항생제를 대체할 수 있는 물질의 개발과 관련 기술의 개발이 매우 중요한 과제로 인식되고 있다. 항생제 대체의 가능성이 가장 높게 평가되고 있는 물질로는 식물에서 유래한 천연 추출물이 있다. 식물은 환경으로부터 자신을 보호하기 위하여 이차대사산물을 생산하며, 상기 이차대사산물은 여러 가지 생리활성 작용을 나타내므로 인간이나 동물의 질병을 예방 또는 치료하기 위한 의약품으로 사용될 수 있다. 병원성 미생물에 대한 항균 효과 역시 식물의 이차대사산물이 나타낼 수 있는 생리활성 중의 하나이다. 또한, 식물의 이차대사산물은 반추위 동물에 있어서 반추위 내 발효를 변화시켜 사료 에너지의 이용 효율을 증가시키는 반면 메탄가스 발생을 감소시킨다는 연구 결과들이 보고된 바 있으며, 식물이 생산하는 이차대사산물 중에서 항균작용을 나타내는 대표적인 성분들인 페놀성 물질, 정유, 플라보노이드, 사사포닌(sarsaponin)을 함유하는 일부 식물 추출물들이 메탄가스 생성을 감소시킨다는 것이 증명된 바 있다.

[0006] 반추위 메탄가스 저감에 대한 작용기전은 크게 두 가지로 나뉠 수 있다. 첫 번째는 발생되는 수소를 메탄가스 생성이 아닌 다른 방향으로 대사되게 하는 수소치환방법이다. 두 번째는 메탄가스를 생성하는 세균에 대하여 직접적인 항균작용을 통하여 메탄가스 생성을 줄이는 방법이다. 이들 두 가지 방법들 중에서 어떤 것이 효율적이라고 단정 지을 수는 없으나, 궁극적으로 메탄가스를 저감시키는 효과를 찾는 것이 더 중요하다.

[0007] 이에 본 기술은 반추위내 메탄가스를 줄일 수 있는 식물 또는 식물 추출물을 탐색하고 사료첨가제로서의 활용에 그 목적을 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2020-0071317호 (2020.06.19 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 반추동물 메탄 저감을 위한 사료 첨가용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 반추위 내 메탄가스 생성을 억제하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가용 조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 사료 조성물을 반추동물에 투여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 잣송이 부산물에서 추출한 피톤치드 오일을 in vitro에서 반추위 발효성상의 주요 지표인 휘발성지방산인 프로피오네이트(propionate)의 농도가 대조구에 비해 유의적 차이가 났으며, 뷰티레이트(butyrate)의 농도가 대조구에 유의적으로 높았으며, 피톤치드 오일의 첨가 농도가 증가함에 따라 암모니아태질소 농도가 유의적으로 높게 나타났으며, 메탄 및 이산화탄소의 생성이 감소하는 것을 확인한 바, 상기와 같은

효과를 가지는 잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일은 가축의 생장을 촉진하고 사료 효율을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용하여도 안전한 합성 첨가제 또는 항생제 대체제로 사용될 수 있으며, 메탄가스 생성을 감소시키는 천연 메탄 저감제로서 사료 첨가제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 잣송이 유래 피톤치드 오일의 가스 생성 프로파일을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0017] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0018] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 잣송이 부산물 유래 피톤치드 오일을 유효성분으로 포함하는 반추동물 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 조성물은 총 가스 발생량, 메탄 발생량 및 이산화탄소 발생량을 감소시킨다. 상기 메탄은 이산화탄소 다음으로 지구온난화에 가장 큰 영향을 미치는 요인이며, 반추동물이 탄수화물을 포함하는 사료를 섭취하는 경우 메탄가스 생성 미생물에 의해 반추위 내에서 생성되는데, 이는 사료 이용 효율을 떨어뜨리는 원인 중 하나로, 반추동물의 반추위 내의 메탄가스 생성을 억제시키는 것이 중요하다.

[0022] 상기 반추동물은 포유류 소목에 속하는 되새김 동물로 소, 염소, 황소, 물소, 들소, 사슴, 낙타, 양 등을 포함하며, 네 개의 격실의 위를 가지는데 그 중 하나가 반추위이다. 반추동물 반추위(rumen)라고 불리우는 소화계에서 미생물의 발효를 통해 셀룰로즈(cellulose)를 휘발성 지방산(volatile fatty acid)으로 전환시키고 이것을 영양분으로 이용한다. 즉, 반추위 내에서 탄수화물의 분해를 통하여 휘발성 지방산, 수소, 이산화탄소 등이 생성되며, 상기 수소와 이산화탄소는 반추위 산도 하강의 원인이 된다. 상기 수소와 이산화탄소는 메탄으로 전환되어 소실된다.

[0023] 구체적으로 상기 반추동물은 소, 염소, 양, 기린, 미국산 들소, 유럽산 들소, 야크(yak), 물소, 사슴, 낙타, 알파카(alpaca), 라마, 누(wildebeest), 영양, 가지뿔 영양(pronghorn) 및 닐가이 영양(nilgai)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0024] 상기 유효성분은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능 및/또는 효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분으로 포함하는 것을 의미한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가용 조성물을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 사료 조성물은 상기 메탄 저감을 위한 사료첨가용 조성물 및 기타 공지의 사료 조성물에 첨가되는 성분을 포함할 수 있고, 상기 사료 조성물은 공지의 방법에 의해 제조되는 것으로, 이에 대한 상세한 설명은 생략하기로 한다. 또한 상기 사료는 일반볏짚, 야초, 목초, 앤시리지, 건초, 산야초 등이 있으나, 이에 제한되는 것은

아니며 가축의 사육에 사용되는 사료이면 무방하다.

[0027] 상기 사료첨가용 조성물은 건조사료 총 100 중량부에 대하여 0.1 내지 15 중량부로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 사료 조성물을 반추동물에 투여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 억제 방법을 제공한다

[0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0030] **실시예 1: 공시동물 및 반추위액**

[0031] 연구 절차 및 공시축의 사양관리는 국립경상대학교 실험동물 복지 윤리법에 따라 수행하였으며, 반추위액은 국립경상대학교 야생동물보호센터에서 사육중인 반추위에 캐뉼라(cannula)가 장착된 한우 암소(체중 450 kg±30kg)로부터 채취하였다.

[0032] 공시동물의 사양관리는 농후사료(제 BBVMRO 158호)와 티모시(timothy)를 6:4의 중량비로 혼합한 후, 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:00) 분할 급여하였으며, 물과 미네랄 블록은 자유 섭취하도록 하였다.

[0033] 반추위액은 오전 사료급여 직전 반추위 캐뉼라를 통해 채취하였고, 4겹의 직포(cheese cloth)를 이용하여 여과한 다음, 혐기상태의 2 L 유리병에 담아 신속하게 실험실로 이동하였다. 상기 반추위액은 39℃ 항온수조(water bath, Lab Companion; BS-21)에 1시간 정치시킨 후, 진공 펌프로 사료 입자를 제거한 다음 in vitro 시험에 사용하였다.

[0034] **실시예 2: 공시재료 및 in vitro 시험**

[0035] 2 mm으로 분쇄한 티모시를 65℃ 건조기(dry oven)에서 24시간 동안 건조시킨 후 공시재료로 사용하였고, 3 ㎝×5.5 ㎝로 자체 제작한 nylon bag(Ankom Forage bag: R1020)에 공시재료 0.95 g을 넣어 모든 처리구에 일괄적으로 사용하였으며, 0.05 g은 처리구별로 메탄 저감을 위한 원료로 사용하였다.

[0036] 공시재료인 티모시와 각 처리구별 원료를 nylon bag에 넣어 열 봉합(heat sealing)한 후 50 mL 혈청 병(serum bottle)에 투여하였다. 이후 반추위액과 McDougall 버퍼(Mcdougall, 1948)를 1:2의 비율로 혼합한 배양액 60mL를 혐기상태(O2-free N2)로 분주한 후 부틸 고무(butyl rubber)와 알루미늄 씰(aluminum seal)을 이용하여 혈청 병을 밀봉하였다. 각 처리구별 배양은 39℃의 진탕 배양기(shaking incubator, Jeio Tech; SI-900R, 120 rpm)에서 시간대별(12 및 24시간)로 3반복으로 in vitro 시험을 수행하였다.

[0037] **실시예 3: 분석항목 및 방법**

[0038] 3-1. pH 분석

[0039] pH 분석을 위해, Weaton decapper(Weaton Co., USA)를 이용하여 혈청 병의 부틸 고무와 알루미늄 씰을 제거한 후 배양액의 pH를 pH 측정기(Mettler Toledo, MP230)를 이용하여 측정하였다.

[0040] 3-2. 건물 소화율(DMD) 분석

[0041] 건물 소화율(dry matter digestibility) 분석을 위해, 혈청 병 내 nylon bag을 수거하여 물을 채운 수조에 넣고, Heidolphs Rotamax 120(Heidolph Instrument, Germany)를 이용하여 100 rpm에서 20분간 3회 세척 후, 65℃의 건조기(Jeio tech, Korea)에서 약 24시간 동안 건조시켜 건물 잔량을 측정하였다. 이후 발효 전 기질량과의 차이를 구한 후, 상기 차이를 발효 전 기질량의 백분율로 환산하여 건물 소화율을 계산하였다.

[0042] 3-3. 미생물 성장량(MGR) 분석

[0043] 미생물 성장량(microbial growth rate) 분석을 위해, 배양액 1 mL를 취한 후, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료입자를 제거하였다. 이후 상등액을 14,000 rpm에서 3분간 재원심분리하여 미생물 펠렛(pellet)을 침전시킨 다음 상등액 제거 후, 펠렛에 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 6.5)를 1 mL 첨가하여 볼텍스(vortex)로 교반하는 세척 과정을 3회 반복 수행하였다. 이후 분광광도계(spectrophotometer, BIO-RAD Model 680)로 550 nm에서 광학 밀도(optical density; O.D) 값을 측정하여 미생물 성장량을 계산하였다.

[0044] 3-4. 총 가스 발생량 분석

[0045] 총 가스 발생량은 Theodorou 등(1994)의 방법을 참고하여 수행하였다. 혈청 병의 상부 공간에 있는 가스를 detachable pressure transducer 및 digital readout voltmeter(Laurel Electronics, Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하였고, 이후 9 mL 진공관(vacutainer)에 가스를 포집하여 가스 크로마토그래피(gas chromatography; GC, HP 5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 메탄 및 이산화탄소 발생량을 측정하였다.

[0046] 3-5. 휘발성 지방산(VFA) 분석

[0047] 휘발성 지방산(volatile fatty acid) 분석을 위해, 배양액 1 mL를 취한 후, 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료입자를 제거하였다. 이후 상등액을 0.20 μM 시린지 필터(syringe filter)로 여과한 다음 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC, Agilent-1200, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시료의 주입량은 20 μL였고, 이동상 용액은 0.0085 NH_2SO_4를 사용하였으며, 유속은 0.6 mL/분이었다. 컬럼은 300 mm× 7.8 mm I.d. MetaCarb 87H(Varian, USA)을 35℃의 조건에서 사용하였다.

[0048] 3-6. 미생물 군집 변화 분석

[0049] 미생물 군집의 변화를 분석하기 위해, 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 수행하였다. 배양액 1 mL를 취한 후, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 사료 입자를 제거한 다음, NucleoSpin Soil(Macherey-Nagel, Duren, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하고, Nano-drop(Thermo Scientific, Wilmington, Delaware USA)을 이용하여 DNA의 농도를 측정한 후 10 mg/μL로 보정하여 실험에 사용하였다.

[0050] 실시간 중합효소 연쇄반응에 사용된 프라이머(primer)는 각각 총 박테리아(total bacteria, Denman and McSweeney, 2006), 메탄 생성균(Ciliate-associated methanogens, Skillman et al., 2006), 메탄 세균(Methanogenic archaea, Denman et al., 2007), 피브로박터 숙시노게네스와 루미노코쿠스 프라베파시엔스(Fibrobacter succinogenes and Ruminococcus flavefaciens, Denman and McSweeney, 2006) 및 루미노코쿠스 알부스(Ruminococcus albus, Koike and Kobayashi, 2001)에 대한 프라이머이다.

[0051] 실험에 사용하기 전, 전방향 프라이머(forward primer; FW) 10 μL 및 역방향 프라이머(reverse primer; RW) 10 μL를 증류수 180 μL를 섞어 10 pmol로 희석하였다. 0.2 mL PCR tube(PCR-0208-FCP-C, Corning Axygen, New York, USA)에 10 mg/μL로 보정한 DNA와 증류수를 섞어 9 μL 분주하고, 희석된 프라이머 1 μL와 SYBR Green(Code: QPK-201, Toyobo Co., LTD., Japan) 10 μL를 섞은 pre-mixture를 11 μL 분주하여 총 부피가 20 μL가 되도록 하였다.

[0052] 이후 Denman과 McSweency(2006), Denman 등(2007)의 방법을 참고하여 Real-Time PCR(CFX96TM Real-Time system, BIO RAD)을 수행하였으며, 총 박테리아를 레퍼런스 유전자(reference gene)로 사용하여 섬유소 박테리아(Ruminococcus albus, Ruminocuccus flavefaciens, Fibrobacter succinogenes), 메탄 세균 및 메탄 생성균의 발현율을 측정하였으며, 대조구를 1로 보고 다른 처리구를 상대정량하여 미생물 군집의 변화를 분석하였다.

[0053] **실시예 4: 통계처리**

[0054] 통계처리는 SAS package program(2002)의 General Linear Model(GLM) procedure에 따라 처리하였으며, 각 처리구간의 유의성 검증을 위해 분산 분석을 실시 후, Tukey multiple range test 로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다($P<0.05$).

[0055] **시험예 1: 잣송이 유래 피톤치드 오일의 성분 분석**

[0056] 잣송이(*Pinus koraiensis*) 부산물 유래 피톤치드 오일에 함유된 화합물의 종류를 분석하였다. 성분은 DB-5MS 컬럼에서 용출되는 순서대로 나열되었으며, FID 피크 면적 정규화로 얻은 백분율로 함량을 분석하였다. (표 1)

표 1

[0057]

성분	함유%	RT
Monoterpene hydrocarbons		
α-Pinene	0.38 ± 0.02	3.884
α-Pinene	37.98 ± 0.26	4.027
Camphene	1.65 ± 0.03	4.288
2,4(10)-Thujadiene	0.38 ± 0.01	4.332
β-Phellandrene	0.57 ± 0.01	4.604

β-Pinene	10.03 ± 0.10	4.713
β-Myrcene	2.37 ± 0.04	4.809
δ.3-Carene	0.91 ± 1.47	5.181
β-Cymene	0.89 ± 0.01	5.432
D-Limonene	30.27 ± 0.22	5.515
γ-Terpinene	0.06 ± 0.00	5.979
Terpinolene	0.22 ± 0.00	6.437
α-Pinene oxide	0.16 ± 0.01	6.703
cis-Verbenol	0.12 ± 0.01	6.866
Limonene oxide	0.14 ± 0.01	7.228
Oxygenated monoterpenes		
Cineole	1.37 ± 0.02	5.575
Fenchone	0.38 ± 0.01	6.518
Linalool	0.79 ± 0.02	6.621
D-Fenchyl alcohol	0.33 ± 0.01	7.021
α-Campholenal	0.25 ± 0.00	7.134
trans-Verbenol	0.32 ± 0.00	7.444
Camphor	0.46 ± 0.00	7.51
endo-Borneol	0.18 ± 0.01	7.899
Isopinocamphone	0.12 ± 0.01	7.979
4-Terpineol	0.13 ± 0.01	8.022
p-Cymen-8-ol	0.16 ± 0.00	8.096
α-Terpineol	0.56 ± 0.26	8.245
Myrtenol	0.31 ± 0.22	8.27
trans-Isopiperitenol	0.09 ± 0.01	8.33
Berbenone	0.21 ± 0.02	8.463
trans-Carveol	0.30 ± 0.02	8.604
cis-Carveol	0.12 ± 0.01	8.815
Linalyl acetate	1.07 ± 0.02	9.015
α-Fenchyl acetate	0.81 ± 0.01	9.63
β-Terpineol	0.06 ± 0.01	10.523
Sesquiterpene hydrocarbons		
α-Longipinene	0.40 ± 0.01	10.686
α-Cubebene	0.55 ± 0.04	11.028
Longifolene	1.61 ± 0.03	11.58
trans-Caryophyllene	0.48 ± 0.02	11.684
α-Humulene	0.08 ± 0.00	12.183
α-Muurolene	0.12 ± 0.01	12.706
Oxygenated sesquiterpenes		
trans-Pinocarveol	0.55 ± 0.01	7.396
Caryophyllene oxide	0.56 ± 0.00	13.878
Total (%)	98.48 ± 1.57	
Monoterpene hydrocarbons (%)	86.11 ± 1.45	
Oxygenated monoterpenes (%)	8.02 ± 0.12	
Sesquiterpene hydrocarbons (%)	3.25 ± 0.08	
Oxygenated sesquiterpenes (%)	1.11 ± 0.01	

[0058] RT: Retention time

[0059] **시험예 2: 잣송이 유래 피톤치드 오일이 반추동물 메탄 저감에 미치는 영향**

[0060] 잣송이(*Pinus koraiensis*) 부산물 유래 피톤치드 오일이 in vitro 반추위 내 발효성상 중 pH, 건물 소화율 및 미생물 성장량에 미치는 영향을 평가하였다. 잣송이 부산물에서 추출한 피톤치드 오일을 20 ul(Low), 50 ul(Medium), 및 100 ul(High)의 농도로 첨가하고, 12 시간(표 2) 또는 24 시간(표 3) 동안 반추위 발효성상의 주요 지표인 휘발성지방산 농도 및 암모니아태질소 농도 등을 측정하였다.

표 2

[0061]

Parameters	Control	PIN essential oil			SEM	P value		
		Low	Medium	High		L	Q	C
Total gas (ml)	80.74^{a}	69.95^{b}	55.80^{c}	44.00^{d}	1.58	<.0001	<.0001	0.0034
Methane (ml)	13.50^{a}	7.95^{b}	7.36^{b}	5.09^{c}	0.41	<.0001	<.0001	<.0001
Carbon dioxide (ml)	61.13^{a}	40.71^{b}	41.71^{b}	30.96^{c}	1.85	<.0001	<.0001	0.0044
Ammonia (mg · dL^{-1})	8.04^{b}	12.50^{a}	12.05^{a}	12.63^{a}	0.36	<.0001	<.0001	<.0001
DMD (%)	41.53^{a}	36.87^{b}	33.17^{c}	31.33^{d}	0.48	<.0001	<.0001	<.0001
pH	6.76^{c}	6.83^{bc}	6.91^{b}	7.11^{a}	0.03	<.0001	<.0001	0.5299
Total VFA (mmol)	52.15^{a}	48.53^{b}	43.84^{c}	43.91^{c}	0.58	<.0001	<.0001	<.0001
Acetate (mmol)	33.84^{a}	31.13^{b}	28.11^{c}	26.21^{d}	0.27	<.0001	<.0001	<.0001
Propionate (mmol)	9.99^{a}	10.22^{a}	6.97^{b}	5.91^{b}	0.27	<.0001	<.0001	0.1171
Butyrate (mmol)	8.32^{b}	7.19^{b}	8.77^{b}	11.79^{a}	0.43	<.0001	<.0001	0.0066
A/P ratio	3.39^{b}	3.05^{b}	4.07^{a}	4.49^{a}	0.15	<.0001	<.0001	0.7572
Protozoa (x10^{4} · mL^{-1})	30.74^{a}	12.78^{b}	9.45^{b}	10.74^{b}	1.51	<.0001	<.0001	<.0001

[0062] PIN(pinus koraiensis): 잣송이, SEM(standard error of the means): 평균 오차, L: 선형, Q: 2차원, C: 입방, MGR(microbial growth rate): 미생물 성장량, OD(optical density): 광학 밀도, DMD(dry matter digestibility): 건물 소화율, VFA(volatile fatty acid): 휘발성 지방산, A/P: acetate/propionate

표 3

[0063]

Parameters	Control	PIN essential oil			SEM	P value		
		Low	Medium	High		L	Q	C
Total gas (ml)	115.49^{a}	109.82^{b}	86.66^{c}	64.82^{d}	1.16	<.0001	<.0001	0.2550
Methane (ml)	19.13^{a}	16.50^{b}	13.66^{c}	4.76^{d}	0.51	<.0001	<.0001	0.0300
Carbon dioxide (ml)	74.42^{b}	79.13^{a}	69.62^{b}	30.51^{c}	2.89	<.0001	<.0001	0.0002
Ammonia (mg · dL^{-1})	10.13^{b}	10.13^{b}	11.03^{ab}	11.67^{a}	0.38	0.0271	0.004	0.9629
DMD (%)	54.60^{a}	51.83^{b}	46.33^{c}	42.40^{d}	0.73	<.0001	<.0001	0.0484
pH	6.30	6.36	6.44	6.33	0.04	0.1206	0.6003	0.0238
Total VFA (mmol)	63.53^{a}	64.17^{a}	56.07^{b}	53.80^{b}	0.64	<.0001	<.0001	0.0955
Acetate (mmol)	41.13^{a}	36.91^{b}	33.87^{c}	31.26^{d}	0.38	<.0001	<.0001	<.0001
Propionate (mmol)	13.89^{b}	17.03^{a}	12.15^{c}	8.56^{d}	0.30	<.0001	<.0001	0.0002
Butyrate (mmol)	8.51^{c}	9.58^{bc}	10.30^{b}	13.97^{a}	0.32	<.0001	<.0001	0.0526
A/P ratio	2.96^{b}	2.20^{c}	2.77^{b}	3.67^{a}	0.10	<.0001	<.0001	<.0001
Protozoa (x10^{4} · mL^{-1})	24.26^{a}	16.11^{b}	10.93^{c}	5.55^{d}	1.29	<.0001	<.0001	0.0049

[0064] PIN(pinus koraiensis): 잣송이, SEM(standard error of the means): 평균 오차, L: 선형, Q: 2차원, C: 입방, MGR(microbial growth rate): 미생물 성장량, OD(optical density): 광학 밀도, DMD(dry matter

digestibility): 건물 소화율, VFA(volatile fatty acid): 휘발성 지방산, A/P: acetate/propionate

[0065] 표 2 및 3에 나타난 바와 같이, 잣송이(*Pinus koraiensis*) 부산물 유래 피톤치드 오일을 12 시간 또는 24 시간 처리하였을 때에 각 파라미터가 변화하였다. total gas, methane, 및 carbon dioxide의 수준의 경우, 12 시간 및 24 시간 모두에서 피톤치드 오일의 농도가 증가할수록 이 유의적으로($P<0.0001$) 감소하는 것으로 나타났다. 건물 소화율의 경우, 12 시간 및 24 시간 모두에서 피톤치드 오일의 농도가 증가할수록 건물 소화율의 수준이 유의적으로($P<0.0001$) 감소하였다. 배양액의 pH의 경우, 12 시간에서는 피톤치드 오일의 처리 농도가 증가할수록 가 유의적으로 ($P<0.0001$) 높아졌으나, 24 시간에서는 유의적 ($P>0.05$) 차이가 나타나지 않았다. 암모니아 농도의 경우, 12 시간 및 24 시간 모두에서 피톤치드 오일의 농도가 증가할수록 암모니아의 농도가 유의적으로 ($P<0.0001$, $P=0.0271$) 증가하였다.

[0066] 총 휘발성지방산과 acetate의 생성량의 경우, 12 시간에서 피톤치드 오일의 농도가 증가할수록 control에 비해 생산량의 수준이 낮았으나, propionate는 12시간 low 첨가에서, butyrate는 12시간 medium과 high 첨가에서 유의적으로 ($P<0.0001$) 높은 결과를 보였다. AP ratio 또한 medium과 high 첨가에서 유의적으로 ($P<0.0001$) 높은 결과를 보였다.

[0067] 발효 24시간의 총 휘발성지방산 생성은 control과 low 첨가에서 유의적으로 ($P<0.0001$) 높은 결과를 보였다. Acetate 생성량은 control 대비 PIN essential oil의 농도가 높을수록 유의적으로 ($P<0.0001$) 낮은 결과를 보였고, propionate 생성량은 low 첨가에서, butyrate는 생성량은 high 첨가에서 유의적으로 ($P<0.0001$) 높은 결과를 보였다. AP ratio는 high 첨가에서 유의적으로 ($P<0.0001$) 높은 결과를 보였다. Protozoa의 수는 발효 12, 24 시간 모두에서 PIN essential oil을 첨가했을 때 control에 비해 유의적으로 ($P<0.0001$) 낮은 결과를 보였다.

[0068] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

도면1

