

# 산삼배양액 이용에 관한 반추위 미생물 대사 연구



글 | 장문백 교수(중앙대학교 동물자원과학과)

## 산삼 배양근 배양액의 사료적 가치

현재 bioreactor 배양을 통한 희귀종인 Panax속 식물군의 의·약학적 중요성 및 응용 가능성이 제시되고 있으며, 특히 산삼 및 유용 균사체의 대량생산 산업이 활발히 이루어지고 있는 실정에서 이에 따른 경제적인 부가가치 산업이 활성화되고 있다.

이렇게 산업적으로 생물배양기에서 배양된 상향 균사체는 항암 성분인  $\beta$ -D-Glucan의 지표물질인  $\alpha$ -methyl-D-glucoside의 함량이 건조 중량의 28% 이상으로 나타났음이 확인되었으며, 산삼의 경우에는 genomic DNA 지문 분석법(AFLPs)에 의해 산삼과 인삼의 특이성과 차이를 명확히 입증한 상태이다. 또한 염색소 DNA상의 특정 유전자(rbcL과 psbD)의 존재 확인에 기존의 산삼과 배양생산된 산삼배양근의 유전적 동질성이 입증되었다.

그러나 이러한 생물배양기(bioreactor)를 이용한 배양 기술은 많은 양의 배양액이 사용되며, 유용 균사체의 성장이 경제적 가치에 도달 후 재활용 될 수

없어 폐기 처분에 따른 경제적 손실을 초래하게 된다. 또한 배양액 중 배양 조건에 의해 탈락되는 산삼의 성분이 2% 정도 존재하며, 이중 saponin의 함량이 10% 이상인 것으로 확인되었다.

산삼 배양근 내에 존재하는 saponin은 전염병, 위장병, 관절통의 약품으로 사용되어 왔으며 암모니아를 화학적 결합에 의해 배출을 억제하여 냄새를 억제하는 urease 활성 방해 작용 기전을 가지고 있어 urea가 암모니아로 분해되는 것을 방해한다.

또한 oligosaccharide와 함께 유용 미생물의 증식을 도와 배설물 냄새를 억제하고, 또한 장내 미생물군의 정상화에 기여하는 것으로 알려져 있다.

반추위의 발효를 개선하려는 친환경적 수단으로 식물체 내에 존재하는 2차적인 물질의 특성에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다.

이러한 연구들은 식물 자체가 포식체로부터 자신을 보호하려는 다양한 2차적 구성 물질을 포함하고 있다는 것이 밝혀지고, 특히 식물체 중에 이러한 작용을 하는 물질로 잘 알려진 구성 물질들은 반추가

(공동연구 : 배귀석(중앙대), 남경표(중앙대), 김혜숙(중앙대), 이상구((주)네오바이오), 최행석((주)우수컴), 민우기(중앙대), 주종원(건국대), 맹원재(건국대))

축의 사료에 널리 분포하는 saponins(Makkar와 Becker 1996), tannins(Pell 등, 2000)과, 사료 소화율에 영향을 주는 화학적 구성물인 lignin 등이 있다(Kovacs 등, 1998).

이러한 물질들은 비록 반추위 내 발효 조건을 개선하는 잠재적인 효과는 크지만, 이런 화합물이 높은 수준으로 공급되면 반추 미생물 합성을 저해(Wang 등, 1994)할 뿐 아니라, 반추 가축 생리에 악영향을 미치기도 한다(Makkar 등, 1995).

이런 효과는 우회 단백질의 구성 요소가 소장에서 이용 유·무에 따라 반추 가축에게 유용하거나 해가 될 수 있다. 그러나 이러한 물질들은 가축의 분뇨를 통한 질소와 암모니아의 방출을 감소시키며(Hill과 Learer, 1991; Wang 등, 1996), 특히 saponin은 in vitro상에서 메탄생성 감소에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나(Wang 등, 1998), 이와 같은 많은 연구들은 saponin, tannin 구성물질과 lignin의 구조다양성 때문에 일관성이 없이 진행되고 있는 것이 사실이다.

반추위에서 합성된 미생물 단백질은 반추동물의 소장에 유입하는 단백질원의 많은 부분을 차지하고 있으며, 반추위에서 형성된 미생물 단백질의 상당 부분이 암모니아를 이용하여 생성된다(Wallace 등, 1994). In vitro 방법에 의한 연구에서 프로토조아에 의한 박테리아의 포식관계는 반추위에 미생물 단백질 합성량을 조절하는 주요 원인이 되므로(Wallace와 McPherson, 1987), 반추위의 내에서의 protozoa 제거는 미생물단백질 합성량을 극대화시킬 수 있는 방법이라 할 수 있다(Bird 등, 1979; Demeyer와 Van Nevel, 1979).

이러한 관점에서 프로토조아 억제효과를 가지고

있는 물질로써 미생물 단백질 이용성을 개선하려는 시도가 행해져 왔으나, 독성과 관계된 문제로 많은 사용이 이루어지지는 않았다. 그러나 반추 가축에게 스테로이드계 saponin의 급여시 반추위 내에서 프로토조아 성장 억제에 의한 반추위 발효 조건 증진 효과, 성장율과 유생산 증대에 영향을 미쳤으며, 반추 가축의 배설물 내에 암모니아함량 감소로 인한 친환경적 물질의 특성을 가지고 있어(Makkar 등, 1988) 현재 연구가 활발히 진행되고 있다.

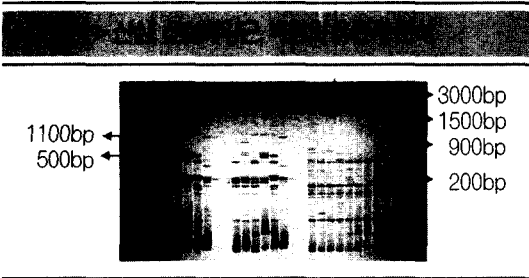
### 산삼과 산삼 배양근의 유전적 차이

본 연구를 위하여 사용한 DNA 지문 분석 방법은 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) · Silver Staining 방법(Van Der Merwe 등, 2000)으로, 제한 효소를 처리하여 얻어진 다양한 크기의 DNA 절편에 선택적으로 DNA 연결자를 연결시킨 후 각 연결자를 포함하는 짧은 염기를 사용하여 다양한 길이의 염기 절편을 선별적으로 증폭(1차), 재증폭(2차)시켜 얻어진 절편들의 다양성을 지문화하여 polymorphism을 나타내는 증폭 산물을 기준으로 각 개체가 가지는 유전적 다양성의 지수로 표지(marking)하여 원재료 산삼과 배양 산삼과 동일한 유전적 조성을 확인하였고, 산삼 유전자는 재배 인삼의 유전적 조성고 차별됨을 확인하였다.

또한 산삼에서만 특이적으로 증폭되는 유전자 부위는 재배 인삼과 구별되는 유전적 표지자(genetic marker)로 선별하여 활용할 수 있는 자료가 된다.

본 실험에 사용된 산삼은 (주)Neobio가 보유하고 있는 산삼 6개체(70~100년생) 및 이로부터 조직 배

양하여 대량생산하고 있는 배양 산삼근 6개 cell line, 국내 재배 인삼 10개체(4~6년생, 산지별 임의 추출)의 total DNA를 추출·정제하여 사용하였다. 그 결과 AFLPs 방법에 따른 지문 분석은 재배 인삼과 산삼의 유전적인 조성의 차이가 있었을 뿐 아니라 원재료 산삼과 배양 산삼의 유전적 조성은 환경이나 형태가 변하더라도 유전적 변이가 없음을 genomic DNA분석법을 통하여 확인하였다(그림 1)).



### 반추위 발효성상 변화

배양 시간에 따른 반추위 내 pH의 변화에서는 배양초기 3시간까지는 대조구와 처리구에서 차이가 없었으나, 배양 6시간 이후 WGM 3% 처리구에서 유의적으로 가장 낮았으며, 12시간 이후부터는 전체 처리구에서 차이를 나타내었다. 특히, 배양 6시간에는 WGM 3% 처리구에서 6.61로 다소 낮은 pH를 보였으나 배양 24시간까지 6.43을 유지하였으며, WGM 처리구 중에서 전체 배양기간 동안 가장 낮은 pH를 나타내었다.

이는 김 등(1994)이 인삼박을 알팔파 대체수준으로 급여한 실험에서도 배양 6시간 이후 급격히 감소하는 pH 변화와 같은 경향이었다.

NH<sub>3</sub>N 농도는 대조구보다 WGM 처리구에서 배양 9시간까지 낮은 농도를 보였으나 12시간 이후

1, 5% WGM처리구에서 높아지는 경향을 나타내었으며, 3% 처리구와 대조구는 낮아지는 경향을 나타내었다. 배양 24시간부터 WGM 3% 처리구에서 0.10mg/100ml로 가장 낮은 NH<sub>3</sub>N 농도를 보였으나, WGM 5% 처리구에서 3.50mg/100ml로 가장 높았다.

반추위 미생물 성장에 있어서 NH<sub>3</sub>N은 중요한 질소원이며 반추위 미생물 단백질의 약 80%는 NH<sub>3</sub>N으로 부터 유래하고(Bryant와 Robinson, 1963), 최적 미생물 성장에 필요한 적정 NH<sub>3</sub>N 농도는 일정치 않으나 in vitro에서 5~8mg/100ml (Allison, 1970), in vivo의 경우 21~42 mg/100ml(Hespel 등, 1979) 수준인데 시험기간 중 NH<sub>3</sub>N 함량은 전체적으로 WGM 처리구에서 수준보다 다소 낮은 결과를 나타내었다.

이러한 결과는 반추위내 NH<sub>3</sub>N 농도는 미생물 단백질 합성비율과 단백질 분해율에 따라 결정되는데(Mehrez 등, 1977), 본 시험에서 대조구에 비하여 5% 처리구를 제외한 WGM 처리구의 낮은 암모니아 농도를 보인 것은 WGM 처리구가 대조구의 반추위내 단백질 소화율이 다른 기질보다 낮기 때문으로 사료되며, Goodall 등(1980)의 연구 결과에 나타난 것처럼 saponin의 작용에 의해 ammonia 농도를 낮추는데 영향을 미친 동일한 결과로 사료된다(김 등, 1994).

미생물단백질 합성량은 배양 이후 전체 처리구에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.

특히 WGM 3%처리구에서 배양 6시간 이후 미생물단백질 합성량이 대조구와 다른 처리구에 비하여 급격히 증가하였고 배양 9시간대에서 0.53mg/100ml로 가장 높았으며, 이후 다소 감

소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 saponin 성분이 함유되어 있는 tannin 결정체와 saponin의 결합 물질을 첨가한 in vitro 시험에서 15N을 이용한 반추위미생물 합성량 측정시 배양 초기에 tannin내에 존재하는 saponin 성분에 의해 미생물들에 의한 사료내 단백질 부족 효과에 의하여 미생물단백질 합성량이 다소 감소하였으나 배양 시간이 증가할수록 반추위미생물들에 의해 생성되는 short·chain fatty acid의 이용성 증가에 의해 미생물단백질 합성량이 증가한다는 보고와 일치 (Makkar 등, 1997)했는데, 이는 tannin과 saponin 결합물질이 영양물질에 대한 식물자체의 물리·화학적 변형 효과에 의한 것이라 하였다 (Freeland 등, 1985; Ikedo 등, 1996).

배양시간에 따른 반추위내 protozoa 수의 변화는 대조구에 비하여 WGM 처리구에서 전반적으로 배양 9시간까지 낮아지는 경향을 보였고 전체 배양시간 동안 WGM 3% 처리구에서 가장 낮은 결과를 나타내었다. 이는 steroid계 saponin을 첨가한 RUSITEC(Rumen Simulation Technique) 시험에서 반추위 미생물단백질 합성량에는 변화가 없었으나 protozoa 수는 감소시키며(Wang 등, 1998), saponin 성분이 프로토조아 제거 효과를 가지고 있다는 시험 결과와 일치하였다(Goodall, 1980; Goodall 등, 1982; Kil 등, 1994; Makkar 등, 1988). 배양시간에 따른 반추위 내 NDF와 ADF의 소화율은 대조구와 모든 WGM 처리구에서 배양시간이 경과되면서 전체적으로 높아졌다.

또한 NDF 소화율은 대조구와 WGM 3% 처리구에서, ADF 소화율은 전체 처리구에서 유사한 경향을 나타내었는데, Wang 등(1998)은 saponin 첨가

구에서 전체 gas 생성량의 차이 없이 methane 생성량이 15% 감소하였으며, 건물 소화율에는 차이가 없었다는 결과와 일치하였다.

Total VFA 생성량에서는 대조구가 WGM 처리구보다 다소 높은 생성량을 보였지만, 배양 12시간부터는 WGM 5% 처리구에서 통계적 차이 없이 높은 Total VFA 생성량을 보였다.

Acetate 생성량은 배양 6시간부터 WGM 처리구가 대조구보다 높은 생성량을 보였으며, 특히 WGM 3% 처리구에서 다른 처리구보다 다소 높았다. Propionate 생성량에서는 배양 12시간부터 WGM 3%와 5% 처리구가 다른 처리구들에 비해 높은 생성량을 나타내었고, butyrate 생성량에서도 마찬가지로 WGM 첨가구가 대조구에 비해 높았으며, 전체적으로 total VFA와 acetate, propionate, butyrate 함량은 수준별 WGM함량에 의해 차이가 없었다 (Wang 등, 1998).

A/P 비율은 조사료원 함량이 높은 시험 사료의 배합으로 배양 초기부터 4에 가깝게 높은 수치를 유지하다가 12시간 이후부터는 급격히 낮아졌으며, A/P 비율 또한 대조구보다 WGM 처리구에서 다소 높은 비율을 유지하였고 배양 12시간대 이후로는 전체 처리구에서 차이가 없었다.

본 실험의 종합결론은 수준별 산삼 배양액에 의한 반추위내 미생물 발효성상에 미치는 영향에 대하여 조사하기 위해 실시된 연구의 결과는 용해도가 높거나 급여 초기 사료의 이용률이 저하되는 급여 체계에서 산삼 배양액의 첨가는 초기 반추위 미생물의 사료 이용률 증진과 프로토조아 활성 억제 효과에 의해 반추위 미생물합성량 증진에 도움이 될 수 있을 것이다. ㉕