

식물성 에스트로겐 유사 효능을 갖는 천연추출물을 이용한
거세우 성장 및 육질 개선을 위한 기능성 사료첨가제
개발

Development of Functional Feed Additive for the
improvement of fattening and beef quality of castrated beef
cattle by the natural extracts having estrogen-like action
of phytoestrogen

(주)내츄럴엔도텍

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물성에스트로겐 유사효능을 갖는 천연추출물을 이용한 거세우 성장 및 육질 개선을 위한 기능성 사료첨가제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : (주)내츄럴엔도텍

주관연구책임자 : 김 재 수

세부연구책임자 : 김 재 수

연 구 원 : 곽 보 연

이 권 택

이 재 경

협동연구기관명 : 한경대학교

협동연구책임자 : 황 성 구

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 강 종 구

요 약 문

I. 제 목

식물성 에스트로젠 유사효능을 갖는 천연 추출물을 이용한 거세우 성장 및 육질개선을 위한 기능성 사료 첨가제 개발

(Development of Functional Feed Additive for the improvement of fattening and beef quality of castrated beef cattle by the natural extracts having estrogen-like action of phytoestrogen)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 개발의 목적

본 연구의 최종 목표는 당사가 개발하고 특허등록이 된 성장촉진 효과가 있는 백하수오 등 복합추출물을 이용하여 국내 한우 거세우에서 육량을 증가시킬 수 있는 사료첨가제로 개발하고 동시에 이를 활용하여 육량과 함께 육질을 동시에 향상시키는 사양기술을 개발하여 국내 **축산농가의 소득향상에 기여하고자 함.**

2. 연구개발의 필요성

한미 쇠고기 협상으로 미국산 쇠고기 외에 캐나다와 유럽산 쇠고기의 수입이 가시화 되고 있는 현실에서 한우의 품질제고를 위한 거세우 사양기술의 확립과 보급이 시급한 상황이다. 거세우의 가장 큰 문제인 육량의 감소를 증가시킬 필요함. 성장촉진 잠재력을 지닌 당사의 생약추출물을 활용하여 거세우에서 발생하는 육량 감소를 해결할 수 있는 있고 동시에 육질을 향상시키는 사료첨가제의 개발과 사양기술 개발이 필요한 현실임.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 임상을 통해 phytoestrogen의 기능성이 확인된 하수오, 숙단, 당귀의 각

각의 추출물과 복합추출물 소재의 *in vitro* 및 *in vivo* 에스트로겐 활성을 연구하고 근육세포주(C2C12 cells), 지방세포주(3T3L-1 cells)를 이용하여 성장촉진 기작을 연구하며, 천연추출물의 TBARS를 분석하여 성장촉진과 항산화활성과의 관련성을 조사 연구한다. 또한 이러한 연구 결과를 바탕으로 육성기 및 비육기 거세우에 대한 증체 효과를 확인하는 사양실험을 수행한다.

1. 하수오, 속단, 당귀의 지표물질 선별 및 분석방법 확립

- o 기존 문헌 분석을 통한 생약재의 성분 조사
- o 지표물질의 선별 및 분석 방법 확립

2. 에스트로겐 활성 탐색

- o 하수오, 속단, 당귀 등 생약재의 에스트로겐 활성을 MCF-7 cell을 이용 확인함.
- o 난소절제 된 rat에서 생약재 투여에 의한 에스트로겐 활성을 탐색한다.

3. 사료첨가제로서의 시제품 생산

- o 생약재의 추출수율 탐색

4. 세포주를 이용한 성장촉진효과 탐색

- o C2C12 cell line과 3T3-L1 cell line에 각각의 생약추출물을 투여후 IRS-1과 Glut-4 유전자 및 단백질 발현 정도를 확인한다.

5. 항산화능에 대한 영향을 탐색

- o 생약추출물의 TBARS inhibition 여부를 확인

6. 생약추출물의 반추위내 대사활성에 미치는 영향

- o 생약추출물을 반추위에 투여시 가스발생, pH, 암모니아태질소, 휘발성지방산의 변화를 탐색한다.

7. 생약추출물이 거세 쥐에서 육질개선 가능성 확인

- o 거세쥐에 생약추출물 경구 투여시 증체량 및 사료섭취량, 지질변화, 콜레스테롤 변화 탐색

8. 생약추출물의 홀스타인 거세 비육우 투여 시 증체 가능성 확인

- o 사양실험을 통한 증체량 증가 여부 탐색
- o 전단력, 가열감량, pH, 보수력, 육색, Drip loss 등의 육질 검사를 통한 육질 개선 여부 탐색
- o 등지방두께, 육량지수, 근내지방도, 등심단면적, 지방색, 지육률, 육색, 조직감 등 등급 개선 여부 탐색

IV. 연구개발결과

1. 지표물질 탐색 및 분석조건 확립

- o 문헌 분석 후 Cinnamic acid (하수오), shanziside methylester (속단)를 선별하고 이들의 HPLC 분석 조건을 확립하였음.

2. 에스트로겐 활성 탐색

- o 하수오, 속단, 당귀 각각의 열수 및 유기용매 분획과 복합추출물은 에스트로겐 활성은 보이지 않았고 항에스트로겐 활성이 나타났으며, 백합, 별사상자, 원지, 상백피의 열수추출물은 4ug/ml 수준에서 40% 정도의 에스트로겐 상대 활성을 나타냈음.
- o 난소절제된 rat에서 하수오, 속단, 당귀 추출물 투여시 혈중 에스트로겐 농도, 체중 및 자궁의 무게는 대조군 대비 유의한 차이가 없었고, 대퇴부골밀도는 유의하게 증가하여($p < 0.05$) 식물성에스트로겐의 이로운 역할과 에스트로겐 의존성 발암물질에 대한 안전성을 확인하였다.

3. 지방세포주 및 근육세포주의 증식에 대한 영향

- o 당귀를 제외한 속단, 천궁, 유근피, 천속단, 서목태 추출물은 3T3-L1 cell에 대해 24시간 처리시 400ppm의 농도까지 cell proliferation을 증가시켰음.
- o 3T3-L1 cell에 48시간 처리시 당귀와 천속단은 800 ppm의 고농도에서 세포독성은 없고 cell proliferation을 증가시킴.
- o C2C12 세포주에 대해 천궁과 천속단추출물을 24시간 처리시 cell proliferation을 증가시킴.

4. 항산화능에 대한 영향을 탐색

- TBARS inhibition은 천속단, 천궁, 서목태, 당귀 추출물은 농도 의존적으로 증가하는 결과가 나타났고 특히, 유근피는 5 ppm의 낮은 농도에서도 항산화능이 있는 것으로 나타났음.
- 천속단, 천궁의 경우 250ppm까지 유의적인 차이를 보이며 항산화능이 존재하는 것으로 나타남.
- 서목태, 천당귀의 경우 모든 농도에서 유의적인 차이를 보이며 Inhibition이 증가하는 결과를 나타내었으며, 5가지 생약은 항산화능이 존재하는 것으로 나타났음.

5. 생약추출물의 반추위내 대사활성에 미치는 영향

- T2(하수오+속단)처리군에서 누적가스가 가장 높게 나타나 이들이 좋은 영양소 급원으로 판단되고, 속단추출물이 pH를 변화에 그 효과가 가장 큰 것으로 나타남.
- 암모니아태질소는 속단과 하수오의 단독보다는 혼합 처리한 군에서, 휘발성 질소의 경우 각각의 생약재를 단독으로 처리한 군에서 가장 높게 나타났음.

6. 생약추출물의 홀스타인 거세 비육우 투여 사양 실험

- 실험사료의 급여는 control군에 비행 생체중의 증가경향을 확인함
 - 일당증체량의 변화는 1차측정 때 유의한 차이를 보였고 농도가 높을수록 일당 증체량이 높은 결과를 나타내 천연추출물 첨가제는 육성기에서 비육전기까지 성장에 효과가 있는 것으로 판단됨.
- 보수력은 실험사료에서 유의적으로 높게 나타났고, Drip loss는 3일과 7일에서 효과적으로 감소되었음. 등지방두께는 첨가제 투여군에서 얇게 나타났음.
- 천연생약재(하수오, 속단, 당귀, 천궁, 서목태, 유근피 혼합) 추출물의 급여로 육질의 등급을 높이는 데는 뚜렷한 영향을 미치지 않았지만 증체 및 항산화 효과에 의한 가열감량의 저하 및 보수력 증가로 조직의 물리화학적 특성을 개선시켜 육즙 손실이 적어지고 육우의 맛과 향을 높임으로서 육우산업에 새로운 경쟁력을 갖추게 하는 계기가 될 수 있으리라 사료됨.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

에스트로젠 활성이 확인된 4종의 생약에 대해서는 1건의 국내특허가 출원되었다. 이 4종의 생약에 대해서는 천연물의약이나 건강기능식품 소재로서 개발이 가능하다. 본 연구과제의 소재를 활용하여 2건의 사료첨가제가 등록이 되었고 1건은 당사의

원료를 이용하여 상품화가 되었다. 일부 *in vitro* 실험에서 확인된 증체 및 육질개선 기능성은 추가연구를 통해 기능성을 향상시킬 수 있을 것이다.

본 연구과제의 연구 성과를 바탕으로 Biochemical and Biophysical Research Commucations에 2건의 논문이 투고중이다.

SUMMARY

Objectives: This research was designed to develop functional feed additives to not only increase the body weight gain of beef cattle but also improve beef quality with new proprietary phytoestrogen of complex plant extracts including *Cynanchum wilfordii* of having the stimulatory effect of physical growth simultaneously, and eventually to help livestock farmers economically.

Methods: *in-vitro* and *in-vivo* studies were performed to investigate the estrogen agonist and/or antagonist action of *C. wilfordii*, *Phlomis umbrosa*, *Angelica gigas* and other new potential phytoestrogen using e-screen test with human breast cancer cell line, MCF-7 and ovariectomized rats.

For observing the physical growth enhancing effect, it was necessary to conduct *in vitro* study using muscle cells (C2C12) and adipocytes (3T3-L1) through the expression of growth-related molecules such as IRS-1 and GLUT-4 and to investigate the correlation between muscle growth and antioxidant activities of natural extracts through the inhibitory action of TBARS, marker of peroxidative cell injury.

Ovariectomized (ORX) rat test was done for the increase of meat mass, the change in feed intake, free fatty acid and cholesterol level. Feeding trial using Holstein steer (castrated cow) was undertaken to investigate if the plant extracts enhance the increase of the body weight as well as meat quality in terms of fat thickness of the back, fat contents in muscle and meat, area of *Longissimus dorsi* muscle, color of fat and meat, mass decrease on heating, juice content, pH change, and drip loss.

Research on the standardization of the phytoestrogen was also done.

Results: Water extracts of *C. wilfordii*, *P. umbrosa* and *A. gigas* inhibited the proliferation of MCF-7 cells showing its estrogen antagonistic action while water extract of *Lilium longiflorum*, *Cnidium monieri*, *Polygala tenuifolia*, and *Morus alba* showed 40% relative estrogen agonistic action at 4 ug/ml.

In ovariectomized rat test, the complex extract of *C. wilfordii*, *P. umbrosa* and *A. gigas* did not increase body and uterus weights without influencing the level of estradiol but significantly increased the femoral bone mineral density ($p < 0.05$) confirming their beneficial action as phytoestrogen and safety against

estrogen-dependent carcinogen as well.

Extracts of *P. umbrosa*, *Cnidii Rhizoma*, *Ulmus pumila*, Dipsaci Radix and *Rhynchosia nulubilis* enhance the proliferation of 3T3-L1 cells with 24 hr treatment up to 400ppm as well as extracts of *C. Rhizoma* and *D. Radix* enhance the proliferation of C2C12 cells with 24 hr treatment showing the stimulatory effect on the proliferation of adipocytes and muscle cells. Extracts of *R. nulubilis* and *A. gigas* inhibit TBARS dose-dependently with significance at all the concentrations while *D. Radix* and *C. Rhizoma* showed the free-radical scavenging effect up to the concentration of 250ppm with significance.

In order to investigate the improvement of nutritional metabolism by the natural extracts in rumen, several parameters after incubation with each extract were measured. Compared to the control, *C. wilfordii* and *P. umbrosa* generated the greatest cumulative gas production showing a good nutrient source for beef cattle and the higher ammonium nitrogen than each of the herbal extract while *P. umbrosa* extract has the greatest effect on pH value and the more of volatile nitrogen than the composite extract.

In castrated Holstein beef cattle test, the body weight of treatment group only tended to increase. With the facts that the difference in the body weight was significant in the first measurement and that the higher concentration the more increase in weight, however, it can be said that the plant extracts has growth stimulating effect during the growing period. In the treatment group, juice content was higher and drip loss was decreased at day 3 and 7. Fat thickness of the back is lower in treatment group. It can be concluded that the plant extracts do not have the effect on upgrading the meat quality but has the beneficial effects on increasing body weight, scavenging free radicals, inhibiting mass reduction on heating, and increasing juice to improve the physical-chemical characteristics of meat tissue showing the loss of juice and improve taste and flavor of beef.

With standard materials isolated and secured for *C. wilfordii* with cinnamic acid and *P. umbrosa* with shanzhiside methylester, respectively. Analysis method for standardization is finalized.

Remarks: After the research, one patent is pending for the 4 different plants with phytoestrogenic actions to be developed as functional foods or natural medicines.

During the course of the research, two feed additives were registered using the plant extracts, and the one has been commercialized. Some of the plant extracts can increase the body weight and improve beef quality in an additional study based on the results of the research. Two papers are submitted in Biochemical and Biophysical Research Communications journal.

CONTENTS

Chapter I. Outline of research	14
Section 1. Purpose and necessity of research	14
Section 2. Scope of research	15
Chapter II. Present status of domestic and foreign technical development ...	16
Section 1. Present status of domestic technical development	16
Section 2. Present status of foreign technical development	16
Chapter III. Contents and results of research accomplishment	17
Section 1. Theoretical approach method	17
Section 2. Contents of research	19
1. Traditional herbs and manufacturing of herb extract	19
2. Characteristics study of herbs	21
3. Analysis of estrogenic activity	24
4. Improvement of meat quality by <i>in vitro</i> method	26
5. Effects on growth-promoting in orchietomized rat(ORX) model	26
6. Effects of herbal extracts on metabolism in rumen fermentation	27
7. Feeding experiment of holstein beef cattle	28
Section 3. Results of research	29
1. Manufacturing and analysis of herbal extract	29
2. HPLC analysis of herbs	30
3. Analysis of estrogenic activity	35
4. Manufacturing feed additive for feeding experiment	45
5. Effects of natural herbal extracts on increasement of meat mass and by <i>in vitro</i> experiment	46
6. Antioxidant activity of natural herbal extracts	52
7. Growth-promoting effect of natural herbal extracts	55
8. Effects of natural herbal extracts on metabolism in rumen fermentation ...	60
9. Weight gain study of castrated beef cattle	63
10. Determination of meat quality grade of castrated beef cattle	67

Chapter IV. Degree of research attainments and contribution to related field ...	79
Section 1. Evaluation of degree of research attainments	79
1. Goal and contents of research	79
2. Degree of first year's research attainment	79
3. Degree of second year's research attainment	80
4. Degree of third year's research attainment	80
5. Final evaluation of study	81
Section 2. Degree of contributions to related field	81
Chapter V. Results and application plans of research attainments	82
1. Utilization and commercialization plan	82
2. Secure plans of intellectual property rights	82
3. Additional study and application plan to related study	82
Chapter VI. References	83

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 1 절	연구개발의 목적 및 필요성	14
제 2 절	연구개발의 범위	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 1 절	국내 기술개발 현황	16
제 2 절	국외 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절	이론적 접근방법	17
제 2 절	연구내용	19
1.	생약재 및 추출물 제조	19
2.	생약특성연구	21
3.	Estrogenic activity 분석	24
4.	<i>In vitro</i> 육질개선	26
5.	거세쥐(OVX) 모델에서 성장촉진효과	26
6.	천연추출물 반추위내 대사활성 실험	27
7.	사양시험	28
제 3 절	연구결과	29
1.	생약재 추출물 제조 및 분석	29
2.	각 생약의 HPLC chromatogram 분석	30
3.	Estrogenic activity 분석	35
4.	사양실험용 사료첨가제 생산	45
5.	<i>In vitro</i> 실험을 통한 천연추출물의 육량증가 및 육질개선 영향 연구...	46
6.	생약추출물의 항산화능	52
7.	거세쥐 모델에서 성장촉진효과	55
8.	생약추출물 반추위내 대사영향 실험	60
9.	거세비육우 증체실험	63

10. 거세 비육우 육질등급 판정	67
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	79
제 1 절 연구목표 달성도 평가	79
1. 연구개발의 목표 및 내용	79
2. 1차년도 연구개발 목표 달성도	79
3. 2차년도 연구개발 목표 달성도	80
4. 3차년도 연구개발 목표 달성도	80
5. 최종평가	81
제 2 절 관련분야 기술발전에 기여도	81
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	82
1. 실용화, 사업화 계획	82
2. 특허 등 지식재산권 확보계획	82
3. 추가연구, 타연구에 활용계획	82
제 6 장 참고문헌	83

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

국내에서는 수입육에 비해 한우가 고품질의 제품으로 인정되고 있다. 이는 한국인의 입맛과 국산제품에 대한 선호와 한우의 상대적인 신선도가 주원인으로 판단된다. 한육우의 소비자 조사에서, 한우고기는 맛과 안전성면에서 우월한 것으로 인식되어, 특히 안전성에 추가비용을 지불할 의사가 있는 것으로 나타났다. 그러나 일찍이 화우를 수입하여 일본인의 입맛에 맞도록 키워 일본에 역수출하고 있는 미국과 호주의 사례를 통해 볼 때, 적당한 가격과 품질을 가진 수입육이 수입되면 고급육으로서 한우의 위상이 위협을 받게 될 가능성이 높다. 호주에서는 국내 프리미엄급 고기샘플을 대상으로 다양한 호주산 품종들과 유전형질을 비교함과 함께 교잡육종 프로젝트를 진행하여 한국인의 입맛에 맞는 고급육을 수출하려고 노력하고 있다.

2008년부터 미국산 쇠고기가 수입이 재개되어 호주, 뉴질랜드산 쇠고기와 함께 한우 시장을 위협하고 있는 형편이다. 수입쇠고기 가격과 한우고기 가격 차이, 한육우 사육두수의 증가와 미국산 쇠고기 수입재개로 인해 한우 산지가격이 큰 폭으로 조정받을 전망이다. 국내에서는 이러한 도전에 대비하여 육종과 사양기술개발, 고급육의 브랜드화를 추진하고 있지만 품종의 확립과 이에 맞는 적절한 사양기술 등에 대한 연구가 필요한 상황이다.

지방이 적은 숫소는 성장속도가 크고 사료효율이 적은 경향이 있어 보통 고기의 수율은 높지만 육질은 낮다. 반면 거세한 숫소는 지방의 축적이 많고 마블링이 잘되어 육질 1등급의 출현율이 개선되고 연도, 다즙성, 향미 등이 개선되나, 비거세우에 비해 증체속도가 감소하고 사료이용효율이 감소한다.(Hunt 1991, Schanbacher 1984) 이는 거세 시 성장호르몬 분비를 촉진하고 성장효과에 중요한 역할을 하는 성호르몬의 분비가 감소하기 때문으로 볼 수 있다.(Lee et. al. 1990) 실제로 거세한 소에는 estrogen 단독 혹은 복합 또는 성장호르몬제를 투여하여 체중 증가를 도모하는 기술이 확립되어 있다.

축산물가공처리법에서는 잔류항생제와 호르몬제에 대해서 엄격하게 규제를 하고 있고 소비자들의 태도가 부정적일 가능성이 높으므로 축산농가에서는 호르몬제나 항생물질을 사용하지 않고 거세우에서 중량을 높일 수 있는 방안을 강구할 필요가 있는 바, 본 연구소에서 개발한 안전한 식물추출물들을 활용하여, 축산자원에 안전하고 효과적인 성장촉진 작용을 이루어 육량 등급을 향상시킬 수 있음은 물론 비육후기에 더욱 다양한 기술을 적용할 수 있어 육질등급을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 최근 유기농 한우고기의 판매가가 2배에 이르고, 소비자 조사결과, 안전성에 추가 비용을 지출할 충분한 의사가 있는 것으로 확인되었는 바, 안전한 생약소재의 사용은 축산물의 브랜드화에 더욱 유리하게 작용할 것이다.

제 2 절 연구개발의 범위

식물성에스트로겐 생약 복합추출물과 IGF-1 분비촉진 효과를 가진 생약재들로부터 유기용매 및 열수추출 또는 생약의 가공 등으로 사료에 적합한 추출물 및 분쇄물을 제조하고 그들의 성장촉진 및 육질개선 관련 기작을 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통해 확인한다. 생약 추출물 또는 분쇄물을 경제적으로 활용하여 제조한 사료첨가제를 이용한 사양실험을 통해 성장촉진 또는 육질개선효과를 확인하고자 본 연구를 진행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

국내에서는 한약재 부산물이나 알코올 발효조사료 등을 이용한 육질개선기술이 확립되어 있다. 그러나 반추위에서 에너지 효율 증가 등으로 사료효율을 증가시키는 것 이외에 거세로 인한 호르몬 변화로 육량 저하를 방지하는 기술은 선진국에 비해 뒤져있다. 현재의 기술로 사육한 한우의 최종 출하무게는 일본의 화우와 비교하여 100kg이상의 차이가 있다. 추가의 육량증가는 성장촉진제로 가능하지만 이는 주로 호르몬 계통이다. 하지만 최근 국내외에서의 안전하고 친환경적인 식품의 요구가 강해짐에 따라 육류에서도 인체건강에 영향을 줄 수 있는 항생제의 사용이 소비자들 사이에서 이슈가 되고 있다. 호르몬제에 대해서는 국내에서는 아직 이슈화가 되지 않고 있으나 잠재적인 위험성은 항생제보다 클 것으로 판단된다. 따라서 국내에서 호르몬제를 이용한 육량증가기술의 적용은 어려울 것으로 판단되고 그 대안이 되는 기술의 개발이 필요한 실정이다..

제 2 절 국외 기술개발 현황

일본에서 2차례 수출된 화우는 미국에서 번식되어 호주와 유럽에서 사육되고 있다. 이들은 화우의 유전정보를 바탕으로 화우의 품종을 연구하고 앵거스와외의 교잡과 사양기술을 활용하여 일본인의 입맛에 맞는 축산물을 생산하기 위해 노력하고 있다. 일본에 역수출하고 있는 미국과 호주의 사례를 통해 볼 때, 적당한 가격과 품질을 가진 수입육이 수입되면 고급육으로서 한우의 위상이 위협을 받게 될 가능성이 높다. 호주에서는 국내 프리미엄급 고기샘플을 대상으로 다양한 호주산 품종들과 유전형질을 비교함과 함께 교잡육종 프로젝트를 진행하여 한국인의 입맛에 맞는 고급육을 수출하려고 노력하고 있다.

Table 1. 국내외 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
영남대	한우체내 지방생합성 조절	미활용
축산기술연구소	한우지방세포배양 및 분화인자	한우지방대사 연구
South Australian Research and Development Inst.	국내 한우의 고급육 샘플 분석	한국인의 입맛에 맞는 품종 및 사양기술개발
Nebraska Univ. USDA	성관련 유전형질과 도체특성	육질개선 관련 육종
Ohio State Univ.	거세, 임플란트, 영양의 도체특성에 대한 영향	사양기술 개발

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 접근방법

거세한 소에는 estrogen 단독 또는 androgen, progesteron과 복합하여 투여하면 성장호르몬의 분비가 증가하여 간의 IGF-1의 생산이 증가하게 된다. Schoonmaker 등의 실험에서 Synovex-C를 임플란트 하기 전까지는 비거세우에서 혈중 IGF-1 농도가 거세우에 비해 39.5% 높았다. 그러나 임플란트 후에는 오히려 거세우에서 IGF-1 농도가 12.2% 더 높아졌다(J. P. Schoonmaker et al., 2002). 즉 성장호르몬의 성장촉진효과는 growth hormone과 IGF-1에 의한 성장효과이다. 이들 성장호르몬은 정상적으로 생체내에서 생성되고 빠르게 불활성화되어 잔류의 문제점이 없다.

이와 같은 이론적 근거를 바탕으로, 본 연구과제에서는 수년간의 연구를 거쳐 성균관대 의대 삼성제일병원에서 1년간 임상시험을 거쳐 그 효능이 확인된 하수오 등 복합추출물을 고부가 축산사료 첨가제로 사용하여, 성장을 촉진시키고, 육질개선을 도모할 수 있는 연구를 진행하고 자 한다. 본 연구소에서는 자체 개발하여 특허 등록된 상기 복합추출물에 대해 성장 호르몬의 경우, 치료군에서는 268%가 증가하였으나, 대조군에서는 42% 증가하는 데 그쳐 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$, Mann-Whitney test). 한편, 혈청 E2, FSH, 혈압 등은 두 군 모두 치료 전후에 차이를 나타내지 않았다.

위와 같은 당 연구소의 실험 결과는 당 연구소에서 개발한 식물 소재가 성장호르몬의 분비를 증가시키고 있음을 밝히고 있어, 이 소재를 사료첨가제로 개발하여 육질개선 및 축산농가의 경제성 향상에 이바지 할 수 있음을 암시하고 있다.

한편, 당 연구소에서는 식물유래 성장호르몬 분비촉진 조성물을 아래와 같이 연구 개발하여 과학적 근거를 확보하였다.

1) 세포실험 (최철석 등, 2002)

가) 당사 개발 식물추출 혼합물 (YGF251)을 9주령의 Sprague Dawley계 래트의 뇌하수체를 처리하여 확보한 세포를 2일간 배양하여 처리

나) 방사선면역 측정법으로 대조군 대비 성장호르몬의 분비를 약 6배 촉진시키는 효과

2) 동물실험 (최철석 등, 2002)

가) 9주령의 Sprague Dawley계 래트를 대조군 6마리, 실험군 7마리로 나누어, 단회 투여 실험에서 대조군은 8시간 후 IGF-1의 농도가 약 26% 감소한 반면, 실험군은 혈중 IGF-1 농도가 약 7% 감소하는 데 그쳐 혈중 IGF-1의 농도가 시간에 관계없이 유지되는 경향을 보임.

나) 3주령의 옹성 Sprague Dawley계 래트를 대조군, 실험군 각각 10마리로 나누어 8 주간

급여 실험에서 대조군 대비 실험군의 대퇴부 뼈의 길이를 6% 증가시킴.

3) 임상실험 (김재수 등, 2002)

가) 상기 YGF251의 인체 혈액중의 IGF-I 분비 증가효과를 검토하고자 40세에서 70세 이하의 성인남녀 40명을 선정하여 무작위로 YGF251 투여군과 위약군으로 배정하여 2개월 간 실시
나) YGF251 투여군에서 투여전 245.6 ng/mL에서, 1개월 투여후 269.3 ng/mL, 2개월 투여후 275.6 ng/mL로 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.05$), 위약군에서는 투여전 280.0 ng/mL에서, 1개월후 239.2 ng/mL, 2개월후 230.2 ng/mL로 유의하게 감소하여 ($p < 0.05$), 투여군의 IGF-I 함량변화율이 1개월후 9.6%, 2개월후 12.2%로 점차 증가하는 것으로 나타났다.

IGF-I의 생체 내 기능에 대해서는 IGF-I 투여에 의한 성장촉진(Blum et. al., 1993), 골격근 재생효과(Shiotani et. al., 2001), 세포 증식효과(Singleton et. al., 2001), 골 무기질 밀도 개선효과(Woods et. al., 2000) 등에 관한 보고들이 있다. 따라서, YGF251 투여에 따른 IGF-I의 주요 작용인 성장기 아동의 신장 증가효과 뿐만 아니라 성인에게는 혈당량 감소, 세포증식, 근력강화, 골격근 재생, 등의 효과도 기대해 볼 수 있을 것으로 추측되며, 이는 동물의 성장촉진을 통해 생산육의 증대에 큰 도움을 줄 것으로 기대할 수 있다.

제 2 절 연구내용

1. 생약재 및 추출물 제조

당사에서 본 과제에 육질개선연구에 사용하는 생약은 한속단(*Phlomis umbrosa*), 하수오(*Cynanchum wilfordii*), 당귀(*Angelica gigas*)로서 세 생약을 각각 또는 1:1:1.077 비로 동량을 사용하여 열수 또는 주정으로 추출한 추출물을 제조하여 실험하였다. 초기 실험에서 성장관련 유효 성분과 분획은 확인이 되지 않았으므로 일반적으로 알려진 성분을 지표성분으로 삼아 추출물에 대한 연구를 진행하였다.

가. 한속단

한속단(*Phlomis umbrosa*)은 국내 자생식물로 중국과 국내에서 자생하며 국내에서는 속단을 일부 대체해 왔다. 현재 국내에서는 대부분 수입산 천속단이 속단으로 사용되고 있으며 한속단은 속단생약으로서 인식이나 사용이 감소하고 있다. 식약청의 자료에 따르면 천속단과 한속단은 모두 속단으로 식품의 주원료로 사용이 가능하다.

한속단의 지표성분에 대해서는 아직 공정서에 올라있지 않고 함유성분으로 알려진 것들은 shanziside methylester, betonicine, umbroside, sesamoside, phloyoside I, II, forsytoside B 등이 알려져 있으며 이 중 Chromadex에서 구입이 가능한 shanziside methylester를 지표물질로 선정하여 분석조건을 확립하였다.

나. 하수오

하수오는 중약에서 적하수오와 하수오 두 가지를 섞어 사용하였으며 중약에서 하수오는 *Cynanchum bungei*(戟叶牛皮消), *C. auriculatum*(耳叶牛皮消), *C. wilfordii*(隔山牛皮消) 세가지가 사용되고 있으며 국내에서는 *C. wilfordii*가 하수오로서 사용되고 있다. (중국 천연약물집 (<http://www.zjtcm.net/wljx/medicine/kejian2/index.HTM>))

하수오의 함유성분은 대표적으로 항암성분인 wilfoside C3N, C1N, C2N, C3G, C1G, C2G, D1N, K1N, M1N, F1N, W1N, W3N, G1G, gagaminine 등과 산, 염기가수분해 산물인 trans-cinnamic acid, penupogenin, caudatin, sarcostin, cymarose, diginose 등이 확인되었다. 당사에서는 소량에서도 검출이 가능하고 상업적으로 구입이 쉬운 cinnamic acid를 지표성분으로 선정하여 분석법을 확립하였다.

다. 당귀

당귀는 국내에서 일당귀와 참당귀가 재배되고 있으며 중국에서는 천당귀가 사용된다. 참당귀는 국내에서만 당귀로 사용되고 있으나 그 효능에 대해서는 일본과 중국에서 항암이나 항산화에 관련하여 연구가 다수 진행되고 있다. 참당귀에는 decursin, decurcinol, 7-demethylsuberosine, umbelliferone, isoimperatorine, xathyletin, nodakenin, angelan 등이 알려져 있으며 당사는 의약품등 시험법에 실린 decursin 분석법을 일부 변경하여 응용하였다.

라. 신규생약소재의 검토

1차년도 연구결과 *in vitro*에서는 증체 및 육질개선에 도움이 되는 결과를 얻지 못하였다. 따라서 본 과제 2차년도 추가연구를 성공적으로 수행하기 위하여 기존의 소재 이외에 기능성을 갖는 소재의 사용을 검토하였다.

1) 천궁

Cnidium officinale Makino 의 뿌리줄기를 건조한 것, 중국에서는 *Ligisticum chuanxing Hort*의 뿌리줄기를 사용한다. 미나리과(Umbelliferae)에 속하고 주요 지표성분은 phthalide 계통인 ligustilide이다. 이 약은 혈관이완, 혈압강하, 혈전형성을 억제하는 기능이 있다. diabetic glomerulopathy(당뇨병성 신사구체증)의 발전과 진행을 막으며 함유성분인 alkylphthalide인 cnidilide, ligustilide, butylphthalide, neocnidilide가 곤충 및 응애에 대한 살충효과와 acetylcholine esterase 저해능을 가지고 있다. 함유성분인 falcarindiol은 NO-mediated neuronal death를 저해하는 기능이 있다. 추출물에는 혈관신생억제-항암효과가 있고 branched α -glucan은 phagocytosis억제 및 anticomplement 활성이 있다.

2) 유백피

*Ulmus pumila Linne*의 껍질로 이노, 해열, 종기에 효과가 있어 소염의 기능성이 있는 것으로 추정된다. 껍질에는 다량의 점액성 고분자물질이 포함되어 있다.

뿌리껍질에는 ulmudiol, dehydroulmudiol, ulmestone, epifriedelanol, friedelin, oleanolic acid, maslinic acid, camaldulenic acid, and arjunolic acid 등의 triterpenoids가 함유되어 있다. sesquiterpenoids인 mansonone E (ME) and mansonone F (MF)는 인간의 암세포에 대해 세포사를 촉진시키는 기능이 있다.

3) 서목태

Rhynchosia nulubilis 약콩, 여우콩이라고도하며 그 추출물에는 수컷쥐의 정자생성을 억제하고 생식기의 변형을 초래하여 불임을 유도하는 기능이 있다. 70% 메탄올 추출물은 estrogen receptor- α 의 발현과 ERE-luciferase 활성을 높였고 MG-63 osteoblastic 세포의 증식을 촉진하여 에스트로겐 활성을 보였다. 또한 IGF-1의 발현을 선택적으로 증가시켰다. 또한 메탄올 추출물에서 위암, 자궁암에 대해 증식억제 효과가 있는 gallic acid methylester, gallic acid, 7-O-galloylcatechin, 1,6-di-O-galloylglucose, 1-O-galloylglucose, trigalloyl gallic acid이 분리되었다.

4) 천속단

*Dipsacus asperoides C. Y. Cheng*의 뿌리, 골절이나 외상의 치료에 사용한다. 한속단과 기원이 다르고 약성에서도 차이가 있어 근래에는 천속단 만이 속단약재로 사용된다. Daucosterol, hederagenin, urusolic acid 등의 성분을 함유한다.

이 식물은 사포닌 분획을 다량 함유하고 있는데 이 분획은 세포의 생존을 증가시키고 LDH의 유출과 malondialdehyde 수준을 뚜렷이 감소시켜 베타아밀로이드에 의한 신경손상을 방지하였다. 한편 조다당체 분획에는 anti-complementary activity, 대식세포의 식작용억제와 함께 임파구에 대한 mitogenic activity 가 있어 면역에 대한 조절기능이 있다.

5) 추가로 원지, 사상자, 백합, 상백피, 사인의 5종 생약에 대해 추출물을 제조하여 에스트로겐 활성을 연구하여 새로운 사료첨가제로서 가능성을 검토하였다.

2. 생약특성연구

가. 각 생약의 추출용매별 지표성분 측정

하수오, 속단, 당귀샘플은 옴니허브와 대흥교역에서 입수하였고 그 내용은 아래와 같다. 참고로 대흥교역의 샘플은 당사의 제품제조용 원료와 같다.

Table 2. 각 생약별 생산지

생약명	대흥교역	옴니허브
속단	중국산, 국산(비교용)	국산(비교용)
하수오	중국산	
당귀	국산	

각 생약을 열수와 70% 주정을 사용하여 추출 건조한 후 각 지표성분을 측정하였다. 각 생약 50그램으로부터 열수추출물을 제조하였다.

나. 각 생약의 지표성분 분석조건

1) 속단

가) 속단 지표물질 shanzhiside methyl ester 전처리 방법

속단분말 3 g을 메탄올 70 mL에 침적하여 55°C에서 2시간동안 환류추출 하였고, 이를 여과하여 감압농축기로 농축하였다. 농축시킨 추출물은 메탄올 50 mL에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 검액으로 사용하였다.

나) 속단 지표물질 HPLC 분석

속단의 지표물질은 shanzhiside methyl ester이며, 이동상으로는 70% acetonitrile과 water를 사용하였다. 지표물질은 HPLC를 이용하여 분석하였으며, Atlantis dC(18 3 µm, 4.6×150mm) 컬럼을 사용하였다. 이동상 유속은 1.0 mL/min으로 고정하고 UV 검출장치의 파장은 235 nm로 고정하였다. 이동상 70% acetonitrile과 water의 조성비를 아래 Table 3과 같이 달리하여 분석하였다.

Table 3. Shanzhiside methyl ester 분석을 위한 이동상의 조성비

min	A: 70% Acetonitrile	B: Water
0	15	85
2	20	80
4	25	75
6	30	70
7	100	0
17	100	0
20	15	85
27	15	85

2) 하수오

가) 하수오 지표물질 cinnamic acid 전처리 방법

하수오 분말 3 g을 0.1 N NaOH 100 mL에 침적하여 55°C에서 1시간동안 반응시키고, 이를 0.1 N HCl로 중화하였다. 추출물은 분획깔대기 상에서 ethyl acetate로 분획한 후 이와 같은 조작을 2회 반복 실시하여 농축하였다. 농축시킨 분획물은 메탄올 50 mL에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 검액으로 사용하였다.

나) 하수오 지표물질 HPLC 분석

하수오의 지표물질은 cinnamic acid이며, HPLC 분석에 사용한 컬럼은 PRONTOSIL EUROBOND를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 water:acetonitrile:MeOH:acetic acid=15:80:5:0.1, B 용매는 water:acetonitrile:MeOH:acetic acid=97:3:0:0.1이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분(0% A), 0~4분(30% A), 4~8분(60% A), 8~12분(80% A), 12~16분(90% A), 16~20분(100% A)으로 조절하였다. 유속은 0.7 mL/min이었으며, UV 검출 장치의 파장은 280 nm로 고정하였다.

3) 당귀

가) 당귀 지표물질 decursin 전처리 방법

당귀분말 3 g을 메탄올 70 mL에 침적하여 55°C에서 2시간동안 환류추출 하였고, 이를 여과하여 감압농축기로 농축하였다. 농축시킨 추출물은 메탄올 50 mL에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 검액으로 사용하였다.

나) 당귀 지표물질 HPLC 분석

당귀의 지표물질은 decursin이며, 이동상으로는 70% acetonitrile을 사용하였다. 지표물질은 HPLC를 이용하여 분석하였으며, PRONTOSIL EUROBOND 컬럼을 사용하였다. 이동상 유속은 1.0 mL/min으로 고정하고 UV 검출장치의 파장은 280 nm로 고정하였다.

다. 수율 및 추출물 중 지표성분 함량 측정

상기 3가지 생약 이외 생약의 특성 및 그 추출물의 특성을 파악하기 위해 아래와 같이 추출실험 및 분석을 진행하였다.

1) 열수추출 및 수율측정

생약재 무게의 10배의 물로 95 - 100°C, 6시간 동안 열수추출하여 여액의 고형분을 측정하였다.

2) 에탄올 추출 및 수율측정

생약재 무게의 10배 부피의 에탄올로 60°C, 2시간 동안 2회 추출하여 여액의 용매를 증류하여 남은 고형분을 측정하였다.

3) 추출물 Chromatogram 분석

각 생약에는 사포닌, 폴리페놀 등 친수성을 가진 물질이 많거나 중성지방이나 정유 등의 친유성분이 많이 함유된 경우가 있어 배합하여 사용시 동이한 추출조건에서 수율이 달라질 수 있다. 또한 각 추출물의 크로마토그램 분석을 통해 차후 분석을 위한 기반을 확보하고자 하였다. 상기 에탄올 추출물을 대상으로 친수성 물질과 친유성 물질에 대한 크로마토그램 패턴을 아래와 같이 작성하였다.

가) 친유성 물질 분석조건

전처리 방법

시료 3g에 메탄올 40ml을 가하여 2시간동안 초음파 추출을 한 후 여과하고, 감압농축기를 사용하여 메탄올을 제거한다. 볼륨메트릭플라스크를 사용하여 메탄올이 제거된 시료를 메탄올 50 ml에 다시 정량적으로 녹인 후 0.45 μ m Membrane filter로 여과하여 검액으로 사용한다.

HPLC Condition

- ① Mobile phase 70% Acetonitrile, isocratic mode
- ② Flow rate : 1.0 mL/min
- ③ Wavelength : UV 280 nm
- ④ Column : PRONTOSIL EUROBOND C18 5.0 μ m(NC-04 250*4.0mm)

나) 친수성물질 분석조건

전처리 방법

시료 3g에 메탄올 40ml을 가하여 2시간동안 초음파 추출을 한 후 여과하고, 감압농축기를 사용하여 메탄올을 제거한다. 볼륨메트릭플라스크를 사용하여 메탄올이 제거된 시료를 메탄올 50 ml에 다시 정량적으로 녹인 후 0.45 μ m Membrane filter로 여과하여 검액으로 사용한다.

HPLC Condition

①. Mobile phase Gradient mode

A : Acetonitrile

B : Water

min	A	B
0	0	100
5	10	90
10	30	70
15	50	50
17	70	30
20	90	10
22	100	0
32	0	100

② flow rate : 1.0 ml/min

③ wavelength : 280 nm

④ column : PRONTOSIL EUROBOND C18 5.0 μ m(NC-04 250*4.0mm)

라. *in vitro* 실험을 위한 계통분획

각 생약의 기능성과 대강의 물성을 확인하기 위해 각 생약의 에탄올 추출물을 계통분획하여 샘플을 제조하여 *in vitro* 실험에 사용하였다.

마. 시생산

사료첨가물로 사용시 경제성을 고려하여 추출물 이외에 생약을 최대한 활용하는 방안을 고려하여 추출물 및 생약박 분말을 제조하였다.

3. Estrogenic activity 분석

가. MCF-7 cell을 이용한 estrogen 활성 확인

MCF-7 cell을 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (50unit/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin)이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 배양한다. 배양된 MCF-7 cell을 24-well-plate에 2.5×10^4 cell/well로 분주하여 간은 배지를 이용해 3일간 배양한 후 배지를 phenol red가 포함되지 않은 DMEM으로 교체하고 시험물질을 투여한다. 24시간째에, 시험물질 및 양성대조물질로서 estradiol을 투여한 후 배양한다. Dose-dependent assay를 위해 estradiol 과 시험물질을 각 농도별 10-1000ug/mL로 각 well에 투여한 후 24시간동안 배양한다. MTT assay로 MCF-7 cell proliferation에 대한 영향을 측정하였다.

나. 낮은 농도에서 estrogenic activity

상기실험에서의 시료처리 보다 낮은 농도 0.0062, 0.032, 0.16, 0.8, 4, 20, 100ug/mL에서 하수오, 속단, 당귀 열수추출물의 에스트로겐 활성을 확인하였다.

다. 난소절제 랫드에서 estrogen 활성의 확인

시험물질1은 하수오(*Cynanchum wilfordii*), 속단(*Phlomis umbrosa*), 및 당귀(*Angelica gigas*)를 국내외에서 구입하여 중량비 1:1:1.077로 배합하여 8-10배의 열수(95-100)로 16시간 정도 추출한 후, 분무건조로 제조하였다.

시험물질2는 시험물질 1 41.21% (백수오 추출물 13.39%, 속단 추출물 13.39%, 당귀 추출물 14.42%)에 L-arginine 14.42%, L-lysine HCl 4.81%, 대두추출물 3.85%, seaweed calcium 29.81%, dried vitamin A 0.12%, 합성vitamin E 0.96%, vitamin C 0.59%, vitamin B1(thiamine hydrochloride) 0.96%, vitamin B6(pyridoxine hydrochloride) 0.32%, vitamin B12(cyanocobalamine) 0.0002%, vitamin D3(cholecalciferol) 0.0008%, biotin 0.012%, nicotinamide 1.75%, ferrous lactate 1.20%의 조성을 무게비로 배합하였다.

Table 4. OVX 동물실험군별 시험물질 및 투여량

실험군	조건	투여량 mg/kg/day
G1	Normal control	0
G2	Sham control	0
G3	OVX control	0
G4	OVX +시험물질1	73.5
G5	OVX +시험물질1	180
G6	OVX +시험물질1	440
G7	OVX +시험물질2	73.5
G8	OVX + 시험물질2	180
G9	OVX + 시험물질2	440

난소절제 Rat에서의 Osteocalcin 및 대퇴부 골밀도 측정

8주령 Sprague-Dawley (SD)계 rat을 구입하여 10일간 순화시켰다. 순화된 rat에 대해 난소 절제술을 시행한 후 3주간의 회복기를 거쳐 Table 1과 같이 9개군으로 나누었다. (군당 7마리)

시험물질은 12주간 sonde를 이용하여 경구투여 하였고 정상군(G1), Sham 대조군(G2), OVX 대조군(G3)은 증류수를 대신하여 경구투여 하였다. 실험종료 시 부검하여 자궁의 절대 중량과 대퇴골의 골밀도를 측정하였다.

또한, 부검 전 하룻밤 절식시킨 후, 실험동물의 복대정맥에서 혈액을 채취하여 -70℃에서 냉

동 보관 후 혈중 호르몬을 측정하였다.

4. *in vitro* 육질개선

가. 근육세포 및 지방전구세포를 이용한 *in vitro* 세포분화능 실험

C2C12 cell을 plate에 1×10^5 분주하여 3시간 동안 안정시킨 후 하수오와 속단으로 0ppm(Control), 100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm씩 각각 처리하여 24시간과 48시간 배양했다. 이후 WST처리로 배양을 정지시킨 후 Microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

위와 같은 방법으로 지방세포주인 3T3-L1세포에 하수오, 속단, 당귀, 천궁, 서목태, 유근피를 농도별로 처리하여 cell proliferation을 실행하였으며 세포독성은 MTT assay 로 평가하였다.

또한 근섬유세포주인 C2C12세포를 이용하여 추출물을 처리하고 24시간 및 48시간 배양이 끝난 후 세포배양액을 제거한 후 PBS로 세척한 후 세포질내 단백질을 획득하기 위한 Lysis Buffer를 이용하여 세포과쇄액을 얻은 후 원심분리하여 세포질액 Sample을 준비하였다. 단백질 함량을 측정한 후 Western blot을 실시하였다. 먼저 SDS PAGE 법을 이용하여 전기영동을 실시한 후 나이론 Membrane에 Transfer한 후 목적으로하는 1차항체를 이용하여 결합을 시킨 후 Washing 하고 2차항체를 결합시킨 후 HRP 효소를 이용하여 발색시키고 X-선 필름에 감광시켜 목적으로하는 밴드를 얻어 단백질 발현량을 분석하였다.

한편, 목적으로 하는 단백질의 RNA 수준에서의 발현량을 조사하기 위하여 C2C12세포를 하수오와 속단으로 처리하여 24시간 또는 48시간 배양한 후 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하고 역전사효소(Reverse Transcriptase)를 이용하여 이들의 cDNA를 획득한 후 각 유전자의 forward 및 backward primer를 이용하여 증폭시킨 후 전기영동을 실시하여 이들의 발현량을 조사하였다.

나. 지방산화 억제능: 천연추출물의 항산화활성을 조사하기 위해서 TBARS를 실시했다. 7주령 rat의 brain을 적출하여 균질화하여 50mM Tris-HCL buffer(p.H 7.4)를 제조했다. 이 뇌실질액을 과산화를 유도하며 이때 각 추출물을 농도별로 투여하여 추출물이 어느 정도 지질과산화물질 생성을 억제하는지 조사함으로써 각 추출물의 항산화활성을 분석하였다. 간략히 실험관에 뇌실질을 기질로 넣고 Sample을 넣어 2시간 배양 후 TBA 측정시약을 시약을 넣어 15분 배양 후 3000rpm에 10분 원심분리하여 535nm에서 plate reader로 흡광도를 측정하여 계산하였다

5 거세쥐(ORX) 모델에서 성장촉진효과

거세한 rat에 생약추출물을 투여할 경우 일어날 생체 내 지표변화를 측정하여 이후 소에 적용 시 필요한 기초정보를 확보하기 위해 실시하였다. 시료는 속단, 하수오, 당귀의 열수추출물, 이 세

가지의 1:1:1.077배합물(시험물질1), 시험물질1 81.055%에 lysine 5%, arginine 13% 그리고 vitamin B1 0.945%를 첨가한 시험물질2를 200ppm/체중100g 농도로 5주간 경구투여 하였다. 실험 종료 후 체중을 측정하고 Ether로 마취시켜 혈액을 채취하여 도살하였으며 즉시 신장주위 및 정소주위의 지방조직을 채취하고 간장을 채취하여 관류 후 분석에 이용하였다.

생약추출물의 대사영향에 대해 증체 및 사료효율, 혈액성분 분석(Glucose, GH, Insulin, FFA, TG, Cholestrol 등), 체지방 축적 및 지방산 조성 등을 조사 및 분석하였다.

6. 천연추출물 반추위내 대사활성 실험

천연추출물의 반추위내 대사활성을 보기위해서 반추위 발효 특성을 조사하였다.

실험은 성환소재의 축산과학원에서 반추위에 캐놀라가 장착된 Holstein 건유우에 반추위액을 채취하여 실험하였다.

실험에 사용한 배지는 반추위액에 McDougall buffer를 혼합하여 사용했다.

Table 5. 반추위내 대사활성 실험을 위한 배지의 조성

Ingredients	Amount
NaHCO3	9.8g
Na2HPO4 2H2O	4.62g
KCl	0.57g
NaCl	0.47g
MgSO4 7H2O	0.12g
4% CaCl2	1ml

각 처리군의 T1은 속단추출분말+하수오추출분말+아미노산 및 비타민류 혼합물을 T2는 속단추출분말+하수오추출분말을 T3는 속단추출분말을 T4는 *in vitro* 당귀 주정 80% 동결건조를 T5는 하수오 추출분말를 T6는 10% feed(하수오+속단+천궁+당귀), T7는 50% feed(하수오+속단+천궁+당귀)로 처리하였다.

가스발생량은 피스톤의 위치를 읽어서 측정하였으며 p.H는 배양액의 pH meter를 이용하여 측정하였고 메탄농도는 48시간동안 배양액을 배양하여 Vial 내 가스를 포집하여 GC를 이용해 측정했다.

반추위내 휘발성 지방산의 측정은 Erwin 방법에 의해 수행하여 GC로 측정했다. 암모니아태질소의 측정은 Chaney and Mabach의 방법을 수행하여 측정하였다.

7. 사양시험

가. 1차 사양시험

9(2-마)에서 시생산한 사료첨가제를 부형제(소맥피 분말)를 혼합하여 10%, 50%의 첨가제를 함유하도록 조제하였다. 거세가 끝나고 안정된 홀스타인 3개월령 송아지 각 시험구당 8두씩 총 24두를 선발하여 개시체중(120 kg)이 동일하도록 임의 배치하였다. 사료는 시판 송아지사료를 평균 체중의 1.5%에 달하는 양을 동일하게 급여하였다. 시험군은 상기 두 가지 농도로 25 g/두의 사료첨가제 혼합제를 사료위에 뿌려 급여하였다. 3개월 후 체중 측정하여 일당증체량을 조사하고 사료섭취량 조사, 한약재의 증체 촉진 가능성 검토체중을 측정하여 증체량을 구하였다.

나. 2차 사양시험

시험군은 1차 사양시험측정 후 3개월간 육성우 사료에 상기 사료첨가제 혼합제를 두당 하루 25g 씩 섞어 급여하였다. 급여 3개월 후 육성기(1, 2차 사양시험 9개월 소요)에서 체중 측정하여 일당증체량을 조사하고 사료섭취량 조사, 한약재의 증체 촉진 가능성 검토체중을 측정하여 증체량을 구하였다.

다. 3차 사양시험

시험군은 1, 2차 사양시험과 동일한 양의 사료첨가제를 비육전기 사료(농후사료5~7kg, 볏짚, 사료첨가제 25g/두)에 섞어 급여하였다. 시험기간은 총 13개월 동안 실시되었으며 개시체중 이후 총 4번의 체중을 측정하였고 도축 시 종료체중을 측정하여 생체중 및 증체량을 측정하였다. 도축일은 각 군별로 차이가 있었으며 차이에 따른 섭취량은 계산했다.

도축 후 축산물 등급판정소에서 등급 판정을 받았으며 이후의 Sample을 받아 물성 검사를 실시하였다.

물성검사에 이용된 Sample은 등심부분을 사용하였으며 각 전단력, 가열감량, 보수력, 육색, pH, Drip loss를 측정하였다.

물성검사의 가열감량은 20g의 sample을 80℃의 온도로 water bath로 30분 가열 후 30분 방냉하여 무게를 측정한다. 전단력은 가열감량에 측정 때 이용한 Sample을 이용하고 Rheotech를 사용하여 측정하였다.

육색은 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 보수력은 압착판에 No2. Filter paper를 고정시킨 후 Sample 0.3g를 올려 2분 간 압착 시킨 후 수분에 의한 퍼진 면적을 Digital planimeter로 계산하여 측정했다.

pH는 Sample 5g을 균질화하여 pH meter로 측정하였다.

제 3 절 연구결과

1. 생약재 추출물 제조 및 분석

옴니허브와 대흥교역에서 입수한 생약을 추출 건조한 후 각 지표성분을 측정하였다. 분말화가 어려운 당귀는 텍스트린을 30%첨가하였다.

가. 각 생약재의 추출 수율

1) 하수오, 속단, 당귀 생약 50그램의 열수추출물 수율은 아래 Table과 같다.

Table 6. 각 생약 50g의 열수추출 수율

생약명	추출물 중량	고형분수율	추출물 조사포닌 함량
하수오/중국산 대흥교역	11.42g	22.8%	378.6mg/g
속단/중국산 대흥교역	5.24g	10.5%	167.5mg/g
당귀/국산	14.86g	29.7%	179.6mg/g

2) 천궁, 유백피, 서목태 생약의 열수추출 및 수율측정

생약재 무게의 10배의 물로 95 - 100℃, 6시간 동안 열수 추출하여 여액의 고형분을 측정하였고 추출 수율을 다음 Table에 나타내었다.

Table 7. 천궁, 유백피, 서목태 생약의 열수추출 수율

생약재	천궁	유백피	서목태
생약재 무게(g)	31.18	35.48	31.41
고형분의 무게(g)	10.09	2.72	11.51
수율(%)	32.36	7.67	36.64

3) 천궁, 유백피, 서목태 생약의 에탄올 추출 및 수율측정

생약재 무게의 10배 부피의 에탄올로 60℃, 2시간 동안 2회 추출하여 여액의 용매를 증류하여 남은 고형분을 측정하고 추출수율을 다음 Table 8에 나타내었다.

Table 8. 천궁, 유백피, 서목태 생약의 에탄올 추출 수율

생약재	천궁	유백피	서목태
생약재 무게(g)	100	100	30
고형분무게(g)	19.63	8.93	5.85
수율(%)	19.63	8.93	19.50

열수 추출 및 에탄올 추출 수율은 각각의 생약재마다 차이를 나타내고 있고 가장 높은 수율을 보이는 생약은 서목태로서 열수추출시 36.64%로 나타났고 제일 낮은 수율은 유백피로 에탄올 추출시 8.93%로 나타났다. 그러나 대부분의 생약은 전체적으로 20%근처에서 추출 수율을 보이고 있음.

2. 각 생약의 HPLC chromatogram 분석

가. 분석조건 확립

1) *Phlomis umbrosa* 추출물

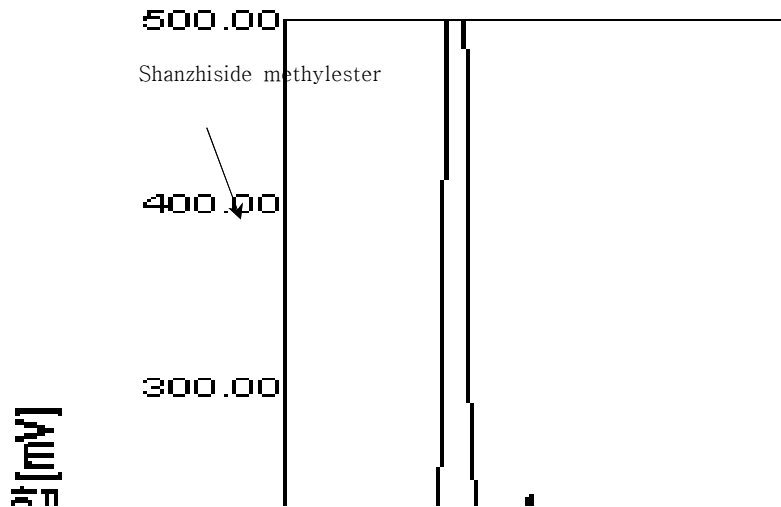


Fig. 1. Chromatogram of *Phlomis umbrosa* extract.

2) *Cynanchum wilfordii*

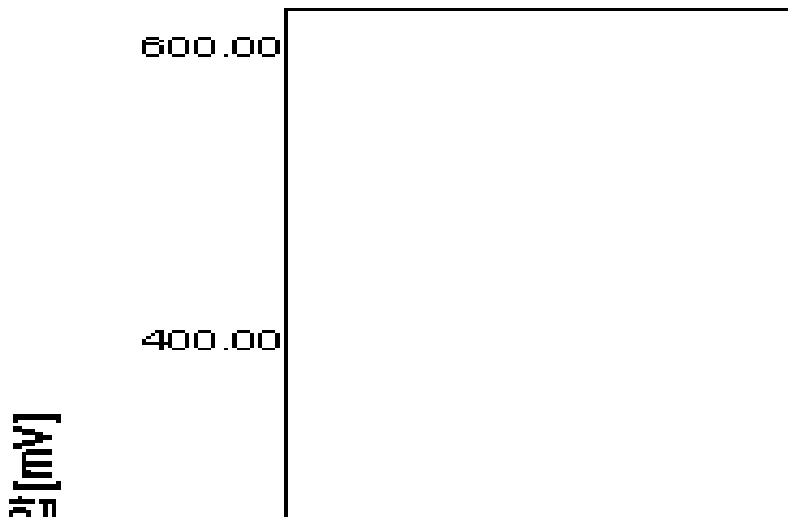


Fig. 2. Chromatogram of alkali hydrolyzed extract of *Cynanchum wilfordii*.

3) *Angelica gigas*

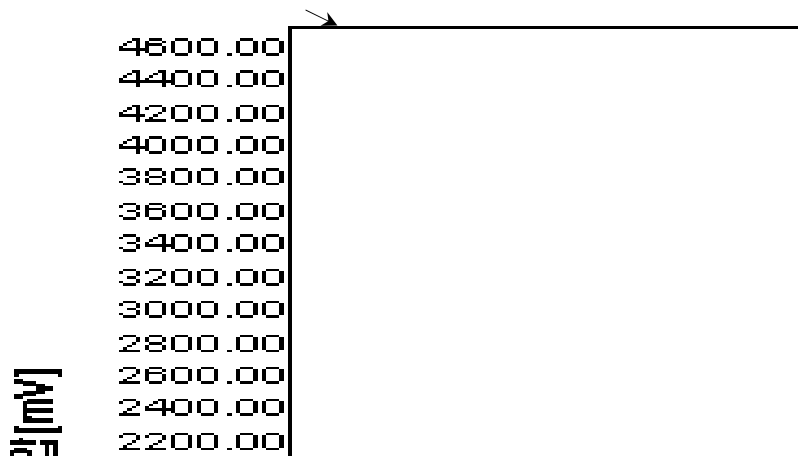
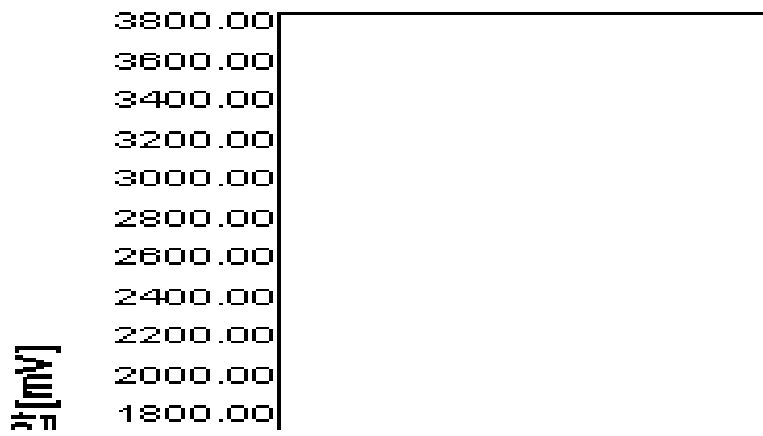


Fig. 3. Chromatogram of extract of *Angelica gigas*.

각 생약에는 사포닌, 폴리페놀 등 친수성을 가진 물질이 많거나 중성지방이나 정유 등의 친유성분이 많이 함유된 경우가 있어 배합하여 사용 시 동일한 추출조건에서 수율이 달라질 수 있다. 또한 각 추출물의 크로마토그램 분석을 통해 차후 분석을 위한 기반을 확보하고자 하였다. 상기 에탄올 추출물을 대상으로 친수성 물질과 친유성 물질에 대한 크로마토그램 패턴을 아래와 같이 작성하였다.

5) 천궁

i) 친유성 물질 분석



ii) 친수성 물질 분석

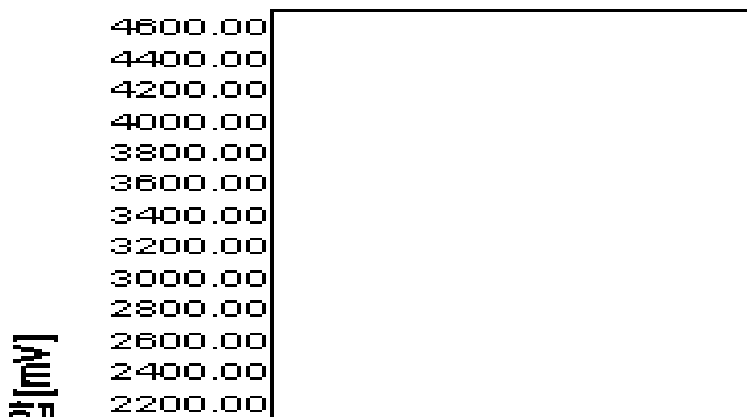
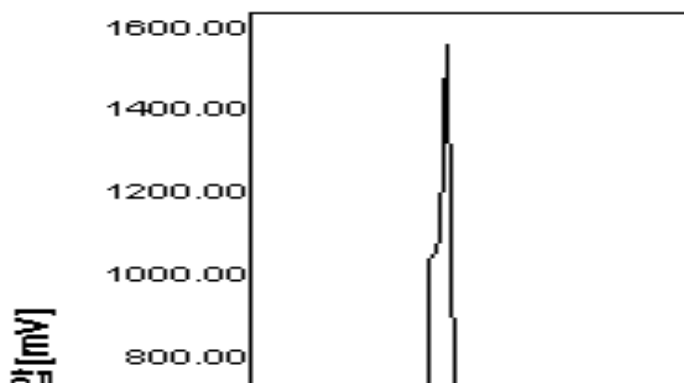


Fig. 4. Chromatogram of extract of *Cnidium officinale*.

6) 유백피

i) 친유성 물질 분석



ii) 친수성 물질 분석

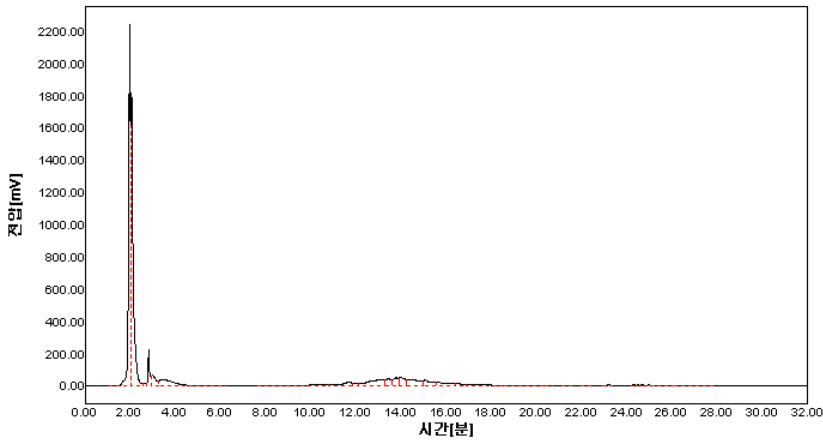
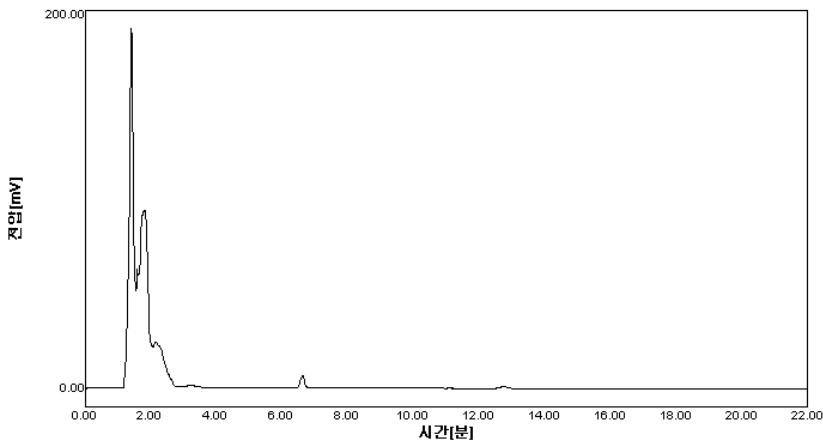


Fig. 5. Chromatogram of extract of *Ulmus pumila*.

7) 서목태

i) 친유성 물질 분석



ii) 친수성 물질 분석

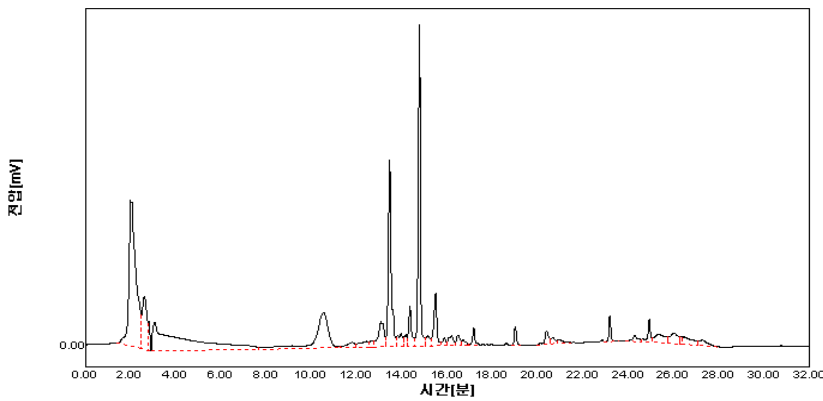


Fig. 6. Chromatogram of extract of *Rhynchosia nulubilis*.

나. 각 생약재의 지표물질 성분 함량측정

1) 하수오, 속단, 당귀의 열수 및 에탄올 추출물의 지표성분 함량

위에서 설정한 분석방법으로 각각의 열수 및 에탄올 추출물에 대한 지표성분을 분석하여 다음 Table 9에 나타내었다.

Table 9. 각 생약의 열수추출물 및 70% 주정추출물의 지표성분 함량

샘플명	열수	70% 에탄올	비고
하수오, 중국산/대홍교역 (Cinnamic acid)	0.0057%	0.023%	추출물의 가수분해 후 측정
속단, 중국산/대홍교역 (Shanzhiside methylester)	0.011%	0.13%	
당귀, 국산/대홍교역 (Decursin)	1.12%	5.48%	

Table 9에서 보는 바와 같이 하수오에는 cinnamic acid의 함량이 다른 2가지 생약 (속단, 당귀)의 지표물질보다는 낮은 함량을 보였다. 세 가지 생약재에서 열수 보다는 에탄올 추출에서 지표물질이 더 높은 함량을 나타내고 있다.

2) 추출물 시생산 및 지표성분 분석

사료첨가제로서 생산성을 검토하기 위해 세 가지 생약재(하수오:속단:당귀)를 1:1:1.077로 혼합하여 추출하여 복합생약추출물을 시생산하여 수율을 검토하였다. 열수추출물의 수율은 22.7%, 주정추출물의 수율은 17.45%로 열수추출이 수율이 높았다. 다음 Table 10에 각각의 조건에 대한 수율을 나타내었다.

Table 10. 생약 및 복합 추출물 시생산

구분	시생산 조건	추출분말/생약	분석
하수오, 속단, 당귀	열수추출/분무건조	11.8kg/52kg	Cin. 0.0034% SM 0.042% Dcu. 0.3%
하수오, 속단, 당귀	60%주정 85°C/분무건조	8.9kg/51kg	Cin. 0.0048% SM 0.0086% Dcu. 미량
속단	60%주정 85°C/분무건조	6.8kg/50kg	SM 0.048%
하수오, 속단, 당귀	열수추출/동결건조	0.9kg/9.3kg	Cin. 0.0068% SM 0.0053% Dcu. 0.862%

3. Estrogenic activity 분석

가. MCF-7 cell을 이용한 estrogenic activity 측정

1) 속단 분획별 MCF-7에 대한 증식효과

속단 에탄올 추출물의 헥산, 에틸아세테이트, 물포화부탄올, 물층을 MCF-7 cell에 대한 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 투여하여 증식효과를 측정하였다. 아래 데이터는 대조군을 100%로 하였을 때 상대증식비율이다. 각 분획별로 처리농도가 증가함에 따라 오히려 대조군대비 세포의 증식이 억제되었음을 확인할 수 있었다.

Table 11. 속단에탄올 추출물의 계통분획별 에스트로젠 활성

시험물질	에탄올추출 헥산 분획				
	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Mean	76.11	30.78	2.17	6.89	7.46
S.D	14.34	4.68	0.36	1.08	1.86

시험물질	에탄올추출 EA 분획				
	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Mean	91.22	64.47	13.58	2.28	4.39
S.D	2.07	3.23	4.48	0.27	0.42

시험물질	에탄올추출 부탄올 분획				
	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Mean	86.10	19.93	8.37	6.81	4.68
S.D	2.41	4.69	1.05	0.84	0.16

시험물질	에탄올추출 물 분획				
	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Mean	86.28	81.70	75.16	12.56	8.16
S.D	5.04	6.53	4.73	3.09	2.61

2) 하수오 분획별 MCF-7 cell에 대한 증식효과

하수오 추출물은 모든 분획에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포증식을 억제하지 않았으나 그이상의 농도에서는 세포증식을 억제하였다. 헥산과 에틸아세테이트 분획은 양이 적어 실험에서 제외하였다.

Table 12. 하수오 에탄올 추출물의 계통분획별 에스트로겐 활성

		단위:%			
시험물질	에탄올 추출분말				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	98.72	107.59	90.15	5.34	0.75
S.D	2.65	8.49	9.01	1.31	0.58

시험물질	에탄올 추출 부탄을 분획				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	84.66	81.86	58.73	1.28	3.48
S.D	5.81	3.01	4.74	0.29	0.76

시험물질	에탄올 추출 물 분획				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	94.55	89.34	87.53	57.30	16.65
S.D	4.91	2.40	1.27	7.69	1.04

3) 당귀 분획별 MCF-7 cell에 대한 증식효과

당귀추출물은 에틸에테르 분획에서 세포증식억제효과가 높았으나 물포화부탄올이나 물층에서는 하수오와 유사하게 100 μ g/ml까지는 세포증식 억제효과가 낮았다.

세가지 생약 추출물의 각 분획 별로 에스트로겐 활성을 확인한 결과 유기용매 분획에서는 MCF-7 cell의 증식억제 효과가 뚜렷하였고 물분획에서도 약하지만 증식억제 효과가 있었다.

각 생약의 에탄올 추출물의 용매별 분획에서는 에스트로겐 활성을 확인할 수 없었고 오히려 세포의 증식을 억제하였다.

Table 13. 당귀 에탄올 추출물의 계통분획별 에스트로겐 활성

		단위:%			
시험물질	에탄올 추출 EA분획				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	69.73	11.97	3.21	5.55	15.35
S.D	2.79	0.83	0.44	0.63	1.59

시험물질	에탄올 추출 부탄을 분획				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	109.53	111.48	97.72	11.16	6.72
S.D	7.91	10.92	14.34	0.41	0.25

시험물질	에탄올 추출 물 분획				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	90.61	91.25	90.70	76.24	25.41
S.D	4.20	4.75	5.56	3.98	3.08

4) 생약별 열수추출물 및 복합 열수추출물의 MCF-7 cell에 대한 증식효과

복합열수추출물 및 각 생약의 열수추출물에서도 세포증식효과가 관찰되지 않았고 물층 또는 열수추출물에서는 상대적으로 용매추출물보다 세포증식 억제효과가 낮았다. 하수오, 속단, 당귀의 각각 생약의 유기용매추출물에서 또는 각 생약과 복합 열수추출물은 MCF-7 cell을 이용한 실험에서 에스트로겐 활성을 보이지 않았다.

Table 14. 각 생약별 열수추출물 및 복합 열수추출물의 에스트로겐 활성

단위:%					
시험물질	1:1:1 복합 열수추출물				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	102.86	104.56	90.26	108.58	76.05
S.D	1.83	5.84	7.93	6.30	7.62

시험물질	속단열수추출물				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	90.46	84.52	92.67	100.41	15.00
S.D	6.78	6.53	11.85	4.73	3.49

시험물질	하수오 열수추출물				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	87.32	75.70	75.09	96.89	95.82
S.D	1.76	5.49	34.43	4.35	6.99

시험물질	당귀 열수추출물				
농도	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Mean	96.24	94.35	96.56	86.58	44.03
S.D	4.91	2.38	7.83	11.00	2.73

5) 하수오, 속단, 당귀 저농도에서의 estrogenic activity

하수오, 속단, 당귀의 MCF-7 cell을 이용한 에스트로겐 활성 실험에서 처리농도가 10 μ g/ml 이상으로 그 이하 농도에서 에스트로겐 활성이 나타날 가능성을 검토하기 위해 아래와 같이 0.0064 μ g/ml에서 100 μ g/ml까지의 처리농도에서 에스트로겐 활성을 평가하였으나 세포의 증식이 낮아 의미있는 데이터를 얻지 못했다.

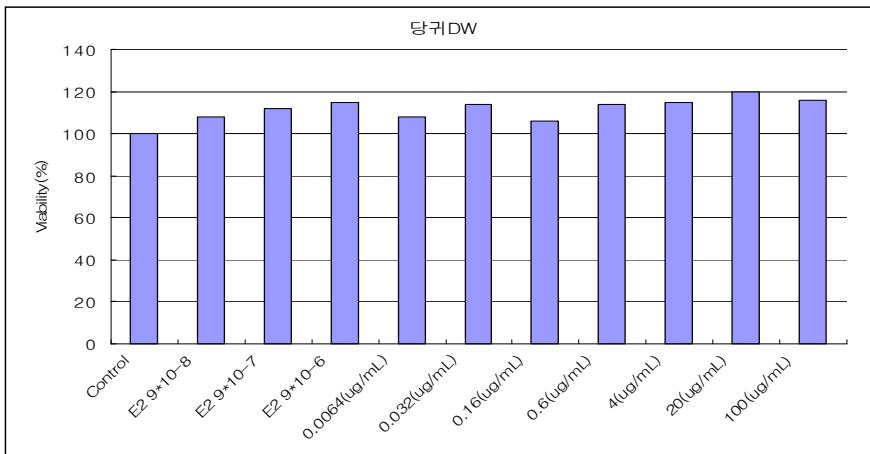
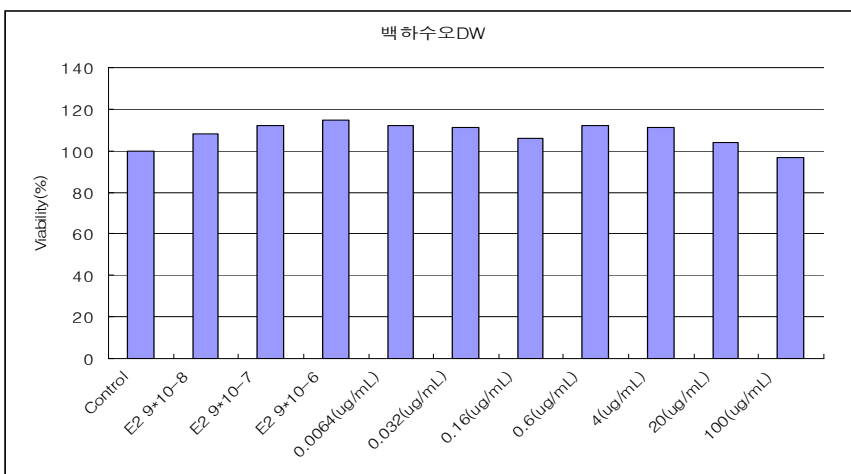
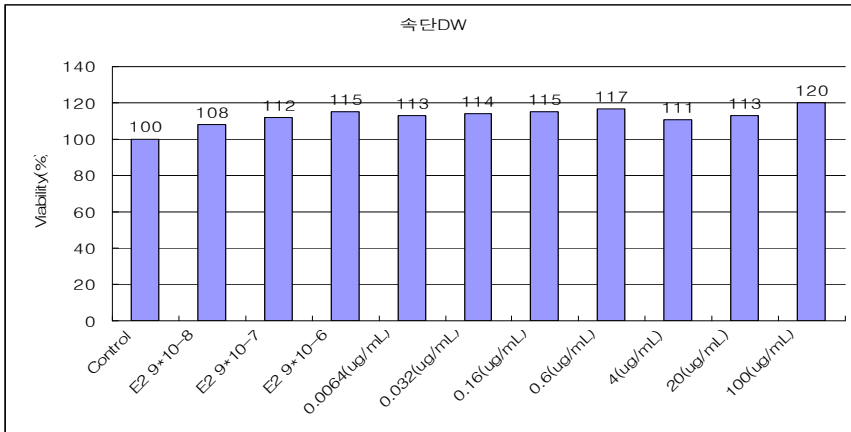


Fig. 7. 하수오, 속단, 당귀 추출물의 에스트로젠 활성.

6) 백합, 벌사상자, 원지, 및 상백피 생약의 estrogenic activity

가) E2처리에 의한 대조군 대비 세포증식을 100%로 하였을 때 각 생약 첨가에 의한 세포증식 정도를 상대에스트로젠 활성(REA relative estrogenic activity)을 %로 평가하였다. 백합, 벌사상자, 원지, 상백피 추출물의 농도에 따른 estrogenicity를 다음 Table 15~18에 나타내었다. 4

가지 생약 모두 4 ug/ml 수준에서는 약 40% 정도 상대 활성을 보여주고 있다.

Table 15. 백합 추출물의 에스트로겐 활성

실험군	에스트라디올 (E2, 9×10^{-9} M)	백합 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
REA(%) 평균	100	-3.43	5.48	21.39	40.26
S.D	7.43	2.47	2.28	1.95	2.36

Table 16. 벌사상자 추출물의 에스트로겐 활성

실험군	에스트라디올 (E2, 9×10^{-9} M)	벌사상자 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	벌사상자 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	벌사상자 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	벌사상자 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
REA(%) 평균	100	29.44	32.08	39.77	34.52
S.D	7.43	4.57	8.56	41.65	1.32

Table 17. 원지 추출물의 에스트로겐 활성

실험군	에스트라디올 (E2, 9×10^{-9} M)	원지 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
REA(%) 평균	100	-31.35	7.20	38.28	49.9
S.D	7.43	16.27	0.41	1.59	12.01

Table 18. 상백피 추출물의 에스트로겐 활성

실험군	에스트라디올 (E2, 9×10^{-9} M)	상백피 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
REA(%) 평균	100	-18.88	8.52	36.44	44.69
S.D	7.43	3.64	6.52	1.66	5.52

나) Anti-estrogenicity 활성

백합, 원지, 사상자 또는 상백피 추출물에 대한 항에스트로겐 활성은 대조군 대비 에스트라디올에 의한 증식을 100으로 하였을 때 생약추출물에 의한 에스트라디올의 증식효과의 억제 정도를 저해율(%)로 계산하여 농도별로 항에스트로겐 활성을 다음 Table 19~22와 Fig. 8~11에 나타내었다.

Table 19. 백합 추출물의 항에스트로겐 활성

실험군	4-히드록시 타목시펜 (0.4 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	백합 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
저해율(%)	55.78	106.6	107.99	103.37	103.83
S.D	3.34	7.23	2.06	4.20	28.86

Table 20. 사상자 추출물의 항에스트로겐 활성

실험군	4-히드록시 타목시펜 (0.4 $\mu\text{g/mL}$)	별사상자 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	별사상자 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	별사상자 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	별사상자 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
저해율(%)	55.78	56.83	62.28	68.38	83.77
S.D	3.34	2.31	1.83	7.14	1.02

Table 21. 원지 추출물의 항에스트로겐 활성

실험군	4-히드록시 타목시펜 (0.4 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	원지 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
저해율(%)	55.78	109.77	85.41	81.78	57.82
S.D	3.34	1.73	0.34	0.50	13.55

Table 22. 상백피 추출물의 항에스트로겐 활성

실험군	4-히드록시 타목시펜 (0.4 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (0.25 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (1 $\mu\text{g/mL}$)	상백피 추출물 (4 $\mu\text{g/mL}$)
저해율(%)	55.78	81.78	103.89	102.24	104.75
S.D	3.34	2.89	6.93	7.21	1.98

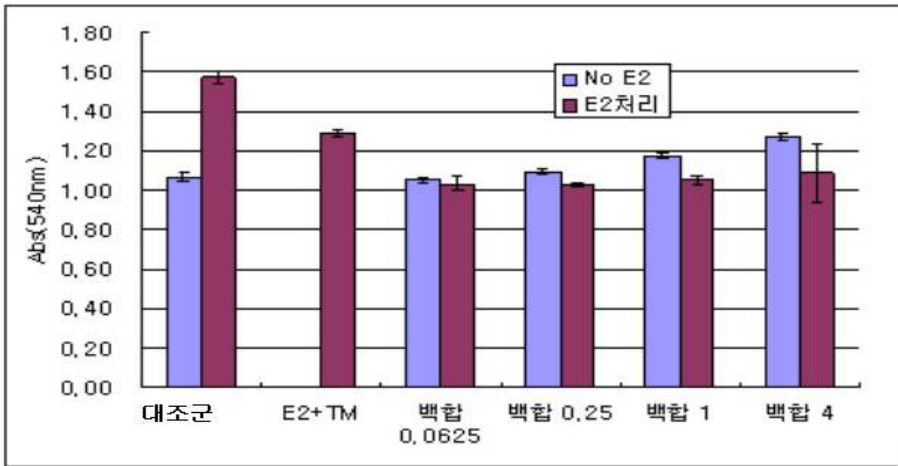


Fig. 8. 백합 열수추출물의 에스트로겐활성 및 항에스트로겐 활성.

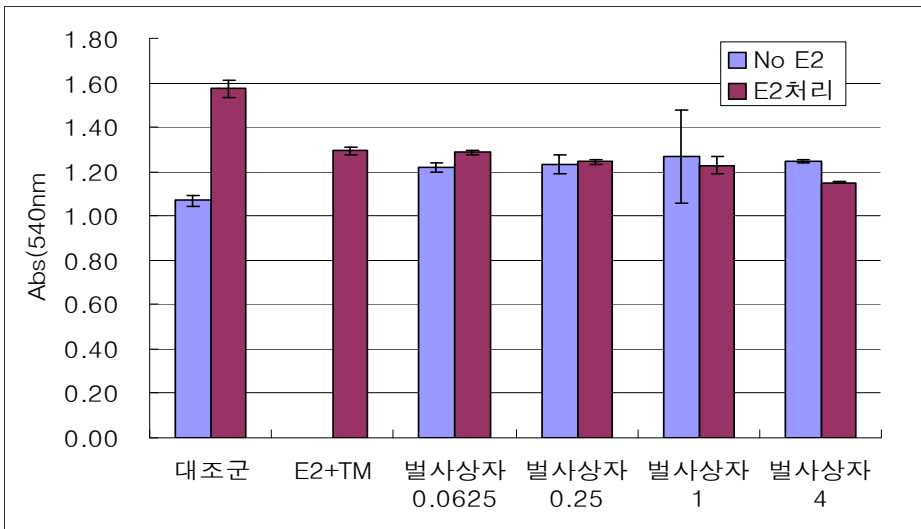


Fig. 9. 별사상자 열수추출물의 에스트로겐 활성 및 항에스트로겐 활성.

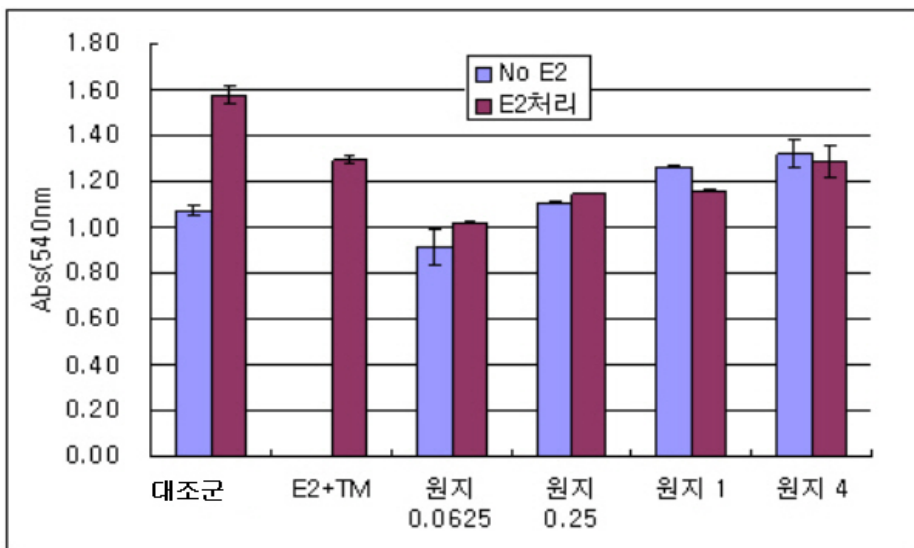


Fig. 10. 원지 열수추출물의 에스트로겐 활성 및 항에스트로겐 활성.

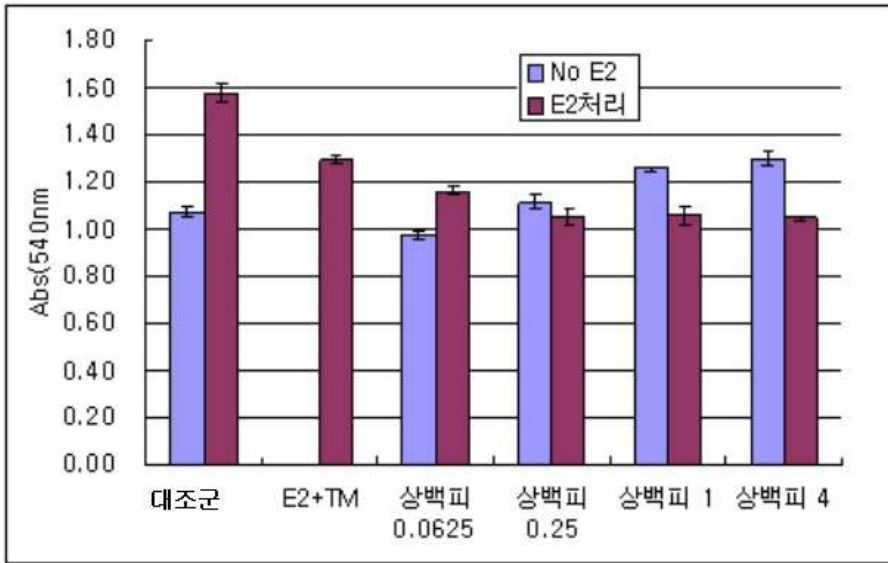


Fig. 11. 상백피 열수추출물의 에스트로겐 활성 및 항에스트로겐 활성.

본 과제에 사용되는 생약의 에스트로겐 활성을 확인한 결과 MCF-7 cell을 이용한 *in vitro* 실험에서는 하수오, 속단, 당귀에서는 에스트로겐 활성을 확인하지 못했다. 한편 추가로 검토한 백합, 사상자, 상백피, 원지에서는 에스트로겐 활성 및 항에스트로겐 활성을 확인하였다.

나. 난소절제쥐에서 에스트로겐 활성 측정

하수오, 속단, 당귀 복합 열수추출물의 에스트로겐 활성을 난소를 절제한 쥐에서 골밀도와 자궁무게로 측정하였다.

Table 23. OVX 동물실험군별 시험물질 및 투여량

실험군	조건	투여량 mg/kg/day
G1	Normal control	0
G2	Sham control	0
G3	OVX control	0
G4	OVX +시험물질1	73.5
G5	OVX +시험물질1	180
G6	OVX +시험물질1	440
G7	OVX +시험물질2	73.5
G8	OVX + 시험물질2	180
G9	OVX + 시험물질2	440

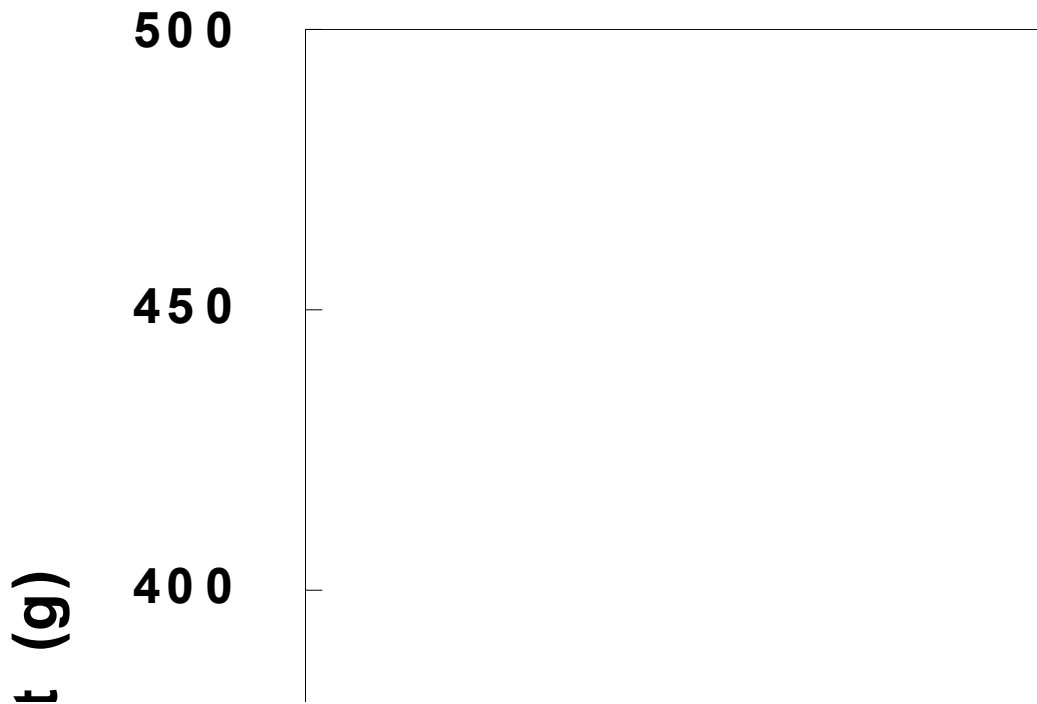


Fig. 12. 실험기간동안의 각 군별 평균체중의 변화 ■: G2 Sham control, □: G3; OVX control, ▲: G4; OVX + 시험물질1 (73.5 mg/kg/day), △: G5; OVX + 시험물질1 (180 mg/kg/day), ●: G6; OVX + 시험물질1 (440 mg/kg/day), ○: G7 OVX + 시험물질2 (73.5 mg/kg/day), ◆: G8; OVX + 시험물질2 (180 mg/kg/day), ◇: G9 OVX + 시험물질2 (440 mg/kg/day)

실험기간인 12주 동안 체중 증가량을 보면 역시 Sham군이 실험군에 비하여 유의성 있게 작게 나타났다. 그러나 난소절제 대조군과 다른 모든 실험군간의 체중 변화는 유의한 차이가 관찰되지 않아 시험물질이 OVX rat의 체중을 변화시키는 데 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

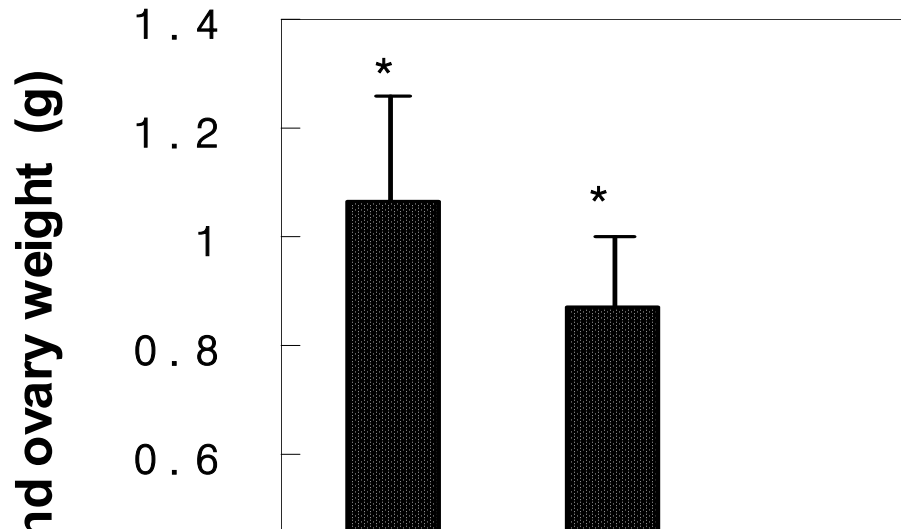


Fig. 13. 부검 후 실험군별 자궁과 난소중량.

실험개시 12주 후 측정된 자궁의 절대 중량은 모든 실험군과 OVX군에서 Sham군에 비해 중량이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 자궁의 무게가 감소한 것은 자궁의 조직유지에 필요한 E2가 분비되지 않기 때문이다. 한편, OVX 대조군과 시료 투여 실험군간 유의적인 중량 차이는 관찰되지 않았다. 이는 실험에 사용된 생약추출물 또는 에스트로몬 투여군이 자궁의 무게에 아무런 영향을 주지 않은 것을 보여주고 있다.

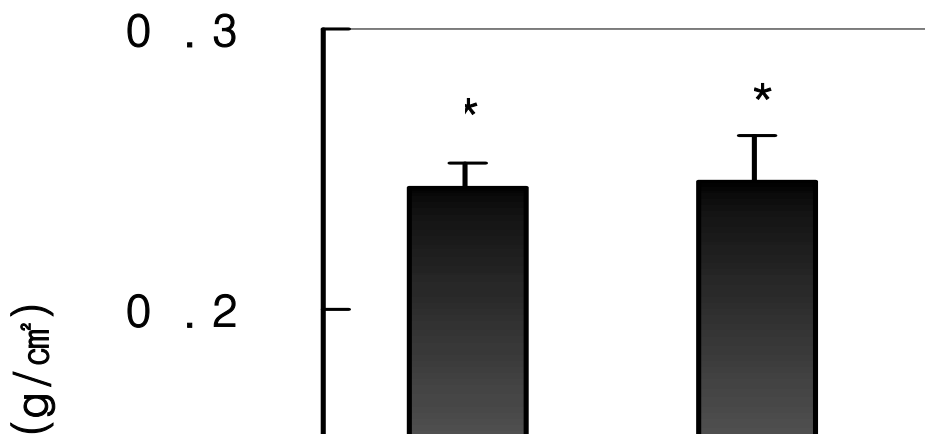


Fig. 14. 12주 투여 후 각 실험군별 FBMD(femoral bone density).

실험물질1 및 실험물질2 투여군에서 OVX 대조군에 비하여 FBMD가 통계적으로 유의하게 증가된 것이 관찰 되었다($p < 0.05$). OVX 대조군의 FBMD는 Sham 대조군 대비 약 30% 감소된 수치를 보였으며, 실험물질1 및 실험물질2 투여군은 각각 약 70% 및 60%가 회복된 FBMD

를 나타내었다. 또한, Lee 등의 임상시험에서도 FBMD가 유의적으로 증가하여 실험물질1이 rat에서나 사람에게서 골밀도를 증가시킨다고 판단할 수 있다.

이를 종합하면 하수오,속단, 당귀 혼합 추출물이 *in vivo* 실험결과 FBMD의 증가를 포함하는 식물성 에스트로겐 효과를 가진 유효성분임을 확인할 수 있었다.

4. 사양실험용 사료첨가제 생산

하수오 속단, 당귀외에 3가지 생약을 추가하여 아래의 배합비로 총 3.9kg을 배합하여 부형제로서 왕겨를 첨가하여 총 44kg을 제조하였다.

Table 23. 사양실험용 사료첨가제의 생약조성

하수오	속단	서목태	당귀	천궁	유근피	합계
30.77%	15.38%	15.38%	12.82%	12.82%	12.82%	100%

5. *in vitro* 실험을 통한 천연추출물의 육량증가 및 육질개선 영향 연구

가. 근육세포주의 증식에 대한 영향

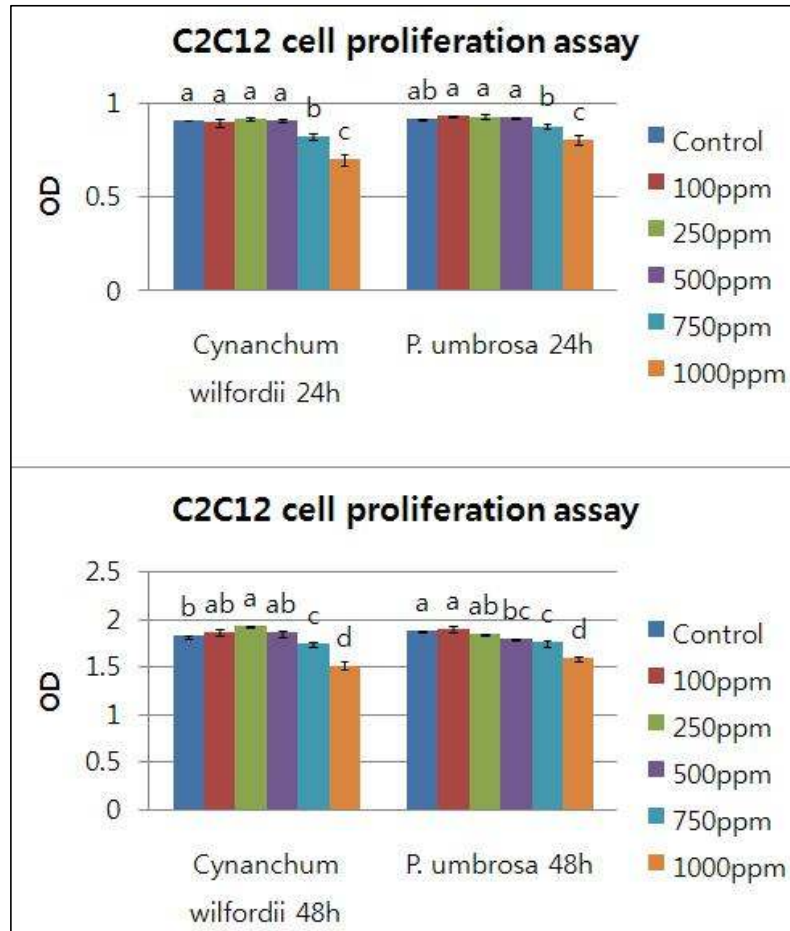


Fig. 16. 하수오와 속단의 C2C12 cell Proliferation에 대한 영향.

위의 Fig, 16에는 비육우의 증체량 촉진을 위한 천연추출물의 영향을 조사하기 위하여 *in vitro* 실험을 실시한 결과를 나타내었다. 근섬유세포인 C2C12 세포주를 각각 속단과 하수오를 처리하 후 24시간 및 48시간 동안 배양하여 세포의 증식도를 조사하였다.

속단과 하수오는 동일하게 100, 250, 500, 750, 1000µg/ml 농도별로 처리하였다. 실험결과 24시간 배양한 하수오를 처리한 세포에서는 대조군과 비교하여 100, 250, 500µg/ml 농도로 처리한 경우 세포독성이 없었으나 750µg/ml 이상 처리군에서는 독성의 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 또한 속단을 처리하고 24시간 배양한 C2C12 세포에서도 하수오를 처리한 결과와 유사한 결과를 나타내어 대조군과 비교하였을 때 100, 250, 500µg/ml에서는 세포독성이 관찰되지 아니하였으며 750µg/ml을 처리한 세포군에서는 세포독성의 경향은 있었으나 대조군과의 통계적 유의차는 나타나지 아니하였다. 한편 1000µg/ml의 높은 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 독성은 속단 처리의 경우보다 하수오 처리군에서 다소 세포독성 정도가 마일드한 것으로 조사되었다.

C2C12 세포주를 48시간 동안 배양했을 때도 24시간 배양한 결과와 유사한 세포증식활성의 패턴을 보였다. 하수오를 처리한 경우 100 μ g/ml 처리한 경우 세포증식활성이 증가하는 경향을 보이다가 250 μ g/ml 처리한 군에서는 유의하게 증가하였다가 500 μ g/ml 처리한 군에서 다시 감소하기 시작하여 750 μ g/ml 이상 처리한 세포군에서는 24시간 대와 마찬가지로 세포독성을 나타내었다. 속단을 처리하고 48시간 배양한 후의 세포증식 활성결과도 역시 처리농도 의존적으로 조금씩 감소하는 경향을 나타내어 500 μ g/ml 처리군에서 이미 유의하게 세포독성이 관찰되었다. 이상의 결과에서 하수오 또는 속단 모두 500 μ g/ml과 750 μ g/ml 이상의 고농도로 처리하면 세포독성이 있는 것으로 나타났다.

나. 근육세포주의 영양소 이용관련 유전자 발현에 대한 영향

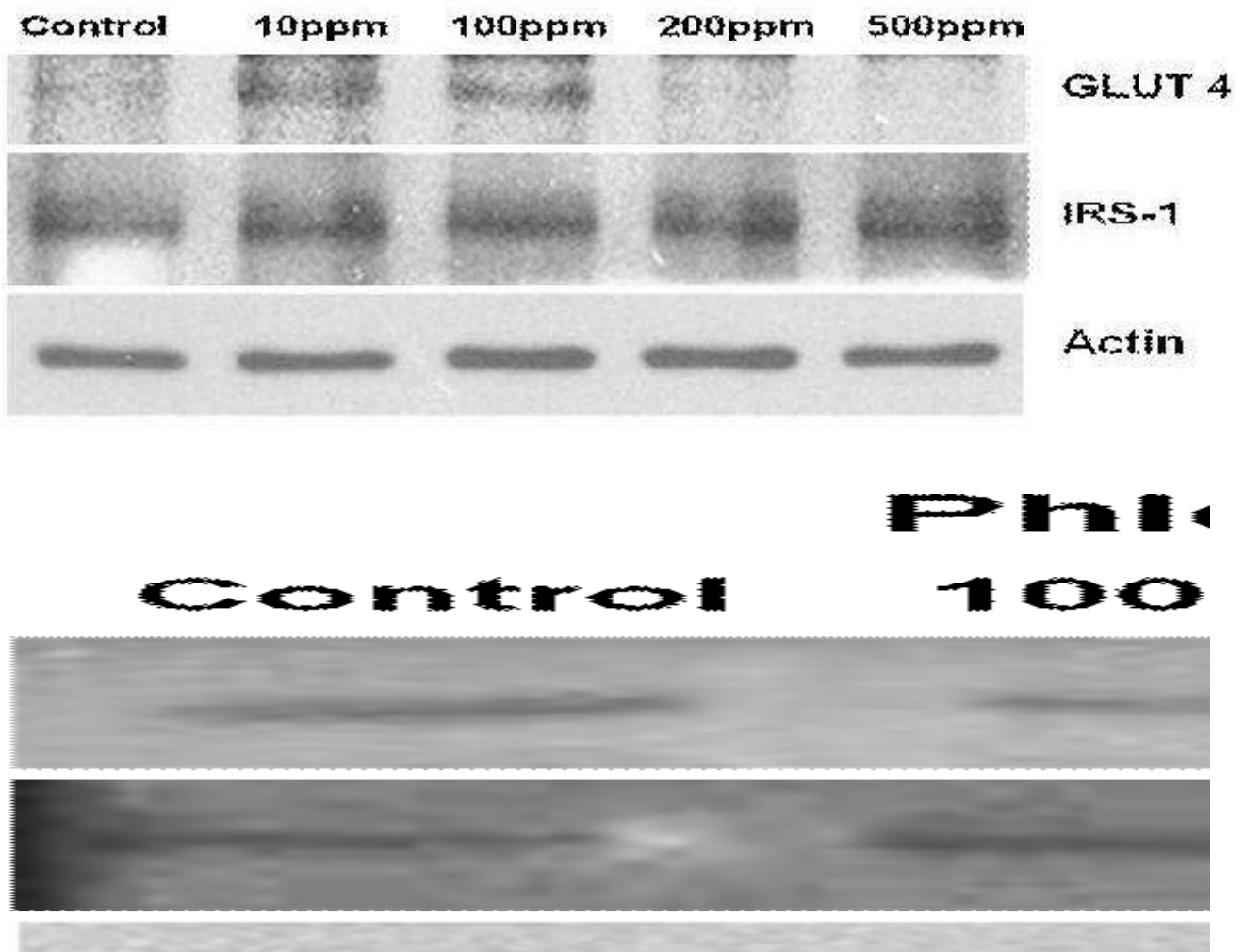


Fig. 17. 하수오와 속단의 C2C12 cells에서 GLUT4와 IRS-1 단백질 발현에 대한 영향.

위의 Fig. 17에는 비육우의 증체량 촉진을 위한 천연추출물의 영향을 조사하기 위하여 근섬유세포주인 C2C12 세포에 하수오 및 속단을 처리하고 24시간 배양한 후 세포 내 영양소 이용성 관련 단백질인 GLUT-4(Glucose Transporter-4)와 IRS-1(Insulin Receptor, substrate-1)의 발현을 조사하였다. 하수오추출물 처리에 의해 GLUT-4 발현량은 Control에 비하여 10 μ g/ml

및 100 μ g/ml까지 점차 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 200 μ g/ml 과 500 μ g/ml 처리군에서는 현저하게 감소한 것을 알 수 있었다. 한편 속단추출물 처리에 따른 인슐린 수용체 단백질인 IRS-1의 발현량은 Control에 비해 100 μ g/ml 농도로 처리한 세포에서는 발현량이 증가하였다가 농도가 높아질수록 발현량은 낮아지는 것으로 조사되었다. 속단추출물 처리에 따른 GLUT-4 발현량은 농도별 처리에 따른 변화를 보이지 않는 것으로 나타났다.

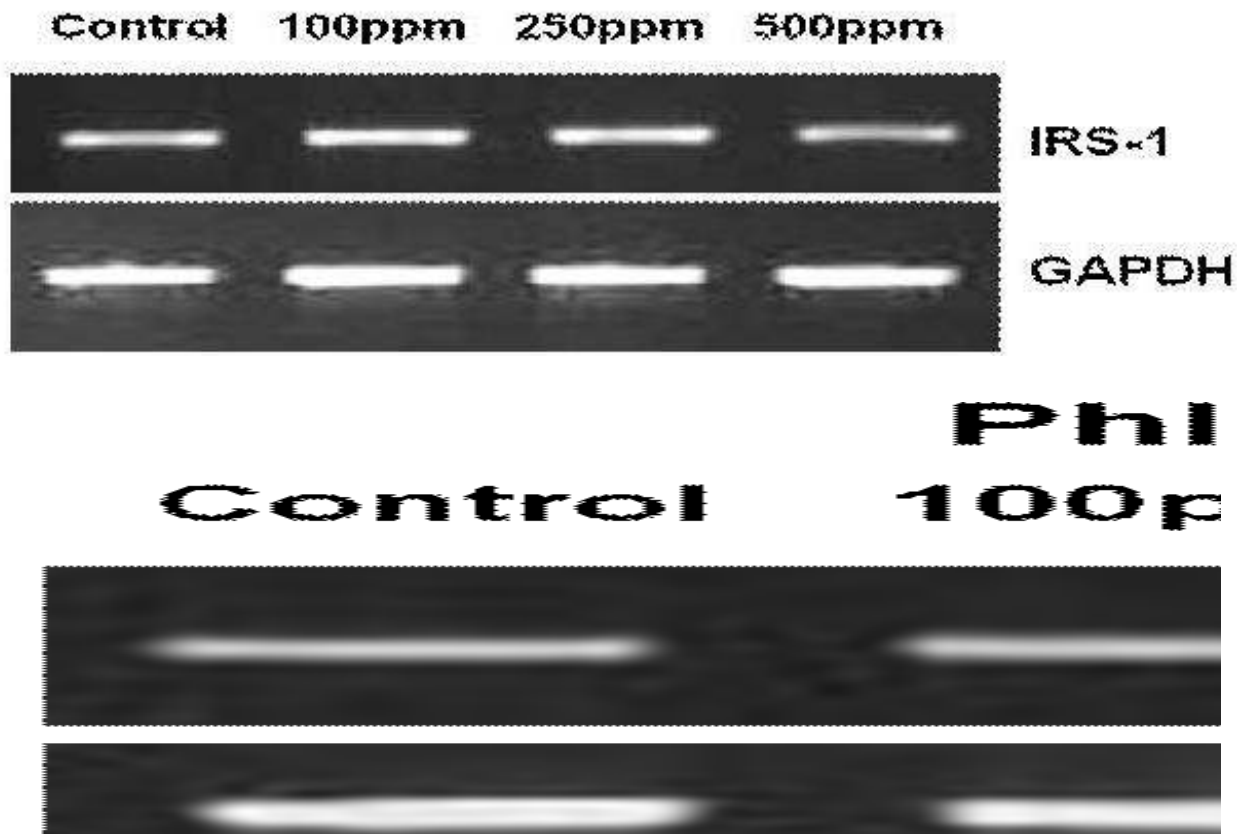


Fig. 18. 하수오와 속단의 C2C12 cells에서 IRS-1 mRNA 발현에 대한 영향.

Fig. 18에는 하수오 및 속단추출물을 처리한 C2C12 세포에서 IRS-1 유전자의 발현 결과를 나타내었다. IRS-1 유전자 발현의 경우 250 μ g/ml까지 점차 증가하는 경향을 보이다가 다시 감소하는 경향을 보였다. Fig. 2에서 단백질 발현은 100 μ g/ml 처리군에서 증가하였다가 200 μ g/ml 처리군에서 감소한 것을 보면 처리농도에 따른 유전자 전사후 조절에 따른 변화의 가능성도 배제할 수 없는 것으로 판단되었다. 또한 속단추출물 처리에 따른 IRS-1 유전자 발현의 경우 하수오와 같이 점차 증가하는 경향을 보이다가 250 μ g/ml에서부터 점차 감소하는 경향을 보이고 있다. 이 결과도 IRS-1 단백질 발현과 비교하여 볼 때 대조군보다는 약간 증가하는 경향은 있으나 유의한 차이는 없으며 500 μ g/ml 처리군에서 까지도 전사량은 어느 정도 유지되고 있지만 이것 역시 단백질 발현 전에 전사 후 조절(Post-transcriptional regulation) 작용을 받은 결과에 기인하는 것으로 판단되었다.

다. 6가지 생약의 지방세포주 증식에 대한 영향

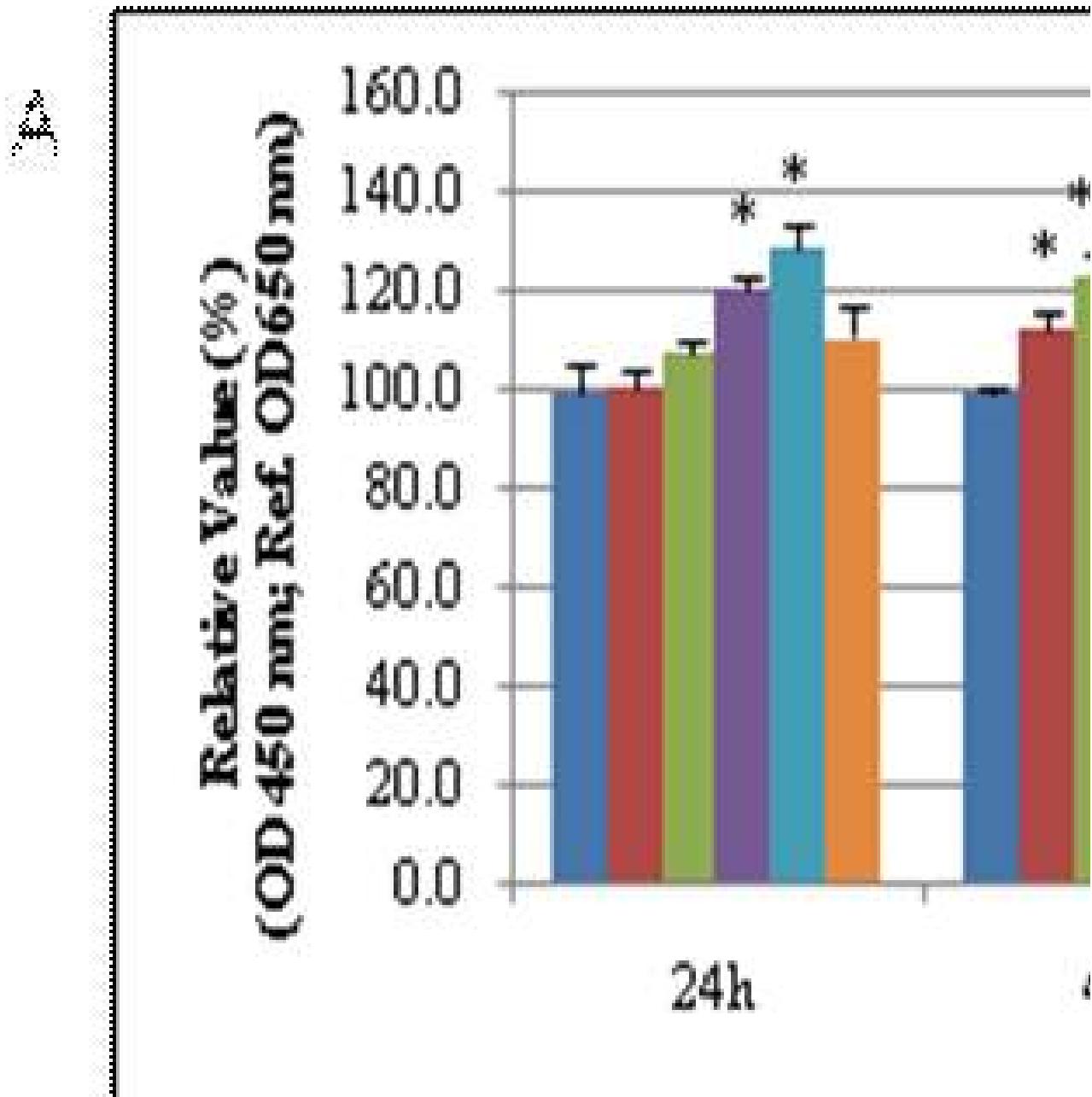


Fig. 19. 3T3-L1 cell 증식에 대한 6가지 생약추출물의 영향.

A: 속단, B: 천궁, C: 유근피, D: 당귀, E: 천속단, F: 서목태

Fig. 19에는 비육우의 육질등급을 결정하는데 가장 중요한 지방교잡 형성과 관련된 지방세포의 증식에 미치는 천연추출물의 영향을 조사하기 위하여 6가지 천연물질(속단, 천궁, 유근피, 서목태, 당귀, 속단, 하수오)을 3T3-L1 cell에 농도별로 처리하여 cell proliferation을 조사했다. 각 천연추출물을 처리한 후 24시간과 48시간 동안 배양한 결과를 ELISA를 사용하여 측정하였다.

천연추출물을 처리한 세포 중 Fig. 19. A는 속단을 처리한 것으로 24시간 배양 시 50 μ g/ml 으로부터 400 μ g/ml까지는 농도의존적으로 3T3L-1지방전구세포의 증식이 증가하였는데 800 μ g/ml에서는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 800 μ g/ml에서도 여전히 대조군 보다는 증

식활성은 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 48시간 배양한 결과에서도 유사하게 나타났으나 800 μ g/ml 처리한 세포에서는 대조군보다 낮아 세포독성이 있는 것으로 판단되었다. 세포독성이 200 μ g/ml에서 증가하여 Cell proliferation에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 48시간에서는 100, 200, 400 μ g/ml에서 증가하여 영향을 미치는 것으로 나타났으며 800 μ g/ml의 높은 농도에서는 독성영향을 나타내는 것으로 나타났다.

Fig. 19. B 에는 천궁을 처리한 결과를 나타내었다. 천궁은 24시간 배양 시 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 48시간 배양 결과에서도 24시간의 배양결과와 동일한 패턴을 보였다. 200 μ g/ml 까지는 대조군에 비해 유의하게 증가하고 400 μ g/ml의 경우 감소하기 시작하지만 여전히 대조군에 비하면 유의하게 높은 것으로 나타났다. 그러나 800 μ g/ml 처리군의 경우 유의하게 감소하여 뚜렷한 세포독성 현상을 나타내었다. 유근피를 처리한 결과(Fig. 19. C), 24시간 배양한 후 세포증식활성은 50 μ g/ml 농도에서부터 400 μ g/ml 처리한 세포군에서 대조군과 비교해 모두 유의하게 세포증식활성이 있는 것으로 나타났으나 800 μ g/ml 처리군의 경우 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 48시간 배양한 결과 200 μ g/ml 까지 낮은 농도로 처리한 군에서도 세포증식활성은 정체하거나 cell cycle arrest 현상이 두드러지게 나타나 400 μ g/ml 과 800 μ g/ml 처리군에서는 유의한 세포독성현상이 관찰되었다. 당귀의 경우는 24시간 및 48시간 배양 모두 전처리농도별로 세포증식활성은 영향이 없었으며 800 μ g/ml의 높은 농도에서도 오히려 약간 증가하는 경향을 나타낼 정도로 다른 추출물과는 현저히 다른 패턴을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 19. D).

Fig. 19. E에는 천속단을 처리한 결과를 나타내었다. 천속단을 처리한 경우 24시간 및 48시간 모두 유사한 세포증식활성 패턴을 나타내었으며 모두 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하는 매우 흥미로운 결과가 나타나 속단은 세포독성은 없으며 세포의 증식활성을 촉진하는 Mitogen으로서의 효능을 갖는 것으로 사료되었다. 200, 400, 800 μ g/ml에서 독성영향 없이 증가되어 높은 농도에서도 독성영향 없이 cell proliferation 영향을 미치는 것으로 나타났으나 48시간에서는 영향을 미치지 못하고 높은 농도에서 독성영향만 미쳤다.

Fig. 19. F에는 서목태를 처리한 결과를 나타내었다. 서목태를 처리한 결과도 속단을 처리한 결과와 마찬가지로 모든 처리농도별로 세포증식활성은 증가하는 것으로 나타났다. 24시간 배양한 결과는 농도의존적으로 증가하는 경향을 보인 반면 48시간 배양한 결과 200 μ g/ml 까지는 증가하다가 400 μ g/ml 및 800 μ g/ml 처리군에서는 다시 감소하는 경향을 보였다 그러나 대조군에 비하면 여전히 높은 세포증식활성을 갖는 것으로 조사되었다.

라. 6가지 생약의 근육세포주의 증식에 대한 영향

Fig. 20에는 천연추출물 6가지를 각각 C2C12 cell에 처리하여 근섬유세포의 증식활성을 조사한 결과를 나타내었다. 비육우의 지육중량정도에 따라서 등급이 결정되고 그것은 곧 농가수익과 직결되기 때문에 천연추출물 처리에 따른 근섬유세포의 증식활성을 갖는 추출물을 스크리닝 하기 위하여 Fig. 19에서와 마찬가지로 6가지 천연물질 (속단, 천궁, 유근피, 서목태, 당귀, 속단, 하수오)을 C2C12 세포에 농도별로 처리하고 24시간과 48시간 동안 배양한 결과를 ELISA를 사용하여 측정하였다.

Fig. 20. A는 속단을 처리한 것으로 24시간 배양한 경우 50 μ g/ml 으로부터 400 μ g/ml까지는 처리농도에 관계없이 증식활성에 변화를 보이지 아니하였다. 그러나 800 μ g/ml에서는 대조군보다 유의하게 감소하여 세포독성이 있는 것으로 판단되었다. 48시간 배양한 결과에서는 농도의

존적으로 세포증식활성이 감소하여 800 μ g/ml 처리한 세포에서는 대조군보다 약 20%의 세포독성이 있는 것으로 나타났다.

Fig. 20. B 에는 천궁을 처리한 결과를 나타내었다. 천궁은 24시간 배양 및 48시간 배양 모두 유사한 증식활성패턴을 보였다. 50~400 μ g/ml 처리 농도에서는 약간 증가하든지 아니면 대조군과 비슷한 수준의 세포증식활성을 나타내었는데 800 μ g/ml 처리군의 경우 감소정도가 뚜렷한 세포독성 현상을 나타내었다.

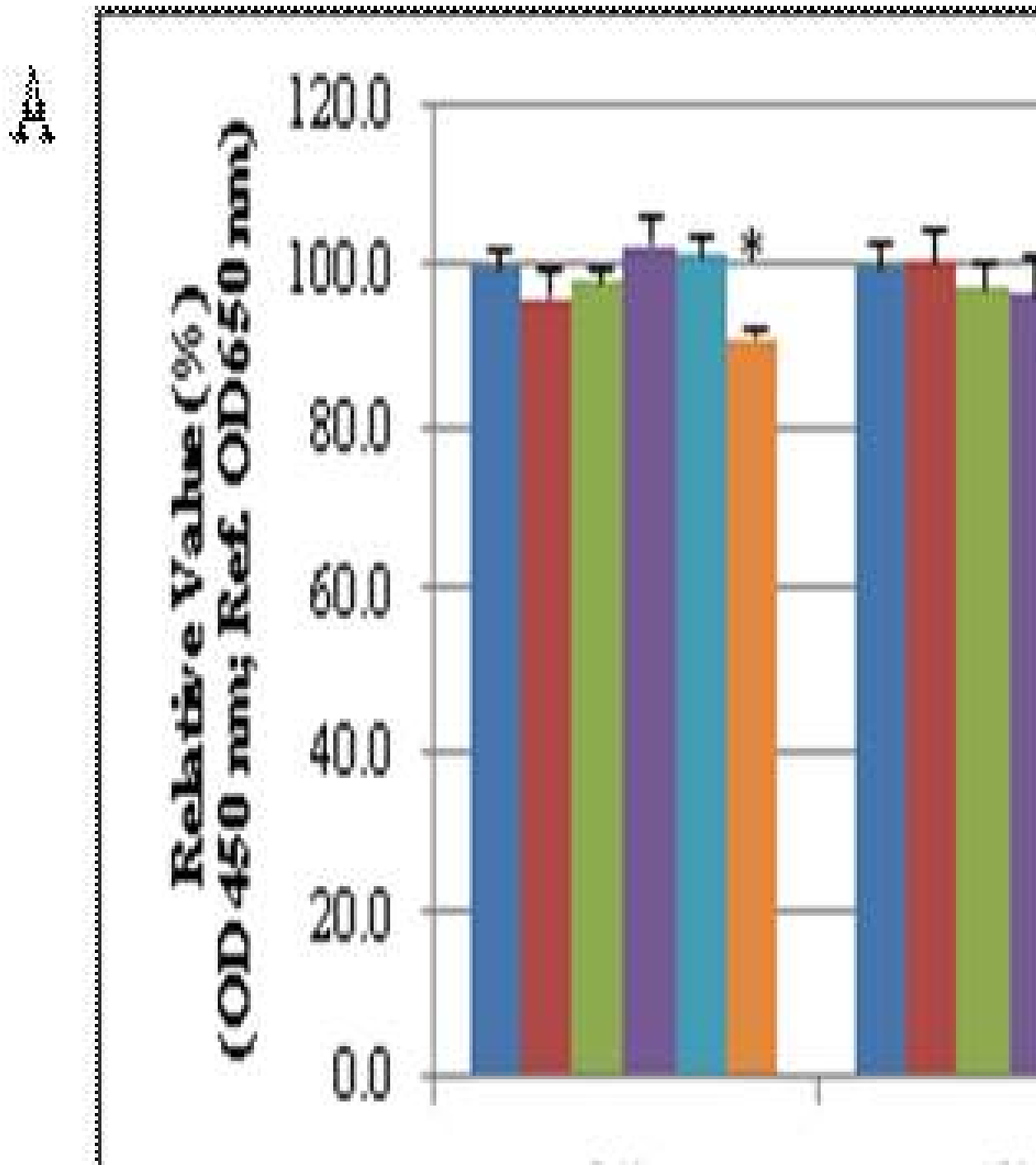


Fig. 20. C2C12 cell 증식에 대한 6가지 생약 추출물의 영향.

A: 속단, B: 천궁, C: 유근피, D: 당귀, E: 천속단, F: 서목태

Fig. 20. C는 유근피의 처리 결과를 나타내었는데, 24시간 배양한 후 세포증식활성은 50 μ g/ml 농도에서부터 200 μ g/ml 처리한 세포군까지는 대조군과 비교해 모두 유의한 차이를 나타내지 아니하고 비슷한 증식활성을 보이다가 400 μ g/ml 에서는 감소의 경향을 나타내다가 800 μ g/ml 처리군의 경우 유의하게 감소하는 결과를 나타내었다. 그러나 48시간 배양한 결과 아주 뚜렷하게 농도의존적으로 감소하는 경향을 보여 50 μ g/ml 에서부터 대조군의 증식활성에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

당귀의 경우는 24시간 배양 후 저농도에서 일부 활성이 증가하는 것으로 나타났으며 48시간 배양 모두 전 처리농도별로 세포증식활성은 영향이 없었다(Fig. 20. D).

Fig. 20. E에는 천속단을 처리한 결과를 나타내었다. 천속단을 처리한 경우 24시간 배양하였을 때 농도의존적으로 미약하게 증가하는 경향이 있었으나 유의한 변화는 아니었으며 48시간 배양 결과는 전체 처리 농도간에는 차이가 없었으나 전체적으로 대조군에 비해 세포증식활성은 낮은 활성을 나타내었다.

Fig. 20. F에는 서목태를 처리한 결과를 나타내었다. 24시간 또는 48시간 배양한 결과 모두 200 μ g/ml 까지는 약간 증가하거나 변화가 없는 것으로 나타났으나 400 μ g/ml 및 800 μ g/ml 처리군에서는 유의하게 감소하여 대조군에 비해 세포독성 현상을 나타내는 것으로 조사되었다.

6. 생약추출물의 항산화능

Fig. 21에는 천연추출물의 항산화능을 측정하기에 앞서 높은 항산화력을 갖는 quercetin을 사용하여 얼마만큼의 지질산화물인 TBARS 생성억제능을 갖는지 항산화실험의 표준화 실험을 실시한 그림이다. 7주령의 rat brain을 샘플링 한 뒤 산화제를 첨가한 것을 control로 하고 여기에 표준물질인 quercetin을 농도별로 처리하여 ELISA Reader 실험기기를 이용하여 535nm에서 O.D값 측정하였다. 측정결과 농도가 증가할수록 TBARS O.D값이 점차 감소하였다. 샘플의 반복수는 3반복을 하였으며 모두 농도에 따라 유의하게 감소하는 결과값을 나타내었다.

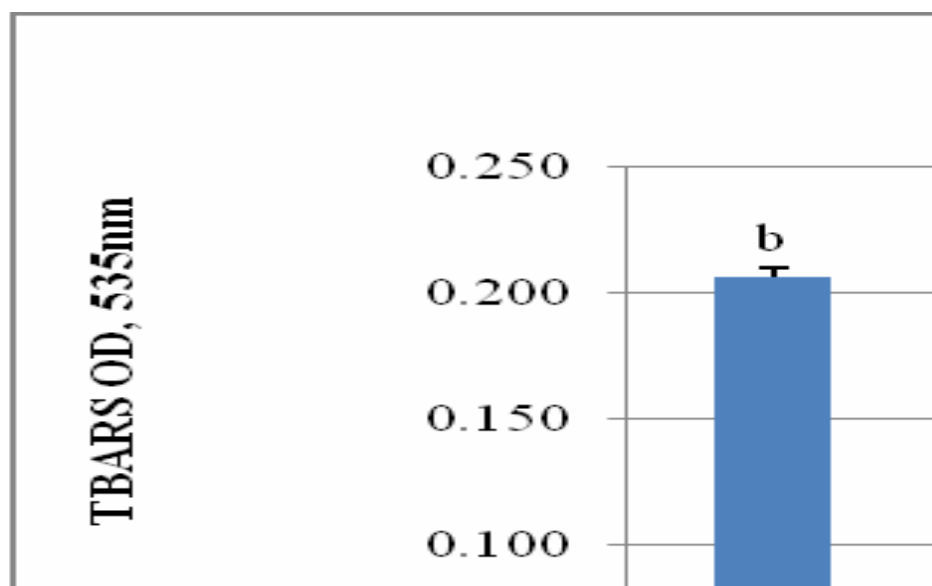


Fig. 21. 산화제에 의해 유도된 TBARS생산에 대한 여러 농도의 quercetin 첨가의 효과.

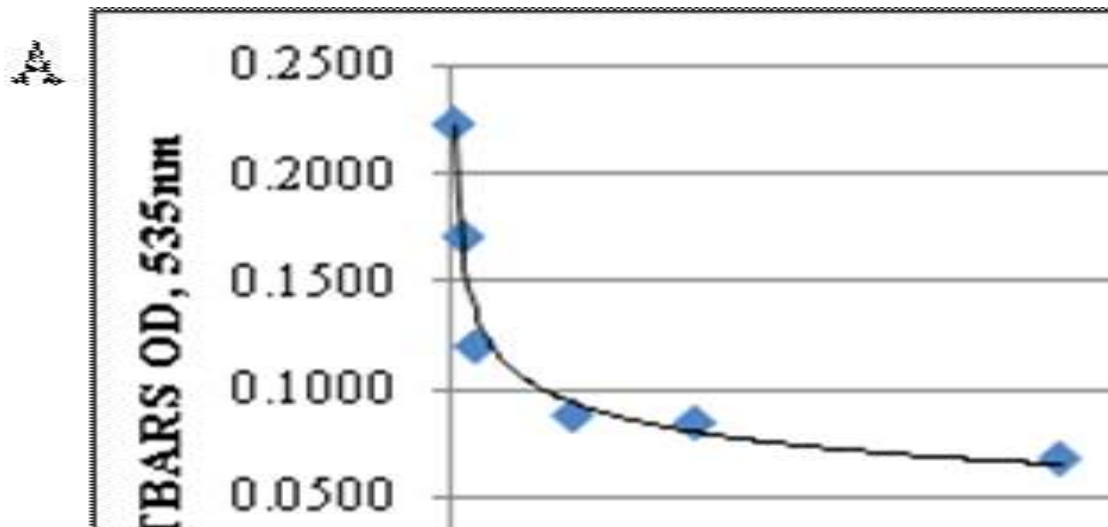


Fig. 22. Quercetin 농도에 따른 TBARS(A) 및 TBARS inhibition efficiency(B)의 상관관계.

Fig. 22(A)는 quercetin 농도와 TBARS 발생량간의 두 변수를 이용하여 회귀식을 구하였으며 이때 회귀상수 R2 값은 0.973으로 매우 높은 직선성의 상관을 갖는 것으로 나타났다. Fig. 22(B)는 이것을 다시 quercetin 농도별로 TBARS 억제능을 나타내었다. 이 결과를 표준으로 하여 각 천연추출물의 항산화능력을 quercetin의 항산화활성과 비교하여 quercetin에 상응하는 (Quercetin Equivalant) 수치를 나타내어 비교하고자 한다.

Fig. 23(A)에는 천속단, 천궁, 유근피, 서목태, 당귀의 5가지 추출물을 농도별로 처리하여 항산화능력을 측정한 것을 나타내었다. 항산화능력은 quercetin에 상응하는 농도로 표시하였다. 한편 Fig. 23(B)는 각 천연추출물을 농도별로 처리한 후 TBARS 생성 억제능을 그림으로 나타내었다.

측정결과 천속단 및 천궁추출물은 농도의존적으로 증가하는 강한 항산화효능을 나타내었다. 한편 유근피는 낮은 농도에서도 이미 높은 항산화력을 보여 농도의존적으로 약간씩 증가하며 전 농도에서 모두 강한 항산화활성을 갖는 것으로 나타나 다섯가지 중 가장 강력한 항산화제인 것으로 판단되었다. 서목태 및 당귀 추출물은 모두 농도의존적으로 항산화활성이 증가하는 결과가 나타났으며 Quercetin 상응 농도도 비슷한 것으로 나타났다.

Fig. 24에는 3T3-L1 cell 세포증식활성과 각 추출물의 항산화력을 나타내는 TBARS inhibition 효능과의 사이에 상관을 구한 것을 그래프로 나타내었다.

위의 실험에서 3T3-L1 cell의 생존력은 처리추출물의 항산화활성이 높으면 높을수록 낮아지는 것으로 나타나 이들의 항산화 효능이 높으면 어떠한 이유로 세포의 생존력이 낮아지는지 정확한 원인은 알 수 없으나 적정농도 이상으로 처리할 경우 Cell death program의 신호가 전달될 가능성이 있는 것으로 사료되었다. 따라서 세포증식활성을 기대하는 경우 증식활성이 감소하기 시작하는 농도 이하로 조절하여 처리해야 하는 주요한 기초자료를 얻게 되었다.

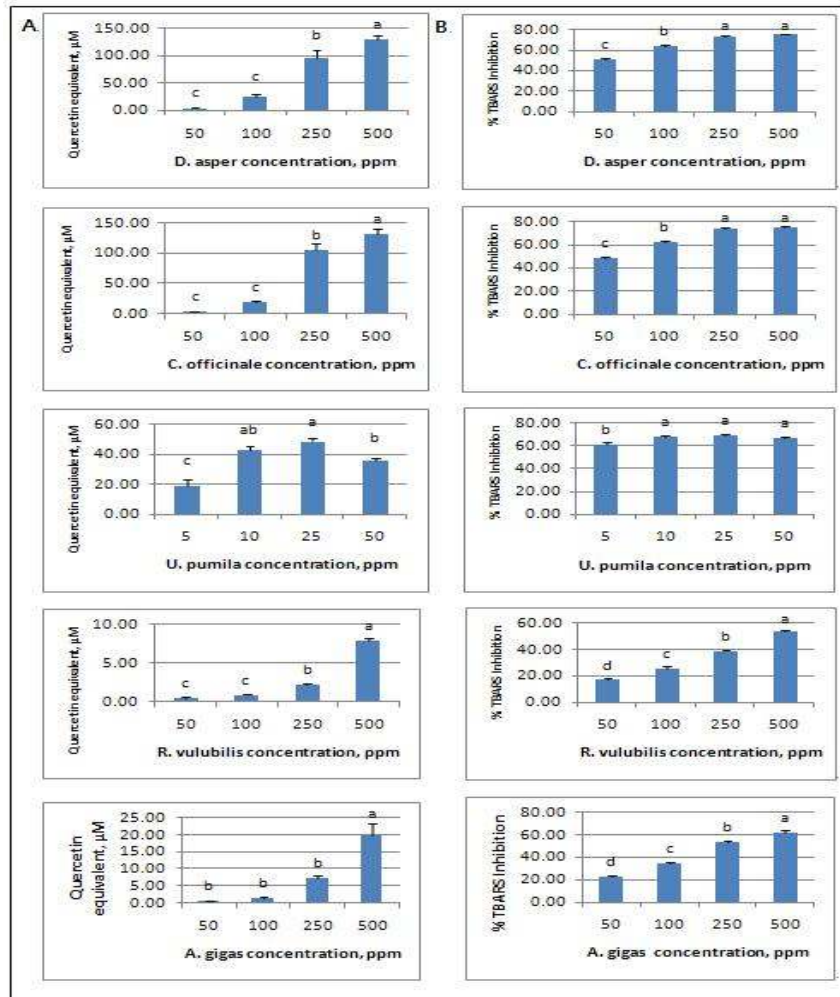


Fig. 23. 5가지 생약 추출물의 Quercetin Equivalence(A)와 TBARS inhibition(B)으로 측정된 항산화 활성.

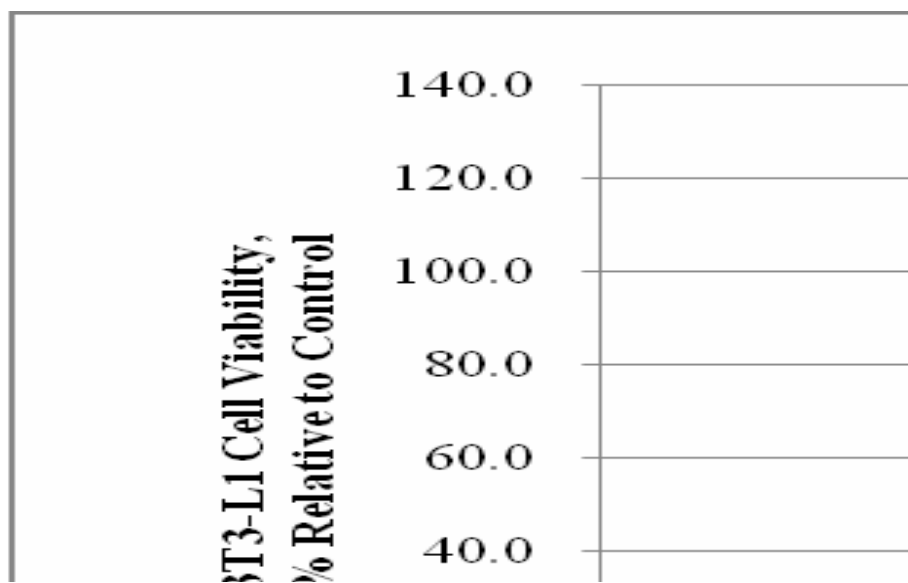


Fig. 24. 3T3-L1 cell viability와 TBARS inhibition의 상관관계.

7. 거세쥐 모델에서 성장촉진효과

거세한 rat에 생약추출물을 투여할 경우 일어날 생체 내 지표변화를 측정하여 이후 소에 적용 시 필요한 기초정보를 확보하기 위해 실시하였다. 시료는 속단, 하수오, 당귀의 열수추출물, 이 세 가지의 1:1:1.077배합물(시험물질1), 시험물질1 81.055%에 lysine 5%, arginine 13% 그리고 vitamin B1 0.945%를 첨가한 시험물질2를 200ppm/체중100g 농도로 5주간 경구투여 하였다.

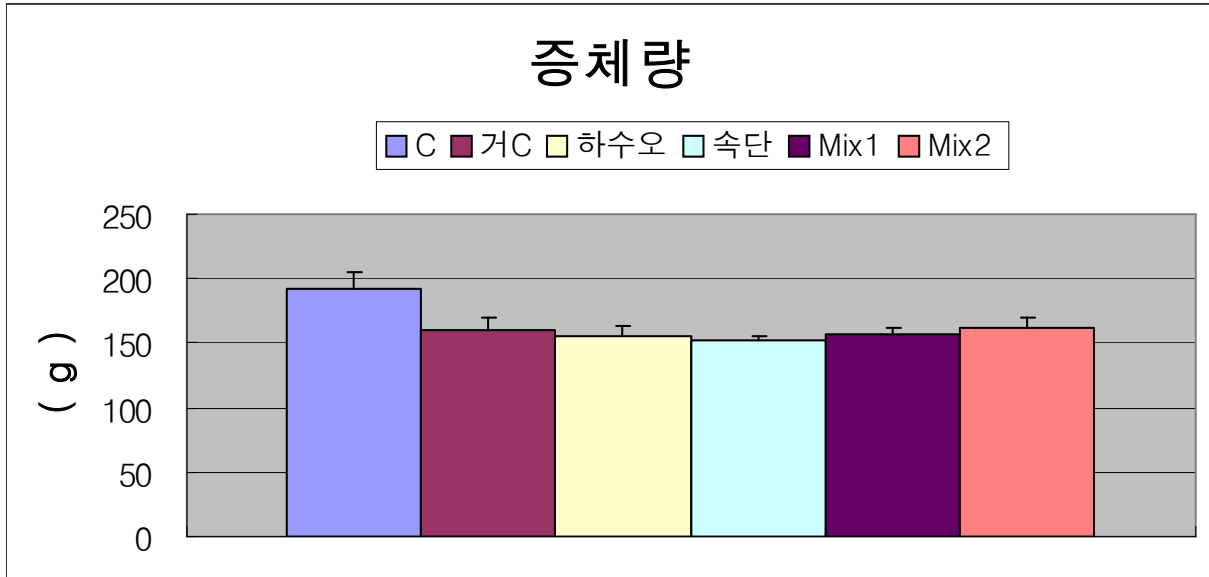


Fig. 25. 거세쥐에서 시험물질의 증체량에 대한 영향.

4주령의 Wistar Rat를 구입하여 1주간 환경에 적응시킨 후 Ether로 마취시켜 외상수술에 의해 정소를 순식간에 절제한 후 안정회복시켜 수술부위가 완전히 치료된 후 실험에 이용하였다. 사양실험실시 결과 거세함에 따라 증체량은 유의하게 감소하였다. 그러나 각 추출물을 경구투여 한 결과 전 실험군에서 증체량의 회복은 기대에 미치지 못하였다. 사료섭취량도 실험구간에 차이가 없어 사료효율도 뚜렷한 차이를 나타내지 아니하였다. 이 실험 결과, 추출물의 투여농도를 증가시키거나 소에서의 사육기간을 고려하여 사육기간을 길게 계획하여 실시해 볼 필요가 있는 것으로 사료되었다.

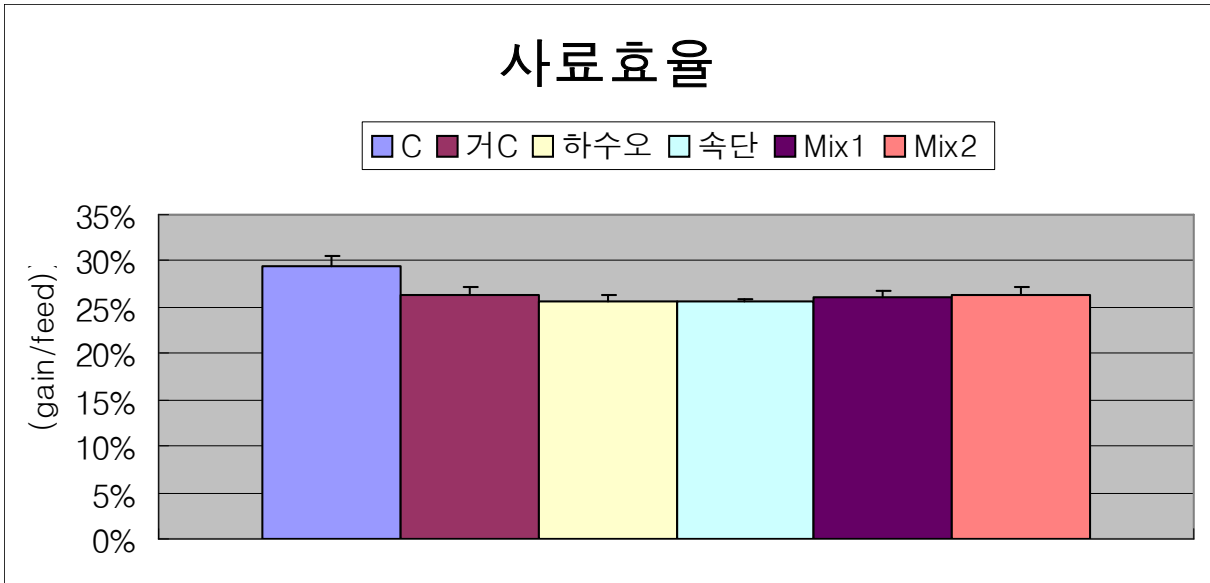


Fig. 26. 거세쥐에서 시험물질의 사료효율에 대한 영향.

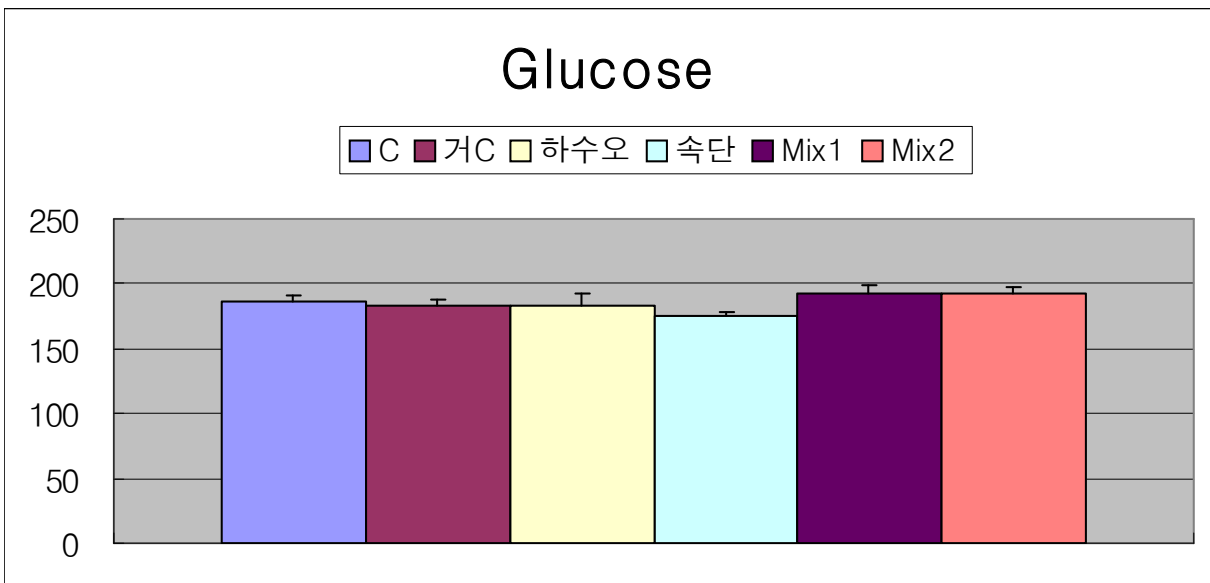


Fig. 27. 거세쥐에서 시험물질의 혈당에 대한 영향.

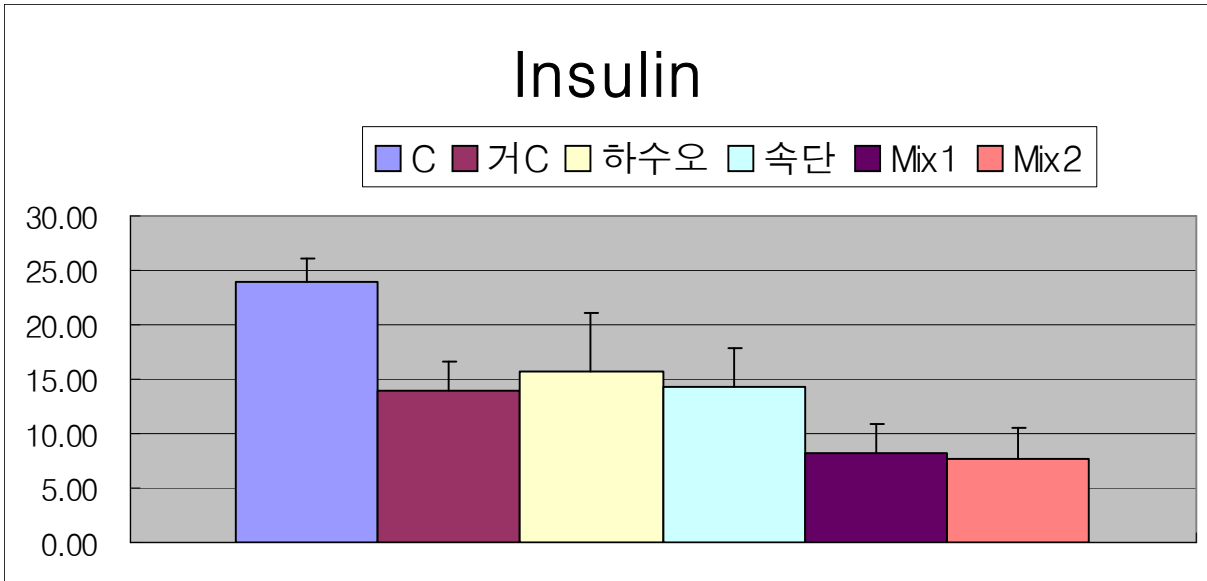


Fig. 28. 거세쥐에서 시험물질의 혈중 인슐린 농도에 대한 영향.

혈중 Glucose 농도는 처리구간에 유의한 차이를 나타내지 아니하였다. 혈중 Glucose 농도는 혈 중 Insulin 농도와 밀접하게 관련이 있는 데 인슐린 농도가 다소 낮은 경향이 있는 것으로 나타난 Mix 1 및 Mix 2 투여군의 혈 중 글루코스 함량이 다소 높은 결과를 나타내어 혈 중 인슐린 농도의 결과를 잘 반영해 주고 있다.

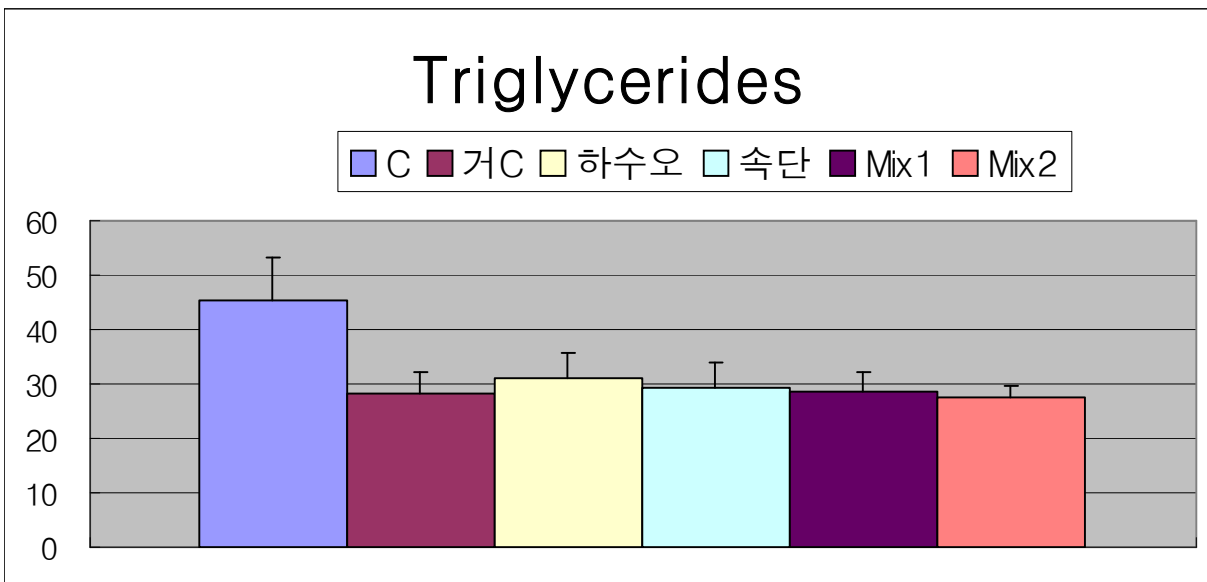


Fig. 29. 거세쥐에서 시험물질의 혈중 중성지방에 대한 영향.

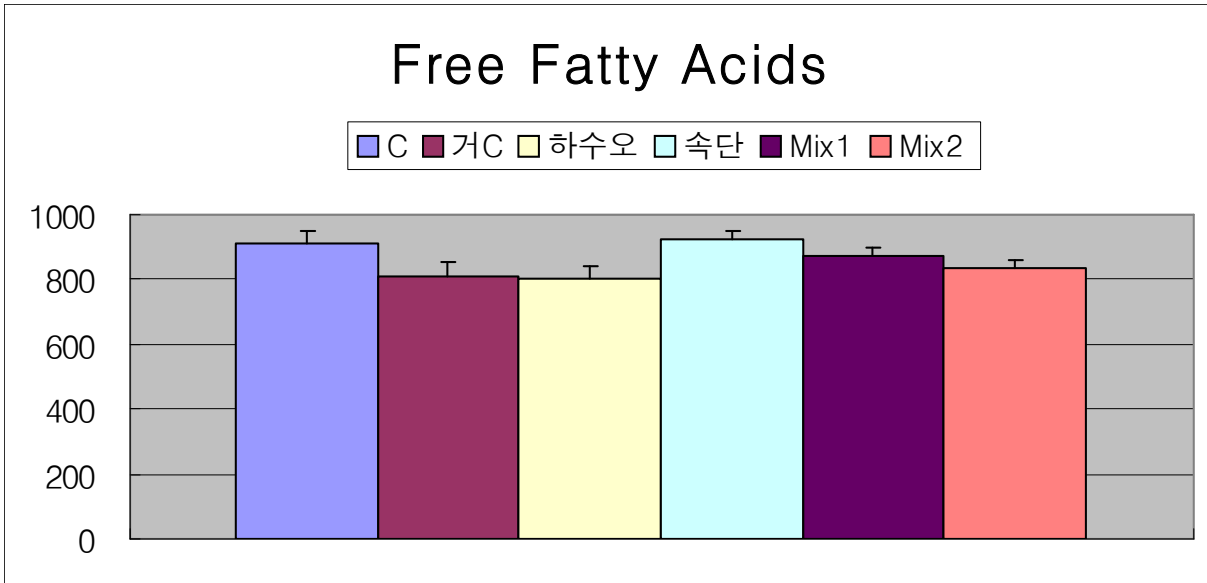


Fig. 30. 거세쥐에서 시험물질의 혈중 FFA 함량에 대한 영향.

거세함에 따라 혈 중 Triglyceride 농도가 유의하게 감소하는 것은 본 연구에서 측정하지는 않았지만 정소를 절제함으로 말미암아 융성호르몬 분비억제에 따른 지질생합성 저해가 원인인 것으로 사료되었다. 한편 혈중 유리지방산 농도는 처리구간에 유의한 차이를 나타내지 않아 천연추출물 투여에 의한 체내 지방 분해에는 차이가 없는 것으로 판단되었다 따라서, 본 연구에서 각 추출물 투여에 의한 체중 증가에 뚜렷한 회복을 보이지 아니한 것은 체내 축적에너지의 분해이용이 증가한 것 보다는 에너지 흡수이용 및 동화적 작용의 억제에 주로 기인하고 있는 것으로 판단되었다.

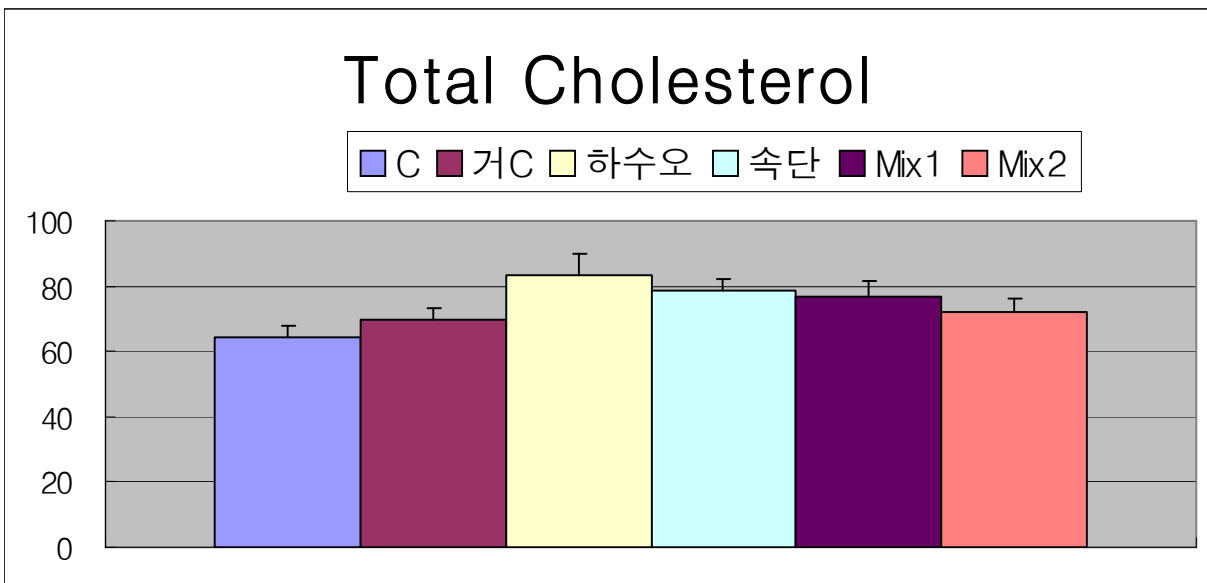


Fig. 31. 거세쥐에서 시험물질의 총 콜레스테롤에 대한 영향.

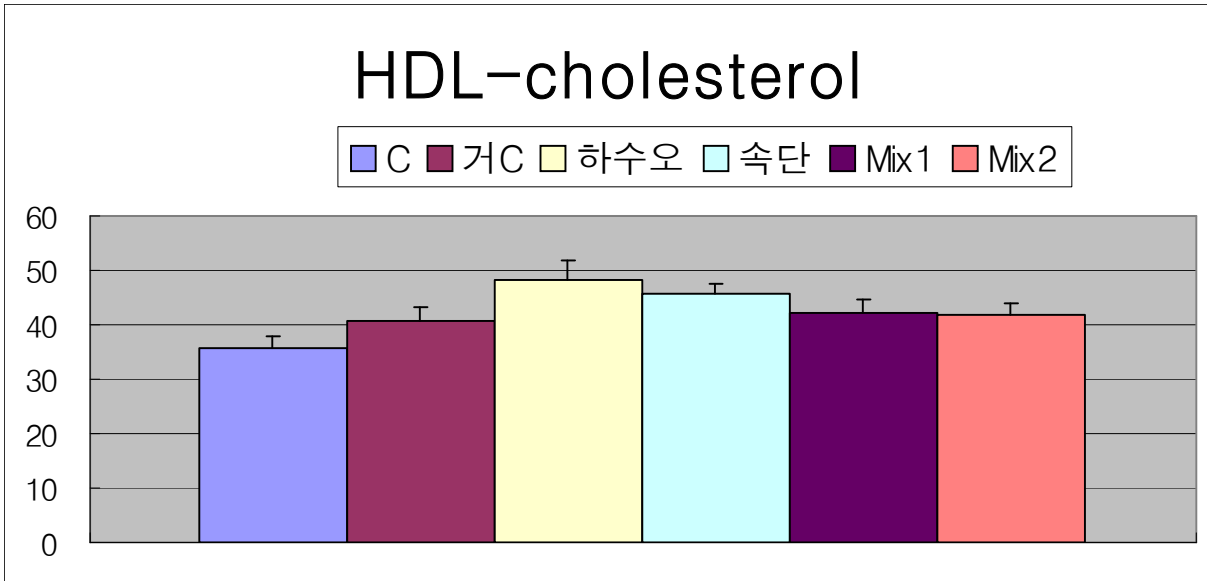


Fig. 32. 거세쥐에서 시험물질의 혈중 HDL 콜레스테롤에 대한 영향.

한편 혈중 총 콜레스테롤 및 HDL-cholesterol농도의 결과를 보면, 각각의 추출물 투여에 따른 총콜레스테롤농도는 비거세 군에 비해 유의하게 증가한 것으로 나타나 체내에서 거세로 말미암아 스테로이드계 호르몬의 기본 구성요소인 콜레스테롤의 이용성이 감소한 것이 원인이 된 것으로 사료되었다. 또한 총콜레스테롤농도와 HDL-Cholesterol 농도의 차이가 LDL-cholesterol 농도라 할 수 있는 데 LDL-cholesterol 농도는 각 처리구간에 비슷한 추이를 보여 콜레스테롤의 체내 생합성에는 거세에 따른 큰 차이를 보이지 않고 콜레스테롤의 이용성이 저하한 결과를 잘 반영하고 있다고 할 수 있다.

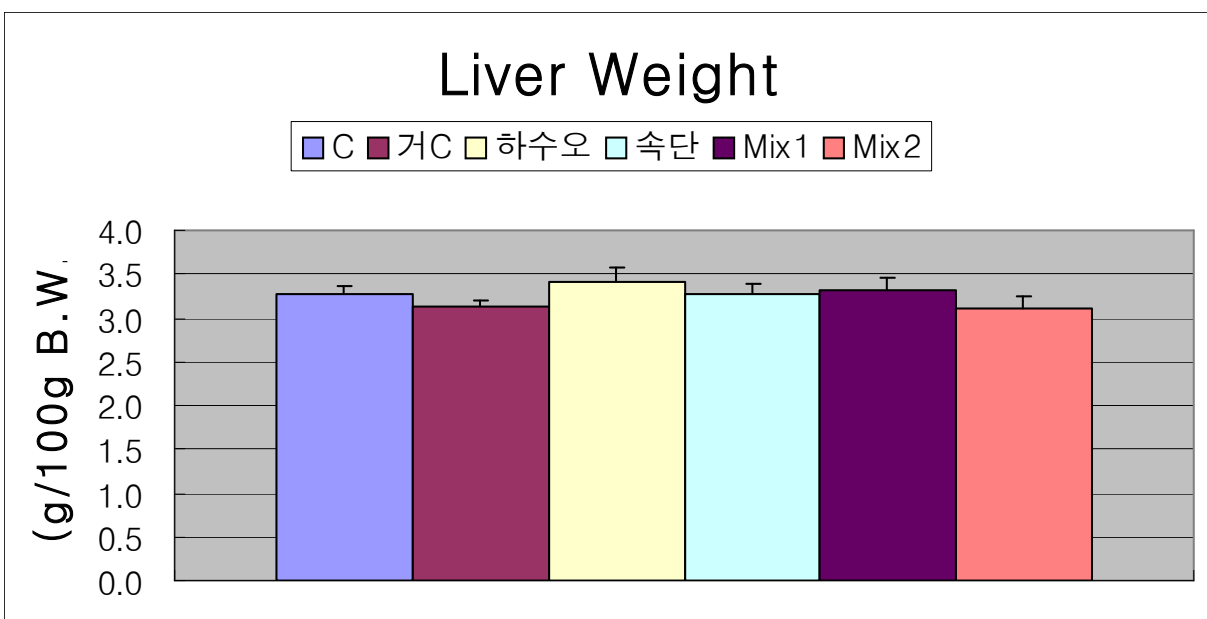


Fig. 33. 거세쥐에서 시험물질의 간중량에 대한 영향.

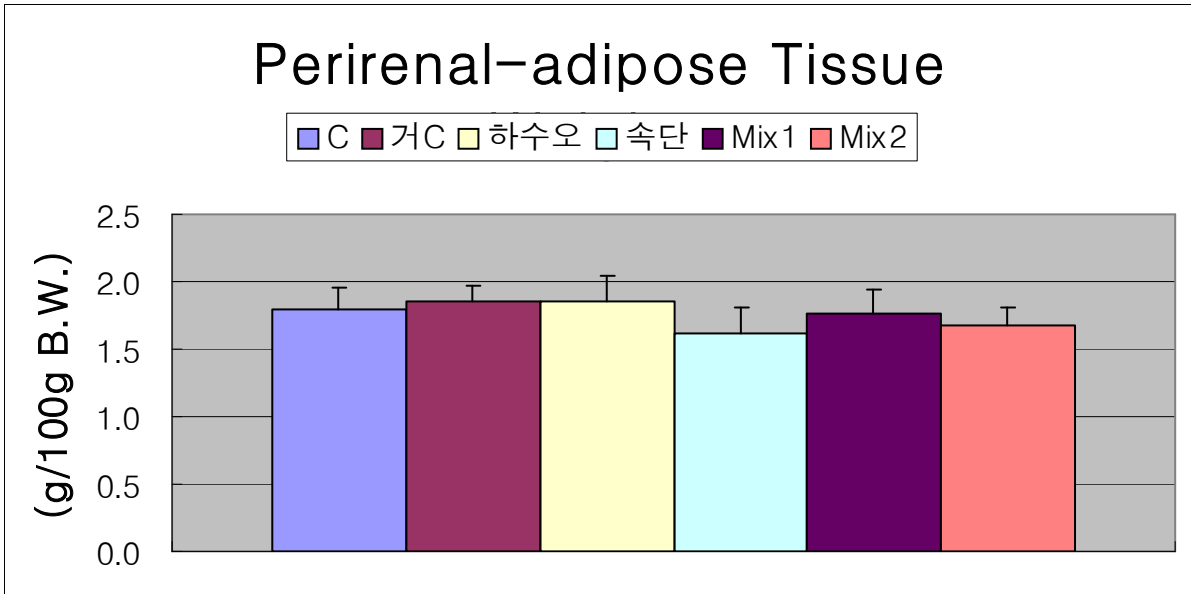


Fig. 34. 거세쥐에서 시험물질의 지방조직의 중량에 대한 영향.

위의 그래프에는 체중 100g 당 간장 및 신장주위 지방조직의 무게를 나타내었다. 간장 무게 및 지방조직무게의 결과 사료영양소의 이용효율은 저하하였지만 거세에 따른 어떤 대사이상도 관찰되지 아니하였고 각 처리샘플 투여에 따른 특이한 차이는 관찰되지 아니하였다.

8. 생약추출물 반추위내 대사영향 실험

하수오, 속단, 당귀, 천궁 등의 추출물을 이용하여 반추위내 대사활성에 미치는 영향을 보기 위해 조사했다. 한우암소의 반추위내 캐놀라가 장착된 동물을 이용하여 조사했으며 2시간 이내에 측정했다. 처리군의 T1은 속단추출분말+하수오추출분말+아미노산 및 비타민류 혼합물을 T2는 속단추출분말+하수오추출분말을 T3는 속단추출분말을 T4는 *in vitro* 당귀 주정 80% 동결건조를 T5는 하수오 추출분말을 T6는 10% feed(하수오+속단+천궁+당귀), T7는 50% feed(하수오+속단+천궁+당귀)로 처리하였다.

Table 24. *in vitro* 배양시간대에 따른 누적가스 발생량(ml)

배양 시간	Control	Treatments							SEM
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
24(h)	18.3±0.4 ^d	25.9±2.3 ^b	29.0±1.0 ^a	27.8±0.9 ^a	26.2±1.0 ^b	28.2±1.0 ^a	22.6±0.9 ^c	25.0±1.0 ^b	0.542
48(h)	30.9±0.1 ^{ab}	41.4±2.9 ^a	40.9±0.8 ^{ab}	40.5±0.6 ^a	37.6±0.3 ^{ab}	38.8±0.4 ^{ab}	31.9±0.0 ^b	36.0±1.0 ^{ab}	0.427

Values within same rows with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$, ANOVA)

Table 24에는 각 추출물의 단일 또는 혼합추출을 투여하고 배양한 *in vitro* 반추위내 영양소 대사과정을 조사한 결과 중 배양시간대에 따른 누적가스 발생량(ml)을 나타내었다. *in vitro* 배양시간대에 따른 누적가스 발생량을 조사하였다. 가스 발생량은 측정 기계의 피스톤의 위치를 읽어 측정했으며 배양시간을 24시간과 48시간으로 나누어 측정하였다. 누적가스 발생은 미생물 활성에 따른 가스 발생으로 반추위내 대사활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 측정하였는데 실험결과 대조군과 처리군과의 비교에서 24시간 배양했을 때 처리군은 유의한 차이를 보이며 누적가스 발생량이 높아지는 경향을 보였다. 처리구내에서 T2와 T5가 가장 높은 발생량을 나타내 하수오가 누적가스 발생량을 높이는데 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 T6, T7의 하수오, 속단, 당귀, 천궁을 10%, 50% 혼합한 사료에서도 대조군에 비해 유의한 차이를 보이며 높아지는 경향을 보였다. 48시간에서도 대조군과 처리구와 차이에서 유의적인 차이를 보이며 24시간 때의 누적가스발생량 결과와 유사한 패턴을 나타내었다. 그러나 T6 처리구는 대조군과 비교해 24시간에는 증가한 결과로 나타났지만 48시간에서는 차이가 없는 것으로 나타나 처리 농도가 낮기 때문인지 다른 요인이 작용한 것인지 분명히 알 수 없었다. 반면 T1, T2 군에서의 결과를 보면 하수오와 속단 추출물의 경우 누적가스 발생량을 높이는데 좋은 영양소 공급 원이라는 것이 증명되어 이를 이용한 첨가제 개발에 좋은 자료가 되리라 판단된다.

Table 25. 48시간 배양 후 메탄 및 이산화탄소 농도

구분	Control	Treatments						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
CH ₄ (%)	11.25	11.44	12.69	12.76	11.35	8.50	10.06	15.88
CO ₂ (%)	53.95	56.94	62.38	59.20	58.16	50.08	36.56	61.35

Table 25에는 각 추출물의 단일 또는 혼합추출을 투여하고 배양한 *in vitro* 반추위내 영양소 대사과정을 조사한 결과 중 배양시간대에 따른 메탄 및 이산화탄소 발생량(ml)을 나타내었다. 48시간 배양 후 메탄 및 이산화탄소 농도를 GC를 이용해서 측정한 값으로 메탄농도는 대조군에 비해 T1, T4 처리군은 차이를 보이지 아니하였으나 하수오 및 속단 혼합물 또는 속단단일 추출물의 경우 메탄생성량이 증가하는 것으로 나타났으며 T7군에서 가장 높은 값을 보였다. 한편, T5의 하수오 추출물을 넣고 배양한 경우 메탄생성량이 가장 낮은 것으로 나타나 메탄생성량을 촉진하는 것은 속단추출물의 영향이 크게 반영되는 것으로 판단되었다.

한편, 이산화탄소의 농도 역시 대조군과 처리군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 T6 첨가물을 제외하고는 전체적으로 대조군에 비해 이산화탄소발생량은 증가하는 경향이 있는 것으로 조사되었다.

Table 26에서는 *in vitro* 배양시간대에 따른 pH를 측정한 것으로 pH meter를 이용해 측정했으며 배양시간은 24시간과 48시간동안 배양하여 측정하였다.

pH의 측정은 미생물 활성에 따른 반추위내 대사활성 중 휘발성지방산 생성량과 밀접한 관계가 있는데, 24시간 배양결과 처리군이 대조군에 비해 유의적인 차이를 보이며 낮아지는 경향을 보였다. 처리구 내에서는 큰 차이를 보이지 않았지만 T2와 T3가 가장 큰 차이를 보이며 낮아지는 것으로 나타나 속단추출물이 pH를 낮추는데 영향을 미치는 것으로 보였다.

Table 26. *in vitro* 배양시간대에 따른 pH

배양 시간	Control	Treatments							SEM
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
24(h)	6.60 ±0.05 ^d	6.50 ±0.05 ^b	6.43 ±0.01 ^c	6.43 ±0.03 ^c	6.47 ±0.03 ^{bc}	6.46 ±0.02 ^{bc}	6.48 ±0.01 ^{bc}	6.44 ±0.02 ^c	0.012
48(h)	6.49 ±0.05 ^a	6.44 ±0.03 ^{bc}	6.30 ±0.04 ^{bc}	6.26 ±0.02 ^c	6.34 ±0.05 ^b	6.32 ±0.07 ^{bc}	6.46 ±0.03 ^a	6.26 ±0.03 ^c	0.019

Values within same rows with different superscripts are significantly different (p<0.05, ANOVA)

또한 48시간동안 배양한 결과에서도 유의적인 차이를 보이며 낮추는 경향을 보였으며 처리구 내에서 차이도 T3가 가장 낮은 것으로 나타나 속단추출물이 영향을 나타냈다. 또한 T7의 50% Mix feed도 pH를 낮추는 것으로 나타났다.

이를 결과적으로 볼 때 처리물질이 휘발성 지방산 생성에 의해 pH가 낮아지는 것으로 조사 되었으며 특히 속단추출물이 그 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

Table 27. 배양시간에 따른 암모니아태질소 농도(mg/100ml)

배양 시간	Control	Treatments							SEM
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
0(h)	4.72 ±0.01								
24(h)	8.70 ±0.23 ^b	16.47 ±0.42 ^a	9.65 ±0.48 ^b	7.06 ±0.70 ^b	9.22 ±0.73 ^b	8.95 ±1.07 ^b	12.91 ±0.25 ^b	16.78 ±3.86 ^a	0.744
48(h)	12.31 ±0.91 ^c	25.55 ±1.36 ^a	16.36 ±0.28 ^b	14.18 ±1.84 ^{bc}	17.46 ±0.43 ^b	17.98 ±0.00 ^b	7.04 ±0.70 ^d	14.58 ±3.09 ^{bc}	1.061

Values within same rows with different superscripts are significantly different (p<0.05, ANOVA)

위의 table 27은 배양시간에 따른 암모니아태질소 농도를 측정 한 것으로 Chaney와 Mabach의 방법으로 측정했으며 배양시간은 24시간과 48시간동안 배양하여 측정하였다. 암모니아태질소의 측정은 미생물 활성에 따른 반추위내 대사활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 측정했다. 배양 0시간에 Control을 측정 한 값을 Standard로 하여 4.72로 측정되었다.

위의 실험으로 24시간동안 배양한 결과 유의적인 차이를 보이지 못했다. 하지만 T1과 T7은 유의적인 차이를 보이며 암모니아태질소의 농도를 높이는 것으로 나타났다. 48시간동안 배양한 결과에서는 처리군이 대조군에 비해 유의적인 차이를 보이며 높아지는 경향을 보였으며 특히 T1은 다른 처리물질들 보다 높은 암모니아태질소 농도의 증가를 보였다.

이를 결과적으로 볼 때 T1과 T2가 높은 것으로 나타났는데 T3와 T5가 낮은 것으로 보아 속단과 하수오의 단독으로의 물질 보다 혼합하여 처리하는 것이 많은 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Table 28. 휘발성지방산 농도측정(mM)

Item	배양시간 (hr)	Treatments							
		control	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Acetate	0	33.07							
	24	45.48	65.74	61.22	67.23	63.99	66.62	60.94	67.97
	48	63.72	80.79	67.68	79.21	46.08	79.41	66.12	74.92
Propionate	0	19.67							
	24	27.19	32.60	37.83	41.07	39.11	41.50	37.17	42.60
	48	38.38	47.74	41.41	48.11	27.25	49.16	41.42	48.02
Isobutyrate	0	1.22							
	24	1.85	2.19	2.02	2.21	2.13	2.19	2.25	2.78
	48	2.70	2.91	2.46	2.81	1.74	2.96	2.32	2.98
Butyrate	0	13.50							
	24	20.39	32.26	27.08	30.19	28.97	28.30	25.43	28.29
	48	27.20	39.06	29.30	34.62	20.84	33.78	27.20	31.76
Isovalerate	0	2.95							
	24	3.57	5.49	5.35	5.98	5.74	5.54	5.14	6.56
	48	6.55	7.61	6.54	7.73	4.77	7.60	5.30	7.07
Valerate	0	1.63							
	24	3.03	4.71	4.32	4.55	4.39	4.63	3.79	4.44
	48	4.29	5.70	4.90	5.55	3.35	5.84	4.14	5.06

위의 table 28은 배양시간에 따른 휘발성지방산 농도를 측정된 것으로 배양 시간은 24시간과 48시간 동안 배양하여 측정하였으며 각 대조군에서 0시간에 Standard로 측정했다. 위의 실험에서 Acetate는 처리군이 대조군보다 유의적인 차이를 보이며 높이는 경향을 보였으며 T3와 T5와 같이 단독으로 처리했을 때 높이는 경향을 보였다. 하지만 48시간동안 배양했을 때 단독으로 처리한 물질들이 높은 경향을 보이긴 했지만 T1의 첨가하여 혼합한 경우에 가장 높게 나타났다. 또한 T7의 50% Mix feed도 높게 나타나는 경향을 보였다. 이후의 Propionate, Isobutyrate, Butyrate, Isovalerate, Valerate에서도 처리군이 대조군보다 높은 경향을 유지했으며 T3와 T5와 같은 단독 처리물질이 높고 48시간의 배양 시 단독처리물질과 T1의 첨가하여 혼합한 물질에서 높은 경향을 유지했다. 또한 T7의 50% Mix feed도 높게 나타나는 경향을 유지했다.

위의 결과로 볼 때 속단추출물이나 하수오 추출물의 단독처리한 물질이 휘발성지방산의 농도를 높이는데 영향을 미치는 것으로 판단되며 시간의 경과에 따라서는 아미노산이나 비타민과 같은 물질을 첨가하여 급여하는 것도 영양소 이용성에는 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

9. 거세비육우 증체실험

속단, 하수오, 천궁, 당귀, 서목태, 유근피로 제조한 사료첨가제를 또는 부형제와 혼합하여 10%와 50%의 농도로 희석한 후 Holstein에 급여하여 성장 및 육질개선에 대한 조사를 하였다.

실험에 사용된 동물은 Holstein으로 총 24마리로 각 군당 8마리씩 대조군(0%) 8마리, 처리군인 T1(10%) 8마리, T2(50%)가 8마리를 사용하였다. 총 사육기간은 13개월로 총 5번의 체중 측정을 하였다.

Table 29. Initial and final body weights(kg)

구 분	개시체중	1차체중	2차체중	3차체중	종료체중
Control	174.63±7.89	354.63±9.28	508.88±14.69	644.00 ±14.06	768.75±15.75
T-1	174.75 ±3.99	362.88±6.61	526.88 ±7.25	651.50±7.63	772.50 ±9.01
T-2	174.50±1.49	369.63 ±3.31	527.13±8.17	655.50 ±7.20	790.00±9.26

13개월동안 일반사료, 10%희석 첨가제혼합사료, 50%희석 첨가제 혼합사료를 급여한 각 군의 체중변화를 나타내었다. 개시체중은 대조군과 처리군 모두 0.07kg 의 오차범위 내에서 실험을 시작하였다.

1차 체중측정 결과 대조군에 비해 처리군이 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이를 나타내지는 않았으며 처리군 간의 농도에 따른 차이 역시 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 이후 2차 및 3차 체중 측정에서도 대조군과 처리군 간에 유의한 차이를 보이지 않았지만 증가하는 경향이 있는 것으로 나타났다. 그러나 처리군 간에는 사료 내 첨가 농도에 따른 뚜렷한 차이는 관찰되지 아니하였다.

따라서 실험사료의 급여함으로서 Control 사료급여군에 비해 생체중의 증가를 보이지만 유의한 차이를 보이지 않았으며 첨가제의 농도차이에 의한 미미하게 높은 농도의 처리군에서 종료체중이 높게 나타났지만 유의한 차이를 보이지는 않는 것으로 판단되었다.

Table 30. Body Weight Gain

구 분	1차 측정	2차측정	3차측정	4차측정
Control	180.00±5.93	333.75±11.49	469.38±13.51	594.13 ±14.81
T-1	188.13±5.44	352.13 ±7.14	476.75±9.20	597.75 ±10.95
T-2	195.13±5.45	352.63 ±9.18	481.00±7.97	615.50 ±9.95

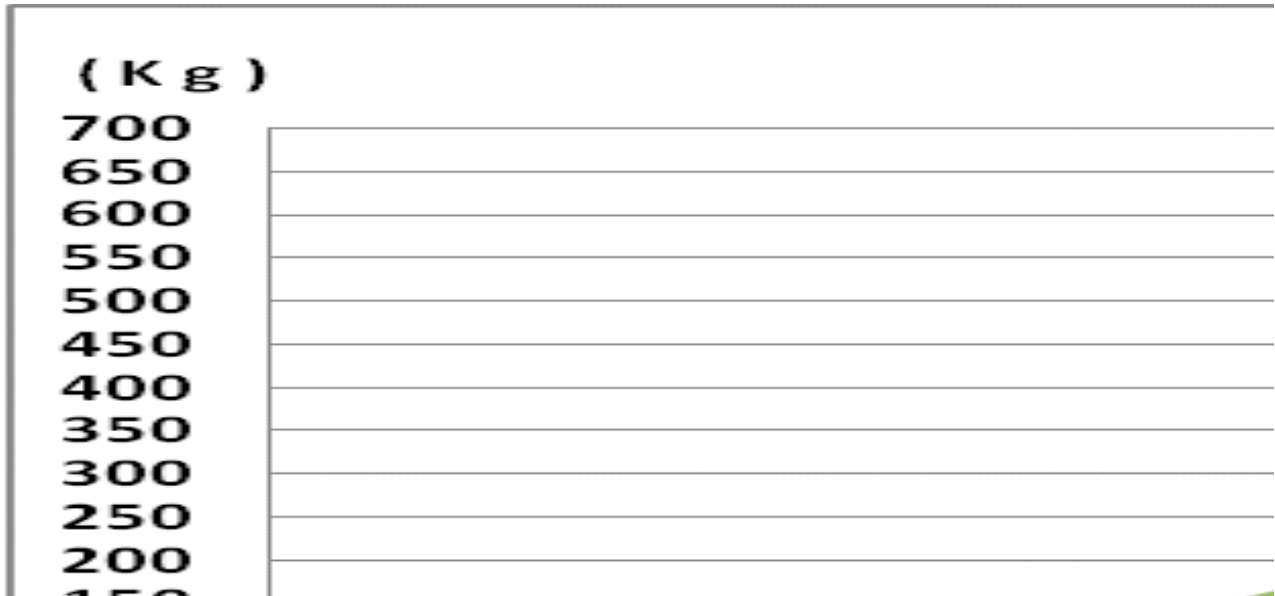


Fig. 35. 실험사료 급여의 홀스타인 거세 비육우의 증체에 대한 영향.

13개월동안 일반사료, 10%희석 첨가제혼합사료, 50%희석 첨가제 혼합사료의 급여 시 증체량의 변화는 실험 1차 측정 때부터 대조군에 비해 처리군이 유의한 차이를 보이며 높은 경향을 보였고 농도가 높을수록 증체량이 높은 경향을 보였다. 이후의 측정에서는 대조군보다 처리군에서 유의한 차이를 보이지는 않았지만 높은 경향은 유지했으며 농도에 따른 차이에서도 유의적인 차이를 보이지 않았다.

전체적으로 볼 때 실험사료의 급여가 Control 사료의 급여에 비해 초기에는 유의한 차이를 보이며 증가하였지만 성숙함에 따라 유의한 차이를 보이지 못하고 약간의 증가를 보였다. 처리 농도에 따른 변화에서도 성장 초기에 약간의 유의한 차이를 보인 것에 비해 성숙함에 따라 유의한 차이를 보이지 못했다.

Table 31. 일당 증체량

구 분	1차 측정	2차측정	3차측정	4차측정
Control	1.94±0.06	1.84±0.06	1.74±0.05	1.45 ±0.04
T-1	2.02±0.04	1.95 ±0.04	1.77±0.03	1.51 ±0.05
T-2	2.10±0.05	1.95 ±0.05	1.77±0.03	1.54 ±0.02



Fig. 36. 실험사료 급여의 홀스타인 거세 비육우의 일당 증체에 대한 영향.

13개월동안 일반사료, 10%희석 첨가제혼합사료, 50%희석 첨가제 혼합사료의 급여 시 일당 증체량의 변화는 체중 1차 측정 때부터 대조구에 비해 처리구가 유의한 차이를 보이며 높은 경향을 보였고 농도가 높을수록 일당 증체량이 높은 경향을 보였다. 이 결과로 보아 천연추출물 첨가제는 육성기에서 비육 전기까지의 성장에는 첨가효과가 있는 것으로 판단되며 이러한 결과는 농도차이에 의한 효과도 잘 반영되고 있는 것으로 분석되었다. 이후의 측정 결과도 처리구가 높은 경향을 유지하였으나 유의한 차이를 보이지 않았으며 농도에 따른 차이도 없는 것으로 나타났다.

Table 32. 사료효율

구 분	1차 측정	2차측정	3차측정	4차측정
Control	20.64±0.68	17.00±0.59	15.17±0.44	12.09 ±0.30
T-1	21.57±0.62	17.94 ±0.36	15.41±5.45	12.56 ±4.44
T-2	22.38±0.63	17.96 ±0.47	15.55±5.50	12.87 ±4.55

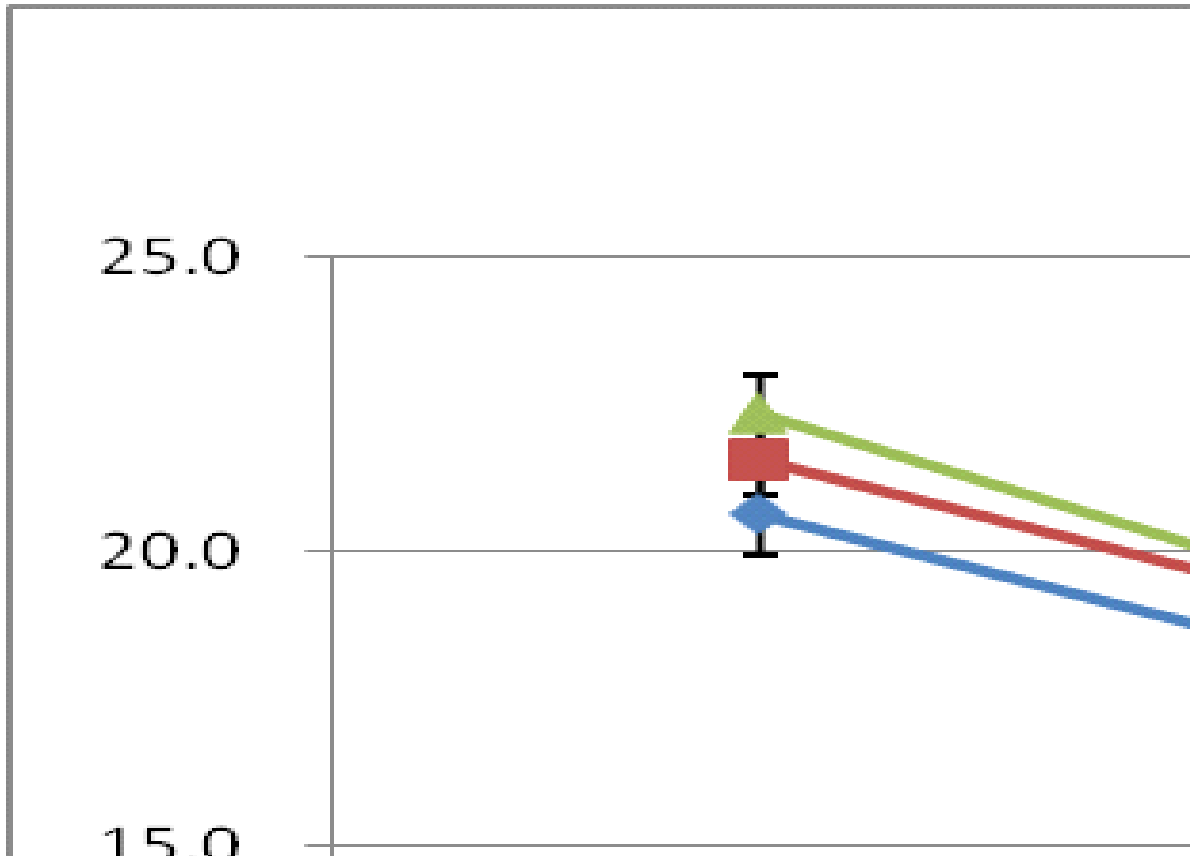


Fig. 37. 실험사료 급여에 의한 홀스타인 거세 비육우의 사료효율.

13개월동안 실험사료를 급여한 결과, 사료효율의 변화는 실험 1차 측정(93일 측정) 때 처리군의 사료 효율이 대조군에 비해 20% 이상 개선되는 사료효율을 보였으며 대조군에 비해 처리군이 유의한 차이를 보이며 처리군 간에도 농도가 높을수록 사료효율이 높아지는 경향을 보였다.

이상의 결과로부터 천연추출물 첨가사료의 급여가 Control 사료를 급여한 것에 비해 초기에는 유의한 차이를 보이며 사료효율이 높아지는 경향을 보였지만 성숙함에 따라 유의한 차이를 보이지 못하고 약간의 사료효율 증가만 보였다. 처리 농도에 따른 변화에서도 성장 초기에 약간의 유의한 차이를 보인 것에 비해 성숙함에 따라 유의한 차이를 보이지 못했다.

10. 거세 비육우 육질등급 판정

Table 33. 육질의 변화 - pH

구 분	Control	T1	T2
Mean	5.61	5.54	5.53
SD	2.69	1.95	3.91
SE	0.90	0.56	1.13

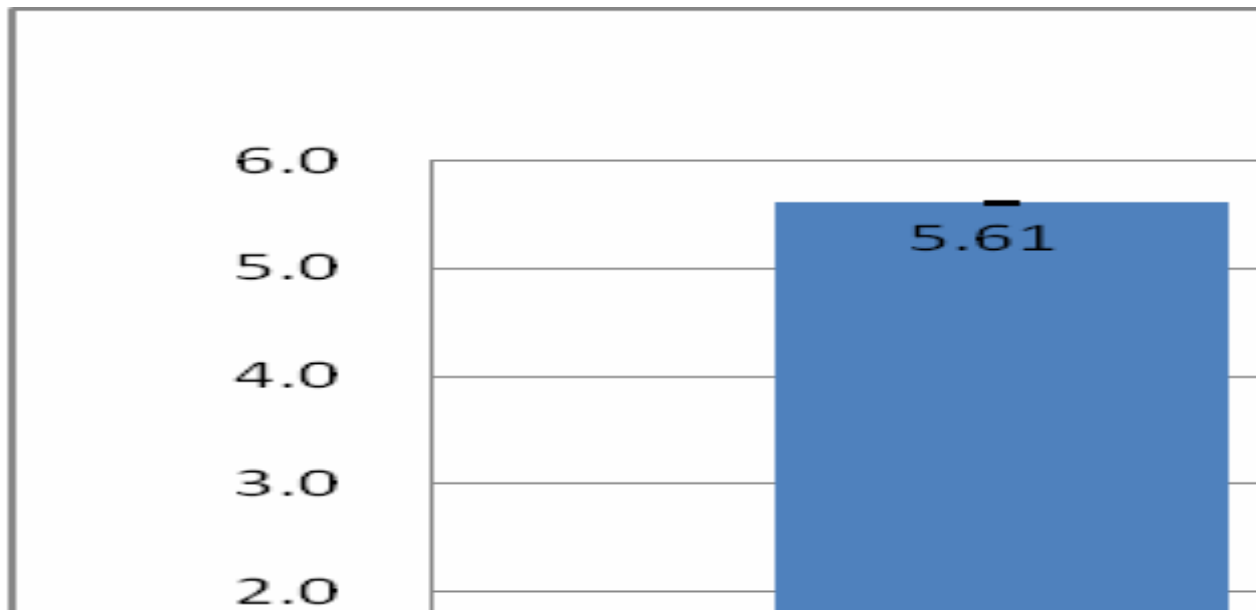


Fig. 38. 실험사료의 급여에 의한 홀스타인 거세 비육우 조직내 pH 변화.

Fig. 38에는 시험사육기간동안 대조사료 및 실험사료를 급여한 홀스타인 거세비육우의 조직내 pH값을 나타내었다. 실험에 사용한 Sample 부위는 등심을 사용했으며 pH 측정은 도축 후 12시간 이내에 Sample을 채취하여 측정했다. 실험사료에 급여에 따른 pH는 Control이 5.61, T1가 5.54, T2가 5.53로서 각 실험구간에 차이가 없었으며 모두 5.5~6.5 의 정상치를 나타내었다.

Table 34. 육질의 변화 - 가열감량

구 분	Control	T1	T2
Mean	33.63	31.81	32.25
SD	2.69	1.95	3.91
SE	0.90	0.56	1.13

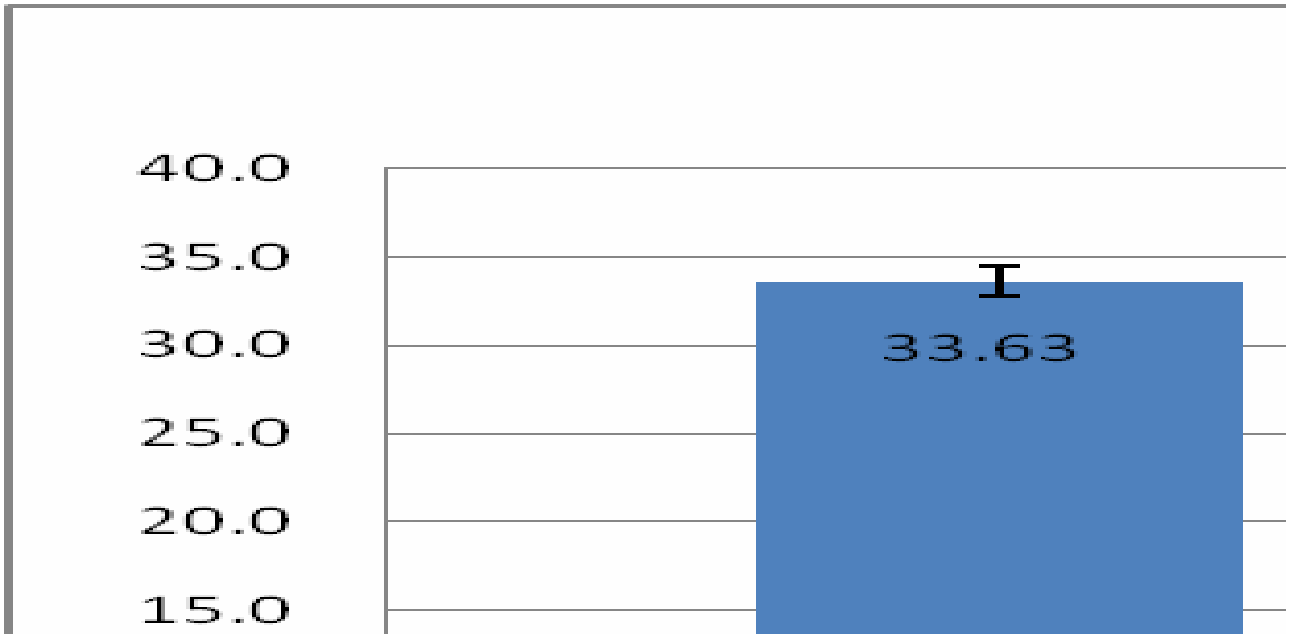


Fig. 39. 홀스타인 거세우의 허리부분 고기의 cooking loss에 대한 영향.

Fig. 39에는 시험사육기간 동안 대조사료 및 실험사료를 급여한 홀스타인 거세비육우의 육질 중 가열감량(cooking loss) 값을 나타내었다. 실험사료 급여에 따른 가열감량은 그림에 나타내었듯이 Control이 33.63, T1가 31.81, T2가 32.25로서 대조군에 비해 처리군에서 약간 낮아지는 경향을 보였지만 통계적 유의차는 없는 것으로 나타났다. 한편 처리군간의 첨가제 농도차이에 따른 변화는 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 실험사료의 급여가 가열감량을 낮추는데 유의한 차이를 보이지는 못했지만 낮아지는 경향을 보여 천연추출물의 항산화 활성이 높은 것에서 이 결과가 기인할 수도 있는 것으로 사료되었다.

Table 35. 육질의 변화 - 보수력

구 분	Control	T1	T2
Mean	30.52	44.63	37.93
SD	4.33	6.64	9.58
SE	1.44	1.92	2.76

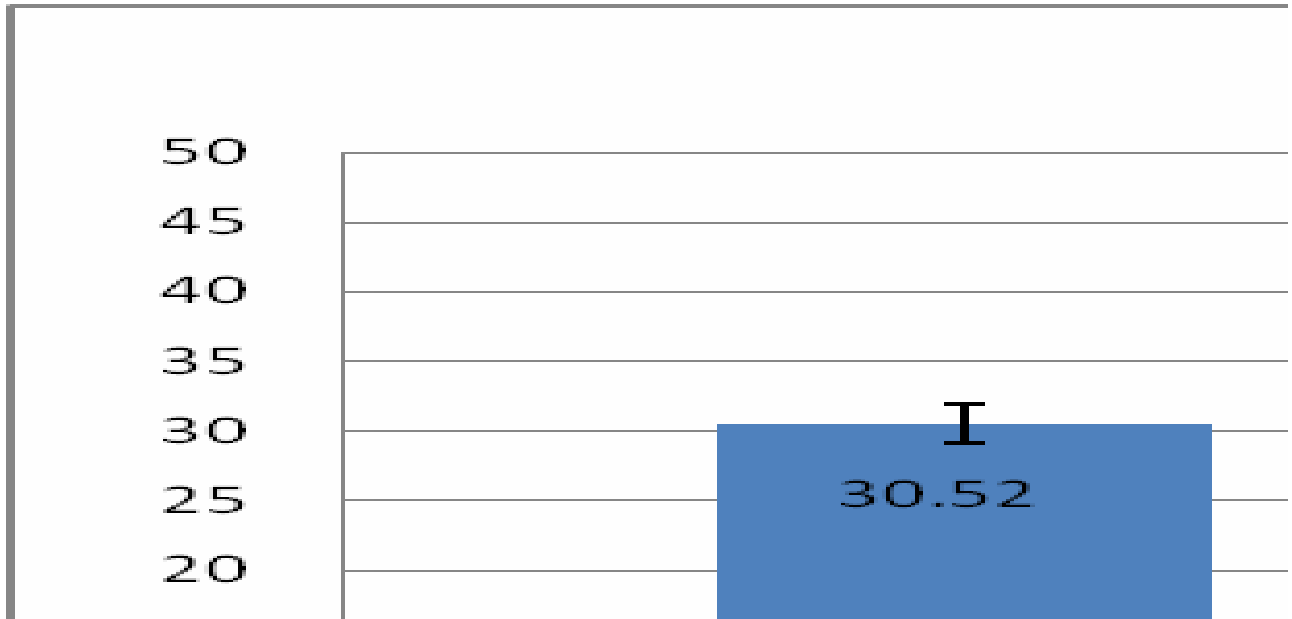


Fig. 40. 홀스타인 거세 비육우 허리부분 고기의 보수력에 대한 영향.

Fig. 40에는 시험사육기간 동안 대조사료 및 실험사료를 급여한 홀스타인 거세비육우의 육질 중 보수력(water holding capacity) 값을 나타내었다. 실험사료에 급여에 따른 보수력의 차이는 Control이 30.52, T1가 44.63, T2가 37.93을 보여 대조군과 처리군과 사이에 유의한 차이를 보이며 높아지는 결과를 나타내었다. 처리군간의 비교에서는 고농도로 급여한 것에서 보수력은 낮아 농도의존적으로 보수력이 증가하지는 않는 것으로 사료되었다. 이렇게 처리군 사료급여에 따른 보수력이 증가하는 결과는 첨가제의 향산화 효능이 높은 결과와 관련하는 것으로 사료되며 이러한 결과는 Fig. 39의 가열감량이 낮아지는 결과를 뒷받침하는 것으로서 향산화력이 높은 첨가제를 급여함으로써 거세육우의 조직의 물리화학적 특성을 개선시켜 육즙손실이 적어짐으로서 육우의 맛과 향을 높일 수 있을 것으로 기대되었다.

Table 36. 육질의 변화 - Drip loss

구분	Control		T1		T2	
	3일차	7일차	3일차	7일차	3일차	7일차
Mean	1.30	2.26	0.78	1.04	1.33	1.63
SD	0.36	0.48	0.36	0.30	0.39	0.38
SE	0.12	0.16	0.10	0.09	0.11	0.11

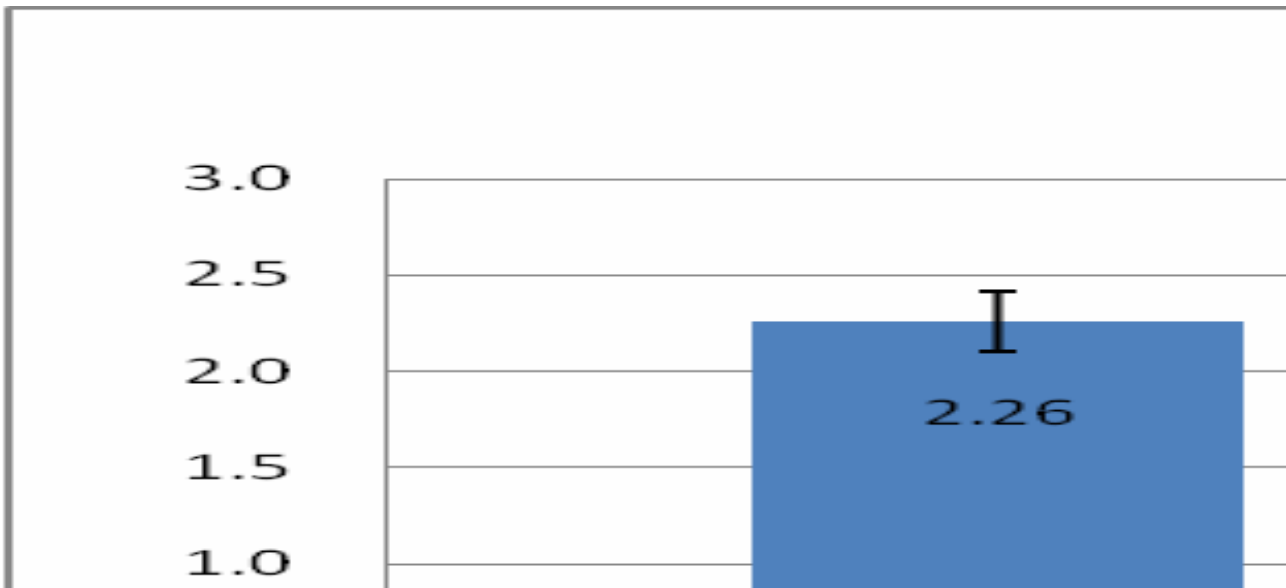
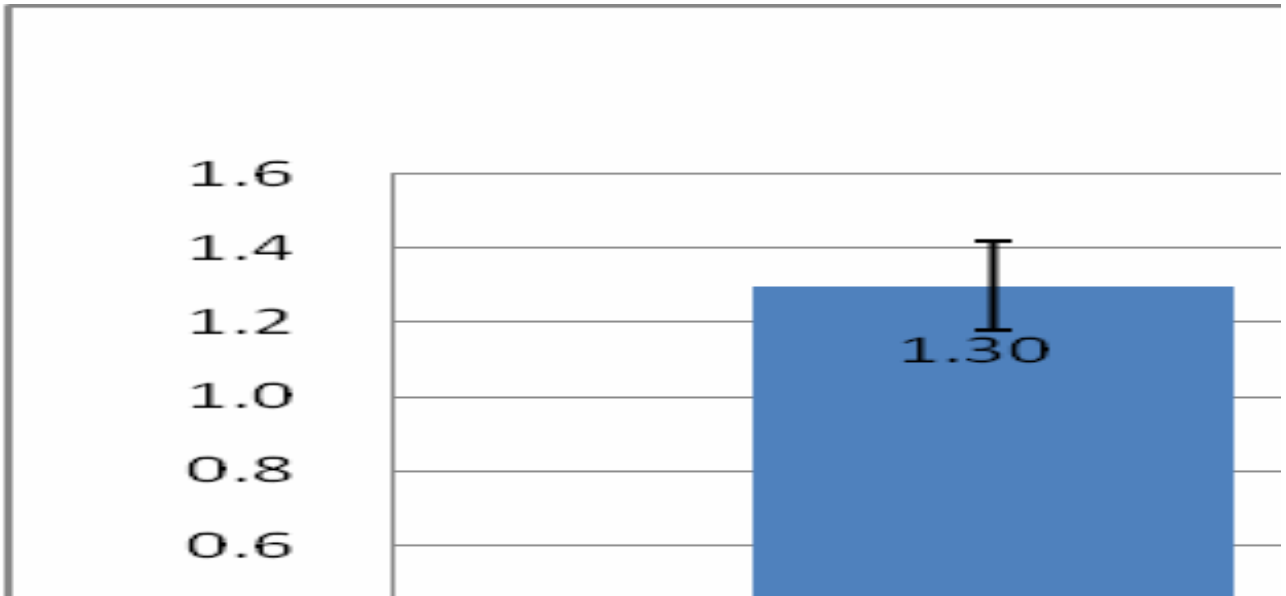


Fig. 41. 홀스타인 거세 비육우의 허리부분 고기의 저장감량에 대한 영향.

Fig. 41에는 시험사육기간 동안 대조사료 및 실험사료를 급여한 홀스타인 거세비육우의 육질 중 저장 3일째와 7일째의 저장감량 (drip loss) 값을 나타내었다.

Drip loss는 Sample 채취 후 3일과 7일 동안 냉장상태를 유지하며 저장한 후 분석하였다. 실험사료 급여에 따른 Drip loss의 비교는 3일간 저장하고 감량을 측정된 결과 Control은 1.30, T1은 0.78, T2는 1.33을 보여 1% 내외로 3일 저장에 따른 처리구간에 유의한 차이를 보이지 않았지만 첨가제를 저농도로 급여한 것에서 가장 낮은 값을 보여 초기저장에서도 저장감량을 개선시킬 수 있는 것으로 판단되었다. 7일간 저장한 후의 저장감량 결과를 보면, 대조군이 2.26%인 것에 비해 T1이 1.04%, T2가 1.63%로 유의하게 낮아지는 결과를 나타내어 보수력이 개선된 것과 가열감량이 줄어든 결과 모두 항산화력이 높은 첨가제의 첨가효과에 의해 조직의 막의 산화가 줄어들고 따라서 막의 기능이 개선된 결과를 잘 반영해주고 있다고 할 수 있다. 이러한 결과를 위해서는 10% 농도의 것으로도 충분히 조직의 물리화학적 특성을 개선하는 효

과는 있어 이러한 것을 목적으로는 10%농도 이상의 첨가를 할 필요는 없는 것으로 판단되었다.

Table 37. 육질의 변화 - 전단력

구 분	Control	T1	T2
Mean	2.32	2.34	2.34
SD	0.01	0.01	0.01
SE	0.00	0.00	0.00

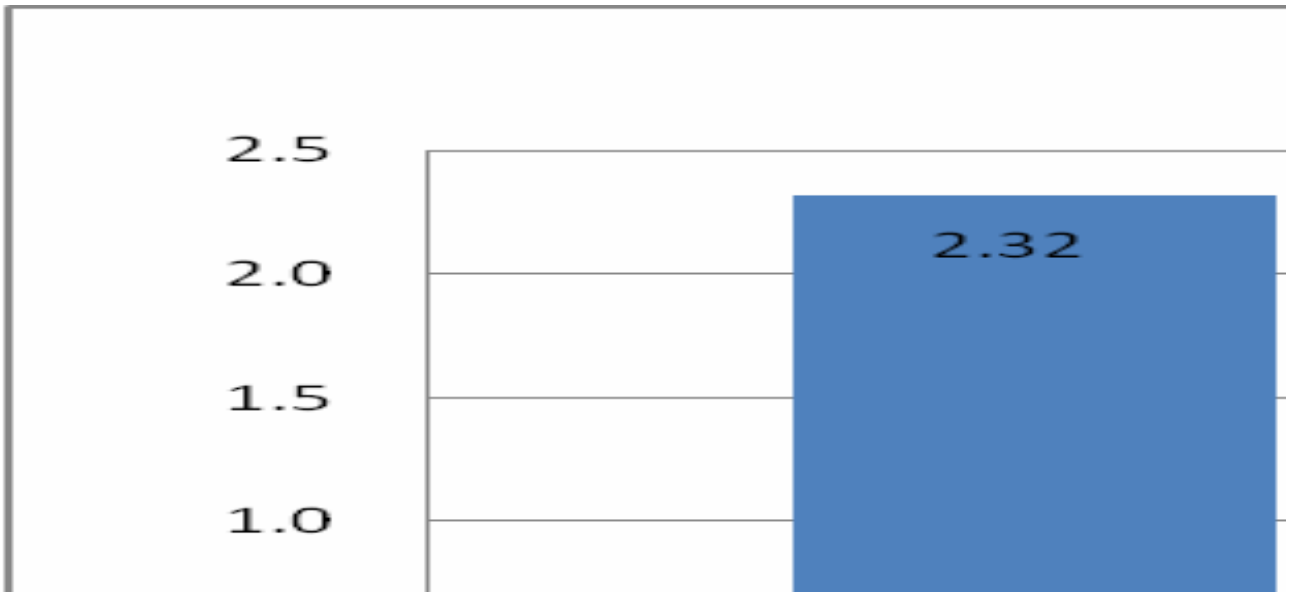


Fig. 42. 홀스타인 거세 비육우 허리부분 고기의 전단력에 대한 영향.

Fig. 42에는 시험사육기간 동안 대조사료 및 실험사료를 급여한 홀스타인 거세비육우의 육질 중 전단력(breaking force) 값을 나타내었다. 실험사료에 급여에 따른 전단력의 차이는 Control 이 2.32, T1가 2.34, T2가 2.34로서 전단력은 각 실험군 사이에 차이를 보이지 않았다

Table 38. 육질의 변화 - 육색

구분	Control			T1			T2		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b
Mean	39.74	19.62	11.30	38.68	18.95	10.76	40.07	17.19	10.83
SD	1.48	1.85	1.14	2.28	2.37	1.46	2.34	2.49	1.52
SE	0.49	0.62	0.38	0.66	0.68	0.42	0.67	0.72	0.44

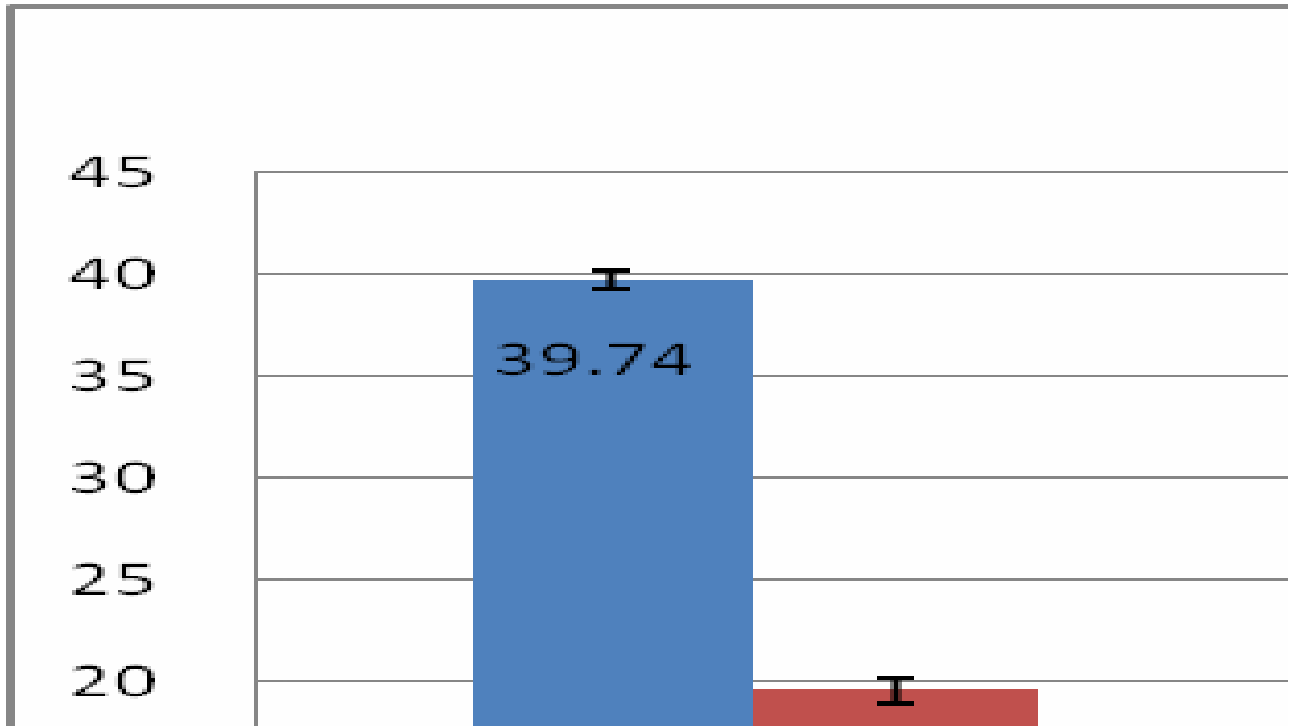


Fig. 43. 홀스타인 거세 비육우의 허리고기의 육색.

Fig. 43에는 시험사육기간 동안 대조사료 및 실험사료를 급여한 홀스타인 거세비육우의 육질 중 육색(meat color)을 나타내었다. 육색의 L은 밝기, a는 적색도, b는 황색도를 나타낸다. 실험사료에 급여에 따른 육색의 분석결과, L값은 대조군에서 39.74, T1가 38.68, T2가 40.07을 나타내어 보여 대조군과 처리군과의 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. a값의 경우 대조군과 10% 처리군 사이에는 차이가 없었으나 50% 처리구인 T2는 17.19로 다소 적색도가 낮아지는 경향을 나타내었다. 이렇게 적색도가 다소 낮아지는 경향을 보인 것은 지방 교잡도는 차이가 없으나 근육내에 있는 지방색도가 밝아진 것도 적색도가 다소 낮아진 원인의 하나가 될 수 있다고 판단되었다. 한편, 황색도를 나타내는 b값의 대조군과 처리군 사이에 유의한 차이는 아니었지만 처리군에서 다소 낮아지는 경향을 나타내어 고기가 창백해 보이는 정도가 낮아져 외관상의 육질도 첨가제 첨가급여에 의해 개선될 수 있는 가능성을 제시하였다.

Table 39. 등급판정 결과 - 등지방두께

구 분	Control	T1	T2
Mean	8.50	6.63	7.38
SD	4.11	1.69	2.26
SE	1.45	0.60	0.80

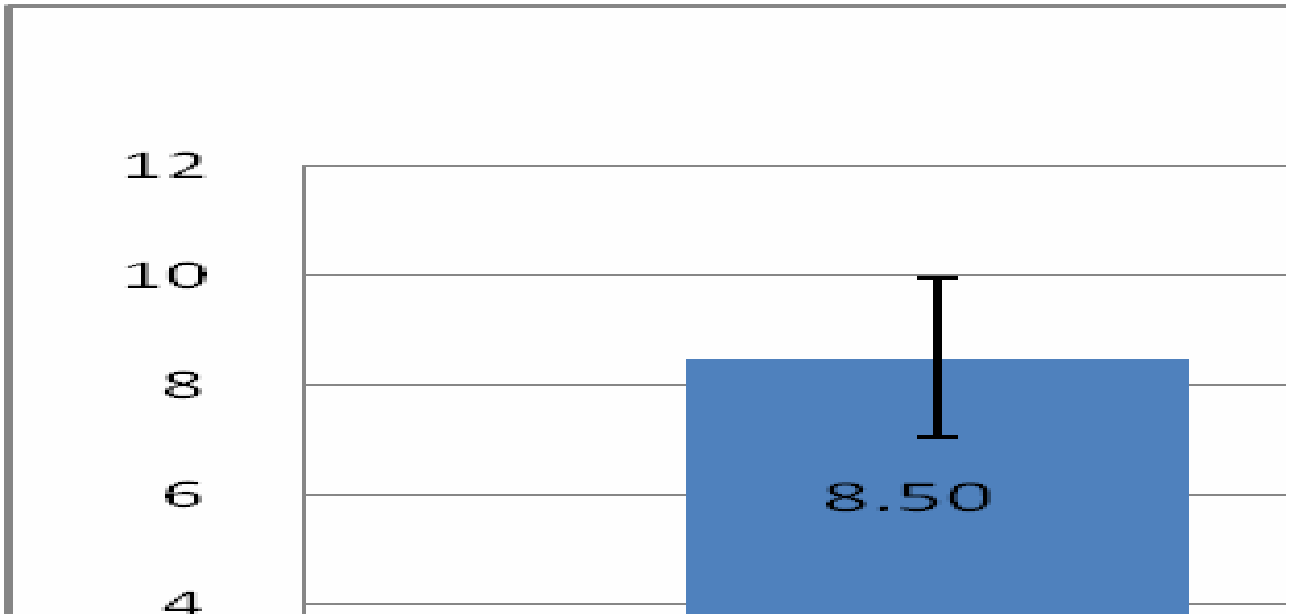


Fig. 44. 홀스타인 거세 비육우의 등지방 두께.

Fig. 44에는 실험사육이 종료된 홀스타인 거세비육우의 평균등지방두께를 나타내었다. 등지방두께는 대조군사료를 급여한 것에서 가장 두꺼운 것으로 나타났다. T1 및 T2군 모두 대조군보다 얇아져 첨가제급여에 의한 등지방두께가 얇아지는 결과는 섭취에너지의 재분배에서 등지방으로 축적되는 에너지 비용을 줄일 수 있는 흥미로운 결과이라고 할 수 있다.

Table 40. 등급판정 결과 - 육량지수

구 분	Control	T1	T2
Mean	61.52	62.58	62.02
SD	2.93	1.41	2.07
SE	1.03	0.50	0.73

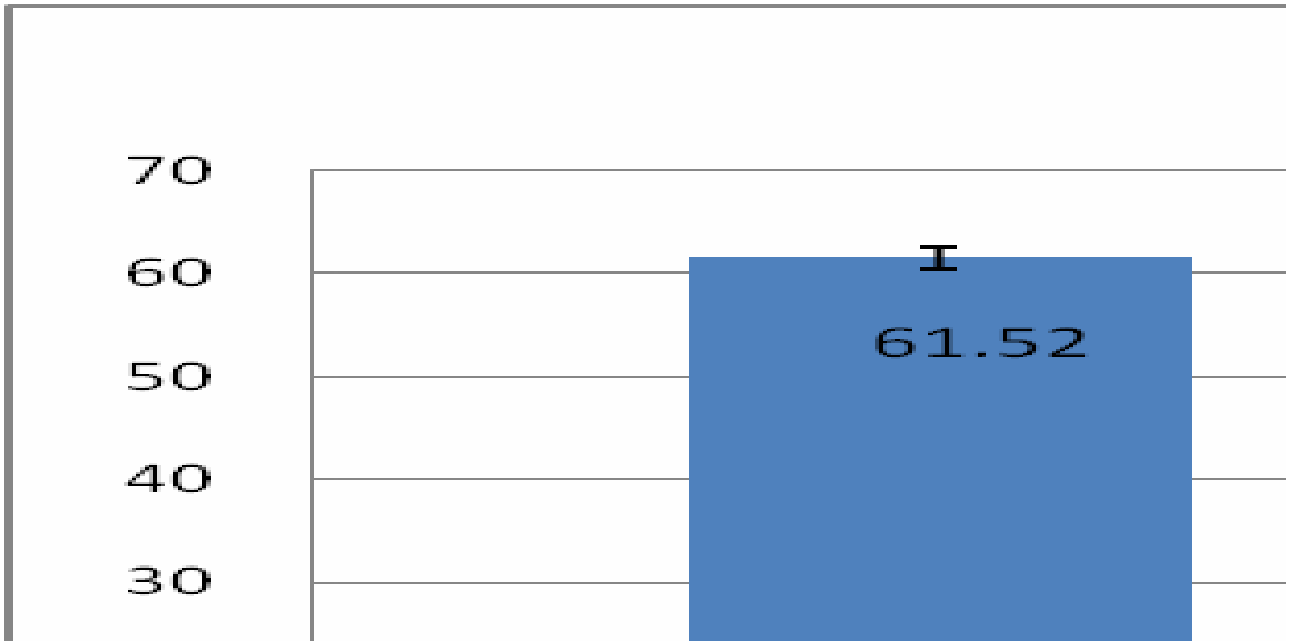


Fig. 45. 홀스타인 거세 비육우 허리부분 고기의 육량지수.

Table 41. 등급판정 결과 - 근내지방도

구분	Control	T1	T2
Mean	2.00	1.25	1.13
SD	1.69	0.46	0.35
SE	0.60	0.16	0.13

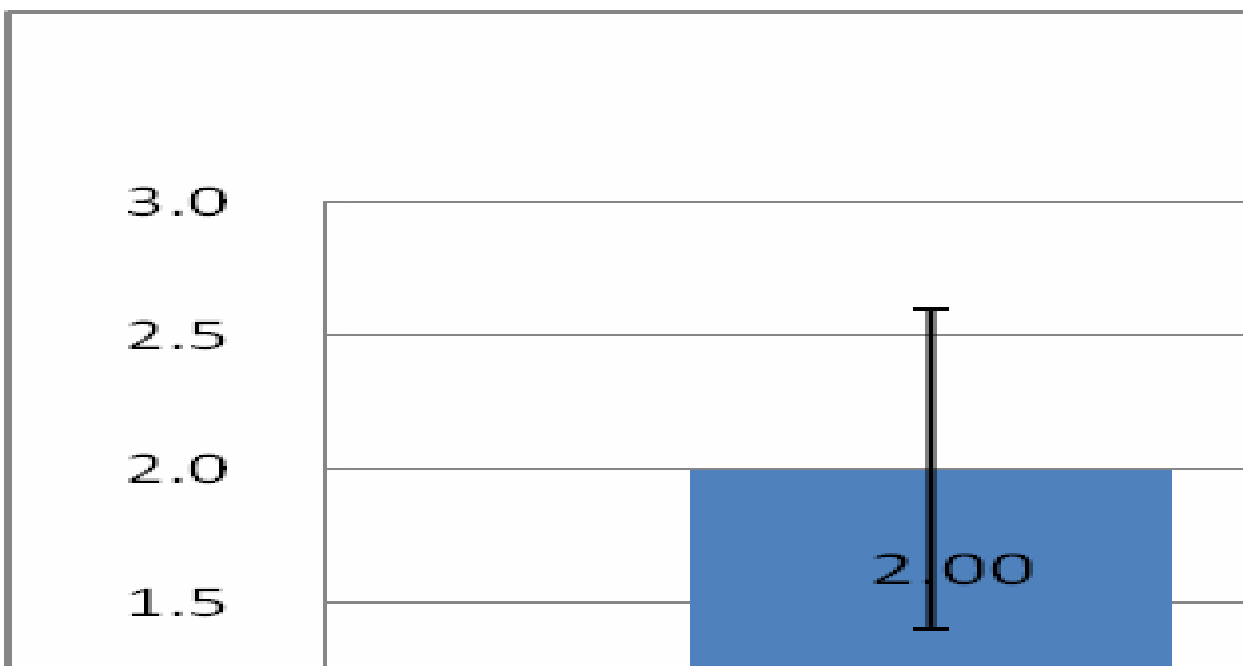


Fig. 46. 홀스타인 거세비육우 허리부분 고기의 근내지방도.

Fig. 46에는 실험사육이 종료된 홀스타인 거세비육우의 근내지방도를 나타내었다. 근내지방도는 통계적 유의차는 없었지만 대조군에서 가장 높은 값을 나타내었고 처리군 실험사료를 급여한 것에서 대조군에 비해 지방교잡도가 낮아졌다. 이것은 분명한 원인은 알 수 없으나 첨가제 급여에 의해 체내 지방세포의 증식 및 분화는 다소 억제되었을 가능성도 배제할 수 없다고 판단되었다.

Table 42. 등급판정 결과 - 등심단면적

구 분	Control	T1	T2
Mean	68.63	69.63	69.50
SD	4.41	6.16	4.63
SE	1.56	2.18	1.64

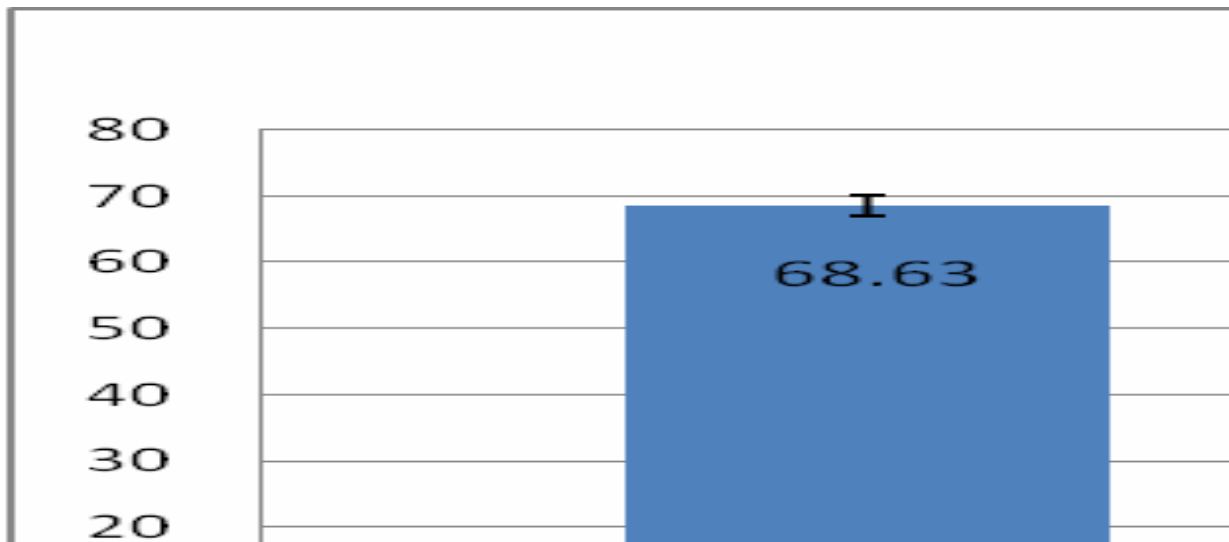


Fig. 47. 홀스타인 거세 비육우의 등심단면적.

Fig. 47에는 실험사육이 종료된 홀스타인 거세비육우의 등심단면적을 나타내었다. 등심단면적은 대조군에 비해 유의한 차이는 아니었지만 처리군에서 모두 높아지는 경향을 나타내었다. 이 결과는 체내 흡수된 영양소로부터의 지방축적효율보다는 단백질로 축적되는 효율이 높아졌을 가능성이 있는 것으로 사료되었다.

Table 43. 등급판정 결과 - 지방색

구 분	Control	T1	T2
Mean	2.25	2.25	2.75
SD	0.46	0.46	0.46
SE	0.16	0.16	0.16

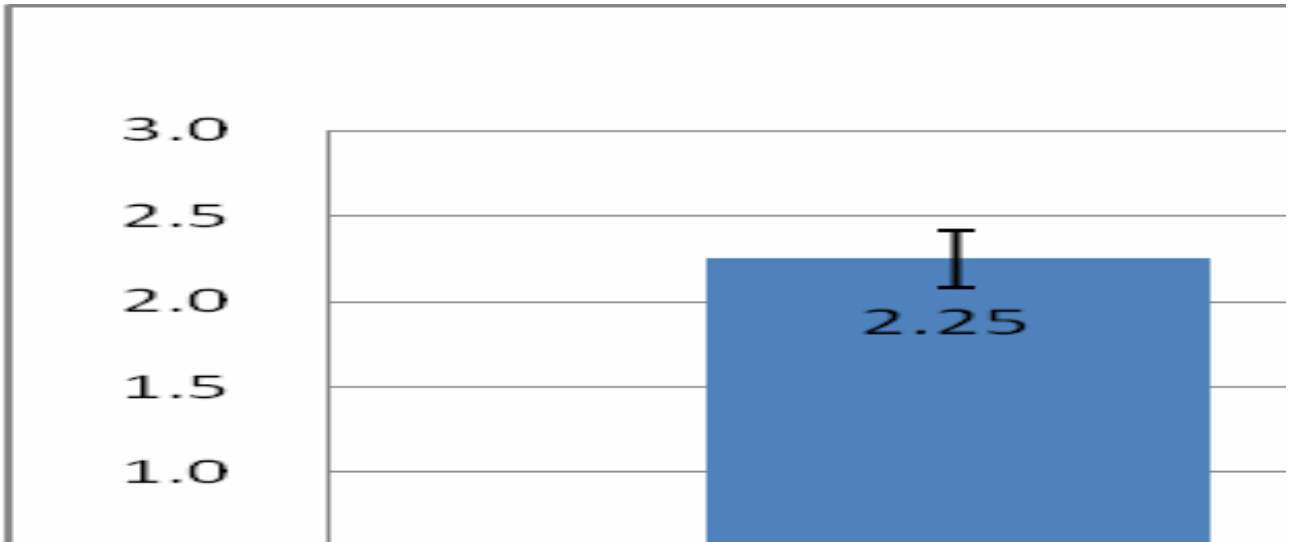


Fig. 48. 홀스타인 거세 비육우의 허리부분 고기의 지방색.

Fig. 48에는 실험사육이 종료된 홀스타인 거세비육우의 지방색을 나타내었다. 지방색은 대조군과 T1 처리군과는 비슷한 값을 나타내었는데 T2군에서 가장 높은 값을 보여 전체적으로 육색을 밝고 암적색을 다소 개선시켜 주는 것으로 사료되었다. 그러나 어떠한 작용기전에 의해 백색의 지방이 축적될 수 있는지는 알 수 없었다.

Table 44. 등급판정 결과 - 지육율

구 분	Control	T1	T2
Mean	55.78	56.69	55.81
SD	0.38	0.56	1.77
SE	0.14	0.20	0.63

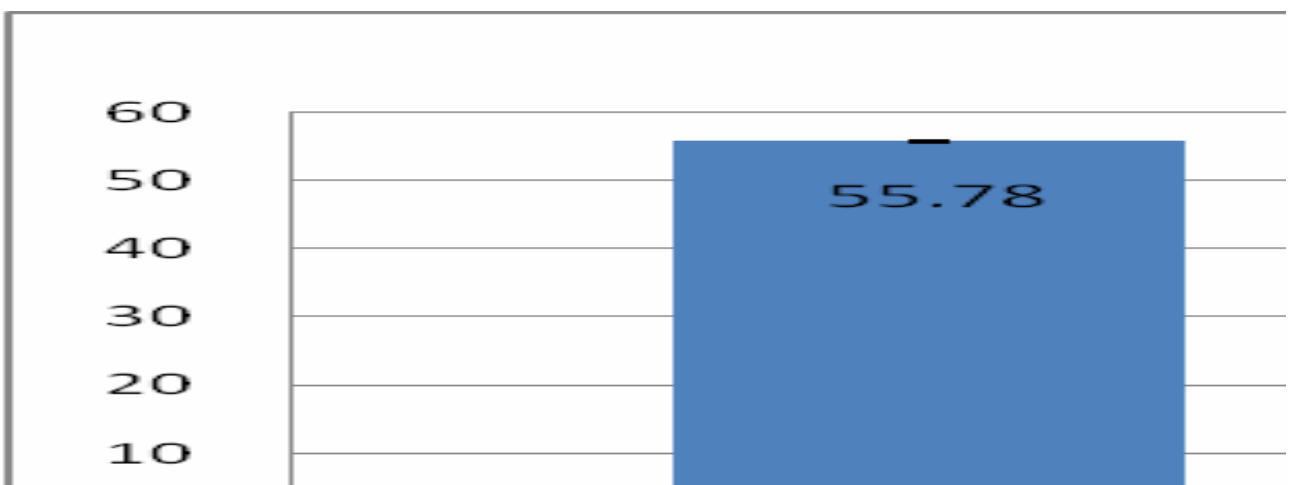


Fig. 49. 홀스타인 거세 비육우의 지육율.

Fig. 49에는 실험사육이 종료된 홀스타인 거세비육우의 지육율을 나타내었다. 지육율은 각 처리구간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 T1처리군에서 다소 높아지는 경향을 나타내어 생체중 당 머리와 내장부분을 제거하고 난 지육중량의 비율이 대조군에 비해 다소 개선되는 것으로 나타났다.

Table 45. 등급판정 결과 - 육질등급

구 분	Control	T1	T2
Mean	3.63	3.25	3.13
SD	0.74	0.46	0.35
SE	0.26	0.16	0.13

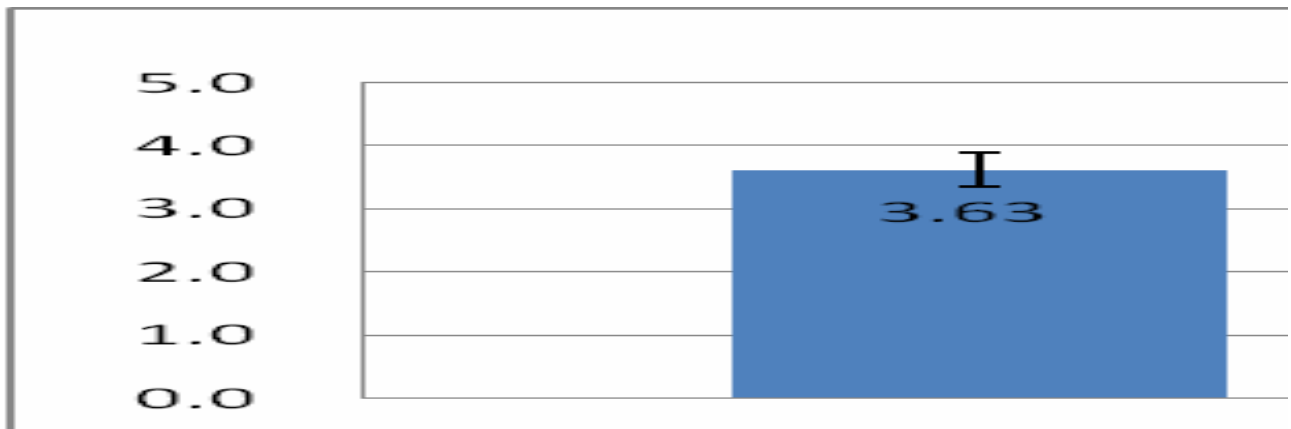


Fig. 50. 홀스타인 거세비육우의 실험사료에 의한 육질등급에 대한 영향.

Fig. 50에는 실험사육이 종료된 홀스타인 거세비육우의 최종 육질등급을 나타내었다. 육질등급의 계산은 1등급부터 5등급까지로 해서 최고 5점부터 1점까지로 계산했다. 1등급은 5점, 2등급은 4점, 3등급은 3점, 4등급은 2점, 5등급은 1점으로 해서 계산했다. 육질등급에서 실험사료의 급여에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 대조군에 비해 처리군에서 다소 낮은 경향을 나타내어 이 결과는 결국 등심내 마블링 등급이 낮은 것이 최종 육질등급을 낮추는 결과를 초래한 것으로 판단된다.

이상에서와 같이 실험사료의 급여가 육질의 등급을 높이는 데는 뚜렷한 영향을 미치지 않았지만 증체 및 조직의 물리화학적 특징, 육색 및 저장감량 등 고기 품질을 높이는 것으로 나타나 풍미까지 개선되면 거세에 의해 떨어진 증체량을 개선하며 육우산업에 새로운 경쟁력을 갖추게 하는 계기가 되리라 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 달성도 평가

1. 연구개발의 목표 및 내용

본 연구과제에서는 당사가 개발하고 특허등록이 된 성장촉진 효과가 있는 하수오 등 복합 추출물을 이용하여 거세우에서 육량을 증가시킬 수 있는 사료첨가제로 개발하고 동시에 이를 활용하여 육량과 함께 육질을 동시에 향상시키는 사양기술을 개발하여 국내 축산농가의 소득 향상에 기여하고자 진행하였다.

2. 1차년도 연구개발 목표 달성도

Table 46. 1차년도 연구개발 목표 및 달성도

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성율
1차 년도	생약 추출 및 분획	15%	- 사료첨가물 제조를 위한 최적 추출 법 제시	100%
	세포분화능	15%	- 세포분화능을 지닌 생약 확인 - 생약의 작용기전 추정	100%
	생약성분의 <i>in vitro</i> 에스트로겐 활성 검증	20%	- 활성을 지닌 생약 확인 - 생약의 작용기전 추정	100%
	<i>in vivo</i> 사료적합성 확인	25%	- 사료화의 적합성 평가 요소 파악 - 육질개선 기능 및 기작 추정	100%
	<i>in vivo</i> 성장촉진기작 확인	25%	- 생약의 성장촉진 기전 추정	100%

식물성에스트로겐 활성이 있는 것으로 추정되는 하수오, 속단, 당귀 생약의 열수추출물 및 추출수율이 가장 높을 것으로 추정되는 70% 주정 추출물을 제조하였다. 또한 유효성분을 연구하기 위해 용매별 계통분획을 하여 *in vitro*, *in vivo* 실험을 위해 제공하였다.

MCF-7 cell을 이용한 e-screening 실험에서 estrogenic 활성을 확인하려고 하였으나 활성을 가진 추출물 또는 분획을 확인할 수 없었다. 난소절제쥐를 이용한 열수추출물의 *in vivo* 에스트로겐 활성도 뚜렷하게 확인되지 않았다.

한 편 생약성분의 육질개선이나 육량증가 기능성을 확인하기위한 지방세포 및 근육세포주를 이용한 *in vitro* 실험에서는 하수오와 속단 1:1 배합추출분말에서 GLUT-4와 IRS-1 발현이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 그러나 거세쥐(ORX rat)을 이용한 실험에서는 증체량과 사료효율에서 유의한 결과를 얻지 못

했다.

3. 2차년도 연구개발 목표 달성도

Table 47. 2차년도 연구개발 목표 및 달성도

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성율
2차 년도	배합비 제형개발	15%	- 기능성에 적합한 배합비 도출 - 미생물의 작용 최소화	100%
	유효분획의 물질분리	20%	- 각 생약별 유효성분을 포함하는 분획의 정제	50%
	1,2차사양실험	45%	- 사료섭취량, 성장 효과 평가 - 생리지표분석결과와 일치성	100%
	유효분획의 활성확인	20%	- 유효분획 확인	50%

2차년도에는 하수오, 속단, 당귀ddhl에 소의 증체에 도움이 될 수 있는 추가의 생약소재를 검토하여 이들 생약을 최대한 활용할 수 있는 경제적인 사료첨가물 시제품을 생산하였다. 이를 이용하여 1차 및 2차 사양실험이 진행되었다. 그러나 사료첨가제의 경제성을 최대한 활용하여야 하므로 현 단계에서는 생약의 추출물에서 유효분획을 찾고 분리하는 과정이 필요없는 것으로 판단하여 생약의 열수추출물에 대해서만 *in vitro* 실험을 통해 육질개선 및 육량개선 실험을 진행하였다.

4. 3차년도 연구개발 목표 달성도

Table 48. 3차년도 연구개발 목표 및 달성도

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성율
3차 년도	최종제형 결정시제품제조	15%	- 제품의 경제성 및 사료 적합성	100%
	지표성분분석법 정립	10%	- HPLC 등에 의한 지표성분 정량	100%
	3차사양실험	35%	- 성장촉진효과, 육량개선 효과 - 육질개선 효과	100%
	MCF-7 실험	15%	- Estrogeinc 활성분획 확인	80%
	반추위 영향연구	15%	- 생약성분의 반추위내 영향 연구	100%
	Estrogenic 물질연구	10%	- Estrogenic 물질 category 연구	50%

사양실험을 위해 경제성이 높은 사료첨가제로서 시생산을 하였고 추가로 5종의 생약에 대해 메탄올 추출 후 계통분획물을 제조하였고 추가로 열수추출물을 제조하여 *in vitro* estrogenic 활성실험을 진행하였다. 추후 사용한 원료의 특성을 검토하고 분석법을 확립하기 위해 추출물의 HPLC 패턴을 분석하였다. 3차사양실험에서는 축우의 육질개선에 대한 영향을 평가하였고 추가로 하수오, 속단, 당귀 추출물의 기존 실험보다 낮은 농도에서 estrogenic 활성을 평가하였고 하수오, 속단, 천궁, 당귀 추출물의 반추위내 대사에 대한 영향을 평가한 결과 하수오와 속단의 단독추출물이 반추위내 유기산의 생성을 증가시켰음을 확인하였다.

5. 최종평가

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성율
최종 평가	사료제품개발	25%	- 제품의 경제성 및 사료 적합성 - 지표성분의 정량기술 확보	95%
	기능성 평가 및 기작규명	25%	- 육량증가 기작 연구	85%
	거세우 비육실험	50%	- 생약의 육질개선 효과 평가 - 비육을 위한 사양기술 도출	85%

거세우에서 육량을 증대시킬 것으로 기대되는 생약을 활용하여 사료첨가제 형태로 제조하여 사양실험에 적용하였다. 생약추출물을 이용하여 육량증가 및 육질개선에 관련된 생약의 기능성을 연구하였다. 사양실험을 통해 육량증가 및 육질개선에 대한 영향을 평가하였고 그 과정을 통해 추후 사양기술을 확립하는데 필요한 기술자료를 확보하였다.

제 2 절 관련분야 기술발전에 기여도

본 과제의 수행 결과 도출한 사료첨가제는 사양실험을 통해 전반적인 육량증가 및 육질개선의 효과를 얻지는 못하였지만 육성기에서는 성장촉진의 효과가 확인되었다. 또한 육질개선에서도 질감과 맛의결정에 중요한 보수성 및 드립손실이 감소하는 유의한 데이터를 얻었다. 반추위에서 유기산의 발효에 긍정적인 영향이 확인 되었는데 이는 생약소재의 기능성이 반추위내 대사와 관련되었음을 암시한다.

추가로 백합, 사상자, 원지, 상백피 추출물의 에스트로젠 및 항에스트로젠 활성을 확인한 것은 관련 소재를 이용한 갱년기 질환의 치료에 필요한 건강기능 식품 및 천연물 의약품 연구에 도움이 될 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화, 사업화 계획

본 과제 of 생약소재를 활용한 사료첨가제 2종이 상품화 되어 그 중 한 가지는 당사에서 제공한 추출물을 원료로 어류의 성장촉진용으로 사용되고 있다. 본 연구과제 이후 추가의 연구로 육질개선에 대한 기능성이 우수한 새로운 제품의 개발 가능성을 검토할 예정이다.

2. 특허 등 지식재산권 확보계획

4종 생약의 에스트로겐 활성화에 대해서는 특허를 출원하였다. 하수오, 숙단, 당귀 복합 또는 단일 소재의 육질개선 관련 기능성은 기존 공제된 적이 없는 기술이므로 특허화가 가능할 것으로 사료되어 추가 특허출원을 검토할 예정이다.

3. 추가연구, 타연구에 활용계획

특허를 출원한 4종 생약의 에스트로겐 활성화 및 항에스트로겐 활성화는 갱년기 증상을 겪는 여성을 위한 제품으로 잠재성이 크다. 기존 호르몬대체요법은 에스트로겐에 의한 여성암 및 심혈관 질환의 위험성으로

제 6 장 참고문헌

- Asarian L. 2006, Philosophical Transactions of the Royal Society B 361(1471):1251–1263
- Chowen Julie A. et. al., 2004, The regulation of GH secretion by sex steroids, *European Journal of Endocrinology* 151:U95–U100
- Blum, W. F., K. Albertsson–Wikland, S. Rosberg, and M. B. Ranke (1993), Serum levels of insulin–like growth factor I (IGF–I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**:1610–1616.
- Hunt D. W., D. M. Henricks, G. C. Skelley. 1991. Use of trenbolone acetate and estradiol in intact and castrate male cattle: Effects on growth, serum hormones, and carcass characteristics *J. Anim. Sci.* 69:2452–2462
- Lee C. Y., D. M. Hemricks, G. C. Skelley and L. W. Grimes. 1990. Growth and hormone response of intact and castrate male cattle to trenbolone acetate and estradiol. *J. Anim. Sci.* 68:2682–2689
- Leung Kin–Chuen et. al., 2004, Estrogen Regulation of Growth Hormone Action, *Endocrine Review* 25(5):693–721
- Sakai, Y. Nagai, J. Kanzaki, and M. Hasegawa (2001), Skeletal muscle regeneration after insulin–like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector, *Gene Ther.*, **8**:1043–1050.
- Schanbacher B. D. 1984. Manipulation of endogeneous and exogenous hormones for red meat production. *J. Anim. Sci.* 59:1621
- Schoonmaker J. P. et al., 2002 Effect of an accelerated finishing program on performance, carcass characteristics, and circulating insulin–like growth factor 1 concentration of early–weaned bulls and steers, *Journal of Animal Science* 80:900–910
- Shiotani et. al., 2001, Skeletal muscle regeneration after insulin–like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector, *Gene Ther.*, **8**:1043–1050
- Shiotani, A., M. Fukumura, M. Maeda, X. Hou, M. Inoue, T. Kanamori, S. Komaba, K. Washizawa, S. Fujikawa, T. Yamamoto, C. Kadono, K. Watabe, H. Fukuda, K. Saito, Y.
- Singleton, J. R. and E. L. Feldman (2001), Insulin–like growth factor–I in muscle metabolism and myotherapies, *Neurobiol. Dis.*, **8**:541–554.
- Thraikill, K. M. (2000), Insulin–like growth factor–1 in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility, *Diabetes Technol. Ther.*, **2**(1): 69–80.
- Woods, K. A., C. Camacho–Hubner, R. N. Bergman, D. Barter, A. J. Clark, and M. O. Savage (2000), Effects of insulin–like growth factor I (IGF–I) therapy on body composition and insulin resistance in IGF–I gene deletion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**:1407–1411.

- 김재수 등, 2002, YGF251투여에 의한 인체내 혈중의 IGF-1 분비량 변화효과, *한국생물공학회지* 17(4):403-408
- 이기호 등, 2005, 폐경전후 여성에 대한 자연생약추출물(에스트로몬^R)의 1년간 투여효과 및 안정성 평가, *대한폐경학회지* 11(1):16-25
- 최철석 등, 2002, 식물추출물(YGF)의 IGF-1 분비촉진에 미치는 영향, *한국생물공학회지* 17(2):203-206

주 의

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