



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년07월13일

(11) 등록번호 10-0739215

(24) 등록일자 2007년07월06일

(21) 출원번호 10-2006-0017948

(22) 출원일자 2006년02월24일

심사청구일자 2006년02월24일

(65) 공개번호

(43) 공개일자

(73) 특허권자 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자 김곤섭
경남 진주시 평거동 들말대경아파트 101-1402

(74) 대리인 김형준

(56) 선행기술조사문헌
KR1020030036549 A

심사관 : 노대현

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 및 그 제조방법

(57) 요약

홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 양계용 사료첨가제의 제조방법은, 홍화와 삼백초를 준비한 후, 이를 각각 분쇄하여 미세분말을 제조한 다음, 홍화분말은 사료첨가제 전체 중량대비 30 중량 %, 삼백초분말은 사료첨가제 전체 중량대비 70 중량 %를 교반기에 넣고 교반하여 페이스트 상태의 고형물을 만든 후, 이 고형물과 글루코오스를 반응기에 넣고 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조한 다음, 제조된 반응물을 과립화 한 후 건조시켜 양계용 사료첨가제를 제조하는 것으로 구성된다.

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

본 발명에 의해, 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*)가 억제되고, 양계의 체중을 증가시키며, 육성율을 높이고 폐사율을 감소시키는 양계용 사료첨가제와 양계용 사료가 제공된다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

양계용 사료첨가제 제조방법에 있어서,

홍화와 삼백초를 준비하는 제1공정,

준비된 홍화와 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말을 제조하는 제2공정,

홍화분말은 사료첨가제 전체 중량대비 30 중량 %, 삼백초분말은 사료첨가제 전체 중량대비 70 중량 %를 교반기에 넣고 교반하여 고형물을 만드는 제3공정,

이 고형물과 글루코오스를 반응기에 넣고 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 제4공정,

제조된 반응물을 과립화 한 다음 건조시켜 양계용 사료첨가제를 제조하는 제5공정으로 구성된,

홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 제조방법.

청구항 2.

제1항에 있어서,

제4공정의 반응물 제조시, 글루코오스를 고형물 중량대비 5 중량 %를 첨가하는 것이 특징인,

홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 제조방법.

청구항 3.

제1항에 있어서,

제5공정에서 반응물을 과립화 한 다음 건조시킬 때, 40 ~ 50 ℃에서 2 ~ 4 시간 건조시키는 것이 특징인,

홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 제조방법.

청구항 4.

양계용 사료첨가제에 있어서,

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된,

홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제.

청구항 5.

양계용 사료에 있어서,

제4항의 양계용 사료첨가제가 사료 전체 중량대비 1 ~ 3 중량 %가 함유되어 구성된, 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

국내에서 가축용 항생제는 연간 1200 여 톤이 판매되고 있으며, 가축의 종류로는 돼지, 닭, 수산물, 소의 순서로 항생제 사용량이 많다.

이로 인하여, 상기 가축들은 각종 세균에 대한 항생제 내성이 생성되어, 항생제가 세균을 죽이는 약효를 거의 상실한 것으로 나타났다.

특히, 닭에서 분리된 포도상 구균의 경우 테트라사이클린에 대한 내성율이 96 %를 나타내었다.

또한, 고기, 우유, 계란 등 축산물에 잔류된 항생제가 음식과 함께 인체에 들어와 항생제 내성균이 생기기 때문에 인체에도 나쁜영향을 미친다고 한다.

의료 조사에 따르면 동물에서 비롯되어 사람에게 문제가 되는 내성세균의 대부분은 인수공통세균에 의한 것이라고 보고되어져 있다.

인수공통세균으로는 소, 돼지, 닭에서 분리된 살모넬라(*Salmonella*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 대장균(*E. coli*)등이 있으며, 이들의 내성정도를 비교한 결과, 나라별, 숙주별, 균종별로 항생제 내성 패턴이 다르게 나타났다.

이는 항생제의 적용이나 질병의 통제가 각각의 특성에 따라 다름을 나타낸다.

항생제는 동물의 복지를 위해, 또한 인수공통질환을 포함한 전염병의 통제를 위해 필요하며, 경제적인 측면에서도 매우 중요하다.

재래닭은 기호성은 좋으나 발육이 늦어 사육비가 많이 들고 경제성이 낮은 단점이 있다.

현재, WTO 이후 축산물 시장개방에 대항하기 위해서는 외래종과 차별되는 고품질의 특수 닭고기생산이 필요하며, 또한 기존의 재래닭보다 성장이 빠르고 기능성을 가진 실용닭의 사육으로 농가의 생산성을 높이는 것은 물론 균일화된 규격품의 재래닭 육용화 생산체계를 마련하고 대외수출을 통하여 국가 경쟁력을 높일 필요성이 대두되고 있다.

근년 양계 사육형태가 대형화됨에 따라 대량 밀집사육으로 인한 캄필로박터제주니(*Campylobacter jejuni*) 감염증이 증가되며, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및 오염을 방지하는 것은 어려운 일이다.

또한, 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약중지로 재감염이 문제시되며, 무분별한 오남용으로 인한 내성균의 출현증가뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약제 잔류로 사람의 건강을 위협할 수가 있다.

따라서, 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 닭의 캄필로박터(*Campylobacter*)속 균에 대한 감소대책으로 프락토-올리고사카라이드(fracto-oligosaccharide), 건조효모(dried yeast), 포믹에시드(formic acid) 또는 프로포닉 에시드(proponic acid)등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 그 효과가 미흡하여 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.

또한, 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나 이 역시 그 효과가 미흡하여 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.

따라서, 캄필로박터 제주니 속 균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 필요한 실정이다.

또한, 국내산 계육의 안정성 확보는 물론 캄필로박터 종에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구가 시급한 실정이다.

한국공개특허공보 제10-2006-0010513호(양계용 사료의 제조방법)에는, 공지된 배합사료(옥수수, 밀기울, 겨, 여분, 석회석)에 소정의 첨가물(동충하초, 키토산, 참숯가루)을 일정량 혼합시켜 양계용 사료를 제조하는 방법에 관한 것이 공개되어 있다.

한국공개특허공보 특2001-0067892호(한약이 배합된 사료 및 그 제조방법)에는, 어분 및 농축된 어즙으로 이루어진 어즙, 약초, 백출, 천궁, 진피, 갈근, 당귀, 황기, 산사자, 복령, 산약, 음양각, 인직 혹은 두충 중에서 적어도 어느 하나 이상으로 구성된 한약제 1 ~ 4 중량 % 및 영양소 2 ~ 9 중량 %로 구성되어 제조하는 방법에 관한 것이 공개되어 있다.

한국등록특허공보 제10-0495605호(육계용 한방사료첨가제와 그 제조방법)에는, 황근, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자, 방기, 포도당을 혼합하여 육계용 한방사료첨가제를 제조하는 것이 공개되어 있다.

그러나, 상기 방법들은 사료첨가제의 제조방법이 복잡하며, 많은 종류의 재료가 소요되어 비용면에서도 경제적으로 적합하지 않고, 양계 사육시 가장 문제시 되는 인수공통세균을 감소시키는 효과가 미약한 문제점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서, 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*)균을 억제시키는 양계용 사료첨가제 제조방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.

또, 양계의 체중을 증가시키며, 육성율이 높고, 폐사율이 낮은 양계를 사육할 수 있는 양계용 사료첨가제를 제공하는데 그 목적이 있다.

또한, 본 발명의 양계용 사료첨가제가 첨가된 안전성이 높은 고품질의 양계용 사료를 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성

본 발명은 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 양계용 사료첨가제의 제조방법은, 홍화와 삼백초를 준비하는 제1공정, 준비된 홍화와 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말을 제조하는 제2공정, 홍화 분말은 사료첨가제 전체 중량대비 30 중량 %, 삼백초 분말은 사료첨가제 전체 중량대비 70 중량 %를 교반기에 넣고 교반하여 고형물을 만드는 제3공정, 이 고형물과 글루코오스를 반응기에 넣고 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 제4공정, 제조된 반응물을 과립화 한 다음 건조시켜 양계용 사료첨가제를 제조하는 제5공정으로 구성된다.

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

이때, 양계용 사료첨가제의 첨가량이 1 중량 % 미만일 경우 효과가 약하고, 첨가량이 3 중량 %를 초과할 경우 경제성이 떨어진다.

본 발명의 양계용 사료첨가제의 주요 성분과 그 약리 효과를 살펴보면 다음과 같다.

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

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.

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.

또한, 항산화효과, 항암효과, 골다공증 예방에 우수하다고 알려져 있다.

삼백초(Bluet)는 쌍떡잎식물 후추목 삼백초과의 여러해살이풀로써, 학명은 *Saururus chinensis* 이다.

이는 삼백초과의 다년초로서, 제주도의 습지에서 자라는데 높이는 50 ~ 100 cm이며, 흰색 뿌리줄기가 진흙 속을 가로 뚫어 번식하는 식물이며, 잎은 엽통 모양이고 초여름에 흰 꽃이 피며, 잎·꽃·뿌리가 희다 하여 삼백초라 불리며, 한방에서 중약(重藥)이라 하여 이뇨제 등으로 쓰여지고 있다.

삼백초에는 항균성분인 디카노일 아세트알데하이드(decanyl 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.

뿐만 아니라, 이뇨작용, 혈압조절 작용 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.

글루코오스(glucose)는 대표적인 알도헥소오스(탄소원자 6개를 가지며, 알데히드기를 가지는 단당류)로써, 분자식은 $C_6H_{12}O_6$ 이다.

D형·L형 2종의 광학이성질체가 있는데, 천연으로는 D형만이 존재하며 이 D-글루코오스를 포도당이라 한다.

이러한 글루코오스는 달콤한 과즙, 동물의 혈액·림프액 등에 유리상태로 존재하는 외에, 글리코젠·녹말·셀룰로오스 등의 다당류, 설탕 등의 소당류 및 여러 배당체의 구성성분으로서, 또한 세포벽의 구성성분으로서 자연계에 널리 존재하는 물질이다.

본 발명에서는 상기와 같이 카타민 성분이 함유된 홍화와 항균성분이 함유된 삼백초를 준비한 후, 이를 각각 분쇄하여 미세분말을 제조한 다음, 홍화 분말은 사료첨가제 전체 중량대비 30 중량 %, 삼백초 분말은 사료첨가제 전체 중량대비 70 중량 %를 교반기에 넣고 교반하여 고형물을 만든 후, 이 고형물과 글루코오스를 반응기에 넣고 70 ~ 80 °C에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하여 이 반응물을 과립화 한 다음 건조시켜 양계용 사료첨가제를 제조하였다.

상기 양계용 사료첨가제의 항균활성을 실험한 결과, 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*) 등에 대하여 높은 억제활성을 나타내었다.

따라서, 상기의 양계용 사료첨가제를 양계용 사료 전체 중량대비 1 ~ 3 중량%를 첨가하여 양계용 사료를 제조한 후, 이를 이용하여 양계를 사육한 결과, 사료 요구율, 치사율이 감소하며, 체중, 육성율은 증가하였으며, 지방, 콜레스테롤이 감소되며, 불포화지방산은 증가되고 포화지방산은 감소되며, 관능에 영향을 미치는 특정 아미노산이 증가되며, 면역체계의 영향을 미칠 수 있는 39kDa, PI 4.6 부위는 down regulation을 나타내었으며, 19kDa, PI 4.6 부위에서는 up regulation을 나타냄을 알 수 있었다.

본 발명의 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제 및 그 제조방법에 대하여 자세히 설명하면 다음과 같다.

1. 양계용 사료첨가제의 제조방법

(1) 제1공정 : 재료준비

홍화와 삼백초를 준비한다.

(2) 제2공정 : 미세분말 제조

준비된 홍화와 삼백초는 분쇄기를 사용하여, 각각 분쇄하여 미세분말을 제조한다.

(3) 제3공정 : 고형물 제조

상기 제조된 홍화분말과 삼백초 분말을 교반기에 넣고 교반하여 페이스트 상태의 고형물을 만든다.

이때, 홍화분말은 사료첨가제 전체 중량대비 30 중량 %, 삼백초분말은 사료첨가제 전체 중량대비 70 중량 %를 교반기에 넣고 교반하여 고형물을 제조하는 것이 바람직하다.

(4) 제4공정 : 반응물 제조

글루코오스를 준비한 후 상기 고형물과 함께 반응기에 넣고 반응시켜 반응물을 제조한다.

이때, 글루코오스를 고형물 중량대비 5 중량%를 넣고 70 ~ 80 °C 반응기에서 10 ~ 14 시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 것이 바람직하다.

(5) 제5공정 : 양계용 사료첨가제 제조

상기 제조된 반응물을 과립화 한 다음 건조시켜 양계용 사료첨가제를 제조한다.

이때, 45 ~ 50 °C에서 2 ~ 4 시간을 건조시켜 양계용 사료첨가제를 제조하는 것이 바람직하다.

이하, 본 발명에 대하여 실시예와 실험예를 통하여 상세히 설명하나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<실시예 1> 본 발명인 양계용 사료첨가제 제조

홍화와 삼백초를 시중에서 구입하여 준비하였다.

준비된 홍화 500 g과 삼백초 1 kg을 분쇄기를 사용하여 각각 분쇄하여 미세분말로 제조하였다.

상기 홍화 분말 300 g과 삼백초 분말 700 g을 교반기에 넣고 교반하여 고형물을 만들었다.

이 고형물과 글루코오스 5 g을 반응기에 넣고 70 °C에서 12 시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하였다.

이 반응물을 과립기에 넣어, 가로 1 mm, 세로 1 mm, 높이 1 mm 크기로 과립화시켰다.

과립을 건조실에 넣고 45 °C 에서 2 시간 건조시켜서, 본 발명의 양계용 사료첨가제를 제조하였다.

<실시예 2> 본 발명의 양계용 사료첨가제를 첨가한 양계용 사료의 제조

양계 사육시, 통상적으로 쓰이고 있는 시판육계 전기사료(Dodam Tec.)의 양계용 사료를 구입하였다.

구입한 양계용 사료 99 kg에 실시예 1에서 제조된 본 발명의 양계용 사료첨가제 1 kg을 첨가한 다음, 교반 혼합하여 양계용 사료를 제조하였다.

<실험예 1> 본 발명의 양계용 사료첨가제의 병원세균에 대한 항균효과 실험

1. 실험균주 준비

국립보건 환경 연구원에서 분양받은 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni* ATCC#3356)와 캄필로박터 콜리(*C. coli* ATCC#2758), 수의과학 검역원에서 분양받은 살모넬라 엔테로티디스(*Salmonella enterotidis* ATCC#13076)인 총 3 균주를 준비하였다.

상기 캄필로박터 종은 소의 혈액을 5 % 첨가한 100 ml의 브루셀라 배양액(Brucella broth)에 10 ml의 VTP brucella FBP broth(VTP : vancomycin 0.02 %, trimethoprim lactate 0.001 %, polymixin B 5,000 IU/L complex, Sodium pyruvate 0.025 % complex)에 접종하고, gas pack(Gibco)를 이용하여 CO₂ 10 %, O₂ 5% 분압에서 42 °C에서 48 시간 배양하였다.

살모넬라 종은 10 ml의 트립틱 소이 배양액(tryptic soy broth; TSB, Gibco)에 접종하여 37 °C에서 24 시간 배양하였다.

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.

2. 양계용 사료첨가제의 항균성 물질 추출

본 발명의 실시예 1에서의 제조한 양계용 사료첨가제 20 g과 증류수 100 ml을 혼합하여 80 °C의 수욕상에서 30 분 동안 중탕하였다.

상기 중탕액을 0.45 µm 필터로 여과하여 수득한 양계용 사료첨가제 여과액을 4 °C에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

3. 최소발육 억제농도측정

실험균주에 대한 본 발명의 양계용 사료첨가제의 최소 발육 억제농도(Minimal inhibitory concentration; MIC)는 국립병리시험실표준협회(National Committee Clinical Laboratory Standard ; NCCLS, 1997)기준에 따라 한천평판희석법(Agar Dilution Method)으로 측정하였다.

즉, 본 실험에 사용하기 위해 제조된 양계용 사료첨가제 여과액을 인산염 완충용액(PBS)으로 2 배수 희석하여 농도별로 함유하는 뮐러 힌톤배지(Mueller Hinton Medium; MHM, Difco)에 10⁵ CFU/ml로 조정된 각 균액을 다중접종기(multiple inoculator)로 접종하였다.

접종 후, 캄필로박터 종은 10 % CO₂, 5 % O₂ 분압으로 가스팩(gas pack)을 사용하여 42 °C에서 24 시간 배양하며, 나머지 살모넬라 종은 37 °C 배양기에서 24 시간 배양하여 균의 발육이 억제된 농도를 최소발육억제농도(%)로 나타내었다.

각 세균에 대한 최소발육억제농도를 조사하고, 그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.

<표 1> 각 세균에 대한 양계용 사료첨가제의 최소발육억제농도

Microorganisms	최소발육억제농도(%)				
	2.0	1.0	0.5	0.25	0.13
<i>Camphylobacter jejuni</i>	-	-	+	+	+
<i>Camphylobacter coli</i>	-	+	+	+	+
<i>Salmonella enterotidis</i>	-	+	+	+	+

+ : 균주 발생함. - : 균주 발생안함.

상기 표 1에서 보는 바와 같이, 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*) 에 대해서는 1.0 % 이상의 농도에서 항균 효과를 나타내었다.

캄필로박터 콜리(*C. coli*)에 대해서는 2.0 % 이상의 농도에서 항균효과를 나타내었다.

살모넬라 엔테로티디스(*Salmonella enterotidis*)에 대해서도 2.0 % 이상의 농도에서 항균효과를 나타내었다.

<실험예 2> 본 발명인 양계용 사료첨가제에 의한 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)의 장관정착 억제효과실험

1. 실험동물 및 사료

실험동물은 백색 레그혼 계 SPF계란(성일과학에서 구입)을 부화시켜 사육한 2주령의 유추 50 수를 사용하였다.

캄필로박터 분리시험에서 음성을 나타내는 개체를 선발하여 실험군과 대조군로 나누어 5 수씩 케이지 사용하였다.

실시에 2의 방법으로 제조한, 양계용 사료를 실험군에 급여하였다.

대조군은 시판 육계전기사료를 그대로 급여하였다.

사육장소는 경기도 용인소재 양계장을 이용하여, 2005년 1 월부터 2005년 6월까지 사육하였으며, 사료와 물은 1 일 3 회씩 급여하였다.

2. 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 균주 배양

캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni* ATCC#3356) 균주를 소혈액 5%를 첨가한 VTP-brucella-FBP broth에 접종하여 10 % CO₂, 5 % O₂의 미호기 조건으로 42 °C에서 24 시간 배양하였다.

3. 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 감염여부 실험과정 및 그 결과

모든 실험동물은 상기 캄필로박터 제주니 배양 균액을 2,000 rpm에서 15 분간 원심 침전하고, PBS(pH 7.2)로 10 배 계단 희석하여 2.3 × 10⁸ CFU로 조정된 다음, 경구 주입관(Sonde)을 사용하여 0.5 ml 경구 접종하였다.

접종 후, 1 일, 7 일, 14 일, 21 일에 직장 분변을 취하여 5수의 평균치를 측정하여, 캄필로박터 제주니의 분리율을 조사하였다.

그 결과를 아래의 표 2에 나타내었다.

<표 2> 감염 계군의 분변에서의 캄필로박터 제주니 균주 분리

처리그룹	접종 후 경과시간	검출수/총수
대조군	1 day	5/5
	7 days	4/5
	14 days	4/5
	21 days	4/5
실험군	1 day	5/5
	7 days	3/5
	14 days	2/5
	21 days	1/5

상기 표 2에 나타나 있듯이, 접종 1 일경에는 대조군 및 실험군 모두 직장 분변에서 캄필로박터 제주니가 검출되었다.

대조군에서는 1 주일 경과 후부터 3 주까지 5마리의 실험군 중 4 마리에서 캄필로박터 제주니가 검출되었다.

그러나, 실험군에서는 1 주 후 5 마리의 실험군 중에서 3 마리, 2 주일 후 2 마리, 3주 후에는 1 마리에서만 직장 분변에서 캄필로 박터가 검출되었다.

4. 캄필로박터 제주니 접종군의 장관 정착에 대한 주사 전자 현미경 관찰실험과정 및 그 결과

캠필로박터 제주니 균의 장관 정착상태를 확인하기 위하여 균 접종 후 1 일, 7 일, 14 일, 21 일에 공장을 적출하여 냉각된 PBS로 가볍게 세척한 다음, 2 % glutaraldehyde(Sorensen, pH 7.4)에 침적하여 4 ℃에서 고정하였다.

그 다음, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)로 1 시간 간격으로 3 회 수세하고, 70, 80, 90, 95 % absolute ethanol에서 탈수과정을 거쳐 임계 건조기에서 건조시켰다.

건조된 조직편을 양면 테이프를 이용하여 블록에 옮기고 ion sputtering coater 내에서 순금으로 100 Å 두께로 표면 처리하여 주사 전자 현미경(JSM 6400, oxford)로 관찰하였다.

그 결과를 도 2와 도 3에 나타내었다.

도 2에 나타나 있듯이, 대조군에서는 감염 후 7 일, 14 일, 21 일에 균이 소장 점막 표면 부위에 다수 부착하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다.

그러나, 도 3에 나타나 있듯이, 실험군에서는 시간이 지남에 따라 캠필로박터 제주니 균이 거의 관찰되지 않았으므로, 이는 본 발명인 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제가 포함된 사료를 사용하여 사육할 시, 세균의 장관 정착을 억제함을 알 수 있었다.

<실험예 3> 본 발명인 양계용 사료첨가제의 캠필로박터 종에 대한 방제효과실험

1. 실험동물 및 사료

실험군은 실시예 2의 방법으로 제조한 양계용 사료를 급여하여 250 수를 사육하였다.

대조군은 시판 육계전기사료를 그대로 급여하여 250 수를 사육하였다.

야외 적용 시험은 경기도 용인소재 양계장을 이용하여, 2005년 1 월부터 2005년 6월까지 사육하였으며, 사료와 물은 1 일 3 회씩 급여하였다.

공시동물은 부화 4 ~ 5 일령의 육계를 이용하였다.

2. 시료 채취

상기 각각의 사료 급여 1 주 후부터 2 주 간격으로 5 회에 걸쳐 대조군과 실험군의 각 20 마리씩 분변, 비장, 간으로부터 시료를 채취하였다.

분변재료는 직장분변을 멸균된 면봉을 이용하여 채취하였다.

또한, 비장 및 간의 시료는 1 회용 위생장갑(poly glove)을 사용하여 무균적으로 채취한 다음, 1 g의 시료를 마쇄한 후 각각의 시료를 소의 혈액 5%가 첨가된 VTP brucella FBP broth(VTP : vancomycin 0.002 %, trimethoprine lactate 0.001 % 및 polymixin 5.000 IU/L complex ; FBP : ferrous sulfate) 각 10 ml에 접종하였다.

3. 실험결과

캠필로박터 종의 분리 빈도에 대하여 아래의 표 3에 나타내었다.

<표 3> 캠필로박터 종에 대한 방제효과

기간	종류	총 개체량	분리된 개체수(방제율%)		
			간	비장	직장 분변
1 주	대조군	20	2(10)	2(10)	5(25)
	실험군	20	1(5)	1(5)	5(25)

3 주	대조군	20	2(10)	1(5)	8(40)
	실험군	20	1(5)	1(5)	4(20)
5 주	대조군	20	3(15)	2(10)	10(50)
	실험군	20	.	.	3(15)
7 주	대조군	20	4(20)	3(15)	16(80)
	실험군	20	.	.	3(15)
합계	대조군	20	11(13.7)	8(10)	40(50)
	실험군	20	2(2.5)	2(2.5)	15(18.7)

* 방제율(%) = 분리된 개체수/총 개체량 × 100

상기 표 3에 나타나 있듯이, 대조군의 직장 분변에서는 입식 후 20 두 중 5 두(25%)에서 캄필로 박터가 분리되었으며, 그 후 분리율이 점차 증가하였으며, 7 주 후에서 20 두 중 16 두(80%)에서 균이 분리되었다.

그러나, 실험군의 직장 분변에서는 입식 1주일 후 20 두 중 5두(25%)에서 캄필로박터가 분리되었으나, 그 후 분리율이 다소 감소하여 7 주 후에는 20 두 중 3 두(15%)에서 분리되었으므로, 본 발명의 양계용 사료첨가제를 이용하여 사육할 시 캄필로 박터의 방제효과가 높음을 알 수 있었다.

또한, 대조군의 간 및 비장 재료에서는 80 두 중 각 11 두(13.7%) 및 8 두(10%)에서 균이 분리되었으나, 실험군의 간 및 비장재료에서는 각 2 두(2.5 %)에서 균이 분리되었습니다.

<실험예 4> 양계 유추의 분변으로부터 캄필로박터 균의 분리율 조사실험

1. 공시동물 및 사료

공시동물은 부화 후 5 일령의 백색계통의 육계를 입식하고, 실험군과 대조군으로 나누어 각기 160 수씩 배치하고 4 주간 사육하였다.

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하였다.

사료와 물은 자유 급식시켰다.

입식 후 4 일간 항생물질을 음용수에 투여하였다.

2. 시료채취

출하 직전에 실험군의 분변 160 예와 대조군의 분변 160 예로 총 320 예의 분변을 채취하였다.

직장 분변 채취는 1 회용 위생장갑(poly glove)을 사용하여 5 g씩 채취하였고, 24 시간 이내에 균 분리를 실시하였다.

3. 캄필로박터 종의 분리 및 동정

3-1. 캄필로박터 종의 배양

직장 분변을 5 % 소혈액을 첨가한 VTP 브루셀라-FBP액(VTP Brucella-FBP broth) 10 ml에 접종한 것을 실험실로 옮겨 단시간에 균분리를 실시하였다.

균 분리 방법은 시료채취시 사용한 증균배지를 캄피팩 2(Campy pack 2; BBL, USA)와 혐기성 자르(jar; Ditco. USA)를 이용하여 10 % CO₂, 5% O₂, 85% N₂의 미호기 상태에서 42 ℃에서 24 시간 증균배양하였다.

증균 배양액 0.03 ml를 취하여 agar에 접종하고 증균 배양과 동일한 미호기 조건으로 42 ℃에서 24 시간 배양한 다음, 각각의 평판배지에서 캄필로박터 종으로 의심되는 집락 3개씩을 선발하였다.

3-2. 캄필로박터 종의 동정실험

분리한 세균의 동정은 Modiros와 Hotman의 MFLP-46 Isolation of therophilic Campylobacter의 방법에 따라 캄피 BAP 배지(campy BAP agar)에서 작은(폭 0.2 ~ 0.8 μm)집락을 선발하여 G(-)로서 만곡 또는 S자형의 나선모양과 같은 운동성(corkscrew-like motility)을 나타내는 균을 선발하였다.

선발된 세균은 카타라아제 생성, 옥시다아제 생성, 43 °C 및 25 °C에서의 발육성, 날리딕스산(nalidixic acid; 30 μg , disc)에 대한 감수성, 세파로틴(cephalothin; 30 μg , disc)에 대한 저항성, H₂S생성, 질산염(nitrate) 환원, 1 % 글리신 및 3.5% 염화나트륨 첨가 배지에서 발육성 등에 관한 생화학적 정상검사를 다음과 같이 실시하였다.

상기 실험 결과 판정은, 질산염(nitrate) 환원 실험에서는 반고체 질산염(semisolid nitrate) 시험관에 0.5 ml의 질산염 레이전트(nitrate reagent)를 첨가하여 1분 후 선홍색을 띤 것과 색깔이 없는 시험관에서는 아연가루(Zinc dust)를 소량 첨가하여 색깔이 나타내지 않을 때 양성으로 판정하였으며, 아연가루(Zinc dust)를 가하여 붉은색을 띤 것을 음성으로 판정하였다.

H₂S 생성시험은 브루셀라 시스테인 미디움(Brucella cystein medium)에 리드 아세트산 스트립(lead acetate strip; 2 %)을 메달아 검은색을 나타낸 것을 양성을 판정하였다.

1% glycin 및 3.5 % NaCl 첨가 배지에서의 발육성은 배지의 상층부에 균이 증식한 것을 양성으로 판정하였다.

글루코스(glucose) 발효성은 브루셀라 반고체 글루코스 미디움(Brucella semisolid glucose medium)에서 증식한 것을 양성으로 판정하여, 캄필로 박터 종균으로 추정하였다.

4. 실험결과

직장분변에서의 균 분리율을 측정한 결과를 아래의 표 4에 나타내었다.

처리군	분변실험한 개체수	분리개체양	분리율(%)
대조군	160	43	26.9
실험군	160	12	7.5

상기 표 4의 결과에 나타나 있듯이, 대조군은 160 예 중 43 예에서 균이 분리되어 26.9 %의 분리율을 나타내었으나, 실험군에서는 160 예 중 12 예에서 균이 분리되어 7.5 %의 분리율을 나타내었다.

<실험예 5> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 사양에 미치는 영향

사료첨가제가 실용재래닭 사양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1 % 되게 균질하게 혼합 한 후, 급여 57 일째 사양에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과를 아래의 표 5에 나타내었다.

<표 5> 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 사양에 미치는 영향

내용	대조군	실험군	결과
평균체중	0.63 kg	1.68 kg	+ 0.05 kg
육성율	92 %	99 %	+ 7 %
폐사율	9 %	1 %	- 8%
사료요구율	1.75	1.62	-0.13

상기 표 5에 나타나 있듯이, 평균체중을 비교하여 보면 대조군은 1.63 kg이며, 실험군은 1.68 kg으로써, 실험군의 평균체중이 대조군에 비해 0.05 kg이 증가되었다.

또, 육성율을 비교하여 보면 대조군은 92 %이며, 실험군은 99 %로써, 실험군이 대조군보다 7% 높은 육성율을 나타냄을 알 수 있었다.

또한, 폐사율을 비교하여 보면 대조군은 9 %를 나타내었으나, 실험군은 1 %로써, 실험군이 대조군보다 폐사율이 낮음을 알 수 있었다.

마지막으로 사료요구율을 비교하여 보면 대조군은 1.75, 실험군은 1.62 로써 실험군이 대조군에 비해 0.13 감소하는 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

즉, 본 발명인 홍화와 삼백초를 이용한 양계용 사료첨가제는 재래닭 성장에 영향을 미침을 알 수 있었다.

<실험예 6> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭 이화학적 변화에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

2. 실험방법

2-1. 함유수분측정

함유수분 전수분은 A.O.A.C.(1990) 방법에 따라 102±2℃의 건조기(drying oven)에서 24 시간 건조 후 중량을 측정하여 건조 전 시료의 중량에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

전수분은 시료를 건조된 페트리디쉬(a)를 무게를 잰 후 시료를 넣어 다시 무게를 잰 후(b)에 건조기(24 hr, 105 ℃)에서 건조시킨 후 무게(c)를 측정하였다.

$$\text{보수력}(\%) = \frac{(c-a)-(b-a)}{(c-a)} \times 100$$

2-2. 조지방 측정

조지방 함량은 Folch 등(1957)의 방법을 이용하여 측정하였다.

시료 2 g을 50 ml 테스트 튜브에 넣고 Folch I(클로로포름 : 메탄올 = 2:1)용액을 20 ml 넣고 호모지나이저(Homogenizer; polytron)에서 14,000 rpm으로 30 초간 균질화 한 다음 Folch I용액 15 ml로 호모지나이저(Homogenizer) 균질봉을 세척하여 테스트 튜브 캡을 한 다음 4 ℃ 냉장고에서 2 시간동안 방치하면서 20 분 간격으로 흔들면서 섞어(shaking) 주었다.

테스트 튜브에 균질화된 시료를 100 ml 메스실린더에 와트만 No.1 필터 용지(Whatman No.1 filter paper)를 이용해서 여과하였다.

메스실린더 눈금을 읽고 여액의 25 %에 해당하는 0.88 % NaCl을 첨가하여 메스실린더 캡을 한 다음 격렬히 흔든 후 1 시간 방치하였다.

이때, Folch II(클로로포름 : 메탄올 : 물 = 3 : 47 : 48)용액 10 ml으로 메스실린더 벽면을 세척한 후 눈금을 읽는다(a).

상층을 아스피레이터(aspirator)를 이용해서 제거하고 하층 10 ml을 무게를 알고 있는 수기(b)를 건조기(50 ℃)에 넣고 건조한 후 무게(c)를 측정하였다.

계산식은 다음과 같다.

$$\text{조지방함량(\%)} = \frac{(c-b) \times 10/a}{\text{Sample(g)}} \times 100$$

2-3. 조회분 측정

조회분 함량은 회분 정량용 도가니를 105 °C 건조기에서 건조한 후 데시케이터에서 완전히 건조시킨 후 시료 1 ~ 3 g을 건조된 도가니에 달아 넣고 시료가 든 도가니를 550 °C 회화로(Isotemp Muffle Furnace, Model No. 602025, Fisher Scientific USA)에서 2 시간 동안 연소하였다.

회화로가 200 °C 이하로 내려가면 시료를 태운 도가니를 꺼내어 데시케이터에 넣고 30 분간 방냉한 다음 무게를 측정하여 함량을 구하였다.

계산식은 다음과 같다.

$$\text{조회분(\%)} = \frac{\text{회화로에 남은 시료 무게}}{\text{원래의 시료 무게}} \times 100$$

2-4. 통계처리

상기 실험에서 얻어진 성적은 SAS/PC (SAS, 1998)을 이용하여 처리구간을 분산분석 및 Duncan의 다중검정법으로 각 요인간의 유의성을 비교 분석하였다.

3. 실험결과

상기 결과를 아래의 표 6에 나타내었다.

<표 6> 본 발명의 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 이화학적 변화에 미치는 영향

항목	대조군	실험군	비고
지방	11.37±0.59	8.98±0.34	sample 100 g(%)
콜레스테롤	63.7±2.18 mg%	59.9±1.32 mg%	sample 100g, GC kit
수분	67.53±1.68	67.56±0.45	sample 100g(%)
회분	1.10±0.06	0.89±0.09	sample 100g, Mohr
조단백	18.28±1.54	20.24±1.14	sample 100g, Kijedal
칼슘	13.5±0.12 mg/dl	16.5±0.19 mg/dl	serum
인	7.2 ~ 8.5 mg/dl	8.1 ~ 9.3 mg/dl	serum

상기 표 6에 나타나 있듯이, 지방은 대조군 11.37±0.59, 실험군 8.98±0.34을 나타내었으며, 콜레스테롤은 대조군 63.7±2.18 mg%, 실험군 59.9±1.32 mg%, 조단백은 대조군 18.28 ±1.54, 실험군 20.24± 1.14, 칼슘은 대조군 13.5 ±0.12 mg/dl, 실험군 16.5 ±0.19 mg/dl, 인산은 대조군 7.2-8.5 mg/dl, 실험군 8.1-9.3 mg/dl을 나타내었습니다.

따라서, 실험군이 대조군에 비하여, 지방과 콜레스테롤의 양은 감소되며, 조단백, 칼슘, 인의 양은 증가됨을 알 수 있었다.

<실험예 7> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭에 미치는 안정성 평가 실험

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

2. 실험방법

상기 대조군과 실험군의 재래닭 날개혈관(wing vein)에서 각각 혈액 1cc를 채취하여 4 °C 에서 3,000 rpm 으로 15 분간 원심분리한 후, 혈청을 -80 °C에서 냉동 보관하면서 생화학 분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였다.

3. 실험결과

아래의 표 7에 그 결과를 나타내었다.

<표 7> 안정성 평가

매개변수	대조군	실험군	비고
SGOT	89 ~ 204	88 ~ 201	보통
SGPT	10.1~ 41.2	10.0 ~ 40.2	보통
글루코스(Glucose)	152 ~ 190	154 ~ 190	보통
빌리루빈(Bilirubin)	0.00 ~ 0.20	0.01 ~ 0.19	보통
LDH	89 ~ 290	88 ~ 280	보통
CPK	235 ~ 800	235 ~ 800	보통
알칼리성 인산염 (Alkaline phosphate)	24.5 ~ 44.4	24.0 ~ 40.4	보통
아밀라아제(Amylase)	160 ~ 345	160 ~ 345	보통

상기 표 7에 나타나 있듯이, SGOT, SGPT, 글루코스(glucose), 빌리루빈(bilirubin), LDH 등이 정상범위 내에 있음을 알 수 있었다.

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

<실험예 8> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 단백질 발현에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

2. 실험방법

2-1. 이차원 전기영동의 시료 사용조건

혈청을 12 시간 예비 배양한 후 100 μ l를 50 ml의 LB broth에 접종하고, 37 °C에서 220 rpm으로 24 시간 동안 진탕배양하였다.

세균의 배양액은 4 °C에서 6,000 rpm 15 분동안 원심 침전시키고 침전된 균괴는 40 mM tris-HCl buffer(pH 7.2)로 50 ml 부여시킨 다음 4 °C에서 6,000 rpm으로 10 분간 3 회 세척한 후, 흡광도 1.0(λ =610nm)수준으로 희석하였다.

희석된 세균액은 각각 8 ml씩 분주하고, 다시 원심침전시켜 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

2-2. 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

이차원 전기영동을 위한 단백질 추출은 O' Farrell의 방법을 준용하였으며, 준비된 시료에 500 μ l의 세포용해 완충액(lysis buffer; 9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCl)을 첨가하여 얼음에서 1 시간 반응시킨 다음 13,000×g에서 1 시간 원심시켜 상층액을 회수하고, 회수된 상층액은 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

2-3. 일차원적 전기영동(First-dimension Isoelectric focusing; IEF)

IPGphor 시스템을 이용하여 IEF를 수행하였다.

탈수완충액(Rehydration buffer; 9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCL, 65mM DTT, and 0.5% IPG buffer, bromophenol blue)에 정량한 시료의 단백질을 전기영동 장치 지지대(IPGphore strip holder)에 250 μ l 로딩한 후 13 cm 이동피에취영동종이(immobilized pH Gradient (IPG) strip)을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 덮개유출용액(cover fluid oil)을 가하였다.

IEF 조건은 전류가 IPG 영동종이(strip) 당 50 μ A가 넘지 않도록 하였으며, 20 $^{\circ}$ C의 온도조건에서 12 시간 수분보충(rehydration)한 후, 30 V에서 2 시간, 200 V에서 1 시간, 500 V에서 1 시간, 1000 V에서 1 시간, 2000 V에서 2 시간, 8000 V에서 10 시간 통전하여 최종 83760 Vhr까지 실시하였다.

IEF가 끝난 IPG strip은 2차원 SDS-PAGE를 수행하였다.

2-4. 이차원적 전기영동(Second-dimension SDS-PAGE)

상기 IEF가 끝난 IPG 영동종이(strip)는 1%(w/v) DTT를 첨가한 평형완충액(equilibration buffer; 1.5M tris-HCl, pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 15 분간 반응시키고, 다시 1.25 %(w/v)의 아이도아세타마이드(iodoacetamide)를 첨가한 평형완충액(equilibration buffer)에 15 분간 반응시킨 다음, IPG 영동종이(strip)를 12.5 % 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)의 상단부에 적용시키고, 빈공간은 페놀 레드(phenol red)를 첨가한 저용점 아가로스 겔 (low melting agarose gel)을 분주하였다.

10 mA의 조건으로 아가로스 겔(agarose gel)의 붉은색 염색(dye)이 영동종이(strip)를 완전히 빠져나가면 20 mA로 변환시켜 브로모페놀(bromophenol)이 겔 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

2-5. 도은 염색

상기 이차원 전기영동을 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위해 도은염색을 하였다.

gel을 고정용액(50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 한 시간 이상 처리한 후, 50 % EtOH으로 20 분간 3 회 반복 세척한 다음 Na₂S₂O₃·5H₂O로 1 분간 전처리 하였다.

겔을 3차 증류수로 20 초간 3 회 세척한 다음 AgNO₃와 37% HCOH로 30 분간 처리하여 Na₂CO₃와 37% HCOH로 발색시키고, 점(spot)을 확인한 후 점용액(stop solution; 50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.

2-6. 유도성 발색(Enhanced chemiluminescence; ECL)을 이용한 면역투과(Immunoblotting)

이차원 전기 영동을 한 겔에서 항원 점(spot)을 검출하기 위하여 15 초동안 MeOH에 전처리한 PVDF 막(membrane)에 60 V에서 70 분동안 전사시킨 후 5 % 지방제거우유(skim milk)를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 막음(blocking) 하였다.

5 % 지방제거우유(skim milk)에 1 : 200으로 희석한 살모넬라 장염(*S. enteritidis*) 특이 다가 혈청을 가하여 2 시간동안 진탕 배양하면서 반응시킨 후 폴리에틸렌 솔비탄 모노라우레이트(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate ; tween20)을 0.1 % 첨가한 트리스완충액(tris buffered saline)으로 세척한 후 다시 5% 지방제거우유(skim milk)에 1:2000으로 희석한 항 토끼 접합 면역 글로브린 쥐(anti rabbit horse radish conjugated IgG)를 가하여 1 시간동안 진탕하여 반응시킨 후 유발성 키트(ECL kit)를 이용하여 항원을 검출하였다.

2-7. 통계처리

상기 도은 염색한 겔과 면역투과(immunoblotting) 결과는 스캐닝(scanning) 한 후 전용이미지 분석프로그램인 프로텍스2 차원 프로그램(Phoretix 2D program; Ver. 5.01)을 이용하여 재료를 분석하였다.

3. 실험결과

상기 이차적 전기영동 실험을 통해, 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭 단백질 발현에 미치는 영향에 대해서 알아 보았다.

도 4에 상기 결과를 나타낸 바와 같이, 39kDa, pI 4.6 부위와 19kDa, pI 4.6 부위에서 각각 아래조절(down regulation)과 상조절(up regulation)이 된 것을 관찰할 수 있었다.

이 39kDa, pI 4.6 부위와 19kDa, pI 4.6 부위에서 각각 아래조절(down regulation) 와 상조절(up regulation)이 된 것이 사료첨가제에 의한 면역반응, 항균작용 등에 영향을 미침을 알 수 있었다.

<실험예 9> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 아미노산 조성에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

질량분석기(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOFMS) 를 준비하였다.

2. 실험방법

2-1. 점 제거(spot excising)

프로텍스2차원 프로그램(Phoretix 2D program)을 통해 분석된 2-D겔을 분석한 후, 관심 있는 단백질의 동정(identification)을 위해 관련 점(spot)을 피펫 팁을 이용하여 1mm² 크기로 잘라내었다.

2-2. 탈염색과정

잘라낸 점(spot)은 도은 염색 상태이므로, 30 mM 적혈염(Potassium ferricyanide) 와 100mM 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate)를 1:1로 혼합한 용액에 넣어 5분 동안 반응시켜 탈색(destaining) 해주었다.

탈색(destaining)한 겔은 순수증류수(pure water)를 이용하여 5 분 동안 3 ~ 4 회 세척해주었다.

겔 내부의 수분을 제거시켜주기 위해 아세토니트릴(acetonitrile)을 넣어 15 분 동안 반응시킨 후 겔이 하얀색으로 탈수상태가 된 것을 확인한 후, 아세토니트릴(acetonitrile)을 제거시켜주고 겔은 진공 원심분리기(vacuum centrifuge)를 이용하여 완전 건조시켰다.

2-3. 겔환원과 알킬레이션(In-gel Reduction and Alkylation)

건조된 겔에 10 mM DTT가 함유된 100 mM NH₄HCO₃를 넣어 30 분간 반응시킨 후, 다시 55 mM 아이도아세타마이드(iodoacetamide)가 함유된 100 mM NH₄HCO₃를 넣어 암실에서 30 분간 다시 반응시켰다.

100mM NH₄HCO₃를 이용하여 한번 더 세척한 후 아세토니트릴(acetonitrile)을 이용하여 겔을 탈수시켰다.

2-4. 겔 소화(In-gel Digestion)

건조된 겔에 50 mM NH₄HCO₃와 5 mM CaCl₂의 소화 버퍼(digestion buffer)를 넣어 녹인 12.5 ng/ μ l의 트립신(trypsin)을 15 μ l를 넣어 45 분동안 얼음(ice)에서 정치시키고 흡수되지 않고, 남은 용액은 모두 제거한 후 20 μ l의 트립신(trypsin)이 포함되지 않은 소화 버퍼(digestion buffer)를 넣어 37 °C에서 16 시간정도 소화(digest)시켰다.

2-5. 펩타이드 추출(Extraction of Peptides)

15 μ l의 순수증류수(pure water)를 넣어 30 분간 볼텍스(vortex) 시킨 후, 20 μ l의 아세토니트릴(acetonitrile)을 넣어 다시 30 분간 볼텍스(vortex) 시킨 후 상층액만 수거, 진공 원심분리기(vacuum centrifuge)를 이용하여 건조시켰다.

2-6. 목표샘플준비(On Target sample preparation, Dried-Droplet Method)

매트릭스 솔루션(Matrix solution)으로 40 mg의 HCCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 50 % 아세토니트릴(acetonitrile)과 0.3 % TFA 1ml에 녹인 상층액에 적당량의 칼리브란트(calibrant; Bradykinin, Angiotensin)를 섞어 건조된 샘플과 혼합한 후, MALDI 타겟(target)에 2 μ l 타겟팅(targetting)한 후 건조 시켜 MALDI-TOF를 시행하였다.

2-7. 데이터 분석(Data analysis)

얻어진 펩티드(peptide)의 양(mass)은 단백질 분석기(Protein Prospector)에 있는 MS-Fit 프로그램을 이용하여 NCBInr 데이터베이스에 접속하여 단백질을 동정하였다.

이때, 양의 오차(mass tolerance)는 50 ppm 이내로 하였고 최소 4 개 이상의 펩티드가 매칭(matching) 되어진 단백질만을 선택하였다.

3. 실험결과

상기 실험한 결과, 아래의 표 8과 도 5, 6에 나타내었다.

<표 8> 실용재래닭 아미노산 조성

단위 : mg/100g

항목	대조군	실험군
Thr	918.4 $\pm$ 5.67	953.2 $\pm$ 19.32
Arg	681.3 $\pm$ 51.38	1574.6 $\pm$ 69.14
Ala	593.2 $\pm$ 48.49*	1489.7 $\pm$ 71.16*
Pro	685.2 $\pm$ 46.59**	853.2 $\pm$ 59.22**
Tyr	514.2 $\pm$ 8.30	632.4 $\pm$ 54.22
Val	824.3 $\pm$ 11.54**	1237.2 $\pm$ 58.35**
Mct	413.2 $\pm$ 3.59*	514.2 $\pm$ 23.52*
Lys	1542.2 $\pm$ 65.32	1932.6 $\pm$ 54.32
Isoleu	867.1 $\pm$ 19.84*	1132.3 $\pm$ 43.74*
Leu	1512.3 $\pm$ 3.98*	1775.1 $\pm$ 821.42*
Phe	639.4 $\pm$ 19.42	714.1 $\pm$ 39.13
Asp	1858.7 $\pm$ 67.05	1967.2 $\pm$ 59.16
Ser	895.7 $\pm$ 37.23	870.8 $\pm$ 19.28
Glu	2758.1 $\pm$ 104.54	2609.3 $\pm$ 940.27
Gly	754.3 $\pm$ 74.19	1012.3 $\pm$ 63.72
His	685.7 $\pm$ 16.54	754.2 $\pm$ 26.54*

* : 유의차(p<0.05) ** : 유의차(p<0.01)

상기 표 8과 도 5, 6에 나타나 있듯이, 실험군이 대조군에 비하여 아스파르트산(asparatic acid), 글루타메이트(glutamate), 글루신(glycine), 히스티딘(histidine), 알긴(argine), 프롤린(proline), 발린(valine), 라이신(lysine), 이소레우신(isoleucine), 레우신(leucine)이 증가됨을 알 수 있었다.

이와 같은 결과는 농촌 영양 개선 연구원의 식품성분과 유사한 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

<실험예 10> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭에 지방산 조성에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

2. 실험방법

2-1. 지방산 분석실험

지방산 조성은 Folch법(1957)을 변형하여 수행하였다.

세절육 10 g을 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 혼합용액(클로로포름 : 메탄올 = 2:1) 150 ml를 첨가한 다음 호모지나이저(homogenizer)로 12,500rpm에서 3 분간 균질화하여 원심분리관(500ml)에 필터링(Whatman No. 1, 185mm)한 후 여기에 0.88% NaOH를 총여액의 1/4 정도 첨가하여 균형을 맞춘 후 원심분리기(Union 5KR, Made in KOREA; 3,000rpm, 10min)를 이용하여 원심분리하고 아스피레이터(aspirator)를 이용하여 연결된 모세관으로 상등액을 버리고 하층(lipid layer)을 취하였다.

유기용매층인 하층은 250 ml 원형 flask에 하층을 여과하되 이때 Na_2SO_4 를 이용하여 남은 수분을 흡착 여과한 후 감압농축기(evaporator, England; 55°C, 25min)를 이용하여 지질을 추출하였다.

지질을 추출한 후 40 °C 이하에서 질소가스를 계속 주입하면서 농축하였다(유기용매 회수).

농축 지질은 질소가스 주입 후 파라핀 필름으로 밀봉하고 메틸유도체화(Methylation)하기 전까지 냉동(-20°C 이하)하여 보관하였다.

순수 분리된 0.5 ~ 1.0mg의 지질을 테스트 튜브에 넣은 후 BF_3 2ml를 추가하여 뚜껑을 닫고 후 워터 보스(water both, 90°C)에 20 분간 흔들어(5 분마다 흔들어 줌)준 후 실온에 냉각하였다.

테스트 튜브에 증류수 1 ml와 헥산(Hexane) 2 ml를 넣어 흔들면서 섞어(shaking)준 후 하층의 증류수를 제거하고 다시 증류수 2 ml를 3 회 반복하여 첨가한 후에 하층을 제거하고 난 후에 Na_2SO_4 를 넣어 잔존하고 있는 수분을 완전히 제거하고, 상등액 2.5 ~ 3 μl 를 취하여 GC(HP 6890+ GC)에 주입하여 지방산을 분리 정량하였으며 이때 GC조건은 다음과 같다.

<표 9> GC 조건

항목	상태
컬럼	알레크 AT-실라르 모세관 컬럼 (Allech AT - Silar capillary column)
	30 m × 0.32 mm × 0.25 μl
	처음온도(Initial temp); 140°C 마지막온도(Final temp); 280°C 주입온도(Injector temp); 240°C
	검출온도(Detector temp); 250°C 프로그래밍율(Programming rate); 2°C/min
검출기	플램 이온화 검출기(Flame Ionization Detector)
이동가스	He
전도율	50 ml/min
슬릿 비율 (Slit ratio)	100 : 1

3. 실험결과

결과를 아래의 표 10에 나타내었다.

<표 10> 지방산 측정

지방산	대조군	실험군
미리스트산(Myristic acid) (C14 : 0)	0.72±0.04	0.73±0.02
팔미트산(Palmitic acid) (C16 : 0)	25.14±0.65 ^A	24.59±0.74 ^B
팔미톨레산(Palmitoleic acid) (C16 : 1)	4.19±0.15	4.20±0.06
스테아르산(Stearic acid) (C18 : 0)	11.53±0.13 ^A	10.07±0.17 ^B
올레산(Oleic acid) (C18 : 1)	34.43±0.94 ^A	36.23±0.64 ^B
리놀레산(Linoleic acid) (C18 : 2)	18.81±0.15	18.98±0.11
디호모-감마-리놀레산 (Dihomo-γ-linolenic acid) (C20 : 3)	1.69±0.03	1.72±0.04
아라치돈산(Arachidonic acid) (C20 : 4)	3.49±0.64	3.48±0.14
포화지방산(Saturated Fatty Acid)	37.39±0.82	35.39±0.91
불포화지방산(Unsaturated Fatty Acid)	62.61±2.01	64.61±0.90

A, B : 유의차(p<0.05)

상기 표 10에 나타나 있듯이, 실험군이 대조군에 비하여 포화지방산인 팔미트산(C16:0)이 감소(25.14±0.65→24.59±0.74)하고, 스테아르산(C18:0)이 감소(11.53±0.13→10.07±0.17)하며, 불포화지방산인 올레산(C18:1)이 증가(34.43±0.04→36.23±0.64)하고, 리놀레산(C18:2)이 증가(18.81±0.15→18.98±0.11)됨을 알 수 있었다.

따라서, 실험군은 대조군에 비하여 전반적으로, 포화지방산의 감소, 불포화지방산의 증가됨을 알 수 있었다.

즉, 본 발명에서 이용된 재료 중 홍화에는 불포화지방산을 증가시키고, 포화지방산을 감소시키며, Ca를 증가시키는 것으로 알려져 있다.

상기 결과는 본 발명에서 이용된 나머지 재료인 삼백초 향균성분인 디카노닐 아세트알데하이드(decanyl acetaldehyde), 메틸-n-노닐-케톤(methyl-n-nonyl-ketone), 미르세네(myrcene), 카프릭 알데하이드(capric aldehyde) 등이 함유되어 있어 향균작용 및 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다는 연구결과와 일치됨을 알 수 있었다.

<실험예 11> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 혈청 내 Pi 농도에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

2. 실험방법

상기의 대조군, 실험군 사료를 급여한 후, 1,2,3,4 주 혈청내 Pi의 농도변화에 대한 back screen 으로 실시한 NMR을 측정하였다.

3. 실험결과

상기 실험한 결과를 도 7에 나타낸 바와 같이, 대조군의 경우, 실험 2주 이후 점차 감소하는 반면, 실험군의 경우 양계용 첨가제를 급여하기 시작하는 2주에는 잠시 감소하였으나 다시 그 값이 증가하는 경향을 보였다.

<실험예 12> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 계육 색깔 및 pH에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

2. 실험방법

2-1. pH 측정

근막, 지방 등을 제거한 후 3 mm 플레이트로 분쇄한 시료 3 g을 증류수 27 ml와 함께 호모게나이저(homogenizer; MSE, U.S.A.)로 14,000 rpm에서 1 분간 균질하여 pH측정기(pH-meter; Orion, 602, Swiss)로 측정하였다.

2-2. color 측정

육색과 지방색은 색차기(chromo meter; Model CR-210, Minolta Co. LTD. Japan)를 사용하여 동일한 시료를 3 회 반복 측정하였으며, 이때 표준색판은 Y=93.5, x=0.3132, y=0.3198로 하였다.

3. 실험결과

상기 실험결과를 아래의 표 11에 나타내었다.

<표 11> 계육 색깔 및 pH 측정

	Color			pH
	Lightness(밝기)	Redness(적색)	Yellowness(노란색)	
대조군	52.79±4.56	2.94±1.67	9.92±2.03	5.69±0.10
실험군	50.95±1.21	3.48±0.38	9.69±0.58	5.67±0.09

상기 표 11에 나타나 있듯이, 계육 색깔을 비교하여 보면, 실험군이 대조군에 비하여 적색깔(red)은 증가하고, 노란색깔(yellow)은 감소하였다.

또한, 계육 pH를 비교하여 보면, 실험군이 대조군에 비하여 pH의 감소(5.69±0.10→5.67±0.09)를 나타내었다.

상기와 같은 결과는, 박과 유의 한약제 부산물 처리와 일치하는 결과를 보였으며, 낮은 명도는 높은 pH 와 상호관련성이 있다고 등의 결과(Bendall)와 일치함을 알 수 있었다.

<실험예 13> 본 발명인 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 계육 항생제 잔류대사 비교분석

실험군은 실시예 2의 양계용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 육계전기 사료를 급여하여 각각 250 수씩 재래닭을 배치하고 57 일간 사육하여 준비하였다.

상기 급여 57일째 일시적으로 테트라사이클린(tetracycline)계에 대하여 항생제 잔류대사를 비교 분석하였다.

그 결과 실험군, 대조군 모두 검출되지 않았다.

발명의 효과

본 발명에 의해, 캄필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*)를 억제시키는 양계용 사료첨가제의 제조방법이 제공된다.

또, 양계의 체중을 증가시키며, 육성율은 높이고, 폐사율은 감소시키는 양계용 사료첨가제가 제공된다.

또한, 본 발명의 양계용 사료첨가제가 첨가된 안전성이 높은 고품질의 양계용 사료가 제공된다.

도면의 간단한 설명

도 1 : 본 발명의 양계용 사료첨가제 제조공정도.

도 2 : 대조군(시판 육계전기사료 급여)에서의 캄필로박터 제주니 접종군의 장관 정착에 대한 주사 전자현미경 사진.

도 3 : 실험군(본 발명인 양계용 사료첨가제 급여)에서의 캄필로박터 제주니 접종군의 장관 정착에 대한 주사 전자현미경 사진.

도 4 : 본 발명의 양계용 사료첨가제가 실용재래닭의 단백질발현을 나타내는 전기영동 실험사진.

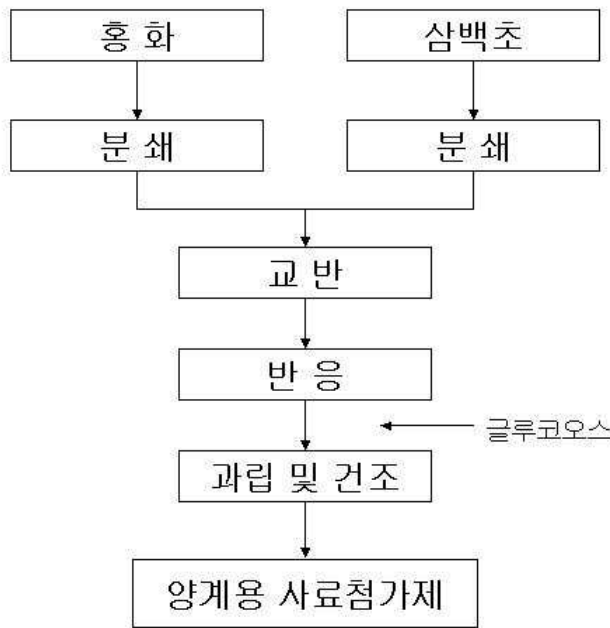
도 5 : 대조군(시판 육계전기사료 급여)의 아미노산 GC 사진.

도 6 : 실험군(본 발명인 양계용 사료첨가제 급여)의 아미노산 GC 사진.

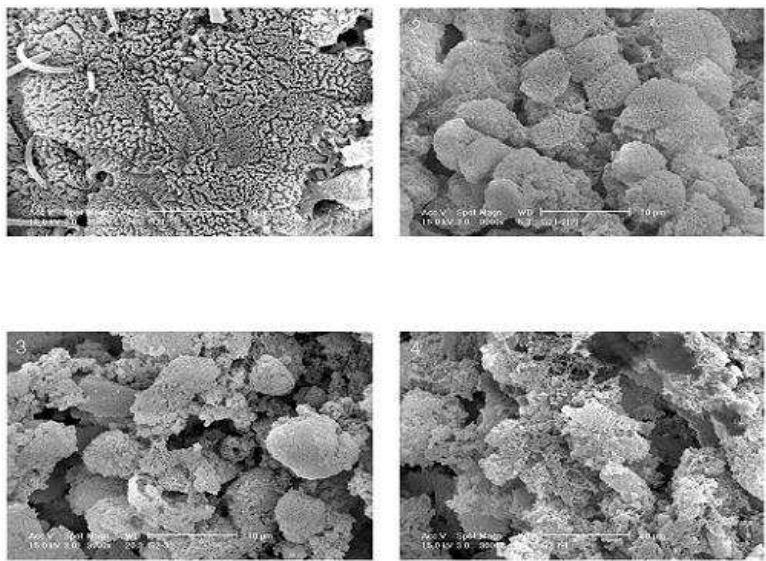
도 7 : 대조군과 실험군의 NMR 측정사진.

도면

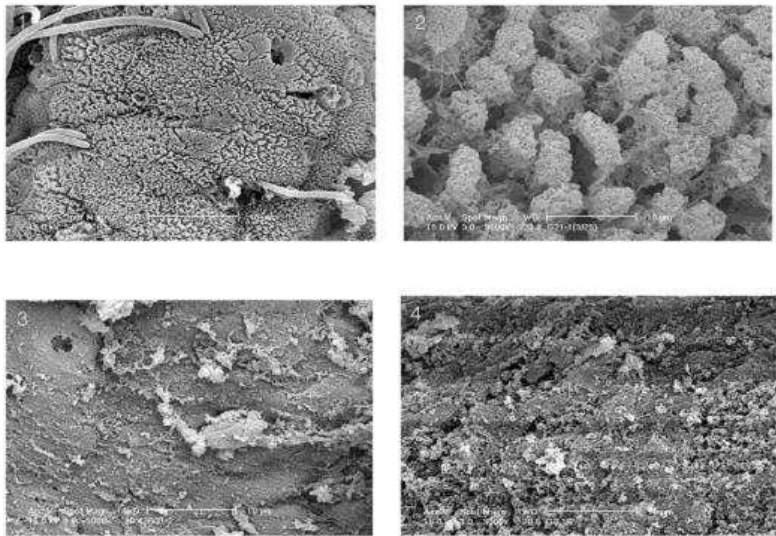
도면1



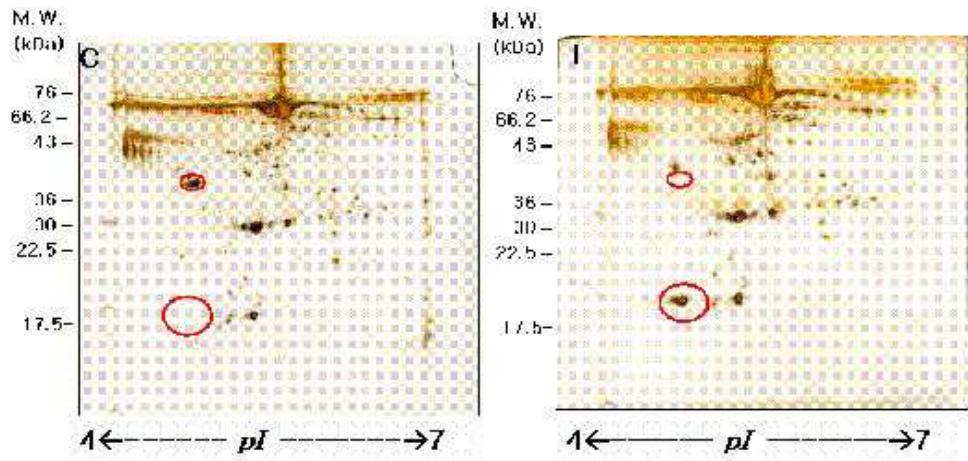
도면2



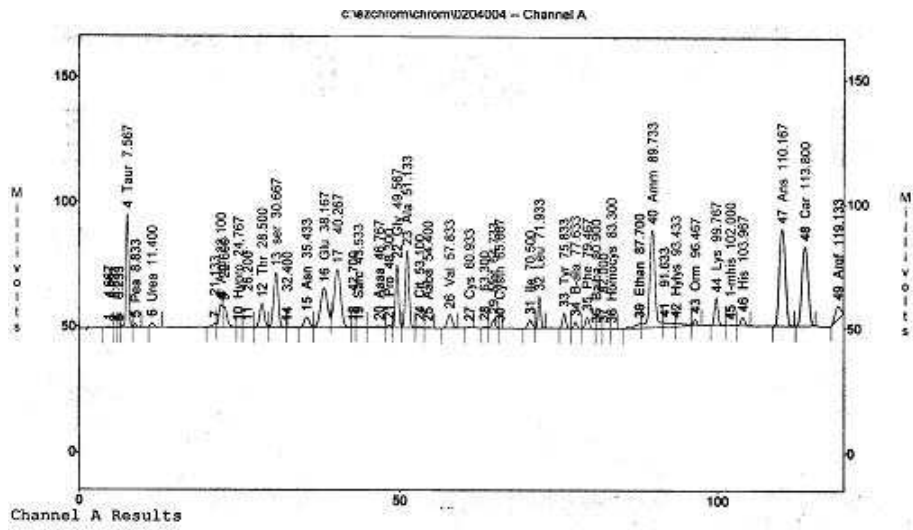
도면3



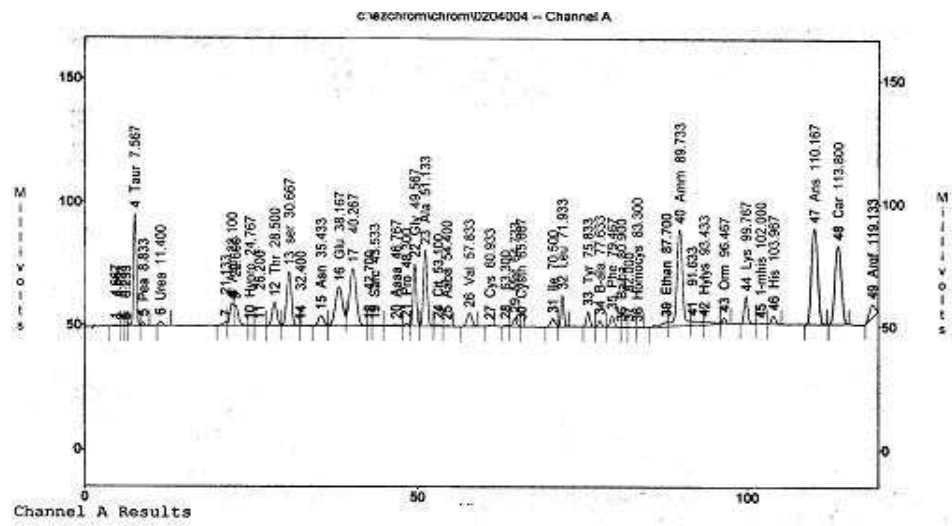
도면4



도면5



도면6



도면7

