

최 종
연구보고서

광물질 proteinates의 개발과 응용에 관한 연구
Studies on the development and application of
mineral proteinates

연구기관
중 앙 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “광물질 proteinates의 개발과 응용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 중앙 대학교

총괄연구책임자 : 백 인 기

세부연구책임자 : 한 재 홍

연 구 원 : 이 문 구, 김 찬 호

연 구 원 : 신 광 석, 박 광 월

연 구 원 : 남 궁 년

연 구 원 : 신 복 규, 지 용 석

연 구 원 : 원 동 호

참 여 기 업 : (주) 이노바이오

요 약 문

I. 제 목

광물질 proteinates의 개발과 응용에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물이나 동물에 있어서 광물질의 흡수나 대사 활동이 원활히 이뤄지기 위해서 chelation이 이뤄진다. 이러한 형태로 광물질을 아미노산과 결합시키면 생물체내에 광물질의 형태와 더 유사하며 흡수 이용률이 높아질 것이다. 그러나 amino acid-chelate는 하나의 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 약리적 사용수준에서 과다 사용 시 아미노산 중독의 우려가 있어서 사용량에 문제가 될 수 있지만 proteinate가 개발된다면 여러 가지 아미노산으로 결합 되어 있기 때문에 사용상의 제약을 덜어 줄 수 있다. 더욱이 사료 내 항생제 첨가 규제가 강화됨에 따라서 항생제를 대체할만한 약리적 수준에서 사용 되는 mineral proteinate(예: Zn, Cu)의 사용이 불가피하게 되었다. 또한 Chelate 미네랄 제품의 국내외적 가격 경쟁력을 높이기 위해 기존에 제품화 된 amino acid-chelate보다 저렴한 chelate 제제인 mineral proteinate의 개발이 요망된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

광물질 proteinates의 개발과 응용에 관한 연구의 내용을 세부 연구 과제 별로 나누어 살펴보면 아래와 같다.

제1 세부과제명	Mineral proteinate의 생산 및 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험 (중앙 대학교 : 백 인 기)
제2 세부과제명	Mineral soy proteinate 제제의 분자적 특성 규명 (중앙 대학교 : 한 재 흥)

제 1 세부과제의 연구 내용 및 범위:

1차년도 (2005)에는 Fe proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험을 하

였고, 2차년도(2006)에는 Zn, Cu proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여 시험을 실시하였다. 마지막 3차년도(2007)는 Ca, Mg chelate 첨가 사양시험을 실시하였다.

제 2 세부과제의 연구 내용 및 범위:

1차년도 (2005)에는 수용성 soy digest의 단백질의 분자량 분포 측정과 미네랄 proteinate 생산 조건 확립에 관한 연구를 하였고, 2차년도(2006)에는 Mineral soy proteinate의 금속 이온 함량 측정과 결합 형태 규명에 관한 연구를 실시하였다. 마지막 3차년도(2007)는 새로운 chelating agents 를 이용한 Ca, Mg의 chelating 조건 개발 및 미네랄 proteinate 형성 기작 규명에 관한 연구를 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1-1. 제1 세부과제 연구 개발 결과

가. 1차년도

Soy digest에 iron soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% NaOH를 다양한 수준으로 첨가하여 chelation시켰다. 그 결과 pH 9.6일 때 Fe content와 Fe recovery는 19.3%, 99.3%로 가장 높았다. Fe-Soy proteinate의 산란계와 육계에서의 효과를 알아보는 실험을 실시하였다.

산란계에서는 난황 내 Fe 함량은 4주 이후에 침착되기 시작하였고 control에 비해 철분첨가구들에서 향상되었고 SP-Fe 100에서 가장 높았다($p < 0.05$). 철분강화란 생산에 있어서 35일 동안 SP-Fe 100ppm 첨가가 가장 좋은 효과를 나타냈다. 육계 실험에서는 iron-soy proteinate 200ppm 급여시 날개살, 다리살의 Fe 함량이 증가되었고 육색도 좋아지며 iron-methionine chelate, Ferrous sulfate 보다 더 좋은 결과를 보였다.

나. 2차년도

Soy digest에 Cu soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% NaOH를 다양한 수준으로 첨가하여 chelation시켰다. Cu-soy proteinate는 pH 5.4 일 때 Cu content와 Cu recovery는 18.4%, 75.6%로 가장 높았다. Zn-soy proteinate는 pH 8.9 일 때 Zn content와 Zn recovery는 18.5%, 83.6%로 가장 높았다.

Cu soy-proteinate의 효과를 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 육계에서는 전 구간을 봤을 때 증체량 사료섭취량 폐사율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 사료 효율에서 Cu를 첨가한 첨가구들이 무첨가구보다 유의적으로 낮게 나왔다($P < 0.05$). 산란계에서는 사료 전환률은 구리를 첨가한 실험구들이 유의적으로 무첨가구보다 낮게 나왔다. 계란 품질의 난황색에서는 200ppm 첨가구가 다른 첨가구들에 비해 유의적으로 높았다. 자돈 시험에서는 생산성에서는 유의적인 차이는 없었지만 일당 증체량에서 Cu + Zn proteinate를 첨가한 실험구와 항생제구가 수치상으로 높게 나왔다. 또한 사료 요구율에서는 Cu + Zn proteinate를 첨가한 실험구와 항생제구가 낮은 경향을 보였다.

다. 3차년도

Soy digest에 Mg soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% KOH를 다양한 수준으로 첨가하여 chelation시켰다. Mg-soy proteinate는 pH 9.7 일 때 Mg content와 Mg recovery는 8.42%, 19.26%로 가장 높았다.

Mg proteinate와 Fe proteinate를 육성비육돈 사료에 첨가 급여하였을 때의 영향을 알아보기 위한 실험을 실시했다. 생산성에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 부위별 L value는 lion과 tender loin에서 SP-Mg 50 첨가구가 ham에서는 SP-Fe 100와 SP-Mg 50 첨가구가 높은 경향을 보였다. a value에서는 유의적인 차이를 보이지 않았지만 SP-Fe 100 + SP-Mg 50첨가구가 수치상으로 높은 경향을 보였다. b value에서는 proteinate 첨가구들이 무첨가구에 비해 높은 경향을 보였다. 근육 내 pH는 도축 시점으로부터 9시간 이내에 SP-Fe 100 + SP-Mg 50 첨가구가 낮은 경향을 보였다. 근육 내 온도는 도축시점으로부터 한 시간 정도까지 SP-Fe 100 + SP-Mg 50 첨가구가 높은 경향을 보였다.

Ca proteinate를 산란계 사료에 첨가 급여하였을 때의 효과를 알아보기 위한 실험을 하였다. 사양시험결과는 예상과는 달리 proteinate 첨가구가 다른 처리구들에 비해 산란율, 섭취량, 사료효율이 현저하게 떨어지고 난각의 강도도 현저하게 떨어졌다. 이는 proteinate 제조과정에서 석회석의 용해제로 사용된 염산으로부터 온 염산에 의해 Cl 중독에 의한 것으로 판단된다. Cl 중독문제를 해결하게 되면 양질의 Ca proteinate 제조가 가능할 것이다.

1-2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

- 연구자료 논문게재
- 참여기업에서 제품생산에 활용
- 최근 proteinate 소재인 대두박 가격이 시험 개시 시 보다 2배 이상 급등하여 생산원가 높아짐. 그에 따른 대두박 대체 소재 개발 필요.

2-1. 제2 세부과제 연구 개발 결과

가. Metal-methionine 제제의 분자구조 규명

Mineral-methionine chelates의 분자구조를 규명하기 위해서 Copper sulfate와 L-methionine과의 반응으로 $Cu(L-Met)_2$ 화합물을 합성하였으며 이 화합물과 더불어 Copamin, Zincamin, Ferramin 등을 FT-IR과 XRD로 분석하였다. Mineral-methionine chealte 제제의 FT-IR spectra를 methionine 및 mineral salts의 spectra와 비교하였을 때, Copamin과 Zincamin은 Cu, Zn 2가 이온과 methionine이 chelation되었으나, Ferramin은 chelation 되지 않았음이 확인되었다. Methionine의 경우 1508 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} , 1583 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} 에서 다양한 C=O stretching peak이 관찰되나, Copamin 과 Zincamin에서는 chelate 형성에 의해 1616 cm^{-1} 과 1604 cm^{-1} 에서만 C=O stretching이 관찰된다. Ferramin의 경우 1100 cm^{-1} 근처의 peaks을 제외하고는methionine의 IR spectrum과 매우 유사하게


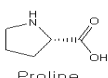
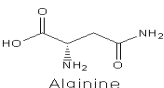
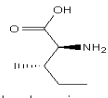
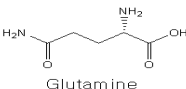
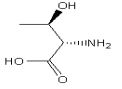
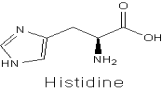
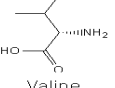
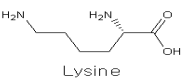
나타나므로, chelation이 되지 않았음을 보여주고 있다. 1100 cm⁻¹ 근처의 peak 들은 sulfate 이온의 peak에 해당한다.

XRD 를 이용하여 Copamin, Zincamin, Ferramin에 존재하는 결정성의 mineral chelate의 상대적 함량을 조사하였다. Copamin 과 Zincamin은 높은 결정성을 보였으나, Ferramin의 경우 결정성을 가지는 비율이 매우 낮았다. 또한, Ferramin에서 발견되는 결정성의 성분은 methionine과 mithionium sulfate에 의한 것이 확인되었다. 그러므로, mineral-methionine chelate 제제의 생산에 있어서 Cu, Zn 이온과 Fe 이온의 반응성이 매우 다를 수 있다.

나. Metal-amino acids 제제의 합성

새로운 미네랄 아미노산 제제를 개발하는데 사용될 수 있는 중요한 자료가 되므로, mineral-methionine chelates 제제와 관련하여 다양한 아미노산에 대한 Fe, Cu, Zn의 chelation을 조사하였다. 실험을 위해서는 표 1에 보이는 9종의 아미노산을 사용하였다. 그 결과 ferrous 이온(Fe²⁺)에 대해서는 아이소류신을 제외한 모든 아미노산의 carbonyl peaks에서 변화가 관찰되었으나, 글루타민과 발린의 경우 그 변화가 아주 미비하였다. 그러므로 ferrous 이온의 경우 알라닌, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 프롤린, 쓰레오닌과 결합하여 chelates 를 형성할 수 있는 것으로 FT-IR 상으로는 관찰되었다. Ferric 이온(Fe³⁺)의 경우도 FT-IR 스펙트럼 상으로는 ferrous 이온과 비슷한 경향을 보였으나 특이하게 아이소류신과 잘 결합하는 것으로 관찰되었다. 구리 (Cu²⁺)이온의 경우 아이소류신과 쓰레오닌을 제외하고는 모두 구리-아미노산 킬레이트를 형성하였다. 아연 (Zn²⁺) 이온의 경우는 쓰레오닌을 제외하고 모두 아연-아미노산 킬레이트를 형성하였다.

표 1. 실험에 사용된 9가지 아미노산 잔기의 pI 와 분자량.

Amino acid	pI/ Mw.	Amino acid	pI/ Mw.
 Alanine	6.00/ 89.09	 Proline	6.30/ 115.13
 Arginine	11.15/ 174.20	 Isoleucine	5.94/ 131.17
 Glutamine	5.65/ 146.15	 Threonine	5.66/ 181.19
 Histidine	7.47/ 155.16	 Valine	5.96/ 117.15
 Lysine	9.59/ 146.19		

다. Soy proteinate 의 생산조건 확립

Alcalase 처리 soy proteinaste의 생산조건을 최적화하기 위해서 반응조건과 사용되는 효소의 최적 조건을 조사하였다. Soy digest 생산에 가장 중요한 조건은 효소의 기질로 사용되는 대두박의 입자 크기이며, 입자 크기가 1mm 이하인 경우 반응 시간이 기존에 알려져 있던 8시간 보다 훨씬 작은 4 시간 정도가 최대 생산량을 위해 요구됨을 알 수 있었다. 또한, 반응 온도는 50°C 정도가 최적이었으며, 반응 온도가 낮을 경우 pH 나 효소량의 변화에 soy digest 형성 반응이 변화를 받지 않았다. 또한, soluble protein의 분자량 분포를 측정하기 위해서 alcalase처리시 시간별 proteinate의 분자량 분포를 전기영동으로 확인하였다. Alcalase 처리 전에는 분자량 10만 이상의 단백질이 주로 존재하는데 시간이 지남에 따라 고분자의 단백질이 점점 사라져서 2 시간 이후에는 거의 존재하지 않아 Alcalase 처리 후 2 시간 이후에는 대부분의 soluble 단백질이 효율적으로 저분자화 됨을 확인 할 수 있었다.

라. mineral proteinates의 chelation 확인

Metal-proteinate의 금속-단백질 결합 여부를 확인하기 위해서 FT-IR, UV-Vis, XRD spectroscopy 방법을 이용하여 측정하였다. 이들 결과를 종합하면, Zn-proteinate와 Cu-proteinate는 3가지 방법 모두에 의해서 금속이온과 peptide 사이에 결합이 의심의 여지 없이 확실히 확인되었고, Fe-proteinate, Ca-proteinate, Mg-proteinate의 경우에는 금속이온과 peptide 사이의 결합이 존재하는 것으로 생각되나, 그 결합의 정도가 Zn, Cu-proteinate에 비해서는 적은 것으로 판단된다. 또한, Fe(II) 이온과 Fe(III) 이온의 metal-proteinate 형성 여부는 그 차이가 크지 않은 것으로 보인다.

분광학적인 분석방법은 그 특성상 정량적인 결과를 얻을 수 있지만, metal-proteinate의 경우에는 절대적인 표준물질이 존재하지 않아서 완벽히 정량적인 결과를 얻을 수는 없었다. 하지만, 그 동안 사료첨가제 부분에서 과학적 근거가 절실히 요구되던, metal-proteinate의 분석에 과학적 근거와 자료를 제공할 수 있는 결과를 얻을 수 있었다.

2-2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

가. Mineral chelate 제제의 분석 방법 활용

본 과제를 통하여, metal-methionine, metal-proteinate 제제의 분자결합 여부와 금속함량의 화학적 분석방법이 확립되었다. 즉, UV-Vis, FT-IR, XRD 등을 이용한 분광학적 분석 방법은 금속이온의 유기리간드에 대한 결합여부를 확인할 수 있는 비파괴적 분석법임이 확인되었고 겔투과 크로마토그래피와 ICP를 통한 금속이온의 정량분석이 확립되었다. 그러므로 이를 이용한 식품, 사료, 의약품에 사용되는 각종 mineral chelate 제제의 검사, 분석이 가능한 것이다.

나. 새로운 metal-아미노산 제제의 산업적 응용

미네랄의 메티오닌 제제나 metal-proteinates 제제 뿐 아니라, 그 화학적 성분이 뚜렷하고, 각종 필수 미네랄의 도입이 가능한 metal-아미노산 제제의 합성이 성공적으로 수행되었다. 이 결과 사료첨가제 뿐 아니라, 건강 기능 식품, 의료용으로 사용될 수 있는 각종 metal-

아미노산 제제의 산업적 응용이 가능하게 되었다. 예를 들어, Cu, Zn, Fe 이외의 Co, Mn, Mo 등의 필수 미네랄을 효율적으로 공급할 수 있는 제제의 개발이 가능하게 되었으며, Gd 등을 이용한 의료용 MRI 조영제의 개발도 가능하다.

다. 대두박 저분자 제제의 산업적 활용

대두박은 식품 및 사료 산업에 중요한 단백질 공급원인데, 체내 흡수에 의한 생물학적 효과는 대부분 저분자 폴리펩티드 형태로 이루어진다. 본 연구과제의 개발과정 중 대두박 단백질의 효율적인 저분자화 조건이 확립되었으므로, 기초개발 자료를 이용한 대두박 이용 산업 분야의 효율적 기술 개발을 기대할 수 있을 것이다.

SUMMARY

I. Title

Studies on the development and application of mineral proteinates.

II. Objectives

The first sub project

In order to improve digestibility of minerals, mineral-chelate products have been developed and utilized in animal products. Innobio Co. successfully developed methionine mineral chelates (Cu, Zn and Fe). They have been marketed under the name Copamin, Zincamin and Feramin. However, the company has been experiencing difficulties in price competitiveness due to high product cost. In order to reduce product cost, this project tried to use soy-protein digest as a chelating agent replacing methionine. Three year research program included development of mineral soy-protein digest complexes and evaluated their efficacy in animal production especially in broilers, layers and pigs.

The second sub project

The objectives of the research was characterization of metal-proteinates at the molecular level. Specifically, metal ion coordination to peptides in metal-proteinates was studied to find whether there are actual coordination bonds between metal ion and proteinate. Quantitative analysis method to determine metal ion content in metal-proteinate was also established.

III. Scopes

Contents of study (The first sub project)

In the first year (2005), Fe-proteinate was developed and its efficacy was tested with broilers and layers.

In the second year (2006), Zn and Cu-proteinates were made and their efficacies were tested with broilers, layers and weanling pigs.

In the third year (2007), the procedure of Mg and Ca-proteinates production has been developed and tested with layers and grow-finish pigs.

Contents of study (The second sub project)

To characterize metal-proteinates, simple model system was built. Metal-methionine

complexes were synthesized from the reaction between metal ions (Fe, Cu, Zn) and methionine. The complexes were characterized by FT-IR, UV-Vis, and XRD spectroscopy, which proved these spectroscopic methods are useful to characterize biomolecule chelate complexes. For metal-protein system, optimum protein production conditions were obtained and various metal ions, including Fe(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II), Ca(II), and Mg(II), were reacted with peptidase-treated protein to produce corresponding metal-proteins. The products were named as Fe(II)-protein, Fe(III)-protein, Cu-protein, Zn-protein, Ca-protein, and Mg-protein, respectively. These metal proteins were characterized by FT-IR, UV-Vis, and XRD spectroscopy to study whether each metal ion is coordinated to the polypeptide.

IV. Results and Recommendation

1-1. Result (The first sub project)

In the first year, Fe-soy protein(SP) was made by chelating soybean meal digest and FeSO₄. At pH 9.6 adjusted with 50% NaOH in the reacting solution, Fe recovery in the Fe-soy protein was maximum being 99.3% and Fe content in the Fe-soy protein(Fe-SP) being 19.3%.

Fe-soy protein was supplemented to broilers and layers diets. Broilers fed 200ppm as Fe-soy protein showed significantly higher Fe content of the muscle of wing and legs than the control. Fe-soy protein was superior to Fe-methionine and FeSO₄ in improving Fe content and color of broiler meat. In the layer experiment, Fe content in the yolk significantly increased at 4th week and maximized at 5th week in Fe supplemented groups. In enriching Fe content in the eggs, Fe-SP 100(100ppm Fe as Fe-SP) showed the best result.

In the second year, Cu-SP and Zn-SP were made. The Cu content(18.4%) and Cu recovery(75.6%) in the Cu-SP was maximum at pH 5.4. The Zn content(18.5%) and Zn recovery(83.6%) in the Zn-SP was maximum at pH 8.9.

Trials with broilers, layers and weanling pigs have been conducted. In the broiler trial, Cu-SP supplementation did not show any significant effects on gain, feed intake and mortality. However, feed conversion ratio was significantly improved by Cu-SP supplementation. In the layer experiment, feed conversion ratio was significantly improved as in broiler trial. Egg yolk color also improved in 200ppm Fe as Fe-SP supplementation group. In the weanling pig trial, Cu-SP+Zn-SP and antibiotics group tended to be high in weight gain and low in feed conversion ratio compared to the control group.

In the third year, Mg-SP was made and the Mg content(8.42%) and Mg

recovery(19.26%) was maximum at pH 9.7.

Fe-SP and Mg-SP were supplemented to grow-finish pigs. Production performances were not significantly different from those of the control. However, color brightness and yellowness(L and b of Minolta Spectrometer) tended to be high in Fe-SP and Mg-SP supplemented group. The pH of pork tended to be low and postmortem temperature of pork tended to be high in Fe-SP and Mg-SP supplemented groups.

There was difficulty in making Ca-SP. Limestone(calcium carbonate) was dissolved with HCl and reacted with soybean meal digest. Ca-SP produced in such a way was supplemented to layers. Production performance and eggshell strength decreased in Ca-SP supplemented group. The negative result may be caused by chlorine(Cl⁻) intoxication.

1-2. Result application (**The first sub project**)

The results will be published in scientific journals(local and international). Innobio Co. will utilize the research results in making mineral soy-proteinates with various macro and micro minerals.

Recently, soy bean price has been skyrocketing and more than double of that of 3years ago while the methionine price has been fairly stable. It is necessary to look for other possible and economical protein sources to replace soy bean meal as chelating agents.

2-1. Result (**The second sub project**)

Spectroscopic characterizations of metal-proteinates was tried to confirmed metal ion chelation to the peptides of soy digest. All the results from FT-IR, UV-Vis and XRD measurements suggested certain metal ion coordination to the peptides in case of Zn-proteinate and Cu-proteinate. But for Fe-proteinate, Ca-proteinate and Mg-proteinate, the evidences were not consistent among three different spectroscopic data, and which implies weak and/or poor binding of the metal ions to the polypeptides. While these spectroscopic data successfully provided qualitative results on the issue of metal ion chelation, quantitative analysis cannot be performed spectroscopically. The quantitative determination of metal ion in the metal-proteinate can be achieved by chromatography-ICP methods, which we devised before. In summary, we have established reliable tools to analyze metal-proteinates.

2-2. Result application (**The second sub project**)

Establishment of analytical method for amino acid chelate complexes. Recently various metal-amino acid chelates are used as additives of animal feeds. Our research

established scientific protocol to analyze metal-amino acid chelates products. Hence, quality control is possible for chelate products, including the imported additives. The analysis protocol can also be used for any chelate complexes.

Optimized soy-digest production conditions. The reaction conditions of Alcalase to produce water-soluble low molecular weight peptide oligomer from soy meal in high yield were optimized. This result can be used in food and animal feed industries which process soy meal.

Establishment of analytical method for metal-proteinate. UV-Vis, FT-IR, and XRD spectroscopic methods can be used to analyze metal-proteinate. Furthermore, the analytical methods can be applied to metal-biopolymer (starch, chitosan, and etc) chelates to check if the metal ion is coordinatively bound to biopolymer.

Synthesis of Ca and Mg-proteinate. The results showed synthesis of Ca-proteinate and Mg-proteinate is possible by conventional method, which stimulates development of new products. The increase of metal ion-contents in the metal-proteinates still needs to be improved.

CONTENT

Chapter 1 Introduction	-----1
Part 1. Necessity of reaserch	-----1
1. Technical aspect	-----1
2. Economic · industrial aspect	-----1
3. Social · cultural aspect	-----1
Part 2. Purposes and scopes of reaserch	-----2
1. Purposes and scopes of reaserch	-----2
A. The First year (2005)	-----2
B. The Second year (2006)	-----3
C. The Third year (2007)	-----3
Chapter 2 Current situation of the level of technology development related to the project	-----4
Chapter 3 Result of research	-----5
Part 1. The first sub project: Effect of the dietary supplementation of mineral proteinate in animal feeds.	-----5
1. The First year: Effect of the dietary supplementation of Fe proteinate on layers and broilers.	-----5
A. Production of Fe-soy proteinate	-----5
B. Production of iron enriched egg by Iron-soy proteinate on laying hens.	---11
C. Production of iron enriched meats by supplementation iron-soy proteinate on broiler chicks.	-----20
2. The Second year: Effect of the dietary supplementation of Zn, Cu proteinate on layers, broilers and weanling pigs.	-----28
A. Production of Zn, Cu-soy proteinate	-----28
B. Effect of the dietary supplementation of Cu proteinate on broilers.	-----30
C. Effect of the dietary supplementation of Cu proteinate on layers by supplementation level.	-----34
D. Effect of the dietary supplementation of Zn, Cu proteinate on weanling pigs.	-----37
3. The Third year: Effect of the dietary supplementation of Mg, Ca proteinate in	

animal feeds. -----	40
A. Production of Mg, Ca-soy proteinate -----	40
B. Effect of the dietary supplementation of Mg, Fe proteinate on grow-finish pigs -----	42
C. Effect of the dietary supplementation of Ca proteinate on layers -----	52
3. Overall conclusion -----	53
A. The First year -----	53
B. The Second year -----	54
C. The Third year -----	55
Part 2 The second sub project: Characterization of the metal-proteinates at the molecular level -----	56
1. The First year: Measurement of the molecular weight distribution of proteins in water-soluble soy digest and establishment of the conditions for mineral proteinate production. -----	56
A. Examination of the model system for the mineral chelates and the chemical composition of methionine chelate. -----	56
B. Establishment of the production conditions of soy digest for the formation of soy digest mineral proteinate. -----	58
C. Solutions for Fe proteinate formation. -----	60
2. The Second year: Measurement of the metal ion content in mineral soy proteinate and study of the binding pattern. -----	60
A. Study of time-dependent molecular weight changes in the soy proteinate formation -----	60
B. Study on the interactions between mineral ion and amino acids. -----	61
C. Establishment of analytical method for metal ion content in Fe, Cu, Zn proteinates. -----	70
3. The Third year: Ca and Mg-proteinate formation and the mechanistic study of mineral proteinate formation.-----	71
A. Characterization of Fe, Cu, Zn soy proteinates at the molecular level and synthesis of Ca and Mg soy protein -----	71
1) Materials and Methods -----	72
A) Soy digest -----	72
B) Metal-proteinases -----	72
2) Results and Discussion -----	72
A) FT-IR -----	72
B) UV-Vis spectroscopy -----	76
C) X-ray diffraction study -----	77

3) Conclusion -----	83
Chapter 4 Achievements and contribution to related areas -----	84
Part 1. Aims, scope and evaluation point of reaserch-----	84
1. Aims of reaserch-----	84
2. Aims and scope of research-----	84
3. Evaluation point of reaserch -----	86
Part 2. Contribution to the related areas -----	87
Chapter 5 Application plan of results -----	88
Chapter 6 References -----	89

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	1
제1절 연구개발의 필요성	1
1. 기술적 측면	1
2. 경제·산업적 측면	1
3. 사회·문화적 측면	1
제2절 연구개발의 목표 및 내용	2
1. 연구개발의 목표 및 내용	2
가. 제1차년도(2005)	2
나. 제2차년도(2006)	3
다. 제3차년도(2007)	3
 제2장 국내외 기술개발 현황	 4
 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	 5
제1절 제1 세부과제: Mineral proteinate의 생산 및 가축 사료 내 proteinate 첨가 급 여시험	5
1. 1 차년도: Fe proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험	5
가. 탈지대두박을 이용한 Fe-soy proteinate의 생산	5
나. Iron-soy proteinate를 이용한 철분강화란 생산	11
다. Iron-soy proteinate를 이용한 철분강화계육 생산	20
2. 2 차년도: Zn, Cu proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험	28
가. 탈지대두박을 이용한 Cu, Zn-soy proteinate의 생산	28
나. 육계 사료 내 Cu proteinate 첨가 효과에 관한 실험	30
다. 산란계 사료 내 Cu proteinate의 적정 첨가 수준에 관한 실험	34
라. 이유자돈 사료 내 Zn, Cu proteinate 첨가 효과에 관한 실험	37
3. 3 차년도: 사료 내 Ca, Mg proteinate 첨가 사양시험	40
가. 탈지대두박을 이용한 Mg, Ca-soy proteinate의 생산	40
나. 육성 비육돈의 사료 내 Mg proteinate 및 Fe proteinate 첨가가 생산성과 돈육 품질에 미치는 영향	42
다. 산란계 사료 내 Ca proteinate 첨가가 미치는 영향	52
4. 종합 결과	53
가. 1차년도	53
나. 2차년도	54

다. 3차년도	55
제2절 제2 세부과제: Mineral soy proteinate 제제의 분자적 특성 규명	56
1. 1 차년도: 수용성 soy digest의 단백질의 분자량 분포 측정과 미네랄 proteinate 생산 조건 확립	56
가. Mineral chelate의 형성을 위한 모델 시스템과 기존 개발 metal methionine 제제의 화학적 조성 규명	56
나. Soy digest mineral proteinate의 형성을 위한 soy digest 의 생산조건 확립	58
다. Fe proteinate 형성의 문제점 해결	60
2. 2 차년도: Mineral soy proteinate의 금속 이온 함량 측정과 결합 형태 규명	60
가. Soy proteinate의 분자량 분포 경시 변화 연구	60
나. Mineral ion과 아미노산의 결합 연구	61
다. Fe, Cu, Zn proteinates의 금속이온 함량 측정방법 확립	70
3. 3 차년도: 새로운 chelating agents를 이용한 Ca, Mg의 chelating 조건 개발 및 미네랄 proteinate 형성 기작을 규명	71
가. 2차년도에 얻어진 결과를 이용하여 최종적으로 Fe, Cu, Zn soy proteinates의 분자적 특성을 연구하고 Ca, Mg soy protein의 형성 여부 조사	71
1) 재료 및 방법	72
가) Soy digest	72
나) Metal-proteinases	72
2) 결과 및 고찰	72
가) FT-IR 분석	72
나) UV-Vis spectroscopy	76
다) X-ray diffraction study	77
3) 결론	83
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	84
제1절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점	84
1. 연구개발 목표	84
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 범위	84
3. 평가의 착안점	86
제2절 관련분야 기여도	87
제5장 연구개발결과의 활용계획	88
제6장 참고문헌	89

제 1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. Amino acid chelate는 하나의 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 약리적 사용수준에서 과다 사용 시 아미노산 중독(예: 메치오닌)의 우려가 있어서 사용량에 문제가 될 수 있지만 proteinate가 개발된다면 여러 가지 아미노산으로 결합 되어 있기 때문에 사용상의 제약을 덜어 줄 수 있다.

나. 선행연구에서 개발에 성공한 Amino acid chelate의 ligand로서 손쉽게 구할 수 있는 아미노산인 methionine을 사용하였는데 단백질(soy) digest를 이용할 경우 mineral과 결합할 수 있는 다량의 ligand를 확보 할 수 있고 가축의 생체 이용률을 높여 줄 수 있다.

다. 선행연구에서 proteinate 제조 원료로 어분대신 탈지대두박이 적합하다는 것이 밝혀졌으며 대두박을 이용한 광물질 proteinate의 개발로 경제적인 mineral chelate의 제조가 필요하다.

라. 여러 가지 광물질 자원 중에서 대두박 미네랄 proteinate로의 전환이 좋은 것을 선별하는 기술이 필요하며, 더 나아가 학문적으로 어떠한 기작에 의해서 안정한 광물질 proteinate의 형성이 이루어지는지에 대한 연구가 전무하므로 이를 연구하는 것이 필요하다.

2. 경제·산업적 측면

가. Chelate 미네랄 제품의 국내외적 가격 경쟁력을 높이기 위해 기존에 제품화 된 amino acid-chelate보다 저렴한 chelate 제재인 mineral proteinate의 개발이 요망된다.

나. 향후 2006년도부터 EU에서 사료 내 항생제 첨가 전면 금지됨에 따라서 항생제를 대체할만한 약리적 수준에서 사용되는 mineral proteinate(예: Zn, Cu)의 사용이 불가피하게 되었다.

다. 특히 Mineral proteinate 제조방법을 확립함으로써 다양한 미네랄 proteinate 제재의 생산에 응용할 수 있다.

라. 시중에 범람하는 유사 chelate 제재와 구분할 수 있는 화학적 구조 규명이 필요하다

3. 사회·문화적 측면

가. 무기태로 공급되는 mineral은 생체 내 이용성이 낮아서 많은 양이 가축의 분뇨로 배

출되는데 chelate 또는 proteinate로 급여하면 mineral의 생체 내 이용성을 높여 광물질의 배설량을 감소시키므로 환경오염을 줄이고 광물질 자원을 절약할 수 있다.

제 2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 본 연구실에서 개발한 2가 광물질(Cu, Zn, Fe) methionine chelate 제조 시 사용되는 methionine 대신 저렴한 chelating agent를 선발 - 다양한 단백질 공급원을 검토한 결과 일차적으로 탈지대두박이 최적원료로 선발됨 (선행예비시험).

나. Mineral proteinate의 chelating agent로 사용할 protein(soy) digest의 생산 공정을 개발한다.

다. 수용성 무기염과 soy digest의 최적 반응(pH, 온도) 및 생산조건을 확립한다.

라. Mineral proteinates로 항생제 대체 사료개발과 기능성 식품개발을 위해 산란계, 육계, 이유자돈, 육성 비육돈으로 사양시험을 실시한다.

마. 사양시험결과를 토대로 무항생제사료(Cu, Zn proteinates 이용) 및 철분강화계란 및 계육생산(Fe proteinates 이용) 등 브랜드 및 기능성 축산물 생산 방안을 제시한다.

바. 최종년도에는 chelation이 어려운 토금속류인 Ca과 Mg의 chelate 제조한다.

사. Chelates의 화학적 구조를 규명한다.

아. 사양시험을 통하여 효과가 검증되면 제품화에 따른 기술 이전을 실시한다.

가. 제1차년도(2005)

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2005)	제 1 세부과제 - Fe proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험	- 선행 연구 재검토 및 문헌조사 - Soy digest 및 Fe soy proteinate의 pilot scale 생산 - 산란계 사료 내 Fe proteinate첨가 사양 시험 (철분강화란 생산) - 육계 사료 내 Fe proteinate첨가 사양 시험 (철분강화계육 생산)
	제 2 세부과제 - 수용성 soy digest의 단 백질의 분자량 분포 추정 과 미네랄 proteinate 생 산 조건 확립	- Mineral soy proteinate의 반응조건에 따른 펩타이드 형성과 분자량 분포를 조사 - FeSO ₄ , ZnSO ₄ , CuSO ₄ 등의 무기질을 이용한 mineral soy proteinate의 생산 조건 확립

나. 제2차년도(2006)

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2006)	제 1 세부과제 - Zn, Cu proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험	- Zn proteinate의 생산 - Cu proteinate의 생산 - 육계 사료 내 Cu proteinate 첨가 사양 시험 (Cu-met 비교시험) - 산란계 사료 내 Cu proteinate 첨가사양 시험 (수준별 비교시험) - 이유자돈 사료 내 Zn proteinate + Cu proteinate 첨가사양시험 (항생제 대체)
	제 2 세부과제 - Mineral soy proteinate 의 금속 이온 함량 측정 과 결합 형태 규명	- Fe, Zn, Cu 등의 대두박 미네랄 proteinate의 금속 이온 함량 측정 방법 확립 - 다양한 무기질 원료를 사용하여 최적의 대두박 미네랄 proteinate 생산조건을 확립 - 분광학적 분석방법을 이용한 대두박 펩타이드와 Fe, Zn, Cu 의 결합 형태 규명

다. 제3차년도(2007)

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2007)	제 1 세부과제 - Ca, Mg chelate 첨가 사 양시험	- Ca chelate 시제품 생산 - Mg chelate시제품 생산 - 산란계에 Ca chelate 첨가 사양시험 - 육성돈에 Mg proteinate + Fe proteinate 시 험 (PSE 예방 시험)
	제 2 세부과제 - 새로운 chelating agents 를 이용한 Ca, Mg의 chelating 조건 개발 - 미네랄 proteinate 형성 기작을 규명	- Ca 및 Mg의 chelate의 개발 - 대두박의 펩타이드와 금속 이온과의 상호작용을 연구하여 생성 기작을 규명

제 2장 국내외 기술개발 현황

1. 미국의 Albion사, Zinpro사 등이 세계적 선두 주자이며 이들의 chelate 제조법은 구체적으로 공개되지 않음
2. 국내에서는 저자의 연구실에서 2000 ~ 2002(3년) 동안 “기능성 미네랄 chelate의 개발과 이용에 관한 연구”를 농림기술개발과제로 수행한바 Zn-methionine, Cu-methionine을 성공적으로 생산하여 연구 참여 업체인 (주) 이노바이오에서 출시하고 있음.
3. 그러나 methionine chelate의 효능은 탁월하나 제조 원료 가격이 높아 성능이 확인되지 않은 유사 chelate 제품(국내산, 중국산)과 가격 경쟁에서 열세에 있음. 따라서 값싼 chelating agents를 개발하여 생산원가 절감이 절대적으로 요구됨.
4. 미네랄 자원의 절약과 환경오염예방을 위해 앞으로 약리적 사용 수준의 광물질을 필두로 하여 전 미네랄의 chelate化가 세계적인 추세로 대두되고 있음.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 제1 세부과제: Mineral proteinate의 생산 및 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험

1. 1 차년도: Fe proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험

가. 탈지대두박을 이용한 Fe-soy proteinate의 생산

1) 재료 및 방법

가) Soy digest의 제조

본 시험에 사용된 탈지대두박은 조단백질 함량이 44%이상인 일반 사료원료에 사용되고 있는 것이며 dry oven에 60℃ · 4hr 건조 후 cutting mill(J-NCM, Jisico Co. Ltd., Korea)로 미세하게 분쇄하였다. 분쇄된 탈지대두박 100g을 칭량하여 3L beaker에 담고 증류수 1L를 넣어주고 항온수조(J-PWBPI, Jisico co. Ltd., Korea)를 이용해 60℃로 일정하게 유지시켜 주며 stirrer(PL-S10, Poong Lim. Co. Ltd., Korea)로 교반시켜 준다. 복합효소제(Alcalase 2.4L, Novozymes Korea., Denmark)는 건물의 4%인 4ml을 첨가해주었고 효소제의 최적반응조건인 pH 8.0을 맞추어 주기 위해 NaOH를 이용하였다. Micro pipette를 이용해 NaOH를 서서히 첨가하여 pH meter(HI8314, Hanna Instruments S.r.l., Italy)로 pH를 측정하였다. 혼합 수용액의 pH가 8.0에 도달했을때를 시점으로 8hr동안 교반과 온도는 일정히 유지해주어 soy digest를 제조하였다.

나) Iron solution의 제조

본 시험에 사용된 철분 수용액은 Iron sulfate heptahydrate(Samchun Pure Chemical Co. Ltd., Korea)를 사용하였으며 그 양은 탈지대두박의 질량비 1:1을 적용하여 100g을 3L beaker를 이용해 1L의 증류수를 혼합하여 교반시켜 제조하였다.

다) Iron 회수율 측정

본 시험에서 iron-soy proteinate의 생성정도를 알아보기 위해 Fe 회수율을 측정하였다. 측정 방법은 생성된 soy digest에 fe solution을 혼합해주어 30분간 교반해준다. 교반 후 pH buffer인 NaOH를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70ml을 넣어주어 반응시켜 총 8개의 반응물을 회수하여 dry oven에 60℃로 건조시킨 후 분쇄하여 8개의 Fe-soy proteinate를 제조한다.

라) Iron 함량의 측정

제조된 iron-soy proteinate의 Fe 함량은 AOAC(1990)방법에 준하여 wet digestion으로 전처리를 한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma) Emission Spectrometer (JY-Ultima-2, France)를 이용하여 측정하였다.

2) 결과 및 고찰

본 시험에서 soy digest 제조에 사용된 복합효소제는 Novozymes사의 Alcalase 2.4L®을 사용하였으며 그 생화학적 특성은 Figure 1에서 보는 바와 같다.

Figure 2와 4는 유청 및 대두 단백질에서 온도에 따른 alcalase의 생산성을 나타내었고 온도에 의한 alcalase의 activity를 나타내었다. Figure 2와 figure 4에서 보는바와 같이 유청 단백질과 대두 단백질과의 alcalase의 생산성에 있어서 반응최적온도가 다를 수 있었으며 alcalase의 activity도 60°C에서 가장 높았음을 알 수 있었다. 본 시험에서는 Figure 2와 4의 자료를 적용해 탈지대두박을 가수분해하는 온도조건을 60°C로 설정하였다. Figure 3은 pH에 의한 alcalase activity의 변화를 나타내었다. pH 7~8에서 alcalase activity가 가장 높았으므로 본 시험에서의 탈지대두박을 Alcalase 2.4L 을 이용한 가수분해시 pH를 8로 설정하였다.

본 시험에서 NaOH의 사용량에 의한 Fe-soy proteinates의 Fe content, Fe recovery 및 pH에 대한 영향은 Table 1과 Figure 1에 나타내었다. Figure 2, 3, 및 4를 통해서 복합효소제인 alcalase 2.4L®을 이용하여 pH 8, 60°C, 8hr의 조건으로 soy digest를 제조하였고 이 soy digest에 NaOH(pH-buffer)를 전혀 첨가하지 않고 철분 수용액을 혼합하여 반응시켰을 때 pH는 6이었고 Fe content는 7.6%, Fe recovery는 20.2%였다. NaOH를 70ml 첨가시켰을 때 pH 12.1로 측정되었고 Fe content는 18%, Fe recovery는 78%로 나타났다. Fe content와 recovery에서 가장 좋은 결과를 보인 것은 NaOH 55ml 첨가시켰을 때였고 pH는 9.6으로 측정되었다.

이상의 결과에서 나타났듯이 복합효소제 이용에 있어서 제품에 대한 자료가 제공되었기 때문에 탈지대두박을 가수분해하는데 조건설정이 용이했다. 복합효소제인 alcalase 2.4L®은 탈지대두박의 4%를 첨가해주었고 항온수조를 이용해 60°C, pH 8로 8시간 동안 가수분해 하였다. 이 후에 철분의 함량과 회수율을 비교했을 때 pH 9.6에서 최상의 iron-soy proteinate 생성되었고 각각 19.3%, 99.5%의 결과를 보였다. 본 실험실에서는 초기에 metal proteinate의 chelating agent로 사료 내 동물성단백질 공급원으로 이용되는 fish meal을 선정하였다. 하지만 실제로 가수분해하여 수용성 무기염과 chelation시킨 결과 fish meal에 다량 함유되어 있는 지방성분이 chelation inhibitor로 작용해 mineral-proteinate 생성을 저해한다는 사실을 알게 됐다. Spears(1996)에 의하면 반추가축에게 complexes, chelates 및 proteinates등의 다양한 유기태 미네랄이 사용되고 있고 이들로 인해서 반추가축의 생산성 향상된다고 보고하였다. 또한 유기태 미네랄은 사용된 chelating agent 및 chelation condition에 따라서 그 효능이 다양하게 변하기 때문에 가축을 통한 사양시험을 통해서 효과가 입증되어야만 한다.

현재의 chelate 제품의 chelating agent로 amino acid인 methionine을 이용하여 metal과 methionine의 분자량 비율로 1:2 혼합하여 생산한 mineral-amino acid chelate가 정확한 의미에서의 chelate라 할 수 있다. Methionine은 합성에 의해서 대량 생산이 가능하기 때문에 다양한 mineral-methionine chelate가 제품화 되어있다. 또한 가축의 제 1 제한 아미노산에 속해있는 methionine은 원료의 가격이 탈지대두박의 10배 정도로 고가이기 때문에

methionine을 이용한 mineral-methionine chelate의 가격 또한 고가일 수밖에 없다. 현재 사료첨가제의 사용에 있어서 가장 중요한 것은 첨가제의 효능도 중요하겠지만 제품의 가격이 저렴해야 하기 때문에 고가의 mineral-methionine chelate 제품은 사용상에 제약을 받을 수밖에 없고 사료 내 많은 양을 첨가 할 경우 methionine 중독의 우려도 있다. 이러한 chelate의 단점을 보완하고자 본 시험에서는 값싼 chelating agent로 선정된 탈지대두박을 이용한 soy digest를 생성하여 수용성 철분을 혼합하여 제조한 iron-soy proteinate가 보완해줄 것으로 기대한다.

결론적으로 탈지대두박을 이용한 iron-soy proteinate 제조 방법은 alcalase 2.4L®을 이용하여 soy digest를 만들 경우에 pH 8, 60°C, 8hr 동안 가수분해 시켜주었고 수용성 철분을 혼합하여 pH 9.6에서 가장 이상적인 iron-soy proteinate를 제조할 수 있다.

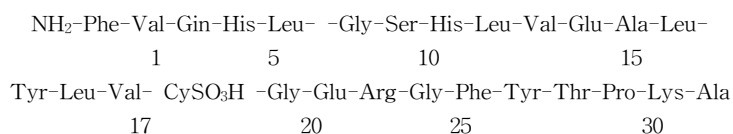
Table 1. Biological composition of alcalase.

일반명	Subtilisin Carlsberg
작용 모드	Endoprotease
활성기	Serine
저해제	
DFP & PMSF ¹⁾	+
EDTA ²⁾ & phosphate	0
Soybean trypsin inhibitor	0
Bonds attacked in the oxidized	4-5, 9-10, 11-12, 15-16, 26-27
B-chain of insulin ³⁾	
분자량 (대략)	27300

¹⁾DFP : Diisopropyl fluorophosphate; PMSF : Phenylmethylsulphonylfluoride

²⁾EDTA : Ethylenediamine tetra-acetic acid

³⁾Oxidized B-chain of insulin:



(Johansen, J.T. et al, C.R.Trav.Lab.Carlsberg 36, 365-384, 1968)

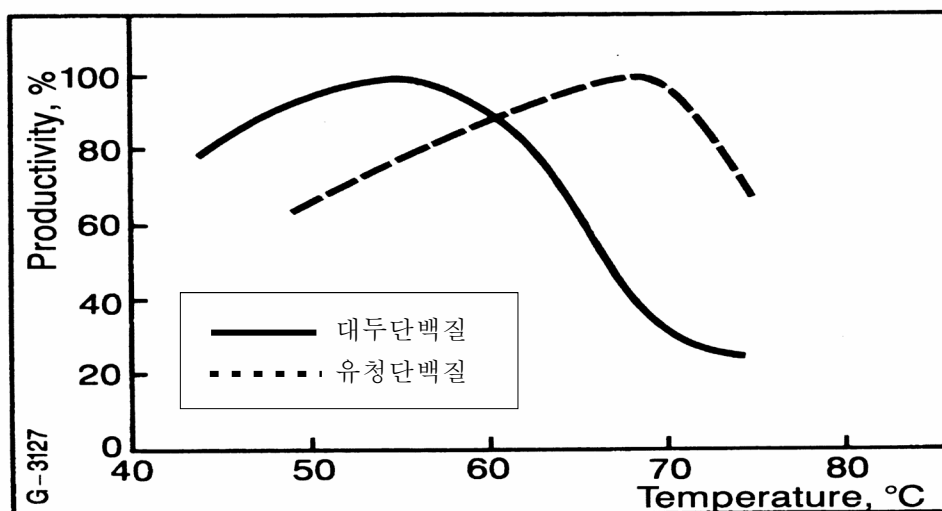


Figure 1. Effects of alcalase productivity by temperature in whey and soy protein.

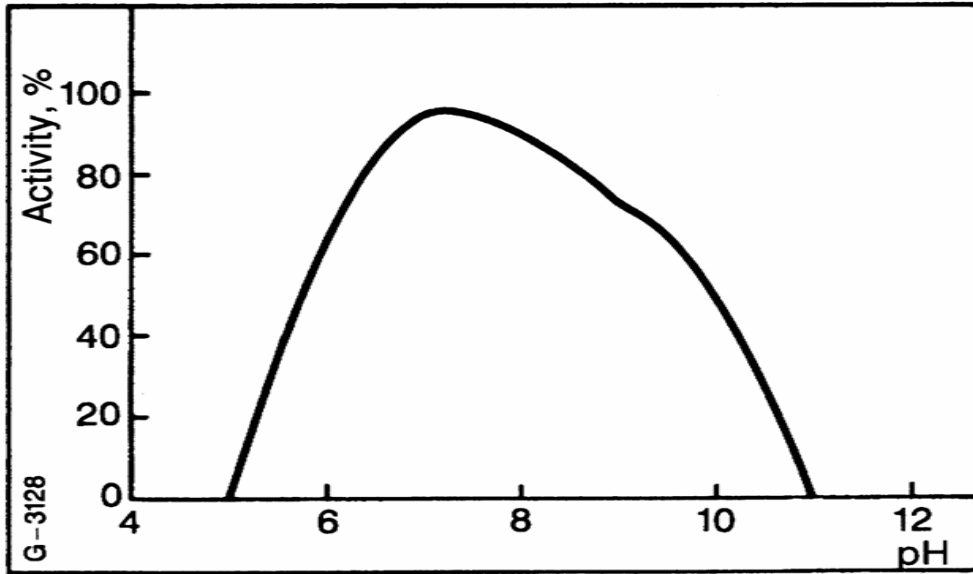


Figure 2. Effect of alkalase activity by pH.

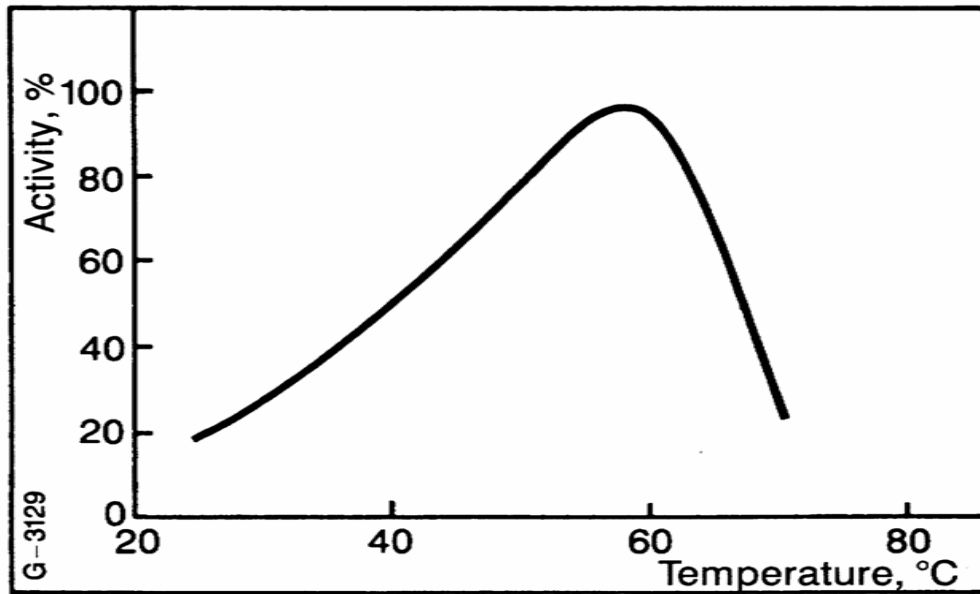


Figure 3. Effects of alkalase activity by temperature.

Table 2. Effects of Fe content, recovery and pH by supplemental 50% NaOH.

	50% NaOH(ml)									
	0	10	20	30	40	50	55	60	70	
pH	5.9	6.6	7.1	7.4	8.2	8.7	8.7	9.6	11.0	12.1
Fe content, %	7.6	10.1	14.0	16.5	17.9	19.4	19.3	19.6	19.6	18.0
Fe recovery, %	20.2	30.0	49.5	66.2	79.2	91.7	99.5	85.6	85.6	78.0

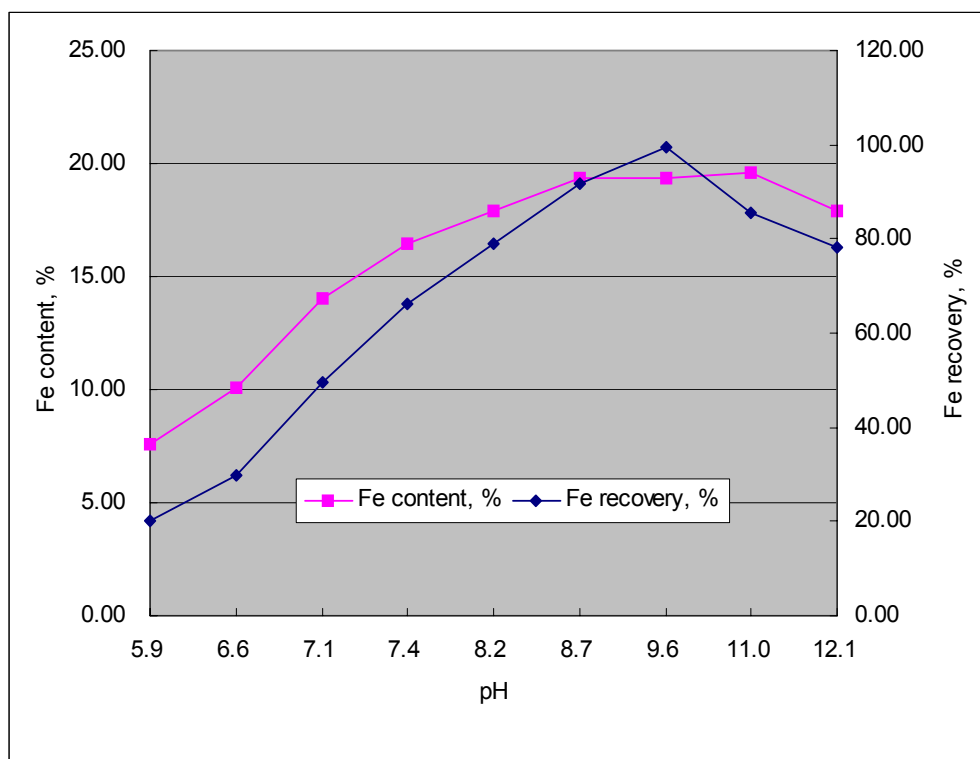


Figure 4. Effects of Fe content and recovery by pH

3) 요약

본 시험은 탈지대두박을 이용하여 Fe-soy proteinate를 만들기 위해 실시하였다. 탈지대두박은 조단백질이 44%이상인 것을 사용하였다. 1L의 증류수에 100g의 탈지대두박과 alcalase 2.4L® 4ml를 첨가하여 pH 8, 60도의 조건으로 8시간동안 가수분해하여 soy digest를 만들었다. Iron soluble은 ferrous sulfate 100g에 1L 증류수를 넣어 만들었다. soy digest에 iron soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% NaOH를 다양한 수준으로 첨가하여 (0,10,20,30,40,50,55,60,70ml) chelation시켰다. soy digest와 iron soluble을 혼합했을때 pH는 6이었고 Fe content와 Fe recovery는 각각 7.6%, 20%였다. pH 12일때 Fe content와 Fe recovery는 18%, 78%였다. pH 9.6일 때 Fe content와 Fe recovery는 19.3%, 99.3로 가장 높았다. 결론적으로 탈지대두박을 이용한 Fe-soy proteinate를 만들때 alcalase 2.4L을 이용해 pH 8, 60도 8시간 가수분해 시켜 soy digest를 만들고 50% NaOH를 이용해 pH 9.6정도에서 가장 최적의 Fe-soy proteinate가 생성되었다.

나. Iron-soy proteinate를 이용한 철분강화란 생산

1) 재료 및 방법

가) 시험 사료

본 시험에 사용된 사료의 배합표는 Table 1에서 보는 바와 같이 사료의 에너지 함량과 조단백질 함량이 각각 2,750 kcal/kg와 17.5%인 사료를 대조구(control) 사료로 이용하였다. 대조구에 본대학 동물영양학 실험실에서 제조한 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - D, L methionine (Met-Fe) 복합제($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: D, L methionine, 1:2, molar ratio), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Soy digest(SP-Fe) 복합제($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: soy digest, 1:1, 중량비)를 첨가하여 처리구 사료로 사용하였다.

나) 시험동물 및 시험설계

본 시험의 사양시험을 위해 68주령의 산란계(Hy-Line Brown) 800수를 공시하여 Table 2에서 보는 바와 같이 일반 산란계 사료를 대조구(control), Met-Fe 100구(Met-Fe로 Fe 100ppm 첨가), SP-Fe 100구(SP-Fe로 Fe 100ppm 첨가), SP-Fe 200구(SP-Fe로 Fe 200ppm 첨가)의 4처리에 처리당 10반복, 반복당 20수씩 완전임의 배치하였다. 사양시험은 5주간 실시하였고 시험기간 동안 물과 사료를 자유섭취하게 하였고 일반적인 점등관리(16hr)를 실시하였다.

다) 계란의 생산성, 품질검사 및 난황 내 Fe, Cu 및 Zn 함량 분석

계란의 생산성 검사를 위해 산란율, 평균난중, 연 · 파란율은 매일 측정하여 주별 평균을 산출하였고 사료섭취량은 주 1회 측정하여 사료 전환율을 산출하였다. 주 1회씩 총 6회(0, 1, 2, 3, 4, 5 week)에 걸쳐 반복당 연 · 파란을 제외한 10개의 계란을 임의적으로 채취하여 처리당 100개, 총 400개의 계란으로 난각강도, Haugh unit, 난황색과 난황색등의 품질검사를 실시하고 난황을 분리하여 동결건조 및 지방을 제거하여 난황 내 미네랄함량 분석에 이용하였다.

난각강도와 난각두께는 Texture Analyser(Stable micro system., UK)와 Dial Pipe Guage(Model 7360, Mitutoyo Co, Kwasaki 213, Japan)를 이용해 측정하였다. 난각색과 난황색은 Color fan(eggshell; Samyang Co, Korea, egg yolk; Roche Co, Switzerland)을 이용해 측정하였다. Haugh unit는 HU formula(Eiscn et al., 1962)에 준하여 난중과 micrometer(Model S-8400, AMES, Waltham, USA)를 이용하여 난백고를 측정하여 산출하였다.

품질검사 후 난황을 분리하여 Vacuum Freeze dryer(Beta-A, Germany)와 Soxhlet 장치를 이용하여 수분과 지방을 제거하여 난황 내 미네랄함량 분석을 위한 시료로 이용하였고 AOAC(1988)방법에 준하여 습식법(wet digestion)으로 전처리하여 ICP(Inductively Coupled Plasma) Emission Spectrometer(JY-Ultima-2, France)를 이용해 Fe, Cu 및 Zn의 함량을 측정하였다.

라) 화학분석 및 통계처리

시험사료와 분의 일반 조성분 분석은 AOAC(1990)방법에 준하여 실시하였고 시험에서 얻어진 자료의 통계처리는 SAS(1995) GLM(General Linear Model) Procedure를 이용하여 시행되었으며 처리 평균간의 유의성은 contrast와 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다.

Table 1. Formula and composition of control diet

Ingredient	Percent
Corn	51.380
Soybean meal	20.237
Wheat bran	3.000
Rice bran	1.500
Wheat	3.000
Lupin kernel	4.000
Corn gluten feed	2.070
Tallow	2.360
Salt	0.210
Limestone	9.690
Oyster shell	0.800
D.C.P	0.820
Electrolytes ¹	0.150
Additives ²	0.153
Vitamin premix ³	0.130
Mineral premix ⁴	0.120
Choline-Cl(50%)	0.070
Methionine Hydroxyl Analogue(88%)	0.080
Phytase ⁵	0.030
Total	100.000
Calculated composition	
ME, kcal/kg	2,750
Crude protein, %	17.50
Lysine, %	0.83
Methionine, %	0.37
Met. + Cys., %	0.64
Calcium, %	3.95
Total P, %	0.50
Avail P, %	0.38
Crude fat, %	5.17
Crude fiber, %	3.30
Crude ash, %	13.40

¹Consist of: KCl, 35%; NaHCO₃, 40%; Na₂SO₄, 25%.

²Consists per kg: Cyromazine, 5ppm; vitamin E, 15ppm; vitamin C, 100ppm.

³Consists per kg: vitamin A, 10,000IU; vitamin D₃, 2,500IU; vitamin E, 15IU; vitamin K₃, 2mg; vitamin B₁, 1.5IU; vitamin B₂, 4mg; vitamin B₆, 3mg; vitamin B₁₂, 3ug; pantothenic acid, 8mg; niacin, 25mg; folic acid, 0.5mg.

⁴Provideds per kg diet; Zn, 52.5mg; Mn, 52.5mg; Fe, 52.5mg; Cu, 52.5mg; I, 1.155mg; Co, 0.315mg; Se, 0.315mg.

⁵Phytase peovided by BASF Korea Ltd.

Table 2. Dietary treatments

Treatments	Supplemental iron sources	Supplementation level of Fe, ppm
1 Control		
2 Met-Fe 100	Fe-methionine chelate	100
3 SP-Fe 100	Fe-soy proteinate	100
4 SP-Fe 200	Fe-soy proteinate	200

2) 결과 및 고찰

본 시험에서 Met-Fe 100ppm, SP-Fe 100 및 200ppm의 첨가로 인한 산란계의 생산성과 품질에 미치는 영향은 Table 3에 나타내었다. 5주 동안의 일계산란율(hen-day egg production)에서는 SP-Fe 100구가 82.09%로 가장 높은 수치를 보였고 Met-Fe 100구에서 78.65%로 가장 낮은 수치를 보였지만($p < 0.05$) control과 SP-Fe 100 및 200구에서의 통계적 유의차는 없었다.

난중에서는 SP-Fe 200구에서 68.53g 으로 가장 무거웠으며, Met-Fe 100구는 control에 비해 수치상 무거웠지만 유의차는 없었고 Control이 67.79g 으로 가장 무게가 낮았다($p < 0.05$). control과 Met-Fe 100구는 통계적으로나 수치상으로 차이가 없었고 SP-Fe 100 및 200구는 다른 처리구에 비해 더 무거웠다.

사료전환율에서 다른 처리구에 비해 Met-Fe 100구에서 2.46으로 가장 높았고 SP-Fe 100 및 200구와 Control 간에는 수치상으로나 통계적인 유의차를 보이지 않았다($p < 0.05$). Haugh unit에서는 Met-Fe 100구가 81.31로 가장 낮았고 SP-Fe 200구가 83.20으로 가장 높았고($p < 0.05$) control에 비해 SP-Fe 첨가구들이 유의적으로 높은 경향을 보였다.

난각 강도와 난각 두께는 Met-Fe와 SP-Fe의 첨가로 인한 통계적 유의차를 보이지 않았고 난황색도에서도 control에 비해 처리구들이 높은 수치를 보였지만 통계적 유의차를 보이지 않았다.

난각색은 control에 비해 철분 첨가구들에서 높은 경향을 보였고 SP-Fe 100구에서 11.58로 가장 높은 수치를 나타냈다($p < 0.05$).

본 시험에서 Met-Fe 및 SP-Fe 첨가에 따른 난황 내 Cu, Fe 및 Zn 함량의 변화는 Table 4에 나타내었다. 시험 개시부터 4주까지 모든 처리구들에서 Fe, Zn 및 Cu의 함량에 있어서 통계적 유의성을 보이지 않았고 Cu의 경우 5주 동안 모든 처리구들에서 통계적 유의차를 보이지 않았다. 난황 내 Zn의 함량도 Cu와 마찬가지로 4주까지 아무런 변화가 없었지만 4주 이후 철분의 함량이 증가됨에 따라 높아지는 경향을 보였다.

Met-Fe, SP-Fe의 첨가로 인한 난황 내 철분 함량 Figure 1에 나타내었다. Fe의 경우 4주 이후에 함량에 변화를 보였고 5주에 control에 비해 Met-Fe 100, SP-Fe 100 및 SP-Fe 200구에서 대조구에 비해 각각 13%, 17% 및 8% 증가하였고 SP-Fe 100구가

267ppm으로 가장 높았고 control에서 229ppm으로 가장 낮았다($p < 0.05$). Met-Fe 100구에 비해서 SP-Fe 100구가 난황 내 철분 함량이 증가되었고 SP-Fe 200구는 SP-Fe 100구보다 철분함량이 더 낮았다.

이상의 결과에서 보면 사료섭취량에서 Met-Fe, SP-Fe 등의 organic Fe source의 산란계 사료 내 첨가 급여시 Met-Fe를 100ppm 첨가하였을 때 control과 SP-Fe를 각각 100ppm, 200ppm 첨가한 구보다 낮은 결과를 보였는데 이는 공시동물의 주령이 68주령으로 산란율이 점차 감소되는 시기이고 그 감소율이 일정하지 때문에 공시동물의 개체차이라고 보여지며 247ppm의 철분이 함유되어 있는 control은 철분결핍을 유발할 수준은 아니며 100, 200ppm의 철분의 첨가로 과잉을 유발할 수준은 아니므로 생산성에서는 Met-Fe, SP-Fe의 공급이 산란율의 변화에 직접적인 영향을 주었다고 판단하기는 어렵다. Morck and Austic(1991)은 산란계에서 정상적인 hematocrit을 유지하기 위한 사료 내 철분의 최소요구량은 35~45mg/kg이라고 하였고 최적의 산란율유지를 위해서는 55mg/kg 이상 첨가 해주어야 한다고 하였다. 산란계에서 P 결핍으로 인해 egg weight와 egg production이 감소한다고 보고된 적은 있다(Hutwitz and Bornstein, 1963; Mikaelian and Sell, 1981).

일반적으로 eggshell quality는 Ca, P, 및 Mg 등의 mineral이 관여하고 각 mineral들은 간접적으로 interaction 한다는 사실이 널리 알려져 있다. Park (2004)등에 의하면 철분공급으로 인해 eggshell strength가 증가하였지만 본 실험에서는 eggshell strength에서 유의차를 보이지 않았다. Lim and Paik(2003)에 의하면 Met-Cu를 산란계 사료 내 첨가 급여시 eggshell strength가 증가한다고 하였는데 이는 구리의 첨가로 인해 난각막에 영향을 주었다고 보고하였다.

Lang and Wells (1987)에 의하면 protoporphyrin은 갈색계란의 eggshell의 주요 착색제라 하였고 Kennedy and Vevers (1973)에 의하면 erythrocytes는 난각의 poyphyrins의 전구물질이라고 하였다. 산란계 사료 내 철분의 공급이 erythrocytes의 형성을 증가시켜 eggshell color가 증가되었다고 보고한 Park(2004)등의 연구 결과와 본 실험의 결과가 일치하였다.

난황의 철분함량에 있어서 park(2004)등에 의하면 ferrous sulfate, Met-Fe 및 Availa Fe-60을 수준별로 비교시험 하였는데 Met-Fe 100ppm 첨가가 난황 내 철분 함량이 증가에 있어서 가장 좋은 효과를 나타냈고 철분 공급원의 첨가 급여로 인해 난황 내 철분의 함량이 증가한다는 사실은 본 실험의 결과와 일치 하였다. 그리고 inorganic mineral 보다 organic mineral의 첨가가 난황 내 철분 함량 증가에 더 좋은 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 하지만 본 실험결과에서는 4주 이후부터 난황 내 철분의 함량이 증가한 반면에 park(2004)등의 보고에서와 달리 2주 이후부터 증가된 점은 상이하였다. 이는 기존의 연구에 사용되었던 공시동물의 주령이 30주령인 반면에 본 시험에 사용되었던 공시동물은 68주령인 점을 감안할 때 산란계의 주령이 오래됨에 따라 체내 대사작용 등이 노화되어 나타난 결과라고 사료된다.

현재 Fe 뿐만 아니라 Cu, Zn 및 Mn등의 mineral이 사료 내 첨가 형태가 inorganic mineral에서 organic mineral형태로 바뀌고 있는데 organic mineral의 종류도 결합 형태에

따라 다양하다.

AAFCO(Association of American Feed Control Official)에서는 organic mineral 중에서 Metal proteinate는 가수 분해된 단백질과 수용성 무기염의 chelation 반응에 의한 생성된 물질이라고 정의 하였다. 본 실험에 사용된 SP-Fe는 단백질 원료로서 Soybean meal(CP 48%)을 사용하였고 효소제를 이용하여 soy digest를 만들어 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 수용액과 반응시켜 Fe - soy proteinate를 제조하여 사양시험에 이용하였고, Iron-methionene chelate와 iron-soy proteinate의 철분의 함량은 각각 10%, 19%였다.

Park(2004)등에 의해 철분강화란 생산에 있어서 이미 유기태 철 화합물인 Met-Fe의 산란계 사료 내 첨가 급여 효과가 입증되었고 본 실험실에서 제조한 SP-Fe와의 비교 실험 결과 eggshell quality, egg production에서도 비슷한 결과를 나타냈고 난황 내 철분 함량에 있어서도 Met-Fe 100보다 SP-Fe 100구에서 더 좋은 결과가 나타난 것으로 보아 SP-Fe가 철분공급원으로서 Met-Fe를 대체하기에 충분하다고 사료된다. 하지만 SP-Fe를 200ppm 첨가로 인해서 난황 내 철분함량 증가는 보이지 않아서 가장 적절한 철분 공급량은 100ppm이다.

결론적으로 산란계 사료 내 SP-Fe 100ppm 첨가로 eggshell color의 향상과 난황 내 철분의 함량이 증가되어 철분강화란 생산에 있어서 Met-Fe를 대체하기에 적합하다. 또한 soybean meal을 이용한 mineral-soy proteinate는 mineral amino-acid chelate에 비해 제조 비용이 저렴하기 때문에 다양한 mineral-soy proteinate의 제품화 가능성을 제시해주었다.

Table 3. Effect of supplementary Fe sources on the performance and egg quality of laying hens.

Parameters	Treatments				SEM
	Control	Met-Fe 100	SP-Fe 100	SP-Fe 200	
Hen-day egg production (%)	80.78 ^a	78.65 ^b	82.09 ^a	82.06 ^a	0.74
Egg weight (g)	67.79 ^b	67.86 ^b	68.17 ^{ab}	68.53 ^a	0.18
Feed intake (g/hen/day)	129.34	130.53	129.40	131.79	0.87
Feed conversion (feed/egg mass)	2.37 ^b	2.46 ^a	2.32 ^b	2.35 ^b	0.02
Soft & Broken egg (%)	0.17	0.17	0.13	0.17	0.03
Haugh unit	82.04 ^{bc}	81.32 ^c	82.85 ^{ab}	83.20 ^a	0.44
Eggshell strength (kg/cm ³)	2848.67	2869.31	2789.85	2890.13	43.58
Eggshell thickness	39.99	39.81	40.10	39.93	0.29
Eggyolk color	8.06	8.23	8.15	8.28	0.11
Eggshell color	10.94 ^b	11.48 ^a	11.58 ^a	11.29 ^a	0.13

^{abc} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05)

Table 4. Effects of supplemental Fe sources on Cu and Fe, Zn content of egg yolk.

Wk	Treatments				SEM	
	Control	Met-Fe 100	SP-Fe 100	SP-Fe 200		
----- ppm (DM basis, Fat free)-----						
Cu	0	9.69	9.65	9.54	9.43	0.38
	1	9.57	9.55	9.78	9.65	0.14
	2	9.30	9.50	9.23	9.73	0.32
	3	9.13	9.21	9.23	9.13	0.18
	4	9.96	9.63	9.68	9.88	0.25
	5	9.45	9.96	9.61	9.67	0.20
Fe	0	229.32	228.70	228.50	230.37	4.98
	1	232.93	233.63	233.43	235.19	4.59
	2	232.88	234.07	246.96	239.39	5.73
	3	231.20	236.27	233.90	234.19	4.96
	4	227.96	230.65	231.85	236.42	4.91
	5	229.14 ^b	259.00 ^{ab}	267.12 ^a	248.14 ^{ab}	11.33
Zn	0	100.10	102.13	100.50	102.77	2.02
	1	101.23	103.32	103.26	102.31	0.83
	2	107.15	107.77	108.34	107.98	1.99
	3	112.94	114.69	112.51	111.50	1.44
	4	109.06	111.80	112.56	112.35	2.24
	5	108.06 ^b	120.11 ^a	119.43 ^a	121.21 ^a	3.49

^{ab} Values with different superscripts in the same row are different (p<0.05)

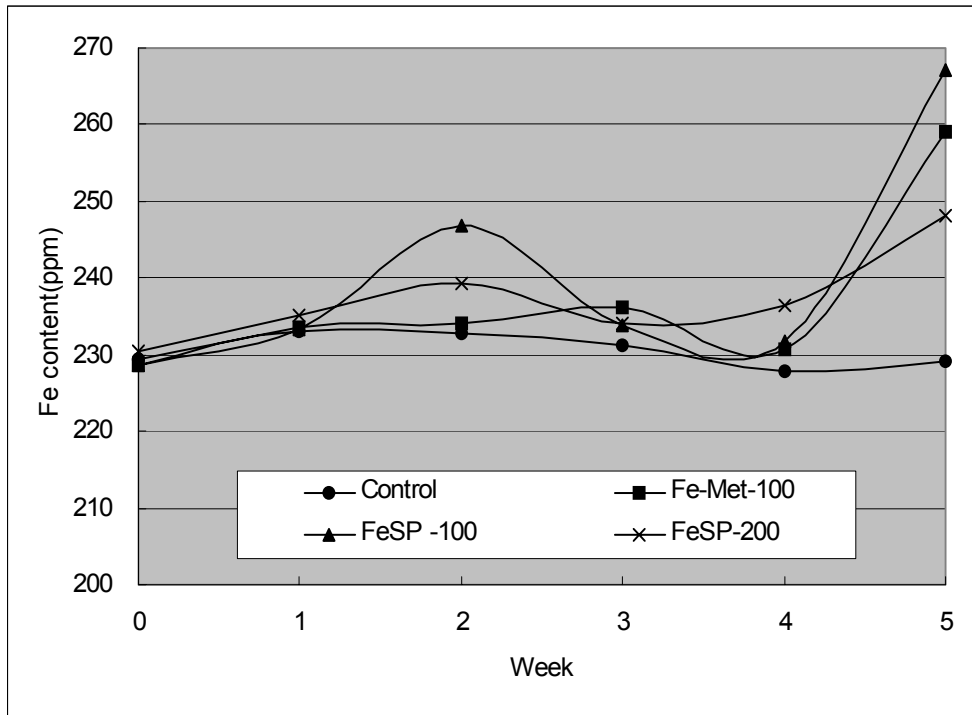


Figure 1. Change of Fe content in egg yolk for 5weeks (DM, Fat free)

3) 요약

본 시험은 산란계의 철분강화란 생산에 있어서 Fe-Soy proteinate의 효과를 알아보기 위해 Fe-methionine chelate와 비교시험을 실시하였다. 68주령의 Hy-Line Brown 800수를 각 cage에 두 마리씩 총 100cage에서 사육하였다. 5cage에 20마리를 한 반복으로 4처리로 구분하여 처리당 10반복으로 구분하여 완전임의 배치하였다: Control, Met-Fe 100; supplementation 100ppm Fe as iron-methionine chelate, SP-Fe 100; supplementation 100ppm Fe as iron-soy proteinate, SP-Fe 200; supplementation 200ppm Fe as iron-soy proteinate.

35일의 사양시험기간 동안 생산성에 있어서 철분첨가로 인한 영향은 없었다. 하지만 난각색에서는 철분첨가구가 대조구에 비해 향상되었다. 난황 내 Fe 함량은 4주 이후에 침착되기 시작하였고 control에 비해 철분첨가구들에서 향상되었고 SP-Fe 100에서 가장 높았다($p < 0.05$). SP-Fe를 100ppm 이상 첨가시 더 이상의 효과는 없었다. Cu는 시험 전 기간 동안 아무런 변화가 없었지만 Zn는 Fe와 마찬가지로 철분첨가구들에서 함량이 증가되는 경향을 보였다($p < 0.05$). 5주때 난황 내 철분함량은 control에 비해 Met-Fe 100, SP-Fe 100 및 SP-Fe 200구에서 각각 13%, 17%, 8% 향상되었다. 결론적으로 철분강화란 생산에 있어서 35일 동안 SP-Fe 100ppm 첨가가 가장 좋은 효과를 나타냈다.

다. Iron-soy proteinate를 이용한 철분강화계육 생산

1) 재료 및 방법

가) 시험 사료 및 사양관리

본 시험에 사용된 사료는 Table 1에서 보는 바와 같이 NRC(1994)요구량에 따라 옥수수-대두박 위주로 배합하였고 시험전기(0~3주)에는 starter를 급여하였고, 시험후기(4~5주)에는 Finisher를 급여하였으며 각각의 에너지와 조단백질함량은 3,100 kcal/kg, 22%; 3150 kcal/kg, 19%이다.

이 대조구 사료에 본 대학 동물영양학 실험실에서 제조한 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - D, L methionine(Met-Fe) 복합제($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: D, L methionine, 1:2, molar ratio), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Soy digest(SP-Fe) 복합제($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: soy digest, 1:1, 중량비)를 철분 첨가제로 이용하였다.

사료와 물은 자유로이 섭취케 하였고 매주 fen 당 사료 잔량과 체중을 측정한 평균값을 이용하여 개체당 사료섭취량, 증체량 및 사료 효율을 산출하였다.

나) 공시동물 및 시험설계

갓 부화한 broiler(Ross종) 250수를 공시하여 5처리 5반복 반복당 10수(암수 각각 5수)씩 완전임의 배치하였다.

처리구는 다음과 같다.

Control : Basal diet(starter; 175ppm, finisher; 209ppm)

SP-Fe 100 : Control + SP-Fe 100ppm

SP-Fe 200 : Control + SP-Fe 200ppm

Met-Fe 200 : Control + Met-Fe 200ppm

FeSO_4 200 : Control + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200ppm

본 시험에서는 Table 1에 명시된 기초사료를 Control, control에 SP-Fe 100ppm 첨가한 것을 SP-Fe 100, Sp-Fe 200ppm 첨가한 것을 SP-Fe 200, Met-Fe 200ppm 첨가한 것을 Met-200, ferrous sulfate 200ppm 첨가한 것을 FeSO_4 200구로 총 다섯 개의 처리구로 명시하였다. 처리구들에 첨가된 철분공급원들은 Fe 함량을 기준으로 공급하였으며 FeSO_4 200 처리구에는 Samchun Pure Chemical Co. Ltd에서 생산한 시약급 제품을 사용하였다.

다) Fe, Cu 및 Zn 함량 분석

시험 종료 후 반복당 암수 각각 1수씩 도살하여 가슴, 날개 및 다리 근육과 비장 및 간을 채취하여 Fe, Cu 및 Zn 함량 분석을 위한 시료로 이용하였다.

Fe, Cu 및 Zn 함량은 AOAC(1990)방법에 준하여 wet digestion으로 전처리를 한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma) Emission Spectrometer(JY-Ultima-2, France)를 이용하여 측정하였다.

라) Breast, Leg muscle의 색도 측정

육계의 가슴 및 다리 근육의 색도 측정을 위해 시험 종료 후 반복당 암수 각각 1수씩 도살하여 color chromameter(Minolta CM-508i, Japan)를 이용하여 각 근육의 동일한 3부

위를 측정 한 후 평균값을 구하여 적색도를 산출하였다.

마) 화학분석 및 통계처리

시험사료와 분의 일반 조성분 분석은 AOAC(1990)방법에 준하여 실시하였고 시험에서 얻어진 자료의 통계처리는 SAS(1995) GLM(General Linear Model) Procedure를 이용하여 시행되었으며 처리 평균간의 유의성은 contrast와 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다.

Table 1. Composition and nutrition content of broiler diets.

Ingredients	Starter	Finisher
Chemical composition	%	
Corn	51.92	54.67
Soybean meal(44% CP)	28.10	23.00
Wheat meal	5.00	10.00
Corn gluten (63% CP)	3.84	2.01
Fish meal	4.00	3.50
animal fat	3.50	3.50
DCP	1.86	1.59
Limestone	1.00	1.00
Salt	0.22	0.25
Choline 50%	0.06	0.04
Methionine 99%	0.11	0.11
Lysine (78%)	0.14	0.11
Vitamin premix ¹	0.14	0.12
Mineral premix ²	0.10	0.10
Total	100.00	100.00
Calculated composition		
ME, kcal/kg	3100.00	3150.00
Crude protein, %	22.00	19.00
Crude fat, %	6.80	6.70
Crude fiber, %	3.50	3.40
Crude ash, %	5.80	5.30
Ca	1.00	0.92
P	0.72	0.65
Avail phosphorus, %	0.51	0.45
Lysine, %	1.20	1.02
Methionine + Cystine, %	0.87	0.75

¹Provided per kg of diet: vitamin A, 12,000 IU; vitamin D3, 2,500 IU; vitamin E, 20mg; vitamin K3, 2mg; vitamin B1, 2mg; vitamin B2, 5mg; vitamin B6, 3mg; vitamin B12, 18ug; pantothenic acid, 8mg; folic acid, 1mg; niacin, 24mg biotin, 50ug.

²Provided per kg of diet: I, 1mg; Fe, 50mg; Mn, 50mg; Zn, 60mg; Cu, 6mg; Co, 0.25mg; Se 0.15mg.

2) 결과 및 고찰

가) 증체량, 사료 섭취량, 사료효율

본 시험에서의 증체량, 사료섭취량, 사료효율, 폐사율은 Table 2에서 보는바와 같다. 전 시험기간 동안 FeSO₄ 200 처리구가 1840g/bird로 가장 낮은 증체를 보였으며, SP-Fe 200 처리구가 1913g/bird로 가장 높게 나타났다($p < 0.05$). 사료 섭취량은 finisher(4~5주) 기간에 FeSO₄ 200 처리구가 1881g/bird로 가장 낮았으며 Sp-Fe 200 및 Met-Fe 200 처리구가 각각 1958, 1962g/bird로 높게 나타났다($p < 0.05$). 하지만 전 시험기간 동안 수치상의 차이는 있었지만 통계상 유의차를 보이지 않았다. 사료 효율은 전 시험기간 동안 Met-Fe 200 처리구가 가장 높은 수치를 나타냈으나 통계상 유의차를 보이지 않았다. 폐사율에서도 철분 첨가에 의한 통계상 유의차를 보이지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 FeSO₄ 형태의 철분을 육계에 과다 급여시 증체 및 사료 섭취량이 감소한다는 Cao(1996)등의 연구보고와 유사하였다. 또한 control에 비해 유기태 철 처리구인 SP-Fe 100, SP-Fe 200 및 Met-Fe 200 처리구가 증체량 및 사료섭취량이 향상되었고 전 시험기간 동안의 폐사율이 높아지거나 사료 효율이 낮아지지 않았다.

나) 근육조직, 비장 및 간의 mineral 함량

본 시험에서의 비장 내 Fe 함량과 간 내 Fe, Cu 및 Zn 함량은 Table 3에 나타내었다. 비장 내 Fe 함량은 FeSO₄ 200 처리구가 606ppm으로 가장 높은 수치를 보였으며 SP-Fe 200 처리구가 564ppm으로 가장 낮은 수치를 보였지만 통계상 유의차를 보이지 않았다. 간에서의 Fe 함량은 SP-Fe 200 처리구가 893ppm으로 가장 높은 수치를 보였으며 control에서 487ppm으로 가장 낮은 수치를 나타냈다($p < 0.05$)이며 Control과 처리구들간에 contrast 비교시 사료 내 철분공급으로 인한 간 내 철분 함량이 증가하였다($p < 0.0001$). 간 내 철분 함량은 control에 비해 SP-Fe 100, SP-Fe 200, Mwt-Fe 200, FeSO₄ 200 처리구에서 각각 24, 83, 58, 9% 향상되었고 inorganic-Fe 보다는 organic-Fe의 간 내 Fe 함량 증가율이 더 높았다. 간 내 Cu 및 Zn 함량에서는 SP-Fe 100과 SP-Fe 200 처리구가 각각 12ppm과 97ppm으로 가장 높게 나타났지만 처리간에 통계상 유의차를 보이지 않았다. 이상의 결과에서 보면 비장에서는 유기태 및 무기태 철분 100 및 200ppm 수준의 철분공급으로 인한 영향은 없었다. Cao(1996)등은 육계 사료 내 reagent grade FeSO₄ · 7H₂O, feed grade FeSO₄ · H₂O 및 Fe-methionine을 0, 400, 600, 800ppm 첨가 급여시 간 내 철분의 함량도 첨가량에 따라 증가한 결과를 보였는데 본 시험에서의 결과와 일치하였다. Macro 및 trace 미네랄은 그 종류에 따라 interaction이 작용하는데 본 시험 결과로 봤을 때 200ppm 수준의 철분 공급은 간 내 Cu 및 Zn 함량에 영향을 미치지 않았다. 간에서의 SP-Fe 200 과 Met-Fe 200 처리구의 철분 함량 증가율을 비교했을 때 Fe-methionine chelate보다 Fe-soy proteinate가 더 높은 증가율을 보였다.

본 시험에서의 근육조직(breast, Leg 및 wing muscle) 내 Fe, Cu 및 Zn 함량의 분석결과는 Table 4에 나타내었다. BM 내의 Fe 함량은 SP-Fe 200 처리구가 9.04ppm으로 가장 높았고 control이 7.58ppm으로 가장 낮았다($p < 0.05$). 또한 control에 비해 SP-Fe 100, SP-Fe 200, Met-Fe 200, FeSO₄ 200 처리구의 철분 함량이 각각 10, 19, 12, 11% 증가하

었는데 간에서와 마찬가지로 SP-Fe 200 처리구가 Met-Fe 200 보다 더 높은 증가율을 보였고 FeSO₄ 200 처리구는 SP-Fe 100 처리구보다 더 많은 양의 철분을 공급했음에도 불구하고 비슷한 증가율을 보였다. BM 내의 철분 공급으로 인한 Cu, Zn 함량은 수치상 변화나 통계상 유의성을 보이지 않았다.

LM 내의 Fe 함량도 BM에서와 마찬가지로 control이 10.08ppm 으로 가장 낮았고 SP-Fe 200 처리구가 14.61ppm으로 가장 높았다($p < 0.05$). 철분 함량의 증가율은 SP-100, SP-Fe 200, Met-Fe 200, FeSO₄ 200 처리구 각각 control에 비해 30, 45, 37, 22%로 나타났다. LM에서의 Cu 및 Zn 함량도 SP-Fe 200 처리구가 각각 0.74ppm, 15ppm으로 가장 높았고 Cu는 FeSO₄ 200처리구가 0.52ppm, 10.86ppm으로 가장 낮은 결과를 보였다 ($P < 0.05$). WM 내 Fe 함량의 증가율은 control에 비해 SP-Fe 100, SP-Fe 200, Met-Fe 200, FeSO₄ 200 처리구가 각각 10, 14, 14, 4%로 나타났고 SP-Fe 200과 Met-Fe 200 처리구가 가장 높은 수치를 보였지만 통계상 유의차를 보이지 않았다. WM 내의 Cu와 Zn 함량 또한 수치상의 변화는 있었지만 통계상 유의차를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 보면 근육조직(BM, LM, WM)에서의 철분함량은 모든 처리구에서 증가하였고 Fe-methionine chelate 보다 Fe-soy proteinate가 더 좋은 결과를 나타냈고 FeSO₄를 200ppm 첨가한 것보다 Fe-soy proteinate 100ppm 첨가한 처리구의 결과가 더 좋았다. Bi Yu(2000)등의 연구보고에 의하면 이유자돈에게 amino acid complex인 Availa-Fe®를 급여한 결과 근육 및 간에서 control에 비해 철분의 함량이 첨가 수준에 따라 증가($p < 0.05$)하였는데 본 시험에서의 결과와 일치하였고 ferrous sulfate 보다 Availa-Fe®의 체내이용률이 유의하게 향상되었다고 하였다.

다) BM(Breast muscle)과 LM(leg muscle)의 적색도 분석

본 시험에서의 BM과 LM의 적색도 분석결과는 Table 5에 나타내었다. BM에서의 적색도를 나타내는 a value는 SP-Fe 200 처리구가 3.81로 가장 높았고 control이 2.17로 가장 낮았다($p < 0.05$). Control과 처리구간에 contrast 비교시 $p < 0.0051$ 로 처리구에서 유의하게 향상되었다. LM에서의 a value도 BM에서와 마찬가지로 SP-Fe 200 처리구에서 7.54로 가장 높았고 control은 4.96으로 가장 낮았다($p < 0.05$). Control과 처리구간에 contrast 비교했을 때 $p < 0.0002$ 로 처리구에서 유의하게 향상되었다. 이상의 결과에서 철분첨가로 인해 육계의 BM과 LM에서 적색도가 향상되었다. 이는 Bi Yu(2000)등의 연구보고에서 Availa-Fe®를 이유자돈에게 급여한 결과 skin color가 유의하게 향상되었다($p < 0.05$)는 결과와 유사하였다.

본 실험실에서 제조한 Fe-soy proteinate가 육계의 생산성, BM · LM · WM의 Fe 함량과 적색도에 미치는 영향을 연구하기 위하여 Fe-methionine chelate 및 FeSO₄ · 7H₂O의 비교실험을 5주 동안 실시하였다. 생산성에 있어서 일반사료를 급여한 control과 비교했을 때 무기태 철 처리구인 FeSO₄ 200구가 사료 섭취량과 증체율이 유의하게 낮은 결과를 나타냈으며 Fe-methionine chelate 200ppm 첨가한 Met-Fe 200구가 유의성이 가장 높은 결과를 보였고 Fe-soy proteinate 100, 200ppm 첨가한 SP-Fe 100구와 SP-Fe 200구에서는 control과 비슷한 결과를 보였다. 사료효율과 폐사율에서는 모든 처리구에서 유의차를 보이

지 않았다. 비장에서의 Fe 함량에는 수치상으로는 FeSO₄ 200구가 가장 높았지만 처리구간에 통계상 유의차를 보이지 않았다. 간에서의 모든 처리구가 control에 비해 철분 함량이 증가하였고 SP-Fe 200구에서 88%로 가장 많이 증가되었다. FeSO₄ 200구는 200ppm 수준의 철을 첨가했음에도 불구하고 100ppm 수준을 첨가한 SP-Fe 100구 보다 낮은 결과를 보였다. BM, LM 및 WM에서도 모든 처리구가 control에 비해 철분 함량이 증가하였고 SP-Fe 200구에서 각각 19, 45, 14%로 가장 높은 결과를 나타냈다. BM과 LM에서의 적색도 분석에서도 모든 처리구가 control에 비해 적색도 수준이 향상되었고 SP-Fe 200구가 가장 높은 결과를 나타냈다.

결론적으로 Fe-soy proteinate 200ppm 수준을 육계 사료 내 첨가 급여했을 때 간, 가슴살, 다리살, 날개살 내 철분의 함량이 가장 많이 축적되었고 다리살, 가슴살의 적색도를 향상시킬 수 있다. 이를 이용한 철분 강화 계육 생산이 가능하고 Fe-methionine chelate를 대체할 수 있다. 또한 Fe 뿐만 아니라 Cu 및 Zn등의 다양한 미네랄의 proteinate를 제조할 수 있다.

Table 2. Effect of supplementary Fe sources on the performance of broilers.

Item	wk	Treatments					SEM
		Control	SP-Fe 100	SP-Fe 200	Met-Fe 200	FeSO ₄ 200	
Weight gain, g/bird	0~3	774.67	827.12	796.97	809.08	800.32	16.34
	4~5	1109.2 ^a	1058.9 ^{ab}	86.34 ^{ab}	1104.6 ^{ab}	1039.82 ^b	21.06
	0~5	1883.87 ^{ab}	1886.02 ^{ab}	1883.32 ^{ab}	1913.68 ^a	1840.14 ^b	17.84
Feed intake, g/bird	0~3	1076.40	1127.20	1085.60	1070.00	1065.38	21.58
	4~5	1932.1 ^{ab}	1945.36 ^{ab}	1958.36 ^a	1962.10	1881.82 ^b	23.81
	0~5	3008.50	3072.30	3043.96	3032.10	2947.20	39.11
Feed /gain	0~3	1.39	1.36	1.36	1.32	1.33	0.02
	4~5	1.75	1.81	1.80	1.78	1.80	0.04
	0~5	1.60	1.63	1.62	1.58	1.60	0.02
Mortality, %	0~3	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.89
	4~5	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.89
	0~5	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	1.26

^{ab} Means with no common superscript differ significantly (p<0.05)

Table 3. Effect of supplemental Fe source on Cu, Fe and Zn content of muscular

Item	Treatments						SEM	
	Control	SP-Fe 100	SP-Fe 200	Met-Fe 200	FeSO ₄ 200			
		----- ppm -----						
BM (Breast muscle)	Cu	0.54	0.44	0.44	0.55	0.52	0.11	
	Fe	7.58 ^b	8.38 ^{ab}	9.04 ^a	8.53 ^{ab}	8.44 ^{ab}	0.44	
	Zn	4.67	4.87	4.67	4.82	4.59	0.26	
LM (Leg muscle)	Cu	0.56 ^{ab}	0.63 ^{ab}	0.74 ^a	0.71 ^{ab}	0.52 ^b	0.07	
	Fe	10.08 ^c	13.18 ^{ab}	14.61 ^a	13.81 ^{ab}	12.36 ^b	0.68	
	Zn	11.46 ^c	13.72 ^{ab}	15.00 ^a	12.88 ^{bc}	10.86 ^c	0.71	
WM (Wing muscle)	Cu	0.68	0.72	0.62	0.64	0.61	0.05	
	Fe	7.66	8.44	8.76	8.76	8.02	0.40	
	Zn	9.21	9.88	8.64	10.00	8.38	0.53	

^{abc}Means with no common superscript differ significantly (p<0.05)

Table 4. Effect of supplemental Fe sources on Cu, Fe and Zn content of spleen and liver

		Treatments					SEM
		Control	SP-Fe 100	SP-Fe 200	Met-Fe 200	FeSO ₄ 200	
		----- ppm (DM basis) -----					
Spleen	Fe	573.06	587.38	564.10	565.96	606.16	28.18
	Cu	11.49	12.18	11.82	11.41	11.30	0.58
Liver	Fe ¹	487.14 ^b	608.41 ^b	893.98 ^a	772.94 ^a	534.11 ^b	46.22
	Zn	73.75	92.92	97.26	96.72	79.62	8.85

^{ab}Means with no common superscript differ significantly (p<0.05)

¹Contrast T1 VS T2~T5; p<0.0001

Table 5. Effect of supplementary Fe source on meat color of muscular of broiler chickens.

		Treatments					SEM
		Control	SP-Fe 100	SP-Fe 200	Met-Fe 200	FeSO ₄ 200	
BM (Breast muscle) ¹	L	43.19 ^c	45.60 ^a	45.46 ^{ab}	44.49 ^{abc}	43.43 ^{bc}	0.68
	a	2.17 ^b	2.69 ^b	3.81 ^a	2.64 ^b	2.72 ^b	0.25
	b	6.30 ^b	7.42 ^a	7.85 ^a	6.46 ^b	6.58 ^b	0.29
LM (Leg muscle) ²	L	46.14 ^a	44.54 ^{ab}	43.37 ^{bc}	44.70 ^{ab}	41.59 ^c	0.81
	a	4.96 ^c	6.15 ^b	7.54 ^a	6.87 ^{ab}	6.45 ^{ab}	0.40
	b	7.04	7.36	7.07	7.36	6.01	0.44

L; Luminance or brightness(vary from black to white)

a; red-green component(+a=red, -a=green)

b; yellow blue component(+b=yellow, -b=blue)

^{abc} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05).

¹Contrast T1 vs T2~T5; p<0.0051

²Contrast T1 vs T2~T5; p<0.0002

3) 요약

본 시험은 iron soy-proteinate가 boiler의 생산성, 근육, 조직의 Fe 함량 및 근육의 색도에 대한 영향을 알아보기 위해 Fe-methionine chelate 및 ferrous sulfate와 비교실험을 실시하였다. 250마리의 ross broiler chicks 를 4처리 5반복으로 무작위 배열하여 5주 동안 시험하였다. 각 처리구는 Corn-soybean meal 위주로 배합한 basal diet(starter 175 mg/kg Fe; finisher 209 mg/kg Fe, DM basis)를 급여한 것(Control),에 각각 Fe-soy-proteinate를 100ppm 첨가한 것(SP-Fe 100), 200ppm 첨가한 것(SP-Fe 200), Fe-methionine chelate 200ppm 첨가한 것(Met-Fe 200) 및 FeSO₄ · 7H₂O 200ppm(FeSO₄ 200)을 첨가하였다. 증체량에서 Met-Fe 200이 유의적으로 높았지만(P<0.05), 사료섭취량, 사료효율 및 폐사율에서는 통계상 유의차는 없었다. 비장 내 Fe 함량은 통계상 유의차는 없었지만 간에서는 철분 첨가로 Fe 함량이 증가하는 경향을 보였고(P<0.0001), SP-Fe 200에 가장 높았다(p<0.05). 가슴살 및 다릿살은 모든 처리구가 control에 비해 Fe 함량이 향상되었으며 SP-Fe 200에서 각각 9.04 mg/kg, 14.61 mg/kg으로 가장 높았고(p<0.05), 19%, 45% 향상되었지만 날갯살에서는 통계적 유의차는 없었다. 날갯살과 다릿살에서 적색도는 철분첨가로 인해 향상되었고(p<0.0051, p<0.0002), SP-Fe 200구가 가장 높았다 (P<0.05). 결론적으로 육계에 iron-soy proteinate 200ppm 급여시 날개살, 다릿살의 Fe 함량이 증가되었고 육색도 좋아지며 iron-methionine chelate, Ferrous sulfate 보다 더 좋은 결과를 보였다.

2. 2차년도: Zn, Cu proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험

가. 탈지대두박을 이용한 Fe-soy proteinate의 생산

1) 재료 및 방법

가) Soy digest의 제조

본 시험에 사용된 탈지대두박은 조단백질 함량이 44%이상인 일반 사료원료에 사용되고 있는 것이며 dry oven에 60℃ · 4hr 건조 후 cutting mill(J-NCM, Jisico Co. Ltd., Korea)로 미세하게 분쇄하였다. 분쇄된 탈지대두박 100g을 칭량하여 3L beaker에 담고 증류수 1L를 넣어주고 항온수조(J-PWBPI, Jisico co. Ltd., Korea)를 이용해 60℃로 일정하게 유지시켜 주며 stirrer(PL-S10, Poong Lim. Co. Ltd., Korea)로 교반시켜 준다. 복합효소제(Alcalase 2.4L, Novozymes Korea., Denmark)는 건물의 4%인 4ml을 첨가해주었고 효소제의 최적반응조건인 pH 8.0을 맞추어 주기 위해 NaOH를 이용하였다. Micro pipet을 이용해 NaOH를 서서히 첨가하여 pH meter(HI8314, Hanna Instruments S.r.l., Italy)로 pH를 측정하였다. 혼합 수용액의 pH가 8.0에 도달했을때를 시점으로 4hr동안 교반과 온도는 일정히 유지해주어 soy digest를 제조하였다.

나) Copper, Zinc solution의 제조

본 시험에 사용된 구리와 아연 수용액은 Copper sulfate와 Zinc sulfate를 사용하였으며 그 양은 탈지대두박의 질량비 1:1을 적용하여 100g을 3L beaker를 이용해 1L의 증류수를 혼합하여 교반시켜 제조하였다.

다) Cu, Zn 회수율 측정

본 시험에서 Cu, Zn soy proteinate의 생성정도를 알아보기 위해 Cu, Zn 회수율을 측정하였다. 측정 방법은 생성된 soy digest에 Cu, Zn solution을 혼합해주어 30분간 교반해준다. 교반 후 pH buffer인 NaOH를 0, 10, 20, 30, 40, 45, 50ml을 넣어주어 반응시켜 총 7개의 반응물을 회수하여 dry oven에 60℃로 건조시킨 후 분쇄하여 7개의 Cu, Zn soy proteinate를 제조하였다.

라) Cu, Zn 함량의 측정

제조된 Cu, Zn soy proteinate의 Cu, Zn 함량은 AOAC(1990)방법에 준하여 wet digestion으로 전처리를 한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma) Emission Spectrometer (JY-Ultima-2, France)를 이용하여 측정하였다.

2) 결과 및 고찰

본 시험은 1차년도 Fe-soy proteinate 생산 시험에서 얻어진 결과를 바탕으로 Cu, Zn soy proteinate의 생산 조건을 알아보는 실험이었다. soy digest의 제조 조건, mineral solution의 제조 방법과 회수율 측정방법은 1차년도 시험과 동일하다. 다만 soy digest의 제조 조건 중에서 반응 시간을 4시간으로 줄여주었다. 이는 제2 세부과제 1차년도에 시행된 Soy digest mineral proteinate의 형성을 위한 soy digest의 생산조건 확립을 위한 연

구 결과에 의해서 줄여준 것이다. 연구 결과에 의하면 반응 시간별 폴리펩타이드의 생성이 4시간이 지나면서 폴리펩타이드 생성의 증가가 더디지는 것이 관찰되었다고 한다. 그러므로, 4 시간 정도의 미세한 대두박 입자를 사용하면 충분한 폴리펩타이드를 생산할 수 있을 것이라는 결과가 나왔다.

본 시험에서 NaOH의 사용량에 의한 Cu-soy proteinates의 Cu content, Cu recovery 및 pH에 대한 영향은 Table 2-1-1에 나타내었다. Soy digest에 NaOH(pH-buffer)를 전혀 첨가하지 않고 철분 수용액을 혼합하여 반응시켰을 때 pH는 4.2였고 Cu content는 10.6%, Cu recovery는 27.8%였다. NaOH를 50ml 첨가 시켰을 때 pH 8.2로 측정되었고 Cu content는 17.5%, Cu recovery는 76.0%로 나타났다. 이중에서 가장 좋은 조건을 보인 것은 NaOH 30ml를 첨가한 것으로 pH 5.4 일 때였다. Zn-soy proteinates의 경우 Zn content, Zn recovery 및 pH에 대한 영향은 Table 2-1-2에 나타내었다. Soy digest에 NaOH(pH-buffer)를 전혀 첨가하지 않고 철분 수용액을 혼합하여 반응시켰을 때 pH는 6.2였고 Zn content는 11.6%, Zn recovery는 42.4%였다. NaOH를 50ml 첨가 시켰을 때 pH 11.2로 측정되었고 Zn content는 17.7%, Zn recovery는 54.5%로 나타났다. 이중에서 가장 좋은 조건을 보인 것은 NaOH 40ml를 첨가한 것으로 pH 8.9 일 때였다.

Table 2-1-1. Effects of Cu content, recovery and pH by supplemental 50% NaOH.

	50% NaOH(ml)						
	0	10	20	30	40	45	50
pH	4.2	4.6	4.9	5.4	6.5	7.0	8.2
Cu content, %	10.6	13.5	15.6	18.4	16.3	16.0	17.5
Cu recovery, %	27.8	46.3	65.3	75.6	76.2	75.4	76.0

Table 2-1-2. Effects of Zn content, recovery and pH by supplemental 50% NaOH.

	50% NaOH(ml)						
	0	10	20	30	40	45	50
pH	6.2	6.3	6.7	7.7	8.9	9.6	11.2
Zn content, %	11.6	14.0	14.8	15.1	18.5	18.3	17.7
Zn recovery, %	42.4	50.5	71.2	81.5	83.6	74.5	54.5

3) 요약

본 시험은 탈지대두박을 이용하여 Cu, Zn-soy proteinate를 만들기 위해 실시하였다. 1L의 증류수에 100g의 탈지대두박과 alcalase 2.4L® 4ml을 첨가하여 pH 8, 60도의 조건으로 4시간동안 가수분해하여 soy digest를 만들었다. Cu soluble은 Cu sulfate 100g에 1L 증류수를 넣어 만들었다. soy digest에 Cu soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% NaOH를 다양한 수준으로 첨가하여 (0,10,20,30,40,45,50ml) chelation시켰다. Cu-soy proteinate는 pH 5.4 일 때 Cu content와 Cu recovery는 18.4%, 75.6%로 가장 높았다. Zn-soy proteinate는 pH 8.9 일 때 Zn content와 Zn recovery는 18.5%, 83.6%로 가장 높았다. 결론적으로 탈지대두박을 이용한 Cu, Zn-soy proteinate를 만들때 alcalase 2.4L을 이용해 pH 8, 60도 4시간 가수분해 시켜 soy digest를 만들고 50% NaOH를 이용해 pH가 Cu의 경우 5.4정도에서 Zn의 경우 8.9정도에서 가장 최적의 soy proteinate가 생성되었다.

나. 육계 사료 내 Cu proteinate 첨가 사양 시험(Cu-met 비교시험)

1) 실험설계

갓 부화한 broiler(Ross종) 1000수를 공시하여 4처리 5반복 반복 당 50수(암수 각각 25수)씩 완전임의 배치하였다. 시험 처리는 무첨가구(Control), Control + Cu Sulfate 200ppm 첨가구(200ppm Cu in Cu Sulfate, Cu Sulfate), Control + Cu methionine chelate 200ppm 첨가구(200ppm Cu in Cu methionine chelate, Cu-Met), 및 Control + Cu proteinate 200ppm 첨가구(200ppm Cu in Cu proteinate, Cu-SP)로 하였다.

2) 조사항목

가) 증체량, 사료 섭취량, 사료 요구율, 생산지수

사료 요구율 (사료 섭취량 / 증체량)

생산지수 (출하시 평균체중 × 생존율 / 출하일령 × 사료 요구율) 산출.

나) 대사시험 및 영양소 이용률 측정.

영양소 이용률 측정 $\{(\text{섭취건물중량} \times \text{영양소함량}(\%) - \text{분뇨건물중량} \times \text{분뇨 영양소함량}) / (\text{섭취건물 중량} \times \text{영양소함량}(\%))\} \times 100$

다) Fe, Cu 및 Zn 함량 분석

시험 종료 후 반복당 암수 각각 1수씩 도살하여 가슴, 날개 및 다리 근육과 간을 채취하여 Fe, Cu 및 Zn 함량 분석.

Fe, Cu 및 Zn 함량은 AOAC(1990)방법에 준하여 wet digestion으로 전처리를 한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma) Emission Spectrometer(JY-Ultima-2, France)를 이용하여 측정.

3) 결과

Table 2-2-1 Weight gain, feed intake, feed efficiency, mortality of broiler chickens fed experimental diets for 5wks

parameter	Wks	Treatments ¹				SEM
		Control	Cu Sulfate	Cu-Met	Cu-SP	
Weight gain, g/bird	0~3	780.38	791.22	759.39	765.92	21.55
	4~5	1058.83 ^b	1162.58 ^a	1179.1a	1175.84a	19.81
	0~5	1839.21	1953.8	1938.49	1941.76	24.57
Feed intake g/bird	0~3	1028.52 ^a	980.17 ^{ab}	967.94 ^b	979.75 ^{ab}	16.65
	4~5	1895.58 ^a	1886.25 ^{ab}	1911.81 ^b	1915.39 ^{ab}	25.76
	0~5	2924.09	2866.42	2879.75	2895.14	34.92
Feed Conversion	0~3	1.32 ^a	1.24 ^b	1.28 ^{ab}	1.28 ^{ab}	0.020
	4~5	1.79 ^a	1.63 ^b	1.62 ^b	1.63 ^b	0.019
	0~5	1.59 ^a	1.47 ^b	1.49 ^b	1.49 ^b	0.013
Mortality,%	0~3	4.00	4.00	6.00	5.00	2.20
	4~5	1.02	0.52	1.02	0.53	0.70
	0~5	5.00	4.50	7.00	5.50	1.95
Production Index		290.29 ^b	318.328 ^a	318.485 ^a	320.365 ^a	3.22

¹ Control : Control diet, Cu Sulfate: Control + Cu Sulfate 200ppm, Cu-Met: Control + Cu-Met 200ppm, Cu-SP: Control + Cu Proteinat 200ppm

^{a-b}Means with the different superscripts differ significantly (P < 0.05)

Table 2-2-2 Nutrients availability of the experimental diets

parameter	Treatments(%) ¹				SEM
	Control	Cu Sulfate	Cu-Met	Cu-SP	
DM	87.0	86.8	86.5	86.1	2.44
Crude protein	78.9	79.9	77.0	77.9	3.72
Crude fat	93.6	94.3	94.6	95.6	1.50
Crude fiber	49.0	56.5	48.8	47.4	9.54
Ash	60.6	58.4	57.3	58.1	7.36
Moisture	88.7	89.8	89.1	88.2	2.13
NFE	92.2	91.9	92.2	91.2	1.62
Cu	67.0	63.7	60.2	52.1	8.64

¹ Control : Control diet, Cu Sulfate: Control + Cu Sulfate 200ppm, Cu-Met: Control + Cu-Met 200ppm, Cu-SP: Control + Cu Proteinate 200ppm

Table 2-2-3 Effect of supplemental Cu source on Cu, Fe and Zn content of muscular

Parameter	Treatments(ppm) ¹				SEM	
	Control	Cu Sulfate	Cu-Met	Cu-SP		
Breast muscle	Cu	4.69	4.13	3.07	3.79	0.95
	Fe	17.0	15.8	15.3	18.3	1.67
	Zn	7.55 ^a	7.12 ^{ab}	5.96 ^{bc}	5.74 ^c	0.31
Wing muscle	Cu	3.60	4.63	4.17	4.78	1.21
	Fe	21.0	22.0	16.8	21.5	3.28
	Zn	15.8 ^a	12.9 ^b	14.4 ^{ab}	13.3 ^b	0.55
Leg muscle	Cu	2.99	4.36	5.21	4.61	1.04
	Fe	19.0	16.9	19.5	21.8	1.95
	Zn	13.1 ^b	16.3 ^a	11.0 ^b	12.9 ^b	0.58

¹ Control : Control diet, Cu Sulfate: Control + Cu Sulfate 200ppm, Cu-Met: Control + Cu-Met 200ppm, Cu-SP: Control + Cu Proteinatate 200ppm

^{a-b} Means with the different superscripts differ significantly (P < 0.05)

3) 요약

본 시험은 Cu soy-proteinate가 broiler에 대한 영향을 알아보기 위해 Cu-methionine chelate 및 Cu sulfate와 비교실험을 실시하였다. 1000마리의 ross broiler chicks 를 4처리 5반복으로 무작위 배열하여 5주 동안 시험하였다. 각 처리구는 basal diet를 급여한 것에 각각 FeSO₄·7H₂O 첨가한 것, Cu-methionine chelate 200ppm 첨가한 것 및 Cu-soy-proteinate 200ppm 첨가한 것이었다. 전 구간을 봤을 때 증체량 사료섭취량 폐사율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 사료 효율은 무첨가구가 유의적으로 구리를 첨가한 첨가구들보다 높게 나왔다(P<0.05). 근육내 미네랄 함량에서는 아연 함량이 유의적인 차이를 보였다. 구리와 철분은 유의적으로 차이를 보이지 않았다. 가슴과 날개 근육에서 무첨가구가 다른 첨가구들에 비해 아연의 함량이 높은 경향을 보였다.

다. 산란계 사료 내 Cu proteinate 첨가 사양 시험 (적정 첨가 수준 시험)

1) 실험 설계 및 처리구 : 5처리 10반복

- T1 : Basal diet
- T2 : Basal diet + Cu soy-proteinate(50ppm Cu)
- T3 : Basal diet + Cu soy-proteinate(100ppm Cu)
- T4 : Basal diet + Cu soy-proteinate(150ppm Cu)
- T5 : Basal diet + Cu soy-proteinate(200ppm Cu)

2) 조사항목

가) 산란율, 난중, 연파란율, 사료 섭취량, 사료 요구율

산란율, 평균난중, 연파란율은 매일 오후 5시 측정하여 주별 계산하였고, 사료 섭취량은 주 1회 조사하여 사료 요구율을 산출하였다.

나) 난각강도, 난각색, 난황색, 난각두께, Haugh unit

주1회씩 총7회 (0, 1, 2, 3, 4, 5week)에 걸쳐 반복당 10개 처리당 100개 총 10000개의 계란으로 난각강도, 난각색, 난황색, 난각두께, Haugh unit등의 품질검사를 실시 하였다.

다) 혈액성상 분석

혈액분석- 5ml EDTA가 처리된 vacutainer에 채혈후 24시간안에 혈액분석기 이용하여 측정.

3) 결과

Table 2-3-1 Laying performance, eggshell quality and egg yolk color during the 5wk experiment

Parameter	Treatments.					SEM
	Control	Cu50	Cu100	Cu150	Cu200	
Performance						
Henday egg production,%	91.37	92.77	92.45	91.23	91.87	1.069
Henhouse egg production,%	91.37	92.47	92.37	90.93	91.25	1.188
Egg weight,g	63.14	62.98	63.23	63.21	63.59	0.250
Broken & soft egg, %	0.17	0.15	0.26	0.27	0.30	0.062
Feed Intake, g/day	122.8 ^a	112.8 ^b	111.9 ^b	110.6 ^b	111.4 ^b	1.56
Feed Conversion g/100g egg mass	2.13 ^a	1.94 ^b	1.91 ^b	1.92 ^b	1.91 ^b	0.035
Egg quality						
Egg shell strength, kg/cm ²	4.15	4.28	4.19	4.12	4.28	0.079
Eggshell color	12.28 ^{ab}	12.48 ^{ab}	12.07 ^b	12.70 ^a	12.68 ^a	0.145
Egg yolk color	9.90 ^{bc}	9.99 ^b	9.79 ^c	9.98 ^b	10.16 ^a	0.047
Haugh unit	94.32	94.00	93.65	95.65	93.45	0.737
Eggshell thickness, (mm)	0.393 ^a	0.387 ^{ab}	0.383 ^b	0.381 ^b	0.386 ^b	0.0021

Control: Control diet, Cu50: Control + Cu proteinate(Cu 50ppm), Cu100: Control + Cu proteinate(Cu 100ppm), Cu150: Control + Cu proteinate(Cu 150ppm), Cu200: Control + Cu proteinate(Cu 200ppm)

^{a-c}Means with the different superscripts differ significantly (P < 0.05)

Table 2-3-2 Leukocytes and Erythrocytes in blood from Laying Hens fed experimental diets

Parameter	Treatments.					SEM
	Control	Cu50	Cu100	Cu150	Cu200	
Leukocytes						
WBC(K/ μ l)	14.84	15.62	15.35	15.33	15.65	1.955
NE(K/ μ l)	2.49	2.50	2.40	2.47	2.52	0.333
LY(K/ μ l)	11.84	11.28	11.17	11.38	11.98	0.995
SI(NE/LY)	0.22	0.23	0.22	0.21	0.21	0.028
MO(K/ μ l)	1.63	1.72	1.81	1.82	1.84	0.379
EO(K/ μ l)	0.16	0.16	0.12	0.13	0.13	0.058
BA(K/ μ l)	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.008
Erythrocytes						
RBC(M/ μ l)	2.18	2.17	2.19	2.25	2.25	0.128
Hb(g/dl)	9.33	9.48	9.62	10.12	9.56	0.626
HCT(%)	21.98	21.40	21.72	24.36	21.96	1.593
MCV(fl)	110.22	109.46	108.80	108.18	108.52	1.971
MCH(pg)	47.24	45.80	46.20	44.96	47.08	1.551
MCHC(g/dl)	45.76	42.80	44.24	43.58	44.56	2.063

WBC:White blood cell, NE:Neutrophil, LY:Lymphocyte, MO:Monocyte, EO:Eosinophil, BA:Basophil, SI: Stress indicator, RBC: Red blood cell, HB:Hemoglobin, HCT:Hematocrit, MCV:Mean corpuscular volume, MCH:Mean corpuscular hemoglobin, MCHC:Mean corpuscular hemoglobin concentration
Control: Control diet, Cu50: Control + Cu proteinate(Cu 50ppm), Cu100: Control + Cu proteinate(Cu 100ppm), Cu150: Control + Cu proteinate(Cu 150ppm), Cu200: Control + Cu proteinate(Cu 200ppm)

4) 요약

본 실험은 산란계 사료에 Cu proteinate를 수준별로 첨가하였을 때의 효과를 통해 급여 적정 수준을 알아보기 위한 시험이었다. 이 시험의 처리구는 각각 무첨가구, Cu proteinate를 50ppm, 100ppm, 150ppm 그리고 200ppm 첨가한 것이었다. 생산성에서는 사료 섭취량과 사료 전환률에서 유의적인 차이가 나타났고, 산란률, 난중, 연과란률에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 사료 섭취량은 무첨가구가 첨가구들에 비해 유의적으로 높게 나왔다. 사료 전환률은 구리를 첨가한 실험구들이 유의적으로 무첨가구보다 낮게 나왔다. 계란 품질의 난황색에서는 200ppm 첨가구가 다른 첨가구들에 비해 유의적으로 높았다. 난각색은 100ppm 첨가구가 유의적으로 다른 첨가구들에 비해 낮았으면 150ppm, 200ppm 첨가구가 다른 첨가구들에 비해 높은 경향을 보였다.

라. 이유자돈사료에 Cu, Zn proteinate 첨가의 항생제 대체효과에 대한 시험

1) 시험 설계

시험동물은 약 4주령(28±3)의 3원 교잡종 이유자돈 45두를 공시 하였으며 시험개시시의 평균체중은 7.31Kg±0.01이었다. 처리구당 3반복, 반복당 3두씩 자돈을 대사케이지(size : 가로 35.5cm × 세로 45cm × 높이 55cm) 완전 임의로 배치하였다. 본 시험의 처리구는 다음과 같았다.

T1 : Basal diet

T2 : Basal diet + avilmysine 0.03%

T3 : Basal diet + Cu soy-proteinate(100ppm Cu)

T4 : Basal diet + Zn soy-proteinate(100ppm Zn)

T5 : Basal diet + Cu soy-proteinate + Zn soy-proteinate(100ppm Fe, 100ppm Zn)

2) 조사항목

가) 혈액 성상

4주간의 사양시험을 종료한 후 모든 자돈을 보정 틀에 고정시키고 경정맥을 통해 5ml씩 채혈한 후 EDTA 처리된 튜브에 담아 냉장 보관 12시간 이내에 HEMACYTETM(OSI Oxford Science Inc, 2003, USA)를 이용하여 혈액 분석(Leukocytes; WBC, NE, LY, Erythroctes; RBC, Hb, HCT)을 실시하였으며, NE값과 LY값을 이용하여 stress indicator를 측정하였다.

나) 소화율 및 화학분석

시험사료의 소화율을 조사하기 위하여 사양 시험 개시 후 3주째에 Cr2O3를 사료내 0.3% 첨가하여 3일간의 적응기간 후 하루에 2회씩 분을 채취 후 60℃ 건조기에서 72시간 건조시킨 후 분쇄하여 시료로 사용하였다.

시료와 분의 조성분은 AOAC(1990) 방법에 준하여 실시하고 사료와 분 중 Cr의 농도와 광물질의 농도를 측정하기 위해 HNO3과 HCl로 전처리를 하여 ICP(Inductively Coupled

Plasma)를 이용하여 측정한다.

사료와 분의 일반성분과 인의 소화율은 간접방법으로 다음의 계산식에 의하여 구한다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = 100 / \{1 - (\text{사료중의 Cr함량 \%} - \text{분중의 영양소 함량 \%}) / (\text{분중의 Cr 함량 \%} - \text{사료중의 영양소 함량 \%})\}$$

3) 결과

Table 2-4-1. The effect of experimental diets on performance of weaning pigs

Item	Treatment ¹					SEM
	Control	Avilamycin	Cu SP	Zn Sp	Cu SP + Zn Sp	
Initial body Wt. (kg)	7.309	7.306	7.310	7.320	7.314	0.249
Final body Wt. (kg)	17.45	17.79	17.48	17.49	18.30	0.84
A v e r a g e daily Gain	289.75	299.47	290.43	290.50	313.89	20.37
Daily feed intake	21.96	23.52	22.85	22.55	22.64	0.44
Feed/gain	2.20	2.13	2.30	2.25	2.13	0.15

¹Control: Control diet, Avilamycin: Control + Avilamycin 0.3%, Cu SP: Control + Cu proteinate(Cu 200ppm), Zn Sp: Control + Zn proteinate(Zn 200ppm), Cu SP+Zn Sp: Control + Cu proteinate(Cu 200ppm)+Zn proteinate(Zn 200ppm)

Table 2-4-2. Leukocytes and Erythrocytes in blood from weaning pigs fed experimental diets

Parameter*	Treatments**					SEM
	Control	Avilamycin	Cu SP	Zn Sp	Cu SP + Zn Sp	
Leukocytes						
WBC(K/ μ l)	19.02	18.53	19.53	17.68	19.23	1.204
NE(K/ μ l)	7.12	6.75	6.64	6.71	6.90	0.615
LY(K/ μ l)	10.96 ^{ab}	10.58 ^{ab}	12.01 ^a	9.70 ^b	10.37 ^{ab}	0.597
SI(NE/LY)	0.65	0.63	0.55	0.71	0.67	0.053
MO(K/ μ l)	0.59	0.55	0.65	0.50	0.50	0.062
EO(K/ μ l)	0.17	0.13	0.21	0.19	0.23	0.044
BA(K/ μ l)	0.023	0.021	0.022	0.032	0.027	0.0096
Erythrocytes						
RBC(M/ μ l)	6.28	6.63	6.80	6.59	6.43	0.523
Hb(g/dl)	11.40	10.80	10.96	11.00	10.92	0.392
HCT(%)	34.52	33.06	34.40	33.04	32.32	1.185
MCV(fl)	50.04	50.02	50.64	50.42	50.16	1.351
MCH(pg)	16.48	16.36	16.97	16.82	16.76	0.625
MCHC(g/dl)	33.32	32.66	33.06	32.04	31.88	0.580

*WBC:White blood cell, NE:Neutrophil, LY:Lymphocyte, MO:Monocyte, EO:Eosinophil, BA:Basophil, SI: Stress indicator, RBC: Red blood cell, HB:Hemoglobin, HCT:Hematocrit, MCV:Mean corpuscular volume, MCH:Mean corpuscular hemoglobin, MCHC:Mean corpuscular hemoglobin concentration

**Control: Control diet, Avilamycin: Control + Avilamycin 0.3%, Cu SP: Control + Cu proteinate(Cu 200ppm), Zn Sp: Control + Zn proteinate(Zn 200ppm), Cu SP+Zn Sp: Control + Cu proteinate(Cu 200ppm)+Zn proteinate(Zn 200ppm)

4) 요약

본 실험은 자돈 사료에 Cu와 Zn proteinate를 첨가하였을 때의 효과를 알아보기 위한 시험이었다. 이 시험의 처리구는 각각 무첨가구, 항생제 첨가구, Cu proteinate 첨가구, Zn proteinate 첨가구 그리고 Cu + Zn proteinate를 첨가한 것이었다. 생산성에서는 유의적인 차이는 없었지만 일당 증체량이 Cu + Zn proteinate를 첨가한 실험구가 수치상으로 가장 높았고 그 다음은 항생제를 첨가한 실험구였다. Cu + Zn proteinate를 첨가한 실험구와 항생제를 첨가한 실험구가 사료효율에서 가장 낮은 수치를 나타내었다. 혈액성상에서는 LY에서 유의적인 차이가 있었다. Cu proteinate를 첨가한 실험구가 가장 높았고 Zn proteinate를 첨가한 실험구가 가장 낮았다.

3. 3차년도: Ca, Mg chelate 제조 및 첨가 사양시험

가. 탈지대두박을 이용한 Mg, Ca soy proteinate의 생산

1) 탈지대두박을 이용한 Mg soy proteinate의 생산

가) 재료 및 방법

Mg soy proteinate의 단백질원으로 사용한 Soy digest의 제조는 2차년도에 Cu, Zn soy proteinate의 제조에 사용된 방법과 동일한 조건에서 동일한 방법을 사용하였다. Mg 수용액은 Mg oxide를 사용하여 만들었으며 그 양은 탈지대두박의 질량비 1:1을 적용하여 100g을 3L beaker를 이용해 1L의 증류수를 혼합하여 교반시켜 제조하였다.

회수율의 측정 방법은 생성된 soy digest에 Mg solution을 혼합해주어 30분간 교반해준다. 교반 후 pH buffer인 KOH를 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100ml을 넣어주어 반응시켜 총 11개의 반응물을 회수하여 dry oven에 60°C로 건조시킨 후 분쇄하여 11개의 Mg-soy proteinate를 제조한다. 제조된 Mg soy proteinate의 Mg 함량은 AOAC(1990)방법에 준하여 wet digestion으로 전처리를 한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma) Emission Spectrometer (JY-Ultima-2, France)를 이용하여 측정하였다.

나) 결과

본 시험은 1, 2차년도의 제조 시험과 마찬가지로 같은 조건하에서 이뤄졌다. 3차년도의 경우에는 1, 2차년도와 다르게 NaOH를 pH buffer로 사용하는 대신에 KOH를 이용하였다. 그 이유는 Fe, Cu, Zn와 달리 Mg는 Na보다 이온화도가 높기 때문이다. 그래서 Mg보다 이온화도가 높은 K이 들어있는 KOH를 사용하게 되었다.

본 시험에서 KOH의 사용량에 의한 Mg-soy proteinates의 Mg content, Mg recovery 및 pH에 대한 영향은 Table 3-1-1에 나타내었다. Soy digest에 KOH(pH-buffer)를 5ml에 Mg 수용액을 혼합하여 반응시켰을 때 pH는 8.2였고 Mg content는 5.75%, Mg recovery는 6.95%였다. KOH를 100ml 첨가 시켰을 때 pH 9.7로 측정되었고 Mg content는 9.04%, Mg recovery는 13.63%로 나타났다. 이 중에서 가장 좋은 조건을 보인 것은 KOH 80ml를 첨가한 것으로 pH 9.7 일 때였다.

2) 탈지대두박을 이용한 Ca soy proteinate의 생산

현재 산란계 사료에 칼슘공급원으로 석회석(CaCO₃)을 사용한다.

Ca-proteinate제조시 Ca의 공급원으로 석회석(CaCO₃), Calcium sulfate(CaSO₄), Calcium nitrate tetrahydrate(Ca(NO₃)₂·4H₂O) 등을 사용할 수 있지만 Calcium nitrate tetrahydrate는 석회석과 비교하여 상당한 고가이다.

Calcium nitrate tetrahydrate는 물에 잘 녹지만 석회석 및 Calcium sulfate는 물에 잘 녹지 않는다. 석회석과 calcium sulfate는 용매로 산(acid)를 사용하여야 하는데 염산(HCl)은 Cl의 함량이 매우 높다. 가금에게 염소(Cl)의 초과 급여는 염중독을 일으켜 산란율을 저하시킨다. 다른 용매로는 염소가 들어있지 않은 Formic acid(HCOOH), Acetic acid(CH₃COOH), Sulfuric acid(H₂SO₄)등이 있다.

석회석과 CaSO₄는 Formic acid와 Acetic acid에 잘 녹지 않았으며, Sulfuric acid에 잘 녹았다. Sulfuric acid에는 과다의 황(S)이 함유되어 있어 그에 의한 좋지 않은 효과가 나타날 수도 있다. Formic acid를 용매로 사용하였을 때 석회석과 Calcium sulfate가 녹는 것처럼 보였으나 약 30분 정치시 녹지 않고 아래쪽으로 가라앉았다. 특히 Calcium sulfate는 석고화 반응을 일으켜 굳었다. Formic acid와 Sulfuric acid를 혼합하여 용매로 사용하였을 때 층이 분리되어 혼합되지 않고 녹지도 않았다.

용매를 Sulfuric acid만으로 사용하였을 때는 모든 Ca공급원은 잘 녹았지만 소화공정을 한 대두박과 혼합시 결정화 반응을 보이지 않았고 pH가 매우 낮아 알칼리처리를 하기 위해 과다한 NH₄OH를 처리해야 하였다. 결정화 반응은 킬레이트(chelate)화를 알아보는 척도로 이용된다. NH₄OH는 가금에 좋지 않은 영향은 없을 것으로 예상되지만 냄새 때문에 실험자가 조절하기에 매우 힘들다. Calcium nitrate tetrahydrate를 물에 녹여 사용하였을 때 물에는 잘 녹았지만 역시 결정화 반응을 보이지 않았다.

Table 3-1-1. Effects of Cu content, recovery and pH by supplemental 50% NaOH.

	50% NaOH(ml)										
	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pH	8.2	8.7	9.3	9.3	9.5	9.6	9.5	9.2	9.7	9.6	9.7
Cu content, %	5.75	6.22	9.79	6.71	7.05	8.08	7.95	8.11	8.42	8.98	9.04
Cu recovery, %	6.95	8.94	17.32	10.93	11.15	13.55	15.40	15.84	19.26	19.10	13.63

3) 요약

본 시험은 탈지대두박을 이용하여 Mg-soy proteinate를 만들기 위해 실시하였다. 1L의

증류수에 100g의 탈지대두박과 alcalase 2.4L® 4ml을 첨가하여 pH 8, 60도의 조건으로 4 시간동안 가수분해하여 soy digest를 만들었다. Mg soluble은 Mg sulfate 100g에 1L 증류수를 넣어 만들었다. soy digest에 Mg soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% KOH를 다양한 수준으로 첨가하여 (0,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100ml) chelation시켰다. Mg-soy proteinate는 pH 9.7 일 때 Mg content와 Mg recovery는 8.42%, 19.26%로 가장 높았다.

결론적으로 탈지대두박을 이용한 Mg-soy proteinate를 만들때 alcalase 2.4L을 이용해 pH 8, 60도 4시간 가수분해 시켜 soy digest를 만들고 50% KOH를 이용해 pH가 Mg의 경우 pH 9.7정도에서 가장 최적의 soy proteinate가 생성되었다.

나. 육성 비육돈의 사료 내 Mg proteinate 및 Fe proteinate 첨가가 생산성과 돈육 품질에 미치는 영향

1) 재료 및 방법

가) 시험 사료

본 시험에 사용된 기초사료(대조구)의 배합비와 성분은 Table 1 에서 보는 바와 같으며, NRC(1998) 요구량에 준하여 작성되었다.

나) 시험동물 및 시험설계

사양시험을 위하여 3원 교잡종(Landrace Yorkshire Duroc) 육성 비육돈 120두를 공시하였으며 시험개시시의 체중은 평균 39kg 이었다. 4처리 3반복 반복당 10두(암컷: 5두, 거세수컷: 5두)로 하여 평사 스크레파식 돈방(4m 3m)에 각 처리별로 체중이 비슷한 개체들을 수용하여 완전임의배치 하였다. 시험 처리는 무첨가구(Control), Control + Fe proteinate 100ppm 첨가구(100ppm Fe in Fe-proteinate, SP-Fe 100), Control + Mg proteinate 50ppm 첨가구(50ppm Mg in Mg-proteinate, SP-Mg 50), 및 Control + Fe proteinate 100ppm + Mg proteinate 50ppm 첨가구(100ppm Fe in Fe-proteinate + 50ppm Mg in Mg-proteinate, SP-Fe 100 + SP-Mg 50)로 하였다.

다) 사양관리

실험기간 동안 물과 사료는 자유 채식 도록 하였으며, 체중 및 사료섭취량은 사양시험 개시 시와 개시일로부터 4주째(grower stage)와 11주째(grow-finisher stage) 측정하여 기별 일당증체량, 일당사료섭취량 및 사료요구율을 계산 하였다.

라) Sample 채취

사양시험 종료 후 각 처리 별로 암?수(거세돈) 각 5두씩, 총 40두를 도체 하여 등심, 안심, 햄, 혈액 및 간을 채취한 후 즉시 액체 질소 탱크에 넣어 운반 하였으며 분석 시까지 -50℃에 냉동 보관 하였다.

마) 근육, 혈액 및 간 내 Fe, Mg 함량 분석

사양시험 종료 후 각 처리당 10두(암?거세수컷 각 5두)씩을 선발 도축하여 등심, 안심, 햄, 혈액 및 간을 채취하여 분석에 이용하였으며, Fe 와 Mg 분석은 AOAC(1990) 방법에

준하여 HNO₃ 와 HCl 로 전처리 한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma, ULTIMA2, Jobin Yvon, France) 방출 분광기를 이용하여 측정 하였다.

바) Water holding capacity 측정

도축 후 채취한 등심, 안심 및 햄 근육을 Water holding capacity 측정에 이용하였으며, 분석 방법은 AOAC(1990) 방법에 준하여 전처리 한 후 원심분리기(3,000rpm, 4°C, 15min.) 를 이용하여 측정 하였다.

사) 근육 Hunter value, pH 및 온도 측정

사양시험 종료 후 각 처리당 10두(암?거세수컷 각 5두)씩을 선발 도축한 후 채취한 등심, 안심 및 햄 근육을 Hunter value, pH 및 온도 측정에 이용하였으며, 근육 Hunter L*, a* 와 b* value 측정은 도축 후 시간대(0, 1hr, 9hr, 14hr, 18hr 및 24hr)별로 Chromameter(Minolta CM-508i, Japan)을 이용하여 각 근육의 동일한 3부위를 선정 측정 한 후 평균값을 얻었으며, 근육 pH 와 온도 측정은 근육용 pH meter(model 720, Thermo Orion, USA) 와 온도계(Testo 826-T4, Germany)를 이용하여 도축 후 시간대(0, 1hr, 9hr, 14hr, 18hr 및 24hr)별로 근육의 동일한 부위를 선정하여 측정하였다.

자) 통계분석

사양시험에서 얻어진 자료의 통계처리는 SAS(1995)의 GLM(General Linear Model) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리 평균 간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 분석 하였다.

Table 3-2-1. Composition and nutrient content of experimental diets¹

Ingredients, %	Grower	Grow-finisher
Corn	57.56	61.89
Soybean meal	23.01	19.88
Wheat	6.00	5.00
Rice bran polish	2.00	2.00
Ca carbonate	0.57	0.74
DEFL. Phosphorus	0.71	0.56
Salt	0.20	0.23
Animal fat	5.20	5.24
Molasses	4.00	4.00
Choline chloride(75%)	0.02	0.03
CuSO ₄ (34% Cu)	0.03	0.03
L-lysine(78%)	0.30	0.21
DL-methionine(88%)	0.04	0.02
L-threonine(98%)	0.05	0.04
Antibiotic	0.11	-
Hog premix ²	0.20	0.13
Total	100.00	100.00
Chemical composition ³		
ME, kcal/kg	3,250.00	3,300.00
Crude protein, %	16.7	15.20
Lysine, %	1.10	0.92
Ca, %	0.70	0.70
Phosphorus, %	0.45	0.40

¹ As-fed basis. Pigs weighing 39kg in average were fed grower feed for 4weeks(0 - 4 week), grow-finisher feed for 7 weeks(5 - 11 week).

² Provide per kg diet: Vit A, 10,000IU; Vit D₃, 2,000IU; Vit E, 42IU; Vit K, 5mg Vit B₂, 9.6mg Vit B₆, 2.45 mg Vit B₁₂, 40 μ g pantothenic acid, 27mg niacin, 49mg biotin, 0.05mg Cu, 140mg Fe, 179mg Zn, 179mg Mn, 12.5 mg I, 0.5mg Co, 0.25mg Se, 0.4mg

³ Calculated value

2) 결과

Table 3-2-2. The effect of experimental diets on performance of pigs

Items	Treatments ¹				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
Grower stage(0-4weeks)					
ADG, g	888.57	785.12	828.57	826.31	29.91
ADFI, g	2094.88	1905.12	2063.81	2081.07	101.83
Feed/gain	2.36	2.43	2.49	2.52	0.06
Grow-finisher stage(4-11 weeks)					
ADG, g	754.90	727.35	771.36	776.19	54.19
ADFI, g	2247.96	2238.84	2303.95	2406.26	88.20
Feed/gain	2.98	3.08	2.99	3.10	0.17
Overall(0-11 weeks)					
ADG, g	803.51	761.95	792.16	794.42	33.35
ADFI, g	2192.29	2117.49	2216.62	2288.01	83.03
Feed/gain	2.73	2.78	2.80	2.88	0.06

¹ Control, SP-Fe 100 Control + 100ppm Fe in Fe-proteinate, SP-Mg 50 Control + 50ppm Mg in Mg-proteinate, SP-Fe 100+SP-Mg 50 Control + Fe 100ppm in Fe-proteinate + Mg 50ppm in Mg-proteinate

* Standard error of mean

Table 3-2-3. Effects of Fe-proteinate and Mg-proteinate on the content of Fe and Mg in muscle, liver and blood of pork

Items	Treatments				SEM*	
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100 + SP-Mg 50		
----- wet tissue, ppm -----						
Loin	Fe	55.43 ^{ab}	49.98 ^b	58.75 ^{ab}	70.26 ^a	5.45
	Mg	886.37 ^a	843.33 ^{ab}	762.40 ^{bc}	714.72 ^c	34.91
Tender loin	Fe	68.34	77.19	59.90	71.20	6.76
	Mg	908.68	914.25	925.76	918.89	23.82
Ham	Fe	58.61	60.12	59.77	71.66	7.57
	Mg	880.43	816.49	890.29	869.13	25.62
Liver	Fe	556.41	580.12	556.80	562.36	27.88
	Mg	567.53 ^b	610.36 ^{ab}	606.64 ^{ab}	682.91 ^a	29.24
Blood	Fe	371.05 ^b	414.33 ^a	422.75 ^a	442.77 ^a	14.39
	Mg	50.48	51.12	49.48	52.25	1.36

* Standard error of mean

^{a-c} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05)

Table 3-2-4. Effect of Fe-proteinate and Mg-proteinate on Water Holding Capacity

Items	Treatments				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
Water holding capacity(WHC), %					
Loin	10.63	10.06	9.08	9.65	1.21
Tender loin	9.19	9.46	10.14	10.09	1.31
Ham	7.31	10.13	7.88	7.05	1.38

* Standard error of mean

Table 3-2-5. Effect of Fe-proteinate and Mg-proteinate on Hunter L*** value

Criteria	Treatments				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
	Loin**				
0	35.99	37.86	37.53	37.28	0.65
1 hr	37.34	39.02	38.05	38.80	0.63
9 hr	37.04	39.31	39.24	37.84	0.99
14 hr	38.61	40.27	40.98	39.50	0.91
18 hr	37.88 ^b	40.34 ^a	40.23 ^a	39.67 ^{ab}	0.78
24 hr	35.85 ^B	38.96 ^A	39.21 ^A	38.23 ^{AB}	0.70
	Tender loin**				
0 hr	35.69	35.11	35.88	34.32	0.71
1 hr	36.25 ^{ab}	35.92 ^{ab}	37.35 ^a	34.89 ^b	0.63
9 hr	37.34	36.58	38.42	36.28	0.69
14 hr	37.17	36.30	38.00	37.30	0.84
18 hr	35.64 ^{ab}	33.86 ^b	37.00 ^a	36.08 ^{ab}	0.86
24 hr	36.02	36.02	36.43	36.34	0.84
	Ham**				
0 hr	37.46 ^b	39.95 ^a	39.30 ^{ab}	38.33 ^{ab}	0.77
1 hr	37.21	39.19	39.59	37.11	1.05
9 hr	35.92 ^b	38.76 ^a	38.79 ^a	36.14 ^b	0.77
14 hr	35.05 ^B	39.11 ^A	40.05 ^A	37.38 ^{AB}	0.95
18 hr	35.32 ^B	38.49 ^{AB}	38.86 ^A	37.37 ^{AB}	0.80
24 hr	36.01 ^b	39.18 ^a	37.69 ^{ab}	37.12 ^{ab}	0.95

* Standard error of mean

** Post-mortem time

*** L; luminance or brightness(vary from black or green)

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05)^{A-B} Values with differentsuperscripts in the same row are different(p<0.01)

Table 3-2-6. Effect of Fe-proteinate and Mg-proteinate on Hunter a^{***} value

Criteria	Treatments				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
	Loin**				
0	2.82	2.38	2.44	3.09	0.29
1 hr	3.47	3.60	2.94	3.49	0.24
9 hr	4.76	4.55	4.43	5.18	0.37
14 hr	6.22	6.08	5.87	6.27	0.37
18 hr	6.32	6.58	6.18	6.86	0.48
24 hr	5.69	5.70	7.04	7.39	0.67
	Tender loin**				
0 hr	8.19	8.46	8.65	7.92	0.42
1 hr	10.53	10.19	10.29	10.46	0.50
9 hr	10.59	9.72	10.40	9.83	0.62
14 hr	10.24	9.26	9.17	9.93	0.70
18 hr	10.38	9.53	9.01	9.78	0.57
24 hr	7.38	7.12	7.70	7.49	1.07
	Ham**				
0 hr	4.84	4.63	3.92	4.74	0.51
1 hr	5.34	5.13	5.05	5.20	0.52
9 hr	6.18	5.88	5.36	6.16	0.36
14 hr	6.66	6.74	6.27	7.27	0.41
18 hr	7.73	7.64	8.72	8.80	0.60
24 hr	7.64	7.28	7.36	7.95	0.32

* Standard error of mean

** Post-mortem time

*** a: red-green component(+a=red, -a=green)

Table 3-2-7. Effect of Fe-proteinate and Mg-proteinate on Hunter b*** value

Criteria	Treatments				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
	Loin**				
0	4.81	5.04	4.72	4.86	0.24
1 hr	5.45	5.48	5.15	5.09	0.24
9 hr	5.40	5.66	5.59	5.61	0.28
14 hr	6.52	6.43	6.62	6.56	0.25
18 hr	6.30	6.44	6.62	6.61	0.26
24 hr	5.09	5.65	5.64	5.68	0.38
	Tender loin**				
0 hr	5.05	4.87	5.23	4.71	0.23
1 hr	6.21	5.70	5.99	5.81	0.22
9 hr	6.80	5.97	6.08	6.32	0.31
14 hr	6.64	6.43	6.71	6.80	0.33
18 hr	6.41	5.97	6.19	6.66	0.29
24 hr	5.67 ^b	5.67 ^{ab}	6.13 ^{ab}	6.75 ^a	0.31
	Ham**				
0 hr	4.96	5.20	5.46	5.41	0.24
1 hr	5.13	5.78	5.54	5.43	0.24
9 hr	5.14 ^B	6.27 ^A	5.86 ^{AB}	5.58 ^{AB}	0.24
14 hr	5.85 ^b	6.91 ^a	6.46 ^{ab}	6.43 ^{ab}	0.28
18 hr	5.83 ^B	6.99 ^A	6.60 ^{AB}	6.79 ^{AB}	0.27
24 hr	5.44	5.93	6.52	5.78	0.38

* Standard error of mean

** Post-mortem time

*** b; yellow blue component(+b=yellow, -b=blue)

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05)

^{A-B} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.01)

Table 3-2-8. Effect Fe-proteinate and Mg-proteinate on muscle pH

Criteria	Treatments				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
Loin**					
0	6.10 ^{ab}	6.13 ^a	5.95 ^{ab}	5.75 ^b	0.12
1 hr	6.16 ^a	6.08 ^{ab}	5.96 ^{ab}	5.78 ^b	0.12
9 hr	5.84	5.85	5.71	5.80	0.05
14 hr	5.73	5.73	5.59	5.59	0.05
18 hr	5.75 ^a	5.70 ^a	5.52 ^b	5.59 ^{ab}	0.06
24 hr	5.53	5.59	5.55	5.66	0.43
Tender loin**					
0 hr	6.03 ^a	5.91 ^{ab}	5.77 ^{ab}	5.72 ^b	0.09
1 hr	6.10 ^a	5.99 ^{ab}	5.87 ^{ab}	5.72 ^b	0.10
9 hr	5.97 ^a	5.86 ^{ab}	5.81 ^b	5.89 ^{ab}	0.05
14 hr	5.89 ^a	5.76 ^{ab}	5.69 ^b	5.68 ^b	0.06
18 hr	5.80	5.73	5.60	5.64	0.08
24 hr	5.75	5.67	5.60	5.63	0.06
Ham**					
0 hr	6.52 ^a	6.45 ^{ab}	6.37 ^{ab}	6.17 ^b	0.10
1 hr	6.42	6.49	6.33	6.23	0.09
9 hr	6.03	5.86	6.12	5.88	0.16
14 hr	5.93 ^a	5.79 ^{ab}	5.66 ^b	5.69 ^{ab}	0.08
18 hr	5.74 ^A	5.70 ^{AB}	5.52 ^B	5.63 ^{AB}	0.05
24 hr	5.63	5.61	5.65	5.66	0.06

* Standard error of mean

** Post-mortem time

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05)^{A-B} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.01)

Table 3-2-9. Effect of Fe-proteinate and Mg-proteinate on muscle temperature

Criteria	Treatments				SEM*
	Control	SP-Fe 100	SP-Mg 50	SP-Fe 100+SP-Mg 50	
Loin **					
0	33.09 ^{AB}	31.46 ^C	35.70 ^{AB}	37.20 ^A	0.82
1 hr	17.75 ^B	17.74 ^B	19.24 ^{AB}	20.98 ^A	0.74
9 hr	10.36	10.22	10.52	10.22	0.97
14 hr	10.66	10.99	11.19	10.97	0.96
18 hr	10.41	10.59	10.87	10.70	0.84
24 hr	11.26	11.01	11.46	11.40	0.69
Tender loin **					
0 hr	28.51 ^B	27.75 ^B	30.59 ^{AB}	34.45 ^A	1.23
1 hr	13.73 ^{AB}	12.73 ^B	14.91 ^A	15.20 ^A	0.40
9 hr	10.65	10.34	10.68	10.58	0.93
14 hr	11.28	10.90	11.37	11.14	0.89
18 hr	10.69	10.60	10.97	10.92	0.82
24 hr	11.69	11.47	11.76	11.65	0.57
Ham **					
0 hr	26.75 ^B	30.78 ^A	31.37 ^A	34.27 ^A	0.94
1 hr	12.58 ^b	15.16 ^a	13.65 ^{ab}	13.93 ^{ab}	0.75
9 hr	10.54	10.84	10.60	10.98	0.87
14 hr	11.08	11.02	11.43	10.90	0.91
18 hr	10.53	10.67	11.04	10.57	0.82
24 hr	11.61	11.49	11.80	11.74	0.61

* Standard error of mean

** Post-mortem time

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.05)

^{A-C} Values with different superscripts in the same row are different(p<0.01)

4) 요약

본 시험은 Mg proteinate와 Fe proteinate를 육성비육돈 사료에 첨가 급여하였을 때 생산성, 육질 및 육색도 등을 알아보기 위한 실험이었다. 시험 처리는 무첨가구(Control), Control + Fe proteinate 100ppm 첨가구(100ppm Fe in Fe-proteinate, SP-Fe 100), Control + Mg proteinate 50ppm 첨가구(50ppm Mg in Mg-proteinate, SP-Mg 50), 및 Control + Fe proteinate 100ppm + Mg proteinate 50ppm 첨가구(100ppm Fe in Fe-proteinate + 50ppm Mg in Mg-proteinate, SP-Fe 100 + SP-Mg 50)로 하였다. 사양 시험결과와는 예상과는 달리 proteinate 첨가구가 다른 처리구들에 비해 산란율, 섭취량, 사양 시험 결과 생산성에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈액의 광물질 함량에서 첨가구들이 무첨가구에 비해 유의적으로 높게 나왔다. 간에서는 SP-Fe 100 + SP-Mg 50를 첨가한 실험구가 가장 높은 결항을 보였다. Loin에서는 SP-Fe 100 + SP-Mg 50을 첨가한 실험구가 Fe의 함량은 가장 높고 Mg의 함량은 가장 낮은 경향을 보였다. Water holding capacity에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 부위별 L value는 lion과 tender loin에서 SP-Mg 50 첨가구가 ham에서는 SP-Fe 100와 SP-Mg 50가 높은 경향을 보였다. a value에서는 유의적인 차이를 보이진 않았지만 SP-Fe 100 + SP-Mg 50첨가구가 수치상으로 높은 경향을 보였다. b value에서는 proteinate 첨가구들이 무첨가구에 비해 높은 경향을 보였다. 근육 내 pH는 도축 시점으로부터 9시간 이내에 SP-Fe 100 + SP-Mg 50 첨가구가 낮은 경향을 보였다. 근육 내 온도는 도축시점으로부터 한시간 정도까지 SP-Fe 100 + SP-Mg 50 첨가구가 높은 경향을 보였다.

다. 산란계 사료 내 Ca-chelate 첨가가 난각 강화 효과에 미치는 영향

1) 실험 설계 및 처리구 : 4처리 5반복

- T1 : Basal diet
- T2 : Basal diet + limestone 4%(4% Ca)
- T3 : Basal diet + Ca soy proteinate(3% Ca)
- T4 : Basal diet + Ca soy proteinate(4% Ca)

2) 조사항목

가) 산란율, 난중, 연과란율, 사료 섭취량, 사료 요구율

산란율, 평균난중, 연과란율은 매일 오후 5시 측정하여 주별 계산하였고, 사료 섭취량은 주 1회 조사하여 사료 요구율을 산출하였다.

나) 난각강도, 난각두께

주1회씩 반복당 10개 처리당 50개 총 200개의 계란으로 난각강도, 난각두께의 품질검사를 실시 하였다.

3) 결과

Table 3-3-1 Summary of laying performance and eggshell quality

Parameter	Treatments.			
	Control	limestone	3%Ca SP	4%Ca SP
Performance				
Henday egg production,%	75.38	78.72	31.77	32.48
Henhouse egg production,%	75.38	78.67	31.76	32.48
Egg weight,g	68.37	67.91	64.83	64.13
Feed Intake, g/day	139.27	129.91	83.57	78.01
Feed Conversion g/100g egg mass	2.7	2.38	12.16	6.06
Egg quality				
Egg shell strength, kg/cm ²	3421.34	3640.98	2452.99	2338.20
Eggshell thickness, (mm)	0.406	0.417	0.351	0.345

4) 요약

본 시험은 Ca proteinate를 산란계 사료에 첨가 급여하였을 때의 효과를 알아보려고 실시하였다. 본 시험의 처리구는 무첨가구, limestone 첨가구, Ca proteinate 3% 그리고 Ca proteinate 4%를 첨가한 것이었다. 사양시험결과는 예상과는 달리 proteinate 첨가구가 다른 처리구들에 비해 산란율, 섭취량, 사료효율이 현저하게 떨어지고 난각의 강도도 현저하게 떨어진다. 이는 proteinate 제조과정에서 석회석의 용해제로 사용된 염산으로부터 온 염산에 의해 Cl 중독에 의한 것으로 판단된다. Cl 중독문제를 해결하게 되면 양질의 Ca proteinate 제조가 가능할 것이다.

4. 종합 결과

가. 1차년도

Fe-soy proteinate를 만들기 위해 1L의 증류수에 100g의 탈지대두박과 alcalase 2.4L® 4ml을 첨가하여 pH 8, 60도의 조건으로 8시간동안 가수분해하여 soy digest를 만들었다. Iron soluble은 ferrous sulfate 100g에 1L 증류수를 넣어 만들었다. Soy digest에 iron soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% NaOH를 다양한 수준으로 첨가하여 chelation시켰다. pH 9.6일 때 Fe content와 Fe recovery는 19.3%, 99.3로 가장 높았다.

산란계의 철분강화란 생산에 있어서 Fe-Soy proteinate의 효과를 알아보기 위해 Fe-methionine chelate와 비교시험을 실시하였다. 난황 내 Fe 함량은 4주 이후에 침착되기 시작하였고 control에 비해 철분첨가구들에서 향상되었고 SP-Fe 100에서 가장 높았다 ($p < 0.05$). 5주째 난황 내 철분함량은 control에 비해 Met-Fe 100, SP-Fe 100 및 SP-Fe 200구에서 각각 13%, 17%, 8% 향상되었다. 철분강화란 생산에 있어서 35일 동안 SP-Fe 100ppm 첨가가 가장 좋은 효과를 나타냈다.

Iron soy-proteinate가 broiler의 생산성, 근육, 조직의 Fe 함량 및 근육의 색도에 대한 영향을 알아보기 위해 Fe-methionine chelate 및 ferrous sulfate와 비교실험을 실시하였다. 결론적으로 육계에 iron-soy proteinate 200ppm 급여시 날개살, 다리살의 Fe 함량이 증가되었고 육색도 좋아지며 iron-methionine chelate, Ferrous sulfate 보다 더 좋은 결과를 보였다.

나. 2차년도

Cu, Zn-soy proteinate를 만들기 위해 1L의 증류수에 100g의 탈지대두박과 alcalase 2.4L (®) 4ml를 첨가하여 pH 8, 60도의 조건으로 4시간동안 가수분해하여 soy digest를 만들었다. Cu soluble은 Cu sulfate 100g에 1L 증류수를 넣어 만들었다. soy digest에 Cu soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% NaOH를 다양한 수준으로 첨가하여 chelation시켰다. Cu-soy proteinate는 pH 5.4 일 때 Cu content와 Cu recovery는 18.4%, 75.6%로 가장 높았다. Zn-soy proteinate는 pH 8.9 일 때 Zn content와 Zn recovery는 18.5%, 83.6%로 가장 높았다.

Cu soy-proteinate가 broiler에 대한 영향을 알아보기 위해 Cu-methionine chelate 및 Cu sulfate와 비교실험을 실시하였다. 전 구간을 봤을 때 증체량 사료섭취량 폐사율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 사료 효율은 무첨가구가 유의적으로 구리를 첨가한 첨가구들보다 높게 나왔다($P < 0.05$).

산란계 사료에 Cu proteinate를 수준별로 첨가하였을 때의 효과를 통해 급여 적정 수준을 알아보기 위한 시험을 했다. 사료 섭취량은 무첨가구가 첨가구들에 비해 유의적으로 높게 나왔다. 사료 전환률은 구리를 첨가한 실험구들이 유의적으로 무첨가구보다 낮게 나왔다. 계란 품질의 난황색에서는 200ppm 첨가구가 다른 첨가구들에 비해 유의적으로 높았다.

자돈 사료에 Cu와 Zn proteinate를 첨가하였을 때의 효과를 알아보기 위한 시험이었다. 이 시험의 처리구는 각각 무첨가구, 항생제 첨가구, Cu proteinate 첨가구, Zn proteinate 첨가구 그리고 Cu + Zn proteinate를 첨가한 것이었다. 생산성에서는 유의적인 차이는 없었지만 일당 증체량이 Cu + Zn proteinate를 첨가한 실험구가 수치상으로 가장 높았고 그 다음은 항생제를 첨가한 실험구였다. Cu + Zn proteinate를 첨가한 실험구와 항생제를 첨가한 실험구가 사료효율에서 가장 낮은 수치를 나타내었다. 혈액색상에서는 LY에서 유의적인 차이가 있었다. Cu proteinate를 첨가한 실험구가 가장 높았고 Zn proteinate를 첨가한 실험구가 가장 낮았다.

다. 3차년도

Mg-soy proteinate를 만들기 1L의 증류수에 100g의 탈지대두박과 alcalase 2.4L® 4ml을 첨가하여 pH 8, 60도의 조건으로 4시간동안 가수분해하여 soy digest를 만들었다. Mg soluble은 Mg sulfate 100g에 1L 증류수를 넣어 만들었다. Soy digest에 Mg soluble을 혼합하여 pH-buffer인 50% KOH를 다양한 수준으로 첨가하여 chelation시켰다. Mg-soy proteinate는 pH 9.7 일 때 Mg content와 Mg recovery는 8.42%, 19.26%로 가장 높았다.

Mg proteinate와 Fe proteinate를 육성비육돈 사료에 첨가 급여하였을 때 생산성, 육질 및 육색도 등을 알아보기 위한 실험을 실시했다. 생산성에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈액의 광물질 함량에서 첨가구들이 무첨가구에 비해 유의적으로 높게 나왔다. 간에서는 SP-Fe 100 + SP-Mg 50를 첨가한 실험구가 가장 높은 결항을 보였다. Loin에서는 SP-Fe 100 + SP-Mg 50을 첨가한 실험구가 Fe의 함량은 가장 높고 Mg의 함량은 가장 낮은 경향을 보였다. Water holding capacity에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 부위별 L value는 loin과 tender loin에서 SP-Mg 50 첨가구가 ham에서는 SP-Fe 100와 SP-Mg 50가 높은 경향을 보였다. a value에서는 유의적인 차이를 보이지 않았지만 SP-Fe 100 + SP-Mg 50첨가구가 수치상으로 높은 경향을 보였다. b value에서는 proteinate 첨가구들이 무첨가구에 비해 높은 경향을 보였다. 근육 내 pH는 도축 시점으로부터 9시간 이내에 SP-Fe 100 + SP-Mg 50 첨가구가 낮은 경향을 보였다. 근육 내 온도는 도축시점으로부터 한시간 정도까지 SP-Fe 100 + SP-Mg 50 첨가구가 높은 경향을 보였다.

Ca proteinate를 산란계 사료에 첨가 급여하였을 때의 효과를 알아보기 위한 실험을 하였다. 사양시험결과는 예상과는 달리 proteinate 첨가구가 다른 처리구들에 비해 산란율, 섭취량, 사료효율이 현저하게 떨어지고 난각의 강도도 현저하게 떨어졌다. 이는 proteinate 제조과정에서 석회석의 용해제로 사용된 염산으로부터 온 염산에 의해 Cl 중독에 의한 것으로 판단된다. Cl 중독문제를 해결하게 되면 양질의 Ca proteinate 제조가 가능할 것이다.

제2절 제2 세부과제: Mineral soy proteinate 제제의 분자적 특성 규명

1. 1 차년도: 수용성 soy digest의 단백질의 분자량 분포 측정과 미네랄 proteinate 생산 조건 확립

가. Mineral chelate의 형성을 위한 모델 시스템과 기존 개발 metal methionine 제제의 화학적 조성 규명

Mineral-methionine chelates를 soy digest mineral proteinate 생산의 모델 시스템으로 사용하기 위해서 Copper sulfate와 L-methionine과의 반응으로 $\text{Cu}(\text{L-Met})_2$ 화합물을 합성하였으며 이 화합물과 더불어 Copamin, Zincamin, Ferramin 등을 FT-IR과 XRD로 분석하였다. Mineral-methionine chealte 제제의 FT-IR spectra를 methionine 및 mineral salts의 spectra와 비교하였을 때, Copamin과 Zincamin은 Cu, Zn 2가 이온과 methionine이 chelation되었으나, Ferramin은 chelation 되지 않았음이 확인되었다. 그림 1에서는 금속이온과 결합하지 않은 methionine (A)과 Copamin (B), Zincamin (C)의 FT-IR spectra를 보여주고 있는데 methionine의 경우 1508 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} , 1583 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} 에서 다양한 C=O stretching peak이 관찰되나, Copamin 과 Zincamin에서는 chelate 형성에 의해 1616 cm^{-1} 과 1604 cm^{-1} 에서만 C=O stretching이 관찰된다. Ferramin의 경우 1100 cm^{-1} 근처의 peaks을 제외하고는 methionine의 IR spectrum과 매우 유사하게 나타나므로 (그림 2), chelation이 되지 않았음을 보여주고 있다. 1100 cm^{-1} 근처의 peak 들은 sulfate 이온의 peak에 해당한다.

XRD 를 이용하여 Copamin, Zincamin, Ferramin에 존재하는 결정성의 mineral chelate의 상대적 함량을 조사하였다. 그림 3에서 보듯이 Copamin 과 Zincamin은 높은 결정성을 보였으나, Ferramin의 경우 결정성을 가지는 비율이 매우 낮았다. 또한, Ferramin에서 발견되는 결정성의 성분은 methionine과 mithionium sulfate에 의한 것이 확인되었다. (data not shown) 그러므로, mineral-methionine chelate 제제의 생산에 있어서 Cu, Zn 이온과 Fe 이온의 반응성이 매우 다를 수 있었다.

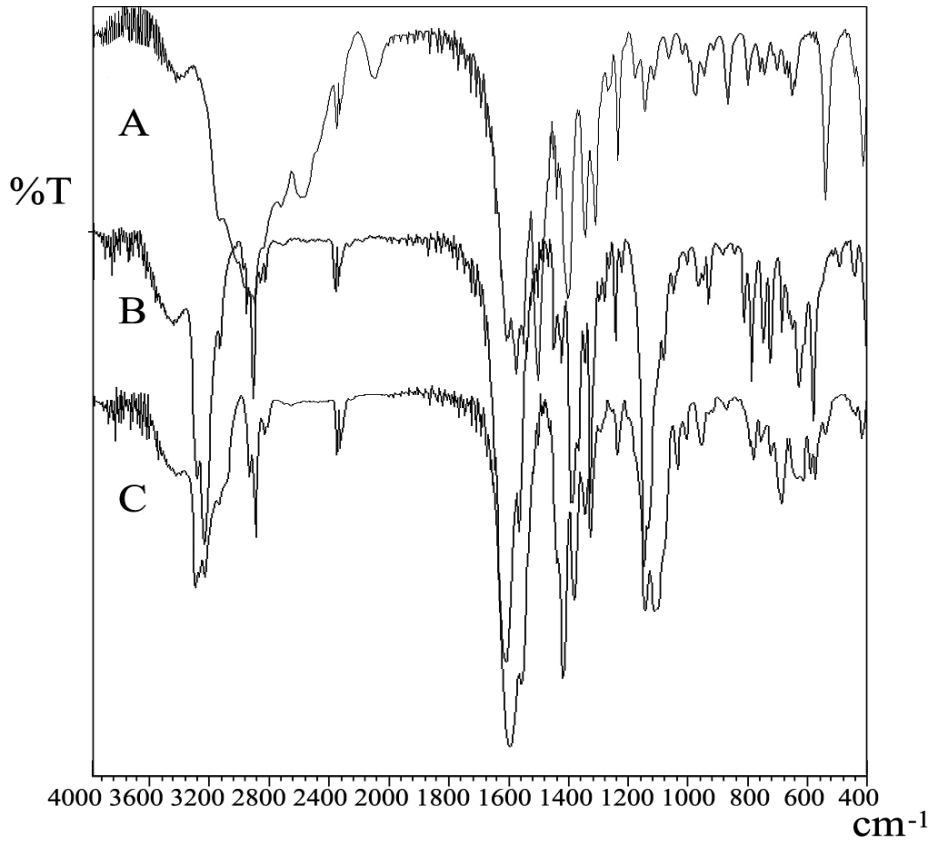


그림 6 . L-methionine (A), Coppamin (B) 과 Zincamin (C)의 FT-IR spectra.

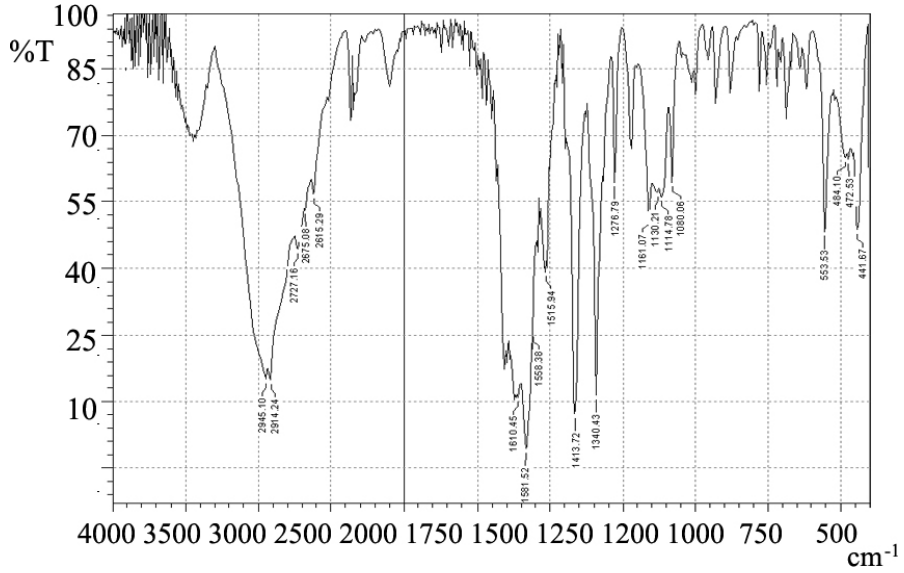


그림 7 . Ferramin의 FT-IR spectrum.

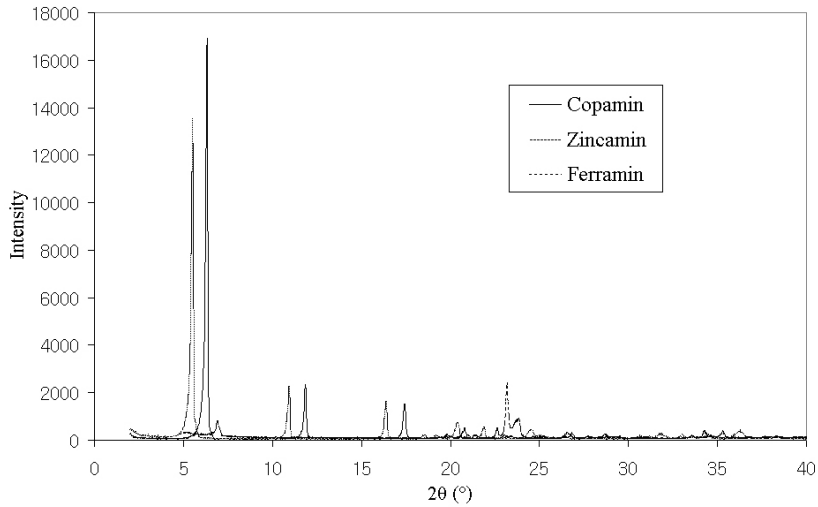


그림 8 . Copamin, Zincamin, Ferramin의 XRD spectrum 비교.

나. Soy digest mineral proteinate의 형성을 위한 soy digest 의 생산조건 확립

Soy digest 의 생산조건을 최적화하기 위해서 반응조건과 사용되는 효소의 최적 조건을 조사하였다. 생산조건은 대두박으로부터 폴리펩타이드 형성을 UV-Vis 분광기로 조사하였는데, 표준 조건으로 1g의 대두박을 10ml 의 증류수에 녹이고, 40ul 의 효소를 가해서 pH

8.0에서 실시하였으며, 280nm에서 흡광도를 사용하였다. 온도별 실험을 제외한 반응의 온도는 36.5 °C 였다.

1) 대두박의 입자크기 : 효소 처리에 있어서 물리적인 대두박과 효소의 반응을 위해서는 입자가 작아야 충분한 표면적을 가지며 가용성 성분이 효소에 의해서 폴리펩타이드로 저분자화 됨을 확인하였다. 예를 들어, 대두박 분쇄 입자가 1-3 nm 일 경우 효소 처리에 소요되는 시간은 8시간 이상이였으나, 미세하게 분쇄하여 1nm 이하의 대두박 입자를 사용하였을 경우에는 4-5 시간이면 최대 폴리펩타이드 생성량을 관찰 할 수 있었다.

2) 반응 온도 : 20 - 60 °C 범위에서 반응 온도별 폴리펩타이드의 생성량을 보면, 50 °C에서 제일 높았다. (그림 4)

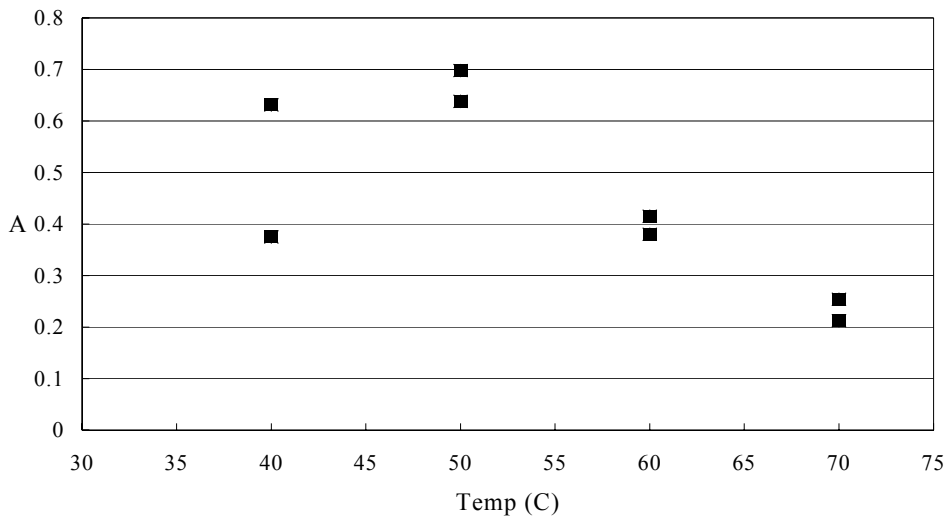


그림 9 . 반응 온도별 Soy digest 의 생성량 조사.

3) 반응 pH : 효소 반응은 염기 pH에서 최대 활성을 보이는 것으로 알려져 있는데, 실제 pH 7 - 9 사이의 폴리펩타이드 형성을 측정하였을 때 pH 8에서 제일 활성이 높은 것으로 조사되었다. 그러나, 폴리펩타이드의 형성은 pH 7 - 9 범위에서 pH 에 크게 영향을 받지 않는았다.

4) 효소량 : 효소량을 20 ul 와 60 ul 사이에서 측정해 보았을 때, 효소량에 따른 폴리펩타이드의 생성량에는 변화가 없었다. 그러나, 실험 조건이 36.5 °C이므로, 적정 온도에서 효소량별 폴리펩타이드 생성을 확인하는 실험이 진행되고 있다.

5) 반응시간 : 반응 시간별 폴리펩타이드의 생성을 보면 4시간이 지나면서 폴리펩타이드 생성의 증가가 더더지는 것이 관찰되었다. 그러므로, 4 시간 정도의 미세한 대두박 입자를 사용하면 충분한 폴리펩타이드를 생산할 수 있을 것이다. (그림 5)

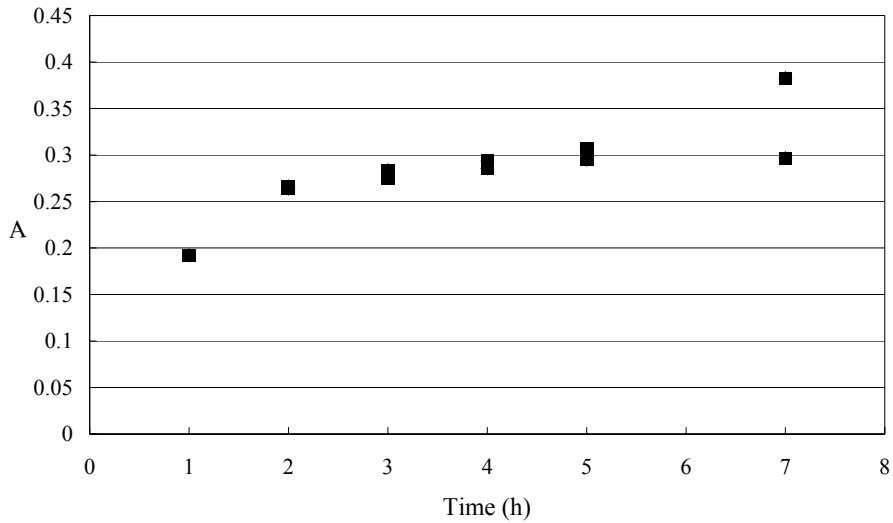


그림 10 . 반응 시간별 폴리펩타이드의 생성 경향.

6) Soy digest의 생산 조건 : Soy digest 생산에 가장 중요한 조건은 효소의 기질로 사용되는 대두박의 입자 크기이며, 입자 크기가 1mm 이하인 경우 반응 시간이 기존에 알려져 있던 8시간 보다 훨씬 작은 4 시간 정도가 최대 생산량을 위해 요구됨을 알 수 있었다. 또한, 반응 온도는 50°C 정도가 최적이었으며, 반응 온도가 낮을 경우 pH 나 효소량의 변화에 soy digest 형성 반응이 변화를 받지 않았다.

다. Fe proteinate 형성의 문제점 해결

Ferramin의 경우에서 확인 되었듯이 Fe 이온과 아미노산 또는 폴리펩타이드의 chelation은 잘 형성되지 않는데, 이런 문제점을 해결하기 위해서 다양한 Fe salts와 methionine의 반응을 시도하여 보았다. 결론적으로 Fe의 chelation은 Fe 이온의 산화상태에 의존함을 알게 되었고, Fe(II) sulfate 대신에 Fe(III) sulfate를 사용하여 Fe-methionine chelate를 생성할 수 있었다. 현재 Fe-methionine의 특성을 조사하고 있으며, soy digest 생산조건이 확립됨에 따라 Fe-methionine 생산 조건을 적용하여 Fe protein 형성을 시도할 계획이다.

2. 2차년도: Mineral soy proteinate의 금속 이온 함량 측정과 결합 형태 규명

가. Soy proteinate의 분자량 분포 경시 변화 연구

Soy proteinate의 mineral 과 chelation 시에 중요하게 작용하는 요인들로서 soy proteinate의 alcalase처리시 생성되는 soluble protein의 함량과 분자량 분포가 있는데, 1차

년도에 최대 soluble proteine 생산에 대한 조건을 확립하였다. Soluble protein의 분자량 분포를 측정하기 위해서 alcalase처리 시간별 proteinate의 분자량 분포를 전기영동으로 확인하였다 (그림 6). Alcalase 처리 전에는 분자량 10만 이상의 단백질이 주로 존재하는데 시간이 지남에 따라 고분자의 단백질이 점점 사라져서 2 시간 이후에는 거의 존재하지 않는 것을 보이고 있다. 그러므로 alcalase 처리 후 2 시간 이후에는 대부분의 soluble 단백질이 효율적으로 저분자화 됨을 확인 할 수 있었다.

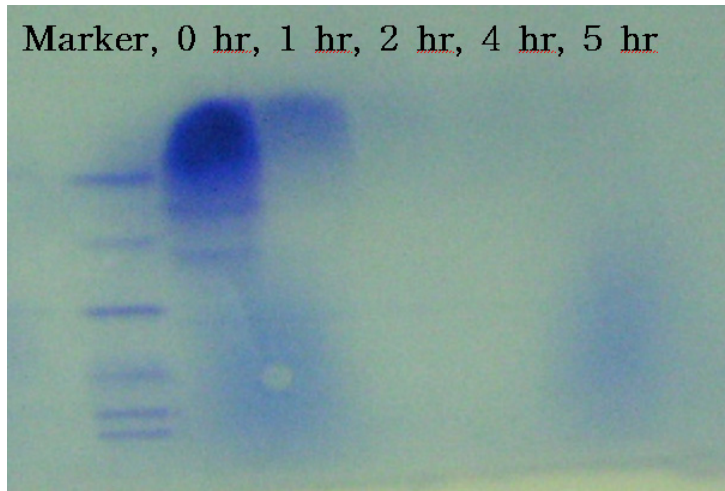


그림 11. 시간별 Soy proteinate의 분자량 분포 변화

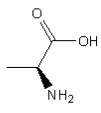
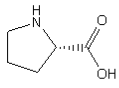
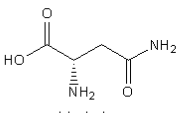
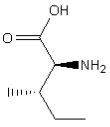
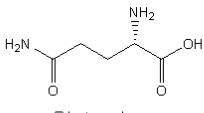
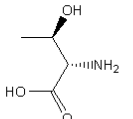
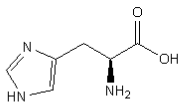
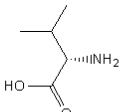
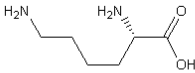
그러므로, 저분자 peptide oligomer 생성에 근거하여 실험동물에서 mineral proteinate의 흡수에 중요한 역할을 하는 proteinate의 분자량은 문제가 되지 않음을 알 수 있었다.

나. Mineral ion과 아미노산의 결합 연구

미네랄 메티오닌 제제와 관련하여 다양한 아미노산에 대한 Fe, Cu, Zn의 chelation을 조사하였다. 관련 연구 결과는 메티오닌 제제 뿐만 아니라, 새로운 미네랄 아미노산 제제를 개발하는데 사용될 수 있는 중요한 자료가 될 것이다.

실험에 사용된 아미노산중 아래 표에 보이는 9가지 아미노산만이 중성형태로 증류수에 녹아 용액을 형성하였다.

표 1. 실험에 사용된 9가지 아미노산 잔기의 pI 와 분자량.

Amino acid	pI/ Mw.	Amino acid	pI/ Mw.
 Alanine	6.00/ 89.09	 Proline	6.30/ 115.13
 Arginine	11.15/ 174.20	 Isoleucine	5.94/ 131.17
 Glutamine	5.65/ 146.15	 Threonine	5.66/ 181.19
 Histidine	7.47/ 155.16	 Valine	5.96/ 117.15
 Lysine	9.59/ 146.19		

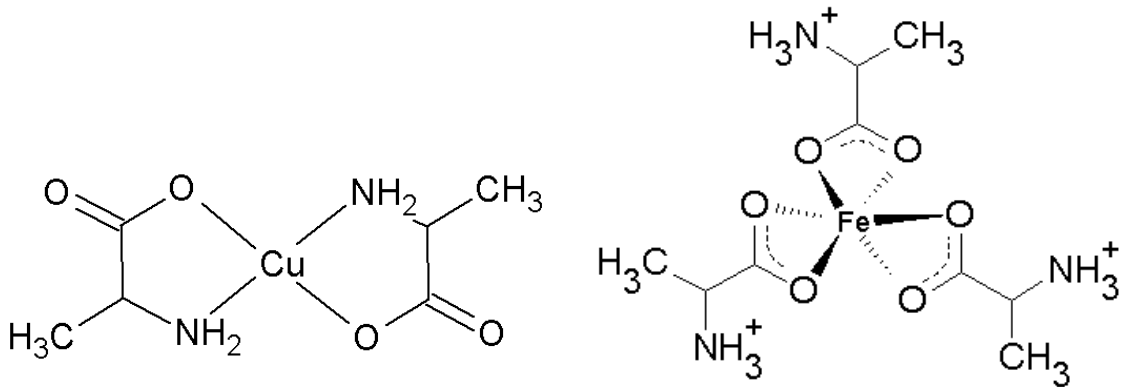
또한, 이들 아미노산과 반응에 사용된 미네랄 이온은 아래 표 2에 제시되어 있다. 철 이온의 경우 1차년도 페라민의 경우에서 제기된 산화 상태에 따른 chelation의 차이를 고려하여 2가의 Fe(II) 이온과 3가의 Fe(III) 이온을 모두 사용하였다.

표 2. 아미노산과의 chelation에 사용된 Fe, Cu, Zn 시약.

◆ 반응에 사용된 **Metal salt**

Reagent	Mw.	Reagent	Mw.
Fe(II)Cl ₂	126.75	Cu(II)SO ₄ •5H ₂ O	249.69
Fe(III)Cl ₃	162.21	Zn(II)Cl ₂ •7H ₂ O	287.55

모든 반응은 2 당량의 아미노산과 1 당량의 금속이온을 수용액에서 30분 동안 교반하였으며, 반응 결과물들은 용매를 제거한 후 FT-IR spectrometer를 이용하여 아미노산 chelation의 특징적인 지표가 되는 carbonyl peak의 변화를 추적하였다. 대표적으로 알라닌의 경우 (그림 7) 1620 cm^{-1} 과 1592 cm^{-1} 에서는 알라닌의 carbonyl stretching 이 두 군데서 나타나는데, $\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$ 를 반응시키면 1743 cm^{-1} 과 1623 cm^{-1} 으로 이동한다. 이는 carbonyl peak 이 비대칭적인 환경에 존재한다는 것을 의미한다. Ferric ion (Fe^{III})의 결합시 알라닌은 1640 cm^{-1} 에 하나의 peak을 보이는데, 이는 carbonyl 기의 bridging mode binding을 의미한다.



아스파라긴과 라이신의 경우에도 비슷한 경향을 보여주었는데, 모두 frequency의 증가가 관찰되었다 (그림 8). 표 3에서는 soluble 아미노산인 알라닌, 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 프롤린, 쓰레오닌, 발린의 데이터를 정리해서 보여주고 있다.

Ferrous 이온(Fe^{+2})에 대해서는 아이소류신을 제외한 모든 아미노산의 carbonyl peaks에서 변화가 관찰되었으나, 글루타민과 발린의 경우 그 변화가 아주 미비하였다. 그러므로 Ferrous 이온의 경우 알라닌, 아스파라긴, 히스티딘, 라이신, 프롤린, 쓰레오닌과 결합하여 chelates 를 형성할 수 있는 것으로 FT-IR 상으로는 관찰되었다. Ferric 이온 (Fe^{+3})의 경우도 FT-IR 스펙트럼 상으로는 ferrous 이온과 비슷한 경향을 보였으나 특이하게 아이소류신과 잘 결합하는 것으로 관찰되었다.

구리 (Cu^{+2})이온의 경우 아이소류신과 쓰레오닌을 제외하고는 모두 구리-아미노산 킬레이트를 형성하였다. 아연 (Zn^{+2}) 이온의 경우는 쓰레오닌을 제외하고 모두 아연-아미노산 킬레이트를 형성하였다.

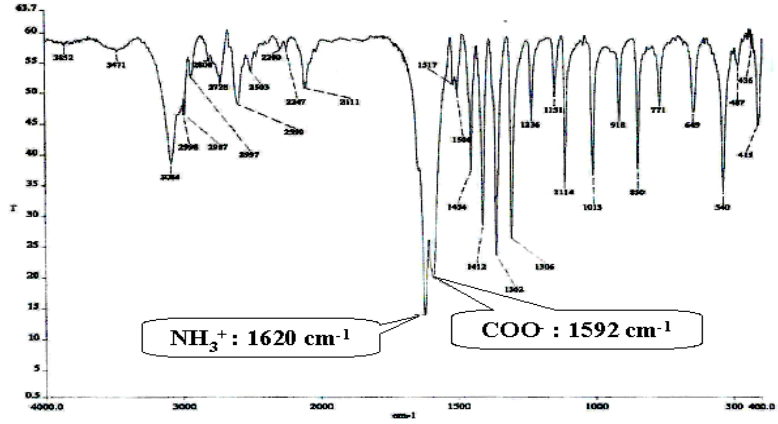
Alanine, Asparagine, Histidine, Lysine, Proline은 4가지 금속 ($\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$)과 반응 시 COO^- 의 peak의 shift를 확인하였고, Threonine, Isoleucine, Valine은 shift하지 않은 것으로 보여진다. 또한 Glutamine은 $\text{Cu}(\text{II})$ 와 반응 할 때만 shift를 보였다.

이러한 chelation 은 가시광 영역의 색깔을 가지는 $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Cu}(\text{II})$ 이온의 경우 금속이온의 고유의 색깔이 각 이온 수화물의 리간드 필드에 의한 것이므로, 리간드가 변경되

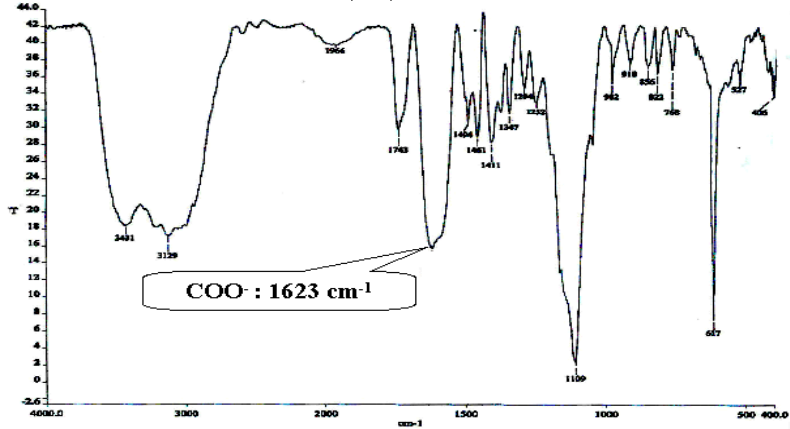
면 그 색깔이 바뀌는 원리를 이용하여 미네랄-아미노산의 chelation 여부를 쉽게 판단할 수 있다 (그림 9). Metal ion와 amino acid와 반응 시 일어나는 색 변화는 육안 및 UV-Vis spectrum 으로 확인하였다. Amino acid와 Fe(II), Fe(III), Cu(II)와의 반응 시 Absorbance가 대체적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 하지만 Zn(II)은 육안으로나 UV data로나 Absorbance증가는 확인 할 수 없었다. 그림 10에는 알라닌과 네 가지 금속 이온의 chelation을 UV-Vis spectroscopy로 조사한 것으로 Fe(+2) 이온과 Cu(+2) 이온의 경우 색깔 변화가 뚜렷하게 관찰되었으며, Fe(+3) 이온과 Zn(+2) 이온의 경우 FT-IR에서 carboxyl 기의 peak 이 변화하였음에도 그 색깔 변화가 두드러지지 않았다.

이와 같이 IR spectrum에서 COO^- 또는 NH_3^+ peak의 shift와 UV-vis Spectrum 의 변화는 metal ion과 amino acid 의 chelation을 확인할 수 있는 효과적인 방법이다.

◆ Alanine



◆ Alanine + Cu(II)



◆ Alanine + Fe(III)

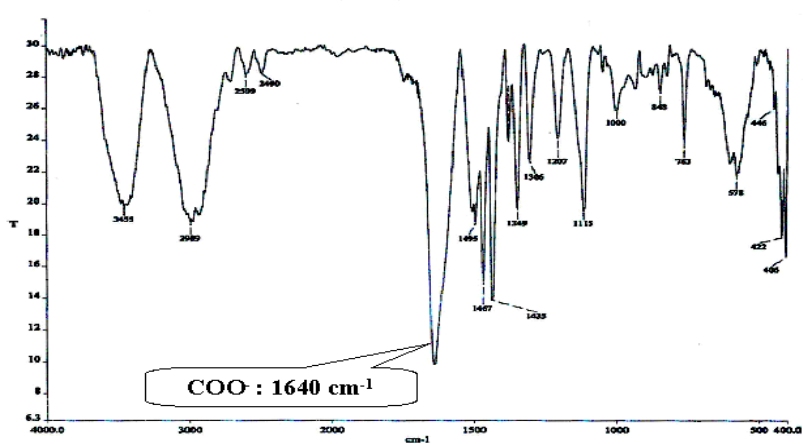


그림 7. 알라닌과 Cu(II) 이온, Fe(III) 이온의 반응 생성물 FT-IR 스펙트럼.

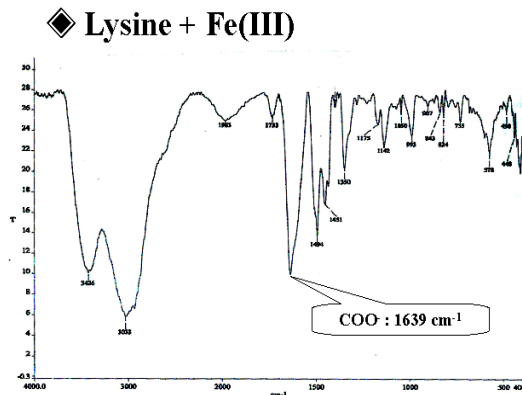
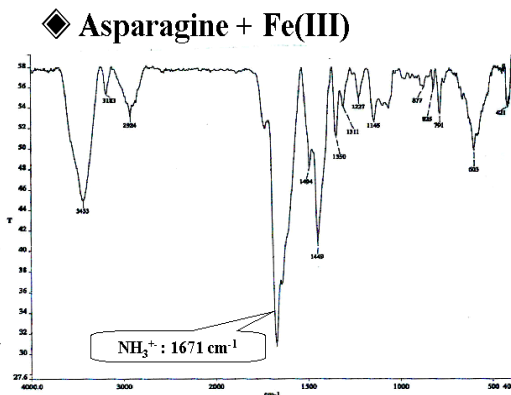
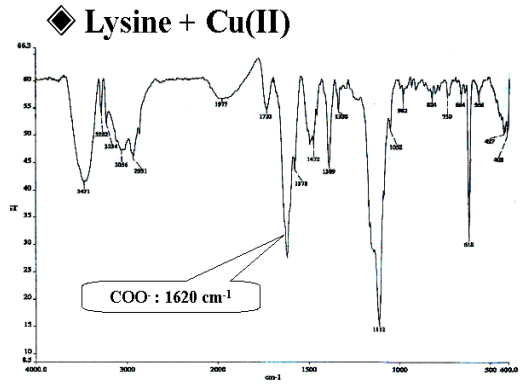
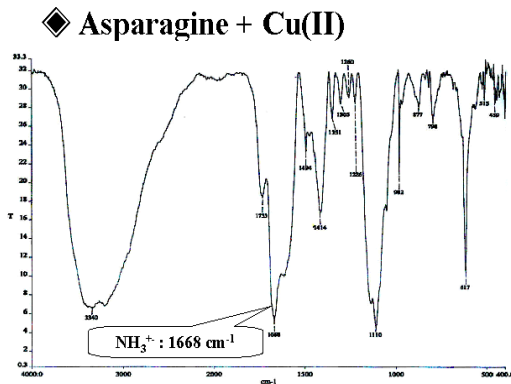
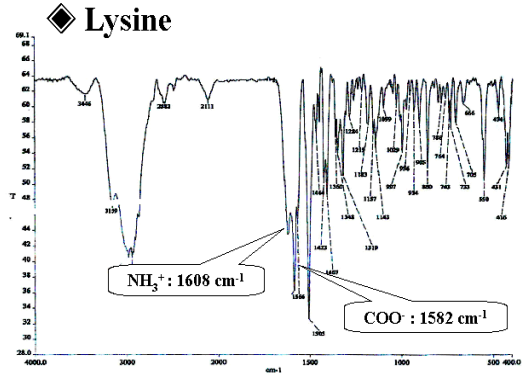
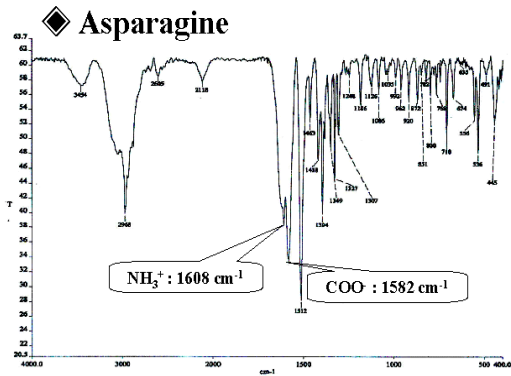


그림 8. 아스파라긴과 라이신의 Cu(II) 이온, Fe(III) 이온의 반응 생성물 FT-IR 스펙트럼.

아미노산 단량체와 Fe(+2), Fe(+3), Cu(+2), Zn(+2) 이온과의 결합은 아미노산에 결합되어 있는 잔기의 극성이나 산성도에 무관하게 잘 형성되는 것으로 관찰되었는데, 이는 아미노산의 잔기보다는 아미노 그룹과 카르복실산 그룹을 이용하여 금속이온과 chelation 을 형성하기 때문인 것으로 추측된다. 그러므로 실제 peptide oligomer 와 금속이온들과의 결

합은 그 형성 비율이 매우 작을 것을 생각된다. 반면에 soy proteinate의 분자량 변화 실험을 고려하면, alcalase의 처리 후 대부분의 proteinate 가 dipeptide, tripeptide 또는 아미노산 수준으로 저분자화 되는 것으로 판단되는 바, soy proteinate의 미세탈 제제화에 alcalase의 처리가 필수적임을 알 수 있다.

표 3. 아미노산과 금속이온의 chelation 시 FT-IR에서의 변화.

		Ala	Asn	Gln	His	Ile	Lys	Pro	Thr	Val
Free A.A.	COO ⁻	1592 cm ⁻¹	1582 cm ⁻¹	1636 cm ⁻¹	1605 cm ⁻¹	1583 cm ⁻¹	1584 cm ⁻¹	1624 cm ⁻¹	1626 cm ⁻¹	1618 cm ⁻¹
	NH ₃ ⁺	1620 cm ⁻¹	1608 cm ⁻¹	1685 cm ⁻¹	1638 cm ⁻¹	1608 cm ⁻¹	1620 cm ⁻¹	-	-	1630 cm ⁻¹
Complex with Fe(II)	COO ⁻	1635 cm ⁻¹	1645 cm ⁻¹	1635 cm ⁻¹	1627 cm ⁻¹	1583 cm ⁻¹	1635 cm ⁻¹	1641 cm ⁻¹	1630 cm ⁻¹	1620 cm ⁻¹
	NH ₃ ⁺	-	1679 cm ⁻¹	1687 cm ⁻¹	-	1608 cm ⁻¹	-	-	-	1634 cm ⁻¹
Complex with Fe(III)	COO ⁻	1640 cm ⁻¹	-	1635 cm ⁻¹	1645 cm ⁻¹	1638 cm ⁻¹	1639 cm ⁻¹	1634 cm ⁻¹	1637 cm ⁻¹	1619 cm ⁻¹
	NH ₃ ⁺	-	1671 cm ⁻¹	1687 cm ⁻¹	-	-	-	-	-	1635 cm ⁻¹
Complex with Cu(II)	COO ⁻	1623 cm ⁻¹	-	1661 cm ⁻¹	1625 cm ⁻¹	1583 cm ⁻¹	1636 cm ⁻¹	1627 cm ⁻¹	1627 cm ⁻¹	1625 cm ⁻¹
	NH ₃ ⁺	-	1668 cm ⁻¹	-	-	1607 cm ⁻¹	-	-	-	1634 cm ⁻¹
Complex with Zn(II)	COO ⁻	1622 cm ⁻¹	1644 cm ⁻¹	1635 cm ⁻¹	1624 cm ⁻¹	1584 cm ⁻¹	1620 cm ⁻¹	1626 cm ⁻¹	1626 cm ⁻¹	1620 cm ⁻¹
	NH ₃ ⁺	1653 cm ⁻¹	1679 cm ⁻¹	-	1667 cm ⁻¹	1634 cm ⁻¹	-	-	-	1634 cm ⁻¹

반응전



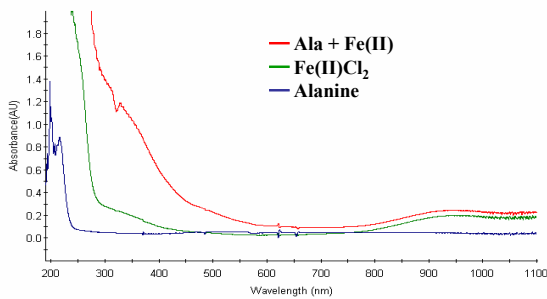
Zn(II) Fe(III) Fe(II) Cu(II)

반응후

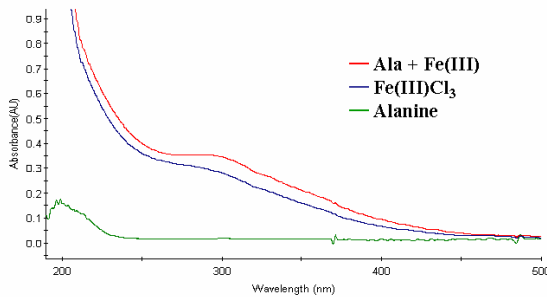


그림 9. 아미노산과 금속이온의 결합에 따른 색깔 변화.

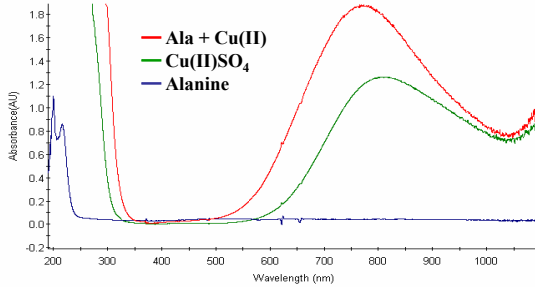
◆ Alanine + Fe(II), 1.1 M



◆ Alanine + Fe(III), 1.1 mM



◆ Alanine + Cu(II), 1.1 M



◆ Alanine + Zn(II), 1.1 mM

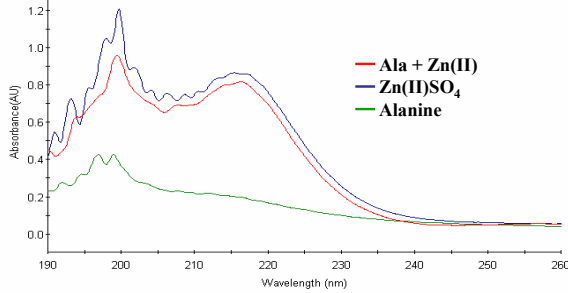


그림 10. 알라닌과 Fe(+2), Fe(+3), Cu(+2), Zn(+2) 이온의 반응 UV-Vis 스펙트럼.

다. Fe, Cu, Zn proteinates의 금속이온 함량 측정방법 확립

Mineral proteinate의 형성 후 실제적으로 chelation 되어 존재하는 금속이온의 함량을 측정하기 위해서 다양한 방법이 시도되었다. 1차년도에는 XRD를 이용한 정량법이 사용되었으며, 이는 FT-IR 이나 UV-Vis spectroscopy 도 chelation 여부를 정성적으로 판단할 수 있는 방법이 된다. 더욱 재현성이 높고 정확한 정량법을 완성하고자 ICP/AES (Inductively-coupled plasma/atomic emission spectroscopy) 방법을 이용하여 mineral proteinate를 분석하였다. ICP/AES 분석은 Fe, Cu, Zn 등의 전이 금속의 낮은 농도에서의 분석에 매우 용이하며, 시료의 전처리 전에 투석 막을 사용하여 proteinate에 결합하지 않은 금속이온을 제거한 후 분석한다면, 용액 상에서 실제 존재하게 되는 결합태의 금속이온의 농도를 정확히 측정할 수 있을 것이다. 또한, 이 방법은 용액 상의 mineral proteinate를 각기 다른 pH 나 온도에서 분석할 수 있기 때문에 생체 내의 조건에서의 bioavailability를 추측하는데 자료를 제공할 수 있을 것이다.

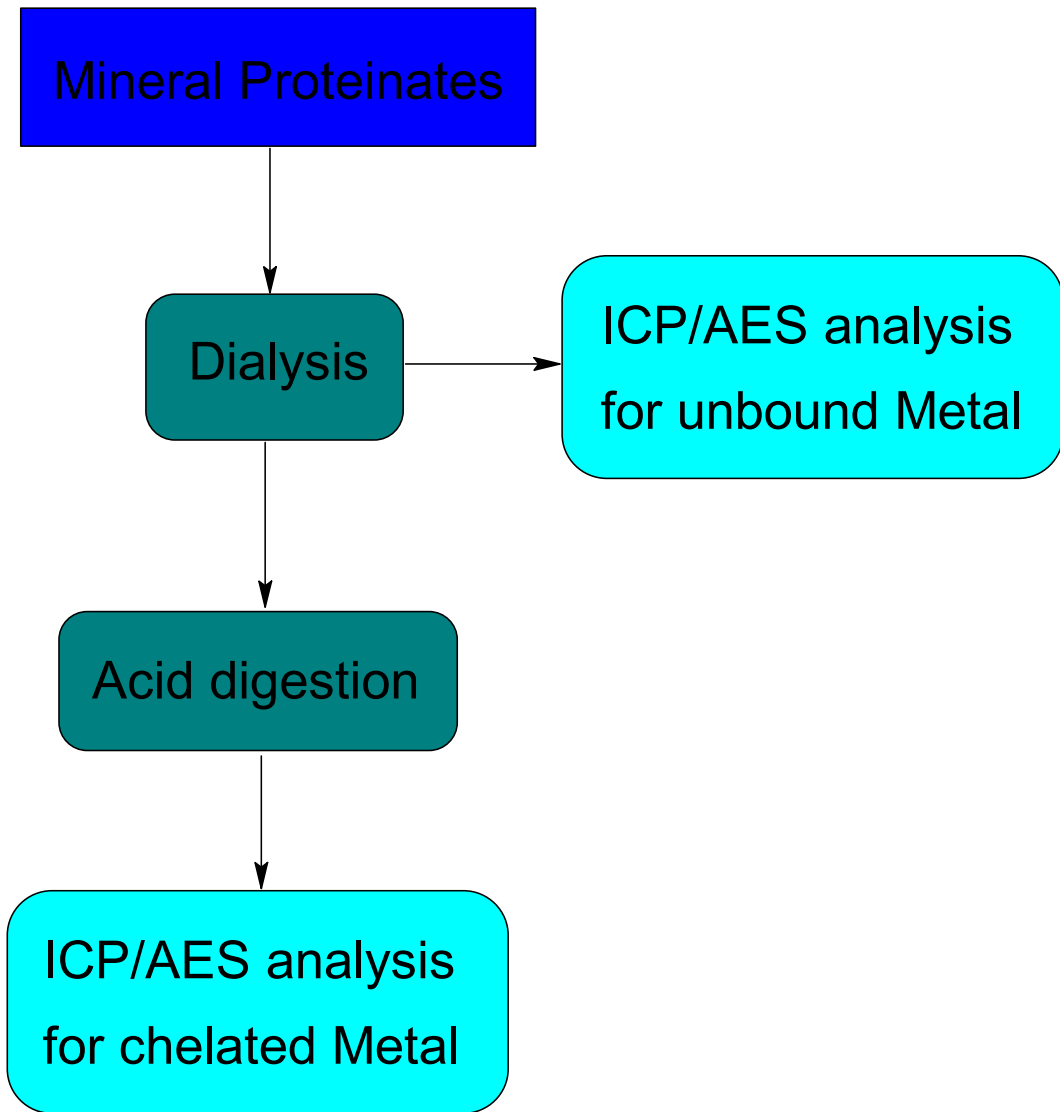


그림 11. Mineral proteinate의 분석 과정.

3. 3차년도: 새로운 chelating agents 를 이용한 Ca, Mg의 chelating 조건 개발 및 미네랄 proteinate 형성 기작을 규명

가. 2차년도에 얻어진 결과를 이용하여 최종적으로 Fe, Cu, Zn soy proteinates의 분자적 특성을 연구하고 Ca, Mg soy protein의 형성 여부 조사

기존의 연구 결과 금속이온과 아미노산의 복합체 형성은 FT-IR, UV-Vis spectroscopy 등의 분광학적 방법과 XRD의 분석방법으로 확인할 수 있음이 정립되었다. Fe, Cu, Zn 이온과 대두박 proteinate와의 복합체 형성을 확인하기 위해서 위의 방법을 사용하여 분자적 특성을 규명하고자 하였다.

1) 실험방법

Metal-Proteinate를 합성하기 위해 필요한 대두박은 조단백질 함량이 44%이상인 일반 사료원료에서 사용된 것을 사용했으며, Alcalase는 Alcalase 2.4L, Novozymes Korea., Denmark를 사용하였다. UV spectra는 SCINCO사의 S-3100을 이용하여 얻었고, IR spectra는 SHIMADZU사의 FTIR-8400S를 이용하여 얻었다.

가) Soy digest

Soy digest의 합성은 다른 논문을 참고하여 만들었다.¹⁾ Dry oven에 60°C, 4시간 건조 후 cutting mill로 미세하게 분쇄된 탈지대두박 1g을 10ml의 dH₂O에 넣고 물로 중탕을 하여 60°C를 유지시켜 주면서 magnetic stirrer로 저어준다. Alcalase를 40µg을 첨가한후 효소제의 최적반응 조건인 pH 8.0을 맞추어 주기위해 1N NaOH를 이용하였다. pasteur pipet를 이용해 NaOH를 서서히 첨가하여 pH meter로 측정하여 맞춰주었다. pH를 유지시켜 주기위해 30분마다 NaOH로 pH 8.0을 맞춰 주었다. 최초 pH 8.0을 맞춰준 시점으로 5시간동안 교반을 하여 soy digest를 제조하였다.

나) Metal-proteinases

Metal-Proteinate는 Fe-Soy proteinate를 만드는 논문을 참고하였고,¹⁾ 금속이온만 변경하여서 만들었다. 6개의 금속이온(Fe(II), Fe(III), Cu, Zn, Mg, Ca)은 각각 금속이온 solution(1mM, 3ml)으로 dH₂O에 금속이온을 녹여 20ml vial에 제조하였고 soy digest도 solution상태에서 3ml를 5ml vial에 취하여 두 solution을 20ml vial에 혼합해 주고 30분간 magnetic stirrer로 저어주어 합성하였다.

2) 결과 및 고찰

Metal-proteinates를 6개의 금속이온(Fe(II), Fe(III), Mg, Ca, Zn, Cu)과 alcalase로 가수분해 하여 만든 soy digest를 이용하여 합성하였고 UV, FT-IR을 통하여 분석을 하였다. UV를 통해 soy digest의 고유 패턴이 금속과 chealate되면 색을 가지고 있는 금속들은 패턴의 변화가 생긴다는 것을 알게 되었고 IR을 통해 peptide의 COO⁻ 작용기가 금속이온과의 결합으로 인해서 Peak의 이동을 볼 수 있었다.

Metal-proteinates 형성 과정을 보면, 금속이온 solution과 soy digest solution을 섞어주자마자 색이 있는 금속이온들은 기존에 가지고 있던 색에 변화가 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 저어주어도 처음에 변한 색은 계속 유지되었다. 색이 없는 금속이온들은 섞어주어도 아무런 변화를 확인할 수 없었다.

가) FT-IR 분석

1) 이한규, 2005, 중앙대학교 동물자원학과 대학원 석사학위논문

Soy proteinates는 alcalase에 의해 가수분해된 peptide이므로, peptide 말단에 있는 carboxyl기와 amino기, 그리고 peptide 사슬 중간 부분에 존재하는 아미노산의 작용기에 존재하는 carboxyl 기 등의 작용기가 금속이온의 결합 자리로 작용할 것으로 예상된다. Soy proteinates 의 IR 스펙트럼을 보면 (그림 12), 1650 cm^{-1} 에 C=O stretching peak와 1400 cm^{-1} 에 COO stretching peak이 발견된다.

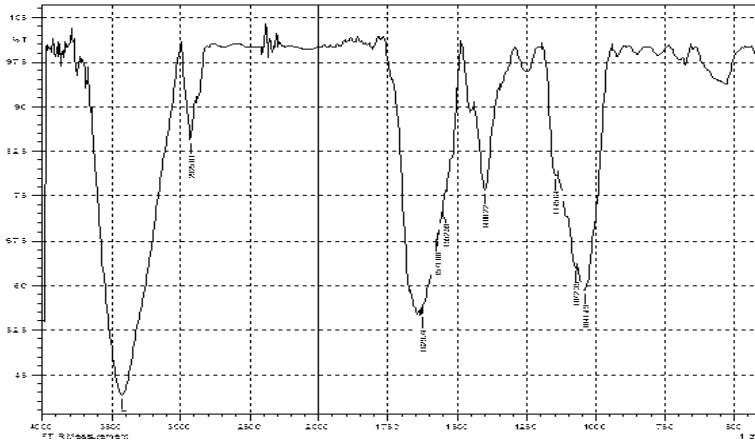


그림 12. Soy proteinate 의 FT-IR 스펙트럼

Fe(II) 이온과 Fe(III) 이온을 soy digest에 반응시켜서 형성한 Fe(II)-proteinate와 Fe(III)-proteinate의 FT-IR 스펙트럼에서는 (그림 13), Fe(II) proteinate의 경우 chelation에 의한 C=O stretching pattern의 변화와 1400 cm^{-1} 영역의 이동이 관찰된다. C=O stretching peak이 복잡하게 변한 것은 다양한 carbonyl 기가 Fe(II) 이온과 결합하기 때문인 것으로 생각된다. 또한, 1400 cm^{-1} 에 관찰되는 COO stretching peak이 1420 cm^{-1} 로 이동하여, Fe(II)이온의 proteinate 결합을 확인하고 있다. Fe(III) proteinate의 경우에도 유사한 FT-IR peaks 의 변화가 관찰되므로, Fe-proteinate 의 형성은 Fe 이온의 산화상태에 무관하게 모두 가능한 것으로 생각된다. 또한 Fe-proteinate의 형성은 soy digest에 존재하는 polypeptide chains의 carboxyl 기에 배위되는 방식으로 이루어지는 것으로 생각된다.

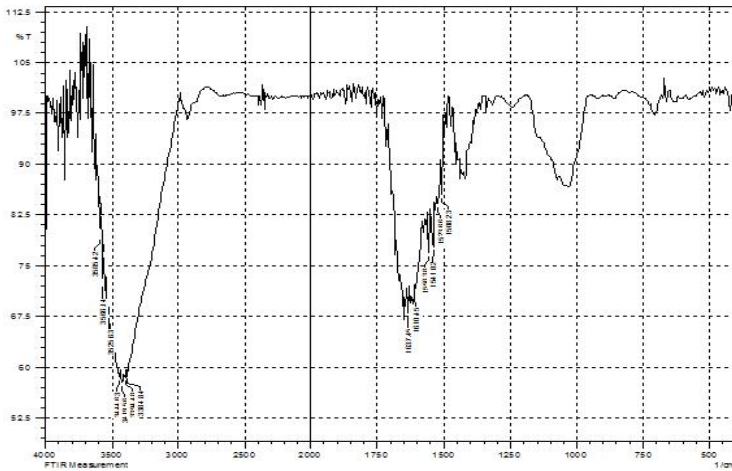


그림 13. Fe(II)-proteinate의 FT-IR 스펙트럼.

Cu-proteinate의 형성을 확인하기 위해서 FT-IR 스펙트럼을 보면 (그림 14), C=O, CO₂ stretching 영역에서 Fe-proteinates와 거의 유사한 스펙트럼을 보이는데, 이는 구리이온도 철 이온과 비슷한 형식으로 배위결합을 하기 때문인 것으로 생각된다. 또한 Cu-proteinates의 경우 619cm⁻¹에 Cu-O stretching 으로 생각되는 peak이 강하게 나타난다. 마찬가지로 Mg-proteinate의 경우에도 비슷한 영역에 Mg-O stretching에 해당하는 peak이 나타난다.

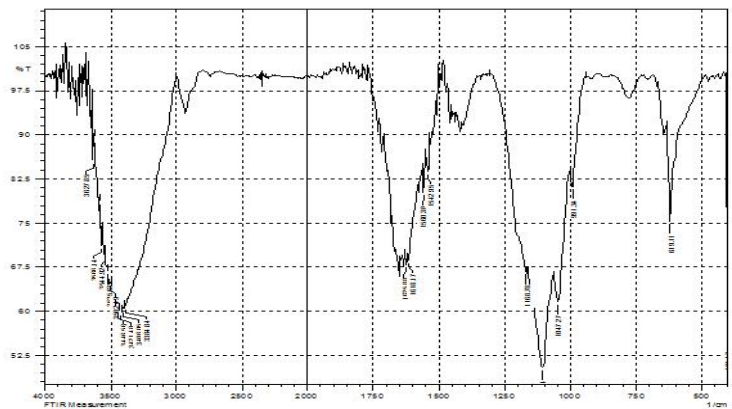


그림 14. Cu-proteinate의 FT-IR 스펙트럼.

Zn-proteinate의 경우 (그림 15) C=O stretching이 영역의 폭이 좁아지는 것으로 보아 매우 균질한 형태의 Zn-O=C 결합을 형성하는 것으로 생각된다. 일반적으로 Cu와 Zn는 금속이온과 유사한 형태의 배위결합을 하는 것으로 알려져 있는데,

proteinate의 경우에는 두 금속이온이 약간 다른 형태의 결합을 하는 것으로 생각된다.

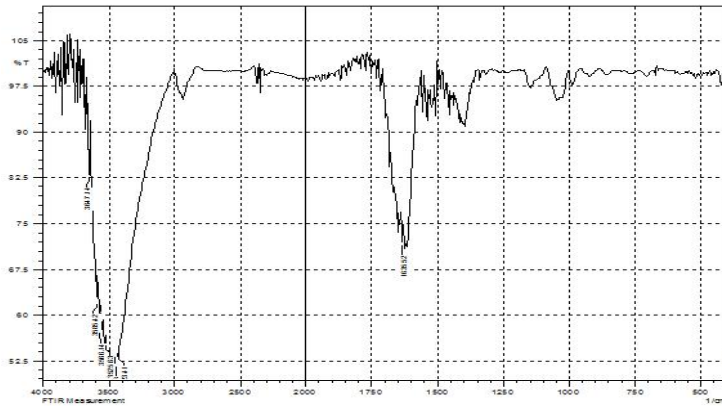
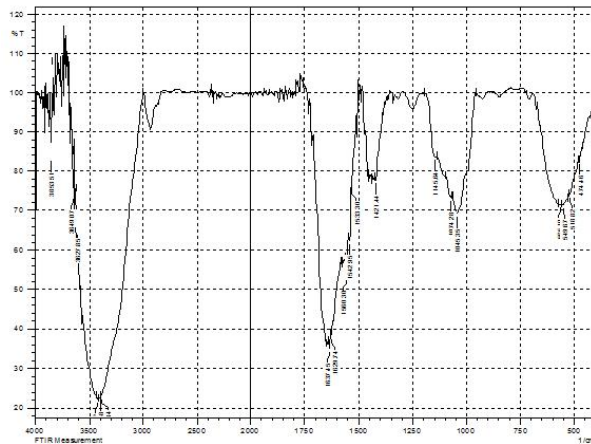


그림 15. Zn-proteinate의 FT-IR 스펙트럼.

Calcium 과 magnesium같은 alkali earth metal ion은 배위 결합의 정도가 매우 약한 것으로 알려져 있는데, 일부 당과 같은 hydroxyl 기가 많은 분자와 결합을 형성하는 예가 많이 알려져 있다. 또한, 이들은 다가이온으로 이온을 가진 분자와 정전기적 결합을 형성할 수 있다. 그림 16에는 Ca(II), Mg(II) 이온과 soy proteinate를 반응시킨 반응물의 FT-IR 스펙트럼이 보이는데, soy proteinate 의 스펙트럼 (그림 12) 과 비교하였을 때 변화가 있는 것으로 보아, 특정 형태의 상호작용을 하면서 결합하고 있는 것으로 생각된다.



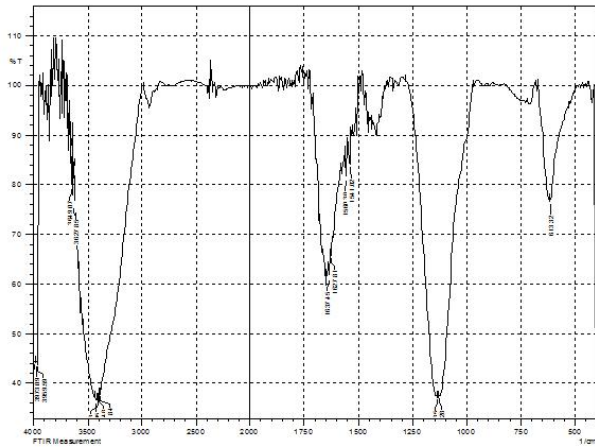
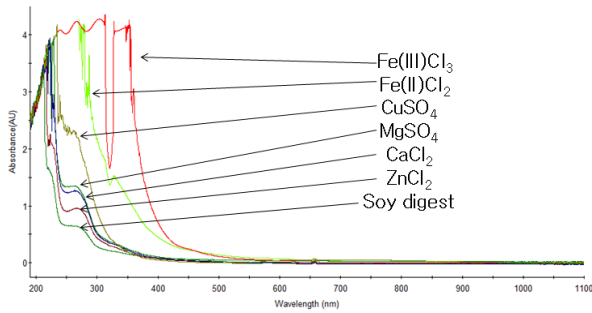


그림 16. Ca-proteinates (왼쪽)와 Mg-proteinates (오른쪽)의 FT-IR 스펙트럼.

나) UV-Vis spectroscopy

금속이온이 리간드에 결합하게 되면, 전이 금속의 경우 $d \rightarrow d$ transition이나 metal-ligand charge transfer (MLCT)의 메커니즘을 거쳐서 electronic spectra의 변화가 예상된다. $d \rightarrow d$ Transition의 경우 일반적으로 가시광선 영역의 에너지를 흡수하여 일반적으로 색깔을 띠게 되고, Fe(II), Fe(III), Cu(II) 이온이 $d \rightarrow d$ transition이 가능한 금속이온이며 Zn(II), Ca(II), Mg(II) 이온은 $d \rightarrow d$ transition을 관찰할 수 없다. 그러므로, 이들 이온은 용액의 색이 일반적으로 투명한 것이다. 반면 MLCT는 자외선 영역과 가시광선 영역에서 모두 관찰되는데, 모든 금속이온에서 관찰할 수 있다.



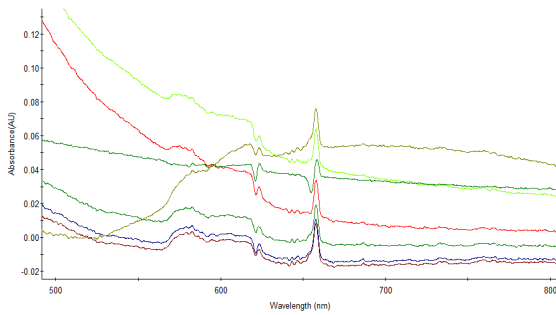


그림 17. Soy digest 와 metal-proteinates의 UV-Vis 스펙트럼. 오른쪽 스펙트럼은 왼쪽 스펙트럼의 장파장 영역을 확대한 것임.

2차년도 아미노산 실험결과에서도 보이듯이 (그림 10), 금속이온의 proteinate 결합은 Fe(II), Fe(III), Cu(II)-proteinate의 경우 가시광선 영역의 흡광도 증가가 예측되는데, 이러한 현상이 관측되었다. 또한, Zn(II), Ca(II), Mg(II)-proteinate의 경우 가시광선 영역의 흡광도 변화는 미비하나 UV 영역에서 모두 흡광도가 증가하여 배위화합물 형성이 이루어졌음을 보여주고 있다. 반면 어느 정도의 금속이온이 proteinate와 배위결합을 형성하고 있는지는 UV-Vis spectroscopy를 통해서 알 수 없었다. 이는 metal-proteinates의 표준물질이 존재하지 않기 때문에 흡광계수를 알 수 없기 때문이다.

다) X-ray diffraction study

대두박 proteinate와 위의 실험에 사용된 metal proteinates를 30mA, 35kV에서 $2^{\circ} < 2\theta < 70^{\circ}$ 의 범위에서 측정하였다. 그림 18의 soy proteinate XRD 스펙트럼을 보면, 예상되는 바와 같이 결정성이 거의 없음을 알 수 있다.

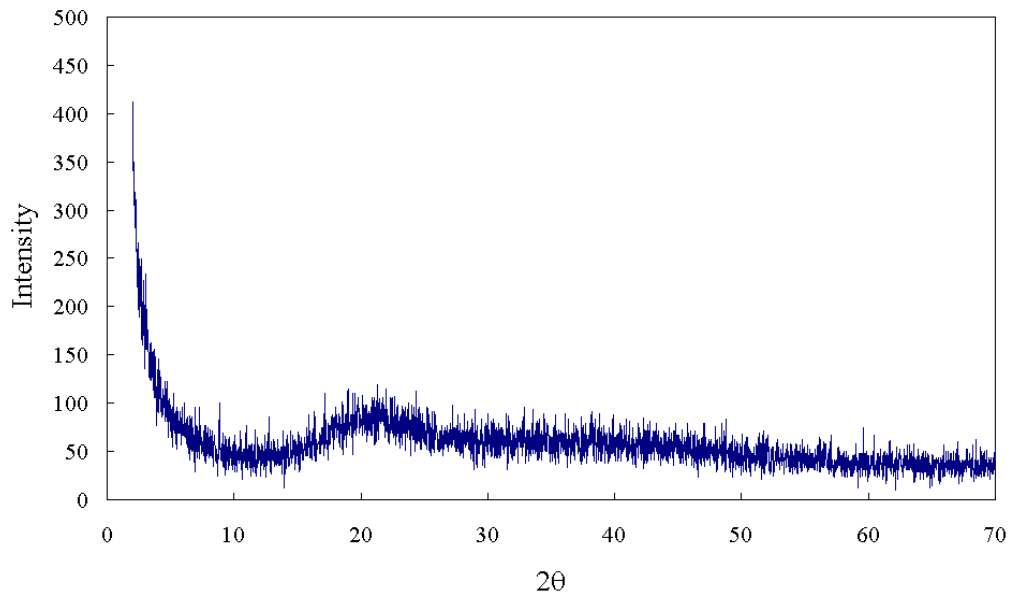


그림 18. soy proteinate의 XRD 스펙트럼.

하지만, 금속이온의 경우 아주 높은 결정성을 가져서 intensity가 큰 peak들을 보이게 된다. (그림 19) Fe(II)-proteinate의 경우 XRD에서 diffraction 이 거의 없어 결정성이 없는 것으로 확인되었으며, Fe(III)-proteinate의 경우도 마찬가지이다. 그러므로, Fe-proteinate의 경우 XRD에서 FT-IR, UV-Vis 결과와는 달리 Fe의 결합여부를 확인하기 어려웠다.

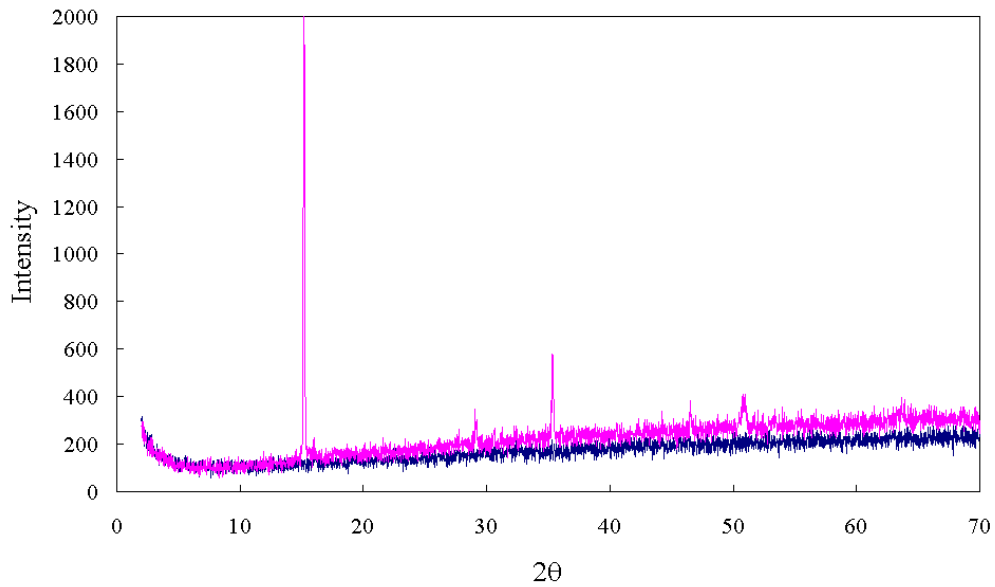


그림 19. Fe(II)Cl₂ (분홍색) 와 Fe(II)-proteinate (푸른색)의 XRD 스펙트럼.

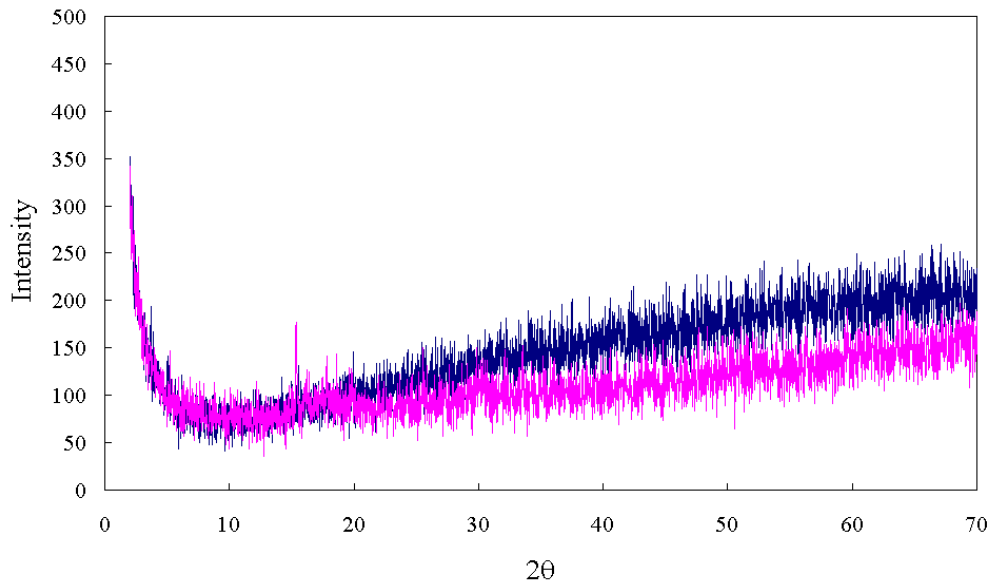


그림 20. Fe(III)Cl₃ (분홍색) 와 Fe(II)-proteinate (푸른색)의 XRD 스펙트럼.

Cu-proteinate의 경우 Cu 이온과는 다른 diffracton이 XRD 스펙트럼 (그림 21)에

서 관찰되며, 비록 정량적이지는 않지만 상당량의 Cu 이온이 단백질에 배위되어있는 것으로 보인다. 그러므로, FT-IR, UV-Vis data와 함께 XRD 결과도 Cu-proteinate의 Cu-peptide 배위결합을 증명하고 있다.

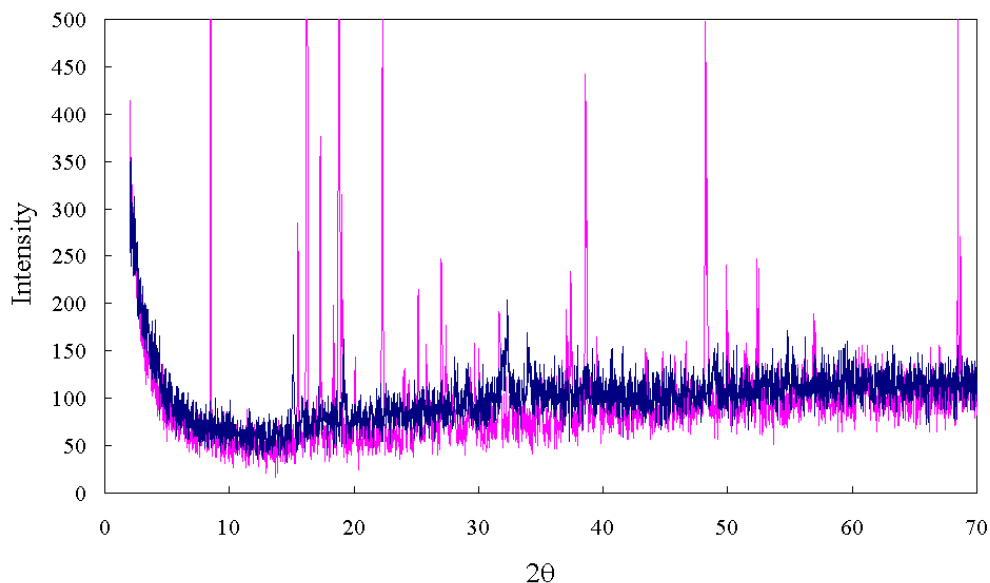


그림 21. Cu(II)SO₄ (분홍색) 와 Cu-proteinate (푸른색)의 XRD 스펙트럼.

Zn-proteinate의 경우도 Cu-proteinate와 마찬가지로 높은 diffraction intensity를 나타내는데 (그림 22), 특히 high angle 값이 높은 특징을 보인다. FT-IR, UV-Vis data와 상보적으로 해석을 하며, Zn-proteinate도 높은 함량의 Zn 이온을 배위결합으로 peptide chain에 결합하고 있는 것으로 생각된다.

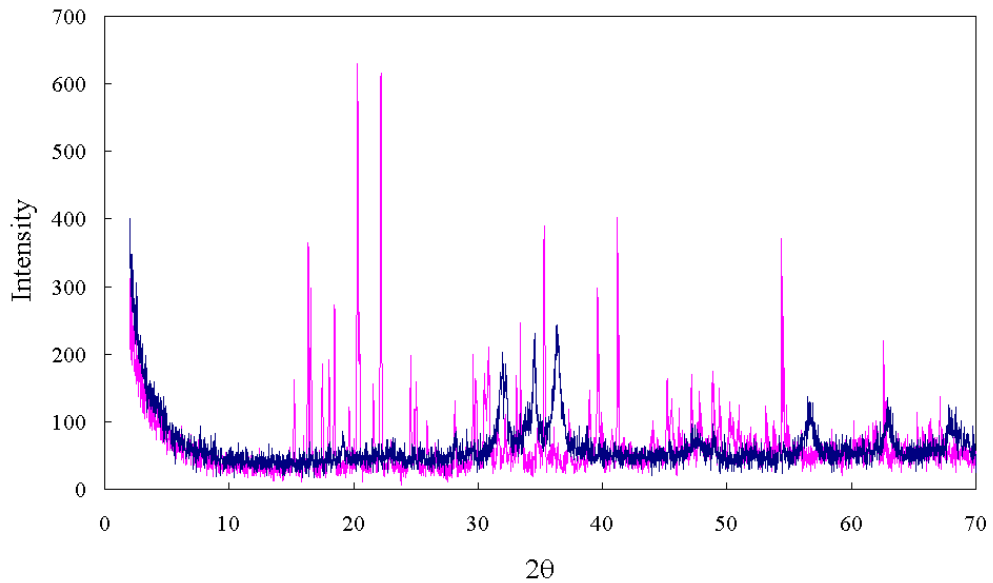


그림 22. Zn(II)SO₄ (분홍색) 와 Zn-proteinate (푸른색)의 XRD 스펙트럼.

관심을 가지는 것이 Ca-proteinate와 Mg-proteinate 인데 그 이유는 이들 이온이 특히 공유결합을 하기가 어렵기 때문이다. 또한, 이들 이온은 $d \rightarrow d$ transition이 없어 UV-Vis spectroscopy에서 그 결합 여부를 알기가 어렵다. 하지만, XRD 측정 결과 Cu-proteinate 나 Zn-proteinate 보다는 정도가 떨어지지만 결정성을 가지고 있는 것으로 해석되었다. (그림 23, 24) 그러므로, Ca-proteinate 와 Mg-proteinate 도 동일한 합성 방법으로 형성이 가능한 것을 알 수가 있다.

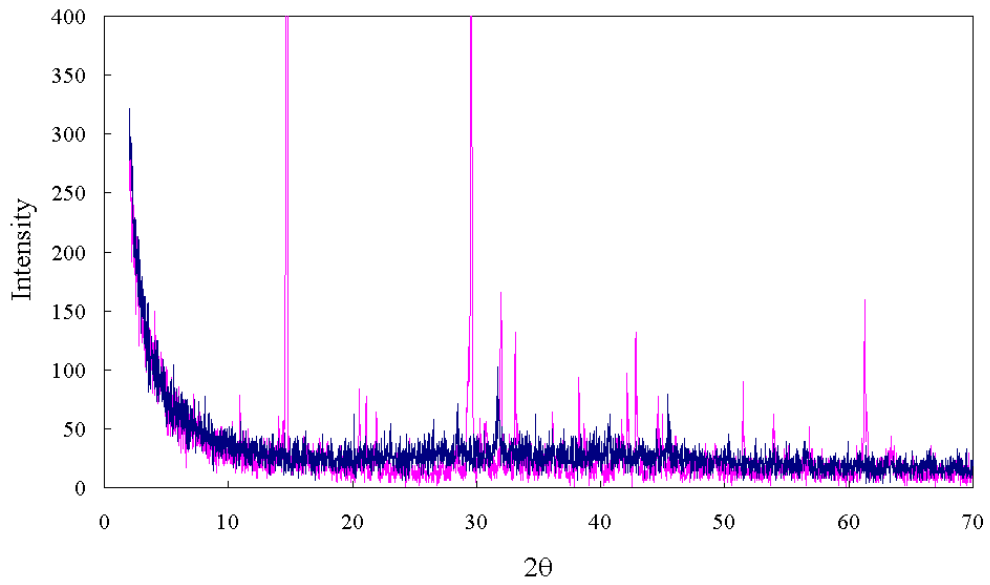


그림 23. Ca(II)Cl₂ (분홍색) 와 Ca-proteinat (푸른색)의 XRD 스펙트럼.

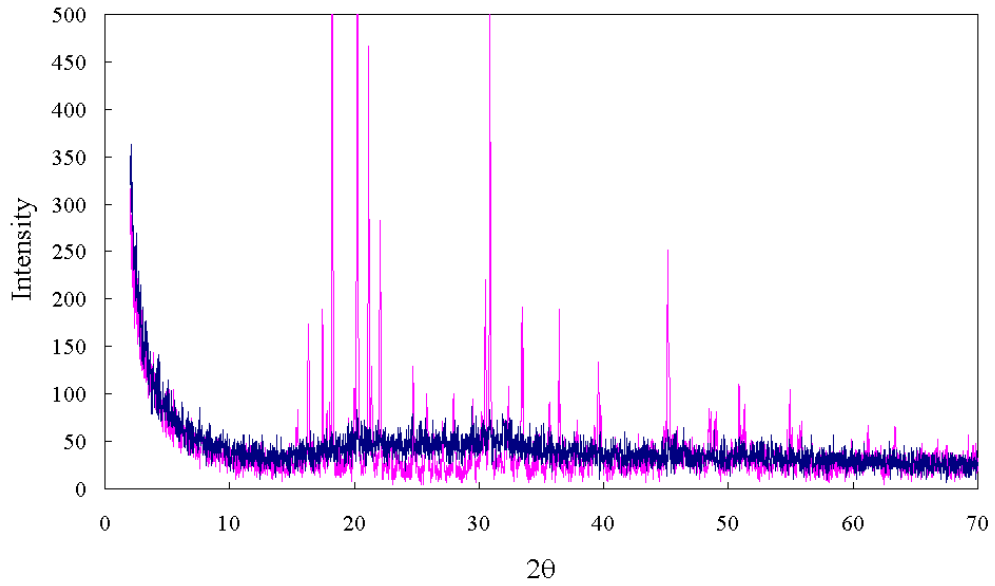


그림 24. Mg(II)SO₄ (분홍색) 와 Mg-proteinat (푸른색)의 XRD 스펙트럼.

다. 결론

Metal-proteinate의 금속-단백질 결합 여부를 확인하기 위해서 FT-IR, UV-Vis, XRD spectroscopy 방법을 이용하여 측정하였다. 이들 결과를 종합하면, Zn-proteinate와 Cu-proteinate는 3가지 방법 모두에 의해서 금속이온과 peptide 사이에 결합이 의심의 여지 없이 확실히 확인되었고, Fe-proteinate, Ca-proteinate, Mg-proteinate의 경우에는 금속이온과 peptide 사이의 결합이 존재하는 것으로 생각되나, 그 결합의 정도가 Zn, Cu-proteinate에 비해서는 적은 것으로 판단된다. 또한, Fe(II) 이온과 Fe(III) 이온의 metal-proteinate 형성 여부는 그 차이가 크지 않은 것으로 보인다.

분광학적인 분석방법은 그 특성상 정량적인 결과를 얻을 수 있지만, metal-proteinate의 경우에는 절대적인 표준물질이 존재하지 않아서 완벽히 정량적인 결과를 얻을 수는 없었다. 하지만, 상대적인 양의 측정은 가능하며, 정량적인 metal-proteinate의 분석을 위해서는 2차년도에 보고한 분리와 금속이온 분석의 방법을 쓰면 쉽게 그 결과를 얻을 수 있을 것이다. 본 연구과제를 통하여 그 동안 사료 첨가제 부분에서 과학적 근거가 절실히 요구되던, metal-proteinate의 분석에 과학적 근거와 자료를 제공할 수 있는 결과를 얻을 수 있었다.

제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

가. 본 연구실에서 개발한 2가 광물질(Cu, Zn, Fe) methionine chelate 제조 시 사용되는 methionine 대신 저렴한 chelating agent를 선발 - 다양한 단백질 공급원을 검토한 결과 일차적으로 탈지대두박이 최적원료로 선발됨 (선행예비시험).

나. Mineral proteinate의 chelating agent로 사용할 protein(soy) digest의 생산 공정을 개발한다.

다. 수용성 무기염과 soy digest의 최적 반응(pH, 온도) 및 생산조건을 확립한다.

라. Mineral proteinates로 항생제 대체 사료개발과 기능성 식품개발을 위해 산란계, 육계, 이유자돈, 육성 비육돈으로 사양시험을 실시한다.

마. 사양시험결과를 토대로 무항생제사료(Cu, Zn proteinates 이용) 및 철분강화계란 및 계육생산(Fe proteinates 이용) 등 브랜드 및 기능성 축산물 생산 방안을 제시한다.

바. 최종년도에는 chelation이 어려운 토금속류인 Ca과 Mg의 chelate 제조한다.

사. Chelates의 화학적 구조를 규명한다.

아. 사양시험을 통하여 효과가 검증되면 제품화에 따른 기술 이전을 실시한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용 범위

가. 제1차년도(2005)

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제 1 세부과제 - Fe proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험	- 선행 연구 재검토 및 문헌조사 - Soy digest 및 Fe soy proteinate의 pilot scale 생산 - 산란계 사료 내 Fe proteinate첨가 사양 시험 (철분강화계란 생산) - 육계 사료 내 Fe proteinate첨가 사양 시험 (철분강화계육 생산)
제 2 세부과제 - 수용성 soy digest의 단백질의 분자량 분포 측정과 미네랄 proteinate 생산 조건 확립	- Mineral soy proteinate의 반응조건에 따른 펩타이드 형성과 분자량 분포를 조사 - FeSO ₄ , ZnSO ₄ , CuSO ₄ 등의 무기질을 이용한 mineral soy proteinate의 생산 조건 확립

나. 제2차년도(2006)

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제 1 세부과제 - Zn, Cu proteinate의 생산과 가축 사료 내 proteinate 첨가 급여시험	- Zn proteinate의 생산 - Cu proteinate의 생산 - 육계 사료 내 Cu proteinate 첨가 사양 시험 (Cu-met 비교시험) - 산란계 사료 내 Cu proteinate 시험 (수준별 비교시험) - 이유자돈에 Zn proteinate + Cu proteinate 시험(항생제 대체)
제 2 세부과제 - Mineral soy proteinate의 금속 이온 함량 측정과 결합 형태 규명	- Fe, Zn, Cu 등의 대두박 미네랄 proteinate의 금속 이온 함량 측정 방법 확립 - 다양한 무기질 원료를 사용하여 최적의 대두박 미네랄 proteinate 생산조건을 확립 - 분광학적 분석방법을 이용한 대두박 펩타이드와 Fe, Zn, Cu 의 결합 형태 규명

다. 제3차년도(2007)

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제 1 세부과제 - Ca, Mg chelate 첨가 사양시험	- Ca chelate 시제품 생산 - Mg chelate시제품 생산 - 산란계에 Ca chelate 첨가 사양시험 - 육성돈에 Mg proteinate + Fe proteinate 시험(PSE 예방 시험)
제 2 세부과제 - 새로운 chelating agents 를 이용한 Ca, Mg의 chelating 조건 개발 및 미네랄 proteinate 형성 기작을 규명	- Ca 및 Mg의 chelate의 개발 - 대두박의 펩타이드와 금속 이온과의 상호작용을 연구하여 생성 기작을 규명

3. 연구 평가의 착안점 및 달성도

가. 제1차년도(2005)

세부연구목표	가중 치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
Soy digest와 Fe proteinate의 생산조건 확 립	40 %	Soy digest 생산량 증대를 위한 대두박 단백질의 저분자화의 조건을 확립하였는가?	100
		Fe proteinate의 형성조건을 확립하였는가?	100
		저분자화의 특성과 Fe chelation의 원리를 파악하였는가?	100
산란계 사료 내 Fe proteinate 첨가 급여시험	30 %	Fe proteinate의 산란계 사료 내 첨가가 다른 형태의 Fe와 비교 실험을 통한 효과 검정	100
육계 사료 내 Fe proteinate 첨가 급여시험	30 %	Fe proteinate의 육계 사료 내 첨가가 다른 형태의 Fe와 비교 실험을 통한 효과 검정	100

나. 제2차년도(2006)

Zn, Cu 등의 proteinate의 생산조건 확립	40 %	Zn proteinate의 생산조건을 확립하였는가?	100
		Cu proteinate의 생산조건을 확립하였는가?	100
		Zn, Cu의 chelation의 특성을 규명하였는가?	100
육계 사료 내 Cu proteinate 첨가 사양시험	20 %	Cu proteinate의 육계에서의 효과와 다른 형태의 Cu와의 비교 실험을 통한 효과 검정	100
산란계 사료 내 Cu proteinate 첨가 사양시험	20 %	Cu proteinate의 산란계 사료에의 적정 첨가 수준에 대한 검정	100
육성돈에 Zn + Cu proteinate 첨가 사양시험	20 %	Cu + Zn proteinate복합제의 육성돈에서의 항생제 대체 효과에 대한 검정 실험	100

다. 제3차년도(2007)

Ca, Mg chelate의 개발	40 %	Ca proteinate의 생산조건을 확립하였는가? Mg proteinate의 생산조건을 확립하였는가? Ca, Mg의 chelation의 특성을 규명하였는가?	100 100 100
산란계 사료 내 Ca chelate 첨가 사양시험	30 %	Ca chelate의 산란계에서의 효과와 다른 형태의 Ca와의 비교 실험을 통한 효과 검정	100
육성돈에 Mg + Fe proteinate 첨가 사양시험	30 %	Mg + Fe proteinate 복합제의 산란계에서의 효과와 다른 형태의 미네랄과의 비교 실험을 통한 효과 검정	100

제 2절 관련분야 기여도

1. metal-아미노산 킬레이트 제제의 분자적 특성 규명을 통한 아미노산 킬레이트 제제의 분석 방법 확립: 최근 국내외에서 사료첨가제로 사용되고 있는 다양한 metal-아미노산 킬레이트 제제의 분석을 위한 과학적 protocol을 확립하였다. 그러므로, 수입제품이나 생산제품의 품질 검사를 과학적으로 실시할 수 있는 방법이 가능하게 되었다. 이 방법은 아미노산 뿐 아니라 기타 금속이온 결합 작은 분자에 모두 적용될 수 있다.

2. soy-digest 생산 조건 확립: 대두박을 이용한 peptide oligomer 의 생산조건을 확립함으로써, 사료, 식품 등의 대두박 물질 이용 관련 산업에 중요한 자료를 제공할 수 있게 되었다.

3. metal-proteinate의 분석방법 확립: UV-Vis, FT-IR, XRD 등을 이용한 분광학적 방법으로 metal-proteinate의 분석이 가능함을 보였고, 이러한 기술을 proteinate 뿐 아니라 starch, chitosan 등의 모든 biopolymer와 금속이온의 결합여부를 확인하는 목적으로도 사용될 수 있다.

4. Ca, Mg-proteinate의 개발: 기존에 어렵게 인식되던 Ca-proteinate와 Mg-proteinate의 형성이 가능함을 보였으며, 새로운 제품 개발로 발전될 것이 기대된다. 다만, Ca, Mg의 함량의 판단과 증가는 계속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

제 5장. 연구개발 결과의 활용계획

제 1절 연구개발과제의 연구 성과

1. 학술지 논문 게재 실적.

가. 한재홍, 백인기. 2006. FT-IR and XRD Analyses of Commercial Methionine-Mineral Chelates. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 49 (1) p8-10

나. 이한규, 이문구, 백인기. Production of Iron Enriched Egg by Iron-soy Proteinates on Laying Hens. *AAJAS*. 2008. 게재 예정

2. 학술대회 발표 실적

가. 이한규, 이문구, 백인기. 2006. Production of Iron Enriched Egg by Iron-soy Proteinates on Laying Hens. *Animal science congress. 12th AAAP*. 2006. 9. 18~22

나. 이한규, 이문구, 백인기. 2006. Production of Iron Enriched Meat by Supplementation of Iron-Soy Proteinates to Broiler Chicks. *Animal science congress. 12th AAAP*. 2006. 9. 18~22

다. 이문구, 백인기. 구리 공급원들(Cu-soy proteinates, Cu-methionine, Cu sulfate)이 육계의 생산성에 미치는 영향. 2007년도 한국 동물자원과학회 학술발표회. 2007.06.28 중앙대학교

라. 지용석, 이지훈, 허호길, 한재홍. Preparation and Characterization of α -Amino Acid-Metal Complexes. *The 2006 International Symposium of Korean Society for Applied Biological Chemistry, Gyeongju, Korea, Oct 26-27, 2006*.

마. 지용석, 한재홍. Synthesis and Characterization of metal-proteinates. 대한화학회 제 101회 대한화학회 총회 및 학술발표회, 경기도 고양시 일산 KINTEX, 2008년 4월 17-18일.

제 6장. 참고 문헌

- AOAC. 1990. Official method of analysis. 15th ed. Association of Official Chemist. Washington, DC. USA.
- Ashmed, H. D. 1993. The role of amino acids chelates in animal nutrition. Noyes Publications. New Jersey, USA.
- B. Yu., W. J. Huang., W. S. Chiou. 2000. Bioavailability of iron from amino acid complex in weanling pigs. *Anim Feed. Sci. Tech.* 86(2000)39-52.
- Cao, J., X. G. Luo., P. R. Henry., C. B. Ammerman., R. C. Littell., and R. D. Milles. 1996. Effect of dietary iron concentration, Age, and length of iron feeding on feed intake and tissue iron concentration of broiler chicks for use as a bioassay of supplemental iron sources. *Pouly. Sci.* 75:495-504.
- Hallberg, L. 1981. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.* 1:123.
- Henry, P. R., Miller, E. R. 1995. Iron bioavailability. In: *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Mineral, and Vitamins.* Academic Press, San Diego, CA, pp. 169-199.
- Hurwitz, S., and S. Bornstein, 1963. The effect of calcium and phosphorus in the diet of laying hens ob egg production and shell quality. *Isr. J. Agric. Res.* 13:147-154.
- Jerry W. Spears. 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Animal Feed Science Technology* 58: 151-163.
- Kennedy, G. Y. and H. G. Vevers. 1973. Eggshell pigmentation of Araucano fowl. *Comp. Biol. Phy.* 44b:11-25.
- Kratzer, F. H., and P. Vohra. 1986. *Chelation in Nutrition.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Kye, S. H., H. Y. Paik. 1993. Iron nutrition and related dietary factors in apparently healthy young Korean women(2). Analysis of iron in major food items and availability if dietary iron. *Korean. J. Nutr.* 26(6):703-714.
- Lang, M. R. and J. W. Wells. 1987. A review of eggshell pigmentation. *World's Poult. Sci. J. Vol.* 43:(3):238-246.
- Lim, H. S. and I. K. Paik. 2003. Effects of supplementary mineral methionine chelates (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol.* 16(12):1804-1808.
- Martinez-Torres, C., Romano, E., Layrresse. M., 1981. Effects of cysteine on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 322-327.

- Mikaelian, K. S., and J. L. Sell, 1981. Performance of laying hens fed various phosphorus levels continuously or phase fed decremental phosphorus levels. *Poultry. Sci.* 60:1916-1924.
- Min, S. K., H. Namkung and I. K. Paik. 1993. Effects of supplementary copper complexes on the performance of broiler chickens, *Korean J. Anim. Nurt. Feed.* 17(5):247-257.
- Monsen, E. R. 1988. Iron nutrition and absorption : Dietary factors witch impact iron bioavailability . *J. Am. Diet. Assoc.* 88:789-790.
- Morck, T. A. and R. Austic. 1981. Iron requirements of White Leghorns. *Poult. Sci.* 60:1497-1503.
- Morris, E. R., Ellis, R. 1982. Phytate, wheat bran and bioavailability of dietary iron. In: Kies, C. (Ed.), *Nutritional bioavailability of Iron.* American Chemical Society, Washington, DC, pp. 121.
- Nam, H. S., S. Y. LY. 1992. A sutvey on iron intake and nutritional status of female college students of Chungnam National University. *Korean. J. Nutr.* 25(5):404-412.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirements of poultry.* National Academy Press, Washington , DC. USA.
- Paik, I. K. 2001. Application of chelated Minerals in Animal Production. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 14: Special Issue:191-198.
- Paik, I. K. 2001. Management of excretion of phosphorus, nitrogen and pharmacological level minerals to reduce environmental pollution from animal production. *Asian-Aust. J. Sci.* Vol. 14, No. 3 : 384-394.
- Paik, I. K. and Y. K. Kim. 1993. The effects of supplemental sources of copper on the performance of weanling pigs and broiler. *Proceedings of VII World Conference on Animal Production, Edmonton, Alberta, Canada.* 2:395-393(Abst.).
- Park, S. W., H. Namkung, H. J. Ahn and I. K. Paik. 2004. Production of iron enriched eggs of laying hens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol 17, No. 12: 1725-1728)
- Product Sheet. 2002. *Alcalase® Food Grade.* Novozymes A/S, Denmark.
- SAS Institute, 1995. *SAS® User's Guide: Statistics.* 6 ed. SAS institute Inc., Cary, NC.
- Sung, C. J. 1997. A study on the dietary fiber intake and iron metabolism in Korean female college students. *Korean. J. Nutr.* 30(2):147-157.
- S. W. Park, H. Namkung, H. J. Ahn and I. K. Paik. 2004. Production of Iron Enriched Eggs of Laying Hens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol 17, No. 12:

1725-1728

Susan, J. F., Wright, A. J. A., 1984. The influence of previous iron intake on the estimation of bioavailability of Fe from a test meal given to rats. *Br. J. Nutr.* 51, 185-191.

Yang, C. J., D. Unganbayer., S. J. Na., S. Y. Ko., H. Y. Wi., D. K. Jung., and H. Y. Kim. 2004. Effects of organic iron supplementation on growth performance and body composition broiler chicks. *Korean. J. Poult. Sci.* Vol. 31, No. 2, 93-100.

Acda, S. P.; Chae, B. J. *Pakistan J. Nutr.* 2002, 1, 25-30

Center for Food and Nutrition Policy-USDA. (2002) Proteinated and chelated mineral complexes. CFNP TAP Review, Virginia, USA

Douglas, B., McDaniel, D. and Alexander, J. (1993) Concepts and models of inorganic chemistry, pp. 262-264, John Wiley & Sons, New York.

Guo, R., Henry, P. R., Holwerda, R. A., Cao, J., Littell, R. C., Miles, R. D., Ammerman, C. B. *J. Anim. Sci.* 2001, 79, 1132-1141.

Han, J.; Chi, Y. S.; Shi, B.-K.; Kim, S. K. Paik, I. K.; *Agric. Chem. Biotechnol.* 2006, 49, 8-10.

<http://phys.kookmin.ac.kr/~xray/xrd/xrd.html>

<http://www.innobio.co.kr/>

Kazuo, N. (1997) Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, John Wiley, New York.

Kim, S., Kim, H. and Chae H. J. *Agric. Chem. Biotechnol.* 2004, 47, 20-26.

Lee, H. K. Master Thesis, Chung-Ang University, 2005.

Lim, H. S.; Paik, I.K. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2003, 16, 1804-1808.

Ou, C.-C.; Powers, D. A.; Thich, J. A.; Felthouse, T. R.; Hendrickson, D. N.;

Potenza, J. A.; Schugar, H. J. *Inorg. Chem.* 1978, 17, 34-40.

Paik I. K. *J. Anim. Sci.* 2001, 14, 191-198.

Salter, Jr., M. H.; Reibenspies, J. H.; Jones, S. B.; Hancock, R. D. *Inorg. Chem.* 2005, 44, 2791-2797.

Wilson, R. B.; de Meester, P.; Hodgson, D. J. *Inorg. Chem.* 1977, 16, 1498-1502.

주 의

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