



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0112281
(43) 공개일자 2009년10월28일

(51) Int. Cl.

A23K 1/14 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0038076

(22) 출원일자 2008년04월24일

심사청구일자 2008년04월24일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김곤섭

경남 진주시 평거동 들말대경아파트 101-1402

(74) 대리인

김형준

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조방법

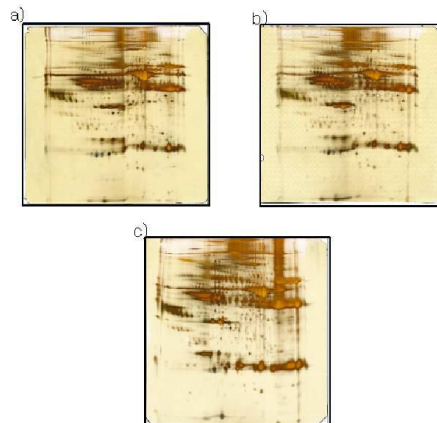
(57) 요약

본 발명은 천연약용식물을 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 혼합물을 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 과립화 한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 것으로 구성된다.

본 발명에 의해, 장독소생산대장균이 억제되고, 양돈의 체중을 증가시키는 양돈용 사료첨가제가 제공된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

양돈용 사료첨가제 제조방법에 있어서,

홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말로 제조하는 제1공정,

상기 제조한 홍화분말, 황금분말, 어성초분말, 삼백초분말을 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 제조하는 제2공정,

이 혼합물을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 °C에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 제3공정,

제2공정에서 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화 한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 제4공정으로 구성된,

천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

제2공정에 혼합물 제조시 홍화분말은 혼합물 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 황금분말은 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 어성초분말은 전체중량대비 10 ~ 30 중량 %, 삼백초분말은 혼합물 전체중량대비 10 ~ 50 중량 %로 혼합하여 제조하는 것이 특징인,

천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

제3공정의 반응물 제조시, 가수분해효소를 혼합물 중량대비 5 ~ 10 중량 %를 첨가하는 것이 특징인,

천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

제3공정의 반응물 제조시, 사용된 가수분해효소로는 글루코카이네이즈(glucokinase), 헥소카이네이즈(hexokinase), 에이디페이즈(adpase)중 선택된 1종인 것이 특징인,

천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

제4공정에서 고형물을 과립화 한 다음 건조시킬 때, 40 ~ 50 °C에서 2 ~ 4 시간 건조시키는 것이 특징인,

천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 제조방법.

청구항 6

양돈용 사료첨가제에 있어서,

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된,

천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제.

청구항 7

양돈용 사료에 있어서,

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

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

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

배경기술

- <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, 물로키아, 인동초, 주정박을 이용하여 제조한 사료첨가제에 관한 것이 공개되어 있다.
- <15> 상기와 같이, 항생제를 대체할 수 있는 천연물질을 이용한 사료첨가제에 대한 연구가 시행되고 있으나, 많은 종류의 재료 중 천연약용식물인 홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 이용한 사료첨가제에 대한 연구는 이루어진 바 없

으며, 양돈 사육시 가장 문제시 되는 장독소생산대장균에 대한 감소 효과에 대해서는 연구된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <16> 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서, 장독소생산대장균이 억제되고, 양돈의 체중을 증가시킬 수 있는 양돈용 사료첨가제를 제공하는데 목적이 있다.

과제 해결수단

- <17> 본 발명의 양돈용 사료첨가제의 제조방법은, 홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 각각 분쇄하여 미세분말로 제조하는 제1공정, 상기 제조한 홍화분말, 황금분말, 어성초분말, 삼백초분말을 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 제조하는 제2공정, 이 혼합물을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하는 제3공정, 제3공정에서 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화 한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 제4공정으로 구성된다.
- <18> 또한, 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 양돈용 사료 전체 중량대비 1 ~ 3중량%를 첨가하여 양돈용 사료를 제조하는 것으로 구성된다.

효 과

- <19> 본 발명에 의해, 장독소생산대장균이 억제되는 양돈용 사료첨가제가 제공된다.
- <20> 또한, 양돈의 체중은 증가되나, 사료요구율은 감소하는 양돈용 사료가 제공된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <21> 본 발명의 양돈용 사료첨가제의 주요 성분과 그 약리 효과를 살펴보면 다음과 같다.
- <22> 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.
- <23> 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.
- <24> 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.
- <25> 또한, 항산화효과, 항암효과, 골다공증 예방에 우수하다고 알려져 있다.
- <26> 황금(Skullcap)은 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로써, 학명은 *Scutellaria baicalensis* 이다.
- <27> 이는 산지의 풀밭에서 주로 성장하며, 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다.
- <28> 한방에서 이 뿌리를 해열·이뇨·지사·이담 및 소염제로 주로 이용하여 약용식물로 재배되고 있다.
- <29> 어성초는 삼백초과에 속하는 다년생 초본으로써, 동양 특산의 숙근초로 십약, 중약, 즙채 등으로 불리우기도 한다.
- <30> 학명은 *Houttuynia Cordata*라고 하며, 높이는 26 ~ 30cm, 줄기는 가늘고 잎은 심장모양으로 고구마 잎이나 메밀 잎과 유사하다.
- <31> 특이한 것은 비린내가 심하게 나기 때문에 중국에서는 어성초라 불려 왔다.
- <32> 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 있다.
- <33> 특히 한국, 일본, 중국 등지에서 식용, 약용, 미용 등의 용도로 사용 오래전부터 사용되어 왔으며 특히 부인병

에 좋은 것으로 알려져 왔다.

- <34> 또한, 전초에 0.0049%의 휘발성분 즉 정유성분이 함유되어 있다.
- <35> 이 정유 중에는 데카노일 아세트 알데히드 (Decanoilacetaldehyd), 메톤 (Methyl-nonylketone), 미르센 (Myrcene), 로우릭 알데히드 (Lauric ldehyde), 캐프릭드 (Capricaldehtde)등이 있다.
- <36> 어성초의 향균작용으로는 대장균, 티푸스균, 파라티푸스균, 적리균, 임균, 포도구균, 사상균, 백선균, 무좀균, 항산성 세균뿐만 아니라 비병원성 세균에도 역균 내지는 향균작용이 있다.
- <37> 이밖에 어성초에는 진통작용, 지혈작용, 장액 분비 억제작용, 조직 재생작용, 지해작용등이 있다.
- <38> 삼백초(Bluet)는 쌍떡잎식물 후추목 삼백초과의 여러해살이풀로써, 학명은 *Saururus chinensis* 이다.
- <39> 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.
- <40> 삼백초에는 향균성분인 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.
- <41> 뿐만 아니라, 이뇨작용, 혈압조절 작용 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.
- <42> 본 발명의 발명자들은 항생제를 대체할 수 있는 약재를 찾아내기 위해 여러 종류의 천연약용식물을 이용하여 수차례 연구한 결과, 카타민 성분이 함유된 홍화와 향균성분이 함유된 삼백초, 황금, 어성초를 이용하여 양돈용 사료첨가제를 제조할 시, 장독소생산대장균(*Enterotoxigenic E.coli*) 등에 대하여 높은 억제활성을 나타냄을 확인하였다.
- <43> 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.
- <44> 이때, 양돈용 사료첨가제의 첨가량이 1 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 3 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <45> 본 발명의 천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조방법에 대하여 자세히 설명하면 다음과 같다.
- <46> 1. 양돈용 사료첨가제의 제조방법
- <47> (1) 제1공정 : 재료를 미세분말형태로 제조
- <48> 홍화, 삼백초, 황금, 어성초를 준비한 후, 이들을 각각 분쇄기로 분쇄하여 미세분말형태로 제조한다.
- <49> (2) 제2공정 : 혼합물 제조
- <50> 상기 제조한 홍화분말, 황금분말, 어성초분말, 삼백초분말을 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 제조한다.
- <51> 이때, 홍화분말은 혼합물 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 황금분말은 전체중량대비 5 ~ 20 중량 %, 어성초분말은 전체중량대비 10 ~ 30 중량 %, 삼백초분말은 혼합물 전체중량대비 10 ~ 50 중량 %로 혼합하여 제조하는 것이 바람직하다.
- <52> 홍화분말과 황금분말의 첨가량이 5 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 20 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <53> 어성초분말의 첨가량이 각각 10 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 30 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <54> 삼백초분말의 첨가량도 10 중량 % 미만일 경우 그 효과가 미약하고, 첨가량이 50 중량 %를 초과할 경우는 경제성이 떨어진다.
- <55> (3) 제3공정 : 반응물 제조

- <56> 상기 혼합물을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소를 첨가한 다음, 70 ~ 80 ℃에서 10 ~ 14시간 동안 반응시켜 반응물을 제조한다.
- <57> 이때, 가수분해효소를 혼합물 중량대비 5 ~ 10 중량 %를 첨가하는 것이 바람직하다.
- <58> 가수분해효소로는 글루코카이네이즈(glucokinase), 헥소카이네이즈(hexokiase), 에이디페이즈(adpase) 중 선택된 1종을 사용한다.
- <59> (4) 제4공정 : 양돈용 사료첨가제 제조
- <60> 제3공정에서 제조한 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화 한 다음 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조한다.
- <61> 이때, 40 ~ 50 ℃에서 2 ~ 4 시간 건조시켜 양돈용 사료첨가제를 제조하는 것이 바람직하다.
- <62> 이하, 본 발명에 대하여 실시예와 실험예를 통하여 상세히 설명하나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- <63> <실시예 1> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조1
- <64> 홍화, 황금, 어성초, 삼백초를 시중에서 구입하여 준비하였다.
- <65> 상기 준비된 재료들을 분쇄기에 각각 넣고 분쇄하여 미세분말로 제조하였다.
- <66> 상기 홍화분말 200 g, 황금분말 200 g, 어성초분말 300 g, 삼백초 분말 300 g을 교반기에 넣고 혼합하여 혼합물을 만들었다.
- <67> 상기 혼합물 1 kg을 반응기에 넣은 뒤, 가수분해효소(글루코카이네이즈, glucokinase)를 혼합물 중량의 5 %를 첨가한 다음, 70 ℃에서 12시간 동안 반응시켜 반응물을 제조하였다.
- <68> 이 반응물에 포도당을 넣고 혼합하여 고형물을 만든 다음, 이 고형물을 과립화에 넣어, 가로 1 mm, 세로 1 mm, 높이 1 mm 크기로 과립화시켰다.
- <69> 과립을 건조실에 넣고 45 ℃ 에서 2 시간 건조시켜서, 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <70> <실시예 2> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 2
- <71> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 홍화분말 100 g, 황금분말 100 g, 어성초분말 300 g, 삼백초 분말 500 g을 교반기에 넣고 혼합하여 제조한 혼합물을 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <72> <실시예 3> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 3
- <73> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 홍화분말 150 g, 황금분말 150 g, 어성초분말 200 g, 삼백초 분말 500 g을 교반기에 넣고 혼합하여 제조한 혼합물을 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <74> <실시예 4> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 4
- <75> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 가수분해효소로 헥소카이네이즈(hexokiase)7를 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <76> <실시예 5> 본 발명의 양돈용 사료첨가제 제조 5
- <77> 실시예 1과 같은 방법으로 제조하되, 가수분해효소로 에이디페이즈(adpase)를 사용하여 본 발명인 양돈용 사료첨가제를 제조하였다.
- <78> <실시예 6> 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 첨가한 양돈용 사료의 제조1
- <79> 양돈 사육시, 통상적으로 쓰이고 있는 시판양돈 전기사료(Dodam Tec.)의 양돈용 사료를 구입하였다.
- <80> 구입한 양돈용 사료 99 kg에 실시예 1에서 제조된 본 발명의 양돈용 사료첨가제 1 kg을 첨가한 다음, 교반 혼합하여 양돈용 사료를 제조하였다.
- <81> <실시예 7> 본 발명의 양돈용 사료첨가제를 첨가한 양돈용 사료의 제조2
- <82> 양돈 사육시, 통상적으로 쓰이고 있는 시판양돈 전기사료(Dodam Tec.)의 양돈용 사료를 구입하였다.

- <83> 구입한 양돈용 사료 98 kg에 실시예 2에서 제조된 본 발명의 양돈용 사료첨가제 2 kg을 첨가한 다음, 교반 혼합하여 양돈용 사료를 제조하였다.
- <84> <실험예 1> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 혈중 항체가에 미치는 영향
- <85> 1. 실험동물 및 사료
- <86> 실험군은 실시예 6과 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하였다.
- <87> 각각 50 수씩 돼지(4주령)를 배치하고 돼지에 장독소생산대장균(*Enterotoxigenic E.coli*: ETEC: $10^7/\text{ml}$)을 접종하여 14 일간 사육하여 준비하였다.
- <88> 2. 실험방법
- <89> (1) 일반조직염색 및 분석
- <90> 사료첨가제가 장 점막에 미치는 영향을 광학현미경으로 조사하기 위하여 살처분한 돼지의 복강을 열고 소장 및 대장을 적출하여 4 % 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정하였다.
- <91> 후고정이 끝난 조직은 일반적인 조직포매 과정을 거쳐 4 ~ 5 μm 두께의 조직절편을 제작하여 슬라이드에 부착하였다.
- <92> H&E(Hematoxylin and Eosin)염색을 수행하여 각 장기의 조직학적인 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.
- <93> (2) 장관 조직의 SEM 실험방법
- <94> 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(Glutaldehyde)에 조직을 냉장상태(4℃)에서 48시간 동안 전고정 하였다.
- <95> 전고정한 조직을 0.1M PBS에 5분 동안 세척한 후 1% O_3 에 조직을 냉장상태에서 2시간 동안 보관하였다.
- <96> 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.
- <97> 이온 스퍼터링 코우터(Ion sputtering coater)로 처리하여 주사전자현미경(JLEOL사, JEM600)으로 가속전압 10 KV하에서 촬영하여 사진을 관찰하였다.
- <98> 3. 실험결과
- <99> 상기 실험결과, 아래의 표 1과 같이 나타났다.

표 1

	돼지 수	사육기간(DAYS)		
		1	7	14
대조군	1	<1:2	1:4	1:8
	2	<1:2	1:4	1:8
	3	<1:2	1:4	1:8
	4	<1:2	1:4	1:8
실험군 1	1	<1:2	1:2	1:3
	2	<1:2	1:2	1:4
	3	<1:2	1:2	1:4
	4	<1:2	1:4	1:4
실험군 2	1	<1:2	1:2	1:4
	2	<1:2	1:2	1:6
	3	<1:2	1:4	1:4
	4	<1:2	1:4	1:4

<101> 상기 표 1에 나타나 있듯이, 항체가의 추이를 조사한 바, 사육기간 7 일 및 14일에서는 본 발명인 실시예 6과 실시예 7의 사료를 먹은 실험군은 모두 1 : 4 배 수준이었으나, 대조군은 1 : 4에서 1 : 8 배로 상승함을 알 수 있었다.

<102> <실험예 2> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지의 사양 및 이화학적 변화에 미치는 영향

<103> 1. 실험재료

<104> 실험군은 실시예 6, 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하여 각각 50 수씩 돼지를 배치하고 6 개월동안 사육하여 준비하였다.

<105> 2. 실험방법

<106> 2-1. 조지방 측정

<107> 조지방 함량은 Folch 등(1957)의 방법을 이용하여 측정하였다.

<108> 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.

<109> 메스실린더 눈금을 읽고 여액의 25 %에 해당하는 0.88 % NaCl을 첨가하여 메스실린더 캡을 한 다음 격렬히 흔든 후 1 시간 방치하였다.

<110> 이때, Folch II(클로로포름 : 메탄올 : 물 = 3 : 47 : 48)용액 10 ml으로 메스실린더 벽면을 세척한 후 눈금을 읽는다(a).

<111> 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.

<112> 계산식은 다음과 같다.

<113>
$$\text{조지방함량}(\%) = \frac{(c-b) \times 10/a}{\text{Sample}(g)} \times 100$$

<114> 2-2. 조회분 측정

<115> 조회분 함량은 회분 정량용 도가니를 105 ℃ 건조기에서 건조한 후 데시게이터에서 완전히 건조시킨 후 시료 1 ~ 3 g을 건조된 도가니에 달아 넣고 시료가 든 도가니를 550 ℃ 회화로(Isotemp Muffle Furnace, Model No. 602025, Fisher Scientific USA)에서 2 시간 동안 연소하였다.

<116> 회화도가 200 ℃ 이하로 내려가면 시료를 태운 도가니를 꺼내어 데시게이터에 넣고 30 분간 방냉한 다음 무게를 측정하여 함량을 구하였다.

<117> 계산식은 다음과 같다.

<118>
$$\text{조회분}(\%) = \frac{\text{회화로에남은시료무게}}{\text{원래의시료무게}} \times 100$$

<119> 2-4. 통계처리

<120> 상기 실험에서 얻어진 성적은 SAS/PC (SAS, 1998)을 이용하여 처리구간을 분산분석 및 Duncan의 다중검정법으로 각 요인간의 유의성을 비교 분석하였다.

<121> 3. 실험결과

<122> 상기 실험결과를 아래의 표 2에 나타내었다.

표 2

<123>

	조지방 (%)	콜레스테롤 (mg/fatg)	조단백 (%)	조회분 (%)	사료요구율 (%)	체중 (kg)
대조군	6.43±0.65	61.21±0.46	20.80±0.75	3.95±1.10	2.98	106.71
실험군 1	3.93±0.46	55.43±0.53	20.94±0.19	3.90±1.26	2.85	108.20
실험군 2	3.94±0.36	56.43±0.59	20.97±0.13	3.92±1.13	2.84	108.18

<124>

상기 표 2에 나타나 있듯이, 본 발명인 실시예 6과 실시예 7의 사료를 먹은 실험군이 대조군에 비하여 조지방의 감소(6.43±0.65 → 3.93±0.46 : 3.94±0.36), 콜레스테롤감소(61.21±0.46 → 55.43±0.53 : 56.43±0.59), 사료요구율(2.98 → 2.85 : 2.84)의 감소, 체중(106.71 → 108.20 : 108.18)의 증가를 나타내었다.

<125>

즉, 본 발명인 천연약용식물을 이용한 양돈용 사료첨가제는 돼지 성장에 영향을 미침을 알 수 있었다.

<126>

<실험예 3> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지의 지방산에 미치는 영향

<127>

1. 실험재료

<128>

실험군은 실시예 6, 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하여 각각 50 수씩 돼지를 배치하고 6 개월동안 사육하여 준비하였다.

<129>

2. 지방산 분석실험

<130>

지방산 조성은 Folch법(1957)을 변형하여 수행하였다.

<131>

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.

<132>

유기용매층인 하층은 250 ml 원형 플라스크에 하층을 여과하되 이때 Na₂SO₄를 이용하여 남은 수분을 흡착 여과한 후 감압농축기(evaporator, England; 55℃, 25min)를 이용하여 지질을 추출하였다.

<133>

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

<134>

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

<135>

순수 분리된 0.5 ~ 1.0mg의 지질을 테스트 튜브에 넣은 후 BF₃ 2ml를 추가하여 뚜껑을 닫고 후 워터 보스(water both, 90℃)에 20 분간 흔들어(5 분마다 흔들어 줌)준 후 실온에 냉각하였다.

<136>

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 Na₂SO₄를 넣어 잔존하고 있는 수분을 완전히 제거하고, 상등액 2.5 ~ 3μl를 취하여 GC(HP 6890⁺ GC)에 주입하여 지방산을 분리 정량하였으며 이때 GC조건은 다음과 같다.

표 3

<137>

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℃ 마지막온도(Final temp); 280℃ 주입온도(Injector temp); 240℃
	검출온도(Detector temp); 250℃ 프로그래밍율(Programming rate); 2℃/min

검출기	플램 이온화 검출기(Flame Ionization Detector)
이동가스	He
전도율	50 ml/min
슬리트 비율 (Slit ratio)	100 : 1

3. 실험결과

상기 실험결과 아래의 표 4와 같이 나타났다.

표 4

지방산	대조군	실험군 1	실험군 2
미리스트산(Myristic acid) (C14 : 0)	14.1±0.01	13.90±0.01	13.81±0.02
팔미트산(Palmitic acid) (C16 : 0)	26.03±0.70	21.02±0.07	21.03±0.06
팔미톨레산(Palmitoleic acid) (C16 : 1)	3.26±0.16	4.30±0.06	4.29±0.05
스테아르산(Stearic acid) (C18 : 0)	15.40±0.10	10.07±0.17	11.06±0.07
올레산(Oleic acid) (C18 : 1)	42.34±0.01	45.30±0.75	45.29±0.68
리놀레산(Linoleic acid) (C18 : 2)	15.80±0.14	17.70±0.08	17.68±0.07
디호모-감마-리놀레산 (Dihomo- γ -linolenic acid) (C20 : 3)	0.84±0.02	1.69±0.01	1.68±0.01
아라치돈산(Arachidonic acid) (C20 : 4)	1.50±0.04	3.21±0.05	3.19±0.03
단일불포화지방산(Monounsaturated Fatty Acid)	45.60±0.17	49.60±0.81	49.58±0.78
폴리불포화지방산(Polyunsaturated Fatty Acid)	18.14±0.20	21.91±0.14	22.55±0.11

상기 표 4에 나타나 있듯이, 본 발명인 실시예 6과 실시예 7의 사료를 먹은 실험군이 대조군에 비하여 팔미트산(C16:0)의 감소, 팔미톨레산(C16:1)의 증가, 스테아르산(C18:0) 감소, 올레산(C18:1) 증가, 리놀레산(C18:2) 증가, 디호모-감마-리놀레산(C20:3) 증가, 아라치돈산(C20:4)의 증가로 대조군에 비하여 사료첨가제를 급여한 군(1%, 2%)이 불포화지방산의 증가를 나타내었다

<실험예 4> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지의 아미노산 조성에 미치는 영향

1. 실험재료

실험군은 실시예 6, 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하여 각각 50 수씩 돼지를 배치하고 6 개월동안 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 1mm 크기로 잘라내었다.

2-2. 탈염색과정

- <150> 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.
- <151> 탈색(destaining)한 겔은 순수증류수(pure water)를 이용하여 5 분 동안 3 ~ 4 회 세척해주었다.
- <152> 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.
- <153> 2-3. 겔환원과 알킬레이션(In-gel Reduction and Alkylation)
- <154> 건조된 겔에 10 mM DTT가 함유된 100 mM NH_4HCO_3 를 넣어 30 분간 반응시킨 후, 다시 55 mM 아이도아세타마이드(iodoacetamide)가 함유된 100 mM NH_4HCO_3 를 넣어 암실에서 30 분간 다시 반응시켰다.
- <155> 100mM NH_4HCO_3 를 이용하여 한번 더 세척한 후 아세토니트릴(acetonitrile)을 이용하여 겔을 탈수시켰다.
- <156> 2-4. 겔 소화(In-gel Digestion)
- <157> 건조된 겔에 50 mM NH_4HCO_3 와 5 mM CaCl_2 의 소화 버퍼(digestion buffer)를 넣어 녹인 12.5 ng/ μl 의 트립신(trypsin)을 15 μl 를 넣어 45 분동안 얼음(ice)에서 정치시키고 흡수되지 않고, 남은 용액은 모두 제거한 후 20 μl 의 트립신(trypsin)이 포함되지 않은 소화 버퍼(digestion buffer)를 넣어 37 °C에서 16 시간정도 소화(digest)시켰다.
- <158> 2-5. 펩타이드 추출(Extraction of Peptides)
- <159> 15 μl 의 순수증류수(pure water)를 넣어 30 분간 볼텍스(vortex) 시킨 후, 20 μl 의 아세토니트릴(acetonitrile)을 넣어 다시 30 분간 볼텍스(vortex) 시킨 후 상층액만 수거, 진공 원심분리기(vacuum centrifuge)를 이용하여 건조시켰다.
- <160> 2-6. 목표샘플준비(On Target sample preparation, Dried-Droplet Method)
- <161> 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 칼리브랜트(calibrant; Bradykinin, Angiotensin)를 섞어 건조된 샘플과 혼합한 후, MALDI 타겟(target)에 2 μl 타겟팅(targetting)한 후 건조 시켜 MALDI-TOF를 시행하였다.
- <162> 2-7. 데이터 분석(Data analysis)
- <163> 얻어진 펩티드(peptide)의 양(mass)은 단백질 분석기(Protein Prospector)에 있는 MS-Fit 프로그램을 이용하여 NCBInr 데이터베이스에 접속하여 단백질을 동정하였다.
- <164> 이때, 양의 오차(mass tolerance)는 50 ppm 이내로 하였고 최소 4 개 이상의 펩티드가 매칭(matching) 되어진 단백질만을 선택하였다.
- <165> 3. 실험결과
- <166> 상기 실험한 결과, 아래의 표 5에 나타내었다.

표 5

<167> 단위 : mg/100g

항목	대조군	실험군 1	실험군 2
Asp	808.7 $\pm$ 27.05	1007.2 $\pm$ 19.16	1067.2 $\pm$ 19.10
Ser	685.7 $\pm$ 17.20	680.8 $\pm$ 19.28	770.8 $\pm$ 16.20
Glu	1648.1 $\pm$ 86.54	1782.3 $\pm$ 40.27	1879.3 $\pm$ 30.20
Gly	334.3 $\pm$ 14.19	912.3 $\pm$ 53.72*	1012.0 $\pm$ 13.23*
His	135.7 $\pm$ 0.54	354.2 $\pm$ 26.54*	294.2 $\pm$ 10.54*
Thr	318.4 $\pm$ 5.67	433.2 $\pm$ 19.20	453.1 $\pm$ 14.12

Arg	778.3±41.30	714.6±49.10	574.6±39.14
Ala	468.2±38.29	480.7±11.16 [*]	489.7±12.14 [*]
Pro	735.2±33.59	823.2±56.22 ^{**}	853.2±59.20 ^{**}
Tyr	314.2±6.30	232.4±14.21	232.4±24.11
Val	714.3±10.54 ^{**}	837.2±38.35 ^{**}	937.2±22.20 ^{**}
Met	513.2±3.39 [*]	518.2±13.52 [*]	514.2±26.12 [*]
Lys	842.2±65.32	932.6±24.32 ^{**}	910.6±10.11 ^{**}
Isoleu	477.1±19.84 [*]	732.3±13.74 [*]	719.1±12.00 [*]
Leu	1012.3±3.68 [*]	1225.1±21.42 [*]	1175.1±13.18 [*]
Phe	549.4±10.42	414.1±38.13	411.8±22.67

* : 유의차(p<0.05) ** : 유의차(p<0.01)

상기 표 5에 나타나 있듯이, 본 발명인 실시예 6과 실시예 7의 사료를 먹은 실험군이 대조군에 비하여 아스파르트산(aspartic 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 5> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지의 체내단백질 발현에 미치는 영향

1. 실험재료

1. 실험동물 및 사료

실험군은 실시예 6과 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하였다.

각각 50 수컷 돼지(4주령)를 배치하고 돼지에 장독소생산대장균(*Enterotoxigenic E.coli*: ETEC: 10^7 /ml)을 접종하여 6 주간 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 덮

개유출용액(cover fluid oil)을 가하였다.

- <186> IEF 조건은 전류가 IPG 영동종이(strip) 당 50 μ A가 넘지 않도록 하였으며, 20 $^{\circ}$ C의 온도조건에서 12 시간 수분 보충(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.
- <187> IEF가 끝난 IPG strip은 2차원 SDS-PAGE를 수행하였다.
- <188> 2-4. 이차원적 전기영동(Second-dimension SDS-PAGE)
- <189> 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 저융점 아가로스 겔 (low melting agarose gel)을 분주하였다.
- <190> 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.
- <191> 2-5. 도은 염색
- <192> 상기 이차원 전기영동을 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위해 도은염색을 하였다.
- <193> gel을 고정용액(50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 한 시간 이상 처리한 후, 50 % EtOH으로 20 분간 3 회 반복 세척한 다음 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 1 분간 전처리 하였다.
- <194> 겔을 3차 증류수로 20 초간 3 회 세척한 다음 AgNO_3 와 37% HCOH로 30 분간 처리하여 Na_2CO_3 와 37% HCOH로 발색시키고, 점(spot)을 확인한 후 점용액(stop solution; 50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.
- <195> 2-6. 유도성 발색(Enhanced chemiluminescence; ECL)을 이용한 면역투과(Immunoblotting)
- <196> 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.
- <197> 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.
- <198> 2-7. 통계처리
- <199> 상기 도은 염색한 겔과 면역투과(immunoblotting) 결과는 스캐닝(scanning) 한 후 전용이미지 분석프로그램인 프로텍스2차원 프로그램(Phoretix 2D program; Ver. 5.01)을 이용하여 재료를 분석하였다.
- <200> 3. 실험결과
- <201> 사료 첨가제가 돼지 체내 발현 pattern ETEC를 투여한 후 사료첨가제의 영향에 대한 단백질 발현 양상을 조사한 결과, 도 1,2,3에 나타나 있듯이, 사료첨가제를 먹인 군과 대조군의 단백질 발현에 차이가 나타났다.
- <202> 즉, 사료첨가제 급여군에서 면역글로블린(Ig lmbda C region)이 발현되었다.
- <203> <실험예 7> 본 발명인 양돈용 사료첨가제가 돼지에 미치는 안정성 평가 실험
- <204> 1. 실험재료
- <205> 실험군은 실시예 6, 7의 양돈용 사료첨가제를 첨가하여 제조한 사료를 급여하고, 대조군은 양돈전기사료를 급여하여 각각 50 수씩 돼지를 배치하고 180일 동안 사육하여 준비하였다.
- <206> 2. 실험방법
- <207> 상기 대조군과 실험군의 돼지바깥귀정맥에서 각각 혈액 1cc를 채취하여 4 $^{\circ}$ C 에서 3,000 rpm 으로 15 분간 원심

분리한 후, 혈청을 생화학 분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였다.

3. 실험결과

아래의 표 6에 그 결과를 나타내었다.

표 6

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

상기 표 6에 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.

도면의 간단한 설명

도 1 : ETEC 투여 1일째 돼지 체내단백질 발현정도를 나타낸 전기영동 실험사진

a) 실험군 1(실시에 6의 사료가 급여된 돼지)

b) 실험군 1(실시에 7의 사료가 급여된 돼지)

c) 대조군

도 2 : ETEC 투여 6주째 돼지 체내단백질 발현정도를 나타낸 전기영동 실험사진

a) 실험군 1(실시에 6의 사료가 급여된 돼지)

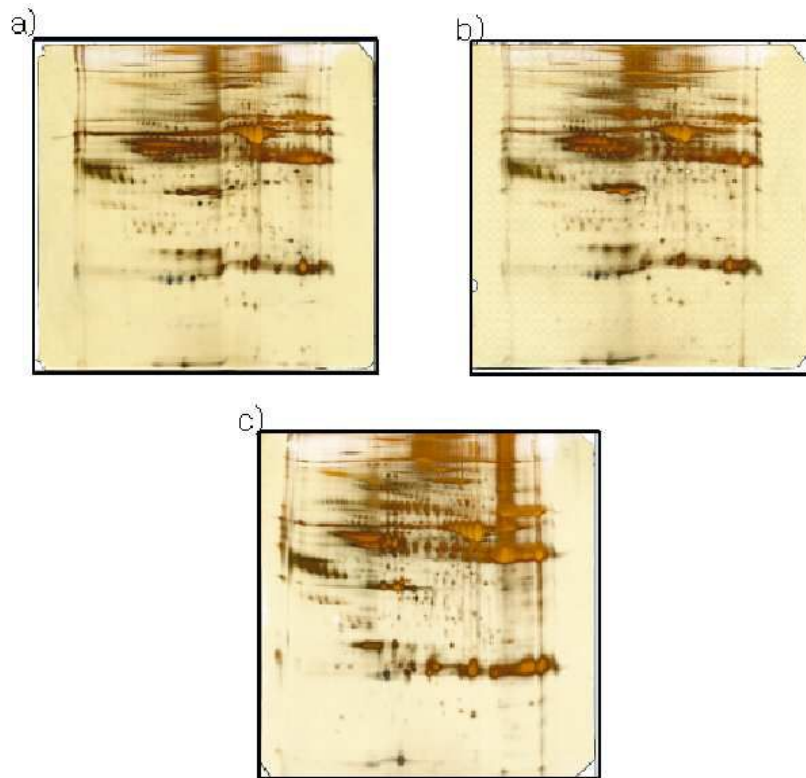
b) 실험군 1(실시에 7의 사료가 급여된 돼지)

c) 대조군

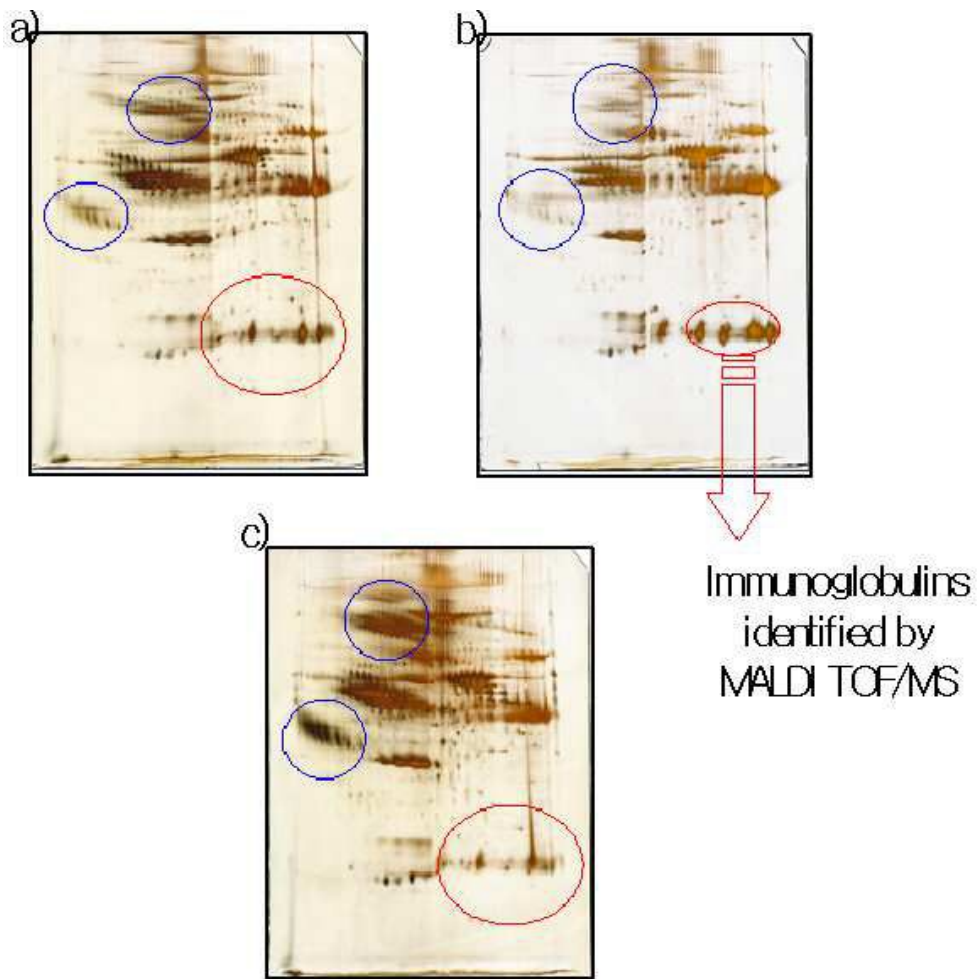
도 3은 : 실험군 1의 아미노산 GC 사진.

도면

도면1



도면2



도면3

