

최 중
연구보고서

축산분뇨의 환경오염개선을 위한 효소제의 개발과 응용

Development and Application of enzyme preparation to
reduce environmental pollution from animal manure

효소생산 균주의 개발과 사료첨가용 효소제 (phytase)의 개발

Development of enzyme producing strains and crude
phytase products

효소제의 평가 및 환경친화적 가축사양전략 개발

Evaluation of enzyme products and development of
environment friendly feeding strategies

연구기관
중 앙 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “축산분뇨의 환경오염개선을 위한 효소제의 개발과 응용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . 30 .

주관연구기관명 : 중앙대학교

총괄연구책임자 : 백 인 기

연 구 원 : 함 영 태

연 구 원 : 이 재 관

연 구 원 : 장 문 백

요 약 문

I. 제 목

축산분뇨의 환경오염개선을 위한 효소제의 개발과 응용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

모든 산업에 있어서 환경문제가 중요하지만 특히 축산업의 시급한 당면 과제는 축산업에 의한 환경오염을 최소화하는 것이다. 환경적인 관점에서 볼 때 농업(축산업 포함)의 발전을 위해서는 非再生性자원의 투입을 최소화하는 동시에 농가에서의 영양소 이용률을 증가시키므로써 환경에 대한 피해를 최소화해야 한다. 원래 축산업은 식품가공산업, 제분산업, 도축산업 등에서 생산되는 부산물들을 사용하므로써 이들 부산물의 공해 유발 가능성을 줄이기 때문에 환경적으로 건전한 산업이다. 또한 가축에서 생산되는 분뇨는 토양으로 환원시켜 유기질 비료와 토질개선제로써 오랫동안 애용되어 왔다. 근래에 와서 축산업의 고도성장으로 인한 집약화, 대규모화에 따라 가축분뇨의 생산량은 급증한 반면 분뇨를 환원시킬 수 있는 초지나 경지면적은 증가율이 제자리 또는 감소하는 추세이기 때문에 가축분뇨가 환경에 미치는 영향에 대해서는 국내는 물론 세계적으로 첨예의 관심사가 되었다.

분뇨영양소를 토양에 과다하게 산포하게 되면 빗물에 씻기거나 침출에 의해 지표수와 지하수가 오염되는데 환경적으로 가장 문제시되는 영양소는 질소(N)와 인(P)이다. 분뇨중 질소는 토양미생물에 의해 nitrification을 통하여 질산염(nitrate)을 생성하며 이는 주된 수질오염원이 된다. 또한 분뇨로부터 발생하는 암모니아 가스는 냄새 때문에 주민들의 민원 사항이 되며 증발되어서는 산성비의 원인이 된다. 산성비는 서유럽에서 삼림을 고사시키고 있는데 축산이 그 요인의 50%를 점하고 있다. 또한 nitrification 및 denitrification 과정에서 발생하는 nitrous oxide(N₂O)는 오존층을 파괴한다.

한편 분뇨중의 인(P)이 수로를 따라 저수지나 강으로 유입되면 藻類(algae)와 수중식물의 성장을 과다하게 촉진시키는 富營養化의 원인이 된다. 과다하게 번

성한 이들 수중식물이 썩으면서 용존산소를 고갈시키게 되며 이로 인해 어류의 폐사를 유발한다. 최근 우리나라에서 나타나고 있는 綠藻類와 赤藻類의 異常과 다 증식도 이와 직간접적으로 연관이 있는 것으로 추측된다.

이상에서 개략적으로 고찰한 바와 같이 축산분뇨는 적절히 이용하면 중요한 유기질 자원이 되지만 과다하게 사용하면 환경오염의 주범이 된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 구미 각국에서는 축산에 의한 환경오염문제를 체계적으로 연구하고 전략적인 대응방안을 범 국가적으로 실시한 바 네델란드나 덴마크 같은 나라는 축산분뇨에 의한 환경문제를 완전히 가깝게 해결하게 되었다.

이들의 전략적 대응방안의 요체는

제 1 단계: 가축의 분뇨배설량을 줄이고 이 분뇨를 통해 배설되는 영양소 특히 질소와 인의 량을 줄이는 것이다. 이는 가축의 사양기술 또는 영양관리를 통하여 이루어진다.

제 2 단계: 가축을 사육하는 농가는 분뇨처리를 위한 토지를 확보하거나 처리업자와 계약을 해야 한다. 생산된 분뇨는 농경지나 초지에다 摘期(가을부터 겨울에는 산포금지)에 최대허용량(EC, 연간 170 kg N/ha; 영국 250 kg N/ha) 범위 내에서 산포한다.

제 3 단계: 분뇨의 직접산포가 적절하지 않는 경우는 여러가지 처리를 하게 된다. 예를 들면 부숙법(aerobic composting, anaerobic composting, vermicomposting), 활성오니법(activated sludge process), 연속베치 반응조(SBR)처리, 역삼투(reverse osmosis)시스템, 고부가가치 유기질 비료개발, biofilter, 飼料化, 연료화 등의 처리 방법이 있다.

이상에서 약술한 바와 같이 축산에 의한 환경오염 문제는 전체를 놓고 체계적으로 전략을 수립해야 함에도 불구하고 우리나라의 대응방안은 지금까지 제 3 단계의 지엽적인 처리문제에만 집중되어온 결과 축산선진국에서 이룩한 “환경문제 완전해결”이라는 수준에 도달하기까지는 요원한 현실이다. 따라서 본 연구의 목적은

첫째, 축산분뇨로 인한 환경문제해결 전략의 제 1 단계인 영양관리 중 핵심을 이루고 있는 효소사용을 위하여 필요한 사료첨가용 효소제(phytase)를 생물공학적인 기법을 통하여 개발하며,

둘째, 개발된 효소제들을 이용하여 가축의 排糞量과 糞中 N와 P의 배설량을 줄여 환경문제를 해결하는 사양전략을 수립하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1-1 세부과제

이종유전자의 발현을 유도하는 고발현용 발현벡터의 선정은 *gpd* promoter와 *trpC* promoter를 가지는 B-galactosidase fusion (*E. coli lacZ* gene) 벡터를 *A. oryzae*에 형질전환시키고, 발현 되는 효소의 양을 분석함으로써 적정 promoter의 선별을 수행하였다. 또한 형질전환 최적화를 위하여 electroporation에 의하여 형질전환시키고 형질전환 효율을 분석하였다.

*Aspergillii*에서 phytase의 고발현을 위하여 UV-irradiation을 이용한 고발현 돌연변이 균주의 선발 및 phytase gene의 분리 및 동정을 위한 연구를 진행하였다. UV mutation을 이용한 고발현 균주의 개발은 254 nm의 UV irradiation을 이용하여 *Aspergillus ficuum*과 *Aspergillus oryzae*에서 phytase 고발현 돌연변이 균주를 선별하였고, 이들의 phytase activity를 분석하였다. 유전자 분리 동정 연구는 *Aspergillus ficuum*과 *Aspergillus oryzae*의 total RNA로부터 mRNA를 분리 하였으며, *Aspergillus ficuum*과 *Aspergillus oryzae*의 total RNA와 mRNA를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 증폭된 유전자들을 pGEM vector에 subcloning하여 DNA sequencing으로 유전자 서열을 분석하고, DNA analysis system-Blast and DNAsis-을 이용하여 동정 실험을 수행하였다.

2. 제1-2 세부과제

액체 배양에 의한 파이테이즈 발효생산에 조건을 최적화하기 위해 배지의 조성 및 인산농도의 제어에 의한 유가식발효법을 개발하였다. 생산된 효소의 안정성을 조사하였고 제제화하기 위한 방법을 개발하였다. 파이롯드 생산을 통해 대량의 효소를 생산/정제하고 분말제제화하였다.

3. 제2 세부과제

육계사료에서 phytase 첨가시 보충무기태 P의 감소와 이에 따른 P의 배설량 감소효과 검정과 Phytase 첨가로 인한 사료내 P의 감소가 산란계의 생산성과 P 배설량에 미치는 영향을 알아보기위해 수행하였다. 실험실에서 제조한 crude

phytase를 이용한 사양시험과 Carbohydrases 사용효과 검정을 실시하였다. 그리고 육계사료에 있어서 wild type phytase 첨가효과와 식물성 사료원료의 화학적 분석을 수행하였다.

4. 제3 세부과제

축산분뇨에 대한 영양성분검정, 토양성분 배합비 작성과 pellet 제조기술개발을 위해 수행하였다. 또한 pellet의 육묘생산, 생육 및 품질검정을 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 제1-1 세부과제

가. *Aspergilli* Transformation by using Electroporation

Electroporation에 의한 transformation 방법 중 가장 큰 잇점은 신속하고 간단한 방법이라는 것이다 (Delorme, 1989). 이것은 cell에 plasmid DNA가 들어 오게 하기 위해 centrifugation 과 현탁 과정이 전부이고 electric pulse도 약 1.15msec 정도이다. 두번째로 electroporation은 PEG-mediated transformation보다 재생력이 있다는 것이다. 이 두 방법의 가장 중요한 큰차이는 transformants의 안정성이다. 이러한 영향을 설명하기 가능한것은 high-voltage electroporation에 의하여 repair system이 활성화 되었기 때문이다. 또, 다른 잇점은 transformed colony를 selective marker가 들어있는 배지에서 직접 얻을 수 있다. 그러므로 mutants 등을 screening하기에 도움이 된다 (Delorme, 1989). 이상의 결과를 토대로 Electroporation의 최적 형질전환 효율에 영향을 미치는 제반요인들의 조건 (5.0KV/cm, 2310 Ω 0.5 μ F)을 확립함으로써, 아직까지 그 활용의 범위가 제한된 곰팡이 분야에서 보다 간단하고 빠르게 그리고 많은 형질전환된 균주를 얻을 수 있을 것이다.

나. Screening of Phytase High-Expression Strains by UV-mediated Mutagenesis

UV light에 의한 고발현 돌연변이주의 선별에서는 *Aspergillus species*를 254nm의 UV light로 20분간 처리하여 가장 효소역가가 높은 질소원인 암모늄 염

($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)이 포함된 PSM배지에서 phytase 분비로 생겨나는 clear zone의 면적비가 Wild type에 비해 우수한 것을 선별하여, *A. oryzae*에서는 4개 (YUV-47, -169, -341, -511), *A. ficuum*에서는 6개 (FUV-17, -36, -69, -193, -317, -419)을 선별하였다.

선별된 돌연변이주는 phytase plate assay결과, *A. oryzae*에서는 wild type보다 약 120-135%의 효과를 보였으며, wild type에 비해 성장이 빨랐다. *A. ficuum*에서는 wild type보다 약 140-170%의 효과를 나타내었다.

선별된 돌연변이주로 phytase activity assay하여 specific enzyme activity를 분석한 결과, *A. ficuum*에서는 wild type보다 130-140%의 높은 효소활성을 나타내었다. 그러나, *A. oryzae*에서는 wild type보다 높은 효소활성을 보이지 않았다. 이는 배지에서 나타난 높은 활성이 돌연변이주에서의 specific enzyme activity의 증가가 아니라, wild type에 비하여 돌연변이주에서 보이는 높은 생장에 기인하는 것으로 분석되었다.

다. Isolation and Identification of Phytase gene

Aspergillus group은 phytase를 생산하는 microorganisms중에서 extracellular phytase activity가 가장 높게 나타났다. 그 중 가장 연구가 활발히 되어있는 *A. ficuum*와 이것을 토대로 *A. oryzae*에서 phytase gene을 분리하고자 두 *Aspergillus* species에서 total RNA 및 mRNA를 추출하였고, RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 PCR을 사용하여 증폭시킨 뒤 phytase gene size와 유사한 1.2kb와 1.4kb DNA fragments를 분리하여 pT7 Blue-T vector에 subcloning하여 pPHY9과 pPHY13을 선별하였다. 선별된 두 plasmids를 DNA sequencing하여 각각 약 250bp, 260bp의 염기서열을 확인하였으며, 이를 gene search하였다. 1.4kb의 5 prime의 250bp DNA fragment (pPHY9)는 *A. ficuum*의 *phyA* gene과 약 40%의 similarity를 보였으며, 이는 향후 phytase gene 분리를 위한 probe로 확보하였다.

2. 제1-2 세부과제

파이테이즈 발효에 영향을 미치는 인자로서 탄소원, 질소원 및 인산원의 종류

및 농도를 결정하였다. 탄소원과 질소원으로는 포도당과 질산염이 효소생산에 요구되었고, 인산의 농도는 평균적으로 20mg-KH₂PO₄/L의 농도가 파이테이즈 생산에 적합한 것으로 조사되었다. 인산의 유기식 배양을 최적농도에서 조절한 결과 5-6 배의 생산성 증가를 얻을 수 있었다. 또한, 교반식 발효조에서 포도당과 인산을 feeding 하는 유기식 배양에 의해 32 unit/ml의 효소 생산을 얻을 수 있었다. 발효 생산된 효소의 분리를 위해 균체를 제거하고 발효액을 농축하여 동결건조된 효소를 제조하였다. 동결건조시 효소활성은 유지되는 것으로 나타났고, 효소 안정화를 위해 첨가제의 필요성은 없는 것으로 조사되었다. 또한, 대량의 파이테이즈 정제를 위해 황산 암모늄에 의한 침전법이 사용될 수 있음을 조사하였고, 이때 수율은 67% 정도 되는 것으로 나타났다.

개발되어진 파이테이즈 생산 및 분리 정제 공정은 동물사료의 첨가제로서 파이테이즈 생산공정에 이용될 수 있을 것이다.

3. 제 2 세부과제

상업적으로 이용되고 있는 효소제들 (phytases 및 carbohydrases)의 사료내 첨가효과를 평가하기 위하여 일련의 사양실험 및 영양소의 생체 내 이용을 측정 위한 대사실험을 실시하였다. 실험 1에서 실험 6는 사료 내 미생물 phytase의 첨가가 육계 및 산란계의 생산성 및 생체이용율에 미치는 효과를 조사하였다. 특히 실험 4와 5에서는 *Aspergillus ficcum*의 배양물로부터 자체 생산한 crude phytase의 생체 내 효능을 평가함으로써 효소생산 가능성을 살펴보았으며, 실험 7는 산란계 사료에 복합탄수화물 효소제 (Roxazyme)의 첨가효과를 검증하였다. 또한 실험 8은 phytase효소제의 보다 정확한 효능 평가를 위한 각 사료원료내에 존재하는 phytic acid, phytate-P 및 phytase activity를 측정하였다.

실험 1은 인 수준을 달리한 산란계 사료에 phytase 첨가가 산란율, 난질 그리고 P 배설량에 미치는 효과를 알아보기 위해 총 964 마리의 ISA Brown 산란계를 이용하여 20주 동안 사양시험을 실시하였다. 시험사료는 T1 [corn-soy control diet, 1.4% tricalcium phosphate (TCP)], T2 (control diet phytase 500 U/kg), T3 (0.7% TCP diet phytase 500 U/kg) 그리고 T4 (0% TCP diet

phytase 500 U/kg)이며, Natuphos® (미생물 phytase)의 첨가수준은 500 U/kg 으로 하였다. 미생물 phytase 500 U/kg의 첨가는 산란율에 영향없이 non-phytate phosphorus (NPP, 무기태 인)수준을 0.12%까지 감소시킬 수 있으며 P 배설량도 상당히 감소시킬 수 있다.

실험 2는 미생물 phytase (Natuphos) 첨가가 사료내 가용 인 (non-phytate phosphorus, NPP) 수준에 미치는 효과를 알아보기 위해 864수의 48주령된 ISA Brown 산란계를 이용하여 사양실험을 실시하였다. 시험사료는 T1 (0.26% NPP 수준의 대조구 사료), T2 (0.21% NPP + phytase 250 U/kg), T3 (0.16% NPP + phytase 250 U/kg) 그리고 T4 (0.11% NPP + phytase 250 U/kg)으로 하였다. 일일 사료소비량이 130 g의 갈색산란계 사료에 미생물 phytase가 250 U/kg 첨가된다면 사료내 NPP 수준을 0.16%로 낮출 수 있다. T3 (Phytase 첨가한 0.16% NPP)의 산란율 및 난각질은 대조구 (phytase 무첨가한 0.26% NPP, T1) 사료에 비해 비슷하거나 좋은 결과를 나타냈다. 또한 경골에 질에 영향을 미치지 않았으며 P의 배설량도 32.7%의 감소를 보였다.

실험 3에서는 저 수준의 인을 함유한 육계사료에 미생물 phytase (Natuphos®)의 첨가효과를 알아보기 위해 갓 부화한 육계 병아리 (Arbor Acres) 1,000수 (암수 500수씩)를 공시하여 사양실험을 하였다. 시험사료는 T1 [대조구 (정상 수준의 P 수준)], T2 [control diet + phytase 600 U/kg 1/3 tricalcium phosphate (TCP)], T3 (control diet + phytase 600 U/kg 2/3 TCP) 그리고 T4 (control diet + phytase 600 U/kg 100% TCP)로 하였다. 낮은 수준의 P 함유 사료에 미생물 phytase의 첨가 (600 U/사료 kg)는 육계의 생산성, P의 이용율 및 P와 Cu의 축적량을 개선시킬 수 있었다.

실험 4는 *Aspergillus ficcum*의 배양물로부터 생산한 crude phytase의 효능을 평가하기 위해 갓 부화한 Arbor Acres 수평아리 300수를 이용하여 사양실험을 실시하였다. 시험사료는 T1: 대조구 [0.45% non-phytate phosphorus, NPP (1-21 d) 와 0.35% NPP (22-35 d)], T2: 대조구 0.1% NPP, T3: 대조구 0.2% NPP, T4: T3 + crude phytase (soup + cell) 600 U/사료 kg, 그리고 T5: T3 + crude phytase (soup) 600 U/사료 kg으로 하였다. 저 수준의 NPP (정상수준의 56%) 사료에 crude phytase 첨가는 육계의 생산성 및 영양소이용율을 개선시켰

다.

실험 5는 사양시험결과, 증체량과 사료섭취량은 T3가 다른 처리구들 보다 유의하게 낮았고 ($P < 0.05$), 사료요구율은 T3가 1.73으로 높았을 뿐 유의차를 보이지는 않았다. 영양소이용율은 T3가 다소 낮았을 뿐 처리간 유의차를 보이지 않았지만, Ca과 P 이용율은 T1의 43%, 47%에 비해 T4가 각각 49%, 55%로 향상되었고, P 배설량은 phytase 첨가구인 T2와 T4가 대조구 배설량의 92.7%, 72.9% 수준으로 감소하였다. 이상의 결과를 보면, P 함량이 NRC (1994) 요구량 보다 낮은 사료에 phytase를 첨가한 처리구 (T4)가 NRC (1994) 요구량을 충족시킨 대조구 (T1)와 유사한 경향을 보였는데, 이는 P 흡수율 증가, phytate-mineral complex로부터 다른 광물질의 분해 이용, inositol의 이용, 소화율 증가 그리고 아미노산 (amino acids)의 이용율 증가 등 여러 요인 중 하나 혹은 그 이상의 작용에 의한 것으로 사료된다. 결론적으로 P 수준이 낮은 사료에 phytase 첨가 시 생산성에 영향을 주지 않으면서 영양소이용율의 향상과 P 배설량의 감소를 보였는데, 이는 경제적이고 환경적인 측면에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

실험 6은 무기태 인의 수준을 달리한 육계사료에 phytase 첨가 효과를 알아보기 위해 5주간의 사양시험을 실시하였다. 갓 부화한 900수의 Arber Acres 병아리를 3×2 요인 설계로 6처리에 할당하였다. 무기태인은 3수준으로 대조구 (C) 수준과 C-0.1%수준, 그리고 C-0.2%수준이었으며, 미생물 phytase 첨가수준은 2수준으로 0과 500U으로 하였다. 무기태인의 감소는 사료 섭취량, 증체량 그리고 폐사율에 있어서 좋지 않은 영향을 미쳤으나, 반면 phytase 첨가로 인해 사료섭취량, 증체량 그리고 폐사율이 개선되었다. 또한 사료내 단백질, 지방 그리고 조회분과 같은 유기영양소 및 Ca, P, Zn 그리고 Cu 와 같은 무기물의 이용율도 phytase 첨가로 현저히 개선되었다. 특히 phytase 첨가로 인해 두드러진 효과는 사료내 P의 사용량을 감소시킴으로써 P의 배설량을 상당량 감소시킬 수 있었다.

실험 7는 소맥기초사료에 복합탄수화물 분해효소제로서 Roxazyme-G의 첨가효과를 알아보기 위해 총 864 수의 Hy-Line 갈색산란계를 이용하여 실시하였다. 효소첨가구의 소맥은 효소무첨가구보다 ME가를 인위적으로 5% 증가 (spec-modified) 시켜 사용하였다. 시험사료는 10% 소맥 (T1), 25% 소맥 (T2),

25% 소맥 (spec-modified)+0.01% Roxazyme-G (T3), 그리고 소맥 (spec-modified)+0.01% Roxazyme-G (T4)로 하였다. 실험 5의 결과로서 사료 내 복합효소제 (carbohydrases)의 첨가는 산란계의 생산성이나 계란의 품질을 저하시키지 않으면서 황색옥수수를 전량 대체할 수 있다.

실험 8에서는 식물성 사료원에 들어있는 natural phytase activity를 측정하기 위해 실시하였다. Natural phytase를 microbial phytase와 비교했을 때 pH와 온도에 있어서 다르다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로, 미생물 phytase 및 carbohydrases의 사용은 영양소 (특히, P 또는 N) 이용율을 증가시킴으로써 한층 개선된 생산성을 가져올 수 있다. 또한 이들 효소제의 사용으로 가축 분뇨로부터 배설되는 영양소를 감소시킴으로 인해 환경오염의 발생을 최소화할 수 있다.

3. 제 3 세부과제

본 실험결과 계분의 비료성분으로서 카리, 칼슘 및 마그네슘이 매우 풍부함-완효성 비료로서 잠재적 가치가 매우 높다. 또한 왕겨를 분말화함으로써 배지로서의 물리성이 크게 향상되었고, 유기물인 펙틴을 왕겨분말에 첨가함으로써 기존의 배지보다 물리성 및 화학성이 우수한 옥모용 배지로 이용가치가 높다고 판단되며, 왕겨 및 펙틴 혼합배지에서 배추모종의 생육을 현저히 억제시켜 공정옥묘에 활용이 가능하다고 판단된다. 계분 10~20% (건물기준)을 왕겨배지에 첨가하면 전기전도도가 1.0~1.2로서 채소작물의 옥묘에 이용이 가능하였고, 계분의 첨가 배추종자의 발아율을 억제시켜, 발아한 이후 추비로 이용할 수 있었다.

본 연구는 본래 첫째 효소제 (phytase)의 균주개발과 효소제품화 공정개발, 둘째 효소제를 이용한 환경친화적인 사양기법개발 셋째 축분을 이용한 완효성 유기질비료의 개발로 시작하였으나 2차년도에 연구비의 조정 (112,500 천원 → 50,000 천원)으로 인하여 연구방향을 phytase를 생산하는 유전자재조합 및 고발현 돌연변이 균주선발 (1-1과제)과 phytase생산균주의 제제화 (1-2과제) 그리고 phytase제제 생물학적 평가 및 환경친화적 사양기법개발 (2과제)로 조정하였다.

1-1 세부과제의 연구결과중 유전자조작에 의한 phytase 고발현 균주의 개발은 아직 뚜렷한 성과를 얻지 못하여 계속 작업중이나 UV mutation에 의한 고발현 변이주의 개발에서는 wild type 보다 역가가 높은 균주를 개발하였다.

1-2 세부과제의 연구결과는 phytase 생산균주로부터 효소를 대량발효 생산하여 제제화하는데 필요한 공정을 연구하였으며 적정배지, 배양조건, 건조공정 등을 개발하였다. 특히 효소의 안정화에는 l-arginine이 탁월한 효과가 있다는 것이 발견되어 Biotechnol. Bioprocess Eng. (1998. 3. 32-34)에 발표하였다.

2 세부과제에서는 phytase를 이용하여 사료에 인산칼슘의 사용량을 줄이고 인의 배설량을 줄이므로써 환경친화적인 사양기법을 실증적으로 보여주었으며 1세부과제에서 생산된 균주를 이용하여 pilot scale로 생산된 여러 가지 제제들을 생물학적으로 비교검토하여 실용성을 검정하였다. 본 연구의 결과들을 Poultry Sci와 Asian-Australasian J. Anim. Sci에 각각 게재 승인을 받아 곧 출간될 예정이다.

이상에서 요약한 바와 같이 본 연구는 계획대로 진행되어 매우 많은 연구결과를 도출하였다. 얻어진 연구의 결과들 특히 제제의 안정화 및 제제화 기법, phytase를 이용한 환경친화적 사료의 제조기법 등은 앞으로 세미나 또는 논문발표를 통하여 산업체에서 이용할 수 있도록 홍보할 계획임. 아쉬운 점은 1-1세부과제에서 시도한 유전자 재조합 phytase 고발현 균주의 개발이 완료되지 못하고 진행중인 상태에서 3년 연구기간이 종료된 것이다. 유전자 재조합 균주개발 연구는 추후에도 계속 진행할 예정으로 연구결과가 어느 정도 가시화되면 제품화와 생물학적 평가를 위한 연구과제를 신청할 예정이다.

SUMMARY

This project consists of 3 sections: Section I. Genetic manipulation of microbes producing phytase. Section II. Production of microbial phytase. Section III. Development environment friendly feeding strategy Evaluation of phytase supplementation in animal production and environment.

Section I: Genetic manipulation of microbes producing phytase.

Phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8) are enzymes which catalyze the hydrolysis of phytic acid or phytate into myo-inositol and inorganic phosphate. Phytases are found in plants and a variety of microorganisms. Phytase production of *Aspergillus* species, *A. oryzae* and *A. ficuum*, are influenced by nitrogen source, ammonium ions, especially ammonium phosphate, are markedly superior to nitrate for the phytase production. In this study, screening of strong promoter system and optimization of transformation system for *Aspergilli* were carried out and high phytase-produced mutant strains were isolated by using UV mutagenesis. Phytase gene were isolated and identified by using RT-PCR and DNAsis.

Electricfield-mediated transformation method is fast, simple to perform, and avoids the use of some chemicals. It may also provide an alternative method of introducing foreign DNA into organisms that cannot be transformed by traditional PEG/CaCl₂ method. The optimum electrotransformation conditions for *Aspergillus oryzae* were determined with 4ug of supercoiled DNA, pILJ-16 and around 0.2 x 10⁵ protoplast cell at various field strength. The survived population of enzyme-treated *A. oryzae* protoplast cells in the electricfield were ~80% of untreated cell

population at 1.3 KV/cm to ~50% at 6.3 KV/cm. The electro- transformation efficiency expressed as transformants/ug of input DNA/ population of survival cell increased with the increment of the field strength upto 5.0 KV/cm, but more increased at 6.3 KV/cm. The highest value, 14.35%, was obtained at 6.30 KV/cm and 1540 Ω .

Aspergillus species were treated with 254nm of UV irradiation for the screening of high phytase producing mutant strains, on PSM media containing ammonium phosphate. Four UV mutant strains in *A. oryzae* (YUV-47, -169, -341, -511) and six in *A. ficuum* (FUV-17, -36, -69, -193, -317, -419) were isolated. The specific enzyme activities of *A. ficuum* mutants are 110 to 140% higher than that of wild type. *A. oryzae* mutants do not have higher activities than wild type. It may be due to the higher growth patterns of mutants.

For the isolation of phytase gene, *A. oryzae* and *A. ficuum* were cultured on PSM media containing ammonium phosphate. After 4days, mycelia were harvested by filtration and isolated total RNA and cDNAs were synthesized by RT-PCR. The phytase gene was amplified with the primers designed from *A. ficuum* sequence and then 1.2 and 1.4kb of the amplified DNA fragments by secondary PCR were subcloned into pT7 Blue-T vector. They were transformed into *E. coli* HB101 and selected two clones, pPHY9 and pPHY13 using LB/amp/IPTG/X-gal media. The similarity analysis between the amplified fragments and *A. ficuum* phytase gene were carried out by using BLAST and DNASIS. 5'-250bp of pPHY9 fragment was 40% of similarity with phytase gene of *A. ficuum*

Section II. Production of microbial phytase.

Factors affecting a fermentative production of phytase such as kinds and concentrations of carbon, nitrogen and phosphate sources were determined. For optimal production the enzyme glucose and nitrate were

required as carbon and nitrogen sources, respectively, and it was investigated that an average of 20mg-KH₂PO₄/L was a proper concentration. As a result of fed-batch culture with the optimal concentration of phosphate, 5 to 6 times higher production of the enzyme was obtained. Furthermore, 32 unit/ml of phytase resulted from the fed-batch culture of glucose and phosphate in stirred-tank fermentor. Biomass was removed by filtration to recover the produced enzyme and followed by concentration and freeze-drying to prepare the dry enzyme. Enzyme activity was maintained after freeze-drying, and additives were not required to stabilize the activity. And, precipitation method using ammonium sulfate for recovery of phytase was investigated and recovery yield was 67% at saturate concentration of ammonium sulfate.

Section III. Development environment friendly feeding strategy

To determine the effects of enzyme preparations (microbial phytase and carbohydrases) to chicken diets, a series of experiments was conducted. Eight experiments, Experiment 1 to 6 with microbial phytase, Experiment 7 with carbohydrases, and an *in vitro* experiment (Exp. 8) have been conducted to evaluate the effects of supplementation of these enzyme preparations in broilers and laying hens.

In Experiment 1, a 20-wk feeding trial (21 to 40-wk-old) was conducted to evaluate the effects of the phytase supplementation on egg production, egg quality and P excretion of laying hens fed diets containing different levels of phosphorus. Nine hundred and sixty ISA Brown hens were randomly allocated to completely randomized block arrangement of four diets: T1, corn-soy control diet without phytase [1.4% tricalcium phosphate (TCP)]; T2, control diet phytase; T3, 0.7% TCP diet phytase; and T4, 0% TCP diet phytase. Natuphos® was supplemented at a level of 500 U/kg. The result showed that supplementation of 500 U of microbial phytase/kg diet can

reduce NPP level to 0.12% in layer diet without affecting laying performance and resulting in a significant reduction of P excretion.

In Experiment 2, an 8-wk feeding trial was conducted with eight hundred and sixty-four 48-wk-old ISA Brown laying hens to determine if microbial phytase (Natuphos®) supplementation can reduce of non-phytate phosphorus (NPP) level in laying diets. The experiment consisted of four dietary treatments: T1, control diet of 0.26% NPP without supplementary phytase; T2, 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet; T3, 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet; and T4, 0.11% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet. Results indicate that the NPP level in the diet of brown layers consuming about 130 g of feed can be lowered to 0.16% if 250 U of microbial phytase per kg diet is supplemented. Compared to the control T1 (0.26% NPP without phytase supplementation), parameters of egg production and shell quality were equal if not better and parameters of tibial quality were not adversely affected in T3 (0.16% NPP with phytase supplementation). Also, there was 32.7% reduction in P excretion.

In Experiment 3, an experiment was conducted with day-old 1,000 broiler chicks (Arbor Acres) to determine the effects of supplementary microbial phytase (Natuphos®) to low P diets. Dietary treatments were T1, control diet containing the normal P level without phytase; T2, control diet 1/3 tricalcium phosphate (TCP) phytase; T3, control diet 2/3 TCP phytase; and T4, control diet 100% TCP phytase. Phytase was supplemented at a level of 600 U/kg. Results showed that the supplementation of 600 U microbial phytase/kg of diet to low P diets improves the broiler performances, availability of P, retention of P and Cu.

In Experiment 4, an experiment was conducted with day-old 300 commercial male broiler chicks (Arbor Acres) to evaluate the effect of the crude phytase produced from a culture of *Aspergillus ficcum*. The five dietary treatments were T1 (control diet, 0.45% NPP for starter period and

0.35% NPP for finisher period), T2 (T1 0.1% NPP), T3 (T1 0.2% NPP), T4 [T3 600 U of crude phytase (soup cell)], and T5 [T3 600 U of crude phytase (soup)]. Result showed that the crude phytase supplementation to broiler diets containing a very low level of NPP, 56% of the normal level, improved the growth performances and bioavailability of nutrients. In Experiment 5, the effects of crude phytase produced from *Aspergillus ficuum* was evaluated. The productivity, nutrient utilization, and the amount of P excretion were measured. Day-old 240 broiler male chicks (Avian) were randomly allocated to completely randomized arrangement of four diets of a 2×2 factorial design (P level×phytase), and replicated six times. Total feeding trial took 35 days, divided into the starter and the finisher diets. Four dietary treatments were T1, Control diet containing 0.45% of NPP for the starter and 0.35% for the finisher diet; T2, Control diet + 600 U of phytase/kg diet; T3, containing 0.1% NPP lesser than T1; T4, T3 + 600 U of phytase/kg diet. Feed intake and weight gain were significantly improved by the phytase supplementation in the low-P diet ($P<0.05$), but feed to gain ratio and mortality were not affected by phytase supplementation. The P excretion of T2 and T4 were reduced up to 92%, 73% compared to T1, respectively. As the P level is low, P excretion was reduced and were significantly reduced by the phytase supplementation ($P<0.05$). T4 showed significantly higher than the others on availability of Ca, P, Mg, and Fe ($P<0.05$), effects of phytase supplementation was significantly improved to availability of P and Mg ($P<0.05$). Mineral contents in plasma of T4 had more Ca, P, Mg, and Zn than T1, but the phytase supplementation did not affect the all minerals. The weight, length and ash percentage of the tibial bone was significantly lower in T3 ($P<0.05$), and the phytase supplementation affected on the weight and ash percentage of the tibial bone ($P<0.05$).

In conclusion, there was significantly improved on growth performance

and mineral availability when crude phytase was added to low P diet, and as P excretion reduced, it was assumed to reduce the soil and water pollution.

In Experiment 6, a 5-wk feeding trial was conducted to determine the effects of phytase supplementation to the diets with different levels of nonphytate phosphorous (NPP). Nine hundred hatched broiler chickens of Arbor Acres strain were allotted to six treatments of 3×2 factorial design. Three levels of NPP - control level (C), C-0.1% NPP and C-0.2% NPP, and two levels of phytase - 0 or 500U of microbial phytase (Novo Corp.) were employed. Reduction of NPP level shown significant ($p<0.01$) adverse effects on feed intake, weight gain and mortality of the birds. On the other hand, phytase supplementation significantly improved availability of dry matter ($p=0.007$), crude protein ($p=0.076$), crude fat ($p=0.002$) and crude ash ($p=0.078$) in the diets. There were significant influences of NPP level in the availability of Zn ($p<0.01$) and Cu ($p<0.05$). Phytase supplementation significantly improved the availability P and Zn at $p<0.05$, and Mg and Cu at $p<0.01$, respectively. The NPP level significantly influenced retention of N, crude ash, Ca, P and Zn at $p<0.01$ and Mg and Cu at $p<0.05$, respectively. Phytase supplementation significantly ($P<0.01$) increased the retention of these components. The NPP level significantly influenced the excretions of crude ash at $p<0.05$ and P and Cu at $P<0.01$, respectively. Phytase supplementation significantly ($P<0.05$) reduced N excretion. Reduction of NPP significantly reduced tibia weight, length at $p<0.01$ and girth at $p<0.05$. However, parameters of tibia were not significantly affected by phytase supplementation. It is concluded that adverse effects of low NPP can be alleviated by supplementation of phytase in broiler chickens.

In Experiment 7, an experiment was conducted to evaluate the effect of a microbial enzyme (Roxazyme-G), a multi-carbohydrase preparation,

supplementation to the wheat-based layer diets. The energy value of wheat in the enzyme supplemented diets was adjusted (spec-modified) to have 5% more ME than the wheat in diets without enzyme. A total of 864 Hy-Line brown layers were assigned to 4 dietary treatments: T1, 10% wheat; T2, 25% wheat; T3, 25% wheat (spec-modified) + 0.01% Roxazyme-G; and T4, all wheat (spec-modified) + 0.01% Roxazyme-G. The result showed that a multi-carbohydrases supplementation enables complete replacement of yellow corn with wheat without loss of productivity and major egg quality parameters.

In Experiment 8, an *in vitro* experiment was conducted to evaluate natural phytase in the feed ingredients. Natural phytase showed different characteristics in pH and temperature compared to microbial phytase.

In conclusion, supplementation of microbial phytases or carbohydrases led to better production performance due to the improved nutrient utilization (especially P and N). Also, enzyme preparations can minimize the environmental pollution by reducing fecal excretion of nutrients, especially P for phytase.

Contents

Chapter 1. Introduction

1. Necessity of research
2. Purpose and outline of the research

Chapter 2. Selection of Potent Strains Producing Phytase

1. Introduction
2. Materials and methods
3. Results and discussion
4. Conclusion
5. Reference

Chapter 3. Fermentation and Production of Microbial Phytase

1. Introduction
2. Conditions of media for the fermentation and heat stability of phytase
3. Optimization of conditions for fermentation
4. Processing of crude phytase
5. Conclusion

Chapter 4. Development of Environment Friendly Feeding Strategies

1. Introduction
2. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality and phosphorus excretion of laying hens fed different levels of phosphorus
3. Effects of microbial phytase supplementation to diets with low phosphorus levels on the performance and utilization of nutrients in broiler chickens

4. Effects of microbial phytase supplementation to diets with low non-phytate phosphorus levels on the performance and bioavailability of nutrients in laying hens
5. Evaluation of the efficacy of crude phytase produced from *Aspergillus ficuum* to broiler diets with low phosphorus level on the performance and nutrients
6. Effects of crude phytase supplementation on performance and nutrient availability of broiler chicken fed different levels of phosphorus
7. Effects of phytase supplementation on the performance of broilers fed diets with different levels of non-phytate P
8. Supplementation of microbial enzyme carbohydrase to the diets laying hens
9. Total P, phytic acid, phytate P, phytase activity in grains and cereals
10. Conclusion
11. Reference

Chapter 5. Development of Slow-release Organic Fertilizer

1. Development of slow-release organic fertilizer pellet using animal manure
2. Development of culturing medium for Chinese cabbage using animal manure

목 차

제 1 장 서 론

- 제1절 연구개발의 필요성
- 제2절 연구개발의 목표 및 내용

제 2 장 Phytase 고발현균주의 선별분야

- 제1절 서 설
- 제2절 실험재료 및 방법
- 제3절 결과 및 토의
- 제4절 결론
- 제5절 참고문헌

제 3 장 Phytase 발효생산 및 제제화공정 개발분야

- 제1절 서 설
- 제2절 Phytase 발효 배지조건 및 열안전성
- 제3절 Phytase 발효 생산조건의 최적화
- 제4절 발효 생산된 phytase의 제제화
- 제5절 결론

제 4 장 환경친화적 사양전략 개발 분야

- 제1절 서 설
- 제2절 인 수준이 다른 사료에 phytase 첨가시 산란율과 계란의 품질 및 인 배설량에 미치는 영향
- 제3절 육계사료에 있어서 phytase 첨가시 보충 무기태 인의 감소와 인 배설량에 미치는 영향
- 제4절 인 수준이 다른 산란계사료에 phytase 첨가가 영양소 이용율에 미치는 효과
- 제5절 Pilot scale로 생산된 미생물 phytase 첨가시 육계의 생산성 및 인 배설량에 미치는 효과

제6절 인 수준이 다른 육계사료에 Crude Phytase 첨가시 영양소 이용율 및 생산성에 미치는 효과

제7절 비피틴태 인 (non-phytate P) 수준이 다른 육계 사료 급여시 phytase의 첨가효과

제8절 Carbohydrase 첨가가 산란계의 생산성 및 계란의 품질에 미치는 영향

제9절 Total P, phytic acid, phytate P, phytase activity in grains and cereals

제10절 결론

제11절 참고문헌

제5장 완효성 유기질 비료의 개발분야

제1절 가축분을 이용한 완효성 유기질비료 pellet 제품의 개발 및 효과 검토

제2절 축분을 활용한 배추의 육묘용 배지조성 및 재배에 관한 연구

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

모든 산업에 있어서 환경문제가 중요하지만 특히 축산업의 시급한 당면 과제는 축산업에 의한 환경오염을 최소화하는 것이다. 환경적인 관점에서 볼 때 농업(축산업 포함)의 발전을 위해서는 非再生性자원의 투입을 최소화하는 동시에 농가에서의 영양소 이용률을 증가시키므로써 환경에 대한 피해를 최소화해야 한다. 원래 축산업은 식품가공산업, 제분산업, 도축산업 등에서 생산되는 부산물들을 사용하므로써 이들 부산물의 공해 유발 가능성을 줄이기 때문에 환경적으로 건전한 산업이다. 또한 가축에서 생산되는 분뇨는 토양으로 환원시켜 유기질 비료와 토질개선제로써 오랫동안 애용되어 왔다. 근래에 와서 축산업의 고도성장으로 인한 집약화, 대규모화에 따라 가축분뇨의 생산량은 급증한 반면 분뇨를 환원시킬 수 있는 초지나 경지면적은 증가율이 제자리 또는 감소하는 추세이기 때문에 가축분뇨가 환경에 미치는 영향에 대해서는 국내는 물론 세계적으로 참여의 관심사가 되었다.

분뇨영양소를 토양에 과다하게 산포하게 되면 빗물에 씻기거나 침출에 의해 지표수와 지하수가 오염되는데 환경적으로 가장 문제시되는 영양소는 질소(N)와 인(P)이다. 분뇨중 질소는 토양미생물에 의해 nitrification을 통하여 질산염(nitrate)을 생성하며 이는 주된 수질오염원이 된다. 또한 분뇨로부터 발생하는 암모니아 가스는 냄새 때문에 주민들의 민원 사항이 되며 증발되어서는 산성비의 원인이 된다. 산성비는 서유럽에서 삼림을 고사시키고 있는데 (ApSimon 등, 1987) 축산이 그 요인의 50%를 점하고 있다 (Poultry International, 1992). 또한 nitrification 및 denitrification 과정에서 발생하는 nitrous oxide(N_2O)는 오존층을 파괴한다 (Christensen, 1983; Paul 등, 1993).

한편 분뇨중의 인(P)이 수로를 따라 저수지나 강으로 유입되면 藻類(algae)와 수중식물의 성장을 과다하게 촉진시키는 富營養化의 원인이 된다. 과다하게 번성한 이들 수중식물이 썩으면서 용존산소를 고갈시키게 되며 이로 인해 어류의 폐사를 유발한다. 최근 우리나라에서 나타나고 있는 綠藻類와 赤藻類의 異常과

다 증식도 이와 직간접적으로 연관이 있는 것으로 추측된다.

이상에서 개략적으로 고찰한 바와 같이 축산분뇨는 적절히 이용하면 중요한 유기질 자원이 되지만 과다하게 사용하면 환경오염의 주범이 된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 구미 각국에서는 축산에 의한 환경오염문제를 체계적으로 연구하고 전략적인 대응방안을 범 국가적으로 실시한 바 네델란드나 덴마크 같은 나라는 축산분뇨에 의한 환경문제를 완전히 가깝게 해결하게 되었다.

이들의 전략적 대응방안의 요체는

제 1 단계: 가축의 분뇨배설량을 줄이고 이 분뇨를 통해 배설되는 영양소 특히 질소와 인의 양을 줄이는 것이다. 이는 가축의 사양기술 또는 영양관리를 통하여 이루어진다.

제 2 단계: 가축을 사육하는 농가는 분뇨처리를 위한 토지를 확보하거나 처리업자와 계약을 해야 한다. 생산된 분뇨는 농경지나 초지에다 糞期(가을부터 겨울에는 산포금지)에 최대허용량(EC, 연간 170 kg N/ha: 영국 250 kg N/ha) 범위 내에서 산포한다.

제 3 단계: 분뇨의 직접산포가 적절하지 않는 경우는 여러가지 처리를 하게 된다. 예를들면 부숙법(aerobic composting, anaerobic composting, vermicomposting), 활성오니법(activated sludge process), 연속베치 반응조(SBR)처리, 역삼투(reverse osmosis)시스템, 고부가가치 유기질 비료개발, biofilter, 飼料化, 연료화 등의 처리 방법이 있다 (Paik 등, 1995).

이상에서 약술한 바와 같이 축산에 의한 환경오염 문제는 전체를 놓고 체계적으로 전략을 수립해야 함에도 불구하고 우리나라의 대응방안은 지금까지 제 3 단계의 지엽적인 처리문제에만 집중되어온 결과 축산선진국에서 이룩한 “환경문제 완전해결”이라는 수준에 도달하기까지는 요원한 현실이다. 따라서 본 연구의 목적은

첫째, 축산분뇨로 인한 환경문제해결 전략의 제 1 단계인 영양관리 중 핵심을 이루고 있는 효소사용을 위하여 필요한 사료첨가용 phytase와 carbohydrases(xylanase 및 β -glucanase)를 생물공학적인 기법을 통하여 개발하며,

둘째, 개발된 효소제들을 이용하여 가축의 排糞量과 糞中 N와 P의 배설량을

줄여 환경문제를 해결하는 사양전략을 수립하는데 있다.

1. 연구개발에 따른 기술, 경제, 산업적 기대효과

가. 기술적인 측면

첫째, 효소제의 경우는 효소제 전문제조회사인 Novo사와 생화학제제 제조회사인 Roche 등이 오랜 기술 축적을 통하여 개발한 사료용 효소제를 유럽 및 전세계를 상대로 하여 널리 공급하고 있다. 앞으로 영양소이용율 향상을 통한 축산 환경문제의 해결을 위해서는 이 효소제들 (phytase, carbohydrases)의 사용이 불가피하다. 국내의 기술진에 의해 생물공학적인 기법을 이용하여 활력이 높은 균주를 생산하여 이용하면 이 효소제들의 국산화가 가능할 것이다.

둘째, 이렇게 생산된 효소제를 이용하여 糞의 배설량을 감소시키고 P와 N의 배설량을 줄이는 동시에 경제적으로 가축의 생산성을 유지 또는 개선하는 환경 친화적인 사양기법을 개발한다.

나. 경제·산업적인 측면

본 연구에 의한 기술개발은

첫째, 외국의 거대기업이 생산한 제품들(효소제)을 수입하여 사용하므로써 막대한 외화의 지출이 예상되므로 이들의 국산화는 국제수지 개선에 공헌하며 나아가 제품의 우수성이 입증되면 해외시장의 개척도 가능할 것이다.

둘째, 이들 효소제들을 사용하여 축산분뇨에 의한 환경공해 문제 해결의 1단계 전략 수립과 실행에 중추적 역할을 담당하게 된다.

2. 국내의 관련기술의 현황과 문제점

가. 타연구기관의 기술개발 현황

1) 효소제의 개발

11,150 U/g cellulase, 27,600 U/g glucanase 그리고 37,150 U/g xylanase를 함유한 복합효소제가 *Trichoderma viride*로 부터 개발되었다 (Brufau 등, 1974). β -glucanase와 xylanase의 함유비율이 다른 복합효소제 등이 *Trichoderma*

longibrachiatum 과 *Bacillus subtilis*로 부터 제조되었다 (Creswell, 1994).

Phytase는 *Aspergillus ficuum* (Simmons 등, 1990; Nasi, 1990) 또는 *Aspergillus niger* (Beers와 Jongbloed, 1992)로 부터 개발되어 사용되고 있다. *Aspergillus niger*중의 phytase활성을 위한 유전자를 담배씨앗에 유전공학적으로 삽입하여 담배씨앗의 可溶性단백질 중 1%가 phytase로 발현되는 연구가 성공되었다 (Pen 등, 1993). 이 유전자 변형 담배씨앗을 옥계사료에 첨가시 곰팡이에서 생산된 phytase를 사용한 것과 같은 효과를 얻었다. 현재 국내에서 상계 제품을 개발한 실적은 없으며 외국산 제품에 대한 효능검사가 일부 실시된 바 있다.

2) 효소제 사용에 의한 가축의 생산성 및 환경개선 효과

일부 사료곡물에 들어 있는 탄수화물의 일종인 非澱粉性 다당류 (밀이나 호밀의 pentosans 또는 arabinoxylans; 보리나 귀리의 β -glucans)는 可溶性 섬유소로 다른 영양소의 소화흡수를 저해하는 것으로 알려졌다. 옥계사료에 복합효소제 (Avizyme; β -glucanase+xylanase)를 사용시 분의 배설량이 12% (밀 대조구 대비)와 14.7% (밀/보리 대조구 대비) 감소하였다 (Wyatt, 1995).

탄수화물 분해효소 복합제를 돼지사료에 첨가시 질소의 축적률이 개선되었고 (Low와 Longland, 1990) 밀 기초사료에 사용시 증체률이 향상(+17%)되고 사료 전환률이 개선(1.46 對 1.29) 되었으며 질소이용률이 개선 (37.4 對 45.3%)되었다. β -glucanase를 옥계사료에 첨가했을 때 바닥(분뇨+깔짚)으로 부터 발생하는 암모니아 가스량이 80%나 감소되었다 (Williams와 Kelly, 1994). 백 등 (1995)이 실시한 산란계 시험에서 탄수화물효소 복합제 (Roxazyme)을 사용시 밀로 옥수수를 완전 대체하여도 생산성에 차이가 없었으며 특히 효소사용시 난황의 착색도가 유의하게 증가되었다. 이는 효소의 사용이 지방의 소화율에도 유익한 효과를 나타내는 것을 시사한다.

한편 밀이나 보리, triticale 및 호밀에는 phytase가 상당량 함유되어 있으나 옥수수, 귀리 그리고 대두박을 비롯한 식물성 박류에는 phytase가 없다 (Pointillart, 1993). 따라서 옥수수 위주의 사료를 사용할 때는 phytic P를 이용할 수 없기 때문에 phytase를 사용하므로써 인산칼슘사용량을 줄여 원가를

절감하고 P의 배설량을 줄여 P에 의한 공해문제를 감소시킬 수 있다.

육성돈으로 실시한 시험에서 phytase의 첨가 (800~1,550 U/kg)로 P와 Ca의 생체이용률이 각각 22-50%와 10-16%씩 개선되었다 (Soares와 Hughes, 1995). 육계에 있어서는 phytase첨가 (1,000 IU/kg)로 인해 P와 Ca의 생체이용률이 각각 60% 및 26% 개선되었다 (Simons 등, 1990). 유럽에서 실시한 여러 가지 사양시험을 종합한 결과 phytase를 사용했을 때 糞中 P의 배설량을 25-30% 감소시킬 수 있었다 (Federation Européenne des Fabricants d'Adjuvants pour la Nutrition Animale, 1992).

지금까지 얻어진 연구결과에 의하면 단위동물에 있어서 옥수수 위주의 사료에는 phytase를 그리고 밀, 보리 위주의 사료에는 xylanase나 β -glucanase 또는 이들의 복합제를 사용하면 배분량과 P 및 N의 배설량을 개선하며 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3) 고부가가치 유기질 비료 개발

Alabama의 Tennessee Valley Authority (TVA)는 Auburn 대학과 협동으로 잔디밭이나 골프장에서 이용할 수 있는 완효성 유기질비료의 개발에 지속적인 연구 투자를 해왔다. 이들이 사용한 방법은 가금분을 부숙시킨 후 여러 가지 화학약품 (뇨소, ammonia sulphate, ureaform, 인산질비료, KCl 등)을 배합하여 여러 가지 배합비율의 pellet를 제조하는 것이다. 대표적인 제품으로는 8-8-8, 8-14-8, 12-4-6(N-P-K) 등인데 현재 톤당 U.S. \$200에 판매하고 있으며 자세한 제조기법은 공개되어 있지 않다 (FERENCE Weicker & Co., 1994).

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표와 내용

가. 효소제 생산에 필요한 균주의 개발 및 사료용 효소제의 개발

본 세부과제에서는 *A. oryzae*를 유전공학적 이종단백질 생산의 host cell로 사용하여 phytase 유전자를 *A. oryzae*에 형질전환시켜 phytase 고발현 recombinant cell을 얻음으로서, 산업적으로 유용한 phytase 효소를 대량생산하

고자 한다. 이와 같은 재조합 균주를 분리하여 념으로서 생산 균주 및 효소의 산업적 활용을 극대화하고자 한다.

나. 효소제의 효능을 검정하고 이의 사용에 따른 가축의 생산성, 경제성, 환경에 미치는 영향을 평가하여 환경친화적 가축사양기법을 개발하고 가축 (육계, 산란계)을 이용한 검정 및 환경친화적 사양기법 개발

구분	연구개발 목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1996)	<p>제 1 세부과제 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고역가 균주 및 유전자 탐색 (phytase) - Wild type의 배양 및 효소생산 방법 개발 - Phytase의 액상 안정화: (β-Glucanase & Xylanase 포함) 	<ul style="list-style-type: none"> - Phytase유전자 탐색 - 유전자 분리 및 동정 - Phytase, glucanase, xylanase의 생산균주 및 효소역가 측정법 확보 - 문헌 조사 - Enzyme 특성 분석 - pH-Activity Profile - 온도-Activity Profile - Stability Test - Stabilizers Effect - Accelerated Stability Test <p>사료 Pellet 스프레이용 시작품 개발</p>
	<p>제 2 세부과제 :</p> <p>가금에서 phytase 검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 육계사료에서 phytase첨가시 보충무기태 P의 감소와 이에 따른 P의 배설량 감소효과 검정 - Phytase첨가로 인한 사료내 P의 감소가 산란계의 생산성과 P배설량에 미치는 영향
	<p>제 3 세부과제 :</p> <p>축산분뇨 자원화 기초 성분분석 및 Formulation</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 축산분뇨에 대한 영양성분검정, 토양성분 배합비 작성 - Pellet 제조기술개발 - Pellet의 육묘생산, 생육 및 품질검정
2차년도 (1997)	<p>제 1 세부과제 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유전자 재조합균주의 개발 - Bioreactor에서의 phytase 생산 조건 연구 및 carbohydrase효소의 예비실험 	<ul style="list-style-type: none"> - 고발현 벡터제조 - 유전자 재조합균주 개발 - 배양액의 최적 조성조사 - 발효조에서 효소생산
	<p>제 2 세부과제 :</p> <p>가금에서 crude phytase 및 carbohydrases검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 실험실에서 제조한 crude phytase를 이용한 사양시험 • Carbohydrases사용효과 검정 - 소맥 또는 대맥 사료에 대한 효과검정

3차년도 (1998)	제 1 세부과제 : - 유전자 재조합균주 / 고발현 돌연변이주의 선발 - 변이주의 발효생산 - 효소생산 균주를 이용한 미생물의 생균제제화	- Phytase 유전자의 분리 - 고발현 돌연변이주의 선발 - 변이주의 배양 및 효소 생산조건의 최적화 - 생균제제의 안정성 조건 조사 및 제형 개발
	제 2 세부과제 : - Wild type phytase제제의 사양시험 - 변이주 phytase의 생물학적 효능검사 - 사료원료내 total P, phytate-P 및 internal phytase에 연구	- 육계사료에 있어서 wild type phytase 첨가효과 - 변이주로 생산한 crude phytase 첨가 효과 - 식물성 사료원료의 화학적 분석

2. 추진전략 및 방법

본 연구는 설정한 목표를 효율적으로 달성하기 위하여 두개의 세부과제로 분리하여 세부과제 책임자를 두어 추진한다.

가. 제 1 세부과제: 효소생산 균주의 개발과 사료첨가용 효소제의 개발

1) 1차년도

- (1) 고역가 phytase 발현 균주 및 유전자 탐색
- (2) Phytase 효소생산 균주의 비교
- (3) 액상 Phytase의 안정화 연구

연구개발의 대상이 되는 phytase, glucanase, xylanase 생산 균주를 확립한다. 초기 단계에서는 wild type의 cell line을 이용하여 효소의 생산형태 및 효소 역가를 측정하는데 중점을 둔다. 특히 phytase의 역가 측정, 균주확립, 및 유전자의 분리에 개발의 초점을 맞춘다. 사료 Pellet 스프레이용 시작품을 시판되는 효소를 이용하여 개발한다. 소기의 목적을 달성하기 위해 다음과 같은 세부전략을 세운다.

- ATCC 혹은 외국의 연구자로부터 효소를 생산하는 균주 및 유전자를 확보한다.
- phytase 유전자를 분리 동정한다.

- 효소 - phytase, glucanase, xylanase - 들의 활성을 측정하는 방법을 조사. 개발한다. 또한, 이들 효소들의 기질이 되는 phytin, glucan, xylan의 분석법을 조사한다.
- 진탕배양법을 이용하여 각 효소를 생산하는 균주를 배양한다.
- 사료 Pellet 스프레이용 시작품 개발한다.
- Phytase의 특성 연구: 분자량, 등전점, pH와 온도에 따른 용해도 등
- Phytase의 pH-activity profile
- Phytase의 temperature-activity profile
- Phytase의 안정성(stability) test (various pH and temperature conditions)
- 탄수화물계의 단백질 안정화제들의 첨가에 따른 안정성 향상 연구
- 높은 온도들 (30, 40, 50 °C)에서의 Accelerated Stability Test
- 액상에서 안정한 Phytase formulation

2) 2차년도

가) 유전자 재조합 균주의 개발

나) Bioreactor에서의 Phytase 생산 조건 연구 및 Carbohydrase 효소의 예비 실험

Phytase 유전자를 분리하여 고발현 vector를 제조하여 유전공학적 이중단백질 생산에 유용한 host cell인 *Aspergillus oryzae*에 형질전환시켜 재조합 균주를 개발한다. 또한 생물반응기에서의 생산성 향상을 위한 유가식 배양법을 개발하고, 이를 이용한 3-5리터 스케일의 phytase 생산액을 2세부과제에 공급한다. 또한, carbohydrase의 분석법 등에 대한 예비실험을 수행한다.

- Phytase 유전자를 고발현 vector에 subcloning하여 host cell인 *A. oryzae*에 electroporation을 이용하여 형질전환시켜 고발현 재조합 균주를 선별한다.
- Phytase의 생물배양기에서 production kinetics와 cell growth kinetics를 조사하고 production pattern을 비교한다. High producer의 배양조건을 최적화하기 위해 배지내의 carbon, 및 phosphate원의 유가식 배양을 수행한다.

3) 3차년도

가) Phytase 유전자 분리 및 고발현 돌연변이주의 선별

*Aspergillus oryzae*에서의 RT PCR을 이용한 phytase 유전자의 분리와 이와 병행하여 UV irradiation을 이용한 고발현돌연변이주를 선발하여 wild type의 균주와 비교 분석하고, 선별균주의 고발현 조건의 최적화를 찾고자 한다.

나) 변이주 배양

변이주의 배양을 위한 배지의 조성을 최적화하기 위해, 전년도에 개발된 배지를 기준으로 변형을 시도한다. 이로부터 최대 효소 생산배지의 조성을 찾는다.

- (1) 탄소원 농도에 따른 최적조건 조사.
- (2) 질소원의 농도에 따른 발효조건 조사.
- (3) 인산 조절에 의한 효소생산성 확
- (4) recombinant 세포의 경우 유전자발현 조건 조사.

다) 생균제제의 조성 및 제법 연구

전년도에 개발한 *Asp. ficuum*의 배양액 및 균체를 생균제제로 만든다. 사용되어질 방법은 동결건조 및 열건조로서 아래와 같은 조건을 조사하여 효소 활성을 최적화하고, 2세부과제에 시료를 제공한다.

- (1) 동결 건조시 부용제 (효소안정제)의 종류 (아미노산, 칼슘이온) 연구
- (2) 열건조시 안정제로서 사료의 성분을 이용하고자 한다. 효소 및 세포를 사료성분 중의 고체담체에 흡착시켜 안정화를 유도하고자 한다.
- (3) 열건조 온도의 최적화 조사.

나. 제 2 세부과제: 효소제의 평가 및 환경친화적 가축사양전략 개발

추진전략 : 수입효소제제들과 Pilot fermenter에서 생산된 phytase 제품의 생물학적 효능을 평가하여 개발제품의 효능을 증진시키는데 필요한 기초자료를 제시한다. 또한 P와 기타 영양소 배설량을 낮출 수 있는 동시에 가축의 생산성을 유지시키는 환경친화성 사양기법을 개발하며 아울러 경제성을 평가하여 제도화를 위한 기초자료를 제공토록 한다.

1) 1차년도

가) 육계사료에 있어서 phytase 첨가시 보충 무기태 P의 감소와 이에 따른 P의 배설량 감소효과 검증

(1) 시험사료의 준비 및 처리

처리 1 : NRC(1994) 권장수준의 무기태 인이 함유된 대조구 사료

처리 2 : 대조구 + 육계시험 1에서 결정된 수준의 phytase 첨가

처리 3 : 대조구 + phytase, dicalcium phosphate 50% 감량

처리 4 : 대조구 + phytase, dicalcium phosphate 100% 감량

(2) 시험방법

갓 부화한 육계 총 1,100수 (우 500수와 ♂ 600수)를 시험구로 배치한다. 1,000수 (우500, ♂ 500)는 5~6주 동안 평사관리 한다. 나머지 ♂ 100수는 3주령과 5주령의 phosphorus와 calcium에 관한 균형시험을 위하여 metabolic cage에서 사양시험한다.

(3) 분석항목

(가) Phytate P분석 및 사료원료와 사료 내의 총 P 분석

(나) 생존율 (survivability)과 폐사율 (mortality)

(다) 주당 증체량, 사료섭취량, 사료효율

(라) 경골의 길이, 둘레, 강도, 회분함량, P 및 Ca함량 측정

(마) Plasma의 alkaline phosphatase activity 측정

(바) P와 Ca 대사이용성

나) Phytase 첨가로 인한 사료내 P의 감소가 산란계의 생산성과 난각질 및 P 배설량 감소에 미치는 영향

(1) 시험사료의 준비 및 처리

시험 1)과 유사

(2) 시험방법

총 1,000수의 암평아리를 산란하기까지 시판사료로 사양관리한다. 5% 산란을 시기로부터 시작하여 산란률이 65%로 저하될 때까지 시험사료를 급여한다. 시험말기에 100수의 산란계 (처리당 25수씩)를 생물학적 항목 분석을 위하여 사용한다.

(3) 분석항목

(가) Phytate P 분석 및 사료원료와 사료내의 총 P 분석

(나) 산란계 생존율 (survivability)과 폐사율 (mortality)

(다) 주당 산란율, 사료섭취량, 사료전환율

(라) 난중 (egg weight), 난각 강도 (egg shell strength), Haugh unit 측정

(마) 경골의 길이, 둘레, 강도, 회분함량, P 및 Ca 함량 측정

(바) Plasma의 alkaline phosphatase activity 측정

(사) 환경에 관한 영향 및 경제성 분석

2) 2차년도

가) Carbohydrases(xylanase와 β -glucanase)의 사용효과 검정을 위한 소맥 또는 대맥 위주 사료에 대한 효과검정

(1) 시험사료의 준비 및 처리

3~4 수준의 pentosanases (single 또는 combination)를 소맥 또는 대맥 위주사료에 첨가하여 적정사용량을 결정한다.

(2) 시험방법

갓 부화한 육계 총 1,100수 (우 500수와 ♂ 600수)를 시험구로 배치한다.

1,000수 (♀500, ♂ 500)는 5~6주 동안 평사관리 한다. 나머지 ♂ 100수는 3주령과 5주령의 영양소 이용을 특히 건물(DM)과 N 및 NFE에 관한 균형시험을 위하여 metabolic cage에서 대사시험한다.

(3) 분석항목

- (가) 육계생존율 (survivability)과 폐사율 (mortality)
- (나) 주당증체량, 사료섭취량, 사료전환율
- (다) 腸內容物의 粘度
- (라) 영양소 (특히 N, NFE)의 이용율
- (마) 효소첨가가 사료의 ME가에 미치는 영향
- (바) 환경에 대한 영향 및 경제성 분석

나) Pilot scale로 생산한 phytase의 생물학적 효능검사

(1) 시험사료의 준비 및 처리

시험 1)과 유사

(2) 시험방법

시험 1)의 방법과 유사

(3) 분석항목

1)과 유사

3) 3차년도

가) 육계사료에 Wild type phytase제제의 첨가효과에 관한 연구

(1) 시험사료의 준비 및 처리

여러 수준의 인산칼슘을 함유한 사료에 적정 수준의 wild type phytase 를 첨가한다.

(2) 시험방법

갓 부화한 육계 1,000수 (암수 각 500수씩)로 pen 당 50수(암수 각 25수씩) 평사에 수용하여 5주간 사양시험을 실시하고 대사실험을 통하여 P을 비롯한 영

양소이용을 평가한다.

(3) 분석항목

(가) 육계 생산성 (증체량, 사료섭취량, 사료요구율)

(나) 생존율 또는 사망율

(다) 영양소 (Ca, P, N, NFE 등)의 이용율

(라) 혈청내 광물질 (Ca, P) 함량

(마) 경골의 길이, 둘레 및 광물질 (ash, Ca, P, Zn, Cu 등) 함량 측정

기타 항목은 시험 3-2-1에 준하여 실시한다.

나) 육계사료에 있어서 변이균주로 생산한 Crude phytase의 생물학적 효능 검사

(1) 시험사료의 준비 및 처리

시험 3-2-5와 유사

(2) 분석항목

(가) 육계 생산성 (증체량, 사료섭취량, 사료요구율)

(나) 생존율 또는 사망율

(다) 영양소 (Ca, P, N, NFE 등)의 이용율

(라) 혈청내 광물질 (Ca, P) 함량

(마) 경골의 길이, 둘레 및 광물질 (ash, Ca, P, Zn, Cu 등) 함량 측정

기타 항목은 시험 3-2-5에 준하여 실시한다.

다) 사료원료내 유기태 인 및 phytase activity 측정에 대한 연구

(1) 시험사료의 준비 및 처리

옥수수 및 대두박을 비롯한 가축사료에 이용되는 여러 가지 식물성 원료를 이용한다.

(2) 분석항목

(가) 각 원료에 대한 total P 함량

(나) 각 원료에 대한 유기태 인 (phytate P)의 함량

(다) 각 원료내에 존재하는 internal phytase activity 측정

다. 제3세부과제:가축분을 이용한 綫效性 유기질비료 pellet제품의 개발 및 효과 검증

1) 1차년도

가축분뇨는 급여사료의 종류와 급여방법에 따라 그 특성 및 성분이 판이하게 다르므로 본 시험에서 생산되는 가축분뇨를 일괄적으로 도입하여 이용하는데는 문제점이 있다. 따라서 이를 농축시키고 토양성분에 부족한 성분을 적절하게 배합하여 적용할 수 있도록 다음과 같은 사항을 연구한다.

(가) 육계, 산란계, 돈분의 화학적 성분 분석을 한다.

(나) 축분의 영양소 함량에 따라 작물이 요구하는 토양성분 (초지 및 사료작물, 경제작물, Golf장)과 비교하여 N, P, K 배합비율을 결정한다.

(다) Pellet화 적정 조건을 검증한다: 온도, 압력, 수분함량, 부형제배합비, die 직경, Zeolite 첨가 비율

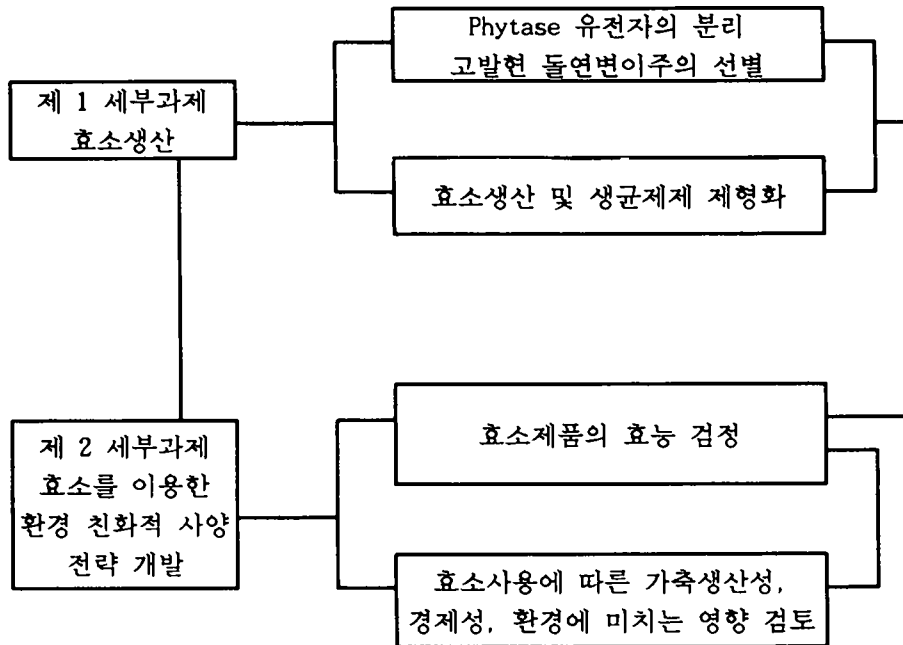
(라) 원예작물의 육묘에 필요한 인공배지용 비료의 formulation 결정

(마) 인공배지를 이용한 작물의 재배생산력 검증

<2차년도, 3차년도> 제외

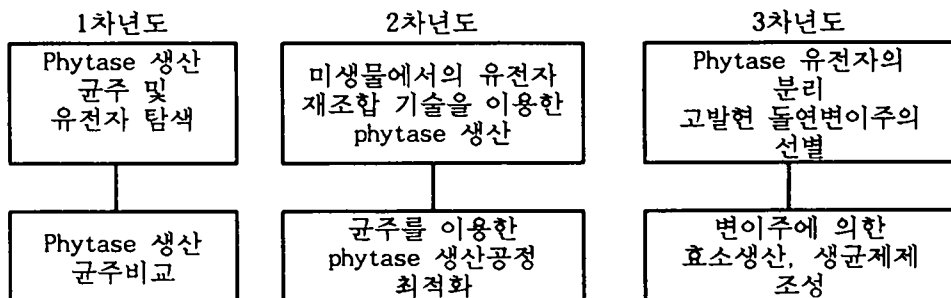
3. 연구개발 추진체제

가. 전체과제 추진체제

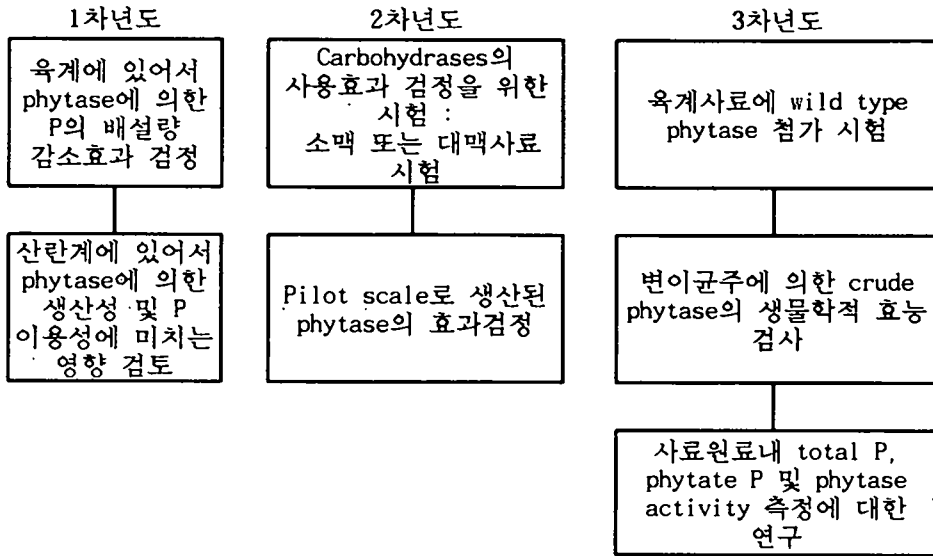


나. 세부과제별 추진체제

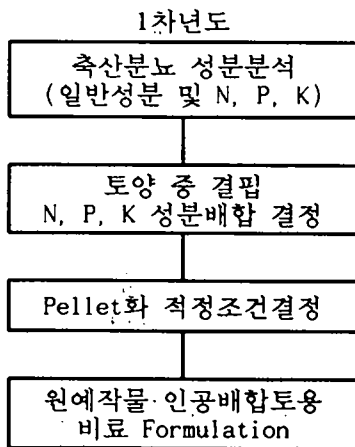
1) 제 1 세부과제



2) 제 2 세부과제



3) 제 3 세부과제



2. 3차년도 계획취소

제 2 장 Phytase 고발현균주의 선별분야

제 1 절 서 설

1. General of Phytase and Phytic Acid

Phosphate는 식물뿐만이 아니라, 모든 동물에게도 요구되는 중요한 광물질이다. 식물성장의 3대 요소이며, 동물 체내 대부분의 생화학적 반응 (핵산이나, 막의 성분 또는 인산화)에 작용한다. Phosphate의 중요한 작용은 근육과 뼈의 생체조직의 성장에 관여한다. 인이 결핍된 사료나 식품을 섭취할 경우, 체중감소, 사료나 식품 효율의 감소, 뼈의 강도약화, 그리고 골발달의 저하와 같은 현상이 나타난다. Phosphate의 주형태는 phytate 또는 phytic acid라 불리는 유기화합물로 되어있다 (Fig. 2-1-1). Phytic acid는 옥수수, 대두박, 기타 곡류, 종실류 (oilseed meal), 밀씨앗으로부터 만들어지는 부산물 사료나 식물성 식품에 다량으로 존재하는데, 사람이나 돼지 또는 가금류 등의 단위동물에게는 효율적인 영양을 제공할 수가 없다. Phytic acid가 protein, vitamin 그리고 mineral등과 상호작용하는 항영양 인자 (Anti-nutrients factor)이기 때문에 흡수를 억제할 뿐만 아니라, 단백질이 basic 부위에 강하게 결합하여 소화와 관여하는 많은 중요한 단백질 pepsin, trypsin, α -amylase 등의 기능을 억제한다 (Hartmann, 1979).

현재 많은 polyphosphorylated inositols가 천연에서 발견되고 있으며, 이들은 다양한 요소들의 복합체로 구성되어 있다. 이러한 복잡성의 이유로 명명하는데도 상당한 혼선을 초래하는데, 상업적으로 얻어지는 phytic acid는 hexaphosphate보다 더 적은 phosphate 파생물질을 가지고 있다 (Greaves, 1967).

Anderson (1915)은 이러한 低 esters의 존재가 hexaphosphate 생합성 과정의 단계에서 발생하는 것인지 아니면 실제로 분리방법에 따른 화학적 분해 산물인지에 대해 의문을 제기하였다. Cosgrove (1970)는 phytic acid는 일반적으로 phytase라 불리는 phosphatase에 의해서 탈인산화되거나 또는 산이나 알칼리 용액에 넣어 열처리를 시킴으로써 가능하다고 보고하였다. 이 외에도 phytate를

제거하는 방법으로 여러 연구 - heating (Allen, 1977), autoclaving (Chang et al., 1977), soaking (De Boland et al., 1976), fermentation (Mandal et al., 1972), chemical treatment (Brooks and Morr, 1984) - 가 진행되었는데, 이러한 방법들은 phytate제거에 어느 정도 효과를 보았지만, 그 외에 다른 유용한 영양물질들까지 제거해 버려서 효율적인 방법이 되지 못하였다. 따라서 phytase에 대한 연구가 시작되었고, 이러한 효소적 처리방법이 우수하고 효율적인 방법임이 밝혀졌다 (Bitar et al., 1972).

Phytic acid, 또는 phytate는 보통 *myo*-inositol hexaphosphoric acid로 불리워지고 과학적으로는 1,2,3,4,5,6-hexakis (dihydrogen phosphate) *myo*-inositol (IUPAC-IUB, 1968)로 명명되어진다. Phytin은 phytic acid에 calcium-magnesium salt가 포함된 것을 말한다. 반면에 phytate는 phytic acid의 1부터 12까지의 음이온을 가진다. 실제로 9개의 stereoisometric inositol 형태가 가능하나 식물에서는 오로지 *myo*-inositol 형태만이 존재한다. 반면 토양에서는 *neo*-, *chiro*-, *scyllo*-hexa phosphates가 발견되었으며, Oberleas (1966)는 이런 형태는 토양 속의 미생물이나 혹은 토양의 특성에 따라 가능할 것이라 추정하였다. 그러나 hexaphosphates의 형태가 동물조직에서는 발견되지 않았으며 mono-, di-, tri-esters 등이 지질과 복합체를 이루어 존재한다는 것이 확인되었다.

Gibson (1987)과 Howson (1983)은 6개의 *myo*-inositol pentaphosphates중 하나가 닭의 혈액에 존재한다고 보고하였고, 이 외에 다른 연구자들은 cereal grain phytic acid에 효소적, 화학적 처리를 가하여 *myo*-inositol pentaphosphates를 얻어냈다.

Phytic acid는 $C_6H_{18}O_{24}P_6$ 으로 구성되어 있으며, 분자량 (MW)은 660.04이다. 이들 각각은 carbon이 10.92%, hydrogen이 2.75%, oxygen이 58.18% 그리고 phosphate가 8.16%로 식물의 major phosphorous compound를 이루며, 특히 oil seeds, legumes, cereal grains에 풍부하다. 그리고 2·3개의 cations과 불용성 복합체를 형성한다. phytate는 6개의 phosphate group을 포함하는 cyclic compound이다 (Gibbins et al, 1963).

Phytate는 콩이나 대부분의 콩 부산물의 건조중량에 1-1.5%를 차지한다. 돼

지나 닭이 먹는 사료에는 phytate가 풍부한데 여기에 phytase를 첨가한 결과 phosphorous 이용률이 강화되었다. Phytic acid는 위장내의 pH 조건하에서 단백질과 복합체를 형성한다고 알려지고 있다. 결합은 anionic phosphate groups과 amino acids의 cationic groups간에 이루어진다. 그러므로 phytate- protein 복합체의 단계적 가수분해는 protein의 분해를 증가시키고 필수 아미노산의 생흡수를 증가시킨다 (Eckhout et al, 1994).

Phytase는 유기인산을 포함하는 물질로부터 무기인산을 유리화시키는 최초의 효소이다. Phytase의 과학적인 정식명칭은 myo-inositol hexakis phosphate phosphohydrolase (EC 3.1.3.8)이며, 생물계에는 적어도 2종류의 phytase가 존재하는데 하나는 phytic acid의 1-phosphate를 제거하고, 다른 하나는 6-phosphate를 제거한다고 하였다 (Maga, 1982). 사람의 장에 있는 phytase는 phytate의 분해에 큰 기능을 발휘하지 못한다. 그러나 밀겨에 있는 phytase와 *Aspergillus niger*의 phytase는 phytate를 상당히 잘 분해하며, phytase activity는 식품이나 사료의 가공처리 방법에 따라서 많은 차이가 있다.

현재 연구 방향은 밀, 보리, 콩등을 주식으로 하는 돼지나 가금류 같은 동물의 사료에 microbial phytase의 첨가가 phosphorous, calcium, magnesium, zinc, protein등의 이용률을 높이는지를 밝히는 것이다. 현 연구의 또 다른 면은 nitrogen 흡수에 microbial phytase의 영향을 조사하는 것이다. Endogenous phytase와 exogenous phytase에 의한 phytate 가수분해는 곡물로부터 철의 흡수를 증가시켰다. Endogenous phytase를 활성화시켜서 wheat bran과 rye flour에 있는 phytate를 가수분해시켰을 때 철의 흡수가 증가하였고, 요리하지 않은 oatmeal에 wheat phytase를 첨가하였을 때 또한 철의 흡수가 증가하였다. Phytate의 가수분해는 fermentation, germination 같은 공정에서도 발생한다. wheat phytase를 활성화시키는 적정조건은 pH 4.5-5.0, 55℃이다 (Sandberg and Svanbeg, 1991).

*Aspergillus ficuum*에 의해 생산되는 3개의 extracellular acid phosphatases는 myo-inositol hexakis-, pentakis-, tetrakis-, triphosphate에 대해 다양한 친화성을 가지고 있다. Phytase는 pH 2.5-5.5사이에서 phytate를 분해한다 (Fig. 1-2). 그러나, Extracellular acid phosphatase의 적정 pH는

2.5와 6.0이었다 (Irving and Cosgrove, 1971).

Phytase cDNA는 transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) 식물에서 일정하게 발현된다. 세포의 용액으로 protein의 방출은 tobacco pathogen related protein S로부터 signal sequence를 이용하여 얻어졌다. 분리된 세포의 용액에서 specific phytase activity는 전체 잎 추출액에서 얻어진 것보다 90배나 더 높았다. Glycosylation의 차이에도 불구하고 tobacco와 *Aspergillus* phytase의 specific activity는 동일하였다 (Ullah, 1995).

Phytate를 감소시키는 가장 간단하고 효과적인 방법 중에 하나는 식물조직의 다른 부위에 위치한 endogenous phytase를 이용하는 것이다. 예를 들어 자가 분해에 의한 soy flour로부터 소량의 phytate를 포함하는 soybean protein 추출물을 얻어 65°C의 물에 soy flour를 부유시킴으로써 phytase로 하여금 phytate를 가수분해하게 한다. Phytate의 가수분해는 soybean protein으로부터 초원심 분리에 의한 phytate의 분리를 용이하게 한다. 이 방법에 의해 얻어진 산물은 90% 이상의 단백질을 포함하며, phytate의 수준은 거의 무시할 정도이다. 이러한 제거는 초원심분리나 이온교환수지법에 의해서도 직접적인 영향을 받는다. Phytate의 제거는 bean으로부터 단백질의 추출동안에 pH, salt concentration, temperature등에 의해서도 영향을 받는다. 빵이 soy protein으로 강화되었을 때 효모에 의해 생산된 phytase의 가수분해에 의해 phytate의 상당한 감소를 초래하였다. 발효를 수행하는 전통적인 soybean에 기초한 식품들은 phytate의 감소를 가져왔다. 이는 아마도 미생물에 의해 phytase의 action이 용이해졌기 때문일 것이다. Soybean의 젖산발효도 또한, phytate를 감소시킴으로써 철의 흡수에 증가를 가져오는 비슷한 효과를 보였다 (Simons and Verstegh, 1990).

*Aspergillus ficum*의 배양 여과액에 soybean meal의 첨가는 phytate의 90% 이상을 감소시켰고, 닭의 phosphorous와 calcium의 요구량을 감소시켰다. 이와 비슷한 처리가 어린 닭과 돼지에 실행되었을 때 또한 phosphorous의 이용률을 증가시켰다. 소량의 phytate를 포함하는 soybean은 wheat bran으로부터 얻어진 crude phytase를 마쇄한 전체 soybean에 첨가함으로써 얻어진다 (Jongbloed et al, 1992).

현재 상품화된 대표적인 phytase는 네덜란드 Gistbrocades사의 Maxazyme FT

와 Natuphos가 있고, 덴마크의 Novo사의 Phytase Novo가 있다. 이들 제품은 recombinant DNA technology를 이용한 재조합 *Aspergillus*를 균주로 하여 대량 배양, 정제, 제제화하여 시판되고 있다. 이들 효소들은 액상, 분말상, granule 상 등으로 제제화하여 동물사료와의 혼합 phytic acid를 phosphate로 전환시켜 주고, 또한 feeding시 단위동물의 소화관 내에서 효소반응에 의한 inorganic phosphate의 생성을 촉진시킴으로 가금류나 돼지에서의 장내 흡수를 증가시켜 배설되는 공해 오염물질인 phosphate의 양을 줄여준다. 이는 환경적, 경제적 측면에서 많은 효과를 가져올 수 있는데, 환경적인 측면에서는 축산폐수나 인분으로 인한 토양 및 수질오염을 방지하는데 커다란 효과를 볼 수 있다. 다시 말해서 사람이나 동물이 흡수하지 못한 인 성분이 토양이나 하천에 유기 되어지면 부영양화로 인해서 용존 산소 결핍을 초래한다. 이는 토양이나 하천에 서식하는 호기성 미생물들을 사멸시키고, 혐기성 미생물들을 출현시키면서 토양이나 하천의 부패를 불러들일 수 있기 때문이다. 경제적인 측면으로는 가축사료의 이용효율을 높일 수 있어서 별도의 무기인 공급이 필요치 않게 된다.

효소의 안정화와 제제화는 효소의 활성도를 생산된 효소의 유통 보존 기간 중에 일정하게 유지시켜 주고 사용시 그 역할을 극대화시켜주는 것이 기술의 핵심이다. Phytic acid로부터 phosphate를 분해하는 phytase도 효소역가가 높은 균주를 사용하여 전통적 DNA재조합 기술로 고발현시켜 대량 생산할 수 있으나, 효소의 안정성 (Enzyme stability)와 제제화 (Formulation)은 효소들마다 그 물리적, 화학적 특성이 다르기 때문에 현재까지 국내 및 국외에서 이론적인 연구 결과 보고가 없다.

2. *Aspergilli* as Microorganism

가. General

Aspergillus species는 Aspergillaceae Ascomycetes group에 속하는 filamentous fungi이다. Ascomycetes는 자루모양의 ascus가 있으며, 이 안에는 8개의 asco-spore를 가진다. 그러나 실제로 ascospore의 수는 species에 따라 하나에서 수천 개의 차이를 보이고 있다. 다른 특징으로는 septate mycelium을 가지며, asci를 가지는 fruiting body를 대부분의 species가 형성하고,

flagellate type의 세포를 형성하지 않는다. 생식방법에 있어서는 ascospore를 형성하는 유성생식과 conidia를 생산하는 무성생식의 단계가 있다 (Cove, 1977).

*Aspergilli*는 colony 모양으로 균사 성장한다. 균사는 다세포의 branched hyphae를 가지며, 단세포의 conidia chain을 가진다. *Aspergilli*는 산업적으로 많이 사용되고 있는데, 그 이유는 *Aspergilli*가 여러 종류의 유용한 효소들 (citric acid, gluconic acid in *A. ficuum*)을 생산하는 능력을 가지고 있기 때문이다. 일부 species에서는 mycotoxin이라는 독성물질을 생성하는데 *A. parasiticus*가 생성하는 aflatoxin이 많이 알려져있다 (Alexopolos and Mims, 1979).

*Aspergilli*의 유전적인 연구는 Pontecorvo와 그 외의 여러 group에서 주로 *A. nidulans*를 가지고 연구되어왔다. 이 곰팡이는 homothallic이나 정확히 보면 relative heterothallic이며 (Pontecorvo et al., 1953), strain들을 상호 cross시켜보면 대부분의 cleistothecia가 single fertilization에 의하여 형성되며 hybrid origin을 가진다. Asci에는 8개의 unordered ascospore를 가지므로 Unordered octad analysis를 약간 미성숙한 cleistothecia로부터 asci를 분리하여 수행할 수 있다 (Strickland, 1958a and b; Clutterbuck, 1974 and 1982). *A. nidulans*는 8개의 haploid chromosome을 가지며 (Kafer, 1958), genome size는 4.5×10^7 bp이다. 이러한 genome size는 yeast보다 두배 정도 크며, *E. coli* 보다는 10배정도 크다.

Haploidization때에는 recombination이 발생되지않기 때문에 새로 분리해낸 돌연변이의 linkage map을 쉽게 알 수 있다. Diploid 상태에는 불안정하여 서서히 haploid상태로 전환된다 (Pontecorvo et al., 1954). 이러한 haploidization은 chemical reagents로 촉진시킬 수 있는데 예로 arsenate (van Arkel, 1963), p -fluorophenylalanine (McCully and Forbes, 1965) 또는 benlate (Hastie, 1970)등이 있다. 또한 haploidization을 이용하여 돌연변이에 translocation이 일어났는지 알아볼 수 있다. Heterokaryon을 만들어 complementation analysis를 할 수 있는데 이러한 heterokaryon은 상호보완적인 두 strain을 각각이 필요로 하는 supplement가 없는 배지에서 같이 배양하여 얻어낼 수 있으며,

cytoplasmic inheritance를 알아보는데 사용할 수 있는데, 그 이유는 heterokaryon에서는 핵융합이 거의 일어나지 않고 단핵의 conidia를 형성하기 때문이다 (Rowlands and Turner, 1973 and 1974; Gunatilleke et al., 1975). 또한, heterokaryon에서는 mitotic recombination이 diploid mycelium에서 자주 일어나므로, *A. nidulans*는 mitotic recombination analysis를 하기에 적합하다. 하지만 진정한 sexual cycle이 없는 관계로 유전학적 조작이 어려워 *in vitro* 유전자조작이 필요하다.

나. Characteristics of *Aspergillus oryzae*

1) Secretion of proteins

*A. oryzae*는 secretory system이 잘 발달되어 있어 유전공학적 측면에서 많은 관심을 끈다. 생산된 단백질이 배지로 배출된다는 것은 여러 면에서 유익한 점이 많다. 배출된 단백질은 세포내의 단백질 분해효소에 의한 분해로부터 보호될 수 있다 (Kitano et al., 1987; Hellebust et al., 1988). 또한 이종 단백질의 체내 축적에 의하여 야기되는 inclusion body 형성 (Williams et al., 1982; Schoemaker et al., 1985; Schoner, 1985)과 세포의 대사작용 방해도 피할 수 있으며, 세포 단백질과 분리되어 생산된 단백질을 배지로 부터 쉽게 순수분리해 낼 수 있다 (Priest, 1985).

이러한 secretion 기작에 대하여는 많은 연구가 진행되고 있으며, 몇가지 가설들이 보고되고 있다. Signal hypothesis (Blobel and Dobberstein, 1975; Muller et al., 1982)에서는 signal sequence 인식 단백질, ribosomes, 그리고 세포막의 receptor들의 결합체가 단백질이 지방 이중구조의 세포막을 통과하는데 필수적이다. Wickner (1979)가 주창한 membrane-trigger hypothesis를 보면, 단백질의 자체 구조 형성 능력이 단백질을 배출을 가능케 한다고 보고 있다. 즉 단백질의 전위체가 세포벽에 붙은 후 외부의 도움없이 자체 구조를 변화시켜 세포막을 통과한다고 본다. Direct transfer mode (von Heijne and Blomberg, 1979)에서는 polypeptide chain의 random coil 구조에서 α -helix 구조로의 변환 과정에서 얻어지는 net free energy에 의하여 이동이 가능하여 진다고 본다. 마지막으로 Engleman and Steitz (1981)이 내놓은 helical hairpin hypothesis 또는 loop

model을 보면, positive charge를 띄는 amino-terminus 또는 signal sequence가 negative charge를 띄는 cytoplasmic membrane의 안벽에 붙은 후 signal peptide chain의 hydrophobic region이 지방 이중구조의 세포막을 loop 또는 hairpin-like structure를 이용하여 통과하게 된다.

Eukaryote에서 단백질 합성이 endoplasmic reticulum (ER)에 붙은 ribosome에 의하여 일어남과 동시에 ER의 lumen속으로 이동하는 것에 비추어 볼 때 signal hypothesis가 다른 가설에 비하여 가장 타당성이 있다고 보여진다. 배출되는 단백질의 mRNA 상에는 amino-terminal sequence에 leader peptide or signal sequence 이 있다. 이 signal peptide는 단백질이 합성되며 ER lumen 속으로 들어갈 때 ER membrane에 있는 signal peptidase에 의하여 제거된다. 또한 단백질의 glycosylation이 일어날 경우 mannose core oligosaccharide가 정해진 위치의 asparagine residue에 가서 붙게 되며 (Cambell and Blobel, 1976; Rothman et al., 1978; Glabe et al., 1980); cysteine residue가 산화되어 disulfide bond를 형성하게 된다 (Bergman and Kuehl, 1979). 이러한 signal hypothesis를 뒷받침하여 주는 주요 인자들이 개의 체계에서 분리되었다. Signal recognition particle (SRP)는 11s cytoplasmic ribonucleoprotein으로 여섯 개의 서로 다른 polypeptide chain (72, 68, 54, 19, 14 과 9 kD)과 300 nt RNA molecule로 이루어져 있다 (Walter and Blobel, 1980 and 1982). 또 다른 중요한 인자로 docking protein 또는 SRP receptor protein은 72 kDa으로 endoplasmic reticulum의 membrane에 끼여 있다 (Gilmore et al., 1982; Meyer et al., 1982).

Signal peptide는 일반적으로 15 - 25 개의 hydrophobic한 아미노산으로 구성되어 있으며 endoproteolytic signal peptidase에 의하여 제거된다. Von Heijne (1983 and 1984)에 따르면 signal peptidase가 잘려지는 부근의 특정한 아미노산들을 인지한다고 한다. 이런 절단 위치를 인지하는 것을 '-3, -1 rule'라고 부르기도 한다 (von Heijne, 1983; Perlman and Halvorson, 1983). 이 rule에 따르면 -1 과 -3의 위치에는 -1 위치에 Gln이 오는 예외의 경우를 제하면 작고 중성의 아미노산이 오게 된다 (즉 Ala, Ser, Gly, Cys, Thr). -3의 위치에는 aromatic (Phe, His, Tyr, Trp), charged (Asp, Glu, Lys, Arg), Large polar (Asn, Gln) 또는 Proline이 오지 않는다. 그러나 이런 아미노산들은 -2 위치에 종종 오는 것을 볼

수 있다. Eukaryote에서는 -5 위치에, prokaryote에선 -6 위치에 hydrophobic한 아미노산이 주로 오며 signal sequence의 중간에는 hydrophobic core를 형성한다.

2) Expression of heterologous genes in *Aspergillus*.

Aspergillus species를 포함한 많은 filamentous fungi는 *E. coli*나 *S. cerevisiae*와는 달리 자연적으로 많은 양의 단백질 또는 효소들을 배지에 분비한다. Cullen 등(1987)은 *A. nidulans*를 이용한 고등동물 유전인자의 발현에 관하여 보고하였다. 치즈 제조에 사용되는 효소인 bovine chymosin (또는 rennin)을 이 균주에서 발현시켰다. 여기서 생산된 chymosin은 효소 특성 및 면역학적 조사에서 bovine chymosin과 동일하였다. 이 chymosin 유전인자의 발현에는 *A. niger* glucoamylase gene의 transcriptional, translational 그리고 secretory signal sequence을 prochymosin과 preprochymosin cDNA에 연결하여 사용하였다. 면역학적 분석에서 90%의 chymosin이 체외로 배출되었다. Transformant의 genomic DNA를 southern blot hybridization으로 분석한 결과 chymosin gene이 chromosome에 들어간 것을 보여 주며 일부 transformants에서는 여러 copy가 들어갔다. 현재에는 효소 생산 능력이 뛰어난 *A. awamori*에서 이 rennin을 유전공학적으로 대량 생산하여 상품화 하였다.

*A. oryzae*는 많은 양의 extracellular α -amylase 또는 Taka-amylase를 생산하는 균주로 산업적 효소 생산에 유용하게 쓰이는 미생물이다 (Akabori et al., 1954). Filamentous fungus의 일종인 *Rhizomucor miehei*에서 분리해 낸 aspartic proteinase gene (Boel et al., 1986)을 *A. oryzae*에서 발현시켰다 (Christensen et al., 1988). 여기서는 α -amylase gene의 promoter system을 이용하였다. *A. oryzae*에서 발현된 proteinase는 원래의 *R. miehei* proteinase보다 더 glycosylation이 일어났으나 효소의 activity에는 별 차이가 없었다. *R. miehei*의 proteinase는 preproenzyme으로서 pre-sequence가 signal peptide이며, propeptide는 척추동물의 gastric aspartic proteinase의 경우 처럼 (Foltmann, 1981) pH의 변화로 자체적으로 잘라진다고 추측되고 있다. *A. oryzae*에서는 mature form과 proenzyme이 다 생산되고 있으며 아마도 proenzyme은 autocatalysis 또는 *A. oryzae*의 효소 작용에 의하여 mature form으로 전환된다고 보여진다.

3) System for the analysis of expression signals

Fusion protein 개념은 *E. coli*의 T4 bacteriophage rIIA gene과 B gene의 사용에서 부터 왔다 (Champe and Benzer, 1962). 이 실험에서는 일정 부분을 제거한 B protein gene과 rIIA gene fusion에 의하여 생성된 hybrid protein에서도 B protein activity가 여전히 남아 있었다. 이 실험 결과에 의거하여 여러 미생물에 *E. coli lacZ* gene을 report gene으로 이용한 expression signal 분석이 시도되어 왔다 (Shilhavy, 1984; Shilhavy and Beckwith, 1985; Strandberg et al., 1987).

E. coli lacZ gene fusion을 이용에는 많은 장점들이 있다. *LacZ* 단백질인 β -galactosidase의 activity는 0-nitrophenyl- β -D-galctopyranoside (ONPG)라는 chromogenic substance를 사용하여 쉽게 분석할 수 있다. ONPG는 무색이나 β -galactosidase에 의하여 잘라져서 생기는 o-nitrophenol은 황색을 띄게 된다. 결국 이 색깔의 열고 질음이 발현된 효소의 activity와 비례하게 된다(Casadaban and Cohen, 1980; Casadaban et al., 1983). 이러한 분석의 실행시에는 특정 유전인자의 promoter 지역에 전체의 *lacZ* gene을 연결시키는 transcriptional fusion과 관심있는 유전인자의 단백질 coding 지역에 처음 여덟 개의 아미노산 codon이 없는 *lacZ* structural gene을 codon순서에 맞추어 연결시키는 translational fusion이 있다. 두번째의 경우에는 *lacZ* gene 앞의 sequence에 promoter, ribosome binding site 그리고 ATG translational initiation codon이 존재하여야 하며, 이 hybrid protein이 beta-galactosidase activity를 가져야 한다. Accolla and celada (1976)에 의하면 β -galactosidase amino-terminus의 일정 부분, 정확히 말하여 처음 27 개의 아미노산을 제거하여도 enzyme activity에 큰 영향을 미치지 않는다.

Van Gorcom 등(1985)은 *E. coli lacZ* gene을 *Aspergillus nidulans trpC* gene의 단백질 coding 지역에 연결시켜 발현시켰다. 이 fusion gene에서 transcriptional과 translational initiation sequence를 제거시켜 *lacZ* gene의 발현이 중단되는 것을 보여 줌으로써 *lacZ* gene의 발현이 *trpC* gene에 의존함을 보여주었다. 또한 *A. nidulans* 자체의 β -galactase gene인 *bglA* gene의 발현이 glucose와 sucrose에 의하여 억제되고 lactose와 galactose에 의해서는 향상되는 것을 보여 주고 있다. 따라서 glucose나 sucrose가 포함된 배지에서 배양함으로써

A. nidulans 자체의 β -galactosidase의 방해없이 *lacZ* fusion vector에서 발현되는 *E. coli* β -galactosidase의 activity를 조사할 수 있었다. Plasmid pAN5-41B는 *A. nidulans gpdA* promoter와 단백질 coding region 일부가 *E. coli lacZ* gene과 결합되어 있으며, plasmid pAN923-21B는 *A. nidulans trpC* promoter와 *E. coli lacZ* gene을 가지고 있다. 또한 이 두 plasmid는 *A. nidulans*의 *argB* gene을 selectable marker로 가지며 *A. nidulans trpC* gene의 transcriptional termination sequence를 가지고 있다. *A. nidulans*의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD; EC 1.2.1.12) gene (*gpdA*)은 *S. cerevisiae*의 *gpdA* gene을 사용하여 *A. nidulans* gene library로 부터 분리하여 냈다 (pant et al., 1988). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase는 glycolysis와 gluconeogenesis에서 중요한 역할을 한다. Glycolysis에서는 glyceraldehyde-3-phosphate를 biphosphate glycerate로 전환시켜 주며, gluconeogenesis에서는 그 반대로 작용한다. *S. cerevisiae* (Krebs et al., 1953)와 rat muscle tissue (Piechaczyk et al., 1984)에서의 glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase의 발현은 매우 높아 전체 cell 단백질의 5%에 이르고 있다. *A. nidulans trpC* gene은 *E. coli*의 *trpC* mutation의 complementation (Orr and Timberlake, 1982)를 이용하여 *A. nidulans* genomic DNA library로 부터 분리하였다 (Yelton et al., 1983). 이 *trpC* gene은 trifunctional polypeptide로 glutamine amido transferase (GAT), indoleglycerolphosphate synthase (IGPS), 그리고 phosphoriboxylantranilate isomerase (PRAI) activity를 가지고 있으며, tryptophan biosynthesis에 관여한다 (Roberts, 1967; Kafer, 1977). *A. nidulans*에서의 *trpC* mRNA level은 배지의 성분과 이 fungus의 developmental stage에 따라 조절된다 (Yelton et al., 1983). Fungus를 nitrate를 sole nitrogen source로 하는 minimal medium에서 배양할 때 mRNA의 양이 최고조에 이르렀으며, ammonium을 sole nitrogen source로 할 때에는 3 - 4 배 정도 낮은 함량을 보였다. 특히 yeast extract를 사용한 배지에서는 최저의 mRNA 양을 보여 주고 있다. 그러나 yeast extract를 함유한 배지에서 포자 형성할 때에는 nitrate를 함유한 배지에서 균사 성장을 할 때와 마찬가지로 많은 양의 *trpC* mRNA를 생성하였다. 이것은 developmental stage에서 tryptophan이나 tryptophan derivative가 포자 형성시 많이 필요하기 때문이다.

3. *Aspergilli*에서의 형질전환

가. General

미생물의 형질전환 방법은 분자생물학이나 유전공학 등에서 중요한 기술이다. *E. coli*에서는 CaCl_2 방법과 *B. subtilis*에서의 PEG 방법은 세포의 competence를 증가시키는 방법으로 발전되어 왔다. (Diver, 1990) 동물 세포에서는 calcium phosphate/ DNA coprecipitation 방법을 주로 이용하여 왔으나 이 방법은 fibroblasts 등에서는 그 효율이 높지만, 다른 유형의 세포에서는 적용하기에 어려움이 있었다. (Potter, 1990) 최근에 들어오면서 유전자의 형질 전환은 electricfield-mediated transformation method (electroporation)의 개발로 미생물은 물론 동식물 세포에서도 그 응용의 폭을 넓히고 있다. 일례로써, 다루기 힘든 lymphocytes, neuronal cells, endocrine cells, primary animal cells, hepatoma cells, hematopoietic stem cells, and plant protoplasts 등에 적용되고 있다. (Potter, 1988; Goldman et al., 1990; Simon and McEntee, 1989)

본 논문에서는 *A. oryzae* (YTH-1)에서 electroporation을 이용한 형질 전환 효율의 최적조건을 알아보고자 한다.

나. DNA transformation method

1) Transformation of coprecipitates of Calcium phosphate and DNA

이 방법은 가장 넓게 이용되는 transformation 방법이다. 또 supercoiled plasmid DNAs를 가진 mammalian cells의 안정된 transformants를 얻기위한 high efficient method이다. Calcium phosphate-DNA coprecipitation은 조직배양 배지에서 incubation time (15 - 24 hr) 연장하에 pH 6.96의 상태와 CO_2 장력(2 - 4%)의 조절이 따른다. 그 기작은 알 수 없지만 endocytosis로 외부 DNA 등을 세포질 혹은 핵 안으로 받아들인다고 믿고 있다. cell type에 의존하여 배양된 cell의 20% 이상을 한번에 transfection 할 수 있다. 이 방법은 foreign DNA의 integrated copies의 head to tail을 안정적으로 정확히 transfection한다. 이 방법은 supercoiled DNAs에서 보다 linear DNAs에서 낮은 transfection 효율을 얻게 되었는데 이는 calcium phosphate-DNA coprecipitate의 형성이 느려서 nucleases로부터 DNA의 보호가 지연되기 때문이다. 최상의 결과는 supercoiled DNAs를 CsCl-Ethidium Bromide density gradients 안에서 centrifugation을 두차례에 걸쳐 시행하므로 얻곤 한다.

2) Polybrene

Polycation polybrene은 cell 내로 DNA transformation을 촉진시키는데 사용되어 왔다. polycation polybrene은 다른 방법으로는 비교적 transfection이 힘든 cell안으로 low-molecular weight DNAs을 보다 안전하고 효율적으로 받아들인다.

Calcium phosphate coprecipitation method와 이 방법 사이에서의 효율은 high-molecular weight DNA 에서는 별 차이가 없다. Polybrene이 transfection의 중개역할을 하는것이 cloned DNA 의 일시적인 발현을 위해 사용할수 있는지 또는 안정된 transformation인지는 알 수 없는 단점이 있다.

3) Protoplast fusion

높은 plasmid copies를 가진 bacteria protoplast를 원하는 cell과 함께 배양하는 방법이다. Cloned DNA 는 fusing protoplasts로 cell 안으로 들어갈 수 있다. lysozyme을 cell wall에 처리하고 PEG와 섞어 fusion을 유도한다. PEG를 제거하고 kanamycin이 있는 plate에서 tissue culture하면 약간의 살아있는 bacteria transformants가 자란다. 이 방법은 immunoglobulin genes을 B cell 안으로 넣을때 globin genes을 쥐의 erythroleukemia cells안으로 넣을 때 이용되곤 했다. 이 방법의 잇점은 효율이 높다는 것이다. 그러나 시간낭비이고 cotransformation이 일반적으로 가능하지 않다. 그리고 관심있는 gene은 반드시 항상 selective marker를 요구하는 plasmid로 옮긴다. 이 방법은 다른 방법으로 처리할 수 있는 많은 cell에 효과적이지는 못하지만 DNA의 endocytosis가 효과적으로 일어나지 못하는 cell lines에 유용한 방법이다. protoplast fusion은 종종 multiple copies의 plasmid DNA를 정확하게 host chromosome 안으로 받아들인다.

4) Liposomes

인공적으로 소낭 즉 liposome을 만들어 그 속에 DNA 또는 RNA를 넣어 cell membrane과 liposome 사이의 fusion으로 transfection한다. 비록 DNA는

cationic lipid를 합성하여 fusion에 의해 cell로 들어 간다지만 이 방법은 간단하고 효과적이다. 그리고 상당히 새로운 방법이다.

5) Direct microinjection into nuclei

이 방법은 low-pH endosomes과 같은 cell 구성 물질에 DNA가 노출되지 않는 잇점이 있다. 그러나 생화학적 분석을 하기에 충분히 큰 DNA를 전달하는데는 이용할 수 없다.

다. Transformation system in Aspergillus

곰팡이에서의 유전적 transformation은 Mishra and Tatum (1973)에 의해서 처음 보고되었다. *Neurospora crassa*의 inositol-requiring mutant (inl)를 wild-type에서 추출한 DNA와 같이 calcium ion이 있는 배지에서 배양하였을 때 inositol-independent한 strain을 conidia로 부터 얻을 수 있었다. Hinnen 등 (1978)은 *Saccharomyces cerevisiae*의 *leu2* mutant의 protoplast에 wild-type strain에서 추출한 DNA를 넣어 prototroph을 얻을 수 있다고 보고하였다. 그들은 1 M sobitol을 osmotic stabilizer (Hutchinson and Hartwell, 1967)로 사용하여 glucanase로 곰팡이의 세포벽을 부분적으로 제거시켜 protoplast를 만들었다. 이러한 protoplast를 이용한 transformation은 다른 filamentous fungi들 *N. crassa* (Case et al., 1979; Buxton and Radford, 1984), *A. nidulans* (Ballance et al., 1983; Yelton et al., 1984; John and Peberdy, 1984), *A. niger* (Kelly and Hynes, 1985), *A. oryzae* (Gomi et al., 1987; Hahn and Batt, 1988) and *A. ficuum* (Mullaney et al., 1988)-에서 점차 그 활용의 범위를 넓혀 오고 있다.

Fungal protoplast를 만들때 여러 종류의 효소들을 사용할 수 있는데 그예로 helicase or glucanase (Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978)과 zymolyase (Hsiao and Carbon, 1979) 등이 있다. 현재 *Aspergillus*의 protoplast 제조에 가장 보편적으로 사용하는 효소는 fungus *Trichoderma viride*에서 추출한 Novozyme 234 (Beach and Nurse, 1981)이다. 이 효소는 가수분해성 효소들의 집합체로 주로 β -1,3-glycanases와 chitinase를 포함하고 있다. 또한 protoplast 제조시 한가지 이상의 효소를 섞어 쓰는 경우도 많다. Yelton 등 (1984)은 *A. nidulans*의

protoplast 제조시 novozyme 234와 β -glucuronidase (type H2S; Sigma)를 섞어 썼으며, Binniger 등 (1987)은 *Coprinus cinereus*에 cellulase와 chitinase를 같이 사용하였다.

Protoplast는 다른 cell type에서 만들 수 있다. *Neurospora crassa*에서는 주로 발아하는 다핵의 macroconidia를 단핵의 microconidia나 어린 mycelia보다 더 이용한다 (Buxton and Radford, 1984; Rossier et al., 1985). 반면에 *Aspergillus species*에서는 발아하는 conidia나 mycelia를 protoplast 제조에 사용하고 있다. Protoplast 제조시에는 반드시 osmotic stabilizer를 같이 넣어 주어야 하는데, osmotic stabilizer로 0.8 - 1.2 M의 sobitol을 많이 사용하고 있다. 또는 1.2 M의 magnesium sulfate를 *A. nidulans*에 사용한 예도 보고되고 있다 (Tilburn et al., 1983; Yelton et al., 1984).

Non-protoplast cell도 고농도의 알칼리성 metal ion으로 competency를 갖게 할 수 있다는 몇가지 보고도 있다. 예로서 *S. cerevisiae*의 calcium chloride 처리 (Iimura et al., 1983), lithium acetate 처리 (Ito et al., 1983) 등이 있다. 이와 같은 방법은 *Kluyveromyces fragilis* (Das et al., 1984), *Neurospora crassa* (Dhawale et al., 1984) 그리고 *Coprinus cinereus* (Binniger et al., 1987) 등에서 그 사용이 보고 되고 있다.

Fungus의 transformation에서는 주로 calcium ion과 고농도의 polyethylene glycol (PEG)이 사용되고 있다. 그 외에도 10mM의 Tris-HCl (pH 7.5 또는 8.0) 혹은 10mM의 morpholinepropanesulfonic acid (MOPS, ca. pH 6.0) buffer와 10mM의 calcium chloride가 *S. cerevisiae*나 filamentous fungus인 *Aspergillus*에서 사용되고 있으며, *N. crassa*에서는 50mM의 calcium chloride가 더 자주 쓰여지고 있다. PEG는 세포들을 영키게 만들어 DNA가 좀더 잘 붙게 만든다는 보고가 있으며 (Fincham, 1989), 대개의 경우에 10 배 volume의 40% PEG 용액을 사용하고 있다.

*Aspergillus*에서는 여러 종류의 selectable marker들을 분리하여 사용하고 있다. *S. cerevisiae*에서 분리한 *ura3* (Bach et al., 1979)나 *pyrG* (Palmer and Cove, 1975) gene은 *A. nidulans*의 mutant에서는 서로 상호 보완되지 않아 selectable marker로 사용하지 못한다. 그러나 *N. crassa*에서 분리한 *pyrG* gene은 *A. nidulans*에 상호 보완의 효과가 있어 쓰여지고 있으며 (Ballance et al.,

1983), 이 gene을 이용하여 많은 vector들이 만들어졌다. 그 외에도 nutritional selectable marker로 *A. nidulans*에서 분리해 낸 *trpC* gene (Yelton et al., 1984) 과 *argB* gene 등이 *A. nidulans* (John and Peberdy, 1984; Johnstone et al., 1985), *A. oryzae* (Hahn and Batt, 1988), *A. niger* (Buxton et al., 1985)의 transformation에 쓰여지고 있으며, *A. niger*에서 분리해 낸 *pyrG* gene (van Hartingsveldt et al., 1987)이 그 auxotroph인 strain의 transformation에 사용되고 있으며 *A. oryzae*에도 사용하였다 (Mattern et al., 1987).

일반적으로 *Aspergillus*에서의 transformation frequency는 상당히 낮다 (10 - 50 transformants/ug of input DNA). 따라서 transformation frequency를 높이려는 시도가 꾸준히 진행되어 왔으며(Struhl et al., 1979 for yeast; Ballance and Turner, 1985), Johnstone 등 (1985)은 *A. nidulans*의 *argB* gene 을 plasmid pUC-8 에 집어 넣은 새 vector를 이용하여 frequency를 상당히 높였다고 보고하였다 (500 transformants/ug DNA). 또한 chromosomal DNA에 integration된 plasmid가 자연적으로 빠져나와 transforming된 plasmid를 *E. coli*에서 재수거할 수 있다고 하였다.

대부분의 안정된 *Aspergillus*의 transformant에서는 여러 copy의 plasmid들이 chromosomal DNA에 삽입된 것을 볼 수 있다 (Orr-Weaver et al., 1981; Orr-Weaver and Szostak, 1983; Upshall, 1986). 일부 transformant는 처음에는 아주 천천히 자라 올라 오다가 커다란 sector들을 형성하는 것들이 있다. 이러한 transformant들을 'abortive'라 부르며, transforming된 gene이 chromosomal DNA에 들어가지 않고 일시적으로 발현되었다가 mitotic 성장중에 불활성된다고 생각되어 진다. 이런 'abortive' transformant중 극히 일부의 cell에서 plasmid가 chromosomal DNA에 들어가 정상적인 성장을 하는 것도 있다 (Hicks et al., 1978).

A. nidulans argB gene (Berse et al., 1983) 등의 nutritional selectable marker를 사용할 경우에는 그 gene과 상호 보완이 가능한 auxotroph의 분리가 필수적이다. 이러한 불편을 없애기 위하여 *Aspergillus*에서 작용되는 dominant한 marker의 분리가 연구되어 왔다(Hynes and Pateman, 1979a and b; Hynes, 1979). Acetamidase 만드는 *amdS* gene은 *Aspergillus*를 acetamide를 sole nitrogen 공급원으로 사용할 수 있게 하여 줌으로써 wild type의 *Aspergillus species*들의 transformation에 selectable marker로 쓸 수 있게 하였다 (Tilburn et al., 1983

and Wernars et al., 1985 and 1986 for *A. nidulans*; Kelly and Hynes, 1985 for *A. niger*). 항생물질에 저항성을 주는 유전인자 역시 사용되어 오고 있으며, 그 예로 oligomycin에 대한 *oliC* gene (Ward et al., 1986)과 hygromycinB에 대한 *E. coli hph* gene (Punt et al., 1987; Cullen et al., 1987) 등의 사용이 있다. Oligomycin에 저항성이 있는 *A. nidulans* ATP synthase의 subunit 9 gene을 담고 있는 *oliC* marker는 활성의 oligomycin-resistant ATP synthase complex를 조합할 수 있는 species에 한 하여 사용할 수 있다. HygromycinB는 aminoglycosidic 항생물질로 prokaryotes과 eukaryotes 모두에서 translocation을 막아 단백질 합성을 저해한다 (Gonzalez et al., 1978). *E. coli hph* gene은 HygromycinB(HmB) phosphotransferase를 담은 것으로 phosphorylation에 의하여 항생물질을 파괴시킨다 (Gritz and Davies, 1983). 이 marker는 *S. cerevisiae* (Gritz and Davies, 1983; Kaster et al., 1984)와 *Cephalosporium acremonium* (Queener et al., 1985) 등에 사용한 예가 보고되고 있다. 그러나 곰팡이가 대체적으로 항생물질에 강하고 strain에 따라 저항성의 정도가 달라 그 사용에 많은 제약을 받고 있다.

Protoplast나 competent가 있는 cell에 두 종류의 서로 다른 plasmid을 넣으면, 대부분의 경우 두 종류의 plasmid 모두 cell이 흡수하는 현상을 볼 수 있다. 이와 같은 현상을 cotransformation이라 하며 실지 실험에 매우 유용하게 사용할 수 있다. 즉 cotransformation이란 관심있는 plasmid를 selectable marker plasmid와 같이 transformation 시키므로써 관심있는 gene과 maker gene을 한 plasmid 속에 재조합하여 줄 필요가 없으므로 plasmid의 크기를 크게 하지 않아도 다루기 쉽고 transformation frequency를 높일 수 있으며 또한 plasmid 제작에 드는 시간과 노동을 줄일 수 있다. 이러한 cotransformation의 예로는 bacteria (Cohen et al., 1973; Kretschmer et al., 1975), yeast (Hicks et al., for *S. cerevisiae*; Gaillardin et al., 1985 for *Yarrowia lipolytica*), fungi (Wernars et al., 1987 for *A. nidulans*; Hahn and Batt, 1989 for *A. oryzae*) 그리고 mammalian cells (Wigler et al., 1979) 등에서 볼 수 있다. *E. coli*로 부터 분리해 낸 hygromycinB-resistant gene vector를 *A. nidulans*와 *A. niger*에 *pyrG* 또는 *amdS* gene vector를 selectable marker로 cotransformation 시켰을 때, *A. nidulans*에서는 60%가, *A. niger*에서는 80%의 transformants가 두 plasmid 모두를

가졌다 (Punt et al., 1987).

라. Electroporation for microbial transformation

유전자의 형질전환은 electric field-mediated transformation method (electroporation)이 개발되기 전까지는 미생물에서는 PEG/CaCl₂ method, 동식물의 세포에서는 calcium phosphate/DNA coprecipitation 방법이 주로 이용되었다. 그러나 이 방법들은 일부 미생물과 fibroblast (1990) 등에서는 그 효율이 높지만, 일부 미생물과 세포에서는 그 적용의 범위가 제한되고 있다. 이에 반해 전기적 충격을 이용하는 electroporation은 어떤 유형의 세포를 막론하고 그 응용의 폭을 넓히고 있다. Electric Field-mediated transformation은 cell membrane에 순간적으로 high voltage electric field를 걸어주면 membrane에 pore를 형성하여 고분자 물질인 DNA의 세포막 통과가 용이하게 된다. 이렇게 형성된 pore는 0°C에서 자연적으로 다시 원상태의 membrane 구조를 형성한다. 이 방법은 그 조작이 간단하고 빠르다. Electroporation과 calcium phosphate coprecipitation procedure의 중요한 차이점은 예를 들어 eukaryotic cells의 transfection은 antibiotic media에서 selection한 후 DNA integrated가 시작된다. calcium phosphate의 경우 transfected DNA의 genome안에 받아들일 수 있는 DNA의 양은 3 million base pairs 이다. 결과적으로 transfected DNA는 많은 copy로 이루어지게 되는 것이다 (Knutson and Yee, 1987; Calvin and Hanawalt, 1988; Miller et al., 1988; Potter, 1988; Delorme, 1989; Simon and McEntee, 1989; Diver, 1990; Goldman et al., 1990; Starr and Huse, 1990).

1) Electroporation에 영향을 미치는 요인들

Electroporation을 이용한 형질전환에 영향을 미치는 요인은 다음과 같다 (DoWer et al., 1988), (Luchansky et al., 1988), (potter, 1988), (Delorme, 1989), (Simon and McEntee, 1989), (Goldman et al., 1990).

가) Voltage and Capacitance

Electroporation에 있어서 가장 중요한것은 voltage의 설정이다. Electroporation에 의한 transformation 초기에는 적절한 transformants를 얻기 위해 높은 field strength를 걸어 주었다. 그러나 field strength는 cell membrane에 pore를 만들기에 충분히 높은 voltage를 걸어 주어야 하는 반면, 세포가 죽지 않을 정도로 낮아야 한다. Mammalian cells은 25 uF capacitance, 1.5 kV 정도가 효과적이다. 세포가 특히 electric field에 민감하다면 더 낮은 데서 처리하여야 한다. 일반적으로 cell의 크기, 즉 지름이 클수록 낮은 전압과 capacitance를 걸어 줌으로서 세포의 치사율을 낮출 수 있다 (Potter, 1988). 그러나 실제 실험 시에는 세포의 종류에 따라 세포의 치사율과 형질전환 효율을 고려하여 적정 전압과 capacitance를 찾아야 한다. 일반적으로 40 - 80%의 생존율을 고려한다.

Pulse 지수는 peak voltage와 resistance capacitance time(τ) 상수에 의해 결정되는데 이것은 세포 종류에 대한 최적의 electroporation 조건을 결정하는데 중요한 한 몫을 한다. 또한 cuvette size를 결정하는 조건이기도 하다. 일반적으로 25.0 kV/cm일 경우, 0.1cm cuvette을 사용하고, 사용 전압이 떨어질수록 큰 size의 cuvette를 사용한다. 동물 세포와 식물의 원형질체에 대한 electroporation은 낮은 field strength (500 - 1125 V/cm)와 msec 정도의 τ 가 보다 더 효과적이다.

나) pH

세포의 치사에 크게 작용하는 요인은 pH의 변화로 전극 부위에서의 전기분해에 기인한다. 이러한 문제점은 phosphate-buffered saline에 extra buffer, HEPES 또는 Tris-HCl (pH 7.5)를 넣어 ionic strength를 제공하여 극복할 수 있다 (Potter, 1988).

다) Cell type

Electroporation에 의한 현질전환의 효율은 cell type에 의존한다 (Goldman et al., 1990, Simon and McEntee, 1989). Fibroblasts와 같은 cells은 calcium phosphat coprecipitate에 의한 전통적인 방법으로 쉽게 형질전환된다. Electroporation에서는 $1 \text{ cell}/10^3 - 10^4$ viable cells의 빈도로 permanent transfectants를 얻을 수 있다. 이것은 calcium phosphat coprecipitate에 의해 얻을 수 있는 효율과 비슷하다. 일반적인 방법으로 다루기 힘든 cell에 대해서도 electroporation은 대부분의 cell types에서 $1 \text{ cell}/10^{-4} - 10^{-5}$ cells

의 빈도로 안정된 transfectants를 얻을 수 있다.

라) Cell growth phase

세포의 성장 단계는 크게 4 단계로 구분되는데, 이는 lag, exponential (log), stationary, death phase로서 이러한 cell growth phase는 electroporation 효율에 영향을 미친다 (Simon and McEntee, 1989; Delorme, 1989; Dower et al., 1988; Luchansky et al., 1988). Yeast cell은 stationlay phase의 resting cells보다는 log phase에 있는 세포가 더 형질전환 시키기 용이하다. OD Value (OD₆₀₀) 0.35 보다 6에서는 transformation 효율이 4.5배 낮아졌고, 11에서는 22.5배나 낮아졌다 (Delorme, 1989).

마) Incubation time

Dower 등(1988)은 electroporation하기 전 electroporation buffer에서 배양시키는 시간을 15, 30, 45분 등으로 나누어 배양시간이 형질전환의 효율에 미치는 영향을 관찰하였다. 15분 이하의 배양시 transformants를 얻을 수 없었고, 30분 배양시에는 15분 배양의 경우보다 50%나 낮은 효율을 얻음으로서 electroporation 전 배양incubation 시간의 영향력을 알 수 있다.

바) Cell and plasmid DNA concentration

세포의 농도에 따라 제한적으로 DNA량을 조절함으로써 transformation의 효율을 올릴 수 있다. DNA의 량을 고정하고 cell의 농도를 증가시키면 transformants의 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있다 (Potter, 1988, Simon and McEntee, 1989, Delorme, 1989, Dower et al., 1988). 그러나 cell 농도가 지나치게 높으면 cell을 plate에 깔기 전 희석시키는 것이 바람직하다 (Potter, 1988). 이는 transformation되지 않은 cell과 transformants사이에서 cross feeding이 일어나는것을 막기 위해서 이다. 반면 cell의 농도를 고정하고 plasmid DNA량을 증가하면 어느정도까지는 transformation 효율이 증가하다가 더 이상 증가하지 않는데 이것은 cell이 외부DNA를 받아들인데 한계가 있기 때문이다.

cell 수와 DNA 량의 증가는 낮은 transfection 효율과 또 low promoter/enhancer효율의 문제를 모면할 수 있는 일시적인 gene expression 연구를 위해 electroporation에서 이용된다.

이외에 여러가지 요인들이 electroporation에 의한 transformation에 영향을 미친다. plasmid의 구조, carrier DNA, DNA의 질 등이 그것이다. 또 electroporation하기 전에 cell mixture를 0℃에서 일정 시간 방치해 두는 것

(incubation), temperature 등도 transformation 효율에 영향을 미친다.

2) Electroporation의 활용

다음 각 미생물에서의 electroporation efficiency를 높이기 위한 최적 조건을 살펴보자.

가) YEAST

Yeast cells의 cell wall 구성은 대부분 mannoproteins와 glucans이므로 transformation이 힘들다(Delorme, 1989). 그래서 cell wall에 glucanase, lyticase, enzymolase or 화학적인 요소로 polyethylene glycol(PEG), LiCl, thiol compounds 등을 처리하여 고분자 물질 또는 외부 DNA를 cell안으로 들어 오기 용이하게 하는 방법을 써왔다(Delorme, 1989, Calvin and Hanawalt, 1988). 그러나 이 방법은 시간을 소비하게 되고 transformants를 selection하기 위해 plate에 깔기 전에 반드시 PEG등을 제거 해야만 한다(Simon and McEntee, 1989). PEG는 transformants recovery에 영향을 미치기 때문이다. 최근 이런 단점을 극복한 빠르고 효율적인 방법인 electroporation이 *Saccharomyces cerevisiae*에 이용되었다. 그 내용을 좀더 자세히 알아보면 다음과 같다.

최적 조건은, DNA microgram 당 transformants의 수가 800 V에서 보다는 900 V에서 증가되는 것을 볼 수 있었고 1000 V에서는 현격히 감소되는 것을 볼 수 있다. 그러나 높은 voltage에서는 cell death가 증가한다. 즉, 900 V / 0.4 cm에서는 52 % , 1000 V / 0.4 cm에서는 84 %로 cell death가 증가한다. transformation의 효율은 보다 많은 transformant를 얻는 것이므로 yeast cell electroporation의 최적 voltage는 900 V이다. 이 voltage에서 DNA microgram 당 가장많은 colonies를 얻을 수 있다.

우선 yeast cell을 YPD medium에서 하룻밤 배양하고 다시 새 배지 100 ml에 cell 1ml의 비율로 접종하고 OD₆₀₀ 0.35-0.75가 되면 centrifuge하여 YDP배지 1 ml에 OD₆₀₀ 10-20이 되도록 현탁한다. 이 cell 현탁액 20ul에 cesium chloride로 정제한 plasmid DNA를 0.1 ug 첨가하여 900V, 25uF의 조건으로 Gene Pulser에서 electroporation한다. electroporation된 cell 100-200 ul를 SDCAA

plates(0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose, 0.5 % acid-hydrolyzed Casamino acide, 2 % Bacto-agar)에서 2일간 30℃를 유지 하고 배양한다.

이상으로 얻은 transformants의 plasmid DNA는 제한효소와 Southern hybridization방법을 이용하여 분석할 수 있다.

나) Filamentous Fungi

대부분 곰팡이의 transformation은 고농도의 PEG를 첨가한 방법이였다 (Goldman et al., 1990). 최근 electroporation이 여러 cell에 다양하게 이용되고 있어 곰팡이에도 적용해보았지만 아직 초기 단계에 불과하다.

*T. harzianum*로 부터 얻은 접합관 이나 균사에 electroporation방법으로 transformants을 얻을 수 없었다. 그래서 osmotically sensitive cells(OSC)을 실험해 보았다.

최적 조건은 접합관에 cell wall-degration enzyme을 처리하여 OSC의 농도를 2.0×10^8 /ml, 전기저항은 200Ω으로 고정하고 voltage와 capacitance를 다르게 조정하여 효율을 알아본 결과 2.8 kV/cm에서 높은 transformants 수율을 얻음을 보았다. 또 voltage를 2.0 kV/cm, capacitance는 25 uF로 하고 저항을 바꿔주면 100Ω에서 cell survival이 20 %로 현격히떨어지고 200-800Ω까지 계속 조금씩 떨어져 800Ω에서는 10 %정도 밖에 되지않음을 알 수 있다. 결론적으로 *T. harzianum* OSC의 electroporation의 최적의 조건은 field strength는 2.8 kV/cm, capacitance는 25 uF, 저항은 800Ω이다.

OSC의 농도를 1.0×10^9 /ml로 증가 시키면 transformation 효율은 2.3배 증가된다. cell농도가 2.5×10^9 /ml이면 또 2.0×10^8 /ml 이하이면 transformation 효율은 현격히 감소한다. plasmid 의 농도 또한 transformation에 영향을 미치는데 이것은 plasmid DNA의 농도가 증가함에 따라 transformation 효율도 또한 증가한다.

Transformation of filamentous fungi방법은 PEG방법을 기초한것이다. PEG의 농도가 다양하게 변함에따라 transformation 효율도 다양하다. Electropoation

medium에 1.0 % PEG를 사용함으로써 435 transformants/ μ g of DNA의 효율을 얻었는데 이효율은 PEG없는 상태에서의 electroporation보다 약 4배 높은 효율이다. 단지 PEG만 사용한 경우에는 어떠한 transformants도 얻을 수 없다. 최근에는 *Rhodococcus fascians* 와 *Bacillus thuringiensis*에도 PEG 와 electroporation 를 조화롭게 사용하여 효율을 얻고 있다.

Electroporation은 빠르고 쉽게 수행할 수 있고 최소의 sample 준비를 요한다. electroporation은 *T. harzianum*, *A. nidulans*, *S. pombe*, *D. discoideum*을 포함한 많은 곰팡이 종에 DNA를 전달하는 유용한 방법이다.

다) *E. coli*

*E. coli*는 6.0 kV/cm의 field strength에서 성공적으로 10^5 - 10^6 transformants/ μ g을 얻었다. electroporation은 *E. coli* with M13 DNA의 transforming에 가장 효과적인 방법으로 알려졌다.

최적 조건은 20 msec의 pulses, 7 kV/cm에서 최고의 transformation 효율을 얻을 수 있었고 이보다 짧은 pulses, 5 msec일때는 11 kV/cm의 field strength에서 최고의 효율을 얻을 수 있었다. 이 두 경우 모두 같은 수준의 transformation 효율을 얻을 수 있었다. field strength가 증가될수록 cell survival은 계속 감소한다는 것을 yeast나 fungi에서 보았듯이 *E. coli*에서도 마찬가지이다. cell survival이 30-40 %일때 transformation 효율이 최고라고 말할 수 있다.

Cell과 DNA mixture의 incubation time은 transformation을 결정하는 요소이다. electroporation 하기 전(pre)에 incubation하는 경우는 transformation 효율에 그다지 큰 영향을 미치지 않지만 후(post)에 incubation하는것은 transformation 효율에 지대한 영향을 미친다. post-pulse incubation이 1분 이내 인 경우에는 효율이 3배 감소하고 30분 이내에서는 20배 이상 감소 하는것을 보았다. Electroporation buffer는 차가운 0.1 M HEPES, pH 7.0으로 한다 (Starr and Huse, 1990).

라) Bacteria

Bacteria와 같이 작은 cell을 받아들이는데는 Electroporation이 제한적으로 성공하였다. 왜냐하면 이런 작은 size bacteria는 이론적으로 mammalian cells 이나 larger plant cells보다 외부 물질을 받아 들일 수 있게하기 위해서는 larger electric field(4000-25000 V/cm)를 요구한다(Calvin and Hanawalt,1988, Knutson and Yee,1987).

최적 조건은 Bacteria 의 poration buffer 조건을 ① 10 % glycerol- 0.2 mM K_2HPO_4 (pH 7.5), ② 15 % gleeceol-0.2 mM K_2HPO_4 (pH 7.5) , ③ 0.2 mM K_2HPO_4 (pH 7.5)으로 하여 glycerol 농도의 영향을 3000 - 13000 V/cm field strength 와 0, 15, 30 % glycerol 농도 에서 cells poration을 관찰하였다. 0.2 mM K_2HPO_4 , pUC18은 0.1 ug/ml이고 cell의 농도는 plasmid와 1:2의 비율로 한다. 결과는 최고의 field strength 에서 30% glycerol 농도는 3 의경우에 생존력은 입증되었지만 transformation 은 80 % 감소 하였고 glycerol농도가 더 낮아 15 - 0 %이면 생존력 또는 transformation 들중 하나에 영향이 없다. 다른 buffer농도의 영향력을 glycerol 없이 K_2HPO_4 buffer농도를 0, 0.2, 1 mM로 하여 반복 실험하였다. 생존력에는 영향력이 없지만 transformation 효율은 0mM solution에서 최고의 효율을 나타내고 이러한 buffer system은 cell types 에 따라 다를 것이다.

본 연구에서는 *Aspergillus* species (*A. oryzae* and *A. ficuum*)에서 유전자 재조합균주의 개발을 위한 강한 발현벡터의 선정 및 형질전환 방법의 확립과 UV irradiation에 의한 phytase 고발현 돌연변이주를 선별하고, phytase 유전자를 RT-PCR을 이용하여 분리, 동정하고자 하였다.

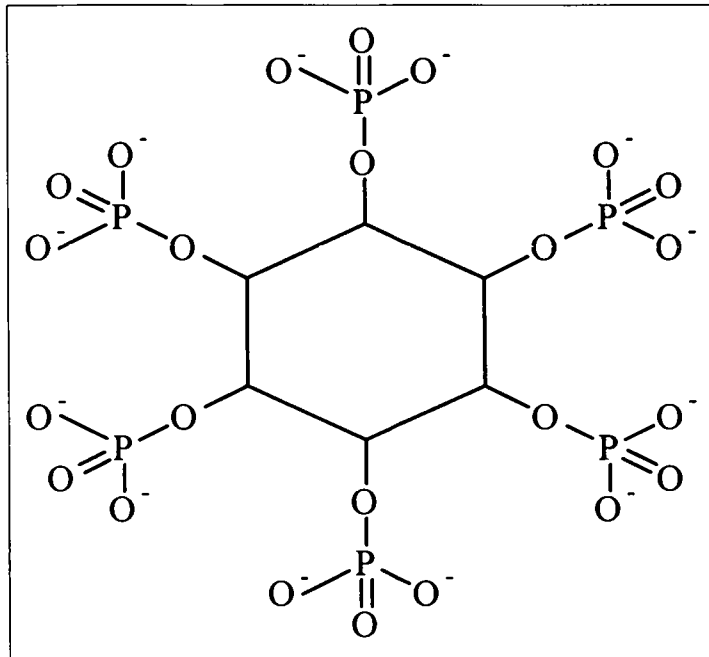


Figure 2-1-1. Structure of Phytic acid

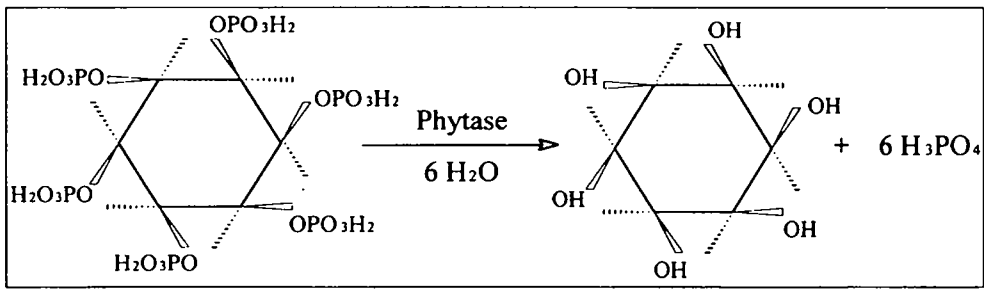


Figure 2-1-2. Hydrolysis of phytate into *myo*-inositol and inorganic phosphate

제 2 절 실험재료 및 방법

1. Microorganisms and Media

본 연구에 사용된 균주는 *Aspergillus oryzae* (YTH-1, *arg B*⁻ mutants)와 *Aspergillus ficuum* Wild type이며, 균주 배양과 harvest를 위해 complex media 인 YPD media (Yeast Extract 10g/L, Peptone 20g/L, D-glucose 20g/L)와 YPS media (Yeast Extract 10g/L, Peptone 20g/L, Sucrose 20g/L)를 사용하였다. 또한 minimal media로는 Czapek-Dox media (Bacto Sacchrose 30g/L, Sodium Nitrate 3g/L, Di-potassium Phosphate 1g/L, Magnesium Sulfate 0.5g/L, Potassium Chloride 0.5g/L, Ferrous Sulfate 0.01g/L)를 사용하였다. Phytase activity assay를 위해 PSM media (Phytase Screening Media, D-glucose 15g/L, calcium phytate 5.0g/L, MgSO₄-7H₂O 0.5g/L, KCl 0.5g/L, FeSO₄-7H₂O 0.5g/L, MnSO₄-4H₂O 0.01g/L, Agar 15g/L, Nitrogen Source: NH₄H₂PO₄ 5.0g/L)를 사용하였다.

2. Transformation

가. preparation of spore stocks

single colony의 *A. oryzae* (YTH-1) 를 YPD-BROS agar media (Glucose 20g/L, Peptone 20g/L, Yeast Extract 10g/L, agar 15g/L)에 깔고서 30℃에서 10일간 배양하고, spore 가 형성되면 0.1% Tritone X-100을 부어서 조심스럽게 긁어낸다. 이 용액들을 cheesecloth에 여과 시킨 후, 8000 x g에서 10분간 원심 분리 한다. pellet을 살균수로 3번 정도 씻으며, 매번 원심분리 한다. 최종 살균수 1ml 에 녹여 4℃에서 보관한다.

나. Preparation of protoplast

400ml Minimal Media (Czapek-dox 14g/400ml)에 *A. oryzae*-1(1ml)와 Arginin(400μl)을 Inoculation 한다. 17-18hrs, 30℃, 180rpm, Shaking하여 키운 다음, Centrifuge(Beckman, JA-20) 4℃, 10min, 9000rpm(250ml centrifuge tube 사용). 상등액을 버리고, 0.6M MgSO₄를 넣어 Vortex한 후 50ml centrifuge tube에 옮긴 후 9000rpm 10분 원심분리 한다. 상등액 버리고 Osmotically stabilized buffer 5ml를 Conical tube에 넣고 Lysing Enzyme 100mg 정도를 녹

인 후 125ml 삼각 Flask에 Filtration 한다. Pellet도 Osmotically stabilized buffer 10ml에 녹인 후 Vortex 하여 lysing enzyme이 들어 있는 125ml 삼각 Flask에 붓고 2hrs, 120rpm, 30°C, Shaking 한다. 갈색 50ml Centrifuge tube에 옮긴 후 ST Buffer(0.6M sobitol, 100mM Tris-Cl, pH 7.0)를 overlay (조심스럽게) 해서 7000rpm, 4°C, 15min 원심분리 한다. Pool (유층-중간의 뿌연 부분)을 pipet으로 수거한 후 ice에 보관한다. ST buffer를 제거한 후 Vortex하고서 ST buffer를 Overlay한 후 7000rpm, 15min, 원심분리 한다. Pool층을 수거하여 Ice에 담긴 갈색 tube에 넣는다. 2X Volume STE buffer를 넣고 9000rpm, 4°C, 10min, 원심분리 한다. 상등액을 버리고 STC buffer 2ml를 넣고 녹인다.

다. Purification of closed circular plasmid ILJ-16 by centrifugation to equilibrium in CsCl-Ethidium bromide gradients.

Plasmid ILJ-16의 DNA 1 ml에 CsCl 1 g을 넣고, 잘 섞는다. 여기에 Et-Br (10 mg/ml) 80 ul 첨가한다. 이 용액의 final density는 1.66g/ml 가 되고, Et-Br의 concentration은 0.74g/ml 가 된다. 적당한 centrifugation tube 로 옮기고, 나머지 부분을 light paraffin oil로 채운다. 45,000 rpm for 36 hours at 20°C 에서 원심분리 한다. 두개의 DNA band 가 보인다. (위 band 는 linear DNA와 nicked circular plasmid DNA 이고, 아래 band 는 closed circular plasmid DNA이다.) Tube 의 cap을 제거한 후, hypodermic needled 을 tube에 꽂아 closed circular pILJ-16을 뽑아 낸다. 여기에 같은 양의 isoamylalcohol 혹은 1-butanol saturated with water 를 넣고, pipetting으로 잘 섞는다. 1500g for 3 min, 실온에서 원심분리 한다. low aqueous phase 를 clean glass tube 로 옮긴다. 이것을 5번 반복 한다. (aqueous sol'n의 분홍색이 사라질때 까지) 그리고, TE buffer (pH 8.0)에서 aqueous phase 를 투석 한다.

라. Electroporation

STC buffer로 녹인 protoplast를 가지고 EasyJect를 이용하여 Electroporation을 준비한다. Cuvette을 10개 준비를 하고 2500V 부터 500 단위로 500V 까지 viability cuvette 5개에 표시한다. 역시 transformant cuvette 5개에도 표시한다. Transformant cuvette 에 각각 4ug 의 DNA (pILJ-16) 를 넣고, 20min 동안 ice에서 incubation 한다. 리모콘을 사용하여 저항과 전기장별로 전기 충격을 가한다. (모든 Sample은 살짝 돌려 mix한 후 실험한다.) 20min 동안 ice에서 incubation 한다. Eppendorf tube에 YGS media(0.5% yeast extract, 2% D-glucose, 1.2M sorbitol)를 800ul를 넣고, 전기 충격을 가한 protoplast를 옮긴다. (희석비율이 1/5) 30°C, 180rpm, 2hrs, Shaking하고 나

서, 새로운 Eppendorf tube에 STC buffer(1.2M sorbitol, 10mM Tris-Cl pH 7.5, 10mM CaCl₂) 900 μ l와 Sample (viability cuvette , transformant cuvette) 100 μ l을 넣는다.(희석 비율이 1/50) Transformant cuvette 5개는 HMS agar media에 viability cuvette 5개는 YPD agar media 에, 그리고 protoplast 의 총수를 알기위해 control 로 전기충격을 가하지 않은 protoplast를 YPD agar media 에 각각 100ul spreading 한다. (희석 비율이 1/500) 10일 동안 30 $^{\circ}$ C incubation 하여 counting 한다.

3. Screening of Phytase High-Expression Strains by UV-mediated Mutagenesis

UV mutation에 대한 Schematic diagram은 Fig. 2-1에 보여주고 있다.

가. UV Mutation

1) Condition of UV irradiation time

*A. oryzae*와 *A. ficum*의 spore에서 고발현 균주를 분리하고자 254nm의 UV light로 20cm 높이에서 5분간격으로 처리하여 가장 효율적으로 UV mutants를 선별할 수 있는 UV irradiation time을 정하였다.

2) UV Irradiation

*A. oryzae*와 *A. ficum*의 spore (10^{7-8} spore/ml)를 살균한 glass plate에 깔고 20cm의 높이에서 UV light (254nm)를 20분간 쬐여주었다. UV 처리한 spore는 4 $^{\circ}$ C에 보관하였으며, 희석하여 효소역가가 가장 높은 암모늄염 (NH₄H₂PO₄)이 포함된 PSM 고체배지에 칸 뒤, phytase 분비로 생겨나는 clear zone의 면적비를 비교하여, Wild type보다 효소 활성이 높은 돌연변이 균주를 선별하였다.

나. Phytase Activity Assay

1) Phytase plate Assay

Phytase plate assay는 효소역가가 가장 높은 암모늄염 (NH₄H₂PO₄)이 포함된 phytase screening medium agar (D-glucose 15g/L, calcium phytate 5.0g/L, MgSO₄ 7dH₂O 0.5g/L, KCl 0.5g/L, FeSO₄ 7dH₂O 0.01g/L, MnSO₄ 4dH₂O 0.01g/L, Agar 15g/L, Nitrogen source: NH₄H₂PO₄ 5.0g/L)를 제조하였다. 10N NaOH로 pH를 5.5로 맞추고 121 $^{\circ}$ C에서 autoclave를 하였다.

UV mutation시킨 *A. oryzae* 돌연변이주와 *A. ficuum* 돌연변이주를 PSM 고체 배지에서 2-3일 배양한 뒤 역가가 큰 것을 선별하여 다시 YPD 고체배지에서 옮겨 배양하였다. 하루동안 배양하여 살균한 이쑤시게로 PSM 고체배지에 single colony를 옮겨 30℃ 에서 1일간 incubation하여 4℃ cold chamber에 12시간 보관한 후 생겨난 clear zone을 분석하였다.

2) Culture media Assay

UV mutation 시킨 *Aspergillus* mutants를 YPD 고체배지에서 3일동안 배양 (30℃, 200rpm)한 뒤, 배양액을 cold room에서 오염되지않게 filtration 한 후, 일정량을 다시 PSM 액체배지에 접종하여 같은 조건으로 2일간 배양하여 cold room에서 다시 filtration하여 mycelia와 culture media를 분리하였다.

Culture media assay는 filtration시켜 걸러진 배양액을 가지고 assay를 하였다. Reaction tube에 crude culture media 10ul와 기질로 2mM sodium phytate 420ul (0.1M Tris-Cl, pH 7.0 100ml + sodium phytate 0.1848g)를 넣고 잘 혼합한다. 37℃ water bath에서 30분동안 반응을 시킨 후, 5% TCA solution 500ul로 효소기질 반응을 정지시키고 10분간 ice에 방치하였다. Control tube는 처음에 효소를 넣지 않고 같은 순서로 반응을 하고 5% TCA sol'n을 넣은 뒤 첨가하여 진행시켰다. 4ml의 Reagent A (10% ascorbic acid, 2.5% ammonium molybdate, 6N H₂SO₄)를 넣고 잘 섞는다. 37℃ water bath에서 30분동안 반응을 시키고 실온에서 약 30분동안 방치한 뒤 OD₈₂₀에서 값을 구하였다.

다. Protein concentration and Phosphate concentration Analysis

1) Protein Micro-Assay

단백질 정량 분석은 Bio-Rad protein micro-assay (Ca# 500-0006, BIO-RAD) 방법에 의해 분석하였다. Standard curve는 Bovine serum albumin (BSA)를 사용하여 작성하였다 (Fig. 2-2). 800ul의 BSA 단백질 (10ug/ul)를 test tube에 넣은 후 200ul의 5X dye reagent를 넣고 잘 혼합한다. 실온에서 5분간 반응시킨 뒤 Microplate-reader (Ca#550, Bio-Rad)를 이용하여 OD₅₉₅에서 흡광도를 측정하고 sample의 protein을 정량하였다.

2) Inorganic Phosphate Assay

인 정량 분석은 Fiske-Subbarow 방법을 사용하였다. Standard curve는 inorganic phosphate (K_2HPO_4)로 작성하였다 (Fig. 2-3). 1ml의 K_2HPO_4 sol'n (200 μ M)을 test tube에 넣고 4ml의 Reagent A (10% ascorbic acid, 2.5% ammonium molybdate, 6N H_2SO_4)와 잘 혼합한 후, 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤, 실온에서 다시 30분간 방치시켰다. OD₆₂₀에서 흡광도를 측정하고 sample의 phosphate를 정량하였다.

4. Isolation and Identification of Phytase gene

Phytase 유전자의 분리 및 동정에 관한 flow chart는 Fig. 2-4에 보여주고 있다.

가. Isolation of total RNA

Aspergillus species를 2일간 shaking incubator (Vision Co. Korea)에서 30°C, 180rpm으로 YPD media에서 배양한 후, 살균된 filter paper (Whatman #42)로 filtration하여 얻은 mycelia 10g을 PSM media (containing $NH_4H_2PO_4$)로 옮기고, 10-16시간 같은 조건으로 다시 배양하였다. 배양액을 filtration하여 걸러진 20g의 mycelia를 액체질소와 냉동된 막자사발로 grinding하였다. Grind된 mycelia를 GTC buffer 50ml (guanidine isothiocyanate 24g, 3M NaOAc (pH 6.0) 417 μ l, 0.5M EDTA (pH 8.0) 500 μ l, up to 0.1% DEPC-water 50ml, add β -Mercaptoethanol right before use 500 μ l)를 넣고 잘 섞은 다음, 6,000 Xg, 10min, 4°C (BECKMAN Co. USA)로 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 miracloth (CalBiochem, U.S.A)로 걸러낸 뒤, 12ml의 Ultracentrifuge tube에 5.7M CsCl sol'n을 4.5ml 넣고 그 위에 조심스럽게 상등액을 떨어뜨려 tube를 채운다. 기포가 생기지 않게 잘 sealing한 후 55,000rpm, 10°C에서 over-night (Kotron Co. Japan)으로 원심 분리하였다. 주사기로 상등액을 제거한 후 tube 밑에 남은 RNA pellet을 0.1% DEPC-water 500 μ l에 녹인 후, 1/10 vol.의 3M NaOAc (pH 6.0)와 2 vol.의 100% ethanol을 넣어주고 -20°C에서 overnight시켰다. 15,000 Xg, 15min, 4°C (Vision Co. Korea)에서 원심 분리하고 phenol과

chloroform (1:1)로 처리한 뒤 다시 chloroform으로 처리하여 100% ethanol로 침전을 시켜 정제하였다. 75% ethanol로 pellet을 wash하고 air dry 시킨 뒤 0.1% DEPC-water 300ul에 녹였다. 추출된 total RNA 일부를 260/280nm에서 spectrophotometer (DU600, BECKMAN Co. USA)를 이용하여 정량하고 -70℃에 분주하여 보관하였다.

나. Screening of total RNA

1% Agarose (0.3g)을 0.1% DEPC-water 26.2ml에 녹인 후, 10X MOPS buffer 3ml를 넣어준다. 50℃까지 cooling시킨 뒤 fume hood에서 37% form- aldehyde 0.54ml를 넣고 잘 흔들어준 후 DNA-RNA free된 mold kit에 붓는다. Total RNA를 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 concentration을 조정 한 후, 각 sample당 10ul의 loading buffer (10X MOPS buffer 0.8ml, 80% glycerol 0.4ml, 0.25% bromophenol blue 0.4ml 37% formaldehyde 1.4ml, foramide 4.0ml, 1mg/ml Et-Br 0.04ml)를 첨가하였다. 70℃에서 2분 동안 heating시켜 2차구조를 풀어준 뒤, 1X MOPS buffer를 running buffer로 사용하여 4℃, 97V에서 전기영동 하였다.

다. Isolation of mRNA

(PolyAtract[®] mRNA Isolation systems, Promega co.)

1mg의 total RNA를 500ul의 RNase-free water에 녹인 후, 65℃에서 10분간 heating하였다. 20X SSC buffer(NaCl 175.4g/L, Sodium citrate 88.2g/L)로 0.5X SSC 1.2ml, 0.1X SSC 1.4ml를 준비한다. 20X SSC buffer 13ul와 Oligo(dT) 3ul를 넣어준다. 조심스럽게 섞어준 뒤 room temperature (R.T)에서 10분간 incubation시킨다. SA-PMPs를 기포가 생기지 않게 섞어주고 magnetic stand를 이용하여 상층액을 제거한다. 0.5X SSC로 SA-PMPs를 3회 wash하고 0.1ml의 0.5X SSC에 녹인다. Total RNA가 녹아있는 RNase-free water를 wash한 SA-PMPs tube에 넣고 10분간 R.T에서 incubation한 뒤 상층액만 제거하였다. 다시 0.1X SSC로 mRNA가 붙어있는 SA-PMPs를 4회 wash하였다. RNase-free water 0.1ml를 넣고 mRNA를 녹인 후, 상층액만 취하고, 다시 0.15ml의 RNase-free water를 넣어서 상층액만 취하여 -70℃에 보관하였다.

라. RT-PCR

Total 20ul의 반응액에 1ug의 *Aspergillus* species의 mRNA (or total RNA) 와 0.3ug의 primer (R1 primer, 5'-gTAATTCAGCTAAgCAAAACA-3'), 0.02ug의 random hexamer를 넣고 0.1% DEPC-water로 총 volume을 8ul로 채워준다. 준비된 master mix (5X RT buffer 400ul/ml, 0.1M DTT 200ul/ml, nuclease free B.S.A 20ul/ml, 4dNTP 200ul/ml, dH₂O 180ul/ml)를 10ul 넣어주고 70°C에서 3분간 heating한 후, ice에서 3분간 cooling시켰다. 37°C water bath에 1-2분간 방치한 후 Reverse transcriptase (NEB Co., 200U/ul)를 2ul 넣고 1/5로 희석된 RNasin (30U/ul)을 1ul 넣어주었다. 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 95°C에서 5분간 heating하여 reverse transcriptase의 활성을 제거하여 first strand cDNA를 합성하였다.

마. Secondary Polymerase Chain Reaction

Total 50ul의 반응액에 각각 1ug의 F1 primer (5'-gAATTCAGCTTCTCATAgg CATCA-3')와 R1 primer (5'-gTAATTCAGCTAAgCAAAACA-3'), 0.125mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 5% DMSO, proof reading 기능을 가진 2.5 Unit의 Taq. polymerase (Cat.# RR001A, TAKARA Ex Taq) 그리고 0.2ug의 합성된 cDNA를 첨가하였다. Automated PCR machine은 Robo-cycler™40 (Stratagene co. USA)에 의해 수행되었다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시키는 hot start method를 사용하였다. 반응은 30회에 걸쳐 95°C에서 1분 30초 동안 denaturation을, 54°C에서 2분30초 동안 annealing을 그리고, 72°C에서 3분간 extension하여 single cDNA를 증폭시켰다. 증폭된 cDNA는 phenol과 chloro form (1:1)으로 처리하고 100% ethanol로 침전시켜 정제하였다.

바. DNA Extraction from Agarose Gel

Agarose gel에 있는 목적의 DNA band를 최소의 크기로 얇게 잘라내어 JETsorb™ (Genomed, Cat.#110300) kit를 이용하여 DNA를 추출하였다.

사. Ligation into pT7 Blue-T vector

Thermostable polymerase (TAKARA Ex Taq., TAKARA Cat.# RR001A)에 의한 PCR products는 3'-end에 single deoxyadenosine이 합성되기 때문에 3'-end에 single thymidine이 있는 pT7 Blue-T vector (Novagen, Cat.# 69820-1)에 쉽게 ligation시킬 수 있다. 0.5ml microcentrifuge tube에 10X reaction buffer 1ul, pT7 Blue-T vector (50ng) 1ul, PCR product 5ul, T₄ DNA ligase (1weiss U/ul) 1ul를 넣고 dH₂O로 총 10ul를 맞춰준 뒤 15°C water bath에서 overnight 반응시켰다.

아. Transformation of the pT7 Blue-T vector into *E. coli* HB101

Ligation 시킨 vector를 200ul의 competent cell인 *E. coli* HB101에 넣고 ice에 10분간 방치하였다. 42°C에서 50초간 열 충격을 가한 뒤, ice에 2분간 방치하였다. SOC 배지를 500ul를 넣고 37°C에서 1시간, 180rpm으로 shaking incubation시켰다. 100ul를 LB/amp/IPTG/X-gal agar media에 spreading하여 18 시간동안 37°C에서 배양한 뒤 Blue-White colony를 screen하였다.

자. Plasmid DNA Preparation (Alkaline lysis method)

5ml LB/amp (25mg/ml) broth에서 37°C, overnigh 배양시킨 *E. coli*를 eppendorf tube에 옮겨 원심분리 (12,000 Xg, 30sec)하여 cell pellet을 collection하여 0.5ml STE buffer (0.1M NaCl, 10mM Tris-Cl, pH8.0, 0.1mM EDTA)에 cell pellet을 현탁시키고 원심분리 (12,000 Xg, 30sec)하여 상등액을 제거하고 pellet을 ice-cold한 100ul의 Sol'n I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, pH8.0, 0.1mM EDTA)을 첨가하여 현탁시킨 후, 여기에 ice-cold한 200ul의 Sol'n II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 첨가하여 조심스럽게 tube를 inverting하며 섞어주었다. ice에서 10분간 반응시키고 ice-cold한 Sol'n III (3M Potassium and 5M Acetate) 150ul를 첨가하여 조심스럽게 섞어준 뒤 ice에서 5분간 방치한 후, 4°C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 fresh tube에 옮긴다. RNase (25mg/ml) 5ul를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하여 RNA를 제거하였다. 반응이 끝나면 같은 양의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가하여

vortex하고 4℃, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 2배의 ice-cold한 100% ethanol을 첨가하여 -70℃에서 침전시킨 뒤 4℃, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 ice-cold한 70% ethanol로 2번 wash한 후 pellet을 air dry시켰다. dry시킨 pellet을 TE buffer (1mM EDTA, 10mM Tris-Cl, pH8.0)에 녹여 -20℃에 보관하였다.

차. DNA Sequencing

DNA sequencing은 Sanger dideoxy-mediated chain-termination방법으로 [α - ^{32}P] dATP를 이용하여 Sequenase™ T7 DNA polymerase (United States Biochemical co., ver 2.0) kit로 6-8%의 acrylamide gel에서 분석하였다.

카. Analysis of DNA Sequence

DNA sequencing으로 확인된 sequence를 가지고 Blast 및 DNASIS를 이용하여 similarity와 open reading frame을 조사하였다.

Aspergillus oryzae YTH-1 spore [$\sim 10^{7-8}$ spore/ml]

↓

in sterilized glass plate

↓

UV treatment (254 nm, 20 cm height, 5min)

↓

dilution and Spread on PSM

↓

screening

Fig. 2-2-1. Schematic diagram of screening of phytase high-expression mutant strains using UV irradiation

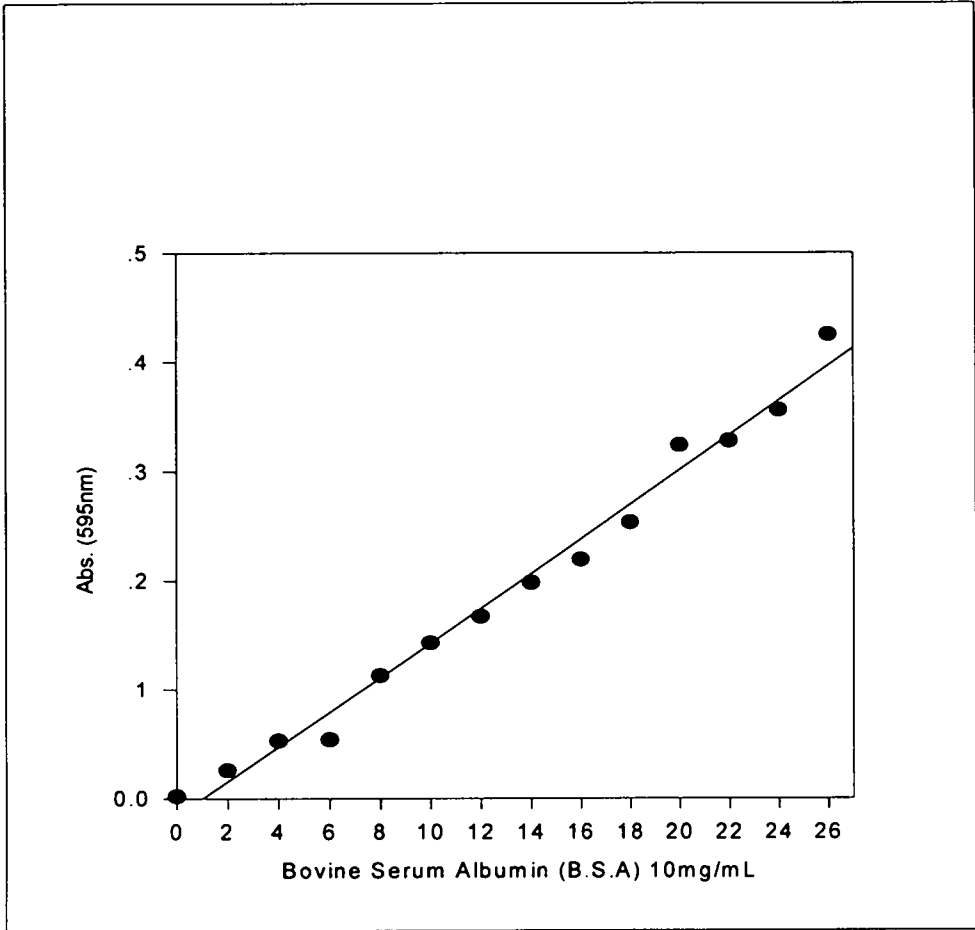


Figure 2-2-2. Standard curve of Protein micro-assay

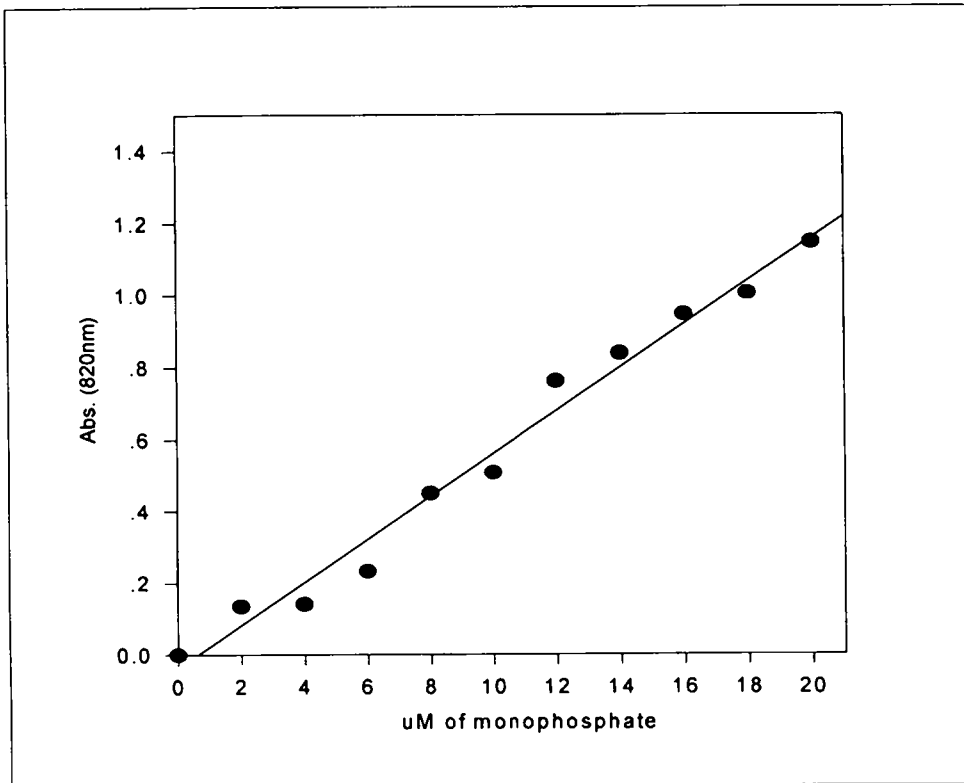


Figure 2-2-3. Standard curve of Inorganic phosphate assay

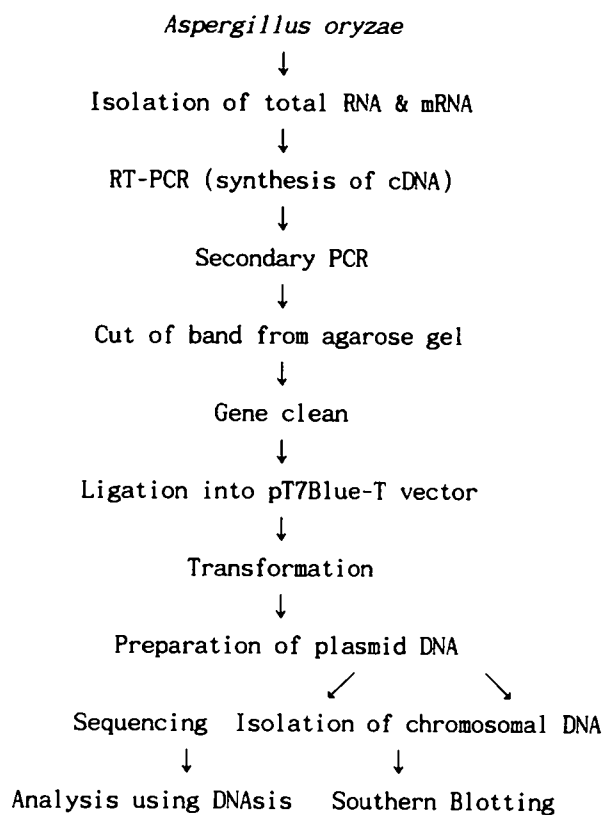


Fig. 2-2-4. Flow chart of the isolation and identification of phytase gene in *Aspergillus oryzae*.

제 3 절 결과 및 토의

1. 발현벡타의 선정 및 Electroporation을 이용한 형질전환 최적화

가. 발현벡타의 선정

발현벡타의 선정에서는 *gpd* promoter와 *trpC* promoter를 가지는 B-galactosidase fusion (*E. coli lacZ* gene) 벡타를 *A. oryzae*에 형질전환시키고, 발현되는 효소의 양을 분석함으로써 적정 promoter의 선별을 수행한 결과, Table 3-1에서와 같이 *gpd* promoter가 *trpC* promoter보다 *A. oryzae*에서 70배 이상의 발현 능력을 보여 주었다. 이와 같이 강한 promoter activity를 가지는 벡타들을 수집하였다 (Table 2-3-2).

나. Electroporation을 이용한 형질전환 최적화

1) 700Ω 에서의 형질전환 효율과 protoplast의 생존율

Electrotransformation에 있어서 가장 중요한것은 Voltage의 설정이다. 처음에는 적절한 transformants를 얻기 위해 높은 전기장을 걸어주어왔다. 이는 cell membrane 의 pore를 만들기에 충분한 voltage를 얻기위함이었다. 그러나, protoplast의 치사율을 생각하지 않으면 안되는 문제점이 남아있었다. 일반적으로 protoplast의 농도, 형태 및 크기에 따라 40-75%의 생존율 고려했다. Protoplast의 농도를 0.2×10^5 로, 전기 저항을 700Ω으로 고정하고 0.5uF에서 Voltage를 다르게 조정하여 효율을 알아본 결과, 전기장이 1.3KV/cm에서 6.3KV/cm까지 증가 할수록 형질전환 효율은 0.0684 에서 0.1295로 점점 더 증가 하며, Viability of Protoplast는 전기장이 1.3KV/cm일 때 71%이고, 6.3KV/cm에서는 50%로 전기장이 증가할수록 약간씩 낮아졌다 (Fig. 2-3-1). Electrotransformation efficiency는 transformants/ug of input DNA/number of survival cell로 정했다.

2) 1540Ω에서의 형질전환 효율과 protoplast의 생존율

Protoplast의 농도를 0.2×10^5 로 전기저항을 1540Ω으로 고정하고 0.5uF에서 전기장이 1.3KV/cm에서 3.8KV/cm까지 증가 할수록 형질전환 효율은 0.0744 부터 0.1136로 거의 평형을 유지하다가, 5KV/cm와 6.3KV/cm사이에서는 0.136에서 0.1435로 아주 급격히 높아졌다. 즉, 최적 형질전환 효율의 전기장 조건은 6.3KV/cm에서였다. Viability of Protoplast는 전기장이 1.3KV/cm에서 5.0KV/cm 까지는 74%에서 56%로 완만히 떨어지다가 6.3KV/cm로 증가했을때 49%로 이 실험에서 가장 낮게 떨어졌다 (Fig. 2-3-2).

3) 2310Ω에서의 형질전환 효율과 protoplast의 생존율

일반적으로 DNA양을 고정하고 protoplast의 농도를 증가시키면 transformants의 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Protoplast의 농도를 0.4×10^5 로 전기저항을 2310Ω으로 고정하고 0.5uF에서 voltage를 500-2500V까지, 조정하여 형질전환 효율을 알아본 결과 전기장이 1.3KV/cm에서 6.3KV/cm까지 증가 할수록, 형질전환 효율은 0.0201에서 0.072로 기울기가 완만히 증가하는 경향으로 이 실험 조건에서 가장 효율이 떨어졌다. 이는 전기저항이 가장 높은 2310Ω에서 2500V가 어느정도 viability of protoplast에 영향을 미치고 있음을 보여주고 있다. 즉, 전류흐름이 짧을수록 형질전환 효율은 그다지 높지 않았다. Protoplast의 성장율을 보면, 1.3KV/cm인 76%에서 6.3KV/cm인 58%까지 거의 완만곡선을 그리며 생존율이 가장 높았다 (Fig. 2-3-3).

대부분 곰팡이의 transformation은 고농도의 PEG 등을 이용한 고전적 방법을 쓰고 있다 (Goldman et al., 1990). 그러나 이 방법은 시간을 소비하게 되고 transformants를 selection하기 위해 plate에 깔기 전에 반드시 PEG등을 제거 해야만 하는데, (Simon and McEntee, 1989)이것은 PEG가 transformants의 recovery에 영향을 미치기 때문이다. 최근 electroporation이 여러 cell에 다양하게 이용되고 있어 곰팡이에도 적용해 보고 있지만 아직 초기 단계에 불과하다. 본 연구자는 Electroporation의 최적 조건에 미치는 여러 조건들 중에서도 electrical parameter 만을 조정하여, 형질 전환 효율을 높이고자 하였다. *A. oryzae* 접합관에 cell wall-degradation enzyme (lysing enzyme or Novozyme 234)을 처리하여 osmotically sensitive cells 혹은 protoplast을 얻었다. OSC의 농도를 0.2×10^5 protoplast cell 에, capacitance를 0.5uF로 고정하고, 변환 상수인 ohm 과 voltage value를 다르게 조정하여 효율을 알아본 결과, 6.3 kV/cm, 1540 ohm 에서 가장 높은 transformant 수율(14.35%)을 얻었다. *Aspergillus oryzae*의, 최적 형질전환 조건은 Table 2-3-3에서 보여주고 있다.

2. Screening of Phytase High-Expression Strains by UV-mediated Mutagenesis

가. Condition of UV irradiation time

*A. oryzae*와 *A. ficuum*의 spore를 254nm의 UV light로 20cm의 높이에서 5분 간격으로 처리한 결과, *A. oryzae*와 *A. ficuum* spore의 population이 처음 5분 간 처리했을 때 약 70%의 감소율을 나타내었다. 15분 처리이후 부터는 93- 96%

의 감소율을 나타냈으며, 30분까지의 처리에서 더 이상 감소하지 않았다. 따라서 가장 효율적인 UV 돌연변이주를 선별할 수 있는 UV irradiation time을 96%의 감소율을 보이는 20분으로 정하였다 (Fig. 3-4).

나. Phytase Activity Assay

1) Phytase plate Assay

*A. oryzae*와 *A. ficuum*에서 고발현 균주를 분리하고자 254nm의 UV로 처리하여 얻은 UV mutants와 Wild type의 효소 역가를 phytase plate assay를 통하여 비교 분석하였다 (Fig. 2-3-5). UV mutant는 254nm에서 UV로 처리한 뒤 효소역가가 가장 높은 질소원인 암모늄염 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)이 포함된 PSM 고체배지에서 phytase 분비로 생겨나는 Clear zone의 면적비가 Wild type에 비해 역가가 우수한 것을 선별한 결과, *A. oryzae*에서는 4개 (YUV-47, -169, -341, -511), *A. ficuum*에서는 6개 (FUV-17, -36, -69, -193, -317, -419)의 돌연변이주를 선별하였다. Phytase plate assay 결과 선별된 *A. oryzae*에서는 약 120-135%의 wild type보다 높은 효소역가를 보였으며 성장이 빨랐다. *A. ficuum*에서는 약 140-170%의 효과를 나타내었다 (Table 2-3-4).

2) Culture media Assay

Phytase plate assay에서 선별된 돌연변이주로 enzyme activity를 비교 분석한 결과, *A. ficuum*에서는 wild type보다 140%의 높은 효소활성을 보이는 mutant (FUV-69)를 포함하여 110-130%의 효소활성을 보이는 mutants (FUV-193, -317, -419)를 선별하였다. *A. oryzae*에서는 wild type보다 110- 115%의 높은 효소활성을 보이는 mutants (YUV-47, -341)를 선별하였다. 그러나 *A. ficuum*의 mutants에 비해 높은 활성을 보이는 균주는 없었다 (Fig. 2-3-6).

다. Secreted Proteins in culture media

Phytase plate assay에서 선별된 돌연변이주의 culture media를 protein micro-assay로 분석한 결과, *A. oryzae*의 mutants (YUV-47, -169, -341, 511)는 wild type보다 120-150%의 많은 secreted protein양을 나타내었다. *A.*

*ficuum*의 mutants (FUV-36, -69, -193, -317)는 wild type에 비해 110-125%의 많은 protein 양을 나타내었으나, *A. oryzae*의 mutants보다는 낮은 양을 보였다 (Fig. 2-3-7). 이는 *A. oryzae*의 돌연변이주가 wild type에 비해 높은 생장률을 보이는 것에 기인하는 것으로 분석되었다.

라. Phytase Specific Enzyme Activity

1) Phytase Specific Enzyme Activity with Protein (SU)

선별된 *Aspergillus* 돌연변이주의 culture media에서 protein의 양(mg of protein)을 base로 1 Specific Enzyme Units (SU)를 μM of monophosphate/min (반응시간)/mg of protein으로 정의한 specific enzyme activity를 비교 분석한 결과, *A. ficuum*의 mutants에서는 wild type에 비해 110-120%의 높은 효소활성을 보였으며 (FUV-17, -69, -419), *A. oryzae*의 mutants는 wild type에 비해 높은 효소활성을 보이지 않았다 (Fig. 2-3-8). 이는 *A. oryzae*의 돌연변이주가 *A. ficuum*의 돌연변이주보다 빠른 생장률로 인해서 많은 protein이 생성된 결과, secreted protein을 기초로 specific enzyme activity가 낮게 나타났다.

2) Phytase Specific Enzyme Activity with Mycelia (SUG)

선별된 *Aspergillus* 돌연변이주의 culture media에서 filtration하여 얻어진 mycelia의 무게 (g of mycelia)를 base로 1 Specific Enzyme Units (SUG)를 μM of monophosphate/min(반응시간)/g of mycelia로 정의한 specific enzyme activity를 비교 분석한 결과, *A. ficuum*에서는 wild type에 비해 170%의 높은 효소활성을 가진 mutants (FUV-69, -193)을 포함하여 125-150%의 높은 효소활성을 가진 mutants (FUV-419, -317)가 나타났으나, *A. oryzae*에서는 wild type에 비해 높은 효소활성을 보이지 않았다 (Fig. 2-3-9). 이는 역시 돌연변이주의 높은 생장률에 의한 것으로 분석되었다.

3) Phytase Specific Enzyme Activity with Culture Media (SUL)

protein양이나 mycelia의 무게를 기초로한 specific enzyme activity로 발효시 생산되는 총효소량을 나타내는 기준으로 삼기어려우므로, 균체를 제거한

filtration되어진 culture media의 양 (ml of culture media)을 base로 선택하여 1 Specific enzyme Units (SUL)를 μM of monophosphate/min(반응시간)/ml of culture media로 정의한 specific enzyme activity를 비교 분석한 결과, *A. ficuum*에서는 wild type에 비해 140%의 높은 효소활성을 가지는 mutant (FUV-69)를 비롯하여 110-130%의 높은 효소활성을 가지는 mutants (FUV-193, -317, -419)을 선별하였다. 또한 *A. oryzae*에서는 wild type에 비해 110%의 높은 효소활성을 가지는 mutant (YUV-47)을 선별하였다 (Fig. 2-3-10).

3. Isolation and Identification of Phytase gene

가. Isolation of total RNA

Guanidine thiocyanate/CsCl method를 사용하여 분리한 total RNA를 formaldehyde agarose gel에서 분리한 결과, 28S와 18S의 band와 smearing을 RNA 분자를 확인하였다 (Fig. 3-11).

나. Isolation of mRNA

PolyATtract[®] mRNA Isolation systems (Promega co.)를 이용하여 mRNA를 분리하였으며, Formaldehyde agarose gel에 total RNA를 control로 분석한 결과, 28S와 18S의 control bands와 비교하여 smearing된 mRNA를 확인하였다 (Fig. 2-3-12).

다. RT-PCR

*A. oryzae*와 *A. ficuum*의 total RNA에서 M-MLuV 역전사효소 (Fermentas, cat. # EP0351)와 R1 primer (5'-gTAATTCAGCTAAGCAAAACA-3')를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 [α -³¹P] dATP로 label시킨 cDNA를 Alkaline agarose gel에 loading하여 band를 확인하였으며, isotope로 label된 cDNA는 X-ray film으로 develop하여 확인한 결과, 약 1.0kb의 single strand cDNA band를 확인하였다 (Fig. 2-3-13).

라. Secondary Polymerase Chain Reaction

A. *ficuum*의 phytase를 encoding하는 phytase gene size는 약 1.4kb정도이며, 이 sequence를 참고로 각각 F1 primer (forward primer, 23mer, 5'-gAAT TCACTTCTCATAggCATCA-3')와 R1 primer (reverse primer, 21mer, 5'-gTAAT TCAGCTAAgCAAACA-3')를 제작하였다. 또한 phytase gene의 consensus sequence를 참고로 primer A (forward primer, 20mer, 5'-ATggAYATgTgYTCNTT YGA-3')와 primer B (reverse primer, 20mer, 5'-TTRCCRGCRCCRTgNCCRT A-3')를 제작하였다. F1과 R1 primer를 사용하여 54℃에서 2분 30초를 annealing condition으로 PCR을 수행한 결과, gene size로 예측되는 1.2kb와 1.4kb의 PCR products를 얻었다 (Fig. 2-3-14).

마. Subcloning into pT7 Blue-T vector

Secondary PCR에서 얻어진 1.2kb와 1.4kb의 PCR products를 pT7 Blue-T vector에 subcloning하여 (Fig. 2-3-15), *E. coli* HB101에 transformation 시켰다. Transformation된 *E. coli*를 LB/amp(50mg/ml)/IPTG/X-gal 배지에 접종하여 lacZ gene속에 PCR fragments가 insert되어 β-galactosidase activity가 없어진 white single colony로 자라올라온 것, pPHY9과 pPHY13을 선별하였다.

바. Plasmid DNA preparation and DNA Sequencing

선별된 1.4kb의 pPHY9과 1.2kb의 pPHY13를 LB/amp broth에 overnight culturing하여 alkaline lysis method로 plasmid DNA prep.을 하여, 두개의 clones, pPHY9과 pPHY13의 sequence를 분석한 결과, 1.4kb의 pPHY9은 5 prime에서의 250bp의 염기서열을 확인하였으며, 1.2kb의 pPHY13은 5 prime에서의 260bp의 염기서열을 확인하였다 (Table 2-3-5).

사. Analysis of DNA Sequence

분석한 5 prime, 250bp의 pPHY9과 5 prime, 260bp의 pPHY13의 염기서열을 Blast와 DNASIS를 이용하여 *A. ficuum*의 *phyA* gene과 similarity 및 open reading frame을 분석한 결과, pPHY9은 *A. ficuum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*

및 *A. terreus* 9A1의 *phy A* gene과 40%의 유사성을 보였으나, pPHY13에서는 20%의 높지않은 유사성을 보였다 (Table 2-3-6). 따라서 이 pPHY9의 DNA fragment는 phytase gene의 분리에 probe로 사용할 수 있다.

Table 2-3-1. Assay for promoter strength in *Aspergillus oryzae* by using *lacZ* fusion vectors.

Strain	Plasmid	Promotor	Specific Activity ^a
YTH-1	-	-	-
C5-1	pAN5-41B	<u>gpd</u> A	2,2898.0
C9-1	pAN923-21B	<u>trp</u> C	52.3
C9-2	pAN923-21B	<u>trp</u> C	21.3
C9-3	pAN923-21B	<u>trp</u> C	38.3
C9-4	pAN923-21B	<u>trp</u> C	10.5

a. umoles o-nitro-phenol released per min per mg protein

Table 2-3-2. Expression Vectors for high expression of heterologous proteins in *Aspergillus oryzae*.

	Promotor	Secretion Seq.	cloning sites	terminator	Unique sites
Type I					
pAN52-1Not ^{a)}	P _{gpdA}	-	NcoI, BamHI	t _{trpC}	NotI, XbaI, HindIII
pAN52-2 ^{a)}	P _{gpdA}	-	HindIII	t _{trpC}	EcoRI, XbaI
pAN52-3 ^{a)}	P _{gpdA}	-	NcoI, HindIII	t _{trpC}	EcoRI, XbaI
pAN52-7Not	P _{glaA}	-	NcoI, BamHI ^{b)}	t _{trpC}	NotI, XbaI, HindIII
pAN52-9Not	P _{glaA}	-	NcoI, EcoRV, HindIII ^{b)} , BamHI ^{b)}	t _{trpC}	NotI, XbaI
pAN52-10Not	P _{glaA}	-	NcoI, EcoRV, HindIII ^{b)} , BamHI ^{b)}	t _{trpC}	NotI, XbaI
Type II					
pAN52-5Not ^{a)}	P _{gpdA}	S _{glaA} (24aa)	BssHII, BamHI, HindIII	t _{trpC}	NotI, XbaI
pAN52-6Not	P _{glaA}	S _{glaA} (24aa)	BssHII, BamHI ^{b)} , HindIII	t _{trpC}	NotI, XbaI
pAN52-8Not	P _{glaA}	S _{glaA} (18aa)	BssHII, BamHI ^{b)} , HindIII	t _{trpC}	NotI, XbaI
Type III					
pAN56-1 ^{a)}	P _{gpdA}	S _{glaA} (24aa) +glaA(G2)	NarI	t _{trpC}	XbaI
pAN56-2 ^{a)}	P _{glaA}	S _{glaA} (24aa) +glaA(G2)	NarI	t _{trpC}	XbaI

a) complete sequence known b) not unique

Table 2-3-3. Electroporation을 이용한 *A. oryzae*에서의 형질 전환 최적화 조건

Voltage (V)	Resistor	# of Protoplast	Viability (%)	Effieciency (%)
2500	2310	0.4 X 10 ⁵	58	7.2
2000			60	5.86
1500			65	3.89
1000			74	2.89
500			76	2.01
2500	1540	0.2 X 10 ⁵	49	14.35
2000			56	11.36
1500			56	10.21
1000			62	8.6
500			74	7.44
2500	700	0.2 X 10 ⁵	50	12.95
2000			58	11.12
1500			61	9.52
1000			69	8.45
500			71	6.84

Table 2-3-4. Ratio of Phytase plate assay. YW: *A. oryzae* wild type, YUV-#
A. oryzae UV mutant number, FW: *A. ficuum* wild type, FUV-#:
A. ficuum UV mutant number

Strain	Mutants	Colony (Cm ²)	Clear zone (Cm ²)	Ratio	%
<i>A. oryzae</i>	YW	8.04	12.57	1:1.56	100
	YUV-47	9.12	14.82	1:1.63	125.8
	YUV-169	9.00	14.60	1:1.62	123.6
	YUV-341	9.62	15.72	1:1.63	134.7
	YUV-511	9.10	15.00	1:1.65	130.2
<i>A. ficuum</i>	FW	2.23	8.13	1:3.65	100
	FUV-17	2.97	11.87	1:3.90	150.8
	FUV-36	3.14	12.57	1:4.00	158.8
	FUV-69	3.57	13.87	1:3.89	174.6
	FUV-193	3.15	11.65	1:3.70	144.1
	FUV-317	3.18	12.98	1:4.08	166.1
	FUV-419	2.87	12.17	1:4.24	157.6

Table 2-3-5. The nucleotides sequence of the pPHY9 and pPHY13

A. The nucleotide sequence of the pPHY9

1 GACTCTAGAG GATCTACTAG TCATATGGAT TGAATTCACT
41 TCTCATAGGC ATCATATCAG CAACAAACCC TCCTCCAAC
81 GTTACCGGCA CTGAGCTGGC AATTCCCATG ATTAGTCGGG
121 AAACAATGAG CATGGAGATC TAGATGCTGG ATGCGCAGAC
161 TATGGCTGAC TCATGAAGAG GATATCGCCC CATGTGTCAC
201 TCGCAACCTT CACTCATTTC CGTATTGGTA GTCAAGATCA

B. The nucleotide sequence of the pPHY13

1 CTA CTAGTCA TATGGATTGA ATTCACTTCT CATAGGCATC
41 AATTGAAGA AATTAATTGA AAAACAATTC CCAGACACAA
81 ACTGGGGCCA ATACGCCCGA GGGTATGTTT TACGATCGTA
121 AACTTTGCCC TACATTGGTT AACTCGATAG TCCAGTCTTC
161 TCGATGGTGG ATATAGGACC CCAGAGCGGG CCGTCACAAT
201 GCAGCAGCGT AACTATCGTG CACGTAGCAT CGAGGTCAGT
241 TGCAGTAGCT AGATCACGTC AG

Table 2-3-6. Similarity of pPHY9 with phytase gene

Score	E		
Sequences producing significant alignments:			
(bits)	Value		
emb:Y11458:SSCAGREP5	S. salar microsatellite DNA, CAG-repeat (CAG)5	64	1e-08
emb:Y11447:SSGTREP15	S. salar microsatellite DNA, GT-repeat (GT)15	62	4e-08
emb:AJ224630:BYM224630	Barley yellow mosaic virus 5'-end of 70k...	62	4e-08
gb:U76257:GMRRNA01	Gadus morhua 18S ribosomal RNA gene, partial...	56	3e-06
emb:Y11449:SSGTRP10	S. salar microsatellite DNA, GT-repeat (TG)10	54	1e-05
emb:Z46805:OCTASSPRO	O. cuniculus mRNA for tumour associated pro...	54	1e-05
gb:AF005250:	Shewanella alga 16S ribosomal RNA gene, partial se...	50	2e-04
emb:Y11450:SSCAREP10	S. salar microsatellite DNA, CA-repeat (AC)...	48	6e-04
gb:AF031882:AF031882	Euprymna morsei internal transcribed space...	46	0.003
gb:AF091004:AF091004	Trichinella spiralis unknown gene	44	0.010
emb:Y14270:SAIS1548	Streptococcus agalactiae insertion sequence...	42	0.040
gb:AF040932:AF040932	Paragonimus westermani clone D4 18S riboso...	40	0.16
gb:AC002473:AC002473	Drosophila melanogaster (P1 DS02833 (D61))...	38	0.62
gb:U12862:BTU12862	Bos taurus natural resistance associated mac...	38	0.62
gb:U64861:CELC47D2	Caenorhabditis elegans cosmid C47D2.	36	2.5
gb:AF052611:AF052611	Citrus sinensis beta-tubulin 4 pseudogene,...	36	2.5

gb:AF010496:AF010496	Rhodobacter capsulatus strain SB1003, part...	36
2.5		
gb:AF052608:AF052608	Citrus sinensis beta-tubulin pseudogene, p...	36
2.5		
gb:AC005365:AC005365	Homo sapiens chromosome 16, P1 clone 79-2A...	36
2.5		
dbj:D17521:RATCLC3	Rat mRNA for protein kinase C-regulated chlo...	36
2.5		
gb:M94550:ASNPHYTASE	Aspergillus niger myo-inistol hexaphosphat...	36
2.5		
emb:Z16414:ANPHYAG	A.niger phyA gene	36
2.5		

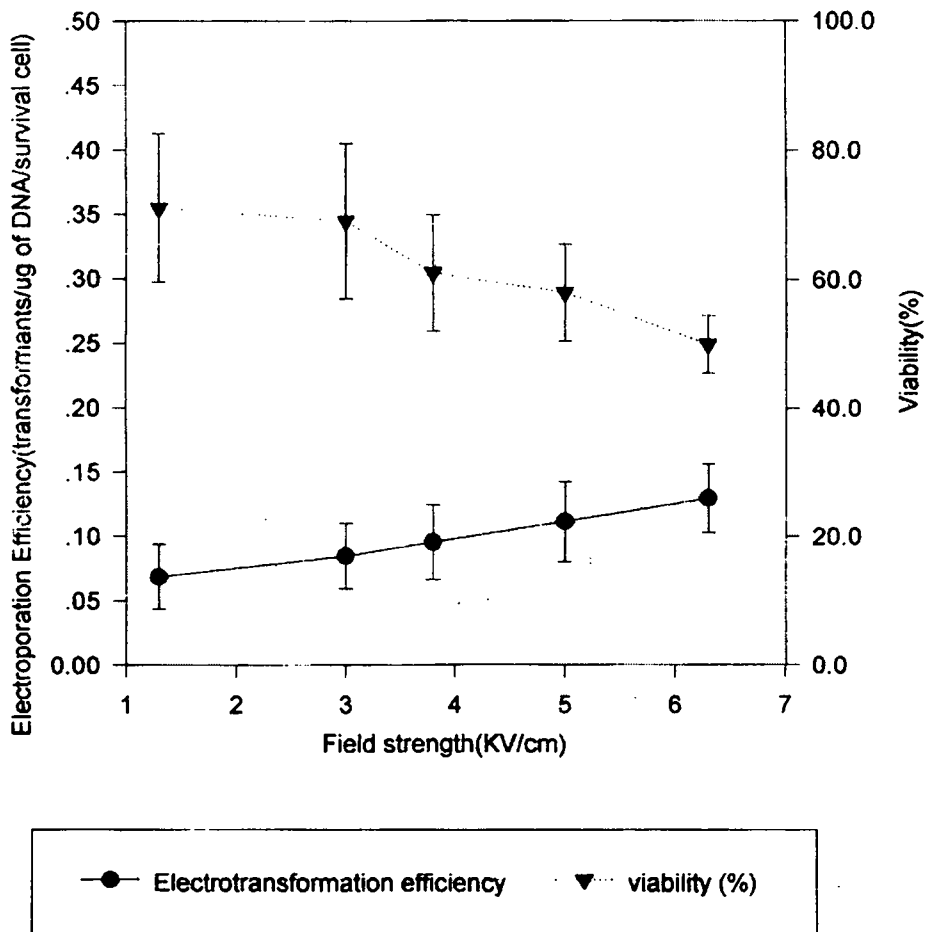


Fig. 2-3-1. Effect of the field strength on the electroporation efficiency and the survival rate of *Aspergillus oryzae* at 7000Ω

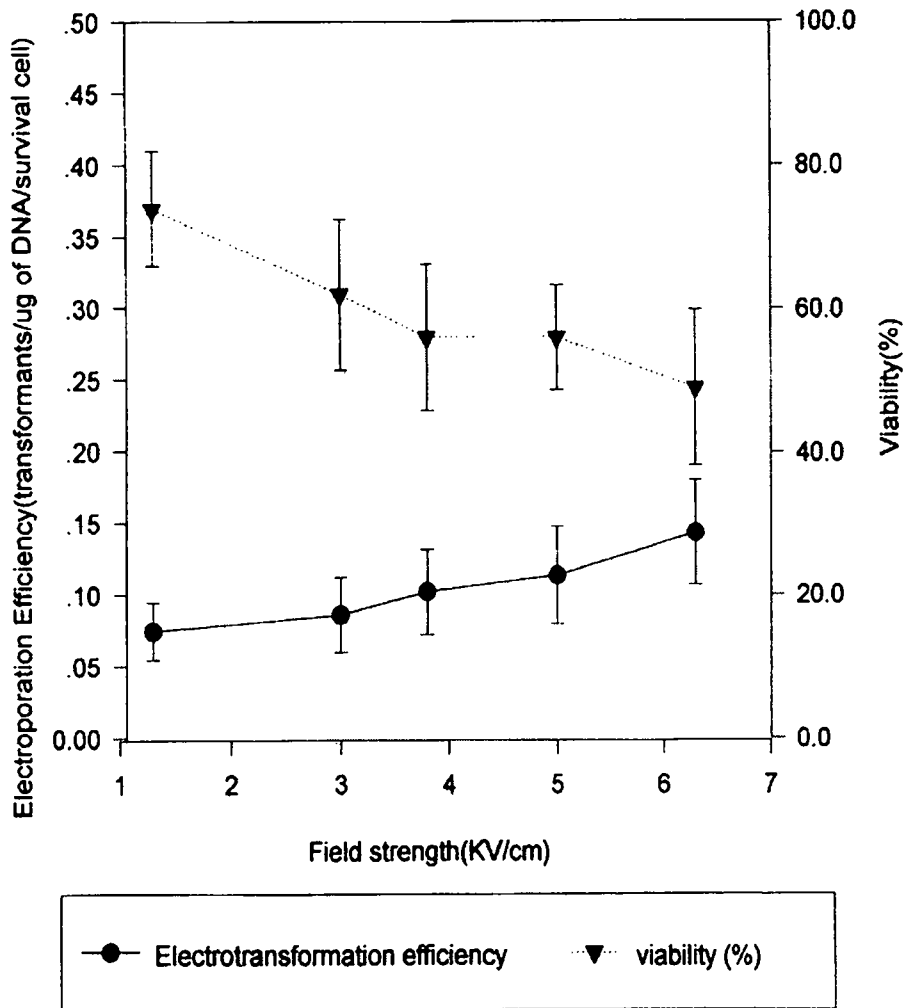


Fig. 2-3-2. Effect of the field strength on the electrotransformation efficiency and the survival rate of *Aspergillus oryzae* at 15400

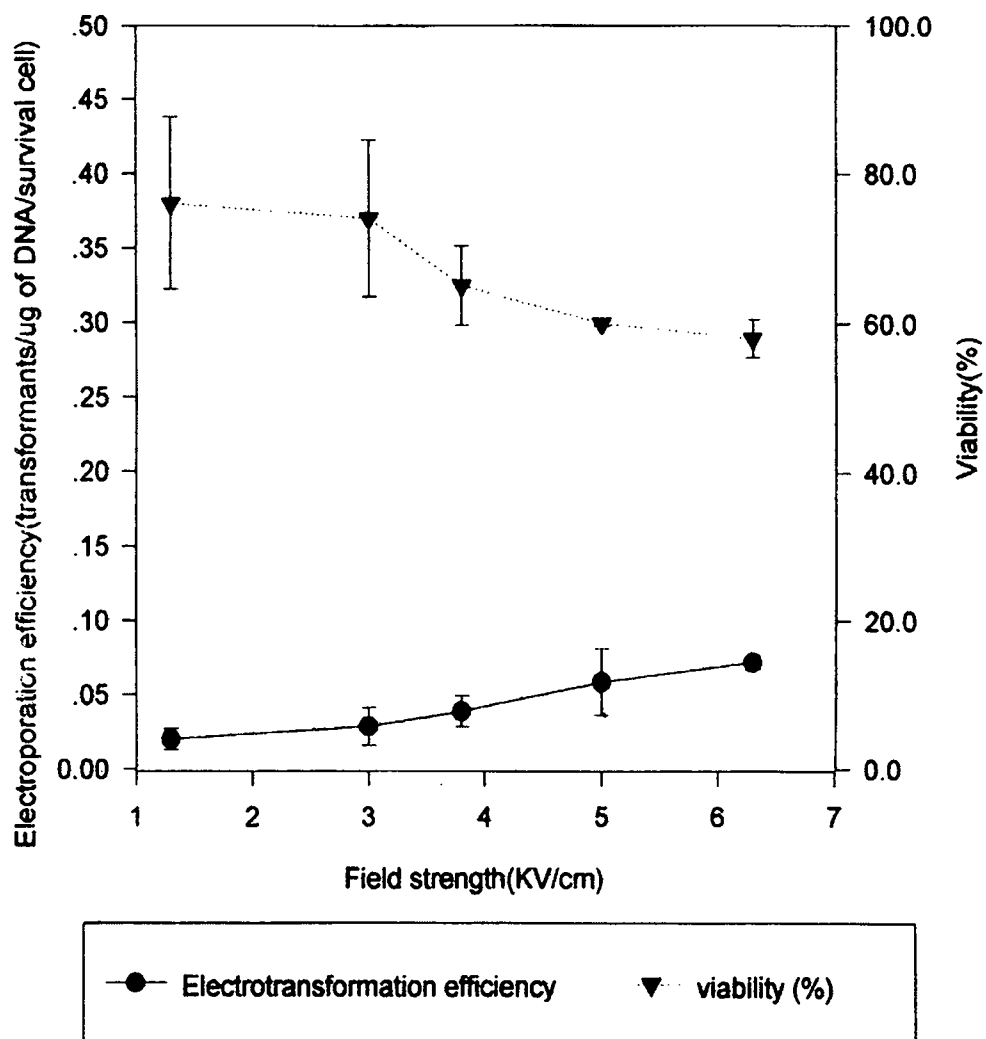


Fig. 2-3-3. Effect of the field strength on the electrotransformation efficiency and the survival rate of *Aspergillus oryzae* at 23100

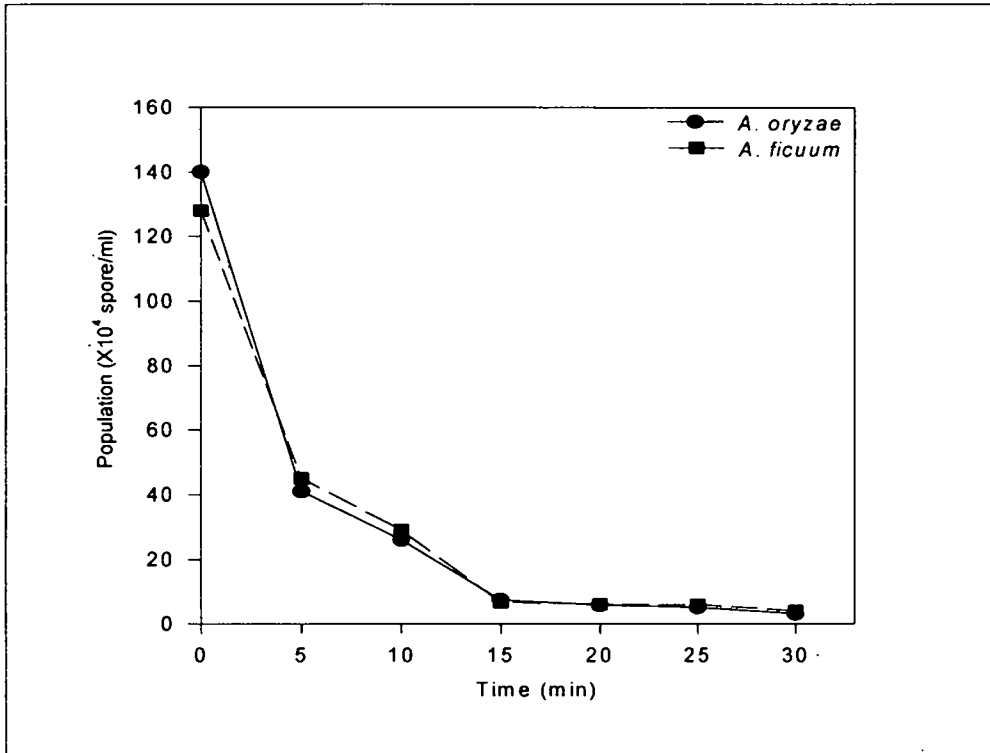


Figure 2-3-4. Survival curve of *Aspergillus* spores by UV-irradiation

A. UV mutant Wild type



B. Wild type UV mutant

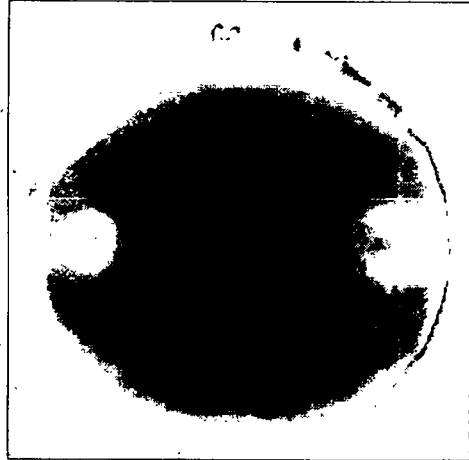


Figure 2-3-5. Screening of Phytase plate assay with *Aspergillus* species.

A: *A. oryzae* UV mutants (YUV-341), B: *A. ficuum* UV mutants (FUV-69)

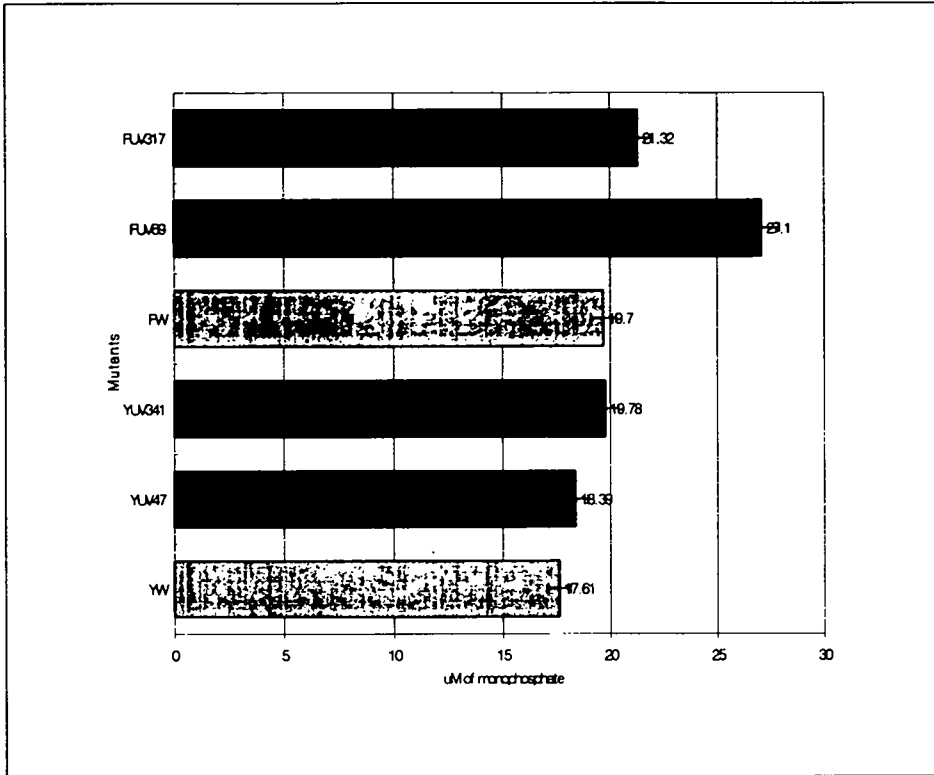


Figure 2-3-6. Phytase activity assay with culture media YW: *A. oryzae* wild type, YUV-#: *A. oryzae* UV mutants number, FW: *A. ficuum* wild type, FUV-#: *A. ficuum* UV mutants number

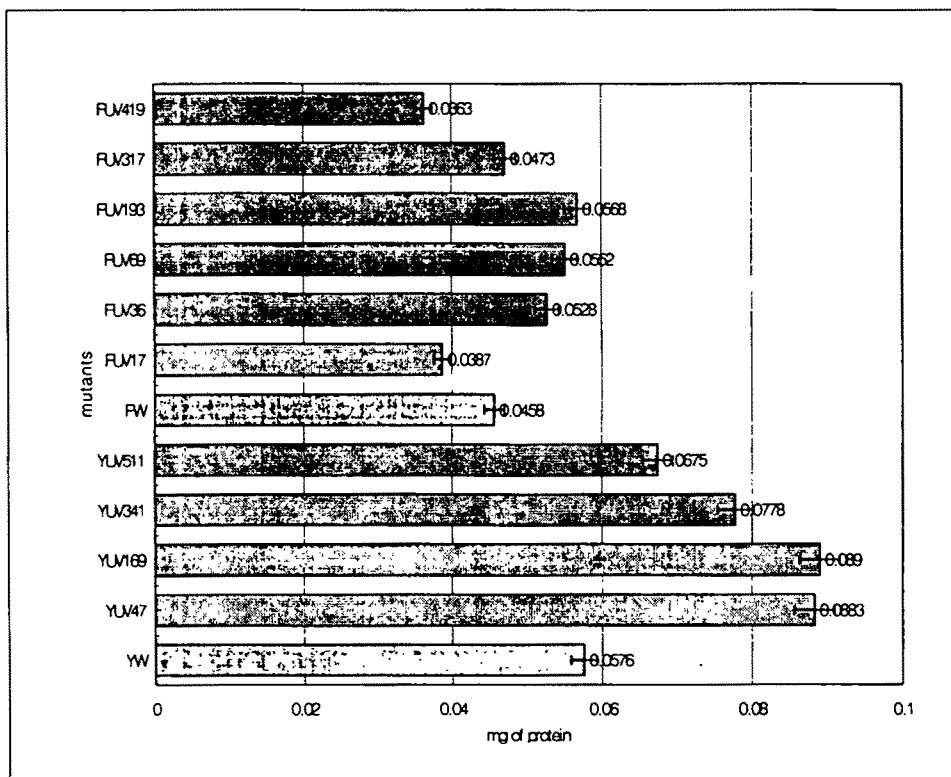


Figure 2-3-7. Secreted proteins concentration in culture media. YW: *A. oryzae* wild type, YUV-#: *A. oryzae* UV mutants number, FW: *A. ficuum* wild type, FUV-#: *A. ficuum* UV mutants number

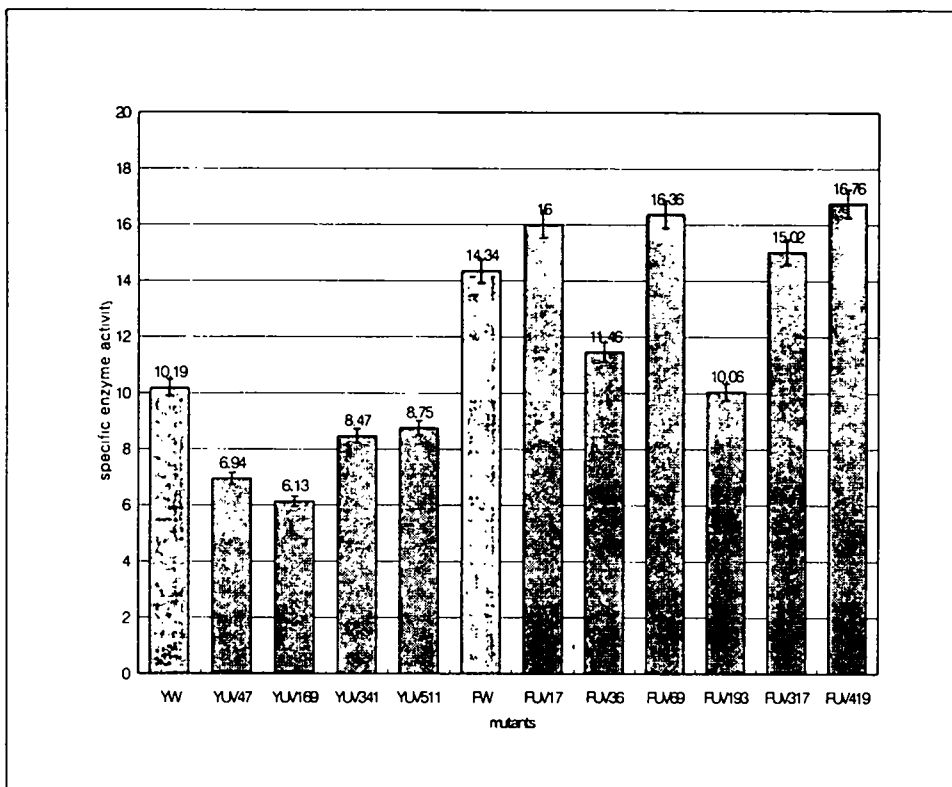


Figure 2-3-8. Phytase specific enzyme activity based concentration of protein.

YW: *A. oryzae* wild type, YUV-#: *A. oryzae* UV mutants number

FW: *A. ficuum* wild type, FUV-#: *A. ficuum* UV mutants number

1 Specific Enzyme Units(SU) = μM of monophosphate/min/mg of protein

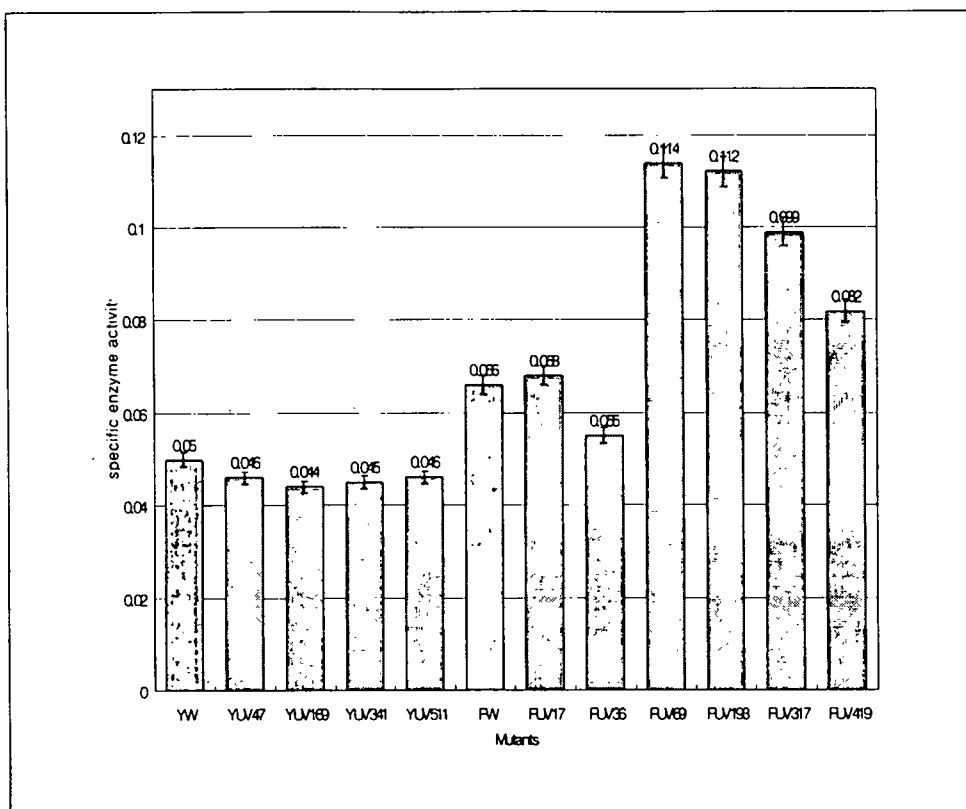


Figure 2-3-9. Phytase specific enzyme activity based weight of mycelia.

YW:

A. oryzae wild type, YUV-#: *A. oryzae* UV mutants number, FW:

A. ficuum wild type, FUV-#: *A. ficuum* UV mutants number

1 Specific Enzyme Units(SUG) = μM of monophosphate/min/g of mycelia

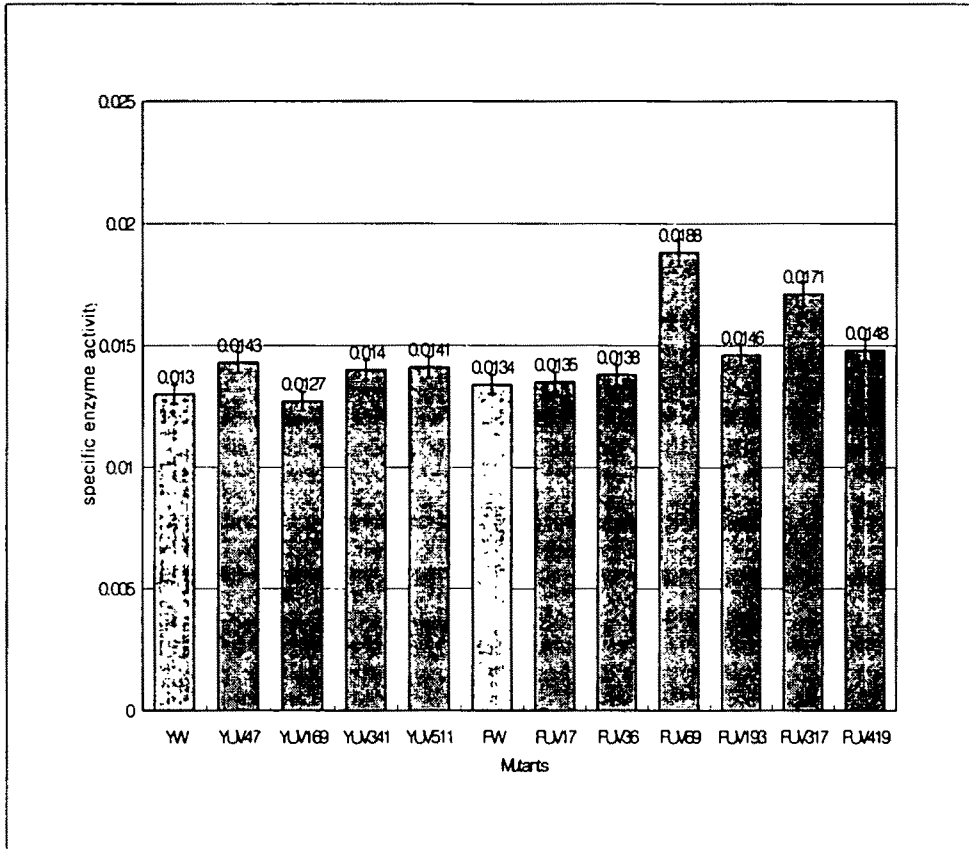


Figure 2-3-10. Phytase specific enzyme activity based volume of culture media.

YW: *A. oryzae* wild type, YUV-#: *A. oryzae* UV mutants number

FW: *A. ficuum* wild type, FUV-#: *A. ficuum* UV mutants number

1 Specific Enzyme Units(SUL) = μM of monophosphate/min/ml of culture media

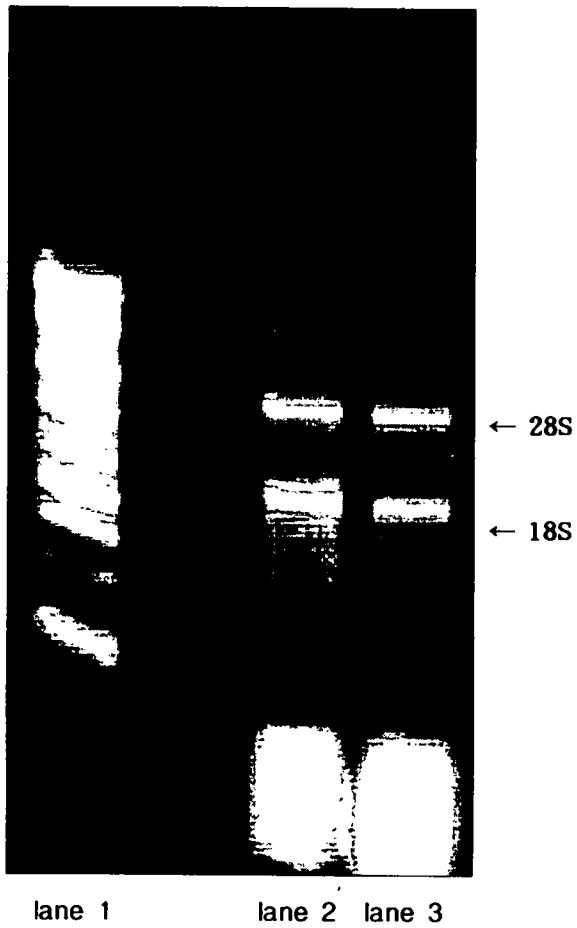


Figure 2-3-11. Formaldehyde agarose gel analysis of total RNA isolated from *Aspergillus* species. lane 1: RNA standard marker, lane 2: *A. oryzae*, lane 3: *A. ficuum*

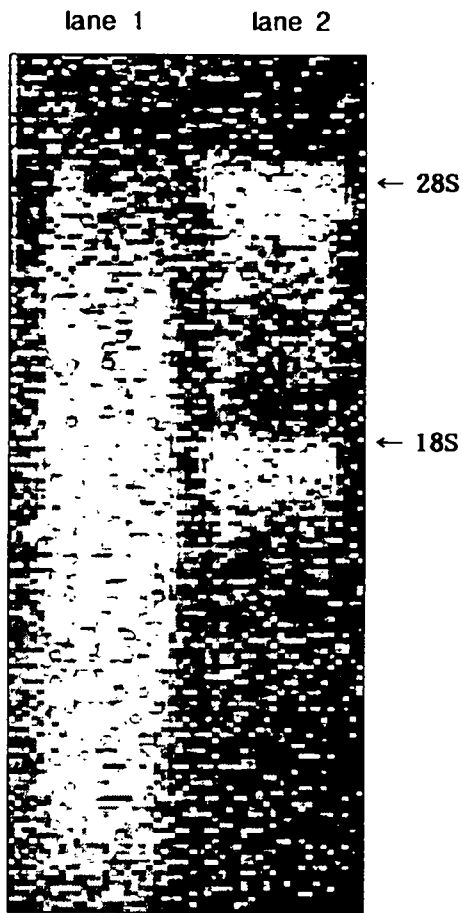


Figure 2-3-12. Isolated mRNA of *A. ficuum*. lane 1: mRNA of *A. ficuum*
lane 2: total RNA of *A. ficuum*

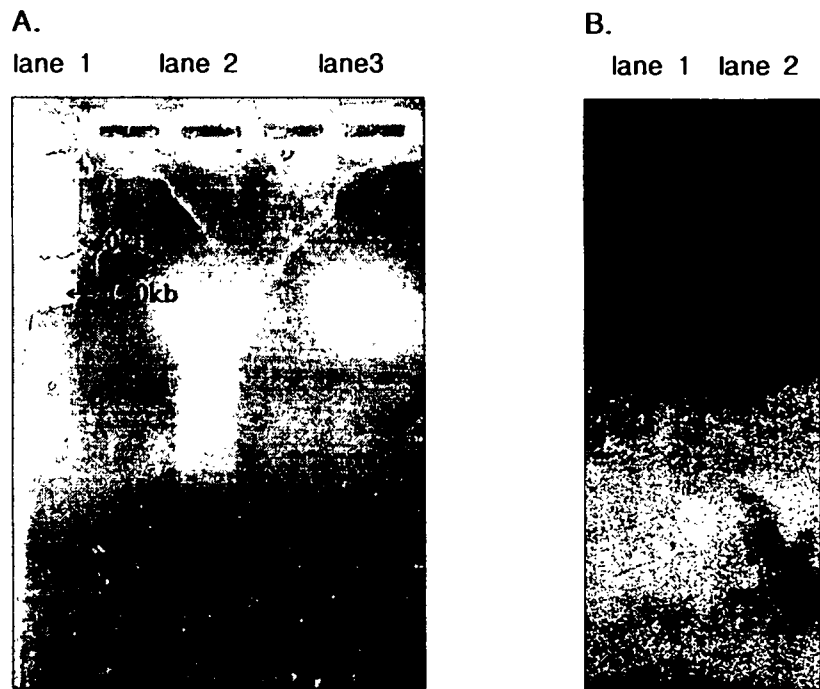


Figure 2-3-13. A: Synthesis of first single strand cDNA using an mRNA of *Aspergillus* species, B: Screening of cDNA labeled [α - 32 P] dATP. A: lane 1: λ /Hind III, lane 2: *A. oryzae*, lane 3: *A. ficuum*. B: lane 1: *A. oryzae*, lane 2: *A. ficuum*

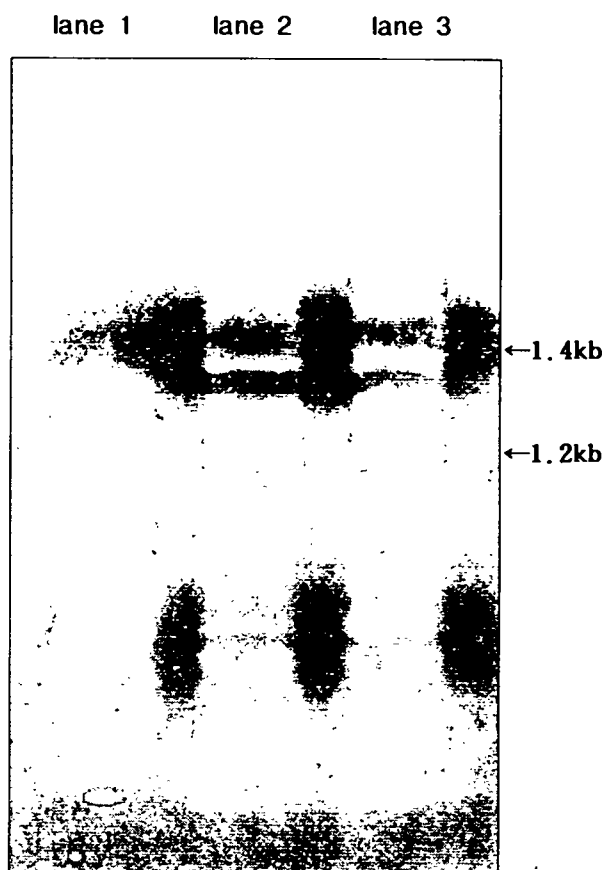


Figure 2-3-14. Amplification of the 1.2kb and 1.4kb by RT-PCR using a phytase cDNA fragment in *Aspergillus* species. lane 1: ϕ X 174/HaeIII, lane 2: *A. oryzae*, lane 3: *A. ficuum*

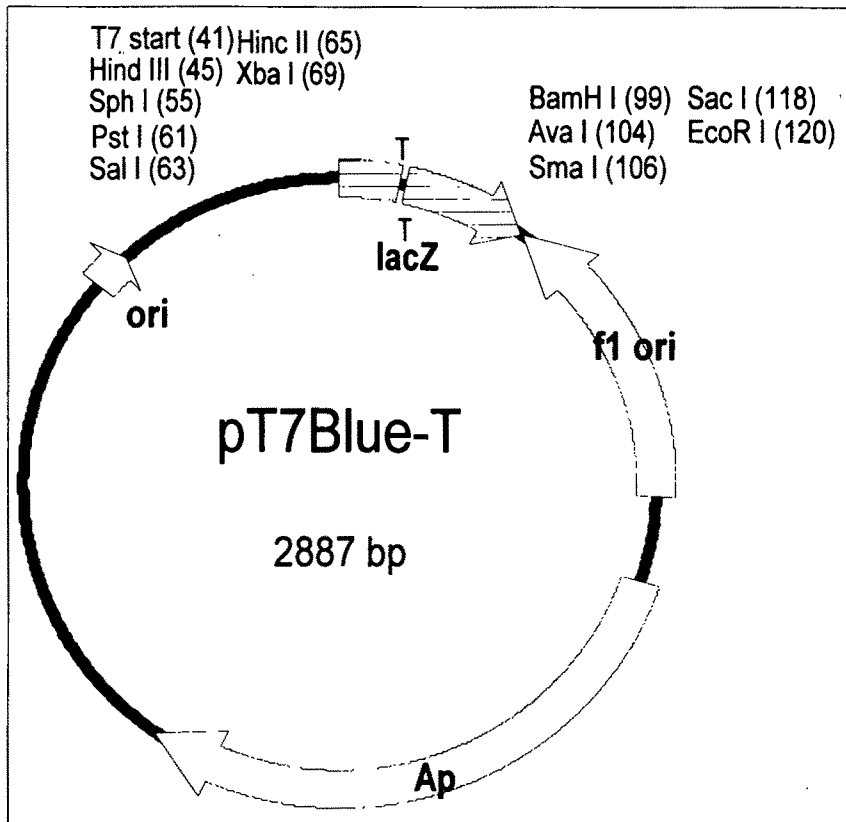


Figure 2-3-15. Subcloning into pT7 Blue-T Vector

제 4 절 결론

1. *Aspergilli* Transformation by using Electroporation

Electroporation에 의한 transformation 방법 중 가장 큰 잇점은 신속하고 간단한 방법이라는 것이다 (Delorme, 1989). 이것은 cell에 plasmid DNA가 들어오게 하기 위해 centrifugation 과 현탁 과정이 전부이고 electric pulse도 약 1.15msec 정도이다. 두번째로 electroporation은 PEG-mediated transformation보다 재생력이 있다는 것이다. 이 두 방법의 가장 중요한 큰차이는 transformants의 안정성이다. 이러한 영향을 설명하기 가능한것은 high-voltage electroporation에 의하여 repair system이 활성화 되었기 때문이다. 또, 다른 잇점은 transformed colony를 selective marker가 들어있는 배지에서 직접 얻을 수 있다. 그러므로 mutants 등을 screening하기에 도움이 된다 (Delorme, 1989). 이상의 결과를 토대로 Electroporation의 최적 형질전환 효율에 영향을 미치는 제반요인들의 조건 (5.0KV/cm, 2310 Ω 0.5 μ F)을 확립함으로써, 아직까지 그 활용의 범위가 제한된 곰팡이 분야에서 보다 간단하고 빠르게 그리고 많은 형질전환된 균주를 얻을 수 있을 것이다.

2. Screening of Phytase High-Expression Strains by UV-mediated Mutagenesis

UV light에 의한 고발현 돌연변이주의 선별에서는 *Aspergillus* species를 254nm의 UV light로 20분간 처리하여 가장 효소역가가 높은 질소원인 암모늄 염 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)이 포함된 PSM배지에서 phytase 분비로 생겨나는 clear zone의 면적비가 Wild type에 비해 우수한 것을 선별하여, *A. oryzae*에서는 4개 (YUV -47, -169, -341, - 511), *A. ficuum*에서는 6개 (FUV-17, -36, -69, -193, -317, -419)을 선별하였다.

선별된 돌연변이주는 phytase plate assay결과, *A. oryzae*에서는 wild type 보다 약 120-135%의 효과를 보였으며, wild type에 비해 성장이 빨랐다. *A. ficuum*에서는 wild type보다 약 140-170%의 효과를 나타내었다.

선별된 돌연변이주로 phytase activity assay하여 specific enzyme activity를 분석한 결과, *A. ficuum*에서는 wild type보다 130-140%의 높은 효소활성을 나타내었다. 그러나, *A. oryzae*에서는 wild type보다 높은 효소활성을 보이지 않았다. 이는 배지에서 나타난 높은 활성이 돌연 변이주에서의

specific enzyme activity의 증가가 아니라, wild type에 비하여 돌연변이주에서 보이는 높은 생 장율에 기인하는 것으로 분석되었다.

3. Isolation and Identification of Phytase gene

Aspergillus group은 phytase를 생산하는 microorganisms중에서 extracellular phytase activity가 가장 높게 나타났다. 그 중 가장 연구가 활발히 되어있는 *A. ficuum*와 이것을 토대로 *A. oryzae*에서 phytase gene을 분리하고자 두 *Aspergillus* species에서 total RNA 및 mRNA를 추출하였고, RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 PCR을 사용하여 증폭시킨 뒤 phytase gene size와 유사한 1.2kb와 1.4kb DNA fragments를 분리하여 pT7 Blue-T vector에 subcloning하여 pPHY9과 pPHY13을 선별하였다. 선별된 두 plasmids를 DNA sequencing하여 각각 약 250bp, 260bp의 염기서열을 확인하였으며, 이를 gene search하였다. 1.4kb의 5 prime의 250bp DNA fragment (pPHY9)는 *A. ficuum*의 *phyA* gene과 약 40%의 similarity를 보였으며, 이는 향후 phytase gene 분리를 위한 probe로 확보하였다.

제 5 절 참고문헌

- Accolla, R.S. and F. Celada. (1976) *FEBS Lett.*, 67:299.
- Akabori, S., T. Ikenaka and B. Hagihara. (1954) *J. Biochem.*, 41:577.
- Alexopoulos, C.J. and C.W. Mims. (1979) *Introductory Mycology*. 3rd ed., John Wiley & Sons. Newwork.
- Allen, R.J.L. (1977) *Biochem. J.*, 34:858-865
- Anderson, R.J. (1915) *J. Biol. Chem.* 20:475
- Bergman, L.W. and W.M. Kuehl. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254:8869.
- Bitar, K. and Reinhold, J.G. (1972) *Biochem. Biophys. Acta.*, 268:442
- Blobel, G. and B. Dobberstein. (1975) *J. Cell. Biol.*, 67:835
- Buxton, F.P. and A. Radford. (1984) *Mol. Gen. Genet.*, 196:339
- Campbell, P.N. and G. Blobel. (1976) *FEBS Lett.*, 72:215
- Casadaban, M.J., Martinez-Arias, S.K. Shapira and L. Chou. (1983) *Methods in Enzymol.*, 100:293
- Case, M.E., M. Schweizer, S.R. Kushner and N.H. Giles. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259
- Champe, S.P. and S. Benzer. (1962) *J. Mol. Biol.*, 4:288.
- Chang, R., S. Schwimmer and H.K. Burr. (1977) *J. Food Sci.*, 42:1098
- Christensen, T., H. Woeldike, E. Boel, S.B. Mortensen, K. HJjortshoej, L.Thim and M.T. Hansen (1988) *Bio/Technol.*, 6:1419.
- Clutterbuck, A.J. (1974) In *Handbook of Genetics*. ed. R.C. King. vol. 1. Plenum, New York. pp 209-217.
- Clutterbuck, A.J. (1982) *Aspergillus nidulans*. *Genet. Maps*, 2:209.
- Cooper, T.G. *The Tools of Biochemistry*. Wiley Press. pp 55-56
- Cosrove, D.J. (1966) *Rev. Putr. Appl. Chem.*, 16:209

- Cove, D.J. (1977) In *Genetics and Physiology of Aspergillus*. J.E. Smith and J.A. Pateman (ed.) The British Mycological Society Symposium Series No. 1. Academic Press, London. pp. 81-95
- Cullen, D., S.A. Leong., L.J. Wilson and D.J. Hennel. (1987) *Gene*, 57:21.
- de Boland, A.R., G.B. Garner and B.L.O'dell. (1975) *J. Agri. Food chem.*, 23:1186
- Ecckhout, W. and M. de paepe. (1994) *Anim. Feed Sci. Technol.*, 47:19-29
- Engelman, D.M. and T.A. Steitz. (1981) *Cell*, 23:411.
- Fiske, C.H. and Subbarow. (1925) *J. Biol. Chem.*, 66:376
- Foltmann, B. (1981) *Essays Biochem.*, 17:52.
- Gibbins, L.N. and F.W. Norris. (1963) *Biochem. J.* 86:67
- Gibson, D.M. (1987) *Biotechnol. Lett.*, 9(5):305-310
- Gilmore, R., P. Walter and G. Blobel. (1982) *J. Cell. Biol.*, 95:470
- Glabe, C.G., J.A. Hanover and W.J. Lennarz. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255:9236
- Glass, R.L. and Geddes, W.F. (1959) *Cereal Chem.*, 36:186
- Greaves, M.P., Anderson, G. and Webley, D.M. (1967) *Biochem. Biophys. Acta.*, 132:412-418
- Gunatilleke, I.A.U.N., C. Scazzocchio and H.N. Arst. (1975) *Mol. Gen. Genet.*, 137:269.
- Hahm, Y.T. and C.A. Batt. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1610
- Han, Y.W., Gallagher, D.J. and Wilfred, A.G. (1987) *J. Microbiol.*, 2:195-200
- Hartmann, G.H. (1979) *J. Am. Oil Chem.* 56:731
- Hastie, A.C. (1970) *Nature* (London), 226:771
- Hellebust, H., A. Veide and S-O. Enfors. (1988) *J. Biotechnol.*, 7:185.
- Hinnen, A., J.B. Hicks and G.R. Fink. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

75:1929

- Howson, S.J. and R.P. Davis. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 5:77-382
- Irving, G.C.J. and D.J. Cosgrove. (1971) *Aust. J. Biol. Sci.*, 24:547-557
- IUPAC-IUB. (1968) *Eur. J. Biochem.*, 5:1
- John, M.A., and J.F. Peberdy. (1984) *Enz. microbiol. Technol.* 6:386.
- Jongbloed, A.W., Z. Mroz and P.A.J. Kemme. (1992) *Anim. Sci.*, 70:1159-1168
- Kafer, E. (1958) *Adv. Genet.*, 9:105
- Kafer, E. (1961) *Can. J. Genet. Cytol.* 19:723
- Kafer, E. (1961) *Genetics*, 46:1581
- Kelly, M.K. and M.J. Hynes. (1985) *EMBO*, 4:475.
- Kitano, K., s. Fujimoto, M. Nakao, t. Witanable and Y. Nakao. (1987) *J. Biotechnol.*, 5:77.
- Koch, H., Bommer, H.D. and Koppers, J. (1982) *Die Starke*, 34:16
- Krebs, E.G., G.W. Rafter and J.M. Junge. (1953) *J. Biol. Chem.*, 200:479.
- Luis, P., Monika, H., Markus, W., Michel, T. and Adolphus, P. G. M. van Loon (1997) *Appli. Environ. Microbiol.*, 63(5)1696-1700
- Maga, J.A. (1982) *J. Agric. food chem.*, 30(1):1-9
- Mandal, N.C., Burman, S. and Biswas, B.B. (1972) *Phytochemistry* 11:495
- Mccully, K.S. and E. Forbes. (1965) *Genet. Res., Cambridge.*, 6:352
- Mckellar, R.C. and Cholette. (1984) *Osphate*, 47(6):1224-1227
- Meyer, K.I., E. Krause and B. Dobberstein. (1982) *Nature*, 297:647.
- Mueller, M., I. Ibrahimi, C.N. Chang, P. Waler and G. Blobel. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257:11860
- Nikolaos, B.K., Maria, G.P.; Anastasia, S. and Panagiotis, A. (1998) *Biotechnol. Lette.*, 20(5):475-478
- Oberleas., D., Muhrer, M.E. and O'Dell. B.L., (1966) *J. Nut.*, 90:56

- Orr, W. and W.E. Timberlake. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5976.
- Perlman, D. and H.O. Halvorson. (1983) *J. Mol. Biol.*, 167:391.
- Perlman, D. and H.O. Halvorson. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5976
- Piechaczyk, M., J.M. Blanchard, L. Marty, C. Dani, F. Panabieres, Pontecorvo, G., E. Tarr-Gloor and E. Forbes. (1954) *J. Genet.*, 52:226.
- Pontecorvo, G., J.A. Roper, L.M. Hemmons, K.D. MacDonald and A.W.J. Bufton. (1953) *Adv. Genet.*, 50:141
- Posternak, T. (1957) *J. Biol. Chem.*, 188:317
- Priest, F.G. (1985) In *Comprehensive Biotechnology*. vol. 1. ed. M. Moo-Young. Pergamon Press, Oxford. pp 587-604
- Punt, P.J., M.A. Dingemans, B.J.M. Jacobs-Meijnsing, P.H. Pouwels and C.A.M.J.J. van den Hondel. (1988) *Gene*, 69:49.
- Roberts, C.F. (1967) *Genetics*, 55:233.
- Rothman, J.E., F.N. Katz and H.F. Lodish. (1978) *Cell*, 15:1447.
- Rowlands, R.T. and G. Turner. (1973) *Mol. Gen. Genet.*, 126:201
- Rowlands, R.T. and G. Turner. (1974) *Mol. Gen. Genet.*, 133:151
- S.E. Sabouty, P.Fort and P. Jeanteur. (1984) *Nucl. Acids Res.*, 12:6951.
- Sandberg, A. and U. Svanberg. (1991) *J. Food Sci.*, 56:1330-1333
- Schoemaker, J.M., A.H. Brasnett and F.A.O. Marston. (1985) *EMBO*, 4:775.
- Schoner, R.G., L.F. Ellis and B.E. Schoner. (1985) *Bio-Technol.*, 3:151
- Shilhavy, T.J. and J.R. Beckwith. (1985) *Microbiol. Rev.*, 49:398.
- Shilhavy, T.J., M.L. berman and L.W. Enquist. (1984) *Cold Spring Harbor Lab., New York*. pp. 208.

- Shimizu, Milio (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(8):1364-1365
- Skowronski, T. (1976) *Polish J. Soil Sci.*, 9:145-150
- Skowronski, T. (1978) *Acta. Microbiol. pol.*, 27:41-48
- Strandberg, L., A. Veide and S-O. Enfors. (1987) *J. Biotechnol.*, 6:225.
- Strickland, W.N. (1958a) *Proc. of the Royal Society, London. Ser B.* (149). pp 82-101.
- Strickland, W.N. (1958b) *Proc. of the Royal Society, London. Ser B.* (149). pp 533-542.
- Tilburn, J., C. Scazzocchio and G.G. Taylor. (1983) *Gene*, 26:205.
- Ullah, A.H.J. and H.C. Jr. Dischinger. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 750:51-57
- van Arkel, G.A. (1963) *Aspergillus Newlet.*, 4:9.
- van Gorcom, R.F.M., P.J. Pouwels, T. Goosen, J. Visser, J.W.J. van den Broek, J.E. Hamer, W.E. Timberlake and C.A.M.J.J. van den Hondel. (1985) *Gene*, 40:99.
- von Heijne, G. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 133:17
- von Heijne, G. and C. Blomberg. (1979) *Eur. J. Biochem.*, 97:175.
- Walter, P. and G. Blobel. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7112
- Walter, P. and G. Blobel. (1982) *Nature*, 299:691
- Wang, H.L., Swain, E.W. and Hesselstine, C.W. (1980) *J. Food Sci.* 45:1262-1266
- Wickner, W. (1979) *Ann. Rev. Biochem.*, 48:23.
- Wim van Hartingveldt, Cora M.J. van Zeijl and Harteveld, G.M. (1993) *Gene* 127:87-94
- Yamada, K., Minoda, Y. Kobayashi, T., Hidaka, Y., Matuo, H. and Kobayashi M. (1968) *J. Ferment. Technol.*, 46:858-862

Yamamoto, S., Minoda, Y. and Yamada, K. (1972) *Agric. Biol. Chem.*,
36:2097-2013

Yelton, M.M., J.E. Hamer and W.E. Timberlake. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470

Yelton, M.M., J.E. Hamer, E.R. de Souza, E.J. Mullaney and W.E. Timberlake. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:7576.

제 3 장 Phytase 발효생산 및 제제화공정의 개발분야

제 1 절 서 설

효소의 대량생산을 위해 발효공정의 최적화 및 생산된 효소의 회수/제제화는 필수적 단계이다. 파이테이즈 생산을 위한 공정은 현탁상 배양 및 고체배양 방법으로 시도 되었다. 파이테이즈는 세포외로 분비되는 phosphatase 의 하나로 phytic acid를 myo-inositol과 인산으로 분해하는 특이효소이다. 액체배양에서 파이테이즈의 생산에 영향을 주는 배지 및 배양 조건에 대해서는 보고된 바가 거의 없는 실정이다. 일부 보고에서는 인산의 종류 및 농도, 계면활성제의 농도 등이 영향을 주는 것으로 언급하고 있다. 또한, 배지에 첨가되는 전분에 의해 효소생산이 증진되는 것이 보고되었으나, 이에 대한 원인은 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 파이테이즈의 액체 발효생산에 미치는 인자를 조사하여, 발효 생산 배지를 최적화 하고자 하였다. 또한, 파이테이즈 발효조건을 제어하여 효소생산의 극대화를 이루고자 유가식 배양을 시도 하였다. 최종적으로 생산 효소의 분말화공정을 수행하고 이를 동물사양시험에 적용하였다.

제 2 절 파이테이즈 발효 배지조건 및 열안정성

1. 연구개발목표

가. Phytase 효소생산 균주의 비교.

나. 효소의 활성을 측정하는 방법을 조사. 개발한다.

다. 진탕배양법을 이용하여 효소를 생산하는 균주를 배양한다.

라. Crude Phytase의 온도에 따른 안정성 연구 및 안정성 향상 연구

마. 여러 첨가제의 탐색: Crude Phytase 열 안정성 성능 비교 분석

바. 우수한 액상 열 안정화제의 선별 및 안정화 조건 확립

2. 연구수행 방법

가. 균주의 regeneration : 분양받은 균주들은 동결건조된 상태이므로, 활성을 나타내기 위해 수차례의 계대배양이 요구된다. 사용된 배지는 malt-yeast extract agar배지로서, 경사배양을 하였다. 계대배양시에 액체배양을 250 ml flask에서 수행하여 phytase 활성을 분석, 조사하였다.

나. Phytase 활성 분석은 sigma Chemical에서 구입하였고, 반응기질로는 phytic acid (wheat)를 사용하였다. 효소활성분석의 감도를 높이기 위해, 반응온도, 기질농도, 반응시간 등을 조사하여 반응조건을 최적화하였다.

다. Phytase 발효생산배지를 최적화하기 위해 배지 성분의 조성 및 종류를 조사하였다. 이를 위해, 250 ml flask에 50 ml 배지를 첨가하고 121℃에서 20분간 멸균하여 포자를 접종하였다 (접종농도:60,000 spores/ml). 발효는 27℃에서 200rpm으로 6일간 진탕배양하였다. 효소의 활성은 배지의 상등액으로부터 분석하였다.

라. 생산된 효소의 활성을 확인하기 위해, 분쇄된 대두 및 대두박에 존재하는 phytic acid의 분해반응을 조사하였다. 이때 대조구로는 시판되는 Novozyme을 이용하였다. 반응온도에 따른 효소의 안정성 및 활성을 조사하기 위해, 45, 55, 65℃에서 시간에 따라 활성을 분석하였다.

마. Phytase는 Sigma사의 *Aspergillus ficuum*에서 생산된 crude phytase(3.5 U/mg solid)를 구입하여 사용하였다. Phytase의 활성도는 JAOAC에 발표된 Engelen 등의 방법으로 측정하였는데 간단히 요약하면 기질로는 rice에서 얻은 dodecasodium phytate를 16.8mg를 1 liter의 acetate buffer (pH 5.5)에 녹여 사용하였다. 이 기질 용액은 활성도 측정 당일 새로 만들어 사용하였다. 활성도 측정시의 모든 buffer는 1.76g의 acetic acid, 30.02 g의 sodium acetate, 0.417 g의 CaCl₂ H₂O를 1 liter의 증류수에 녹여 pH를 5.5에 맞추어 사용하였다. 효소의 역가는 효소에 의한 기질 phytate의 inositol과 phosphate로의 전환으로 인한 phosphate의 양을 ammonium heptamolybdate

(100 ammonium heptamolybdate/10 mL 25% ammonia in 1000 mL water)와 ammonium vanadate (2.35 g in 400 mL water, add 20 mL nitric acid, and diluted to 1 liter water)와의 혼합물로 이루어진 stock solution을 먼저 만들어 정량하였다. 노란색의 발색 정도는 spectrophotometer로 415 nm에서 정량하여 상대활성도를 계산하였다. 먼저 각 온도에서의 활성도를 측정하였고, 변성온도 이상인 60도에서 효소의 안정성을 시간별로 측정하였다. 이 결과를 바탕으로 여러 효소 안정화제를 적절한 농도로 첨가하여 60도에서의 시간별 안정성을 측정하였다. 특히 L-arginine과 Ca 이온의 농도를 조직적으로 변화시켜 최대의 안정성을 나타내는 formulation을 찾아 내었다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구수행내용

- 1) 분양받은 균주들로부터 high producer의 선별
- 2) Phytase 분석 조건 확립
- 3) 발효생산 배지조성의 최적화
- 4) 생산된 phytase의 효소활성 확인 및 안정성 조사
- 5) Phytase의 열 안정성을 위하여는 아미노산의 배열을 단백질 공학의 방법으로 치환시키는 방법이 있으나 본 연구는 안정화제를 첨가함으로써 효소의 안정성을 증가시키는 간편한 방법을 선택했다. 이는 기존의 생명공학회사에서 많이 쓰이는 단백질 약물의 안정성을 증가시키는 가장 쉬운 방법으로 주로 탄수화물이나 합성고분자, 또는 저분자량의 아미노산이나 무기이온들을 많이 쓰고 있다. 여기에 착안하여 phytase에도 그러한 안정제들이 효과가 있는지 탐색하고, 있다면, phytase 액상 효소제제의 조성물을 적절히 조절하여 유통시의 상온에서나 phytase-사료 제제화시의 고온처리과정에서 안정한 액상 효소제제를 탐색하였다.

나. 연구결과

1) Phytase 생산균주 비교

가) 아래의 Table 3-2-1에서와 같이 *A. ficuum* (NRRL3135)로부터 가장 높은 phytase 활성을 얻을 수 있었다.

나) Phytase 활성의 분석조건을 찾기 위해 효소와 기질간의 반응조건을 조사하였다. 반응온도는 37℃와 55℃를 비교하여 55℃에서 분석의 감도가 2배이상 높은 것으로 조사되었다. 또한, 기존에 사용되었던 end-point 분석방법에 문제가 있음이 발견되어, kinetic analysis방법을 도입하여 정확도를 기했다. 이로부터 다음과 같은 분석법을 만들었다 (Table 3-2-2).

다) 발효배지조성의 최적화를 위해 진탕배양을 수행하였다. 질소원과 탄소원의 종류 및 농도에 대해 조사한 결과가 Table 3-2-3,4에 보여져 있다. 질소원과 탄소원으로는 각각 질산태와 포도당이 우수한 것으로 나타났다.

최적 포도당농도는 30 g/l, 최적 NaNO₃ 농도는 8.6 g/l 및 최적 FeSO₄ 농도는 0.1 g/l로 나타났다. 이상의 결과로부터 *A. ficuum*으로부터 phytase의 생산을 위한 배지조성을 최적화 하였고 결과가 Table 3-2-4에 보여져 있다.

라) 생산된 효소활성의 안정성 조사로부터 상품화되어 있는 phytase (Novo L)와 비교하여, 본 연구에서 생산된 효소의 안정성을 조사하였다. Fig 3-2-1에 보인 바와 같이, 온도에 따라 유사한 안정성을 보였다.

2) Phytase의 액상 안정화

Fig 3-2-2는 crude phytase를 pH 5.5 acetate buffer에 첨가하여 여러 다른 온도에서 incubation 시켰을 경우의 그 효소 역가의 감소를 나타낸 것이다. 60도에서의 급격한 활성도 소실은 phytase의 변성온도가 55도 부근이라는 사실과 잘 맞는다 (Fig 3-2-5 참조). 50도까지는 120 시간 까지도 그 활성도의 소실이 없다. 따라서 이후의 실험은 60도에서 그 열 안정성의 향상에 주안점을 두어 행하였다. 그림 3는 여러 효소 안정화제를 crude phytase에 첨가한 경우의 phytase의 열 안정성을 나타낸 것이다. 각 첨가제의 농도는 다음과 같다.

첨가제	분자량	농도 (w/w)	심볼 (비고)
No Additive	-	-	●
Trehalose	378.2	5%	■
Sucrose	342.3	5%	▲
Sorbitol	182.2	5%	▼
Glucose	180.2	5%	◆
L-Arginine	174.2	1%	육각형
D-Xylose	150.1	5%	●

L-arginine이 가장 우수한 열 안정성을 나타내었다. 아무것도 첨가하지 않은 crude phytase의 경우, 15%정도의 효소 역가를 유지하는데 비하여, L-arginine의 경우에는 70분 후 약 80% 정도의 효소 역가를 보지하고 있다. Fig 3-2-4은 L-arginine의 첨가 농도에 따른 crude phytase의 안정화도를 나타낸 것으로 L-arginine의 농도가 0.75 -1.0 % 부근에서 열 안정성이 최대임을 알 수 있다. 따라서 계속되는 실험에서는 L-arginine 1%의 농도를 유지시켜 주었다. Fig 3-2-5는 L-arginine이 효소의 활성도에 미치는 영향을 나타내었다. 효소의 활성(activity)는 안정도(stability)와는 다른 개념으로 각 온도에서의 5분 동안 반응된 후의 효소 역가를 의미한다. 그림에서 보는 바와 같이, 온도의존성 활성도는 약간 감소하나 대체로 temperature-activity profile은 바뀌지 않는 것을 알 수 있다. 따라서, L-arginine은 phytase의 효소의 활성도를 증가시키는 것이 아니라 효소의 열 안정성을 증가시키는 것으로 사료된다. L-arginine이 crude phytase 뿐 아니라 상업적으로 생산되는 Gist-brocades사의 액상 유전자 재조합 phytase의 열 안정성을 증가시키는 여부는 Fig 3-2-6에 나타내었다. 그림에서 보듯이, L-arginine이 역시 기존의 제품의 열 안정성을 크게 증가시키는 것으로 밝혀졌다. Fig 3-2-7은 Sigma사에서 얻은 crude phytase와 상업적으로 얻은 Gist-brocades와 Novo사의 유전자 재조합 phytase의 열 안정성을, L-arginine이 없을 때, 60도에서 비교한 것이다. 기존의 상업적 액상 phytase는 열 안정화를

위한 제제화를 하여 crude phytase보다 우수한 안정성을 나타내었다. Fig 3-2-5의 결과와 비교하여 볼 때, L-arginine은 crude나 유전자 재조합 phytase에 공통으로 쓰일 수 있는 매우 유망한 안정화제로 생각된다. Fig 3-2-8은 세가지 phytase에 0.75% L-arginine을 첨가하였을 경우의 60도에서 열 안정성을 나타내었다. 이 경우에도 효소의 활성도가 매우 잘 유지되는 것을 알 수 있다. 위에서 언급한 바와 L-arginine은 효소의 열 안정성을 증가시키나 효소의 활성도에는 별 영향이 없어 phytase 효소를 활성화시키는 활성화 첨가제를 찾게 되었다. Fig 3-2-9은 활성화 첨가제로 1% L-arginine의 존재하에 여러 다른 농도의 Ca 이온의 효과를 본 것이다. 칼슘이온의 농도가 1 mM정도에서 가장 우수한 활성도를 가짐을 알 수 있다. 60도에서 10분간 방치하여도 칼슘의 농도 1mM과 안정화제로서의 L-arginine 1% 일 때, 거의 효소 역가의 소실이 없었다. Fig 3-2-10은 L-arginine과 칼슘이온의 상호 작용으로 인한 crude phytase의 60도에서의 안정성을 나타낸 것이다. 효소 활성화제로서 칼슘이온 농도 1 mM과 효소 안정화제로서 L-arginine 1.0 %(w/w)가 가장 좋은 열 안정성을 나타낸다. 결론적으로, 본 세부과제에서는 제1차년도에 열 안정성이 매우 안 좋은 액상 crude phytase를 L-arginine과 칼슘이온을 이용한 적절한 제제화로 상당히 안정한 액상 효소제제로 성공적으로 개발할 수 있음을 보여주었다. 기존의 제품에 비하여 별로 뒤지지 않는 안정한 효소제제의 개발은 유전자 조작에 의한 균주의 개발과 발효 및 분리공정을 통한 효소 자체의 대량 생산에 못지 않게 경쟁력이 있는 기술이다. 이는 상온 유통시의 액상 효소의 수명을 연장시켜주고 효소의 역가를 보존함으로써 우수한 환경보존 가축사료 효소제제가 국내에서도 개발될 수 있음을 보여준다.

Table 3-2-1. Phytase production by various fungi in starch and starch-free media.

Varieties		Activity (unit/ml)
<i>A. ficuum</i>	NRRL 3135	3.56
<i>A. niger</i>	NRRL 326	0.05
<i>A. tubingensis</i>	NRRL 4875	0.30
<i>A. niger</i>	NRRL 337	0.05
<i>A. niger</i>	NRRL 372	0.02
<i>A. carbonarius</i>	NRRL 368	0.07
<i>A. niger</i> <i>Vaccinimoneum</i>	NRRL 348	0.07
<i>A. niger</i>	NRRL 330	0.01
<i>A. niger</i>	NRRL 4361	0.02

The organisms were grown for 6 days on starch-free media containing 170 mg/l K_2HPO_4 at 27°C.

Table 3-2-2. Phytase activity 분석조건.

기질의 농도	1.5 mM phytate-Na
반응온도	55℃
Kinetic sampling time	5 and 15 min.
생성물 분석	무기인산, molybdovanadate 방법

Table 3-2-3. 질소원과 탄소원이 phytase 생산과 세포증식에 미치는 영향

Nitrogen source	Carbon source	cell growth (mg-DCW/ml)	Phytase activity (unit/ml)
NaNO ₃	glucose	10.1	3.3
	maltose	8.2	2.0
	sucrose	9.4	2.1
	sorbitol	7.3	1.1
	lactose	1.2	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	glucose	11.3	1.9
	maltose	11.5	0.9
	sucrose	13.6	0.8
	sorbitol	8.6	0.5
	lactose	1.5	0.2

A. ficuum (NRRL3135) 균주를 50 ml배지 (250 ml flask)에서 진탕배양하였다.

배지로는 무전분배지를 사용하였다.

Table 3-2-4. 최적화된 배지조성

성분	조성 (g/l)
Glucose	30.0
Sodium nitrate	8.6
Potassium phosphate-dibasic	0.17
Magnesium sulfate-7H ₂ O	0.5
Ferrous sulfate	0.1
Potassium chloride	0.5

전분배지는 Potassium phosphate-dibasic의 농도가 0.017 g/l이고, 전분의 농도가 6%이다.

● 45°C ■ 55°C ▲ 65°C

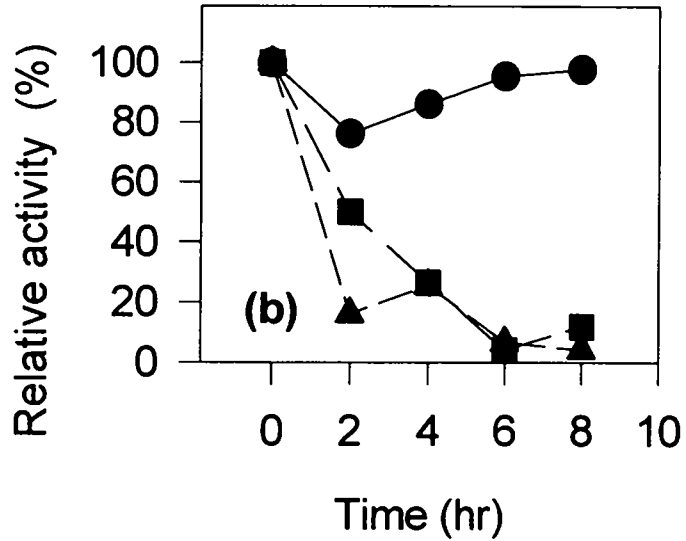
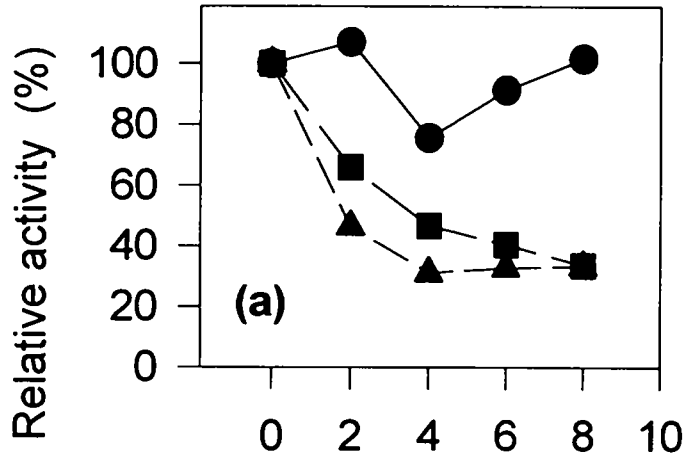


Figure 3-2-1. Phytase의 안정성 비교. (a) 본 연구에서 생산된 효소
(b) Novo L.

Phytase Activity vs. Temperature

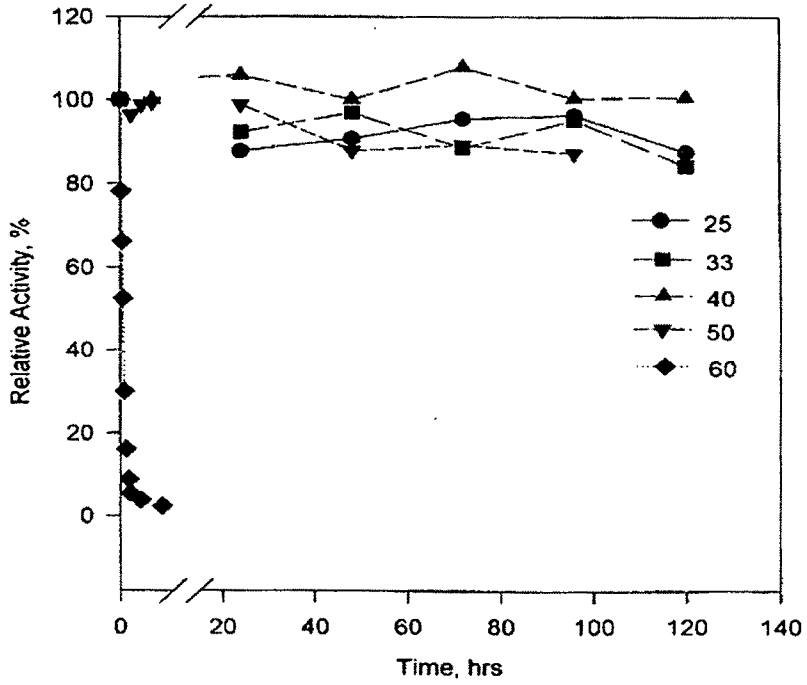


Figure 3-2-2. Phytase vs temperature

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

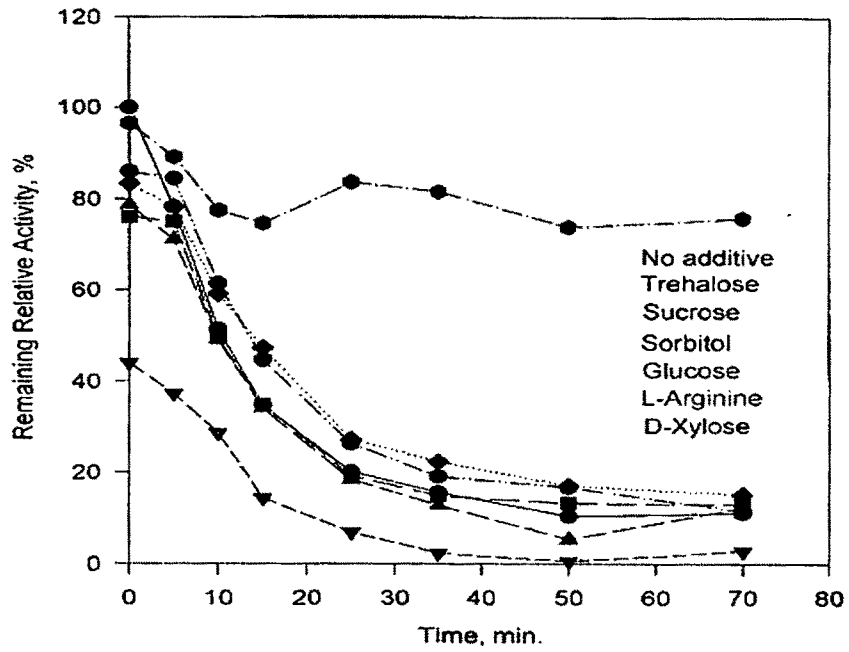


Figure 3-2-3. Additive effect on phytase thermal stability

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

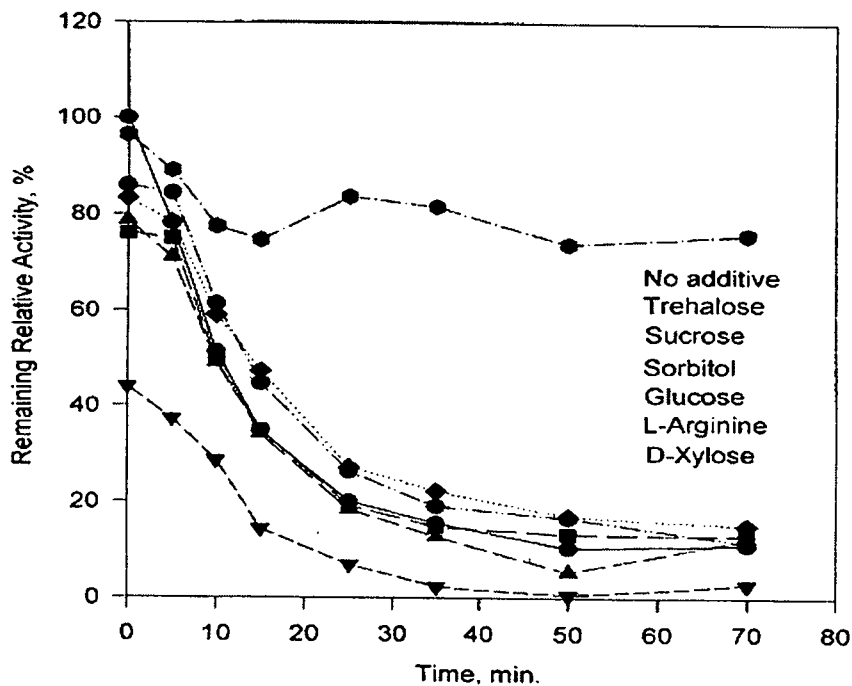


Figure 3-3-4. Effect of arginine on phytase thermal stability

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

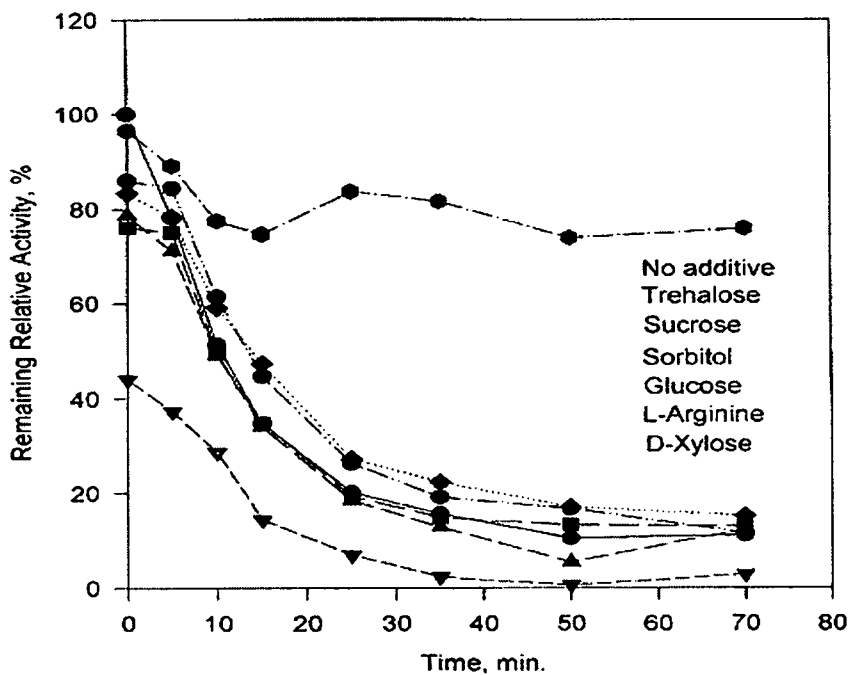


Figure3-2-5. Temperature-activity profile with L-arginine

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

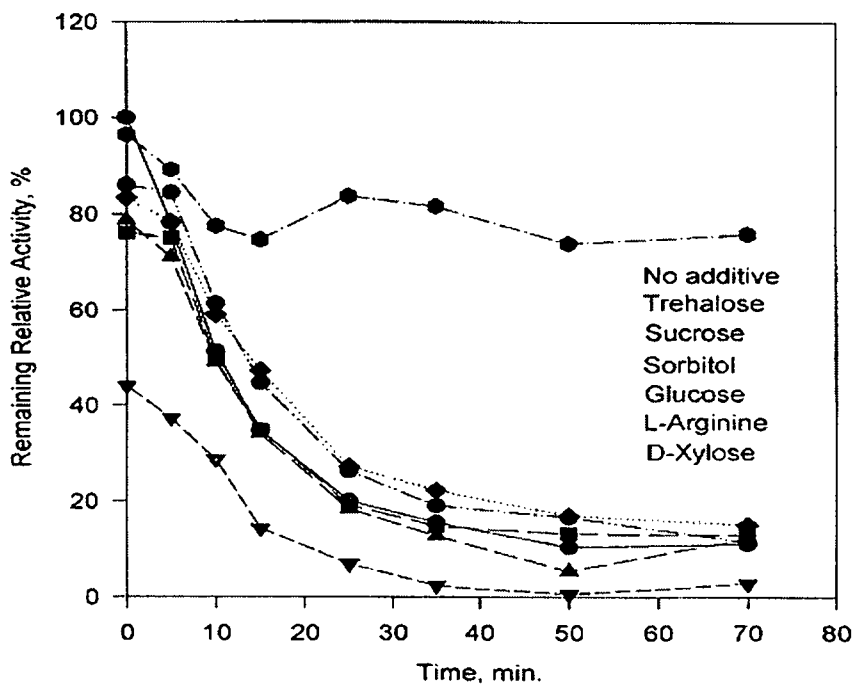


Figure 3-2-6. Effect of l-arginine on Gist-brocades phytase stability

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

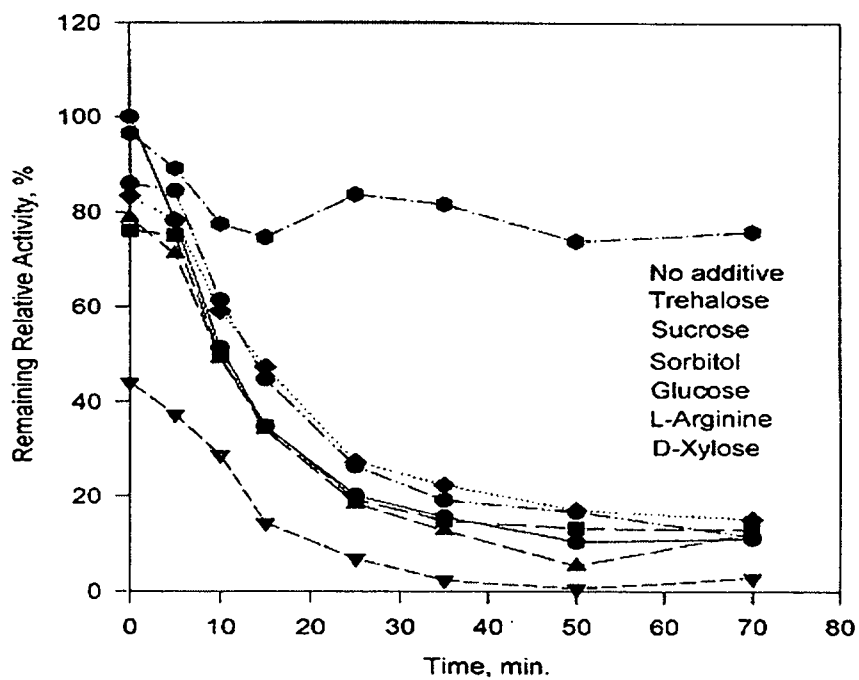


Figure 3-2-7. Phytase stability at 60 degree

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

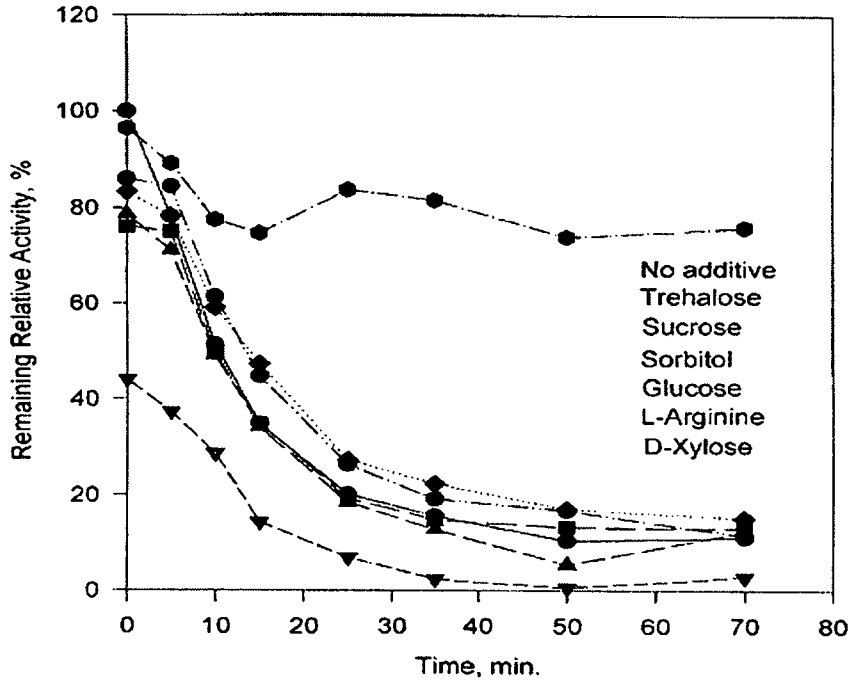


Figure 3-2-8. Phytase stability at 60 degree with 0.75% l-arginine

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

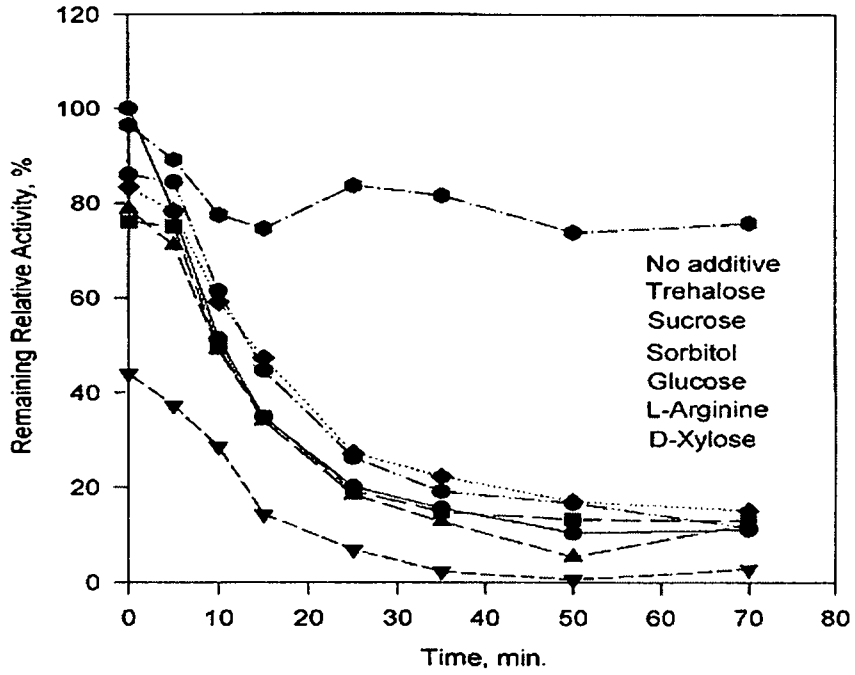


Figure 3-2-9. Effect of calcium conc. on phytase activity

Additive Effect on Phytase Thermal Stability

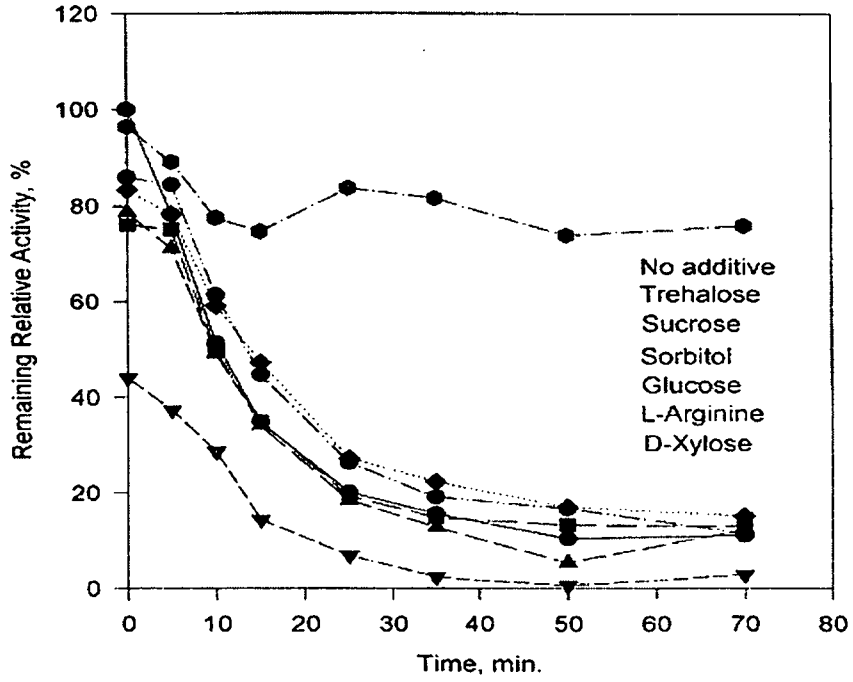


Figure 3-2-10. Effect of calcium concentration on phytase stability as a function of l-arginine concentration

4. 연구개발 목표의 달성도

가. Phytase 생산균주인 *A. niger*, *A. ficuum*, *A. carbonarius* 및 *A. tubingensis* 등을 미국 농무성 연구소 (Southern Regional Research Center)로부터 분양 받아, phytase 생산성을 조사하였다. 그 결과, *A. ficuum* (NRRL3135) 균주로부터 가장 높은 생산성을 얻었다. 또한, 세포증식에 관한 morphology 조사와 배지조성의 최적화에 대한 조사를 수행하였다. 또한, 기종에 사용되었던 배지에 존재하는 전분의 역할을 규명하고, chemically-defined media에 의해 유사한 정도의 phytase 생산을 실현하였다.

나. Sigma에서 crude한 phytase를 얻어서 여러 온도에서의 활성도를 검색하였다. 또한 효소가 변성되는 불활성 온도이상에서의 열에 의한 효소 활성의 감소를 시간에 따라 측정하였다. 이러한 결과를 바탕으로 열에 불안정한 phytase를 안정화시킬 수 있는 여러 안정화제를 첨가하여 효소역가의 소실을 검토하였다. 그 결과 아미노산의 일종인 L-arginine과 칼슘이온이 효소의 안정화에 크게 영향을 미치는 사실을 발견하였으며, crude phytase의 액상 제품을 위한 위 열 안정제 조성물의 가장 적절한 formulation을 시도하였다. 이를 바탕으로, 기존의 상품화된 액상 phytase 제품을 Gistbrocades사와 Novo사로 부터 각각 얻어서 본 연구에서 개발한 안정화된 crude phytase와 열안정성을 비교 분석하였다. 그 결과 60°C에서의 열 안정성이 기존의 제품보다 더 우수하다는 사실을 확인하였다.

제 3 절 Phytase 발효 생산조건의 최적화

1. 연구개발목표

가. Bioreactor에서의 Phytase 생산 조건 연구

- 배양액의 최적 조성조사
- 발효조에서 효소생산

선별된 phytase 생산 균주를 5리터 발효조에서 배양하여 효소 생산 kinetics를 얻고, 유가식 배양에 의해 효소생산의 최적화를 이룬다.

2. 연구수행 방법

가. 균주의 보관

발효의 접종용 seed culture로 사용될 균주는 포자형태로 보관하였다. Yeast-Malt extract-Peptone의 고형배지 20 ml을 100 mm petridish에서 15일간 27℃로 배양하여 포자를 얻었다. 0.01%의 Triton X-100의 용액으로 포자를 수확하여 3×10^6 /ml의 농도로 만들어 stock 용액으로 4℃에서 보관하였다.

나. Seed culture

Seed 용 배지는 표 5와 같이하여 100 ml의 배지를 500 ml-flask에서 멸균하여 2 ml의 포자 stock 용액을 접종하여 5일간 200rpm, 27℃에서 진탕배양하였다.

다. 발효조 배양

발효조는 한국발효기의 5리터 Jar fermentor를 사용하였다. 발효기 운전 조건은 다음과 같았다: 400 rpm turbine impeller, 1 vvm air, 27℃. 발효 부피는 3리터로 하였고, 실리콘 소포제를 사용하여 foaming을 막았다. 발효배지중 인산염과 철염은 따로 멸균. 냉각한 후 Jar에 투입하였다. Seeding 부피는 배지의 5%로 하였다. 샘플은 매일 취하였고, 인산, 포도당, phytase 등의 농도를 측정하였다.

라. 유가식 발효배양

인산농도를 조절하면서 포도당을 주입하는 방법으로 유가식 배양을 수행하였

다. 인산의 농도는 12시간 간격으로 sampling하여 정량한 후, 소모양을 주입하는 방식으로 정하여진 농도를 유지하였다.

마. 인산, 포도당의 분석

인산의 농도는 vanadomolybdophosphoric acid 법을 사용하여 415nm에서 흡광도를 측정함으로써 분석하였다. 표준시약으로 potassium phosphate dibasic을 사용하였다.

포도당은 dinitrosalicylic acid 법을 이용하여 측정하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구수행내용

- 1) 전분이 phytase 의 생산에 미치는 영향 및 원인 조사
- 2) 인산농도 제어에 의한 효소생산성 증가
- 3) 발효조 배양에 의한 효소생산 조사
- 4) 생산된 효소의 특성 조사
- 5) 생산된 효소의 저장성 조사

나. 연구결과

1) 전분에 의한 phytase 생산 증가

배지의 성분으로 전분이 사용되는 이유를 조사하고 이를 효소생산에 이용하고자 하였다. Fig 3-3-1에서 보듯이, 전분이 결핍된 배지에서는 효소의 생산이 거의 없음을 볼 수 있었다. 전분이 효소생산에 미치는 positive effect를 조사하기 위해 두 가지의 측면을 검토하였다. 첫째, 전분의 구성성분인 아밀로펙틴의 6번 탄소에 에스테르 결합된 인산의 방출로 인한 인산 농도의 조절이 있다. 둘째, 전분이 나타내는 점성으로 인한 분산효과에 의한 균의 펠렛화를 방지하여 물질전달을 증가시키는 효과가 있다.

전분 배지에서 인산의 농도는 효소생산에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다 (Fig 3-3-2A). 그러나, 무전분배지에서는 인산의 농도가 phytase 생산에 제한인자로 작용하여 170 mg/l의 인산염 농도에서 최대 효소생산을 보여주었다 (Fig 3-3-2B). 인산은 과다첨가시 효소생산에 저해작용을 하는 것으로 나타

났다 (Fig 3-3-2A와 B). 이는 인산이 feedback regulation을 하는 것으로 생각된다. 또한, 무전분배지에 170 mg/l의 인산염 농도에서 효소생산량은 잔분배지에 비교할 만하였다.

전분의 다른 역할인 분산효과를 조사하기 위해 대조구로 무전분, 알진산 및 CMC (carboxymethyl cellulose)를 첨가한 배양을 사용하였다. Fig 3-3-3에서 보듯이, 전분배지에서 세포의 분산이 잘 이루어진 것을 볼 수 있었다. Negative control 인 무전분배지에서는 세포의 pellet이 5mm 내외의 크기로 형성되었다. 알진산 및 CMC 가 첨가된 배지에서는 cell pellet이 작게 분산된 형태로 배양되었다. Cell pellet에 따른 효소생산이 Fig 3-3-4에 비교되어 있다. 무전분배지에 비하여 전분배지에서 효소생산이 92% 높았다. 또한, 다른 분산제의 경우도 무전분배지에 비하여 높은 효소생산을 보였다. 이는 분산제에 의한 cell pellet 크기의 감소로 물질전달이 증가한 결과로 여겨진다.

2) 인산농도 제어에 의한 효소생산성 증가

전분배지에서는 인산의 농도가, Fig 3-3-5에서 보듯이, 15-20 mg-K₂HPO₄/l로 유지되는 것이 측정되었다. 그러나, 무전분배지의 인산농도는 5일동안에 거의 고갈되는 것이 관찰되었다 (Fig 3-3-6). 또한, phytase 생산은 발효의 후반부에 주로 이루어지는 것으로 나타났다. 적정인산 농도를 찾기 위해 진탕배양을 수행하였다. 인산의 농도를 0.1-0.55 mM 사이의 여러 농도로 제어하면서 발효하였다. 인산제어는 12시간 간격으로 off-line sampling에 의해 측정후 potassium phosphate-dibasic을 주입하는 방식으로 8일간 배양하였다. 그림 7에 인산의 주입도가 보여져 있다. Fig 3-3-8에 phytase 생산의 경시적 변화가 보여져 있다 (Fig 3-3-7의 계획에 따라 주입). 효소생산은 40 mg/l로 조절하였을 때 최대를 보였다. 이같은 결과는 phytase 생산이 인산에 의해 regulation을 받는 것을 보여주는 것이다. 또한, 효소의 생산에 인산조절이 중요한 전략임을 말하여 준다. 40 mg/l의 인산염농도가 최적이지만 실제 조절되는 농도는 중간정도일 것으로 생각된다 (off-line control이므로).

3) 발효조 배양에 의한 효소생산 조사

인산농도의 제어 및 포도당의 유가식 배양에 의한 생산성 향상을 조사하

였다. 발효조는 5리터 부피의 교반식발효조를 사용하였고, 운전부피는 3리터로 하였다. 인산 및 포도당의 농도는 24시간 간격으로 측정하였다 (Fig 3-3-9). 대조구는 포도당 유가식 배양이었다. Fig 3-3-10에서 보듯이, 포도당만 유가식배양한 경우는 20 unit/ml이었고, 인산과 포도당을 동시에 조절하였을 때 13일간에 33 unit/ml의 phytase 생산을 얻었다. 이는 50% 정도 증가된 생산 수율이다 (Fig 3-3-10). Fig 3-3-11에 교반식 발효조와 flask에서 배양된 세포의 morphology를 보여 주고 있다. 교반식 발효조에서는 전분의 첨가 없이 세포의 분산이 매우 잘된 것을 알수 있었다. 이는 flask에 비하여 발효조내에 전단응력이 더 크므로 분산효과가 상대적으로 좋기 때문으로 여겨진다.

4) 생산된 효소의 특성 조사

본 과제에서 생산된 효소의 특성을 발표된 특성 및 상업용 효소의 특성과 비교하였다. NOVO사의 phytase의 K_m 은 4.7mM이었고, 생산된 효소의 K_m 은 0.88 mM 이었다. 사용된 기질은 phytate (wheat)이었다 (Fig 3-3-12). K_m 값이 적은 효소가 기질에 대한 친화력이 좋은 것을 감안하면, 생산된 효소가 저농도의 기질에서도 반응성이 좋을 것으로 기대된다.

온도에 대한 영향을 조사하기 위해 활성화 에너지를 계산하였다. Fig 3-3-13에서 보듯이 두 효소에 대하여 비슷한 활성화에너지 값이 구해졌다.

5) 생산된 효소의 저장성 조사

Fig 3-3-14에 보듯이, 생산된 phytase 는 상당히 안정하여 4°C에서도 1주일간 활성에 변화가 없었다. 냉동건조한 시료의 활성은 25% 정도 감소하는 것으로 나타났다.

6) 샘플 제공

2세부과제의 사료사양 시험을 위한 시료를 20리터 제조하였다. 제조된 시료의 phytase 활성이 24 unit/ml 이었다.

Table 3-3-1. Phytase 생산 배지조성

성분	조성 (g/l)
Glucose	30.0
Sodium nitrate	8.6
Potassium phosphate-dibasic	0.17
Magnesium sulfate-7H ₂ O	0.5
Ferrous sulfate	0.1
Potassium chloride	0.5

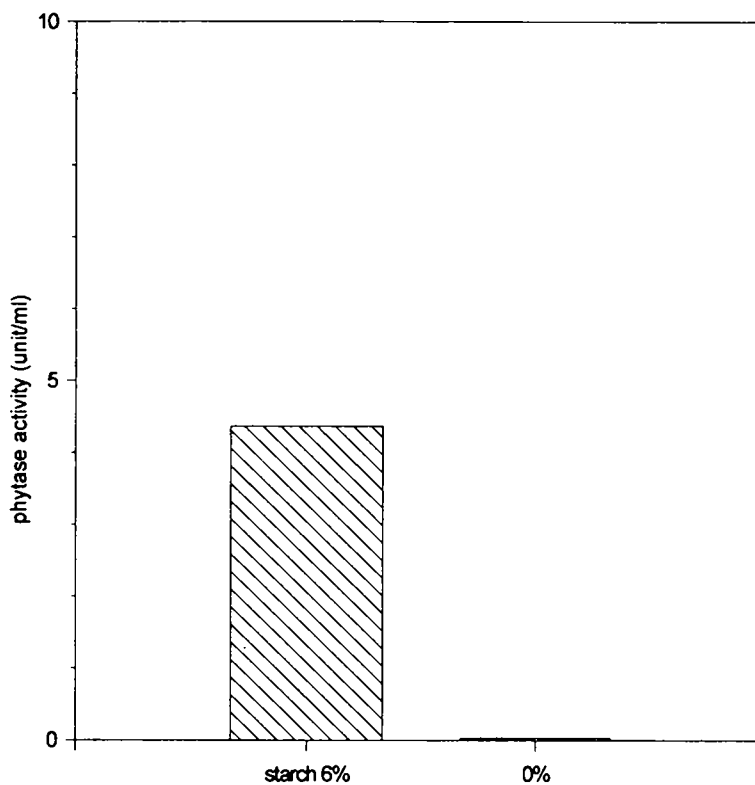


Fig. 3-3-11. Effect of starch (Hylonstarch 5) on phytase production. Basal medium composition is described in Table 1 except phosphate concentration (17 mg- K_2HPO_4/L). Fermentations were conducted in 500 ml-flask containing 100 ml medium. Culture without starch showed little production of the enzyme.

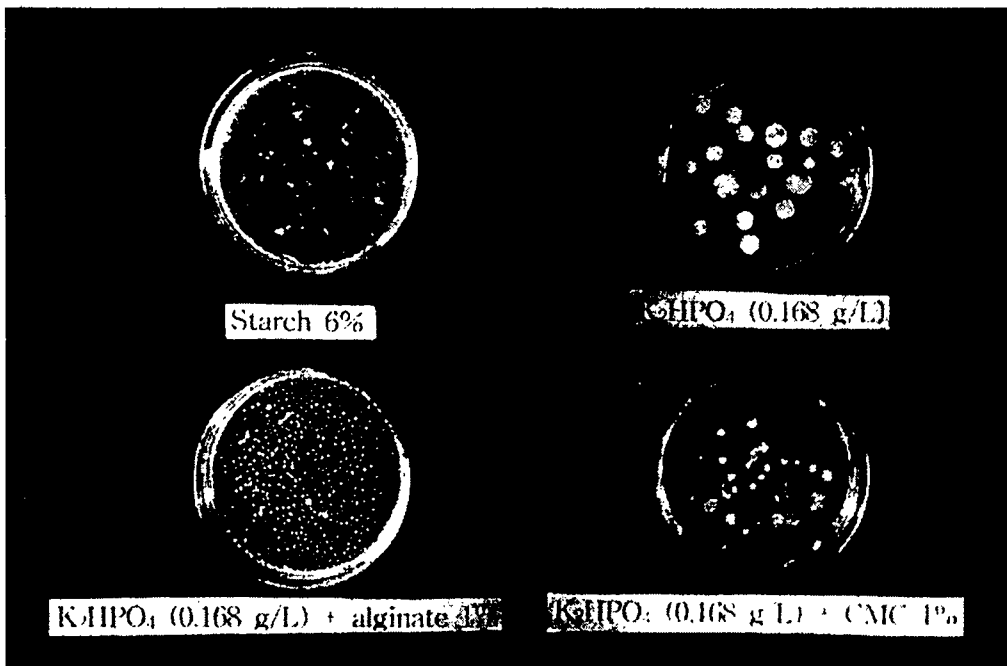


Fig 3-3-2 Photographs of cell pellets cultured in various media.

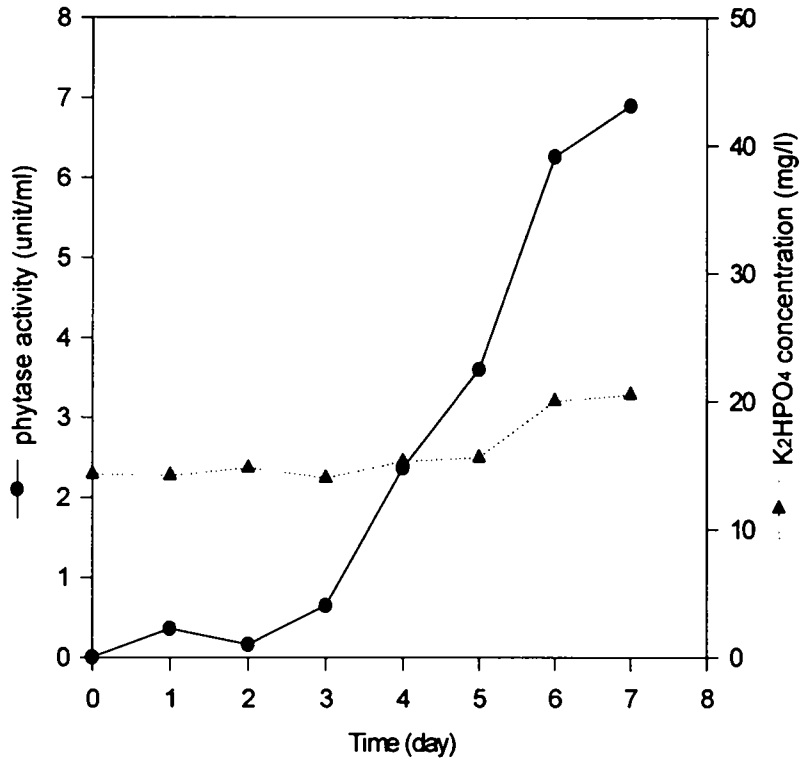


Fig 3-3-3 Time course behavior of phosphate concentration in starch-supplemented fermentation. Phosphate concentration was maintained at about 20 mg/l.

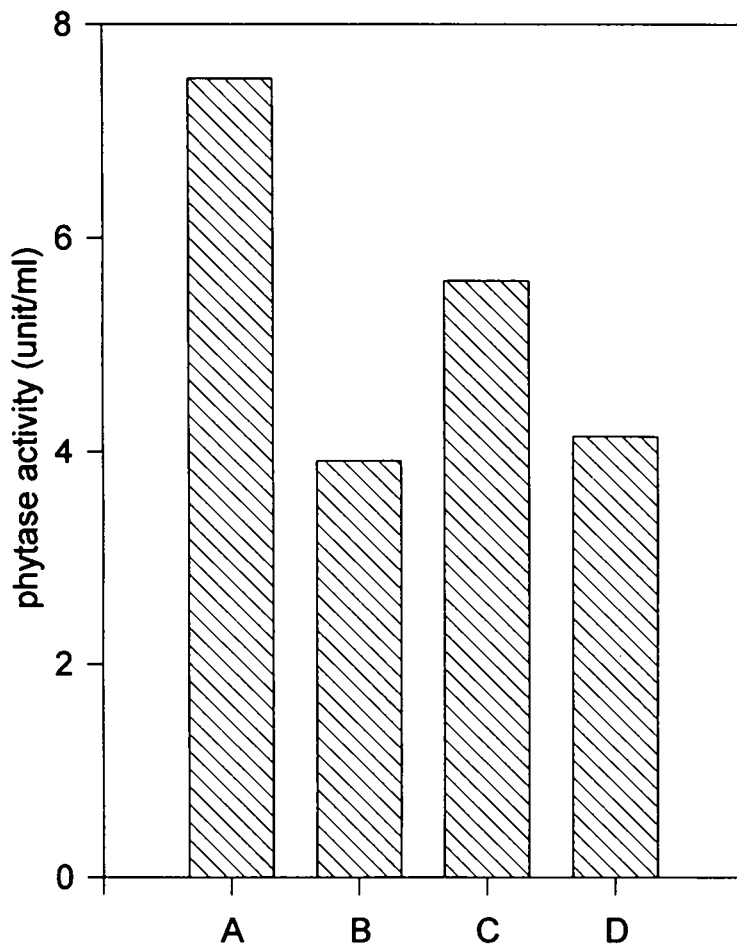


Fig 3-3-4 Effect of starch on phytase production in comparison to various water-soluble polymers. A: Hylonstarch 5 (6%), B: KH_2PO_4 (170 mg/L), C: alginate (1%) + KH_2PO_4 (170 mg/L), and D: CMC (1%) + KH_2PO_4 (170 mg/L).

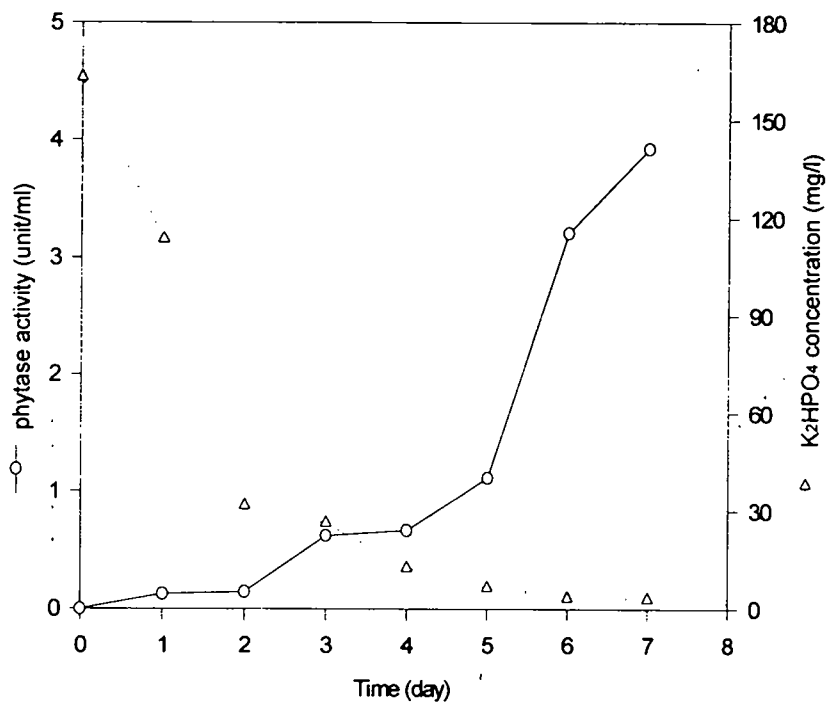


Fig 3-3-5 Kinetics of phosphate concentration in starch-free media. Compared to starch-supplemented media, phosphate concentration gradually decreases during the culture and less phytase titre was obtained.

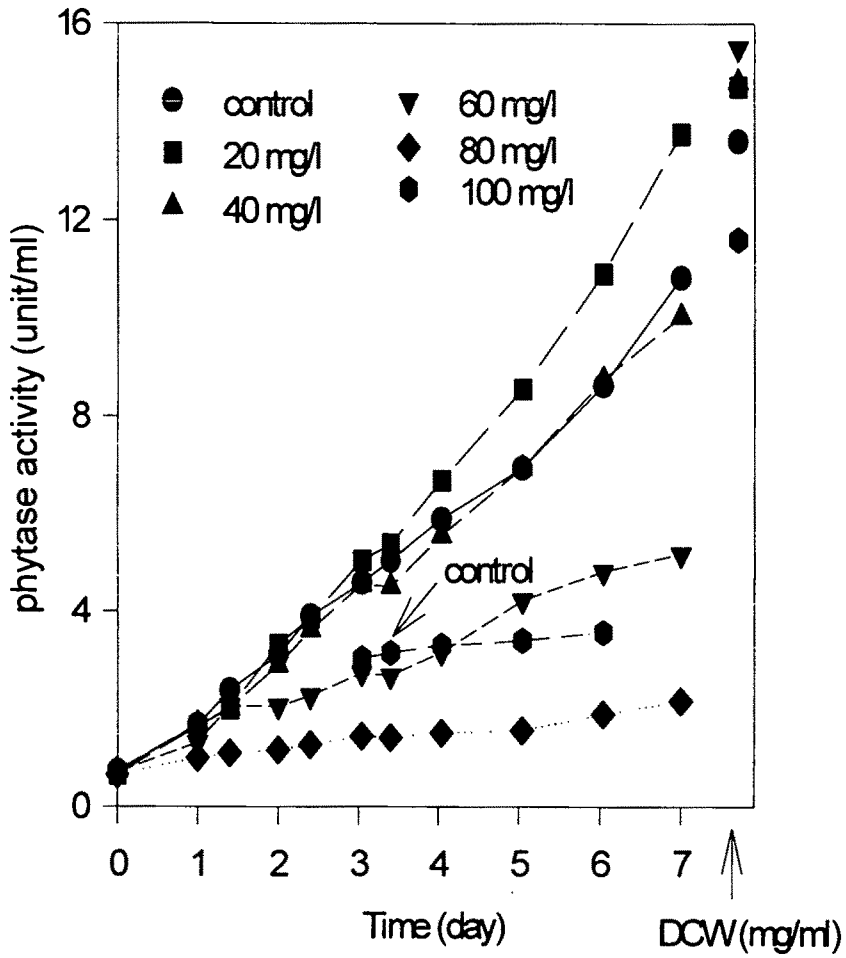


Fig 3-3-6 Phytase production in phosphate-controlled fermentation. Cultures were performed in 500 ml-flask. Phosphate was measured and controlled according to Figure 7. Highest phytase production was observed at 40 mg/l.

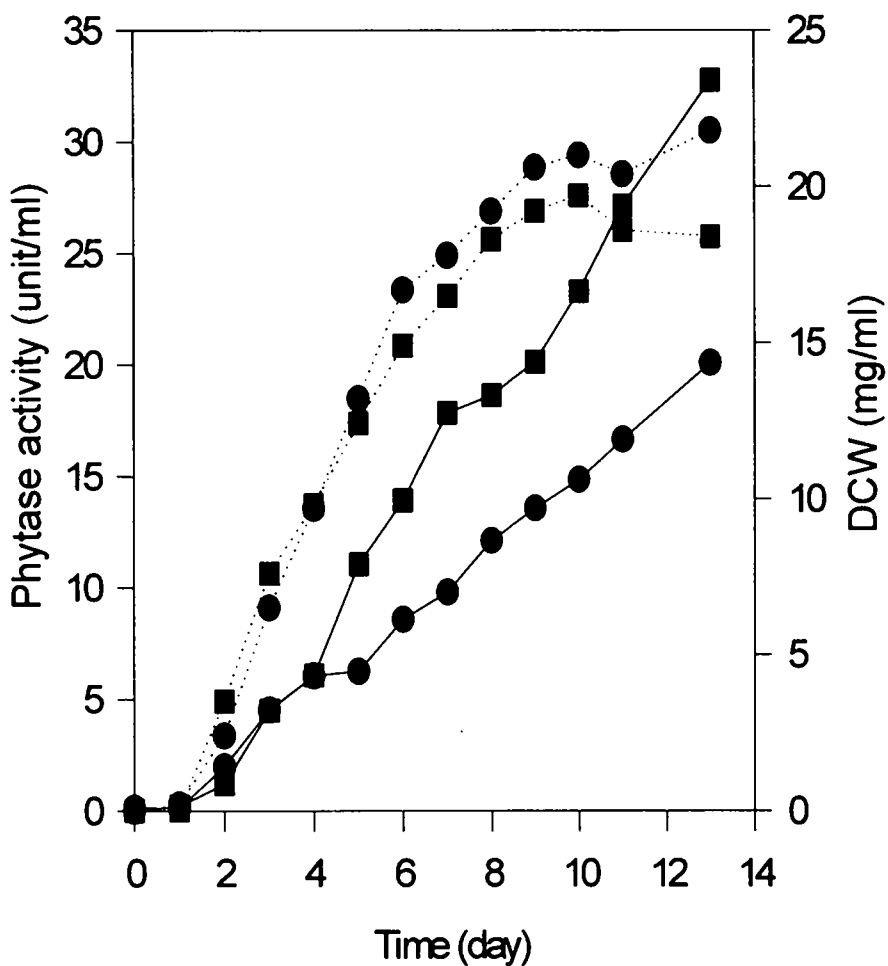


Fig 3-3-7 Phytase production in 3-L fermentor. Phosphate and glucose were controlled according to Figure 9. ●: glucose controlled, ■: glucose and phosphate-controlled fermentation. Solid lines stand for phytase concentration and broken lines for DCW.

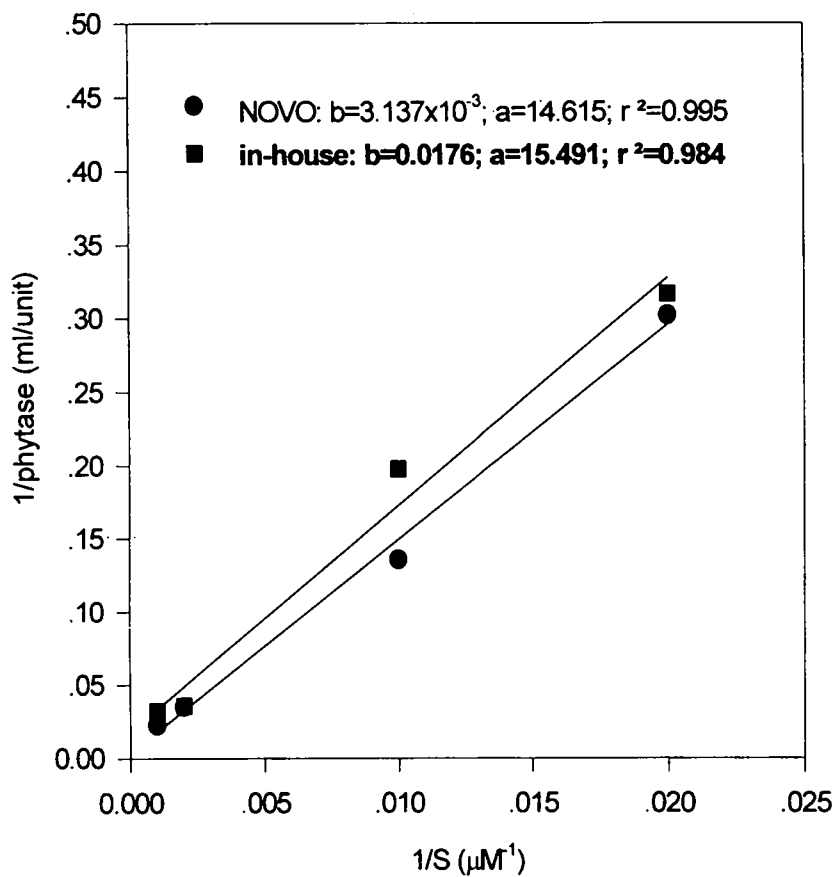


Fig 3-3-8 Lineweaver-Bulk plot for phytase from NOVO and the produced one
 K_m for NOVO and the produced are 4658.9 μM and 880.2 μM , respectively.

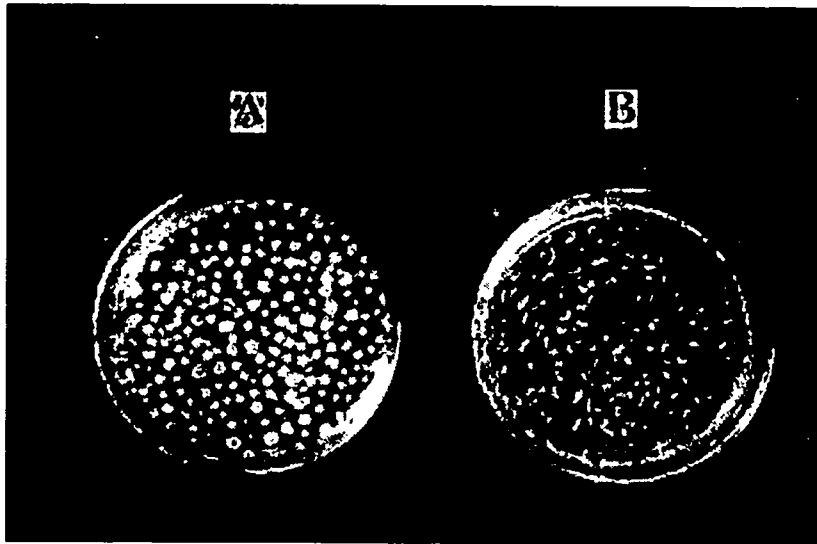


Fig 3-3-9 Photographs of pellets cultured in flask (A) and agitated fermentor (B). In fermentor pellets were dispersed to small size.

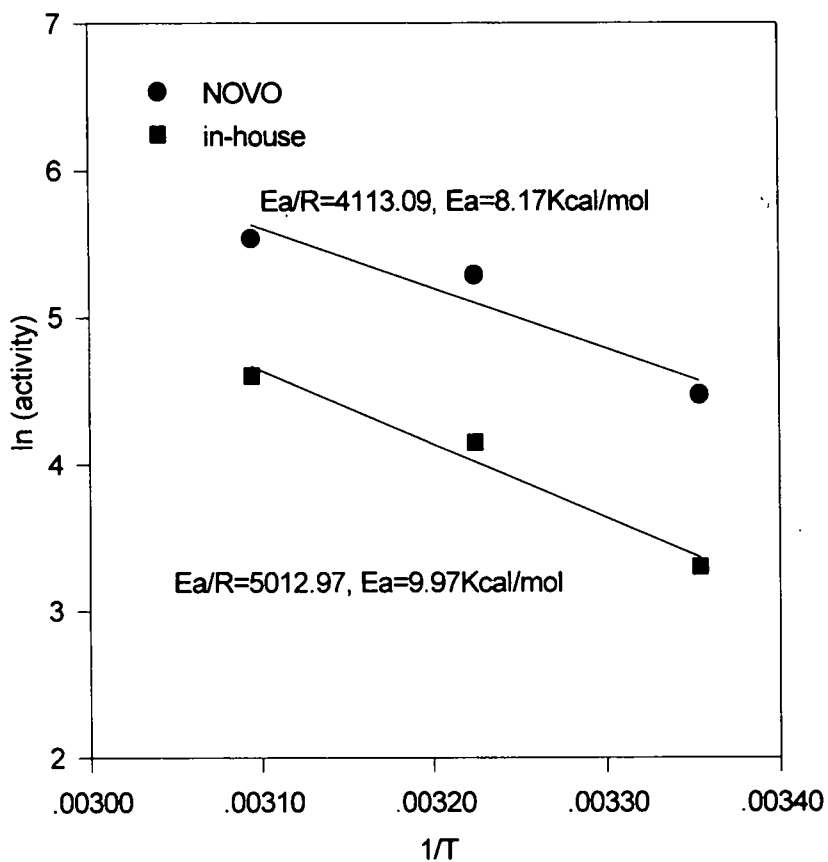


Fig 3-3-10 Effect of temperature on phytase activity. Data are presented according to Arrhenius plot. Activation energies of NOVO and the produced are 8.17 Kcal /mol and 9.97 Kcal/mol, respectively.

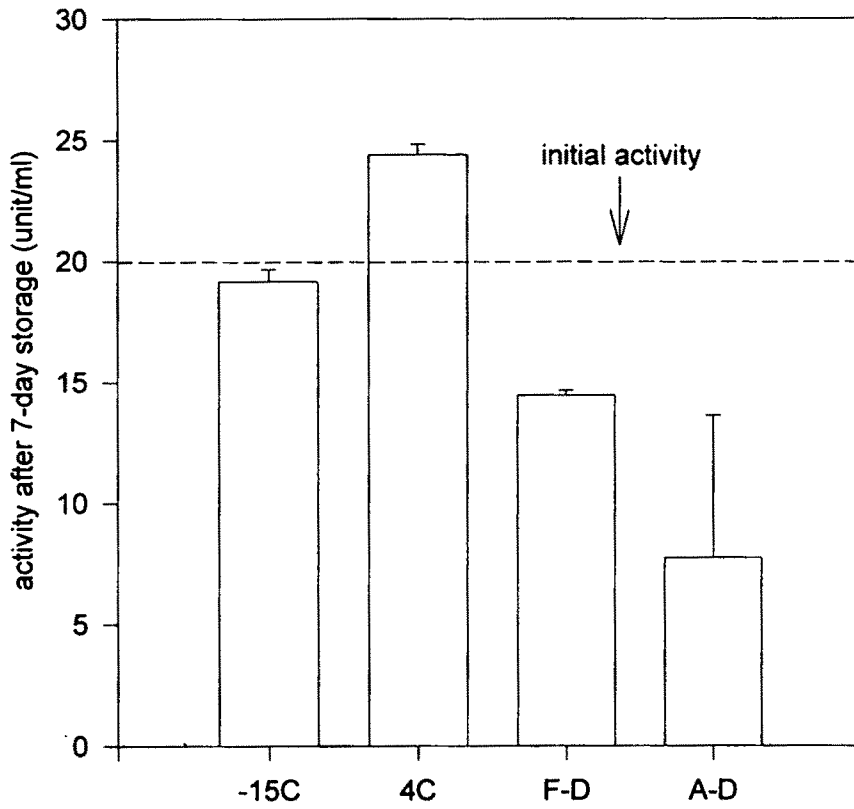


Fig 3-3-11 Effect of storage method on the activity of the produced phytase. -15C stored at -15°C, 4C: stored at 4°C, F-D: freeze-dried, A-D: air-dried.

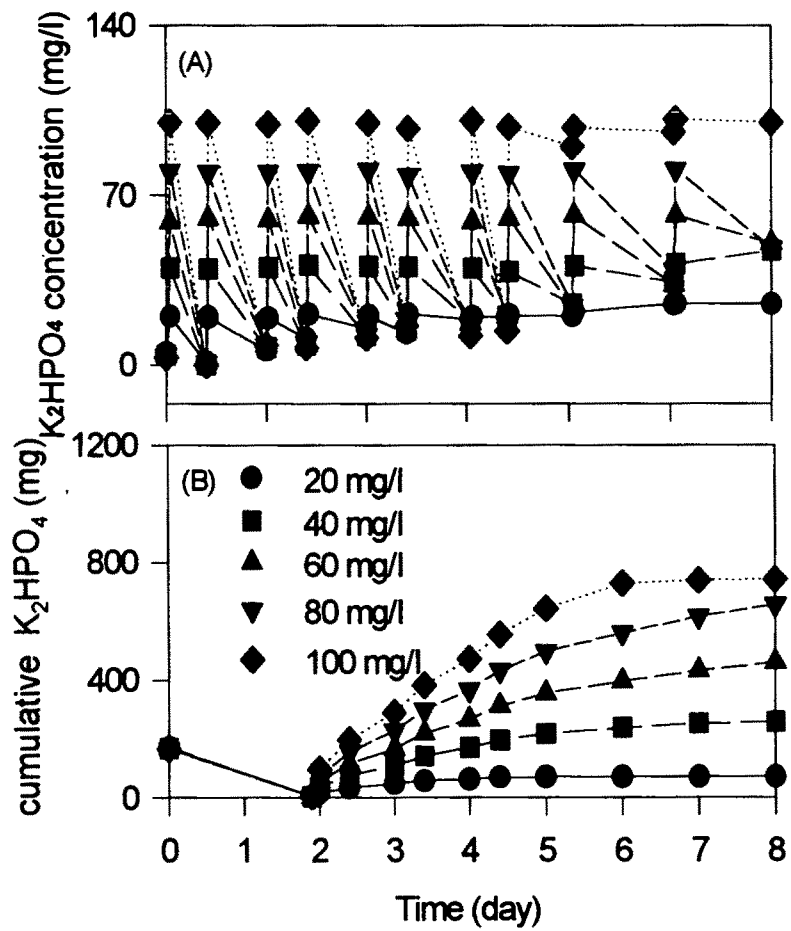


Fig 3-3-12. Kinetics of phosphate concentrations that were controlled at specified level. (A) Phosphate concentration and (B) cumulative amount of phosphate.

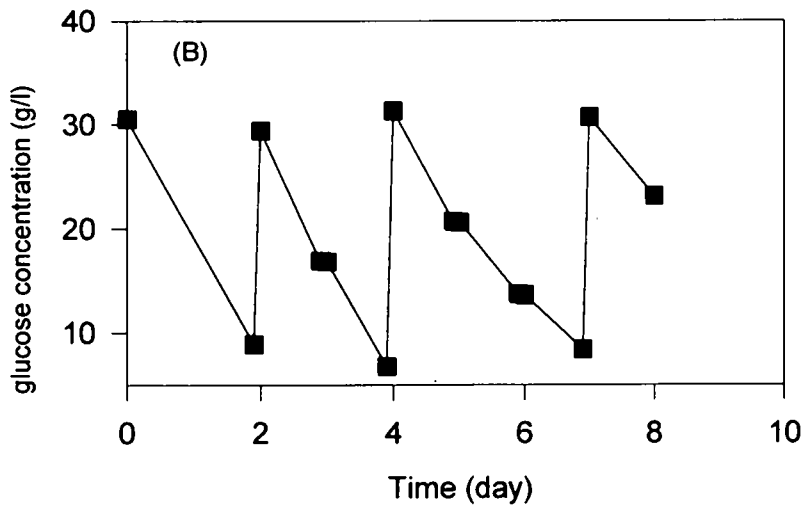
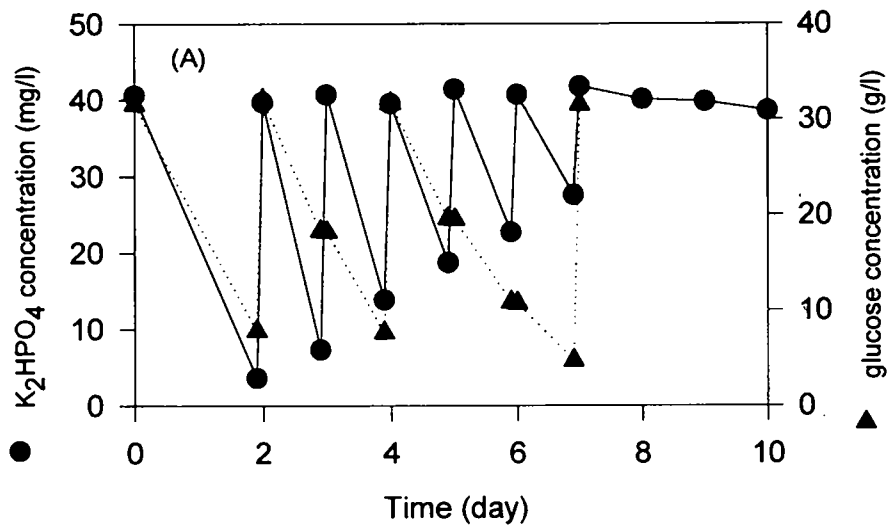


Fig 3-3-13 Feeding schedule of phosphate- and (or) glucose-controlled fermentation. (A) Phosphate- and glucose-controlled fermentation, and (B) glucose-controlled fermentation. Both substrates were controlled by off-line monitoring.

4. 연구개발 목표의 달성도

유가식 배양을 위해 인산이 효소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 배지에 존재하는 전분이 효소 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 생물반응기에서의 생산성 향상을 위한 유가식 배양법을 개발하였고, 이를 이용한 5리터 스케일에서 phytase를 발효생산하였다. 또한, 생산된 phytase를 2세부과제에 공급하기 위해 20리터 발효를 수행하였다.

Phytase의 생물배양기에서 production kinetics를 조사하였다. 배양조건을 최적화하기 위해 배지내의 carbon, 및 phosphate원의 유가식 배양을 수행하였다. 인산 및 포도당의 조절에 의해 phytase 생산이 대조구들에 비하여 3-4배의 생산성 증가가 있었다. 생산된 phytase의 저장성을 시험하기 위해 동결건조 후의 효소의 활성을 조사하였다. 그림 2에서 보듯이 1주일간 냉동 (-15°C)에서 보관한 경우는 처음의 활성을 유지하고 있었다. 그러나, 동결건조와 공기건조 후의 활성은 각각 72%, 39%를 회복하였다. 오히려 4°C 냉장보관한 경우는 활성이 22% 정도 증가를 하였다. 또한, 생산된 효소의 특성을 일부 확인하였다.

제4절 발효 생산된 파이테이즈의 제제화

1. 연구개발목표

- 가. 생산된 효소의 제제화.
- 나. 2세부과제에 시료를 제공.

2. 연구수행 방법

가. 효소의 생산

Phytase의 대량생산을 위해 200 리터 발효조를 사용하여 100-150 리터의 working volume에서 균을 배양하였다. 배지는 glucose 30 g/l, sodium nitrate 8.6 g/l, potassium phosphate-diabasic 0.17 g/l, Magnesium sulfate-7H₂O 0.5 g/l, Ferrous sulfate 0.1 g/l, Potassium chloride 0.5 g/l를 1리터에 용해하여 준비되었다. 배지는 121℃에서 45분간 멸균을 수행하였다. 4%의 농도 (5일간 배양)로 접종되었고, 28℃에서 12일간 유가식 배양을 수행하였다. 2절에서 언급된 인산제어 방식에 의해 인산농도를 20 mg-K₂HPO₄의 농도로 유지하면서 발효를 수행하였다. 소포제로는 실리콘계 소포제를 사용하였고, 공기는 0.7 vvm으로 sparger를 통해 주입하였다.

나. 발효액의 농축

세포를 제거하기 위해 여과보조제로 규조토를 사용하였다 (1% 규조토). 규조토가 혼합된 발효액을 규조토로 pre-coating 된 여과지를 통해 진공여과하였다. 통상적으로 80% 정도의 상등액을 회수하였다. 회수된 발효액은 ultrafiltration을 통해 11 배 농축되었다. Millipore사의 Pellicon system을 사용하였고, molecular cutoff는 30K 이었다. 농축과정은 효소불활성화를 최소화하기 위해 4℃에서 수행하였다.

다. 동결 건조

농축된 발효액은 -70℃에서 동결시킨 후, 동결건조기 (Eylar)를 사용하여 분말화시켰다.

라. Spray-drying

여과에 의해 세포가 제거된 회수 발효액을 실험실용 스프레이 건조기에 의해 건조시켰다. 효소 안정화를 위한 filler의 첨가는 건조 전에 일정량을 발효액과 혼합하였고, 건조 중 균일한 혼합을 위해 교반을 하였다.

마. 황산암모늄 침전

회수된 발효액을 4℃에서 일정량의 분말화된 황산암모늄과 서서히 혼합시킨 후 1시간 동안 교반하여 침전을 유도하였다. 침전된 효소는 Beckmann 고속원심 분리기로 3000 rpm에서 침전회수하였다. 20 ml로부터 회수된 효소는 1 ml의 phosphate saline solution에 용해하여 활성을 측정하여 회수율을 결정하였다.

바. 균체의 회수 및 동결건조

원심분리법에 의해 분리된 균체를 동결하였다.

3. 연구내용 및 결과

가. 연구내용

*A. ficuum*의 배양액 및 균체를 제제화하였다. 동결건조 및 열건조법에 의해 수행하였고, 아래와 같은 조건을 조사하여 효소 활성을 최적화하고, 2세부과제에 시료를 제공하였다.

- 1) 동결 건조시 부용제 (효소안정제)의 종류 (아미노산, 칼슘이온)를조사 하였다.
- 2) 열건조시 안정제로서 사료의 성분을 이용하여 안정화시키고자, 사료성분 중의 고체담체에 흡착시켜 안정화를 유도하고자 하였다.

나. 연구결과

1) 효소 안정제가 효소활성에 미치는 영향

*Asp. ficuum*의 배양액 및 균체를 건조된 상태로 생균제제화 하였다. 100 리터의 발효에서 인산염의 제어에 의해 생산된 발효액으로부터 균체 및 효소액을 확보하였다. Spray-drying에 의한 효소의 건조조건을 최적화하기 위해 첨가제 (안

정제)에 대한 효과를 조사하였다. Fig 3-4-2에서 보듯이, 기존에 알려진 phytase 안정제인 arginine 및 Ca^{++} 에 의해 오히려 활성이 낮아지는 것이 관찰되었다. 이는 crude한 발효액에 존재하는 염이 spray-dry시에 농축되어 효소의 불활성화가 야기되는 것으로 여겨진다. Table 3-4-1에 효소활성의 손실율이 보여져 있다. 발효 원액을 건조한 것이 활성이 제일 높은 것으로 측정되어 있다.

2) Filler에 의한 효소 안정화

대두박은 단백질 및 당성분이 많으므로 효소의 안정화 및 효소의 가공시 filler로 이용될 수 있다. Fig 3-4-3에 대두박의 농도에 따른 건조 효소의 활성을 조사하였다. Filler를 사용하지 않은 경우의 효소활성이 제일 높은 것으로 나타났다. 이는 대두박에 존재하는 단백질 혹은 저분자 물질이 phytase의 활성을 저해하는 것으로 사려되었다.

3) Phytase 제조를 위한 downstream : 여과, 농축 및 동결건조

200리터 발효조에서 working volume을 100리터로 하여 phytase를 생산하였다. 1,2차년도에 개발된 배지와 유가식배양 (인산과 포도당의 첨가)에 의해 12일간 배양하고, Fig 3-4-4의 방식에 의해 여과, 농축 및 동결건조를 하였다. 발효 후 회수된 여과액은 80-110 리터이었다 (균체 부피에 의한 손실은 20% 정도).

4) 동결 건조에 의한 효소 및 균체의 제제화

100리터 발효조에서 생산된 phytase의 동결건조 시 효소활성을 조사하였다. 또한, 규조토 여과된 균체에 존재하는 잔존 활성의 양 (18.1 unit/g-dry mass, 동결건조효소의 4.0%에 해당함)을 확인하였다. Table 3-4-2,3에서 보듯이 농축 및 동결 건조에 의한 효소활성의 변화는 미미한 것으로 나타났고, 균체여과에 의해 손실되는 효소 역가는 무시할 수 있는 것으로 조사되었다. 그러나, 균체의 부피가 전체부피의 약 30%에 달하므로 전체 생산된 효소활성의 30% 정도가 여과시 손실되는 것으로 조사되었다. 또한, 동결건조에 의해 약간의 효소활성 증가가 관찰되었는데 이는 건조시 효소단백질의 변성에 기인하거나, 측정오차일 것

으로 생각된다.

5) 침전법에 의한 효소회수

배양액 중에 녹아 있는 파이테이즈 효소를 황산암모늄 침전법에 의해 회수하였다.

그림 28에서 보듯이, 효소의 회수는 황산암모늄의 농도에 따라 증가하는 양상을 보였고, 포화 황산암모늄용액에서 침전/회수된 효소의 회수율은 68% 정도가 되었다.

Table 3-4-1. Spray-drying에 의한 phytase 활성의 손실.
Arginine 및 calcium ion에 의한 안정화 효과.

첨가제	Activity loss after spray-drying (%)
ARG* 10mg	62.1
ARG 100mg	37.2
ARG 1000mg	22.8
Control	11.5
Ca ⁺⁺ 0.1mM	30.6
Ca ⁺⁺ 1mM	29.3
ARG 500mg + Ca ⁺⁺ 0.1mM	29.1

* arginine은 100ml의 액체 발효액에 첨가한 양이다.

Table 3-4-2. 규조토 여과 및 농축시 phytase 효소 역가의 변화

공정	Activity (%)*
발효원액 (Broth)	100
규조토여과액	104
11배 농축 (retentate)	1390
농축 permeate	0.3~1.1

* 발효액 중의 역가를 100%로 정하고 상대 역가를 백분율로 나타내었다.

Table 3-4-3. 농축효소와 동결건조효소의 활성 비교

공정	Activity (%)*
11배 농축효소액	100
동결건조 효소	113

* 농축액 중의 역가를 100%로 정하고 상대 역가를 백분율로 나타내었다.

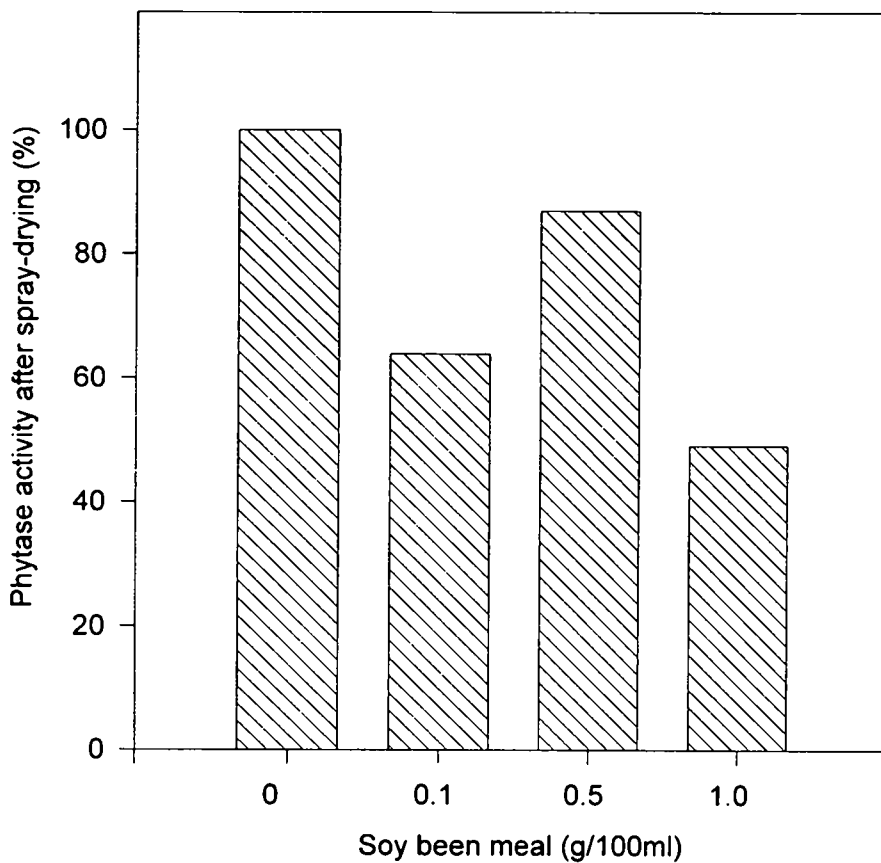


Fig 3-4-1. Effect of soy bean meal as a filler on phytase activity after spray-drying.

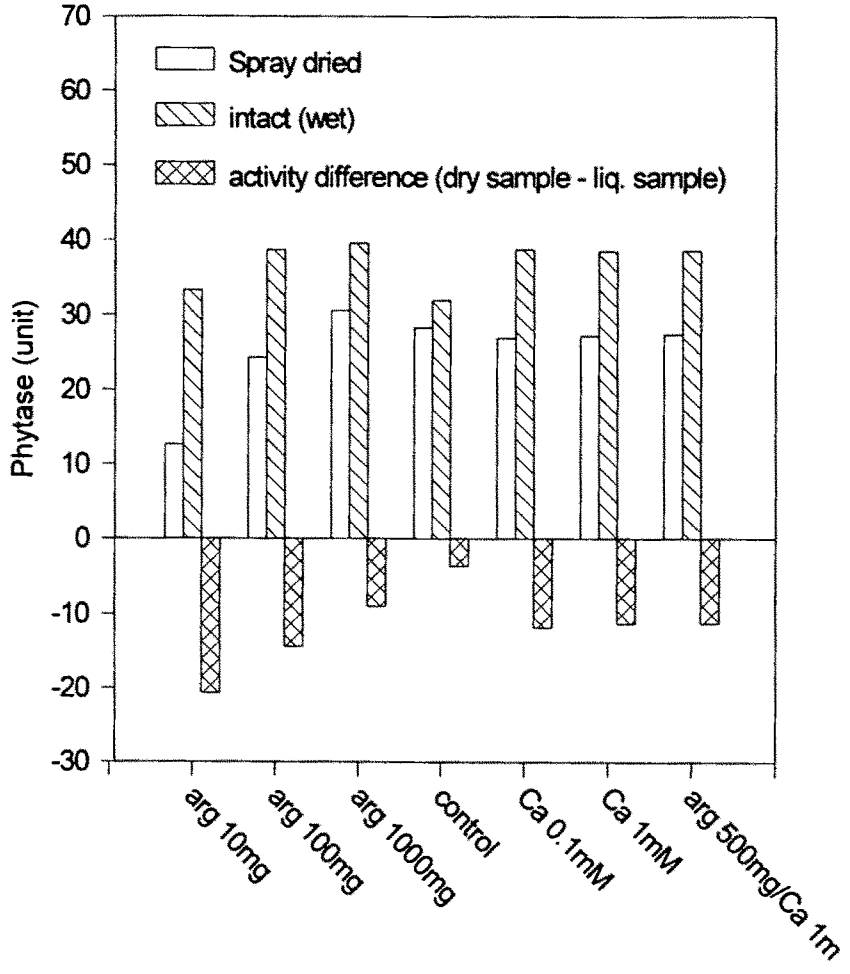


Fig 3-4-2. Effect of arginine (arg) and Ca⁺⁺ on phytase stabilization

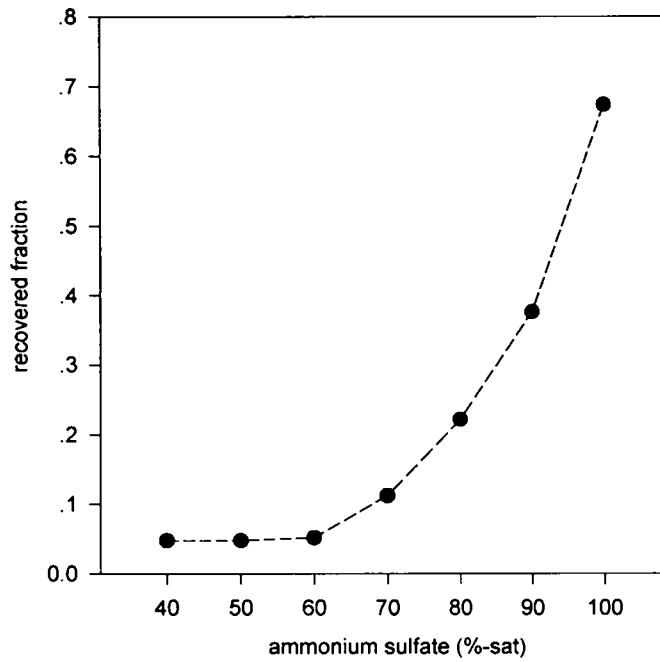


Fig 3-4-3. Recovery of phytase by ammonium sulfate precipitation

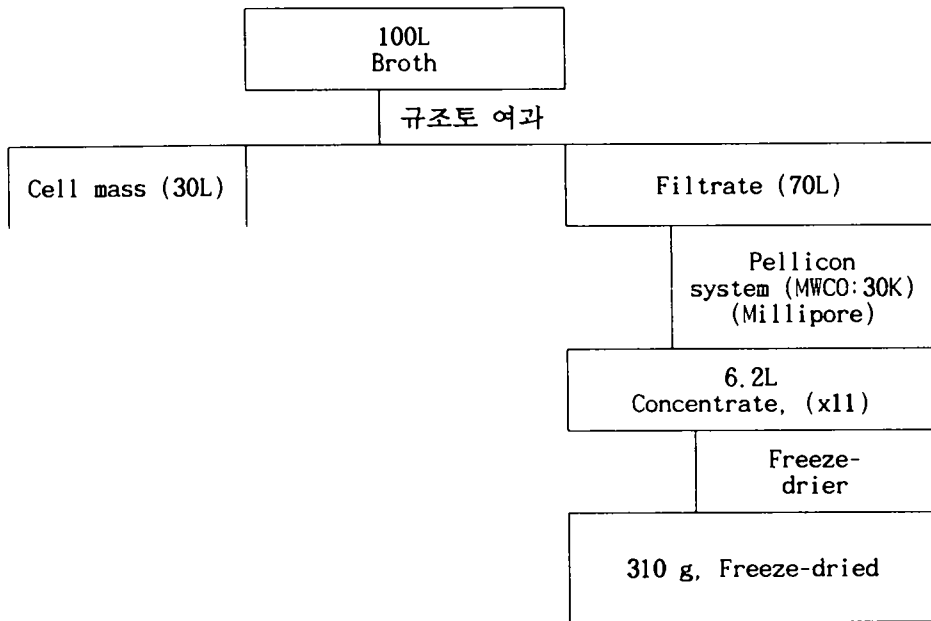


Fig 3-4-4 Preparation of freeze-dried phytase from fermentation broth.

제 5 절 결 론

1. Phytase 효소생산 균주를 선별하여 *Aspergillus ficuum*에서 효소생산량이 최대임을 확인하였다.
2. 균주의 발효조건을 조사하여 배지성분 중의 탄소원, 질소원, 무기염류 등의 종류 및 농도를 최적화하여 배지 조성을 확립하였다.
3. 배지 중의 전분의 역할을 조사하여 유가식 발효법을 확보하였다. 이로부터 효소생산성을 3-4배 증가시켰다.
4. 교반식발효조를 사용하여 발효생산을 하였고, pilot scale (150리터 발효부피/200리터 발효조)에서 효소생산을 수행하였다.
5. 생산효소의 회수를 위해 여과 및 농축공정을 수행하여 효소제 시료를 제조하는 방법을 확보하였다.
6. 효소의 분말화를 위해 건조공정을 수행하였다. 건조시 부용제의 종류 및 함량에 대한 조사를 수행하였다.
7. 효소 회수의 경제성을 높이기 위해 염에 의한 침전법을 조사하였고, 포화 황산암모늄에서 효소회수율 (67%)이 최대가 되었다.

제 4 장 환경친화적 사양전략 개발 분야

제 1 절 서 설

곡류를 포함한 대부분의 식물성 원료들에 함유되어 있는 P는 60% 이상이 phytate phosphorus 형태로 존재하기 때문에 가축에 있어서 그 이용율은 상당히 낮다 (Nelson 등, 1968; Reddy 등, 1982). 이러한 낮은 이용률은 P의 배설량을 증가시켜 환경오염의 주된 원인으로 작용하게 된다. 또한 보리, 밀, 호밀, 귀리 등과 같은 일부 식물성 원료에는 β -glucans, pentosans (arabinoxylans)과 같은 비전분성다당류 (non-starch polysaccharides, NSP)라는 항영양인자들이 함유되어 있는데 이들 물질은 장내의 점조도를 증가시켜 효소의 활성을 떨어뜨리고 여러 가지 영양소의 흡수를 방해하는 것으로 알려져 있다 (Schutte 등, 1993). 그리고 이들 물질들로 인한 sticky droppings의 배설은 환경적인 문제를 야기할 수 있다. 따라서 본 연구는 가금 (육계 및 산란계) 사료에 효소제 (phytase 및 carbohydrases)를 첨가로 P의 이용율 및 여러 가지 영양소이용율에 미치는 효과를 알아보고 식물성 원료에 함유되어 있는 phytate-P 함량 및 phytase activity를 여러 조건하에서 측정하여 가축사료에 보다 효율적인 효소제 사용을 이루기 위하여 실시하였다.

제 2 절 인산수준이 다른 사료에 phytase첨가시 산란율과 계란의 품질 및 인산 배설량에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 실험사료

실험사료는 각 처리의 열량 및 단백질 수준을 동일하게 하여 computer formulation에 의해 작성되었으며, 무기태 P의 공급원으로서 Tricalcium phosphate (TCP)가 실험사료에 사용되었다. 사료내 phytase 첨가효과를 알아보기 위해 인산칼슘의 첨가수준을 NRC (1994) 요구량의 50% 또는 100% 감소시켰으며, 그로인한 부족한 Ca 수준을 석회석으로 대체하였다.

나. 실험설계 및 사양실험

18주령된 ISA brown 산란계 960수를 4처리 12반복 반복당 20수 (cage당 2수)씩 난괴법으로 배치하였다. 각 사료처리구는 T1: 대조구사료 (1.4% 인산칼슘, T2 : 대조구사료 + phytase, T3: 0.7% 인산칼슘 + phytase, 그리고 T4: 0% 인산칼슘 + phytase로 하였고 사료내 phytase 첨가수준은 500 U/사료 kg 으로 하였다.

사양시험은 20주령이 될 때까지 일반 시판용 산란예비사료를 급여하였고 20주령부터 실험사료를 급여하면서 본 실험이 개시되는 21주령이 될 때까지 7일간의 적응기간을 두었다. 실험사료는 mash 형태로 하여 사양시험동안 물과 함께 자유로이 섭취토록 하였다. 계사내부는 적절한 환기를 시켜주었고 점등프로그램은 18주령시 하루 14:30 점등을 시작으로 하여 점중점감법에 의해 16시간이 될 때까지 매주 30분씩 증가시켰다.

다. 난질측정

난수와 계란의 무게는 매일 측정하였고, 사료섭취량은 매주 측정하였다. 난질 및 난각질을 평가하기 위해 각 처리로 부터 매주 25개의 계란을 취하여 비중, 난각강도, 난각두께 그리고 난백고를 측정하였다. 계란의 비중은 1.065에서 1.120까지 0.005씩 증가시킨 소금물을 사용하여 측정하였다. 난각강도는

Texture Test System (T2100C, Food Technology Co., USA)을 사용하였고, Haugh unit 은 dial indicator (AMES, Waltham, Mass., USA) 를 사용하여 측정된 농후 난백의 높이와 계란의 무게로 부터 계산되었다 (Eisen et al., 1962). 난각두께 는 dial pipe gage (Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 둔단부, 예단부 그리고 중간부를 측정하여 평균값을 구하였다.

라. 영양소 이용율, 축적량 및 영양소 배설량

사양실험 종료후 각처리별로 6필씩 취하여 대사케이지에 1수씩 배치하여 3일 간의 적응기간 후 3일 동안 전분채취법으로 분을 회수하였다. 영양소의 생체이용율을 측정하기 위해 사료 및 분의 일반조성분은 AOAC (1990)에 따라 실시하였다. 또한 사료내 Ca, P, Mg, Zn, Fe 및 Cu의 함량을 측정하기 위해 건식법 (AOAC, 1990)으로 전처리하여 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer)를 이용하여 측정하였다.

Table 4-2-1. Formula and composition of experimental diets

Ingredients, %	Treatments ¹			
	T1	T2	T3	T4
Corn	62.20	62.20	62.20	62.30
Soybean meal (CP 44%)	21.00	21.00	21.00	21.00
Limestone	8.55	8.55	9.16	9.76
Rapeseed meal	3.00	3.00	3.00	3.00
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50
Wheat bran	1.53	1.53	1.53	1.53
Tricalcium phosphate (P 18%)	1.40	1.40	0.70	-
Layer premix ¹	0.32	0.32	0.32	0.32
Salt	0.31	0.31	0.31	0.31
DL-Methionine (CP 50%)	0.19	0.19	0.19	0.19
Sand	-	-	0.08	0.19
Phytase ²	-	+	+	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ⁵				
ME, kcal/kg	2750	2750	2750	2750
CP, %	16.0	16.0	16.0	16.0
Lysine, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Met+Cys, %	0.61	0.61	0.61	0.61
Ca, %	3.75	3.75	3.75	3.75
P-available, %	0.37	0.37	0.24	0.12
P-total, %	0.61	0.61	0.49	0.37

¹ Provides per kg of diet: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D₃, 2,000 IU; vitamin E, 0.25 IU; vitamin K₃, 2 mg; vitamin B₁, 2 mg; vitamin B₂, 6 mg; vitamin B₆, 3 mg; vitamin B₁₂, 10 µg; niacin, 30 mg; pantothenic acid, 10 mg; folic acid, 1 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 40 mg; Fe, 60 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.2 mg.

² Natuphos[®]: product of BASF.

³ Calculated values.

⁴ T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

2. 결 과

40주 동안의 사양시험결과 산란계의 생산성 및 난질의 측정 결과는 Table 4-2-2, 3과 같다. 일계산란율이나 총산란율에 있어서 T2구가 다른 처리구보다 다소 높은 경향을 보였지만 통계적 유의성은 나타나지 않았으며, 또한 무기태 P의 함량을 50%, 100% 감소시킨 T2와 T3구도 T1보다 다소 높은 경향을 보여주었다. 사료섭취량은 T2구가 가장 많이($p < 0.05$) 섭취하였으며 T1구가 가장 적게 섭취하였다. 사료전환율은 모든 처리구에서 비슷한 경향을 보였다. 실험동안 산란계의 폐사율은 T2구가 다른 처리구에 비해 낮았으나 통계적 유의차는 없었다.

계란의 비중은 T1구가 가장 높았으며 ($p < 0.05$), 난각의 두께에서도 T1구가 가장 두꺼웠고 ($p < 0.05$) T3구가 가장 얇았다. 난각강도는 T3와 T4구가 T1과 T2구보다 다소 높은 경향을 보여주었으나 통계적으로 차이는 없었다. 연파란율은 통계적 유의차는 나타나지 않았지만 T1구가 다른 처리구에 비해 가장 낮았고 T4구가 가장 높게 나타났다. Haugh unit에 있어서는 처리 모두가 비슷한 결과를 보였다.

영양소의 이용율을 비롯한 측정량 및 배설량은 Table 4-2-4, 5, 6, 7에 나타나 있다. DM 및 NFE의 소화율은 phytase첨가구들이 대조구보다 높았다. Ca, P 및 Mg의 체내 축적율은 유의한 ($p < 0.05$) 차이가 있었으며 Ca과 Mg의 축적율은 대조구에서 가장 낮았고 P는 T4구에서 가장 낮게 나타났다. 회분, P 및 Zn의 배설량은 대조구에서 가장 높았으며 P배설량은 사료내 P 수준이 가장 낮은 T4구에서 가장 낮았다.

Table 4-2-2. Overall performance of laying hens fed experimental diets during 21 to 40 wk of age

Parameters	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
Egg production (%, hen-day)	84.49 ^B	86.31 ^A	84.35 ^B	84.83 ^B	0.29
Egg production (%, hen-housed)	83.26 ^B	85.54 ^a	83.55 ^B	83.71 ^B	0.34
Egg weight, g	58.55 ^{ab}	58.72 ^a	58.48 ^b	58.69 ^a	0.07
Feed consumption (g/hen/day)	112.37 ^c	114.77 ^a	113.47 ^b	113.70 ^b	0.31
Feed conversion (feed/egg mass)	2.25	2.24	2.26	2.26	0.015
Mortality (%)	2.92	1.67	3.33	3.33	0.57

¹T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

²Standard error of mean.

^{a-b, A-B}Values with different superscripts in the same row are significantly different at P<0.05 or P<0.01.

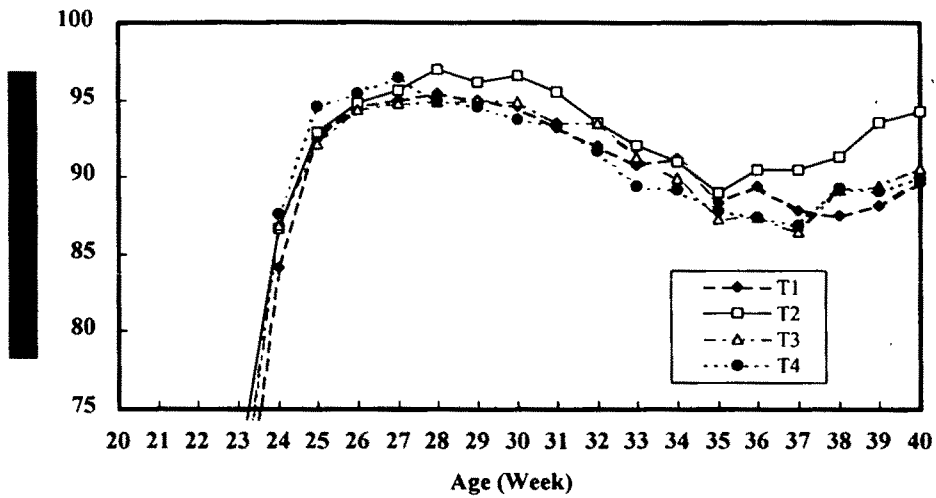


Fig. 4-2-1. Hen-housed egg production of birds fed experimental diets. T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

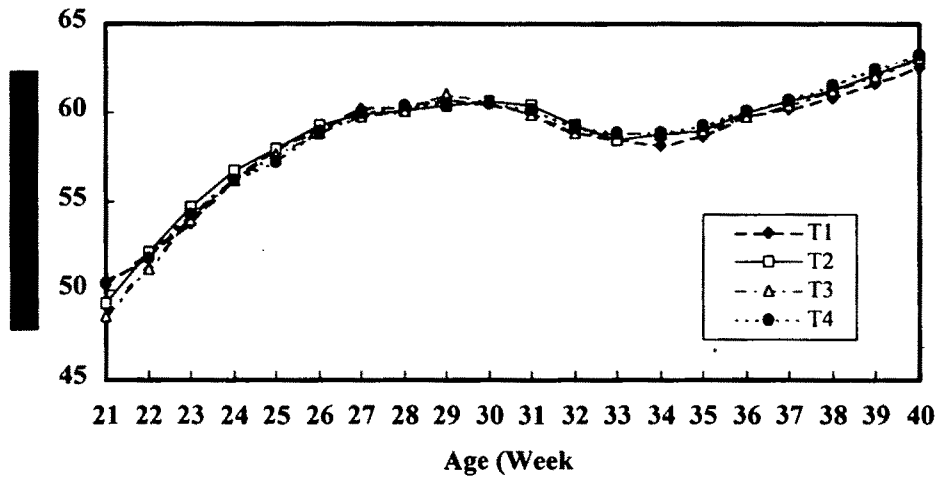


Fig. 4-2-2. Egg weight of birds fed experimental diets. T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

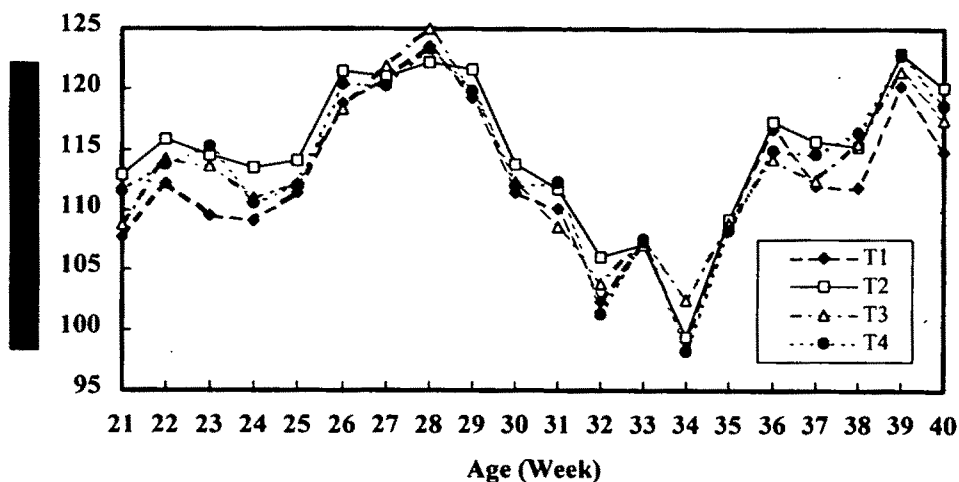


Fig. 4-2-3. Feed consumption of birds fed experimental diets. T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

Table 4-2-3. Quality of eggs laid by hens fed experimental diets during 21 to 40-wk-old.

Parameters	Treatments ¹				Pooled SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
Specific gravity	1.0901 ^A	1.0897 ^{AB}	1.0891 ^B	1.0890 ^B	0.0002
Eggshell thickness, μm	361.0 ^a	359.8 ^b	357.1 ^b	358.4	1.03
Eggshench ²)	10.05	10.10	10.21	10.22	0.076
Broken eggll strength, PSI(Lb/i ratio, %	0.43	0.46	0.43	0.54	0.082
Haugh unit	94.20	94.49	93.74	94.47	0.31

¹T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

²Standard error of mean.

^{a-b}: ^{A-B} Values with different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$ or $P < 0.01$.

Table 4-2-4. Availability of nutrients of laying hens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				Pooled SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	%, DM				
DM	72.63	74.78	75.16	76.57	1.157
Protein	57.83	59.17	63.07	60.99	2.539
Fat	87.34	91.47	90.72	90.39	1.457
Fiber	23.36 ^{ab}	15.93 ^b	28.57 ^a	15.90 ^b	3.214
Ash	43.91 ^B	53.98 ^A	51.13 ^A	48.95 ^{AB}	1.746
NFE	86.56	87.11	86.95	90.38	1.116

¹T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

²Standard error of mean.

^{a-b}, ^{A-B} Values with different superscripts in the same row are significantly different at P<0.05 or P<0.01.

Table 4-2-5. Availability of Ca, P, Mg, Zn, Fe and Cu of laying hens fed experimental diets

Minerals	Treatments ¹				Pooled SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	%, DM				
Calcium	52.11	56.53	50.76	56.07	2.654
Phosphorus	29.94 ^b	38.99 ^a	38.30 ^a	33.31 ^{ab}	2.328
Magnesium	41.83	45.87	44.41	47.26	2.363
Iron	30.55 ^{ab}	27.65 ^b	33.47 ^{ab}	36.49 ^a	2.156
Zinc	12.27 ^{ab}	14.15 ^b	20.44 ^a	17.65 ^{ab}	1.590
Copper	13.46	20.34	20.03	25.99	5.262

¹T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

²Standard error of mean.

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are significantly different at P<0.05.

Table 4-2-6. Nutrients retention of laying hens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				Pooled SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	g/hen/d, DM				
Nitrogen	1.99	2.41	2.67	2.70	0.223
Ash	7.54 ^B	11.06 ^a	10.78 ^A	10.63 ^A	0.786
Calcium	2.50 ^b	3.30 ^{ab}	3.05 ^a	3.49 ^a	0.276
Phosphorus	0.25 ^b	0.38 ^a	0.31 ^{ab}	0.21 ^b	0.034
Magnesium	0.19 ^b	0.25 ^{ab}	0.25 ^{ab}	0.28 ^a	0.025
	mg/hen/d, DM				
Iron	12.96 ^b	13.98 ^b	17.53 ^{ab}	19.43 ^a	1.599
Zinc	1.43 ^b	1.82 ^{ab}	2.59 ^a	2.45 ^a	0.243
Copper	0.40	0.66	0.67	0.98	0.179

¹T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

²Standard error of mean.

^{a-b}: ^{A-B} Values with different superscripts in the same row are significantly different at P<0.05.

Table 4-2-7. Nutrients excretion of laying hens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				Pooled SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	g/hen/d, DM				
Nitrogen	1.53	1.52	1.36	1.43	0.092
Ash	10.26 ^A	8.59 ^B	8.94 ^{AB}	9.34 ^{AB}	0.321
Calcium	2.47	2.30	2.57	2.30	0.138
Phosphorus	0.61 ^A	0.54 ^A	0.43 ^B	0.36 ^B	0.018
Magnesium	0.29	0.27	0.27	0.26	0.013
	mg/hen/d, DM				
Iron	31.31 ^{ab}	33.32 ^{ab}	30.29 ^{ab}	28.98 ^b	0.982
Zinc	10.62 ^A	9.84 ^{AB}	8.74 ^B	9.07 ^{AB}	0.355
Copper	2.48	2.33	2.31	2.15	0.151

¹T1: Control diet (1.4% TCP), T2: Control diet + phytase 500 U/kg, T3: 0.7% TCP diet + phytase 500 U/kg, T4: 0% TCP diet + phytase 500 U/kg.

²Standard error of mean.

^{a-b, A-B} Values with different superscripts in the same row are significantly different at P<0.05 or P<0.01.

제 3 절 육계사료에 있어서 phytase첨가시 보충 무기태 P의 감소와 磷 배설량에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 실험사료

실험사료는 Table 4-3-1,2와 같이 열량과 단백질 수준을 동일하게하여 least-cost formulation에 의해 작성되었으며, 무기태 P의 공급원으로서 Tricalcium phosphate (TCP)가 실험사료에 사용되었으며 사료내 phytase 첨가효과를 알아보기 위해 인산칼슘의 첨가수준을 NRC (1994) 요구량의 1/3, 2/3 또는 100% 감소시켰으며, 그로 인한 부족한 Ca 수준을 석회석으로 대체하였다.

나. 실험설계 및 사양실험

갓 부화한 Arbor Acers 1,000수(암·수 500수씩)를 4처리 5반복 반복당 50(암·수 25수씩) 수씩 완전임의 배치하였다. 각 사료처리구는 T1: 대조구사료(NRC 요구량의 무기인 수준), T2 : 대조구사료 + 600 U/kg phytase - 1/3 TCP, T3: 대조구사료 + 600 U/kg phytase - 2/3 TCP, 그리고 T4: 대조구사료 + 600 U/kg phytase - 100% TCP 로 하였다.

사양시험은 5주간 실시하였고 공시병아리들은 평사에 수용하고 매주 증체량과 사료섭취량을 측정하였으며 물과 사료는 자유로이 섭취케 하였다.

다. 영양소 이용율, 축적량 및 영양소 배설량

사양실험 종료후 각처리별로 3수씩 취하여 대사케이지에 1수씩 배치하여 3일간의 적응기간 후 3일 동안 전분채취법으로 분을 회수하였다. 영양소의 생체이용율을 측정하기 위해 사료 및 분의 일반조성분은 AOAC (1990)에 따라 실시하였다. 또한 사료내 Ca, P, Mg, Zn, Fe 및 Cu의 함량을 측정하기 위해 건식법(AOAC, 1990)으로 전처리하여 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer)를 이용하여 측정하였다.

라. 부전골의 무게, 길이, 둘레 및 광물질 함량

사양시험 후 각 처리별로 15수씩 희생시켜 좌측 부전골 (metatarsal bone)을 절단하여 무게, 길이 및 둘레를 측정하였다. 뼈의 광물질함량을 측정하기 위해 미세하게 분쇄한 다음 지방을 제거하여 사료분석과 동일한 방법으로 하였다.

마. 통계분석

실험으로부터 얻어진 결과는 SAS (1985)의 General Linear Models (GLM)을 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리평균간의 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

Table 4-3-1. Formula and composition of broiler starter diets

Ingredients, %	Treatments ⁴			
	T1	T2	T3	T4
Corn	60.69	60.69	60.69	60.69
Soybean meal (44%)	26.30	26.30	26.30	26.30
Corn gluten	7.44	7.44	7.44	7.44
Tricalcium phosphate	1.79	1.19	0.59	-
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50
Limestone	0.76	1.28	1.79	2.31
Broiler premix ¹	0.73	0.73	0.73	0.73
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40
DL-Methionine(50%)	0.23	0.23	0.23	0.23
Lysine-HCl(78%)	0.17	0.17	0.17	0.17
Sand	-	-	0.08	0.18
Phytase ²	-	+	+	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ³				
ME, kcal/kg	3050	3050	3050	3050
CP, %	21.5	21.5	21.5	21.5
Lysine, %	1.10	1.10	1.10	1.10
Met+Cys, %	0.86	0.86	0.86	0.86
Ca, %	1.00	1.00	1.00	1.00
P-available, %	0.45	0.34	0.23	0.13
P-total, %	0.71	0.60	0.50	0.39

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 16,000 IU; vitamin D₃, 3,200 IU; vitamin E, 0.4 IU; vitamin K₃, 6.5 mg; vitamin B₁, 2.6 mg; vitamin B₂, 10.4 mg; vitamin B₆, 6.5 mg; vitamin B₁₂, 39 µg; niacin, 52 mg; pantothenic acid, 19.5 mg; folic acid, 1.3 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 70 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

²Natuphos[®]; provided by BASF Korea Ltd.

³Calculated values.

⁴T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

Table 4-3-2. Formula and composition of broiler finisher diets

Ingredients, %	Treatments ⁴			
	T1	T2	T3	T4
Corn	68.53	68.53	68.53	68.53
Soybean meal (44%)	18.85	18.85	18.85	18.85
Corn gluten	7.59	7.59	7.59	7.59
Tricalcium phosphate	1.56	1.05	0.52	-
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50
Limestone	0.75	1.20	1.65	2.11
Broiler premix ¹	0.58	0.58	0.58	0.58
Salt	0.29	0.29	0.29	0.29
DL-Methionine(50%)	0.28	0.28	0.28	0.28
Lysine-HCl(78%)	0.07	0.07	0.07	0.07
Sand	-	0.06	0.13	0.20
Phytase ²	-	+	+	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ³				
ME, kcal/kg	3150	3150	3150	3150
CP, %	19.0	19.0	19.0	19.0
Lysine, %	1.00	1.00	1.00	1.00
Met+Cys, %	0.71	0.71	0.71	0.71
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90
P-available, %	0.40	0.31	0.21	0.12
P-total, %	0.64	0.55	0.45	0.36

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 16,000 IU; vitamin D₃, 3,200 IU; vitamin E, 0.4 IU; vitamin K₃, 6.5 mg; vitamin B₁, 2.6 mg; vitamin B₂, 10.4 mg; vitamin B₆, 6.5 mg; vitamin B₁₂, 39 µg; niacin, 52 mg; pantothenic acid, 19.5 mg; folic acid, 1.3 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 70 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

²Natuphos[®]: provided by BASF Korea Ltd.

³Calculated values.

⁴T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

2. 결 과

5주간의 사양실험결과 얻어진 증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 Table 4-3-3과 같다. 5주까지의 증체량은 T2구가 다른 처리구에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 좋았고 T4구가 가장 낮았으며, 초기(0-3주) 동안 증체량에서도 T2구가 다른 처리구에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 높았고 T4구가 가장 낮았다. 사료섭취량에 있어서 5주동안 T2구가 가장 많이 ($p < 0.05$) 섭취하였으며, T4구가 가장 적게 섭취하였다. 또한 0-3주 동안의 사료섭취량에서 T1과 T2구가 다른 처리구에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다. 사료요구율은 T1과 T2구가 다른 처리구보다 낮았으나 통계적으로 유의차는 없었다. 폐사율에 있어서 T4구가 다른 처리구보다 높았으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

일반조성분에 대한 영양소이용율은 Table 4-3-4에 보여주고 있다. 조섬유를 제외한 성분의 영양소이용율은 T2구가 T3구나 T4구에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 높았으나 T1과는 차이가 없었다.

광물질 이용율은 Table 4-3-5에 보여주고 있다. Ca, Mg, Zn 및 Cu의 이용율은 phytase 첨가구들 (T2, T3 및 T4)이 대조구 (T1)보다 높은 경향이 있었으나 유의성은 나타나지 않았다. P의 이용율은 phytase 첨가구들에서 유의하게 ($p < 0.01$) 높았다.

영양소축적량은 Table 4-3-6에 나타나 있다. P의 축적량은 T2구가 T3나 T4구보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높았고 Cu의 축적량도 T2구가 다른 처리구에 비하여 더 높았다. 그러나 질소, 회분, Ca, Mg, Zn 및 Fe의 이용율은 처리간에 유의성이 나타나지 않았다.

Table 4-3-7에서 보여주는 바와 같이 P배설량은 T3와 T4구가 T1이나 T2구보다 유의하게 ($p < 0.01$) 낮은 반면 질소, 회분, Ca, Mg, Fe, Zn 및 Cu의 축적량은 처리간에 차이가 없었다.

부전골의 무게, 길이, 둘레 및 광물질 함량은 Table 4-3-8에 나타나 있다. T3구에서 부전골은 T1보다 더 무겁고 길었는데 이것은 phytase 첨가로 인해 뼈의 생성이 개선되었다는 것을 의미한다. 또한 뼈의 Ca, P, Mg, Zn 및 Fe의 함량은 사료내 P수준이 감소함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 Cu함량은 phytase 첨가에 의해 영향을 받지 않았다.

Table 4-3-3. Effects of phytase levels on the body weight gain, feed intake, feed/gain and mortality of broiler chickens for experimental periods

Item	age(wk)	Treatments ¹				SEM ²
		T1	T2	T3	T4	
Weight gain, g	0-3	718.54 ^B	748.06 ^A	723.85 ^B	681.19 ^C	5.17
	4-5	896.29	883.22	879.76	880.39	10.66
	0-5	1614.82 ^{AB}	1631.28 ^A	1603.58 ^{AB}	1561.58 ^B	12.76
Feed Intake, g	0-3	1075.89 ^{AB}	1108.23 ^A	1097.16 ^A	1052.28 ^B	7.89
	4-5	1751.43	1751.07	1740.54	1718.91	16.81
	0-5	2827.32 ^{ab}	2859.29 ^a	2837.70 ^{ab}	2771.19 ^b	23.16
Feed/Gain	0-3	1.50 ^B	1.48 ^B	1.52 ^{AB}	1.55 ^A	0.01
	4-5	1.96	1.98	1.98	1.95	0.02
	0-5	1.75	1.75	1.77	1.77	0.01
Mortality, %	0-3	3.60	3.20	1.60	4.00	1.16
	4-5	1.26	0.82	1.22	2.47	0.74
	0-5	4.80	4.00	2.80	6.40	1.289

¹T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

²Standard error of mean.

^{a-c} ^{A-C} Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 and p<0.01.

Table 4-3-4. Nutrients availability of broiler fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(DM, %)				
DM	80.06	82.03	81.68	80.94	0.79
Protein	72.38	72.85	72.99	72.26	1.81
Fat	80.16	84.30	84.34	83.05	1.44
Fiber	14.60 ^{ab}	20.49 ^a	13.01 ^b	11.76 ^b	2.01
Ash	35.89	38.28	34.76	37.63	1.71
NFE	90.44	91.99	92.20	91.24	0.60

¹T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

²Standard error of mean.

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

Table 4-3-5. Availability of minerals of broiler fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(DM, %)				
Ca	30.10	27.77	31.87	29.53	3.60
P	29.38 ^B	35.63 ^{AB}	40.50 ^A	43.66 ^A	2.53
Mg	14.17	19.33	20.36	15.07	2.30
Fe	4.28 ^a	14.22 ^a	15.66 ^a	9.01 ^{ab}	2.60
Zn	23.96	26.78	26.44	31.01	2.44
Cu	5.91	24.87	13.52	6.40	4.39

¹T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

²Standard error of mean.

^{a-b, A-B}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

Table 4-3-6. Nutrients Retentions of broiler fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(g/bird/d, DM)				
Nitrogen	4.68	4.47	4.36	4.87	0.48
Ash	4.19	4.47	3.69	4.79	0.45
Ca	0.51	0.54	0.49	0.53	0.08
P	0.34 ^{ab}	0.42 ^a	0.28 ^{ab}	0.28 ^b	0.04
Mg	0.05	0.07	0.07	0.06	0.012
	(mg/bird/d, DM)				
Fe	1.43	5.68	5.30	3.40	1.22
Zn	4.85	5.43	4.66	7.14	0.76
Cu	0.61 ^b	3.35 ^a	1.47 ^b	0.70 ^b	0.55

¹T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

²Standard error of mean.

^{a-b}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4-3-7. Nutrients excretions of broiler fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(g/bird/d, DM)				
Nitrogen	1.80	1.76	1.61	1.86	0.12
Ash	7.62	7.11	6.98	8.00	0.43
Ca	1.21	1.26	1.06	1.28	0.11
P	0.84 ^A	0.65 ^A	0.42 ^B	0.36 ^B	0.04
Mg	0.30	0.28	0.26	0.32	0.02
	(mg/bird/d, DM)				
Fe	36.39	32.28	29.47	36.24	2.14
Zn	15.73	14.39	13.09	16.15	0.95
Cu	10.88	10.52	9.52	10.95	0.58

¹T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

²Standard error of mean.

^{A-B}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.01$.

Table 4-3-8. Metatarsal weight, length, and girth and contents of ash minerals of bone in broiler chicken fed experimental diets for 35 days

Items	Treatments ¹				SEM
	T1	T2	T3	T4	
Weight ² ,g	3.15 ^b	3.18 ^b	3.46 ^a	3.28 ^{ab}	0.086
Length ² ,cm	7.65	7.57	7.73	7.65	0.073
Girth ² ,cm	2.44 ^b	2.49 ^b	2.73 ^a	2.71 ^a	0.076
Ash,%DM	45.14	43.79	45.05	44.61	0.45
	———— (% of bone) ————				
Ca	21.40 ^d	25.38 ^c	29.27 ^b	36.86 ^a	0.38
P	11.06 ^d	12.63 ^c	13.78 ^b	15.59 ^a	0.14
Mg	0.57 ^d	0.61 ^c	0.64 ^b	0.69 ^a	0.009
	———— (µg/g of bone) ————				
Zn	199.23 ^c	212.69 ^c	234.74 ^b	249.75 ^a	5.07
Fe	238.65 ^c	254.68 ^{bc}	291.40 ^{ab}	330.68 ^a	15.19
Cu	10.65	9.36	11.32	11.87	0.98

¹T1 = Control diet, T2 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 1/3 TCP(Tricalcium phosphate), T3 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 2/3 TCP, T4 = Control diet + 600 U phytase/kg diet - 100% TCP.

²Data presented as least square means with final body weight used as covariate.

*^{a-d}values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

제 4 절 磷 수준이 다른 산란계사료에 phytase첨가가 영양소 이용율에 미치는 효과

1. 재료 및 방법

가. 실험사료

실험사료는 각 처리의 열량 및 단백질 수준을 동일하게하여 computer formulation에 의해 작성되었으며 (Table 4-4-1), 무기태 P의 공급원으로서 Tricalcium phosphate (TCP)가 실험사료에 사용되었다. 사료내 phytase 첨가효과를 알아보기 위해 인산칼슘의 첨가수준을 NRC (1994) 요구량의 50% 또는 100% 감소시켰으며, 그로인한 부족한 Ca 수준을 석회석으로 대체하였다.

나. 실험설계 및 사양실험

48주령된 ISA brown 산란계 864수를 4처리 12반복 반복당 18수 (cage당 2수) 씩 난괴법으로 배치하였다. 각 사료처리구는 T1 (대조구): 0.26% 가용인 (Total P 0.55%)을 함유한 사료, T2 : 0.26% 가용인 (Total P 0.50%) + phytase 250 U/사료 kg, T3: 0.16% 가용인 (Total P 0.45%) + phytase 250 U/사료 kg, 그리고 T4: 0.11% 가용인 (Total P 0.40%) + 250 U of phytase/사료 kg로 하였다.

사양시험은 48주령부터 55주령까지 56일 동안 실시하였으며 실험사료는 mash 형태로 하여 사양시험동안 물과 함께 자유로이 섭취토록 하였다. 계사내부는 적절한 환기를 시켜주었고 점등프로그램은 자연점등을 포함하여 하루 16시간이 되도록 유지하였다.

다. 난질측정

난수와 계란의 무게는 매일 측정하였고, 사료섭취량은 매주 측정하였다. 난질 및 난각질을 평가하기 위해 각 처리로 부터 매주 25개의 계란을 취하여 비중, 난각강도, 난각두께 그리고 난백고를 측정하였다. 계란의 비중은 1.065에서 1.120까지 0.005씩 증가시킨 소금물을 사용하여 측정하였다. 난각강도는 Texture Test System (T2100C, Food Technology Co., USA)을 사용하였고, Haugh

unit 은 dial indicator (AMES, Waltham, Mass., USA) 를 사용하여 측정된 농후 난백의 높이와 계란의 무게로 부터 계산되었다 (Eisen et al., 1962). 난각두께 는 dial pipe gage (Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 둔단부, 예단부 그리고 중간부를 측정하여 평균값을 구하였다.

라. 영양소의 이용율, 축적량 및 배설량 측정

사양실험 종료후 각 처리별로 9수씩 선별하여 대사케이지에 1수씩 배치하였고 3일간의 적응기간을 둔 다음 3일 동안 전분채취법으로 분을 회수하였다. 영양소 이용효율을 알아보기 위해 사료와 함께 채취된 분은 48시간 동안 60℃에서 건조시킨 다음 일반성분분석 및 광물질 분석을 위해 분쇄하였다. 일반성분분석은 AOAC (1990)에 준하여 실시하였고, Ca, P, Mg, Zn, Fe 및 Cu와 같은 광물질 분석은 건식법 (AOAC, 1990)으로 전처리 한 다음 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer)를 이용하여 함량을 측정하였다.

마. 경골분석

사양실험 종료후 각 처리구에서 15수씩 희생시킨 다음 왼쪽 정강이를 취하여 경골무게, 길이 및 둘레를 측정하였으며, 경골내 광물질 함량을 측정하기 위해 60℃에서 72시간 건조시킨 다음 분쇄하여 지방을 추출하여 사료 및 분의 광물질 분석방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

Table 4-4-1. Formula and composition of experimental diets

Ingredients, %	Treatments ⁴			
	T1	T2	T3	T4
Corn	57.37	57.37	57.37	57.37
Soybean meal (44% CP)	13.63	13.63	13.63	13.63
Wheat bran	10.00	10.00	10.00	10.00
Limestone	9.08	9.32	9.58	9.84
Corn gluten	5.00	5.00	5.00	5.00
Animal fat	3.20	3.20	3.20	3.20
Tricalcium phosphate (18% P)	0.90	0.60	0.30	-
Layer premix ¹	0.32	0.32	0.32	0.32
Salt	0.31	0.31	0.31	0.31
Lysine-HCl(78% CP)	0.09	0.09	0.09	0.09
DL-Methionine(50% CP)	0.10	0.10	0.10	0.10
Sand	-	0.06	0.10	0.14
Phytase ²	-	+	+	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ⁵				
ME, kcal/kg	2850	2850	2850	2850
CP, %	15.50	15.50	15.50	15.50
Lysine, %	0.70	0.70	0.70	0.70
Met+Cys, %	0.60	0.60	0.60	0.60
Ca, %	3.75	3.75	3.75	3.75
P-available, %	0.27	0.22	0.16	0.11
P-total, %	0.56	0.50	0.45	0.40

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D₃, 2,000 IU; vitamin E, 0.25 IU; vitamin K₃, 2 mg; vitamin B₁, 2 mg; vitamin B₂, 6 mg; vitamin B₆, 3 mg; vitamin B₁₂, 10 μg; niacin, 30 mg; pantothenic acid, 10 mg; folic acid, 1 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 40 mg; Fe, 60 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.2 mg.

²Natuphos[®]: provided by BASF Korea Ltd.

³Calculated values.

⁴T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

2. 결 과

8주 동안의 사양시험결과 산란계의 생산성 및 난질의 측정 결과는 Table 4-4-2, 3과 같다. 일계산란율과 총산란율은 T3구가 가장 ($P<0.01$) 높았다. 난중에 있어서도 T3구가 가장 높게 나타났다. 계란의 난각강도, 비중 및 난각두께는 대체적으로 phytase첨가구들이 높았지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 연파란율은 대조구가 유의하게 ($P<0.01$) 높았다.

영양소이용율 및 배설량은 Table 4-4-4, 5, 6에서 보여주고 있다. DM, 단백질, 조섬유, 회분 및 NFE의 이용율은 phytase처리구들이 대조구보다 높았지만 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 지방의 이용율은 T3구가 유의하게 ($P<0.05$) 높았다. Ca 및 P의 이용율에 있어서도 T3구가 유의하게 높게 나타났다. N 배설량은 처리간에 유의한 차이가 없었으며 P의 배설량은 phytase첨가구들이 대조구에 비해 유의하게 ($P<0.01$) 감소하였다.

경골의 무게, 길이 및 둘레를 측정한 결과 처리간에 유의한 차이가 없었으며 (Table 4-4-7), 경골내 광물질 함량은 Table 4-4-8에 나타나 있다. 경골내 Ca, P 및 Mg 함량은 처리간에 유의한 차이가 있었고 T2구가 다른 처리구에 비해 높게 나타났다. 또한 경골에 있어서 대부분의 광물질 함량이 T2구가 가장 높았고, T3, T4 그리고 T1순으로 나타났다.

Table 4-4-2. The productivity of laying hens fed experimental diets from 48 to 55 wk of age

Parameters	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
Egg production (%, hen-day)	90.48 ^B	90.78 ^{AB}	91.77 ^A	89.68 ^B	0.29
Egg production (%, hen-housed)	90.48 ^B	90.17 ^B	91.53 ^A	88.38 ^C	0.28
Egg weight, g	65.79 ^{AB}	65.81 ^{AB}	66.01 ^A	65.57 ^B	0.07
Feed consumption (g/hen/day)	131.5 ^{AB}	132.7 ^A	132.2 ^A	130.4 ^B	0.44
Feed conversion (feed/egg mass)	2.216 ^{AB}	2.226 ^A	2.185 ^B	2.223 ^A	0.0097
Mortality, %	0.00 ^B	0.36 ^{AB}	0.08 ^B	0.48 ^A	0.098

¹T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

²Standard error of mean.

^{a-c} Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 and p<0.01.

Table 4-4-3. Egg and shell quality of laying hens fed experimental diets from 48 to 55 wk of age at experimet 2

Parameters	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
Eggshell strength, PSI (Lb/inch ²)	8.44	8.51	8.72	8.73	0.10
Specific gravity	1.0858	1.0865	1.0859	1.0861	0.0003
Eggshell thickness, μm	372.83	375.86	372.68	375.52	1.77
Broken egg ratio, %	0.80 ^{aA}	0.34 ^{bB}	0.53 ^{bAB}	0.32 ^{bB}	0.074

¹T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

²Standard error of mean.

^{a-b} Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05 and p<0.01.

Table 4-4-4. Availability of nutrients of laying hens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(DM, %)				
DM	75.00	75.02	76.17	76.79	0.90
Protein	58.47	62.04	60.60	62.72	2.21
Fat	89.82 ^{ab}	88.80 ^b	91.67 ^a	90.53 ^{ab}	0.85
Fiber	18.32	21.03	27.40	23.49	3.38
Ash	48.17	51.62	53.83	49.43	2.94
NFE	88.36	88.16	88.81	88.70	0.50

¹T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

²Standard error of mean.

^{a-b}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4-4-5. Availability of minerals of laying hens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(DM, %)				
Ca	51.19 ^b	53.72 ^{ab}	62.10 ^a	62.72	3.20
P	25.2 ^B	33.31 ^{AB}	46.21 ^A	44.05 ^A	3.38
Mg	19.14 ^b	22.16 ^b	35.31 ^a	29.18 ^{ab}	3.78
Fe	36.39 ^A	18.69 ^B	32.65 ^{AB}	29.00 ^{AB}	3.78
Zn	21.31	18.82	27.19	24.25	3.06
Cu	18.19 ^B	24.92 ^{AB}	39.63 ^A	38.55 ^A	3.55

¹T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

²Standard error of mean.

^{a-b, A-B}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

Table 4-4-6. Nutrients excretion of laying hens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹				SEM ²
	T1	T2	T3	T4	
	(g/bird/d, DM)				
Nitrogen	1.60	1.58	1.63	1.49	0.088
P	0.52 ^A	0.46 ^A	0.35 ^B	0.30 ^B	0.022

¹T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

²Standard error of mean.

^{A,B}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.01$.

Table 4-4-7. Tibia weight, length, and girth of laying hens fed experimental diets

Items ¹	Treatments ²				SEM ³
	T1	T2	T3	T4	
Weight(g)	6.91	7.09	7.34	6.85	0.219
Length(cm)	11.82	11.78	11.73	11.82	0.086
Girth(cm)	2.28	2.24	2.30	2.27	0.031

¹Data presented as least square means with final body weight used as covariate.

²T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

³Standard error of mean.

Table 4-4-8. Content of ash minerals of tibia of laying hens fed experimental diets

Nutrients ¹	Treatments ²				SEM ³
	T1	T2	T3	T4	
Ash(% DM)	37.77	37.00	37.45	38.00	0.44
	————— (% of tibia) —————				
Ca	23.60 ^{bc}	25.08 ^a	24.24 ^b	23.23 ^c	0.26
P	11.19 ^b	11.89 ^a	11.43 ^b	11.16 ^b	0.12
Mg	0.42 ^c	0.45 ^a	0.44 ^{ab}	0.43 ^{bc}	0.005
	————— (µg/g of tibia) —————				
Zn	213.31 ^b	234.33 ^{ab}	237.69 ^{ab}	277.01 ^a	17.48
Fe	251.92	237.94	254.55	253.57	11.86
Cu	15.95 ^a	10.88 ^b	9.16 ^b	10.42 ^b	1.72

¹Values from fat free tibia.

²T1 = Control diet of 0.26% NPP (non-phytate phosphorus) with no supplementary phytase, T2 = 0.21% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T3 = 0.16% NPP diet with 250 U of phytase/kg diet, T4 = 0.11% NPP diet with 250 U of phytase /kg diet.

³Standard error of the mean.

^{a-c}Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

제 5 절 Pilot scale로 생산된 미생물 phytase첨가사육계의 생산성 및 인 배설량에 미치는 효과

1. 재료 및 방법

가. 실험사료

실험사료는 Table 4-5-1,2와 같이 열량과 단백질 수준을 동일하게하여 computer formulation에 의해 작성되었으며 (Table 4-5-1), 무기태 P의 공급원으로서 Tricalcium phosphate (TCP)가 실험사료에 사용되었으며 사료에 phytase를 첨가함으로써 P의 요구량 감소효과를 알아보기 위해 사료내 가용인 수준을 NRC (1994) 요구량의 0.1%, 0.2% 감소시켜 미생물로부터 자체 생산한 액상 형태의 phytase를 cell과 broth의 혼합형태로 된 것과 broth로만 된 것으로 하여 각각 가용인 수준을 0.2% 감소시킨 처리구에 사료 kg 당 600 U 씩 첨가하였다.

나. 실험설계 및 사양실험

갯 부화한 Arbor Acers 수컷 300수를 5처리 5반복 반복당 12 수씩 완전임의 배치하였다. 각 사료처리구는 T1: 대조구사료 (NRC 요구량의 가용인 수준), T2: 대조구사료의 가용인 수준에서 0.1% NPP (non-phytate phosphate) 감소, T3: 대조구사료의 가용인 수준에서 0.2% NPP 감소, T4: T3 + 사료 kg 당 600 U phytase (broth+cell) 및 T5: T3 + 사료 kg 당 600 U phytase (broth)로 하였다. 사양시험은 전·후기로 나누어 5주간 실시하였고 공시병아리들은 철제 battery에 수용하여 물과 사료는 자유로이 섭취케 하였다.

다. 생산성 및 생체이용을 평가

Phytase 첨가로 인한 육계생산성 개선효과를 알아보기 위해 매주 증체량 및 사료섭취량을 측정하였으며 대사실험을 통한 여러 가지 영양소의 이용율을 측정하였다. 또한 Ca, P을 비롯한 Cu, Mg, Zn와 같은 광물질들의 흡수 이용효과를 살펴보기 위해 사양실험 종료후 각 처리당 12수씩 취하여 심장으로부터 혈액을 채취하여 혈청내 광물질 함량을 측정하였고, 혈액 채취 후 왼쪽 정강이를 절단

하여 뼈이외의 모든 조직을 제거시킨 다음 60℃ drying oven에서 72시간 건조시켜 측정에 이용하였다. 정강이의 무게, 길이 및 둘레를 측정한 후 분쇄하여 회분함량 및 Ca, P, Cu, Mg, Zn의 함량을 측정하였다.

Table 4-5-1. Formula and composition of broiler starter diets

Ingredients, %	Treatments ⁴				
	T1	T2	T3	T4	T5
Corn	58.41	58.45	58.49	58.49	58.49
Soybean meal (44% CP)	24.27	24.43	24.59	24.59	24.59
Corn gluten	11.79	11.67	11.56	11.56	11.56
Tricalcium phosphate (18% P)	1.79	1.24	0.68	0.68	0.68
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Limestone	0.77	1.25	1.73	1.73	1.73
Broiler premix ¹	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lysine-HCl (78% CP)	0.19	0.19	0.18	0.18	0.18
DL-Methionine (50% CP)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Phytase ²	-	-	-	+	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ³					
ME, kcal/kg	3100	3100	3100	3100	3100
CP, %	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
Lysine, %	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Met+Cys, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Ca, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
nonphytate P, %	0.45	0.35	0.25	0.25	0.25
P-total, %	0.71	0.61	0.51	0.51	0.51

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 16,000 IU; vitamin D₃, 3,200 IU; vitamin K₃, 6.5 mg; vitamin E, 0.4 IU; vitamin B₁, 2.6 mg; vitamin B₂, 10.4 mg; vitamin B₆, 6.5 mg; vitamin B₁₂, 39 µg; niacin, 52 mg; pantothenic acid, 19.5 mg; folic acid, 1.3 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 70 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

²microbial phytase: produced by Dept. of Biotechnology, Chung-Ang University.

³Calculated values.

⁴T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.35%, T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (broth)/kg of diet.

Table 4-5-2. Formula and composition of broiler finisher diets

Ingredients, %	Treatments ⁴				
	T1	T2	T3	T4	T5
Corn	65.32	65.37	58.49	58.49	58.49
Soybean meal (44% CP)	23.06	23.22	24.59	24.59	24.59
Corn gluten	6.82	6.71	11.56	11.56	11.56
Tricalcium phosphate (18% P)	1.26	0.71	0.68	0.68	0.68
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Limestone	0.98	1.46	1.73	1.73	1.73
Broiler premix ¹	0.58	0.58	0.73	0.73	0.73
Salt	0.27	0.27	0.40	0.40	0.40
Lysine-HCl (78% CP)	0.15	0.15	0.18	0.18	0.18
DL-Methionine (50% CP)	0.04	0.04	0.15	0.15	0.15
Phytase ²	-	-	-	+	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ³					
ME, kcal/kg	3100	3100	3100	3100	3100
CP, %	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Lysine, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Met+Cys, %	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
nonphytate P, %	0.35	0.25	0.15	0.15	0.15
P-total, %	0.61	0.51	0.41	0.41	0.41

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 16,000 IU; vitamin D₃, 3,200 IU; vitamin K₃, 6.5 mg; vitamin E, 0.4 IU; vitamin B₁, 2.6 mg; vitamin B₂, 10.4 mg; vitamin B₆, 6.5 mg; vitamin B₁₂, 39 µg; niacin, 52 mg; pantothenic acid, 19.5 mg; folic acid, 1.3 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 70 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

²microbial phytase: produced by Dept. of Biotechnology, Chung-Ang University.

³Calculated values.

⁴T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.35%, T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (broth)/kg of diet.

2. 결 과

사양실험을 통해서 얻어진 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율은 Table 4-5-3에서 보여주고 있다. 5주까지의 증체량은 NRC (1994) 권장수준의 인을 함유한 대조구 (CONT)사료를 섭취한 구가 유의하게 ($p < 0.01$) 높았고, 대조구보다 인의 요구량을 0.2% (NPP 기준) 감소시킨 T3구가 가장 낮은 증체량을 보여주었다. 또한 낮은 수준의 인을 함유하고 자체 생산한 phytase를 첨가한 처리구들 (T4와 T5)은 인의 함량이 낮은 처리구보다 유의하게 ($p < 0.01$) 증체량이 높았지만 대조구에 비해서 낮게 나타났다. 또한 phytase 공급형태 (sbroth + cell과 broth)에 따른 증체량에는 뚜렷한 차이가 없었다. 사료섭취량에 있어서도 대조구가 가장 많이 ($p < 0.01$) 섭취하였으며 C-0.2% nP구가 가장 낮은 섭취량을 나타냈다. Phytase첨가구들은 대조구보다 낮은 섭취량을 보였지만 낮은 수준의 인을 함유한 사료구 (T3)보다는 유의하게 ($p < 0.01$) 섭취량이 높았다. Feed/gain 은 대조구와 T2구 (대조구 - 0.1% NPP)가 다른 처리구들 보다 유의하게 ($p < 0.01$) 좋았으며 phytase첨가구들은 T3구 (대조구 - 0.2% NPP)와 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 폐사율은 NPP 수준을 대조구보다 0.2%감소시킨 T3구에서 가장 높았으나 ($p < 0.01$), 다른 처리구들 간에는 유의한 차이가 없었다.

영양소이용율은 Table 4-5-4에 보여주고 있다. 본 실험에서 언급된 대부분의 영양소 (건물, 회분, 조섬유, Ca, P, Zn 및 Fe) 이용율은 T3구가 다른 처리구에 비해 유의하게 낮았던 반면 지방이나 구리와 같은 일부 영양소들의 이용율은 높게 나타났다.

영양소 배설량에 대한 결과는 Table 4-5-5에 나타나 있다. Crude phytase 첨가구들 (T4와 T5)의 P 배설량은 정상수준의 P을 함유한 T1구나 0.1% NPP 수준을 감소시킨 T2구 보다 유의하게 ($p < 0.05$) 낮았으나 T3구 (0.2% NPP 감소)와는 유의한 차이가 없었다.

Table 4-5-6에는 혈청내 Ca, P, Mg, Zn, Fe 및 Cu의 농도를 보여주고 있다. 혈청내 Ca과 Mg의 함량은 crude phytase 첨가구들이 NPP 수준이 낮은 phytase 무첨가구들에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 높았으며, 특히 broth와 cell 혼합형태로 첨가한 T4구가 broth만을 첨가한 T5구보다 다소 높았다. 혈청내 P와 Fe 및 Cu농도는 처리간에 유의성이 나타났는데, T1과 T4구가 다른 처리구들보다 유의하게

($p < 0.05$) 높았다.

Table 4-5-7은 경골의 무게, 길이, 둘레 및 경골내 광물질 함량을 보여주고 있다. 경골의 무게 및 길이는 정상수준의 NPP 수준인 T1구에서 가장 좋았다. Crude phytase 첨가구들 (T4와 T5)은 T1이나 T2구에 비해서 좋은 성적을 나타내지 않았지만 같은 수준의 NPP를 함유한 T3구보다는 현저하게 개선되었다.

Table 4-5-3. Weight gain, Feed intake, feed/gain, and mortality of broiler chicken fed experimental diets

Item	Treatments ¹					SEM ²
	T1	T2	T3	T4	T5	
Weight gain, g/bird						
0-3 wk	612.7 ^a	534.2 ^b	384.1 ^d	479.6 ^{bc}	464.5 ^c	18.83
4-5 wk	606.1 ^a	555.4 ^{ab}	352.7 ^c	521.8 ^b	496.7 ^b	22.35
0-5 wk	1218.8 ^a	1089.5 ^b	736.8 ^d	1001.4 ^c	961.3 ^c	25.79
Feed intake, g/bird						
0-3 wk	849.0 ^a	747.5 ^b	541.6 ^c	699.7 ^b	684.6 ^b	23.67
4-5 wk	1118.1 ^a	1007.9 ^b	744.5 ^c	1058.7 ^{ab}	1005.4 ^b	33.55
0-5 wk	1967.1 ^a	1755.5 ^b	1286.1 ^c	1758.4 ^b	1690.0 ^b	43.55
Feed/Gain						
0-3 wk	1.38 ^c	1.40 ^{bc}	1.41 ^{bc}	1.46 ^{ab}	1.48 ^a	0.02
4-5 wk	1.85 ^b	1.82 ^b	2.12 ^a	2.04 ^a	2.03 ^a	0.05
0-5 wk	1.61 ^b	1.62 ^b	1.75 ^a	1.76 ^a	1.76 ^a	0.02
Mortality, %						
0-3 wk	3.32 ^b	6.67 ^b	26.66 ^a	11.66 ^b	10.00 ^b	4.92
4-5 wk	6.82	7.33	12.40	13.27	5.30	3.16
0-5 wk	10.00 ^b	13.33 ^b	36.67 ^a	23.33 ^{ab}	15.00 ^b	4.62

¹T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.45% (Starter) and 0.35% (finisher), T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (soup)/kg of diet.

²Standard error of mean.

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

Table 4-5-4. Availability of nutrients in broiler chickens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹					SEM ²
	T1	T2	T3	T4	T5	
	----- (%) -----					
DM	82.11 ^a	80.43 ^{ab}	78.19 ^b	80.60 ^{ab}	79.74 ^{ab}	0.89
Ash	46.66 ^a	38.15 ^b	31.17 ^b	47.01 ^a	34.07 ^b	2.62
Protein	78.17 ^a	76.21	74.26	73.54	75.96	2.43
Fat	89.82 ^a	85.06 ^{ab}	90.62 ^c	86.36 ^{ab}	83.75 ^{bc}	1.41
Fiber	25.96 ^a	19.26 ^{ab}	14.45 ^b	18.90 ^{ab}	19.70 ^{ab}	3.29
NFE	90.30	89.96	89.57	91.31	90.14	0.73
Ca	39.99 ^{bc}	35.04 ^c	34.37 ^c	56.14 ^a	44.91 ^b	3.05
P	44.17 ^{bc}	37.77 ^c	40.60 ^{bc}	58.44 ^a	48.04 ^b	2.28
Mg	31.14	30.85	28.66	37.69	27.46	3.21
Zn	30.36 ^a	32.02 ^{ab}	22.81 ^b	42.06 ^a	42.38 ^a	3.58
Fe	24.24 ^{ab}	28.88 ^{ab}	14.41 ^b	28.56 ^{ab}	37.38 ^a	4.32
Cu	3.89 ^b	9.47 ^b	26.06 ^a	41.35 ^a	25.86 ^a	4.04

¹T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.45% (Starter) and 0.35% (finisher), T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (soup)/kg of diet.

²Standard error of mean.

^{a,b}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4-5-5. Excretion of nutrients by broiler chickens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹					SEM ²
	T1	T2	T3	T4	T5	
	(g/bird/d)					
DM	13.38	14.89	13.11	12.62	12.71	1.00
Ash	2.93	3.18	2.96	2.58	2.96	0.23
Nitrogen	0.72	0.75	0.71	0.70	0.68	0.067
NFE	4.66	5.63	4.57	4.66	4.58	0.54
Ca	0.47 ^a	0.50 ^a	0.44 ^{ab}	0.35 ^b	0.40 ^{ab}	0.04
P	0.28 ^a	0.23 ^b	0.14 ^c	0.10 ^c	0.12 ^c	0.014
Mg	0.097 ^{ab}	0.102 ^a	0.084 ^{ab}	0.079 ^b	0.092 ^{ab}	0.007
	(mg/bird/d)					
Zn	6.97	6.78	6.10	5.45	5.43	0.52
Fe	15.74 ^a	14.85 ^a	11.66 ^{ab}	11.45 ^{ab}	9.91 ^b	1.45
Cu	1.11 ^a	1.00 ^a	0.68 ^b	0.68 ^b	0.70 ^b	0.076

¹T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.45% (Starter) and 0.35% (finisher), T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (soup)/kg of diet.

²Standard error of mean.

^{a-b}Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

Table 4-5-6. Serum Ca, P, Mg, Zn, Fe, and Cu in broiler chickens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹					SEM ²
	T1	T2	T3	T4	T5	
	(mg/dL)					
Ca	13.57 ^c	14.09 ^c	14.48 ^c	24.58 ^a	20.25 ^b	0.90
P	18.92 ^a	15.43 ^b	13.43 ^b	18.23 ^a	15.74 ^b	0.81
Mg	4.42 ^c	4.25 ^c	3.67 ^d	5.49 ^a	4.83 ^b	0.14
Fe	0.53 ^c	0.67 ^{bc}	0.86 ^b	1.22 ^a	1.32 ^a	0.09
	(µg/dL)					
Zn	255 ^c	251 ^c	270 ^c	353 ^b	487 ^a	28.0
Cu	18 ^b	19 ^b	16 ^b	32 ^a	30 ^a	2.00

¹T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.45% (Starter) and 0.35% (finisher), T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (soup)/kg of diet.

²Standard error of mean.

^{a-c}Values with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

Table 4-5-7. Tibial weight, length, and girth and the contents of crude ash and minerals of tibia in broiler chickens fed experimental diets

Nutrients	Treatments ¹					SEM ²
	T1	T2	T3	T4	T5	
Weight, g	4.15 ^a	3.78 ^b	2.85 ^d	3.21 ^c	3.17 ^c	0.14
Length, cm	8.43 ^a	8.12 ^b	7.26 ^d	7.64 ^c	7.59 ^c	0.13
Girth, cm	2.25 ^{ab}	2.33 ^a	2.15 ^b	2.26 ^{ab}	2.19 ^{ab}	0.08
	(% of tibia)					
Crude ash	58.72 ^a	50.14 ^c	44.09 ^d	52.17 ^{bc}	54.86	0.96
Ca	19.71 ^a	16.93 ^b	12.70 ^d	14.59 ^c	13.53 ^d	0.51
P	9.87 ^a	8.23 ^b	6.30 ^d	7.17 ^c	6.75 ^{cd}	0.27
Mg	0.45 ^a	0.39 ^b	0.33 ^c	0.38 ^b	0.38 ^b	0.017
	(μ g/g of tibia)					
Zn	409.9 ^a	361.0	350.4 ^b	386.7 ^{ab}	366.4 ^b	18.15
Fe	324.9 ^b	329.3 ^b	402.1 ^a	332.0 ^b	412.9 ^a	30.45
Cu	5.4	5.6	5.3	5.5	5.4	0.44

¹T1 = control diet with non-phytate phosphorus (NPP) levels at 0.45% (Starter) and 0.35% (finisher), T2 = T1 - 0.1% NPP, T3 = T1 - 0.2% NPP, T4 = T3 + 600 U of crude phytase (broth+cell)/kg of diet, T5 = T3 + 600 U of crude phytase (soup)/kg of diet.

²Standard error of mean.

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

제 6 절 磷수준이 다른 육계사료에 Crude Phytase 첨가시 영양소이용율 및 생산성에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

Phytase는 *Aspergillus ficuum*을 이용하여 생산하였고, activity 측정은 Engelen (1994) 방법을 변형하여 측정하였다. 시험사료는 Table 4-6-1, 2와 같고, 시험동물은 갓 부화한 Avian (브로일러) 수평아리 240수를 공시하여 4처리 6반복 반복당 10수씩을 완전임의 배치하였다. 각 처리구는 T1: 대조구 (non-phytate P(NPP): 전기-0.45%, 후기-0.35%), T2: 대조구+600 U phytase/kg diet, T3: 대조구-0.1% NPP, T4: T3+600 U phytase/kg diet로 하였다. 5주 사양 시험기간동안 물과 사료는 자유로이 섭취케 하고 24시간동안 조명해주었다. 주요 조사항목은 중체량, 사료섭취량, 영양소이용율, plasma 및 tibia 내 무기물 함량 등 이었다.

Table 4-6-1. Formula and composition of broiler starter(1-21 d) diets.

Ingredients, %	Treatments ³			
	T1	T2	T3	T4
Corn, ground	58.85	58.85	58.85	58.85
Soybean meal (44%CP)	22.20	22.20	22.20	22.20
Corn gluten	11.99	11.99	11.99	11.99
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00
Tricalcium phosphate	1.65	1.65	1.13	1.13
Limestone	0.88	0.88	1.32	1.32
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50
Broiler premix ¹	0.22	0.22	0.22	0.22
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40
DL-Methionine (50%)	0.14	0.14	0.14	0.14
Lysine-HCl (98%)	0.18	0.18	0.18	0.18
Sand	-	-	0.07	0.07
Phytase ²	-	+	-	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition				
ME, kcal/kg	3100.00	3100.00	3100.00	3100.00
Crude Protein, %	23.00	23.00	23.00	23.00
Lysine, %	1.10	1.10	1.10	1.10
Methionine +Cystine, %	0.90	0.90	0.90	0.90
Calcium, %	1.00	1.00	1.00	1.00
Non-phytate phosphorus, %	0.45	0.45	0.35	0.35
Total phosphorus, %	0.72	0.72	0.62	0.62

¹Broiler premix provides followings per kg of diet: vitamin A, 12,960 IU; vitamin D3, 3300 IU; vitamin E, 11mg; vitamin K3, 2.4mg; vitamin B1, 2.6mg; vitamin B2, 5.9mg; vitamin B6, 3.3mg; vitamin B12, 15MCg; Niacin, 52.8mg; Folic acid, 1.4mg; Biotin, 72mg; Calpanto, 110mg; Zn, 58.8mg; Mn, 79.2mg; Fe, 62.4mg; Cu, 6mg; I, 1.3mg; Co, 0.3mg; MO, 0.12mg Endox, 72mg; Se, 0.12mg; Na2SO4, 120mg.

²produced by Chung-Ang Univesity

³T1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

TABLE 4-6-2. Formula and composition of broiler finisher(22-35 d) diets.

Ingredients, %	Treatments ³			
	T1	T2	T3	T4
Corn, ground	65.63	65.63	65.63	65.63
Soybean meal (44%CP)	20.62	20.62	20.62	20.62
Corn gluten	7.30	7.30	7.30	7.30
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00
Tricalcium phosphate	1.16	1.16	0.65	0.65
Limestone	1.05	1.05	1.50	1.50
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50
Broiler premix ¹	0.27	0.27	0.27	0.27
Salt	0.27	0.27	0.27	0.27
DL-Methionine (50%)	0.03	0.03	0.03	0.03
Lysine-HCl (98%)	0.16	0.16	0.16	0.16
Sand	-	-	0.07	0.07
Phytase ²	-	+	-	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Calculated composition				
ME, kcal/kg	3100.00	3100.00	3100.00	3100.00
Crude protein, %	20.00	20.00	20.00	20.00
Lysine, %	1.00	1.00	1.00	1.00
Methionine +Cystine, %	0.72	0.72	0.72	0.72
Calcium, %	0.90	0.90	0.90	0.90
Non-phytate phosphorus, %	0.35	0.35	0.25	0.25
Total phosphorus, %	0.61	0.61	0.51	0.51

¹Broiler premix provides followings per kg of starter diet: vitamin A, 10,800 IU; vitamin D3, 2750 IU ; vitamin E , 9.2mg; vitamin K3 , 2.0mg; vitamin B1, 2.2mg; vitamin B2 , 4.9mg; vitamin B6, 2.8mg; vitamin B12, 12.5MCg; Niacin, 44mg; Folic acid, 1.2mg; Biotin, 60mg; Calpanto, 91.7mg; Zn, 49mg; Mn, 66mg; Fe, 52mg; Cu, 5mg; I, 1.1mg; Co, 0.25mg; MO, 0.1mg; Endox, 60mg; Se, 0.1mg; Na2SO4, 100mg.

²produced by Chung-Ang University

³T1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

2. 결과 및 고찰

사양시험결과, 증체량과 사료섭취량은 T3가 다른 처리구들 보다 유의하게 낮았고 ($P < 0.05$), 사료요구율은 T3가 1.73으로 높았을 뿐 유의차를 보이지는 않았다. 영양소이용율은 T3가 다소 낮았을 뿐 처리간 유의차를 보이지 않았지만, Ca과 P 이용율은 T1의 43%, 47%에 비해 T4가 각각 49%, 55%로 향상되었고, P 배설량은 phytase 첨가구인 T2와 T4가 대조구 배설량의 92.7%, 72.9% 수준으로 감소하였다. 이상의 결과를 보면, P 함량이 NRC (1994) 요구량 보다 낮은 사료에 phytase를 첨가한 처리구 (T4)가 NRC (1994) 요구량을 충족시킨 대조구 (T1)와 유사한 경향을 보였는데, 이는 P 흡수율 증가, phytate-mineral complex로부터 다른 광물질의 분해 이용, inositol의 이용, 소화율 증가 그리고 아미노산 (amino acids)의 이용율 증가 등 여러 요인 중 하나 혹은 그 이상의 작용에 의한 것으로 사료된다. 결론적으로 P 수준이 낮은 사료에 phytase 첨가시 생산성에 영향을 주지 않으면서 영양소이용율의 향상과 P 배설량의 감소를 보였는데, 이는 경제적이고 환경적인 측면에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 4-6-3. Body weight, feed intake, feed/gain and mortality of broiler chickens fed experimental diets for 35 d

Item	age (d)	Treatments				SEM
		T1	T2	T3	T4	
Weight, g/bird	1-21	780.6 ^a	782.3 ^a	723.7 ^b	778.8 ^a	12.19
	22-35	801.6	809.7	740.1	812.2	28.82
	1-35	1582.3 ^a	1592.1 ^a	1463.8	1590.8 ^a	35.50
Feed intake, g/bird	1-21	1115.3 ^a	1112.8 ^a	1035.8 ^b	1110.1 ^a	23.40
	22-35	1538.1 ^{ab}	1555.4 ^{ab}	1489.3 ^b	1593.7 ^a	34.91
	1-35	2653.4 ^a	2668.2 ^a	2525.1 ^b	2703.8 ^b	51.08
Feed/gain (g/g)	1-21	1.43	1.42	1.43	1.43	0.02
	22-35	1.92	1.93	2.02	1.96	0.05
	1-35	1.68	1.68	1.73	1.70	0.02
Mortality, %	1-21	6.67	5.00	6.67	10.00	3.56
	22-35	0.00	1.85	3.75	0.00	1.85
	1-35	6.67	6.67	10.00	10.00	4.28

^aT1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

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

TABLE 4-6-4. The effect of crude phytase supplementation on nutrient availability of broiler chickens fed corn-soybean diets.

Treatments ¹	DM	C. Protein	C. Fat	C. Fiber	C. Ash	
			(%)			
T1	79.77	75.50	84.06	13.00	38.81	
T2	79.44	74.29	86.12	15.95	39.43	
T3	78.74	71.40	84.10	12.96	38.45	
T4	79.08	74.06	83.66	11.58	39.99	
SEM	0.51	2.16	1.79	1.74	1.19	
	df	Probabilities				
Treatments	3	0.0466	0.4301	0.6377	0.0239	0.6974
Phosphorus	1	0.1493	0.2335	0.4154	0.1374	0.9160
Phytase	1	0.8541	0.6845	0.5867	0.5840	0.2829
P * Phytase	1	0.5318	0.2835	0.4030	0.1428	0.6428
		Main effect				
Phosphorus						
Control		79.53	74.89	85.09	14.47	39.12
C-0.1 %NPP		78.90	72.73	83.88	12.28	39.22
Phytase						
0 U/kg		79.18	73.45	84.08	12.98	38.63
600 U/kg		79.26	74.17	84.89	13.78	39.71

¹T1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

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

TABLE 4-6-5. The effect of crude phytase supplementation on NFE availability and nutrient excretion of broiler chickens fed corn-soybean diets.

Treatments	NFE	Phosphorus	Nitrogen
	%	(mg/day/bird)	
T1	90.3	319.2 ^a	861.3
T2	89.5	296.0 ^b	882.4
T3	89.8	250.9 ^c	928.8
T4	89.6	232.8 ^c	931.8
SEM	0.52	9.01	71.49
	df	Probabilities	
Treatments	3	0.5315	0.7853
Phosphorus	1	0.6881	0.3288
Phytase	1	0.2134	0.8389
P * Phytase	1	0.5091	0.8787
		Main effect	
Phosphorus			
Control	89.9	307.6 ^a	871.8
C-0.1 %NPP	89.7	241.8 ^b	930.3
Phytase			
0 U/kg	90.1	285.0 ^a	895.0
600 U/kg	89.5	264.4 ^b	907.1

¹T1: Control diet, T2: T1+600 U phytase/kg diet, T3: T1-0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

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

TABLE 4-6-6. The effect of crude phytase supplementation on mineral availability of broiler chickens fed corn-soybean diets.

Treatments	Calcium	Phosphorus	Magnesium	Iron	Zinc	
	(%)					
T1	43.31 ^{bc}	47.46 ^b	17.83 ^b	30.37 ^a	23.57 ^a	
T2	41.70 ^c	49.94 ^b	19.57 ^b	16.54 ^b	8.78 ^b	
T3	45.44 ^b	47.03 ^b	16.40 ^b	24.80 ^a	16.62 ^a	
T4	49.76 ^a	55.10 ^a	22.92 ^a	26.58 ^a	19.03 ^a	
SEM	1.43	1.59	1.31	2.28	3.08	
	df					
	Probabilities					
Treatments	3	0.0006	0.0009	0.0023	0.0003	0.0042
Phosphorus	1	0.0003	0.0834	0.3799	0.2437	0.5209
Phytase	1	0.2635	0.0006	0.0010	0.0041	0.0233
P * Phytase	1	0.0195	0.0432	0.0369	0.0004	0.0027
	Main effect					
Phosphorus						
Control		42.500 ^b	48.699	18.702	23.453	16.677
C-0.1 %NPP		47.601 ^a	51.060	19.663	25.689	17.823
Phytase						
0 U/kg		44.377	47.243 ^b	17.118 ^b	27.583 ^a	20.094 ^a
600 U/kg		45.724	52.516 ^a	21.247 ^a	21.560 ^b	13.905 ^b

T1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

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

TABLE 4-6-7. The effect of crude phytase supplementation on mineral contents of plasma of broiler chickens fed corn-soybean diets.

Treatments	Calcium	Phosphorus	Magnesium	Iron	Zinc
		(mg/dl)			
T1	9.82 ^b	14.50 ^{ab}	2.82 ^b	0.56	167.6 ^b
T2	10.82 ^a	14.42 ^{ab}	3.30 ^a	0.65	199.8 ^a
T3	10.99 ^a	12.80 ^b	3.44 ^a	0.60	206.0 ^a
T4	10.68 ^a	14.78 ^a	3.19 ^{ab}	0.46	180.5 ^{ab}
SEM	0.43	0.97	0.22	0.14	16.0
Probabilities					
Treatments	0.0200	0.1130	0.0249	0.4728	0.0520
Phosphorus	0.0638	0.2838	0.0866	0.4014	0.2328
Phytase	0.2111	0.1302	0.4122	0.7386	0.5545
P * Phytase	0.0207	0.1018	0.0136	0.1963	0.0141
Main effect					
Phosphorus					
Control	10.32	14.46	3.06	0.61	183.7
C-0.1 %NPP	10.83	13.79	3.31	0.53	196.0
Phytase					
0 U/kg	10.40	13.65	3.13	0.58	186.8
600 U/kg	10.75	14.60	3.24	0.55	192.9

¹T1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet

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

TABLE 4-6-8. The effect of crude phytase supplementation on weight, girth, and length of tibia of broiler chickens fed corn-soybean diets.

Treatment	Weight	Girth	Length
	g	cm	
T1	4.13 ^a	2.90	9.07 ^a
T2	4.16 ^a	2.79	9.02 ^a
T3	3.39 ^b	2.74	8.67 ^b
T4	4.05 ^a	2.86	8.90 ^{ab}
SEM	0.14	0.10	0.14
	df	Probabilities	
Treatments	3	0.0001	0.2343
Phosphorus	1	0.0001	0.4340
Phytase	1	0.0003	0.9723
P * Phytase	1	0.0003	0.0576
		Main effect	
Phosphorus			
Control		4.13 ^a	2.84
C-0.1 %NPP		3.72 ^b	2.79
Phytase			
0 U/kg		3.76 ^b	2.82
600 U/kg		4.09 ^a	2.82

** Values with different superscripts in the same row are significantly different(P<0.05)

TABLE 4-6-9. The effect of crude phytase supplementation on mineral contents of tibia of broiler chickens fed corn-soybean diets

Treatments	Ash	Calcium	Phosphorus	Magnesium	Iron	Zinc
	%, DM	—————	(% of tibia)	—————	—————	($\mu\text{g/g}$ of tibia)
T1	50.87 ^a	17.53 ^b	8.59 ^a	0.303 ^{ab}	191.5 ^{ab}	169.8
T2	51.10 ^a	18.64 ^a	8.62 ^a	0.317 ^a	192.9 ^{ab}	167.0
T3	48.84 ^b	17.23 ^{bc}	7.83 ^c	0.278 ^c	210.3 ^a	160.9
T4	51.51 ^a	16.93 ^c	8.24 ^b	0.300 ^b	170.4 ^b	167.1
SEM	0.72	0.32	0.16	0.009	0.002	0.54
————— Probabilities —————						
Treatments	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001	0.0866	0.4811
Phosphorus	0.0767	0.0001	0.0001	0.0003	0.8641	0.2987
Phytase	0.0024	0.0448	0.0243	0.0013	0.0794	0.6626
P * Phytase	0.0095	0.0009	0.0477	0.4587	0.0587	0.2784
————— Main effect —————						
Phosphorus						
Control	50.97	18.08 ^a	8.60 ^a	0.310 ^a	192.2	168.4
C-0.1 %NPP	50.17	17.08 ^b	8.04 ^b	0.289 ^b	190.4	164.0
Phytase						
0 U/kg	49.85 ^b	17.38 ^b	8.21 ^b	0.291 ^b	200.9	165.4
600 U/kg	51.32 ^a	17.79 ^a	8.43 ^a	0.309 ^a	181.7	167.1

^aT1: Control diet, T2: T1 + 600 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 600 U phytase/kg diet
^{a,b} Values with different superscripts in the same row are significantly different ($P < 0.05$)

제 7 절 비 피틴태 인(non-phytate P) 수준이 다른 육계사료 급여시 phytase의 첨가효과

1. 재료 및 방법

가. 시험사료 및 실험설계

시험사료는 NRC (1994) 요구량의 non-phytate phosphorus (NPP) (전기: 0.45%, 후기: 0.35%) 로부터 NPP의 수준을 각각 0.1%와 0.2%까지 감소시킨 3개의 NPP 수준에 phytase 2수준 (첨가와 무 첨가)으로 하여 3×2 요인 설계한다. 그 외의 열량과 단백질 수준은 동일하게 하였고 인산칼슘 감소로 인한 Ca의 부족 분은 석회석으로 대체하였으며 각 처리의 영양소 농도를 같게 하기 위해 부족한 양은 모래로 보충한다.

각 사료의 처리구는 T1: 대조구사료-NRC 수준의 NPP (전기: 0.45, 후기: 0.35% NPP), T2: 대조구사료 + 500 U phytase/kg 사료, T3: 대조구사료 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg 사료, T5: 대조구사료 - 0.2% NPP, 그리고 T6은 T5+ 500 U phytase/kg 사료로 한다.

나. 시험동물

갓 부화한 병아리 900수 (암, 수 450수씩)를 6처리에 처리당 3반복, 반복당 50수 (암, 수 25수씩)를 배치한다.

다. 사양시험 및 대사시험

사양시험은 공시 병아리를 평사에 사육하고 물과 사료는 자유로이 섭취케 한다. 증체율과 사료섭취량은 매주 측정한다.

대사시험은 사양 시험 4주 째에 각 처리별로 수컷 4마리씩을 선발해 cage에 수용하여 3일간의 적응기간 후 3일간 전분 채취법으로 실시한다.

라. 경골의 채취 및 분석

시험이 끝난 후 처리별로 각각 암수 5수씩 도살 후 모두 경골을 회수한다. 회

수된 경골은 무게, 길이, 경골의 중앙부위의 외경을 측정하여 둘레를 측정한다. 측정이 모두 끝난 후에 지방 추출과 분쇄 후 회분을 측정한다.

경골의 P, Ca 분석은 회분 분석 후 HNO_3 로 전처리한 다음 ICP (Inductively Coupled Plasma) 방출 분광기로 측정한다.

마. 화학분석 및 통계 분석

사료와 분의 일반 성분 분석과 경골의 회분 측정은 AOAC(1990) 방법에 준해 실시한다. 또한 사료와 분의 P, Ca 분석은 AOAC(1990) 방법에 준하여 HNO_3 로 전처리 후 ICP (Inductively Coupled Plasma) 방출 분광기로 측정한다.

사양 성적 및 화학분석 결과들은 SAS[®](1985)의 GLM(General Liner Model) Procedure를 통해 P의 첨가 수준과 phytase의 효과를 비교한다.

Table 4-7-1. Formula and composition of broiler starter diets

Ingredients (%)	Treatments ³					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Corn	58.37	58.37	58.37	58.37	58.37	58.37
Soybean meal (44% CP)	21.58	21.58	21.58	21.58	21.58	21.58
Corn Gluten	12.49	12.49	12.49	12.49	12.49	12.49
Rapessed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Tricalcium phosphate (18% P)	1.79	1.79	1.23	1.23	0.68	0.68
Limestone	0.76	0.76	1.24	1.24	1.72	1.72
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Broiler premix ¹	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Methionine	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
Lysine-HCl	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sand	-	-	0.08	0.08	0.15	0.15
Phytase ² (500 U/kg)	-	+	-	+	-	+
Total	100	100	100	100	100	100
Calculated composition						
ME, kcal/kg	3100	3100	3100	3100	3100	3100
CP, %	23	23	23	23	23	23
Lysine, %	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Met+Cys, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Ca, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Nonphytate P, %	0.45	0.45	0.35	0.35	0.25	0.25
Total P, %	0.72	0.72	0.62	0.62	0.52	0.52

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 16,000 IU; vitamin D₃, 3,200 IU; vitamin E, 0.4 IU; vitamin K₃, 6.5 mg; vitamin B₁, 2.6 mg; vitamin B₂, 10.4 mg; vitamin B₆, 6.5 mg; vitamin B₁₂, 39 µg; niacin, 52 mg; folic acid, 1.3 mg; pantothenic acid, 19.5 mg; tocopherol, 30 IU; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 70 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

²Provided by NOVO Corp.

³T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP diet, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

Table 4-7-2. Formula and composition of broiler finisher diets

Ingredients (%)	Treatments ³					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Corn	65.28	65.28	65.28	65.28	65.28	65.28
Soybean meal (44% CP)	20.38	20.38	20.38	20.38	20.38	20.38
Corn gluten	7.52	7.52	7.52	7.52	7.52	7.52
Rapeseed meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Tricalcium phosphate(18% P)	1.26	1.26	0.70	0.70	0.15	0.15
Limestone	0.97	0.97	1.45	1.45	1.93	1.93
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Broiler premix ¹	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
Salt	0.27	0.27	0.27	0.27	0.40	0.40
Methionine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Lysine-HCl	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Sand	-	-	0.08	0.08	0.15	0.15
Phytase ² (500 U/kg)	-	+	-	+	-	+
Total	100	100	100	100	100	100
Calculated composition						
ME, kcal/kg	3100	3100	3100	3100	3100	3100
CP, %	20	20	20	20	20	20
Lysine, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Met+Cys, %	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Nonphytate P, %	0.35	0.35	0.25	0.25	0.15	0.15
Total P, %	0.61	0.61	0.51	0.51	0.41	0.41

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 12,000 IU; vitamin D₃, 2,400 IU; vitamin E, 0.3 IU; vitamin K₃, 5 mg; vitamin B₁, 2 mg; vitamin B₂, 8 mg; vitamin B₆, 5 mg; vitamin B₁₂, 30 µg; niacin, 40 mg; folic acid, 1 mg; pantothenic acid, 15 mg; tocopherol, 20 IU; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 70 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

²Provided by NOVO Corp.

³T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP diet, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP diet, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet.

2. 결과 및 고찰

가용인의 수준이 감소함에 따라 사료 섭취량, 증체량 그리고 폐사율이 유의하게 ($P < 0.01$) 저하하였으나 phytase 첨가로 인해 증체량 ($P < 0.01$) 및 사료 섭취량과 폐사율($P < 0.05$)이 현저히 개선되었다. 또한 phytase 첨가는 사료에 DM ($P=0.007$), 조단백질($P=0.0076$), 조지방 ($P=0.002$) 그리고 조회분 ($P=0.078$)의 이용율을 증가시켰다. Cu ($P < 0.05$)와 Zn ($P < 0.01$)의 이용율은 NPP 수준에 유의하게 영향을 받았는데 NPP수준이 감소하면 Zn의 이용율($P < 0.01$)이 감소하고 Cu의 이용율($P < 0.05$)은 증가하였다. phytase 첨가로 인해 P와 Zn ($P < 0.05$) 및 Mg와 Cu ($P < 0.01$)의 이용율이 유의하게 증가되었다. NPP 수준이 낮으면 N, 조회분, Ca, P 그리고 Zn ($P < 0.01$)와 Mg과 Cu($P < 0.05$)의 축적량은 감소하였으며 조회분의 배설량 ($P < 0.05$)은 증가되었고 P와 Cu의 배설량 ($P < 0.01$)은 감소하였다. Phytase 첨가는 이들 영양소의 축적량에 유의하게($P < 0.01$) 증가시켰고 N의 배설량을 유의하게 ($P < 0.05$) 감소시켰다. 또한 NPP의 감소는 경골의 무게와 길이($P < 0.01$) 그리고 둘레 ($P < 0.05$)를 유의하게 감소시켰으며 Phytase 첨가로 인해 경골의 길이 ($P < 0.05$) 및 회분함량 ($P < 0.01$)을 증가되었다. 결론적으로 NPP의 감소로 인한 여러 가지 저해효과들을 phytase 첨가로서 개선할 수 있으며 생산성에 영향을 미치지 않으면서 NPP의 수준을 줄일 수 있다.

Table 4-7-3. Body weight gain, feed intake, feed/gain and mortality of broiler chickens fed experimental diets

Item	age (d)	Treatments						SEM
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Weight, g/bird	1-21	586.9 ^a	597.2 ^a	531.0 ^b	558.8 ^{ab}	370.5 ^d	455.6 ^c	6.81
	22-35	779.8 ^a	767.5 ^a	662.1 ^a	766.3 ^a	413.0 ^b	433.6 ^b	21.18
	1-35	1366.6 ^a	1364.6 ^a	1193.1 ^b	1325.1 ^{ab}	783.4 ^c	889.1 ^c	24.68
Feed intake, g/bird	1-21	842.7 ^a	858.6 ^a	783.4 ^{ab}	812.7 ^a	585.0 ^c	705.4 ^b	12.74
	22-35	1348.8 ^a	1332.4 ^a	1180.6 ^a	1340.6 ^a	687.9 ^b	837.7 ^b	27.60
	1-35	2191.5 ^a	2191.0 ^a	1964.0 ^a	2153.2 ^a	1272.9 ^c	1543.1 ^b	34.85
Feed/gain (g/g)	1-21	1.44	1.44	1.48	1.45	1.58	1.55	0.03
	22-35	1.73 ^b	1.74 ^b	1.78 ^{ab}	1.75 ^{ab}	1.68 ^b	1.94 ^a	0.04
	1-35	1.61	1.61	1.65	1.62	1.63	1.74	0.02
Mortality, %	1-21	5.39 ^b	2.00 ^b	10.06 ^b	4.04 ^b	25.88 ^a	13.63 ^b	1.68
	22-35	0.74 ^b	1.65 ^b	5.23 ^b	5.62 ^b	35.58 ^a	7.15 ^b	1.45
	1-35	6.07 ^c	3.07 ^c	14.83 ^{bc}	9.42 ^{bc}	52.38 ^a	19.75 ^b	1.78

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{a-b}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.01).

^{a-d}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.05).

Table 4-7-4. Nutrients availability of experimental diets in broiler chickens

Treatment ¹	Nutrients				
	DM	Protein	Fat	Ash	
	----- (%) -----				
T1	83.4 ^A	69.6 ^A	83.7 ^C	39.5 ^{ab}	
T2	84.7 ^A	73.4 ^A	89.1 ^A	47.7 ^a	
T3	83.8 ^A	66.2 ^A	85.6 ^{BC}	39.4 ^{ab}	
T4	84.2 ^A	68.7 ^A	87.7 ^{AB}	45.1 ^a	
T5	79.7 ^B	57.6 ^B	85.0 ^{BC}	28.5 ^b	
T6	84.7 ^A	68.3 ^A	84.8 ^{BC}	37.3 ^{ab}	
SEM	0.6492	2.5764	0.6538	3.4938	
ANOVA	df	----- (Probabilities) -----			
Treatment	5	0.0083	0.0888	0.0018	0.1143
Phosphorus	2	0.0755	0.0892	0.1100	0.0811
Phytase	1	0.0074	0.0757	0.0023	0.0783
Phosphorus × Phytase	2	0.0297	0.4097	0.0113	0.9398
Main effects					
phosphorus					
Control		83.9	70.8	86.4	42.8
C-0.1% NPP		84.1	67.4	86.6	42.3
C-0.2% NPP		82.2	63.0	84.9	32.9
Phytase					
0 U/kg		82.4 ^B	64.4	84.8 ^B	35.8
500 U/kg		84.5 ^A	69.7	87.2 ^A	42.8

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{A-B}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.01).

^{a-d}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.05).

Table 4-7-5. Mineral availability of experimental diets in broiler chickens

Treatment ¹	Nutrients					
	Ca	P	Mg	Zn	Cu	
	----- (%) -----					
T1	42.8 ^b	50.5 ^{ab}	19.8 ^c	27.0 ^{bc}	14.4 ^B	
T2	57.6 ^a	61.6 ^a	31.3 ^a	43.7 ^a	34.5 ^A	
T3	47.6 ^{ab}	57.3 ^{ab}	21.8 ^{bc}	31.1 ^{ab}	29.8 ^{AB}	
T4	44.8 ^{ab}	66.1 ^a	24.8 ^{abc}	30.2 ^{ab}	38.3 ^A	
T5	42.2 ^b	38.9 ^b	21.5 ^{bc}	13.3 ^c	26.1 ^{AB}	
T6	46.8 ^{ab}	60.1 ^a	28.8 ^{ab}	24.7 ^{bc}	38.4 ^A	
SEM	3.0727	4.5990	2.0831	3.6789	2.8358	
ANOVA	df	----- (Probabilities) -----				
Treatment	5	0.1153	0.1087	0.0390	0.0121	0.0016
Phosphorus	2	0.3432	0.1892	0.6831	0.0008	0.0327
Phytase	1	0.1082	0.0156	0.0044	0.0129	0.0003
Phosphorus × Phytase	2	0.1090	0.5921	0.3068	0.0004	0.2826
Main effects						
phosphorus						
Control		50.2	56.1	25.5	35.4 ^A	24.4 ^b
C-0.1% NPP		46.2	61.7	23.3	30.6 ^{AB}	34.0 ^a
C-0.2% NPP		44.5	49.4	25.1	25.6 ^B	32.3 ^a
Phytase						
0 U/kg		44.2	48.8 ^b	21.0 ^B	28.2 ^b	23.4 ^B
500 U/kg		49.7	62.6 ^a	28.3 ^A	32.9 ^a	37.1 ^A

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T2 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{a-b}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.01).

^{A-B}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.05).

Table 4-7-6. Nutrients retention of experimental diets in broiler chickens

Treatment ¹	Nutrients							
	Nitrogen	Ash	Ca	P	Mg	Zn	Cu	
	(g/bird/d)				(mg/bird/d)			
T1	3.2 ^{AB}	2.54 ^B	0.47 ^B	0.35 ^B	0.035 ^B	3.52 ^B	0.246 ^B	
T2	3.3 ^A	3.49 ^A	0.95 ^A	0.56 ^A	0.063 ^A	7.82 ^A	0.834 ^A	
T3	2.6 ^B	2.40 ^B	0.61 ^B	0.33 ^B	0.036 ^B	4.00 ^B	0.647 ^A	
T4	2.4 ^{AB}	2.41 ^B	0.54 ^B	0.30 ^{BC}	0.041 ^B	3.53 ^B	0.822 ^A	
T5	0.9 ^C	0.76 ^C	0.23 ^C	0.12 ^D	0.015 ^C	0.77 ^C	0.196 ^B	
T6	2.8 ^{AB}	2.01 ^B	0.49 ^B	0.25 ^C	0.053 ^{AB}	2.58 ^B	0.786 ^A	
SEM	0.1166	0.1515	0.0307	0.0130	0.0036	0.3216	0.0576	
ANOVA	d)	------(Probabilities)-----						
Treatment	5	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Phosphorus	2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0112	0.0001	0.0130
Phytase	1	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Phosphorus × Phytase	2	0.0001	0.0025	0.0001	0.0001	0.0079	0.0001	0.0201
Main effects								
phosphorus								
Control		3.3 ^A	3.01 ^A	0.71 ^A	0.45 ^A	0.049 ^a	5.67 ^A	0.54 ^b
C-0.1% NPP		2.7 ^B	2.45 ^B	0.58 ^B	0.32 ^B	0.039 ^b	3.77 ^B	0.73 ^a
C-0.2% NPP		1.8 ^C	1.38 ^C	0.36 ^C	0.18 ^C	0.034 ^b	1.67 ^C	0.49 ^b
Phytase								
0 U/kg		2.2 ^B	1.90 ^B	0.43 ^B	0.25 ^B	0.029 ^B	2.76 ^B	0.36 ^B
500 U/kg		3.0 ^A	2.67 ^A	0.66 ^A	0.37 ^A	0.052 ^A	4.64 ^A	0.81 ^A

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{A-B}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.01).

^{a-b}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.05).

Table 4-7-7. Nutrients excretion of experimental diets in broiler chickens

Treatment ¹	Nutrients							
	Nitrogen	Ash	Ca	P	Mg	Zn	Cu	
	(g/bird/d)			(mg/bird/d)				
T1	1.13 ^b	3.12 ^b	0.50 ^b	0.27 ^A	0.115	7.628 ^b	1.175 ^{AB}	
T2	0.99 ^b	3.15 ^b	0.57 ^{ab}	0.29 ^A	0.114	8.301 ^{ab}	1.307 ^{AB}	
T3	1.23 ^{ab}	3.40 ^{ab}	0.62 ^{ab}	0.23 ^{AB}	0.120	8.142 ^{ab}	1.403 ^A	
T4	0.98 ^b	3.43 ^{ab}	0.62 ^{ab}	0.19 ^{AB}	0.110	7.519 ^b	1.210 ^{AB}	
T5	1.50 ^a	3.98 ^a	0.68 ^a	0.22 ^{AB}	0.128	9.289 ^a	1.104 ^{BC}	
T6	1.19 ^{ab}	3.44 ^{ab}	0.57 ^{ab}	0.15 ^B	0.118	7.042 ^b	0.985 ^C	
SEM	0.0434	0.1814	0.0351	0.0191	0.0061	0.4005	0.0587	
ANOVA	df	----- (Probabilities) -----						
Treatment	5	0.0502	0.2144	0.1614	0.0068	0.7313	0.1054	0.0034
Phosphorus	2	0.1800	0.0724	0.1083	0.0031	0.4885	0.8076	0.0025
Phytase	1	0.0166	0.4279	0.7013	0.1069	0.3016	0.0930	0.2623
Phosphorus × Phytase	2	0.9705	0.3940	0.1396	0.2456	0.8124	0.0355	0.0456
Main effects phosphorus								
Control		1.14	3.13 ^b	0.54	0.28 ^A	0.114	7.964	1.241 ^A
C-0.1% NPP		1.12	3.41 ^{ab}	0.62	0.21 ^B	0.115	7.830	1.306 ^A
C-0.2% NPP		1.32	3.67 ^a	0.62	0.19 ^B	0.123	8.165	1.044 ^B
Phytase								
0 U/kg		1.32 ^a	3.45	0.59	0.24	0.121	8.353	1.227
500 U/kg		1.06 ^b	3.33	0.58	0.21	0.114	7.621	1.167

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{a-d} Means within each column with no common superscript differ significantly (P < 0.01).

Table 4-7-8. Tibia weight, length and girth of broiler fed experimental diets for 35 d

Treatment ¹			
	Weight (g)	Length (cm)	Girth (cm)
T1	9.41 ^A	9.04 ^A	2.58 ^a
T2	9.19 ^A	8.66 ^{AB}	2.63 ^a
T3	6.80 ^B	8.45 ^B	2.56 ^a
T4	6.63 ^B	8.56 ^B	2.59 ^a
T5	2.46 ^D	6.81 ^D	2.31 ^b
T6	3.67 ^C	7.58 ^C	2.51 ^{ab}
SEM	0.2946	0.1312	0.0956
ANOVA	df	----- (Probabilities) -----	
Treatment	5	0.0001	0.0508
Phosphorus	2	0.0001	0.0243
Phytase	1	0.1489	0.1293
Phosphorus × Phytase	2	0.0036	0.4610
Main effects			
phosphorus			
Control		9.30 ^A	8.85 ^A
C-0.1% NPP		6.72 ^B	8.50 ^B
C-0.2% NPP		3.07 ^C	7.20 ^C
Phytase			
0 U/kg		6.22	8.10 ^b
500 U/kg		6.50	8.27 ^a

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{A-D}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.01)

^{a-d}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.05)

Table 4-7-9. Ash and mineral content of tibia of broiler chickens fed experimental diets for 35 d

Treatment ¹	Ash		Ca		P		Mg		
	(% of DM)		-----		(% of ash)		-----		
T1	52.10 ^A	17.27 ^{AB}	8.83 ^{AB}	0.56 ^A					
T2	55.14 ^A	18.45 ^A	9.37 ^A	0.58 ^A					
T3	44.58 ^B	14.65 ^C	7.70 ^C	0.50 ^{BC}					
T4	53.80 ^A	17.60 ^{AB}	9.03 ^{AB}	0.54 ^{AB}					
T5	46.68 ^B	16.01 ^{BC}	8.12 ^{BC}	0.49 ^C					
T6	46.92 ^B	14.22 ^C	7.26 ^C	0.46 ^C					
SEM	1.2417	0.6685	0.3131	0.0151					
ANOVA	df	----- (Probabilities) -----							
Treatment	5	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001				
Phosphorus	2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001				
Phytase	1	0.0001	0.0664	0.0605	0.3160				
Phosphorus × Phytase	2	0.0001	0.0002	0.0002	0.0455				
Main effects									
phosphorus									
Control		53.62 ^A	17.86 ^A	9.06 ^A	0.57 ^A				
C-0.1% NPP		49.20 ^B	16.12 ^B	8.36 ^B	0.52 ^B				
C-0.2% NPP		46.85 ^B	15.13 ^B	7.71 ^B	0.47 ^C				
Phytase									
0 U/kg		47.79 ^B	16.00	8.19	0.52				
500 U/kg		51.99 ^A	16.80	8.57	0.53				

¹T1: Control diet, T2: T1 + 500 U phytase/kg diet, T3: T1 - 0.1% NPP, T4: T3 + 500 U phytase/kg diet, T5: T1 - 0.2% NPP, T6: T5 + 500 U phytase/kg diet

^{A-B}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.001).

^{a-c}Means within each column with no common superscript differ significantly (P<0.005).

제 8 절 Carbohydrase 첨가가 산란계의 생산성 및 계란의 품질에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 실험사료

밀위주의 사료에 multi-enzyme (carbohydrases)의 첨가효과를 알아보기 위해 18 주령된 Hy-Line 갈색산란계 864수를 4처리 12반복 반복당 18수 (cage당 2수) 씩 난괴법으로 배치하였다. 각 사료처리구들은 대조구사료 (10% wheat: T1), 25% wheat + 5 ppm Carophyll Red (T2), 25% modified wheat + Roxazyme G 0.01% + 5 ppm Carophyll Red (T3) 및 modified wheat (no-restriction) + 25 ppm Carophyll Yellow + 5 ppm Carophyll Red (T4)로 하여 21주 동안 사양실험을 하였다.

나. 실험설계 및 사양실험

18주령된 ISA brown 산란계 864수를 4처리 12반복 반복당 18수 (cage당 2수) 씩 난괴법으로 배치하였다. 사양시험은 19주령이 될 때까지 일반 시판용 산란에 비사료를 급여하였고 20주령부터 40주령까지 실험사료를 급여하였다. 실험사료는 mash 형태로 하여 사양시험동안 물과 함께 자유로이 섭취토록 하였다. 계사 내부는 적절한 환기를 시켜주었고 점등프로그램은 18주령시 하루 14:30 점등을 시작으로 16시간이 될 때까지 매주 30분씩 증가시켰다.

다. 난질측정

난수와 계란의 무게는 매일 측정하였고, 사료섭취량은 매주 측정하였다. 난질 및 난각질을 평가하기 위해 각 처리로 부터 매주 25개의 계란을 취하여 비중, 난각강도, 난각두께 그리고 난백고를 측정하였다. 계란의 비중은 1.065에서 1.120까지 0.005씩 증가시킨 소금물을 사용하여 측정하였다. Haugh unit 은 dial indicator (AMES, Waltham, Mass., USA) 를 사용하여 측정된 농후난백의 높이와 계란의 무게로 부터 계산되었다 (Eisen et al., 1962). 난각두께는 dial pipe gage (Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 둔단부, 예단부 그리고 중간부를

측정하여 평균값을 구하였다.

Table 4-8-1. Formula and composition of experimental diets

Ingredients, %	Pre-lay	Treatments			
		T1	T2	T3	T4
Corn	47.90	51.87	41.08	39.00	-
Wheat	10.00	10.00	25.00	-	-
Spec-modified wheat	-	-	-	25.00	66.87
Soybean meal (44%)	13.50	15.80	15.50	15.30	9.40
Limestone	4.51	9.08	9.09	9.09	9.11
Full-fat soybean	-	-	-	-	5.21
Wheat bran	15.10	3.50	-	2.50	2.20
Rapeseed meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Corn gluten	2.60	3.20	2.70	2.50	0.50
Animal fat	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Calcium phosphate(18%)	0.96	1.11	1.14	1.11	1.08
Layer premix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Salt	0.29	0.32	0.32	0.32	0.32
DL-Methionine(50%)	0.14	0.12	0.16	0.17	0.30
Lysine-HCl(78%)	-	-	0.01	-	-
Roxazyme ²	-	-	-	0.01	0.01
Carophyll Red ³	-	-	+	+	+
Carophyll Yellow ⁴	-	-	-	-	+
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Composition ⁵					
ME, kcal/kg	2750	2750	2750	2750	2750
CP, %	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0
Lysine, %	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71
Met+Cys, %	0.62	0.62	0.64	0.64	0.69
Ca, %	2.00	3.75	3.75	3.75	3.75
P-available, %	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
P-total, %	0.60	0.60	0.59	0.60	0.62
Linoleic acid, %	1.51	1.42	1.20	1.19	1.00

¹Provides per kg of diet: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D₃, 2,000 IU; vitamin E, 0.25 IU; vitamin K₃, 2 mg; vitamin B₁, 2 mg; vitamin B₂, 6 mg; vitamin B₆, 3 mg; vitamin B₁₂, 10 µg; niacin, 30 mg; pantothenic acid, 10 mg; folic acid, 1 mg; choline, 250 mg; ethoxyquin, 125 mg; I, 0.5 mg; Zn, 50 mg; Mn, 40 mg; Fe, 60 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.2 mg;

²*Trichoderma viride* enzymes: Roxazyme-G from Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland.

^{3,4}Pigmenters produced by Hoffmann-La Roche : supplemented at the level of 5 ppm for Carophyll Red and 25 ppm for Carophyll Yellow.

⁵Calculated values.

2. 결 과

사양실험을 통해서 얻어진 결과를 Table 8-2, 3, 그리고 T8-4에서 보여주고 있다. 산란율에 있어서 T4구가 다른 처리구에 비해 유의하게 높았고 반면 난중은 가벼웠다 ($P < 0.01$). 비중과 연파란율에 있어서 효소첨가구들 (T3 와 T4) 이 무첨가구들 (T1과 T2) 보다 약간 높았지만 유의한 차이는 없었다. Haugh unit score는 T4구에서 가장 높았으며 ($P < 0.05$), 계란청결도는 처리간에 차이가 없었다. 난각두께는 T1에서 가장 높았다 ($P < 0.05$). 난황착색도는 T3구가 가장 높았던 반면 T4구는 가장 낮았다 ($P < 0.01$).

Table 4-8-2. Overall performance of laying hens fed experimental diets during 20 to 40 wk of age

Parameters	Treatments ¹				SEM
	T1	T2	T3	T4	
Egg production (%, hen-day)	74.65 ^a	73.60 ^b	74.03 ^{ab}	74.78 ^a	0.03
Egg production (%, hen-housed)	67.10 ^{BC}	67.67 ^{AB}	66.23 ^C	68.72 ^a	0.33
Egg weight, g	58.73 ^A	58.65 ^A	58.51 ^{AB}	58.14 ^B	0.12
Feed consumption (g/hen/day)	128.83 ^A	126.35 ^B	129.05 ^A	129.23 ^A	0.34
Feed conversion (feed/egg mass)	2.93	2.92	2.97	2.95	0.04
Mortality (%)	7.84	6.05	7.84	6.38	1.14

¹T1: 10% wheat, T2: 25% wheat + 5 ppm Carophyll Red, T3: 25% spec-modified wheat + 0.01% Roxazyme-G + 5 ppm Carophyll Red, T4: spec-modified wheat (no-restriction) + 0.01% Roxazyme-G + 5 ppm Carophyll Red + 25 ppm Carophyll Yellow.

^{a-b, A-B} Values with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

Table 4-8-3. Body weight of laying hens fed experimental diets at 20 wk, 30 wk and 40 wk of age

Parameters	Treatments ¹				SEM
	T1	T2	T3	T4	
Initiation of lay (20 wk)	1479.8	1416.4	1489.2	1454.2	45.71
30 wk	2001.3	1909.8	2001.7	1965.5	54.59
40 wk	2272.2	2195.8	2206.0	2274.4	85.70
Weight gain(20 wk to 40 wk)	792.4	779.4	716.8	820.3	88.92

¹T1: 10% wheat, T2: 25% wheat + 5 ppm Carophyll Red, T3: 25% spec-modified wheat + 0.01% Roxazyme-G + 5 ppm Carophyll Red, T4: spec-modified wheat(no-restriction) + 0.01% Roxazyme-G + 5 ppm Carophyll Red + 25 ppm Carophyll Yellow.

Table 4-8-4. Quality of eggs laid by hens fed experimental diets during 20 to 40 wk of age

Parameters	Treatments ¹				SEM
	T1	T2	T3	T4	
Specific gravity	1.0915	1.0914	1.0918	1.0918	0.0003
Eggshell thickness, mm	410.8 ^A	405.4 ^B	404.2 ^B	403.0 ^B	1.163
Broken egg ratio, %	0.69	0.73	0.64	0.63	0.111
Haugh unit	92.1 ^{ab}	91.8 ^b	92.6 ^{ab}	93.0 ^a	0.334
Egg cleanliness ²	1.22	1.22	1.23	1.22	0.028
Egg yolk color score ³	8.5 ^C	8.8 ^B	10.2 ^A	6.7 ^D	0.045

¹T1: 10% wheat, T2: 25% wheat + 5 ppm Carophyll Red, T3: 25% spec-modified wheat + 0.01% Roxazyme-G + 5 ppm Carophyll Red, T4: spec-modified wheat(no-restriction) + 0.01% Roxazyme-G + 5 ppm Carophyll Red + 25 ppm Carophyll Yellow.

²Visual score from 1 to 4 (very clean, clean, dirty and very dirty).

³Measured by Roche color fan.

^{a-b, A-B}Values with different superscript in the same row are significantly different at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

제 9 절 Total-P, phytic acid, phytate-P, phytase activity in grains and cereals

1. 재료 및 방법

가. Total-Phosphorus

Total-Phosphorus의 측정은 AOAC (1990)의 방법에 준하여 건식법(dry ashing method)으로 측정 하였다. 시료 2g을 crucible에 정량하여 550℃ 회화로에서 2시간 태운 후, 시료를 실온에서 냉각시키고 HNO₃(1:1) 용액으로 crucible에 있는 시료에 2-3 방울 떨어뜨려 제법 끈끈한 액이 되면 다시 550℃ 회화로에서 2시간 태웠다. 실온에서 냉각시킨 후 HCl(1:1) 용액 10 ml을 crucible에 넣고 유리봉으로 저어 완전히 용해시킨다. 이 용액을 250 ml volumetric flask에서 NO-41(Whatman) 여과지로 여과시키고, 공시액을 24시간 공기중에 방치한 후 희석하여 ICP(Inductively Coupled Plasma: Model JY, Jobin Yvon, France) 방출분광기를 이용하여 측정하였다.

나. Phytate-P

시료 2g을 정확히 칭량하여 0.2N HCl 50ml에 넣고 1시간동안 shaking한 후 10배 희석하였다. Phytate reference solutions과 시료 희석액 0.5ml을 마개가 달린 tube에 각각 넣고, ferric solution 1ml을 첨가했다. 30분 동안 끓는 물에서 tube를 가열한 후, 차가운 물에서 실온이 될 때까지 냉각시켰다. Tube내 시료를 혼합하고 3000g에서 30분 동안 원심분리를 한 후에 상층액 1ml을 다른 tube로 옮긴 후 2,2'-bipyridine solution 1.5ml을 첨가하여 519 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. Phytase activity

0.2ml의 sample과 standard solution이 들어있는 test tube를 약 5분 동안 37±0.1 °C 온수조 안에서 평형을 유지한 후 0.4ml의 substrate solution을 첨가한다. 30분 동안 incubation을 시킨 후 0.4ml의 color-stop mix용액을 첨가한다. 이 용액들을 30분 안에 spectrophotometer에서 415nm로 측정한다.

Phytase activity 정의는 37°C, pH 5.5인 Na-phytate 용액 (5.1mM)으로부터 1 분 동안 1 μ M의 무기태 인을 유리시킬 수 있는 phytase 효소의 양으로 표현한다.

2. 결과 및 고찰

Table. 4-9-1 Phytic acid, phytate P, total P, and phytase activity in feed ingredients

	Phytic acid	Phytate-P	Total P	Phytate-P	Phytase activity
	mg/100g	mg/100g	mg/100g	% of total P	U/kg
Corn	211.3	59.6	181.9	32.7	0.2
Lupin	193.8	54.6	306.5	17.8	3.2
Tapioca	24.9	7.0	58.9	11.9	18.8
Wheat	705.9	199.0	295.1	67.5	2902.3
Sesame meal	1922.6	542.2	816.3	66.4	3.0
Soybean meal	1013.7	285.9	576.5	49.6	7.5
Cottonseed meal	1073.9	302.8	677.8	44.7	2.4
Cocunut meal	722.0	203.6	538.7	37.8	350.1
Corn germ meal	112.3	31.7	130.0	24.4	12.6
Corn gluten meal	1017.4	286.9	536.0	53.5	169.7
Corn gluten feed	3178.6	896.4	1098.9	81.5	14.8
Rapseed meal	1897.9	535.2	1016.1	52.7	102.5
Wheat bran	2530.1	741.7	892.9	83.1	2935.1
Rice bran	4160.4	1201.4	1886.0	63.7	-
Rice bran (fat-free)	3818.8	1076.9	1898.7	56.7	113.7

Phytic acid는 주로 박류와 곡류의 부산물이 많아 함유하고 있었다. 특히 부산물인 wheat bran과 rice bran은 각각 2530 mg/100g과 4160 mg/100g로 많은

양을 함유하고 있었다. 그러나 이와 대조적으로 곡류에는 상당히 적은 양의 phytic acid를 함유하고 있었다. Phytate P 역시 phytic acid와 같은 결과로 나타났는데, 이는 phytic acid의 28.2 %를 차지하고 있기 때문이다. Total P 역시 박류와 부산물이 많이 함유하고 있지만 phytate P에서와 같이 곡류와 많은 차이를 나타내지는 않았다. 특히 rice bran은 1886 mg/100g으로 가장 많은 양을 함유하고 있었다. Phytase activity는 곡류에는 거의 존재하지 않았지만 wheat 경우에는 예외적으로 2902 u/kg 높은 역가를 보였다. 주로 박류와 부산물에 phytase가 존재하였는데, 그 중에서도 wheat bran이 2935 U/kg으로 가장 높았다. 그러나 그외 원료들은 소량의 activity가 존재하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 살펴보면 곡류의 외피부분에 많은 양의 P이 함유된 것을 알수 있다. Wheat과 wheat bran은 가축의 에너지원으로 많이 쓰이고 있는 사료원 인데, 본 시험결과 많은 양의 phytate P와 높은 phytase activity를 지니고 있는 것으로 나타났다. 이는 단위가축이 이용하지 못하고 배설되는 phytate P를 phytase 작용에 의해 흡수이용이 가능하여 배설되는 양을 줄일 수 있고, 또한 무기태 인의 첨가량을 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

Figure 4-9-1은 미생물 phytase와 식물성 phytase의 pH에 따른 변화를 나타낸 그래프이다. 미생물·식물성 phytase 모두 pH 5.5에서 가장 높은 활성을 보였다. pH가 낮아질수록 활성도 떨어졌는데, 이때 특히 식물성 phytase보다는 미생물 phytase가 훨씬 더 많이 감소하였다. 중성 pH 상황아래에서는 미생물·식물성 phytase 모두 급격히 감소하여 거의 활성이 없었다. 가축의 위내 pH는 2-3이기 때문에 현재 사용하고 있는 미생물 phytase는 위를 통과하면서 activity는 실제 측정치의 40 % 정도밖에 기능을 발휘한다고 할 수 있다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해서는 activity가 파괴되지 않고 장으로 이동할 수 있게끔 하는 어떤 방법을 강구해야 할 것으로 사료된다.

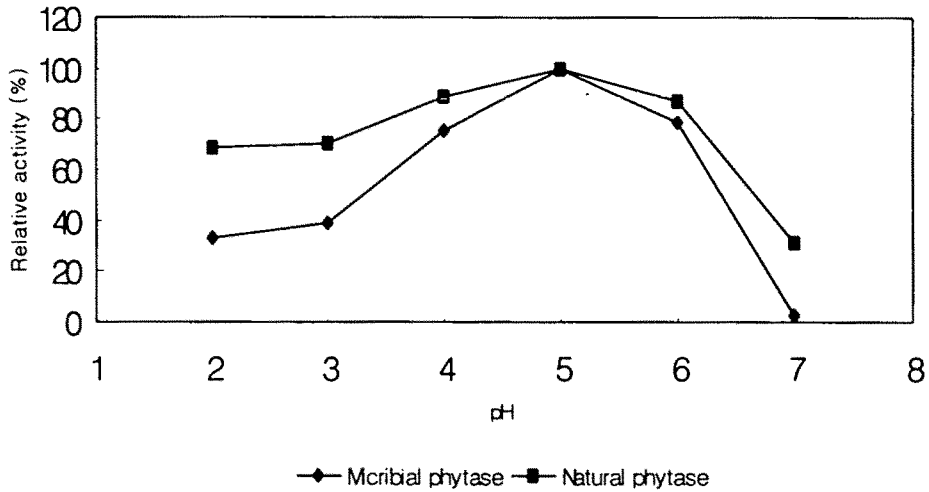


Figure 4-9-1. pH profile of microbial and natural phytase

제 10 절 결 론

산란계에 있어서 사료내 phytase를 첨가함으로써 생산성이나 난중 및 난각질에 영향을 미치지 않으면서 인산칼슘의 양을 100% 감소시킬 수 있었다. 제 3절에서 phytase첨가로 P의 이용율이 80%이상 개선되었으며 배설량은 42% 정도의 감소를 가져왔다. Simons등 (1992)이 낮은 수준의 무기 인을 함유한 육계사료에 phytase를 첨가함으로써 total P의 이용율을 70%까지 향상시킬 수 있었으며, 인의 이용율이 증가함으로써 인해 40% 이상 P의 배설량을 감소시킨다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서는 증체량에 영향을 미치지 않으면서 P의 이용율이 38% 개선되었고 P의 배설량에 있어서도 45% 이상 개선효과를 가져왔다.

결론적으로 정상적인 옥수수-대두박 위주의 산란계 및 육계사료에 미생물 phytase의 첨가는 산란율이나 난질 그리고 증체율 등에 영향을 미치지 않으면서 생산성의 개선시킬 수 있었으며 또한 phytase를 첨가함으로써 사료내 total P

수준의 감소와 인산칼슘의 사용량을 감소시킬 수 있고, 그로 인한 P의 배설량도 감소시킬 수 있다. 경제적인 측면에서 볼 때 phytase의 첨가비용이 인산칼슘 첨가비용을 초과하지 않는다면 환경적 이익뿐 만 아니라 경제적인 측면에서도 상당한 효과를 기대할 수 있다. 또한 carbohydrases첨가로 산란율에 차이없이 옥수수를 전량 밀로 대체할 수 있다.

제 11 절 참고문헌

- Andrews, D. K., and L. R. Berg, 1977. Observation on phosphorus requirements of laying pullets. *Poultry Sci.* 56:1693.(Abstr.)
- Association of Official Analytical Chemist, 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Damron, B. L., A. R. Eldred, and R. H. Harms, 1974. The relationship of dietary phosphorus to eggshell quality. *Poultry Sci.* 54:1916.(Abstr.)
- De Rham, O., and T. Jost, 1979. Phytate protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products. *J. Food Sci.* 44:596-600.
- Edwards, H. M. Jr., and F. A. Suso, 1981. Phosphorus requirement of six strains of caged laying hens. *Poultry Sci.* 60:2346-2348.
- Eisen, E. J., B. B. Bohren, and H. E. McKean, 1962. The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poultry Sci.* 41:1461-1468.
- Fretzdorff, B., J. M. Brummer, W. Rcken, R. Greiner, U. Konietzny, and K. D. Jany, 1995. Reduktion des phytinsure-Gehaltes bei der Herstellung von Backwaren und Getreidenahrungsmitteln. *AID-Verbraucherdienst* 40:12-20.
- Gordon, R. W., and D. A. Roland, SR., 1997. Performance of commercial laying hens fed various phosphorus levels with and without supplemental phytase. *Poultry Sci.* 76:1172-1177.
- Grunder, A. A., R. B. Guyer, E. G. Buss, and C. O. Clagett, 1980. Calcium-binding proteins in serum: Quantitative differences between

- thick and thin shell lines of chickens. *Poultry Sci.* 59:880-884.
- Hamilton, R. M. G., and I. R. Sibbald, 1977. The effects of dietary phosphorus on productive performance and egg quality of ten strains of White leghorns. *Poultry Sci.* 56:1221-1228.
- Hurwitz, S., and A. Bar, 1967. Calcium metabolism of hens secreting heavy or light egg shells. *Poultry Sci.* 46:1522-1527.
- National Research Council, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nelson, T. S., T. R. Shieh, R. J. Wodsinski, and J. H. Ware, 1968. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Sci.* 47:1842-1848.
- Peter, W., and H. Jeroch, 1993. The effectiveness of microbial phytase addition to layer rations on maize and wheat basis. In: Wenk, C., and M. Boessinger, *Enzymes in Animal Nutrition*, pp 206-209. *Proceedings of the 1st Symposium*. Kartause Ittingen, Switzerland.
- Reddy, N. R., C. V. Balakrishnan, and D. K. Salunkhe, 1982. Phytates in legumes. *Adv. Food Res.* 28:1-92.
- Said, N. W., T. W. Sullivan, M. L. Sunde, and H. R. Bird, 1984. Effect of dietary phosphorus level and source on productive performance and egg quality of two commercial strains of laying hens. *Poultry Sci.* 63:2007-2019.
- SAS Institute, 1988. *SAS[†] Users Guide: Statistics*. Version 6 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Simons, P. C. M., A. W. Jongbloed, and H. A. J. Versteegh, 1992. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in poultry and pigs. *Br. J. Nutr.* 66:100-109.
- Tyler, C., 1957. The metabolic significance of variations in the shell calcium: retained calcium relationship between individual hens. *J. Agric. Sci.* 48:171-174.
- Vandepopuliere, J. M., and J. J. Lyons, 1992. Effect of inorganic phosphate source and dietary phosphorus level on laying hen performance and eggshell quality. *Poultry Sci.* 71:1022-1031.

- Van der Klis, J. D., H. A. J. Versteegh, and C. W. Scheele, 1994. Practical enzyme use in poultry diets: phytase and NSP enzymes. In BASF Technical Symposium during the Carolina Poultry Nutrition Conference, Charlotte, December 1994, pp 113-128.
- Van der Klis, J. D., and H. A. J. Versteegh, 1996. Phosphorus nutrition of poultry. Recent Advanced in Animal Nutrition, pp 71-83.

제 5 장 효소제와 완효성 유기질 비료의 개발분야

제 1 절 가축분을 이용한 완효성 유기질비료 Pellet 제품의 개발 및 효과 검토

1. 서 설

최근 환경오염의 중요성이 대두되며 축산 폐자원의 처리문제가 심각하게 고려되고 있다. 축산농가로부터 방출되는 가축의 분뇨 및 폐수에 다량 함유되어 있는 인산화합물들은 수질의 부영양화를 일으켜 수질오염의 주요인이 되고 있다. 하지만 가축분뇨에는 식물의 생장에 필요한 주요 성분이 다량 함유되어 있어 가공시 식물재배용 비료로의 활용성이 크다 (김과 신, 1992). 발효되지 않은 생분은 질소, 인산, 칼리 등의 성분이 유기질의 형태로 포함되어 비료의 가치를 충분히 갖추고 있으나 토양에 스며들지 않고 쉽게 굳는 성질로 인하여 토양 표층의 염류 농도를 증가시키며 급속한 분해에 따른 발열반응으로 일시적 산소 및 질소의 결핍현상을 초래하기 때문에 토양의 산성화와 영양소 보유기능이 현저하게 저하된다 (Van Horn 등, 1996). 따라서, composed manure의 성분분석과 pellet 성형을 통한 value-added product (토양이용 가축분 Pellet)의 생산이 필요하며 이로인한 골프장 등 경제적이고 효율적인 토양에의 이용성 검토가 필요하다. 이에 따라 pellet 제조를 위한 완효성 조절에 관해 결착제 선정, 물성 실험 및 첨가수준, 성분보정 기초분석 등을 검토할 필요가 있으며, 경제작물에 활용할 수 있는 성분함량 균형점 검토가 필요하다.

또한 이를 이용한 경제작물로서의 원예작물 등을 성공적으로 재배하기 위하여는 육묘기의 육묘가 매우 중요하다. 최근에는 대부분의 채소재배 농가에서는 육묘만 전문적으로 생산하는 농가 및 종묘회사로부터 묘를 구입하여 재배하는 방식이 급증하고 있다. 따라서 이러한 전문 공정육묘 시설도 상당히 증가하고 있지만, 여기에 필요한 육묘용 배지를 전부 외국의 자재나 기술을 그대로 도입하여 이용하고 있어, 육묘용 배지의 국산화 (왕겨 이용)가 시급하다.

원예작물의 재배 단계중 유묘기의 육묘가 매우 중요하여 최근에는 채소재배농가에서 육묘만 전문적으로 생산하는 농가 및 전문 공정육묘시설을 갖춘 플러그 묘회사로부터 묘를 구입하여 재배하는 방식이 급증하고 있다 (김, 1996, 김, 1993). 현재 육묘용 배지는 전량 외국의 자재나 기술을 그대로 도입하여 이용하고 있는 추세로 시판되고 있는 육묘배지는 전량 수입된 피트모스에 펄라이트, 버미큘라이트를 배합한 것이 대부분이다. 국내 공정육묘 산업의 확대에 따른 현안점은 재배작물별 생육특성에 적합하고 작업성이 높으며 정식기에 적응성이 높은 배지를 국산화하는 문제가 시급하다 (이, 1994).

왕겨는 우리 나라에서 가장 쉽게 구할 수 있는 유기물 자재로서 피트모스에 비해 보수력이 떨어지고 양이온 치환능력이 낮으며 섬유질의 부족으로 배지자체의 결합력이 적어 뿌리 발달이 적은 작물에 있어서는 성형성이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 그렇지만 가공이 쉽고 전 처리 후 이·화학성이 향상되어 육묘배지로서의 가능성이 높아 비료화된 유기성 가축분뇨와 혼합하여 원예육묘용 상토로 제작하여 식물체의 재배생산력을 검정하여 수입에 의존하는 원예용 상토의 대체효과 및 유기자원의 폐기 시 따르는 환경오염을 감소시키는데 기여할 수 있을 것이다 (이, 1994, 이, 1994).

그리하여 생계분 및 돈분을 호기성발효를 통한 발열반응을 야기시켜 60℃ 정도의 고온을 거쳐 수분의 증발 및 악취제거와 충분한 유기물의 분해로 화학적으로 안정된 상태로 나타냈으며 분의 영양성분을 검토하여 토양에 이용할 수 있는지를 알아보고 pelleting을 통한 비료화의 이용성을 1차로 조사하였다. 또한 농업 부산물인 왕겨와 축산 폐자원인 계분을 가공, 혼합한 채소 육묘용 상토제작으로 수입에 의존하는 원예용 상토의 수입 대체효과 및 유기자원의 폐기시 따르는 환경오염 감소를 검정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 펠릿제품의 개발

1) 가축분의 펠릿화 순서

가) 생산단계분 (phytase 처리시험 포함), 생돈분을 수집하여 상온에서 수분 50% 까지 1차 건조시킨다.

나) 1차 건조후 사료물, 깃털, 기타 이물질을 선별한다.

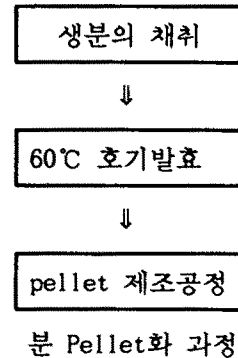
다) 1차 건조후 60℃에서 공기공급상태로 15일간 호기적으로 숙분화시킨다 (Fig 5-1-1).

라) 숙분화시킨 후 2차로 이물질을 제거한다.

마) 1mm-screen mill로 분쇄한다.

바) 예비시험을 거친 아교 0.2%와 Zeolite 0.5% 처리한다.

사) 수분을 약 20%로 맞춘 후, 직경 2mm, 길이 2.5cm로 pelleting 한다.



나. 육묘용 혼합배지 제작

1) 왕겨 분말처리 및 온탕처리의 물리적 성질 변화

육묘용 배지는 식물을 지주 하는 역할, 무기원소 및 수분의 저장고, 토양 산소 및 이산화탄소의 이동이 용이해야 한다. 또한 시설재배의 증가로 원예작물의 주년재배가 가능해 짐에 따라 연중 계속해서 이용할 수 있는 균일성과 어디에서나 쉽게 구할 수 있는 물질이어야 하며 가격이 저렴하여야 한다. 이상의 복합적 요소를 고루 갖출 수 있도록 왕겨를 기본으로 하여 인공배지를 제조하였다.

인공배지의 입자가 너무 크면 충분한 토양수를 보유할 수 없어 관수 횟수를 증가시켜야 되므로, 노동력과 사용되는 비료의 유출이 많아져 생산비 증가의 원인이 된다. 반면에 지나치게 작은 입자로만 구성되어 있다면 토양 공극이 적어져, 과다한 수분을 보유하게 되어 토양 내의 공기의 확산이 억제되어 식물 지하부의 생육이 불건전해 질 것이다.

Table 5-1-1. Change in physical characteristics of rice-hull after powdered.

Treatment	B. D. (g/ml) ^z	P. D. (g/ml) ^y	Porosity(%)	M. H. C. (%) ^x
Control	0.07	0.41	82.9	232.4
20 mesh	0.20	1.01	80.2	361.2

^z B. D. : Bulk density, ^y P. D. : Particle density, ^x M. H. C. : Moisture holding capacity

인공배지의 보수성 및 통기성은 입자 사이의 공극크기 및 공극량에 의존하게 된다. 왕겨는 입자의 크기가 지나치게 크기 때문에 통기성은 좋지만 보수성이 약하여 그대로 사용하기에는 적합하지 못하므로 제분기를 이용 표1에 나타낸 바와 같이 분말로 만든 후 20 mesh채로 쳐서 일정 크기의 것만을 사용하였다. 분말왕겨는 진비중이 증가하고 보수력이 향상되어 식물체를 지지할 수 있는 능력이 커졌다. 보수력과 함께 배지로서의 주요한 단점으로 지적되었던 보비력은 2시간의 온탕처리로 이온치환능력을 8배 가량 향상시킬 수 있다고 보고되었다 (이, 1994, 이, 1994, 이, 1994). 배지의 이온치환능력은 비료성분의 식물 이용도를 증가시킬 수 있으며, 비료 성분을 완효성으로 이용될 수 있게 한다. 왕겨는 이온치환 능력이 매우 낮기 때문에 시비한 비료성분을 흡착할 수 있는 능력이 낮다. 따라서 왕겨를 2시간 동안 열탕 처리하여 이온치환 능력을 증가시켜 주었다.

2) 왕겨·pectin 혼합배지의 조성 및 물리성 조사

Table 5-1-2는 왕겨의 물리성을 보완하기 위하여 유기물인 펙틴을 왕겨분말에 첨가하여 배지의 물리성을 측정된 결과이다. 펙틴을 혼합함으로써 왕겨 단독 배지보다 진비중 및 수분보지력이 향상되어 육묘용 배지로 이용가치가 높다고 판

단된다. 특히 펙틴 2.5% 및 5%를 왕겨와 25 : 75의 비율로 혼합한 처리는 배지가 갖추어야 할 물리성이 가장 우수하였다.

Fig 5-1-1. Laboratory Scale Composting Apparatus

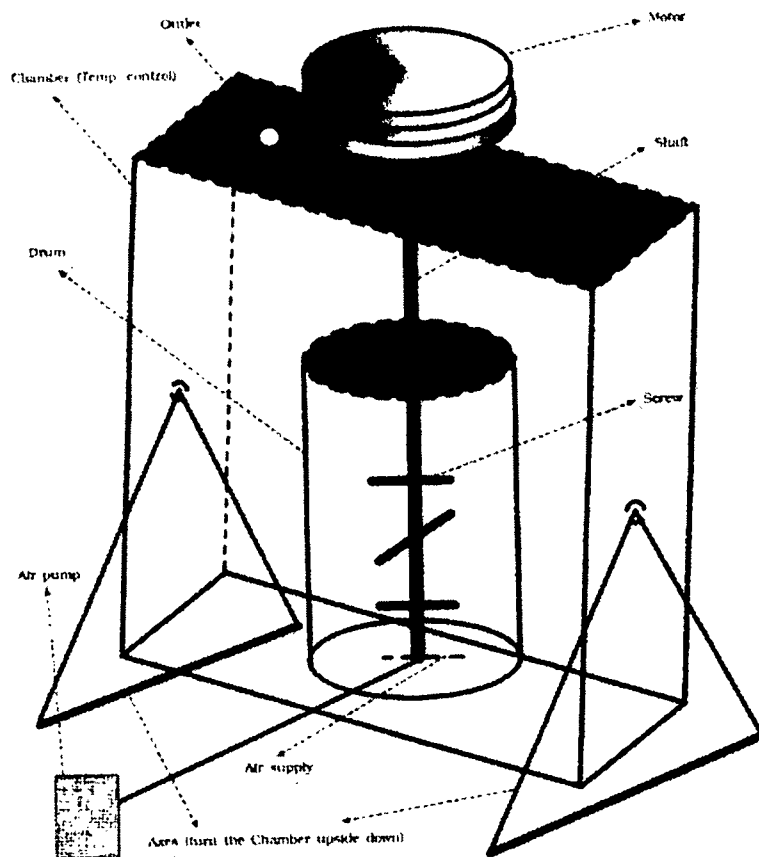


Table 5-1-2. Physical characteristics of media composed with pectin and rice hull in pot media.

Pectin	Pectin : Rice hull	B.D. (g/ml) ^z	P.D. (g/ml) ^y	Porosity(%)	M.H.C. (%) ^x
2.5%	25 : 75	0.21	1.10	81.3	384.9
	40 : 60	0.19	0.83	76.9	420.0
	50 : 50	0.18	0.68	73.7	458.8
5.0%	25 : 75	0.19	0.84	77.8	423.3
	40 : 60	0.20	0.35	42.3	400.0
	50 : 50	0.22	0.30	25.0	344.4
7.5%	25 : 75	0.23	0.64	64.5	342.9
	40 : 60	0.21	0.50	57.1	366.7
	50 : 50	0.19	0.33	42.3	430.6

^z B.D. = Bulk density, ^y P.D. = Particle density, ^x M.H.C. = Moisture holding capacity

3) 왕겨 활용배지와 기존배지와 비교

Table 5-1-3. Physical characteristics comparison of pectin-media with organic and commercial media

Media materials	B.D(g/ml) ^x	P.D(g/ml) ^y	Porosity(%)	M.H.C(%) ^v
Peatmoss	0.10	0.90	88.9	777.6
Vermiculite	0.28	0.89	68.7	1000.1
Perlite	0.17	0.11	84.2	196.6
Ball	0.12	0.42	71.4	-
Baroker	0.18	0.51	64.7	424.8
Rice Hull	0.07	0.41	82.9	232.4
Rice Hull Powdered(RHP)	0.20	1.01	80.2	361.2
RHP : Pectin(2.5%) = 75:25	0.21	1.10	81.3	384.9
RHP : Pectin(5.0%) = 75:25	0.19	0.84	77.8	423.3

x, y, v : See the Table 2.

Ball: Imported soil for seedling growth.

Baroker: Commercial premixed soil.

Table 5-1-3은 육묘용 시판상토와 전처리된 왕겨 펙틴 혼합배지의 이·화학적 특성을 비교한 것으로 진비중, 공극율, 수분보지력의 품질 비교에서도 차이를 보이지 않아 채소 육묘용 배지로 잠재적 가치를 보여 주었다.

다. 계분의 비료 효과 검증

1) 계분의 화학성 비교

Table 5-1-4에는 육묘용 배지로 이용하기 위하여 첨가된 계분과 시판상토 및 일반 채소재배용 토양의 화학성분을 비교한 결과를 나타냈다.

Table 5-1-4. Comparison of chemical characteristics of chicken manure with the nutrient composition of vegetables seedling soil.

Distinction	pH	EC (mS/cm)	Cation Concentration(%)				
			N	P	K	Ca	Mg
Chicken manure(Control)	7.42	6.28	5.0	2.1	1.9	1.6	0.6
Chicken manure(Gelatinized) ^z	7.77	6.20	5.4	2.1	2.0	1.5	0.6
Baroker soil	7.43	0.89	0.5	0.4 ^y	0.3	-	-
Tomato seedling soil	5.24	4.26	0.4*	0.09*	0.6*	0.4*	0.1*
Chinese cabbage seedling soil	5.10	4.97	0.3*	0.1*	0.5*	0.4*	0.06*
Commercial fertilizer	-	-	9.0	14.0	12.0	-	2.0

^z Chicken manure was mixed with gelatin.

^y Concentration of P₂O₅.

* g/week

Table 5-1-5. Yield parameters of chinese cabbage grown for 2 months after trans-planting into a commercial soils.

Treatment	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Plant width (cm)	Fresh weight (g)
Bunhong	27.9±1.9	30.8±1.1	51.1±1.9	732.0±28.4
Baroker	27.9±1.9	31.6±1.4	48.2±2.8	662.0±71.9
Ball	27.9±1.9	30.8±1.3	49.4±1.5	647.0±18.6
Sawdust media	28.4±1.5	29.3±1.2	48.6±3.6	585.0±27.4
2.5% pectin + Rice Hull	26.4±2.1	29.1±1.2	48.2±2.8	566.0±57.7
5.0% pectin + Rice Hull	26.4±3.4	29.0±2.3	48.6±5.9	562.0±100.3

생체중은 육묘 시 가장 무겁던 부농상토의 배추가 정식 후에도 가장 무거웠으며 왕겨·pectin 혼합배지와 1.3배 가량 더 나갔으나 육묘 종료시의 생체중 차이가 6.5배 었던 것을 감안한다면 재배기간이 길어질수록 생체중의 폭이 감소하였다.

바. 계분의 비료화 검정

육묘실험이 종결된 후 대조구에서 재배된 묘 중 건전한 것들을 바로커 상토에 정식 후 복합비료와 계분을 시비한 후 5주간 재배 검정한 결과 엽수, 엽장은 대조구와 차이가 없었으나 신선중과 건물중은 3주차부터 차이를 보였다. 계분의 완효성이 시판비료에 비해 떨어져 영양분의 용탈이 빨랐기 때문으로 사료된다.

경과시간 (hr)	5	10	15	20	25	35
결삭제 처리	4	20	40	65	80	90
결삭제 무처리	10	30	60	80	90	100

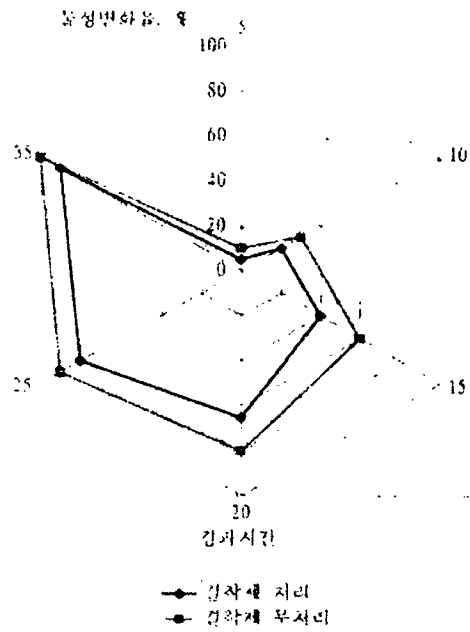


Fig 5-1-2: Pellet 분성변화에 미치는 결삭제 처리 효과

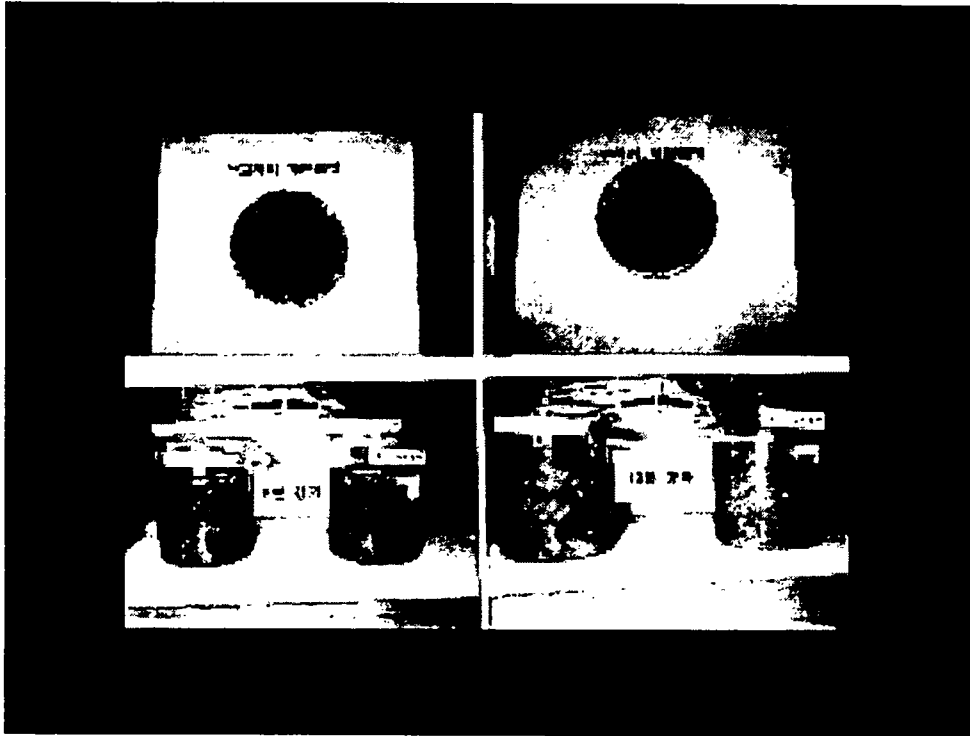


Fig 5-1-3. 계분 pellet 물성변화에 미치는 결착제 처리 효과

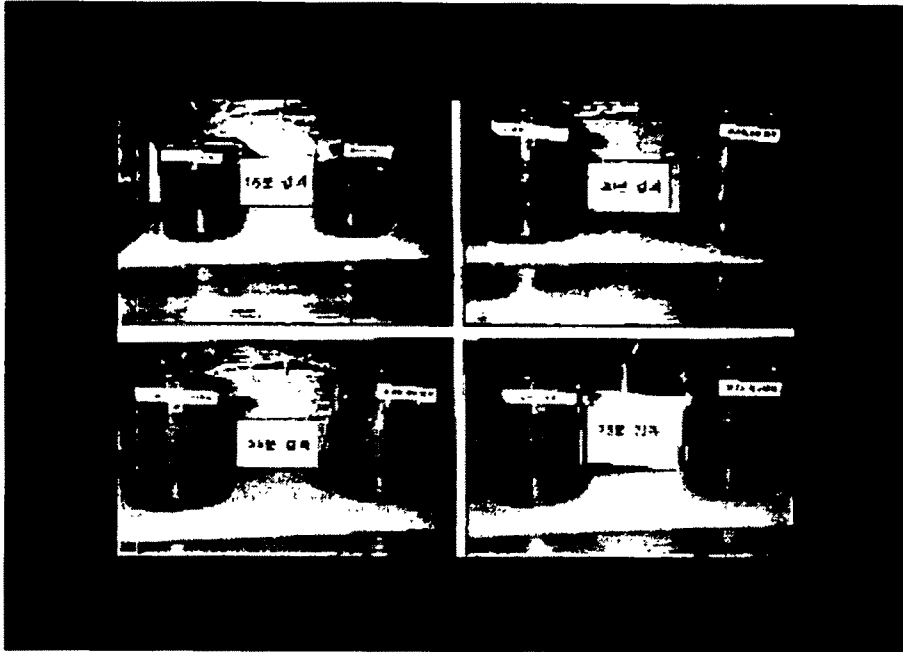


Fig 5-1-4. 계분 pellet 물성변화에 미치는 결합제 처리 효과

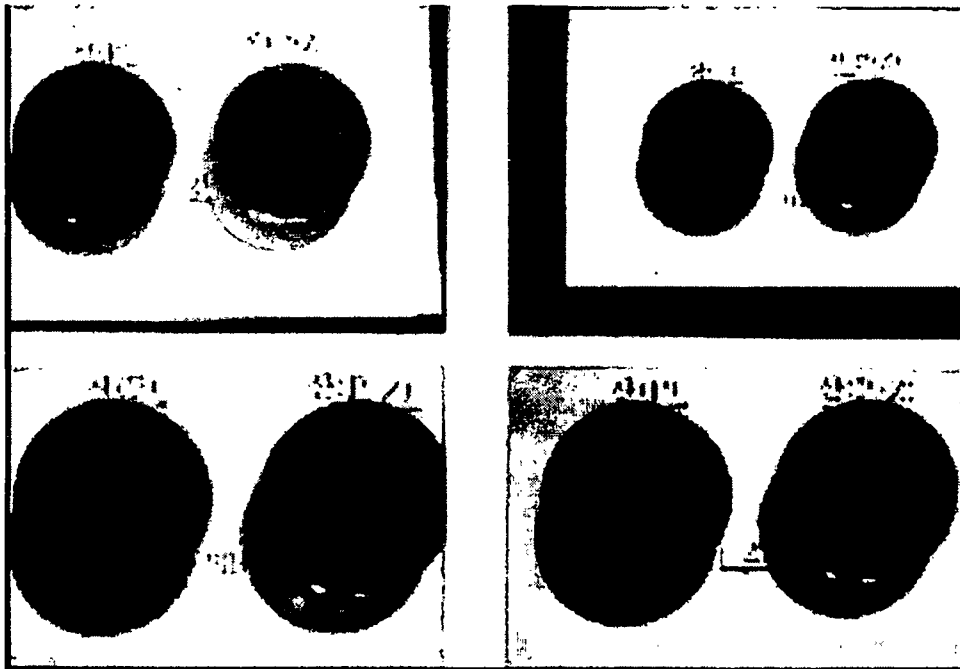


Fig 5-1-5. Phytase 처리 산란계분 pellet 물성변화에 미치는 zeolite 처리 효과

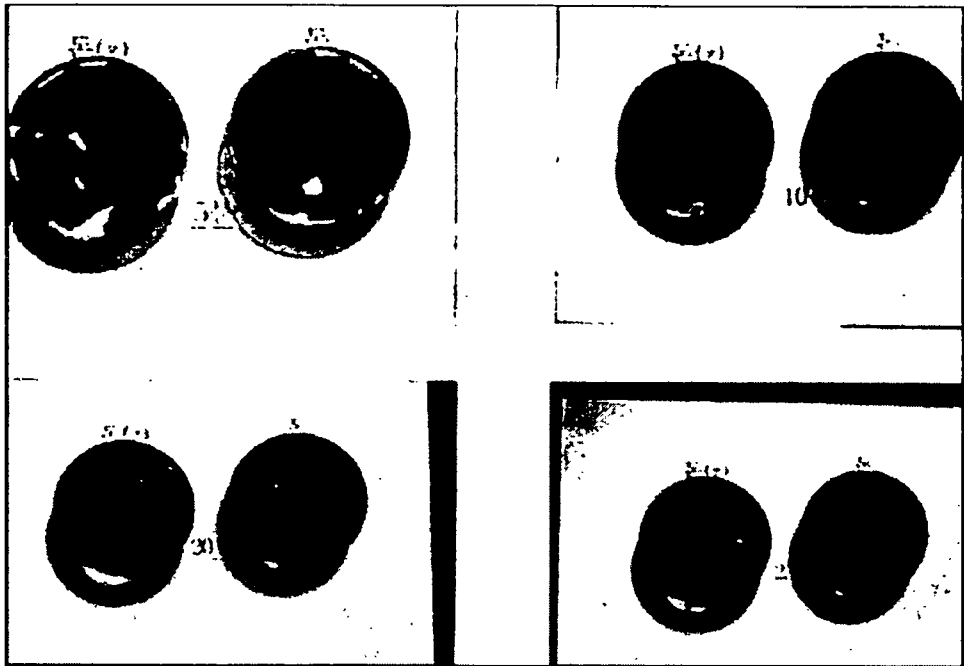


Fig 5-1-6. 돈분 pellet 물성변화에 미치는 zeolite 처리 효과

4. 결과 요약

아교처리는 계분 펠렛화에 효과적이었으며, 경제적으로 토양중 분해속도도 유지할 수 있는 가능성이 있다고 사료됨. 분종류로 보면 계분보다 돈분이 물성변화 속도가 낮았으며, zeolite 처리시에 그속도가 더욱 낮아졌다. Phytase 처리시에 계분에 zeolite 첨가는 별 효과가 없었다. 처리수준은 다양한 수준으로 검토할 필요가 있다고 사료되나, 경제성으로 보아 (1,700원/kg) 현 수준 (0.2%)이 적당하다고 본다. Zeolite 첨가는 분의 성분함량에는 큰 차이가 나지 않았고, Phytase 처리구에서 칼륨성분의 차이가 났다. 펠렛 성형은 토양 이용관계에 따른 물성상 직경 2mm, 길이 2.5cm가 적당하다고 사료됨

왕겨는 주년 공급이 가능하고 취급이 용이하여 수입에 의존하던 옥묘용 배지의 대체재료로 사용하기에 적합하다. 그러나 비중이 낮아 식물체를 지지하기 힘들고 수분보지력과 보비력의 낮아 그대로 사용하기에 적합하지 못하여 가공이 필요하였다. 왕겨를 20mesh로 분말화 함으로서 진비중을 2.5배 가량 높여 식물체 지지력을 향상시켜 주었고 열탕처리를 통해 양이온치환능력을 증가시키었다. 분말왕겨의 열탕처리 후 2.5%와 5%의 pectin을 첨가하여 수분보지력 및 보비력을 증진시켜 시판상토의 이화학적 수준으로 가공하였다.

왕겨·pectin 혼합배지(이후 왕겨배지)를 이용한 배추재배 결과 옥묘기간 동안의 시판상토인 부농상토, Ball 상토, 바로커에 비해 초기생육이 느렸지만, 왕겨배지에 기비 첨가를 하지 않았기 때문에 판단되어 옥묘 3주차부터 액비를 공급하자 생육속도가 증가하였다. 옥묘 후 생육반응을 관찰하기 위해 모든 처리구를 옥묘 5주 후 부농상토에 정식 하였다. 2달 후 옥묘 시 생육상태가 가장 좋았던 부농상토의 배추가 생체중이 가장 무거웠다. 그러나 부농상토의 배추가 옥묘 5주시 왕겨배지에 비해 6.5배 무겁던 것에 비해 2개월 후에는 1.3배의 차이로 그 차가 좁혀져. 옥묘배지로서 왕겨의 가능성을 보여주었다.

계분은 식물체에 필요한 무기양분을 고루 함유하고 있다. 특히 식물의 삼대원소인 질소, 인산, 칼리 성분을 각각 5%, 2.1%, 1.9% 함유하고 있어 채소 재배용 기비로 활용될 가능성을 보여주었다. 그러나 계분을 그대로 사용하기에는 악취가 심하고 발효과정에서 암모니아와 같은 식물체에 유해한 가스의 배출이 우려

되어 건조 후 압착된 상태로 가공한 것을 실험에 사용하였다. 원예용 복합비료를 대조구로 하여 배추의 생육상태를 관찰한 실험에서 기비 첨가 후 2주간은 대조구와 생육차를 보이지 않았으나 점차 생육차를 보이기 시작하여 3주차에는 복합비료 처리구의 생체중이 계분 처리구에 비해 2.3배 높았다. 이러한 생육차는 계분의 완효성이 떨어지기 때문으로 사료된다. 계분의 가공 과정에서 이를 고려하여 계분에 아교를 첨가하였지만 양분의 용해 속도를 늦추는데는 적합하지 못하였다. 따라서 계분의 완효화 과정만 완료된다면 채소 재배용 비료로서의 가능성이 매우 높을 것으로 보여진다.

5. 참고문헌

- Behnke, Keith C. 1996. Feed manufacturing technology: current issues and challenges. *Animal Feed Science Technology* 62:49-57.
- Lee, C. W., 최종명 1995. 양액재배 배지의 구성과 적정 혼합비율. 경상대 시설원예연구소. pp.43-58.
- Van Horn, H. H., G. L. Newton, and W. E. Kunkle. 1996. Ruminant nutrition from an environmental perspective: Factors affecting whole-farm nutrient balance. *J. Anim. Sci.* 74:3082-3102.
- 김광용 1993. 공정육묘 전용 배지의 특성과 개발 방향. *시원지* 6(1) : 50-59.
- 김수생, 신항식. 1992. 유기성 폐기물의 자원화와 폐기물관리. 한국유기성 폐기물 자원화 협의회 창립 총회 pp. 17-38.
- 김홍기 1996. 과채류의 플러그며 생산을 위한 혼합배지의 개발. *J.Greenhouse industry*. 호남온실작물연구소 10 : 30-35.
- 농업과학기술원. 1996. 비료의 품질검사방법 및 시료 채취기준.
- 농업기술연구소. 1988. 토양화학 분석법. pp. 19-60.
- 맹원재, 윤광로, 신형태, 김대진. 1991. 수정중보 사료분석실험. 선진문화사.
- 박상근 1994. 공정육묘 시스템 도입의 필요성과 전망. *시원지* 7(2) : 31-40.
- 이지원 1994. 공정육묘용 배지의 특성과 활성 및 관리. *한국생물생산시설환경학회지* 3(2) : 48-61.
- 이정식 1994. 국내산 화분용 유기질 배양토 원료 개발에 관한 연구. 농진청 특정용역과제 논문집.
- 이정식 1994. 화훼용 수입 배양토의 이용 현황과 문제점. *시원지* 7(20) : 41-50.
- 황선용, 박문희, 김유섭, 박영대, 김동수. 1991. 원예용 상토개발에 관한 연구-분재용 인공배양토 개발 연구. *농사시험연구보고(토양화학)* 157-166.

제 2 절 축분을 활용한 배추의 육묘용 배지조성 및 재배에 관한 연구

1. 서 설

최근 환경오염의 중요성이 대두되며 축산 폐자원의 처리문제가 심각하게 고려되고 있다. 축산농가로부터 방출되는 가축의 분뇨 및 폐수에 다량 함유되어 있는 인산화합물들은 수질의 부영양화를 일으켜 수질오염의 주요인이 되고 있다. 하지만 가축분뇨에는 식물의 생장에 필요한 주요 성분이 다량 함유되어 있어 가공 시 식물재배용 비료로의 활용성이 크다. 원예작물의 재배 단계중 육묘기의 육묘가 매우 중요하여 최근에는 채소재배농가에서 육묘만 전문적으로 생산하는 농가 및 전문 공정육묘시설을 갖춘 플러그 묘 회사로부터 묘를 구입하여 재배하는 방식이 급증하고 있다. 현재 육묘용 배지는 전량 외국의 자재나 기술을 그대로 도입하여 이용하고 있는 추세로 시판되고 있는 육묘배지는 전량 수입된 피트모스에 펠라이트, 버미큘라이트를 배합한 것이 대부분이다. 국내 공정육묘 산업의 확대에 따른 현안점은 재배작물별 생육특성에 적합하고 작업성이 높으며 정식기에 적응성이 높은 배지를 국산화하는 문제가 시급하다.

왕겨는 우리 나라에서 가장 쉽게 구할 수 있는 유기물 자재로서 피트모스에 비해 보수력이 떨어지고 양이온 치환능력이 낮으며 섬유질의 부족으로 배지 자체의 결합력이 적어 뿌리 발달이 적은 작물에 있어서는 성형성이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 그렇지만 가공이 쉽고 전처리 후 이·화학성이 향상되어 육묘배지로서의 가능성이 높아 비료화된 유기성 가축분뇨와 혼합하여 원예육묘용 상토로 제작하여 식물체의 재배생산력을 검정하여 수입에 의존하는 원예용 상토의 대체 효과 및 유기자원의 폐기 시 따르는 환경오염을 감소시키는데 기여할 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

가. 육묘용 배지 조제

본 육묘실험에 공시된 작물은 겨울 김장용 '장미배추'(Brassica campestris var. pekinensis: 중앙종묘)였으며, 육묘용 배지의 조제는 왕겨와 펙틴을 사용하였다. 우선 분말왕겨를 20mesh로 균일화한 후 1시간 온탕처리하고 수분을 증발시켜 배지조성에 이용하였다. 건조된 왕겨분말과 펙틴을 수화시킨 용액을 일정비율로 섞은 다음, buchner 깔대기로 1기압 하에서 여과시켜 포화상태로 만들었다. 이 혼합배지와 바로커(서울농자재)와 Ball상토(한미플러그)를 대조구로 하여 배지의 물리성 및 화학성을 비교평가 하였으며, 배추의 육묘 생육 실험을 실시하였다.

나. 왕겨배지와 계분의 적정혼합비율 조사

물리적 성질의 조사결과 가능성이 높았던 왕겨:펙틴(75:25)배지에 계분을 10, 20, 30% 혼합한 후 각 처리 배지를 증류수 100ml 당 5g씩 첨가하여 일정간격으로 EC를 측정하여 EC가 더 이상 증가하지 않는 시점의 수치를 대조구로 사용할 Ball 상토, 바로커와 비교하여 첨가할 계분의 양을 결정하였다(Fig 5-2-1).

다. 배지 및 계분의 특성 조사

조제된 배지에 사용되는 양액으로는 중앙대학교 축산학과에서 제작한 계분 pellet을 이용하였으며, 원예용 복합비료(조비)를 대조구로 하여 배추를 공시하여 육묘 및 정식 후 생육반응을 조사하였다. 배지 및 계분의 특성은 농촌진흥청의 토양분석법에 따라 배지재료와 계분을 105~110℃ dry oven에서 8시간 동안 완전 건조시켜 분석에 사용하였다.⁽¹¹⁾ 배지의 물리성은 다음과 같이 측정하였다.

가비중(전용적 밀도) : 토양의 무게/토양의 용적

진비중(입자밀도) : 고체의 무게/고체의 용적

공극률 : 토양의 전체부피에 대한 공극의 용적백분율. (진비중-가비중)/진비

증×100(%)

토양 수분함량(중량법) : (젖은 토양의 중량-건조된 토양의 중량)/건조된 토양의 무게

라. 배지의 화학성 및 계분의 성분분석

배지와 계분의 화학성은 농업과학기술원의 비료품질검사방법 및 시료 채취 기준에 준하였다.⁽¹⁰⁾ 분석시료 5g에 증류수 25ml를 가하여 30분간 진탕 후, pH는 pH meter(Orion 720A)로, EC는 EC meter(YSI 35 Conductance meter)로 측정하였다. 배지의 양이온은 시료 0.2g를 질산과 과산화수소수로 유기물을 완전히 분해한 후 Atomic Absorption Spectrophotometer (Hibachi 6100)로 분석하였다.

마. 육묘 중 생육반응

배추 육묘 생육 반응실험은 배지를 충전시킨 72공 플라스틱 육묘판에 종자를 파종한 후, 일주일 간격으로 엽수, 초장, 최대엽장, 생체중 및 건물중을 5주간 조사하였으며, 육묘가 종료된 후 직경 25cm의 화분으로 정식 하여 생육조사를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 육묘용 혼합배지 제작

1) 왕겨 분말처리 및 온탕처리의 물리적 성질 변화

육묘용 배지는 식물을 지주 하는 역할, 무기원소 및 수분의 저장고, 토양 산소 및 이산화탄소의 이동이 용이해야 한다. 또한 시설재배의 증가로 원예작물의 주년재배가 가능해 짐에 따라 연중 계속해서 이용할 수 있는 균일성과 어디에서나 쉽게 구할 수 있는 물질이어야 하며 가격이 저렴하여야 한다. 이상의 복합적 요소를 고루 갖출 수 있도록 왕겨를 기본으로 하여 인공배지를 제조하였다.

인공배지의 입자가 너무 크면 충분한 토양수를 보유할 수 없어 관수 횟수를 증가시켜야 되므로, 노동력과 사용되는 비료의 유출이 많아져 생산비 증가의 원

인이 된다. 반면에 지나치게 작은 입자로만 구성되어 있다면 토양 공극이 적어져, 과도한 수분을 보유하게 되어 토양 내의 공기의 확산이 억제되어 식물 지하부의 생육이 불건전해 질 것이다.

Table 5-2-1. Change in physical characteristics of rice-hull after powdered.

Treatment	B. D. (g/ml) ^c	P. D. (g/ml) ^f	Porosity(%)	M. H. C. (%) ^h
Control	0.07	0.41	82.9	232.4
20 mesh	0.20	1.01	80.2	361.2

^z B.D. : Bulk density, ^y P.D. : Particle density, ^x M.H.C. : Moisture holding capacity

인공배지의 보수성 및 통기성은 입자 사이의 공극크기 및 공극량에 의존하게 된다. 왕겨는 입자의 크기가 지나치게 크기 때문에 통기성은 좋지만 보수성이 약하여 그대로 사용하기에는 적합하지 못하므로 계분기를 이용 Table 5-2-1에 나타낸 바와 같이 분말로 만든 후 20 mesh채로 쳐서 일정 크기의 것만을 사용하였다. 분말왕겨는 진비중이 증가하고 보수력이 향상되어 식물체를 지지할 수 있는 능력이 커졌다. 보수력과 함께 배지로서의 주요한 단점으로 지적되었던 보비력은 2시간의 온탕처리로 이온치환능력을 8배 가량 향상시킬 수 있다고 보고되었다.^{(3). (4). (5)} 배지의 이온치환능력은 비료성분의 식물 이용도를 증가시킬 수 있으며, 비료 성분을 완료성으로 이용될 수 있게 한다. 왕겨는 이온치환 능력이 매우 낮기 때문에 시비한 비료성분을 흡착할 수 있는 능력이 낮다. 따라서 왕겨를 2시간 동안 열탕 처리하여 이온치환 능력을 증가시켜 주었다.

2) 왕겨 , pectin 혼합배지의 조성 및 물리성 조사

Table 5-2-2는 왕겨의 물리성을 보완하기 위하여 유기물인 펙틴을 왕겨분말에 첨가하여 배지의 물리성을 측정된 결과이다. 펙틴을 혼합함으로써 왕겨 단독 배지보다 진비중 및 수분보지력이 향상되어 육묘용 배지로 이용가치가 높다고

판단된다. 특히 펙틴 2.5% 및 5%를 왕겨와 25 : 75의 비율로 혼합한 처리는 배지가 갖추어야 할 물리성이 가장 우수하였다.

Table 5-2-2. Physical characteristics of media composed with pectin and rice hull in pot media.

Pectin	Pectin : Rice hull	B.D. (g/ml) ^z	P.D. (g/ml) ^y	Porosity(%)	M.H.C. (%) ^x
2.5%	25 : 75	0.21	1.10	81.3	384.9
	40 : 60	0.19	0.83	76.9	420.0
	50 : 50	0.18	0.68	73.7	458.8
5.0%	25 : 75	0.19	0.84	77.8	423.3
	40 : 60	0.20	0.35	42.3	400.0
	50 : 50	0.22	0.30	25.0	344.4
7.5%	25 : 75	0.23	0.64	64.5	342.9
	40 : 60	0.21	0.50	57.1	366.7
	50 : 50	0.19	0.33	42.3	430.6

^z B.D. = Bulk density, ^y P.D. = Particle density, ^x M.H.C. = Moisture holding capacity

3) 왕겨 활용배지와 기존배지와의 비교

Table 5-2-3. Physical characteristics comparison of pectin-media with organic and commercial soil media.

Media materials	B.D(g/ml) ^x	P.D(g/ml) ^y	Porosity(%)	M.H.C(%) ^v
Peatmoss	0.10	0.90	88.9	777.6
Vermiculite	0.28	0.89	68.7	1000.1
Perlite	0.17	0.11	84.2	196.6
Ball	0.12	0.42	71.4	-
Baroker	0.18	0.51	64.7	424.8
Rice Hull	0.07	0.41	82.9	232.4
Rice Hull Powdered(RHP)	0.20	1.01	80.2	361.2
RHP : Pectin(2.5%) = 75:25	0.21	1.10	81.3	384.9
RHP : Pectin(5.0%) = 75:25	0.19	0.84	77.8	423.3

x, y, v : See the Table 2.

Ball: Imported soil for seedling growth.

Baroker: Commercial premixed soil.

Table 5-2-3은 육묘용 시판상토와 전처리가 완료된 왕겨 펙틴 혼합배지의 이·화학적 특성을 비교한 것으로 진비중, 공극율, 수분보지력의 품질 비교에서도 차이를 보이지 않아 채소 육묘용 배지로 잠재적 가치를 보여 주었다.

나. 계분의 비료 효과 검정

1) 계분의 화학성 비교

Table 5-2-4에는 육묘용 배지로 이용하기 위하여 첨가된 계분과 시판상토 및 일반 채소재배용 토양의 화학성분을 비교한 결과를 나타냈다.

Table 5-2-4. Comparison of chemical characteristics of chicken manure with the nutrient composition of vegetables seedling soil.

Distinction	pH	EC (mS/cm)	Cation Concentration(%)				
			N	P	K	Ca	Mg
Chicken manure(Control)	7.42	6.28	5.0	2.1	1.9	1.6	0.6
Chicken manure (Gelatinized) ²	7.77	6.20	5.4	2.1	2.0	1.5	0.6
Baroker soil	7.43	0.89	0.5	0.4 ^y	0.3	-	-
Tomato seedling soil	5.24	4.26	0.4 [*]	0.09 [*]	0.6 [*]	0.4 [*]	0.1 [*]
Chinese cabbage seedling soil	5.10	4.97	0.3 [*]	0.1 [*]	0.5 [*]	0.4 [*]	0.06 [*]
Commercial fertilizer	-	-	9.0	14.0	12.0	-	2.0

² Chicken manure was mixed with gelatin.

^y Concentration of P₂O₅.

* g/week

계분에는 식물 재배 시 주요성분인 질소, 인산, 칼리, 칼슘 및 마그네슘이 매우 풍부하여 기비로서의 잠재적 가치가 매우 높다. pH가 7.4~7.8 정도로 다소 높지만 펙틴 첨가에 의해 적정 수준으로 약산성으로 조절될 수 있었다. 계분의 비료성분의 완효성 효과를 위한 아교처리와 아교 무처리에서는 무기이온이나 EC가 거의 같은 수준으로 측정되는 바 첨가한 아교가 계분의 화학적 성분에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

2) 왕겨배지와 계분의 적정 혼합비율 조사

왕겨배지에 첨가할 계분의 양을 EC를 이용하여 간접적으로 측정하였다. 물리적 성질의 조사결과 가능성이 높았던 왕겨:pectin(75:25)배지에 계분을 10, 20, 30% 혼합한 후 각 처리 배지를 증류수 100ml 당 5g씩 첨가하여 일정간격으로 EC를 측정하여 EC가 더 이상 증가하지 않는 시점의 수치를 control로 사용할 Ball상토, 바로커와 비교하여 첨가할 계분의 양을 결정하였다(Fig 5-2-1). EC의 변

화는 1시간 이후 모든 처리에서 변화가 현저히 줄었으며 overnight 한 후의 수치도 1시간 동안의 수치와 큰 차이를 보이지 않았으며 계분 첨가량에 따라 EC는 일정하게 증가하였다(Fig 5-2-2)

다. 식물체 재배 생산력 검정

1) 배지종류별 생육반응

1차 실험은 시판상토인 바로커와 Ball 상토가 초기생육에서 엽수, 초장, 최대엽장, 생체중, 건물중의 모든 성장반응에 있어 실험구인 왕겨·pectin 배지보다 좋은 결과를 보였다. 엽수의 경우 실험구가 3주 정도의 차이로 느린 성장을 보였다. 왕겨·pectin 배지의 초기 생육 차가 배지내의 영양분이 대조구에 비해 부족하여 생긴 것으로 판단되어 3주차부터 일주일 간격으로 액비를 공급하였는데 그 후로는 왕겨·pectin 배지의 생육이 좋아졌다. 오히려 생육 후반부에는 대조구인 Ball 상토는 엽수, 초장, 건물중이 감소하는 S자 형태 곡선의 성장형태를 보이는데 반해 왕겨·pectin 배지의 경우 생육전반에 걸쳐 전, 후기의 차이가 고른 일자의 상승곡선의 성장형태를 보여주었다. 실험구 내에서는 인공배지 실험 시 물리·화학성이 가장 우수하였던 2.5% pectin과 왕겨의 혼합배지가 5% pectin과 왕겨의 혼합배지에 비해 생육반응에서 좋은 결과를 보였다. (Fig 5-2-3, 4.)

2차실험은 대조구에 부농상토와 톱밥상토를 추가하였다. 바로커와 Ball 상토는 1차 실험에서와 같이 생육후반부에 최대엽장의 성장이 느려지는 경향을 보여주었다. 2차 실험에 추가된 부농상토는 모든 성장반응에서 가장 좋은 결과를 보여 주었다. 실험구인 왕겨·pectin 배지는 2.5% pectin 혼합상토가 5% 혼합상토 보다 엽수, 생체중, 건물중 등 모든 성장반응에서 좋은 결과를 보여 주었지만 대조구에 비해서는 성장반응이 느렸다. (Fig 5-2-5)

각 처리별 5주 동안 육묘한 식물체를 대상으로 엽록소 함량을 비교한 결과 대조구인 부농상토가 실험구인 5% pectin·왕겨 혼합배지에 비해 1.6배, 2.5% pectin·왕겨 배지에 비해 2.1배 높은 함량을 보였다. 다른 대조구와의 비교에서는 Ball 상토, 바로커와 5% pectin·왕겨 혼합배지와는 차이를 보이지 않았고

톱밥상토보다는 높은 함량을 보였다. (그림 6)

2) 육묘 후 생육반응

Table 5-2-5는 각 처리간 5주간 육묘가 끝난 배추를 부농상토가 충진된 분
에 정식 후 2개월간 재배 후 생육반응을 비교한 것이다.

Table 5-2-5. Yield parameters of chinese cabbage grown for 2 months after
trans-planting into a commercial soils.

Treatment	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Plant width (cm)	Fresh weight (g)
Bunhong	27.9±1.9	30.8±1.1	51.1±1.9	732.0±28.4
Baroker	27.9±1.9	31.6±1.4	48.2±2.8	662.0±71.9
Ball	27.9±1.9	30.8±1.3	49.4±1.5	647.0±18.6
Sawdust media	28.4±1.5	29.3±1.2	48.6±3.6	585.0±27.4
2.5% pectin + Rice Hull	26.4±2.1	29.1±1.2	48.2±2.8	566.0±57.7
5.0% pectin + Rice Hull	26.4±3.4	29.0±2.3	48.6±5.9	562.0±100.3

생체중은 육묘 시 가장 무겁던 부농상토의 배추가 정식 후에도 가장 무거웠으며
왕겨·pectin 혼합배지와 1.3배 가량 더 나갔으나 육묘 종료시의 생체중 차이가
6.5배 었던 것을 감안한다면 재배기간이 길어질수록 생체중의 폭이 감소하였다.

3) 계분의 비료화 검정

육묘실험이 종결된 후 대조구에서 재배된 묘 중 건전한 것들을 바로커 상토
에 정식 후 복합비료와 계분을 시비한 후 5주간 재배 검정한 결과 엽수, 엽장은
대조구와 차이가 없었으나 신선중과 건물중은 3주차부터 차이를 보였다. 계분의
완효성이 시판비료에 비해 떨어져 영양분의 용탈이 빨랐기 때문으로 사료된다.

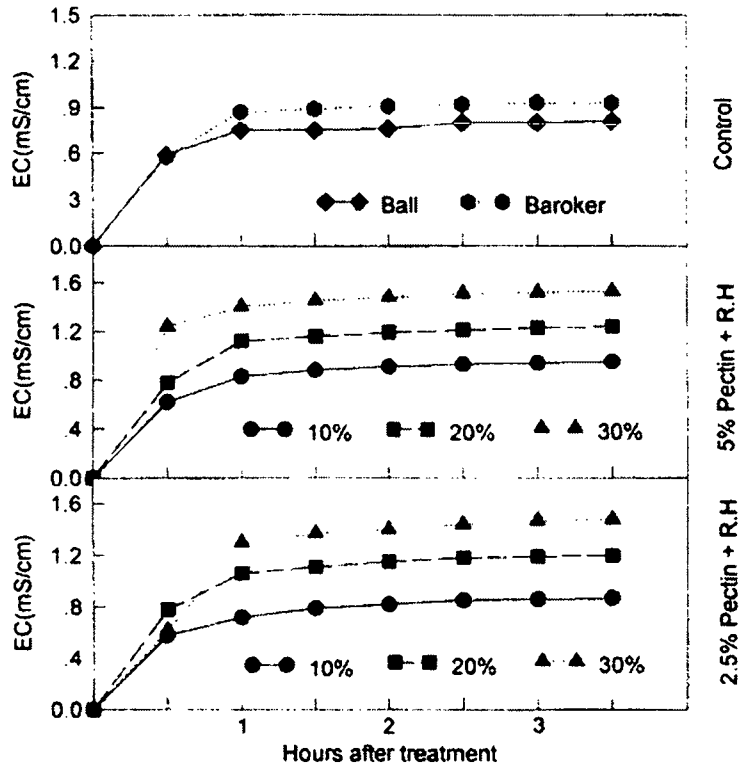


Fig 5-7-1 Comparison of electric conductivity with concentration of chicken manure in seedling soils.

X : Percent of chicken manury in seedling soil.

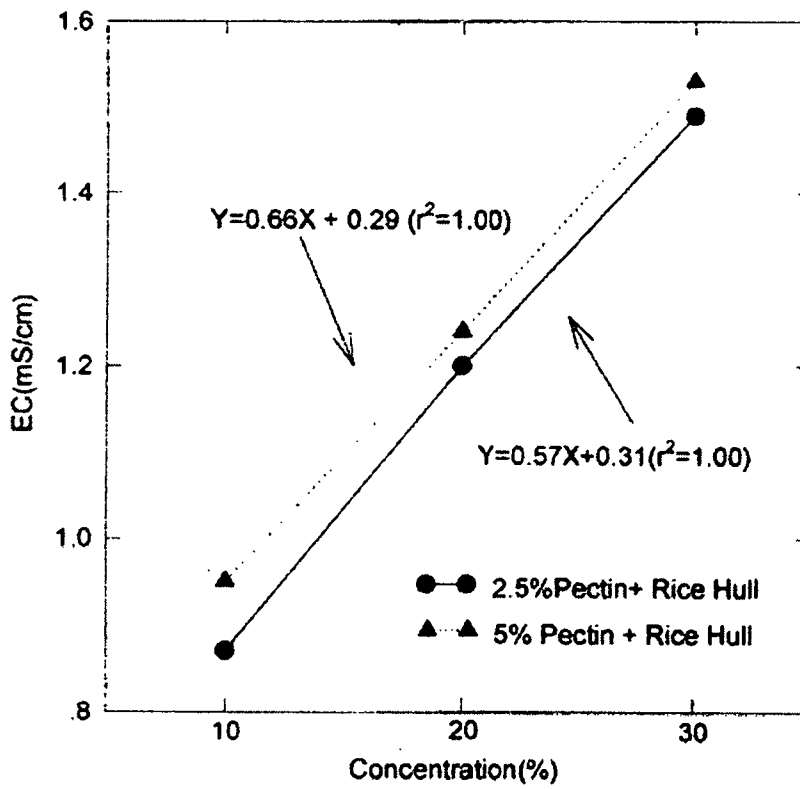


Fig 5-z-2. Comparison of electric conductivity with concentration of chicken manure in vegetable seedling soil.

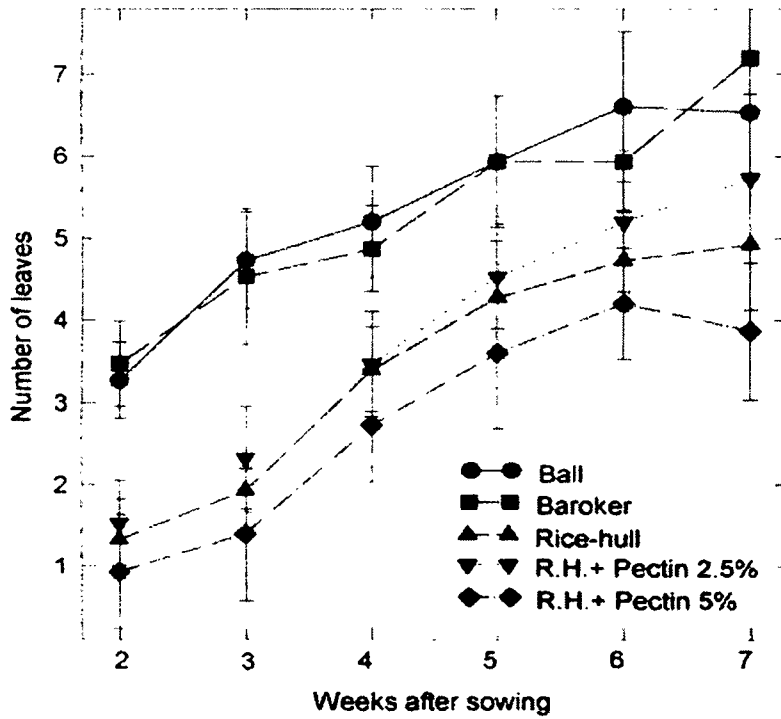


Fig 5-2-3. Change in number of chinese cabbage leaves grown 7 weeks in several seedling pot media.

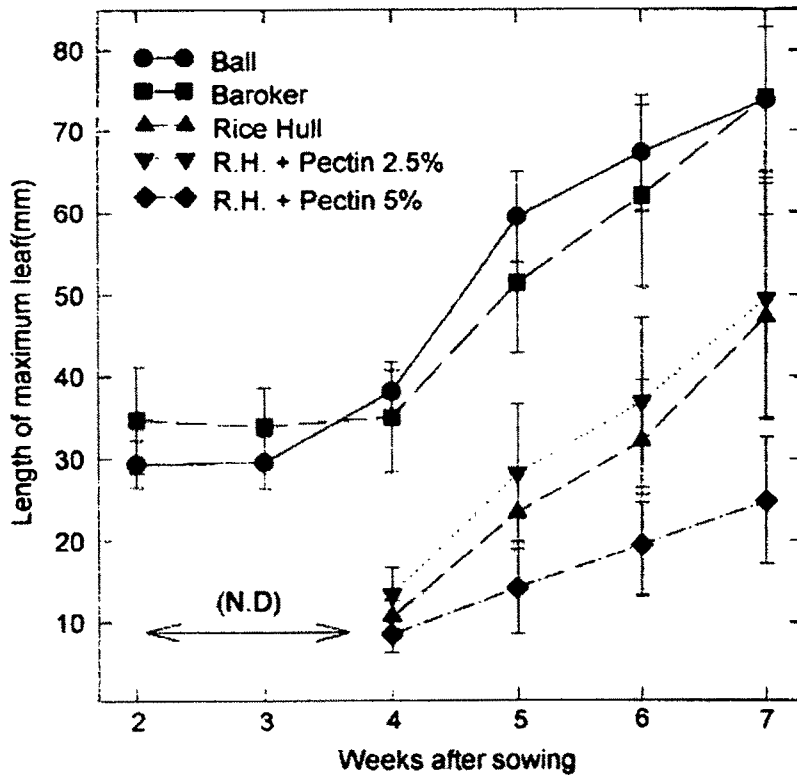


Fig 5-2-4. Change of maximum length of chinese cabbage leaf grown for 7 weeks in several seedling pot media.

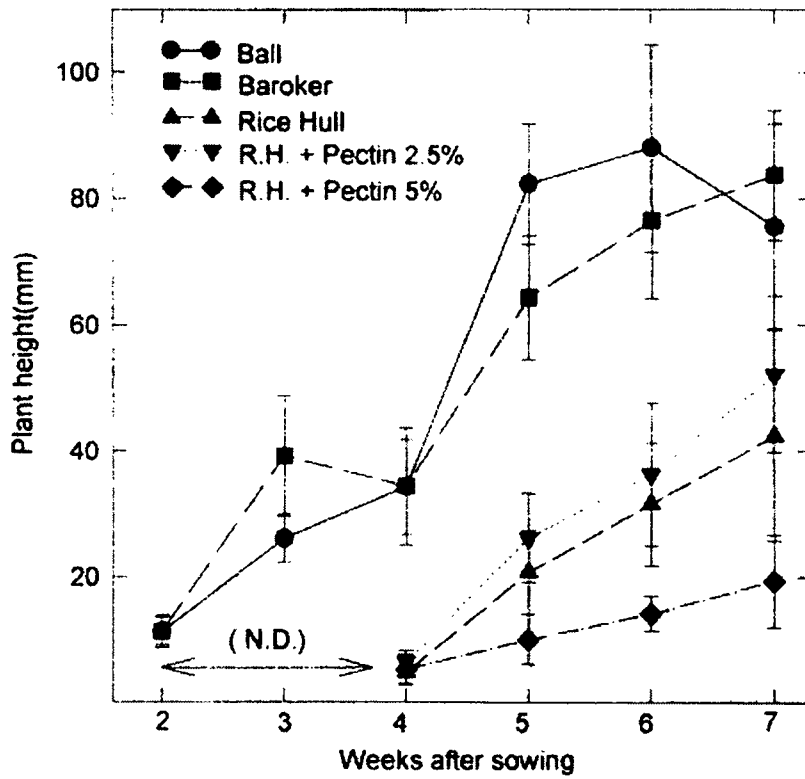


Fig 5-2-5 Change of plant height of chinese cabbage grown for 7 weeks in several seedling pot media.

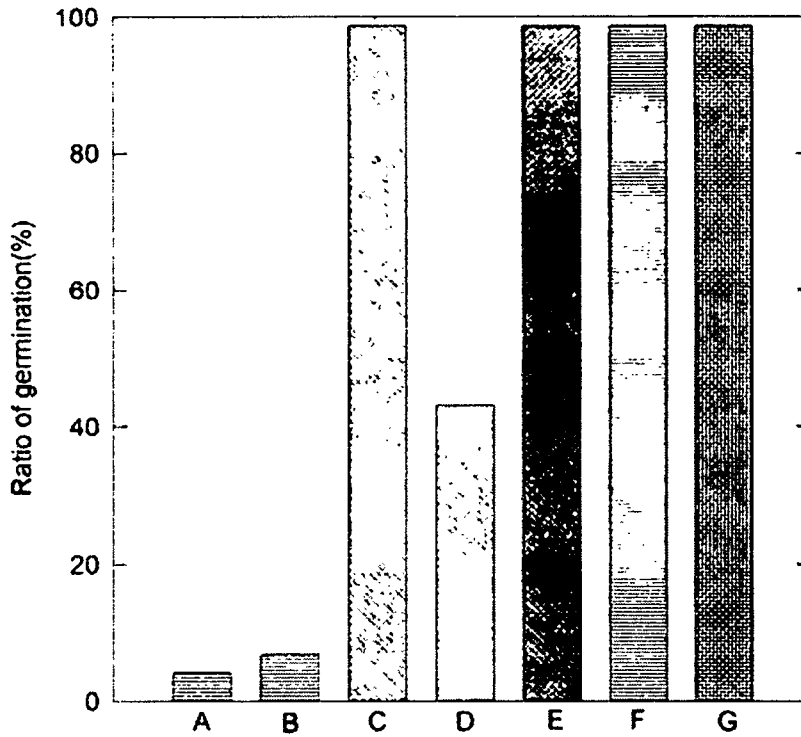


Fig 5-2-6. Percentage of germination of chinese cabbage seed in various artificial media.

- A : 2.5% Pectin + Powdered Rice Hull+ Powdered Chicken manure
- B : 5% Pectin + Powdered Ricde Hull + Powdered Chicken manure
- C : 2.5% Pectin + Powdered Rice Hull
- D : 5% Pectin + Powdered Rice Hull
- E : Powdered Rice Hull F : Ball G : Baroker

4. 결과 요약

왕겨는 주년 공급이 가능하고 취급이 용이하여 수입에 의존하던 옥묘용 배지의 대체재료로 사용하기에 적합하다. 그러나 비중이 낮아 식물체를 지지하기 힘들고 수분보지력과 보비력의 낮아 그대로 사용하기에 적합하지 못하여 가공이 필요하였다. 왕겨를 20mesh로 분말화 함으로서 진비중을 2.5배 가량 높여 식물체 지지력을 향상시켜 주었고 열탕처리를 통해 양이온치환능력을 증가시켰었다. 분말왕겨의 열탕처리 후 2.5%와 5%의 pectin을 첨가하여 수분보지력 및 보비력을 증진시켜 시판상토의 이화학적 수준으로 가공하였다.

왕겨·pectin 혼합배지(이후 왕겨배지)를 이용한 배추재배 결과 옥묘기간 동안의 시판상토인 부농상토, Ball 상토, 바로커에 비해 초기생육이 느렸지만, 왕겨배지에 기비 첨가를 하지 않았기 때문에 판단되어 옥묘 3주차부터 액비를 공급하자 생육속도가 증가하였다. 옥묘 후 생육반응을 관찰하기 위해 모든 처리구를 옥묘 5주 후 부농상토에 정식 하였다. 2달 후 옥묘 시 생육상태가 가장 좋았던 부농상토의 배추가 생체중이 가장 무거웠다. 그러나 부농상토의 배추가 옥묘 5주시 왕겨배지에 비해 6.5배 무겁던 것에 비해 2개월 후에는 1.3배의 차이로 그 차가 좁혀져, 옥묘배지로서 왕겨의 가능성을 보여주었다.

계분은 식물체에 필요한 무기양분을 고루 함유하고 있다. 특히 식물의 삼대 원소인 질소, 인산, 칼리 성분을 각각 5%, 2.1%, 1.9% 함유하고 있어 채소 재배용 기비로 활용될 가능성을 보여주었다. 그러나 계분을 그대로 사용하기에는 악취가 심하고 발효과정에서 암모니아와 같은 식물체에 유해한 가스의 배출이 우려되어 건조 후 압착된 상태로 가공한 것을 실험에 사용하였다. 원예용 복합비료를 대조구로 하여 배추의 생육상태를 관찰한 실험에서 기비 첨가 후 2주간은 대조구와 생육차를 보이지 않았으나 점차 생육차를 보이기 시작하여 3주차에는 복합비료 처리구의 생체중이 계분 처리구에 비해 2.3배 높았다. 이러한 생육차는 계분의 완효성이 떨어지기 때문으로 사료된다. 계분의 가공 과정에서 이를 고려하여 계분에 야교를 첨가하였지만 양분의 용해 속도를 늦추는데는 적합하지 못하였다. 따라서 계분의 완효화 과정만 완료된다면 채소 재배용 비료로서의 가능성이 매우 높을 것으로 보여진다.

5. 참고문헌

- 황선웅, 박문희, 김유섭, 박영대, 김동수. 1991. 원예용 상토개발에 관한 연구-분재용 인공배양토 개발 연구. 농사시험연구보고(토양화학) 157-166
- Lee, C. W., 최종명 1995. 양액재배 배지의 구성과 적정 혼합비율. 경상대 시설원예연구소. pp. 43-58
- 이지원 1994. 공정육묘용 배지의 특성과 활성 및 관리. 한국생물생산시설환경학회지 3(2) : 48-61
- 이정식 1994. 국내산 화분용 유기질 배양토 원료 개발에 관한 연구. 농진청 특정용역과제 논문집.
- 이정식 1994. 화훼용 수입 배양토의 이용 현황과 문제점. 시원지 7(20) : 41-50
- 김흥기 1996. 과채류의 플러그며 생산을 위한 혼합배지의 개발. J.Greenhouse industry. 호남온실작물연구소 10 : 30-35
- 김광용 1993. 공정육묘 전용 배지의 특성과 개발 방향. 시원지 6(1) : 50-59
- 김수생, 신항식. 1992. 유기성 폐기물의 자원화와 폐기물관리. 한국유기성 폐기물 자원화 협의회 창립 총회 pp. 17-38
- 박상근 1994. 공정육묘 시스템 도입의 필요성과 전망. 시원지 7(2) : 31-40
- 농업과학기술원. 1996. 비료의 품질검사방법 및 시료 채취기준
- 농업기술연구소. 1988. 토양화학 분석법. pp. 19-60