J. Fd Hyg. Safety 10(2), 61 - 64(1995)

유전자재조합 Bovine Somatotropin 투여가 우유 중의 Bovine Somatotropin 농도에 미치는 영향

최정은 · 최명자 · 진재호 · 김주호* · 박종세
한국과학기술연구원, 도핑콘트롤센터
**(주) 엘지화학 기술연구원, 바이오텍연구소*

Effect of Recombinant Bovine Somatotropin Administration on Bovine Somatotropin Levels in Cow Milk

Jeong-Eun Choi, Myung-Ja Choi, Jae-Ho Chin, Joo-Ho Kim* and Jong-Sei Park
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131 Cheongryang, Seoul, 130-650
**Biotech Research, LG Chem Research Park, P.O. Box 61 Yu Sung, Taejeon, 305-380*

ABSTRACT—The present study was conducted to examine the effect of recombinant bovine somatotropin(γBST), which was administered to cow to promote milk production, on bST levels in milk. Fourteen cows were divided into two groups: 1) control cows received neither γbST nor vehicle, 2) treated cows were administered twice at two-week interval with 500 mg γbST each cow by subcutaneous injection. Milk samples were taken on day 0 (prior to injection), day 7 (7 days after 1st injection), day 21 (7 days after 2nd injection) and day 35 (21 days after 2nd injection). Milk bST concentration was measured by the radioimmunoassay method. There was no statistical difference($p<0.05$) in milk bST levels between two groups showing bST levels in the range of 1.8 ng/m*l* to 3.1 ng/m*l*. That is, γbST administration did not increase bST levels in milk.

Key words □ Bovine somatotropin, Milk, Recombinant bovine somatotropin, Radioimmunoassay, Monkey anti-bST

Somatotropin (ST, growth hormone, GH이라고 부르기도 함)은 약 190개의 아미노산으로 이루어진 polypeptide로 뇌하수체 전엽에서 분비되어 세포증식과 단백질 합성 그리고 metabolic factor에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[1] 그래서 연골과 뼈의 성장속도 증가, 우유생산량 증대와 같은 anabolic activity를 나타내고, 탄수화물과 지질대사에 관여하여 지방축적을 감소시키고 hyperglycemia를 유도시킨다. ST의 이러한 효과는 ST 자체의 직접적인 작용기전에도 의하지만, 주로 insulin-like growth factor-1(IGF-1) 분비를 통한 간접적인 작용으로 나타난다.[2-3] IGF-1은 ST의 자극을 받아 간에서 주로 분비되는 70개의 아미노산 polypeptide로 혈액내에서 특수한 binding protein과 결합된 상태로 존재한다.

ST를 가축에 투여한 실험은 뇌하수체 추출물을 이용하여 이루어지기 시작했으나[4] 추출호르몬의 양적 제한으로 인하여 활발히 진행되지는 못하였다. 그러나 최근 유전자재조합 기술의 발달로 다량의 recombinant somatotropin (γST)의 사용이 가능해 지자, 소와 돼지 등에 γST를 투여하여 체중, 성장률의 증가, 사료효율 증가, 육질개선 우유생산량 증가 등을 관찰한 많은 연구들이 보고되기 시작했으며[5-7] γST 사용이 축산업의 생산성 향상에 큰 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 한편 γST를 가축에 사용

하기 위해서는 γST를 사용한 축산 생산물을 사람이 섭취하여도 안전성에 아무런 문제가 없다는 것을 우선 밝혀야 한다.

ST는 종 특이성과 진화적 특성을 나타내기 때문에 사람에게서 생리활성을 나타내지 못하며[8] 반감기가 짧아서 체내에서 곧 제거되나[9] IGF-1은 종 특이성이 없어 소, 돼지, 사람 등의 포유동물이 모두 동일하다.[10] 그러나 ST, IGF-1 모두 polypeptide의 식품가공처리 과정이나 인체 소화기내에서 불활성화 된다는 점을 고려해 볼 때 ST와 IGF-1에 대한 식품위생상의 우려는 가벼워 질 수 있다. 그렇더라도 recombinant bovine somatotropin (γbST)을 투여한 젖소에서 생산된 우유의 bST 농도가 보통 젖소 우유중의 bST 농도보다 높다면 이는 그리 바람직한 일은 아니다. 따라서 본 연구에서는 젖소의 산유량을 증가시키기 위해 투여한 γbST가 우유중의 bST 농도에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

γbST 투여

14마리의 젖소를 대조군과 γbST 투여군으로 나누어 (7두/군), 대조군에는 아무것도 투여하지 않았고 γbST 투여군에는 두당 500 mg의 γbST를 미근부에 피하주사하였다. 1차 투여하여 실험이 시작된 날을 0일로 계산하여 14일(2주 후)에 다시 동량의 γbST를 같은 방법으로 주사하였다. γbST는 LG화학 기술연구원 바이오텍연구소에서 생산하는 것을 사용하였고, 사료는 농가 관행에 따른 TMR을 급여하였다.

우유시료 채취

우유시료는 대조군과 γbST 투여군 모두에게서 0일 (γbST 투여전), 7일(γbST 1차 투여 후 1주일 후), 21일 (γbST 2차 투여 후 1주일 후), 35일(γbST 2차 투여 후 3일 후)에 4번 채취하여 분석할 때까지 −70°C에 보관하였다.

시료 추출과정

우유 5 m*l*를 4°C, 2,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 위의 지방층을 제거한 후 원심분리된 우유 2 m*l*를 12×75 mm 시험관에 취했다. Rennet 용액(500 mg rennet/10 m*l* H_2O, Sigma Chemical, USA) 100 u*l*를 가하여 혼합하고 실온에서 하룻밤 배양한 후, 4°C 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액(유청)을 취했다. bST radioimmunoassay(RIA)에 100 u*l* 유청을 사용하였다.

Assay buffer—bST RIA buffer로는 150 mM NaCl, 0.5% BSA를 함유하는 10 mM tris buffer(pH 7.5)를 사용하였다.

표준용액—표준 bST 용액(10 ug/m*l*)은 Dr. A.F. Parlow (director of Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA medical center, USA)에게서 구입하였고, bST assay buffer를 사용하여 40 ng/m*l*~0.32 ng/m*l* 농도로 희석하여 사용하였다.

항체[11,12]—Monkey anti-bST는 Dr. P.C. Owens (CSIRO Division of Nutrition, Australia)가 제조한 것을 1 : 1,000으로 bST assay buffer로 희석하여 사용하였다.

^{125}I-labeled Tracer—LG화학 바이오텍 연구소에서 chloramine-T method[13]로 제조한 ^{125}I-bST를 사용하였다. 만들어진 tracer는 Sephadex G-75 chromatography (fractionsize: 0.5 m*l*/tube)로 정제하였으며 ^{125}I-bST의 radioactivity는 9×10^7 cpm/m*l*이었다. RIA에서는 10,000~15,000 cpm/100 u*l*가 되도록 bST assay buffer로 희석하여 사용하였다.

Precipitating solution—Goat anti-monkey IgG(Cappel, USA, 1 : 50 희석), normal monkey serum(Cappel, USA, 1 : 100 희석), 6% polyethylene glycol 8,000 (PEG 8,000, Sigma Chemical, USA) in H_2O를 사용하였다.

RIA 방법

100 u*l*의 표준 용액 또는 시료추출액을 12×75 mm polystyrene tube에 넣고 anti-bST 100 u*l*, ^{125}I-bST 100 u*l* ^{125}I-bST 100 u*l* (10,000~15,000 cpm)를 가한 후 잘 혼합하여 실온에서 16시간 배양시켰다. 여기에 anti-monkey IgG 100 u*l*를 가하고 실온에서 1시간 배양시킨 후 normal monkey serum 100 u*l*, 6% PEG 8,000 100 u*l*를 가하고 1시간 더 배양시켰다. bST assay buffer 1 m*l*를 가하여 혼합하고, 4°C 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거하였으며 침전된 ^{125}I-bST-antibody complex의 radioactivity를 gamma counter(Minaxi-γ auto gamma 5,000 series, Packard, USA)를 사용하여 1분간 측정하였다. Non-specific binding의 측정을 위해서는 anti-bST 대신 bST assay buffer 100 u*l*를 사용하였다.

통계처리

모든 자료는 mean±standard deviation으로 나타내었으며, analysis of variance(ANOVA) test를 실시한 후 유의적인 차이가 발견되었을 때 Duncarn's multiple range test (DMRT, $p<0.05$)를 적용하였다.

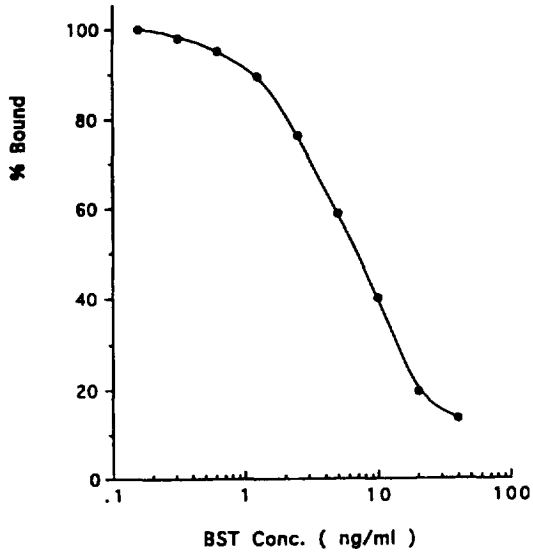

Fig. 1. Standard curve of bST by radioimmunoassay.

결과 및 고찰

표준 정량곡선 및 분석 정밀도 평가

bST RIA에 0.32 ng/m*l*~40 ng/m*l* 범위에서 표준 정량곡선을 작성하였다(Fig. 1). 분석감도는 작성된 정량곡선에서 계산된 가장 낮은 측정 가능한 농도를 통계처리하여 구하였다(n=6). 즉 계산된 가장 낮은 농도의 평균값을 구한 후 95% confidence limit을 더하였다. 그 결과 분석감도는 0.17 ng/m*l*이었다.

정밀도 실험은 저 · 중 · 고 표준용액의 coefficient of variance(n=5)는 within-run assay의 경우 2.0~8.5%, run-to-run assay의 경우 1.5~7.7%였다.

추출율을 조사하기 위해서 bST 농도를 알고 있는 우유시료(bST: 1.2 ng/m*l*)에 bST(2 ng/m*l*) 표준용액을 가한 후, 앞의 시료 추출과정과 동일한 과정으로 추출하였으며, 그 결과 80.8%의 추출을 얻었다.

우유 시료 중의 bST 농도

우유 시료 중의 bST 농도는 Table 2에 나타난 바와 같았다. 대조군과 γbST 투여군에서 모두 1.8~3.1 ng/m*l*로 γbST 투여가 우유 중의 bST 농도에 아무런 영향을 미치지 못한 것을 관찰할 수 있었다. 2주 간격으로 500 mg의 γbST를 투여하였으므로, 대략 하루에 36 mg γbST를 투여한 효과를 기대할 수 있는데, 위의 결과는 실제로 매일 37.5 mg γbST를 투여했을 때 잔류 bST 양이 대조군과 차이가 없었다는 보고[14]와 함께 γbST 투여 방법이 bST 농도에 영향을 미치지 못한다는 것도 나타내고 있다.

bST는 경구섭취시 인체에서 비활성일 뿐만 아니라 분유 제조과정과 우유의 저온살균 과정에서 불활성화되는 것이 밝혀져 있다.[15] 이러한 보문들과 본 연구의 결과를 함께 고려해 볼 때, γbST를 투여한 젖소의 우유를 일반 소비자가 섭취하더라도 식품위생상 안전한 것으로 사료된다.

Table 1. Precision study of bST by RIA (unit : ng/m*l*)

Control	N	Run-to-run assay		Within-run assay	
		Mean±S.D.	% CV	Mean±S.D.	% CV
L	5	1.5±0.1	7.7	1.8±0.2	8.5
M	5	5.0±0.2	4.4	4.4±0.2	4.3
H	5	11.4±0.2	1.5	11.0±0.2	2.0

L, M and H indicate low, medium and high level of controls. S.D.; standard deviation, CV; coefficient of variance.

Table 2. bST levels in milk after γbST treatment

(unit : ng/m*l*)

Group	Control (n=7)	Treatment (n=7)
Day 0	2.5±0.8 a	2.5±0.6 a
Day 7	2.9±1.0 a	2.0±1.0 a
Day 21	3.1±1.7 a	1.8±0.7 a
Day 35*	2.4±1.3 a	2.1±1.0 a

*; n=6, n; The number of specimens, day 0; prior to treatment, day 7; 7 days after 1st treatment, day 21; 7 days after 2nd treatment, day 35; 21 days after 2nd treatment, a; The same letter means no statistically significant difference between mean values at the 5% level.

국문요약

Recombinant bovine somatotropin(γbST)이 젖소의 산유량 증가를 위해 투여되었을 때 우유 중의 bST 농도에 어떠한 영향을 미치는지 조사해 보았다. 14마리의 젖소를 대조군 (n=7)과 γbST 투여군(n=7)으로 나누어 대조군에는 아무것도 투여하지 않았고, γbST 투여군에는 두당 500 mg γbST를 피하주사하였다. 처음 투여하여 실험이 시작된 날을 0일로 하여, 0일과 14일에 두번 주사하였다. 우유시료는 대조군과 γbST 투여군 모두 0일(γbST 투여전), 7일(1차 투여 후 7일 후), 21(2차 투여 후 7일 후), 35일(2차 투여 후 21일 후)에 채취하였다. Radioimmunoassay로 우유 중의 bST 농도를 측정한 결과 bST 농도로 대조군과 투여군의 모든 시료에서 1.8 ng/m*l*～3.1 ng/m*l*로 유의적인 차이가 없었다($p<0.05$). 이 결과는 γbST 투여가 우유 중의 bST 농도에 아무런 영향을 끼치지 못한다는 것을 나타낸다.

참고문헌

1. Juskevich, J.C. and Guyer, C.G.: Bovine Growth Hormone: Human food safety evaluation. *Science,* **249**, 875 (1990).
2. D'Ercole, A.J., Stile, A.D. and Underwood, L.E.: Tissue concentration of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.,* **81**, 935 (1984).
3. Orlowski, C.C. and Chernausek, S.D.: Discordance of serum and tissue somatomedin levels in growth hormone-stimulated growth in the rat. *Endocrinology,* **123**, 44 (1988).
4. Hutton, J.B.: The effect of growth hormone on the yield and composition of cow's milk. *J. Endocr.,* **16**, 115 (1957).
5. Hart, I.C., Bines, J.A., James, S. and Morant, S.V.: The effect of injecting or infusing low doses of bovine growth hormone on milk yield, milk composition and the quantity of hormone in the milk serum of cows. *Anim. Prod.,* **40**, 243 (1985).
6. Etherton, T.D., Wiggins, J.P., Evock, C.M., Chung, C.S., Rebhun, J.F., Walton, P.E. and Steele, N.C.: Stimulation of pig growth performance by porcine growth hormone: determination of the dose-response relationship. *J. Anim. Sci.,* **64**, 433 (1987).
7. Campbell, R.G., Steele, N.C., Caperna, T.J., McMurtry, J. P., Solomon, M.G. and Mitchell, A.D.: Interrelationships between energy intake and endogenous porcine growth hormone administration on the performance, body composition and protein and energy metabolism of growing pigs weighing 25-55 kilograms live weight. *ibid.,* **66**, 1643 (1988).
8. Tanner, J.M.: Human growth hormone, *Nature Lond.,* 237, 433 (1972).
9. Chung, C.S., Etherton, T.D. and Wiggins, J.P.: Stimulation of swine growth by porcine growth hormone. *J. Anim. Sci.,* **60**, 118 (1985).
10. Tavakkol, A., Simmen, F.A. and Simmen, R.C.M.: Porcine insulin-like growth factor-I(pIGG-1): complementary deoxyribonucleic acid cloning and uterine expression of messenger ribonucleic acid encoding evolutionarily conserved IGF-I peptides. *Mol. Endocrinol.,* **2**, 674 (1988).
11. Owens, P.C., Johnson, R.J., Campbell, R.G. and Ballard, F.J.: Growth hormone increases insulin-like growth factor-I(IGF-I) and decreases IGF-II in plasma of growing pigs. *J. Endocrinol.,* **124** 269 (1990).
12. Owens, P.C., Colon, M.A., Campbell, R.G., Johnson, R. J., King, R. and Ballard, F.J.: Developmental changes in growth hormone, insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in plasma of young growing pigs. *ibid.,* **128**, 439 (1991).
13. Johnstone, A. and Thorpe, R.: Immunochemistry in Practice, 2nd Ed. Blackwell scientific pubs., Oxford, pp. 113-130 (1987).
14. Sinkins, K.L.: in Proceedings of the California animal nutrition conference on nutrient partitioning. (Robb, E. ed)., Fresno, California, pp. 36-45 (1987).
15. Moore, J.A., Rudman, C.G., MacLachlan, N.J., Fuller, G. B., Burnett, B. and Frane, J.W.: Equivalent potency and pharmacokinetics of recombinant human growth hormones with or without an N-terminal methionine. *Endocrinology,* **122** 2920 (1988).