



**A Study on The Development of Iron-Fortified Dairy Products  
Utilizing Transferrin from Blood of Slaughtered Animal**

“

”

.

1999. 10. 20.

:

:

:

:

:

:

:

:

:

:

:

:

I.

(transferrin)

II.

500

가

가가

### III.

1.

Immobilized metal affinity chromatography(IMAC) column  
가

2.

batch type IMAC IEC  
system

3.

(pepsin pancrease) pH  
가

4.

hemoglobin , % Hematocrit ,

5.

-  
가

chelating

-

6. -

-

hemoglobin, % Hematocrit,

-

7.

-

가

#### IV.

1.

chelating sepharose fast

flow cupric ion

IMAC

. 1 (0.02M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M NaCl, pH 3.5)

74%가, 2

(0.01M imidazol)

7.0%가

SDS-PAGE

, 1

2

IgG

.

(MCO 30kD) HPLC 4.6 C18 가 column

2.

1g 1.14mg  
 1 2  
 가 (pH6, 37 )  
 가 , FeCl3 가 , 가  
 (7.5ng/ml) 2.2% 가  
 (1ng/ml) 가 가 47.0%가 가  
 5Fe  
*In situ* ligated segment 가  
 가  
 , 가 18.4%가 ,  
 10 20 가 48.49% 49.79%  
 가가

3. (transferrin extract)

batch type IEC IMC .  
 Batch type IEC ,  
 90.4%가

30.4% IgG . IMAC , 3  
 74.0%가 IgG  
 24.2% .  
 batch type IEC IMAC  
 , IEC  
 ( 30.4%, 90.4%) IMAC 3 ( 24.2%,  
 74.0%) .  
 가 ,  
 (FeSO4) 가 가 (100ppm Fe) 15.8%가 가  
 1 , 2.5 , 5 , 10  
 , 25 가 , 가 가 , 65.8, 70.8, 79.2,  
 75.8, 82.6% . 가  
 가 .

4.

pH가  
 simulated digestion  
 . 가 가 15%가  
 dialysate 가  
 17.2% 16% dialysate .  
 가 가 24%가 dialysate 4  
 가 .  
 HIST(73 , 30 ) LILT(63 , 30  
 ) 가 가 , 가  
 가 (Fe : (w/w) = 1 : 10 )

75.8% LILT, HIST 71.26, 75.47% 가  
 가 TIBC  
 HIST 95.3%, LILT 91.9%  
 . 가 3.1 × 10<sup>6</sup> CFU/ml  
 9.3 CFU/ml HIST LILT 가  
 2 × 10<sup>4</sup> 3 × 10<sup>4</sup> CFU/ml .

5.

FeS04 FeS04  
 200 가  
 hemoglobin , % hematocrit ,  
 25ng group  
 hemoglobin 100ng  
 group 가 . 50ng  
 group hemoglobin  
 50ng marginal dosage  
 50ng 가  
 50ng  
 50ng hemoglobin  
 가 ng 가 hemoglobin  
 (g) FeS04 group 3 0.4048g FeS04  
 group 0.5495g 35.7% 가 .  
 hemoglobin



6.

가 batch type IEC

, 가,

(8,948ppm) 37% (3,314ppm)가

(pH 6, 37 ) incubation , 가

37.4%가 가 가

7.

가

simulated digestion

가 , chelating 5.9%가 pepsin pancreatin digestion

dialysate FeCl3 + , FeCl3

FeS04 가 3.2, 3.2, 4.0%가 가

2

가 가 FeS04 -

42 hemoglobin , -

가 FeS04 hemoglobin 60%가 가 .

chelating group 가  
 chelating group 가  
 가 .  
 8.  
 , FeCl<sub>3</sub> FeSO<sub>4</sub> 23ppm 가  
 60 . 150mmHg , 72  
 30 , 4  
 가  
 가 source 23  
 , 가  
 가 .  
 source FeCl<sub>3</sub> - , FeSO<sub>4</sub>  
 FeCl<sub>3</sub> FeSO<sub>4</sub>  
 FeSO<sub>4</sub> FeCl<sub>3</sub>  
 가  
 - 가 가  
 . , source가 가  
 4 head space  
 , FeSO<sub>4</sub> 가  
 30 가  
 . FeCl<sub>3</sub> -  
 가 . FeSO<sub>4</sub>가 FeCl<sub>3</sub>  
 4 30

-

FeCl3

10%가

3%가 cream

72 30 42

0.02%( , ABT-B) 가 pH4.7 42

4 - , FeCl3

FeSO4 23 ppm 가

4 , ,

23 4

, FeSO4 가 가

. FeSO4 가

가

FeCl3

가 , pH, ,

가 가 .

# **SUMMARY**

## **I. Title**

A Study on The Development of Iron-Fortified Dairy Products Utilizing Transferrin from Blood of Slaughtered Animal

## **II. Objective and Significance**

Since many countries are still investing lots of money on developing effective iron sources that are excellent in preventing or healing iron-deficient anemia, it is very attractive to do the research on developing ready to absorbable iron sources for medicinal as well as food additive purposes. The objectives of this project are to develop new type of the iron source using transferrin obtained from blood of slaughtered animals, and, by adding this, to develop iron-fortified dairy products.

## **III. Scope and Content**

### **1. Isolation and purification of transferrin from animal blood**

Immobilized metal affinity chromatography(IMAC) and C18 reversed phase column were utilized for isolation and purification of transferrin from

blood of slaughtered animal. Purified transferrin was studied for its properties such as iron-binding capacity, iron-solubilizing ability, and the effect on iron-bioavailability that was determined by *in situ* ligated method.

## **2. Development of the effective way of producing transferrin extract**

Porcine plasma was fractionated either by batch type IMAC or IEC, and transferrin fractions obtained by two methods were compared with their transferrin recovery and purity for the purpose of establishing the effective way of producing transferrin extract.

## **3. Properties of transferrin extract**

Transferrin extract was tested for its stabilities towards pHs and digestive enzymes(pepsin and trypsin). It was also investigated for protein denaturation and microbial qualities after heat treatment.

## **4. Effects of transferrin extract on bio-availability of iron**

Iron-deficient anemia was induced to SD rats by feeding iron-deficient diet. Then, iron( $\text{FeSO}_4$ ) alone or iron and transferrin extract were fed daily. During experimental period, hemoglobin concentrations, % hematocrit, and body weight were measured to study effects of transferrin extract on bio-availability of iron.

## **5. Production of iron-transferrin extract**

Iron-transferrin extract was produced by chelating irons to

transferrin extract and its properties were studied.

#### **6. Effect of iron- transferrin extract on bio- availability of iron**

SD rats on which iron-deficient anemia were induced were fed iron- transferrin extract daily. Effects of iron- transferrin extract on bio- availability of iron were investigated by measuring hemoglobin concentrations, % hematocrit, and body weight.

#### **7. Processing iron- fortified dairy products**

Iron- fortified milk and yoghurt were processed by adding iron- transferrin extract. Changes in sensoric qualities and other properties of the products were investigated during storage.

### **IV. Major results and Recommendation**

#### **1. Isolation and purification of transferrin from blood of slaughtered animal**

Bovine and porcine blood were obtained from municipal slaughter house. Plasma obtained by centrifuging blood were further fractionated by IMAC using chelating sepharose fast flow gel that was chelated with cupric ions. By 1st eluting buffer(0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M NaCl, ph 3.5), 74% of total plasma proteins were eluted while 7.0% of plasma proteins were eluted by 2nd eluting buffer. The 1st fraction was mainly composed of serum albumin while transferrin and IgG were main proteins in 2nd fraction. The

concentration of transferrin in 2nd fraction were increased to 4.6 times when compared to concentrations of transferrin in plasma. Transferrin was further purified on C18 reversed phase column.

## **2. Properties of purified transferrin**

One gram of purified transferrin could bind 1.14mg of ferric iron, which represented one molecule of transferrin can bind about two molecules of iron. Iron should be solubilized first at duodenum to be absorbed into our body. Therefore, solubilization is prerequisite for absorption. When iron-solubilizing ability of transferrin at duodenum condition (pH 6, 37 °C) was tested, only 2.2% of added iron (7.5 µg Fe/ml) were solubilized in the absence of transferrin while 47.0% of added iron were solubilized in the presence of transferrin (1mg/ml). When FeCl<sub>3</sub> (80 µg Fe/ml) was injected into iron-deficient rats by intestinal segment *in situ* technique, 18.4% of injected iron was absorbed whereas 48.49 and 48.76% of injected iron was absorbed with addition of 10 and 20mg transferrin/ml, respectively.

## **3. Development of the effective way of producing transferrin extract**

Batch type IEC and IMAC methods were applied for effective production of transferrin extracts. In the case of IEC, 90.4% of whole transferrin were eluted by absorption buffer and the purity of transferrin in this fraction was 28.8%. Rests of proteins in this fraction were mostly composed of IgG. In the case of IMAC, 74.0% of transferrin were eluted by 3rd elution buffer. The purity of transferrin in this fraction was 24.2%.

According to these results, transferrin extracts were more effectively fractionated by IEC rather than IMAC method. When transferrin extract fractionated by IEC were evaluated for iron-solubilizing ability at the duodenums condition, 15.8% of added irons(in the form of FeSO<sub>4</sub>) were solubilized without adding transferrin extracts whereas 65.8, 70.8, 79.2, 75.8, and 82.6% of added irons were solubilized when 1, 2.5, 5, 10, and 25 times as large amount of transferrin extract as added irons were added, respectively. These results indicated that even adding equal amount of transferrin extract can significantly increase solubility of added irons.

#### **4. Properties of transferrin extract**

Simulated digestion method was adopted for testing stability of transferrin extracts toward pHs and digestive enzymes. In control group, which iron was solely added to milk, 15% of added iron were detected in dialysate whereas 17.2% and 16.0% of added iron were detected in transferrin- and lactoferrin-added groups, respectively. However, 24% of added iron were existed to dialysate in transferrin extract-added group indicating that transferrin extract is the most effective in increasing bio-availabilities of iron. Heat treatments, either by LTLT or HTST, didn't significantly affect both iron-solubilizing ability and iron-binding ability of transferrin extract. Protein patterns in transferrin extract on SDS-PAGE were almost identical before and after heat treatments. By LTLT, total microbial counts were reduced from  $3.1 \times 10^6$  to  $3 \times 10^4$ CFU/ml while they were more reduced to  $2 \times 10^4$ CFU/ml by HTST. Coli forms were not detected after heat treatments.



## **5. Effects of transferrin extract on iron bio-availability**

To investigate effects of transferrin extract on bio-availability of iron, iron-deficient anemia was induced to SD rats by feeding iron-deficient diets for 7 weeks. Bio-availability of iron was determined by measuring hemoglobin concentrations, % hematocrit, and body weight weekly. To determine marginal iron dosage, iron (in the form of FeSO<sub>4</sub>) was solely fed with amounts of 25, 50, and 100µg daily. Hemoglobin concentrations (g/dL) of SD rats fed 25µg of iron daily were gradually decreased during experimental period. Hemoglobin concentrations of SD rats fed 50µg of iron were almost constant while those of 100µg iron fed group were slowly increased. From these results, it is obvious that further animal experiment should be done with feeding marginal iron dosage of 50µg daily. After marginal iron dosage was decided, FeSO<sub>4</sub> alone or FeSO<sub>4</sub> with transferrin extract which were added 200 times more than the amount of iron was forced fed daily. Conclusively, Hg(g)/Fe(mg) intake of the group that was fed FeSO<sub>4</sub> solely increased to 0.4048g after 3 weeks otherwise that of transferrin extract added group increased to 0.5495g indicating that addition of transferrin extract significantly enhance body absorption of iron.

## **6. Production of iron-transferrin extract**

Iron-transferrin extract was processed by adding irons followed by dialyzation and sterilization. Among total irons added, 37.0% was remained in iron-transferrin extract complex while only 3.9% was remained when iron was solely dialyzed. When FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> and iron-transferrin extract was

incubated at duodenums condition, concentrations of solubilized irons in iron-transferrin extract were much higher than other two irons.

#### **7. Effect of iron-transferrin extract on iron bio-availability**

Simulated digestion method was applied to determine solubility of iron-transferrin at the condition of digestion. When iron-transferrin extract was added, 5.9% of the total added iron remained in dialysate whereas 3.2, 3.2, and 4.0% of added irons were detected from dialysates of FeCl<sub>3</sub> + transferrin extract, FeCl<sub>3</sub> and FeSO<sub>4</sub> added groups, respectively. The effect of iron-transferrin extract on bio-availability of iron was investigated by animal experiment. The group of rats that was fed with iron-transferrin extract daily as equal amount of 37µg iron showed total hemoglobin concentrations of 0.783g at the beginning to 1.3519g after 42 days whereas concentrations of hemoglobin in FeSO<sub>4</sub>, which is known as the most effective iron source in absorption, added group were increased less rapidly from 0.7604g to 1.1177g. This result indicated that iron-transferrin is excellent iron source for enhancing bio-availability of iron. Since iron-transferrin extract was more effective in iron absorption than FeCl<sub>3</sub> + transferrin extract, chelating iron to transferrin extract was considered to be essential process.

#### **8. Processing iron-fortified dairy products**

Iron-fortified milk was processed by adding 23ppm of iron(in the forms of FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub> and iron-transferrin extract) and heated to 60 followed by homogenization, sterilization, and bottling. Milk samples were stored at 4 and tested for sensoric evaluation and lipid oxidation. Although

serious defects in sensoric properties were not observed in all milk samples during storage, FeCl<sub>3</sub>-fortified milk exhibited the best quality followed by iron-transferrin extract and FeSO<sub>4</sub> fortified milks. Oxygen concentrations in FeSO<sub>4</sub> decreased significantly during storage at 4 °C while those in FeCl<sub>3</sub> and iron-transferrin extract were almost constant indicating that FeCl<sub>3</sub> and iron-transferrin extract were much less reactive to oxidation than FeSO<sub>4</sub>. Iron-fortified yoghurt was processed by mixing skim milk powder and cream to 10 : 3(w/w), sterilization, inoculation of mixed culture of LAB, and incubation at 42 °C till pH dropped to 4.7. After incubation, iron-transferrin extract, FeCl<sub>3</sub> and FeSO<sub>4</sub> were added to yoghurt, mixed and filled to pasteurized bottles. Changes in sensoric qualities, titratable acidity and lactic acid bacteria counts of products were evaluated during storage at 4 °C. There were no significant defects in sensoric qualities during storage except FeSO<sub>4</sub> added yoghurt. Rancid flavors were detected in FeSO<sub>4</sub> added yoghurt from the beginning of the storage and intensity of these off-flavors were rapidly increased during storage indicating FeSO<sub>4</sub> is much reactive to lipid oxidation. No significant differences were observed in pH, acidity and microbial counts among three products during storage.

# CONTENTS

Summary-----	
Chapter 1 -----	
Introduction-----	
Chapter 2-----	
1. Introduction -----	
2. Materials & Methods -----	
1) Blood collection and plasma separation-----	
2) Isolation and purification of transferrin-----	
3) Electrophoresis	
4) Protein determination	
5) Iron binding capacity	
6) Iron solubilizing ability	
7) <i>In situ</i> ligated method	
3. Results & Discussion -----	
1) Isolation and purification of transferrin-----	
2) Properties of transferrin-----	
① Iron binding capacity -----	
⑤ Iron solubilizing ability-----	
③ Effect on bio-availability of iron-----	
Chapter 3-----	
1. Introduction-----	
2. Materials & Methods -----	
1) Production of transferrin extract-----	

2) Properties of transferrin extract-----	
① Stability toward pHs and digestive enzymes-----	
⑤ Heat stability	
3) Effect on bio-availability of iron	
3. Results & Discussion -----	
1) Effective way of producing transferrin extract-----	
2) Properties of transferrin extract-----	
① Stability toward pHs and digestive enzymes-----	
⑤ Heat stability-----	
3) Effect on bio-availability of iron-----	
Chapter 4-----	
1. Introduction-----	
2. Materials & Methods -----	
1) Production of iron-transferrin extract-----	
2) Effect on bio-availability of iron	
3) Processing iron-fortified dairy products	
① Iron-fortified milk	
⑤ Iron-fortified yoghurt	
3. Results & Discussion -----	
1) Effective way of producing iron-transferrin extract-----	
2) Effect on bio-availability of iron	
3) Processing iron-fortified dairy products	
① Iron-fortified milk	
⑤ Iron-fortified yoghurt	
References-----	

1

2

1

2

1.

2.

3.

4.

5.

6.

7.

3

1.

2.

가.

.

.

3

1

2

1.

2.

.

----

-----

-----

-----

-----

-----

-----

-----

가 -----

-----

-----

-----

가. -----

. 가 -----

-----

**system**

---

-----

-----

-----

-----

가. pH -----

. -----

3. -----

3 -----

1. -----

2. -----

가. pH -----

. -----

3. -----

4 . - -----

1 -----

2 -----

1. - -----

2. - -----

3.

가.

. -----

3 -----

1. - -----

2. - -----

3.

가.

. -----

# 1

## 1

### 1. (iron)

가

60-75%가

3%

0-30%

1% 가

5-15% cytochrome oxidase, catalase

electron

transport system

adenosine

triphosphate

(Zubay, 1983).

가

energy

(Edgerton, 1972)

### 2.

(bio-availability)

2가(ferrous)

3가 (ferric)

pH가 3

가 ferric hydroxides

ferric iron 가

가

hydroxides phosphate

complexes chelates

가 (Kaltwasser , 1987).



가 가 . 가  
,  
chelate  
ligands (Valberg , 1983).

3. (iron fortification)

가  
,  
(Hallberg, 1981).  
가 가  
( , , ) 가  
. complex  
가  
가 가 .  
1) , 2) , 3)  
, , 4)  
. (Cook , 1983).

carrier 가

4. (transferrin) 16-18%  
가

(blood plasma protein)  
가 , protease

77,000 dalton

pH 2 3가 (ferric ion)

tyrosine .

1 liter 2.3g .

hemoglobin, myoglobin, cytochrom cytochrom oxidase

(whey) (lactoferrin)

가 .

2

.

1

**lactoferrin**

**ovotransferrin**

가

가

**chapter**

가

2

1.

가

**10% sodium citrate**

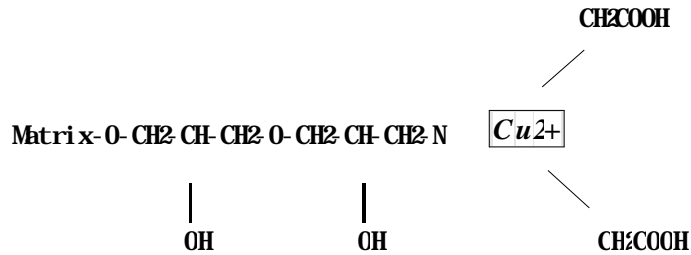
1%가

가 1

**(3,000 x g 20 )**

2.

FPLC(Pharmacia Co.) chelating sepharose fast flow(IDA  
 sepharose, Pharmacia Co.)  $Cu^{2+}$  ( 1)  $Cu^{2+}$   
 IMAC  
 gel (binding buffer) 0.02M  
 $Na_2HPO_4$  0.5M NaCl (pH 8.2) pH 3.4  
 1 (elution buffer), 0.01M imidazole 2



1.  $Cu^{2+}$ 가 chelating sepharose fast flow

Signa phenol reagent  
 SDS-PAGE  
 laser densitometer(ultrascan XL, Pharmacia Co.) . 2  
 (MCO 30Kdal)  
 HPLC(model IC-900, Jasco. Co.) column(crestpak C18S,

Jasco. Co.) . HPLC 0.1%  
 trifluoroacetic acid/H<sub>2</sub>O(A) 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile(B)  
 60nl/hr 25 70/30(A/B) 50/50(A/B)  
 gradient 280nm .  
 SDS-PAGE nobility,

3.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
 (SDS-PAGE) Hoefer Mighty Small II(SE 250 MINI-Vertical Gel  
 Electrophoresis Unit, Pharmacia Biotech) EPS 600 Power Supply (Pharmacia  
 Biotech) , Gel 9% SDS-PAGE, sample buffer β  
 -mercapthoethanol 가 100W, 200nA coonassie  
 blue .

4.

SDS-PAGE  
 laser densitometer(Ultrosan XL, Pharmacia LKB,  
 ) . micro protein  
 determination . , 0.85% NaCl 0.2nl  
 2.2nl Biuret Reagent(Signa) 10 .  
 Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent(Signa) 0.1nl 30  
 570nm , Protein standard(Signa)

5.

IMAC ,  
 alkali (pH 8.5)  
 total iron concentration (TIC)  
 kit  
 unsaturated iron binding capacity(UIBC) total iron binding  
 capacity(TIBC) .

6.

가  
 IMAC , 가  
 7.5µg Fe/nl FeCl<sub>3</sub> 가 pH  
 (pH 2, 37 ) (pH 6, 37 ) 2  
 incubation 가  
 ferrozine . Ferrozine 1.25nl ascorbic  
 acid soln 0.5nl 10 1nl 10% ammonium  
 acetate 1.25nl ferrozine reagent 가 10 ,  
 562nm .

7.

1  
 SD rat 8  
 , 5 3 sodium pentabarbi tal  
 . SD rat 2  
 µFe 1nl  
 1 .

1.

	(g/kg )
Casein	200
Corn starch	150
Cellulose	50
DL-methionine	3
Mineral mixa	35
Vitamin mixb	10
Choline bitartrate	2
Sucrose	500
Corn oil	50

a Mineral mix (g/kg) : CaHPO<sub>4</sub> 500.0, NaCl 74.0, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub> 220.0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 52.0, MgO 24.0, MnCO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 3.5, ZnCO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 1.6, CuCO<sub>3</sub> 0.3, KI04 0.01, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01, Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.55, finely ground sucrose 124.03.

b Vitamin mix (g/kg) : thiamin HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, Niacin 3.0, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, vitamin B<sub>12</sub> 1.0, dry vitamin A palmitate 0.8, dry vitamin E acetate 10.0, vitamin D<sub>3</sub> 0.25, menadiolone sodium bisulfite complex 0.15, sucrose fine powder 981.08.

## 2. *In situ* ligated segment

	- 10		- 20
	(nl)	(nl)	(nl)
FeCl <sub>3</sub> (l)	0.3	0.3	0.3
	-	10ng	20ng
0.01mol HCl/L	0.1	0.1	0.1
3	0.542	0.542	0.542
0.25mol/L Tris buffer (pH 8.5)	0.058	0.058	0.058

Final pH : 7.2

180ng Fe/L in 0.01mol HCl/L & 50µCi/ml

<sup>59</sup>Fe

gamma counter(Packard Auto-Gamma Model 2000 series)

3

1.

Chelating sepharose fast flow cupric ion

IMAC

( 2). phenol reagent

3 phenol reagent

(0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, pH 8.2)

13.0%가 1 (0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5M NaCl, pH 3.5)

70.3%, 2 (0.01M imidazol)

16.7%가 ( 3). SDS-PAGE

, 1

2 , IgG ( 4).

SDS-PAGE laser densitometer ,

10.4% 76.7%가

2 ( 4).



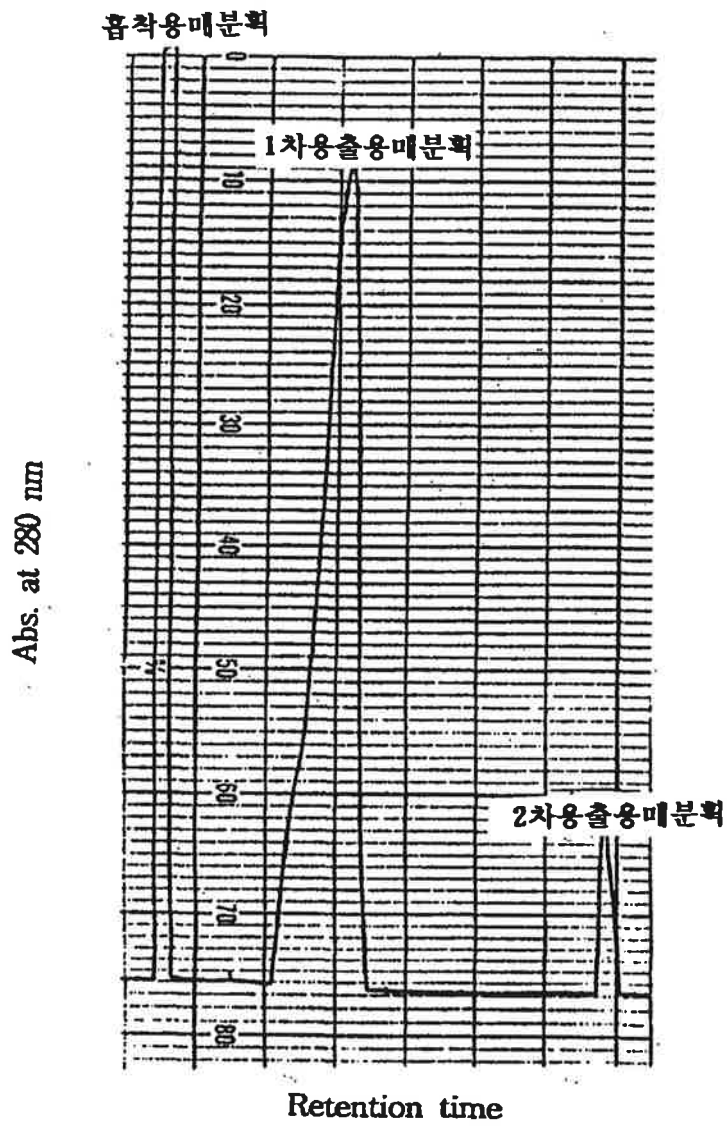


그림 2. IMAC에 의한 철장단백질의 분획

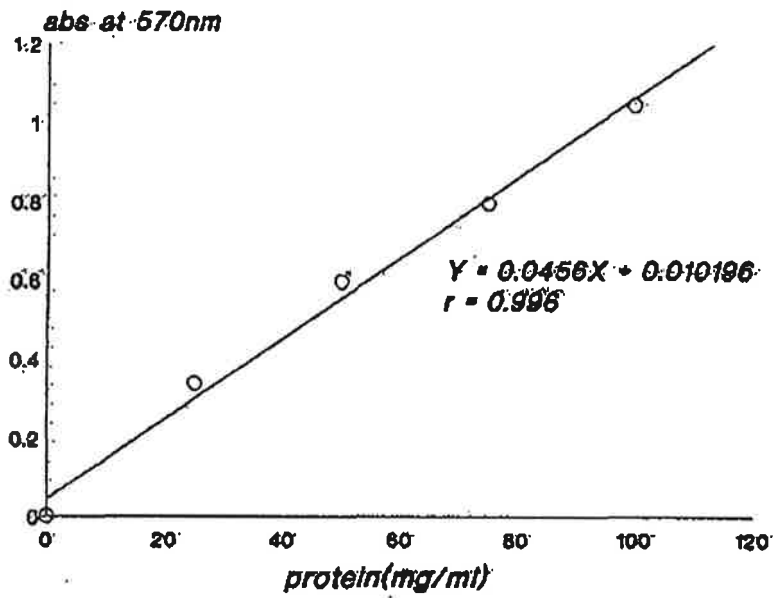


그림 3. Phenol reagent법에 의한 단백질 함량 측정 표준곡선

표 3. IMAC에 의해 분리된 각 분획의 단백질 농도

	총단백질량(mg/ml)	%
혈장	70.1	100.0
흡착용매	9.1	13.0
1차용출용매	49.3	70.3
2차용출용매	11.7	16.7



그림 4. IMAC에 의해 분획된 혈장단백질의 전기영동 pattern

1. 혈장
2. 1차용출용매 분획
3. 2차용출용매 분획
4. 트랜스페린 표준품

표 4. IMAC상에서 2차용출용매에 의해 분리된 분획의 트랜스페린 조성

	총단백질량 (mg/ml)	트랜스페린 (mg/ml)	순도 (%)	회수율 (%)
혈장	70.1	7.3	10.4	100
2차용출용매 분획	11.7	5.6	47.8	76.7

IMAC상에서 2차용출용매에 의해 분리된 분획을 한의여과(MWCO 30kD)로 농축하고 HPLC상에서 역상 column을 통해 트랜스페린 표준품과의 retention time을 비교하여 트랜스페린을 분리하였다(그림 5). 트랜스페린의 트랜스페린 peak에 해당되는 분획을 모아 농축하고 SDS-PAGE상에서 트랜스페린 표준품과 Rf를 비교한 결과, 분리된 peak는 거의 트랜스페린으로 구성되었음을 알 수 있었다(그림 6). 또한 이 peak의 아미노산조성을 트랜스페린 표준품과 비교해 보았을 때, 둘 사이의 아미노산조성이 거의 동일하여 HPLC에서 분리된 peak가 순수한 트랜스페린임을 알 수 있었다(표 5).

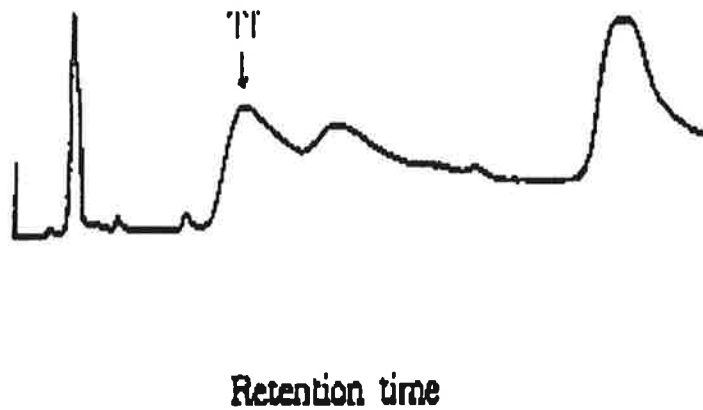


그림 5. 2차용출용매 분획의 HPLC chromatogram

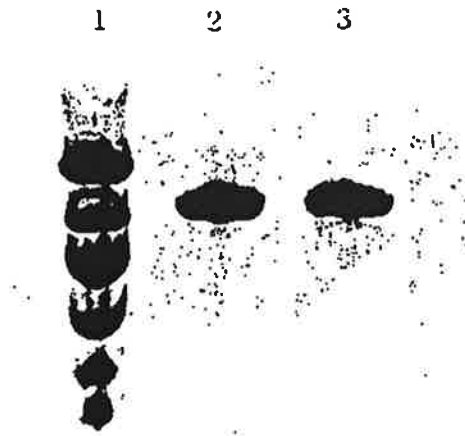


그림 6. IMAC와 HPLC를 거쳐 분리된 트랜스페린

1. Molecular weight standard
2. 트랜스페린 표준품
3. 분리·정제된 트랜스페린

5.

	MOL %	
	( )	( )
ASX**	13.65	13.94
GLX**	9.45	10.04
SER	6.17	6.77
GLY	8.58	8.87
HIS	2.58	2.11
ARG	3.83	3.62
THR	5.53	5.64
ALA	8.58	8.24
PRO	5.51	5.98
TYR	3.90	3.03
VAL	5.02	5.22
MET	1.83	1.15
ILE	2.62	2.61
LEU	8.13	7.85
PHE	4.39	4.41
TRP	0.00	0.00
LYS	10.26	10.53
TOTAL	100.00	100.00

\*\* ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid.

## 2. 트랜스페린의 특성

### 가. 철분결합능

HPLC를 통하여 분리된 트랜스페린의 양이 제한적이었기 때문에 분리된 트랜스페린의 농도를 phenol reagen법을 사용하여 측정한 대신에 HPLC상에서 트랜스페린 표준품의 농도별 peak area와의 상관관계식으로부터 비교하여 측정하였다(그림 7). 분리된 트랜스페린의 농도 변화에 따른 철분결합능의 변화는 그림 8에 나타내었으며 트랜스페린 1mg은 약 1.14 $\mu$ g의 철분을 결합하는 능력을 보였다. 이와 같은 결과로부터 1분자의 트랜스페린이 2개의 철분과 결합할 수 있음을 확인할 수 있었다. 대부분이 알부민으로 구성된 1차용출용매 분획의 철분결합능은 단백질 1mg당 0.049 $\mu$ g인 반면, 트랜스페린이 함유된 2차용출용매 분획은 단백질 1mg당 약 0.2 $\mu$ g의 철분과 결합하였다(표 6). 따라서 트랜스페린이 함유된 2차용출용매 분획의 철분결합능이 주로 알부민으로 구성된 1차용출용매 분획보다 월등히 높았다.

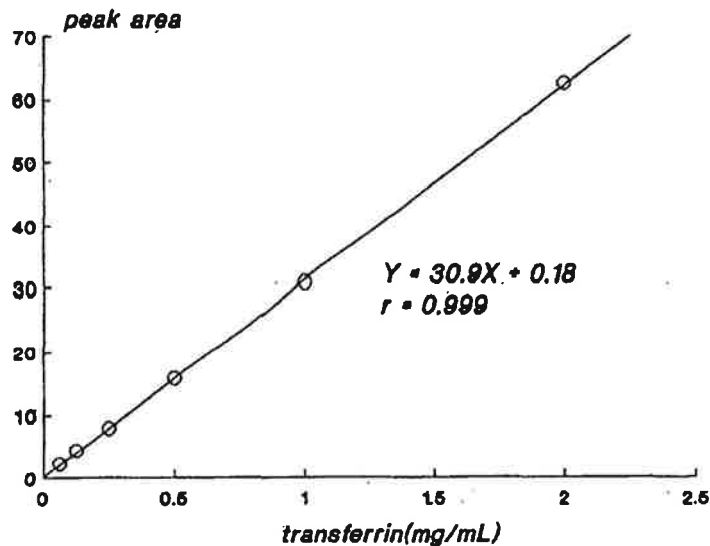


그림 7. HPLC를 통하여 분리·정제된 트랜스페린의 농도별 peak area

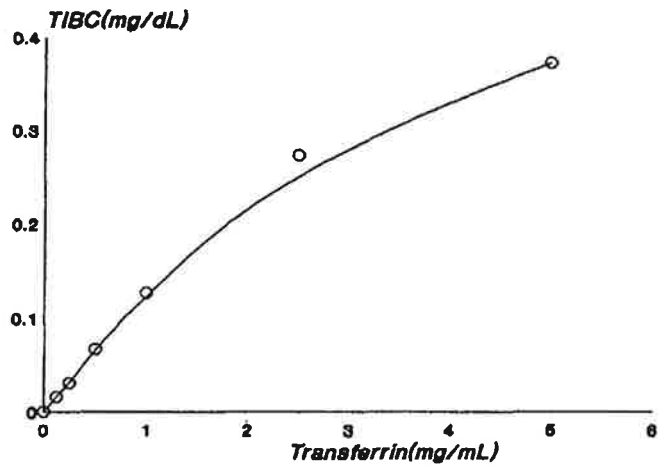


그림 8. 분리된 트랜스페린의 농도에 따른 철분결합능의 변화

표 6. 트랜스페린 및 각 혈장분획의 철분결합능

	Total Iron ( $\mu\text{g}$ )	UIBC <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}$ )	TIBC <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}$ )
트랜스페린	0	1.14	1.14
1차용출용매 분획	0.045	0.004	0.049
2차용출용매 분획	0.075	0.12	0.199

1) UIBC : unsaturated iron binding capacity

2) TIBC : total iron binding capacity = total iron + UIBC



나. 철분가용화능

철분이 체내로 흡수되기 위해서는 가용성의 상태로 존재하는 것이 우선 조건이다. 따라서 이론적으로 철분을 가용화 상태로 유지시켜 줄 수 있는 성분의 존재하에서 철분의 체내흡수는 향상될 것이다. 철분은 체내의 십이지장에서 대부분 흡수되기 때문에 소화기관에 protease의 작용을 고려하지 않은 위의 조건 (pH 2, 37°C)과 십이지장의 조건(pH 6, 37°C)에서 철분과 트랜스페린 등을 incubation한 후 원심분리하여 침전되지 않고 상층부에 남아 있는 철분의 양을 ferrozine법으로 측정하여 이들의 철분가용화능의 지표로 삼았다. 그림 9는 철분의 양과 ferrozine test와의 상관관계를 나타내는 표준곡선이다. 위의 조건인 pH 2에서는 트랜스페린 등을 첨가하지 않은 control의 경우에는 첨가한 철분의 80% 이상이 가용화되었으며 각 혈장분획과 트랜스페린 등의 첨가가 철분가용화능에는 크게 영향을 미치지 않았다(표 7). 위와 같은 결과는 철분이 pH 5이하의 조건에서는 가용화 경향이 강하여지기 때문인 것으로 판단된다.

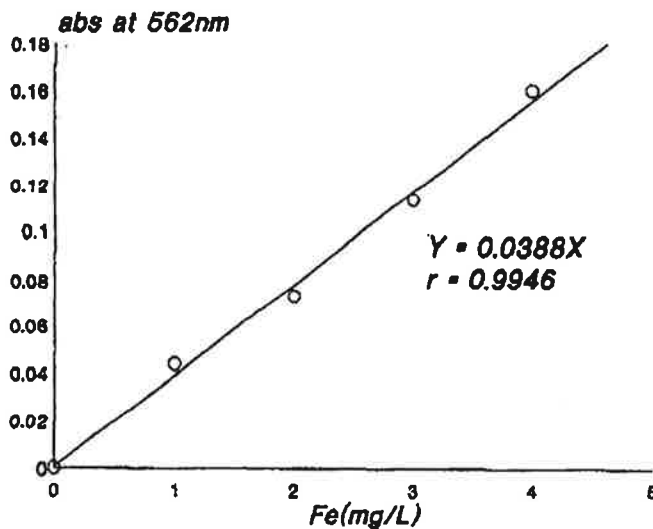


그림 9. Ferrozine test의 표준곡선

표 7. 트랜스페린 및 각 혈장분획의 위(pH 2, 37℃)의 조건에서의 철분  
가용화능

	첨가 철분량 ( $\mu\text{g}$ )	가용성 철분량 ( $\mu\text{g}$ )
Control		6.13
트랜스페린 (1mg/ml)		6.30
1차용출용매 분획 (1mg/ml)	7.5	6.04
2차용출용매 분획 (1mg/ml)		6.69

그림 10은 철분의 체내흡수가 일어나는 십이지장 조건에서의 트랜스페린 농도별 철분가용화능을 보여주고 있다.

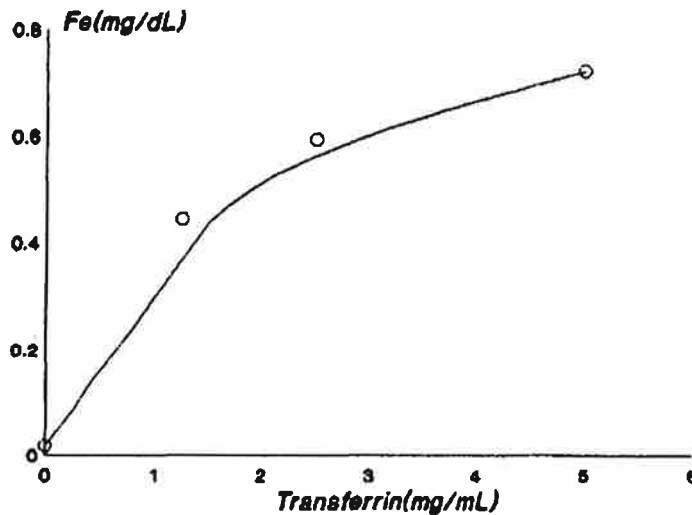


그림 10. 십이지장 조건에서의 트랜스페린 농도에 따른 철분가용화능의 변화

FeCl<sub>3</sub> 가 control  
 , 가 2.2% 가 1 , 2  
 , , 가 가  
 9.5, 42.3, 47.0, 53.0%가 가 ( 8).  
 , 2 가  
 IgG 가

8. (pH 6, 37 )

가

	가 (ng)	가 (ng)
Control		0.17
(1ng/ml)		3.50
1	7.5	0.76
(1ng/ml)		
2		3.17
(1ng/ml)		

mechanism . henoglobi n ,  
 5 10% 가 .  
 가

가

, 가 가  
5Fe .

9. *In situ* ligated segment

가 가

	5Fe (CPM)		
		- 10	- 20
1	137, 788	95, 587	86, 689
2	124, 885	83, 143	43, 652
3	126, 816	83, 525	107, 067
4	142, 822	85, 676	108, 757
5	106, 056	91, 049	86, 026
(A)	127, 693	87, 796	86, 438
(T)	156, 480	170, 449	168, 685
5Fe (%) 1) = { (A/T) × 100 }	81. 60%	51. 51%	51. 24%
5Fe (%) = { 100 - Fe }	18. 40%	48. 49%	48. 76%

1) 5Fe = 5Fe .

9 가

가

. 10ng 가 가 2.6 가

가  
가  
10ng                      20ng                      가  
.

## 제 3 장 트랜스페린 추출물의 생산 system 개발 및 특성 연구 분야

### 제1절 서 설

1차년도 연구결과를 토대로 경제적이고 효율적으로 트랜스페린이 함유된 분획을 얻고 이들의 소화과정 중에 일어날 수 있는 철분가용화능의 변화 및 동물실험을 통한 철분체내이용성에 미치는 영향 등을 본 chapter를 통하여 연구하였다. 트랜스페린 추출물의 제조기술은 (주)오리엔탈제약에 기술이전이 된 상태임으로 상세한 제조조건은 본 최종보고서를 통하여 언급할 수 없음에 먼저 양해를 구하며 본 chapter에서는 대략적인 제조방법을 제시하였다.

### 제2절 연구수행방법

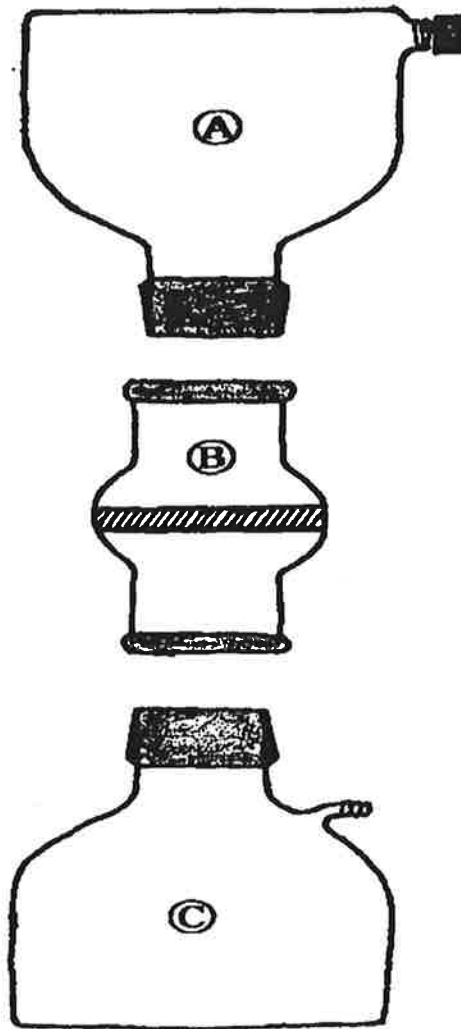
#### 1. 트랜스페린 추출물의 생산

도축즉시 수거한 소혈액 및 돼지혈액을 항응고제로 처리하여 냉장상태에서 운반하여 원심분리(5,000×g, 30분) 후 상등액을 취하여 혈장으로 사용하였다. 다만 소 혈액의 경우에는 전체혈액의 20%만이 혈장으로 회수된 반면, 돼지 혈액의 경우에는 전체 혈액의 50%가 혈장으로 회수되어 차후 실험에 필요한 혈장은 돼지 혈액에서 회수하기로 하였다. 혈장으로부터 트랜스페린을 효율적으로

용하는 방법 보다 batch type이 유리할 것으로 간주하여 이를 이용한 단백질 분획장치를 고안하였다(그림 11). 단백질 분획장치는 유리로 세공되었으며, 세부분으로 나뉘어 진다. 이 장치는 일정량의 gel과 sample, 그리고 1차 용출용액을 reaction vessel ㉔에 넣어서 magnetic stirrer를 이용하여 교반하여 주고, 일정시간 후에 glass filter ㉕와 extraction vessel ㉖를 reaction vessel위에 끼운 후 뒤집어서 gel은 여과되지 않게 하고 1차 용출용액에 용출된 단백질은 여과되어 분리될 수 있게 고안되었다. 여과속도를 높이기 위하여 extraction vessel에 aspirator를 연결할 수 있는 연결구를 장치하였다. Gel로부터 용출되지 않은 단백질은 2차, 3차용출용액 등으로부터 같은 방법에 의해 분리되어 질 수 있다. 본 연구를 위하여서 2L 또는 3L 용량의 단백질 분획장치를 사용하였다.

IMAC gel 100ml을 2L 용량의 단백질 추출여과장치에 넣어 500ml (2.5 bed volumn)의 증류수로 20분 동안 2회 세척하여 여과하고 흡착용매 500ml로 평형화시킨 후 여과하였다. 동결된 혈장을 녹인 후 5,000 x g에서 10분간 원심분리하여 생성된 curd를 제거하고 membrane filter(pore size 0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과한 혈장 100ml(0.5 bed volumn)를 흡착용매 400ml와 함께 20분 동안 혼합하여 여과하였다. Gel에 고정화된 금속이온에 흡착된 단백질을 용출시키기 위해 1차와 2차, 3차 용출용매(elution buffer)를 사용하였다. 마지막으로 남아있는 모든 단백질을 용출하기 위해 washing soln으로 gel을 세척하였다.

효율적인 혈장단백질의 분획을 위해 IMAC외에 IEC를 이용하여 단백질을 분획하였다. IMAC에서와 같이 단백질 여과추출장치를 이용하였으며, 흡착용매와 1차-4차 용출용매를 사용하였다. Gel양과 혈장, 용매의 양은 IMAC와 같게 하였다. Gel filtration은 유리 column(80 x 2.0cm)에 sephadex G-100을 충전하여 행하였다. 분리·정제된 트랜스페린의 아미노산조성은 Picotag system을 이용하여 행하였다.



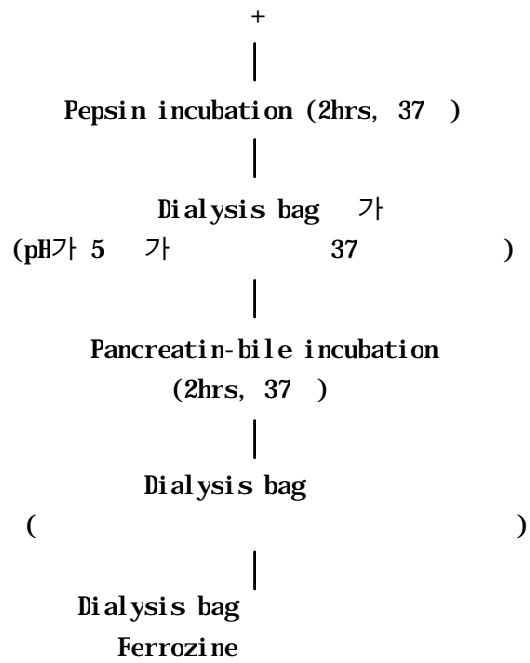
도 1. 단백질분획장치

그림 11. 단백질 분획장치



IEC IMAC  
 SDS-PAGE laser densitometer .  
 가 7.5ng  
 Fe/ml FeSO<sub>4</sub> 가 , pH (pH 6, 37 )  
 2 incubation  
 가 ferrozine .  
 total iron binding capacity (TIBC) .

2.  
 가. pH  
 pH Miller  
 simulated digestion .  
 12 simulated digestion  
 (10ng/dL) (500ng/dL)  
 가  
 . Simulated digestion pepsin digestion pancreatin  
 digestion HCl NaHCO<sub>3</sub>  
 pore size 6,000 8,000 dalton  
 dialysis membrane  
 ferrozine .



12. Simulated digestion .

HISI(73 , 30 ) LILI(63 , 30 )가

가 가 . ,

SDS-PAGE . 가

SPC , VRB

3.

3 SD rat

( 10) 4

gavage tube                      forced feeding

FeSO<sub>4</sub> (25, 50, 100, 200mg Fe/day)

FeSO<sub>4</sub> +                      { Fe :                      (w/w) = 1 : 50, 100,

200 } ,

(orbital vein plexus)                      hemoglobin    hematocrit

hemoglobin                      :

$$\text{hemoglobin(g)} = (\text{g}) \times 0.067 \times \text{Hb(g/dL)} / 100$$

ng    가    hemoglobin    가    hemoglobin

10.

	(g/kg)
Casein	200
Corn starch	150
Cellulose	50
DL-methionine	3
Mineral mixa	35
Vitamin mixb	10
Choline bitartrate	2
Sucrose	500
Corn oil	50

a Mineral suppliment (g/kg) : CaHPO<sub>4</sub> 500.0, NaCl 74.0, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 220.0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 52.0, MgO 24.0, MnCO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 3.5, ZnCO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 1.6, CuCO<sub>3</sub> 0.3, KI 0.4 0.01, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01, CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.55, finely ground sucrose 124.03.

b Vitamin suppliment (g/kg) : thiamin HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, Niacin 3.0, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, vitamin B<sub>12</sub> 1.0, dry vitamin A palmitate 0.8, dry vitamin E acetate 10.0, vitamin D<sub>3</sub> 0.25, menadione sodium bisulfite complex 0.15, sucrose fine powder 981.08.

## 제3절 결과 및 고찰

### 1. 트랜스페린 추출물의 효율적인 생산 방법

혈액으로부터 트랜스페린 추출물을 효율적으로 생산하기 위하여 우선 혈장 회수율이 뛰어난 돼지혈액으로부터 트랜스페린을 분리·정제하는 과정이 필요하였다. 또한 트랜스페린 추출물의 분획을 위해 사용될 IEC와 IMAC공정은 column을 이용하는 방법보다 batch type의 단백질 분획장치의 개발이 트랜스페린 추출물의 효율적인 생산을 위해 유리할 것으로 간주되었다. 돼지혈액으로부터 얻어진 혈장에 포함된 단백질의 양은 혈장 1ml 당 70.1mg이었으며 SDS-PAGE 상에서 densitometer를 이용하여 주요 혈장단백질의 조성을 측정된 결과, 알부민이 전체 혈장단백질의 42.8%를 차지하였으며 IgG와 트랜스페린은 각각 22.4%와 10.4%를 차지하였다. 그림 13은 단백질 분획장치를 이용하여 batch type의 ion exchange를 통한 혈장단백질의 분획 pattern을 전기영동상에서 보여주고 있다. IEC gel로부터 각종 용출용액을 통해 분획된 혈장단백질 중 흡착용액에 의해서 총 loading한 혈장단백질(7.01 g)의 30.9%에 해당하는 2.17 g의 혈장단백질이 resin으로부터 용출되었고 이들의 단백질조성을 살펴보면 알부민은 거의 용출되지 않았으나 면역단백질과 트랜스페린이 각각 47.2%와 30.4%로 가장 많은 부분을 차지하였으며 그 외의 혈장단백질도 19.8%를 차지하였다. 한편, 1차용출용매에 의해서는 혈장단백질의 18.8%가 용출되었고 용출된 혈장단백질의 57.5%가 알부민이었으며 그 외 IgG는 26.0%, 트랜스페린은 5.4%로 구성되어 있었다. 알부민은 주요 혈장단백질 중 IEC gel과 가장 강한 결합을 보여 2차용출용매에 의하여 분획된 단백질의 73.6%를 차지하였다. 대부분의 혈장단백질(80%)은 흡착용매와 1차, 2차용출용매에 의해 용출되었으며 IEC에 의해서 총 투여한 혈장단백질의 89.6%인 6.28g이 회수되었다. 분획 조건에 따른 주요 혈장단백질의 % 회수율을 살펴보면 전체 트랜스페린의 90.4%와 전체 면역단백질의 65.0%가 흡착용액에

의하여 용출되었다(표 11). 이와 같은 결과는 대부분의 트랜스페린이 흡착용액으로 평형화된 IEC gel에 거의 흡착되지 못하고 용출되었음을 알 수 있다.

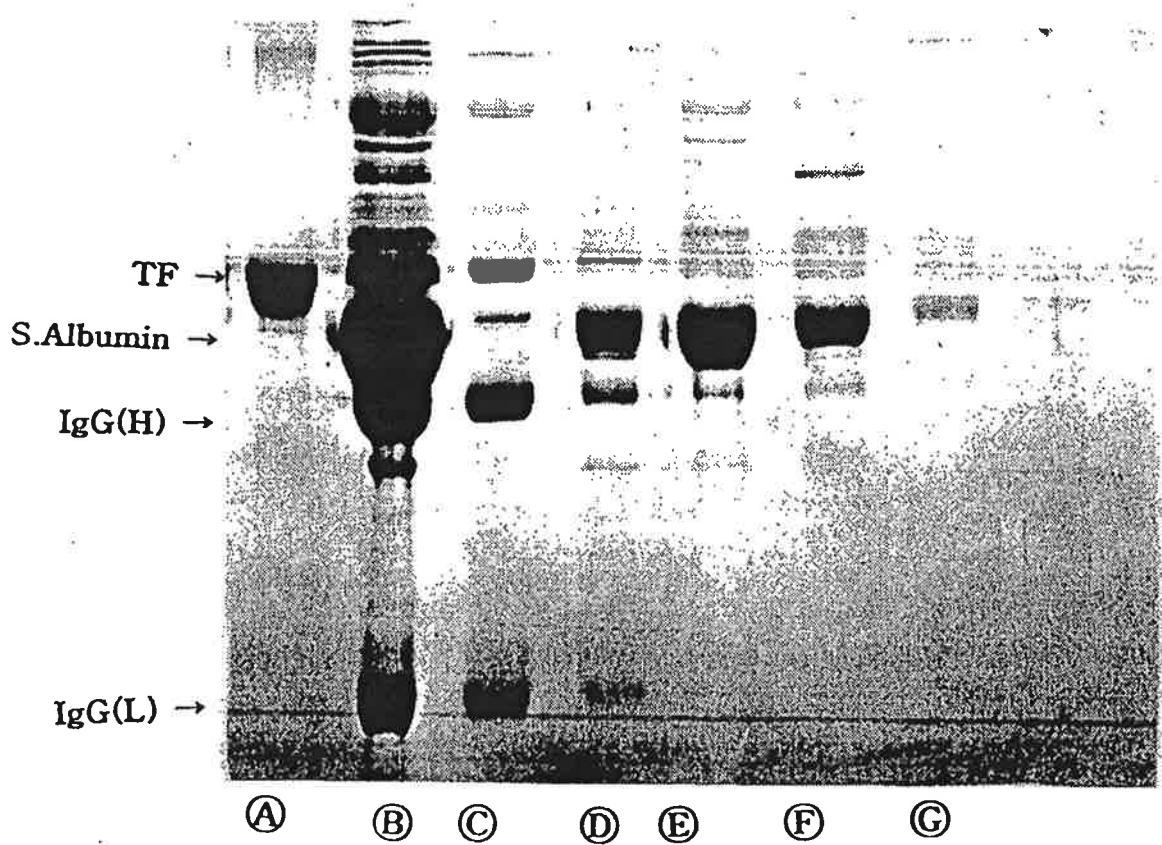


그림 13. Batch type의 IEC에 의해 분획된 혈장단백질의 전기영동 pattern

- Ⓐ 트랜스페린
- Ⓑ 혈장
- Ⓒ 흡착용매 분획
- Ⓓ~Ⓒ 1차~4차용출용매 분획

### 11. Batch type IEC

			1	2	3	4
(ng/ml)	70.1	21.7	13.2	21.2	5.6	1.1
IgG	30.0	0.6	7.6	15.6	5.2	1.1
	(100)	(2.0)	(25.3)	(52.0)	(17.2)	(3.5)
	15.7	10.2	3.4	1.3	0.3	-
	(100)	(65.0)	(21.7)	(8.3)	(1.9)	
	7.3	6.6	0.7	-	-	-
(100)	(90.4)	(9.6)				
	17.1	4.3	1.5	4.3	0.1	-

\*Data in parentheses are yield(%) of each plasma protein eluted by different eluting buffers.

IMAC , Cu<sup>2+</sup> ion  
 1  
 chelating ( 14, 12). 2  
 loading 37.5%  
 73.4%가 . 3  
 31.8% , IgG  
 47.1%, 28.7% 24.2% .  
 washing soln  
 82.9%가 IgG . IMAC 3

트랜스페린의 74.0%가 분획되었으며 이 분획에서의 트랜스페린의 순도는 24.2% 이었다.

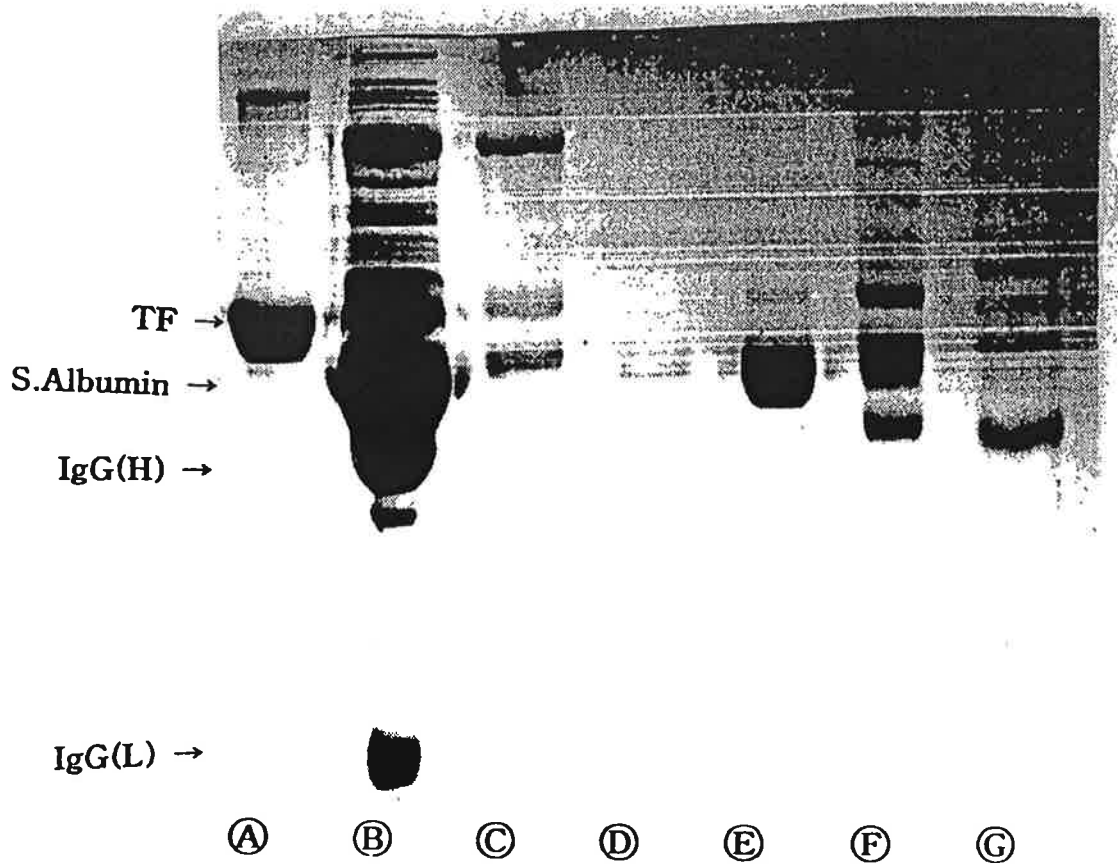


그림 14. Batch type의 IMAC에 의해 분획된 혈장단백질의 전기영동 pattern

- Ⓐ 트랜스페린
- Ⓑ 혈장
- Ⓒ 흡착용매 분획
- Ⓓ~Ⓕ 1차~3차용출용매 분획
- Ⓖ Washing soln 분획

## 12. Batch type IMAC

			1	2	3	washing soln.
(ng/ml)	70.1	8.8	-	26.3	22.3	7.0
IgG	30.0	0.2	-	19.3	10.5	-
	(100)	(0.7)		(64.3)	(35.0)	
	15.7	-	-	-	6.4	5.8
	(100)				(40.8)	(36.9)
	7.3	-	-	1.0	5.4	0.2
(100)			(13.7)	(74.0)	(12.3)	
	17.1	8.6	-	6.0	-	1.0

\*Data in parentheses are yield(%) of each plasma protein eluted by different eluting buffers.

	batch type	IMAC	IEC
IEC	( 30.4%,	90.2%)	IMAC 3
24.2%,	74.0%)		(
	( 13).		

## 13. Batch type IMAC IEC

	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(%)
IEC( )	21.7	6.6	30.4	90.4
IMAC(3 )	22.3	5.4	24.2	74.0



또한 IEC에 의해 얻어진 트랜스페린 분획에서 총 단백질량의 약50% 이상을 차지하는 IgG는 IMAC결과에서 볼 수 있듯이 트랜스페린 보다도 금속 ion과의 chelating력이 강함을 알 수 있었다. 따라서 트랜스페린 외에 IgG도 금속 ion과의 결합력이 어느 정도 인정되므로 혈장으로부터 IEC를 통하여 얻어진 트랜스페린 분획의 단백질조성이 IMAC를 통하여 얻어진 단백질조성보다 철분가용화능에 더 유리 할 것으로 간주되어 batch type의 IEC에 의해 얻어진 다량의 IgG와 트랜스페린이 함유된 트랜스페린 분획이 트랜스페린 추출물로서 적합한 것으로 사료된다.

IEC에서 얻어진 트랜스페린 분획을 sephadex G-100을 이용한 gel filtration으로 최종 처리하여 트랜스페린을 분리하였으며(그림 15) 돼지혈액으로부터 분리·정제된 트랜스페린의 아미노산조성은 표 14와 같다.

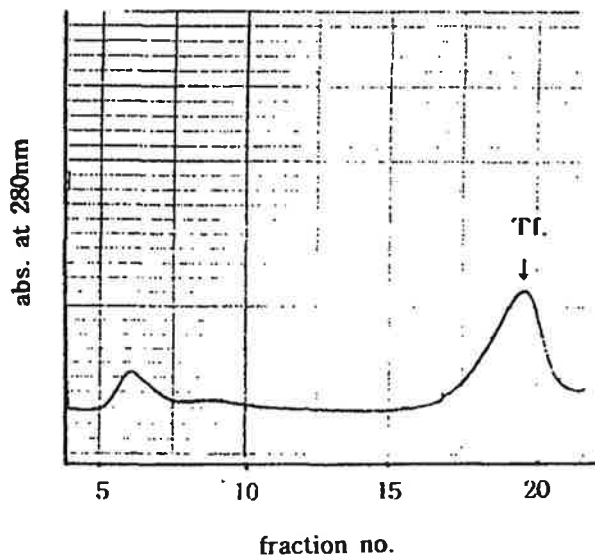


그림 15. Batch type IEC와 gel filtration을 통하여 돼지혈액으로부터 분리된 트랜스페린

14.

	MOL %
ASX**	9.31
GLX**	8.99
SER	7.91
GLY	8.77
HIS	2.12
ARG	3.85
THR	6.27
ALA	9.33
PRO	6.85
TYR	2.53
VAL	7.99
MET	0.87
ILE	3.60
LEU	9.01
PHE	4.36
TRP	0.00
LYS	8.23
TOTAL	100.00

1

IEC  
IEC gel (v/v) , gel 1 :  
0.5 가 1 : 2  
가 ( 16).



그림 16. 효과적인 트랜스페린 추출물의 분획을 위해 gel : 혈장(w/w)의 비율을 달리하였을 때의 전기영동 pattern

- Ⓐ 트랜스페린
- Ⓑ 혈장
- Ⓒ 1 : 0.5
- Ⓓ 1 : 1
- Ⓔ 1 : 1.5

트렌스페린 추출물의 농도에 따른 십이지장 조건(pH 6, 37°C)에서의 철분가용화능을 조사한 결과, 철분( $\text{FeSO}_4$ )만을 첨가한 경우에는 첨가한 철분(100ppm Fe)의 15.8%가 가용화된 상태로 잔존하였으나 트렌스페린 추출물을 철분농도에 대하여 1배, 2.5배, 5배, 10배, 25배 첨가할 경우 가용화된 철분량은 급격히 증가하여, 65.8, 70.8, 79.2, 75.8, 82.6%에 이르렀다(그림 17). 따라서 트렌스페린 추출물을 철분량과 동량으로만 첨가하여도 십이지장조건에서 철분가용화능이 급격히 향상될 수 있을 것임을 알 수 있다.

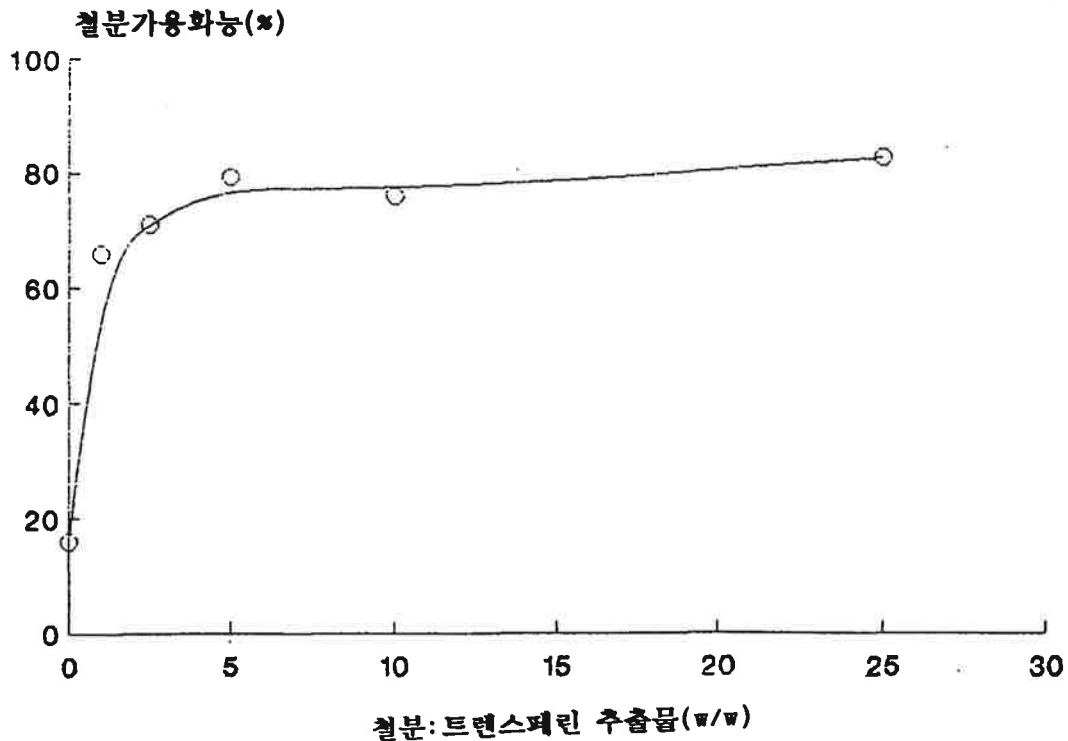


그림 17. 철분과 트렌스페린 추출물의 첨가비에 따른 십이지장 조건에서의 철분가용화능의 변화

## 2. 트랜스페린 추출물의 특성 조사

### 가. 소화효소와 pH에 대한 안정성

트랜스페린 추출물의 소화효소와 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 순수 분리된 트랜스페린의 pepsin과 trypsin에 대한 안정성을 먼저 조사하였다. Pepsin과 trypsin을 트랜스페린의 3%에 해당하는 양으로 첨가하고 각각의 최적 pH (pepsin - pH2.0, trypsin - pH7.0)로 맞추고 37℃에서 2시간 동안 incubation한 후, 80℃에서 15분간 가열하여 이들 효소를 불활성화시키고 pH를 6.0으로 맞춘 후에 효소와 반응한 트랜스페린의 철분가용화능을 측정하였다. 그림 18에서 보는 바와 같이 효소로 처리하지 않은 트랜스페린 추출물을 5mg/ml의 농도로 조정하였을 때, 첨가된 철분 7.5μg/ml 중 7.2μg의 철분이 가용화상태가 되었으나 pepsin과 trypsin으로 처리하였을 경우에는 각각 2.5μg과 4.0μg이 가용화상태를 유지하였다. 전반적으로 pepsin에 의해서 트랜스페린의 철분가용화능이 크게 영향을 받는 것으로 사료된다.

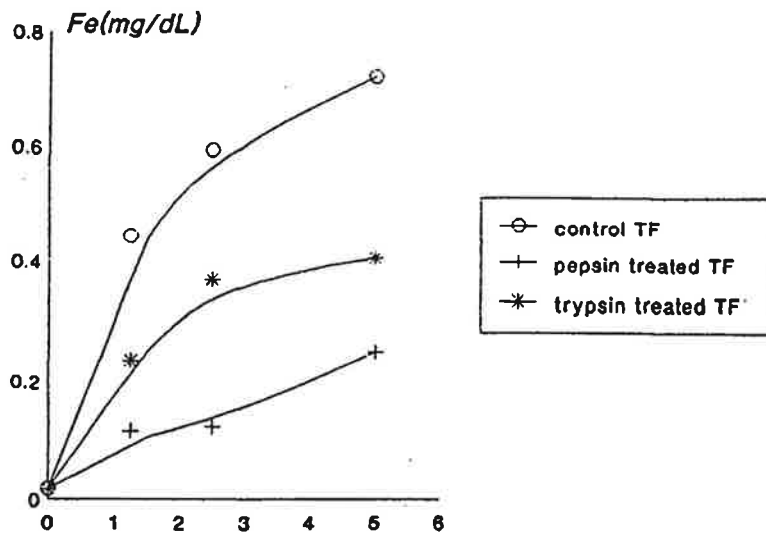


그림 18. Pepsin과 trypsin 처리된 트랜스페린 추출물의 철분가용화능 변화

소화효소와 pH가 트랜스페린 추출물의 철분생이용성에 미치는 효과를 연구하기 위하여 체내소화상태를 모방한 simulated digestion법을 본 연구에 응용하였다. 본 연구에서는 10mg의 철분을 함유한 우유 100g 중에 트랜스페린 추출물(500mg), 정제된 트랜스페린(250mg), 락토페린(250mg)을 각각 첨가하여 이들이 pepsin과 trypsin 등에 의해 소화되는 과정 중에 철분의 생이용성에 미치는 영향을 조사하였다. 우유에 철분만 첨가한 대조구의 경우에는 첨가한 철분의 15%가 dialysate에서 검출되었으며 트랜스페린과 락토페린을 철분과 함께 첨가한 경우에는 각각 17.2%와 16%의 철분이 dialysate에 존재하였다. 트랜스페린 추출물을 첨가하였을 경우에는 첨가한 철분의 24%가 dialysate에 남아있어 4개의 실험구 중 가장 높은 철분가용화능을 나타내었다(그림 19).

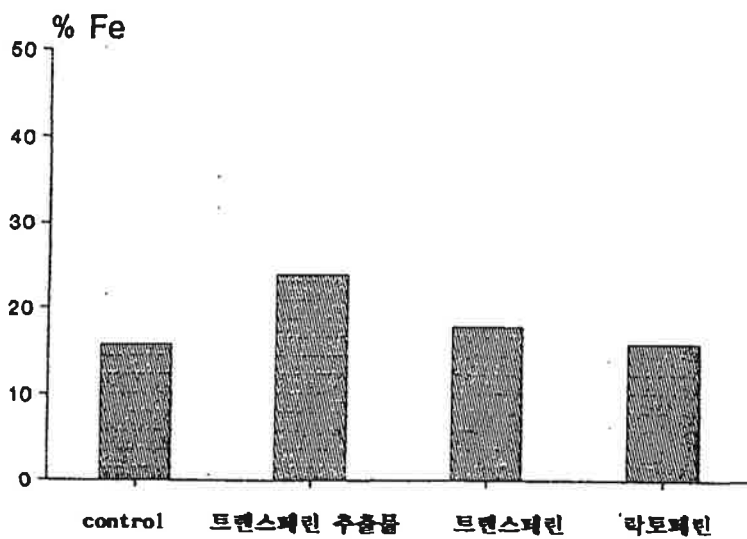


그림 19. 트랜스페린 추출물, 트랜스페린, 락토페린을 일정량의 철분과 혼합한 후 simulated digestion법으로 처리하였을 때 dialysate에 잔존하는 철분량

나. 열에 대한 안정성

트랜스페린 추출물의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 트랜스페린 추출물을 HTST(73℃, 30초)와 LTLT(63℃, 30분)살균공정에 의거하여 가열처리 하였을 때 일어나는 특성의 변화에 대하여 연구하였다. 가열처리에 의한 트랜스페린 추출물의 철분가용화능(Fe : 트랜스페린 추출물(w/w) = 1 : 10 기준)의 변화는 열처리전의 75.8%와 LTLT, HTST 처리후의 81.26, 85.47%로서 가열살균처리에 의한 트랜스페린 분획의 철분가용화능에는 변화가 거의 없음을 알 수 있었다. TIBC로 측정된 철분결합능은 HTST에 의하여 95.3%, LTLT에 의하여 91.9%의 철분결합능 역시 큰 변화가 없는 것으로 드러났다. 전기영동을 통하여 단백질 변성여부를 관찰하고자 하였을 때도 가열처리에 의한 변화가 관찰되지 않았다(그림 20).

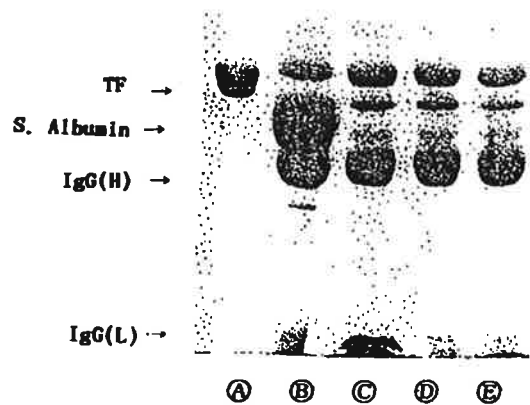


그림 20. 가열살균처리에 의한 트랜스페린 추출물의 전기영동상의 pattern 변화

- Ⓐ 트랜스페린
- Ⓑ 혈장
- Ⓒ 트랜스페린 추출물(가열처리 전)
- Ⓓ " (LTLT처리 후)
- Ⓔ " (HTST처리 후)

가  $3.1 \times 10^6$  CFU/ml  
 9.3 CFU/ml HIST가 가  $2 \times 10^4$   
 CFU/ml LILT  $3 \times 10^4$  CFU/ml .

3.

12  
 dialysis , 0.45µm membrane .  
 가 FeSO<sub>4</sub>가 가

가 FeSO<sub>4</sub> FeSO<sub>4</sub>  
 . , 3 SD rat 4

100nl henoglobin 6g  
 . FeSO<sub>4</sub> 1(Fe ) : 200( )  
 gavage tube

10 15 rat 1  
 henoglobin , % henatocrit ,

henoglobin 가 FeSO<sub>4</sub>  
 ( 15).

SD rat 25µg group henoglobin  
 가 . 100µg group  
 50µg group henoglobin  
 50µg

marginal dosage 50µg



가

15.

henoglobin

		Hg(g) /dl
Fe25 <sub>ng</sub>	0	5.70±0.94
	7	5.56±0.71
	14	5.28±0.95
	21	5.19±0.70
Fe50 <sub>ng</sub>	0	5.70±0.94
	7	5.78±0.84
	14	5.82±0.82
	21	5.99±1.52
Fe100 <sub>ng</sub>	0	5.70±0.94
	7	6.15±1.07
	14	6.05±1.04
	21	6.96±1.33

50<sub>ng</sub>  
 henoglobin 가 ng  
 henoglobin 1 0.42g 3 0.55g 가 ,  
 가 가 FeSO<sub>4</sub> group 1  
 0.39g 3 0.41g 가 ( 16).  
 가

16.

		가 (g)	Hg(g)/dl	%Ht	Hg(g)	Hg(g) / Fe(ng)
Fe50 <sub>ng</sub>	0		5.70±0.94	16.20±3.77	0.561	
	7	32.74±27.88	5.78±0.84	13.80±1.92	0.696	0.3857
	14	70.41±29.25	5.82±0.82	16.00±3.79	0.848	0.4100
	21	98.80±26.63	5.99±1.52	15.09±3.30	0.986	0.4048
Fe50 <sub>ng</sub> + [ ] [ ] (10ng)	0		5.70±0.94	16.20±3.77	0.578	
	7	34.84±23.74	5.81±0.86	15.80±1.92	0.725	0.4200
	14	71.01±23.33	6.15±0.57	17.25±3.49	0.916	0.4829
	21	98.49±20.07	6.90±2.10	20.44±3.78	1.155	0.5495

4 -

1

2  
chapter -

-  
type

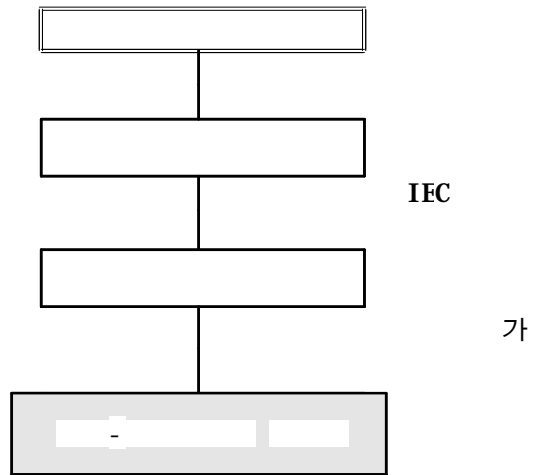
가 가 . 2

2

1. -

-

.



21. -

2. -

, - pH

1, 2 simulated digestion

, 100g 5ng FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> +

, - 가

가 .

-

3 SD rat 4

, 10 5 group control group

- group 37ng

- , FeCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> +

50ng Fe gavage

tube .

(orbital vein plexus)

hemoglobin hematocrit

hemoglobin

:

$$\text{hemoglobin(g)} = (\text{g}) \times 0.067 \times \text{Hb(g/dL)} / 100$$

3.

가.

, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub> 23ppm 가  
 60 ( 23). 150mmHg ,  
 72 30 ,  
 4 가  
 (1 ),  
 (5 ), (9 ) 9 7 . 가  
 TCD GC  
 source 50ml vial 가 sealing 4  
 head space

+ (23ppm)

(40 )

(150 mmHg)

(72 / 30 min)

(250ml plastic bottle)

22.

가 23  
 , 10%가  
 3%가 cream ( 24). 72  
 30 42 0.02%( ,  
 ABI-B) 가 pH4.7 42 .  
 4 - , FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub> 23 ppm  
 가 4 ,  
 , .

(13%) + Cream(3%)

(70 / 30min.)

(42 0

(0.02%)

(42 pH가 4.7 )

(4 )

가(23 ppm)

. 23.

3

1. -

batch type IEC

(FeCl<sub>3</sub>)

(8,948ppm) 37% (3,314ppm)가

. (pH 6, 37 ) incubation  
 , 가  
 37.4%가 가 가  
 .  
 2. -  
 가 simulated digestion ,  
 - 가 , chelating 5.9%가  
 pepsin pancreatin digestion dialysate FeCl3  
 + , FeCl3, FeSO4 가 3.2, 3.2, 4.0%가  
 가 ( 17). -  
 source 가  
 chelating 가 가  
 .  
 2 . 18  
 source  
 . control  
 group 가 가 -  
 group 37ng group 50ng  
 g 가 가 .



17. Simulated digestion

source

dialyzate

source	Dialyzate
-	5.85%
FeCl <sub>3</sub> +	3.19%
FeCl <sub>3</sub>	3.23%
FeSO <sub>4</sub>	3.96%

18.

SD rat

(g)

( )	0	7	14	21	28	35	42
Control	188.97	198.13	211.23	224.36	238.40	243.17	249.99
-	189.152	207.75	231.08	257.40	278.91	294.53	306.51
FeCl <sub>3</sub>	183.17	194.88	219.41	242.89	265.86	286.30	287.73
FeSO <sub>4</sub>	177.77	192.39	212.20	235.86	257.82	271.04	284.00
FeCl <sub>3</sub> +	190.28	205.27	227.13	249.80	269.12	282.59	289.73



% hematocrit

가      hemoglobin      가      가      ( 20).

-      group      % hematocrit

가

hemoglobin      가      가      % hematocrit

가

FeSO4

chelating

20.      SD rat      % hematocrit

( )	0	7	14	21	28	35	42
Control	15.00	15.67	15.50	13.17	11.50	12.33	13.17
-	16.80	18.20	17.30	17.00	17.90	19.20	19.80
FeCl3	15.88	14.88	14.90	13.50	13.63	13.75	14.38
FeSO4	17.50	17.38	15.10	15.14	15.14	16.63	17.38
FeCl3 +	17.38	15.75	17.50	15.50	16.63	17.00	17.75

3.

가.

가

23

가

가가

( 21).

source FeCl<sub>3</sub> - , FeSO<sub>4</sub>

FeCl<sub>3</sub>

FeSO<sub>4</sub>

FeSO<sub>4</sub>

FeCl<sub>3</sub>

가

-

가

가

.

21.

4

	0	7	0	7
Control	7.1	6.7	7.3	6.9
-	6.2	5.2	5.8	5.7
FeCl <sub>3</sub>	5.2	5.7	5.5	5.9
FeSO <sub>4</sub>	4.9	4.8	5.5	5.2

,

가

4

head space

, FeSO<sub>4</sub>

가

( 22). 30 가  
 FeSO<sub>4</sub>가 FeCl<sub>3</sub>  
 4 30 -  
 FeCl<sub>3</sub> .

22. 4

	head space (%)			
	0	10	20	30
Control	20.08	20.06	20.02	19.63
-	19.95	19.91	19.92	19.46
FeCl <sub>3</sub>	19.97	19.91	19.95	19.29
FeSO <sub>4</sub>	19.76	19.56	19.53	17.72

가 23  
 . 4  
 , FeSO<sub>4</sub> 가 control  
 ( 23). FeSO<sub>4</sub> 가  
 가  
 . - FeCl<sub>3</sub>  
 가 -

23. 4

	0		7	
	0	7	0	7
Control	6.8	5.9	6.9	5.9
-	5.8	5.1	5.9	4.8
FeCl <sub>3</sub>	6.2	5.5	6.6	5.3
FeSO <sub>4</sub>	3.4	2.5	3.2	2.5

, pH, , 가 가  
( 24).

24. 4

	pH				( $\times 10^6$ )	
	0	4	0	4	0	4
Control	4.7	4.6	0.87	1.0	7.5	8.6
-	4.7	4.6	0.85	1.1	6.6	9.3
FeCl <sub>3</sub>	4.6	4.5	0.91	1.1	6.9	7.9
FeSO <sub>4</sub>	4.7	4.6	0.85	1.0	7.7	9.5

- 가  
23 가  
가 -

가

.

1. Zubay, G. Aerobic production of ATP electron transport, *Biochemistry* (1st ed.) pp 364-407, 1983
2. Edgerton, R.V., Bryant, S.L., Gillespie, C.A. and Gardner, G.W. Iron deficiency anemia and physical performance and activity of rats. *J. Nutr.* 102;308, 1972
3. Kaltwasser, J.P., Werner, E. and Niechzial, M. Bioavailability and therapeutic efficiency of bivalent and trivalent iron preparations. *Drug Res.* 37(1); 122, 1987
4. Valberg, L.S. and Flanagan, P.R. Intestinal absorption of iron and chemically related metals and metal-related disease. pp 46-66, Raven Press. NY, USA
5. Hallberg, L. Iron nutrition and food iron fortification. *Hematol.* 19; 31-41, 1982
6. Cook, J.D., Finch, C.A. and Smith, N.J. Evaluation of the iron status of a population. *Blood* 48; 449-445, 1982
7. 齊藤昌義, 新藤哲也, 門間美千子, 千國辛一. 血漿蛋白質 鐵結合能 検討. *日本食品工業學會紙* 40(7):513-518, 1993
8. Shalan Alwan Nashikhi and Shuryonakai. Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography. *J. Dairy Sci.* 71:1756-1763, 1988.
9. Birger Blomback and Lars A. Hanson. Plasma proteins, John Wiley & Sons, 1979





1.

2.

3. 가

