

반추미생물 분석에 의한 Chromium-methionine Chelate의 반추위 By-pass을 추정

김창혁 · 박병기 · 박정금 · 김현숙 · 성경일 · 신종서 · 오상집

강원대학교 동물자원공동연구소

Estimation of Rumen By-pass Rate of Chromium-methionine Chelates by Ruminal Bacteria Analysis

C. H. Kim, B. K. Park, J. G. Park, H. S. Kim, K. I. Sung, J. S. Shin and S. J. Ohh

Institute of Animal Resources, Kangwon National University

ABSTRACT

The study was designed to estimate the *in vitro* rumen by-pass rate of both chromium methionine chelate as an organic supplement and CrCl₃ as an inorganic supplement. Rumen by-pass rates of the supplements were evaluated by comparing ruminal metabolites in rumen fluid and Cr and methionine contents in the body of ruminal microorganism.

For *in vitro* digestion examination, basic nutrients for ruminal microbes were supplied with 7g (DM) of feed, 2g of rice straw, and 2g of corn silage per each incubation jar. Three treatments including Control(no supplementation of Cr), T1 (1000 ppb supplementation of CrCl₃) and T2 (chromium methionine chelate supplementation equivalent to 1000 ppb of Cr content) were prepared with five replications per each treatment.

pH of T2 was lower than that of Control and T1 regardless of incubation time. Ammonia content was higher in T2 than in Control and T1 during first 6 hours of incubation. However, the ammonia content in Control was remained low after 6 hours. Total volatile fatty acids (VFA) content in control was increased constantly as incubation time was extended. Therefore, VFA content in T1 and T2 were significantly lower (P<0.05) than those of Control. Dry matter recovery rate by ruminal microorganism was the lowest in T1, however ruminal microbial population was increased most efficiently in T2 during 12 hours of *in vitro* incubation. Cr concentrations in the body of ruminal microbes were not different (P>0.05) between Control and T2, but it was significantly high in T1 (P<0.05). Contents of methionine and cystine in ruminal microbes also were not different between Control and T2 (P>0.05), but it was relatively low in T1.

Based on the above results, the chromium methionine chelate was believed to by-pass rumen and could remain intact until it reaches small intestine compared to inorganic chromium. This results implies that chromium methionine chelate could be more effective to function in the small intestine of ruminant animals.

(Key words : Chromium, Ruminal microbe, Methionine, Chromium-methionine chelate, *In vitro*)

I. 서 론

최근, 동물의 성장 촉진, 사료효율 개선 및
가능성 육의 생산을 목적으로 미량광물질의 이

용에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 특
히 가축의 체내에서 생체조절에 관여하는 광물
질의 경우 일반적인 사료급여 방법을 통해서
급여효율이 떨어질 뿐만 아니라 체내 이용을

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원과제(KRF-01-005-G20007)로 수행한 연구임.
Corresponding author: Chang-Hyeug, Kim, Institute of animal resources, Kangwpon National University,
Chuncheon, 200-701, Korea, Tel : 033-250-7693.

또한 낮은 특성으로 인해 최근에는 미량 광물질의 급여효율 및 체내 이용성을 높이기 위한 방안으로 미량광물질에 대한 유기태화 기술이 활용되고 있다(Jeffrey와 Fisher, 1990).

Chromium(이하 Cr)은 가축의 체내 영양소 대사에 관여하여 육조성분을 조절하는 기능이 있는 것으로 보고된 바 있다(Schwartz와 Mertz, 1959). 즉, glucose tolerance factor(GTF)의 구성 성분으로서 insulin의 기능 활성화(Schwartz와 Mertz, 1957)에 관여하며, 콜레스테롤 항상성 유지(Evans, 1989), HDL-cholesterol 증가(Evans, 1989), 면역기능 강화 등(Schwartz와 Mertz, 1959; Steele 등, 1977, 1982; Anderson, 1987; Evans, 1989; Chang과 Mowat, 1992; Moonsie-Shageer와 Mowat, 1993)의 기능을 하는 것으로 보고된 바 있다. 이상에서 언급한 바와 같이 Cr은 체내에서 반드시 필요로 하는 광물질이지만, Cr 자체가 체내 이용성이 매우 낮은 관계로 picolinate, nicotinate, EDTA, yeast, amino acid(methionine, alanine) 등 유기물을 결합대상(ligand, 이하 리간드)으로 chelate Cr을 제조하여 이용하고 있다(Mertz와 Roginski, 1969; Votava 등, 1973).

몇몇 연구자들에 의해 일부 축종에서 실시되었던 chelate Cr의 첨가 효과에 대해 살펴보면, 브로일러(Anderson, 1987) 및 돼지(Page 등, 1993)의 경우 chelate Cr을 첨가하게 되면 증체량 및 사료효율이 개선되며, chelate Cr은 체내에서 단백질 합성, 핵산 및 지질대사와도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다. 한편, Kegley 등(1997)은 육우에 chelate Cr을 첨가한 결과 chelate Cr의 첨가 급여는 면역기능을 증가시켜 질병을 예방할 뿐만 아니라 수송 스트레스로 인한 경제적인 손실도 감소시켜준다고 보고하였으나, 반추동물의 경우 단위동물과는 달리 증체율 및 사료효율의 개선효과는 기대할 수 없는 것으로 보고된 바 있다(Swanson 등, 2000).

단, 아쉬운 점은 단위 동물에 비해 반추동물의 경우 chelate Cr의 급여에 따른 생산성 증진 효과 및 생리적인 특성 구명이 상대적으로 미흡한 실정인데, 이는 반추동물을 대상으로 한

chelate Cr의 실험이 상대적으로 부족한데 일차적인 원인이 있으며, 2차적인 원인으로는 chelate Cr의 첨가에 따른 반추 미생물에 의한 발효특성 및 소장으로의 by-pass 여부에 대한 검토가 이루어지지 않았기 때문에 chelate Cr의 반추동물을 대상으로 한 활용에 있어서 제한 요인으로 작용하고 있는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 Cr을 유기태화 하기 위하여 methionine으로 chelate한 Cr-methionine chelate(이하 크라민®, Inno-Bio, Korea)의 첨가가 *in vitro* 반추위 발효특성에 미치는 영향을 조사하고 반추위액 중에서 크라민®의 용해성 및 반추 미생물 집단에 의한 크라민®의 흡수여부를 평가하여 chelate Cr의 이용성, 안정성 및 by-pass 여부를 간접적으로 증명하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 시험에서는 공시동물로 반추위 cannula가 장착된 한우 암소(400 kg)를 이용하였으며, 사료 급여는 체중의 1.5% 수준으로 조사료인 호밀건초와 시판 배합사료의 비율을 50:50으로 하여 1일 2회(09:00 및 18:00) 급여하였고, 물은 자유 음수토록 하였다. 실험은 예비시험기간 6일과 본 시험 1일로 반복 실시하였다. 급여한 농후 사료의 구체적인 배합비는 Table 1과 같다.

2. 시험구 처리

In vitro 배양시험은 one batch *in vitro* incubator(model: Ankom Technology-DAISY II, USA)를 이용하여 실시하였으며, 배양 처리구는 jar(배양 용기)를 이용하였다. Jar 당 반추미생물의 기초 영양소로 시중에 유통되고 있는 배합사료는 20 mesh 이하로 분쇄하여 건물기준으로 7g, 볏짚 2g 및 Corn silage 2g 씩 동일하게 첨가한 후 부형제만을 첨가한 대조구(control), CrCl₃를 1000 ppb 첨가한 T1구 및 Cr 함량이 1000 ppb가 되도록 크라민®을 첨가한 T2 구로 총 3처리구를 두었으며, 처리 당 5반복으로 시험을 수행하였

Table 1. Feed ingredient and chemical composition of a formulated mixture used for incubation

Ingradients	%
Corn	55.0
Wheat	15.0
Defatted rice bran	8.0
Corn gluten feed	5.0
Soybean meal	10.0
Molasses	0.2
Limestone	2.0
Salt	0.5
Calcium-phosphate	1.3
Vit.-min. mixture ¹⁾	1.0
Calculated chemical composition	
Crude protein	15.12
TDN	74
Calcium	1.16
Phosphrous	0.75

¹⁾ Vitamin-mineral mixture : Vitamin A 3000 IU; Vitamin D 6000 IU; Vitamin E 30 IU; Cu 25 mg; Fe 150 mg; Zn 200 mg; Mn 100 mg; Co 0.5 mg; I 1.5 mg.

다(Table 2).

3. Rumen inoculum 및 *in vitro* 배양액의 준비

In vitro 배양 시험에 사용된 반추위액의 채취는 반추위 cannula가 장착된 한우 암소(400 kg)의 반추위 cannula를 통해 오진 사료 급여전에 반추위액과 고형물을 채취한 후 4겹의 cheese cloth를 통해 여과하여 2,000 ml를 채취하였으며, 채취한 위액은 미리 39℃로 예열되고 O₂ free-CO₂ gas가 충전된 용기에 담고 재차 O₂ free-CO₂ gas를 30초간 주입한 후 밀폐하여 혐기적인 조건을 유지하였다. 채취된 반추위액은 30분 내로 실험실로 운반한 후 *in vitro* 배양시험을 위한 inoculum으로 사용하였다.

In vitro 배양액은 rumen inoculum 400 ml를 미리 제조된 인공타액(buffer solution A 및 B)

Table 2. Composition of rumen buffer solutions for *in vitro* incubation

Components		Unit
Buffer solution A:		
KH ₂ PO ₄	10.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g
NaCl	0.5	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	g
Urea(regent grade)	0.5	g
Distilled water	1,000	ml
Buffer solution B:		
Na ₂ CO ₃	15.0	g
Na ₂ S·9H ₂ O	1.0	g
Distilled water	1,000	ml

1,600 ml와 혼합하여 제조하였다. 인공타액은 Table 3과 같은 비율로 buffer solution A와 B로 구분하여 각각 제조한 후 시험개시 전에 A용액 1,330 ml과 B용액 266 ml를 동시에 *in vitro* 배양 jar에 넣고 혼합하여 pH가 6.8이 되도록 조정하였으며, 39℃까지 예열하여 사용하였다. 한편, rumen inoculum 접종시에는 O₂ free-CO₂ gas를 30초간 충전하여 배양 jar내의 공기를 배제하였으며, 그 후 39℃에서 1시간 동안 예비 배양을 실시하여 안정화 시킨 후 시험에 이용하였다.

4. 조사항목 및 분석방법

(1) 배양액 내 pH 및 암모니아 농도 측정

In vitro 배양 0, 3, 6, 9 및 12 시간별로 각각 배양액 5 ml를 채취한 즉시 pH를 측정하고, 4℃에서 3,000×g로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 10배 희석하여 자동수질분석기(Quikchem 8000, USA)로 배양액내 암모니아 농도를 측정하였다.

(2) 휘발성 지방산(VFA) 농도

배양액의 VFA 농도는 실험설계에 따라 매 시간대별로 5 ml의 배양액을 채취한 후 20%의

Table 3. Experimental design for *in vitro* trial

Items	Treatment		
	Control	T1	T2
Basal feed(DM) (g)	7	7	7
Corn silage(DM) (g)	2	2	2
Rice straw(DM) (g)	2	2	2
Cr content (ppb)	—	1,000	1,000

T1 : CrCl₃, T2 : Chromium-methionine chelate.

metaphosphate 1 ml 및 포화 HgCl₂ 0.5 ml를 첨가한 후 4°C에서 4,000×g로 5분간 원심 분리하여 상층액을 취한 후 gas chromatography (Shimadzu GC-17A, Japan)를 이용하여 휘발성 지방산 농도를 측정하였다. 휘발성 지방산 측정에 이용된 column은 HP-Innowaw (Cross-Linked PEG) 30 m×0.32 mm×0.5 μ m(HP Part No. 19091N-213) 이었으며, 측정조건은 inject port 온도 200°C, column 온도 150°C, detector 온도 220°C 및 5°C/min의 column temperature programming에 따라 실시하였다. 또한 헬륨(He)gas(carrier gas) 유입량은 1 ml/min으로 하고, 수소(H₂) gas 및 산소(air) 흐름속도는 각각 30 ml/min 및 300 ml/min이었으며, 시료 주입량은 1 μ l로 하였다.

(3) 총 미생물의 분리

In vitro 배양 0, 3, 6, 9 및 12시간대별로 각각 200 ml의 배양액을 채취한 후 사료 입자에 부착되어 있는 총 미생물을 분리하기 위하여 O₂ free-CO₂ gas를 주입하며 homogenizer로 3분간 3회를 교반한 다음 O₂ free-CO₂ gas를 연속적으로 주입하며 4겹의 cheese cloth로 여과하여 총 미생물 분리를 위한 시료로 사용하였다. 총 미생물의 분리는 Shultz와 Shultz(1970)의 tungstic acid 침전법에 의해 분리하였는데, 위액 20 ml에 1.07N H₂SO₄ 5 ml 및 10% sodium tungstate 5 ml를 분주하고 교반하였으며, 교반된 시료는 4시간 이상 정치시킨 후 200×g에서 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물은 원심분리를 통해 증류수:H₂SO₄:Sodium tungstate (4:1:1) 용액으로 2회 세척한 다음 동결 건조하여 분석 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

(4) 균체의 Cr 및 아미노산 농도 분석

미생물체에 함유된 Cr 농도는 미생물 균체를 건식법으로 600°C에서 24시간 동안 회화 후 3차 증류수로 10배 희석하여 ICP (LEEMAN PS950, USA)를 이용하여 분석하였다. 또한 미생물 균체의 아미노산 함량은 Mason 등(1980)의 방법에 따라 미생물 시료를 전처리 하여 HPLC (Waters 510 Pump; Waters™ Automated Gradient Controller; Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector; Waters Temperature Control Module, USA)를 이용하여 분석하였다.

5. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과들은 SAS@8.1 package / PC(1990)를 이용하여 일반선형 모형(GLM)으로 분산분석을 실시한 후 처리간 평균의 유의성 검증을 Pair-difference의 방법에 의해 0.05% 수준에서 유의성을 검증하였다.

$$Y_{ij} = \mu + T_j + e_{ij}$$

여기에서,

Y_{ij} : 실험 실측치

μ : 전체평균

T_i : i번째 처리의 효과

e_{ij} : 각 개체의 고유한 확률오차

III. 결과 및 고찰

일부 반추위 박테리아가 가지고 있는 많은 효소는 pH 변화에 민감하기 때문에 미생물의 세포내 pH는 거의 중성으로 유지된다. 만일 pH

가 낮아지게 되면 세포 외부의 H^+ 농도가 증가하고 세포내로 H^+ 가 유입되기 때문에 박테리아는 세포내 pH를 거의 중성으로 유지하기 위해 세포 외부로 H^+ 를 수송하기 위한 추가적인 ATP를 소비해야만 한다(박 등, 2002). 또한 ATP hydrolysis로부터 파생된 ATP 혹은 에너지는 양자를 이동시키기에 불충분하게 되고 세포내의 pH가 떨어지고 이는 효소는 불활성화를 유도하여 세포의 사멸을 초래하기 때문에 첨가물에 따른 배양액내 pH를 조사는 기본적으로 수행되어야 한다.

무기태 3가 Cr인 $CrCl_3$ 및 chelate Cr인 크라민®의 첨가에 따른 *in vitro* 배양액의 pH 변화는 Table 4에 나타낸 바와 같다. *In vitro* 배양 3시간의 대조구(Control), T1($CrCl_3$) 및 T2(크라민®)구의 배양액내 pH는 각각 6.61, 6.66 및 6.59로 나타나 비록 통계적인 유의성은 인정되지 않았으나, 대조구 및 T1구에 비해 T2에서 배양액내 pH가 낮은 경향을 보였다. 또한 이후 배양시간이 경과함에 따라 처리에 관계없이 배양액내 pH가 지속적으로 낮아지는 경향을 보였으며, 배양 3시간과 마찬가지로 대조구 및 T1구에 비해 T2구에서 배양시간에 관계없이 배양액내 pH가 낮은 경향을 보였다. 이상의 결과에서 T1구의 배양액내 pH는 대조구의 배양액내 pH와 전 배양시간에서 차이가 없는 것으로 나타나 반추위액내에서 무기태 Cr의 이용성은 낮다고 판단되었다. 한편 T2구는 배양액내 pH가 비록 통계적인 유의성은 없었으나, 전 배

양시간에서 대조구와 T1구에 비하여 상대적으로 낮은 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 배양액내 낮은 pH가 methionine의 부분적인 분해로 인한 결과인지 혹은 크라민®의 첨가로 인한 반추위내 영양소 이용성이 향상되었기 때문에 일어난 현상인지에 대하여는 앞으로도 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

반추위내에서 단백질 영양의 효과에 대한 지표 중의 하나가 암모니아를 꼽을 수 있다. 반추위 내에서 암모니아 농도는 사료 단백질의 이화작용, 반추위로부터 암모니아의 흡수 및 반추미생물의 성장으로 인한 암모니아의 동화작용이 서로간의 균형을 나타낸다(엄 등, 2002). 따라서 본 실험에서도 반추위내 영양대사에서 중요한 위치를 차지하고 있는 암모니아 농도에 대해 조사하였는데, 그 결과는 Table 5에서 나타낸 바와 같다. *In vitro* 배양 3시간의 대조구, T1구 및 T2구의 배양액내 암모니아 농도는 각각 15.78, 13.58 및 17.04 mg/dl로 대조구에 비해 T1구의 경우에는 암모니아 농도가 낮게 나타난 반면에 T2구의 경우에는 암모니아 농도가 유의적으로 높은 결과를 보였다($P < 0.05$). 한편, 배양 0시간부터 배양 6시간까지는 처리에 관계없이 배양액내 암모니아 농도가 증가하는 경향을 보였으며, 대조구 및 T1구에 비해 T2의 암모니아 생성량이 많은 것으로 나타났다. 반면에 배양 6시간 이후에는 처리에 관계없이 배양액내 암모니아 농도가 감소하여 일정 농도를 유지하는 결과를 보였다. 일반적으로 암모니아

Table 4. Changes of pH during *in vitro* incubation

Incubation time(hr)	Treatments		
	Control	T1	T2
0	6.81 ± 0.13	6.82 ± 0.04	6.80 ± 0.07
3	6.61 ± 0.14	6.66 ± 0.09	6.59 ± 0.05
6	6.30 ± 0.13	6.35 ± 0.04	6.25 ± 0.10
9	6.11 ± 0.08	6.13 ± 0.13	6.03 ± 0.05
12	5.94 ± 0.02	5.94 ± 0.06	5.86 ± 0.17

T1 : $CrCl_3$ 1000 ppb, T2 : Chromium-methionine chelate 1000 ppb

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

Table 5. Changes of ammonia concentration during *in vitro* incubation

Incubation time(hr)	Treatments		
	Control	T1	T2
0	8.45 ± 0.24 ^c	11.60 ± 0.02 ^a	10.29 ± 0.06 ^b
3	15.78 ± 0.03 ^b	13.58 ± 0.18 ^c	17.04 ± 0.05 ^a
6	15.88 ± 0.08 ^c	16.89 ± 0.09 ^b	21.20 ± 0.04 ^a
9	15.61 ± 0.11 ^a	13.14 ± 0.08 ^c	14.53 ± 0.08 ^b
12	11.70 ± 0.01 ^c	12.51 ± 0.07 ^b	14.55 ± 0.00 ^a

T1 : CrCl₃ 1000 ppb, T2 : Chromium-methionine chelate 1000 ppb

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

는 반추 미생물의 단백질 합성에 가장 중요한 질소원이며(Bryant, 1974), 사료내 단백질 함량이나 용해도와 그 밖의 물리 및 화학적 특성에 따라 반추위내의 암모니아 농도는 크게 영향을 받게 되는데, Erdman 등(1985) 및 Church(1988)는 반추위내의 암모니아 농도는 사료의 소화속도와 어느 정도 일정한 경향을 나타낸다고 보고하여 본 실험에서도 *in vitro* 배양액의 pH가 낮고 암모니아 농도가 높았던 T2가 대조구 및 T1구에 비해 미생물에 의한 암모니아 이용성이 더 높은 것으로 판단된다. 따라서 유기태 Cr 첨가가 무기태 Cr 첨가에 비해 실제로 반추가축에 있어서 반추위내 미생물체 단백질 합성을 위한 더 많은 질소원을 제공할 수 있다고 판단되었다.

Cr 원료의 첨가에 따른 *in vitro* 배양액의 휘발성지방산(VFA) 농도 변화는 Table 6의 결과와 같다. *In vitro* 배양시간에 따른 총 휘발성 생성량(TVFA)은 처리에 관계없이 배양 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며, 배양 12시간을 제외한 전 배양시간에서 대조구에 비해 처리구들(T1 및 T2구)의 TVFA가 유의적으로 낮은 것으로 나타났다 (P<0.05). 한편 *in vitro* 배양 12시간의 대조구, T1 및 T2구의 배양액내 acetate 농도는 각각 53.78, 54.11 및 50.18 mM/dl로 대조구 및 T1구에 비해 T2구의 배양액내 acetate 농도가 낮게 나타났으며, 이로 인해 T2구의 A/P ratio가 낮

은 결과를 보였다. 이와 같이 A/P ratio 변화는 반추동물의 생체내에서 일어나는 VFA 이용 및 그 생리적 작용을 변화시켜 지방대사를 조절하기 때문에 최근에는 이를 이용하여 고급육 생산에 응용하려고 노력하고 있다(Hiroaki, 1997).

In vitro 배양 동안 배양액내의 총 미생물의 건물 회수율은 Table 7과 같다. *In vitro* 배양 12시간 동안의 대조구의 총 미생물의 건물 회수율은 모든 처리구간 통계적인 차이는 없었으나, 0.42%에서 0.51%로 약 12% 증가하였고, T1구는 0.43%에서 0.49%로 경미한 증가를 보였으나, T2구의 경우에는 0.45%에서 0.66%로 약 15% 증가하는 것으로 나타난 것으로 미루어 크라민®의 첨가로 인해 미생물 건물량이 효율적으로 증가된 것으로 판단된다. 일반적으로 반추위에서 소장으로 유입되는 단백질의 60~80%가 반추위에서 합성된 미생물 단백질로 구성되며(Smith, 1979), 이러한 미생물 단백질 소화율은 70% 이상으로 반추위에서 합성되는 미생물 단백질은 숙주동물에게 단백질 공급원으로서 중요한 역할을 담당하고 있다. 한편, 반추위내 암모니아의 경우 반추미생물의 단백질 합성에 영향을 미치는 요인 중의 하나인 동시에 반추위내 미생물 성장을 위한 필수적인 질소원인데(Stern 등, 1978), 본 실험의 결과에서 크라민®의 첨가로 인해 반추위 미생물 건물 회수량이 증가한 원인은 크라민®의 첨가가 배양액내 암모니아의 생성량을 증가시킨 것이 그 원인으

Table 6. Changes of volatile fatty acids during *in vitro* incubation

Incubation time(hr)	Items	Treatments		
		Control	T1	T2
0	Acetic acid(C2)	21.28± 1.34	20.73± 0.79	21.46± 1.45
	Butyric acid(C4)	2.30± 0.19	2.45± 0.06	2.64± 0.11
	Propionic acid(C3)	3.80± 0.36	4.06± 0.14	4.21± 0.04
	TVFA	27.38± 0.80	27.23± 0.61	28.32± 1.55
	A/P ratio	5.60	5.11	5.10
3	Acetic acid(C2)	30.73± 7.85 ^a	27.76± 5.76 ^c	29.39± 6.90 ^b
	Butyric acid(C4)	3.94± 1.00 ^a	3.52± 0.71 ^b	3.80± 0.90 ^a
	Propionic acid(C3)	8.57± 3.06 ^a	7.50± 2.31 ^b	8.54± 3.05 ^a
	TVFA	43.24±11.91 ^a	38.78± 8.78 ^c	41.73±10.84 ^b
	A/P ratio	3.58± 0.34	3.70± 0.21	3.44± 0.12
6	Acetic acid(C2)	43.86±17.13 ^a	38.54±13.48 ^b	41.30±15.32 ^{ab}
	Butyric acid(C4)	5.57± 2.15 ^a	4.75± 1.57 ^c	5.10± 1.82 ^b
	Propionic acid(C3)	16.74± 8.84 ^a	14.65± 7.36 ^b	16.62± 8.76 ^a
	TVFA	66.18±28.13 ^a	57.94±22.37 ^c	63.02±25.90 ^b
	A/P ratio	2.62± 0.12	2.63± 0.08	2.48± 0.18
9	Acetic acid(C2)	52.56±23.29 ^a	47.56±19.75 ^c	49.96±21.46 ^b
	Butyric acid(C4)	7.01± 3.17 ^a	6.11± 2.53 ^b	6.54± 2.85 ^b
	Propionic acid(C3)	21.84±12.45 ^a	20.72±11.66 ^b	21.18±11.98 ^{ab}
	TVFA	81.42±38.91 ^a	74.39±33.93 ^c	77.68±36.29 ^b
	A/P ratio	2.41± 0.21	2.30± 0.26	2.36± 0.09
12	Acetic acid(C2)	53.78±24.18	54.11±24.45	50.18±25.84
	Butyric acid(C4)	7.91± 3.80	7.56± 3.57	7.79± 3.73
	Propionic acid(C3)	22.80±13.14	21.44±14.30	21.41±12.15
	TVFA	84.48±41.12	83.05±42.32	79.58±41.71
	A/P ratio	2.36± 0.15	2.52± 0.18	2.34± 0.17

T1 : CrCl₃ 1000 ppb, T2 : Chromium-methionine chelate 1000 ppb

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

TVFA : Total Volatile Fatty Acid, A/P ratio : Acetic acid/Propionic acid.

로 판단되며, 실제로 본 실험에서 배양액내 암모니아(Table 5) 농도가 대조구 및 T1구에 비해 T2구가 대부분의 배양시간에서 높게 나타난 사실로 미루어도 이러한 결과를 뒷받침 해주고 있다고 판단할 수 있다.

총미생물 건물 중의 Cr 함량은 Table 8에 나타낸 바와 같다. 각 처리 간 Cr 함량은 *in vitro* 배양 초기에는 차이를 보이지 않았으나(P>

0.05), 배양 3시간 쯤 미생물 내 Cr 함량이 대조구, T1 및 T3에서 각각 148.3, 192.0 및 165.0 ppb로 나타났다. 이와 같이 대조구의 경우에는 배양 0시간에 비해 Cr 함량이 다소 낮아졌으나, T1 및 T2(P<0.05)구의 경우에는 Cr 함량이 배양 초기에 비하여 높아지는 결과를 보였다. 그러나 그 이후 배양시간이 경과함에 따라 T1구의 Cr 함량은 배양시간이 경과함에 따라 유

Table 7. Dry matter recovery into rumen microbes during *in vitro* incubation

Incubation time(hr)	Treatment		
	Control	T1	T2
..... % of DM recovery			
0 hour	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.45 ± 0.04
3 hour	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.46 ± 0.02
6 hour	0.44 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.50 ± 0.01
9 hour	0.48 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.59 ± 0.01
12 hour	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.66 ± 0.02
Total	2.28	2.22	2.66

T1 : CrCl₃ 1000 ppb, T2 : Chromium-methionine chelate 1000 ppb^{abc} Means with different superscripts in the same row differ (P<0.05)Table 8. Changes of Cr contents in rumen microbes during *in vitro* incubation.

Incubation time(hr)	Treatment		
	Control	T1	T2
0	156.75 ± 2.65	162.00 ± 0.00	159.00 ± 6.32
3	148.30 ± 4.25 ^b	192.00 ± 8.16 ^a	165.00 ± 3.84 ^b
6	150.00 ± 6.13 ^b	276.25 ± 7.16 ^a	162.88 ± 2.35 ^b
9	156.30 ± 3.76 ^b	253.38 ± 7.12 ^a	169.75 ± 6.54 ^b
12	147.65 ± 9.07 ^b	230.50 ± 7.08 ^a	155.38 ± 8.27 ^b

T1 : CrCl₃ 1000 ppb, T2 : Chromium-methionine chelate 1000 ppb^{abc} Means with different superscripts in the same row differ (P<0.05).

의적으로 높게 나타난 반면에 대조구와 T2구의 Cr 함량은 비슷한 수준을 유지하였다. 한편, T2구의 Cr 함량이 대조구에 비하여 약간 높은 것은 미결합 Cr 분자가 미생물에 이용되었을 가능성을 제기할 수 있으며, 본 시험의 결과만으로는 크라민[®]이 반추 미생물에 의해 분해되는 것은 상당히 미약할 것이라고 판단된다.

총미생물 건물 중의 미생물체를 분석한 결과, 미생물체 내 methionine 및 cystein 함량을 분석한 결과는 Fig. 1에서 나타낸 바와 같다. 통계적인 차이는 나타나지 않았으나, 미생물체 내에 methionine 농도는 배양 시간이 경과함에 따라 계속적으로 증가하는 경향을 보였으나, cystein의 경우에는 배양시간의 경과에 따른 변

화는 없는 것으로 나타났다. 또한 각 배양 시간대별 methionine 농도는 처리 간에 차이 (P<0.05)가 없는 것으로 나타났으며, 오히려 대조구의 methionine 농도가 높게 나타난 점으로 미루어 반추 미생물에 의한 크라민[®]의 분해는 극히 제한적인 것으로 판단된다.

따라서 본 시험의 결과를 종합해보면, 크라민[®]의 첨가에 따른 *in vitro* 배양액내 pH 및 암모니아 농도를 포함한 발효특성에 대한 부의 영향은 없는 것으로 판단되며, 오히려 미생물체 단백질의 합성에 이용되어 숙주동물을 단백질 공급원으로 이용될 수 있는 암모니아의 생성량과 총미생물 건물회수량을 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다. 또한 총미생물 건물 중의

Fig. 1. Changes of methionine and cysteine concentration in rumen microbes during *in vitro* incubation.

T1 : CrCl₃ 1000 ppb.

T2 : Chromium-methionine chelate 1000 ppb.

Met : Methionine, Cys : Cysteine.

Cr 및 methionine 함량 분석을 통해서 확인된 바와 같이 반추 미생물에 의한 크라민®의 분해는 상당히 제한적이기 때문에 실제로 반추가축에 급여하였을 경우 반추위 분해를 회피해서 소장으로 by-pass 되어 숙주동물에서 Cr의 이용성 증진에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 무기태 크롬(CrCl₃)와 유기태화 크롬인 Cr-methionine chelate(크라민®)을 첨가하였을 때 *in vitro* 조건에서 반추위내 발효성과 반추미생물체 내 Cr과 Methionine을 분석하여 크라민®의 by-pass 여부를 간접적으로 증명하고자 실시하였다.

In vitro 소화시험에 이용한 기초영양소는 Jar 당 반추미생물 기초 영양소로 시중에 유통되고 있는 배합사료 7 g(DM), 볏짚 2 g(DM) 및 Corn silage 2 g(DM)을 동일하게 배합하였으며, 시험구로는 대조구(control), CrCl₃를 1000 ppb 첨가한 T1구 및 Cr 농도가 1000 ppb이 되도록 크라민®을 첨가한 T2구를 두었으며, 처리 당 5반복으로 시험을 수행하였다.

T2의 pH는 모든 배양시간에서 대조구 및 T1구에 비하여 낮은 경향을 보였으며, 암모니아 농도는 배양 6시간 전까지는 대조구와 T1구에

비하여 T2구가 높은 경향을 보였으나, 배양 6시간 이후에는 모든 처리구가 일정하게 낮게 유지되었다. 총 휘발성지방산 농도는 모든 처리구가 배양시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하였으며, 대조구에 비하여 T1구와 T2구의 농도가 유의적으로 낮았다. *In vitro* 배양 12시간 동안 미생물체 건물 회수율은 T1구가 가장 낮은 반면에 T2구가 가장 효율적으로 미생물을 증가시켰다. 반추미생물체 내 Cr 농도는 대조구와 T2구간에는 차이가 없었으나(P>0.05), T1구는 유의적(P>0.05)으로 높게 나타났다. 반추미생물체 내 methionine 및 cyctine 농도는 대조구와 T2구간에는 차이(P>0.05)가 없었으나, T1구는 비교적 낮은 경향을 보였다.

본 시험의 결과를 종합해 보면, 크라민®의 첨가에 따른 *in vitro* 배양액내 pH 및 암모니아 농도를 포함한 발효특성에 대한 부의 영향은 없는 것으로 판단되며, 오히려 미생물체 단백질의 합성에 이용되어 암모니아의 생성량과 총 미생물 건물 회수량을 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다. 또한 크라민®은 반추 미생물에 의해 상당히 제한적으로 분해되기 때문에 반추위를 회피해서 소장으로 by-pass 되어 이용된 것으로 판단되었다.

V. 인용 문헌

1. Anderson, R. A. 1988. Chromium. In: Smith, K. (Ed.), Trace elements in Food. Marcel Dekker, New York. pp. 231-247.
2. Bryant, M. P. 1974. Nutritional features and ecology of predominant anaerobic bacteria of the intestinal tract. Am. J. Clin. Nutr. 27:1313.
3. Chang, X. and Mowat, D. N. 1992. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. J. Anim. Sci. 70:559.
4. Church, D. C. 1988. The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.
5. Erdman, R. A. 1985. Effect of abomasal and dietary choline on milk yield and composition in first lactation dairy cows. J. Dairy Sci. 68:134 (Abstr.).

6. Evans, G. W. 1989. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int. J. Biosocial. Med. Research.* 11:163-180.
7. Hiroaki, S. 1997. Control of Secretion and Action of Insulin by Volatile Fatty Acids in Ruminants. *Animal Sci. and Technol. (Jpn).* 68:993-1002.
8. Jeffrey, A. and Fisher, M. D. 1990. The Chromium Program. New York, 1-5.
9. Kegley, E. B., Spears, J. W. and Jr. Brown, T. T. 1997. Effect of shipping and Chromium Supplementation on performance, Immune Response, and Disease Resistance of Steers. 75:1956-1964.
10. Mason, V. C., Bach, A. S. and Rudeom, M. 1980. Hydrolysate preparation for amino acids determinations in feed constituents. 3rd EAAP-Symposium on protein metabolism and nutrition. Braunschweig.
11. Mertz, W. and Roginski, E. E. 1969. Effects of chromium(III) supplementation on growth and survival under stress in rats fed low protein diets. *J. Nutr.* 97:531.
12. Moonsie-shageer and Mowat, D. N. 1993. Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents and immune status of stressed feeder calves. *J. Anim. Sci.* 71:232-238.
13. Page, T. G., Southern, L. L., Ward, T. L. and Thompson, Jr. D. L. 1993. Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pig. *J. Anim. Sci.* 71:656.
14. SAS. 1990. SAS/STAT guide for personal computers@6.08. SAS Institute Inc. Cary, USA.
15. Shultz, T. A. and Shultz, E. 1970. Estimation of rumen microbial nitrogen by three analytical methods. *J. Dairy Sci.* 53:781-784.
16. Shwartz, K. and Merts, W. 1959. Chromium(III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 72:515-518.
17. Smith, R. H. 1979. Synthesis of microbial nitrogen compounds in the rumen and their subsequent digestion. *J. Anim. Sci.* 49(6):1604.
18. Steele, N. C., Althen, T. G. and Frobish, L. T. 1977. Biological activity of glucose tolerance factor in swine. *J. Anim. Sci.* 45:1341.
19. Stern, M. D., Hoover, W. H. and Crooker, P. H. 1978. Effects of nonstructural carbohydrate, urea and soluble protein synthesis in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 47:944.
20. Swanson, K. C., Harmon, D. L., Jacques, K. A., Larson, B. T., Richards, C. J., Bohnert, D. W. and Paton, S. J. 2000. Efficacy of chromium-yeast supplementation for growing beef steers. 86:95-105.
21. Votava, H. J., Hahn, C. J. and Evans, G. W. 1973. Isolation and partial characterization of a ⁵¹Cr complex from brewer's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55:312.
22. 박병기, 박재인, 라창식, 신종서. 2002. 폐기균체의 재활용에 관한 연구. 강원대학교 동물자원공동연구소 논문집 동물자원연구. 13:166-175.
23. 엄창국, 박병기, 박재인, 김창혁, 고용균, 김종복, 홍병주, 신종서. 2002. 알코올 발효사료 급여가 반추위내 발효성상 및 미생물 단백질 합성에 미치는 영향. 강원대학교 동물자원공동연구소 논문집 동물자원연구. 13:207-219.

(접수일자 : 2005. 5. 17. / 채택일자 : 2005. 8. 10.)