

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ0100232)

한우에 농식품부산물 급여시 최적 비타민 A 및 광물질 급여기준 설정 연구
(Studies on the setting of the optimal Vitamin A and mineral levels for the agricultural-food byproduct feeding in Hanwoo)

환경대학교

연구수행기간
2014.02 ~ 2016.12

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “한우에 농식품부산물 급여시 최적 비타민 A 및 광물질 급여기준 설정 연구”(개발기간 : 2014.02. ~ 2016.12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절 기술 및 작용기전
연구

제2세부연구과제 : 한우에 적정 비타민 A 및 칼슘 인 비율 구명을 위한 체내 대사조절 연구

제3세부연구과제 : 한우 고급육 생산을 위한 과학적 Vitamin A 제한 기술 개발

2017.2.20.

제1세부연구기관명 : 한경대학교

제1세부연구책임자 : 황성구

참여 연구원 : 박지영, 김희우, 웬치마리, 전정민, 에밀조셉, 최윤정

제2세부연구기관명 : 국립축산과학

제2세부연구책임자 : 백열창

참여 연구원 : 오영균, 박윤정

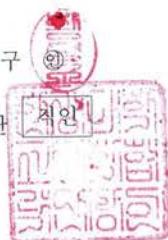
제3협동연구기관명 : 건국대학교

제3협동연구책임자 : 이홍구

참여 연구원 : 최낙진, 이재성, 김원섭, 김영신, 팽동교, 류채화, 김지현,

주관연구책임자 : 황성구

주관연구기관장 : 한경대학교산학협력단



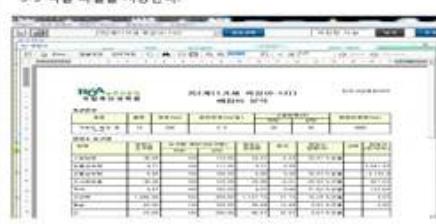
농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

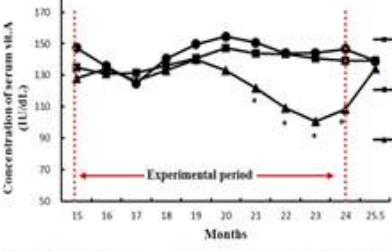
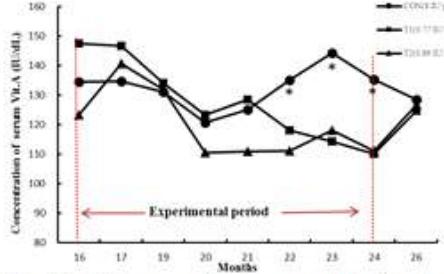
보고서 요약서

과제번호	PJ0100232		연구기간	2014. 02. 01 ~ 2016. 12. 31 (35개월)
연구사업명	단위사업명	농업공동연구		
	세부사업명	FTA대응 경쟁력 향상기술개발		
	내역사업명	축산경쟁력 제고		
연구과제명	주관과제명	한우에 농식품부산물 급여시 최적 비타민 A 및 광물질 급여기준 설정 연구		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절 기술 및 작용기전 연구 (2세부) 한우에 적정 비타민 A 및 칼슘 인 비율 구명을 위한 체내 대사조절 연구 (3세부) 한우 고급육 생산을 위한 과학적 Vitamin A 제한 기술 개발		
연구책임자	구분	과제명		소속
	1세부	한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절 기술 및 작용기전 연구		환경대
	2세부	한우에 적정 비타민 A 및 칼슘 인 비율 구명을 위한 체내 대사조절 연구		축산원
	3세부	한우 고급육 생산을 위한 과학적 Vitamin A 제한 기술 개발		건국대
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 3명 외부: 15명		총 연구개발비	정부: 930,000천원 민간: 0천원 계: 930,000천원
위탁연구기관명 및 연구책임자	해당없음		참여기업명	해당없음
국제공동연구	상대국명: 해당없음		상대국 연구기관명: 해당없음	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				

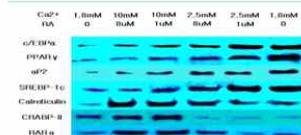
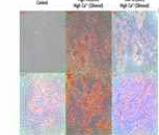
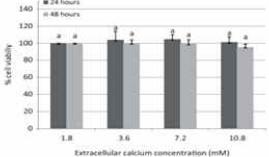
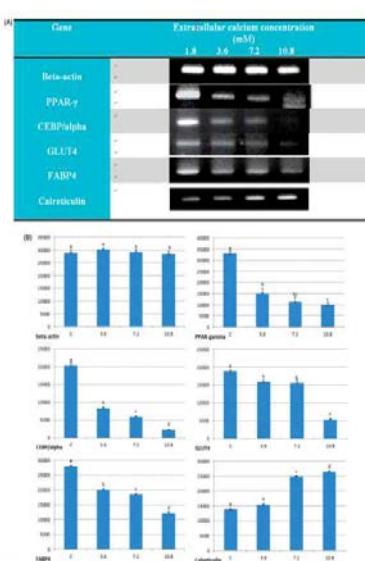
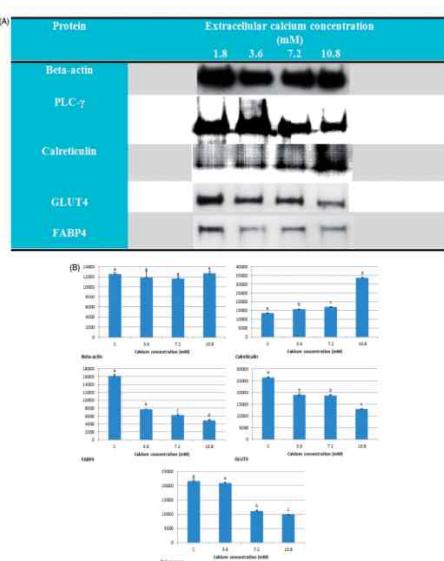
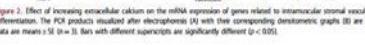
〈 국 문 요 약 문 〉

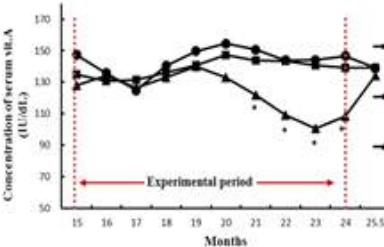
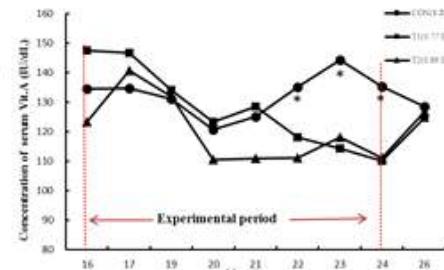
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농식품부산물을 활용하여 vitamin A 및 광물질의 적절한 수준을 조절하여 대사에 이상이 없는 수준에서 고급육을 생산하는 기술은 농가의 소득 증대와 농산부산물 활용에 있어 기술개발 																																								
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소의 지방 및 근육 조직으로부터 맥관계 간세포를 분리하여 배양하며 Ca²⁺ 및 비타민 처리 농도를 달리하며 칼슘 및 비타민 A 처리에 의한 분화조절 작용기전 밝힘 ○ 근조직 유래 맥관계간세포를 분리배양하며 세포외 칼슘조절을 통한 지방세포 분화조절에 Calreticulin 작용기전 밝힘 <p style="margin-top: 10px;"> Stromal Vascular cell를 이용한 extra cellular Ca²⁺ 처리 수준에 따른 지방세포 분화 </p> <table border="1"> <caption>Estimated data from the bar chart</caption> <thead> <tr> <th>Ca²⁺ (μM)</th> <th>24 Hours</th> <th>48 Hours</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>~10</td><td>~10</td></tr> <tr><td>1</td><td>~30</td><td>~35</td></tr> <tr><td>2</td><td>~50</td><td>~55</td></tr> <tr><td>3</td><td>~60</td><td>~65</td></tr> <tr><td>4</td><td>~70</td><td>~75</td></tr> </tbody> </table> <p style="margin-top: 10px;"> 3T3-L1 세포를 칼슘과 레티노인산 농도를 달리 하여 처리 지방세포 분화 정도측정 </p> <p>(A) Histology images of 3T3-L1 cells treated with different calcium and retinoic acid concentrations. Scale bars are present in each image.</p> <p>(B) Bar graph showing the degree of differentiation (0 to 1.0) for each treatment group. Asterisks indicate significant differences.</p> <table border="1"> <caption>Estimated data from the bar graph in (B)</caption> <thead> <tr> <th>Treatment</th> <th>Differentiation Degree</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0 μM Ca, 0 μM RA</td><td>~0.1</td></tr> <tr><td>1 μM Ca, 0 μM RA</td><td>~0.2</td></tr> <tr><td>2 μM Ca, 0 μM RA</td><td>~0.3</td></tr> <tr><td>3 μM Ca, 0 μM RA</td><td>~0.4</td></tr> <tr><td>4 μM Ca, 0 μM RA</td><td>~0.5</td></tr> <tr><td>0 μM Ca, 1 μM RA</td><td>~0.6</td></tr> <tr><td>1 μM Ca, 1 μM RA</td><td>~0.7</td></tr> <tr><td>2 μM Ca, 1 μM RA</td><td>~0.8</td></tr> <tr><td>3 μM Ca, 1 μM RA</td><td>~0.9</td></tr> <tr><td>4 μM Ca, 1 μM RA</td><td>~0.95</td></tr> </tbody> </table> <p style="margin-top: 10px;"> 3T3-L1 세포에서 칼슘, 레티노인산 처리농도를 달리 하여 분화된 지방분화 관련 단백질의 발현량 </p>	Ca ²⁺ (μM)	24 Hours	48 Hours	0	~10	~10	1	~30	~35	2	~50	~55	3	~60	~65	4	~70	~75	Treatment	Differentiation Degree	0 μM Ca, 0 μM RA	~0.1	1 μM Ca, 0 μM RA	~0.2	2 μM Ca, 0 μM RA	~0.3	3 μM Ca, 0 μM RA	~0.4	4 μM Ca, 0 μM RA	~0.5	0 μM Ca, 1 μM RA	~0.6	1 μM Ca, 1 μM RA	~0.7	2 μM Ca, 1 μM RA	~0.8	3 μM Ca, 1 μM RA	~0.9	4 μM Ca, 1 μM RA	~0.95
Ca ²⁺ (μM)	24 Hours	48 Hours																																							
0	~10	~10																																							
1	~30	~35																																							
2	~50	~55																																							
3	~60	~65																																							
4	~70	~75																																							
Treatment	Differentiation Degree																																								
0 μM Ca, 0 μM RA	~0.1																																								
1 μM Ca, 0 μM RA	~0.2																																								
2 μM Ca, 0 μM RA	~0.3																																								
3 μM Ca, 0 μM RA	~0.4																																								
4 μM Ca, 0 μM RA	~0.5																																								
0 μM Ca, 1 μM RA	~0.6																																								
1 μM Ca, 1 μM RA	~0.7																																								
2 μM Ca, 1 μM RA	~0.8																																								
3 μM Ca, 1 μM RA	~0.9																																								
4 μM Ca, 1 μM RA	~0.95																																								

<p>1. 해당 프로그램을 다운로드 및 실행</p> <p>1-1 국립축산과학원 홈페이지(nias.go.kr) 접속 1-2 접속에 농가활용 프로그램 클릭 1-3 한우사양표준 2015 프로그램 (TMR 배합프로그램 클릭) 1-4 불린 파일에 광물질 확인프로그램 다운로드</p> 	<p>2. 프로그램 실행</p> <p>2-1 해당 액셀 파일을 실행한다. 2-2 '입력' 시트에 나와 있는 설문서 위에본다. 2-3 농장에서 이용하는 광물질 첨가제 성분을 입력한다.</p> 
<p>3. 한우사양표준 배합비프로그램에서 배합비를 엑셀로 다운로드</p> <p>3-1 프린트 버튼을 누른다. 3-2 엑셀로 저장 버튼을 누른다. 3-3 엑셀 파일을 저장한다.</p> 	<p>4. 배합비 불러오기</p> <p>4-1 콘텐츠 사용을 클릭한다. 4-2 한우사양표준 배합비 불러오기를 클릭한다. 4-3 저장한 배합비(엑셀)를 클릭한다.</p> 
<p>5. 배합비 확인</p> <p>5-1 '보고서'라는 시트가 생긴다. 5-2 보고서 시트에서 내가 불러온 배합비를 확인한다. 5-3 결과보고서를 확인한다.</p> 	<p>6. 결과 보고서 확인</p> <p>6-1 결과 보고서 시트를 클릭한다. 6-2 자가배합사료 광물질 확인 결과 표를 확인한다. 6-3 비록, 일신, 비유조기로 구성되고 사양 단계에 따라 확인한다. 6-4 주의한 부분은 노란색으로 표시되고 과잉은 빨간색으로 표시된다.</p> 
<ul style="list-style-type: none"> ○ 광물질의 부족 및 과잉으로 오는 대사성 질병 사전 예방 및 농가에서 직접 만든 사료의 불안감 해소 ○ 자가배합사료 제조 한우농가용 광물질 검증 프로그램 개발 	

																																																												
	Fig 34. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from vitamin A premix.	Fig 35. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from feedstuff.																																																										
	<table border="1" data-bbox="488 616 912 874"> <thead> <tr> <th colspan="3">근내지방 지수</th> <th rowspan="2">P-value (T-test)</th> </tr> <tr> <th>혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110</th> <th>혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>연구 5</td> <td>5.2±0.38</td> <td>6.3±0.66</td> <td>0.136</td> </tr> <tr> <td>연구 6</td> <td>5.1±0.35</td> <td>5.6±0.46</td> <td>0.243</td> </tr> <tr> <td>연구 5 + 연구 6</td> <td>5.1±0.35</td> <td>6.0±0.36</td> <td>0.068</td> </tr> </tbody> </table>	근내지방 지수			P-value (T-test)	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110	연구 5	5.2±0.38	6.3±0.66	0.136	연구 6	5.1±0.35	5.6±0.46	0.243	연구 5 + 연구 6	5.1±0.35	6.0±0.36	0.068	<table border="1" data-bbox="928 616 1372 874"> <thead> <tr> <th></th> <th>IT type</th> <th>TC type</th> <th>P value</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>등지방 두께(mm)</td> <td>12.7±0.42</td> <td>13.2±0.72</td> <td>0.952</td> </tr> <tr> <td>등심 면적(cm²)</td> <td>86.5±0.94</td> <td>93.0±1.88</td> <td>0.002</td> </tr> <tr> <td>도체중 (kg)</td> <td>411.0±5.04</td> <td>444.2±9.63</td> <td>0.002</td> </tr> <tr> <td>총당지수</td> <td>64.8±0.29</td> <td>64.6±0.57</td> <td>0.771</td> </tr> <tr> <td>근내지방(NJ)</td> <td>5.2±0.16</td> <td>6.3±0.26</td> <td>0.001</td> </tr> <tr> <td>육색</td> <td>48±0.04</td> <td>48±0.07</td> <td>0.936</td> </tr> <tr> <td>지방색</td> <td>3.0±0.02</td> <td>3.0±0.00</td> <td>0.330</td> </tr> <tr> <td>조리감</td> <td>1.2±0.04</td> <td>1.1±0.04</td> <td>0.125</td> </tr> <tr> <td>성숙도</td> <td>2.1±0.03</td> <td>2.2±0.06</td> <td>0.410</td> </tr> </tbody> </table>		IT type	TC type	P value	등지방 두께(mm)	12.7±0.42	13.2±0.72	0.952	등심 면적(cm ²)	86.5±0.94	93.0±1.88	0.002	도체중 (kg)	411.0±5.04	444.2±9.63	0.002	총당지수	64.8±0.29	64.6±0.57	0.771	근내지방(NJ)	5.2±0.16	6.3±0.26	0.001	육색	48±0.04	48±0.07	0.936	지방색	3.0±0.02	3.0±0.00	0.330	조리감	1.2±0.04	1.1±0.04	0.125	성숙도	2.1±0.03	2.2±0.06	0.410
근내지방 지수			P-value (T-test)																																																									
혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110																																																											
연구 5	5.2±0.38	6.3±0.66	0.136																																																									
연구 6	5.1±0.35	5.6±0.46	0.243																																																									
연구 5 + 연구 6	5.1±0.35	6.0±0.36	0.068																																																									
	IT type	TC type	P value																																																									
등지방 두께(mm)	12.7±0.42	13.2±0.72	0.952																																																									
등심 면적(cm ²)	86.5±0.94	93.0±1.88	0.002																																																									
도체중 (kg)	411.0±5.04	444.2±9.63	0.002																																																									
총당지수	64.8±0.29	64.6±0.57	0.771																																																									
근내지방(NJ)	5.2±0.16	6.3±0.26	0.001																																																									
육색	48±0.04	48±0.07	0.936																																																									
지방색	3.0±0.02	3.0±0.00	0.330																																																									
조리감	1.2±0.04	1.1±0.04	0.125																																																									
성숙도	2.1±0.03	2.2±0.06	0.410																																																									
	Fig 36. Effect of different period	Fig 37. Effect of ADH1C gene on concentration of serum vitamin A in carcass traits in Korean native steers marbling score.																																																										
	○ 한우 사양에 있어 Vitamin A 제한 기술의 개발은 한우 사양시스템에 있어 농가에 적용하여 높은 수준의 Marbling을 생산 할 수 있는 고급육 생산용 사료개발 및 사양시스템 개발에 핵심적인 기술로 활용 가능	○ 한우에 비타민 A 제한급여 시 ADH1C 유전자의 형질에 따라 근내지방도에 미치는 영향이 다르다는 것을 확인																																																										
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 농림식품부산물을 이용한 신종 사료자원의 개발 및 산업화를 통한 사료비 절감 및 한우 생산비 저감 효과 ○ 본 연구를 통한 한우 사양에 있어 Vitamin A 제한 기술의 개발은 한우 사양시스템에 있어 농가에 적용하여 높은 수준의 Marbling을 생산 할 수 있는 고급육 생산용 사료개발 및 사양시스템 개발에 핵심적인 기술로 활용할 수 있음 ○ 광물질의 부족 및 과잉으로 오는 대사성 질병 사전 예방, 농가에서 직접 만든 사료의 불안감 해소																																																											
중심어 (5개 이내)	한우	마블링	vitamin A 제한	광물질	대사																																																							

〈 Summary 〉

<p>Purpose& Contents</p>	<p>○ The objective of this study is to increase the income of beef cattle farmers by developing the utilization of agricultural by-products through setting the optimal vitamin A and mineral levels in Hanwoo.</p>
<p>Results</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;">  <p>Figure 4: Western blot analysis of proteins associated with the differentiation of bovine intramuscular stromal vascular cells after treatment with different concentrations of calcium and retinoic acid.</p> </div> <div style="width: 45%;">  <p>Figure 5: Effect of different concentration of calcium and retinoic acid on Hanwoo beef cattle stromal vascular cell differentiation. (A) Cells were treated for 9 days after the induction of differentiation and were stained with Oil Red O. (B) Elution of Oil Red O staining with hexane.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;">  <p>Figure 1: Effect of increasing extracellular calcium concentration on the viability of intramuscular stromal vascular cells from Hanwoo beef cattle. Data are means \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).</p> </div> <div style="width: 45%;">  <p>Figure 2: Effect of increasing extracellular calcium on the mRNA expression of genes related to intramuscular stromal vascular cells differentiation. The PCR products resulted after electrophoresis (A) with their corresponding densitometric graphs (B) are shown. Data are means \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;">  <p>Figure 3: Effect of increasing extracellular calcium concentration on the expression of adipogenesis-related proteins in IM SVCs. The relative protein expression (A) and the quantitative protein expression obtained through densitometry analysis (B) are shown. Data are means \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).</p> </div> <div style="width: 45%;">  <p>Figure 4: RT-PCR analysis of genes related to IM SVC differentiation.</p> </div> </div> <div style="margin-top: 20px;"> <p>○ Our current study has shown that exposure of primary isolates of IM SVCs to high extracellular calcium levels cause a decrease in the adipogenesis of the cells in a dose-dependent manner as seen in the results of the RT-PCR and Western blot analyses. In addition, the PLCγ and PKC data shows that the treatments with increasing calcium also have an increase in the protein expression and activity of the aforementioned molecules, respectively. Data derived from this study shows that, in vitro, increasing the calcium levels present in the microenvironment of fat precursor cells leads to a lower percentage of adipogenesis in between muscle fibres.</p> </div>

		Fig 34. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from vitamin A premix.		Fig 35. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from feedstuff.																																																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">근내지방 지수</th> <th rowspan="2">P-value (T-test)</th> </tr> <tr> <th>혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110</th> <th>혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>연구 5</td> <td>5.2±0.38</td> <td>6.3±0.66</td> </tr> <tr> <td>연구 6</td> <td>5.1±0.35</td> <td>5.6±0.46</td> </tr> <tr> <td>연구 5 + 연구 6</td> <td>5.1±0.25</td> <td>6.0±0.36</td> </tr> </tbody> </table>	근내지방 지수		P-value (T-test)	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110	연구 5	5.2±0.38	6.3±0.66	연구 6	5.1±0.35	5.6±0.46	연구 5 + 연구 6	5.1±0.25	6.0±0.36	P-value (T-test)	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>TT type</th> <th>TC type</th> <th>P value</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>등지방 두께(mm)</td> <td>12.7±0.42</td> <td>13.2±0.72</td> <td>0.952</td> </tr> <tr> <td>등심 면적(cm²)</td> <td>86.5±0.94</td> <td>93.0±1.88</td> <td>0.002</td> </tr> <tr> <td>도체중 (kg)</td> <td>411.0±5.04</td> <td>444.2±9.63</td> <td>0.002</td> </tr> <tr> <td>총장지수</td> <td>64.8±0.29</td> <td>64.6±0.57</td> <td>0.771</td> </tr> <tr> <td>근내지방(NO)</td> <td>5.2±0.16</td> <td>6.3±0.26</td> <td>0.001</td> </tr> <tr> <td>육색</td> <td>48±0.04</td> <td>48±0.07</td> <td>0.936</td> </tr> <tr> <td>지방색</td> <td>3.0±0.02</td> <td>3.0±0.00</td> <td>0.330</td> </tr> <tr> <td>조리감</td> <td>1.2±0.04</td> <td>1.1±0.04</td> <td>0.125</td> </tr> <tr> <td>성숙도</td> <td>2.1±0.03</td> <td>2.2±0.06</td> <td>0.410</td> </tr> </tbody> </table>		TT type	TC type	P value	등지방 두께(mm)	12.7±0.42	13.2±0.72	0.952	등심 면적(cm ²)	86.5±0.94	93.0±1.88	0.002	도체중 (kg)	411.0±5.04	444.2±9.63	0.002	총장지수	64.8±0.29	64.6±0.57	0.771	근내지방(NO)	5.2±0.16	6.3±0.26	0.001	육색	48±0.04	48±0.07	0.936	지방색	3.0±0.02	3.0±0.00	0.330	조리감	1.2±0.04	1.1±0.04	0.125	성숙도	2.1±0.03	2.2±0.06	0.410	Fig 36. Effect of different period	Fig 37. Effect of ADH1C gene on concentration of serum vitamin A in carcass traits in Korean native steers marbling score.
근내지방 지수		P-value (T-test)																																																									
혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110																																																										
연구 5	5.2±0.38	6.3±0.66																																																									
연구 6	5.1±0.35	5.6±0.46																																																									
연구 5 + 연구 6	5.1±0.25	6.0±0.36																																																									
	TT type	TC type	P value																																																								
등지방 두께(mm)	12.7±0.42	13.2±0.72	0.952																																																								
등심 면적(cm ²)	86.5±0.94	93.0±1.88	0.002																																																								
도체중 (kg)	411.0±5.04	444.2±9.63	0.002																																																								
총장지수	64.8±0.29	64.6±0.57	0.771																																																								
근내지방(NO)	5.2±0.16	6.3±0.26	0.001																																																								
육색	48±0.04	48±0.07	0.936																																																								
지방색	3.0±0.02	3.0±0.00	0.330																																																								
조리감	1.2±0.04	1.1±0.04	0.125																																																								
성숙도	2.1±0.03	2.2±0.06	0.410																																																								
	<ul style="list-style-type: none"> ○ In the study of vitamin A restriction, we found that vitamin A restriction from vitamin premix and feedstuff revealed the decreased of serum vitamin A concentration. Meanwhile, serum vitamin A which was below 110 IU/dl showed the trend of higher ($P<0.10$) marbling under vitamin A restriction without any metabolic diseases. ○ In addition, based on the vitamin A restriction study, TC type of ADH1C genotype had preferable marbling score, eye muscle area and carcass weight than that in TT type ($P<0.05$). ○ As a result, vitamin A restriction and TC type of ADH1C genotype could have the potential benefit of increasing the marbling in Korean native steers. 																																																										
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ In this study, determination of the optimal vitamin A and mineral levels in Hanwoo can be utilized as a core technology for development of high quality meat production and specification system which can produce high level of marbling applied to farmhouse in Hanwoo feeding system. ○ The study can contribute to improving the utilization of agricultural by-products. ○ Prevention of metabolic diseases caused by lack or excess of minerals, and helps on the concerns of farmers when formulating feeds by themselves. ○ The study can contribute to reduction of the feed price and the production costs of Hanwoo by industrialization. 																																																										
Keywords	Hanwoo	marbling	vitamin A restriction	minerals metabolism																																																							

〈 목 차 〉

제 1 장 연구 개발 과제의 개요	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	25
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	118
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	122
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	125
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	128
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설 · 장비현황 ..	129
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ..	130
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	135
제 11장 기타사항	137
제 12장 참고문헌	142

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

- 농식품부산물을 활용하여 vitamin A 및 광물질의 적절한 수준을 조절하여 대사에 이상이 없는 수준에서 고급육을 생산하는 기술은 농가의 소득 증대와 농산부산물 활용에 있어 기술개발의 필요

제2절 연구 개발의 필요성

1. 연구개발 대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

가. 경제적 · 산업적 중요성

우리나라는 가축배합사료의 96% 이상을 수입에 의존하고 있어 곡물수출국의 기상이변 등에 의한 곡물 작황이 좋지 않은 경우 사료 곡물 수급불안정으로 인한 사료비 상승요인이 발생하고 이로인한 국내 축산업의 위기는 더욱 고조될 수 밖에 없다. 최근 통계청 자료에 따르면 한우 비육우 두당 사료비가 2002년도에 125만원 이던 것이 2010년에는 228만원으로 상승하였고 2015년에는 286만원으로 2002년에 비해 각각 82%, 128%로 가파르게 상승하고 있는 것으로 조사되었다. 이렇게 가축 사료 원료의 대부분을 수입에 의존하는 우리나라에 있어서 국내 농식품부산물의 효율적인 이용은 더욱 절실히 요구되어지고 있다. 국내 농식품부산물 연간 발생량은 약 6,265천 톤으로 50%정도를 섬유질배합사료(TMR) 원료로 사용할 경우 배합사료 1,714천 톤을 대체하는 효과가 있다. 하지만 사료비 절감을 위하여 한우농가 및 지자체 또는 농업기술센터 등에서 농식품부산물을 활용하여 사료를 제조하고 있으나 원료사료 별 영양소 함량이 다르고 급여 권장량이 상이하여 이용에 상당히 어려움을 겪고 있는 실정이다. 특히, 미강과 같은 강피류는 농가에서 비교적 손쉽게 얻을 수 있는 농산부산물이어서 사료원료로 많이 활용되고 있으나 인 함량이 약 2%정도로 높은 편이어서 뇨결석증과 같은 대사질병의 주요 원인이 되고 있는 문제도 농식품부산물의 이용을 떨어뜨린다고 할 수 있다.

최근, 한우 고급육 생산에 혈중 비타민A 농도를 낮게 유지하면 근내지방축적이 증가한다는 연구결과가 발표됨에 따라 사료공장 및 농가단위의 자가배합사료 제조시 사료 내 비타민 A함량을 낮게 유지하려는 시도들이 많이 하고 있다. 사료 내 비타민 A 조절은 요구량보다 약간 높은 정도의 조절을 하는 것이 이웃나라 일본에서 널리 행해지고 있는 것으로 알려지며 우리나라 비육우 생산 농가에서도 조절기술을 도입하려는 시도를 많이 하고 있는데 충분한 경험이 없는 경우에 지용성비타민이며 필수영양소 중의 하나인 vitamin A가 결핍될 경우 요로계통의 상피조직 탈락을 촉진하고, 결석의 핵을 형성하여 탈락된 조직세포주변에 광물질이 침착되어 결석을 형성하기도 하는 것으로 보고되어지고 있다 (Grasesa 등, 1998).

한편, 일본 와규비육의 경우 21~23개월령부터 사료 내 낮은 vitamin A와 Ca의 수준은 근내지방도를 높이는 것으로 보고되고 있어 (Adachi 등, 1999) 우리나라에서도 사료 내 비타민A 및 칼슘조절에 의한 고급육 생산 기술 연구는 가속화 될 것으로 보여진다. 그러나 국내에서는 농산부산물을 이용한 비타민 및 무기물 조절에 의한 고급육 생산에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서, 농식품부산물을 활용하여 vitamin A 및 광물질의 적절한 수준을 조절하여 대사에 이상이 없는 수준에서 고

급육을 생산할 수 있는 기술개발의 필요성이 절실하다고 판단된다.

제3절 연구 개발 범위

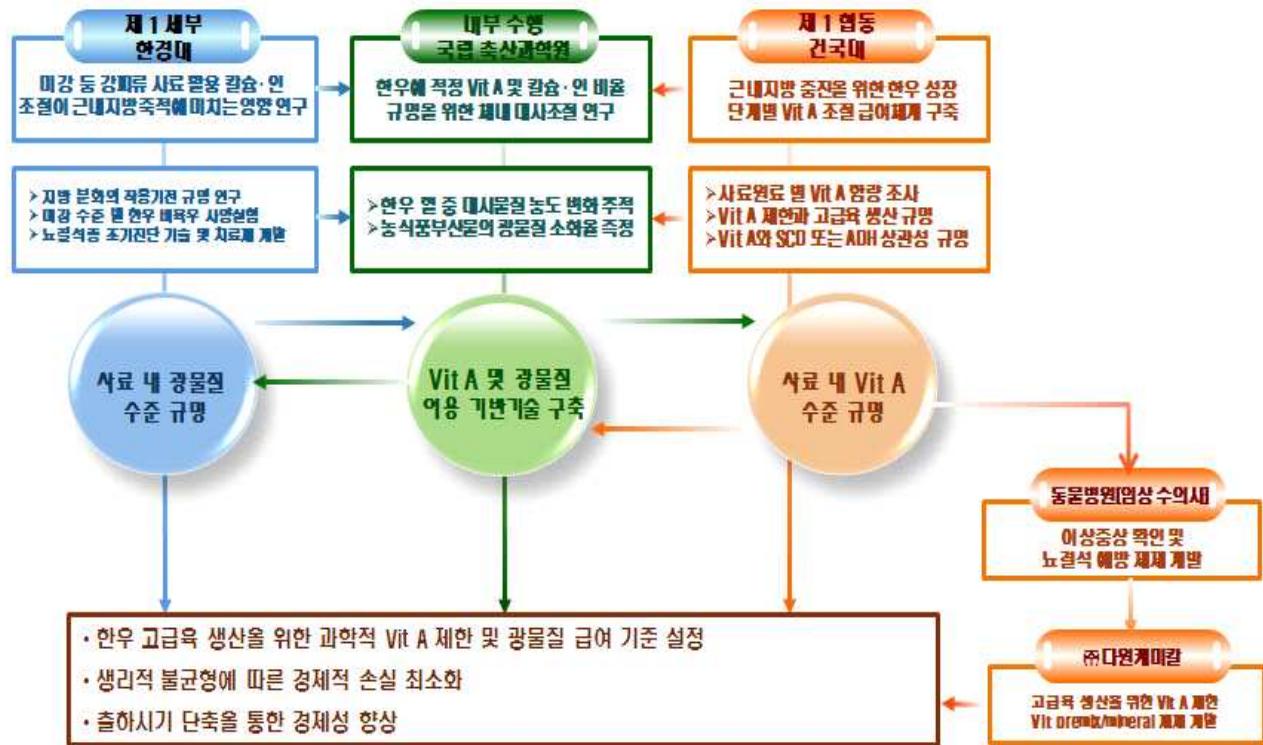
1. 연구개발 범위



연구개발의 추진전략 및 방법

- 각 분야의 최고의 전문가가 연구책임자로 구성되어 있는 모든 세부, 협동 및 참여기업이 독립적 모듈을 이루어 기술을 개발하되, 모든 과제가 유기적으로 연동되어 통합적 시스템을 이루고 지속적인 피드백을 통해 현장 적용이 우수한 농림부산물을 활용한 한우 고급육 생산 최적의 vitamin A 및 광물질 급여수준 설정 연구를 시행.
- 선행연구, 문헌조사를 통해 현재 보유하고 있는 기반기술을 국립축산과학원 영양생리팀 대사실에서 구현하고, 지속적으로 각 과제별 연구결과를 적용, 검증하고, 이에 따라 체계적으로 vitamin A 제한 및 광물질 급여 시스템을 보정 및 수정함.
- 개발된 연구결과물은 각 부분별 결과도출에 따라 신속히 기술이전 및 산업화를 실시하고, 개발된 한우 vitamin A 및 광물질 조절 기술은 참여기업(전문 첨가제 기업 및 동물병원)의 인프라를 통해 현장 적용 및 검증하고, 연구결과의 상품화, 산업화를 이루어 부가가치 창출함.

2. 연구개발 추진체계



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1 절 국내 연구 현황

1. vitamin A와 고급육 생산과의 관계

1973년 조 등(1973)은 유우 및 한우의 혈청 중 carotenoid 및 vitamin A의 함량을 측정하기 시작하였고 1989년 하와 조(1989)는 한우의 최대 유효 vitamin A 혈중 농도를 결정하기 위하여 vitamin A 및 holo-retinol binding protein 농도에 관한 연구를 하였다. 또한 1998년 안 등(1998)은 vitamin A 급여수준과 거세가 한우의 비육능력 및 혈액성상에 미치는 영향을 연구한 결과, vitamin A 급여수준이 중체량, 사료 섭취량 그리고 사료효율에 영향을 주지 않았으나, 혈액 중 cholesterol은 vitamin A의 제한 급여에 의해 증가되었다고 하였다.

하지만, 1999년 안 등(1999)이 vitamin A 급여수준과 거세가 한우 지방조직의 지방산조성 및 육질에 미치는 영향을 연구한 결과, vitamin A 수준에 의해 근내지방의 지방산 조성은 변하지 않았으나, oleic acid의 수준은 증가되는 경향을 보였다고 보고하였다. 또한 vitamin A의 수준을 감소시킬 시 거세우의 도체 지방색이 하얗게 변하였으며($p<0.05$), vitamin A의 가장 적절한 수준은 요구량의 60%라고 제시하였다. 추가적으로 2000년 양파 안(2000)은 혈액 중의 vitamin A가 한우 거세우의 육질에 미치는 영향을 연구한 결과, 혈액 중의 vitamin A 함량은 육질등급이 높을수록, 낮음을 제시하였다. 또한, 2001년 양파 안(2001)의 또 다른 논문인 혈액 중 vitamin A 및 E 농도와 한우 거세우의 도체특성과의 관계에 관한 조사연구에 따르면, vitamin A의 경우 육량등급, 육질등급 및 근내지방도와는 부의 상관관계($p<0.05$)를 가지고 있었고, 등지방두께, 육색($p<0.05$) 및 vitamin E($p<0.05$)와는 정의 상관관계를 가지고 있다고 하였다.

2003년 채 등(2003)의 연구에 의하면 거세한우의 혈청 및 간장내 vitamin A 농도와 도체형질간의 상관관계에 대한 연구 결과, 개체별, 지역별, 농가별로 큰 변이를 보였으며, 거세한우의 혈청 내 vitamin A 농도는 근내지방도($r=-0.24$, $p<0.01$), 등심내 조지방 함량($r=-0.21$, $p<0.01$) 및 육질등급($r=-0.20$, $p<0.01$)과 유의한 부의 상관을 나타내었으며, 간장내 vitamin A plamitate는 등심내 조지방 함량($r=-0.18$, $p<0.01$) 및 육질등급($r=-0.16$, $p<0.05$)과 유의한 부의 상관을 나타내었다고 하였다.

그러므로 채 등(2003)과 같이 다양한 선행연구를 통해 한우 고급육 생산 시 사료 내 vitamin A 함량을 조절함으로서 근내지방도를 향상시킬 수 있다는 가능성을 시사하였으나, 한우 고급육 생산을 위한 거세한우의 사료 내 vitamin A의 함량과 급여량 및 급여시기 등에 대한 보다 구체적이 연구가 계속해서 수행되어야 할 것을 제시하였다.

2. 광물질과 고급육 생산과의 관계

2003년 이 등(2003)의 연구에 의하면 한우 비육후기 사료에 칼슘 첨가제(석회석) 제거가 성장 및 육질특성에 미치는 영향을 연구한 결과, 비육후기에 칼슘제(석회석)를 첨가하지 않은 사료의 급여는 에너지 섭취의 증가 또는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 합성 촉진을 통하여, 근내지방합성이 증가되어 성장률 및 근내지방도를 개선한다고 제시하였다. 또한, 2005년 김 등(2005)의 연구에 의하면 거정석과 vitamin A 급여가 거세한우의 성장, 혈액성상 및 도체특성에 미치는 영향을 조사한 결과, vitamin A의 경우 혈중 레티놀 농도를 증가시켰고($p<0.05$), 혈중 총 콜레스테롤을 감소시켰으며($p<0.05$), marbling score와 육질등급은 거정석(점토광물)에서 유의하게 증가($p<0.05$)하여 거정석 첨가는 고급육 생산에 도움이 될 것이라 논의하였다.

하지만, 2005년 김과 김(2005)의 연구에 의하면 활성탄과 vitamin A의 급여가 거세한우의 성장, 혈액성상 및 도체 특성에 미치는 영향을 조사한 결과, 일당증체량, 혈액의 WBC 수치 및 혈액성상 변화, 도체 등급의 특성 등이 처리구간에 유의성이 없었다하여 광물질의 종류에 따라 고급육에 관여하는 요인에 차이가 있는 것으로 보고하였다.

3. Vitamin A 조절에 의한 다양한 생리 변화

Vitamin A(retinol)는 β -carotene의 변환으로부터 또는 직접 음식으로부터 흡수할 수 있는 밝은 노란색 결정 화합물이다(Provitamin A; Figure 1). 일반적으로 vitamin A는 동물의 시력, 생식기능, 골격성장, 상피세포 유지, 상피조직 내 거대분자의 합성 및 세포막 유지 등 동물의 건강과 면역기능의 유지 그리고 질병발생을 억제하기 위해서 필수적인 영양소(McDowell, 1989)다. 한우에서 vitamin A는 건강, 성장 및 생명을 유지하는데 필수적이며, 과도한 결핍 시에는 성장이 멈추고 폐사까지 이를 수 있으므로 성장기 한우에 있어서는 반드시 필요하며, 임신기에는 더 많은 량이 요구된다. 그러므로 시기뿐만 아니라, 동물 종에 따라서도 평균적으로 보유하고 있어야 할 β -carotene의 양이 있다(EFSA, 2012; Table 1).

Vitamin A의 결핍 시 야맹증과 감염에 싸울 수 있는 능력을 감소시키는 단점이 있으며, 심지어 가볍거나 무증상의 결핍 또한 호흡기와 설사 감염, 느린 뼈의 발달 그리고 심각한 질병으로부터의 생존 확률 감소 등의 위험성을 증가시키기 때문에 문제가 될 수 있다고 전해진다(Souganidis 등, 2013). 하지만 반대로 vitamin A의 과잉 섭취 시에는 구역질 및 설사와 같은 소화 생리적 현상에 이상이 생기며, 털이 거칠어지고, 관절이상 및 뼈의 탈석회화에 의한 골절이 쉽게 일어난다.

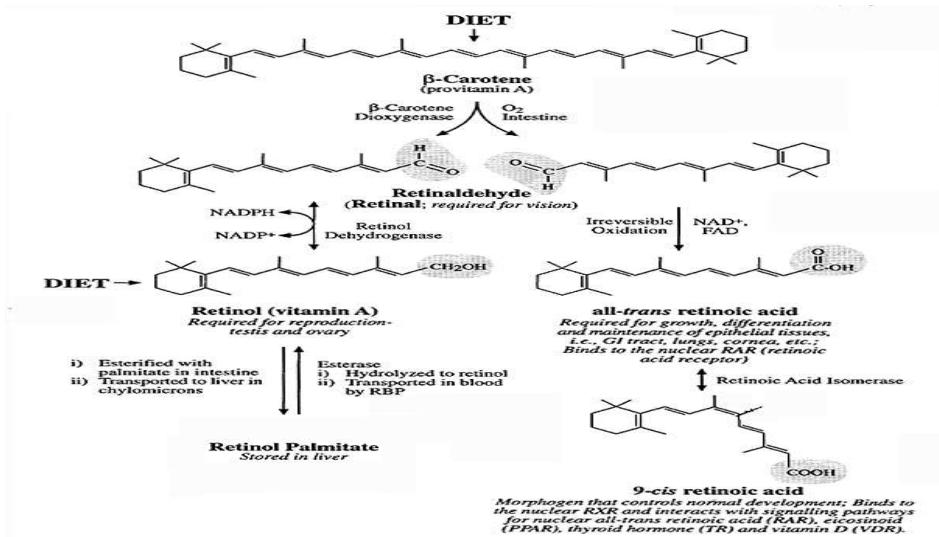


Fig 1. The chemistry, metabolism of vitamin A in human

Table 1. Tissue concentration of beta-carotene in different animal species fed graded levels of beta-carotene (partially recalculated)

Species	Beta-carotene concentration						Ref.
	Plasma/serum (nmol/L)	Liver (ng/g)	Adipose (ng/g)	Corpus luteum (ng/g)	Lung (ng/g)	Milk (nmol/L)	
Humans	170–5 360	(–)	620	(–)	(–)	(–)	1, 2
	(–)	429–10 415	(–)	(–)	54–859	(–)	3
	640–750	(–)	(–)	(–)	(–)	31–50	4*
Rat	7.5–11.2	ND	n. d.	(–)	(–)	(–)	5
	310–340	156–13 368	(–)	(–)	(–)	(–)	6
Pig	2–15	0–487	(–)	25–172	0–12	(–)	7
	55.9	~100	(–)	~100	(–)	(–)	8
Cow/cattle	1 751	~3 000	(–)	~14 200	(–)	(–)	8
	4 806–10 673	(–)	(–)	(–)	(–)	147–209	9
Pre- ruminant calf	2790–17 830	107–40 534	483–2 684	(–)	(–)	(–)	10
	63–386	172–338	(–)	(–)	(–)	(–)	11
Ferret	11–870	0–4 700	0–300	(–)	(–)	(–)	5
	680–1 800	644	(~14)	(–)	23	(–)	12
	1–5 750	161–42 305	0–752	(–)	1–698	(–)	13
Gerbil	0–88	18–497	–46	(–)	11–62	(–)	14
	0.1–106	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	15
Cat	93–125	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	16
	137	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	17

(–), not determined or no data available; ND, below detection limit.*From autopsy.

1, Johnson et al. (1995); 2, Parker (1988); 3, Schmitz et al. (1991); 4, Canfield et al. (1997); 5, Ribaya-Mercado et al. (1989); 6, Barua and Olson (2000); 7, Schweigert et al. (2001); 8, Chew et al. (1984); 9, Calderón et al. (2007); 10, Hoppe et al. (1996); 11, Poor et al. (1993); 12, Gugger et al. (1992); 13, Ribaya-Mercado et al. (1992); 14, Pollack et al. (1994); 15, Thatcher et al. (1998); 16, Chew et al. (2000a); 17, Schweigert et al. (2002).

4. Vitamin A 제한과 marbling의 연관성

Vitamin A(retinol)는 눈의 망막에 필요할 뿐만 아니라, 세포의 분화 및 증식의 조절 역할도 하는 것으로 알려져 있다(Ertesvag 등, 2007). 또한, Vitamin A는 돼지(Brandebourg와 Hu, 2005)와 양(Torii 등, 1995)에 있어서 지방 전구 세포의 지방 생성을 억제할 수 있다고 하였다. Ohyama 등(1998)의 연구에서는 소의 지방 세포로부터 1차로 배양된 기질 혈관 세포에서 vitamin A를 처리한 결과 완전한 thiazolidinedione(T-174)의 자극 활동의 차단을 통하여 지방 분화에 용량 의존적으로 억제되었다(Figure 2).

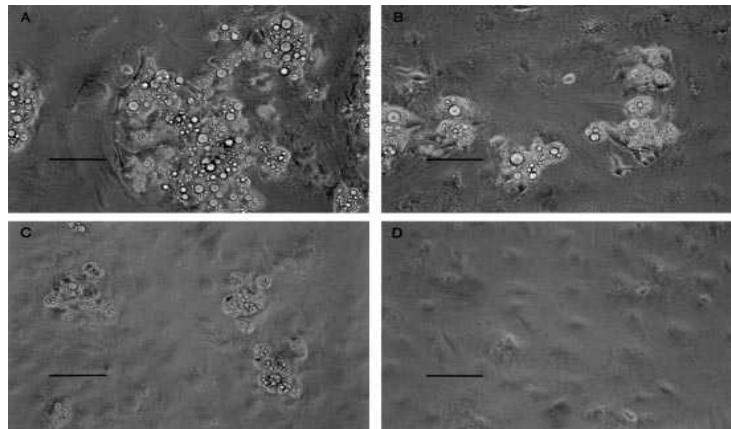


Figure 2. Photomicrographs of bovine preadipocytes cultured under different concentrations of retinol with 25 mM thiazolidinedione (T-174). (A) Without retinol, (B) .4 mg/100 mL retinol, (C) 4 mg/100 mL retinol, and (D) 40 mg/100 mL retinol. Bar = 100 mm.

Vitamin A와 carotenoid의 낮은 수준이 지방 조직의 발달 즉, 소의 생체 marbling을 더욱더 자극하는 것으로 밝혀졌다. Kawada 등(1990)의 연구에 의하면 β -carotene을 포함한 vitamin A 그룹은 3T3-L1 세포의 지방 전환을 강력하게 억제시킨다고 밝혔다. 하지만, 아직 소 유래의 세포를 이용한 지방분화 및 상호분화 관련 연구는 미흡한 실정이다.

소의 비육 3단계(21~23개월)에 있어서 혈청에서의 낮은 vitamin A 수준은 높은 marbling 점수와 연관이 있을 것으로 제시되었다(Adachi 등, 1999). 그리고 또 다른 연구에 의하면 비육우에 있어서 낮은 vitamin A 급여 수준은 피하지방 세포의 영향을 받지 않고, 지방 세포분화와 근육 지방 축적이 증가되었다고 보고되었다(Gorocica-Buenfil 등, 2007). 그러므로 최근, 일반적인 일본 소 농장에서는 섭취되는 먹이와 적절한 vitamin A 수준을 통하여 marbling을 개선하기 위한 전략을 세우고 있다(Kato 등, 2011).

5. 이상증상 징후 진단을 위한 혈액대사지표의 활용

혈액대사지표는 대사판정검사 또는 대사판정테스트(metabolic profile test: MPT)를 통하여 만들어지며, 가축의 사료급여 및 사양관리에서 비롯되는 각종 영양장애 및 질병 등 초기의 대사 불균형 특정 유형에 대한 조기 경보를 제공하기 위하여 혈액 화학적 성질의 통계 분석을 기초로 하여 조기 이상증상 징후에 대한 진단 지원을 하기 위해 설계되었다(Payne, 1972). 이 시스템은 가축의 영양 상태와 대사상태가 가축 체내 혈액성상에 곧바로 반영된다는 metabolism에 기초를 두고 있다. 가축이 에너지 생산과 소비의 균형이 맞을 때는 대사가 안정되어 있는 상태이며, 외견상뿐만 아니라 혈액검사를 실시하였을 때 또한 대사가 정상으로 나오지만, 에너지 생산과 소비의 균형이 완전히 깨졌을 경우 외견상뿐만 아니라 대사 또한 비정상으로 나오게 된다. 하지만, 에너지 생산과 소비의 균형이 한쪽으로 치우쳤을 때는 외견상으로는 건강해보이나 대사적으로는 비정상이기 때문에 외견상으로는 확인할 수 없으므로, MPT를 실시하여 외견상으로 이상이 보이기 전에 신속히 대처하여야 한다.

최근, MPT는 동물의 생산 특성을 향상시키기 위해 설계된 선택 프로그램에 대한 생리

학적 특성을 측정하는데 사용되고 있으며(Kato 등, 2011), MPT 기술도입은 과학적 사양을 위해 필요하다. 몇 가지 생화학적 평가 중, 특히 요소질소(UN)와 Glucose 그리고 마그네슘(Mg)값은 비육 단계 동안 소들의 상태를 알 수 있는 비육우의 MS와의 관계가 가능한 것으로 간주되었다. 그렇기 때문에 일본에서는 vitamin A가 근내지방 합성과는 부(-)의 상관관계를 가지는 것으로 알려져 화우의 고급육 생산을 위한 방법으로 소에게 vitamin A 결핍을 유도하려는 시도를 하고 있으며, 결핍에 의한 이상증상을 모니터링하기 위하여 혈액대사지표를 활용하고 있다.

6. Vitamin A제한과 ADH1C 유전자형

알코올 탈 수소효소(Alcohol dehydrogenase, ADH) (EC 1.1.1.1)는 탈 수소효소의 하나의 그룹으로 많은 유기체에서 발생되며, 알코올과 알데하이드 사이 또는 케톤과 함께 니코틴 아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD⁺to NADH)의 감소에서 삼호전환을 촉진시킨다. 또한, ADH는 레티놀 저장과 분해 사이의 균형 조절에서 세포 레티놀 결합 단백질(CRBP)의 정반대적인 작용으로 발견되었다(Molotkov 등, 2004). ADH1C c.-64T>C의 TT genotype은 vitamin A가 제한되었을 때 CC genotype보다 근내지방(IMF: Intramuscular fat)이 더 많이 축적된다고 하였으며, 이 vitamin A제한관련 유전자는 거세우에서 marbling을 극대화하기 위한 마커로 활용할 수 있다고 하였다(Ward 등, 2012).

7. 한우에서 요석증의 발생 및 치료 개요

칼슘과 인과 같은 광물질은 가축의 체내에서 서로 길항작용을 하기 때문에 비율이 깨지면 생리적인 부작용으로 나타난다. 강피류에 많이 함유되어 있는 인을 한우 비육우에 추가급여 시 뇌결석의 위험성이 증가된다는 연구 보고가 있으며, 비육우의 대사성 질환 중 거세우에서 가장 많이 발생하는 것이 바로 뇌결석증이라고 한다(정준, 2001). 뇌결석증이란 신장과 방광에 형성된 결석이 수뇨관과 요도를 폐쇄하여 배뇨곤란상태를 초래하거나 배뇨불능상태에 이를 것을 말하며, 한우에 있어서 뇌결석증은 주로 농후사료위주의 비육우 사양방식에서 다발하는 것으로 알려져 있다(Yano 등, 1972). 뇌결석증에 걸린 소의 경우 오줌 중의 인(P)의 농도가 높은 것이 특징이다(Table 1, Yano 등, 1972). 지용성 vitamin 중 vitamin A의 결핍은 요로계통의 상피조직 탈락을 촉진하고, 결석의 핵을 형성하여 탈락된 조직세포주변에 광물질이 침착되어 결석을 형성하기도 한다(Grasesa 등, 1998). Vitamin A제한을 통한 고급육 생산기술의 적용으로 사료 중 vitamin A 함량을 낮추게 되면 단백질을 이용한 동화작용 관련 hormone 분비가 나빠지게 되고 이에 따라 단백질 이용효율 저하로 인한 잉여 단백질은 암모니아 형태로 뇌로 배설되어 이것 또한 결석형성을 증가시킬 뿐만 아니라 vitamin A가 부족하게 되면 방광 및 요도의 점막상피세포 탈락이 과도하게 촉진되어 더욱 결석형성이 증가한다. 요결석은 소가 장기간 마그네슘과 칼슘이 풍부한 사료를 섭취 시, 칼슘과 마그네슘은 칼슘 옥살 레이트와 마그네슘 옥살 레이트로 생산되고 신장이나 방광에서 떨어지는 점막상피세포와 결합하여 형성된다(禹金山, 2015; 표 1). 일반적인 오줌에는 일정량의 소금결정 및 콜로이드물질이 있고, 이것들은 상대적으로 균형을 유지한다. 하지만, 이 균형이 어긋나 정상적인 포화농도를 벗어나면 소금은 오줌에 결정상물질로 계속 석출되고 요결석을 생산한다(黃建云, 2015). 청초사료 급여가 부족할

때, 비육촉진제로서의 에스트로겐를 과다하게 투여하면 비타민 A와 β-carotene 부족할 수 있기 때문에 면역력 저하를 발생할 수 있다. 이것으로 인해 mucoprotein 함량이 많이 증가하고, 점막상피세포가 쉽게 탈락할 수 있음. 그리고 알칼리성뇨에서 탈락한 세포와 무기물이 쉽게 결합하여 뇨결성이 생성되어진다(Bill Kvasnicka, 1914).

비타민 D가 과량섭취하면, 오줌 내 칼슘의 농도를 증가시켜서 무기물 대사를 불균형 될 수 있다. 일광이 부족할 경우 비타민 D 생성이 제한되어 칼슘이 부족할 수 있기 때문에 무기물 대사 불균형으로 인과 마그네슘결합을 촉진시킨다. 음수량이 부족하면 오줌의 광물질 농도가 높아져 침전을 촉진한다. 조기 거세시 요로계가 충분히 발달하지 않아 요결석이 쉽게 발생할 수 있다. 시스틴 결석과 요산결석은 cystinase의 부족 및 요산대사부전에 기인한다. 이와테현 식육검사소에 의한 동 5년간 소의 방광결석 발생율에 있어서 암컷은 1.1%, 거세우는 6.8%이며, 품종별로는 홀스타인종은 3.7%, 교잡종은 4.2% 및 흑털화(화합)종이 6.8%이며, 흑모(화합)종의 거세우가 뇨석증이 발생하기 쉬운것으로 사료된다(奥村亮子,2006). 농후사료를 과다 섭취 시 혈 중 pH가 낮아지고, 강피류의 높은 인 함량에 기인한 뇨 중 인, 이온이나 마그네슘 이온이 신우, 방광, 뇨도 등에서 탈락되어 나오는 상피세포를 포함한 기타 유기물을 둘러싸며 암모니아와 결합하여 인산암모늄마그네슘 결정(결석)이 형성되어 나타난다(Munakata, 1974; Ghurch와 Fontenot, 1979). 많이 발생하는 부위는 음경중의 S자형 만곡부이며 방광과 요도에도 발생하고 신장과 세뇨관은 드물게 나타난다.

Table 2. 사료중 칼슘과 인의 비율이 뇨중의 광물질 배설량에 미치는 영향

사료중 Ca함량	0.1	0.6	1.2
사료중 P함량	0.6	0.6	0.6
뇨중 광물질 농도(mg/dl)	Ca	0.6	1.2
	P	180a	93b
	Mg	37	45
뇨중 광물질배설량(g/日)	Ca	0.01	0.01
	P	1.53a	0.53b
	Mg	0.28	0.23

* a,b,c : $P < 0.01$

(출처: 농협중앙회)

8. 뇨결석 및 광물질 조절과 marbling의 연관성

한우 비육우에 칼슘을 제한 급여 시 근내지방도가 개선되는 결과를 얻었으며, 사료 내 칼슘농도가 저하하면 뼈 중 칼슘이 동원되어 세포 내 칼슘이온이 증가하게 되는데, 이것이 신호전달이 되어 지방생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그리고 최근, 비만조절에 관한 연구결과에서 Intra cellular Ca^{2+} 조절을 통한 분화정도를 확인한 연구결과가 보고되면서 세포 내 칼슘은 지방 세포의 지질 대사, 중성 지방 축적에 중요한 조절 역할을 하며, 지질 합성 유전자 발현 및 지질 생합성을 증가시킨다고 알려지고 있다.

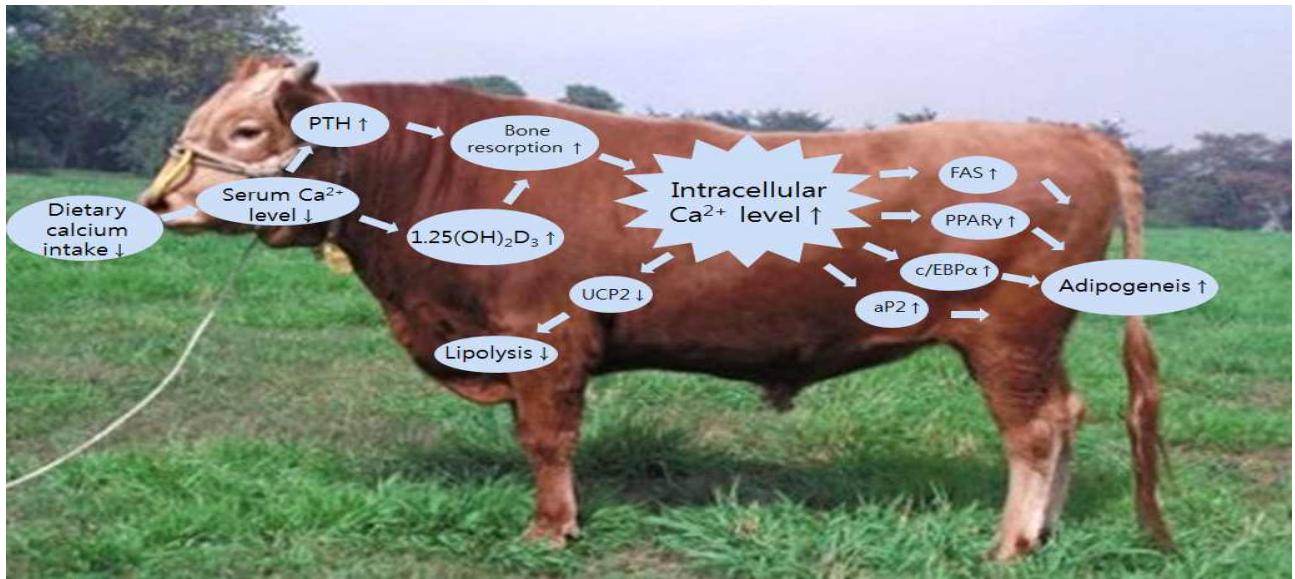


그림 1. 칼슘이온의 항상성과 지방축적 관련성 모식도

그림 1의 모식도에서와 같이 세포 내 칼슘이온 증가는 지방 축적 관련 유전자의 발현 및 지방 축적 촉진, 지방 분해 억제 등을 통해 지방 세포의 숫자 및 지방 축적이 증가하게 된다고 보고되어지고 있다(Ntambi와 Takova, 1996; Shi 등, 2000). 식이를 통한 세포 내 칼슘 조절은 칼슘 분비 촉진 호르몬인 calcitrophic Hormone인 부갑상선호르몬(PTH) 및 활성형 vitamin D에 의해 조절된다. 사료 내 Ca²⁺ 수준이 낮으면 혈중 칼슘 농도가 낮아지게 되고, 이것이 signal이 되어 부갑상선 호르몬(PTH) 및 1,25(OH)₂D₃의 분비를 촉진하게 되는데, 이 Calcitrophic hormone이 장내에서 Ca²⁺, P³⁻의 흡수를 촉진시키게 되고, 뼈 속에 저장되어있는 칼슘을 동원함으로서 칼슘항상성을 유지하는 것으로 알려져 있다. 이 때 내인성 Ca²⁺ 이온의 동원을 촉진하게 되어 결과적으로 세포내 칼슘농도가 증가하게 된다(Zemel 등, 2000). 일부 실험을 통해 세포 내 칼슘의 증가는 열 발생과 에너지 대사의 조절에 관여하는 탈공역 단백질(Uncoupling Protein 2 : UCP2)의 발현을 감소시킴으로써 지방의 산화가 감소하고 지질축적이 증가되는 결과로 나타났다(de Oliveira Freitas 등, 2012).

<Vitamin A 및 칼슘과 marbling의 상호관련성>

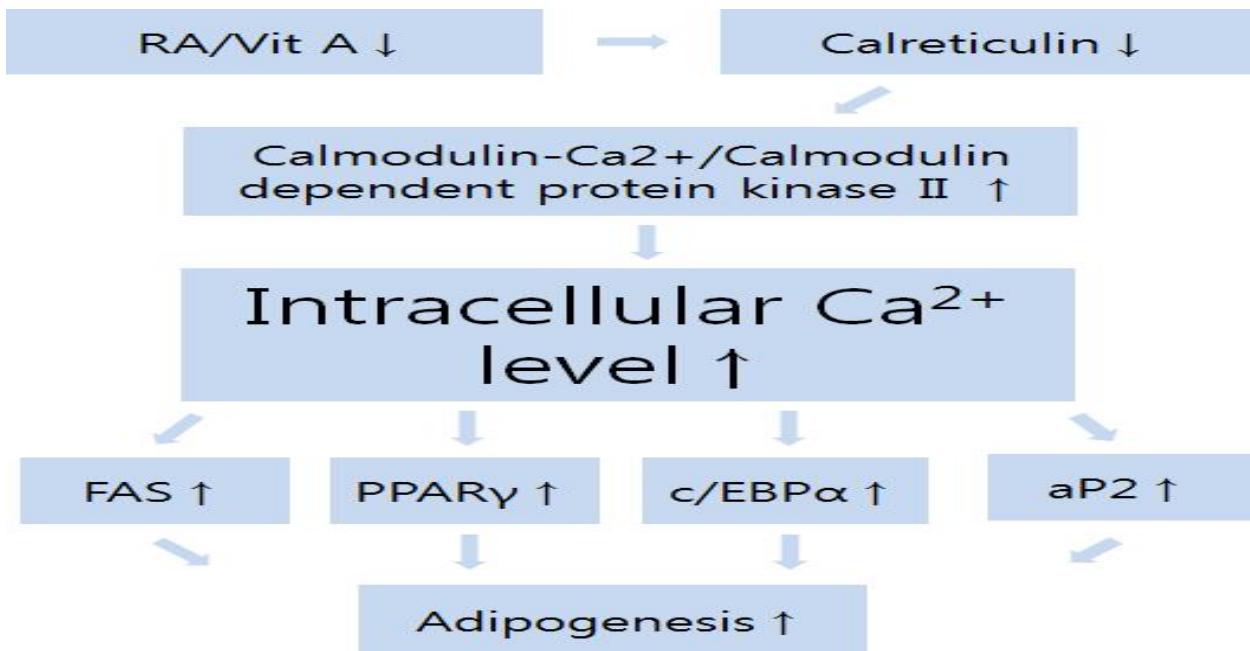


그림 2. Vitamin A 및 칼슘과의 지방 축적에 관한 상호관련성 모식도.

그림 2의 모식도에 나타내었듯이 vitamin A의 활성 형태인 Retinoic acid(RA)와 칼슘과의 지방축적 관련 유전자 발현에 미치는 상호관련성은 근내지방도를 조절하는 작용기전에 관한 중요한 실마리를 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 연구보고에 따르면, RA를 낮은 수준으로 처리하면 소포체 막의 주요 칼슘결합단백질인 calreticulin의 발현의 감소를 유도하는 것으로 확인되었다. Calreticulin의 발현 감소는 Calmodulin-Ca²⁺/Calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII)의 단백질 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다(Meldolesi, 2008; Szabo 등, 2008). 동시에 세포내 칼슘의 증가는 지방조직에서 미분화 지방세포가 지방세포로 분화되어 지방을 생성하는 동안 분화단계별 발현되는 유전자인 PPAR-γ 및 C/EBP-α, FAS, aP2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Jensen 등, 2004; Serlachius와 Andersson, 2004; Zhang 등, 2007). 이와는 반대로 calreticulin의 발현 증가는 PPAR-γ 및 C/EBP-α, FAS, aP2 등의 발현을 억제시키는 것으로 나타났다.

그러나 Calreticulin의 발현을 억제시킨 세포에서는 vitamin A를 처리하여도 PPAR-γ, C/EBP-α는 증가하여 근내지방축적 조절을 위한 vitamin A 결핍에 의한 지방축적 조절 작용기전이 calreticulin의 신호전달 의존적인지 아닌지는 여전히 밝혀지지 않는 채로 남아있다.

9. 요석증 치료방법

요석증 치료방법에는 Vit A가 풍부한 청초사료와 Vit AD3 경구투여, 염화암모늄 경구 투여물을 많이 섭취시키기 위해서 사료에 4%-5% NaCl 첨가, 요도에서 수술을 통해 결석을 제거 등이 있으며, 최근에는 키톤, 참가시나무 추출액 등을 이용하여 요석증 치료하는 등 표3과 같이 다양한 방법으로 요석증을 치료하고 있다.

Table 3. 요석증 치료 제제 목록

품 목	함유물 및 함량	처방 용량	근거자료
키톤	NH4Cl, Vit.A, Vit.D	50g/pack, W 20g for 400–500 kg cattle	 Keyton
우로지로가시 액기스	참나무가시 추출물	10–20g/day for 100 kg, 1–3 days	 우로지로가시 액기스
크리아스톤산	Vit.A 8,000,000 IU	100 g 중: Vit.A 200,0000 IU;	
	Vit.D 3750,000 IU	Vit.D 40,0000 IU;	
	CaCO 31 kg	탄산칼슘 30 g	

3. 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

	내용
국내 연구 현황	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 칼슘 수준 조절에 관한 복합적인 상호 작용에 대한 고급육 생산 및 대사 연구 현황은 전무후무함. ○ 국내 연구의 경우 vitamin A와 vitamin D3를 조절하여 고급육 생산을 하기 위한 연구는 있었으나, 대사조절에 관한 작용기전 연구는 아직 부족한 실정임. ○ 뿐만 아니라 vitamin A와 광물질의 혼합적인 상호작용에 의한 고급육 생산 증진과 더불어 대사 이상에 관한 복합적인 연구는 아직 전무함. ○ 식품 부산물을 이용한 고급육 생산 연구는 활발히 진행 중이나, 영양생화학적 조절 기능에 관한 대사연구는 아직 부족한 것으로 판단됨. ○ 국내 연구의 경우 고급육 관련 단백체 정보를 얻기 위하여 조직을 채취하지만, 조직의 경우 샘플 확보가 어렵고, 특히 육종개량의 경우 우수 형질 가축을 선발 시 도축하여 최종산물인 조직을 생체 조직에서 biopsy 해야만 하는 단점이 있어 검증 및 활용에 제한이 많음. ○ 혈액에서 단백체 분석의 경우 혈액 중 고함량 단백질의 제거기술이 부족하여 처리간의 차이점 확인이 불분명하였음. ○ 국내에는 현재까지 확고한 vitamin A 분석법이 정립되지 않아 데이터화하기에 어려움이 많음. ○ 한우 연구에서 대사체 연구는 단순한 대사관련 지표만 분석하였음. ○ 단기적 사양시기에서만 분석하였으며, 동물개체에 대한 연구가 많지 않음.
국외 연구 현황	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국외 vitamin A 및 vitamin D3에 대한 연구는 현재까지 진행 중에 있는 것으로 확인되었으나, 정확한 원인은 규명되지 않았음. ○ 칼슘에 대한 대사 조절에 관한 연구는 활발히 진행하고 있으나, In vitro 내 수준의 칼슘에 관한 연구이며, 주로 비만조절 및 골다공증 관련 연구이며 고급육의 생산 및 대사에 관한 복합적인 연구는 매우 부족한 것으로 나타남.
필요 연구 분야	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사육과정 중 혈액의 채취에 의한 vitamin A 및 대사 수준 등을 즉각적으로 검증하여 시기 별 데이터 확보가 가능하여야 하며, 유전자 type에 따른 선별이 가능하고, 성장 및 사양시기 별 자료 조사가 필요함. ○ 혈액 중 고함량 단백질 제거기술뿐만 아니라 vitamin A 분석법이 정립되어 실험 결과에 대한 여러 가지 해석을 할 수 있어야 함. ○ 혈액에서 유전체, 단백체 및 대사체를 동시에 분석함으로써 상호관계 및 이상 유무에 대한 해석의 정밀성이 필요함. ○ 사료 원료 및 농림식품부산물 내 vitamin A와 광물질의 정확한 함량 조사와 함께 함량 조절의 기술 필요함. ○ 사료 내 농식품 부산물을 이용한 칼슘 및 vitamin A조절에 관한 기술이 복합적으로 적용할 수 있는 기술이 필요함.

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

제1절 한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절기술 및 작용기전 연구, 한경대

1. 연구 수행 내용

연구 1. 마우스 지방전구 세포 3T3-L1 cell 또는 소 유래 Stromal Vascular 세포를 이용한 extra cellular Ca^{2+} 처리 수준에 따른 지방세포 분화 조사

실험 1. Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 수준 차이에 따른 3T3-L1세포의 분화량 변화 조사

- ▶ Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 처리농도에 따른 3T3-L1세포의 생존력 변화 조사
- ▶ Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 처리농도에 따른 3T3-L1세포의 분화량 변화 조사
- ▶ Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 처리농도에 따른 3T3-L1세포의 분화 관련 mRNA 유전자 발현조사 (Calreticulin C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, SREBP-1, Leptin, aP2 등)
- ▶ Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 처리농도에 따른 3T3-L1세포의 분화 관련 단백질 발현 조사 (Calreticulin C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, SREBP-1, Leptin, aP2 등)

실험 2. 비육우의 지방조직으로부터 분리해 낸 Stromal Vascular cell을 이용한 extra cellular Ca^{2+} 및 Retinoic acid의 처리 수준에 따른 지방세포 분화

- ▶ 생존능 변화 조사
- ▶ Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 처리농도에 따른 Stromal Vascular cell의 분화량 변화 조사
- ▶ Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid의 처리농도에 따른 Stromal Vascular cell의 지방세포 분화 관련 mRNA 유전자 발현조사 (Calreticulin C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, SREBP-1, Leptin, aP2 등)

연구 2. 소 유래 Stromal Vascular 세포를 이용한 extra cellular Ca^{2+} 및 Vit A의 처리 수준에 따른 지방세포 분화 및 작용기전 조사

실험 1. Intramuscular stromal vascular 세포를 이용한 세포외 칼슘 영향 연구

- ▶ intramuscular stromal vascular cells(소 유래 맥관계 세포)에 칼슘농도 처리별 세포 생존능조사
- ▶ intramuscular stromal vascular cells에 칼슘농도를 달리하여 처리한 후 지방세포 분화 관련 유전자들의 mRNA 발현량 조사

- ▶ intramuscular stromal vascular cells에 칼슘농도를 달리하여 처리한 후 지방분화 관련 단백질의 발현량 측정
- ▶ intramuscular stromal vascular cells에 칼슘농도를 달리하여 처리한 후 PKC 활성 측정

실험 2. 소 유래 Stromal Vascular 세포를 이용한 Intracellular Ca^{2+} 및 vitamin A 조절에 기인한 지방세포 분화관련 신호전달 규명 (PKC, MAPK, C/EBP- α , PPAR- γ , CREB, CaMKII, Calreticulin 등)

- ▶ Intramuscular stromal vascular 세포를 이용한 Intracellular Ca^{2+} 및 vitamin A 처리연구

연구 3. 사료 내 Ca^{2+} 과 인 비율 차이에 따른 한우 비육우 사양실험 실시(1차 사양실험)

실험 1. 1차 사양실험

(1) 공시 동물 : 한우 거세 비육우 17~18개월령 72두를 3개 처리군에 각 24두씩 배치하고 공시축은 각 pen 당 4두씩 6반복 배치한 후, 물은 자유로이 섭취하도록 하고 시험사료를 급여하며 급여량에서 잔량을 제하여 섭취량으로 계산함.

(2) 실험 design

Treatment	Control(24 heads)	T1(24 heads)	T2(24 heads)
Calcium concentration	normal	low	high

※ 한우 고급육 생산용 mineral/vitamin 프리미스 제제 개발(참여기업과 공동)

(3) 시험 기간 : 사양실험은 30개월령까지 실시하되 사양실험 개시 6개월 후 체중 측정, 혈액 및 등심조직 Biopsy를 실시.

(4) 분석 항목 :

- ▶ 사료 섭취량, 증체량 및 사료 효율
- ▶ 등심조직의 Biopsy 샘플 내 C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, Calreticulin 유전자의 mRNA 및 단백질 발현 조사
- ▶ 혈액 성분 분석 (Glucose, Total Cholesterol, Insulin, PTH, 1,25(OH)2D3, Triglyceride, Blood Urea Nitrogen, Total bilirubin, GOT, GPT, Ca^{2+} , P^{3-} 등)
- ▶ 뇨중 요석증 관련 인자 분석(pH , 탁도, Ca^{2+} , P^{3-} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ 등)

실험 2. 1차 사양실험 종료 (30개월령) 후 종료체중 측정, 혈액 및 뇨 샘플링, 등심조직 Biopsy, 도축 후 육질등급 분석

- ▶ 사료 섭취량, 증체량 및 사료 효율
- ▶ 등심조직의 Biopsy 샘플 내 C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, Calreticulin 유전자의 mRNA 및 단백질 발현 조사
- ▶ 혈액성분 분석 (Glucose, Total Cholesterol, Insulin, PTH, 1,25(OH)₂D₃, Triglyceride, Blood Urea Nitrogen, Total bilirubin, GOT, GPT, Ca²⁺, P³⁻ 등)
- ▶ 뇨중 요석증 관련 인자 분석(pH, 탁도, Ca²⁺, P³⁻, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ 등)
- ▶ 등급판정 분석 (도체중, 지육율, 등심단면적, 등지방 두께, marbling score, 육량등급, 육질등급, 육색 및 지방색 등)

연구 4. 소 유래 맥관계 간세포(Stromal Vascular cells)를 이용한 근내 지방도 강화 모델 시스템 확립

- ▶ 칼슘과 근내 지방도 강화 모델 시스템 확립
- ▶ Vitamin A와 Calreticulin의 지방 분화 신호 체계 확립
- ▶ Primary signal and Secondary or alternative signaling cascade 확립(PKC, MAPK, C/EBP- α , PPAR- γ , CREB, CaMKII, Calreticulin 등)

연구 5. 사료 내 칼슘 및 vitamin A 수준 차이에 따른 한우 비육우 사양실험 실시 (2차 사양실험)

실험 1. 2차 사양실험

(1) 공시 동물 : 한우 거세 비육우 17~18개월령 72두를 3개 처리군에 각 24두씩 배치하고 공시축은 각 pen 당 4두씩 6반복 배치한 후, 물은 자유로이 섭취하도록 하고 시험사료를 급여하며 급여량에서 잔량을 제하여 섭취량으로 계산함.

(2) 실험 design

Treatment	Control(24 heads)	T1(24 heads)	T2(24 heads)
Calcium concentration	normal	low	high
Vit A concentration	normal	high	low

(3) 시험 기간 : 사양실험은 30개월령까지 실시하되 사양실험 개시 6개월 후 체중 측정, 혈액

및 등심조직 Biopsy를 실시

(4) 분석 항목 :

- ▶ 사료 섭취량, 증체량 및 사료 효율
- ▶ 등심조직의 Biopsy 샘플 내 C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, Calreticulin 유전자의 mRNA 및 단백질 발현 조사
- ▶ 혈액 성분 분석 (Glucose, Total Cholesterol, Insulin, PTH, 1,25(OH)₂D₃, Triglyceride, Blood Urea Nitrogen, Total bilirubin, GOT, GPT, Ca²⁺, P³⁻ 등)
- ▶ 뇨중 요석증 관련 인자 분석(pH, 탁도, Ca²⁺, P³⁻, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ 등)

실험 2. 2차 사양실험 종료 (30개월령)후 종료체중 측정, 혈액 및 뇨 샘플링, 등심조직 Biopsy, 도축 후 육질등급 분석

- ▶ 사료 섭취량, 증체량 및 사료 효율
- ▶ 등심조직의 Biopsy 샘플 내 C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, Calreticulin 유전자의 mRNA 및 단백질 발현 조사
- ▶ 혈액 성분 분석 (Glucose, Total Cholesterol, Insulin, PTH, 1,25(OH)₂D₃, Triglyceride, Blood Urea Nitrogen, Total bilirubin, GOT, GPT, Ca²⁺, P³⁻ 등)
- ▶ 뇨중 요석증 관련 인자 분석(pH, 탁도, Ca²⁺, P³⁻, K⁺, Mg²⁺, Na⁺ 등)
- ▶ 등급판정 분석 (도체중, 지육율, 등심단면적, 등지방 두께, marbling score, 육량등급, 육질등급, 육색 및 지방색 등)

2. 연구수행 결과

(제1세부) 한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절 기술 및 작용기전 연구, 환경대학교, 황성구

연구 1. 마우스 지방전구 세포 3T3-L1 cell 과 소 유래 Stromal Vascular 세포를 이용한 extra cellular Ca^{2+} 처리 수준에 따른 지방세포 분화 조사

실험 1. 마우스 지방전구 세포 3T3-L1 cell을 이용한 extra cellular Ca^{2+} 처리 수준에 따른 지방세포 분화 조사

가. Introduction

최근, 비만조절에 관한 연구결과에서 Intra cellular Ca^{2+} 조절을 통한 분화정도를 확인한 연구결과가 보고되면서 세포 내 칼슘은 지방 세포의 지질 대사, 중성 지방 축적에 중요한 조절 역할을 하며, 지질 합성 유전자 발현 및 지질 생합성을 증가시킨다고 알려지고 있다.

또한 세포 내 칼슘이온 증가는 지방 축적 관련 유전자의 발현 및 지방 축적 촉진, 지방 분해 억제 등을 통해 지방 세포의 숫자 및 지방 축적이 증가하게 된다고 보고되어지고 있다 (Ntambi와 Takova, 1996; Shi 등, 2000).

식이를 통한 세포 내 칼슘 조절은 칼슘 분비 촉진 호르몬인 calcitrophic Hormone인 부갑상선 호르몬(PTH) 및 활성형 vitamin D에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있는데 식이 내 Ca^{2+} 수준이 낮으면 혈중 칼슘 농도가 낮아지게 되고, 이것이 signal이 되어 부갑상선 호르몬(PTH) 및 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 분비를 촉진하게 되는데, 이 Calcitrophic hormone이 장내에서 Ca^{2+} , P^{3-} 의 흡수를 촉진시키게 되고, 뼈 속에 저장되어있는 칼슘을 동원함으로서 칼슘항상성을 유지하는 것으로 알려져 있다. 내인성 Ca^{2+} 이온의 동원을 촉진하게 되어 결과적으로 세포내 칼슘농도가 증가하게 된다 (Zemel 등, 2000).

일부 실험을 통해 세포 내 칼슘의 증가는 열 발생과 에너지 대사의 조절에 관여하는 탈공역 단백질(Uncoupling Protein 2 : UCP2)의 발현을 감소시킴으로써 지방의 산화가 감소하고 지질축적이 증가되는 결과로 나타나는 것으로 보고되어지고 있다 (de Oliveira Freitas 등, 2012).

그러나 세포 내 칼슘은 칼슘항상성 유지에 따라 매우 민감하게 조절 되고 칼슘과 비타민A와의 동시처리에 의한 시너지효과 및 길항효과에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않아 본연구에서는 칼슘과 비타민A 처리 조건을 달리하며 지방세포 및 맥관계 간세포의 분화에 미치는 영향을 조사함으로서 한우 비육우의 근내지방도를 증진시키기 위한 세포수준에서의 연구를 실시하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) Stromal vascular cell 분리

도드람LPC 도축장에서 한우 거세우의 복강 내 지방을 채취하여 penicillin(100U/ml) streptomycin을 포함하는 DMEM배지에 넣어 실험실로 운송하였다. 채취한 지방조직을 멸균수술용 가위로 세절한 후 수차례 DMEM 용액으로 세척하였다. 혈관, 결합조직 등을 제거한 후, 10% bovine serum albumin (BSA)과 0.4% collagenase를 첨가한 Krebs-Ringer-Bicarbonate (KRB) buffer(3R/g tissue; 0.77M NaCl, 0.77M KCl, 0.77M KH_2PO_4 , 0.77M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0.77M NaHCO₃, 0.275M CaCl₂ 22H₂O, 0.3M glucose) 용액으로 90분 동안 소화를 시켰다. 소화 후 250 μ m nylon membrane에 통과시켜 소화가 되지 않은 지방조직 및 결합조직을 걸러내었다. 성숙한 지방 세포가 있는 상층부분을 걷어내고 하층부분 을 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 맥관계간세포를 얻은 다음, DMEM 으로 3회 세척하였다. Hemocytometer를 이용 하여 세포 수를 측정한 후, 2 \times 10⁴ cells/ml의 밀도로 6well에 나누어 접종하고 5% FBS, 100U/ml penicillin, 100g/ml streptomycin, fungizone을 포함한 1:1 DMEM/F-12 배지에서 배양하였다. 배양조건은 37°C, 95% air, 5% CO₂로 하였으며 배지는 48시간 간격으로 교환해 주었다. 지방 전구세포들이 증식하여 배양기의 바닥에 confluent하게 되었을 때 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12에 10g/ml insulin(bovine pancreas), 10g/ml holo-transferrin(bovine), 0.5mM MIX, 1ng/ml T3, 25mM 2,4-thiazolidinedione, 1 μ M DEX, 25ng/ml hydrocortisone, 1g/ml lipid mixture(cholesterol rich) 를 해당 처리구별로 혼합 처리함으로서 분화를 유도하였다. SVC 분화결과는 Oil red-O 염색을 실시하였다.

(2) 세포배양

실험에 사용한 마우스 지방전구세포인 3T3-L1 세포는 10% BCS DMEM 배지를 넣고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 24 well plate에 5 \times 10⁴/well의 세포수로 분주한 후 100% confluence 시점이 되면 2일 동안 더 유지시켰다. 지방전구세포는 MDI(0.5 mM IBMX, 1 μ M dexamethasone, 1 μ g/mL insulin)를 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48시간 후, 1 μ g/mL insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 이를 동안 배양하였다. 그 후 2일마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하였다. 지방세포 분화 유도 동안 용아초 에틸아세테이트 분획물을 50, 100 μ g/mL의 농도로 각 배양액에 처리하였고, 분화가 완성되는 시점인 8일째에 지방세포 분화 정도를 관찰하였다.

(3) 세포증식활성 측정

CCK-8 assay (Cell Counting Kit 8, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA)로 측정하였으며, 세포 배양용 96 well plate에 3 \times 10⁴ cells/ml을 80 μ l씩 분주하여 37°C 및 5% CO₂ incubator에서 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후, 농도를 달리한 시료액을 20 μ l 씩 접종 하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후 CCK-8 용액 10 μ l를 첨가 하여 37°C에서 3시간 배양하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Oil Red O 염색

세포 내 droplet 생성을 확인하기 위하여 Oil Red O 염색 을 실시하였다. 준비된 3T3-L1 지방 전구세포를 PBS로 세척한 후 3.7% formalin으로 1시간 동안 고정하고 60% isopropanol 을 이용하여 세척한 다음 Oil Red O solution을 처리하여 실온에서 20분 간 염색하였다. 염색 후 Oil Red O solution을 제거하고 중류수로 3회 세척한 다음 염색된 세포를 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한 정량적 분석을 위하여 100% isopropanol을 이용하여 지방을 추출한 후 96 well plate에 200 μ l씩 옮겨서 ELISA reader로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

칼슘과 비타민 A를 농도별로 처리하면서 분화시킨 3T3-L1 지방전구세포 에 TRIzol reagent

(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 1 ml 을 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 200 µl의 chloroform을 첨가하여 40°C에서 30분 동안 반응시켰다. 14,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리시켜 400 µl의 상층액을 분리하여 동량의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 반응시킨 후 14,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리시켜 total RNA를 분리 하였다. 분리된 RNA를 DEPC water를 이용하여 녹이고 정량 한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 역전사 및 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1× TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr)을 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였으며, housekeeping 유전자인 β-Actin을 internal control로 사용하였고 비만 관련 유전자의 Senser 및 Anti-senser primer 의 Sequence는 아래와 같다.

Sequence of primers used for RT-PCR		
β -Actin	Sense	5'-AGG-GAA-ATC-GTG-CGT-GAC-AT-3'
	Anti-sense	5'-AGC-TCA-GTA-ACA-GTC-CGC-CT3'
PPAR γ	Sense	5'-CGC-TGA-TGC-ACT-GCC-TAT-GA-3'
	Anti-sense	5'-TGC-GAG-TGG-TCT-TCC-ATC-AC-3'
C/EBP α	Sense	5'-GTG-TGC-ACG-TCT-ATG-CTA-AAC-CA-3'
	Anti-sense	5'-GCC-GTT-AGT-GAA-GAG-TCT-CAG-TTT-G-3'
SREBP-1c	Sense	5'-AGC-AGC-CCC-ATG-AAC-AAA-CAC-3'
	Anti-sense	5'-CAG-CAG-TAG-GTC-TGC-CTT-GAT-3'
aP2	Sense	5'-AAC-ACC-GAG-ATT-TCC-TTC-AA-3'
	Anti-sense	5'-AGT-CAC-GCC-TTT-CAT-AAC-ACA-3'
RXR	Sense	5'-GGC-TGC-AAG-GGA-TTC-TTC-CG-3'
	Anti-sense	5'-CTA-GAC-ACT-TAA-GGC-CTA-3'
CRABP2	Sense	5-CTG-ACC-ATG-ACG-GCA-GAT-GA-3'
	Anti-sense	5-CCC-CAG-AAG-TGA-CCG-AAG-TG-3'
Calreticulin	Sense	5-GGA-TAT-CCG-GTG-TAA-GGA-TTT-3'
	Anti-sense	5-ATC-CTT-ACA-CCG-GAT-ATC-CTT -3'

(6) Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석 동일한 방법으로 준비된 3T3-L1 지방전 구세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 40°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을

실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1,500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminoesence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

다. 연구결과

실험 1. Extra cellular 칼슘이온 및 Retinoic acid 의 수준 차이에 따른 분화량 변화 조사

Figure. 1-3은 3T3-L1 마우스 지방전구세포에 칼슘과 레티노인산의 농도 조합을 달리하여 처리한 후 24, 48시간동안 CO₂ 인큐베이터에 배양하며 세포생존능을 확인하였다. 실험 결과, 칼슘과 레티노인산의 농도차이에 따른 처리세포별 세포생존율에는 차이가 없어 칼슘과 비타민 A의 높고 낮음에 따른 세포독성은 없는 것으로 나타났다.

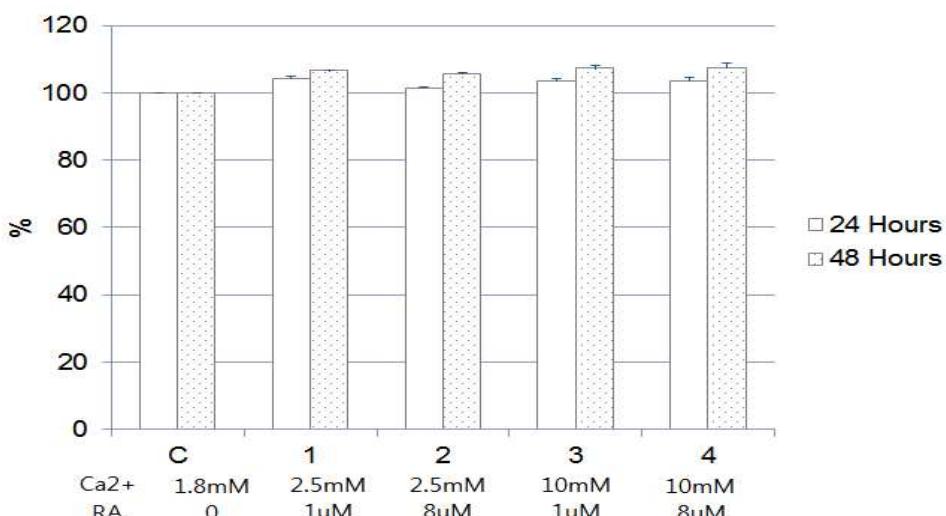


Figure 1-3. Effect of different concentrations of calcium and retinoic acid on the cell viability of 3T3-L1 cells incubated for 24 and 48 hours(Mean±SE, n=5).

Figure 1-4(A)는 3T3-L1 마우스 지방전구세포를 배양 후에 Confluence 조건하에서 칼슘과 레티노인산 농도를 달리하여 처리하면서 8일간 분화 유도한 후 Oil Red O staining을 한 결과이며, Figure 1-4(B)는 Oil Red O staining을 한 후 isopropanol으로 용출하여 흡광도 490nm에서 triglyceride 생성량을 측정한 결과이다. 실험결과 Figure 1-4(A)에서 다른 처리구에 비해 칼슘과 레티노인산의 농도가 낮을수록 세포분화가 증가하는 것으로 나타났으며, Figure 1-4(B)에서는 칼슘과 레티노인산 농도가 낮을수록 triglyceride의 양도 증가

한 것으로 나타났다.

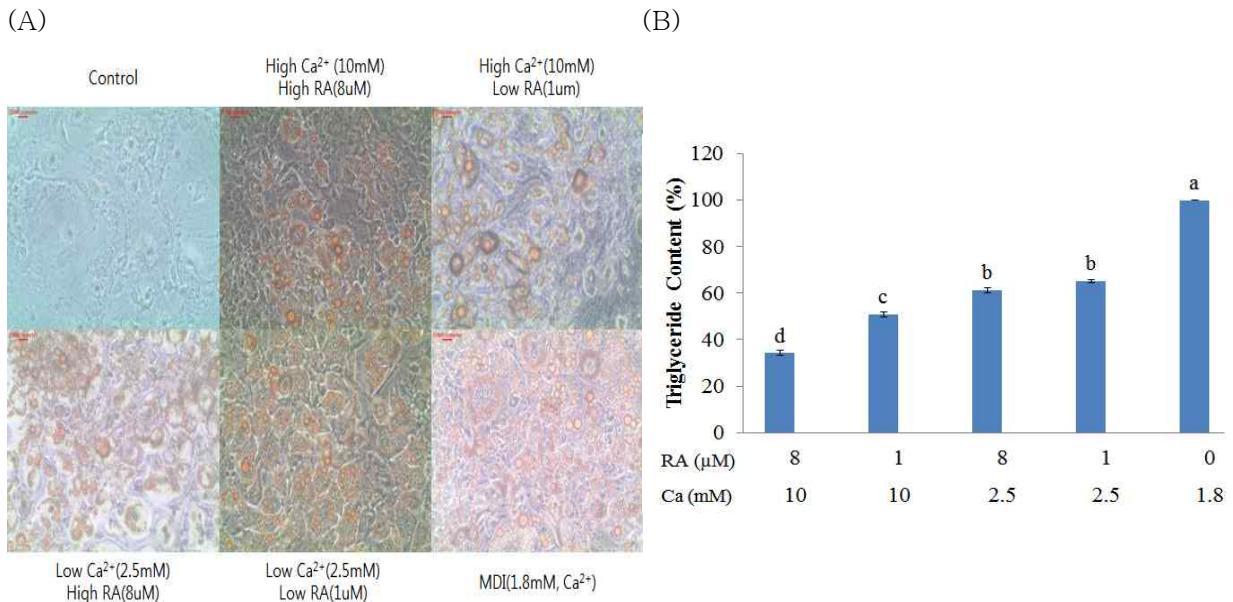


Figure 1-4. Effect of different concentrations of calcium and retinoic acid on 3T3-L1 cell differentiation. (A) Cells were treated for 8 days after the induction of differentiation and were stained with Oil Red O. (B) Elution of Oil Red O staining with Isopropanol.

Figure 1-5는 마우스 지방전구세포 3T3-L1 세포를 배양 후에 칼슘과 레티노인산을 농도 별로 달리 처리하면서 8일간 분화 유도하고 지방세포 분화관련 유전자들의 mRNA 발현량을 조사한 결과이다. 실험결과 세포의 칼슘과 레티노인산의 처리 농도가 낮을수록 지방 분화관련 유전자인 C/EBP α , PPAR γ , aP2, SREBP-1c, RXR α 유전자들은 발현량이 증가하였으며, calreticulin 유전자는 발현량이 칼슘과 레티노산 처리 농도에 따라 감소하는 것으로 나타나 이들 유전자 발현, 특히 PPAR γ 또는 C/EBP α 유전자의 발현과 calreticulin 유전자 발현과의 신호전달에 대한 Cross talking 관련성 등 작용기전을 조사하는 것은 지방 세포 분화에 중요한 정보가 되리라 판단된다.

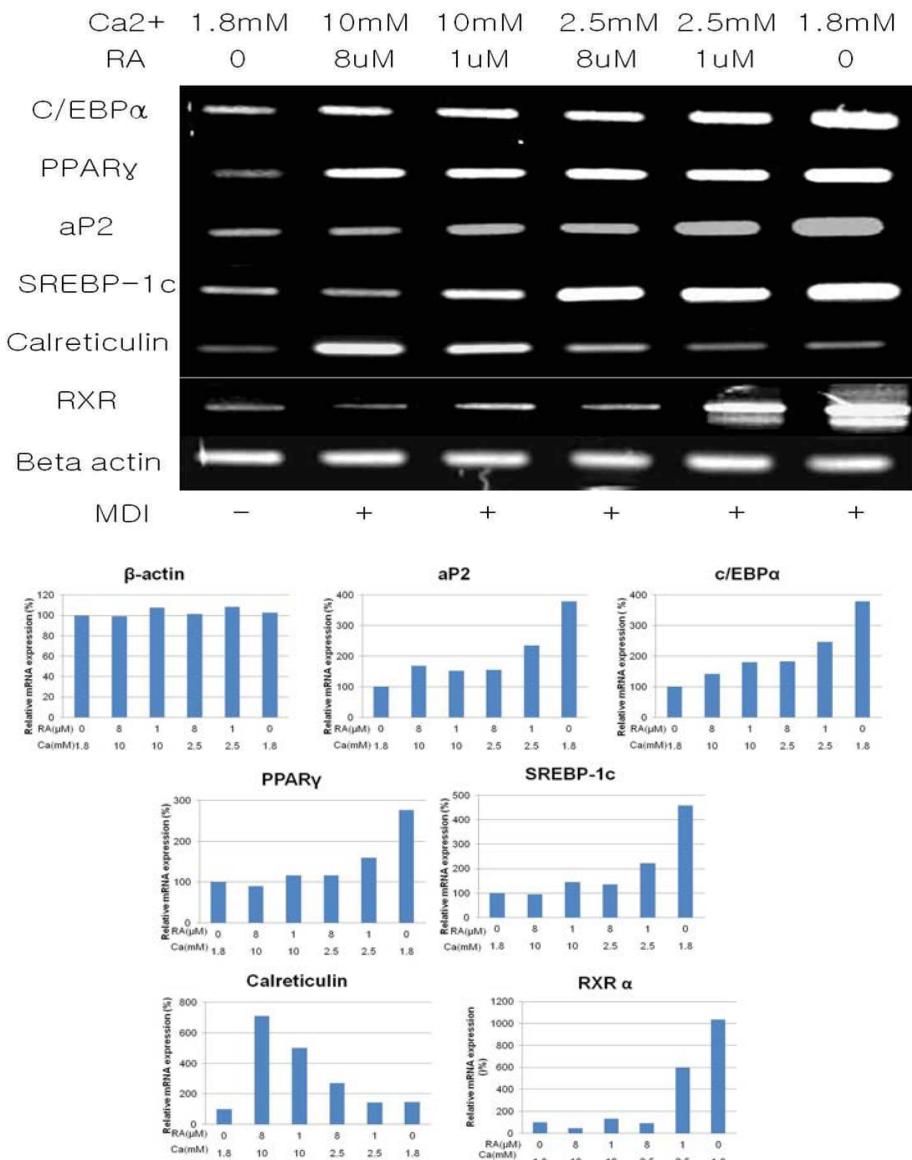


Figure 1-5. Effect of extracellular calcium and retinoic acid concentration on the mRNA expressions of genes associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation.

Figure 1-6에서는 마우스 지방전구세포 3T3-L1 세포에서 칼슘과 레티노인산 처리농도를 달리하며 8일간 분화 유도하여 지방분화 관련 단백질의 발현량을 측정한 결과이다. 실험 결과, 지방분화 관련 단백질 발현량은 Figure 1-5의 RNA 발현량 결과를 잘 반영하고 있는 것으로 나타났다.

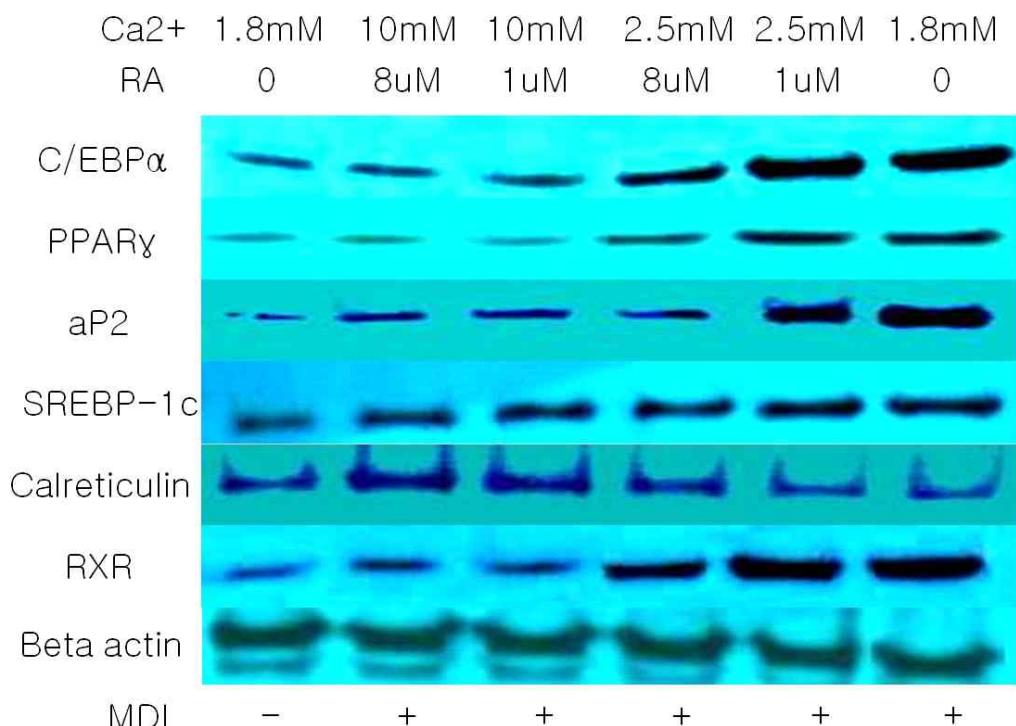


Figure 1-6. Effect of extra cellular calcium and retinoic acid concentration on the protein expressions of genes associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation.

실험 2. 비육우의 지방조직으로부터 분리해 낸 Stromal Vascular cell를 이용한 extra cellular Ca²⁺ 처리 수준에 따른 지방세포 분화

Figure 1-7은 한우 거세우의 복강내 지방에서 분리한 소유래 맥관계 간세포(Stromal vacular cell : SVC)를 이용하여 칼슘과 레티노인산 농도를 달리하며 처리하고 24, 48시간 동안 CO₂ 인큐베이터에 배양하여 세포 생존능을 확인하였다. 실험 결과, 3T3-L1세포의 세포생존율 결과와 매우 유사하여 처리구간에 독성은 없었고 대조군에 비해 48시간의 세포증식 활성이 일부 증가되는 것으로 나타났다.

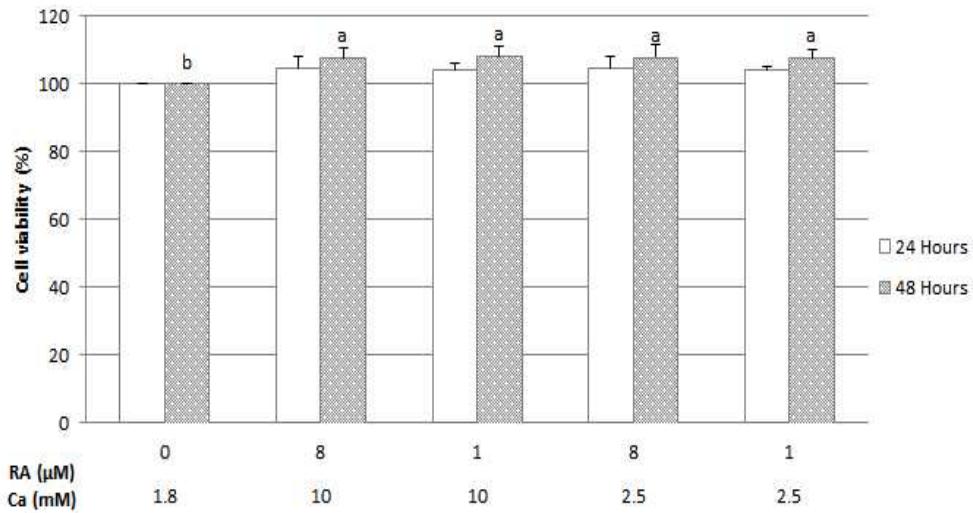
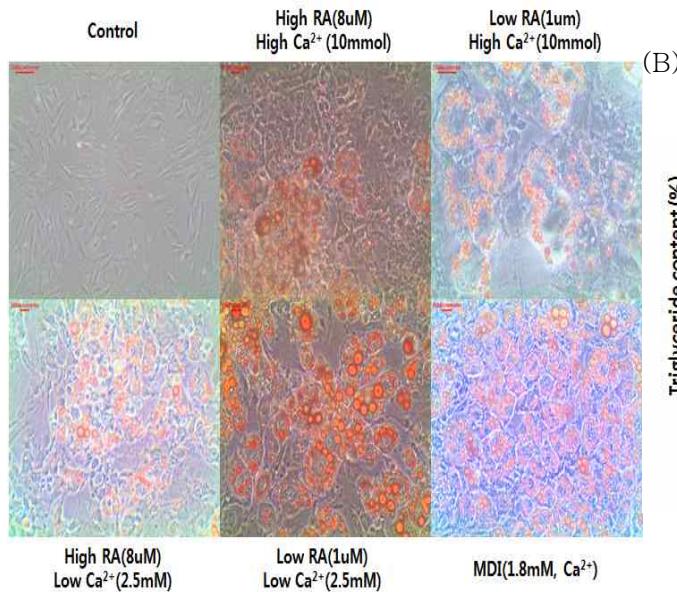


Figure 1-7. Effect of different concentrations of calcium and retinoic acid on the cell viability of Hanwoo beef cattle stromal vascular cells incubated for 24 and 48 hours(Mean \pm SE, n=5).

Figure 1-8(A)는 한우 거세우의 복강 내 지방에서 소유래 맥관계 간세포(Stromal vacular cell : SVC)를 분리하여 배양을 시킨 후에 칼슘과 레티노산을 농도별로 조합을 달리하여 함께 처리하면서 8일간 분화 유도하여 Oil Red O staining을 한 결과이며, Fig. 1-8(B)는 Oil Red O staining을 한 후 isopropanol으로 용출하여 흡광도 490nm에서 triglyceride 생성량을 측정한 결과이다. 실험결과 Fig. 1-8(A)에서 다른 처리구에 비해 칼슘과 레티노인산의 농도가 낮을수록 세포분화가 증가하는 것으로 나타났으며 칼슘이 높고 비타민 A가 낮을 때보다 칼슘이 낮고 비타민A가 높은 조합에서 분화가 더 증가하는 것으로 나타나 상호관련성을 규명하는 것은 매우 귀중한 자료가 되리라 판단되었다. 한편 Fig. 1-8(B)에서도 칼슘과 레티노인산 두 가지 모두 농도가 낮았을 때 가장 높은 triglyceride의 생성량을 나타냈다.

(A)



(B)

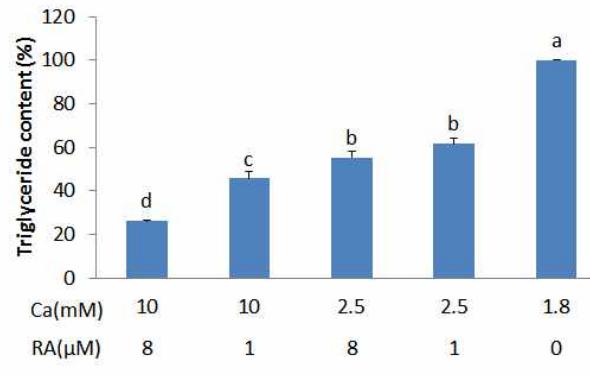


Figure 1-8. Effect of different concentrations of calcium and retinoic acid on Hanwoo beef cattle stromal vascular cell differentiation. (A) Cells were treated for 8 days after the induction of differentiation and were stained with Oil Red O. (B) Elution of Oil Red O staining with Isopropanol.

Figure 1-9는 한우 거세우의 복장 내 지방에서 분리한 소유래 맥관계 간세포(Stromal vacular cell : SVC)를 이용하여 분화를 유도하며 칼슘과 레티노인산 농도를 각각 달리하는 조건하에서 8일간 지방세포에로의 분화를 유도하며 지방축적 관련 유전자의 mRNA 발현량을 분석한 결과이다. 실험결과, 세포외 칼슘과 레티노인산 모두 처리 농도가 낮았을 때 지방분화관련 유전자인 *c/EBPα*, *PPARγ*, *aP2*, *SREBP-1c* 유전자들은 발현량이 가장 높았으며, *calreticulin* 유전자의 발현량은 칼슘과 레티노인산 처리 농도와 (-)의 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 이 결과는 3T3-L1 cell 의 결과와 매우 유사한 패턴을 보이는 것으로 Oil Red O staining 결과를 잘 반영하여 주고 있다.

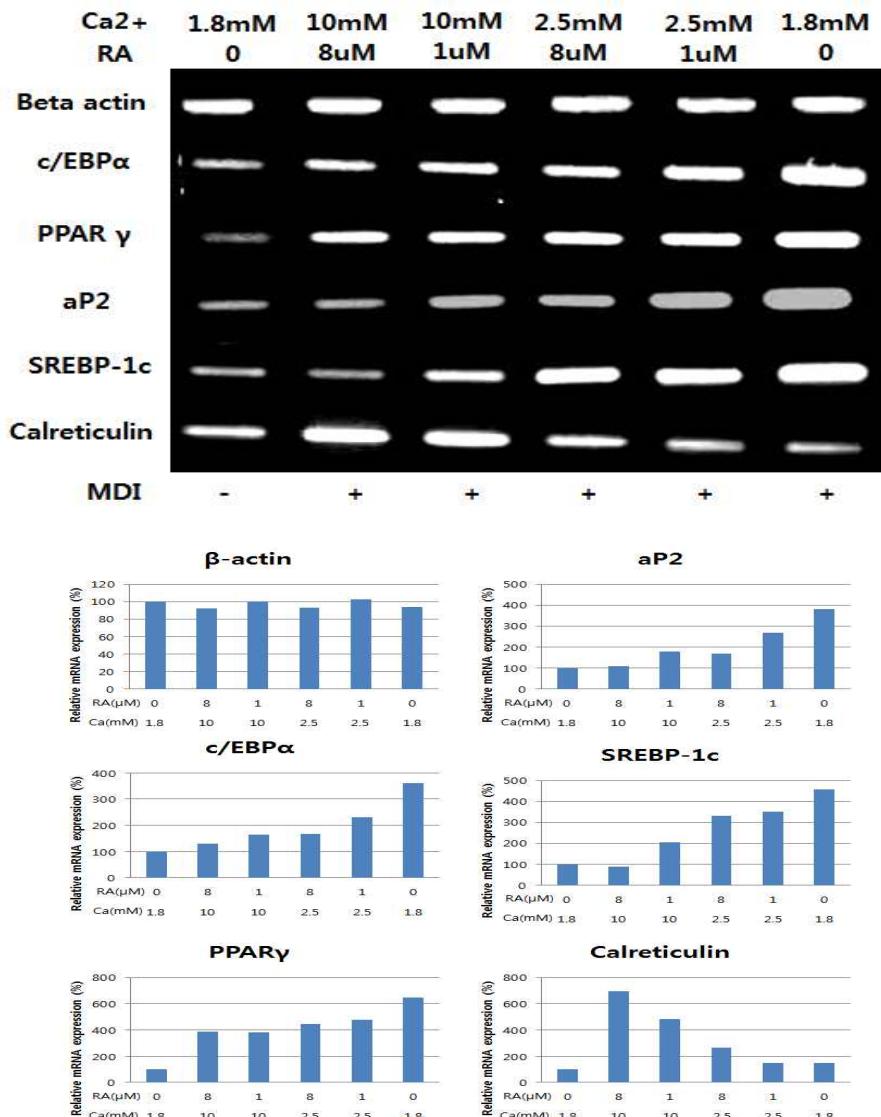


Figure 1-9. Effect of extracellular calcium and retinoic acid concentration on the mRNA expressions of genes associated with adipocyte differentiation in Hanwoo stromal vascular cells.

연구 2. 소 유래 Stromal Vascular 세포를 이용한 extra cellular Ca²⁺ 및 Vit A의 처리 수준에 따른 지방세포 분화 및 작용기전 조사

실험 1. Intramuscular stromal vascular 세포를 이용한 세포외 칼슘 영향 연구

가. Introduction

근내지방도 증가는 근육내 지방이 침착되는 것으로서 고기의 맛과 풍미를 극대화시킨다. 가축의 지방대사 생리상 근내지방 축적은 체지방 축적의 마지 막 단계로서 현재까지 근내지방도를 높이기 위하여 다양한 사양관리 방법이 시도되고 있으나 여전히 1++ 등급은 전국평균 25%를 넘지 못하고 있는 실정이다. 근내지방도를 보다 효율적인 방법으로 증진시키

기 위해서는 근내지방 조직과 기 타부위 지방조직세포를 세포학적, 생화학적, 분자생물학적 으로 이해함으로써 지방세포 및 조직의 발달과 생합성 및 분해기작의 차이를 구명하고 근 내지방 조직세포를 성장시키고 분화 된 세포내에 지방구가 침착을 증진시키는 영양생화학 적 및 내분비학적 조절기술의 개발이 요구되어지고 있다. 특히 칼슘이나 비타민 조절에 관해서 일본의 경우에는 많은 연구가 이루어져 왔으나 한우 거세우를 이용한 연구는 거의 없는 실정이다. 한우의 국제 경쟁력을 강화시키기 위해서는 근내지방도 향상 즉, 등심내 지방의 축적을 강화시키기 위해서는 한우의 체지방 축적에 관한 메카니즘을 이해하기 위해서는 실험실내에서 다양한 조건 하에서의 지방세포분화조절에 관련한 영양생화학적 조절 중 특히 칼슘조절에 의한 분화조절 연구는 거의 전무하여 본 연구를 통해 세포외 칼슘 수준에 따른 한우거세우의 근내 SVC 세포를 분리하여 칼슘처리 조건의 차이에 따른 지방세포 분화조절 작용기전을 연구하고자 한다.

나. 재료 및 방법

(1) Intramuscular Stromal vascular cell 분리

도드람LPC 도축장에서 한우 거세우의 목살부위의 근육을 채취하여 penicillin (100U/ml) streptomycin을 포함하는 DMEM배지에 넣어 실험실로 운송하였다. 채취한 근육조직을 멸균수 술용 가위로 세절한 후 수차례 DMEM 용액으로 세척하였다. 혈관, 결합조직 등을 제거한 후, 10% bovine serum albumin (BSA)과 0.4% collagenase를 첨가한 Krebs-Ringer-Bicarbonate (KRB) buffer(3R/g tissue; 0.77M NaCl, 0.77M KCl, 0.77M KH₂PO₄, 0.77M MgSO₄ 7H₂O, 0.77M NaHCO₃, 0.275M CaCl₂ 2H₂O, 0.3M glucose) 용액으로 90분 동안 소화를 시켰다. 소화 후 250 μ m nylon membrane에 통과시켜 소화가 되지 않은 지방조직 및 결합조직을 걸러내 었다. 성숙한 지방 세포가 있는 상층부분을 걷어내고 하층부분 을 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 맥관계간세포를 얻은 다음, DMEM 으로 3회 세척하였다. Hemocytometer를 이용 하여 세포 수를 측정한 후, 2 \times 10⁴ cells/ml의 밀도로 6well에 나누어 접종하고 5% FBS, 100U/ml penicillin, 100g/ml streptomycin, fungizone을 포함한 1:1 DMEM/F-12 배지에서 배양하였다. 배양조건은 37°C, 95% air, 5% CO₂로 하였으며 배지는 48시간 간격으로 교환해 주었다. 지방 전구세포들이 증식하여 배양기의 바닥에 confluent하게 되었을 때 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12에 10g/ml insulin(bovine pancreas), 10g/ml holo-transferrin(bovine), 0.5mM MIX, 1ng/ml T3, 25mM 2,4-thiazolidinedione, 1 μ M DEX, 25ng/ml hydrocortisone, 1g/ml lipid mixture(cholesterol rich) 를 해당 처리구별로 혼합 처리함으로서 분화를 유도하였다. SVC 분화결과는 Oil red-O 염색을 실시하였다.

(2) Cell Viability Assay

세포증식활성은 CCK-8 assay (Cell Counting Kit 8, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA)로 측정하였으며, 세포 배양용 96 well plate에 3 \times 10⁴ cells/ml을 80 μ l 씩 분주하여 37°C 및 5% CO₂ incubator에서 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후, 농도를 달리 한 시료액을 20 μ l씩 접종 하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후 CCK-8 용액 10 μ l를 첨가 하여 37°C에서 3시간 배양하고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Oil Red O 염색

세포 내 droplet 생성을 확인하기 위하여 Oil Red O 염색 을 실시하였다. 준비된 맥관계간세포를 PBS로 세척한 후 3.7% formalin으로 1시간 동안 고정하고 60% isopropanol 을 이용하여 세척한 다음 Oil Red O solution을 처리하여 실온에서 20분간 염색하였다. 염색 후 Oil Red O solution을 제거하고 중류수로 3회 세척한 다음 염색된 세포를 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한 정량적 분석을 위하여 100% isopropanol을 이용하여 지방을 추출한 후 96 well plate에 200 μ l씩 옮겨서 ELISA reader로 500 nm에서 흡광도 를 측정하였다.

(4) PKC 활성도 측정

PKC 활성도는 PKC assay kit (Upstate Biotech, Charlottesville, VA)를 사용하여 측정하다. 평활근 세포를 5.5 mmol/L과 30 mmol/L D-glucose가 포함된 배지로 72시간 동안 배양하다. 72시간 후 배지를 제거하고 여기에 buffered salt solution [137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 0.3 mmol/L sodium phosphate, 0.4 mmol/L potassium phosphate, 25 mmol/L β -glycerophosphate, 5.5 mmol/L D-glucose, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L CaCl₂, 100 μ mol/L γ 32P-ATP, 50 μ g/mL digitonin, 20 mmol/L HEPES (pH 7.2)]을 첨가하다. 그리고 100 μ L의 25% TCA를 첨가하여 반응을 지시 켰다. 25 μ L의 aliquot를 2 cm phosphocellulose filter (Whatman P81)에 옮긴 다음 0.75% phosphoric acid로 세 번 세척하다. Filter에 결합된 peptide substrate의 인산화 정도를 scintillation counter를 사용하여 측정하고 PKC 활성도를 계산하다.

(5) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

칼슘을 농도별로 처리하면서 분화시킨 맥관계 간세포(SVC) 에 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 1 ml 을 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 200 μ l의 chloroform 을 첨가하여 40°C에서 30분 동안 반응시켰다. 14,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리시켜 400 μ l의 상층액을 분리하여 동량의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 반응시킨 후 14,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리시켜 total RNA를 분리 하였다. 분리된 RNA를 DEPC water를 이용하여 녹이고 정량 한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 역전사 및 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1× TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr)을 이용 하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였으며, housekeeping 유전자인 β -Actin을 internal control로 사용하였고 비만 관련 유전자의 Senser 및 Anti-senser primer 의 Sequence는 아래와 같다.

Sequence of primers used for RT-PCR			
β -Actin	Sense	5'-AGG-GAA-ATC-GTG-CGT-GAC-AT-3'	
	Anti-sense	5'-AGC-TCA-GTA-ACA-GTC-CGC-CT3'	
PPAR γ	Sense	5'-CGC-TGA-TGC-ACT-GCC-TAT-GA-3'	
	Anti-sense	5'-TGC-GAG-TGG-TCT-TCC-ATC-AC-3'	
C/EBP α	Sense	5'-GTG-TGC-ACG-TCT-ATG-CTA-AAC-CA-3'	
	Anti-sense	5'-GCC-GTT-AGT-GAA-GAG-TCT-CAG-TTT-G-3'	
GLUT4	Sense	5'-ACA-TAC-CTG-ACA-GGG-CAA-GG-3'	
	Anti-sense	5'-CGC-CCT-TAG-TTG-GTC-AGA-AG-3'	
FABP	Sense	5'-AAC-ACC-GAG-ATT-TCC-TTC-AA-3'	
	Anti-sense	5'-AGT-CAC-GCC-TTT-CAT-AAC-ACA-3'	
Calreticulin	Sense	5'-GGA-TAT-CCG-GTG-TAA-GGA-TTT-3'	
	Anti-sense	5'-ATC-CTT-ACA-CCG-GAT-ATC-CTT-3'	

(6) Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

동일한 방법으로 준비된 맥관계 간세포(SVC)에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4oC에서 1시 간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1,500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminoesence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

다. 연구 결과

Figure 1-10은 SVC (소 유래 맥관계 간세포)에 칼슘을 농도 별로 처리한 후 24, 48시간 동안 CO₂ 인큐베이터에 배양하며 세포생존능을 확인하였다. 실험 결과, 칼슘의 농도차이에 따른 처리세포별 세포생존율에는 차이가 없어 칼슘의 높고 낮음에 따른 세포독성은 없는 것으로 나타났다.

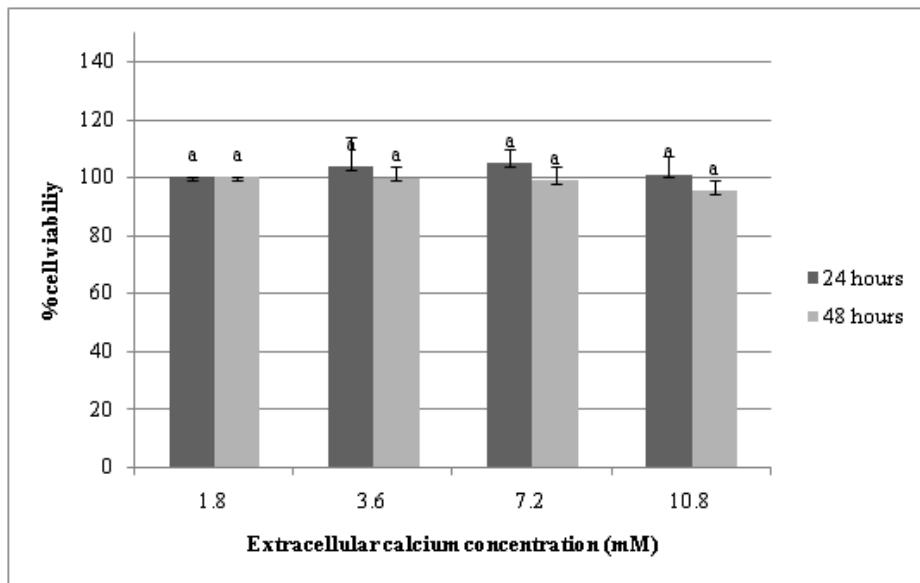


Figure 1-10. Effect of increasing extracellular calcium concentration on the viability of intramuscular stromal vascular cells from Hanwoo beef cattle. Bars with different superscripts are significantly different. Data are means \pm SE ($n=3$). ($P < 0.05$)

Figure 1-11은 stromal vascular cells을 배양 후에 칼슘을 농도별로 달리 처리하면서 14일 간 분화 유도하고 지방세포 분화 관련 유전자들의 mRNA 발현량을 조사한 결과이다. 실험결과, 칼슘 처리농도가 높을수록 지방세포 분화 관련 유전자인 PPAR γ 및 CEBP/ α 의 발현량이 감소하였으며, FABP4 및 GLUT4 발현 또한 감소하는 것을 보였다. 한편, Calreticulin 유전자는 발현량이 칼슘 처리 농도에 따라 증가하는 것으로 나타나 이를 유전자 발현, 특히 PPAR γ 또는 C/EBP α , FABP4 및 GLUT4 유전자의 발현과 calreticulin 유전자 발현과의 신호전달에 대한 Cross talking 관련성 등 작용기전을 조사하는 것은 지방세포 분화에 중요한 정보가 되리라 판단된다.

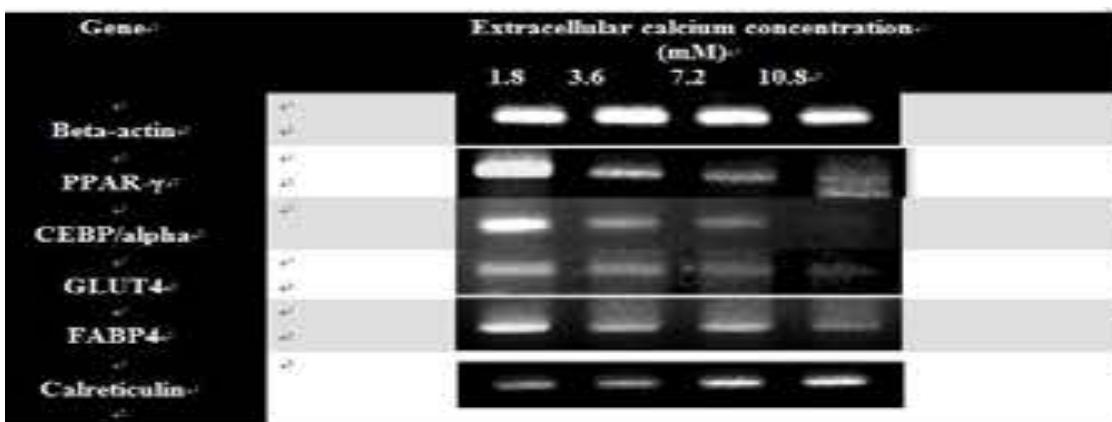


Figure 1-11. Effect of increasing extracellular calcium on the mRNA expression of genes related to intramuscular stromal vascular cells differentiation.

Figure 1-12에서는 stromal vascular cells에서 칼슘 처리 농도를 달리하여 14일간 분화 유도하여 지방분화 관련 단백질의 발현량을 측정한 결과이다. 실험결과, 칼슘 처리 농도의 증가와 함께 FABP4 및 GLUT4 발현량이 감소하는 경향을 보였으며, PLC- γ 의 단백질 발현 또한 칼슘 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났다.

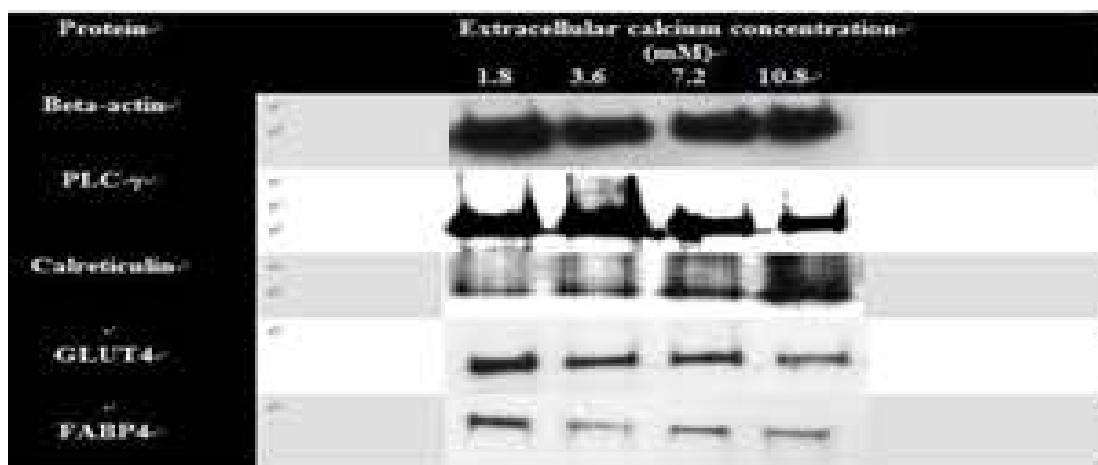


Figure 1-12. Effect of increasing extracellular calcium concentration on the expression of adipogenesis-related proteins.

Figure. 1-13은 intramuscular stromal vascular cells에 칼슘농도를 달리하여 처리한 후 PKC 활성을 측정한 결과를 나타내었다. 세포에 칼슘 농도처리가 증가함에 따라 PKC 활성의 감소를 보였다. 이 결과는 PKC 활성이 지방축적을 감소시키고 IM SVC에서 칼슘 농도가 증가함에 따라 감소한다는 것을 보여준다. 지금까지 보고된 바에 의하면, phospholipase C(PLC)가 활성화 되기전에 앞서 세포막에 존재하는 G-Protein의 신호전달 체계가 먼저 활성화 되어지는 것으로 알려져 있다.

즉, 리간드의 결합으로 수용체 세포질 도메인의 구조 변화가 일어나면 G-Protein의 α 소 단위체의 GDP와 GTP 교환이 발생합니다. α -GTP 가 막을 따라 이동해 phospholipase C(PLC)와 결합해 활성화하면, phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate(PIP2)가 가수분해되어 Diacylglycerol(DAG)과 Inositol 3Phosphate(IP3)가 각각 생성된다. IP3는 소포체의 IP3 수용체에 결합해서 Ca^{2+} 채널을 열어주고 세포질로 Ca^{2+} 이 확산되도록 하며, 확산된 Ca^{2+} 은 세포막에서 DAG와 함께 삼합체를 형성해 Protein Kinase-C(PKC)를 활성화 시킨다. PKC는 하위 표적 단백질들의 Ser/Thr기에 인산화를 수행한다. 신호가 종결되면 소포체의 ATP-powered pump가 세포질로부터 Ca^{2+} 을 회수하며, IP3는 inositol phosphatase에 의해 인산이 제거된다.

이러한 일련의 신호전달 체계에서 칼슘처리농도가 증가할수록 PLC- γ 활성화를 통한 소포체로부터의 Ca^{2+} 방출을 억제하고, 이 결과 PKC 활성의 감소를 초래한 것으로 사료되었다. 지방세포 분화관련 유전자의 발현이 억제되는 결과는 PKC 활성의 감소에서 기인하였을 가능성을 제시하고 있다.

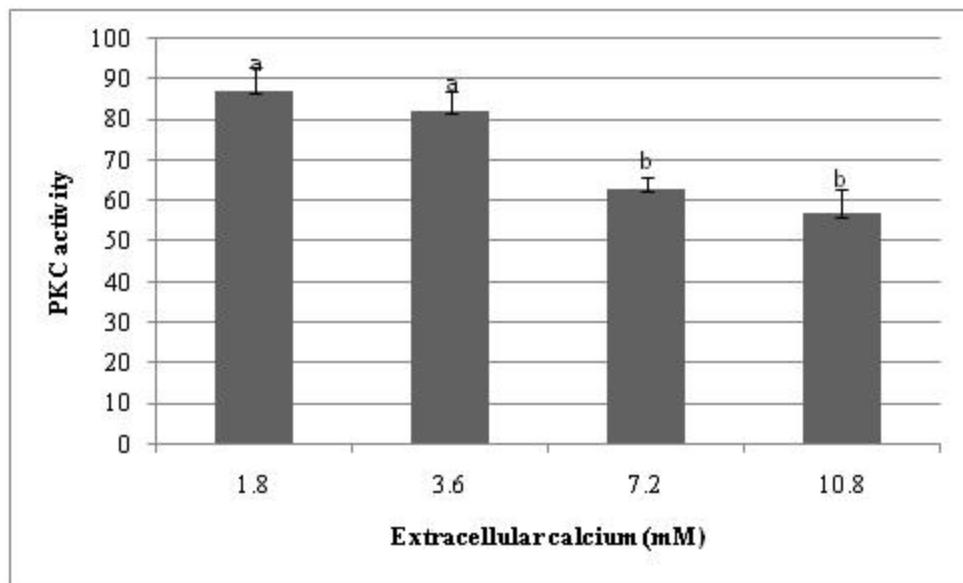


Figure 1-13. Results of the protein kinase C activity ELISA assay kit for the intramuscular stromal vascular cells treated with increasing extracellular calcium. Data are means +SE(n = 3). Bars with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

실험 2. 소 유래 Stromal Vascular 세포를 이용한 Intracellular Ca²⁺ 및 vitamin A 조절에 기인한 지방세포 분화관련 신호전달 규명 (PKC, MAPK, C/EBP- α , PPAR- γ , CREB, CaMKII, Calreticulin 등)

Figure 1-14는 Western blot을 통하여 지방 생성 단백질의 단백질 발현 정도 결과를 나타낸 것이다. 지방 생성 단백질(C/EBP α , PPAR γ , AP2, SREBP-1C)의 단백질 발현이 칼슘 농도가 칼슘과 레티노인산이 감소하는 것과 반비례하여 증가하는 경향을 보여주었다. 반면에, Calreticulin과 CRABP-II와 RAR α 는 칼슘과 레티노인산이 감소하는 것과 비례하여 감소하는 경향을 보여주었다.

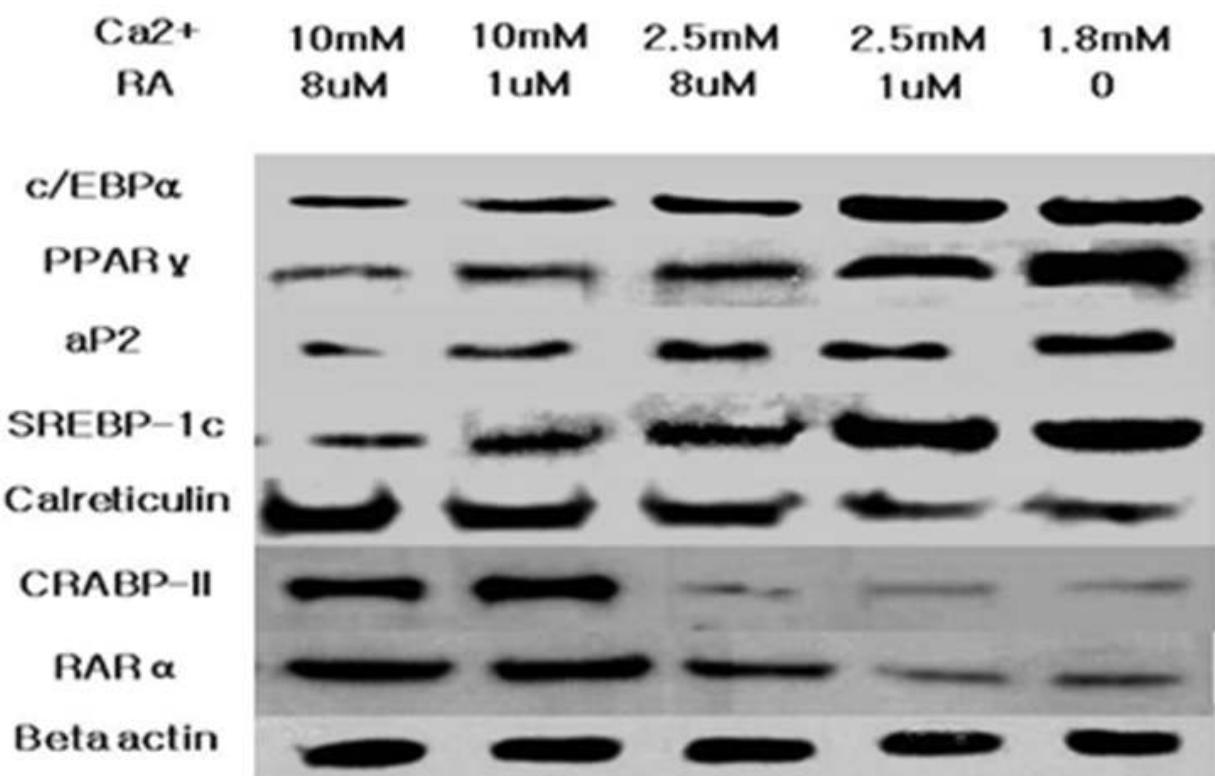


Figure 1-14. Western blot analysis of proteins associated with the differentiation of bovine intramuscular stromal vascular cells after treatment with different concentrations of calcium and retinoic acid.

연구 3. 사료 내 칼슘과 인 비율의 차이에 따른 한우 비육우 1차 사양실험

Table 1-4에는 사료내 칼슘과 인 비율을 달리한 실험사료를 제조하여 급여한 사양실험 성적을 나타내었다. 평균 일당 증체량은 칼슘인 비율이 1.5 : 1인 대조군의 0.52kg에 비해 칼슘인 비율이 1:1인 처리군1에서는 0.45kg으로 감소한 것으로 나타났다. 그러나 칼슘인 비율이 0.75:1인 처리군2에서는 평균 일당 증체량이 0.51kg으로 대조군과 유사한 증체량 증가를 나타내었다. 한편, 각 시험군의 평균 일당 사료 섭취량은 약 7.2kg으로 실험구간에 거의 동일하였다. 따라서, 사료효율은 대조군과 T2군에서 유사한 값을 나타내었으며, T1군에서는 낮아지는 경향이 있는 것으로 나타났다. 그러나 T1군에서 증체량이 낮아진 이유는 분명이 알 수 없었으나 개시체중이 다소 낮았던 것도 고려해봐야 할 원인 중의 하나로 사료되었다.

Table 1-4. 증체량, 사료섭취량 및 사료효율

Ca:p Feed content	Treatment groups		
	control 1.5:1 (n=20)	T1 1:1 (n=20)	T2 0.75:1 (n=20)
IBW (kg)	659.31±59.528	561.36±39.97	604±54.62
FBW (kg)	754.75±70.01	658.45±43.67	714.87±68.37
BWG (kg)	95.4375±37.00	97.09±27.14	110.87±37.00
ADFI (kg)	7.200±0.42	7.212±0.34	7.214±0.28
FCR(gain/feed)	0.0726±0.02	0.0654±0.02	0.0739±0.02
ADG(daily gain)	0.52±0.21	0.45±0.13	0.51±0.16

* IBW: initial body weight; FBW: final body weight; BWG: body weight gain; ADFI: average daily feed intake; FCR: feed conversion ratio; ADG: average daily gain
Data are means ±SE(n=20).

Table 1-5에서 지육률은 모두 60% 내외로 각 시험구간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 육량지수는 칼슘과 인의 비율이 1:1인 T1군에서 육량지수가 증가한 것으로 나타나 T1군의 증체량이 낮은 반면 등지방 두께도 낮아 육량지수는 다소 증가한 것으로 사료되었다. 한편, 근내지방도는 칼슘과 인의 비율이 낮아질수록 높아지리라 기대하였으나 본 연구결과 세포 수준에서의 연구결과와 일치하지는 아니하여 체내 칼슘은 칼슘 항상성 유지 작용 기전에 의존하여 사료 내 조절에 대한 효과가 뚜렷하게 나타나지는 않은 것으로 판단되었다. 따라서 칼슘인 비율조절에 의한 근내지방도 증진에 관한 농가수준에서의 적용에는 더욱 연구가 필요하며, 2차 사양실험에서의 결과를 포함하여 면밀히 검토한 후 실질적으로 고급육 생산 기법에 도입해야 할 것으로 고려되었다.

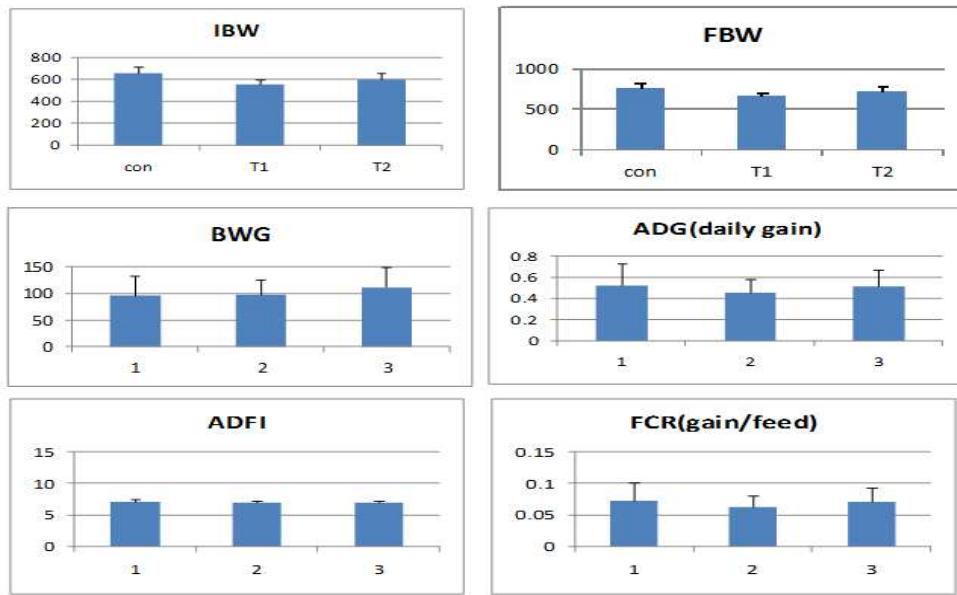
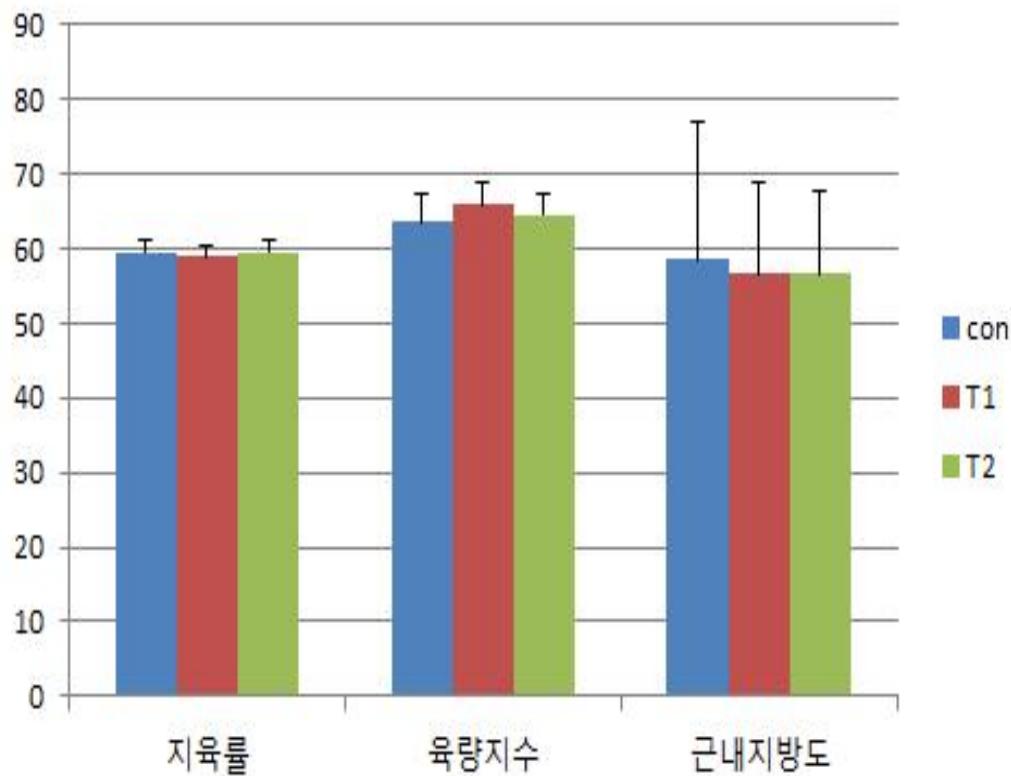


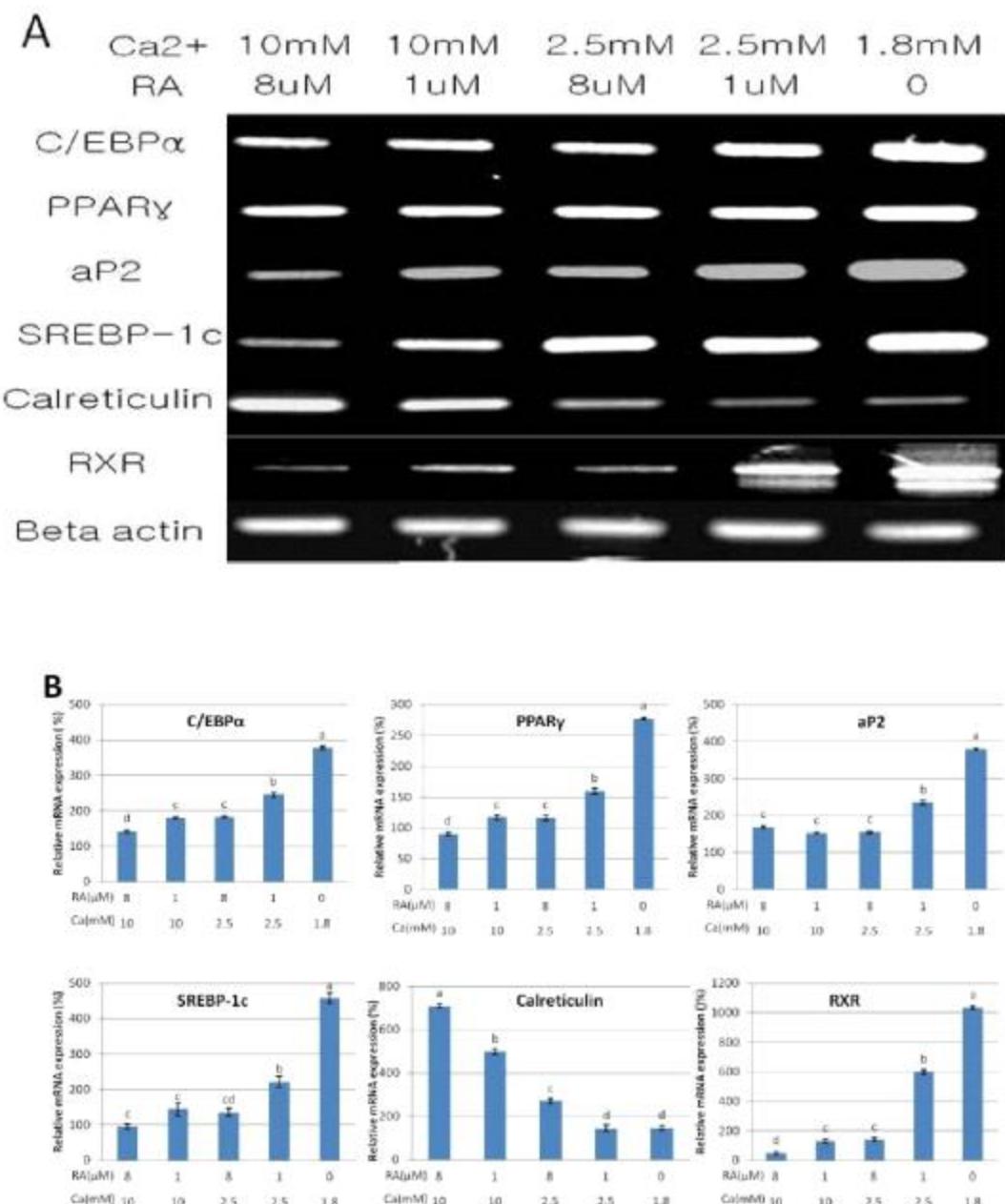
Table 1-5. 도체 품질 비교

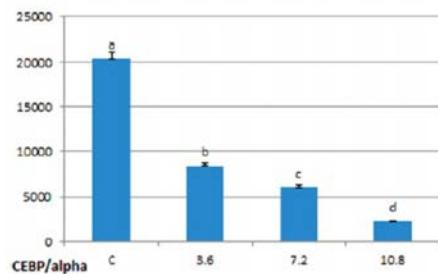
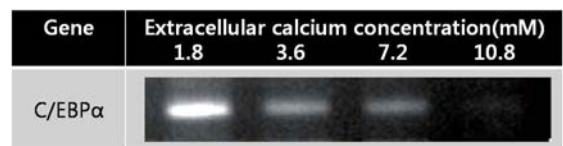
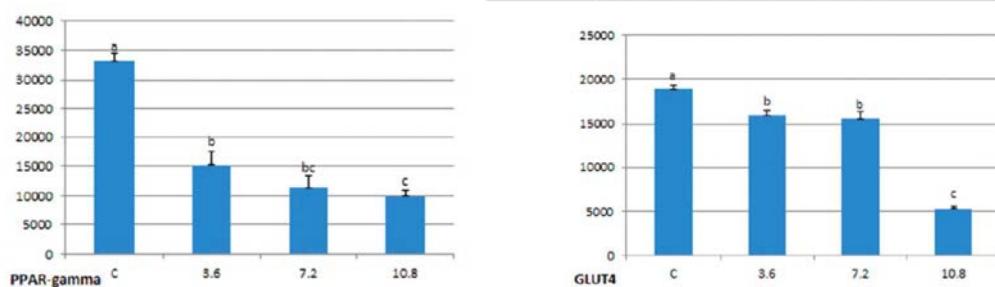
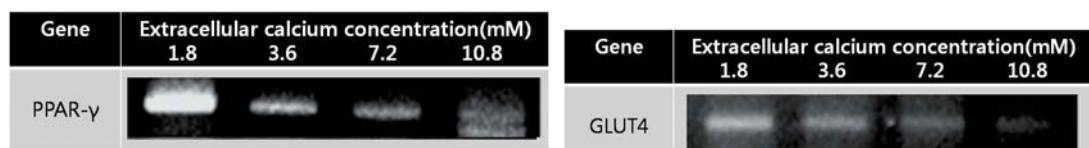
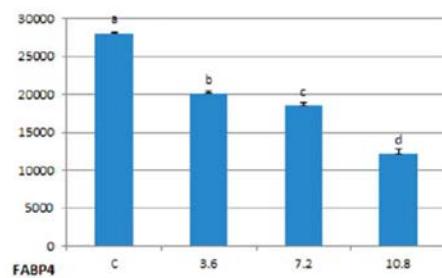
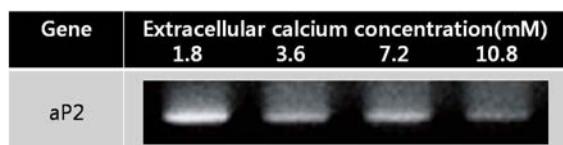
Ca:p Feed content	Treatment groups		
	control	T1	T2
	1.5:1 (n=20)	1:1 (n=20)	0.75:1 (n=20)
지육률	59.56±1.45	59.12±1.75	59.46±1.59
육량지수	63.58±3.66	66.34±2.51	64.43±2.80
근내지방도	58.50±18.44	52.81±11.68	56.62±10.93

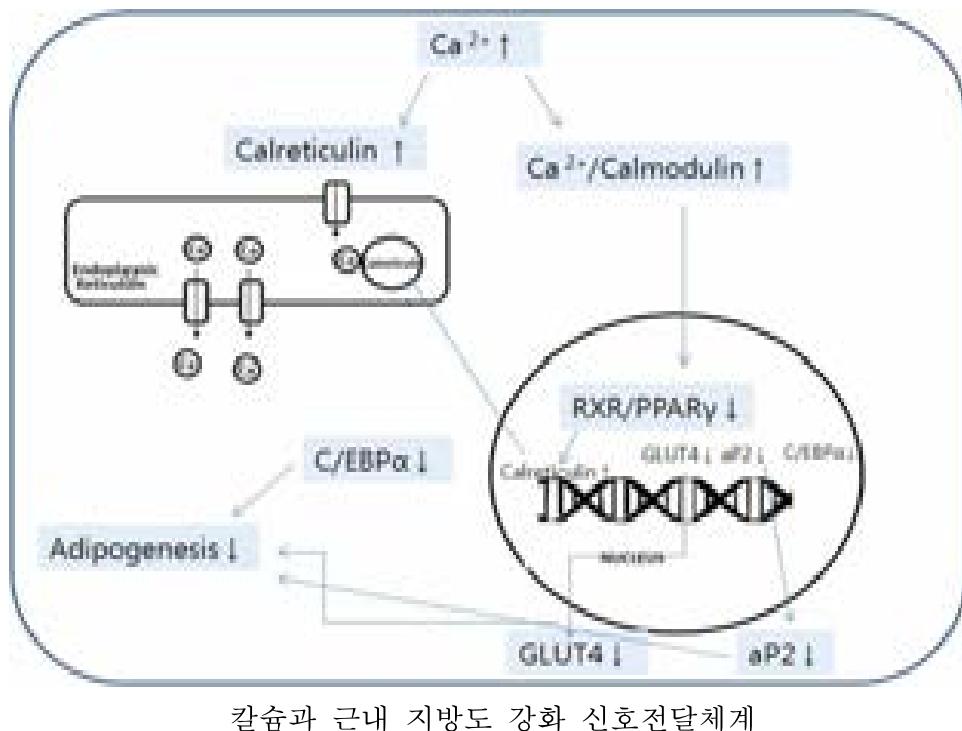


연구 4. 소 유래 맥관계 간세포(Stromal Vascular cells)를 이용한 근내 지방도 강화 모델 시스템 확립

▶ 칼슘과 근내 지방도 강화 모델 시스템 확립







칼슘과 근내 지방도 강화 신호전달체계

<In vivo 칼슘 조절 사양 실험 결과>

Table 1-6에서 지육율은 모두 60% 내외로 각 시험구간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 육량지수는 칼슘과 인의 비율이 1:1인 T1군에서 육량지수가 증가한 것으로 나타나 T1군의 증체량이 낮은 반면 등지방 두께도 낮아 육량지수는 다소 증가한 것으로 사료되었다. 한편, 근내지방도는 칼슘과 인의 비율이 낮아질수록 높아지리라 기대하였으나 본 연구결과 세포 수준에서의 연구결과와 일치하지는 아니하여 체내 칼슘은 칼슘 항상성 유지 작용 기전에 의존하여 사료 내 조절에 대한 효과가 뚜렷하게 나타나지는 않은 것으로 판단되었다. 따라서 칼슘인 비율조절에 의한 근내지방도 증진에 관한 농가수준에서의 적용에는 더욱 연구가 필요하며, 2차 사양실험에서의 결과를 포함하여 면밀히 검토한 후 실질적으로 고급육 생산 기법에 도입해야 할 것으로 고려되었다.

Table 1-6. Marbling characteristics of Hanwoo beef cattle with altered dietary calcium for 6 months

	Control	T1	T2
Carcass percentage	59.56±1.45	59.12±1.75	59.46±1.59
Carcass grade	63.58±3.66	66.34±2.51	64.43±2.80
Marbling score	58.50±18.44	52.81±11.68	56.62±10.93

*Data are means ±SE(n=20). Means with different superscripts are significantly different at p≤0.05.

Table 1-7에는 사료 내 칼슘과 인 비율을 달리한 실험사료를 제조하여 급여한 사양실험 성적을 나타내었다.

평균 일당 증체량은 칼슘인 비율이 1.5 : 1인 대조군의 0.52kg에 비해서 칼슘인의 비율이 1:1인 처리군1 에서는 0.45kg으로 감소한 것으로 나타났다. 그러나 칼슘인 비율이 0.75:1 인 처리군2에서는 평균 일당 증체량이 0.51kg으로 대조군과 유사한 증체량 증가를 나타내었다. 한편, 각 시험군의 평균 일당 사료 섭취량은 약 7.2kg으로 실험구간에 거의 동일하였다. 따라서, 사료 효율은 대조군과 T2군에서 유사한 값을 나타내었으며, T1군에서는 낮아지는 경향이 있는 것으로 나타났다. 그러나 T1군에서 증체량이 낮아진 이유는 분명히 알 수 없었으나 개시체중이 다소 낮았던 것도 고려해봐야 할 원인 중의 하나로 사료되었다.

Table 1-7. Production performance of Hanwoo beef cattle following altered dietary calcium for 6 months

Parameters ¹	Control	T1	T2
IBW (kg)	659.31±59.528	561.36±39.97	604±54.62
FBW (kg)	754.75±70.01	658.45±43.67	714.87±68.37
BWG (kg)	95.4375±37.00	97.09±27.14	110.87±37.00
ADG	0.52±0.21	0.45±0.13	0.51±0.16
ADFI (kg)	7.200±0.42	7.212±0.34	7.214±0.28
FCR	0.0726±0.02	0.0654±0.02	0.0739±0.02

*Data are means ±SE(n=20). Means with different superscripts are significantly different at p≤0.05.¹IBW- initial body weight; FBW: final body weight; BWG: body weight gain; ADFI: average daily feed intake; FCR: feed conversion ratio; ADG: average daily gain

Table 1-8에서 보는 바와 같이 혈중 칼슘농도는 사료 내 칼슘 수준을 달리하여도 대조군 및 실험군 사이에 유의한 차이를 나타내지 아니하였다. 인 함량도 각 실험군 사이에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 사료 내 혈중 칼슘인 비율은 대조군에서 1.13 : 1로써 가장 높았고, T1 및 T2구에서는 대조군보다는 낮았으나 T1 및 T2 사이에 칼슘인 비율은 차이가 없었다. 대조군에서도 사료 내 칼슘인 비율이 1.5 : 1정도였으나, 혈액 내에 수준은 다소 낮게 유지되고 있었으며, T1군은 사료내 칼슘인 비율이 1:1이 되도록 하였고, T2군은 0.75 : 1로 조절하였으나, 혈액 내 칼슘인 비율은 T1 및 T2군 사이에 유사한 값을 나타낸 결과를 보아 사료 내 칼슘인 비율을 인위적으로 조절할 지라도 혈액 내 칼슘인 비율은 사료 내 칼슘인 비율을 반영하지 아니하고, 칼슘의 항상성 유지를 위해서 매우 민감하게 조정되고 있는 것으로 나타났다. 이 결과, 0.75 : 1정도의 칼슘인 비율 조절은 육질 개선에 영향을 주기에는 조절 정도가 미약한 것으로 사료되어 현재 진행 중에 있는 사양 실험에서는 칼슘인 비율을 0.5 : 1정도 수준으로 조절하여 사양 실험을 실시하고 있음.

Table 1-8. Serum calcium and phosphorous levels of experimental animals with dietary manipulations of calcium

	Control	T1	T2
Average Calcium (mmol/L)	2.53 ± 0.10	2.43 ± 0.08	2.43 ± 0.13
Average Phosphorous (mmol/L)	2.24 ± 0.14	2.55 ± 0.23	2.43 ± 0.21
Ca:P ratio	1.13:1	0.95:1	1:1

*Data are means ±SE. Means with different superscripts are significantly different at p≤0.05.

Table 1-9에 나타난 바와 같이 혈액 성분은 글루코스, 총 콜레스테롤, BUN을 포함하여 Total Bilirubin, GOT, GPT 등 모두 대조군 및 실험군 사이에 적정 수준의 수치를 나타내었으며, 처리군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 1-9. Serum biochemistry of experimental animals with diets having altered dietary calcium for six months

Parameters¹	Control	T1	T2
Glucose(mg/dL)	96±15.22	100±10.25	95±9.79
Total cholesterol(mg/dL)	143±12.8	146±28.4	134±20.79
BUN(mg/dL)	8.2±1.44	9.1±1.55	9.7±1.65
Total Bilirubin(mg/dL)	0.3±0.06	0.8±0.46	0.2±0.07
GOT(IU/L)	72.74±11.64	75.8±16.11	65.6±12.85
GPT(IU/L)	15.4±1.76	20.2±5.67	18.9±5.01

*Data are means ±SE(n=20). Means with different superscripts are significantly different at p≤0.05. Glucose: 40-100mg/dL, Total cholesterol: 62-193 mg/dL, BUN: 10-25mg/dL, Total Bilirubin: 0-0.1mg/dL, GOT: 60-125 IU/L, GPT: 6.9-35 IU/L. Normal values for the blood biochemistry parameters used in the study (The Merck Veterinary Manual, 10thed, 2010).

Figure 1-15에는 칼슘 수준을 달리한 실험사료를 급여한 한우 거세우에서 채취한 근육조직으로부터 RNA를 분리하여 근내 지방 축적 관련 유전자의 발현량을 분석하여 나타내었다. PPAR γ , C/EBP α , FABP4 및 SREBPc 모두 대조군과 칼슘수준을 달리한 처리군에서 유사한 발현량을 나타내어 근내 지방도의 결과를 잘 반영하여 주고 있다.

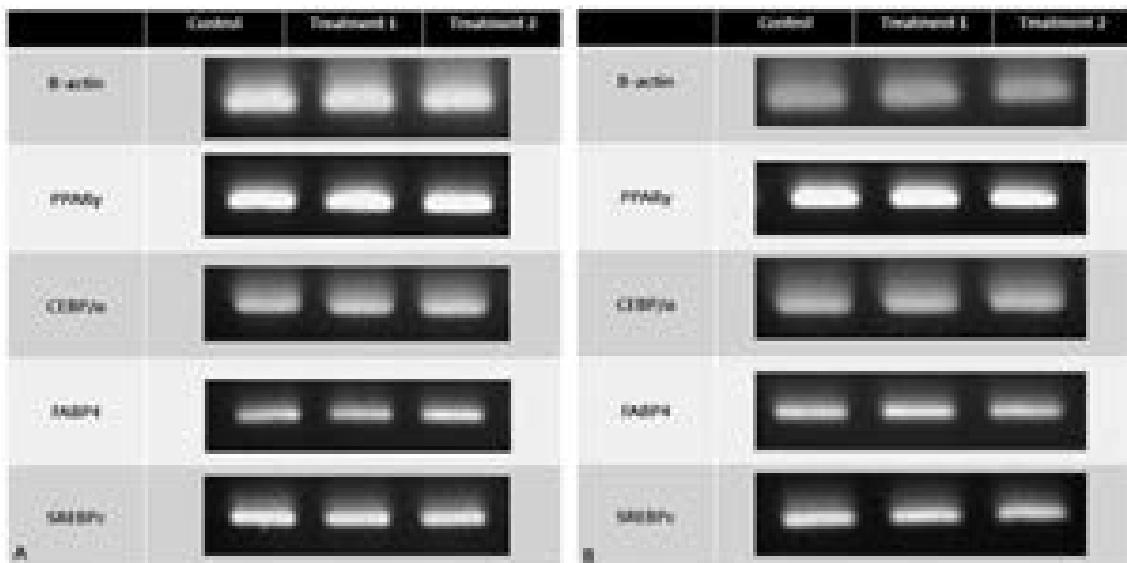


Figure 1-15. mRNA expression of adipogenesis-related genes of representative experimental animals from different Ca treatment groups (PPAR:peroxisome proliferator activated receptor gamma; CEBP α : CCAAT/enhancer binding protein alpha; FABP4: fatty acid binding protein 4; SREBPc: sterol regulatory element-binding protein).

연구 5. 2차 사양실험 및 진행보고

◎ 비육 전기 구간의 비타민 A 및 칼슘 combination 사료 급여 사양시험 (추가 사양실험)

Table 1-10에는 거세한우에 근내지방이 왕성하게 침착되는 비육전기에 칼슘 및 비타민A 조절 효과를 조사하기 위하여 16~18개월령 거세한우를 8개월간 실험사료를 급여하고 나머지 비육 후기는 정상비육후기 사료를 급여한 사양실험 결과를 나타내었다.

증체는 정상사료를 급여한 소에서 239kg으로 가장 높았고 높은 정상칼슘에 비타민 A를 낮춘 경우 증체량이 감소하는 결과를 나타내었다. 한편, 낮은 정상 비타민 A 수준에 칼슘을 낮춘 경우는 증체량이 정상칼슘에 정상 비타민 A를 급여한 것보다는 낮았지만 비타민 A가 낮은 것은 칼슘이 낮은 것보다 증체에 더욱 민감하게 영향을 주는 것으로 사료되었다. 한편, 칼슘 및 비타민A 두 가지 모두 낮은 사료를 급여한 군에서는 어느 군과 비교하여도 가장 낮은 증체량 값을 나타내어 근내지방도를 높이려는 시도에는 증체량 문제를 고려하여 비타민 및 무기물 조절에 더욱 고도의 기술 도입이 필요하다고 판단되었다.

Table 1-10. Effect of limiting the dietary calcium and Vitamin A level on Hanwoo beef steer growth performance.

	HCa+HVA	HCa+LVA	LCa+HVA	LCa+LVA
Initial body weight (kg)	505.0±35.1	504.0±33.1	504.0±27.1	504.0±30.8
Final body weight (kg)	711.0±37.8	707.9±41.9	706.2±29.5	708.1±42.5
Body weight gain (kg)	206.0±37.8	204.0±44.2	202.0±29.5	204.0±42.5
Daily body weight gain (kg)	0.858±0.15	0.850±0.18	0.843±0.12	0.851±0.17
Daily feed intake (kg)	9.18±0.28 ^a	8.81±0.22 ^b	8.57±0.25 ^c	8.55±0.20 ^c
Feed Efficiency (gain/feed)	0.093±0.01	0.096±0.02	0.098±0.01	0.099±0.02

* Data are means ± SE (n=72). Means with different superscript are significantly different at p<0.05.

Table 1-11에는 사양실험 종료시 채취한 혈액의 생화학적 분들을 조사하여 나타내었다. 이 실험 결과는 실험를 급여한 8개월 동안의 비육전기를 지나 도살시 까지 정상사료를 급여한 후 혈액 성분을 조사한 결과로 각 실험구간에 뚜렷한 차이가 없이 모두 정상수준에 있는 것으로 나타났다.

Table 1-11. Effect of limiting the dietary calcium and Vitamin A during the early fattening stage on blood metabolites of finishing Hanwoo beef steers

	HCa+HVA	HCa+LVA	LCa+HVA	LCa+LVA
Glucose(mg/dL)	87.0±10.5	79.4±9.0	88.2±13.4	81.0±16.6
Total Cholesterol(mg/dL)	161.6±27.1	169.2±26.3	156.0±53.6	164.4±20.0
BUN(mg/dL)	10.8±1.3	11.6±1.6	11.6±1.1	11.8±1.3
Total Bilirubin(mg/dL)	0.57±0.3	0.46±0.3	1.28±1.61	1.18±2.1
GOT(IU/L)	70.0±16.8	86.2±17.7	96.0±32.9	102±34.7
GPT(IU/L)	15.4±5.9	15.2±5.0	16.4±3.1	25.0±3.8

Vitamin A (IU/ml)	0.216±0.03	0.256±0.07	0.240±0.09	0.256±0.03
Triglycerides (mg/dL)	36.5±7.9	29.3±6.2	32.0±10.7	40.8±14.8
Calcium (mmol/L)	9.6±0.4 ^a	8.5±0.4 ^{bc}	8.31±1.0 ^c	9.25±0.4 ^{ab}
Phosphorus (mmol/L)	7.5±0.8	7.4±0.2	6.8±0.7	7.7±0.5

* Data are means ± SE (n=72). Means with different superscript are significantly different at p<0.05.

Table 1-12에는 실험 종료 후 도체 된 실험축의 목부위의 근육을 채취하여 조직의 이화학적 성질을 비교분석한 결과이다. 마블링 스코어와 관련이 있는 근육의 지방함량이 처리군에서 증가하는 것으로 나타난 것이 매우 흥미로운 결과이다.

Table 1-12. Physicochemical characteristics of *M. longissimus* of Hanwoo beef cattle fed diets with different levels of calcium and Vitamin A during fattening stage.

	HCa+HVA	HCa+LVA	LCa+HVA	LCa+LVA
pH	6.02±0.17	5.98±0.12	6.15±0.09	6.02±0.17
Drip loss (%) 1day	8.48±2.03 ^a	5.31±1.72 ^b	7.10±1.27 ^{ab}	8.30±1.47 ^a
Drip loss (%) 3day	10.95±3.96	10.21±2.40	11.20±2.98	9.81±2.43
Drip loss (%) 6day	14.12±3.15	12.32±2.40	12.85±2.26	10.68±2.22
Cooking loss (%)	41.5±1.7 ^a	37.1±1.9 ^b	41.2±3.2 ^a	36.1±1.9 ^b
Water-holding capacity (%)	46.2±5.7 ^b	50.8±5.4 ^a	40.3±6.9 ^b	53.7±5.3 ^a
Crude fat (%)	5.95±1.9 ^b	5.84±2.1 ^b	6.39±1.4 ^b	9.91±3.1 ^a

* Data are means ± SE (n=72). Means with different superscript are significantly different at p<0.05.

Table 1-13에는 실험사육 종료 후 각 실험사료를 급여한 실험축의 도체성적을 분석하여 나타내었다.

지육율은 각 실험구간에 차이가 없었다. 등심단면적은 칼슘 및 비타민A 조절사료를 급여한 것에서 약간 높은 값을 나타내었으나 유의한 차이는 없었다. 등지방두께, 육량등급 및

육량지수는 각 실험구간에 차이가 없었으나 마블링스코어는 칼슘이나 비타민A 조절사료를 급여한 것에서 증가하는 것으로 나타났다.

Table 1-13. Carcass characteristics of Hanwoo beef cattle fed diets with different levels of calcium and Vitamin A during fattening stage.

	HCa+HVA	HCa+LVA	LCa+HVA	LCa+LVA
Dressing (%)	60.35±1.57	61.94±1.44	61.10±1.63	60.82±1.22
Rib eye area (cm ²)	90.0±6.0	93.0±8.3	92.0±6.5	92.0±6.6
Back-fat thickness (cm)	11.0±2.0^b	13.0±2.7^a	12.0±1.5^{ab}	12.0±1.6^{ab}
Yield grade	3.0±1.2	3.0±1.5	3.0±1.1	3.0±1.2
Marbling score	6.1±1.0	7.1±1.0	6.9±1.1	7.2±1.2
Yield index	65.0±1.7	66.0±2.9	66.0±1.9	64.0±3.0

*Data are means ± SE (n=72). Means with different superscript are significantly different at p<0.05.

아래 Figure 1-16에는 목부위에서 채취한 각 실험축의 샘플로부터 근육 조직 내 지방축적 관련 유전자의 발현을 조사하여 나타내었다.

PPAR γ 는 칼슘공급이 충분한 경우 비타민 A에 의해 조절이 민감한 것을 알 수 있었다. 그러나 칼슘공급을 낮춘 경우에는 비타민 A에 의한 효과는 크게 달라지지 않는 것을 알 수 있었다. 한편, SREBP-1c 유전자는 비타민A와 상관없이 칼슘에 의해 민감하게 반응을 하는 것으로 나타나 매우 흥미로운 결과로 판단되며 FABP(aP2)유전자는 PPAR γ 와 마찬가지로 칼슘이 정상인 경우에 비타민 A가 낮은 경우에 발현량이 증가하는 것으로 조사되었다.

한편, 지방축적 관련 유전자 중에 지방세포 분화와 가장 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 CEBP α 유전자는 칼슘이 정상인 사료를 급여한 군에서는 비타민A 수준을 낮추어도 영향을 받지 아니하였으나 칼슘수준이 낮은 사료를 급여한 것에서는 모두 높은 발현량을 나타내었고 이 경우에는 비타민 A가 낮은 경우에 더욱 발현량이 증가하는 것으로 나타나 본 연구에서 칼슘 및 비타민 A 모두 낮은 군에서 마블링스코어가 높아지는 것이나 조직내 지방함량이 많은 결과와 일치하는 결과를 나타내어 매우 흥미로운 결과로 주목된다.

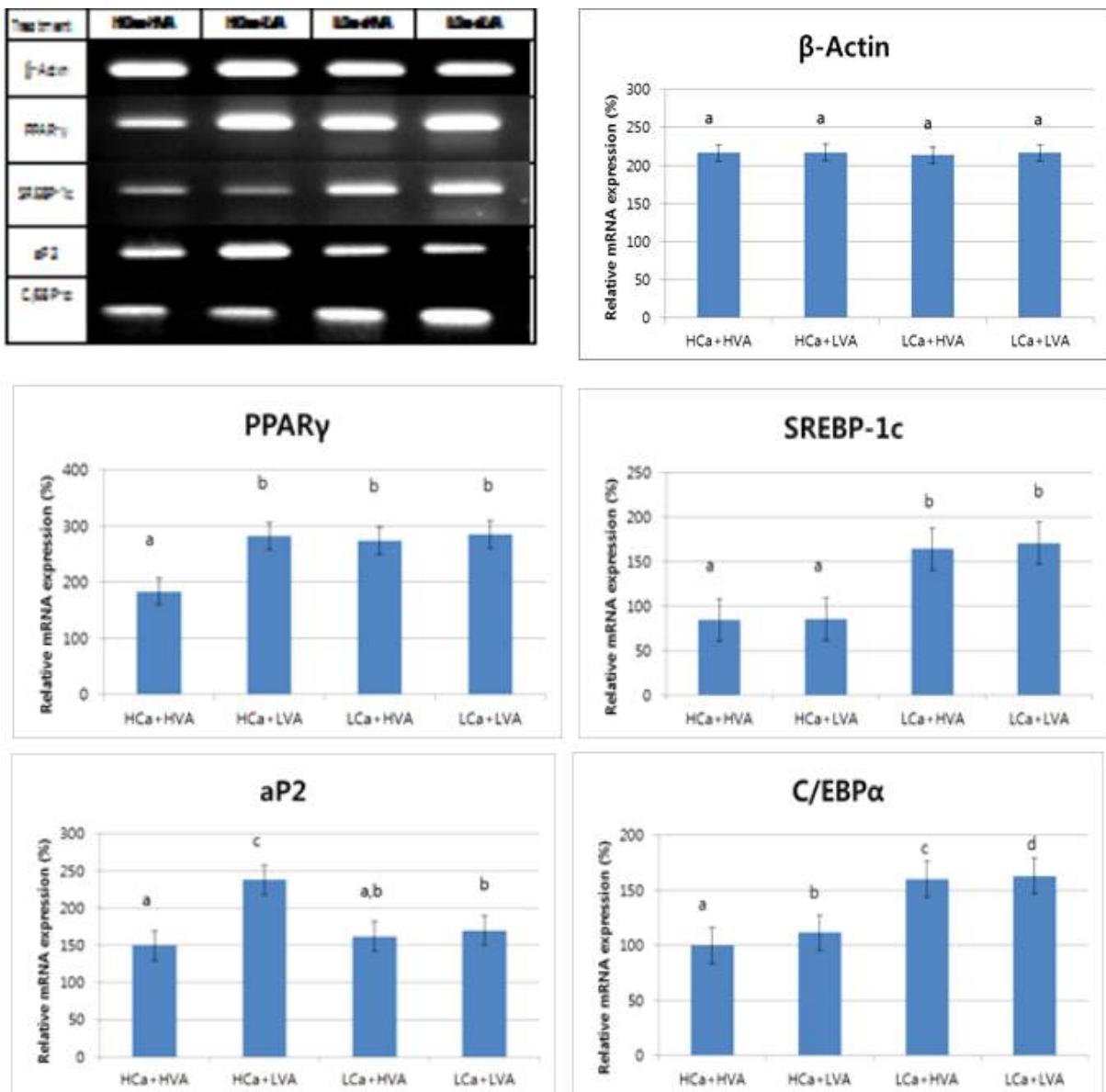


Figure 1-16. mRNA expression of adipogenesis-related genes of representative experimental animals from different Ca and Vit. A treatment groups (PPAR-peroxisome proliferator activated receptor gamma; CEBP/α: CCAAT/enhancer binding protein alpha; FABP4: fatty acid binding protein 4; SREBPc : sterol regulatory element-binding protein).

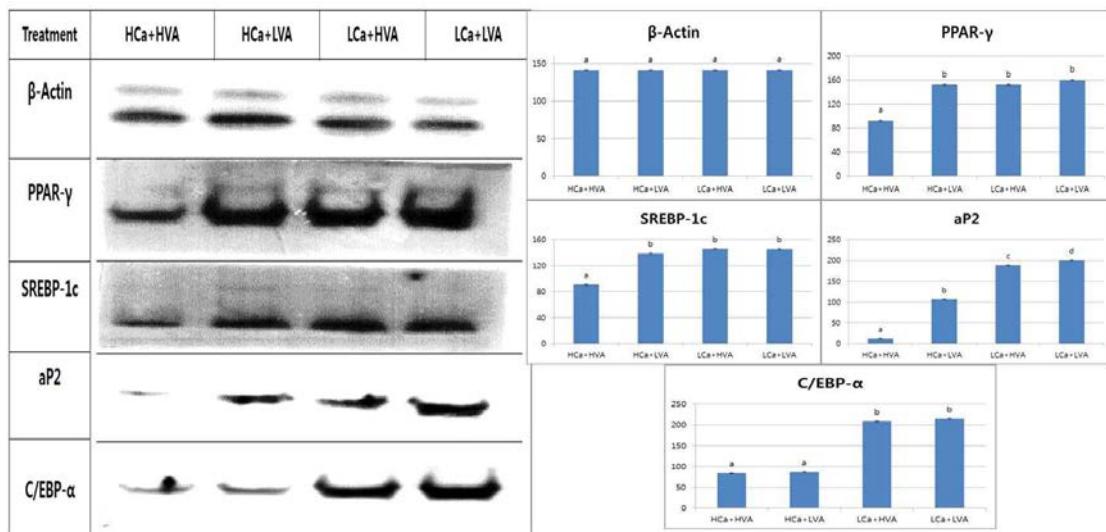


Figure 1-17. Protein expression of adipogenic-related genes from *Longissimus* muscle samples from different treatment groups. (PPAR-γ: peroxisome proliferator activated receptor gamma; SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein 1c; aP2: adipocyte protein 2/fatty acid binding protein 4; C/EBP/α: CCAAT/enhancer binding protein alpha)

◎ 비육 후기 구간의 비타민 A 및 칼슘 combination 사료 급여 사양시험

Treatment	HCa+HVA	HCa+LVA	LCa+HVA	LCa+LVA
Vitamin A	Normal	Normal	Low	Low
Calcium	Normal	Low	Normal	Low

□ 체중 측정 : 실험 개시 체중 (16.1.29. 가을농장)

	Con	T1	T2	T3
Weight (kg)	535.8±79.11	554.75±49.00	551.6±55.89	551±36.31

혈액 성분 분석 (16.1.29. 가율농장)

	Con	T1	T2	T3
Glucose(mg/dL)	122.125±6.12	186.5±64.87	148.125±18.82	123.625±12.6 1
Total Cholesterol(mg/dL)	223.25±23.64	198.25±20.19	218.25±9.48	178.125±6.21
BUN(mg/dL)	10±0.70	10.5±0.31	11.875±0.85	10.5±0
Total Bilirubin(mg/dL)	1.25±0.13	1.9125±0.81	1.4875±0.21	0.7125±0.39
GOT(IU/L)	131±63.45	207.625±95.91	220.875±93.23	111.25±0.75
GPT(IU/L)	31.5±0.89	37.625±9.43	45.25±12.71	24.375±0.02

◎ 2차 사양실험 진행보고 : 비육 전후기 구간의 비타민 A 및 칼슘 combination 사료 급여 사양시험

비육전기 종료 중체량 및 Biopsy 실시







비타민 A 및 칼슘 농도 차이에 따른 사양 실험 결과(재육농장)

<증체량 및 사료효율>

Table 1-14. production performance of Hanwoo beef cattle steers fed different levels of calcium and vitamin A.

Parameters	HCa+HVA	HCa+LVA	LCa+HVA	LCa+LVA
Initial body weight (kg)	382.00±22.82	381.50±25.75	371.50±50.08	381.50±33.97
Final body weight (kg)	521.50±32.93	498.75±11.36	523.50±42.44	509.00±5.32
Body weight gain (kg)	139.50±12.66	117.25±17.06	152.00±38.13	127.50±13.75
Daily body weight gain (kg)	0.883±.09	0.742±.20	0.962±.14	0.807±.36
Daily feed intake (kg)	9.47	9.51	9.53	9.48
Feed Efficiency (gain/feed)	0.093±.01	0.078±.02	0.101±.01	0.085±.04

Data are means ± SE (n=16).

칼슘과 레티노인산 수준을 달리한 실험사료를 급여한 한우거세비육우의 성장결과에 대한 차이를 Table 1-14에 나타내었다. 초기 비육 단계에서는 평균 일당 증체량 및 사료 효율 간에 유의한 차이는 없었다. 이는 칼슘과 비타민 A의 수준을 낮추는 것이 한우 거세비육우의 비육 전기 단계에서의 성장과 생리적 기능에 심각한 부정적 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. LCa+HVA를 가진 사료를 지속적으로 섭취한 거세우는 실험사료를 공급한 기간 동안 다른 모든 실험사료급여 그룹 보다 일관되게 가장 높은 ADG 및 사료효율을 나타내었다.

<혈액성분>

Table 1-15. Serum biochemical profile of Hanwoo beef cattle steers fed diets with different levels of calcium and vitamin A.

Parameters	Hca+HVA	Hca+LVA	Lca+HVA	Lca+LVA
Glucose (mg/dL)	109.75±8.54	97.75±13.50	96.25±8.26	99.25±8.96
Total Cholesterol (md/dL)	242.25±15.33	210.00±29.38	184.50±29.45	210.75±23.01
BUN (mg/dL)	14.50±0.58	13.00±0.46	14.25±0.31	14.00±0.50
Total Bilirubin (mg/dL)	0.13±.05	0.20±.10	0.15±.10	0.13±.05
GOT (IU/L)	59.50±19.67 ^b	90.50±11.85 ^{ab}	73.25±17.46 ^{ab}	106.50±19.08 ^a
GPT (IU/L)	14.33±3.05	14.50±2.89	15.00±2.57	19.00±2.53

Data are means ± SE (n=16).

글루코오스, 총 콜레스테롤, 혈액 요소 질소, 총 빌리루빈 및 GPT의 농도는 실험 군 간에 유의한 차이가 없었다. (Table1-15). 본 연구의 결과는 초기 육성기간 동안에 칼슘과 비타민 A 농도의 차이에 의한 영향이 혈청 대사산물 농도에 유의한 영향을 미치지 않았음을 보여준다.

한우거세비육우에 칼슘이 낮은 사료를 급여하였을 때 GOT의 농도만이 LCa + LVA로 사료를 급여 한 동물에서 유의하게 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 혈청에서 GOT의 농도는 간세포에 손상을 나타낸다.

본 연구에서는, 비육전기 기간 동안 LCa + LVA를 가진 사료를 섭취한 거세우의 지방에서 GOT 농도가 약간 증가했다. 이것은 낮은 칼슘과 비타민A 사료를 섭취한 동물과 비교하여 볼 때 안정적인 간 기능을 가지고 있다는 것을 추정할 수 있다.

<등심 바이옴시 조직의 지방축적 관련 유전자 및 단백질 발현 조사>

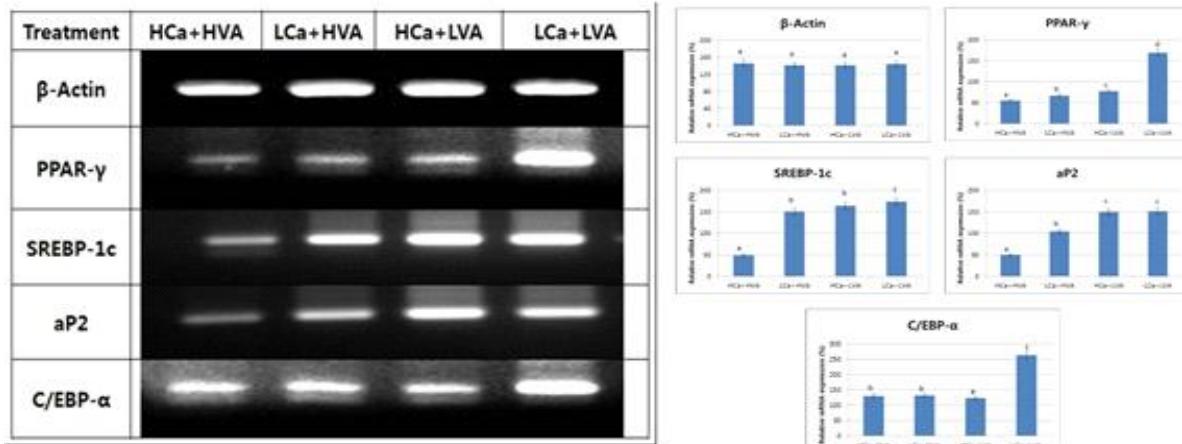


Figure 1-18. Changes on the mRNA expression of adipogenic-related genes from the representative biopsy muscle sample of each different treatment group. (PPAR: peroxisome proliferator activated receptor gamma; SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein 1c; aP2: adipocyte protein 2/fatty acid binding protein 4; CEBP/ α : CCAAT/enhancer binding protein alpha).

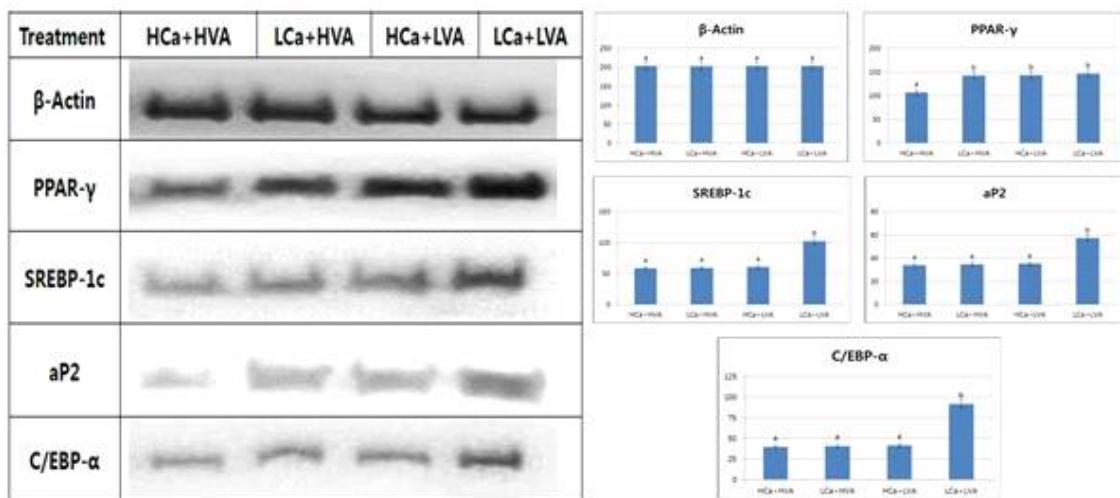


Figure 1-19. Protein expression of adipogenic-related genes from the representative biopsy muscle sample of each different treatment group. (PPAR: peroxisome proliferator activated receptor gamma; SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein 1c; aP2: adipocyte protein 2/fatty acid binding protein 4; CEBP/ α : CCAAT/enhancer binding protein alpha).

비육전기 기간 동안의 비타민A와 칼슘 농도를 달리한 실험사료를 급여한 24개월령 거세비육우의 육질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마지막 득골과 꼬리에서 5번째 척추뼈 부분의 등심 부위에서 바이옴시 기구로 채취한 등심바이옴시 샘플로부터 RNA 및 단백질을 추출하여 지방 축적 관련 유전자의 발현 및 단백질 발현을 조사하였다 (Figure 1-18 및 Figure 1-19). 연구결

과에서 나타내었듯이 사료 내 비타민 A 및 칼슘함량이 감소할수록 지방축적 관련 유전자의 발현은 증가하는 것으로 나타났다. C/EBP α , PPAR γ , aP2 and SREBP-1c 발현 결과는 본 연구팀이 In Vitro 연구결과에서 보고하였던 결과를 잘 반영하는 것으로 나타났다. 본 연구결과에서 근내지방축적을 증진시키기 위한 칼슘 및 비타민A 조절은 비육전기부터 조절하는 것이 효과가 있는 것을 알 수 있다.

본 연구결과 각기 다른 비타민A 및 칼슘 수준의 사료를 비육전기간 급여하였을 때 건강이나 중체에는 부정적 결과를 초래하지 아니하며 근내지방축적 관련 유전자 발현증가를 통해 근내지방축적을 증가시키는 것으로 나타났다.

제 2절: 한우에 적정 비타민 A 및 칼슘 인 비율 구명을 위한 체내 대사조절 연구

1. 농식품부산물을 포함한 사료원료의 가축 체내 칼슘·인의 소화율 측정

1. 사료원료의 칼슘·인 함량 측정

가. 재료 및 방법

한우사료에 주로 이용되는 사료를 수집하여 Thomas willey mill을 사용하여 분쇄하고, 1mm screen을 통한 시료를 분석용으로 사용하였다. 사료 샘플은 건물(Dry mater: DM), 칼슘, 인은 AOAC 방법으로 측정하였다.

Table 2-1. 주요 한우 사료료의 건물, 칼슘, 인 분석 결과

사료명	수분	칼슘	인
단백피	87.14	0.13	1.09
루핀	88.52	0.37	0.41
면실	90.23	0.23	0.65
에뉴얼라이그라스	90.85	0.24	0.12
엿박	89.31	0.14	0.37
옥수수말분	87.41	0.09	0.32
티모시	89.53	0.29	0.27
단백피	89.56	0.20	0.87
대두박	88.67	0.42	0.67
라이그라스	90.16	0.15	0.05
미강	86.96	0.07	2.04
밀기울	88.13	0.12	1.05
볏짚	89.89	0.20	0.10
알팔파	87.01	0.61	0.28
야자박	87.60	0.16	0.51
억새	93.34	0.09	0.10
연맥	88.37	0.28	0.18
옥수수	88.22	2.70	0.23
옥수수후레이크	86.83	0.02	0.23
참깨묵	91.81	2.16	1.35
채종박	89.48	1.24	1.09
콘글루텐밀	92.72	0.04	0.38
톨페스큐	91.29	0.13	0.12
티모시	92.14	0.29	0.28
팜박	89.78	0.64	0.56

나. 결과 및 고찰

한우 사료에 주로 이용되는 총 25점의 건물, 칼슘, 인 분석 결과는 3-1에 제시하였다. 각 영양소를 건물 기준으로 제시하였다. 분석결과는 사료배합시 기초자료로 활용이 가능하다.

2. 피스톨라 장착 한우 대사시험을 통한 사료원료의 소화관내 비타민 A 및 칼슘 인의 소화율 측정

가. 재료 및 방법

본 연구는 국립축산과학원 축산생명환경부 제4우사에서 거세 한우 4두($539 \pm 29\text{kg}$)를 공시하여 4×4 latin square design으로 수행하였다. 처리원료는 들깻묵, 면실박 및 채종박이었으며, 급여량은 거세우에서 TDN 기준으로 일당증체량 0.8kg의 80%를 급여하였다. 대조구는 조사료 20%, 배합사료 80%를 급여하였으며, 처리구에서는 조사료 14%, 배합사료 56%로 조사료, 배합사료의 비율을 대조구와 같은 2:8로 고정시킨 후 처리원료를 30% 대체하였다. 본 실험의 결과는 SAS program의 GLM procedure를 이용하여 각 처리간의 분산분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의수준 0.05에서 검정하였다.

나. 결과 및 고찰

기초사료까지 *In vivo* 실험을 통한 대조구의 소화율은 70.66%, 면실박 처리구의 소화율은 69.66%, 채종박 73.34% 및 들깻묵 66.14%였고(Table 3-3), different method(Table 3-4)를 이용하여 계산한 각 TMR 원료의 소화율은 면실박 67.70%, 채종박 79.59% 및 들깻묵 55.59%였다. *In vivo* 실험을 통한 소화율에서는 면실박 및 들깻묵 처리구간 유의차가 나타나지 않았지만, different method를 이용하여 계산한 소화율에서는 면실박 및 들깻묵 처리구에서 유의차를 보였다($P<0.05$). 따라서 *in vivo* 실험에서의 TMR 사료원료원 소화율을 비교할 때 외관상소화율을 이용하는 것에 비해 different method를 이용하여 사료원 각각의 소화율을 비교하는 것이 보다 적합할 것으로 사료된다.

칼슘과 인의 소화율은 Table 2-4, 2-5에 제시하였다. 각각의 원료에 따라서 소화율이 각기 달랐으며, 특히 칼슘의 소화율은 사료원료에 따라서 큰 차이를 나타냈다. 하지만 Apparent serum retinol은 큰 차이를 보이지는 않았다.

Table 2-2. Ingredients and nutrient content of diets (DM basis)

Item	Treatment			
	Control	Cottenseed meal	Rapeseed meal	Perilla meal
Ingredients, %				
Rice straw	20.0	14.0	14.0	14.0
Cottenseed meal	-	30.0	-	-
Rapeseed meal	1.6	1.1	31.1	1.1
Perilla meal	-	-	-	30.0
Corn	38.2	26.8	26.8	26.8
Wheat bran	32.8	23.0	23.0	23.0
Soybean meal	4.0	2.8	2.8	2.8
Molasses	1.6	1.1	1.1	1.1
Limestone	1.2	0.8	0.8	0.8
Salt	0.3	0.2	0.2	0.2
Lasalocid	0.1	0.1	0.1	0.1
Grobic-DC	0.2	0.1	0.1	0.1
Chemical composition, %				
DM	8.6	11.7	10.0	7.5
CP	12.8	21.1	20.1	21.0
NDF	40.3	36.9	36.4	46.2
ADF	13.3	15.9	13.9	22.2
EE	3.7	3.0	3.4	3.9
Ca	0.8	1.0	0.8	0.7
P	0.6	0.8	0.8	0.8
Ash	6.9	8.1	7.9	6.5

Table 2-3. Apparent total tract DM digestibility and estimation of digestibility of each by-product by different method

Item	Treatment				SEM
	Control	Cottenseed meal	Rapeseed meal	Perilla meal	
Apparent total tract dry matter digestibility	70.66	69.77	73.34	66.14	1.44
Digestibility of by-product	-	67.7	79.59	55.59	5.03

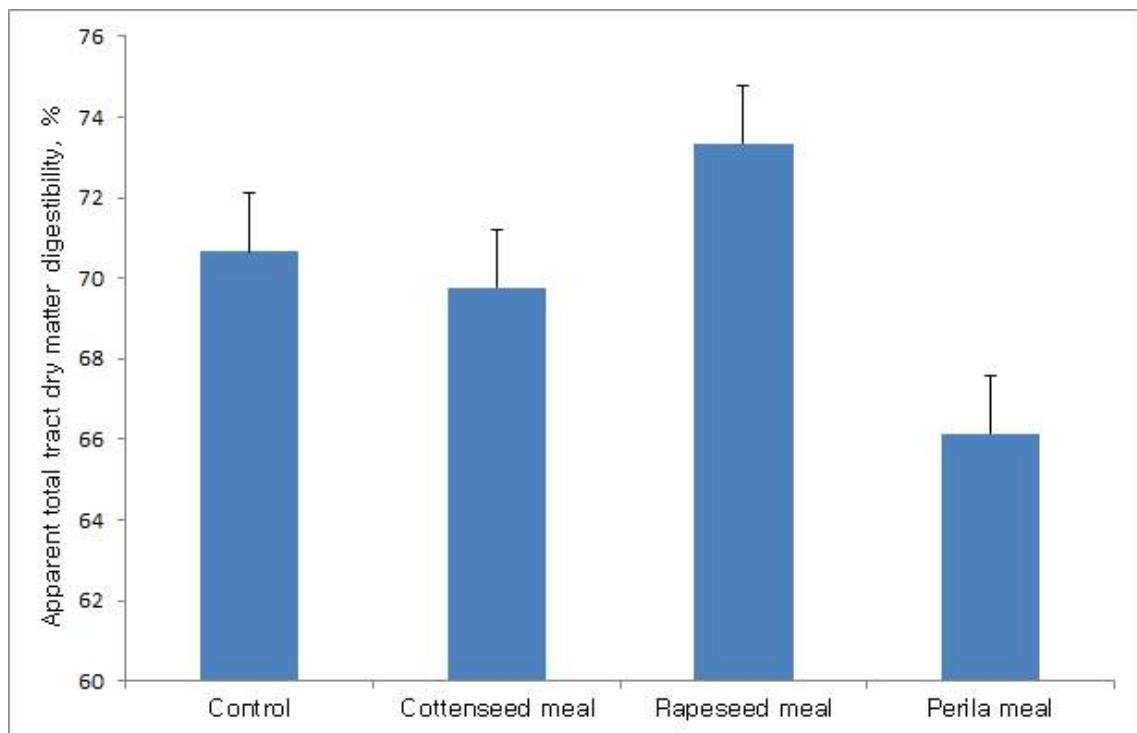


Figure 2-1. Apparent total tract dry matter digestibility.

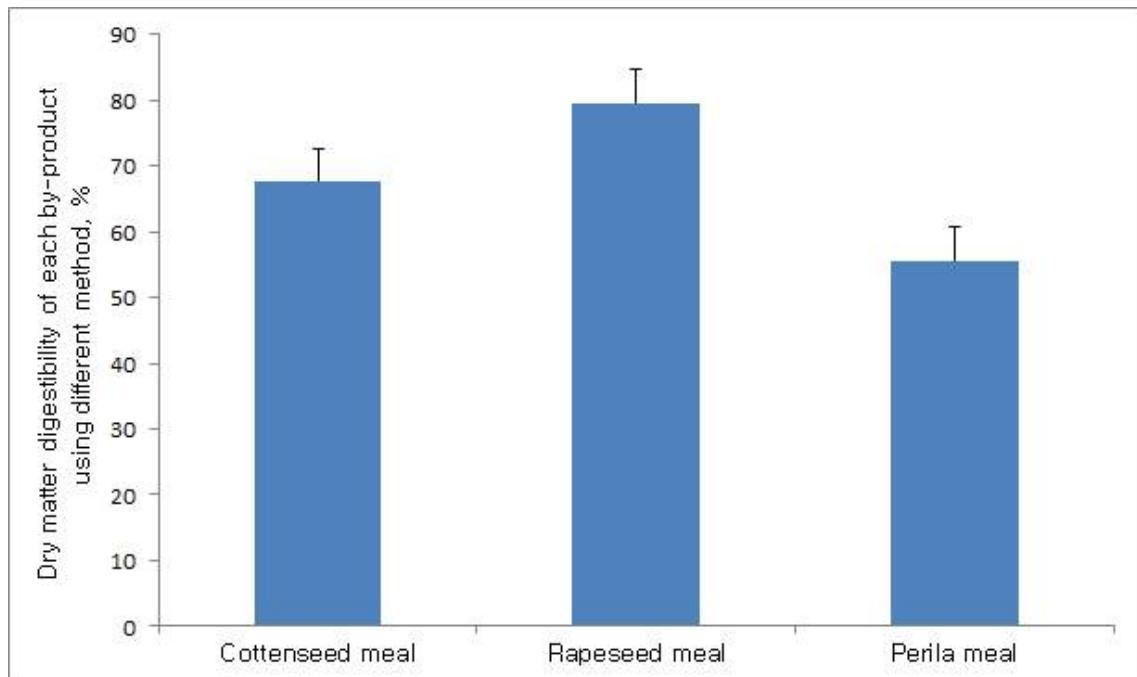


Figure 2-2. Dry matter digestibility of each by-product using different method.

Table 2-4. Apparent total Ca digestibility and estimation of digestibility of a each feedstuff by different method

Item	Treatment				SEM
	Control	Cottenseed meal	Rapeseed meal	Perilla meal	
Apparent total Ca digestibility of a feedstuff (%)	28.00	30.97	22.49	27.42	1.76
Digestibility of a feedstuff using by different method (%)	-	9.63	37.30	26.07	8.03

Table 2-5. Apparent total P digestibility and estimation of digestibility of a each feedstuff by different method

Item	Treatment				SEM
	Conrol	Cottenseed meal	Rapeseed meal	Perilla meal	
Apparent total P digestibility of a feedstuff (%)	32.75	40.16	40.52	36.86	1.81
Digestibility of a feedstuff using by different method (%)	-	58.56	57.43	46.43	3.88

Table 2-6. Apparent serum retinol and estimation of digestibility of a each feedstuff by different method

Item	treatment				SEM
	Control	Cottenseed meal	Rapeseed meal	Perrila meal	
Apparent serum retinol (IU/dL)	104.20	109.05	111.16	107.47	1.47
Serum retinol using by different method (IU/dL)	-	51.59	54.60	49.33	1.53

3. 칼슘과 인의 비율 조절을 통한 혈중 칼슘 인 농도 측정

가. 재료 및 방법

본 시험에는 반추위 누관이 장착된 거세한우 4두(체중: $559\pm25.3\text{kg}$)를 공시하고, 국립축산과학원 제 4한우사에서 *in vivo* 소화 시험을 실시하였다. 시험개시 전 일주일 동안 대사를 적응 기간을 두었고, 17일간 처리구 사료 별로 급여하였으며, 분샘플링은 4일동안 실시하였다. 사료의 건물 급여량은 한우가축사양표준 요구량표에 근거 0.8kg에서 60%만 급여하였다. 미강을 22.5%, 벗꽃25%를 급여하였고 배합사료는 석회석의 처리한 후 나머지 부분을 급여하였다. 전체 사료에 Ca:P의 처리비율은 T1(0.5:1), T2(1:1%), T3(1.5:1%), T3(2:1)로 급여하였으며, 실험디자인은 4×4 Latin square design으로 수행하였다. 매일 총 배분량의 10%를 수거하여 60°C 에서 72시간 건조한 후 2mm screen 이 장착된 Willey mill(Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, U.S.A.)로 분쇄한 후 DM, Ca, P 소화율을

측정하였다.

<Table 2-7> Ingredient composition and chemical composition of treatment feedstuff

	Treatment			
	Ca:P=0.5:1	Ca:P=1:1	Ca:P=1.5:1	Ca:P=2:1
Ingredients,%				
Ricestraw	25.00	25.00	25.00	25.00
Ricebran	22.55	22.50	22.50	22.50
Corn	25.10	24.41	23.69	22.93
Wheatbran	21.53	20.89	20.27	19.66
Soybeanmeal	2.63	2.55	2.47	2.40
Cottenseedmeal	1.05	1.02	0.99	0.96
Molasses	1.05	1.02	0.99	0.96
Limesone	0.79	2.31	3.79	5.30
Salt	0.21	0.20	0.20	0.20
Grobig-DC	0.11	0.10	0.10	0.10
Total	100	100	100	100
Chemicalcomposition,(%ofDrymatter)				
Moisture	8.5	8.4	8.2	8.1
CP	12.4	12.2	12.0	11.7
NDF	39.2	38.7	38.2	37.7
ADF	15.9	15.8	15.7	15.6
EE	7.4	7.4	7.3	7.2
Ca	0.5	1.1	1.6	2.1
P	1.1	1.1	1.1	1.1
Ash	8.6	8.5	8.4	8.3

나. 결과 및 고찰

DM소화율과 처리구별 Ca, P의 소화율은 Table 2-8에 제시하였다. DM 소화율은 전 처리구별로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 인 소화율에서는 T1처리구에서 가장 높은 수치를 나타냈지만(53.73%) 처리구별로는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Ca 소화율에서는 T1 처리구(6.1%)로 T4 처리구(49.48%)로 유의적인 차이를 나타내었으며($P<0.05$), 석회석 첨가비율이 높아짐에 따라서 Ca 소화율이 높아지는 결과가 나타났다.

Table. 2-8. In vivo apparent fecal dry matter, ca and p digestibility of treatment feedstuff

Treatment	DM	Ca	P
Ca:P = 0.5:1	66.64±4.55	6.21±4.68 ^B	53.73±6.28
Ca:P = 1:1	67.17±1.16	24.88±20.39 ^{AB}	45.05±11.25
Ca:P = 1.5:1	66.07±0.82	38.37±23.30 ^{AB}	39.82±14.62
Ca:P = 2:1	66.02±1.94	49.47±29.56 ^A	49.91±14.98

4. 칼슘과 인의 비율 및 비타민 결핍 사료 급여시 한우 거세우 생리 변화

가. 재료 및 방법

본 시험에는 국립축산과학원 축산생명환경부 제4우사에서 거세 한우 4두(체중: 343±22..34kg)를 공시하고, 국립축산과학원 제 4 한우사에서 *in vivo* 소화 시험을 실시하였습니다. 시험개시 전 35일 동안 대사를 적응 기간을 거치고 본 실험은 월령 17개월령부터 21개월령까지 3개월 동안 이루어졌습니다. 처리는 칼슘과 인의 비율을 역비로 배합된 사료에 비타민프리믹스를 급여하지 않았을 경우 한우 비육기에 나타나는 생리적 변화를 측정하고자 하였습니다. 사료 배합은 한우가축사양표준 프로그램을 이용하여 칼슘과 인 비율이 1:3 및 비타민 프리믹스를 넣지 않은 사료를 배합하여 평균 체중에 2%를 급여하였고 조농비율은 농후사료:85%, 조사료:15%로 급여하였습니다. 시료 샘플링은 21, 35, 63, 84, 105일에 실시하였습니다. 분석 항목으로는 체중, 사료 일반성분분석(건물, 조단백질, 조지방, NDF, ADF, 조회분, 열량), 일일 뇨량, 뇨 pH(9시, 11시, 1시 3시 5시), 요시험지붕 검사(잠혈, 빌리루빈, 우리빌리노겐, 케톤체, 단백질, 아질산염, 포도당, pH, 비중, 백혈구), 일반 혈액 분석(Complete Blood cell Count)을 실시하였습니다. 뇨와 혈액 분석을 통해서 칼슘과 인 비율 및 비타민 결핍시 한우 거세우에 생리적 변화를 확인하였고 반려견에서 간단하게 질병 진료에 이용되고 있는 요시험지붕 검사를 통하여 한우 거세우에서 생리변화 및 이상 징후를 확인하고자 하였습니다.

Table 2-9. Ingredients and nutrient content of diets (DM basis)

	Pre-period	Treatment	Rice straw
Ingredients,%			
Corn	40.65	32.31	-
Wheatbran	13.34	29.81	-
Soybeanmeal	9.82	3.07	-
Cottenseedmeal	4.16	3.53	-
Palm kernel meal	4.14	3.53	-
Corn gluten feed	20.74	23.87	-
Coconut meal	4.14	3.53	-
Limesone	1.77	-	-
Salt	0.48	0.35	-
Grobig-DC	0.23	-	-
Sodium bicarbonate	0.48	-	-
Chemical composition, %			
DM	10.40	10.63	9.87
CP	12.70	13.16	5.04
Ash	5.44	5.50	11.87
NDF	21.87	22.12	68.42
ADF	9.75	9.06	48.44
Ca	0.97	0.19	0.19
P	0.49	0.63	0.04
Ca/P ratio	1.9:1	1:3	
Vitamin	5만/IU	프리믹스 무첨가	
열량(cal/g)	3919.50	3926.00	

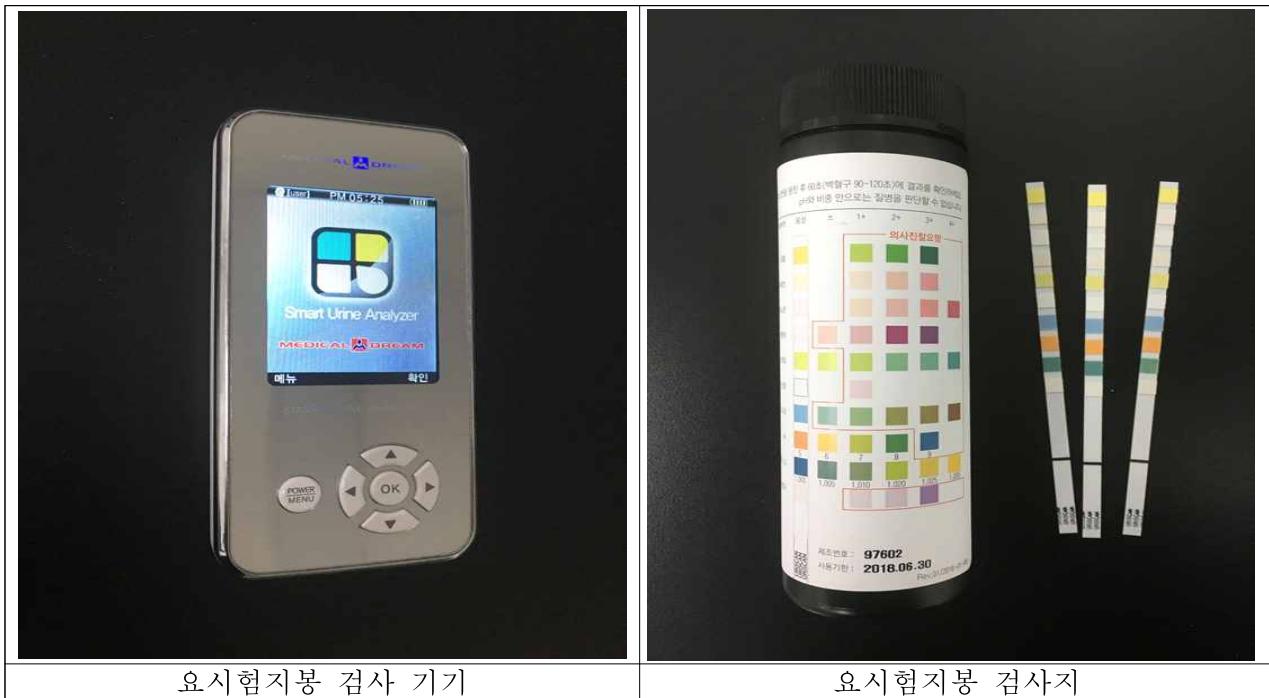


Table 2-10. Urine reagent strip test

성분	정상치	이상치	의심되는 질환
암혈	음성(-)	+1이상	신장 요로계의 염증이나 종양, 외상
밸리루빈	음성(-)	+1이상	담석증, 당도암, 급성간염, 만성간염, 간경변
우로밸리노 겐	음성(-), 약양성(+)	2E.U./dl 이상	간장애, 용혈성황달, 폐색성황달
케톤체	음성(-)	+1이상	중증당뇨병(당뇨병성), 절식(단식)
단백질	음성(-)	+1이상	신장염, 신증후군, 당뇨병, 교원병, 월슨(Wilson)병, 골수종 등
아질산염	음성(-)	양성(+)	신우신염, 방광염, 요도염
포도당	음성(-)	+1이상	당뇨병, 신성당뇨, 내분비질환, 췌장질환, 간경변, 뇌종양 등
pH(산성도)	4.5~8.5	4이하 9이상	당뇨병, 통풍, 신염, 공복, 탈수, 발열, 요로감염증, 과호흡
비중	1.015~1.025	1.010 이하 1.030 이상	신우신염, 방광염, 요도염
백혈구	음성(-)	+1이상	신장이나 비뇨생식계 이상, 사구체신염, 낭창성신염, 종양, 신경석

Table 2-11. Urine reagent strip analysis method

성분	분석 방법
잠혈	혈색소에 존재하는 가성과산화효소(pseudoperoxidase)가 시약의 과산화수소를 분해시켜 테트라메틸벤지딘(tetramethyl benzidine)을 산화시켜 발색 반응을 보임.
밸리루빈	밸리루빈이 디아조늄염(diazonium)과 반응하여 담갈색 내지 짙은 갈색 보임.
우로빌리노겐	우로빌리노겐이 디아조늄염(diazonium)과 반응하여 갈색을 보임.
케톤체	니트로프루시드(sodium nitroprusside)와 반응하여 연분홍색에서 자색으로 보임.
단백질	단백이 시험지봉의 테트라브로모페놀블루(tetrabromophenol blue)에 의해 일정 pH(pH 3.0)에서 펩티드의 전하와 만나면서 pH 지시제의 발색함.
아질산염	질산염(nitrate)이 세균에 의해 분해되어 아질산염으로 환원되어 분홍색 내지는 붉은색을 보임.
포도당	포도당산화효소(glucose oxidase)에 의해 과산화수소가 유리되고, 이 과산화수소가 요오드화칼륨(KI)과 반응하여 발색함.
pH(산성도)	pH에 따라 반응하는 지시약이 시약으로 있어 변색됨.
비중	요의 이온 농도에 따라 시험지봉의 반응부에 있는 중합전해질(polyelectrolyte)의 pKa 값의 변화가 지시약에 의해 변색됨.
백혈구	백혈구의 에스테르분해효소(esterase)가 피롤아미노산에스테르(pyrrol amino acid ester) 유도체를 분해하여 유리된 피롤(pyrrol)이 디아조늄염(diazonium)과 반응하여 발색 반응함.

나. 결과 및 고찰

칼슘과 인 비율 및 비타민 결핍시 한우 거세우에 생리적 변화를 관찰한 결과 일당증체량은 유의적 차이를 나타내지 않았으나 일당증체량이 실험기간에 35일까지는 수치적으로 증가하였고 이는 여름에서 가을로 넘어가는 시기에 실험을 실시하여 고온스트레스의 저감에 따른 것으로 사료되고 이후 일당증체량이 감소하였습니다(Table 2-12). 칼슘과 인 비율을 역비로 주고 비타민 A를 결핍시켰을 경우 요로결석이 와서 뇨량이 줄어들 것으로 예상하였으나 일일 뇨량을 측정해본 결과 개체 및 측정일에 따라서 큰 편차를 보였고 뇨 pH는 2시간 간격으로 측정한 결과 사료급여 전 뇨 pH가 높은 경향을 보였으며 이후 사료급여 4시간까지 서서히 감소하였다가 다시 회복하였습니다. 또한 뇨량이 감소함에 따라서 뇨 pH가 감소하는 것을 확인할 수 있었습니다(Table 2-13). 비육우에서 결석 성분은 인산마그네슘과 인산 암모늄이 대표적인 원인으로 나타나는데 이를 확인하기 위해 뇨 미네랄 분석을 실시한 결과 인 배출량이 Pre-period 보다 감소하는 것을 볼 수 있었습니다. 이는 시험사료를 배합할 때 비타민 미네랄 프리믹스를 제외하여 급여한 인에 함량이 감소한 결과로 보여집니다(Table 2-14) 칼슘과 인 비율 및 비타민 결핍시 현장에서 쉽게 생리적 현상 및 이상징후를 확인할 수

있는 요시험지봉검사를 실시한 결과 칼슘과 인 비율 및 비타민 결핍 사료를 섭취하는 기간이 증가함에 따라서 이상치를 보이는 횟수가 증가 및 뇨 비중이 증가하는 것을 확인할 수 있었습니다 뇨 비중은 1.03이상이면 의심되는 질환이 신우신염, 방광염 및 요도염이 있는데 105일에서는 실험축 4두 모두 1.03 이상에 수치를 보였습니다.(Table 2-15, 16) 일반 혈액 분석 결과 실험을 시작하면서 적혈구 수치가 증가하였지만 칼슘과 인 비율 및 비타민 결핍 사료를 섭취하는 기간 동안 감소하였습니다.(Table 2-17) 혈액 내 비타민 A의 농도는 Pre-period에서 103.4IU/dL 측정되었으며, 84일 지난 후에 혈중 비타민 A함량이 54.4 ± 8.07^b 으로 측정되었으며 Pre-period에 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).(Table 2-18)

Table 2-12. Changes in body weight and average daily gain

	Pre-period	21d	35d	63d	84d	105d
BW	372.5 ± 19.76	391.1 ± 19.43	404.5 ± 18.45	421.9 ± 18.84	437.9 ± 19.03	452.9 ± 20.26
ADG	0.84	0.89	0.96	0.62	0.76	0.75

Table 2-13. Effect of dietary Ca:P difference on the urine volume and urine pH of Korean native steer

Urine	Pre-period	21d	35d	63d	84d	105d
Volume(L)	12.2 ± 4.96	17.43 ± 9.38	17.03 ± 8.89	11.05 ± 1.23	16.52 ± 4.09	11.80 ± 4.07
pH (9h)	7.82	7.21	7.23	6.82	7.20	6.63
pH (11h)	6.98	7.50	7.22	6.84	7.52	6.36
pH (13h)	6.98	7.36	6.96	-	7.81	6.26
pH (15h)	7.25	7.14	7.35	6.96	7.84	6.44
pH (17h)	7.20	7.33	7.58	7.15	7.94	6.67
pH (mean)	7.24	7.31	7.27	6.94	7.66	6.47

Table 2-14. Effect of dietary Ca:P difference on the urine Ca, P, Na and Mg balance of Korean native steer

Urine	Pre-period	21d	35d	63d	84d	105d
Ca (mg/dl)	168.97	229.09	140.57	179.54	183.07	167.73
P (mg/dl)	896.47	734.15	610.11	746.91	697.06	684.69
Na(mg/dl)	643.62	345.05	255.26	414.64	338.32	336.08
Mg (mg/dl)	646.30	558.10	418.03	540.81	505.65	488.16
Ca (g/day)	1.49	2.01	1.24	1.58	1.61	1.47
P (g/day)	7.28	5.96	4.95	6.06	5.66	5.56
Na (g/day)	4.73	2.54	1.88	3.05	2.49	2.47
Mg (g/day)	4.94	4.27	3.20	4.14	3.87	3.73

Table 2-15. Results of urine reagent strip for each day

기간	개체	잠혈	빌리루빈	우로 빌리노젠	케톤체	단백질	아질산염	포도당	pH	비중	백혈구
0일	A	음성	음성	음성	음성	+	음성	음성	8	1.01	음성
	B	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	7	1.01	음성
	C	음성	음성	음성	음성	+-	음성	음성	6	1.005	음성
	D	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	7	1.01	음성
21일	A	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	8	1.01	음성
	B	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	7	1.01	음성
	C	음성	음성	음성	음성	음성	+	음성	7	1.01	음성
	D	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	7	1.01	음성
35일	A	음성	음성	음성	음성	+	음성	음성	7	1.01	음성
	B	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	7	1.02	음성
	C	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	7	1.02	음성
	D	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	6	1.01	음성
63일	A	음성	음성	음성	음성	+	음성	음성	8	1.01	음성
	B	음성	음성	음성	음성	+-	음성	음성	7	1.02	음성
	C	음성	음성	음성	음성	+-	음성	음성	6	1.005	음성
	D	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	6	1.02	음성
84일	A	음성	음성	음성	음성	+	음성	음성	7	1.02	+++
	B	음성	음성	음성	음성	++	음성	음성	7	1.02	+++
	C	음성	음성	음성	음성	음성	음성	+++	5	1.02	음성
	D	음성	음성	+	+-	++	음성	음성	7	1.03	음성
105일	A	음성	음성	음성	음성	++	+	음성	8	1.03	음성
	B	음성	음성	음성	음성	+-	음성	+-	8	1.03	음성
	C	음성	음성	음성	음성	음성	음성	+-	6	1.03	음성
	D	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	8	1.03	음성

Table 2-16. Results of urine reagent strip for diagnosis

기간	잡혈	빌리루빈	우로 빌리노젠	케톤체	단백질	아질산염	포도당	백혈구
0일	음성	음성	음성	음성	15	음성	음성	음성
21일	음성	음성	음성	음성	8	4	음성	음성
35일	음성	음성	2	4	8	음성	음성	음성
63일	음성	음성	1	음성	12	음성	음성	음성
84일	1	음성	2	1	13	음성	12	2
105일	1	음성	2	1	17	1	5	음성

Table 2-17. Least-squares treatment means for blood cell data ⁺

기간	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	PLT	MPV	PDW	PCT
0일	39.36	9.10	13.63	35.55	39.35	274.25	5.53	14.18	0.15
21일	49.77	9.75	15.18	42.20	43.40	333.50	5.43	14.63	0.18
35일	29.21	9.65	14.75	39.15	40.78	323.50	5.48	14.40	0.18
63일	30.78	9.71	14.98	40.68	42.00	317.25	5.45	14.40	0.17
84일	29.72	8.80	13.48	35.00	39.98	266.25	6.05	14.63	0.16
105일	34.16	8.38	13.25	34.10	41.13	278.75	6.00	14.63	0.17

⁺ WBC: 백혈구, RBC: 적혈구, HgB: 헤모글로빈, Hct: 혈마토크리트, MCV: 적혈구 평균 용적, PLT: 혈소판, MPV: 평균혈소판용적, PDW: 혈소판분포계수, PCT: 프로칼시토닌

Table 2-18. Effect of dietary Ca:P difference on the serum vitamin A of Korean native steer

	Pre-period	35d	84d
Concentration of Vitamin A (IU/dL)	103.4±34.56 ^a	78.0±9.53 ^a	54.4±8.07 ^b

Values (mean±SEM) in period different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

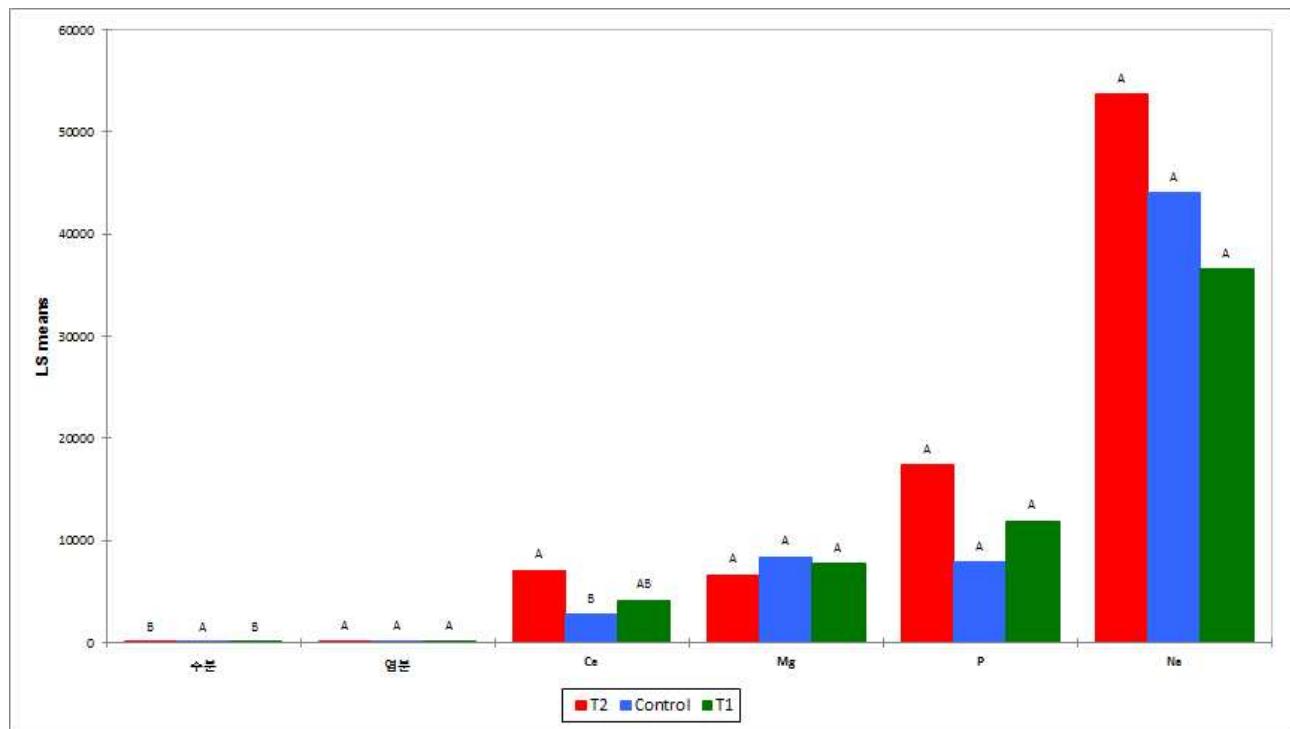
5. 영양수준별 혈액 및 뇌중 대사물질 농도 변화 추적을 통한 최적 조건 설정

가. 재료 및 방법

1세부과제에서 2차 사양시험 수행중인 시험축 중에서 오줌을 수집하여 Ca, P, Mg, Na을 각각 분석을 실시하였다. 본 실험의 통계 분석은 XLSTAT statistical software를 이용하여 각 처리간의 분산분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의수준 0.05에서 검정하였다.

Table 2-19. 영양수준별 혈액의 뇌중 광물질 농도 측정 결과

	Ca	Mg	P	Na
control	0.27±0.18	0.84±0.38	0.79±0.97	4.40±2.03
T1	0.42±0.43	0.78±0.84	1.19±1.98	3.66±1.54
T2	0.71±0.42	0.66±0.84	1.74±1.85	5.37±2.25



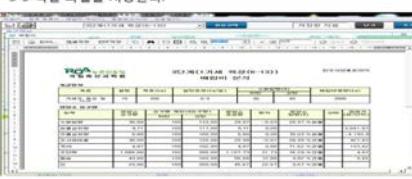
6. 자가배합사료 제조 한우농가용 광물질 검증 프로그램

가. 배경

해당 프로그램은 농가가 이해하기 쉽도록 사료원료에 함유하고 있는 β -carotene을 비타민 A IU단위로 변경해주고, 내가 만든 사료의 전체 비타민 함량을 예측 할 수 있다.

β -carotene은 붉은색, 노란색, 푸른색 등을 나타내는 색소로서 색깔이 있는 식물에 풍부하게 존재한다. β -carotene은 비타민 A의 전구물이며 α 및 γ -carotene도 존재하지만 비타민 A 활성도는 β -carotene이 가장 높다. 비타민 A 활성도 단위를 표현하는데 여러 가지 방법이 사용되는데, 1 IU(international unit)는 0.3 μg retinol 및 0.6 μg β -carotene을 의미한다. ‘한우 거세우에 있어서 vitamin A 제한 급여가 고급육 생산에 미치는 영향’ 연구 결과 비타민 제한 기술의 핵심은 원료 사료의 carotene까지 고려 해야 된다. 하지만 농가에서 직접 원료사료의 carotene를 찾고 직접 비타민 A IU 단위로 직접 계산하는 것이 어렵기 때문에 프로그램을 개발하게 되었다.

나. 사용설명서

1. 해당 프로그램을 다운로드 및 실행 <ul style="list-style-type: none"> 1-1 국립축산과학원 홈페이지(nias.go.kr) 접속 1-2 최하단에 농가활용 프로그램 클릭 1-3 한우사양표준 2015 배합프로그램 클릭 1-4 불임 파일에 비타민 A 확인프로그램 다운로드 	2. 프로그램 실행 <ul style="list-style-type: none"> 2-1 해당 액셀 파일을 실행한다. 2-2 ‘입력’ 시트에 나와 있는 설명서 읽어본다. 2-3 농장에서 이용하는 비타민 A 첨가제 성분을 입력한다. # 원료 사료에 Carotin 함량을 넣으면 비타민 A로 변환해준다. 
3. 한우사양표준 배합비프로그램에서 배합비를 엑셀로 다운로드 <ul style="list-style-type: none"> 3-1 프린트 버튼을 누른다. 3-2 엑셀로 저장 버튼을 누른다. 3-3 엑셀 파일을 저장한다. 	4. 배합비 불러오기 <ul style="list-style-type: none"> 4-1 콘텐츠 사용을 클릭한다. 4-2 한우사양표준 배합비 불러오기를 클릭한다. 4-3 저장한 배합비 프로그램을 클릭한다. 4-4 저장한 배합비(엑셀)를 클릭한다. 
5. 배합비 확인 <ul style="list-style-type: none"> 5-1 ‘보고서라는 시트가 생긴다. 5-2 보고서 시트에서 내가 불러온 배합비를 확인한다. 5-3 결과보고서를 확인한다. 	6. 결과보고서 확인 <ul style="list-style-type: none"> 6-1 결과 보고서 시트를 클릭한다. 6-2 시트에 배합비와 비타민 A 확인 결과 표를 확인한다. 6-3 시트에 신 비워돈기준구성되고 사양 단계에 따라 확인한다. 6-4 부록 한 부분은 노란색으로 표시되고 과잉은 빨간색으로 표시된다. 

제3절 한우에 농식품 부산물 급여시 최적 비타민 A 및 광물질 급여 기준 설정 연구

1. 연구 수행 내용

<연구 1. 사료원료별 β -carotene 함량 기초 자료 및 동물 체내 vitamin A 합성 능력 조사>

실험 1. 사료원료 별 β -carotene 함량 조사

사료내 β -carotene 함량 분석방법

▶ HPLC [high performance liquid chromatography]를 통한 사료원료 별 β -carotene 함량 분석

- 표준용액 준비

- Ⓐ 베타카로틴(C40H56, MW: 536.87, CAS No.: 7235-40-7)을 25mg을 정밀히 취하여 갈색 유리병에 넣음
- Ⓑ 사이클로헥산을 이용하여 완전히 녹임(50um/mL)
- Ⓒ 에탄올로 단계적으로 희석하여 표준용액으로 함(8.0 – 0.3125um/mL)

- 시험용액 준비

- Ⓓ 원재료를 적당한 크기로 자른 후, 분쇄기에 넣어 1차 분쇄작업을 실시 함
- Ⓔ 체망(체눈 크기: 3.35, 2.0, 1.0mm)을 이용하여 체눈 크기 1.0mm 이하의 분쇄물을 선별 작업 함
- Ⓕ 동결건조를 24시간동안 실시하여 건조물의 양을 산출 함
- Ⓖ 건조물에 3% 피로갈률 에탄올 용액 10mL과 60% 수산화칼륨 용액 1mL을 가한 후, 균질 기를 이용하여 2차 분쇄작업을 실시 함
- Ⓗ 3% 피로갈률 에탄올 용액 10mL과 60% 수산화칼륨 용액 1mL을 가하여 70°C 수욕 중에 30분간 진탕하며 비누화(saponification) 함
- Ⓘ 이를 흐르는 물에 냉각하고 1%염화나트륨 용액 22.5mL을 가한 후 헥산·초산에틸(9:1) 혼합용액을 15ml 가하여 10분간 진탕 함
- Ⓙ 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층을 갈색플라스크로 옮김
- Ⓕ 하층에 헥산·초산에틸(9:1) 15mL을 가하여 2회 반복 추출하여 상층액을 합함
- Ⓗ 감압농축 후, 에탄올 50mL에 녹임
- Ⓘ 여과필터(0.22 um; Merck Millipore Ltd., IRL)에 통과 시킨 시험용액을 본 실험에 사용 함

Table 3-4. 액체크로마토그래피(Liquid chromatography) 조건

Items	Condition
Injection volume	20uL
Detector wavelength	450um
Mobile phase	A solvent: acetonitrile : methanol(85:15), B solvent: dichloromethane
Solvent condition	A solvent(70%), B solvent(30%)
Flow rate	1.0mL/min

□ 실험 2. 혈중 Vitamin A 분석 방법 확립

○ 한우의 혈중 내 비타민 A 함량 조사

- 혈액 샘플 준비

- Ⓐ 한우의 경정맥에서 혈액을 채취하여 빛이 차단된 혈청튜브에 보관
 Ⓣ 3500rpm에서 15min간 원심분리 후 상층액을 갈색튜브에 넣어 -80°C에서 분석 전까지 보관

- 내부 표준용액 준비

- Ⓐ Stock solution: Retinyl acetate (R7882, Sigma) 100mg를 취하여 0.04% BHT-EtOH 용액에 넣어 최종 농도가 1mg/ml이 되도록 녹임.
 Ⓣ Working solution A (25μg/ml): 25ml stock solution + 975ml 0.04% BHT-EtOH
 Ⓤ Working solution B (10μg/ml): 10ml stock solution + 990ml 0.04% BHT-EtOH
 Ⓥ Working Internal Standard Solution (1ug/ml): 20ml Sol A + 480ml 0.04% BHT-EtOH

- 표준용액 준비

- Ⓐ Retinoic acid (R7632, Sigma) 25mg을 취하여 0.04% BHT-EtOH 용액에 넣어 최종 농도가 100ug/0.9ml이 되도록 녹임.
 Ⓣ 아래의 방법으로 최종농도 0.05μg/ml까지 희석하여 표준용액 제조

Table 3-5. 표준용액 제조 방법

STD	농도 (μg/ml)	표준용액	0.04% BHT-EtOH	Solution B
Stock sol	100	450μl of stock sol	:	:
:	:	:	:	:
STD 1	12.5	450 μl of STD 0	450 μl	100 μl
STD 2	6.25	450 μl of STD 1	450 μl	100 μl
STD 3	3.13	450 μl of STD 2	450 μl	100 μl
STD 4	1.56	450 μl of STD 3	450 μl	100 μl
STD 5	0.78	450 μl of STD 4	450 μl	100 μl
STD 6	0.39	450 μl of STD 5	450 μl	100 μl
STD 7	0.20	450 μl of STD 6	450 μl	100 μl
STD 8	0.10	450 μl of STD 7	450 μl	100 μl
STD 9	0.05	450 μl of STD 8	450 μl	100 μl

- 혈중 비타민 A 분석법

* 비타민 산화를 방지하기 위해 어두운 곳 또는 노란색/ 빨간색 등이 있는 곳에서 추출 과정을 수행.

- Ⓐ 2ml micro tube에 혈청 200 μ l와 내부 표준용액 20 μ l 첨가
- Ⓑ DIW 200 μ l와 0.04% BHT-EtOH 400 μ l를 추가적으로 넣은 후 강하게 voltexing.
- Ⓒ 0.04% BHT-Hexane 800 μ l 첨가하여 강하게 voltexing
- Ⓓ 3500g, 4°C, 10min간 원심 분리
- Ⓔ 2ml amber tube에 상층액 700 μ l를 옮기고 N2를 이용하여 증발
- Ⓕ 완전히 증발시킨 후 95% 메탄올 500 μ l을 사용하여 녹임.
- Ⓖ Filtration 및 GC amber vial로 옮겨 측정

Table 3-6. HPLC 조건

Items	Condition
Equipment	Agilent 1100 series
Column	Stainless steel Novapak C18 (3.9mm ID x 150mm); reverse phase
Injection volume	20 μ l
Detector wavelength	325 nm
Mobile phase	methanol : DIW (95:5)
Flow rate	1.0 ml/min
Column temperature	20°C

실험 3. 사료 유래의 β -carotene 동물 체내 vitamin A 합성 능력 평가 (축산과학원과 공동연구)

- 연구 목적 : 사료 유래의 β -carotene 함유 원료사료 급여 후 혈중 vitamin A 함량이 시기에 따라 어떻게 변화하는지 분석
- 경경맥 카테터 설치 한우 4두 공시(축산과학원 자료 참조)
- 분석항목 : β -carotene 함유 원료사료 급여 후 혈중 vitamin A 함량 조사(실험 1의 방법과 동일)

<연구 2. *In vitro* 실험을 통한 vitamin A가 지방분화에 미치는 영향 조사>

- 실험 1. 소섬유아세포 (BEFS)의 근육과 지방분화에 있어 9-*cis*-RA 처리가 미치는 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량 조사

- 연구 목적: 10 μ M 9-*cis*-RA를 BEFS-PPAR γ 2와 BEFS-MyoD 세포에 처리하였을 때, 분화시기에 따른 선행연구에서 발굴한 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량을 조사하고자

함

- 이용 세포: BEFS-PPAR γ 2와 BEFS-MyoD 세포
- 조사 내용: 분화시기 (분화 전, 분화 초기와 분화 후기)에 따른 혈중 vitamin A 조절 유전자 (Complement factor B, Gelsolin a)와 선정 유전자 (HSPB1)의 발현량 조사
- 조사 항목
 - 9-*cis*-RA 처리 전, 후 분화마커 유전자의 발현량 조사
 - 9-*cis*-RA 처리 전, 후 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량 조사
- 세포 배양 방법
 - BEFS-MyoD 배양 방법
 - ⓐ Cell seeding: 6-well plate 기준으로 well당 0.3 or 0.5 \times 10⁴ 수준
 - ⓑ 성장배지 조성: DMEM (high glucose), 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), 1% L-glutamine
 - ⓒ 분화배지 조성: DMEM (high glucose), 1% P/S, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 2% horse serum, 10 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml doxycycline
 - ⓓ 분화유도 방법: 세포가 100% confluent 후(0 d) 분화배지로 교체하여 6일간 배양. 배지는 2일 간격으로 교체.
 - BEFS-PPAR γ 2 배양 방법
 - ⓐ Cell seeding: 6-well plate 기준으로 well당 0.3 or 0.5 \times 10⁴ 수준
 - ⓑ 성장배지 조성: DMEM (high glucose), 10% FBS, 1% P/S, 1% L-glutamine
 - ⓓ 초기분화배지 조성: DMEM (high glucose), 10% FBS, 1% P/S, 1% L-glutamine, 1 μ g/ml insulin, 0.5 mM IBMX, 1 μ M dexamethasone
 - ⓔ 분화배지 조성: DMEM (high glucose), 10% FBS, 1% P/S, 1% L-glutamine, 1 μ g/ml insulin
 - ⓕ 분화유도 방법: 세포가 100% confluent 후(0 d) 초기 분화배지로 교체가하여 48 h 배양 (2 d), 48 h 이후 분화배지로 교체하여 분화유도. 배지는 2일 간격으로 교체하여 16일까지 배양

□ 실험 2. BEFS-MyoD의 지방분화유도에 있어 9-*cis*-RA와 adipogenic mixture 처리가 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량 조사

- 연구 목적: 10 μ M 9-*cis*-RA와 adipogenic mixture를 활용한 BEFS-MyoD 세포의 지방분화유도를 하였을 때, 분화시기에 따른 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량을 조사하고자 함
- 이용 세포: BEFS-MyoD 세포
- 조사 내용: 분화시기 (분화 전, 분화 초기와 분화 후기)에 따른 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량 조사
- 조사 항목
 - Doxycycline, Troglitazone, 9-*cis*-RA와 adipogenic mixture 처리 전, 후 혈중 vitamin

A 조절 유전자 (Complement factor B, Gelsolin a)와 선정 유전자 (HSPB1)의 발현량 조사

○ 세포 배양 방법

- BEFS-MyoD 배양 방법

ⓐ Cell seeding: 6-well plate 기준으로 well 당 0.3 or 0.5×10^4 수준

ⓑ 초기분화배지 조성: DMEM (high glucose), 10% FBS, 1% P/S, 1% L-glutamine, 1 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml doxycycline, 0.5 mM IBMX, 1 μ M dexamethasone, 2 μ g/ml troglitazone, 10 μ M sodium acetate, 1x lipid mixture, 10 μ M 9-cis-RA

ⓒ 분화배지 조성: DMEM (high glucose), 10% FBS, 1% P/S, 1% L-glutamine, 1 μ g/ml insulin, 1 μ g/ml doxycycline, 2 μ g/ml troglitazone, 10 μ M sodium acetate, 1x lipid mixture

ⓓ 분화유도 방법 : 세포가 100% confluent 후(0 d) 초기 분화배지로 교체하여 72 h 배양 (3 d), 72 h 이후 분화배지로 교체하여 분화유도. 배지는 2일 간격으로 교체하여 16일까지 배양.

○ 실험 설계: 표 7과 같이 처리함

Table 3-7. Treatments of BEFS-MyoD

Item	Con+	Con-	T1	T2	T3	T4	T5
Doxycycline	+	-	+	+	-	-	-
Troglitazone	-	-	+	+	+	-	+
9-cis-RA	-	-	-	+	+	+	-
Lipid mixture	+	-	+	+	+	+	+

연구 3. 한우거세우의 ADH1C 유전자형 조사연구

○ 연구 목적 : 국내 거세한우의 Vit A제한과 유전적관련성조사를 위한 기초자료

○ 조사 두수 : 총 17두의 거세 한우에서 조사

○ 조사 항목 : 도체 성적, 혈중 Vitamin A 농도, ADH1c 유전자 type 분석

- PCR-RFLP (polymorphism chain reaction-restriction fragment length polymorphism)를 이용한 한우 ADH(alcohol dehydrogenase)1C 유전자의 유전자 type 분석(연구 2 분석 방법 동일)

[ADH1c Genotyping 분석 방법]

가. DNA extraction

1) Cell lysis step

가) 150ul 전혈을 1.5 tube에 넣고 450ul RBC Lysis soution 첨가.

나) voltexing 후 상온에서 5분간 방치.

다) 10000g 1min 조건하에서 centrifuge.

라) pellet을 제외한 상층액을 제거.

- 마) tube vortex.
- 바) 150ul Cell Lysis Solution을 tube에 첨가 후 Pipetting
- 2) protein separate step
- 가) 상온에서 sample를 석힌 후 300ul PPT buffer를 tube에 첨가 후 vortex
- 나) 14500g 4min centrifuge.
- 3) DNA purification
- 가) 300ul의 상층액을 새 1.5ml tube 첨가 후 300ul 100% Isopropanol을 넣은 후 Invert.
- 나) 14,500g 4min centrifuge
- 다) 상층액을 버리고 휴지로 닦음.
- 라) 1ml의 70% Ethanol 첨가 후 invert.
- 마) 14500g 4min centrifuge.
- 바) 상층액을 버리고 휴지로 닦음
- 사) 공기중에서 10~15 min 건조.
- 아) 50~150ul DNA Rehydration Buffer를 첨가.
- 자) 65도에서 30~60 min 방치 또는 4도에서 overnight culture.

나. Target gene amplification

1) PCR 준비

- 가) 다음 그림의 구성성분으로 각각의 PCR mixture 제조

조성물	용량
Taq-mixture	15ul
Primer (10pmol/ul)	1ul
Genomuc dna(100ng)	2ul
D.W	12ul
Total	30ul

※ADH1C target primer

Gene	Primer sequence	Product size	Genbank Accessing NO.
ADH1C	F - CAGGGCTTAAAGATCCCAGA R - TAGCCAATGCTTGTCTCTCG	250bp	NC007304.4

- 나) 다음 그림의 조건으로 PCR 설정 후 run.

Reaction	시간	cycles
Pre-denaturation(95°C)	5min	35cycles
Denaturation(95°C)	30sec	
Annealing(55°C)	30sec	
Extension(72°C)	30sec	
Final extension(72°C)	5min	

다) DNA 증폭 확인

(1) Gel 제조

(가) 다음 그림의 조성으로 gel solution 제조 후 microwave 5분 후 plate 제조

조성물	용량
1x TBE buffer	150ml
agarose	3g
Eco Dye DNA Staing solution	15ul

(2) DNA gel loading

(가) 100v 90min 전기영동 후 확인.

다. ADH1C type 확인

1) 다음 그림의 구성성분으로 각각의 PCR-RFLP mixture 제조 후 Incubate 55°C 3h.

조성물	용량
PCR product	5ul
Restriction enzyme	1.5U = 0.15ul
Restriction enzyme buffer	1ul
D.W	3.85
Total	10ul

※Restriction enzyme : BsII (CCNNNNNN ↓ NNGG, 55°C)

2) DNA Type 확인

(1) Gel 제조

(가) 다음 그림의 조성으로 gel solution 제조 후 microwave 5분 후 plate 제조

조성물	용량
1x TBE buffer	150ml
agarose	3g
Eco Dye DNA Staing solution	15ul

(2) DNA gel loading

(가) 100v 90min 전기 영동 후 확인.

연구 4. 한우에 있어서 ADH 유전자 type의 vitamin A 제한에 의한 marbling 생산에 미치는 상관성 조사

- 연구목적 : 한우 거세우에 있어서 vitamin A 제한시 유전자형 및 marbling에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시
- 공시동물: 한우거세우 총 136두
- 조사항목:
 - 도체 분석: 30개월령 도축 (Quality grade, Yield grade, Backfat thickness, Longissimus dorsi area 등)
 - PCR-RFLP (polymorphism chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 를 이용한 한우 ADH (alcohol dehydrogenase) 유전자의 SNP 조사
 - Vitamin A제한시 ADH유전자 와 marbling 생산 상관성 조사

연구 5. 한우 거세우에 있어서 vitamin A 제한 급여가 고급육 생산에 미치는 영향

- 연구목적 : 한우 거세우에 있어서 vitamin A 제한 급여(premix 조절)가 한우고급육 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시
- 공시동물 : 한우 거세우 15개월령 60두
- Vitamin A 급여 수준 : High, Medium and Low 각 20두/group
- 실험 design

Table 3-8. Experiment design

Treatment	C (21 heads)	T1 (21 heads)	T2 (19 heads)
Vitamin A concentration ((IU/g)	High	Medium	Low
Total	8.89 IU/g Feed	3.89 IU/g Feed	0.89 IU/g Feed
Premix	8 IU/g Premix	3 IU/g Premix	0 IU/g Premix

Table 3-9. Experiment strategy

Treatment	~ 14개월령	15~23개월령	24~출하
High	0.1% Premix 1	0.1% Premix 1	0.1% Premix 1
Medium	0.1% Premix 1	0.1% Premix 2	0.1% Premix 1
Low	0.1% Premix 1	0.1% Premix 3	0.1% Premix 1

Premix 1: Vit A 8,000,000 IU/kg

Premix 2: Vit A 3,000,000 IU/kg

Premix 3: Vit A 0 IU/kg

Table 3-10. Types of vitamin premix using the experiment

구분	단위	Premix 1	Premix 2	Premix 3
Vitamin A	IU/Kg	8,000,000	3,000,000	0
Vitamin D	IU/Kg	750,000	750,000	750,000
Vitamin E	IU/Kg	40,000	40,000	40,000

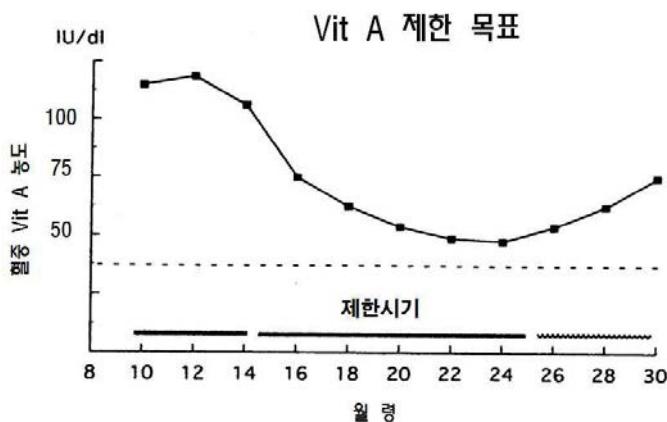


Figure 3-3. Strategy of vitamin A restriction

- Vitamin A제한기간 : 15~24 개월령까지 (9개월간)

- 조사항목 :

- 체중 측정: 2달 1회 측정 (15-24개월령까지 월 측정)
- 혈중 vitamin A 및 MPT 조사 (15-24개월령까지 매월 채혈)
- 유전자형 검사: ADH genotype 1C에 따라 군분리 실시
- 도체 분석: 30개월 령 도축 (Quality grade, Yield grade, Backfat thickness, Longissimus dorsi area 등)
- 혈중 Vitamin A 분석법
 1. 2ml micro tube에 혈청 200μl와 내부 표준용액 20μl 첨가
 2. DW 200μl와 0.04% BHT-EtOH 400μl를 추가적으로 넣은 후 강하게 voltexing.
 3. 0.04% BHT-Hexane 800μl 첨가하여 강하게 voltexing
 4. 3500g, 4°C, 10분간 원심 분리
 5. 2ml amber tube에 상층액 700μl를 옮기고 N₂를 이용하여 증발
 6. 완전히 증발시킨 후 95% 메탄올 500μl을 사용하여 녹임.
 7. Filtration 및 GC amber vial로 옮겨 측정

Table 3-11. HPLC condition for analysis of serum vitamin A

Items	Condition
Equipment	Agilent 1100 series
Column	Stainless steel Novapak C18 (3.9mm ID x 150mm); reverse phase
Injection volume	20 μ l
Detector wavelength	325 nm
Mobile phase	methanol : DIW (95:5)
Flow rate	1.0 ml/min
Column temperature	20°C

- 혈중 대사산물은 Biochemical analyzer (Diamond Diagnostics)를 이용하여 분석함

연구 6. 한우 거세우에 있어서 사료원료 내의 Vitamin A 제한 급여가 고급육 생산에 미치는 영향

- 연구목적 : 본 연구는 한우 거세우에 있어서 사료원료 자체에서 vitamin A 전구물질인 carotenoid를 분석하여 급여사료의 vitamin A 함량을 제한시켜 고급육 생산에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 실험을 실시
- 공시 동물: 한우 거세우 11개월령 30두
- 시험 장소: 건국대학교 부속목장
- 실험 design
 - 대조구 (C) : 사료중 carotenoid 및 vitamin A premix 제한하지 않은 사료 급여
 - 처리1 (T1) : 사료중 carotenoid 제한 및 vitamin A premix 무첨가
 - 처리2 (T2) : 대조구 사료에 vitamin A premix 무첨가

Table 3-12. Experiment design

Treatment	C (10 heads)	T1 (10 heads)	T2 (10 heads)
Vitamin concentration (IU/g)			
Total feed	8.9 IU/g Feed	0.77IU/g feed	0.9 IU/g Feed
Premix	8 IU/g Premix	0 IU/g Premix	0 IU/g Premix

C: High vitamin A level in experiment feed

T1: Restriction of carotenoid in feed and vitamin A premix free

T2: Vitamin A premix free

- Vitamin A제한기간: 16~24개월령까지 (8개월간)
- 분석 항목
 - 체중 측정: 2달 1회 측정 (16~24개월령까지 매월 측정)
 - 혈중 vitamin A 및 MPT, CBC조사 (16~24개월령까지 매월 채혈)
 - 유전자형 검사: ADH 1c genotype

- 지방조직에서 지방합성 관련된 유전자 검사 (PPAR γ 2, aP2등)
- 도체 분석: 30개월령 도축 (Quality grade, Yield grade, Backfat thickness, Longissimus dorsi area 등)
- 지방조직에 RNA 추출
 1. 0.1g 조직/1 ml Trizol로 첨가하여, homogenizing 후에 -80도에 저장
 2. 실험 시작할 때 샘플을 ice에 녹아서 12,000 g, 10 min, 4°C 원심분리
 3. 상층액을 새튜브에 옮김
 4. 200 ul chloroform을 넣고 vortexing 후에 상온에서 2분간 배양
 5. 12,000 g, 15 min, 4°C 원심분리, 상층액을 500 ul를 새튜브에 옮김
 6. 500 ul Isopropanol을 놓고 vortexing 후 상온에서 10분간 배양
 7. 12,000 g, 10 min, 4°C 원심분리하고, isopropanol을 제거
 8. 75% EtOH로 RNA pellet을 washing하고 12,000 g, 10 min, 4°C 원심분리
 9. EtOH를 제거하고 100% EtOH로 RNA pellet을 washing하고, 12,000 g, 10 min, 4°C 원심분리
 10. EtOH를 제거하고 pellet을 15분간 진공건조한 후 30 ul Rnase free water로 녹임
 11. 60°C에서 10분간 배양하고 nanodrop으로 RNA 농도와 quality를 측정
- cDNA 합성 및 qRT-PCR
 1. cDNA synthesis kit(Bio-rad)와 RNA(1 μ g)으로 cDNA를 합성
 2. cDNA(50 ng) 2.5 μ l, iQTM SYBR® Green Supermix(Bio-Rad) 10 μ l, 10pmol forward 및 reverse primer 0.6 μ l, Rnase free water 6.3 ul 총 reaction volume 20 μ l로 BIO-RAD CFX Connect® Real-Time System에서 qRT-PCR 수행
 3. 95°C 3min 후 95°C 10s, 60°C 30s, 72°C 30s에서 40-cycles 수행
 4. $\Delta\Delta CT$ 방법으로 상대 비교하였으며 β -actin으로 normalization

연구 7. Vitamin A 결핍조기 진단을 위한 생리지표 발굴

- 연구 목적: 체내 vitamin A 결핍증상 모니터링을 위한 생리지표 발굴
- 공시 동물: 91두의 한우 거세우
- 조사 내용: 혈중 vitamin A 결핍 수준과 대사산물과의 상관성 조사
- 조사 항목: Serum vitamin A, Glucose, Albumin, Urea nitrogen, Mg 등 15개 항목
- 분석 방법
 - 혈중 Vitamin A 분석법
 1. 2ml micro tube에 혈청 200 μ l와 내부 표준용액 20 μ l 첨가
 2. DIW 200 μ l와 0.04% BHT-EtOH 400 μ l를 추가적으로 넣은 후 강하게 vortexing.
 3. 0.04% BHT-Hexane 800 μ l 첨가하여 강하게 vortexing
 4. 3500g, 4°C, 10분간 원심 분리
 5. 2ml amber tube에 상층액 700 μ l를 옮기고 N₂를 이용하여 증발
 6. 완전히 증발시킨 후 95% 메탄올 500 μ l을 사용하여 녹임

7. Filtration 및 GC amber vial로 옮겨 측정

Table 3-13. HPLC condition for analysis of serum vitamin A

Items	Condition
Equipment	Agilent 1100 series
Column	Stainless steel Novapak C18 (3.9mm ID x 150mm); reverse phase
Injection volume	20 μ l
Detector wavelength	325 nm
Mobile phase	methanol : DIW (95:5)
Flow rate	1.0 ml/min
Column temperature	20°C

- 혈중 대사산물은 Biochemical analyzer (Diamond Diagnostics)를 이용하여 분석함

연구 8. Vitamin A 결핍으로 인한 요석증 예방용 첨가제 개발

- 연구목적: 한우 계세우에 있어서 vitamin A 제한시 뇌결석증 유발을 예방하기 위하여 관련 제품 및 자료를 토대로 선정된 물질을 검증하기 위하여 奥村亮子 (2006)의 방법으로 in vitro 실험을 실시하고 이를 근거로 in vivo 실험 진행하였음

<In vitro 실험>

- 실험 방법: 30개월령 뇌결석 의심 거세한우의 뇌를 이용하여 뇌결석 분해 후보 물질 처리한후 뇨중 free Mg 와 IP 측정함으로 뇌결석 치료를 검증함

Table 3-14. 뇌결석 후보 물질 목록

품 목	함유물 및 함량	근거자료
참가시나무 진액	함량; 2.4 kg 일 3.0 L 물	奥村亮子, 2006 논문 참조 우로지로가시 액기 스 제품중 성분
Vit.A	8,000,000 IU	
Vit.D3	750,000 IU	키톤, 크리아스톤 산 제품중 성분
CaCO3	1 kg	

- 분석 방법:

<뇨중 결석 분해정도 조사방법>

1. 奥村亮子 (2006)의 논문 및 트리아스톤산 약품 (일본 약품)조제법을 참고하여 함량비율에 따라서 PMBX 시약 (요석증 예방 복합제)을 조제한다.
2. 각 처리군에 15ml tube에 5 ml 오줌 및 PMBX 시약 800 μ l 첨가
3. 37 °C에 30min동안 incubation한다.

4. 녹십자에 의뢰하여 뇨중 Mg 와 IP 측정한다.

<첨가량 산출 근거>

-Urine : Cow 5.8~54.7L/day, 중간수치 25L/day.(K.betteridge, 2013)

-참가시나무 진액 투여: 100kg 당10~20g/day→100kg당 10~20ml/day

-오줌에 첨가량 (체중 500kg 경우): 참가시나무 20ml / 100kg 체중 or 5L 오줌→ 참가시나무 20ul / 5 ml 오줌

- 첨가제 형태 급여량: 1 회 10~15g / 100kg 체중

○ 실험 설계:

Table 3-15. In vitro 실험 설계

Item	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Urine	x	5ml						
DW	5ml	o	x	o	x	o	x	o
Trichloroacetic acid	x	x	x	o	o	o	o	o
참가시나무 추출액	o	x	o	x	o	x	o	x
Vit A + Vit D3	x	x	x	x	x	o	o	o
CaCO3	x	x	x	x	x	x	x	o

* 5 % Trichloroacetic acid(TA) (0.25g 넣음) 참고논문: (奥村亮子,2006) → 5 % トリクロル酢酸

<In vivo 실험>

○ 실험 방법: in vitro실험을 통하여 선정된 후보물질을 실제 요석증 의심 거세한우에 급여하여 뇨중 IP와 Mg 농도를 측정함

○ 실험동물: 29개월령 한우 8마리

○ 실험방법: In vitro실험에서 선정된 T3 검증

- 참가시나무 첨가제 조제 (70 g 참가시나무 추출액 + 400 g 부형제/1 마리 1일)



부형제 (단독)



참가시나무 첨가제 (70 g 참가시나무 추출액 + 400 g 부형제/1 마리 1일)

- 5 일 동안 참가시나무 첨가제 급여

- 실험 시작전 및 실험 종료후에 Urine 채취

○ 분석 항목: Urine에 IP 및 Mg 농도 분석은 in vitro와 동일

○ 실험 설계:

	대조구	처리구
공시동물	3 마리	5 마리
첨가량	부형제	첨가제
처리기간	5일	5일
샘플채취	실험시작 전 및 실험종료 후 Urine 채취	실험시작 전 및 실험종료 후 Urine 채취

2. 주요 연구 결과

연구 1. 사료원료별 β -carotene 함량 기초 자료 및 동물 체내 vitamin A 합성 능력 조사

실험 1. 사료원료 별 β -carotene 함량 조사

- 액체크로마토그래프를 통해 표준물질의 검출조건(Figure 3-4)을 보면 15분 이후에 β -carotene이 존재함을 확인하였고, 표준물질을 농도별로 희석하여 검출선을 확립
- 이를 토대로 시험용액을 분석한 결과(Figure 3-5) 동일 검출시간에서 β -carotene 존재의 확인으로 사료원료 별 β -carotene 함량 분석방법을 확립
- 한우사료에 이용되는 원료에 대한 carotenoid중 주요성분인 α -carotene 과 β -carotene의 분석 결과 그리고 이를 vitamin A로 환산한 수치는 표 16,17 과 같음
- 결과를 살펴보면 2012 한국표준사료성분표상의 carotene함량과 큰 차이를 보이고 있는데 이와 같은 결과는 현행의 한우 사료 내 vitamin A의 함량을 book value로 결정하는 것은 정확하지 않다는 증거가 됨

<Chromatogram and standard curve of β -carotene>

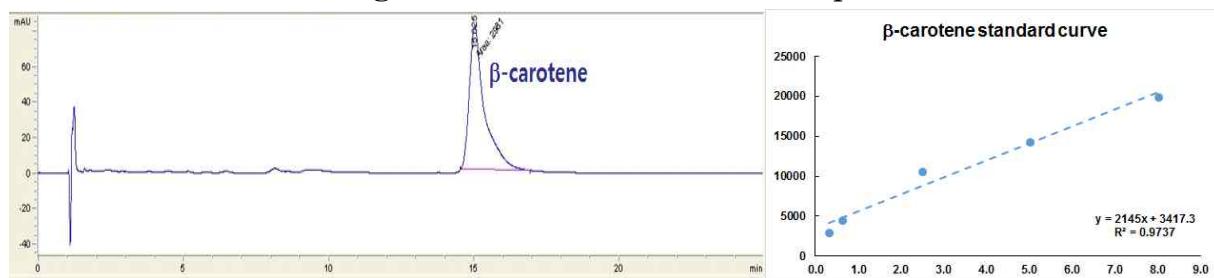


Figure 3-4. The representative chromatogram and standard curve of β -carotene by using liquid chromatography

<Chromatogram of Test sample>

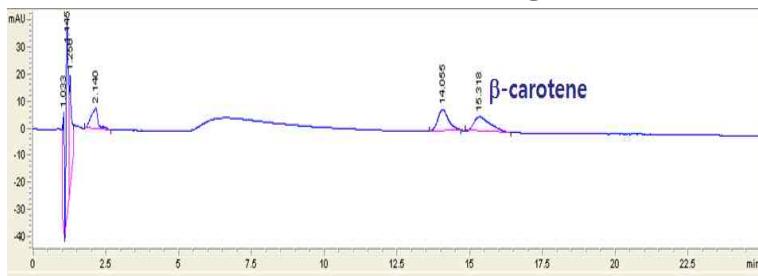
Figure 3-5. The representative chromatogram of β -carotene in the test sample by using liquid chromatography

Table 3-16. 사료 원료 내 carotenoids 함량 분석

	α -carotene (mg/kg)	β -carotene (mg/kg)	α -carotene to Vit A ¹ (IU/kg)	β -carotene to Vit A ² (IU/kg)	Vit A equivalents ³ (IU/kg)	비고 ⁴
분쇄옥수수	0.46	1.33	91.67	530.24	621.92	5.51
분쇄소매	—	—	—	—	—	—
소맥피	—	—	—	—	—	2.99
생미강	—	—	—	—	—	—
대두피	—	0.54	—	215.92	215.92	—
단백피	—	0.36	—	145.62	145.62	—
후레아이크콘	0.44	1.73	87.86	691.37	779.22	—
옥분	—	1.19	—	475.46	475.46	—
팜박	0.88	0.90	176.26	359.72	535.98	—
야자박	—	—	—	—	—	—
채종박	—	0.50	—	201.62	201.62	—
밀가루	—	0.23	—	93.26	93.26	—
주정박	0.91	2.98	181.80	1190.12	1371.92	4.0
면실피	—	—	—	—	—	—

Table 3-17. 조사료 내 carotenoids 함량 분석

	α -carotene (mg/kg)	β -carotene (mg/kg)	α -carotene to Vit A ¹ (IU/kg)	β -carotene to Vit A ² (IU/kg)	Vit A equivalents ³ (IU/kg)	비고 ⁴
톨페스큐	—	1.56	—	624	624	—
볏집	—	3.41	—	1364	1364	—
연맥	—	36.29	—	14516	14516	—

¹ α -carotene to Vitamin A (IU/kg) : 1 mg of α -carotene is 200 IU vitamin A (ref. NRC 2000)² β -carotene to Vitamin A(IU/kg):1mg of β -carotene is 400 IU vitamin A (ref. NRC 2000)³ Vitamin A equivalents(IU/kg): α -carotene to Vitamin A3(IU/kg)+ β -carotene to Vitamin A (IU/kg)⁴ 비고, 2012 한국표준사료성분표, Carotin (mg/kg)

실험 2. 혈중 Vit A분석 방법 확립

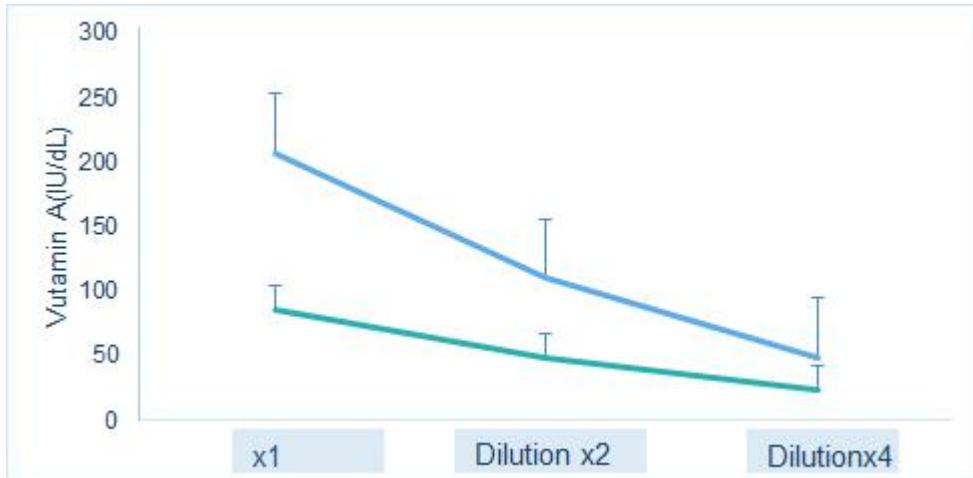


Figure 3-6. 혈중 Vit A의 dilution에 의한 농도 변화

- 실험방법에서 소개한 혈중 vitamin A분석 방법을 통하여 그림 6과같이 serial dilution한 혈청을 분석한 결과 혈중 vitamin A함량이 희석배율의 증가와 함께 감소되는 것을 확인하였음.

실험 3. 사료 유래의 β -carotene의 동물 체내 vitamin A로의 합성 능력 평가 (축산과학원과 공동 진행)

- 관련 연구 결과 및 고찰은 제1세부과제의 결과보고를 참조

Table 3-18. β -carotene함유 원료사료 급여 후 혈중 vitamin A 함량 변화

Vitamin A(IU/dL)	A	B	C	D	E	F	G	H
1st	137.1	96.3	87.4	113.0	127.1	124.3	100.2	92.7
2nd	142.0	82.3	104.5	113.0	118.9	128.9	106.0	100.4
3rd	135.3	74.2	95.0	82.2	115.4	117.5	95.7	84.8
4th	-	-	-	-	116.0	122.1	99.6	77.8
5th	75.69	63.30	75.54	75.23	86.61	67.38	87.64	85.95

연구 2. *In vitro*실험을 통한 vitamin A가 지방분화에 미치는 영향조사

- 실험 1. 소섬유아세포 (BEFS)의 근육과 지방분화에 있어 9-*cis*-RA 처리가 미치는 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량 조사
 - 9-*cis*-RA 처리에 따라 근육분화와 지방분화가 감소하는 것을 Oil-red O 염색, PPAR γ 2와 Desmin 유전자 발현량을 통해 확인하였음
 - Gelsolin a와 Complement facotr B는 본 연구팀의 선행연구에서 거세한우에 있어서

vitamin A제한과 관련성이 있는 유전자로 본 실험에서 9-*cis*-RA 처리에 의한 근육과 지방 분화시기동안 발현량이 감소하였음

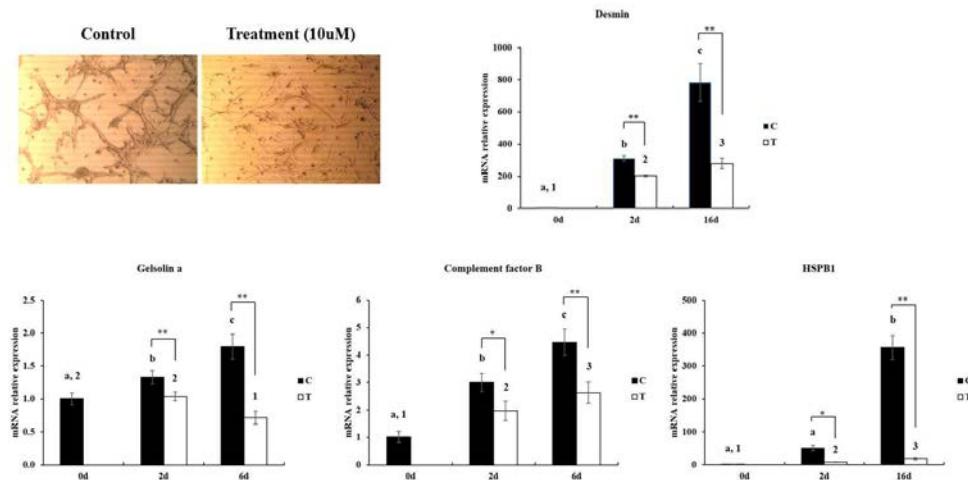


Figure 3-7. mRNA expression of target genes in BEFS-MyoD treated with 9-*cis*-RA. C: control, T: treatment with 10 μ M RA

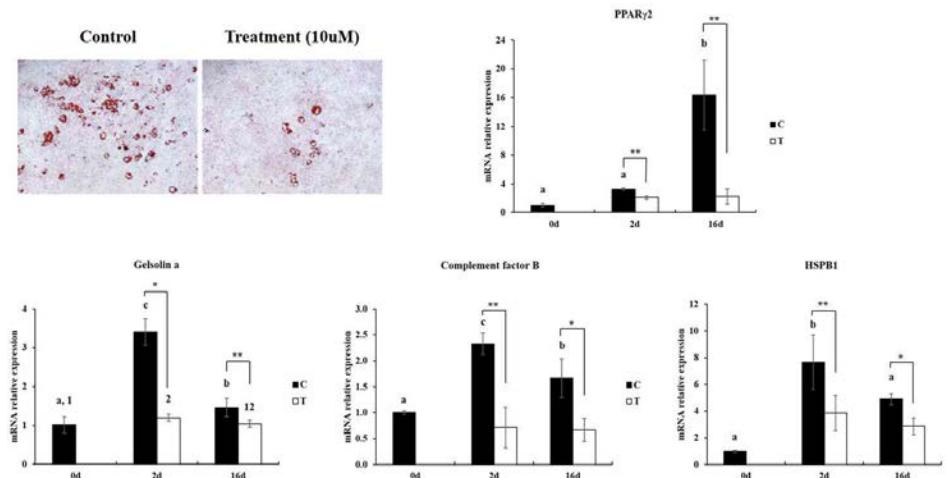


Figure 3-8. mRNA expression of target genes in BEFS-PPAR γ 2 treated with 9-*cis*-RA. C: control, T: treatment with 10 μ M RA

- 실험 2. BEFS-MyoD의 지방분화유도에 있어 9-*cis*-RA와 adipogenic mixture 처리가 혈중 vitamin A 조절 유전자의 발현량 조사
 - BEFS-MyoD에 TZD와 lipid mixture를 이용하여 지방분화를 유도한 T3와 T5 처리구에서 지방구를 Oil-red O 염색을 통해 확인하였음. Doxycycline으로 MyoD 발현량을 유도한 그룹에서는 지방분화구를 확인하지 못하였음

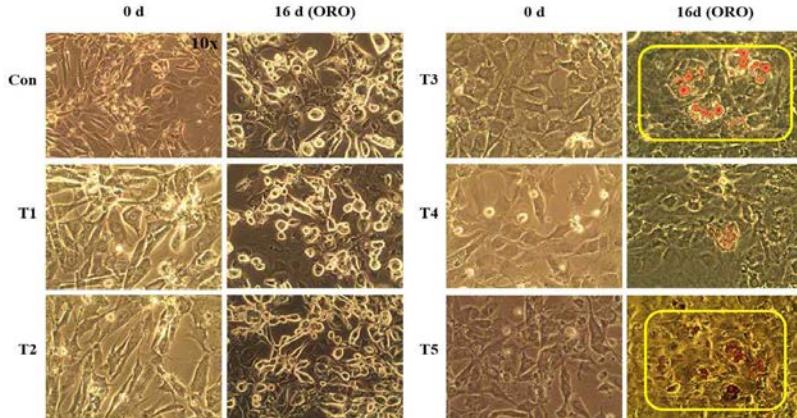


Figure 3-9. Representative photographs showing Oil-red O stained BEFS-MyoD that was grown in adipogenic differentiation culture medium for 16 days.

- 초기 분화기간동안 Doxycycline을 처리하지 않은 T3-T5구에서 PPAR γ 2의 발현량이 처리한 구보다 높았지만, 분화 후에는 차이가 없었음
- Desmin의 경우 분화기간동안 T3-T5구에서 발현량이 낮았음
- Gelsolin a와 Complement factor B의 경우 분화기간동안 처리에 따른 차이를 나타내지 않았지만 HSPB1의 경우 T1과 T2구에서 높게 발현되었으며 T3-T5구에서는 발현량이 낮았음

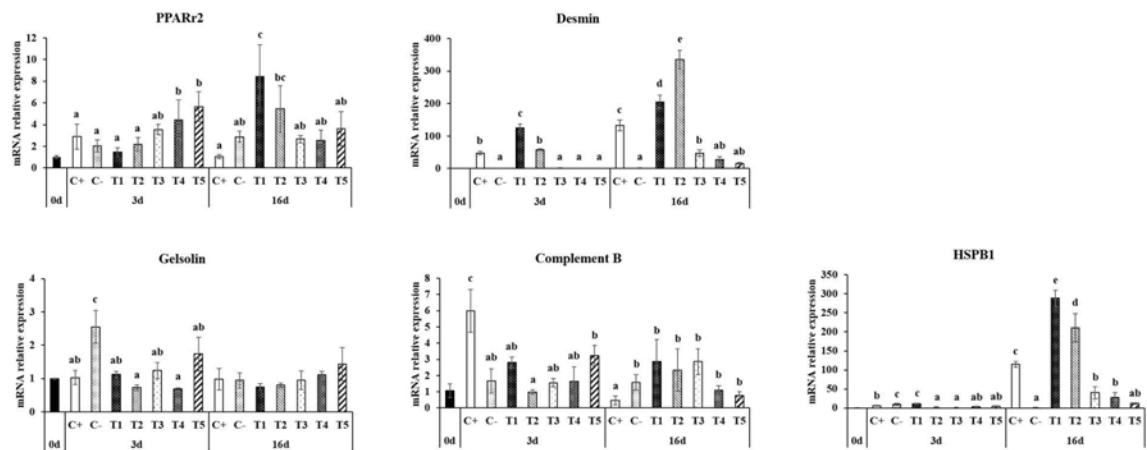


Figure 3-10. mRNA expression of target genes in BEFS-MyoD induced adipogenesis with RA.

- 본 연구 결과를 통하여 Vitamin A는 소의 근육분화와 지방분화를 감소시키는 것으로 확인하였으며, 한우 혈중 Vitamin A 수준에 따라 조절되는 Gelsolin a와 Complement factor B와 사료효율과 영양수준에 연관된 HSPB1의 경우 소섬유아세포를 근육세포와 지방세포로 분화시킬 때 레티놀의 첨가에 따라 mRNA 발현량이 억제되는 유전자로 Vitamin A 수준과 근육 및 지방발달에 밀접한 관계

가 있는 유전자로 판단되어짐

연구 3. 한우거세우의 ADH 유전자형 조사연구

- ADH1C gene은 alcohol dehydrogenase family 중 하나로 class I alcohol dehydrogenase와 gamma subunit을 암호화함
- 이 효소는 ethanol oxidation에 높은 활성을 나타내며, ethanol의 catabolism에 중요한 역할을 함. 이러한 ADH1C gene의 promoter region 내 SNP는 선행 연구에서 이미 발견이 되어 있음 (A.K. Ward, 2012)
- SNP의 결과 ADH1C gene의 gene type은 tt, ct, cc의 세가지 type으로 구분이 되며, 이러한 ADH1C gene type에 따른 비타민 A 제한 관련 앵거스 품종을 이용한 선행 연구의 논문에 따르면, gene type 중 tt type의 genotype의 경우 비타민A 제한급여를 하였을 때 다른 유전자형보다 intramuscular fat content가 높게 나타났음 (A.K. Ward, 2012)
- 본 연구에서 거세한우의 ADH1C gene type의 분포를 통해 어떠한 유형의 gene type이 현재 한우종에서는 분포하고 있는지 확인하고자 진행하였음
- 거세우 총 170두를 분석한 결과, 현재 한우의 유전자형에서 약 84%는 TT genotype의 분포를 보이며 약 15%는 CT genotype을 가지는 것으로 판단되며, CC genotype은 거의 없는 것으로 나타났음

Table 3-19. 170두에 대한 ADH1C 유전자의 genotyping 결과

No.	개체번호	결과	No.	개체번호	결과	No.	개체번호	결과
1	23958	TT	32	1707	TT	63	6813	CT
2	18208	TT	33	4603	TT	64	2209	TT
3	30260	TT	34	5348	TT	65	2126	TT
4	23966	TT	35	2125	TT	66	4282	TT
5	35414	TT	36	2133	TT	67	2729	TT
6	73984	TT	37	4190	CT	68	7267	TT
7	48302	CT	38	3423	TT	69	4609	TT
8	85197	TT	39	7907	CT	70	8033	TT
9	47725	TT	40	2130	TT	71	7940	TT
10	51708	TT	41	2128	TT	72	3248	TT
11	85189	TT	42	5018	CT	73	7503	TT
12	49012	TT	43	7963	TT	74	2127	TT
13	54719	TT	44	2919	TT	75	2124	TT
14	54702	TT	45	5019	TT	76	4322	CT
15	77909	TT	46	7945	TT	77	4976	TT
16	84012	TT	47	2872	TT	78	7013	TT

17	54680	TT	48	7664	TT	79	7070	TT
18	10429	TT	49	2701	TT	80	7947	CT
19	49292	CT	50	3360	TT	81	6512	TT
20	78487	TT	51	6513	TT	82	6260	TT
21	66136	TT	52	4260	TT	83	3493	TT
22	47709	TT	53	7950	CT	84	7507	CT
23	11114	TT	54	7502	TT	85	7940	CT
24	92243	CT	55	3831	TT	86	4318	TT
25	78729	TT	56	5305	TT	87	2702	TT
26	49661	TT	57	7671	TT	88	5867	TT
27	49668	TT	58	7778	TT	89	7002	TT
28	51443	CT	59	7948	CT	90	1169	TT
29	50029	TT	60	4293	CT	91	6414	TT
30	765	TT	61	4255	TT	92	2696	TT
31	4625	TT	62	1125	TT	93	7917	TT

Table 3-20. 170두에 대한 ADH1C 유전자의 genotyping 결과(계속)

No.	개체번호	결과	No.	개체번호	결과	No.	개체번호	결과
1	1434	TT	32	4153	TT	63	5755	TT
2	1210	TT	33	1802	TT	64	1986	TT
3	9804	TT	34	9776	TT	65	5781	TT
4	1697	TT	35	3959	TT	66	0154	TT
5	5458	TT	36	6404	TT	67	5159	TT
6	0930	TT	37	3901	TT	68	0180	TT
7	5787	TT	38	1473	TT	69	0035	TT
8	3753	TT	39	3751	TT	70	5B	TT
9	6404	TT	40	1436	TT	71	5A	TT
10	8017	TT	41	0583	TT	72	5D	TT
11	4413	TT	42	6214	TT	73	5C	TT
12	1891	TT	43	9584	TC	74	5H	TT
13	5232	TT	44	8202	TC	75	5G	TC
14	2670	TT	45	0829	TT	76	5F	TT
15	6717	TT	46	4617	TT	77	5E	TT
16	1710	TT	47	2089	TT			
17	1792	TT	48	9507	TT			
18	7528	TT	49	#	TT			
19	3806	TC	50	7034	TT			
20	3109	TT	51	2384	TC			
21	6597	TT	52	5746	TC			
22	0536	TT	53	4879	TT			
23	2421	TT	54	6670	TT			
24	7209	TT	55	5223	TC			
25	6556	TC	56	1448	TT			

26	7211	TC	57	0927	TT			
27	4370	TT	58	5551	TT			
28	4393	TT	59	2122	TC			
29	3249	TT	60	4667	TT			
30	6698	TT	61	5782	TC			
31	1884	TT	62	0838	TT			

Table 3-21. 국내 거세한우의 ADH1C 유전자형 출현빈도 결과

	TT	CT	CC	Total
Heads	144	26	-	170
%	84.70	15.29	0	100

연구 4. 한우에 있어서 ADH1c 유전자 type이 vitamin A 제한에 의한 marbling 생산에 미치는 상관성 조사

- 본 연구에서는 비육전기 vitamin A제한을 한 거세한우에 있어서 ADH1C 유전자의 유전자형을 조사한 결과 TT type 및 TC type을 agarose gel 전기영동방법을 통하여 table 3-19와 같이 확인하였음 (그림 11)
 - 136두의 거세한우의 유전자형을 조사한 결과 75%는 TT type 있고 25%는 TC type을 확인하였음 (표 21)
 - 이들의 도축결과 근내지방도에서 TT type 보다 TC type 더 높은 수치를 보였음. 이는 A.K. Ward (2012)에 의해 앵거스에서 조사된 결과와는 다르게 나타났음 (표 22)
 - 혈중 Vitamin A 농도는 Vitamin A 제한 급여되면 Vitamin A 농도는 유의적으로 감소하였고, Vitamin A 제한 급여시 TT type 보다 TC type에서 더 낮은 혈중 Vitamin A 농도의 경향을 나타냈음 (표 23)
- 이와 같은 결과는 한우의 vitamin A관련 ADH1C유전자의 근내지방대축적 대사조절 메커니즘이 앵거스와 다르다는 것을 의미하고, 상대적으로 TC type의 비율이 낮은 현재의 한우의 유전적인 형질을 감안해 볼 때 현행의 사양시스템에서 vitamin A제한에 대한 사양적용을 신중히 해야 한다고 제안함

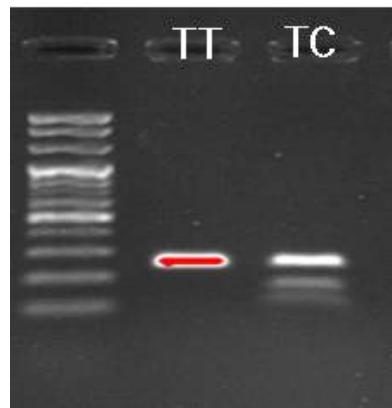


Figure 3-11. Agarose gel electrophoresis of ADH1C gene c.-64T>C PCR-RFLP. Lane 1 is 100bp plus DNA ladder and lane 2 is standard of TT type, lane 3 is standard of TC type.

Table 3-22. Ratio of ADH1C genotype in Korean native steers

	TT type	TC type	CC type
Heads	102	34	0
Ratio (%)	75%	25%	0%

Table 3-23. Effect of ADH1C gene on carcass traits in Korean native steers during vitamin A restriction

	TT type	TC type	P value
등지방 두께(mm)	12.7±0.42	13.2±0.72	0.952
등심 면적(cm ²)	86.8 ^a ±0.94	93.0 ^b ±1.88	0.002
도체중 (kg)	411.0 ^a ±5.04	444.2 ^b ±9.83	0.002
유량지수	64.8±0.29	64.6±0.57	0.771
근내지방(NO.)	5.2 ^a ±0.16	6.3 ^b ±0.28	0.001
육색	4.8±0.04	4.8±0.07	0.936
지방색	3.0±0.02	3.0±0.00	0.320
조직감	1.2±0.04	1.1±0.04	0.125
성숙도	2.1±0.03	2.2±0.06	0.410

Values (mean+SEM) in a period bearing different superscripts differ significantly (P<0.05)

Table 3-24. Effect of ADH1C genotype on the level of serum vitamin A during vitamin A restriction

	Control		Treatment		P-value		
	(8.89IU/g feed vitamin A)	(0.89 IU/g feed vitamin A)	TT type (25 heads)	TC type (6 heads)	G ^A	V ^A ^B	G×V ^A
VA ^B concentration (IU/dL)	137.4±5.31	140.3±7.96	111.1±5.00	79.7±16.05	0.14 9	0.00 0*	0.083

Values (mean+SEM) in a period bearing different superscripts differ significantly (P<0.05)

^AG = Genotype, ^BVA = Vitamin A

연구 5. 한우 거세우에 있어서 vitamin A 제한 급여가 고급육 생산에 미치는 영향

- Premix내 vitamin A를 조절하여 15~24개월령까지 vitamin A 제한급여를 실시하여 한우거세우의 성장성적 및 도체성적에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같음
- 체중결과에서 T1 과 T2의 수치는 Con과 비교하여 차이가 보이지 않았고, 일당증체

량 같은 경우에는 Con이 다른 처리구에 비하여 차이가 보이지 않았음(Figure 3-12, Table 3-25)

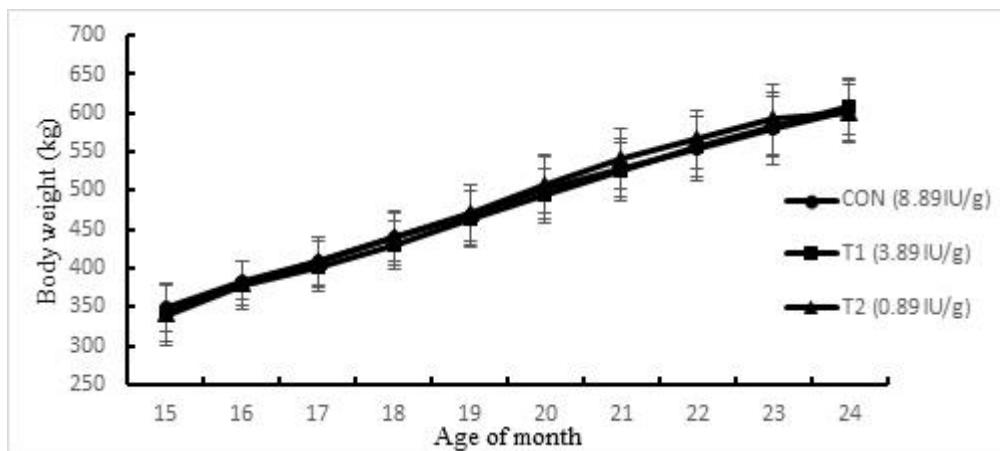


Figure 3-12. Changes of body weight in Korean native steers during the vitamin A restriction from vitamin premix.

Table 3-25. Changes in average daily gain during vitamin A restriction

	Months of age	Control (8.89 IU/g)	T1 (3.89 IU/g)	T2 (0.89 IU/g)
ADG*	15–16	0.79±0.073	0.89±0.044	0.80±0.068
	16–17	0.81±0.104	0.80±0.080	0.95±0.086
	17–18	1.03±0.086	0.89±0.044	1.00±0.058
	18–19	1.01±0.075	1.19±0.063	1.10±0.073
	19–20	1.09±0.045	0.95±0.052	1.17±0.102
	20–21	0.82±0.043	1.11±0.065	1.11±0.066
	21–22	0.83±0.054	0.91±0.069	0.75±0.066
	22–23	0.74±0.066	0.81±0.072	0.67±0.039
	23–24	0.92±0.081	0.72±0.038	0.61±0.080
	Total	0.89±0.025	0.92±0.022	0.91±0.028

* ADG: Average of daily gain. Value (mean±SEM) in a period have no significant differences

- Figure 3-13은 시험 기간 동안 혈중 vitamin A 농도변화를 나타낸 것으로 Con 보다 T1에 혈중 vitamin A 농도는 변화를 보이지 않았고, T2는 Con 보다 혈중 Vitamin A 농도가 유의적으로 감소하였음($P<0.05$)
- 이 결과를 통해 T1의 사료 내 vitamin A 함량은 3.89 IU/g 으로 그림 13에서 보는 바와 같이 vitamin을 제한급여를 하여도 혈중 vitamin A 농도의 변화에는 영향을 미치지 않았음

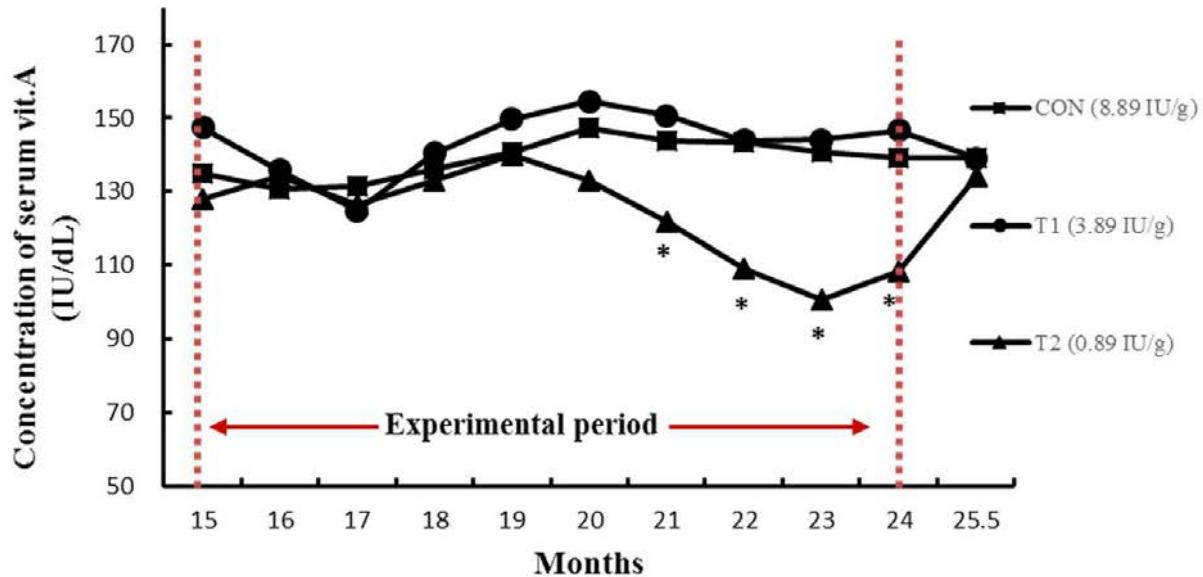


Figure 3-13. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from vitamin premix.

- MPT 결과에서 T2 group에 혈중 Vitamin A 농도가 Con 보다 유의적 감소하는 것을 확인하였음($P<0.05$). Albumin, creatinine, NEFA, BUN 같은 경우에 T2는 Con, T1 보다 수치가 높게 나왔고, BUN의 경우에 있어서 Con보다 T1, T2에서 유의적으로 증가하였음 ($P = 0.010$)

Table 3-26. Effect of vitamin A restriction from vitamin A premix on the changes in serum metabolites at 24 mon of Korean native steer

Parameter	Control (8.89 IU/g)	T1 (3.89 IU/g)	T2 (0.89 IU/g)	P value
Concentration of Vitamin A (IU/dL)	139.2±6.40 ^b	146.6±4.94 ^b	108.4±6.95 ^a	0.000
Albumin (mg/dL)	3.7±0.04 ^a	3.8±0.03 ^{ab}	3.8±0.06 ^b	0.038
Glutamic-oxalacetic transaminase (U/L)	73.6±1.67	81.7±5.06	74.5±2.52	0.188
Glutamic pyruvic transaminase (U/L)	23.0±0.56	23.9±0.83	22.6±0.58	0.415
Blood urea nitrogen(mg/dL)	17.7±0.68 ^a	19.4±0.48 ^b	20.3±0.56 ^b	0.010
CREA (mg/dL)	1.5±0.04 ^a	1.5±0.03 ^a	1.6±0.04 ^b	0.071
Triglycerides (mg/dL)	23.7±1.61	25.9±1.73	25.6±1.76	0.615
Cholesterol (mg/dL)	160.8±6.69	175.7±5.30	181.7±9.38	0.156
Glucose (mg/dL)	44.2±2.86	45.8±3.61	53.6±5.06	0.221
High-density lipoproteins (mg/dL)	199.1±16.21	216.0±18.58	208.7±20.95	0.814
Low-density lipoproteins (mg/dL)	38.6±3.44	46.9±4.03	48.2±4.08	0.178
Calcium (mg/dL)	9.9±0.12	10.0±0.12	10.0±0.11	0.521
Inorganic Phosphorus (mg/dL)	8.3±0.15	8.6±0.18	8.3±0.20	0.489
Magnesium (mg/dL)	3.1±0.08	3.0±0.14	2.9±0.08	0.664
Non-esterified fatty acid (mmol/L)	199.1±11.78 ^a	213.0±13.44 ^a	286.5±23.24 ^b	0.001

Values (mean±SEM) in period different superscripts differ significantly ($P<0.05$). Data were the measured value for a pooled serum according to the levels of vitamin A dietary supplementation; Control (n=21), T1 (n=21) and T2 (n=19)

- 도축결과에서 도체중은 T1에 있어서 Con, T2보다 수치를 높은 것으로 나왔음
- 등급을 비교하였을 때 1등급 이상 개체는 Con, T1 보다 T2 group에 가장 많이 출현하였고 1+등급이상 소는 T1 group에서 가장 많이 발현하였다
- 근내지방 수치의 경우도 Con, T1, T2 순으로 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 유의차는 보이지 않았음

Table 3-27. Effect of vitamin A restriction from vitamin A premix on carcass traits in Korean native steers during vitamin A restriction

	Control (8.89 IU/g)	T1 (3.89 IU/g)	T2 (0.89 IU/g)	P-value
등지방 두께 (mm)	10.8±1.62	10.3±1.25	11.5±0.72	0.868
등심 면적(cm ²)	95.6±1.82	89.3±1.45	92.5±2.65	0.133
도체중 (kg)	466.4±10.56 ^b	402.4±8.48 ^a	440.5±9.57 ^b	0.001
유량지수	65.9±1.16	68.5±0.47	65.7±0.66	0.153
근내지방(NO)	4.9±0.43	5.9±0.63	5.6±0.45	0.326
육색	4.9±0.06	4.9±0.11	5.0±0.17	0.824
지방색	1.3±0.11	3.0±0.00	2.9±0.08	0.709
조직감	2.1±0.08	1.1±0.11	1.3±0.13	0.596
성숙도	1.4±0.13	2.1±0.11	2.1±0.08	0.958
등급≥1	76.5%	88.9%	91.7%	—
등급≥1+	41.2%	55.6%	41.7%	—

Values (mean ± SEM) in a period bearing different superscripts differ significantly. Data were the measured value for a pooled serum according to the levels of vitamin A dietary supplementation; Control (n=17), T1 (n=10) and T2 (n=10)

- 이와 같은 결과는 사료내 vitamin A 함량이 사료 g당 0.89IU일 때 vitamin Premix 중 vitamin A를 완전 제거하여도 혈중 vitamin A 농도 감소는 결핍수준 (40IU/dL 이하) 까지 떨어지지 않는다는 것을 알 수 있었으며 혈중 수준이 100IU/dL 이하로 떨어지지 않을 경우 근내지방도에서는 유의성이 있는 차이를 보이지 않는다는 것을 알 수 있었음. 따라서 원료사료의 조절 실험의 필요성이 대두됨

연구 7. 한우 거세우에 있어서 사료원료 내의 vitamin A 제한 급여가 고급육 생산에 미치는 영향

- 본 연구에서는 연구 6의 결과에서 사료 원료 중 vitamin A 전구물질인 카로틴의 함량이 높은 원료를 제한의 필요성이 대두되었던바 사료원료 내의 vitamin A 조절을 통한 한우거세우에 있어서 성장성적 및 고급육생산에 미치는 영향을 조사하였음
- 체중결과에서 Con, T1, T2의 총 일당증체량의 경우 Con, T1, T2 각각 0.79, 0.89, 0.82 kg로 처리구간 통계적 유의차를 보이지 않아 0.77 IU/g Vitamin A로 제한해도 소의 체중에 미치는 영향이 없는 것을 확인하였음 (그림 14, 표 27)

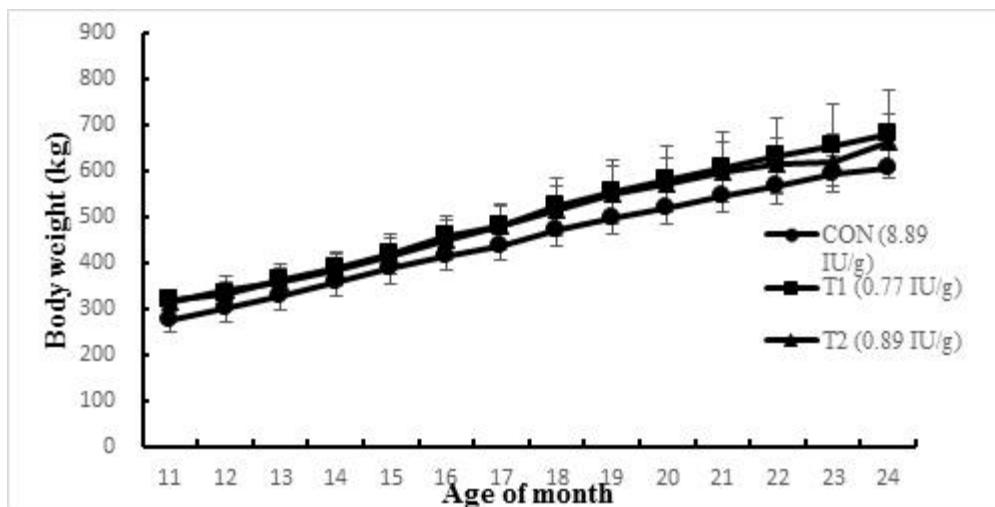


Figure 3-14. Changes of body weight in Korean native steers during the vitamin A restriction from feedstuff.

Table 3-28. Changes in average daily gain during vitamin A restriction from feedstuff

	Months of age	Control (8.89 IU/g)	T1 (0.77 IU/g)	T2 (0.89 IU/g)
ADG*	16–17	0.77±0.054 ^a	0.58±0.092 ^a	1.02±0.084 ^b
	17–18	0.89±0.065 ^a	1.59±0.122 ^b	0.99±0.116 ^a
	18–19	0.74±0.050 ^a	0.83±0.120 ^a	1.33±0.123 ^b
	19–20	0.51±0.062 ^{ab}	0.75±0.086 ^b	0.56±0.086 ^a
	20–21	0.71±0.051	0.69±0.064	0.69±0.088
	21–22	0.79±0.063 ^b	0.61±0.131 ^{ab}	0.40±0.086 ^a
	22–23	0.87±0.095 ^b	0.83±0.130 ^b	0.13±0.065 ^a
	23–24	0.37±0.085 ^a	0.84±0.108 ^b	1.52±0.096 ^c
	Total	0.79±0.025	0.89±0.064	0.82±0.032

*ADG: Average of daily gain. Values (mean±SEM) in a period have no significant differences

- 실험하는 동안 혈중 vitamin A 농도는 Con 보다 T1, T2에서 유의적으로 감소하였고 T1, T2 group 사이에 차이가 보이지 않았음
- T1그룹은 T2와 다르게 사료원료로 부터 vitamin A를 제한하였지만 혈중 수준의 차이를 보이지 않았음
- 이는 사료원료에 vitamin A로 전변할 수 있는 carotenoids이 다양하게 존재하는데, 본 연구에서 분석한 carotenoids는 알파 및 베타카로틴으로 환산한 함량이므로 다른 carotenoid들이 혈중 vitamin A에 기여하였으리라 사료됨

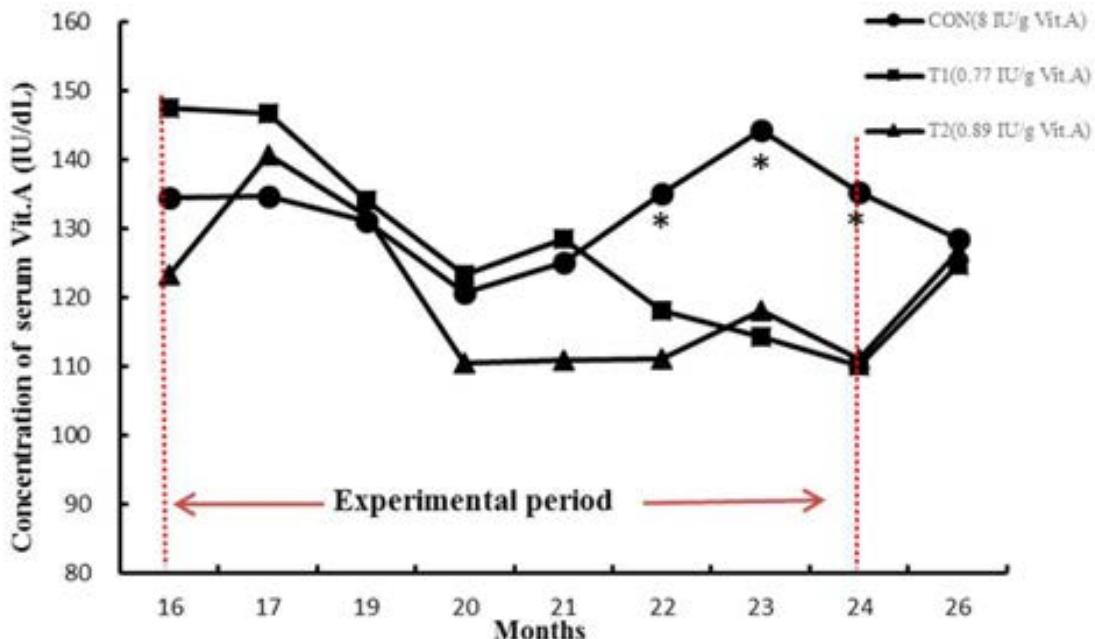


Figure 3-15. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from feedstuff.

- Vitamin A 제한기간동안 혈중 대사산물(MPT)을 분석한 결과 Con 보다 T1, T2의 혈중 Vitamin A농도는 예상대로 대조구에 비하여 감소하였음.
- 하지만 그 수준이 당초 목표로 했던 수준 (50 IU/dL이하)에는 크게 미치지 않고 있음
- 이는 사료원료의 carotenoids함량이 높은 이유와 육성시기 조직 내 축적된 retinol의 영향이라 사료됨
- MPT 14 개 항목중에 NEFA, Mg, LDL, ALB는 Con, T2 보다, T1 group에 수치가 높은 것으로 나왔고; CREA, Cholesterol 같은 경우에 Con 보다 T1, T2 groups에 높은 수치를 나타냈음

Table 3-29. Effect of vitamin A restriction from the feedstuff on the changes in serum metabolites at 24 mon of Korean native steer

Parameter	Control (8.89 IU/g)	T1 (0.77 IU/g)	T2 (0.89 IU/g)	P value
Concentration of Vitamin A (IU/dL)	135.2±4.71 ^b	110.1±6.00 ^a	111.0±6.46 ^a	0.005
Albumin (g/dL)	3.6±0.10 ^a	4.0±0.09 ^b	3.7±0.05 ^a	0.005
Glutamic-oxalacetic transaminase (U/L)	68.7±3.12	87.4±9.65	67.0±7.89	0.107
Glutamic pyruvic transaminase (U/L)	20.7±0.77	21.7±1.38	19.1±0.57	0.140
Blood urea nitrogen(mg/dL)	22.2±0.48	22.2±0.93	20.7±0.97	0.387
CREA(mg/dL)	1.3±0.03 ^a	1.5±0.06 ^b	1.4±0.05 ^{ab}	0.041
Triglycerides (mg/dL)	24.9±2.11	30.4±2.44	25.7±2.05	0.211
Cholesterol (mg/dL)	162.2±16.52 ^a	173.1±12.69 ^{ab}	206.8±12.10 ^b	0.038
Glucose (mg/dL)	78.1±1.58	83.8±3.41	84.0±2.29	0.209
High-density lipoproteins (mg/dL)	105.7±6.84	101.9±6.09	110.0±2.89	0.454
Low-density lipoproteins (mg/dL)	19.5±2.11 ^a	28.4±2.56 ^b	32.4±3.02 ^b	0.004
Calcium (mg/dL)	9.5±0.22	9.7±0.17	9.3±0.09	0.088
Inorganic Phosphorus (mg/dL)	8.9±0.34	8.7±0.32	8.0±0.24	0.104
Magnesium (mg/dL)	2.5±0.06 ^a	2.9±0.09 ^b	2.5±0.06 ^a	0.000
Non-esterified fatty acid (mmol/L)	202.1±24.61 ^a	382.9±50.06 ^b	254.7±34.19 ^a	0.008

Values (mean±SEM) in a row bearing different superscripts differ significantly (P<0.05)

¹Data were the measured value for a pooled serum according to the levels of vitamin A dietary supplementation; Control (n=10), T1 (n=10) and T2 (n=10)

- 도축결과 근내지방 수치는 통계적 유의차는 보이지 않았지만 1등급 이상 출현율은 T1, T2에서 con 보다 높게 나왔고, 육색은 T2 group에서 제일 높게 나타냈음
- 지방색 및 성숙도에서 con 보다 T1, T2에서 높은 수치를 나타냈음
- 혈중 vitamin A 농도 와 근내지방 수치에 대한 상관관계를 분석 하였을 때 vitamin A 제한급여동안 혈중 vitamin A 농도를 감소할수록 marbling 수치가 증가하는 경향을

보였음 ($P<0.05$)

- 도체 피하지방에 지방대사 관련 유전자인 PPAR α 및 aP2 mRNA 발현량을 분석한 결과 유의적인 차이는 보이지 않았음

Table 3-30. Effect of vitamin A restriction from feedstuff on carcass traits in Korean native steers during vitamin A restriction

	Control (8.89 IU/g)	T1 (0.77 IU/g)	T2 (0.89 IU/g)	<i>P</i> -value
등지방 두께 (mm)	15.0±1.37	12.9±1.25	12.8±1.38	0.424
등심 면적(cm^2)	85.1±2.00	88.3±4.28	83.8±3.09	0.611
도체중 (kg)	423.5±10.48	450.9±14.50	445.8±10.50	0.244
유량지수	62.9±0.93	64.0±0.83	63.9±1.03	0.671
근내지방(NO.)	5.2±0.57	5.9±0.59	5.4±0.69	0.711
육색	4.8±0.20 ^{ab}	4.6±0.16 ^a	5.2±0.22 ^b	0.095
지방색	2.6±0.16 ^a	3.0±0.00 ^b	3.0±0.00 ^b	0.009
조직감	1.3±0.15	1.3±0.13	1.4±0.18	0.543
성숙도	2.0±0.00 ^a	2.7±0.15 ^b	2.4±0.34 ^{ab}	0.059
등급≥1	70%	90%	77.8%	—
등급≥1+	40%	60%	55.6%	—

Values (mean ± SEM) in a period bearing different superscripts differ significantly

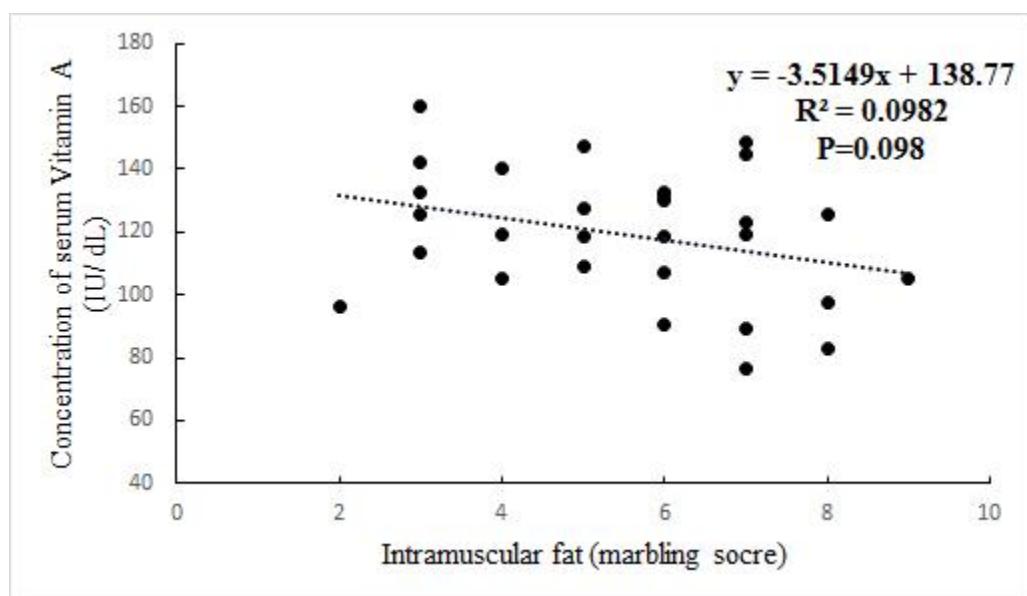


Figure 3-16. Relationship between serum vitamin A concentration and beef intramuscular fat with the vitamin A restriction from feedstuff in Korean native steers

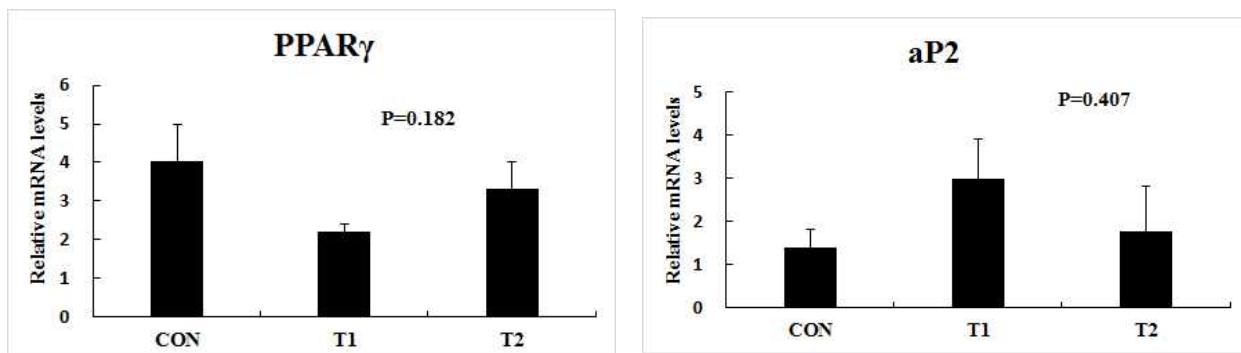


Figure 3-17. Expression of PPAR γ and aP2 gene in the subcutaneous fat.

Table 3-31. Effect of different period concentration of serum vitamin A in marbling score.

	근내지방 지수		P-value (T-test)
	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110 IU	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110 IU	
연구 5	5.2±0.38	6.3±0.66	0.156
연구 6	5.1±0.35	5.8±0.46	0.243
연구 5 + 연구 6	5.1±0.26	6.0±0.38	0.068

- 연구 4의 결과에서와 같이 vitamin A제한 사료에 대한 혈중 vitamin A의 감소 수준이 유전자형에 따라 다르게 나타나는 등 vitamin A제한에 의한 개체 간 차이가 인정되어진다. 따라서 vitamin A제한 사양에 따른 도축 후 근내지방도에 영향을 미치는 정도는 실제 혈중 vitamin A감소의 정도에 따라 좌우되어지므로 표 30은 연구 5와 6을 종합하여 분석한 결과로써 혈중 vitamin A는 110IU 이하인 개체와 110 IU이상인 개체에서 도축 후 근내지방도를 분석했을 때 110IU이하인 개체가 이상인 개체보다 높은 marbling 수치를 보였음 (P=0.068).

- 이상의 결과를 종합해 볼 때 사료원료를 조절하여 사료 g당 0.77IU수준까지 제한한다 할지라도 혈중 수준이 50IU/dL수준까지는 감소하지 않는다는 것이 증명 되었으며 제한사료를 급여하더라도 혈중 제한수준까지 떨어지지 않는다면 고급육 생산으로 이어지지 않는다는 것을 알 수 있었음

연구 7. Vitamin A 결핍조기 진단을 위한 생리지표 발굴

- 사료중 vitamin A의 제한에 따른 혈중 vitamin A의 농도변화와 혈중 대사산물간의 상관성 검증을 위하여 제한 8개월째 혈액에서 분석결과를 보면 (Table 3-32) vitamin A 농도와 Albumin, Glutamic-oxalacetic transaminase, Blood urine nitrogen, Triglycerides, Glucose, Cholesterol, High-density lipoproteins, NEFA의 농도가 증가하는 것은 확인하였고, Glutamic pyruvic transaminase, Low-density lipoproteins의 농도가 증가하다가 감소하는 것은 확인하였음. 이들은 향후 vitamin A 결핍 조기 진단을 위한 지표로 활용 될 수 있음을 시사함. 하지만 vitamin A 농도와 이들 간의 상관성을 확인 되지 않아 보다 많은 자료를 토대로 검증되어야 할 필요성이 있음.

Table 3-32. Effect of vitamin A restriction on the changes in serum metabolites at 24 mon of Korean native steer

Parameter	8.89 IU/g feed	3.89 IU/g feed	0.89 IU/g feed	0.77 IU/g feed
Concentration of Vitamin A	137.9±4.50 ^b	146.6±4.94 ^b	109.3±5.21 ^a	110.1±6.00 ^a
Albumin (g/dL)	3.7±0.04 ^a	3.8±0.03 ^a	3.8±0.05 ^a	4.0±0.09 ^b
Glutamic-oxalacetic transaminase (U/L)	72.0±1.31 ^a	81.7±5.06 ^{ab}	71.7±3.21 ^a	87.4±9.65 ^b
Glutamic pyruvic transaminase (U/L)	22.3±0.45 ^{ab}	23.9±0.83 ^b	21.4±0.54 ^a	21.7±1.38 ^a
Blood urea nitrogen(mg/dL)	19.1±0.64 ^a	19.4±0.48 ^a	20.4±0.50 ^{ab}	22.2±0.93 ^b
CREA(mg/dL)	1.4±0.03	1.5±0.03	1.5±0.04	1.5±0.06
Triglycerides (mg/dL)	24.1±1.32 ^a	25.9±1.73 ^{ab}	25.7±1.38 ^{ab}	30.4±2.44 ^b
Cholesterol (mg/dL)	161.3±6.05 ^a	175.7±5.30 ^{ab}	190.4±7.89 ^b	173.1±12.69 ^{ab}
Glucose (mg/dL)	55.1±3.52 ^{ab}	45.8±3.61 ^a	66.2±4.01 ^b	83.8±3.41 ^c
High-density lipoproteins (mg/dL)	169.0±13.55 ^b	216.0±18.58 ^b	174.7±16.85 ^b	101.9±6.09 ^a
Low-density lipoproteins (mg/dL)	32.4±2.87 ^a	46.9±4.13 ^b	44.0±3.36 ^b	28.4±2.56 ^a
Calcium (mg/dL)	9.7±0.13	10.0±0.12	9.7±0.12	9.7±0.17
Inorganic Phosphorus (mg/dL)	8.5±0.13	8.6±0.18	8.2±0.17	8.7±0.32
Magnesium (mg/dL)	2.9±0.08	3.0±0.14	2.8±0.07	2.9±0.09
Non-esterified fatty acid (mmol/L)	194.0±10.91 ^a	213.0±13.44 ^a	275.5±19.73 ^b	382.9±50.6 ^c

Values (mean±SD) in a row bearing different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

^aData were the measured value for a pooled serum according to the levels of vitamin A dietary supplementation; Control (n=31), T1 (n=21), T2 (n=29) and T3 (n=10)

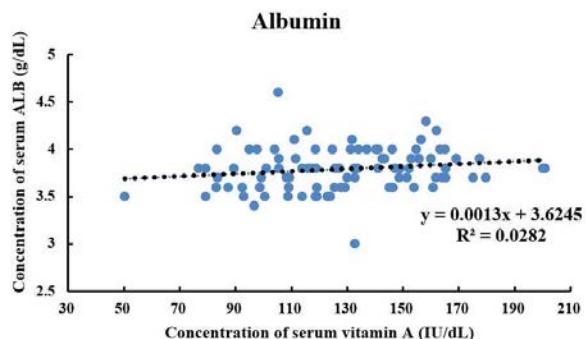


Fig 3-18. Changes in serum Albumin of Korean native steer during vitamin A restriction.

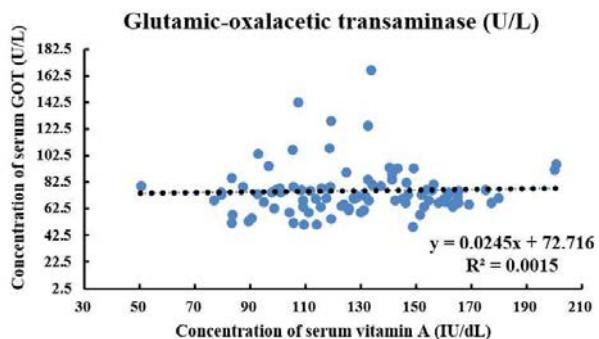


Fig 3-19. Changes in serum GOT of Korean native steer during vitamin A restriction.

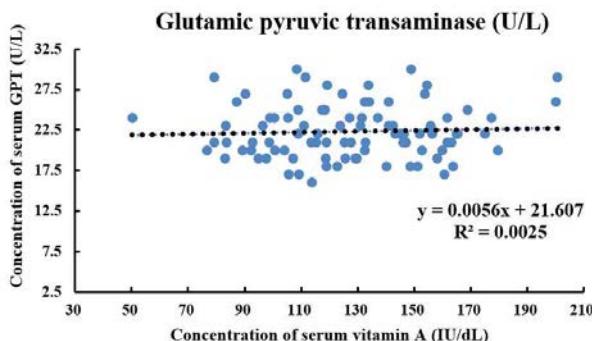


Fig 3-20. Changes in serum GPT of Korean native steer during vitamin A restriction.

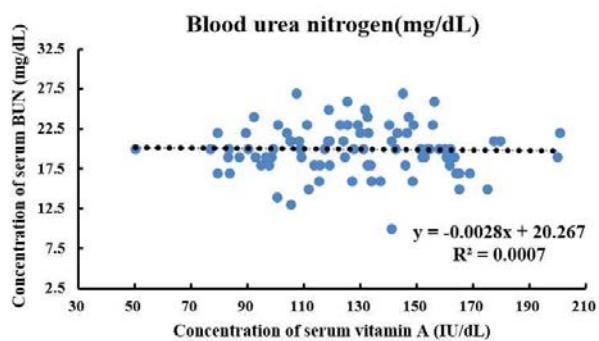


Fig 3-21. Changes in serum BUN of Korean native steer during vitamin A restriction.

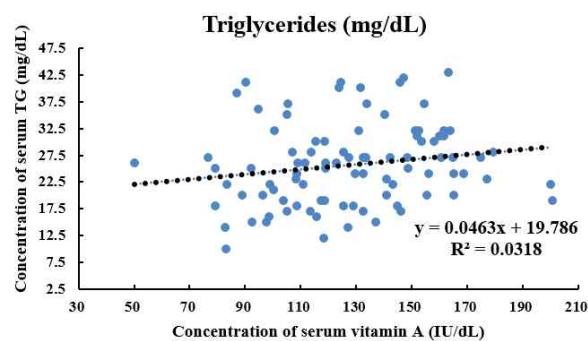


Fig 3-22. Changes in serum TG of Korean native steer during vitamin A restriction.

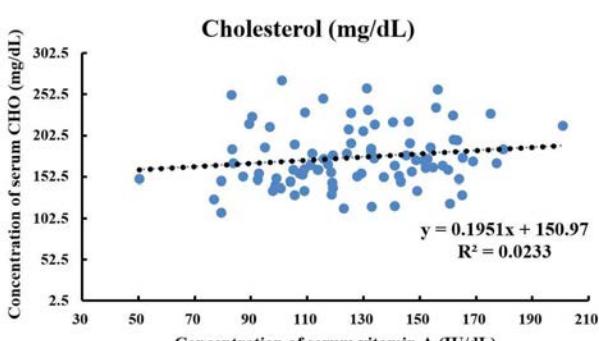


Fig 3-23. Changes in serum CHO of Korean native steer during vitamin A restriction.

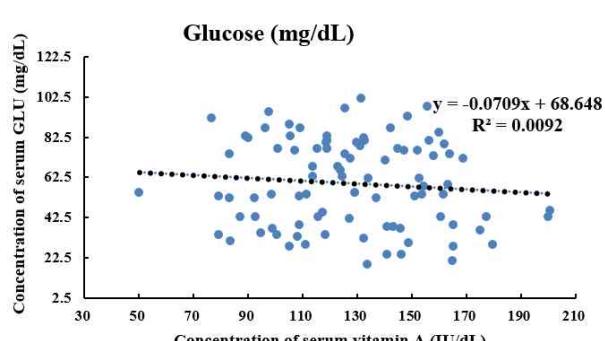


Fig 3-24. Changes in serum GLU of Korean native steer during vitamin A restriction.

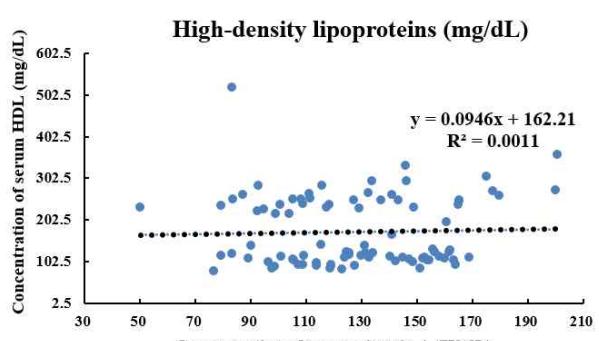


Fig 3-25. Changes in serum HDL of Korean native steer during vitamin A restriction.

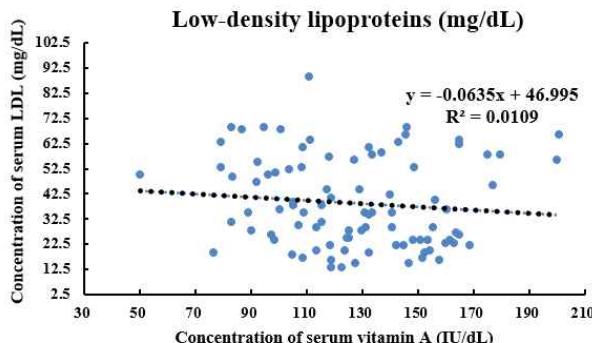


Fig 3-26. Changes in serum LDL of Korean native steer during vitamin A restriction.

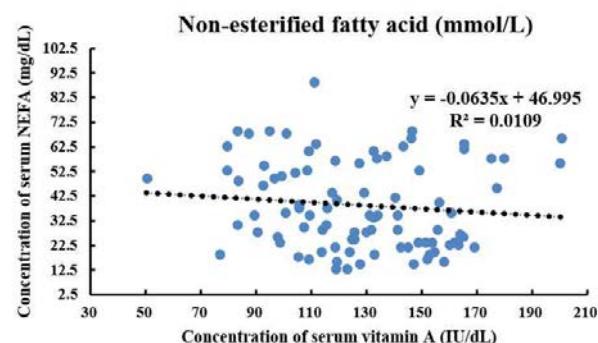


Fig 3-27. Changes in serum NEFA of Korean native steer during vitamin A restriction.

연구 8. Vitamin A 결핍으로 인한 요석증 예방 첨가제 개발

- 본 연구는 Vitamin A제한으로 인한 요석증 발생 증가를 막기 위한 첨가제를 개발하고자 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 실시하였음
- 실험결과 30개월령의 한우 urine에서 요석의 분해정도를 나타내는 IP 및 Mg의 농도를 확인하였음 (표 3-32)
- Urine내 결석을 분해시키는 효과가 있는 것으로 알려진 다양한 물질을 *in vitro*로 조사한 결과 T5(참가시나무 진액) 및 T7(참가시나무 진액 + Vit.A & Vit.D)이 urine에 IP 과 Mg 농도가 증가하는 경향을 보였음 (그림 3-28, 3-29)
- 참가시나무 진액 안에 있는 IP 와 Mg를 고려하더라도 T3 보다 IP 함량은 7.1% 정도 증가하였음. 따라서 경제성을 고려하기 위해서 T5를 선택하여 *in vivo* 실험 진행하였음
- *In vivo* 실험에서 T5(참가시나무 진액)를 5일간 급여한 결과 급여전보다 대조구 및 처리구 모두에서 뇨중 IP 및 Mg농도가 감소하는 결과를 보였음
- 이는 공시동물의 생리적인 상태 또는 급여사료의 섭식이 영향을 미쳤을 것으로 판단되어짐. 이러한 상황을 고려해서 급여전 농도에 비하여 감소되는 정도를 볼 때 뇨중 IP의 농도의 경우 대조구의 경우 18% 감소한 반면에 T5(참가시나무 진액)급여구의 경우 15%감소하였고, 뇨중 Mg 함량의 경우역시 대조구 60%, 처리구 45% 감소하는 등 미미하지만 개선정도가 확인되었음
- 본 연구에서는 급여기간이 짧아 화학적 지표에서 뚜렷한 결과는 보이지 않았으나, 자료로 정리하지는 못하였지만 시험축의 행동 관찰 결과 물 및 사료급여 횟수가 증가하였고 요석증 스트레스 행동도 감소되었음이 확인되었음

Table 3-33. Concentration of IP and Mg in urine of Korean native steer (mg/dL)

Name	Inorganic-phosphorus	Mg
한우 Urine	36.8	> 9.72

Inorganic Phosphorus (IP)

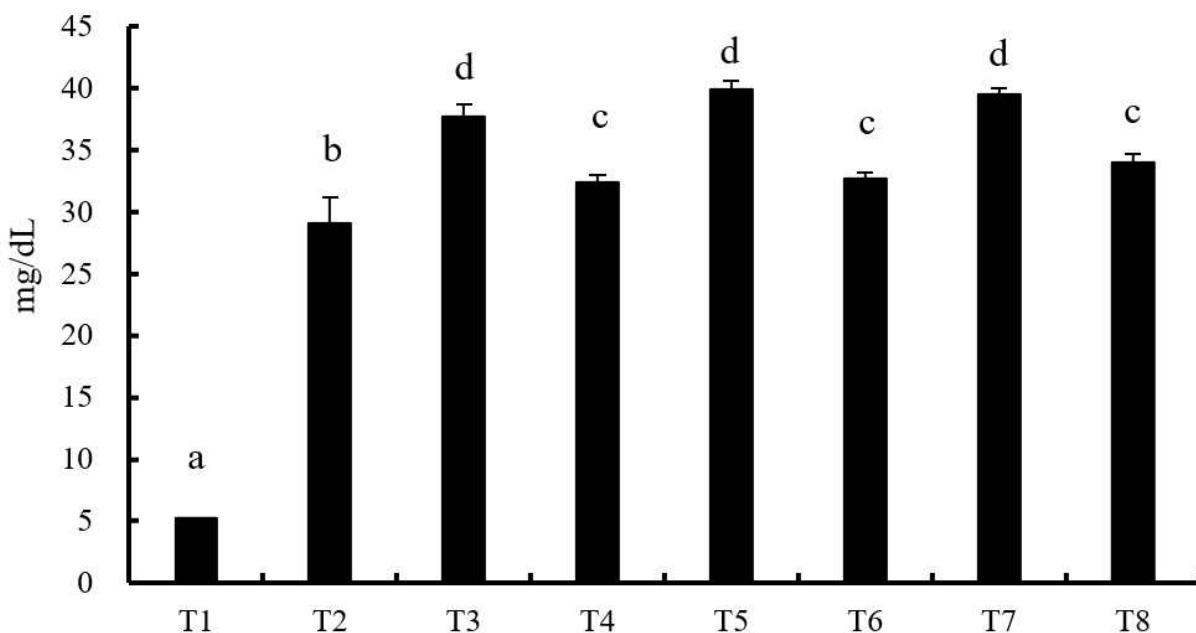


Figure 3-28. The concentration of Inorganic Phosphorus in Urine of each group
abcd, p < 0.05

5 % Trichloroacetic acid(TA) (0.25g 넣음) 참고문: (奥村亮子,2006) →

5 % トリクロル 酢酸

T1: DW + 참가시나무 진액

T2: Urine + DW

T3: Urine + 참가시나무 진액

T4: Urine + Trichloroacetic acid + DW

T5: Urine + Trichloroacetic acid + 참가시나무 진액

T6: Urine + Trichloroacetic acid + Vit.A & Vit.D3 + DW

T7: Urine + Trichloroacetic acid + 참가시나무 진액 + Vit.A & Vit.D3

T8: Urine + Trichloroacetic acid + Vit.A & Vit.D3 + CaCO3 + DW

Magnesium (Mg)

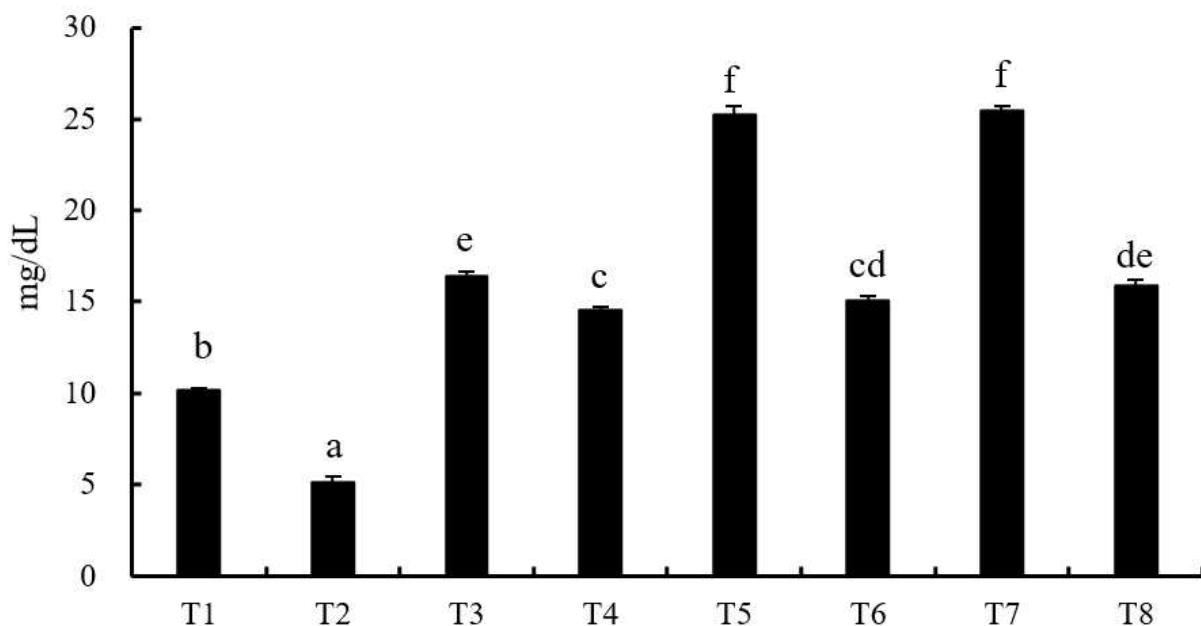


Figure 3-29. The concentration of Magnesium in Urine of each group
abcdef, p < 0.05

5 % Trichloroacetic acid(TA) (0.25g 넣음) 참고문: (奥村亮子,2006) →

5 % トリクロル酢酸

T1: DW + 참가시나무 진액;

T2: Urine + DW;

T3: Urine + 참가시나무 진액;

T4: Urine + Trichloroacetic acid + DW;

T5: Urine + Trichloroacetic acid + 참가시나무 진액;

T6: Urine + Trichloroacetic acid + Vit.A & Vit.D3 + DW;

T7: Urine + Trichloroacetic acid + 참가시나무 진액 + Vit.A & Vit.D3;

T8: Urine + Trichloroacetic acid + Vit.A & Vit.D3 + CaCO₃ + DW;

<In vivo 실험 결과>

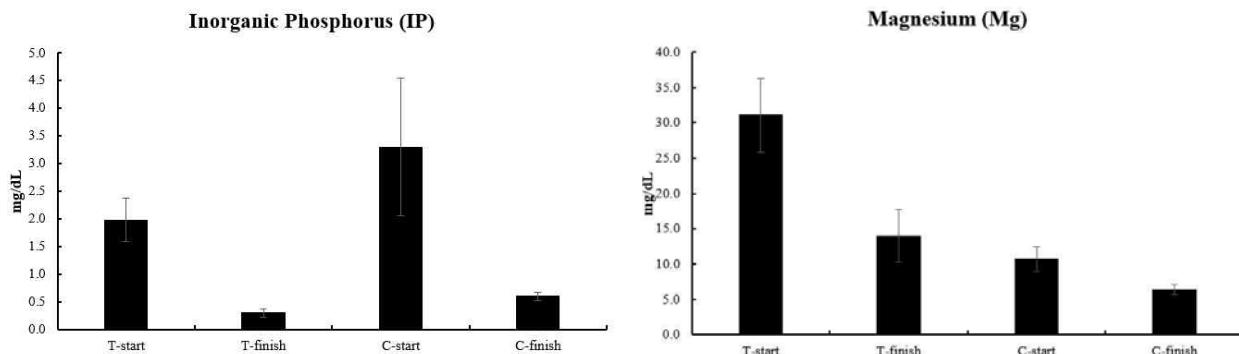


Fig 3-30. Change of IP in urine during the *in vivo* test

Fig 3-31. Change of Mg in urine during the *in vivo* test

<종합 결론>

- 사료중 carotinoid중 베타 및 알파 카로틴의 분석방법을 정립하였으며, 한우 혈액 중 vitamin A분석법을 확립하였음
- BEFS cell를 이용하여 9-cis retinoic acid처리할 때 특정 gene marker의 발현량에 통해 retinoic acid 가 지방합성을 억제한다는 것을 확인하였고, BEFS-MyoD에 TZD 와 lipid mixture를 이용하여 지방분화를 유도시 vitamin A가 지방분화를 억제한다는 것을 확인하였음
- 거세한우의 경우 ADH1C의 유전자형은 TT형이 CT형 보다 높았으며, vitamin A 제한 급여할 때 TT보다 CT 형에서 높은 marbling 수치를 보였음
- Vitamin A 제한 급여할 때 사료 g당 vitamin A농도가 0.89IU수준까지 Premix내 vitamin A를 제거하거나 사료원료부터 vitamin A를 제한하면 (0.77IU/g feed) 성장에 미치는 영향은 없으나 혈중 vitamin A수준의 감소를 보이는 개체에서 Marbling수치의 증가를 보였음
- *In vitro* 실험에 통해 참가시나무 진액은 요석증 예방치료제로써 가능성을 보였음

본 연구를 종합하여 볼 때 사료내 vitamin A를 사료 g당 0.77IU수준까지 제한한다하더라도 혈중 vitamin A수준은 80IU/dL이하로 떨어지지 않으며 특별한 결핍증상도 보이지 않았으며 개체에 따라 차이가 있었음이 확인된바, vitamin A를 제한하는 사료를 한우 고급육 생산시스템에 적용시 ADH1C유전자형이 고려되어져야 하며, 혈중 vitamin A수준의 감소에 영향을 미치는 원료사료내 carotenoid가 낮은 원료를 선택하는 것이 중요하다고 판단됨

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도(%)
1) 소 유래 맥관계 간세포(Stromal Vascular cells)에서 Ca^{2+} 의 차이에 따른 분화조절 및 작용기전 규명	20%	- 소의 지방 및 근육 조직으로부터 맥관계 간세포를 분리하여 배양하며 Ca^{2+} 및 비타민 처리 농도를 달리하며 칼슘 및 비타민 A 처리에 의한 분화조절 작용기전 밝힘	100%
2) 사료 내 칼슘 수준 차이에 따른 한우 비육우 사양실험	20%	- 사료내 칼슘 수준을 조절하여 사양실험을 실시함. 혈액 내 칼슘항상성 유지 기전과 <i>In vitro</i> 실험결과 적용 검토함	100%
3) 사료원료별 β -carotene 함량 기초 자료 및 동물 체내 vitamin A 합성 능력 조사	20%	- 사료 원료에 대한 β -carotene 함량 조사 방법을 구축하였음	100%
4) Vitamin A 제한 수준에 따른 <i>in vivo</i> 와 <i>in vitro</i> 조사	20%	- 소유래 BEFS-MyoD 및 BEFS-PPAR γ 2를 이용한 vitamin A가 지방분화에 미치는 영향을 조사하였음	100%
5) 농식품부산물을 포함한 사료원료의 가축체내 칼슘·인의 소화율 산출	20%	- 농식품부산물의 칼슘·인의 <i>in vivo</i> 측정법을 활용하여 분석을 실시하였음	100%
6) 소유래 맥관계 간세포(Stromal Vascular cells)에서 Calreticulin 등 지방 분화 조절 관련성 유전자 발현 조절 및 작용기전 조사	15%	- 근조직 유래 맥관계간세포를 분리배양하며 세포외 칼슘조절을 통한 지방세포 분화조절에 Calreticulin 작용기전 밝힘	100%
7) 사료 내 칼슘 수준 차이에 따른 한우 비육우의 성장 및 사료효율 등 사양실험 종료 및 육질검사 결과 분석 연구	15%	1차 사양시험 결과로서 칼슘의 수준차이가 한우 비육우의 성장에 영향을 미치지 않았으며, 육질 결과 분석도 실시하였음	100%
8) 사료 내 칼슘이온 및 vitamin A의 수준 차이에 따른 한우 비육우 사양 실험 실시	20%	- 소의 지방 및 근육 조직으로부터 맥관계 간세포를 분리하여 배양하며 Ca^{2+} 및 비타민 처리 농도를 달리하며 칼슘 및 비타민 A 처리에 의한 분화조절 작용기전 밝힘	100%

9) Vitamin A 결핍조기 진단을 위한 생리지표 발굴	10%	- Vitamin A에 제한된 한우의 혈중 12가지의 대사산물을 조사하여 관련성 있는 항목을 발굴하였음	100%
10) <i>In vitro</i> 실험을 통한 칼슘·인이 지방 분화에 미치는 영향 조사	20%	- SVC을 이용한 칼슘 농도에 따른 지방 세포 분화 효과를 조사하였음	100%
11) Vitamin A 제한 처리수준에 따른 고급육 생산 조사	20%	- 비육전기 거세한우에 있어서 Premix 중 vitamin A제를 수준별로 제한하여 고급육 생산에 미치는 영향을 조사하였음	100%
12) 사료 내 칼슘이온과 vitamin A의 조절에 따른 한우 비육우 사양실험 종료 및 육질검사 결과 분석 연구	20%	- 사료내 칼슘 및 비타민을 조절하며 비육전기 적용시험 실시하였음. 비육전후기 칼슘 및 비타민 조절 시험은 Biopsy를 실시하였음. 비육후기 적용 시험은 추가로 진행중에 있음.	100%
13) 요증 대사성 질병관련 및 미네랄 대사 관련 작용기전 규명	20%	- <i>In vivo</i> 대사시험을 통하여 미대사 관련 시험을 수행하였음	100%
14) 한우 거세우에 있어서 사료원료내 Vitamin A 제한 급여가 고급육 생산에 미치는 영향	20%	- 사료원료내 vitamin A 전구물질인 carotenoids 함량이 낮은 원료를 제한하여 고급육 생산에 미치는 영향을 조사하였음	100%
15) 한우에 있어서 ADH1C 유전자 type이 vitamin A제한에 의한 marbling 생산에 미치는 상관성 조사	15%	- 한우에 있어서 ADH1C 유전자 type을 조사하였고 혈중 vitamin A 농도와 marbling과의 상관성을 조사하였음	100%
16) Vitamin A 결핍으로 인한 요석증 예방 침가제 개발	15%	- 거세한우의 요석증 예방을 위한 침가제 개발을 위한 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 실험을 진행하였음	100%
17) 한우 대사실험을 통한 췌적비타민 A 함량 및 칼슘 인 비율의 검증	10%	- 한우 대사시험을 통하여 칼슘인 비율을 검증을 진행하고 있음	70%

<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 고급육 생산을 위한 최적 Vitamin A 및 칼슘 인의 비율 구명 ○ 한우 뇌결석증 감소 및 고급육 생산의 증가에 의한 농가소득 증대 ○ 고급육 생산 및 뇌결석증 감소를 위한 Mineral과 vitamin A 제한 프리믹스 제제 개발 ○ 농림식품부산물의 사료가치평가로 한국사양표준 등의 기초자료 제공 	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 한우 고급육 생산을 위한 칼슘 인 비율은 0.5:1 정도가 효과적인 것으로 조사됨 - 비타민A 조절은 비육전기에 실시하는 것이 바람직하며 베타카로틴 함량이 낮은 원료의 사용을 고려하여 조절 필요하며 칼슘조절을 동시에 실시하는 것이 시너직 효과 기대. - Vitamin A조절시 발생하기 쉬운 요결석 예방을 위한 Mineral과 vitamin A 제한 프리믹스 제제 개발 	<p>100%</p>
--	-------------	--	-------------

* 당초 목표 및 가중치는 협약 시(신규연구과제 등록 시) 제시한 최종 목표 및 가중치를 입력함(협약 변경에 의해 변경된 경우에는 변경된 목표 및 가중치를 입력)

제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명		연도	당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	5	2	40	17	
	비SCI	7	2	28	13	
산업재산권	출원	3	3	100	13	
영농기술·정보 기관제출		7	5	71	13	
정책자료 기관제출		2	1	50	7	
학술발표	국제	3	6	100	13	
	국내	10	10	100	17	
기술이전		0	1	100		
홍보성과		5	9	100	7	
계		42	39	-	100	

* ATIS 승인 기준

* 달성도(%) = (실적소계/당초목표전체) × 100

<ATIS 승인받지 못한 국내논문>

* 반추동물 생산물 유래 기능성 지방산 CLA, 2016. 10, 한국축산식품학회, Vol 5, No 2, page 26~30 (ISSN 2287-3686)

<ATIS 승인받지 못한 국외논문>

* Differentiation of Hanwoo Beef Cattle Intramuscular Stromal Vascular Cells Treated with Different Concentrations of Calcium and Retinoic Acid, Austin Biology, Austin Biol. 2016; 1(1): 1001~1005.

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

제1절 연구결과의 활용방안

한우의 vitamin A 및 광물질 적절한 첨가 함량 표를 활용한 시기 별 맞춤형 사료를 제작 및 시기별 사양관리 시스템을 패키지로 구성하여 상품화시키고 한우 고급육 vitamin A 제한 mineral/vitamin 프리믹스 제제를 사료첨가제 회사에 기술이전 상품화 추진할 계획이다. 또한, 농식품 부산물을 활용한 vitamin A 및 광물질의 조절이 영양 및 유전적 요인과 관련된 혈중 단백질 및 대사 지표의 연관성을 규명하여 한우 고급육 사료개발 및 사료비 절감에 활용할 계획이다.

본 과제를 통해 개발되는 기술은 한우 사양관리, 가축 생체 정보 모니터링 시스템 및 솔루션으로 제품화 될 것이며, 국내 한우 지역 별 농가를 대상으로 하는 종합 관리 시스템으로 상품화하고 한우 육성기 및 비육기 적절한 vitamin A 및 광물질 맞춤형 사료 개발 및 농가 보급 및 정밀사양시스템의 활용을 위한 사료자원의 라이브러리를 제작함으로써 사료업체의 새로운 사료 배합 프로그램 개발에 기여하며 정밀사양시스템의 활용을 위한 사료자원의 vitamin A 및 광물질 사료 내 최적 함량을 제작함으로써 효율적 사양시스템을 활용할 수 있고, 이로 인한 축산농가의 가축생산 효율성의 극대화 유도한다.

농림식품부산물을 이용한 신종 사료자원의 개발 및 산업화를 통한 사료비 절감 및 한우 생산비 저감 효과 및 데이터의 축적과 판독은 국가 감독 기관에서도 축산 정책을 설정함에 있어 정확한 판단과 실질적 도움이 되는 정책을 만드는데 활용하고 최종적으로 지식재산권 확보 및 기술이전을 통한 기전 조절 기술의 산업화로 활용할 계획이다.

제2절 현재 추진 중인 추가적인 논문개발 및 산업재산권 출원 현황

<Accept된 논문>

- AJAS (SCIE): Effect of Alcohol Dehydrogenase 1C (ADH1C) Genotype on Vitamin A Restriction and Marbling in Korean Native Steers
 Manuscript ID: AJAS-16-0708
 Submission: September 21, 2016
 Accepted: January 11, 2017
- International Journal of Philippine Science and Technology
 (formerly Philippine Science Letters)(SCI): Low extracellular calcium and retinoic acid concentration promotes adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes", Submission: July 15, 2016
 Accepted: September 15, 2016 (2017년 3월 인쇄 예정)

<투고중인 논문>

- AJAS 투고중인 논문(SCIE): The Effects of Whey Protein on Starch Digestion in Rumen and Small Intestine of Hanwoo Steers
 Manuscript ID: AJAS-16-0737
 Submission: September 28, 2016
- RCCP 투고중인 논문(SCIE): Rumen fermentation and digestibility of Hanwoo steers supplemented with spent mushroom substrate (*Pleurotus ostreatus*) inoculated with *Lactobacillus brevis*
- Asian Journal of Animal and Veterinary Advances에 투고중인 논문(SCOPUS 등재 국외 학술지): Effect of Dietary Calcium and Vitamin A level on the Production Performance, Adipogenic gene expression and Blood biochemical profile during early fattening stage of Hanwoo beef cattle steers (ISSN #: 1683-9919)
 Manuscript Number: 82764-AJAVA-AJ
 Submission date: February 13, 2017
- Asian Journal of Applied Sciences에 투고중인 논문(SCOPUS 등재 국외 학술지): Evaluation of the Effects of Different Forms and Concentrations of

Vitamin C and Zinc on 3T3-L1 Cell Proliferation and Differentiation(ISSN #: 1996-3343)

Manuscript Number: 82714-AJAPS-KR

Submission Date: February 09, 2017

- Journal Name: Asian Journal of Animal and Veterinary Advances에 투고중인 논문 (SCOPUS 등재 국외 학술지): Limiting dietary Calcium and Vitamin A during early Fattening stage affects Performance and Carcass Quality of Finishing Hanwoo beef cattle(ISSN Number 1683-9919)

Manuscript Number : 82976-AJAVA-AJ

Submission Date: February 27,2017

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

(1) 근육내 지방 조직의 개선을 최대화하기 위한 소가축의 관리

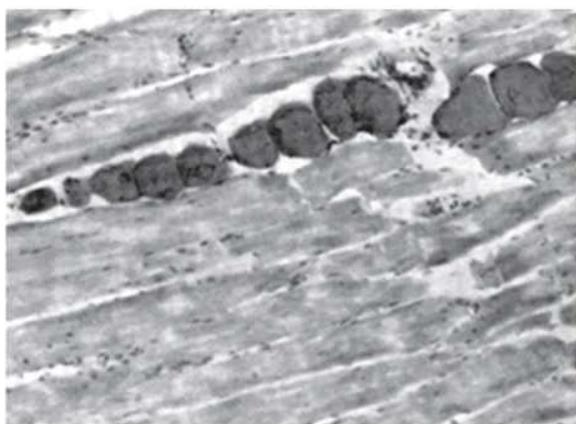


Figure 4a. Marbling adipocytes lying alongside muscle fibers in bovine longissimus muscle. Moody and Cassens (1968)

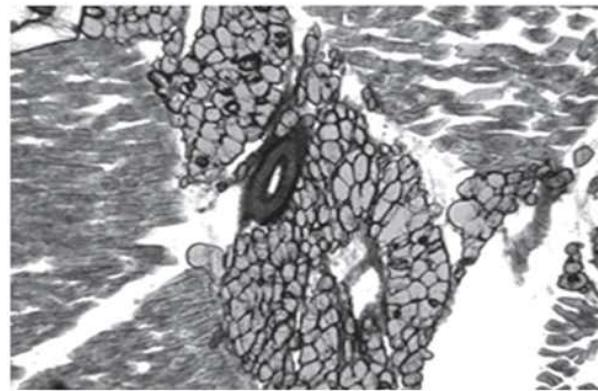


Figure 4b. Marbling adipocytes located in perimysial seams of connective tissue. The oval central structure is an arteriole, which is flanked by pockets of marbling adipocytes. Brooks et al. (2011b)

- 소 최장근 근육내 근섬유에 위치한 marbling화된 지방세포의 모습을 촬영한 선구자적 자료

- 소 근육 결합조직 경계면에 접하여 물성이 개선되어 최대로 marbling화된 지방세포 모습을 촬영한 자료

(2) T. Gotoh et al., Animal Frontiers. 2014, Vol. 4, No. 4. 46–54.

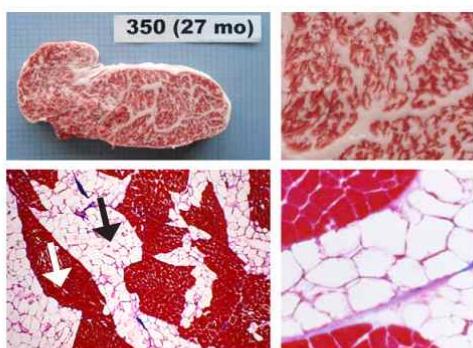


Figure 2. Meat produced by Japanese Black steers. **Left top:** marbled beef at 12 thoracic vertebrae level of *Longissimus thoracis* muscle (BMS No. 7). **Right top:** Macro appearance of marbled fat depots. **Left bottom:** Azan staining of transverse section (thickness: 10 mm) in the *Longissimus thoracis* muscle of the best grade Japanese Black marbled beef. Myofiber bundles (white arrow) look like islands in a sea of adipose tissue (black arrow; Gotoh et al., 2003). **Right bottom:** Azan staining of adipocytes.

- marbling이 잘된 일본흑우 및 화우에 생성된 지방세포가 선명하게 확대된 단면 모습

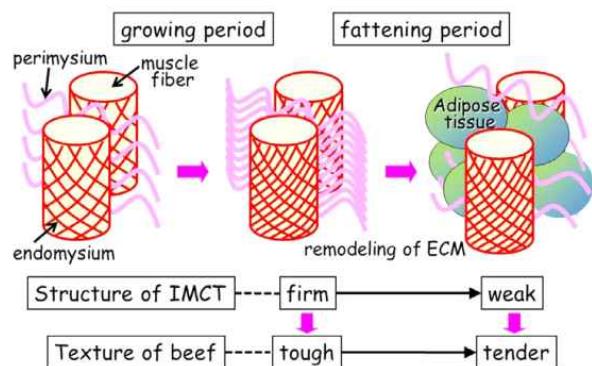


Figure 5. Effect of intramuscular fat deposition on the structure of intramuscular connective tissue (IMCT). With animal growth, collagen crosslinks become more stable, and the structural integrity of IMCT increases. These changes increase the mechanical properties of IMCT, contributing to the toughening of meat. The intramuscular fat deposits mainly in the perimysium (between muscle fiber bundles), resulting in marbling. This causes the remodeling of extracellular matrix (ECM) and reduces the mechanical strength of IMCT, contributing to the tenderization of beef (Nishimura, 2010).

- 가축 성장기 및 육성기에 있어서 소 근육내 결합조직의 지방이 재구성됨에 따라 우육이 연화되는 과정을 도식적으로 제시함

(3) H. KAWACHI, *Animal Science Journal* (2006) 77, 463-471

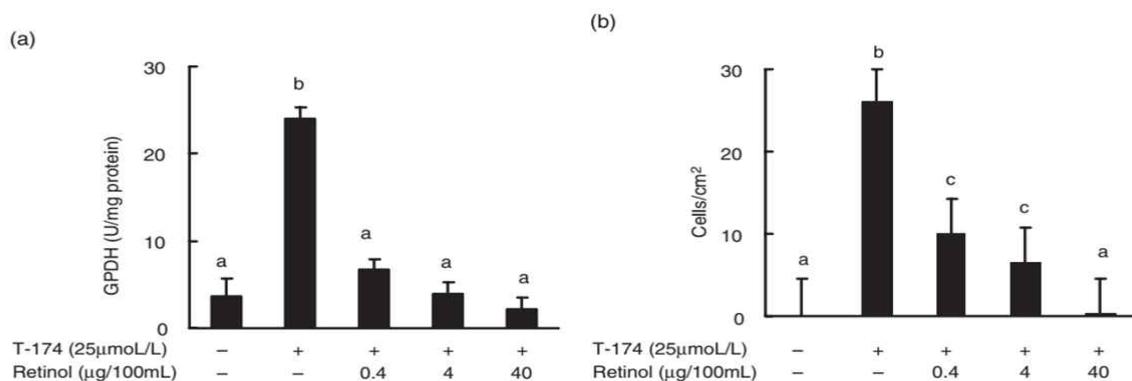


Figure 1 Effect of thiazolidindione (T-174) and retinol on (a) glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity and (b) the number of cells that contain lipid droplets in bovine adipocyte. Values are means \pm SE for stromal-vascular cells from three steers with three replicated cultures. a-c indicate significant difference at $P < 0.05$ (Ohyama et al. 1998).

- thiazolidindione과 retinol 등 미량영양소가 소의 지방세포 분화에 미치는 효과에 대하여 설명

(4) M. A. Gorocica-Buenfil et al., J. Anim. Sci. 2007. 85:2243-2255.

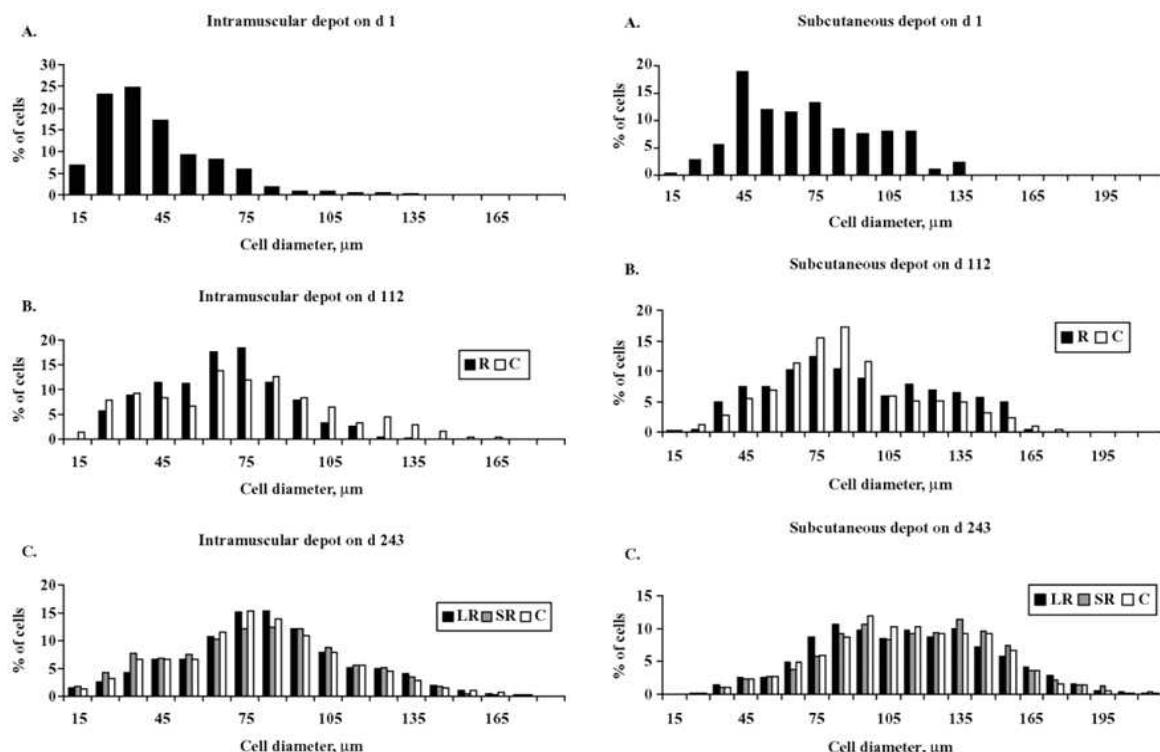


Figure 1. Effect of vitamin A restriction on intramuscular adipocyte cell diameter on A) d 1, B) d 112 (R = restricted, and C = control), and C) d 243 (LR = long restriction, SR = short restriction, and C = control).

Figure 2. Effect of vitamin A restriction on subcutaneous adipocyte cell diameter on A) d 1, B) d 112 (R = restricted, and C = control), and C) d 243 (LR = long restriction, SR = short restriction, and C = control).

- 흄스터인소에 있어서 conjugated linoleic acid(CLA) 형성량과 marbling에 대한 Vitamin A의 제한급식의 효과

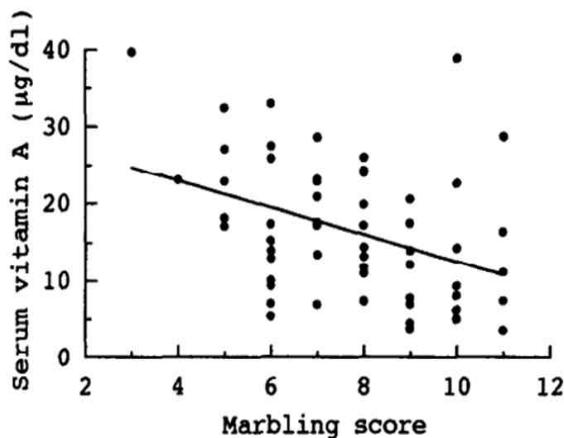


Fig 30. Relationship between serum vitamin A concentrations (Y) and beef marbling scores (X)
 $Y=29.9-1.7X(r=-0.38,p<0.05)$ (Akio Oka, 1998)

- 일본 화우에 비타민 a를 제한급여 했을 때 낮은 혈중 vitamin A 수준은 높은 marbling 수치를 나타냈음

Parameters	Vitamin A levels		
	High (4.8 IU/g)	Medium (4.8 IU/g)	Low (4.8 IU/g)
Vitamin A (IU/g)	136.38±9.93 ^b	118.56±11.23 ^a	81.06±8.36 ^a
Total protein (g/dL)	6.62±0.08	6.63±0.08	
Aspartate transaminase (IU/L)	78.19±7.11	71.56±5.61	65.75±4.48
Alanine transaminase (IU/L)	19.56±0.64	18.69±0.62	18.31±0.62
γ -glutamyltranspeptidase (IU/L)	28.88±1.67	31.54±2.59	26.62±1.87
Blood urea nitrogen (mg/dL)	12.40±0.42	12.73±0.41	12.40±0.70
Calcium (mg/dL)	10.29±0.09 ^b	10.45±0.06 ^a	10.54±0.09 ^a
Inorganic phosphorus (mg/dL)	9.58±0.14	9.77±0.22	9.53±0.14
Magnesium (mg/dL)	2.42±0.04	2.46±0.04	2.36±0.04
High-density lipoproteins (mg/dL)	152.71±4.94	161.86±4.40	158.21±3.08
Low-density lipoproteins (mg/dL)	58.25±8.05	58.88±6.67	62.50±6.75
Total cholesterol (mg/dL)	185.21±5.92 ^b	207.06±7.36 ^a	198.06±4.95 ^a
Triglyceride (mg/dL)	17.94±1.56	18.13±1.32	18.13±1.72
Glucose (mg/dL)	74.44±1.63	74.44±1.35	74.56±1.54
Albumin (g/dL)	3.73±0.04	3.76±0.04	3.70±0.03
Creatinine (mg/dL)	1.44±0.03	1.43±0.04	1.44±0.03
Cortisol (ng/mL) ¹	30.79	34.14	23.14
Cortisone (ng/mL) ¹	3.82	3.95	2.45
11-hydroxy steroid type 2 activity ¹	0.69	0.80	0.43

Values (mean±SD) in a row bearing different superscripts differ significantly ($P<0.05$). Data were the measured value for a pooled serum according to the levels of vitamin A dietary supplementation: High ($n=16$, pooled), Medium ($n=16$, pooled) and Low ($n=16$, pooled); ¹11-hydroxy steroid (metabolite)/corticosterone (precursor).

Fig32. Vitamin A concentrations, metabolic profile test (MPT) results (Tao Wang, 2014)

- Vitamin A 급여농도 별로 혈중 대사 분석하는 기술을 제시함

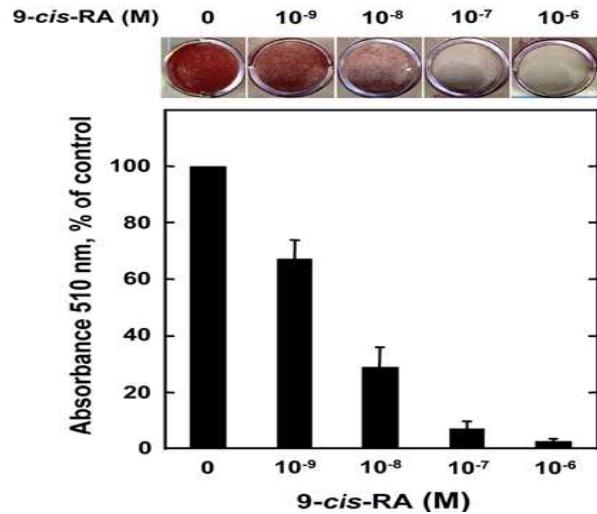


Fig 31.DIM-stimulated 3T3-L1 cells were treated with 9-cis-RA (Chiaki Sagara,C2013)

- 3T3-L1 세포에서 retinoic acid를 처리하면 지방합성을 억제한다는 것을 확인하였음

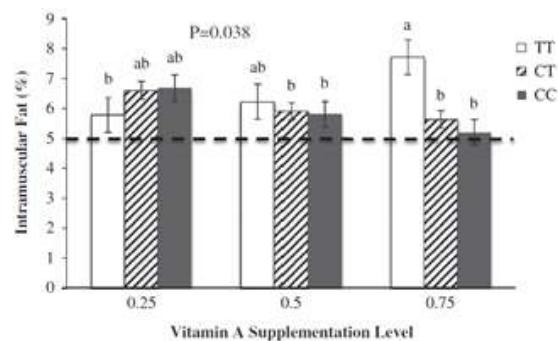


Fig 33. Intramuscular fat of the longissimus thoracis muscle of TT, CT and CC steers on each of three vitamin A treatments (25%, 50% and 75% of National Research Council recommendation of 2200 IU vitamin A/kg dry matter). (K.G. Krone, 2016)

- Vitamin A 제한 상태에서 제한농도가 다르면 ADH1C 유전자에 의해 근내지방의 수치도 다르게 나타냈음.

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

보안 등급 분류	보안	일반
		○
결정 사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황 해당사항없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

제1절. 연구실 안전조치 이행

1. 기술적 위험요소 분석

가. 생물학적 유해물

미생물과 실험용 동물을 취급하는 실험실에서 발생될 수 있는 위험들은 직접적으로 연구 활동 종사자뿐만 아니라 실험 장소 외의 사람 또는 동물에게도 전파되기 때문에 매우 위험 할 수 있다.

나. 전염성 물질

실험실 내에서 식품을 먹거나 물을 마시는 것과 담배를 피우는 것은 금지되는 행동이다. 실험실 내로 음료수나 음식을 가지고 들어오는 것도 허용되어서는 안 된다. 또 손톱을 물어뜯거나 연필, 펜 등을 씹는 좋지 못한 습관을 가지고 있으면서 그 습관을 도저히 참을 수 없는 사람을 연구활동 종사자로 적당하지 않으며 높은 수준의 개인 위생이 모든 요원에게 있어서 필수적인 조건이다. 그리고 직접 입으로 피펫을 사용하는 작업은 적절한 안전장치를 갖추고 시행하여야 한다. 사용 후에는 반드시 피펫을 소독해 두어야 한다.

다. 자기감염

이것은 깨어진 유리조각이나 해부도구 바늘과 같은 날카로운 물건을 잘못 다루어 상처가 났을 때 미생물이 매우 쉽게 피부에 접촉되어 언제나 일어날 수 있다. 자기감염의 위험은 기구의 사용을 완전하게 하고 예방조치를 취하면 줄일 수 있는데 손이나 팔에 베이거나 긁힌 상처가 있다면 실험하기 전에 방수 붕대로 상처를 덮어야 한다. 실험 중에 발생되는 상처의 경우에는 일반적인 1차 치료와 함께 항파상풍 주사를 접종하는 것이 좋다. 그리고 눈에 세균이 침입하는 것을 최소화하기 위하여 보호장비를 사용하는 것이 좋다. 실험 중 필요 시 입과 코를 가리는 마스크의 사용도 사정에 따라서는 좋은 예방수단이 될 것이다.

라. 실험복

의복이나 장비를 보호하기 위한 모든 실험복과 덮개는 실험실 비품으로 취급되어야 하고 작업지시에서 절대로 빼어서는 안 된다. 이 실험복과 덮개는 반드시 세탁하여 살균처리가 되어야 하며 개인 소지품을 실험복 주머니에 넣어두는 일이 없어야 한다.

마. 실험폐기물

유리조각, 수술용 칼, 주사 바늘 등의 폐기물은 살균한 다음 지정된 용기에 폐기하여야 하고 이 용기에는 분명한 표시가 되어 있어야 한다. 피하 주사기와 바늘은 사용 후에 재생하거나 다시 사용할 수 없도록 부수어서 폐기해야 한다. 또 폐기물의 살균은 실험실에서만 하여야 하고 소각할 재료도 자격을 갖춘 사람에 의해 안전한 방법으로 소각기에 운반될 수 있도록 비닐백과 같은 것에 담아 두어야 하며 소각은 확실하게 이루어져야 한다. 그러므로 이런 실험 조작은 잘 설계된 시설 하에서 실시 하여야 한다. 특히 매우 위험한 병원미생물은 공기여과장치가 부착된 안전한 캐비닛에서 취급하는 것이 바람직하다.

2. 안전관리대책

가. 생물학적 안전조치 단계

미생물과 생물학적 위험 물질을 다루는 연구실은 특정 감염성 질병에 대한 전염 위험성을 갖고 있는 특별한 곳이다. 역사적으로 많은 연구자들이 미생물과 생물학 연구의 역사를 통해서 실험실에서 감염이 되곤 했다. 이런 많은 사고들이 전염성 물질을 처리할 때 부주의와 미숙한 기술로 인한 것으로 생각된다. 생물학적 위험으로부터 연구실을 안전하게 유지하기 위해서는 적절한 위생계획을 세우고 위험요소를 효과적으로 차단하면 된다. 생물학적 위험요소에 대한 차단 계획은 3 단계로 이루어 질 수 있다. 1단계는 감염물질에 대한 노출로부터 좋은 생물학적 기술과 적절히 안전한 장비를 사용하여 연구활동종사자와 연구실을 보호하는 것이다. 백신의 사용은 이런 방법의 좋은 예이다. 2단계는 시설 설계와 운영체계 상에서 외부환경을 보호하는 것이다. 2 단계 차단의 목적은 연구활동종사자와 관계자들의 위험물질에 대한 노출을 줄이고, 내재적으로 위험 물질의외부 환경으로 누출을 막는 것이다. 3단계는 연구실에서의 실천활동과 기술, 안전 장비와 시설 설계를 통해 이루어 질 수 있다.

나. 생물학적 안전 규정의 준수

생물학적 위험요소에 대한 가장 중요한 예방책은 연구과정에 표준 미생물학적 실습과 기술에 대한 엄격한 규정 준수에 있다. 감염성물질이나 오염된 물질을 다루는 연구활동 종사자는 가능한 위험에 대해 숙지하고 위험물질을 다루는 안전한 방법을 알아야 한다. 연구실 책임자는 사람들에게 이에 대한 적절한 교육을 시킬 책임이 있다. 생물학적 위험에 대한 표준적인 규정에 대한 실습이 위험을 통제하는 데에 충분하지 않을때, 추가적인 조치가 필요 할지도 모른다. 연구실 책임자는 추가적인 안전 실습을 교육시키는데 책임이 있다. 각 연구실은 위험을 최소화하거나, 제거하기 위해서 고안된 연습과 절차를 정하고, 생물학적 위험 물질을 다루는 생물 안전 및 운영 매뉴얼을 작성하고 준수해야 한다. 모든 연구활동 종사자에게 생물학적 위험에 대해 통보되어야 하며, 필요한 실습과 절차를 읽고, 따르는 것이 요구 된다. 적절한 실험실 기술, 안전 절차와 전염성 물질을 다룰 줄 알고 훈련 받은 연구활동 종사자가 연구실 활동을 관리해야 한다. 연구활동 종사자들의 장갑 또는 다른 개인 보호용 장비를 제거 한 후, 피 또는 다른 전염성 물질과의 접촉 후 손은 즉시 씻어야 한다. 확실히 오염되었다면, 가능한 빨리 모든 개인 보호용 장비는 작업 지역을 떠나자마자 즉시 제거하고, 저장, 세탁, 오염 제거 또는 폐기를 위하여 적절하게 지정된 지역 또는 용기에 보관하여야 한다. 사용된 바늘과 칼날은 구부리거나 자르지 않으며 재생시키지 않으며 일회용 주사기에서 떼어 내지 않는다. 오염의 가능성이 있는 연구실 내에서 식사를 하고, 술을 마시고, 담배를 피우고, 화장품 또는 입술 향유를 바르고, 콘택트렌즈를 다루는 것은 금지된다. 음식과 음료수는 피 또는 다른 내재적으로 전염성 물질이 냉동고 또는 캐비닛 또는 오염이 가능한 곳에는 보관해서는 안 된다. 피 또는 다른 내재적으로 전염성 물질을 포함한 처리과정에서 물질의 에어로졸화 및 분사, 튀기는 것을 최소화해야 한다.

다. 생물학적 안전 장비

생물학적 안전과 관련한 안전장비로는 생물학적 안전 캐비닛과 별도의 용기 이 있다. 생물학적 안전 캐비닛은 실험실 과정에서 생성된 전염성 에어로졸을 차단하기 위해 사용되는 주요한 장치다. 앞이 열린 Class I 과 Class II의 생물학적 안전 캐비닛은 연구활동 종사자

와 환경을 보호하는 데 있어 높은 수준을 제공하는 장치이다. 가스 밀폐형 Class III 생물학적 안전 캐비닛은 연구활동 종사자와 환경을 보호하는 최고 수준의 것이다. 안전 장비도 장갑, 코트, 가운, 구두 표지, 부츠, 방독면, 얼굴 방패와 안전 안경과 같은 개인 보호를 위한 아이템들을 포함한다. 그것이 생물학적 안전 캐비닛에서 작업하기 위해 비실용적인 약간의 상황에서, 개인 보호 장치는 사람들과 전염성 물질 사이의 주요한 장벽을 형성할지도 모른다. 그런 활동의 예는 유지보수, 서비스 또는 실험실 능력의 지원에 관해서 어떤 동물성 연구, 동물성 부검, 생산 활동과 활동을 포함한다.

라. 개인 보호구

연구활동 과정에 생물학적 위험에 노출 가능성이 있을 때, 연구주체의 장은 적절한 개인 보호구를 이용할 수 있도록 지원해야 한다. 개인용 보호구로는 장갑, 가운, 유체의 방수용 앞치마, 실험실 코트, 모자, 발 덮개, 얼굴 가리개, 마스크, 보안경, 마우스피스, 소생 가방, 포켓용 마스크 또는 다른 환기 장치를 포함한다. 연구실 책임자는 개인 보호장비가 연구실에서 즉시 이용될 수 있도록 비치하거나, 연구활동 종사자들에게 나누어 주어야 한다. 연구실 책임자는 개인 보호구의 청소, 세탁 또는 폐기를 할 수 있도록 지원해야 한다. 연구실 책임자는 개인 보호구를 효율적으로 이용할 수 있도록 유지 및 수리 또는 교체해 놓아야 한다. 연구활동 종사자가 피 또는 전염성 물질이 피부에 직접적으로 접촉할 가능성이 있을 때 장갑을 펼히 착용하여야 한다. 가시적으로 더러워 지거나 터지고 구멍이 났을 때 또는 보호기능에 문제가 있을 때 즉각 교체할 수 있는 수술 또는 검사용 장갑 같은 일회용 장갑이 준비되어 있어야 한다. 1회용 장갑은 재사용을 위해 씻거나 소독해서는 안 된다. 만일 장갑의 기능에 문제가 되지 않는다면 장갑을 소독 할 수는 있으나 구멍이 생기고, 금이 가고, 문제가 생길 가능성이 보이면 폐기해야 한다. 피의 분출, 스프레이, 전염성 물질의 에어로졸이 발생될 가능성이 있을 때는 언제나 마스크, 눈 보호 또는 보안면 등을 착용해야 한다. 연구활동 종사자는 감염물질에의 노출 가능성이 있을 때 적절한 보호복을 착용하여야 한다. 만일 피 또는 전염성 물질로 일반 의복이 이 더러워진 수 있다면, 실험실 가운, 실험실 코트, 앞치마 또는 유사한 옷을 착용하여야 한다. 만일 피 또는 전염성 물질이 튀거나 분사된다면 방수성 옷, 외과의 모자 또는 외투 등을 착용하여야 한다. 만일 신발이 피 또는 전염성 물질에 잠기거나 오염될 수 있다면, 방수성 보호 구두를 착용하여야 한다.

마. 연구실관리

연구실은 깨끗하고 위생적인 조건으로 유지해야 한다. 모든 장비, 환경과 작업 표면은 적절하게 청결하여야 하며, 피 또는 전염성 물질과의 접촉 후에는 소독해야 한다.

- (1) 작업 대에 피 또는 전염성 물질의 유출되어 오염이 확인된다면, 작업 표면은 실험이 끝난 후 적절한 소독약으로 청소해야 한다.
- (2) 플라스틱 제 포장지, 알루미늄 호일 또는 뒷면이 방수가 되는 흡수성 종이와 같은 보호용 덮개가 장비와 작업 표면을 보호하는데 사용될 수 있다. 이 덮개도 명백히 오염되었을 때와 일정한 실험이 끝나면 제거되고 교체해야 한다.
- (3) 피 또는 전염성 물질로 오염될지도 모르는 장비는 서비스 또는 수송에 앞서 주기적으로 점검하고 필요하다면 소독이 필요하다.
- (4) 피 또는 전염성 물질로 오염될 수 있는 가능성을 가지고 있는 모든 박스, 통, 캔들이

재사용될 때에는 정기적으로 조사, 청소 및 소독한다.

(5) 오염 된지도 모르는 부서진 유리 제품은 손으로 직접 집어서는 안 된다. 그것을 사용 하려면 브러시, 먼지 팬, 집게, 면봉 또는 핀셋과 같은 기계적인 수단을 사용하여 청소해야 한다.

(6) 샘플로 채취한 혈액 또는 전염성 물질은 보관 및 수송 전에 라벨을 붙이고 밀폐 및 누출방지가 되는 용기 또는 색칠된 가방에 두어야 한다. 만일 용기의 바깥쪽에 누출 가능성이 있으면, 더 큰 용기를 사용하여 이를 담고 밀폐해야 한다. 만일 주 용기에 유출이 의심되면, 누출 방지 및 저항력이 있는 외부 용기를 사용하여야 한다. 피 또는 전염성 물질로 오염된 재사용할 수 있는 물품은 씻고 또는 재처리하기에 앞서 오염을 제거해야 한다.

⑥ 전염성 폐기물 처리

유리조각, 수술용 칼, 주사 바늘 등의 폐기물은 살균한 다음 지정된 용기에 폐기하여야 하고 이 용기에는 분명한 표시가 되어 있어야 한다. 피하 주사기와 바늘은 사용 후에 재생하거나 다시 사용할 수 없도록 부수어서 폐기해야 한다. 또 폐기물의 살균은 실험실에서만 하여야 하고 소각할 재료도 자격을 갖춘 사람에 의해 안전한 방법으로 소각기에 운반될 수 있도록 비닐백과 같은 것에 담아 두어야 하며 소각은 확실하게 이루어져야 한다. 그러므로 이런 실험 조작은 잘 설계된 시설 하에서 실시하여야 한다. 특히 매우 위험한 병원미생물은 공기여과장치가 부착된 안전한 캐비닛에서 취급하는 것이 바람직하다.

⑦ 참여연구원의 교육 훈련 및 건강검진실시

안전하게 실험을 진행하기 위해서, 참여연구원의 교육은 필수적이다. 위험한 시약을 사용 및 보관 시 더욱 주의해서 취급해야 한다.

[제 1협동 : 건국대학교]

- 연구실 안전조치 이행실적은 본 기관의 연구실 안전관리 규정에 의거하여 추진하였음.
- 연구실 안전교육 대상
 - 대학 및 연구기관 등에서 과학기술분야 연구개발활동에 종사하는 연구원 · 대학생 · 대학원생 및 연구보조원
- 연구원의 안전교육훈련 정기 실시
 - 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제17조 및 동법 시행규칙 제9조 실험실 안전관리 규정 제16장 (안전교육), 제17조 (안전교육의 관리)
 - 연구실안전교육 훈련시간 및 수료인정기간 : 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며. 1년에 8시간 이상 교육을 받음.

과정	대상	시간
정기	연구활동종사자	8시간이상/반기별
신규채용	신규채용된 연구활동 종사자(계약직 포함)	6시간이상
	대학 · 연구기관 등에서 채용된 자 외의 자로서 신규로 연구개발활동에 참여하는 연구활동종사자	2시간이상
특별안전	중대 연구실사고발생 및 연구내용변경 등의 경우 연구주체의 창이 필요하다고 인정하는 연구활동종사자	6시간이상

- 안전교육과정 : 전공 특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시

A코스 : 생물·방사선 취급

B코스 : 화학·가스 취급

C코스 : 전기·기계 취급

- 교육과정 :



○ 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정 표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법사무실철거
- 사이버 안전교육 훈련

○ 실험실환경안전점검 실시

- 실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험 정도에 따라 A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전문기관에 의뢰하여 정밀안전진단을 실시하였음.

○ 본기관의 연구관리규정 제3장(간접비 관리)에 따라 해당 과제의 간접비에서 연구실 안전관리비를 편성하여 사용할 수 있다. 연구실안전관리비는 안전환경 조성에 관한 법률에 의거 연구활동종사자에 대한 보험료, 교육훈련, 건강검진 비용, 보호장비구입, 안전설비 설치·유지 및 보수, 안전 점검 및 정밀안전진단비 등에 사용하는 경비를 말하며 연구과제 수행 시 해당과제 인건비 총액의 2% 범위 내에서 예산편성에 반영할 수 있다.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일	사사여부	특기 사항
1	논문	Increased adipocyte differentiation may be mediated by extracellular calcium levels through effects on calreticulin and peroxisome proliferator activated receptor gamma expression in intramuscular stromal vascular cells isolated from Hanwoo beef cattle	한경대학교	1저자, 교신저자	Italian Journal of Animal Science/Italia n	0.718	2016.06.19	단독사사	SCI
2	기타 (국내 학술)	Low extracellular calcium and retinoic acid concentration promotes adipocyte differentiation in Hanwoo beef cattle stromal vascular cell	한경대학교	1저자, 교신저자	동물자원과학회/한국		2014.06.05	단독사사	학술 대회
3	기타 (국외 학술)	The increase of adipocyte differentiation by the manipulation of extracellular calcuim and retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes and intramuscular stromal vascular cells(IM SVCs) isolated from Hanwoo beef cattle	한경대학교	1저자, 교신저자	International Conference on Food, Agriculture and Natural Resources/인도네시아		2015.09.01	단독사사	학술 대회
4	기타 (국외 학술)	The increase of extracellular calcium and calcium ion channel activity may affect the inflammatory action of lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 murine macrophage cells	한경대학교	1저자, 교신저자	Experimental Biology/미국		2016.04.05	단독사사	학술 대회

5	논문	Effect of Encapsulatng Nitrate in Sesame Gum on In vitro Rumen Fermentation Parameters	전북대학교	공동 저자	Asian-Australian Journal of animal science	0.563	2014.11.06		SCI
6	논문	The development status and prospect of Korean livestock industry	건국대학교	공동 저자	Journal of Animal and Veterinary Advances	0.19	2014.12		비)SCI
7	논문	천연물질을 이용한 반추동물 항생제 대체용 친환경 펠렛코팅오일의 개발	전북대학교	공동 저자	한국유기농업학회지	0.5889	2015.6		비)SCI
8	학술 발표(국제)	Effects of Intravenous and Oral Administrated L-tryptophan on Gastro-intestinal Hormones and Duodenal Pancreatic Amylase for Improved Carbohydrate Digestibility of Steers	건국대학교	주저자	Joint ISNH/ISRP		2014.09.09		

제 11 장 기타사항

○ 변경사항

연차	당초계획	변경내용	변경사유(근거문서 포함)
1년차 (2014)	1협동과제 책임자 변경 (오영관)	백열창	인사이동 영양생리팀-481 (2014.04.15.)
3년차	제1세부과제 시험설계 변경(환경대) 비육전기에 비타민 조절을 실시하여, 비육 후기에 비 타민과 칼슘을 동시에 조 절	제1세부과제 시험설계 변경(환경대)비육전기부터 비타민 및 칼슘 조절기술 을 도입하고 종료 후 도축 하지 않고 바이옴시 등의 기법으로 자료를 확보 할 수 있는 방안으로 사양시 험을 실시	기획조정과-2920 (2016.06.10.)

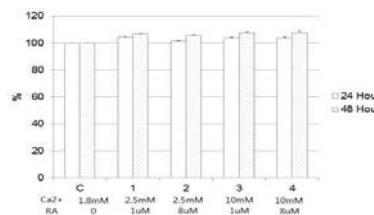
한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절 기술 및 작용기전 연구

□ 연구 배경

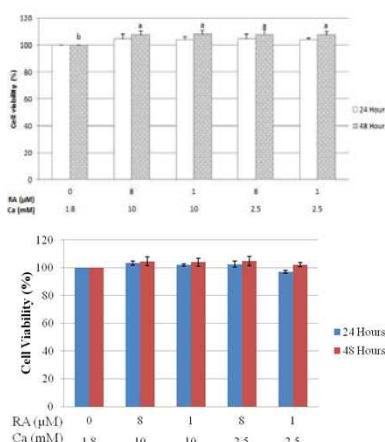
- 한우 비육우에 칼슘을 제한 급여 시 근내지방도가 개선되는 결과를 얻은 바 있으나 칼슘과 인에 대한 체내 대사기전에 대한 체계화된 연구는 아직 전무함.
- 사료 내 칼슘농도가 저하하면 뼈 중 칼슘이 동원되어 세포 내 칼슘이온이 증가하게 되는데, 이것이 신호전달이 되어 지방생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 세포수준에서의 작용기전 연구 또한 부족함.

□ 주요 연구성과

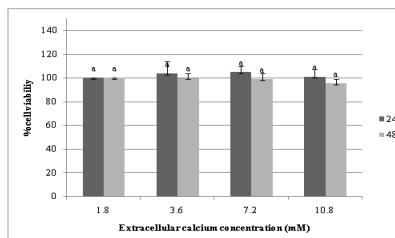
Stromal Vascular cell를 이용한 extra cellular Ca^{2+} 처리 수준에 따른 지방세포 분화



SVC에 칼슘과 레티노인산을 농도별 처리 후 세포 생존능 조사



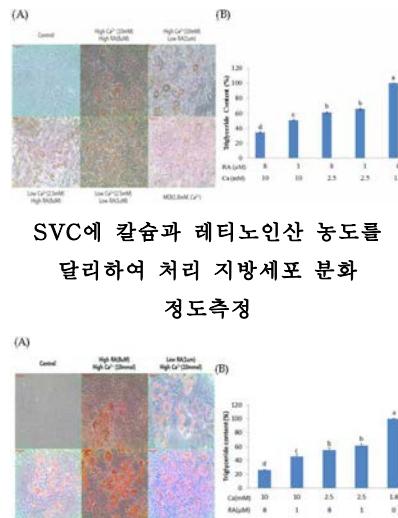
SVC에 칼슘을 농도별로 처리한 후 세포생존능 조사



증체량, 사료섭취량 및 사료효율 도체 품질 비교

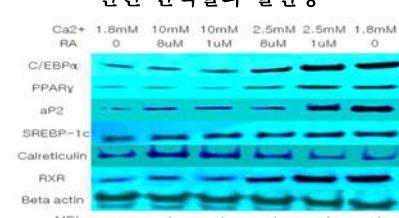
3T3-L1 세포를 칼슘과 레티노인산 농도를 달리하여 처리 지방세포 분화

정도측정

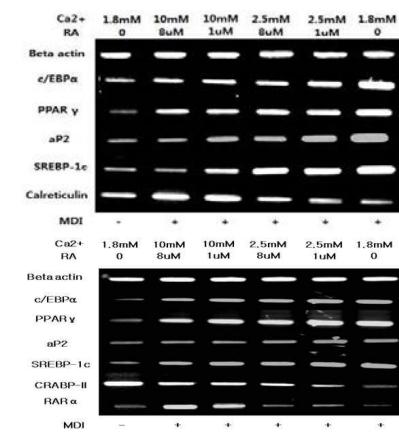


SVC에 칼슘과 레티노인산 농도별 처리하여 처리 지방세포 분화 정도측정

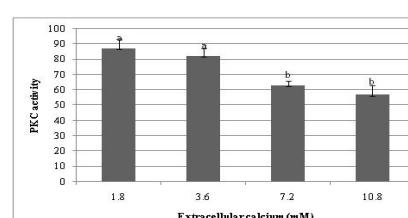
3T3-L1 세포에서 칼슘, 레티노인산 처리농도를 달리하여 분화된 지방분화 관련 단백질의 발현량



SVC에 칼슘과 레티노인산을 농도별 처리 후 지방분화관련유전자 mRNA 발현량 조사



SVC에 칼슘을 농도별 처리 후 시판되는 키트를 사용하여 PKC 활성 측정



Intramuscular stromal vascular 세포를 이용한 Intracellular Ca^{2+} 및 vitaminA 처리 연구

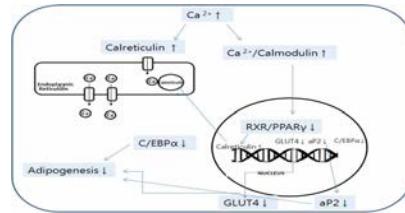
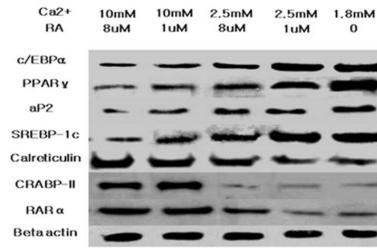
칼슘과 근내지방도 강화 시스템 모델 확립

Cap Feed content	Treatment groups		
	control 1.51 (n=20)	T1 1.1 (n=20)	T2 0.761 (n=20)
IBW (kg)	659.31±59.528	561.36±39.97	604±54.62
FBW (kg)	754.75±70.01	658.45±43.67	714.87±63.37
BWG (kg)	95.4375±37.00	97.09±27.14	110.87±37.00
ADG (kg)	7.200±0.42	7.212±0.34	7.214±0.28
FCR(gain/feed)	0.0726±0.02	0.0654±0.02	0.0739±0.02
ADG/day(gain)	0.52±0.31	0.45±0.13	0.61±0.16

Cap Feed content	Treatment groups		
	control 1.51 (n=20)	T1 1.1 (n=20)	T2 0.761 (n=20)
기록률	58.56±1.45	59.12±1.75	58.46±1.39
육체지수	63.68±2.66	66.94±2.51	64.45±2.00
근내지방률	58.50±18.44	82.81±11.68	56.62±10.98

In vivo 칼슘 사양실험 결과

Parameters ^a	Control	T1	T2
Carcass percentage	59.56±1.45	59.12±1.75	59.46±1.59
Carcass grade	63.58±3.66	66.34±2.51	64.43±2.80
Marbling score	58.50±18.4	52.81±11.68	56.62±10.93
	4		
Parameters ^a	Control	T1	T2
IBW (kg)	659.31±59.528	561.36±39.97	604±54.62
FBW (kg)	754.75±70.01	658.45±43.67	714.87±63.37
BWG (kg)	95.4375±37.00	97.09±27.14	110.87±37.00
ADG	0.52±0.21	0.45±0.13	0.51±0.16
ADFI (kg)	7.200±0.42	7.212±0.34	7.214±0.28
FCR	0.0726±0.02	0.0654±0.02	0.0739±0.02
Parameters ^a	Control	T1	T2
Average Calcium(mmol/L)	2.53 ± 0.10	2.43 ± 0.08	2.43 ± 0.13
Average Phosphorous (mmol/L)	2.24 ± 0.14	2.55 ± 0.23	2.43 ± 0.21
Ca:P ratio	1.13:1	0.95:1	1:1
Parameters ^a	Control	T1	T2
Glucose(mg/dL)	96±15.22	100±10.25	95±9.79
Total cholesterol(mg/dL)	143±12.8	146±28.4	134±20.79
BUN(mg/dL)	8.2±1.44	9.1±1.55	9.7±1.65
Total Bilirubin(mg/dL)	0.3±0.06	0.8±0.46	0.24±0.07
GOT(U/L)	72.74±11.6	75.8±16.11	65.6±12.8
	4	5	
GPT(U/L)	15.4±1.76	20.2±5.67	18.9±5.01



칼슘을 수준별급여한 한우 거세우에서
채취한 근육조직으로부터 근내 지방
축적 관련 유전자의 발현량을 분석

2차 사양실험

제2회 축정 : 실험 개시 제2회 (16.1.20. 가을농경 : 9월 사양실험 종료예정)			
	Con	T1	T2
Weight (kg)	535.8±79.11	554.75±49.00	551.6±55.89
			551±36.31

□ 혈액 성분 분석 (16.1.29. 가을농경)

	Con	Treatment 1	Treatment 2
B-actin			
PPAR			
CBPm			
SMPN			
SMBP			
A			

□ 혈액 성분 분석 (16.1.29. 가을농경) (16.6.20. 배언농경 : 12월 biopsy 분석 예정예비, 2017년 6월 설립 품목 우 쟁과 분석을 실시하고 평균 연구 결과 보고 예정.)

	Con	T1	T2	T3
Glucose(mg/dL)	122.125±6.12	106.51±64.87	148.125±18.82	123.625±12.61
Total Cholesterol(mg/dL)	223.251±23.64	198.251±20.49	216.251±14.48	178.125±6.21
BUN(mg/dL)	10±0.70	10.51±0.31	11.87±0.85	10.51±0
Total Bilirubin(mg/dL)	1.25±0.13	1.0125±0.01	1.4875±0.021	0.7125±0.39
GOT(U/L)	131±63.45	207.625±95.91	220.875±93.23	111.25±6.75
GPT(U/L)	31.5±0.89	37.625±9.43	45.25±12.71	24.375±0.02
	Con	T1	T2	T3
Weight (kg)	382±22.81	381.5±25.74	381.5±33.96	371.5±49.40

□ 혈액 성분 분석 (16.6.20. 배언농경)

	Con	T1	T2	T3
Glucose(mg/dL)	101.51±1.07	94.75±7.04	99.25±6.02	100.5±27.59
Total Cholesterol(mg/dL)	162.21±17.51	148.75±28.44	123.5±27.95	136.75±52.22
BUN(mg/dL)	10±1.36	10.25±1.23	10.25±0.5	10.5±1.91
Total Bilirubin(mg/dL)	0.6751±0.02	0.2516±0.05	0.210	0.5750±0.48
GOT(U/L)	51.75±8.80	61.25±14.19	49.5±3.87	68.25±16.00
GPT(U/L)	16.25±1.89	16±4.08	12.75±2.87	15.5±3.25

□ 과급효과

- 농립식품부산물을 이용한 신종 사료자원의 개발 및 산업화를 통한 사료비 절감 및 한우 생산비 저감 효과
- 데이터의 축적과 판독은 국가 감독 기관에서도 축산 정책을 설정함에 있어 정확한 판단과 실질적 도움이 되는 정책을 만드는데 활용
- 최종적으로 지식재산권 확보 및 기술이전을 통한 기전 조절 기술의 산업화로 활용

어 젠 다	17	예산사업명	공동연구사업 / FTA 대응경쟁력향상기술개발_축산경쟁력제고
주관과제명(과제번호)	한우에 농식품부산물 급여시 최적 비타민 A 및 광물질 급여기준 설정 연구 (PJ010023)		
세부과제명(과제번호)	한우 고급육 생산을 위한 최적 칼슘·인 조절 기술 및 작용기전 연구 (PJ000000000)		
연 구 자	(소속) 한경대학교	(성명) 황성구	T. ***** E-mail: sghwang@hknu.ac.kr

한우에 농식품부산물 급여시 최적 비타민 A 급여기준설정 연구

□ 연구 배경

- 한우 거세우에서 vitamin A 제한 급여 시 최적 vitamin A 급여농도 및 근내지방도에 개선정도에 대한 연구 결과 부족함
- 한우 거세우에 비타민 A 제한 급여시 ADH1C 유전자형이 근내지방도에 영향을 미치는지에 관한 연구가 부족함

□ 주요 연구성과

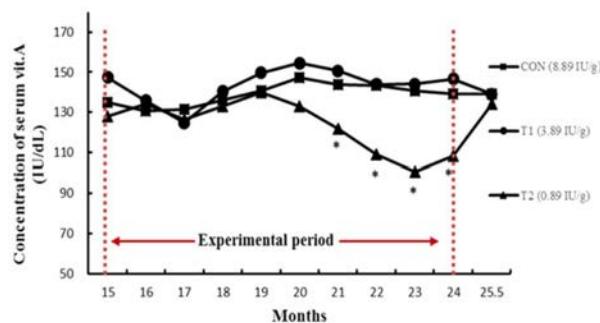


Fig 34. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from vitamin A premix.

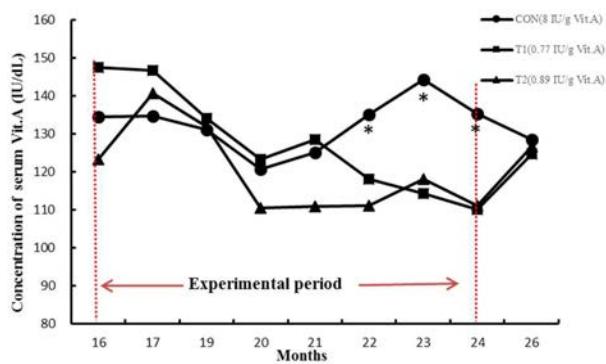


Fig 35. Changes in serum vitamin A concentration of Korean native steer during vitamin A restriction from feedstuff.

근내지방 지수			
	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) >110 IU	혈중 Vitamin A 농도 (IU/dL) <110 IU	P-value
연구 5	5.2±0.38	6.3±0.66	0.156
연구 6	5.1±0.35	5.8±0.46	0.243
연구 5 + 연구 6	5.1±0.26	6.0±0.38	0.068

Fig 36. Effect of different peirod concentration of serum vitamin A in marbling socre.

	TT type	TC type	P value
등지방 두께(mm)	12.7±0.42	13.2±0.72	0.952
등심 면적(cm ²)	86.8±0.94	93.0±1.88	0.002
도체중(kg)	411.0±5.04	444.2±9.83	0.002
유량지수	64.8±0.29	64.6±0.57	0.771
근내지방(NO.)	5.2±0.16	6.3±0.28	0.001
육색	4.8±0.04	4.8±0.07	0.936
지방색	3.0±0.02	3.0±0.00	0.320
조직감	1.2±0.04	1.1±0.04	0.125
성숙도	2.1±0.03	2.2±0.06	0.410

Fig 37. Effect of ADH1C gene on carcass traits in Korean native steers during vitamin A restriction

□ 과급효과

※ 과학, 기술적, 사회·경제적 효과를 자세히 작성

- 본 연구를 통한 한우 사양에 있어 Vitamin A 제한 기술의 개발은 한우 사양시스템에 있어 농가에 적용하여 높은 수준의 Marbling을 생산 할 수 있는 고급육 생산용 사료개발 및 사양시스템 개발에 핵심적인 기술로 활용할 수 있음
- 한우에 비타민 A 제한급여 시 ADH1C 유전자의 형질에 따라 근내지방도에 미치

는 영향이 다르다는 것을 확인하고 이를 통해 유전자 형질에 따른 vitamin A 맞춤형 사양관리에 활용할 수 있음.

어 젠 다	1_1	예산사업명	FTA 대응 경쟁력 향상 기술 개발사업
주관과제명(과제번호)	한우에 농식품부산물 급여시 최적 비타민 A 및 광물질 급여기준 설정 연구 (PJ010023)		
세부과제명(과제번호)	한우 고급육 생산을 위한 과학적 Vitamin A 제한 기술 개발 (PJ010023032016)		
연 구 자	(소속) 건국대학교 (성명) 이홍구 T.	*****	E-mail:hglee66@konkuk.ac.kr

제 12 장 참고 문헌

1. Adachi, K., Kawano, H., Tsuno, K., Nomura, Y., Yamamoto, N., Arikawa, A., Tsuji, A., Adachi, M., Onimaru, T., and Ohwada, K. (1999) Relationship between Serum Biochemical Values and Marbling Scores in Japanese Black Steer. *J. Vet. Med. Sci.* 61(8), 961–964.
2. Brandebourg, T.D., and Hu, C.Y. (2005) Regulation of differentiating pig preadipocytes by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* 83(1), 98–107.
3. De Oliveira Freitas DM, Martino HDS, Ribeiro SMR and Alfenas RCG 2012. Calcium ingestion and obesity control. *Nutr. Hosp.* 27:1758–1771.
4. EFSA. 2012. Scientific Opinion on the safety and efficacy of beta-carotene as a feed additive for all animal species and categories-EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal*, 10(6):2737
5. Ertesvag, A., Aasheim, H.C., Naderi, S., and Blomhoff, H.K. (2007) Vitamin A potentiates CpG-mediated memory B-cell proliferation and differentiation: involvement of early activation of p38MAPK. *Blood* 109(9), 3865–3872.
6. Fajas , L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, Miard S, and Auwerx J. 2002 . The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev. Cell .* 3: 903 - 910.
7. Gorocica-Buenfil, M.A., Fluharty, F.L., Reynolds, C.K., and Loerch, S.C. (2007) Effect of dietary vitamin A restriction on marbling and conjugated linoleic acid content in Holstein steers. *J. Anim. Sci.* 85: 2243–2255.
8. Gorocica-Buenfil, M.A., Fluharty, F.L., and Loerch, S.C. (2008) Effect of vitamin A restriction on carcass characteristics and immune status of beef steers. *J. Anim. Sci.* 86, 1609–1616.
9. Grasesa, F., Garcia-Gonzalezb, R., Genestara, C., and Torrec, J.J. 1998. Vitamin A and urolithiasis. *Clinica Chimica Acta*, 269: 147–157.
10. He YH, Song Y, Liao XL, Wang L, Li G, Alima, Li Y and Sun CH. 2011. The calcium sensing receptor affects fat accumulation via effects on antilipolytic pathways in adipose tissue of Rats fed low calcium diets. *The Journal of Nutrition.* 1938–1946.
11. Jensen B, Farach-Carson MC, Kenaley E, and Akanbi KA 2004 . High extracellular calcium attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Exp.Cell Res.* 301: 280 - 292.
12. Jeyakumar, S.M., Vajreswari, A., and Giridharan, N.V. 2008. Vitamin A regulates obesity in WNIN/Ob obese rat; independent of stearoyl-CoA desaturase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 370(2):243–247.
13. Jiang, Z., Michal, J.J., Tobey, D.J., Daniels, T.F., Rule, D.C., and Macneil, M.D. (2008) Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle. *Int. J. Biol. Sci.* 4(6):345–351.
14. Jin, X., Kim, J. G., Oh, M. J., Oh, H. Y., Sohn, Y. W., Pian, X., et al. (2007) Opposite roles of MRF4 and MyoD in cell proliferation and myogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 476–482.
15. Jin, X., Lee, J. S., Kwak, S., Jung, J. E., Kim, T. K., Xu, C., et al. (2006) Myogenic differentiation of p53- and Rb-deficient immortalized and transformed bovine fibroblasts in response to MyoD. *Molecules and Cells*, 21, 206–212.
16. Jin, Y.C. 2011. Profiling and functional study of proteins involved in synthesis of CLA in the mammary gland (Doctor Dissertation). SeoulNationalUniversity,Seoul,SouthKorea.
17. Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S., and Sugimoto, E. 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from

- preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.*, 96(2): 323–326.
18. Kato, Y., Ito, M., and Hirooka, H. (2011) Genetic parameters of serum vitamin A and total cholesterol concentrations and the genetic relationships with carcass traits in an F1 cross between Japanese Black sires and Holstein dams. *J. Anim. Sci.* 89, 951–958.
19. Kuri-Harcuch, W. 1982. Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid, *Differentiation*. 23:164 - 169.
20. Matsuhashi, T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe, T., Sakaguchi, S., and Kobayashi, E. (2011) Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *J Anim Sci*, 89:12–22.
21. Mauvoisin, D., and Mounier, C. (2011) Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*, 93(1):78–86.
22. Meldolesi J 2008. Inhibition of adipogenesis: a new job for the ER calcium pool. *Journal of Cell Biology* 182:11–13.
23. Miller CW, Casimir DA and Ntambi JM. 1996. The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha. *Endocrinology*. 137:5641–5650.
24. Miller, C.W., Waters, K.M., and Ntambi, J.M. 1997. Regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1 by vitamin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 231(1):206–210.
25. Molotkov, A. Ghyselinck, N.B., Chambon, P., and Duester, G. 2004. Opposing actions of cellular retinol binding-protein and alcohol dehydrogenase control the balance between retinol storage and degradation. *Biochem. J.* 383: 295–302.
26. Ntambi, J.M., and Miyazaki, M. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research* 43:91–104.
27. Ntambi JM and Takova T 1996. Role of calcium in the early stages of murine adipocyte differentiation as evidenced by calcium mobilizing agents. *Differentiation* 60:151–158.
28. Oh, D.Y., Lee Y.S., and Yeo, J.S. 2011. Identification of the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) of the Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) Associated with Unsaturated Fatty Acid in Hanwoo (Korean Cattle). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(6): 757– 765.
29. Ohyama, M., Matsuda, K., Torii, S., Matsui, T., Yano, H., Kawada, T., and Ishihara, T. (1998) The Interaction between Vitamin A and Thiazolidinedione on Bovine Adipocyte Differentiation in Primary Culture. *J. Anim. Sci.* 76, 61–65.
30. Oka A, Maruo Y, Miki T, Yamasaki T and Saito T. 1998. Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat Science*. 48: 159 - 167.
31. Payne, J.M. (1972) The Compton metabolic profile test. *Proc. R. Soc. Med.* 65(2), 181–183.
32. Peacock M. 2010. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5:23–30.
33. Pearle, M.S., Calhoun, E.A and Curhan, G.C (2007). "Chapter 8: Urolithiasis". In Litwin, MS; Saigal, CS. *Urologic Diseases in America* (NIH Publication No. 07 - 5512). Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. pp. 283 - 319. Retrieved 2011-06-04.
34. Safanova I, Darimont C, Amri EZ, Grimaldi P, Ailhaud G, Reichert U, Shroot B, 1997. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104:201 - 211.
35. Serlachius M and Andersson LC. 2004 . Upregulated expression of stanniocalcin-1 during adipogenesis. *Exp. Cell Res.* 296: 256 - 264.
36. Shi H, Halvorsen YD, Ellis PN, Wilkison WO and Zemel MB 2000. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics* 3:75–82.

37. Souganidis, E., Laillou, A., Leyvraz, M., Moench-Pfanner, R. (2013) A comparison of retinyl palmitate and red palm oil β -carotene as strategies to address Vitamin A deficiency. *Nutrients* 5(8):3257-3271.
38. Stone RL and Bemlohr DA. 1990. The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation*. 45:119 - 127.
39. Sun X, Zemel MB. 2004. Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis. *FASEB J.* 18:1430 - 2.
40. Szabo E, Qui Y, Baksh S, Michalak M and Opas M 2008. Calreticulin inhibits commitment to adipocyte differentiation. *Journal of Cell Biology* 182: 103-116.
41. Timio, F., Kerry, S.M., Anson, K.M., Eastwood, J.B., Cappuccio, F.P. 2003. Calcium urolithiasis, blood pressure and salt intake. *Blood Press.*, 12(2): 122-127.
42. Torii, S., Matsumoto, K., Matsui, T., and Yano, H. (1995) Effect of vitamin A, C and D on glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of sheep preadipocytes in primary culture. *Anim. Sci. Technol. (Japanese)* 66, 1039-1042.
43. Wang T and Lee HG. (2013) Advances in Research on cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid: A Major Functional Conjugated Linoleic Acid Isomer. *Crit Rev Food Sci Nutr* DOI:10.1080/10408398.2012.674071.
44. Wang T. 2013. Mining of Proteins Involved in cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid Synthesis in Ruminant Mammary Gland (Doctor Dissertation). Pusan National University, Pusan, South Korea.
45. Wang , Z, Zhang B, Wang M, and Carr BI. 2003. Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element-binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB-binding protein to pp90RSK. *J. Biol. Chem.* 278: 11138 - 11144.
46. Ward, A. K. McKinnon, J. J. Hendrick S. and Buchanan, F. C.. 2012. The impact of vitamin A restriction and ADH1C genotype on marbling in feedlot steers. *J ANIM SCI* 2012, 90: 2476-2483.
47. Wu, X.X., Yang, Z.P., Shi, X.K., Li, J.Y. Ji, D.J., Mao, Y.J., Chang, L.L., Gao, H.J. (2012) Association of SCD1 and DGAT1 SNPs with the intramuscular fat traits in Chinese Simmental cattle and their distribution in eight Chinese cattle breeds. *Mol. Biol. Rep.*, 39:1065-1071.
48. Yin, J., Jin, X., Beck, S., Kang, D., Hong, Z., Li, Z. (2010) In vitro myogenic and adipogenic differentiation model of genetically engineered bovine embryonic fibroblast cell lines. *Biotechnology Letters*, 32, 195-202.
49. Zemel MB. 1998. Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 188:129 - 36.
50. Zemel MB. 2005. Calcium and dairy modulation of obesity risk. *Obes Res.* 13:192-193.
51. Zemel MB, Richards J, Milstead A and Campbell P. 2005. Effects of calcium and dairy on body composition and weight loss in African-American adults. *Obes Res.* 13: 1218-1225.
52. Zemel MB, Shi H, Greer B, DiRienzo D and Zemel PC. 2000. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 14:1132-1138.
53. Zhang LL, Yan LD, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, Yan ZC, Wang LJ, Zhao ZG and Zhu SJ. 2007. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ. Res.* 100: 1063 - 1070.
54. 김병기, 고시장. 2005. 거정석과 비타민 A 급여가 거세한우 등심육의 이화학적 특성에 미치는 영향. *한국축산식품학회지*. 25(2):156-161.
55. 김병기, 고시장, 김영직. 2005. 거정석과 비타민 A 급여가 거세한우의 성장, 혈액성상 및 도체특성에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지*. 47(2):283-292.
56. 김병기, 김영직. 2005. 활성탄과 비타민 A의 급여가 거세 한우의 성장, 혈액성상 및 도체 특성에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지*. 47(2):233-242.
57. 안병홍, 김병호, 문여황. 1998. 비타민 A 급여수준과 거세가 한우의 비육능력 및 혈청성상에 미치는 영향. *한국영양사료학회지*. 22(4):237-243.

58. 안병홍, 김병호, 문여황. 1999. 비타민 A 급여수준과 거세우가 한우 지방조직의 지방산조성 및 육질에 미치는 영향. 축산진흥연구소보. 26:85.
59. 양소정, 안병홍. 2001. 혈액중 비타민 A 및 E 농도와 한우 거세우의 도체특성과의 관계에 관한 조사연구. 한국동물자원과학회지. 43(6):895-904.
60. 이종언, 박남건, 성필남, 진신흠, 박범영. 2003. 한우 비육후기 사료에 칼슘 첨가제(석회석) 제거가 성장 및 육질특성에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 45(3):455-462.
61. 정준. 2001. 한우 고급육생산에 있어 뇨결석증(Urolithiasis)에 관하여. 한우개량. 6(7).18-21.
62. 조종후, 양용관, 이광원. 1973. 유우 및 한우의 혈청 중 Carotenoid 및 vitamin A 함량. 대한수의학회지. 13(1):13-16.
63. 채성화, 정근기, 최창본. 2003. 거세한우의 혈청 및 간장내 비타민 A 농도와 도체형질간의 상관관계. 한국동물자원과학회지. 45(4):585-592.
64. 하태광, 조종후. 1989. 한우의 혈장 vitamin A 및 holo-retinol binding protein 농도에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 13(3):255-262.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「FTA대응경쟁력향상기술개발사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「FTA대응경쟁력향상기술개발사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.