

최    중  
연구보고서

Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절 에 의한 한우암소  
노폐우의 육질 개선 법 개발

Production of tender beef from cull Korean native  
cows using cholecalciferol and manipulated  
calcium metabolism

연구기관

전 남 대 학 교  
농촌진흥청 축산연구소

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절 에 의한 한우암소 노폐물의  
육질 개선 법 개발” 과제 의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 5 월 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 명 규 호

협동연구기관명 : 축산연구소

협동연구책임자 : 김 영 근

# 요 약 문

## I. 제 목

Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절 에 의한 한우암소 노폐우의 육질 개선 법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

암소 한우의 사육은 송아지를 생산하는 수단으로 우리나라 육우산업의 근간이라 할 수 있으며 적정규모의 가임 암소 사육두수 유지는 절대 절명의 주요사항이라 할 수 있다. 그러나 한우 송아지 가격의 불안정시 사양가들은, 한우 암소를 1산 이 나 2산 까지 만 번식에 이용한 후 비육출하 하는 생산체계를 유지하고, 따라서 여기서 생산되는 송아지의 생시체중이 작아지고 성숙체중도 작아지는 현상이 나타날 우려가 있다. 그 주된 이유는 송아지 가격 하락 뿐만 아니라, 고 산 차 노폐우 비육 출하 시 한국축산물등급판정 기준 에 의한 성숙도 증가 및 조직 감 감소 로 인한 등급저하와 소비자들의 외면으로 인한 경제적 손실 때문 이다. 따라서 이를 **영양 사료학적 대사조절 방법으로 고산차 노폐우 고기의 연도를 향상시켜, 저산차 가임 한우를 고산 차 까지 번식우로 사양 하도록 유도 함** 으로 서 1. 안정적 가임 한우두수 유지, 2. 한우자원의 효율적 생산, 3. 한우 사양 환경 개선 및 복지 증진 에 크게 기여 하는 데 본 연구의 목적 이 있다.

본 연구의 필요성으로 는

### 1) 기술적 측면

소 의 사료 내 cholecalciferol 은 체내에서 간 과 신장에서 각각 순 차적으로 대사 활성물질인 25 hydroxy cholecalciferol (이하 cholecalciferol 이라 칭함) 과 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 로 전환 되어 혈중 칼슘 량을 증가시켜 결과적으로 근 세포내 칼슘 농도를 증가 시키고, 또 한편 으로는 음이온사료

(anion diet) 급여에 의한 사료 내 음-양 이온 균형 조절에 의해서도 우체 내 칼슘 대사가 촉진되므로, 상기의 두 요인에 의한 소고기의 연도 증가 메커니즘을 분자 생물학적 수준에서 규명코자 근육내 calpain 효소계의 변화를 조사할 필요성이 있다 하겠다.

## 2) 경제·산업적 측면

한우암소 노폐물의 연도를 향상시켜주는 사육법을 개발 보급하여 현재 한우암소의 평균 산차를 2-3산에서 소의 육종변식학적 산차인 6산에 가까운 4-5산으로 유도하여 한우 송아지 생산비용 절감은 물론이고 적정 가임 한우의 숫자를 적정 수준으로 유지시켜줌으로서 우리나라 전체 한우의 사육기반을 안정적으로 조성하는데 한몫을 할 수 있으리라 생각된다.

## 3) 사회·문화적 측면

한국인들이 선호하는 암소 한우 고기를 더욱 보다 안정적으로 공급하기 위해, 고산차 한우고기의 연도를 향상시키는 기술을 개발하여 보급하고자한다.

# III. 연구개발 내용 및 범위

Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절에 의한 한우암소 노폐물의 육질 개선법을 개발하기 위하여 2과제로 구분하여 연구를 수행하였다.

## 1. Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절을 이용한 한우 암소 노폐물의 육질 개선 사육 프로그램개발

연구계획서 상 설정된 출하 직전 6일 및 14일전에 cholecalciferol 및 음이온 사료를 급여하여 사양시험을 실시하면서,

가. Cholecalciferol 및 음이온 사료 급여기간중 체중, 사료 섭취량 및 일당

증체량 조사

- 나. 음 이온 사료 급여전 및 급여기간중 혈액, 뇨 채취 및 pH 조사
- 다. 도체를 한국축산물등급판정 기준 에 의해 육질, 육량, 육색, 지방색, 조직감 및 성숙도를 판정
- 라. 배 최장근 시료 의 기호도 조사
- 마. 경제성 조사 를 하였다.

## 2. Cholecalciferol과 칼슘 대사조절에 의한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선을 위한 작용 기작 규명

Cholecalciferol 및 음이온사료 급여에 의해 발생 할 수 있는 연도 향상 기작의 차이를 생리 및 분자 생물학적 수준에서 규명하기 위해 사양 시험을 수행하면서 또는 도체로부터 혈액, 요 및 조직 등 의 시료들을 확보 하여,

1. Cholecalciferol 급여전 및 급여기간중 혈액 채취 및 혈장 중 칼슘, 주요 광물질, 중성지방, glucose 함량 분석
2. 도축 시 혈장, 간, 신장 및 배 최장 근 중 칼슘, cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol 및 1,25 di-hydroxycholecalciferol 함량 분석
3. 배최장근 시료 의 Warner-Bratzer Shear Force Value(WBS) 조사
4. 배 최장 근 내 calpain 및 calpastatin mRNA발현 율 을 조사 비교 하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1, 연구개발 결과

#### 가. Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절 을 이용한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선 사육 프로그램개발

- 1) 사양시험 기간중 대조구와 cholecalciferol 및 cholecalciferol + 음이온 사료 급여구간의 사료섭취량, 증체량, 사료효율 비교 사양 시험 기간 중 3 처리구간의

사료섭취량, 증체량 및 사료효율에 차이가 없었다.

2) Cholecalciferol + 음이온 급여에 의해 시험우의 요 pH가 다른 2 처리구에 비해 유의적으로 감소하였다.

2) 사양 시험 종료 후 3 처리구간의 도체성적 조사 비교 하였으나 전 처리구간에 아무런 차이를 발견 할 수 없었다.

3) 노폐한우의 비육 최후기에 cholecalciferol 또는 음이온 사료를 급여하여도 고기의 다즙성, 연도 및 풍미에 전혀 영향을 미치지 않았다.

4) 노폐한우의 비육 최후기에 cholecalciferol 또는 음이온 사료를 급여한 후 경제성 분석을 비교 한 결과 비육 최후기 4 개월간 한우 암소 노폐우에 cholecalciferol 을 급여 하므로써 생산비가 60% 증가 되었으나, 음이온 사료 급여에 의해 생산비 증가는 40% 로 감소시킬 수 있었다.

#### **나. Cholecalciferol과 칼슘 대사조절에 의한 한우 암소 노폐우의 육질 개선을 위한 작용 기작 규명**

1) Cholecalciferol + 음이온 사료 급여에 의해 혈청 중 칼슘 농도가 다른 2 구에 비해 현저히 증가 되었으며, 혈청 마그네슘 및 인의 농도도 cholecalciferol 및 음이온 사료 급여에 의해 대조 구에 비해 유의적으로 감소되었다.

2) 도축시 배 최장근 중 칼슘 및 간, 신장, 배 최장근 및 혈청 중 cholecalciferol, 농도는 3처리구간에 차이가 없었으며 각 조직 및 혈청 중 25-hydroxycholecalciferol 농도는 cholecalciferol 및 음이온 사료 급여에 의해 유의적으로 증가 되었다. 배최장근,간 및 혈청중 1,25 di-hydroxycholecalciferol 농도는 음이온 사료 급여에 의해 상승적으로 증가 되는 효과를 나타내었다.

3) 도축후 1, 7 및 14 일 경과 후 배 최장근의 연도를 측정 한 결과 3 처리구간의 유의적 차이는 없었으나, 수치적으로는 cholecalciferol + 음이온 사료 급여 구가 가장 양호한 연도를 보여주었다.

4) Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여에 의해 배 최장근내  $\mu$ -calpain

mRNA의 발현도는 크게 증가 되었으며, 반대로 calpastatin mRNA의 발현도는 크게 감소되었다. 특히 배 최장근 내  $\mu$ -calapin 단백질 농도는 음이온 사료 급여에 의해 대조 구에 비해 크게 증가되었음을 알 수 있었다.

## 2. 연구개발 결과의 활용

- ◆ 현재 규명된 cholecalciferol 급여 수준 보다 더 세분화 된 급여 방법, 수준 및 급여기간의 시험 완료 후,

  - ⇒ 축산연구소의 영농기술 상담 창구를 이용하여 한우 농가에 기술보급 실시

  - ⇒ 전북익산 죽림농장을 시범농장으로 하여 각 한우 농가 및 농촌진흥청, 각 시, 군 농업기술센터를 통한 cholecalciferol 및 음이온 사료 급여 기술 보급 및 방법 지도

  - ⇒ 선도 cholecalciferol 사료 생산 업체로 광주광역시 축산농협 목포배합사료 공장을 지정하여 cholecalciferol 첨가 비육후기 배합사료 생산 시범판매 유도 후 국내 전 배합사료공장에 기술 무상 이전 추진

- ◆ 현재 까지 밝혀진 cholecalciferol 의 육우 내 작용 기작을 근거로,

  - ⇒ Cholecalciferol 급여 방법과 한우에 대한 국제적 공인을 받기 위한 수단 의 일환으로SCI 급 논문에 투고 게재

  - ⇒ 국내 외 세미나 등을 통한 cholecalciferol 급여 작용원리 강연을 통한 타 연구자들의 추가 시험 유도 등에 활용하고자 한다.

# SUMMARY

## I. Title

Production of tender beef in cull Korean native cows using cholecalciferol and manipulated calcium metabolism

## II. Object and Significance

The average parity of cull native Korean cows varies widely, depending upon the market price of the calves. Although parity 6 is considered to be the optimal value for beef cows in terms of breeding and reproductive physiology, Korean farmers normally cull cows at parity 2 or 3, primarily as the result of low calf prices, and the tendency in mature cull cows toward a more inferior meat palatability. Increasing the parity of cows may also serve to reduce the risk of decreases in age-associated birth and mature weights of dams (Lee et al., 2003). The inverse relationship between the physiological maturity of the carcass and the tenderness of the beef has been well documented in other studies (Boleman et al., 1996). Pre-slaughter 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-OH D<sub>3</sub> ; cholecalciferol) feeding appears to exert beneficial effects on postmortem proteolysis and the tenderness of the beef, without the accumulation of large concentrations of residual vitamin D<sub>3</sub> and its primary metabolite, 25-OH D<sub>3</sub> (Foote et al., 2004). Neither troponin-T degradation nor Warner-Bratzer shear force (WBSF), however, was improved by this metabolite in another study (Wertz et al., 2004). The manipulation of the acid-base balance has been extensively investigated in studies of the health and productivity of dairy cows, as a low prepartum dietary cation-anion difference (DCAD) appears to exert a mitigating effect on hypocalcemia peripartum, via an increase in urinary calcium (Ca),



blood-ionized Ca, and responsiveness to Ca-homeostatic hormones (Block, 1994). Very little attention, however, has been focused on the possibility of increasing Ca availability to the proteases responsible for the muscle tenderness of beef cattle, as has been demonstrated with vitamin D<sub>3</sub> and/or its supplements (Montgomery et al., 2000; Foote et al., 2004; Rider Sell et al., 2004), in combination with a low dietary DCAD regimen (anion diet). In the current study, we hypothesized that the administration of manipulated DCAD and 25-OH D<sub>3</sub> (DCAD+25-OH D<sub>3</sub>) to multiparous cull native Korean cows before harvest might effect an increase in the concentrations of Ca<sup>2+</sup> in both the blood and muscle of the cows and would, therefore, result in the production of more tender beef, via an increase in myofibril proteolysis, than was observed in the 25-OH D<sub>3</sub>-only supplemented cows.

**This hypothesis was assessed via the evaluation of tenderness, postmortem proteolysis, vitamin D metabolite residue levels, and the gene and protein expression levels of calcium-dependent proteases.**

### III. Research Contents and Scope

This study was divided into 2 sub projects to evaluate cholecalciferol and anion diet effects on better tender beef production in cull Korean native cows.

#### **1. A development for cholecalciferol and anion diet feeding program for cull Korean native cows**

This feeding trial was conducted to evaluate cholecalciferol and anion diet feeding effect on performance, carcass traits, palatability and economic analysis when the cholecalciferol (125 mg) and anion diet (-10 mEq/100 g DM) were fed 6 and 14 days, respectively, prior to market.

## 2. Mechanisms of cholecalciferol and anion diet in tender beef production of cull Korean native cows

This study was conducted to trace tender beef production mechanisms in the body of cull cows when cholecalciferol and anion diet fed by

- ♦ Urine pH and blood serum contents
- ♦ Muscle and sera vitamin D metabolite
- ♦ Muscle calcium, tenderness, and sensory evaluation
- ♦ Calpain and calpastatin gene, and protein expressions in tissue

# IV. Results and Suggestion on Utilization of Results

## 1. Results

1) A development for cholecalciferol and anion diet feeding program for cull Korean native cows

- *Performance*

No significant treatment response to body weight gain was found to dietary cholecalciferol supplementation and anion diet for the duration of the trial. Daily dry matter intake also did not differ between control and treated cull cows. The results suggest that cholecalciferol and anion diet had almost the same nutritive values as the concentrate ration in this study as there was no difference in final body weights between the three groups.

- *Carcass characteristics, and Muscle and Sera Vitamin D Metabolite*

No carcass traits were affected by the cholecalciferol and anion diet treatments. The administration of cholecalciferol and anion diet had no effect on vitamin D<sub>3</sub> concentrations in LM, liver, kidney or serum. However, the cows fed on the cholecalciferol and anion diet exhibited increases ( $P < 0.039$ ) in 25-OH D<sub>3</sub> concentrations in all 3 tested tissue types. Although the same phenomenon ( $P = 0.0001$ ) was observed in the serum 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> levels as in the serum 25-OH D<sub>3</sub> levels of the experimental cows, the anion diet resulted in a reduction ( $P = 0.002$ ) in the 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> concentrations of LM, as compared with either the control or the 25-OH D<sub>3</sub> supplemented cows. The anion diet, however, effected an increase ( $P = 0.0001$ ,  $P = 0.001$  and  $P = 0.0001$ , respectively), in the hepatic, renal and sera 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> levels, as compared to either the control or cholecalciferol supplemented cows.

- *Panel test and Economic analysis*

There was no cholecalciferol and anion diet fed effect on the juiciness, tenderness and flavor of beef from cull Korean native cows. The production cost of beef from Korean native cows increased with cholecalciferol feeding by 60%.

## 2) Mechanisms of PG in protein and fat depositions of beef steers

- *Urine pH and blood serum contents*

The cow's urine pH values were very significantly decreased ( $P = 0.0001$ ) in the cows treated with the anion diet (pH 8.15, 7.94, and 6.73 for control, cholecalciferol, and anion groups, respectively) This suggests that the anion diet (-10 mEq/100g DM) could produce more acidogenic physiological condition in cow's body. The blood serum profile revealed that 125 mg of cholecalciferol supplementation alone was insufficient to elevate the blood Ca concentration, but anion diet significantly increased ( $P = 0.030$ ) the concentration compared with non-supplemented controls. As a result of this,

the Ca concentrations in the anion diet fed cows were found to be elevated ( $P = 0.030$ ) compared with the other groups. In addition to an elevation in Ca concentrations, the cholecalciferol and anion diet treatment resulted in a reduction ( $P = 0.003$ ) in magnesium levels compared with the control levels. The anion diet resulted in an alleviation ( $P = 0.012$ ) of serum chlorine levels, as compared with the control cows, whereas phosphorus levels were substantially elevated in the 25-OH D3 and DCAD+25-OH D3 cows ( $P = 0.001$ ). We observed no significant differences among the cow groups with regard to blood sodium, potassium, triglyceride, and glucose levels among the treatment groups

### ● *Muscle calcium and Tenderness*

Although we noted numerical increases of 10% in the cholecalciferol and anion diet groups, we detected no statistically significant differences among treatments, which is thought to be attributable to lower baseline extractable free calcium concentrations ( $8.9 \mu\text{g/g}$ ) in the LM. The WBSF values were similar ( $P > 0.258$ ) in the steaks from all 3 cow groups in our study. Although the length of postmortem aging improved the tenderness of the steaks, tenderization during the postmortem aging process was not enhanced by either the administration of cholecalciferol nor the anion diet.

### ● *Calpain and Calpastatin Gene, and Protein Expressions in Tissues*

The LM of cows treated with cholecalciferol supplementation and anion diet were scaled up ( $P < 0.01$ ) by over 400% with regard to  $\mu$ -calpain mRNA levels, as compared to the control cows. Moreover, the LM  $\mu$ -calpain mRNA levels in the cholecalciferol supplemented and anion diet cows had increased ( $P < 0.05$ ) by 497% and 300%, respectively, relative to those of the control. However, the expressions of LM calpastatin mRNA were notably attenuated ( $P < 0.01$ ) to 14.3% and 29.3% by the cholecalciferol supplementation and anion treatments, respectively. On the whole, the 25-OH D3 regimen clearly increased the expression of the calpain gene, while effecting a reduction in the expression of the calpastatin gene in the LM

muscle. Although no changes were detected in the quantities of m-calpain and calpastatin proteins among the groups, the amount of  $\mu$ -calpain protein was significantly increased ( $P < 0.05$ ) above control levels in the muscle tissues of the anion diet group.

## 2. Suggestion on Utilization of Results

- ◆ After conducting more specified delivery method, feeding level and duration of cholecalciferol and anion diet,

- ⇒ Spread the cholecalciferol and anion diet feeding program through National Livestock Research Institute to every Hanwoo farm household.

- ⇒ Spread the cholecalciferol and anion diet feeding program through Rural Development Administration and Agricultural Development and Technology Centers to every Hanwoo farm household after the Bamboo farm as a leader farm.

- ⇒ Spread cholecalciferol and anion diet formulation technology to all commercial mixed feed companies in Korea after Gwangju Livestock Co-op feed company as a guide feed company.

- ◆ Mainly based on the mechanism of cholecalciferol and anion diet in the body of cull beef cows with this experiment,

- ⇒ Publish the data harvested on an international journal.

- ⇒ Actively take part in international and domestic meetings as a speaker to evangelize the benefit of cholecalciferol and anion diet to cull beef cows.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Overview of project</b> -----	16
Section 1. The aim of research -----	16
(1) Aims -----	16
(2) Scope -----	16
(3) Necessity -----	16
<b>Chapter 2. Status of development</b> -----	21
Section 1. Status of development in domestic and abroad -----	21
Section 2. Prospect of the development -----	21
<b>Chapter 3. Research contents and Results</b> -----	22
Section 1. A development for cholecalciferol and anion diet feeding program for cull Korean native cows -----	22
(1) Introduction -----	22
(2) Materials and methods -----	22
(3) Results and discussion -----	24
Section 2. Mechanisms of cholecalciferol and anion diet in increasing tenderness of cull beef cows -----	29
(1) Introduction -----	29
(2) Materials and methods -----	29
(3) Results and discussion -----	38
<b>Chapter 4. Implementation and contribution to its related field</b> -50	
<b>Chapter 5. Application of results</b> -----	51
<b>Chapter 6. References</b> -----	53

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	16
제1절	연구개발의 필요성 -----	16
1.	목적 -----	16
2.	범위 -----	16
3.	필요성 -----	16
제 2 장	국내·외 기술개발 현황 -----	21
제1절	국내·외 관련기술의 현황과 문제점 ---	21
제2절	전 망 -----	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	22
제1절	Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절 을 이용한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선 사육 프로그램개발 -----	22
1.	서설 -----	22
2.	재료 및 방법 -----	22
3.	결과 및 고찰 -----	24
제2절	Cholecalciferol과 칼슘 대사조절에 의한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선을 위한 작용 기작 규명 -----	29
1.	서설 -----	29
2.	재료 및 방법 -----	29
3.	결과 및 고찰 -----	38
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에 의 기여도 -----	50
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	51
제 6 장	참고문헌 -----	53

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 필요성

### 1. 목적

본 연구의 목적은 cholecalciferol 과 음이온 사료 를 급여 하여 **확실한 영양 대사적 이론에 근거한 연도가 향상된 고급 한우 암소노폐우육**을 생산 하는데 그 최종 목적이 있다.

이러한 목적을 달성하기 위해

- 가. Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절 을 이용한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선 사육 프로그램개발 하고,
- 나. Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절에 의한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선을 위한 작용 기작 규명 하는 데 그 목표가 있다.

### 2. 범위

따라서, 본 연구의 범위는

- 가. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 성장률 및 사료효율
- 나. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 시험우 의 요 pH 변화 관찰
- 다. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 도체의 등급판정  
라 Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 도체의 기호 성
- 마. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 한우육 생산의 경제성
- 바. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 혈액 및 조직 내 칼슘, cholecalciferol 및 그대사물 변화 측정
- 사. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 혈중 광물질 농도 및 대사 물 및 배 최장 근 의 연도 변화
- 아. Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 시 배 최장근 내 calpain 및 calpastatin mRNA 및 단백질 발현 조사 등을 조사 분석하여 cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 에 의한 노폐 암소의 배 최장 근 내 연도 향상 기작을 규명하고자 한다.

### 3. 필요성



## 1) 기술적 측면

암소 한우의 사육은 송아지를 생산하는 수단으로 우리나라 육우산업의 근간이라 할수 있으며 적정규모의 가임 암소 사육두수 유지는 절대 절명의 주요사항이라 할수있다. 그러나 한우 송아지 가격의 불안정시 사양 가 들은, 한우 암소를 1산 이 나 2산 까지 만 번식에 이용 한 후 비육출하 하는 생산체계를 유지하고, 따라서 여기서 생산되는 송아지의 생시체중이 작아지고 성숙체중도 작아지는 현상이 나타날 우려가 있다(이 등, 2003). 실제로 소의 육중번식학적 분만 산차 가 6산 임에도 불구하고 저 산 차 인 2-3 산 차 에 번식을 중단하고 노폐우 비육 사양을 실시하여 시장 출하 하고 있는 실정이다. 그 주된 이유는 송아지 가격 하락 뿐 만 아니라, 고 산차 노폐우 비육 출하 시 한국축산물등급판정 기준 에 의한 성숙도 증가 및 조직 감 감소 로 인한 등급저하와 소비자들의 외면으로 인한 경제적 손실 때문이다. 따라서 이를 **영양 사료학적 대사조절 방법으로 고 산차 노폐우 고기의 연도(tenderness) 를향상시켜, 저산차 가임 한우를 고산차 까지 번식우로 사양 하도록 유도 함** 으로서 **1. 안정적 가임 한우두수 유지, 2. 한우자원의 효율적 생산, 3. 한우 사양 환경 개선 및 복지 증진** 에 크게 기여 할 수 있으리라 생각된다.

### ○ 사료 내 cholecalciferol 과 우체 내 칼슘 대사

Horst 와 Littledike 는 1979년 에 이미 소 의 사료 내 cholecalciferol 은 체내에서 간 과 신장에서 각각 순 차적으로 대사 활성물질인 25 hydroxy cholecalciferol 과 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 로 전환 되어 혈중 칼슘량을 증가시켜 준다고 보고한바있다. 또 한 골격근육은 cholecalciferol 의 주요 작용조직(target tissue) 이며 쥐 에 cholecalciferol 추가 급여시 근섬유 Z-line 에 칼슘결합도 증가로인한 근세포내 칼슘 농도 증가가 보고(Toury 등, 1990) 된 바 있으며 이는 추후 Figure 1에서 와 같이 비육우에서 도 증명된바 있다 (Montgomery등, 2000).

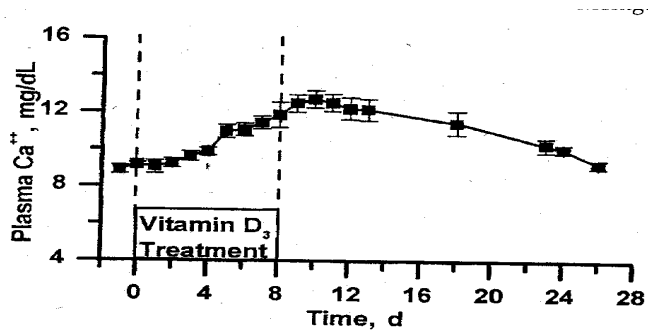


Figure 1.

○ 사료 내 음-양 이온 균형 조절 과 우체 내 칼슘 대사

위에서 언급 한 바와 같이 cholecalciferol 이 칼슘대사 에 큰 영향을 미치는 것은 이미 잘 알려진 사실이나 착유우 에서 혈중 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 농도 가 높음 에도 유열 이보고 된 후, Host 와 Reinhardt (1983)은 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 의 민감도 감소를 의심 하고 이에 기초하여 결국 상기 홀몬 의 활성도는 작용 세포 내의 산-염기 평형 상태 에 의 해 좌우 될 것 이라는 가정을 세운다. 이후 유우의 유열 치료를 위한 고 칼슘, 음 이온사료(mEq/100g(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-(Cl<sup>-</sup>+S<sup>-</sup>)) 가 개발되어 실제 많이 응용되고 있다. 사료 내 음-양이온 조절에 의한 칼슘대사의 변화는 장, 신장, 골 내에서의 변화 로 설명 되어지는데, 우선 장 에서 우체 는 항상 전기 적으로 중성을 유지 하려 고 하는데 음이온 사료를 급여하면 장내 H<sup>+</sup> 농도가 높아져 장내 가 약산성 이 되고 산염기평형을 유지하기위하여 다시 Ca<sup>+</sup>을 체외로 배설하게 되며, 따라서 결과적으로 신장에서 의 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 과 부갑상선 홀몬 의 양을 증가시켜 이후 골 중 칼슘 동원 량을 증가시킨다 (Block, 1994). 그리고 신 장에서는 신장 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 은 pH 에 매우 민감하여 과량 의 음이온 은 신장세포내의 pH를 변화시켜 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 의 생산량을 증가시킨다(Gaynor et al.,1989). 마지막으로 골 중 칼슘 동원 량 이 증가 될 때 pH 에 매우 민감한 골osteoclast 세포의 lysosome 과 미토콘드리아 효소(succinate dehydrogenase, acid phosphatase)가 증가 되어 이 에 관여한 다.

#### ○ 쇠고기의 연도(tenderness) 와 calpain system

쇠고기의 연도에 영향을 미치는 요인은 여러 가지가 있을 수 있겠으나, 그중 가장 뚜렷이 큰 영향을 미치는 것으로 현재까지 알려진 매카니즘으로는 도축 후 쇠고기 내에 존재하는 단백질분해효소의 일종인 calpain system의 활성화 유무에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있다 (Koochmarae, 1992). 그런데 이 calpain 효소는 칼슘에 의해 그 활성도가 좌우되는 소위 "calcium dependent proteinase"이며 이를 다시 세분하면 micro 그람단위의 칼슘과 milli 그람단위의 칼슘에 의해 활성도가 좌우되는  $\mu$ -calpain과 m-calpain으로 분류되며, 다른 한편으로는 이의 길항 효소(specific inhibitor)인 calpastatin이 반비례하여 존재하면서 고기의 연도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Table 1). 따라서 Table 1에서와 같이 도축 직전 동물 근육 내 칼슘 대사량을 증가시켜 주는 cholecalciferol을 다량 급여사양함으로써 도축 후 도체 내 높은량의 칼슘 농도가 유지되고 이를 calpain이 이용하여 근육 단백질을 효율적으로 분해하여 고기의 연도를 현저히 향상시킬 수 있다(Swanek 등, 1999). 또한 이 calpain 효소들의 골격 근육내 활성도는 이 효소들의 mRNA 발현율이 특정호르몬 작용에 의해 전사 또는 mRNA 안정화 단계에서 영향을 받는 만큼 비례하여 변하는 것으로 보고(Parr 등, 1992) 되고 있다. 따라서 골격근육 내 이 효소들의 활성도에 영향을 미칠 수 있는 영양소의 공급 유무에 따라 이 효소 유전자들의 표현도도 변할 것이라 생각되어, 추후 한우의 영양사료, 식육, 번식 및 육종학상의 쇠고기연도 예측 수단으로 보다 개량된 형태로 이의 측정 방법을 제고할 필요가 있다.

Table 1.

Item	Treatment		SEM	P <
	Control	Vitamin D <sub>3</sub>		
n	22	22	—	—
Ca, µg/g	14.2	21.3	1.8	.02
Shear force, d 7	5.13	4.21	.28	.02
Shear force, d 14	4.40	3.81	.25	.07
Shear force, d 21	4.04	3.44	.24	.13
Shear force > 4.6 kg, d 7	55.8	39.2	9.6	.23
Shear force > 4.6 kg, d 14	47.5	24.2	9.4	.09
Shear force > 4.6 kg, d 21	32.5	10.0	8.5	.07
µ-Calpain, activity/g	.56	.19	.04	.05
m-Calpain, activity/g	.99	.62	.07	.07
Calpastatin, activity/g	4.83	4.11	.31	.04

<sup>a</sup>Calpain and calpastatin activities were determined at 24 h postmortem.

## 2) 경제 · 산업적 측면

우리나라의 한우 사육 기반은 육우 시장 개방 압력, 생우 수입 허가 등 급속한 한우 사육환경 변화로 인한, 사육 농가들의 불안으로 인해 최근 통계자료만 보더라도 총한우 사육두수가 2002년 6월 1,448,000 마리가 불과 일년후인 2003년 6월 1,423,000 마리로 불과 일년 사이에 86,000 마리가 감소하였다. 이는 단순히 한우 사육두수 감소만을 의미하는 것이 아니고, 가임암소의 사육두수가 동기간 619,000 마리에서 579,000 마리로 무려 22,000 두가 감소되어 이러한 추세로 가면 자칫 한우 사육의 근간이 회복하기 어려운 상태로 갈것이라는 지적이 적지 않다. 따라서 이러한 문제를 해결하기위한 한 방편으로 산차가 높은 한우암소 노페우의 연도를 향상시켜주는 사육법을 개발 보급하여 현재 한우암소의 평균 산차를 2-3 산에서 소의 육종번식학적 산차인 6산에 가까운 4-5산으로 유도하여 한우 송아지 생산비용 절감은 물론이고 적정 가임한우의 숫자를 적정 수준으로 유지시켜줌으로서 우리나라 전체 한우의 사육기반을 안정적으로 조성하는데 한몫을 할수있으리라 생각된다.

## 3) 사회 · 문화적 측면

한국인은 쇠고기를 돼지고기 및 닭고기 보다 선호 하며 쇠고기 중에서도 한

우 고기를 매우 즐겨 찾는다. 이를 좀더 자세히 들여다보면 한우고기 중에서도 암소한우 고기를 더욱 좋아 한다. 이는 쇠고기의 성별 특징상 암소고기는 숫 소 또는 거세 우 고기보다 지방축적량 이 많아 풍미 및 상강도가 증가되기 때문이다. 따라서 암소 고기를 좋아 하는 우리 선조 들 의 기호도 는 식육과학상 으로 도 근거가 있다고 하겠다. 그럼에도 불구하고 기호 성 이 훨씬 좋은 암소고기를 소비자 가 요구하는 만큼 많이 생산하지 못하는 이유는 씨받이 소로서 적정 수 준의 한우를 확보해야 되기 때문이다. 그러나 암소의 산차 가 1산차 증가 할수록 한국축산물등급판정기준 의 성숙도(고기의 연도 와 밀접한 관련이 있음) 는 2등 급씩 증가됨은 물론 조직감 도 저하 되어 사양 가 들은 저 산우를 시장 에 출하 하는 경향이 있다. 따라서 고 산차 한우고기 의 연도를 향상 시키는 기술을 개발 하여 보급함으로써 이러한 문제를 자연스럽게 해결할 수 있을 것이다.

## 제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

### 제1절 국내 · 외 관련기술의 현황과 문제점

Cholecalciferol 급여에 의한 쇠고기의 연도 향상에 관한 연구 보고가 국내에 서는 전혀 없으며, 다만 한우 체내 calpain system 조절기술 개발 에 관한 연구 는 본인이 연구원으로 참여하여 2000년 에 보고(농림부,2000) 한바 있다. 국외에 서 거세우 에 출하 전 10 일 간  $7.5 \times 10^6$  IU의 비타민 D3를 첨가 급여 하여 연도 가 유의적으로 향상되었으며, 고기 내 calpastatin 함량을 유의적으로 감소 시켜 결과적으로 는 고기의 연도를 향상시켰다(Swanek 등, 1999). 또 한편으로 는 8 일 간  $5.0-7.5 \times 10^6$  IU의 비타민 D3를 첨가 급여 함으로서 혈장 내 칼슘함 량을 유의적으로 증가시켰음 은 물론 도축 후 근육 에서 calpain 에 의해 분해된 troponin-T 분해 시 생성 되는 30-k Da의 단백 함량 이 증가 됨을 증명하여 연 도를 향상 시켰음 을 보고 한바 있다(Montgomery 등, 2000). 그러나 외국에서도 근육다발이 굵어지기 시작 하는 4산 이상의 암소노폐우를 대상으로 한 시험보 고는 전무한 실정이다. 더욱이 사료 내 음-양 이온 균형 조절에 의한 칼슘 대사량 증가 에 의한 근육 연도향상 에 관한 시도는 국내외를 막론하고 최초 의 시도이다. 또한 근육 내  $\mu$ -calpain 과 m-calpain 및 calpastatin 효소의 함량

을 직접 측정하는 방법은 이효소들의 특성상 도축후 24 시간 내의 신선육에서 신속히 추출 분석하여야 하는 번거로움과 장시간이 소요되어 대단히 불편할 뿐만 아니라 실험오차가 커질 수 있는 가능성도 다분히 내재 하고 있다. 따라서 소의 골격근에서 이 효소들의 활성도와 mRNA 발현을 간에 고도의 상관성이 이미 밝혀져 있으므로(Parr 등, 1992) 이러한 방법으로 이를 검증해볼 필요가 있다.

## 제2절 전망

이미 알려진 바와 같이 우리의 경쟁 대상국인 구미의 축산 선진국들에 비해 너무 낮은 비육우의 생산성을 극복 하는 길은 품질향상 뿐이며 이는 우리가 기필코 해결해야할 절대 절명의 과제이다.

따라서 이를 해결하기 위한 하나의 수단으로 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 그 과학적 실현 가능성과 식품으로서의 안정성 효과가 가장 크게 기대되는 cholecalciferol 및 음이온 급여 프로그램을 사용함은 물론 밝혀진 작용원리를 응용함으로써 앞으로 노폐 암소한우육의 육질을 획기적으로 향상시키는 기초 자료로 사용함은 물론, 한우의 국제적 경쟁력과 농가의 수익성을 극대화 하는데 크게 기여 할 수 있으리라 확신한다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 Cholecalciferol 과 칼슘 대사조절을 이용한 한우 암소 노폐우의 육질 개선 사육 프로그램개발

#### 1. 서설

cholecalciferol 과 음이온사료를 출하 직전의 한우 암소 노퍽우 에 급여하여 기 제시된 축체 내 영양 대사적 기작에 의해 실제 고기 의 연도가 향상된 고급 육을 생산 할 수 있는지를 in vivo 시험을 통해 증명 하고자한다. 따라서 본 시험을 통해 cholecalciferol 과 음이온 사료 급여가 사양성적, 도체 특성 및 육질, 기호 성 및 경제성 에 미치는 영향을 규명코자 본 시험을 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시 동물 및 시험구 배치

체중 450kg 내외의 평균 94개월령 암소 한우 노퍽우 24마리를 공시하여 2주 간의 시험구 배치 적응기간을 거쳤다. 이후 각 처리 에 8마리씩 대조구, cholecalciferol 구 및 음이온 사료 급여구 에 산차를 기준 으로 체중이 고르게 분포 되도록 완전임의 배치법에 의하여 배치하여 98.5개월령 까지 4개월간 본 시험을 실시하였다.

### 나. 사양 관리 및 Cholecalciferol 투여방법

공시동물의 사료 급여는 조사료원으로 벯짚은 완전 자유채식 하도록 하고, 농후사료는 시판 비육우 비육후기 배합사료(우성사료,천안; Table 2) 를 건물 중으로 1일 체중의 약 1.8% 수준인 9-10 kg/마리를 급여하였다.

Cholecalciferol 급여구 (Cholecalciferol)는 도축 6일전 125mg 의 25-OH-D<sub>3</sub> (ROVIMIX<sup>®</sup>Hy·D<sup>®</sup> DSM Nutritional Products Inc., Belvidere, NJ, USA) 를 급여하였으며, 음이온 사료 급여구 (Anion) 는 도축 20일에서 6일전 까지 14일간 사료내 음이온농도가 -10 mEq/100g DM 이될수 있도록 Animate<sup>®</sup> (Mosaic Co., South Riverview, FL, USA) 를 첨가하여 급여 한 후 도축 6일전 125mg 의 25-OH-D<sub>3</sub>를 급여 하였다.

급여한 사료의 화학적 성분은 AOAC (1995), NDF 및 ADF Van Soest 등 (1991)의 방법에 의해 분석하였다.

Table 2. Ingredient and chemical composition of concentrate diet fed to cull cows during experimental period (as-fed basis)

Component	Amount
Corn grain (cracked), %	36.6
Wheat grain (cracked),%	15.0
Molasses cane, %	5.0
Wheat bran, %	16.2
Rice bran, %	8.0
Palm kernel meal, %	8.0
Lupine, %	8.0
Tricalcium phosphate,%	0.3
Urea, %	0.2
Salt, %	1.0
Limestone, %	1.4
Vitamin and mineral premix, % <sup>a</sup>	0.3
Crude protein, %	11.1
Fat, %	4.2
Ash, %	5.0
NDF, %	20.8
ADF, %	9.3
NE <sub>m</sub> , Mcal/kg <sup>b</sup>	1.71
NE <sub>g</sub> , Mcal/kg <sup>b</sup>	1.11

<sup>a</sup>Premix provided the following per kilogram of premix: vitamin A 3,800 KIU; vitamin D 3 700 KIU; vitamin E 20 KIU; Fe 50,000 mg; Cu 7,000 mg; Mn 24,000mg; Zn 30,000 mg; Co 150 mg; I 600 mg; Se 150 mg.

<sup>b</sup>Calculated values.



#### 다. 조사 항목

1) 사료섭취량 - 일일 사료 섭취량을 농후사료와 조사료로 나누어 급여한 양에서 잔량을 구하여 계산하였다.

2) 증체량 - 시험기간 중 매 한달 간격으로 우형기를 이용하여 오전 10시에 측정하였다.

3) 사료 요구율 - 일일 사료 섭취량을 일일 증체량으로 나누어 구하였다.

4) 도체등급 판정 - 처리구 및 대조구는 공히 98.5개월령 (체중 589 kg)에 도축하여 농림부 고시 소 도체등급 판정방법 (KMAF, 2003)에 의해 육량 및 육질 등급을 기준으로 최종 등급을 판정하였다.

5) 우육의 소비자 기호성 조사 - 잘 훈련된 5명의 검사원에 의해 대조 및 처리구의 배최장 근육을 다즙성, 연도, 풍미 등을 매우 나쁘다(1) - 매우좋다(6)까지의 6 단계로 구별하여 비교 구분 판단하였다 (NLRI, 2004).

6) 경제성 분석 - 처리구별로 사양시험 기간 동안 소요된 시험우 구입비, 사료비, cholecalciferol 및 음이온 사료 투여비 등 제경비를 마리당 총수입에서 제한 값을 구하여 비교 하였다.

#### 라. 통계 분석

수집 된 자료는 SAS-PC 프로그램을 이용하여 조사 항목 간 3 처리 평균간 분산 분석을 실시하여 유의성 이 발견 될 경우 Duncan 다중검정에 의해 처리 간 유의성을 검증 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 사료 성분함량, 성장률 및 사료효율

본 시험 중 급여 한 볏짚의 화학적 성분은 건물 중으로 조단백질 5.00%, 칼슘 0.32%, 인 0.12%, NDF 66.14% 및 ADF 44.74% 이었다 (데이터는 제시 되지 않았슴). 그리고 시험기간 중 급여한 농후 사료의 화학적 성분은 조단백질 11.1% 및 NEm 및 NEg 가 각각 1.71 및 1.11 Mcal/kg 으로 한국사양표준 (KMAF,2002) 및 NRC (NRC, 2000) 의 거세한우 비육후기 영양소 요구량을 충

족시키기에 충분한 양질의 농후 사료였다.

대조구 및 처리구의 사료를 급여받은 시험우의 체중은 Table 3 에서와 같다. 3처리구의 시험 개시 시 체중은 거의 동일 (P = 0.98) 했다. 도축 6일전 125 mg 의 25-OH D<sub>3</sub> 를 급여 받거나, 14일간 음이온사료 급여후 다시 125 mg 의 25-OH D<sub>3</sub> 를 급여 받은, cholecalciferol 및 음이온 처리구 공히 전시험 기간중 증체량에 영향 ( P = 0.69) 을 미치지 못했다. 특히 14일간 음이온 사료를 급여 해도 평균1일 사료섭취량 이 11.19kg 으로 타구 에 비해 감소하지 않았을 뿐만 아니라, 더구나 시험기간 중 일당 증체량 에도 차이 (P = 0.19) 가 없었다. Wertz 등 (2004) 은 25-OH D<sub>3</sub> 62.5 또는 125 mg을 비육우 에 경구 투여하여도 사양성적 에 영향을 전혀 미치지 않는다고 하였다. 따라서 Table 3 의 결과로 볼 때 노폐 한우 비육 시 연도향상 목적으로 125 mg 의 25-OH D<sub>3</sub> 나 음이온 사료를 급여하여도 사양성적에 전혀 영향을 미치지 않는다고 말할 수 있다.

Table 3. Performance for cull cows given control, cholecalciferol and anion diet

Item	Treatment			P-value	SEM
	Control	Cholecalciferol	Anion		
Initial wt, kg	464	457	462	0.98	98.17
Final wt, kg	600	594	573	0.69	65.15
DMI, kg/d	10.50	10.93	11.19	-	-
ADG, kg/d	0.90	0.90	0.73	0.19	0.15
G:F	0.09	0.08	0.06	-	-

#### 나. 도체특성 등급 판정

Cholecalciferol 및 음이온 사료 급여가 도체의 등급판정에 미치는 영향은 Table 4 에서와 같다. 사양 시험 결과에서 예상했던 대로 cholecalciferol 및 음이온 사료 급여는 도체 체중에 영향을 미치지 않았다.

다만 수치상으로 배 최장근 면적 과 등지방 두께 및 배최장근 내 지방 침착

도가 음이온 사료 급여 에 의해 대조 구 에 비해 감소되는 듯한 경향을 보이고 있는데 이러한 현상이 우연의 일치인지 아니면 체내 특정 영양소 대사 에 영양 한 결과에 의한 것인지는 이에 대한 조사가 추후 더 되어야 하리라 생각된다. 그밖에 육질 및 육량 등급에는 처리에 의한 영향이 전혀 나타나지 않았다.

Table 4. Carcass characteristics for cull cows given control, cholecalciferol and anion diets

Item	Treatment			P-value	SEM
	Control	Cholecalciferol	Anion		
Carcass characteristics					
Carcass wt, kg	355.0	330.7	322.0	0.336	45.095
LM area, cm <sup>2</sup>	84.6	87.3	81.3	0.500	9.852
Fat thickness, mm	10.4	11.9	9.3	0.239	3.009
Marbling score <sup>a</sup>	3.6	3.0	2.9	0.560	1.570
Quality grade <sup>b</sup>	2.3	2.5	2.5	0.696	0.673
Yield grade <sup>c</sup>	1.5	1.9	1.4	0.116	0.476

<sup>a</sup> 1 = trace, 7 = very abundant (KMAF, 2003).

<sup>b</sup> 1+=Very high; 1 = High; 2 = Good; 3 = Fair; 4 = Poor (KMAF, 2003).

<sup>c</sup> 1 = High; 2 = Good; 3 = Fair (KMAF, 2003).

#### 다. 기호성

25-OH D<sub>3</sub> 는 지용성 비타민 인 비타민 D<sub>3</sub> 의 활성 형태로 비타민 D<sub>3</sub> 와 마찬가지로 과량 섭취할 경우 독성 이 있으며 그 맛 도 매우 쓰므로 이의 투여가 소 배 최장 근 근육의 기호 성 에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5 와 같다. Table 5에서 와같이 숫자 상 으로 다즙 성, 연도 및 풍미가 cholecalciferol 또는 음이온 사료 급여에 의해 다소 향상 되는 듯한 경향을 보이고 있으나, 그 차이도 매우 미미 했을 뿐만 아니라, 통계적 차이는 전혀 나타나지 않았다.

Table 5. Sensory traits of longissimus dorsi muscle (LM) steak for cull cows given control, cholecalciferol and anion diets

Item	Treatment			P-value	SEM
	Control	Cholecalciferol	Anion		
Juiciness <sup>a</sup>	4.46	4.48	4.53	0.914	0.411
Tenderness <sup>a</sup>	4.44	4.39	4.57	0.984	0.484
Flavor intensity <sup>a</sup>	4.79	4.89	4.94	0.837	0.250

<sup>a</sup> 6 = extremely juicy, tender, and intense to 1 = extremely dry, tough, and bland.

#### 라. 경제성

비육 최후기 4개월간 암소 한우 노페우에 cholecalciferol 급여가 암소 한우 육 생산비 에 미치는 영향은 Table 5 에서와 같다. 즉 cholecalciferol 과 anion 사료 급여로 인해 사료비에서 각각 22,000원 과 36,000 원 이 더 소요 됐으며, Table 6 에서와 같이 대조구 대비해 cholecalciferol 과 anion 사료 급여구의 최종 증 체량 저하 로 인해 두 당 176,000원 및 90,000 원 정도 수입이 감소 되어 최종적으로 대조구 암소 한우에 비해 각각 216,000원 및 142,000원 정도의 두당 수입 감소 가 기록 되었다. 따라서 본 시험 당시의 환경 즉 밀소 구입가 및 생산비와 판매 가가 보장 되는 환경 하에서는 암소 한우 사육 농가에 cholecalciferol 급여를 적극 추천 할 수 는 없다. 그러나 본 연구에서 분석한 경제성 분석은 순 생산비와 순 도체 판매액만을 계상한 단순 경제성 분석으로 생산 및 판매 여건 변화에 대 한 보다 자세한 예측과 cholecalciferol 급여로 인한 연도향상 에 의한 소비자 판매가 인상 등 에 대한 고려가 있는 후, 본 사양방법의 적용여부를 신중히 결정해 야 되리라 사료 된다.

Table 6. Economic analysis for control and treated Korean native steers  
(unit: 1,000 Won)

Item	Control	Cholecalciferol	Anion
Total cost per head	3,490	3,520	3,542
- Animal <sup>a</sup>	2,773	2,773	2,773
- Feed <sup>b</sup>	581	603	617
- Other expenses <sup>c</sup>	136	144	152
Total income per head	3,853	3,677	3,763
- Animal	3,643	3,467	3,553
- By products <sup>d</sup>	210	210	210
Gross income per head	363	147	221
Index	100	40	60

<sup>a</sup> Animal purchase cost : 5,546won/live wt.kg.

<sup>b</sup> Feed cost/kg : Cholecalciferol 8,000 Won, Anion 8,000 Won,  
Concentrate 317 Won, Rice straw 290 Won.

<sup>c</sup> Other expenses : sawdust and other materials.

<sup>d</sup> By products : compost and empty warehouse sack.

## 제2절 Cholecalciferol과 칼슘 대사조절에 의한 한우 암소 노폐물의 육질 개선을 위한 작용 기작 규명

### 1. 서설

Cholecalciferol 이 칼슘대사 에 큰 영향을 미치는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 즉 이미 착유우의 유열 에서 증명 된바와 같이 cholecalciferol 의 활성형인 1,25 di-hydroxy cholecalciferol 의 민감 도 를 증가 시켜 주기위해 노폐한우 비육우 사료내 cholecalciferol 투여 전 음이온 사료를 이용하여 체액을 호산성화 하여 실제 쇠고기의 연도향상 에 작용하는 기작을 규명 하고자 제1절 의 in vivo 실험시 획득한 시료들을 이용하여 본 실험을 실시하였다. 본 시험 에서는 이를 위하여, 혈액 및 근육을 분석하고, 뿐만 아니라 연도관련 유전자 mRNA

및 단백질의 변화를 조사하여 연도 향상 기작 규명의 기초 자료를 제공코자 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시료채취 및 뇨 pH 와 혈액 및 조직 분석

요 - 음이온 사료 투여종료 1일전 모든 처리구의 시험우의 배뇨 관 을 직장을 통해 손으로 자극하여 배뇨를 유발하여 배뇨 중간정도 기 에 요를 채취 후 30분 이내 에 pH를 측정하였다.

혈액-Cholecalciferol 및 음이온 사료 급여에 의한 혈중 대사물의 변화를 측정하기위해 cholecalciferol 급여 48 시간 후 에 전혈 15 ml를 채혈 후 3,000 rpm 에서 15분 원심분리로 혈청을 분리 후  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관 하면서 혈청 칼슘, 마그네슘, 염소, 인 은 Roche Cobas<sup>®</sup>Integra Blood Chemistry Analyzer (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) 로 소듐 과 포타슘 은 Bayer ion-selective electrode module (Bayer Ltd., Ibaraki, Japan) 로, triglyceride 와 glucose 는 Bayer Advia<sup>®</sup>(Blood Chemistry analyzer (Bayer Ltd., Ibaraki, Japan)를 이용하여 각각 분석하였다.

근육 및 조직- 시험 종료 후 24 시간 절식시킨 전체 시험 우 도축 시 배 최장근, 간 및 신장 조직을 각각 따로 채취하여 액체질소에 보관하면서 추후 분석에 사용하였다.

### 나. 배최장근 연도, 유리칼슘 농도 및 혈액 및 조직중 비타민 D 및 대사물농도 측정

Warner-Bratzer Shear Force (WBSF)- 도축 시 2.25 cm 두께 로 4개의 steak시료를 준비한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 1, 7 및 14 일 숙성 후 각 시험 우 배 최장근 을 수조에서 60분간 예열 하여 중심의 온도를  $70^{\circ}\text{C}$  되게 한 후 약  $18^{\circ}\text{C}$  의 흐르는 물에 30분간 냉각 후, 직경 1.27 cm 의 8개 조각을 만들고 이를 다시 V형 인장 날 의 cross-head 속도를 400mm/분 되게 하여 측정 하였다 (Wheeler 등, 2000).

근육 중 유리 칼슘농도 -배 최장근중 유리칼슘 농도는, ion meter (Okaton

Ion 510, Singapore)를 이용하여 Ca-selective electrode (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL) 로 Hwang 등 (2004) 의 방법 에 의해 측정 하였다.

혈액 및 조직중 비타민 D 및 대사물농도-조직 비타민 D<sub>3</sub>, 25-OH D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, 와 혈청 비타민 D<sub>3</sub> 는 Horst 등 (1981)방법으로 추출 후 진공건 조 하였고, 혈청 25-OH D<sub>3</sub> 와 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 는 Hollis 등 (1993) 방법으로 추출 한후 추후 분석에 사용하였으며 자세한 방법은 아래 에 설명 한 바와 같고, 그 모식도 는 각각 Figure 2 및 3 과 같다 . 건조된 비타민 D<sub>3</sub> 는 Agilent Zorbax<sup>®</sup> Sil HPLC column (0.46 x 25 cm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)을 이 용하여 hexane/isopropanol (99/1) 로 Horst 등 (1981) 의 방법 에 의해 HPLC (Kontron Instruments, Milan, Italy) 에서 분리하여 cholecalciferol 부분 만 회수 한후 UV detector 254 nm에서 각 분획 들을 측정한 후, 표준액 과 시료 내 peak 면적을 비교 계산 하여 함량을 계산하였다. 자세한 방법은 아래 에 설명 하는 바 와 같고 회수된 cholecalciferol 의 HPLC 상 에서 18분 56 초 만에 형성 된 크 로마토그램은 Figure 4 과 같다. 한편 25-OH D<sub>3</sub> and 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 의 농도는 gamma counter (Perkin-ElmerCorp., Beltsville, MA)에서 RIA kits (BioSource Europe; Nivellis, Belgium)를 이용하여 분석하였다.

#### o Cholecalciferol

1. 약 1g의 조직 시료 또는 혈청을 4ml의 PBS에 넣고 균질화 한후
2. 2ml 의 균질액을 25x 100 mm 원심분리관 에 넣은후
3. 6ml의 헥산을 첨가한후 120회/분의 속도로 수평교반기에서 10분간 교반 후, 원심분리하여 상층액 보관
4. 보관 된 상층액을 hexane/isopropanol(99/1; vol/vol) 용액에 녹여
5. LRC 500mg silica cartridge(Varian, Harbor city, CA)에 가하고 8ml의 헥산 으로 세척후
- 6.헥산/isopropanol (99:1)용액 8ml로 세척을 2회 (16 ml) 하면 cholecalciferol 을 추출하였다.

#### o 25-OH D<sub>3</sub> 및 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>

1. 약 1g의 조직 시료 또는 혈청을 4ml의 PBS 에 넣고 균질 화 한후
2. 2ml 의 균질액 을 25x 100 mm 원심 분리관 에 넣은 후 2.6ml의

chloroform 과 1.4 ml 의 메타놀을 첨가하여 10 분간 교반후 원심분리 하여 상층액을 회수 하고

3. 여기에 2 ml의 chloroform 첨가 하여 10분 교반 후 원심분리 하여 하층 (chloroform+헥산층) 을 회수 하여 진공건조 후 1ml의 헥산을 가하여 녹인후
4. LRC 500mg silica cartridge(Varian, Harbor city, CA)에 가하고 8ml의 헥산으로 세척 후
5. 헥산/isopropanol (99:1)용액 8ml로 세척하면 cholecalciferol 이 추출되고
6. 헥산/isopropanol (95:1)용액 8ml로 세척하면 25-hydroxycholecalciferol 이 추출되며
7. 헥산/isopropanol (86:14)용액 8ml로 세척하면 1,25-dihydroxycholecalciferol 이 추출된다.
8. 상기의 추출물들을 RIA 방법 이용하여 25-hydroxycholecalciferol 및 1,25 di-hydroxycholecalciferol 을 분석하였다.



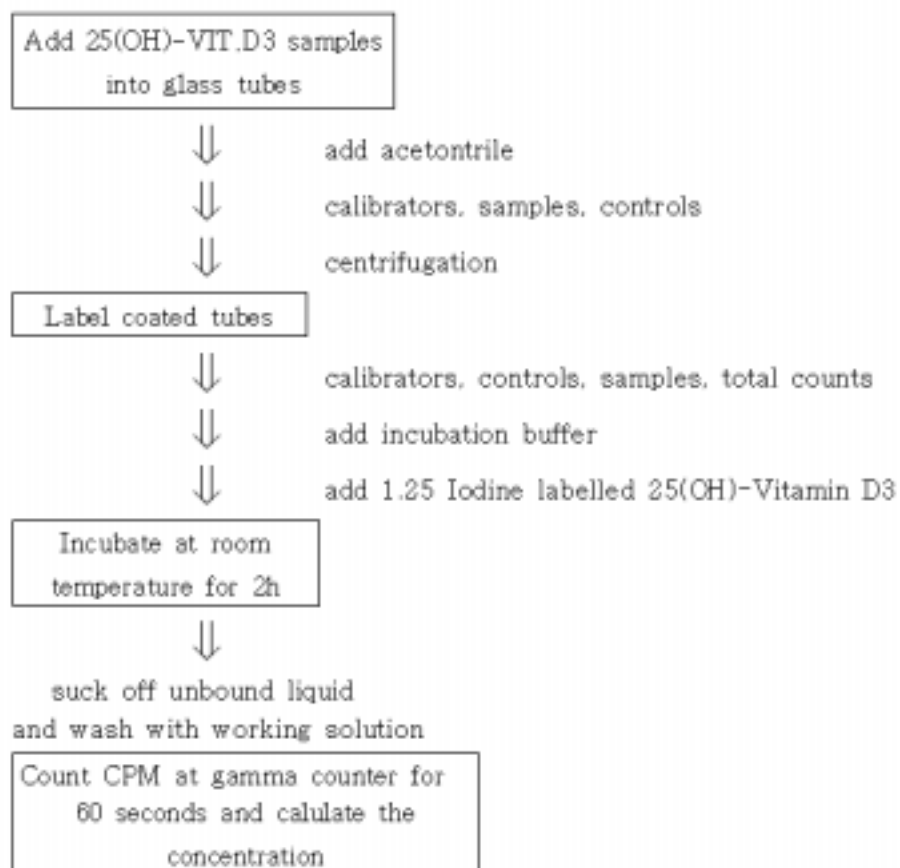


Figure 2. 1,25-di-hydroxycholecalciferol 분석 모식도

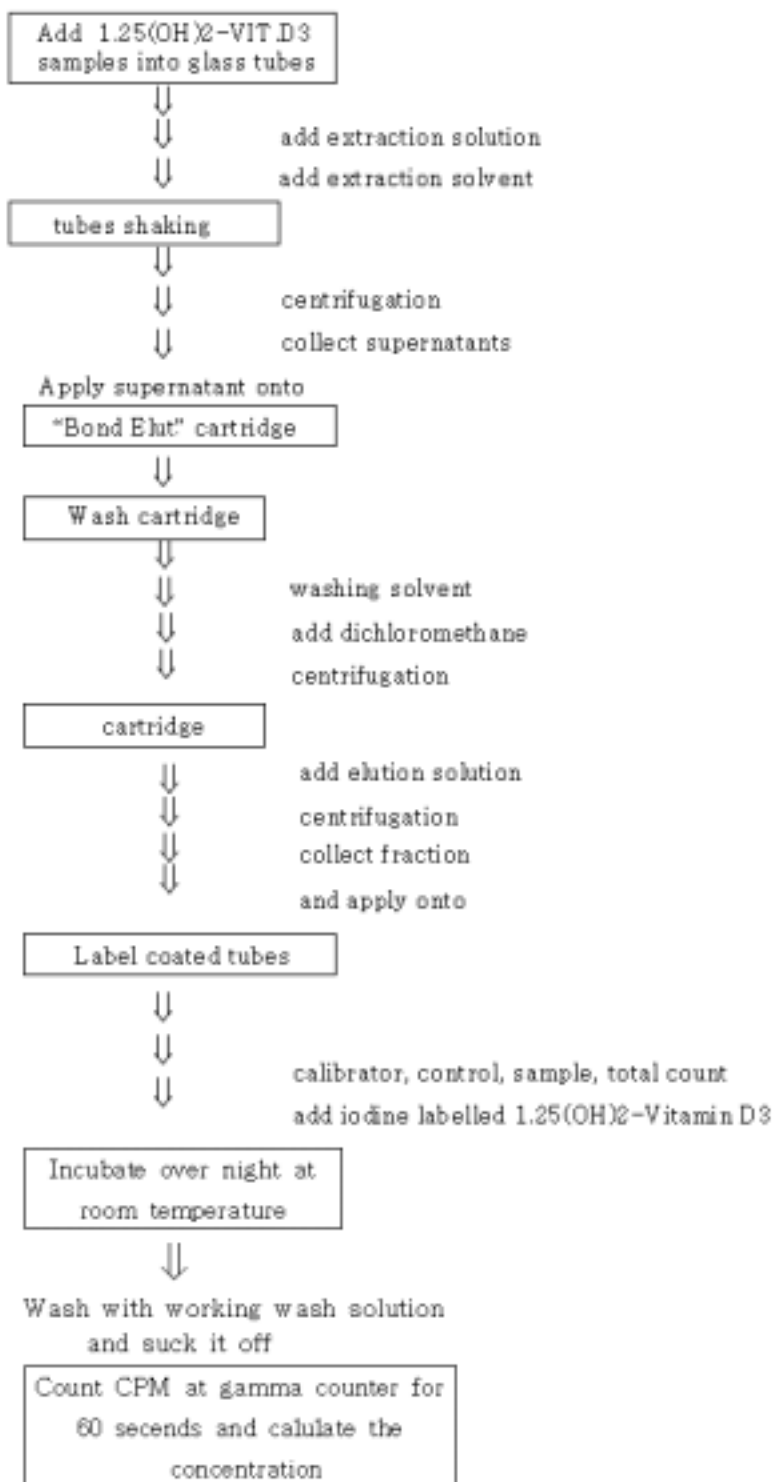


Figure 3. 1,25-di-hydroxycholecalciferol 분석 모식도

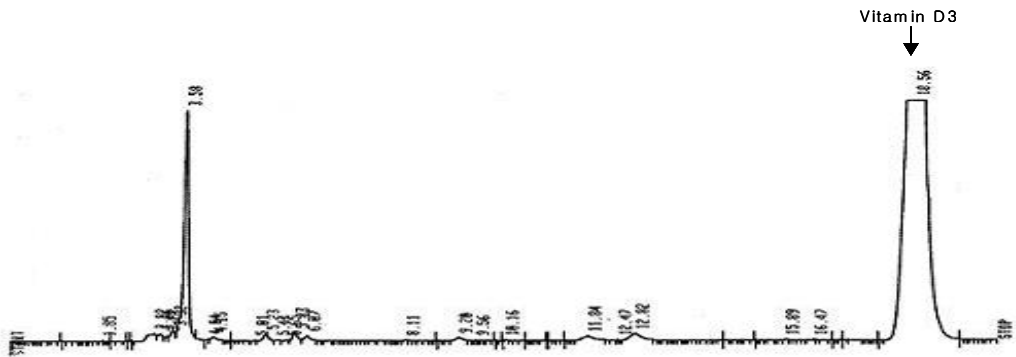


Figure 4. HPLC 비타민 D<sub>3</sub> 표준액 chromatogram

다. Real time RT-PCR 방법 및 Western Blot 에 의한 근육 조직내 calpain 계 효소 mRNA 및 단백질 농도 조사

Real time RT-PCR-ribonuclease protection assay 또는 Northern blot 방법 보다 더 간편하면서 정확한 방법의 일환으로 근육중 calpain 계 효소 mRNA 차이를 측정하였다.

#### 1) 배척장근 RNA 추출

사양시험 직후 도축시 채취하여 액체 질소 보관 되어있는 배척장근 조직 약 600 mg에서 Chomczynski 와 Sacchi 방법(1987)을 응용한 trizol 용액으로 용해하여 homegenizer에서 1 분씩 2번에 걸쳐 15,000 rpm에서 균질화 한 후 실온에서 (15-30°C)방치 하였다. 이후 시료를 1.5 ml effendorf tube에 옮긴후 200 ul의 chloroform을 가하여 손으로 매우 세게 교반 후 다시 5 °C, 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리 과정을 거쳐 최상층에 무색의 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 1.5 ml effendorf tube에 옮긴 후 0.5 ml의 isopropyl alcohol을 가하여 손으로 세게 흔든 후, 5°C, 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 RNA를 침전 시켰다. 상등액을 제거후 약 1 ml의 75% 에탄올 을 가하여 vortexing 한후 5 °C, 10,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 RNA를 세척 하였다. 세척된 RNA를 상온에서 약 5분간 방치 하여 잔존 알콜을 증발시킨 후 약 210 ul의 TE버퍼 (pH 7.5) 에 재 용해하였다. 재 용해 된 RNA를 260 nm의 spectrophotometer 에서 농도를 정량한 다음 다시 1% agarose gel 100 v에서 25분간 전기영동 하여 integrity 이상

유무를 확인한 후, -70°C 에 보관하면서 추후 실험에 사용하였다.

## 2) Real time RT-PCR

### ① Primer 제조

Real time RT-PCR에 필요한  $\mu$ -calpain (Accession No NM 174261), m-calpain (Accession No J 05065), calpastatin (Accession No NM 174003) primer는 사용하고자 하는 PCR machine 제조사의 요구 사항에 맞게 Forwad 및 Reverse 두 primer의 Tm값을 58 - 65 °C 사이에 두 값의 차이를 2°C 이하가 되고, GC 비율을 50-60%, 길이를 120-150 mer가 되도록 Gene Runner version 3.04 (Hastings Software, Inc, 1944) 프로그램을 이용하여 디자인 (Table 7)한 후 다시 blast search에서 homology (Figure 5, 6, 7)를 확인 후 Bioneer 사에 제조를 의뢰구입 후 real time RT-PCR에 사용 하였다.

Table 7. Forward and Reverse primers for real-time polymerase chain reaction for bovine  $\mu$ -calpain, m-calpain, calpastatin and cyclophilin mRNA

Protein	Primer
$\mu$ -calpain (Accession No NM 174261)	
Forward	5'-AGGCCAATGAGAGTGAGGAGGTCC-3'
Reverse	5'-CAGGATGTCGGGTCACCACTTTG-3'
m-calpain (Accession No J 05065)	
Forward	5'-CCATAACCCTTCTCTTGCACCTGTG-3'
Reverse	5'-AATGGGTGTGCCTGGGTATGAAG-3'
Calpastatin (Accession No NM 174003)	
Forward	5'-AGATCTCCGGTGGTGGAAAGAGC-3'
Reverse	5'-TGGTTTAGATTCAGCTGGTACGGC-3'
Cyclophilin (Accession No Y00052)	
Forward	5'-CAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTG-3'
Reverse	5'-AGATGCCAGGACCCGTATGCTTTAG-3'

## ② Real time RT-PCR

250 ul의 PCR 튜브에 200ng의 추출된 배최장근 RNA, QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master mix(Qiagene,USA) 25ul, Forward 와 Reverse primer를 각각 0.5uM 씩 넣고, QuantiTect RT Mix를 0.5ul 첨가한 후 RNase free 증류수를 사용하여 최종 반응액이 50 ul가 되도록 하였다. 이 반응액을 Rotar-Gene 2000 Real time Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia)에서 cycler 제조 회사에서 권장한 94 °C에서 15초, 55 °C에서 30초의 반응을 40 회 반복 RT-PCR하여 Bovine calpain standard curve를 구하기 위해 bovine calpain cDNA를 제조후 Figure 9 에서와 같이 100ug을 시작으로 10 배씩 희석 하여 각 농도에서의 CT (DNA 농도) 값을 구한 결과 추세선 식은  $conc=10^{(-0.499*CT+2.569)}$  으로 -0.5의 기울기를 나타냈고,  $R^2$  값도 0.9 로 고도의 상관도를 나타냈다. 처리 구간의  $\mu$ -calpain, m-calpain, calpastatin mRNA 발현 차이를 비교는, house keeping gene 으로는 cyclophilin (Assession # Y00052) (Figure 8) 을 사용하여 두 처리의 결과를 normlization 하는데 사용하였으며, 두 처리 간의 차이는 take off cyle을 calpastatin의 nucleotide 길이 (4551 bp)를 기준으로 미리 구해놓은 표준식을 이용하여 발현 율 을 구한 다음 이를 다시 대조구 발현율을 100으로 한 처리구의 상대적 발현 율 로 표현 하였다.

LOCUS NM\_174261 1315 bp mRNA linear MAR 23-APR-2005  
 DEFINITION Bos taurus calpain, small subunit 1 (CAPNS1), mRNA.  
 ACCESSION NM\_174261  
 VERSION NM\_174261.1 GI:27806276  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bos taurus (cow)

Sequences producing significant alignments:		Score	E	
		(Bits)	Value	
<a href="#">gi 27806276 ref NM_174261.1 </a>	Bos taurus calpain, small subu...	<u>48</u>	2e-04	<b>GU</b>
<a href="#">gi 47523693 ref NM_214318.1 </a>	Sus scrofa calpain I light sub...	<u>48</u>	2e-04	<b>GU</b>
<a href="#">gi 8778195 gb AF277049.1 AF277049</a>	Ovis aries calpain IV reg...	<u>48</u>	2e-04	
<a href="#">qi 24528343 emb AJ410870.2 SSC410870</a>	Sus scrofa COX7A1 gen...	<u>48</u>	2e-04	

>[gi|27806276|ref|NM\\_174261.1|](#) **GU** Bos taurus calpain, small subunit 1 (CAPNS1), mRNA  
 Length = 1315




Score = 46.1 bits (23), Expect = 8e-04  
 Identities = 23/23 (100%)  
 Strand = Plus / Minus


```

Query: 1 caggatgtcgggtcaccactttg 23
      |||
Sbjct: 417 caggatgtcgggtcaccactttg 395
  
```

Figure 5, The result of blast search for  $\mu$ -calpain1 primer.

LOCUS BOVCALPA 1343 bp mRNA linear MAR 26-APR-1993  
 DEFINITION B.taurus calpain II regulatory subunit mRNA, complete cds.  
 ACCESSION J05065  
 VERSION J05065.1 GI:162780  
 KEYWORDS calpain II regulatory subunit; regulatory subunit.  
 SOURCE Bos taurus (cow)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
<a href="#">gi 162780 gb J05065.1 BOVCALPA</a> B.taurus calpain II regulatory su	<a href="#">50.1</a>	8e-05 
<a href="#">gi 15451651 gb AC008872.6</a> Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2	<a href="#">36.2</a>	1.2
<a href="#">gi 55648526 ref XM_512486.1</a> PREDICTED: Pan troglodytes simil...	<a href="#">34.2</a>	4.7 
<a href="#">gi 47106803 gb BT014388.1</a> Lycopersicon esculentum clone 133692F	<a href="#">34.2</a>	4.7 
<a href="#">gi 37700418 gb AC123865.5</a> Mus musculus BAC clone RP23-365C14...	<a href="#">34.2</a>	4.7

[>gi|162780|gb|J05065.1|BOVCALPA](#)  B.taurus calpain II regulatory subunit mRNA, complete cds  
 Length = 1343

Score = 50.1 bits (25), Expect = 7e-05  
 Identities = 25/25 (100%)  
 Strand = Plus / Plus

```

Query: 1   ccataacccttctcttgacactgtg 25
          |||
Sbjct: 1089 ccataacccttctcttgacactgtg 1113
  
```

Figure 6, The result of blast search for m-calpain primer.

LOCUS NM\_174003 4551 bp mRNA linear MAM 07-AUG-2005  
 DEFINITION Bos taurus calpastatin (CAST), transcript variant 2, mRNA.  
 ACCESSION NM\_174003 XM\_611833  
 VERSION NM\_174003.2 GI:31343059  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bos taurus (cow)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
<a href="#">gi 31343059 ref NM_174003.2 </a> Bos taurus calpastatin (CAST),...	<u>46</u>	8e-04	<a href="#">G</a> <a href="#">U</a>
<a href="#">gi 5442419 gb AF159246.1 AF159246</a> Bos taurus calpastatin mR...	<u>46</u>	8e-04	<a href="#">G</a> <a href="#">U</a>
<a href="#">gi 12082822 gb AF321530.1 AF321530</a> Bos taurus calpastatin g...	<u>46</u>	8e-04	
<a href="#">gi 289405 gb L14450.1 B0VCPTNA</a> Bos taurus calpastatin mRNA...	<u>46</u>	8e-04	<a href="#">G</a> <a href="#">U</a>
<a href="#">gi 1519340 gb U66320.1 OAU66320</a> Ovis aries calpastatin mRNA...	<u>38</u>	0.20	<a href="#">G</a> <a href="#">U</a>

>[gi|31343059|ref|NM\\_174003.2|](#) [G](#) [U](#) Bos taurus calpastatin (CAST), transcript variant 2, mRNA  
 Length=4551

Score = 46.1 bits (23). Expect = 0.001  
 Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1  AGATCTCOGGTGGTGGAAAGAGC 23
          |||
Sbjct 648 AGATCTCOGGTGGTGGAAAGAGC 671
  
```

Figure 7, The result of blast search for calpastatin primer.



<a href="#">gi 12709876 emb AL160400.20 </a>	Human DNA sequence from clone ...	<u>48</u>	2e-04	<b>L</b>
<a href="#">gi 16972970 emb AL392111.12 </a>	Human DNA sequence from clone ...	<u>48</u>	2e-04	
<a href="#">gi 18614049 emb AL592492.10 </a>	Human DNA sequence from clone ...	<u>48</u>	2e-04	
<a href="#">gi 1483514 emb Z78021.1 HSU85A.3</a>	Human DNA sequence from clo...	<u>48</u>	2e-04	
<a href="#">gi 30308 emb Y00052.1 HSCYCR</a>	Human mRNA for T-cell cyclophilin	<u>48</u>	2e-04	<b>LU</b>
<a href="#">gi 1359712 emb X94359.1 HSACES</a>	H.sapiens gene 5' region of ...	<u>48</u>	2e-04	<b>G</b>
<a href="#">gi 30167 emb X52851.1 HSCPH70</a>	Human cyclophilin gene for cy...	<u>50</u>	7e-05	<b>LG</b>
<a href="#">gi 48145530 emb CP456707.1 </a>	Homo sapiens full open reading ...	<u>50</u>	7e-05	

[>gi|30308|emb|Y00052.1|HSCYCR](#) **LU** Human mRNA for T-cell cyclophilin  
 Length = 723

Score = 50.1 bits (25), Expect = 7e-05  
 Identities = 25/25 (100%)  
 Strand = Plus / Minus

```

Query: 1  agataccaggaccgatatactttag 25
          |||
Sbjct: 306 agataccaggaccgatatactttag 282
  
```

Figure 8, The result of blast search for cyclophilin primer.

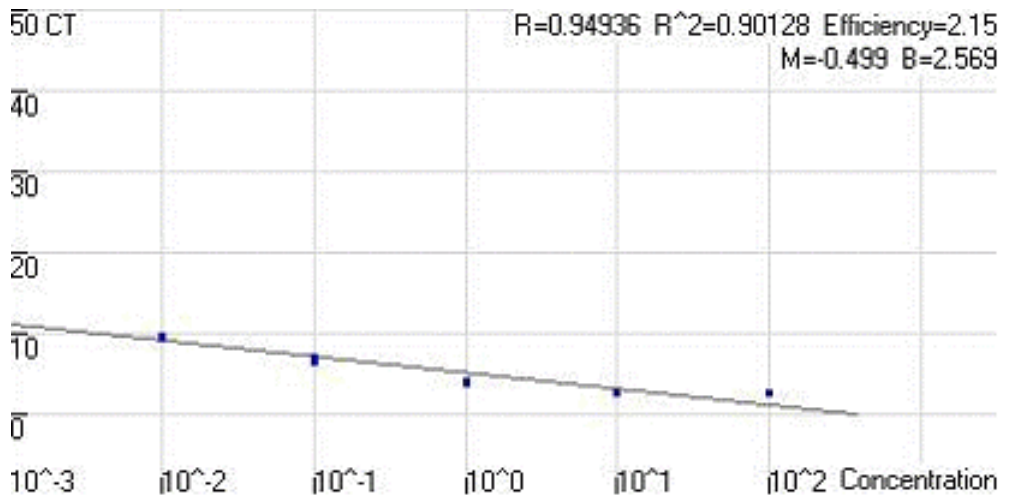
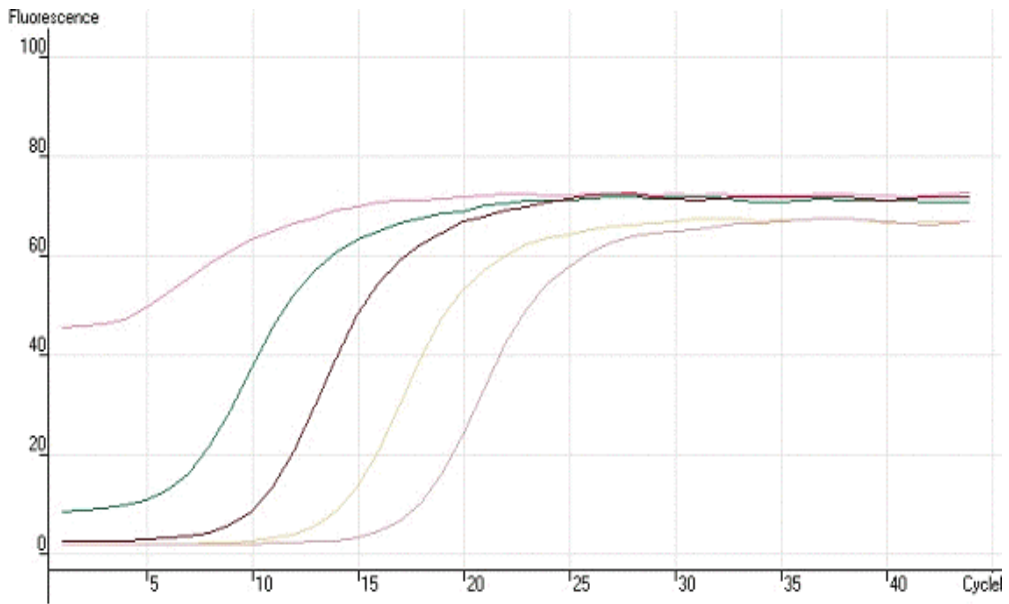


Figure 9. Real-time RT-PCR 표준곡선도

Western blot analysis-각 처리구별 배 최장근 내 Calpain 계 효소의 단백질 농도를 측정하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

배 최장근 시료를 calpain 계 효소는 pH 7.6 이하에서는 침전 되므로 tris-EDTA buffer (pH 8.3)를 이용 하여 단백질을 추출한 후 BCA kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)를 이용하여 단백질량을 측정한 후, 7.5% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동 하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membranes 전기 blotter를 이용하여 옮긴후 blocking buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05%, Tween20, 1% polyvinylpyriodide and 0.1% bovine serum albumin) 로 2시간 blocking 하였 고, 그 후 각 1:2,000 의 monoclonal anti- $\mu$ -calpain (Clone 9A4H8D3, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA), 1:500 의 monoclonal anti-m-calpain (Clone 107-82, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA), 1:5,000 의 monoclonal anti-calpastatin (Clone 1F7E3D10, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 및 1:5,000 의 monoclonal anti- $\beta$ -actin (Clone AC5, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 으로 4°C에서 incubating buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.1% polyvinylpyriodide and 0.1% bovine serum albumin) 로 하룻 밤 반응 시켰다. 이후 다시 incubating buffer 로 2차 항체 인 horseradish peroxide 가 conjugate 된 goat anti-mouse antibody (1:8,000 dilution) (Product No A9917, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 로 배양한 후 washing buffer로 30 분씩 3번 세척 후, WEST-one<sup>®</sup> chemiluminescence solution (INTRON Biotechnology, Sungnam, Gyunggi, Korea)을 뿌린후, dark box (Intelligent Dark box II<sup>®</sup>, LAS-1000 plus, Fuji film Microdevices Co. Ltd., Miyagi, Japan) 에서 1-2분 노출하여 영상을 획득하였다.  $\mu$ -calpain, m-calpain and calpastatin 단백질의 농도는 동일 시료에서 추출한 총단백질중  $\beta$ -actin 농도의 상대적 량을 기준으로 보정하여 처리 간 각 효소 단백질의 농도를 비교하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 요 pH 및 혈중 함량변화

Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여에 의한 한우 암소 노폐우의 뇨 pH 변화 에 미치는 영향은 Table 8 과 같다. 즉 cholecalciferol 급여 시 pH 가 7.94 로 대조구 8.15 에 비해 유의적 변화 는 없었으나, 음이온 사료 급여에 의해 뇨 pH 가 6.72 로 대조구 및 25-OH D<sub>3</sub> 급여구 에 비해 매우 유의적 (P= 0.0001) 으로 감소되어 연구자 들이 의도했던 음이온 사료 급여에 의한 체내 생리적 대사의 호산성화 가 매우 효과적으로 달성 된 것으로 사료 된다. 이는 유우 사료 내 음이온

농도를 증가 시켜 줌으로서 요 pH 가 유의적으로 감소하였다는 Roche 등 (2003) 의 보고와 매우일치 한다. 혈청 중 칼슘 함량 변화는 cholecalciferol 만 급여 시 는 변화가 없었으나, 음이온 사료 급여에 의해 대조구 에 비해 혈청 칼슘농도가 유의 적 (P =0.030)으로 증가되었다. 이는 육우에서 비타민 D<sub>3</sub> 와 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 에 의 해서 는 혈중 칼슘 농도가 증가하였으나, 25-OH D<sub>3</sub> 에의해서는 혈중 칼슘 농도 가 증가 되지 않았다는 보고 와 일치 한다 (Foote 등, 2004). 이는 아마도, 젖소에서 잘 조절된 사료내 음이온농도 에 의해, 요 칼슘 배설량 증가, 혈중 칼슘 용도 증가 및 칼슘 항상성 민감도 증가 등의 기작 에 의해 분만전후 저 칼슘 증을 완화 해주므 로 (Block, 1994), 아마도 본 시험에서 급여한 음이온사료 에 의해 급여한 25-OH D<sub>3</sub> 의 효과가 나타날 수 도 있었을 것이다. 또한 Cholecalciferol 과 음이온 사료 급 여에 의해 혈청 중 마그네슘 농도가 유의적 (P = 0.003) 으로 감소되었으며, 이는 육우에 도축 7일전 5 x 10<sup>6</sup> IU를 급여 시 혈중 마그네슘 농도 가 증가하였다는 Swanek 등 (1999) 의 보고와 일치하는 결과 이다. 혈청 중 인의 농도는 대조구 에 비해 cholecalciferol 과 음 이온 사료 급여 에 의해 유의적 (P = 0.001) 으로 증가 하였으나 이와 반대로 혈청 중 염소 농도는 음이온 사료 급여에 의해 유의적 (P =0.012) 으로 감소되었다. 그 밖에 cholecalciferol 또는 음이온사료를 급여하여도 혈중 glucose 와 triglyceride 농도는 변화가 없었다.

Table 8. Urine pH and blood serum contents for cull cows given control, cholecalciferol and anion diets

Item	Treatment			P-value	SEM
	Control	Cholecalciferol	Anion		
Urine pH	8.15 <sup>a</sup>	7.94 <sup>a</sup>	6.72 <sup>b</sup>	0.0001	0.5577
Ca, mg/dL	10.2 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	11.5 <sup>b</sup>	0.030	1.043
Mg, mEq/L	2.3 <sup>a</sup>	2.0 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>	0.003	0.209
Cl, mM	114.9 <sup>a</sup>	112.5 <sup>ab</sup>	108.8 <sup>b</sup>	0.012	4.631
P, mg/dL	6.7 <sup>a</sup>	9.5 <sup>b</sup>	8.4 <sup>b</sup>	0.001	1.247
Na, mM	155.0	154.3	148.6	0.147	6.79
K, mM	4.6	4.7	4.7	0.741	0.279
Triglyceride, mg/dL	38.0	40.5	36.8	0.689	8.765
Glucose, mg/dL	89.5	89.3	83.4	0.516	11.96

<sup>a,b</sup> Within a raw, means with a different superscripts differ.

나. 배 최장근 연도, 유리칼슘 농도 및 혈액 및 조직 중 비타민 D 및 대사 물 농도

Cholecalciferol 과 음이온사료가 배 최장근 유리칼슘 및 연 도 에 미치는 영향은 Table 9에서 와 같다. 즉 사료 내 Cholecalciferol 과 음이온 사료 첨가 에 의해 수치상으로 대조구 에 비해 10% 정도의 증가가 있었지만 처리구간 통계 적 유의성 은 발견하지 못했는데 이는 본 시험에서 획득한 시료 들내 유리 칼슘 의 농도가 다른 시험 의 농도 (Swanek 등, 1999) 보다 근본적으로 낮기 때문 인 것으로 보인다. 배 최장근 의 연도 (WBSF) 역시 전 체적 으로 전 처리구 간 에 유의적 차이가 없었다. 전반적으로 숙성 기간 이 길어짐 에 따라 연도가 향상 되었으나, cholecalciferol 또는 음이온 사료 급여에 의한 향상 효과 역시 볼수 없 었다. Platter 등 (2003) 은 고기의 연도 에 영향 하는 인장도 는 4.5 kg 이라 하 였는데, 본 시험 시료의 인장 도는 이보다 훨씬 높은 수치에서부터 시작 하였으 나, 기본적으로 배 최장근 내 유리 칼슘 농도의 변 화가없었기 때문 에 연도 에 서도 동일한 결과 가 나타난 것으로 생각된다.

Table 9. Calcium contents and Warner-Bratzler shear force (WBSF) of LM steak for cull cows given control, cholcalciferol and anion diets

Item	Treatment			P-value	SEM
	Control	Cholecalciferol	Anion		
Ca, $\mu\text{g/g}$ , fresh basis	8.9	9.6	9.9	0.376	1.216
WBFS, kg					
d 1	8.44	7.68	7.39	0.258	1.270
d 7	5.47	5.43	4.85	0.303	0.870
d 14	4.02	4.01	3.53	0.513	0.962

Cholecalciferol 과 음이온 사료 급여 에 의해 배 최장근, 간, 신장 및 혈청중 비타민 D<sub>3</sub> 의 농도에 변화가 없었는데, 이는 25-OH D<sub>3</sub> 를 급여한 육우의 동일 조직 및 혈청에서 비타민 D<sub>3</sub> 의 농도 에 변화 가 없다고 보고한 Foot 등 (2004) 의 결과 와 일치한다. 그러나, cholecalciferol 또는 음이온 사료 급여 시 대조구 에 비해 조사된 3종의 모든 조직 내 25-OH D<sub>3</sub> 농도 가 유의적 (P < 0.039) 으로 증가함을 알 수 있었다. 더구나 음이온 사료 급여 시 는 혈청 내 25-OH D<sub>3</sub> 농도 가 cholecalciferol 급여구 에 비해서도 1.3 배 높게 매우 유의적 (P = 0.0001) 으로 증가되었다. Table 10 에서 와 같이 본시험 에서 한우 노폐우 에 cholecalciferol 또는 음이온 사료를 급여해도 근육 또는 장기 중 에 비타민 D<sub>3</sub> 의 농도에 변화 가 없음 은 비타민 D 과다섭취 에 의한 염려를 해소 해 줄 수 있는 좋은 자료라고 볼 수 있다. 혈청 중 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 농도는 혈청 25-OH D<sub>3</sub> 농도 와 동일하였으나, 음이온 사료 섭취 우 배 최장 근 중 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 농도는 오히려 다른 구 에 비해 유의적 (P = 0.002)으로 감소하였으나, 간, 신장 및 혈청 중 농도는 여 타 구 에 비해 유의적 (P =0.0001, P = 0.001, P =0.0001) 으로 증가 되었다. 이는 아마도 신장에서 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 생성이 pH 에 매우 민감하기 때문 에 Table 7에서 와 같이, 음이온 사료 에 의해 체액 이 산성으로 변했기 때문으로 생각 된다 (Gaynor 등, 1989; Block, 1994). 그러나 이러한 결과는 25-OH D<sub>3</sub> 를 육우 에 급여해도 과량의 25-OH D<sub>3</sub> 는 24,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 로 전환되고 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 농도는 증가 되지 않는다고 한 Wertz 등 (2004) 과는 상치된 결과 로 현재로서는 이를 명확히 설명하기가 곤란하고, 이에 관한 연구 가 추후 더 수행되어야 하리라 생각된다.

Table 10. Concentration (as-is basis) of vitamin D<sub>3</sub>, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-OH D<sub>3</sub>), and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) of LM steak, liver, kidney and serum for cull cows given control, cholecalciferol and anion diets

Item	Treatment			P-value	SEM
	Control	Cholecalciferol	Anion		
	Vitamin D <sub>3</sub> , ng/g				
LM	1.2	1.0	0.9	0.750	0.10
Liver	11.4	10.9	10.3	0.870	3.45
Kidney	13.0	13.8	14.9	0.769	2.56
Serum, ng/mL	4.0	4.8	4.2	0.937	0.79
	25-OH D <sub>3</sub> , ng/g				
LM	1.8 <sup>a</sup>	4.5 <sup>b</sup>	4.0 <sup>b</sup>	0.039	0.240
Liver	4.5 <sup>a</sup>	17.3 <sup>b</sup>	17.9 <sup>b</sup>	0.001	2.561
Kidney	4.2 <sup>a</sup>	8.7 <sup>b</sup>	7.3 <sup>b</sup>	0.010	2.013
Serum, ng/mL	88.0 <sup>a</sup>	383.0 <sup>b</sup>	488.2 <sup>c</sup>	0.0001	72.194
	1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> , pg/g				
LM	24.0 <sup>a</sup>	22.7 <sup>a</sup>	17.3 <sup>b</sup>	0.002	3.395
Liver	14.3 <sup>a</sup>	16.2 <sup>a</sup>	19.5 <sup>b</sup>	0.0001	1.849
Kidney	14.7 <sup>a</sup>	19.2 <sup>b</sup>	19.9 <sup>b</sup>	0.001	2.638
Serum, ng/mL	9.7 <sup>a</sup>	25.3 <sup>b</sup>	33.8 <sup>c</sup>	0.0001	6.738

<sup>a,b,c</sup> Within a row, means with a different superscripts differ.

다. 근육 조직내 calpain 계 효소 mRNA 및 단백질 농도 조사

1) 시료 확보 및 시험준비

근육내 연도 향상에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 사양시험이 종료되는 98.5개월령에 각 처리당 8 마리씩의 배 최장근을 채취하여 액체질소에 보관하여 추후 분석에 사용하기 위해 보관하였다. 한편 시험우 배 최장근 내  $\mu$ -calpain, m-calpain 및 calpastatin mRNA 농도조사를 위한 total RNA의 추출 결과

Figure 10, 11 및 12 과 같이 각 처리 구 의 전 시험 우 에서 농도 와 integrity 가 매우 우수한 Total RNA가 추출되었음 을 확인하였다.

bovine  $\mu$ -calpain, m-calapin 및 calapstatin 의 real time PCR take off cycle 에 따른 1 ng의 total RNA 당 특정 gene의 발현 수(No. of copy) 계산식은 공히  $y = 7 \times 10^7 e^{-0.6762 \times x}$  (  $y = 1$  ng의 total RNA 당 특정 gene의 발현 수,  $x =$  take off cycle) 이었는데, 이는 take off cycle이 1회전이 빠를수록 약 2.5 배 정도의 발현수가 높음을 의미 한다. 본 식을 계산하기 위하여 본 시험에서 사용한 RNA 시료들과 동일한 크기의 DNA를 5회 희석하여, 각 희석 농도 내 특정 gene의 예상 발현수를 동일 농도DNA에서 실제측정된 take off cycle 과의 관계 로 계산식을 구하였다.

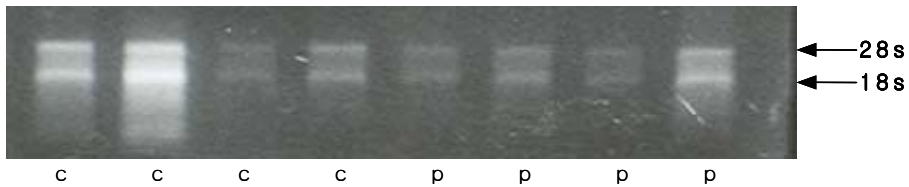


Figure 10. Total RNA of longissimus muscles of control cows.

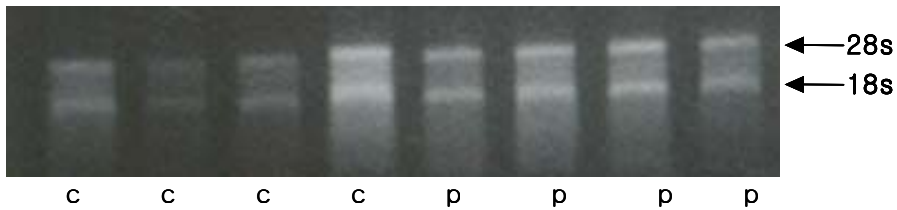


Figure 11. Total RNA of longissimus muscles of cholecalciferol fed cows

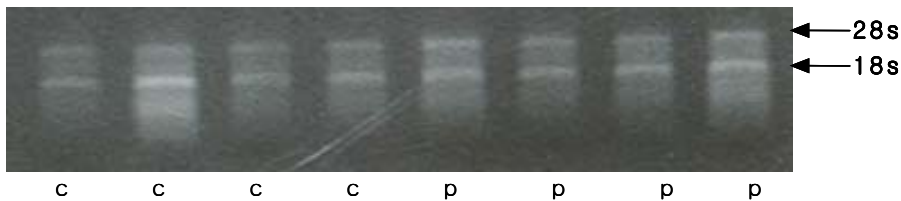


Figure 12. Total RNA of longissimus muscles of anion diet fed cows.



한편, 배 최장근 내  $\mu$ -calpain, m-calpain 및 calpastatin 단백질 농도조사를 위한 Western blotting 준비 작업으로 각 처리우의 배 최장근을 SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 단백질을 분리한 후 분리 양호 유무를 보기위해 Coomassie 염색을 한 결과는 Figure 13, 14, 15 과 같다.



Figure 13. SDS-polyacrylamide gel image of longissimus muscles of control cows.

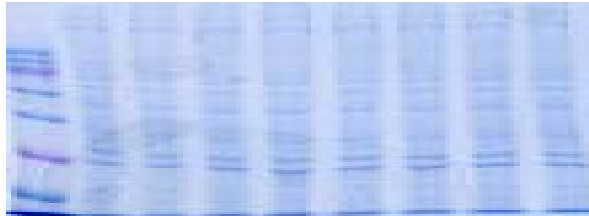


Figure 14. SDS-polyacrylamide gel image of longissimus muscles of cholecalciferol fed cows.



Figure 15. SDS-polyacrylamide gel image of longissimus muscles of anion diet cows.

## 2) 시험 결과

### 가) 배 최장근 내 $\mu$ -calpain, m-calpain 및 calpastatin mRNA 농도

Cholecalciferol 과 음이온 사료를 급여한 암소 노폐 한우의 배 최장근 내  $\mu$ -calpain mRNA 발현도는 대조구 에 비해 400 % 증가 ( $P < 0.01$ ) 하였으며 (Figure 16), m-calpain mRNA 발현도 역시 대조구 에 비해 cholecalciferol 과 음이온 사료를 급여 에 의해 각각 497% 및 300% 증가 ( $P < 0.05$ ) 되었다 (Figure 17). 그러나 그와 반대로 calpastatin mRNA 발현은 대조구 에 비해 cholecalciferol 과 음이온 사료를 급여 에 의해 각각 14.3% 및 29.3% 감소 ( $P < 0.01$ ) 되었다 (Figure 18). 상기 calpain 계 3종의 효소 들 의 mRNA 발현을 볼 때 calpain 은 cholecalciferol 과 음이온 사료를 급여 에 의해 그 발현도 가 증가 되는 반면, calpastatin은 역 으로 감소되는 성향을 보여주고 있다. 그러나 음이온 사료 급여에 의한 전 calapin계 효소 발현의 상승효과 는 볼 수 없다.

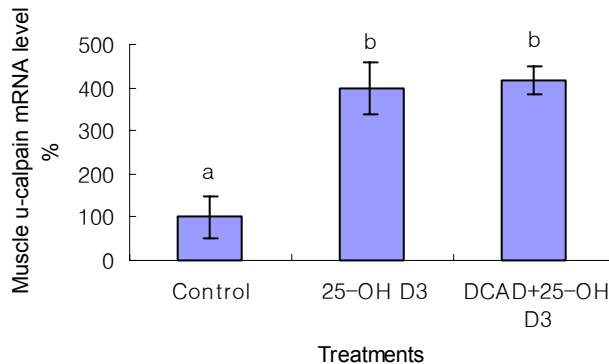


Figure 16. LM  $\mu$ -calpain mRNA levels in cull cows given control, cholecalciferol and anion diets. The data are expressed as a percentage of the value observed in the control. Each bar was normalized by the quantity of cyclophilin detected in the same tissue. The bar graph represents the mean  $\pm$ SEM of 8 cows. Bars that do not have a common letter differ ( $P < 0.01$ ).

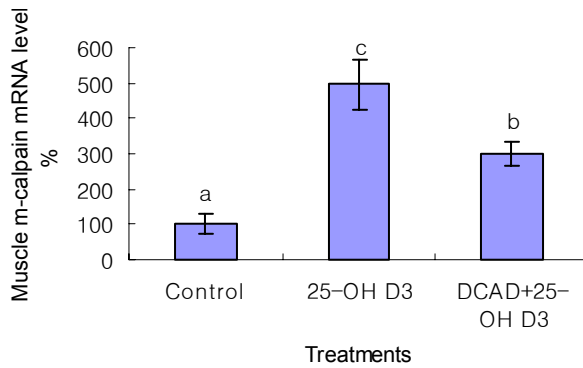


Figure 17. LM m-calpain mRNA levels in cull cows fed on control, cholecalciferol and anion diets. The data are expressed as a percentage of the value observed in the control. Each bar was normalized by the quantity of cyclophilin obtained from the same tissue. The bar graph represents the mean  $\pm$ SEM of 8 cows. Bars that do not have a common letter differ ( $P < 0.05$ )

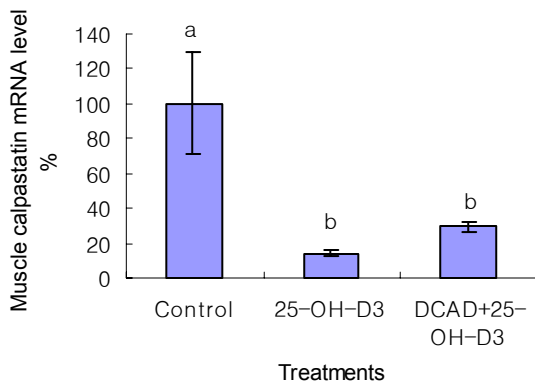


Figure 18. LM calpastatin mRNA levels in cull cows fed on control, cholecalciferol and anion diets. The data are expressed as a percentage of the value observed in the control. Each bar was normalized by the quantity of cyclophilin obtained from the same tissue. The bar graph represents the mean  $\pm$ SEM of 8 cows. Bars that do not have a common letter differ ( $P < 0.01$ ).

나) 배 최장근 내  $\mu$ -calpain, m-calpain 및 calpastatin 단백질 농도

Cholecalciferol 과 음이온 사료를 급여한 암소 노폐 한우의 배 최장근 내  $\mu$ -calpain, m-calpain 및 calpastatin 단백질 농도는 Figure 19, 20 및 21 에 서와 같다. 전 처리간 에 m-calpain 과 calpastatin 단백질 농도 에는 차이가 없 었으나, 음이온 급여 시 대조 구에 비해  $\mu$ -calpain 단백질 농도는 유의적 ( $P < 0.05$ ) 으로 증가되었다. 일반적으로 골격근육 휴식 시 유리칼슘 농도는 0.05-0.10  $\mu\text{M}$  이고, 운동 시 농도는 200-1,000  $\mu\text{M}$  이며,  $\mu$ -calpain 과 m-calpain 의 1/2 최대 활성을 위한 유리칼슘 농도는 각각 3-5  $\mu\text{M}$  및 200-1,000  $\mu\text{M}$  이 므로, Figure 16에서 보여준 음이온 사료 급여 시 400% 증가 발현된  $\mu$ -calpain mRNA 에 의해  $\mu$ -calpain 단백질 이 40% 증가 된 것은 실제로 가능 한 일 이라 생각 된다. 또한 Table 8에서 보여 준바와 같이 음이온사료 급여에 의해 형성된 체액의 산성화 에 의해 근육 내  $\mu$ -calpain 단백질 이 분해가 더디게 진행 (Maddock 등, 2005) 된 결과 일수 도 있다. 그러나 기존 에 발표 된 보고 들 (Swanek 등, 1999; Montgomery 등, 2002) 과 반대되게, 전반적으로 calpain 계 효소의 농도가 cholecalciferol, 또는 음이온사료 급여 시 오히려 증가 되었는데 이는 기존의 보고 된 시험 들은 도축 후 24 시간 이후 즉 근 내 유리칼슘 의 농 도 가 상승되고 이에 의해 calpain 계 효소들의 분해가 매우 활발히 진행된 후 측정된 반면, 본 시험 에서는 도축 직후 시료를 채취하여 측정했기 때문 이라 생 각 된다. 본 시험 에서와 유사한 방법으로 시험한 Berry 와 Mecjknng-Gill (1999) 은 백혈 암 세포에서 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 투여시  $\mu$ -calpain 단백질 농도가 증 가됨을 보고하고 있다.

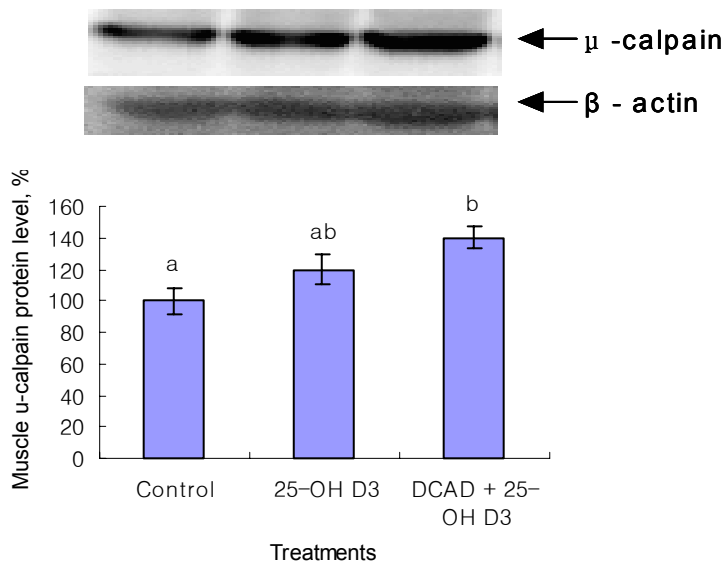


Figure 19. Western blot analysis of LM  $\mu$ -calpain protein levels in cull cows fed on control, cholecalciferol and anion diets. The data are expressed as a percentage of the value observed in the control. Each bar was normalized by the quantity of  $\beta$ -actin obtained from the same tissue. The bar graph represents the mean  $\pm$ SEM of 8 cows. Bars that do not have a common letter differ ( $P < 0.05$ ).

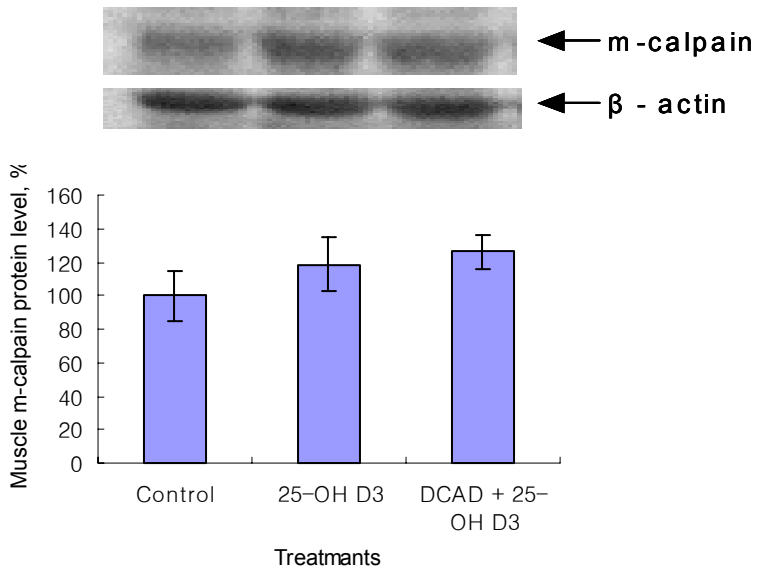


Figure 20. Western blot analysis of LMm-calpain protein levels in cull cows fed on control, cholecalciferol and anion diets. The data are expressed as a percentage of the value observed in the control. Each bar was normalized by the quantity of  $\beta$ -actin obtained from the same tissue. The bar graph represents the mean  $\pm$ SEM of 8 cows.

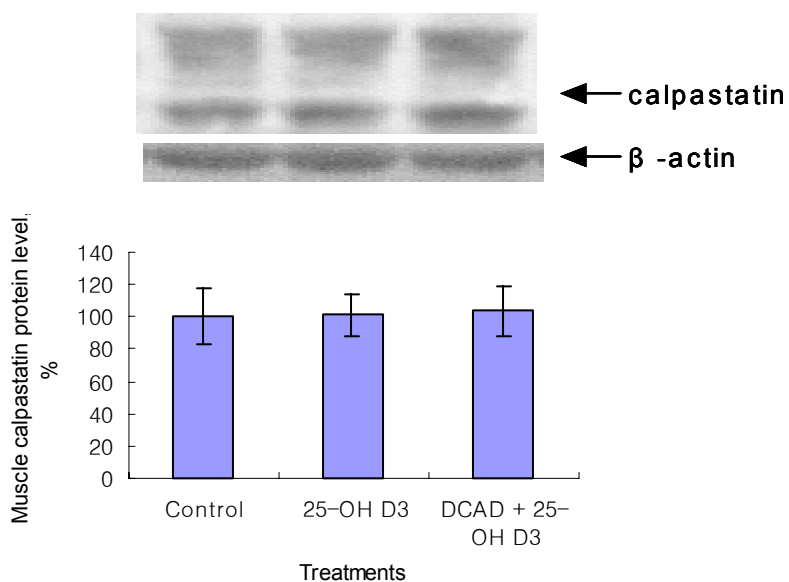


Figure 21. Western blot analysis of LM calpastatin protein levels in cull cows fed on control, cholecalciferol and anion diets. The data are expressed as a percentage of the value observed in the control. Each bar was normalized by the quantity of  $\beta$ -actin obtained from the same tissue. The bar graph represents the mean  $\pm$ SEM of 8 cows.

## 제 4 장      목표달성도 및 관련분야에 의 기여도

본 cholecalciferol 과 칼슘대사 조절 프로그램 기술로 사양한 한우 노폐우의 연도 및 조직 감 향상으로 인해 성숙도 증가로 인한 도체등급 하락을 보상 받을 수 있었으며, 한우 종빈우 의 육종번식 기간 연장으로 송아지 생산비를 현격히 감소시킬 수 있을 것 이다. 또한 한편으로 산업적으로는 보다 안정적 인 한우 종빈우 두수를 확보함으로써 한우 가격 및 쇠고기 가격을 안정화 시킬수 있다. 이렇게 함으로서 국내 쇠고기 수요 공급 불안정으로 인한 농민 의 불만 및 파생되는 무역 마찰 등의 소지를 예방할 수 있을 것 이다.

Cholecalciferol 과 칼슘 대사 조절 에 의한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선을 위한 작용 기작 규명 시험 에서는 근육 및 각 장기 의 칼슘 및 cholecalciferol 대사물 을 분석 한 결과 인체 에 유해 한 수준의 비타민 D<sub>3</sub> 및 그 대사물 이 축적 되지 않음 이 증명 되어, 본 사양 시험프로그램 에 의해 사양 되어진 한우암소 우육은 소비자 들 에게 매우 안전함 이 증명 되었다. 또한 근내 calpain 및 calpastatin mRNA 발현을 및 단백질 량을 조사해 본 결과 상기 사양 프로그램에 의한 연도 향상 가능성은 음이온 투여 에 의해 체내 생리적 대사가 호산성화 되고 이에 의한 cholecalciferol의 상승효과 가 나타나, 도살직전 골격근내 u-calpain mRNA 량이 증가되고 반면에 calpastatin mRNA 량 감소 에 의한 것으로 그 작용기작 을 밝혔다.

또한 한우 뿐만아니라 법적으로 육우로 분류되고있는 노폐 홀스타인 암소에 도 이 프로그램을 이용하므로써 한우에서와 동일한 개선 효과를 이룰 수 있으리라 예측된다. 본 실험 에서 정립 된 근육내 calpastatin 및 calpain mRNA와 연도 과의 상관관계 측정 기술을 통해 분자생물학적 수준에서 근육내 cholecalciferol 대사물의 작용 기작을 규명 하므로써 추후 고급육 생산의 기초 자료로도 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 본시험에서 증명 된 원리를 이용하여 타 축종(예; 가금류, 돼지) 에 도 응용하여 양질의 동물성 식품을 생산하는데 기여 할 수 있으리라 생각된다.



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- ◆ 현재 규명된 Cholecalciferol 급여 수준 보다 더 세분화된 급여 방법, 수준 및 급여기간의 시험 완료 후,
  - ⇒ 축산 연구소의 영농기술 상담 창구를 이용하여 한우 농가에 기술보급 실시
  - ⇒ 전북익산 죽림농장을 시범농가로 하여 각 한우 농가 및 농촌진흥청, 각 시, 군 농업기술센터를 통한 Cholecalciferol 과 칼슘 대사 조절 에 의한 한우 암소 노폐우육 연도 향상 기술 보급 및 방법 지도
  - ⇒ 선도 Cholecalciferol 과 칼슘 대사 조절 사료생산 업체로 광주광역시 축산농협 목포배합사료공장을 지정 하여 cholecalciferol 및 음이온 첨가 비육 후기 배합사료 생산 판매 유도 후 국내 전 배합사료공장에 기술 무상 이전을 추진 할 계획이며,
- ◆ 현재 까지 밝혀진 Cholecalciferol 과 칼슘 대사 조절 에 의한 한우 암소 노폐우 의 육질 개선 작용 기작을 근거로,
  - ⇒ Cholecalciferol 과 칼슘 대사 조절 급여 방법과 한우에 대한 국제적 공인을 받기 위한 수단의 일환으로 SCI 급 논문에 투고 게재
  - ⇒ 국내 외 세미나 등을 통한 Cholecalciferol 과 칼슘 대사 조절 작용원리 강연을 통한 타 연구자들의 추가 시험 유도 등이 되도록 활용할 계획이다.

## 제 6 장 참고문헌

1. AOAC. 1966. Official Methods of Analysis. 16th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA
2. Berry, D. M., and K. A. Meckling-Gill. 1999. Vitamin D analogs, 20-epi-22oxa-24a,26a,27a,-trihomo-1a,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>, 1,24(OH)<sub>2</sub>-22ene-24cyclopropyl-vitamin D<sub>3</sub> and 1a,25(OH)<sub>2</sub>-lumisterol 3 prime NB4 leukemia Cells for monocytic differentiation via nongenomic signaling pathways, involving calcium and calpain. Endocrinology. 140:4779-4788.
3. Block E. 1994. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. J. Dairy Science. 77:1437-1450.
4. Chomezynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.
5. Foote, M. R., R. L. Horst, E. J. Huff-Lonergan, A. H. Trenkle, F. C. Parrish, Jr., and D. C. Beitz. 2004. The use of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites to improve beef tenderness. J. Anim. Sci. 82:242-249.
6. Gaynor, P. J., F. J. Mueller, J. K. Miller, N. Ramsey, J. P. Goff, and R. L. Host. 1989. Parturient hypocalcemia in Jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios. J. Dairy Sci. 72:2525-2531.
7. Hollis, B. W., J. Q. Kamerud, S. R. Selvaag, J. D. Lorenz, and J. L. Napoli. 1993. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an <sup>125</sup>I-labeled tracer. Clin. Chem. 39:529-533.

8. Horst, R. L. and E. T. Littledike. 1979. Assay for vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> in plasma of dairy cows: Changes after massive dosing of vitamin D<sub>3</sub>. *J. Dairy Sci.* 62:1764-1751.
9. Horst, R. L., E. T. Littledike, J. L. Riley, and J. L. Napoli. 1981. Quantification of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals. *Anal. Biochem.* 116:189-203.
10. Horst, R. L. and T. A. Reinhardt. 1983. Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the periparturient cow. *J. Dairy Sci.* 66:661-669.
11. Hwang, I. H., B. Y. Park, S. H. Cho, and J. M. Lee. 2004. Effects of muscle shorting and proteolysis on Warner-Bratzler shear force in beef longissimus and semitendinosus. *Meat Sci.* 68:497-505.
12. Kim, Y. K., H. Choi and K. H. Myung. 2005. Effects of propylene glycol on carcass traits and its related gene expression in Korean native steers. *J. Anim. Sci.* 83:344-349.
13. KMAF. 2002. Korean Feeding Standard for Korean Cattle (Hanwoo). Korean Ministry of Agriculture and Forestry, Seoul, Korea.
14. KMAF. 2003. Korea Animal Products Grading System for Beef Carcasses. Korean Ministry of Agriculture and Forestry, Seoul, Korea.
15. Koohmaraie, M. 1992. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. *Proc. Recip. Meat Conf.* 45:63-71.
16. Maddock, K. R., E. Huff-Lonergan, L. J. Rowe, and S. M. Lonergan. 2005. Effect of pH and ionic strength on  $\mu$ - and m-calpain inhibition by calpastatin. *J. Anim. Sci.* 83:1370-1376.

17. Montgomery, J. L., M. A. Carr, C. R. Kerth, G. G. Hilton, B. P. Price, M. L. Galyean, R. L. Horst, and M. F. Miller. 2002 Effect of vitamin D3 supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. *J. Anim. Sci.* 80:971-981.
18. Montgomery, J.L., F. C. Parrish, Jr., D. C. Beitz, R. L. Horst, E. J. Huff-Lonergran and A. H. Trenkel. 2000. The use of vitamin D3 to improve beef tenderness. *J. Anim. Sci.*78:2615-2621.
19. NLRI. 2004. Research guidelines for cookery, sensory evaluation and tenderness measurements of fresh meat. National Livestock Research Institute, Suwon, Gyunggi, Korea.
20. NRC. 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
21. Parr, T., R. G. Bardsley, R. S. Gilmore and P. J. Buttery. 1992. Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by  $\beta$ -adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle. *Enur. J. Biochem.* 208: 333-339.
22. Platter, W. J., J. D. Tatum, K. E. Belk, P. L. Chapman, J. A. Scanga, and G. C. Smith. 2003. Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef strip loin steaks. *J. Anim. Sci.* 81:2741-2750.
23. Roche, J. R., D. Dalley, P. Moate, C. Grainger, M. Rath, and F. O'Mara. 2003. Dietary cation-anion difference and the health and production of pasture-fed dairy cows. 1. Dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:970-978.
24. Swanek, S. S., J. B. Morgan, F. N. Owens, D. R. Gill, C. A. Strasia, H. G. Dolezal and F. K. Ray. 1999. Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.* 77:874-881.

25. Tourey, R., S. Stelly, E. Biosonneau, M. Convertand Y. Dupuis. 1990. Relationship between vitamin D status and desposition of bound calcium in skeletal muscle of the rat. *Biol. Cell.* 69:179-189.
26. Van Soest, P. J., H. B. Robertson, and B. A. lewis. 1991. Method of dietary fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal material. *J. Dairy. Si.* 74:3583-3597.
27. Wertz, A. E., T. J. Knight, A. Trenkle, R. Sonon, R. L. Horst, E. J. Huff-Lonergan, and D. C. Beitz. 2004. Feeding 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> to improve beef tenderness. *J. Anim. Sci.* 82:1410-1418.
28. Wheeler, T. L., S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie. 2000. Relationship of beef longissimus tenderness classes to tenderness of gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *J. Anim. Sci.* 78:2856-286.
29. 농림부. 2003. 축산물등급판정세부기준.
30. 농림부, 전남대학교 .2000. 한우 고급육 생산을 위한 calpain proteolytic system 조절기술 개발.
31. 이창우, 최재관, 전기준, 나기준, 이채영, 황정미, 이종복. 2003. 한우 암소의 성장곡선 모수에 영향을 미치는 요인. *동물자원지.* 45:711-724.

## 주 의

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