

Cr-methionine chelate의 제품화 기술개발 및
사료내 첨가가 주요 경제동물에서의 생산성
및 축산물 품질에 미치는 영향

Development of both plant-scale production and
animal application technologies of Cr-methionine
chelate as feed supplement to enhance animal
productivity and products quality.

강 원 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Cr-methionine chelate의 제품화 기술개발 및 사료내 첨가가 주요 경제 동물에서의 생산성 및 축산물 품질에 미치는 영향” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 15 일

주관연구기관명 : 강 원 대 학 교

총괄연구책임자 : 오 상 집

세부연구책임자 : 오 상 집

연 구 원 : 이 준 엽

연 구 원 : 박 정 금

연 구 원 : 김 상 진

연 구 원 : 양 현 석

연 구 원 : 유 영 범

연 구 원 : 최 지 영

요 약 문

I. 제 목

Cr-methionine chelate의 제품화 기술개발 및 사료내 첨가가 주요 경제동물에서의 생산성 및 축산물 품질에 미치는 영향

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

Cr-methionine chelate의 산업적 제품화 기술을 확립하고 이를 다양한 가축에 급여하여 저지방, 저 콜레스테롤 고급육 생산, 가축 항병력 증진, 가축의 생산성을 향상시킬수 있는 활용기술을 개발하고 이의 이용방법을 조사한다.

2. 연구개발의 필요성

광물질 영양에 있어서 그 광물질이 갖는 체내 이용성은 대단히 중요하다(Ashmead, 1993). 지금까지는 가축을 위한 광물질 보충시 잘 정제된 무기태 광물질을 급여함으로써 충당되었으나, 이들은 소장에서의 흡수율이 대부분 20% 미만으로 매우 낮아 비효율적이다(Kratzer and Vohra, 1986).

특히 무기태 Cr의 경우 그 이용성이 낮아 체외로 다량 배설될 경우에는 환경오염원으로도 작용하게 된다. 따라서 이러한 무기태 광물질의 생체내 이용성을 높이기 위해서는 유기태화 하는 것이 효과적이다.

최근들어 가축의 생산과정에서 생산성과 번식률이 개선되다보니 가축의 체형은 대형화된 반면 축산물의 경우 지방함량이 낮은 축산물에 대한 선호도가 증가하면서 Cr과 같은 광물질 요구량은 더욱 높아지고 있다.

크롬(Chromium, Cr)은 glucose tolerance factor(GTF)의 구성성분으로 중요하며, GTF는 세포내로 glucose 진입을 촉진하는 insulin의 작용에 활력을 더해주는 마치 호르몬과 같은 역할을 하는 물질이다. 따라서 insulin에 대한 영향으로 인하여 탄수화물, 지방, 단백질 대사에 중요한 역할을 하여(Anderson, 1987, Mertz, 1993; Evans and Bowman, 1992; Offenbacher 등, 1988; Ott and Kivipelto, 1999, Rosinski and Mertz, 1969, Steel, 1977; Vincent, 2001) 결과적으로 육질변화에 영향을 주는 주요 미량 광물질로 알려져 있다. Cr은 또한 핵단백질 합성(Weser 와 Koolman, 1969)과 RNA 합성(Okada 등, 1983)에도 영향을 미루어 축산물내 단백질 함량에도 영향을 미칠수 있는 것으로 평가되고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cr-methionine chelate제품의 pilot plant수준의 생산기술 개발 ○ 돼지의 성장능력에 미치는 영향 평가 ○ 이유자돈에서의 면역반응 평가시험 ○ 돈육의 육질변화에 미치는 영향
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cr-methionine chelate 체내지방 대사조절 기능 평가 ○ 다른 광물질 착염화물과의 길항또는 교호작용 평가 ○ Cr-methionine chelate의 급여가 육계의 생산성과 계육의 품질개선 여부평가 ○ 산란계의 생산성과 계란의 품질 개선여부 평가
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젖소사료에 Cr-methionine에 의한 유생산 능력에 미치는 영향 평가 ○ Cr-methionine급여에 의한 우유성분 및 품질평가 ○ Cr-methionine의 일반적 체중 및 식이조절 능력평가
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cr-methionine의 제품화 기술확립 ○ Cr-methionine의 주요축종별 활용기술 개발 ○ Cr-methionine chelate의 활용에 의한 기능성 고품위 축산물의 생산 성공

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1. Cr-methionine의 산업적 제조기술 및 제품화 기술

Cr-methionine 의 산업화 제조기술을 위해 실험실 조건에서 찾아낸 pH 조절을 위하여 사용된 0.01M NaOH 용액과 0.09M NaOH 두가지를 이용하는 대신 산업 현장에서는 제조단가를 낮추며 실용성을 위하여 50% NaOH를 적용하여 pH 조절을 하였으며, 최적의 조건은 pH 7~8을 유지하는 것이 가장 높은 수율의 Cr-methionine 화합물을 얻을 수 있다.

Cr-methionine 화합물의 원재료인 Cr의 함량은 약 10%에 해당되므로 이를 가축 사료첨가제로 상용화하기 위해서는 부형제를 첨가하여 제품 1kg 당 Cr 함량 100ppm이상, 400ppm이상, 500ppm이상으로 제조된 3종류의 크롬-메치오닌 제품을 시판하고 있다.

2. 크롬의 급원별 첨가가 이유자돈의 혈액성상, 면역반응 및 지방세포크기에 미치는 영향

혈액성상은 Cholestrol, Creatin, Triglyceride, Ca 및 BUN 등은 처리구간의 아무런 차이를 나타내지 않았으나, Total protein, Glucose, ALP 등은 Cr-methionine (CrMET) 200ppb를 급여한 구가 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다. 말초혈액내 면역세포의 분포비율 평가에서 CD4, CD4CD8, B cell 그리고 Mo/Gr은 처리간의 차이를 보이지 않았으나 세포 독성 세포인 CD8은 무기태 크롬 처리구인 CrCl3에서 가장 높은 분포율을 보였고, 유기태 크롬 Cr-methionine 100ppb 처리구가 대조구보다 증가한 것으로 나타났다(P<0.05). 외부물질 침입시 비특이적으로 작용하는 neutrophil의 활성은 유기태 Cr 처리구들이 무기태 Cr 처리구보다 증가한 것으로 나타났다(P<0.05). 외부 항원인 mitogen에 대한 세포증식능에서는 LPS에 대한 B세포의 반응은 처리간 아무런 차이가 없었으나, ConA에 대한 T 세포에 대해서는 Cr-methionine 100ppb 첨가구가 다른 모든 처리구보다 증가하였다. 이상의 결과로 Cr-methionine 급여가 자돈

의 혈청내 지질대사 개선에 미치는 효과는 확실하게 규명하지 못하였으나, 면역반응은 비특이적 반응의 증가와 면역세포의 활성화를 통하여 개선될 수 있을 것으로 판단된다.

3. 크롬의 급원별 급여가 육성비육돈의 성장단계별 소화율, 혈액성상과 도체품질에 미치는 영향

성장단계별 영양소 소화율은 20~50kg에는 처리구간 차이가 없었으며, 50~90kg 과 90~105kg에는 CrCl3 200ppb를 급여한 처리구에서 단백질과 에너지 소화율이 증가하였다($p<0.05$). 성장단계별 분 중 광물질 함량은 90~110kg에서 CrMet 200ppb 첨가구에서 분 중 Cr의 함량이 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). 20~50kg에서 triglyceride의 농도는 CrPic 200ppb 처리구에서 가장 낮았다($p<0.05$). 나머지 혈액성상에서는 처리구간 차이가 없었다. 50~90kg에서 CrMet 100ppb 첨가구의 cholesterol 함량이 CrPic 200ppb 와 CrMet 200ppb 첨가구에 비하여 증가하였다($p<0.05$). 90~105kg에서는 CrPic 200ppb 첨가구의 cholesterol 함량이 대조구보다 증가하였으나 다른 크롬 첨가구와 차이가 없었다. 도체품질은 처리구간 아무런 차이가 없었다. 하지만 살코기 함량이 CrMet 첨가구에서 대조구보다 개선된 경향을 나타내었으며 등지방두께도 CrMet 첨가구에서 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 크롬의 형태에 의한 소화율과 혈액성상은 성장단계별로 상이한 결과를 보여주었으나 도체품질에서는 Chromium methionine의 첨가로 지방의 함량은 줄이고 살코기 함량은 증가시킬수 있을 것으로 판단되었다.

4. 크롬과 구리의 형태별 병용급여가 육성돈의 육성성적, 소화율 및 분의 광물질 배출량에 미치는 영향

Chromium 및 copper의 형태별 병용급여가 육성돈의 육성성적, 영양소 소화율, 분내 광물질 배출량에 미치는 영향을 비교 평가한 결과는 다음과 같다. 유기태 또는 무기태 크롬과 구리의 병용급여는 일당증체량, 일당사료섭취량, 사료효율에 아무런 영향이 없었다. 유기태 크롬과 무기태 구리의 병용 첨가구에서 영양소 소화율이 가장 낮았다($p<0.05$). 광물질 종류(크롬과 구리)는 영양소 소화율에 아무런 영향이 없었으며, 광물질 형태의 차이는 조회분을 제외한 영양소들의 소화율에 영향하였다. 또한 조지

방을 제외한 영양소 소화율에서 광물질 종류와 형태 사이의 상호작용이 인정되었다 ($p < 0.05$). 분내 광물질 중 Zn 함량이 무기태 Cr과 무기태 Cu 병용첨가구에서 가장 높았으며 무기태 크롬과 유기태 구리 병용 첨가구에서 가장 낮았다($p < 0.05$). 다른 광물질들의 분내배설량에는 아무런 차이가 없었다. 이상의 결과로 미루어 보아 유기태 또는 무기태 크롬과 구리의 병용첨가는 영양소 소화율에서 교호 및 길항작용 효과가 있는 것으로 판단되어지며, 특히 Zn의 분내 배설량이 Cr과 Cu의 적절한 조합에 의해 감소될 수 있음을 시사하였다. 따라서 토양에 축적되어 환경오염을 일으킬 수 있는 광물질들의 배설량이 다른 광물질들의 종류와 형태에 따라 감소될 수 있을 것으로 판단된다..

5. 크롬의 급원별 첨가가 육계의 성장능력, 영양소 이용율, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향

본 연구는 Chromium을 시판되고 있는 Chromium 급여제와 Methionine을 chelation한 크롬을 사료에 첨가하여 육계의 성장능력, 영양소 이용률, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향을 비교 평가하고자 실시하였다. 실험결과 육성성적은 Cr-Met 400ppb 첨가구의 사료 이용률이 Cr-Pic 200ppb첨가구보다 개선되었다($p < 0.05$). Cr-Met 400ppb첨가는 Cr-Pic 200ppb 처리구에 비하여 건물 이용율을 증가시켰으며, 조회분 이용률도 Cr-Met첨가구들이 Cr-Pic 200ppb첨가구보다 증가하였다($p < 0.05$). 면역 장기의 무게에서는 Cr-Met 200ppb 처리구에서 흉선의 무게가 다른 처리구에 비하여 증가하였다($p < 0.05$). 체액성 면역반응에서는 혈청내 anti-LPS 항체는 대조구와 Cr-Pic 200ppb 처리구를 제외한 모든 처리구에서 증가하였다($p < 0.05$). 혈액성상은 triglyceride의 함량이 LPS 접종유무로 커다란 차이를 나타내었으며, cholesterol은 LPS접종시 처리구간 아무런 차이가 없었으나 LPS를 접종하지 않았을 때 Cr-Met 400ppb첨가구에서 가장 낮은 결과를 나타내었다. 이상의 실험결과로 미루어 Cr-Methionine의 첨가는 성장 능력 개선과 영양소 이용 효율 증가, 면역반응에 개선 효과가 있는 것으로 판단된다.

6. 크롬의 급원별 첨가가 산란계의 성장능력, 영양소 이용율과 난특성에 미치는 영향

본 연구는 Chromium을 시판되고 있는 Chromium 급여제와 Methionine을 chelation한 크롬을 사료에 첨가하여 산란계의 성장능력, 영양소 이용율과 난특성에 미치는 영향을 비교 평가하고자 실시하였다. 실험결과 산란율은 4~6주 실험기간에 처리구가 대조구보다 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 그러나 전체 실험기간인 8주동안은 chromium chloride 200ppb와 chromium methionine 800ppb처리구가 대조구보다 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). Feed/egg는 2~4주 실험기간에 chromium methionine 800ppb 처리구가 대조구보다 증가하였다($p<0.05$). 이상의 실험결과로 미루어 Cr-Methionine의 첨가는 성장 능력 개선의 개선 효과가 있는 것으로 판단된다.

7. Cr-Met chelate의 급여가 고탄수화물 식이급여 흰쥐의 육성성적, 지방조직 무게, 혈청내 지질함량 및 leptin mRNA발현에 미치는 영향

일당사료섭취량과 사료요구율(F/G)은 고탄수화물 급여구 전체가 정상사료 급여구보다 유의적으로 감소하였다. 전체 에너지 섭취량에서는 처리구간 아무런 차이가 없었으나 탄수화물 에너지 섭취량은 고탄수화물 급여구가 정상급여구보다 증가하였다($p<0.05$). Cr은 형태, 급여수준 그리고 물성적 특징에 따라 체내 대사과정에서 insulin과 관련 호르몬의 활성화에 미치는 영향이 다르게 나타난다(Machalinski et al., 2006). 본 실험에서도 Cr-Met chelate와 CrCl₃의 insulin에 대한 효과는 다르게 나타난 것으로 판단된다. 또한 Ohh et al.(2003)도 Cr-Met chelate를 수준별로 급여시 흰쥐에서 insulin의 함량에는 아무런 영향이 없었다고 보고함으로써 우리 연구결과와 일치하였다.

8. Cr-Met chelate의 급여가 고지방 식이유도 비만쥐의 육성성적, 비만지수, 지방조직 함량, 혈청내 지질함량 그리고 leptin mRNA발현에 미치는 영향

고지방 식이 유도 비만쥐의 육성성적에 미치는 Cr-Met chelate의 영향을 알아보기 위하여 먼저 8주간 Cr이 전혀 첨가되어 있지 않은 고지방 사료를 급여하여 비만을 유도하였다. 8주후 정상식이를 급여한 구와 체중을 비교한 결과 유의적인 체중의 차이를 확인하였으며 비만지수를 계산하여 비만이 유도되었음을 확인하였다. 사료요구

율은 고지방 CrCl₃ 300ppb 급여구에서 가장 낮았다. 고지방 식이급여구들간의 육성성적을 살펴보면 Cr-Met chelate 300ppb급여구에서 일당사료섭취량이 가장 높았으며 일당증체량은 가장 낮았다. 하지만 사료요구율은 Cr이 첨가되어 있지 않은 고지방 급여구와 차이가 없었으나 Cr-Met chelate 150ppb와 CrCl₃ 300ppb 급여구보다 높았다. 고지방 급여구들에서 Cr-Met chelate급여구가 Cr을 첨가하지 않은 고지방 급여구보다 LEE index, TM index, body fat에서 유의적으로 감소하였으며 CrCl₃ 300ppb급여구는 Cr을 첨가하지 않은 고지방 급여구와 차이가 없었다. 복강지방의 무게는 고지방 식이 급여구들 사이에서 Cr-Met chelate 150ppb급여구에서 가장 낮은 결과를 보여주었다. 무기태 Cr첨가구인 CrCl₃ 300ppb급여구는 Cr을 첨가하지 않은 고지방 식이 급여구와 아무런 차이가 없었다. 따라서 CrCl₃의 급여수준보다 절반의 함량만으로도 복강지방의 감소를 가져오는 것으로 보아 본 연구진이 사용한 Cr-Met chelate의 흡수율과 이용성이 더 우수한 것으로 판단된다. 본 실험에서는 지방분해와 관련된 mRNA를 분석하지 않아 정확한 원인을 평가하기는 어려우나 leptin mRNA의 발현양에도 차이가 없었던 점으로 미루어 insulin보다는 지방분해(lipolysis)에 의한 leptin의 감소가 이루어 졌을 것으로 판단된다.

9. Cr-Met chelate의 급여가 착유우의 유생산 및 유성분에 미치는 영향

유생산은 Cr급여구가 대조구보다 유의적으로 증가하였으며 CrCl₃ 400ppb급여구에서 가장 높은 결과를 보여주었다. 일일 유지방 생산량은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 높은 결과를 나타내었다. 반면 유단백질은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 낮았으나 일일 유단백 생산량은 처리구간 차이가 없었다. 유지보정 유생산은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 높았다. 본 실험에서 사용된 Cr-Met chelate의 유성분에 대한 급여효과는 Cr을 첨가하지 않은 대조구보다 증가하는 경향을 보여주었으나 통계적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Hayirli et al.(2001)가 Cr-Met chelate를 수준별로 착유우에 급여한 결과 급여 수준간 아무런 차이가 없었다는 결과와 일치하였다. HDL콜레스테롤은 Cr첨가구들이 대조구보다 감소한 것으로 나타났다. 유량은 Cr-Met chelate급여구의 경우 4개월간 차이가 없었으며 CrCl₃급여구는 다소 증가하였다. FCM의 경우 Cr을 첨가하지 않은 대조구에서는 시간이 지남에 따라 다소 감소하는 경향이었으나 Cr-Met chelate급여구의 경우 400ppb에서는 차이가 없었으며 200ppb에서는 다소 감소하였다. CrCl₃에서는 다소 증가하였으나 큰 차이를 보이지 않았다.

10. Cr-Met chelate의 급여가 trans지방 함유 식품 급여 흰쥐의 성장능력, 지방조직 무게 그리고 혈청 지질 함량에 미치는 영향

처리구간 일당사료섭취량, 일당증체량 그리고 사료요구율에서 아무런 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 본 실험의 기간이 비교적 짧았기 때문인 것으로 판단된다. 기존의 연구결과를 바탕으로 Cr의 대사적 작용시점은 단기간 급여시 보다 장기간 급여시 효과가 있는 것으로 나타났기 때문이다. 또한 Cr-Met chelate의 급여가 trans 지방산 급여 흰쥐의 지방조직 무게에서도 아무런 영향이 없었다. 하지만 trans지방산 급여구의 지방무게가 대조구보다 다소 높은 결과를 보여주었다. Cr-Met chelate급여는 corn oil 급여구에서 혈청내 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시켰으나 trans지방 급여구에서는 아무런 영향이 없었다. 하지만 trans지방과 Cr-Met chelate첨가구에서 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 함량이 가장 높았다($p < 0.05$). 본 시험에서의 총 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤 함량의 유의적인 증가는 지방의 급원이 달랐기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 trans지방과 Cr-Met chelate의 상관관계에 대한 보다 면밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

2. 활용에 대한 건의

1. 연구성과 활용실적

- 개발된 Cr-methionine chelate는 (주)이노바이오에서 생산되어 판매중에 있으며 고급육 생산을 위한 첨가제로서 유용하게 사용되고 있다.
- 지금까지의 연구결과는 국내학회(3편) 국제학회(1편), 국제학술지(1편)를 발표하였다.

2. 연구성과 활용계획

- 고급육 생산목적 또는 저지방 축산물의 생산을 위한 기술적 자료로 활용
- 비만 제어 가능성 후보물질로서 활용가능성 극대화 예정
- 앞으로 국제학회(2편), 국내학회(2편), 국제학술지(2편), 국내 학술지(3편)를 발표 준비 또는 예정

SUMMARY

I. Title

Development of both plant-scale production and animal application technologies of Cr-methionine chelate as feed supplement to enhance animal productivity and products quality

II. Objective and Importance of Research

The objective of research was to develop novel technologies for plant-scale production and animal application of Cr-methionine chelate as feed supplement to enhance animal productivity and products quality. Chromium is an essential trace mineral in animal and human nutrition. Commercial inorganic minerals have been problematic since they have relatively lower bioavailability compared to the organic chromium. So far, several types of organic mineral have been developed and introduced in the market. Chromium methionine chelate is a newly developed organic mineral which is proposed to be highly available upon feeding to animal. But the correct assay method to evaluate its bioavailability in the livestock animals is not developed yet. Hence, this study is focused to investigate optimal reaction condition to maximize plant-scale production of Cr-methionine and to develop its application technology to animals.

Since the fat related-quality of animal products draws more attention consumes, fat deposition mechanism and its modulation technologies appeared as an important decisive factor for modern animal production. In this context, this research for chromium and its supplying form deserves a serious attention.

III. Contents and Scope of this Study

First year	<ul style="list-style-type: none">○ Development of pilot plant scale production technology of Cr-methionine chelate products.○ Evaluation of the product for swine growing performance.○ Immune response assay in weaning pigs.○ Effect on pork qualities.
Second year	<ul style="list-style-type: none">○ Evaluation of Cr-met on fat metabolism.○ Synergistic and antagonistic effect with other mineral chelate.○ Supplementation Cr-methionine chelate on broiler performance.○ Cr-methionine chelate on laying bird performance and egg quality.
Third year	<ul style="list-style-type: none">○ Dietary Cr-methionine supplementation on dairy cattle performance.○ Effect of Cr-met on milk composition and quality.○ Effect of Cr-met on body weight control and feeding regulation.
Final Evaluation	<ul style="list-style-type: none">○ Establishment of phase scale production technologies for feed Cr-met products.○ Development of Cr-met application technologies to industrial animals production technology development of value added animal products.

IV. Results of the Study and Suggestions for Practical Application.

1. Establishment of the new for Chromium-Methionine products.

This study was carried out to develop and establish the industry level technology to process high purity Cr-methionine product. Cr-methionine was manufactured by chelating chromium(III) with L-methionine ligand in aqueous

solution. Based on the elemental analysis and spectral studies, the resulting product is a complex containing 1:3 ratio of chromium to L-methionine. In the developed process in this study, pH was successfully controlled by 50% NaOH to reduce production cost. This technology also found the optimum pH (pH 7~8) for the maximum output.

Since Cr-methionine contained about 10% of Cr concentration in raw products, appropriate dilution ratio with carrier material is practically important for field animal application.

Accordingly, Cr-methionine products were on the market as Cramin 1⁺ (100ppm of Cr/kg), Cramin 400 (400ppm of Cr/kg) and Cramin 500 (500ppm of Cr/kg) for various application.

2. Effects of different sources of chromium on the serum traits, immune response and fat cell morphology in weaned pig.

This study was carried out to evaluate the effects of organic and inorganic sources of chromium on the serum traits and immune response in weaned pig. A total of 30 weaned pigs at about 22d of age, average weight 5.3 ± 1.2 kg were employed and designated by sources of dietary chromium as follows: no supplemental Cr, 200ppb CrCl₃, 200ppb Cr-picolinate, 200ppb Cr-methionine and 100ppb Cr-methionine supplementation into basal diet. Cr supplementation was not effective on regulation of serum cholesterol, creatin, triglyderide, Ca, and BUN. However, total protein, glucose and ALP was increased ($P < 0.05$) in pigs fed 200ppb Cr-methionine. Proportion of porcine leukocytes in peripheral blood was not affected in weaned pigs supplemented with Cr. *In vitro* immune response as measured by a chemiluminescence in peripheral blood was increased ($P < 0.05$) in pigs fed supplemental Cr from Cr-picolinate or Cr-methionine.

3. Effects of chromium sources on nutrients digestibility, serum traits and carcass quality in growing-finishing pigs.

This study was carried out to evaluate the effects of chromium sources on nutrients digestibility, serum traits and carcass quality in growing-finishing pigs. A total of 30 growing pigs, average weight 19kg were designated by sources of dietary chromium as follows: no supplemental Cr or 200ppb of supplemental Cr from either CrCl₃, Cr-picolinate or Cr-methionine or 100ppb of supplemental Cr from Cr-methionine supplementation into basal diet. The addition of Cr had no effect on nutrients digestibility in 20~50kg pig, but a supplementation of 200ppb CrCl₃ has increased ($P < 0.05$) the digestibility in 50~90kg and 90kg~105kg pigs. Blood triglyceride level was the lowest in 20~50kg pigs fed 200ppb Cr-picolinate.

However, cholesterol was increased ($P < 0.05$) in 50~90kg pigs fed 100ppb Cr-methionine compared to pigs fed 200ppb Cr-methionine and 200ppb Cr-picolinate. Lean percentage and backfat thickness of pork of pigs fed Cr-methionine supplemented diets was significantly ($P < 0.05$) lower than that of no-chromium control group. There were no significant differences in loin eye area and carcass percentage.

4. Effects of different sources of dietary chromium and copper on growth performances, nutrients digestibility, fecal mineral excretion of growing pig

This study was carried out to evaluate the effects of organic and inorganic sources of both chromium and copper on growth performances, nutrients digestibility, fecal mineral excretion of growing pig. A total of 36 growing pigs (Landrace x Yorkshire) x Duroc, average weight 61.2kg were allotted to 4 treatments with 3 replicates and 3 pigs per a replicate. 4 treatments were designated by sources of both dietary chromium and copper as follows: ①200ppb chromium

methionine and 200ppm copper methionine, ②200ppb chromium methionine and 200ppm copper sulfate, ③200ppb chromium chloride and 200ppm copper methionine, ④200ppb chromium chloride and 200ppm copper sulfate supplementation into basal diet. Sources of chromium and copper did not affect growth performances of pig. Nutrients digestibility was the lowest in chromium methionine and copper sulfatesupplemented diet, but the highest in chromium chloride and copper sulfate supplemented diet. Interestingly, fecal Zn excretion was the highest ($p<0.05$) by chromium chloride and copper sulfate supplementation but the lowest ($p<0.05$) by dietary chromium chloride and copper methionine supplementation. This study showed an interesting interaction among copper and chromium vs Zn according to the sources of copper and chromium.

5. Effects of different sources of dietary chromium on growth performances, nutrients utilizability, serum traits and immune response in broiler.

This study was carried out to evaluate the effect of different sources of chromium on growth performances, nutrients utilizability, serum traits and immune response in broiler chicken. Control and treatments were designated by dietary chromium levels as follows: Control treatment has no supplemental chromium into basal diet, whereas 4 treatments were designated by one of the following 200ppb chromium chloride (CC200), 200ppb chromium picolinate (CP200), 200ppb (CM200) and 400ppb chromium methionine (CM400) supplementation into basal diet. A feed efficiency was improved ($p<0.05$) by 400ppb chromium methionine supplementation. Both crude ash and dry matter utilizabilities were improved ($p<0.05$) by both 200 and 400 ppb chromium methionine supplementation. Anti-LPS antibody titer were increased ($p<0.05$) by 200ppb chromium chloride, 200 and 400 ppb chromium methionine supplementation. There was a big difference in serum triglyceride level between LPS injected and not injected broilers. Based on the result of this experiment, it can be concluded that dietary chromium methionine supplementation

was effective to improve growth performance, ash and DM utilizabilities and immune response in broiler.

6. Effect of different sources of dietary chromium on egg production, egg quality and feed conversion in laying hen

This study was carried out to evaluate the effects of different sources of chromium on laying hen performances and egg quality. Control and 5 treatments were designated by dietary chromium levels as follows: Control treatment has no supplemental chromium into basal diet, whereas 5 treatments were designated by one of the following: 200ppb chromium chloride (CC200), 200ppb chromium picolinate (CP200), 200ppb (CM200), 400ppb (CM400) and 800ppb (CM800) chromium methionine supplementation into basal diet. Egg production was improved ($p < 0.05$) by CC200, CM200 and CM400 supplementation compared to control treatment. Although there is a difference ($p < 0.05$) in feed intake during 2-6weeks but those were not different upon considering whole 8wks. Feed/egg was different ($p < 0.05$) by 800ppb chromium methionine supplementation only at 2-4weeks, but there is no such a difference upon considering whole experimental period. There was no characteristic difference in egg quality among difference in treatments. This study indicated that chromium methionine is effective for improving egg production in laying hen.

7. Effect of Cr-Met chelate on the growth performance, adipose tissue weight, serum lipid contents and leptin mRNA expression on the high carbohydrate diet fed rat.

Although there was no difference on the growth performances among treatments, both feed intake and feed/gain in rat fed high carbohydrate diets was

higher than those fed normal diets. Among high carbohydrate diet treatments, total calorie intake/gain and carbohydrate calorie intake/gain was lowest in Cr-Met chelate 300ppb supplemented group and highest in CrCl₃ supplemented group. There was no difference on the adipose tissue weight among all treatments. The serum leptin was highest in Cr-Met chelate 150ppb supplemented group with no differences in insulin content. Leptin mRNA expression in the adipose tissue was tended to be increased by Cr-Met chelate supplementation.

8. Effect of Cr-Met chelate on the growth performance, obesity indices, adipose tissue weight and leptin mRNA expression in obesity induced rat by high fat diet.

To investigate the effect of Cr-Met chelate on the growth performance, obesity indices, adipose tissue weight and leptin mRNA expression in high fat diet fed obese rat, Obesity was induced by feeding Cr-free high fat diet for 8 wks. Both ADFI and ADG in Cr-Met chelate 300ppb supplemented group was lower than those in other group ($p < 0.05$). Several obesity indices including Lee index, TM index and body fat were decreased by Cr-Met chelate supplementation with exception on rohler index. Adipose tissue weight showed variable results among treatment. Cr-Met chelate 300ppb supplementation increased HDL-cholesterol content in serum and HDL-cholesterol to total cholesterol ratio in this group was higher than those in other group. Although there was no difference on serum leptin content among treatments, Leptin content in the high fat diet fed group was higher than those in normal fat diet fed group. Cr supplementation did not affect leptin mRNA expression in adipose tissue.

9. Effect of Cr-Met chelate supplementation on milk yield, milk component, and serum IgG and lipid contents in lactating cow.

Milk yield in the CrCl₃ 400ppb supplemented group was higher than those in control group(no additional Cr supplementation). Although there was no difference on milk fat content(%) among treatments, daily milk fat production(kg/d) was highest in CrCl₃ 400ppb supplemented group. Solid-not-fat(%) was decreased by Cr-Met chelate 200ppb supplementation(p<0.05). FCM in CrCl₃ 400ppb supplemented group was higher than those in other groups(p<0.05). Cr-Met chelate supplementation did not affect milk fat, milk protein contents and FCM. HDL-cholesterol contents in serum was decreased by Cr-Met chelate and CrCl₃ supplementation. Monthly milk component data showed that milk protein was slightly decreased by CrCl₃ supplementation but increased by Cr-Met chelate 200ppb supplementation.

10. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the growth performance, adipose tissue weight and lipid contents in rats fed trans fat containing diet.

This study was carried out to investigate the effect of Cr-Met chelate on growth performances, adipose tissue weight and lipid contents in serum at rats fed two types of dietary fat according to by 2×2((Cr met, CrCl₃) × (regular fat, trans fat)) factorial design. There was no difference on feed intake, weight gain and feed/gain among treatments. Also, Different Cr source did not affect adipose tissue weight. In the corn oil diet fed rat, both total cholesterol and HDL-cholesterol was decreased(p<0.05) by Cr-Met chelate supplementation. Cholesterol contents in Cr-Met chelate supplemented group among trans fatty acid diet fed rat was lower than those in CrCl₃ supplemented group. The main effector for the significant

difference in total cholesterol and HDL-cholesterol contents was the type of dietary fat($p=0.006$).

CONTENTS(영 문 목 차)

Chapter 1. Purpose and Scope of the Study	23
Chapter 2. R&D and Technology status	24
Chapter 3. Experimentation and their results	27
Section 1. Establishment of the new for Chromium–Methionine products.	27
Section 2. Effects of different sources of chromium on the serum traits, immune response and fat cell morphology in weaned pig.	39
Section 3. Effects of chromium sources on nutrients digestibility, serum traits and carcass quality in growing–finishing pigs.	58
Section 4. Effects of different sources of dietary chromium and copper on growth performances, nutrients digestibility, fecal mineral excretion of growing pig.	70
Section 5. Effects of different sources of dietary chromium on growth performances, nutrients utilizability, serum traits and immune response in broiler.	82
Section 6. Effect of different sources of dietary chromium on egg production, egg quality and feed conversion in laying hen. ..	105
Section 7. Effect of Cr–Met chelate on the growth performance, adipose tissue weight, serum lipid contents and leptin mRNA expression on the high carbohydrate diet fed rat.	116
Section 8. Effect of Cr–Met chelate on the growth performance, obesity indices, adipose tissue weight and leptin mRNA expression in obesity induced rat by high fat diet.	127

Section 9. Effect of Cr-Met chelate supplementation on milk yield, milk component, and serum IgG and lipid contents in lactating cow.	138
Section 10. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the growth performance, adipose tissue weight and lipid contents in rats fed trans fat containing diet.	148
Chapter 4. Goal Accomplishment and ther Resulting Contributions.	155
Chapter 5. Application Plan of the Results.	158
Chapter 6. References.	159

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	27
1절 Cr-methionine의 산업적 제조기술 및 제품화 기술	27
2절 크롬의 급원별 첨가가 이유자돈의 혈액성상, 면역반응 및 지방세포크기에 미치는 영향	39
3절 크롬의 급원별 급여가 육성비육돈의 성장단계별 소화율, 혈액성상과 도체품질에 미치는 영향	58
4절 크롬과 구리의 형태별 병용급여가 육성돈의 육성성적, 소화율 및 분의 광물질 배출량에 미치는 영향	70
5절 크롬의 급원별 첨가가 육계의 성장능력, 영양소 이용율, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향	82
6절 크롬의 급원별 첨가가 산란계의 성장능력, 영양소 이용율과 난특성에 미치는 영향	105
7절 Cr-Met chelate의 급여가 고탄수화물 식이급여 흰쥐의 육성성적, 지방조직 무게, 혈청내 지질함량 및 leptin mRNA발현에 미치는 영향	116
8절 Cr-Met chelate의 급여가 고지방 식이유도 비만쥐의 육성성적, 비만지수, 지방조직 함량, 혈청내 지질함량 그리고 leptin mRNA 발현에 미치는 영향	127
9절 Cr-Met chelate의 급여가 착유우의 유생산 및 유성분에 미치는 영향	138
10절 Cr-Met chelate의 급여가 trans지방함유 식이급여 흰쥐의 성장능력, 지방조직 무게 그리고 혈청 지질 함량에 미치는 영향	148

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	155
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	158
제 6 장	참고문헌	159

제1장 연구 개발의 목적과 범위

1. 연구 개발의 목적

Cr-methionine chelate의 산업적 제품화 기술을 확립하고 이를 다양한 가축에 급여하여 저지방, 저 콜레스테롤 고급육 생산, 가축 항병력 증진, 가축의 생산성을 향상시킬수 있는 활용기술을 개발하고 이의 이용방법을 조사한다.

2. 연구 개발의 범위

1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cr-methionine chelate제품의 pilot plant수준의 생산기술 개발 ○ 돼지의 성장능력에 미치는 영향 평가 완료 ○ 이유자돈에서의 면역반응 평가시험 완료 ○ 돈육의 육질변화에 미치는 영향 완료
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cr-methionine chelate 체내지방 대사조절 기능 평가 ○ 다른 광물질 착염화물과의 길항또는 교호작용 평가 ○ Cr-methionine chelate의 급여가 육계의 생산성과 계육의 품질개선 여부평가 ○ 산란계의 생산성과 계란의 품질 개선여부 평가
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젖소사료에 Cr-methionine에 의한 유생산 능력에 미치는 영향 평가 ○ Cr-methionine급여에 의한 우유성분 및 품질평가 ○ Cr-methionine의 일반적 체중 및 식이조절 능력평가
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cr-methionine의 제품화 기술확립 ○ Cr-methionine의 주요축종별 활용기술 개발 ○ Cr-methionine chelate의 활용에 의한 기능성 고품위 축산물의 생산 성공

제2장 가축에 있어서 chromium의 영양과 국내외 관련 기술 현황

1. 연구의 필요성

광물질 영양에 있어서 그 광물질이 갖는 체내 이용성은 대단히 중요하다(Ashmead, 1993). 지금까지는 가축을 위한 광물질 보충시 잘 정제된 무기태 광물질을 급여함으로써 충당되었으나, 이들은 소장에서의 흡수율이 대부분 20% 미만으로 매우 낮아 비효율적이다(Kratzer and Vohra, 1986).

특히 무기태 Cr의 경우 그 이용성이 낮아 체외로 다량 배설될 경우에는 환경오염원으로도 작용하게 된다. 따라서 이러한 무기태 광물질의 생체내 이용성을 높이기 위해서는 유기태화 하는 것이 효과적이다.

최근들어 가축의 생산과정에서 생산성과 번식률이 개선되다보니 가축의 체형은 대형화된 반면 축산물의 경우 지방함량이 낮은 축산물에 대한 선호도가 증가하면서 Cr과 같은 광물질 요구량은 더욱 높아지고 있다.

크롬(Chromium, Cr)은 glucose tolerance factor(GTF)의 구성성분으로 중요하며, GTF는 세포내로 glucose 진입을 촉진하는 insulin의 작용에 활력을 더해주는 마치 호르몬과 같은 역할을 하는 물질이다. 따라서 insulin에 대한 영향으로 인하여 탄수화물, 지방, 단백질 대사에 중요한 역할을 하여(Anderson, 1987, Mertz, 1993; Evans and Bowman, 1992; Offenbacher 등, 1988; Ott and Kivipelto, 1999, Rosinski and Mertz, 1969, Steel, 1977; Vincent, 2001) 결과적으로 육질변화에 영향을 주는 주요 미량 광물질로 알려져 있다. Cr은 또한 핵단백질 합성(Weser 와 Koolman, 1969)과 RNA 합성(Okada 등, 1983)에도 영향을 미루어 축산물내 단백질 함량에도 영향을 미칠수 있는 것으로 평가되고 있다.

가. 기술적 측면

Cr은 인체와 가축에서 필수적인 영양소임이 입증(Mertz, 1974, Schwarz, 1959)된 이래, Chromium Picolinate(CrP)를 급여시 육성, 비육돈에서 등지방 두께가 감소하고, 배장근 단면적이 증가 하는 등 육질 개선효과(Page 등, 1993; Lindemann 등, 1995;

Kornegay 등(1997); Ligt 등(2002)) 와 혈중 콜레스테롤 함량 감소 및 이유자돈에서 Stress하에서의 면역기능 강화(Page 등, 1993; Heugten과 Spears, 1997; Ligt 등, 2002), 스트레스 완화(Mowat, 1994), 당대사와 insulin의 기능에 작용(Evans, 1989), 모돈에서 복당두수의 증가(Lindemann 등, 1995), 영향이 없었다고 보고(Boleman 등, 1995; Mooney 와 Cromwell, 1995), Chromium Nicotinate 첨가가 비육돈의 성장률과 도체성적을 향상시킨다로 보고(Casparwenk, 1995; 권 등, 1999)등 다양한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

따라서 최근 사료첨가물질로의 Cr이 Cr-Picolinate, Cr-niconitate 등의 형태로 공급되어지고 있지만 대부분 수입에 의존하고 있으므로 이에 대한 기술의 선도 측면에서 Cr-methionine chelate를 개발하여 활용하는 기술을 개발하고자 한다.

국내외적으로 미네랄 methionine chelation에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔고, 많은 제품들이 개발되어왔으나 Cr-methionine chelation에 대한 검정방법은 아직 확립되지 않고 가축에서의 활용과 기능에 대한 평가가 전무한 실정이다.

따라서 다음과 같은 분야가 기술적으로 개발, 확립되어야 한다.

- 최적의 Cr-methionine chelation 방법 개발
- Cr-methionine chelation 여부 및 수준 검정방법 개발
- 미네랄 chelate의 기능성 다양화를 위한 복합제 개발
- 생물학적 기능성에 대한 검정방법 확립
- 환경에 미치는 영향 평가
- 축종별 Cr-methionine chelate의 활용기술

가. 경제·산업적 측면

- 광물질의 다량급여체제로 야기될 수 있는 중금속에 의한 환경오염 잠재력을 감소시켜야 한다
- 가축의 지방대사 조절에 의한 지방 및 에너지 사료원의 절감으로 축산경제성 및 자원경제성을 개선시켜야 한다.
- Cr-methionine chelate의 활용을 통한 저지방 고단백질 고품위 축산물의 생산으로 축산소득을 증대시켜야 한다.

다. 사회·문화적 측면

유기 축산물의 생산에 대한 관심이 증가하면서, 이에 걸맞은 자원절약적이고 환경친화적인 기능성 미네랄 chelate를 개발하여 일부 항생제 및 항균제를 대체하고 또한 고부가 축산물을 생산함으로써 축산의 공익적 기능을 개선하여야 한다.

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

본 연구진의 한우의 생체기구 조절 및 육질 개선 연구과정에서 크롬-메치오닌 착염 화물질을 한우에 첨가하여 혈당을 감소시키고 인슐린 농도를 증가시키고, 첨가수준을 높일수록 비만지수 및 체지방 함량이 감소하는 수치를 나타내어 육질 개선물질로서의 긍정적 효과를 발견함

그러나 타 동물 예를 들면 돼지, 육계, 산란계, 유우에 대한 활용연구가 전무한 실정이고 Cr-methionine chelate의 효과적 제품화 기술도 전혀 개발되지 않은 상태임

3. 앞으로의 전망

저지방 고단백질 고품위 축산물에 대한 선호도가 증가하고 저투입형 축산이 요구되고 있기 때문에 Cr-methionine chelate 뿐만 아니라 복합 미네랄 chelate 제품을 개발하여 환경 친화적이고, 자원을 절약할 수 있는 사료첨가제에 대한 전망은 국내외적으로 매우 지대함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 Cr-methionine의 산업적 제조기술 및 제품화 기술

1. 서 론

Chromium(Cr)은 인체와 가축에서 필수적인 영양소임이 입증(Mertz, 1993)된 이래 많은 관심을 가지게 된 미량 원소로 3가와 6가의 두가지 종류가 일반적인 형태이다. 6가 Cr은 3가에 비해 중독성이 아주 강하며, 3가 Cr은 실제로 독성이 매우 낮다. 고양이는 매일 1,000mg의 3가 Cr을 먹고도 견딜수 있으며, 쥐는 100ppm 수준을 급여하여도 나쁜 영향이 없었다(World health organization; 1973). 동물 사료에 있어서 Cu, Zn, Cr, Mg, Fe 등 광물질의 중요성은 이미 오래 전부터 많은 연구를 통하여 동물사료에 있어서 그의 중요성이 잘 알려져 왔다. 이러한 미량광물질은 사료원료로서 뿐만 아니라 다른 생리적 작용 등으로 인하여 관심을 갖게 되었다. 그러나 이와 같은 미량 광물질은 무기태로서 생체 이용성이 매우 저조하다. 무기태 Cr은 거의 소화흡수 되지 않으며 유기태 Cr이 무기태보다 흡수가 더 잘된다. Anderson(1987)에 의하면 흡수된 무기태 Cr량은 0.4~3%밖에 되지 않는다고 보고하였다. 특히 본 기술에서 사용된 Cr은 사료에 과량으로 존재하면 중독증상을 일으키며, 비록 과량이 아니더라도 체내에서 이용되지 않은 무기태 Cr이 체외로 배설되었을 경우에는 환경오염원이 된다. 따라서 이러한 중독성 필수광물질은 사료첨가량을 최소화하고 체내에서 이용성을 높여주는 것이 바람직하다. Cr을 유기태 형태로 합성하여 소화 흡수를 증진시키기 위한 기술로 chromium picolinate 와 chromium nicotinate가 제품으로 개발되어 있으나, 본 발명에서는 체내 흡수율을 높이기 위한 방법으로 chelation이라는 방법을 사용하여 Chromium methionine을 개발하였다. 이와 같이 광물질의 chelation은 생물에 있어서 절대적으로 필수적인 화학작용이라는 것이다. 특히 과거에 ligand로 이용되었던

EDTA나 gluconate는 그 수용과 이용성이 낮은 것으로 알려진 후 peptide 또는 아미노산을 이용한 chelation 방법이 개발되었다.

AAFCO(1998)에서는 Ligand 물질로서 흡수 이용이 잘되기 위해서는 다음과 같은 조건이 부합되어야 한다고 하였다. 1) 광물질은 아미노산과 chelate되어야 한다. 2) 체내에서 이용성을 높이기 위하여는 생체내 반응과 비슷한 산, 염기, 효소를 이용하여 chelation하여야 한다. 3) 분자량이 작아 장점막을 쉽게 통과할 수 있는 크기여야 한다. 4) 생체내에서 생성되는 chelate와 동일해야 한다. 5) 생성된 chelate는 pH변화에 대한 완충능력을 부여하여 안정성이 유지되어야한다. 따라서 본 발명에서는 이러한 조건에 충족시킬 수 있도록 소장에서 흡수율이 비교적 빠른 methionine을 ligand 물질로 선택하여 Cr-methionine 을 제조하였다. Chromium-methionine 킬레이트는 가축 체내에서 흡수 이용율이 높아 가축의 생산성을 제고시킬 수 있을 뿐만 아니라 반추동물의 지방대사를 조절함으로써 지방구의 근육내 침착이 우수한 고급육을 생산할 수 있으므로 지방대사 조절용 사료첨가제로서 유용크롬을 함유한 유기물은 체내 인슐린 작용 최적화에 필수 성분으로 글루코스 내성인자(GTF)의 주요 성분으로 글루코스의 분해작용 및 글루코스의 지방 전환을 위한 인슐린 작용에 직접 관여한다. 최근의 연구 보고에 의하면 유기태 크롬은 혈당을 낮추고, 콜레스테롤 및 체지방을 감소시키는 한편 근육질을 강화시키며, 돼지 사료에 유기태 크롬을 200ppb로 첨가하면 돼지의 지방질과 콜레스테롤 수준이 낮아질뿐만 아니라 근육합성량이 증가한다고 알려져 있다. 이와 같은 동물용 사료 첨가제인 Chromium-methionine 킬레이트는 순도가 높아야 되며 사료에 첨가하기에 적합한 형태를 갖추어야 하며 제조방법이 용이해야 한다.

따라서 본 논문에서는 동물사료에 첨가되는 고순도 chromium-methionine 킬레이트를 제조할 수 있는 방법과 그것을 산업적으로 제품화하여 가축 체내에서 생체 이용효율이 높은 동물용 사료첨가제를 제조하고자 한다.

2. 재료 및 방법

$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 L-methionine 을 이용한 Cr-methionine 제조방법은 특허 제 0543017호에 의거하여 만들어졌으며, 대규모 공장에서의 산업화 기술은 fig 1-1.의 도식에 의하여 제조하였다. Cr-methionine의 Cr의 함량은 유도결합 플라즈마 분광계(inductively coupled plasma spectrometer, ICP; PS-950, Leman lab.)를 이용하여 분

석하였고, 구조분석을 위해 분말 X-선 회절기(powder X-ray diffractometer; Bruker, D5005, Germany)를 이용하였다.

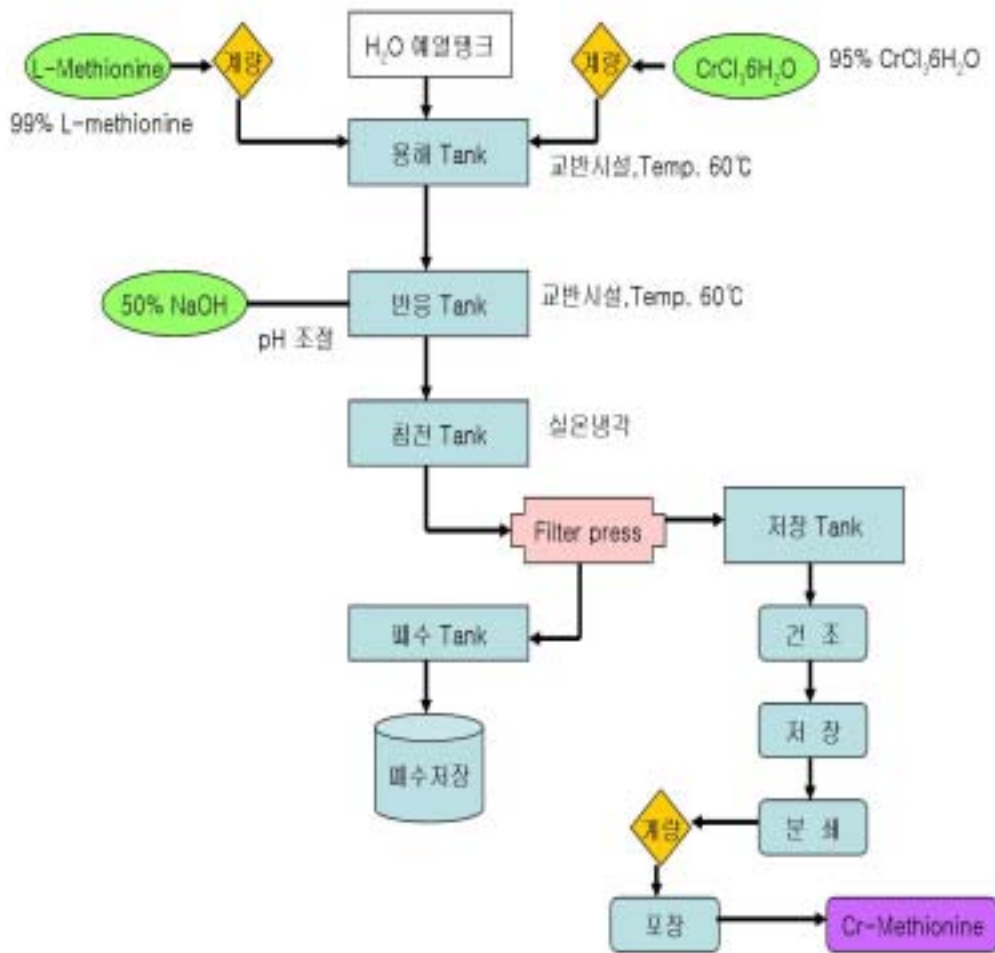
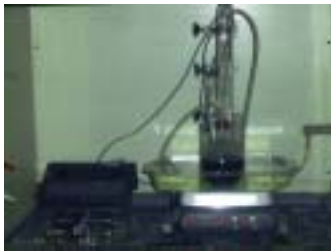


Fig. 1-1. Schematic flow diagram of Cr-methionine chelate production

3. 결과 및 고찰

Cr-methionine 킬레이트를 제조함에 있어서 크게 1) 무기태 크롬 용액과 methionine 용액을 서로 혼합하는 단계, 2) 혼합 용액을 60°C 이하, pH 3.5 이하로 유지하면서 반응을 진행시키는 단계, 3) pH 5.75에서 반응을 정지시키는 단계, 4) 0~30°C의 온도로 반응물을 냉각하여 결정을 생성시키는 단계, 5) 얻어진 결정을 여과하고 건조하는 단계를 포함하는 Cr-methionine 킬레이트의 제조방법 및 chromium-methionine 킬레이트를 생체 이용성을 높이기 위한 hybridization 공정에 의하여 입자도를 낮추고 균일화시키는 방법이 있다.



2-A



2-B



2-C

Fig. 1-2. Cr-methionine 킬레이트의 제조 공정에 따른 반응 변화

Cr-methionine Chelate mineral은 화학 반응을 이용하여 제조된다. 본 공정에서는 Cr 원료로는 비교적 값이 싸고, 쉽게 구입할 수 있는 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 이용하였으며, ligand 물질은 L-methionine을 이용하였다. Ligand 물질로서 methionine은 DL형을 이

용하여 시험한 결과 전혀 chelation 반응이 일어나지 않았다. 일반적으로 적정 pH는 생체 수준과 비슷한 수준을 유지해 주면 되는데 DL-methionine은 전혀 이루어지지 않는 것으로 판명되었다. 그 이유를 면밀히 분석한 결과 D형과 L형으로 분리되지 않는 강한 결합을 하고 있기 때문이라 판단되었다. 따라서 비교적 구입하기 쉬운 L-형 methionine을 가지고 chelation을 시도하였다. L형 methionine을 이용한 chelation 조건은 Cr과 methionine을 몰비 1 : 3으로하여 온도 60℃ 전(가능한 60℃가 넘지 말아야 함 ; methionine은 60℃이상에서는 산화되기 때문임)으로 고정한 후 pH 변화에 의하여 chelation 반응이 순조롭게 일어나도록 유도하였다.

Fig. 1-2의 2-A, 2-B, 2-C는 본 Cr chelates를 제조하는 공정을 반응 시간별로 나타나는 반응을 사진으로 제시한 것이다. 2-A는 처음 Cr과 methionine을 1 : 3으로 (26.65g : 44.76g)을 증류수 150ml를 첨가하여 혼합한 상태이다. 이와 같은 용액 상태는 30분간 100rpm을 지속적으로 각 반응을 수행하였다. 그 후 NaOH 0.05M이 되도록 제조하여 온도와 rpm를 유지하면서 pH 3~4을 유지하도록 첨가하여, 다시 30분간 동일한 온도조건으로 반응을 한 후 0.01M NaOH를 첨가하여 pH 5~6을 유지하였다. 이때에도 온도와 rpm 조건은 동일하게 하였다. 그 후 서서히 20분간 동일 온도와 rpm에서 20분간 각반을 한 후 서서히 냉각시키면 연보라색 침전물이 형성된다. 침전물은 진공펌프를 이용하여 여과지에 증류수로 세척하면서 여과하였고, 회수된 침전물은 온풍건조기(온도 60℃)에서 완전히 건조시킨 다음 미세한 가루형태가 되도록 분쇄하여 순수한 Cr-methionine 을 얻을수 있었다.

실험실 조건에서 얻어진 실험결과를 통하여 산업적으로 이용할수 있는 제품화로 만들기 위해 Fig 1과 같은 방법으로 하여 Cr-methionine을 제조하였다.

우선 실험실 조건에서 찾아낸 pH 조절을 위하여 사용된 0.01M NaOH 용액과 0.09M NaOH 두가지를 이용하는 대신 산업 현장에서는 제조단가를 낮추며 실용성을 위하여 50% NaOH를 적용하여 pH 조절을 하였다.

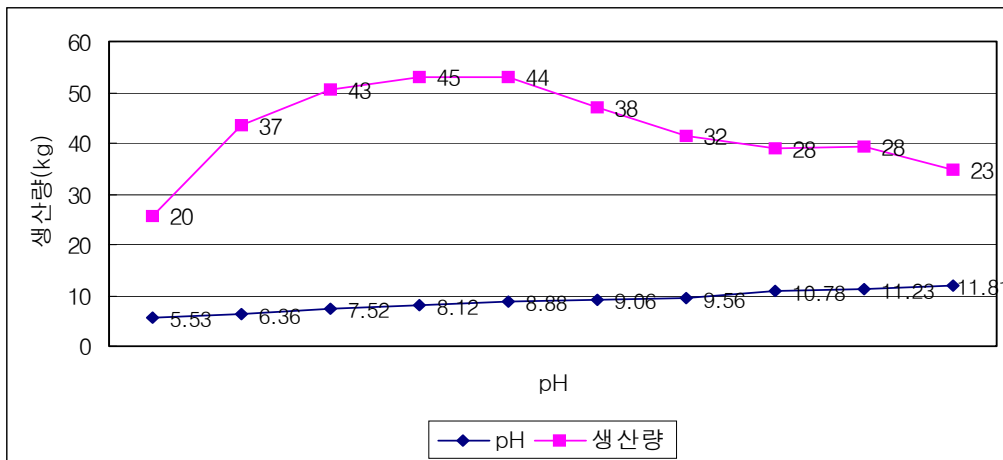


Fig. 1-3. Cr-methionine chelate productivity in pH

Chealton 반응이 일어나는 적정범위는 pH 5 이상으로 NaOH 첨가량을 달리하였을 때의 적정 pH 함량에 따른 수율을 살펴보았다(fig. 1-3). 산업적인 적용을 위한 실험실에서의 조건 실험에서는 pH 7~8에서 가장 높은 수율의 Cr-methionine chelate 침전물을 얻을 수 있었으며 NaOH 첨가량이 50ml 이상 첨가하여 pH가 10-11이상으로 올라가면 침전물내에 Na의 함량이 잔존하게 되어 가장 최적의 조건은 pH 7~8을 유지하는 것이 산업적인 접근에 바람직한 것으로 나타났다.

또한 Hynes 와 Kelly(1995)는 pH와 온도 등 반응조건에 따라 킬레이트의 결합력과 생산수율 측면에서 결정되어지는데 fig. 1-4에서 보는 바와 같이 광물질에 따라 킬레이트를 형성하는 pH는 다르다.

Cr-methionine 킬레이트에서 Cr이 실제로 킬레이트를 형성하고 있는지를 확인하기 위하여 분말 X-ray 회절법으로 측정된 결과 Cr-methionine 킬레이트 화합물이 생성된 것을 확인하였다(fig. 1-3).

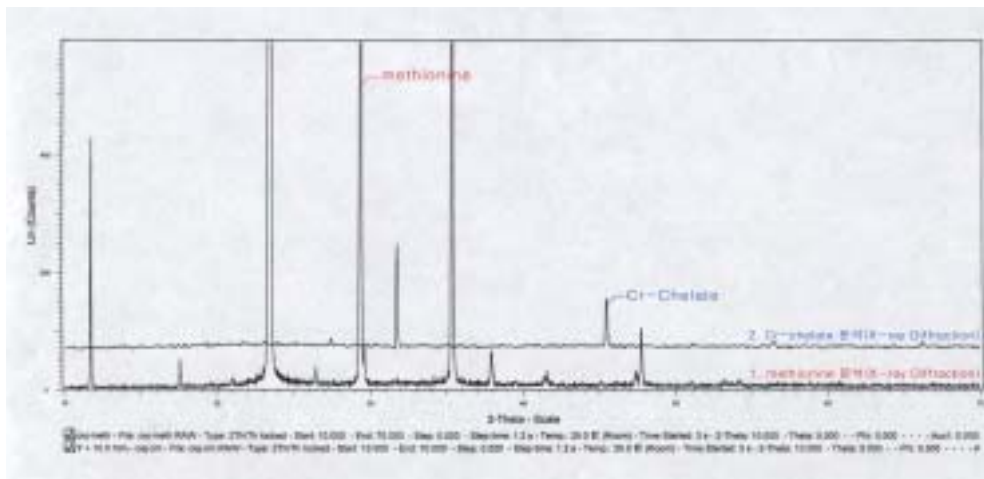


Fig. 1-3. Cr-methionine chealte measured by powder X-ray differactometer

Cr-methionine 킬레이트 화합물의 예상 구조식은 fig. 1-4와 같다.

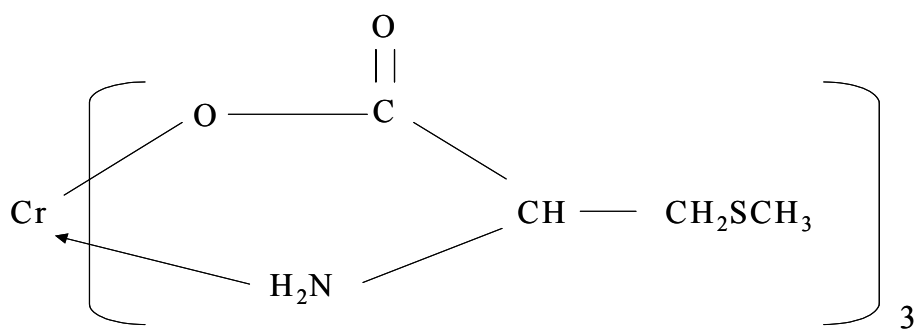


Fig. 1-4. Cr-methionine chelate structure

Cr-methionine 킬레이트의 hybridization 가공에 따른 입자도는 fig. 1-5와 같다. hybridization 시스템은 물리적, 기계적 및 열적 방법을 이용하여 건식상태에서 미분체의 표면을 미분체로 표면개질하여 기능성 복합 분체 재료를 창조하는 high technology이다. 이 장치는 고속회전하는 로터(Rotor), 스테이터(Stator) 및 순환회로로 구성되어 있고 기내에 투입된 피처리물(예, Cr-methionine 킬레이트)은 이것들의 작용에 의하여 기계내에서 분산되면서 충격력을 주체로 입체의 상호작용을 포함한 압축, 마쇄 및 전단력 등의 기계적 작용이 되풀이 되면서 단시간(1~10분)에 고정화 또는 구형성 등의 처리가 균일하게 일어나고 포집기로 신속하게 회수될 수 있다. 또한 이 기계는 본 발명품과 같이 열에 민감한 내열성이 낮은 물질을 가공할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 즉, 본 발명품을 이와 같은 hybridator로 가공한 이유는 입자를 고르게 할 수 있을 뿐만 아니라 구형화 할 수 있기 때문에 이러한 형태의 물질이 소장내에서 생체내로 전이가 비교적 용이할 수 있기 때문이라는 잇점이 있기 때문이다. 그림 5-A는 Cr원료의 입자 형태를 전자현미경적 관찰 상태를 나타낸 것이며, 5-B는 methionine의 형태를 나타낸 것이다. 즉 이와 같이 서로 다른 형태입자를 띄고 있는 금속이온과 유기물은 킬레이트 반응에 의하여 그림 5-C에서와 같이 입자의 형태가 변화된다. 그러나 5-C에 나타난 입자도도 불밀로 가공한 후의 형태이기 때문에 이보다도 더 거친 형태를 갖고 있는 것이 Cr-methionine 킬레이트 화합물의 특성이라 하겠다. 이와 같이 거친 입자는 체내 흡수율도 낮을 것이라는 판단 아래 hybridization이라는 미세 분쇄공정을 도입하게 되었다. 즉 5-D에 나타난 바와 같이 입자가 매끄럽고 미세한 구형의 분말로 가공되어진다.

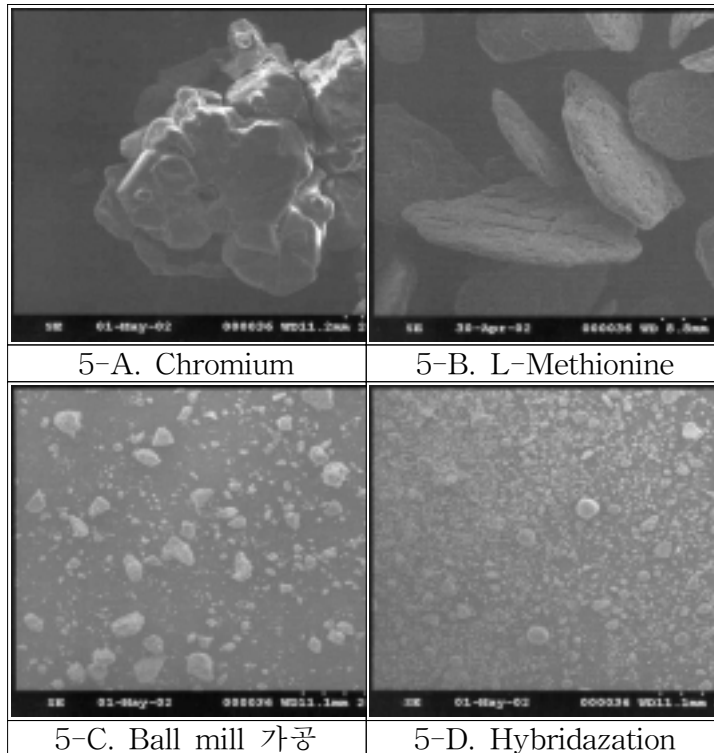


Fig. 1-5. Cr-methionine 킬레이트의 가공전과 가공후의 형태

즉, hybridizer로 가공하여도 적당한 rpm과 시간을 필요로 하는데 chromium-methionine 킬레이트는 참고자료에도 나타난 바와 같이 900rpm에서 가공하는 것이 가장 미세한 입자를 얻을 수 있고, 또한 가장 우수한 입자 분포를 얻을 수 있다. 900rpm보다 더 높은 1100rpm으로 가공하면 입자의 뭉침현상이 발생하여 입자도가 높아지고 입자분포 또한 적절하게 유지하지 못하였다.

실험실 조건에서 얻어진 실험결과를 통하여 산업적으로 이용할수 있는 제품화로 만들기 위해 아래의 그림과 같은 방법으로 하여 cr-methionine chelate를 제조하였다. 우선 실험실 조건에서 찾아낸 pH 조절을 위하여 사용된 0.01M NaOH 용액과 0.09M NaOH 두가지를 이용하는 대신 산업 현장에서는 제조단가를 낮추며 실용성을 위하여 50% NaOH를 적용하여 pH 조절을 하였다.

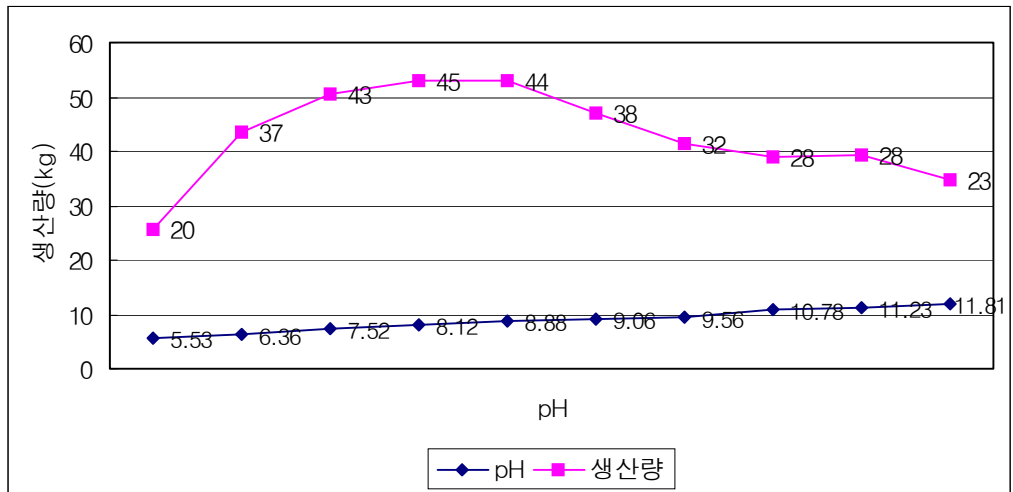


Fig. 1-6. Cr-methionine chelate productivity in pH

Chealton 반응이 일어나는 적정범위는 pH 5 이상으로 NaOH 첨가량을 달리하였을 때의 적정 pH 함량에 따른 수율을 살펴보았다(fig. 1-6). 산업적인 적용을 위한 실험실에서의 조건 실험에서는 pH 7~8에서 가장 높은 수율의 Cr-methionine chelate 침전물을 얻을 수 있었으며 NaOH 첨가량이 50ml 이상 첨가하여 pH가 10-11이상으로 올라가면 침전물내에 Na의 함량이 잔존하게 되어 가장 최적의 조건은 pH 7~8을 유지하는 것이 산업적인 접근에 바람직한 것으로 나타났다.

Cr-methionine chelate 화합물의 원재료의 Cr의 함량은 약 10%에 해당되므로 이를 상용화 하는 제품은 부형제를 첨가하여 Cr 함량 100ppm이상, 400ppm이상, 500ppm이상으로 현재 제품 1kg 당 Cr 100ppm이상 첨가된 크롬 함량에 따라 3종류의 제품으로 시판하고 있다. 현재 “크라민 원 플러스”(Cr 함량 100ppm 이상)제품은 배합사료 공장(동해축협, 삼척축협, 태백축협 상장지점 등) 및 농장(부안, 천안, 춘천 등)에 판매가 되고 있다.



Fig. 1-7. 크라민 제품화 사진



Fig. 1-8. Comparison of morphology of commercial Cr-methionine chelate(Cramin) and commercial Cr-picolinate(PIFz-Cr₂) as an organic chromium source



Fig. 1-9. Morphological photograph of raw Cr-methionine chelate(left) and carrier-mixed Cr-methionine chelate(right)

제2절 크롬의 급원별 첨가가 이유자돈의 혈액성상, 면역반응 및 지방세포크기에 미치는 영향

1 서 론

이유자돈은 환경이나 사양변화에 따른 스트레스와 모돈으로부터 이행된 면역항체의 역가가 감소하는 시기로 인해 질병에 대한 저항력이 감소되는 시기이다. 양돈산업에서 안전하고 위생적이며 고품질 축산물 생산 등에 대한 생산성 향상뿐만 아니라, 항병력 및 면역력 증진 효과에 대한 방안으로 천연 광물질을 사료화하는 기능성 광물질 Chromium(Cr)은 GTF(glucose tolerance factor)의 중요한 구성성분으로써 세포 내로 glucose 진입을 촉진하는 insulin의 활력을 증가시키므로 결과적으로 탄수화물, 지방, 단백질 대사에 중요한 역할을 수행함으로써(Mertz, 1993; Schwarz 와 Mertz, 1959) 항스트레스 작용에도 영향을 미친다. Cr은 핵단백질 합성(Weser과 Koolman, 1969)과 RNA합성(Okada 등, 1983)에도 영향을 준다고 하였다. 스트레스나 질병은 Cr 이동을 증가시켜서 오줌으로 Cr 배설량이 증가되며(Pekarek 등, 1975; Borel 등, 1984; Anderson 등, 1988), 따라서 Cr 결핍증이 더욱 악화될 수 있다. 특히 van Heugten 과 Spears(1997)는 질병이나 스트레스가 있는 가축에서는 뇨를 통해서 Cr의 배설량이 증가되기 때문에 Cr의 보충급여가 필요하다고 보고하였다. 무기태 Cr은 거의 소화흡수되지 않으며 유기태 Cr이 무기태보다 흡수가 더 잘된다. Anderson(1987)에 의하면 흡수된 무기태 Cr량은 0.4~3%밖에 되지 않는다고 보고하였다. 체내이용 효율성을 향상시키기 위한 유기태 물질과 chelate 결합한 Cr-methionine을 rat에 첨가시 체지방량과 혈액성상 등에 개선(김 등, 2003)이 되었으며, Burton 등(1993)은 chelated chromium을 첨가 시 비특이적 면역반응을 증가시킨다고 보고하였다.

하지만 Cr-methionine의 가축에 대한 평가는 특수동물 및 반추가축에 대해서만 제한적이었으며 이유자돈에 대한 연구는 아직 전무한 실정이다. 따라서 크롬의 급원별

첨가가 이유자돈의 혈액성과 말초혈액 내 림프구 아군분포율과 mitogen에 의한 세포 증식능 그리고 호중구의 탐식능력에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 시험장소

본 실험은 강원대학교 부속목장(양돈사)에서 실시하였으며, 연구진에 의해 개발된 Cr-methionine이 이유자돈의 혈액성상 및 자돈의 항병력 증진효과를 평가하기 위하여 공시동물로 3원 교잡종(Landrace×Duroc×Yorkshire)으로 22일령에 이유된 평균체중 5.3 ± 1.2 kg의 이유자돈 30두를 공시하여 면역반응 시험, 소화시험 및 혈액내 생화학 검사에 이용하였다.

2. 시험사료 및 시험설계

시험사료는 가루형태의 시판사료를 대조구로 하여, 여기에 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 Cr-picolinate, Cr-methionine을 첨가한 처리구를 두었다. 시험사료의 배합비는 Table 2-1(자돈), 2-2(육성돈)에서와 같고, 처리에 따라 무기태 Cr으로는 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 200ppb(CrCl₃200)첨가하였으며 유기태 Cr첨가구에는 시판되고 있는 Cr-picolinate를 200ppb(CrPic200)를 첨가하였다. Cr-methionine첨가구에는 각각 200ppb(CrMet200) 또는 100ppb(CrMet100)을 첨가하여 돼지에서의 반응성을 평가하였다. 각 처리당 6두씩 동일 돈방에서 사육하였으며 이유와 동시에 이유 스트레스 사료(Phase 1)를 1주간 급여하였고, 이후 Phase 2사료로 변환하여 2주간 급여하였다. 이유 3주후 부터는 젖돈 사료를 약 평균체중 45kg시기까지 급여하였다. 본 시험에 사용된 사료내 영양소 함량은 NRC사양표준에 맞추어 배합되었으며 시험사료와 물은 무제한 급여하였다.

Table 2-1. Formula and chemical composition of weaned pig basal diet

Ingredients	Phase 1	Phase 2
Corn		54.00
Soybean meal		27.00
Wheat flour		4.00
Lupin hull		2.00
Wheat bran		2.00
Processing grain	32.00	
Suprex corn	5.60	
Whey powder	20.10	
Milk replacer	13.00	7.00
Glucose	7.00	
Yeast	2.00	
Animal plasma	3.00	
Fat powder	3.50	
Zinc oxide	0.40	
Calcium phosphate	1.00	1.40
Salt		0.50
Lysine HCl(50%)	0.20	0.40
Methionine		0.20
Vit. mix.	0.50 ^a	0.42 ^b
Min. mix.	0.50 ^c	0.50 ^d
Others	11.20	0.58
Total	100.00	100.00
Chemical composition*		
Crude protein(%)	22.26	19.56
Crude fat(%)	7.61	4.19
Crude fiber(%)	2.00	3.52
Ash(%)	5.27	4.01
Ca(%)	0.58	0.70
P(%)	0.68	0.66
DE(Kcal/Kg)	3,789	3,448
Lys(%)	1.60	1.09
Met(%)	0.46	0.42
Met+Cys(%)	0.71	0.80

* Calculated value

a The vitamin premix contains the following per kg of phase 1 diet : Vit. A. 22,500IU; vit. D3, 2,000IU; vita.E, 60mg; vit. B1, 5mg; vit. B2, 5mg; vit. B6, 5mg; vit. B12, 50mg, vit. K, 5mg

b The vitamin premix contains the following per kg of phase 2 diet : Vit. A. 10,000IU; vit. D3, 2,000IU; vita.E, 40mg; vit. B1, 1.2mg; vit. B2, 9mg; vit. B12, 40mg

c The mineral premix contains the following per kg of phase 1 diet : Mn, 40mg; Zn, 2,500mg; Fe, 150mg; Cu, 130mg; I, 0.6mg; Se, 0.15mg; Co, 0.5mg

d The mineral premix contains the following per kg of phase 2 diet : Mn, 51.6mg; Zn, 70mg; Fe, 150mg; Cu, 145mg; I, 1mg; Se, 0.3mg

Table 2-2. Formula and chemical composition of growing pig basal diet

Ingredients	Growing
Corn	54.11
Soybean meal	32.65
Molasses	3.00
호분	1.34
DCP	1.54
마이맥스	0.05
NaCl	0.25
animal fat	5.40
Phytase	0.20
Choline chloride	0.16
Tocomix	0.05
DL-methionine	0.03
L-lysine	0.30
Biotin	0.05
Vit. AD ₃	0.03
Vit. Mix. ^a	0.25
Min. Mix. ^b	0.15
Others	0.44
Chemical composition*	
Crude protein(%)	19.50
Crude fat(%)	7.76
Ash(%)	5.48
DE(Kcal/Kg)	3590
Ca(%)	1.00
P(%)	0.60
Lys(%)	1.27
Met+Cys(%)	0.65

* Calculated value

a The vitamin premix contains the following per kg of diet :

Vit. A, 16,000IU; vit. D₃, 2,450IU; vita.E, 87.5mg; vit. B₁, 1.88mg;
vit. B₂, 6.25mg; vit. B₆, 2.5mg

b The mineral premix contains the following per kg of diet : Mn, 60mg;

Zn, 105mg; Fe, 150mg; Cu, 105mg; I, 0.75mg; Se, 0.3mg

3. 자돈의 면역화

이유자돈의 chromium첨가 급원에 의한 면역반응을 평가하기 위하여 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 조사하였으며, 시험사료 급여 30일후 자돈내 면역세포의 분포비율을 조사하였다. 체액성 면역반응을 조사하기 위하여 시험사료 급여 1주일후 외인성 항원인 egg albumin(1mg/1ml of complete freund's adjuvant)을 0.1ml 근육주사 하였으며 1차접종 1주일 후 다시 2차 접종(booster injection)하였다. 채혈은 2차 접종후 1주일 후에 경정맥으로부터 실시하였으며, 이후 성장단계별로 경정맥으로부터 약 10ml씩 모든 실험돈으로부터 채혈하였다.

4. 말초혈액으로부터 면역세포의 분리

면역세포 분포비율 조사와 세포성 면역반응(blastogenesis)을 조사하기 위하여 시험사료 급여 4주후 모든 실험돈의 경정맥(jugular vein)으로부터 약5ml 전혈을 채혈하였다. 채혈된 혈액은 항응고제로서 sodium heparin이 들어있는 튜브로 옮겨졌으며 채혈된 혈액중 일부는 혈청을 얻기위해 항응고제가 없는 튜브로 옮겨졌다. 항응고제가 들어있는 튜브에 들어있는 혈액은 실험실로 가져온후 6% dextrin용액을 1:5(dextrin:whole blood)의 비율로 각 튜브에 첨가하여 37°C에서 1시간동안 정치시켜 적혈구를 침전시켰다. 혈액으로부터 백혈구와 호중구의 분리는 비중법을 이용하였다. 전혈로부터 적혈구를 침전시키는 동안 비중액을 준비하였다. 먼저 histopaque 1119(1119-1, Sigma Co.)를 튜브에 첨가한 후 , 다시 histopaque 1077(1077-1, Sigma Co.)용액을 histopaque 1119용액층 위에 조심스럽게 분주하였다. 1시간동안의 침전이 끝난 혈액으로부터 조심스럽게 상층액을 미리 준비된 비중액이 담긴 튜브에 첨가한다. 이때 각 비중액과 상층액의 양은 1:1:2의 비율을 유지한다. 상층액이 옮겨진 튜브들은 800g의 원심력으로 30분간 실온에서 원심분리하였다. 원심분리후 분리된 neutrophil층과 lymphocyte층을 서로 다른 튜브에 옮긴다. neutrophil은 10% FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 무색의 RPMI1640(R8755, Sigma Co.)배지를 첨가하여 세포를 세척한후 trypan blue dye exclusion방법으로 세포수를 측정하여 세포의 농도가 $10^6/ml$ 가 되도록 조절하였다. lymphocyte는 PBS를 사용하여 세척한후 neutrophil과 동일한 방법으로 세포수를 조절하였다.

5. 지방세포수와 크기조사

분화된 지방세포는 세포내 지질과 핵을 각각 대조염색함으로써 동일 현미경 배율에서 대안렌즈를 통하여 관찰되는 부분만을 계수하였다. 이 방법으로 각 시료당 3well을 그리고 각well당 3부분을 조사하였다. 크기는 micrometer를 이용하여 측정하였다.

6. 조사항목

가. 영양소 소화율

크롬별 수준 첨가에 의한 이유자돈에서 육성기의 영양소 소화율을 평가하기 위하여 간접소화율 측정방법을 이용하였다. 본 실험에서는 시험사료에 chromium을 첨가하였기 때문에 관행적 간접소화율 측정방법에서 사용되는 외부marker인 Cr₂O₃의 사용을 배제하였다. 따라서 외부 marker대신 내부 marker인 acid insoluble ash(AIA)를 이용하여 분석하였으며 이유시기와 육성전기에는 소화시험 사료에 내부 marker의 분석을 용이하게 하기 위하여 celite를 각각 0.5%씩 첨가하였다. 또한 celite첨가 시험사료 급여후 정확한 채분을 위하여 celite첨가 시험사료에 FeO₃를 1%첨가하여 분의 색깔의 변화를 통하여 celite함유 시험사료에 대한 정확한 채분을 가능하게 하였다. 하지만 육성후기와 비육기에는 분석시 충분한 양의 불용성 광물질을 확보할 수 있기 때문에 celite와 FeO₃를 첨가하지 않았다.

AIA의 분석은 McCarthy et al.(1974)의 방법에 따라 4N-HCl로 소화시킨 후 여과지(whatman No. 41)로 여과하여 회화시킨다.

소화율은 다음의 식에 따라 시험사료와 분의 분석결과로부터 계산되었다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{1 - (\text{사료중의 AIA함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%})}{\text{분중의 AIA함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%}} \times 100$$

나. 분내 광물질 배출량

분내 광물질 분석을 위해 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 분쇄된 분의 시료를 각 처리구와 반복별로 1g씩 칭량하여 분해용 튜브(50ml)에 넣는다. 질산(65%,v/v) 10 ml와 끓임쪽(3~4개)을 첨가하여 60℃로 예열되어 있는 dry heating block에서 약 30 분간 분해한다. 모든 시료가 질산용액에 녹아있음을 확인한 후 110℃에서 1시간동안 가열한 다음 다시 150℃에서 30분에서 1시간 더 가열한다. 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, 다시 질산 10ml를 첨가하고 튜브로부터 흰색의 연기가 나올 때 까지 150℃에서 1시간 더 분해시킨다. 분해가 완료된 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, Hydrogen peroxide 4ml를 튜브에 넣고 잘 혼합한 다음 110℃에서 1시간 정도 분해시킨다. 분해가 끝난 후 튜브에 3차 증류수 첨가하여 filter paper(Whatmam No. 42)로 여과시켜 50ml 메스플라스크에 담는다. 다시 0.45 μ m syringe membrane filter로 여과하여 새로운 50ml 튜브에 담는다. 광물질 분석은 유도결합 플라즈마 분광계(inductively coupled plasma spectrometer, ICP; PS-950, Leman lab.)를 이용하여 분석하였다. 광물질 분석은 총 7개 광물질(Fe, Cu, Zn, Cr, Na, Mg, Ca)을 측정하였다. 검량선 작성에 필요한 표준광물질(HIGH-PURITY STANDARDS Co., USA) ICP분석용을 이용하였다.

다. 혈액성상 분석

이유자돈의 혈액의 생화학 분석을 위하여 Cr-methioninr과 Cr-picolinate 또는 CrCl₃의 첨가에 따른 혈액내 생화학 수치의 변화를 조사하였다. 생화학 분석을 위하여 사양시험 종료 후 자돈의 경정맥에서 채혈하여 상온에서 약 2시간 방치하여 혈액을 응고시킨 후 4℃ 3000 rpm에서 15분간 원심분리를 통해 혈청을 분리하여 분석일까지 냉동고 -30℃에서 보관하였다. 분석성분중 ALP(alkaline phosphatase), Ca(calcium), Chol(cholesterol), TP(total protein), TG(triglycerides), Glu(glucose), BUN(blood urea nitrogen), Crea(creatinine)은 혈액자동분석기를 이용하여 분석하였다. 그리고 돼지혈청내 insulin, growth hormone은 시판 분석 kit(Linco Co., USA)을 이용하였다. 이 방법은 radioimmuno assay(RIA)를 이용하는 방법으로 이 kit에는 검출 항체가 I¹²⁵로 labeling되어있다. 이 radioisotope의 반감기가 60.4일로 통상 구매후 30일 이내 분석하여야 한다.

라. 말포혈액내 면역세포의 활성(chemiluminescence)측정

neutrophil과 monocyte에 의한 탐식작용시 나타나는 'respiratory burst'인 화학발광(chemiluminescence)은 luminometer(Lmax, Molecular Device Co., USA)를 이용하여 측정하였다. 세포수를 $10^6/ml$ 로 조절한 배양액 $200\mu l$ 를 luminometer측정용 plate에 넣고 $37^\circ C$ 에서 15분간 안정화 시켰다. 다음 각각의 well에 탐식작용시 발생하는 reactive oxygen intermediate중 O_2^- (superoxide anion)와 H_2O_2 (hydrogen peroxide)를 측정하기 위해 각각 증폭제(amplifier)로서 1mM lucigenin과 1mM luminol을 $50\mu l$ 씩 첨가하여 5분간 배양시킨 다음, 자극유도제(stimulator)로 zymosan($2.5mg/ml$)을 $20\mu l$ 첨가하여 활성을 측정하였다. 측정결과는 maximum RLU(relative luminescence unit) 값으로 나타내었다. 분석된 결과는 전혈을 이용하여 측정하였기 때문에 flow cytometer를 이용하여 측정한 세포내 monocyte와 granulocyte의 비율을 보정하여 측정혈액내 탐식세포의 비율을 동일하게 하였다.

마. Lysozyme의 활성 측정

대식세포(macrophage)의 활성의 지표로서 혈청내 lysozyme의 활성을 측정한다. Lysozyme은 그람음성또는 양성균의 세포벽의 peptidoglycan의 구성성분인 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine사이의 beta-1,4 glycosidic bond를 공격하는 효소로서 고등척추동물에서는 주로 macrophage에 의해 생성된다. 따라서 혈청내 lysozyme의 함량을 측정함으로써 비특이적 면역세포인 macrophage의 활성을 측정할 수 있다. 측정은 molecular probes사(USA)의 lysozyme assay kit을 이용한다. 이 방법은 기질로서 *Micrococcus lysodeikticus*의 세포벽을 이용한다. 시료와 기질을 혼합하여 $37^\circ C$ 에서 30분간 배양한 다음 여기파장 494nm와 방출파장 518nm에서 형광분광계를 이용하여 활성을 측정한다.

바. Specific egg albumin antibody와 total antibody(IgM과 IgG)의 측정

Anti-egg albumin specific IgG activity를 측정하기 위하여 microplate의 각각의 well에 $150\mu l$ 의 anti-porcine IgG($3.75\mu g/ml$)와 egg albumin($20\mu g/ml$)이 들어있는 coating buffer($0.05M$ carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)로 $37^\circ C$ 에서 2시간 배양한다. 배양후 PBS-tween20(pH 7.4)를 이용하여 3회 각각의 plate를 세척한 다음, 시료를 $150\mu l$ 첨가하여 $37^\circ C$ 에서 1시간 30분동안 배양한 다음 다시 3회 세척한다.

anti-porcine IgG conjugated with horseradish peroxidase(1:2000)를 150 μ l씩 각각의 well에 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분동안 배양한 다음 PBS-tween20용액으로 3회 세척한다. 기질용액으로는 ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))를 이용하였다. 0.05M phosphate citrate buffer(pH 5.0)에 ABTS를 녹인 다음, 100 μ l를 각각의 well에 첨가한 다음 30분간 실온에서 배양후 405nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

total antibody(IgG와 IgM)의 정량은 Bethyl Co.(U.K.)의 측정용 kit을 이용한다. 이 방법은 radial immunodiffusion(RID)를 이용한 방법이다.

사. 면역세포 분포비율

돼지 말초혈액내 면역세포의 분포율은 FITC(fluorescein isothiocyanate)또는 RPE(R. phycoerythrin)와 같은 형광색소를 이용하여 해당 세포를 표식한후 flow cytometry(FACScan, BD Science Co. USA)를 이용하여 2000개의 세포를 검사하여 양성반응을 보인 세포만을 측정하였다. 측정된 자료는 Cell Quest 3.1 program(BD Science Co. USA)을 이용하여 분포율을 분석하였다. 이때 사용된 단클론항체는 table 과 같다. 형광염색시 flow cytometry는 동시에 2가지 형광색소만을 감지할 수 있기 때문에 각 튜브에 서로다른 형광색소가 결합된 단클론항체만을 첨가하였다(direct staining). 본 실험에 사용된 단클론항체는 모두 southern biotechnology associate Inc.(U.S.A.)로부터 구입하였다.

Table 2-3. A panel of porcine monoclonal antibodies used in this experiment to detect porcine lymphocytes

MAB	Isotype of MAb	Molecules	Cell type
74-12-4	IgG2b	PoCD4	T h/i cells
76-2-11	IgG2a	PoCD8	T c/s cells
BB6-11C9.6	IgG1	PoCD21	B cells
74-22-15	IgG1	PoMo/Gr	Monocyte/Granulocyte

PoCD4 : Porcine CD4 + T lymphocyte

PoCD8 : Porcine CD8 + T lymphocyte

PoCD21 : Porcine CD21 + B lymphocyte

아. mitogen에 의한 세포증식능

이유자돈에 4주간 시험사료를 급여한 후 모든 돼지로부터 말초혈액내 림프세포를 분리한 다음 10⁶/ml가 되도록 조절하였다. 세포증식능 실험에 사용된 배지는 10% FBS가 첨가된 RPMI1640을 사용하였으며 세포증식을 유도하기 위하여 사용된 mitogen은 T세포에 대하여 concanavalin A(ConA), B세포에 대하여는 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다. 세포에 접종시에는 예비실험을 통하여 결정된 함량(Con A, 2.5mg/ml; LPS, 1mg/ml)을 각각의 well에 4 μ l, 6 μ l씩 접종하였다. 접종후 microplate를 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 5%의 조건하에서 탄산가스 배양기에서 48시간 배양되었다. 세포증식의 평가는 시판 증식능분석 시약 AlamarBlue(Serotec Co., UK)를 이용하여 배양종료 6시간전에 각 well첨가한 다음 배양종료후 fluorescence microplate reader에서 흡광도를 측정하였다. 세포증식정도(stimulation index)는 제작사에서 제시한 공식에 의하여 계산되었다.

7. 통계처리

모든 분석 결과의 통계분석은 SAS program(2004)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였으며, 처리평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법 (Snedecor and Cochran, 1980)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

1. 돼지의 성장단계별 Cr-methionine의 첨가제로서의 효과

본 연구진은 개발된 Cr-methionine 제품의 돼지에서의 활용성을 평가하기 위하여 이유직후부터 시작하여 출하시까지 life cycle동안 급여한다음 성장단계별로 육성성적과 소화율을 평가하였다. 무기태 또는 유기태 Cr의 첨가가 이유자돈에서 영양소 소화율에 미치는 영향(table 2-4)을 살펴보면 조단백질 소화율은 CrMet100첨가구에서 가장 높았으나 CrMet200첨가구는 대조구나 무기태 Cr첨가구와 비슷한 소화율을 보여주었다. 조지방 소화율에서도 CrMet100첨가구가 가장 높은 결과를 나타내었으며 유기태 Cr첨가구(CrPic200, CrMet200, CrMet100)의 소화율이 무기태 Cr첨가구(CrCl₃200)보다 높은 결과를 나타내었다. 회분소화율에서는 처리구간 아무런 차이가 없었다.

Cr-Methionine chelate첨가구인 CrMet200과 CrMet100에서의 에너지 소화율은 무기태 Cr첨가구인 CrCl₃200보다 높았다. 또한 총 탄수화물의 소화율도 무기태 Cr첨가구보다 높았으나 유기태 Cr첨가구인 CrPic200첨가구와는 차이가 없었다. 어린 자돈시기에서 영양소 소화율의 개선은 양돈 생산성 관점에서 매우 유익하다.

본 연구진이 개발한 Cr-methionine의 이유자돈의 소화율에서의 효과는 현재 시판되고 있는 유기태 Cr-picolinate와 비교하여 보면 조단백질, 조지방 소화율에는 큰 차이가 없었으나 에너지와 총탄수화물의 소화율은 증가하였다. 육성초기에서 소화율에 미치는 영향(table 2-5)은 회분을 제외하고는 아무런 차이가 없었다. 육성기 소화율이 이유자돈과 비교하여 처리구간 차이가 없었던 것은 이 시기에 소화기관의 성장이 완료되었기 때문인 것으로 판단된다.

따라서 유기태 Cr의 경우 무기태 Cr과 비교하여 어린 자돈시기에는 흡수율의 개선으로 일반 영양소의 소화율이 개선되나 돼지가 성숙함에 따라 그 차이는 나타나지 않는 것으로 판단된다.

Table 2-4. Nutrients digestibility in weaned pigs fed either inorganic or organic chromium supplemented diet

Items	Treatments					SEM
	Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
Crude protein	72.33 ^b	72.12 ^b	75.50 ^{ab}	72.72 ^b	78.85 ^a	2.47
Crude fat	72.35 ^{bc}	69.40 ^c	75.66 ^{ab}	77.34 ^{ab}	79.31 ^a	3.28
Ash	45.08	38.54	41.88	42.14	49.52	6.71
Energy	76.94 ^{bc}	75.31 ^c	79.67 ^{ab}	80.08 ^a	81.43 ^a	1.91
Total CHO	80.73 ^{bc}	79.35 ^c	82.85 ^{ab}	84.59 ^a	84.82 ^a	1.51

^{a,b,c} Means with the different superscripts within the same row differ(p<0.05)

Table 2-5. Nutrients digestibility in growing pigs fed either inorganic or organic chromium supplemented diet

Items	Treatments					SEM
	Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
Crude protein	80.07	81.12	79.17	77.01	77.71	3.20
Crude fat	83.62	83.27	81.01	78.05	77.45	3.73
Ash	57.76 ^a	51.49 ^{ab}	53.40 ^{ab}	47.72 ^{bc}	42.08 ^c	3.99
Energy	80.62	80.76	80.87	78.62	79.42	2.96
Total CHO	84.85	84.73	85.43	83.80	84.65	2.44

^{a,b,c} Means with the different superscripts within the same row differ(p<0.05)

Table 2-6. Effects of chromium sources on fecal mineral excretion in weaned pigs

Items	Treatments					SEM
	Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
Cr	9.1 ^{ab}	9.1 ^{ab}	7.7 ^b	8.5 ^{ab}	8.8 ^a	0.5
Cu	395.3 ^{bc}	456.3 ^a	358.7 ^c	395.0 ^{bc}	423.0 ^{ab}	20.4
Fe	20545.0 ^a	20594.0 ^a	14261.3 ^b	16717.3 ^{ab}	20232.0 ^a	2116.6
Zn	879.0 ^a	948.3 ^a	496.3 ^b	876.7 ^a	675.7 ^{ab}	9.96
Na	1015.0	924.0	1075.0	981.0	771.0	209.9
Mg	5923.7	6208.0	6267.0	6202.3	6429.3	291.9
Ca	4243.3	4184.7	4020.3	4240.7	4270.0	134.9

^{a,b,c} Means with the different superscripts within the same row differ(p<0.05)

혈액성상은 Cholestrol, Creatin, Triglyceride, Ca 및 BUN 등은 처리구간의 아무런 차이를 나타내지 않았으나, Total protein, Glucose, ALP 등은 Cr-methionine(CrMET) 200ppb를 급여한 구가 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다.

Anderson(1995)은 크롬을 첨가하였을때 혈중 총콜레스테롤, LDL cholesterol, triglyceride는 감소하였지만 HDL cholesterol은 증가한다고 보고하였다.

Table 2-7. Effect of chromium sources on the serum traits in weaned pigs

Items	Treatments					SEM
	Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
ALP	612.80 ^b	629.40 ^b	813.25 ^a	715.00 ^{ab}	661.20 ^b	101.67
BUN	10.01	9.93	9.18	9.65	10.68	1.72
Ca	12.65	12.70	13.13	13.08	13.17	0.73
Cholesterol	101.00	108.80	109.00	103.00	104.83	9.96
Creatin	0.78	0.78	0.75	0.79	0.83	0.07
Glucose	124.33 ^{ab}	116.40 ^b	122.67 ^{ab}	132.50 ^a	126.50 ^{ab}	11.29
Total protein	6.52 ^b	6.74 ^{ab}	6.55 ^b	7.07 ^a	6.90 ^{ab}	0.33
Triglyceride	54.33	61.25	47.67	61.00	53.33	10.78

^{a,b} Means with the different superscripts within the same row differ(p<0.05)

권 등(1999)은 비육돈에 Chromium nicotinate를 400ppb와 800ppb를 급여한 구에서 혈중 콜레스테롤 함량이 낮은 경향이 나타났으나 유의성은 없었다고 보고하였다. 반대로 정 등(1995)은 chromium picolinate를 첨가한 사료를 급여한 결과 혈중 콜레스테롤의 함량은 오히려 증가하는 경향을 보였으나 처리구간에 유의성은 없었다고 하였다.

2. 자돈의 항병력 증진효과

이유자돈의 시기는 면역체계가 미성숙한 상태이기 때문에 질병에 가장 감수성이 예민한 시기이다. 따라서 이유일령과 이유시 체중등은 이유시 상당히 중요한 고려대상이다. 특히 이유일령을 단축시킬 경우 더욱 세심한 주의가 필요하다. NRC사양표준에서 권장하는 영양소 수준은 최적의 성장을 위한 것이다. 따라서 이유시기에서와 같은 면역력이 약한 시기에 NRC의 권장수준만으로는 질병 감수성을 이겨낼 수 있는 충분한 면역력을 확보하기 어렵다. 특히 미량광물질의 경우 첨가되는 형태가 무기태일 경우 소화흡수율이 매우 낮기 때문에 특정 광물질이 가축의 면역반응에도 상당한 영향을 미칠 수 있다. 따라서 이러한 미량광물질을 유기태 형태로 급여하고자 하는 많은 노력이 있었으며 이중 대표적인 방법이 mineral-amino acid chelate이다. 따라서 본 연구진에서 미량광물질중 Cr을 methionine과 chelating하여 유기태 형태의 Cr을 개발하였으며 이를 이유자돈에 급여하여 면역반응에 미치는 영향을 무기태 Cr과 대표적 유기태 Cr인 Cr-picolinate와 비교하였다. 면역세포의 분포비율(table 6)을 살펴보면 helper T cell 인 CD4, CD4CD8, B cell 그리고 Mo/Gr은 처리간의 차이를 보이지 않았으나 세포 독성 세포인 CD8은 무기태 크롬 처리구인 CrCl₃에서 가장 높은 분포율을 보였고, 유기태 크롬 Cr-methionine 100ppb 처리구가 대조구보다 증가한 것으로 나타났다(P<0.05). 따라서 Cr-methionine chelate첨가수준에 따라 분포율이 달라질 수 있음을 확인하였다. 항체형성 세포인 B cell을 측정하기 위하여 T cell 또는 granulocyte와 monocyte에서는 발현되지 않는 CD21 marker를 이용하여 측정한 결과 모든 처리구간에 차이는 없었으나 CD8의 분포율이 높았던 CrMet100첨가구에서 타 처리구보다 보다 낮은 경향을 보였다.

Table 2-8. Proportion of porcine leukocytes in peripheral blood of weaned pig fed either inorganic or organic chromium supplemented diet

MAb	Treatments					SEM
	Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
CD4	18.72	17.81	16.99	19.22	17.58	2.61
CD8	15.87 ^b	22.58 ^a	19.72 ^{ab}	15.82 ^b	18.60 ^{ab}	2.25
CD4CD8	3.60	3.23	3.17	3.05	2.43	0.88
CD21	11.05	10.13	11.02	12.29	8.73	1.80
Mo/Gr	23.76	23.87	23.33	23.18	25.65	4.02

^{a,b} Means with the different superscripts within the same row differ(p<0.05)

유기태 Cr에 의한 비특이적 면역반응을 측정하고자 말초혈액내 탐식작용에 관여하는 monocyte와 neutrophil에 의한 화학발광을 luminometer를 이용하여 측정한 결과는 fig. 1과 같다.

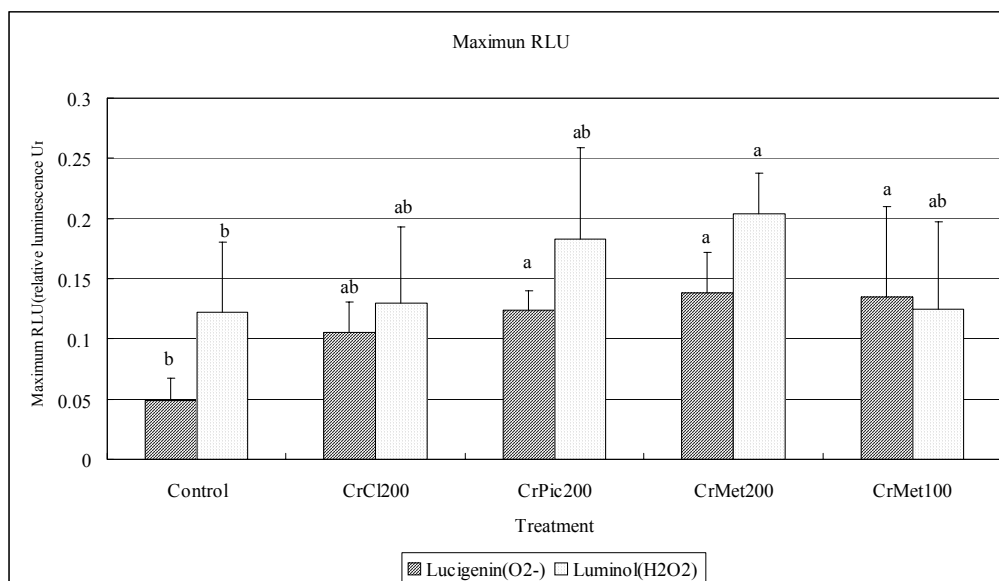


Fig. 2-1. Chemiluminescence in peripheral blood of weaned pigs fed diets supplemented with either inorganic or organic chromium(chromium picolinate, chromium methionine)

전체적으로 유기태 Cr첨가에 의해 탐식세포에 의한 화학발광이 대조구보다 높은 결과를 나타내었다. lucigenin(O_2^-)에 의한 화학발광은 유기태 Cr첨가구에서 대조구보다 높았으며 luminol(H_2O_2)에 의한 화학발광은 CrMet200첨가구에서 타 처리구보다 높았다. 외부물질 침입시 비특이적으로 작용하는 neutrophil의 활성화는 유기태 처리구들이 무기태 Cr 처리구보다 증가한 것으로 나타났다($P < 0.05$).

Fig. 2-2에서는 세포매개성 면역반응 평가하고자 돼지의 말초혈액에서 면역세포(lymphocyte)를 분리하여 세포증식 실험을 실시하였다. B cell mitogen에 의한 증식에는 차이가 없었으나 T cell mitogen에 의한 증식은 CrMet100첨가구에서 가장 높게 나타났다. 세포분포비율에서 T cell인 CD8의 분포율은 오히려 다소 낮았던 결과와 비교하여 보면 CrMet의 첨가는 외부자극에 반응하여 반응하는 작용에 효과가 있는 것으로 판단되며 그 효과는 CrMet의 농도에 따라서 달라질 수 있음을 시사하였다.

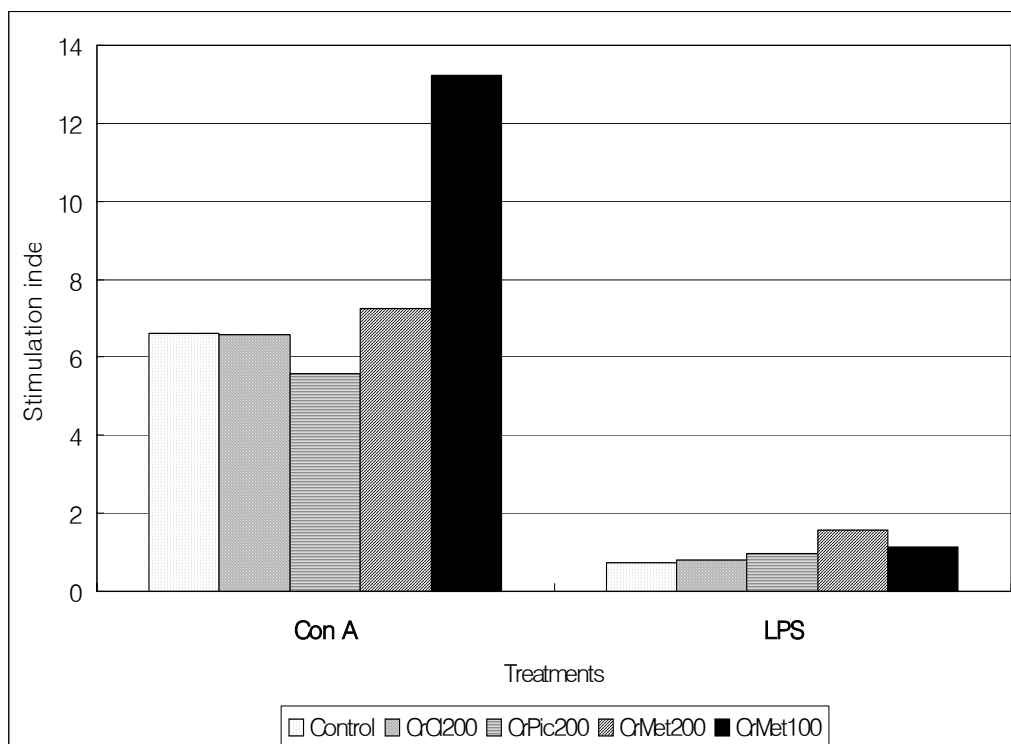
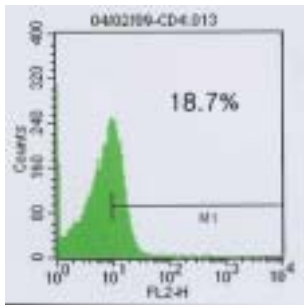
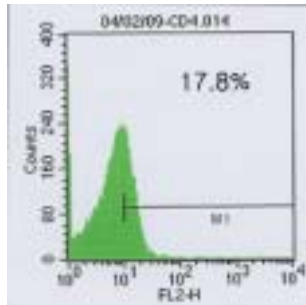


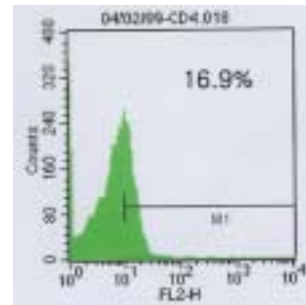
Fig. 2-2. Effect of dietary chromium sources on the peripheral blood lymphocyte proliferative responses to two polyclonal mitogens



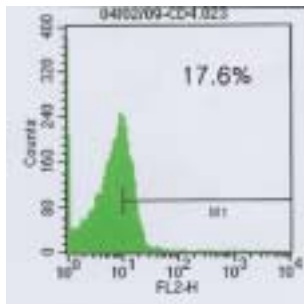
Control



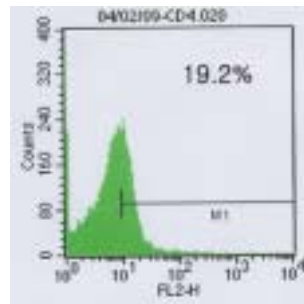
CrCl₃200



CrPic200

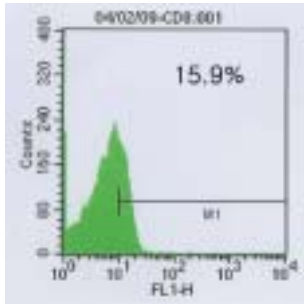


CrMet200

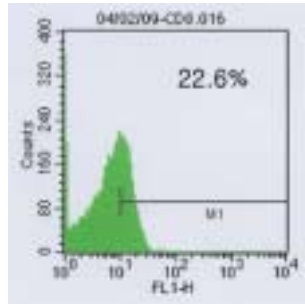


CrMet100

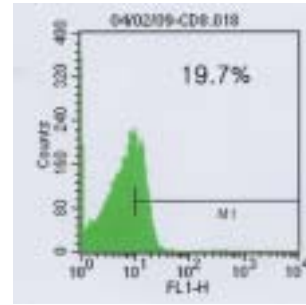
Fig. 2-3. Representative histogram of positive CD4 monoclonal antibody



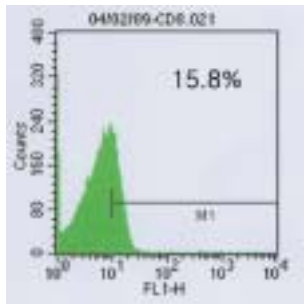
Control



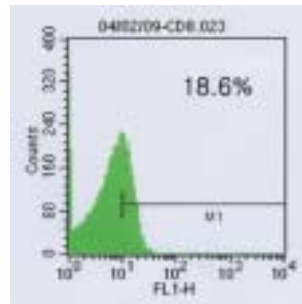
CrCl₃200



CrPic200



CrMet200



CrMet100

Fig. 2-4. Representative histogram of positive CD8 monoclonal antibody

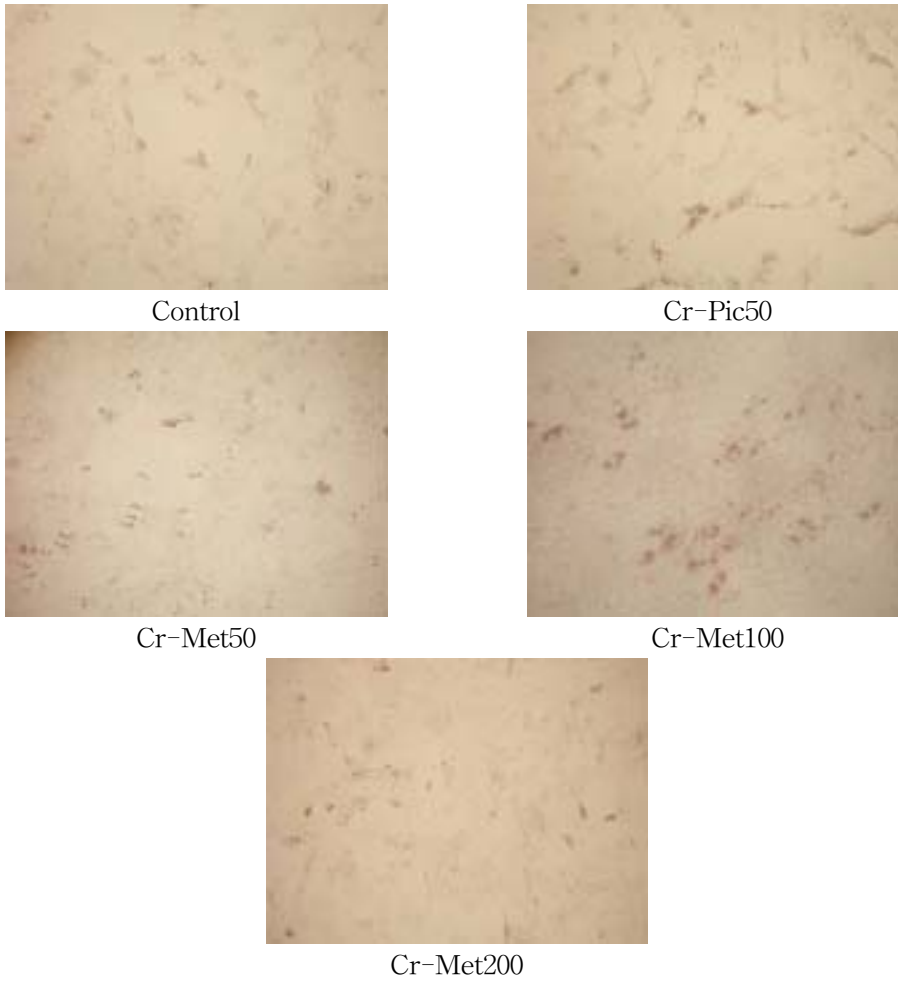


Fig. 2-5. Morphology of adipocyte differentiated in culture media containing Cr sources

제3절 크롬의 급원별 급여가 육성비육돈의 성장단계별

소화율, 혈액성상과 도체품질에 미치는 영향

1. 서 론

Chromium(Cr)은 인체와 가축에서 필수적인 영양소임이 입증(Mertz, 1993)된 이래 많은 관심을 가지게 된 미량 원소로 3가와 6가의 두가지 종류가 일반적인 형태이다. 6가 Cr은 3가에 비해 중독성이 아주 강하며, 3가 Cr은 실제로 독성이 매우 낮다.

Cr은 glucose tolerance factor(GTF)의 구성성분으로 중요하며, GTF는 세포내로 glucose진입을 촉진하는 insulin의 작용에 활력을 더해주는 마치 호르몬과 같은 역할을 하는 물질로 insulin에 대한 효과로 인하여 결과적으로 탄수화물, 단백질, 그리고 지방의 대사에 중요한 역할을 하게 된다(Anderson, 1987; Mertz, 1993). Steele 등(1977)은 크롬이 함유된 synthetic glucose tolerance factor가 돼지에서 insulin activity를 상승시킨다고 보고하였다. 하지만 Steele 등(1982)은 돼지에게 크롬을 급여시 hepatic insulin binding에는 영향이 없지만 사료효율과 성장률이 증가하였다고 보고하였다.

또한 환경적, 생리적 스트레스 상황하에서 가축에 급여시 체내 glucose대사의 활성화로 항스트레스 작용을 할 뿐만 아니라 가축의 항병력 개선에도 영향한다. Chang 과 Mowat(1992)는 예방 또는 치료용으로 항생제 처리를 하지 않은 숫송아지에게 Cr을 급여시 증체율이 개선되었고, Burton 등(1993)은 젖소에서 면역능력이 향상되었다고 보고하였다.

Evans(1989)와 Kaats 등(1991)은 Chromium picolinate를 사람에게 보충급여하였을 때 lean body mass가 증가하고 체지방이 감소한다고 하였으며, 체내이용 효율성을 향상시키기 위한 유기태 물질과 chelate 결합한 Cr-methionine을 rat에 첨가시 체지방량과 혈액성상 등에 개선(김 등, 2003)이 되었다고 보고되었다. Lindemann 등(1995)이

Cr-picolinate의 형태로 Cr 200ppb를 사료내 첨가하여 급여하였을때 돼지 도체성적이 좋았다. 또한 Caparwenk(1995)의 보고에 의하면 chromium nicotinate는 비육돈의 성장률과 도체성적에 대하여 영향이 있음을 보여주었으며, Kormegay 등(1997)은 육성 비육돈에서 chromium picolinate로 Cr 200ppb를 공급받은 돼지는 배장근 단면적이 더 넓었고, 질소흡수율과 DM 소화율도 개선되었다고 하였다. Page 등(1993)은 chromium picolinate를 급여한 육성 비육돈에서 혈중 콜레스테롤 함량이 감소되었다고 하였다.

가축사료에 첨가되는 무기태 광물질의 경우 가축에 급여시 10%미만의 낮은 흡수율로 이용성이 매우 낮다. Anderson(1987)에 의하면 흡수된 무기태 Cr량은 0.4~3%밖에 되지 않는다고 보고하였다. 따라서 유기태 광물질의 개발의 필요성이 대두되고 있다. 아연, 구리, 망간등의 광물질의 경우 다양한 유기태 제품이 개발 및 생산되고 있으나 유기태 크롬의 종류는 현재 매우 제한적이다. 유기태 형태로서의 Cr의 보충은 비육돈에서 육질을 개선하는 효과가 있어 육질조절물질로서 저지방 축산물의 생산기능도 수행할 수 있다.

본 실험은 미량광물질로서 무기태 크롬($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)과 현재 판매되고 있는 유기태 크롬인 Chromium-picolinate와 본 연구진이 개발한 Chromium-methionine의 첨가가 육성비육돈의 소화율, 혈액성상, 그리고 도체품질에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 시험장소

본 실험은 강원대학교 부속목장(양돈사)에서 실시하였으며, 연구진에 의해 개발된 Cr-methionine의 육성비육돈의 성장단계별 소화율 및 도체품질에 미치는 영향을 보기 위하여 공시동물로는 3원 교잡종(Landrace×Duroc×Yorkshire)으로 개시체중 19kg의 육성돈을 처리당 6두로 5처리한 30두를 공시하여 소화시험 및 도체품질 검사에 이용하였다.

2. 시험사료 및 시험설계

시험사료는 가루형태의 시판사료를 대조구로 하여, 여기에 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 Cr-picolinate, Cr-methionine을 첨가한 처리구를 두었다. 시험사료의 배합비는 Table 3-2에서와 같고, 처리에 따라 무기태 Cr으로는 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 200ppb(CrCl₃200)첨가하였으며 유기태 Cr첨가구에는 시판되고 있는 Cr-picolinate를 200ppb(CrPic200)를 첨가하였다. Cr-methionine첨가구에는 각각 200ppb(CrMet200) 또는 100ppb(CrMet100)을 첨가하여 돼지에서의 반응성을 평가하였다. 각 처리당 6두씩 동일 돈방에서 사육하였으며 시험사료와 물은 무제한 급여하였다. 본 시험에 사용된 사료내 영양소 함량은 NRC 사양표준에 맞추어 배합된 관행사료를 이용하였다.

Table 3-1. Formula and chemical composition of growing pig basal diet

Ingredients	Growing
Corn	54.11
Soybean meal	32.65
Molasses	3.00
호분	1.34
DCP	1.54
마이맥스	0.05
NaCl	0.25
animal fat	5.40
Phytase	0.20
Choline chloride	0.16
Tocomix	0.05
DL-methionine	0.03
L-lysine	0.30
Biotin	0.05
Vit. AD ₃	0.03
Vit. Mix. ^a	0.25
Min. Mix. ^b	0.15
Others	0.44
Chemical composition*	
Crude protein(%)	19.50
Crude fat(%)	7.76
Ash(%)	5.48
DE(Kcal/Kg)	3590
Ca(%)	1.00
P(%)	0.60
Lys(%)	1.27
Met+Cys(%)	0.65

* Calculated value

a The vitamin premix contains the following per kg of diet :

Vit. A, 16,000IU; vit. D₃, 2,450IU; vita.E, 87.5mg; vit. B₁, 1.88mg;
vit. B₂, 6.25mg; vit. B₆, 2.5mg

b The mineral premix contains the following per kg of diet : Mn, 60mg;

Zn, 105mg.; Fe, 150mg; Cu, 105mg; I, 0.75mg; Se, 0.3mg

3. 조사항목

가. 영양소 소화율

크롬별 수준 첨가에 의한 자돈에서 육성기의 성장단계별 영양소 소화율을 평가하기 위하여 간접소화율 측정방법을 이용하였다. 본 실험에서는 시험사료에 chromium을 첨가 하였기 때문에 관행적 간접소화율 측정방법에서 사용되는 외부marker인 Cr₂O₃의 사용을 배제하였다. 따라서 외부 marker대신 내부 marker인 acid insoluble ash(AIA)를 이용하여 분석하였으며 이유시기와 육성전기에는 소화시험 사료에 내부 marker의 분석을 용이하게 하기 위하여 celite를 각각 0.5%씩 첨가하였다. 또한 celite 첨가 시험사료 급여후 정확한 채분을 위하여 celite첨가 시험사료에 FeO₃를 1%첨가하여 분의 색깔의 변화를 통하여 celite함유 시험사료에 대한 정확한 채분을 가능하게 하였다. 하지만 육성후기와 비육기에는 분석시 충분한 양의 불용성 광물질을 확보할 수 있기 때문에 celite와 FeO₃를 첨가하지 않았다.

AIA의 분석은 McCarthy et al.(1974)의 방법에 따라 4N-HCl로 소화시킨 후 여과지(whatman No. 41)로 여과하여 회화시킨다.

소화율은 다음의 식에 따라 시험사료와 분의 분석결과로부터 계산되었다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{1 - (\text{사료중의 AIA함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%})}{\text{분중의 AIA함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%}} \times 100$$

나. 분내 광물질 배출량

분내 광물질 분석을 위해 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 분쇄된 분의 시료를 각 처리구와 반복별로 1g씩 칭량하여 분해용 튜브(50ml)에 넣는다. 질산(65%,v/v) 10ml와 끓임쪽(3~4개)을 첨가하여 60℃로 예열되어 있는 dry heating block에서 약 30분간 분해한다. 모든 시료가 질산용액에 녹아있음을 확인한 후 110℃에서 1시간동안 가열한 다음 다시 150℃에서 30분에서 1시간 더 가열한다. 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, 다시 질산 10ml를 첨가하고 튜브로부터 흰색의 연기가 나올 때 까지 150℃에서 1시간 더 분해시킨다. 분해가 완료된 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, Hydrogen peroxide 4ml를 튜브에 넣고 잘 혼합한 다음 110℃에서 1시간 정도 분해시킨다. 분해

가 끝난 후 튜브에 3차 증류수 첨가하여 filter paper(Whatmam No. 42)로 여과시켜 50ml 메스플라스크에 담는다. 다시 0.45 μ m syringe membrane filter로 여과하여 새로운 50ml 튜브에 담는다.

광물질 분석은 유도결합 플라즈마 분광계(inductively coupled plasma spectrometer, ICP; PS-950, Leman lab.)를 이용하여 분석하였다. 광물질 분석은 총 7개 광물질(Fe, Cu, Zn, Cr, Na, Mg, Ca)을 측정하였다. 검량선 작성에 필요한 표준광물질 (HIGH-PURITY STANDARDS Co., USA) ICP분석용을 이용하였다.

다. 혈액성상 분석

자돈에서 육성비육의 성장단계별 혈액의 생화학 분석을 위하여 Cr-methionin과 Cr-picolinate 또는 CrCl₃의 첨가에 따른 혈액내 생화학 수치의 변화를 조사하였다. 생화학 분석을 위하여 사양시험 종료 후 자돈의 경정맥에서 채혈하여 상온에서 약 2시간 방치하여 혈액을 응고시킨 후 4℃ 3000 rpm에서 15분간 원심분리를 통해 혈청을 분리하여 분석일까지 냉동고 -30℃에서 보관하였다. 분석성분중 ALP(alkaline phosphatase), Ca(calcium), Chol(cholesterol), TP(total protein), TG(triglycerides), Glu(glucose), BUN(blood urea nitrogen), Crea(creatinine)은 혈액자동분석기를 이용하여 분석하였다. 그리고 돼지혈청내 insulin, growth hormone은 시판 분석 kit(Linco Co., USA)을 이용하였다. 이 방법은 radioimmuno assay(RIA)를 이용하는 방법으로 이 kit에는 검출 항체가 I¹²⁵로 labeling되어있다. 이 radioisotope의 반감기가 60.4일로 통상 구매후 30일 이내 분석하여야 한다.

라. 도체품질 평가

도체품질의 평가는 NPPC(national pork producers council)의 지침에 따라 실시한다. 배장근 단면적은 10번째와 11번째 갈비사이를 측정하고, 수직부위의 등지방두께를 측정한다. standardized fat free lean의 함량은 도체시 측정한 온도체 무게와 함께 NPPC에서 제시한 공식에 의해 계산한다.

4. 통계처리

모든 분석 결과의 통계분석은 SAS program(2004)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였으며, 처리평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법 (Snedecor and Cochran, 1980)을 이용하였다.

제3절. 결과 및 고찰

성장단계별 영양소 소화율에 대한 결과는 표 2와 같다. 20~50kg에서는 조회분 소화율에서 Chromium methionine을 급여한 처리구에서 다른 처리구보다 낮은 경향을 보이고 있으나 조단백, 조지방, 에너지, 총탄수화물 소화율에서는 처리구간 차이를 보이지 않았다. 50~90kg 과 90~105kg에는 CrCl₃ 200ppb를 급여한 처리구에서 단백질과 에너지 소화율이 증가하였다(p<0.05).

Table 3-2. Effects of chromium sources on nutrients digestibility in growing-finishing pigs

Weight	Items	Treatments					SEM
		Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
20~50kg	CP	80.07	81.12	79.17	77.01	77.71	3.20
	EE	83.62	83.27	81.01	78.05	77.45	3.73
	Ash	57.76 ^a	51.49 ^{ab}	53.40 ^{ab}	47.72 ^{bc}	42.08 ^c	3.99
	Energy	80.62	80.76	80.87	78.62	79.42	2.96
	Tatal CHO	84.85	84.73	85.43	83.80	84.65	2.44
50~90kg	CP	76.38 ^a	82.07 ^a	77.87 ^a	62.93 ^b	78.37 ^a	3.06
	EE	74.33 ^b	86.18 ^b	83.70 ^a	76.08 ^b	83.22 ^a	2.29
	Ash	50.48 ^b	57.75 ^a	56.06 ^a	44.80 ^c	49.49 ^{bc}	2.96
	Energy	81.05 ^{cd}	85.97 ^a	85.00 ^{ab}	79.89 ^d	83.20 ^{bc}	1.24
	Tatal CHO	87.18	89.23	89.63	87.49	88.62	1.55
90~110kg	CP	78.40 ^b	86.29 ^a	81.84 ^b	80.34 ^b	80.83 ^b	2.11
	EE	80.39 ^c	90.79 ^a	87.11 ^{ab}	81.35 ^{bc}	86.11 ^{abc}	3.21
	Ash	47.21 ^c	62.34 ^a	53.54 ^{bc}	56.48 ^{ab}	52.04 ^{bc}	3.85
	Energy	83.06 ^b	88.69 ^a	85.17 ^b	84.63 ^b	84.41 ^b	1.51
	Tatal CHO	88.06 ^b	91.54 ^a	89.21 ^b	89.24 ^b	88.70 ^b	1.08

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

Chromium 첨가수준별 급여가 분내 광물질 배설량에 미치는 영향은 표 3과 같다. 20~50kg에는 Cr-Met100구와 CrCl₃ 급여구에서 분중 Cr의 함량이 가장 낮았으며, 90~110kg에서는 Cr-Met 200ppb를 급여한구에서 분 중 Cr의 함량이 유의적으로 낮았다. 이는 Chromium methionine의 체내 이용율이 CrCl₃ 또는 Cr-Picolinate 보다 높다는 것을 간접적으로 알 수 있는 척도가 될 수 있다.

Table 3-3. Effects of chromium sources on fecal mineral excretion in growing-finishing pigs

Weight	Items	Treatments					SEM
		Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
20~50kg	Cr	12.2 ^a	8.4 ^b	7.5 ^b	12.2 ^a	8.0 ^b	0.5
	Cu	401.7 ^{ab}	424.0 ^a	315.7 ^b	375.3 ^{ab}	400.0 ^{ab}	47.1
	Fe	9748.7	10763.0	7617.3	9488.7	9899.3	1713.8
	Zn	1003.3	882.7	1560.0	825.3	922.7	499.4
	Na	915.3	625.0	645.7	647.3	683.3	200.3
	Mg	6350.7 ^a	6413.3 ^a	5289.7 ^b	5850.3 ^{ab}	6198.3 ^a	449.3
	Ca	4183.7 ^{ab}	4162.7 ^{ab}	4311.7 ^a	4168.7 ^{ab}	3937.0 ^b	147.1
50~90kg	Cr	16.1	17.4	18.5	18.3	18.4	1.5
	Cu	330.7 ^c	405.0 ^a	375.0 ^{ab}	360.0 ^{bc}	374.3 ^{ab}	20.0
	Fe	12991.2	13396.0	13323.0	14593.7	14821.0	2458.3
	Zn	381.0 ^b	466.3 ^a	450.7 ^a	474.7 ^a	454.0 ^a	27.9
	Na	81.05 ^{cd}	85.97 ^a	85.00 ^{ab}	79.89 ^d	83.20 ^{bc}	1.2
	Mg	5701.0 ^c	6341.3 ^{ab}	6589.0 ^a	6054.7 ^b	6363.3 ^{ab}	1905.0
	Ca	4313.0	4172.7	4298.0	4290.3	4290.7	149.0
90~110kg	Cr	20.8 ^{ab}	23.6 ^a	22.4 ^a	15.5 ^c	17.1 ^{bc}	2.5
	Cu	405.3 ^{bc}	431.0 ^{ab}	466.5 ^a	375.8 ^c	458.3 ^a	21.9
	Fe	16012.3 ^{ab}	14419.7 ^b	18300.3 ^a	14777.0 ^b	18331.3 ^a	1588.3
	Zn	484.0 ^c	492.0 ^c	553.7 ^b	500.7 ^c	597.3 ^a	23.1
	Na	1807.0	1523.0	1716.0	1444.0	2287.0	468.7
	Mg	6103.7 ^c	6429.3 ^b	6799.7 ^a	5766.7 ^d	6574.0 ^{ab}	177.8
	Ca	4229.3	4369.7	4338.7	4498.7	4436.7	182.3

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

Table 3-4. Effects of chromium sources on serum traits in growing-finishing pigs

Weight	Items ⁺	Treatments					SEM
		Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
20~50kg	ALP	373	426	417	448	430	71
	BUN	18.8 ^a	13.4 ^b	14.4 ^b	12.4 ^b	14.3 ^b	2.5
	Ca	12.3	12.3	12.1	12.6	12.0	0.5
	Chol	108.6	97	98.4	105.8	104.4	11.8
	Creat	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.1
	Glu	106.6	98.7	97.2	110.2	103.2	9.6
	TP	7.7	7.8	7.7	8.3	7.9	0.5
	Trig	46.6 ^{ab}	61.3 ^a	39.8 ^b	51.6 ^{ab}	55.6 ^{ab}	13.3
50~90kg	ALP	297	311	326	288	340	71
	BUN	17.5 ^{ab}	13.3 ^{ab}	13.5 ^{ab}	12.6 ^b	21.7 ^a	6.6
	Ca	11.9	12.1	11.9	11.6	10.7	1.5
	Chol	107.8 ^{ab}	106.7 ^{ab}	98.8 ^b	96.0 ^b	127.2 ^a	17.1
	Creat	1.1	1.2	1.1	1.2	1.3	0.1
	Glu	98.8	88.7	88.8	97.2	101.7	16.0
	TP	7.5	7.8	7.5	7.5	8.6	1.1
	Trig	44.0	50.3	36.3	37.2	49.3	7.1
90~110kg	ALP	247 ^c	346 ^{ab}	382 ^a	268 ^{bc}	272 ^{bc}	71
	BUN	15.5	16.5	17.1	14.2	17.3	4.2
	Ca	12.0	13.5	14.1	11.9	12.2	2.0
	Chol	107.3 ^b	120.5 ^{ab}	134.4 ^a	111.0 ^{ab}	125.4 ^{ab}	17.2
	Creat	1.3	1.4	1.7	1.4	1.4	0.3
	Glu	75.8 ^{ab}	92.2 ^a	102.0 ^a	80.5 ^{ab}	63.5 ^b	19.1
	TP	7.9	8.9	9.5	8.1	8.5	1.4
	Trig	47.2	41.3	48.6	56.0	46.8	10.9

a,b,c Means with different superscripts within the same row differ(P<0.05)

+ ALP,U/L; BUN, mg/dL; Ca, mg/dL; Chol, mg/dL; Creat, mg/dL; Glu, mg/dL; TP, g/dL; Trig, mg/dL

혈액성상에 대한 결과는 표 3-4와 같다. 20~50kg에서 triglyceride의 농도가 CrPic

200ppb 처리구에서 가장 낮았으나($p < 0.05$) 나머지 처리구간 차이는 없었다. 50~90kg에서 CrMet 100ppb 첨가구의 cholesterol 함량이 CrPic 200ppb 와 CrMet 200ppb 첨가구에 비하여 증가하는것을 볼수 있다($p < 0.05$). 90~105kg에서는 CrPic 200ppb 첨가구의 cholesterol 함량이 대조구보다 증가하였으나 다른 크롬 첨가구와 차이가 없었다.

Cr의 작용기작에 관한 연구가 최근 들어 많이 이루어짐으로서 상당수의 대사 기전이 밝혀지게 되었는데 Cr은 glucose 대사와 insulin, 아미노산의 흡수와 대사, 핵단백질 및 RNA 합성에 영향을 미치며 혈중 콜레스테롤 함량의 감소에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Page 등, 1993). 정 등(1995)은 chromium picolinate를 첨가한 사료를 급여한 결과 혈중 콜레스테롤 함량은 오히려 증가한다고 하였으나 Page 등(1993)은 chromium picolinate를 급여한 육성·비육돈에서 혈중 콜레스테롤 함량이 감소되었다는 보고와는 다른 결과를 보여주고 있다. 권 등(1999)은 chromium nicotinate 제제를 비육돈 사료에 첨가하였을때 혈중 총콜레스테롤 함량이 대조구가 97.0mg/dl이었으며 400ppb 구와 800ppb 급여구에서 각각 93.6 과 95.1mg/dl로 약간 낮은 경향을 나타내었으나 처리간에 유의성은 없었다.

Table 3-5. Effects of chromium sources on carcass characteristics in growing-finishing pigs

Items	Treatments					SEM
	Control	CrCl ₃ 200	CrPic200	CrMet200	CrMet100	
Carcass weight(kg)	80	81	83	75	81	5.6
Backfat thickness(cm)	2.8 ^a	2.4 ^{ab}	2.4 ^{ab}	1.9 ^b	2.3 ^{ab}	0.3
Loin muscle area(cm ²)	51	48	52	52	52	4.9
Lean perchantage (%)	58 ^b	59 ^{ab}	60 ^{ab}	63 ^a	60 ^{ab}	2.6

^{a,b} Means with different superscripts within the same row differ($P < 0.05$)

도체품질은 처리구간 아무런 차이가 없었다. 하지만 살코기 함량이 CrMet 첨가구에서 대조구보다 개선된 경향을 나타내었으며 등지방두께도 CrMet 첨가구에서 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 권 등(1993)은 Chromium nicotinate를 급여한 구에서 등지방 두께가 유의적으로 감소하였다고 보고하고 있다.

제4절 크롬과 구리의 형태별 병용급여가 육성돈의 육성성적, 소화율 및 분의 광물질 배출량에 미치는 영향

1. 서 론

미량 광물질은 가축의 체내 대사에서 필수 영양소이며, 고유의 생화학적 역할과 영양소 대사, 항병력 증진효과에 관여하며 체내에서 자체 합성을 못하므로 반드시 외부로부터 공급을 받아야만 한다. 또한 중독되지 않는 범위내에서 일정 요구량에 맞추어 급여시 가축의 정상적인 성장을 보장하고 나아가 기능성 축산물 생산기능 또는 환경친화 축산경영을 가능케 한다. 하지만 가축 사료에 첨가되는 미량광물질의 형태는 무기태로 체내 흡수율이 매우 낮기 때문에 NRC 권장수준 보다 많은 양을 첨가하고 있는 실정이다. 최근들어 체내 흡수율을 증가시키기 위하여 여러 종류의 유기태 광물질이 개발되고 있다. 하지만 이런 유기태 광물질들도 결합 형태에 따라 흡수율과 급여효과가 매우 다르게 나타난다. 이러한 유기태 광물질의 형태중 최근에 개발된 것이 chelation 방법이다. Chelation이란 둘 또는 그 이상의 아미노산 분자와 금속 이온을 공유 또는 배위결합 형태를 의미하며 분자량은 800dalton 미만을 의미한다(AAFCO, 1998). 이 아미노산 chelate 광물질은 불용성 화합물인 무기태 광물질에 비해 가용성이며 분자량이 낮아 소장에서 흡수율이 증가되며, 세포와 조직내 광물질의 흡수율이 아미노산의 흡수로 인해 개선되므로 조직내 축적을 또한 증가된다.

Copper는 가축의 성장촉진을 위한 필수 광물질로서 CuSO_4 형태의 다양한 구리 수준(0~750ppm)에서 250ppm 수준이 육성·비육돈에 있어 육성성적에 최적임을 시사했다(Bunch et al., 1961; Hawbaker et al., 1961; Kline et al., 1971). 포유자돈에서는 사료에 250ppm copper 첨가시 125ppm 보다 육성성적의 개선이 보고되었다(Bunch et al., 1961; Gipp et al., 1973).

Kornegay and Harper (1997)은 돼지에서 섭취한 무기태 copper의 70%~95%가 분으로 배설한다고 보고함으로써, 미량광물질 과잉급여에 의한 토양오염의 가능성을 제

시하였다. 반면 Armstrong et al. (2004)은 사료내 copper 함량이 많을수록 배설되는 copper의 함량도 많아지나, 유기태 copper를 사용하면 무기태 copper에 비하여 적게 배설된다고 보고함으로써 유기태 광물질의 사용으로 미량광물질의 토양내 축적을 예방할 수 있음을 시사하였다.

가축 영양에 있어 Chromium의 생화학적 역할은 지방대사, 탄수화물대사, 단백질 합성에 관여하며, glucose tolerance factor(GTF)의 구성성분으로 작용하여 insulin의 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Schwartz and Mertz, 1959). 또한 혈액내 cholesterol의 항상성 유지, HDL-cholesterol의 증가, glucose와 아미노산의 세포내 흡수 촉진 및 면역기능유지에도 중요한 역할을 수행한다(Anderson, 1987; Mertz, 1969).

Page et al. (1992b)은 돼지에서 chromium을 200ppb 급여시 일당증체량과 사료섭취량이 증가했다고 보고한 반면, Lien et al. (1993)은 육성성적에 영향을 미치지 않는다는 상반된 결과도 보고하였다. 지금까지 chromium 첨가에 의해 육성 능력 개선효과는 정상적인 가축보다는 스트레스 상태의 가축에서 나타나고 있다. Burton (1995)은 chromium의 급여로 glucose 흡수가 증가되어 영양, 대사, 신체, 환경 및 생리적 스트레스 상태의 가축에서 필요한 에너지를 공급 받을 수 있기 때문에 스트레스가 감소된다고 보고하였다.

한편, 돼지에서는 copper-zinc 병용첨가로 인하여 증체량이 개선되었으며(Hoefler et al, 1960), Cu-lysine complex의 200ppm 급여시 chromium의 흡수율을 감소시킨다고 보고되었다(Apgar and Kornegay, 1996). Ohh and Lee(2005)는 유기태 광물질 또는 무기태 광물질 사이에서 교호 또는 길항작용의 가능성을 제시하였다. 그러나 Chromium과 copper의 교호 및 길항작용에 대한 평가는 매우 전무한 상태이다.

따라서 본 실험은 육성돈에서 미량 광물질 사이의 교호 및 길항작용을 평가하기 위하여 유기태 또는 무기태 chromium과 copper의 급원별 병용급여가 육성돈의 육성성적, 영양소 소화율 및 분내 광물질 배설량에 미치는 영향을 평가하고자 요인실험(2X2)을 통하여 조사하였다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물, 시험기간 및 장소

본 실험은 2005년 8월 31일부터 10월 5일까지 34일간 강원대학교 부속 목장(양돈사)에서 유기태 및 무기태 형태의 chromium과 copper의 병용급여 후 육성돈의 육성 성적, 영양소 소화율 및 분의 광물질 배출량에 미치는 영향을 평가하기 위하여 공시동물로 3원교잡종([Landrace × Yorkshire] × Duroc)으로 평균개시체중 61.2Kg 육성돈 총 41두를 공시하여 실험에 이용하였다.

2. 시험사료 및 실험설계

시험사료는 항생제를 첨가하지 않은 가루형태의 시판사료(Table 4-1.)를 이용하였으며, 광물질 보충사료를 제외한 사료를 먼저 배합한 다음 table 4-2에서와 같이 유기태 또는 무기태 chromium과 copper 및 다른 광물질을 예비 배합후 사료에 첨가하여 재배합하였다. chromium과 copper를 제외한 광물질은 모두 무기태로 급여하였으며, 유기태 chromium과 copper는 methionine과 chelation된 형태를 이용하였다. 무기태 chromium과 copper는 각각 chromium chloride와 copper sulfate를 이용하였다. 사료와 음수는 모두 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험구는 4개의 처리구로 4처리 3반복 반복 당 3~4두씩 완전임의 배치하였다.

Table 4-1. Formula and chemical compositions of experimental diet

Ingredient	%
Corn	45.32
Wheat	17.00
Lupin kernel	4.00
Rice bran	2.00
Soybean meal	11.60
Wheat bran	2.96
Rapeseed meal	2.50
Parm meal	3.00
Animal fat	2.50
Molasses	3.00
L-lysine	0.50
Choline chloride	0.06
Limestone	1.26
Tricalcium phosphate	2.02
Salt	0.28
Vitamin ¹⁾ / Mineral premix ²⁾	2.00
Total	100
Chemical composition³⁾	
ME(kcal/kg)	3222
CP(%)	18
EE(%)	5.9
Ash(%)	7.4

¹⁾ Vitamin premix contains the following per Kg of diet : Vit.A, 10,000IU/Kg; Vit.D3, 2,000IU/Kg; Vit.E, 40ppm; Vit.K3, 2ppm; Vit.B1, 10ppm; Vit.B2, 4ppm; Vit.B6, 4ppm; Vit.B12, 40ppb; Niacin, 20ppm; Pantothenic acid, 15ppb; Folic acid, 3ppm; Biotin, 0.3ppm; Ethoxyquin 0.5ppm

²⁾ Mineral premix contains the following per Kg of diet : Fe, 80mg; Cu, 200mg; Zn, 50mg; Mn, 50mg; Co, 5mg; I, 4.5mg; Se, 2mg; Cr, 200 μ g

³⁾ Calculated value

Table 4-2. Experimental design.

Sources	Treatments			
	Cr-Met		CrCl ₃	
	Cu-Met	CuSO ₄	Cu-Met	CuSO ₄
Cr-Met	200ppb	200ppm		
CrCl ₃			200ppb	200ppb
Cu-Met	200ppm		200ppm	
CuSO ₄		200ppm		200ppm

3. 조사항목

가. 육성성적

일당 증체량(average daily gain; ADG)은 시험사료 급여 개시 체중과 종료시 체중의 무게차이를 반복군내 공시두수와 시험기간으로 나누어 계산하였고, 일당 사료 섭취량(average daily feed intake; ADFI)은 반복 당 총 사료급여량을 측정하여 종료시 체중 측정일에 사료잔량을 공제하여 반복군내 공시두수와 시험기간으로 나누어 계산하였다. 사료 요구율(feed/gain; F/G)은 사료 섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다.

나. 영양소 소화율

유기태 또는 무기태 chromium과 copper의 병용급여에 의한 영양소 소화율을 평가하기 위하여 간접소화율 측정방법을 이용하였다. 본 실험에서는 시험사료에 chromium을 첨가 하였기 때문에 관행적 간접소화율 측정방법에서 이용되는 marker인 chromium oxide를 이용할 수 없다. 따라서 McCarthy et al.(1974)이 개발한 AIA(acid-insoluble ash) 법을 본시험에서 이용하였다. 이 방법은 가축의 체내에서 소화되지 않는 불소화성 광물질을 marker로 이용하는 방법이다. 본 시험에서는 불소화성 광물질의 오차를 최소화하기 위해 celite를 배합사료에 0.2% 첨가하여 가축에 급여하였다. 또한 시험사료 급여 후 배출되는 시험 분을 확인하기 위하여 시험사료에 Fe₂O₃를 0.5% 첨가하였다. AIA의 분석은 McCarthy et al.(1974)의 방법에 따라 4N-HCl로 소화시킨 후 filter paper(Whatman no. 42)로 여과하여 회화 시킨다.

소화율은 다음의 식에 따라 시험사료와 분의 분석 결과로부터 계산되었다.

$$\text{영양소 소화율(\%)} = \frac{1 - (\text{사료중의 AIA함량\%} \times \text{분중의 영양소함량\%})}{\text{분중의 AIA함량\%} \times \text{사료중의 영양소함량\%}} \times 100$$

다. 분내 광물질 배출량

분내 광물질 분석을 위해 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 분쇄된 분의 시료를 각 처리구와 반복별로 1g씩 칭량하여 분해용 튜브(50ml)에 넣는다. 질산(65%,v/v) 10 ml와 끓임쪽(3~4개)을 첨가하여 60℃로 예열되어 있는 dry heating block에서 약 30 분간 분해한다. 모든 시료가 질산용액에 녹아있음을 확인한 후 110℃에서 1시간동안 가열한 다음 다시 150℃에서 30분에서 1시간 더 가열한다. 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, 다시 질산 10ml를 첨가하고 튜브로부터 흰색의 연기가 나올 때 까지 150℃에서 1시간 더 분해시킨다. 분해가 완료된 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, Hydrogen peroxide 4ml를 튜브에 넣고 잘 혼합한 다음 110℃에서 1시간 정도 분해시킨다. 분해가 끝난 후 튜브에 3차 증류수 첨가하여 filter paper(Whatmam No. 42)로 여과시켜 50ml 메스플라스크에 담는다. 다시 0.45 μ m syringe membrane filter로 여과하여 새로운 50ml 튜브에 담는다.

광물질 분석은 유도결합 플라즈마 분광계(inductively coupled plasma spectrometer, ICP; PS-950, Leman lab.)를 이용하여 분석하였다. 광물질 분석은 총 7개 광물질(Fe, Cu, Zn, Cr, Na, Mg, Ca)을 측정하였다. 검량선 작성에 필요한 표준광물질 (HIGH-PURITY STANDARDS Co., USA) ICP분석용을 이용하였다.

4. 통계처리

모든 분석 결과의 통계분석은 SAS program(2004)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였으며, 처리평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법 (Snedecor and Cochran, 1980)을 이용하였다. 광물질 종류와 형태에 따른 요인분석은 contrast를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

Chromium 및 copper의 급원별 병용급여가 육성성적에 미치는 영향은 table 4-3과 같다. 일당증체량(ADG), 일당사료섭취량(ADFI), 사료요구율(F/G)은 처리구간 아무런 차이가 없었다.

Table 4-3. Effect of different sources of chromium and copper on the growth performances in growing pig.

Item	Cr-Met		CrCl ₃		SEM ¹⁾
	Cu-Met	CuSO ₄	Cu-Met	CuSO ₄	
ADG (g/day/pig)	812	850	914	810	69
ADFI (g/day/pig)	2334	2532	2601	2464	218
F/G (feed/gain)	2.90	2.98	2.84	2.71	0.25
Contrast	ADG		ADFI		F/C
Chromium vs. Copper	NS ²⁾		NS		NS
Organic vs. Inorganic	NS		NS		NS
Mineral × Source	NS		NS		NS

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

²⁾ Non significant

Mooney and Cromwell (1997)은 육성비육돈에 유기태 chromium으로서 Cr-picolinate를 200ppb 첨가시 일당증체량이 개선되었으나 사료요구율에는 아무런 영향이 없었다. 반면, Lindemann(1995 a.b)는 Cr-picolinate 200ppb를 육성돈에 급여시 증체량에는 아무런 차이가 없었던 반면, 사료요구율은 개선되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 정상적인 돼지에 유기태 chromium의 첨가로 뚜렷한 개선효과를 얻기 힘들다는 것을 의미한다. 비록 본 시험에서 사용된 Cr-methionine chelate와는 다른 형태의 유기태 chromium을 사용한 결과여서 직접 비교하기는 어려우나 본 실험에 사용된 돼지들의 경우 인위적인 스트레스가 없었기 때문에 육성성적에 아무런 차이가 없었던 것으로 판단된다.

Copper의 사료내 첨가는 서론에서 기술한 바와 같이 NRC 권장급여량 보다 과다

급여시 육성성적이 개선되는 것으로 보고되고 있으며 이러한 결과는 유기태 또는 무기태 copper를 급여시에도 비슷한 결과를 보이고 있다(Stansbury et al., 1990). 하지만 본 시험의 경우 기존의 연구결과에서 보고된 육성성적 개선효과와는 반대로 나타났으며, 특히 지금까지 육성성적 개선효과가 보고된 논문들에서 첨가한 수준과 비슷한 수준이었음에도 불구하고 개선효과를 보이지 않은 것은 부분적으로 chromium광물질에 의한 저해 효과인 것으로 판단된다. 또한, 어린돼지에서 copper과 zinc의 병용급여시 copper 단독급여구보다 일당증체량과 사료섭취량이 증가하였다고 zinc단독급여구보다는 감소하였다는 연구결과(Smith et al., 1997)로 미루어 chromium과 copper의 병용급여가 육성능력에 영향할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4-4. Effect of different sources of chromium and copper on nutrients digestibility in growing pig

Item	Cr-Met		CrCl ₃		SEM ¹⁾	
	Cu-Met	CuSO ₄	Cu-Met	CuSO ₄		
CP	72.97 ^a	63.06 ^b	76.00 ^a	77.63 ^a	3.79	
EE	78.07 ^{ab}	71.44 ^b	81.07 ^{ab}	84.39 ^a	5.92	
Ash	42.63 ^a	26.19 ^b	35.80 ^{ab}	43.83 ^a	7.25	
Energy	77.12 ^a	67.11 ^b	76.88 ^a	79.16 ^a	3.32	
Total CHO	83.14 ^a	76.39 ^b	82.36 ^a	84.18 ^a	2.44	
Contrast		CP	EE	Ash	Energy	Total CHO
Chromium vs. Copper		NS ²⁾	NS	NS	NS	NS
Organic vs. Inorganic		**	*	NS	*	*
Mineral × Source		*	NS	*	*	*

^{a, b}, *, ** Means with different superscripts within the same row differ (P<0.05, 0.01)

¹⁾ Standard error of mean (P<0.05)

²⁾ Non significant

Chromium 및 copper의 급원별 병용급여가 영양소 소화율에 미치는 영향은 table 4-4와 같다. Cr-methionine에 Cu-methionine과 CuSO₄를 병용 첨가시 소화율은 CuSO₄를 급여한 구에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다(p<0.05). 반면 CrCl₃에 Cu-methionine과 CuSO₄를 병용 첨가시 소화율은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 CuSO₄의 경우 Cr-methionine보다 CrCl₃와 병용 첨가시에서 소화율이 증가하는 것

으로 나타났다($p < 0.05$). 이러한 결과는 CuSO_4 는 chromium의 급여 형태에 따라 소화율에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 무기태 chromium과 무기태 copper 첨가구의 영양소 소화율이 가장 높은 결과를 보여주었다. 각각의 영양소의 소화율에 미치는 광물질의 종류와 급원에 따른 효과를 보면 단백질, 에너지 그리고 총 탄수화물은 광물질 형태 또는 광물질 종류(chromium vs. copper)와 형태(organic vs. inorganic)사이의 상호작용에 의해 영향을 받았으며, 조지방은 광물질의 종류와 형태사이의 상호작용($p < 0.05$)에 의해 영향을 받은 것으로 나타났다. 또한 광물질의 종류(chromium vs. copper)는 각각의 영양소 소화율에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

비록 영양소 소화율에서는 광물질 종류와 형태사이의 상호작용이 있는 것으로 나타났다. 그러나 육성성적에서는 아무런 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 실험에서 선택한 광물질인 chromium과 copper가 다른 영양소들의 소화율에는 영향을 미치지 않지만 성장능력과 밀접한 관련이 있는 조직내 세포 수준의 흡수이용에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한 소화율이 가장 높았던 무기태 chromium과 무기태 copper 첨가구에서의 사료요구율이 타 처리구보다 높은 경향을 보여 주었는데, 이러한 결과는 높은 생물학적 이용성을 가지고 있는 유기태 광물질도 다른 유기태 광물질들과 병용 급여시 길항작용이 존재할 수 있음을 시사한다.

Table 4-5. Effect of different sources of chromium and copper on fecal mineral excretion of growing pig

Minerals(ppm)	Cr-Met		CrCl ₃		SEM ¹⁾		
	Cu-Met	CuSO ₄	Cu-Met	CuSO ₄			
Fe	226	231	218	231	25.06		
Cu	31.43	28.63	29.47	32.53	2.90		
Zn	11.93 ^{ab}	11.00 ^{ab}	10.51 ^b	12.73 ^a	0.94		
Cr	0.38	0.37	0.34	0.34	0.04		
Na	33.40	47.13	48.73	55.87	18.92		
Mg	169.00	171.00	151.33	151.67	14.10		
Ca	97.10	97.27	98.97	98.10	1.97		
Contrast	Fe	Cu	Zn	Cr	Na	Mg	Ca
Chromium vs. Copper	NS ²⁾	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organic vs. Inorganic	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mineral × Source	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

^{a,b}, * Means with different superscripts within the same row differ (P<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (P<0.05)

²⁾ Non significant

Chromium 및 copper의 급원별 병용급여가 분내 광물질 배설량에 미치는 영향은 Table 4-5와 같다. 분내 광물질 중 zinc 함량은 CrCl₃과 Cu-methionine 급여구보다 CrCl₃와 CuSO₄ 급여구에서 낮은 결과를 나타내었으며 이러한 결과는 광물질 종류와 형태가 zinc 배설량에 영향을 준 것으로 판단되었다(p<0.05). 반면 다른 광물질은 처리구 간 아무런 차이를 보이지 않았다. 또한 copper의 함량은 급여 형태 사이에 차이가 없었으나 chromium의 경우 유기태 급여구에서 배설량이 다소 증가한 것으로 나타났다.

Ward et al.(1991)은 사료내 copper가 과량 함유되어 있으면 장내에서 흡수 경쟁으로 인해 zinc의 흡수가 방해된다고 보고하였다. 하지만 본 시험에서는 copper의 첨가 수준이 유기태와 무기태 모두에서 NRC 권장수준보다 높았고, 특히 유기태 copper가 무기태 copper보다 흡수율이 높음에도 불구하고 상반된 결과를 나타내었지만 zinc의 배설량이 다른 광물질 사이의 상호작용에 의해 감소될 수 있다는 가능성을 제시하였다. Hahn and Evans(1975)에 의하면 zinc이 결핍된 쥐에서 chromium의 흡수 및 장내 함량이 증가되었고, 이와 같은 증가는 zinc의 급여로 억제되었다고 한다. 또한

chromium를 급여한 결과 zinc의 흡수 및 장내의 zinc함량이 감소되었기 때문에 chromium과 zinc은 장내에서 공통적인 대사경로를 가진다고 보고하였다. 본 실험에서는 chromium의 급여 형태에 따른 zinc의 배설량에 일관된 경향을 찾기 어려우나 zinc의 흡수에 chromium도 영향하였을 것으로 판단된다. 비록 chromiumrhk copper에 의한 병용첨가가 분내 광물질의 배설량에 영향이 없는 것으로 나타났으나 토양오염 광물질 중 하나인 zinc의 배설량은 낮출수 있는 것으로 판단되었다.

제5절 크롬의 급원별 첨가가 육계의 성장능력, 영양소 이용율, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향

1. 서 론

국내외적으로 「안전하고 위생적인 축산물」 생산에 대한 관심이 고조되면서 환경과 축산물의 안전성에 대한 관심이 고조되고 있다 또한 사육생산비절감과 고품질 축산물 생산 등의 생산성 향상뿐만 아니라, 항병력 및 면역 증강 효과에 대한 방안의 하나로 천연 광물질을 사료화하는 것이 제시되고 있다. 광물질은 동물이나 식물의 체내에서 합성할 수 없으므로 반드시 자연으로부터 공급을 받아야 하며 특히 동물의 신체적 구성에서 차지하는 비율이 극소량인데 반해서 체내 유기 영양소의 대사와 그 자체 고유의 역할로 생리적 대사에 관여를 하는 필수 영양소이다.

Chromium은 미량광물질로서 지방 대사, 단백질 합성, 탄수화물 대사과정에 관여하며, glucose tolerance factor(GTF)의 구성성분으로 작용하여 insulin의 효과를 증가시킨다(Schwartz and Mertz, 1959). 또한 cholesterol의 항상성 유지, HDL-cholesterol의 증가, glucose와 아미노산의 세포내 흡수촉진 및 면역기능을 개선시킨다고 보고하고 있다(Anderson, 1987; Mertz, 1993).

그러나 Chromium은 일반 가축사료에 소량 함유되어 있고 대부분이 무기태의 형태로 존재하며 흡수 이용율이 매우 낮기 때문에 생체 생리적 대사 작용의 역할을 수행할 수 없을(Anderson, 1987) 뿐만 아니라, 체내에서 흡수 이용되지 않은 chromium이 체외로 배설이 되어서 토양과 수질 등의 환경오염원으로 작용을 하게 된다.

지금까지 가축에게 급여한 chromium 형태로는 무기태 chromium과 유기태 chromium의 형태인 metal amino acid complex로서 많은 실험들이 이루어져 왔다. 그중 chromium picolinate를 육성 비육돈 사료에 급여하였을 때 등지방 두께가 14~16% 감소되었고, 배장근 단면적 증가와 혈중 cholesterol을 감소시켰으며(page et al., 1993), 육성 비육돈 사료에 chromium picolinate를 200ppb 급여하였을 때 배장근

단면적 증가와 질소 흡수율과 건물 소화율에 효과가 있다고 보고하였다(kornegay et al., 1997). 그러나 Mooney et al.(1997)은 chromium picolinate를 육성 비육돈에 급여 하였을 때 도체내 단백질과 지방 침착에 아무런 영향을 주지 않았다는 상반된 결과도 보고되고 있다. 이와 같이 현재까지 chromium에 대한 대부분의 연구는 무기태와 유기산복합체(Metal Amino acid complex)에 대한 것이었으며 그 첨가 효과 역시 정확하게 규명되지 않았다.

따라서 Chromium의 체내 이용 흡수율을 향상시키기 위한 다른 방안으로 유기태 물질인 아미노산과 chelate 결합을 하는 방법이 대두되고 있다. 신체 조직은 아미노산과 저분자 펩타이드 등을 효율적으로 잘 흡수하기 때문에 chromium을 아미노산과 저분자 peptide 물질에 chelation을 시키면 단백질 속에 chromium이 숨겨지게 되며, 따라서 소장벽의 용모들로 인해서 단백질 속에 숨겨진 chromium을 흡수하는 상태가 쉬워져 효율적으로 이용 할 수 있게 된다(신,1993).

김 등(2003)은 chromium methionine을 rat에 첨가 시 체지방량과 혈중 total cholestrol 함량이 감소되었던 반면 HDL cholesterol의 함량은 증가 되었다고 보고하였다. Holstein 착유우에 5ppm의 chelated chromium을 급여 하였을 때 생체 내에서 감염에 대한 방어를 할 수 있는 특이적 면역반응을 활성화 시킴으로써 면역조절물질로서 가능성을 제시하였다(Burton et al., 1993). 그러나 chromium methionine의 착염화한 형태의 실험은 특수동물이나 반추가축에서만 한정되어 있고 또한 국내외에서 단위 동물에 대한 급여 실험에 대해서는 전무한 상태이다.

따라서 본 실험은 가축의 생산성 개선과 면역조절물질로서 가능성이 제시된 chromium을 기존의 chromium 급여 형태와 methionine을 chelation한 크롬의 급원별 첨가가 육계의 성장능력, 영양소이용률, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향을 비교 평가하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물, 시험기간 및 장소

본 실험 Chromium의 급원별 첨가가 육계의 성장능력, 영양소 이용율, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 2004년 10월 11일부터 11월 17일까지 5주간 실험하였다. 육성실험은 강원도 춘천시 광판 소재 농장에서 실시하였으며, 면역반응 평가를 위한 실험은 강원 대학교 소동물 사육장에서 별도로 실시 하였다. 공시동물로는 1일령의 육계(Ross종) 총 340 수중, 육성실험과 면역 실험에 각각 300수와 40수를 공시하였다.

사육은 밑면과 윗면이 없는 철제 4각 칸막이로서 육성 실험구 케이지는 140×120×80cm, 면역 실험구 케이지는 120×110×80cm에서 평사하였다.

2. 시험사료 및 실험설계

대조구는 항생제(antibiotics)를 첨가하지 않은 순수 배합사료(Table 5-1.)만을 급여하였으며 처리구(Table 5-2.)는 각각 CrCl₂ 200ppb, Cr-Picolinate 200ppb, Cr-Methionine 200ppb, Cr-Methionine 400ppb를 첨가한 4처리를 두었고 급여한 사료는 크럼블형태의 사료이다. 실험기간동안 시험사료는 전기와 후기로 나누어 제조하였으며, 물과 함께 자유로이 섭취하도록 하였다. 육성 실험구는 대조구와 4개의 처리구로 5처리 4반복 반복당 15수씩 총 300수를 완전임의 배치 하였으며, 면역실험은 처리당 8수씩 총 40수를 완전임의 배치하였다.

3. 조사항목

가. 육성 성적

증체량(weight gain)은 평가 개시일의 무게와 체중 측정일의 무게 차이를 반복군내 공시 수수로 나누어 계산하였고, 사료 섭취량(feed intake)은 사료 급여량에서 체중 측정일에 잔량을 공제 한 후 반복군 공시수수로 나누어 일수당 사료섭취량을 계산하였으며 체중과 사료 잔량 무게 측정 은 3주와 5주차에 각각 실시하였다. 사료 요구율(F/G; feed/gain)은 사료 섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다.

나. ELISA를 이용한 항원항체반응 분석

육계의 면역반응을 평가하기 위하여 면역 항원으로서 LPS(Lipopolysaccharide : thymus dependant antigen)를 복강내에 주사하여 항체 형성 정도를 평가하였다. 1차 접종은 17일령에 LPS를 0.1% NaCl에 용해한 뒤 0.45 μ m micro filter로 여과하여 100 μ l 접종하였으며 2차 접종은 1차 접종 5일 후에 동일한 방법으로 접종하였다. 실험 종료시 의정맥에서 3ml 혈액을 채혈 후 혈청을 분리하였고 분리된 혈청은 분석 전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 분석 방법은 Fig 5-1과 같다.



* 150 μ l의 anti-chicken IgG(3.75 μ g/ml)와 BSA(20 μ g/ml)가 각각의 well에 포함된 Micro-plate

** pH 7.4

***3',3',5',5'-Tetramethylbenzidine(TMB) 1tablet을 Dimethyl sulfoxide 1ml에 녹인 다음 0.05M phosphate-citrate buffer(pH5.0) 9ml를 첨가하여 혼합 후 well에 분주하기 직전에 enzyme substrate 10ml에 2 μ l의 30% hydrogen peroxide를 첨가

Fig. 5-1. ELISA procedures for measurement of anti-LPS antibody titer concentrations.

Table 5-1. Formula and chemical composition of experimental diet

Ingredient(%)	Starter	Finisher
Corn	55.73	48.65
Wheat	15.00	15.00
Rice Bran	1.52	2.00
Soybean meal	21.52	20.36
Rapeseed meal	1.52	2.52
Sesame meal	1.00	-
Meat meal	3.00	2.52
Feather meal	1.00	1.00
Limestone	0.68	0.67
DCP	1.34	1.32
Salt	0.25	0.25
Animal fat	4.04	4.76
Choline	0.13	0.13
DL-Methionine	0.27	0.20
L-Lysine	0.36	0.24
Vit. Premix ^a	0.15	0.15
Min. Premix ^b	0.13	0.13
Enramycin	0.05	0.05
Tukocs	0.05	-
Madulamycin	-	0.05
Total	100%	100%
Chemical composition		
Me(kcal/kg)	3067.28	3112.12
CP(%)	20.00	19.01
Lysine	1.20	1.08
Methionine	0.56	0.48
Methionine + Cystine(%)	0.90	0.82
Choline(%)	0.17	0.17

^a The vitamin premix contains the followings per kg of diet vit. A 21000IU vit D3 4500IU vit E 60mg/kg vit K3 3.6mg/kg vit B1 1.8mg/kg vit B2 7.5mg/kg vit B6 6mg/kg vit B12 0.03mg/kg Panthothenic acid 15mg/kg Folic acid 0.75mg/kg Biotin 0.105ppm

^b The mineral premix contains the followings per kg of diet Mn 93.6mg/kg Zn 78mg/kg Fe 62.4mg/kg Cu 6.5mg/kg I 1.3mg/kg

Table 5-2. Experimental design.

	Control ¹	Treatments ²			
		CC 200	CP 200	CM 200	CM 400
CrCl ₂	–	200ppb	–	–	–
CrPic	–	–	200ppb	–	–
CrMet	–	–	–	200ppb	–
CrMet	–	–	–	–	400ppb

¹ Control : Experiment diet

² Treatments : CC200 : CrCl₂

CP200 : Cr Picolinate 200ppb

CM200 : Cr Methionine 200ppb

CM400 : Cr Methionine 400ppb

다. 면역 장기 무게

실험 종료와 동시에 면역 실험 구의 모든 육계를 도살한 후 흉선(thymus), 비장(spleen), 그리고 F낭(bursa of fabricius)을 적출하여 지방조직을 제거한 다음 0.9% 생리식염수로 2회 세척하고 흡습포를 이용하여 수분을 제거한 후 면역 장기 무게를 측정하였다.

라. 사료일반성분 분석, 대사실험

급여 사료 중 일정량을 채취하여 분쇄 후 48시간 풍건상태에서 방치 후 135℃ 건조기에서 2시간 건조 후 무게를 측정하여 건물(Dry matter, DM) 함량을 구하였다. A.O.A.C.(1990)방법에 의하여 조회분(Crude ash), 조단백(Crude protein, CP), 조지방(Ether extract, EE), 총에너지 (Gross Energy)를 분석하였다.

대사실험은 반복당 2마리씩 비슷한 체중을 보이는 공시축을 선정하여 실험 전 24시간 절식을 시켰으며 3일동안 1000g을 급여 총 배설량을 채취하였다. 1000g에서 잔량을 공제하여 섭취량을 계산하였으며 수거한 총 배설물은 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 총 무게를 측정하였다.

측정한 시료는 분쇄하여 풍건 상태에 48시간 방치 후 135℃ 건조기에서 2시간 건조 후 무게를 측정하여 건물(Dry matter, DM) 함량을 구하였으며 분석 방법 및 조사항목은 사료일반성분 분석과 같다.

마. 혈액성상

혈액성상 분석에 필요한 혈청은 antigen(LPS)를 접종한 것과 접종하지 않은 것으로 구분을 하였으며 BUN(blood urea nitrogen), ALP(Alkaline Phosphatase), TP(total protein), Calcium, Creatinine, Cholesterol, Glucose, Triglyceride등을 Auto-analyzer(Vetex, Schiapparelli Biosystem Inc, Netherlands)를 사용하여 분석하였다.

바. 육질분석

1). 일반성분

고기의 일반성분 분석은 A.O.A.C.(1998) 방법에 따라 조단백질, 조지방 함량을 측정하였다. 조단백질은 시료 1g을 측정하여 Kjeldahl법을, 조지방은 시료 1g으로 Soxhlet 추출법을 이용하였다.

2). 육색 측정

육색측정을 위하여 5주간의 사양시험이 종료된 즉시 단두 도살하여 혈액이 더 이상 흐르지 않을 때까지 약 2분간 방혈한 후 가슴부위의 피부를 제거한 가슴 및 다리 부위를 채취하여 시료로 이용하였다. 색차계 (Yasuda Seiko Co, CR-300, Minolta, Japan)를 사용하여 시료를 평평하게 펼친다음 CIE의 명도 L*(lightness), 적색도 a*(redness), 및 황색도 b*(yellowness) 값을 3회 반복하여 측정하였으며, 이때 표준백색판의 색도값은 Y=93.70, x=0.3129, y=0.3194이었다.

3). 가열감량

가슴살 및 다리살의 피부를 제거하고 스테이크 모양으로 절단하여 무게를 측정 (평균중량; 가슴살 50g, 다리살 25g)하고 은박 호일로 포장 후 항온 수조에서 고기의 내부온도를 80℃로 하여 1시간 동안 가열한 다음, 상온에서 냉각시켜 감량된 무게를 측정하였다.

이때 감량은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{가열감량 (\%)} = \frac{(\text{시료의 무게(g)} - \text{가열후 시료의 무게(g)})}{\text{가열전 시료의 무게(g)}} \times 100$$

4). 지방산패도

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Sinnhuber와 Yu(1977)의 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 세절육을 0.4g 정량하여 황산화제 용액(propylene glycol+warmtween+BHT+BHA) 2~3방울, TBA 용액 3ml, TCA-HCL 17ml를 넣고 vertex에서 2~3초간 혼합하였다. 시험관의 마개를 닫고 100°C 이상의 물에서 30분간 가열한 후 냉각하였다. 마개를 열어 5ml의 반응액을 새 시험관에 옮기고 여기에 chloroform 2ml를 넣은 다음 3,000rpm에서 15분간 원심분리시켜 상등액을 532nm에서 측정하였다. 과산화물가(Peroxide value; POV)는 Shantha와 Decker(1994)의 방법에 준하여 실시하였다. 이때 닭고기의 저장은 폴리에틸렌 포장지에 함기 포장하여 시료로 이용하였다.

$$TBA=(A_s-A_b)\times 46/(g\times 5)$$

- * TBA = mg MA/Kg sample
- * A_s = Absorbance of the sample
- * A_b = Absorbance of the blank

$$\text{Peroxide value} = ((A_s-A_b)\times m\times V_2)/(55.84\times m_0\times 2\times V_1)$$

- * A_s = Absorbance of the sample
- * A_b = Absorbance of the blank
- * m = slope of the calibration curve;(About half of value in the reference 2 because of half volume)
- * m_0 = grams of the sample
- * 55.84 = atomic weight of iron
- * V_1 = Volume used in measurement (3ml in this test)
- * V_2 = Total volumn of extract (7.2ml in this test)

사. 광물질 함량

사료와 분내 광물질 분석을 위해 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 분쇄된 분의 시료를 각 처리구와 반복별로 1g씩 칭량하여 분해용 튜브(50ml)에 넣는다. 질산965%, v/v) 10ml와 끓임쪽(3~4개)을 첨가하여 60℃로 예열되어 있는 dry heating block에서 약 30분간 분해한다. 모든 시료가 질산용액에 녹아있음을 확인한 후 110℃에서 1시간 동안 가열한 다음 다시 150℃에서 30분에서 1시간 더 가열한다. 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, 다시 질산 10ml를 첨가하고 튜브로부터 흰색의 연기가 나올 때까지 150℃에서 1시간 더 분해시킨다. 분해가 완료된 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, Hydrogen peroxide 4ml를 튜브에 넣고 잘 혼합한 다음 110℃에서 1시간 정도 분해시킨다. 분해가 끝난 후 튜브에 3차 증류수 첨가하여 filter paper(Whatman No. 42)로 여과시켜 50ml 메스플라스크에 담는다. 다시 0.45 μ m syringe membrane filter로 여과하여 새로운 50ml 튜브에 담는다. 가슴살과 다리살 장기조직인 간과 신장은 동결건조 후 사료 및 분내 광물질 분석과 같은 방법으로 전처리 하였으며, 광물질 분석은 유도 결합 플라즈마 분광계(inductively coupled plasma spectrometer, ICP; PS-950, Leman lab.)를 이용하여 분석하였다. 광물질 분석은 총 7개 광물질(Fe, Cu, Zn, Cr, Na, Mg, Ca)을 측정하였다. 검량선 작성에 필요한 표준광물질(HIGH-PURITY STANDARDS Co., USA) ICP분석용을 이용하였다.

아. 통계처리

모든 분석 결과의 통계 분석은 SAS program(1989)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였으며, 처리 평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법(Snedecor and Cochran, 1980)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

Chromium의 급원별 첨가 급여가 육성 능력에 미치는 영향은 table 5-3과 같다. 첫 21일 동안 사료 섭취량은 CM400 처리구에서 유의적으로 낮은 것으로 나타났으며 ($P<0.05$), 증체량에서는 모든 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 반면 사료 요구율의 경우 CP200 처리구만이 다른 모든 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 기존의 보고에 따르면 육계 사료내 Cr-pic를 급원별 첨가결과 증체율, 사료효율에 아무런 영향이 나타나지 않았다는 보고와 일치한다(Kim et al., 1996b). 따라서 본 실험에서 사용한 chromium methionine의 첨가구만이 부화 후 어린 병아리에 사료요구율 개선에 효과가 있는 것으로 판단된다. 21일과 35일 동안의 사료섭취량과 증체량은 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 사료 요구율은 대조구에 비해 모든 처리구가 낮은 경향을 보였다.

실험 개시일부터 종료시까지의 사료 섭취량은 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 증체량은 CM200 처리구가 유의적으로 가장 높았다($P<0.05$). 사료요구율은 CP200 처리구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$), 반면 chromium methionine 처리구들이 유의적으로 사료요구율이 낮은 이유로는 사료섭취량은 비슷함에도 증체량이 증가하였기 때문으로, chromium chelation한 첨가구가 다른 크롬의 첨가 형태보다 증체량이 우수한 것으로 판단된다.

Table 5-3. Effect of different sources of chromium on nutrients utilizability.

Item	----- Treatment -----					SEM
	C	CC200	CP200	CM200	CM400	
DM	73.27 ^{ab}	74.71 ^{ab}	72.97 ^b	75.20 ^{ab}	76.55 ^a	2.05
CP	47.20	51.58	49.99	55.50	57.30	7.73
EE	88.63	89.36	88.55	86.92	90.54	3.14
Ash	28.87 ^c	32.63 ^{bc}	26.01 ^c	44.47 ^a	43.28 ^{ab}	7.40
Energy	77.92	78.87	78.16	79.86	80.84	1.95
Total CHO	86.05	85.42	84.64	85.08	85.26	1.31

a, b, c Values with different superscripts within the same row differ ($p<0.05$)

SEM : Standard error of mean ($p<0.05$)

Chromium의 급원별 첨가 급여에 따른 영양소 이용률 결과는 table 5-4와 같다. CP, EE, Energy, Total CHO의 이용률은 대조구와 모든 처리구에서 유의적인 차이는 보이지 않았으나 CM200과 CM400 처리구에서 조단백질 이용률이 다른 처리구에 비해 높은 경향을 보였다. 또한DM과 Ash의 이용률도 CM200과 CM400 처리구에서 유의적으로 높은 수준을 보였다($P<0.05$). 이는 금속광물질을 아미노산과 저분자 peptide 형태로 chelate 시키면 흡수하는 상태가 쉽고 효율적으로 이용할 수 있다는 신(1993)의 보고와도 일치한다. 그러나 Kim et al.(1996)은 육계의Cr-pic 200ppb 급여시 조지방과 조회분의 이용률이 유의적으로 증가 하였다는 보고와는 상반된 결과를 나타낸다.

이상의 결과로 미루어 보아 methionine을 chelation한 chromium 처리구가 소장내에서 이용 흡수가 증가하여 에너지 이용률이 증가하였다고 판단된다.

Table 5-4. Effect of different source of chromium on the growth performance in broiler.

Age	Items	C	CC200	CP200	CM200	CM400	SEM
1~21 Day	FI(g)	836.63 ^a	834.10 ^a	851.85 ^a	841.00 ^a	792.45 ^b	23.78
	WG(g)	592.36	599.33	577.42	604.58	578.49	18.90
	F/G	1.42 ^b	1.39 ^b	1.48 ^a	1.39 ^b	1.37 ^b	0.04
21~37 day	FI(g)	2101.65	2188.55	2116.28	2151.18	2141.93	77.11
	WG(g)	1067.60	1151.65	1119.63	1142.75	1128.95	59.08
	F/G	1.97	1.90	1.89	1.88	1.90	0.09
Overall (1~37)	FI(g)	2888.15	2997.08	3050.35	2992.75	2879.78	122.54
	WG(g)	1665.75 ^c	1750.78 ^b	1697.05 ^{bc}	1882.33 ^a	1707.43 ^{bc}	40.99
	F/G	1.74 ^{ab}	1.71 ^{ab}	1.80 ^a	1.71 ^{ab}	1.69 ^b	0.06

a, b, c Values with different superscripts within the same row differ ($p<0.05$)

SEM : Standard error of mean ($p<0.05$)

chromium의 급원별 첨가가 흉선 의존성 항원(thymus-dependant antigen)인 LPS(Lipopoly Sacchrude)를 접종한 육계의 면역장기인 비장(spleen), 흉선(thymus), F낭(bursa of fabricius)의 무게에 미치는 영향은 table 5와 같다. 비정상적인 적혈구를 제거하는 기능과 면역에 관여하는 비장은 CC200 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 반면 유기태 형태의 처리구들간에는 아무런 차이를 보이지 않았다. Roura et al.(1992)이 LPS접종후 육계 병아리의 비장에 영향을 미친다고 보

고 하였으며, 또한 비장 무게의 비대는 면역세포의 증식이 증가하는 것으로 보고 하였다(Opera et al., 2000). T세포를 생성 그리고 B세포의 증식과 분화를 촉진시키고 macrophage의 기능을 자극하며 이종세포에 장애를 주는 흉선(thymus)은 모든 유기태 형태의 chromium 처리구들이 유의적으로 높았으며($P < 0.05$), 대조구와 무기태 크롬 처리간에는 아무런 차이가 없었다. 특히 조류에만 존재하며 B세포의 성숙을 담당하는 F낭(brusa of fabricius)은 처리들간의 유의적인 차이는 없었으나 대조구에 비해 chromium 처리구들이 다소 높은 경향을 보였다. 본 실험의 흉선의 크기 변화는 Xie et al.(2000)이 외부 항원인 LPS를 3주령에 접종 후 12, 24, 48h 후에 도살한 F낭의 무게가 시간별로 감소하였다는 보고와는 반대되는 결과이다. 이는 면역학적 스트레스인자인 LPS를 접종함으로써 corticosteroids의 생산이 증가하였기 때문이라 보고하였는데(Riddell, 1987), 본 실험에서 첨가한 chromium이 corticosteroids의 생산을 감소시켜 F낭의 크기에 변화를 준 것으로 판단된다.

Table 5-5. Effect of different sources of chromium on relative immune organ weight in broiler.

Item	----- Treatment -----					SEM
	C	CC200	CP200	CM200	CM400	
	% of body weight					
Spleen	0.17 ^b	0.22 ^a	0.21 ^{ab}	0.19 ^b	0.17 ^{ab}	0.05
Thymus	0.24 ^b	0.26 ^b	0.34 ^{ab}	0.39 ^a	0.31 ^{ab}	0.10
Bursa of fabricius	0.125	0.16	0.16	0.15	0.13	0.06

^{a, b} Values with different superscripts within the same row differ ($p < 0.05$)
SEM : Standard error of mean ($p < 0.05$)

Chromium의 급원별 첨가가 특이적 면역 반응의 하나인 체액성 면역 반응에 대한 결과는 table 5-6과 같다. 체액성 면역은 B-lymphocyte가 담당을 하며 외부로부터 들어온 항원(antigen)을 혈액에 존재하는 항체(antibody)가 특이적으로 인식하여 제거하는 면역으로서 면역 단백질인 IgG, IgM, IgA, IgE등이 있다. 본 실험에서는 이종 항원인 LPS(Lipopolysaccharide)를 사용하여 항원 항체 반응을 측정하였다. 실험의 결과 anti-LPS IgG titer은 무기태 처리구와 모든 chromium methionine 처리구(CM200, CM400)에서 유의적으로 높게 나타났으며($P < 0.05$) 다른 처리구간에는 유의

적인 보이지 않았다. 이는 Chang et al.(1992)의 비육후기 chromium yeast를 0.2ppm 급여한 결과 혈중 cortisol의 감소와 혈중내 IgM의 total immunoglobulin이 증가하였다는 결과와 일치한다. 또한 Chelate한 chromium의 급여가 착유우에 체액성 면역에 미치는 영향을 대한 실험 결과 IgG 항체 생산량에는 영향을 주는데 반해 IgM에는 영향을 주지 않는다는 보고(Burton et al., 1993)로 미루어 chromium의 급여형태의 수준에 따른 특이 항체의 활성화와 항원에 반응하는 항체의 형태가 다르게 나타날 수 있음을 시사하였다.

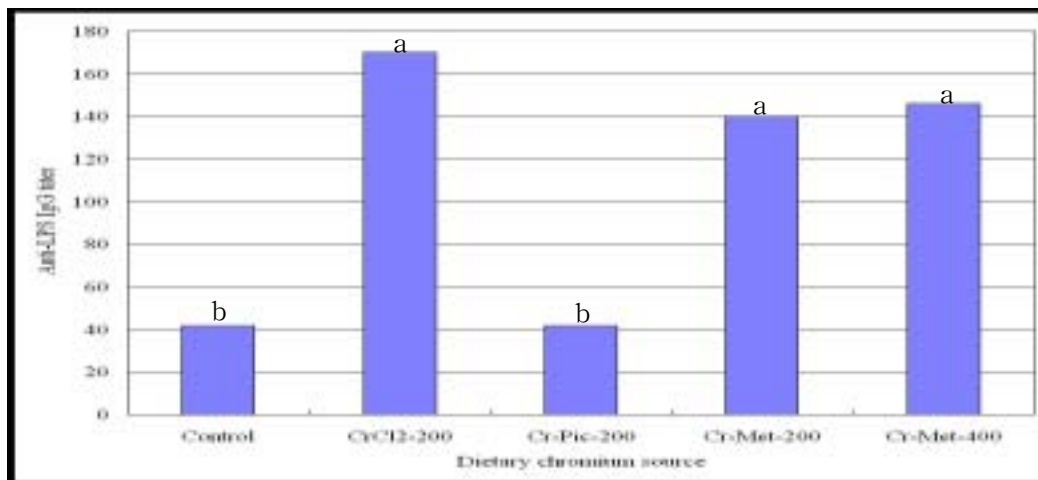


Fig 5-2.. Effect of different source of chromium on Anti-LPS antibody titer of serum in broiler.

Table 5-7. Effects of different sources of chromium on the serum and non serum traits of broilers.

Items	----- Treatment (LPS Challeng) -----					SEM
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400	
ALP	2477.00	2544.13	3272.14	3152.50	2695.17	872.66
BUN	2.11	1.95	2.13	2.33	1.50	1.103
CA	12.90 ^b	13.84 ^a	12.54 ^{bc}	11.90 ^c	12.63 ^{bc}	0.80
CHOL	140.38	164.63	153.14	138.33	160.50	25.34
CREAT	0.45	0.42	0.40	0.43	0.45	0.052
GLU	299.13	264.75	272.43	287.83	279.33	29.78
TP	3.11 ^b	3.64 ^a	3.13 ^b	3.02 ^b	3.40 ^{ab}	0.36
TRI	37.25	37.00	33.57	30.67	33.67	13.34
----- Treatment (Non LPS) -----						
ALP	2967.00 ^b	3209.50 ^b	4283.50 ^{ab}	3665.33 ^{ab}	6450.50 ^a	1652.12
BUN	3.10	1.10	1.75	1.20	1.43	1.48
CA	12.00	12.05	11.95	11.95	10.38	1.38
CHOL	152.25 ^{ab}	158.00 ^{ab}	158.50 ^{ab}	172.75 ^a	134.25 ^b	21.76
CREAT	0.460 ^a	0.445 ^a	0.420 ^{ab}	0.393 ^{ab}	0.360 ^b	0.048
GLU	284.25	301.00	277.25	271.75	256.75	37.73
TP	3.80 ^a	3.45 ^{ab}	4.05 ^a	3.90 ^a	2.78 ^b	0.46
TRI	79.75	80.50	67.50	82.75	69.50	20.77

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 5-7은 LPS를 접종한 면역 실험구와 접종하지 않은 육성 실험구의 혈액성상 결과이다. LPS를 접종한 면역 실험구의 경우 CA과 TP에서 유의적인 차이를 보였다 (P<0.05). ALP, GLU와 TRI에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 감소하는 경향을 보였으며, 이는 chromium의 급원별 첨가로 인해 감소한 것으로 판단된다. LPS를 접종하지 않은 육성 실험구는 ALP, CHOL, CREAT와 TP에서 유의적인 차이를 보였으

며($P<0.05$), CM400처리구에서 뚜렷한 변화를 보였다. BUN은 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 chromium의 급원별 첨가로 인한 감소효과를 보았다고 판단된다. 반면 면역 실험구의 경우 CM400 처리구에서 BUN의 감소 경향을 보였다. 두 실험구에서 ALP는 대조구보다 모든 처리구에서 높은 경향을 보였으며 이는 chromium의 급원별 첨가로 인한 결과로 판단된다. TRI는 육성실험구가 면역 실험구보다 높은 증가를 보였다. 육성 실험구와 면역 실험구의 결과가 다른 경향을 보이는 것은 면역 실험구에서 LPS 접종 및 채혈로 인한 스트레스로 인한 것이라 판단된다.

Table 5-8. Effect of different sources of chromium on thiobarbituric acid reactive substance of chicken meat. mg MA/kg

Items	----- Treatment -----					SEM	
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400		
Breast	0day	0.23a	0.21a	0.15b	0.19a	0.15b	0.03
	1wk	0.33c	0.84a	0.37c	0.46bc	0.59b	0.16
	2wk	1.31bc	2.80a	1.20c	2.30ab	2.24ab	0.76
	3wk	1.63c	3.04a	1.56c	2.89ab	2.08bc	0.69
Thigh	0day	0.26a	2.28a	0.14b	0.24a	0.10b	0.05
	1wk	0.35b	0.95a	0.44b	0.52b	0.99a	0.19
	2wk	1.80ab	2.29a	1.38b	2.25a	1.96a	0.42
	3wk	1.27c	3.45a	2.47b	3.28ab	3.21ab	0.65

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ ($p<0.05$)

SEM : Standard error of mean ($p<0.05$)

Chromium의 급원별 첨가가 계육의 TBARS변화는 Table 5-8과 같다. 저장기간이 경과함에 따라 전 처리구에서 증가하였다. 처리구간의 TBARS가의 변화를 보면 흉심 부위의 CP200처리구가 0, 1주, 2주, 3주 등 저장기간이 경과함에 따라 다른 처리구보다 낮은 경향을 나타내었으며($p<0.05$) CC200처리구가 다른 처리구보다 높은 경향을 나타내었다($p<0.05$). 대퇴부위도 흉심부위와 마찬가지로 CP200처리구가 저장기간이 경과함에 따라 다른 처리구 보다 낮은 경향을 나타내었으며($p<0.05$) CC200 처리구가 다른 처리구보다 높은 경향을 나타내었다($p<0.05$). chromium methionine의 첨가는 지방산패도를 chromium picolinate보다는 낮지만 chromium chloride보다는 억제력을 시키

는 것으로 사료된다. 흉심과 대퇴부위가 차이를 나타내는 원인은 인지질의 함량이 높고, 불포화지방도가 높기 때문이라 하였다(Pearson et al., 1970). Park 등(1995)은 흉심부위에 비하여 대퇴부위의 TBARS가 높게 나타났다고 보고하면서 그 이유를 대퇴부위의 지방함량, 지방산 조성, 육색소 및 효소의 차이에 기인한다고 하였다.

Table 5-9. Effect of different sources of chromium on lipid oxidation of chicken meat.

Items	----- Treatment -----					SEM	
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400		
Breast	0day	0.055	0.053	0.056	0.060	0.060	0.005
	1wk	0.073	0.072	0.073	0.073	0.073	0.006
	2wk	0.060	0.073	0.069	0.072	0.065	0.011
	3wk	0.080	0.063	0.066	0.070	0.068	0.009
	4wk	0.052	0.057	0.053	0.051	0.063	0.011
Thigh	0day	0.039	0.034	0.030	0.029	0.032	0.006
	1wk	0.105	0.065	0.063	0.056	0.047	0.039
	2wk	0.079	0.065	0.077	0.077	0.073	0.008
	3wk	0.068	0.072	0.066	0.061	0.063	0.007
	4wk	0.058 ^b	0.071 ^a	0.055 ^b	0.051 ^b	0.056 ^b	0.006

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Chromium의 급원별 첨가가 계육의 POV 변화는 Table 5-9와 같다. 흉심부위는 모든 처리구에서 저장기간이 경과함에 따라 나타나는 지방산화는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 대퇴부위는 3주간의 저장기간이 경과함에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았으나 4주간의 저장 기간이 경과함에 따라 CC200처리구가 다른 처리구 보다 높은 지방산화를 나타내었으나(p<0.05) CP200, CM200, CM400과 대조구간의 결과에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 Chromium chloride의 첨가가 대퇴부위의 지방산화를 증가 시키는 것으로 사료된다.

Table 5-10. Effect of different sources of chromium on the proximate composition of chicken meat.

Items		----- Treatment -----					SEM
		Control	CC200	CP200	CM200	CM400	
Crude Protean	Thigh	21.59 ^{ab}	20.98 ^b	21.34 ^{ab}	22.75 ^a	20.97 ^b	1.42
	Breast	24.72 ^a	23.90 ^{ab}	24.41 ^{ab}	24.46 ^{ab}	23.45 ^b	1.04
Crude Lipid	Thigh	0.77	0.52	0.98	0.53	0.99	0.38
	Breast	1.07 ^a	0.59 ^b	0.95 ^{ab}	0.72 ^{ab}	0.82 ^{ab}	0.27

a, b, c Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

크롬의 급원별 첨가에 따른 대퇴부위와 흉심부위의 단백질과 지방 함량은 Table 10과 같다. 대퇴부위의 단백질 함량은 CM200처리구가 높은 경향을 나타냈으나 chromium methionine의 함량이 증가한 CM400처리구에서는 가장 낮은 경향을 보여 주었다(p<0.05). 또한 흉심부위에서도 CM400 처리구가 가장 낮았다. 대퇴부위의 지방함량은 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 CM400 처리구가 가장 높은 경향을 보였다. 흉심부위의 지방함량은 CC200처리구가 가장 낮았으며(p<0.05) 나머지 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 5-11. Effect of different sources of chromium on cooking loss of chicken meat.

Items	----- Treatment -----					SEM
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400	
Breast	23.77 ^c	26.21 ^b	26.01 ^b	24.85 ^{bc}	27.81 ^a	1.38
Thigh	30.29	28.61	28.63	28.21	29.33	2.16

a, b, c Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

크롬의 급원별 첨가에 따른 대퇴부위와 흉심부위의 가열감량은 Table 5-11과 같다. 흉심부위는 CM400처리구가 가장 높았으며(p<0.05) 대퇴부위는 모든 처리구간 유의적

인 차이를 나타내지 않았다. Palanska와 Nosal(1991)은 육의 pH와 가열감량의 관계를 설명하면서 pH가 높으면 가열감량이 적다는 보고를 하였으나 본 실험에서는 pH와의 관계를 볼수가 없었다. 또한 가열감량은 단백질의 변성으로 나타나는데 근육의 가열 온도와 가열시간이 중요한 오인이 되며, 가열 감량은 보수성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Winger and Fennema, 1976). 일반적으로 식육에 물리적인 힘 즉 절단, 분쇄, 압착, 동결, 해동 또는 가열시에 근육 단백질의 수분 유지 능력은 처리조건에 따라 달라진다.

Table 5-12. Effect of different sources of chromium on meat color of chicken meat.

Items	----- Treatment -----					SEM	
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400		
Breast	L	58.04 ^a	56.86 ^{ab}	55.94 ^b	58.37 ^a	58.71 ^a	1.84
	a	15.08 ^{ab}	15.28 ^{ab}	15.98 ^a	14.50 ^b	15.73 ^{ab}	1.13
	b	12.14	13.04	12.65	13.75	12.91	1.93
Thigh	L	52.92 ^b	56.88 ^a	55.96 ^a	56.44 ^a	58.49 ^a	2.22
	a	14.63 ^a	13.01 ^b	14.03 ^{ab}	13.98 ^{ab}	14.78 ^a	1.19
	b	14.10 ^b	16.49 ^a	15.72 ^{ab}	16.67 ^a	15.84 ^{ab}	2.08

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 5-12는 크롬의 급원별 첨가에 따른 대퇴부위와 흉심부위의 육색을 나타내었다. 흉심부위의 명도는 나타내는 L값은 대조구와 CM200, CM400처리구가 CP200처리구보다 밝은 육색을 나타내었으며, 적색도를 나타내는 a값은 CP200처리구가 가장 높았으며, CM200처리구가 가장 낮았다(p<0.05). 황색도를 나타내는 b값은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 대퇴부위의 L값은 대조구에서 가장 낮았으며, a값은 CC200처리구에서 가장 높았다(p<0.05). b값은 모든처리구가 대조구보다 증가하였다(p<0.05). 육색소인 myoglobin은 육색소내의 산소 유무에 크게 영향을 받는데, 육조직내의 효소활동, 저장온도, 미생물의 오염도, pH등에 따라 다르다. 특히 육색소와 산소와의 반응 정도와 효소 활동이 육색 변화에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Lewrie, 1985).

Table 5-13. Effect of different sources of chromium on fecal mineral excretion of broiler.

Items	----- Treatment -----					SEM
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400	
Cr	7.59 ^a	7.27 ^b	7.21 ^b	7.27 ^b	7.40 ^{ab}	0.198
Cu	5.12 ^a	4.39 ^b	4.25 ^b	3.52 ^c	3.56 ^c	0.525
Fe	7.65	9.95	6.56	12.44	7.21	5.445
Mn	11.85 ^a	11.14 ^b	11.00 ^b	11.07 ^b	11.13 ^b	0.265
Na	329.67	354.88	336.29	336.50	323.17	52.032
Ca	45.13 ^a	38.05 ^b	34.74 ^{bc}	34.21 ^{bc}	32.41 ^c	3.262

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 5-13은 분내 광물질 함량을 나타내었다. Chromium의 함량은 대조구가 다른 처리구보다 높은 배출량을 보여주었다(p<0.05). 또한 Cupper와 Mn Ca함량도 대조구가 다른 처리구보다 높은 배출량 나타내었다(p<0.05). 이는 chromium의 추가 급여로 인해 다른 광물질들과의 상호 관계를 나타내는 것으로 사료된다.

Table 5-14. Effect of different sources of chromium on meat mineral excretion of chicken meat.

Items	Treatment					SEM	
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400		
Breast	Cr	7.66 ^a	7.34 ^{bc}	7.26 ^c	7.30 ^{bc}	7.47 ^b	0.14
	Cu	5.26 ^a	4.53 ^b	4.37 ^b	3.58 ^c	3.63 ^c	0.47
	Fe	8.58 ^{ab}	11.15 ^{ab}	7.18 ^b	14.23 ^a	8.24 ^{ab}	5.02
	Zn	ND	ND	ND	ND	ND	
	Mn	11.92 ^a	11.18 ^b	11.05 ^b	11.10 ^b	11.26 ^b	0.22
	Na	357.90	360.53	343.03	346.44	329.92	43.75
	Ca	46.58a	38.75b	35.50bc	34.71c	33.18c	2.62
Thigh	Cr	7.36 ^b	7.39 ^{ab}	7.48 ^{ab}	7.64 ^a	7.56 ^{ab}	0.16
	Cu	4.15 ^b	4.83 ^b	5.09 ^b	7.17 ^a	5.20 ^b	0.84
	Fe	11.45	22.14	20.51	14.38	17.02	7.46
	Zn	ND	ND	ND	ND	ND	
	Mn	11.16 ^b	11.21 ^b	11.31 ^{ab}	11.48 ^a	11.46 ^a	0.13
	Na	520.60	483.20	465.75	459.00	466.00	67.49
	Ca	40.32	36.54	35.55	37.10	34.68	3.75

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ ($p < 0.05$)

SEM : Standard error of mean ($p < 0.05$)

Table 5-14는 계육의 흉심부위와 대퇴부위의 광물질 함량을 나타내었다. 분내 높은 chromium 함량을 배출한 대조구가 흉심부위에서 가장 높은 chromium 함량을 나타내었으나 대퇴부에서는 가장 낮은 함량을 나타내었다($p < 0.05$).

Table 5-15는 신장과 간의 광물질 함량을 나타내었다. Chromium의 함량은 신장과 간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. Cupper와 Fe은 신장에서 CM400과 CM200처리구에서 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$).

Table 5-15. Effect of different sources of chromium on kindey and liver mineral excretion of broiler.

Items	----- Treatment -----					SEM	
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400		
Kidney	Cr	15.48	15.45	15.42	15.06	15.09	0.37
	Cu	17.22 ^b	16.87 ^b	21.66 ^a	19.22 ^{ab}	21.04 ^a	2.09
	Fe	170.50 ^b	185.79 ^{ab}	184.21 ^{ab}	216.28 ^a	200.68 ^{ab}	28.93
	Zn	82.79 ^a	82.08 ^a	70.02 ^b	65.38 ^b	60.26 ^b	8.62
	Mn	35.01 ^a	32.11 ^c	33.51 ^b	32.55 ^{bc}	32.53 ^{bc}	1.14
	Na	27125.08 ^a	23301.25 ^b	24779.14 ^{ab}	24990.17 ^{ab}	24504.50 ^{ab}	2325.07
	Ca	134.58 ^c	150.48 ^{ab}	133.97 ^c	162.12 ^a	146.47 ^{bc}	11.46
Liver	Cr	15.38	15.39	15.69	15.38	15.63	0.33
	Cu	18.74	19.65	17.86	17.66	18.20	2.72
	Fe	303.00	358.13	389.17	343.00	335.00	99.60
	Zn	54.68 ^c	67.41 ^b	79.01 ^a	75.42 ^{ab}	78.02 ^a	8.41
	Mn	34.92 ^a	31.65 ^b	34.52 ^a	34.08 ^a	34.67 ^a	2.02
	Na	14519.13	12262.13	10858.83	11280.50	11845.17	3339.70
	Ca	96.00	98.81	89.86	94.32	89.05	9.98

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ ($p<0.05$)

SEM : Standard error of mean ($p<0.05$)

제6절 크롬의 급원별 첨가가 산란계의 성장능력, 영양소 이용율과 난특성에 미치는 영향

1. 서 론

Chromium은 가축에 있어서 필수 미량광물질이다. 그러나 Chromium은 일반 가축 사료에 소량 함유되어 있고 대부분이 무기태의 형태로 존재하며 흡수 이용율이 매우 낮기 때문에 생체 생리적 대사 작용의 역할을 수행할 수 없을(Anderson, 1987) 뿐만 아니라, 체내에서 흡수 이용되지 않은 chromium이 체외로 배설이 되어서 토양과 수질 등의 환경오염원으로 작용을 하게 된다.

따라서 Chromium의 체내 이용 흡수율을 향상시키기 위한 다른 방안으로 nicotinic acid, glycine, glutamic acid, cysteine과 Ca를 결합을 하는 방법이 이용되어 왔다.(Mertz, 1975). 이와 같이 현재까지 chromium에 대한 대부분의 연구는 무기태와 유기산복합체(Metal Amino acid complex)에 대한 것이었으며 그 첨가 효과 역시 정확하게 규명되지 않았다.

김 등(1997)은 chromium picolinate를 0, 200, 400, 800 μ l 급여시 400 μ l 처리구에서 난중이 증가하였으며 200, 400 그리고 800 μ l 처리구에서 건물과 단백질 소화율이 증가하였다고 보고 하였다. 반면 Line 등(1996)은 55주령의 산란계에서 chromium picolinate를 200, 400, 800 μ l 그리고 Benabdeljelil 과 Jensen(1989)은 chromium chloride를 5, 10, 50mg 급여시 아무런 효과가 없었다고 보고하였다. 따라서 Chromium의 체내 이용 흡수율을 향상시키기 위한 다른 방안으로 유기태 물질인 아미노산과 chelate 결합을 하는 방법이 대두되고 있다. 신체 조직은 아미노산과 저분자 펩타이드 등을 효율적으로 잘 흡수하기 때문에 chromium을 아미노산과 저분자 peptide 물질에 chelation을 시키면 단백질 속에 chromium이 숨겨지게 되며, 따라서 소장벽의 용모들로 인해서 단백질 속에 숨겨진 chromium을 흡수하는 상태가 쉬워져 효율적으로 이용할 수 있게 된다(신,1993). 그러나 chromium methionine의 착염화한 형태의 실험은 특수동물이나 반추가축에서만 한정되어 있고 또한 국내외에서 단위동물에 대한 급여 실험에 대해서는 전무한 상태이다.

따라서 본 실험은 가축의 생산성 개선과 면역조절물질로서 가능성이 제시된 chromium을 기존의 chromium 급여 형태와 methionine을 chelation한 크롬의 급여별 첨가가 산란계의 영양소이용률, 산란율 및 난특성에 미치는 영향을 비교 평가하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물, 시험기간 및 장소

본 실험 Chromium의 급원별 첨가가 산란계의 영양소이용률, 산란율 및 난특성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 2005년 7월 25일부터 9월 18일까지 8주간 실험하였다. 실험은 강원도 춘천시 광판리 소재 농장에서 실시하였으며, 공시동물로는 26주령의 산란계(Lohman Brown종) 총 384수를 공시하였으며, 2단 A형 3열 산란 케이지에서 16시간 고정 점등으로 사육하며 실험하였다.

2. 시험사료 및 실험설계

대조구는 항생제(antibiotics)를 첨가하지 않은 순수 배합사료(Table 1.)만을 급여하였으며 처리구(Table 2.)는 각각 CrCl_2 200ppb, Cr-Picolinate 200ppb, Cr-Methionine 200ppb, Cr-Methionine 400ppb와 800ppb를 첨가한 5처리를 두었고 급여한 사료는 가루형태의 사료이다. 실험기간동안 시험사료는 물과 함께 자유로이 섭취하도록 하였으며 물은 니뿔로 급수하였다. 실험구는 대조구와 5개의 처리구로 6처리 4반복 반복당 16수씩 총 384수를 완전임의 배치하였다.

3. 조사항목

가. 산란 성적

산란율은 매일 오전 10시에 산란수와 폐사율을 조사하여 시험 기간 동안 1일 생존 총 수수에 총 산란수로 나누는 일계산란율(hen day egg production)로 계산하였다. 평균난중은 사료급여 후 집란하여 반복별로 총 난중을 칭량하고 이를 산란수로 나누어 평균난중을 계산하였다. 평균 사료 섭취량은 시험 기간 동안 총 급여사료에서 시험 종료일에 측정된 사료잔량을 공제한 후 이를 총 마리수와 시험기간으로 나누어 계산하였다. 사료 요구율은 시험 기간동안 반복별 사료 섭취량을 동기간의 총 난중으로 나누어 계산하였다.

나. 난특성

난각 강도는 강도측정기(FN 595, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 난각두께의 측정은 dial pipe guage(P-1, Ozaki Co., Japan)를 이용하여 계란의 둔단부와 예단부를 난각막을 제거한 후 실시하였다. 난황색은 yolk color fan(Roche, Swintzerland)을 이용하여 3명의 panel이 측정한 값을 평균으로 하여 평가하였다.

다. 난황내 총 콜레스테롤 함량

난황내 콜레스테롤의 분석은 pasin et al.(1998)의 방법에 따라 채란 일에 분리된 난황을 2% NaCl용액으로 30배 희석하여 균질화 시킨 다음 2시간동안 배양한 후 시판 콜레스테롤 진단시약(영동제약, 한국)을 이용하여 분석하였다.

라. 사료일반성분 분석, 대사실험

급여 사료 중 일정량을 채취하여 분쇄 후 48시간 풍건상태에서 방치 후 135℃ 건조기에서 2시간 건조 후 무게를 측정하여 건물(Dry matter, DM) 함량을 구하였다. A.O.A.C.(1990)방법에 의하여 조회분(Crude ash), 조단백(Crude protein, CP), 조지방(Ether extract, EE), 총에너지 (Gross Energy)를 분석하였다.

대사실험은 반복당 2마리씩 비슷한 체중을 보이는 공시축을 선정하여 실험 전 24시간 절식을 시켰으며 3일동안 1000g을 급여 총 배설량을 채취하였다. 1000g에서 잔량을 공제하여 섭취량을 계산하였으며 수거한 총 배설물은 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 총 무게를 측정하였다.

측정한 시료는 분쇄하여 풍건 상태에 48시간 방치 후 135℃ 건조기에서 2시간 건조 후 무게를 측정하여 건물(Dry matter, DM) 함량을 구하였으며 분석 방법 및 조사항목은 사료일반성분 분석과 같다.

마. 난황일반성분

난황을 분리후 동결건조 후 조단백질, 조지방 함량을 A.O.A.C.(1998) 방법에 따라 측정하였다. 조단백질은 시료 1g을 측정하여 Kjeldahl법을, 조지방은 시료 1g으로 Soxhet 추출법을 이용하였다.

Table 6-1. Formula and chemical composition of experimental diet

Ingredient(%)	%
Corn(PRI)	0.76
Corn(6.5)	61.5108
Glutein	1.16
Soybean meal	18.12
Rapeseed meal	2
Sesame meal	2
Meat meal	2
Limestone	9.02
DCP	0.636
Salt	0.252
Animal fat	2
Choline	0.07
DL-Methionine	0.15
L-Lysine	0.0312
Vit. Premix ^a	0.1
Min. Premix ^b	0.1
포스포메가	0.06
옥시스타	0.03
.....	
Total	100%
Chemical composition	
Me(kcal/kg)	2776.43
CP(%)	17.00
Lysine	0.80
Methionine	0.43
Methionine + Cystine(%)	0.7
Choline(%)	1300.36

^a The vitamin premix contains the followings per kg of diet vit. A 12000IU vit D3 3000IU vit E 21mg/kg vit K3 2.4mg/kg vit B1 1.2mg/kg vit B2 4.8mg/kg B6 2.4mg/kg B12 0.02mg/kg Panthothenic acid 10mg/kg Folic acid 0.3mg/kg Biotin 0ppm

^b The mineral premix contains the followings per kg of diet Mn 72mg/kg Zn 60mg/kg Fe 48mg/kg Cu 5mg/kg I 1mg/kg

Table 6-2. Experimental design.

	Control ¹	-----Treatments ² -----				
		CC 200	CP 200	CM 200	CM 400	CM800
CrCl ₂	-	200ppb	-	-	-	-
CrPic	-	-	200ppb	-	-	-
CrMet	-	-	-	200ppb	-	-
CrMet	-	-	-	-	400ppb	800ppb

¹ Control : Experiment diet

² Treatments : CC200 : CrCl₂

CP200 : Cr Picolinate 200ppb

CM200 : Cr Methionine 200ppb

CM400 : Cr Methionine 400ppb

CM800 : Cr Methionine 800ppb

바. 광물질 함량

난황내 광물질 분석을 위해 60℃ 건조기에서 72시간 건조 후 분쇄된 분의 시료를 각 처리구와 반복별로 1g씩 칭량하여 분해용 튜브(50ml)에 넣는다. 질산(65%, v/v) 10ml와 끓임쪽(3~4개)을 첨가하여 60℃로 예열되어 있는 dry heating block에서 약 30분간 분해한다. 모든 시료가 질산용액에 녹아있음을 확인한 후 110℃에서 1시간동안 가열한 다음 다시 150℃에서 30분에서 1시간 더 가열한다. 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, 다시 질산 10ml를 첨가하고 튜브로부터 흰색의 연기가 나올 때까지 150℃에서 1시간 더 분해시킨다. 분해가 완료된 튜브를 실온에서 냉각시킨 다음, Hydrogen peroxide 4ml를 튜브에 넣고 잘 혼합한 다음 110℃에서 1시간 정도 분해시킨다. 분해가 끝난 후 튜브에 3차 증류수 첨가하여 filter paper(Whatmam No. 42)로 여과시켜 50ml 메스플라스크에 담는다. 다시 0.45 μ m syringe membrane filter로 여과하여 새로운 50ml 튜브에 담는다. 광물질 분석은 유도결합 플라즈마 분광계(inductively coupled plasma spectrometer, ICP; PS-950, Leman lab.)를 이용하여 분석하였다. 광물질 분석은 총 7개 광물질(Fe, Cu, Zn, Cr, Na, Mg, Ca)을 측정하였다. 검량선 작성에 필요한 표준광물질(HIGH-PURITY STANDARDS Co., USA) ICP분석용을 이용하였다.

4. 통계처리

모든 분석 결과의 통계 분석은 SAS program(1989)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였으며, 처리 평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법(Snedecor and Cochran, 1980)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 6-3. Effect of dietary chromium sources on laying hen nutrients utilizability.

Items	Control	-----Treatments-----					SEM
		CC200	CP200	CM200	CM400	CM800	
DM	74.99	75.12	72.64	76.40	78.43	75.76	3.30
CP	34.74 ^{bc}	38.58 ^{abc}	28.28 ^c	43.11 ^{ab}	43.17 ^{ab}	46.84 ^a	6.11
EE	91.24 ^{ab}	87.91 ^{bc}	86.78 ^c	89.59 ^{abc}	91.19 ^{ab}	93.66 ^a	2.15
Ash	61.41 ^{abc}	58.33 ^c	60.01 ^{bc}	68.68 ^{ab}	58.81 ^c	70.09 ^a	5.03
Energy	80.17	80.05	78.11	81.39	82.68	81.80	2.72
Total CHO	91.43	92.89	80.22	90.90	73.17	92.39	2.51

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ ($p < 0.05$)

SEM : Standard error of mean ($p < 0.05$)

Table 6-3은 산란계의 영양소 소화율을 나타내었다. 단백질, 지방, 회분은 영양소 이용률은 CM800처리구에서 가장 높았다($p < 0.05$). 단백질과 조지방의 영양소 이용률은 CP200처리구에서 가장 낮았고($p < 0.05$) 회분이용률은 CC200 처리구가 낮았다($p < 0.05$)

Table 6-4는 산란계의 산란율 일일섭취량 사료요구율을 나타내었다. 0~2주, 4~6주 그리고 6~8주동안 chromium첨가구는 대조구 보다 증가하는 경향을 보였다. 그러나 CC200, CM200 그리고 CM400 처리구는 전체 시험기간에는 대조구와 뚜렷한 증가를 보이지 않았다. 2~4주 그리고 4~5주동안 CC200 처리구의 사료 섭취량이 감소하였다 ($p < 0.05$). CM200처리구는 0~2주동안 CM800 처리구는 2~4주동안 사료요구율이 높았지만 전체시험기간동안은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 김등(1996)은 chromium의 첨가로 산란계의 산란율이 약간 증가하는 경향이 있다고 보고 하였으나, Lin등 (1999) 과 Piva 등(2003)은 효과가 없다고 보고되었다.

Table 6-4. Effect of dietary chromium sources on laying hen performances.

Age	Items	Control	-----Treatments-----					SEM
			CC200	CP200	CM200	CM400	CM800	
0~2wk	Egg production(%)	85.22 ^b	93.02 ^a	89.99 ^{ab}	91.64 ^{ab}	91.93 ^{ab}	90.78 ^{ab}	4.11
	Daily Feed intake(g)	101.40	111.14	106.95	109.96	104.07	104.80	7.03
	Feed/Egg	1.76 ^b	1.93 ^{ab}	1.87 ^{ab}	1.95 ^a	1.81 ^{ab}	1.83 ^{ab}	0.11
2~4wk	Egg production(%)	87.88	95.23	89.43	95.21	93.71	92.67	5.11
	Daily Feed intake(g)	140.51 ^{ab}	119.59 ^b	128.03 ^{ab}	127.36 ^{ab}	123.16 ^{ab}	141.83 ^a	13.30
	Feed/Egg	2.41 ^{ab}	2.05 ^b	2.21 ^{ab}	2.23 ^{ab}	2.10 ^{ab}	2.45 ^a	0.24
4~6wk	Egg production(%)	88.88 ^b	95.46 ^a	93.68 ^{ab}	95.32 ^a	95.72 ^a	94.44 ^{ab}	3.81
	Daily Feed intake(g)	136.09 ^a	119.94 ^b	138.08 ^a	128.87 ^{ab}	140.06 ^a	140.80 ^a	7.42
	Feed/Egg	2.26 ^a	2.01 ^b	2.32 ^a	2.18 ^{ab}	2.32 ^a	2.33 ^a	0.14
6~8wk	Egg production(%)	87.33 ^b	96.12 ^a	92.21 ^{ab}	97.31 ^a	94.86 ^a	94.29 ^a	3.72
	Daily Feed intake(g)	131.44	137.52	128.75	129.68	128.35	132.51	6.79
	Feed/Egg	2.16	2.28	2.12	2.15	2.09	2.15	0.12
Overall 0~8wk	Egg production(%)	87.33 ^b	94.96 ^a	91.33 ^{ab}	94.87 ^a	94.06 ^a	93.04 ^{ab}	3.84
	Daily Feed intake(g)	127.36	122.05	125.45	123.97	123.91	129.98	5.36
	Feed/Egg	2.15	2.07	2.13	2.12	2.08	2.19	0.11

^{a, b}. Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 6-5. Effect of dietary chromium sources on yolk cholesterol concentration.

Items	Control	-----Treatments-----					SEM
		CC200	CP200	CM200	CM400	CM800	
mg/DL							
Yolk total cholesterol	9.50	9.49	9.25	9.12	8.87	9.50	0.63

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 6-5는 난황의 콜레스테롤을 나타내었다. 유의적인 차이를 보이지 않았지만 CM200와 CM400에서 감소하는 경향을 보였다.

Table 6. Effect of dietary chromium sources on egg quality.

Age	Items	Control	-----Treatments-----					SEM
			CC200	CP200	CM200	CM400	CM800	
4wk	Egg weight(g)	58.23	58.40	57.99	57.22	58.77	58.03	1.43
	Egg shell strength(kg/cm ²)	3.81	3.64	4.00	3.74	3.69	3.88	0.45
	Egg shell thickness(μ m)	0.37	0.35	0.36	0.35	0.37	0.37	0.02
	Yolk color	5.25	5.25	5.40	5.25	5.45	5.60	0.37
6wk	Egg weight(g)	60.34	59.70	59.65	59.16	60.26	60.47	1.48
	Egg shell strength(kg/cm ²)	3.61	3.46	3.43	3.62	3.53	3.69	0.27
	Egg shell thickness(μ m)	0.36	0.36	0.36	0.35	0.36	0.36	0.01
	Yolk color	4.5	4.5	4.6	4.5	4.4	4.6	0.32
8wk	Egg weight(g)	60.98	60.43	60.79	60.42	61.46	61.70	1.25
	Egg shell strength(kg/cm ²)	4.78 ^{ab}	4.85 ^a	4.46 ^{ab}	4.38 ^{ab}	4.43 ^{ab}	4.35 ^b	0.29
	Egg shell thickness(μ m)	0.36	0.36	0.36	0.36	0.35	0.35	0.01
	Yolk color	5.2	5.5	5.3	5.3	5.6	5.6	0.33
Overall 0~8wk	Egg weight(g)	59.32	59.02	58.87	58.31	59.50	59.40	1.32
	Egg shell strength(kg/cm ²)	4.06	3.98	3.96	3.91	3.88	3.97	0.54
	Egg shell thickness(μ m)	0.36	0.35	0.36	0.35	0.36	0.36	0.01
	Yolk color	4.97	5.08	5.08	5.02	5.12	5.27	0.52

^{a, b} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 6-6은 난특성을 나타내었다. 난각 후도는 8주차 대조구에서 가장 높았으나 (p<0.05) 전체 시험 기간 동안은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 6-7. Effect of dietary chromium sources on yolk the proximate composition.

Items	----- Treatment -----						SEM
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400	CM800	
protein	55.37ab	56.42ab	54.61b	56.41ab	56.68ab	57.28a	1.60
lipid	31.70ab	31.88ab	32.03a	31.26b	31.95ab	31.67ab	0.46

^{a, b} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 6-7은 난황의 단백질과 지방함량을 나타내었다. 단백질 함량은 CP200 처리구가 가장 낮았으며(p<0.05), CM800처리구에서 가장 높았다(p<0.05). 지방 함량은 CM200처리구가 가장 낮았으며(p<0.05), CP200 처리구에서 높은 경향을 나타내었다(p<0.05).

Table 6-8. Effect of dietary chromium sources on yolk mineral concentration.

Items	----- Treatment -----						SEM
	Control	CC200	CP200	CM200	CM400	CM800	
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Cu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Fe	1.68	1.75	1.63	1.85	1.85	1.85	0.14
Zn	0.65	0.63	0.65	0.58	0.68	0.68	0.10
Mg	3.00 ^b	3.53 ^a	3.63 ^a	3.63 ^a	3.65 ^a	3.48 ^a	0.21
Na	17.08 ^b	19.38 ^a	19.63 ^a	19.83 ^a	19.38 ^a	18.80 ^{ab}	1.36
Ca	39.78 ^c	43.28 ^{bc}	47.33 ^a	46.08 ^{ab}	43.23 ^{bc}	41.90 ^c	2.19

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

SEM : Standard error of mean (p<0.05)

Table 6-8은 난황내 광물질 함량을 나타내었다. Chromium과 Cupper는 검출되지 않았다. 마그네슘과 나트륨의 함량은 대조구 보다 chromium첨가구에서 증가하는 경향을 보였으며(p<0.05), 칼슘의 함량은 대조구와 CM800처리구를 제외한 chromium첨가구에서 증가하는 경향을 나타내었다.

제7절 Cr-Met chelate의 급여가 고탄수화물 식이급여 흰쥐의 육성성적, 지방조직 무게, 혈청내 지질함량 및 leptin mRNA발현에 미치는 영향

1. 서 론

성인 비만의 예방과 발병원인은 열량균형 유지에 달려있다. 따라서 총 섭취열량이 총 소비열량보다 많으면 비만의 요인이 된다. 이것은 섭취하는 식이의 구성에 의해서도 영향을 받는다. 다시 말하면, 고 지방식이와 비교할 때 적어도 열량의 55%를 다양한 탄수화물 급원으로 제공하는 식이는 체지방의 축적을 감소시킬 수 있다. 고 탄수화물 식이는 상대적으로 식이 섬유질이 많을때 고 지방식이보다 열량 밀도가 낮은 경향이 있다. 이러한 식이는 용적감이 크기 때문에 포만감을 증진시키며 이러한 포만감은 식이의 총 부피에 의해 영향을 받는다. 식이조성은 지방으로 축적되는 초과열량 비율에도 영향을 미친다. 열량원으로 즉시 쓰이지 않은 식이지방은 지방조직에 효율적으로 저장되지만 체내 탄수화물 저장능력에는 한계가 있으며 과잉 탄수화물이 체지방으로 쉽게 저장되지 않는다. 하지만 인슐린 저항성이 있는 경우 sucrose나 maltose의 섭취가 지나치게 많을때 지방으로 축적되는 경향이 있다. 또한 과잉의 탄수화물은 쉽게 산화되는 경향이 있어 지방산화를 감소시킴으로써 간접적으로 지방축적을 유도한다.

렙틴은 지방 세포에서 혈중으로 방출되어 뇌혈액막 (blood-brain barrier)을 통과한 후 중추 신경계내의 수용체에서 작용을 하게 된다. 렙틴은 음식물 섭취를 억제하고, 체중을 감소하며, 에너지 소비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 렙틴의 발현은 음식물 섭취 후에 증가 하고 공복시에는 감소한다. 렙틴의 발현이 감소하게 되면 인슐린의 저항성을 일으키는 것으로 알려져 지방대사 뿐만 아니라 탄수화물 대사와도 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

Cr의 가장 중요한 기능중의 하나는 혈당조절기능이다. 이는 insulin의 기능과도 밀접한 연관이 있는데 고탄수화물 섭취시 혈당을 감소하기 위하여 insulin분비를 동반하

여야 한다. 이 과정에서 Cr이 매우 중요한 역할을 수행한다.

따라서 본 연구에서는 본 연구진이 개발한 Cr-met chelate가 고탄수화물식을 섭취하고 있는 흰쥐에 병행급여시 체중의 변화, 비만가능성 조사, 지방조직의 leptin mRNA발현양과 혈액내 leptin의 함량에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물, 실험기간 및 장소

3주령 Sprague Dawley(평균체중 87g)중 수컷 30마리를 공시하여 고탄수화물 식이 급여시 Cr-Met chelate의 병용급여가 성장능력, 칼로리섭취, 비만지수, 혈액성상 그리고 지방조직내 leptin의 mRNA발현에 미치는 영향을 평가하고자 5처리 3반복, 반복당 2마리씩 한 케이지에서 시험에 이용하였다.

2. 시험사료 및 실험설계

시험사료는 흰쥐용 표준사료인 AIN-76A를 기초사료로 하였으며 광물질 보충사료는 Cr을 제외한 것을 사용하였다. 본 시험에 사용된 사료의 배합비는 table 7-1과 같다. Cr-Met chelate과 CrCl₃을 예비 배합 후 사료에 첨가하여 재배합하였다. 정상식이와 고탄수화물식이의 배합비는 차이가 없다. 하지만 고탄수화물식이의 경우 30% sucrose 용액을 음수로 추가 급여하여 고탄수화물 섭취를 유도하였다. 처리구로는 Cr이 첨가되어 있지 않은 정상급여구(LCNC), Cr이 첨가되어 있지 않은 고탄수화물급여구(HCNC), Cr-Methionine 150ppb가 첨가된 고탄수화물 급여구(HCCM15)과 300ppb가 첨가된 고탄수화물 급여구(HCCM30), CrCl₃ 300ppb가 첨가된 고탄수화물 급여구(HCCC30)를 두었다. 사료는 매일 오전에 급여하였으며, 체중, 사료섭취량 과 음수량은 매주 측정하여 기록하였다. 사료와 음수는 모두 자유로이 섭취하도록 하였다.

3. 조사항목

가. 육성성적 및 칼로리 섭취량

증체량(weight gain)은 평가 개시일의 무게와 체중 측정일의 무게 차이를 반복군 내 공시 수수로 나누어 계산하였고, 사료 섭취량(feed intake)은 사료 급여량에서 체중 측정일에 잔량을 공제 한 후 반복군 공시두수로 나누어 마리당 사료섭취량을 계산하였으며 체중과 사료 잔량 무게 측정은 매주 측정하여 기록하였다. 사료 요구율(F/G; feed/gain)은 사료 섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다. 또한 섭취한 30% sucrose 용액의 음수 열량 섭취를 기준으로 일당 탄수화물 열량 섭취량과 탄수화물 열량 요구율을 구하였다.

나. 혈청 내 Leptin, Insulin 함량

실험 종료 후 24시간 동안 절식시키고 ether로 가볍게 마취시킨 후 복대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 약 30분 방치 후에 3000rpm(4℃)에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 분석 전까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다. Insulin의 분석은 sandwich ELISA를 이용한 assay kit(Linco research, USA)를 이용하여 측정하였다. Leptin의 분석은 ELISA를 이용한 assay kit(BioVendor, Czech Republic)를 이용하여 측정하였다.

다. 비만지수

실험 종료 시 rats의 꼬부터 항문까지의 길이를 측정하여 비만도지수를 산출하였다.

$$\text{Róhrer index} = \{ \text{Body weight (g)} / \text{Naso-anal length (cm)}^3 \} \times 10^3$$

$$\text{Lee index} = \{ \text{Body weight (g)}^{1/3} / \text{Naso-anal length (cm)} \} \times 10^3$$

$$\text{TM index} = \{ \text{Body weight (g)} / \text{Naso-anal length (cm)}^{2.823} \} \times 10^3$$

$$\text{Body fat} = 0.581 \times \text{TM index} - 22.03$$

라. 혈청 내 lipid contents

혈청 total cholesterol, triglyceride 와 HDL cholesterol 농도는 영동제약사의 cholesterol kit로 측정하였다. Total cholesterol과 triglyceride는 혈청 10 μ l를 Trinder 발색제 1000 μ l와 혼합후 각각 5분간 37 $^{\circ}$ C 배양기에 넣은 후 흡광광도계를 이용하여 600nm에서 흡광도를 분석하였으며, HDL cholesterol은 면역법으로 혈청 10 μ l를 R1시약과 실온에서 5분간 방치후 R2 시약을 다시 혼합하여 5분간 37 $^{\circ}$ C 배양기에 넣은 후 흡광광도계를 이용하여 546nm에서 흡광도를 측정하였다. 심혈관계 질환의 위험도 판정에 사용되고 있는 HTR(HDL to total cholesterol ratio)지수는 HDL cholesterol/total cholesterol 방법에 의해 산출하였다.

마. 지방조직무게

실험 종료 후 24시간 동안 절식시키고 ether로 가볍게 마취시킨 후 지방조직 중 epididymal과 abdominal 지방조직을 적출하였다. 적출한 각각의 지방조직의 무게를 측정하고 다음 체중대비 지방무게(%)로 계산하였다.

바. Leptin mRNA 발현량 측정

지방조직에서 발현된 mRNA의 정량분석은 reverse transcription-PCR을 이용하여 측정하였다. 먼저 적출한 지방조직으로부터 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 RQ-1 RNase-free DNase 2unit와 RNasin 20unit으로 1시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 처리하였다. 처리된 5 μ g의 RNA는 2.5mM MgCl₂, 10mM DTT, 와 각 0.5mM dNTP 그리고 0.5 μ g의 oligo(dT)₁₂₋₁₈ 가 들어있는 PCR buffer(20mM Tris-HCl, 50mM KCl) 20 μ l에서 Superscript III revers transcriptase 200unit으로 50분간 42 $^{\circ}$ C에서 처리되었다. 이 혼합액은 다시 E.coli유래 RNase 2unit으로 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 처리하였다. 생성된 cDNA는 각각 200nM의 sense와 antisense oligonucleotide primers(table 7-1)가 들어있는 PCR buffer에서 2.5unit의 Taq DNA polymerase으로 PCR에서 증폭되었다. PCR 조건은 denaturation : 94 $^{\circ}$ C에서 1분간(첫 cycle에서는 3분간), annealing : 58 $^{\circ}$ C에서 1분간, extension : 72 $^{\circ}$ C에서 2분간(마지막 cycle에서 10분간) 30회 실시되었다. PCR산물은 1% agarose gel에서 분리하여

ethidium bromide로 염색후 밴드를 확인하였다. Leptin의 mRNA정량에 대한 control mRNA는 β -actin을 선정하여 leptin과 대조하여 발현정도를 비교하였다.

Table 7-1. Characteristics of porcine-isolated DNA sequenses

Probe	Primer	Size, bp	Gene bank number
Leptin	sense:5'-ACACCAAAACCCTCATCAAG-3'	207	NM013076
	antisense:5'-GAAGGCAAGCTGGTGAGGA-3'		
β -actin	sense:5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3'	511	NM031144
	antisense:5'-GCTAGAAGCATTGCGGTGGA-3'		

4. 통계처리

모든 분석 결과의 통계 분석은 SAS program(1989)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준 에서 유의성을 검증하였으며, 처리 평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법(Snedecor and cochran,1980)을 이용하였다.

Table 7-2. Formula and chemical compositions of experimental diets.

Ingredients	Experimental diet	
	Nomal	High CHO
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Cornstarch	60.0	60.0
Dextrin	10.0	10.0
Sucrose	-	-
Cellulose	-	-
Corn oil	5.0	5.0
Lard	-	-
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
Vitamin mix ³⁾	1.0	1.0
Choline bitartate	0.2	0.2
Total	100.0	100.0
Kcal/kg	4,100	4,100
		30% sucrose 용액음수급여
Kcal%		
Protein	20.8	20.8
Carbohydrate	68.2	68.2
Fat	11.0	11.0
Total	100.0	100.0

¹⁾AIN-76A diet

²⁾AIN-76A mineral mix. (chromium free)

³⁾AIN-76A vitamin mix

3. 결과 및 고찰

고탄수화물 식이급여를 위하여 배합사료내 sucrose의 함량은 AIN-76A 표준식이료를 약간 변형하여 제조하였다. 대신 음수에 증류수대신 30% sucrose용액을 급여하여 sucrose를 통한 탄수화물 섭취를 유도하였다. 일당사료섭취량과 사료요구율(F/G)은 고탄수화물 급여구 전체가 정상사료 급여구보다 유의적으로 감소하였다(table 7-3). 일반적으로 에너지 밀도가 높은 사료의 섭취량이 밀도가 낮은 사료보다 감소하게 된다. 이것은 가축이 체내 에너지 대사의 항상성을 유지하기 위한 것으로 본 실험에서는 음수로 급여한 30% sucrose용액이 급여사료내 탄수화물에서 유래하는 에너지요구량의 일부분을 충족하였기 때문에 사료의 섭취량이 감소한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 에너지섭취량 결과에서도 확인되었다. 또한 고탄수화물 식이급여구내에서 일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율은 처리구간 아무런 차이가 없었다. 하지만 Bock et al.(1994)은 고탄수화물 식이유도 비만흰쥐에서 Zn, Cr 그리고 Se을 급여한 처리구에서 일당사료섭취량과 실험기간 전체증체량이 3가지 광물질을 제거한 사료를 급여한 처리구보다 감소하였다는 보고로 미루어 본 실험에서는 Cr광물질만을 대상으로 하였기 때문에 육성성적에 아무런 영향이 없었던 것으로 판단된다. 또한 실험용 흰쥐의 체중이 본 실험에서는 평균 84g이었던 반면 Bock et al.(1994)의 실험에서는 평균 340~370g이었기 때문에 저체중에서 고탄수화물 식이에 대한 민감성이 낮다는 보고(Kanarek et al., 1987)와 비교하여 보면 본 시험에서 고탄수화물 식이에 대한 성장능력의 차이가 없었던 것으로 판단된다.

Table 3은 Cr의 급여가 고탄수화물 식이급여 흰쥐에서 에너지 섭취량에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. 전체 에너지 섭취량에서는 처리구간 아무런 차이가 없었으나 탄수화물 에너지 섭취량은 고탄수화물 급여구가 정상급여구보다 증가하였다 ($p < 0.05$). 전체 에너지 요구율에서는 고탄수화물 식이급여구중에서 CrCl₃급여구가 가장 높았으며 Cr-Met chelate급여구에서 가장 낮았다. 이러한 결과는 탄수화물 에너지 요구율 결과에서도 일치하였다. 이러한 결과는 Cr-Met chelate가 탄수화물의 대사작용에 영향하였기 때문인 것으로 판단된다.

Cr-Met chelate와 CrCl₃를 급여가 고탄수화물 식이섭취 흰쥐의 지방조직 함량의 무게를 측정한 결과는 table 7-4에 나타내었다. 복강지방과 부고환지방 그리고 전체지방 함량은 처리구간 차이가 없었다. 이것은 32% sucrose용액 급여 흰쥐와 급여하지 않은

흰쥐사이에 체중의 차이는 없었으나 sucrose용액을 급여한 흰쥐에서 비만지수로서 Lee index가 증가하였다는 보고 (Kanarek and Marks-Kaufman,1979)와 정반대의 결과로서 본 실험결과에서는 탄수화물 에너지 섭취량이 sucrose용액 급여구에서 높았으나 전체 에너지 섭취량에서는 차이가 없었기 때문에 지방함량에서도 차이가 없었던 것으로 판단된다. Hasten et al.(1997)는 Cr의 형태에 따른 체지방의 함량을 조사한 결과 3차례의 실험중 한번만 체지방 함량의 감소를 확인하였으며 이러한 감소의 원인은 insulin에 의한 thermogenesis라고 보고하였다. 반면 Anderson et al.(1991)은 저Cr식을 섭취하는 정상인과 고혈당증환자에서 Cr의 보충급여로 정상인보다 고혈당증 환자에서 insulin의 함량이 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 고탄수화물 식이를 통하여 고혈당을 유도하고자 하였으나 처리구간 혈당의 차이를 확인하지 못하였기 때문에 정확한 비교는 어려우나 본 연구에는 실험시작시부터 Cr을 급여하였기 때문에 저Cr 식이를 일정기간 섭취후 Cr을 급여하여 실험을 실시한 Anderson et al.(1991)의 연구결과와는 다른 경향을 보인 것으로 판단된다.

Table 7-5는 혈청내 leptin과 insulin함량결과이다. leptin은 지방조직 무게가 처리구간 차이가 없었음에도 불구하고 Cr-Met chelate 150ppb급여구에서 가장 높았다. leptin은 체내 에너지 대사의 항상성에 관여하는 비만조절 호르몬으로 지방조직에서 생성되어 시상하부의 leptin receptor와 결합하여 섭취량을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Attele et al., 2002). 본 실험에서도 고탄수화물 급여구에서 처리구간 일당사료 섭취량에는 차이가 없었으나 Cr-Met chelate급여구에서 감소하는 경향을 나타냄으로써 Cr-Met chelate가 leptin생성에 영향하는 것으로 판단된다. 하지만 insulin의 함량은 Cr-met chelate 300ppb 급여구에서 가장 낮았으나 반복간 편차가 심하여 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. Cr은 형태, 급여수준 그리고 물성적 특징에 따라 체내 대사과정에서 insulin과 관련 호르몬의 활성화에 미치는 영향이 다르게 나타난다 (Machalinski et al., 2006). 본 실험에서도 Cr-Met chelate와 CrCl3의 insulin에 대한 효과는 다르게 나타난 것으로 판단된다. 또한 Ohh et al.(2003)도 Cr-Met chelate를 수준별로 급여시 흰쥐에서 insulin의 함량에는 아무런 영향이 없었다고 보고함으로써 우리 연구결과와 일치하였다.

Table 7-3. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the growth performances and calorie intake in rat fed high carbohydrate diet

ITEM	Treatments					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
Growth Performances						
ADFI (g/d/rat)	17.07 ^a	10.17 ^b	9.80 ^b	10.67 ^b	11.0 ^b	2.31
ADG (g/d/rat)	6.70 ^a	5.70 ^b	5.77 ^{ab}	6.47 ^{ab}	5.67 ^b	0.51
Feed/Gain	2.56 ^a	1.79 ^b	1.70 ^b	1.65 ^b	1.91 ^b	0.33
Caloric intake						
Total Calorie (kcal)	70.00	73.70	73.17	79.23	79.67	7.90
Carbohydrate Caloric Intake (kcal)	47.77 ^b	60.43 ^a	60.40 ^a	65.37 ^a	65.33 ^a	4.95
Caloride/Gain	10.53 ^b	12.90 ^{aAB}	12.70 ^{aAB}	12.30 ^{abB}	14.00 ^{aA}	0.92
Carbohydrate Calorie/Gain	7.17 ^c	10.57 ^{abAB}	10.50 ^{abB}	10.13 ^{bbB}	11.53 ^{aA}	0.60

^{a, b} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

^{A, B} Values with different superscripts within the same row among high carbohydrate diet treatments differ (p<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

Table 7-4. Effect of Cr-Met chelate supplementation on adipose tissue weight in rat fed high carbohydrate diet

Adipose tissue	Treatment					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
(% of body weight)						
Abdominal Fat	2.94	2.68	2.48	3.11	2.85	0.45
Epididymal Fat	2.31	2.13	2.21	1.83	2.20	0.49
Total Fat	5.25	4.82	4.69	4.94	5.04	0.86

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

Table 7-5. Effect of Cr-Met chelate supplementation on serum leptin and insulin contents in rat fed high carbohydrate diet

ITEM	Treatment					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
Leptin (ng/ml)	6.73 ^b	7.30 ^{bB}	9.70 ^{aA}	6.52 ^{bB}	6.60 ^{bB}	2.12
Insulin (ng/ml)	1.71	2.27	1.84	1.57	2.95	1.56

^{a, b} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

^{A, B} Values with different superscripts within the same row among high carbohydrate diet

treatments differ (p<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

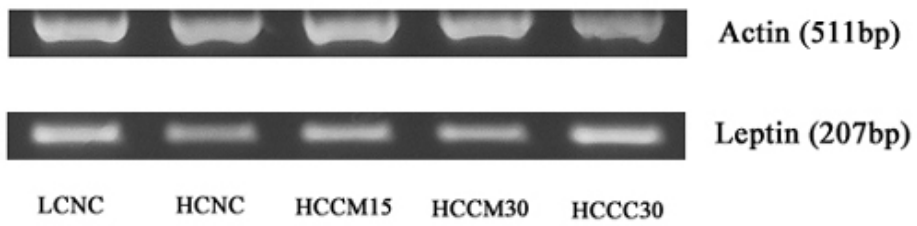
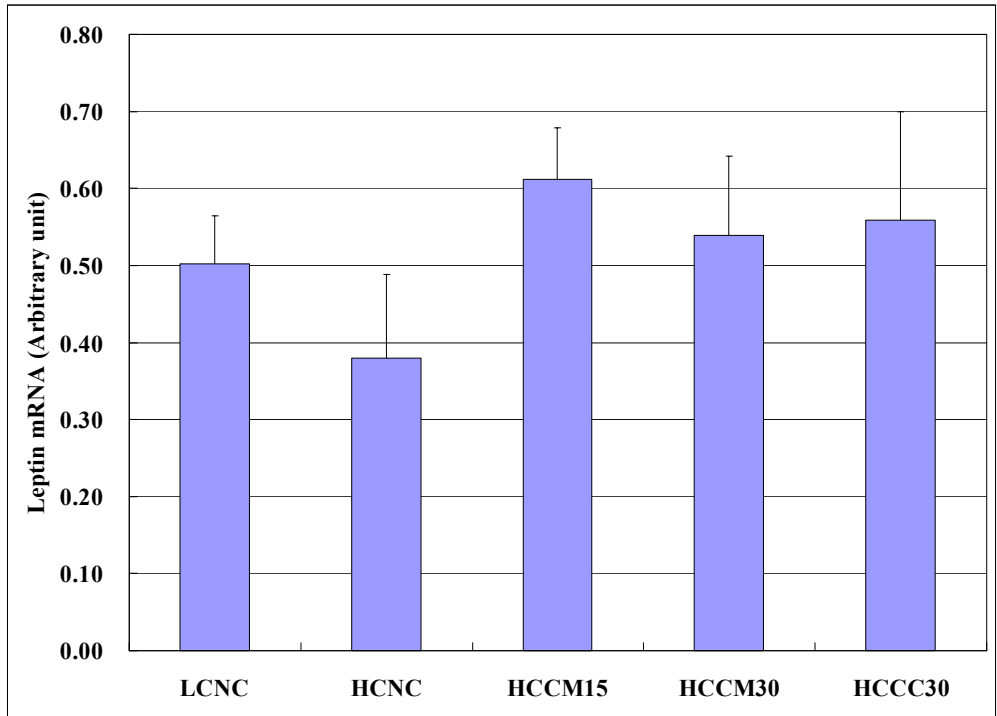


Fig. 7-1. Effect of Cr-Met chelate supplementation on leptin mRNA expression in adipose tissue in rat fed high carbohydrate diets

제8절 Cr-Met chelate의 급여가 고지방 식이유도 비만쥐의 육성성적, 비만지수, 지방조직 함량, 혈청내 지질함량 그리고 leptin mRNA발현에 미치는 영향

1. 서 론

비만 또는 과체중은 생리적 위험인자일 뿐만 아니라 공중보건측면에서 사회적 문제를 야기시킬 수 있는 잠재적 위험성을 내포하고 있다. 비만의 원인은 영양학적으로 총 소비열량 보다 총 섭취열량이 많기 때문에 발생한다. 이러한 열량섭취의 대부분은 섭취하는 지질로부터 유래한다. 따라서 지질섭취가 증가할수록 비만의 가능성 또한 증가하게 된다. 비만을 예방하기 위하여 지질섭취량을 감소시키거나, 섭취한 열량을 소비하는 방법이 최선일 것이다. 과거부터 이러한 비만의 예방을 위해 영양학적 접근이 이루어져 왔다.

이러한 접근방법중의 하나가 Cr과 같은 지질대사에 영향할 수 있는 미량광물질의 이용이다. 현재까지 지질대사에서 Cr의 정확한 역할은 알려져 있지 않다. 하지만 중성지질, HDL 콜레스테롤 함량의 변화등이 있었다는 연구결과가 보고되고 있음으로 미루어 Cr이 지질대사에 미치는 역할은 존재하고 있음을 알 수 있다. 또한 가축의 경우 등지방 두께의 감소 또는 정육율의 증가가 보고되고 있다(Ohh and Lee, 2005). 이러한 결과들은 모두 지질과 관련있는 것들로 체내 지방축적의 조절이 가능할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 본 연구진이 개발한 Cr-Met chelate는 기존에 사용되던 무기태 Cr의 단점인 낮은 체내 흡수율을 개선한 Cr으로서 Ohh et al.(2003)은 흰쥐에서 고지방사료에 Cr-Met chelate를 수준별로 첨가하여 급여한 결과 비만지수가 1200ppb 수준에서 유의적으로 감소하였음을 보고하였다. 또한 김등(2003)은 흰쥐에서 고지방사료에 Cr-Met chelate와 CrCl₃를 급여하여 비교한 결과 Cr-Met chelate급여로 비만지수가 유의적으로 감소하였다고 보고함으로서 Ohh et al.(2003)과 일치하는 결과를 보여주었다. 하지만 이들의 연구는 정상개체에서 고지방 식이를 급여시 Cr을 첨가한 것

으로 지질대사에서 Cr의 작용시점을 파악하기는 어렵다. 따라서 본 실험에서는 고지방 식이로 비만이 유도된 흰쥐에 Cr을 급여하여 이미 축적된 지방의 감소 가능성을 평가하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물, 실험기간 및 장소

3주령 Sprague Dawley(평균체중 87g)종 수컷 40마리를 공시하여 Cr-Met chelate의 급여가 고지방식이 유도 비만쥐의 성장능력, 칼로리섭취, 비만지수, 혈액성상 그리고 지방조직내 leptin의 mRNA발현에 미치는 영향을 평가하고자 5처리 4반복, 반복당 2마리씩 시험에 이용하였다.

2. 시험사료 및 실험설계

시험사료는 흰쥐용 표준사료인 AIN-76A를 기초사료로 하였으며 광물질 보충사료는 Cr을 제외한 것을 사용하였다. 본 시험에 사용된 사료의 배합비는 table 8-1과 같다. Cr-Met chelate과 CrCl₃을 예비 배합 후 사료에 첨가하여 재배합하였다. 고지방식이의 제조는 정상식이와 비교하여 lard를 이용하여 지방으로 공급되는 열량을 60%로 조절하였다. 하지만 고지방식이 유도 비만을 위하여 3주령부터 8주간 Cr이 첨가되어 있지 않은 고지방 식이를 급여하였다. 처리구로는 Cr인 첨가되어 있지 않은 정상급여구(LFNC), Cr이 첨가되어 있지 않은 고탄수화물급여구(HFNC), Cr-Methionine 150ppb가 첨가된 고탄수화물 급여구(HFCM15)과 300ppb가 첨가된 고탄수화물 급여구(HFCM30), CrCl₃ 300ppb가 첨가된 고탄수화물 급여구(HFCC30)를 두었다. 사료는 매일 오전에 급여하였으며, 체중, 사료섭취량 과 음수량은 매주 측정하여 기록하였다. 사료와 음수는 모두 자유로이 섭취하도록 하였다.

3. 조사항목

가 육성성적 및 칼로리 섭취량

증체량(weight gain)은 평가 개시일의 무게와 체중 측정일의 무게 차이를 반복군

내 공시 수수 로 나누어 계산하였고, 사료 섭취량(feed intake)은 사료 급여량에서 체중 측정일에 잔량을 공제 한 후 반복군 공시두수로 나누어 마리당 사료섭취량을 계산하였으며 체중과 사료 잔량 무게 측정은 매주 측정하여 기록하였다. 사료 요구율(F/G; feed/gain)은 사료 섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다. 또한 섭취한 30% sucrose 용액의 음수 열량 섭취를 기준으로 일당 탄수화물 열량 섭취량과 탄수화물 열량 요구율을 구하였다.

나. 혈청 내 Leptin, Insulin 함량

실험 종료 후 24시간 동안 절식시키고 ether로 가볍게 마취시킨 후 복대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 약 30분 방치 후에 3000rpm(4℃)에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 분석 전까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다. Insulin의 분석은 sandwich ELISA를 이용한 assay kit(Linco research, USA)를 이용하여 측정하였다. Leptin의 분석은 ELISA를 이용한 assay kit(BioVendor, Czech Republic)를 이용하여 측정하였다.

다. 비만지수

실험 종료 시 rats의 코부터 항문까지의 길이를 측정하여 비만도지수를 산출하였다.

$$\text{Röhrer index} = \{ \text{Body weight (g)} / \text{Naso-anal length (cm)}^3 \} \times 10^3$$

$$\text{Lee index} = \{ \text{Body weight (g)}^{1/3} / \text{Naso-anal length (cm)} \} \times 10^3$$

$$\text{TM index} = \{ \text{Body weight (g)} / \text{Naso-anal length (cm)}^{2.823} \} \times 10^3$$

$$\text{Body fat} = 0.581 \times \text{TM index} - 22.03$$

라. 혈청 내 lipid contents

혈청 total cholesterol, triglyceride 와 HDL cholesterol 농도는 영동제약사의 cholesterol kit로 측정하였다. Total cholesterol과 triglyceride는 혈청 10 μ l를 Trinder 발색제 1000 μ l와 혼합후 각각 5분간 37℃ 배양기에 넣은 후 흡광광도계를 이용하여 600nm에서 흡광도를 분석하였으며, HDL cholesterol은 면역법으로 혈청 10 μ l를 R1시

약과 실온에서 5분간 방치후 R2 시약을 다시 혼합하여 5분간 37℃ 배양기에 넣은 후 흡광광도계를 이용하여 546nm에서 흡광도를 측정하였다. 심혈관계 질환의 위험도 판정에 사용되고 있는 HTR(HDL to total cholesterol ratio)지수는 HDL cholesterol/total cholesterol 방법에 의해 산출하였다.

마. 지방조직무게

실험 종료 후 24시간 동안 절식시키고 ether로 가볍게 마취시킨 후 지방조직 중 epididymal과 abdominal 지방조직을 적출하였다. 적출한 각각의 지방조직의 무게를 측정하여 다음 체중대비 지방무게(%)로 계산하였다.

바. Leptin mRNA 발현량 측정

지방조직에서 발현된 mRNA의 정량분석은 reverse transcription-PCR을 이용하여 측정하였다. 먼저 적출한 지방조직으로부터 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 RQ-1 RNase-free DNase 2unit와 RNasin 20unit으로 1시간동안 37℃에서 처리하였다. 처리된 5 μ g의 RNA는 2.5mM MgCl₂, 10mM DTT, 와 각 0.5mM dNTP 그리고 0.5 μ g의 oligo(dT)₁₂₋₁₈ 가 들어있는 PCR buffer(20mM Tris-HCl, 50mM KCl) 20 μ l에서 Superscript III revers transcriptase 200unit으로 50분간 42℃에서 처리되었다. 이 혼합액은 다시 E.coli유래 RNase 2unit으로 20분간 37℃에서 처리하였다. 생성된 cDNA는 각각 200nM의 sense와 antisense oligonucleotide primers(table 8-1)가 들어있는 PCR buffer에서 2.5unit의 Taq DNA polymerase으로 PCR에서 증폭되었다. PCR 조건은 denaturation : 94℃에서 1분간(첫 cycle에서는 3분간), annealing : 58℃에서 1분간, extension : 72℃에서 2분간(마지막 cycle에서 10분간) 30회 실시되었다. PCR산물은 1% agarose gel에서 분리하여 ethidium bromide로 염색후 밴드를 확인하였다. Leptin의 mRNA정량에 대한 control mRNA는 β -actin을 선정하여 leptin과 대조하여 발현정도를 비교하였다.

Table 8-1. Characteristics of porcine-isolated DNA sequenses

Probe	Primer	Size, bp	Gene bank number
Leptin	sense:5'-ACACCAAAACCCTCATCAAG-3'	207	NM013076
	antisense:5'-GAAGGCAAGCTGGTGAGGA-3'		
β-actin	sense:5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3'	511	NM031144
	antisense:5'-GCTAGAAGCATTGCGGTGGA-3'		

4. 통계처리

모든 분석 결과의 통계 분석은 SAS program(1989)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준 에서 유의성을 검증하였으며, 처리 평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법(Snedecor and cochrane,1980)을 이용하였다.

Table 8-2. Formula and chemical compositions of experimental diets.

Ingredients	Experimental diet	
	Nomal ¹⁾	High fat
Casein	20.0	26.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Cornstarch	30.0	19.0
Dextrin	-	-
Sucrose	35.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0
Lard	-	30.0
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
Vitamin mix ³⁾	1.0	1.0
Choline bitartate	0.2	0.2
Total	100.0	100.0
Kcal/kg	3,900	5,400
Kcal%		
Protein	21.8	20.2
Carbohydrate	66.6	21.5
Fat	11.6	58.3
Total	100.0	100.0

¹⁾AIN-76A diet

²⁾AIN-76A mineral mix. (chromium free)

³⁾AIN-76A vitamin mix

3. 결과 및 고찰

고지방 식이 유도 비만쥐의 육성성적에 미치는 Cr-Met chelate의 영향을 알아보기 위하여 먼저 8주간 Cr이 전혀 첨가되어 있지 않은 고지방 사료를 급여하여 비만을 유도하였다. 8주후 정상식을 급여한 구와 체중을 비교한 결과 유의적인 체중의 차이를 확인하였으며 비만지수를 계산하여 비만이 유도되었음을 확인하였다. 이후 처리구 별로 Cr을 6주간 급여한 결과는 표 8-3에 나타내었다. 일당사료섭취량은 정상식이구에서 가장 높았으나 일당증체량은 정상식이 급여구와 고지방 Cr-Met chelate 300ppb 급여구에서 가장 낮은 결과를 나타내었다. 사료요구율은 고지방 CrCl₃ 300ppb 급여구에서 가장 낮았다. 고지방 식이급여구들간의 육성성적을 살펴보면 Cr-Met chelate 300ppb급여구에서 일당사료섭취량이 가장 높았으며 일당증체량은 가장 낮았다. 하지만 사료요구율은 Cr이 첨가되어 있지 않은 고지방 급여구와 차이가 없었으나 Cr-Met chelate 150ppb와 CrCl₃ 300ppb 급여구보다 높았다.

Cr-Met chelate의 급여가 비만쥐의 비만지수에 미치는 영향을 살펴보면 표 8-4와 같다. 고지방 급여구들에서 Cr-Met chelate급여구가 Cr을 첨가하지 않은 고지방 급여구보다 LEE index, TM index, body fat에서 유의적으로 감소하였으며 CrCl₃ 300ppb 급여구는 Cr을 첨가하지 않은 고지방 급여구와 차이가 없었다. 이러한 결과는 Cr-Met chelate의 흡수이용성이 무기태 Cr인 CrCl₃보다 증가하였기 때문인 것으로 판단된다. 이러한 결과는 김 등(2003)이 고지방 식이를 섭취하고 있는 흰쥐에 Cr-Met chelate를 급여한 결과 비만지수 Röhrer index, Lee index, TM index 그리고 body fat에서 Cr을 첨가하지 않은 고지방 식이급여구 CrCl₃를 첨가한 급여구보다 감소하였다는 결과 일치하였다. 따라서 Cr-Met chelate은 지방대사에 관여하여 비만을 감소시키는 것으로 판단된다. 하지만 지방조직 함량의 무게에서는 부고환지방 무게와 총지방 무게는 처리구간 차이가 없는 것으로 나타났다. 복강지방의 무게는 고지방 식이 급여구들 사이에서 Cr-Met chelate 150ppb급여구에서 가장 낮은 결과를 보여주었다. 무기태 Cr첨가구인 CrCl₃ 300ppb급여구는 Cr을 첨가하지 않은 고지방 식이 급여구와 아무런 차이가 없었다. 따라서 CrCl₃의 급여수준보다 절반의 함량만으로도 복강지방의 감소를 가져오는 것으로 보아 본 연구진이 사용한 Cr-Met chelate의 흡수율과 이용성이 더 우수한 것으로 판단된다.

표 8-6는 Cr-Met chelate의 급여가 고지방사료 식이급여 비만쥐의 혈청내 지질함

량에 미치는 결과는 나타내었다. 총 콜레스테롤 함량은 고지방 식이 급여구가 정상식이 급여구보다 높았다. 고지방 식이 급여구들사이에는 총 콜레스테롤과 중성지질의 함량은 Cr-Met chelate 150ppb급여구와 CrCl₃급여구에서 가장 낮았던 반면 HDL콜레스테롤의 함량은 CrCl₃급여구가 Cr-Met chelate 150ppb급여구보다 높았다. 이러한 결과는 첨가된 Cr의 종류에 따라 콜레스테롤 대사에 미치는 영향이 달라질 수 있음을 시사한다. 다시 말하면, CrCl₃급여구와 Cr-Met chelate 150ppb급여구를 비교하여 보면 HDL콜레스테롤의 함량과 총 콜레스테롤 함량이 다른 처리구보다 높았음에도 불구하고 HDL콜레스테롤의 함량과 총 콜레스테롤 함량의 비율은 CrCl₃급여구가 Cr-Met chelate 150ppb급여구보다 높았다. 김 등(2003)은 Cr-Met chelate의 급여가 고지방 식이 급여구에서 Cr을 급여하지 않은 고지방 식이급여구 보다 총 콜레스테롤의 함량이 감소하였다고 보고하여 본 연구결과와 상반된 결과를 보여주었다. 이것은 본 실험이 Cr이 첨가되어 있지 않은 고지방 식이를 8주간 급여후 Cr을 첨가하였기 때문에 일단 증가된 콜레스테롤의 함량은 Cr의 급여로 감소되기 어려움을 시사한다.

Leptin함량은 고지방 급여구가 정상식이 급여구보다 증가하였으나 고지방 급여구들 사이에서는 처리구간 아무런 차이가 없었다. 일반적으로 Leptin의 함량은 지방조직의 함량이 증가함에 따라 혈액내 순화되는 leptin의 함량도 증가하게 된다. 따라서 본 연구에서도 부고환지방의 무게와 총 지방조직의 무게가 처리구간 차이가 없었던 것으로 미루어 혈액내 순환되는 leptin의 함량에도 차이가 없었을 것으로 판단된다. 하지만 Ainslie et al.(2000)은 4주간 흰쥐에 고지방 식이 또는 정상식이를 급여한후 혈액내 leptin함량을 측정된 결과 고지방 식이를 급여한 흰쥐의 leptin함량이 약 24% 감소하였음을 보고하였다. 그는 이러한 결과에 대해 2가지 원인을 제시하였다. 하나는 고지방 식이가 지방세포속으로 insulin-stimulated glucose uptake를 감소시켰다는 점과 지방분해(lipolysis)가 증가하였다는 점이다. lipolysis과정에는 지방세포에 특이적인 수용체(peroxisome proliferator-activated receptor)의 발현이 증가하는데 이 수용체가 leptin의 생성을 감소시킨다는 것이다. 하지만 본 실험에서는 지방분해와 관련된 mRNA를 분석하지 않아 정확한 원인을 평가하기는 어려우나 leptin mRNA의 발현양에도 차이가 없었던 점으로 미루어 insulin보다는 지방분해(lipolysis)에 의한 leptin의 감소가 이루어 졌을 것으로 판단된다.

Table 8-3. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the growth performances in high fat diet fed obese rat

ITEM	Treatment					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
Initial weight (g)	377	487	452	443	457	33
Final weight (g)	448	625	584	540	611	46
ADFI (g/d/rat)	22.47 ^a	19.48 ^{ba}	18.55 ^{bcAB}	16.60 ^{cB}	19.33 ^{bcC}	1.58
ADG (g/d/rat)	2.93 ^b	3.53 ^{abA}	3.50 ^{abA}	2.63 ^{bB}	4.05 ^{aA}	0.53
Feed/Gain	7.83 ^a	5.57 ^{bcAB}	5.33 ^{bcB}	6.41 ^{ba}	4.82 ^{cB}	0.68

a, b, c Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

Table 8-4. Effect of Cr-Met chelate supplementation on obesity indices in high fat diet fed obese rat

ITEM	Treatment					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
Rohrer index ²⁾	32.01	36.27	25.58	31.94	34.23	6.78
Lee index ²⁾	317.38 ^b	330.87 ^{aA}	320.90 ^{bB}	317.14 ^{bB}	324.51 ^{abAB}	5.59
TM index ²⁾	56.45 ^b	64.48 ^{aA}	58.90 ^{bB}	56.62 ^{bB}	60.35 ^{abAB}	3.23
Body fat ²⁾ (g/100g body weight)	1.77 ^b	15.44 ^{aA}	12.19 ^{bB}	1.87 ^{bB}	13.40 ^{abAB}	1.87

a, b Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

²⁾ Röhler index= {Body weight (g)/ Naso-anal length (cm)³}×10³

Lee index={Body weight (g)^{1/3}/ Naso-anal length (cm) }×10³

TM index ={Body weight (g)/ Naso-anal length (cm)^{2.823}}×10³

Body fat=0.581×TM index - 22.03

Table 8-5. Effect of Cr-Met chelate supplementation on adipose tissue weight in high fat diet fed obese rat

ITEM	Treatment					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
	(% of body weight)					
Abdominal Fat	2.98 ^b	4.31 ^{aA}	3.76 ^{abB}	3.87 ^{aAB}	4.13 ^{aB}	0.71
Epididymal Fat	2.35 ^b	3.55 ^a	2.74 ^b	3.02 ^{ab}	2.81 ^b	0.62
Total Fat	5.37 ^b	7.86 ^a	6.51 ^{ab}	6.85 ^a	6.94 ^a	1.19

^{a, b} Values with different superscripts within the same row differ ($p < 0.05$)

¹⁾ Standard error of mean ($p < 0.05$)

Table 8-6. Effect of Cr-Met chelate supplementation on serum lipid contents in high fat diet fed obese rat

ITEM	Treatment					SEM ¹⁾
	NCNC	HCNC	HCCM15	HCCM30	HCCC30	
Total Cholesterol (mg/dL)	142.62 ^c	161.91 ^{abAB}	152.86 ^{bcB}	168.98 ^{aB}	154.64 ^{bA}	8.54
Triglyceride (mg/dL)	195.31 ^b	230.20 ^{abAB}	207.91 ^{bB}	256.41 ^{aB}	202.05 ^{bA}	34.66
HDL Cholesterol (mg/dL)	69.13 ^b	67.26 ^{bB}	65.68 ^{bB}	87.30 ^{abA}	98.28 ^{aAB}	18.93
HDL-Cho/Total Cho	0.19 ^{ab}	0.42 ^{bB}	0.43 ^{bB}	0.52 ^{abA}	0.64 ^{aAB}	0.13
Leptin (ng/ml)	1.69	2.74	2.89	2.84	2.63	1.15

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ ($p < 0.05$)

¹⁾ Standard error of mean ($p < 0.05$)

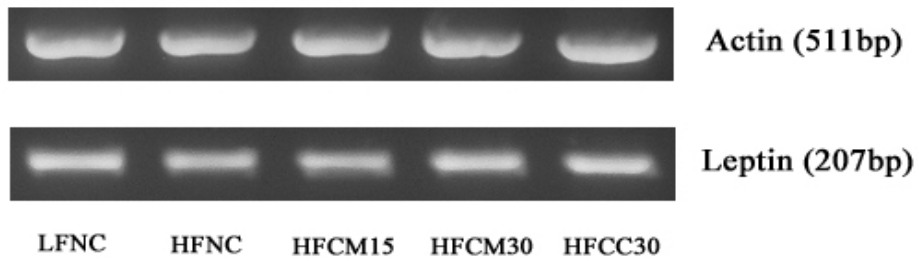
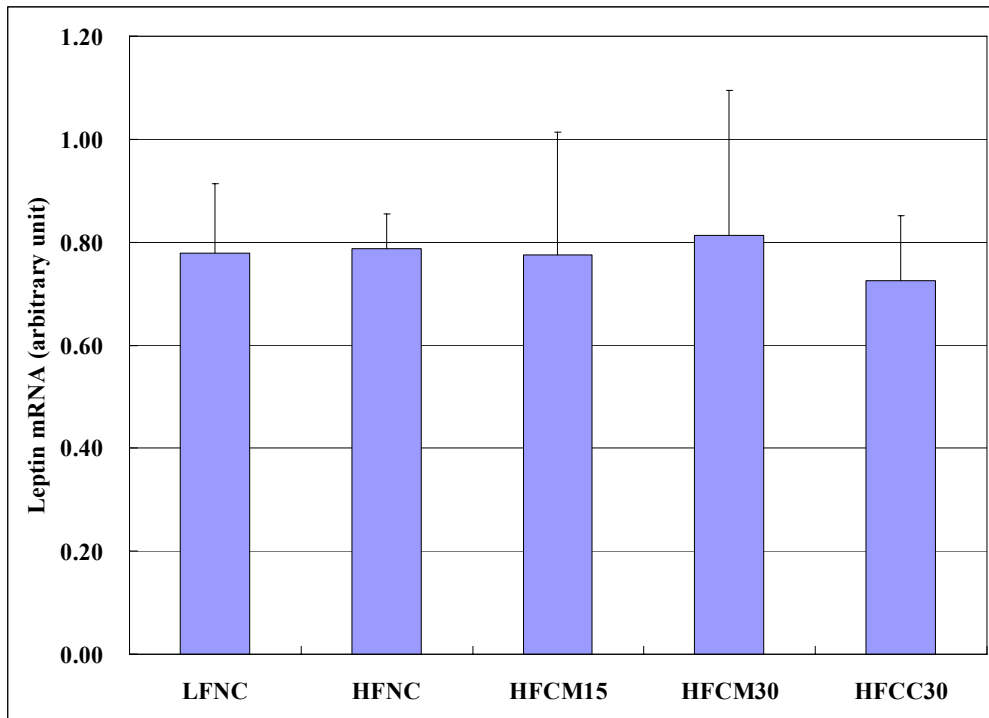


Fig. 8-1. Effect of Cr-Met chelate supplementation on leptin mRNA expression in adipose tissue in high fat diets induced obese rat

제9절 Cr-Met chelate의 급여가 착유우의 유생산

및 유성분에 미치는 영향

1. 서론

필수광물질인 Cr은 최근 기능성 광물질로서 많은 관심을 받아오고 있다. Cr은 탄수화물 대사에서 필수 광물질일 뿐만 아니라 지방대사와 단백질 대사에도 많은 영향을 미치고 있음이 많은 연구결과를 통하여 밝혀졌다.

Cr을 이용한 초기실험은 대부분 포유동물을 대상으로 하였으나 축산분야에서는 육우와 착유우같은 대가축에 대한 평가도 이루어져 왔다. 그 이유는 축산물 소비자들이 기능성 축산물 선호하고 있다는 점과 과거와 달리 가축의 복지라는 개념이 도입되었다는 점이다. 즉 스트레스를 받고 있는 가축의 경우 생산성의 감소뿐만 아니라 축산물 품질의 저하도 동반되어 나타나기 때문이다. 따라서 최근 Cr에 대한 관심도 이러한 관점에서 이루어졌다고 할 것이다. 또한 육우 또는 착유우와 같은 대가축의 경우 Cr의 효과는 유생산 또는 육량의 증가 또는 스트레스하에서 면역반응의 개선과 같은 가축의 복지에 대한 평가가 주를 이루고 있다. 하지만 보고된 Cr의 효과는 연구결과마다 차이를 보이고 있다. 그 이유는 실험에 사용된 Cr의 형태가 다르다는 점이다. 다시 말하면, 무기태 Cr과 유기태 Cr의 경우 흡수율이 다르기 때문에 실제 가축에 동일 수준에서 급여시 흡수되는 Cr의 양이 달라지므로 그에 따른 효과도 다르게 나타남을 알 수 있다. 따라서 최근 이러한 미량광물질들의 흡수율을 개선하고자 chelate형태의 제품들이 개발되고 있다. 본 연구실에서 개발된 Cr-Met chelate의 경우 Cr광물질과 필수아미노산인 methionine을 결합시킨 제품으로 분자량이 작아 장관벽의 통과가 용이하여 높은 체내 흡수율을 기대할 수 있다. 또한 각종 영양학적 대사에 관여함으로써

서 축산물의 성분의 변화도 기대할 수 있다.

따라서 본 연구는 기능성 유기태 Cr인 Cr-Met chelate의 급여가 축산물에 미치는 변화를 평가하고자 실시하였으며 실험축종으로 착유우를 이용하여 무기태 Cr인 CrCl₃와 동일수준 또는 절반의 수준에서 유생산, 유성분 그리고 혈청내 지질성분과 항체가 의 변화에 미치는 영향을 평가하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

1. 시험설계 및 시험사료

Cr-Met chelate의 급여가 착유우의 유생산과 유성분에 미치는 영향을 평가하고자 실시하였다. 본 시험의 기초사료는 기초사료는 농가관행 완전혼합사료(total mixed ratio)와 착유우용 배합사료를 각각 7:3의 비율로 혼합하여 급여하였다. 본 시험에 사용된 Cr-Met chelate는 (주)이노바이오로부터 공급받아 사용하였으며 CrCl₃는 시약급을 이용하여 사용전에 미분쇄기를 이용하여 재분쇄후 사용하였다. 본 시험에서는 Cr을 첨가하지 않은 기초사료 급여구를 대조구로 하였으며, Cr-Met chelate 급여구는 기초사료의 건물량을 기준으로 각각 400과 200ppb가 되도록 첨가하였으며, CrCl₃급여구에는 CrCl₃를 400ppb 첨가하였다. Cr급원의 배합사료내 첨가는 먼저 실험에 영향을 주지 않는 부형제와 예비혼합한 다음, 실험농가에서 TMR배합시에 일일 급여수준에 맞추어 첨가 배합하였다.

2. 사양관리

착유우는 평균체중 650kg, 평균산차 2.8산, 그리고 분만후 일령은 165±23일 착유우 24두를 처리당 6두씩 공시하여 4개월간 실험에 이용하였다. 시험사료는 일일 2회 오전과 오후에 급여하였으며, 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였으며, 착유는 개체별로 아침과 저녁에 일일 2회 착유하였다. 기타 사양관리는 농장관행에 따라 실시하였다.

3. 조사항목

가. 유생산량과 유성분

착유량은 개체별로 아침과 저녁 착유시 파이프라인 착유기용 유량계를 사용하여 측정된 값을 합하여 기록하였다. 유성분 분석은 시험시작일부터 종료일까지 검정일에 채취한 시료를 유지방, 유당, 유단백질, SNF, 체세포수(somatic cell)을 측정하였고 유지율보정유(fat corrected milk; FCM)는 $(0.4 \times \text{유량}) + (15 \times \text{유지방량}) = \text{FCM}$ 의 공식을 이용하였다.

나. 혈청내 total IgG 와 콜레스테롤 분석

채혈은 실험 종료일에 저녁 착유시간에 꼬리정맥으로부터 8ml를 채혈하여 혈청을 분리하여 분석에 이용하였다. Anti-bovine IgG activity를 측정하기 위하여 microplate의 각각의 well에 $100\mu\text{l}$ 의 anti-bovine IgG($10\mu\text{g/ml}$)를 coating buffer(0.05M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)를 이용하여 37°C 에서 2시간 배양하였다. 배양 후 PBS-tween20(pH 7.4)를 이용하여 3회 각각의 plate를 세척한 다음, 미리 희석된 혈청을 $100\mu\text{l}$ 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 배양한 다음 다시 3회 세척한다. 희석배율은 1:500,000이었다. anti-bovine IgG conjugated with horseradish peroxidase(1:10,000)를 $100\mu\text{l}$ 씩 각각의 well에 첨가하여 다시 37°C 에서 1시간 동안 배양한 다음 PBS-tween20용액으로 3회 세척한다. 기질용액으로는 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)를 이용하였다. 0.05M phosphate citrate buffer(pH 5.0)에 TMB를 녹인 다음, $100\mu\text{l}$ 를 각각의 well에 첨가한 다음 5~10분간 실온에서 배양 후 2M H_2SO_4 를 $100\mu\text{l}$ 첨가하여 발색반응을 정지시켰다. activity의 측정 은 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 통계처리

모든 분석결과와 통계분석은 SAS program(1989)의 general linear model procedure를 이용하여 5%수준에서 유의성을 검정하였으며, 처리 평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법(Snedecor and Cochran, 1980)을 이용하였다.

Table 9-1. Chemical composition of experimental TMR and basal diet

	TMR	Basal diet
Moisture		12
CP		20.5
TDN		73
CFat		3.5
CFiber		9
Ca		1.15
P		0.58
ADF		12
NDF		18

3. 결과 및 고찰

Cr-Met chelate을 4개월간 급여한 후 착유우의 유생산및 유성분의 변화를 조사한 결과는 table 9-2에 나타내었다. 유생산은 Cr급여구가 대조구보다 유의적으로 증가하였으며 CrCl₃ 400ppb급여구에서 가장 높은 결과를 보여주었다. 하지만 유지방에서는 처리구간 아무런 차이가 없었다. 반면 유단백은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 낮았다. 무지고형분은 Cr-Met chelate 200ppb급여구에서 가장 낮았다. 지금까지 착유우에 있어 Cr의 첨가효과는 비유초기(Burton et al., 1993) 또는 환경적 또는 유전적 스트레스를 받고있는 착유우에 대한 연구결과가 주로 보고되어 왔다. 이러한 연구결과들은 주로 유생산량 또는 유성분의 변화 보고하였다. 이러한 연구결과도 실험조건(산차, 산유일령등)에 따라 큰 변이를 보여주고 있다. Yang et al.(1996)은 Cr을 초산 착유우에 급여하여 실험한 결과 두 번의 실험에서 각각 13.2%와 7%의 유생산 증가를 보고하였다. 하지만 다산의 착유우에서는 아무런 변화가 없었다고 보고하여 산차수에 따라 Cr의 효과가 다르게 나타날 수 있음을 알수있다. Subiyatno et al.(1996)도 건유기동안 10mg/day의 chelate형태의 Cr을 급여한 결과 초산 착유우의 비유 초기에 유생산이 증가하였으나 다산의 착유우에서는 아무런 영향이 없었다고 보고하므로 Yang et al.(1996)의 결과와 일치하였다. 하지만 본 연구결과에서는 다산의 착유우에 Cr의 급여가 대조구보다 유생산량에서 증가하는 경향을 보여주어 상반된 결과를 나타내었다.

평균 유지방함량은 처리구간 차이가 없었으나 일일 유지방 생산량은 CrCl₃ 400ppb 급여구에 가장 높은 결과를 나타내었다. 반면 유단백질은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 낮았으나 일일 유단백 생산량은 처리구간 차이가 없었다. 유지보정 유생산은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 높았다. 본 실험에서 사용된 Cr-Met chelate의 유성분에 대한 급여효과는 Cr을 첨가하지 않은 대조구보다 증가하는 경향을 보여주었으나 통계적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Hayirli et al.(2001)가 Cr-Met chelate를 수준별로 착유우에 급여한 결과 급여수준간 아무런 차이가 없었다는 결과와 일치하였다.

Table 9-3은 총 IgG의 함량을 나타낸 결과로 처리구간 아무런 차이를 보이지 않았다. 본 실험에서는 시험기간이 4개월로 비교적 길었었고 실험축들에서 특별한 질병징후를 확인하지 못하였기 때문에 총 면역단백질의 양도 차이를 보이지 않은 것으로 판단된다.

혈청내 지질함량은 table 9-4에 나타내었다. 총 콜레스테롤은 처리구간 아무런 차이를 보이지 않았으나, 중성지질은 CrCl₃ 400ppb급여구에 가장 낮았으며 HDL콜레스테롤은 Cr첨가구들이 대조구보다 감소한 것으로 나타났다. 혈청내 지질 대사의 경우 연구결과가 전무하여 직접 비교하기는 어려우나 일일 유지방 생산량의 변화로 미루어 체내 지방대사에 Cr이 영향하였을 것으로 판단된다.

Fig. 9-1~9-5는 유량, 유지방, 유단백, 무지고형분 그리고 FCM의 월간변화를 나타낸 그림이다. 유량은 Cr-Met chelate급여구의 경우 4개월간 차이가 없었으며 CrCl₃급여구는 다소 증가하였다. 유지방의 경우 Cr-Met 200ppb급여구를 제외한 나머지 처리구에서는 커다란 차이를 보이지 않았다.

유단백질과 무지고형분은 기간별로 처리구간 많은 차이를 보여주었는데 이것은 분만산차와 착유일령이 처리구내에서도 서로 달랐기 때문인 것으로 판단되며 Cr의 첨가에 의한 일관된 경향도 찾기 어려웠다. FCM의 경우 Cr을 첨가하지 않은 대조구에서는 시간이 지남에 따라 다소 감소하는 경향이었으나 Cr-Met chelate급여구의 경우 400ppb에서는 차이가 없었으며 200ppb에서는 다소 감소하였다. CrCl₃에서는 다소 증가하였으나 큰 차이를 보이진 않았다.

Table 9-2. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the milk yield and milk composition in lactating cows

Milk composition	Control	Treatments			SEM
		Cr-Met 400ppb	Cr-Met 200ppb	CrCl3 400ppb	
Milk yield (kg/d)	36.53 ^b	41.07 ^{ab}	39.71 ^{ab}	43.33 ^a	3.58
Milk fat(%)	3.59	3.24	3.45	3.66	0.30
Milk fat(kg/d)	1.30 ^b	1.33 ^b	1.36 ^b	1.57 ^a	0.06
Milk protein(%)	3.11 ^a	3.02 ^{ab}	2.96 ^{ab}	2.86 ^b	0.12
Milk protein(kg/d)	1.14	1.24	1.17	1.24	0.09
Solid not fat(%)	8.67 ^a	8.80 ^a	8.49 ^b	8.75 ^a	0.11
Solid not fat(kg/d)	3.16 ^b	3.62 ^{ab}	3.37 ^{ab}	3.78 ^a	0.29
FCM(kg/d)	34.25 ^b	35.76 ^b	36.41 ^b	40.11 ^a	1.77
MUN(%)	15.3 ^b	12.7 ^c	17.6 ^a	15.5 ^b	1.8
Somatic cell	63	48	50	52	18

a, b, c Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

Table 9-3. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the total IgG in lactating cows

Lipids	Control	Treatments			SEM
		Cr-Met400ppb	Cr-Met200ppb	CrCl3400ppb	
Total IgG (OD at 450nm)	1.177	1.155	1.156	1.154	0.015

Table 9-4. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the serum lipid contents in lactating cows

Lipids	Control	Treatments			SEM
		Cr-Met 400ppb	Cr-Met 200ppb	CrCl3 400ppb	
Total cholesterol (mg/dl)	222.39	208.65	234.33	217.31	36.67
Triglyceride (mg/dl)	60.07 ^a	60.68 ^a	60.93 ^a	56.17 ^b	2.77
HDL cholesterol (mg/dl)	214.13 ^a	185.26 ^b	193.58 ^b	182.25 ^b	14.60
HTR	0.96	0.92	0.84	0.89	0.16

*HTR : HDL cholesterol/total cholesterol

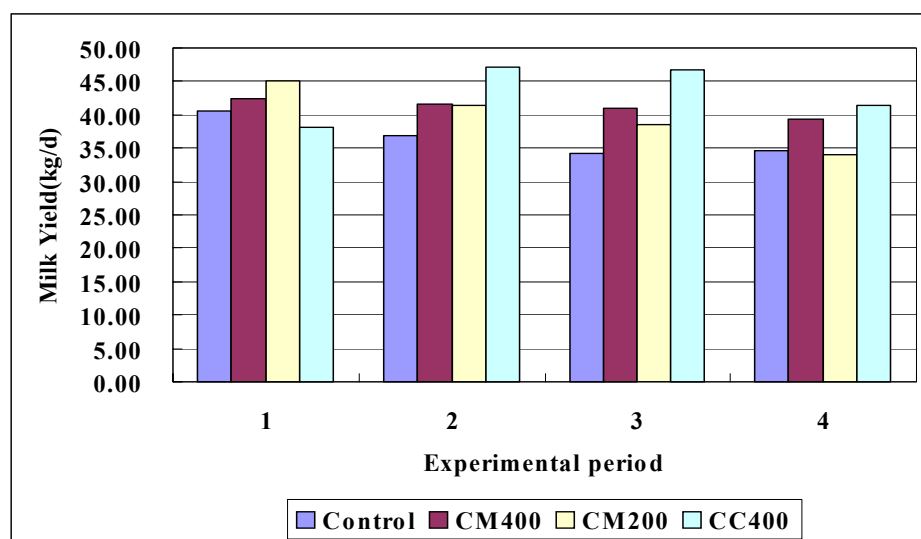


Fig. 9-1. Changes in the milk yield in lactating cows fed Cr-Met chelate supplemented diet during whole periods

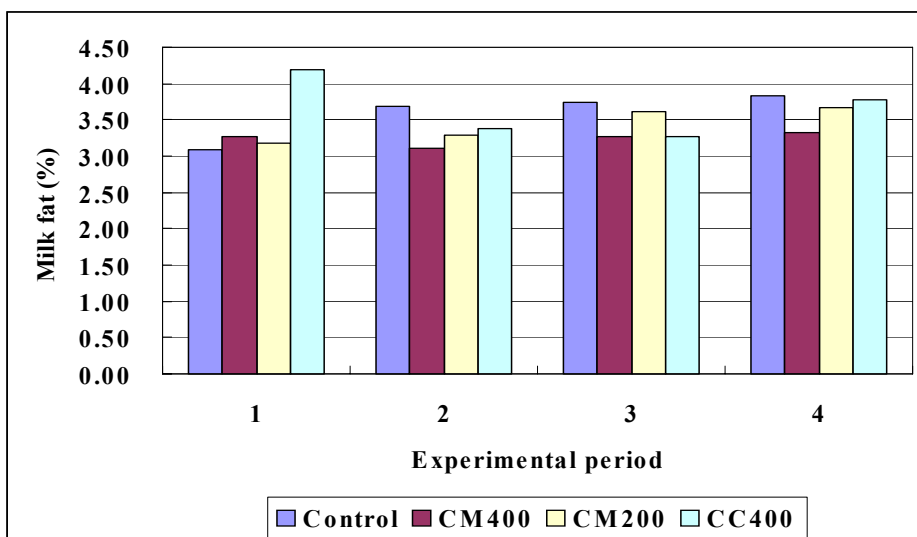


Fig. 9-2. Changes in the milk fat in lactating cows fed Cr-Met chelate supplemented diet during whole periods

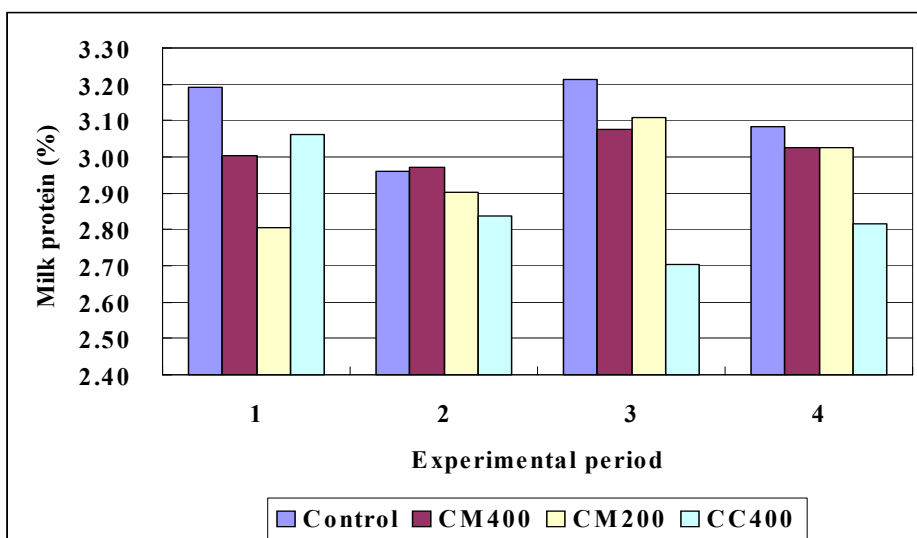


Fig. 9-3. Changes in the milk protein in lactating cows fed Cr-Met chelate supplemented diet during whole periods

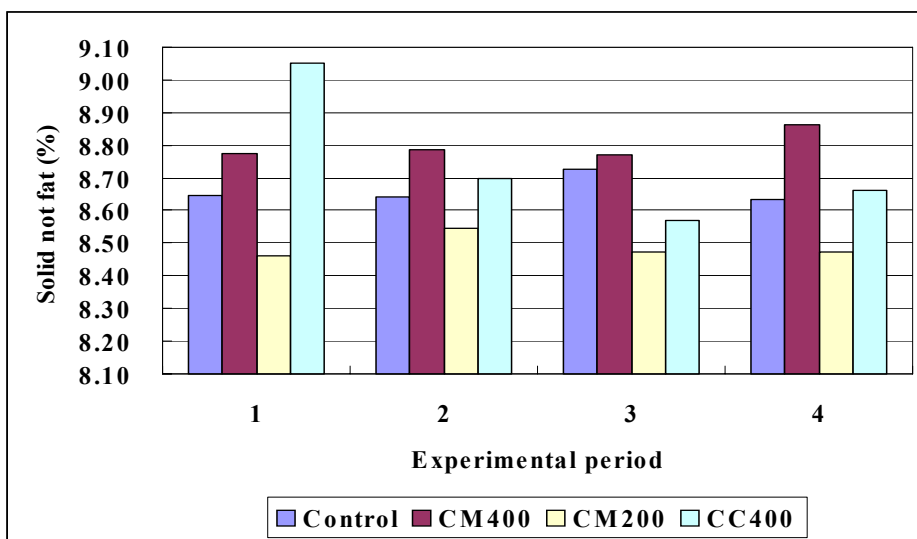


Fig. 9-4. Changes in the solid-not-fat in lactating cows fed Cr-Met chelate supplemented diet during whole periods

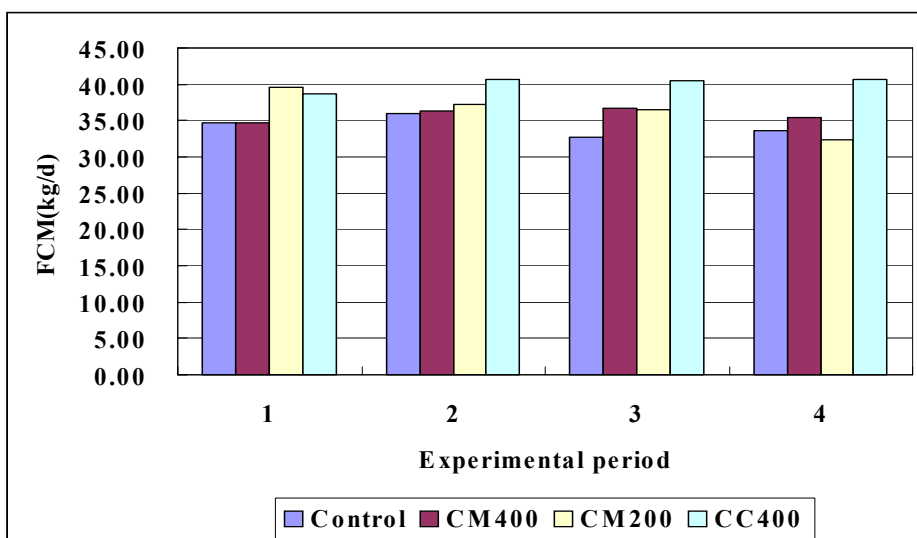


Fig. 9-5. Changes in the FCM in lactating cows fed Cr-Met chelate supplemented diet during whole periods

제10절 Cr-Met chelate의 급여가 trans지방 함유 식이 급여 흰쥐의 성장능력, 지방조직 무게 그리고 혈청 지질 함량에 미치는 영향

1. 서 론

최근 국외에서 건강 위해와 관련하여 trans지방산에 대한 관심이 대두되고 있다. Trans형의 지방산은 cis형의 불포화지방산에 비해 천연의 식물성 유지가 금속 촉매제의 존재 하에서 수소가스에 노출되어 마가린이나 쇼트닝과 같은 고체 또는 반고체 상태로 경화될 때 인공적으로 생성되거나 반추동물의 위 장관에서 생합성을 통해 천연적으로 합성되므로 우유 및 유제품과 육류 등의 가공식품에 함유되어 있다. 마가린과 쇼트닝같은 경화유는 식물성 유지로 만들어 졌기 때문에 동물성 지방인 포화지방산보다 인체에 유용하다고 생각되어 왔고 따라서 관상동맥 질환이나 동맥경화 등의 질환을 더욱 악화시키는 결과를 초래한다고 보고되고 있으며 역학조사 결과 또한 trans지방산이 관상동맥질환과 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다. 미국에서는 최근 trans지방산의 잠재적인 위해에 대한 논쟁이 있으며 식사로부터 trans지방산의 섭취를 감소시키기 위한 방법을 모색하고 있다. 특히 trans함량이 높은 식품의 섭취를 피하거나 가공식품 또는 식품속의 trans지방산 함량을 food labeling한다거나 식품의 가공과 생산 공정에서 trans지방산 함량을 감소시키는 방법등에 관하여 연구중에 있다. 특히, 미국 FDA는 식품의 영양표시에서 trans지방산의 표시를 의무화 하기 위한 입법을 추진하여 2002년 1월부터 시행한다고 발표하였다. 이에 우리나라에서도 2006년부터 가공식품의 영양표시에서 trans지방산의 표시를 의무화하기로 하였다. 하지만 아직까지 식품가공의 효율성이나 가공비용 측면에서 trans지방산을 대체할 수 있는 물질을 찾기 어려웠다. 따라서 최근에는 이러한 trans지방산을 섭취후 제어할 수 있는 물질의 탐색이 이루어지고 있다. 이에 본 연구에서는 Cr-Met을 급여후 trans지방산에 의한 체내 지질관련 대사작용에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

1. 공시동물, 실험기간 및 장소

3주령 Sprague Dawley(평균체중 87g)종 수컷 24마리를 공시하여 trans지방급여 시 Cr-Met chelate의 병용급여가 성장능력, 지방조직 무게, 그리고 혈청내 지질함량에 미치는 영향을 평가하고자 4처리 6반복, 반복당 1마리씩 케이지에서 시험에 이용하였다.

2. 시험사료 및 실험설계

시험사료는 흰쥐용 표준사료인 AIN-76A를 기초사료로 하였으며 광물질 보충사료는 Cr을 제외한 것을 사용하였다. 본 시험에 사용된 사료의 배합비는 table 10-1과 같다. Cr-Met chelate과 CrCl₃을 예비 배합 후 사료에 첨가하여 재배합하였다. 정상식이와 trans지방식의 배합비는 차이가 없다. 하지만 trans지방식이구에서는 trans지방 공급원으로 마가린을 5%첨가하였으며 열량을 동일하게 하기 위하여 정상식이구에 corn oil을 5%추가 배합하였다. 시험설계는 corn oil과 trans지방 처리구, 그리고 Cr을 Cr-Met chelate와 CrCl₃로 나누어 2×2 요인시험 배치하였다. 사료는 매일 오전에 급여하였으며, 체중, 사료섭취량 과 음수량은 매주 측정하여 기록하였다. 사료와 음수는 모두 자유로이 섭취하도록 하였다.

3. 조사항목

1) 육성성적 및 칼로리 섭취량

증체량(weight gain)은 평가 개시일의 무게와 체중 측정일의 무게 차이를 반복군 내 공시 수수로 나누어 계산하였고, 사료 섭취량(feed intake)은 사료 급여량에서 체중 측정일에 잔량을 공제 한 후 반복군 공시두수로 나누어 마리당 사료섭취량을 계산하였으며 체중과 사료 잔량 무게 측정은 매주 측정하여 기록하였다. 사료 요구율(F/G; feed/gain)은 사료 섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다.

2) 지방조직무게

실험 종료 후 24시간 동안 절식시키고 ether로 가볍게 마취시킨 후 지방조직 중 epididymal과 abdominal 지방조직을 적출하였다. 적출한 각각의 지방조직의 무게를

측정한 다음 체중대비 지방무게(%)로 계산하였다.

3) 혈청내 지질함량

혈청 total cholesterol, triglyceride 와 HDL cholesterol 농도는 영동제약사의 cholesterol kit로 측정하였다. Total cholesterol과 triglyceride는 혈청 10 μ l를 Trinder 발색제 1000 μ l와 혼합후 각각 5분간 37 $^{\circ}$ C 배양기에 넣은 후 흡광광도계를 이용하여 600nm에서 흡광도를 분석하였으며, HDL cholesterol은 면역법으로 혈청 10 μ l를 R1시약과 실온에서 5분간 방치후 R2 시약을 다시 혼합하여 5분간 37 $^{\circ}$ C 배양기에 넣은 후 흡광광도계를 이용하여 546nm에서 흡광도를 측정하였다. 심혈관계 질환의 위험도 판정에 사용되고 있는 HTR(HDL to total cholesterol ratio)지수는 HDL cholesterol/total cholesterol 방법에 의해 산출하였다.

4. 통계처리

모든 분석 결과의 통계 분석은 SAS program(1989)의 GLM procedure를 이용하여 5% 수준 에서 유의성을 검증하였으며, 처리 평균간 비교는 Duncan의 다중검정방법 (Snedecor and cochran,1980)을 이용하였다.

Table 10-1. Formula and chemical compositions of experimental diets.

Ingredients	Experimental diet	
	Nomal	Trans
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Cornstarch	30.0	30.0
Sucrose	30.0	30.0
Cellulose	5.0	5.0
Corn oil	10.0	5.0
Margarine	-	5.0
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
Vitamin mix ³⁾	1.0	1.0
Choline bitartate	0.2	0.2
Total	100.0	100.0
Kcal/kg	4,100	4,100
Kcal%		
Protein	20.8	20.8
Carbohydrate	68.2	68.2
Fat	11.0	11.0
Total	100.0	100.0

¹⁾AIN-76A diet

²⁾AIN-76A mineral mix. (chromium free)

³⁾AIN-76A vitamin mix

3. 결과 및 고찰

Cr-Met chelate의 급여가 trans지방을 급여한 흰쥐의 성장능력에 미치는 영향을 조사한 결과는 table 10-2와 같다. 처리구간 일당사료섭취량, 일당증체량 그리고 사료 요구율에서 아무런 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 본 실험의 기간이 비교적 짧았기 때문인 것으로 판단된다. 기존의 연구결과를 바탕으로 Cr의 대사적 작용시점은 단기간 급여시 보다 장기간 급여시 효과가 있는 것으로 나타났기 때문이다. 또한 Cr에 의한 성장능력의 변화는 지금까지의 연구결과들 사이에서도 뚜렷한 효과를 보이고 있지 않다. 더군다나 trans지방산 급여에 의한 성장능력의 변화도 차이가 없었는데 이것은 본 시험에서 사용한 trans지방산의 첨가수준이 비교적 낮았기 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 trans지방산에 의한 성장능력의 변화는 장기간의 섭취가 이루어질 때 나타나기 때문이다.

또한 Cr-Met chelate의 급여가 trans지방산 급여 흰쥐의 지방조직 무게에서도 아무런 영향이 없었다 (table 10-3). 하지만 trans지방산 급여구의 지방무게가 대조구보다 다소 높은 결과를 보여주었다. 따라서 본 실험을 장기간 실시하였다면 체지방 무게의 차이를 나타낼 것으로 판단되지만 Cr첨가에 의한 효과는 판단하기 어렵다. 또한 본 시험에서 이용한 흰쥐의 나이가 비교적 어렸음에도 불구하고 아무런 차이를 보이지 않은 것은 체내지방 축적이 활발히 일어나는 시기였기 때문이며, 특히 지방조직의 변화는 체중과도 밀접한 관계가 있기 때문에 체중 변화의 실험결과와 일치하였다.

Cr-Met chelate급여는 corn oil급여구에서 혈청내 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시켰으나 trans지방 급여구에서는 아무런 영향이 없었다(table 10-4). 하지만 trans지방과 Cr-Met chelate첨가구에서 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 함량이 가장 높았다($p < 0.05$). Ohh et al.(2004)은 Cr-Met chelate를 흰쥐에 급여시 혈중 콜레스테롤은 감소하였으나 HDL 콜레스테롤의 함량은 증가하였다고 보고하였으며, 육성비육돈과 broiler에서는 Cr-Met chelate의 급여가 콜레스테롤 함량에 아무런 영향이 없었다는 보고(Ohh et al., 2004)로 미루어 본 시험에서의 총 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤 함량의 유의적인 증가는 지방의 급원이 달랐기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 trans지방과 Cr-Met chelate의 상관관계에 대한 보다 면밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 10-2. Effect of Cr-Met chelate supplementation on the growth performances in trans fat diet fed rat

ITEM	Treatment				SEM ¹⁾
	Corn oil		Trans fat		
	CrCl3	Cr-Met	CrCl3	Cr-Met	
ADFI (g/d/rat)	25.92	26.12	26.03	26.70	1.67
ADG (g/d/rat)	8.6	8.5	8.8	9.0	0.69
Feed/Gain	3.01	3.10	2.99	2.98	0.17

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

Table 10-3. Effect of Cr-Met chelate supplementation on adipose tissue weight in trans fat diet fed rat

Adipose tissue	Treatment				SEM ¹⁾
	Corn oil		Trans fat		
	CrCl3	Cr-Met	CrCl3	Cr-Met	
(% of body weight)					
Abdominal Fat	1.21	1.25	1.25	1.35	0.26
Epididymal Fat	1.55	1.51	1.76	1.75	0.55
Total Fat	2.76	2.76	3.01	3.10	0.75

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

Table 10-4. Effect of Cr-Met chelate supplementation on serum lipid contents in trans fat diet fed rat

ITEM	Treatment				SEM ¹⁾
	Corn oil		Trans fat		
	CrCl3	Cr-Met	CrCl3	Cr-Met	
Total Cholesterol (mg/dL)	105.7 ^a	86.2 ^b	93.7 ^{ab}	105.5 ^a	11.2
Triglyceride (mg/dL)	115.0	121.2	138.5	137.5	30.1
HDL Cholesterol (mg/dL)	66.0 ^{ab}	58.0 ^b	64.8 ^{ab}	73.6 ^a	7.7
HDL-Cho/Total Cho	0.62	0.68	0.70	0.69	0.09
Contrast	Total	TG	HDL-Cho	HTR	
Oil source	0.56	0.41	0.53	0.55	
Cr type	0.64	0.06	0.006	0.31	
Oil × Cr	0.02	0.68	0.08	0.44	

^{a, b, c} Values with different superscripts within the same row differ (p<0.05)

¹⁾ Standard error of mean (p<0.05)

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ 연구개발 목표 및 내용

◆ 제1차년도 (2004)

1. Cr-methionine의 제조

- Cr-methionine chelate의 제조
- Cr-methionine의 산업적 제조기술 개발
- 산업용 Cr-methionine제제의 제품화 기술

2. Cr-methionine제품의 돼지에서의 활용성 평가

- 돼지의 성장단계별 Cr-methionine의 첨가제로서의 기능평가
- 자돈의 항병력 증진효과 평가
- 돈육의 육질 평가

◆ 제2차년도 (2005)

1. 돼지에 있어서 Cr-methionine의 급여와 생리적 기능변화

- 급여시험후 체내지방 대사조절 기능 평가

2. 양돈사료 첨가 타 metal-chelate 와의 교호, 길항성 평가

- Cr-methionine와 다른 광물질 착염화물과의 길항 또는 교호작용 평가

3. 육계에 있어서 Cr-methionine제품의 기능성 평가

- Cr-methionine의 급여가 육계의 생산성에 미치는 영향평가
- 육계의 항병력 증진효과 평가
- 계육의 육질 평가

4. 산란계에 있어서 Cr-methionine제품의 기능성 평가
 - Cr-methionine의 산란계 사료 첨가효과와 계란의 품질평가

◆ 제3차년도 (2006)

1. 젖소에 있어서 Cr-methionine제품의 기능성 평가
 - 젖소 사료에 Cr-methionine의 투여효과
 - Cr-methionine급여에 의한 우유성분 및 품질평가
2. Cr-methionine의 체중 및 식이조절 능력 평가
 - Cr-methionine의 일반적 체중조절 능력평가
 - Cr-methionine의 식이조절 능력평가

○ 연구결과

◆ 제1차년도

1. Cr-methionine chelate의 순도확인
2. Cr-methionine chelate의 최적 반응조건 설정
3. Cr-methionine chelate의 생산수율 개선조건 확립
4. Cr-methionine chelate의 첨가로 자돈의 면역력 개선 확인
5. 개발된 Cr-methionine chelate을 이용하여 돼지의 성장단계별 육성성적과 소화율을 조사하여 Cr-methionine chelate의 효과 확인

◆ 제2차년도

1. 개발된 Cr-methionine chelate을 이용하여 육계의 생산성 효과 확인
2. Cr-methionine chelate을 이용하여 육계의 항병력 증진 효과 확인
3. Cr-methionine chelate을 이용하여 육계의 육질 평가를 조사하여 지방산화의 효과 확인
4. 산란계에 Cr-methionine chelate을 이용하여 소화율, 생산성 향상 효과 확인

◆ 제3차년도

1. 개발된 Cr-methionine chelate의 첨가가 착유우의 유생산량, 유성분 특히 유지방 생산성과 유단백질 함량 변화 확인.
2. 착유우에서 Cr-methionine chelate에 의한 면역력은 변화가 없음을 확인
3. 고탄수화물 섭취시 Cr-methionine chelate의 급여로 탄수화물에 의한 열량섭취 제어가능성 확인
4. 비만개체에서 고지방 식이급여와 동시에 Cr-methionine chelate를 급여시 증체량과 사료섭취량에 감소함을 확인
5. Cr-methionine chelate급여에 의한 Leptin단백질 함량은 고탄수화물 식이에서 증가하였으나 고지방식이에서는 변화가 없었다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

1. 산업체 기술이전 및 상품화 기술내용

가. Cr-methionine chelate의 제품화 기술

나. Cr-methionine chelate제품의 축종별 활용기술

2. 특허출원 계획

가. Cr-methionine포함 복합 chelate제 생산기술

나. 저지방 고단백질 우유생산 기술

다. 저지방, 저cholesterol, 고단백질 계란 생산 기술

3. 추가기술 개발방안

가. Cr-methionine chelate를 체중제어 제품으로 개발

4. 기술이전 방안

가. 협력업체와 이미 기술이전에 관한 협약을 체결하였음

나. Cr-methionine chelate의 원천제조 기술을 협력업체와 공동으로 특허출원 하였음

제6장 참고 문헌

- AAFCO. 1998. Official publication of the association of American feed control officials incorporated (Paul. M. Bachman, Ed). pp. 237-238
- Anderson, R. A. 1987. Chromium in trace elements in human and animal nutrition, Vol. 1, 5th ed., W. Mertz, ed. Academic Press Inc. New York. pp. 225-244
- Anderson, R. A., Bryden, N. A., Polansky, M. M. and Deuster, P. A. 1988. Exercise effects on chromium excretion of trained and untrained men consuming a constant diet. *J. Appl. Physiol.* 64:249
- Anderson, R. A. 1994. Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals. In : *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 10th Annu. Symp.* Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 267-274.
- Anderson, R. A. 1995. Chromium, glucose tolerance, and lipid metabolism. *J. Adv. Med.* 8: 37
- Anderson R. A., Polansky M. M., Bryden N. A. and Canary J. J. 1991. Supplemental-chromium effects on glucose, insulin, glucagon, and urinary chromium losses in subjects consuming controlled low-chromium diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 54 : 909-16.
- Anderson, R., N. Cheng, N. Bryden, M. Polansky, N. Cheng, J. Chi and J. Feng. 1996. Beneficial effects of chromium for people with type 2 diabetes. *Diabetes* 45: 124A
- A.O.A.C. 1990. Official of Analysis 15th ed. Association of official Analytical chemists. Washington. D.C.
- Apgar G. A. and Kornegay E. T. 1996. Mineral balance of finishing pigs fed copper sulfate or a copper-lysine complex at growth-simulating levels. *J. Anim. Feed. Sci.* 74:1594-1600.

- Armstrong T. A., Cook D. R., Ward M. M., Williams C. M, and Spears J. W. 2004. Effect of dietary copper source (cupric citrate and cupric sulfate) and concentration on growth performance and fecal copper excretion in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82:1234-1240.
- Borel, J. S., Majerus, T. C., Polansky, M. M., Moser, P .B. and Anderson, R. A. 1984. Chromium intake and urinary chromium excretion trauma patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 6:317.
- Brown, L. 1994. Laboratory evaluation of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. *J. Dairy Sci.* 77:181.
- Bunch R. J., Speer V. C., Hays V. W., Hawbaker J. H. and Cantron D. V. 1961. Effects of copper sulfate, copper oxide and chlortetracycline on baby pig performance. *J. Anim. Sci.* 20:723.
- Bunting, L. D., J. M. Fernandez, D. L. Thompson, Jr. and L. L. Southern. 1994. Influence of chromium picolinate on glucose usage and metabolic criteria in growing Holstein calves. *J. Anim. Sci.* 72: 1591-1599.
- Burton, J. L., B. J. Nonnecke, P. L. Dubeski, T. H. Elsasser and B. A. Mallard. 1996. Effect of supplemental chromium on production of cytokines by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J. Dairy, Sci.* 79 : 2237-2246.
- Burton, J. L., B. A. Mallard and D. N. Mowat. 1993. Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. *J. Anim. Sci.* 71: 1532-1539.
- Burton, J. L. 1995. Supplemental chromium : its benefits to the bovine immune system. *Anim. Feed Sci. Tech.* 53: 117-133.
- Cha KW, Kim SI, Kang DK. 2003. Synthesis and structural analysis of chromium(III) picolinate complexes. *Analytical Sci. Tech.* 16(1):25-31.
- Chang G, Mallard BA and Mowat DN, and Gallo GF. 1996. Effect of supplemental chromium on antibody responses of newly arrived feeder calves to vaccines and ovalbumin. *Can. J. Vet. Res.* 60:140-144.
- Chang, X. and D. N. Mowat. 1992. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. *J. Anim. Sci.* 70: 559-565.

- Chang, X., B. A. Mallard and D. N. Mowat. 1994. Proliferation of peripjeral blood lymphocytes of feeder calves in response to chromium. *Nutr. Res.* 14: 851-864.
- Chang, X., B. A. Mallard and D. N. Mowat. 1996. Effects of chromium on health status, blood neutrophil phagocytosis and in vitro lymphocyte blastogenesis of dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52: 37-52.
- Crow, S. D. 1997. Effect of chromium addition along with varying protein levels on growth performances and carcass characteristics of growing and finishing pigs. Research investment report. National Pork Producers Council. USA.
- Chung IB, Shin IS, Han IK, Min JK, Kim WY, Chae BJ and Choi YJ. 1997. Effects of chromium picolinate(CrP) on growth performance, carcass characteristics and serum traits in growing-finishing pigs. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 10(1):8-14.
- Evans, G. W. 1989. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int. J. Biosocial Med. Res.* 11:163.
- Gipp W. F., Pond W. G., Tasker J., Campen D. V., Krook L. and Visek W. J. 1973. Influence of level of dietary copper on weight gain, hematology and liver copper and iron storage of young pigs. *J. Nutr.* 103:713.
- Hahn C. J. and Evans G. W. 1975. Absorption of trace metals in the zinc-deficient rat. *Am. J. Physiol.* 228:1020-1023.
- Hambidge K. M. 1974. Chromium nutrition in man. *Am. J. Nur.* 27 : 505-514.
- Hasten D. L., Hegsted M., Keenan M. J. and Morris G. S. 1997. Dosage effects of Chromium Picolinate on growth and body composition in the rat. *Nutrition Research.* 17 : 283-294.
- Hasten D. L., Hegsted M., Keenan M. J. and Morris G. S. 1997. Effects o various forms of dietary chromium on growth and body composition in the rat. *Nutrition Research.* 17 : 283-294.
- Hayirli, A., D. R. Bremmer, S. J. bertics, M. T. Socha and R. R. Grummer. 2001. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 84: 1218-1230.

- Hawbaker J. A., Speer V. C., Hays V. W., Hawbaker J. H. and Catron D. V. 1961. Effects of copper sulfate and other chemotherapeutics in growing swine rations. *J. Anim. Sci.* 20:163.
- Heugten E van and Spears JW. 1997. Immune response and growth of stressed weanling pigs fed diets supplemented with organic or inorganic forms of chromium. *J. Anim Sci.* 75:409-416.
- Hoefer H. A., Miller E. R., Ullrey E. D., Ritchie H. D. and Luecke R. W. 1960. Interrelationships between calcium, zinc, iron and copper in swine feeding. *J. Anim. Sci.* 19:249-259.
- Hong, S. M., K. I. Sung, S. J. Ohh, J. S. Shin, C. H. Kim and H. S. Kim. 2002. Effect of chromium methionine supplementation to castrated fattening steers on carcass quality and blood metabolites. *Proc. Annu. Congress of Kor. Soc. Anim. Sci. Tech.* p. 196.
- Hossain, S. M. 1998. Organic chromium in poultry : metabolic responses, effects on broiler carcass composition, nutrient composition of eggs. In : *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 14th Annu. Symp.* Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 203-216.
- Hynes, M. J. and M. P. Kelly. 1995. Metal ions, chelates and proteinates. In : *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 11th Annu. Symp.* Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 233-248.
- Jeebhoy, K. N., R. C. Chu, E. B. Marliss, G. R. Greenberg and A. Bruce-Robertson. 1977. Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parental nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 531-538.
- Kaats, G. R., J. A. Fisher and K. Blum. 1991. The effects of chromium picolinate supplementation on body composition in different age groups. *J. Aging* 34:25.
- Kanarek R. B. and Robin Marks-Kaufman. 1979. Developmental aspects of sucrose-induced obesity in rats. *Physiology & Behavior.* 23 : 881-885.

- Kanarek R. B., Aprille J. R., Hirsch E. and Brown C. A. 1987. Sucrose-induced obesity : effect of diet on obesity and brown adipose tissue. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 253 : R158-R166.
- Kline R. D., Hays V. W. and Cromwell G. L. 1971. Effects of copper, molybdenum and sulfate on performance, hematology and copper stores of pigs and lambs. *J. Anim. Sci.* 33:771.
- Konegay E. T. and Harper A. F. 1997. Environmental nutrition : nutrient management strategies to reduce nutrient excretion of swine. *Prof. Anim. Sci.* 13:99-111.
- Kornegay, E. T., Wang, Z., Wood, C. M. and Lindemann, M. D. 1997. Supplemental chromium picolinate influences nitrogen balance, dry matter digestibility, and carcass traits in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 75: 1319.
- Kegley, E. B., D. L. Galloway and T. M. Fakler. 2000. Effects of dietary chromium-L-methionine on glucose metabolism of beef steers. *J. Anim. Sci.* 78: 3177-3183.
- Kim, C. H., M. J. Lee, B. K. Park, H. S. Kim, J. S. Shin, K. I. Sung and S. J. Ohh. 2003a. Determination of in vitro rumen by-pass of chromium methionine chelate through rumen microbial assay. *Proc. Annu. Congress of Kor. Soc. Anim. Sci. Tech.* p. 208.
- Kim C. S. and Kim I. H., 1997. The biological roles of chromium in animal nutrition. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 21 : 77-82.
- Kim, H. S., S. Y. Lee, C. H. Kim, S. J. Ohh, J. S. Shin and K. I. Sung. 2003b. Effect of chromium methionine supplementation on obesity index and serum lipids in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 706-709.
- Kim HS, OHH SJ, Kim CH, Shin JS, Sung KI 2003. Chromium methionine supplementation decreases obesity indices in rats. *J. Food Sci. Nut.* 8(3):249-252.
- Kim IH, Kim CS. 1997. The biological roles of chromium in animal nutrition. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 21(1):77-82.

- Kim, J. D., In K. Han, B. J. Chae, J. H. Lee, J. H. Park and C. J. Yang. 1997. Effects of chromium picolinate on performance, egg quality, serum traits and mortality rate of brown layers. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 10: 1-7.
- Kim YH, Han IK, Choi YJ, Shin IS, Chae BJ and Kang TH. 1996. Effect of dietary excessive chromium picolinate on growth performance, nutrient utilizability and serum traits in broiler chicks. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 9:341-354.
- Lawrie, R. Development in meat science : Packaging fresh meat(A. A. Taylor(Eds). Elsevier applied science publishers. pp89.
- Lee, D, N., F. Y. Wu, Y. H. Cheng, R. S. Lin and P. C. Wu. 2003. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on growth performance and immune responses of broilers. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 16 : 227-233.
- Lein T. F., Chen S. Y., Chen C. L. and Wu C. P. 1993. The effects of various levels of chromium picolinate on growth performance and serum traits of pigs. *J. Chinese Soc. Anim. Sci.* 22:349.
- Lien, T. F., C. P. Wu and J. J. Lu. 2003. Effects of cod liver oil and chromium picolinate supplements on the serum traits, egg yolk fatty acids and cholesterol content in laying hen. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 16 : 1177-1181
- Lindemann M. D., Harper A. F. and Kornegay E. T. 1995a. Further assessment of the effects of supplementation of chromium from chromium picolinate on fecundity in swine. *J. Anim. Sci.* 73:184(Abstr.).
- Lindemann, M. D., C. M. Wood, A. F. Harper, E. T. Kornegay and R. A. Anderson. 1995. Dietary chromium picolinate additions improve gain:feed and carcass characteristics in growing-finishing pigs and increase litter size in reproducing sows. *J. Anim. Sci.* 73: 457-465.
- Lin X., Chavex M. R., Bruch R. C., Kilroy G. E., Simmons L. A., Lin L. Braymer H. D., Bray G. A. and York D. A. 1998. The Effect of a High Fat Diet on Leptin mRNA, Serum Leptin and the Response to Leptin Are Not Altered in a Rat Strain Susceptible to High Fat Diet-Induced Obesity. *J. Nutr.* 128 : 1606-1613.

- Mallard, B. A. and P. Borgs. 1997. Effect of supplemental trivalent chromium on hormone and immune responses in cattle. In : *Biotechnology in the Feed Industry*. Proc. Alltech's 13th Annu. Symp. Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 241-250.
- Mathison, G. W. and D. F. Engstrom. 1995. Chromium and protein supplements for growing-finishing beef steers fed barley-based diets. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 549-558.
- McCarthy J. F., Aherne F. X. and Okai D. B. 1974. Use of HCl insoluble ash as an index material for determining apparent digestibility with pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 54:107-109.
- Mertz W, and Roginski E. E. 1969. Effects of chromium(III) supplementation on growth and survival under stress in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* 97:531-536.
- Mertz, W. 1993. Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.* 123 : 626-633.
- Mooney, K. W. and G. L. Cromwell. 1995. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on growth, carcass characteristics, and accretion rates of carcass tissues in growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 73: 3351-3357
- Mooney K. W. and Cromwell G. L. 1997. Effects of Cr picolinate or Cr chloride as potential carcass modifiers in swine. *J. Anim. Sci.* 75(in press).
- Moris B. K., Blumsohn A., Neil S. M. and Gray T. A. 1992. The trace element chromium—a role in glucose homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 55 : 989-91
- Mowat, D. N., X. Chang and W. Z. Yang. 1993. Chelated chromium for stressed calves. *Can. J. Anim. Sci.* 73: 49-55
- Nutritional Research Council.1997. The role of chromium in animal nutrition. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, and National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C.
- Ohh S. J. and Lee J. Y.. 2005. Dietary Chromium-Methionine Chelate Supplementation on Animal Performance. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18 : 898-907.

- Ohh, S. J., C. H. Kim, J. S. Shin, K. I. Sung and H. S. Kim. 2003. Chromium methionine supplementaion decreases obesity indices in rats. *J. Food. Sci. Nutr.* 8: 249-252.
- Ohh, S. J., J. W. Kim, J. K. Park and J. Y. Lee. 2004. Effect of chromium methionine chelate supplementation on carcass characteristics and meat quality in finishing pigs. Unpublished data.
- Page, T. G., L. L. Southern, T. L. Ward and D. L. Thompson Jr. 1993. Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 71: 656-662.
- Palanska, O. and Nosal, V. 1991. Meat quality of bulls and heifers of commercial cross breeds of the improved slovak spotted cattle with the limousine breed. *Vedecke Prace Vyskumneho Ustaru Zivocisnej Vyroby Nitre (CSFR)* 24, 59.
- Park E. J., Park K. J., and Kim Y. H. 1995. Quality changes of chicken meat during chilled and freeze storage. *Korean J. Ani. Sci.* 37(3):249.
- Park HS, Kang YH. 2004. The role of trivalent chromium as a supplement. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 33(4):762-768.
- Pearson, M. D., Collins-Thompson, D. L., and Ordal, Z. L. 1970. Microbiological sensory and pigment changes of aerobically and an aerobically packaged beef. *J. Food Technol.* 24, 1171-1180
- Pekarek, R. S., Hauser, E. C., Rayfield, E. J. Wannemacher, R. W. and Beisei, W. R. 1975. Relationship between serum chromium concentrations and glucose utilization in normal and in-fected subjects. *Diabets* 24: 350.
- Piva, A., E. Meola, P. P. Gatta, G. Biagi, G. Castellani, A. L. Mordenti, J. B. Luchansky, S. Silva and A. Mordenti. 2003. The effect of dietary supplementation with trivalent chromium on production performance of laying hens and the chromium content in the yolk. *Anim. Feed Sci. Tech.* 106: 149-163.

- Pollard, G. V. and C. R. Richardson. 1999. Effects of organic chromium(Bio-Chrome) on growth, efficiency and carcass characteristics of feedlot steers. In : Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 15th Annu. Symp. Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 103-109.
- Power, R. and K. Horgan. 2000. Biological chemistry and absorption of inorganic and organic trace metals. In : Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 16th Annu. Symp. Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 277-291.
- Ramana, W. and K. S. Sastry. 1994. Chromium toxicity in *Neurospora crassa*. J. Inorg. Biochem. 56: 87-95.
- Roginski, E. E. and W. Mertz. 1969. Effect of chromium (III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet. J. Nutr. 97: 525-530.
- Roura E, Homedes J and Klasing KC. 1992. Prevention of immunologic stress contributes to the growth-permitting ability of dietary antibiotics in chick. J. Nutr. 122:2383-2390.
- SAS. 1989. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Inc., Cary, NC.
- Schroeder H. A. 1968. The Role of Chromium in Mammalian Nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 21 : 230-244
- Schwarz, K. and W. Mertz. 1959. Chromium(III) and the glucose tolerance factor. Arch. Biochem. Biophys, 85: 292.
- Shrivastava, R., P. K. Upreti, P. K. Seth and U. C. Chaturvedi. 2002. Effects of chromium on the immune system. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 34: 1-7.
- Smith J. W., Tokach M. D., Goodband R. D., Nelssen J. L. and Richert B. T. 1997. Effect of the interrelationship between zinc oxide and copper sulfate on growth performance of early-weaned pigs. J. Anim. Sci. 75:1861-1866.
- Stansbury W. F., Tribble L. F. and Orr D. E. Jr. 1990. Effect of chelated copper sources on performance of nursery and growing pigs. J. Anim. Sci. 68:1318-1322.

- Steele, N. C., Althen, T. G. and Frobish, L. T. 1977. Biological activity of glucose tolerance factor in swine. *J. Anim. Sci.* 45: 1341.
- Subiyatno, A., D. N. Mowat and W. Z. Yang. 1996. Metabolite and hormonal responses to glucose or propionate infusions in periparturient dairy cows supplemented with chromium. *J. Dairy. Sci.* 79: 1436-144
- van Heugten, E. and Spears, J. W. 1997. Immune response and growth of stressed weaning pigs fed diets supplemented with organic or inorganic forms of chromium. *J. Animal Sci.* 75:409.
- Vinson J. A. and Hsiao K-H. 1985. Comparative effect of various forms of chromium on serum glucose : an assay for biologically active chromium. *Nutritional Reports International.* 32(1):5
- Vincent J. B. 2000. The Biochemistry of Chromium. *J. Nutr.* 130 : 715-718
- Ward T. L., Watkins K. L., Southern L. L., Hoyt P. G. and French D. D. 1991. Interactive effects of sodium zeolite-A and copper in growing swine: growth, and bone and tissue mineral concentration. *J. Anim. Sci.* 69:726.
- Ward TL, Southern LL and Boleman SL. 1993. Effect of dietary chromium picolinate on growth, nitrogen balance and body composition of growing broiler chickens. *Poult. Sci.* 73(Suppl. 1):37(Abstr.).
- Ward TL, Berrio LF, Southern LL, Fernandez JM and Thompson Jr DL. 1994. In vivo and in vitro evaluation of chromium tripicolinate on insulin binding in pig liver cell plasma membranes. *FASEB J.* 8:1124(Abstr.).
- Ward, T. L., L. L. Southern and R. A. Anderson. 1995. Effect of dietary chromium source on growth, carcass characteristics, and plasma metabolite and hormone concentrations in growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 1): 189(Abstr.)
- Winger, R. T. and Fennema, O. 1976. Tenderness and water holding properties of beef muscle as influenced by freezing and subsequent storage at -3°C or 15°C. *J. Food Sci.* 41, 1433-1442.
- World Health Organization. 1973. W H. O. Tech. Rep. Ser. p. 532.

- Yang, W. Z., D. N. Mowat, A. Subiyatno and R. M. Liptrap. 1996. Effect of chromium supplementation on early lactation performance of Holstein cows. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 221-230.
- Xie H, Rath NC, Huff GR, Huff WE and Balog JM. 2000, Effect of Salmonella typhymurim lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poultry Sci.*, 79:33-40.
- 권 관, 유문일, 연정웅, 권찬호, 손광수, 한면수, 이상훈. 1999. Chromium niconinate(Yeast Brewers Dehydrated, Cr 1,000ppm)의 첨가가 비육돈의 성장과 육질 개선에 미치는 효과. *한국축산학회지*. 41(6) 637~644.
- 김현숙, 이선연, 김창혁, 오상집, 신종서, 성경일. 2003. Chromium Methionine첨가가 비만지수 및 지질 대사에 미치는 영향. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32 : 706-709
- 정일병, 한인규, 채병조, 신인수, 김영화, 박형룡. 1995. Chromium picolinate 첨가가 육성비육돈의 성장, 도체성적 및 혈액성상에 미치는 효과. *크로맥스 기술자료*. p. 193.

주 의

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