

최 종
연구보고서

철분 강화 사료첨가제 및 철분 강화
계육과 돈육 생산 기술 개발

Development of yeast to store iron
in organic form and iron-fortified
livestock including chicken and swine

연구기관
(주)RNA

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “철분 강화 사료첨가제 및 철분 강화 계육과 돈육 생산 기술 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “재조합 단백질을 이용한 고효율 철분 강화 사료 개발”, 위탁과제 “고효율 사료 개발을 위한 철분 강화용 효모 탐색 및 개량”, 협동과제 “고효율 철분이 강화된 계육과 돈육 생산 기술 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 28 일

주관연구기관명 : (주) RNA

총괄연구책임자 : 정 대 균

세부연구책임자 : 정 대 균

연 구 원 : 정 창 영

연 구 원 : 정 선 화

연 구 원 : 장 혁 준

연 구 원 : 문 창 훈

연 구 원 : 김 성 범

위탁연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 김 해 영

협동연구기관명 : 순천대학교

협동연구책임자 : 양 철 주

요 약 문

I. 제 목

철분 강화 사료첨가제 및 철분 강화 계육과 돈육 생산 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

자돈의 경우 철분의 공급이 이루어지지 않을 경우 빈혈증이 나타나 산업적으로 큰 손실을 초래하게 된다. 철분은 무기태 금속염의 경우 체내 흡수율이 낮아서 그의 이용률이 큰 문제점으로 제기되어 왔다. 흡수되지 않고 배출된 철분은 토양 오염을 유발할 수 있다. 따라서 흡수율이 높은 유기태 형태의 철분 공급원이 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 유기태 철분의 공급원으로서 효모를 이용하고자 철분을 세포 내에 고농도로 축적하는 효모와 저장단백질인 ferritin을 발현하여 유기태 철분을 공급하는 효모를 개발하고자 하였다. 또한, 이를 이용하여 양계 및 양돈 산업의 생산성을 제고하고자 다음과 같은 연구를 수행하였다.

- 철 저장단백질 ferritin을 발현하는 효모 개발
- 유기철을 고농도로 축적하는 효모 균주 선발 및 개량
- 가축 사양 시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 철 저장단백질 ferritin을 발현하는 효모 개발

인간의 철 저장단백질인 H-ferritin과 L-ferritin을 발현하는 재조합 효모를 개발하였다. 재조합 ferritin은 철과 결합하여 흡수율이 높은 유기태 철분 공급원의 가능성을 보였다. ferritin을 발현하는 효모는 유기태 철분을 공급하는 사료첨가제로 개발될 수 있을 것이다.

2. 철을 축적하는 효모의 선별과 개량

고농도 무기태 철을 함유하는 배지에서 생육하는 효모를 선별하였으며 mutation을 통해 세포 내 철분에 대한 내성이 증가하도록 효모를 개량하였다. 따라서 철분을 세포 내에 고농도로 축적할 수 있는 효모를 이용하여 유기태 철분을 공급하는 사료첨가제로 개발될 수 있을 것이다.

3. 유기태 철분의 동물 사양 시험

철분을 세포 내에 고농도로 함유할 수 있는 재조합 ferritin 효모와 개량된 효모를 유기태 철분의 공급하였을 때 육계의 증체량이 증가하였으며 도체 중의 철분 함량이 증가하였다. 또한, 산란계의 산란율, 난중, 산란량 등 산란계의 생산성을 향상시킬 수 있었으며 계란의 철분 함량 및 화학적 조성을 개선할 수 있었다. 또한, 유기태 철분 효모는 돼지의 증체량과 사료효율을 개선하였고 도체 중의 철분 함량을 증가시켰다. 따라서 유기태 철분 효모를 이용하여 철분이 강화된 기능성 축산물을 개발할 수 있었다.

4. 개발 효모제품 YM03™과 YF04™의 효능 및 상품성 검증

시판되고 있는 유기철 사료첨가제와 동량의 유기태 철분을 함유하는 효모 제품은 육계와 산란계의 생산성과 체고와 닭고기와 달걀 내에 철분 함량을 보다 강화할 수 있음을 확인하였다. 따라서 효모 생균제 제품에 유기태 철분의 이점을 부가한 고기능성 사료첨가제로 이용될 수 있을 것이다.

본 연구를 통하여 개발된 유기태 철분 공급을 위한 효모는 고기능성 사료 첨가제로 개발될 수 있으며 이를 이용하여 철분이 강화된 육계, 계란, 돈육 및 우유 등의 기능성 축산물을 생산할 수 있을 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of yeast to store iron in organic form and iron-fortified livestock including chicken and swine

II. Background and Objectives

Inadequate feed short of iron results in iron-deficiency anemia in piglets, which touches off an enormous loss in livestock. Absorption of iron in inorganic form is usually low and bioavailability is doubtful. The excreted iron provoke soil pollution. Therefore, needs for bioavailability in organic form of iron increase.

III. Contents and Scope

This study aims to develop yeast to store organic iron in cell. To achieve this goal, yeast to accumulate organic iron was screened and improved by mutation. Futhermore, the recombinant yeasts were constructed to express human ferritin, which is a good source to supplement iron. Iron fortified livestock will be produced with these iron-fortified yeast.

IV. Results and Suggestions

1. Construction of yeast to express human ferritin

Yeasts to express human ferritin was constructed and these recombinant ferritins showed to be able to bind iron. Therefore, these yeasts

can provide the iron of bioavailability and be used as an iron-fortifier.

2. Screening the yeast to store iron in cell and improvement by mutation

The yeast to grow in medium at high concentration of iron was screened and the capacity to accumulate organic iron was improved with mutation. Therefore, these yeasts can provide the iron of bioavailability and be used as an iron-fortifier.

3. Field tests

The feed of organic iron stored in yeast enhanced weight gain of Ross broiler chicken and the content of iron in carcass. Also, it gives improvement on performance of layers including egg weight, egg mass, eggshell thickness, eggshell strength and develop chemical composition of eggs such as cholesterol level. In case of swine, iron fortified yeast contributed to improvement of weight gain and feed efficiency. The content of iron in pork also increased. Therefore, productivity can be enhanced and iron fortified pork can be produced by feeding yeasts storing organic iron.

4. Evaluation of YM03TM과 YF04TM and comparison with commercial organic iron product

Compared to commercial organic products, iron fortified yeast is more effective in view of productivity and iron content in chicken and egg.

The iron fortified yeast gives an additional advantage to probiotics in that they provide iron supplementation of bioavailability and help to produce iron fortified livestock.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	11
Section 1. Background and Objectives	11
Section 2. Content and Scope	15
Chapter 2. State of Technology	16
Chapter 3. Contents and Results	18
Section 1. Construction of recombinant yeast to express human ferritin 18	
1. Cloning and expression of human ferritin in <i>E. coli</i>	18
2. Construction of recombinant yeast (<i>P. pastoris</i>) to express human ferritin	29
3. Construction of recombinant yeast (<i>S. cerevisiae</i>) to express human ferritin	48
4. Overproduction of recombinant yeast to express human ferritin	53
5. Characterization of human ferritin expressed in yeast	62
Section 2. Screening the yeast store iron in cell and improvement with mutation	69
1. Screening the yeast store iron in cell	69
2. Improvement with mutation and characterization	75

Section 3. Development of iron fortified livestock	96
1. Effects of organic iron supplementation on growth performance and body composition in broiler chicks	96
2. Effects of organic iron supplementation on productivity and egg composition in laying hens	115
3. Effects of dietary iron on growth performance and meat in finishing pigs	133
Section 4. Evaluation of YM03 TM and YF04 TM , and comparison with commercial organic iron product	162
1. Effects of dietary Fe and ferritin on growth performance and body composition in broiler chicks	162
2. Effect of Fe and ferritin on productivity and egg composition in laying hens	183
 Chapter 4. Achievement and Contribution	 214
Chapter 5. Suggestions	219
Chapter 6. Information for Abroad Science and Technology	220
Chapter 7. References	221

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
제 1 절	연구개발의 필요성	11
제 2 절	연구개발의 목적 및 범위	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	18
제 1 절	인간 ferritin 재조합 효모	18
1.	인간 ferritin 유전자 cloning 및 발현	18
2.	인간 ferritin 발현 효모 (<i>P. pastoris</i>) 제작	29
3.	인간 ferritin 발현 효모 (<i>S. cerevisiae</i>) 제작	48
4.	재조합 ferritin 발현 효모 대량배양	53
5.	발현된 인간 페리틴의 특성	62
제 2 절	철분 강화용 효모 선발 및 개량	69
1.	유기철 고함유 효모 균주 선발	69
2.	철분 고함유 균주 개량 및 생화학적 특성	75
제 3 절	고효율 철분이 강화된 기능성 계육과 돈육 생산 기술 개발	96
1.	유기철의 첨가가 육계의 성장과 체조성에 미치는 영향	96

2. 유기철의 첨가가 산란계의 생산성 및 난 성분에 미치는 영향	115
3. 폐지에서 철분 첨가가 비육돈의 성장 및 육질에 미치는 영향	133
제 4 절 개발 효모철 제품 YM03 TM 과 YF04 TM 의 효능 및 상품성 검증 ..	162
1. 시판 유기철과 효모제품 YM03과 YF04가 육계의 성장과 체조성에 미치는 영향	162
2. 시판 유기철과 효모제품 YM03과 YF04가 산란계의 생산성 및 난 성분에 미치는 영향	182
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	214
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	219
제 6 장 해외과학기술정보	220
제 7 장 참고문헌	221

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

철분은 혈액의 혈색소(헤모글로빈)를 구성하는 성분으로 산소의 운반과 조직 호흡에 관한 기능과 대사과정에 직접적으로 관여한다. 철분이 부족할 때에는 철분 결핍성 빈혈을 일으키게 된다.

새끼 돼지는 발육속도가 매우 빨라서 출생 시 체중은 1.0~1.5kg에 불과하지만 1주령 시에는 약 2배, 3주령 시에는 약 4배가 되며, 따라서 각 장기 및 신체 조직도 급속도로 발육하게 된다. 이 때 외부로부터 공급되는 철분의 함량이 부족하게 되면, 적혈구의 구성성분인 혈색소(헤모글로빈) 생산량이 감소되고, 자돈의 체중 증가율을 따라잡지 못하므로 생후 3주령 이내에 생리적 빈혈이 오게 된다. 자돈의 혈액 중 혈색소량이 감소하게 되면 설사 발생빈도가 높아지고 항병력이 저하되어 질병에 대한 감수성과 발생이 높아지는 외에도 성장이 늦어지고 허약돈이 되기 쉽다.

철 결핍은 보통 원발성인데 모유가 유일한 철공급원인 신생자축에서 많이 발생된다. 왜냐하면 모유도 철공급원으로서 빈약하기 때문이다. 신생자축의 간에 저장된 철은 정상적인 혈구 형성을 2~3주 이상 유지하는데 불충분한 양이며 자돈에서는 현저하게 부족하다. 토양에 들어있는 대부분의 철분은 사양관리 체계의 변화로 가축이 흙과 접촉할 기회가 없어지면서 철분 결핍증이 발생하게 되었다.

자돈의 빈혈을 방지할 수 있는 대책으로는 어미에게 충분한 철분을 급여하여 태아에게 철분이 이행하도록 하는 것과 출생 후 즉시 철분을 급여(철분 주사 또는 구강투여)하는 것이다. dextran철, 철-sorbitol-citric acid complex, 사카린철이나 글루콘산철과 같은 유기철 제제가 이용된다. 이러한 제제는 근육 내로 주사하면 매우 자극적이고 커다란 딱지가 생기는 단점이 있다.

구강 투여용 철분은 자연 상태인 무기태 금속염의 경우 용해도가 매우 낮고 체내흡수율이 아주 낮아서 그의 이용률이 큰 문제점이다. 또한, 대부분의 경우 소화관을 통과하기 전이나 후에 다른 사료 성분들과의 반응이 쉽다. 다른 철분 공급 방법은 시트르산 철 (iron citrate), 덱스트란 철 (iron dextran), 푸르말산 철 (iron fumarate) 및 숙신산 철 (ferrous succinate) 등과 같은 유기산이나 고분자 전분질과 결합된 형태이다. 그러나 유기철도 생체내로 흡수되어 위를 통과할 때 산성, 펩신의 작용으로 3가철 (Fe³⁺)에서 2가철 (Fe²⁺)로 변하여 흡수율 및 이용률이 낮고, 위장장애 문제도 완전히 개선되지 못했다.

본 연구에서는 흡수율이 높고, 생체 이용률이 높을 뿐만 아니라 위장장애가 없는 유기철을 제조하는 방법을 고안하고자 한다. 이를 위해 유전공학 방법을 이용한 철 저장단백질 (ferritin) 생산 효모 균주 개발 및 철분 내성이 강한 효모 균주를 선별하여 효모 배양 시에 다량의 철을 효모 내로 이전시켜 효모의 구성성분과 결합된 유기철을 제조하고자 한다.

페리틴 (ferritin)은 세포 내 철 저장 단백질로서 철 이온을 중심으로 둘러싸인 구형 단백질이다. 모든 페리틴은 24개의 단백질 단위체 (subunit)로 구성되며, 척추동물에서 분리된 페리틴은 H 및 L의 두 종류 단위체로 이루어지는 반면, 식물과 박테리아에서 분리된 페리틴은 H 단위체로만 구성된다. 일반적으로 하나의 페리틴은 최대 4,500개의 철 분자를 저장할 수 있는 것으로 알려져 있다. H 단위체는 두 개의 Fe(II) 이온의 산화를 촉매하는 중심부 (core)와 연결되어 있는데, H 단위체는 Fe(II)의 산화에 중요한 역할을 하며 L 단위체는 중심부의 형성을 돕는 역할을 한다.

페리틴에 저장된 철은 배아 적혈구 세포 (embryonic red blood cell)에서 헤모글로빈의 생산을 위해 이용되는 등, 페리틴은 체내의 철분 상태에 따라 철을 저장하기도 하고, 저장된 철을 필요한 대사 과정에 공급하는 역할을 하기도 하는 주된 철 저장 단백질이다. 또한 페리틴은 과잉의 철에 의한 독성으로부터 세포를 보호하고, 산소와의 반응을 막아 세포 단백질과 지질을 보호하는 작용을 하는 중요한 단백질로 보고되고 있다. 페리틴에 의한 세포 보호 효과는 하이드록시 라디칼을 형성할 수 있는 높은 독성의 Fe(II)를 보다 독성이 낮은 Fe(III)으로 산화시

켜 내공 (cavaty)에 저장할 수 있는 페리틴의 능력에 기인한다. 대부분의 고등 동물에서 페리틴은 철 저장 단백질로서의 기능이 보다 중요하지만, 원핵세포 등에 있어서는 독성 제거 물질로서의 중요성이 더 강조된다. 이러한 이유로 페리틴은 체내 철분의 과부족을 측정하는 지표로 사용되는 이외에도 철분 결핍에 의한 빈혈 등 각종 질병의 치료를 위한 철분 공급 제제로 이용되고 있다. 소나 말의 비장에서 페리틴을 추출하여 이를 환자에게 투여하는 방법으로, 소나 말의 비장 추출물을 황산암모늄 (ammonium sulfate)으로 처리한 다음 침전물을 분무 건조하여 페리틴을 얻는다. 그러나 이러한 방법은 광우병 등과 같이 동물에서 유발될 수 있는 질병의 위험 때문에 위생상 문제점이 제기되어 왔으며, 이로 인하여 대부분 부적합 판정을 받아 소비자들에게 큰 불신을 주었다. 또한 가축의 페리틴 아미노산 서열과 인간 페리틴의 아미노산 서열에 일부 차이가 있기 때문에 기능과 작용면에서 효율성에 문제가 제기되어 왔다.

따라서 페리틴 제제와 같이 체내 흡수 효율이 높으면서도, 가축 등에서 유발될 수 있는 질병 등의 위험요소로부터 안전성을 갖는 새로운 페리틴 공급 방법을 개발하고자 하였다.

2. 경제 · 산업적 측면

우리나라의 사료시장은 연간 약 3조원으로 축산업에서 높은 비중을 차지하고 있다. 사료 생산량은 연간 15,749천 톤을 생산하였으며, 99년의 경우 양돈 사료의 경우 32.1%, 양계사료가 26.3%로 전체 사료생산량의 과반수를 차지하고 있다. 이와 함께 효모와 같은 사료첨가제도 축산증가 및 사료생산의 증가에 따라 꾸준한 성장이 기대되고 있다.

우리나라의 양돈의 보유는 97년 6,516천두로 세계 21위이며 해마다 보유가 증가되고 있으며, 세계적으로 지난 5년간 20% 성장했다. 이에 따른 국내 축산물 소비량은 99년 1인당 돼지고기는 16,120 g/연, 닭고기는 6,039g/연의 소비량을 보였으며 해마다 증가 추세에 있다. 따라서 축산증가에 따라 사료의 수요도 늘고 있으며 부수적인 사료 첨가제의 경향도 바뀌고 있다. 즉, 주문자생산(OEM)에 의한 농장 주문자들이 원하는 특성에 맞는 배합사료의 개발을 디자인함으로써 사료첨

가제의 다양화를 도모할 수 있다.

최근 선진국에서는 식용고기의 안정성을 지향하는 추세에 따라 사료첨가제 시장에서 생균제가 주목받고 있다. 따라서 위와 같은 시대의 환경상황과 소비구조의 영향에 따라 양돈, 양계사료 등이 여건에 맞게 변화되어야 하며, 인간의 음식물 소비변화는 매우 다양하기 때문에 경제발전과 문화적 비중이 높아지는 우리나라도 선진국화 할 것으로 보여 양돈 및 양계산업은 국민에게 고품질의 단백질원을 공급하는 과정에서 소비자의 선호도에 맞는 육질의 고기를 만들어야 한다. 따라서 유기철을 함유한 효모 개발 시 앞으로 그에 맞는 철분 강화 사료의 충분한 수요가 있을 것으로 전망된다.

3. 사회·문화적 측면

우리나라는 지속적인 저 출산 인구정책으로 출생아 수가 급감하였다. 최근에는 독신여성의 증가와 가임 여성의 감소, 교육비 등 양육비 부담으로 아기 낳기를 거리는 경향 등으로 인하여 생산연령 인구가 줄고 부양해야 할 노인인구만 늘어나는 고령화 사회로 빠르게 진입하고 있다. 여성들의 출산 연령이 많아지면서 산모와 태아의 건강에 대한 관심도 증가하고 있다.

철분은 모체의 저장량이 적고, 일상적으로 부족하기 쉬운 영양소로 임산부 경우 별도의 철분 보충이 필요하다. 임신기에는 모체의 혈량이 50%증가하고 태아의 혈액도 만들어짐으로 다량의 철분이 필요하며 철분이 부족할 경우 조산아 저체중아를 출산할 가능성이 높다. 철분제는 간혹 소화불량이나 구토를 일으킬 수 있기 때문에 식품 중의 흡수가 잘 되는 철분 형태를 섭취하는 것이 좋다.

본 연구를 통하여 개발될 철분 강화 닭고기, 달걀, 돼지고기, 우유 등은 흡수가 잘 되는 유기태 철분을 공급할 수 있는 기능성 축산물로서 국민보건 향상에 크게 기여할 것으로 판단된다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

본 연구에서는 여러 가지 경제적, 기술적 문제를 해결하기 위하여 인간의 ferritin 유전자를 발현하는 효모를 재조합하고 세포 내에 철분을 고농도로 축적하는 효모를 선별하고 mutation을 통하여 개량하여 유기태 철분을 공급하는 사료첨가제를 개발하고자 하였다. 이러한 유기태 철분 효모를 육계, 산란계, 돈육의 사료에 첨가하여 철분이 강화된 기능성 축산물을 개발하고자 하였다. 또한 철분의 공급을 통해 증체율 향상, 육질 개선, 출하일령 단축 등의 생산성 제고를 위한 사료첨가제를 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 범위

연구개발 목적에 따른 주요 연구 내용 및 범위는 다음과 같다.

가. 인간 ferritin 발현 재조합 효모 개발

- 1) 인간 ferritin 발현 *Pichia pastoris* 재조합 효모 개발
- 2) 인간 ferritin 발현 *Saccharomyces cerevisiae* 재조합 효모 개발

나. 유기태 철분 축적 효모 선별 및 개량

- 1) 유기태 철분을 고농도로 축적하는 효모 선별
- 2) mutation을 통한 유기태 철분 축적 효모 개량

다. 유기태 철분 축적 효모 대량 생산 기술 개발

라. 유기태 철분의 육계, 산란계, 돼지의 사양 효과

제 2 장 국내외 기술개발 현황

오랫동안 가축들은 자연으로부터 철분을 섭취하였으며, 별다른 결핍 없이 살아왔다. 그러나 최근에 와서 사양관리체계의 변화로 인하여 가축(특히 돼지)들은 주로 흙과 접할 기회가 없는 콘크리트 바닥에서 키워지게 되므로 인하여 철분의 결핍가능성이 높아지게 되었다. 따라서 철분을 포함한 사료첨가제는 가축의 사육에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다.

과거에는 무기태(무기물 형태 즉 자연산)의 철분이 사료첨가제로 많이 사용되었으나 이는 가축 체내에서의 이용률이 20-30%에 불과하고 나머지는 분뇨로 배설되기 때문에 대량 사용 시 토양오염의 한 원인이 되며 각국에서 무기태 광물질의 대량 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 실정이다. 따라서, 최근에는 이러한 무기태 광물질의 단점을 극복하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

철(II) 시트레이트, 철(II) 글루코네이트, 철(II) 푸마레이트, 철 및 암모늄 시트레이트, 철-콜린 시트레이트 착염, 철-글리신 설페이트 착염(iron-glycine sulfate complex), 철-솔비톨 시트레이트, 철 숙시네이트, 철 솔비텍스(철 솔비톨 시트레이트) 또는 철 솔비톨(iron sorbitol)이 있다. 게다가, 생체 내에서 활성을 나타내는 철의 형태는 보통 Fe^{+++} (또는 Fe^{III} 이나 Fe^{3+})로 표시되는 3가이기 때문에 이들 3가철 유도체들이 2가철 유도체보다 더 높은 활성을 나타낸다. 몇몇 철 유도체들을 경구투여(가장 흔한 투여방법)하면 위장관 및 소화 장애, 구역질 및 위에 부담을 주는 것과 같은 부작용들이 나타날 수도 있으며, 무기철을 투여하는 경우 보다 자주 부작용을 나타내는 경향이 있다. 따라서, 최근에는 위에 부담이 덜 되는 철(III) 알부미네이트, 철-텍스트란 착염(후에 발암물질로 가능성이 있는 것으로 지적됨-Merck Index 12th Edition, code 2991), 철(iron) 사카리네이트, 철 프로테오숙시네이트와 같은 유기철 유도체에 대한 연구가 주로 진행되어 왔다.

철분의 호박산염이나 철분의 폴리말토스 복합체와 같은 유기 화학철을 이용하는 방법 또한 용해도가 매우 낮아 체내 흡수 효율이 떨어지며, 구토, 설사, 속쓰

림, 상복부 불편감 등을 유발하여 위장 장애를 초래한다는 단점이 있다.

동물, 특히 소나 말로부터 유래된 페리틴(Ferritin)이 소개되어 의학적으로나 상업적으로 상당한 성공을 거두었다. 이러한 페리틴은 동물 및 식물계에 널리 분포되어 있는 단백질로서 3가의 철이 가장 풍부하며, 여타의 철단백질 유도체보다 생체이용성이 더 높기 때문에 주로 이용되어 왔다. 그러나, 매우 최근에 유럽연합의 보건당국은 잠재적인 소의 해면형 뇌질환 (Bovine Spongiform Encephalopathy; BSE) 또는 전염성 해면형 뇌질환 (Transmissible Spongiform Encephalopathy; TSE)의 감염 위험 때문에 동물, 특히 소 유래의 모든 적출물이나 유도체에 대해 의학적으로 사용하는 것을 완전히 금지시켰으며, 그 결과 페리틴도 유럽시장은 물론 여타의 많은 국가에서 사용이 중단되었다.

사람의 식이에 흡수율이 높은 유기태 철분 함량을 높이기 위해 콩의 ferritin 유전자를 벼에 형질전환한 시도가 있었다. 식이 내의 phytic acid와 결합하여 이용성이 떨어지는 것을 방지하기 위해 phytase 유전자를 발현하려는 연구가 수행되었다. 또한 철분 흡수를 도와주는 cysteine을 고발현하여 철분 흡수를 돕고자 하는 cysteine-rich metallothionein-like protein 발현 연구도 진행되었다. 그러나 현 시점에서는 유전자조작을 가한 식이를 사람이 섭취할 수 없는 법적 규제뿐만 아니라 안전성을 입증할 수 있는 과학적 검증자료도 부족한 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 인간 ferritin 재조합 효모

1. 인간 ferritin 유전자 cloning 및 발현

가. 재료 및 방법

1) 균주, 배지 및 plasmid

재조합 plasmid의 숙주로는 *Escherichia coli* DH5 α [*supE44*Δ*lacU169*(Φ 80*lacZ*Δ*M15*)*hsdR17recA1endA1gyrA96thi-1relA1*]를 사용하였다. pET15b에 삽입된 ferritin 유전자의 발현을 위해 *E. coli* BL21(DE3) [*F⁻ompThsdS_B(r_B⁻m_B⁻)galdcm*(DE3)] (Novagen)을 사용하였다. *E. coli* 는 액체배지로 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하여 37°C에서 진탕배양하였다. 고체배지는 LB 액체배지에 agar를 1.5% 첨가하여 만들었다. 필요에 따라 항생제로 ampicillin을 배지에 100 μ g/ml이 되도록 첨가하였다. Ferritin 유전자를 cloning하고 발현하기 위해 pET15b (Novagen, USA)를 사용하였다.

2) 효소 및 시약

제한효소들은 Promega (USA)로부터 구입한 것을 사용하였으며, T4 DNA ligase는 Promega와 New England BioLabs (USA)의 제품을 사용하였다. Plasmid DNA의 분리는 Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega)을 사용하였다. PCR에 사용한 *Taq* DNA polymerase와 dNTP mixture는 TaKaRa (Japan)에서 구입하였다. RT-PCR kit는 Promega에서 구입하여 사용하였다. 기타 실험에 사용한 시약들은 주로 Sigma (USA), Merck (German) 제품을 사용하였다. 효소, 시약 및 kit 들은 제조회사에서 제공하는 방법에 따라 사용하였다.

3) H-ferritin 및 L-ferritin 유전자 증폭

H-ferritin 및 L-ferritin 유전자를 증폭하기 위해서 각각 인간의 심장과 간의 mRNA (Clontech, USA)을 주형으로 RT-PCR을 수행하여 cDNA library를 제조하였다. 사용된 primer는 인간 H-ferritin (GenBank Accession No.M97164) 및 L-ferritin (GenBank Accession No.M11147) 유전자 서열을 기초로 합성하였다. cloning을 용이하게 하기 위해 forward primer에는 *NdeI*, reverse primer에는 *BamHI* 제한효소부위를 첨가하였다. PCR에 이용된 프라이머 염기서열은 Table 1과 같았다.

인간 페리틴 유전자를 대량 증폭하기 위하여 앞서 제작한 프라이머와 cDNA library를 이용하여 증합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 열순환기에서 수행하였다. 연쇄증합반응 조건은 열순환기 (PTC-100, MJ Research, U.S.A)를 이용하여, *Taq* DNA polymerase 5 unit, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 20mM Tris-Cl, 50mM KCl의 조성으로 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C 1분, 50°C 1분, 73°C 1분으로 30 cycles을 수행하였다. 증폭산물의 30 cycles에서 반응을 종결시킨 뒤 1%의 Agarose gel에서 전기영동 하에 목적 증폭산물을 확인하였다.

Table 1. Primes used for amplification of human ferritin genes.
Restriction sites are underlined.

Amplified genes	direction	5'-sequences-3'
H-ferritin	forward	g <u>cgccat</u> atgacgaccggtccacctcgcaggtgcgcca
	reverse	g <u>cgcgga</u> tccttagctttcattatcactgtctcccagggt
L-ferritin	forward	cc <u>ggcat</u> atgagctcccagattcgtcagaattattccac
	reverse	g <u>cgcgga</u> tccttagctgtgcttgagagtgagcctttcgaa

4) Agarose gel 전기영동 및 DNA elution

DNA 용액에 gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue, 40% sucrose/TE 완충용액)을 5배 희석하여 첨가하고 0.1 g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.0%의 agarose 수평 gel을 사용하여 50-100 V에서 0.5-2시간 전기영동하였다. 전기영동은 0.5X TAE 완충액 (40mM Tris-acetate, pH7.6, 1mM Na₂EDTA)을 사용하였으며 UV illuminator로 관찰하였다. Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수는 Bioneer DNA PrepMate Nucleic acid Purification Kit을 사용하였다.

5) 증폭된 ferritin 유전자의 cloning

증폭된 ferritin 유전자는 NdeI과 BamHI 제한효소로 처리한 후 agarose gel에서 전기영동하였다. 제한효소 처리된 ferritin 유전자 DNA를 elution하여 같은 제한효소로 처리된 pET15b에 ligation하였다. ligation mixture를 *E. coli*에 electroporation하고 형질전환체를 선발하였다.

6) Competent cell 제조와 electroporation

*E. coli*의 형질전환은 BIO-RAD의 Gene-Pulser II를 사용하였다. 하룻밤 배양한 *E. coli*를 500ml LB 배지에 1%가 되도록 접종하여 optical density가 600nm에서 0.5-0.6이 될 때까지 37°C에서 진탕배양하고 배양액을 4°C에서 4,000g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 균체를 냉각된 10% glycerol에 현탁시킨 후 원심분리를 2회 반복하였다. 마지막 원심분리 후 침전된 균체를 5ml의 glycerol에 현탁하여 competent cell로 사용하였다. Electroporation은 400Ω, 25μF로 설정된 Gene-Pulse II을 이용하여 1.25kV/cm의 전기충격을 가하여 수행하였다. 여기에 SOC 배지 1ml을 첨가하여 회수한 후 37°C 진탕배양기에서 200rpm으로 회복한 후 항생제를 포함한 고체 배지에 도말하였다. Ferritin 유전자가 삽입된 재조합 pET15b를 포함하는 재조합 *E. coli*를 plasmid를 분리하여 확인하였다.

7) 인간 ferritin 발현 및 확인

인간 ferritin 유전자를 발현하기 위해 *E. coli* BL21(DE3)에 인간 ferritin 유전

자가 삽입된 재조합 pET15b를 형질전환하였다. 재조합 pET15b가 도입된 ampicillin 저항성 *E. coli* BL21 (DE3)를 선발하였다. 하룻밤 전배양한 *E. coli* BL21 (DE3)를 50 ml LB 배지에 1% 접종하고 OD₆₀₀이 0.5가 될 때까지 250 rpm으로 진탕배양하였다. 인간 ferritin을 발현 유도를 위해 IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside, Promega)를 최종 농도 0.5 mM이 되도록 첨가하였다. 발현 유도 후 4시간, 18시간 후에 일부를 채취하였다. sonicator를 이용하여 파쇄하고 원심분리하여 cell-free extract를 준비하였다.

발현 유도된 cell-free extract는 7.5% native-PAGE를 통해 단백질을 분리하였다. Fe (II)을 결합하는 활성 ferritin을 구성하는 지를 알아보기 위해 2% K₄Fe(CN)₆, 2% HCl 용액 (1:1 v/v)에 담가 iron staining을 수행하였다. ferritin의 발현 유무를 확인하기 위해 인간 ferritin 단일항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. 발현유도된 cell-free extract를 SDS-PAGE로 단백질을 분리하고 nitrocellulose membrane에 Mini-Trans Blot Cell (BIO-RAD)을 이용하여 옮겼다. nitrocellulose membrane을 5% 탈지분유 용액 (TBS-0.1% Tween 20)에서 실온에서 1시간 blocking하였다. TBS-T 용액으로 충분히 세척한 후, 1:5000 (TBS-T)으로 희석한 ferritin 항체 (mouse) 용액에 1시간 배양하였고 세척하였다. 1:10,000으로 희석한 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG 항체를 1시간 배양하고 세척하였다. 항원-항체 신호는 ECL detection system (Amersham, UK)을 사용하여 검출하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 인간 ferritin유전자의 cloning

사람의 심장과 간 mRNA의 cDNA library를 주형으로 하여 H-ferritin과 L-ferritin 특이 primer를 이용하여 중합 연쇄 효소 반응 (PCR)을 수행하였다. 전기영동 확인 결과, DNA marker(λ -HindIII, 1 Kb ladder marker)와 비교하여 H-ferritin은 572 bp 및 L-ferritin은 548 bp의 예상 크기의 PCR 증폭산물을 확인하였다 (Fig.1). *Nde*I과 *Bam*HI으로 처리하고 elution한 ferritin 유전자를 같은

제한효소로 처리한 pET15b에 도입하여 *E. coli*에 형질전환하였다. Ampicillin 저항성 *E. coli*에서 plasmid를 분리하여 제한효소를 처리하여 예상된 제한효소 pattern을 보이는 재조합 vector를 선발하였다 (Fig. 2). 선발된 재조합 vector는 각각 pETH-FE (H-ferritin), pETL-FE (L-ferritin)으로 명명하였다.

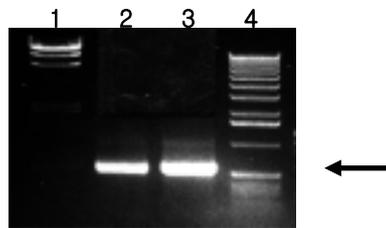
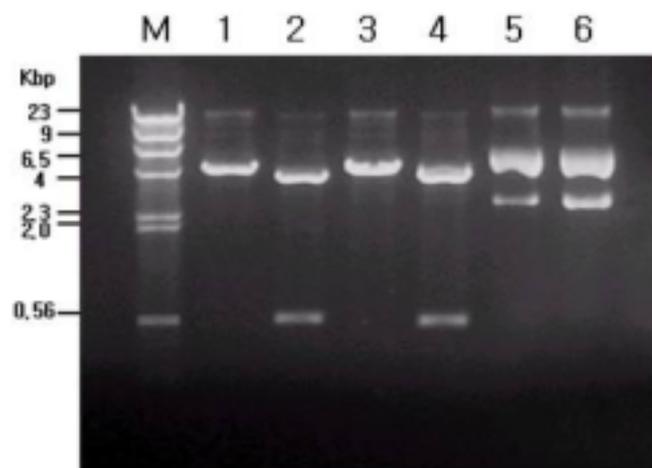


Fig. 1. The amplified H-, L-Ferritin PCR products. lane 1, λ -*Hind*III DNA standard marker; lane 2, H-Ferritin PCR product; 3, L-Ferritin PCR product; 4, 1kb ladder DNA standard marker. Arrows indicate H- and L-Ferritin PCR products.



M. Marker (λ -HindIII)

1. pETH-Fe was digested with *NdeI*

2. pETH-Fe was digested with *NdeI/BamHI*

3. pETL-Fe was digested with *NdeI*

4. pETL-Fe was digested with *NdeI/BamHI*

5.6 Super coiled pETH-Fe and pETL-Fe

Fig. 2. Restriction enzyme digestion of cloned pETH-Fe and pETL-Fe. (The human H- and L-ferritin cDNA regions were inserted into vectors that contained unique *NdeI* and *BamHI* restriction enzyme site).

2) 인간 ferritin의 발현 및 확인

pET15b에 삽입된 인간 ferritin의 발현을 위해 재조합 pET15b를 발현 숙주 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 배양액에 IPTG를 첨가하여 ferritin 발현을 유도하였다. IPTG 첨가에 의해 pETH-FE와 pETL-FE이 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)는 각각 23 kDa과 21 kDa의 단백질을 과발현하는 것을 확인하였다 (Fig. 3A). 재조합 ferritin의 N-말단에 위치하는 histidine tag를 이용하여 과발현된 단백질을 정제하였고 Western blot을 통해 ferritin 단백질임을 확인하였다 (Fig. 3B).

발현된 단위 ferritin이 철을 결합할 수 있는 형태로 결합하는지의 여부를 확인하기 위하여 native-PAGE를 수행하고 iron staining을 수행하였다. Ferritin은 열에 안정하기 때문에 cell-free extract를 70°C에서 10분간 가열한 후 원심분리하여 침전된 단백질을 제거하였다. 상정액을 native-PAGE로 분리하였을 때 coomassie brilliant blue R-250 staining에 의해 거의 순수한 형태로 나타났으며 iron staining에 의해 철을 결합할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 4). 따라서 재조합 인간 ferritin도 *E. coli*에서 철과 결합할 수 있는 형태로 결합하는 것을 알 수 있었다.

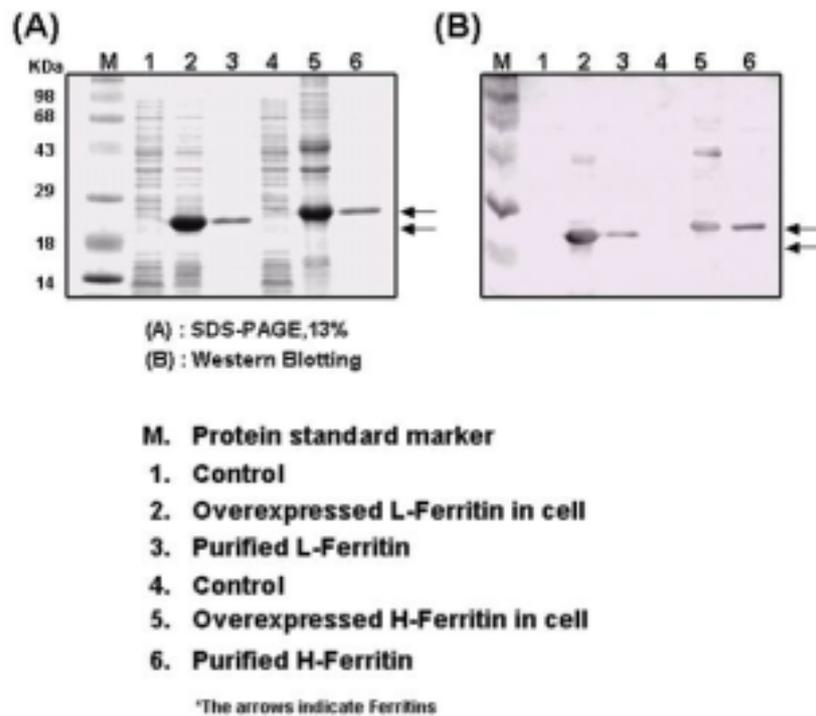


Fig. 3. Expression of poly-histidine fused human H- and L-Ferritin in *E. coli*. (The cell extracts of pre-induction and IPTG induction sample were loaded onto a 13% SDS-PAGE gel and stained with coomassie blue).

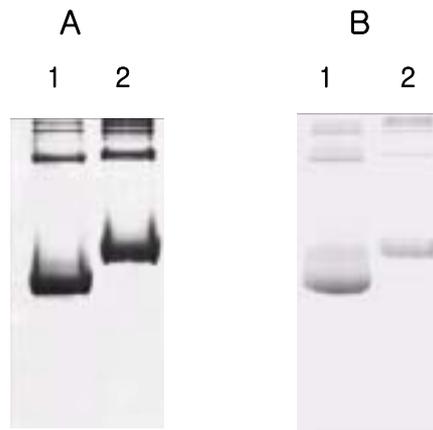


Fig. 4. Native-PAGE and iron staining of expressed ferritin. The recombinant human ferritins were loaded onto a 7.5% Native-PAGE gel and stained with coomassie blue (A). The iron staining (B) was performed after preincubation of purified ferritins with ferrous ammonium sulfate. Each of number 1 and 2 indicates loading of supernatant of pETH-FE and pETL-FE, respectively.

2. 인간 ferritin 발현 효모 (*P. pastoris*) 제작

가. 재료 및 방법

1) 균주, 배지 및 plasmid

Pichia pastoris (Invitrogen, USA) GS115 [*his4*], KM71 [*his4aox1::ARG4arg4*]를 재조합 ferritin의 발현 숙주로 사용하였다. 액체배지는 다른 언급이 없을 시에는 YPDS 배지 (효모 추출물, 펩톤, 포도당, 솔비톨)를 사용하였고 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 고체배지는 YPDS 액체배지에 agar를 첨가하여 고형화하여 사용하였다. 필요한 경우에 Zeocin 100µg/ml이 되도록 첨가하였다. 발현 벡터는 pPICZαA (Invitrogen)을 사용하였다. 이 벡터는 selection marker로 zeocin 저항성 유전자를 포함하고 있으며 alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter-terminator cassette와 multiple cloning sites를 가지고 있다. 또한 *EcoI* 유전자를 가지고 있어 *E. coli*에서 재조합 벡터를 제조할 수 있다.

2) H-ferritin 및 L-ferritin 유전자 증폭

H-ferritin 및 L-ferritin 유전자를 상기에서 제조된 cDNA library를 이용하여 연쇄증합반응을 통하여 증폭하였다. 사용된 primer는 H-ferritin (GenBank Accession No.M97164) 및 L-ferritin (GenBank Accession No.M11147) 유전자 서열을 기초로 합성하였다. cloning을 용이하게 하기 위해 forward primer에는 *EcoRI*, reverse primer에는 *XbaI* 제한효소부위를 첨가하였다. 연쇄증합반응에 이용된 프라이머 염기서열은 Table 2와 같았다. 연쇄증합반응 조건은 상기에서 언급한 것과 같았다.

Table 2. Primes used for amplification of human ferritin genes. Restriction sites are underlined.

Amplified genes	Directions	5'-sequences-3'
H-ferritin	forward	gcgc <u>gaattcat</u> gacgaccgctccacc
	reverse	gcgc <u>tctagatt</u> agctttcattatcact
L-ferritin	forward	gcgc <u>gaattcat</u> gagctcccagattcgt
	reverse	gcgc <u>tctagatt</u> agtcgtgcttgagagt

3) 인간 ferritin 단독 발현 벡터 제작

증폭된 연쇄중합반응 산물을 제한효소 *EcoR* I 으로 절단하여 선형으로 만든 후, 에탄올로 침전시켜 회수하였다. 상기 DNA를 다시 제한효소 *Xba* I 으로 절단하고, agarose gel로 전기영동 하여 H-ferritin (564 bp), L-ferritin (540 bp) 목적 DNA 절편을 elution하였다. DNA 절편을 T4 DNA ligase를 이용하여 AOX (alcohol oxidase) 프로모터와 선별 표지 유전자로서 제오신 (zeocin) 저항성 유전자를 포함하는 효모발현 벡터 pPICZaA의 *EcoR* I /*Xba* I 위치에 삽입하였다. 재조합 벡터들의 제작과정 및 구조를 Fig. 5에 나타내었다.

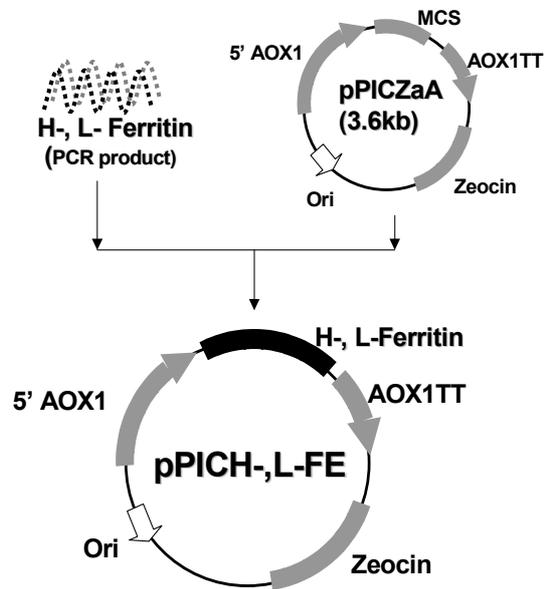


Fig. 5 The expression vector map of pPICZaA & pPICH-,L-FE.

4) H-, L-ferritin 동시 발현 벡터 제작

효모발현 벡터 pPICZaA를 이용한 *Pichia* 발현 시스템의 특징은 두 가지 이상의 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 각각의 유전자에 promoter와 terminator를 포함한 bicistronic 벡터를 만들 수 있는 장점이 있다. 따라서 피키아에서 재조합 H- 및 L-Ferritin을 동시발현 시킬 수 있는 벡터를 제작하기 위해 기존에 제작한 단독 발현 재조합 벡터를 이용하였다. L-Ferritin유전자를 H-ferritin 유전자의 뒤에 삽입시키기 위해 L-Ferritin의 N-terminal에 있는 5'AOX1 부위와 C-term에 있는 AOX1 terminator 부위를 포함하는 카세트를 제작하였다. 먼저 제한효소 *Bgl* II, *Bam*HI으로 반응시켜 선형으로 만든 다음 agarose gel로 전기영동 하여 목적 DNA 절편을 확인하고 카세트부위를 elution하였다. H-ferritin은 *Bam*HI으로 처리하여 vector와 insert를 T4 DNA ligase을 이용하여 삽입시켰다. 연결시킨 ligation 반응물을 *E. coli* DH5α에 electroporation 방법으로 형질전환하였으며, 정방향으로 올바르게 벡터에 삽입된 카세트를 찾기 위해 약 160개의 colony를 선별하였다. 각각을 plasmid DNA추출을 수행하여 제한효소 *Eco*RI을 처리한 다음 agarose gel 전기영동에서 4073 bp 와 2172 bp크기의 DNA가 동시에 보이는 것을 선택하였다. 상기 벡터들의 제작과정 및 구조는 다음 Fig. 6과 같다.

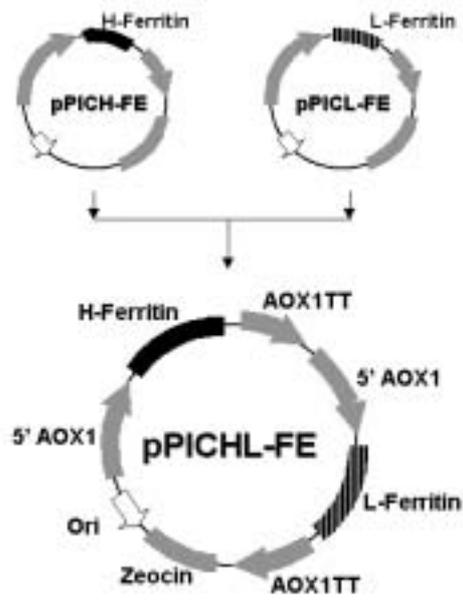


Fig. 6. The coexpression vector map of pPICHL-FE

5) *P. pastoris* 형질전환 및 선발

정제된 벡터 (pPICH-FE, pPICL-FE)를 제한효소로 처리하여 선형 DNA 상태로 만들고 이를 농축시켰다. *P. pastoris* KM71 및 GS115를 YPD (yeast, peptone, dextrose) 배지에 접종하여 배양하여 sorbitol 처리로 competent cell을 얻었다. 준비된 competent cell에 제한효소로 처리하여 선형으로 만든 발현 벡터를 혼합하여 electroporation을 통해 형질전환 시켰다. 조건은 25 μ F, 200 Ω , 7.5 kV/cm를 사용하였다. pPICHL-FE는 supercoiled plasmid를 사용하였다. electroporation 후, 세포들을 회복시킨 뒤 배양액 제오신을 함유하는 YPDS (yeast extract peptone dextrose sorbitol) 고체 배지에 도말한 후 30 $^{\circ}$ C에서 콜로니가 형성될 때까지 2~3일간 배양하였다. 형성된 콜로니 중 인간 페리틴 유전자가 효모의 게놈 내로 삽입된 것을 선별하기 위하여 genomic DNA를 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)을 이용하여 추출한 다음 연쇄중합반응을 수행하였다. 연쇄중합산물은 1% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다.

6) H-, L-ferritin의 발현

재조합 플라스미드로 형질전환시킨 *P. pastoris*에서 인간 페리틴을 발현하기 위해, 상기에서 선별된 재조합 효모를 글리세롤을 탄소원으로 하는 20ml의 BMGY 배지(Yeast extract, Peptone, Yeast nitrogen base, Biotin, Glycerol, Difco)에 소량 접종하고 30 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 진탕배양 하였다. 상기와 같이 탄소원으로 포도당과 글리세롤을 순차적으로 사용함으로써 외래 유전자의 발현을 억제 (repression) 및 탈 억제 (derepression)하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 효모를 분리한 후 메탄올을 포함하는 20 ml의 BMMY 배지 (yeast extract, peptone, yeast nitrogen base, biotin, methanol, Difco)에 OD₆₀₀이 1.0으로 접종하고, 30 $^{\circ}$ C, 호기적 조건 하에서 5일간 배양하여 AOX 프로모터에 의해 조절되는 인간 페리틴 유전자의 발현을 유도하였다. 배양기간 동안 메탄올을 매일 0.5% 첨가하였다. 5일간 배양한 후 배양액을 회수하여 원심분리하고 (4000g, 10분) 효모를 회수하였다. 상기에서 인간 페리틴의 발현을 확인하기 위하여 회수된 효모로부터 glass beads와 breaking buffer(PMSF, EDTA, Glycerol, sodium phosphate

buffer)에 의해 효모를 파쇄시켜 수용성 단백질을 추출하고 13% SDS-PAGE 및 Western blotting으로 H-, L-페리틴의 발현을 조사하였다.

7) *P. pastoris*에 삽입된 페리틴 유전자 수 확인

형질전환된 *P. pastoris*에서 genomic DNA로 integration된 ferritin 유전자의 copy수를 확인하기 위해 southern blotting을 수행하였다. 상기에서 추출한 H-,L-ferritin이 각각 integration된 *P. pastoris* GS115, KM71 genomic DNA에 발현벡터 및 ferritin 유전자 염기서열에 존재하지 않은 *Xba*I 제한효소를 처리하였다. 반응 이후 0.8% agarose gel에 각 lane당 15 μ g의 genomic DNA를 전기영동하여 DNA의 절단을 확인하고 gel을 denaturation용액에 담가 DNA를 변성시켰다. 이후 SSC완충액(3M NaCl, 0.3M Sodium citrate)으로 니트로셀룰로스(nitrocellulose)막으로 DNA를 전이시켰다. 이후 막을 UV crosslinker로 전이율을 강하게 해준 뒤, P³²가 labeled된 probe와 함께 교반하여 반응시켰다. Probe는 벡터에 클로닝된 페리틴 유전자를 이용하여 제작하였고, 교반된 니트로셀룰로스 막을 washing한 다음 상온에서 말리고 BAS카세트 안에서 노출하여 BAS 2040을 이용하여 이미지를 출력하였다. 이후 agarose gel에 같이 전기영동시킨 H-, L-standard와 함께 band intensity를 비교하여 페리틴이 들어간 copy수를 계산하였다. 현상된 이미지는 Scion image프로그램을 이용하여 분석하였다.

나 결과 및 고찰

1) 인간 ferritin 단독 및 동시 발현 *P. pastoris* 벡터의 제작

예상 크기의 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Eco*R I, *Xba* I 으로 절단하고 분리한 DNA 절편을 효모발현 벡터 pPICZaA에 삽입하였다. 인간 H-ferritin 또는 L-ferritin 유전자가 각각 AOX 프로모터 하류에 기능적으로 연결되고, 제오신 저항성 유전자를 선별 표지 유전자로 갖는 발현 벡터를 제작하였으며 이들을 pPICH-FE 및 pPICL-FE라 명명하였다.

pPICL-FE에 있는 L-Ferritin유전자를 pPICH-FE에 삽입시키기 위해

L-Ferritin의 N-term에 있는 5'AOX1 부위와 C-term에 있는 AOX1 TT부위를 *Bgl* II, *Bam*HI 절단하여 *Bam*HI으로 선형화된 pPICH-FE에 삽입하였다. H-ferritin과 L-ferritin이 정 방향으로 삽입된 형질전환체를 찾기 위해 약 160개의 colony를 선별하였다. 각각을 plasmid DNA을 추출하여 제한효소 *Eco*RI을 처리한 다음 agarose gel 전기영동에서 4073 bp 와 2172 bp 크기의 DNA가 동시에 보이는 것을 선택하였다. 이것을 pPICHL-FE라 명명하였으며 H- 및 L-Ferritin을 동시에 발현할 수 있는 벡터를 제작하였다.

2) *Pichia pastoris*에서 ferritin의 단독 발현

인간 ferritin의 발현을 위해 상기에서 제조한 발현 벡터를 이용하여 메탄올 자화 효모 균주인 *P. pastoris*를 형질전환하였다. 제오신을 함유하는 YPDS (yeast extract peptone dextrose sorbitol) 고체 배지에서 형성된 콜로니 중 인간 ferritin 유전자가 효모의 genomic DNA에 삽입된 것을 연합중쇄반응을 통하여 선별하였다. H-ferritin의 경우 GS115 형질전환체에서 선택한 12개의 콜로니 중에 8개가, KM71 형질전환체에서 선택한 10개의 콜로니 중에서 8개가 약 560 bp의 band가 검출되었다 (Fig.7). 또한 L-Ferritin에서는 GS115 형질전환체에서 선택한 12개의 콜로니 중에 10개가, KM71 형질전환체에서 선택한 12개의 콜로니 중에서 9개가 약 540 bp의 band가 검출되었다 (Fig.8). 증폭이 확인된 것들은 ferritin 유전자가 *P. pastoris* genomic DNA의 AOX유전자로 안전하게 들어갔음을 확인할 수 있었다.

H-ferritin과 L-ferritin 발현 cassette가 *P. pastoris*의 genomic DNA로 삽입된 것이 확인된 효모를 파쇄하여 수용성 단백질을 추출하고 13% SDS-PAGE 및 Western blotting으로 H-, L-페리틴의 발현을 조사하였다. 선별된 H- 및 L-ferritin 유전자가 삽입된 총 35개의 형질전환체 중 발현이 확인된 것은 H-ferritin의 경우, 8개의 GS115 strain과 8개의 KM71 strain에서 모두 western blotting에서 약 21 kDa위치에서 signal을 확인하였다 (Fig. 9). L형의 경우, 총 19개의 형질전환체를 선별하였으며 GS115 strain 10개중 10개, KM71 strain 9개중 9개가 약 24 kDa위치에서 선택된 모든 균주가 ferritin band signal을 확인하

였다 (Fig. 10). 따라서 *P. pastoris*의 cytoplasm에서 재조합 인간 H-, L-ferritin 이 발현됨을 확인하였다.

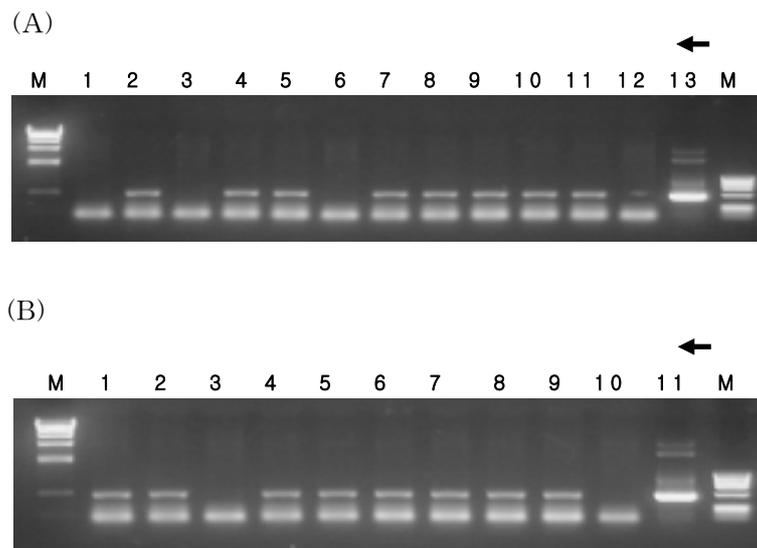


Fig. 7. The results of genomic PCR (H-Ferritin). A, GS115 strain (M: DNA standard marker, #13: H-Ferritin PCR standard); B, KM71 strain (M: DNA standard marker, #11: H-Ferritin PCR standard).

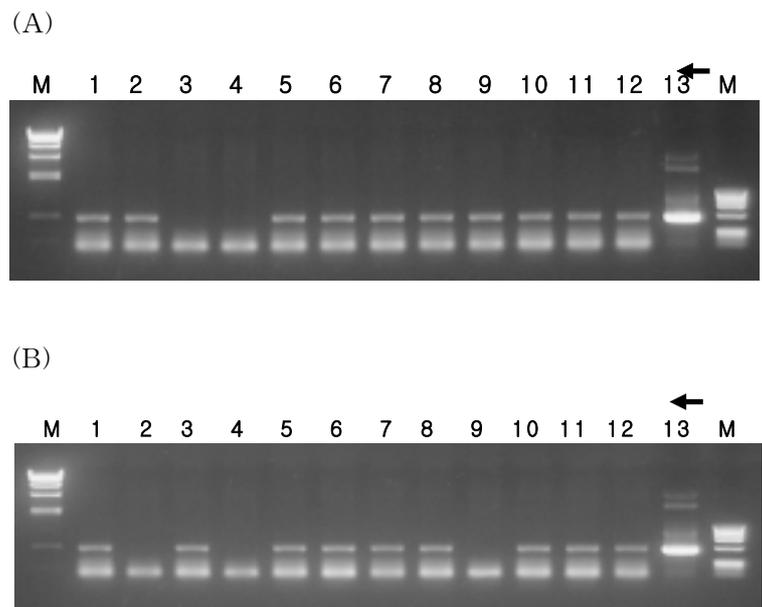
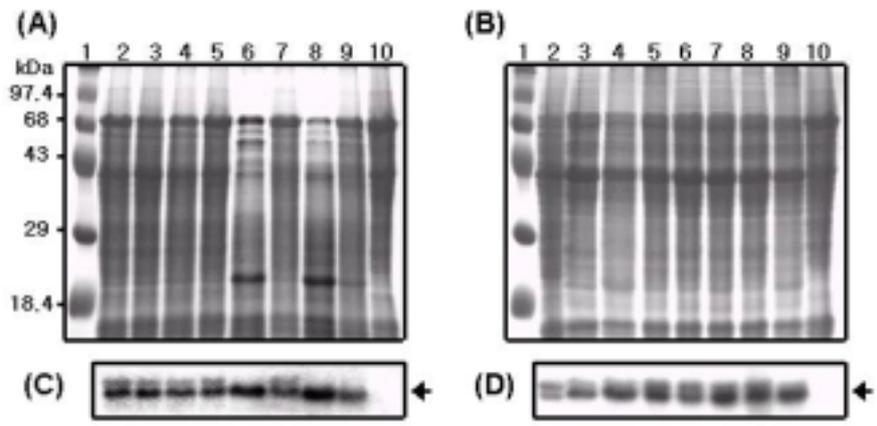
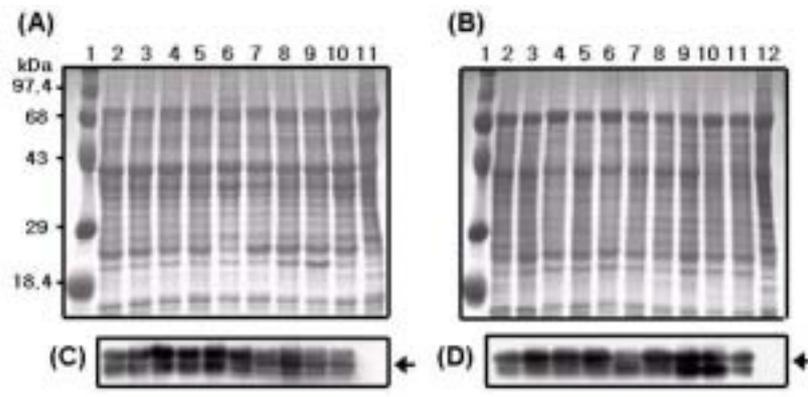


Fig. 8. The results of genomic PCR (L-Ferritin). A, GS115 strain (M: DNA standard marker, #13: L-Ferritin PCR standard); B, KM71 strain (M: DNA standard marker, #13: L-Ferritin PCR standard).



(A) SDS-PAGE (GS115 H-Ferritin transformants)
(B) SDS-PAGE (KM71 H-Ferritin transformants)
(C) Western blotting (GS115 transformants)
(D) Western blotting (KM71 transformants)
 (The arrows indicate the expressed H-ferritin)

Fig. 9. Expression of H-Ferritin in GS115 and KM71 transformant.



(A) SDS-PAGE (GS115 L-Ferritin transformants)

(B) SDS-PAGE (KM71 L-Ferritin transformants)

(C) Western blotting (GS115 transformants)

(D) Western blotting (KM71 transformants)

(The arrows indicate the expressed L-ferritin)

Fig. 10. Expression of L-Ferritin in GS115 and KM71 transformant

3) *P. pastoris*에 삽입된 페리틴 유전자 수

H-ferritin의 경우 선별된 GS115 strain에서 약 4 copy가, KM71 strain에서는 약 2copy가 integration 되었음을 확인하였다. L-ferritin에서는 GS115 strain에서 약 3 copy의 signal이 확인되었으며, KM71 strain의 경우 약 2 copy의 L-ferritin 유전자 integration을 확인하였다 (Fig. 11).

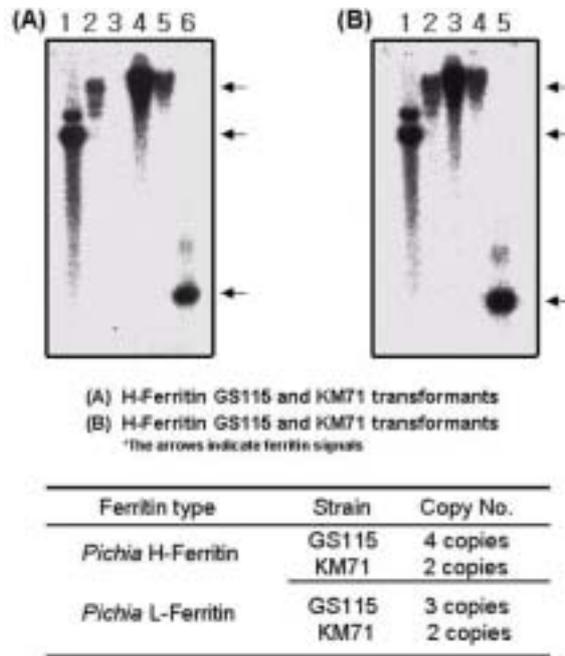


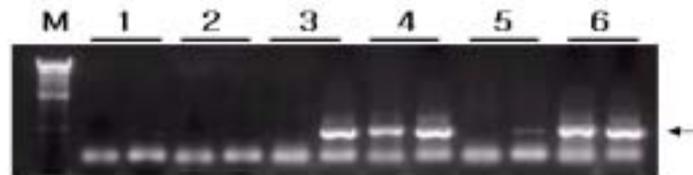
Fig. 11. Genomic southern blot analysis for determination of copy number.

4) *Pichia pastoris*에서 ferritin 동시 발현

인간 H-,L-페리틴의 동시발현을 위해 상기에서 제조한 발현 플라스미드 pPICHL-FE를 이용하여 메탄올 자화 효모 균주인 *P. pastoris* KM71 및 GS115을 형질전환하였다. Zeocin을 함유하는 YPDS (yeast extract peptone dextrose sorbitol) 고체 배지에서 형성된 콜로니 중 인간 ferritin 유전자가 효모의 genomic DNA에 삽입된 것을 연합중쇄반응을 통하여 선발하였다. 연쇄중합반응을 agarose gel에서 확인한 결과 GS115 형질전환체에서 선택한 6개의 콜로니 중에 2개가, KM71 형질전환체에서 선택한 3개의 콜로니 중에서 2개가 H-,L-페리틴의 band가 동시에 검출되었다 (Fig. 12).

H-ferritin과 L-ferritin 동시 발현 cassette가 *P. pastoris*의 genomic DNA로 삽입된 것이 확인된 효모를 과쇄하여 수용성 단백질을 추출하고 13% SDS-PAGE 및 Western blotting으로 H-, L-페리틴의 발현을 조사하였다. 선발된 H- 및 L-ferritin 유전자가 삽입된 총 4개의 형질전환체 중 발현확인은 2개의 GS115 strain에서 2개, 2개의 KM71 strain에서 2개 모두 Western blotting에서 약 21-24 kDa 위치에서 signal을 확인하였다 (Fig. 13).

(A)



(B)

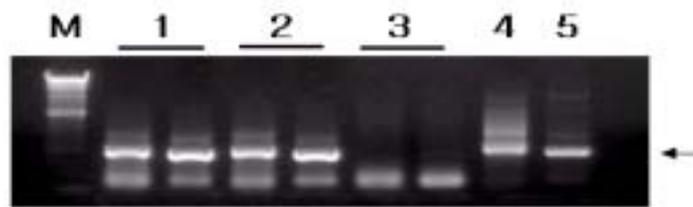


Fig. 12. The results of genomic PCR. A, GS115 strain (M: DNA standard marker); B, KM71 strain. M indicates DNA standard marker and lane 4 and 5 in B indicate H- and L-ferritin PCR standard. Arrows indicate H- and L-Ferritin PCR products.

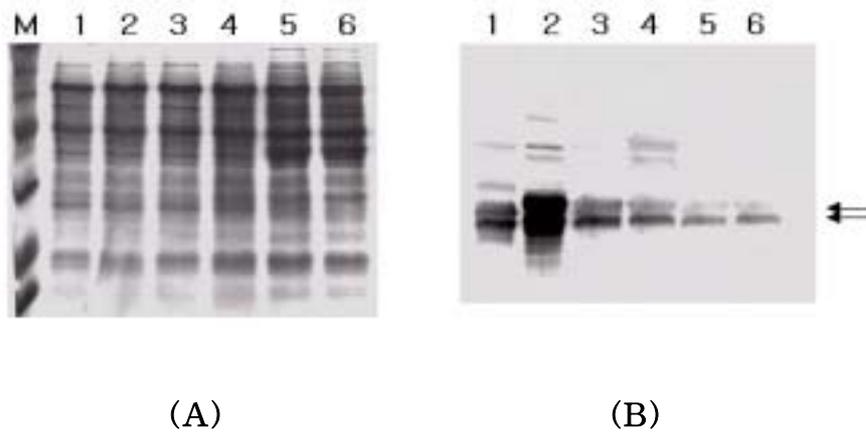


Fig. 13. The results of SDS-PAGE (A) and western blotting (B) in coexpression transformant. A: SDS-PAGE M: Protein standard marker. Lane 1 and 2: H-, L-Ferritin standard in *Pichia pastoris*; lane 3 and 4, Coexpression cell extracts in GS115; lane 5 and 6: coexpression cell extracts in KM71. Arrows indicate H- (above) and L- (below) Ferritin.

3. 인간 ferritin 발현 효모 (*S. cerevisiae*) 제작

가. 재료 및 방법

1) 균주, 배지 및 plasmid

Ferritin의 발현을 위해 *S. cerevisiae* [leu2⁻, ura3⁻, pep4::HIS3]를 사용하였으며 YEPD (yeast extract, peptone, dextrose) 배지, 30°C에서 진탕배양하였다. H-ferritin의 발현을 위해서 integrative vector, YIplac128을, L-ferritin은 episomal vector YEp352를 사용하였다.

2) 발현벡터 제조의 제조 및 형질전환

Ferritin 유전자는 *P. pastoris*에 사용된 서열을 그대로 사용한 대신에 5'-말단에 BamHI, 3'-말단에 SalI으로 대체하였다. 증폭된 산물은 제한효소 처리 후, ADH2-GPD hybrid promoter와 GAL7 terminator 사이에 클로닝하였다. ferritin 발현 cassette는 EcoRI, HindIII로 절단하여 *S. cerevisiae* 발현벡터에 클로닝하였다. 제조된 발현벡터는 electroporation으로 효모에 전달하였다. leucine, uracil 선택배지에서 생육하는 효모에 대해 PCR과 Southern blot을 통해 발현벡터의 형질전환 여부를 확인하였다. HL-ferritin의 동시 발현을 위해 H-ferritin이 integration된 재조합 효모에 L-ferritin이 클로닝된 YEp352를 형질전환하였다. ferritin의 발현여부와 철 결합능을 iron staining을 통해 확인하였다 .

3) 철 축적능

Ferritin 발현 효모를 ferric citrate를 함유하는 YEPD 배지에서 배양한 후 회수하였다. 회수된 효모는 세척한 후 건조하였다. 효모 내에 축적된 철분 함량을 atomic absorption spectrometry를 이용하여 정량하였다.

나. 결과 및 방법

1) 인간 ferritin 발현 *S. cerevisiae* 개발

인간 H-ferritin 유전자가 integration된 재조합 효모 (hFeHC)와 L-ferritin 유전자가 cloning된 episomal vector YEp352로 형질전환한 재조합 효모 (hFeLC)와 H-, L-ferritin 유전자가 모두 형질전환된 재조합 효모 (hFeHLC)를 Leu, Ura 선택배지에서 선발하였다. ferritin 유전자의 PCR과 Southern blot으로 확인하였다. Ferritin 발현 *E. coli*에서와 같이 열에 안정한 ferritin을 분획한 후 native-PAGE로 분리하였다. iron staining으로 철과 결합할 수 있는 형태로 ferritin이 결합하는 것을 확인하였다 (Fig. 14).

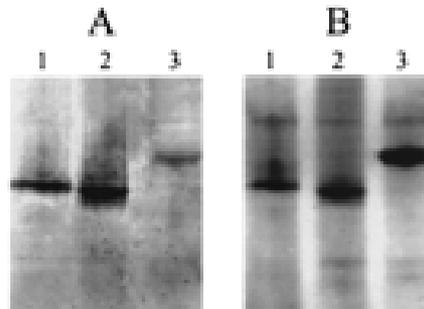


Fig. 14. Iron staining of isoferritins. (A) Prussian blue-stained native PAGE after preincubation of the cell extract of *S. cerevisiae* with 1 mM ferrous ammonium sulfate. (B) Coomassie blue-stained SDS-PAGE without preincubation. Lane 1, H homopolymer; 2, H-, L- heteropolymer; 3, L homopolymer.

2) 인간 ferritin 발현 *S. cerevisiae*의 철 축적능

인간 ferritin 발현 *S. cerevisiae*을 측정하기 위해 ferric citrate를 함유한 YEPD배지에서 배양한 후 철분 함량을 측정하였다. 모든 형태의 ferritin 발현 효모가 wild type보다 많은 철을 축적하였다 (Table 3). HL-ferritin 발현 효모가 가장 많은 철을 축적할 수 있었다. 또한, ferric citrate가 함유된 배지에서 wild type 보다 생육이 나은 것을 확인하였다.

Table 3. Atomic absorption spectrometry of intracellular iron content

strains	Fe-citrate (mM)	cfu/ml	iron content (mg/kg)
Wild type	0	$3.0 \cdot 10^8$	7.2
	20	$1.0 \cdot 10^8$	198
hFeHC	0	$2.9 \cdot 10^8$	6.7
	20	$1.5 \cdot 10^8$	521
hFeLC	0	$3.1 \cdot 10^8$	8.3
	20	$1.3 \cdot 10^8$	760
hFeHLC	0	$3.2 \cdot 10^8$	9.8
	20	$1.4 \cdot 10^8$	1023

4. 재조합 ferritin 발현 효모 대량배양

가. 재료 및 방법

1) 재조합 *P. pastoris* 유가배양

H-, L-ferritin 단독 발현한 재조합 *P. pastoris*는 동시 발현 재조합 *P. pastoris*와 비슷한 수준의 유기철을 함유하는 것으로 나타났다. 또한 동시 발현 *P. pastoris*의 재조합을 위해 사용된 2 copy의 homologous 부분은 재조합 유전자를 deletion시킬 수 있기 때문에 H- 및 L-chain 단독 발현 재조합 효모를 유가배양하여 ferritin의 발현량과 효모 내에 축적된 Fe 함량을 조사하였다.

100ml의 BMGY 배지 (yeast nitrogen base w/o amino acids 13.4 g/l, biotin 0.4 mg/l, glycerol 10 g/l)에서 전 배양을 하였다. 전 배양된 효모는 회수하여 antifoam agent (1%)와 casamino acid (1%)가 첨가된 1 L의 basal salts medium (Table 4)에 접종하였다. 배양은 30°C에서 550 rpm으로 수행하였다. 생육이 최대에 이르렀을 때부터 1g/l/h의 속도로 glycerol을 첨가하였으며 균체량이 30 g/l까지 배양하였다. 이 때에 초기 배양액의 1%가 되도록 casamino acid를 질소원으로 추가 공급하였다. 또한, ferritin 발현과 Fe의 축적을 위해 1ml/h의 속도로 methanol을 공급하였고 trace elements solution을 12ml/L methanol로 공급하였다. 100시간동안 유가배양을 수행하였고 24시간 마다 sampling 하여 SDS-PAGE와 Western blot을 수행하여 발현된 ferritin의 양을 측정하였다 .

Table 4. Formulation of media used for fed-batch cultivation

Basal salts medium	
Components	g/l or ml/l
H ₃ PO ₄ (85% w/v)	26.7
CaSO ₄	0.93
K ₂ SO ₄	18.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14.9
KOH	4.13
Glycerol	40
Ferric citrate	4.89
Casamino acid	10
Trace elements solution	
CuCl ₂ ·2H ₂ O	4.5
KI	0.09
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2
H ₃ BO ₃	0.02
CoSO ₄ ·7H ₂ O	1.08
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	42.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	65
biotin	0.2
H ₂ SO ₄	5

2) 재조합 *S. cerevisiae*의 대량배양

협동연구과제에의 수행을 위하여 재조합 *S. cerevisiae* hFeHLC를 대량배양하였다. 종균은 YNBCAD 배지를, 철 함유 효모 생산을 위해서 산업용 배지 구성 성분을 이용한 YPD 배지를 사용하였다. 종균 30L를 YPD 300L가 있는 발효조에 접종하고 제공된 공기를 1vvm의 속도로 공급하며 120rpm으로 진탕배양한 후, 배양 말기에 ferric citrate 20mM을 첨가하여 배양하였다. 배양 종료 후에 연속식 원심분리기를 이용하여 효모를 회수하고 물로 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 세척된 효모는 냉동건조하여 철 함유 효모분말을 제조하였다. 제조된 효모 분말의 철 함유량은 AAS 분석을 통해 확인하였다.

3) 재조합 *S. cerevisiae*의 유가배양

가) 재조합 *S. cerevisiae*의 유가배양

인간 ferritin 발현 재조합 *S. cerevisiae*의 유가배양을 위한 종균은 YNBCAD 배지 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids, 0.5% casamino acid, 2% glucose)를 사용하여 배양하였다. 유가배양을 위한 배지조성은 아래 Table 5와 같다. 종균 100 ml을 최초 배양 배지 900ml에 접종하고 DO stat를 통해 성장배지를 공급하였다. 발효말기에 ferric citrate를 공급하여 유기철 함유 효모를 생산하였다.

Table 5. Media compositions for fed-batch fermentations.

components	media (g/l)		
	initial	growth	production
glucose	5	400	
ferric citrate	-	-	20 mM
yeast extract	3	30	
casamino acid	-	5	
(NH ₄)SO ₄	3	40	
sodium citrate	0.2	1.8	
K ₂ HPO ₄	1.5	14.9	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	5.7	
trace solution	5 ml	10 ml	

나) 산업용 배지를 이용한 유가배양

종균 배양 배지로는 YNBCAD를 사용하였고, 본 배양 배지는 탄소원으로 당밀을 질소원으로 CSL을, 기타 성분으로는 (urea 0.03%, KH_2PO_4 0.004%, MgSO_4 0.02%, ZnSO_4 0.02%, biotin 0.0001%)을 함유하는 배지를 사용하였다. 발효조에 서의 회분배양은 10% 당밀, 5% CSL을 함유한 배지를 사용하였다. YNBCAD 평판배지의 colony를 10 ml YNBCAD 배지 함유 시험관에서 12 시간 배양 후 5% 당밀, 2% CSL 50 ml 배지에 접종 (5% v/v)하여 전배양 (30°C, 170rpm)하고 발효조에 접종하였다. 회분배양은 10% 당밀과 5% CSL 1 ℓ, 30°C에서 50% NH_4OH 를 사용하여 pH5.5로 조절하였다. 교반속도의 조절로 용존산소를 초기 공기포화의 30% 이상으로 유지하였고 통기속도는 2 vvm으로 유지하였다.

유가배양에서는 10% 당밀과 5% CSL을 함유하는 기본 배지로 9 시간 회분배양 후 20mM ferric citrate를 포함한 농축배지 (30% 당밀, 15% CSL을 100 ml)를 공급하였다. 간헐적 유가배양에서는 농축배지를 7번 공급하였다. 초기 배양액 부피는 1 ℓ, 통기속도는 3 vvm, 교반속도는 초기 공기포화의 20% 이상, pH 5.5로 유지하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 재조합 *P. pastoris* 유가배양

glycerol을 탄소원으로 사용한 유가배양을 통해 고농도를 배양을 하였고 정지기에 들어서서는 초기에 methanol을 공급하여 ferritin의 발현을 유도하였다. L-ferritin은 methanol 첨가에 의해 발현되기 시작하여 배양 말기에 95mg ferritin/g dry cell weight가 발현되었다 (Fig. 15). H-ferritin은 배양 말기에 25.7 mg ferritin/g dry cell weight가 발현되었다 (Fig. 16). 배양 종료 후, ferritin에 의해 효모 내에 축적된 철함량을 측정하였다. ferritin의 발현에 의해 철함량이 대조군보다 H-ferritin 재조합 효모는 9.6 배, L-ferritin 재조합 효모는 5.4 배 높은 것으로 나타났다. (Table 6). 배지 중에 첨가된 철의 세포 독성 효과가 발현된 ferritin에 중화, 축적되었기 때문인 것으로 생각된다. H-ferritin과 L-ferritin의 동시 발현은 batch culture로 수행하였으나 H-ferritin을 단독, 유가배양한 경우보다 많은 철을 축적하는 것으로 나타났다. 그러나, ferritin 유전자의 integration에 사용된 2 copy의 homologous 부위로 인해 ferritin 유전자의 결손을 우려하여 ferritin 발현 효모로는 사용하지 않았다.

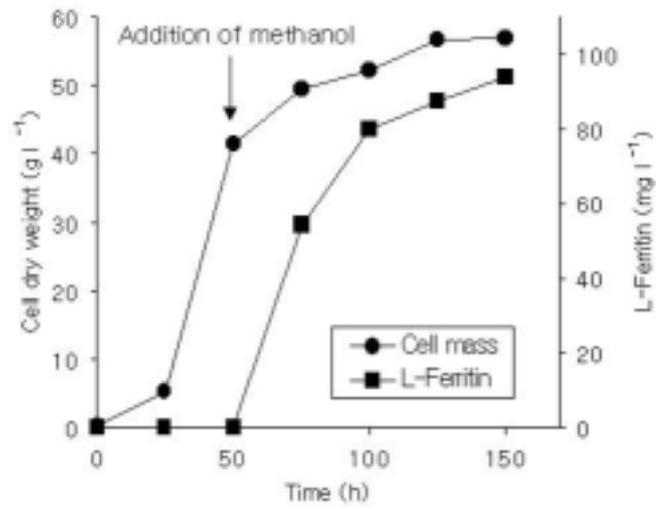


Fig. 15. Expression of L-ferritin and growth of transformant in fed-batch culture.

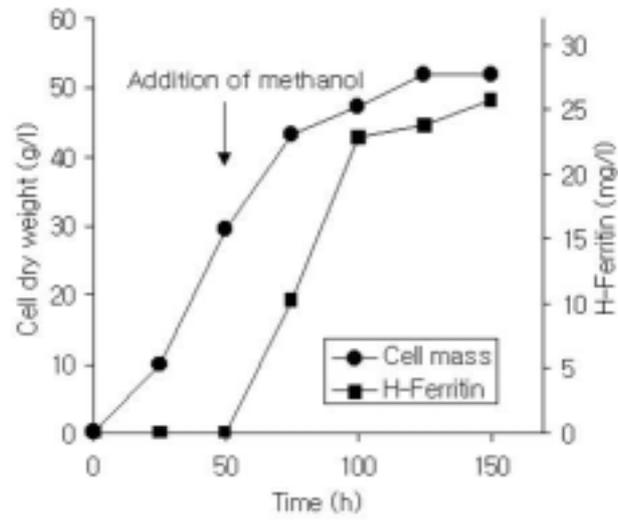


Fig. 16. Expression of H-ferritin and growth of transformant in fed-batch culture.

Table 6. Atomic absorption spectrometry analysis of iron content

Transformant	Fe-citrate concentration mM.	Iron content (mg/kg)
Control	0	175±77
	20	314±58
H-ferritin	0	253±88
	20	3038±72
H-, L-ferritin [#]	0	235±73
	20	3451±95
L-ferritin	0	248±68
	20	1695±85

[#]: result from batch culture

2) 재조합 *S. cerevisiae*의 대량배양

300L 대량배양은 YPD 배지를 사용하였으며 배양 말기에 ferric citrate를 첨가하여 유기태 철을 함유하는 효모를 생산하였다. 배양을 종료하고 연속식 원심분리기를 이용하여 상정액 및 균체를 분리하고 세척하여 열풍건조 및 냉동건조하여 분말로 제조하였다. 건조된 유기태 철 함유 효모는 5.58 kg이었으며 철 함량은 약 2,900 mg/kg이었다. 제조된 효모 분말은 협동연구과제의 사양실험을 위해 제공하였다.

3) 재조합 *S. cerevisiae*의 유가배양

Yeast extract와 포도당을 배지로 이용한 DO stat. 방식의 유가배양으로 76g/l의 세포농도와 2,800ppm/g DCW의 유기태 철분을 생산할 수 있었다.

당밀 10%와 CSL 5%의 배지로 회분배양을 한 결과, 12시간 배양 후 최대 세포 농도 18.6 g/l을 얻을 수 있었다. 대수증식기 구간 (3-6시간)에서 최대 비증식속도 (μ_{max})를 보이며 0.31h⁻¹이었다. 증식수율은 ($Y_{x/s}$)은 0.47 g/g-sugar였다. 이러한 발효변수를 이용하여 기질소모 속도 ($q_s = \mu_{max}/Y_{x/s}$)를 계산하고 유가배양에서의 기질공급 속도 결정에 이용하였다.

당밀과 CSL을 이용한 간헐적 유가배양으로 42.7 g/l의 세포농도와 2,900 ppm/g DCW의 유기태 철분을 생산할 수 있었다. 간헐적 유가배양에 의해 유기태 철분의 함량은 회분배양과 비슷하였으나 효모의 고농도 배양을 통해 배지의 경제성과 함께 생산성을 제고할 수 있었다. 그러나, 보다 다양한 기질 공급 속도와 기질 공급 방식을 통해 보다 높은 수율의 고농도 배양이 필요할 것으로 판단된다.

5. 발현된 인간 페리틴의 특성

가. 재료 및 방법

1) 인간 페리틴의 정제

인간 페리틴을 상기와 같이 발현한 *P. pastoris*를 회수하여 glass bead를 이용하여 파쇄하였고 원심분리하여 수용성 인간 페리틴을 함유하는 상정액을 회수하였다. 열에 불안정한 단백질을 72°C에서 10분간 가열하여 제거한 후, (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 80% 농도까지 침출하는 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질은 20 mM Tris-Cl (pH7.4)를 사용하여 투석하였다. 염이 제거된 단백질 분획은 Mono-Q를 사용하여 FPLC로 분획하였다. 페리틴 분획은 SDS-PAGE로 분리한 후 Western blot을 수행하였다.

2) 발현된 페리틴의 철결합능

정제된 human ferritin의 철과의 결합속도를 알아보기 위해 페리틴보다 1,000배 많은 Fe (II) (pH7.0)과 배양하여 310nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) Ferritin의 glycosylation

H-ferritin은 21, 21.5, 22 kDa의 3 band를 보였으며 (Fig. 17) L-ferritin은 19, 21 kDa의 2 band를 보였다 (Fig. 18). 이러한 분자량 차이는 단백질 발현 후의 당과의 결합으로 추정된다. 이를 확인하기 위하여 glycosylation을 억제하는 tunicamycin을 첨가하여 페리틴을 발현하였다. Tunicamycin의 첨가에 의해 H-, L-ferritin은 각각 23, 21 kDa의 하나의 band로 나왔다 (Fig. 19, 20).

2) 발현된 ferritin의 철결합능

정제된 human ferritin의 철과의 결합속도를 알아보기 위해 페리틴보다 1,000배 많은 Fe (II) (pH7.0)과 배양하여 310nm에서 흡광도를 측정하였다. 초기 결합속도는 H-ferritin이 높았으나 H-, L-heteropolymer ferritin이 보다 많은 철과 결합할 수 있음을 알 수 있었다. L-ferritin은 철과의 결합 속도가 매우 느린 것으로 나타났으나 시간이 경과하면 H-ferritin과 비슷한 수준으로 결합하는 것으로 나타났다 (Fig. 21).

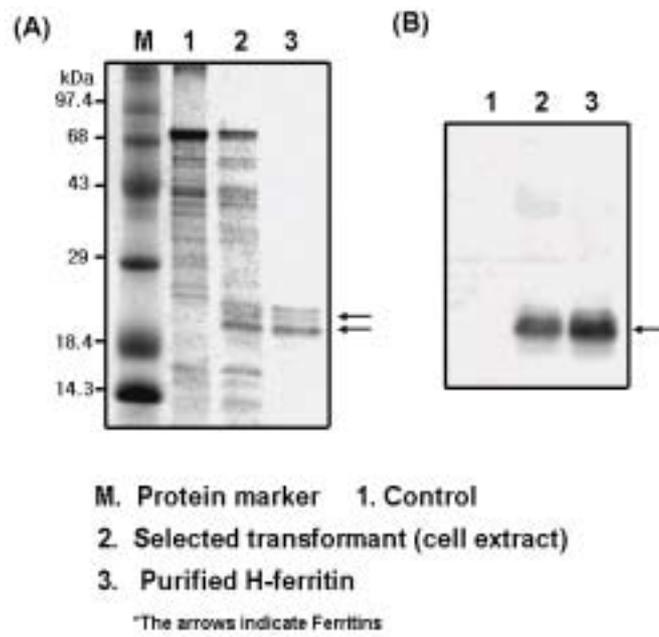


Fig. 17. Purification of H-Ferritin. A: SDS-PAGE, B: western blotting.

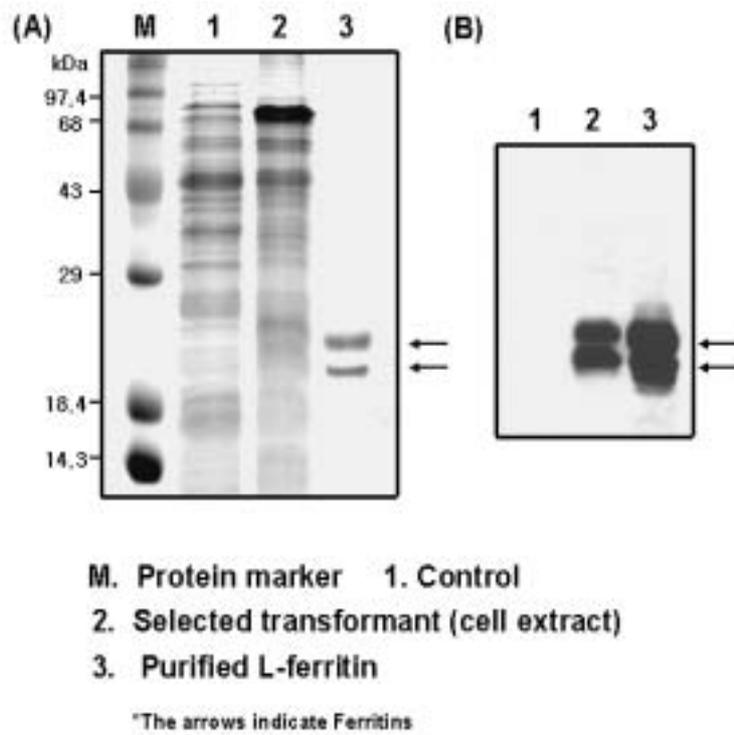


Fig. 18. Purification of L-Ferritin. A. SDS-PAGE, B. western blotting.

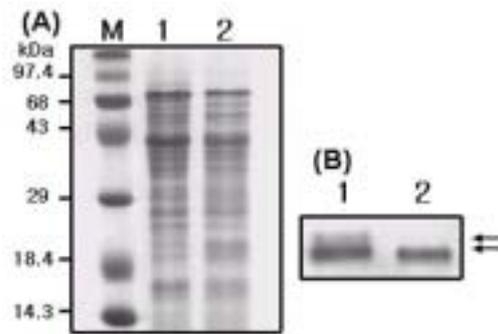


Fig. 19. Characterization of expressed H-Ferritin without (lane 1) or with (lane 2) tunicamycin. A, SDS-PAGE; B, Western blot

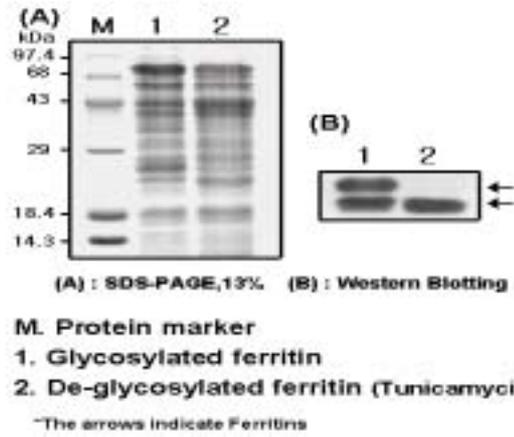


Fig. 20. Characterization of expressed L-Ferritin without (lane 1) or with (lane 2) tunicamycin. A, SDS-PAGE; B, Western blot.

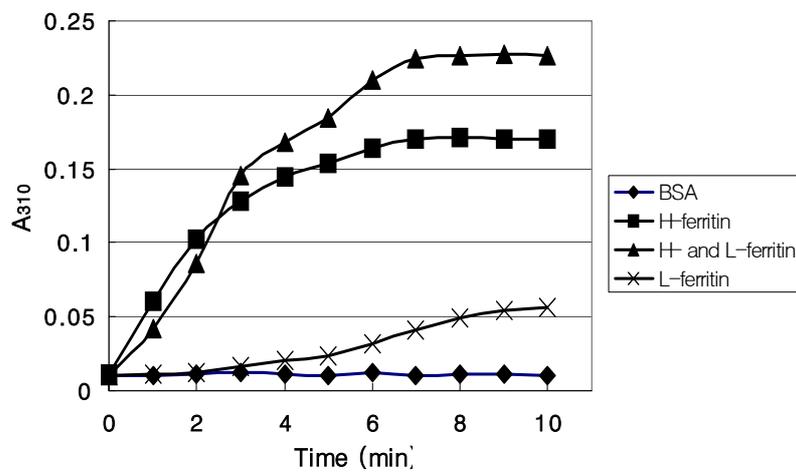


Fig. 21. Iron uptake analysis of purified recombinant ferritin.

제 2 절 철분 강화용 효모 선발 및 개량

1. 유기철 고함유 효모 균주 선발

가. 재료 및 방법

1) 사료제 이용성 효모 조사

사료첨가제에 활용할 수 있는 효모를 탐색하기 위해 문헌조사 및 균주은행(KCTC)에서 균주를 탐색하고 각 효모 종들의 genotype, phenotype, 및 배지 이용성 등의 특징을 파악하였다. 이 중 유기철 단백질을 효모 균체 내에서 생산하기 적합한 여러 종류의 효모를 최종 선별하였고 균주 확보는 본 연구진에서 소유하고 있는 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*의 wild-type과 mutant 균주를 사용하였다.

2) 최적배지 선별

선발된 효모의 최적 배지조건을 찾기 위해 효모가 증식할 수 있는 기본배지 및 최소배지를 조제하였다. 기본배지로는 YPD(Yeast extract, Peptone, Dextrose)와 YM (Yeast extract, Malt extract, Tryptone, Dextrose)배지를 제조하였고 최소배지로는 YMM (Yeast nitrogen base without A.A, Amonium sulfate, Casamino acid, Dextrose)배지, BMGY(Yeast nitrogen base, Biotin, Potassium phosphate, Glycerol) 배지를 각각 제조한 다음 2가와 3가의 무기 철을 다른 농도별로 순차적으로 첨가하여 액체배지 및 고체 배지를 만들었다. 선발된 효모를 위의 언급한 방법으로 활성 시킨 다음 비선별 대조구와 비교하여 기본배지 및 최소배지에 접종하고 일부 고체배지에 도말하였다. 이 때 철의 농도를 달리한 각각의 배지에서 시간별로 균체 증식곡선을 만들어 균체량을 확인하였고, 고체배지에서의 효모 군집 (Colony)의 생성과 크기를 확인하여 최적 배지조건을 선별하였다.

3) 유기철 함유 효모의 선별

선택된 효모 균주를 철이 첨가된 배지에서 배양하기 앞서 YPD배지에서 활성화시켰다. 활성화된 균체를 포집하여 철 함유 배지에 접종하고 배지에 사용되는 철은 ferrous sulfate 또는 ferric citrate를 이용하였다. 효모의 배양은 ferrous sulfate 또는 ferric citrate을 농도별로 첨가하였고, 여기에 배양된 효모를 접종하고 30℃에서 10시간 배양하였다. 효모 내에 함유된 철의 측정은 배양액을 원심분리시켜 철분을 함유하는 균체를 수확하고 흡수되지 못한 무기철분을 증류수로 3회 세척한 후 원심분리하여 유기체 표면에 잔류하는 철을 완전 제거한 후 분석하였다. 이에 따라 고농도의 철이 첨가된 조건하에서 균체내로의 철 유입량이 가장 우수한 균주를 선발하였다.

4) 원자흡광분석기(Atomic absorption spectrometer) 이용 분석

선택된 사카로마이세스 및 발현된 피키아 균체내의 철 함량을 측정하기 위해 AAS (Atomic Absorption Spectrometry) 분석 방법으로 정량하였다. 효모 균체를 포집하여 3차 증류수로 2번 washing한 다음 50℃에서 48시간동안 건조 후 샘플 당 1g을 취하였다. 준비된 샘플에 10ml의 HClO₄, 2ml의 HNO₃를 넣은 후 부유물이 없어질 때까지 약 10-15min 가열하고, 물 20ml정도를 다시 넣어 가열시킨 다음 3MM paper에 여과하였다. 이것에 3차 증류수를 채워 100ml이 되도록 한 후 5ml을 취하여 Atomic Absorption Spectrometer에 주입하여 ppm단위로 철분 함량을 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 사료제 이용성 효모 조사 및 확보

사료첨가제에 활용할 수 있는 효모를 탐색하기 위해 문헌조사 및 균주은행(KCTC)에서 균주를 탐색하고 각 효모 종들의 genotype, phenotype, 및 배지 이용성 등의 특징을 파악했다. 이 중 유기철 단백질을 효모균체 내에서 생산하기 적합한 여러 종류의 효모를 최종 선별했고 균주 확보는 본 연구진에서 소유하고

있는 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*의 wild-type과 mutant 균주를 사용했다. 균주 목록은 Table 7에 정리하였다.

2) 철분 고함유 효모 생산을 위한 최적배지 선별

선발된 효모를 위의 언급한 방법으로 활성화 시킨 다음 비선별 대조구와 비교하여 기본배지 및 최소배지에 접종하고 일부 고체배지에 도말 시킨 결과, 2가의 철인 경우 모든 배지에서 착물이 생겼고 3가의 철은 단지 최소배지의 경우에만 철과 결합하여 착물이 생겼다. YPD 배지의 경우 액체배지에서 균체가 자라며 서로 뭉쳐 배지 조건으로 부적합하였다. YM 배지의 경우 철이 50mM 이상 까지 녹아도 3가의 철일 경우 착물이 없었으며 균체 또한 잘 자라 YM 배지와 3가 철인 ferric citrate를 본 실험의 배지로 결정하였다.

Table 7. List of yeasts used in this study.

<i>Pichia pastoris</i>	GS115	KM71	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC 7924	KCTC 7928	KCTC 7919
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	fet3 (mutant)	FET3/FTR1 (mutant)	YPH449 (wild type)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFRI 00122	KFRI 01015	KFRI 00147
	KFRI 01014	KFRI 00124	KFRI 00631

3) 유기철 함유 효모의 선별

본 연구진이 보유하고 있는 균주 중 유기철 단백질을 효모균체 내에서 생산하기 적합한 효모를 선택하기 위해 각각의 균주를 고농도 철을 함유한 배지에서 길러 균체들이 얼마만큼의 철을 함유하는지 측정하였다.

우선 각각의 균주를 YM배지에서 활성화시킨다. 활성화된 균체들을 포집하여 0 mM, 20 mM의 ferric citrate를 넣은 철 함유 배지에 접종한 후 30℃에서 240rpm으로 10시간 배양하였다. 이렇게 배양한 균주들에 함유된 철의 양을 AAS (Atomic Absorption Spectrometry) 분석 방법을 통해 측정하기 위해 각각의 배양액을 원심분리시켜 철분이 함유된 균체들을 수확하고 흡수되지 못한 무기철을 씻어내기 위해 50 ml의 H₂O로 3회 세척한 후 원심분리하여 균체 표면에 잔류하는 철을 완전히 제거하였다.

위와 같은 방법으로 고농도의 철이 첨가된 조건하에서 균체내로의 철 유입량이 가장 우수한 균주(*Saccharomyces cerevisiae* :KCTC7928)를 선발하였다 (Table 8).

Table 8. The amount of iron in yeast

Samples	ppm ¹	Samples	ppm
fet3 2000ppm ²	511.3	KCTC7924 2000ppm	4593.6
fet3 0ppm	151.9	KCTC7924 0ppm	487.7
FET3/FTR1 2000ppm	703.3	KCTC7919 2000ppm	4170.4
FET3/FTR1 0ppm	520.9	KCTC7919 0ppm	907.5
YMP449 2000ppm	999.2	KCTC7928 2000ppm	5589.2
YMP449 0ppm	452.4	KCTC7928 0ppm	111.0
KM71 2000ppm	1544.3	GS115 2000ppm	1748.4
KM71 0ppm	418.5	GS115 0ppm	397.5

1균체 내 철함량 2배지 내 철함량

2. 철분 고함유 균주 개량 및 생화학적 특성

가. 재료 및 방법

1) 우수 균주를 선별하기 위한 균주의 mutation

고농도의 유기철을 함유할 수 있는 균주로 개량하기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*의 mutant 빈도를 높일 수 있는 EMS(ethyl methanesulfonate)를 이용하여 mutagenesis를 수행하였다. EMS(sigma) 처리 시 균체 수는 6.2×10^8 cells로 EMS 50ul를 넣어 90분 처리하였으며 EMS 처리에 의한 균체 lethality가 약 70%가 되도록 하였으며 EMS 처리 후 YM 고체배지에 100~200개 정도의 균수가 되도록 고르게 도말한 후 30°C에서 이틀 정도 배양하였다.

2) 변이주의 다른 금속이온에 대한 영향 조사

실험에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양조건은 기본적으로 YM배지를 사용하였으며 액체배지의 조성은 0.3%(w/v) yeast extract, 0.3%(w/v) malt extract, 1%(w/v) glucose, 0.5%(w/v) peptone이고 고체배지는 YM배지에 agar를 첨가하였다. YM 액체 배지에 균체를 배양하였으며 파장 600 nm에서 흡광도 0.4가 될 때 철 공급원으로 ferric citrate (Sigma)를, 구리 공급원으로 Cupric sulfate (Sigma)를 첨가하였고 배양조건에 따른 각 배지에 대한 철과 구리의 첨가농도는 Table 9에 나타내었다.

배양 조건 A-I의 경우 wild type과 mutant type을 각각 철 20 mM이 첨가된 YM배지에 1/200으로 접종하여 30시간동안 30°C 260 rpm에서 배양하였고 A-II의 경우 mutant type 한 가지 균체를 desferrioxamine(DFO) 100 μ M이 첨가되어 chelating으로 미량의 철도 제거한 배지와 철 20 mM이 첨가된 배지로 두 가지 배지에 접종하여 배양하였고 아하 조건을 A-I과 같이 하여 철 대사에 대한 변화를 좀 더 살펴보았다. 마지막으로 B는 구리 50 μ M이 첨가된 배지에 wild type과 mutant type을 각각 배양하였으며 역시 배양 조건은 A-I과 같게 하였다.

Table 9. Condition of iron and copper and inoculation strain in each media.

Media type	Concentration of added metals and inoculated strain	
	Wild type strain (KCTC 7928)	Mutant type strain (S22-47)
A- I	Fe 20 mM	Fe 20 mM
A- II	x	Fe 20 mM DFO 100 μ M
B	Cu 50 μ M	Cu 50 μ M

3) 이차전기영동방법을 이용한 변이주의 특성규명

가) 이차전기영동 시료 준비

250 ml삼각플라스크에 담긴 50 ml의 YM배지에 1/200량으로 균체를 접종하고 A-I, A-II, B 각 배양조건의 철과 구리를 첨가하여 30시간 동안 30°C 260 rpm에서 배양하였다. 진탕배양된 균체를 6,000 rpm에서 15분간 원심 분리로 포집하여 3회 이상 증류수로 세척하고 2-DE 시료 처리를 하였다. 포집된 효모 중 건조중량 10~20 mg의 균체를 1.5 ml microtube에 담아 400 μ l의 sample buffer (100 mM Tris-Cl pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)와 함께 10초씩 6번의 sonication(Ultrasonic vcx400; Sonic & Material INC)을 하였다(12, 13, 14). 여기에 1 ml의 lysis buffer(7 M Urea, 2 M Thiourea, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 4% CHAPS, 0.5% IPG buffer and 1% DTT)를 첨가하고 30분간 실온에서 혼합하고 15,000 rpm 4°C로 30분간 원심분리하여 상층액을 새로운 1.5 ml microtube에 옮겨준다(15). 차가운 acetone과 시료용액을 4:1의 비율로 혼합하여 -20°C에서 3시간 이상 침전시키고 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 acetone을 휘발시켜 단백질을 남긴다(16, 17). 다시 30 μ l의 lysis buffer를 첨가하여 녹이고 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 새로운 1.5 ml microtube에 옮기면 시료가 완성된다. 완성된 시료는 -70°C에 보관한다. 시료 준비가 완성되면 추출된 단백질을 정량 하였다. protein assay kit(Bio-Rad)을 사용하여 정량하고 kit 표준 사용 방법을 준수하여 수행하였다.

나) Isoelectric focusing (IEF)

2-dimensional electrophoresis 중 첫 번째인 isoelectric focusing은 정량을 마친 sample과 rehydration solution (8 M urea, 2% CHAPS, 0.2% DTT 그리고 0.5% IPG buffer)을 혼합하여 단백질 300 μ g에 최종 부피 350 μ l를 실온에서 30분 교반시키고 strip-holder에 분주하여 IPG-strips (Immobiline Drystrip, pH4-7, 18 cm, Amersham Pharmacia Biotech)을 올려준 후에 20°C에서 30 V 6 hr, 150 V 1 hr, 300 V 1 hr, 600 V 1 hr, 5,000 V 4 hr 그리고 5,000 V 10 hr의 단계로

최종 70,000 V를 기준으로 하여 IPG-Phor (Amersham Pharmacia Biotech)에서 focusing하였다.

다) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

Isoelectric focusing을 마치고 IPG strip을 equilibration solution(50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS)에 실온에서 30분간 교반하고 2-dimensional electrophoresis의 두 번째 인 SDS-PAGE는 12% acrylamide gel을 사용하였으며 조성은 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide, 1.5 M Tris-Cl pH 8.8을 사용하여 두께 1 mm인 gel을 만들어 IPG strip을 loading하였다. 단백질 전기영동 장치는 Protean II xi set(Bio-Rad, USA)를 사용하였고 20 mA/gel로 running하였다.

라) Silver stain

SDS-PAGE의 단백질 spot의 염색은 silver staining의 한가지인 Silver stain PlusOne kit의 방법을 변형하여 사용하였다. 40% methanol과 10% acetic acid로 1시간 이상 fixing을 하고 장시간 fixing을 할 경우 3일 이내로 하며 fixing buffer를 교체해 주었다. 30% 에탄올로 20분씩 2번 세척해주고 다시 증류수로 20분 세척하였다. sensitizing에 0.02% sodium thiosulfate (sigma)를 1~2분 처리하고 증류수로 30초씩 2회 세척 후 silver reaction 에서 0.2% silver nitrate(sigma)와 0.02% formaldehyde를 혼합한 solution에 30분간 처리하였다. 다시 증류수로 1분씩 2회 세척하고 developing으로 2.5% sodium carbonate와 0.05% formaldehyde를 spot이 나타나는 정도를 살피며 반응시켰고 차가운 증류수로 1회 세척하고 마지막으로 stoping에 0.5% EDTA를 45분 처리하고 증류수로 세척하여 staining을 마치고 4°C에서 보관하였다.

마) 단백질 분석

2-dimensional electrophoresis를 통하여 나타난 gel 상에서의 단백질 spot은 균주 고유의 발현양상을 보이므로 finger printing이라 부른다. 한 균주를 두 개

의 다른 배양 조건에서 얻어진 finger printing 또는 같은 배양 조건에서 다른 균주에서 발견된 단백질들을 spot으로 확인하였으며 차이를 나타내는 spot들을 선별하여 gel에서 잘라낸다. gel 조각을 speed vacuum concentrator로 5분간 건조시키고 0.2 μg modified trypsin (Promega)를 포함한 50 mM ammonium bicarbonate 20 μl 에 담가 얼음에서 30분 동안 처리한다. 시약을 제거하고 다시 50 mM ammonium bicarbonate 30 μl 를 첨가하여 37°C에서 12시간 이상 정치하였다. 잔여 trypsin을 제거하고 C18 nanoscale (porus C18) column으로 염을 제거하였다. peptides는 matrix solution(70% acetonitrile, 0.1% TFA, 10 mg/ml alpha-cyano-4-hydroxycinamic acid) 0.8 μl 로 추출하여 stainless steel target plate에 loading하였다. Loading된 peptides는 MALDI-TOF mass spectrometer(Micromass)로 분석하고 NCBI database에서 *S. cerevisiae* peptides와 일치하는 것을 검색하여 어떤 단백질인지 밝혀냈다.

나. 결과 및 고찰

1) 최대 유기철 함유의 변이주 개발

선발된 고농도의 철이 첨가된 조건하에서 균체내로의 철 유입량이 가장 우수한 균주 (*Saccharomyces cerevisiae* :KCTC7928)를 이용하여 선발된 균주(KCTC7928)를 보다 고농도의 유기철을 함유할 수 있는 균주로 만들기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*의 mutant 빈도를 높일 수 있는 EMS(ethyl methanesulfonate)를 이용하여 mutagenesis를 수행하였다. 실험방법에 기술된 방법으로 EMS mutagenesis를 수행한 후 고농도 유기철을 함유할 수 있는 균주를 선택하기 위해 EMS를 처리 하지 않은 대조균이 자랄 수 없는 ferric citrate 40mM을 함유한 YM 고체배지에 replica를 찍어 일차적인 선별 작업을 하였다 (Table 10). 이들 YM 고체배지를 30°C에서 이틀정도 기른 후 40mM의 ferric citrate를 함유한 YM배지 상에서 대조균과 EMS 처리 균의 성장을 비교한 후 이차적 선별 방법인 AAS (Atomic Absorption Spectrometry) 분석을 위한 11개의 균주를 선별하였다 (Table 11).

Table 10. Replica numbers of yeast treated with EMS

Survival rate	KCTC7928(O.D=7.0/ survival rate 33%)			
Iron concentration (mM)	control		EMS Treated	
	0mM	40mM	0mM	40mM
Replica-plate	2EA	2EA	100EA	100EA
numbers	C1~2	C1~2	S1~100	S1~100
Colonies numbers	100EA	100EA	5000EA	5000EA
High growth capacity		0EA		*15EA
Medi growth capacity		0EA		*28EA
No growth capacity				*3EA

Table 11. Selection of mutant strains by growth capacity

Sample plate number	Replica EMS treated colonies numbers		
	High growth	Medi growth	Anti- growth
S2		1	
S3			
S4	26	40	
S6	13		
S7			
S8			
S9	24,44		
S10			¹ 48 (no growth)
S11	39,49	48,28,29	
S12		9,1,12,25,28	
S14		27	
S15	*27(high)	1,32	
S16			
S17			
S18		4,5	
S19		4,5,6	
S20		1	
S21		7	¹ 28(little)
S22	47	7,31	² 28
S23		38,42,39	
S35	*39(high)		
S37	49		
S40	44		
S53	40	35	
S68	6,30		
S73	42	26	
S89		43	

선택된 *Saccharomyces cerevisiae* mutant 15개의 균체내의 흡수된 철 함량을 측정하기 위해 AAS (Atomic Absorption Spectrometry) 분석 방법으로 정량하였다. 효모 균체를 포집하여 3차 증류수로 3번 washing한 다음 50℃에서 48시간동안 건조 후 샘플 당 0.04g을 취하였다. 준비된 샘플에 2ml의 HClO₄, 4ml의 HNO₃를 넣은 후 산에 의해 균체가 분해되어 부유물이 없어질 때까지 약 10-15min 가열하고, 물 20ml정도를 다시 넣어 다시 한번 가열시킨다. 이것에 3차 증류수를 채워 100ml이 되도록 한 후 3MM paper에 여과하였다. 5ml을 취하여 Atomic Absorption Spectrometer에 주입하여 ppm단위로 11개의 mutant 내의 철의 함량을 측정하였다 (Table 12).

이상에서 선별된 효모 mutant 가운데 S4-26, S15-27, S35-39, S22-47 등이 우수한 철 결합 품종으로 얻을 수 있었으며, S22-47을 선택하여 추후 실험을 진행하였다.

Table 12. The amount of iron in yeast mutant.

samples	0mM	10mM	20mM
	Iron con.	Iron con.	Iron con.
wild	333.75	4339.75	8250
S4-26	404.50	5223.50	14400
S6-13	159.50	3432.25	13750
S9-24	82.25	4837.25	14500
S11-39	80.75	4850.00	17925
S15-27	524.75	5460.00	13175
S22-47	649.00	5350.00	10025
S35-39	665.50	5300	9850
S37-49	227.50	4162.50	10075
S40-44	297.00	5555.00	14800
S53-40	30.25	4424.75	13975
S73-42	9.25	5724.75	13275

3) 유기철이 포함된 변이종의 특성 규명

가) 무기철이 함유된 배지에서의 생육특성

대조구인 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7928과 철 효모 mutant S22-47의 각각 철 20 mM이 첨가된 배지에서 배양한 A-I의 경우 일반 YM배지에서 배양한 경우보다 약 $\text{Log}(\text{cell}/\text{ml})$ 0.25의 차이로 낮은 성장속도를 보였으며 균주별로는 두 가지 배지에서 모두 wild type이 높은 성장력을 보였으나 최종 배양 종료 후에는 $\text{Log}(\text{cell}/\text{ml})$ 0.2 미만의 차이를 보였다. 철 0 mM과 철 20 mM의 배지에서 배양 시 성장곡선을 Fig. 22에 나타내었다.

또한, 구리 50 μM 을 첨가한 배지에 wild type과 mutant type을 각각 배양하고 그에 따른 성장곡선을 Fig. 23에 나타내었으며 첨가물이 없이 YM 배지에 배양하였을 경우와 매우 유사한 성장속도를 보였다.

배지 내에 철과 구리의 농도가 증가하는 것에 따라 yeast의 생장이 저해되었으며 구리는 철에 비해 낮은 농도에서도 더욱 강력한 성장억제력을 보였다. 내성을 가진 균주를 선별할 때에는 성장할 수 있는 최대 농도를 찾아야 하지만 철과 구리의 함량은 생장이 저해 받지 않는 최대 농도에서 실험을 수행하여 생산성을 고려하였다.

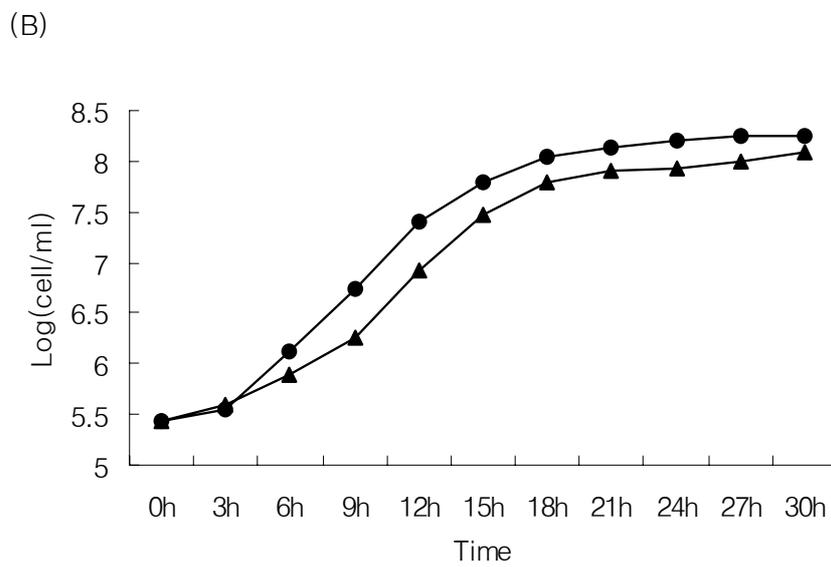
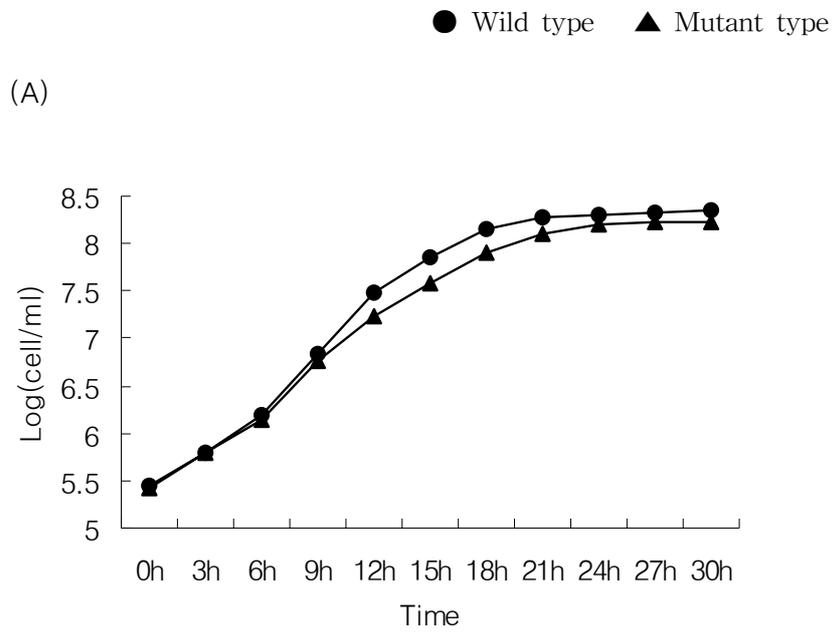


Fig. 22. Growth curves of wild type and mutant type grown in YM media containing (A) Fe 0 mM and (B) Fe 20 mM. ● : *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7928, ▲ : Mutant type S22-47

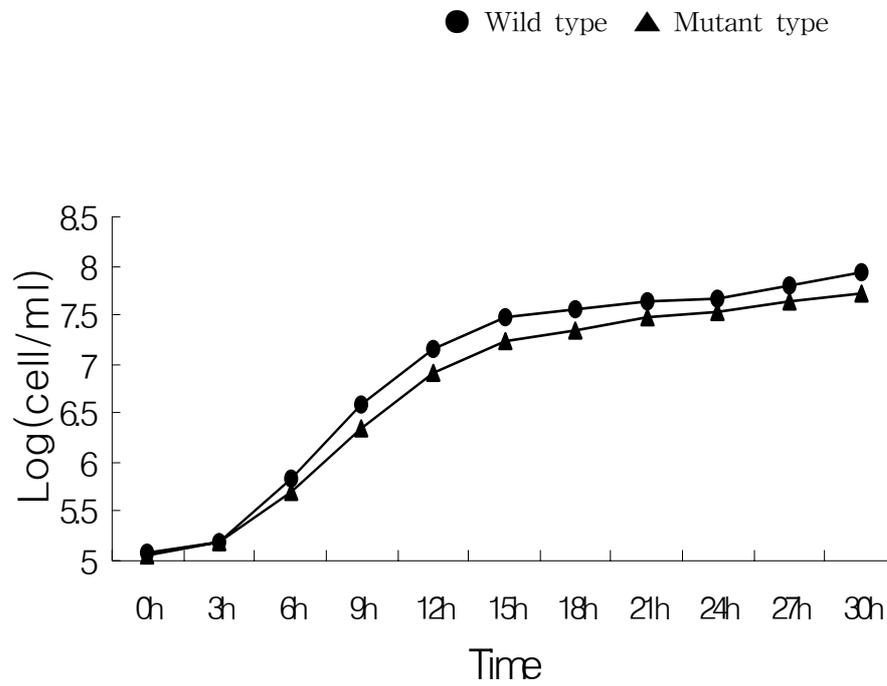


Fig. 23. Growth curves of wild type and mutant type grown in YM media containing Cu 50 μ M. ● : *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7928, ▲ : Mutant type S22-47

나) 효모내 철과 구리의 농도 측정

측정해야 할 물질에 따라 배양조건을 분류한다면 철의 함량을 측정해야하는 A-I, A-II와 구리의 함량을 측정해야 하는 B로 나눌 수 있다. 우선 철의 함량을 측정한 A-I의 경우 control로 철을 첨가하지 않은 YM배지에서 Atomic absorption spectrometer (AAS)를 이용하여 측정한 철의 농도는 wild type에서 334 $\mu\text{g/g}$ 이고 mutant type에서 310 $\mu\text{g/g}$ 으로 wild type이 높았지만 철 20 mM이 첨가된 배지에서는 wild type이 6,250 $\mu\text{g/g}$ 이고 mutant type이 15,925 $\mu\text{g/g}$ 으로 mutant type이 약 2.5배가 높았다.

구리의 함량을 측정한 B의 경우는 control인 YM배지에서 배양한 wild type이 4 $\mu\text{g/g}$, mutant type이 21 $\mu\text{g/g}$ 로 구리를 함유하였으며 구리 50 μM 을 첨가하여 배양한 wild type이 198 $\mu\text{g/g}$, mutant type이 330 $\mu\text{g/g}$ 로 mutant가 약 1.7배 높은 함량을 보였다. 그리고 생장곡선에 나타내지는 않았지만 구리 50 μM 의 보다 저조한 성장률을 보인 구리 100 μM 배지에서 배양된 yeast의 AAS 결과를 볼 때 구리함량은 mutant type이 792 $\mu\text{g/g}$ 로 더 높았지만 생산량을 고려할 때 구리 50 μM 에서 더 많은 균체를 얻을 수 있으므로 이 농도를 실험에 사용하였다. A-I, A-II, B 각각의 경우에 맞추어 Fe과 Cu의 농도를 측정한 결과는 다음 Table 13, Table 14에 나타내었다.

Table 13. Atomic absorption spectrophotometry of intracellular iron content. a : *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7928, b : Mutant type S22-47, c : Unit ($\mu\text{g/g}$)

Concentration of metalin Medium	Sample
	Mutant type ^b
Control ^a	310±36 ^c
Fe 20 mM	15,925±2,023

Tables 14. Atomic absorption spectrophotometry of intracellular iron

Copper Concentration in Medium	Samples	
	Wild type ^b	Mutant type ^c
Control ^a	4 ^d ±1.5	21±8
Cu 50 µM	198±11	330±17
Cu 100 µM	939±17	792±25

content. a : Cu 0 µM, general YM media. b : *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7928, c : Mutant type S11-39, d : Unit (µg/g)

다) Two-dimensional electrophoresis 와 Image 분석

앞에서 살펴본 바와 같이 *S. cerevisiae*는 철과 구리를 흡수·저장하는 대사과정을 가지고 있으며 환경에 따라서 흡수되는 철과 구리의 양이 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 철과 구리의 대사가 조절되는 것을 좀더 자세히 알아보기 위하여 2-DE를 수행하였고 이를 통하여 대사에 관여하는 다양한 단백질들의 발현 변화를 찾아 볼 수 있기를 기대하였다.

2-DE는 pH 3-10의 범위에서 시작하였고 pH 4-7에서 좀더 많고 선명한 spots를 확인할 수 있어서 실험에 이용하는 pH범위를 4~7로 하였다. staining은 초기에 Coomassie blue를 사용하였으나 후에 감도가 뛰어난 silver staining angelica법을 사용하게 되었다. 2-DE gel에서는 변성이나 실험의 오차에 영향을 받는 것을 고려하여 gel의 중앙에 가까울수록 신뢰도가 높으며 본 연구에서는 분자량의 크기가 200~12 Kda 내에 있으며 strip의 양끝 5 mm인 strip holder의 전극이 접하는 부분의 안쪽을 신뢰구간으로 하였다. 재현성에서는 최소 3회 이상 동일한 위치에 동일한 발현 정도를 보이는 것만을 분석하였으며 철 또는 구리가 첨가된 경우의 2-DE 결과를 우선하여 분석하였다.

우선 철 20 mM에서 배양한 wild type과 mutant type의 2-DE 결과는 Figure 5에 나타내었으며 두 gel을 비교하여 차이가 나는 spot들 중 대표적인 것들을 2-D 프로그램을 이용하여, 신뢰성이 있게 차이를 보이는 것 10개의 spot에 대하여 MALDI-TOF 분석을 수행하였다.

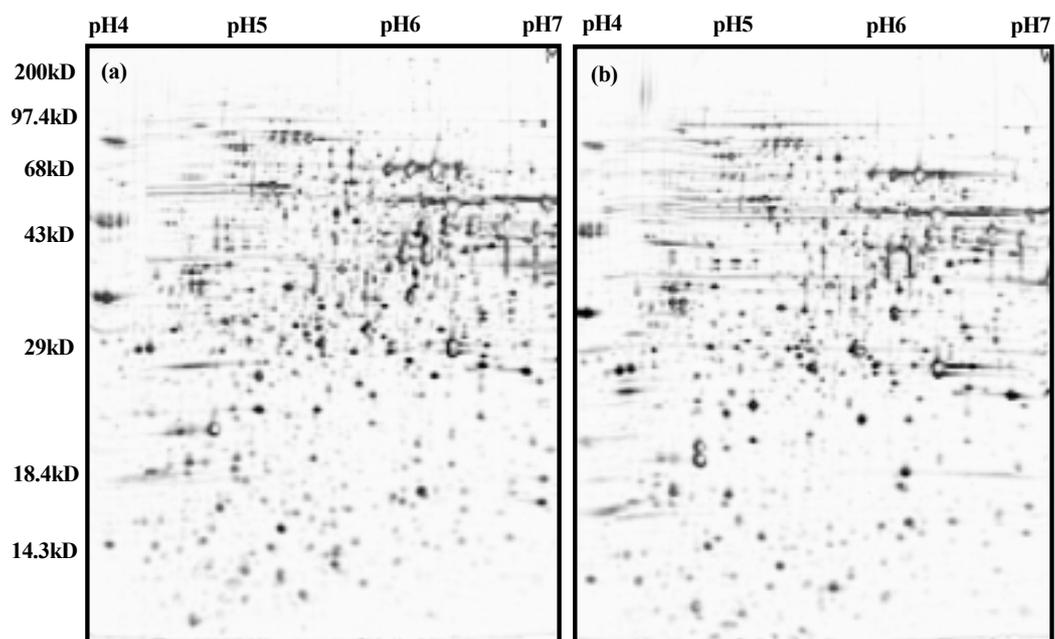


Fig. 24. 2-DE gel of protein extract obtained from *Saccharomyces cerevisiae*.(a) Silver stained 2-DE gel of proteins extracted from mutant(S22-47), (b) Silver stained 2-DE gel of proteins extracted from wild type(KCTC7928)

④ MALDI-TOF 분석 결과

2-DE를 통하여 확인한 발현이 달라진 단백질 spot들의 명확한 규명을 위하여 elution과 trypsin digestion의 전처리를 거쳐 MALDI-TOF mass spectrometer (Micromass)분석을 하였고 기기 보정은 trypsin auto digestion product(2211.105 m/z)를 사용하였다. MALDI-TOF 결과는 peptides 그래프로 나타나며 data를 단백질 sequence 형태로 전환하고 NCBI database의 단백질 sequence와 비교하여 일치도를 평가한다. 가장 높은 일치도를 보이는 단백질부터 우선순위를 부여하고 각 순위별 단백질의 data를 링크시켜 ProFound table로 나타낸다. 결과 그래프의 예를 Fig. 25에 그리고 ProFound의 예를 Fig. 26에 나타내었다.

철 20 mM에서 배양한 wild type과 mutant type의 최종 결과는 Table 15에서 볼 수 있듯이 10번 spot이 철과 구리의 대사에 대표적 단백질인 H48c Yeast Cu(Ii)Zn superoxide dismutase (SOD)로 밝혀졌으며 이것은 toxic superoxide radical을 제거하는 antioxidant defence mechanism 기능을 한다.

2번 spot인 Enolase (2-Phospho-D-Glycerate Hydrolase; ENO1)는 기본적으로 carbohydrate metabolism의 기능을 하지만 한편으로는 산화와 삼투압에 의한 스트레스에 반응하여 발현량이 증가하고 Mg(II)와 Zn(II)에 의해서 활성화되며 phosphoglycolate에 의해서 저해된다.

3번 spot인 Pyruvate decarboxylase (PDC1p)는 carbohydrate metabolism에 관여하는 효소이지만 *S. cerevisiae*가 스트레스를 받을 때 발현하는 단백질들에 대한 연구결과에서 스트레스가 발현 원인인 단백질들과 함께 발현되는 단백질로 스트레스와 관련이 있는 것으로 예상된다.

이밖에도 아직 기능이 알려지지 않은 6번과 1차대사에 관여하는 7번 spot 등이 결과로 나왔다.

이러한 철의 축적과 연관된 관련된 단백질들은 유전학적, 분자생물학적 기술을 사용하여 mutant를 제조하여 철 저장을 향상시킬 수 있는 효모개발에 이용될 수 있을 것이다.

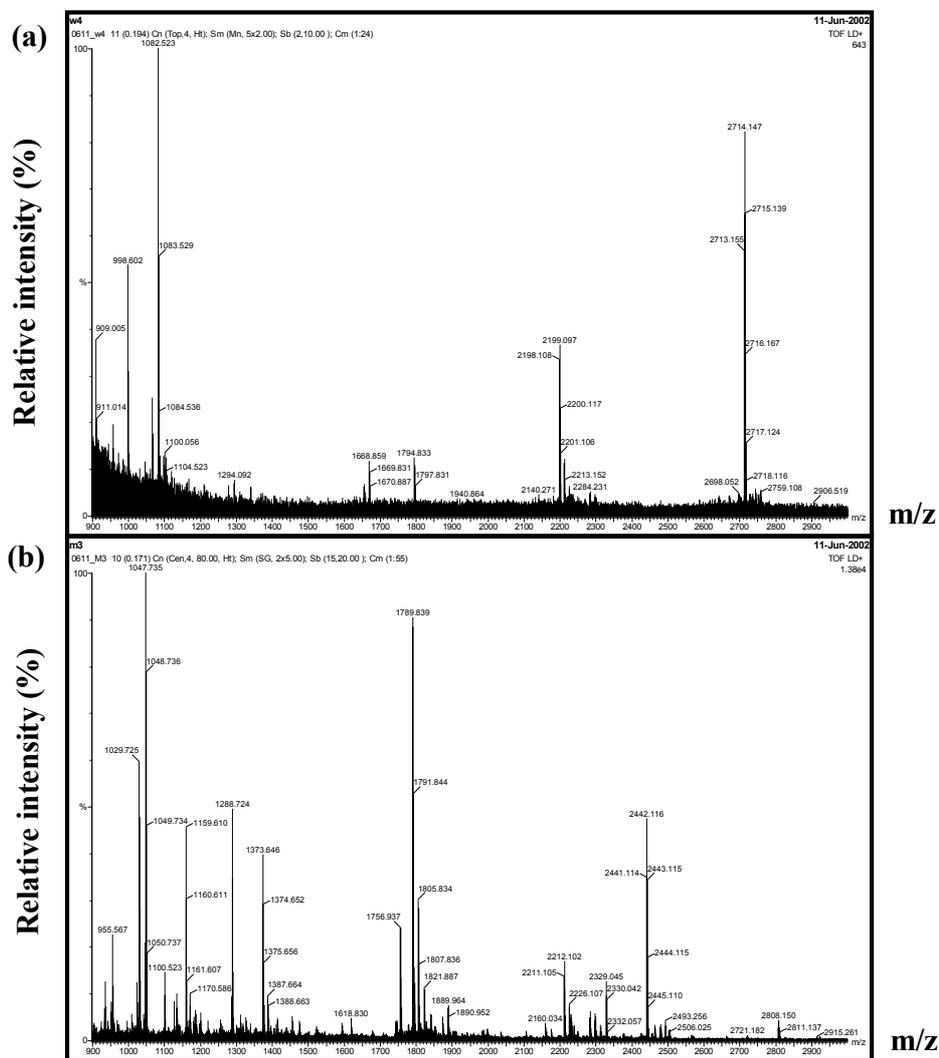


Fig. 25. Mass spectra observed after MALDI-TOF analysis. (a) Highest sequence coverage (59%) observed after MALDI-TOF analysis of triptic peptides derived from spot no. 10. (b) MALDI-TOF analysis of triptic peptides derived from spot no. 5

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search c1E294E3-0119-2C72BAF2 [860910 sequences searched]							
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pf	kDa	@
+1	1.0e+000	1.43	▼ gi171463 gb AAA3490.1 (M55275) endonuclease ScaI 75 kDa subunit [Saccharomyces cerevisiae]	12	5.4	70.78	@
2	7.4e-006	-	▼ gi6320803 ref NP_010884.1 (NC_001137) ExtraCellular Mutant; Ecm10p [Saccharomyces cerevisiae]	7	5.9	70.07	@
+3	3.7e-006	-	▼ gi749992 ref T21420 hypothetical protein F26E4.10 - Caenorhabditis elegans	10	8.8	80.04	@
4	3.5e-006	-	▼ gi7436372 ref T14897 probable ATPase (EC 3.6.1.-) - Leishmania donovani	7	5.6	116.78	@
5	1.6e-006	-	▼ gi6594273 gb BAA8412.1 (AB008428) serine acetyltransferase [Cyanodioschyzon merolae]	12	9.7	43.95	@
6	1.5e-006	-	▼ gi15607083 ref NP_214467.1 (NC_000918) glycyl-tRNA synthetase beta subunit [Aquifex aeolicus]	8	6.4	77.68	@
+7	7.5e-007	-	▼ gi15028297 gb AAK76625.1 (AY045951) putative cell division protein [Arabidopsis thaliana]	9	5.0	52.98	@
8	6.5e-007	-	▼ gi9836834 gb AAG00321.1 (AF209439) unknown [Borrelia hermsi]	14	6.3	45.17	@
+9	3.3e-007	-	▼ gi809597 gb BAA97148.1 (AB018116) gene_id:MNBE.14-unknown protein [Arabidopsis thaliana]	10	5.7	55.71	@
10	1.7e-007	-	▼ gi11282466 ref T44668 hypothetical protein [imported] - Pseudomonas aeruginosa	14	8.8	29.52	@

Fig. 26. Screenshots of protein data search after MALDI-TOF analysis. NCBI search using ProFound software.

Table 15. Results from identification of *Saccharomyces cerevisiae* proteins from 2-DE gels by MALDI-TOF mass mapping.

Spot No.	ACC NO.	Gene ^a	Identified protein (highest probability)	pI ^b / MW(Da) ^b
1	171463	ENS1	Endonuclease Scel 75 kDa subunit	5.4 / 70780
2	230999	ENO1	Enolase (2-Phospho-D-Glycerate Hydrolase)	6.0 / 46670
3	1127232	PDC 1p	Pyruvate decarboxylase	5.8 / 61710
4	6322599	HOM 6p	Catalyzes third step in common pathway for methionine and threonine biosynthesis	6.9 / 38480
5	443550	TPI 1p	Triosephosphate Isomerase	5.7 / 26890
6	10383764	YCL026c-bp ^c	Hypothetical ORF	6.4 / 20980
7	6321631	Tdh3p	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6.5 / 35830
8	6324804	WTM 1p	WD repeat containing transcriptional modulator 1	5.2 / 48480
9	6320235	PST 2p	Protoplasts-Secreted protein	5.5 / 21000
10	6730103	1B4TA ^c	H48c Yeast Cu(li)ZN SUPEROXIDE DISMUTASE	5.5 / 15840

a Data from GenBank.

b Value from the database ProFound

c Incubation in Fe 20 mM medium

제 3 절 고효율 철분이 강화된 기능성 계육과 돈육 생산 기술 개발

1. 유기철의 첨가가 육계의 성장과 체조성에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 공시동물

체중이 균일한 Ross broiler 초생추 168수를 공시하여 본 시험에 이용하였다. 사양관리는 본 실험실의 관행에 의해서 실시하였으며, 본 시험에서는 3단 철제 cage를 이용하여 cage당 6수씩 임의적으로 수용하여 6주간 사양하였다.

2) 시험 사료 및 시험설계

본 시험에서 사용한 기초사료의 배합율과 영양소 함량은 Table 16에 나타나 있다. starter는 시험 전기(0~3주)에 급여하였으며, finisher는 시험 후기 (3~6주)에 급여하여 사양시험하였다. 본 시험에서는 Table 16에 제시한 철분함량이 포함되지 않은 기초사료에 NRC (1994) 권장인 Fe 80 mg/kg을 첨가한 것을 대조구 ① (FE-80)로 하여, 대조구에 항생제 (CTC 0.05%)를 첨가한 항생제 처리구 ② (FE-80+A), Fe 160 mg/kg 처리구 ③ (FE-160), *Saccharomyces cerevisiae* S22-47 (yeast mutant; YM)을 대조구의 철 함량 기준으로 80 mg/kg 첨가한 처리구 ④ (YM-80), Fe 160 mg/kg 처리구 ⑤ (YM-160), *Saccharomyces cerevisiae* hFeHLC (ferritin containing yeast; YF)을 대조구의 철 함량 기준으로 80 mg/kg 처리구 ⑥ (YF-80) 및 Fe 160 mg/kg 처리구 ⑦ (YF-160)로 총 7처리 4반복으로 반복당 6수씩 총 168수를 임의 배치하여 사양 시험을 수행하였다. 시험에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* S22-47은 15종류의 효모 중 균주대로 철 유입량이 가장 우수한 균주를 선발한 것이며, *Saccharomyces cerevisiae* hFeHLC은 ferritin이 고효율로 발현되는 재조합 효모로서,

(주) RNA가 보유한 균주를 본 시험에 이용하였다.

Table 16. Formula and chemical composition of the experiment diets

Ingredient (%)	Starter	Finisher
Corn	53.67	59.65
Wheat bran	1.42	1.50
Soybean meal	25.80	26.31
Fish meal	5.00	0.00
Corn gluten meal	6.50	5.10
Soybean oil	5.32	5.15
L-Lysine-HCl	0.00	0.09
Methionine	0.14	0.07
Tricalcium phosphate	1.32	1.38
Salt	0.25	0.25
Vit-min. mix ¹	0.50	0.50
Antibiotics	0.05	0.00
Anticoccidium	0.03	0.00
Chemical composition ²		
ME (kal/kg)	3,200	3,200
C. P (%)	23.02	20.02
Lysine (%)	1.13	1.00
Methionine (%)	0.50	0.38

¹ Provided following nutrients per kg of diet : vitamin A, 9,000,000 IU; vitamin D₃, 2,100,000 IU; vitamin E, 15,000 IU; vitamin K, 2,000 mg; vitamin B₁, 1,500 mg; vitamin B₂, 4,000 mg; vitamin B₆, 3,000 mg; vitamin B₁₂, 15 mg; Ca-pantothenate, 8,500 mg; niacin, 20,000 mg; biotin, 110 mg; folic acid, 600 mg; Co, 300 mg; Cu, 3,500 mg; Mn, 55,000 mg; Zn, 40,000 mg; I, 600 mg; Se, 130 mg.

² Calculated values.

3) 조사항목 및 조사방법

가) 증체량, 사료섭취량, 사료효율

체중 측정은 개시 시부터 시험 종료 시까지 매주 일정시간에 반복별로 측정하였으며, 증체량은 종료 시 체중에서 개시 시 체중을 감하여 구하였으며, 사료섭취량은 매주 체중 측정 직전에 반복별로 사료의 잔량을 측정하여 섭취량을 구하였다. 사료효율은 증체량을 사료섭취량으로 나누어서 구하였다.

나) 체 조성

육계의 체 조성은 사양시험 종료 직후, 각 처리구에서 평균체중에 가까운 닭을 반복 당 1~2수씩 처리구당 5수를 선발하였다. 시험동물의 경정맥을 절단하여 채혈을 하고, 탈모처리 후 내장을 제거하는 동시에 정강이 고기와 가슴고기를 각각 적출하여 만육기로 분쇄한 것을 분석시료로 하여 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분 등 일반성분은 A.O.A.C. (1995) 방법에 따라 분석하였다.

다) 도체 산패도

도체의 산패도는 시료를 칭량하여 test tube에 넣고 thiobasbitusic acid (TBA) 용액을 넣어 centrifuge tube에 담아 2,500 rpm에서 15분간 원심분리하고, 그 후에 상층액을 cuvette에 옮겨, UV-Spectrophotometer (KONTROM 942, Italy)를 이용해서 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) 혈중 및 도체 cholesterol 함량

혈중 콜레스테롤을 분석하기 위해 시험 종료 후 각 처리구에서 평균체중에 가까운 닭을 반복 당 1~2수씩 선발하여 12시간 절식시킨 다음, 닭의 목 밑 경정맥에서 마리당 2 ml 정도를 채혈하였다. 이것을 15분간 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 혈장을 취하여 cholesterol 분석에 이용하였다. 도체 콜레스테롤을 분석하기 위해 각 처리구의 다리살 50 g을 취하여 메탄올과 클로로포름 (2:1) 용액 150 ml에서 균질화시킨 다음 여과시킨 후, 원심분리하

여 상층의 여액을 제거하고, 하층에 50 ml의 클로로포름을 넣고 다시 균질화시킨 다음 여과하여, 염류용액 (0.88% 염화칼륨) 50 ml를 첨가하여 균질화시킨 후, 원심분리 하여, 상층의 여액을 제거한 다음, 감압농축기를 이용하여 클로로포름을 제거하고 지방의 무게를 측정하였다. 추출된 지방에 클로로포름으로 10 ml를 정확하게 채운 다음 키트 (아산제약2)를 이용한 측정법으로 닭 다리살의 콜레스테롤을 측정하였다.

마) 도체 지방산 함량

지방산 조성의 분석을 위해 시료 5 g과 Folch 용액 (chloroform: 2:1, v/v) 100 ml를 혼합하여 마쇄기로 마쇄한 후 질소 충전 진전에 밀봉하여 실온에서 30분간 교반한 다음 Buchner 여과기로 여과하였다. 여과액을 분액여두에 옮기고 증류수 70 ml를 가한 후 서서히 혼합한 다음, 냉장고 (5℃)에서 2개의 층이 분리될 때까지 방치한 후, 아래층을 취해서 회전진공농축기 (35℃)에서 농축시켰다. 농축액을 시험관에 옮겨 질소가스로 건조시킨 다음 5% sulfuric acid-methanol 3 ml를 가하고 석유 에테르 3 ml로 3회 추출하여 질소가스로 건조시킨 다음, 석유 에테르 100 µg로 녹여서 GC (DS 6200, DONAM)로 분석하였다.

바) 복강 내 지방 및 장기무게 측정

Deaton (1974)의 방법에 의하여 처리구별 6수의 개체별로 생체중을 먼저 측정하였으며, 각 장기의 무게와 복부지방의 무게를 측정하기 위하여 공시축의 경정맥을 절단하고 채혈을 하여 탈모처리한 후 내장을 제거하는 동시에 가슴살과 늑골내의 근위, 장, 총 배설장 및 복강 주위에 있는 지방을 적출하여 복강 지방의 무게를 측정하고, 소낭, 심장, 간, 근위, 췌장, 맹장, 신장, 소장, 대장을 각각 적출하여 무게를 측정하였다.

사) 통계분석

모든 데이터는 주간별로 수집되었고, 처리구 평균값의 표준오차의 산출은 SAS statcal package program (SAS, Institute, 1995)을 이용하여 분산분석을

실시하였고 처리 간 유의성 검정은 Duncan의 다중검정을 5% 수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 증체량, 사료섭취량, 사료효율

본 시험에서의 증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 Table 17에 나타내었다. 전 시험기간 동안 다른 처리구에 비해 대조구 (FE-80)가 낮은 증체를 보였으며, YM-160 처리가 가장 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 사료 섭취량 역시 YM-160 처리구가 가장 높게 나타났으며, 대조구 (FE-80)가 가장 낮게 나타났다 ($P < 0.05$). 사료효율은 항생제 첨가구와 YM 처리구 모두 가장 높은 수치를 보였으나 통계적 유의차를 보이지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 효모로부터 생산된 생리활성물질 등은 가축의 기호성, 생산성 및 소화율을 개선시키고 (Rose, 1987), 단위 동물의 사료에 yeast culture를 첨가하였을 때 사료 효율을 개선한다는 보고 (Chapple, 1981)들과 일치하는 것으로 판단된다.

Table 17. Effects of organic iron supplementation on growth performance of broiler chicks

Treatments	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
Weight gain (g)	1,888 ^b	2,061 ^{ab}	1,966 ^{ab}	2,066 ^{ab}	2,148 ^a	1,981 ^{ab}	2,033 ^a _b
Feed intake (g)	3,243 ^b	3,490 ^{ab}	3,408 ^{ab}	3,538 ^{ab}	3,685 ^a	3,465 ^{ab}	3,633 ^a
Feed efficiency	0.58	0.59	0.58	0.59	0.59	0.57	0.56

^{a,b} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE; FeSO₄·7H₂O, YM; yeast mutant, YF; ferritin containing yeast, A; Chlortetracycline 0.05%.

2) 체 조성

본 시험에서 체조성을 분석한 결과는 Table 18에 나타내었다. 수분 함량은 항생제 처리구가 YM 및 YF 처리구에 비해 높은 함량을 보였으나, 각 처리구별 통계적 유의차를 보이지 않았다. 조회분 함량은 FE-160 처리구가 가장 높은 함량을 보였으며, 조단백질 함량은 YM과 YF 처리구가 높은 함량을 보였다. 조지방 함량은 항생제 첨가구가 가장 높은 함량을 보였고, YM과 YF 처리구는 대조구나 항생제 첨가구보다 낮게 나타났다.

Table 18. Effects of antibiotics and organic iron supplementation on the carcass composition of broiler chicks (%)

Carcass composition	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
Moisture	71.38	72.06	71.58	71.49	71.91	71.56	71.60
Crude ash	1.29	1.57	1.67	1.42	1.24	1.59	1.64
Crude protein	11.52 ^b	11.12 ^c	13.61 ^a	13.63 ^a	13.26 ^{ab}	13.59 ^a	13.57 ^a
Ether extract	15.06	15.22	13.06	13.16	12.88	13.23	12.57

^{a-c} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE; FeSO₄·7H₂O, YM; yeast mutant, YF; ferritin containing yeast, A; Chlorotetracycline 0.05%.

3. 혈중 cholesterol 및 철(Fe) 함량

본 시험에서의 혈중 cholesterol 함량과 Fe함량 분석 결과는 Table 19에 나타내었다. 혈중 cholesterol 함량은 대조구 (FE-80)보다 YM과 YF 처리구에서 높게 나타났다. 특히 항생제구 (FE-80+A)와 YM-160 처리구에서 높은 수치를 보였을 뿐만 아니라 통계적 유의차도 나타났다 ($P<0.05$). Cunnane와 Mcadoo (1987)는 흰쥐를 대상으로 27 ppm과 237 ppm의 철분을 공급하였을 때, 철분함량이 높은 섭취군이 정상철분 섭취군에 비해 혈중 콜레스테롤과 중성지방, 적혈구 콜레스테롤과 인지질 함량이 유의적으로 높았으며, 전예숙과 승정자 (1996)는 혈청 총 콜레스테롤 수준은 철분 섭취수준 증가에 따라 유의적으로 높았다고 보고하였으며, Dabbagh et al. (1994)도 쥐에게 철분을 보충시켰을 때 혈중 콜레스테롤 농도가 유의하게 증가하였다고 하여서 본 시험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

혈중 철 함량은 YF-160 처리구가 가장 높았으며, YM 처리구가 대조구 (FE-80)에 비해 낮은 수치를 나타내어 통계적 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 전예숙과 승정자 (1996)는 혈청내 철분 함량은 철분의 섭취수준에 따라 유의적인 차이를 보였다고 하였으며, Granink (1946)은 간장 비장에서의 철분저장 단백질인 페리틴이 소장에서도 존재하며, 이것이 철의 흡수에 관여한다고 보고한 바 있어, 본 시험에서의 페리틴이 다량 첨가된 YF-160 처리구가 다른 처리구보다 혈중 철(Fe) 함량이 가장 높게 나타나 전예숙과 승정자 (1996), Granink (1946)의 보고들과 유사한 결과를 보였다.

Table 19. Effects of organic iron supplementation on plasma cholesterol and Fe in broiler chicks (mg/dl)

Items	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
Cholesterol	103 ^c	130 ^a	118 ^{abc}	127 ^a	130 ^a	107 ^{bc}	125 ^{ab}
Fe	1.19 ^{ab}	1.14 ^{ab}	1.38 ^{ab}	0.96 ^b	0.93 ^b	1.15 ^{ab}	1.52 ^a

^{a-c} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE; FeSO₄·7H₂O, YM; yeast mutant, YF; ferritin containing yeast, A; Chlorotetracycline 0.05%.

4. 도체 cholesterol 함량 및 산패도

본 시험에서의 도체 cholesterol 함량 및 산패도를 분석한 결과를 Table 20에 나타내었다. 도체 cholesterol은 대조구 (FE-80)에서 가장 높은 수치를 보였으며, YM과 YF 처리구에서는 대조구에 비해 낮게 나타났으나, 통계적 유의차를 보이지 않았다. 산패도는 대조구가 가장 높게 나타났으며, YM-80 처리구가 가장 낮게 나타나 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 본 시험에서의 철 (Fe)과 철단백질을 첨가한 처리구에서 대조구에 비해 산패도가 낮은 것은 유기철을 첨가한 처리구의 체지방 함량이 낮은 것에 기인된 것으로 판단된다. 또한 효모 (yeast)의 첨가수준이 증가함에 따라 산패도가 증가하는 경향을 보였다.

Table 20. Effects of organic iron supplementation on meat cholesterol and TBA in broiler chicks (mg/g)

Items	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
Cholesterol	0.92	0.88	0.86	0.85	0.88	0.90	0.85
TBA	0.35 ^a	0.22 ^{bc}	0.22 ^{bc}	0.17 ^c	0.28 ^{ab}	0.22 ^{bc}	0.34 ^a

^{a-c} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE: FeSO₄·7H₂O, YM: yeast mutant, YF: ferritin containing yeast., A: Chlorotetracycline 0.05%.

5. 도체 지방산 함량

본 시험에서의 도체 지방산 함량은 Table 21에 나타내었다.

각 처리구별 도체 지방산은 palmitic acid(C16:0), oleic acid(C18:1 ω 9) 및 linoleic acid(C18:2 ω 6)의 함량이 높게 나타났다. Whitehead(1986)는 닭의 체내 지방산은 주로 palmitic acid와 oleic acid의 함량이 높다고 보고하여 본 시험의 결과와 유사하였다. 포화지방산의 비율은 대조구에 비해 YM 및 YF 처리구가 높게 나타났으며, YF-80 처리구가 가장 높은 비율을 나타냈다. 그리고 불포화지방산의 비율은 YM-160 처리구에서 가장 높게 나타났다. 본 시험에서의 철(Fe)과 철단백질을 첨가한 처리구는 대조구에 비해 palmitic acid (C16:0)의 함량이 높게 나타났으며, 통계적 유의성도 있었다($P < 0.05$).

Table 21. Effects of organic iron supplementation on fatty acid in broiler chicks (%)

Fatty acid	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
C14 : 0	1.17 ^{abc}	1.33 ^{abc}	.38 ^{abc}	1.61 ^a	1.57 ^{ab}	0.97 ^{bc}	0.89 ^c
C16 : 0	17.37 ^{ab}	17.88 ^{ab}	16.59 ^b	20.65 ^a	18.93 ^{ab}	16.56 ^b	20.60 ^a
C16: 1 ω 7	4.70 ^a	4.40 ^a	4.16 ^{ab}	2.22 ^b	4.02 ^{ab}	3.97 ^{ab}	3.19 ^{ab}
C18 : 0	5.77 ^{ab}	6.01 ^{ab}	6.33 ^a	4.48 ^b	6.01 ^{ab}	5.34 ^{ab}	4.63 ^b
C18 : 1 ω 9	29.11	27.82	26.74	23.89	25.96	27.62	29.64
C18 : 2 ω 6	34.22 ^{bc}	35.12 ^{abc}	36.86 ^{ab}	31.97 ^c	36.36 ^{abc}	39.02 ^a	35.43 ^{abc}
C18 : 3 ω 6	2.67	2.62	2.61	2.15	2.23	2.64	2.39
C18 : 3 ω 3	0.04 ^b	0.22 ^b	0.36 ^b	0.95 ^a	0.31 ^b	0.29 ^b	0.25 ^b
C20 : 1 ω 9	2.66	2.82	3.19	2.97	3.00	2.30	1.95
C20 : 2 ω 6	0.17 ^{ab}	0.10 ^{ab}	0.10 ^{ab}	0.22 ^a	0.20 ^{ab}	0.01 ^b	0.04 ^{ab}
C20 : 4 ω 6	0.50	0.61	0.65	0.54	0.53	0.50	0.38
C20 : 5 ω 3	0.91 ^a	0.51 ^{ab}	0.49 ^{ab}	0.46 ^{ab}	0.44 ^{ab}	0.34 ^b	0.30 ^b
C22 : 4 ω 6	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00
C22 : 5 ω 3	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C22 : 6 ω 3	0.54 ^a	0.57 ^a	0.54 ^a	0.45 ^{ab}	0.45 ^{ab}	0.37 ^{ab}	0.31 ^b
SFA ¹	24.31	25.22	24.30	26.74	26.50	22.88	26.11
USFA ²	75.69	74.78	75.70	73.26	73.50	77.12	73.89
USFA/SFA	3.11	2.97	3.12	2.74	2.77	3.37	2.83

¹ Saturated fatty acids, ² Unsaturated fatty acids.

^{a,b} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE: FeSO₄·7H₂O, YM: yeast mutant, YF: ferritin containing yeast, A: Chlorotetracycline 0.05%.

6. 도체 광물질 함량

본 시험에서의 도체 광물질 함량은 Table 22에 나타내었다. 철(Fe) 함량은 대조구(FE-80)가 가장 낮았으며, YM과 YF를 처리구에서 높게 나타났다. YM과 YF를 처리구중 YF-160 처리구에서 가장 높게 나타나 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 카드뮴(Cd) 함량은 YM과 YF 처리구가 대조구(FE-80) 비해 높게 나타났으나 통계적 유의차는 보이지 않았으며, 비소(As) 함량은 YF-160 처리구가 가장 높은 함량을 보였다.

Table 22. Effects of organic iron supplementation on Fe and mineral in broiler chicks

Items	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
Fe (mg/kg)	15.17 ^d	29.64 ^c	34.73 ^{bc}	44.60 ^{ab}	34.18 ^{bc}	42.35 ^{ab}	48.94 ^a
Cd (mg/kg)	0.01	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03
As (mg/kg)	0.05 ^a	0.07 ^{bc}	0.07 ^{bc}	0.09 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.10 ^a

^{a-c} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE: FeSO₄·7H₂O, YM: yeast mutant, YF: ferritin containing yeast, A: Chlorotetracycline 0.05%.

7. 복강 지방 및 장기무게 측정

시험육계의 소낭, 심장, 간, 근위, 횡장, 맹장, 신장 및 복강내 지방의 무게를 생체중에 대한 백분율로 계산한 결과를 Table 23에 나타내었다. 생체중에 대한 장기의 비율은 YM과 YF 처리구가 대조구(FE-80)보다 낮은 경향을 보였으며, 심장과 근위 및 복강 내 지방 비율은 대조구(FE-80)보다 높게 나타났으나, 통계적 유의차를 보이지 않았다. 복강 내 지방 축적률은 대조구에 비해 YM과 YF를 첨가한 처리구가 높게 나타났으며, 특히 YM-160 처리구가 가장 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 본 시험의 결과는 Leestra et al.(1986)의 복강지방 축적 비율과 체중 간에 표현형 상관은 일반적으로 정(+)의 상관관계에 있다는 보고와 일치한다.

Table 23. Effects of organic iron supplementation on development of intestinal organs in broiler chicks (%)

Items	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)		YF (mg/kg)	
	80	80+A	160	80	160	80	160
Crop wt./live wt.	0.52 ^b	0.73 ^a	0.44 ^b	0.51 ^b	0.37 ^b	0.40 ^b	0.40 ^b
Heart wt./live wt.	0.45 ^b	0.71 ^a	0.55 ^b	0.52 ^b	0.45 ^b	0.51 ^b	0.48 ^b
Liver wt./live wt.	2.11	2.17	1.87	2.22	2.07	1.74	1.94
Gizzard wt./live wt.	2.21	2.62	2.26	2.29	2.26	2.36	2.59
Pancreas wt./live wt.	0.84 ^b	1.01 ^a	0.85 ^b	0.73 ^b	0.73 ^b	0.76 ^b	0.85 ^b
Cecum wt./live wt.	0.81 ^{ab}	1.05 ^a	0.82 ^{ab}	0.89 ^{ab}	0.77 ^b	0.81 ^{ab}	0.77 ^b
Kidney wt./live wt.	0.13 ^b	0.35 ^a	0.13 ^b	0.12 ^b	0.12 ^b	0.12 ^b	0.12 ^b
S-Intestine wt./live wt.	2.12 ^{abc}	2.61 ^{ab}	2.24 ^{abc}	2.66 ^a	2.07 ^{bc}	1.91 ^c	1.96 ^c
L-Intestine wt./live wt.	0.19 ^b	0.45 ^a	0.24 ^b	0.18 ^b	0.22 ^b	0.19 ^b	0.16 ^b
Abdominal fat pad wt./live wt.	1.35	1.80	1.77	1.41	2.02	1.48	1.82

^{a-c} Means with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05).

FE; FeSO₄·7H₂O, YM; yeast mutant, YF; ferritin containing yeast, A; Chlorotetracycline 0.05%.

2. 유기철의 첨가가 산란계의 생산성 및 난 성분에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 공시동물, 시험설계 및 시험사료

공시동물은 30주령 갈색 테트란 산란계 198수를 공시하였다. 공시된 산란계는 2수용 3단 철제 cage에서 7주간 사육하였으며, 시험 사료 및 물은 자유 채식토록 하였다. 본 시험에 이용된 철분함량이 포함되지 않은 기초사료의 배합율표와 영양소 함량은 Table 24에 나타나 있다. 시험사료는 항생제를 첨가하지 않고 NRC(1994)의 산란계 영양소 요구량에 맞추어 기초사료를 배합하여 NRC 권장인 황산 제 1철($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: FE)을 사용하여 사양표준 권장량인 Fe 45 mg/kg을 첨가하여 처리한 대조구 ① (FE-45), Fe 90 mg/kg 첨가한 처리구 ② (FE-90), Fe 180 mg/kg 첨가한 처리구 ③ (FE-180), *Saccharomyces cerevisiae* S22-47 (yeast mutant)을 대조구의 철 함량 기준으로 45 mg/kg 첨가한 처리구 ④ (YM-45), 90 mg/kg 첨가한 처리구 ⑤ (YM-90), 180 mg/kg 첨가한 처리구 ⑥ (YM-180), *Saccharomyces cerevisiae* hFeHLC(ferritin containing yeast ; YF, 철 함량)을 대조구의 철 함량 기준으로 45 mg/kg 첨가한 처리구 ⑦ (YF-45), 90 mg/kg 첨가한 처리구 ⑧ (YF-90) 및 180 mg/kg 첨가한 처리구 ⑨ (YF-180)로 한 총 9처리구 4반복, 반복당 6수씩 임의배치하여 본 시험을 수행하였다. 시험에 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* S22-47은 15종류의 효모 중 균주내로 철 유입량이 가장 우수한 균주를 선발한 것이며, *Saccharomyces cerevisiae* hFeHLC는 ferritin이 고효율로 발현되는 재조합 효모로서, (주) RNA가 보유한 균주를 본 시험에 이용하였다.

Table 24. Formula and chemical composition of basal diet (%)

Ingredient (%)	Control
Corn	65.59
Wheat bran	6.50
Soybean meal	16.00
Corn gluten meal	2.60
Salt	0.30
Vit-min mix ¹	0.30
L-Lysine·HCl	0.04
Methionine	0.07
Limestone	7.73
Tricalcium phosphate	0.87
Chemical composition ²	
ME (kal/kg)	2,750
C. P (%)	15.01
Lysine (%)	0.69
Methionine (%)	0.30
Ca (%)	3.25
Avail. P (%)	0.25

¹ Provided following nutrients per kg of diet : vitamin A, 9,000,000 IU; vitamin D₃, 2,100,000 IU; vitamin E, 15,000 IU; vitamin K, 2,000 mg; vitamin B₁, 1,500 mg; vitamin B₂, 4,000 mg; vitamin B₆, 3,000 mg; vitamin B₁₂, 15 mg.; Ca-pantothenate, 8500 mg; niacin, 20,000 mg; biotin, 110 mg; folic acid, 600 mg; Co, 300 mg; Cu, 3,500 mg; Mn, 55,000 mg; Zn, 40,000 mg; I, 600 mg; Se, 130 mg.

² Calculated values.

2) 조사항목 및 조사방법

가) 산란능력 및 난질

산란율은 시험기간 중 생산된 총 산란수를 공시수로 나누어 백분율로 환산하였으며, 난중은 집란 후, 칭량하여 총 난중을 총 산란수로 나누어 평균 난중을 구하였다. 사료 요구율은 시험기간중 총 사료섭취량을 총 산란량으로 나누어 산정하였으며, 난각의 두께는 난의 세 지점을 측정하여 그 평균치를 사용하였다. 난각강도는 난각강도계 (OZAKI MFG. Co. Ltd., Japan)를 이용하여 측정하였다. TSS (Technical Services and Supplies, FHK Japan)를 이용하여 하우유니트, 난백높이, 난각색, 혈반 및 육반 등을 측정하였다.

나) 계란의 화학적 조성

난황의 지방산 분석은 시료 5 g과 Folch 용액(chloroform : methanol = 2 : 1, v/v) 100 ml를 혼합하여 질소 충전 직전에 밀봉하여 실온에서 30분간 교반한 다음 Buchner 여과기로 여과한 후, 여과액을 분액여두에 옮기고 증류수 70 ml를 가한 후 서서히 혼합한 다음, 냉장고(5℃)에서 2개층이 분리될 때까지 방치한 후, 아래층을 취하여 회전진공농축기(35℃)에서 농축시켰다. 농축액을 시험관에 옮겨 질소가스로 건조시킨 다음 5% sulfuric acid-methanol 3 ml를 가하고 석유 에테르 3 ml로 3회 추출하여 질소가스로 건조시킨 다음, 석유 에테르 100 μ g으로 녹여서 GC(DS 6200, DONAM)로 분석하였다. 난황 cholesterol 분석은 Folch et al.(1957)의 방법으로 분석하였으며, 각 처리구의 계란 난황을 30 μ m의 체를 통하여 난황막 및 알끈을 제거하고 잘 균질한 후 시료로 사용했다. 시료 2 g을 20 ml의 메탄올과 40 ml의 클로로포름에서 균질화시키고, 여과하여 원심분리시켜 하층만을 취하여 염류용액(0.88% 염화칼륨) 약 20 ml를 첨가하여 균질화시킨 후, 원심분리하여, 윗층의 여액을 제거한 다음, 감압농축기를 이용하여 클로로포름을 제거하고 지방의 무게를 측정하였다. 추출된 지방에 클로로포름으로 10 ml를 정확하게 채운 다음 키트(아산제약)를 이용하여 난황의 콜레스테롤을 측정하였다. 계란내 광물질 함량 분석은 ICP (Inductively Coupled Plasma, Spectro-telame,

PLAME)로 측정하였다. 관능검사는 곽해수(1992)의 방법에 의해서 실시하였으며, 관능검사의 시료는 시험종료시 계란으로 끓은 물에 20분간 삶은 것을 이용하였으며, 1에서 5점까지의 점수(1: 매우 나쁘다, 2: 나쁘다, 3: 보통이다, 4: 좋다, 5: 매우 좋다)인 5점 척도법(Stone et al., 1974)으로 외형, 색깔, 다즙성, 연도, 향과 종합적인 평가를 검사하였다.

다) 통계처리

본 시험에서 얻어진 자료의 통계처리는 SAS Statical Package Program(SAS, Institute, 1995)에 의하여 분산분석을 실시하였으며, 처리 평균간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법을 이용하여 5% 수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 산란율, 난중, 산란량, 사료섭취량 및 사료요구율

본 시험에서의 각 처리구별 산란율, 난중, 산란량, 사료섭취량 및 사료요구율을 Table 25에 나타내었다. 산란율은 YF-180 처리구가 가장 높게 나타났으며, 대조구 FE-45가 가장 낮은 산란율을 보여 처리구간의 유의차를 보였다($P < 0.05$). 산란율은 대조구 FE-45보다 YM와 YF 처리구가 높게 나타나 유종석 등(1990), Gerendia et al.(1992) 및 Lim(1992)이 산란계에 대해 활성효모 첨가로 산란율의 개선에 대한 실험보고와 유사한 결과를 얻었다. 각 처리구별 난중은 YF-180 처리구가 가장 높았으며, FE-90 처리구가 가장 낮은 난중을 보여 처리구간의 유의차를 보였다($P < 0.05$). 산란량은 YF-180 처리구가 가장 높은 산란량을 보였으며, FE-45은 가장 낮은 산란량을 보여 처리구간의 유의차 있었다($P < 0.05$). 사료섭취량은 YF-180 처리구가 FE-45 처리구보다 높게 나타났으며, FE-90 처리구는 FE-45 처리구보다 낮게 나타나 가장 낮은 섭취량을 보여 처리구간의 유의차를 보였다($P < 0.05$). YM와 YF 처리구는 FE-45와 FE-90 처리구보다 높은 섭취량을 보였으며, 이는 Pepler(1982), Cantor et al.(1983) 및 Hughes(1987)는 효모배양물을 사료에 첨가했을 때, 기호성 증진제로서 작용을 하여 사료 섭취량을 증가

시킨다는 보고와 유사하였다. 사료 요구율은 YM-90 처리구가 가장 높게 나타났으며, YF-45 처리구가 가장 낮은 사료 요구율으로 보여 처리구간의 유의차를 보였다($P < 0.05$). 사료 요구율은 YM와 YF 처리구가 FE-45와 FE-90 처리구보다 개선되는 결과를 보였는데, 이는 황성효모를 산란계에 첨가한 유종석 등(1990), Lim(1992) 보고와 일치하였다.

Table 25. Effect of organic iron supplementation on egg production, egg weight, egg mass, feed intake and feed conversion ratio of layers

Item	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
production (%)	82.81 ^c	87.30 ^{bc}	87.08 ^{bc}	87.40 ^{bc}	86.23 ^{bc}	88.86 ^{ab}	91.75 ^{bc}	93.73 ^{ab}	93.96 ^a
weight (g)	59.81 ^c	59.70 ^c	60.57 ^{bc}	62.29 ^{ab}	60.56 ^{bc}	62.30 ^{ab}	61.51 ^a	61.92 ^{ab}	62.97 ^a
mass (g)	49.53 ^d	52.01 ^{cd}	52.77 ^{cd}	54.51 ^{bc}	52.23 ^{cd}	55.38 ^{abc}	57.78 ^a	58.16 ^{ab}	59.47 ^a
Feed intake (g/b)	120.91 ^d	117.53 ^e	126.30 ^{cde}	132.31 ^{ab}	135.14 ^{ab}	129.61 ^{abcd}	121.63 ^{cd}	131.48 ^{abc}	138.86 ^a
FCR	2.44 ^{ab}	2.26 ^{bc}	2.39 ^{bc}	2.32 ^{ab}	2.59 ^a	2.34 ^{bc}	2.11 ^c	2.27 ^{bc}	2.33 ^{bc}

^{a-e} Means with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

2. 난각두께 및 난각강도

각 처리구별 난각두께, 난각강도는 Table 26에 나타내었다. 난각두께는 YF-180 처리구가 가장 두꺼웠으며, FE-90 처리구가 가장 낮은 난각두께를 보여 처리구간의 유의차를 보였다($P < 0.05$). 철과 철분단백질 첨가 수준이 증가함에 따라 난각 두께는 두꺼워지는 경향을 보였다. 난각 강도는 YF-45 처리구가 가장 높게 나타났으며, YM-45 처리구는 가장 낮게 나타나 처리구간의 유의차를 보였다($P < 0.05$). YM와 YF 처리구는 FE-45와 FE-90 처리구보다 강도가 강한 경향을 보였다.

Table 26. Effect of organic iron supplementation on eggshell thickness and eggshell strength of layers

Item	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
Eggshell thickness (μm)	336 ^{bc}	329 ^c	342 ^{bc}	340 ^{bc}	349 ^{ab}	352 ^{ab}	359 ^a	349 ^{ab}	364 ^a
Eggshell strength (kg/cm ²)	2,720 ^c	2,972 ^{bc}	2,977 ^{bc}	2,598 ^c	3,294 ^b	3,396 ^{bc}	4,506 ^a	3,352 ^{bc}	3,570 ^b

^{a-c} Means with different superscripts in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

3. 난황 색도

각 처리구별 난황 색도는 Table 27에 나타내었다. 백색도는 YM-90 처리구가 가장 높게 나타났으며, YF-90 처리구가 가장 낮게 나타나 처리구간의 유의차를 보였다($P<0.05$). 적색도는 YF-90 처리구가 가장 높게 나타났으며, YF-180 처리구가 가장 낮게 나타났다. 그러나 처리구간 유의적 차이는 보이지 않았다. 황색도에서는 YM-90 처리구가 가장 높았으며, YM-45 처리구에서 가장 낮은 황색도를 보여 처리구간의 유의적 차이를 보였다($P<0.05$).

Table 27. Effect of organic iron supplementation on egg-yolk color changes in layer fed with ferritin supplementation

Egg-yolk color	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
L	47.18 ^{abc}	48.28 ^{abc}	48.46 ^{ab}	47.33 ^{abc}	48.60 ^a	47.09 ^{bc}	47.17 ^{abc}	46.97 ^c	47.49 ^{abc}
a	-1.66	-1.24	-1.62	-1.52	-1.61	-1.41	-1.55	-1.21	-1.79
b	50.52 ^{ab}	52.49 ^a	52.24 ^a	50.06 ^b	52.58 ^a	50.93 ^{ab}	50.64 ^{ab}	50.84 ^{ab}	50.49 ^{ab}

^{a-c} Means with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

4. 하우 유니트, 난백높이, 난각색, 혈반 및 잔반, 난황 콜레스테롤

본 시험의 처리구별 하우 유니트 (Haugh unit), 난백높이, 난각색, 혈반 및 육반, 난황 콜레스테롤은 Table 28에 나타내었다. 하우 유니트는 YM-180 처리구가 가장 높았으며, YF-180 처리구가 가장 낮게 나타났으나, 처리구간의 유의적인 차이는 없었다. 난백 높이는 YM-180 처리구가 가장 높게 나타났으며, YF-90, YF-180 처리구에서 가장 낮게 나타났으나, 처리구간의 유의차는 보이지 않았다. 난각색은 YM-180 처리구가 가장 높았으며, YM-90 처리구에서 가장 낮게 나타나 처리구간의 유의차를 보였다($P<0.05$). 혈반은 FE-180 처리구가 가장 높았으며, FE-45, YM-90 처리구, YM-180 처리구, YF-90 처리구 및 YF-180 처리구에서는 혈반이 나타나지 않았지만 처리구간에 유의한 차이를 나타내었다 ($P<0.05$). 잔반은 YF-180 처리구가 가장 높았으며, FE-45에서 가장 낮은 결과를 보여 처리구간 유의차를 보였다($P<0.05$). 각 처리구별 난황 콜레스테롤 함량은 FE-45 처리구가 가장 높게 나타났으며, YF-45 처리구가 가장 낮게 나타나 처리구간의 유의적 차이를 보였다 ($P<0.05$).

Table 28. Effect of organic iron supplementation on Haugh unit, albumen index, eggshell color, blood spot, meat spot and yolk cholesterol of eggs

Item	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
Haugh unit	56.30	54.53	64.01	59.13	56.78	74.89	64.11	52.94	52.36
Albumen index	3.91	3.96	4.46	4.27	4.05	5.41	4.70	3.81	3.81
Eggshell color	35.13 ^{ab}	30.63 ^c	34.55 ^{abc}	30.80 ^{bc}	30.08 ^{abc}	39.10 ^a	31.11 ^{bc}	33.60 ^{abc}	34.70 ^{abc}
Blood spot	0.00 ^b	0.13 ^{ab}	0.18 ^a	0.07 ^{ab}	0.00 ^b	0.00 ^b	0.06 ^{ab}	0.00 ^b	0.00 ^b
Meat spot	0.20	0.31	0.27	0.33	0.38	0.40	0.39	0.50	0.57
Cholesterol (mg/g)	13.82 ^a	12.84 ^{ab}	12.95 ^{ab}	13.39 ^{ab}	12.65 ^{ab}	13.22 ^{ab}	12.57 ^b	12.79 ^{ab}	12.60 ^{ab}

^{a-c} Means with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

5. 난황 지방산 함량

각 처리구별 난황 지방산 함량은 Table 29에 나타내었다. 난황내 지방산 중 oleic acid는 YM-45 처리구가 가장 높았고, YM-90 처리구가 가장 낮게 나타났으나 유의적 차이를 보이지는 않았다. 산란계의 경우, 사료내 지방산 조성은 계란의 난황과 체조직의 지방산 함량에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Guenter et al., 1971; Sim et al., 1973; Huang et al., 1990). 특히 Sim et al.(1973)은 사료내 급여 지방에서 유래된 linoleic acid(C18:2 ω 6, LA)수준이 증가할수록 난황과 체조직의 linoleic acid가 증가한다고 보고하였으나, 본 시험에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 29. Effect of organic iron supplementation on egg yolk fatty acid composition of the egg-yolk in the experiment (%)

Fatty acid	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
14:0	0.41 ^b	0.39 ^b	2.38 ^{ab}	0.42 ^b	2.97 ^a	0.71 ^{ab}	0.39 ^b	0.34 ^b	1.18 ^{ab}
16:0	27.68	27.42	24.69	29.27	21.08	27.24	27.99	27.52	22.42
16:1 (ω7)	3.72	3.03	2.94	2.30	6.13	2.68	3.28	2.46	9.50
18:0	7.93	8.50	5.57	8.38	6.60	7.93	7.81	8.27	6.40
18:1 (ω9)	41.28	41.31	36.52	44.19	30.07	39.87	43.98	41.71	33.29
18:1 (ω7)	2.46	2.63	9.46	0.00	10.48	3.87	1.72	1.97	7.47
18:2 (ω6)	13.14	14.62	11.93	9.83	17.93	14.28	12.68	15.35	11.56
18:3 (ω6)	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
18:3 (ω3)	0.26	0.25	0.85	0.74	0.27	0.33	0.26	0.24	0.68
20:1 (ω9)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.40
20:5 (ω3)	2.09	1.85	4.88	1.61	4.47	2.93	1.59	1.59	5.21
22:4 (ω6)	0.00	0.00	0.00	3.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
22:6 (ω3)	1.03	0.00	0.30	0.16	0.00	0.00	0.31	0.47	1.88
SFA ¹	36.02	36.31	32.65	38.06	36.13	35.87	36.19	30.65	30.00
USFA ²	63.98	63.69	67.35	31.94	63.87	64.13	63.81	69.35	70.00
USFA/SFA	1.78	1.75	2.06	1.63	1.77	1.79	1.76	2.26	2.33

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

¹ Saturated fatty acids, ² Unsaturated fatty acids.

6. 난황내 무기물 함량

각 처리구별 난황 내 무기물 함량을 Table 30에 나타내었다. Ca은 YM-90 처리구에서 가장 높았으며, YF-180 처리구가 가장 낮게 나타났다. P(인)은 YM-90 처리구에서 가장 높았으며, Fe-45 처리구가 가장 낮게 나타났다. Fe는 Fe-45 처리구가 가장 낮았으며, YM-180 처리구가 가장 높은 함량을 보였다.

Table 30. Effect of organic iron supplementation on egg-yolk mineral composition (mg/kg)

Items	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
Ca	688.38	867.11	921.73	732.14	926.41	912.38	781.52	709.52	654.74
P	2,232.87	2,489.54	2,611.74	2,401.47	3,206.09	3,408.91	2,663.60	2,663.17	2,278.22
K	796.24	866.34	1,132.24	963.86	1242.27	1528.23	1147.80	605.43	907.17
Na	1,625.14	1,672.34	1,762.21	1,739.34	1,705.43	1,744.75	1,623.40	1,632.72	1,776.92
Mg	157.70	170.00	171.54	163.48	162.40	175.46	149.65	154.63	145.80
Fe	55.17	55.41	62.72	64.75	67.36	70.34	60.76	65.65	69.17
Mn	0.93	0.88	1.02	0.88	0.87	1.08	1.00	1.02	0.64
Zn	12.39	14.76	18.13	13.55	17.85	19.70	14.85	9.86	11.27
Cu	2.27	1.72	2.68	4.75	2.71	2.42	2.39	1.29	1.38

7. 관능검사

본 시험의 관능검사에 대한 결과는 Table 31에 나타내었다. 관능검사 결과 외형은 YF-45 처리구와 YF-180 처리구가 높았으며, YM-45 처리구가 가장 낮은 결과를 보여 처리구간의 유의적 차이를 보였다($P < 0.05$). 색은 YM-45 처리구가 높게 나타났으며, YM-90 처리구에서 가장 낮게 나타나 처리구간의 유의적 차이를 보였다($P < 0.05$). 다즙성은 YF-45 처리구가 가장 높았으며, FE-45 처리구가 가장 낮았으나, 처리구간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 냄새(향)은 FE-180 처리구가 가장 높았으며, FE-45 처리구가 가장 낮은 수치를 보였으나 유의성은 없었다. 종합적인 기호도는 YF-45 처리구가 가장 우수하였으며, YM-90 처리구가 가장 낮았다 ($P < 0.05$).

Table 31. Effect of organic iron supplementation on sensory evaluation of egg

Items	FE (mg/kg)			YM (mg/kg)			YF (mg/kg)		
	45	90	180	45	90	180	45	90	180
Appearance	3.03 ^{bc}	3.67 ^{abc}	3.23 ^{ab}	3.53 ^a	2.87 ^c	3.10 ^{abc}	3.37 ^{abc}	3.33 ^{abc}	3.37 ^{abc}
Color	3.23 ^{ab}	3.13 ^b	3.33 ^{ab}	3.63 ^a	2.97 ^b	3.00 ^b	3.06 ^b	3.30 ^b	3.20 ^b
Juceiness	2.96	3.03	3.06	3.23	3.03	3.17	3.50	3.07	3.47
Texture	3.40 ^{abc}	3.53 ^{abc}	2.97 ^{abc}	3.23 ^{abc}	2.97 ^{bc}	2.97 ^c	3.46 ^a	3.06 ^{abc}	3.23 ^{abc}
Flavor	2.83	3.43	4.03	3.30	3.00	2.96	3.00	3.20	3.30
Overall acceptability	3.46 ^{abc}	3.30 ^{abc}	3.73 ^a	3.63 ^{ab}	2.93 ^c	3.26 ^c	3.76 ^{bc}	3.36 ^{bc}	3.36 ^{abc}

^{a-c} Means with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

3. 돼지에서 철분 첨가가 비육돈의 성장 및 육질에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 공시동물 및 시험설계

공시동물은 돼지 중에서 평균 체중이 약 45 kg인 균일한 2원 교잡종 (듀록 + 랜드레이스) 거세돈 42마리를 선택하여 공시하였다. 본 시험에서는 철분이 함유된 비육돈 시판사료를 대조구 (control)로 하였으며, 대조구 사료에 철분을 32 mg/kg, 3.2 mg/kg 각각 첨가하여 설계하였다. A사의 organic Fe은 권장 사용량에 따라 사료 ton 당 200 g과 이의 10%인 20 g을 첨가하여 최종 사료 내 철분이 32 mg/kg, 3.2 mg/kg이 되도록 첨가하였다. 총 7처리 6반복으로 반복 당 1두씩 총 42마리를 임의배치하여 사양 시험을 실시하였다.

2) 시험기간 및 시험장소

시험기간은 비육 전기는 2003년 4월 4일부터 2003년 5월 16일까지 비육후기는 2003년 5월 17일부터 2003년 6월 14일까지 10주간 사양시험을 실시했으며, 본 시험장소는 순천대학교 동물자원과학과 부속 동물 사육장 돈사에서 사양 시험을 실시하였다.

3) 시험사료 및 사양관리

본 시험에서 사용한 시험사료는 시판되는 비육돈의 배합사료를 대조구로 이용하였으며, 사료배합표와 영양소 함량은 Table 32에 나타나 있다. 처리구는, yeast mutant 유기태 철분 (YM), ferritin type 유기태 철분 (YF), organic Fe (아미노산 착화합물) 처리구로 하였다. 효모 유기태 철분은 최종 사료 내 철분이 3.2 mg/kg 및 32 mg/kg이 추가되도록 각각 0.02% 및 0.2%를 첨가한 yeast mutant 처리구 (YM) 와 ferritin type 처리구 (YF)로 처리하였다. 유기철 (organic Fe)은 권장 사용량에 따라 철분이 3.2 mg/kg과 32 mg/kg이 추가되도록 대조구 사료 각각 0.002% 및 0.02%를 첨가하였다.

Table 32. Formula and chemical composition of the experiment diets

Ingredient	%
Corn grain	70.86
Wheat bran	2.00
Soybean meal-45	21.50
Molasses cane	2.00
Animal fat	1.77
Salt	0.30
Vitamin premixes ¹⁾	0.15
Mineral premixes ¹⁾	0.15
Antibiotic premixes	0.10
Limestone	0.50
Tricalcium Phosphate	0.67
Total	100.00
Chemical composition ²⁾	
DE (kcal/kg)	3,332
CP (%)	16.50
Lysine (%)	0.77
Ca (%)	0.50
Crude fat	4.65
Methionine (%)	0.26
Avail. P (%)	0.22

¹⁾ The vitamin and mineral premix contained the following per kg of diet : vitamin A, 8,000 IU; vitamin D, 880 IU; vitamin E, 24 IU; vitamin K 1.5 IU; riboflavin 3.2 mg, pantothenic acid 10 mg; niacin 20 mg; B₁₂, 15 mg; Zn, 40 mg; Fe 65 mg; Mn 35 mg; Cu 50 mg; I 0.3 mg; Se 0.2 mg; Co 0.3 mg

²⁾ Provided per kg of diet: 3.471 IU; vitamin A, 514 IU vitamin D, 19.3 IU vitamin E, 1.06 mg vitamin K, 0.64 mg thiamin, 0.26 mg riboflavin, 1.09 mg pyridoxine, 0.01 mg vitamin B₁₂, 8.36 mg pantothenic acid, 16.71 mg niacin, 0.04 mg biotin, and 0.32 mg folic acid.

4) 조사항목 및 조사방법

가) 증체량, 사료섭취량 및 사료효율

체중 측정은 개시부터 시험 종료시까지 전기에는 2주마다 개체별로 체중을 측정하고 후기에는 4주째에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 전기에는 2주마다 후기에는 4주째 체중 측정 직전에 반복별로 사료의 잔량을 측정하여 섭취량을 구하였다. 사료효율은 증체량을 사료섭취량으로 나누어서 구하였다.

나) 체조성 분석

돼지의 체조성은 사양시험 종료 직후 각 처리구에서 평균체중에 가까운 돼지들로 반복당 4마리씩 28마리를 선발하였다. 선발된 돼지로부터 등심 부위를 적출하여 만육기로 분쇄한 것을 분석시료로 하여 수분, 조지방 및 조회분 등 A.O.A.C. (1995) 방법에 따라 분석하였다.

다) 도체 등급 판정

순천 도축장에서 도살하고 돼지의 도체 등급 판정은 등급 판정관이 판정한 결과에 따른 것이다.

라) 혈중 철분 함량

시험 종료 후 각 처리구에서 돼지의 목 부위의 경정맥에서 10 ml 정도를 채혈하였다. 이것을 15분간 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 혈장을 취하여 혈중 철분 함량 분석에 이용하였다.

마) 도체 철분 함량

시료 2~5 g를 자제 크루시블에 취하고 열판에서 600℃에서 2시간 회화 후 방냉 후 No.6 여과지를 이용하여 일정량으로 맞춰 시료액을 하여 50 ml 메스플라스크에 취하고 5% 란타넘 용액 10 ml를 넣고, 다시 염산 용액 (1:1) 1 ml를 가지고 증류수 표선을 맞춘다. 이 때 철(Fe)표준원액을 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/kg이

되도록 50 ml 메스플라스크에 취한 다음 여기에 란타 용액 10 ml를 각각 넣고 증류수로 표선까지 채운 다음 미리 30분간 예열한 원자흡광광도계 파장 248.3 nm에서 흡광도를 측정한다.

바) 도체 지방산 함량

지방산 조성의 분석은 시료 250 ml와 forch solvent 150 ml을 넣고 Homgenizer (2,500 rpm)로 3분간 마쇄한 후 centrifuge tube에 여액을 모은다. 이것을 2번에서 3 번 반복을 하였다. 모은 여액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 한다. 둥근 원형 250 ml flask에 하층을 여과할 때 이때 Na_2SO_4 를 이용수분흡착 한다. 여액을 40°C이하에서 로타리 증발기로 증발 후 메틸화하여 보관을 한다. 메틸화된 용액을 100 μl lipid 7번을 검화용 reaction vial에 가한 후 0.5 N-NaOH 용액을 1 ml을 가하여 뚜껑을 닫고 20분간 가열 후 냉각을 한다. 그리고 용액 2 ml BF_3 -methanol을 넣고 20분간 가열을 하고 시험관에 넣고 1 ml의 heptane과 8 ml의 NaCl 포화용액을 가한 후 1분간 혼합 후 30분 방치하고 상등액을 1~2 μl 를 취하여 GC에 주입하여 지방산 분리하였다.

사) 육색도

등심 표면에 Croma meter (Minolta Co. Cr 301, Japan)를 사용하여 백색도 (lightness)를 나타내는 L값, 적색도 (redness)를 나타내있는 a값과 황색도 (yellowness)를 나타내는 b값을 측정하였다. 이때의 표준색은 L-값이 97.10, a-값이 -0.17, b-값이 1.99인 백색 표준판을 사용하였다.

아) 혈중 Cholesterol 함량

시험 종료 3일전 각 처리구의 돼지 목부위 경정맥에서 10 ml 정도를 채혈하였다. 이것을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 혈장을 취하여 혈중 콜레스테롤 함량을 분석하였다.

자) 도체 아미노산 함량

시료 15 g에 증류수 100 ml를 가하여 혼합한 후 20% trichloroacetic acid (TCA) 15 ml를 가하여 침전된 단백질을 원심분리 하였다. 상층액에 40 ml의 diethylether를 가하여 TCA (trichloroacetic acid)와 지용성 물질을 제거한 후 수층을 40°C에서 감압, 농축하였다. 농축액에 0.2 M sodium citrate buffer (pH 2.2) 용액으로 25 ml이 되게 정용한 후 0.22 μ m membrane filter를 사용하여 여과 하였으며 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

차) 도체 산패도

도체의 산패도는 시료를 평량하여 Test tube에 넣고 TBA solution을 넣어 원심분리기 tube에 담아 2,500 rpm에서 15분간 원심분리를 하고, 그 이후에 상층액을 cuvette에 옮겨, UV-Spectrophotometer (KONTRON942, Italy)를 이용해서 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

카) 암모니아 가스 발생량

암모니아 가스 측정은 시험 종료 3일전 각 처리구 별로 분을 1.5 kg씩 3처리구로 플라스틱통에 나눠 분을 발효시켜 1주, 2주, 3주, 4주로 가스포집기 (Gastec GV-100S, Japan)를 이용하여 가스검지관대로 각각 1분간 흡입한 후 검지관에 나타난 수치를 측정하여 NH₃을 조사하였다.

타) 관능검사

관능검사는 순천대학에서 학생들 30명을 대상으로 각 처리구별로 등심부위를 일정한 간격으로 나누었고 학교 앞에서 바로 고기를 익혀 시식하는 방법을 택했으며 1에서 5점까지의 점수 (1: 매우나쁘다, 2: 나쁘다, 3: 보통이다, 4: 좋다, 5: 매우 좋다) 인 5점 척도법으로 외형, 색깔, 다즙성, 조직감, 향미 및 종합적인 평가를 검사하였다.

파) 통계분석

모든 자료는 주간별로 수집되었고, 처리구 평균값의 표준오차의 산출은 SAS

statistical package program (1985)을 이용하여 분산분석을 실시하였고 처리간 유의성 검정은 Duncan의 다중분석법 (Duncan, 1955)을 5%수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 증체량, 사료섭취량 및 사료효율

철분을 첨가하여 총 10주간 사양 시험을 실시한 결과 증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 Table 33와 같이 나타났다. 증체량은 Organic iron 0.002% 처리구가 40.28 kg으로 가장 높았고 사료섭취량은 Organic iron 0.002% 처리구가 12.56 kg으로 가장 많이 섭취하였다. 사료효율에서는 YM 0.02% 처리구가 0.40으로 1~6주차에서 가장 높은 것으로 나왔다. 6~10주차에서 YF 0.02% 처리구가 48.54 kg으로 가장 높은 증체량을 나타냈으며 사료섭취면에서는 YF 0.02% 처리구가 15.08로 가장 높았고, 사료효율에서는 YM 0.02%처리구가 0.35로 가장 높았다. 정 등 (1982)은 철분 보충하는 수준과 과잉으로 공급하는 수준에서 사료섭취량은 유의적 차이를 보았으나, 체중증가량에는 유의적 차이를 보이지는 않았다.

Table 33. Effects of dietary iron on growth performance of pigs (kg)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^a	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Initial weight	45.33	45.20	45.33	45.83	45.50	45.50	43.17
Final Weight	105.83	112.40	111.50	109.83	108.17	111.00	108.00
1 ~ 6weeks							
Weight gain	37.50	33.33	37.50	37.50	36.11	40.28	38.89
Feed intake	12.28	13.20	12.67	13.22	10.83	13.56	13.33
Gain/Feed	0.33	0.40	0.34	0.35	0.30	0.34	0.34
6 ~ 10weeks							
Weight gain	42.71	43.96	44.63	48.54	45.21	43.96	48.13
Feed intake	11.83	13.80	14.08	12.17	15.08	13.33	14.08
Gain/Feed	0.28	0.31	0.32	0.25	0.33	0.30	0.29
Total							
Weight gain	80.21	77.29	82.13	86.04	81.32	84.24	87.01
Feed intake	24.11	27.00	26.75	25.39	25.92	26.89	27.42
Gain/Feed	0.30	0.35	0.33	0.30	0.32	0.32	0.32

^a, When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

2) 체조성 분석

철분 첨가에 따른 체조성 분석 결과는 Table 34은 도체 등심의 일반성분을 분석한 결과이다. 체조성은 분석 중에 수분 및 조회분에서는 YF 0.2% 첨가구가 수분 71.95%, 회분 1.97%로 높은 수치를 보였고, Organic iron 0.02% 첨가구는 수분 71.18% 회분 1.18%로 낮은 수치를 보여 통계적 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 조지방은 Organic iron 0.002%가 15.26%로 높은 경향을 보였지만 YM 0.2% 첨가구는 6.72%로 가장 낮았다 ($P<0.05$). 조단백질에서는 대조구가 23.42%로 높게 나타났지만 YM 0.02% 첨가구에서는 20.98%으로 가장 낮은 수치를 나타나 통계적인 유의차를 보였다 ($P<0.05$).

Table 34. Effect of dietary iron on the carcass composition of porks (%)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^e	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Moisture	71.24 ^b	72.37 ^{ab}	73.22 ^a	71.78 ^{ab}	71.95 ^{ab}	71.42 ^{ab}	71.18 ^b
Crude ash	1.32 ^b	1.32 ^b	1.28 ^b	1.25 ^b	1.97 ^a	1.26 ^b	1.18 ^b
Crude fat	15.18 ^a	9.55 ^{ab}	6.72 ^b	9.77 ^{ab}	9.53 ^{ab}	15.26 ^a	15.19 ^a
Crude protein	23.42 ^a	20.98 ^d	23.36 ^a	23.21 ^a	22.70 ^{ab}	21.90 ^c	22.45 ^{bc}

^{a,b,c,d} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^e When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

3) 도체등급 판정

철분 첨가에 따른 도체의 등급판정 결과는 Table 35와 같이 나타났다. 도체중은 대조구가 78.00로 낮게 나왔고 YM 0.2% 첨가구는 87.8으로 가장 높게 나왔지만 유의차가 보였다 ($P < 0.05$). 등지방 두께는 YM 0.2% 첨가구가 25.00으로 높게 나타났으며 대조구는 22.00로 가장 낮게 나타났으나 유의차는 없었다 ($P > 0.05$). 도체 등급별 (A: 3, B: 2, C: 1)로 YM 0.02% 첨가구가 2.80 높게 나타났으며 통계적 유의차는 없었다 ($P > 0.05$).

Table 35. Effect of dietary iron on carcass characteristics of pigs

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^c	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Slaughter wt (kg)	78.00 ^b	81.00 ^b	87.83 ^a	79.20 ^b	79.43 ^b	83.17 ^b	81.50 ^b
Back fat (mm)	22.00	21.40	25.00	22.60	23.57	24.17	22.50
Carcass grade	2.50	2.80	2.17	2.40	2.71	2.33	2.50

^{a,b} Mean with different superscripts within the same row are significantly different ($P < 0.05$) (Carcass grade: A-3, B-2, C-1)

^c When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

4) 혈중 철분 함량

철분 첨가에 따른 혈중 철분의 함량을 Table 36에 나타내었다. 혈중 내 철분 함량은 YF 0.2%첨가구가 8.20로 가장 높았고, Organic iron 0.002% 첨가구가 2.85로 낮은 수치를 보였지만 통계적 유의차는 없었다 ($P>0.05$).

Table 36. Effects of dietary iron on plasma Fe of pigs (mg/kg)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^a	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Fe	5.51	4.82	8.00	7.84	8.20	2.85	3.04

a When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

5) 도체 중 철분 함량

철분 첨가에 따른 도체 중 철분의 함량을 Table 37과 같다. 도체 중 철분 함량은 YF 0.2%첨가구가 31.35로 가장 높은 철분 함량을 보였고, YM 0.02% 첨가구에서는 14.18 mg/kg로 가장 낮은 철분 함량을 보였으며, 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

Table 37. Effects of dietary iron on meat Fe of pigs (mg/kg)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic Fe (%)	
		0.02 ^e	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Fe	16.01 ^{cd}	14.18 ^d	22.77 ^{bc}	25.87 ^{ab}	31.35 ^a	15.61 ^{cd}	21.35 ^{bcd}

^{a,b,c,d} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^e When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

6) 도체 지방산 함량

철분 첨가에 따른 지방산 함량을 분석한 결과는 Table 38에 나타나 있다. C14:0 지방산은 대조구가 1.46으로 가장 높게 나타나 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). C16:0 지방산은 YM 0.2% 첨가구가 26.03으로 가장 높았고, C18:0 지방산은 대조구가 11.68로 가장 높아 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). C18:3n3 지방산은 YF 0.2% 첨가구가 0.43으로 가장 높았고, Organic iron 0.02% 첨가구가 0.19로 가장 낮게 나타나 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). C20:2n6 지방산은 YF 0.2 % 첨가구가 0.48로 가장 높았고, YM 0.02% 첨가구가 0.13으로 가장 낮아 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). Oleic acid는 단일불포화 지방산으로서 다량 섭취시 혈중 중성지방이나 콜레스테롤의 저하를 가져오므로 동맥경화증과 같은 성인병에 유익한 효과가 있는것으로 보고되고 있으며 (Grundy, 1986), 콜레스테롤과 포화지방산은 뇌졸중, 동맥경화, 고혈압 등의 성인병의 주요 위험인자로서 이들을 섭취하면 관상동맥 경화증이 더 많이 발생한다고 하였다 (Key, 1980). 또한 포화지방산 (SFA)을 많이 섭취하면 인체에 해로운 저밀도지단백 (Low-Density Lipo-protein : LDL)의 수용체 활성이 감소되어 LDL의 체내함량이 상승된다고 하였는데 LDL은 혈전 생성의 주요물질로서 혈관의 협착과 경화를 가져오게 한다 (Grundy, 1986). Freeman 등 (1968)은 포화지방산은 micelle 형성이 낮아 불포화 지방산보다 소화율이 낮지만 불포화지방산이 존재할 때는 소화율이 증가하며 지방공급원을 구성하는 지방산조성에 달려 있다고 하였다

Table 38. Effects of iron on meat fatty acid of pig

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic Fe (%)	
		0.02 ^e	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
C14:0	1.46 ^a	1.21 ^{abc}	1.02 ^c	0.96 ^c	1.04 ^{bc}	1.40 ^{ab}	1.17 ^{abc}
C16:0	25.26 ^a	25.31 ^a	26.03 ^a	24.34 ^a	18.62 ^b	25.84 ^a	24.42 ^a
C16:1n7	5.97	4.35	1.72	2.17	3.39	4.47	5.38 ^a
C18:0	11.68 ^a	9.27 ^{ab}	8.54 ^b	9.81 ^{ab}	9.56 ^{ab}	10.48 ^{ab}	8.98 ^{ab}
C18:1n9	43.91	47.00	42.07	43.79	46.48	40.46	45.42
C18:2n6	9.71	10.11	15.37	14.23	15.72	13.64	11.30
C18:3n6	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04
C18:3n3	0.28 ^b	0.20 ^b	0.25 ^b	0.25 ^b	0.43 ^a	0.20 ^b	0.19 ^b
C20:1n9	0.73	0.37	0.54	0.55	0.56	0.51	0.66
C20:2n6	0.25 ^{ab}	0.13 ^a	0.35 ^{ab}	0.35 ^{ab}	0.48 ^a	0.23 ^{ab}	0.23 ^{ab}
C20:3n6	0.83	0.17	0.42	0.34	0.36	0.26	0.15
C20:4n6	0.46 ^b	1.43 ^{ab}	2.70 ^a	2.35 ^a	2.37 ^a	1.94 ^{ab}	1.60 ^{ab}
C20:5n3	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.04
C22:4n6	0.15	0.21	0.36	0.29	0.35	0.15	0.17
C22:5n3	0.16 ^a	0.21 ^{bcd}	0.47 ^a	0.41 ^{abc}	0.44 ^{ab}	0.34 ^{abcd}	0.18 ^{cd}
C22:6n3	0.07 ^{ab}	0.03 ^{ab}	0.18 ^{ab}	0.17 ^{ab}	0.22 ^a	0.00	0.07 ^{ab}
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
SFA	38.39	35.80	35.58	35.11	29.22	37.72	34.57
USFA	61.61	64.20	64.42	64.89	70.78	62.28	65.43
mono	49.66	51.72	44.33	46.50	50.43	45.44	51.46
poly	11.95	12.49	20.09	18.39	20.35	16.84	13.97
n3	0.54	0.44	0.90	0.83	1.08	0.62	0.48
n6	11.41	12.04	19.20	17.56	19.27	16.23	13.48
n6/n3	20.91	27.90	21.81	22.19	17.81	25.93	36.23
MUFA/SFA	1.32	1.46	1.25	1.35	1.73	1.22	1.50
PUFA/SFA	0.31	0.35	0.57	0.53	0.70	0.44	0.40

a,b,c,d Mean with different superscripts within the same row are significantly different ($P < 0.05$) ^e When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

7) 육색도

철분 첨가에 따른 돈육의 육색도는 Table 39과 같이 나타나 있다. 백색도에서는 YF 0.02% 첨가구가 58.79%로 수치가 가장 높았고, 대조구는 49.77로 낮은 수치를 보여 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 적색도는 YM 0.02% 첨가구는 10.15%로 가장 높았고, Organic 0.02% 첨가구가 8.52로 낮은 수치를 보였지만 통계적 유의차는 보이지 않았다 ($P > 0.05$). 황색도 Organic iron 0.002% 첨가구가 8.14%로 가장 높았고, 대조구가 6.09로 낮은 수치를 보여 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 신선 돈육에서 중요한 육색 측정치는 명도 (L)로서, 명도는 최종 소비자가 식육으로 선택하는데 중요하게 작용한다 (Joo 등, 1995).

Table 39. Effect of dietary iron on meat color of pigs

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic Fe (%)	
		0.02 ^c	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
L ¹⁾	49.77 ^a	55.20 ^a	53.22 ^{ab}	58.79 ^a	56.12 ^a	54.18 ^{ab}	54.14 ^{ab}
a ¹⁾	8.65	10.15	8.91	9.65	8.98	9.56	8.52
b ¹⁾	6.09 ^a	7.61 ^b	7.06 ^a	8.06 ^a	7.14 ^a	8.13 ^a	7.17 ^a

¹⁾ L: lightness, a: redness, b: yellowness

^{a,b} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^c When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

8) 혈중 Cholesterol 함량

철분 첨가에 따른 혈중 콜레스테롤 결과는 Table 40에 나타났다. 혈중 콜레스테롤은 YF 0.02% 첨가구가 125.56으로 가장 낮았고 대조구는 513.59로 가장 높았으며, 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 전 등 (1996)은 혈청 총 콜레스테롤 수준은 철분 섭취수준 증가에 따라 유의적으로 높았다고 보고하였다. 또 Dabbagh (1994) 등도 쥐에게 철분을 보충시켰을 때 혈중 콜레스테롤 농도가 유의하게 증가하였다고 보고한 바 있다. 그러나 본 실험에서는 유기철분을 함유한 YM, YF 및 Organic iron 섭취 증가에 따라 다소 낮아지는 경향을 보였다. 이에 대한 원인 규명은 좀 더 구체적인 연구가 필요하다고 본다.

Table 40. Effect of dietary iron on plasma cholesterol of pigs (mg/dl)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^d	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Cholesterol	513.59 ^a	234.60 ^c	136.43 ^c	125.56 ^c	220.99 ^c	360.69 ^b	193.18 ^c

^{a,b,c} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^d When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

9) 도체 Cholesterol 함량

철분 첨가에 따른 도체 콜레스테롤 결과는 Table 41에 나타났다. 철분 첨가에 따른 혈중 콜레스테롤 함량은 낮은 경향을 보였지만 도체중 콜레스테롤 함량은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 도체 콜레스테롤 결과는 Organic iron 0.02% 첨가구가 0.39로 가장 낮게 나왔고 YM 0.02% 첨가구가 1.19으로 가장 높게 나타났다으나 통계적 유의차는 보이지 않았다 ($P>0.05$).

Table 41. Effect of dietary iron on meat cholesterol of pigs (mg/g)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^a	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Cholesterol	0.83	0.79	1.19	0.65	1.05	0.39	0.44

^a When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

10) 도체 산패도 (TBA)

철분 첨가에 따른 도체 산패도의 결과는 Table 42에 나타나 있다. 신선한 돈육에서 YF 0.2% 첨가구가 3.12로 산패도가 높게 나타났고, Organic iron 0.02% 첨가구는 1.71로 가장 낮게 나타나 통계적 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 7일차에서는 YF 0.2% 첨가구가 5.08로 가장 높은 수치를 보였으며 산패도가 가장 낮은 수치는 대조구가 2.75로 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 14일차 산패도에서는 Organic iron 0.02% 처리구가 5.38로 가장 낮은 수치를 보였고 YF 0.2% 첨가구가 8.35으로 가장 높은 수치를 보여 통계적 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 21일차에는 산패도는 YM 0.02% 첨가구가 10.54로 가장 높은 산패도를 나타냈으며, Organic iron 0.002% 첨가구는 5.70으로 가장 낮은 수치를 보여 통계적 유의차를 보였다 ($P<0.05$).

Table 42. Effect of dietary iron on meat TBA of pigs (mmol/100g)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^d	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Fresh	2.68 ^a	2.73 ^a	2.77 ^a	2.31 ^{ab}	3.12 ^a	3.02 ^a	1.71 ^b
7 days	2.75 ^c	4.15 ^{ab}	3.35 ^{bc}	3.53 ^{ab}	5.08 ^a	3.88 ^{abc}	3.72 ^{bc}
14 days	8.16 ^{ab}	6.37 ^{abc}	7.11 ^{abc}	5.52 ^{bc}	8.35 ^a	5.38 ^c	7.41 ^{abc}
21 days	8.68 ^{ab}	10.54 ^a	8.17 ^{ab}	9.76 ^a	9.53 ^a	5.70 ^b	9.19 ^a

^{a,b,c} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^d When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

11) 암모니아 가스 발생량

철분 첨가에 따른 돼지분에 대한 NH_3 를 측정된 결과는 Table 43와 같다. 7일차에는 YM 0.02%첨가구가 26.33 ppm으로 가장 높은 수치를 보였고 Organic iron 0.02% 첨가구가 5.00 ppm으로 가장 적게 나타났다. 14일차에서는 YM 0.02%첨가구가 46.00으로 가장 높았고, Organic iron 0.02% 첨가구가 8.33 ppm으로 가장 낮은 수치를 보였다. 전체적으로 효모와 Organic iron 첨가구의 사료내 첨가 수준이 증가 할수록 분중 암모니아 가스의 발생은 감소하는 경향을 보였으나 21일차에서는 Organic iron 0.002% 첨가구가 60.33 ppm으로 가장 높은 수치를 보였고, Organic iron 0.002% 첨가구가 17.67 ppm으로 가장 낮은 수치를 나타냈다. 그리고 28일차에는 Organic iron 0.002% 첨가구가 99.33으로 암모니아 가스가 가장 높이 나타났으며, Organic iron 0.02% 첨가구가 26.67 ppm으로 가장 낮은 수치를 보여 통계적인 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

Table 43. Effect of dietary iron on feces NH₃ of pigs (ppm)

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^d	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
7 days	11.00	26.33	21.67	17.00	8.33	8.00	5.00
14 days	29.33	46.00	42.67	24.33	17.67	21.33	8.33
21 days	50.67	58.33	51.33	29.00	37.67	60.33	17.67
28 days	72.00 ^{ab}	70.00 ^{abc}	60.00 ^{abc}	32.00 ^{bc}	56.00 ^{abc}	99.33 ^a	26.67 ^c

^{a,b,c} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^d When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

12) 관능검사

철분 첨가에 따른 돈육의 관능검사에 대한 결과는 Table 44과 같다. 관능검사 결과 외형에서는 Organic iron 0.02% 첨가구가 2.65로 낮았고 YM 0.02% 첨가구가 3.52로 가장 높게 나타나 통계적인 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 돈육의 색상은 YF 0.02% 첨가구가 2.81으로 가장 낮았고 YM 0.02% 첨가구가 3.35로 가장 높게 나타났으나 통계적인 유의차를 보이지 않았다 ($P > 0.05$). 다즙성은 YF 0.02% 첨가구가 3.14로 가장 높았고, Organic iron 0.02% 첨가구가 2.09로 낮게 나타나 통계적인 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 조직감은 Organic iron 0.002% 첨가구가 3.09으로 가장 높게 나타나고, 향은 Organic iron 0.002% 첨가구가 3.05로 가장 높게 나타났다. 종합적인 기호도에서는 YM 0.2%와 YF 0.02% 첨가구가 3.14으로 가장 높게 나타나고, Organic iron 0.02% 첨가구가 2.70으로 가장 낮게 나타났으며, 통계적 유의차는 보이지 않았다 ($P > 0.05$).

Table 44. Effect of dietary iron on meat sensuous evaluation of porks

Treatments	Control	YM (%)		YF (%)		Organic iron (%)	
		0.02 ^a	0.2	0.02	0.2	0.002	0.02
Appearance	3.30 ^a	3.52 ^a	3.04 ^{ab}	2.71 ^b	3.05 ^{ab}	3.23 ^a	2.65 ^b
Color	3.00	3.35	3.09	2.81	3.05	3.23	3.04
Juiceness	2.43 ^{bc}	3.09 ^a	2.74 ^{ab}	3.14 ^a	2.95 ^{ab}	3.00 ^a	2.09 ^c
Texture	2.52	2.78	2.91	2.95	2.77	3.09	2.43
Flavor	2.91	2.87	3.04	3.05	2.59	3.14	3.00
Overall acceptability	2.91	3.00	2.96	3.14	3.14	3.09	2.70

^{a,b,c} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)

^d When YM (yeast mutant) and YF (yeast ferritin type) were added at rates of 0.02% and 0.2%, the final concentrations of iron were at 3.2 mg/kg and 32 mg/kg. For these concentrations, Organic iron was added at rates of 0.002% and 0.02%.

제 4 절 개발 효모철 제품 YM03TM과 YF04TM의 효능 및 상품성 검증

1. 시판 유기철과 효모제품 YM03과 YF04가 육계의 성장과 체조성에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 공시동물 및 사양관리

공시동물은 Ross broiler 중에서 체중이 균일한 계 294마리를 선택하여 공시하였다. 사양관리는 294수를 한 처리구에 6반복으로 반복당 6수씩 수용하여 사양했으며 사료와 물은 자유 섭취토록 하였다. 사육기간 동안 매주 각 처리구 반복별로 체중을 측정하였으며, 사료의 급여량과 잔량을 조사하여 주령별 사료 섭취량과 증체량을 측정하였다. 사양시험은 순천대학교 부속동물사육장의 3단 철제 cage에서 사육하였으며 육계사료의 배합 및 분석 실험은 본 대학 영양사료 실험실에서 실시하였다.

2) 시험기간 및 시험장소

시험기간은 2004년 2월 8일부터 2002년 3월 14일까지 6주간 사양시험을 실시했다. 본 시험장소는 순천대학교 동물자원과학과 부속 사육장에서 사양하였다.

3) 시험 사료 및 시험설계

본 시험에서 사용한 시험사료의 배합율표와 영양소 함량은 Table 45에 나타나 있다. 기초사료는 Fe을 제외시키고 육계 전기와 후기 사료를 배합하였다. 육계전기 사료로 시험 전기 (0~3주)에 급여하였으며, finisher는 육계 후기 사료로 시험 후기 (3~6주)에 급여하여 사육실험을 하였다. 효모 제품 YM03TM은 생균수가 10¹⁰ cfu/kg이고 철분 함량은 200 mg/kg이다. 효모 제품 YM04TM은 생균수가

10^{10} cfu/kg이고 철분 함량은 500 mg/kg이다. 시판 Organic Fe은 철분 함량이 5% 제품이다. 본 시험에서는 기초사료에 황산 제 1철 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; FE)로 NRC (1994) 사양표준의 권장량인 Fe 80 mg/kg을 첨가한 대조구 (control), 기초사료에 *Saccharomyces cerevisiae* (mutant type)를 이용한 효모 제품 (YM03TM) 0.1% 처리구 (10^7 cfu/kg, Fe 0.2 mg/kg), 1.0% 처리구 (10^8 cfu/kg, Fe 2 mg/kg), *Saccharomyces cerevisiae* hFeHLC (ferritin containing yeast)를 이용한 효모 제품 (YF04TM) 0.1% 처리구 (10^7 cfu/kg, Fe 0.5 mg/kg), 1.0% 처리구 (10^8 cfu/kg, Fe 5 mg/kg), 시판 organic Fe 0.01% 처리구 (Fe 5 mg/kg), Organic Fe 0.1% (50 mg/kg) 처리구로 총 7처리 6반복으로 반복 당 6수씩 총 294수를 임의 배치하여 사양 시험하였다.

Table 45. Formula and chemical composition of the experiment at diets

Ingredient (%)	Starter	Finisher
Corn grain	53.55	41.54
Wheat brain	–	22.00
Soybean meal	29.55	20.85
fish meal	3.00	1.00
Corn gluten meal	2.00	3.67
Soybean oil	1.50	3.00
L-Lysine-HCl	0.62	0.65
Methionine	0.50	0.47
Animal fat	4.70	3.38
Limstone	0.50	0.60
Tricalcium Phosphate	1.83	1.80
Salt	0.20	0.20
Vit-min. Mix ¹⁾	0.26	0.26
Antibiotics	0.50	0.13
Anti-coxidum	0.73	0.51
Chemical composition ²⁾		
ME (kal/kg)	4,000	4,000
C. Protein (%)	21.41	19.75
Lysine (%)	1.25	10.57
Methionine (%)	0.61	5.57

¹⁾Vit-min. mix. provided following nutrients per kg of diet : Vitamin A, 9,000,000 IU; Vitamin D3, 2,100,000 (Starter), 2,200,000 (Finisher) IU; Vitamin E, 15,000 (Starter), 30,000 (Finisher) IU; Vitamin K, 2,000 mg; Vitamin B1, 1,500 (Starter), 2,000 (Finisher) mg ;Vitamin B2, 4,000 (Starter), 5,200 (Finisher) mg; Vitamin B6, 3,000 mg; Vitamin B12, 15 (Starter), 20 (Finisher) mg.; Pan-Acid-Ca, 8500 (Starter), 10,000 (Finisher) mg; Niacin, 20,000 (Starter), 30,000 (Finisher) mg; Biotin, 110 (Starter), 120 (Finisher) mg; Folic-Acid, 600 (Starter), 1,000 (Finisher) mg; Co, 300 (Starter), 350 (Finisher) mg; Cu, 3,500 (Starter), 4,500 (Finisher) mg; Mn, 55,000 (Starter), 65,000 (Finisher) mg; Zn, 50,000 (Starter), 60,000 (Finisher) mg; I, 600 (Starter), 800 (Finisher) mg; Se, 130 mg

²⁾Calculated values

4) 조사항목 및 조사방법

가) 증체량

체중 측정은 개시 때부터 시험 종료까지 매주 일정시간에 반복별로 측정하였으며, 증체량은 종료시 체중에서 개시시 체중을 감하여 구하였다.

나) 사료섭취량 및 사료효율

사료섭취량은 매주 체중 측정 직전에 반복별로 사료의 잔량을 측정하여 섭취량을 구하였다. 사료효율은 증체량을 사료섭취량으로 나누어서 구하였다.

다) 체조성

육계의 체조성은 사양시험 종료 직후 각 처리구에서 평균체중에 가까운 닭을 반복당 1~2수씩 처리당 5수를 선발하였다. 시험동물의 경정맥을 절단하여 채혈을 하고, 탈모처리 후 내장을 제거하는 동시에 정강이 고기와 가슴고기를 각각 적출하여 만육기로 분쇄한 것을 분석시료로 하여 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분 등 일반성분은 A.O.A.C (1995) 방법에 따라 분석하였다.

라) 혈중 cholesterol 함량

시험 종료 후 각 처리구에서 평균체중에 가까운 닭을 반복당 1~2수씩 선발하여 12시간 절식시킨 다음 닭의 목 밑 경정맥에서 마리당 2 ml 정도를 채혈하였다. 이것을 15분간 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 혈장을 취하여 cholesterol를 분석에 이용하였다.

마) 철분 함량

시료 2~5 g를 자제 크루시블에 취하고 열판에서 600℃에서 2시간 회화 후 방냉 후 No.6 여과지를 이용하여 일정량으로 맞춰 시료액을 하여 50 ml 메스플라스크에 취하고 5% 란타넘 용액 10 ml를 넣고, 다시 염산 용액 (1:1) 1 ml를 가지고 증류수 표선을 맞춘다. 이 때 철(Fe)표준원액을 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/kg이

되도록 50 ml 메스플라스크에 취한 다음 여기에 란타 용액 10 ml를 각각 넣고 증류수로 표선까지 채운 다음 미리 30분간 예열한 원자흡광광도계 (AAS : HITACHI, Z6000)를 이용하여 파장 248.3 nm에서 원자흡광광도법으로 측정하였다.

마) 혈중, 도체 지방산 함량

지방산 조성의 분석은 시료 5 g과 Folch용액 (chloroform : 2 : 1, v/v) 100 ml를 혼합하여 마쇄기로 마쇄한 후 질소 충전직전에 밀봉하여 실온에서 30분간 교반한 다음 Bucher 여과기로 여과하였다. 여과액을 분액여두에 옮기고 증류수 70 ml를 가한 후 서서히 혼합한 다음, 냉장고 (5°C)에서 2개의 층이 분리될 때까지 방치한 후, 아래층을 취해서 회전진공농축기 (35°C)에서 농축시켰다. 농축액을 시험관에 옮겨 질소가스로 건조시킨 다음 5% sulfuric acid-methanol 3 ml를 가하고 석유 에테르 3 ml로 3회 추출하여 질소가스로 건조시킨 다음, 석유 ether 100 µg로 녹여서 GC로 분석하였다.

사) 복강내 지방 및 장기무게 측정

Deaton (1974)의 방법에 의하여 처리구별 6수의 개체별로 생체중을 먼저 측정하였으며, 각 장기의 무게와 복부지방의 무게는 공시축의 경정맥을 절단하여 채혈을 하였으며, 탈모 처리 한 후 내장을 제거하는 동시에 가슴살과 늑골내의 근위, 장, 총 배설설강 및 복부 근육 주위에 있는 지방을 적출하여 복강 지방 (abdominal fat pad)의 무게를 측정하였다. 소낭, 심장, 간, 근위, 췌장, 맹장, 신장, 소장, 대장을 각각 적출하여 무게를 측정하였다.

아) 통계분석

모든 데이터는 주간별로 수집되었고, 처리구 평균값의 표준오차의 산출은 SAS statical package program (SAS, Institute, 1995)을 이용하여 분산분석을 실시하였고 처리간 유의성 검정은 Duncan의 다중검정을 5% 수준에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 증체량, 사료섭취량 및 사료효율

철과 철분이 강화된 효모를 첨가하여 6주간 사양 시험한 결과 증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 Table 46와 같이 나타났다. 0~3주차에서는 증체량은 Organic iron 0.01% 처리구가 818 g 가장 높았고 사료섭취량은 YM03 1.0 처리구가 1,082 g으로 가장 많이 섭취하였고, 사료효율은 Organic Fe 0.1% 처리구가 1.44로 가장 높았다. 4~6주차에서는 증체량은 1,369 g으로 YM03 0.1% 처리구가 가장 높은 증체량을 보였고 사료섭취량은 YM03 1.0% 처리구가 2,745 g으로 가장 높았으며 사료 효율은 2.09로 YM03 1.0% 처리구가 가장 높았다.

0~6주차의 전체적으로 볼 때 증체량은 2,121 g으로 Organic iron 0.01% 처리구가 높았고 사료섭취량은 3,827 g으로 YM03 1.0 % 처리구가 가장 높았으며 사료효율에서는 1.83으로 YM03 1.0 % 처리구가 가장 높은 결과를 보였다. 이러한 결과에서 Rose 등 (1987)은 효모로부터 생산된 뉴클레오타이드, 아미노산, 성장 촉진인자 및 효소 등은 가축의 기호성, 생산성 및 소화율을 개선시킨 것은 일치하였다. 또한 단위 동물의 사료에 yeast culture를 첨가하였을 때 사료 효율을 개선한다는 보고 (Chapple, 1981)가 있었다. 본 실험에서는 기호성과 생산성은 좋은 결과가 나왔지만 사료효율 면에서는 대조구보다 낮은 경향을 보여 Chapple 등 (1981)의 보고와는 차이를 보였다.

Table 46. Effects of dietary Fe on growth performance of broiler (g)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^a	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
0 ~ 3 weeks							
Initial weight	43	43	43	43	43	43	43
Final Weight	802	778	816	803	811	818	794
Weight gain	759	735	773	760	768	776	751
Feed intake	1,081	1,044	1,083	1,033	1,044	1,075	1,078
Feed/Gain	1.43	1.42	1.41	1.36	1.36	1.39	1.44
4 ~ 6 weeks							
Initial weight	802	778	816	803	811	819	794
Final Weight	2,130	2,146	2,137	2,132	2,146	2,164	2,143
Weight gain	1,328	1,369	1,321	1,329	1,335	1,335	1,349
Feed intake	2,716	2,716	2,745	2,703	2,695	2,716	2,700
Feed/Gain	2.05	1.99	2.09	2.04	2.02	2.03	2.01
0 ~ 6 weeks							
Initial weight	43	43	43	43	43	43	43
Final Weight	2,130	2,146	2,137	2,132	2,146	2,164	2,143
Weight gain	2,087	2,103	2,094	2,089	2,103	2,121	2,100
Feed intake	3,797	3,759	3,827	3,736	3,739	3,791	3,778
Feed/Gain	1.82	1.79	1.83	1.79	1.78	1.79	1.80

^a When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10^7 cfu/kg and 10^8 cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

2) 체조성

시험사료인 철분 단백질의 첨가 수준이 육계의 체조성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 가슴살과 다리살의 성분분석을 실시한 결과 Table 47과 같이 나타났다. 수분에서는 75.26%로 YM03 0.1% 처리구가 가장 높았고 다른 처리구와는 유의차를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 조희분에서는 YF04 0.1% 처리구가 1.08%으로 가장 낮은 수치를 보였고 YF04 1.0% 처리구가 1.45%와 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 조지방에서는 YM03 0.1% 처리구가 5.79%으로 가장 높은 수치를 YF04 1.0% 처리구가 3.70%으로 가장 낮은 수치로 유의차를 보였다 ($P<0.05$). 그리고 조단백질에서는 YF04 1.0% 처리구가 21.18% 가장 높은 함유를 보였고 대조구 20.12%와 유의차를 보였다 ($P<0.05$).

Table 47. Effects of Fe on the carcass composition of broiler (%)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^e	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
Moisture	74.87 ^a ±0.31	75.26 ^a ±0.40	73.60 ^a ±0.56	75.11 ^a ±0.29	74.46 ^{ab} ±0.57	74.51 ^{ab} ±0.40	74.77 ^{ab} ±0.47
Crude ash	1.67 ^{cd} ±0.07	1.22 ^{bcd} ±0.08	1.43 ^{ab} ±0.03	1.08 ^d ±0.12	1.45 ^a ±0.04	1.32 ^{abc} ±0.04	1.28 ^{abcd} ±0.05
Crude Fat	5.78 ^a ±0.23	5.79 ^a ±0.20	4.54 ^b ±0.18	4.62 ^b ±0.26	3.70 ^c ±0.41	3.71 ^c ±0.41	3.58 ^c ±0.17
Crude Protein	20.12 ^c ±0.13	20.88 ^{ab} ±0.45	20.96 ^{ab} ±0.21	21.00 ^{ab} ±0.11	21.18 ^a ±0.16	20.38 ^{bc} ±0.16	19.29 ^d ±0.14

^{a,b,c,d} Mean with different superscripts within the same raw are significantly different (P<0.05)

^e When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

3) 도체산패도 (TBA) 측정

시험 육계의 도체산패도 (TBA) 값을 측정하기 위해 가슴살을 분석한 결과는 Table 48과 같았다. 3주차에서는 YF04 0.1% 처리구가 5.59으로 가장 낮은 산패도를 보였고 YM03 0.1% 처리구는 9.69으로 가장 높은 산패도를 보였으며, 통계적 유의차가 나타났다 ($P < 0.05$). 6주차에서는 YF04 1.0% 처리구가 10.52 산패도가 가장 낮았으며, YM03 1.0% 처리구는 15.25로 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 9주차에서는 YF04 0.1% 21.34로 가장 낮은 산패도 수치를 보였으며 유의차는 없었다 ($P > 0.05$). Waldo 등 (1993)은 척추동물 ferritin 중 H chain에 Iron-tyrosinate complex가 존재하나 L chain에는 존재하지 않으며 이는 철의 빠른 산화와 관련이 있다고 보고하였으나 본 연구결과에서는 전체적으로 철분의 첨가 수준 또는 종류에 따른 큰 차이는 없는 것으로 나타났다 ($P > 0.05$).

Table 48. Effects of dietary Fe on meat TBA in broiler (%)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^d	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
3 Week	9.17 ^{ab} ±1.18	9.69 ^a ±1.89	9.29 ^{bc} ± 0.77	5.59 ^c ± 0.41	7.03 ^{bc} ±0.03	6.76 ^c ±0.35	6.48 ^c ±0.36
6 Week	14.58 ^a ±2.38	15.19 ^a ±1.52	15.25 ^a ± 0.92	12.57 ^{ab} ±1.31	10.52 ^b ±1.03	11.71 ^{ab} ±0.73	14.92 ^a ±1.16
9 Week	24.29 ±4.72	24.98 ±1.76	24.83 ±3.52	21.34 ±1.17	21.58 ±0.58	22.53 ±2.19	27.55 ±1.29

^{a,b,c} Mean with different superscripts within the same raw are significantly different (P<0.05)

^dWhen YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

4) 혈중 Fe 함량

혈청내 철분(Fe) 함량을 분석한 결과는 Table 49에 나타나 있다. 혈청(Serum)에서는 대조구가 1.43 mg/dl으로 가장 높은 철분 (Fe)을 보였으나 처리간의 유의차는 없었다 ($P>0.05$). 전 등 (1996)은 혈청의 철분 함량은 철분의 섭취 수준 증가에 따라 유의하게 높았다고 보고하였지만 본 실험에는 섭취에 따라 혈청 철분 함량에 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 49. Effects of dietary ferritin on Serum Fe in broiler (mg/dl)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^a	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
Serum	1.43 ±0.08	1.22 ±0.09	1.35 ±0.08	1.38 ±0.10	1.19 ±0.01	1.32 ±0.10	1.41 ±0.11

^a When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10^7 cfu/kg and 10^8 cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

5) 도체 Fe 함량

Fe 함량을 분석한 결과는 Table 50에 나타나 있다. 도체 철분 함량은 YF04 0.1%와 1.0% 처리구가 41.58 mg/dl와 40.31 mg/dl으로 대조구의 30.51 mg/dl보다 높은 수치를 보였으나 처리간의 유의차는 나타나지 않았다 ($P>0.05$). Granink (1946)은 간장과 비장에서 철 저장 역할을 가진 단백질로 알려져 있는 ferritin이 소장에서도 존재하고 있으며, 이 ferritin이 철의 흡수에 관여한다고 보고한 바 있으며, 본 연구 결과에서도 유사한 경향은 있었으나 통계적 유의성은 없었다..

Table 50. Effects of dietary ferritin on Meat Fe in broiler (mg/dl)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^a	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
Meat	30.51 ±2.32	32.75 ±2.10	32.42 ±2.86	41.58 ±1.69	40.31 ±3.24	37.66 ±3.38	37.03 ±5.47

^a When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10^7 cfu/kg and 10^8 cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

6) 혈중 지방산 함량

시험사료를 섭취한 육계의 혈중 지방산 함량을 분석한 결과는 Table 51에 나타나 있다. 필수 지방산이 부족하게 되면 특징적인 결핍증상은 질병의 저항성 저하와 음수량의 증가를 가져온다고 한다 (Balnave, 1970). 본 시험의 결과 혈중 내의 여러 가지 지방산 중 palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1) 및 linoleic acid (C18:2)의 함량이 많은 부분을 차지한다. Whitehead (1986)는 닭의 체내 지방산은 주로 palmitic acid (C16:0)와 oleic acid (C18:1)인데 본 실험에서도 이 보고와 유사한 결과를 보였다. 포화지방산의 비율은 YF04 1.0% 처리구가 34.33%로 가장 높게 나타났으며, 불포화지방산의 비율은 YF04 0.1% 처리구가 32.78%로 가장 높게 나타났다. 철분이 강화된 효모를 첨가한 처리구는 대조구에 비해서 palmitic acid (C16:0)은 증가함을 보였지만 linoleic acid (C18:2)가 증가하지 않았다.

Table 51. Effects of dietary Fe on plasma fatty acid in broiler (%)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^f	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
C14 : 0	0.24 ^a ±0.02	0.25 ^{ab} ±0.01	0.22 ^{ab} ±0.05	0.29 ^a ±0.05	0.22 ^{ab} ±0.01	0.23 ^{ab} ±0.03	0.19 ^b ±0.02
C16 : 0	20.45 ^b ±0.73	22.58 ^{ab} ±0.55	22.39 ^{ab} ±1.41	21.00 ^{ab} ±1.67	24.28 ^a ±2.56	19.70 ^b ±1.69	22.86 ^{ab} ±0.96
C18 : 0	6.89 ^a ±0.95	5.42 ^{bcd} ±0.36	4.33 ^d ±0.43	6.62 ^{ab} ±0.49	6.19 ^{abc} ±0.91	5.39 ^{bcd} ±0.43	5.22 ^{cd} ±0.23
C18 : 1	18.07 ^b ±0.57	19.78 ^{ab} ±0.72	20.03 ^{ab} ±1.43	21.57 ^a ±0.58	20.72 ^a ±1.43	19.67 ^{ab} ±1.45	20.76 ^a ±1.09
C18 : 2	11.28 ^a ±0.45	8.63 ^c ±0.48	10.59 ^{ab} ±0.58	9.91 ^{abc} ±1.00	9.08 ^{bc} ±1.26	9.30 ^{bc} ±0.55	8.45 ^c ±0.63
C18 : 3	0.05 ±0.01	0.06 ±0.02	0.07 ±0.01	0.06 ±0.01	0.04 ±0.01	0.07 ±0.01	0.07 ±0.01
C20 : 1	0.19 ^c ±0.03	0.23 ^{bc} ±0.03	0.23 ^{bc} ±0.03	0.27 ^{abc} ±0.04	0.34 ^a ±0.06	0.31 ^{ab} ±0.07	0.26 ^{abc} ±0.03
C20 : 2	0.19 ^c ±0.01	0.23 ^{bc} ±0.02	0.41 ^a ±0.02	0.21 ^c ±0.03	0.22 ^c ±0.03	0.28 ^b ±0.01	0.23 ^{bc} ±0.03
C22 : 0	3.16 ^a ±0.72	3.21 ^a ±0.35	2.16 ^b ±0.43	2.80 ^{ab} ±0.28	2.51 ^{ab} ±0.36	2.16 ^b ±0.50	2.11 ^b ±0.07
C22 : 1	0.04 ^e ±0.02	0.06 ^e ±0.02	1.01 ^a ±0.10	0.76 ^b ±0.05	0.51 ^c ±0.13	0.43 ^{cd} ±0.02	0.31 ^d ±0.01
C24 : 0	1.24 ^b ±0.16	1.26 ^b ±0.15	1.29 ^b ±0.15	0.98 ^b ±0.06	1.13 ^b ±0.07	1.77 ^a ±0.23	1.79 ^a ±0.29
SFA ¹⁾	31.98	31.67	30.36	31.36	34.33	29.25	32.17
USFA ²⁾	31.02	28.99	32.34	32.78	30.91	30.06	30.08
USFA/SFA	1.03	1.09	1.07	1.05	0.90	1.02	0.93

1) Saturated fatty acids, 2) Unsaturated fatty acids. ^{a,b,c,d,e} Mean with different superscripts within the same row are significantly different (P<0.05)
^e When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

7) 도체 지방산 함량

시험사료를 섭취한 육계의 도체 지방산 함량을 분석한 결과는 Table 52에 나타나 있다. 본 시험의 결과 혈중 내의 여러 가지 지방산 중 palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1) 및 linoleic acid (C18:2)의 함량이 많은 부분을 차지한 것과 그 외 지방산의 함유량이 도체 내에서도 유사한 결과를 보였다. 포화지방산의 비율은 YM03 1.0% 처리구가 33.63%로 가장 높게 나타났으며, 불포화지방산의 비율은 YM03 1.0% 처리구가 61.01%로 가장 높게 나타났다. 대조구의 비교하여 불포화지방산의 함유율은 높은 경향을 나타냈으나 포화지방산에서는 낮은 경향을 보였다.

Table 52. Effects of dietary ferritin on meat fatty acid in broiler (%)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^f	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
C14 : 0	1.28 ^{bc} ±0.14	1.15 ^{bc} ±0.03	1.48 ^{ab} ±0.11	1.33 ^c ±0.02	1.16 ^c ±0.03	1.50 ^{ab} ±0.03	1.63 ^a ±0.28
C16 : 0	22.25 ^{ab} ±1.18	22.95 ^a ±1.16	23.04 ^a ±0.67	21.28 ^{ab} ±0.90	19.73 ^{bc} ±0.55	18.37 ^c ±0.89	22.01 ^{ab} ±2.42
C18 : 0	6.69 ±0.45	6.53 ±0.72	8.44 ±0.45	7.51 ±0.71	7.74 ±0.83	8.08 ±0.67	8.01 ±0.99
C18 : 1	41.23 ±0.50	40.80 ±0.87	42.21 ±0.72	40.53 ±1.46	39.80 ±0.90	38.30 ±1.14	41.33 ±4.80
C18 : 2	15.68 ^{bc} ±0.61	15.67 ^{bc} ±0.51	16.68 ^{ab} ±0.39	13.77 ^c ±0.53	16.99 ^{ab} ±0.97	18.37 ^a ±0.07	17.46 ^{ab} ±2.35
C18 : 3	0.82 ^e ±0.07	1.27 ^{bc} ±0.03	1.01 ^{cd} ±0.10	1.12 ^{cd} ±0.03	1.51 ^a ±0.11	1.39 ^a ±0.11	0.83 ^e ±0.07
C20 : 1	0.54 ^b ±0.02	0.83 ^a ±0.06	0.79 ^{ab} ±0.04	0.78 ^{ab} ±0.11	0.55 ^b ±0.07	0.73 ^{ab} ±0.11	0.85 ^a ±0.14
C20 : 2	0.19 ^b ±0.01	0.22 ^{ab} ±0.01	0.27 ^{ab} ±0.02	0.27 ^{ab} ±0.02	0.22 ^{ab} ±0.03	0.19 ^b ±0.02	0.30 ^a ±0.06
C22 : 0	0.53 ^b ±0.03	0.63 ^b ±0.03	0.62 ^b ±0.02	0.55 ^b ±0.07	0.72 ^{ab} ±0.05	0.84 ^a ±0.10	0.57 ^b ±0.04
C22 : 1	0.04 ±0.01	0.06 ±0.02	0.05 ±0.01	0.07 ±0.01	0.04 ±0.01	0.07 ±0.01	0.06 ±0.02
C24 : 0	0.05 ±0.01	0.07 ±0.01	0.05 ±0.01	0.08 ±0.04	0.07 ±0.04	0.09 ±0.01	0.10 ±0.02
SFA ¹⁾	30.80	31.33	33.63	30.75	29.42	28.88	32.32
USFA ²⁾	58.50	58.85	61.01	56.54	56.54	59.05	60.83
USFA/SFA	1.90	1.88	1.81	1.84	1.92	2.04	1.88

1) Saturated fatty acids, 2) Unsaturated fatty acids. ^{a,b,c,d,e} Mean with different superscripts within the same raw are significantly different (P<0.05). ^f When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

8) 복강 지방 및 장기무게 측정

Table 53는 시험사료를 6주간 급여한 육계의 소낭, 심장, 간, 근위, 췌장, 맹장, 신장 및 복강내 지방의 무게에 대한 결과이다. 생 체중에 대한 장기의 비율은 대체적으로 YM03 처리구가 대조구 및 다른 처리구에 비해 낮은 경향을 나타냈으며 소낭 부분에서 유의차를 보였다 ($P<0.05$). YF04 처리구는 영양 흡수를 담당하는 기관인 소장 무게가 다른 처리구보다 높은 경향을 나타내었다. 이로 볼 때는 소장은 YF04 처리구가 영양 흡수면에서 좋은 경향을 나타낼 것으로 사료된다. 복강 내 지방 축적은 YF04 1.0% 처리구가 23.17 g으로 가장 높은 수치를 보였고 YM03 0.1% 처리구는 6.79 g으로 낮았고 유의차를 보였다($P<0.05$). 대체적으로 복강 내 지방의 축적이 많으면 다른 기관들도 높은 경향을 보였다. Leestra 등 (1986)의 복강지방 축적 비율과 체중간의 표현형 상관은 일반적으로 정 (+)의 상관관계의 결과를 보였다는 보고와 일치하였다.

Table 53. Effects of ferritin on development of intestinal organs in broiler
(g)

Treatments	Control	YM03 (%)		YF04 (%)		Organic iron (%)	
		0.1 ^d	1.0	0.1	1.0	0.01	0.1
Crop wt./Live wt.	5.30 ^{ab} ±0.80	2.65 ^c ±0.27	3.62 ^{bc} ±0.71	5.82 ^a ±0.64	5.97 ^a ±0.53	5.76 ^a ±0.62	6.95 ^a ±0.65
Heart wt./Live wt.	11.71 ±0.84	11.81 ±0.89	11.65 ±0.79	15.85 ±3.22	11.62 ±1.18	11.64 ±0.88	12.83 ±1.45
Liver wt./Live wt.	37.29 ±1.54	35.28 ±1.34	37.45 ±1.63	37.06 ±2.19	39.41 ±3.00	35.48 ±3.06	42.67 ±4.43
Gizzardwt./Live wt.	43.54 ±2.76	38.09 ±2.92	38.31 ±2.92	38.58 ±2.55	38.22 ±1.83	40.26 ±1.56	39.36 ±1.87
Pancreas wt./Live wt.	3.84 ±0.33	4.41 ±0.21	4.08 ±0.20	4.83 ±0.32	4.07 ±0.30	8.67 ±4.71	4.51 ±0.43
Cecum wt./Live wt.	11.40 ±0.97	12.74 ±1.21	13.91 ±1.55	13.36 ±0.77	11.63 ±1.86	15.94 ±2.14	12.67 ±1.77
Kidney wt./Live wt.	2.88 ±0.34	4.05 ±0.69	3.67 ±0.65	3.37 ±0.27	3.03 ±0.32	3.43 ±0.34	3.64 ±0.41
SIntestine wt./Live wt.	39.58 ±2.61	40.51 ±0.66	40.36 ±1.48	43.22 ±5.39	45.09 ±2.13	38.58 ±2.30	42.63 ±2.91
LIntestine wt./Live wt.	9.09 ^a ±1.44	9.62 ^a ±0.44	7.95 ^{ab} ±0.63	6.57 ^{ab} ±7.94	5.46 ^b ±0.88	4.85 ^b ±0.71	5.31 ^b ±1.12
Abdominal fat pad wt./Live wt.	18.49 ^{abc} ±3.89	6.79 ^c ±0.88	11.21 ^{bc} ±3.60	16.00 ^{abc} ±3.12	23.17 ^a ±3.54	16.93 ^{abc} ±4.04	14.42 ^{ab} ±2.29
Proventriculus/Live wt.	8.10 ±0.34	7.71 ±0.56	7.76 ±0.20	9.11 ±0.82	8.61 ±0.54	7.59 ±0.34	8.77 ±0.54

^{a,b,c} Mean with different superscripts within the same raw are significantly different (P<0.05).

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

2. 철과 철분단백질 첨가가 산란계의 생산성 및 난 성분에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 공시동물

공시동물은 35주령 갈색 (Hyline Variety Brown) 산란계 245수를 공시하였다. 공시된 산란계는 2수용 3단 철제 cage에서 사육하였으며 시험 사료 및 물은 자유 채식토록 하였으며 점등 및 기타 사양관리는 일반 관행을 따랐다.

2) 시험기간 및 시험장소

시험기간은 2004년 2월 11일부터 4월 14일까지 9주간에 걸쳐 순천대학교 부속 동물 사육장에서 사양시험을 실시하였다.

3) 시험 설계 및 시험사료

본 시험에서 사용한 기초사료는 일반사료로 사료배합율표와 영양소 함량은 Table 54에 나타나 있다. 효모 제품 YM03TM은 생균수가 10^{10} cfu/kg이고 철분 함량은 200 mg/kg이다. 효모 제품 YM04TM은 생균수가 10^{10} cfu/kg이고 철분 함량은 500 mg/kg이다. 시판 Organic Fe은 철분 함량이 5%인 일반제품을 이용하였다. 본 시험에서는 기초사료에 *Saccharomyces cerevisiae* (mutant type)를 이용한 효모 제품 (YM03TM) 0.1% 처리구 (10^7 cfu/kg, Fe 0.2 mg/kg), 1.0% 처리구 (10^8 cfu/kg, Fe 2 mg/kg), *Saccharomyces cerevisiae* hFeHLC (ferritin containing yeast)를 이용한 효모 제품 (YF04TM) 0.1% 처리구 (10^7 cfu/kg, Fe 0.5 mg/kg), 1.0% 처리구 (10^8 cfu/kg, Fe 5 mg/kg), 시판 B 사의 organic Fe 0.01% 처리구 (Fe 5 mg/kg), Organic Fe 0.1% (50 mg/kg) 처리구로 총 7처리 5반복 반복당 7수씩 임의배치하여 사양시험을 실시하였다.

Table 54. Formula and chemical composition of experimental diet (%)

Ingredients	Control
Corn grain	62.17
Soybean meal	19.35
Corn gluten meal	3.50
Fish meal	1.25
Animal fat	1.85
Salt	0.20
Tricolcium phosphate	1.58
Limestone	8.35
Shellmax	0.30
DL-Methionine	0.21
L-Lysine	0.06
Cholin chloride	0.10
Vit-min mix ¹⁾	0.24
Natuphos	0.03
Avizyuphos	0.02
Bio-5050	0.10
Fermentzyme	0.10
Citrax	0.01
Biotite	0.30
Ferm-Kito	0.10
Digestarom-Pol	0.01
N-Fac 1000	0.12
Shell Fos	0.05
Chemical composition ²⁾	
ME (kcal/kg)	2782.86
C. Protein (%)	16.36
Lysine (%)	0.79
Methionine (%)	0.39
Ca (%)	3.89
Avail. P (%)	0.38

¹⁾ Vit-min mix. provided following nutrients per kg of diet : Vitamin A, 9,000,000 IU; Vitamin D3, 2,100,000 IU; Vitamin E, 15,000 IU; Vitamin K, 2,000mg; Vitamin B1, 1,500mg; Vitamin B2, 4,000mg; Vitamin B6, 3,000mg; Vitamin B12, 15mg; Pan-Acid-Ca, 8500mg; Niacin, 20,000mg; Biotin, 110mg; Folic-Acid, 600mg; Fe, 40,000; Co, 300mg; Cu, 3,500mg; Mn, 55,000mg; Zn, 40,000mg; I, 600mg; Se, 130mg

²⁾ Calculated values

4) 조사항목 및 조사방법

가) 산란율

산란율은 시험기간 중 생산된 총 산란수를 공시수로 나누어 백분율로 환산하였다.

나) 난중

난중은 매일 4시에 집란 후 평량, 반복별로 총 난중을 총 산란수로 나누어 평균 난중을 구하였다.

다) 산란량

산란량은 산란율에 난중을 곱하여 계산하였다.

라) 사료섭취량 및 사료 요구율

시험기간중 매 1주 간격으로 사료섭취량을 평량하여 1일 1수당 사료 섭취량을 계산하였으며, 시험기간중 총 사료섭취량을 총 산란량으로 나누어 사료요구율을 계산하였다.

마) 난각 두께

난각의 두께는 시험기간 중 1주 간격으로 집란, 난의 세 지점을 측정하여 그 평균치를 사용하였다.

마) 난황 색도

난황의 표면을 Chroma meter (Minolta, CR-210, Japan)를 사용하여 백색도 (lightness)를 나타내는 L값, 적색도 (redness)를 나타내는 a값과 황색도 (yellowness)를 나타내는 b값을 측정하였다. 이 때의 표준색은 L값이 97.10, a값이 -0.17 및 b값이 1.99인 백색 표준판을 사용하였다.

사) 하우 유니트 (Haugh unit), 난형태, 난백색, 난황

하우 유니트, 난형태, 난백색, 난황은 TSS (Technical services and supplies)로 측정하였다. 난백색은 TSS의 scanner로 측정하였으며, 주로 난의 옆부분 중 색이 고른 부분에서 측정을 하였다. 난형태는 난황의 끝으로부터 대략 1 cm밖의 난백이 수평인 부분을 다리가 세 개인 난백측정기를 가지고 가볍게 눌러서 바닥에 닿으면 컴퓨터로 연결된 센서가 난형태를 HU까지 기록을 하였다.

아) 난황 지방산 함량

난황지방산 1 g을 12 ml Folch solution(Chloroform : Methanol = 2:1)에 녹여서 Vortexing하여 균일하게 하였다. Vortexing한 것을 질소가스로 씻어내고 60°C Water bath에서 1시간동안 Stirring시킨후 반응물을 여과하였다 (Whatman#1 filter paper이용). 15 ml test tube에 옮기고 0.9% NaCl 2.4 ml를 섞는다. 30분동안 3000rpm에서 원심분리를 시켰다. 원심분리된 용액의 아래층 용액 1 ml을 ampule(작은병)에 옮기고 질소가스로 건조 시켰다. 이 용액에 benzene 3방울을 떨어뜨린후 5% sulfuric acid (in MeOH) 1 ml에 다시 용해시켰다.

Water bath에서 45분동안 95°C에서 가열한다. 용액을 식힌후 tube에 옮겨 1 ml Sodium Carbonate를 첨가한다. Petroleum ether 3 ml를 첨가하여 3회이상 추출후 질소가스하에서 건조시켰다. 0.5 ml Petroleum ether에 녹여 CG로 분석하였다.

자) 난황내 철분 함량

계란내 철분 함량 분석 기기는 ICP (inductively coupled plasma, 유도결합플라즈마)로 측정하였다. 시료액 조제는 시료 50 g 정도를 자제크루시블에 취하고 100℃에서 건조한 후 600℃에서 회백색이 될 때까지 태운후 방냉하고 염산 (1:1) 20 ml를 가하여 하룻밤 방치 용해시킨 후 No. 6 여과지를 이용 뜨거운 3차 증류수로 여과하여 50 ml로 시료 액으로 하였다. 시판되고 있는 표준용액 (1,000 mg/kg)을 희석하여 Ca, P, K, Na 및 Mg는 0, 2, 4, 8, 16 및 32 mg/kg으로 Fe, Mn, Zn 및 Cu는 0, 0.5, 1, 2, 4 및 8 mg/kg으로 흡광도를 측정 검량곡선으로 하고 미리 제조된 시료 액을 측정하였으며, 측정단위는 mg/kg으로 하였다.

카) 관능검사

관능검사는 곽 (1992)의 방법에 의해서 실시하였으며, 관능검사의 시료는 7주의 계란으로 끓은 물에 20분간 삶았고, 관능검사원의 대상은 순천대학교 동물자원과학과 학생 30명으로 이루어져 1에서 5점까지의 점수 (1: 매우 나쁘다, 2: 나쁘다, 3: 보통이다, 4: 좋다, 5: 매우 좋다)인 5점 척도법 (Stone 등, 1974)으로 외형, 색깔, 다즙성, 연도, 향과 종합적인 평가를 검사하였다.

타) 산패도 (TBA)

본 시험에서 얻어진 자료의 산패도 (TBA)는 난황을 이용하여 test tube에 넣고 thio-basbitusic acid (TBA) 용액을 넣어 centrifuge tube에 담아 2,500 rpm에서 15분간 원심분리를 하고, 그후에 상층액을 cuvette에 옮겨, UV-Spectrophotometer (KONTROM 942, Italy)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

파) 통계처리

본 시험에서 얻어진 자료의 통계처리는 SAS statical Package Program (SAS, Institute, 1995)에 의하여 분산분석을 실시하였으며, 처리 평균간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법을 이용하여 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 산란율

철과 철단백질 첨가에 따른 Table 55와 같이 나타났다. 평균 산란율은 Organic Fe과 YF04 처리구가 YM03 처리구에 비해서 높은 경향을 보였다. YF04 1.0% 처리구의 평균 산란율이 97.09%로 가장 높게 나타났으며, 대조구는 90.66%로 가장 낮은 산란율을 보여 처리간의 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

산란율은 YF04 1.0% 처리구가 대조구보다 높은 산란율을 보였는데, 이는 유종석 등 (1990), Gerendia (1992) 및 Lim (1992)이 보고한 활성효모 첨가로 산란율을 개선되었다는 연구결과와 유사한 결과를 보인 것이다.

Table 55. Effect of dietary ferritin on egg production in the layer (%)

Treat Week	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	87.12 ^a	97.76 ^a	91.79 ^{ab}	95.83 ^a	93.89 ^a	95.92 ^a	96.74 ^a
2	93.67	97.59	96.51	97.62	100.83	97.47	95.61
3	90.94	92.33	95.92	94.01	94.54	95.73	95.27
4	92.65	95.60	96.94	98.73	95.80	97.94	96.55
5	91.57 ^b	98.78 ^a	97.70 ^a	96.59 ^{ab}	97.64 ^a	96.89 ^{ab}	94.95 ^{ab}
6	89.59 ^c	95.58 ^{ab}	95.94 ^{ab}	91.27 ^{bc}	99.32 ^a	97.76 ^a	97.11 ^a
7	92.21 ^b	97.01 ^{ab}	95.32 ^{ab}	95.71 ^{ab}	91.17 ^a	98.18 ^{ab}	96.26 ^{ab}
8	88.99 ^b	95.24 ^a	93.78 ^{ab}	94.29 ^{ab}	96.74 ^a	95.48 ^a	95.36 ^a
9	89.24 ^b	97.37	95.80 ^{ab}	95.95 ^a	95.87 ^a	94.12 ^{ab}	94.92 ^{ab}
Mean	90.66 ^b	96.36 ^a	95.52 ^a	95.56 ^a	97.09 ^a	96.61 ^a	95.86 ^a

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

2) 난중

유기철과 철단백질 첨가에 따른 난중은 Table 56에 나타나 있다. 대조구보다 Organic Fe과 철단백질 처리구들이 낮은 경향을 보였다. YM03 0.1% 및 1.0% 처리구가 59.77 g 및 59.69 g으로 가장 높고 Organic Fe 0.1% 처리구가 56.87 g으로 가장 낮은 난중을 보여 처리간의 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

본 실험에서 주령별 난중을 보면 주령이 지나감에 따라 전체적으로 난중의 무게가 감소하는 경향을 보였다. 이는 백 (1991)이 실험한 결과 산란율이 증가로 인하여 난중은 비례적으로 가벼워지는 경향을 보였다는 보고와 유사하였다.

Table 56. Effect of dietary ferritin on egg weight in the layer (g)

Treat. Week	Control	YM03 0.1% ^c	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	56.20 ^b	60.82 ^a	58.30 ^{ab}	58.48 ^{ab}	57.83 ^{ab}	58.85 ^{ab}	58.81 ^{ab}
2	58.50	59.83	58.14	59.87	59.56	58.80	59.04
3	59.07	59.88	58.99	60.01	60.28	58.58	58.92
4	60.29 ^{ab}	60.29 ^{ab}	59.61 ^{ab}	59.68 ^{ab}	58.66 ^b	61.10 ^a	60.08 ^{ab}
5	59.85	59.15	58.43	58.45	57.04	58.22	57.99
6	59.50 ^{ab}	61.40 ^a	58.80 ^c	59.88 ^{ab}	59.49 ^{ab}	60.12 ^{ab}	59.01 ^{ab}
7	58.27	59.60	58.41	58.58	58.55	58.82	58.01
8	59.50	60.27	59.05	59.80	57.81	59.95	59.50
9	59.77 ^a	59.77 ^a	59.70 ^a	58.67 ^{ab}	58.82 ^{ab}	58.63 ^{ab}	56.87 ^b
Mean	59.18 ^a	59.77 ^a	59.69 ^a	58.67 ^{ab}	58.81 ^{ab}	58.63 ^{ab}	56.87 ^b

^{a,b} Mean with different superscripts in the same rows are significant different ($P < 0.05$)

^c When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10^7 cfu/kg and 10^8 cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

3) 산란량

유기철과 철단백질 첨가에 따른 산란량은 Table 57에 나타나 있다. 산란량은 YM03 0.1% 처리구가 57.88 g으로 높은 산란량을 보였고 대조구가 52.11 g으로 가장 낮은 산란량을 보여 처리간의 유의차가 나타났다 ($P < 0.05$). 또한 YF04 첨가구는 1.0% 첨가했을 때 산란량은 56.83 g으로서 YF04 0.1% 첨가구 56.60 g과 비슷한 산란량을 보였으며, 대조구 52.11 g과도 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

Table 57. Effect of dietary ferritin on egg mass in the layer (g)

Treat. Week	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	48.22 ^c	59.47 ^b	53.75 ^b	56.06 ^{ab}	54.30 ^b	56.50 ^{ab}	56.91 ^{ab}
2	52.63 ^{ab}	58.38 ^a	56.13 ^a	58.17 ^{ab}	59.58 ^a	57.29 ^{ab}	56.41 ^{ab}
3	53.00	55.37	56.57	56.41	56.90	56.02	56.17
4	54.05 ^b	57.56 ^{ab}	57.76 ^{ab}	58.84 ^{ab}	56.15 ^{ab}	59.85 ^a	57.99 ^{ab}
5	52.93 ^b	58.44	57.08	56.33	55.41	56.41	55.06
6	53.03 ^c	58.68 ^a	56.41 ^{ab}	55.15 ^{ab}	58.82 ^a	58.79 ^a	57.32 ^a
7	52.45 ^b	57.76 ^a	55.65 ^{ab}	56.05 ^{ab}	58.03 ^a	57.77 ^a	55.86 ^{ab}
8	51.56 ^b	57.40 ^a	55.38 ^{ab}	56.36 ^a	55.92 ^a	57.22 ^a	56.65 ^a
9	51.18 ^b	57.89 ^a	56.90 ^a	56.00 ^{ab}	56.39 ^{ab}	55.19 ^{ab}	53.97 ^{ab}
Mean	52.11 ^b	57.88 ^a	56.18 ^a	56.60 ^a	56.83 ^a	57.23 ^a	56.26 ^a

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

4) 사료 섭취량

유기철과 철단백질 첨가에 따른 사료 섭취량은 Table 58에 나타나 있다. 사료 섭취량은 YM03 1.0% 처리구가 130.00 g으로 가장 높은 섭취량을 보였고 대조구는 119.40 g으로 가장 낮은 섭취량을 보였다. 이는 처리구간의 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 사료섭취량을 보면 효모철이나 유기철의 섭취량이 대조구보다 높은 경향을 보였다. 이는 Peppler (1982), Cantor 등 (1983) 및 Hughes (1987)는 효모 배양물을 사료에 첨가했을 때 기호성 증진제로서 작용을 하여 사료 섭취량을 증가시킨다는 보고와 유사한 경향으로 사료된다..

Table 58. Effect of dietary ferritin on feed intake in the layers (g)

Treat. Week	Control	YM03 0.1% ^c	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	129.58	129.80	144.40	131.20	135.60	127.80	136.20
2	127.75	133.00	137.20	127.20	132.80	128.80	134.80
3	99.75	98.40	108.60	104.60	112.20	95.60	96.20
4	121.80	128.60	131.00	125.40	134.40	120.80	128.80
5	117.75	118.00	127.40	129.40	120.20	125.40	131.20
6	115.75 ^b	121.00 ^{ab}	137.40 ^a	122.80 ^{ab}	127.60 ^{ab}	118.00 ^{ab}	125.20 ^{ab}
7	126.00	124.80	124.60	135.40	133.80	131.40	129.00
8	123.25	138.80	138.80	127.60	131.80	130.00	132.20
9	109.75 ^{ab}	119.80 ^{ab}	123.60 ^{ab}	133.40 ^a	126.40 ^{ab}	121.20 ^{ab}	126.40 ^{ab}
Mean	119.40 ^b	121.83 ^{ab}	130.00 ^a	125.83 ^{ab}	127.67 ^{ab}	121.83 ^{ab}	126.33 ^{ab}

^{a,b} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^c When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

5) 사료 요구율

철과 철단백질 첨가에 따른 사료 요구율은 Table 59에 나타나 있다. 산란계 사료에 철과 철단백질 첨가가 산란계의 사료 요구율에 미치는 영향으로 평균 사료요구율은 YM03 1.0% 처리구가 2.21으로 가장 높았고, YM03 0.1% 처리구가 2.03으로 가장 낮은 사료 요구율으로 보였으며, 처리구간 통계적인 유의차를 보이지는 않았다 ($P>0.05$).

Table 59. Effect of dietary ferritin on feed conversion in the layer

Treat. Week	Control	YM03 0.1% ^c	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	2.30 ^{ab}	2.14 ^b	2.48 ^a	2.25 ^{ab}	2.35 ^{ab}	2.17 ^b	2.32 ^{ab}
2	2.20	2.23	2.36	2.13	2.22	2.19	2.28
3	1.74	1.66	1.84	1.73	1.83	1.63	1.63
4	2.12 ^{ab}	2.11 ^{ab}	2.20 ^{ab}	2.09 ^{ab}	2.28 ^a	1.97 ^b	2.14 ^{ab}
5	2.09	2.01	2.18	2.21	2.10	2.15	2.26
6	2.04 ^{ab}	1.97 ^b	2.30 ^a	2.05 ^{ab}	2.13 ^{ab}	1.96 ^b	2.12 ^{ab}
7	2.26	2.10	2.15	2.30	2.27	2.23	2.22
8	2.11	2.07	2.34	2.12	2.28	2.17	2.22
9	1.98	2.01	2.06	2.25	2.12	2.06	2.22
Mean	2.09	2.03	2.21	2.13	2.18	2.06	2.16

^{a,b} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^c When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

6) 난각 두께

철과 철단백질 첨가에 따른 난각의 두께는 Table 60에 나타나 있다. 난각두께는 YM03 1.0% 처리구가 352.0 μm 으로 가장 높았고 대조구는 348.5 μm 및 Oragnic Fe 0.01%첨가구가 348.2 μm 로 낮은 난각두께를 보여 열거한 평균 난각 두께에서는 처리구간의 유의차를 보였다 ($P<0.05$).

Table 60. Effect of dietary ferritin on egg shell thickness in the eggs (μm)

Treat. Week	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	355.4 ^c	346.9 ^b	346.0 ^b	347.8 ^b	361.3 ^a	349.0 ^b	365.6 ^a
2	337.3 ^c	350.7 ^{ab}	347.9 ^{ab}	353.5 ^a	341.9 ^{bc}	348.8 ^{ab}	352.5 ^a
3	343.8 ^{bc}	338.7 ^c	356.2 ^a	349.9 ^{ab}	339.2 ^c	351.6 ^{ab}	345.3 ^{bc}
4	346.6	350.7	345.2	344.4	349.9	343.1	347.7
5	360.3 ^a	355.1 ^{ab}	352.9 ^{abc}	355.1 ^{ab}	352.8 ^{abc}	338.9 ^c	340.8 ^{bc}
6	363.6 ^{ab}	359.0 ^{ab}	363.5 ^{ab}	366.3 ^a	349.7 ^b	352.1 ^b	358.7 ^{ab}
7	355.1 ^{ab}	349.4 ^b	368.0 ^a	356.8 ^{ab}	356.2 ^{ab}	345.5 ^b	346.7 ^b
8	354.0	354.9	346.2	346.7	344.0	350.7	348.0
9	340.8 ^{ab}	343.2 ^{ab}	342.0 ^{ab}	337.0 ^b	343.0 ^{ab}	353.9 ^a	352.7 ^a
Mean	348.5	349.7	352.0	351.1	348.7	348.2	350.6

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different ($P < 0.05$)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10^7 cfu/kg and 10^8 cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

7) 난황 색도

철과 철단백질 첨가에 따른 난황 색도는 Table 61에 나타나 있다. 색도 측정은 3주, 5주, 7주 3번회에 걸쳐 채취한 계란으로 백색도 (L), 적색도 (a), 황색도 (b)을 측정한 평균치를 나타낸 것이다. 백색도는 YM03 0.1% 처리구가 50.63으로 가장 높게 나타났고, 대조구는 49.98으로 가장 낮은 백색도를 보였지만 처리구간의 유의차는 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$).

적색도는 대조구는 8.85로 가장 높았고 Organic 0.01% 처리구가 7.64로 가장 낮은 적색도를 보였으며 처리구간의 유의적 차이를 보였다 ($P<0.05$).

황색도는 YM 0.1% 처리구가 62.92으로 가장 높았고, 대조구는 59.22으로 가장 낮은 황색도를 보였으며, 이들 처리구간에는 유의적 차이를 보였다 ($P<0.05$).

Table 61. Effect of dietary ferritin on egg yolk color changes

Treat	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
L	49.98 ±1.44	50.63 ±0.72	50.36 ±0.59	50.60 ±0.78	50.59 ±0.90	50.39 ±0.80	50.57 ±1.24
a	8.85 ^a ±0.41	8.36 ^{ab} ±0.36	8.40 ^{ab} ±0.27	8.62 ^{ab} ±0.42	8.32 ^b ±0.38	7.64 ^c ±0.31	7.70 ^c ±0.26
b	59.22 ^b ±2.34	62.92 ^a ±1.59	62.14 ^a ±1.59	61.91 ^a ±2.29	61.50 ^{ab} ±1.67	61.00 ^{ab} ±1.89	62.63 ^a ±1.57

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

8) 하우 유니트 (Haugh unit)

철과 철단백질 첨가에 따른 주령별 하우 유니트는 Table 62과 같이 나타나 있다. 하우 유니트는 YM03 0.1% 처리구가 88.95으로 가장 높았으며, 대조구가 78.94로 가장 낮게 나타났으며, 이들 처리구간의 유의적 차이를 보였다 ($P < 0.05$).

Table 62. Effect of ferritin on internal quality in the eggs (Haugh unit)

Treat Week	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
2	85.25 ^b ±1.24	85.40 ^b ±1.12	92.00 ^a ±2.51	87.00 ^{ab} ±2.55	89.40 ^{ab} ±0.68	86.20 ^b ±1.20	87.00 ^{ab} ±1.05
4	83.75 ±1.75	83.80 ±1.24	87.60 ±1.91	84.20 ±0.66	86.20 ±1.16	85.40 ±0.93	87.40 ±1.21
6	87.25 ±1.00	88.60 ±1.17	87.20 ±1.16	87.40 ±1.21	87.60 ±0.87	89.00 ±0.71	88.20 ±0.86
8	86.50 ^b ±1.12	89.20 ^{ab} ±0.86	89.00 ^{ab} ±0.84	90.00 ^a ±0.71	89.40 ^{ab} ±0.93	89.20 ^{ab} ±1.16	89.00 ^{ab} ±1.22
Mean	78.94 ^b ±1.28	86.25 ^a ±1.10	88.95 ^a ±1.60	87.15 ^a ±1.28	87.90 ^a ±0.91	87.45 ^a ±1.02	87.90 ^a ±1.09

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

9) 난형태, 난백색, 난황지수

철과 철단백질 첨가에 따른 난형태, 난백색, 난황은 Table 63에 나타나 있다. 난형태는 대조구가 77.77으로 수치가 가장 높았으며, Organic Fe 0.1% 처리구가 74.03으로 수치가 가장 낮았으나 처리구간의 유의적 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 난백색은 YF04 1.0% 처리구가 0.49으로 가장 높은 수치를 보였으며 YM03 0.1% 처리구가 0.46으로 가장 낮았으며, 처리구간의 유의차는 보이지 않았다 ($P>0.05$). 난황지수는 YF04 0.1% 처리구와 YF04 1.0% 처리구가 높은 수치를 보였고 나머지 처리구는 조금 낮은 수치를 보였으나 전체적으로 비슷한 결과를 보였으며, 처리구간의 유의차는 없었다 ($P>0.05$).

Table 63. Effects of ferritin on shape index, albumen index, yolk index

Treat.	Control	YM03 0.1% ^a	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
shape index	77.77 ±1.01	75.05 ±0.98	75.62 ±1.09	74.06 ±0.35	76.24 ±0.91	76.21 ±0.79	74.03 ±0.67
albumen index	0.47 ±0.005	0.46 ±0.003	0.47 ±0.005	0.47 ±0.005	0.49 ±0.003	0.48 ±0.002	0.48 ±0.003
yolk index	0.10 ±0.008	0.10 ±0.007	0.10 ±0.006	0.11 ±0.007	0.11 ±0.007	0.10 ±0.008	0.10 0.008

^a When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10^7 cfu/kg and 10^8 cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

10) 난황 지방산 함량

철과 철단백질 첨가에 따른 난황 지방산 함량은 Table 64에 나타나 있다. 난황 내 지방산 중 18:1에서 YF04 1.0% 처리구가 41.88으로 가장 높았고, 대조구는 39.10으로 가장 낮은 결과를 보였으며, 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

산란계의 경우 사료 내 지방산 조성은 계란의 난황과 체조직의 지방산 함량에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Guenter 등, 1971; Sim 등, 1973; Huang 등, 1990). 특히 Sim 등 (1973)은 사료내 급여 지방에서 유래된 linoleic acid (C18:2, LA)수준이 증가할수록 난황과 조직의 LA이 증가한다고 하였다.

Table 64. Effect of ferritin on egg yolk fatty acid composition of the 7th week in the experiment

Week \ Treat.	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
14:0	0.37 ^a ±0.07	0.33 ^{ab} ±0.01	0.36 ^a ±0.06	0.22 ^c ±0.05	0.22 ^c ±0.02	0.27 ^{bc} ±0.02	0.28 ^{abc} ±0.04
16:0	20.77 ^a ±0.70	19.60 ^a ±1.10	20.13 ^a ±1.44	16.33 ^b ±1.01	20.40 ^a ±0.02	19.71 ^a ±0.31	20.54 ^a ±2.06
18:0	8.64 ^a ±1.92	3.33 ^b ±1.51	1.32 ^c ±0.52	0.75 ^c ±0.15	0.20 ^c ±0.02	0.22 ^c ±0.01	1.73 ^{bc} ±0.20
18:1	39.10 ^b ±0.52	41.84 ^a ±1.37	41.29 ^{ab} ±0.78	40.39 ^{ab} ±0.59	41.88 ^a ±0.50	39.54 ^{ab} ±0.30	41.16 ^{ab} ±1.75
18:2	5.78 ^b ±0.32	6.65 ^b ±1.16	8.49 ^{ab} ±1.44	80.2 ^b ±1.64	7.12 ^b ±0.74	5.71 ^b ±0.38	11.95 ^a ±3.04
18:3	1.83 ^a ±0.67	0.36 ^b ±0.16	0.18 ^b ±0.03	0.23 ^b ±0.05	0.21 ^b ±0.01	0.23 ^b ±0.01	0.27 ^b ±0.10
20:1	0.20 ^{bcd} ±0.01	0.28 ^{ab} ±0.05	0.35 ^a ±0.07	0.12 ^d ±0.01	0.22 ^{bc} ±0.06	0.19 ^b ±0.01	0.17 ^{cd} ±0.02
20:2	0.27 ±0.03	0.23 ±0.01	0.30 ±0.07	0.21 ±0.02	0.21 ±0.02	0.25 ±0.01	0.23 ±0.03
22:0	0.41 ^a ±0.07	0.14 ^b ±0.08	0.05 ^c ±0.01	0.02 ^c ±0.01	0.03 ^c ±0.01	0.02 ^c ±0.01	0.03 ^c ±0.01
22:1	0.05 ^b ±0.01	0.03 ^b ±0.01	0.13 ^a ±0.02	0.02 ^b ±0.01	0.02 ^b ±0.01	0.02 ^b ±0.01	0.02 ^b ±0.01
24:0	1.78 ^a ±0.54	0.67 ^b ±0.22	0.33 ^c ±0.05	0.22 ^c ±0.09	0.22 ^c ±0.01	0.17 ^c ±0.09	0.26 ^c ±0.03

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

C14:0 (myristic acid), C16:0 (palmitic acid), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid), C18:3 (linolenic acid), C20:1 (eicosenoic acid), C20:2 (eicosadienoic acid), C22:0 (benanexic acid), C22:1 (erutic acid), C24:0 (lignouric acid)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

11) 난황내 철분 함량

철 첨가에 따른 난황 내 철분 함량은 Table 65에 나타나 있다. 난황 내 철분 함량은 Organic Fe 0.1% 첨가구가 19.10 mg/kg으로 가장 높았으며, YF04 1.0% 처리구가 철분 17.85으로 높은 결과를 보였으며, YF04 0.1% 처리구가 13.11로 가장 낮았고 YM03 0.1%처리구가 13.33 및 대조구 13.39 mg/kg으로 이들 처리구간의 유의적 차이를 보였다 ($P>0.05$). 이는 사료내 철분 첨가 수준이 증가할 수 난황내 철분함량이 증가하는 경향을 보여주는 것이다.

Table 65. Effect of ferritin on egg yolk Fe in the experiment (mg/kg)

Treat.	Control	YM03 0.1% ^c	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
Fe	13.39 ^b ±0.44	13.33 ^b ±1.93	17.57 ^a ±0.78	13.11 ^b ±0.41	17.85 ^a ±0.68	12.72 ^b ±2.30	19.10 ^a ±0.76

^{a,b} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^c When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

12) 관능검사

관능검사에 대한 결과는 Table 66에 나타나 있다. 관능검사 결과 외형은 YF04 1.0% 처리구가 3.64으로 높게 나타났으며 YM03 0.1% 처리구가 3.00으로 가장 낮은 결과를 보였으나 처리구간의 유의적 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 색은 YF04 1.0% 처리구가 4.00으로 높았으며 YF04 0.1% 처리구는 2.93으로 가장 낮게 나타났으며, 처리구간의 유의적 차이를 보였다 ($P<0.05$). 다즙성은 YF04 1.0% 처리구가 3.50으로 가장 높게 나타났으며 YM03 0.1%와 YM03 1.0% 처리구가 각각 3.07으로 가장 낮게 나타났으나 이는 처리구간의 유의적 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 조직감은 YF04 0.1% 처리구가 3.57으로 가장 높게 나타났으며 YM03 0.1% 처리구가 3.21으로 가장 낮게 나타났으나 처리구간의 유의적 차이는 보이지 않았다 ($P>0.05$). 향은 Orgainc Fe 0.1% 처리구가 3.64으로 가장 높게 나타났으며 YM03 0.1% 처리구가 2.85으로 가장 낮은 수치를 보였다 ($P>0.05$). 종합적인 기호도는 YF04 1.0% 처리구가 4.00으로 가장 높았고 YM03 0.1% 처리구가 2.86으로 가장 낮았으며, 처리구간 유의차를 보였다 ($P<0.05$).

Table 66. Effect of dietary ferritin on sensuous evaluation of the egg

Treat.	Control	YM03 0.1% ^d	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
Appearance	3.31 ±0.17	3.00 ±0.28	3.07 ±0.17	3.29 ±0.24	3.64 ±0.27	3.29 ±0.24	3.36 ±0.23
Color	3.46 ^{abc} ±0.23	3.14 ^{bc} ±0.25	3.57 ^{abc} ±0.21	2.93 ^c ±0.27	4.00 ^a ±0.21	3.43 ^{abc} ±0.25	3.57 ^{abc} ±0.24
Juceciness	3.31 ±0.16	3.07 ±0.20	3.07 ±0.18	3.43 ±0.29	3.50 ±0.27	3.14 ±0.31	33.14 ±0.29
Texture	3.23 ±0.11	3.21 ±0.19	3.29 ±0.21	3.57 ±0.20	3.43 ±0.25	3.36 ±0.25	3.29 ±0.27
Flavor	3.23 ^{ab} ±0.17	2.85 ^b ±0.25	3.00 ^{ab} ±0.25	3.21 ^{ab} ±0.30	3.36 ^{ab} ±0.23	3.57 ^{ab} ±0.23	3.64 ^a ±0.23
Overall	3.00 ^b	2.86 ^b	3.29 ^{ab}	3.50 ^{ab}	4.00 ^a	3.21 ^{ab}	3.50 ^{ab}
Acceptability	±0.30	±0.23	±0.30	±0.17	±0.26	±0.28	±0.23

^{a,b,c} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^d When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

13) 산패도 (TBA)

주령별 계란의 산패도 (TBA)에 대한 결과는 Table 67에 나타나 있다. 산패도 분석 결과 주령이 경과할 수록 산패도는 증가하였다. 계란의 1, 2, 3주 평균 산패도는 YM03 1.0% 처리구가 3.98으로 가장 높게 나타났으며 대조구가 2.85으로 가장 낮았으며 이들 처리간에는 통계적 유의차를 보였다 ($P < 0.05$).

Table 67. Effect of dietary ferritin on TBA of the egg

Treat. Week	Control	YM03 0.1% ^e	YM03 1.0%	YF04 0.1%	YF04 1.0%	Organic 0.01%	Organic 0.1%
1	1.80 ^a ±0.97	1.94 ^a ±0.08	2.01 ^a ±0.20	1.77 ^a ±0.15	1.64 ^a ±0.11	2.07 ^a ±0.15	1.86 ^b ±0.08
2	2.17 ^b ±0.21	2.68 ^b ±0.18	3.80 ^a ±0.32	3.62 ^a ±0.34	2.71 ^b ±0.25	3.99 ^a ±0.24	2.81 ^b ±0.23
3	4.57 ^d ±0.37	4.73 ^{cd} ±0.26	6.13 ^a ±0.29	5.69 ^{ab} ±0.25	5.48 ^{ab} ±0.22	5.30 ^{bc} ±0.16	5.14 ^{bcd} ±0.14
Mean	2.85 ^c ±0.51	3.11 ^c ±0.17	3.98 ^a ±0.27	3.69 ^{ab} ±0.25	3.28 ^b ±0.19	3.78 ^a ±0.18	3.27 ^b ±0.15

^{a,b,c,d} Mean with different superscripts in the same rows are significant different (P<0.05)

^e When YM03 (yeast mutant) and YF04 (yeast ferritin type) were added at rates of 0.1% and 1.0%, the final numbers of yeasts were 10⁷ cfu/kg and 10⁸ cfu/kg, respectively. Addition of YM03 and YF04 at 1% supplies Fe 2 mg/kg and 5mg/kg, and organic iron at 0.01% supply Fe at 5 mg/kg.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표의 달성도

본 연구는 소화 흡수율과 생체 이용성이 높은 유기철을 함유하는 효모를 개발하고 이를 이용하여 고부가가치, 기능성 철분 강화 축산물을 생산하고자 하였다.

본 연구를 통하여 인간 ferritin을 효모 내에 발현하여 배지 내의 무기태 철분을 ferritin에 결합된 유기태 철분 공급원을 개발하였다. 또한 무기철을 효모 세포 내에 유기태 형태로 축적할 수 있는 효모를 선별하였으며 mutation을 통해 유기태 철분을 축적할 수 있는 능력을 향상하였다. wild type과 mutant의 2-DE 단백질 분석을 통하여 유기태 철분 축적을 향상시킬 수 있는 단백질을 확인하였다. 유기태 철분을 축적하는 재조합 및 mutant 효모를 대량 배양하여 동물 사양 시험에 적용하였다.

유기태 철분을 함유하는 효모를 사료에 첨가하여 육계의 성장과 체조성을 조사하였다. 증체량 및 도체 내 철분 함량은 유기태 철분을 첨가하였을 때 유의적으로 증가하였다. 따라서, 유기철을 육계사료에 첨가하는 경우, 육계의 생산성 향상과 더불어 철분강화 계육의 생산이 가능할 것으로 기대된다.

유기태 철분을 함유하는 효모를 첨가하여 산란계의 산란율, 난중, 산란량 등 산란계의 생산성을 향상시킬 수 있었으며 계란의 철분 함량 및 화학적 조성을 개선시키는 것으로 평가되었다.

유기태 철분을 함유하는 효모를 첨가하였을 때, 도체의 철분 함량은 유의적으로 증가하였으며 육질의 관능검사 결과 유의적 차이는 보이지 않았으나 기호도가 높은 것으로 나타났다.

이러한 연구결과들은 목표를 100% 달성하였다고 판단된다.

1. 1차년도 연구개발목표의 달성도

연구개발 목표	연구평가		달성도
	착안점	연구성과	
철 저장 단백질 ferritin이 재조합된 유기철 저장 효모 개발	페리틴 발현 동시 발현백터 제작	H-ferritin, L-ferritin 단독 및 동시 발현백터 제작	100%
	효모에서 페리틴 발현 여부	페리틴 발현 효모 개발	
유기철 함유 효모의 선별 및 배지 조건 확립	유기철 함유 효모 선별	사료제 이용성 효모 조사 및 확보 유기철 함유 효모 선별	100%
	유기철 함유 효모 생산을 위한 배지 최적화	최적 배지 선별	
철분이 강화된 기능성 계육 개발	철분 첨가제의 첨가 수준 결정 및 철분 강화 닭고기 효과 분석	육계의 생산성과 철분 강화 계육 생산	100%
	철분 첨가제의 첨가 수준 결정 및 철분 강화 계란 효과 분석	산란계의 산란율, 난중, 산란량 등 산란계의 생산성을 향상시킬 수 있었으며 계란의 철분 함량 및 화학적 조성을 개선	100%

2. 2차년도 연구개발목표의 달성도

연구개발 목표	연구평가		달성도
	착안점	연구성과	
재조합 효모를 이용한 고효율 철분 강화 사료 개발	유기태 철분을 함유한 효모의 대량 생산	유기배양 및 대량 배양을 통해 ferritin에 결합한 유기태 철분 생산 철의 정성·정량 방법 확립	100%
고효율 사료 개발을 위한 철분 강화용 효모 개발	유기철 함유 변이주 개량 유기철 함유 효모 대량생산 및 분리기술 확립	유기철 축적이 개선된 변이주 개량 대량 배양 및 분리 기술 확립	100%
철분이 강화된 돈육 생산	도체 내의 철분 함량	철분강화 돼지 사료첨가제의 최적화 조건 확립 효모철분의 철분 강화 돼지고기 개발 및 생산	100%

3. 3차년도 연구개발목표의 달성도

연구개발 목표	연구평가		달성도
	착안점	연구성과	
철분 강화 효모 시작품 제작	대량 배양 및 시 작품 제작	유가 배양을 통한 대량 배양	100%
		시작품 제작	
유기철을 축적하 는 변이종의 특성 규명	변이주의 다른 금속이온에 대한 영향 평가	Cu 축적능 평가	100%
	이차전기영동법 을 이용한 변이주 의 특성 규명	세포 내 Fe에 내 성을 주는 기작 추정	
효모 철분사료를 이용한 육계, 산란 계 사료 및 철분 강화 축산물 개발	철분 강화 닭고 기 및 계란 생산	다양한 효모철분 사료를 이용한 육 계 및 산란계 사 양 실험	100%
	철분 강화 사료 첨가제 및 축산물 개발	효모철분 사료를 이용한 육계, 산란 계 사료 및 축산 물 개발 및 생산	

제 2 절 관련 분야에의 기여도

효모는 probiotic 생균제로 사용되고 있으며 많은 유용한 외래 유전자의 발현 숙주로 사용되고 있다. 효모는 아미노산 조성이 우수하여 생체이용률이 높으며 핵산과 글루탐산에 의한 감미제, 비타민의 공급원으로서 가축의 영양과 장내 미생물의 성장 촉진에 기여할 수 있다. 또한 철, 아연 등의 무기태 무기질을 생체 이용률이 높은 유기태 광물질 공급원으로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 이러한 효모의 장점에 phytase, cysteine-rich metallothionein-like protein과 같은 가축의 이용률, 증체량 등 양돈·양계 산업의 생산성을 제고할 수 있는 유전자조작 방법을 확립하였다. mutation을 통해 효모 내 고농도 철분 함량에 내성을 갖는 효모의 개량 방법을 통해 철분 외에 아연과 같은 다른 유기태 미네랄 공급원을 제공할 수 있을 것이다. 철분제 사료첨가제의 수입 대체 효과를 기대할 수 있으며 사료 원가를 줄일 수 있는 경제적 효과가 가져온다.

흡수율이 높은 유기태 철분을 사용함으로써 생체이용율을 높이고 분뇨로 배출되는 것이 감소함으로써 토양 및 수질 오염을 줄일 수 있다. 따라서 폐수처리에 소요되는 막대한 처리비용을 감소시킬 수 있으며 토양오염에 의한 미래 자원을 보호할 수 있다.

철분이 강화된 기능성 축산물은 어려움에 직면한 축산농가에 새로운 돌파구를 제시할 수 있을 것이며 수익 증대에 기여할 것이다.

본 연구를 통해 유전자 조작 기술, 발효기술 등 다양한 분야의 기술을 축적, 결합하여 생명공학을 이용한 유용물질 생산을 체계적으로 진행시킬 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 개발을 통하여 얻은 유기태 철분 함유 효모는 생균제 제품과 모돈 및 자돈의 빈혈치료를 위한 철분 사료 첨가제로 사업화할 계획이다.

국내에는 아직까지 철분강화 축산물이 개발된 바가 없으나 빈혈증이 많은 노약자나 여성들의 빈혈치료를 위하여 철분이 강화된 육계, 계란, 돈육 및 우유 등의 기능성 축산물을 생산하고자 한다.

효모를 이용하여 비 heme성 단백질 물질인 ferritin을 대량생산하고 동물체내에서 Fe의 흡수율이 높은 철분강화 사료와 축산물을 개발하여 어린이, 노약자 및 여성들에게 많이 발생하는 영양성 빈혈증 (nutritional anemia)을 예방하고 치료하는데 활용하고자 한다.

또한, 개발된 고효율 철분 강화사료를 이용한 고품질 철분강화 축산물을 개발하여 빈혈증이 많은 노약자나 여성들의 빈혈치료를 위하여 철분이 강화된 육계, 계란, 및 돈육 등의 기능성 축산물을 생산하여 축산물의 브랜드화를 추구한다.

제 6 장 해외과학기술정보

철분은 자연상태인 금속염의 경우 생체내로 흡수될 때 체내흡수율이 아주 낮아서 그의 이용율이 큰 문제점으로 제기되어 왔다. 기존 가축의 국내 철분섭취 관련 기술 및 개발현황으로는 철분을 시트르산 철(iron citrate), 텍스트란 철(iron dextran), 푸르말산 철(iron fumarate) 및 숙신산 철(ferrous succinate) 등과 같은 유기산이나 고분자 전분질과 결합된 형태로 만들어 공급하고 있으나, 소화흡수율 및 경제적인 면에서 많은 문제점을 갖고 있다.

신생 자돈의 철분공급의 경우 하루에 7 mg의 철분을 외부로부터 필요하게 되어 10% 철분 주사제가 개발되었다. 그러나 위의 경우 유기철도 생체내로 흡수되어 위를 통과할 때 산성, 펩신의 작용으로 3가철(Fe^{3+})에서 2가철(Fe^{2+})로 변하여 흡수율 및 이용율이 낮고, 위장장애 문제도 완전히 개선되지 못했다. 또한 주사제의 경우도 자돈에 대한 통증, 스트레스, 주사부위의 착색, 농양생성 및 도체 등급 저하 등의 문제점이 있다.

사람의 식이에 흡수율이 높은 유기태 철분 함량을 높이기 위해 콩의 ferritin 유전자를 벼에 형질전환한 시도가 있었다. 식이 내의 phytic acid와 결합하여 이용성이 떨어지는 것을 방지하기 위해 phytase 유전자를 발현하려는 연구가 수행되었다. 또한 철분 흡수를 도와주는 cysteine을 고발현하여 철분 흡수를 돕고자 하는 cysteine-rich metallothionein-like protein 발현 연구도 진행되었다. 그러나 현 시점에서는 유전자조작을 가한 식이를 사람이 섭취할 수 없는 법적 규제뿐만 아니라 안전성을 입증할 수 있는 과학적 검증자료도 부족한 실정이다.

제 7 장 참고문헌

- A.O.A.C. 1995. official Method of Analysis, Association of official chemists. Washington. D. C.
- Balnave, D. 1970. Essential fatty acids in poultry nutrition. World's poult.sci.j.26, 442
- Bezkorovainy A 1989 Biochemistry of nonheme iron in man. Clin Physiol Biochem 7:53-69.
- Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, Finch CA 1979 Iron metabolism in man. Blackwell Scientific Publications, London 105-155.
- Brauguhler, J. M., Chase, R. L. 1987. Oxidation of ferrous iron during peroxidation of lipid substrates. Biochim Biophys Acta, 921(17). 457~464.
- Cantor, A. H., Johnson, T. H. and Hussein, A. S. 1983. Effects of yeast culture on feed palatability in turkeys. In: Diamond V Mills Inc. Ceder Rapids. Ia. M8320
- Chapple R. P 1981 Effect of calcium phosphorus levels and live yeast culture on phosphorus utilization of growing finishing swine. M.S thesis, University of Misuri, Columbia, Mo
- Cunnane SC, Mcadoo KR 1987 Iron intake influences essential fatty acid lipid composition of rat plasma and erythrocytes. J Nutr 117:1514.
- Dabbagh NJ, Mannion T, Lynch SM, Frei B 1994 The effects of iron overload on rat plasma and liver oxidant status *in vivo*. Biochem J 300, 799.
- Deaton J. W., Kubena L. F., Chen T. C., Reece F. N. 1974 Factor influencing the quantity of abdominal fat in broilers. 2 Caeg versus floor rearing. Poultry Sci 53:574.
- Ece A, YigitoGlu M. R., Vurgun N., Guven and Iscan A. 1999 Serumlipid and

- lipoprotein profile in children with iron deficiency anemia. *pediatr. int* 41(2), 168~173
- Engle, J. P., Polins, K. S., and Stile I. I. 1987. Acute iron intoxication, treatment controversies. *Drug Intell Clin Pharm*, 21, 153~159.
- Engle, J. P., Polins, K. S., and Stile I. I. 1987. Acute iron intoxication, treatment controversies. *Drug Intell Clin Pharm*, 21, 153~159.
- Finch CA, Hueber HA 1986 Iron metabolism. *Clin Physiol Biochem* 4:5-10.
- Folch J, Lees M, Sloan-Stanlet GHS 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Folch, J., Lees, M. and Sloan-Stanlet, G. H. S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 : 497-509
- Fritz JC, Pla GW, Roberts T, Boehme JW, Hove EL 1970 Biological availability in animals of iron from common dietary sources. *J Agr Food Chem* 18:647-651.
- Gerendia DT, Gippert HIF, Ferucue H 1992 Addition of yeast to diets new hampshire patent stock biotechnology in the feed industry. *Proc Alltechs 8Th Annual Symp Alltech Publ, Ky* 46.
- Gipp, W. F., Pond, W. C., Kallfel, F. A., Taskes, J. B., Van Campen, D. R., Krook, L, Visek, W. J. 1974. Effect of dietary copper, iron and ascorbic acid on hematology, blood and tissue copper, iron and zinc concentrations and ⁶⁴Cu and ⁵⁹Fe metabolism in young pigs, *J. Nutr*, 104, 523~541.
- Greengard J. 1975. Iron poisoning in children. *Clin Toxicol* 2, 575~597.
- Grundy, S. M. 1986. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 314~745.

- Guenter W, Bragg DB, Kondra PA 1987 Effect of dietary linoleic acid on composition of egg yolk, liver and adipose tissue. *Poultry Sci* 55:845.
- H. Kim, H. Kim, J. Kim, K. Ryu, S. Park, K. Jahng, M. Yang, and D. Kim, 2002. Expression of heteropolymeric ferritin improves iron storage in yeast. *AEM*. 69:2
- Hallberg L 1981 Bioavailability of dietary iron in man. *Ann Rev Nutr* 1:123.
- Henretig, F. M., Temple, A. R. 1984. acute iron poisoning in children. *Emerg Med clin North Am* 2, 121~132.
- Huang ZB, Leibovitz H, Lee CM, Miller R 1990 Effect of dietary fish oil on 3 fatty acid levels in chicken eggs and thigh flesh. *J Agric Food Chem* 38:783.
- Hughes J 1987 Yeast culture applications in calf and dairy diets. In: Lyons, YP.(ed). *Biotechnology in the Feed Industry*. Alltech Publ Ky 143.
- Keys, A. 1980. Coronary heart disease in seven countries, *Circulation* (suppl.) XLI, A53.
- Kondo, J. and Wagai, B. 1968. Experimental use of clinoptilolite-tuff as dietary supplements for pigs, *Youtlnkai* May. 1-4.
- Kye SH, Paik HY 1993 Iron nutrition and related dietary factors in apparently healthy young Korean women (2). Analysis of iron in major food items and availability of dietary iron, *Korean J Nutr* 26(6):703-714.
- Leestra FR, Vereijken FG, Pit R 1986 Fat deposition in a broiler sire strain. 1. Phenotypic and genetic variation in, and correlations between, abdominal fat, body weight, and feed conversion. *Poultry Sci* 65:1225-1235.
- Lim DVM 1992 Effect of diet quality and Yea-Sacc1026 on performance of commercial layers. *Biotechnology in the Feed Industry*. Alltech Publ Ky 412.
- Linder MC, Munro HN 1975 Protein of Iron storage and Transport in *Biochem and Medicine* : 395. North-Holland, Amsterdam.
- Livrea, M. A. Tesoriere, L, Pintaudi A. M. et al. 1996. Oxidative stress

- antioxidant status in beta - thalassemia major. Iron overload and depletion lipid-soluble antioxidants. *Blood*, 88(9), 3608~3614.
- Lynch, S. R., Beard, J. L., Dassenko, A. and Cook, J. D. 1984. Iron absorption from legumes in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 40 : 42-47
- Mc. Cord, J. M. 1996. Effects of positive iron status at cellular level. *Nutr Rev*, 54(3), 85~88.
- Monsen ER 1988 Iron nutrition and absorption : Dietary factors which impact iron bioavailability. *J Am Diet Assoc* 88:789- 790.
- Nam HS, Ly SY 1992 A survey 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.
- Peppler HJ 1982 Yeast extracts. In: Rose AH ed. *Fermented Foods*. Academic Press, London 293.
- Pollack S, Campana T, Arcario A 1972 *J Lab Clin Med* 80, 32.
- Proudfoot A. T., Simpson D., Dyson E. H. 1986. Management of acute iron Poisoning
- Rose AH 1987 Yeast, a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. 113-115.
- SAS 1995 SAS User's Guide Statistics. Statistical Analysis System. Inst.
- Schauben J. L., Augenstein W. L., Cox J, Sato R. 1990. Report of three cases and a review of therapeutic intervention. *J. Emerg Med* 8, 309~319.
- Sheard, N. F. 1994. Iron deficiency and infant development. *Nutr Rev*, 52(4), 137~146.
- Sim JS, Bagg DB, Hodgson GD 1973 Effect of dietary on animal tallow and vegetable oil on fatty acid composition of egg yolk, adipose tissue and liver in laying hens. *Poultry Sci* 52:51.

- Standish J. F., Ammerman, C. B., Simpson, C. F., Neal, F. C., Palmer, A. Z. 1969. Influence of graded levels of dietary iron as ferrous sulfate, on performance and tissue mineral composition of steers. *T. Anim Sci* 29, 496~503.
- Stone H, Sidel J, Oliver S, Woolsey A, Singleton RC 1974 Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technol* 28:24-29.
- Sung CJ 1997 A study on the dietary fiber intake and iron metabolism in Korean female college students. *Korean J Nutr* 30(2):147-157.
- Whitehead CC 1986 Nutritional factors influence fat in poultry. *Feedstuff* Jan 20:31.
- 곽해수 1992 관능검사와 유제품. *한국유가공연구회지* 10(1): 1-16.
- 김범수 1998 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) ferritin의 특성 및 DNA cloning. 고려대학교 박사논문 10:9-10.
- 김성훈, 허린수, 박항균 등. 1985 철분투여가 적혈구내막 및 혈장내의 지질함량에 미치는 영향. *대한수의학회지* 25(2), 125~132.
- 김윤지 1999 철분강화 우유의 생이용성 평가. *한국식품영양과학회지* 28(3):705-709.
- 김혜영, 강형숙. 2003. 철분과 운동이 혈청 지질과 지단백 콜레스테롤 미치는 영향. *환경생물학회지* 21(2), 189~193.
- 박선민, Jean, T. Shook. 1996. 식이내 함유된 포화 지방산의 종류에 따른 Lipoprotein 대사와 LDL-Receptor 활성화에 미치는 영향. *한국영양학회지* 29(6), 661~677.
- 박진희 강권규 강희완 노일섭 1997 Cloning and expression of a ferritin gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedling. *한국원예학회 논문발표요지* 15:3-3.
- 백인기. 1991. 생균제의 첨가가 가축의 생산성에 미치는 영향. *사료가공단기과정* pp. 84
- 유종석, 백인기. 1990. 활성효모 첨가가 산란계의 생산성에 미치는 영향. *한국가금학회지*. 17(3): 179-197

- 임동주, 송호철, 박전홍. 2001 철분 투여한 돼지에서 비타민 C의 항산화 작용. 대한수의학화회지 41(3), 305~310.
- 전예숙, 승정자. 1996 철분과 셀레늄의 섭취수준이 흰쥐의 혈액과 간장의 지질 수준에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 25(4):568-574.
- 전예숙, 승정자. 1996. 철분과 셀레늄의 섭취수준이 흰쥐의 혈액과 간장의 지질 수준에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25 (4), 568~574.
- 정해랑, 김미경. 1982. 식이내 단백질과 철분 수준이 흰쥐의 Fe, Cu 및 Zn대사에 미치는 영향. 한국영양학회지 15(4), 258~267.
- 지규만. 1994. 계란의 콜레스테롤 : 문제점과 대책. 한국가금학회지. 21(2) 139-150
- 채범석, 강은주, 이혜숙, 한정호, 1981. 한국인 빈혈 빈도에 관한 연구. 한국영양학회지 14(4) : 182-189