

최 종
연구보고서

한우 체내지방 생합성 조절기술개발에 관한 연구
Control of Body Fat Biosynthesis in Hanwoo

영양학적 조절방법에 의한 한우 체지방 생합성 조절 기술 개발
Control of Body Fat Biosynthesis in Hanwoo by Nutritional Manipulation

면역학적 기법을 이용한 한우 불가식 체지방 억제 기술 개발
**Development of an immunological technique to reduce inedible body fat
in Hanwoo**

연구기관

축산기술연구소 · 영남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우 체내 지방 생합성 조절 기술개발에 관한 연구”(세부과제명 : 영양학적 조절방법에 의한 한우 체지방 생합성 조절 기술 개발; 면역학적 기법을 이용한 한우 불가식 체지방 억제 기술 개발) 과제 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 12 .

주관연구기관명 : 축산기술연구소
총괄연구책임자 : 이 상 철
연 구 원 : 이 현 정
연 구 원 : 오 영 균
연 구 원 : 김 동 운
연 구 원 : 은 정 식
협동연구기관명 : 영 남 대 학 교
협동연구책임자 : 최 창 본

요 약 문

I. 제 목

한우체내지방 생합성 조절기술개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 외국 수입최고기와의 품질차별화를 통해 국내한우 사육기반과 수요기반을 안정화하고 한우 산육능력의 유전적 열세를 육질개선을 통해 한우 고급육으로 생산되어 국가경쟁력 우위를 견지할 필요가 있음
- 근내지방 축적은 체지방 축적의 마지막 단계로서 현재까지 근내지방도를 높이기 위하여 시도되고 있는 사양방법은 불가피하게 불가식체지방의 증가를 동반하고 있어 육량등급 저하와 생산비 증가를 가져오고 있음
- 근내지방도를 극대화하기 위해서는 근내지방 조직세포를 성장시키고 발달된 세포내에 지방구가 침착되는 특성을 응용하여 지방대사를 영양학, 생화학 및 내분비학적으로 조절하는 기술이 요구됨
- 불가식 체지방의 함량이 매우 높은 기존의 고급육 생산체계방법의 기술적 한계성을 극복하기 위해서는 면역학적 기법을 이용한 첨단기술 개발이 요청됨

III. 연구개발 내용 및 범위

<영양학적 조절방법에 의한 한우 체지방 생합성 조절 기술 개발>

한우의 근내지방도를 극대화하기 위한 기술을 개발하기 위해 1차적으로 지방조직별 지방 생합성 및 분해기전 구명하기 위한 지방세포 및 조직배양기술을 확립한 다음 지방세포의 지방생합성 조절물질 및 분해에 영향하는 물질을 탐색하였다. 지방합성 촉진 물질의 생체 작용 가능성을 구명하기 위해 반추위, 경정맥, 제4위를 통해 각종 VFA, 탄수화물 주입 효과를 봄과 동시에 VFA 급여 시험을 실시하였다. 또한 한우의 성장단계별 혈중 지방대사 관련 물질의 농도를 측정함으로써 외부로 부터의 지방합성 유도를 위한 기초자료를 구하였다. 최종적으로

각종 원료사료의 VFA 생성패턴과 그동안 얻어진 각종 연구결과를 바탕으로 비육후기 한우에 대한 사료 및 사료 첨가제 급여 효과 시험을 실시하였다. 한우 지방 전구세포의 GPDH 활성화에 호르몬으로는 insulin+triiodothyronine(T₃), 비타민 으로서는 비타민 C가 효과적이었으며 비타민 A는 부의 효과를 나타내었다. 지방 전구세포의 증식에는 IGF-1과 estradiol 17-β 보다 우수하였고 지방조직 부위간에는 근내지방세포의 증식속도가 가장 빨랐다. 지방 조직의 지방 합성율은 지방 조직 부위에 관계없이 초산이 glucose 보다 fatty acid-glyceride 합성 능력이 우수하였다. 아미노산의 경우 leucine의 지방합성 능력 효과가 인정되었다. 전반적으로 insulin은 지방조직의 지방 합성을 촉진한 반면 Norepinephrine은 지방 분해율을 촉진하였다. 반추위내 propionate 주입 및 경정맥 glucose 주입시 insulin의 농도가 증가하는 결과를 얻었고 탄수화물 공급원을 제4위로 주입하였을 때 glucose는 insulin이 증가하고 NEFA가 감소되는 경향이 있었으나 당밀과 전분 주입시에는 효과를 볼 수 없었다. 최종적으로 3년간의 기초 연구결과를 바탕으로 사료 및 사료첨가제를 조제하여 비육후기 한우에 급여한 결과 사료 첨가제의 경우 비록 유의성은 없었으나 근내지방도가 개선되고 육질 등급이 향상됨과 동시에 올레인산 함량이 증가하는 효과를 보여 육질개선용 사료첨가제로서의 가치가 인정되었다.

<면역학적 기법을 이용한 한우 불가식 체지방 억제 기술 개발>

한우 지방세포로부터 원형질막 단백질을 분리, 그 특성을 파악하고, 분리한 단백질을 면양에 면역주사 함으로서, 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체를 개발하였다. 한우 지방세포 원형질막에 특이적으로 존재하는 55kD 단백질은 기존에 알려진 단백질(특히 포유동물의 serum albumin)과 N-terminal 서열이 유사한 것으로 밝혀졌으나, bovine serum albumin에 대한 다클론 항체로 immunoblotting으로 확인해 본 결과, 교차반응성을 나타내지 않음으로서, 기능적으로는 전혀 새로운 단백질 일 가능성도 있다. 본 연구에서 개발된 한우 지방세포에 대한 항체는 81,000배의 희석 배율에서도 역가를 감지할 수 있을 정도로 높은 역가를 지니고 있었으며, 기타 조직과의 교차반응성은 매우 미약하게 나타난 반면, 지방세포와는 매우 강한 항원-항체 반응을 나타내었다. 항체의 지방세포 원형질막 단백질에 대한 특이성은 immunoblotting 및 immunohistochemistry를 통해서도 재확인되었다. 배양중인 한우 지방세포에, 본 연구에서 개발한 항체를 처리한 경우, 대부분의 한우 지방세포가 파괴된 반면, 동일 한우 지방세포에 비면역 혈

청을 처리한 경우, 지방세포는 거의 파괴되지 않았다. 이러한 항체의 지방세포에 대한 세포독성 효과는 lactate dehydrogenase(LDH) 및 MTT assay를 통하여 확인할 수 있었으며, 현미경상으로 형태학적인 변화의 관찰이 가능하였다. 거세 한우에 본 연구에서 개발한 항체를 수동면역시킬 경우, 항체 처리로 인한 특별한 부작용 없이 정상적인 성장을 하였다. 항체를 주사한 거세 한우의 경우, 비록 통계적 유의성은 없었으나 등지방 두께가 현저히 줄어든 반면, 배최장근단면적과 근내지방도는 증가하였다. 그러나, 전체 도체 구성 중 지방함량이 차지하는 비율은 항체의 처리로 인한 뚜렷한 효과가 없었는데, 이는 항체 처리를 위한 시험우 선발시 과도한 체지방 축적이 예상되는 한우를 선발. 공시하였기 때문이다. 거세 한우에 대한 항체의 처리는 혈중 glucose와 triacylglycerol 함량에는 큰 영향을 미치지 않았다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

<영양학적 조절방법에 의한 한우 체지방 생합성 조절 기술 개발>

한우 근내지방도 증진을 통한 사료첨가제로서의 가치가 비육시험을 통해 인정되었으나 첨가제의 대량 생산을 통한 제품의 균일성 확보, 기호성 증진 등 산업화를 위한 제조 공정에 대한 추가적인 연구사업이 요청됨.

<면역학적 기법을 이용한 한우 불가식 체지방 억제 기술 개발>

그러나 현행의 거세-장기 비육에 의한 고급육 생산 방법은 과도한 불가식 지방의 축적이라는 문제를 안고 있다. 따라서, 본 연구는 한우의 불가식 체지방 축적을 억제시킬 수 있는 첨단기법을 개발하고자 하였으며, 소기의 연구 목적을 달성하였다. 그러나, 본 연구에서 공시한 한우가 농가에서 임대한 공시우로서, 본 연구자들이 원하는 두수와 실험 design에 의한 실험을 할 수가 없었다. 따라서, 본 연구의 실용화를 위해서는 보다 많은 공시우, 다양한 형태의 항체 처리, 농가가 쉽게 활용할 수 있는 방법 등을 고려한 후속 연구가 필수적인 것으로 생각되며, 이에 대한 지원을 건의합니다.

SUMMARY

I. Title

Control of fat biosynthesis in Hanwoo

II. Objectives and importances of the project

- Stimulation of Hanwoo beef consumption demand and stabilization of raising constituency in Hanwoo farms by the quality differentiation from imported beef
- Conventional feeding strategy to maximize the marbling in finishing stage accompany the increase of inedible body fat resulting in low meat yields and high cost
- To improve the marbling it needs the manipulation of body fat metabolism through nutritional, biochemical and immunological technology.
- Advanced technology based on immunology is necessary to overcome the problems of conventional high quality beef feeding system accompanying the increase of the inedible body fat

III. Contents and ranges of the project

<Control of Body Fat Biosynthesis in Hanwoo by Nutritional Manipulation>

On the purpose of clarifying the mechanism of body fat biosynthesis and lipolysis to develop the technology for Hanwoo marbling improvement, In vitro adipocyte and adipose tissue culture system was established and effects of regulating factors were investigated. Effects of lipogenic precursors infused into rumen, jugular vein and abomasum were assessed by rumen fermentation characteristics and VFA changes. And the changes of concentration in blood metabolites according to the growth stages were investigated and the results gave the basic information of lipogenic precursors.

Finally on the basis of VFA pattern for various feedstuffs, and all the results obtained, feeds and feed additives were developed and the effects was

investigated.

For preadipocytes differentiation, insulin and T₃ as hormone, Vit C as nutrients were effective and Vit A were negative. For preadipocyte proliferation, IGF-1 was more effective than estradiol 17 β and intramuscular preadipocytes showed greater proliferation rate than any other cells.

In lipogenesis, acetate were effectively deposited in fatty acid-glyceride fraction than glucose. For amino acid and its deriveatives, leucine were most effective. Generally, insulin stimulated lipogenesis as norepinephrine does lipolysis. Serum insulin concentration was increased by the infusion of propionate in the rumen and glucose in the jugular vein.

Serum insulin concentration was increased but NEFA concentration was decreased by the abomasal glucose infusion, while starch and molasses infusion showed no difference.

When finishing Hanwoo are fed on feed and feed additives manufactured by the NLRI, marbling scores, quality grades and oleic acid contents in *longissimus dorsi* were improved although not significant compared to control.

<Development of an immunological technique to reduce inedible body fat in Hanwoo>

First of all, adipocyte plasma membrane proteins from Hanwoo was isolated and characterized. From this study, 55kD protein was found only on the plasma membrane of adipocytes, but was not observed on the plasma membranes of the other tissues such as heart, liver, kidney. N-terminal region of the 55kD protein contained a strong sequence homology to the N-terminal region of albumin and albumin-related proteins. However, a polyclonal antibody raised against the bovine serum albumin did not cross-react with the 55kD protein. At present, it can not be concluded whether the 55kD protein and albumin are similar in their functional properties. Sheep was immunized with whole proteins isolated from adipocyte plasma membrane to produce antibodies. Antisera obtained in this study showed high titers with detectable amounts of antibody diluted in excess of 81,000 times. The antisera expressed strong antigen-antibody reactivity with adipocyte plasma membrane proteins whilst expressed very minimum reactivity with plasma membrane proteins isolated from other organs, heart, liver, kidney, and spleen. These specificity of antisera were confirmed by immunoblotting and immunohistochemistry. Antisera treatments

to Hanwoo adipocytes in culture resulted in lysis of the most of adipocytes whilst non-immunized antisera treatments did not cause lysis of adipocytes. These cytotoxic effects of antisera were confirmed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity and MTT assay. Furthermore, lysis of adipocytes by antisera treatments could be seen under microscope. Passive immunization of Hanwoo steer with antisera showed normal body weight gain with no side-effects. Although there were no statistical significances, passively immunized Hanwoo steer showed thinner backfat thickness and increased longissimus muscle area and higher marbling degree. But the proportion of dissectible body fat in total carcass weight showed no dramatic changes because Hanwoo steers used in the current study was selected for high fat contents. Antisera injection to Hanwoo steer showed no significant changes in blood glucose and triacylglycerol contents.

IV. Suggestions and applications for the results of the project

<Control of Body Fat Biosynthesis in Hanwoo by Nutritional Manipulation>

Although the feed additives developed were proved to be effective on Hanwoo marbling by feeding trials, further researches are needed to industrialize the products such as products uniformity, mass production, improvement of palatability.

<Development of an immunological technique to reduce inedible body fat in Hanwoo>

The objectives of the current study, to develop advanced technique to reduce inedible body fat in Hanwoo, were achieved successfully. Since, however, experimental animals used in this study was selected by farm house, it is essential to conduct succeeding researches with more experimental animals, with more diverse treatments of antisera, with more easy way for farmer to apply current study. And we suggest a kind of back-up experiment for the practical use of this immunological technique to reduce inedible body fat in castrated-long-term fed Hanwoo.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	24
Chapter 2 Control of Hanwoo adipose tissue biosynthesis by nutritional manipulation	28
Section 1. Introduction	28
Section 2. Materials and methods	29
1. Establishment of Hanwoo adipose cell <i>in vitro</i> culture	29
A. Animals	29
B. Tissue preparation	29
C. Preadipocyte recovery	29
D. <i>In vitro</i> preadipocyte culture	30
2. Effects of hormones and depot on the proliferation of stromal vascular preadipocytes of adipose tissues from Hanwoo	30
A. Animals	30
B. Preadipocyte recovery	30
C. <i>In vitro</i> preadipocyte culture	30
D. Statistics	30
3. Effects of hormones on the differentiation of stromal vascular preadipocytes of adipose tissues from Hanwoo	31
A. Animals	31
B. Preadipocyte recovery and <i>in vitro</i> culture	31
C. Induction of preadipocyte differentiation	31
D. Measurement of GPDH	31
E. Measurement of Protein	32
4. Effects of vitamins on the differentiation of stromal vascular preadipocytes of adipose tissues from Hanwoo	32
A. Animals	32

B. Preadipocyte recovery and <i>in vitro</i> culture	32
C. Induction of preadipocyte differentiation	32
D. Measurement of GPDH	32
E. Measurement of Protein	33
5. Effects of carbon precursors and hormone on the lipogenesis and lipolysis of Hanwoo adipose tissues	33
A. Animals	33
B. Tissue recovery	33
C. Tissue preparation	33
D. Measurement of cell size	33
E. Fatty acid, sugar and amino acid incorporation into adipose tissue	34
F. Incorporation of radioisotope labelled acetate and glucose in adipose tissue by insulin and IGF-1	34
G. Lipogenesis from acetate and glucose in subcutaneous and intramuscular adipose tissue of Hanwoo steers by insulin and norepinephrine	34
H. Glycerol analysis	35
I. Lipid extraction	35
6. Effects of hormones and growing stages on the differentiation of preadipocytes from sheep	35
A. Animals	35
B. Preadipocyte recovery and <i>in vitro</i> culture	35
C. Induction of preadipocyte differentiation	35
D. Measurement of GPDH	36
E. Measurement of Protein	36
7. The relationship between serum insulin concentration and carcass characteristics in fattening Hanwoo	36
A. Animals	36
B. Experimental ration and feeding	36
C. Animal management	38
D. Experimental design	38
1) Weight and feed intake	38
2) Nutritional composition of experimental diet	38

3) Carcass trait	38
4) Blood characteristics	39
5) Statistics	39
8. Effects of serum glucose and insulin concentrations by intraruminal propionate infusion	39
A. Animal	39
B. Experimental ratio and feeding	39
C. Jugular vein catheter installation	40
D. Experimental design	40
E. Experimental method	41
1) Infusion solution	41
2) Infusion of propionate solution into rumen	41
3) Sampling	41
a) Rumen fluid	41
b) Blood	41
F. Experimental method and measurements	41
1) Nutritional composition of experimental diet	41
2) Rumen fluid	41
3) Blood	42
G. Statistics	42
9. Effects of serum glucose and insulin concentrations by intravenous glucose infusion	42
A. Animal	42
B. Feeding	42
C. Experimental design	42
D. Experimental methods and measurements	43
1) Glucose infusion	43
2) Blood sampling and analysis	43
10. Changes of VFA concentration feed ingredients by fermentation time	43
A. Animal	43
B. Experimental ration	43
C. Experimental methods and measurements	43
11. Effects of serum glucose and insulin concentrations by acetate and	

propionate feeding	44
A. Animal	44
B. Lipogenic precursor	44
C. Experimental design	44
D. Feeding and sampling	44
E. Experimental methods and measurements	44
1) Rumen fluid	44
2) Blood	45
12. Effects of serum glucose and insulin concentrations by abomasal carbohydrate sources infusion	45
A. Animal	45
B. Experimental ratio and feeding	45
C. Jugular vein catheter installation	45
D. Experimental design	46
E. Experimental method	46
1) Carbohydrate solution	46
2) Carbohydrate solution infusion into abomasum	46
3) Blood sampling	47
F. Experimental method and measurements	47
1) Nutritional composition of experimental diet	47
2) Blood analysis	47
G. Statistics	47
13. Effects of fattening feeds and feed additives on marbling score of Hanwoo	47
A. Animal	47
B. Experimental period and places	47
C. Experimental design	48
D. Experimental method	48
1) Feed additives and ration fermentation	48
2) Feeding and weight measurements	48
3) Carcass characteristics	49
4) Chemical composition of carcass	49
Section 3. Results and Discussions	49

1. Establishment of Hanwoo adipose cell in vitro culture	49
2. Effects of hormones and depot on the proliferation of stromal vascular preadipocytes of adipose tissues from Hanwoo	50
3. Effects of hormones on the differentiation of stromal vascular preadipocytes of adipose tissues from Hanwoo	55
4. Effects of vitamins on the differentiation of stromal vascular preadipocytes of adipose tissues from Hanwoo	59
5. Effects of carbon precursors and hormone on the lipogenesis and lipolysis of Hanwoo adipose tissues	64
A. Adipocyte size	64
B. Fatty acid, sugar and amino acid incorporation into adipose tissue	66
C. Incorporation of radioisotope labelled acetate and glucose in adipose tissue by insulin and IGF-142	68
D. Lipogenesis from acetate and glucose in subcutaneous and intramuscular adipose tissue of Hanwoo steers by insulin and norepinephrine	70
E. Effects of hormones on lipolysis of Hanwoo adipose tissue	72
6. Effects of hormones and growing stages on the differentiation of preadipocytes from sheep	73
A. Factors affecting the differentiation	73
B. Age effect	76
C. Site effect	76
7. The relationship between serum insulin concentration and carcass characteristics in fattening Hanwoo	80
A. Growth	80
B. Nutrient intake	82
C. Carcass characteristics	84
D. Changes of blood metabolites and insulin	86
E. Relationship between blood metabolites and carcass traits	88
8. Effects of serum glucose and insulin concentrations by intraruminal propionate infusion	90
A. pH	90
B. VFA	90

C. Changes of blood metabolites and insulin concentration	92
9. Effects of serum glucose and insulin concentrations by intravenous glucose infusion	94
10. Changes of VFA concentration f feed ingredients by fermentation time	96
11. Effects of serum glucose and insulin concentrations by acetate and propionate feeding	97
A. Changes of rumen fermentation	97
B. Changes of blood	98
12. Effects of serum glucose and insulin concentrations by abomasal carbohydrate sources infusion	100
A. Changes of blood metabolites and insulin concentration	100
13. Effects of fattening feeds and feed additives on marbling score of Hanwoo	102
A. Feeding trials	102
B. Carcass characteristics and beef quality	103
C. Chemical composition of beef	104
 Section 4. Abstract	 107
 Section 5. References	 109
 Chapter 3 Development for an immunological technique to reduce inedible body fat in Hanwoo (Korean Cattle)	 116
 Section 1. Introduction	 116
 Section 2. Materials and methods	 118
1. Characterization of proteins isolated from adipocyte plasma membrane of Hanwoo	118
A. Isolation of plasma membrane proteins from adipocytes and various tissues of Hanwoo	118
B. Analysis of adipocyte specific proteins in Hanwoo	119

C. Identification of adipocyte plasma membrane proteins using avidin-biotin coupling	120
D. Analysis of N-terminal amino acid sequences of adipocyte specific proteins of Hanwoo	120
2. Development of antibodies against adipocyte plasma membrane proteins isolated from Hanwoo	121
A. Isolation of adipocyte plasma membrane proteins	121
B. Development of antibodies from sheep	121
C. Titers and cross-reactivity of antisera by ELISA	121
D. Immunoblotting	123
E. Immunohistochemistry	124
3. Cytotoxicity of antisera against adipocyte plasma membrane proteins isolated from Hanwoo (<i>in vitro</i>)	125
A. Adipocyte culture	125
B. Antisera treatments	125
1) Experimental design for antisera treatments	125
2) Antisera treatments	126
C. Analytical items and methods	126
1) Lactate dehydrogenase (LDH) activity	126
2) MTT assay	127
3) Morphological changes	127
4. Effects of antisera on carcass characteristics and body fat contents in Hanwoo steer (<i>in vivo</i>)	127
A. Mass production of antisera for <i>in vivo</i> trials	127
B. Maintenance of Hanwoo steer	127
C. Passive immunization	128
D. Analytical items and methods	128
1) Body weight	128
2) Carcass characteristics	128
3) Blood glucose and triacylglycerol	129
Section 3. Results and discussion	130
1. Characterization of proteins isolated from adipocyte plasma membrane	

of Hanwoo	130
A. Isolation of plasma membrane proteins from adipocytes and various tissues of Hanwoo	130
B. Analysis of adipocyte specific proteins in Hanwoo	130
C. Identification of adipocyte plasma membrane proteins using avidin-biotin coupling	131
D. Analysis of N-terminal amino acid sequences of adipocyte specific, proteins of Hanwoo	134
2.. Development of antibodies against adipocyte plasma membrane proteins isolated from Hanwoo	136
A. Titers and cross-reactivity of antisera by ELISA	136
B. Immunoblotting	139
C. Immunohistochemistry	142
3. Cytotoxicity of antisera against adipocyte plasma membrane proteins isolated from Hanwoo (<i>in vitro</i>)	143
A. Comparison between non-immunized and immunized serum	143
B. Complement action for cytotoxicity	143
C. Comparison between liquid and lyophilized antisera	144
D. Comparison between innate and heat-inactivated antisera	144
E. MTT assay	148
4. Effects of antisera on carcass characteristics and body fat contents in Hanwoo steer(<i>in vivo</i>)	151
A. Body weight	151
B. Blood glucose and triacylglycerol	151
C. Carcass characteristics	152
Section 4. Abstract	156
Section 5. References	157

목 차

제 1 장 서 론	24
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	24
1. 연구개발의 필요성	24
가. 기술적 측면	24
나. 경제·산업적 측면	24
다. 사회·문화적 측면	24
2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	25
가. 국 내	25
나. 외 국	25
3. 연구개발의 목표 및 내용	26
가. 연구개발목표와 내용	26
나. 연차별 연구개발목표와 내용	27
제 2 장 영양학적 조절방법에 의한 한우 체지방 생합성 조절 기 술 개발 분야	28
제 1 절 서 설	28
제 2 절 재료 및 방법	29
1. 지방세포 체외배양 방법의 확립	29
가. 공시동물	29
나. 지방조직 채취	29
다. 지방세포의 회수	29
라. 지방전구세포의 배양	30
2. (시험1) 호르몬이 한우지방전구세포의 증식에 미치는 영향	30
가. 공시동물	30
나. 지방세포의 회수	30

다. 지방전구세포의 배양	30
라. 통계분석	30
3. (시험 2) 호르몬이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향	31
가. 공시동물	31
나. 지방전구세포의 회수 및 배양	31
다. 지방전구세포의 분화	31
라. GPDH 효소활성 측정	31
마. 단백질 측정	32
4. (시험 3) 비타민 및 광물질이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향	32
가. 공시동물	32
나. 지방전구세포의 회수 및 배양	32
다. 지방전구세포의 분화	32
라. GPDH 활성측정	32
마. 단백질 측정	33
5. (시험 4) 탄소원과 호르몬처리에 따른 지방조직의 지방생합성 및 분해에 관한 연구	33
가. 공시동물	33
나. 지방조직의 회수	33
다. 지방조직절편	33
라. 지방세포의 크기 측정	33
마. 지방산, 당, 아미노산의 지방조직내 유입을 측정	34
바. Insulin과 IGF-1첨가에 의한 지방조직내 유입을 측정	34
사. Insulin과 Norepinephrine첨가에 의한 초산과 glucose의 지방생합성능 측정	34
아. 지방조직의 지방분해	34
자. Glycerol 분석	35
차. 지방추출(Folch extraction)	35
6. (시험 5) 호르몬 및 성장단계에 따른 면양지방전구세포 분화	35
가. 공시동물	35
나. 지방전구세포의 회수 및 배양	35
다. 지방전구세포의 분화	35
라. GPDH 활성측정	36
마. 단백질 측정	36

7. (시험 6) 한우의 비육과정에 있어서 혈중 insulin 농도와 도체형질과의 상관	36
가. 공시동물	36
나. 시험 사료 및 급여	36
다. 시험축 사양관리	38
라. 시험 설계	38
마. 조사항목 및 조사방법	38
1) 체중 및 사료섭취량	38
2) 시험 사료의 영양소 함량	38
3) 도체특성 조사	38
4) 혈액성상	39
5) 통계분석	39
8. (시험 7) 반추위내 propionate 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향	39
가. 공시동물	39
나. 시험사료 및 급여	39
다. 경정맥 catheter 장착	40
라. 시험 설계	40
마. 시험방법	41
1) 주입용액의 제조	41
2) Propionate 용액의 반추위 주입	41
3) 시료 채취	41
가) 반추위액 채취	41
나) 혈액 채취	41
바. 분석항목 및 방법	41
1) 사료의 영양소 함량	41
2) 반추위액	41
3) 혈액 분석	42
사. 통계분석	42
9. (시험 8) 한우 거세우 경정맥 glucose 주입에 의한 혈중 대사 물질 변화	42
가. 공시동물	42
나. 사료급여	42
다. 시험설계	42

라. 조사항목 및 방법	43
1) Glucose 주입	43
2) 혈액 채취 및 성분분석	43
10. (시험 9) 가축사료원료의 발효시간별 VFA 농도 변화	43
가. 공시동물	43
나. 시험사료	43
다. 조사항목 및 방법	43
11. (시험 10) Acetate 및 propionate 급여가 혈중 glucose 및 insulin 농도 에 미치는 영향	44
가. 공시동물	44
나. 지방합성 유도물질	44
다. 시험설계	44
라. 사료급여 및 시료채취	44
마. 분석항목 및 방법	44
1) 반추위액	44
2) 혈액 분석	45
12. (시험 11) 한우 4위내 탄수화물 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향	45
가. 공시동물	45
나. 시험 사료 및 급여	45
다. 경정맥 catheter 장착	45
라. 시험설계	46
마. 시험방법	46
1) 탄수화물 주입용액 제조	46
2) 탄수화물의 제4위내 주입	46
3) 혈액 채취	47
바. 분석 항목 및 방법	47
1) 사료의 영양소 함량	47
2) 혈액분석	47
사. 통계분석	47
13. (시험 12) 한우의 근내지방도 극대화를 위한 비육용 사료 및 사료 첨가제 효능 입증	47
가. 공시동물	47
나. 시험기간 및 장소	47

다. 시험설계	48
라. 시험방법	48
1) 축산연 사료첨가제 및 사료조제	48
2) 사료급여 및 체중 측정	48
3) 도체특성 조사	49
4) 고기의 화학적 조성	49
제 3 절 결과 및 고찰	49
1. 지방세포 배양체계 확립	49
2. (시험 1) 호르몬이 한우지방전구세포의 증식에 미치는 영향	50
3. (시험 2) 호르몬이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향	55
4. (시험 3) 비타민 및 광물질이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향	59
가. 수용성 비타민이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향	59
나. 지용성 비타민의 첨가가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향	61
5. (시험 4) 탄소원 및 호르몬에 따른 지방조직의 지방생합성 및 분해에 관한 연구	64
가. 지방세포의 크기	64
나. 지방산, 당, 아미노산의 지방조직내 유입을 측정	66
다. Insulin과 IGF-1첨가에 의한 지방조직내 유입을 측정	68
라. Insulin과 Norepinephrine첨가에 의한 초산과 glucose의 지방합성능 측정	70
마. 호르몬 첨가에 따른 지방조직의 지방분해 연구	72
6. (시험 5) 면양의 성장단계별 지방전구세포 분화	73
가. 분화에 영향하는 요인	73
나. 연령효과	76
다. 부위효과	76
7. (시험 6) 한우의 비육과정에 있어서 serum insulin 농도와 도체형질과의 상관	80
가. 발육능력	80
나. 영양소 섭취량	82
다. 도체성적	84
라. 혈청 대사물질 및 insulin 농도의 변화	86

마. 혈액성상과 도체성적간의 상관	88
8. (시험 7) 반추위내 propionate 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향	90
가. pH 변화	90
나. VFA 함량	90
다. 혈중 대사물질 및 insulin 농도의 변화	92
9. (시험 8) 한우 거세우 경정맥 glucose 주입에 의한 혈중 대사 물질 변화	94
10. (시험 9) 가축사료원료의 발효시간별 VFA 농도 변화	96
11. (시험 10) Acetate 및 propionate 급여가 혈중 glucose 및 insulin 농도에 미치는 영향	97
가. 반추위 발효성상의 변화	97
나. 혈액성상의 변화	98
12. (시험 11) 한우 4위내 탄수화물원 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향	100
가. 혈중 대사물질 및 insulin 농도의 변화	100
13. (시험 12) 한우의 근내지방도 극대화를 위한 비육용 사료 및 사료 첨가제 효능 입증	102
가. 사양시험 성적	102
나. 도체 및 육질 조사	103
다. 고기의 화학적 조성	104
제 4 절 적 요	107
제 5 절 인용문헌	109
제 3 장 면역학적 기법을 이용한 한우 불가식체지방 억제기술 개발 분야	116
제 1 절 서 론	116

제 2 절 재료 및 방법 118

1. 한우 지방세포 원형질막 단백질의 특성 분석 118
 가. 한우의 지방세포 및 여러 조직으로부터 원형질막 단백질의 분리 .. 118
 나. 한우 지방세포 원형질막 특이단백질의 분석 119
 다. Avidin-Biotin coupling을 이용한 한우 지방세포 원형질막 단백질의 동정 120
 라. 한우 지방세포 원형질막 특이단백질의 아미노산 서열 분석 120

2. 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체 개발 121
 가. 지방세포 원형질막 단백질의 분리 121
 나. 면양으로부터 항체의 생산 121
 다. ELISA에 의한 항체의 역가 측정 및 조직특이성 확인 121
 라. Immunoblotting 123
 마. Immunohistochemistry 124

3. 한우 지방세포에 대한 항체의 세포독성 효능 시험(*in vitro*) 125
 가. 지방세포의 배양 125
 나. 항체의 처리 125
 1) 항체 처리 design 125
 2) 항체 처리 126
 다. 조사 항목 및 방법 126
 1) LDH Assay 126
 2) MTT assay 127
 3) 형태학적 변화 127

4. 한우 지방세포에 대한 항체가 거세 한우의 성장 및 체조성에 미치는 영향 (*in vivo*) 127
 가. *In vivo* 시험을 위한 항체의 대량 생산 127
 나. 거세 한우의 사양 시험 127
 다. 수동면역 128
 라. 조사항목 및 방법 128
 1) 체 중 128
 2) 혈중 glucose 및 triacylglycerol 분석 128
 3) 도체 특성 분석 129

제 3 절 결과 및 고찰	130
1. 한우의 지방세포 및 여러 조직으로부터 원형질막 단백질의 분리	130
2. 한우 지방세포 원형질막 특이 단백질의 분석	130
3. Avidin-Biotin coupling을 이용한 한우 지방세포 원형질막 단백질의 동정	131
4. 한우 지방세포에 특이적으로 존재하는 원형질막 단백질의 아미노산 서열 분석	134
5. 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 역가 및 교차반응성 ..	136
가. 항체의 역가 및 교차반응성	136
나. Immunoblotting	139
다. Immunohistochemistry	142
6. 한우 지방세포에 대한 항체의 세포 독성 효능실험(<i>in vitro</i>)	143
가. 비면역 혈청과 면역혈청간의 비교	143
나. Complement가 항체의 작용에 미치는 영향	143
다. Liquid와 lyophilized antisera의 세포독성	144
라. 항체의 가열처리가 세포독성에 미치는 영향	144
마. MTT assay	148
바. 형태학적 변화	149
7. 한우지방세포에 대한 항체가 거세한우의 성장 및 체조성에 미치는 영향 (<i>in vivo</i>)	151
가. 거세한우의 체중변화	151
나. 한우의 혈중 glucose 및 triacylglycerol 함량 변화	151
다. 한우의 체조성 및 도체의 이화학적 특성	152
제 4 절 적 요	156
제 5 절 인용문헌	157

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 1) 근내지방 조직과 기타부위 지방조직세포의 발생기작과 지방생합성 및 분해 기작의 차이를 구명하기 위한 세포학적, 생화학적, 분자생물학적 접근이 필요함
- 2) 근내지방도를 극대화하기 위해서는 근내지방 조직세포를 성장시키고 발달된 세포내에 지방구가 침착되는 특성을 응용하여 지방대사를 영양학, 생화학 및 내분비학적으로 조절하는 기술이 요구됨
- 3) 불가식 체지방의 함량이 매우 높은 기존의 고급육 생산체계방법의 기술적 한계성을 극복하기 위해서는 면역학적 기법을 이용한 고도의 첨단기술 개발이 요청됨

나. 경제·산업적 측면

- 1) 근내지방 축적은 체지방 축적의 마지막 단계로서 현재까지 근내지방도를 높이기 위하여 시도되고 있는 사양방법(비육기간 연장, 거세 등)은 불가피하게 불가식체지방의 증가를 동반하여 육량등급 저하와 생산비증가를 가져오고 있음
- 2) 한우 산육능력의 유전적 열세를 육질개선을 통해 쇠고기에 대한 국가경쟁력 우위를 견지할 필요가 있음
- 3) 외국 수입쇠고기와 품질차별화를 통해 소비자에 의한 자발적이고 안정된 수요창출이 요구됨

다. 사회·문화적 측면

- 1) 실용화된 사양체계 적용에 의한 고급육생산으로 한우 사육농가의 사육의욕을 고취시켜 사육기반을 안정화시켜야 함

- 2) 선도농가 육성을 위한 주요 프로그램 제공으로 정부시책에 자발적으로 참여케 할 수 있음
- 3) 첨단 과학기술 도입에 의한 한우고기 차별화로 축산업에 대한 국가적 인식을 제고시킬 수 있음

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

가. 국 내

- 1) 국내에서는 한우의 지방생합성 조절에 관한 연구는 시도한 바 없으며 단지 영남대 최창본 교수가 돼지를 대상으로 “면역학적 방법을 이용한 저지방 돼지고기 생산에 관한 연구”를 2년전에 착수 개발 완료하여 현재 생체 시험단계에 있음
- 2) 축산기술연구소에서는 '94년부터 과학기술처 선도기술 개발사업인 “유전공학기법에 의한 가축개량기술 개발연구”의 일환으로 한우의 경제형질에 대한 유전자 탐색 및 고급육형의 생리특성을 구명하고 있음
- 3) 축산기술연구소에서는 '96년에 한우지방세포의 배양체계확립과 아울러 지방전구세포의 증식 및 분화특성을 구명하였고 증식 및 분화에 관여하는 제반 인자에 대한 검토를 하였다. '97년에는 지방세포의 분화에 관여하는 미량인자의 효과를 구명하여 특정 인자에 의해 근내지방세포의 분화가 영향받을 수 있다는 결과를 얻었으며 지방조직의 지방합성의 경우 거세우와 비거세우지방조직간 지방합성효율연구, glucose과 초산의 지방산 및 글리세롤유입, 호르몬처리에 의한 지방조직의 지방합성 및 분해 연구를 수행한 바 있으며 최근 한우 생체 지방대사에 관한 연구를 집중적으로 수행하고 있음
- 4) 영남대에서는 '96년에 한우지방 세포 원형질막 단백질을 검출하였으며 현재 아미노산 서열분석을 하고 있고 이후 Gene-Bank를 통해 homology를 비교할 예정에 있음

나. 외 국

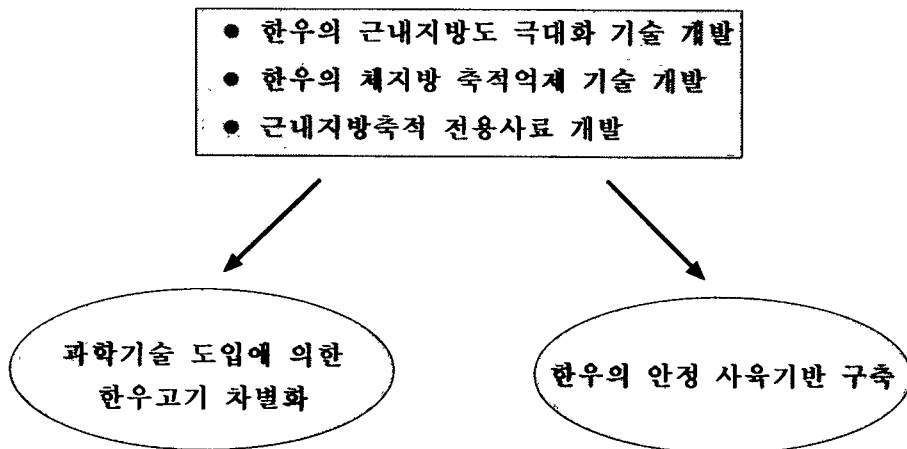
- 1) 미국에서는 우리나라와 같이 USDA 육질등급체계가 근내지방도를 중심으로 판정되므로 현재의 근내지방도는 유지하면서 체지방 함량을 줄이려는 연구가 Texas A & M, Iowa, Oklahoma 대학 등에서 육우품종별, 도살월령(체중)별, 지방부위별, 지방세포의 세포학적 특성 및 지방산 합성기전을 *in*

vitro 및 *in vivo* 시험을 통해 구명하고 있으며 첨가제 개발 연구도 시도되고 있음

- 2) 영국에서는 우리나라와 달리 근내지방도 증가보다는 체지방 감소에 중점을 두고 있으며 특히 닭, 돼지 및 면양의 체지방 감소는 Hannah연구소의 Flint 박사팀이 면역학적 방법에 의해 가능성을 제시하였고 현재 젖소를 대상으로 연구중에 있음. 또한 Hannah연구소에서는 지방생합성 및 분해에 관여하는 성장호르몬, 인슐린, 카테콜라민 및 타이록신 등의 호르몬 투입에 따른 지방세포의 세포학적, 생리학적, 분자생물학적 원인구명과 아울러 지방합성에 관여하는 유전자발현을 조절하는 지방축적 감소연구에 진전된 실적이 있음
- 3) 일본은 수십년간 거듭된 개량과 영양학적 기술의 실용화를 통해 근내지방도가 높은 화우고급육을 생산하고 있는데 화우의 연령 및 영양수준에 따른 혈중 지질성분의 변화를 구명한바 있으며 최근 교토에서는 지방전구세포의 분화에 영향을 미치는 제반 인자의 효과를 검토하는 연구를 수행중에 있음

3. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발목표와 내용



나. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1996)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방조직별 지방 생합성 및 분해 기전 구명 ○ 한우 지방세포원 형질막 특이단백 질 분리 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방세포의 증식 및 성숙기전 <ul style="list-style-type: none"> - 원시지방세포 배양기술 확립 - 지방조직별(복부, 피하, 근간, 근내) 지방세포의 증식 및 성속속도 ○ 지방합성 및 분해와 관련된 주요인자 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 에너지 공급종류에 따른 지방합성을 변화 - 내분비에 의한 지방합성 및 분해조절 - 지방합성 및 분해와 관련된 효소체계변화 ○ 지방부위별 지방세포 원형질막 단백질 검출, 분리 및 아미노산 서열분석
2차년도 (1997)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방 생합성 조절물질 탐색 및 생체 지방대사 구명 ○ 단백질에 대한 항체 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방 조직별 지방세포의 지방 생합성 조절물질 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 지방조직: 피하지방, 근내지방 - 조절물질: 지방합성, 분해 촉진 및 억제물질 ○ 지방세포의 지방합성 조절물질의 생체 적용가능성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 지방합성 관여물질의 주입에 의한 혈액 정상 구명 ○ Cell line 및 Primary culture를 이용한 항체의 효능 시험 ○ Polyclonal 및 monoclonal 항체의 생산 및 정제
3차년도 (1998)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 근내지방도 증진 위한 반추위발효 조절 기술 개발 ○ 항체효능시험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효최종산물로서 근내지방합성에 관여하는 각종 전구물질의 투여효과 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 주입부위: 경정맥, 반추위, 4위 - 전구물질: VFA, 탄수화물 - 조사방법: 혈중 지방대사물질 농도, 호르몬 ○ Cell culture 및 한우를 이용한 항체의 효능실험
4차년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 근내지방도 증진 위한 사료조작기법 개발 ○ 한우 지방세포 원형질막 항체의 효능실험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 근내지방도 증진 위한 최적 원료사료 조합 <ul style="list-style-type: none"> - 원료 조합별 VFA 농도 변화 측정 ○ 휘발성지방산 급여에 따른 혈중 지방대사물질 농도변화 <ul style="list-style-type: none"> - 휘발성지방산 : acetate, propionate - 조사항목 : 혈중 glucose, insulin ○ 근내지방도 극대화 위한 비육사료 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 비육기 거세한우 사양시험 ○ 거세한우를 이용한 <i>in vivo</i> 시험 ○ 특히 등록 및 항체의 산업화를 위한 연구

제 2 장 영양학적 조절방법에 의한 한우 체지방 생합성 조절 기술 개발 분야

제 1 절 서 설

2000년 시장개방에 따른 국내 한우산업을 안정화시키기 위해서는 고급육 생산기술의 개발 및 농가 적용으로 외국 수입쇠고기와 품질을 차별화시킴으로 인하여 이에 따른 수익성이 보장되면 생산기반인 사육농가는 사육의욕이 고취되어 한우사육기반이 안정되고, 이와 더불어 고품질을 선호하는 소비자의 자발적인 수요창출로 인하여 수요기반이 안정화된다.

고급육 생산에 가장 주요목표인 근내지방도 증가는 근육내 지방을 침착시켜 고기의 맛과 풍미를 극대화시킨다. 가축의 지방 대사생리상 근내지방 축적은 체지방 축적의 마지막 단계로서 현재까지 근내지방도를 높이기 위해 시도되고 있는 사양방법(비육기간 연장, 거세 등)은 불가피하게 불가식체지방의 증가를 동반하고 있어 육량등급 저하와 생산비 증가를 가져오고 있다.

따라서 근내지방도를 보다 효율적인 방법으로 증진시키기 위해서는 근내지방 조직과 기타부위 지방조직세포를 세포학적, 생화학적, 분자생물학적으로 이해하므로써 지방세포 및 조직의 발달과 생합성 및 분해기작의 차이를 구명하고 근내지방 조직세포를 성장시키고 분화된 세포내에 지방구가 침착되는 특성을 응용하여 지방대사를 영양학, 생화학 및 내분비학적으로 조절하는 기술이 개발되어야 한다.

현재 주요 쇠고기 수출국인 미국에서도 수출시장 강화와 국내시장 보호, 육성을 목적으로 소고기의 육질개선을 위해 지방대사에 대한 품종간 유전학적 비교 및 지방조직간의 생화학적 대사차이를 이용한 영양, 사양학적 조절기술개발과 지방세포의 생화학적 특성 및 분자유전학적 대사조절 기전연구가 한창이고 일본에서 역시 화우고급육의 수출시장확대 및 자국의 쇠고기 시장 보호를 목적으로 고급화우 생산에 대한 농가자체에 축적된 사육기술 Know-how이외에 생화학, 내분비학, 분자생물학적 이해를 기초로 한 영양학적 조절기술개발에 박차를 가하고 있다.

이러한 효율적이고 과학적인 지식과 기술들을 실용화하고 실제 농가사양체계에 적용시킴으로써 한우의 육질을 개선하고 국가경쟁력 우위를 견지할 있다. 아울러 첨단 과학기술 도입에 의한 한우고기 차별화로 축산업에 대한 국가적 인식을 제고시킬 수 있으며 선도농가 육성을 위한 주요 프로그램 제공으로 정부시책에 자발적으로 참여케 할 수 있다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 지방세포 채취배양 방법의 확립

가. 공시동물

지방세포의 물리적 특성과 지방전구세포분화시험을 위해 고급육 사양체계에 의해 사육된 24개월령 이상된 평균체중 554kg인 거세한우를 이용하였다.

나. 지방조직 채취

지방조직은 방혈 즉시 개복하여 하복부 지방을 채취하였고 6-7번째 늑골부분의 등심에서 피하, 근간, 근내 지방을 채취하였다.

다. 지방세포의 회수

채취한 복부, 피하, 근간 및 근내지방을 신속하게 실험실로 운반하였으며 지방조직에서 결체조직, 혈관, 임파구 등을 제거하고 collagenase의 소화를 용이하게 하기 위해 잘게 세절한 후 0.1%의 collagenase type II를 포함한 KRB(Krebs ringer's buffered solution)에 넣어 37℃에서 1시간 소화처리하고, 250 μ m nylon mesh를 이용해 미소화 된 지방절편을 제거하였다. 여과된 용액내 상층 adipocyte 부분을 제외한 부분을 수집하여 2,800rpm에서 5분간 원심분리하고 분리된 세포 펠렛을 Hanks' Balanced Salts Solution(HBSS)으로 세척, 이 과정을 3회 반복하여 지방 전구세포를 포함한 세포군을 얻었다. 혈구계산기를 이용하여 세포수를 측정한 후 3×10^4 cells/cm²의 밀도로 petri dish에 접종하고 20% 소태아 혈청, 2mM 초산, 100U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함한 Medium 199 Hepes Modification(M199) 배양액에서 배양하였다. 배양조건을 3

7℃, 5% CO₂로 하고 배지는 2일 간격으로 교환하였다.

라. 지방전구세포의 배양

세포배양용 배지로 M199와 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham(DMEM/F-12), 분화유도제인 insulin, triiodothyronine, dexamethasone 및 lipid는 Sigma 제품을 사용하였다. 효소활성 측정의 기질로 사용된 NADH 및 dihydroxyacetone phosphate는 Sigma로부터 구입하였고 기타 시약은 조직배양용을 사용하였다.

2. (시험1) 호르몬이 한우지방전구세포의 증식에 미치는 영향

가. 공시동물

고급육 사양체계에 의해 사육된 24개월령 이상된 거세한우를 이용하여 복부 지방조직을 채취하였고 6~7번째 늑골부분의 등심을 제거하여 이 부분에서 피하, 근간, 근내 지방조직을 채취하였다.

나. 지방세포의 회수

확립된 지방세포배양체계에 준하여 지방조직 및 지방세포를 준비하였다.

다. 지방전구세포의 배양

세포배양용 배지는 M199를 증진 영향 호르몬은 IGF-1과 Estradiol 17-β을 사용하였다. 세포의 증식측정은 현미경을 이용한 direct counting 방법과 DNA 함량을 측정하였다.

라. 통계분석

모든 자료는 SAS(1997)의 GLM procedure를 이용하여 분산 분석을 실시하였고, 유의성 검정은 Duncan's Multiple range test로 처리하였다.

3. (시험 2) 호르몬이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향

가. 공시동물

시험 1과 동일

나. 지방전구세포의 회수 및 배양

시험 1과 동일

다. 지방전구세포의 분화

증식배양액에서 10일간 배양후 항생제가 첨가된 DMEM/F-12에 2ng/ml의 insulin과 2nM T3, 10nM Dexmethasone, 0.5mM MIX(Methylisoxanthine), 1% lipids가 첨가된 것을 분화유도배양액으로 하여 Confluence된 지방전구세포를 48시간 처리한 후, Dexamethasone과 MIX를 제외한 분화유도제가 첨가된 것을 분화 배양액으로 사용하였다. 또한 insulin, T3 및 Dexamethasone이 분화에 미치는 효과를 보기 위해 기본 분화 배양액에 첨가하였다.

Dexamethasone은 50% ethanol, MIX는 pH 9로 조정된 생리적 식염수에 용해시켰고, 분화기간은 분화유도일을 0일로 하여 12일간 배양하였으며 분화배양액은 3-4일마다 교환하였다. 지방세포의 분화는 현미경을 통한 형태학적 방법과 생화학적 지표인 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)활성 측정으로 평가되었다.

라. GPDH 효소활성 측정

분화유도가 끝난 뒤 petri dish의 배양액을 제거하고 인산완충생리식염수로 3회 세척한 후 0.5ml의 0.5%v/v Triton X-100이 함유된 0.1M Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)을 첨가하여 물리적인 힘을 가해 petri dish 바닥의 세포를 eppendorff tube에 옮기고 Potter-Elvehjem Homogenizer로 세포막을 파괴하였다. 세포내용물이 완전히 용출되도록 wheel mixer로 낮은 온도에서 교반한 후 최종적으로 14,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 회수한 후 별도의 eppendorff tube에 옮겨 즉시 GPDH 활성을 측정하였다. 효소 활성은 37℃에서 기질용액과 NADH를 첨가하여 분광 광도계의 흡광도 340nm에서 1분당 생산되는 NAD의 생산량으로 측정하였다. 즉, 분광 광도계의 흡광도는 340nm에 맞추고 0.1M Tris-HCl(pH 7.5), 2.5mM EDTA, 0.1mM β -mercaptoethanol, 12 μ M β

-NADH, 100 μ l의 시료를 cuvette에 넣고 반응이 일어나지 않음을 확인 후 20mM dihydroxyacetone phosphate를 넣어 흡광도 변화를 3분간 기록하였다.

마. 단백질 측정

단백질은 Bio-Rad protein assay Kit를 사용하여 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 정량하였다(Bradford, 1976).

4. (시험 3) 비타민 및 광물질이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향

가. 공시동물

시험1과 동일.

나. 지방전구세포의 회수 및 배양

시험 1과 동일

다. 지방전구세포의 분화

Confluence된 지방전구세포에 분화 배양액을 48시간 처리한 후 각종 영양소, 수용성 vitamin(Vit. C, Biotin, Pantothenic acid), 지용성 vitamine (Vit. A)의 분화에 미치는 효과를 보기 위해 배양액에 첨가하였다.

Dexamethasone은 50% ethanol에 MIX는 pH 9로 조정된 생리적 식염수에 용해시켰고, 각 영양소의 농도는 초산 2mM, vitamin C 50 μ M, Biotin 10 μ M, Pantothenic acid 100 μ M 수준으로 첨가하였다.

수용성 비타민의 경우, 증류수에 녹여 여과 멸균하였으며, 지용성 비타민은 100% ethanol에 용해시켜 첨가하였다. 이때 첨가된 ethanol의 양은 세포대사에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

분화 유도기간은 분화 유도일을 0일로 하여 12일간 배양하였으며 분화배양액은 3-4일마다 교환하였다.

라. GPDH 활성측정

시험 2과 동일

마. 단백질 측정

시험 2과 동일

5. (시험 4) 탄소원과 호르몬처리에 따른 지방조직의 지방생합성 및 분해에 관한 연구

가. 공시동물

시험 1와 동일

나. 지방조직의 회수

시험 1와 동일

다. 지방조직절편

회수된 지방조직을 2mM 초산, 25mM HEPES, 0.1% glucose이 첨가된 KRB 용액에서 혈관과 Collagen을 제거한 뒤 일정하고 균일한 크기로 세절하였다. 세절된 지방조직은 KRB로 2회 세척한 후 항생제가 첨가된 M199에서 24시간동안 안정화하였다.

라. 지방세포의 크기 측정

각 부위별 세절된 지방조직 150-200mg을 15ml falcon tube에 넣고 37℃의 0.9% 생리적 식염수로 지방절편을 rinse하고 3ml의 50mM collidine-HCl 완충액 (pH 7.4)와 5ml의 3% osmium tetroxide를 넣고 72-96시간 동안 지방세포를 고정시켰다. osmium:collidine 완충액을 제거하고, 10ml의 0.9% 생리식염수를 넣어 24시간 동안 정치시킨 후 생리식염수를 제거하고 10ml의 8M urea 용액을 넣어 24~48시간 처리하였다. 250 μ m nylon mesh를 통과해서 나온 지방세포를 한번 더 20 μ m mesh로 여과하여 여과되지 않은 지방세포를 0.01% Triton X-100(pH 10), 0.01% Triton X-100:0.9% 생리식염수 (pH 10)로 rinse하였다. 지방세포의 크기는 Coulter Counter(Coulter Multisizer II)에서 560 μ m aperture를 사용하여 측정하였다.

마. 지방산, 당, 아미노산의 지방조직내 유입을 측정

피하 및 근내 지방조직을 세절한 후 약 50-100mg의 지방조직을 각각 0.25 μ Ci의 [$1-^{14}$ C]acetate, [$1-^{14}$ C]glucose, [$U-^{14}$ C]leucine, [$U-^{14}$ C]isoleucine, [$U-^{14}$ C] keto-isocaproic acid가 첨가된 2.5ml의 M199 배양액에 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 2시간 배양 후 지방조직을 꺼내어 수분을 제거하고, 무게를 정량한 조직을 6ml의 cocktail solution이 들어있는 vial에 넣고 liquid scintillation counter를 사용하여 방사능(Radioactivity)을 측정한 후 지방세포로 흡수된 acetate, glucose, leucine, isoleucine, keto-isocaproic acid의 양을 산출하여 지방산 생합성 능력을 결정하였다.

바. Insulin과 IGF-1첨가에 의한 지방조직내 유입을 측정

각 부위별 지방조직을 세절한 후 약 50-100mg의 지방조직을 insulin과 IGF-1이 첨가된 M199의 24-well plate에 넣고 2일간 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 배양하였다. 그 후 0.25 μ Ci의 [$1-^{14}$ C] acetate 또는 0.25 μ Ci의 [$U-^{14}$ C]glucose가 첨가된 2.5ml의 M199 배양액에 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 2시간 배양 후 지방조직을 꺼내어 수분을 제거하고, 무게를 정량한 조직을 6ml의 cocktail solution이 들어 있는 vial에 넣고 liquid scintillation counter를 사용하여 방사능을 측정하였다.

사. Insulin과 Norepinephrine첨가에 의한 초산과 glucose의 지방생합성능 측정

세절된 지방조직을 insulin(2 μ g/ml)과 Norepinephrine(100 μ M)이 첨가된 M199에서 2일 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 배양하였다. 배양 후 1 μ Ci의 [$U-^{14}$ C]acetate 또는 1 μ Ci의 [$U-^{14}$ C] glucose를 함유하는 2.5ml의 M199 배양액에 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 3시간 배양하였다. 지방조직을 꺼내어 수분을 제거하고, 나머지 조직은 시험 3의 “다”의 지방합성능 측정과 동일한 방법으로 수행하였다.

아. 지방조직의 지방분해

3% BSA(fat-free)가 첨가된 KRB 2.5ml를 넣은 삼각 플라스크에 지방조직 절편을 약 100mg정도 넣고 37 $^{\circ}$ C 수조에서 3시간 배양한다. KRB에는 insulin, norepinephrine을 각각 2 μ g/ml, 10mM를 첨가하였다. 3시간후 1ml의 시료를 채취한 후 45% Perchloric acid가 담긴 튜브에 넣어 지방분해 작용을 정지시켰다. 시료는 2500rpm에서 15분 원심분리하였으며, 원심분리된 상층액은 5M KOH와 포

화 KHCO_3 가 담긴 튜브에 옮겨 중화시키고 2500rpm에서 15분간 재원심분리하였고 상층액을 취하여 지방분해 산물인 Glycerol을 측정하였다.

자. Glycerol 분석

30 μl 의 시료와 200 μl 의 분석 완충액(0.25M Triethanolamine, pH 7.5, 2mg/ml NAD, 5mg/ml ATP, pH 7.5, 1M MgCl_2 , 10% Triton X-100 1mg/ml diaphorase, 10mg/ml GPDH, MTT), 50 μl 의 1:125 Glycerokinase를 혼합 후 45분간 암실에서 반응시키고 600nm에서 비색 측정하였다.

차. 지방추출(Folch extraction)

지방조직절편 약 100mg을 1N HCl이 두방울 첨가된 1:1 Chloroform:methanol(1:1) 8ml에 24시간 정치하였다. 6ml의 chloroform을 첨가하고 최소 2시간 정치한 후, 0.88% KCl을 4ml 넣고 밤새 정치하였다. 2개의 층으로 분리가 되면 상층액을 제거하고 upper phase로 세척한 후 다시 제거하였다. 하층액을 증발기로 증발시키고 chloroform에 다시 용해시켰다. 새용기로 옮긴 후 65°C hot plate에서 chloroform을 증발, 냉각시킨 후 굳어진 지방무게를 측정하였다

6. (시험 5) 호르몬 및 성장단계에 따른 면양지방전구세포 분화

가. 공시동물

Finn×Dorset-horn양이 공시되었다. 포유면양은 1개월령으로 어미양과 함께 사육되었고 거세숫양은 6~8개월령이었다. 4~6년된 어미양이 임신 115일령일때 태아면양을 적출하였다. 면양의 체중에 따라 10~30ml의 pentobarbital로 마취시켜 방혈한 후 피하지방조직은 옆구리에서 채취하였고, 복부 및 신지방조직은 개복 후 무균적으로 채취하였다.

나. 지방전구세포의 회수 및 배양

시험1과 동일

다. 지방전구세포의 분화

지방전구세포가 dish바닥에 Confluence되었을때 분화유도 배양액으로 교환

하였다. penicillin과 streptomycin이 첨가된 DMEM/F-12배양액에 insulin(5ng/ml)과 T₃ (Triiodothyronine), 2nM이 첨가된 것을 기본 분화 유도배양액로 하여, 각각 Excyte(지질) 1%, BRL 49653(100nM), Dexamethasone(10nM), 초산(2mM), fibroblast growth factor(FGF)(100ng/ml), GH(45ng/ml)을 첨가하였다. 분화기간은 10일로 하고 5일에 1회 배양액을 교환하였다.

라. GPDH 활성측정

시험 2와 동일

마. 단백질 측정

시험 2와 동일

7. (시험 6) 한우의 비육과정에 있어서 혈중 insulin 농도와 도체형질과의 상관

가. 공시동물

13개월령(평균체중 310.2kg) 한우 거세우 14두를 공시동물로 이용하였다.

나. 시험 사료 및 급여

농후사료는 축산기술연구소 사료공장에서 Table 1에 나타난 바와 같이 배합하여 제조한 사료를 이용하였으며, 조사료로는 볏짚을 이용하였다. 농후사료와 볏짚의 영양소 함량은 Table 2와 같다.

Table 1. Ingredient composition of experimental concentrates¹⁾ for fattening period (% , as fed basis)

Ingredients	Finisher I	Finisher II
Corn, ground	32.99	49.77
Wheat, ground	25.00	20.00
Corn gluten feed	-	1.04
Wheat bran	15.00	17.03
Tapioca	9.00	-
Alfalfa	1.00	-
Soybean meal	-	0.60
Cottonseed meal	3.64	-
Rapeseed meal	4.04	5.00
Tallow	0.40	-
Cane molasses	7.00	5.00
Limestone	1.32	1.04
Salt, suncured	0.40	0.40
Sodium bicarbonate	0.12	0.12
Mineral premix ²⁾	0.10	0.10

¹⁾Finisher I, concentrate for the early fattening stage (13~18 month of age);
Finisher II, concentrate for the late fattening stage (19~24 month of age).

²⁾Per : K, 0.08%; S, 0.05%; Fe, 30ppm; Zn, 50ppm; Mn, 40ppm; Cu, 10ppm; Co 0.5ppm; I, 0.53ppm; Se, 0.13ppm; Mg, 0.03%.

Table 2. Chemical composition of experimental feeds (% , as fed basis)

Components	Concentrates ¹⁾		Roughage
	Finisher I	Finisher II	Rice straw
Moisture	14.77	14.31	16.29
Crude protein	11.98	11.10	4.62
Ether extract	2.19	2.50	0.82
Crude fiber	3.97	3.95	26.86
Crude ash	4.87	3.49	11.16
NFE ¹⁾	62.22	64.66	40.25
Ca	0.79	0.36	0.79
P	0.35	0.34	0.35

¹⁾Nitrogen-free extracts.

다. 시험축 사양관리

시험축은 pen(6.3×12m)당 7두씩 군사시켰으며 배합사료는 사료개체급여기(Kalan)가 설치된 개방식 우사에서 급여하되 그 급여량과 단백질 및 에너지가는 성장단계별로 구분하여 비육전기(13~18개월령)에는 체중의 1.7~1.8%(CP 12%, TDN 72%)를 급여하였으며, 비육후기(19~24개월령)에는 자유채식량(CP 11%, TDN 74%)을 1일 2회로 나누어 급여하였다. 조사료인 볏짚과 물 및 미네랄 블록은 전 사양기간 동안 자유채식토록 하였다.

라. 시험 설계

한우 거세우 14두에 대한 비육기간 동안의 혈액성분의 변화와 비육전기, 비육후기 및 전 비육기간에 걸친 평균치 그리고 비육종료시(24개월령)의 혈액성분과 도체성적 간의 상관을 조사하였다.

마. 조사항목 및 조사방법

1) 체중 및 사료섭취량

체중은 시험 개시시부터 종료시 까지 15일 간격으로 측정하였으며, 사료섭취량은 매일 아침 잔량을 측정하는 방법으로 조사하였다.

2) 시험 사료의 영양소 함량

시험 사료의 일반성분과 Ca 및 P함량은 AOAC법(1990)에 준하여 분석하였다.

3) 도체특성 조사

사양시험이 종료된 후 시험축을 24시간 절식시킨 다음 축산기술연구소 육가공장으로 운반하여 도축하였다. 소도체의 육량 및 육질은 소도체등급 기준 개정안(농림부 고시, 1997-66호, 1997. 11)에 준하여 평가하였다. 도체특성은 좌냉도체의 제13늑골(肋骨)과 제1요추(腰椎) 사이를 직각으로 절개하여 배최장근단면적(背最腸筋斷面積)과 근내지방도, 육색, 지방색, 조직감 및 성숙도를 측정하였으며 등지방두께는 절개한 단면의 정중앙에서 피하쪽의 지방두께를 측정하였다.

4) 혈액성상

14개월령부터 출하시기인 24개월령까지 2개월 간격으로 소의 경정맥에서 진공채혈관을 이용하여 채혈하였고 채혈시간은 아침사료 급여 후 2시간(오전 11시)에 실시하였다. 채혈 후 실온에서 2시간 정치 후 3,500rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청과 혈장을 분리하였다. 분리한 혈청은 -70°C 의 초저온냉동고에 보관한 후 분석에 이용하였다.

혈청 glucose는 혈액분석 kit(Glucose HK Reagent, Chiron Diagnostics Co., USA)로 혈액자동분석기(Express Plus, Ciba Corning Diagnostics Corp., USA)를 이용하여 분석하였으며 혈청 유리지방산(NEFA)은 Spectrophotometer (Spectronic 601, Milton-roy Co., USA)로 파장 540nm와 555nm에서 측정하였다. 또한 혈청 insulin은 효소법에 준하여 ELISA Reader(ELP-40, Bio-Tek Instruments, France)로 측정하였다.

5) 통계분석

시험결과에 대한 통계분석은 SAS(Cary, NC., 1997)의 procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하였다. 또한 각 도체성적과 혈액성분간의 상관계수는 Pearsons법에 의하여 구하였다.

8. (시험 7) 반추위내 propionate 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향

가. 공시동물

반추위내 fistular가 부착된 13개월령의 평균체중이 269.7kg인 한우 거세우 4두를 공시동물로 이용하였다.

나. 시험사료 및 급여

농후사료와 볏짚을 각각 5:5의 비율로 하여 체중의 1.5%에 해당하는 양의 사료(NRC, 1996 기준 요구량의 80%)를 오전 10시와 오후 5시에 동량으로 나누어 급여하였다. 또한 농후사료는 Table 3에 나타난 바와 같이 축산기술연구소 사료공장에서 배합하여 제조한 사료를 이용하였으며, 농후사료와 볏짚의 영양소

함량은 Table 4와 같다.

Table 3. Ingredient composition of experimental concentrate mixture (as fed basis)

Ingredients	Composition (%)
Yellow Corn	55.0
Wheat bran	23.0
Soybean meal	20.0
NaCl	0.7
Limestone	0.5
Tricalcium phosphate	0.5
Vitamin and mineral mixture*	0.3

*Per kg : Vitamin A, 6,000IU; Vitamin D₃, 1,022IU; K, 0.08%; S, 0.05%; Mg, 0.03%; Zn, 50ppm; Mn, 40ppm; Fe, 30ppm; Cu, 10ppm; Co, 0.5ppm; I, 0.53ppm; Se, 0.13ppm.

Table 4. Chemical composition of experimental feeds

Item	Crude protein	Ether extract	Crude fiber	NFE	NDF ¹⁾	ADF ²⁾
Concentrates	20.94	3.59	6.42	62.18	48.10	9.07
Rice straw	5.72	1.15	36.31	44.70	80.48	52.50

¹⁾NDF : Neutral detergent fiber.

²⁾ADF : Acid detergent fiber.

다. 경정맥 catheter 장착

Catheter 시술 스트레스(stress)에 의한 혈액 정상 변화를 배제하기 위하여 혈액 시료 채취 1일 전에 경정맥 catheter를 장착하였다.

라. 시험 설계

시험설계는 각각 대조구, propionate 0.5M 주입구, 1.0M 주입구 및 1.5M 주입구 4처리로 하여 4×4 Latin square design에 의하여 실시하였다.

마. 시험방법

1) 주입용액의 제조

물 1ℓ에 propionate 37, 74 및 111g을 용해하여 0.5, 1.0 및 1.5M propionate 용액을 조제하였으며 propionate 주입으로 인한 급격한 pH 저하를 막기 위하여 KOH와 NaOH로 pH 7.0으로 보정하여 이용하였다.

2) Propionate 용액의 반추위 주입

오전 사료급여 3시간 후(오후 1시)부터 peristaltic pump(505S, Watson-Mallow Ltd., UK)를 이용하여 1시간 동안 반추위 fistular를 통해 5일간 주입하였고, 마지막 5일째에 반추위액과 혈액을 채취하였다. 또한 다음 주입까지는 3일의 비 주입기간을 두었다.

3) 시료 채취

가) 반추위액 채취

반추위 fistular를 통하여 propionate용액 주입 직전과 주입 후 60, 120, 180 및 300분에 위액을 채취하였다.

나) 혈액 채취

하루 전에 장착한 경정맥 catheter를 이용하여 propionate 용액 주입 직전과 주입 후 30, 60, 90, 120, 180 및 300분에 혈액을 채취하여 분석에 이용하였다.

바. 분석항목 및 방법

1) 사료의 영양소 함량

사료의 일반성분은 시험6과 동일한 방법으로 분석하였고 ADF 및 NDF의 분석은 Van Soest방법(1982)으로 분석하였다.

2) 반추위액

채취한 위액을 8겹의 cheese cloth로 여과하여 사료입자를 제거한 후 pH meter(Model 920A, Orion Research Inc., USA)를 이용하여 채취 즉시 pH를 측정하였다. 휘발성지방산 함량 측정은 반추위액 100ml 당 HgCl₂ 2ml를 첨가하여

미생물 활성을 억제시키고 25% metaphosphoric acid 용액 20ml(Erwin, 1961)와 internal standard로 pivalic acid 0.5ml(Czerkawski, 1976)를 첨가하여 잘 흔든 다음 4℃에서 30분간 정치한 후 3,000rpm으로 약 30분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후 Gas Chromatography(VISTA 6000, Varian Associates Inc., USA)를 사용하여 분석하였다.

3) 혈액 분석

채취한 혈액은 약 1시간 동안 4℃에서 정치시킨 후 3,500rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리, 시험 6과 동일한 방법으로 혈청 glucose, insulin 및 NEFA 농도를 분석하였다. 또한 항응고제로 EDTA를 첨가한 혈액에서 혈장을 분리하여 이중항체법으로 Gamma-counter(Hewlett packard, USA)를 이용 혈장 glucagon 농도를 분석하였다.

사. 통계분석

시험결과에 대한 통계분석은 시험6과 같은 방법으로 각 첨가구별 유의성 검정을 실시하였다.

9. (시험 8) 한우 거세우 경정맥 glucose 주입에 의한 혈중 대사 물질 변화

가. 공시동물

경정맥 catheter가 장착된 거세 수송아지 3두(평균체중 300kg)를 공시하여 실시하였다.

나. 사료급여

시험기간동안 급여한 사료는 같은 양의 농후사료와 볏짚을 체중의 1.3%로 오전과 오후로 나누어 급여하였다.

다. 시험설계

0, 50, 100mg glucose/BW kg 세 처리구로하여 3×3 Latin Square Design 으로 수행하였다.

라. 조사항목 및 방법

1) Glucose 주입

오전 사료 급여전 각각 0, 50, 100mg/kg의 glucose를 경정맥 catheter를 통하여 동시 주입하였다.

2) 혈액 채취 및 성분분석

혈액은 주입직전과 주입 후 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120분에 경정맥 catheter를 통하여 채취하였다. 채혈 후 실온에서 2시간 정치한 후 3,500rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 혈청대사 물질을 분석하기 위하여 -70℃에 보관한 후 시험 6 및 7과 같은 방법으로 glucose, insulin, glucagon 및 NEFA를 분석하였다.

10. (시험 9) 가축사료원료의 발효시간별 VFA 농도 변화

가. 공시동물

반추위 fistular가 장착된 한우 1두를 실험동물로 공시하여 반추위액을 채취하였다.

나. 시험사료

에너지사료, 단백질사료 및 조사료원 18종

다. 조사항목 및 방법

아침사료 급여 3시간후에 반추위 캐놀라를 통하여 반추위액을 채취하여 8 겹의 cheese cloth로 거른 후 McDougall's 완충액과 1:1로 혼합하여 총 70ml를 배양액으로 하였다. 시험사료로 밀, 보리, 수수, 소맥피, 옥수수, 타피오카, 옥글루텐, 대두박, 야자박, 채종박, 단백질, 팥박, 면실박, 볏짚, 알팔파큐브 알팔파펠렛, 비트펄프 및 옥수수사일리지를 첨가하여 5시간을 배양한 후 채취하여 시험 7과 같은 방법으로 휘발성지방산을 분석하였다

11. (시험 10) Acetate 및 propionate 급여가 혈중 glucose 및 insulin 농도에 미치는 영향

가. 공시동물

반추위 fistular가 장착된 한우 거세우 3두

나. 지방합성 유도물질

Sodium Acetate, Sodium Propionate

다. 시험설계

본 시험은 다음과 같이 각 처리기간 7일로 구성된 3×3 Latin square design에 의하여 실시하였다.

Items	Treatments
Control	Rice straw + Concentrate (2:8) + NaCl 80.5g
Sodium acetate	Rice straw + Concentrate (2:8) + Sodium Acetate 128g
Sodium propionate	Rice straw + Concentrate (2:8) + Sodium Propionate 128g

라. 사료급여 및 시료채취

사료는 체중의 약 1.8%에 해당하는 양을 오전 9시와 오후 5시 동량으로 2회에 나누어 급여하였으며, 첨가제는 오전 사료 급여시에 농후사료와 혼합하여 전량급여 하였다. 각 시험기간의 6일째 되는 날 반추위액은 오전사료 급여 직전과 급여 후 1, 2, 3, 5와 7시간에 채취하였으며, 혈액은 시험 마지막인 7일째에 오전 사료급여 전 30과 10분 그리고 사료급여 후 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210과 240분에 시험 전에 설치한 경정맥 catheter를 통해 채취하였다.

마. 분석항목 및 방법

1) 반추위액

시험 7과 동일한 방법으로 pH와 휘발성지방산을 분석하였다.

2) 혈액 분석

시험 7과 동일한 방법으로 혈중 glucose, insulin, glucagon 및 NEFA의 농도를 분석하였다.

12. (시험 11) 한우 4위내 탄수화물 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향

가. 공시동물

4위 cannular가 장착된 20개월령의 평균체중 304.kg인 한우 거세우 4두를 공시하였다.

나. 시험 사료 및 급여

소장에 유입되는 사료탄수화물 양을 최소화하기 위해 체중의 약 1.5%에 해당하는 건초(5kg, as fed basis)만을 동량으로 나누어 오전 9시와 오후 6시에 2회로 나누어 급여하였다. 건초의 영양소 함량은 Table 5와 같다.

Table 5. Chemical composition of hay

Item	Crude protein	Ether extract	Crude fiber	NFE ¹⁾	NDF ²⁾	ADF ³⁾	GE ⁴⁾ (kcal/kg)
	DM, %						
Hay	13.26	2.43	32.75	42.19	75.01	38.64	4,564

¹⁾NFE : Nitrogen-free extracts.

²⁾NDF : Neutral detergent fiber.

³⁾ADF : Acid detergent fiber.

⁴⁾GE : Gross energy.

다. 경정맥 catheter 장착

Catherter 시술 스트레스(stress)에 의한 혈액 정상 변화를 배제하기 위하여 혈액 시료 채취 1일 전에 경정맥을 통하여 catheter를 장착하였다.

라. 시험설계

시험설계는 각각 대조구, glucose 주입구, starch 주입구, molasses 주입구로 4처리구로 하여 4×4 Latin square design에 의하여 실시하였다.

마. 시험방법

1) 탄수화물 주입용액 제조

제4위로 주입되는 용액은 glucose와 corn starch, molasses 각각의 NFE 값을 계산(Table 6)하여 glucose를 기준으로(30g/h) 4위에 주입되는 탄수화물의 양이 동일하도록 하여 Table 7과 같이 물 2ℓ에 녹여 제조하였다.

Table 6. Chemical compositions of carbohydrate sources

	Moisture	CP	EE	CF	Ash	NFE
	%					
Glucose	8.39	0.14	-	0.21	0.10	90.98
Corn starch	13.25	0.31	-	0.28	0.21	86.13
Molasses	20.51	5.69	1.05	-	10.61	62.14

Table 7. The weights of carbohydrate sources in treatment solutions

Control	Treatments		
Water	Glucose	Corn starch	Molasses
	g in 2ℓ water		
2ℓ	240.0	253.5	351.4

2) 탄수화물의 제4위내 주입

사료급여 2시간 후(오전 11시)부터 peristaltic pump (505S, Watson-Mallow Ltd., UK)를 이용 8시간 동안 30g/h의 속도로 4위 cannula를 통하여 6일간 연속 주입하고 마지막 6일째에 혈액을 채취하였다. 또한 다음 주입기간까지는 3일의 비 주입기간을 두었다.

3) 혈액 채취

경정맥 catheter를 이용 주입 전 30, 15분과 주입 후 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420, 480, 540분에 혈액을 채취하였으며, 채혈 후 혈액을 1시간 동안 실온에 정치한 후 3,500rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장과 혈액을 분리하였다. 분리한 혈장과 혈청은 -70°C 의 초저온 냉동고에 보관한 후 분석에 이용하였다.

바. 분석 항목 및 방법

1) 사료의 영양소 함량

사료의 일반성분과 ADF 및 NDF의 분석은 시험6과 동일한 방법으로 분석하였고 GE(Gross energy)는 Bomb Calorimeter(Parr Instrument Co., USA)를 이용하여 분석하였다.

2) 혈액분석

혈액성분은 시험 6 및 7과 동일한 방법으로 혈청 glucose와 insulin, NEFA(Non-esterified fatty acid) 및 혈장 glucagon을 분석하였다.

사. 통계분석

시험결과에 대한 통계분석은 시험6과 동일한 방법으로 각 첨가구별 유의성 검정을 실시하였다.

13. (시험 12) 한우의 근내지방도 극대화를 위한 비육용 사료 및 사료첨가제 효능 입증

가. 공시동물

24개월령(체중 약 580kg) 한우 거세우 44두를 공시하였다.

나. 시험기간 및 장소

'99년 9~11월 동안 약 3개월간 경기도 양평군 개군한우단지에서 사양시험을 실시하였다.

다. 시험설계

시험설계는 대조구로서 시판 배합사료를 이용하였고 처리1구는 축산기술연구소에서 자체적으로 배합비를 작성하였으며 처리 2와 3구는 시판 배합사료를 섭취케 하면서 비타민 C-EC 첨가제와 축산연 조제 첨가제를 1일 두당 100g씩 별도 급여하였다. 총 12개의 우방을 가지고 처리구당 3개의 우방내에 11두씩 배치하였다.

Table 8. Experimental design

Treatments	Feeds/Additives
Control	Commercial formula feed
Treatment 1	NLRI-formula feed
Treatment 2	Vitamin C-EC
Treatment 3	NLRI-feed additives

라. 시험방법

1) 축산연 사료첨가제 및 사료조제

3년간의 기초연구시험 결과를 바탕으로 지방세포내 지방합성을 촉진시키는 효과가 있다고 인정되는 물질 중에서 glucose, 비타민 2종 및 광물질 2종을 선별하여 bead를 제조한 후 용점 53℃인 시판 보호지방을 용해시켜서 bead에 코팅처리 하여 첨가제를 제조하였다(처리 3구). 처리 1구인 축산기술연구소 자체사료의 경우에는 배합비의 spec.으로서 원료별 propionate 생성 특성을 최대로 활용하면서 프로피온산염을 강화시켰고 지방합성 촉진에 관계하는 아미노산을 최대로 함유케하였으며 반추위 발효성상을 안정적으로 유지하기 위한 발효인덱스 개념을 도입하였다. 또한 유질개선에 가장 적합한 양이온-음이온 균형을 적용시켰고 자체적으로 제조한 첨가제(처리 3구)를 활용하였다.

2) 사료급여 및 체중 측정

배합사료는 자유채식 시키면서 볏짚은 1kg으로 제한급여하였으며 체중은 1개월에 한번씩 측정하였다.

3) 도체특성 조사

사양시험이 종료된 후 시험축을 경기도 이천 소재 도축장에서 계류후 도살하였으며 소 도체의 육량 및 육질은 소도체등급기준 개정안(농림부 고시, 1996-66호, 1997. 11)에 준하여 평가하였다.

4) 고기의 화학적 조성

발골시 6~7 늑골부위의 등심 1kg을 채취하여 Chroma meter(Minolta Co. CR 301)로 Hunter Value L, a, b를 측정한 후 시료의 일반성분과(A.O.A.C, 1990) 아미노산 및 지방산함량(Morrison과 Smith, 1964)을 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 지방세포 배양체계 확립

지방채취를 위해 공시되었던 한우의 평균체중은 약 554kg 이었다. 세포배양을 위한 조직시료는 채취의 단계에서 오염에 주의해야 하는데, 미생물에 오염된 시료는 배양 초기부터 기대하는 효과를 볼 수 없을뿐더러 기타 다른 시료에도 영향을 미치므로 시료채취에 소요되는 모든 도구를 멸균된 것으로 사용하였고 생체로부터 분리된 조직을 체외에서 받는 환경변화에 의한 stress를 줄이기 위해 빠른 시간내에 최적의 체외배양 조건을 맞추어 주었다.

지방전구세포의 회수시 포함되는 혈구세포 및 다른 세포의 혼입을 줄이고 조직내 콜라겐을 제거하여 collagenase의 소화를 돕기 위해 채취된 지방조직을 잘게 세절하였다. 최대의 지방전구세포 세포를 얻기 위해서는 시료의 양과 collagenase의 농도, 소화시간 및 온도를 잘 맞추어야 하는데 본 연구에서는 약 12~15g의 시료를 0.1~0.15% collagenase 용액에 넣어 약 37°C에서 60~90분간 소화시키는 것이 회수율과 지방전구 세포의 안정성에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

일단 회수된 지방전구 세포는 collagenase 용액을 제거하기 위해 3회 HBSS 로 세척하였고 세척된 지방전구 세포는 3×10^4 cells/cm²로 세포수를 조정하여

M199+20% FCS 배양액에 넣고, 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양했다. 시료가 지방세포이므로 처리기간 동안 온도가 낮아지면 세포내 지방이 굳어져 전체조직과 세포가 경화되어 처리 및 회수가 어려워지므로 모든 체외처리 단계에서 37℃를 유지하였다. 일단 배양에 들어가면 2일 간격으로 생존과 증식에 필요한 영양분을 공급하고 대사노폐물을 제거하기 위해 HBSS로 2회 세척하고 새로운 M199 +20% FCS로 교환하였다. Fig. 3과 같이 지방세포는 Fibroblast의 형태를 하고 있으며 배양 3일째부터 급속히 증식하여 배양 후 7일 정도가 지나면 세포의 증식이 거의 이루어져 petri dish 바닥내에 confluent가 형성되어, 지방세포에 적당한 배양체계를 확보하였으며 이 상태의 세포를 사용하여 분화유도 실험을 하였다.

2. (시험 1) 호르몬이 한우지방전구세포의 증식에 미치는 영향

지방조직 부위를 복부, 피하, 근간, 근내로 달리하여 배양기간 동안의 세포수 변화를 측정한 결과는 Table 9, 10, 11, 12에 나타나 있다. 지방조직 부위에 관계없이 배양기간이 경과함에 따라 세포수가 급증하였으며 세포수가 2배로 증가하는 시기는 배양 약 4일째로 판단되었다.

일반적으로 인간의 지방세포수가 2배로 증가되는 시기는 35~45시간으로 보고되고 있는 반면 (Van, 1985), 한우 지방세포의 초기증식속도는 이 보다 훨씬 늦은 것으로 밝혀졌다. 또한 배양 7일째부터 IGF-1 처리구는 무처리에 비해 다소 높은 증식속도를 보였으나 estradiol은 오히려 증식에 역효과를 보였다. 현미경학적 관찰에 의하면 지방조직 부위에 관계없이 배양 11일째 confluent layer가 형성되는 것으로 보인다. 한편 근내지방의 S.V세포가 다른 지방조직의 세포에 비해 높은 증식현상을 보였는데, 이는 일반적으로 지방조직의 지방축적순서에 있어 근내지방이 가장 늦는 것으로 미루어 보아 근내 지방세포내 미분화된 세포의 활성이 다른 부위에 비해 높기 때문인 것으로 사료된다.

DNA 농도측정을 통해 지방조직 부위 및 호르몬 첨가에 의한 따른 세포의 증식 현상을 관찰한 결과는 Fig. 1, 2에 나타난 바와 같이 배양기간이 증가함에 따라 DNA함량이 증가하였다. 지방조직간에는 근간지방이 배양 9일까지 가장 높은 경향을 보였으며 다음으로 근내지방이 뒤따랐다. 호르몬 투여에 의한 효과는 세포수 변화와 유사하게 IGF-1 처리가 무처리에 비해 높았던 반면 Estradiol은 오

히려 저해효과를 나타냈는데 사람의 경우 Estradiol처리에 의해 세포의 증식이 촉진되었다고 보고된 결과(Roncari와 Van, 1978)로 미루어 보아 본 실험에 사용된 Estradiol의 첨가농도가 실제 생리적 수준보다 훨씬 높았던데 기인되었을 수 있다고 사료된다.

IGF-1처리에서 복부지방전구세포의 수는 배양 20일째부터 높은 수준을 유지하고 있으나 estradiol-17 β 처리구는 배양초기부터 무처리구보다 낮은 경향을 보이다가 24일부터는 유의적으로 낮았다. 호르몬 처리에 의한 증식효과는 배양 13일, 20일과 24일에 나타났다(Table 9).

Table 9. Change of stromal vascular cell number from omental adipose tissue during *in vitro* culture ($\times 10^4$ cells/ml)

Treatment	Days of culture											Day Effect	
	1	3	5	7	9	11	13	16	18	20	24	L	Q
Control	3.23	3.57	9.30	13.33	16.77	30.55 ^{ab}	31.55 ^{ab}	35.10	41.73	44.37 ^{ab}	72.80 ^a	*	NS
IGF-1	2.97	4.4	9.84	18.97	27.37	33.80 ^a	38.60 ^a	41.40	45.00	55.4 ^a	54.30 ^{ab}	**	NS
Estradiol	2.20	4.13	7.80	12.27	14.17	21.25 ^b	24.3 ^b	26.10	34.00	33.4 ^b	41.6 ^b	**	NS
Hormone effect	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	*	*		

* : Significant (P<0.05), ** : Significant (P<0.01), NS : Not Significant.

비록 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 피하지방전구세포에 IGF-1를 첨가했을 때, 세포의 수는 11일부터 다른 처리구에 비해 높았다. 근간지방전구세포 역시 피하지방전구세포와 유사한 결과를 나타냈다. 호르몬 처리에 의한 증식효과는 피하지방전구세포에서는 배양 7일째, 근간지방전구세포는 11일에 나타났다 (Table 10, 11).

Table 10. Change of stromal vascular cell number from subcutaneous adipose tissue during *in vitro* culture ($\times 10^4$ cells/ml)

Treatment	Days of culture											Day Effect	
	1	3	5	7	9	11	13	16	18	20	24	L	Q
Control	3.30	3.80	8.80	12.30	22.00	26.25	25.15	41.55	57.93	57.80	59.90	*	NS
IGF-1	2.00	3.43	9.07	16.60	21.47	34.9	40.50	42.8	45.3	60.30	76.40	*	NS
Estradiol	1.93	3.37	8.20	11.13	19.07	22.4	25.60	28.1	45.3	46.30	61.60	**	*
Hormone effect	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

* : Significant (P<0.05), ** : Significant (P<0.01), NS : Not Significant.

Table 11. Change of stromal vascular cell number from intermuscular adipose tissue during *in vitro* culture ($\times 10^4$ cells/ml)

Treatment	Days of culture											Day Effect	
	1	3	5	7	9	11	13	16	18	20	24	L	Q
Control	2.07	2.90	7.63	10.30	16.73	22.30 ^p	28.85	31.50	35.10	39.53	60.35	NS	NS
IGF-1	2.07	3.63	8.37	15.47	17.63	36.30 ^a	43.80	43.80	55.00	55.10	56.00	**	NS
Estradiol	2.13	2.50	6.47	9.30	13.77	17.65 ^p	29.00	31.50	38.8	32.50	35.00	**	NS
Hormone effect	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS		

* : Significant (P<0.05), ** : Significant (P<0.01), NS : Not Significant,

IGF-1를 처리한 근내지방 전구세포의 수는 무첨가구와 유의적으로 다르지 않았지만 estradiol-17 β 처리구는 11일과 13일에 유의적으로 낮았다(Table 12).

Robelin (1981)은 근간지방과 내장지방은 성숙체중의 35-45%에서 피하지방은 45-55%에서 증식하기 시작한다고 하였고 Leat (1980)는 근내지방은 생후 13개월령에서부터 나타나기 시작하여 이후 급격히 증가한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 공시된 한우는 24개월령으로 이미 근내지방이 왕성하게 자라는 시

기로 다른 지방조직에 비해 매우 높은 증식속도를 나타내었다. 지방조직간 지방 전구세포의 증식속도는 지방조직 고유의 발달특성을 나타내었다.

성장호르몬이 조직간 차별적으로 높게 나타낼수 있는 체내환경에서부터 분리된 지방전구세포가 동일한 체외환경에서도 다른 증식속도를 나타내는 것으로 보아 지방조직간 증식속도의 차이는 조직부위간 유전적 요인에 관련된 특성으로 추측된다.

Table 12. Change of stromal vascular cell number from intramuscular adipose tissue during *in vitro* culture ($\times 10^4$ cells/ml)

Treatment	Days of culture											Day Effect	
	1	3	5	7	9	11	13	16	18	+20	24	L	Q
Control	3.40	3.20	7.37	14.47	23.03	33.50	45.65	49.25	49.00	57.43	86.25	*	NS
IGF-1	3.05	4.43	9.11	12.60	22.43	39.30	45.60	56.00	59.00	70.10	90.80	**	NS
Estradiol	3.40	4.87	7.73	11.43	19.33	21.55	27.05	45.50	52.50	72.40		NS	**
Hormone effect	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS		

* : Significant (P<0.05), ** : Significant (P<0.01), NS : Not Significant

본 연구의 결과는 IGF-1을 배양액내 100nM 첨가한 것으로 IGF-1의 지방전구세포 증식촉진 효과는 다른 결과에서도 유사하게 나타난다.

IGF-1은 3T3 지방전구세포주(cell line)에서도 mitogenic 효과가 있고 Ob17 지방전구세포주(cell line)와 흰쥐 지방전구세포의 증식과 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 또한 Grimaldi 등 (1983)은 혈청이 첨가되거나 무혈청 배양액에서 돼지의 기저세포분획(stromal-vascular fraction)에서 유래된 세포의 증식과 분화를 유도하였다고 보고하였다. 잘 알려진 IGF의 역할중의 하나는 DNA와 RNA, 단백질 합성 촉진인데 IGF-1은 추진요소(progression factor)로서 세포분열시 세포로 하여금 Go/Gs cell cycle을 통과할 수 있도록 하고 또 다른 성장인자인 PDGF에 대한 효과를 증진시킨다(Stiles et al, 1979). 본 실험의 배양조건에서는 혈청이 20% 함유되어 있으므로 IGF-1의 지방전구세포 증식 촉진 효과는 혈청내 이러한 성장인자에 대한 IGF-1의 효과도 부분적으로 포함될 수 있을 것으로 추측된다. 따라서 지방조직간 발달의 차이는 이러한 국소적으로 분비 자극

되는 성장인자의 Autocrine, paracrine 효과에 의해 나타난다고 추측된다.

지방전구세포의 배양에 estradiol-17 β 을 첨가했을 때 estradiol-17 β 은 지방전구세포의 증식(세포수, DNA함량)을 촉진시키지 못했다. 그러나 Roncari 등(1978)은 생체내 가장 활성이 높은 estrogen 형태인 estradiol-17 β 이 지방세포의 증식을 촉진시켰다고 보고하였고, estradiol-17 β (50ng/ml)을 배양초기부터 첨가했을 때 48시간후 사람복부 지방전구세포의 증식을 유의적으로 증가시켰다고 보고하였다. Roncari 등(1978)의 이러한 결과는 부분적으로 성숙숙시 일부지방조직의 지방세포 증가를 설명할 수도 있다.

본 연구에서는 estradiol-17 β 이 5 μ M 수준으로 첨가됐으며 이러한 고수준의 steroid hormone이 증식에 억제영향을 미쳤을 것으로 추측된다.

호르몬 처리에 따른 총 genomic DNA의 변화는 Fig. 1, 2에 나타나 있다. 배양이 진행될수록 DNA의 양은 세포수와 마찬가지로 증가하였고 이러한 결과는 Deslex 등 (1987)의 흰쥐지방전구세포의 IGF-I효과와도 유사하였다

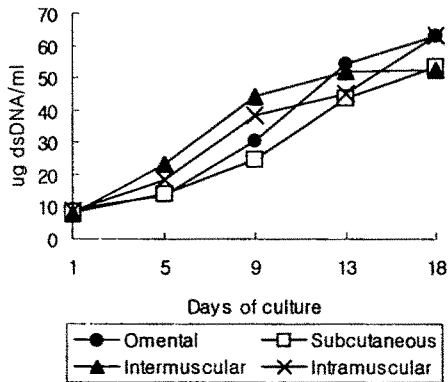


Fig. 1. Change of total genomic DNA of stromal vascular cells from adipose tissue during *in vitro* culture(μ g/ml).

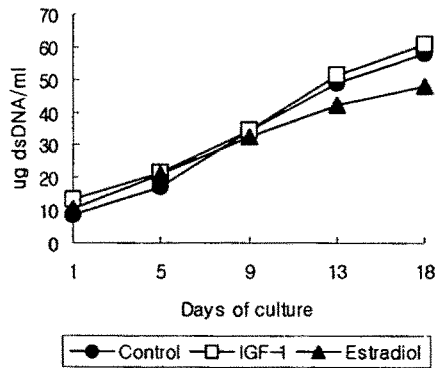


Fig. 2. Effect of hormone on the changes of total genomic DNA of stromal vascular cells from adipose tissue during *in vitro* culture(μ g/ml).

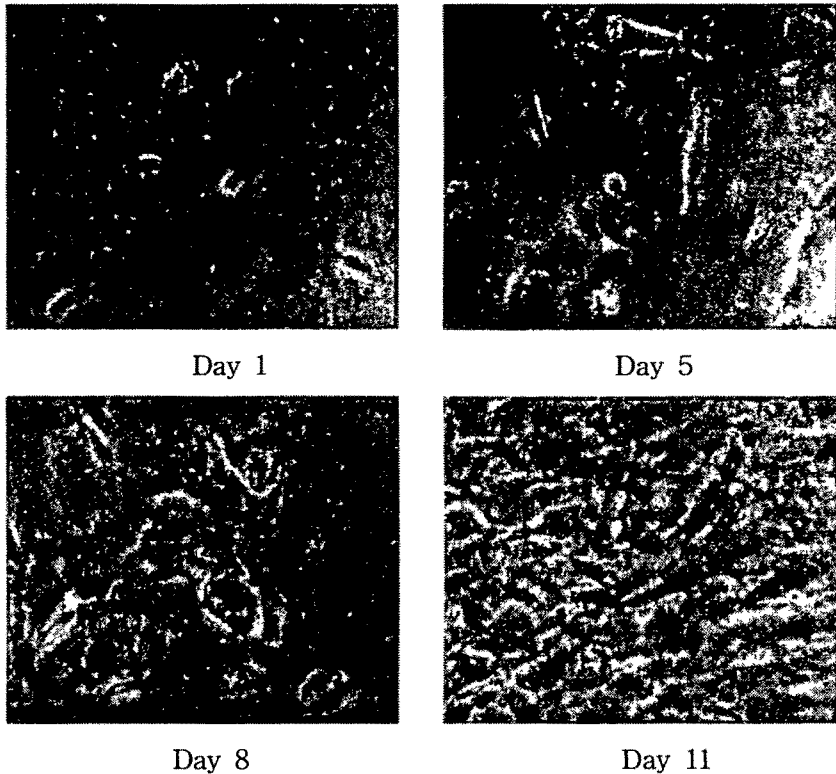


Fig. 3. Proliferation of stromal vascular cells from Hanwoo.

3. (시험 2) 호르몬이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향

지방전구세포는 증식한 후 분화유도 촉진인자의 자극으로 지방생합성과 관련된 효소의 생성과 함께 지방생합성이 이루어져 세포질내에 지방적이 축적되면서 세포는 둥글고 큰 모양으로 변화한다. 성숙 지방세포로의 분화는 현미경을 통한 세포내 지방적 형성의 형태적 관찰과 생화학적 지표인 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)의 활성 측정으로 추정할 수 있다. 지방 세포에 triglyceride가 축적되어지는 즉, 성숙 지방세포로의 분화시기에는 acetyl-CoA carboxylase; fatty acid synthetase, GPDH 등의 지방대사 관련효소 및 여러 종류의 protein 합성이 증가되어진다. 이중 GPDH는 분화의 정도를 측정하는 대표적 지표효소로 이용되고 있으며, 지방세포내에 지방이 축적되기 위해서는

glycerol-3-phosphate는 dihydroxyacetone phosphate로부터 합성되며 이 반응에 GPDH가 관여하게 된다.

분화된 지방세포는 지방적을 축적할 능력을 획득하게 되는데 지방합성의 기질인 초산 또는 지방산이 공급되지 않으면 지방적이 축적되지 않는다고 생각할 수 있다. Table 13은 지방세포가 confluent를 이루었을 때 insulin이 들어있는 DMEM/F-12배양액에 lipid를 첨가 또는 무첨가한 후 14일째에 GPDH 활성을 측정 한 결과로서 lipid를 첨가하지 않은 경우에도 복부 및 근간세포 모두 insulin에 의해 GPDH 활성을 나타냈는데($p < 0.05$), 특히 근간세포의 경우 대조구에 비하여 최고 20배까지 높은 활성을 나타냈으나 피하, 근내세포의 GPDH 활성에는 변화가 없었다. Lipid 첨가구에서 근간세포의 경우 lipid 무첨가구의 근간세포에 비해 5배 정도의 높은 GPDH 활성이 나타났지만 피하와 근내는 lipid를 첨가하더라도 분화 효과는 없었다. 최근 Amri 등(1944)은 지방산이 지방세포 분화를 촉진하는 신호로서 작용한다고 보고한 바 있다.

Table 13. Effect of lipid on the differentiation of peradipocytes from Korean native steers

Treatments		GPDH activity(nmol/min/mg protein)			
		Omental	Subcutaneous	Intermuscular	Intramuscular
control	without lipid	0.08±0.006 ^c	0.08±0.006 ^b	0.09±0.006 ^c	0.08±0.003 ^a
	with lipid	0.08±0.006 ^c	0.08±0.003 ^b	0.09±0.003 ^e	0.07±0.003 ^a
Insulin (0.4mU/ml)	without lipid	1.03±0.088 ^b	0.10±0.006 ^a	1.30±0.058 ^d	0.09±0.006 ^a
	with lipid	1.87±0.088 ^a	0.08±0.006 ^b	5.53±0.133 ^b	0.09±0.003 ^a
Insulin (40mU/ml)	without lipid	1.20±0.116 ^b	0.10±0.006 ^a	1.77±0.067 ^c	0.11±0.025 ^a
	with lipid	2.17±0.186 ^a	0.08±0.004 ^b	9.90±0.208 ^a	0.10±0.006 ^a

^{a,b,c,d,e} Means±standard error(n=3) in the same column with different superscripts are significantly different($P < 0.05$).

Insulin이 작용을 발휘하기 위해서는 먼저 표적 세포막에 존재하는 수용체 단백질에 결합하여 세포내 정보전달의 초기화를 유도시켜야 하는 것으로 알려져 있다. 근간 지방세포에서 높은 GPDH 활성을 나타내는 이유는 근간 지방 세포막에 피하, 근내 및 복부세포와는 달리 insulin에 대한 친화력이 강한 수용체 단백질의 존재 또는 많은 수의 수용체 단백질이 존재할 가능성이 높은 것으로 사료

된다. 한편 복부, 피하 및 근내 지방세포는 insulin에 의한 분화유도가 일어나지 않았는데 이것은 반추가축이 일반적으로 insulin 저항성을 보이는 특이한 대사기구를 가지고 있다는 보고와 면양 피하지방 조직의 수용체 단백질은 rat에 비하여 insulin에 대한 친화성이 낮다는 보고와 연관하여 생각할 수 있다.

Table 14는 마우스에서 지방세포의 분화를 조절한다고 알려진 여러 종류의 분화유도제가 한우의 복부, 피하, 근간 및 근내세포의 분화유도에 미치는 효과를 검토할 목적으로 지방세포가 confluent를 이루었을 때 lipid 및 분화유도제인 insulin, triiodothyronine, dexamethasone을 각각 배양액에 첨가한 후 28일째에 GPDH 활성을 측정된 결과이다. Insulin 단독 처리시 근간세포는 복부, 피하 및 근내세포보다도 월등히 높은 GPDH 활성을 나타냈으나 피하나 근내세포는 전혀 효과가 없었으며, 복부세포는 약간의 활성을 나타내었다. 한편 triiodothyronine이나 dexamethasone의 단독처리구는 분화유도에 전혀 영향을 미치지 않았다. 근간세포의 경우는 insulin과 triiodothyronine 복합첨가가 insulin 단독처리구 보다 높은 수치를 보였으나 근내나 피하세포의 경우는 효과가 없었다. Insulin과 dexamethasone의 복합처리시 근간세포의 GPDH 활성이 급격히 저하했는데 이

Table 14. Effects of various hormones on the differentiation of peradipocytes from Korean native steers

Treatments	GPDH activity(nmol/min/mg protein)				
	Omental	Subcutaneous	Intermuscular	Intramuscular	
control	0.10±0.012 ^a	0.10±0.012 ^d	0.10±0.015 ^d	0.10±0.012 ^b	
Insulin	0.4mU/ml	2.73±0.120 ^c	0.20±0.024 ^{cd}	42.0±01.528 ^c	0.20±0.023 ^a
	40mU/ml	6.13±0.203 ^a	0.21±0.018 ^{cd}	74.3±02.963 ^b	0.20±0.018 ^a
Triiodothyronine	2nM	0.10±0.012 ^c	0.10±0.010 ^d	0.10±0.015 ^d	0.10±0.021 ^b
	10nM	0.09±0.010 ^c	0.09±0.019 ^d	0.10±0.019 ^d	0.10±0.012 ^b
Dexamethasone	10nM	0.09±0.012 ^c	0.10±0.012 ^d	0.10±0.018 ^d	0.10±0.018 ^b
	100nM	0.09±0.015 ^c	0.10±0.012 ^d	0.10±0.012 ^d	0.10±0.022 ^b
Insulin+	40mU/ml+2nM	3.83±0.176 ^b	0.11±0.015 ^d	116.0±4.586 ^a	0.20±0.024 ^a
Triiodothyronine	40mU/ml+10nM	3.00±0.252 ^c	0.90±0.153 ^a	77.0±01.528 ^b	0.20±0.026 ^a
Insulin +	40mU/ml+10nM	1.07±0.145 ^d	0.29±0.023 ^{bc}	5.00±0.231 ^d	0.20±0.029 ^a
Dexamethasone	40mU/ml+100nM	0.50±0.026 ^e	0.40±0.022 ^b	3.10±0.260 ^d	0.20±0.018 ^a

^{a,b,c,d,e} Means±standard error(n=3) in the same column with different superscripts are significantly different(P<0.05).

것은 dexamethasone의 장기간처리에 의해 petri dish 바닥의 cell confluent에 변화가 일어나 대부분의 세포가 배양액중에 뜨면서 세포수도 감소했기 때문이라고 생각한다. 최근 dexamethasone은 transcription factor인 C/EBP β 와 함께 분화초기에만 관련하며, dexamethasone을 분화유도 초기 2일째까지만 처리함으로써 효과적으로 분화를 유도했다는 보고와 관련하여 이것의 처리기간이 분화에 영향을 끼쳤다고 생각된다.

근간지방세포는 insulin과 triiodothyronine 복합처리시 대조구보다 최고 1,000배 이상의 높은 GPDH 활성을 보였는데, triglyceride가 거대한 물방울 형태로 존재하며 저장된 지방적은 세포를 구성하는 다른 기관을 세포벽 주변으로 밀쳐 마치 세포에는 지방적만이 존재하는 것과 같은 모양을 하고 있었다. 그러나 다른 부위 세포에서는 이와 같은 현저한 분화 현상을 관찰할 수 없었던 것으로 미루어 보아 근간 지방세포가 복부, 피하 및 근내 지방세포와는 다른 특성이 있음을 시사하고 있다. 또한 근간지방세포는 insulin 단독처리만으로 분화가 되었고, triiodothyronine과의 복합첨가에 의해 GPDH 활성의 상승효과를 볼 수 있어 분화에는 여러 가지 인자가 복합적으로 작용하고 있을 가능성을 제시하고 있다.

Insulin은 분화의 effector로써 넓게 연구되어져 있는데 rat의 경우 insulin은 glucocorticoid와 함께 GPDHase의 expression을 높이고(Wiederer와 Lofler, 1987), ob17 세포의 경우 insulin은 분화 후기의 지방대사 관련 효소의 수준을 유지하는데 기여하며, diacyl-glycerol-acyl transferase, phpsphatidate phosphorylase, fatty acid synthetase, ATP-citrate lyase, glycerophosphate dehydrogenase, phophoenol-pyruvate carboxylase 등을 포함한 효소의 expression 수준을 높인다고 한다(Gaben-Congneville 등, 1984).

Triiodothyronine은 분화 초기에는 거의 관련하지 않으나 분화 후기 marker인 fatty acid synthetase, GPDHase 등 효소의 수준을 높이는 것으로 보고되어 있다(Gharbi-Chini 등, 1983).

Table 13과 14를 보면 같은 처리구에도 GPDH 활성에 상당한 차이가 있는데 Table 13에서는 분화유도 물질을 배양액에 첨가하고 14일 후에 측정하였으므로 GPDH 활성이 낮았는데 분화유도 기간을 2주 더 연장하면(Table 14) GPDH 활성은 더욱 높게 된다. 일반적으로 한우 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후 약 10일 정도에서부터 작은 지방구의 형성을 관찰할 수 있었으며, petri dish내의 전세포가 분화되는 데는 적어도 4주 이상의 시간이 걸렸다.

따라서 피하, 복부 및 근내지방세포의 분화를 유도하는 데는 호르몬이나 비타

민을 포함한 각기 다른 미지의 물질이 존재할 가능성이 높으므로 여기에 대한 광범위한 접근이 요구된다고 하겠다.

4. (시험 3) 비타민 및 광물질이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향

가. 수용성 비타민이 한우지방전구세포의 분화에 미치는 영향

지방전구세포의 분화는 GPDH활성의 변화와 세포내 지방적의 침착등의 형태적 변화에 의하여 판정하였다. GPDH의 활성은 mg 단백질로 표현하였으나 처리에 따라 배양단위(35mm petri dish)당 단백질의 양이 영향을 받는 것으로 나타나 표에 따라 단백질의 함량을 따로 표기하였다. 시험 2의 결과에서 나타났듯이 지방적은 분화처리 3경일부터 나타나기 시작하여 10일경에 최대를 나타냈다.

시험 2의 결과에서 고농도(1.6ug/ml)로 첨가하였던 것을 5ng/ml로 낮추어도 분화에 영향받지 않아 지방전구세포의 분화에 사용되는 insulin의 농도를 5ng/ml로 고정하였다.

Table 15. Effect of various water soluble vitamins on differentiation of omental, subcutaneous, intermuscular and intramuscular preadipocytes from Hanwoo steer

Sites		Control	Biotin	Pantothenic acid	L-ascorbic acid
Omental	GPDH	139.86 ^a	48.33 ^b	53.14 ^b	158.13 ^a
	Protein	346 ^b	360 ^b	371 ^b	573 ^a
Subcutaneous	GPDH	30.65 ^a	15.35 ^b	21.55 ^b	48.37 ^a
	Protein	312 ^b	363 ^{ab}	443 ^a	283 ^b
Intermuscular	GPDH	133.78 ^a	63.93 ^c	56.65 ^c	107.26 ^b
	Protein	411 ^b	358 ^b	357 ^b	949 ^a
Intramuscular	GPDH	42.91 ^a	30.81 ^a	13.35 ^b	26.97 ^a
	Protein	189 ^a	198 ^a	184 ^a	136 ^a

^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscript are significantly different (P<0.05), GPDH (nmol/min/mg protein), Protein (μg/well)

세 종류의 수용성 비타민을 배양액에 첨가했을 때 분화에 미치는 영향은 Table 15에 나타나 있다. 분화하는 지방전구세포는 형태적으로 fibroblast-like 모양이 점차적으로 둥근 모양으로 변화하였다. Biotin과 Pantothenic acid를 첨가한 처리구는 근내지방전구세포를 제외한 모든 처리구에서 무처리구에 비해 분화도가 유의적으로 낮았으며 유의성을 나타내지 않았으나 vitamin C 처리구는 복부와 피하지방전구세포에서 지방세포의 분화를 촉진하는 것으로 나타났다.

형태적 지방조직 부위별 분화 반응은 수용성 비타민종류에 관계없이 근간, 복부, 피하, 근내 순서로 분화도가 높았다. 복부에 비해 근간 지방전구세포의 GPDH 활성이 낮게 나타난 것은 상대적으로 근간지방전구세포의 단백질 합량이 많았던 것에 기인하며 GPDH의 흡광도만을 볼 때 근간지방 전구세포의 GPDH 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 부위간 분화 자극에 대한 반응이 다른 것은 부위간 세포 내부요인(Intrinsic factor)에 의해 달라지는 것으로 추측된다. 지방조직의 발달순서는 복부, 신장, 근간, 피하, 근내지방 전구세포순으로서 각각의 발달단계에 따라 분화 반응성이 다르고 비교적 신생지방 조직인 피하, 근내는 분화기능을 수행하기보다는 주로 조직의 초기 형성단계인 세포의 증식에 더 민감한 것으로 사료된다. 근간 지방의 분화도가 가장 높았던 것은 모든 지방조직중 가장 대사 활성이 높은 부위로서 외부 자극에 가장 민감하게 반응하였던 것으로 사료된다.

지방 생합성 과정에서 조효소 역할을 하는 Biotin과 Pantothenic acid를 첨가했을 때 오히려 대조구보다 분화가 억제된 결과를 보였으나 vitamin C 처리구는 현미경상으로 관찰했을 때 다른 처리보다 높은 분화도를 보였다. 상대적으로 높은 단백질 합성으로 인해 전체 GPDH 활성은 대조구보다 낮았다. 따라서 비타민 C는 지방전구세포의 GPDH활성과 단백질 합성을 증진시키는 것으로 나타났다.

Kawada(1990)등은 vitamin C가 지방세포 분화에 효과적이나 효과는 10uM이상에서 나타난다고 보고하였으며 생리적인 농도(200uM)를 분화 배양액에 첨가하였을 때 세포내 TG의 함량이 증가하고 GPDH 활성이 증가하였다고 보고하였다. Hata등(1988)은 사람의 fibroblast에서 vitamin C의 collagen에 대한 효과를 확인하였고 Ono 등(1989)은 vitamin C의 수용액내 안정 형태인 L-ascorbic acid가 3T3-L1 지방전구세포주(cell line)와 지방전구세포에서 collagen IV의 합성과 분비를 자극하므로써 세포내 지방적 축적을 촉진한다고 보고하였다. 지방세포의 분화에 있어서 vitamin C의 역할은 collagen내의 주요 단백질인 prolin과 lysine의 수산화(Hydroxylation)를 촉진하는 효과에 기인한다고 보고된 바 있다. 따라

서 collagen이 주성분인 지방조직의 extracellular matrix가 지방전구세포의 분화 신호전달에 주요한 역할을 한다고 추측된다.

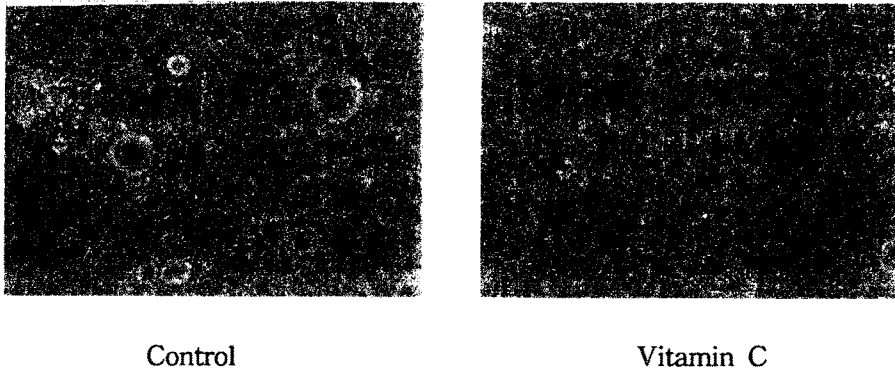


Fig. 4. Differentiating Hanwoo preadipocyte supplemented with vitamin C ($\times 200$).

나. 지용성 비타민의 첨가가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향

Vitamin A의 대사체로서 all-trans retinoic acid를 각각 농도를 0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 달리하여 분화배양액에 첨가함으로써 vitamin A가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

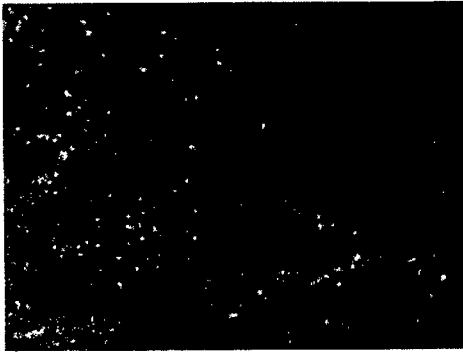
지방전구세포에 retinoic acid를 각각, 0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리했을 때 dose dependent manner로 분화가 억제되었다. 복부 및 근간지방전구세포는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 부터 피하세포는 50 $\mu\text{g/ml}$ 부터 억제되기 시작했으며 근내지방전구세포는 500 $\mu\text{g/ml}$ 부터 억제되기 시작하면서 vitamin A에 가장 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Sato 등(1980)은 vitamin A 유도체, retinol, retinal, retinoic acid를 지방전구세포의 분화에 첨가했을 때 retinol과 retinoic acid가 μ 수준에서 ST 13세포의 분화를 억제하였다고 보고하였다. 또한 Kawada 등(1990)은 Retinoic acid가 지방전구세포의 분화에 영향을 미치는 농도수준은 0.1~10 μM 수준이고 10nM이하에서는 억제효과가 없을 뿐 아니라 Kd value이하에서는 오히려 분화를 촉진하며 vitamin A의 분화억제효과는 지방전구세포의 핵내 두종류의 수용체인

RAR, RXR과 결합을 통해 분화 조절 유전자에 작용하게 되고 결과적으로 유전자수준에서 지방전구세포의 분화가 억제된다고 보고하였다.

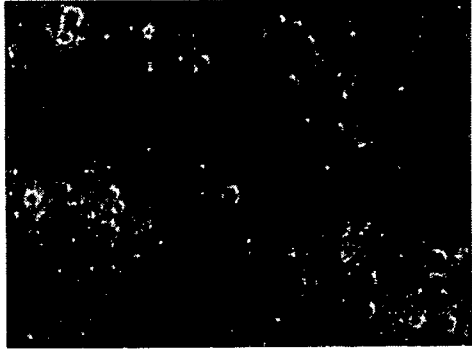
Table 16. Effects of levels of all-trans-retinoic acid on differentiation of omental, subcutaneous, intermuscular and intramuscular preadipocytes from Hanwoo

Sites	Items	Retinoic acid($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
		0	0.5	5	50	500
Omental	GPDH	146.37 ^a	56.34 ^b	41.98 ^b	26.59 ^b	12.45 ^b
	Protein	352 ^a	353 ^a	334 ^a	269 ^{ab}	220 ^b
Subcutaneous	GPDH	21.82 ^a	21.68 ^a	14.6 ^{ab}	7.89 ^b	7.45 ^b
	Protein	312 ^{ab}	370 ^a	397 ^a	251 ^b	290 ^{ab}
Intermuscular	GPDH	133.78 ^a	133.78 ^b	85.89 ^{bc}	67.36 ^c	15.36 ^d
	Protein	436 ^a	436 ^a	470 ^a	454 ^b	242 ^b
Intramuscular	GPDH	31.15 ^a	16.94 ^{ab}	16.38 ^{ab}	13.48 ^{ab}	7.25 ^b
	Protein	217 ^a	214 ^a	200 ^a	191 ^a	248 ^a

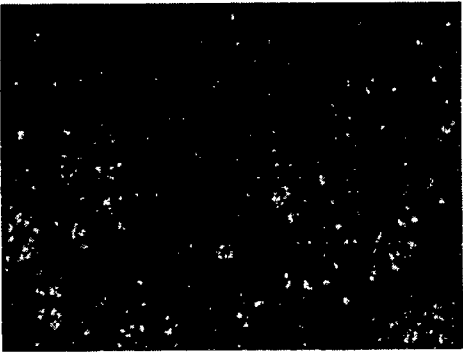
^{a,b,c,d} Means in the same row with different superscript are significantly different ($P < 0.05$), GPDH (nmol/min/mg protein), Protein ($\mu\text{g}/\text{well}$).



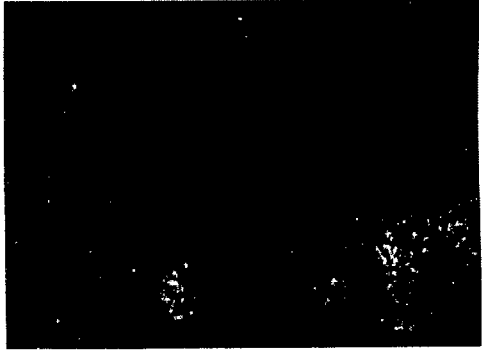
0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of retinoic acid



5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of retinoic acid



50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of retinoic acid



500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of retinoic acid

Fig. 5. Preadipocytes differentiating to mature adipocytes which were treated with different level of retinoic acid.

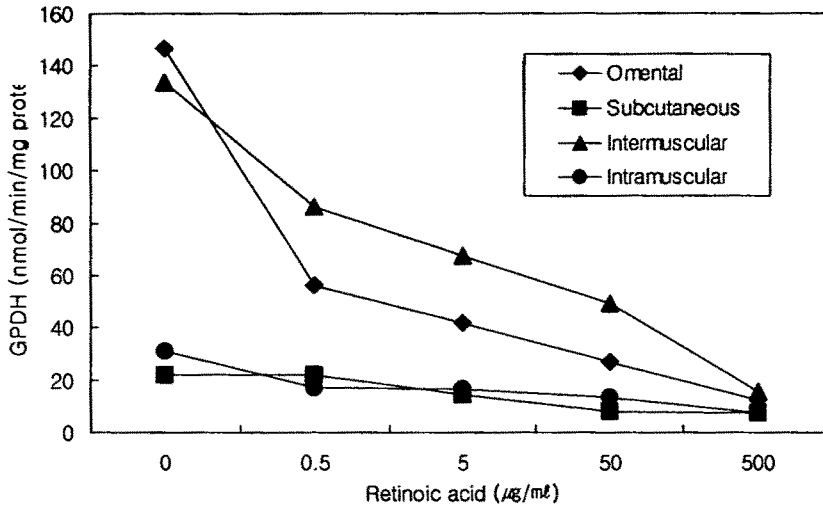


Fig. 6. Effects of all-trans-retinoic acid on GPDH activity of Hanwoo omental, subcutaneous, intermuscular, intramuscular adipose precursor cells culture ($\times 10^4$ cells/ml).

5. (시험 4) 탄소원 및 호르몬에 따른 지방조직의 지방생합성 및 분해에 관한 연구

가. 지방세포의 크기

가축에 있어서 지방조직의 양은 주로 지방세포의 수와 크기에 의해 좌우되며, 이것은 곧 세포수의 증가(hyperplasia)나 세포크기의 증가(hypertrophy) 또는 양자의 혼합에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다. 따라서 정상적으로 성장하는 가축의 지방세포의 수와 크기는 지방축적을 이해하는데 중요한 요인이 된다. 지방조직의 지방세포는 동물이 성숙함에 따라서 세포수의 증가가 완만히 되지만, 피하지방이나 내장지방과 비교하여 근육내지방의 지방세포는 월령이 지난 개체라도 증가를 계속하는 것이 보고되어져 있다. 소의 지방세포의 물성(cellularity)에 대해서는 몇몇 연구가 있으며 지방세포의 수와 크기는 품종에 따라서 차이가 있다(Hood와 Allen, 1973).

Table 17에서는 24개월령의 거세한우와 비거세우의 각 부위별 지방세포의

직경, 용적 및 표면적을 조사하였다. 지방세포의 직경계산에는 직경이 30 μm 이하는 포함하지 않았으며 30 μm 이하로 나타나는 세포는 osmium tetroxide 고정 이전 동결관련 파편으로 간주하였다.

Table 17. Cell diameter, surface area and volume in different adiposes site from Hanwoo bulls and steers

	Omental		Subcutaneous		Intermuscular		Intramuscular		Effect	
	Bull	Steer	Bull	Steer	Bull	Steer	Bull	Steer	castration	Site
Diameter, μm	199.58 ^a	185.80 ^a	135.35 ^a	154.6 ^a	140.08 ^a	157.55 ^a	120.17 ^a	128.85 ^a	NS	**
Surface area, μm^2	130.84 ^a	119.90 ^a	52.56 ^b	81.31 ^a	68.15 ^a	80.91 ^a	49.24 ^a	55.22 ^a	NS	**
Volume, μm^3	4656 ^a	4080 ^a	1268.5 ^b	2312 ^a	1869 ^a	2287 ^a	1179 ^a	1324 ^a	NS	**

^{a b} Means within a site in the same row that do not have a common superscript differ ($P < 0.01$).

** Significant ($p < 0.01$), NS : Not Significant.

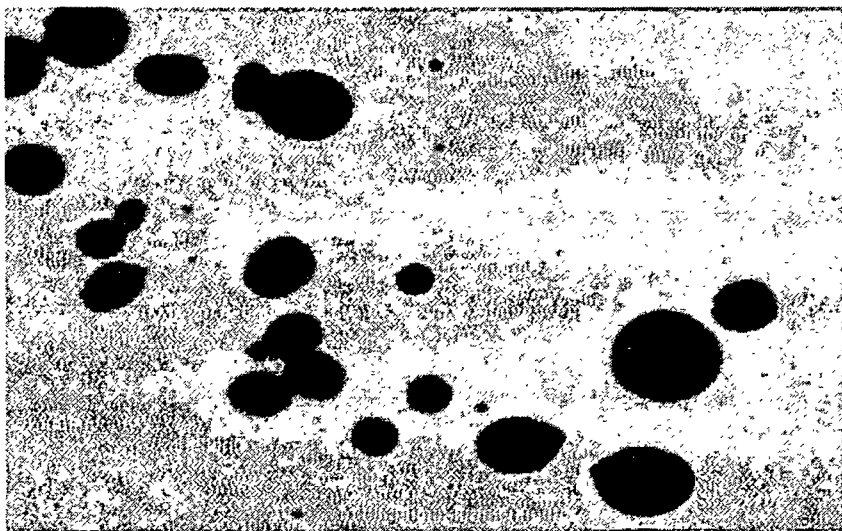


Fig. 7. Hanwoo adipocyte stained with osmium tetroxide.

세포의 크기는 지방조직의 부위에 따라 직경, 표면적, 부피에 유의적으로 차이가 있는 것으로 나타났다. 지방세포는 복부지방세포에서 가장 크고 근내지방세포에서 가장 작은 것으로 나타났지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 거세우 경우 마찬가지로 부위별 지방세포의 직경은 복부지방세포가 가장 크고, 피하, 근간 및 근내 순이었으며 비거세우의 경우 지방세포의 직경은 복부를 제외하고는 거세우에 비하여 작은 경향을 나타내었다.

Danilo등 (1981)은 19개월령의 거세우에서 지방세포의 직경은 복부(175 μ m), 근간(123 μ m), 피하(122 μ m) 및 근내(97 μ m)이었다고 보고하였다.

1909년 Water는 처음으로 근육내 지방세포의 크기는 신장, 피하, 근간 지방세포 보다 작다고 하였으며 근내지방의 비교적 작은 크기는 근육내 물리적 압력에 의한 것이라고 주장하였다. 또한 Hood와 Allen(1973)은 근내지방은 비교적 지방조직중 후기발달형으로 14개월령부터 왕성하게 성장, 분화하며 보통 70-130 μ m 이고 평균 90.9 \pm 5.9 μ m라고 보고하였다. Cianzio등(1985)은 *M. longissimus*의 근내지방세포는 11개월부터 17개월까지 직선적으로 73에서 107 μ m까지 증가하며 19개월령까지 비교적 일정하게 유지된다고 보고하였다. Leat(1980)은 지방세포의 크기는 부위별로 다르며 신지방에서 가장 크고 근내지방에서 가장 작고 이러한 차이는 지방조직간 발달순서를 반영한다고 하였다. 즉 소에서 신지방과 복부 및 내장지방같은 내부 지방이 가장 먼저 발달하고 이후 근간, 피하 마지막으로 비육기에 근내지방이 발달한다고 하였다. 한우에서의 결과는 지방조직간 다른 연구자와 유사한 결과를 보였으며 월령이 높았던 관계로 비교적 직경이 높게 나타난 것으로 사료된다.

피하지방세포를 제외한 다른 지방세포에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 거세우의 피하, 근간, 근내 지방세포는 비거세우에 비해 크고 비거세우의 복부지방세포는 거세우에 비해 큰 것으로 나타났다. 결과적으로 거세우의 피하, 근간, 근내지방세포의 부피는 비거세우에 비해 각각 1.82, 1.22, 1.21배 컸으며 거세우는 지방조직간 정도는 다르지만 지방세포의 크기에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

나. 지방산, 당, 아미노산의 지방조직내 유입을 측정

지방조직은 에너지원인 지방산의 합성 및 축적을 행하는 중요한 조직으로 반추동물은 지방산합성의 90%이상을 지방조직에서 이루어지고 사람과 조류는 주로 간장에서, 또 생쥐, 흰쥐, mouse, 토끼 등은 양쪽에서 이루어진다. 또한 단

위동물의 지방세포는 세포막내의 insulin반응성 glucose 수송단백질 type 4(GLUT4)를 이용하여 혈중의 glucose를 세포내로 받아들여 해당계와 TCA회로를 거쳐서 미토콘드리아로부터 citrate를 방출하여 acetyl-CoA를 합성하고 장쇄 지방산 합성계로 옮겨져 triglyceride를 합성하는 반면에 반추동물은 조사료를 반추위내에서 발효하여 얻어진 휘발성지방산을 에너지원으로 이용하며 지방산합성에는 주로 혈중의 VFA중 초산(acethyl-CoA의 acethyl기)을 세포내로 직접 받아들여 지방산을 합성한다. Smith 등(1984)에 의하면 지방조직에 따라 지방산 합성을 위한 탄소원이 다르다고 하였는데 피하의 경우 지방산 합성에 사용되는 탄소원의 상대적 비율은 acetate가 높으나 근내지방의 경우 glucose가 가장 큰 비중을 차지한다고 보고하였다. Vernon 등(1985)은 121일령된 면양의 복부지방세포의 경우 acetate와 glucose가 거의 같은 비율로 이용되었으나 성숙된 후에는 acetate가 주로 이용된다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 비육우를 이용하여 지방조직 부위별 지방생합성을 검토할 목적으로 한우의 피하와 근내지방조직에 ^{14}C 로 표지된 $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$ 와 $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{acetate}$ 을 사용하여 지방세포내 탄소원의 유입율을 근거로 지방생합성능과 실제로 세포내로 들어 온 탄소원에 의한 지방생합성능을 측정하였다.

Table 18. Incorporation of radioisotope labelled acetate and glucose into adipose tissues of Hanwoo steers (nmol/3hr/ 10^6 cells)

Sites	Acetate	Glucose
Subcutaneous	2423.3 ^a	1502 ^b
Intramuscular	1703.7 ^a	1381 ^a
Site effect	*	NS

^{a, b} Means within a row that do not have a common superscript differ ($P < 0.05$), * : Significant ($P < 0.05$), NS : Not Significant.

Table 19. Incorporation of radioisotope labelled amino acids and KIC into adipose tissues of Hanwoo steers (nmol/3hr/10⁶ cells)

Sites	Leucine	Iso-leucine	2-ketoisocaproic acid
Subcutaneous	190.0 ^a	66.5 ^b	42.0 ^b
Intramuscular	136.5 ^a	41.6 ^b	46.1 ^b
Site effect	NS	*	NS

^{a, b} Means within a row that do not have a common superscript differ (P<0.05), * : Significant (P<0.05), NS : Not Significant.

피하와 근내지방조직에 있어서 acetate와 glucose의 세포내 유입율은 피하 및 근내지방조직 모두에서 glucose보다 acetate를 더 이용하였고, acetate와 glucose의 세포내 유입율은 근내지방조직에서 보다 피하지방조직에서 더욱 높았다(Table 18).

Table 19는 거세우의 지방조직에서 방사능 표지된 아미노산의 세포내 유입율을 조사한 것으로 은 피하, 근내지방조직 모두 leucine, isoleucine, keto-isocaproic acid 순이었으며, 피하지방이 근내지방보다 이들 기질의 이용율이 높았다.

지방생합성에 이용된 아미노산 전구체효율은 다른 결과(Rosenthal 등, 1974)와 유사하였으며 Feller(1965) 역시 흰쥐지방조직에서 아미노산의 이용성이 leucine, alanine, isoleucine, valinetns으로 나타났다고 보고하였다.

지방조직은 아미노산대사의 또 다른 주요조직으로, 특히 축쇄 아미노산의 분해에 중요하다. Leucine 대사물의 주된 산물이 지방산이기 때문에 비교적 지방생합성에 많이 연구가 되어 있으나 반추동물은 단위동물과는 달리 지방조직내 ATP-citrate lyase의 활성이 낮아 glucose와 더불어 단백질이 지방생합성에 이용되는 정도가 한계가 있다(Rosenthal 등, 1974). 본 연구 결과에서도 아미노산은 지방생합성에 비교적 기여도가 낮은 것으로 나타났다.

다. Insulin과 IGF-1첨가에 의한 지방조직내 유입율 측정

한우의 피하 및 근내지방조직에 insulin과 IGF-1이 각각 첨가된 배양액에서 48시간동안 배양했을때 지방생합성에 대한 호르몬의 영향은 Table 20에 나타나 있다.

Table 20. Incorporation of radioisotope labelled acetate and glucose in intramuscular adipose tissue preincubated for 48 hrs with hormones (nmol/3hr/10⁶ cells)

Substrates	Control	Insulin	IGF-1
Acetate	1788.3 ^c	3956.7 ^a	3190.9 ^b
Glucose	1095.3 ^a	1533.3 ^b	1403.7 ^b
Site effects	**	**	**

^{a, b} Means within a row that do not have a common superscript differ (P<0.05), ** : Significant (P<0.01), NS : Not Significant.

지방합성 전구물질효과로 호르몬 첨가에 관계없이 피하 및 근내 모두 acetate 이용성이 높았으며 피하, 근내 모두 insulin에 의하여 지방합성 전구물질의 지방세포유입율은 촉진되었다. 반면 IGF-1은 Insulin에 비해 촉진효과가 낮았으며 이러한 결과는 흰쥐를 이용한 Zapf 등(1979, 1981)의 결과와 유사하게 나타났다.

일반적으로 insulin은 glucose의 흡수, lipoprotein lipase의 활성 증진, hormone sensitive lipase의 활성을 억제하므로써 지방합성을 촉진시키고 norepinephrine, thyroid hormone, glucagon과 같은 호르몬은 지방세포내 hormone sensitive lipase의 활성을 촉진시켜 지방분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 쥐의 지방세포에 있어서 insulin의 작용은 glucose의 흡수와 지방합성을 촉진시키고 지방분해를 억제시키고, 돼지의 지방세포의 경우, short term 처리에서 insulin의 작용은 미약하지만, long-term처리에서는 지방합성능을 유지시켜주는 효과가 있는 것으로 나타났다.

IGF-1은 일반적으로 체내에서 IGF binding protein과 결합한 상태로 체내를 순환하며 조직에 영향을 미친다. 따라서 *in vitro* 지방생합성에 IGF-1의 촉진 효과가 미미하게 나타나는 것은 *in vitro* 상태에서 혈청이나 IGF binding protein은 첨가하지 않은 상태의 free IGF-1의 저하된 효과에 의한 것으로 추측된다. 유사한 결과로 Zapf 등(1984)은 *in vitro*에서 free IGF-1을 첨가했을 때 지방생합성 촉진 효과가 상실되었다고 보고하였다.

라. Insulin과 Norepinephrine첨가에 의한 초산과 glucose의 지방합성능 측정

지방세포는 세포내로 들어온 탄소원을 이용하여 지방산과 글리세롤을 합성하고 최종적으로 triglyceride로 저장한다. 따라서 유입된 탄소원의 지방산과 글리세롤분획에 기여도를 조사함으로써 지방생합성 기전을 이해하고자 탄소원간 지방조직내 이용성을 조사하였다. 한우의 피하 및 근내지방조직을 insulin과 norepinephrine이 각각 첨가된 배양액에서 배양하여 지방생합성에 미치는 이들 호르몬의 영향을 조사하였다.

Table 21. Lipogenesis from acetate and glucose in subcutaneous and intramuscular adipose tissue of Hanwoo steers (nmol/3hr/10⁶ cells)

Glyceride fractions	Sites	Acetate	Glucose
Fatty acid ¹	Subcutaneous	2344.5 ^a	112.0 ^b
	Intramuscular	1703.7 ^a	33.0 ^b
Glycerol	Subcutaneous	18.6 ^b	192.6 ^a
	Intramuscular	17.8 ^b	145.8 ^a

^{a, b}Means within a row that do not have a common superscript differ(P<0.05).

Acetate는 피하와 근내지방에서 지방산합성의 주된 탄소원이며 피하지방세포가 근내보다 지방산합성능력이 높게 나타났다. glucose의 지방산합성의 기여도는 피하 및 근내지방조직에서 모두 acetate보다 낮았으며 지방산보다는 glycerol 합성능이 높았다.

한우에서 acetate와 glucose의 지방산에 있어서의 이용성은 Ballard등(1969)의 면양에서의 결과와 유사하였다. 다른 결과와 마찬가지로 acetate는 지방산 acetyl unit의 70-80%를 차지하였고 대부분의 glycerol 분획은 glucose로 합성되었다.

[U-¹⁴C]acetate의 일부가 glyceride-glycerol분획에서 나타나지만 이것은 acetate가 glycerol-3 phosphate를 통해서라기 보다 TCA cycle의 중간 대사물의 형태로 유입된 것으로 보이고 두 carbon 전구체의 유입은 근내지방조직보다 피하지방조직에서 더 높았다.

Robertson(1981)은 보다 생리적 농도 수준으로서 acetate, 0.6mM,

glucose, 1mM, lactate, 3mM를 면양 신지방조직에 첨가하여 지방산합성에 대한 기여도를 조사했을 때 lactate가, 3%, glucose가, 2%를 차지하였고 나머지는 모두 acetate로부터 유래하였다고 보고하였다. 그러나 Smith와 Crouse(1984)는 생리적 농도수준에서 acetate, glucose, lactate의 지방산합성에 대한 기여도를 조사했을 때 근내지방에서 지방산합성에 acetate의 중요성이 감소하고 glucose의 중요성이 증가하였다고 보고하였다. 그러나 한우의 피하지방과 근내지방에서 acetate와 glucose의 지방합성 기질로서의 기여도를 비교하였을 때 Smith와 Crouse (1984)의 결과와는 반대로 여전히 acetate가 주된 합성기질로 나타났다.

Insulin은 일반적으로 anabolic 기능이 있는 것으로 알려져 있으며 지방대사에서는 lipoprotein lipase의 활성을 증가시키고 glucose의 세포내 흡수를 촉진하며 기타 다른 대사물의 흡수를 자극한다. 또한 지방합성을 촉진하고 지방분해를 억제한다. 본 연구에서는 한우에서 이러한 Insulin의 최대효과 수준을 설정하진 않았지만 첨가된 1.6 μ g/ml수준은 한우 피하 및 근내지방조직내 지방생합성을 촉진시키는 것으로 나타났다.

Table 22. Effects of insulin and norepinephrine on glyceride-fatty acid synthesis in adipose tissue from Hanwoo steers (nmol/3hr/10⁶ cells)

Substrates	Sites	Control	Insulin	Norepinephrine
Acetate	Subcutaneous	578.2 ^b	2609.2 ^a	754.0 ^b
	Intramuscular	532.3 ^b	1464.0 ^a	581.2 ^b
Glucose	Subcutaneous	13.8 ^b	35.5 ^a	18.7 ^b
	Intramuscular	13.8 ^b	31.3 ^a	17.0 ^{ab}
Site effect		NS	**	NS

^{a, b} Means within a row that do not have a common superscript differ (P<0.05), * : Significant (P<0.05), ** : Significant(P<0.01)

Table 23과 24에는 insulin과 norepinephrine가 지방산과 glycerol의 합성에 미치는 영향이 나타나 있다. Insulin은 지방산 합성에 효과적으로 나타났고 다른 처리구와는 달리 insulin 처리구에서는 피하, 근내간 site effect가 있는 것으로 나타났다.

Acetate를 탄소원으로 공급하였을 때 지방산합성에 대한 호르몬의 효과는 피하의 경우 insulin첨가에 의해 지방산 합성능이 증가하였다. 따라서 insulin은 acetate로부터 지방산합성을 촉진시키는 역할을 하였다. Norepinephrine은 지방산합성에 영향하지 않는 것으로 나타났다.

Acetate는 피하와 근내지방에서 지방산합성의 주된 탄소원이며 피하지방세포가 근내보다 지방산합성능력이 높게 나타났다. glucose의 지방산합성의 기여도는 acetate보다 낮았으며 피하지방세포가 근내보다는 glycerol 합성능이 높았다.

Table 23. Effects of insulin and norepinephrine on glyceride-glycerol synthesis in adipose tissues from Hanwoo steers (nmol/3hr/10⁶ cells)

Substrates	Sites	Control	Insulin	Norepinephrine
Acetate	Subcutaneous	37.7 ^a	26.2 ^b	23.3 ^b
	Intramuscular	34.7 ^b	45.2 ^a	25.0 ^b
Glucose	Subcutaneous	75.7 ^b	143.8 ^{ab}	257.5 ^a
	Intramuscular	83.0 ^b	145.0 ^{ab}	235.8 ^a

^{a, b} Means within a row that do not have a common superscript differ (P<0.05).

Glucose를 탄소원으로 공급하였을 때 지방산합성에 대한 호르몬의 효과는 피하지방세포의 경우 insulin에 의해 glycerol합성이 약간 증가하는 추세를 보였으나 근내지방세포에서는 효과가 없었다. norepinephrine에 대해서는 acetate와 glucose로부터 glycerol 합성율은 근내지방세포와 피하지방세포에서는 대조구보다 낮았다.

Glycerol의 생합성에 있어서는 glucose가 acetate보다 좋은 탄소원이었으며 전반적으로 triglyceride 합성에 있어서 acetate가 더 이용되었고, 피하지방세포가 근내지방세포보다 triglyceride 합성능력이 높았다.

마. 호르몬 첨가에 따른 지방조직의 지방분해 연구

지방분해 억제제인 insulin과 자극제인 Norepinephrine의 지방분해효과를 측정하였다 (Fig. 8).

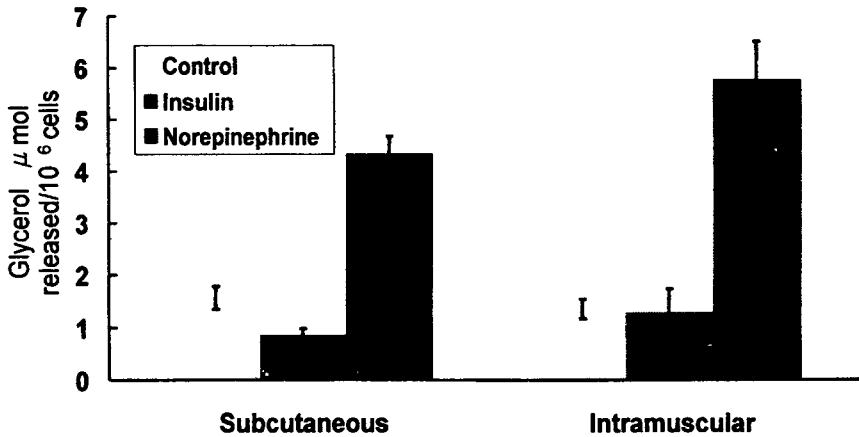


Fig. 8. Effects of insulin and norepinephrine on lipolysis in adipose tissues from Hanwoo steers

Insulin의 효과는 각 부위마다 다르게 나타나는데 복부와 근간의 경우 대조구보다 분해가 높게 일어났으며 피하와 근내의 경우 대조구보다 높게 나타났다. 또한 norepinephrine은 모든 부위에서 매우 효과적으로 분해를 촉진하는 것으로 나타났다.

6. (시험 5) 면양의 성장단계별 지방전구세포 분화

가. 분화에 영향을 미치는 요인

분화에 영향을 미치는 인자 insulin, IGF-1, dexamethasone, 지질이 면양 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. Broad와 Ham(1983)에 의하면 insulin과 IGF-1은 분화유도에 필수적이며 dexamethasone은 분화를 촉진시킨다고 알려져 있다.

지질은 포유자양과 성숙면양의 GPDH의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다 (Table. 25). 지질은 성숙면양의 복부지방전구세포의 GPDH는 증가시켰으나 포유자양에서는 이러한 효과는 나타나지 않았지만 두 면양의 피하지방전구세포에서는 모두 증가시키는 것으로 나타났다.

Broad와 Ham(1983)은 지질첨가가 면양지방전구세포의 분화를 촉진하였다고 하였고 Bjorntorp 등(1980)은 흰쥐 지방전구세포의 분화를 촉진하였다고 하였다

본 연구에서도 마찬가지로 기전은 확실하지 않지만 지질내 arachidonic acid로부터 유래한 지방산이나 prostaglandin이 분해를 촉진시킨 것으로 추측된다.

FGF는 복부와 피하에서 GPDH활성을 감소시켰고 GH 역시 같은 효과를 나타내었다(Table 26).

Dexamethasone은 insulin과 T₃와 함께 첨가했을 때 포유면양과 성숙자양에서 GPDH의 활성을 증가시키는 경향을 나타냈고(Table 27)이러한 효과는 지질보다 효과가 높은 것으로 나타났다. Dexamethasone과 지질을 동시에 처리했을 때 효과는 지질만 단독 처리했을 때 보다 증가됐다.

Broad와 Ham(1983)은 FGF가 면양의 분화를 촉진했다고 보고한 반면 Vierck등(1996)은 dexamethasone과 insulin과 함께 처리했을 때 효과가 없었다고 보고하였다. FGF에 대한 상반된 결과들이 보고되면서도 닭과 돼지에서는 FGF는 효과가 없는 것으로 보고되고 있다. Butterwith(1994)는 이러한 FGF에 대한 다양한 반응은 혈청인자에 영향을 받는다고 하였다.

GH의 영향은 복잡하게 나타나는데 지속적인 GH처리는 지방조직을 감소시키는데 반해 사람과 흰쥐에서 GH의 부족은 지방세포의 수를 감소시킨다. 본 연구에서 GH의 첨가는 GPDH의 활성을 감소시켰으며 이러한 결과는 돼지에서도 유사하게 나타난다(Hausman과 Martin, 1989).

BRL 49653은 100nM수준에서 세포핵내 PPAR- γ 와 결합하고 지방전구세포가 분화하는 동안PPAR- γ 의 농도는 증가하며 BRL 49653-PPAR- γ 결합체가 지방전구세포의 분화를 강하게 촉진한다고 보고되었다 (MacDougald and Lane, 1995).

포유자양의 피하지방세포에 대해 BRL 49653과 Dexamethasone은 동등한 효과를 나타냈으나 동시에 처리했을 때 효과는 부가적이지 않았지만 포유자양의 복부와 성숙면양의 피하, 복부에서는 부가적인 효과를 나타냈다 (Table 28).

BRL 49653과 Dexamethasone의 상호작용에 대해서는 아직 불확실하지만 Dexamethasone이 분화상태에서 PPAR- γ 의 농도를 증가시킨다. 면양에서 Dexamethasone 처리가 PPAR- γ 의 ligand합성에 대한 지방산의 기질로 활용될 수 있을 것으로 추측된다.

Table 24. Effects of insulin and IGF-I on GPDH activity of ovine subcutaneous and omental preadipocytes.

Treatment	GPDH activity	
	Subcutaneous	Omental
Insulin(5ng/ml)+T ₃ +E	48.9 ^a	52.4 ^a
Insulin(1.6 μg/ml)+T ₃ +E	64.9 ^a	29.5 ^{ab}
IGF-I(5ng/ml)+T ₃ +E	43.7 ^a	25.7 ^b
IGF-I(1 μg/ml)+T ₃ +E	41.7 ^a	31.8 ^{ab}

^{a, b} Means in a column without the same superscript differ (P<0.05).

Table 25. Effect of exocyte on GPDH activity and protein/well of ovine subcutaneous and omental preadipocytes.

Site	Treatment	Suckling lamb		Growing sheep	
		GPDH	Protein	GPDH	Protein
Subcutaneous	Insulin+T ₃	39.3 ^a	100 ^a	12.8 ^a	223 ^a
	Insulin+T ₃ +E	52.2 ^b	207 ^b	19.8 ^b	371 ^b
Omental	Insulin+T ₃	25.5 ^c	152 ^c	2.1 ^c	298 ^{ab}
	Insulin+T ₃ +E	28.0 ^{ac}	262 ^d	9.5 ^a	350 ^b

^{a, b} Means in a column without the same superscript differ (P<0.05)

GPDH (nmol/min/mg protein), Protein (μg/well)

Table 26. Effects of fibroblast growth factor (FGF) growth hormone (GH) and dexamethasone (Dex) on GPDH activity and protein per well of ovine subcutaneous and omental preadipocytes

Stages of growth	Treatment	GPDH		Protein	
		Subcutaneous	Omental	Subcutaneous	Omental
Suckling lambs	I+T ₃ +E	67.0 ^a	32.6 ^b	222 ^a	273 ^a
	I+T ₃ +E+FGF	35.7 ^b	14.7 ^c	248 ^a	244 ^a
Suckling lambs	I, T ₃ +E	65.7 ^a	-	164 ^a	-
	I, T ₃ +E+GH	27.5 ^b	-	153 ^a	-
	I, T ₃ +E+GH72h	44.8 ^{ab}	-	178 ^a	-
Growing sheep	I, T ₃ +E	108.6 ^a	28.7 ^b	279 ^a	227 ^a
	I, T ₃ +Dex	127.7 ^b	43.3 ^c	270 ^a	230 ^a
	I, T ₃ +E+Dex	122.2 ^a	50.6 ^c	371 ^b	394 ^b

^{a, b} Means without the same superscript differ (P<0.05)

GPDH (nmol/min/mg protein), Protein (μ g/well)

나. 연령효과

포유면양에서는 BRL 49653과 Dexamethasone을 첨가한 구에서 분화가 가장 높게 나타났으며 모든 처리구에 있어서 피하지방전구세포가 복부지방전구세포보다 분화능이 높게 나타났다. 지질과 BRL 49653에 대한 포유자양과 태아면양의 반응은 거의 유사했으며 FGF첨가는 태아면양에서 신지방 및 피하전구세포의 GPDH를 감소시켰으나 그 효과의 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

성숙 거세면양에서도 역시 포유자양과 같이 처리구에 대해 유사한 경향을 나타냈고 특징적인 것은 태아, 포유자양, 성숙 거세면양의 순으로 분화의 절대치가 감소한 것으로 나타났는데, 이것은 성장이 진행함에 따라 분화에 대한 민감도가 감소되었기 때문인 것으로 생각된다.

다. 부위효과

피하지방전구세포는 insulin과 T3를 단독이나 지질, 혹은 BRL 49653, Dexamethasone과 처리했을 때 복부지방전구세포보다 모든 처리구에서 높은 분화능을 보였으나 insulin과 T3, BRL 49653처리구에 지질이나 Dexamethasone를 처리했을 때에는 복부지방전구세포와 차이를 나타내지 않았다.

Table 27. Effect of BRL 49653 on GPDH activity and protein per well of ovine subcutaneous and omental preadipocytes.

Treatment	GPDH		Protein	
	Subcutaneous	Omental	Subcutaneous	Omental
I+T ₃	40.8 ^a	31.8 ^a	117 ^a	158 ^{ab}
I+T ₃ +E	67.1 ^b	32.6 ^a	222 ^{bc}	273 ^c
I+T ₃ +E+B	72.0 ^b	78.3 ^b	385 ^d	350 ^d

^{a, b} Means without the same superscript differ (P<0.05)

GPDH (nmol/min/mg protein), Protein (μ g/well)

Table 28. Effects of exocyte, dexamethasone and BRL 49653 on GPDH activity and protein/well of subcutaneous and omental preadipocytes from suckling lambs and growing sheep.

Site	Treatment	Suckling lamb		Growing sheep	
		GPDH	Protein	GPDH	Protein
Subcutaneous	I, T ₃	38.5 ^a	80 ^a	9.5 ^a	220 ^a
	I, T ₃ +E	35.2 ^a	220 ^b	16.2 ^{ab}	300 ^{ab}
	I, T ₃ +Dex	61.2 ^b	300 ^b	35.0 ^b	280 ^{ab}
	I, T ₃ +B	65.7 ^b	200 ^b	26.0 ^{ab}	240 ^a
	I, T ₃ +E+B	46.2 ^a	440 ^b	32.5 ^b	400 ^{bc}
	I, T ₃ +Dex+B	70.7 ^b	540 ^c	55.0 ^c	480 ^c
	I, T ₃	18.5 ^a	160 ^a	4.0 ^a	220 ^{ab}
Omental	I, T ₃ +E	22.7 ^{ac}	260 ^a	13.2 ^{ab}	340 ^{ab}
	I, T ₃ +Dex	30.2 ^{ab}	200 ^a	16.7 ^{ab}	200 ^a
	I, T ₃ +B	44.0 ^b	240 ^a	19.5 ^{ab}	240 ^a
	I, T ₃ +E+B	35.2 ^{bc}	440 ^b	30.0 ^{bc}	400 ^b
	I, T ₃ +Dex+B	58.7 ^d	420 ^b	47.5 ^c	400 ^b

^{a, b} Means in a column without the same superscript differ (P<0.05)

GPDH (nmol/min/mg protein), Protein (μ g/well)

많은 연구들이 다른 지방조직간에 같은 처리를 했을 때 분화능이 다르다고 보고되어 왔고 이러한 지방조직부위간 차이는 분명하지 않았다. 본 연구에서도 이러한 지방조직간, 연령간의 분화도의 차이가 나타났다. 부분적으로 지방세포 배양시 다른 조직에 의한 오염으로 설명되기도 하지만 본 연구에서 지방전구세포를 insulin과 T₃, BRL 49653처리구에 지질이나 Dexamethasone를 처리했을 때에 이러한 차이들은 나타나지 않았다. 지방전구세포에 insulin과 T₃에 BRL 49653과 Dexamethasone을 동시에 처리한 구의 분화도는 포유자양의 피하지방전구세포의 분화수준까지 증진되었으며 지질과 BRL 49653처리구는 피하 및 복부지방전구세포의 분화도를 유사한 수준으로 증진시켰다. 따라서 지방조직부위간 차이는 매우 복잡하지만 부분적으로 BRL 49653와 관련된 PPAR- γ 와 관계이고 연령간, 지방조직부위간의 분화도의 차이는 PPAR- γ 와 ligand를 이루는 능력의 제한성에 영향받을 것으로 추측된다.

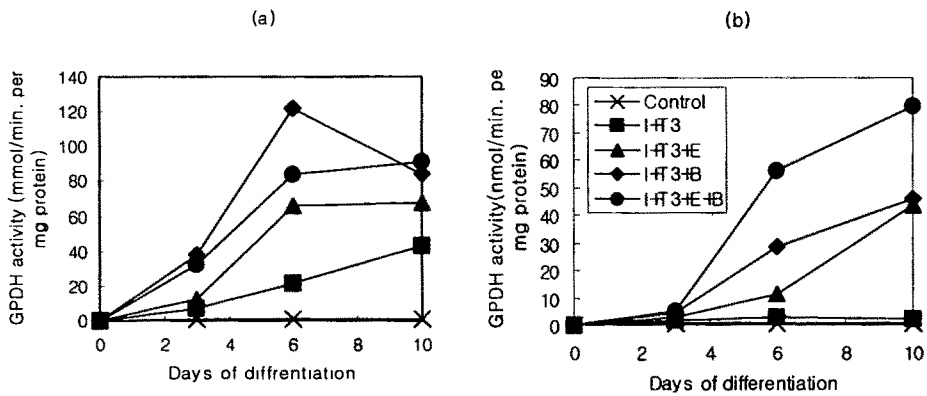


Fig. 9. Changes in GPDH activity during differentiation of (a) subcutaneous and (b) omental preadipocytes from growing sheep. Differentiation was induced by adding: control (x), insulin (I) 1.6 μ g and T₃ (2nM) (■); I, T₃ and excyte (E) (10 μ l/ml) (▲); I, T₃, and BRL 49653 (B) (100nM) (◆); I, T₃, E, B (●).

Table 29. Effect of various factors on GPDH activity and protein/well of subcutaneous and perirenal preadipocytes from foetal lambs

Treatment	GPDH		Protein	
	Subcutaneous	Perirenal	Subcutaneous	Perirenal
I, T ₃ ⁺	42.5 ^b	15.7 ^{ac}	200 ^a	160 ^a
I, T ₃ +E	39.5 ^{ab}	32.5 ^{ab}	420 ^b	380 ^b
I, T ₃ +B	53.5 ^b	44.0 ^b	420 ^b	320 ^b
I, T ₃ +E+B	42.7 ^{ab}	41.0 ^b	620 ^c	600 ^c
I, T ₃ +E+FGF	27.0 ^a	9.7 ^c	420 ^b	320 ^b
I, T ₃ +E+ GH	35.5 ^a	7.5 ^c	260 ^a	260 ^{ab}

^{a, b} Means in a column without the same superscript differ (P<0.05).

GPDH (nmol/min/mg protein), Protein (μ g/well).

Table 30. Comparison of response of subcutaneous and omental preadipocytes from suckling lambs and growing sheep to differentiation stimuli

Treatment	GPDH		Protein		
	(nmol/min per mg protein)	P	(μ g/well)	P	n
I+T ₃	sub > om	0.002	om > sub	0.002	15
I+T ₃ +E	sub > om	0.002	sub = om	0.23	21
I+T ₃ +Dex	sub > om	0.014	sub = om	0.51	10
I+T ₃ +B	sub > om	0.006	sub = om	0.53	10
I+T ₃ +B+E	sub = om	0.24	sub = om	0.24	14
I+T ₃ +B+Dex	sub = om	0.16	sub = om	0.34	7

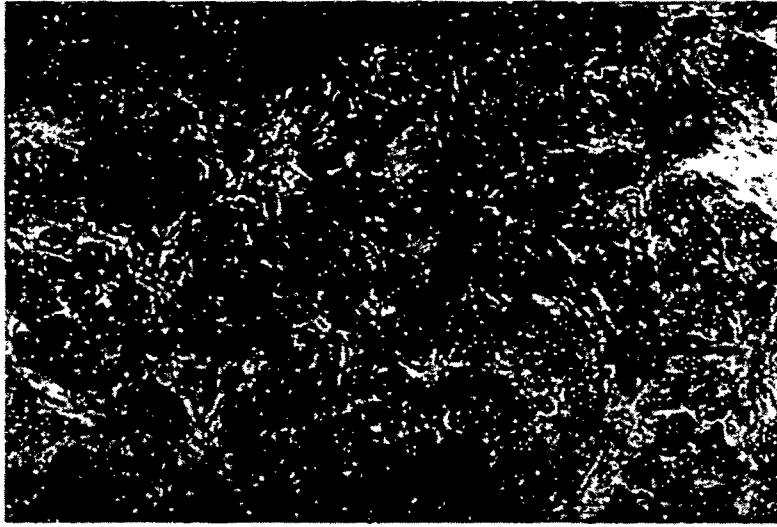


Fig. 10. Perirenal preadipocyte from fetal lamb differentiating to mature adipocyte

7. (시험 6) 한우의 비육과정에 있어서 serum insulin 농도와 도체형질과의 상관

가. 발육능력

비육전기 시작인 13개월령부터 비육 종료시인 24개월령까지 매 1개월 간격으로 발육능력을 조사한 결과는 Table 31과 같다.

전 공시두수의 비육기간 동안의 월령별 체중은 시험 개시시인 13개월령에서 $310.2 \pm 25.1\text{kg}$, 비육후기가 시작되는 19개월령에서 $460.0 \pm 30.8\text{kg}$ 그리고 비육 종료시인 24개월령에서 $605.2 \pm 34.7\text{kg}$ 으로 월령 증가와 함께 증가하였다. 이는 이 등(1997)이 한우 거세우 19두를 대상으로 시험한 결과 13개월령 254.3kg, 19개월령 398.2kg 그리고 비육 종료시인 25개월령 체중이 551.2kg이었던 것보다는 다소 높은 결과였는데, 이러한 결과는 시험축의 개시시 체중과 사양방법 등의 차이 때문으로 사료된다.

한편 일당 증체량은 비육전기 시작인 13개월령부터 서서히 증가하다가 비육후기 개시인 19개월령부터는 급격히 증가하여 20개월령에서 $1.16 \pm 0.23\text{kg/day}$

Table 31. The change of body weights and daily gains by fattening periods in Hanwoo steers

Item	Finisher I (months)						Finisher II (months)					
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Body weight (kg)	310.21 ±25.12	331.07 ±26.79	355.14 ±24.25	384.07 ±26.27	406.50 ±27.55	434.57 ±31.02	469.00 ±30.87	503.93 ±32.73	535.93 ±33.89	564.93 ±32.33	587.93 ±33.21	605.21 ±34.68
Daily gain (kg/day)	0.60 ±0.16	0.70 ±0.16	0.80 ±0.18	0.96 ±0.23	0.75 ±0.15	0.94 ±0.16	1.15 ±0.20	1.16 ±0.23	1.07 ±0.21	0.97 ±0.24	0.77 ±0.21	0.58 ±0.13
Total gain (kg/mon.)	17.86 ±4.79	20.86 ±4.87	24.07 ±5.54	28.93 ±6.78	22.43 ±4.54	28.07 ±4.83	34.43 ±6.14	34.93 ±6.87	32.00 ±6.39	29.00 ±7.19	23.00 ±6.20	17.29 ±3.75

*Mean ± S.D.

로 최고치에 달하였고 그 이후부터는 서서히 감소하였다. 또한 전 비육기간 평균은 0.87kg/day였으며 비육전기와 비육후기 각각의 평균은 0.79와 0.95로 비육후기에서 일당 증체량이 더 높았다. 대부분의 경우 육성기 동안에는 에너지와 단백질은 물론 그 밖의 영양소 섭취량이 증체에 크게 영향을 미치나 비육기에 접어들면서 증체가 주로 에너지 섭취량에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있다 (Martin 등, 1979). 따라서 본 시험에서 증체율이 비육전기 보다 비육후기가 높았던 것은 육성기 및 비육전기 동안에 에너지를 제한해 오다가 그 후 배합사료를 자유채식 시킴으로써 보상성장의 효과를 확인할 수 있었던 것으로 보인다. Bohman (1955)은 특정기간에서의 영양적 제한으로 위축된 성장은 그 후의 제한요소를 제거할 경우 성장 속도가 빨라진다는 보상성장 내용을 보고하였다. 한편 비육전기인 17개월령과 18개월령에서 0.75 및 0.94kg/day로 성장이 잠시 둔화된 것으로 나타났는데, 이는 17 및 18개월령시가 계절적으로 겨울인 12월과 1월이었던 것으로 미루어 보아 섭취한 에너지가 체온 유지에 다량 이용되고 또한 기타 저온 스트레스(stress)에 의한 결과로 사료된다.

나. 영양소 섭취량

비육전기와 비육후기 동안 매 1개월 간격으로 조사한 사료 및 영양소 섭취량은 Table 32와 같다.

비육 전기간 평균 건물, CP 및 TDN 섭취량은 각각 8.29, 0.98 및 5.48kg/day였고 비육전기와 비육후기의 평균 건물 섭취량은 7.84와 8.77kg/day 그리고 CP 섭취량은 0.91과 1.06kg/day이었으며 TDN 섭취량은 4.85와 6.12kg/day로 비육후기가 높은 것으로 나타났다. 또한 농후사료 건물 섭취량은 제한급여 기간인 18개월령까지 체중과 더불어 서서히 증가(4.64~6.52kg/day)를 하다가 자유채식으로 전환된 19개월령부터 7.62 kg/day로 크게 증가하여 20개월령에는 8.42kg/day로 최대치를 나타내었으나 이후 비육 종료시까지 서서히 감소되었다. 볏짚 섭취량은 18개월령까지 계속 일정 수준(2.11~2.37kg/day)을 유지하다가 19개월령부터 배합사료 자유채식으로 인하여 20개월령까지 0.93kg/day로 감소되었고 그 이후부터는 평균 0.92kg/day로 일정 수준을 유지하였다.

한편 CP 및 TDN 섭취량은 배합사료 섭취량의 변화와 동반하여 서서히 증가하다가 자유채식 개시시인 19개월령부터 20개월령까지 크게 증가하였으며 (각각 1.14와 6.58kg/day) 그 이후부터는 서서히 감소하였다.

Table 32. Daily feed and nutrient intakes of Hanwoo steers by fattening periods

Item	Finisher I (months)						Finisher II (months)					
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Dry matter intake (kg/day)												
Concentrate	4.64	4.98	5.32	5.72	6.19	6.52	7.62	8.42	8.29	7.95	7.51	6.82
Rice straw	2.11	2.37	2.35	2.26	2.22	2.15	1.38	0.93	0.94	0.92	0.95	0.90
Total	6.75	7.35	7.67	7.98	8.41	8.67	9.00	9.35	9.22	8.86	8.45	7.72
Nutrient intake (kg/day)												
CP	0.77	0.83	0.88	0.93	0.99	1.04	1.06	1.14	1.13	1.08	1.02	0.93
TDN	4.13	4.47	4.71	4.97	5.29	5.50	6.16	6.58	6.48	6.22	5.91	5.39
Feed conversion (kg/kg gain)												
DM	8.31	7.60	7.02	6.25	8.68	7.11	6.84	7.46	7.98	8.68	10.45	12.30
CP	1.17	1.07	0.99	0.88	1.22	1.00	0.89	0.97	1.03	1.12	1.35	1.59
TDN	7.41	6.83	6.21	5.43	7.42	6.00	5.53	5.83	6.24	6.81	8.23	9.72

다. 도체성적

한우 거세우 14두에 대한 도체 성적은 Table 33 및 34와 같다.

등지방 두께와 배최장근단면적은 각각 평균 9.29mm와 89.21cm²로 나타났고 육량지수는 69.09였다. 또한 육질판정에 중요한 요인으로 작용하고 있는 근내지방도는 3.35로 '평균 1.6등급을 받았다. 육색은 myoglobin 함량에 따라 달라지고 연령이 증가할 수록 그 함량이 증가하여 어두워진다고 하였는데(Field, 1971) 본 시험에서는 평균 4.71로 나타났다.

이 등(1997)은 거세우 19두를 7개월령부터 25개월령까지 비육하였을 때 배최장근 단면적 74.3cm², 등지방 두께 9.6mm, 육량지수 68.15, 근내지방도 4.4, 육색 4.2 등으로 나타나 본 시험성적 보다는 근내지방도와 육색 성적은 다소 높았으나 배최장근단면적과 육량지수에 있어서는 낮은 성적이었다.

Table 33. Carcass characteristics

Steer number	Cold carcass wt. (kg)	Dressing ¹⁾ (%)	Lean meat (%)	Retailed cut (%)	Fat (%)	Bone (%)
1	395.2	63.23	83.14	67.12	21.36	11.43
20	360.4	62.03	83.79	67.02	22.34	10.41
24	362.6	62.95	88.10	67.54	27.68	10.08
25	348.8	60.66	81.33	64.78	23.69	11.39
26	372.2	64.28	83.89	63.21	26.49	10.08
27	391.8	63.19	83.64	59.76	30.66	9.39
29	359.5	63.40	83.07	64.43	24.60	10.78
30	374.0	63.50	78.79	65.76	22.89	11.24
35	343.8	62.17	81.58	64.02	24.74	11.01
37	368.0	63.56	82.26	61.19	28.48	10.15
40	404.2	62.86	82.84	61.19	28.87	9.82
45	391.4	60.78	81.24	63.48	26.47	9.83
46	414.0	64.19	83.24	61.76	28.57	9.53
48	406.4	63.11	82.62	64.29	25.27	10.31
AVG	378.02	62.85	82.82	63.97	25.87	10.39

¹⁾ Dressing percentage was obtained by dividing cold carcass weight by slaughter body weight and proportions (%) of lean meat, retailed cut, fat and bone were calculated based on cold carcass weight.

Table 34. Beef quality and yield traits of Hanwoo steers

Item	Quality traits ¹⁾					Yield traits				
	Marbling score	Meat color	Fat color	Firmness	Grade	Cold carcass wt. (kg)	Longissimus muscle area(cm ²) ²⁾	Back fat thickness (cm) ²⁾	Yield index ³⁾	Grade ⁴⁾
1	4.33	5.00	2.00	1.66	1.00	395.2	100.0	5.0	71.51	A
20	2.33	4.00	3.00	2.00	2.00	360.4	104.0	8.0	71.97	A
24	4.33	4.00	2.00	1.66	1.00	362.6	88.0	6.0	70.32	A
25	2.33	5.00	3.00	2.00	2.00	348.8	82.0	6.0	69.91	A
26	4.00	4.00	3.00	1.66	1.00	372.2	89.0	12.0	67.98	B
27	2.33	5.00	3.00	2.00	2.00	391.8	103.0	12.0	69.05	A
29	4.00	5.00	2.00	1.66	1.00	359.5	75.0	10.0	67.63	B
30	6.00	5.00	2.00	1.33	1.33	374.0	85.0	10.0	68.40	B
35	2.66	5.00	3.00	2.00	2.00	343.8	76.0	7.0	69.02	A
37	2.66	5.00	2.00	1.66	2.00	368.0	75.0	15.0	65.60	C
40	1.33	6.00	3.00	2.00	3.00	404.2	95.0	15.0	67.07	B
45	4.33	4.00	3.00	1.66	1.00	391.4	81.0	9.0	68.30	B
46	2.33	5.00	2.00	2.00	2.00	414.0	88.0	10.0	68.34	B
48	4.00	4.00	4.00	1.66	1.00	406.4	108.0	5.0	72.13	A
AVG	3.35	4.71	2.64	1.78	1.60	378.0	89.2	9.3	69.09	A

¹⁾ Grading ranges are 1 to 5 for marbling score with higher numbers for quality, and 1 to 7 for meat and fat colors, 1 to 3 for firmness, maturity and grade with lower numbers for better quality.

²⁾ Area were measured from longissimus muscle taken as 13th rib, and back fat thickness was also measured at 13th rib.

³⁾ Yield index were calculated using the following equation : yield index = {65.834 - (0.393×backfat thickness (mm)) + (0.088×longissimus area (cm²)) - (0.008×cold carcass weight (kg))} + 2.01.

⁴⁾ Grade index were estimated based on yeild index; A (1.0) for higher than 69.0, B (2.0) for 66.0~69.0 and C (3.0) for lower than 66.0.

라. 혈청 대사물질 및 insulin 농도의 변화

한우 거세우의 비육기간중 혈청 glucose와 NEFA, insulin 농도의 변화는 Table 35와 같다.

혈청 glucose 농도는 농후사료 제한급여 시기인 18개월령까지는 일정 수준(77.69~78.29mg/dl)을 유지하다가 자유채식 기간에는 급격히 감소하기 시작하여 24개월령에는 61.92mg/dl까지 감소하는 등 대체로 연령증가와 함께 감소하는 경향으로 나타났다($P < 0.01$). 또한 serum NEFA 농도는 14~18개월령까지 서서히 감소하였고 비육말기에 급격히 증가하여 22개월령에는 $421.62 \mu\text{Eq/l}$ 로 최고치를 나타내고 이후에도 계속해서 높은 수준을 유지하였다($P < 0.01$). 한편, serum insulin 농도는 16, 20 및 24개월령에 각각 20.16, 27.46 및 $17.86 \mu\text{U/ml}$ 로 나타났다($P < 0.05$).

Table 35. Changes of serum glucose, NEFA and insulin concentrates by fattening periods in Hanwoo steers

Item	Finisher I (months)			Finisher II (months)			P ≤
	14	16	18	20	22	24	
Glucose (mg/dl)	77.69 ^a ± 18.10	80.71 ^a ± 18.09	78.29 ^a ± 16.41	69.50 ^b ± 16.25	63.25 ^{bc} ± 13.38	61.92 ^c ± 16.65	0.0001
NEFA ($\mu\text{Eq/l}$)	293.54 ^c ± 48.57	213.64 ^d ± 39.50	228.50 ^d ± 40.87	376.86 ^b ± 55.43	421.62 ^a ± 53.80	395.30 ^a ± 45.35	0.0001
Insulin ($\mu\text{U/ml}$)	-	20.16 ^b ± 16.37	-	27.46 ^a ± 9.57	-	17.86 ^b ± 3.56	0.0317

*Mean ± S.D.

일반적으로 고 농후사료 다급시에는 혈중 glucose 농도가 증가(松崎과 原 慎, 1995)하게 되는 것으로 알려져 있는데 본 시험에서는 19~20개월령 사이에 자유채식으로 인한 에너지 섭취량의 증가에도 불구하고 serum glucose 농도가 감소하기 시작하였다. 이러한 이유는 비육말기의 급속한 체지방 축적으로 인한 지방세포에서의 glucose 이용성의 증가, 간에서의 glucose 신생능력의 저하, insulin 감수성 향상에 의한 glucose 처리 능력의 향상 등이 예상되지만 그 상세한 것은 불분명하다. Stufflebeam 등(1969)은 58주령의 heifer들을 에너지 급여

수준에 따라 16두씩 3그룹으로 7.5개월 동안 사육한 결과 혈중 glucose 농도가 점점 감소하였고 에너지 섭취량과는 별 관계가 없었다고 하였고 Bide 등(1973)도 18개월령(340kg)의 Herford 거세우 12두를 105일 동안 시험한 결과 혈중 glucose 농도가 50일까지는 일정 수준을 유지하다가 그 이후부터는 2/3 정도로 감소하였다고 하여 본 시험과 유사한 결과를 나타내었다.

혈중 NEFA 농도는 절식시에 현저하게 증가되며(Hartmann과 Lascelles, 1965; Thye 등, 1970; Christie, 1978) 농후사료 섭취량이 증가하게 되면 NEFA 농도는 감소(Van Soest, 1963; Bowden, 1971)하게 되는데 이러한 이유는 지방세포로부터의 지방산 방출의 증·감에 의한 것이다(Jenny 등, 1974). 左 등(1989)은 Holstein 거세우 16두를 농후사료 위주로 12개월간 비육 시켰을 때 혈장 NEFA 농도는 월령과 관계없이 대부분 일정 농도를 유지하였고 17개월령에 높은 수치를 보인 것은 대사체중당 TDN 섭취량이 감소한 시기와 일치하였다고 하였다. 그러나 본 시험에서는 에너지 섭취량이 급격히 증가했던 시기(19~20개월령)에 혈청 NEFA 농도도 급격한 증가를 나타내었고 그 이후 에너지 섭취량의 감소와는 상관없이 높은 수준을 유지하였다. Pothoven 등(1975)과 Sidhu 등(1973)은 지방조직의 지방산 동원 lipase(fatty acid mobilizing lipase, FAML)의 활성은 비육이 진행됨과 동시에 오히려 증가한다는 보고를 하였다. 따라서 이러한 지방조직에서의 FAML활성의 증가는 본 시험에서의 NEFA가 비육이 진행됨에 따라 증가한 경향을 일부 설명할 수 있을 것이라고 사료된다. 한편 Sidhu 와 Emery(1976)는 젖소에 고 농후사료와 일반사료(조사료+농후사료)를 급여하였을 때 고 농후사료 급여시 혈중 NEFA 농도가 더 높았다고 하였고 北川(1983)도 흑모화종 4두와 Holstein 6두를 각각 12 및 10개월간 자유채식시켰을 때 양쪽 모두 비육의 진행과 함께 혈중 NEFA의 농도가 서서히 증가하였다고 하였다.

Insulin 농도는 20개월령에 증가하였다가 24개월령에는 다시 감소됨을 나타내었는데 16, 20 및 24개월령 만의 성적으로는 전체 비육기간의 insulin 농도 변화를 정확히 알아 볼 수 없을 것으로 사료된다. 그러나 松崎과 原愼(1995)는 흑모화종과 갈모화종, Holstein 거세우를 비육전기는 조사료 위주로 비육 후기에는 농후사료와 볏짚을 급여하는 동일 사양조건하에서 비육시켜 비육기간 전 기간 동안의 혈중 insulin 농도를 조사해 본 결과 혈중 insulin 농도는 3품종 모두 체중증가에 따라 증가하였다고 하였다. 그러나 흑모화종 거세우를 농후사료 위주로 15~26개월간 비육 시킨 시험에서는 비육이 진행됨에 따라 insulin 농도가

증가하지 않았다고 하였는데 이는 농후사료 위주의 사육 조건하에서는 비교적 이른 시기에 insulin 농도가 일정이상 증가하였기 때문이라고 하였고 비육말기로 갈수록 insulin 분비 능력과 glucose 처리 속도 또한 현저히 상승하였다고 하였다. Trenkl과 Topel(1978)도 소에 있어서 serum insulin은 연령 증가와 함께 증가하는 경향을 나타내었다고 보고하였다.

마. 혈액성상과 도체성적간의 상관

Table 36은 비육기간 중에 조사한 serum glucose, NEFA 및 insulin 농도를 비육전기, 비육후기 그리고 전 비육기간에 걸친 평균치 그리고 비육종료시(24개월령)로 나누어 도체성적과의 상관을 나타낸 결과이다.

Serum glucose 농도는 어떠한 도체성적과도 상관을 나타내지 않았다. 그러나 Serum NEFA 농도는 비육전기시와 비육종료시($P<0.05$) 및 비육후기시와 비육기 전체 평균($P<0.01$) 모두에서 근내지방도와 정의 상관관계를 나타내어 NEFA의 농도가 높은 소에서는 근내지방도가 높은 것으로 나타났다. 또한 도체율과의 상관에 있어서는 비록 유의성은 인정되지는 않았지만 비육종료시(24개월령)에 약간의 경향($P<0.06$)을 나타내었다. 北川(1983)는 흑모화종(黑毛和種)에 있어서 비육종료시 및 비육 전기간 평균치 NEFA 농도와 근내지방도 간에 높은 정(正)의 상관관계($P<0.01$)를 보았다고 하여 본 시험과 일치하는 결과를 나타내었고, 澤崎과 加納(1977)은 일본 단각종(短角種) 거세우 10두에 대한 시험에서 비육중기에서 도체율과 NEFA간의 유의적인 정의 상관관계($P<0.01$)가 인정되었다고 하였다. 반추동물에 있어서의 체지방 축적은 주로 지방조직 내에서의 triglyceride 축적에 의한 것이며 또한 지방조직은 triglyceride로서의 축적과 NEFA로서의 혈중으로의 동원에 의해 동적 평형상태에서 triglyceride를 축적하는 것으로 알려져 있다(Emery, 1979). 이러한 지방조직에서의 NEFA 합성은 지방산 동원 lipase(fatty acid mobilizing lipase, FAML) 활성 증가에 의해 비육의 진행과 함께 오히려 증가를 한다(Pothoven, 1975; Kris-Etherton과 Etherton, 1982). 따라서 본 시험에서도 비육말기에 NEFA 농도가 유의적으로 증가한 것으로 볼 때 혈청 NEFA 농도 및 비육기간중의 증가량 등으로 도체성적을 어느 정도 추적하는 것이 가능하리라 사료된다.

Insulin 농도와의 상관에 있어서는 전 도체성적에 있어서 유의성은 인정되지는 않았지만 비육종료시(24개월령)에서 근내지방도와 어느 정도 상관의 가능성($P<0.09$)을 나타내었다. 한편 Trenkl과 Topel(1978)은 소에 있어서 insulin

Table 36. Simple correlation coefficients between carcass characteristics and a serum metabolite, insulin

Item	Finisher I			Finisher II			Mean			Final		
	Glucose	Insulin	NEFA	Glucose	Insulin	NEFA	Glucose	Insulin	NEFA	Glucose	Insulin	NEFA
Dressing, %	.380	-.543	.247	.102	-.423	.464	.249	-.562	.277	.186	.395	.602
Marbling score	-.123	.215	.585*	-.169	.342	.747**	-.319	.251	.701**	-.233	.536	.671*
Backfat thickness	.278	-.123	-.094	-.099	-.052	-.572	.130	-.133	-.446	.025	.515	.352
<i>Longissimus</i> muscle area	.091	-.199	.401	.254	.122	.004	.393	-.193	.250	.391	.114	-.268
Yield index	-.149	-.059	.199	.260	.295	.396	.155	-.016	.358	.280	-.267	-.477
Fat %	-.140	-.221	.198	.046	.370	.342	-.171	-.005	.234	-.239	-.650	.025

* P<0.05

**P<0.01

농도는 도체지방(carcass adipose)과 배최장근단면적내 지방비율간에 정의 상관 관계가 있다고 하였으나 松崎과 原愼(1995)도 혈중 insulin 농도와 지육 중 지방 비율간에는 다소 정의 상관성이 나타났지만 근내지방도와의 상관에서는 명확한 관계가 인정되지 않았다고 하였다. 그러나 체지방 축적의 진행이 빠르고 지방교 잡능이 높다고 알려진 흑모화종에 있어서 insulin의 분비가 높았던 것은 지방 축적이나 지방교잡에 관여하고 있다는 것을 시사한다고 하였다. 따라서 혈중 insulin 농도가 육질예측의 지표로서 실용이 가능한지의 여부를 분명히 하기 위해서는 더 많은 공시두수에 의한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

8. (시험 7) 반추위내 propionate 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향

가. pH 변화

반추위내 propionate 주입에 따른 시간대별 pH 변화는 Table 37에서와 같이 시간이 경과함에 따라 거의 비슷한 수준으로 증가하였고 주입액 제조시 pH를 7.0 수준으로 동일하게 맞춰주었기 때문에 propionate 주입에 의한 처리구간의 통계적 유의차는 나타나지 않았다.

Table 37. Changes of rumen pH by intraruminal propionate infusion

Propionate level	Time (min.) after infusion				
	0	60	120	180	300
Control	6.70	6.68	6.73	6.79	7.00
0.5 M	6.67	6.76	6.75	6.84	6.98
1.0 M	6.74	6.73	6.69	6.83	6.97
1.5 M	6.65	6.61	6.72	6.81	7.02

나. VFA 함량

반추위내 propionate 주입에 따른 VFA 함량 변화는 Table 38과 같다.

총VFA 함량은 주입 후 1시간대에 1.5, 1.0 및 0.5M 주입구 및 대조구 순으로 높게 나타났고 이후 점차 감소하는 경향이었으나 처리간 차이는 없었다.

Table 38. Changes of rumen VFA by intraruminal propionate infusion

Propionate level	VFA concentrations	Time (min.) after infusion				
		0	60	120	180	300
Control	Acetate	54.01	43.27	44.63	38.29	35.78
	Propionate	14.43	11.60 ^c	11.73 ^c	9.82 ^b	8.95
	Isobutyrate	1.14	0.88	0.88	0.75	0.77
	Butyrate	7.03	5.97	6.15	5.20	4.78
	Isovalerate	0.79	0.58	0.57	0.49	0.54
	Valerate	1.15	0.80	0.76	0.62	0.60
	A/P ratio	3.81	3.85 ^a	4.01 ^a	4.14 ^a	4.25 ^a
	Total VFA, mM/100ml	78.55	63.10	64.71	55.17	51.43
0.5 M	Acetate	50.61	44.92	44.20	40.39	34.51
	Propionate	13.93	26.00 ^{bc}	20.87 ^{bc}	16.17 ^{ab}	10.62
	Isobutyrate	1.00	1.09	0.85	0.84	0.62
	Butyrate	7.31	8.37	6.68	6.22	3.80
	Isovalerate	0.70	0.70	0.53	0.56	0.37
	Valerate	1.00	0.97	0.75	0.71	0.44
	A/P ratio	3.75	1.73 ^b	2.17 ^b	2.60 ^b	3.49 ^a
	Total VFA, mM/100ml	74.55	82.06	73.88	64.90	50.36
1.0 M	Acetate	50.35	47.52	47.12	45.25	34.84
	Propionate	12.44	32.26 ^b	26.30 ^{ab}	21.09 ^a	14.77
	Isobutyrate	0.99	0.94	0.96	0.93	0.75
	Butyrate	6.66	6.64	7.03	6.63	4.96
	Isovalerate	0.69	0.56	0.58	0.54	0.46
	Valerate	0.99	0.85	0.83	0.78	0.58
	A/P ratio	4.16	1.47 ^{bc}	1.81 ^b	2.18 ^{bc}	2.36 ^b
	Total VFA, mM/100ml	72.13	88.77	82.82	75.23	56.37
1.5 M	Acetate	53.92	51.20	43.29	37.37	30.11
	Propionate	14.39	47.98 ^a	34.86 ^a	24.20 ^a	15.93
	Isobutyrate	1.03	1.00	0.72	0.82	0.66
	Butyrate	7.04	7.06	5.03	5.48	3.92
	Isovalerate	0.69	0.65	0.45	0.52	0.37
	Valerate	1.00	0.83	0.54	0.68	0.47
	A/P ratio	3.79	1.06 ^c	1.24 ^c	1.54 ^c	1.94 ^b
	Total VFA, mM/100ml	78.07	108.71	84.89	69.07	51.46

^{abc} Means within the same row with different superscripts differ (P<0.05).

Propionate 함량에 있어서도 주입 후 1시간대에 주입 농도가 높을수록 높게 나타나 acetate와 propionate의 비율(A/P ratio)도 낮았으며 이후 점차 감소하였다. Acetate를 비롯한 이외의 다른 VFA는 전 시간대에 걸쳐 propionate 주입에 의한 차이가 없었다.

다. 혈중 대사물질 및 insulin 농도의 변화

반추위내 propionate 주입에 의한 insulin 및 혈중 대사물질 농도의 변화는 Fig. 11과 같다.

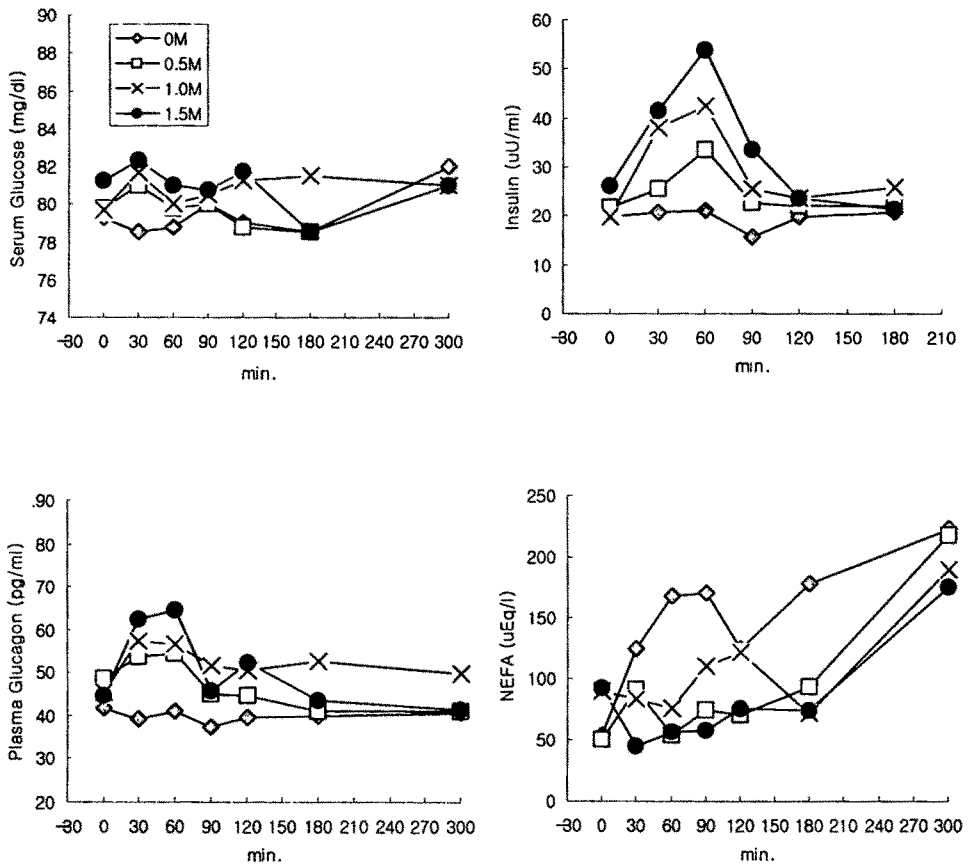


Fig. 11. Changes of blood metabolites and hormones concentrations by intraruminal propionate infusion

반추위내 propionate 주입 후 insulin 농도는 1.5M 주입구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하여 주입 후 60분대에 최대치를 나타내었고($P < 0.05$) 이후 점차 감소하여 90분 이후에는 주입 이전의 수준을 유지하였다. 그러나 0.5 및 1.0M 주입구에서는 대조구에 비해 주입기간 동안 증가하는 경향을 나타내었으나 유의차는 인정되지 않았다. Serum glucose 농도에 있어서는 모든 처리구에 있어서 propionate 주입에 따른 변화가 나타나지 않았다.

또한 glucagon 농도의 변화에 있어서는 propionate 주입에 의해 전처리구에서 대조구에 비해 주입기간 동안 다소 증가하는 경향을 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다. NEFA 농도는 propionate 1.5M 주입구에서 주입기간 동안 대조구에 비해 유의적으로 감소($P < 0.05$)하여 계속 낮은 농도를 유지하다가 300분대에는 다시 증가하여 대조구 및 다른 처리구와 비슷한 수준을 나타내었다. 반면에 0.5와 1.0M 주입구에 있어서는 대조구에 비해 다소 감소하는 경향을 나타내었지만 유의차는 인정되지 않았으며 대조구는 사료급여에 의하여 시험개시 시부터 종료시까지 점차 증가하는 경향을 보였다.

Propionate는 insulin과 glucagon 분비에 생리적 의의를 지니는 VFA 중에 하나로 알려져 있다(Bines와 Hart, 1984; Istasse 등, 1987; 佐野, 1997). Propionate는 간장에서의 glycogenolysis와 gluconeogenesis를 통하여 혈중으로의 glucose 방출을 증가시키거나 또는 직접 췌장세포를 자극함으로써 insulin 분비를 촉진시킬 수 있는데(Bassett, 1972), Anil과 Forbes (1984)는 propionate가 hepatic neuro receptor에 작용하여 insulin 분비를 직접 자극할 수 있다고 하였고 Sano 등(1989)도 반추동물에 있어서는 glucose 보다는 오히려 propionate가 신경계 또는 insulin 자극 기질(insulinotropic substrates)을 직접 자극함으로써 insulin의 분비를 촉진시킬 수 있다고 하였다.

본 시험에서는 propionate 주입에 의해 insulin 분비는 촉진되었으나 glucose의 농도에는 영향을 미치지 못하였는데 이러한 결과만으로 insulin 분비가 propionate의 직접적인 작용으로만 판단하기는 어려운 것으로 사료된다. 즉, propionate가 gluconeogenesis의 전구물질이고 여기서 생성된 glucose가 insulin 분비를 자극할 수 있다는 점도 간과할 수 없다고 사료된다.

반추동물은 일반적인 사양조건하에서의 혈중 propionate 농도는 매우 낮은 농도로 존재한다(Istasse 등, 1987). 이러한 이유는 반추위로부터 흡수된 propionate의 거의 대부분이 간에서 흡수(Baird 등, 1980; Bergman과 Wolff, 1971)되기 때문인데 이 흡수량은 항상 일정하지 않고 혈액의 유입(출)량, 세포내

에서 대사물질로서의 propionate의 필요성 그리고 그 밖의 요인에 의해 좌우된다(Manns 등, 1967). 만약 과량의 propionate가 반추위벽에서 흡수된다면 그만큼 propionate는 간장에서도 빠르게 흡수될 것이고 gluconeogenesis는 간장에서의 glycogen 저장량이 충만해질 때까지 가속화 될 것이며(Manns 등, 1967), 결국에는 간장에서의 흡수 한계를 초과하게 되어 혈중 propionate 농도가 증가하게 될 것이다. 따라서 간장에서 생성된 glucose와 증가된 혈중 propionate는 insulin의 분비를 자극하게 되어 이 insulin이 glucose를 말초조직으로 빠르게 이송하게 될 것이다.

이러한 가설에서 본다면 본 시험에서의 serum insulin 농도의 증가는 간장에서의 gluconeogenesis의 증가와 propionate의 췌장세포의 직접적인 작용 모두가 원인이 될 수 있을 것으로 사료되며, serum glucose 농도의 변화가 없었던 것은 급격한 insulin 농도 증가로 인해 glucose가 말초조직으로 빠르게 이용되었기 때문으로 생각되지만 그 정확한 원인은 알 수 없었다. 또한 Istasse 등(1987)의 연구에서도 건유우의 반추위로 propionate를 약 $70 \mu\text{mol/kg BW/min}$ 로 주입한 결과 insulin 농도는 증가하였지만 glucose 농도의 증가는 없었다고 하여 본 시험과 유사한 결과를 나타내었다.

한편, 본 시험에서는 plasma glucagon의 현저한 증가는 나타나지 않았는데 propionate에 대한 glucagon의 반응은 insulin 만큼 명료하지 않고 반추위에서의 일반적인 흡수 속도에서는 glucagon 분비가 자극될 가능성이 극히 적은 것으로 보고되고 있다(Brockman, 1982; Dejong, 1982; Mineo 등, 1990).

Insulin은 지방조직에 있어 지방합성을 촉진하고 지방분해를 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있는데(Yang과 Baldwin, 1973), 본 시험에서 propionate 주입에 의한 NEFA 농도의 유의적 감소는 insulin 농도의 증가에 의해 지방 분해 작용이 억제된 결과로 사료된다.

9. (시험 8) 한우 거세우 경정맥 glucose 주입에 의한 혈중 대사 물질 변화

혈청 glucose 농도는 경정맥으로 glucose 주입 후 10분내에 증가하였으나 50, 100mg/BW kg 모두 30분에 대조구와 같은 수준으로 감소하여 유지되었다. 혈청 insulin 농도는 50mg/BW kg 주입구에서는 주입 후 5분 100mg/BW kg 주입구에서는 15분에 최고치를 나타내다가 이후 점차 감소하여 glucose 주입이

insulin 분비를 자극하는 것으로 나타났다.

혈청 NEFA 농도는 glucose 주입 후 10분내에 glucose 주입한 구에서 유의적으로 감소하였고 100mg/BW kg 주입구에서는 2시간까지 대조구에 비해 낮게 나타났으며 혈장 glucagon 농도는 glucose 주입에 의하여 1시간 정도 낮은 경향을 보였으며, 특히 100mg/ BW kg에서는 유의적으로 낮게 나타났는데 이러한 이유는 혈액내 glucose 주입에 의해 간장에서의 gluconeogenesis가 저해되고 이로 인한 insulin 농도의 증가가 lipolysis를 저해시켰기 때문으로 사료된다.

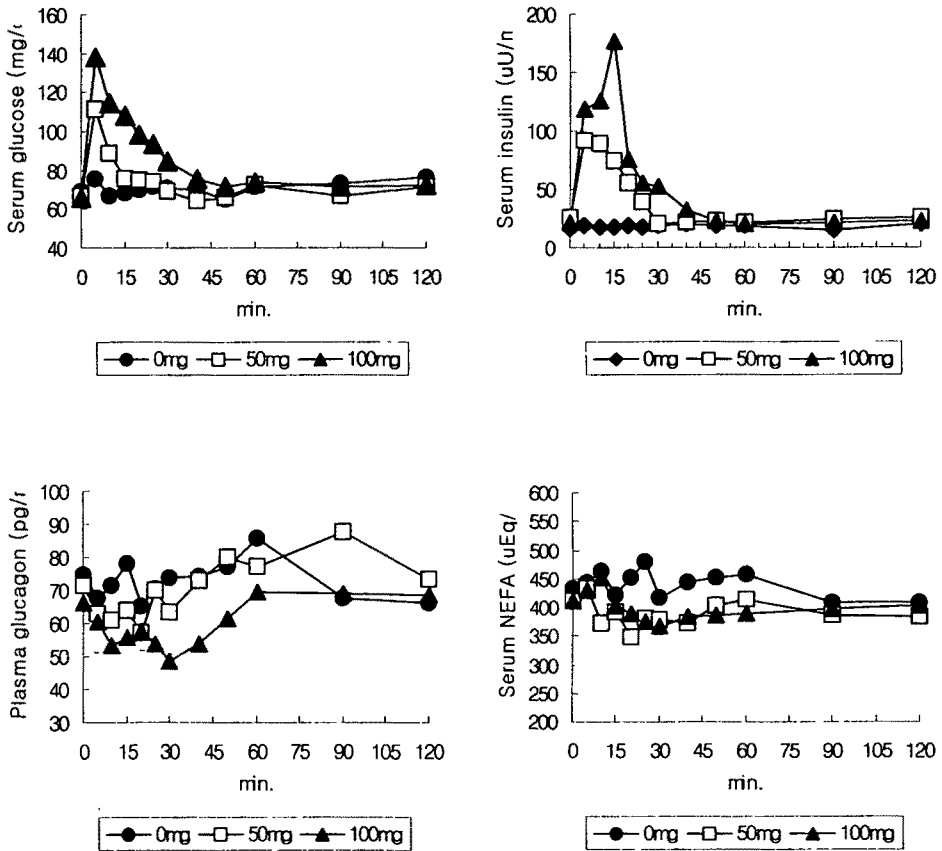


Fig. 12. Changes of blood metabolites and hormones concentrations by intravenous glucose infusion

10. (시험 9) 가축사료원료의 발효시간별 VFA 농도 변화

각 단미사료의 acetate와 propionate의 비율(A/P 비율)은 볏짚과 알팔파와 같은 섬유질이 많은 조사료원에서 가장 높은 수치를 나타냈고 밀과 타피오카와 같은 에너지사료에서 가장 낮게 나타났다. 또한 보리는 다른 에너지 사료에 비하여 A/P 비율도 비교적 높고 propionate 생성 비율도 낮았는데 이는 섬유소 함량이 높은 사료적 특성 때문으로 사료된다. 한편 강피류 중에서는 소맥피가 propionate 생성율이 가장 높았고 A/P비율도 가장 낮은 것으로 나타났다.

Table 39. Concentration of VFA of feed ingredients by *in vitro* fermentation

사료명	Total VFA	C2	C3	Iso-C4	C4	Iso-C5	C5	A/P
	mM/ℓ	-----				molar %	-----	
대조구	96.34	66.04	18.25	1.08	12.49	1.00	1.13	3.62
밀	145.84	61.00	21.67	1.06	13.86	1.13	1.28	2.83
보리	142.58	64.67	18.71	1.00	13.64	0.92	1.07	3.47
옥수수	115.55	62.91	19.21	1.00	14.77	0.96	1.15	3.29
수수	124.69	63.29	18.82	1.02	14.73	1.02	1.13	3.36
타피오카	139.82	63.24	21.29	0.78	13.12	0.81	0.76	2.99
비트펄프	150.93	67.05	18.38	0.83	12.25	0.72	0.78	3.66
대두박	156.49	64.51	18.59	1.16	13.09	1.18	1.47	3.49
옥글루텐	134.22	64.51	18.18	1.11	13.76	1.03	1.41	3.55
소맥피	130.90	62.25	20.41	1.05	14.17	0.98	1.14	3.06
채종박	148.83	64.12	18.80	1.25	13.27	1.11	1.46	3.41
면실박	128.15	66.62	17.11	1.02	13.21	0.94	1.09	3.90
팜박	142.29	65.24	17.65	1.06	13.76	1.10	1.19	3.70
단백피	149.56	62.88	19.43	1.13	14.08	1.01	1.47	3.24
야자박	127.03	63.98	18.75	0.94	14.44	0.93	0.96	3.42
알팔파큐브	114.62	66.92	17.17	0.96	13.03	0.90	1.02	3.90
알팔파펠렛	122.42	64.36	18.51	1.05	13.84	1.05	1.18	3.48
볏짚	104.83	66.78	16.49	1.07	13.55	0.96	1.14	4.05
옥수수 사일리지	118.07	63.42	18.64	1.03	14.78	1.04	1.09	3.42

11. (시험 10) Acetate 및 propionate 급여가 혈중 glucose 및 insulin 농도에 미치는 영향

가. 반추위 발효성상의 변화

휘발성지방산 급여에 따른 반추위 pH 농도의 변화는 전 처리구에서 급여 후 5시간대까지 점차 감소하였다가 이후에 증가하였고 암모니아 농도는 2시간대까지 증가하였다가 이후 점차 감소하는 경향으로 나타났다. 반추위 휘발성지방산 농도에 있어서는 acetate와 propionate 급여구에서 사료급여후 1시간대에 acetate와 propionate 농도가 가장 높게 나타나 이때의 A/P 비율이 각각 1.95와 1.33으로 나타났다.

Table 40. Changes of rumen pH by acetate and propionate supplementation

Treatments	Time (hr.)					
	0	1	2	3	5	7
Control	7.00	6.55	6.38	6.24	5.96	6.48
Sodium Acetate	7.24	6.75	6.58	6.44	5.93	6.70
Sodium Propionate	7.15	6.69	6.35	6.23	6.18	6.73

Table 41. Changes of rumen ammonia concentration by acetate and propionate supplementation (mg/ℓ)

Treatments	Time (hr.)					
	0	1	2	3	5	7
Control	85.2	153.9	193.5	159.5	99.4	43.7
Sodium Acetate	53.6	142.2	156.9	142.6	95.7	28.7
Sodium Propionate	93.7	159.0	204.0	187.3	55.1	41.6

Table 42. Changes of rumen VFA concentration by acetate and propionate supplementation

Treatment	VFA concentration	Time (hr.)					
		0	1	2	3	5	7
Control	Total VFA, mM/100ml	69.05	86.46	97.15	99.10	98.25	78.50
	A/P ratio	3.26	2.83	2.89	2.87	3.01	3.25
	Acetate, molar %	62.69	60.33	60.88	60.90	61.95	63.42
	Propionate	19.34	21.40	21.21	21.33	20.65	19.57
	Isobutyrate	1.66	1.33	1.33	1.29	1.10	1.15
	Butyrate	13.87	14.45	13.73	13.18	13.49	13.80
	Isovalerate	1.12	1.00	1.04	0.98	0.72	0.67
	Valerate	1.32	1.48	1.82	2.32	2.09	1.39
Sodium Acetate	Total VFA, mM/100ml	56.72	96.69	109.12	112.98	130.43	85.58
	A/P ratio	3.66	3.95	3.88	3.59	3.70	3.55
	Acetate, molar %	64.37	67.30	66.28	66.65	65.39	64.97
	Propionate	17.74	17.23	17.45	18.53	18.00	18.42
	Isobutyrate	1.86	1.33	1.16	1.12	1.02	1.15
	Butyrate	13.65	11.82	12.54	12.11	13.39	13.65
	Isovalerate	1.34	0.97	0.94	1.01	0.74	0.71
	Valerate	1.04	1.35	1.62	1.58	1.46	1.10
Sodium Propionate	Total VFA, mM/100ml	64.50	113.17	123.48	112.05	107.30	75.91
	A/P ratio	3.48	1.33	1.62	1.85	2.26	2.64
	Acetate, molar %	64.24	49.02	52.36	55.07	58.56	61.06
	Propionate	18.51	37.43	32.92	30.01	26.30	23.32
	Isobutyrate	1.85	1.05	1.19	1.19	1.12	1.19
	Butyrate	13.00	10.26	10.74	10.93	11.83	12.49
	Isovalerate	1.43	0.86	0.97	0.89	0.71	0.78
	Valerate	0.97	1.38	1.82	1.90	1.48	1.15

나. 혈액성상의 변화

휘발성지방산 급여에 따른 혈청 glucose의 농도는 모든 처리구에서 급여 후 30~40분까지 감소하다가 이후 점차 증가하는 경향으로 나타났다. 혈청 insulin 농도에 있어서는 propionate 급여구에서 급여 후 다른 처리구에 비해 유의적으로

증가하여 30분대에 가장 높았으며 이후 점차 감소하여 propionate가 insulin 분비에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 acetate는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

한편 총 cholesterol 농도 변화에 있어서는 휘발성지방산 첨가급여에 의한 영향이 없는 것으로 나타났으며 혈청 triglycerol 농도에 있어서는 유의적인 차이는 없었다.

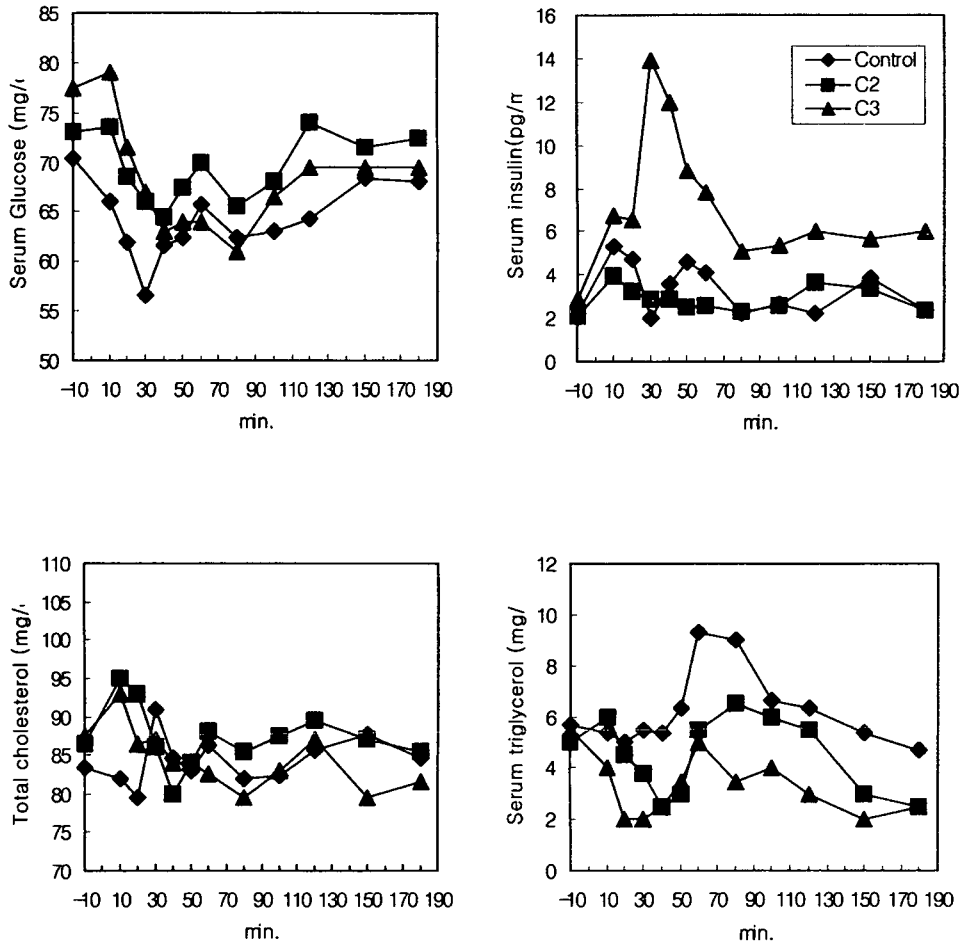


Fig. 13. Changes of blood metabolites and insulin concentration by acetate and propionate supplementation

12. (시험 11) 한우 4위내 탄수화물원 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향

가. 혈중 대사물질 및 insulin 농도의 변화

제4위내로 탄수화물원 주입에 의한 혈중 대사물질 및 insulin 농도의 변화는 Table 43과 같다.

Glucose 주입구에 있어서 혈청 glucose 농도는 주입 후 30~80분까지 유의적으로 증가($P<0.05$)하였다가 이후 감소하여 계속 일정한 농도를 유지하는 경향으로 나타났다. 또한 insulin 농도에 있어서는 주입 후 20분대에 유의적으로 증가($P<0.05$)를 한 후 지속적으로 높은 농도로 유지되는 것으로 보아 제4위내 glucose 주입이 혈청 insulin 분비에 강하게 영향을 미치는 것으로 나타났다.

한편 혈장 glucagon 농도에 있어서는 starch와 molasses 주입구가 120분 ($P<0.05$) 그리고 420분에 molasses 주입구($P<0.05$)가 대조구와 유의성을 나타내었을 뿐 전 시험기간 동안에 유의적인 차이를 보이지 않았고 starch와 molasses 주입구간에서도 유의적 차이를 보이지 않아 제4위로의 starch와 molasses 주입은 혈장 glucagon 농도 변화에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그러나 glucose 주입구에서는 주입 후 glucagon 농도가 감소하기 시작하여 40분에는 42.75pg/ml 로 최저의 수치를 보였고($P<0.05$) 그 후 계속해서 낮은 농도를 유지하여 제4위로의 glucose 주입은 혈장 glucagon 농도를 감소시키는 것으로 나타났다.

혈청 NEFA 농도에 있어서도 starch와 molasses 주입구에서는 150분과 180분($P<0.05$)을 제외하고는 대조구와 유의성이 나타나지 않았으며 starch와 molasses 주입구간에서도 차이는 없었다. 그러나 glucose 주입구에서는 주입 후 80분대에서부터 유의적으로 감소($P<0.05$)하는 경향을 나타내었다. 따라서 제4위내 glucose 주입은 혈청 NEFA 농도에 있어서도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 한편, 대조구에 있어서는 모든 혈액성상에 있어서 특별한 증가나 감소되는 경향은 없이 계속 높은 농도로 유지되는 경향을 나타내었다.

Huntington과 Reynold(1986)는 4위로의 glucose 주입량을 증가시킬수록 혈장 glucose 농도와 net glucose 흡수량이 증가되며 glucose 흡수율은 starch를 주입하였을 때 보다 높다고 하였다. 또한 Kreikemeier 등(1991)도 알팔파만을 급여시킨 거세우의 제4위에 glucose, starch 또는 dextrin 등을 주입한 결과 동맥혈에서의 glucose 농도와 문맥혈로 유입되는 glucose 양은 glucose 주입속도

Table 43. Changes of serum glucose and insulin, NEFA, and plasma glucagon by abomasal carbohydrate infusions

Item	Time (min.) after infusion																			
	-30	-15	10	20	30	40	50	60	80	100	120	150	180	210	240	300	360	420	480	540
Glucose (mg/dℓ)																				
Water	60.00	59.50	59.50	60.50	59.00 ^b	61.00	57.50 ^b	59.50	57.00 ^b	60.50	62.50	59.00	62.50	62.00	60.00	65.5	60.50	63.50	55.00	56.50
Glucose	62.00	62.67	69.33	73.33	71.33 ^a	72.00	75.67 ^a	74.00	70.33 ^a	70.33	62.67	66.33	64.00	62.67	67.33	69.33	63.67	66.00	63.67	67.33
Starch	64.00	64.33	65.00	63.00	65.67 ^{ab}	65.67	64.33 ^{ab}	65.67	62.67 ^{ab}	70.67	62.00	65.67	66.67	62.00	63.33	69.00	64.33	64.67	65.33	60.67
Molasses	61.67	66.00	64.33	67.00	65.67 ^{ab}	67.33	67.33 ^{ab}	65.00	62.67 ^{ab}	64.00	64.67	67.00	71.33	68.67	69.33	69.33	62.50	74.67	67.33	67.00
Insulin (μU/ml)																				
Water	32.97	28.05	42.02	30.41 ^b	29.44 ^b	38.75 ^b	34.05 ^b	28.97 ^b	31.92 ^b	23.48 ^b	24.05 ^b	19.92 ^b	17.15 ^b	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	22.37	22.01	29.44	36.92 ^a	40.92 ^a	38.05 ^a	34.61 ^a	37.52 ^a	29.44 ^a	29.72 ^a	33.50 ^a	37.52 ^a	31.92 ^a	-	-	-	-	-	-	-
Starch	32.33	32.44	33.50	35.74 ^b	34.05 ^b	36.92 ^b	34.61 ^b	38.75 ^b	37.52 ^b	29.44 ^{bc}	22.97 ^b	22.44 ^b	17.60 ^b	-	-	-	-	-	-	-
Molasses	41.34	30.41	38.13	39.39 ^b	35.55 ^{ab}	32.97 ^b	36.33 ^b	32.50 ^b	32.97 ^b	26.29 ^{ab}	28.13 ^b	24.25 ^b	20.90 ^b	-	-	-	-	-	-	-
Glucagon (pg/ml)																				
Water	90.23	94.50	77.44	82.05	78.02	75.60 ^{ab}	78.75 ^a	63.58	74.33 ^a	69.31	78.57 ^a	84.13 ^a	74.62 ^a	80.80 ^a	75.15	87.49	78.51	83.78 ^{ab}	84.11	83.88
Glucose	83.10	79.13	77.17	60.31	51.92	42.75 ^b	49.06 ^b	44.49	44.61 ^b	49.64	51.33 ^b	55.76 ^b	7.37 ^b	48.78 ^b	51.74	56.61	68.49	51.07 ^c	56.57	70.67
Starch	81.68	94.42	72.17	69.95	68.57	82.88 ^a	89.63 ^a	88.27	71.64 ^a	61.99	56.86 ^b	73.26 ^{ab}	72.53 ^a	66.17 ^{ab}	59.69	78.67	76.79	104.60 ^a	76.56	89.75
Molasses	79.61	67.07	78.20	73.71	55.89	61.98 ^{ab}	71.69 ^{ab}	70.12	62.51 ^{ab}	47.97	52.21 ^b	51.54 ^b	59.10 ^b	61.59 ^{ab}	58.78	69.02	75.69	74.66 ^{bc}	87.44	68.87
NEFA (μEg/ℓ)																				
Water	361.0	332.0	363.5	318.5	303.5	303.5	294.5	256.0	302.0 ^a	280.0	284.0 ^a	280.0 ^a	300.0 ^a	316.0 ^a	296.0 ^a	316.0 ^a	332.5 ^a	296.0 ^a	249.0 ^a	287.5
Glucose	330.0	300.50	279.5	265.0	242.0	188.5	173.5	214.0	177.0 ^b	178.5	160.8 ^b	190.0 ^b	116.5 ^c	153.0 ^b	130.0 ^b	170.5 ^b	166.5 ^b	144.0 ^b	144.5 ^b	125.5
Starch	353.0	312.0	259.0	328.5	324.0	303.0	337.5	386.0	214.0 ^{ab}	258.0	216.0 ^{ab}	219.5 ^b	186.0 ^b	235.5 ^{ab}	237.5 ^a	269.0 ^{ab}	235.5 ^{ab}	251.5 ^a	208.0 ^a	259.0
Molasses	359.5	269.0	368.5	331.5	312.5	306.0	358.5	304.0	296.5 ^a	219.5	198.5 ^{ab}	189.0 ^b	208.5 ^b	192.5 ^{ab}	234.0 ^a	227.5 ^{ab}	231.5 ^{ab}	234.0 ^a	197.5 ^{ab}	211.5

^{abc} Means within the same row with different superscripts differ (P<0.05).

가 높을수록 높았지만 starch와 dextrin은 20g/h 이상의 속도에서는 차이가 없었다고 하여 starch와 dextrin 소화의 한계를 보고하였으며, Gross 등(1988)도 starch의 공급이 정미 문맥 glucose 흡수에 미치는 영향은 매우 미미하다고 보고하였다. 그러나 본 시험에서는 starch는 물론 glucose 주입에 의해서도 처음 20~80분대를 제외하고는 혈청 glucose 농도 변화에 계속적인 영향을 미치지 못한 것으로 나타났는데 이러한 이유는 각 조직과 장기들에서의 glucose 이용 또는 insulin 농도 증가에 의한 glucose 소실 등의 복합적인 원인 때문으로 사료된다. 또한 insulin 농도 변화에 있어서 glucose 주입구에서의 유의적 증가는 glucose 주입에 어느 정도 영향을 받았을 것으로 여겨지며 혈장 glucagon 및 혈청 NEFA 농도의 유의적 감소도 이 사실을 뒷받침해줄 수 있다고 사료된다. 한편 starch 주입구에 있어서 glucose 농도와 insulin 농도의 변화가 없었던 것은 starch 주입은 혈중 glucose 농도에 영향을 미치지 못한다는 이전의 연구결과(Larsen 등, 1956; Huber 등, 1961; Wright 등, 1966; Little 등, 1968; Coombe와 Smith, 1974)와 일치하였다. 또한 Siddons(1968)는 반추동물에서는 sucrase의 분비량이 매우 저조하다고 하였는데 본 시험에서 molasses의 주입에 의해 혈청 glucose 농도가 영향을 받지 않았던 것도 molasses의 주성분이 sucrose였기 때문으로 사료된다.

13. (시험 12) 한우의 근내지방도 극대화를 위한 비육용 사료 및 사료첨가제 효능 입증

가. 사양시험 성적

평균 일당증체량은 대조구가 타처리구 보다 비교적 높게 나타났으며 특히 처리 1구와 2구에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 높았다. 특히 처리 1구의 낮은 증체량은 시험사료 적용에 약 20일이 소요되었기 때문에 사료섭취량 저하에 의한 결과로 판단된다. 전체적으로 처리별 일당증체량의 차이는 개시체중에서 나타났던 체중의 차이와 거의 유사한 경향을 보였는데 이는 축군들이 거의 동일 연령으로 구성되었음에도 산육성에 있어서는 개체간 차이가 많이 존재하고 있다는 것을 암시하고 있다. 사료섭취량이 대조구나 타처리구, 특히 처리 2구에 비해 낮게 나타났는데 이는 처리 3구의 보호지방으로 코팅된 에너지가가 높은 첨가제를 별도로 섭취하였던 관계로 낮았으리라 생각된다.

Table 44. Growth performance of Hanwoo steers fed fattening feeds or feed additives

	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Initial body Wt.	593.2	578.5	568.4	584.1
Final body Wt.	678.2	636.3	631.2	644.0
Daily gain	0.82 ^a	0.58 ^b	0.66 ^{ab}	0.78 ^a
Feed intake				
Formula feed	8.48 ^a	7.94 ^{ab}	8.85 ^{ab}	8.15 ^b
Rice straw	0.89 ^a	0.85 ^{ab}	0.84 ^{ab}	0.82 ^b

^{ab} Means within the same row with different superscripts differ (P<0.05).

나. 도체 및 육질 조사

근내 지방도는 처리 3구의 경우 5.15로서 대조구를 비롯한 타처리구에 비해 상대적으로 높게 나타난 경향이 있었으나 처리 1구는 대조구보다 오히려 낮게 나타났는데 이는 시험기간 동안의 배합사료 섭취량 감소에 기인한 것으로 판단 된다. 이러한 결과는 육질등급에도 반영되어 처리 3구는 1.15로서 대조구에 비해

Table 45. Beef quality and yield traits of Hanwoo steers fed fattening feeds or feed additives

	Control	T1	T2	T3
Quality traits				
Marbling score	4.25	3.80	4.38	5.15
Meat color	4.00	4.09	3.82	4.00
Fat color	2.91	3.00	2.72	3.10
Firmness	1.42	1.52	1.45	1.30
Grade	1.28	1.34	1.28	1.15
Yield traits				
Cold carcass wt. (kg)	409.09	388.18	384.36	392.40
<i>Longissimus</i> muscle area (cm ²)	81.00	77.55	78.27	82.10
Back fat thickness(cm)	10.09	11.45	11.09	11.95
Yield index	67.73	67.06	67.30	67.49
Grade	B	B	B	B

최소한 10% 정도의 육질개선효과가 있는 것으로 나타났다. 배최장근 단면적은 대조구와 처리 3구가 처리 1, 2구에 비해 다소 높게 나타났지만 육량지수는 거의 비슷하여 평균적으로 모든 처리구가 B등급을 보였다.

등심의 Hunter L, a, b 값은 Table 에서 나타난 바와 같이 L 값은 처리 3구가 타처리구에 비해 다소 높은 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었으며 a 값은 대조구가 처리 3구에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$).

Table 46. Hunter value of *longissimus dorsi* of Hanwoo steers fed fattening feeds or feed additives

Hunter value	Control	T1	T2	T3
L	37.54	36.32	32.97	40.37
a	25.61 ^a	23.05 ^{ab}	21.42 ^{ab}	21.95 ^b
b	10.19	9.26	9.01	9.76

^{ab} Means within the same row with different superscripts differ ($P<0.05$).

다. 고기의 화학적 조성

등심의 일반성분 함량(Table 47)은 처리구간 유의성은 볼 수 없었으나 처리 3구의 경우 타처리구에 비해 조단백질 함량은 다소 낮았던 반면 조지방 함량이 높은 편으로서 Table 의 근내지방도 성적을 뒷받침하였다.

지방산 함량(Table 48)은 처리구간에 통계적 차이가 없었으나 고기의 풍미에 긍정적으로 영향한다고 알려진 올레인산이 처리 3구에서 타처리구보다 약간 높아진 경향을 볼 수 있었다.

아미노산 함량의 경우(Table 49) Cystein과 Methionine의 경우 대조구와 처리 2, 3구에 비해 높게 나타났는데($P<0.05$) 이는 대조구의 등심중 단백질 함량이 높았던데 기인한 결과로 사료되며 그 외 아미노산 함량에서는 처리구간 차이를 볼 수 없었다.

Table 47. Proximate analysis of *longissimus dorsi* of Hanwoo steers fed fattening feeds or feed additives

Items	Control	T1	T2	T3
Crude protein	19.33	19.34	19.08	18.84
Crude fat	15.00	15.65	16.77	18.11
Crude ash	0.93	0.96	0.90	0.90
Moisture	63.22	64.44	64.41	63.15

Table 48. Fatty acid composition of *longissimus dorsi* of Hanwoo steers fed fattening feeds or feed additives

Fatty acids	Control	T1	T2	T3
Mystric (C _{14:0})	2.91	3.07	2.68	2.64
Palmitic (C _{16:0})	29.81	29.82	29.64	29.48
Palmitoreic (C _{16:1W7})	3.00	2.64	3.17	2.47
Stearic (C _{18:0})	11.93	11.51	12.01	11.49
Oleic (C _{18:1W9})	49.94	50.93	49.99	51.87
Linoleic (C _{18:2W6})	1.77	1.47	1.90	1.47
Linolenic (C _{18:3W3})	0.03	0.06	0.05	0.04
Gondoic (C _{20:1W9})	0.30	0.27	0.31	0.31
Dihomo- γ -Linolenic (C _{20:3W6})	0.11	0.08	0.08	0.07
Arachidonic (C _{20:4W6})	0.17	0.16	0.16	0.14

Table 49. Amino acid composition of *longissimus dorsi* of Hanwoo steers fed fattening feeds or feed additives

Amino acids	Control	T1	T2	T3
Cystein	0.26 ^a	0.24 ^{ab}	0.23 ^b	0.22 ^b
Methionine	0.47 ^a	0.44 ^{ab}	0.43 ^b	0.41 ^b
Aspartic acid	1.84	1.86	1.82	1.80
Threonine	0.91	0.92	0.90	0.90
Serine	0.78	0.79	0.76	0.76
Glutamic acid	3.14	3.15	3.09	3.07
Glycine	0.81	0.81	0.81	0.80
Alanine	1.11	1.11	1.10	1.10
Valine	0.88	0.88	0.87	0.88
Iso-Leucine	0.85	0.85	0.84	0.85
Leucine	1.67	1.66	1.62	1.63
Tyrosine	0.69	0.68	0.64	0.68
Phenylalanine	0.87	0.87	0.81	0.86
Lysine	1.79	1.75	1.63	1.73
Histidine	0.79	0.80	0.77	0.79
Arginine	1.14	1.14	1.13	1.12
Proline	0.41	0.79	0.78	0.78

^{ab} Means within the same row with different superscripts differ (P<0.05).

제 4 절 적 요

성과 연령이 한우와 면양 지방조직세포의 물리적 특성에 미치는 영향을 구명하기 위해 한우 및 면양의 지방조직을 채취하여 지방구의 크기를 측정했을 때 성과 연령이 증가함에 따라 지방구의 크기가 증가하였고 부위에 따라서는 근내 지방세포가 가장 작았다.

한우 지방전구세포의 증식과 분화에 있어서는 IGF-1와 Vit C가 각각 촉진효과가 있었으며 Vit A의 전구물질인 all trans retinoic acid는 분화억제효과를 나타내었다.

지방합성에 있어서는 한우지방조직의 부위에 관계없이 지방합성 전구물질인 acetate가 glucose보다 효율적이었으며 아미노산 및 전구체중에서는 leucine이 가장 효율적인 것으로 나타났다. acetate는 지방의 분획중 fatty acid-glyceride 분획으로, glucose는 glycerol 분획으로의 유입이 효율적으로 나타났다. 한우지방조직의 대사에 있어서 insulin은 지방의 합성에, norepinephrine의 지방의 분해 효과적으로 작용하였다.

면양지방전구세포에서는 insulin과 IGF-1가 분화를 촉진하고 FGF와 GH는 억제하는 것으로 나타났고 지방조직의 부위 및 연령간 나타나는 분화능의 차이는 BRL49653을 첨가했을 때 소실되는 것으로 나타나 세포내에서 BRL49653과 결합하는 PPAR- γ ligand가 지방조직의 부위 및 연령간 나타나는 분화능의 차이와 직접적인 관련이 있을 것으로 사료된다.

면양지방조직에 insulin과 DEX을 첨가했을 때 insulin과 DEX는 지방의 합성 있어서 상승작용을 하고 GH는 합성을 저해하는 것으로 나타났으며 isopterenol은 지방분해를 촉진 adenosine deaminase는 억제하는 것으로 나타났다.

한우의 비육과정에 있어서 혈중 insulin 농도와 도체형질과의 상관에 대하여 시험했을때 serum glucose 농도는 월령 증가와 함께 감소하는 경향으로 나타난 ($P < 0.01$) 반면에 serum NEFA(Non-esterified fatty acid) 농도는 증가하였다 ($P < 0.01$). 한편, 혈중 지방대사관련 물질과 도체성적과의 상관에서 serum NEFA 농도는 비육전기시와 비육종료시($P < 0.05$) 및 비육후기시와 비육기 전체 평균($P < 0.01$) 모두에서 근내지방도와 정의 상관관계를 나타내어 NEFA의 농도가 높은 소에서는 근내지방도가 높은 것으로 나타났고 insulin 농도와와의 상관관계는 전 도체성적에 있어서 유의성은 인정되지는 않았지만 비육종료시(24개월령)에서

근내지방도와 어느 정도 상관의 가능성($P < 0.09$)을 나타내었다.

반추위내 propionate 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향을 조사했을 때 반추위내 propionate 주입 후 insulin 농도는 1.5M 주입구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가($P < 0.05$)하였으나 serum glucose 농도에는 변화가 없었다.

한우 4위내 탄수화물 주입이 혈청 glucose와 insulin 농도에 미치는 영향을 알아본 결과 glucose 주입구에서 만이 serum insulin 농도가 유의적으로 증가($P < 0.05$) 하였으며 starch는 물론 molasses 주입구에서도 혈중 대사물질에 유의적인 영향을 미치지 못한 것으로 나타나 molasses도 소장에서의 이용성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

결과적으로 serum NEFA($P < 0.05$)와 insulin 농도($P < 0.09$)가 근내지방도와 관련이 있는 것으로 나타났으며 반추위내로 주입된 propionate와 소장에서 흡수된 glucose가 췌장 insulin 분비를 자극하는 것으로 나타났다. 따라서 월령에 따른 혈중 지방대사 관련물질의 피악함으로써 육질예측이 어느 정도 가능할 것으로 판단되며, 근내지방이 축적되는 시기인 비육말기에 propionate의 첨가 급여나 glucose bypass 기술의 도입 등은 insulin 분비를 유도함으로써 고급육 생산에 지대한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

제 5 절 인용문헌

- A. O. A. C. 1990. Official Methods of Analysis(14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C.
- Amri, E-Z., Grimaldi, P., Negrel, R. & Ailhaud, G. (1984) Adipose conversion of ob 17 cells. Insulin acts solely as a modulator in the expression of the differentiation program. *Experimental cell Research* 152, 368.
- Baird, G. D., M. A. Lomas, H. W. Symonds and S. R. Shaw. 1980. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. *Biochem. J.* 186:47.
- Bassett, J. M. 1972. Plasma glucagon concentrations in sheep : Their regulation and relation to concentration of insulin and growth hormone. *Aust. J. Biol. Sci.* 25:1277.
- Bergman, E. N. and J. E. Wolff. 1971. Metabolism of volatile fatty acids by the liver and portal-drained viscera in sheep. *Am. J. Physiol.* 221:586.
- Bines, J. A. and I. C. Hart. 1984. The response of plasma insulin and other hormones to intraruminal infusion of VFA mixtures in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 64(Suppl):304.
- Bjornorp, P., M. Karlsson, P. Pettersson and Sypniewska. 1980. Differentiation and function of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J. Lipid Res.* 21:714.
- Bohman, V. R. 1955. Compensatory growth of beef cattle : the effect of hay maturity. *J. Anim. Sci.* 14:249.
- Bowden, D. M. 1971. Non-estrified fatty acids and ketone bodies in blood as indicators of nutritional status in ruminants. A review. *Can. J. Anim. Sci.* 51:1.
- Broad, T. E. & Ham, R. G. (1983) Growth and adipose differentiation of sheep preadipocyte fibroblasts in serum free medium. *Eur. J. Biochem.*

135:33.

- Brockman, R. P. 1982. Insulin and glucagon responses in plasma to intraportal infusions of propionate and butyrate in sheep. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 A:237.
- Butterwith, S. C. 1994. Molecular events in adipocyte development. *Pharmacology and Therapeutics.* 61:399
- Christie, W. W. 1978. The composition, structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals. *Prog. Lipid Res.* 17:111.
- Cianzio, D. S., D. G. Topel, G. B. Whitehurst, D. C. Beitz and H. L. Self. 1985. Adipose tissue growth and cellularity: Changes in bovine adipose size and number. *J. Anim. Sci.* 60:970.
- Coombe, N. B. and R. C. Siddons. 1973. Carbohydrases of the bovine small intestine. *Br. J. Nutr.* 30:269.
- Czerkawski, J. W. 1976. The use of pivalic acid as a reference substance in measurements of production of volatile fatty acids by rumen micro-organism *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 36:311.
- Dejong, A. 1982. Patterns of plasma concentrations of insulin and glucagon after intravenous and intraruminal administration of volatile fatty acids in the goat. *J. Endocrinol.* 92:357.
- Deslex, S., Negrel, R. & Ailhaud, G. (1987) Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipocyte precursor cells. *Experimental Cell Research* 168, 15.
- Emery, R. S. Deposition, secretion, transport and oxidation of fat in ruminants. 1979. *J. Anim. Sci.* 48:1530.
- Erwin, E. C., C. Y. Macro and E. N. Emergy. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Anim. Sci.* 46:1768.
- Feller, D. D. (1965) Conversion of amino acids to fatty acids. IN *Handbook of Physiology, Section 5: Adipose Tissue*, pp239-251 (Renold A.E. & Cahill G.F. Jr., eds) Am. Physiol. Soc. Washington DC.
- Field R. A. 1971. Effects of castration on meat quality and quantity. *J. Anim. Sci.* 32:849.

- Gaben-Cogenville, A., Quignard-Boulangé, A., Aron, Y., Brigant, L., Jahchan, T., Pello, J. & Swiercaewski, E. (1984) Development under the control of insulin of lipogenic enzymes, lipoprotein lipase, isoproterenol and glucagon sensitivity in differentiating rat preadipocytes in primary culture. *Biochemica et Biophysica Acta* 805, 252-260.
- Gharbi-Chihi, J., Bismuth, J., Lissitsky, S. & Torresani, J. (1983) The effect of triiodothyronine on fatty acid synthetase activity and content in differentiating ob 17 preadipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 750, 282.
- Grimaldi, P., Djian, P., Forest, C., Poli, P., Negrel, R. & Ailhaud, G. (1983) Lipogenic and mitogenic effects of insulin during conversion of ob 17 cells to adipose-like cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 29, 271.
- Gross, K. L., D. L. Harmon and T. B. Avery. 1988. Net portal nutrient flux in steers fed diets containing wheat and sorghum grain alone or in combinations. *J. Anim. Sci.* 66:543.
- Hartmann, P. E. and A. K. Lascelles. 1965. The effect of starvation on the uptake of the precursors of milk fat by the bovine mammary gland. *Aust. J. Biol. Sci.* 18:1025.
- Hausman, G.J., and Martin, R.J. 1989. Domes. *Anim. Endocrinol.* 6:331.
- Hood, R. L. and C. E. All. 1973. Cellularity of DNA in rat adipose tissue; Evidence for proliferating cells associated with mature adipocyte, *J. Lipid Res.* 20:691.
- Huber, J. T., Jacobson, N. L., McGilliard, A. D., Morrill, J. T. and Allen, R. S. 1961. Digestibility and diurnal excretion patterns of several carbohydrates fed to calves by nipple pail. *J. Dairy Sci.* 44:1484.
- Huntington, G. B. and P. J. Reynolds. 1986. Net absorption of glucose, L-lactate, volatile fatty acids and nitrogenous compounds by bovine given abomasal infusions of starch or glucose. *J. Dairy Sci.* 69:2428.
- Istasse, L., N. A. MacLeod, E. D. Goodall, and E. R. Ørskow. 1987. Effects on plasma insulin of intermittent infusions of propionic acid, glucose or casein into the alimentary tract of non-lactating cows maintained on a liquid diet. *Br. J. Nutr.* 58:139.

- Jenny, B. F., C. E. Polan and F. W. Thye. 1974. Effects of high grain feeding and stage of lactation on serum insulin, glucose and milk fat percentage in lactating cows. *J. Nutr.* 104:379.
- Kawada, T., N. Aoki, Y. Kamei, K. Maeshige, S. Nishiu and E. Sugimoto, 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96A:323.
- Kreikemeier, K. K., D. L. Harmon, R. T. Brandt, Jr., T. B. Avery and D. E. Johson. 1991. Effect of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin on small intestinal disappearance and net glucose absorption. *J. Anim. Sci.* 69:328.
- Kris-Etherton P. M. and T. D. Etherton. 1982. The role of lipoproteins in lipid metabolism of meat animals. *J. Anim. Sci.* 55:804.
- Larsen, H. J., G. E. Stoddard, N. L. Jacobson and R. S. Allen. 1956. Digestion and absorption of various carbohydrates posterior to the ruminoreticular area of the young bovine. *J. Anim. Sci.* 15:473.
- Leat, W. M. F. and R. W. Cox. 1980. fundamental aspects of adipose tissue growth. In: "growth in animals" (ed. T.L.J. Lawrence). Butterworth. London. pp. 137.
- Little, C. O., G. E. Mitchell and C. M. Reitnour. 1968. Postprandial digestion of corn starch in steers. *J. Anim. Sci.* 27:790.
- Manns, J. G., J. M. Boda, and R. F. Willes. 1967. Probable role of propionate and butyrate in control of insulin secretion in sheep. *Am. J. Physiol.* 212:756.
- Martin, T. G., T. W. Perry, M. T. Mohler and F. H. Owens. 1979. Comparison of four levels of protein supplementation with and without oral diethylstilbestrol on daily gain, feed conversion and carcass traits of bulls. *J. Anim. Sci.* 48:1026.
- Pothoven, M. A., D. C. Beitz and J. H. Thornton. 1975. Lipogenesis and lipolysis in adipose tissue of *ad libitum* and restricted-fed beef cattle during growth. *J. Anim. Sci.* 40:957.
- Robelin, J. 1981. Cellularity of bovine adipose tissues: developmental

- changes from 15 to 65percent mature weight. *J. Lipid Res.* 22:452.
- Robertson J. P., A. Faulkner, and R. G. Vernon. 1981. L-Lactate as a source of carbon for fatty acid synthesis in adult and foetal sheep. *Biochim. Biophys. Acta.* 665:551.
- Roncari, D.A.K. & Van, R.L.R. (1978) Promotion of human adipocyte precursor replication by 17 beta-oestradiol in culture. *Journal of Clinical Investigation* 62, 503.
- Rosenthal J., Angen A. & Farkas J. (1974) Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle. *Am. J. Physiol.* 226, 411.
- Sano, H., Y. Terashima, and T. Senshu. 1989. Insulin secretory response to feeding in sheep fed a diet supplemented with calcium, potassium and sodium propionate. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 60:70.
- SAS. 1997. SAS User's Guide : Statistics. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Siddons, R. C. 1968. Carbohydrase activities in the bovine digestive tract. *Biochem. J.* 108:839.
- Sidhu, K. S. and R. S. Emery. 1973^a. Blood fatty acids and glycerol response to diet and norepinephrine. *J. Dairy Sci.* 56:258.
- Sidhu, K. S., R. S. Emery, A. F. Parr and R. A. Merkel. 1973^b. Fat mobilizing lipase in relation to fatness in lambs. *J. Anim. Sci.* 36:658.
- Smith, S. B. & Crouse, J. D. (1984) Relative contribution of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *J. Nutr.* 114, 792.
- Smith, S. B. 1984. Evidence that phosphofructokinase limits glucose utilization in bovine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 58:1198.
- Stiles, J. W., A. A. Francendese and E. J. Masoro. 1979. Influence of age on size and number of fat cells in the epididymal depot. *Amer. J. Physiol.* 229:1561.
- Stufflebeam, C. E., J. E. Blakely, J. F. Lasley, G. B. Thompson and D. T. Mayer. 1969. Effect of energy intake upon the levels of certain blood components in young beef heifers. *J. Anim. Sci.* 29:992.
- Thye, F. W., R. G. Warner and P. D. Miller. 1970. Relationship of various

- blood metabolites to voluntary feed intake in lactating ewes. *J. Nutr.* 100:565.
- Trenkle, A. and D. G. Topel. 1978. Relationship of some endocrine measurements to growth and carcass composition of cattle. *J. Anim. Sci.* 46:1604.
- Van Soest, P. J. 1963. Ruminant fat metabolism with particular reference to factors affecting low milk fat and feed efficiency. A review. *J. Dairy Sci.* 46:204.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O and B Books, Inc., Corvallis, OR. pp. 81.
- Van, R. I. R. 1985. The adipocyte precursor cells. In new perspectives in adipose tissue :Structure and function and development ed. Cryer, A and Van R.I. R. London. Butterworths. pp353.
- Vernon, R.G. 1985. Fatty acid synthesis from amino acids in sheep adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B:133.
- Waters, H. J. 1909. The influence of nutrition upon the animal form. *Proc. 30th Annum Meet. Soc. Promotion Agr. Sci.* p 70. Soc. Promotion Agr. Sci., Pennsylvania.
- Wiederer, O. & Loffler, G. (1987) Hormonal regulation of the differentiation of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *Journal of Lipid Research* 28, 649.
- Wright, P. L., R. B. Grainger and G. L. Marco. 1966. Postruminal degradation and absorption of carbohydrate by the mature ruminant. *J. Nutr.* 89:241.
- Yang Y. T. and R. L. Baldwin. 1973. Preparation and metabolism of isolated cells from bovine adipose tissue. *J. Dairy Sci.* 56:350.
- Zapf, J., C. Schmid and E. R. Froesch. 1984. Biological and immunological properties of insulin-like factors (IGF) I and II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 13:3.
- Zapf, J., E. R. Froesch and R. E. Hummel. 1981. The insulin-like growth factors (IGF) of human serum: Chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role. *Cur. Top. Cell. Regul.* 19:257.

- Zapf, J., E. Schoenle, G. Jagars, I. Sand, J. Grunwald and E. R. Froesch. 1979. Inhibition of the action of nonsuppressible insulin-like activity on isolated rat fat cells by binding to its carrier protein. *J. Clin. Invest.* 63:1077.
- 北川政幸. 1983. 肉牛の肥育ステージと血中脂質成分との関連について. *栄養生理研究會報* 27:119.
- 松崎正敏, 原愼一郎. 1995. 肉用牛の肥育過程における血中インスリンの分泌動態. 平成7年度九州農試年報. pp. 50.
- 左久, 佐藤行泰, 遠藤信子, 日高智, 岡田光男. 1989. 乳用種去勢牛の血漿脂質成分濃度の肥育期間中の推移. *日畜會報*. 60:158.
- 佐野宏明. 1997. 反芻動物における揮發性脂肪酸によるインスリン分泌および作用の調節. *日畜會報*. 68:993.
- 澤崎 徹, 加納康彦. 1977. 肥育中期における血清脂質濃度と出荷時における枝肉歩留りとの相關. *日畜會報*. 48:664.
- 이성수, 정재경, 박노형, 원유석. 1997. 거세가 한우의 도체특성과 혈청 대사물질에 미치는 영향. *한축지*. 39:145.

제 3 장 면역학적 기법을 이용한 한우 불가식체 지방 억제기술 개발 분야

제 1 절 서 론

건강에 대한 현대인들의 관심과 소득의 증가는 필연적으로 저지방 육류(lean meat)의 생산을 요구하게 되었으며, 그동안 구미 선진국에서는 lean meat에 대한 연구에 막대한 연구비를 투자해 왔다. 그 결과 동물의 체내 지방 축적에 대한 기초 연구와 함께 lean meat을 생산할 수 있는 다양한 기술을 축적하게 되었다.

이들 선진국에서 이용되고 있는 고기를 생산하는 동물 즉 육생산 가축(meat animal)에서 지방함량을 감소시키기 위한 방법은 크게 세 가지로 분류할 수 있다. 첫째는, 육종학적인 방법이며, 둘째는, 사양 관리 측면에서의 시도이며, 셋째는, 첨단기술을 이용한 방법이다. 이중 전통적인 육종법에 의한 lean meat의 생산은 상당한 진전을 이루고 있음은 사실이나, 양돈 산업에서 품종개량에 의한 lean meat의 생산은 한계를 지닐 수밖에 없다. 왜냐하면 등지방이 너무 얇을 경우 전체 지방함량은 줄일 수 있으나, 육질에는 오히려 부정적인 영향을 미치기 때문이다. 또한, 두번째 방법인 사양 관리 측면에서의 시도 역시 원료의 종류, 수급 현황 등 변수가 많아 lean meat 생산을 위한 일률적인 사양 기준을 정하기란 쉽지 않다. 마지막으로 첨단 기술을 이용한 방법으로서, 최근에 학계 및 산업계의 활발한 연구와 함께 이미 실용화도 되고 있으며, 앞으로 무한한 가능성을 지닌 분야이다. 이 분야에서의 시도는 대부분 육생산 가축의 체내 지방축적 mechanism을 파악하고, 그 mechanism을 인위적으로 조절하는 방향으로 접근을 시도하고 있으며, 가장 대표적인 실용화 사례는 성장 호르몬(Somatotropin ; Growth hormone)일 것이다. 이는 체성장의 mechanism에 대한 이론적인 배경과 함께 유전자 재조합기술(recombinant DNA technology)이라는 첨단 기술을 접목한 사례이다. 현재까지 가축에 유전자 재조합 성장 호르몬을 사용한 결과를 보면, 젖소의 유량이 증가하고, 돼지나 비육우의 경우 증체율이 좋아질 뿐만 아니라, 도체의 지방이 감소한다고 보고 되고 있다(Chung 등, 1985; Etherton 등,

1987; Boyd 등, 1987; Campbell 등, 1989; McLaren 등, 1990). 그러나 이러한 효과를 가진 성장 호르몬의 경우 가축 체내 잔류물질의 인체 유해 논쟁이 아직도 계속되고 있으며, EC 국가들은 성장 호르몬을 사용해서 생산한 일체의 축산물에 대하여 자국으로의 수입을 금지하고 있다. 또한 지난 몇 년간의 논쟁 끝에 가축에 대한 성장 호르몬의 사용을 허가한 미국에서조차 아직도 논쟁이 계속되고 있다.

이러한 성장 호르몬의 사용에 대한 소비자들의 강한 거부감과 불안을 해소하기 위하여 제시된 방법이 '면역학적 방법'에 의한 lean meat을 생산하는 기술이다. 이 방법은 지방세포 원형질막(plasma membrane)에 대한 항체를 이용하여 지방세포를 파괴시킴으로서, 지방세포 고유의 지방 축적 기능을 제거한다는 이론이다. 이러한 방법은 세계적으로 아직 시작단계로서, 세계적인 연구를 선도하고 있는 영국의 경우, 가축에서 생산되는 불가식 지방이 연간 5천억원 규모에 달한다고 한다. 이것은 우리나라의 경우도 마찬가지여서 현재 쇠고기의 최종 소비단계에서는 대부분의 불가식 지방이 식용으로 사용되지 못하고 폐기되거나 기타 상업용으로 이용되고 있어 막대한 생산 경비가 낭비되는 결과를 초래하고 있다.

특히 한우의 경우, 국제 경쟁력 강화를 위한 유일한 길은 고급육 생산에 의한 철저한 품질의 차별화 뿐으로 정부에서도 수입개방에 대비하여 육류 등급제라는 제도적 장치를 마련하여 실시하고 있으며, 관련 연구기관이나 대학에서는 한우의 고급육 생산을 위한 기술 개발을 위하여 노력하고 있으나 아직 농가가 활용할 만큼 효율적인 고급육 생산을 위한 한우의 비육기술이 확립되어 있지 않으며, 육류 등급제 또한 고급육 생산 농가에게 충분한 현실적 보상이 되지 않는 현실이다.

현재까지 가장 일반적으로 알려진 한우 고급육 생산 기술은 거세에 이은 장기비육이다. 그러나, 한우를 거세-장기 비육시킬 경우, 육질은 상당히 향상되나 육량에서는 오히려 거세로 인한 성장율의 저하 및 장기비육으로 인한 과도한 불가식 지방의 침착으로 인하여 오히려 비거세우보다 불리한 등급판정을 받고 있다. 따라서, 고급육 생산을 통한 한우의 국제 경쟁력 강화를 위해서는 기존의 거세-장기 비육 기술의 보완과 아울러서 불가식 지방의 축적을 억제시킬 수 있는 기술의 개발이 필요하다. 특히 첨단 생명 공학 기법을 이용한 불가식지방 축적억제는 한우의 국제 경쟁력 강화와 더불어 우리 축산과학 기술의 위상을 제고시키는 물론 특허권의 해외 수출도 가능할 것이다.

따라서, 본 연구는 현재 거세 한우의 장기비육시 초래되는 과도한 불가식 체지방의 축적을 억제시키기 위한 면역학적 기법을 개발하고자 실시되었다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 한우 지방세포 원형질막 단백질의 특성 분석

가. 한우의 지방세포 및 여러 조직으로부터 원형질막 단백질의 분리

Belsham 등(1980)과 Vasilatos 등(1983)의 방법으로 한우 지방세포로부터 원형질막 단백질을 분리하였다.

영남대학교 인근 도축장에서 도축된 한우의 피하지방을 37°C의 Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) buffer에 침지시켜 실험실로 운반하였다. 백(100) gram의 지방조직을 세절한 다음 collagenase(7.5mg/g)를 함유한 KRB Buffer로 37°C에서 한 시간 동안 배양하여 지방을 소화(digestion) 시켰으며, 소화과정이 끝난 후 nylon membrane (pore size: 250 μ m)을 통하여 필터링(filtering)하여 분해되지 않은 조직들을 제거하였다.

Nylon membrane을 통과한 물질은 광학현미경에서 관찰하여 지방세포로 확인하였으며, 이들을 37°C water bath에서 5분간 방치함으로써, 이미 지방입자를 다량 함유하고 있는 성숙한 지방세포(mature adipocyte)의 상층과 아직 지방입자를 함유하지 않은 미성숙 지방세포(immature adipocyte)의 하층으로 분리하였다.

Mature adipocyte는 폐기하였으며, immature adipocyte는 lysing medium (2.5 mM ATP, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM KHCO₃, 2.0 mM Tris)으로 세포막을 파괴한 다음 세포내용물(여러 종류의 cell organelle 포함)과 세포막(membrane fraction) 부분으로 분리하였다. 분리된 막을 850 μ l의 sucrose extraction medium에 용해한 후, 그 중 800 μ l를 Percoll gradient에 조심스럽게 올린 후 10,000 \times g에서 15분 동안 원심 분리 한 후, 원형질막(plasma membrane) 부분만을 채취하였다. 얻어진 원형질막을 NaCl-based medium으로 3회 세척한 다음 단백질 농도를 구하였다.

심장, 간, 비장과 신장의 원형질막 단백질은 Lo 등(1976)의 방법으로 분리하였다.

지방세포와 다른 조직들의 원형질막에 발현되는 단백질들을 비교하기 위하여, 도축된 한우에서 간(Liver), 심장(Heart), 신장(Kidney), 비장(Spleen) 조직들을 채취하여, 각각의 조직을 가위로 세절 한 후, polytrone를 사용하여 최대강도

(maximum strength)에서 25초 동안 homogenation하였다. 2,000×g에서 15분간 원심분리 한 후 얻어진 pellet을 3ml 정도의 ST buffer에 녹인 다음 전술한 지방 세포로부터 원형질막을 분리할 때와 동일하게 Percoll gradient를 이용하여 각 조직들의 원형질막을 분리하였으며, 이렇게 하여 얻어진 원형질막 단백질을 NaCl-based medium으로 3회 세척한 다음 Bradford 방법으로 bovine serum albumin을 standard(BSA)로 단백질 농도를 측정하였다.

나. 한우 지방세포 원형질막 특이단백질의 분석

지방세포에 특이적으로 존재하는 원형질막 단백질을 분석하기 위해서 지방 세포 외에 위의 실험에서 언급된 4개 조직(Liver, Heart, Kidney, Spleen)들의 원형질막을 SDS- polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)와 2-D electrophoresis 하였다.

Separation gel(12%)과 stacking gel(3%)은 각각 4.0ml 30% acrylamide/ N,N' -methylenebisacrylamide, 2.5ml 1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 3.4ml ddH₂O, 100 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% ammonium persulfate, 5 μ l N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine와 1ml 30% acrylamide/ N,N' -methylenebisacrylamide, 1.25 ml 1M Tris-HCl(pH 6.8), 7.65ml ddH₂O, 100 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% ammonium persulfate, 10 μ l TEMED로 만들었다. 원형질막 단백질(10 μ g)을 4X sample dilution buffer (2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 62.5mM Tris, 0.001% bromo-phenol blue, 10% glycerol)에 희석 시킨 후, 90~100℃의 끓는 물에 2~3 분간 끓였다. 각 장기(지방, 심장, 신장, 간장, 근육, 및 비장)의 막 단백질들을 같은 양(10 μ g)으로 loading 하여 100V에서 90분간 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 gel 중 한 장은 Coomassie blue R-250으로 염색하였고, 나머지 한 장은 western immunoblotting에 사용하였다.

2-D electrophoresis는 한 개의 sample에 대해 Isoelectric focusing(IEF)과 SDS-PAGE를 연속적으로 수행하는 작업으로 O'Farrel 방법에 의해 수행되었다. IEF를 위하여 사용된 pH-gradient ampholine은 두 종류이며, pH range가 3.5-10 인 것과 5-7 인 것을 Sigma Chemical Co. 로부터 구입하여 사용하였다. Lower buffer와 upper buffer로는 10 mM H₃PO₄ 와 20 mM NaOH를 각각 사용하였다. Gel running은 500V에서 10분, 750V에서 4시간 동안 수행하였다.

다. Avidin-Biotin coupling을 이용한 한우 지방세포 원형질막 단백질의 동정

본 실험에서 가장 본질적인 실험과정인 지방 조직의 원형질막을 포함한 각 조직들의 원형질막 분리 작업은 Percoll-gradient 방법에 의해 이루어지고 있는데, 과연 이 방법을 통하여 원형질막(plasma membrane)만을 얻을 수 있는가? 하는 의문에 대하여 보다 정확한 실험적 근거를 확보하고자 'Avidin-Biotin coupling' 실험을 수행하였다. 이 실험의 기본적인 메카니즘은 세포의 원형질막에 존재하며 세포 외부로 노출되어 있는 단백질을 biotin으로 label 한 다음, 세포를 detergent(일반적으로 Triton X-100를 사용)로 녹인 후, avidin-Sepharose column을 이용하여 일종의 affinity chromatography 방법으로 세포막 단백질을 분리하는 방법이다.

한우의 지방조직을 collagenase로 처리하여 분리된 adipocyte와 sulfo-NHS-biotin(0.5 mg/ml; Pierce Chemical Co.)를 상온에서 30 분간 배양한 후, 1% Triton X-100 를 사용하여 adipocyte를 용해하였다. Sepharose beads에 공유 결합시킨 avidin(GIBCO, BRL) column을 만들고, 이 column에 용해된 adipocyte를 흘려 보내면 biotin으로 label된 단백질만 column에 결합할 것이다. Avidin-biotin 결합은 6 M Guadinine-HCl에 의해 쉽게 분해되며, column을 통해서 얻어진 샘플을 SDS-PAGE 함으로써 adipocyte 원형질막 단백질의 양상(pattern)을 관찰할 수 있었다.

라. 한우 지방세포 원형질막 특이단백질의 아미노산 서열 분석

위에서 언급된 실험 결과를 통하여 adipocyte 특이 단백질로 선정된 55 KD 단백질에 관하여 좀 더 심도있는 연구를 위해서는, 이 단백질의 아미노산 서열 분석이 선행되었다. 따라서, 본 실험에서는 2-D electrophoreis gel 상에서 55 KD 단백질을 gel eluter (Hoefler)를 이용하여 분리 정제하고, 이를 아미노산 서열 분석 실험에 사용하였다.

Gel elution은 100 Volts(1.5 mA)에서 5시간 수행하였으며, 분리 정제된 55 KD 단백질을 SDS-PAGE 실험을 통하여 그 순도(purity)를 확인 한 후, 아미노산 서열 분석은 Iowa 주립대학 분자 생물학 연구소에 의뢰하였다.

2. 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체 개발

가. 지방세포 원형질막 단백질의 분리

한우 지방세포 원형질막 단백질은 전술한 1의 가 항의 방법과 동일한 방법으로 분리하였다.

나. 면양으로부터 항체의 생산

성숙한 숫컷 면양(Corriedale, 60kg)의 피하 3 부위(목 뒷부분과 양쪽 서혜부)에 한우로부터 추출한 지방세포 원형질막 단백질을 면역접종 시켰다. 면역접종은 모두 3번 시행했는데, 1차 접종에는 한우 지방세포 원형질막 단백질($250\mu\text{g}/1\text{ml}$)과 Freund's incomplete adjuvant $1,750\mu\text{l}$ 그리고 Freund's complete adjuvant $250\mu\text{l}$ 를 혼합한 접종액을 각 부위에 1ml 씩 접종하였다. 1차 접종 후, 3주 간격으로 2차와 3차 접종을 하였는데, 2차와 3차 접종에는 지방세포 원형질막 단백질($125\mu\text{g}/1\text{ml}$)에 Freund's incomplete adjuvant만 2ml 을 첨가하여 면역접종하였다. 1차 면역접종 하기 전(non-immunized serum), 마지막 면역접종이 끝난 후(immunized serum), 10일, 12일, 14일째에 각각 면양의 경정맥으로부터 혈액을 채취하였다(Fig. 1). 혈액을 실온에서 1시간 정치시켜 응고시킨 후, $3,500\text{rpm}$ 에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리한 다음, 분석하기 전까지 -80°C 에서 냉동보관 하였다.

다. ELISA에 의한 항체의 역가 측정 및 조직특이성 확인

Flint 등(1986)의 방법으로 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용해 면양으로부터 생성한 지방세포 원형질막에 대한 항체의 역가(titers)를 측정하였다. 각 장기로부터 추출한 원형질막 단백질을 tris-buffered saline (TBS: 50mM Tris, 154mM NaCl, pH 7.2)에 희석시킨 다음, 96-well plate에 well 당 $100\mu\text{l}$ ($10\mu\text{g}$) loading 하였다(Fig. 2). Cold chamber(4°C) 내에서 overnight으로 plate에 단백질을 binding 시킨 후, TTBS(TBS+0.1% Tween 20)로 3회 washing 하였다. Primary antibody로서, non-immunized serum과 immunized serum을 각각 1:3,000, 1:9,000, 1:27,000, 및 1:81,000배로 희석하여 well에 coating 된 단백질과 실온에서 2시간 incubation 후, TTBS로 3회 washing 하였다. Secondary antibody로서, anti-sheep immunoglobulin G-alkaline phosphatase conjugate(Sigma Chemical, San Diego, USA)를 사용하였

다. 실온에서 secondary antibody와 2시간 incubation 후, TTBS로 3회 washing 하였다.

반응이 끝난 각 well에 alkaline phosphatase substrate buffer(49mM Glycine, 0.4mM ZnCl₂, 1.0mM MgCl₂, pH 9.5)에 4-Nitro-phenyl phosphate (4-NP; Sigma Chemical, San Diego, USA)를 첨가 한 substrate buffer를 well당 250 μ l씩 첨가 한 후, 실온의 암실에서 발색시켰다. 발색이 되면 0.5M NaOH로 반응을 중지 시킨 후, microplate reader로 405nm에서 흡광도 측정을 하였다.



Fig. 1. A demonstraton of blood collection from cannulated sheep in jugular vein.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A 3k	K 3k	M 3k	A 3k	K 3k	M 3k	blank		A 3k	A 3k		
B	A 9k	K 9k	M 9k	A 9k	K 9k	M 9k	blank		A 9k	A 9k	Anti-Serum Treat	
C	A 27k	K 27k	M 27k	A 27k	K 27k	M 27k	blank		A 27k	A 27k		
D	A 81k	K 81k	M 81k	A 81k	K 81k	M 81k	blank		A 81k	A 81k		
E	H 3k	L 3k	S 3k	H 3k	L 3k	S 3k			A 3k	A 3k		
F	H 9k	L 9k	S 9k	H 9k	L 9k	S 9k			A 9k	A 9k	Normal Serum Treat	
G	H 27k	L 27k	S 27k	H 27k	L 27k	S 27k			A 27k	A 27k		
H	H 81k	L 81k	S 81k	H 81k	L 81k	S 81k			A 81k	A 81k		

Fig. 2. ELISA plate design to determine titers and cross reactivity of antisera raised in sheep against adipocyte plasma membrane proteins isolated from Hanwoo(Korean Cattle)

라. Immunoblotting

SDS-PAGE로 분리한 원형질막 단백질들을 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(25mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.4% glycine, 20% methanol)을 이용해 4℃, 110V로 90분 동안 nitrocellulose membrane으로 electrotransfer 시켰다. Transfer가 끝난 nitrocellulose membrane은 건조 후, plastic bag에 넣어 4℃에서 보관하였다.

Western immunoblotting은, nitrocellulose membrane을 증류수에 10분 정도 적신 다음, TBS-Tween(50mM Tris-HCl, pH 7.4, 154mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 10분간 2회 washing 후, 5% skim milk/TBS-Tween으로 상온에서 1시간 정치시킴으로서 non-specific binding을 차단시켰다. 그후 membrane에 한우 지방세포에 대한 면양의 항혈청을 1% skim milk에 1:5,000배 희석하여 2시간 상

온에서 binding 시켰다. Primary antibody와의 binding이 끝난 뒤 membrane을 TBS- Tween용액으로 2차례 washing 한 후, anti-sheep immunoglobulin G-alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemical, San Diego, USA)를 1% skim milk에 1:10,000으로 희석하여 binding 시켰다. Secondary antibody와의 binding 후, membrane을 3회 TBS- Tween으로 washing해 주었다. Washing 후, 66 μ l Nitroblue tetrazolium(NBT; Sigma Chemical, San Diego, USA)과 33 μ l 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate(BCIP; Sigma Chemical, San Diego, USA)를 함유한 10ml alkaline phosphatase substrate 용액(100mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl, pH 9.5)을 nitrocellulose membrane에 첨가하여 발색 반응 시켰다. 반응이 끝난 후, 증류수로 세척하여 반응을 중지시켰다.

마. Immunohistochemistry

한우의 지방조직을 10% neutral buffer formalin(30mM NaH₂PO₄ · H₂O, 54.6mM NaHPO₄, 37~40% formalin)에 넣어 24시간동안 cold chamber에서 고정 시켰다. 고정된 지방조직을 흐르는 물을 이용해 12시간 정도 washing 후, 70% → 80% → 90% → 100% alcohol에 각 1시간씩 정치시키면서 탈수를 하였다. 탈수과정이 끝난 후, xylene 용액에 1시간씩 2회 동안 넣은 후, paraffin과 xylene 이 1:1로 섞인 용액에 1시간 넣어두었다. 조직을 paraffin 1, paraffin 2, paraffin 3의 3단계에 각각 1시간씩 넣어둠으로써 paraffin 침투과정을 거치도록 한 후, stainless mold에 embedding 하였다.

Embedding된 조직과 paraffin을 상온에서 12시간 이상 천천히 굳게 만든 다음, 4℃에 보관하였다. 간편한 cutting을 위해 조직을 다듬은 후, 10 μ m로 cutting 하였다. Cutting 된 조직편을 물기가 있는 slide glass 위에 mounting 한 다음, 상온에서 24시간 이상 건조시켰다. 지방조직이 mounting 되어있는 slide glass를 xylene에 5분간 넣은 뒤, 100% → 90% → 70% alcohol에 각각 5분씩 넣어두었고, 그 후에는 물에 넣어 slide glass가 마르지 않도록 해 주었다. 항원-항체반응을 위해 지방조직을 30분간 5% skim milk/TBS로 non-specific binding을 막아 준 다음, Sprague-Dawley 흰쥐 지방세포 원형질막 단백질에 대한 면양의 antiserum을 primary antibody로 TBS용액에 1:100으로 희석하여 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 조직 주변을 티슈로 깨끗이 닦고 PBS에 5분간 3회 정치시켰다. Immunohistochemistry를 위한 secondary antibody로는 1:500으로 희석한 anti- sheep immunoglobulin G- FITC(Sigma Chemical Co., San Deigo,

USA)를 이용하였으며, secondary antibody와의 반응이 끝난 후, 50% glycerol을 mounting 하여 형광현미경으로 관찰하고 사진 촬영을 하였다.

3. 한우 지방세포에 대한 항체의 세포독성 효능 시험(*in vitro*)

가. 지방세포의 배양

도축장에서 도살된 한우가 해체되는 과정 중 방혈 즉시 피하지방을 채취 후 42℃로 보온된 HBSS에 보관하여 실험실로 운반 후 (1시간 이내) 지방세포를 분리하였다.

채취한 지방조직을 멸균 생리 식염수에 씻은 후, 조직내의 결합조직, 혈관 등을 제거하고 잘게 세절한 다음, 0.4% Collagenase(type II)와 BSA를 포함한 M199중에서 37℃, 60-90분 동안 digestion 시킨 후, 250 μ m nylon mesh를 이용하여 여과함으로써 미소화 된 지방조직과 남아있는 혈관 등을 제거하였다. 여과된 용액내의 mature adipocyte를 함유하는 상층 지방조직을 제거한 후, 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 immature 지방세포 펠렛을 얻고 이를 M199로 3회 세척하여 지방전구세포(preadipocyte)를 포함한 세포군을 얻었다.

Haemocytometer를 이용하여 세포 수를 측정한 후, 2×10^5 cells/cm²의 밀도로 96-well plate에 나누어 seeding하고 20% FBS, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 포함한 M199에서 배양하였다.

배양조건은 37℃, 5% CO₂로 하고 배지는 24시간 간격으로 교환하였다.

나. 항체의 처리

1) 항체 처리 design

항체 처리를 위한 design은 Table 1과 같다.

2) 항체 처리

지방세포를 96-well plate에 seeding하고 confluent 도달 시에 각각의 조건과 농도의 항체를 각 well 당 50 μ l씩 넣고 37℃에서 30분 또는 1시간 동안 incubation을 하였다. 30분간의 incubation이 끝나면, 각각 농도의 complement를

50 μ l 넣은 후, 동일한 조건으로 다시 30분 또는 1시간 incubation을 시켰다. 이렇게 항원 항체 반응이 일어난 96-well plate를 3,000rpm, 10분간 상온에서 원심 분리하여 상층액만 100 μ l를 취하였다. 이상과 같이 얻어진 상층액에서 지방세포가 파괴된 양을 파악하기 위해 LDH Assay와 MTT Assay를 실시하였다.

Table 1. Experimental design for cytotoxicity of antisera against Hanwoo adipocyte plasma membrane proteins

Treatments	Subtreatment
Antisera concentration	Undiluted
	10 \times dilution
	100 \times dilution
Complement concentration	Without complement
	10 \times dilution
	100 \times dilution
Antisera status	Liquid
	Heat inactivated
	Lyophilized

다. 조사 항목 및 방법

1) LDH Assay

항체 처리 후, 96-well plate로부터 채취한 상층액을 새로운 96well에 옮겨 넣고 4mg 3-[4,5-Dimethylthiazol- 2-yl]-2,5-dihenyltetra-zolium bromide ; Thiazolyl blue(MTT), 8ml 0.2M Tris-HCl(pH 8.2), 2ml β -Nicotin-amide adenine di-nucleotide(NAD), 20 μ l Triton X-100, 2.5mg diaphorase 및 0.5ml 10mM lactate substrate가 함유된 assay mixture를 200 μ l씩 well당 첨가한 후, 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) MTT assay

MTT assay는 일반적으로 세포독성을 판단할 때 많이 실시하는 assay로써, metabolic active cell에 의하여 Yellow Tetrazolium Salt MTT가 Purple

Formazan Crystal로 Cleavage되는 원리를 이용해 세포 증식과 활성의 양적 조사에 사용하는 방법으로 LDH assay와는 반대로 항체 처리 후에도 살아 있는 지방세포의 양을 측정함으로써, 역으로 파괴된 지방세포의 양을 알아 낼 수 있는 방법이다.

Assay 방법은, 먼저, 전술한 LDH assay와 같이 96-well plate에서 항원-항체 반응 후 media를 제거하고 새로운 media(without serum) 180 μ l와 MTT 시약 20 μ l를 각 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 3-4 시간 동안 더 incubation하였다. Incubation이 끝나면 well의 media를 가능한 모두 제거한 다음, 1 \times PBS 200 μ l로 washing 한 후, 100% DMSO solution을 각 well당 200 μ l씩 넣었다. 모든 well에 DMSO를 넣은 후, 같은 횟수(약 10회)로 Vigorously pipetting하고 540nm에서 OD값을 측정하였다.

3) 형태학적 변화

전술한 LDH assay를 위한 항체 처리과정에서 지방세포의 파괴정도를 현미경으로 관찰하였다.

4. 한우 지방세포에 대한 항체가 거세 한우의 성장 및 체조성에 미치는 영향 (in vivo)

가. in vivo 시험을 위한 항체의 대량 생산

3두의 면양에게 전술한 방법으로, 한우 지방세포로부터 분리한 원형질막 단백질질을 면역 주사한 다음 항체를 대량 생산하였다. 생산된 항체는 ELISA로 항체 역가를 측정하여 지방세포에 대한 반응성을 검증한 후, -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

나. 거세 한우의 사양 시험

생후 6개월령에 거세한 16개월령의 한우 6두를 각각 대조구와 항체처리구에 배치하였다. 단, 항체처리를 위한 한우는, 본 연구가 유일하게 처음 시도되는 것인 만큼, 항체의 안정성을 입증할 수 없었기 때문에, 농가의 오랜 경험으로 체지방이 과다하게 축적될 것으로 예상되는 것을 선발하여 배치하였다.

농후사료와 조사료는 한우 고급육 사양을 위한 프로그램에 따라 급여하였

으며, 기타 사육 관리는 농가 관행법에 준하였다.

Fig. 3은 *in vivo* 시험의 개요를 나타낸 것이다.

다. 수동면역

총 6두의 거세 한우를 대조구와 항체 처리구로 나누고 생후 20개월령에 항체 처리구는 본 연구에서 면양에서 생산한 한우 지방세포에 대한 항혈청을 매회 두당 50ml씩 각각 주사 하였으며, 2일 후에 동일한 방법으로 한번 더 주사를 하였다. 대조구는 멸균한 생리식염수를 동일한 방법으로 주사하였다.

라. 조사항목 및 방법

1) 체 중

시험 개시시부터 출하시 까지 매월(4주 기준) 일정 시각에 체중을 측정하였다.

2) 혈중 glucose 및 triacylglycerol 분석

시험 개시전, 항체 처리기간 동안은 매일, 이후는 출하시 까지 매월 채취한 혈액으로부터 혈장을 분리하여 혈장내 glucose 및 triacylglycerol 함량을 분석하였다.

Glucose는 EMBIEL glucose test kit(엠비엘 주식회사, 서울, 한국)을 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였으며, triacylglycerol은 EMBIEL triglyceride test kit(엠비엘 주식회사, 서울, 한국)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정함으로써 분석하였다.

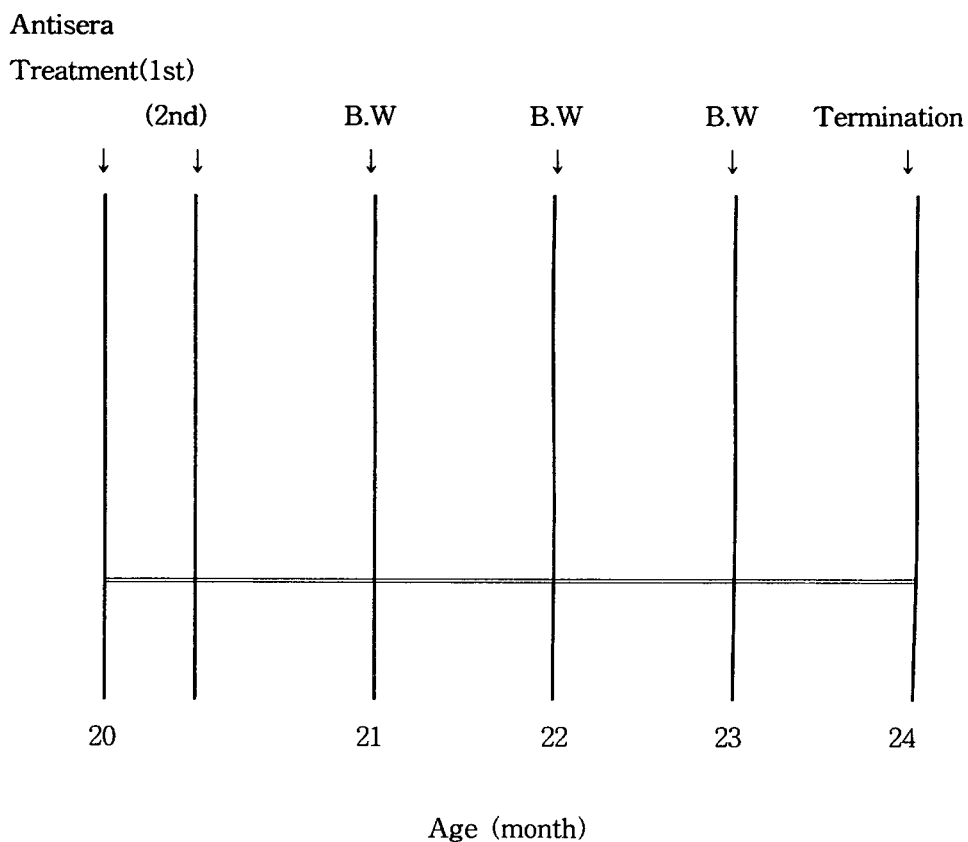


Fig. 3. in vivo experimental design.

3) 도체 특성 분석

생후 24개월령에 출하한 시험우들은, 36시간 절식시킨 다음 도축장에 수송하여 12시간 계류, 안정시켜 관행법에 따라 도축.해체하고, 2℃ 냉장실에서 24시간 냉각시켜, 좌반도체의 중심부 온도가 10℃ 이하가 된 것을 확인한 다음, 냉도체중을 측정하였다. 체구성 조사는, 시험우 6두 모두에 대하여 뼈와 정육과 지방의 양을 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 한우의 지방세포 및 여러 조직으로부터 원형질막 단백질의 분리

각 조직의 원형질막에 존재하는 단백질의 농도는 Bradford 방법(Bio-Rad)을 사용하여 측정하였으며, 그 결과는 아래의 Table 2와 같다.

Table 2. Concentrations of plasma membrane protein obtained from adipose tissue, kidney, heart, liver, and spleen

Plasma Membrane of Tissues	Concentration of Protein* (mg/ml)
Adipose tissue	0.81
Kidney	2.13
Heart	11.46
Liver	7.94
Spleen	5.80

위의 Table 2에서 보는 바와 같이, 지방조직 원형질막에 존재하는 단백질의 농도는 다른 조직들과 비교할 때 매우 낮았다. 이는 다른 조직들과는 달리 지방조직의 경우 그 특성상(지방입자 함유) 조직 자체를 냉각시켜서 homogenation하지 못하고, collagenase digestion 후 얻어진 각각의 세포로부터 원형질막 단백질을 추출하였기 때문이다.

그러나, 이러한 농도는 지방세포에 특이한 원형질막 단백질을 검출하기 위한 SDS-PAGE, 2-D electrophoresis 실험을 수행하기에 일반적으로 충분한 농도였으며, 고농도가 필요한 경우에는 ultra-free(Millipore) system을 이용하여 농축하여 사용하였다.

2. 한우 지방세포 원형질막 특이 단백질의 분석

본 실험은 지방세포의 원형질막(plasma membrane)에 존재하는 단백질들 가

운데서 지방세포에만 특이적으로 존재하는 단백질을 동정하기 위해서 수행되었으며, 간, 심장, 신장, 비장 조직들의 원형질막과 함께 SDS-PAGE와 2-D gel electrophoresis를 통하여 단백질들을 분석하였다.

Fig. 4에서 보듯이, 각 조직들의 원형질막에는 상당히 많은 종류의 단백질이 존재하고 있으며, 단백질 분포 양상(pattern)은 조직에 따라서 약간씩 다른 분포를 지니고 있다. SDS-PAGE와 2-D electrophoresis에서 heart, kidney, liver 조직들의 원형질막 단백질 양상들은 매우 유사하며, 모든 조직에 공통적이며 다량으로 존재하는 'house-keeping'에 해당하는 단백질들도 볼 수 있다. Fig. 5의 2-D electrophoresis 실험에서는 SDS-PAGE 실험에서 보다 비교적 적은 량의 단백질 샘플이 running 되었기 때문에 각 조직간의 단백질들을 명확하게 비교하기는 어렵지만, adipocyte 조직의 원형질막은 다른 조직들의 원형질막과 다른 양상의 단백질들을 함유하고 있다는 것을 알 수 있다. 또한, 2-D electrophoresis 실험에서 각각의 조직에서 분자량이 비슷한 단백질들이 pI(iso-electric point) 값은 다르게 나타나는 것도 볼 수 있는데, 이런 현상은 단백질의 기능과 1차적 구조가 매우 비슷하면서 일부분에 해당하는 아미노산 조성들이 다르기 때문으로 생각된다.

위의 두 실험들을 통하여, adipocyte 조직에만 특이하게 존재하는 단백질로서 80KD, 55KD, 45KD (Fig. 5의 화살표) 등 3개의 단백질을 우선 선정하였으며, 55KD 단백질을 gel-elution 방법으로 분리하여 아미노산 서열을 분석하였다.

3. Avidin-Biotin coupling을 이용한 한우 지방세포 원형질막 단백질의 동정

Percoll-gradient 방법에 의해 얻어진 adipocyte 원형질막과 biotin-avidin affinity chromatography를 이용하여 분리한 원형질막 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 통하여 비교 분석하였다.

Fig. 6에서 보여주는 바와 같이, 두가지 방법들에 의해 분리된 원형질막들의 단백질 양상은 매우 유사한 것을 알 수 있다. 다만, 실험상의 문제점으로 인하여 biotin-avidin 방법에 의해 얻어진 단백질의 농도가 낮기 때문에 gel 상에서 단백질 band가 약하게 silver-staining 되었다. 특히, 앞의 두 실험에서 언급한 바와 같이, 지방조직 adipocyte에 특이한 단백질로 간주한 55 KD 단백질(화살표로 표시함)이 biotin-avidin affinity column을 통하여 얻어진 단백질에 포함되는 것을 확인할 수 있다.

본 실험에 이용된 biotin-avidin affinity chromatography 방법은 Fujimoto *et al.* (1992, J. Cell Biol. 119: 1507-1513)에 잘 묘사되어 있다.

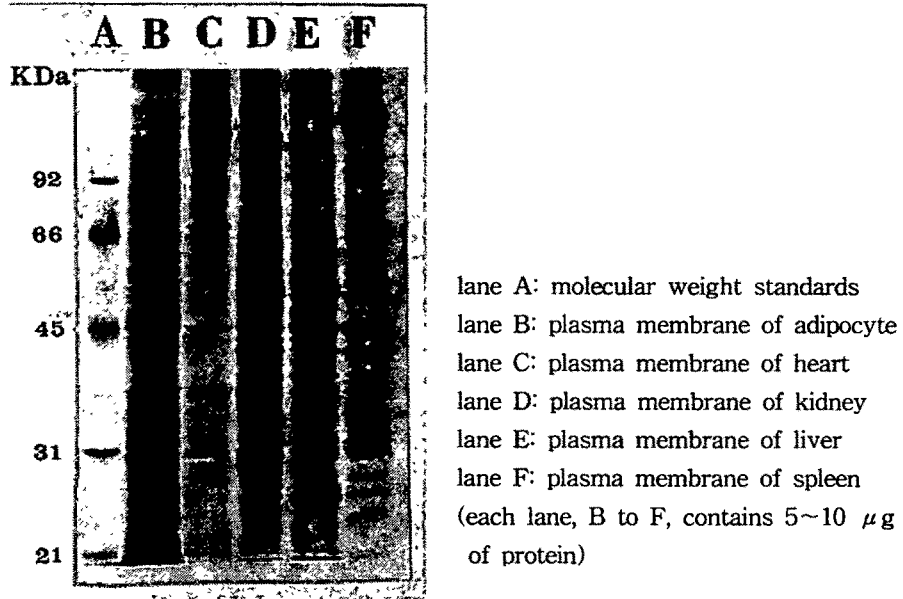


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of plasma membrane fraction obtained from various tissues.

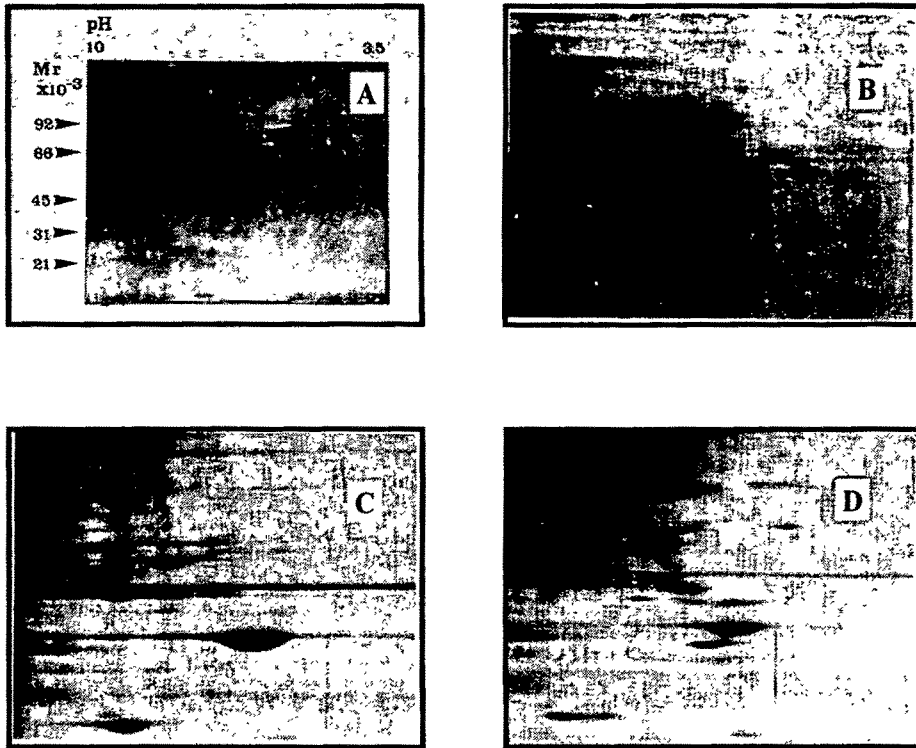


Fig.5. Two-dimensional gel electrophoreses of plasma membrane fractions obtained from various tissues (A: adipocytes, B: heart, C: kidney, D: liver)

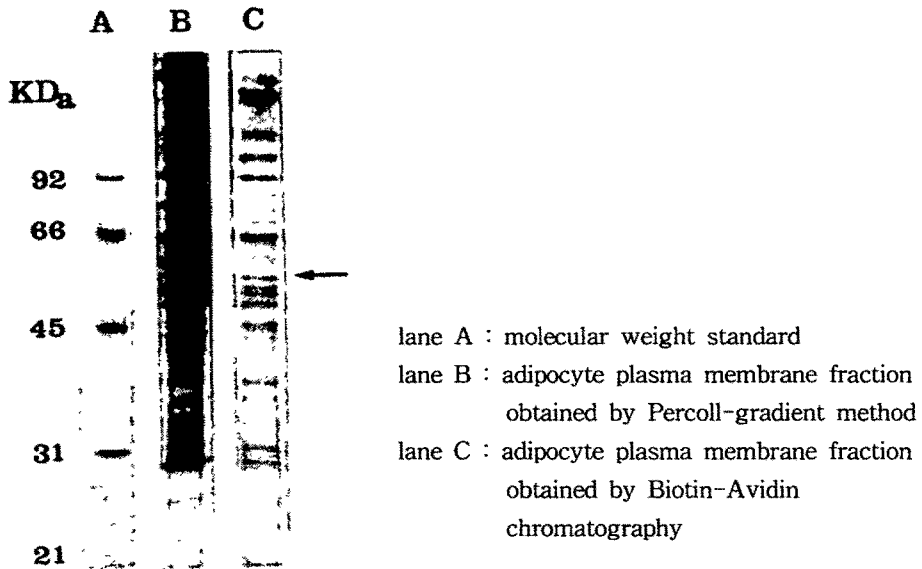


Fig. 6. SDS-PAGE analyses of plasma membrane proteins of adipocyte

4. 한우 지방세포에 특이적으로 존재하는 원형질막 단백질의 아미노산 서열 분석

Gel eluter를 사용하여 수 차례에 걸쳐서 반복한 2-D electrophoresis gel들에서 분리한 55 KD 단백질의 순도 (purity)를 확인하기 위해서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis하여 단백질을 silver-staining kit로 염색하였다 (Fig 6). Gel elution 과정에서 단백질의 농도가 희석되어 단백질 band가 다소 약하게 염색되었지만 순수한 55 KD 단백질(화살표로 표시함)을 확인할 수 있었다. 55 KD 단백질 바로 아래에 한 개의 희미한 단백질 band가 나타나 있는데, 이것은 gel elution 과정동안 55 KD 단백질의 일부분이 분해되어 생성된 것으로 생각된다.

한우 지방세포 원형질막 특이 단백질(55 kDa)에 대한 아미노산 서열을 N-terminal로 부터 분석한 결과는 아래 Fig. 7과 같다.

(1) (2) (3) (4)
 Aspartic acid - Threonine - Histidine - Lysine -

(5) (6) (7) (8)
 Serine - Glutamic acid - Isoleucine - Alanine -

(9) (10) (11) (12)
 Histidine - Arginine - Phenylalanine - Lysine - - -

Fig. 7. N-terminal 12 amino acid sequences of adipocyte specific protein isolated from Hanwoo adipocytes

위 아미노산 서열을 가진 단백질이 이미 알려진 어떤 단백질의 일종인지를 확인하기 위하여 이들 아미노산 서열을 GenBank를 통하여 검색한 결과 다음과 같은 단백질일 가능성이 있다는 결과를 얻었다.

Table 3. Comparison of the amino acid sequences of the N-terminal region of the 55 KD protein with the published sequences of albumin, alloalbumin, and 70 kDaobumin-like plicoprotein(GP70).

Protein	Amino-terminal sequence
55K protein	D T H A S E I A H R F K (1-12)
bovine serum albumin	D T H K S E I A H R F K (1-12)
human serum albumin	D A H K S E V A H R F K (2-13)
human alloalbumin	D A H K S E V A H R F K (25-36)
canine albumin	E A Y K S E I A H R F K (1-12)
GP70	E A H K S E I A H R F K (1-12)

그러나, bovine serum albumin에 대한 polyclonal antibody를 이용하여 BSA와 본 연구에서 지방세포 특이 단백질이라고 판단한 55K 단백질과의 immunoblotting 결과(Fig. 7), 55K 단백질은 bovine serum albumin에 대한 항체와는 전혀 항원-항체 반응을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 55K 단백질이 serum albumin과는 다른 어떤 기능을 가진 단백질일 수도 있다는 것을 시사한다.

5. 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 역가 및 교차반응성

가. 항체의 역가 및 교차반응성

면양으로부터 얻은 한우의 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 역가를 ELISA로 측정된 결과는 Table 4와 같다.

면양에 3차 주사를 실시한 후 10일, 12일, 및 14일째 얻은 혈청을 각각 AS-1, AS-2, 및 AS-3라고 하였으며, 81,000배 까지 항체를 희석해도 반응을 감지할 수 있을 정도로 강력한 항원-항체 반응을 나타냄을 알 수 있었다. 3회에 걸쳐 채혈한 항혈청들은 모두 비슷한 역가를 지녔으나 그중 3차 면역주사 후 12일째(AS-2)의 항혈청의 역가가 가장 높았다.

Table 4. Titers of antisera raised in sheep against Hanwoo adipocyte plasma membrane proteins

Sera Dilution	Optical density at 405 nm			
	NS ¹⁾	AS-1 ²⁾	AS-2 ³⁾	AS-3 ⁴⁾
1:3,000	.330	.924	1.096	1.011
1:9,000	.315	.712	.721	.663
1:27,000	.324	.456	.510	.467
1:81,000	.337	.377	.404	.380

¹⁾Non-immunized sera.

²⁾Antisera bled at 10 days after the third immunization.

³⁾Antisera bled at 12 days after the third immunization.

⁴⁾Antisera bled at 14 days after the third immunization.

Fig. 8은 역가가 가장 높은 AS-2를 3,000배 희석시의 흡광도를 100%로 했을 때 비면역혈청(non-immunized serum)과의 반응성을 상대적 흡광도로 나타낸 것이다. Fig. 8에서 알 수 있듯이 면양의 비면역혈청은 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대해 항원-항체 반응을 거의 나타내지 않았으며, 지방세포 원형질막 단백질을 항원으로 면역주사한 항혈청은 높은 항원-항체 반응을 나타내었다.

지방세포에 대한 항체의 개발은 반추동물보다는 주로 단위동물인 돼지와 쥐를 중심으로 연구가 되어왔으며, Flint 등(1986)은 흰쥐의 지방세포 원형질막 단백질을 면양에 면역주사한 결과 27,000배의 희석 배율에서도 역가를 측정할 수 있었으며, Kestin 등(1993)은 돼지의 지방세포 원형질막 단백질을 면양에 주사하여 27,000배의 희석배율에서도 역가를 감지할 수 있는 높은 역가의 항체를 생산하였다.

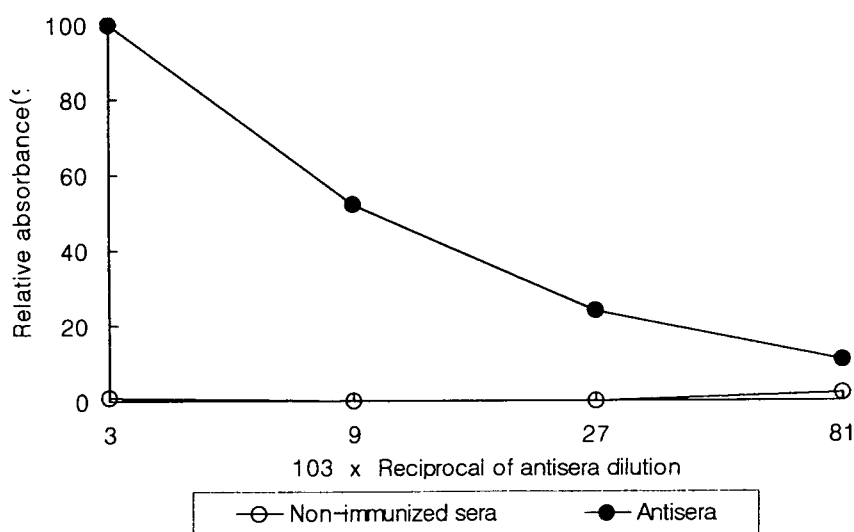


Fig. 8. Reactivity of non-immunized serum(NS) and antiserum (AS) against adipocyte plasma membrane(APM) proteins isolated from Hanwoo as detected by ELISA. The reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of antisera bled at 12 days after the third immunization (1:3,000). Optical density was determined at 405nm using microplate reader.

지방세포에 대한 항체의 개발에 관한 연구는 대부분 돼지(Wright 등, 1990)와 쥐(Futter 등, 1987)과 같은 단위동물에서 이루어졌으며, 반추동물의 지방세포에 대한 항체의 개발은 Nassar와 Hu(1991) 그리고 Moloney 등(1998)이 면양 지방세포에 대한 항체를 개발한 연구가 전부이다. 이들은 면양의 지방세포 원형질막 단백질을 추출하여 당나귀에 면역주사한 결과 102,000배의 희석 배율에서도 역가를 감지할 수 있는 항체를 생산하였다.

비육우의 지방세포 원형질막에 대한 항체의 개발에 대한 보고는 본 연구가 유일하며, 본 연구에서 개발한 한우의 지방세포 원형질막에 대한 항체는 반추동물에서 기 보고된 Nassar와 Hu(1991)의 연구 결과와 비슷한 높은 역가를 지니고 있었다.

다음 단계로 면양으로부터 생성한 항체의 조직특이성을 조사하였다. 먼저 ELISA로 간, 비장, 심장, 신장에 대한 교차 반응성을 조사하였다. 항체는 면양에서 얻은 항혈청 중 역가가 가장 높은 AS-2를 사용하였다.

한우 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체는 지방세포와 특이적으로 반응하였으며, 그 결과 항체는 지방세포 원형질막 단백질에 대해 특이적으로 반응을 나타내었다(Table 5와 Fig. 9).

Nassar와 Hu(1992)는 면양의 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체는 간장과 적혈구의 원형질막 단백질과는 미약한 교차반응성을 나타내었다고 하였다.

Table 5. Cross-reactivity of antisera against adipocyte plasma membrane proteins of Hanwoo with other tissues

Tissue	Optical density at 405 nm			
	1:3,000	1:9,000	1:27,000	1:81,000
Adipocyte	.804	.628	.455	.366
Liver	.325	.301	.325	.317
Spleen	.369	.316	.325	.305
Heart	.305	.300	.312	.298
Kidney	.338	.309	.318	.303

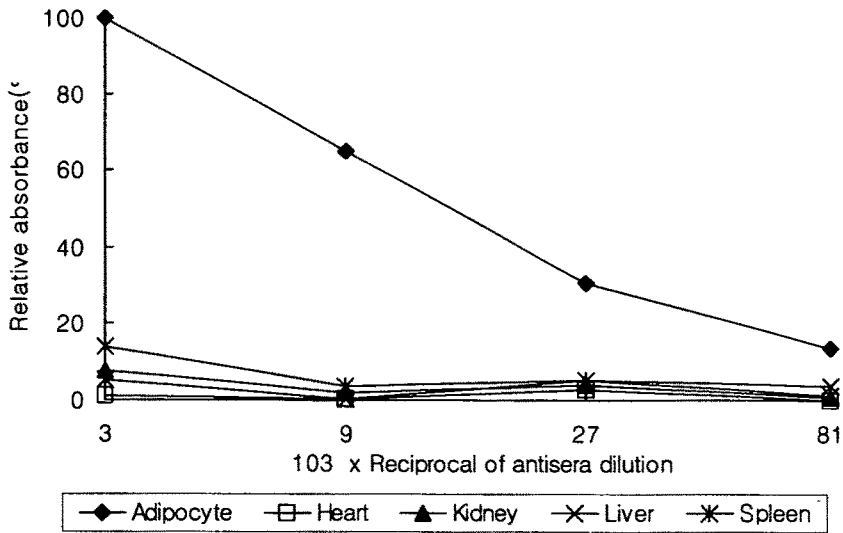
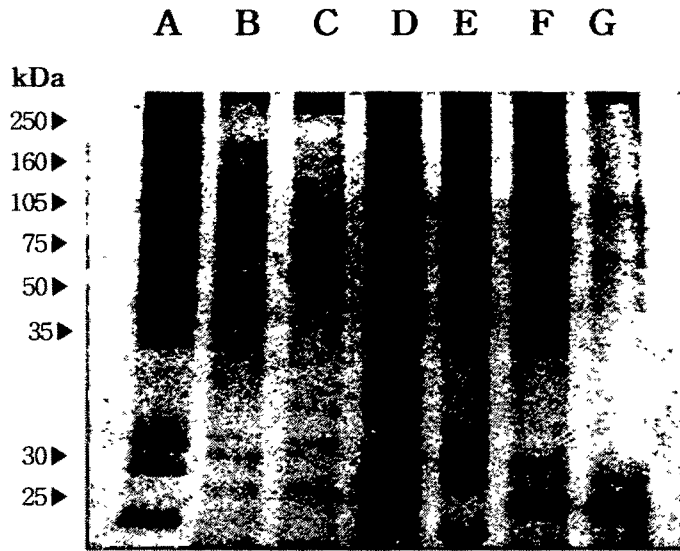


Fig. 9. Cross-reactivity of antisera raised in sheep against Hanwoo adipocyte plasma membrane (APM) proteins with adipocyte, heart, kidney, liver, and spleen of Hanwoo. Relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of antisera bled at 12 days after the third immunization (1:3,000). Optical density was measured at 405nm using microplate reader.

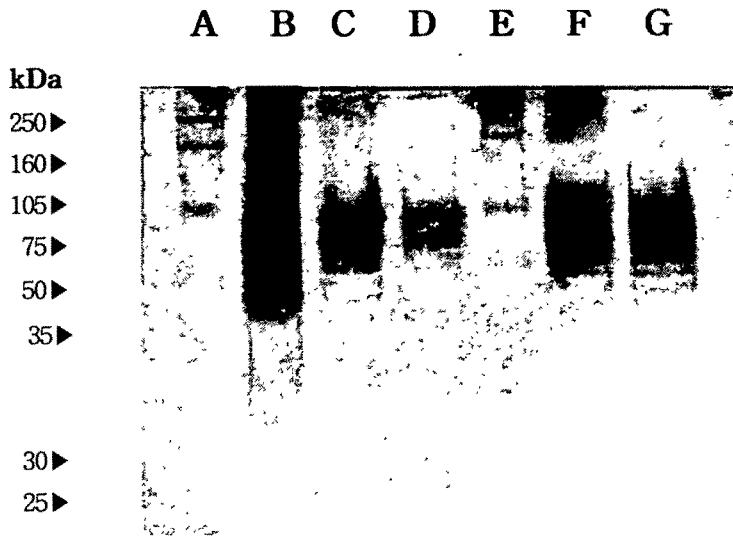
나. Immunoblotting

Immunoblotting으로 조직특이성을 재확인 하기 위하여 각 장기별로 분리한 원형질막 단백질을 10 μ g씩 loading하여 SDS-PAGE를 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하여 반응을 진행시켰다. 동일한 조건에서 SDS-PAGE를 실시한 후 Coomassie blue R-250으로 염색하여 나타난 단백질 pattern은 Fig. 10과 같다. Nitrocellulose membrane에 transfer한 protein에 secondary antibody로 anti-sheep IgG-peroxidase conjugate를 사용하여 반응시킨 immunoblot 결과는 Fig. 11에 나타나 있다.



lane A: molecular weight standards,
 lane B: plasma membrane of adipocyte,
 lane C: plasma membrane of heart,
 lane D: plasma membrane of kidney,
 lane E: molecular weight standards,
 lane F: plasma membrane of liver,
 lane G: plasma membrane of spleen

Fig 10. SDS-PAGE patterns of plasma membrane proteins isolated from adipocyte, heart, kidney, liver, and spleen of Hanwoo. Proteins(10 μ g) were separated on the 3% stacking gel and 12% separation gel for 90 minutes at 90~100V. The gel was stained with Coomassie blue R-250.



lane A: molecular weight standards,
 lane B: plasma membrane of adipocyte,
 lane C: plasma membrane of heart,
 lane D: plasma membrane of kidney,
 lane E: molecular weight standards,
 lane F: plasma membrane of liver,
 lane G: plasma membrane of spleen

Fig. 11. Western immunoblotting of various Hanwoo tissue plasma membrane proteins with antiserum raised in sheep against Hanwoo adipocyte plasma membrane proteins. Equivalent amount(10 μ g) of membrane proteins isolated from adipocyte, heart, kidney, liver, and spleen were loaded at each lane. Anti-sheep immunoglobulin G-Alkaline phosphatase conjugate(Sigma Chemical, San Diego, USA) was used as a secondary antibody.

Fig. 11에 나타난 바와 같이, 한우 지방세포·원형질막 단백질에 대한 항체는 비록 완벽하지는 않지만, 기타 조직과의 반응성은 매우 미약한 반면, 지방세포 원형질막 단백질에 대하여서는 매우 특이적으로 반응하였다.

Kestine 등(1993)은 돼지 지방세포에 대한 항체는 immunoblot 결과, 비장, 적혈구, 뇌, 간장, 신장, 및 근육 조직에 비하여 지방세포 특이적으로 반응을 나타낸다고 하여, 본 연구의 결과와 유사하였다.

다. Immunohistochemistry

고정된 한우 지방세포의 원형질막 외부표면에 대한 항체의 결합 반응은 형광물질인 anti-sheep immunoglobulin G-FITC를 이용한 면역 형광 염색법으로 확인할 수 있었다.

Fig. 12는 면역 형광 염색을 이용해서 항체가 지방세포 외부 표면에 강하게 결합하고 있는 것을 보여주는 것으로, 비면역혈청과 비교해 볼 때, anti-sheep immunoglobulin G-FITC로 표지된 항체는 한우 지방세포 원형질막 표면에 아주 강하게 결합하고 있다. 비 면역혈청이 처리된 지방세포에 나타나는 약간의 형광은 배경 형광으로 설명할 수 있을 것이다.

Fig. 11과 12에 나타난 바와 같이 항혈청은 지방세포 원형질막 단백질에만 전적으로 특이적 반응을 나타내어, ELISA에서 확인된 항체의 조직특이성 결과와 일치하였다.

Nassar와 Hu(1991)는 면양 지방세포 원형질막에 대한 항체의 교차반응성을 간장, 신장, 심장 및 적혈구의 원형질막 단백질을 이용하여 ELISA로 측정한 결과, 생산된 항체는 지방세포에 특이적으로 작용한다고 하였으며, 돼지의 지방세포에 대한 항체를 비장, 적혈구, 뇌, 폐, 간장, 신장, 및 근육의 원형질막 단백질과 immuno-blotting을 실시한 결과 항체는 지방세포 원형질막 단백질에 매우 특이적으로 작용하였다고 한다(Kestin 등,1993). 이러한 항체의 조직 특이성은 지방세포와 기타 장기 세포간 원형질막 단백질 조성의 차이에 기인하는 것으로 생각되며, 향후 항혈청의 실용화에 앞서 해결되어야 할 부작용을 최소화 시킨다는 관점에서 항원으로 이용되는 지방세포 원형질막 단백질의 조성에 대한 상세한 연구가 필요하다.

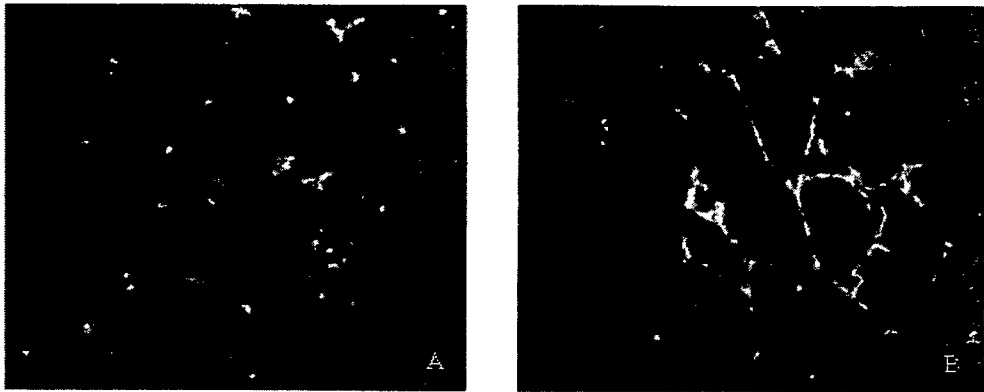


Fig. 12. Immunofluorescence staining of adipocytes with antiserum raised in sheep against Hanwoo adipocyte plasma membrane proteins. Hanwoo adipose tissues were incubated with non-immunized serum at dilution of 1:100(A) and with antiserum at dilution of 1:100(B). Anti-sheep immunoglobulin G-FITC was used as a secondary antibody with dilution of 1:500.

6. 한우 지방세포에 대한 항체의 세포 독성 효능실험(in vitro)

가. 비면역 혈청과 면역혈청간의 비교

LDH assay는 지방세포가 파괴될 때 방출되는 cytosolic enzyme LDH 값을 측정한 것이다. Fig. 13은 비면역혈청과 항혈청의 처리에 의해 confluent한 한우 지방세포로부터 방출되는 cytosolic LDH의 양을 나타내고 있다. 한우 지방세포의 원형질막 단백질에 대한 항체를 처리한 것은 PBS나 비 면역혈청을 처리한 것과 비교해 현저하게 많은 양의 cytosolic LDH의 방출을 나타내고 있음을 알 수 있다($P < .01$). 이는 많은 양의 세포내부 효소인 cytosolic LDH의 방출로 야기되는 세포독성의 증거이며 궁극적으로 세포가 lysis되는 것을 나타낸다.

나. Complement가 항체의 작용에 미치는 영향

보체는 면역에서 생산된 지방세포 원형질막에 대한 항체가 최대의 활력을 나타내기 위해 중요한 역할을 담당하는 것으로 Fig. 13의 비면역혈청 처리에 의

한 약간의 LDH 방출은 보체계의 활성화에 의한 지방세포의 파괴로 볼 수 있다.

또한, Complement의 첨가가 항혈청의 세포독성효과를 뚜렷하게 증가시킴을 Fig. 14서 보여주고 있다. 이와 같이, Complement는 면양에서 생산된 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 활력을 최대로 하기 위한 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

다. Liquid와 lyophilized antisera의 세포독성

한우의 지방세포에 대한 항혈청의 세포독성을 확인함으로써 항체의 실질적인 사용을 위한 항체의 다양한 처리 실험이 수행되었다.

항체를 56℃에서 30분간 incubation시키는 항체의 Heat inactivation은 시키지 않았을 때의 평균 효과를 100%로 보았을 때, Heat Inactivation 시킨 항체는 93.89%의 세포독성 효과를 나타내었다(Fig. 15). 이렇게 Heat inactivation으로 원래 항체가 가졌던 complement의 기능을 상실시킴으로 인해 얻어진 순수한 항체의 효과가 Heat inactivation 시키지 않은 AS보다 효과가 낮다는 것은 complement도 세포독성에 관여한다는 것을 입증하고 있다.

라. 항체의 가열처리가 세포독성에 미치는 영향

Fig. 16에서는 lyophilization 된 항체를 처리했을 때 liquid 상태의 항체처리보다 배양중인 한우 지방세포로부터 방출되는 LDH가 감소하고 있음을 나타낸다. 이는 lyophilization 시키는 과정에서 ammonium sulfate의 처리가 complement를 제거시켜버린 것에서 원인을 찾을 수 있을 것이다.

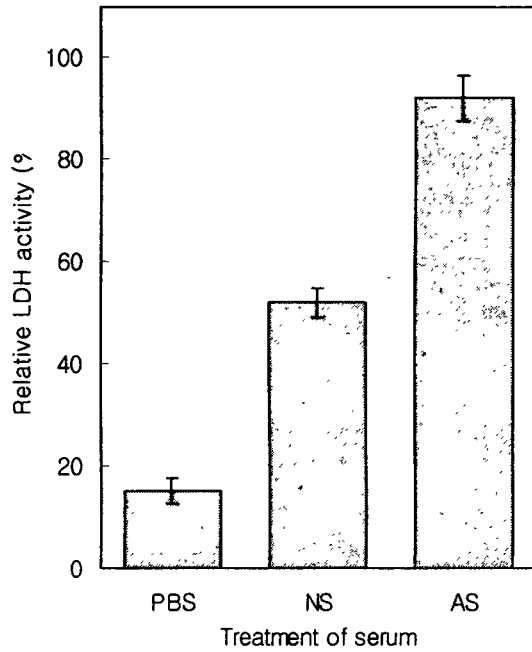


Fig. 13. Relative lactate dehydrogenase(LDH) activity released from confluent Hanwoo adipocytes by antiserum treatment. Relative activity was calculated as a percentage of the maximum optical density of antiserum treated group. NS=Non-immunized serum, AS=Antiserum. Means \pm SE(n=4). Values with different superscripts are different(P<.01).

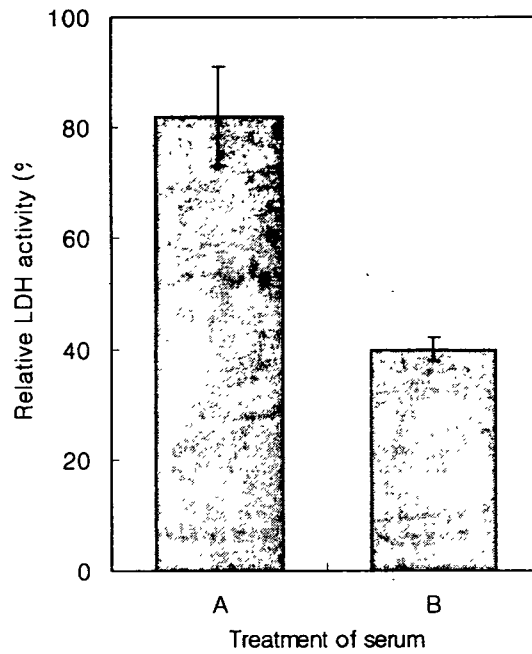


Fig. 14. Relative lactate dehydrogenase(LDH) activity released from confluent Hanwoo adipocytes by treatment of antiserum with or without complements. Relative activities were expressed as percentage of the maximum optical density of antisera with complement treatment. A=Antiserum with complement, B=Antiserum without complement. Mean \pm SE(n=4). Values with different superscripts are different (P<.01).

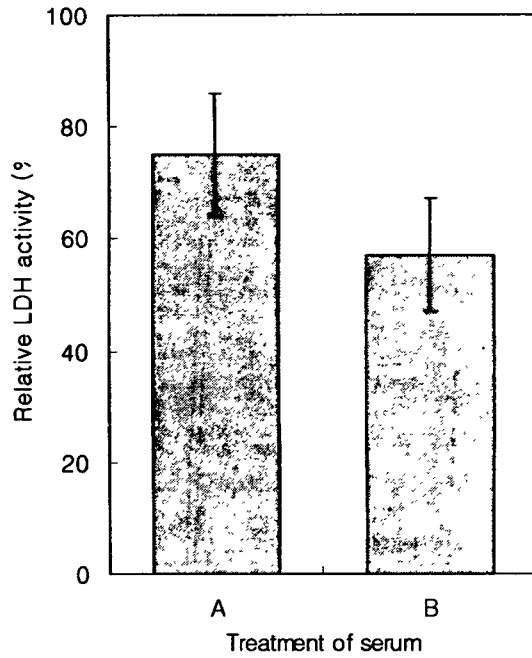


Fig. 15. Relative lactate dehydrogenase(LDH) activity released from confluent Hanwoo adipocytes treated with either liquid or lyophilized antisera. Relative activities were expressed as percentage of the maximum optical density of liquid antisera. A=Liquid antisera, B=Lyophilized antisera. Mean \pm SE(n=4).

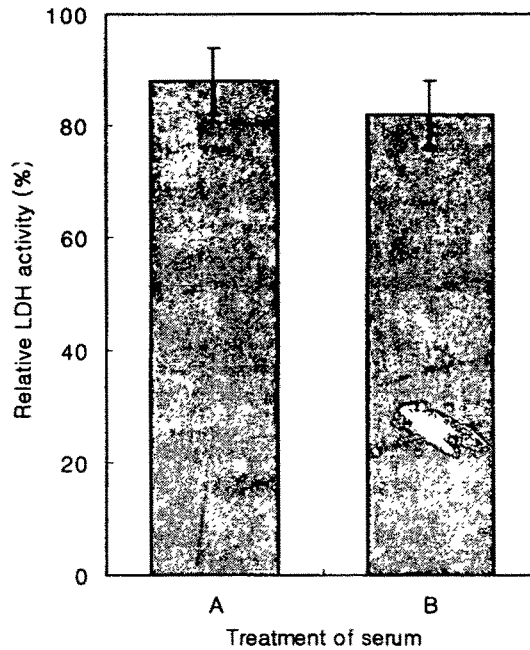


Fig. 16. Relative lactate dehydrogenase(LDH) activity released from confluent Hanwoo adipocytes treated with either innate or heat inactivated antiserum. Relative activities were expressed as percentage of the maximum optical density of innate antisera. A=Innate antiserum, B=Heat inactivated antiserum. Mean \pm SE(n=4).

마. MTT assay

배양중인 한우 지방세포에 대한 항체의 효과를 검증하기 위해 LDH assay 와 함께 MTT assay도 수행되었다. MTT assay는 항체 처리 후에도 살아 있는 세포들에 의해 노란색의 tetrazolium salt MTT가 보라색의 formazan crystal로 분열되는 원리를 이용한 것으로 Fig. 17에서는 비면역 혈청과 비교해서 항혈청의 처리에 의해 한우의 지방세포가 뚜렷하게 감소되었음을 MTT assay에 통하여 증명하고 있다($P < .05$). 이는 한우 지방세포 원형질막 단백질에 대하여 면양에서 생산된 항체가 한우의 지방세포에 매우 강한 독성이 있음을 나타낸다.

바. 형태학적 변화

Fig. 18은 항혈청을 배양중인 한우 지방세포에 처리한 경우, 현미경상으로 나타나는 형태학적 변화를 보여주는 것이다.

항혈청을 처리한 지방세포의 경우, 항혈청을 첨가한 직후부터 지방세포의 파괴를 관찰할 수 있었으며, complement의 처리로 약 1시간 후에는 거의 모든 배양중인 한우 지방세포가 파괴됨을 관찰할 수 있었다. 반면, 비면역혈청을 첨가한 한우 지방세포의 경우 혈청 첨가 직후에는 형태학적으로 큰 변화가 없다가, complement의 처리로 일부 파괴가 됨을 관찰할 수 있었다.

Flint 등(1986)은 지방세포에 대한 항체의 세포독성은 complement 의존적이라고 보고하였다.

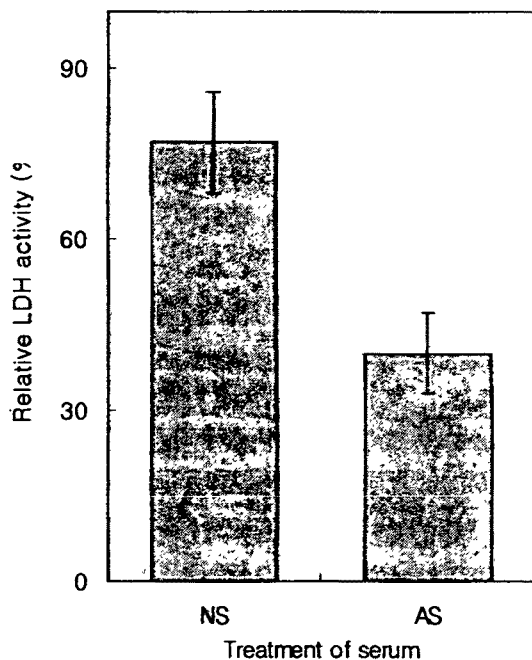


Fig. 17. Relative MTT activity measured in confluent Hanwoo adipocytes treated with either non-immunized serum(NS) or antiserum(AS). Relative activities were expressed as percentage of the maximum optical density of NS treated group. Mean \pm SE(n=4). Values with different superscripts are different(P<.05).


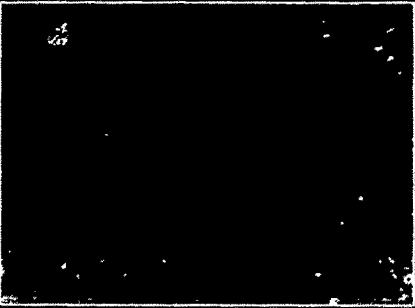



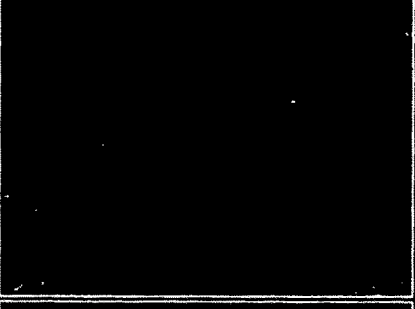

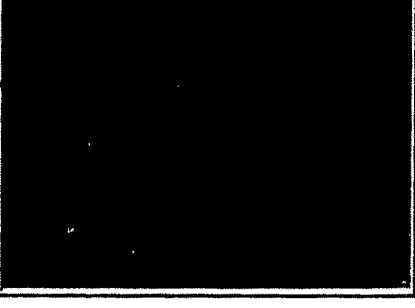
	Non-Immunized Serum	Antiserum
Pre-treatment		
Right after serum treatment		
Right after complement treatment		
Thirty minutes after treatment		

Fig. 18. Morphological changes of cultured Hanwoo adipocytes by antiserum treatments.

7. 한우지방세포에 대한 항체가 거세한우의 성장 및 체조성에 미치는 영향
(*in vivo*)

가. 거세한우의 체중변화

Fig. 19는 본 시험에 이용한 대조구와 항체처리구 거세 한우의 체중 변화를 나타낸 것으로서, 당초 우려하였던 항체의 처리로 인한 특별한 부작용은 나타나지 않는 것으로 생각된다.

처리간에 체중의 차이를 나타낸 것은, 전술한 재료 및 방법에서도 언급한 바와 같이, 본 연구를 위한 시험우를 농가에서 임대하였고, 항체의 처리 등으로 인한 부작용 등을 전혀 예측할 수 없었기 때문에, 농가의 오랜 경험으로 과도한 체지방의 축적이 예상되는 거세 한우를 항체 처리구에 배치하였기 때문이다.

Flint 등(1986)과 Nassar와 Hu(1992)는 지방세포에 대한 항체를 각각 돼지와 면양에 수동면역시 일시적인 행동의 부자연스러움이나 사료섭취량의 감소가 나타났으나, 2~3일 후면 정상상태로 회복되고, 항체 처리로 인한 증체량의 감소는 이때 보상발육(compensatory growth)이 된다고 하였다.

나. 한우의 혈중 glucose 및 triacylglycerol 함량 변화

Table 6은 한우 거세우에 항체를 처리한 경우, 혈액내 glucose와 중성지방(triacylglycerol) 함량의 변화를 나타낸 것이다.

Table 6. Changes in blood glucose and triacyglycero contents in Hanwo steers by antisera treatments

Item		Age, month						
		20			21	22	23	24
		Pretreatment	day 1	day 2				
Glucose, mg/dl	Control	61±4.5	52±2.3	57±6.5	51±3.4	79±4.5	69±2.2	98±2.2
	Treatment	57±2.0	61±4.7	66±3.4	50±2.1	54±5.7	68±4.3	76±7.2
Triacylglycerol, mg/dl	Control	15±2.2	19±1.1	13±3.7	7±2.3	12±3.4	18±1.6	18±3.6
	Treatment	20±2.1	22±1.7	15±3.3	16±4.2	14±3.3	17±5.2	24±5.6

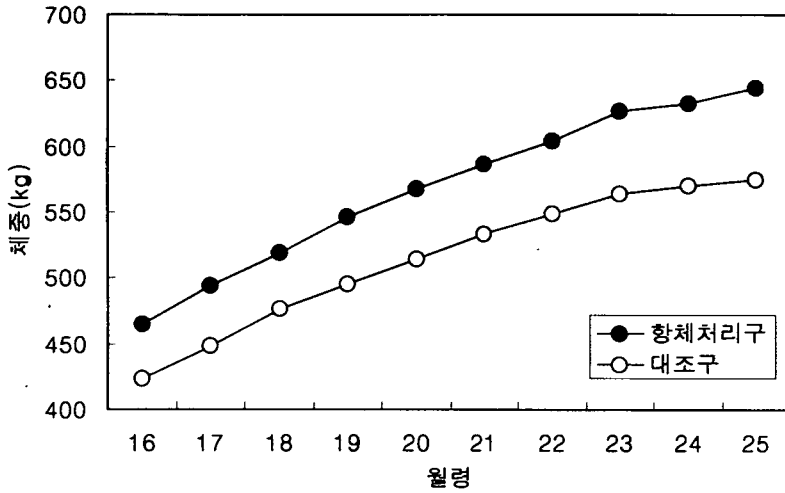


Fig. 19. Body weight changes in passively immunized Hanwoo steers with antisera against adipocyte plasma membrane proteins.

항체의 처리는 거세 한우의 혈액내 glucose 함량에 특이한 영향은 미치지 않는 것으로 생각된다. 단지, 항체 처리 후 처음 2-3일 동안에는 수치상 다소 glucose 함량이 증가하였는데, 이것만으로 항체의 처리가 거세 한우의 혈액내 glucose 함량에 영향을 미쳤다고 보기에는 미흡한 것으로 생각된다.

혈액내 triacylglycerol 함량에도 항체의 처리로 인한 별다른 영향은 없는 것으로 나타났다.

본 연구의 이러한 결과는, 당초 이론적으로 항체를 처리할 경우, 지방세포가 파괴되면서 중성지방에 유리, 대사되면서 glucose metabolism과 관계된 일련의 생화학적 지표에 변화가 있을 것이라는 예상과는 상이한 것으로, Moloney 등 (1998)도 흰쥐 지방세포에 대한 항혈청을 흰쥐에 수동면역 시켰을 때, glucose와 triacylglycerol 함량에 큰 변화가 없었다는 보고와 일치한다.

다. 한우의 체조성 및 도체의 이화학적 특성

지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 처리가 거세우의 체조성에 미치는 영향은 Table 8에 나타난 바와 같다.

Table 8. Effects of antisera against adipocyte plasma membrane proteins on body composition and carcass characteristics of Hanwoo steers

Items	Control	Treatments	p
Backfat thickness, mm	12.33±0.33 ¹⁾	10.67±0.88	0.15
longissimus muscle area, cm ²	74.33±0.88	76.00±1.53	0.40
Carcass weight, kg	328.67±8.37	375.67±11.32	0.03*
Yield index	66.90±0.16	67.33±0.33	0.31
Marbling degree	4.00±1.11	4.67±1.03	0.69
Marbling degree grade	1.33±0.33	1.33±0.33	1.00
Meat color	4.67±0.33	4.67±0.33	1.00
Fat color	2.00±0.00	2.33±0.33	0.37
Carcass, %	63.60±1.20	61.37±1.20	0.26
Bone, %	9.89±0.50	9.48±0.28	0.52
Fat, %	24.16±1.21	27.14±0.92	0.12
Connective tissue, %	0.10±0.03	0.09±0.02	0.93
Moisture, %	65.02±1.74	67.59±2.66	0.46
Crude protein, %	20.79±0.45	21.31±1.04	0.67
Crude fat, %	13.68±2.09	10.66±3.66	0.51

¹⁾Mean±SE

항체를 주사한 한우 거세우의 경우, 유의성은 없었으나 등지방 두께가 현저히 줄어들었으며(Fig. 20 참조), 배최장근 단면적과 근내지방도가 증가하는 것으로 나타났다. 특히 이 결과는 전술한 바와 같이, 불가식 지방의 함량이 많을 것으로 예상되는 시험우를 항체처리구로 배치하였던 점을 감안한다면 매우 의미있는 결과이다(Fig. 21 참조). 또한, 전체 체조성 중 지방함량이 항체처리구가 다소 많았던 것 역시 이러한 배경으로 설명할 수 있으며, 이는 동일한 조건에서 항체를 투여할 경우 체지방의 함량이 현저히 줄어들 수 있을 것으로 판단된다.

Flint 등(1998)은 흰쥐 지방세포에 대한 항체를 면역으로부터 생산하고, 이 항체가 비만 Zucker rat에서 40%의 사료 섭취량 감소를 가져왔다고 보고했으며, 일반 Wistar rat의 경우 체중이 40% 감소한다고 보고하였다. 특히 이 보고는 지

방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 수동면역이 비만동물에서 지방세포조직의 감소와 함께 다른 처리 없이도 이러한 효과가 6-7개월 유지된다는 사실을 밝혀 내었다. 또한 Kestine 등(1993)은 돼지 지방세포에 대한 항혈청을 돼지에 수동면역시킬 경우, 등지방을 30%, 기타 부위의 지방을 25% 정도 감소시켰다고 하였으며, Nassar와 Hu(1991)는 면양 지방세포에 대한 항혈청을 면양에 수동면역시킨 결과, 등지방두께가 24%, 신장지방이 46% 감소한다고 하였다.

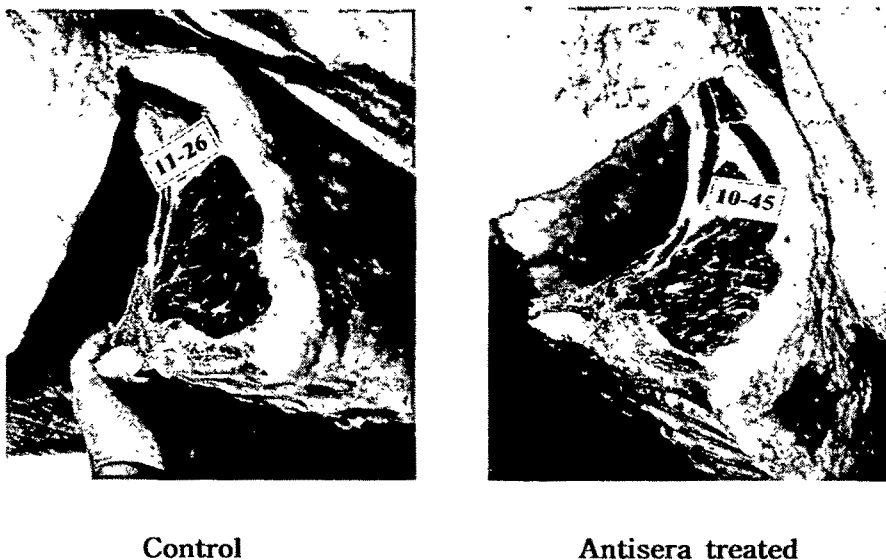
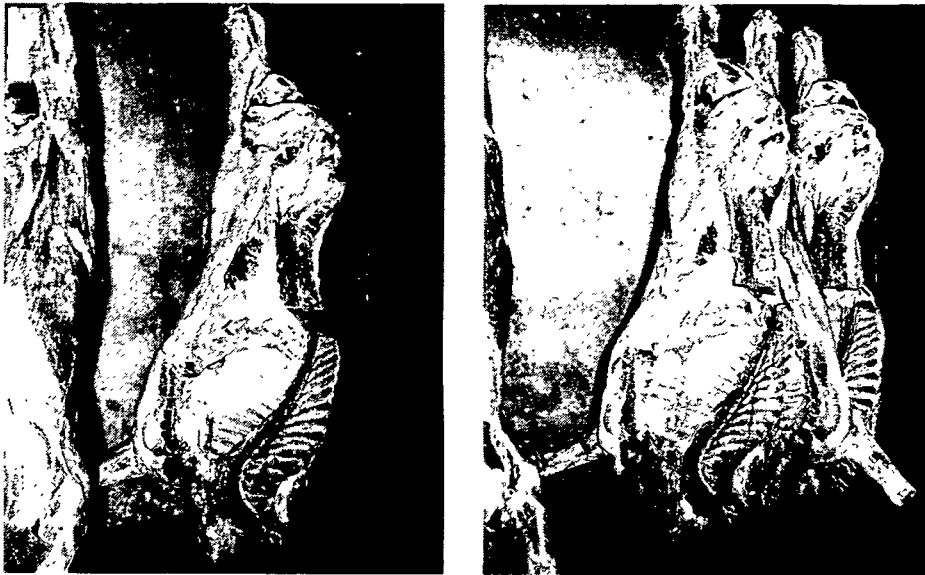


Fig. 20. Photograph showing reduced backfat thickness in passively immunized antisera against adipocyte plasma membrane proteins



Control

Antisera treated

Fig. 21. Photograph showing whole carcass of Hanwoo used in the experiment.

Table 8에 나타난 바와 같이, 거세 한우에 항혈청을 수동면역 시킬 경우, 통계적 유의성은 없었으나, 도체의 수분과 조단백질 함량을 증가시켰으며, 조지방 함량은 현저히 감소하는 경향이였다.

이는 Flint 등(1986)이 보고한 바와 같이, 육생산 동물에서 인위적으로 파괴된 지방세포에서 유리된 중성지방을 구성하고 있던 지방산이 대사가 되면서, 그 탄소 골격이 체단백질의 합성에 이용이 되었다고 추측할 수 있으며, 조단백질과 반대로 항혈청을 처리한 거세 한우의 도체중 조지방 함량의 감소는 항혈청의 생체 내 세포독성 효과 때문인 것으로 생각된다.

제 4 절 적 요

본 연구의 목적은 한우에서 추출한 지방세포 원형질막 단백질에 대한 다클론 항체를 면양에서 개발하고 항체의 조직특이성 및 세포독성효과를 검증한 후, 생체 실험에서의 항체 효과를 검증하기 위해 수행되었다.

먼저 지방세포를 비롯한 주요장기의 원형질막 단백질을 추출하였으며, 추출한 지방세포 원형질막 단백질을 면양에 면역접종하여 항체를 생산하였다. 생산된 항체는 한우의 지방세포 원형질막 단백질과 강한 결합을 하여 ELISA에 의해 최대 81,000배 희석시에도 높은 역가를 나타내었다. 그리고 항체는 기타 주요장기에서 분리한 원형질막 단백질과는 거의 결합을 하지 않음으로서 교차 반응성이 없음을 보여주었다. 이러한 항체의 조직 특이성은 Western immunoblotting에서도 재확인되었다.

배양중인 한우 지방세포의 배지에 항체를 처리한 결과, 세포독성 표지효소인 lactate dehydrogenase(LDH)가 현저하게 증가됨이 확인되었으며 반면에 비면역 혈청을 처리한 지방세포구는 MTT assay를 통해 세포의 원형이 그대로 유지됨을 알 수 있었다. 또한, 거세 한우에 대한 항체의 생체 실험은 도체 육량 및 육질등급의 향상을 가져옴으로서 항체의 효과를 실제 입증해 주었다.

이상의 결과, 본 연구에서 한우의 지방세포 원형질막에 대한 항체가 면양에서 매우 성공적으로 개발되었으며, 기타 장기와의 교차 반응성 비교에서 항체는 지방세포에 대해 조직 특이성을 나타내고 있음을 확인하였다. 또한 이 항체는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 강한 세포독성 효과를 지니고 있음을 확인하였다. 향후, 본 연구에서 개발된 항체의 실용화와 다른 축종의 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체의 응용 개발이 요구된다.

제 5 절 인용문헌

- Belsham, G. J., Denton, R. M. and Tanner, M. J. A. 1980. Use of novel rapid preparation of fat-cell plasma membranes employing Percoll to investigate the effect of insulin and adrenaline of membrane protein phosphorylation within intact fat-cells. *Biochem. J.* 192:457.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248.
- Butterwith, S. C., Kestin, S., Griffin, H. D., Beattie, J., Flint, D. J. 1992b. Identification of chicken(*Gallus domesticus*) adipocyte plasma membrane and differentiation specific proteins using SDS-PAGE and western blotting. *Comp. Biochem. Physiol.* 101:147.
- Butterwith, S. C., Kestin, S., Griffin, H. D., Flint, D. J. 1992a. Cytotoxic antibodies to chicken adipocytes and their precursors : lack of tissue specificity. *Br. Poult. Sci.* Jun; 30:371.
- Cryer A., Gray B. R. and Woodhead J. S. 1984. Study on the characterization of bovine adipocyte precursor cells and their differentiation in vitro, using an indirect-labelled-second antibody cellular immunoassay. *J. develop. Physiol.* 6:159.
- De Clercq, L. and Mourot et al. 1997. An anti-adipocyte monoclonal antibody is cytotoxic to porcine preadipocytes in vitro and depresses the development of pig adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 75:1791.
- Dong, J., Froman, D. P. and Hu, C. Y. 1991. Development and characterization of polyclonal antibodies against chicken adipocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A:195.
- Dulor, J. P., Reyne, Y. and Nougues, J. 1990. In vivo effects of a treatment with antibodies to adipocyte plasma membranes in the rabbit. *Reprod. Nutr.* 30:49.
- Flint, D. J., Coggrave, H., Futter, C. E., Gardner, M. J., and Clarke, T. J. 1986. Stimulatory and cytotoxic effects of an antiserum to adipocyte

- plasma membranes on adipose tissue metabolism in vitro and in vivo. *Int. J. Obesity*. 10:69.
- Flint, D. J. 1998. Effects of antibodies to adipocytes on body weight, food intake, and adipose tissue cellularity in obese rats. *Biochem. and Biophysical research com.* 252:263.
- Futter, C. E. and Flint, D. J. 1987. Long-term reduction of adiposity in rats after passive immunization with antibodies to rat fat cell plasma membranes. In: E. M. Berry, S. H. Blondheim, H. E. Eliahon and E. Shafir(Ed.). *Recent Advances in obesity research: V. in Proc. 5th Int. Congr. on Obesity, Sept. 14-19, 1986, Jerusalem, Israel.* p181. John Libbey and Company, London.
- Futter, C. E., Panton, D., Kestin, S. and Flint, D. J. 1992. Mechanism of action of cytotoxic antibodies to adipocytes on adipose tissue, liver, and food intake in the rat. *Int J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 16:615.
- Kestin, S., Kenndy, R., Tonner, E., Kiemam, M., Cryer, A., Griffin, H., Butterwith, S., Rhind, S. and Flint, D. J. 1993. Decreased fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membranes. *J. Anim. Sci.* 71:1486.
- Killefer, J., Hu, C. Y. 1990a. Production of a novel monoclonal antibody to porcine adipocyte plasma membrane. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194:172.
- Killefer, J., Hu, C. Y. 1990b. Expression of 64kD adipocyte-specific plasma membrane protein in genetically lean but not obese porcine adipocytes. *J. Cell Biochem.* 44:167.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680.
- Lee, S. R., Tume, R. K. and Cryer, A. 1986. Studies on the expression of adipocyte-specific cell surface antigens during the differentiation of adipocyte precursor cells in vitro. *J. Develop. Physiol.* 8:207.
- Lo, H. F., August, T. R., Liberman, U. A. and Edelman, I. S. 1976. Dependence of renal (Na⁺+K⁺)-adenosine triphosphatase activity on thyroid status. *J. Biol. Chem.* 251:7826.
- Marsh, J. L., Rutter, A. J., Kestin, S. C., Griffin, H. D. and Cryer, A. 1994. In

- vivo cytotoxic effects of antisera raised to individual polypeptide components of ovine adipocyte plasma membranes in Clun lambs. *Biochem. Soc. Trans.* 22:3285.
- Moloney, A. P. and Allen, P. and Enright, W. J. 1998. Passive immunisation of sheep against adipose tissue : effects on metabolism, growth and body composition. *Livestock production Sci.* 56:233.
- Nassar, A. H. and Hu, C. Y. 1991a. Growth and carcass characteristics of lambs passively immunized with antibodies developed against ovine adipocyte plasma membranes. *J. Anim. Sci.* 69:578.
- Nassar, A. H. and Hu, C. Y. 1991b. Antibodies to ovine adipocyte plasma membranes recognize tissue and species specific plasma membrane components. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B(3/2):361.
- Nassar, A. H. and Hu, C. Y. 1992. Characterization of polyclonal antibodies against ovine adipocyte plasma membranes. *Int J. Biochem* 24(4):599.
- Panton, D., Futter, C., Kestin, S. and Flint, D. 1990. Increased growth and protein deposition in rats treated with antibodies to adipocytes. *American Physiological society.*
- SAS. 1985. *SAS User's Guide : Statistics*(Version 5 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Tume, R. K., Lee, S. R. and Cryer, A. 1985. A comparison of polypeptide composition of plasma membranes prepared from the white adipose tissue and adipocytes of the mouse, rat, rabbit, ox and chicken by a Percoll self-forming gradient procedure. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: No. 1, pp.127.
- Vasilatos, R., Etherton, T. D. and Wangness, P. J. 1983. Preparation of isolated bovine adipocytes : Validation of use for studies characterizing insulin sensitivity and binding. *Endocrinology.* 112:1667.
- Wright, J. T., Hausman, G. J. 1990^a. Monoclonal antibodies against cell surface antigens expressed during porcine adipocyte differentiation. *Int. J. Obes May:* 14:395.
- Wright, J. T., Hausman, G. J. 1990^b. Adipose tissue development in the fetal pig examined using monoclonal antibodies. *J. Anim. Sci.* 68:1170.