

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0112298 (43) 공개일자 2009년10월28일
(51) Int. Cl. <i>A23K 1/14</i> (2006.01) <i>A23K 1/18</i> (2006.01)	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900	(72) 발명자 김곤섭 경남 진주시 평거동 들말대경아파트 101-1402
(21) 출원번호 10-2008-0038105 (22) 출원일자 2008년04월24일 심사청구일자 2008년04월24일	(74) 대리인 김형준	

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조방법

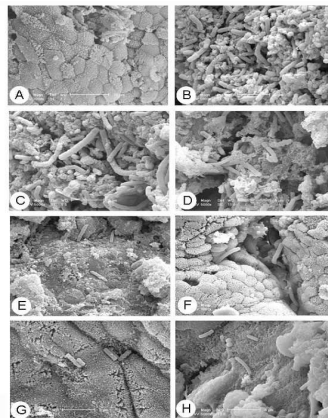
(57) 요약

본 발명은 천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 양돈용 사료첨가제의 제조방법은, 홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말로 제조한 후, 이를 혼합하여 혼합물을 제조한 다음 이 혼합물과 난황항체를 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하고, 이렇게 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 것으로 구성된다.

본 발명에 의해, 장독소생산대장균이 억제되고, 양돈의 체중을 증가시켜주는 양돈용 사료첨가제와 폐사율을 줄이고 육성율을 높이는 양돈용 사료가 제공된다.

대 표 도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

양돈용 사료첨가제 제조방법에 있어서,

홍화, 황금, 어성초, 삼백초, 난황향체를 준비하는 제1공정,

홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말로 제조하는 제2공정,

상기 제조한 홍화분말, 황금분말, 어성초분말, 삼백초분말과 난황향체를 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 제조하는 제3공정,

이 혼합물을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 제4공정,

제4공정에서 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 제5공정으로 구성된,

천연약용식물과 난황향체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

제3공정에 혼합물 제조시 홍화분말은 혼합물 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 황금분말은 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 어성초분말은 전체중량대비 10 ~ 30 중량 %, 삼백초분말은 혼합물 전체중량대비 1 ~ 10 중량 %, 난황향체는 혼합물 전체중량대비 5 ~ 30 중량 %로 혼합하여 제조하는 것이 특징인,

천연약용식물과 난황향체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

제4공정의 반응물 제조시, 가수분해효소를 혼합물 중량대비 5 ~ 10 중량 %를 첨가하는 것이 특징인,

천연약용식물과 난황향체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

제4공정의 반응물 제조시, 사용된 가수분해효소로는 글루코카이네이즈(glucokinase), 헥소카이네이즈(hexokinase), 에이디페이즈(adpase) 중 선택된 1종인 것이 특징인,

천연약용식물과 난황향체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

제5공정에서 고형물을 과립화한 다음 건조시킬 때, 40 ~ 50 ℃에서 2 ~ 4 시간 건조시키는 것이 특징인,

천연약용식물과 난황향체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 6

양돈용 사료첨가제에 있어서,

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된,

천연약용식물과 난황향체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 7

양돈용 사료에 있어서,

제6항의 양돈용 사료첨가제가 사료 전체 중량대비 1 ~ 3 중량 %가 함유되어 구성된,

천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 현재 우리나라에서 사용되고 있는 가축용 항생제는 2003년 기준으로 연간 1400톤 이상의 항생제가 가축의 질병 예방과 치료 등의 목적으로 과도하게 사용되고 있는 실정이다.
- <3> 2003년도 배합사료제조용 항생제(사료첨가용)의 사용량은 가축에 사용되고 있는 항생제의 절반이 넘는 52% 이상인 670톤 이상이었으며, 이 중 돼지에 사용된 양은 68.7% 닭에 사용된 양은 25%, 그리고 소에 사용된 양은 6.3%를 점하고 있는 것으로 알려져 있다
- <4> 현재, 선진 각국에서는 축수산업의 항생제 사용이 인체에 여러 가지 부작용을 초래할 수 있는 것을 고려하여 가축의 질병치료를 목적으로 사용하고 있는 항생제를 제외한 질병예방 및 성장촉진 등의 목적으로 사용하는 사료첨가용 항생제의 사용을 금지시키고 있는 추세이다.
- <5> 즉, 유럽연합(EU)은 1997년에 성장촉진용 항생제로서 아보파신의 사용을 금지시켰으며, 1999년에는 사람의 치료약과 같은 계통이라는 이유로 버지니아마이신, 스피라마이신, 인산 타로신, 아연 바시트라신의 사용을 금지시켰으며, 사료첨가제로 사용하므로써 사람들의 공중위생에 영향을 미치는 것으로 예측된다는 이유로 카바독스, 올라퀸독스의 사용도 금지시켰다.
- <6> 향후, 인류의 건강을 위하여 가축에 사용되는 항생제 중 질병치료를 목적으로 사용되는 경우를 제외하고는, 질병예방이나 성장촉진의 목적으로 사용되는 사료첨가용 항생물질은 점차로 규제가 강화될 것이며 사료된다.
- <7> 따라서 선진국들은 항생물질 대체제의 개발에 박차를 가하고 있으며, 항생물질을 사용하지 않는 유기축산으로 축산의 방향을 전환하고 있는 실정이다.
- <8> 즉, 유럽연합(EU)은 2001년 성장촉진제 및 항생제 대체물질로 Potassium diformate를 최초로 승인 (EC No. 1334/2001)하였으며, 13종의 생균제를 항생제 대체물질로 승인한 상태이다.
- <9> 이와 같이, 전 세계적으로 항생제 대체물질을 개발하기 위한 많은 시도가 진행되고 있으나 그 목적에 전적으로 부합하는 효과를 보이는 물질을 개발하는 데는 많은 어려움이 존재하고 있다.
- <10> 전 세계적인 축산의 방향이 항생물질을 사용하지 않는 유기축산으로 방향을 전환하고 있는 상황에서, 국내 축산업이 국제적 변화에 적극적으로 대처하지 않으면, 국제경쟁력 상실뿐만 아니라, 국내 축산농가의 생존마저 위협당하는 상황이 조만간에 초래될 수 있다.
- <11> 따라서, 국내에서도 아래와 같이 기존의 항생제를 대체하기 위한 많은 연구가 수행되고 있는 상태이다.
- <12> 한국등록특허공보 제10-0568689호(어성초를 이용한 기능성 발효사료와 그 제조방법과 그것을 이용한 돼지의 사육방법 및 그로부터 얻어진 돈육)에는, 어성초를 추출하고 이를 발효시켜 제조한 돼지사료에 관한 것이 공개되어 있다.
- <13> 한국등록특허공보 제10-0400815호(한약재를 함유한 성장촉진용 돼지사료 조성물)에는, 통상적인 기초돼지사료에 인삼, 황기, 양파 및 부형제를 혼합하여 제조한 돼지사료 조성물에 관한 것이 공개되어 있다.
- <14> 한국등록특허공보 제10-0643596호(사료첨가제 및 이를 포함하는 사료)에는, 몰로키아, 인동초, 주정박을 이용하여 제조한 사료첨가제에 관한 것이 공개되어 있다.
- <15> 상기와 같이, 항생제를 대체할 수 있는 천연물질을 이용한 사료첨가제에 대한 연구가 시행되고 있으나, 많은 중

류의 재료 중 홍화, 황금, 어성초, 삼백초, 난황향체를 이용한 사료첨가제에 대한 연구는 이루어진바 없으며, 장독소생성대장균이 억제하는 양돈용 사료에 대해서는 연구된 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<16> 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서, 장독소생성대장균이 억제되고, 양돈의 체중을 증가시켜주는 양돈용 사료첨가제를 제공하려는 목적이 있다.

<17> 또한, 폐사율을 줄이고 육성을 높이는 양돈용 사료를 제공하려는 목적도 있다.

과제 해결수단

<18> 본 발명의 양돈용 사료첨가제의 제조방법은, 홍화, 황금, 어성초, 삼백초, 난황향체를 준비하는 제1공정, 홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말로 제조하는 제2공정, 상기 제조한 홍화분말, 황금분말, 어성초분말, 삼백초분말과 난황향체를 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 제조하는 제3공정, 이 혼합물을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 제4공정, 제4공정에서 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 제5공정으로 구성된다.

<19> 또한, 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 양돈용 사료 전체 중량대비 1 ~ 3중량%를 첨가하여 양돈용 사료를 제조하는 것으로 구성된다.

효 과

<20> 본 발명에 의해, 장독소생성대장균이 억제되고, 양돈의 체중을 증가시켜주는 양돈용 사료첨가제가 제공된다.

<21> 또한, 폐사율을 줄이고 육성을 높이는 양돈용 사료가 제공된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<22> 본 발명의 양돈용 사료첨가제의 주요 성분과 그 약리 효과를 살펴보면 다음과 같다.

<23> 홍화(safflower)는 잇꽃이라 하는 국화과(compositae)에 속하는 일년생 초목으로서, 원산지는 아프가니스탄의 산악지대 또는 에티오피아이며, 중국, 티벳 등지에서 재배되기도 하며, 학명은 *Carthamus flos*이다.

<24> 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 카타민(Carthamin ; $C_{12}H_{22}O_{11}$)인데, 한방의 처방 예로는 홍화탕, 활혈통경탕 등이 있으며, 꽃은 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐만 아니라 혈장 콜레스테롤과 중성지방의 저하 기능도 있어 여성들의 통경약이나 어혈을 푸는 약제로 한방에서 널리 사용되어고 있다.

<25> 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히, 리놀레익 산(linoleic acid ; $CH_3(CH_2)_4(CH=CH(H_2)_2(CH_2)_6COO$) 등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하 작용을 나타낸다고 보고되어져 있다.

<26> 또한, 항산화효과, 항암효과, 골다공증 예방에 우수하다고 알려져 있다.

<27> 황금(Scullcap)은 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로써, 학명은 *Scutellaria baicalensis* 이다.

<28> 이는 산지의 풀밭에서 주로 성장하며, 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다.

<29> 한방에서 이 뿌리를 해열·이뇨·지사·이담 및 소염제로 주로 이용하여 약용식물로 재배되고 있다.

<30> 어성초는 삼백초과에 속하는 다년생 초본으로써, 동양 특산의 숙근초로 십약, 중약, 즙채 등으로 불리우기도 한다.

<31> 학명은 *Houttuynia Cordata*라고 하며, 높이는 26 ~ 30cm, 줄기는 가늘고 잎은 심장모양으로 고구마 잎이나 메밀 잎과 유사하다.

<32> 특이한 것은 비린내가 심하게 나기 때문에 중국에서는 어성초라 불려 왔다.

<33> 어성초는 다양하게 약용으로 쓰여질 뿐 아니라 심각한 환경오염과 일상생활 속의 각종 공해며 독에 저린 현대인에게 질병의 예방과 치료에 탁월한 효과가 있어 신기한 약초로 각광을 받으며 여러 가지의 작용을 인정받고 있

다.

- <34> 특히 한국, 일본, 중국 등지에서 식용, 약용, 미용 등의 용도로 사용 오래전부터 사용되어 왔으며 특히 부인병에 좋은 것으로 알려져 왔다.
- <35> 또한, 전초에 0.0049%의 휘발성분 즉 정유성분이 함유되어 있다.
- <36> 이 정유 중에는 데카노일 아세트 알데히드 (Decanoilacetaldehyd), 메톤 (Methyln-nonylketone), 미르센 (Myrcene), 로우릭 알데히드 (Lauric ldehyde), 캐프릭드 (Capricaldehtde)등이 있다.
- <37> 어성초의 항균작용으로는 대장균, 티푸스균, 파라티푸스균, 적리균, 임균, 포도구균, 사상균, 백선균, 무좀균, 항산성 세균뿐만 아니라 비병원성 세균에도 역균 내지는 항균작용이 있다.
- <38> 이밖에 어성초에는 진통작용, 지혈작용, 장액 분비 억제작용, 조직 재생작용, 지해작용등이 있다.
- <39> 삼백초(Bluet)는 쌍떡잎식물 후추목 삼백초과의 여러해살이풀로써, 학명은 *Saururus chinensis* 이다.
- <40> 이는 삼백초과의 다년초로서, 제주도의 습지에서 자라는데 높이는 50 ~ 100 cm이며, 흰색 뿌리줄기가 진흙 속을 가로 뚫어 번식하는 식물이며, 잎은 염통 모양이고 초여름에 흰 꽃이 피며, 잎·꽃·뿌리가 희다 하여 삼백초라 불리며, 한방에서 중약(重藥)이라 하여 이뇨제 등으로 쓰여지고 있다.
- <41> 삼백초에는 항균성분인 디카노일 아세트알데하이드(decanoyl acetaldehyde), 메틸-엔-노닐-케톤(methyl-n-nonyl-ketone), 미르센(myrcene), 라우릭 알데하이드(lauric aldehyde), 캡릭 알데하이드(capric aldehyde) 등이 함유되어 있으며, 이들 성분은 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 알려져 있다.
- <42> 뿐만 아니라, 이뇨작용, 혈압조절 작용 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.
- <43> 난황항체(IgY)는 산란계의 난황에 존재하는 특이항체를 의미하는 것으로서, 난황 면역글로불린(IgY)이라고도 불리우며, 이는 산란계의 혈청에 존재하는 특이항체인 면역글로불린(IgG)이 계란의 난황으로 이동되어 생성되는 항체이다.
- <44> 본 발명의 발명자들은 항생제를 대체할 수 있는 양돈용 사료첨가제를 찾아내기 위해 수차례 연구한 결과, 여러 종류의 천연약용식물 중 카타민 성분이 함유된 홍화화 항균성분이 함유된 황금, 어성초, 삼백초를 이용하고, 난황에 존재하는 특이항체인 난황항체도 함께 이용하여 양돈용 사료첨가제를 제조할 시, 장독소생성대장균에 대하여 높은 억제활성을 나타냄을 확인하였다.
- <45> 따라서, 상기의 양돈용 사료첨가제를 양돈용 사료 전체 중량대비 1 ~ 3 중량%를 첨가하여 양돈용 사료를 제조한 후, 이를 이용하여 양돈을 사육한 결과, 사료 요구율이 감소하며, 체중은 증가하였으며, 지방, 콜레스테롤이 감소되며, 불포화지방산은 증가됨을 알 수 있었다.
- <46> 이때, 양돈용 사료첨가제의 첨가량이 1 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 3 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <47> 본 발명의 천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조방법에 대하여 자세히 설명하면 다음과 같다.
- <48> 1. 양돈용 사료첨가제의 제조방법
- <49> (1) 제1공정 : 재료준비
- <50> 홍화, 황금, 어성초, 삼백초, 난황항체를 준비한다.
- <51> 이때, 난황항체는 도 1과 같이 분리 정제된 것을 사용하는 것이 좋다.
- <52> (2) 제2공정 : 미세분말로 제조
- <53> 홍화, 삼백초, 황금, 어성초를 분쇄기로 각각 분쇄하여 미세분말로 제조한다.
- <54> (3) 제3공정 : 혼합물 제조
- <55> 상기 제조한 홍화분말, 황금분말, 어성초분말, 삼백초분말과 난황항체를 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 제조한다.

- <56> 이때, 홍화분말은 혼합물 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 황금분말은 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 어성초분말은 전체중량대비 10 ~ 30 중량 %, 삼백초분말은 혼합물 전체중량대비 1 ~ 10 중량 %, 난황향체는 혼합물 전체중량 대비 5 ~ 30 중량 %로 혼합하여 혼합물을 제조하는 것이 바람직하다.
- <57> 홍화분말과 황금분말의 첨가량이 5 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 20 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <58> 어성초분말의 첨가량이 각각 10 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 30 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <59> 삼백초분말의 첨가량도 10 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 50 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <60> 난황향체의 첨가량도 5 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 30 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <61> (3) 제4공정 : 반응물 제조
- <62> 상기 혼합물을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조한다.
- <63> 이때, 가수분해효소를 혼합물 중량대비 5 ~ 10 중량 %를 첨가하는 것이 바람직하다.
- <64> 가수분해효소로는 글루코카이네이즈(glucokinase), 헥소카이네이즈(hexokiase), 에이디페이즈(adpase)중 선택된 1종을 사용한다.
- <65> (4) 제5공정 : 양돈용 사료첨가제 제조
- <66> 제4공정에서 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화 한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조한다.
- <67> 이때, 40 ~ 50 ℃에서 2 ~ 4 시간 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 것이 바람직하다.
- <68> 이하, 본 발명에 대하여 실시예와 실험예를 통하여 상세히 설명하나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- <69> <실시예 1> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조1
- <70> 홍화, 황금, 어성초, 삼백초 시중에서 구입하여 준비하고, 난황향체를 준비하였다.
- <71> 상기 준비된 홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 분쇄기에 각각 넣고 분쇄하여 미세분말로 제조하였다.
- <72> 난황향체는 면역란에서 난황을 분리해 낸 후, 증류수를 넣고 희석한 다음, HCl을 조금씩 넣어가면서 pH를 5.0으로 조정하고, -20 ℃에 24 시간동안 보관한 다음, 이를 해동시킨 후, 고속원심분리기로 지질 고형성분을 제거함으로써 정제된 상등액을 건조시켜 준비하였다.
- <73> 상기 홍화분말 200 g, 황금분말 200 g, 어성초분말 300 g, 삼백초 분말 100 g, 난황향체 200 g을 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 만들었다.
- <74> 상기 혼합물 1 kg을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소(글루코카이네이즈, glucokinase)를 혼합물 중량의 5 %를 첨가한 다음, 70 ℃에서 12시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하였다.
- <75> 이 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화에 넣어, 가로 1 mm, 세로 1 mm, 높이 1 mm 크기로 과립화시켰다.
- <76> 과립을 건조실에 넣고 45 ℃ 에서 2 시간 건조시켜서, 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <77> <실시예 2> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 2
- <78> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 홍화분말 200 g, 황금분말 100 g, 어성초분말 300 g, 삼백초 분말 100 g, 난황향체 300 g을 교반기에 넣고 혼합하여 제조한 혼합물을 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <79> <실시예 3> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 3

- <80> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 홍화분말 200 g, 황금분말 200 g, 어성초분말 250 g, 삼백초 분말 50 g, 난황항체 300 g을 교반기에 넣고 혼합하여 제조한 혼합물을 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <81> <실시예 4> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 4
- <82> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 가수분해효소로 헥소카이네이즈(hexokiase를 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <83> <실시예 5> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 5
- <84> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 가수분해효소로 에이디페이즈(adpase)를 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <85> <실시예 6> 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 첨가한 양돈용 사료의 제조1
- <86> 양돈 사육시, 통상적으로 쓰이고 있는 시판양돈 전기사료(Dodam Tec.)의 양돈용 사료를 구입하였다.
- <87> 구입한 양돈용 사료 99 kg에 실시예 1에서 제조된 본 발명의 양돈용 사료첨가제 1 kg을 첨가한 다음, 교반 혼합하여 양돈용 사료를 제조하였다.
- <88> <실시예 7> 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 첨가한 양돈용 사료의 제조2
- <89> 양돈 사육시, 통상적으로 쓰이고 있는 시판양돈 전기사료(Dodam Tec.)의 양돈용 사료를 구입하였다.
- <90> 구입한 양돈용 사료 98 kg에 실시예 2에서 제조된 본 발명의 양돈용 사료첨가제 2 kg을 첨가한 다음, 교반 혼합하여 양돈용 사료를 제조하였다.
- <91> <실험예 1> 본 발명의 양돈용 사료첨가제의 병원세균에 대한 항균효과 실험
- <92> 1. 실험균주 준비
- <93> 국립보건 환경 연구원에서 분양받은 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*), 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7), 수의과학 검역원에서 분양받은 살모넬라 엔테로티디스(*Salmonella enterotidis*), 살모넬라 플로룸(*Salmonella pullorum*), 유산균(*Lactobacillus acidophilus*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)인 총 6 균주를 준비하였다.
- <94> 각 균의 배양액을 3,000g에서 10 분간 원심 침전하여 0.1 M phosphate buffer(PBS, pH7.0)로 2 회 원심 세척한 후 균수를 MacFarland 표준 탁도 0.5로 맞추어 사용하였다.
- <95> 2. 양돈용 사료첨가제의 항균성 물질 추출
- <96> 본 발명의 실시예 1에서의 제조한 양돈용 사료첨가제 20 g과 증류수 100 ml을 혼합하여 80 ℃의 수욕상에서 30 분 동안 증탕하였다.
- <97> 상기 증탕액을 0.45 μ m 필터로 여과하여 수득한 양돈용 사료첨가제 여과액을 4 ℃에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.
- <98> 3. 최소발육 억제농도측정
- <99> 실험균주에 대한 본 발명의 양돈용 사료첨가제의 최소 발육 억제농도(Minimal inhibitory concentration; MIC)는 국립병리실험실표준협회(National Committee Clinical Laboratory Standard ; NCCLS, 1997)기준에 따라 한천평판희석법(Agar Dilution Method)으로 측정하였다.
- <100> 즉, 본 실험에 사용하기 위해 제조된 양돈용 사료첨가제 여과액을 인산염 완충용액(PBS)으로 2 배수 희석하여 농도별로 함유하는 뮐러 힌톤배지(Mueller Hinton Medium; MHM, Difco)에 10^5 CFU/ml로 조정한 각 균액을 다중점종기(multiple inoculator)로 접종한 후, 배양하여 나타난 균의 발육 억제된 농도를 최소발육억제농도(%)로 나타내었다.
- <101> 각 세균에 대한 최소발육억제농도를 조사하고, 그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.

- <124> 직장 분변 채취는 1 회용 위생장갑(poly glove)을 사용하여 5 g씩 채취하였고, 24 시간 이내에 균 분리를 실시하였다.
- <125> 3. 장독소생산대장균 종의 분리
- <126> 직장 분변을 VTP 브루셀라-FBP액(VTP Brucella-FBP broth) 10 ml에 접종한 것을 실험실로 옮겨 단시간에 균분리를 실시하였다.
- <127> 균 분리 방법은 시료채취시 사용한 증균배지를 캠프팩 2(Campy pack 2; BBL, USA)와 혐기성 자르(jar; Ditco, USA)를 이용하여 10 % CO₂, 5% O₂, 85% N₂의 미호기 상태에서 42 °C에서 24 시간 증균배양하였다.
- <128> 증균 배양액 0.03 ml를 취하여 agar에 접종하고 증균 배양과 동일한 미호기 조건으로 42 °C에서 24 시간 배양한 다음, 각각의 평판배지에서 장독소생산대장균 종으로 의심되는 집락 3개씩을 선발하였다.
- <129> 4. 실험결과
- <130> 직장분변에서의 균 분리율을 측정한 결과를 도 3에 나타내었다.
- <131> 도 3에 나타나 있듯이, 접종 전에는 분변 내 ETEC가 2.3×10^4 에서 2.5×10^4 이었다.
- <132> 그러나 접종 1주일 후에는 대조군은 1.5×10^7 MPN/g이었으나, 사료첨가제를 급여한 군(1%, 2%)에서는 접종 1 주 후 사료첨가제 2% 급여한 군에서 2.4×10^8 이었고 사료첨가제 1% 투여군에서는 4.6×10^8 으로 대조군에 비하여 분변에서 높은 분리율을 나타내었다
- <133> <실험예 3> 장독소생산대장균의 장관정착 억제효과실험
- <134> 1. 실험동물 및 사료
- <135> 실험군은 실시예 6(1 %), 실시예 7(2 %)의 방법으로 제조한 양돈용 사료를 급여하여 사육하였다.
- <136> 대조군은 시판 양돈전기사료를 그대로 급여하여 사육하였다.
- <137> 각각 50 수씩 돼지(4주령)를 배치하고 돼지에 장독소생산대장균(*Enterotoxigenic E.coli*: ETEC: 8×10^8 cell/ml)의 균액 0.5 ml)을 접종하여 6 주간 사육하여 준비하였다.
- <138> 2. 실험방법
- <139> (1) 일반조직염색 및 분석
- <140> 사료첨가제를 매일 경구투여한 후 1개월 간격으로 돼지의 장관을 적출하여 4 % 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정하였다.
- <141> 후고정이 끝난 조직은 일반적인 조직포매 과정을 거쳐 4 ~ 5 μm 두께의 조직절편을 제작하여 슬라이드에 부착하였다.
- <142> H&E(Hematoxylin and Eosin)염색을 수행하여 각 장기의 조직학적인 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.
- <143> (2) 장관 조직의 SEM 실험방법
- <144> 돼지를 살처분하여 소장 및 대장 조직을 채취하였으며 생리식염수에 조직이 손상되지 않게 부드럽게 한번 세척한 후 0.1M PBS에 5분 동안 3번 세척한 다음 2.5% 글루탈리데하이드(Glutaraldehyde)에 조직을 냉장상태(4°C)에서 48시간 동안 전고정 하였다.
- <145> 전고정한 조직을 0.1M PBS에 5분 동안 세척한 후 1% O₃O₄에 조직을 냉장상태에서 2시간 동안 보관하였다.
- <146> 조직을 일반적인 탈수과정에 따라 50%-70%-80%-90%-95%-엡솔루트 알콜(absolute alcohol) I, II, III에 각 단계별로 30분 동안 담가둔 다음, 아세톤 I, II 용액에 1시간씩 담가둔 후 HMDS I, II 용액에 각각 30분씩 담근 후 임계점 건조기에 보관하였다.
- <147> 이온 스퍼터링 코우터(Ion sputtering coater)로 처리하여 주사전자현미경(JLEOL사, JEM600)으로 가속전압 10 KV하에서 촬영하여 사진을 관찰하였다.

- <148> 3. 실험결과
- <149> 상기 실험결과, 도 4에 나타나 있듯이, 사료첨가제 투여 후 1개월에서 십이지장, 공장, 회장, 결장의 조직학적 소견은 사료첨가제의 경구투여군이 대조군에 비해 용모 탈락 비율이 현저하게 감소하였다.
- <150> 이러한 소견은 사료첨가제를 6개월 동안 투여한 군에서도 대조군에 비해 용모 탈락률이 현저하게 감소함을 관찰하였다.
- <151> 또한, 도 5에 나타나 있듯이, 장독소생산대장균 감염 후 7일에서 대조군의 경우 장 점막 상피표면에 다수의 *E. coli*와 장 점막 상피조직의 염증반응이 관찰 되었으나(도 5B), 장내독소생산대장균과 사료첨가제를 7일간 함께 투여한 처리군에서는 장 점막상피에 부착된 *E. coli*가 현저하게 감소하였다 (도 5C, D).
- <152> 한편, 장독소생산대장균 처리 14일 후 대조군에서는 장 점막에 약간의 *E. coli*가 관찰 되었으나(도 5E) 1%와 2% 사료첨가제 투여 군에서는 *E. coli*가 거의 관찰되지 않았고 이러한 결과는 6주 동안 비슷하였으며 1% 수준과 2% 수준의 사료첨가제 투여군 간에는 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 5 F,G,H).
- <153> 한편, 돼지에 장독소생산대장균을 투여하지 않고 사료첨가제(1%, 2%)를 투여한 군과 대조군에서 장관의 변화를 주사전자현미경으로 관찰하였다.
- <154> 사료첨가제를 1개월 동안 투여한 후 십이지장, 공장, 회장 및 결장의 장 점막 상피를 관찰한 결과 사료첨가제 투여군(1%)이 대조군에 비해 enterocyte(장세포)의 탈락률이 현저하게 억제됨을 확인하였다(도 6).
- <155> 이러한 결과는 사료첨가제(1%, 2%)를 5개월 동안 투여한 군에서도 대조군에 비해 현저한 탈락률 억제효과를 나타내었다.
- <156> <실험예 4> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지의 이화학적 변화에 미치는 영향
- <157> 실험군은 실시예 6(2 %)의 방법으로 제조한 양돈용 사료를 급여하여 사육하였다.
- <158> 대조군은 시판 양돈전기사료를 그대로 급여하여 사육하였다.
- <159> 각각 50 수씩 돼지(4주령)를 배치하고 돼지에 장독소생산대장균(*Enterotoxigenic E.coli*: ETEC: 8×10^8 cell/ml)의 균액 0.5 ml)을 접종하여 6 개월동안 사육하여 준비하였다.
- <160> 6 개월 후 대조군과 실험군을 비교해 본 결과, 도 7, 8에도 나타나 있듯이, 대조군 돈사에서는 설사분변이 발생되었고 외관상 상당히 위축된 모습을 나타내었으며, 부검결과 장관이 탈수된 상태였음을 확인하였으며, 사료첨가제를 투여한 돈사에서는 아무런 변화도 확인되지 않았다.
- <161> 즉, 본 발명의 천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제는 장독소생산대장균을 억제하여 돼지 성장에 영향을 미침을 알 수 있었다.
- <162> <실험예 5> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지에 미치는 안정성 평가 실험
- <163> 1. 실험재료
- <164> 실험군은 실시예 6, 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하여 각각 50 수씩 돼지를 배치하고 180일 동안 사육하여 준비하였다.
- <165> 2. 실험방법
- <166> 상기 대조군과 실험군의 돼지바깥귀정맥에서 각각 혈액 1cc를 채취하여 4 °C 에서 3,000 rpm 으로 15 분간 원심분리한 후, 혈청을 생화학 분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였다.
- <167> 3. 실험결과
- <168> 아래의 표 2에 그 결과를 나타내었다.

표 2

매개변수	대조군	실험군1	실험군2
SGOT	30-61	32-58	32-57
SGPT	10.0-45	10.0-40.0	10.0-40.0

글루코스(Glucose)	60-130	64-120	65-110
빌리루빈(Bilirubin)	0.00-0.60	0.01-0.15	0.01-0.14
LDH	32-100	38-80	36-80
CPK	85.170	85-150	85-148
알칼리성 인산염 (Alkaline phosphate)	35-110	44.0-90	45.0-90
아밀라아제(Amylase)	68.0-140	80-135	80-130

<170> 상기 표 2에 나타나 있듯이, SGOT, SGPT, 글루코스(glucose), 빌리루빈(bilirubin), LDH 등이 정상범위 내에 있음을 알 수 있었다.

<171> 따라서, 본 발명의 사료첨가제의 급여가 간 기능 및 간 손상에는 영향을 나타내지 않음으로 안정하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<172> 도 1 : 본 발명에서 이용한 난황향체의 정제도.

<173> 도 2 : 장독소생산대장균에 대해 방제효과를 나타낸 그래프.

<174> 도 3 : 양돈 분변으로부터 장독소생산균의 분리율을 나타낸 그래프.

<175> 도 4 : 사료첨가제(실시에 6)투여 후 돼지 장관변화를 나타낸 광학현미경 사진.

<176> A : 대조군(십이지장) B : 처리군(십이지장)

<177> C : 대조군(공장) D : 처리군(공장)

<178> E : 대조군(회장) F : 처리군(회장)

<179> G : 대조군(결장) H : 처리군(결장)

<180> 도 5 : 장독소생산대장균을 투여한 후 장관변화에 대한 주사 전자현미경 사진.

<181> A : 대조군

<182> B : 장독소생산대장균 투여 1주일째

<183> C : 장독소생산대장균 투여 + 사료첨가제(실시에 6) 급여 1주일째

<184> D : 장독소생산대장균 투여 + 사료첨가제(실시에 7) 급여 1주일째

<185> E : 장독소생산대장균 투여 + 사료첨가제(실시에 6) 급여 2주일째

<186> F : 장독소생산대장균 투여 + 사료첨가제(실시에 6) 급여 3주일째

<187> G : 장독소생산대장균 투여 + 사료첨가제(실시에 6) 급여 4주일째

<188> H : 장독소생산대장균 투여 + 사료첨가제(실시에 6) 급여 6주일째

<189> 도 6 : 사료첨가제(실시에 7)투여 후 돼지 장관변화를 나타낸 주사 전자현미경 사진.

<190> A : 대조군(십이지장) B : 처리군(십이지장)

<191> C : 대조군(공장) D : 처리군(공장)

<192> E : 대조군(회장) F : 처리군(회장)

<193> G : 대조군(결장) H : 처리군(결장)

<194> 도 7 : 돼지의 설사분변 확인사진.

<195> a, b, c, d: 장독소생산대장균 투여하는 모습

<196> e: 사료첨가제 투여한 돈사- 설사분변없음

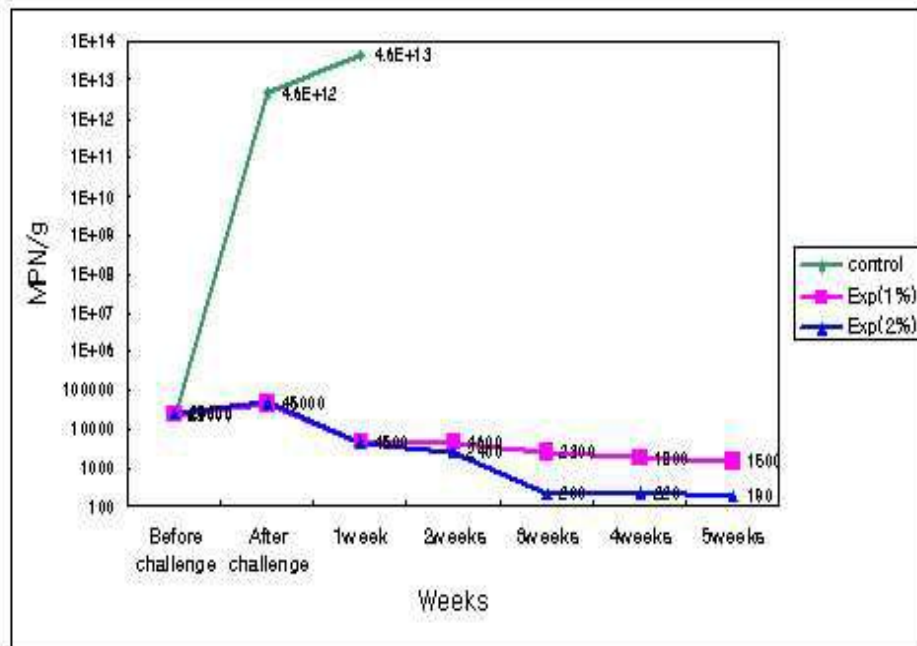
- <197> f: 대조군 돈사- 설사분변발생
- <198> 도 8 : 장독소생산대장균 투여 후 돼지 외, 내관 사진.
- <199> a : 대조군 돈사
- <200> b : 대조군 돈사의 외관- 위축된 모습
- <201> c: 사료첨가제 투여한 돈사
- <202> d: 대조군 돈사의 내관 - 탈수장관확인

도면

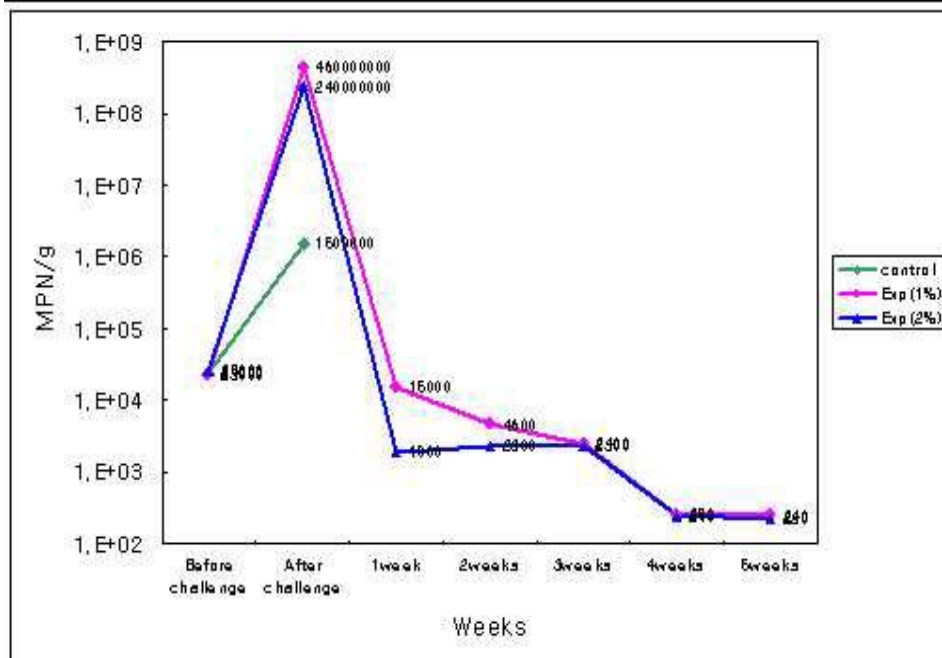
도면1



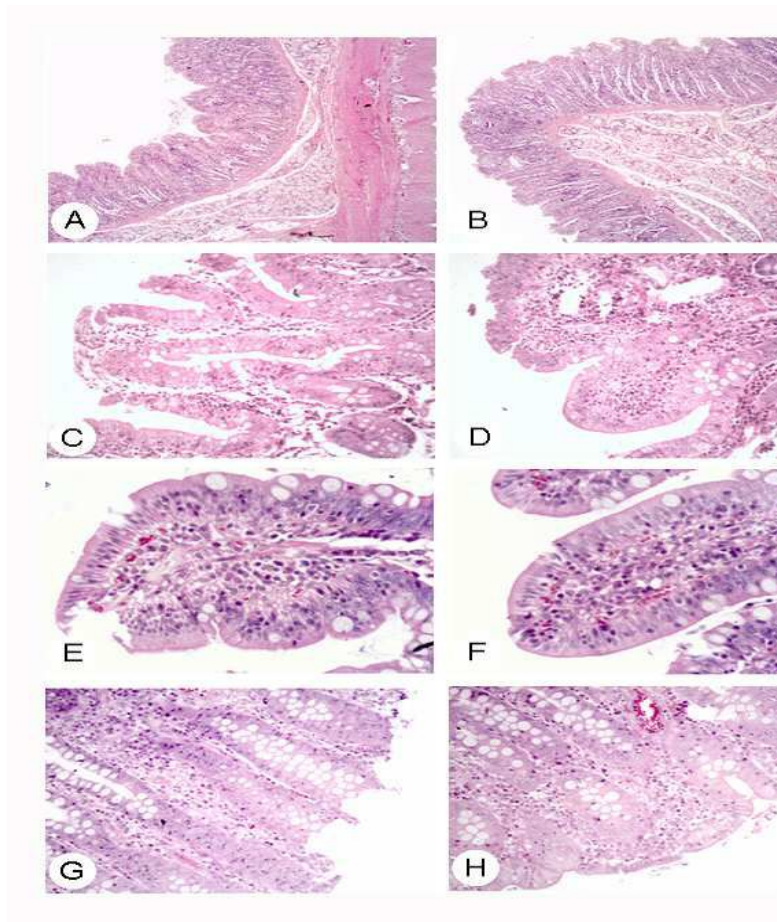
도면2



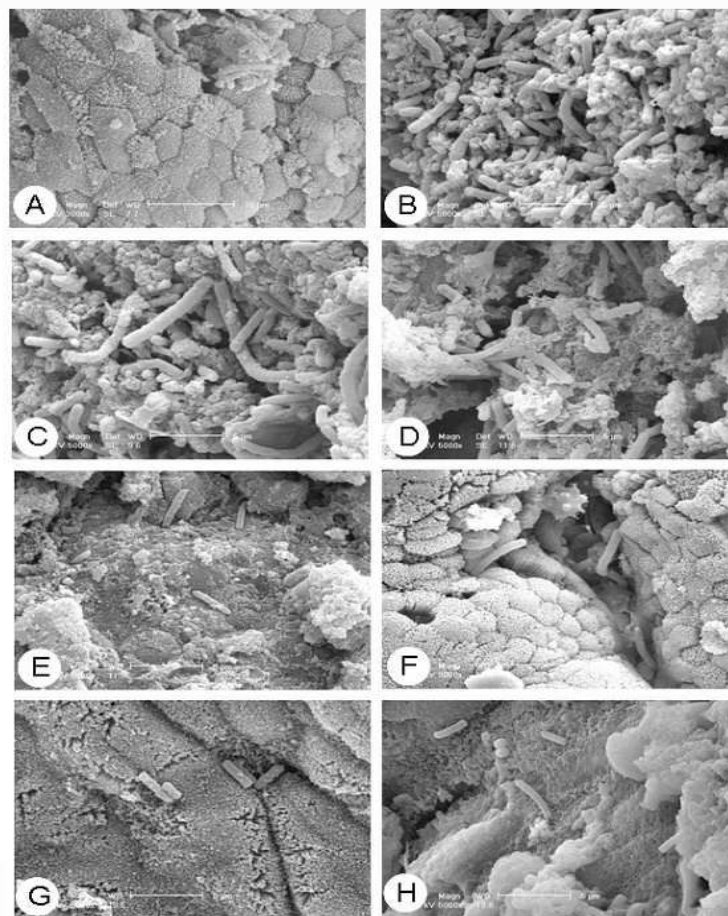
도면3



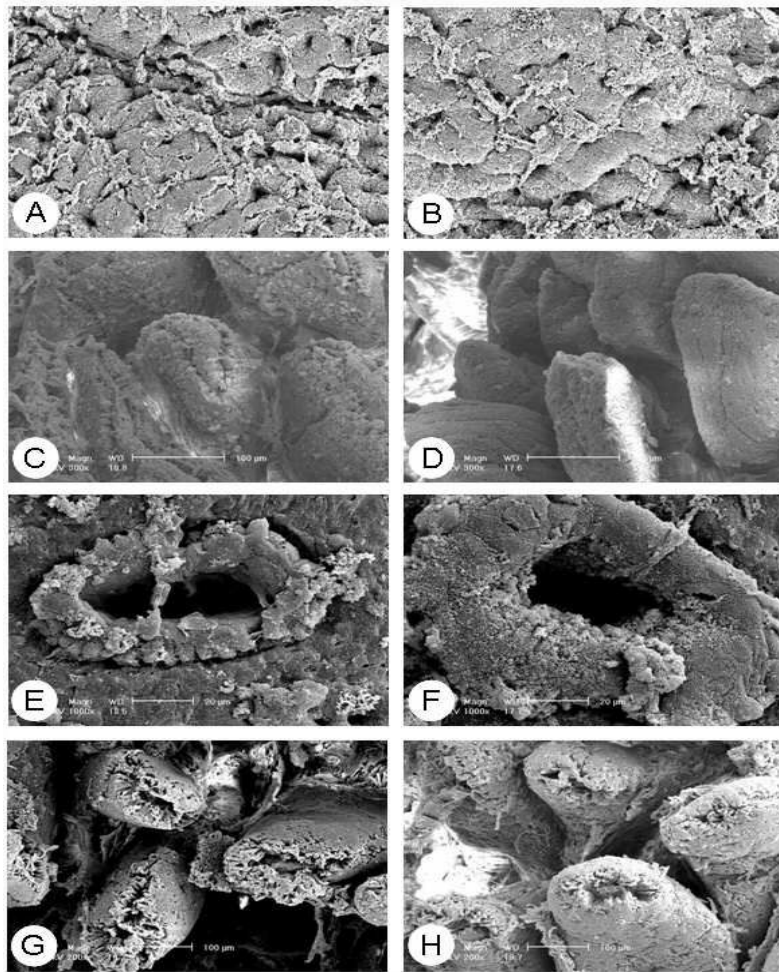
도면4



도면5



도면6



도면7



도면8

