

최 중
연구보고서

Cordycepin 강화 쇠고기 및 우유 생산기술 개발

Development of the Technology for Producing
Cordycepin-Fortified Beef and Milk

연 구 기 관
한 국 농 업 대 학

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “Cordycepin 강화 쇠고기 및 우유생산기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 한국농업대학

총괄연구책임자 : 김완영

세부연구책임자 : 김완영

연 구 원 : 여준모

연 구 원 : 이성훈

연 구 원 : 이장형

연 구 원 : 노환국

연 구 원 : 민정기

연 구 원 : 민필규

연 구 원 : 이상용

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 이성실

연 구 원 : 문여황

연 구 원 : 이상민

연 구 원 : 이신자

연 구 원 : 옥지운

연 구 원 : 강태원

연 구 원 : 임정화

참 여 기 업 명 : 유진바이팜(영농조합법인)

연 구 원 : 이현구

연 구 원 : 이선인

요 약 문

I. 제 목

Cordycepin 강화 쇠고기 및 우유생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근에는 Cordyceps spp. 계열의 동충하초는 항암작용, 피로회복, 면역강화, 항산화 작용, 조혈작용, 구충작용이 있는 것으로 보고되고 있고, 아울러 간, 심장, 신장, 폐 등과 연계된 질환에 탁월한 예방 및 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있는데, 이는 동충하초내 존재하는 기능성 생리활성물질 중 핵산의 nucleoside 유사체인 cordycepin이 각종 질병예방에 가장 강력한 물질인 것으로 알려져 있고, 인체건강과 관련하여 전 세계적으로 연구가 진행되고 있다. Cordycepin이 확인되는 동충하초로는 대표적으로 박쥐나방 애벌레를 기주로 생성되는 시넨시스 동충하초(*Cordyceps sinensis*; 인공재배 불가능)와 누에 또는 번데기를 기주로 생성되는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*; 인공재배 가능)가 있고, 이들내 cordycepin은 자실체보다 균사체내에 그 함량이 높고, 시넨시스종보다는 밀리타리스종이 더 많이 함유하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 국내에서는 대부분이 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*)가 생산되고 있다. 이에 따라 최근 밀리타리스 동충하초에 대한 인공배양기술의 발달로 국내(참여기업 유진바이오팜)에서는 기존의 누에나 번데기의 동물성 기주를 사용하는 방식에서 벗어나 식물성 기주를 이용하여 배양함으로써 동물성기주가 안고 있는 각종 단점(고생산비용, 불쾌한 냄새)을 개선보완하게 되었고, 아울러 대량생산이 가능하게 되었다. 이에 따라 cordycepin이 함유된 식물성 기주 밀리타리스 동충하초균사를 사료첨가제로 공급할 경우 cordycepin이 강화된 축산물(고기, 우유 및 계란)의 생산이 가능할 것으로 판단되고 아울러 농가의 소득증진에 기여할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우 및 젖소에 급여하여, cordycepin 강화 한우고기 및 우유의 생산기술에 관한 일련의 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발의 범위는 다음과 같다.

가. 밀리타리스 동충하초 균사체유래 생리활성물질(cordycepin) 정량

- 1) 동충하초 균사체 종류별 cordycepin 함량 정량
- 2) 동충하초의 영양성분(수분, 단백질, 조지방, 섬유소) 및 중금속함량(Pb, Cd, Cr, Hg) 조성 평가
- 3) 균사체의 지방산, 아미노산 및 광물질의 조성 평가

나. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 유래 cordycepin의 쇠고기 내 잔류 여부 구명

- 1) 비육우를 공시하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 잔류 여부를 결정하기 위한 사양시험(한우사양시험I)
- 2) 후지 및 간조직내 cordycepin 탐색 및 정량

다. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin 및 영양소의 반추위내 분해도 구명

- 1) 반추위 fistula가 장착된 한우를 이용하여 나일론백에 동충하초 및 각종 단백질 단미원료(어분, 대두박) 시료를 반추위에 일정시간별 정지시킴
- 2) 정지시간별 밀리타리스 동충하초 균사체의 영양소 소실율 측정

라. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화 한우고기 생산을 위한 적정사용량 구명을 위한 사양시험연구

- 1) 비육기 거세 한우에 대한 최적 수준의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여량결정을 위한 사양시험(한우사양시험II)
- 2) 쇠고기 및 혈액 중 cordycepin 정량 및 진이올 결정
- 3) 혈액 중 GSH-Px 활성 측정
- 4) 도체성적조사

마. 식물성 밀리타리스 동충하초유래 cordycepin의 비육한육우 포화축적기간 결정을 위한 사양시험

- 1) 최적수준의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 포화축적기간 결

정을 위한 사양시험(한우사양시험III)

- 2) 쇠고기 및 혈액 중 cordycepin 탐색 및 정량
- 3) 혈액 중 GSH-Px 활성 측정
- 4) 도체성적조사

바. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 유래 cordycepin의 우유 내 전이 여부 구명

- 1) 착유우를 공시하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 전이 여부를 결정하기 위한 사양시험(젖소사양시험I)
- 2) 우유내 cordycepin함량 탐색 및 정량
- 3) 혈액 중 GSH-Px 활성측정

사. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 수준별 급여에 따른 적정급여비율 추정에 관한 연구

- 1) 반추위 혼합미생물을 이용하여 균사체 첨가수준별로 기질을 공급하여 인공반추위 배양시험 (*in vitro* 연구)
- 2) 배양시간별 반추위 분해도, 가수분해효소 활력, 반추위 발효성상 조사
- 3) 반추위 미생물 군락변화 관찰
- 4) 한우 및 젖소의 적정첨가량 추정을 위한 자료제시

아. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화 우유생산을 위한 젖소의 적정사용량 구명을 위한 연구

- 1) 비유중인 젖소에 대한 최적 수준의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여량 결정을 위한 사양시험(젖소사양시험II)
- 2) 우유 및 혈액 중 cordycepin 정량 및 전이율 결정
- 3) 혈액 중 GSH-Px 활성 측정
- 4) 유성분 및 체세포수 변화 조사

자. 젖소의 비유기간에 따른 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 최적 사용량에 대한 우유내 cordycepin 함량변화 구명을 위한 연구

- 1) 비유기간에 따른 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체급여에 의한 우유내 cordycepin 변화량 조사를 위한 사양시험(젖소사양시험III)

- 2) 우유 및 혈액 중 cordycepin 정량
- 3) 유성분 및 체세포수 변화 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구개발 결과

1) 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분 및 안전성 조사(1년차 주관과제)

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 사료영양적 가치를 알아보기 위하여, 세 종의 동충하초 즉, 식물성 기주 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체, 번테기(pupae) 기주(동물성) 밀리타리스 동충하초 균사체 및 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균사체를 선정하여 일반성분, 아미노산, 지방산, cordycepin 및 중금속함량을 분석하였다.

본 연구를 통하여 얻어진 결과를 살펴보면, 조단백질함량은 식물성 및 동물성 밀리타리스 동충하초균사체에서 각각 76.16과 75.45%로서 눈꽃동충하초 균사체의 57.21%보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 에테르추출물함량은 눈꽃동충하초, 동물성 밀리타리스 동충하초, 식물성 밀리타리스 동충하초 순으로 유의하게 낮아졌고($P < 0.05$), 식물성이 0.96%로 동물성의 9.04%보다 에테르추출물함량이 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 조섬유함량은 식물성 밀리타리스 및 눈꽃 동충하초균사체가 각각 12.24 및 13.93%로 동물성 밀리타리스 동충하초균사체보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 수분, 조회분 및 가용무질소물 함량은 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다.

세 종류의 동충하초의 아미노산 조성은 모든 처리구에서 공히 글루탐산(Glu)비율이 가장 높았다. 글리신(Gly)은 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체가 식물성 균사체보다 유의하게 높았고($P < 0.05$), 눈꽃 동충하초균사체는 밀리타리스 균사체와는 달리 타이로신(Tyr)비율이 유의하게 높았다($P < 0.05$). 식물성 밀리타리스 동충하초균사체는 트레오닌(Thr), 세린(Ser), 글루탐산, 알라닌(Ala), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe) 및 프롤린(Pro)을 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초에 비하여 유의하게 높은 수준으로 함유하였다($P < 0.05$).

식물성 밀리타리스 동충하초균사체는 리놀레산(C18:2)의 비율이 다른 처리구에 비하여 현저하게 높았으나($P < 0.01$), 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체군은 리놀렌산(C18:3)이 유의하게 높았다($P < 0.01$). 눈꽃동충하초 균사체는 팔미트산(C16:0)과 스테아린산(18:0)의 비율이 다른 처리군에 비하여 유의하게 높았다($P < 0.05$). 식물성 밀

리타리스 균사체내 cordycepin 함량은 건물기준 0.164%를 함유하여 동물성 밀리타리스의 0.068%보다 유의하게 높았다($P < 0.01$). 하지만, 눈꽃동충하초 균사체는 cordycepin이 검출되지 않았다. 세 종류의 동충하초 내 중금속(Cr, Pb, Cd, Hg)은 농림부 허용수준이하로 안전하였다.

2) 식물성 밀리타리스 동충하초균사체의 반추위분해양상 구명(1년차 주관과제)

본 연구는 반추위누관이 장착된 거세한우를 이용하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체, 동물성 밀리타리스동충하초 균사체, 대두박 및 어분내 영양소의 *in situ* 소실율을 조사하고, 균사체내 cordycepin의 반추위내 소실율을 결정하고자 수행하였다. *In situ* 배양시간은 0, 3, 6, 12, 24, 48시간으로 정하여 각 시료의 bag을 한우 반추위에 정지시켰다.

본 연구에서 얻어진 결과를 살펴보면, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 건물소실율은 0, 3, 6시간에서 다른 처리군들 보다 상당히 높은 소실율을 나타내었고 ($P < 0.05$), 12와 24시간에는 대두박의 건물소실율과 유의한 차이를 보이지 않는 동시에, 변데기기주 밀리타리스 동충하초 균사체(Cm:pupae) 및 어분보다는 유의하게 높은 소실율을 나타내었다($P < 0.01$). 동물성인 변데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체 및 어분의 건물소실율은 전반적으로 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 및 대두박에 비하여 유의하게 낮은 소실율을 나타내었고($P < 0.05$), 특히 24, 48시간에는 변데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체가 각각 61.63과 75.98%로 어분의 49.24 및 56.86%보다 유의하게 높은 소실율을 나타내었다($P < 0.001$). 따라서 어분은 전반적으로 모든 배양시간대의 다른 처리구보다 가장 낮은 소실율을 나타내었다($P < 0.05$). 유기물과 조단백질 소실율은 건물과 유사한 패턴을 나타내었다. 배양 3시간까지 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 회분소실율은 변데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체 보다 높았지만 이후로는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 어분의 회분은 전 배양시간대에서 28~37%의 소실율을 나타내었고, 이는 모든 처리구에서 가장 낮았다. 본 연구에서 밀리타리스 균사체내 존재하는 cordycepin의 소실율은 cordycepin의 수용성 성질로 인하여 예측된 결과를 얻어내지 못하였다.

3) 밀리타리스 동충하초균사체내 cordycepin의 한우육내 전이여부 결정 사양시험 (1년차 주관과제)

본 연구는 비육기 거세한우 4두를 공시하여 대조구와 처리구 각각 2두씩 배치하고, 처리구의 균사체 첨가수준은 사료섭취량의 3%로 정하여 60일간 사양하였다. 사양후 도축하여 혈액, 간, 근육(후지)를 취하여 이들내 cordycepin을 정량하고 혈장내 항산화

효소인 GSH-Px활성을 조사하였다.

본 연구에서 얻어진 결과를 살펴보면, 종료 체중, 건물섭취량, 증체량은 대조구 및 밀리타리스 동충하초 균사체급여군간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 혈장내 GSH-Px활성은 처리구가 15.70 unit로서 대조구의 9.23 unit보다 높은 항산화도를 나타내었으나, 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다. 근육내 cordycepin의 전이는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군에서 TLC상 band가 확인되었다.

혈중 cordycepin농도는 대조구에서는 검출수준이하로 나타났고, 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군(Cm)에서는 혈액 mL당 450.8ng으로 유의하게 높았고($P < 0.0001$), 근육(후지)과 간에서는 cordycepin 함량이 각각 조직 건조 g당 2.4와 $3.5\mu\text{g}$ 이 검출되어 식물성 밀리타리스 동충하초내 cordycepin이 비육기 거세한우의 조직에 전이 및 축적되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세우에 급여하였을 때 비록 유의성은 나타나지 않았지만, 항산화 기능이 어느정도 있는 것으로 확인되었고, 처리군의 근육에서 cordycepin이 확인되었다. 따라서, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 한우에 급여하면 조직 내로 cordycepin의 전이가 가능한 것으로 사료된다.

4) Cordycepin 강화 한우고기를 생산하기 위한 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량 결정을 위한 사양연구(2년차 주관과제)

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 한우사료에 수준별로 배합하여 일정기간 급여하였을 때, 거세한우의 사료섭취량, 증체, 도체성적 및 조직내 cordycepin 함량과 혈중 항산화능력을 조사하여 실제 한우 사양에서 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량을 결정하고자 실시하였다.

본 연구는 비육기 거세한우 20두를 공시하여 대조구와 세 수준의 첨가구(1%, 2%, 3%)에 각각 5두씩 배치하고, 예비시험 14일 본 시험기간 60일동안 사양하였다. 사양 후 도축하여 혈액, 간, 근육(후지)를 취하여 이들내 cordycepin을 HPLC를 이용하여 정량하였다.

본 연구에서 얻어진 결과를 살펴보면, 사료섭취량, 총증체량 및 일당증체량은 밀리타리스 동충하초 균사체의 수준별 급여로 유의한 차이가 나타나지 않았고, 도체성적은 육색을 제외한 모든 변수에 영향을 미치지 않았다. 육색에 대하여, 2%군과 3%군이 무첨가군 및 1%급여군보다 유의하게 높은 값을 나타내어 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 육색이 보다 진해지는 것으로 나타났다.

혈중 cordycepin 농도는 대조구에서는 검출수준이하로 나타났고, 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군(Cm)에서는 급여수준이 증가함에 따라 유의하게 증가하였고

($P < 0.0001$), 혈장내 glutathione peroxidase(GSH-Px)활성은 혈중 cordycepin 농도와 유사한 양상을 나타내어 cordycepin이 항산화활성과 깊은 관계가 있는 것으로 확인되었다. 근육(후지)과 간에서도 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여수준이 증가함에 따라 cordycepin 함량이 유의하게 증가하였다. 하지만, 2% 및 3%급여군간에는 유의한 차이가 나타나지 않아 2%가 경제적으로 적정 급여수준인 것으로 나타났다. 하지만, 전반적으로 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin의 급여량에 따른 축적수준은 효율이 1%내외로 비교적 낮은 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 밀리타리스 동충하초 균사체의 비육기 거세한우에 대한 적정사용수준은 혈액 성적과 조직내 cordycepin함량을 감안하여 2%가 적당한 것으로 사료된다.

5) 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화한육우고기생산을 위한 포화축적기간의 구명을 위한 연구(3년차 주관과제)

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 한우사료에 적정수준(2%)으로 혼합하여 급여기간을 달리하였을 때, 거세한우의 사료섭취량, 증체, 도체성적 및 조직내 cordycepin 함량과 혈중 항산화능력을 조사하여 실제 한우 사양에서 식물성 기주 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정급여기간을 결정하고자 실시하였다.

본 연구는 비육기 거세한우 30두를 공시하여 서로 다른 급여기간(1개월, 2개월, 3개월)에 대하여 대조구와 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군으로 나누어 각각 5두씩 배치하였다. 각 급여기간이 끝나면 도축하여 혈액, 간, 근육(후지)를 취하여 이들내 cordycepin함량을 분석하였다.

본 연구에서 얻어진 결과를 살펴보면, 사료섭취량, 총증체량, 일당증체량 및 도체성적은 급여기간 및 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 유의한 차이가 나타나지 않았다.

혈중 cordycepin 농도는 대조구에서는 검출수준이하로 나타났고, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군(Cm)은 급여기간과 관계없이 $0.398 \sim 0.473 \mu\text{g/mL}$ 를 나타내어 비교적 일정한 수준을 유지하였다. 혈장내 glutathione peroxidase(GSH-Px)활성은 혈중 cordycepin 농도와 유사한 양상을 나타내어 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 ($P < 0.001$).

후지 및 간내 cordycepin함량은 급여기간이 증가함에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군에서 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 한우육내 cordycepin 적정포화축적기간은 2내지 3개월 사이가 적정한 것으로 사료된다.

6) 밀리타리스 동충하초균사체내 cordycepin의 젖소 우유내 전이여부 결정 사양시험

(1년차 협동과제)

본 연구는 비유중기 착유우 4두를 공시하여 대조구와 처리구 각각 2두씩 배치하고, 처리구의 군사체 첨가수준은 사료섭취량의 3%(건물 섭취량 20kg 가정: 600 g)로 정하여 45일간 사양하였다.

사료섭취량, 산유량, 유성분 및 우유중 요소태질소(MUN) 그리고 체세포수(SCC)는 두 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 혈장내 GSH-Px활성은 처리구가 13.29 unit로서 대조구의 6.84 unit보다 높은 항산화도를 나타내었으나, 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다. 우유내 cordycepin의 전이는 식물성 밀리타리스 동충하초 군사체 급여군에서 사양기간이 증가함에 따라 TLC상에서 band가 확인되었다.

혈중 및 우유중 cordycepin 농도는 대조구에서 기준치 이하로 검출되었고, 밀리타리스 동충하초 군사체 급여군(Cm)에서는 혈액 mL당 376 내지 449ng으로 유의하게 높았다($P < 0.0001$). 우유 중에서도 cordycepin 함량이 우유 mL당 152~203ng 검출되어 군사체내 cordycepin이 우유로 전이가 가능한 것으로 나타났다.

이번 실험은 단순히 동충하초 cordycepin의 우유내 이행 여부를 조사하기 위하여 실시된 예비실험으로서 제한된 공시두수를 이용하였다. 그렇지만, 본 실험의 결과를 1년차 한우 사양시험과 비교하여 보면, 두 품종의 소가 섭취할 수 있는 사료양이 다르기 때문에 상대적으로 사료 섭취량이 높은 젖소에서 cordycepin의 공급량이 2배 정도 증가할 수밖에 없었다. 공급량을 고려해 볼 때 젖소의 혈액내 cordycepin의 함량은 한우보다 낮은 수준이고, 또한 공급양 대비 우유로 전이되는 비율은 0.78% 수준으로 매우 낮게 나타났다. 이러한 차이를 설명할 수 있는 기전은 본 실험으로서 조사 될 수가 없으나, 현재로서는 소장에서의 cordycepin 흡수율 및 근육축적과 우유로 분비되는 과정에서의 차이로 인한 가능성에 큰 비중을 둘 수 있다.

7) *In vitro* 연구를 통한 밀리타리스 동충하초 군사체의 적정사용량 결정 시험

(1년차 협동과제)

반추위 혼합 혐기미생물(rumen anaerobic mixed microbes)을 접종한 배지에 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 군사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 및 72시간동안 38°C의 shaking incubator에서 혐기배양 배양하였다.

동충하초 군사체를 첨가하여 *in vitro* 혐기 배양을 수행한 결과, 동충하초 군사체를 투입한 구가 투입하지 않은 구보다 가스 발생량과 건물 소화율이 높았으나 pH는 낮게 측정되었다. 또한 배양액내의 암모니아태 질소의 농도도 동충하초 군사체의 첨가

로 증가하는 경향이었으며 조사한 가수분해효소(CMCase, xylanase, Avicellase, amylase, protease) 역시 동충하초 균사체의 첨가로 증가하였다. 이러한 결론들로 미루어 동충하초 균사체는 반추위 혐기성 미생물의 발효에서 cellulolysis나 proteolysis를 증진시키므로써 사료의 이용효율을 증가시킬 수 있는 물질로 평가되었다. 이러한 현상들은 주로 동충하초 균사체 0.6% 첨가구와 0.9% 첨가구에서 나타났다. 따라서 반추가축의 동충하초 균사체의 적정 첨가 수준은 0.6%~0.9% 수준일 것으로 평가되었다.

동충하초 균사체를 0.6%~0.9% 수준으로 첨가하여 배양하면 총 VFA의 함량이 증가할 뿐만아니라 acetate 비율이 증가하며 propionate의 비율에는 크게 영향을 미치지 않아서 결국에는 A/P 비율이 크게 증가하는 것으로 조사되었다.

동충하초 균사체는 반추위 혐기성 박테리아와 섬유소 분해 박테리아의 성장을 촉진시키는 역할을 하였지만, 배양액내 동충하초 균사체의 첨가량이 증가할 수록 죽어 있는 protozoa의 수가 증가하였고, 곰팡이의 수는 감소하는 것으로 조사되어 동충하초 균사체에는 anti-protozoan agents와 anti-fungal agents가 함유되어 있을 가능성이 있는 것으로 조사되었다.

전자현미경 관찰결과, 일반적으로 동충하초 균사체의 외부 구조는 벧짚이나 옥수수 등과 같은 다른 식물체들보다 물리적으로 상당히 간단한 구조를 갖고 있었다.

8) Cordycepin 강화 우유를 생산하기 위한 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량 결정을 위한 사양연구 (2년차 협동과제)

본 연구는 개발된 식물성 기주 밀리타리스 동충하초 균사체를 착유우사료에 수준별로 배합하여 일정기간 급여하였을 때, 착유우의 사료섭취량, 유성분 및 우유와 혈액내 cordycepin함량과 혈중 항산화능력을 조사하여 실제 젖소사양에서 기능성 cordycepin 강화 우유생산을 위한 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량을 결정하고자 실시하였다.

본 연구는 비유중기 착유우 20두를 공시하여 대조구와 세 수준의 첨가구(3%, 6%, 9%)에 각각 5두씩 배치하고, 60일간 사양하였다. 1년차 시험결과에서 동충하초 cordycepin의 우유내 전이율이 매우 낮게 조사되었기 때문에 본 실험에서는 동충하초의 첨가수준을 한우와는 달리 3%를 기준으로 증가하는 방향으로 설정하였다.

동충하초 급여는 사료섭취량에 유의한 영향을 미치지 않았고, 모든 처리군에서 전반적으로 양호한 섭취량을 나타내었다. 또한 산유량, 유성분 및 체세포수(SCC)는 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 우유중 요소태질소농도는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여비율을 증가시킴에 따라 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

대조구에 비하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군들의 우유 및 혈액내 cordycepin 함량은 유의적 ($P < 0.05$)으로 증가하였지만, 균사체 첨가수준간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 첨가 수준이 높아질 수록 cordycepin의 섭취량이 증가하는 반면, 우유로 이행되는 양은 처리구간 큰 차이가 없기 때문에 첨가수준이 증가할 수록 우유내 전이율은 유의성은 없지만 낮아지는 것으로 나타났다. 이번 실험은 1년차 cordycepin의 우유내 전이가능성을 조사한 예비실험결과를 바탕으로 처리구의 증가 및 처리구당 공시두수를 증가시켰다. 하지만 조사된 항목들에서 개체별로 큰 차이가 조사되었는데, 우유내 cordycepin 함량의 경우 범위가 0 ~ 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 로, 검출되지 않는 개체들도 나타났다.

본 실험에 사용된 동충하초의 cordycepin 함량 (0.10%)은 1년차에서 사용했던 것에 (0.16%) 비하여 낮게 나타났다. 따라서 본 실험의 6% 첨가 수준에서 공급된 cordycepin의 양은 1년차에서 3% 수준에서 공급한 양과 비슷하게 계산되었다. 그러므로 본 실험에서는 실질적으로 cordycepin의 공급량을 1년차에 비하여 증가 급여시킨 것은 9% 수준이며, 3% 수준은 1년차에 비하여 감소 급여하게 된 결과를 얻게 되었다.

하지만 1, 2년차에 조사된 우유내 cordycepin의 함량을 기준으로 볼 때 1, 2년차에 급여한 수준보다 cordycepin의 공급량을 높더라도 우유내 cordycepin 함량의 증가를 기대하기는 어려울 것으로 사료된다. 경제적인 측면을 고려하면 본 실험에 사용된 3% 수준의 cordycepin 공급량을 선택하는 것이 바람직하겠지만, 3% 수준에서 검출되지 않은 개체수(2두)가 다른 수준들에 비하여(6%, 9% 각각 1두) 상대적으로 많았기 때문에 보다 균일한 결과를 얻기 위해서는 6% 수준을 선택하는 것이 바람직하다고 사료된다.

9) 비유시기별 적정 사용량에 대한 우유 중의 cordycepin 변화 구명(3년차 협동과제)

본 연구는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 6%수준으로 비유초기 젖소에게 (대조구 5두, 처리구 5두) 6개월간 급여하였을 때, 혈액 및 우유내 cordycepin 함량을 조사하여 비유시기별 변화양상을 조사하고자 실시하였다. 건물 섭취량, 우유중 체세포수 및 우유중 요소태질소농도는 비유 전 기간동안 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군과 대조구 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 또한 유단백질 비율 및 생산량을 제외한 산유량, 유지방 및 유당에는 비유기간이 지속됨에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군과 대조군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 유단백질 함량 및 생산량은 전체기간 평균이 대조군보다 급여군에서 유의하게 높았다($P < 0.05$).

혈액 및 우유중 cordycepin농도는 기대했던 대로 대조군에서는 전혀 검출되지 않았으나, 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여한 처리구에서는 혈액 중 0.31~0.38 μ g/mL, 우유중 0.18~0.26 μ g/mL범위의 cordycepin이 검출되었다. 본 실험의 결과는 2년차 실험결과처럼 표준오차의 값이 높아, 개체별 차이가 큰 것으로 조사되었으며 또한 개체별 자료에서도 비유시기에 따라 우유내 cordycepin 함량의 변화가 높아 일정한 패턴을 도출할 수가 없었고, 검출되지 않는 경우도 일정수준 나타났다. 혈액과 우유 내 cordycepin 함량은 유의적인 상관관계($P=0.006$)가 있는 것으로 조사되었지만 $r^2=0.24$ 로 매우 낮았다. 비유시기에 따른 동충하초의 cordycepin이 우유로 이행되는 패턴은 일정치 않은 것으로 조사되어, 비유시기는 cordycepin의 우유이행에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Cordycepin의 우유내 전이율 범위도 개체별로는 0.00~0.95%로 변이가 높았고 매우 낮게 조사되었다. 이러한 결과가 도출될 수 밖에 없는 이유로서 추측 가능한 점은 젖소는 한우와는 달리 체내 흡수된 미량의 cordycepin이 근육이외에 우유로 매일 분산될 수 밖에 없다는 점이다. 결론적으로 젖소에게 동충하초의 급여를 통한 cordycepin의 우유내 전이는 젖소 개체별 변이가 매우 크며 또한 전이효율이 낮아 농가 산업화에는 많은 어려움이 따를 것으로 자체 평가된다.

나. 결과활용에 대한 건의

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우 및 젖소에 급여하여 쇠고기 및 우유내 cordycepin함량을 분석한 결과, 쇠고기 및 우유내 cordycepin함량이 대조구에 비하여 유의하게 증가하였고, 혈중 글루타치온퍼옥시데이즈(GSH-Px)활성 및 cordycepin이 유의하게 증가하여 동물의 건강증진뿐만 아니라 기능성 축산물로서의 가치를 입증하였다. 하지만, 쇠고기에 비하여 우유는 섭취량 대비 전이율이 낮을 뿐만 아니라, 개체별 변이가 높아 산업기술로서 활용하기에는 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Studies on development of technology for producing Cordycepin-fortified beef and milk

II. Objectives and Necessity of Research & Development

Cordyceps species, also called "winter-worm & summer-grass" are medical fungi well known for its pharmacological actions such as antitumor, fatigue treatment, immunomodulatory, antioxidant, hematogenic and antibacterial activities. In addition, *Cordyceps* species is beneficial to several diseases related to liver, heart, kidney and respiratory system. One of the biologically active components in *Cordyceps* species is known to be cordycepin (3'-deoxyadenosine). The typical *Cordyceps* used in oriental medicine is Chinese *C. sinensis* which forms a fruiting body using the larva of a moth as the host. Because natural *Cordyceps* (*C. sinensis*) is rare and expensive, however, techniques for artificial cultivation of *Cordyceps* species other than the natural *Cordyceps* have been developed and, thus commercial products of *Cordyceps* are now widely available. *C. militaris* is a related species of *C. sinensis* commonly used as a substitute of the natural *Cordyceps*.

It has been reported that the cordycepin content of mycelia is higher than that of fruiting body, and that *C. militaris* contains more cordycepin than does *C. sinensis*. Although the major *Cordyceps* species used in Korea is *Paecilomyces japonica*, techniques for artificial cultivation of *C. militaris* from plant rather than from insects has been developed by EuGene Bio Farm. The *C. militaris* from plant reduced unpleasant odor and high production costs from *C. militaris* commonly used and can be produced on a large scale.

Although the pharmacological actions of *Cordyceps* may also affect livestock, the application of *Cordyceps* in livestock has received little attention. As long as the biologically active components in *Cordyceps* can be transferred to the end products of livestock such as meat and milk, an increase of the market value of livestock products would be expected. Therefore, the objectives of the present

study were to develop technology for producing cordycepin-fortified beef and milk.

III. Contents and Results of Research & Development

1) 1st detailed subject : Determination of chemical compositions and safety on *C. militaris* mycelia from plant

This study was conducted to obtain basic information on *C. militaris* mycelia as feed supplements for livestock by determining chemical composition, the contents of amino acids, fatty acids, cordycepin and heavy metal in three different winter-worm & summer-grass, *C. militaris* mycelia from plant or pupae and *Paecilomyces japonica*.

The content of crude protein in *C. militaris* mycelia from plant and pupae was 76.16 and 75.45%, respectively, being higher ($P < 0.05$) than that of *Paecilomyces japonica* (57.21%). The content of ether extracts in *C. militaris* from plant (0.96%) was significantly lower ($P < 0.05$) than that from pupae (9.04%). The contents of crude fiber in *C. militaris* mycelia from plant and *Paecilomyces japonica* were 12.24 and 13.93%, respectively, being significantly higher ($P < 0.05$) than *C. militaris* mycelia from pupae. There were no significant differences in the content of moisture, crude ash and nitrogen free extract (NFE) between three winter-worm & summer-grass

In all three different winter-worm & summer-grass the highest content of amino acids was glutamic acid. The content of glycine was higher ($P < 0.05$) for *C. militaris* mycelia from pupae than for that from plant, and that of tyrosine was higher ($P < 0.05$) for *Paecilomyces japonica* than for the others.

The content of linoleic acid in *C. militaris* from plant was significantly higher ($P < 0.01$) but that of linolenic acid was significantly lower ($P < 0.01$) than the others. The contents of palmitic and stearic acid in *Paecilomyces japonica* were significantly higher ($P < 0.05$) than the others.

The cordycepin content was significantly higher for *C. militaris* from plant than for that from pupae (0.164% vs 0.068% on a DM basis). But cordycepin was not

detected in *Paecilomyces japonica*.

Heavy metal contents (Cr, Pb, Cd, Hg) for all three different winter-worm & summer-grass were below the allowance levels recommended by Ministry of Agriculture and Forestry in Republic of Korea.

2) 2nd detailed subject : Studies on the *in situ* digestibility of *C. militaris* mycelia from plant

The current study was conducted to investigate *in situ* digestibility of *C. militaris* mycelia from plant using Hanwoo steers equipped with rumen cannulae. The *in situ* digestibility of *C. militaris* mycelia from plant was compared with that from pupae, and also compared with soybean meal and fish meal to examine it as a protein source for ruminant. The incubation times were 0, 3, 6, 12, 24 and 48 h, respectively.

Until 6 h incubation times, the *in situ* dry matter disappearance for *C. militaris* mycelia from plant was higher than the others. At all incubation times, the *in situ* dry matter disappearance for *C. militaris* mycelia from plant was higher than for *C. militaris* mycelia from pupae and fish meal. The *in situ* dry matter disappearance for *C. militaris* mycelia from plant was significantly higher at 0, 3, 6 h incubation but lower at 48 h incubation than for soybean meal. At 24, 48 h incubation, the *in situ* dry matter disappearance for *C. militaris* mycelia from pupae (61.6 and 76.0 %) was significantly higher ($P < 0.001$) than for fish meal (49.2 and 56.7%), showing that the *in situ* dry matter disappearance of fish meal was generally lower than the others at all incubation times.

The pattern of *in situ* disappearance of organic matter and crude protein was similar to that of *in situ* dry matter disappearance. Although the *in situ* disappearance of crude ash for *C. militaris* mycelia from plant were significantly higher than for that from pupae until 3 h incubation, the difference was not seen afterwards. The range of *in situ* disappearance of crude ash in fish meal was 28~37%, being the lowest among the treatments. The result of cordycepin disappearance was not obtained because it is water soluble.

- 3) 3rd detailed subject : Effects of supplementing *C. militaris* mycelia cultured from plants on cordycepin deposition in muscles of finishing Hanwoo steers

The present experiment was conducted to examine the effects of *C. militaris* mycelia cultured from plants on cordycepin deposition in muscles and plasma glutathione peroxidase activity in finishing Hanwoo steers. Four Hanwoo steers were divided into two groups. Control group received no supplement whereas treatment group received 3% of *C. militaris* mycelia of their feed intake for 60 days prior to slaughtering.

Final body weight, average daily gain, dry matter intake were not affected by the treatment. But the activity of plasma glutathione peroxidase was numerically higher for the treatment group than for the control group (15.70 vs 9.23 unit). Furthermore, cordycepin deposition in muscles on the treatment group was identified with thin layer chromatography. The content of cordycepin in whole blood, hind leg and liver for the treatment group was 450.8 ng/ml, 2.4 and 3.5 μ g/g DM, respectively whereas it was not detected in the control group.

The results of the present experiment show that cordycepin could be deposited in muscles of Hanwoo beef by feeding *C. militaris* mycelia cultured from plants.

- 4) 4th detailed subject : Effects of increased level of supplementing *C. militaris* mycelia cultured from plants on cordycepin deposition in muscle and carcass characteristics in finishing Hanwoo steers

The current study was conducted to investigate the effect of increased level of *C. militaris* mycelia from plant on cordycepin deposition in muscle and carcass characteristics in finishing Hanwoo steers. Each five of 20 Hanwoo steers were assigned to four levels supplement of *C. militaris* mycelia from plant (0, 1, 2, and 3% of feed intake), and the feeding treatments were enforced for 60 days.

Total gain, average daily gain and dry matter intake were not affected by the treatments. Furthermore, carcass characteristics was not affected by the treatments with the exception of meat color which was higher for 2% and 3% supplements than for the control and 1% supplement.

The content of whole blood cordycepin and plasma glutathione peroxidase activity were higher for 2% and 3% supplements than for 1% supplement. The content of whole blood cordycepin was not detected in control. The cordycepin content in tissue showed similar responses with that in whole blood. Generally, however, the retention rate was low (about 1%) in all treatments. Because there was no significant difference in the cordycepin content in hind leg between 2% and 3% supplements, it was decided to choose 2% supplement for the next experiment.

5) 5th detailed subject : Effects of feeding period of *C. militaris* mycelia cultured from plants on muscular cordycepin deposition in finishing Hanwoo steers

This study was carried out to determine effects of feeding period of *C. militaris* mycelia on muscular cordycepin deposition in finishing Hanwoo steers. A total of 30 steers were allotted to an experiment with a 3×2 factorial arrangement. Treatments were two groups of with (2%) or without supplementing *C. militaris* mycelia at three different feeding periods (1, 2, and 3 months).

Dry matter intake, average daily gain and carcass characteristics were not affected by the feeding periods and supplementing *C. militaris* mycelia from plant. The content of whole blood cordycepin was not affected by the feeding periods. The range of whole blood cordycepin with supplementing *C. militaris* mycelia from plant was from 0.398 to 0.473 $\mu\text{g/ml}$. The cordycepin in whole blood was not detected in the control group. The activity of plasma glutathione peroxidase showed similar responses with the content of whole blood cordycepin, being higher for the supplement of *C. militaris* mycelia from plant than for the control group.

Supplementing *C. militaris* mycelia from plant to the diet of Hanwoo steers increased the cordycepin content in hind leg and liver whereas no cordycepin was found in control. In addition, the feeding period increased the cordycepin content in hind leg and liver, 2 and 3 months being significantly higher than 1 month. There were no significant differences between 2 and 3 months treatments in the cordycepin content of hind leg and liver.

6) 1st coordinated subject : Effects of supplementing *C. militaris* mycelia cultured from plants on cordycepin content in milk in dairy cows

The present experiment was conducted to examine the effects of *C. militaris* mycelia cultured from plants on cordycepin content in milk and plasma glutathione peroxidase activity in dairy cows. Four Holstein cows were divided into two groups. Control group received no supplement whereas treatment group received 3% of *C. militaris* mycelia from plant of their dry matter intake (600g) for 45 days.

Feed intake, milk production and composition were not affected by supplementing *C. militaris* mycelia from plant. But the activity of plasma glutathione peroxidase was numerically higher for the treatment group than for the control group (13.29 vs 6.84 unit). Furthermore, cordycepin transfer to milk on the treatment group was identified with thin layer chromatography. The range of cordycepin content was 376 ~ 449 ng/ml and 152 ~ 203 ng/ml for whole blood and milk, respectively but it was not detected in either whole blood or milk in control group. The results of the present experiment show that cordycepin could be transferred to milk by feeding *C. militaris* mycelia cultured from plants.

In the present study, although cows consumed two times more of *C. militaris* mycelia than did Hanwoo steers from the study of the first year, the cordycepin content of whole blood was similar between the two breeds. In addition, the calculated transfer efficiency of cordycepin to milk was low (about 0.75%). With the level of experimentation in this study, it can be only speculated that the difference might be due to the difference of the metabolism between muscle deposition and milk secretion or the intestinal absorption of cordycepin between the two breeds.

7) 2nd coordinated subject : Effects of increased level of *Cordyceps militaris* mycelia from plants on *in vitro* rumen microbial fermentation

Effects of *C. militaris* mycelia from plant on rumen microbial fermentation were determined by measuring *in vitro* gas production, cellulose digestion, VFA production, hydrolytic enzyme activities and bacterial counts. *C. militaris* mycelia was

added to buffered rumen fluid with final concentrations of 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 and 1.2%, respectively, and incubation was carried out in a shaking water bath at 38 °C for 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 and 72 h, respectively.

The results of present study showed that the addition of *C. militaris* mycelia to the buffered rumen fluid increased gas production and cellulose filter paper (FP) digestion, but decreased pH compared with the control. The concentration of NH₃-N and hydrolytic enzyme activities (CMCase, xylanase, Avicellase, amylase, protease) were tended to be increased by supplementing *C. militaris* mycelia suggesting that *C. militaris* might increase cellulolysis and proteolysis of rumen anaerobic mixed microbes. Maximum responses to supplementing *C. militaris* were generally seen with 0.6% and 0.9% addition.

The concentration of total VFA and the proportion of acetic acid in total VFA was increased by 0.6% and 0.9% supplements but the proportion of propionic acid was not affected, resulting in increases of the ratio of acetate to propionate.

The addition of *C. militaris* mycelia increased the number of dead protozoa but decreased fungi population, suggesting that *C. militaris* mycelia might contain anti-protozoan and anti-fungal agents.

As a result of electron microscopic examination, the outer layer of *C. militaris* mycelia seemed to be harder than that of rice straw or corn.

8) 3rd coordinated subject : Effects of various levels of *C. militaris* mycelia from plants supplement on cordycepin content in milk and milk production in dairy cows

The current study was conducted to investigate the effect of various levels of *C. militaris* mycelia from plant supplement on cordycepin content in milk and milk production in dairy cows. Each five of 20 Holstein cows were assigned to four levels of the *C. militaris* mycelia (0, 3, 6, 9% of feed intake), and their average lactation number and days in milk were 2.3th and 138.2 days, respectively. As the results of the first year study showed that the transfer efficiency of cordycepin into milk was low, the levels of *C. militaris* mycelia supplement was set to increase over 3% as opposed to the Hanwoo experiment in the second year. The feeding treatments were enforced for 60 days.

Dry matter intake and milk production were not affected by the treatments. The content of milk urea nitrogen in the treatments was increased compared to the control. There were no significant differences in somatic cell counts among the treatments.

Although the content of cordycepin in whole blood and milk were increased by supplementing *C. militaris* mycelia compared to the control, no significant differences were seen between 3, 6 and 9% supplements. As the level of *C. militaris* mycelia supplement increased, the amount of cordycepin supplied also increased whereas there were no significant differences between the treatments in the amount of cordycepin secreted into milk. Therefore, the transfer efficiency of cordycepin to milk was numerically decreased as the level of *C. militaris* mycelia supplement increased. In the present study, the range of cordycepin content in milk from the data of individual cows was 0~0.4µg/ml, and there were even undetected cows, indicating that variation for the transfer efficiency of cordycepin to milk is very high between individual cows.

The cordycepin content of *C. militaris* mycelia (0.10%) used in the present study was lower than that used in the first year study (0.16%). Therefore, the calculated amount of cordycepin supplied were similar between 6% in the present study and 3% in the first year study. Based on the results of cordycepin content from the first and second year study, it would seem unlikely that the cordycepin content of milk would be further increased by supplementing *C. militaris* mycelia beyond 6% of feed intake.

9) 4th coordinated subject : Effects of long-term supply of *C. militaris* mycelia cultured from plants on cordycepin content in milk and milk production in dairy cows

This study was carried out to determine effects of long-term supply of *C. militaris* mycelia on cordycepin content in milk and milk production in dairy cows. Ten Holstein cows in the early stages of lactation were divided into two groups. Control group received no supplement whereas treatment group received 6% of *C. militaris* mycelia of their dry matter intake for 6 months.

Feed intake, milk urea nitrogen and somatic cell counts were not affected by long-term supply of *C. militaris* mycelia for the whole period. In addition, milk

yield and milk composition were not affected by long-term supply of *C. militaris* mycelia at any time of the periods with the exception of milk protein content and yield. The average of milk protein content and yield from the whole period was higher for *C. militaris* mycelia supplement group than for the control group.

As expected, cordycepin in whole blood and milk was not detected in the control group. The range of cordycepin content in the treatment was 0.31 ~ 0.38 μ /ml and 0.18 ~ 0.26 μ /ml for whole blood and milk, respectively. As similar to the results of the second year study, individual variation was high and cordycepin was also undetected in some milk samples. Thus, no clear pattern could be seen in cordycepin content in milk throughout the whole period, suggesting that stages of lactation might be excluded as a factor affecting the transfer efficiency of cordycepin to milk. Again, the transfer efficiency of cordycepin to milk based on individual data in the present study was variable and low, being between 0.00 and 0.95%. The inconsistent results between and even within individual cows cannot be explained at present.

Overall, the results of the present study suggest that the transfer efficiency of cordycepin to milk by supplementing *C. militaris* mycelia in dairy cows was unpredictable and low. Therefore, it could be difficult to apply the output of the present study to dairy industry.

IV. Proposition for Research, Developmental and Application of the Results

The objectives of the present study were to develop technology for producing cordycepin-fortified beef and milk by supplementing *C. militaris* mycelia from plant to diets of Hanwoo and Holstein cows. The results of the present study show that cordycepin content in beef and milk in treatments was significantly increased compared to control. In addition, the activity of plasma glutathione peroxidase was also increased by supplementing *C. militaris* mycelia from plant, suggesting that *C. militaris* mycelia from plant could improve the health of livestock and also be used for producing functional livestock products. However, the transfer efficiency of cordycepin to milk by supplementing *C. militaris* mycelia in dairy cows was unpredictable and low. Therefore, it could be difficult to apply the output from the cow study to dairy industry.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	7
Section 1. Objectives of research and development	7
Section 2. Necessities of research and development	72
Section 3. Scope of research and development	23
Chapter 2. Domestic and foreign situations for technological developments	33
Section 1. Domestic and foreign situations	3
Section 2. Forward perspectives	3
Chapter 3. Contents and results of research	7
Section 1. Determination of chemical compositions and safety on <i>C. militaris</i> mycelia from plant	7
Section 2. Studies on the <i>in situ</i> digestibility of <i>C. militaris</i> mycelia from plant	5
Section 3. Effects of supplementing <i>C. militaris</i> mycelia cultured from plants on cordycepin deposition in muscles of finishing Hanwoo steers	5
Section 4. Effects of increased level of supplementing <i>C. militaris</i> mycelia cultured from plants on cordycepin deposition in muscle and carcass characteristics in finishing Hanwoo steers	7
Section 5. Effects of feeding period of <i>C. militaris</i> mycelia cultured from plants on muscular cordycepin deposition in finishing Hanwoo steers	8
Section 6. Effects of supplementing <i>C. militaris</i> mycelia cultured from plants on cordycepin content in milk in dairy cows	3
Section 7. Effects of increased level of <i>Cordyceps militaris</i> mycelia from plants on <i>in vitro</i> rumen microbial fermentation	102
Section 8. Effects of various levels of <i>C. militaris</i> mycelia from plants supplement on cordycepin content in milk and milk production in dairy cows	123

Section 9. Effects of long-term supply of <i>C. militaris</i> mycelia cultured from plants on cordycepin content in milk and milk production in dairy cows	131
Chapter 4. Achievements and contribution	143
Section 1. Achievements for goals	143
Section 2. Outward contribution	145
Chapter 5. Application plans of research results	146
Chapter 6. Knowledge collected from foreign countries	147
Chapter 7. References	148

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	27
제 1 절	연구개발의 목적	27
제 2 절	연구개발의 필요성	27
제 3 절	연구개발의 범위	32
제 2 장	국내외 기술개발 현황	35
제 1 절	국내·외 관련기술의 현황 및 문제점	35
제 2 절	앞으로의 전망	35
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	37
제 1 절	밀리타리스 동충하초 군사체의 화학적 성분 및 안전성 조사	37
제 2 절	식물성 밀리타리스 동충하초 군사체의 반추위분해양상 구명	50
제 3 절	밀리타리스 동충하초 군사체내 cordycepin의 한우육내 전이여부 결정 사양시험	65
제 4 절	Cordycepin 강화 한우고기를 생산하기 위한 밀리타리스 동충하초 군사체의 적정사용량 결정을 위한 사양연구	75
제 5 절	밀리타리스 동충하초 군사체를 이용한 cordycepin 강화 한우고기 생산을 위한 포화축적기간의 구명을 위한 연구	84
제 6 절	밀리타리스 동충하초군사체내 cordycepin의 젖소 우유내 전이여부 결정 사양시험	93
제 7 절	<i>In vitro</i> 연구를 통한 밀리타리스 동충하초 군사체의 적정사용량 결정 시험	102
제 8 절	Cordycepin 강화 우유를 생산하기 위한 밀리타리스 동충하초 군사체의 적정사용량 결정을 위한 사양연구	123
제 9 절	비유시기별 적정 사용량에 대한 우유 중의 cordycepin 변화 구명	131
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	143
제 1 절	연구개발의 목표 달성도	143

제 2 절	대외 기여도	145
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	146
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	147
제 7 장	참고문헌	148

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우 및 착유우에 급여하여, 밀리타리스 동충하초 균사체에 다량 존재하는 cordycepin이 강화된 한우고기와 우유를 생산하는 새로운 사양기술을 개발한 후, 궁극적으로 한우 및 젖소농가에 기술을 보급하여 축산농가소득증진과 국민건강증진에 기여하는 데 그 목적이 있다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

한·미 FTA 진행 및 미국산 쇠고기 수입 재개방에 따른 대응책의 일환으로, 최근 한우농가에서는 소비자의 요구에 따라 육질이 좋을 뿐만 아니라 기능성 생리활성물질이 강화된 고기의 생산에 관심이 고조될 것으로 예상된다. 지금까지 약용작물 및 지역특산물 또는 그 부산물 등을 급여한 많은 종류의 브랜드쇠고기들이 여러 지역에서 생산되고 있으나 과학적이고 체계적인 연구의 미흡으로 그 작용기전과 효능이 의문시되고 있다(한성일, 1999; 2001).

특정한 물질이나 부산물을 이용한 새로운 기능성 식품 소재원의 개발 시 학술적 근거 자료의 확보가 시급한 실정이다. 아울러, 입증되지 않은 기능성 브랜드육의 생산은 국내 한우쇠고기 시장의 활성화뿐만 아니라 국외시장 진출에 가장 큰 걸림돌이 되고 있다.

한편, 약용버섯은 매우 유용한 생리활성(기능성)물질이 광범위하게 다량으로 존재하기 때문에(Wasser와 Weis, 1999), 생리활성 기능성 물질의 보고(寶庫)가 되므로 최근 학계는 물론 산업계의 관심이 고조되고 있다. 이에 따라 특정 생리활성물질이 다량으로 함유된 버섯을 대량생산할 수 있는 체계를 마련 할 수 있다면 기능성축산물 산업에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

동충하초(冬蟲夏草)는 분류학상으로 자낭균강, 맥각류목에 속하는 버섯으로 일종의 곤충 기생균(*Entomopathic fungi*)으로 보고되고 있고, 이는 겨울철에 곤충의 몸에 들어가 영양분을 흡수하여 곤충을 죽게 하고, 여름철이 되면 죽은 곤충의 몸에서 버섯이 풀처럼 돋아나는 모습에서 그 이름이 유래되는 데, 처음에는 박쥐나방의 유충으로부터 발생되는 동충하초인 *Cordyceps sinensis*에 한하여 동충하초라는 명칭을 부여

하였지만, 현재에는 이에 국한하지 않고 여러 가지 곤충에 기생하여 발생하는 균사체를 포함한 자실체를 총칭하여 사용되고 있다.

수 천년 전부터 중국에서 사용되어온 동충하초는 산삼 및 녹용과 함께 3대 보약제로 취급되고 있는데, 대표적인 효능으로는 항암작용, 피로회복, 면역강화, 항산화 작용, 조혈작용, 구충작용 등을 들 수 있으며(Zhu et al., 1998), 각종 암(특히, 백혈병; leukemia; Kodama et al., 2000)은 물론 간, 심장, 신장, 폐 등과 연계된 질환에 탁월한 예방 및 치료효과가 있는 것으로 잘 알려져 있다(Li et al., 2001; Huang et al., 2003). 우리나라에서는 동충하초가 당뇨병 예방 및 치료 효과가 우수함으로 알려져 있는데, 이는 동충하초의 여러 가지 효능 중에서 극히 일부분에 지나지 않는다.

동충하초 중에 함유된 대표적인 생리활성(기능성)물질에는 각종 nucleosides (cordycepin 포함) 및 nucleotide와 같이 염기가 중심이 되는 성분, galactose와 mannose로 구성된 polyssacharide, ergosterol, cordycepic acid, 각종 아미노산 및 불포화 지방산 등이 있다(Zheng et al., 1999). 물론 이들 물질이 연계하여 질병예방 및 치료에 관계 할 수도 있지만, 가장 주도적인 기능성을 나타내는 물질은 nucleoside로 3'-deoxyadenosine인 cordycepin이라는 데는 학자들 간에 이견이 없으며, 이 물질이 가장 강력한 질병예방 및 치료 능력을 갖는 생리활성물질로 평가되고 있다(Huang et al., 2003).

Cordycepin은 자실체 보다는 균사체에 1.2 ~ 1.3배 높게 존재하는 것으로 알려져 있고, 이는 adenine nucleoside의 유사체로, 3'의 위치에 hydroxyl group(OH)이 없기 때문에, transcription chain terminator로 작용하여 RNA 합성을 저해함으로써 암세포의 증식을 억제하는 항암치료제로 사용되고 있다. Cordycepin은 특히 leukemia의 치료에 탁월한 효과를 나타내는데(Kodama et al., 2000), 세포수준의 연구에 의하면 natural killer 세포의 활력을 증진시키고, interleukin 및 tumor necrosis factor의 생성을 향상키는 것으로 보고되고 있다(Zhou et al., 2002).

또한 ATP 합성을 증가시키고(운동력 증강), superoxide dismutase(SOD)의 역가를 증가시키며(노화방지), 혈당을 감소시키는(당뇨치료), 유아설사병 예방 및 치료 등과 같은 동충하초 섭취효과가 cordycepin으로부터 유래되고 있다. 또한 우유 중에 함유된 성분인 nucleoside도 생리활성물질로 인식되어 학계에서 관심이 고조되고 있는데, 비유가 진행되면서 급격하게 그 양이 감소하는 것으로 연구된바 있다(Schlimme et al., 2000).

따라서, 동충하초 균사체를 한우 및 젖소의 사료 첨가제로 이용할 경우, 상기 기능성 생리활성물질인 cordycepin이 전이되어 고부가 기능성 한우고기 및 우유를 생산함으로써 참여기업(유진바이오팜; 영농조합법인) 및 농가의 소득을 증대시킬 수 있을 것

으로 판단된다.

1) 기술적 측면

중국에서 상용되는 동충하초는 일반적으로 박쥐나방 애벌레를 기주로 생성되는 시넨시스 동충하초(*cordyceps sinensis*; 인공재배 불가능)와 누에 또는 번데기를 기주로 생성되는 밀리타리스 동충하초(*cordyceps militaris*; 인공재배 가능)로 구분되는데, 우리나라에서는 생산되는 것은 대부분 눈꽃 동충하초(*paecilomyces japonica*)이다. 눈꽃 동충하초는 누에 또는 번데기에 기생한다는 점이 밀리타리스 동충하초와 유사하지만, 분생포자를 형성하는 불완전균이라는 점과 동충하초의 특성인 cordycepin이 함유되어 있지 않다는 점이 밀리타리스 동충하초와 크게 다른 점이다. 우리나라에서는 2003년도에 동충하초는 약 20톤 정도 생산되었는데, 대부분 눈꽃동충하초이고, 밀리타리스 동충하초의 생산은 매우 미미한 상태에 있다.

밀리타리스 동충하초를 축산산업에 이용하기 위한 전제조건인 인공재배 및 대량생산 체계가 이미 본 과제의 참여기업인 유진바이오팜(영농조합법인)에서 아래와 같이 세계최초로 성공을 거두었다.

- 1) 종래에 사용되던 기주인 누에 또는 번데기의 불쾌한 냄새 문제점을 식물성 기주를 사용함으로써 해결하여 밀리타리스 동충하초의 식품 또는 사료 첨가제로의 원활한 사용이 가능하도록 밀리타리스 동충하초 생산을 위한 새로운 재배에 성공함.
- 2) 기존 밀리타리스 동충하초 재배 농가에서 사용되는 기주인 번데기는 전량 중국에서 수입이 되므로 값이 비쌀 뿐만 아니라 품질에 문제가 있으며 수급이 불안정하다는 단점이 있으나, 개발된 식물성기주는 안정적 공급이 가능하고 품질이 균일할 뿐만 아니라 대량생산이 용이하고 가격이 저렴한 장점이 있음.
- 3) 동물성기주 유래 동충하초는 한우나 젓소와 같은 반추가축에 기호성이 현저하게 떨어지지만 식물성 기주로부터 생산된 밀리타리스 동충하초는 이들 반추가축에 기호성이 우수한 것으로 나타남(실제 시험결과).
- 4) 새로운 재배기술에 의하여 생산된 밀리타리스 동충하초의 cordycepin 함량은 오히려 증가하여 사료첨가제로서의 가능성을 보임.
- 5) 실제로 산란계에게 급여한 결과 5% 이상 산란율이 개선된 것으로 나타남(농가 시험결과).

단위 가축인 닭을 통하여 얻어진 결과는 밀리타리스 동충하초의 cordycepin이 동물

의 조직 내에 상당량 축적될 수 있음을 시사한다. 반추가축의 경우 반추위 생태계 때문에 덜 효율적으로 전이될 가능성을 배제할 수는 없으나, 다음과 같은 이유로 전이 가능성이 높다고 판단된다.

- 1) Cordycepin(adenine nucleoside; $C_{10}H_{13}N_5O_3$)은 adenine base가 단순하게 deoxyribose와 glycosidic linkage로 연결된 상당히 작은 크기(MW; 251.24)의 분자이므로 장내 및 혈중 효소작용에 의하여 분해될 가능성이 낮음(Mateo와 Stein, 2003).
- 2) Nucleoside 형태는 식품유래 purine 및 pyrimidine을 소장상피세포 안으로 운반하는 역할을 하는 것으로 알려져 있고(Salati et al., 1984), 실제로 식품유래 nucleoside의 90% 이상이 소장내로 흡수됨이 확인됨(Uauy, 1989)
- 3) 특히, nucleoside는 주로 Na^+ -dependant transporter에 의하여 소장상피세포 흡수되는데(Scharrer와 Grenacher, 2001, 2002), 소의 소장상피세포가 사람이나 토끼보다 약 10배 정도 nucleoside의 흡수능력이 우수하게 나타남(Theisinger et al., 2002).

따라서, 밀리타리스 동충하초의 균사체에 다량으로 함유되어 있는 생리활성물질인 cordycepin의 쇠고기 및 우유제품으로의 이행 형태를 구명할 뿐만 아니라 이행을 유도함으로써 cordycepin을 함유하는 고 부가가치의 한우고기 및 우유를 생산하여 축산물의 고품질 브랜드화가 가능하다고 판단된다.

참여기업에서 개발한 밀리타리스 동충하초의 균사체의 생리활성물질을 탐색하고 cordycepin의 함량을 정량하고, 균사체의 물리화학적 특성을 구명함으로써 사료첨가제 원으로서의 가능성을 제시하는 연구가 필요한 것으로 사료된다.

이에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체 및 추출물의 반추위 내 이용성과 반추미생물에 어떠한 영향을 미치는지 구명하고, *in situ* 방법을 통하여 균사체의 반추위 내 분해도를 구명하는 연구가 필요하고, 밀리타리스 동충하초 균사체를 한우 및 젖소에 급여한 후 혈액, 조직 및 우유 중 cordycepin 이행에 관한 연구가 필요하며, 한우 및 젖소에 대한 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정 급여수준 및 포화축적기간 연구를 통하여 사료첨가제로서의 적정배합비 및 첨가기간을 구명하여야 한다.

밀리타리스 동충하초 균사체를 한우 및 젖소에 급여함으로써 cordycepin을 쇠고기 및 우유 내 전이시켜 국민건강 증진에 기여하고 창업보육 상태에 있는 참여기업은 물론 일선 한우 및 낙농농가의 수익을 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

쇠고기 및 우유의 소비는 주로 일반적인 고기 및 우유에서 이루어지고 있으나 쇠고기 및 우유의 소비촉진을 위해서는 브랜드 개발과 쇠고기 및 우유를 이용한 다양한

육·유제품의 개발이 필요한 실정이다.

2) 경제·산업적 측면

- 국내에서 소비되고 있는 쇠고기에 대한 수입 쇠고기의 비율이 점차 증대되고 현재 품질 대비 가격 경쟁력이 우수한 냉장 부분육의 수입량이 증가하고 있는 상황에서 기능성을 갖는 고급 한우 쇠고기의 생산을 통한 특화가 불가피함.
- 우유의 경우, 과잉생산 및 쿼터제 도입에 따라 낙농가는 어느 때 보다 어려운 시기에 있으므로 새로운 기능성 우유의 생산은 매우 절실함.
- 특용작물에 대한 첨가사료자원으로서의 연구와 사료첨가제 이용방법 확립
- 고품질 기능성 축산물의 생산 및 개발, 한우고기 및 우유의 상품 가치 향상을 통한 시장 경쟁력의 확보
- 급변하는 국제 쇠고기 및 우유 교역에서 국내 한우 및 젖소의 안정적 사육기반 구축 및 소비확대를 위해서는 얼굴 있는 고품질의 브랜드 육·유를 생산하여 부가가치를 향상시킬 수 있는 쇠고기 및 우유개발 보급이 시급한 상태임.
- 국내산의 우위성을 활용한 특색 있는 쇠고기 및 우유생산과 소비자의 건강 유지를 위한 축산식품을 개발하여 식품 산업과 국내 축산업의 연대를 강화하여 근본적인 대책의 기틀 마련.
- Cordycepin과 같은 기능성 물질을 이용한 새로운 기능성 브랜드 육·유의 개발에 의한 차별화는 국내 한우 및 젖소산업 기반 구축 및 생산농가 소득증대는 물론 수출 산업으로의 활성화에 중요하며 21세기 국내 쇠고기의 안정적 공급 차원에서 중요하다고 판단됨.

3) 사회·문화적 측면

- 21세기 열린 상품시장을 대비하여 WTO체제하에서의 농축산물 수출증대와 수입 감소를 위한 제품기술 개발 시급.
- Cordycepin은 유아설사(Pickering et al., 1998)에 탁월한 효과가 있으므로, 본 연구를 통한 cordycepin 강화 쇠고기 및 우유 제품은 신생아를 비롯한 유아기 어린이의 건강에 도움을 줌으로서 사회적인 문제로까지 번져가는 유아기의 고충을 덜어주는 데 일조할 것으로 판단됨.
- 과학적 근거자료가 있는 기능성 쇠고기 및 우유의 생산은 소비자들의 신뢰를 구축하는데 필수적임.
- 양질의 냉장 쇠고기 및 우유가 본격적으로 수입되면서 단순히 애국심에 의한 국

내산 한우고기 및 우유의 자발적 수요를 기대하기는 불가능함. 따라서 cordycepin 강화 쇠고기 및 우유와 같은 기능성 고급육 및 우유를 생산하는 것은 수입 쇠고기 및 우유의 대량유입을 막고 WTO에 대처하는 방법이 될 것으로 사료됨.

- 지적 소유권의 확대로 선진국의 기능성 생리활성물질 개발의 기술 이전 회피 현상이 심각한 수준임.
- 고품질 및 기능성 축산물의 생산 및 개발지 상품의 흐름에 따라 차별화 상품을 개발 보급하는 체계를 개발하는 것이 중요함.

제 3 절. 연구개발의 범위

본 연구는 대량생산 가능한 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우 및 착유우에 급여하여 cordycepin 강화 한우고기 및 우유를 생산하기위한 목적으로 실시한 것으로서 그 연구개발의 범위는 다음과 같다.

가. 밀리타리스 동충하초 균사체유래 생리활성물질(cordycepin) 정량

- 1) 동충하초 균사체 종류별 cordycepin 함량 정량
- 2) 동충하초의 영양성분(수분, 단백질, 조지방, 섬유소) 및 중금속함량(Pb, Cd, Cr 및 Hg)
- 3) 균사체의 지방산, 아미노산 및 광물질의 조성 평가

나. 밀리타리스 동충하초 균사체 유래 cordycepin의 쇠고기 내 전이 여부 구명

- 1) 4 두의 비육우를 공시하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 전이 여부를 결정하기 위한 사양시험(한우사양시험I)
- 2) 후지 및 간조직내 cordycepin 탐색 및 정량

다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin 및 영양소의 반추위내 분해도 구명

- 1) 반추위 fistula가 장착된 한우를 이용하여 나일론백에 동충하초 및 각종 단백질 단미원료(어분, 대두박) 시료를 반추위에 일정시간별 정지시킴.
- 2) 정지시간별 밀리타리스 동충하초 균사체의 영양소 소실율 측정

- 라. 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화 한우고기 생산을 위한 적정사용량 구명을 위한 사양시험연구
- 1) 비육기 거세 한우에 대한 최적 수준의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여량결정을 위한 사양시험(한우사양시험II)
 - 2) 쇠고기 및 혈액 중 cordycepin 정량 및 전이율 결정
 - 3) 혈액 중 GSH-Px 활성 측정
 - 4) 도체성적조사
- 마. 밀리타리스 동충하초유래 cordycepin의 비육한우 포화축적기간 결정을 위한 사양시험
- 1) 최적수준의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 포화축적기간 결정을 위한 사양시험(한우사양시험III)
 - 2) 쇠고기 및 혈액 중 cordycepin 탐색 및 정량
 - 3) 혈액 중 GSH-Px 활성 측정
 - 4) 도체성적조사
- 바. 밀리타리스 동충하초 균사체 유래 cordycepin의 우유 내 전이 여부 구명
- 1) 4두의 젖소를 공시하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 전이 여부를 결정하기 위한 사양시험(젖소사양시험I)
 - 2) 우유내 cordycepin함량 탐색 및 정량
 - 3) 혈액 중 GSH-Px 활성측정
- 사. 밀리타리스 동충하초 균사체의 수준별 급여에 따른 적정급여비율추정에 관한 연구
- 1) 반추위 혼합미생물을 이용하여 균사체 첨가수준별로 기질을 공급하여 인공반추위 배양시험 (*in vitro* 연구)
 - 2) 배양시간별 반추위 분해도, 가수분해효소, 반추위 발효성상조사
 - 3) 반추위 미생물 군락변화 관찰
 - 4) 한우 및 젖소의 적정첨가량 추정을 위한 자료제시
- 아. 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화 우유생산을 위한 젖소의 적정사용량 구명을 위한 연구

- 1) 비유중인 젖소에 대한 최적 수준의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여량 결정을 위한 사양시험(젖소사양시험II)
- 2) 우유 및 혈액 중 cordycepin 정량 및 전이율결정
- 3) 혈액 중 GSH-Px 활성 측정
- 4) 유질(유성분) 및 체세포수 변화 조사

자. 젖소의 비유시기에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체의 최적 사용량에 대한 우유 내 cordycepin 함량변화 구명을 위한 연구

- 1) 비유시기에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체급여에 의한 우유내 cordycepin 변화량 조사를 위한 사양시험(젖소사양시험III)
- 2) 우유 및 혈액 중 cordycepin 정량
- 3) 유질(유성분) 및 체세포수 변화 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내 · 외 관련기술의 현황 및 문제점

- 쇠고기 수입개방과 우유생산 과잉에 따른 한우 및 젓소 농가에게 고수익이 보장되는 기능성 브랜드 육·유 생산기술이 시급함.
- 각종 브랜드 육·유가 여러 형태로 시판되고 있으나 과학적이고 체계적인 연구(특히 축산물내에서의 기능성 물질의 전이 연구)의 미흡으로 그 작용기전과 효능이 의문시되고 있음.
- 새로운 기능성 식품 소재원의 개발 시 학술적 근거 자료의 확보가 시급함.
- 입증되지 않은 기능성 브랜드 육·유의 생산은 국내 한우고기 및 우유 시장의 활성화뿐만 아니라 국외시장 진출에 가장 큰 걸림돌이 되고 있음.
- 밀리타리스 동충하초 중 함유된 cordycepin은 매우 유용한 함암물질로 알려져 있으며(Foss, 2000), 면역력 증강 효과를 포함한 각종 항질병효과에 대한 연구가 전 세계적으로 매우 왕성하게 이루어지고 있음(Lallas et al., 2004).
- 국내외적으로 동충하초를 이용한 기능성 생리활성물질 전이연구는 전무한 상태임.
- 한우의 경우, 지금까지 수십종의 기능성 브랜드육이 생산되어 출시되었지만, 물질전이에 대한 과학적인 근거자료가 전무하여 소비자들로부터 외면당하고 있는 실정임.

제 2 절. 앞으로의 전망

- 국민소득이 증대됨에 따라, rich-market을 겨냥한 기능성 브랜드 육·유의 개발로 한우고기 및 우유의 상품가치를 향상시켜 시장 경쟁력을 확보하는 길만이 한우 및 젓소 농가가 살아남을 수 있음.
- 식물성 기주 밀리타리스 동충하초의 대량생산은 한우 및 낙농 산업의 고부가가치 창출에 크게 기여할 것임.
- 본 연구와 같은 연구기반조성으로 인한 다양하고 지역 특용작물에 맞는 명실상부한 브랜드 육·유의 생산이 기대됨.
- 현재까지의 축산연구는 Macro(생산량, 효율 등) 수준에서의 연구가 주를 이루었지만, 앞으로는 Micro(기능성 구명 등) 수준의 연구가 주축을 이룰 것임.

- 본 연구에 의하여 개발된 기능성 한우고기 및 우유의 수출(특히 기능성 식품에 대한 관심이 매우 높은 일본)을 통한 외화벌이에 기여.
- 쇠고기 및 우유 섭취를 통한 cordycepin의 항암 작용은 한국인은 물론 인류건강 증진에 이바지할 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분 및 안전성 조사

1. 연구 수행 내용

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체와 기존의 동물성 동충하초 균사체 및 눈꽃동충하초 균사체의 사료영양적 가치 및 각종 중금속을 분석하여 안전성을 조사하고, 아울러 강력한 생리활성 물질인 cordycepin을 정량하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체에 대한 사료첨가제로서의 가치를 평가하고자 수행하였다.

2. 시험방법

본 연구는 식물성과 동물성의 밀리타리스 동충하초 균사체 및 눈꽃동충하초 균사체는 일반성분, 아미노산, 지방산, cordycepin을 분석하여 비교하였고, 중금속은 식물성과 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체만 조사하였다.

(1) 실험재료의 준비

본 실험에 사용한 동충하초 중 식물성 밀리타리스 동충하초균사체는 참여기업인 유진바이오팜(주)으로부터 시료를 공급받았고, 번데기(pupae) 및 누에(larvae)를 기주로 하는 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체 및 눈꽃동충하초 균사체는 시중에 유통 중인 것을 각각 3개씩 구입하여 분석에 이용하였다. 그리고 식물성 밀리타리스 동충하초의 기주는 주로 대두단백, 글루텐, 전분으로 구성된 식물성 소재원이었다. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 Figure 1-1에 나타내었다.



Figure 1-1. The appearance of floral *Cordyceps militaris* mycelia

(2) 일반성분 분석

일반성분은 AOAC(1995)방법에 따라 수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유를 분석하였다. 수분함량은 105℃ drying oven(한백과학, 한국)에 over night시켜 무게감소 차이로 정량하였고, 조단백질은 마이크로 켈달법, 에테르추출물은 에틸 에테르를 추출 용매로 이용하여 분석하였으며, 탄수화물함량은 가용물질소물로 표현하였다. 가용무질소물함량은 전체에서 수분, 단백질, 에테르추출물, 조회분, 조섬유 함량을 제한 값으로 계산하여 표시하였다.

(3) 아미노산 및 지방산분석

시료 중 아미노산분석은 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 이용하여 실시하였고, 그 분석 절차는 6N HCl로 가수분해(acid-hydrolysis)하고 여과한 후 PIBC 유도체를 형성시키고 이를 Pico-tag(column temperature 46℃, injection volume 10µl, UV detector wave length 254 nm)을 이용한 방법으로 분석하였다. 지방산분석은 Sukhija와 Palmquist(1988)의 방법에 따라 toluene으로 지방산을 추출한 후, 5% methanolic HCl을 첨가하여 70℃ heating block에서 2시간동안 가열하여 methylation을 실시하고 최종적으로 1,500rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 Gas Chromatography(GC, Hewlett Packard 6890, USA)을 이용하여 분석하였다.

(4) 중금속 분석

각 균사체내 중금속(수은, 납, 카드뮴, 크롬)은 Tsutagawa 등(1994)의 방법으로 시료를 회화시킨후 ICP(inductively coupled plasma spectrophotometer, Atomscan 25,

TJA, Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.

(5) Cordycepin 분석

Cordycepin 분석은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90℃에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μBondapak C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다.

아울러 TLC(thin layer chromatography)를 이용하여 cordycepin band를 확인하였는데, TLC의 조건은 silica gel (Merck) precoated TLC plate (UV 254)를 이용하였으며 전개용매는 CHCl₃-MeOH (3:7)로 하였다. 또한 HPLC는 13%의 MeOH를 함유한 diethylamine buffer (pH 4.5)를 이동상으로, column은 ODS (4.6 × 200 mm)를 사용하여 조사하였다. Figure 2에 cordycepin의 화학적 구조를 나타내었다.

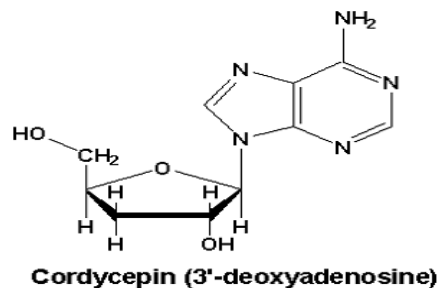


Figure 1-2. The chemical structure of cordycepin

(6) 통계분석

각종 동충하초 균사체 간의 영양성분 및 중금속과 cordycepin함량비교를 위해 본 실험에서 얻어진 모든 자료는 각 처리구의 시료수(반복)의 평균값과 표준오차를 토대로 정리하였고, 처리구간 유의성은 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 최소유의차(LSD, least significant difference) 및 t-test를 이용하여 5%(P=0.05)수준에

서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

(1) 일반성분

식물성(plant)과 동물성(pupae)의 밀리타리스 동충하초 균사체 및 눈꽃동충하초 균사체에 대한 수분, 조단백질, 에테르추출물, 조섬유 및 가용무질소물 함량은 Table 1-1에 나타내었다.

Table 1-1. The chemical composition of mycelia from three different winter-worm & summer-grass

Items	Treatments ¹			SEM ²	P < ³
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	<i>Cordyceps militaris</i> (pupae)	<i>Paecilomyces japonica</i>		
 % of dry matter				
Moisture	8.55	8.29	9.99	0.56	0.1015
CP ⁴	76.16 ^a	75.45 ^a	57.21 ^b	3.89	0.0268
EE ⁵	0.96 ^c	9.04 ^b	12.24 ^a	0.71	0.0012
CF ⁶	12.24 ^a	4.61 ^b	13.93 ^a	1.67	0.0218
CA ⁷	3.21	4.30	3.80	0.49	0.2266
NFE ⁸	7.43	6.60	12.82	2.73	0.1881

¹Each value of treatments represents means of triplicates; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ⁴crude protein; ⁵ether extract; ⁶crude fiber; ⁷crude ash; ⁸nitrogen-free extract; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ.

Table 1-1에서 보는바와 같이 수분함량은 8.29에서 9.99%로 품종 및 기주를 달리하는 동충하초균사체간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 조단백질, 에테르추출물 및 조섬유함량은 균사체간에 유의한 차이를 나타내었다(P<0.05). 조단백질함량은 식물성 및 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체에서 각각 76.16과 75.45%로서 눈꽃동충하초 균사체의 57.21%보다 유의하게 높았다(P<0.05). 이는 각 균사체 배양에 사용된 기주내 단백질함량과 밀접한 관계를 가지며 특히 고농도 단백질의 식물성 원료와 번데기를 기주로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체가 누에를 기주로 하는 눈꽃동충하

초 균사체보다 높았고 이러한 결과는 Oh 등(2003)이 발표한 결과와 일치하였으며, 이들은 밀리타리스 동충하초 균사체의 높은 조단백질함량이 균사체자체 단백질이라기 보다는 기주성분에서 유래한 것이라고 보고하였다.

에테르추출물함량은 눈꽃동충하초, 동물성 밀리타리스 동충하초, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 순으로 유의하게 낮아졌고($P < 0.05$), 특히 주목할 만한 것은 식물성이 0.96%로 동물성의 9.04%보다 에테르추출물함량이 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 이는 번데기 자체가 지니고 있는 성질과 관계하여 동물성 균사체가 에테르추출물이 높았던 것으로 사료되고, 이로 인하여 번데기기주 동충하초 균사체의 저장과정 중에 지방이 산패함으로써 악취가 발생하여 소비자의 구매를 저하시키는 결과를 초래하는 원인일 것으로 추측된다. 이에 반해 식물성 동충하초는 이러한 부분을 개선 보완한 결과인 것으로 판단된다.

한편, 조섬유함량은 식물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체가 각각 12.24 및 13.93%로 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 본 결과의 식물성 밀리타리스 균사체의 높은 조섬유함량은 식물성 기주의 성질을 반영한 것으로 생각되나, 눈꽃동충하초의 결과는 다소 이해하기 힘든 부분이 있고, 이러한 결과는 눈꽃동충하초 균사체자체의 품종특이성에 기인하는 것으로 사료된다.

조회분함량은 3.21에서 4.30%의 범위를 나타내었고, 이들은 처리구간에 커다란 특징을 나타내지 않았다. 아울러 가용무질소물함량은 눈꽃동충하초 균사체에서 12.82%로 식물성 및 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 7.43과 6.60%보다 다소 높은 값은 나타내었으나, 유의한 차이는 나타나지 않았다. 일반적으로 가용무질소물은 섬유소를 제외한 다량의 전분질 탄수화물을 함유하는 부분으로서 동충하초의 경우는 cordycepin 이외의 생리활성 물질로 다당류(polysaccharides)의 함량이 높은 것으로 알려져 있고(Kiho 등, 1995), 이 점을 감안한다면 눈꽃동충하초가 밀리타리스 동충하초에 비하여 다당류의 함량이 높은 것으로 판단된다.

(2) 아미노산

식물성(plant)과 동물성(pupae)의 밀리타리스 동충하초 균사체 및 눈꽃동충하초 균사체에 대한 아미노산조성은 Table 1-2와 Figure 1-3에 나타내었고, 아미노산함량은 Table 1-3과 Figure 1-4에 나타내었다. 먼저 세 종류의 동충하초 조성면에 있어서, 모든 처리구에서 공히 글루탐산(Glu)비율이 가장 높았다. 특히 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 20.99%로 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체의 11.75 및 11.32%보다 유의하게 높았다($P < 0.001$). 그리고 조성면에 있어 가장 낮은 아미노산은 시스테인(Cys) 및 메티오닌(Met)의 함유량아미노산이 비교적 낮은 비율을 차지했으

며, 이중 메티오닌은 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체보다 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체가 유의하게 높았다($P < 0.05$). 아울러 가축의 사료의 제한아미노산인 라이신(Lys) 및 트레오닌(Thr)과 어린 가축의 필수아미노산인 아르기닌(Arg) 및 히스티딘(His) 또한 동일한 양상을 나타내었다($P < 0.05$).

Table 1-2. Amino acid profile of mycelia from three different winter-worm & summer-grass

Items	Treatments ¹			SEM ²	P < ³
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	<i>Cordyceps militaris</i> (pupae)	<i>Paecilomyces japonica</i>		
 % of total amino acids				
Cys	1.43	1.89	1.11	0.57	0.4731
Met	1.41 ^b	2.14 ^a	1.99 ^a	0.15	0.0299
Asp	7.73	11.28	10.94	1.59	0.1916
Thr	3.70 ^b	5.47 ^a	4.42 ^b	0.31	0.0250
Ser	5.17	5.03	3.73	0.46	0.0884
Glu	20.99 ^a	11.75 ^b	11.32 ^b	0.51	0.0005
Gly	3.58 ^b	7.88 ^a	5.05 ^{ab}	1.15	0.0406
Ala	7.09	5.86	4.56	1.01	1.1858
Val	4.07	4.89	5.04	0.65	0.3965
Ile	3.45	3.37	3.95	0.76	0.7327
Leu	12.93	6.81	6.39	2.11	0.0896
Tyr	4.61 ^b	6.03 ^b	8.21 ^a	0.66	0.0267
Phe	5.64	5.59	5.23	0.40	0.5850
Lys	3.13 ^b	7.91 ^a	7.86 ^a	0.77	0.0132
His	2.02 ^b	2.68 ^{ab}	2.82 ^a	0.22	0.0412
Arg	4.55 ^b	7.13 ^a	8.00 ^a	0.58	0.0199
Pro	8.49	4.32	9.37	1.70	0.1088
EAA ⁴	40.91	45.98	45.70	1.71	0.0977
NEAA ⁵	59.09	54.02	54.30	1.71	0.0977

¹Each value of treatments represents means of triplicates; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$; ⁴essential amino acids; ⁵non-essential amino acids; ^{a,b}means within the same row with different superscripts significantly differ.

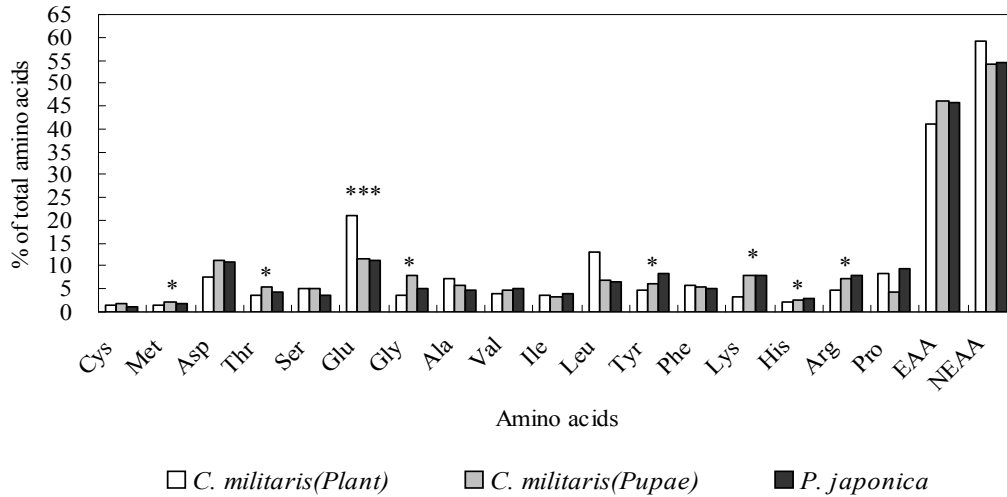


Figure 1-3. Amino acid profile of mycelia from three different winter-worm & summer-grass (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$)

한편, 글리신(Gly)은 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체가 식물성 균사체보다 약 2 배이상 비율이 유의하게 높았고($P < 0.05$), 눈꽃동충하초 균사체는 이들과 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 눈꽃동충하초 균사체는 밀리타리스 균사체와는 달리 타이로신(Tyr)비율이 8.21%로 유의하게 높았다($P < 0.05$). 필수아미노산(EAA)과 비필수아미노산(NEAA)의 비율은 전반적으로 유의한 차이가 나타나지 않았고, 세 처리구 모두에서 필수아미노산보다 비필수아미노산 비율이 높은 것으로 나타났다.

본 연구의 조성결과와는 반대로 총 아미노산의 함량은 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체가 69.24%로 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체의 36.46 및 41.40%로 유의하게 높았고($P < 0.05$), 이와 같은 결과는 각 균사체의 단백질함량과 밀접한 관계를 갖는 것으로 생각되며, 특히 식물성 밀리타리스 균사체는 기주가 고도의 식물성 단백질 소재원(대두단백, 글루텐 등)을 이용하여 배양한 것이므로 그 아미노산과 단백질함량이 높게 나타난 것으로 사료된다.

이와 더불어 각 아미노산의 함량을 살펴보면, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 트레오닌, 세린(Ser), 글루탐산, 알라닌(Ala), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe) 및 프롤린(Pro)을 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초에 비하여 유의하게 높은 함량을 나타내었다($P < 0.05$). 특히 트레오닌과 같은 제한아미노산은 식물성 밀리타리스 균사체에서 높은 함량을 차지하여 이를 가축 사료에 첨가 급여하면 각종 성장 및 발달에 유익한 효과를 가져올 것으로 생각된다.

그리고 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 글루탐산, 알라닌, 류신 및 프롤린은 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체보다 최소 2.35배 내지 최대 3.75배 더 높은 함량을 나타내어 기존의 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체보다 식물성 균사체가 우수한 것으로 나타났다. 이와 함께 필수아미노산과 비필수아미노산은 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체에서 28.34와 40.90%로 기타 동충하초 균사체보다 유의하게 높았다($P < 0.05$).

Table 1-3. Amino acid content of mycelia from three different winter-worm & summer-grass

Items	Treatments ¹			SEM ²	P < ³
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	<i>Cordyceps militaris</i> (pupae)	<i>Paecilomyces japonica</i>		
 % of dry matter				
Cys	0.99	0.69	0.45	0.25	0.2420
Met	0.98	0.78	0.83	0.13	0.3851
Asp	5.31	4.13	4.54	1.13	0.6182
Thr	2.55 ^a	1.98 ^{ab}	1.82 ^b	0.21	0.0487
Ser	3.58 ^a	1.83 ^b	1.53 ^b	0.23	0.0055
Glu	14.52 ^a	4.29 ^b	4.69 ^b	0.59	0.0007
Gly	2.47	2.82	2.11	0.43	0.3744
Ala	4.93 ^a	2.10 ^b	1.90 ^b	0.69	0.0374
Val	2.82	1.79	2.10	0.43	0.1856
Ile	2.39	1.27	1.64	0.44	0.1725
Leu	9.01 ^a	2.51 ^b	2.66 ^b	1.70	0.0403
Tyr	3.21	2.20	3.39	0.52	0.1904
Phe	3.91 ^a	2.05 ^b	2.16 ^b	0.38	0.0275
Lys	2.15	2.88	3.26	0.59	0.3032
His	1.40	0.99	1.17	0.19	0.2432
Arg	3.14	2.58	3.31	0.28	0.1498
Pro	5.89 ^a	1.57 ^b	3.85 ^{ab}	0.74	0.0229
EAA ⁴	28.34 ^a	16.82 ^b	18.95 ^b	2.87	0.0431
NEAA ⁵	40.90 ^a	19.64 ^b	22.45 ^b	2.17	0.0041
Total amino acids	69.24 ^a	36.46 ^b	41.40 ^b	4.96	0.0132

¹Each value of treatments represents means of triplicates; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$; ⁴essential amino acids; ⁵non-essential amino acids; ^{a,b}means within the same row with different superscripts significantly differ.

본 아미노산의 결과로부터 균사체내 아미노산은 버섯배지배양에 사용된 기주의 종류 및 동충하초의 품종에 따라 그 조성 및 함량이 달라지는 것으로 나타났고, 단백질 함량과 밀접한 관계를 가졌다.

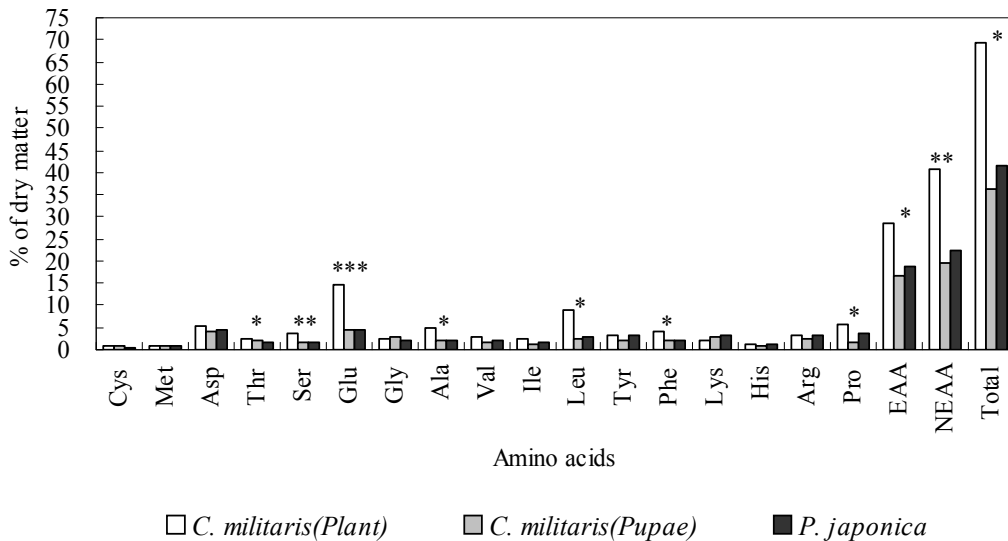


Figure 1-4. Amino acid content of mycelia from three different winter-worm & summer-grass (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)

(3) 지방산 조성

식물성(plant)과 동물성(pupae)의 밀리타리스 동충하초 균사체 및 눈꽃동충하초 균사체에 대한 지방산조성은 Table 1-4에 나타내었다. 표에 나타낸바와 같이 전반적으로 모든 처리군에서 불포화지방산이 67.93 내지 78.15%로 높은 비율을 차지하는 반면, 포화지방산은 19.87내지 28.57%로 불포화지방산에 비하여 상대적으로 낮았다. 특히 밀리타리스 동충하초 균사체 처리군들은 포화지방산이 각기 19.87과 21.90%로 눈꽃동충하초 균사체의 28.57%보다 유의하게 낮았고($P < 0.05$), 불포화지방산은 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체에서 가장 높았다.

아울러 밀리타리스 동충하초 균사체군들은 다가불화지방산의 비율이 눈꽃동충하초 균사체보다 유의하게 높았으며($P < 0.05$), 이들 중 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 리놀렌산(C18:2)의 비율이 다른 처리구에 비하여 현저하게 높았다($P < 0.01$). 이에 반해, 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체군은 리놀렌산(C18:3)이 유의하게 높은 비율을 차지하였고($P < 0.01$), 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체에서 28.80%

로 가장 높았다. 이러한 결과는 Oh 등(2003)이 발표한 연구결과와 일치하였고, 이들 연구진은 동일 종의 동충하초 균사체라 할지라도 기주의 종류에 따라 지방산조성이 달라진다고 보고하였다.

Table 1-4. Fatty acid profile of mycelia from three different winter-worm & summer-grass

Items	Treatments ¹			SEM ²	P < ³
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	<i>Cordyceps militaris</i> (pupae)	<i>Paecilomyces japonica</i>		
 g / 100 g fatty acid				
C16:0	15.88 ^b	16.20 ^b	21.67 ^a	0.55	0.0385
C16:1 n7	1.15	1.10	0.88	0.18	0.3754
C18:0	3.99 ^b	5.70 ^a	6.90 ^a	0.64	0.0279
C18:1 n9	33.50	26.50	31.30	2.96	0.2082
C18:2 n6	42.33 ^a	16.80 ^b	15.23 ^b	1.27	0.0016
C18:3 n3	1.16 ^b	28.80 ^a	20.53 ^a	2.58	0.0031
unknown	1.98	4.90	3.50	0.98	0.7124
SFA ⁴	19.87 ^b	21.90 ^b	28.57 ^a	1.91	0.0418
USFA ⁵	78.15 ^a	73.20 ^{ab}	67.93 ^b	3.76	0.0427
PUFA ⁶	43.50 ^a	45.60 ^a	35.76 ^b	2.86	0.0233
MUFA ⁷	34.65	27.60	32.17	2.53	0.1725

¹Each value of treatments represents means of triplicates; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ⁴saturated fatty acids; ⁵unsaturated fatty acids; ⁶polyunsaturated fatty acids; ⁷monounsaturated fatty acids; ^{a,b}means within the same row with different superscripts significantly differ.

한편, 눈꽃동충하초 균사체내 지방산 조성 중 특징적인 결과는 팔미트산(C16:0)과 스테아린산(18:0)의 비율이 다른 처리군에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내었다. 하지만, 식물성 동충하초 균사체는 이들 지방산이 다른 처리구에 비하여 가장 낮았다 (P<0.05).

이상에서 밀리타리스 동충하초 균사체는 리놀레산과 리놀렌산 등의 인체 및 동물건강에 유익한 불포화지방산이 비율이 높은 반면, 생명체에 유해한 포화지방산은 눈꽃동충하초 균사체에 비하여 유의하게 낮은 비율의 결과를 나타내어 가축체에 적용시 유익할 것으로 기대된다. 하지만, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 지방함량이 1%미만으로 낮아서 지방첨가의 효과는 기대하기 어려울 것으로 사료된다(Table 1-1).

(4) Cordycepin 함량

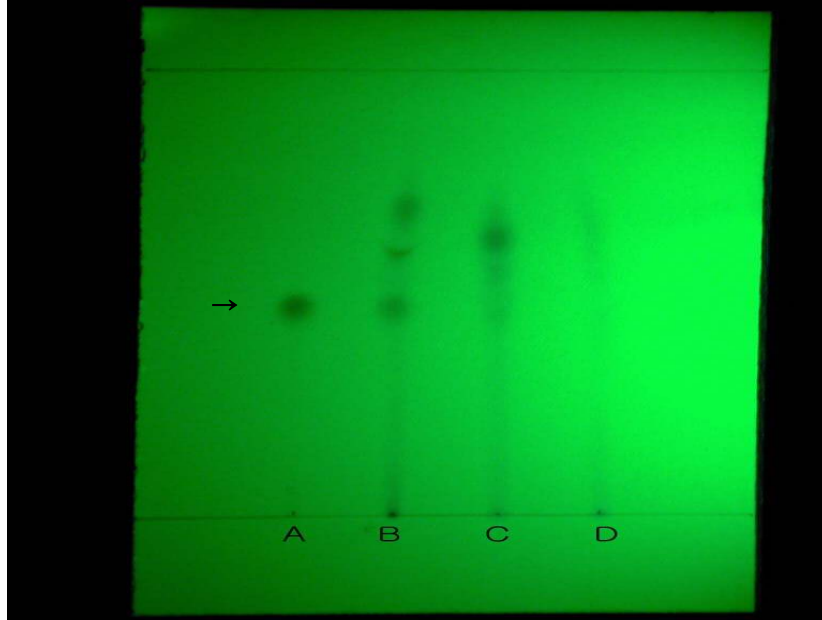


Figure 1-5. The identification of cordycepin in three different winter-worm & summer-grass by thin layer chromatography (A: standard, B: *C. militaris* (plant), C: *C. militaris* (pupae), D: *P. japonica*, arrow mark (→) represents the identification site of cordycepin).

Figure 1-5는 동충하초내 존재하는 중요한 생리활성물질인 cordycepin의 존재를 확인하기 위하여 thin layer chromatography에 전개한 것이다. 그림에서 보는 것처럼 standard line(A)의 cordycepin band위치로부터 밀리타리스 동충하초 균사체에서 선명한 자국이 찍힌 것을 관측할 수 있었고, 특히 식물성(B)이 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체(C)보다 명확한 흔적이 관측되어 식물성이 동물성보다 cordycepin함량이 많이 함유하고 있음을 시사하고 있다. 하지만, 눈꽃동충하초 균사체(D)는 cordycepin의 흔적을 확인할 수 없었다.

한편, Figure 1-6은 standard cordycepin (Sigma제품)을 수준별로 HPLC를 통하여 검출하였을 때, 각 농도별 peak area를 통하여 회귀직선을 작성한 것이다. Figure 1-6에서 보는 것처럼, 농도별 cordycepin은 고도의 신뢰도를 가지는 직선성(linearity)을 보여주었다($R^2=0.9931$). 세 종의 동충하초 균사체내 cordycepin을 분석하였을 때, 그 함량은 Table 1-5에 나타내었다. Table 1-5에서 보는 바와 같이 식물성 밀리타리스 균사체는 시료 중 1.64 mg/g를 함유하여 동물성 밀리타리스 균사체의 0.68 mg/g보다

유의하게 높았고($P < 0.01$), 눈꽃동충하초 균사체는 이전 TLC에서 나타난 것처럼 cordycepin은 본 실험 방법에 의한 분석체계에서 검출되지 않았다.

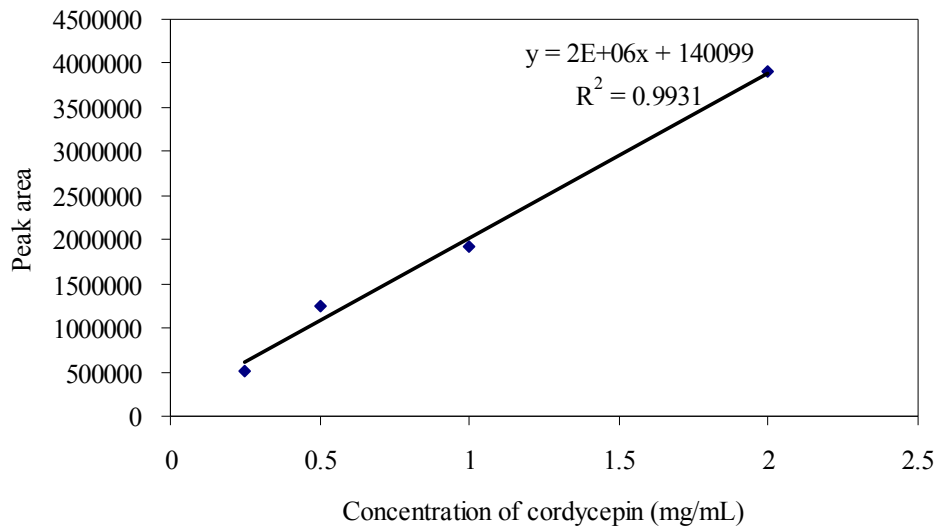


Figure 1-6. Calibration for the standard curve of cordycepin by HPLC

Table 1-5. Cordycepin contents of three different winter-worm & summer-grass

Items	Treatments ¹			SEM ²	P < ³
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	<i>Cordyceps militaris</i> (pupae)	<i>Paecilomyces japonica</i>		
 mg/g DM				
Cordycepin	1.640 ^a	0.676 ^b	ND. ⁴	0.016	0.0098

¹Each value of treatments represents means of triplicates; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$; ⁴not detectable; ^{a,b}means within the same row with different superscripts significantly differ.

본 연구에서, 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin의 함량은 기주의 종류에 따라 함량의 차이를 보여주었고, 특히 식물성 밀리타리스 균사체가 동물성 밀리타리스 및 눈꽃동충하초 균사체보다 현저하게 높은 함량을 나타내었다($P < 0.01$). 본 결과에 나타난 cordycepin 함량은 이전의 연구자(Oh 등, 2003)에 비하면 약 4배에 가까운 수준

이며, 이는 인공재배기술의 발달과 균사체의 성장환경 및 배양기간, 그리고 균사체의 배양단계와 밀접한 상관관계가 있을 것으로 사료된다. 따라서 고농도의 cordycepin이 함유된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 가축에 급여할 시 기능성 축산물의 생산가능성이 한층 높음을 시사한다.

(5) 중금속 함량

Table 1-6은 기존의 밀리타리스 동충하초 균사체 형태인 번데기 기주와 새로이 개발된 식물성 균사체간의 중금속함량을 비교한 것으로, 이는 동물이나 인체에 이용할 시 안전성을 확보하고자 조사하였다.

Table 1-6. Heavy metal contents of mycelia from two different *Cordyceps militaris*

Items	Treatments ¹		SED ²	P < ³
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	<i>Cordyceps militaris</i> (pupae)		
Lead (ppm)	0.17	0.33	0.07	0.0420
Cadmium (ppm)	n.d. ⁴	n.d.	-	-
Chromium (ppm)	2.18	0.32	0.13	0.0361
Mercury (ppb)	2.10	47.00	0.21	0.0048

¹Each value of treatments represents means of triplicates; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴not detectable.

두 종의 밀리타리스 동충하초 균사체내 납, 크롬, 수은함량은 농림부(2004)에서 고시한 허용수준인 10 ppm(납), 2.5 ppm(카드뮴), 100 ppm(크롬), 0.5 ppm(수은) 보다 현저하게 낮았고, 특히 카드뮴은 두 균사체 공히 검출되지 않았다. 하지만, 식물성 균사체의 경우 크롬함량이 2.18 ppm으로 동물성(0.32 ppm)보다 유의하게 높은 데 반하여(P<0.05), 수은은 2.10 ppb로서 동물성(47 ppb)보다 유의하게 낮았다(P<0.01). 본 결과로부터 식물성 균사체는 동물성 균사체보다 식품 및 사료 안전성이 더욱 확보되었음을 시사하고, 동물성에 비하여 식물성의 다소 높은 크롬함량은 최근 들어 인체 건강에 있어 당뇨병예방 치료에 섭취 이용된다는 보고에 착안한다면 다소 긍정적인 면으로 받아들여 질수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 반추위분해양상 구명

1. 연구 수행 내용

본 연구는 기존에 흔히 유통되고 있는 변태기 기주 동물성과 개발된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체간에 cordycepin의 반추동물에 대한 전이가능성을 예측하기 위하여 반추위 누관이 장착된 한우를 이용하는 *in situ* technique을 활용하여 반추위내 cordycepin의 분해양상 및 소실율을 조사하고, 이와 함께 단백질사료공급원으로의 가치를 알아보기 위하여 반추위내 단백질소실율을 조사하였다.

2. 시험방법

본 연구는 반추위누관이 장착된 거세한우(평균 체중 568 kg)를 이용하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체, 동물성 밀리타리스동충하초 균사체, 대두박 및 어분의 단백질사료원료를 선정하고, 이들의 단백질에 대한 반추위 소실율을 조사하였고, 밀리타리스 동충하초 균사체내 기능성 물질인 cordycepin의 반추위내 소실율은 식물성과 동물성(변태기 기주)간에 비교 조사하였다.

(1) 공시동물 및 사양관리

반추위내 누관이 장착된 거세한우 3두를 공시하여 볏짚과 농후사료(수원농협사료)를 40:60의 비율로 배합하여 자유채식시켰고, 이들 원료 및 배합된 급여사료의 화학적 조성은 Table 2-1에 나타내었다. 사료의 급여는 05:00와 17:00의 2회 급여하였다. Mineral block 및 음수는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였으며, 예비기간인 2주 동안 계류우사에 적응 사육시킨 후 본 실험에 이용하였다.

(2) 시험사료 준비 및 실험 설계

본 연구에 사용된 밀리타리스 동충하초 균사체 2종(식물성 및 동물성)과 대두박 및 어분은 *in situ* 실험을 위해 1-mm screen이 장착된 Wiley mill로 분쇄하여 pore size 1.19내지 0.177mm를 통과시켜서 미세입자를 제거하였으며 이를 Dacron bag technique에 이용하였다. 각 원료의 화학적 조성분은 Table 2-2에 나타내었다. 그리고 이들을 0, 3, 6, 12, 24, 48시간에 걸쳐서 반추위 누관이 장착된 한우의 반추위에 정지시켰다.

각 배양시간에 따른 시료의 반복은 소의 개체변이를 최소화하기 위하여 두당 3반복이 되도록 하였으며, 총 9반복으로 실시하였다.

Table 2-1. The chemical composition of feed ingredients and basal diet fed to Hanwoo steers subjected to *in situ* trial

Items	Feed sources		
	Rice straw	Commercial diet ¹	Basal diet ²
 % of dry matter		
Moisture	12.29	12.69	12.53
CP ³	5.07	16.76	12.07
EE ⁴	1.98	3.70	3.01
CF ⁵	32.04	6.65	16.84
CA ⁶	16.74	7.82	11.40
NFE ⁷	44.17	65.07	56.68

¹Purchased from Nonghyup Feed (Suwon) for finishing steers; ²formulated into rice straw and commercial diet at the ratio of 40:60, respectively; ³crude protein; ⁴ether extract; ⁵crude fiber; ⁶crude ash; ⁷nitrogen-free extract.

Table 2-2. The chemical composition of four different ingredients used in *in situ* technique

Items	Treatments ¹			
	<i>C. militaris</i> (plant)	<i>C. militaris</i> (pupae)	Soybean meal	Fish meal
 % of dry matter			
Moisture	8.55	8.29	12.86	9.22
CP ²	76.16	75.45	52.67	59.07
EE ³	0.96	9.04	0.73	11.26
CF ⁴	12.24	4.61	7.82	1.47
CA ⁵	3.21	4.30	6.23	21.03
NFE ⁶	7.43	6.60	32.55	7.18
Cordycepin	0.164	0.068	-	-

¹Each nutrient represents means of triplicates; ²crude protein; ³ether extract; ⁴crude fiber; ⁵crude ash; ⁶nitrogen-free extract.

(3) 시험방법 및 배양

Dacron bag(10×20cm; 53- μ m pore size)에 각 시료 30g을 칭량한 후 봉하여 누관이 장착된 3두의 거세 한우에 균일한 배치로 반추위내에서 배양하였다. Dacron bag의 투입은 사료급여시간에 맞추어 17:00에 개시하여 각 시간대별(3, 6, 12, 24, 48시간)로 시료를 반추위로부터 꺼내었다. 각 시간대로 배양이 끝난 시료백은 미생물의 작용을 정지시키기 위하여 즉시 아이스박스에 보관하였다. 이 후 흐르는 tap water를 이용하여 각 배양이 종료된 백을 맑은 물이 나올 때까지 세척하였고, 이는 다시 증류수로 행구어 세척을 완료하였다. 세척 후 60°C dry oven(한백과학, 한국)에서 48시간 동안 건조하여 분석 시까지 보관하였다. 단, 0시간 시료는 반추위에 정지하지 않고 미지근한 물(약 36°C)에 15분간 침지한 후, 흐르는 tap water로 세척하였다.

(4) 화학적 분석

각 배양 및 세척이 끝난 시료는 건조 후 데시케이터(desiccator)에 보관하여 무게를 측정하고, 이후 사양관리에 이용된 원료사료(벼짚, 농후사료) 및 배합기초사료와 함께 건물, 조단백질, 조지방, 조섬유 및 조회분을 AOAC(1995)방법에 따라 분석하였다. 가용무질소물함량은 건물함량에서 조단백질, 조지방, 조섬유 및 조회분함량을 감하여 조사하였다. 그리고 식물성 및 동물성의 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin의 분해율을 조사하기 위하여 반추위 소화건조시료와 원료시료의 cordycepin분석은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90°C에서 6시간 동안 끓는 물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4°C에서 24시간 동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μ m의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μ Bondapak C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다.

(5) 통계분석

본 실험에서 얻어진 모든 자료는 각 처리구의 시료수(반복)의 평균값과 표준오차를 토대로 정리하였고, 처리구간 유의성은 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)

의 최소유의차(LSD, least significant difference) 및 t-test를 이용하여 5%($P=0.05$)수준에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

(1) 건물 및 유기물소실율

식물성(Cm:plant) 및 동물성(Cm:pupae) 밀리타리스 동충하초 균사체, 대두박(SBM), 어분(FM)에 대한 반추위내 건물소실율은 Table 2-3과 Figure 2-1에 나타내었다. 표와 그림에서 보는 바와 같이 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 0, 3, 6시간에서 다른 처리군들 보다 상당히 높은 소실율을 나타내었고($P<0.05$), 이는 특히 반추위내 발효가 초기에 상당량 일어났음을 시사하고, 특히 0시간에 51.35%가 반추위내에서 소실되어 식물성 동충하초 균사체내에 수용성 fraction이 상당량 존재하는 것으로 조사되었다. 그리고 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 12와 24시간에 접어들면서 대두박의 건물소실율과 유의한 차이를 보이지 않는 동시에, 번데기기주 밀리타리스 동충하초 균사체(Cm:pupae) 및 어분보다는 유의하게 높은 소실율을 보여주었다($P<0.01$).

이에 반해, 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체, 대두박 및 어분은 0, 3, 6시간에서 처리군간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그리고 동물성인 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체 및 어분은 전반적으로 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 및 대두박에 비하여 유의하게 낮은 소실율을 나타내었고, 특히 24, 48시간에는 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체가 각각 61.63과 75.98%로 어분의 49.24 및 56.86%보다 유의하게 높은 소실율을 나타내었으며($P<0.001$), 어분은 전반적으로 모든 배양시간대의 다른 처리구보다 가장 낮은 소실율을 보여주었다($P<0.05$).

어분과는 반대로, 대두박은 배양 6시간까지는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체보다 소실율이 유의하게 낮았지만($P<0.05$), 12시간 이후부터 급격히 분해되기 시작하여 배양 종료 48시간에는 대두박이 98.12%로 건물 대부분이 반추위에서 분해되어 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 79.08%보다 유의하게 높았으며, 이는 전체처리군 중에서 가장 높은 값을 나타내었다($P<0.001$). 이상의 결과에서 밀리타리스 동충하초 균사체간에는 식물성이 동물성보다 반추위내에서 소실율이 높은 것으로 평가되었고, 대두박은 12시간이후에 급격히 반추위내에서 분해되는 반면, 어분은 다른 처리구에 비하여 비교적 반추위내에서 보호되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과와 관련하여 Broderick 등(1988)은 어분, 대두박, 아마종실박, 해바라기박, 채종박, 땅콩박, 옥골분을 *in vitro* 발효소화실험을 실시한 결과, 이들 각각의 분해율은 55, 79, 84, 59, 75, 54 및

58%를 나타내었다고 보고하여, 대두박이 비교적 높은 소실율을 나타내는 반면 어분은 비교적 낮은 소실율을 나타내어 본 연구결과와 유사하였다. 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체에 비해 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체가 높은 소실율을 나타낸 것은 동물성의 복잡하고 견고한 구조로 인하여 식물성이 높게 나타난 것으로 사료된다.

한편, 식물성 동물성 밀리타리스 동충하초 균사체, 대두박, 어분 및 대두박의 반추위내 유기물소실율은 Table 2-4와 Figure 2-2에 나타난 것과 같다. 표와 그림에서 보는 바와 같이 유기물 소실율은 건물소실율과 유사한 패턴을 나타내었고, 전 배양시간대에서 처리군간에 유의한 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 또한 참여기업에서 개발한 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 건물소실율과 마찬가지로 초기 배양시간대인 6시간까지 52.94%로 다른 처리구보다 유의하게 높은 소실율을 보인 반면($P < 0.05$), 후기 발효시간대인 12시간과 24시간에서 대두박과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 하지만, 발효 48시간에는 대두박이 98.07%로 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체가 78.92%를 나타내어 유의하게 높은 유기물 소실율을 보여주었다($P < 0.001$). 이와는 반대로 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체 및 어분은 반추위 배양 24시간까지는 두 처리군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 48시간에는 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체가 74.97%로 어분의 55.03%보다 유의하게 높았다($P < 0.001$). 본 연구결과는 건물과 유사하였다.

Table 2-3. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* dry matter disappearance

Items	Treatments ¹				SEM ²	P < ³
	Cm (plant)	Cm (pupae)	SBM	FM		
Incubation time, hr	DM disappearance, %					
0	51.35 ^a	38.27 ^b	39.57 ^b	34.97 ^b	5.87	0.0408
3	53.60 ^a	41.52 ^b	41.79 ^b	35.48 ^b	5.18	0.0159
6	53.98 ^a	45.80 ^{ab}	43.61 ^b	40.48 ^b	4.51	0.0321
12	60.79 ^a	46.85 ^b	56.30 ^a	42.27 ^b	4.52	0.0037
24	71.78 ^a	61.63 ^b	75.97 ^a	49.24 ^c	3.12	<0.0001
48	79.08 ^b	75.98 ^b	98.12 ^a	56.86 ^c	2.01	<0.0001

¹Cm(plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm(pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ.

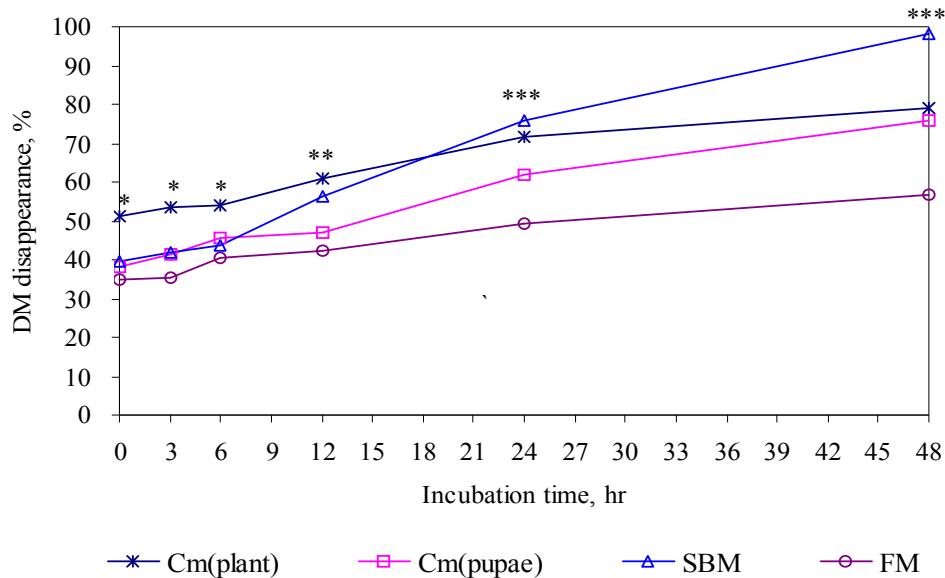


Figure 2-1. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* dry matter disappearance [Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001].

Table 2-4. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* organic matter disappearance

Items	Treatments ¹				SEM ²	P < ³
	Cm (plant)	Cm (pupae)	SBM	FM		
Incubation time, hr OM disappearance, %					
0	49.91 ^a	36.74 ^b	37.42 ^b	36.22 ^b	5.77	0.0451
3	52.45 ^a	39.77 ^b	39.42 ^b	37.51 ^b	5.10	0.0250
6	52.94 ^a	43.99 ^b	41.06 ^b	42.52 ^b	4.39	0.0408
12	59.95 ^a	44.78 ^b	54.10 ^a	43.43 ^b	4.56	0.0063
24	71.46 ^a	60.41 ^b	74.74 ^a	52.12 ^b	4.97	0.0018
48	78.92 ^b	74.97 ^b	98.07 ^a	55.03 ^c	3.37	<0.0001

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ.

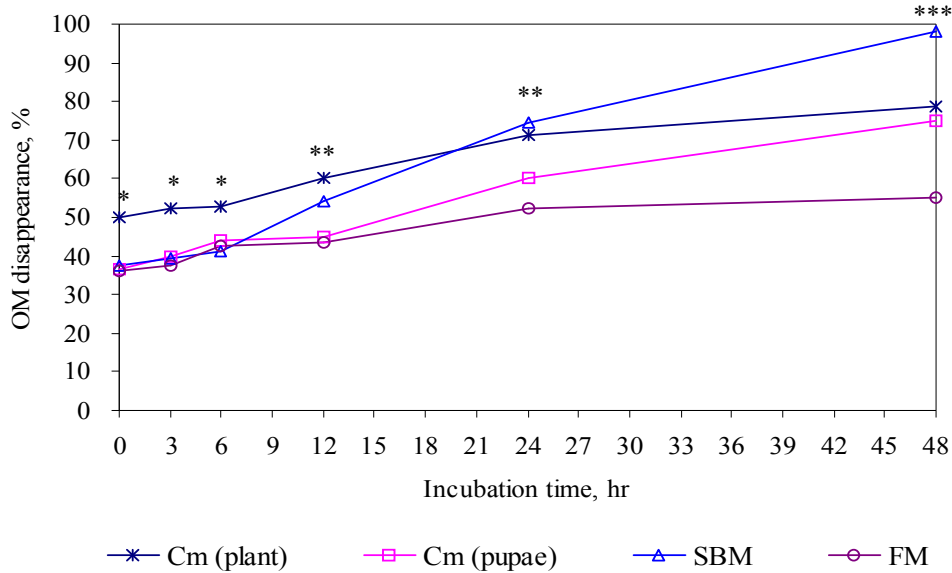


Figure 2-2. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* organic matter disappearance [Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001].

(2) 조단백질소실율

식물성(Cm: plant) 및 동물성(Cm: pupae) 밀리타리스 동충하초 균사체, 대두박(SBM), 어분(FM)에 대한 반추위내 조단백질소실율은 Table 2-5과 Figure 2-3에 나타내었다. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 건물 및 유기물 소실율과 마찬가지로 발효 6시간까지 약 50%전후로 비교적 높은 조단백질 소실율을 나타내어 나머지 처리구보다 유의하게 높았다(P<0.01). 하지만, 배양 48시간에는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체와 번데기 기주 균사체가 각각 75.95와 69.15%로 유의한 차이 없이 식물성 균사체가 번데기의 동물성 균사체보다 다소 높았다.

초기 배양시간(0~6시간)에서 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체, 대두박 및 어분은 대두박의 6시간을 제외하고, 이들 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 배양 6시간에서 대두박은 31.60%로 다른 처리구에 비하여 유의하게 낮았다(P<0.01). 이는 대두박 처리구에서 일시적인 현상으로 6시간 이후에 대두박이 급격히 분해되기 시작하여 급기야 배양 48시간에는 97.94%로 나머지 처리구보다 유의하게 높았다(P<0.001). 배양 24시간에는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체와 대두박은 유의

한 차이가 나타나지 않았으나, 48시간에는 대두박이 식물성 균사체보다 유의하게 높았다($P < 0.001$).

한편, 동물성 단백질 사료원인 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체 및 어분은 식물성 원료인 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 및 대두박보다 비교적 낮은 조단백질 소실율을 나타내었고, 배양 12시간까지는 동물성 원료들간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 동물성의 복잡하고 견고한 구조로 인하여 식물성 단백질이 반추위 미생물에 의해 쉽게 분해된 것으로 사료된다.

배양 24시간과 48시간에는 어분이 각각 43.22와 54.15%로 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체의 52.37과 69.15%보다 유의하게 낮았고($P < 0.001$), 어분은 모든 처리구에서 가장 낮았다.

Table 2-5. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* crude protein disappearance

Items	Treatments ¹				SEM ²	P < ³
	Cm (plant)	Cm (pupae)	SBM	FM		
Incubation time, hr	CP disappearance, %					
0	51.37 ^a	32.85 ^b	27.34 ^b	36.10 ^b	5.78	0.0051
3	51.50 ^a	33.68 ^b	31.79 ^b	36.17 ^b	5.28	0.0067
6	49.53 ^a	37.10 ^{bc}	31.60 ^c	41.57 ^{ab}	4.53	0.0075
12	57.53 ^a	36.77 ^b	44.81 ^b	43.11 ^b	5.37	0.0090
24	66.56 ^a	52.37 ^b	69.13 ^a	43.22 ^c	3.71	<0.0001
48	75.95 ^b	69.15 ^b	97.94 ^a	54.15 ^c	3.64	<0.0001

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ.

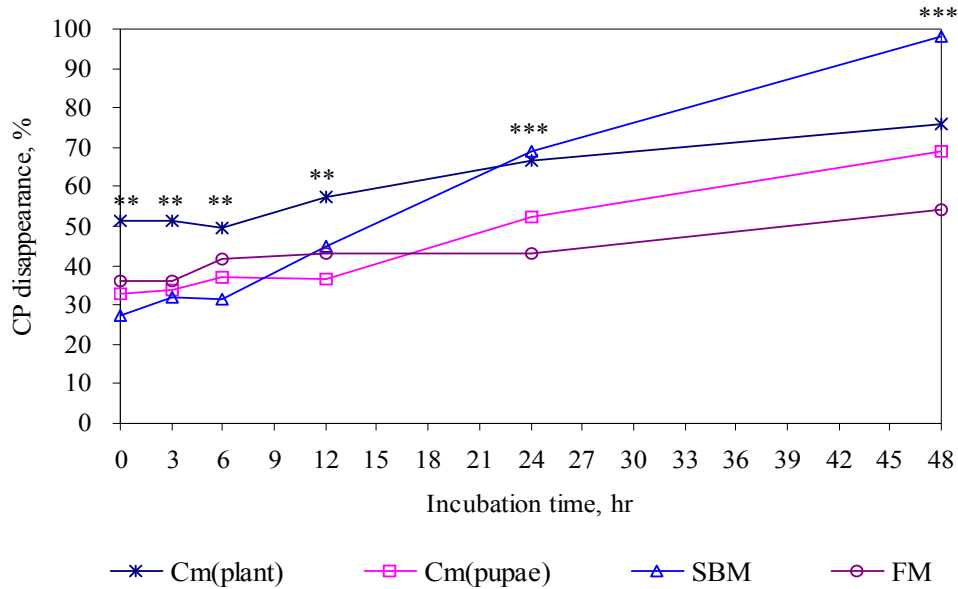


Figure 2-3. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* crude protein disappearance [Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; **: P<0.01, ***: P<0.001]

(3) 무기물소실율

식물성(Cm: plant) 및 동물성(Cm: pupae) 밀리타리스 동충하초 균사체, 대두박(SBM), 어분(FM)에 대한 반추위내 회분소실율은 Table 2-6과 Figure 2-4에 나타내었다. 표와 그림에 나타난 바와 같이 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체와 대두박은 비교적 초기 배양시간대인 0과 3시간에서 두 처리구 공히 70%이상의 높은 회분소실율을 나타내었고, 이 들간에는 유의한 차이가 나타나지 않았지만, 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체 및 어분 보다 유의하게 높았다(P<0.001). 하지만, 배양 6시간에 식물성 및 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체와 대두박은 세 처리구 간에 유의 차이가 나타나지 않았고, 이들은 어분의 30.26%보다 약 2배 이상의 높은 회분소실율을 나타내었다(P<0.001). 반면 대두박은 배양 12시간 이후부터 종료 48시간까지 지속적으로 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체보다 유의하게 높은 소실율을 나타내었고(P<0.001), 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체와 유의한 차이가 나타나지 않았다.

Table 2-6. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* ash disappearance

Items	Treatments ¹				SEM ²	P < ³
	Cm (plant)	Cm (pupae)	SBM	FM		
Incubation time, hr	Ash disappearance, %					
0	75.22 ^a	61.54 ^b	71.96 ^a	27.86 ^c	5.02	<0.0001
3	77.23 ^a	68.15 ^b	77.49 ^a	28.28 ^c	1.76	<0.0001
6	77.93 ^a	73.19 ^a	81.89 ^a	30.26 ^b	6.26	<0.0001
12	78.19 ^b	78.33 ^b	89.35 ^a	32.02 ^c	4.53	<0.0001
24	80.73 ^b	84.90 ^b	94.59 ^a	32.84 ^c	4.88	<0.0001
48	82.37 ^b	91.24 ^{ab}	99.01 ^a	37.00 ^c	5.27	<0.0001

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; a,b,c means within the same row with different superscripts significantly differ.

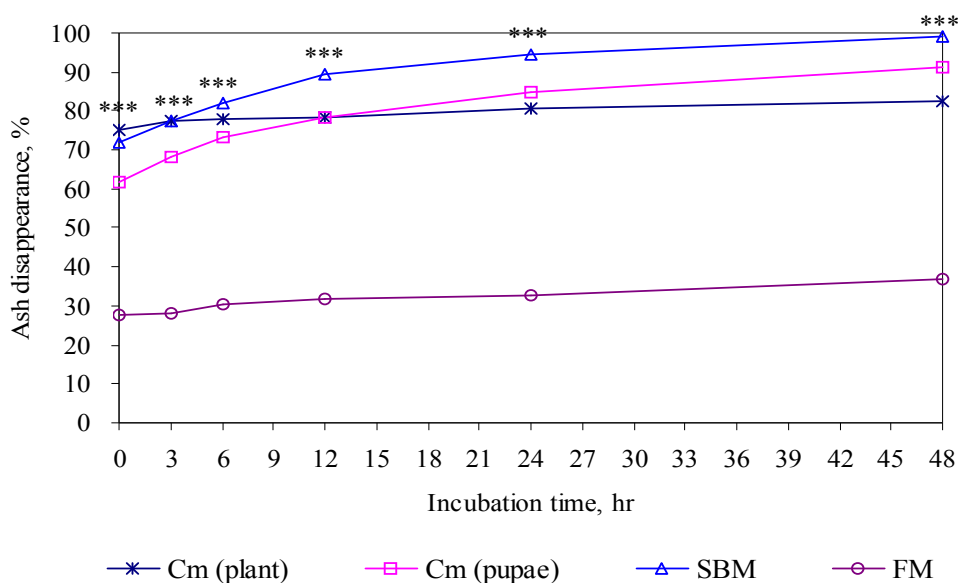


Figure 2-4. Effects of *Cordyceps militaris* mycelia and protein sources on *in situ* ash disappearance [Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia, SBM: soybean meal, FM: fish meal; ***: P<0.001]

한편, 어분은 전 배양시간대에서 28~37%의 소실율을 나타내었고, 이는 모든 처리구에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 본 결과로부터 어분에 존재하는 회분은 시간이 경과하여도 거의 반추위내에서 소실되지 않는 것으로 나타났다. 반면, 대두박 및 동식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 유기물소실율과는 달리 큰 차이를 나타내지 않는 범위내에서 비교적 높은 소실율(배양 종료시 80%이상)을 보였다. 그리고 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 배양 0, 3시간에 각각 75.55와 77.23%로 번데기 기주 동충하초 균사체의 61.54와 68.15%보다 유의하게 높은 회분소실율을 나타낼 뿐 ($P < 0.001$), 이후 시간대에서는 두처리군간에 유의한 차이가 없었으며, 이는 건물 및 유기물과 조단백질 소실율과 차별화되는 결과인 것으로 사료된다.

(4) Cordycepin 소실율

식물성 및 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin에 대한 반추위내 *in situ* 소실율의 결과는 Table 2-7과 Figure 2-5에서 2-9에 나타내었다. Table 2-7에서 나타난 바와 같이 본 연구진은 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin의 소실율의 결과를 얻지 못하였다. 이는 그림에서 보는 바와 같이 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 배양 0시간부터 시료내 cordycepin이 HPLC상에서 검출이 되지 않았다. 0시간 시료는 반추위내에 정지하지 않고 미지근한 물에 15분간 정지후 흐르는 tap water에서 세척한 것이다.

이에 반해 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체는 0시간에서 cordycepin이 검출되긴 하나 시간이 경과함에 따라 cordycepin의 peak가 작아져서 수적으로 소실율을 환산하기에는 불가능하였다.

이상과 같이 식물성 균사체는 반추위내 배양과 상관없이 cordycepin의 물리적인 특성상 물에 의해 용출되어 모두 없어져서 검출되지 않은 것으로 판단된다. 하지만 번데기 기주 밀리타리스 동충하초 균사체는 식물성균사체보다 구조적으로 결합이 다소 견고하여 초기 6시간까지는 검출되나 12시간 이후부터는 모든 부분이 소실되어 HPLC상에서 peak가 나타나지 않은 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체는 cordycepin의 함량이 번데기 기주 균사체보다 높음에도 불구하고 구조적으로 다른 물질과의 결합견고도가 번데기 기주 균사체에 비해 낮은 것으로 판단되고 이 결과 *in situ* Dacron bag 소화시험 종료후 washing에 의하여 모든 cordycepin이 용해되어 소실된 것으로 조사되었다.

하지만, 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 *in situ* 소화물내 cordycepin의 peak가 나타나지 않았다고 하여 전량 반추위내 미생물에 의한 분해로 단정 할 수는 없다.

왜냐하면 일반적으로 cordycepin과 같은 nucleoside는 반추위내에서 미생물에 의해 분해되지 않고 미생물체내로 유입시켜 그대로 하부장관에 운반되어 소장의 소화효소에 의해 nucleoside 및 purine과 pyrimidine 염기형태로 흡수되는 것으로 보고되고 있다 (McAllan, 1980; Smith와 McAllan, 1971; Stangassinger 등, 1995). 따라서 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin은 물리적으로 수용성이므로 *in situ* technique을 통하여 반추위내 소실율을 추정한다는 것은 무리가 있을 것으로 판단된다. 따라서 cordycepin의 반추동물 조직내 전이는 사양시험을 통하여 확인하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

Table 2-7. Effects of two different *Cordyceps militaris* mycelia on *in situ* cordycepin disappearance

Items	Treatments ¹		SEM ²	P < ³
	Cm (plant)	Cm (pupae)		
Incubation time, hr	... Cordycepin disappearance, % ...			
0	-	-	-	-
3	-	-	-	-
6	-	-	-	-
12	-	-	-	-
24	-	-	-	-
48	-	-	-	-

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia, Cm (pupae): faunal *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ.

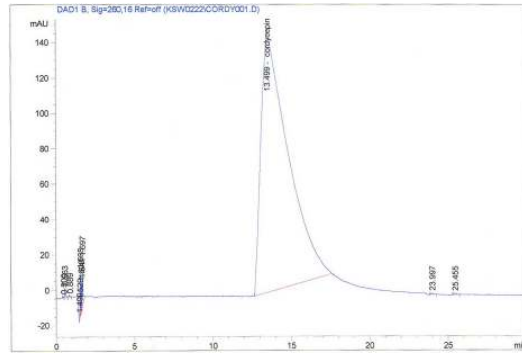
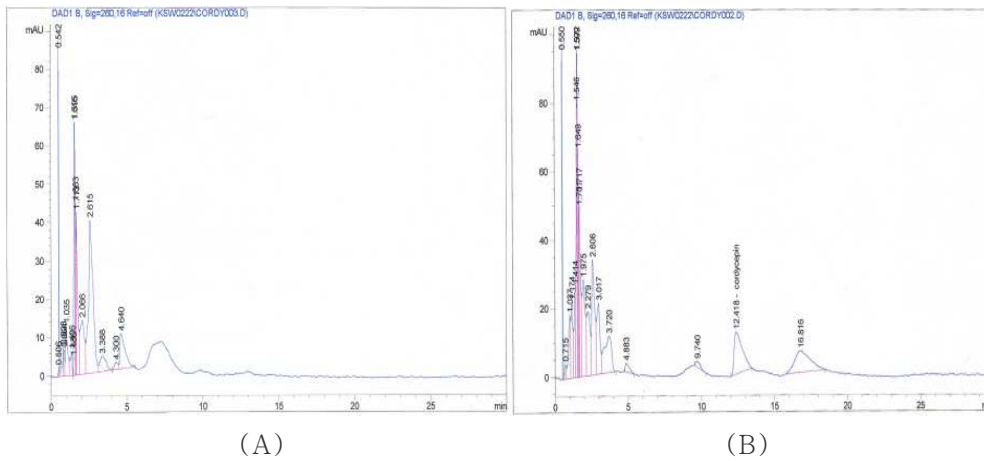


Figure 2-5. HPLC chromatogram of standard for cordycepin



(A)

(B)

Figure 2-6. HPLC chromatogram of 0-hr *in situ* digesta (A: floral *C. militaris* mycelia; B: faunal *C. militaris* mycelia)

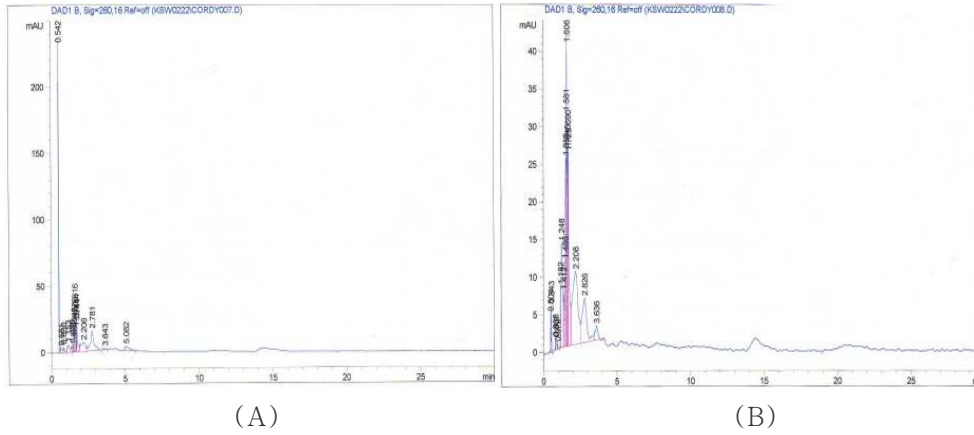


Figure 2-9. HPLC chromatogram of 12-hr *in situ* digesta (A: floral *C. militaris* mycelia; B: faunal *C. militaris* mycelia)

(5) 조지방, 조섬유 소실율

본 연구진은 본래 *in situ* 시험계획시 일반성분 모두의 소실율을 계획하였다. 하지만 조섬유 및 조지방은 본 연구에 사용된 시료의 특성상 소량으로 존재하여 정확한 소실율을 계산하는데 많은 어려움이 있었다. 본 연구진은 *in situ*를 통해 나온 소화물 (digesta)내 조섬유와 조지방을 분석하였고, 수식계산을 통한 전형적인 *in situ* 패턴이 아닌 부정확한 패턴이 나타나 본 결과에서 나타내지 않았다. 본 실험에 사용된 시료는 단백질함량이 높은 사료원이고, 조섬유는 균사체에 별로 존재하지 않는 것으로 본 연구에서는 건물, 유기물, 조단백질, 조회분의 결과만을 제시하였다.

제 3 절. 밀리타리스 동충하초균사체내 cordycepin의 한우육내 전이여부 결정 사양시험

1. 연구 수행 내용

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 한우에 사료경제적인 한계점에서 일정기간 급여하여 균사체내에 존재하는 cordycepin이 한우 조직내에 존재하는 지와 혈중 항산화활성의 증가를 확인하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

2. 시험방법

본 연구는 개발된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체(참여기업 유진바이오팜 제공)의 비육기 한우에 대한 조직내 전이여부와 혈중 항산화효소활성을 조사하기 사양시험을 실시하였다.

본 연구는 비육기 거세한우 4두를 공시하여 대조구와 처리구 각각 2두씩 배치하여 충북 옥천군 소재 한우농가에서 실시하였다. 처리군의 밀리타리스 동충하초 균사체의 사료내 급여수준은 경제적인 최고 한계점을 적용하여 사료섭취량의 3%수준으로 설정하였고, 급여방법은 현장농가의 사료급여방식(기초사료)에 밀리타리스 동충하초 균사체를 탑드레싱(top dressing)하였다. 따라서 기초사료는 대조구로 설정된다. 농장 급여 사료(기초사료)의 화학적 성분과 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분은 Table 3-1에 나타내었다.

가. 실험설계

충북 옥천군 소재 한우 농장에서 본 사양시험을 실시하였고, 체중(평균체중 613kg)과 성장월령(23 ~ 25개월)이 비슷한 비육기 거세한우 4두를 선발하여, 구역(pen) 당 2두씩 배치하였다. 실험사료의 급여는 오전(07:00 a.m.)과 오후(18:00 p.m.)로 나누어 2회 급여 자유 채식시켰고 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였다. 그리고 본 사양시험에 들어가기 전에 실험사료에 대한 적응을 위해 2주간의 예비사양기간을 두었으며, 본 실험은 60일간 지속되었다.

나. 시료채취 및 조사항목

(1) 채혈

혈액은 사양시험 종료 후, 혈중 cordycepin 함량을 조사하기 위하여 오전사료 급여 전 경정맥을 통하여 10mL heparin처리 vacutainer (Becton-Dickinson, Inc.)를 이용하여 채취하였으며, 파쇄얼음이 보존된 아이스박스에 채취한 혈액을 보관하였다.

Table 3-1. The chemical composition of floral *Cordyceps militaris* mycelia and basal diet

Items	Treatments	
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	Basal diet
 % of dry matter	
Moisture	8.55	11.49
CP ¹	76.16	11.26
EE ²	0.96	12.92
CF ³	12.24	3.73
CA ⁴	3.21	2.80
NFE ⁵	7.43	69.29
TDN ⁶	-	74.44
Cordycepin	0.164	-

¹crude protein; ²ether extract; ³crude fiber; ⁴crude ash; ⁵nitrogen-free extract; ⁶total digestible nutrients, TDN value was calculated according to the regression equation described by Wardeh (1981).

그리고 채혈작업이 종료되면 효소(GSH-Px)분석용 혈액은 혈구와 혈장분리를 위해 아이스박스에서 혈액을 꺼내어 온도가 4℃로 유지된 원심분리기에서 3,000×g, 15분간 원심 분리하였으며, 혈장과 전혈은 실험실로 운반하여 분석 시까지 -75℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) 도축 및 근육조직 채취

사양시험이 종료되었을 때, 실험에 이용된 모든 소는 시험종료 시 체중을 개체별로 측정 한 후 서울 가락시장 축산물공판장의 도축장으로 운송하여 도축하였고, 근육조직 내 전이된 cordycepin을 분석하기 위해, 후지와 간을 채취하여 아이스박스에 넣어 실

협실로 운반하였다.

(3) 사료섭취량 및 체중측정

사료섭취량은 1일 2회 급여량과 다음날 아침 사료급여 전 잔여사료를 수거하여 그 차이에 의해 계산하였다. 체중은 증체량을 조사하기 위해 시험개시 시 체중과 시험 종료 시 체중을 측정하였으며, 증체량은 시험개시체중과 종료체중의 차이로 구하였다.

나. 분석 방법

(1) 실험사료의 성분 분석 및 가소화영양소 총량 계산

실험사료의 일반성분은 AOAC(1995)방법에 준하여 분석하였다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin함량은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90℃에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μBondapak C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260 nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다. 실험사료 중 가소화영양소 총량(TDN)은 Wardeh(1989)가 제시한 에너지사료기준의 회귀식에 의하여 계산하였다.

(2) 혈장 중 glutathione peroxidase(GSH-Px; EC 1.11.1.9)활성 측정

혈장 내 존재하는 GSH-Px활성은 효소활성 기질로서 cumene hydroperoxide와 hydrogen peroxide를 사용하여 Lawrence와 Burk(1976)의 방법에 따라 spectrophotometer(Shimadzu, Japan) 340nm에서 3분간 10초 간격으로 읽어서 나타나는 slope을 이용하여 각각의 활성을 측정하였고, 아울러 효소를 단백질 단위로 표시하기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 혈장내 단백질을 정량하였다.

(3) 근육 간 및 혈액내 cordycepin의 분석

근육 조직, 간 및 혈액 중에 존재하는 cordycepin을 분석하기 위해서는 우선 시료 중에 다량 존재하는 지방을 제거하기 위하여 석유 에테르와 증류수 (1:1) 혼합액을 첨가하여 균질한 다음 에테르 층(조지방)을 제거하였다. 잔사에 대하여는 absolute methanol로 3회 환류 추출한 다음 농축하여 유기 용매를 제거하였다. 시료는 다시 증류수에 현탁한 다음 butanol과의 사이에서 partition chromatography를 행하였다. Butanol 층은 회수한 다음 농축, ODS cartridge 통과, millipore filtraton을 거친 후 TLC(thin layer chromatography)정성분석과 HPLC 정량분석을 수행하였다.

(4) 조직내 nucleoside의 분석

당초 계획상에는 nucleoside의 분석이 나타나 있지 않으나, 보다 많은 자료를 확보하고자 분석을 실시하였다. 본 연구의 nucleoside의 분석에 필요한 전 처리과정은 cordycepin 분석방법과 동일하였다.

다. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 모든 자료는 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 t-test를 이용하여 통계 분석하였다. 각 처리구간 유의성검정은 5%($P=0.05$)수준에서 검정하였다(Steel과 Torrie, 1980).

3. 결과 및 고찰

(1) 사료섭취량 및 증체량

식물성 밀리타리스 동충하초의 급여가 일일 건물섭취량 및 증체량에 미치는 영향은 Table 3-2에 나타내었다. Table 3-2에서 보는 바와 같이 종료 체중, 건물섭취량, 증체량은 대조구 및 밀리타리스 동충하초 군사체급여군간에 유의한 차이가 나타나지 않았다.

하지만 전반적으로 증체량이 다소 높은 값을 나타내었다. 이는 cordycepin의 동물체내의 대사과정 중이나 환경적인 스트레스로 일어날 수 있는 장애요소에 영향을 주어 성장에 다소 개선된 효과를 보인 것으로 판단된다. 일반적으로 번데기 기주 동충하초의 경우 불쾌한 냄새로 인하여 다소 사료섭취량이 저하되는 것으로 알려진바 있으나(미발표연구결과), 본 연구에 사용된 식물성 밀리타리스 동충하초 군사체에 의한 사료

섭취량저하현상은 나타나지 않아 사료첨가제로서의 충족요건을 만족하는 것으로 사료 된다.

Table 3-2. Effects of mycelia of floral *Cordyceps militaris* on intakes and gains in finishing Hanwoo steers

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm(plant) ¹		
Final body weight, kg	658.50	660.75	9.33	0.5727
Dry matter intake, kg/day	9.54	9.59	0.81	0.1183
Total gain, kg	46.75	47.50	7.13	0.3084
Average daily gain, g	584.38	593.75	85.56	0.3084
Mycelia intake, kg/whole period	-	23.02	-	-

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05.

(2) 혈중 항산화효소(glutathione peroxidase)활성

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세우에 급여했을 때 혈장내 글루타치온 퍼옥시데이즈(GSH-Px)에 미치는 영향은 Table 3-3과 Figure 3-1에 나타내었다.

Table 3-3. Effects of mycelia of floral *Cordyceps militaris* on plasma glutathione peroxidase in finishing Hanwoo steers

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm (plant) ¹		
Plasma GSH-Px ⁴ activity (Unit) (nmol/min./mg of protein)	9.23	15.70	4.80	0.3102

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴GSH-Px, glutathione peroxidase.

Table 3-3에서 보는 바와 같이 처리구가 15.70 unit로서 대조구의 9.23 unit보다 높은 항산화도를 나타내었으나, 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이는 밀리타

리스 동충하초 균사체내 cordycepin의 간접적인 효능을 시사한 것이고, 통계적 무의미함은 처리구간 사육두수의 부족으로 인한 결과를 상쇄시킨 것으로 관측된다. 최근 연구보고에서 cordycepin은 생명체에서 자연적으로 발생하는 각종 활성산소종 및 산화질소(NO)에 의한 세포손상으로부터 보호하는 항산화적 효능이 발표된바 있다(Won과 Park, 2005).

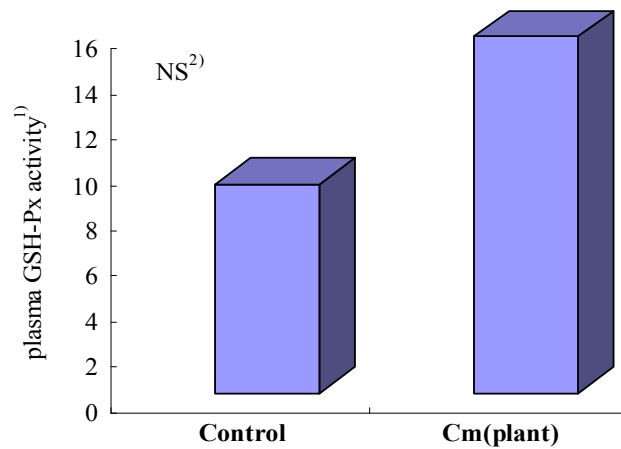


Figure 3-1. Effects of mycelia of floral *Cordyceps militaris* on plasma glutathione peroxidase in finishing Hanwoo steers (¹one unit of plasma GSH-Px activity equals 1 nanomole of NADPH oxidized/min./mg of plasma protein; ²NS, not significant.).

(3) 혈액, 근육 및 간내 cordycepin 함량

밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우에 급여하였을 때, 한우조직(후지 및 간) 및 혈액내 cordycepin의 함량에 미치는 영향은 Table 3-4에 나타내었다. 이에 앞서 근육내 TLC(thin layer chromatography)에 의한 cordycepin을 확인조사작업결과는 Figure 3-2에 나타난 것과 같다. 식물성 기주 밀리타리스 동충하초 균사체를 섭취한 처리군의 후지와 간내 cordycepin 함량의 비교는 Figure 3-3에 나타내었다.

Figure 3-2는 standard를 제외한 모든 시료를 동일한 양으로 취해 전처리하여 TLC 상에 전개한 것으로 그림에서 보는 바와 같이 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체급여군의 한우 근육(후지)인 B와 C를 보면, B에서는 약간 확인되나 C에서는 아주 명확하게 확인되어 밀리타리스 균사체내 존재하는 cordycepin이 근육내로 전이가 된 것

으로 나타났다.

하지만 무급여균인 대조구(D)는 처리구의 B와 유사하였으나 동일 선상에서 선을 그으면 standard의 cordycepin 위치보다 낮은 부위에 조금 나타나 이는 cordycepin이 아닌 것으로 추정된다.

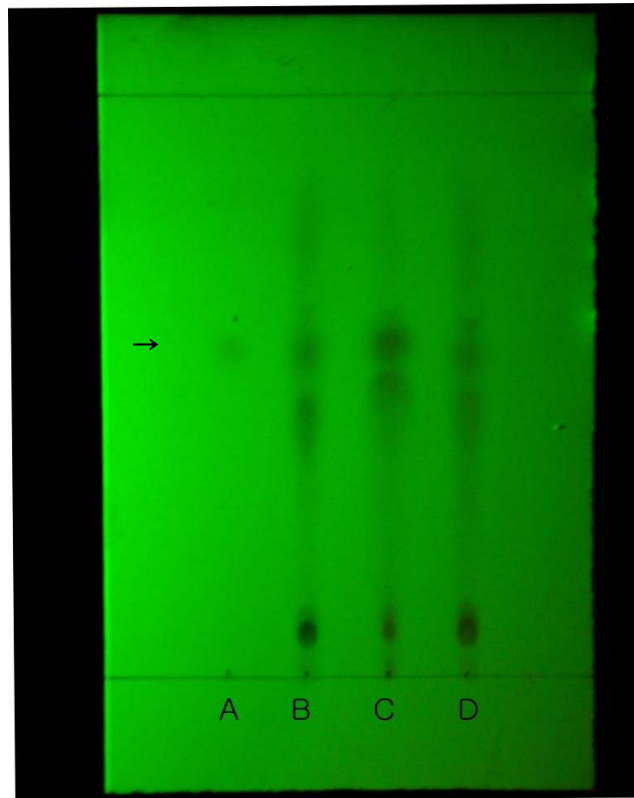


Figure 3-2. The identification of cordycepin for Hanwoo beef muscles by thin layer chromatography (A: standard, B: *C. militaris* (plant) 1, C: *C. militaris* (plant) 2, D: control, arrow mark (→) represents the identification site of cordycepin)

Table 3-4. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on cordycepin contents in whole blood and tissues of finishing Hanwoo steers

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm (plant) ¹		
..... Cordycepin content				
Whole blood (ng/mL)	ND ⁴	450.75	93.25	<0.0001
Hind leg (μ g/g, dried)	ND	2.40	0.54	<0.0001
Liver (μ g/g, dried)	ND	3.50	1.10	<0.0001

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴below the detection limit.

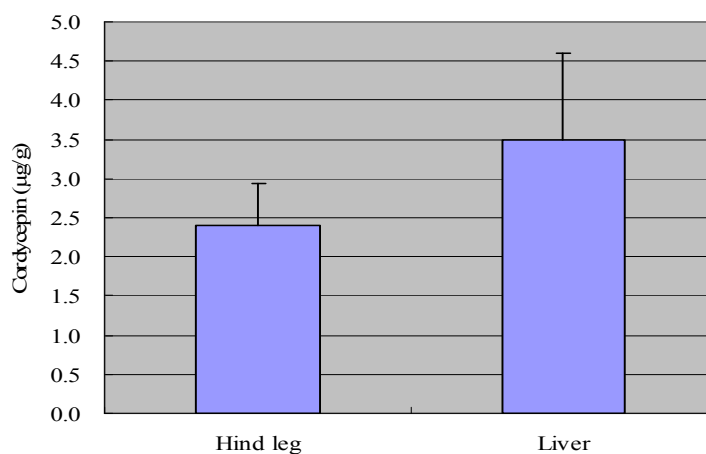


Figure 3-3. The comparison of cordycepin contents between hind legs and livers from steers fed diets containing floral *Cordyceps militaris* mycelia

Table 3-4에서 나타난 바와 같이 비육기 거세한우에 3%의 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여한 결과, 혈중 cordycepin 함량이 혈액 mL당 450.8 ng으로 대조구에 비하여 유의하게 높았고(P<0.0001), 이는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin이 장관내 양호하게 흡수되는 것으로 판단되고, 그 결과로서 조직내 전이가 능성이 높을 것으로 사료된다. 그리고 사료내 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여하지 않은 대조구에서는 본 연구진이 기대한 바와 같이 혈중 및 조직(후지 및 간)내에서 검출되지 않았다.

한편, 비육기 거세한우에 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여하였을 때, 근육(후지)과 간에서는 cordycepin 함량이 각각 조직 건조 g당 2.4와 3.5 μg 이 검출되어 식물성 밀리타리스 동충하초내 cordycepin이 비육기 거세한우의 조직에 전이 및 축적되는 것으로 나타났다. 본 결과는 TLC(thin layer chromatography)의 결과와 일치하였고, 특히 간내 cordycepin 함량이 근육 보다 약 45%가 더 높았다. 일반적으로 cordycepin을 포함하는 nucleosides 및 nucleotides는 소장 > 간 > 근육 순으로 축적되는 것으로 보고되고 있고(Saviano와 Clifford, 1978), 본 연구결과에서도 이러한 연유로 간내 cordycepin 함량이 근육보다 높았던 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 비육기 거세한우에 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 균사체내 존재하는 cordycepin이 혈액내에서 다량 검출되어 장관을 통한 흡수가 효과적인 것으로 나타났고, 그 결과로서 조직과 간내 cordycepin이 축적되어 cordycepin이 강화된 기능성 한우고기의 생산이 가능한 것으로 나타났다.

(4) 조직내 nucleosides 및 uracil 염기함량

밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우에 급여하였을 때, 한우조직(후지 및 간)내 각종 nucleosides 및 uracil 염기함량에 미치는 영향은 Table 3-5에 나타내었다.

Table 3-5에서 나타난 바와 같이 uracil 염기함량은 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여와 상관없이 후지내에서 검출되지 않았고, 후지내 nucleoside의 inosine 및 guanosine 함량 또한 균사체의 급여와 관계없이 처리군 간에 그 함량에 있어서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 후지내 주된 nucleoside로는 다량 검출된 inosine인 것으로 나타났다. 후지의 결과와는 반대로, 간에서는 inosine이 두 처리군에서 검출되지 않았고, guanosine 및 uracil 함량은 밀리타리스 균사체의 급여로 두 처리구간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 3-5. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on different nucleosides and uracil base contents in muscular and hepatic tissues of finishing Hanwoo steers

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm (plant) ¹		
 Hind leg			
Inosine (mg/g)	1.332	1.338	0.01	0.6667
Guanosine (μ g/g)	22.3	36.1	8.83	0.6226
Uracil (mg/g)	ND ⁴	ND	-	-
 Liver			
Inosine (mg/g)	ND	ND	-	-
Guanosine (μ g/g)	57.0	54.5	14.72	0.8929
Uracil (mg/g)	0.31	0.48	0.16	0.4796

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴below the detection limit.

이상의 결과로부터 cordycepin의 nucleosides 및 uracil은 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 그 함량상에 차이가 없는 것으로 나타났고, 후지는 inosine이 주된 nucleoside였고, 간의 주된 nucleoside는 guanosine이었으며, 간내에는 uracil 염기를 다량 함유하였다.

제 4 절. Cordycepin 강화 한우고기를 생산하기 위한 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량 결정을 위한 사양연구

1. 연구 수행 내용

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 *in vitro*수준(협동과제 연구참조)보다 높은 첨가수준에서 수준별(세 수준; 1%, 2%, 3%)로 시험 사료에 배합한 후, 비육기 거세한우에 급여하였을 때, 거세한우의 사료섭취량, 증체, 도체성적 및 조직내 cordycepin 함량과 혈중 항산화능력을 조사하여 실제 한우 사양에서 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량을 결정하고자 실시하였다.

2. 시험방법

본 연구는 개발된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체(참여기업 유진바이오팜 제공)를 수준별로 배합하여 비육기 한우에 대한 조직내 전이와 혈중 항산화효소활성을 조사하여 적정 사용량을 결정을 위한 사양시험을 실시하였다.

본 연구는 비육기 거세한우 20두를 공시하여 대조구(무첨가구)와 세 개의 수준별 처리구에 각각 5두씩 배치하여 충북 옥천군 소재 한우농가에서 실시하였다. 처리군의 밀리타리스 동충하초 균사체의 사료내 급여수준은 사료섭취량의 1%, 2% 및 3% 세 수준으로 설정하였고, 급여방법은 현장농가의 사료급여방식(기초사료)에 밀리타리스 동충하초 균사체를 탑드레싱(top dressing)하였다. 따라서 기초사료는 대조구로 설정된다. 농장 급여사료(기초사료)의 화학적 성분과 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분은 Table 4-1에 나타내었다.

가. 실험설계

충북 옥천군 소재 한우 농장에서 본 사양시험을 실시하였고, 체중(평균체중 569kg)과 성장월령(20 ~ 24개월)이 비슷한 비육기 거세한우 20두를 선발하여, 구역(pen) 당 5두씩 배치하였다. 실험사료의 급여는 오전(07:00 a.m.)과 오후(18:00 p.m.)로 나누어 2회 급여 자유 채식시켰고 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였다. 그리고 본 사양시험에 들어가기 전에 실험사료에 대한 적응을 위해 2주간의 예비사양기간을 두었으며, 본 실험은 60일간 지속되었다.

Table 4-1. The chemical composition of floral *Cordyceps militaris* mycelia and basal diet

Items	Treatments	
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	Basal diet
 % of dry matter	
Moisture	9.14	11.49
CP ¹	72.35	11.26
EE ²	1.20	12.92
CF ³	13.52	3.73
CA ⁴	3.54	2.80
NFE ⁵	9.39	69.29
TDN ⁶	-	74.44
Cordycepin	0.24	-

¹Crude protein; ²ether extract; ³crude fiber; ⁴crude ash; ⁵nitrogen-free extract; ⁶total digestible nutrients, TDN value was calculated according to the regression equation described by Wardeh (1981).

나. 시료채취 및 조사항목

(1) 채혈

혈액은 사양시험 종료 후, 혈중 cordycepin 함량을 조사하기 위하여 오전사료 급여 전 경정맥을 통하여 10mL heparin처리 vacutainer (Becton-Dickinson, Inc.)를 이용하여 채취하였으며, 파쇄얼음이 보존된 아이스박스에 채취한 혈액을 보관하였다.

그리고 채혈작업이 종료되면 효소(GSH-Px)분석용 혈액은 혈구와 혈장분리를 위해 아이스박스에서 혈액을 꺼내어 온도가 4℃로 유지된 원심분리기에서 3,000×g, 15분간 원심 분리하였으며, 혈장과 전혈은 실험실로 운반하여 분석 시까지 -75℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) 도축 및 근육조직 채취

사양시험이 종료되었을 때, 실험에 이용된 모든 소는 시험종료 시 체중을 개체별로 측정 한 후 서울 가락시장 축산물공판장의 도축장으로 운송하여 도축하였고, 근육조직

내 전이된 cordycepin을 분석하기 위해, 후지와 간을 채취하여 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하였다. 아울러 밀리타리스 동충하초 균사체 수준별 급여에 의한 도체특성을 조사하기 위하여 도축 후 24시간에 축산물등급소의 등급기준에 준하여 축산물등급판정사에 의하여 실시되었다.

(3) 사료섭취량 및 체중측정

사료섭취량은 1일 2회 급여량과 다음날 아침 사료급여 전 잔여사료를 수거하여 그 차이에 의해 계산하였다. 체중은 증체량을 조사하기위해 시험개시 시 체중과 시험 종료 시 체중을 측정하였으며, 증체량은 시험개시체중과 종료체중의 차이로 구하였다.

나. 분석 방법

(1) 실험사료의 성분 분석 및 가소화영양소 총량 계산

실험사료의 일반성분은 AOAC(1995)방법에 준하여 분석하였다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin함량은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90℃에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μBondapak C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260 nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다. 실험사료 중 가소화영양소 총량(TDN)은 Wardeh(1989)가 제시한 에너지사료기준의 회귀식에 의하여 계산하였다.

(2) 근육, 간 및 혈액내 cordycepin의 분석

근육 조직, 간 및 혈액 중에 존재하는 cordycepin을 분석하기 위해서는 우선 시료 중에 다량 존재하는 지방을 제거하기 위하여 석유 에테르와 증류수 (1:1) 혼합액을 첨가하여 균질한 다음 에테르 층(조지방)을 제거하였다. 잔사에 대하여는 absolute methanol로 3회 환류 추출한 다음 농축하여 유기 용매를 제거하였다. 시료는 다시 증

류수에 현탁한 다음 butanol과의 사이에서 partition chromatography를 행하였다. Butanol 층은 회수한 다음 농축, ODS cartridge 통과, millipore filtration을 거친 후 HPLC 정량분석을 수행하였다.

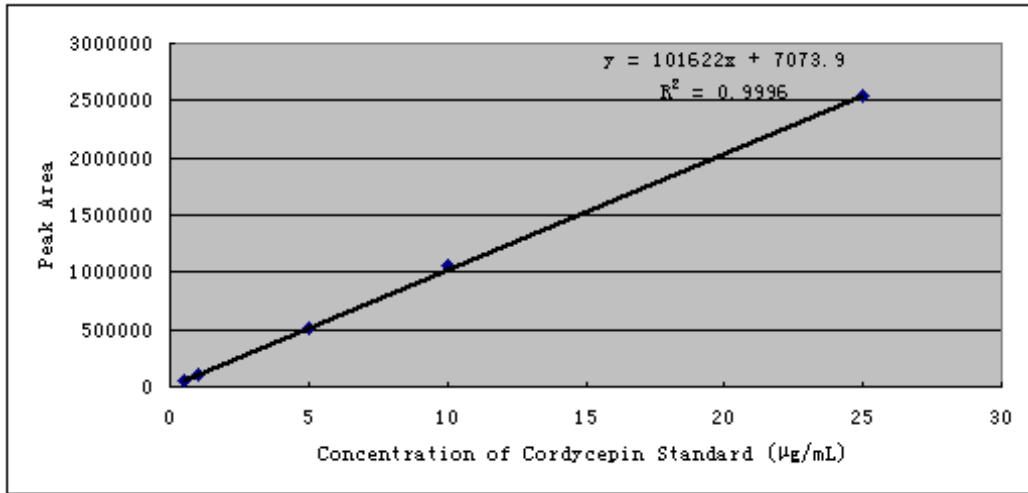


Figure 4-1. Calibration Curve of standard

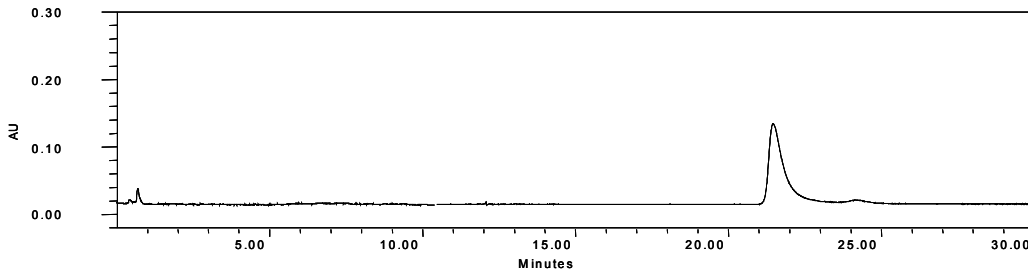


Figure 4-2. HPLC Chromatogram of Standard Cordycepin (10 mg/L)

(3) 혈장 중 glutathione peroxidase(GSH-Px; EC 1.11.1.9)활성 측정

혈장 내 존재하는 GSH-Px활성은 효소활성 기질로서 cumene hydroperoxide와 hydrogen peroxide를 사용하여 Lawrence와 Burk(1976)의 방법에 따라 spectrophotometer(Shimadzu, Japan) 340nm에서 3분간 10초 간격으로 읽어서 나타나는 slope을 이용하여 각각의 활성을 측정하였고, 아울러 효소를 단백질 단위로 표시하기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 혈장내 단백질을 정량하였다.

다. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 모든 자료는 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 GLM(general linear model)을 이용하여 통계 분석하였다. 처리구간 평균비교는 최소 유의차검정(LSD, least significant difference)을 하였고, 유의성 검정은 5%(P=0.05)수준에서 실시하였다(Steel과 Torrie, 1980).

3. 결과 및 고찰

(1) 사료섭취량 및 증체량

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우사료에 수준별로 첨가하여 급여하였을 때, 사료섭취량 및 증체에 미치는 영향은 Table 4-2에 나타난 바와 같다.

Table 4-2. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on feed intakes and gains in finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	1%	2%	3%		
Initial body weight (kg)	565	574	566	571	27.50	0.1903
Final body weight (kg)	609	617	611	615	27.61	0.2041
Dry matter intake (kg/day)	9.38	9.52	9.49	9.37	1.35	0.9652
Total gain (kg)	44.06	43.40	44.60	44.12	1.56	0.8251
Average daily gain (g)	734	723	743	735	26.02	0.8251

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05.

사양시험 기간동안 비육기 한우의 건물섭취량은 처리구 간에 유의한 차이가 나타나지 않았고, 처리구의 1일 평균 섭취량은 약 9.4kg으로 체중의 약 1.7%를 섭취하였으며, 밀리타리스 동충하초 균사체는 사료섭취의 제한요인으로 나타나지 않았다. 일반적으로 번데기 기주 동충하초의 경우 불쾌한 냄새로 인하여 다소 사료섭취량이 저하되는 것으로 알려진바 있으나(미발표연구결과), 본 연구에 사용된 식물성 밀리타리스 동

충하초 균사체에 의한 사료섭취량저하현상은 나타나지 않아 사료첨가제로서의 충족요건을 만족하는 것으로 사료된다.

또한 시험 종료후 체중, 총 증체량 그리고 일당증체량에서도 건물섭취량과 마찬가지로 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 본 연구 결과는 안 등(2002)의 연구에서 나타난 수준과 유사하여 비교적 양호한 증체량을 보여주었고, 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 인한 부(-)의 영향은 나타나지 않았다.

(2) 도체성적

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우사료에 수준별로 첨가하여 급여한 후, 사양기간이 종료되어 도축하였을 때, 도체성적에 미치는 영향은 Table 4-3에 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이 전반적으로 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 도체특성에 영향을 주지 않았다. 하지만, 육색에서 2%군과 3%군은 무첨가군 및 1% 급여군보다 유의하게 높은 값을 나타내어 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 육색이 보다 진해지는 것으로 나타났다.

Table 4-3. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on carcass characteristics in finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	1%	2%	3%		
Dressing, %	59.67	57.17	58.50	58.70	1.31	0.2175
Backfat thickness, mm	6.67	8.33	8.00	8.67	1.87	0.6000
Ribeye area, cm ²	72.00	72.67	67.67	69.67	5.48	0.6789
Yield index	63.92	63.95	63.40	63.16	1.35	0.8584
Marbling score	5.00	4.33	4.67	4.33	0.87	0.7520
Meat color score	4.00 ^b	4.00 ^b	5.00 ^a	4.67 ^a	0.29	0.0061
Fat color score	2.00	2.33	3.00	2.67	0.51	0.1470
Quality grade	2.33	2.67	2.67	2.67	0.58	0.8592

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05.

(3) 혈중 cordycepin 농도 및 혈장내 GSH-Px활성

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우사료에 수준별로 첨가하여 급여하였을 때, 혈중 cordycepin 농도 및 혈장내 글루타치온 과산화효소(GSH-Px)활성에 미치는 영향은 Table 4-4에 나타내었다.

표에 나타난 바와 같이 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 수준별로 급여한 결과, 첨가수준이 증가할수록 혈중 cordycepin 농도가 유의하게 증가하는 것으로 나타났고, 특히 2~3%급여군은 무첨가구 및 1% 급여군에 비하여 유의하게 높았다 ($P < 0.0001$). 이는 1차년도(2005) 연구결과와 유사하였고, 본 연구결과로부터 밀리타리스 동충하초 균사체내 다량 함유되어 cordycepin이 거세한우의 소장에서 비교적 양호하게 흡수되는 것으로 나타났다. 하지만, 2%급여군과 3%급여군간에는 유의한 차이를 나타내지 않아 2% 급여가 더욱 경제적인 것으로 나타났다. 아울러 사양 4주째보다는 8주째에 각 처리군별로 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 혈중 cordycepin의 농도가 증가되는 것으로 나타나 사양기간이 증가됨에 따라 장관내 흡수능력이 향상되는 것으로 나타났다.

Table 4-4. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on whole blood cordycepin concentration and plasma glutathione peroxidase activity in finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	1%	2%	3%		
..... Cordycepin concentration (ng/mL)						
4 weeks	-	137.83 ^b	387.59 ^a	397.02 ^a	56.09	<0.0001
8 weeks	-	177.54 ^b	428.84 ^a	487.08 ^a	59.82	<0.0001
..... Plasma GSH-Px (Unit ⁴)						
4 weeks	15.56 ^b	18.46 ^{ab}	20.85 ^{ab}	24.71 ^a	3.50	0.0405
8 weeks	14.02 ^b	21.11 ^{ab}	23.44 ^a	26.60 ^a	3.10	0.0263

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$; ⁴One unit of GSH-Px activity equals 1 nanomole of NADPH oxidized/minute/milligram of protein.

한편, 혈장내 글루타치온 과산화효소(GSH-Px)활성은 혈중 cordycepin농도와 마찬가지로

가지로 유사한 경향을 나타내었고, 이는 cordycepin이 가지는 항산화활성과 관계하는 것으로 보여진다. 특히, 사양 8주째에 2%와 3%급여군은 무첨가군에 비하여 유의하게 높은 활성을 나타내었고($P < 0.05$), 이들 두 급여군간에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 최근 연구보고에서 cordycepin은 생명체에서 자연적으로 발생하는 각종 활성산소종 및 산화질소(NO)에 의한 세포손상으로부터 보호하는 항산화적 효능이 발표된바 있어(Won과 Park, 2005), 본 연구결과로부터 cordycepin이 가지는 항산화활력으로 인하여 가축의 건강에도 간접적으로 공헌할 수 있을 것으로 판단된다.

(4) 조직내 cordycepin 함량

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육기 거세한우사료에 수준별로 첨가하여 급여하였을 때, 조직(후지 및 간)내 cordycepin함량에 미치는 영향은 Table 4-5에 나타내었다.

Table 4-5. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on cordycepin contents and cordycepin retention rate (%) in tissues of finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	1%	2%	3%		
Hind leg, $\mu\text{g/g}$ dried	-	0.73 ^b	1.82 ^a	2.66 ^a	0.45	0.0004
Liver, $\mu\text{g/g}$ dried	-	1.17 ^b	2.85 ^a	3.89 ^a	0.56	0.0001
..... Cordycepin retention						
Intake, g/whole period	-	13.71	27.33	40.48	-	-
Retention, mg/final BW	-	135.12	333.61	490.77	-	-
Retention rate, %	-	0.9857	1.2206	1.2124	-	-

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if $P < 0.05$.

표에 나타난 바와 같이, 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여수준이 증가함에 따라 조직내 cordycepin함량은 유의하게 증가하였고($P < 0.001$), 2%와 3%급여군간에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 아울러 간내 cordycepin함량은 후지에 비하여 다소 높은 값을 나타내어 간이 cordycepin대사활성에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 하지만, Table 4-5에서 보는 바와 같이 섭취하는 cordycepin량에 대한 조직내 축적되는 효율을 환산하였을 때, 그 축적효율은 1% 내외로 효율이 비교적 낮은 것으로 나타났다.

이와 같은 결과가 나타난 데는 여러 가지 요인이 있겠으나, 그 중에서도 밀리타리스 동충하초의 군사체의 특성상 1년차 주관연구(2005)의 *in situ*결과에서 보고한바와 같이, 군사체내에는 반추위내 빠르게 분해되는 부분이 많았고, 이에 따라 밀리타리스 군사체내 존재하는 cordycepin이 반추위 미생물에 의한 공격을 받아 cordycepin이 상당부분 파괴되어 나타난 결과라 하겠다.

이상의 결과로부터 밀리타리스 동충하초 군사체의 급여로 조직내 cordycepin의 전이가 가능하였고, 밀리타리스 동충하초 군사체의 비육기 거세한우에 대한 적정사용수준은 혈액 성적과 조직내 cordycepin 함량을 감안하여 2%가 적당한 것으로 사료된다.

제 5 절. 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화 한우고기생산을 위한 포화축적기간의 구명을 위한 연구

1. 연구 수행 내용

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용한 cordycepin 강화 한우고기를 생산하기 위한 적정 포화축적기간을 구명하기 위하여, 적정 밀리타리스 동충하초 균사체 수준(2%)에서 급여사양기간(1개월, 2개월, 3개월)을 달리 하였을 때, 비육기 한우의 조직 내 cordycepin 함량과 혈중 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성에 미치는 영향을 조사하여 최대포화축적기간을 제시하고자 실시하였다.

2. 시험방법

본 연구는 개발된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체(참여기업 유진바이오팜 제공)를 적정수준인 2%로 혼합하여 비육기 한우에 1, 2 및 3개월간 급여하여 조직내 cordycepin 전이와 혈중 항산화효소활성을 조사하여 적정 포화축적기간을 결정하기 위하여 실시하였다.

본 연구는 비육기 거세한우 30두를 공시하여 각 급여기간(1개월, 2개월, 3개월)에 대하여 밀리타리스 동충하초 급여군(Cm)과 대조군(Control)로 나누어 총 6처리군으로 실험군을 설정하였다. 농장 급여사료(기초사료)의 화학적 성분과 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분은 Table 5-1에 나타내었다.

가. 실험설계

충북 옥천군 소재 한우 농장에서 본 사양시험을 실시하였고, 성장월령이 22개월령(평균체중 573kg), 23개월령(평균체중 593kg), 24개월령(평균체중 613kg) 거세한우 각 10두씩 총 30두를 선발하여, 각 개월령에 대하여 대조구 및 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군으로 각각 5두씩 나누었다. 실험사료의 급여는 오전(07:00 a.m.)과 오후(18:00 p.m.)로 나누어 2회 급여 자유 채식시켰고 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였다. 그리고 본 사양시험에 들어가기 전에 실험사료에 대한 적응을 위해 2주간의 예비사양기간을 두었으며, 각 급여기간(1개월, 2개월, 3개월)이 끝나면 1개월마다 대조구와 밀리타리스 동충하초 균사체급여구로 각각 5두씩, 즉, 총 10두씩을 개체별로 체중을 측정 후, 도축장으로 운송하였다. 사양시험에 사용된 모든 거세한우의 도축은 약

25개월령에 이루어졌다. 실험에 이용된 거세한우의 실험배치는 Table 5-2에 나타내었다.

Table 5-1. The chemical composition of floral *Cordyceps militaris* mycelia and basal diet

Items	Treatments	
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	Basal diet
 % of dry matter	
Moisture	9.72	11.49
CP ¹	73.55	11.26
EE ²	1.04	12.92
CF ³	14.01	3.73
CA ⁴	2.98	2.80
NFE ⁵	8.42	69.29
TDN ⁶	-	74.44
Cordycepin	0.19	-

¹crude protein; ²ether extract; ³crude fiber; ⁴crude ash; ⁵nitrogen-free extract; ⁶total digestible nutrients, TDN value was calculated according to the regression equation described by Wardeh (1981).

Table 5-2. The arrangement of Hanwoo steers subjected to this trial

Diets	Supplementation period			Total
	1 month	2 months	3 months	
Control	5 ²	5	5	15
Cm ¹	5	5	5	15
Total	10	10	10	30

¹Floral *Cordyceps militaris* mycelia; ²the number of finishing Hanwoo steers within each group.

나. 시료채취 및 조사항목

(1) 채혈

혈액은 사양시험 종료 후, 혈중 cordycepin 함량을 조사하기 위하여 오전사료 급여 전 경정맥을 통하여 10mL heparin처리 vacutainer (Becton-Dickinson, Inc.)를 이용하여 채취하였으며, 파쇄얼음이 보존된 아이스박스에 채취한 혈액을 보관하였다.

그리고 채혈작업이 종료되면 효소(GSH-Px)분석용 혈액은 혈구와 혈장분리를 위해 아이스박스에서 혈액을 꺼내어 온도가 4℃로 유지된 원심분리기에서 3,000×g, 15분간 원심 분리하였으며, 혈장과 전혈은 실험실로 운반하여 분석 시까지 -75℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) 도축 및 근육조직 채취

사양시험이 종료되었을 때, 실험에 이용된 모든 소는 시험종료 시 체중을 개체별로 측정 후 서울 가락시장 축산물공판장의 도축장으로 운송하여 도축하였고, 근육조직 내 전이된 cordycepin을 분석하기 위해, 후지와 간을 채취하여 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하였다. 아울러 밀리타리스 동충하초 균사체 수준별 급여에 의한 도체특성을 조사하기 위하여 도축 후 24시간에 축산물등급소의 등급기준에 준하여 축산물 등급판정사에 의하여 실시되었다.

(3) 사료섭취량 및 체중측정

사료섭취량은 1일 2회 급여량과 다음날 아침 사료급여 전 잔여사료를 수거하여 그 차이에 의해 계산하였다. 체중은 증체량을 조사하기 위해 시험개시 시 체중과 시험 종료 시 체중을 측정하였으며, 증체량은 시험개시체중과 종료체중의 차이로 구하였다.

나. 분석 방법

(1) 실험사료의 성분 분석 및 가소화영양소 총량 계산

실험사료의 일반성분은 AOAC(1995)방법에 준하여 분석하였다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin함량은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90℃에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μBondapak

C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260 nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다. 실험사료 중 가소화영양소 총량(TDN)은 Wardeh(1989)가 제시한 에너지사료기준의 회귀식에 의하여 계산하였다.

(2) 근육, 간 및 혈액내 cordycepin의 분석

근육 조직, 간 및 혈액 중에 존재하는 cordycepin을 분석하기 위해서는 우선 시료 중에 다량 존재하는 지방을 제거하기 위하여 석유 에테르와 증류수 (1:1) 혼합액을 첨가하여 균질한 다음 에테르 층(조지방)을 제거하였다. 잔사에 대하여는 absolute methanol로 3회 환류 추출한 다음 농축하여 유기 용매를 제거하였다. 시료는 다시 증류수에 현탁한 다음 butanol과의 사이에서 partition chromatography를 행하였다. Butanol 층은 회수한 다음 농축, ODS cartridge 통과, millipore filtration을 거친 후 HPLC 정량분석을 수행하였다.

(3) 혈장 중 glutathione peroxidase(GSH-Px; EC 1.11.1.9)활성 측정

혈장 내 존재하는 GSH-Px활성은 효소활성 기질로서 cumene hydroperoxide와 hydrogen peroxide를 사용하여 Lawrence와 Burk(1976)의 방법에 따라 spectrophotometer(Shimadzu, Japan) 340nm에서 3분간 10초 간격으로 읽어서 나타나는 slope을 이용하여 각각의 활성을 측정하였고, 아울러 효소를 단백질 단위로 표시하기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 혈장내 단백질을 정량하였다.

다. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 사료섭취량 및 증체량 그리고 조직과 혈액내 cordycepin 함량에 대한 자료는 밀리타리스 동충하초 균사체와 급여기간이 이들 변수들에 영향을 미치는지 조사하기 위해 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 two way ANOVA procedure를 이용하여 밀리타리스 동충하초 균사체효과, 급여기간효과 및 이들의 상호효과에 대하여 3×2 요인실험(factorial design arrangement)으로 통계 처리하였다. 각 처리구간 평균값의 유의성 검정은 P 값 5%수준에서 Duncan다중검정으로 하였다(Steel과 Torrie, 1980).

3. 결과 및 고찰

(1) 건물섭취량

밀리타리스 동충하초 균사체의 급여기간이 사료건물섭취량에 미치는 영향은 Table 5-3에 나타내었다. 표에서 나타낸 바와 같이 비육기 한우의 건물섭취량은 급여기간 및 균사체급여에 의하여 처리구 간에 유의한 차이가 나타나지 않았고, 전체 처리구의 1일 평균 섭취량은 약 9.7kg을 나타내어 이전의 결과와 유사하였다.

본 연구의 실험군은 급여기간에 따라 1개월 급여군(평균 개시체중 613 kg), 2개월 급여군(평균 개시체중 593 kg), 3개월 급여군(평균 개시체중 573 kg)으로 나누어 사료를 급여하였고, 체중에 따른 섭취량의 차이 또한 나타나지 않았다.

Table 5-3. Effect of supplementation periods of floral *Cordyceps militaris* mycelia on feed intake of finishing Hanwoo steers

Period (month)	Supplementation period						SEM ¹	P<		
	1 month		2 months		3 months			Period ²	Cm ³	Period× Cm ⁴
	Control	Cm	Control	Cm	Control	Cm				
..... Dry matter intake (kg/head/day)										
1	9.85	9.76	9.52	9.49	9.29	9.35	1.27	0.9596	0.9942	0.9732
2	-	-	9.63	9.53	9.37	9.33	0.96	0.9732	0.9635	0.9532
3	-	-	-	-	9.58	9.90	0.77	-	0.9654	0.9873
Mean	9.85	9.76	9.58	9.51	9.41	9.53	0.38	0.9724	0.9847	0.9573

¹Standard error of the mean; ²supplementation period effect; ³floral *Cordyceps militaris* mycelia effect; ⁴interaction between supplementation period and floral *Cordyceps militaris* mycelia.

(2) 증체량

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여기간이 비육기 거세한우사료의 증체에 미치는 영향은 Table 5-4에 나타난 바와 같다. 사양시험 개시체중과 종료체중은 급여기간에 의하여 유의한 차이를 나타내었고(P<0.05), 급여기간이 증가함에 따라 유의하게 낮았다(P<0.05). 이는 사양시험 시작시 체중의 차이에 의한 배치로 인한 것으로 생각된다.

하지만, 총 증체량은 급여기간에 의하여 유의한 차이를 나타내었는데, 즉 급여기간

이 증가함에 따라 유의하게 증가하였다($P < 0.001$). 이는 사양기간의 증가로 인한 증체 허용시간이 길어져서 나타난 결과로 사료된다. 하지만 동일한 급여기간내에서 밀리타리스 동충하초 균사체에 의한 증체량의 차이는 나타나지 않았다. 아울러 일당증체량 또한 급여기간 및 밀리타리스 동충하초 균사체에 의하여 유의한 차이가 나타나지 않았다.

Table 5-4. Effect of supplementation periods of floral *Cordyceps militaris* mycelia on body weight gain of finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation period						SEM ¹	P<		
	1 month		2 months		3 months			Period ²	Cm ³	Period×Cm ⁴
	Control	Cm	Control	Cm	Control	Cm				
..... Performance										
Initial BW, kg	615.74	610.96	592.19	593.74	571.69	574.16	67.42	0.0798	0.7815	0.9298
Final BW, kg	634.74	630.39	629.75	634.86	631.11	635.16	68.30	0.2804	0.7789	0.9373
ADG ⁵ , g	633.33	647.74	626.00	685.33	660.22	677.78	39.16	0.6540	0.1099	0.6665
Total gain, kg	19.00 ^c	19.43 ^c	37.56 ^b	41.12 ^b	59.42 ^a	61.00 ^a	2.29	<0.0001	0.8332	0.1235

¹Standard error of the mean; ²supplementation period effect; ³floral *Cordyceps militaris* mycelia effect; ⁴interaction between supplementation period and floral *Cordyceps militaris* mycelia; ⁵average daily gain; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ..

(3) 도체성적

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여기간이 비육기 거세한우사료의 도체성적에 미치는 영향은 Table 5-5에 나타내었다. 표에서 나타난 바와 같이 밀리타리스 동충하초균사체 급여기간 및 균사체의 급여로 전반적으로 도체성적에 유의한 영향을 나타내지 않았다.

본 연구를 위해 사육된 비육기 거세한우 공시두수(처리군당 5두배치)는 사실상 도체성적을 조사하여 정확한 결과를 도출하는 데는 무리가 있을 것으로 판단되므로, 보다 정확한 연구를 위해서는 사후 더 많은 두수를 이용하여 사양한 후 도체성적을 평가하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

Table 5-5. Effect of supplementation periods of floral *Cordyceps militaris* mycelia on carcass characteristics of finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation period						SEM ¹⁾	P<		
	1 month		2 months		3 months			Period ²⁾	Cm ³⁾	Period× Cm ⁴⁾
	Control	Cm	Control	Cm	Control	Cm				
..... Carcass										
Dressing, %	56.80	58.83	58.50	58.70	59.47	58.65	1.65	0.4355	0.5480	0.3689
Backfat thickness, mm	6.67	6.00	6.50	8.67	5.00	5.50	1.85	0.1338	0.3672	0.6124
Ribeye area, cm ²	72.00	66.67	63.50	69.67	72.33	84.00	6.55	0.0876	0.5308	0.1136
Yield index	63.92	63.64	63.50	63.16	65.67	67.00	1.92	0.0771	0.8608	0.7405
Yield grade	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.50	0.22	0.2968	0.2897	0.1432
Marbling score	5.00	4.33	5.00	4.33	5.00	4.00	0.58	0.4019	0.1139	0.2693
Meat color score	4.00	4.33	5.00	4.67	5.00	4.52	0.37	0.1632	0.2009	0.0366
Fat color score	2.00	2.33	2.00	2.67	2.00	2.00	0.37	0.2661	0.0671	0.6122
Quality grade	2.33	2.67	3.00	2.67	2.00	3.00	0.45	0.3719	0.1245	0.1463

¹⁾Standard error of the mean; ²⁾supplementation period effect; ³⁾floral *Cordyceps militaris* mycelia effect; ⁴⁾interaction between supplementation period and floral *Cordyceps militaris* mycelia.

(4) 혈중 cordycepin농도 및 글루타치온과산화효소활성

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여기간이 비육기 거세한우사료의 혈중 cordycepin농도 및 혈장내 글루타치온과산화효소(GSH-Px)활성에 미치는 영향은 Table 5-6에 나타내었다. 표에서 나타난 바와 같이 밀리타리스 동충하초균사체의 급여로 혈중 cordycepin이 검출되었고, 사양기간 1, 2, 3달차 공히 0.398~0.473 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 나타내어, 동충하초 균사체내 cordycepin이 비교적 일정하게 하부장관에서 흡수되어 조직으로 운반되어 조직내 cordycepin 축적 가능성이 높음을 제시한다. 아울러 이전 연구에서 이미 보고한 바와 마찬가지로, 혈장내 항산화효소인 GSH-Px활성이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($P < 0.001$). 하지만, 급여기간에 의한 효과는 나타나지 않았다. 본 연구결과로부터 cordycepin의 비교적 높은 항산화력은 비육우의 건강 및 질병으로부터 보호할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 5-6. Effects of supplementation periods of floral *Cordyceps militaris* mycelia on whole blood cordycepin concentrations and plasma glutathione peroxidase activity in finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation period						SEM ¹	P<		
	1 month		2 months		3 months			Period ²	Cm ³	Period × Cm ⁴
	Control	Cm	Control	Cm	Control	Cm				
..... Cordycepin concentration, µg/mL										
Blood	ND ^{b5}	0.414 ^a	ND ^b	0.473 ^a	ND ^b	0.398 ^a	0.13	0.9118	0.0012	0.9118
..... GSH-Px activity ⁶ , unit										
Plasma	15.30 ^b	23.40 ^a	15.26 ^b	26.60 ^a	15.57 ^b	25.57 ^a	2.11	0.8639	<0.0001	0.3152

¹Standard error of the mean; ²supplementation period effect; ³floral *Cordyceps militaris* mycelia effect; ⁴interaction between supplementation period and floral *Cordyceps militaris* mycelia; ⁵ND: not been detected, which was assumed arithmetically zero at statistical processing; ⁶one unit of activity equals 1 nmol NADPH oxidized per minute/per milligram of protein; ^{a,b}means within the same row with different superscripts significantly differ.

(5) 조직내 cordycepin 함량

Table 5-7은 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여기간이 비육기 거세한우사료의 근육 및 간조직내 cordycepin축적에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 표에서 보는 것처럼, 후지 및 간내 cordycepin함량은 급여기간이 증가함에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군에서 유의하게 증가하는 결과를 나타내었다(P<0.05). 그리고, 균사체 급여군의 후지와 간의 결과를 보면 1개월 급여에 비해서는 2개월과 3개월급여군이 유의하게 cordycepin이 높으나(P<0.05), 2개월과 3개월간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다.

하지만, 전혀 cordycepin이 검출되지 않은 대조군에 비하면 1개월, 2개월, 3개월 균사체 급여군 공히 cordycepin이 강화된 수준의 한우고기가 생산되었으나, 실용성 및 효율성면에서 보면 2내지 3개월 사이까지 밀리타리스 동충하초 균사체를 비육우에 급여하는 것이 쇠고기내 cordycepin을 포화 및 축적시키는데 효율적인 생산방법인 것으로 사료된다.

Table 5-7. Effect of supplementation periods of floral *Cordyceps militaris* mycelia on cordycepin deposition in finishing Hanwoo steers

Items	Supplementation period						SEM ¹	P<		
	1 month		2 months		3 months			Period ²	Cm ³	Period × Cm ⁴
	Control	Cm	Control	Cm	Control	Cm				
..... Tissue cordycepin, µg/g of dry weight										
Hind leg	ND ⁵	0.87 ^b	ND ^b	1.87 ^a	ND ^b	2.76 ^a	0.45	0.0352	0.0004	0.1924
Liver	ND ^c	1.26 ^b	ND ^c	2.84 ^a	ND ^c	3.28 ^a	0.38	0.0476	<0.0001	0.1751

¹Standard error of the mean; ²supplementation period effect; ³floral *Cordyceps militaris* mycelia effect; ⁴interaction between supplementation period and floral *Cordyceps militaris* mycelia; ⁵ND: not been detected, which was assumed arithmetically zero at statistical processing; ^{a,b,c}means within the same row with different superscripts significantly differ.

제 6 절. 밀리타리스 동충하초균사체내 cordycepin의 젖소 우유내 전이여부 결정 사양시험

1. 연구 수행 내용

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 착유우에 사료경제적인 한계점에 서 일정기간 급여하여 균사체내에 존재하는 cordycepin이 우유내에 존재하는지와 혈중 항산화활성의 증가를 확인하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

2. 시험방법

본 연구는 개발된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체(참여기업 유진바이오팜 제공)의 착유우에 대한 우유내 전이여부와 혈중 항산화효소활성을 조사하기 사양시험을 실시하였다.

본 연구는 착유우 4두를 공시하여 대조구와 처리구 각각 2두씩 배치하여 경남 진주시 소재 착유우농가에서 실시하였다. 처리군의 밀리타리스 동충하초 균사체의 사료내 급여수준은 경제적인 최고 한계점을 적용하여 사료섭취량의 3%수준으로 설정하여 일일 두당 600g(두당건물섭취량 20kg 가정)씩 균사를 제한하였고, 급여방법은 현장농가의 사료급여방식(기초사료)에 밀리타리스 동충하초 균사체를 탑드레싱(top dressing) 하였다. 이에 따라 기초사료를 대조구로 설정하였다. 농장 급여사료(기초사료)의 화학적 성분과 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분은 Table 6-1에 나타내었다.

가. 실험설계

경남 진주시 소재 착유우농장에서 본 사양시험을 실시하였고, 평균 산차는 2.5산이었고, 산유일수는 평균 121.4일인 착유우 4두를 선발하여, 구역(pen) 당 2두씩 배치하였다. 실험사료 급여는 오전(05:00 a.m.)과 오후(17:00 p.m.)로 나누어 2회 급여 자유채식시켰고 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였다. 그리고 본 사양실험에 들어가기 전에 실험사료에 대한 적응을 위해 2주간의 예비사양기간을 두었으며, 본 실험은 45일간 지속되었다.

Table 6-1. The chemical composition of floral *Cordyceps militaris* mycelia and basal diet

Items	Treatments	
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	Basal diet
 % of dry matter	
Moisture	8.55	23.34
CP ¹	76.16	16.40
EE ²	0.96	3.65
CF ³	12.24	20.03
CA ⁴	3.21	7.41
NFE ⁵	7.43	52.51
Cordycepin	0.164	

¹crude protein; ²ether extract; ³crude fiber; ⁴crude ash; ⁵nitrogen-free extract; ⁶total digestible nutrients, TDN value was calculated according to the regression equation described by Wardeh (1981).

나. 시료채취 및 조사항목

(1) 채혈

혈액은 사양시험 종료 후, 혈중 cordycepin 함량을 조사하기 위하여 오전사료 급여 전 미근부 혈관을 통하여 10mL heparin처리 vacutainer (Becton-Dickinson, Inc.)를 이용하여 채취하였으며, 파쇄얼음이 보존된 아이스박스에 채취한 혈액을 보관하였다.

그리고 채혈작업이 종료되면 효소(GSH-Px)분석용 혈액은 혈구와 혈장분리를 위해 아이스박스에서 혈액을 꺼내어 온도가 4℃로 유지된 원심분리기에서 3,000×g, 15분간 원심 분리하였으며, 혈장과 전혈은 실험실로 운반하여 분석 시까지 -75℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) 우유 채취

사양시험이 진행되는 동안 유성분 및 우유내 cordycepin 함량을 분석하기 위하여 본 실험 실시 후 15일 단위로 즉, 15일, 30일, 45일 째에 아침저녁 우유를 동량으로 pooling하여 각 시기별로 시료를 채취하였다. 채취된 우유는 분석시까지 -75℃ 냉동고에 보관하였다.

(3) 사료섭취량

사료섭취량은 1일 2회 급여량과 다음날 아침 사료급여 전 잔여사료를 수거하여 그 차이에 의해 계산하였다.

나. 분석 방법

(1) 실험사료의 성분 분석

실험사료의 일반성분은 AOAC(1995)방법에 준하여 분석하였다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin함량은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90℃에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μBondapak C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260 nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다.

(2) 유성분 분석

사양시험 기간동안 채취한 우유의 성분분석은 Milkoscan 4,000 Series(FOSS Electric Co.)를 이용하여 총 고형물, 무지고형분, 유지방, 유단백질, 유당, 체세포수 및 요소태질소(MUN: milk urea nitrogen)함량을 조사하였다.

(3) 혈장 중 glutathione peroxidase(GSH-Px; EC 1.11.1.9)활성 측정

혈장 내 존재하는 GSH-Px활성은 효소활성 기질로서 cumene hydroperoxide와 hydrogen peroxide를 사용하여 Lawrence와 Burk(1976)의 방법에 따라 spectrophotometer(Shimadzu, Japan) 340nm에서 3분간 10초 간격으로 읽어서 나타나는 slope를 이용하여 각각의 활성을 측정하였고, 아울러 효소를 단백질 단위로 표시하기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 혈장내 단백질을 정량하였다.

(4) 우유 및 혈액내 cordycepin의 분석

우유 및 혈액 중에 존재하는 cordycepin의 분석은 상기 균사체와 동일한 방법으로 정량하였고, 아울러 우유채취 시기별 우유내 cordycepin상을 TLC(thin layer chromatography)에서 분석하였다.

(5) 우유내 nucleoside의 분석

당초 계획상에는 nucleoside의 분석이 나타나 있지 않으나, 보다 많은 자료를 확보하고자 분석을 실시하였다. 본 연구의 nucleoside의 분석에 필요한 전 처리과정은 cordycepin 분석방법과 동일하였다.

다. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 모든 자료는 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 t-test를 이용하여 통계 분석하였다. 각 처리구간 유의성검정은 5%($P=0.05$)수준에서 검정하였다(Steel과 Torrie, 1980).

3. 결과 및 고찰

(1) 사료섭취량, 산유량 및 유성분

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 젖소에게 45일간 급여하였을 때, 사료섭취량, 산유량 및 유성분조성과 생산량에 미치는 영향은 Table 6-2에 나타내었다.

본 연구에서는 실험두수의 부족으로 정확성은 떨어지나 일반적으로 번데기 기주 동충하초의 경우 불쾌한 냄새로 인하여 다소 사료섭취량이 저하되는 것으로 알려진바 있으나(미발표연구결과), 본 연구에 사용된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체에 의한 사료섭취량저하현상은 나타나지 않아 사료첨가제로서의 충족요건을 만족하는 것으로 사료된다.

하지만, 산유량, 유성분 및 우유중 요소태질소(MUN) 그리고 체세포수(SCC)는 두 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이들은 사료섭취량과 마찬가지로 실험 공시두수의 부족으로 정확히 평가하는데는 무리가 있는 것으로 나타났고, 보다 정확한 연구를 위해서는 더 많은 공시두수의 사용을 통한 평가가 이루어져야할 것으로 판

단된다.

균사체내 높은 단백질함량(76.16%, Table 6-1)으로 인한 효과로서 젖소의 단백질 대사지표인 유단백질, 우유중 요소태질소는 두 처리군간에 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 밀리타리동충하초 균사체 급여군에서 유단백질이 3.43%와 1.30 kg으로 대조군의 3.26%와 1.21 kg보다 약간 높은 수준으로 나타내었다. 그리고 균사체의 높은 단백질 함량에도 불구하고 우유중 요소태질소함량은 급여군에서 다소 낮은 값을 나타내어 에너지 단백질 균형에 효과적인 것으로 생각된다.

Table 6-2. Effects of mycelia of floral *Cordyceps militaris* on intakes and milk characteristics in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm (plant) ¹		
Dry matter intake (kg/day)	22.84	22.96	0.54	0.7863
Milk yield (kg/day)	37.45	37.80	2.91	0.9153
Milk fat				
%	3.46	2.91	0.74	0.5333
kg/day	1.27	1.10	0.18	0.4120
Milk protein				
%	3.26	3.43	0.45	0.7435
kg/day	1.21	1.30	0.14	0.6014
Total solids				
%	9.25	8.48	0.30	0.1230
kg/day	3.46	3.21	0.16	0.2523
MUN ⁴ (mg/dl)	14.50	13.50	2.24	0.6985
SCC ⁵ (× 1000/mL)	165.00	165.50	33.19	0.9681

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴milk urea nitrogen; ⁵somatic cell count.

(2) 혈중 항산화효소(glutathione peroxidase)활성

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 착유우에 급여하였을 때 혈장내 글루타치온 퍼옥시데이즈(GSH-P)에 미치는 영향은 Table 6-3과 Figure 6-1에 나타내었다.

Table 6-3에서 보는 바와 같이 이전 주관기관의 한우사양시험과 유사하게도 처리구

가 13.29 unit로서 대조구의 6.84 unit보다 높은 항산화도를 나타내었으나, 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이는 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin의 간접적인 효능을 시사한 것이고, 통계적 무의미함은 처리구간 사육두수의 부족으로 인한 결과를 상쇄시킨 것으로 관측된다. 최근 연구보고에서 cordycepin은 생명체에서 발생하는 각종 활성산소 및 산화질소(NO)에 의한 세포손상으로 보호하는 항산화적 효능이 발표된바 있어(Won과 Park, 2005), 환경적 스트레스에 민감한 젖소에서 우유의 생산성에 유리할 것으로 사료된다.

Table 6-3. Effects of mycelia of floral *Cordyceps militaris* on plasma glutathione peroxidase in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm(plant) ¹		
Plasma GSH-Px ⁴ activity (nmol/min./mg of protein)	6.84	13.29	3.68	0.2210

¹Cm(plant): *C. militaris* mycelia cultured from plant sources; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴GSH-Px, glutathione peroxidase.

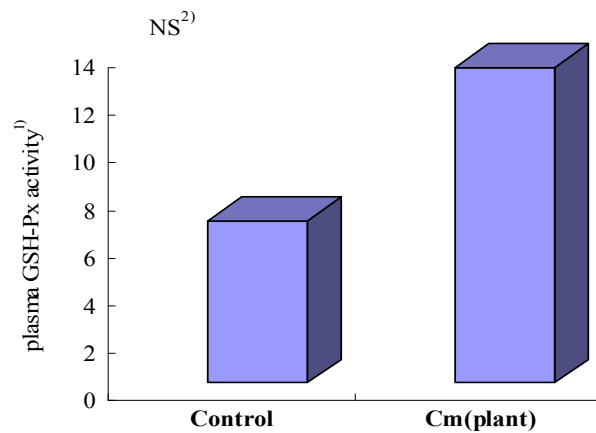


Figure 6-1. Effects of mycelia of *Cordyceps militaris* cultured from plants on plasma glutathione peroxidase in lactating dairy cows (¹one unit of plasma GSH-Px activity equals 1 nanomole of NADPH oxidized/min./mg of plasma protein; ²NS, not significant.).

(3) 혈액 및 우유내 cordycepin 함량

밀리타리스 동충하초 균사체를 비유중인 젖소에 급여하였을 때, 우유 및 혈액내 cordycepin의 함량에 미치는 영향은 Table 6-4에 나타내었고, 우유시료 채취시기에 따른 TLC상에서 우유내 cordycepin을 확인 한 것은 Figure 6-2에 나타내었다.

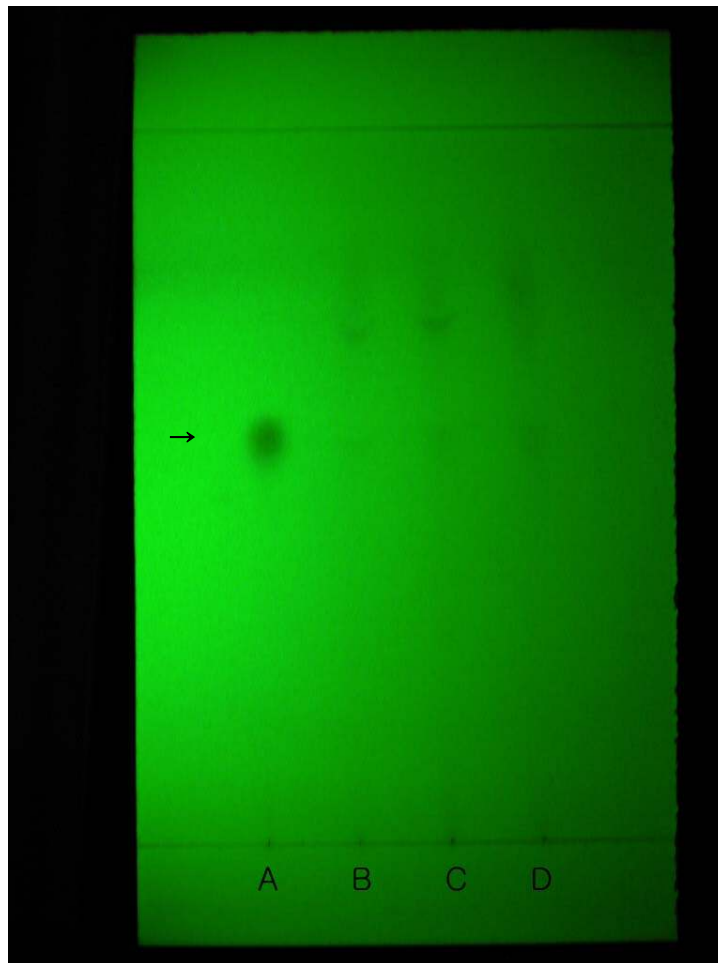


Figure 6-2. The identification of cordycepin for the milk of dairy cows fed floral *Cordyceps militaris* by thin layer chromatography (A: standard, B: milk on day 15 after feeding, C: milk on day 30 after feeding, D: milk on day 45 after feeding)

Table 6-4. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on cordycepin contents in whole blood and milk of lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm (plant) ¹		
..... Whole blood, ng/mL				
2 weeks	ND ⁴	375.66	77.25	<0.0001
4 weeks	ND	379.24	48.62	<0.0001
6 weeks	ND	448.72	65.43	<0.0001
..... Milk, ng/mL				
2 weeks	ND	152.36	43.77	<0.0001
4 weeks	ND	162.57	56.54	<0.0001
6 weeks	ND	203.26	86.91	<0.0001

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴below the detection limit.

표에 나타난 바와 같이 각 사양기간동안 무첨가구인 대조구에서는 cordycepin이 전혀 검출되지 않았고, 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여로 혈액과 우유내 cordycepin 농도가 유의하게 증가하였다(P<0.0001). 아울러 사양이 지속됨에 따라 혈액과 우유에서 cordycepin함량이 증가하였다. 이번 실험은 단순히 동충하초 cordycepin의 우유내 이행 여부를 조사하기 위하여 실시된 예비실험으로서 제한된 공시두수를 이용하였다. 그렇지만, 본 실험의 결과를 1년차 한우 사양시험과 비교하여 보면, 두 품종의 소가 섭취할 수 있는 사료양이 다르기 때문에 상대적으로 사료 섭취량이 높은 젖소에서 cordycepin의 공급양이 2배 정도 증가할 수 밖에 없었다. 공급양을 고려해 볼 때 젖소의 혈액내 cordycepin의 함량은 한우보다 낮은 수준이고, 또한 공급양 대비 우유로 전이되는 비율은 0.78% 수준으로 매우 낮게 나타났다. 이러한 차이를 설명할 수 있는 기전은 본 실험으로서 조사 될 수가 없으나, 현재로선 소장에서의 cordycepin 흡수율 및 근육축적과 우유로 분비되는 과정에서의 차이로 인한 가능성에 큰 비중을 둘 수 있다.

이상의 연구결과로부터 젖소에서 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여는 비육기 거세 한우의 사양시험에서와 마찬가지로 장관내 cordycepin의 흡수가 유효하였고, 또한 우유로 전이가 될 수 있는 것으로 조사되었다.

(4) 우유내 nucleosides

밀리타리스 동충하초 균사체를 착유중인 젖소에 급여하였을 때, 우유내 각종 nucleosides 함량에 미치는 영향은 Table 6-5에 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이 우유내 각종 nucleoside 함량은 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여와 관계없이 두 처리군간에 차이가 나타나지 않았다. 아울러 inosine 및 adenosine은 두 처리구 공히 검출되지 않았고, 우유내 주된 nucleoside는 guanosine로 우유 건조 g당 5 ~ 6 μg 함유하는 것으로 나타났다.

일반적으로 guanosine이 다른 nucleosides(inosine 및 adenosine 등)에 비하여 흡수속도가 가장 빠른 것으로 알려져 있는데(Sanderson과 He, 1994), 본 연구에서 우유중 guanosine 함량이 다른 nucleosides보다 높은 것은 상기 보고사실에 기인할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 6-5. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on different nucleosides in milk of lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm (plant) ¹		
 Inosine			
2 weeks	ND	ND	-	-
4 weeks	ND	ND	-	-
6 weeks	ND	ND	-	-
 Guanosine, $\mu\text{g/g}$ dried			
2 weeks	5.32	5.83	0.45	0.6627
4 weeks	6.21	5.32	0.52	0.6482
6 weeks	6.34	6.25	0.37	0.7425
 Adenosine			
2 weeks	ND	ND	-	-
4 weeks	ND	ND	-	-
6 weeks	ND	ND	-	-

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴below the detection limit.

제 7 절. *In vitro* 연구를 통한 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량 결정 시험

1. 연구 수행 내용

본 연구는 반추위 혼합 혐기성 미생물(rumen anaerobic mixed microbes)을 접종한 배지에 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 여러 수준으로 첨가한 다음, 배양시간의 경과에 따라 가스 발생량, 배양액중의 pH와 발효산물, 건물소화율, 가수분해효소의 활력, 미생물 수의 측정 그리고 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy) 등을 관찰함으로써 동충하초 균사체가 반추위 미생물의 발효와 성장에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사함으로써 반추동물용 사료로서의 이용 가능성과 적정 첨가 수준을 결정하기 위하여 수행하였다.

2. 시험방법

가. 반추위 혼합 미생물의 준비

In vitro 시험을 위한 반추위액은 대화도축장(경남 진주시 상평동 소재)에서 도축 즉시 한우의 반추위로부터 채취하였다. 채취한 위액은 미리 보온되고 oxygen free-CO₂ gas가 충전된 혐기성 용기(5,000mL용)에 담아 실험실로 운반한 다음 사료입자에 부착되어 있는 미생물을 분리하기 위하여 homogenizer에 넣고 oxygen free-CO₂ gas를 충전하여 강하게 교반한 다음 2겹의 cheese cloth로 여과하여 반추위 미생물을 분리하기 위한 시료로 사용하였다. 균질화된 위액을 anaerobic incubator에 한 시간 동안 정치시키고 부유한 사료입자를 vacuum pump로 제거한 다음, 150g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 반추위 혼합 미생물로 공시하였다.

나. 공시기질과 배양액

In vitro 상에서 동충하초의 첨가효과를 가장 뚜렷이 알아보기 위하여 탄수화물원으로 천공된 filter paper를 이용하였다. 반추위 혼합 미생물을 배양하기 위한 배양액은 기본적으로 Lowe's medium(Table 7-1)을 사용하였지만 실험의 특성상 VFA와 Hemin 그리고 yeast extracts는 제외하고 2.5um의 filtering system을 통과한 멸균 반추위액을 50% 이상 포함되게 특별히 제조하여 본 시험에 사용하였다,

Table 7-1. Medium compositions per 100mL of Lowe's medium for anaerobic culture

Component	Unit	Amount	Component	Unit	Amount
Mineral solution I	mL	7.50	Resazurine 0.1% solution	mL	1.00
Macro B solution	mL	5.40	Trypticase peptone	g	0.10
Trace B solution	mL	1.00	Yeast extracts	g	0.05
VFA mixture solution	mL	1.00	NaCO ₃ 8% solution	mL	15.00
Hemin 0.1% solution	mL	1.00	Cystein-HCl-H ₂ O	g	0.05
Vitamin mixture solution	mL	1.00	Distilled water	mL	78.00

Mineral I solution: KH₂PO₄, 1.8g; (NH₄)₂SO₄, 1.8g; NaCl, 3.6g; MgSO₄·7H₂O, 0.73g; and CaCl₂·2H₂O, 0.77g

Macro B solution: KCl, 2.7g; NaCl, 2.7g; MgSO₄·7H₂O, 2.25g; CaCl₂, 0.9g; and NH₄Cl, 2.4g in 300.0ml of distilled water.

VFA mixture solution: Acetic acid, 2.05g; Propionic acid, 0.9g; butyrate, 0.54g; 2-methyl butyrate, 0.015g; Isovalerate, 0.165g; Isobutyrate, 0.14g; n-Valerate, 0.165g; and 0.2M NaOH, 210ml

Vitamin mixture solution: Pyridoxine HCl, 0.06g; Riboflavin, 0.06g; Thiamine HCl, 0.06g; Nicotinamide, 0.06g; Ca-D-Pantothenate, 0.06g; PARA, 0.003g; and Stock Solution, 0.3ml in 300mL in distilled water.

Vitamin Stock Solution: Folic acid, 0.125g; Biotin, 0.125g; and Covalamine, 0.0125g in 25mL of dH₂O.

다. 공시시료의 *in vitro* 배양

탄수화물원으로 filter paper 약 750mg을 정확히 칭량하여 25ml의 배양관(serum bottle)에 넣고 8ml의 Lowe's artificial medium을 anaerobic gassing system을 이용하여 혐기적으로 분주한 다음 121℃에서 20분간 멸균 시켰다. 멸균이 완료된 배양관에 시험설계에 따라 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% (w/v) 첨가한 다음 준비된 반추위 혼합 미생물을 각각 2ml씩 혐기적으로 접종한 다음 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 및 72 시간동안 38℃의 shaking incubator에서 배양하였다. 미생물의 접종과 배양의 전 과정은 Hungate(1966)의 방법을 응용한 anaerobic gassing system으로 혐기상태를 유지하였다. 3반복으로 실험을 수행하였으며 blank test도 3반복으로 동시에 수행하였다.

라. 조사 항목 및 방법

(1) 가스 발생량 (Gas production)

총 가스발생량의 측정은 Fedorak과 Hrwdey(1983)의 방법에 따라 serum bottle내의 head space에 축적된 가스를 water displacement apparatus에 부착된 주사기로 흡입하여 burett내의 물을 밀어 올리는 양(가스압, ml)을 가스 발생량으로 하였다.

(2) 배양액중 pH

가스발생량 측정을 완료한 즉시 Weaton decapper를 이용하여 serum bottle의 stopper를 제거한 다음 배양액의 pH를 pH meter로 측정하였다. pH를 측정하고 4,500 rpm에서 25분간 원심분리한 다음 각종 가수분해 효소와 휘발성지방산(VFA: volatile fatty acids)을 측정하기 위하여 상등액을 회수하였고 잔량으로 소화율을 측정하였다.

(3) 건물소화율 (Dry matter digestibility)

상등액을 회수한 후 시료 잔량을 진공 흡입장치로 수거한 다음 75°C의 강제송풍 건조기에서 약 18시간 건조시켜 잔량을 측정하였다. 건물 분해율은 투입시료량과 잔량의 차이를 구하고 이 차이량을 투입시료량에 대한 백분율로 환산하여 구하였다.

(4) 효소 활력

효소역가를 측정하기 위하여 효소액(원심분리후 상층액) 0.5ml와 0.05M citrate buffer(pH 5.5)에서 1% CMC의 0.5ml과 혼합하였다. 1시간 동안 55°C에서 반응시켰으며 5분 동안 boiling하여 반응을 중지시켰다. Boiling 된 sample은 5분 동안 7,000rpm에서 원심분리 하였으며 상층액에서 생성된 환원당은 Miller 등(1960)의 DNS(dinitrosalicylic acid)방법을 이용하여 비색법으로 550nm에서 측정하였다. 효소 활성의 one unit는 생성된 1mmol glucose을 분당 생성된 환원당과 똑같이 계산하여 효소의 양을 계산하였다. Xylanase 활성은 0.5M potassium phosphate buffer(pH 6.5)의 2% oat spelt xylan(w/v) 1ml을 이용하여 분석하였다. 구체적인 측정방법은 실험실 관행법(반추동물영양실험법, 2003, 서울대 출판부; 하종규, 이성실, 고종열 저)에 따랐다.

(5) 발효산물의 측정

휘발성지방산 함량 측정은 배양액 10ml 당 HgCl₂ 0.2ml를 첨가하여 미생물 활성을 억제시키고 Erwin(1961) 방법에 의하여 25% metaphosphoric acid 용액을 첨가하고 30분간 정치시킨 후에 4°C에서 3,000rpm으로 30분간 원심분리 한 다음 상층액을 GC(Gas chromatography)로 분석하였다. 배양액중의 휘발성지방산(VFA) 함량은 gas chromatography [Column, 15m×0.53mm i.d. fused silica capillary, Durabond(DB)-FFAP, 1.00 μm film thickness (J&W Scientific); carrier gas, He; flame ionization detector]를 사용하여 분석하였다. VFA 분석의 전처리는 배양이 완료된 상층액 5mL을 centrifuge tube에 취한 다음 25% metaphosphoric acid 용액과 internal standard solution (2-ethylhexanoic acid(360mg·mL⁻¹) in 20% metanol) 각각 1mL 씩 넣고 혼합하여 처리하였다. 분석에 이용된 GC는 Varian 3700 기종으로

자료 처리 system(Shimadzu Chromatopac C-R1B Column)이 부착되었다.

NH₃-N(암모니아태 질소) 분석: Chaney와 Marbach (1962)의 방법에 따라 phenol 용액으로 위액중의 암모니아를 발색시킨 후 spectrophotometer(Spectronics)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

(6) 미생물 수의 측정

동충하초의 첨가가 반추위 발효와 반추위 미생물에 미치는 영향을 구명하기 위하여 배양 24시간이 완료된 배양액중의 미생물 수를 측정하였다. 배양액은 혐기희석액 (Table 7-2, Bryant와 Burkey, 1953)으로 십진희석(10⁰~10⁻⁵까지 희석)한 다음, 박테리아의 수와 곰팡이의 수는 이 등(1995)이 이용한 방법과 동일한 방법으로 측정하였으며, 프로토조아의 수는 living cell과 dead cell을 구별하기 위하여 TBFS 용액 (trypan-blue-formalin-saline; 증류수 900ml, 35% formaldehyde 용액 100ml, trypan blue 2g, NaCl 8g; dark blue 용액으로 living cell의 핵을 염색)으로 염색한 다음 Abe 등(1972)의 방법에 준하여 plankton counter glass를 이용하여 현미경하에서 측정하였다.

Table 7-2. Anaerobic dilution solution (Bryant & Burkey, 1953)

Component	Unit	Amount	Component	Unit	Amount
Mineral solution I ^a	ml	7.50	Na ₂ CO ₃	g	0.30
Mineral solution II ^b	ml	7.50	Resazurin, 0.1% solution	ml	0.10
Cystein·HCl·H ₂ O	g	0.05	D-H ₂ O	ml	100.00

^a K₂HPO₄, 6g in 100.0ml of distilled water.

^b NaCl, 1.2g; (NH₄)₂SO₄, 1.2g; KH₂PO₄, 0.6g; CaCl₂, 0.12g; MgSO₄·7H₂O, 0.25g in 100.0ml of distilled water.

(7) 전자 현미경 (SEM, Scanning Electron Microscopy) 관찰

SEM 관찰을 위한 전 처리는 Ho 등 (1988)의 방법을 응용하였다. 진공상태에서 시료의 변형을 방지하기 위하여 0.5%와 5% glutaraldehyde 용액으로 고정된 후, cacodylic buffer로 세척하고, 유기용매 치환법으로 10, 20, 30, 50, 70, 90 및 100%의 ethyl alcohol을 차례로 30분간 통과시켜 탈수시켰다. 탈수가 끝난 시료는 임계점 건조법(critical point drying method)을 이용하여 시료를 내압 용기중에서 액화 CO₂에 담긴 다음 임계점 온도(31°C, 72.8atm) 이상으로 가열하여 gas화 시켜 건조하였다. 건조된 시료를 액체 silver를 이용하여 주사형 현미경의 stub에 mounting 시킨 후, 진공증착장치에서 금(gold)을 시료표면에 분사 증착시켜 주사형 현미경(Scanning Electron Microscopy)을 이용하여 관찰하였다.

마. 통계처리

통계처리는 SAS package program(1996)을 이용하여 분산분석을 실시한 후, 유의성을 검정하고, 처리수준간 평균비교는 Duncan's multiple range test를 이용하여 P<0.05 수준에서 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

(1) 가스 발생량 (Gas production)

밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, 기질 0.1g을 기준으로 각각 17.03, 18.73, 19.93, 20.13, 25.63 그리고 19.77mL의 발효가스가 생성되었다(Table 7-3). 특히, 동충하초 균사체를 투입한 구가 투입하지 않은 구보다 가스 발생량이 높았으며 동충하초 균사체 1.2% 첨가구를 제외하고는 동충하초 균사체의 투입량이 많아질수록 가스 발생량은 같이 증가하는 것으로 조사되었다.

Table 7-3. Effects of supplement levels(%) of *Cordyceps militaris* on cumulative gas production (mL/0.1 g DM substrate) by mixed rumen microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	6.63 ^c	8.47 ^{ab}	7.97 ^b	8.73 ^{ab}	8.93 ^a	8.03 ^{ab}	8.13	0.47
6	7.83 ^c	10.00 ^b	10.23 ^{ab}	11.47 ^a	10.50 ^{ab}	9.80 ^b	9.97	0.70
9	11.43 ^c	13.13 ^{ab}	14.43 ^b	13.93 ^b	18.60 ^a	13.43 ^{ab}	14.16	1.21
12	13.50 ^c	16.90 ^b	19.20 ^b	18.23 ^b	24.13 ^a	17.70 ^b	18.28	1.37
24	17.03 ^c	18.73 ^{bc}	19.93 ^b	20.13 ^b	25.63 ^a	19.77 ^b	20.21	1.27
36	17.47 ^c	20.83 ^b	22.47 ^b	23.17 ^b	26.97 ^a	21.27 ^b	22.03	1.38
48	18.73 ^d	21.50 ^{bc}	23.43 ^b	22.20 ^b	28.50 ^a	19.60 ^{cd}	22.33	1.19
72	19.47 ^d	22.83 ^{bc}	23.57 ^b	22.83 ^{bc}	29.40 ^a	20.83 ^{cd}	23.16	1.42
mean	14.01	16.55	17.65	17.59	21.58	16.30	17.28	
SEM	0.98	1.07	1.19	1.13	1.59	1.03	0.51	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

배양액중에서 미생물들이 분비하는 효소는 탄수화물을 분해시켜 다량의 휘발성지

방산(VFA)과 CH₄, CO₂ 그리고 H₂을 생성하므로 발효가 진행되면 배양기내에는 가스가 차기 시작한다. 따라서 가스 발생량이 많은 발효조는 탄수화물의 발효가 많이 일어났다고 생각할 수 있다. 또한, 단백질은 아미노산과 암모니아로, 지방은 유리지방산 (free fatty acid)으로 분해 시킨다. 숙주인 반추동물은 미생물에 의한 발효작용으로 생산된 대사산물을 이용하여 생활하지만 *in vitro* 배양에서는 축적된 대사산물 때문에 일정 시간이 지나면 더 이상 미생물이 성장하지 못하고 성장이 정지되어 사멸기로 접어들게 된다. 한편, 탄수화물이 미생물에 의해 발효되어 생성되는 가스 조성은 이산화탄소(CO₂)가 60% 정도, 메탄(CH₄)은 30~40% 정도이며, 이산화탄소는 주로 당류의 발효와 아미노산의 분해에 의해 생성되고, 배양액내에 존재하는 중탄산염과 VFA와의 중화작용에 의해서도 생성된다. 메탄은 미생물의 환원작용에 의해 이산화탄소로부터 형성된다.

Table 7-4. Effects of supplement levels(%) of *Cordyceps militaris* on cumulative gas production parameters by mixed rumen microorganisms in *in vitro*

Gas production parameters	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)					
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2
a	6.27	8.35	8.59	9.21	10.35	8.9
b	15.51	17.23	18.45	17	24.04	15.21
c	0.0364	0.0331	0.0352	0.0350	0.0319	0.0345
a + b	21.78	25.58	27.04	26.21	34.39	24.11
% degradation, h ⁻¹	3.64	3.31	3.52	3.50	3.19	3.45
EP ^a (P _{0.025})	22.17	26.01	27.50	26.64	34.99	24.49

^aEP: Effective production of gas amounts calculated from the equation, a+b*(c/c+p), hypothetical ruminal passage rates of 0.025 h⁻¹ (p) were used.

밀리타리스 동충하초 균사체를 첨가하여 배양한 본 실험에서는 배양 24~36시간대에 가스 발생량이 정점에 도달하였으나 그 이후 시간대에서는 가스의 발생량이 매우 적었다. 기질 0.1g을 발효시켜 만들어 낼 수 있는 잠재적 가스발생량(a+b)은 균사체 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가구에서 각각 21.78, 25.58, 27.04, 26.21, 34.39 그리고 24.11mL로서 균사체 0.9% 첨가구에서 가스

발생량이 가장 높았다(Table 7-4). 또한 기질 0.1g을 발효시켜 만들어 낼 수 있는 유효가스 발생량 예측치 역시 22.17, 26.01, 27.50, 26.64, 34.99 그리고 24.49mL로서 균사체 0.9% 첨가구가 가장 높은 예측치를 보였다. 이러한 결과는 동충하초를 반추위 혐기성 미생물 생태계에 적당한 양으로 첨가하면 미생물에 의한 proteolysis나 cellulolysis가 향상될 수 있다는 것이며 사료첨가제로서의 충분한 가능성이 있다는 것을 지적해 주고 있는 것이다. 또한, *in vitro* 실험이기는 하지만 가스발생량을 기초로 한 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체의 반추위내 적정 첨가 기준은 약 0.6~0.9% 수준(Figure 7-1)인 것으로 평가되었다.

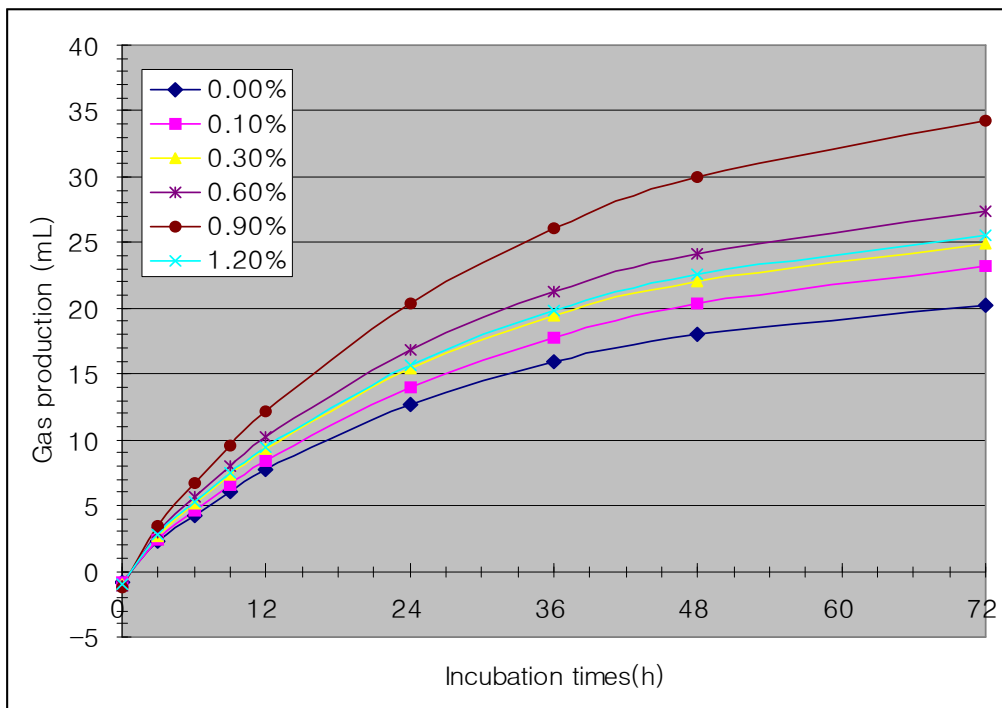


Figure 7-1. Effects of supplement levels(%) of *Cordyceps militaris* on cumulative gas production parameters by mixed rumen microorganisms in *in vitro*.

(2) 배양액의 pH

밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 첨가하여 배양한 다음, 배양액 중의 pH를 측정된 결과는 Table 7-5에서와 같다.

Table 7-5. pH values in the supernatant of medium by mixed rumen microorganisms influenced by the supplement levels(%) of *Cordyceps militaris*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	6.35 ^a	6.38 ^a	6.24 ^{ab}	6.12 ^b	6.05 ^b	6.20 ^{ab}	6.22	0.12
6	6.36 ^{ab}	6.48 ^a	6.26 ^{ab}	6.16 ^b	6.10 ^b	6.27 ^{ab}	6.27	0.14
9	5.72 ^a	5.44 ^{ab}	5.15 ^{bc}	5.13 ^{bc}	5.04 ^c	5.41 ^{ab}	5.31	0.19
12	5.30 ^b	5.21 ^b	5.08 ^b	5.20 ^b	5.09 ^b	5.61 ^a	5.25	0.17
24	5.25 ^a	5.16 ^{abc}	5.06 ^{abc}	4.99 ^{bc}	4.95 ^c	5.20 ^{ab}	5.10	0.11
36	5.22 ^a	5.14 ^a	5.06 ^a	5.02 ^a	4.78 ^b	5.05 ^a	5.04	0.11
48	5.01	4.97	4.95	4.94	4.97	5.01	4.98	0.09
72	4.96	4.95	5.12	5.12	4.92	5.14	5.04	0.15
mean	5.52	5.47	5.36	5.33	5.24	5.49	5.40	
SEM	0.11	0.12	0.11	0.10	0.10	0.10	0.04	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c}Means within a row with different superscripts differ.

반추위 혼합 미생물 접종 당시(0h 배양시) 6.5였던 pH가 배양시간이 경과함에 따라 급격히 감소하기 시작하였다. 이는 혐기성 미생물들이 성장하면서 soluble sugar와 발효산물들이 계속적으로 축적된 결과 때문이라 생각된다(Gordon과 Phillips, 1989). *In vitro* 배양시 측정된 pH는 4.78~6.38의 범위로서 proteolysis와 cellulolysis을 위한 적정 수준(Tamminga, 1979)에 있었다고 판단된다. 특히, 동충하초 균사체를 투여한 구가 투여하지 않은 구보다 거의 모든 측정구에서 pH가 낮게 조사되었다.

밀리타리스 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가한 다음 가스 발생량이 가장 높았던 24시간대의 배양액내의 pH는 각각 5.25, 5.16, 5.06, 4.99, 4.95 그리고 5.20로서 균사체 0.6%와 0.9% 첨가구에서 가장 낮았다. 배양시간이 지남에 따라 pH가 낮아지는 이유는 (발효산물의 종류나 양에 따라서 더 큰 영향을 받지만) 일반적으로 발효산물의 축적 때문에 나타나는 현상으로서 pH가 낮게 측정되었다는 것은 cellulolysis가 강하게 일어났다는 것을 반증하는 것이며, 앞의 결과와 비교할 때 가스 발생량이 상대적으로 높았던 배양구에서 pH는 상대적으로 낮게 측정된 것을 볼 수 있다.

(3) 건물 소화율 (Dry matter digestibility)

동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, 기질의 건물 소화율은 각각 27.44, 34.83, 36.18, 34.79, 37.45 그리고 32.73%로서 동충하초 균사체를 투입한 구가 투입하지 않은 구보다 건물분해율이 높았다(Table 7-6).

Table 7-6. Effects of supplement levels(%) of *Cordyceps militaris* on dry matter digestibility (%) by mixed rumen microorganisms in *in vitro*

Incubation times (h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	10.35 ^b	10.39 ^b	10.41 ^b	11.33 ^{ab}	13.46 ^a	11.67 ^{ab}	11.27	1.25
6	13.84 ^b	15.45 ^b	18.21 ^a	19.12 ^a	19.78 ^a	19.30 ^a	17.62	1.43
9	16.08 ^b	17.99 ^b	22.08 ^a	20.93 ^a	21.79 ^a	22.95 ^a	20.31	1.10
12	24.23 ^c	22.33 ^c	28.55 ^{ab}	29.27 ^{ab}	30.02 ^a	25.55 ^{bc}	26.66	2.31
24	27.44 ^c	34.83 ^{ab}	36.18 ^a	34.79 ^{ab}	37.45 ^a	32.73 ^b	33.91	1.77
36	33.36 ^d	38.34 ^c	39.68 ^{bc}	41.38 ^{ab}	43.20 ^a	37.69 ^c	38.94	1.35
48	39.40 ^c	38.88 ^c	45.57 ^{ab}	44.15 ^b	47.62 ^a	42.84 ^b	43.08	1.73
72	40.83 ^e	44.65 ^d	47.89 ^c	51.26 ^b	55.82 ^a	51.52 ^b	48.66	1.30
mean	25.69	27.86	31.07	31.53	33.64	30.53	30.05	
SEM	2.28	2.51	2.64	2.72	2.91	2.58	1.07	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d,e}Means within a row with different superscripts differ.

밀리타리스 동충하초 균사체를 첨가하여 배양한 본 실험에서는 배양 24~36시간대에 가스 발생량이 정점에 도달하였으며 동충하초 균사체를 첨가하면 가스의 발생량도 증가하는 경향을 보였다. 가스 발생량에서와 마찬가지로 배양기내에서 소화 가능한 건물의 잠재적 소화율은 동충하초 균사체 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가구에서 각각 51.3, 54.12, 57.36, 57.5, 59.32 그리고 56.68%로서 동충하초 균사체 0.9% 첨가구에서 가장 높았다. 그리고 기질이 배양기내에서 1시간 동안 분해될 수 있는 시간당 기질 분해율은 각각 2.31, 2.53, 2.7, 2.87, 3.27 그리고 2.68%로 계산되었으며 기

질의 통과속도를 2.5%로 가정한 연속배양에서의 유효분해도는 각각 52.35, 55.23, 58.50, 58.66, 60.54 그리고 57.81%로서 동충하초 균사체 0.9% 첨가구에서 가장 높았다.

Table 7-7. Effects of supplement levels(%) of *Cordyceps militaris* on cumulative gas production parameters by mixed rumen microorganisms in *in vitro*

Gas production parameters	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)					
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2
a	9.52	9.65	11.63	11.09	10.6	11.35
b	41.78	44.47	45.73	46.41	48.72	45.33
c	0.0231	0.0253	0.027	0.0287	0.0327	0.0268
a + b	51.3	54.12	57.36	57.5	59.32	56.68
% degradation, h ⁻¹	2.31	2.53	2.7	2.87	3.27	2.68
EP ^a (P _{0.025})	52.35	55.23	58.50	58.66	60.54	57.81

^aEP: Effective production of gas amounts calculated from the equation, $a+b*(c/c+p)$, hypothetical ruminal passage rates of 0.025 h⁻¹ (p) were used.

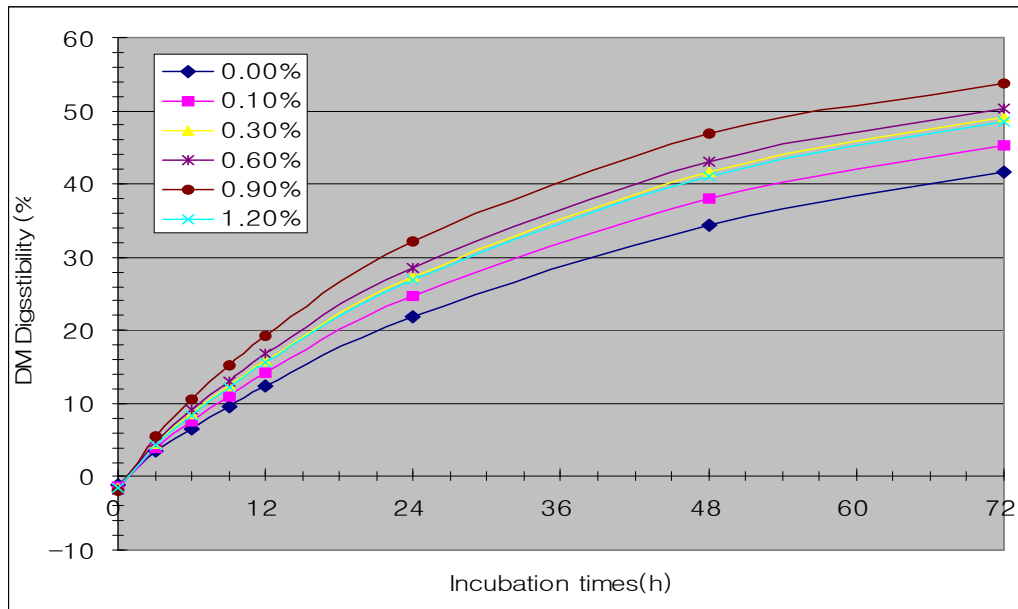


Figure 7-2. Effects of supplement levels(%) of *Cordyceps militaris* on cumulative gas production parameters by mixed rumen microorganisms in *in vitro*

또한, *in vitro* 실험이기는 하지만 가스발생량에서와 마찬가지로 건물 소화율을 기초로 한 밀리타리스 동충하초 균사체의 반추위내 적정 첨가 기준은 약 0.6~0.9% 수준(Figure 7-2)인 것으로 평가되었다.

(4) 가수 분해효소의 활력 (Hydrolytic enzyme activities)

CMC를 기질로 이용하여 배양액의 Endoglucanase(β -1,4-glucan glucanohydrolase, EC3.2.1.4) 활력을 측정한 시험에서 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 섬유소 가수분해효소인 CMcellulase의 활력은 각각 8.80, 9.69, 9.31, 11.62, 11.18 그리고 10.57 U/mL·h⁻¹로 조사되었다(Table 7-8). 동충하초 균사체를 투입한 구가 투입하지 않은 구보다 CMcellulase의 활력이 다소 높아지는 경향이 있었으며. 이와 동일한 경향이 Avicellase(Table 7-10)를 제외하고 조사된 모든 가수분해 효소, 즉 xylanase(Table 7-9), amylase(Table 7-11) 그리고 protease(Table 7-12) 효소 활력에서도 관찰되었다. 이러한 가수분해효소의 활력 증가는 가스발생량의 증가와 건물 소화율의 증가를 잘 반영해 주는 결과로 생각된다.

Table 7-8. CMcellulase activities(U/mL·h⁻¹) in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	5.07	5.42	5.03	5.68	4.61	4.98	5.13	0.75
6	5.84 ^{ab}	6.04 ^{ab}	6.26 ^{ab}	6.50 ^a	4.84 ^c	5.55 ^b	5.84	0.38
9	6.78 ^b	7.85 ^b	7.67 ^b	9.52 ^a	6.67 ^b	7.98 ^b	7.75	0.76
12	7.26 ^c	8.59 ^{bc}	8.56 ^{bc}	10.06 ^a	9.73 ^{ab}	9.70 ^{ab}	8.98	0.76
24	8.80 ^d	9.69 ^{bcd}	9.31 ^{cd}	11.62 ^a	11.18 ^{ab}	10.57 ^{abc}	10.19	0.86
36	9.11 ^b	9.83 ^b	10.44 ^b	12.81 ^a	12.29 ^a	10.43 ^b	10.82	0.88
48	9.08 ^c	9.86 ^c	10.89 ^{bc}	14.39 ^a	12.68 ^{ab}	10.57 ^{bc}	11.24	1.34
72	8.77 ^d	9.78 ^{cd}	10.29 ^c	13.43 ^a	12.00 ^b	10.50 ^c	10.80	0.75
mean	7.59	8.38	8.56	10.50	9.25	8.79	8.84	
SEM	0.32	0.36	0.45	0.64	0.68	0.49	0.22	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

Table 7-9. Xylanase activities(U/mL·h⁻¹) in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	4.38 ^b	5.10 ^b	5.44 ^b	6.02 ^b	7.84 ^a	5.68 ^b	5.74	0.88
6	4.63 ^c	5.19 ^{bc}	5.97 ^{bc}	6.85 ^{ab}	7.88 ^a	6.29 ^{abc}	6.13	0.92
9	8.04 ^b	10.54 ^b	13.49 ^b	22.93 ^a	24.23 ^a	29.15 ^a	18.06	4.20
12	8.89 ^b	10.94 ^b	13.89 ^b	29.58 ^a	28.86 ^a	30.19 ^a	20.39	3.58
24	9.93 ^b	12.04 ^b	13.39 ^b	29.28 ^a	31.95 ^a	31.95 ^a	21.42	1.99
36	12.57 ^c	14.75 ^c	14.50 ^c	30.57 ^b	36.64 ^a	35.30 ^a	24.06	2.44
48	10.73 ^b	12.84 ^b	14.19 ^b	30.08 ^a	32.75 ^a	32.75 ^a	22.22	1.99
72	12.64 ^d	18.50 ^c	23.86 ^b	32.04 ^a	34.09 ^a	33.24 ^a	25.73	2.88
mean	8.98	11.24	13.09	23.42	25.53	25.57	17.97	
SEM	0.66	0.90	1.26	2.14	2.28	2.49	0.92	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

Table 7-10. Avicelase activities(U/mL·h⁻¹) in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	2.30 ^d	2.44 ^{cd}	2.66 ^{bcd}	3.01 ^{abc}	3.21 ^{ab}	3.39 ^a	2.84	0.35
6	2.82 ^b	2.82 ^b	3.07 ^b	3.29 ^b	4.26 ^a	3.55 ^b	3.30	0.39
9	3.24 ^b	3.37 ^b	3.79 ^b	3.99 ^{ab}	4.86 ^a	3.96 ^{ab}	3.87	0.55
12	3.53 ^b	3.66 ^b	4.11 ^b	4.26 ^b	5.46 ^a	4.58 ^{ab}	4.27	0.57
24	3.70 ^c	3.90 ^{bc}	4.41 ^{bc}	4.61 ^{ab}	5.30 ^a	4.59 ^{ab}	4.42	0.43
36	4.10 ^b	4.19 ^b	4.50 ^b	4.79 ^b	5.51 ^a	4.64 ^b	4.62	0.38
48	4.29 ^c	4.51 ^{bc}	4.73 ^{bc}	4.98 ^{bc}	5.92 ^a	5.36 ^{ab}	4.96	0.46
72	4.39 ^c	4.58 ^{bc}	4.78 ^{bc}	5.02 ^{bc}	5.79 ^a	5.15 ^b	4.95	0.35
mean	3.55	3.68	4.01	4.24	5.04	4.40	4.15	
SEM	0.17	0.17	0.17	0.17	0.19	0.16	0.08	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

Table 7-11. Amylase activities($\text{U/mL}\cdot\text{h}^{-1}$) in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	5.24 ^b	5.59 ^b	5.27 ^b	5.75 ^{ab}	6.84 ^a	5.87 ^{ab}	5.76	0.59
6	6.93 ^b	7.46 ^b	9.18 ^a	9.66 ^a	10.21 ^a	9.61 ^a	8.84	0.83
9	8.01 ^c	9.00 ^c	11.20 ^b	10.33 ^b	12.32 ^a	11.05 ^b	10.32	0.59
12	11.37 ^b	11.38 ^b	14.65 ^{ab}	15.06 ^a	15.50 ^a	14.38 ^{ab}	13.72	1.89
24	14.08 ^c	17.76 ^{ab}	18.16 ^a	18.09 ^a	18.82 ^a	16.44 ^b	17.23	0.79
36	16.35 ^c	20.04 ^{ab}	20.00 ^{ab}	20.98 ^a	21.49 ^a	18.84 ^b	19.62	0.99
48	18.26 ^d	19.84 ^{cd}	23.25 ^{ab}	21.97 ^{bc}	24.77 ^a	22.05 ^{bc}	21.69	1.32
72	20.70 ^d	23.17 ^{cd}	24.41 ^{bc}	26.09 ^{ab}	27.23 ^a	25.72 ^{abc}	24.55	1.40
mean	12.62	14.28	15.77	15.99	17.15	15.50	15.22	
SEM	1.11	1.32	1.35	1.38	1.42	1.32	0.54	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

Table 7-12. Protease activities(U/mL·h⁻¹) in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	2.88 ^c	3.03 ^c	3.57 ^b	3.67 ^{ab}	4.18 ^a	3.92 ^{ab}	3.54	0.28
6	3.53 ^b	3.71 ^b	5.43 ^a	5.50 ^a	6.18 ^a	5.83 ^a	5.03	0.48
9	4.40 ^d	5.32 ^c	6.43 ^b	5.94 ^{bc}	7.16 ^a	6.45 ^b	5.90	0.36
12	5.10 ^b	5.81 ^b	8.54 ^a	8.18 ^a	8.85 ^a	8.78 ^a	7.54	1.15
24	6.77 ^c	9.11 ^b	10.78 ^a	9.93 ^{ab}	10.69 ^a	9.43 ^b	9.45	0.63
36	8.50 ^c	10.75 ^b	10.78 ^b	11.12 ^{ab}	12.40 ^a	10.86 ^b	10.73	0.77
48	9.17 ^d	10.51 ^c	12.37 ^{ab}	11.70 ^b	13.33 ^a	12.48 ^{ab}	11.59	0.54
72	10.71 ^d	12.09 ^{cd}	13.08 ^{bc}	13.76 ^{abc}	15.23 ^a	14.07 ^{ab}	13.16	0.94
mean	6.38	7.54	8.87	8.73	9.75	8.98	8.38	
SEM	0.56	0.69	0.68	0.69	0.76	0.69	0.29	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

(5) 발효 특성 (Fermentation characteristics)

배양액중의 단백질들은 반추위 혼합미생물의 분해작용에 의해 peptide를 거쳐 아미노산으로 되며, 아미노산은 다시 암모니아, VFA 그리고 탄산가스로 전환된다. 단백질 분해속도는 단백질의 용해도와 반추위 혼합 미생물을 구성하는 미생물의 종류와 이들이 분비하는 단백질 분해효소의 활력에 따라서 다르게 나타난다. 또한, 질산염(nitrate), peptide 및 요소(urea)와 같은 비단백태질소화합물도 배양액중의 반추위 혼합 미생물에 의해 암모니아로 분해된다. 반추위내에서 생산된 아미노산과 암모니아는 대부분 미생물의 질소원으로 이용되어 미생물체 단백질로 합성된다. 따라서 배양액중에서 단백질과 비단백태 질소화합물의 분해시에 생성되는 암모니아태 질소의 함량은 proteolysis의 정도를 추정할 수 있는 자료가 될 수 있다. 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, 배양액 10mL 중에 존재하는 암모니아태 질소의 농도는 각각 2.80, 2.99, 2.95, 2.86, 2.87 그리고 2.88mg으로 조사되어 처리구간에 큰 차이는 발견되지 않았으나, 전 배양기간 동안에 평균적으로 유지된 배양액 10mL 중의 암모니아태 질소의 농도는 각각 2.10, 2.46, 2.60, 2.87, 2.79 그리고 2.67mg으로서 동충하초 균사체를 첨가한 구에서 다소 높았다

(Table 7-13).

Table 7-13. NH₃-N concentrations (mg/dL) in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

Incubation times(h)	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						mean	SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2		
3	1.67	2.03	2.17	2.52	2.10	2.23	2.12	0.55
6	1.64	1.97	2.28	2.43	2.16	2.17	2.11	0.59
9	1.53	1.95	2.07	2.26	2.07	2.25	2.02	0.70
12	1.82	2.04	2.31	2.08	2.18	2.12	2.09	0.82
24	2.80	2.99	2.95	2.86	2.87	2.88	2.89	0.52
36	2.56	3.10	2.80	3.13	3.26	2.80	2.94	0.36
48	2.45 ^c	2.88 ^{bc}	3.34 ^{ab}	3.57 ^a	3.90 ^a	3.48 ^{ab}	3.27	0.34
72	2.32 ^c	2.75 ^c	2.91 ^{bc}	4.08 ^a	3.81 ^a	3.47 ^{ab}	3.22	0.34
mean	2.10	2.46	2.60	2.87	2.79	2.67	2.58	
SEM	0.10	0.11	0.14	0.18	0.18	0.16	0.06	

SEM: pooled standard errors of the means; ^{a,b,c,d}Means within a row with different superscripts differ.

실제로 *in vivo* 상태에서 암모니아태 질소는 제 1위벽을 통해 흡수되어 간장의 요소 회로를 통해 요소로 합성되고, 합성된 요소의 일부는 타액선으로 운반되어 타액성분으로서 제 1위내에 분비되거나 소량이지만, 또 일부는 제 1위벽을 통해 제 1위내로 직접 확산되어 들어가서 다시 미생물의 질소원으로 이용된다. 이 과정은 계속적으로 반복해서 일어나며, 이를 질소 재순환(recycling nitrogen)라 한다. 이와 같이 여분의 암모니아는 재순환 질소로서 유용하게 이용되기도 하지만, 반추위내 암모니아 농도가 간장의 요소합성 능력을 훨씬 초과할 때는 혈액 중에 암모니아가 과도하게 축적되어 암모니아 중독이 발생하는 경우도 생긴다. 실제 과도한 질소공급으로 암모니아 중독이 발생하는 경우가 있으므로 반추위내 미생물의 증식에 필요한 질소공급 수준(5~20

mg/100mL)을 유지할 수 있을 만큼 단백질을 공급해야한다.

다음 Table 7-14는 배양 24시간이 완료된 배양관중의 휘발성 지방산의 농도와 상대적 비율을 측정한 결과이다.

Table 7-14. Concentrations (*mM*) and relative compositions(*Molar %*) of volatile fatty acids in the supernatant of the medium supplemented with *Cordyceps militaris* by mixed rumen anaerobic microorganisms in *in vitro*

VFA concentrations	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	
Concentrations, <i>mM</i>							
Total VFA	36.00 ^c	58.49 ^b	62.08 ^b	45.98 ^{bc}	122.19 ^a	50.48 ^{bc}	11.38
Acetate (C ₂)	19.10 ^c	33.91 ^b	37.33 ^b	26.05 ^{bc}	84.39 ^a	27.49 ^{bc}	7.39
Propionate (C ₃)	6.87 ^c	12.92 ^b	13.85 ^b	9.30 ^{bc}	25.34 ^a	11.03 ^{bc}	2.81
Iso butyrate (iso C ₄)	0.47 ^{abc}	0.53 ^a	0.49 ^{ab}	0.19 ^c	0.24 ^{bc}	0.40 ^{abc}	0.15
Butyrate (C ₄)	7.37	8.43	7.68	8.41	10.48	9.05	1.83
Iso valerate (iso C ₅)	1.53 ^{ab}	1.82 ^a	1.86 ^a	1.34 ^{ab}	0.77 ^b	1.74 ^{ab}	0.51
Valerate (C ₅)	0.67	0.88	0.87	0.68	0.97	0.76	0.27
Relative compositions, molar %							
Acetate (C ₂)	52.75 ^b	58.07 ^b	60.01 ^b	56.09 ^b	69.14 ^a	54.04 ^b	3.88
Propionate (C ₃)	19.10	21.99	22.14	20.43	20.68	22.02	1.57
Iso butyrate (iso C ₄)	1.34 ^a	0.91 ^{ab}	0.89 ^{ab}	0.38 ^{bc}	0.19 ^c	0.79 ^{abc}	0.34
Butyrate (C ₄)	20.57 ^a	14.48 ^{bc}	12.36 ^c	18.55 ^a	8.52 ^d	18.15 ^{ab}	2.15
Iso valerate (iso C ₅)	4.36 ^a	3.08 ^a	3.24 ^a	3.00 ^a	0.67 ^b	3.47 ^a	0.86
Valerate (C ₅)	1.88 ^a	1.47 ^{ab}	1.36 ^{ab}	1.54 ^{ab}	0.79 ^b	1.54 ^{ab}	0.49
A(C ₂)/P(C ₃) ratio	2.78	2.64	2.72	2.77	3.36	2.49	0.38

SEM: pooled standard errors of the means

^{a,b,c}Means within a row with different superscripts differ.

탄수화물은 그 구성이 무엇이든 미생물에 의해 발효되어 저급지방산인 VFA로 전 변되는데, 주종을 이루는 VFA는 acetate(C₂), propionate(C₃), butyrate(C₄)이며, 그 밖

에도 valerate (C₅), iso-butyrate (iC₄), iso-valerate (iC₅) 등이 생성되지만 그 양은 극히 소량이다. 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, 배양액중에 총휘발성지방산의 농도는 각각 36.00, 58.49, 62.08, 45.98, 122.19 그리고 50.48mM로서 동충하초 균사체의 첨가로 총 휘발성지방산의 농도가 상당히 증가하는 것으로 조사되었다. 일반적으로 각 배양관에서 VFA의 생성비율과 농도는 기질의 종류, 기질의 가공방법, 물리적 형태, 조사료와 농후사료의 비율, 기질의 급여수준과 기질의 급여빈도 등의 많은 요인에 의해 크게 영향을 받지만, 대개 acetate는 60~70%, propionate는 15~25%, butyrate는 8~15%, 그리고 기타 산들은 2~8% 범위로서 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, 배양액의 총휘발성지방산중에서 acetic acid가 차지하는 비율이 각각 52.75, 58.07, 60.01, 56.09, 69.14 그리고 54.04%로서 조사되어 일반적으로 관찰되는 *in vivo* 상태보다는 약간 낮은 경향이 있었다.

동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, propionic acid가 차지하는 비율은 각각 19.10, 21.99, 22.14, 20.43, 20.68 그리고 22.02%로서 결국에는 acetic acid와 propionic acid의 비율(A/P 비율)이 각각 2.78, 2.64, 2.72, 2.77, 3.36 그리고 2.49로 계산되었다. 일반적으로 *in vivo* 상태에서는 조사료의 급여량이 많을수록, 그리고 가공이 덜된 사료일수록 생성된 총 VFA중에서 acetate의 생성비율이 증가하고, propionate와 butyrate의 상대적 비율은 감소한다. 이와 반대로 농후사료의 급여비율이 높거나, 조사료를 분쇄 또는 펠렛화하거나, 농후사료를 펠렛화 또는 열처리하거나, 또는 불포화지방산의 급여수준이 높거나, 훈증압착된 사료의 급여량이 증가할수록 총산중 acetate의 비율이 감소하고 propionate의 비율은 증가되며, 이러한 VFA 조성변화가 생기면 유지율이 떨어지고 체지방의 축적으로 체중이 증가한다. Butyrate는 사료중에 전분과 단백질이 많은 경우에 증가하나 일정한 경향을 나타내지 않는 경우가 많다고 알려져 있다. 본 연구 결과를 요약하면 동충하초 균사체를 첨가하여 배양하면 총 VFA의 함량이 증가할 뿐만아니라 acetate함량이 증가하며 propionate의 함량에는 크게 영향을 미치지 않아서 결국에는 A/P 비율이 크게 증가하는 것으로 조사되었다.

Iso-butyrate와 iso-valerate는 아미노산의 탈아미노 반응에 의해 생기기 때문에, 단백질 함량이 높은 사료를 기질로 급여하면 증가하는 경향이 있다. 본 연구에서는 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가하여 24시간 동안 배양시켰을 경우, iso-butyrate가 차지하는 비율은 각각 1.34, 0.91, 0.89, 0.38, 0.19 그리고 0.79%, iso-valerate가 차지하는 비율은 각각 4.36, 3.08, 3.24, 3.00, 0.67 그리고 3.47%로서 iso-valerate 비율이 iso-butyrate가 차지하는 비율보다 많이 높았다.

(5) 미생물 군락 (Microbial populations)

In vitro 배양 24시간 후에 미생물 군락의 수를 조사한 결과(Table 7-15와 Figure 7-3), 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가한 구의 배양액 1mL 중에 분포되어 있는 총 박테리아의 수는 각각 13.00, 14.00, 15.25, 19.50, 21.50 그리고 15.75 cfu×10⁸으로 counting되었다. 또한, 섬유소 분해 박테리아는 각각 12.25, 16.75, 22.00, 32.25, 35.25 그리고 22.25 cfu×10⁷으로 조사되어 동충하초 균사체는 반추위 박테리아와 섬유소분해 박테리아의 성장을 강하게 증가시킬 수 있는 물질로 조사되었다.

Table 7-15. Microbial fractions(total and cellulolytic bacterial, protozoan and fungal fractions) in the supernatant of anaerobic medium supplemented with *Cordyceps militaris*

Microbial fractions	Supplement levels(%) of <i>C. militaris</i> (ADM basis)						SEM
	0.0	0.1	0.3	0.6	0.9	1.2	
Bacteria, cfu ¹⁾ ×10 ⁹	13.00 ^c	14.00 ^c	15.25 ^c	19.50 ^{ab}	21.50 ^a	15.75 ^{bc}	2.60
Cellulolytics, cfu×10 ⁷	12.25 ^c	16.75 ^c	22.00 ^{bc}	32.25 ^{ab}	35.25 ^a	22.25 ^{bc}	8.16
Live protozoa, cell×10 ²	41.75 ^b	54.50 ^{ab}	74.75 ^a	61.25 ^{ab}	72.75 ^a	62.75 ^{ab}	17.35
Dead protozoa, cell×10 ²	59.25 ^a	50.75 ^{ab}	41.50 ^b	44.75 ^{ab}	34.75 ^b	36.00 ^b	10.62
Fungi, tfu ²⁾ ×10 ³	76.75 ^a	48.25 ^b	46.25 ^b	13.00 ^c	13.25 ^c	3.00 ^c	10.64

SEM: pooled standard errors of the means;^{a,b,c}Means within a row with different superscripts differ.

¹⁾cfu:cell forming unit. ²⁾tfu:thallus forming unit

TBFS 용액(trypan-blue-formalin-saline 용액)과 plankton counter glass를 이용하여 배양액내에 죽어 있는 protozoa의 수를 counting한 결과(Figure 7-3), 반추위 혐기성 박테리아와 섬유소 분해 박테리아에서와는 달리 동충하초 균사체의 첨가량이 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2%로 증가할수록 죽어 있는 protozoa의 수는 감소하는 경향이었고, 살아 있는 protozoa의 수는 동충하초 균사체의 첨가로 다소 증가 하였지만 첨가량에서는 뚜렷한 경향이 발견되지 않았다. 따라서 동충하초 균사체는 반추위 protozoa의 성장을 뚜렷이 억제시킬 수 있는 물질로 조사되었다.

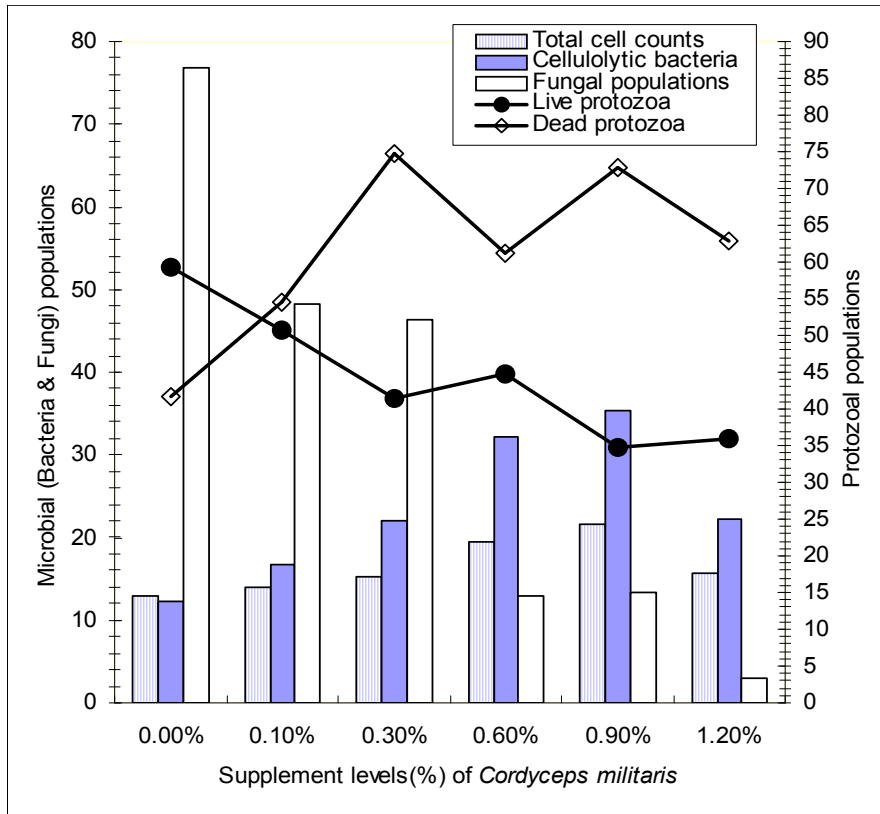


Figure 7-3. Viable ($\blacksquare \times 10^9$, cfu*/mL culture) and cellulolytic ($\blacksquare \times 10^7$, cfu/mL culture) counts of bacteria, and enumerations of anaerobic fungi ($\square \times 10^4$, tfu**/mL culture) and anaerobic live ($\diamond-\diamond$) or dead ($\bullet-\bullet$) protozoa in the culture supernatant of mixed ruminal microorganisms supplemented with *Cordyceps militaris*. Cultures were enumerated after a 24h incubation. *cfu, cell formation unit, **tfu, thallus formation unit.

한편, 동충하초 균사체를 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 그리고 1.2% 첨가한 구의 배양액 1mL중에 분포되어 있는 혐기성 곰팡이의 수는 각각 76.75, 48.25, 46.25, 13.00, 13.25 그리고 $3.00 \text{ tfu} \times 10^3$ (Table 7-2)으로 counting되어 동충하초 균사체의 투여량이 증가할수록 곰팡이의 수는 직선적으로 감소하는 것으로 조사되었다(Figure 7-3). 박테리아와 protozoa 및 곰팡이 중에서 반추위 혐기성 곰팡이가 동충하초 균사체에 가장 큰 영향을 받는 것으로 조사되었다. 동충하초 균사체가 반추위 혐기성 곰팡이의 성장을 억제시킨다는 결과는 매우 흥미로운 사실이며 이러한 이유나 기전을 밝히는 것도 매우 중요한 과제라 생각되며 앞으로의 연구에서 이러한 이유도 밝혀나갈 것이다. 또한 그림에서 보는 것처럼 동충하초 균사체가 프로토조아의 성장을 강하게 억제시키거나

프로토조아를 사멸시켜 동충하초의 균사체에는 강력한 anti-protozoan agent가 함유되어 있을 것으로 판단되었다. 이러한 결과에 대해서도 더 많은 후속 실험들이 수행되어야 하겠지만 methane 생성 억제제로서의 개발 가능성이 매우 높을 것으로 평가되었다. 왜냐하면 반추위에서 메탄을 생성박테리아의 약 80%이상은 프로토조아의 표면에 부착하여 공생하고 있기 때문이다. 따라서 다른 미생물들에 비해 상대적으로 제어하기 쉬운 프로토조아를 제거한다면 메탄생성 박테리아들이 살 곳을 잃어 반추위내에서 메탄의 생성량이 획기적으로 감소될 수 있기 때문이다. 반추위내에서 프로토조아를 제거(Defaunation) 하는 여러 방법들 중에서 가장 효과적인 방법은 항생제를 투여하는 것이다. 그러나 항생제 사용규제 움직임으로 많은 연구자들은 항생제를 대체할 수 있는 천연생리활성 물질을 찾는데 많은 시간들을 투여하고 있다. 다행스럽게도 본 과제에서 동충하초 균사체가 항생제를 대체할 수 있는 가능성이 충분히 있는 물질로 평가되고 있어 이물질을 이용한 메탄생성억제제의 개발 가능성도 앞으로 연구과제와 함께 검토할 예정이다.

(6) 전자현미경 관찰 (SEM observation)

In vitro 배양 12시간 후에 배양액중에 들어 있는 동충하초 균사체를 고정시켜 전자현미경으로 표면을 관찰해본 결과는 Figure 7-4에서와 같다. 현재는 전자 현미경을 시편을 준비하고 전 처리하는 과정에 있기 때문에 아직 많은 시편들을 관찰하지 못하였다. 따라서 전자현미경 관찰을 통하여 뚜렷히 내릴 수 있는 결과들은 아직 발견하지 못하였으나 일반적으로 동충하초 균사체의 외부 구조는 벚짚이나 옥수수 등과 같은 다른 식물체들보다 물리적으로 상당히 간단한 구조를 갖고 있었다. 또한 배양 12시간후에도 곰팡이나 프로토조아의 침입을 받은 흔적들이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 위에서 본 과제 수행자가 언급했던 미생물 수의 변화나 anti-fungal 내지는 anti-protozoan agent에 관한 내용들을 잘 뒷받침해 주는 그림들이었다.

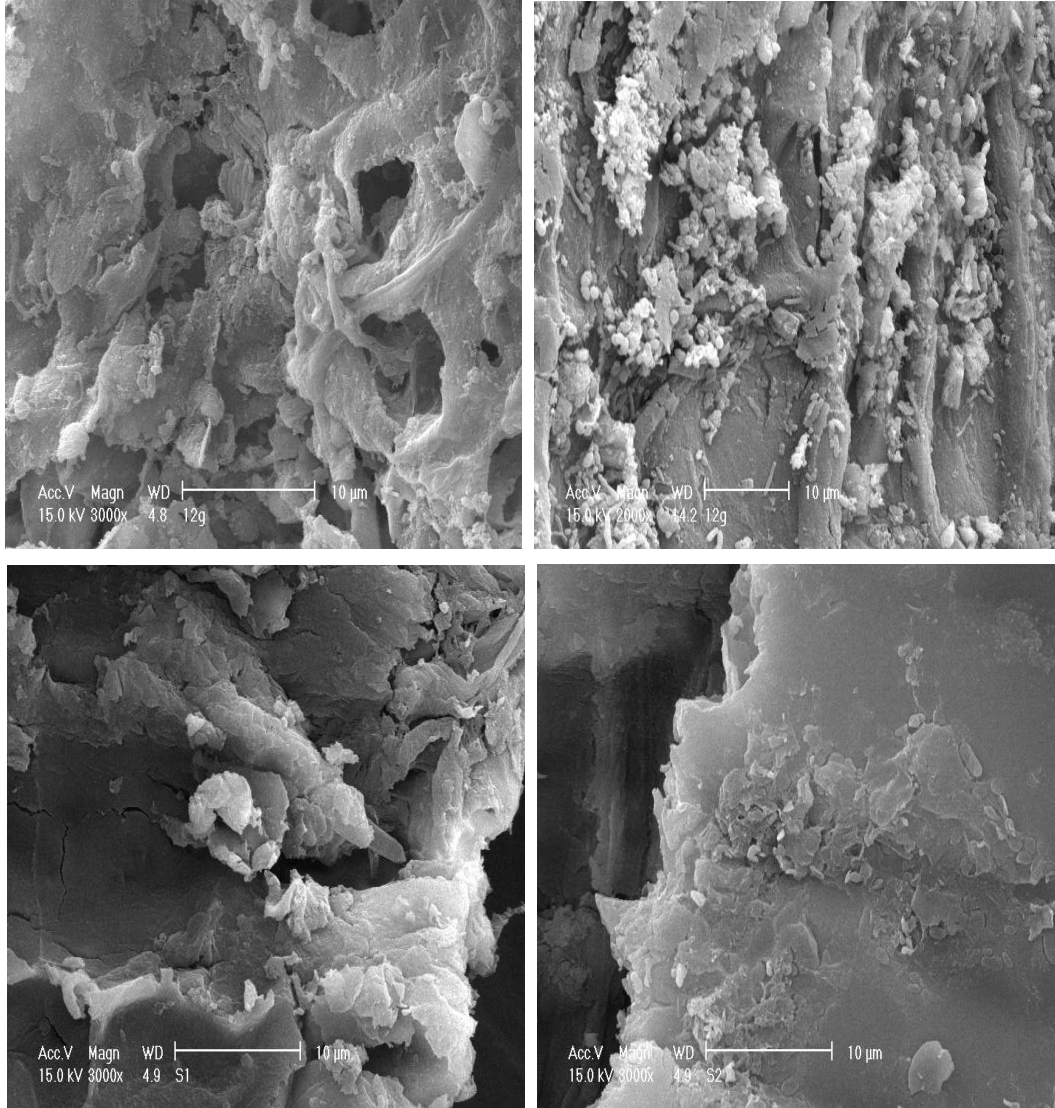


Figure 7-4. SEM (Scanning Electron Microscopy) observations for the surface of *Cordyceps militaris* incubated with mixed anaerobic microbes for 12hours

제 8 절. Cordycepin 강화 우유를 생산하기 위한 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정사용량 결정을 위한 사양연구

1. 연구 수행 내용

본 연구는 식물성 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 높은 수준으로 수준별 짚소사료에 배합한 다음, 착유중인 젖소에 일정기간 급여하였을 때, 혈중 항산화활성 및 유성분과 혈액 및 우유내 cordycepin 함량을 조사하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정급여수준을 결정하고자 본 연구를 실시하였다.

2. 시험방법

본 연구는 cordycepin 강화 우유생산을 위하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체(참여기업 유진바이오팜 제공)의 비유기 착유우에 대하여 사료내 균사체 첨가수준을 달리하여 급여하였을 때, 우유중 cordycepin 함량 및 혈중 항산화효소활성에 미치는 영향을 조사하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정수준을 결정하고자 실시하였다.

본 연구는 착유우 20두를 공시하여 대조구와 세 수준의 첨가구(3, 6, 9%)로 나누어 각 처리군당 각각 5두씩 배치하여 경남 진주시 소재 착유우농가에서 실시하였다. 1년 차 시험결과에서 동충하초 cordycepin의 우유내 전이율이 매우 낮게 조사되었기 때문에 본 실험에서는 동충하초의 첨가수준을 한우와는 달리 3%를 기준으로 증가하는 방향으로 설정하였다. 처리군의 밀리타리스 동충하초 균사체의 사료내 급여수준은 짚소의 일일 두당 사료섭취량기준(20kg 건물기준)으로 해당 처리군 사료의 균사체 비율을 급여하였고, 급여방법은 현장농가의 사료급여방식(기초사료)에 밀리타리스 동충하초 균사체를 탑드레싱(top dressing)하였다. 이에 따라 기초사료를 대조구로 설정하였다. 농장 급여사료(기초사료)의 화학적 성분과 밀리타리스 동충하초 균사체의 화학적 성분은 Table 8-1에 나타내었다.

가. 실험설계

경남 진주시 소재 착유우 농장에서 본 사양시험을 실시하였고, 평균 산차는 2.3산이었고, 산유일수는 평균 138.2일인 착유우 20두를 선발하여, 구역(pen) 당 5두씩 배치하였다. 실험사료 급여는 오전(05:00 a.m.)과 오후(17:00 p.m.)로 나누어 2회 급여 자유채식시켰고 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였다. 그리고 본 사양시험에 들어가기

전에 실험사료에 대한 적응을 위해 2주간의 예비사양기간을 두었으며, 본 실험은 60일간 지속되었다.

Table 8-1. The chemical composition of floral *Cordyceps militaris* mycelia and basal diet

Items	Treatments	
	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	Basal diet
	% of dry matter	
Moisture	10.10	23.34
CP ¹	73.23	16.40
EE ²	1.42	3.65
CF ³	11.58	20.03
CA ⁴	2.99	7.41
NFE ⁵	10.78	52.51
Cordycepin	0.10	

¹crude protein; ²ether extract; ³crude fiber; ⁴crude ash; ⁵nitrogen-free extract; ⁶total digestible nutrients, TDN value was calculated according to the regression equation described by Wardeh (1981).

나. 시료채취 및 조사항목

(1) 채혈

혈액은 사양시험 종료 후, 혈중 cordycepin 함량을 조사하기 위하여 오전사료 급여 전 미근부 혈관을 통하여 10mL heparin처리 vacutainer (Becton-Dickinson, Inc.)를 이용하여 채취하였으며, 파쇄얼음이 보존된 아이스박스에 채취한 혈액을 보관하였다.

그리고 채혈작업이 종료되면 효소(GSH-Px)분석용 혈액은 혈구와 혈장분리를 위해 아이스박스에서 혈액을 꺼내어 온도가 4℃로 유지된 원심분리기에서 3,000×g, 15분간 원심 분리하였으며, 혈장과 전혈은 실험실로 운반하여 분석 시까지 -75℃ 냉동고에 보관하였다.

(2) 우유 채취

사양시험이 진행되는 동안 유성분 및 우유내 cordycepin 함량을 분석하기 위하여

본 실험 실시 후 30일 단위로 즉, 30일, 60일 째에 아침저녁 우유를 동량으로 pooling 하여 각 시기별로 시료를 채취하였다. 채취된 우유는 분석시까지 -75°C 냉동고에 보관하였다.

(3) 사료섭취량

사료섭취량은 1일 2회 급여량과 다음날 아침 사료급여 전 잔여사료를 수거하여 그 차이에 의해 계산하였다.

다. 분석 방법

(1) 실험사료의 성분 분석

실험사료의 일반성분은 AOAC(1995)방법에 준하여 분석하였다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin함량은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90°C 에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4°C 에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm 의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ column(300mm L \times 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260 nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma-Aldrich사에서 구입한 표준품(No. C3394; $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다.

(2) 우유 및 혈액내 cordycepin의 분석

혈액과 우유 중에 존재하는 cordycepin의 분석은 상기 균사체와 동일한 방법으로 분석하였다.

(3) 유성분 분석

사양시험 기간동안 채취한 우유의 성분분석은 Milkoscan 4,000 Series(FOSS Electric Co.)를 이용하여 총 고형물, 무지고형분, 유지방, 유단백질, 유당, 체세포수 및

요소태질소(MUN: milk urea nitrogen)함량을 조사하였다.

(4) 혈장 중 glutathione peroxidase(GSH-Px; EC 1.11.1.9)활성 측정

혈장 내 존재하는 GSH-Px활성은 효소활성 기질로서 cumene hydroperoxide와 hydrogen peroxide를 사용하여 Lawrence와 Burk(1976)의 방법에 따라 spectrophotometer(Shimadzu, Japan) 340nm에서 3분간 10초 간격으로 읽어서 나타나는 slope을 이용하여 각각의 활성을 측정하였고, 아울러 효소를 단백질 단위로 표시하기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 혈장내 단백질을 정량하였다.

다. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 모든 자료는 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 GLM(general linear model)을 이용하여 통계 분석하였다. 우유와 혈중 cordycepin 데이터는 각 개체에 대하여 2회 시료채취(30일, 60일째)결과를 개체별 대표값을 산출하여 각 처리군내 개체반복으로 통계 분석하였다. 처리구간 평균비교는 최소유의차검정(LSD, least significant difference)을 하였고, 유의성 검정은 5%(P=0.05)수준에서 실시하였다(Steel과 Torrie, 1980).

3. 결과 및 고찰

(1) 사료섭취량, 산유량 및 유성분

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여수준별로 젖소에게 60일간 급여하였을 때, 사료섭취량, 산유량 및 유성분조성과 생산량에 미치는 영향은 Table 8-2에 나타내었다. 식물성 기주 밀리타리스 동충하초 균사체를 젖소사료에 최대 9%까지 첨가하였을 때, 사료섭취량에는 유의한 영향을 미치지 않았고, 전반적으로 양호한 섭취량(전 처리군의 평균 20kg 섭취)을 나타내었다.

일반적으로 번데기 기주 동충하초의 경우 불쾌한 냄새로 인하여 다소 사료섭취량이 저하되는 것으로 알려진바 있으나(미발표연구결과), 본 연구에 사용된 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체에 의한 사료섭취량저하현상은 나타나지 않았고, 이에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체가 젖소사료 채식량을 제한하지 않은 것으로 나타났다.

한편, 우유중 요소태질소(MUN)농도를 제외한 산유량, 유성분 및 체세포수(SCC)는 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 전반적으로 밀리타리스 동충하초

균사체 급여비율을 사료에 증가시킴에 따라 유단백질 생산량(kg/day)이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 밀리타리스 동충하초 균사체의 영양성분과 밀접한 관계가 있는 것으로, Table 8-1에 나타나 있는 밀리타리스 동충하초 균사체의 영양소함량을 살펴보면 조단백질 함량이 73.23%로 상당히 높은 함량을 나타내었다. 이에 따라 본 연구에서 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여비율을 증가시킴에 따라 유단백질 생산량이 다소 증가한 것으로 판단되며, 균사체의 영양성분 특성이 우유의 성분성상에 반영된 것으로 보여진다.

Table 8-2. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on intakes and milk composition in lactating dairy cows

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	3%	6%	9%		
Dry matter intake (kg/day)	20.86	19.92	20.54	19.25	0.75	0.7265
Milk yield (kg/day)	22.87	23.88	25.73	25.30	2.81	0.6003
Milk fat						
%	4.03	3.97	4.12	4.08	0.60	0.8636
kg/day	0.92	0.95	1.06	1.03	0.14	0.9533
Milk protein						
%	3.34	3.24	3.21	3.27	0.29	0.7710
kg/day	0.76	0.77	0.83	0.83	0.11	0.8818
Total solids						
%	12.29	12.13	12.19	12.15	0.85	0.9571
kg/day	2.81	2.90	3.10	3.07	0.35	0.7471
MUN ⁴ (mg/dl)	12.26 ^c	13.73 ^{bc}	15.97 ^{ab}	17.78 ^a	1.85	0.0284
SCC ⁵ ($\times 10^3$ /mL)	257.30	281.05	261.43	255.52	78.95	0.9761

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ⁴milk urea nitrogen; ⁵somatic cell count.

이에 반하여 우유중 요소태질소농도(MUN, milk urea nitrogen)는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여비율을 증가시킴에 따라 유의하게 증가하였다(P<0.05). 하지만, 전반적으로 모든 처리구는 MUN의 정상수치인 12 ~ 18 mg/dl 범위 내에 있었다. 본 연구결과는 밀리타리스 동충하초 균사체내에 존재하는 다량의 조단백질함량과 반추위내 조단백질의 빠른 분해로 인한 다량의 암모니아 생성으로 기인되며, 다량(9% 이상 급여시)의 밀리타리스 동충하초 균사체를 반추동물사료에 급여할 시에는 추가적인 에너지사료 급여를 통한 에너지와 단백질 간의 균형을 맞추는 것이 중요할 것으로

사료된다.

(2) 혈중 항산화효소(glutathione peroxidase, GSH-Px)활성

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 증가하는 수준으로 착유우에 급여하였을 때 혈장내 글루타치온 퍼옥시데이즈(GSH-Px)활성에 미치는 영향은 Table 8-3과 Figure 8-1에 나타내었다.

Table 8-3. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on plasma glutathione peroxidase activity in lactating dairy cows

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	3%	6%	9%		
 Plasma GSH-Px (Unit ⁴)					
4 weeks	13.09 ^b	17.26 ^{ab}	20.81 ^a	21.15 ^a	2.49	0.0174
8 weeks	13.26 ^b	19.97 ^b	33.06 ^a	38.83 ^a	4.95	0.0016

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ⁴One unit of GSH-Px activity equals 1 nanomole of NADPH oxidized/minute/milligram of protein.

Table 8-3에서 보는 바와 같이 이전 주관기관의 한우사양시험과 유사하게도 밀리타리스 동충하초 균사체가 증가함에 따라 GSH-Px활성이 유의하게 증가하였으며 (P<0.05), 특히 6%이상 급여할 시 무첨가구 및 3%급여에 비하여 유의하게 높은 활성을 나타내었다. 하지만, 3%급여할 시에는 대조군에 비하여 활성이 다소 증가할 뿐 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다. 이에 따라 젖소사료에 대한 밀리타리스 동충하초의 급여로 항산화활성이 증가하여 젖소의 건강에도 유익한 것으로 나타났다.

본 결과와 관련한 최근 연구보고에서 cordycepin은 생명체에서 발생하는 각종 활성산소 및 산화질소(NO)에 의한 세포손상으로 보호하는 항산화적 효능이 발표된바 있어(Won과 Park, 2005), 환경적 스트레스에 민감한 젖소에서 우유의 생산성에 유리할 것으로 사료된다.

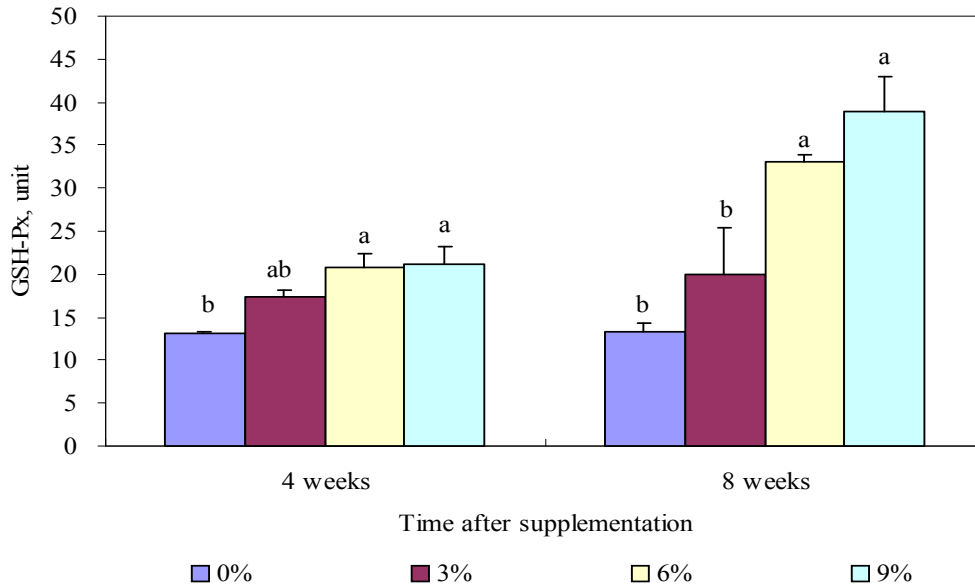


Figure 8-1. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on plasma glutathione peroxidase activity in lactating dairy cows

(3) 혈액 및 우유내 cordycepin 함량

Table 8-4. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on the transfer of cordycepin to blood and milk of lactating dairy cows

Items	Supplementation levels of Cm ¹				SEM ²	P ³ <
	0%	3%	6%	9%		
 Cordycepin					
Whole blood, $\mu\text{g}/\text{mL}$	ND ^b	0.324±0.19 ^a	0.392±0.20 ^a	0.410±0.15 ^a	0.070	0.0025
Milk, $\mu\text{g}/\text{mL}$	ND ^b	0.167±0.10 ^a	0.195±0.17 ^a	0.182±0.09 ^a	0.046	0.0370
Daily milk secretion, mg/head	ND ^b	3.97±2.41 ^a	5.00±4.32 ^a	4.62±2.28 ^a	1.174	0.0387
Daily milk transfer, %	ND ^b	0.66±0.40 ^a	0.42±0.36 ^a	0.26±0.13 ^a	0.112	0.0096

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the mean; ³significant if P<0.05; ⁴ND: not been detected, which was assumed arithmetically zero at statistical processing.

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 증가하는 수준으로 착유우에 급여하였을 때, 혈액과 우유내 cordycepin 전이에 미치는 영향은 Table 8-4에 나타내었다. 이번 실험은 1년차 cordycepin의 우유내 전이가능성을 조사한 예비실험결과를 바탕으로 처리구의 증가 및 처리구당 공시두수를 증가시켰다. 하지만 조사된 항목들에서 개체별로 큰 차이가 조사되었는데, 우유내 cordycepin 함량의 경우 범위가 0~0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 검출되지 않는 개체들도 나타났다. Table 8-4에는 개체간의 큰 변이 때문에 조사된 평균값에 표준오차값(\pm)을 표시하였다. 대조구에 비하여 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군들의 우유 및 혈액내 cordycepin 함량은 유의적 ($P < 0.05$)으로 증가하였다. 하지만, 균사체 첨가수준간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하루 동안 우유로 전이된 cordycepin의 총량도 대조구에 비하여 첨가군들이 유의적으로 높았다. 따라서 첨가 수준이 높아질 수록 cordycepin의 섭취량이 증가하는 반면, 우유로 이행되는 양은 처리구간 큰 차이가 없기 때문에 첨가수준이 증가할 수록 우유내 전이율은 유의성은 없지만 낮아지는 것으로 나타났다. 본 실험에 사용된 동충하초의 cordycepin 함량 (0.10%)은 1년차에서 사용했던 것에 (0.16%) 비하여 낮게 나타났다. 따라서 본 실험의 6% 첨가 수준에서 공급된 cordycepin의 양은 1년차에서 3% 수준에서 공급한 양과 비슷하게 계산되었다. 그러므로 본 실험에서는 실질적으로는 cordycepin의 공급량을 1년차에 비하여 증가 급여시킨 것은 9% 수준이며, 3% 수준은 1년차에 비하여 감소 급여하게 된 결과를 얻게 되었다. 하지만 1, 2년차에 조사된 우유내 cordycepin의 함량을 기준으로 볼 때 1, 2년차에 급여한 수준보다 cordycepin의 공급량을 높이더라도 우유내 cordycepin 함량의 증가를 기대하기는 어려울 것으로 사료된다. 경제적인 측면을 고려하면 본 실험에 사용된 3% 수준의 cordycepin 공급량을 선택하는 것이 바람직하겠지만, 3% 수준에서 검출되지 않은 개체수 (2두)가 다른 수준들에 비하여 (6%, 9% 각각 1두) 상대적으로 많았기 때문에 보다 균일한 결과를 얻기 위해서는 6% 수준을 선택하는 것이 바람직하다고 사료된다.

제 9 절. 비유시기별 적정 사용량에 대한 우유 중의 cordycepin 변화 구명

1. 연구 수행내용

본 연구는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 6%수준으로 비유기 젖소사료에 배합한 다음, 비유초기 젖소에 6개월간 급여하였을 때, 혈액 및 우유내 cordycepin 함량을 조사하여 비유시기별 변화양상을 조사하고자 실시하였다.

2. 시험방법

본 연구는 착유우 10두를 공시하여 대조구(균사체 무첨가)와 처리구(균사체 6%첨가)로 나누어 각 처리군당 각각 5두씩 배치하여 경남 진주시 소재 착유우농가에서 실시하였다. 처리군의 밀리타리스 동충하초 균사체의 사료내 급여수준은 젖소의 일일 두당 사료섭취량기준(20kg 건물기준)으로 해당 처리군 사료의 균사체비율로 급여하였고, 급여방법은 시험농장의 급여사료(기초사료)에 밀리타리스 동충하초 균사체를 top-dressing하여 급여하였다. 기초사료는 지역소재 TMR공장에서 생산되는 섬유질배합사료(TMR, total mixed ration)를 사용하였다. 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체와 농장 급여사료(기초사료)의 화학적 성분비는 Table 9-1에 나타내었다.

가. 실험설계

경남 진주시 소재 착유우농장에서 본 사양시험을 실시하였고, 평균 산차는 1.9산, 비유일수 42.2 ± 15.05 일인 비유초기 착유우 10두를 공시하여, 구역(pen) 당 5두씩 배치하였다. 실험사료 급여는 오전(05:00 a.m.)과 오후(17:00 p.m.)로 나누어 2회 급여 자유 채식시켰고 물은 자유로이 음수할 수 있도록 하였다. 그리고 본 사양시험에 들어가기 전에 실험사료에 대한 적응을 위해 1주간의 예비사양기간을 두었으며, 본 실험은 24주(6개월)간 지속하였다.

나. 시료채취 및 조사항목

(1) 채혈

혈액은 사양시험 종료 후, 혈중 cordycepin 함량을 조사하기 위하여 오전사료 급여 전 미근부 혈관을 통하여 10mL heparin처리 vacutainer (Becton-Dickinson, Inc.)를 이용하여 4주 단위로 채취하였으며, 파쇄얼음이 보존된 아이스박스에 채취한 혈액을 보관하였다. 그리고 채혈작업이 종료되면 실험실로 운반하여 분석 시까지 -75°C 냉동고에 보관하였다.

Table 9-1. The chemical composition of floral *Cordyceps militaris* mycelia and basal diet

Items	<i>Cordyceps militaris</i> (plant)	Items	Basal diet (TMR type)
 % of dry matter % of dry matter
Moisture	8.55	Moisture	19.22
CP ¹	74.25	CP	16.98
EE ²	1.16	EE	6.14
CF ³	10.98	NDF ⁶	27.98
CA ⁴	3.45	CA	7.72
NFE ⁵	10.16	NE _L ⁷ , Mcal/kg	1.79
Cordycepin	0.13		

¹crude protein; ²ether extract; ³crude fiber; ⁴crude ash; ⁵nitrogen-free extract; ⁶neutral detergent fiber; ⁷estimated from NRC(2000).

(2) 우유 채취

사양시험이 진행되는 동안 유성분 및 우유내 cordycepin 함량을 분석하기 위하여 본 실험 실시 후 4주 단위로 아침저녁 우유를 동량으로 pooling하여 각 시기별로 시료를 채취하였다. 채취된 우유는 분석시까지 -75°C 냉동고에 보관하였다.

(3) 사료섭취량

사료섭취량은 1일 2회 급여량과 다음날 아침 사료급여 전 잔여사료를 수거하여 그 차이에 의해 계산하였다.

다. 분석 방법

(1) 실험사료의 성분 분석

실험사료의 일반성분은 AOAC(1995)방법에 준하여 분석하였다. 밀리타리스 동충하초 균사체내 cordycepin함량은 Cunningham 등(1951)이 사용한 과정을 거쳐 추출하였다. 동충하초균사를 90℃에서 6시간 동안 끓는물에서 추출하고 여과 후 2배량의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 증발회전농축기(Rotavapor R-114, Buchi, Switzerland)를 이용하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. Column은 Waters(USA)사의 μBondapak C₁₈ column(300mm L × 3.9 mm ID)을 사용하였으며, 검출기는 JASCO UV detector(260 nm)를 사용하였다. Cordycepin 함량은 검출기에 나타난 peak 면적을 Sigma-Aldrich사에서 구입한 표준품(No. C3394; C₁₀H₁₃N₅O₃; MW 251.2)으로 작성한 표준선으로부터 산출하였다.

(2) 우유 및 혈액내 cordycepin의 분석

혈액과 우유 중에 존재하는 cordycepin의 분석은 상기 균사체와 동일한 방법으로 분석하였다.

(3) 유성분 분석

사양시험 기간동안 채취한 우유의 성분분석은 Milkoscan 4,000 Series(FOSS Electric Co.)를 이용하여 유지방, 유단백질, 유당, 체세포수 및 요소태질소(MUN: milk urea nitrogen)함량을 조사하였다.

라. 통계 분석

본 실험에서 얻어진 모든 자료는 SAS package program(2000, release. 8.1 ver.)의 GLM(general linear model)을 이용하여 통계 분석하였다. 처리구간 평균비교는 t-test를 하였고, 유의성 검정은 5%(P=0.05)수준에서 실시하였다(Steel과 Torrie, 1980).

3. 결과 및 고찰

(1) 사료섭취량, 산유량 및 유성분

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 비유중인 젖소에 6개월간 급여하였을 때, 비유시기 전 기간동안 평균 사료섭취량, 체세포수 및 우유중 요소태질소농도를 조사한 것은 Table 9-2에 나타난 바와 같다.

Table 9-2. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on least squares mean of dry matter intake, somatic cell count and milk urea nitrogen during overall lactational period in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm ¹		
Dry matter intake, kg/day	21.38	22.52	0.72	0.9142
Somatic cell count, ×10 ³ /mL	242	314	121	0.4392
MUN ⁴ , mg/dL	16.97	18.32	0.68	0.8759

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴milk urea nitrogen.

표에서 보는 바와 같이, 비유시기 7주에서 31주 전 기간 동안 건물 섭취량, 우유중 체세포수 및 우유중 요소태질소(MUN, milk urea nitrogen)의 평균값은 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군과 무급여군인 대조군 간에 차이가 나타나지 않았다. 균사체를 급여하여도 1일 평균 두당 22.5kg의 양호한 섭취량을 나타내었고, MUN농도는 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군에서 18.32mg/dl로 대조군의 16.97보다 다소 높은 값은 있으나, 두 처리군 공히 정상적인 수준을 나타내었다.

상기의 결과는 이전의 연차연구와 유사한 결과를 나타내었고, 밀리타리스 동충하초 균사체가 비유중인 젖소의 섭취량에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 하지만, 밀리타리스 동충하초 균사체 자체의 높은 조단백질함량(Table 9-1, 74.25%)이 사료전체의 단백질 함량을 높여 에너지 · 단백질 의 불균형을 초래할 수 있으므로 충분한 에너지가 공급되어 우유중 요소태질소가 기준치 이상 (>19mg/dl) 상승하지 않도록 사료배합시 세심한 주의가 요구된다.

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체급여가 비유기간동안 산유량, 유지방, 유단백 및 유당생산량의 변화에 미치는 영향은 Table 9-3에서 9-6 및 Figure 9-1에서 9-4에 나

타난 바와 같다. 표 및 그림에서 보는 바와 같이 유단백생산량을 제외한 산유량, 유지방 및 유당생산량에는 비유기간이 지속됨에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군과 비급여군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다.

Table 9-3. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on changes for milk yield in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm ¹		
..... Milk yield (kg/d)				
11 weeks	27.75	27.34	2.11	0.8472
15 weeks	28.93	29.26	2.35	0.8885
19 weeks	28.78	29.27	2.72	0.8596
23 weeks	27.34	28.76	2.53	0.5813
27 weeks	26.77	27.38	2.39	0.8001
31 weeks	26.61	26.92	2.29	0.8949
Mean	27.70	28.16	0.59	0.4561

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05.

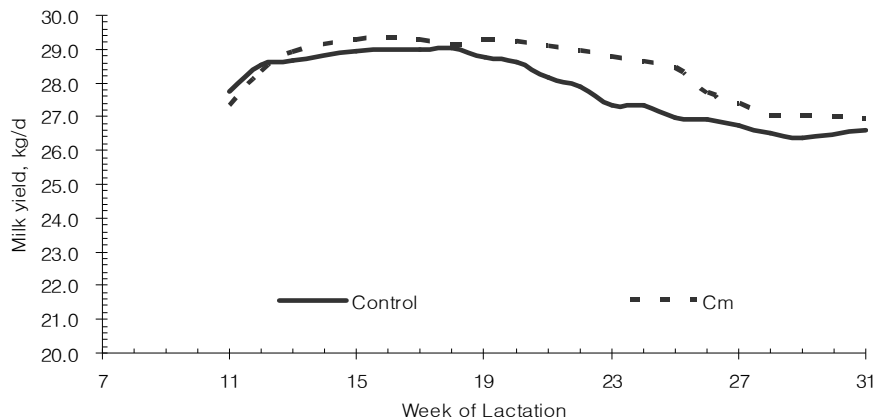


Figure 9-1. The pattern of milk yield by dairy cows fed floral *Cordyceps militaris* mycelia or non supplement diet during lactational period.

Table 9-4. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on changes for percentage and yield of milk fat during lactational period in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm ¹		
 Milk fat (%)			
11 weeks	3.60	3.80	0.23	0.3850
15 weeks	3.69	3.63	0.24	0.7808
19 weeks	3.71	3.75	0.26	0.7466
23 weeks	3.80	3.85	0.26	0.5095
27 weeks	3.90	3.79	0.21	0.8930
31 weeks	4.26	4.04	0.19	0.8640
Mean	3.83	3.81	0.11	0.8588
 Milk fat (kg/d)			
11 weeks	1.00	1.04	0.09	0.5105
15 weeks	1.07	1.06	0.09	0.6614
19 weeks	1.07	1.10	0.10	0.9522
23 weeks	1.04	1.11	0.10	0.3862
27 weeks	1.04	1.04	0.09	0.8878
31 weeks	1.13	1.09	0.07	0.9963
Mean	1.06	1.07	0.03	0.7185

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05.

Table 9-5. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on changes for percentage and yield of milk protein in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm ¹		
..... Milk protein (%)				
11 weeks	2.76	2.96	0.09	0.0398
15 weeks	2.69	2.84	0.10	0.1476
19 weeks	2.78	2.91	0.10	0.2183
23 weeks	2.88	3.05	0.09	0.0604
27 weeks	2.91	3.04	0.11	0.2752
31 weeks	2.94	3.06	0.11	0.2761
Mean	2.83	2.98	0.05	0.0200
..... Milk protein (kg/d)				
11 weeks	0.76	0.81	0.06	0.4724
15 weeks	0.78	0.83	0.06	0.3983
19 weeks	0.79	0.85	0.07	0.4302
23 weeks	0.78	0.87	0.06	0.1630
27 weeks	0.78	0.83	0.06	0.4412
31 weeks	0.78	0.82	0.06	0.4964
Mean	0.78	0.83	0.01	0.0002

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05.

Table 9-6. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on changes for percentage and yield of milk lactose in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm ¹		
..... Lactose (%)				
11 weeks	5.03	5.31	0.21	0.1860
15 weeks	4.75	4.82	0.27	0.7984
19 weeks	4.76	4.79	0.25	0.8986
23 weeks	4.77	4.90	0.26	0.6144
27 weeks	4.83	4.72	0.23	0.6157
31 weeks	4.89	5.06	0.17	0.2971
Mean	4.84	4.93	0.10	0.3527
..... Lactose (kg/d)				
11 weeks	1.39	1.46	0.14	0.6173
15 weeks	1.38	1.42	0.15	0.7555
19 weeks	1.37	1.42	0.17	0.8051
23 weeks	1.33	1.42	0.17	0.5842
27 weeks	1.30	1.29	0.13	0.9846
31 weeks	1.30	1.36	0.12	0.6260
Mean	1.35	1.40	0.03	0.1234

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05.

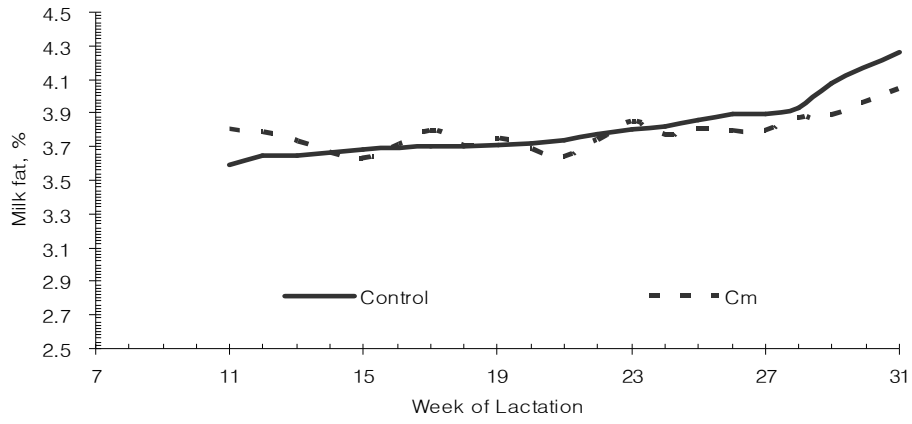


Figure 9-2. Changes for milk fat (%) by dairy cows fed floral *Cordyceps militaris* mycelia or non supplement diet during lactational period.

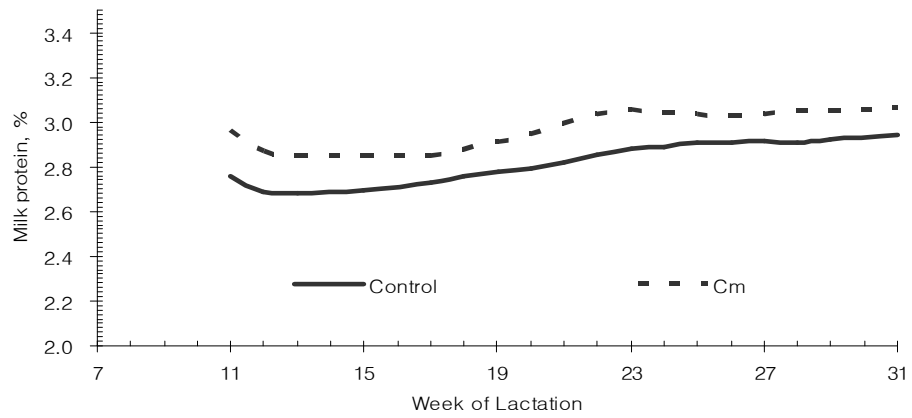


Figure 9-3. Changes for milk protein (%) by dairy cows fed floral *Cordyceps militaris* mycelia or non supplement diet during lactational period.

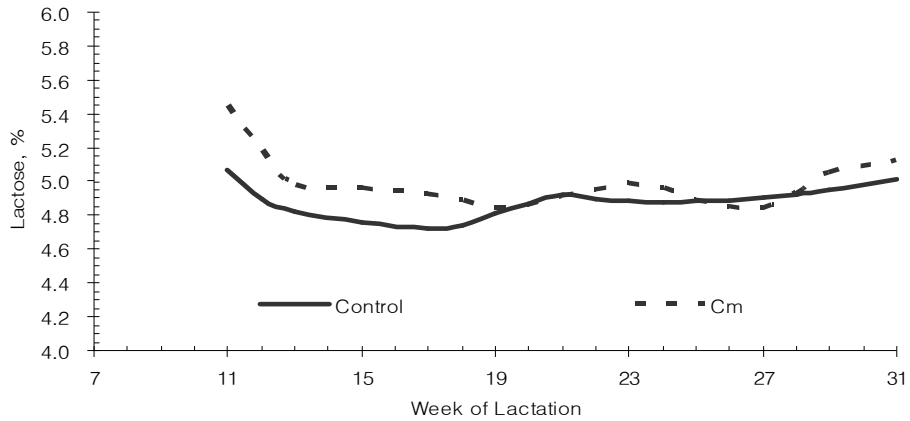


Figure 9-4. Changes for milk lactose (%) by dairy cows fed floral *Cordyceps militaris* mycelia or non supplement diet during lactational period.

그리고 비유기간에 따른 산유량 및 각 유성분비율에 대한 그림은 전형적인 비유곡선을 나타내었고, 전체적인 산유량은 대조군과 급여군 각각 27.7 및 28.16kg/일으로 밀리타리스 동충하초 급여군이 다소 높은 유량을 나타내었다. 아울러 유지방은 대조군과 급여군에서 각각 3.83% vs. 3.81% 및 1.06kg vs. 1.07kg을 나타내어 두 처리군간에 유사하였다.

하지만, 유단백비율 및 생산량은 비유기간 전 기간 평균에서 대조군의 2.83% 및 0.78kg에 비하여 급여군이 2.98% 및 0.83kg으로 유의하게 높았고($P < 0.05$), 특히 비유 11주에 그 효과가 유의하였다($P < 0.05$). 본 결과는 균사체내 다량 존재하는 조단백질 및 질소함량에 기인 한 것으로 사료된다.

(2) 혈중 및 우유중 cordycepin 농도 변화

식물성 밀리타리스 동충하초 균사체급여가 비유기간동안 혈중 및 우유중 cordycepin농도 변화에 미치는 영향은 Table 9-7에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 혈액 및 우유중 cordycepin농도는 기대했던 대로 대조군에서는 전혀 검출되지 않았으나, 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여한 처리구에서는 혈액 중 0.31~0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 우유중 0.18~0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위의 cordycepin이 검출되었다. 혈액과 우유 내 cordycepin 함량은 유의적인 상관관계가 ($P = 0.006$)있는 것으로 조사되었지만 $r^2 = 0.24$ 로 매우 낮았다 (data not shown). 본 실험의 목적은 비유시기에 따른 동충하초의 급여

가 우유내 cordycepin 함량에 미치는 영향을 조사하는 것이었다. 표에서 나타난 바와 같이 비유시기에 따른 동충하초의 cordycepin이 우유로 이행되는 패턴은 일정치 않은 것으로 조사되어, 비유시기는 cordycepin의 우유이행에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 9-7. Effects of floral *Cordyceps militaris* mycelia on cordycepin concentrations in blood and milk in lactating dairy cows

Items	Treatments		SED ²	P ³ <
	Control	Cm ¹		
Whole blood, $\mu\text{g/mL}$				
11 weeks	ND ⁴	0.338 \pm 0.20	0.09	0.005
15 weeks	ND	0.380 \pm 0.17	0.07	<0.001
19 weeks	ND	0.366 \pm 0.24	0.11	0.008
23 weeks	ND	0.328 \pm 0.21	0.10	0.009
27 weeks	ND	0.312 \pm 0.19	0.09	0.007
31 weeks	ND	0.372 \pm 0.22	0.10	0.005
Milk, $\mu\text{g/mL}$				
11 weeks	ND	0.198 \pm 0.13	0.05	0.007
15 weeks	ND	0.250 \pm 0.14	0.06	0.004
19 weeks	ND	0.207 \pm 0.18	0.07	0.019
23 weeks	ND	0.182 \pm 0.09	0.04	0.002
27 weeks	ND	0.255 \pm 0.24	0.10	0.036
31 weeks	ND	0.228 \pm 0.10	0.04	0.001

¹Cm (plant): floral *C. militaris* mycelia; ²standard error of the difference; ³significant if P<0.05; ⁴ND: not been detected, which was assumed arithmetically zero at statistical processing.

본 실험의 결과는 2년차 실험결과처럼 표준오차의 값이 높아, 개체별 차이가 큰 것으로 조사되었으며 또한 개체별 자료에서도 비유시기에 따라 우유내 cordycepin 함량의 변화가 높아 일정한 패턴을 도출할 수가 없었고, 검출되지 않는 경우도 일정수준 나타났다. Cordycepin의 우유내 전이율 범위도 개체별로 0.00~0.95%로 변이가 높았고 매우 낮게 조사되었다. 본 실험은 유일하게 동충하초를 젖소에 급여한 실험으로서, 본 실험의 결과를 뒷받침할 만한 기준에 연구된 자료가 없으며 이를 위해서는 근육,

유선, 소장세포의 cordycepin 이용성에 관한 분자생물학적 접근이 필요하다고 사료된다.

그러나 이러한 결과가 도출될 수 밖에 없는 이유로서 추측 가능한 점은 젖소는 한 우와는 달리 체내 흡수된 미량의 cordycepin이 근육이외에 우유로 매일 분산될 수 밖에 없다는 점이다. 따라서, 이러한 생리적 특징이 미량의 기능성 물질의 급여를 통하여 우유로 전이 가능한 기능성물질은 전이효율의 변화가 매우 큰 것으로 판단된다. 결론적으로 젖소에게 동충하초의 급여를 통한 cordycepin의 우유내 전이는 젖소 개체별 변이가 매우 크며 또한 전이효율이 낮아 농가 기술보급에는 많은 어려움이 따를 것으로 자체 평가된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발의 목표 달성도

본 연구과제를 3년간 수행한 결과, 본 과제에 대한 연구개발 목표달성도를 연구기관별로 구분하여 열거해보면, 먼저 주관기관에서는 1년차에 밀리타리스 동충하초 균사체내 존재하는 cordycepin을 탐색 및 정량하는 분석법을 확립하였고, *in situ* technique을 이용하여 반추위내 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체의 분해패턴을 조사한 후, 실제 비육기 거세한우에 단기적으로 급여해 본 결과 밀리타리스 동충하초 균사체내 존재하는 cordycepin이 전이되는 것을 확인할 수 있었다. 1년차 연구결과를 토대로 2년차에는 비육기 거세한우에 실제 배합할 시 적정수준을 추정하기 위하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 수준별(1%, 2% 및 3%) 급여사양시험을 실시하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 급여수준이 증가함에 따라 근육(후지)과 간내 cordycepin 함량이 유의하게 증가하였을 뿐만 아니라, 혈중 항산화효소(glutathione peroxidase)활성이 수준별로 증가하여 cordycepin 강화 한우고기 생산의 가능성을 높였고, 본 결과로부터 밀리타리스 동충하초 균사체의 비육기 거세한우에 대한 적정사용수준은 혈액 성분과 조직내 cordycepin함량을 감안하여 2%가 적정 경제수준인 것으로 나타났다. 3년차에는 밀리타리스 동충하초 균사체의 적정급여수준(2%)에 대한 적정 급여기간을 결정하기 위하여 1개월, 2개월 및 3개월로 나누어 비육기 한우에 급여하였고, 그 결과 후지 및 간내 cordycepin함량은 급여기간이 증가함에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체 급여군에서 유의하게 증가하였다. 한우육내 cordycepin 적정포화축적기간은 2내지 3개월 사이가 적정한 것으로 나타나 cordycepin 강화 한우고기 생산을 위한 실질적인 사양 급여기술을 완성하였다.

한편, 협동연구기관에서는 1년차에 젖소에 밀리타리스 동충하초 균사체를 급여하기 전에 *in vitro*(체외)상에서 반추위내 발효성상 및 반추위 미생물 군락의 변화를 관찰하였고, 그 결과 밀리타리스 동충하초 균사체가 반추위 혐기성 박테리아와 섬유소 분해 박테리아의 성장을 촉진시키는 역할을 하였지만 동충하초 균사체의 첨가량이 증가할수록 사멸하는 protozoa 수가 직선적으로 증가하였고, 곰팡이 수는 직선적으로 감소하는 것으로 조사되어 동충하초 균사체에는 많은 종류와 양으로 anti-protozoan agents와 anti-fungal agents가 함유되어 있을 가능성이 있는 것으로 조사되었다. 전

자현미경 관찰결과, 일반적으로 밀리타리스 동충하초 균사체의 외부구조는 벚짚이나 옥수수 등과 같은 다른 식물체들보다 물리적으로 상당히 간단한 구조를 갖고 있는 것을 알 수 있었다. 그리고, 우유로 cordycepin 전이 여부를 알아보기 위해 단기간 급여한 결과, 우유내 전이가 가능한 것으로 확인되었다. 하지만, 젖소의 비유생리상 우유에서는 cordycepin이 개체별 심각한 변이를 나타내었다. 우유내 cordycepin이 검출되는 것을 확인한 후, 2년차에는 보다 안정적인 cordycepin 강화 우유를 생산하기 위한 균사체의 적정사용량결정을 위하여 기존 계획서 상에서 계획된 수준보다 높여서 보다 확실한 cordycepin 강화 우유의 생산이 필요할 것으로 사료되어, 급여수준을 3%, 6% 및 9%수준으로 급여한 결과, 우유내 cordycepin이 검출되었으나, 급여수준별 효과는 나타나지 않았고, 처리군내 개체간 변이가 천차만별로 나타났으며, 전이효율 또한 0.65 ~ 0.95%으로 나타나 cordycepin 강화 우유생산의 한계성을 여실히 보여주는 결과였다. 하지만, cordycepin 강화 우유는 젖소의 비유생리와 밀접한 관련을 것이라 가정하고, 본 연구진은 cordycepin 강화 우유연구를 중단하기에는 많은 확신이 서지 않아 보다 확증이 될 만한 결과를 보기 위해서라도 당초 3년차에 계획된 장기급여에 따른 cordycepin함량 변화연구를 추진하기 위하여 비유초기 착유우를 대상으로 24주간 시험을 실시하였다. 그 결과 2년차 연구결과와 상당히 비슷한 결과를 얻었고, 아울러 cordycepin 강화 우유는 본 연구진의 기술을 벗어난 젖소 자체의 미지의 본질적인 부분이 해결되지 않은 한 쉽지 않은 것으로 평가되었다. 다만, 한우의 경우 조직 내에 cordycepin이 축적되는 효과(accumulative effect) 때문에 이행축적이 가능한 것으로 판단되고, 젖소의 경우 착유를 매일 하는 관계로 이행효율이 매우 낮았을 뿐만이 아니라 개체간의 변이도 컸던 것으로 사료된다. 비록 cordycepin 강화우유생산에는 목표달성을 하지 못하였지만, 본 연구진에 의해 얻어진 귀중한 연구결과에서 밀리타리스 동충하초 균사체가 반추위 미생물성장조절 및 항 methane 감소제로 활용가능성을 보여주어 천연물질을 이용한 대체 사료첨가제로서의 가능성을 발견할 수 있었다.

끝으로 얻어진 본 연구결과는 국내외적으로 밀리타리스 동충하초 균사체와 반추동물사양, 특히 한우 및 젖소와 연계한 연구가 전무한 만큼 학술적 및 산업적으로 귀중한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절. 대외 기여도

Cordycepin 강화 한우고기 및 우유생산 기술개발 수행과정에서 얻은 각종 결과들은 다음과 같은 관련 분야의 기술 발전에 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

- 반추동물에 의해 생산되는 축산물내 사양급어를 통한 cordycepin 강화 축산물의 생산은 각종 인체 질병에 대한 효능으로 국민 건강에 기여할 것으로 예상됨.
- 밀리타리스 동충하초 균사체내 다량 존재하는 cordycepin을 탐색 정량 및 분석법을 확립하여 축산물내 codycepin 분석이 가능해 졌음.
- 기존의 값비싼 밀리타리스 동충하초에 비하여 저렴하고 대량생산 가능한 균사체의 개발로 사료보충원으로 활용하여 기능성 축산물 생산에 까지 응용한다는 점에서 농업분야에서의 첨단기술 개발의 기폭제로 작용할 것임.
- 최근 한미 FTA협상타결로 침체된 한우농가에 기술보급으로 기능성 축산물브랜드로서의 효과를 창출하여 농가소득증진에 기여할 것으로 예상됨.
- 최근 well-being의 바람으로 소비자들이 축산물에 대한 기피현상을 보이는데, cordycepin의 인체내 항질병효과를 부각한 기능성 건강 축산식품개발로 침체된 축산농가에 활력소가 될 것으로 예상됨.
- 개발된 기술을 학술지 논문을 통해 관련 연구기관과 산업계에 보급함으로써 브랜드 축산물생산에 대한 과학적인 접근이 가능할 것임.
- 연구과정에서 얻어진 결과를 특허 출원하여 참여기업에 기술이전을 함으로서 산업화에 기여할 것임.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 참여기관(유진바이오팜)에서 대량 생산되는 식물성 밀리타리스 동충하초 균사체를 한우 및 젖소에 급여하여, 궁극적으로 밀리타리스 동충하초 균사체내 인체에 유익한 기능성 생리활성물질로 알려진 cordycepin(3'-deoxyadenosine)을 쇠고기 및 우유에 전이시켜 cordycepin 강화 한우고기 및 우유를 생산하기 위한 기술로서 성공할 경우, 이를 비육한우 및 젖소 사육농가에 관련기술 및 노하우를 참여기업에 보급하여 기능성 브랜드 축산물의 경쟁력을 높이고 농가 소득증진에 기여하고자 하였다.

한우사양연구에서 고기내 cordycepin이 안정적으로 검출되어 cordycepin 강화 한우고기의 생산이 가능하였다. 하지만, 연구진의 노력에도 불구하고 cordycepin 강화 우유의 생산은 비육우와는 달리 젖소 개체간의 우유내 cordycepin농도의 심각한 변이로 인하여 안정적인 강화 우유생산에 한계와 극도로 낮은 전이율을 나타내어 젖소농가에 본 기술을 보급하기에는 미흡한 것으로 사료된다.

본 연구진에 의해 개발된 cordycepin 강화 한우고기생산기술은 현재 특허출원준비중에 있으며, 2009년 상반기나 하반기 특허등록이 가능할 것으로 판단된다. 그리고 희망농가를 상대로 무상으로 기술을 이전하여 무너져가는 축산농가의 회생에 기여할 계획에 있다. 아울러 판매유통망과 희망농가의 적극적인 참여 그리고 안정적인 고기내 cordycepin 품질관리 인증이 어느 정도 확보되면 늦어도 2009년 하순에는 고부가가치 기능성 cordycepin강화 쇠고기가 소비자의 식탁에 오를 수 있을 것으로 예상된다.

아울러 본 연구진에 의해 얻어진 모든 시험연구결과들은 국내외 각종 전문학술지에 원고제출 및 계획 중에 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 없음

제 7 장 참고문헌

- Abe, M., Shibui, H. and Kumeno, F. 1972. Improved method for counting rumen protozoa. Jap. J. Zootech. Sci. 43:535.
- Akin, D.E. and Barton II, F.E. 1983. Rumen microbial attachment and degradation of plant cell walls. Feed. Proc. 42:114.
- Akin, D.E. and Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungus. Appl. Environ. Microbiol. 54:1117.
- AOAC(Association of Official Analytical Chemists), 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed.
- Bauchop, T. and Mountfort, D.O. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. Environ. Microbiol. 42:1103.
- Bauchop, T. 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. Agric. Environ. 6:339.
- Bernalier, A., Bogaert, G. Fonty, G. and Jouany, J.P. 1989. Effect of ionophore antibiotics on anaerobic rumen fungi. In; The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. p. 273. OECD/UNE International Seminar. Penambul books.
- Bernalier, A., Fonty, G. Bonnemoy, F. and Gouet, P. 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. Curr. Microbiol. 25:143.
- Bernalier, A., Fonty, G. Bonnemoy, F. and Gouet, P. 1993. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavofaciens*. J. Gen. Microbiol. 139:873.
- Broderick, G. A., Wallace, R. J., Ørskov, E. R., Hansen, L. 1988. Comparison of estimates of ruminal protein degradation by *in vitro* and *in situ* methods. J. Anim. Sci. 66:1739-1745.
- Bronk, J. R., J. G. Hastewell. 1987. The transport of pyrimidines into tissue rings cut from rat small intestine. J. Physiol. 382:475-488.
- Chesson, A. and Forsberg, C.W. 1988. Polysaccharide degradation by rumen

microorganisms. In: The rumen microbial ecosystem. p. 251. Ed. by P.N. Hobson. Elsevier Applied Science. London and New York.

Cheng, K.-J., Forsberg, C.W., Minato, H. and Costerton, J.W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. 595-624.

Coleman, G.S. 1989. Protozoal-bacterial interaction in the rumen. In: The Roles of Protozoa and Fungi in ruminant Digestion (OECD/UNE International Seminar). p. 13. Penambul Books, Armidale, Australia.

Cunningham, K. G., Hutchinson, S. A., Manson, W., and Spring, F. S. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterization. J. Chem. Soc. 51:2299-2300.

Dehority, B.A. 1965. Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. J. Bacteriol. 89:1515.

Flint, H.J. and Thomson, A.M. 1991. The genetic manipulation of rumen bacteria with special reference to fibre digestion. Anim. Feed Sci. Technol. 32:123.

Fonty, G., Gouet, P. and Sante, V. 1988. Influence d'une bactérie méthanogène sur l'activité cellulolytique de deux espèces de champignons du rumen, *in vitro*. Résultats préliminaires. Reprod. Nutr. Dev. 28:133.

Foss, F.M., 2000. Combination therapy with purine nucleoside analogs. Oncology (Huntingt). 14(6 Suppl 2):31-35.

Guo, F.-Q., Li, A., Huang, L.-F., Liang, Y.-Z., Chen, B.-M., 2006. Identification and determination of nucleosides in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. J. Pharm. Biomed. 40:623-630.

Huang, L.-F., Liang, Y.-Z., Guo, F.-Q., Zhou, Z.-F., Cheng, B.-M., 2003. Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS. J. Pharm. Biomed. Anal. 33:1155-1162.

Hungate, R.E. 1966. The rumen bacteria. In: The rumen and its microbes. p.8. Ed by R. E. Hungate. Academic Press, New York and London.

Itabashi, H. and Matsukawa, T. 1979. Studies on the nutritional significance of

- rumen ciliate protozoa in cattle. 3. Influence of protozoa on growth rate, food intake, rumen fermentation and various plasma components in calves under different planes of nutrition. In; Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station(Morioka). 59:111.
- Joblin, K.N. and Williams, A.G. 1991. Effects of cocultivation of ruminal chytrid with *Methanobrevibacter smithii* on lucerne stem degradation and extracellular fungal enzyme activities. Lett. Appl. Microbiol. 12:121.
- Joblin, K.N., Naylor, G.E. and Williams, A.G. 1990. The effect of *Methanobrevibacter smithii* on the xylanolytic activity of rumen fungi. Appl. Environ. Microbiol. 56:2287.
- Joblin, K.N., Campbell, G.P. Richardson, A.J. and Stewart, C.S. 1989. Fermentation of barley straw by anaerobic rumen bacteria and fungi in axenic culture and in coculture with methanogens. Lett. Appl. Microbiol. 9:195.
- Kiho, R. Ukai, S. 1995. Tochukaso (Semitake and others), Cordyceps species. Food Rev. Int. 11:231–234.
- Kodama, E.N., McCaffrey, R.P., Yusa, K., Mitsuya, H., 2000. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase–positive (TdT+) leukemic cells. Biochem. Pharmacol. 1;59(3):273–281.
- Kuo, Y.–C., Tsai, W.–J., Shiao, M.–S., Chen, C.–F. and Lin, C.–Y. 1996. Cordyceps sinensis. Am. J. Chinese Med. Vol. XXIV, No. 2, pp. 111–125.
- Lallas, G.C., Courtis, N., and Havredaki, M. 2004. K562 cell sensitization to 5–fluorouracil– or interferon–alpha–induced apoptosis via cordycepin (3'–deoxyadenosine): fine control of cell apoptosis via poly(A) polymerase upregulation. Int. J. Biol. Markers 19(1):58–66.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F.,1976. Glutathione peroxidase activity in selenium–deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 952–958.
- Li, S. P., P. Li, T. T. , K. W. Tsim. 2001. Phytomedicine 8:207–212.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265–275.
- Marvin–Sikkema, F.D., Richardson, A.J. Stewart, C.S. Gottschal J.C. and Prins, R.A. 1990. Influence of hydrogen consuming bacteria on cellulose degradation by

anaerobic fungi. Appl. Environ. Microbiol. 56:3793.

Mateo, C. D., Stein, H. H. 2004. Nucleotides and young animal health: can we enhance intestinal tract development and immune function? In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Edited by T. P. Lyons and K. A. Jacques. Pages 159–168.

McAllan, A. B. 1980. The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from, the small intestine of steers. Br. J. Nutr. 44:99–112.

McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 224:6049–6055.

Morgavi, D.P., Sakurada, M. Mizokami, M. Tomita, Y. and Onodera, R. 1994. Effects of ruminal protozoa on cellulose degradation and the growth of an anaerobic ruminal fungus, *Piromyces SP.* Strain OTS1, *in vitro*. Appl. Environ. Microbiol. 60:3718.

Mountfort, D.D. and Asher, R.A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 55:1016

Newbold, C.J., Chamberlain, D.G. and Williams, A.G. 1987. The *in vitro* metabolism of DL-lactic acid by rumen microorganisms. J. Sci. Food. Agric. 38:9.

Newbold, C.J. and Hillman, K. 1990. The effect of ciliate protozoa on the turnover of bacterial and fungal protein in the rumen of sheep. Lett. Appl. Microbiol. 11:100.

NRC. 2000. Nutrient requirements of dairy cattle 7th revised edition. National academy press, Washington, D.C.

Oh, S.-W., Kim, S.-H., Song, H.-N., Han D. S. 2003. Comparative chemical compositions of four kinds of tochukaso. Kor. J. Food Sci. Technol. 35:15–22.

Onodera, R., Murakami, K. and Ogawa., K. 1988a. Cellulose-degrading enzyme activities of mixed rumen ciliate protozoa from goats. Agric. Biol. Chem. 52:2639.

Onodera, R., Yamasaki, N. and Murakami, K. 1988b. Effect of inhibition by ciliate protozoa on the digestion of fibrous materials *in vivo* in the rumen of goats and in an *in vitro* rumen microbial ecosystem. Agric. Biol. Chem. 52:2635.

Orpin, C.G. 1983/84. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed. Sci. Technol. 10:121.

Orth, A.B., Denny, M. and Tien, M. 1991. Overproduction of lignin degrading enzymes by an isolate of phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 57:2591.

Pickering, L.K., Granoff, D.M., Erickson, J.R., Masor, M.L., Cordle, C.T., Schaller, J.P., Winship, T.R. Paule, C.L., and Hilty, M.D., 1998. Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotide. Pediatrics Vol. 101 No.2. 242–249.

Roger, V., Bernalier, A. Grenet, E. Fonty, G. Jamot, J. and Gouet., P. 1993. Degradation of wheat straw and maize stem by a monocentric and a polycentric rumen fungi, alone or in association with rumen cellulolytic bacteria. Anim. Feed Sci. Technol. 42:69.

Roger, V., Grenet, E. Jamot, J. Bernalier, A. Fonty, G. and Gouet, P. 1992. Degradation of maize stem by two rumen fungal species, *Piromyces communis* and *Caecomyces communis*, in pure cultures or in association with cellulolytic bacteria. Reprod. Nutr. Dev. 32:321.

SAS. 1996. User's Guide: Statistics, Version 6 Editions. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.

SAS, 2000. SAS/STAT[®] User's guide (Release 8.1 ed.). Statistics, SAS Inst, Inc., Cary, NC.

Salati, L. M., C. J. Gross, L. M. Henderson and D. A. Saviano. 1984. Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-mono-phosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. J. Nutr. 114:753–760.

Sanderson, I. R. and Y. He. 1994. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. J. Nutr. 124:131–137.

Saviano, D. A. and A. J. Clifford. 1978. Absorption, tissue incorporation and excretion of free purine bases in the rat. Nutr. Rep. Int. 17:551–556.

Scharrer, E., and B. Grenacher. 2001. Active intestinal absorption of nucleosides by Na⁺-dependent transport across the brush-border membrane in cows. J. Dairy Sci. 84:614–619.

Scharrer, E., and B. Grenacher. 2002. Properties of Na⁺-dependent nucleoside

transport in the proximal and distal small intestine of cows. *J. Comp. Physiol. B.* 172:191–196.

Schlimme, E., D. Martin, and H. Meisel. 2000. Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *Brit. J. Nutr.* 84(Suppl. 1):S59–S68.

Smith, R. H., and A. B. McAllan. 1971. Nucleic acid metabolism in the ruminant. 3. Amounts of nucleic acids and total ammonia nitrogen in digesta from the rumen duodenum and ileum of calves. *Br. J. Nutr.* 25:181–190.

Stangassinger, M., Chen, X. B., Lindberg, L. E., Giesecke, D. 1995. Metabolism of purines in relation to microbial production. Pages 387–406 in *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. W. V. Engelhardt, S. Leonhardt–Marek, G. Breves and D. Giesecke, ed., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach* (2nd Ed.). McGraw–Hill Book Co., New York.

Stewart, C.S., Duncan, S.H. Richardson, A.J. Backwell, C. and Begbie, R. 1992. The inhibition of fungal cellulolysis by cell free preparations from ruminococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 97:83–88.

Sukhija, P. S., Palmquist, D. L. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202–1206.

Sung, J. M., Lee, H. K., Choi, Y. S., Kim, Y. O., Kim, S. H., Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* 25:231–252.

Sung, J. M., Yu, Y. B., Cha, D. Y. 1998. *Mushroom Science*. p. 569. Kyohaksa, Seoul.

Theisinger, A., B. Grenacher, Rech, K.S. and E. Scharrer, 2002. Nucleosides are efficiently absorbed by Na⁺–dependent transport across the intestinal brush border membrane in veal calves. *J. Dairy Sci.* 85:2308–2314.

Tsutagawa, Y., Hosogai, Y., Kawai, K. 1994. Comparison of mineral and phosphorus contents of muscle and bone in the wild and cultured horse mackerel. *J. Food Hyg. Soc.* 34:315–318.

Uauy, R. 1989. Dietary nucleotides and requirements in early life. In: Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy 9E. Lebenthal, ed). Raven Press, Ltd. New York, NY, pp. 265–280.

Wardeh, M.F., 1981. Models for estimating energy and protein utilization for feeds. Ph.D. Dissertation; Utah State Univ., Logan.

Wasser, S.P. and Weis, A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). Int. J. Med. Mushroom 1:31–62.

Widyastuti, Y., Newbold, C.J. Stewart, C.S. and Ørskov, E.R. 1995. Interactions between rumen anaerobic fungi and ciliate protozoa in the degradation of rice straw cell walls. Lett. Appl. Microbiol. 20:61.

Williams, A.G. and Coleman, G.S. 1988. The rumen protozoa. In; The Rumen Microbial Ecosystem. p. 778. Ed. by P.N. Hobson. Elsevier Applied Science. London and New York.

Williams, A.G. and Withers, S.E. 1991. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. J. Appl. Microbiol. 70:144.

Williams, A.G., Withers, S.E. and Joblin, K.N. 1991. Xylanolysis by cocultures of the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* and ruminal bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 12:232.

Wolin, M.J. and Miller, T.L. 1988. Microbe–microbe interactions. In; The Rumen Microbial Ecosystem. p. 361. Ed. by P.N. Hobson. Elsevier Applied Science, London and New York.

Won, S.–Y., Park, E.–H. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. J. Ethnopharm.. 96:555–561.

Wood, T.M., McCrea, S.I. Wilson, C.A. and Joblin, K.N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. FEMS. Microbiol. Lett. 34:37.

Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y., Wen, H. 1987. Icons of medical fungi from China. Science press, Beijing, China. p. 60–85.

Yooder, R.D., Trenkle, A. and Burroughs, W. 1966. Influence of rumen protozoa and bacteria upon cellulose digestion *in vitro*. J. Anim. Sci., 25:609-612.

Zheng, H.Z., Z.H. Dong, J. She. 1999. Modern study of traditional medicine, vol. 6, Xue Yuan Press, Beijing, p. 99.

Zhou, X., Meyer, C.U., Schmidtke, P., Zepp, F., 2002. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells. Eur. J. Pharmacol. 25:453(2-3):309-317.

Zhu, J. S., Halpern, G. M., Jones, K. 1998a. The Scientific Rediscovery of an Ancient Chinese Herbal Medicine: Cordyceps sinensis: part I. J. Altern. Complement M. 4:289-303.

농림부. 2004. 사료관리법 13조 유해사료의 범위와 기준 개정안. (농림부고시 제 2004-72호).

안병홍, 송성철, 류재숙, 2002. 조사료와 농후사료의 급여비율이 한우 거세우의 성장 및 도체특성에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 44(6):747-756.

이성실, 하종규, 최윤재, 한인규, 문태현, 김창현. 1995. 반추위 곰팡이의 분리·동정과 섬유소 분해효소의 특성 구명 및 이들의 산업적 이용에 관한 연구. II. 볏짚의 화학적 처리와 이의 급여가 축종별 반추위내 곰팡이의 군집변화에 미치는 영향. 한영사지. 19:411.

한국농촌경제연구원. 2003. 보고자료

한국사양표준 한우, 2002. 농림부 · 농촌진흥청 축산기술연구소.

한성일. 1999. 기능성 축산물의 생산 및 소비 전망. 월간축산 12월호

한성일. 2001. 한육우 브랜드 마케팅 차별화 전략. 월간한우 10월호

주 의

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