

최            중  
연   구   보   고   서

항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등) 과 Carthamin을  
이용한 실용재래닭 생산기술 개발

Production of Korean Native Chicken using  
Methyl-*n*-nonyl-ketone and Carthamin from  
Oriental Herbal Medicine

연구기관

경상대학교 수의과대학

농            립            부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 carthamin을 이용한 실용재래닭 생산 기술 개발 ”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 8월 15일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 김 곤 섭

세부연구책임자 : 김 용 환

세부연구책임자 : 김 곤 섭

연 구 원 : 하 정 기

한 대 용

김 상 희

김 은 희

## 요 약 문

### I. 제 목

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 carthamin을 이용한 실용재래닭 생산기술 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에서 가축용 항생제는 연간 1200여 톤이 판매되고 있다. 가축의 종류로는 돼지, 닭, 수산물, 소의 순서로 항생제 사용량이 많다. 이로 인하여, 소, 돼지, 닭의 각종 세균의 항생제 내성으로 인하여, 항생제가 세균을 죽이는 약효를 거의 상실한 것으로 나타났다. 특히, 닭에서 분리된 포도상 구균의 경우 테트라사이클린에 대한 내성율이 96%에 도달하였다. 가축용 항생제 남용은 사람에게도 나쁜 영향을 미친다. 고기, 우유, 계란 등 축산물에 잔류된 항생제가 음식과 함께 인체에 들어와 항생제 내성균이 생기게 때문이다. 항생제는 동물의 질병 치료를 위해 필수적이거나 올바르게 사용하더라도 내성을 유도한다. 비록 이런 사용이 사람에게 위험할 수도 있으나 사람에서 발생한 대부분의 위험한 내성 세균은 동물에서 유래되지 않았다. 의료 조사에 따르면, 사람에서 문제가 되는 내성 세균 중 동물에서 비롯된 경우는 4% 미만인 것으로 나타났으며 이들은 대부분 사람과 동물 모두에서 문제를 일으키는 인수공통 세균에서 의한 것이었다. 유럽의 소, 돼지, 닭에서 분리된 *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*의 내성 정도를 비교한 최근의 연구에 따르면 나라별, 숙주별, 균종별로 항생제 내성 패턴은 다른 양상을 보였다. 이러한 차이는 항생제의 적용이나 질병의 통제가 각각의 특성에 따라 이루어져야 한다는 것을 보이는 동시에 동물에서의 항생제 내성 발생이나 분포가 간단하지 않으며 아직도 분명하게 밝혀지지 않았다는 것을 의미한다. 항생제는 폐렴이나 장염 같은 질병을 치료하기 위해 동물 개체별로 사용되기도 하고 outbreak의 치료를 위해 농장 전체에 적용되기도 한다. 항생제는 동물의 복지를 위해, 또한 인수공통질병을 포함한 전염병의 통제를 위해 필요하며, 경제적인 측면에서도 매우 중요하다.

재래닭은 기호성은 좋으나 발육이 늦어 사육비가 많이 들고 경제성이 낮은 것이 취약점이다. 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 재래

닭 육용화 생산체계를 마련하고 대외수출을 통하여 국가 경쟁력을 높일 필요성이 대두되고 있다.

근년 양계 사육형태가 대형화됨에 따라 대량 밀집사육으로 인한 *Camphylobacter jejuni* 감염증이 증가되고, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및 오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다. 또한 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약중지로 재감염이 문제시 되며, 무분별한 오남용으로 인한 내성균의 출현증가 뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약제 잔류로 사람의 건강을 위협하고 있다.

*Camphylobacter jejuni*의 감염율은 4주령의 닭에서는 40%, 7주령의 닭에서는 90%이상으로 보고되어 있으며, 사람에게서는 위장염, 복막염 등의 감염증상이 있다. 경제적 손실로서는 미국에서는 약 0.6~1.06 billion \$로 집계되어있다.

*Camphylobacter jejuni*의 닭에서의 감소대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast, mannose 및 formic acid 또는 proponic acid등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며, 또 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로블린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나 역시 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.

*Camphylobacter jejuni*은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등과 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 준다. *Camphylobacter jejuni*은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다.

따라서 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Camphylobacter Spp.*에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구는 시급한 실정이다.

한약제의 유효한 성분은 생체 내에서, 상승효과를 나타내어 생체내의 면역 시스템 중 보체계의 활성화, 여러 가지 cytokine의 활성화와 일상의 식품 성분과의 상승작용으로 신체 항상성을 유지하도록 도와주는 역할을 해 왔다. 이러한 한약제 내의 유효성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 대체 식품 첨가물이나 의약품의 개발이 가능하다.

홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기 부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원작물이기도 하다. 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 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 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고 되었다. 뿐만 아니라 홍화에 포함된 성분 등은 포화성 콜레스테롤을 저하시키며 질병에 대한 이완율을 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며 불포화지방산함량을 높인다는 보고도 있다. 또 맛의 중요인자인 아미노산을 증가

시키며 계육의 보수력 및 연도 등을 향상시킨다고 하였다.

삼백초는 항균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonyl-ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde 등이 함유되어있어 항균작용 및 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 하였다. 뿐만 아니라 이뇨작용, 혈압조절작용 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.

따라서 이 연구의 목표는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 1) *Camphylobacter jejuni* 대한 항균효과 2) 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과 등을 통하여 얻은 성적과 더불어 항생기능과 면역활성을 가진 사료첨가제 생산 및 청정재래닭을 생산하여 농가의 소득 증대 및 안전성 축산물 생산에 이바지하려한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발사업 목표

본연구의 목표는 삼백초의 향균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성 장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 1) *Camphylobacter jejuni* 및 유해미생물에 대한 항균 효과 2) 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과등을 통하여 얻은 성적과 더불어 항생기능과 면역활성을 가진 사료첨가제 생산 및 청정재래닭을 생산하여 농가의 소득증대 및 안전성 축산물 생산에 이바지하려한다.

#### 2. 연구내용 및 범위

##### 가. *Camphylobacter jejuni* 및 유해미생물에 대한 항균효과

- 1) 첨가 농도별 항균성 시험
- 2) 닭의 분변에서 *Campylobacter Spp.*의 분리
- 3) 분리균의 생물형 및 혈청 형별
- 4) 시험 계군의 분변 중 *C. jejuni*의 분리
- 5) 시험 감염 계군의 직장 내용물의 양성 계수 측정
- 6) 전자 현미경에 의한 장관 정착 확인
- 7) 시험대조 계군의 분변 중 *C. jejuni* 분리빈도 조사
- 8) 사료첨가제 투여계군의 분변 중 *C. jejuni* 분리 빈도조사
- 9) 시험대조 계군의 분변, 간 및 비장의 *C. jejuni* 양성계수 측정
- 10) 사료첨가제 투여 계군의 분변, 간 및 비장의 *C. jejuni* 양성계수 측정
- 11) 사료첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견 관찰
- 12) *Campylobacter* 분리주의 항생물질에 대한 감수성 시험

##### 나. 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과

- 1) 지방 조성
- 2) cholesterol 변화
- 3) 단백질 변화
- 4) 아미노산 조성
- 5) 포화 및 불포화지방산의 변화
- 6) 일평균 증체량
- 7) 폐사율
- 8) 육성율
- 9) Proteomics에 의한 사료첨가제의 단백질발현조사

- 10) 사료요구율
- 11) 성장기간동안의 경시별 근육 조직내 항생제잔류 비교분석
- 12) 안전성 검사
- 13) 수분, 회분의 변화

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

##### 1. 연구개발 결과

본 연구는 육계농가의 극심한 피해와 식중독 원인균인 *Camphylobacter jejuni*를 예방하고 항생제등 항균물질의 과다사용에 따른 안전 축산물의 생산의 장애요인을 차단하여 소비자에게 안전한 축산물을 공급하고 고부가가치와 안전성있는 재래닭을 생산하기 위하여 시도되었다.

##### 가. *Camphylobacter jejuni* 및 유해미생물에 대한 항균효과

삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 1%되게 균질하게 섞은 후 재래닭 성장기간동안 57일간 급여하여 *Camphylobacter jejuni*에 대한 항균효과를 연구하였다. 본 연구에서는 각종 병원성 세균에 대한항균성분(methyl-n-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제(MCF)의 발육 최소 억제 농도(MIC)를 조사한 결과는 *C. jejuni*는 1%에서 항균효과를 나타내었고, *C. coli*, *S. enteritidis*는 2% 농도에서는 항균효과를 나타내었다. *S. pullorum*, *E. coli* O157:H7, *L. acidophilus* 및 *Sta. aureus*는 2% 농도에서도 항균효과가 나타나지 않았다. 닭의 분변재료에서 thermophilic *Campylobacter Spp.*의 분리율은 125 예에서 39주가 분리되어 31.2%였다. 균종별 분리율은 *C. jejuni* 26 예로 20.8%, *C. coli* 12 예로 9.6%, *C. laridis*는 1 예로 0.8% 순이었다 균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 26주는 biotype I이 12주(46.1%)로 가장 많았고, II는 9주(34.6%), IV는 5주(19.2%) 순이었다. *C. coli*는 분리균주 중에서 biotype I이 12주(58.3%), II는 5주로서 41.6%였다. *C. laridis*는 biotype I이 1주 분리되었다 분리균의 serotype은 Lior 등의 혈청학적 분류 방법에 따라 36종의 표준 항혈청으로 조사하였다. 분리한 *C. jejuni* 20주에 대하여 serotyping을 실시한 결과 17주가 형별 가능하여 10 종류의 혈청형으로 분류하였다. 10 종류의 혈청형 간에 형별 분포는 뚜렷한 차이는 없었으나 이들 중 혈청형 36, 17, 4, 5, 9, 26 형이 많았다 항균성분(methyl-n-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제(OHMFA) 급여에 의한 *C. jejuni*의 장관 정착 억제

효과를 조사하기 위하여  $2.3 \times 10^8$  cell/ml의 균액 0.5ml을 접종하고 접종전 1일 접종 후 7, 14 및 21일에 직장 분변을 취하여 *C. jejuni*의 분리율을 조사한 결과 접종전 1일경에는 대조군 및 1% OHMFA 첨가 사료 급여군(시험군) 모두 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 대조군에서는 1주일 경과 후부터 3주까지 5마리의 실험군 중 4마리에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 그러나 1% 사료첨가제 급여군에서는 1주 후 5마리의 실험군 중에서 3마리, 2주일 후 2마리, 3주 후에는 1마리에서만 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다.

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 *C. jejuni*의 실용재래닭의 장관 정착에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 2주령의 재래닭에 *C. jejuni*를  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml 수준으로 경구 접종한 후 대조군에는 일반 사료를, 실험군에는 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 소장(공장)에서의 정착 상태를 주사 전자 현미경으로 관찰 한 바, 대조군에서는 감염 후 7, 14, 및 21일에 균이 소장 점막 표면 부위에 다수 부착하고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다. 그러나 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 군에서는 시간이 지남에 따라 *C. jejuni*가 거의 관찰되지 않았다.

농장실험에서는 입식 후 1주부터 2주 간격으로 5회에 걸쳐 사료첨가제 첨가군과 대조군 각 20두의 직장 분변, 간 및 비장재료로부터 시간의 결과에 따른 *Campylobacter Spp.*의 분리빈도를 조사한 결과 직장 분변재료에서 대조군은 입식후 20두 중 5 (25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며 그 후 분리율이 점차 증가하였으며 7주 후에서 20 두중 16(80%)에서 균이 분리 되었다.

직장 분변 재료에서 사료첨가 균의 경우 입식 일주일 후 20두중 5 두(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으나 그 후 분리율이 다소 감소하여 7주 후에는 20두 중 3(15%)에서 분리되어 사료첨가제 첨가 사료의 thermophilic *Campylobacter*의 방제효과가 입증되었다.

간 및 비장 재료에서 대조군에서는 80두 중 각 11(13.7%)두 및 8(10%)두에서 균이 분리되었으나 사료첨가제 군에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)두에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 종대되어 있었다.

Thermophilic *Campylobacter*의 분리율은 160두의 broiler chicken의 직장분변에서 55주(34.4%)의 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며, 이들은 *C. jejuni*가 43주(26.9%)로 가장 높은 분포를 보였으며, *C. coli* 12주(7.5%) 및 *C. laridis* 1주 순으로 분류되었다. 균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 43주는 biotype I이 26주(60.4%)로 가장 높았으며, II는13주(30.2%), IV 3주 (6.8%) 및 III 2주 (4.6%) 순이었다. *C. coli* 1주는 biotype I이 9주로 대부분이었으며 II도 2주 (16.6%) 분리되었다. *C. laridis*는 1주가 분리되었으며 biotype I으로 분류 되었다. 분리균의 serotype은 Lior등의 혈청학적 분류방법에 따라 36종의 표준 항혈청으로 조사 하였다. *C. jejuni*

43주중 41주가 serogrouping이 가능하여 11종류의 serotype으로 분류하였다. Serotype 별 형별분포는 뚜렷한 차이가 없었으나 이들 중 type36(18.6%)과 17(13.9%)이 비교적 많았다. *C. coli*의 serotype은 12주중 10주가 serogrouping 가능하여 5종류의 serotype으로 분류되었으며 type31(33.3%)과 20(25%)이 많은 편이었다. 분리한 *Campylobacter* 55주에 대하여 항생물질에 대한 감수성시험을 실시한 결과 *C. jejuni*(43주) 및 *C. coli*(12주)는 NA, Am, Gm, Cl 및 Cp에 대하여 90%이상의 균주가 높은 감수성을 보였으며, Km, Em, Ap 및 Tc에 대하여 50%이상의 균주가 감수성이었으나, Cep에 대해서는 분리균 모두 감수성 균이 없었다. *C. jejuni* 및 *C. coli*는 항생물질에 대한 감수성 차이가 뚜렷하지 않았다.

나. 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과

삼백초의 항균성분인 methyl-*n*-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 1%되게 균질하게 섞은 후 재래닭 성장기간동안 57일간 급여하여 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과를 시험한 결과, 평균체중은 대조군이 1.62kg, 실험군이 1.67kg으로 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 1% 포함된 사료첨가제(이하, 실험군)를 먹인 군이 대조군에 비하여 0.05kg 이 증가 하였다.

육성율은 대조군이 92%, 실험군이 99%로 대조군에 비해 실험군이 7% 증가하였고, 폐사율은 대조군이 9%, 실험군이 1%이었다. 사료 요구율은 대조군은 1.75, 실험군은 1.62으로 실험군이 대조군에 비해 0.13 감소하는 경향을 나타내었다. 지방은 대조군이 11.37±0.59, 사료첨가제를 먹인 군(이하, 실험군)이 11.37±0.59, cholesterol은 대조군이 63.7±2.18 mg%, 실험군이 63.7±2.18 mg%, 조단백은 대조군은 18.28±1.54, 실험군은 20.24± 1.14, Ca은 대조군은 13.5 ±0.12 mg/dl, 실험군은 16.5 ±0.19 mg/dl, P은 대조군은 7.2-8.5 mg/dl, 실험군은 8.1-9.3 mg/dl군으로 실험군이 대조군에 비하여, 지방, cholesterol의 감소, 조단백, Ca 및 P의 증가를 나타내었다.

재래닭의 계육 내 아미노산조성에 미치는 영향을 조사한 바, 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 asparatic acid, glutamate, glycine, histidine, argine, proline, valine, lysine, isoleucine, leucine이 증가되었다.

지방산에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 포화지방산인 palmitic acid (C16:0)의 감소(25.14±0.65→ 24.59±0.74), stearic acid(C18:0)의 감소(11.53±0.13→10.07±0.17) 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)증가 (34.43±0.04→ 36.23±0.64), linoleic acid (C18:2)증가(18.81±0.15→18.98±0.11)하였고, 실험군이 대조군에 비하여 전반적으로, 포화지방산의 감소, 불포화지방산의 증가를 나타내었다.

1, 2, 3, 4 주 혈청 내 Pi의 농도변화에 대한 back screen으로 실시한 NMR 결과 역시 유의적인 차이를 발견할 수 없었으나 대조군의 경우, 실험 2주 이후 점차 감소하는 반면, 실험군의 경우 첨가제를 급여하기 시작하는 2주에는 잠시 감소하였으나 다시 그 값이 증가하는 경향을 보였다. 계육색깔에 미치는 영향을 조사하기 위하여 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 계육색깔에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 적색깔(redness)의 증가, 노란색깔(yellowness)의 감소가 있었다. 계육 pH에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 pH의 감소 ( $5.69 \pm 0.10$  →  $5.67 \pm 0.09$ )를 나타내었다. 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 일차적으로 tetracycline계에 대한 계육 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군(실험군)과 대조군에서 모두 검출되지 않았다.

## 2. 활용에 대한 건의

삼백초의 항균성분인 methyl-*n*-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용한 한방사료첨가제 개발연구는 항생제등 동물약품의 오·남용에 따른 식육 중 잔류문제, 내성균 출현문제 등 축산물의 안전성과 최근 발효된 CODEX의 유기축산지침의 한부분에도 부흥 할 수 있으며 사료첨가제의 사용으로 인하여 농가에는 소득증대, 소비자에게는 안정성 재래닭 생산에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

## SUMMARY

### I. Title

Production of Korean Native Chicken using Methyl-*n*-nonyl-ketone and Carthamin from Oriental Herbal Medicine

### II. Purpose and Significance of Research

A study was conducted to investigate the effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing oriental herbal medicine such as *Saururi herba Seu rhizoma* and *Carthami flos* on growth performance, physico-chemical properties, the preventive effect of feed supplemented with 1.0% oriental herbal medicine feed additive (OHMFA) on the colonization of thermophilic *Capmpylobacter Spp.* and to isolate the agent from Koran native chickens. the isolated *Capmpylobacter Spp* were biotyped, serotyped and the susceptibility of isolates to antimicrobial agent prevention of *Campylobacter jejuni* and some organism in Korean native chickens.

*Campylobacter jejuni* is the major cause of gastrointestinal diseases in many countries, the food-borne pandemic in humans and chickens. The infection route to human involves colonization, survival and multiplication the alimentary tract.

*Capmpylobacter Spp.* are facultative intracellular pathogens causing localized systemic infection, in addition to a chronic asymptomatic carrier state.

They are of worldwide economic and public health significance. In poultry, which represent important sources of cheap protein throughout the world, pullorum disease continue to cause economic losses, in those parts of the world.

The costs in hygiene with the increasing problems of antibiotics resistance suggest that oriental herbal medicines will become more attractive as an adjunct to existing control measures, antibiotic therapy in food production animals increasingly coming under close scrutiny, largely because of the fear of increased levels of resistance in food-borne human pathogen.

In view of the current increased public awareness of *Campylobacter Spp.* food poisoning, the acceptance of oriental herbal medicine will probably increase, one additional aspects of the use of feed additives of oriental herbal medicines against *Campylobacter Spp.* relates to their ability to colonized the alimentary tract (cecum). If feed additives(methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin) of oriental herbal medicines are feeded to Korean Native Chickens, they will prevents colonization in the alimentary tract(cecum). this protection would then be obtained by this colonization-inhibition effect followed by the development of normal immunity .

Proteomics traditionally used the separation power of two-dimensional electrophoresis for the quantitative analysis of protein amount in complex extract. Two-dimensional electrophoresis can separate several hundred to a thousand of proteins in a single procedure with high resolution.

Therefore, dietary supplementation of feed additives containing methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin using oriental herbal medicines in feed can produce a degree of protection against *Campylobacter Spp.* positive effect of growth performance physical chemical properties in Korean Native chickens.

The overall objectives of the study were to produce of Korean Native chickens by using methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin from oriental herbal medicines

### **III. Contents and Scope of Research**

#### **1. Effect of 1% dietary supplementation of feed additives containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on the preventive effect of *Campylobacter jejuni* in Koran native chickens**

The present study was conducted to investigate the preventive effect of feed supplemented with 1.0% oriental herbal medicine feed additives (OHMFA) on the colonization of thermophilic *Campylobacter Spp.*, and to isolate the agent from broiler chickens. the isolated *Campylobacter Spp.* were biotyped, serotyped and the susceptibility of isolates to antimicrobial agent were examined.

#### **2. Effect of 1% dietary supplementation of feed additives containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on growth performance, physical chemical properties in Koran native chickens**

A study was conducted to investigate the effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing oriental herbal medicines such as *Saururi herba Seu rhizoma* and *Carthami flos* on growth performance, physico-chemical properties (feed gain, incidence of death, weight gain, crude fat, cholesterol, composition of fatty acids and amino acids), protein expression by proteomics in Korean native chickens.

#### IV. Results of Research

This study was attempted for the production of Korean native chicken by using methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin from Oriental Herbal Medicine in Korean native chickens. We conducted experiment to investigate the effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing oriental herbal medicines such as *Saururi herba Seu rhizoma*, *Carthami flos*, and *etc.* on growth performance, physical chemical properties, the preventive effect of feed supplemented with 1.0% oriental herbal medicine feed additives (OHMFA) on the colonization of thermophilic *Campylobacter Spp.* and to isolate the agent from broiler chickens. the isolated *Campylobacter Spp.* were biotyped, serotyped

The results of the study consist of the two main subjects including (1) Effect of 1% dietary supplementation of feed additives containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on the preventive effect of *Campylobacter jejuni* in Korean native chickens (2) Effect of 1% dietary supplementation of feed additives containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on growth performance physico-chemical properties in Korean native chickens

First, to investigate the effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing oriental herbal medicine such as *Saururi herba Seu rhizoma* and *Carthami flos* on the preventive effect of feed supplemented with 1.0% oriental herbal medicine feed additives (OHMFA) on the colonization of thermophilic *Campylobacter Spp.* and to isolate the agent from Korean native chickens. the isolated *Campylobacter Spp.* were biotyped, serotyped and the susceptibility of isolates to antimicrobial agent prevention of *Campylobacter jejuni* and some organism in Korean native chickens.

In this study, antibacterial activity of the chicken feed supplemented with a different concentration of oriental herbal medicine feed additives (OHMFA) extract was tested for some organisms and its preventive effect on the colonization of *Capmpylobacter Spp.* in Korean native chickens were examined. The frequency of *Capmpylobacter Spp.* from feces, liver and spleen sample of Koran native chickens were examined during 2 weeks interval. In control group, frequency of *Capmpylobacter Spp.* from feces of Koran native chickens was increased from 25% in first week to 80% in seventh week but the frequency of *Capmpylobacter Spp* in feces sample treated with OHMFA was slightly reduced from 25% in first week to 15% in seventh week.

The frequency of *Capmpylobacter Spp.* from liver, and spleen was 13.7% and 10% respectively in control group, but the frequency of *Capmpylobacter Spp* in liver, and spleen treated OHMFA was 2.5% each. These results show that the administration of OHMFA may prevent the colonization of *Capmpylobacter Spp* in Koran native chickens.

Isolation rates of *Capmpylobacter Spp* from 180 fecal sample of Koran native chickens was 34.4%.

The majority of 43 isolates of *C. jejuni* was classified on biotype I (60.4%), II (30.2%). Most of 12 isolates of *C. coli* were biotype I (83.3%). Isolated *C. jejuni* 31 strains showed 11 different serotype, and serotype 36(18.6%), 17(13.9%) were most frequent. Isolated *C. coli* 10 strains showed 5 different serotypes and serotype 31(33.3%) and 21(25%) were relatively common.

Isolated *Capmpylobacter Spp* were highly susceptible to nalidixic acid, amikacin, gentamicin, colistin and chloramphenicol.

Second, to evaluate the effect of 1 % dietary supplementation of feed additive containing methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin such as *Saururi herba Seu rhizoma*, *Carthami flos*, and *etc* on feed gain, death rate, meat color, pH, weight gain, crude fat, cholesterol, composition of fatty acids, amino acids, protein expression by proteomics in Korean native chickens were conducted.

From results of this study, our experiments demonstrated that the Korean native chickens fed 1% feed additive decreased feed gain, death rates compared with control treatment. Weight gain and meat color were higher in the 1% supplemented group than the control group. The supplementation of 1% feed additive increased unsaturated fatty acid and reduced not only crude fat but cholesterol in the Korean native chickens compared with those of control.

Studies on the analysis of protein expression by proteomics were conducted and the comparison of a possible spots involved in immune response were examined by using proteome. The comparison of protein expression between control and 1 % dietary supplementation group were showed that dietary supplementation of feed additives group appeared spot to stimulate the immune system of body in the chickens. On the images of two-dimensional electrophoresis(2-DE), differences were observed between two groups and protein spot were observed from 1% supplemented group compared with the control treatment. it was able to identify protein spot having pI 4.6 and molecular weight range from 19 to 39 kDa, (down regulation and up regulation) involved in immune response. The transformation( down regulation and up regulation) of protein spot was suggested that protein spot were involved in immune system, in addition, feed additive containing methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin might induce the formation of factors and activate these factors on immune system.

In conclusion, results of the experiments suggest that feed additive containing methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin from *Saururi herba Seu rhizoma*, *Carthami flos* and *etc* were effective in improving in Korean native chickens on growth performance, physico-chemical properties and prevention of *Campylobacter jejuni*, and may increase economic return.

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
Section 1. Objective of research development.....	1
Section 2. The Significance of the study.....	9
Section 3. The scope of the study.....	12
Section 4. The process system of the study.....	14
<b>Chapter 2. Research Background.....</b>	<b>15</b>
Section 1. The trend of domestic and foreign study.....	15
Section 2. Relative importance of the study .....	19
<b>Chapter 3. Contents and Results .....</b>	<b>21</b>
Section 1. Introduction.....	21
Section 2. Material and Method.....	22
Section 3. Contents & Results.....	39
<b>Chapter 4. Contribution.....</b>	<b>96</b>
Section 1. The pointed aimed.....	96
Section 2. Progress of the study.....	97
Section 3. Contribution.....	98
<b>Chapter 5. Usefulness of the Results.....</b>	<b>99</b>
Section 1. Accessory studies.....	99
Section 2. Application of the results.....	99
Section 3. The industry of the results.....	99
<b>Chapter 6. Information on foreign biotechnology.....</b>	<b>105</b>
<b>Chapter 7. References.....</b>	<b>111</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	1
제 1 절 연구개발의 목적.....	1
제 2 절 필요성.....	9
제 3 절 연구범위.....	12
제 4 절 연구개발 추진체계.....	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	15
제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황.....	15
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치.....	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	21
제 1 절 이론적 근거.....	21
제 2 절 실험적 접근방법.....	22
제 3 절 연구내용 및 결과.....	39
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야의 기여도.....	96
제 1 절 연구평가의 착안점.....	96
제 2 절 연구목표 달성도.....	97
제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도.....	98
제5 장 연구개발 결과의 활용계획.....	99
제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용.....	99
제 2 절 타 연구에의 응용.....	99
제 3 절 기업화 추진방안.....	99
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	105
제 7 장 참고문헌.....	111

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 연구개발의 필요성

동물용 사료첨가 성장촉진용 항생제의 사용 금지로 인해 동물에서의 항생제 사용량이 감소했다는 많은 보고가 있었다. 그러나 성장촉진용 항생제의 사용으로 인한, 예전에는 미처 몰랐던 동물 건강의 증진이나 질병 예방 등의 많은 이득이 확인되었다. 성장촉진용 항생제의 사용금지 이후 다양한 축산 환경 개선에도 불구하고 동물의 건강 상태는 악화되었고, 사람에서 사용되는 약과 동일한 항생제가 수의학분야에서도 치료를 위해 사용량 면에서 증가하게 되었다. 이는 곧 살모넬라, 캄필로박터, 대장균등 인수공통질병 원인체의 항생제 내성을 야기해 인류건강에 위협할 수도 있다

국내에서 가축용 항생제는 연간 1200여 톤이 판매되고 있다. 가축의 종류로는 돼지, 닭, 수산물, 소의 순서로 항생제 사용량이 많다. 이로 인하여, 소, 돼지, 닭의 각종 세균의 항생제 내성으로 인하여, 항생제가 세균을 죽이는 약효를 거의 상실한 것으로 나타났다. 특히, 닭에서 분리된 포도상 구균의 경우 테트라사이클린에 대한 내성율이 96%에 달하였다. 가축용 항생제 남용은 사람에게도 나쁜 영향을 미친다. 고기, 우유, 계란 등 축산물에 잔류된 항생제가 음식과 함께 인체에 들어와 항생제 내성균이 생기게 때문이다. 항생제는 동물의 질병 치료를 위해 필수적이나 올바르게 사용한다 하더라도 내성을 유도한다. 비록 이런 사용이 사람에게 위험할 수도 있으나 사람에서 발생한 대부분의 위험한 내성 세균은 동물에서 유래되지 않았다. 의료 조사에 따르면, 사람에서 문제가 되는 내성 세균 중 동물에서 비롯된 경우는 4% 미만인 것으로 나타났다. 이들은 대부분 사람과 동물 모두에서 문제를 일으키는 인수공통세균에서 의한 것이었다. 유럽의 소, 돼지, 닭에서 분리된 *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*의 내성 정도를 비교한 최근의 연구에 따르면 나라별, 숙주별, 균종별로 항생제 내성 패턴은 다른 양상을 보였다. 이러한 차이는 항생제의 적용이나 질병의 통제가 각각의 특성에 따라 이루어져야 한다는 것을 보이는 동시에 동물에서의 항생제 내성 발생이나 분포가 간단하지 않으며 아직도 분명하게 밝혀지지 않았다는 것을 의미한다. 항생제는 폐렴이나 장염 같은 질병을 치료하기 위해 동물 개체별로 사용되기도 하고 outbreak의 치료를 위해 농장 전체에 적용되기도 한다. 항생제는 동물의 복지를 위해, 또한 인수공통질병을 포함한 전염병의 통제를 위해 필요하며, 경제적인 측면에서도 매우 중요하다.

재래닭은 기호성은 좋으나 발육이 늦어 사육비가 많이 들고 경제성이 낮은 것이 취약점이다. WTO이후 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 *Camphylobacter jejuni* 감염증이 증가되고, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다. 또한 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약중지로 재감염이 문제시 되며, 무분별한 오남용으로 인한 내성균의 출현증가 뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약제 잔류로 사람의 건강을 위협하고 있다.

*Camphylobacter jejuni*의 감염율은 4주령의 닭에서는 40%, 7주령의 닭에서는 90%이상으로 보고되어 있으며, 사람에게서는 위장염, 복막염 등의 감염증상이 있다. 경제적 손실로서는 미국에서는 약 0.6~1.06 billion \$로 집계되어있다.

*Camphylobacter jejuni*의 닭에서의 감소대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast, mannose 및 formic acid 또는 proponic acid등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며,

또 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나 역시 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.

*Camphylobacter jejuni*은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등과 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 준다. *Camphylobacter jejuni* 속균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다.

따라서 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Camphylobacter spp.*에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구는 시급한 실정이다.

한약제의 유효한 성분은 생체 내에서, 상승효과를 나타내어 생체내의 면역 시스템 중 보체계의 활성화, 여러 가지 cytokine의 활성화와 일상의 식품 성분과의 상승작용으로 신체 항상성을 유지하도록 도와주는 역할을 해 왔다. 이러한 한약제 내의 유효성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 대체 식품 첨가물이나 의약품의 개발이 가능하다.

홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기 부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원작물이기도 하다. 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 carthamin (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) 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 약재로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고 되었다. 뿐만 아니라 홍화에 포함된 성분 등은 포화성 콜

레스테롤을 저하시키며 질병에 대한 이완율을 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며 불포화지방산함량을 높인다는 보고도 있다. 또 맛의 중요인자인 아미노산을 증가시키며 계육의 보수력 및 연도 등을 향상시킨다고 하였다.

삼백초는 항균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonyl-ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde 등이 함유되어있어 항균작용 및, 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 하였다. 뿐만 아니라 이노작용, 혈압조절작용 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.

따라서 이 연구의 목표는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 1) *Camphylobacter jejuni* 대한 항균효과 2) 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과등을 통하여 얻은 성적과 더불어 사료제 생산 및 청정재래닭을 생산하여 농가의 소득증대에 이바지하려 한다.

#### 가. 기술적 측면

우리나라의 재래닭은 최근에 국민들의 지대한 관심과 노력으로 사육수가 점차 증가하고 있으며, 혈통보존과 계통조성 및 경제능력의 향상 등을 위한 연구에 많은 노력을 기울이고 있으나 능력이 낮고 시장 출하체중에 도달하는 기간이 길어 경제성에서 다른 육용계에 비하여 생산비가 많이 소요되는 단점이 있다.

UR농산물 협상이 타결되어 닭고기의 수입이 완전 개방됨에 따라 우리나라의 양계산업은 무한경쟁시대에 돌입하였는데, 이러한 국면을 해소하기 위한 방법을 다각도로 모색하고 있으나 간단하지는 않은듯하다. 이러한 난국타개의 일환으로 재래닭의 중요성 부각도 매우 중요한 의미를 가지고 있는데, 전용육계는 성장이 빨라 경제성이 높으나 닭고기의 품질이 떨어지는 단점이 있어, 국민식성에 알맞은 독특한 맛과 육질을 가진 우리나라 재래닭을 이용한 고품질의 닭고기를 생산하여 소비자의 기호에 맞는 생산물로서 소비확대와 생산비 보장을 이룩해야 할 시점이다. 일본이나 대만에서도 재래닭을 이용한 고품질 특수육용계의 생산으로 닭고기 소비시장의 활력소 역할을 하고 있다.

국내산 약초 중 홍화 (safflower)는 잇꽃이라 하는 국화과 (compositae)에 속하는 일년생 초목으로 원산지는 아프가니스탄의 산악지대 또는 에티오피아이며, 중국, 티벳 등지에서 재배되기도 하며 학명은 *Carthamus tinctorius*이다. 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 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 약재로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid 등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고

되었다. 또한 홍화 기름을 이용하여 등불을 켜올 때 나오는 그을음으로 필묵을 만들기도 하는데 이를 홍화묵이라 하여 최상의 필묵으로 여긴다. 홍화가 지닌 또 하나의 기능은 그 작용 기전은 밝혀진 바 없으나 최근 이 홍화씨가 Ca과 Pi를 증가시켜 골절 및 골다공증 등의 뼈 질환에 뛰어난 효과가 있음이 알려져 국내에서 민간요법으로 사용되고 있다. 그래서 홍화씨의 효능에 대한 관심이 집중되면서 국내에서 연구가 활발히 진행되고 있으며 1999년 최 등이 볶은 홍화씨에서 생리 활성 물질인 lignan, flavonoid 및 serotonin 성분들을 분리하여 그 구조식을 밝혔다.

삼백초(*Saururi Herba Seu Rhizoma*)는 향균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonyl-ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde 등이 함유되어 있으며 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 하였다. 뿐만 아니라 이뇨작용, 혈압조절 작용 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.

#### 나. 경제적 측면

근년 양계 사육형태가 대형화됨에 따라 대량 밀집사육으로 인한 *Camphylobacter jejuni* 감염증이 증가되고, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및 오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다. 또한 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약중지로 재감염이 문제시 되며, 무분별한 오남용으로 인한 내성균의 출현증가 뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약제 잔류로 사람의 건강을 위협하고 있다.

●*Camphylobacter jejuni*의 감염율은 4주령의 닭에서는 40%, 7주령의 닭에서는 90% 이상으로 보고 되어있으며, 사람에게서는 위장염, 복막염 등의 감염증상이 있다. 경제적 손실로서는 미국에서는 약 0.6~1.06 billion \$로 집계되어있다.

●*Camphylobacter jejunii*의 닭에서의 감소대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast, mannose 및 formic acid 또는 proponic acid등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며,

●또 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나 역시 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.

●*Camphylobacter jejuni*은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등과 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 준다.

●*Camphylobacter jejuni*은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다.

●따라서 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Camphylobacter spp.*에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구는 시급한 실정이다.

#### 다. 사회적 측면

●근래에 오면서 국민소득과 생활수준의 향상으로 축산물 소비에 있어서도 기호에 맞고 양보다는 질을 찾는 성향이 높아지면서 재래종을 선호하는 추세가 확산되고 있다. 이에 따라 최근 재래닭에 대한 관심이 높아지고 증가되는 수요를 위해 사육수가 크게 늘어나고 있는 실정이다. 이러한 추세와 함께 고유가축의 유지보존에 대한 의미가 강조되면서 재래닭 품종의 순수성 확립과 재래닭을 이용한 실용화 및 산업화를 위한 연구가 절실하다.

●재래닭이 생산하는 즐깃즐깃하고 담백한 특유의 고기 맛을 선호하는 소비층을 확보하고, 나아가 재래닭을 활용한 닭고기 품질의 고급화를 이루어 간다면 발전여지가 많을 것으로 전망된다.

현재로서는 재래닭이 차지하는 비중이 비록 미미한 실정이지만, 대규모로 사육되고 있는 수입 개량종과의 차별성을 부각시키기에 손색이 없는 유전자원으로서의 가치는 충분하다고 여겨진다. 그러므로 이러한 재래닭의 고유한 특성을 다듬어 고품질 실용재래닭 육용화 및 생산은 매우 중요하다고 할 수 있다.

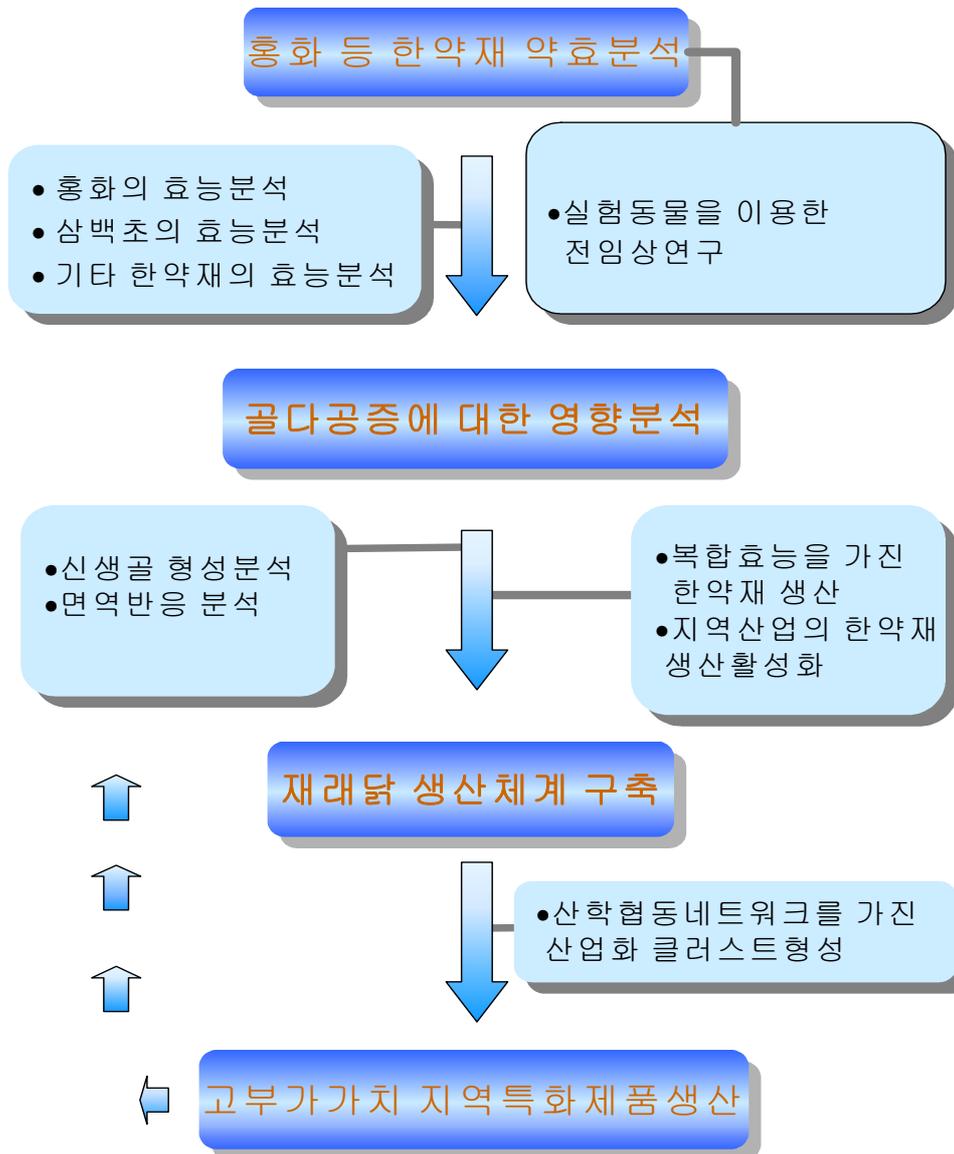
●가까운 대만에서는 닭고기 총생산량 중 재래종 닭고기가 60% 수준을 차지할 정도로 보편화되어 있고, 일본에서도 순수품종의 재래닭을 이용하여 지역별로 60여 종류의 고품질 특수 닭고기를 생산하고 있어, 우리도 이러한 방향으로 발전되어야 할 것으로 생각된다.

고품질의 저렴한 외국산 축산물의 수입이 확대됨에 따라 국민들의 선택폭이 다양해졌고, 경제성을 감안할 때 국내 양계산업에서도 경쟁력 강화를 위한 대등한 혹은 우위를 점할 수 있는 계속생산이 절실히 요구되며 특히 병원성 미생물 등 안전성이 낮은 상태의 식육생산은 국민의 생명을 위협할 뿐 아니라, 국내 양계 산업에 치명적인 영향을 줄 수 있다.

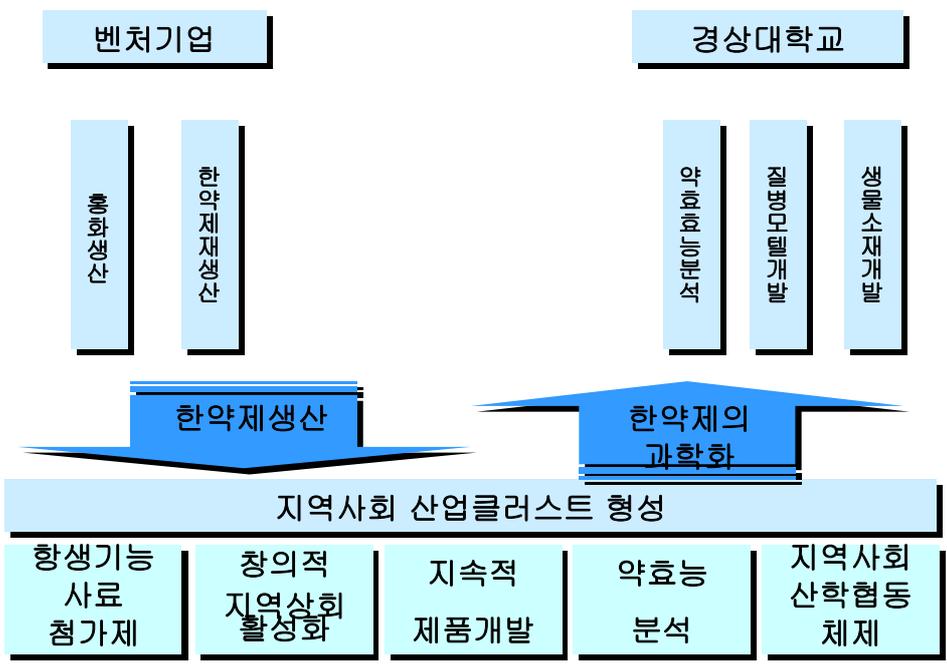
●이제 우리국민은 양보다 질적인 면을 중시하고 있으며, 특히 식품의 안전성 문제는 소비자들의 중대한 관심사로 되어 있어, *Salmonella* 등 각종 위해요소의 오염에 기인한 계육의 비위생적 상태는 사회적인 불안과 산업의 존립을 초래 할 수 있다.

이처럼 현재 국내 양계 사업의 제반 경쟁력(생산비, 원료비, 사육 환경, 수익성 등)이 갈수록 열악, 양계 농가의 소득 증대는 요원하고, 국내 양계시장은 외국산 수입 육계로 대체되는 상황에 까지 놓여 있어 무엇보다 기존 양계 농가의 새로운 사육 기술 개발, 안전 축산물 생산 및 육계의 품질 향상에 경쟁력 있는 새로운 기술 개발이 무엇보다 시급하고 또한 대 정부 차원의 새로운 물질 개발 투자의 인식 전환 역시 시급한 실정이다.

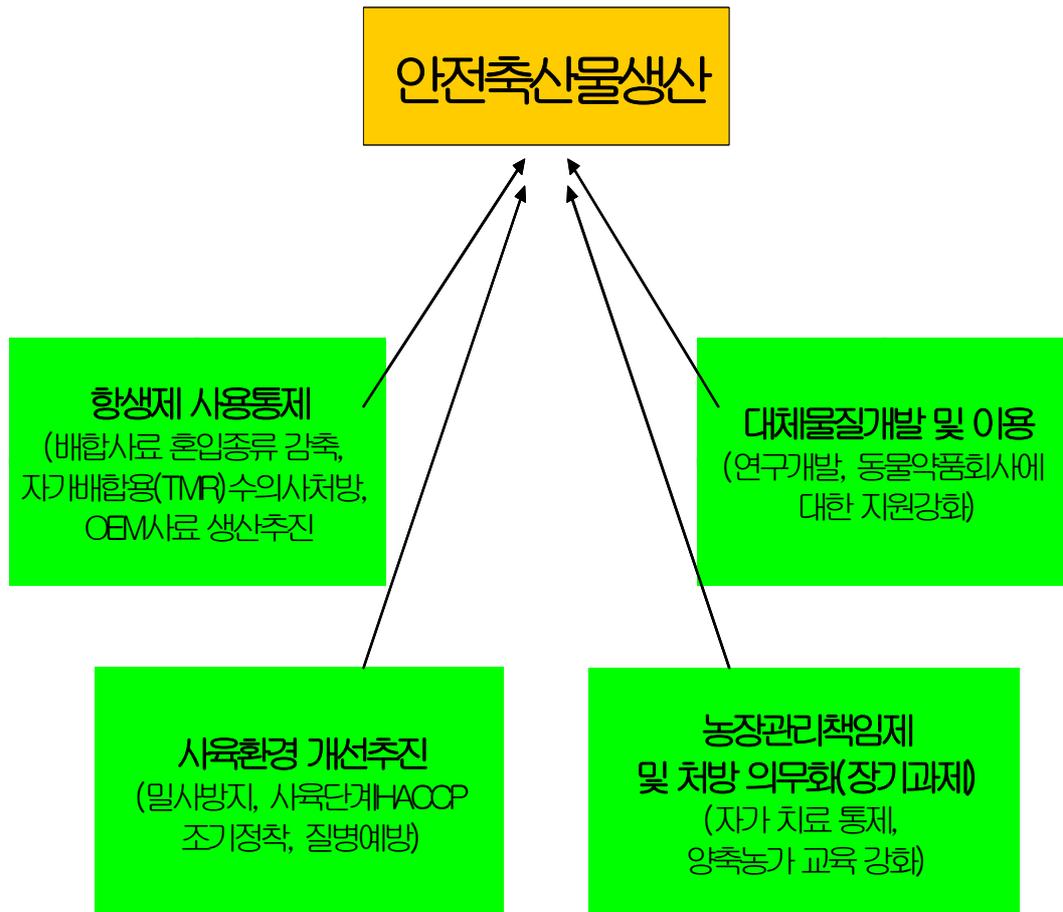
따라서 본 연구는 재래닭 성장 기간동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 *Camphylobacter spp.*을 예방하고, 동시에 고품질 안전성 양계 식품을 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여 할 수 있는 재래닭 생산기술을 개발하고자 본 실험을 수행하였다.



<연구방법의 모형도>



<연구목적의 모형도>



<연구 필요성의 모형도>

## 제 2 절 필요성

축산업은 농지와 노동력의 이용을 최소화 하면서 풍부한 사료와 에너지를 제공하여 축산물 생산의 효율을 높이는 방향으로 발전되었다.

산업동물의 집약적 사육이 가능해짐에 따라 축산업의 주된 비용인 사료의 비용을 낮추게 되었다. 축산의 집중으로 영양이 풍부한 양질의 급식이 가능해졌으며, 양질의 급식은 동물의 영양소 요구량을 만족시키므로 적은 사료급여로 최소의 시간에 동물을 키울 수 있게 되었다. 농업생산력을 더 높이기 위해 축산에서는 항생제를 사용하게 되었다. 비록 명확한 기전은 밝혀지지 않았으나 항생제의 성장촉진 효과는 널리 알려져 있다.

양계산업은 풍부한 자료와 전문적인 의견을 바탕으로 전문적으로 생산이 이루어지고 있다. 이러한 전문적인 생산에서 항생제의 효용성은 비록 공공연하게 알려지지는 않았지만, 생산성면에서 항생제의 지속적인 사용에 따라 질병률, 사망률, 성장, 사료효율 등의 개선을 보여주었다. 또한 소에서 장내 정상 세균총을 조절함으로써 나타나는 효용성이 잘 알려져 있다.

양돈업에서의 항생제의 효과는 아직 논쟁의 여지가 있다. 최근 자료에 따르면 사료 첨가용 항생제의 사용은 자돈의 경우 효과가 있으나 성돈의 경우에는 그렇지 않다. 그러나 다양한 각도에서의 평가는 아직 이루어지지 않았고 치료용 항생제에 대한 평가도 이루어지지 않았다. 게다가 이러한 결과는 한정된 축사의 경우에서만 적용할 수 있을 뿐 일반화할 수는 없다. 그러므로 돼지 관리의 개선으로 성장촉진용 항생제의 필요성이 강조되기는 하지만 특정 시기에는 역시 항생제가 불가피하게 사용될 수 밖에 없는 실정이다.

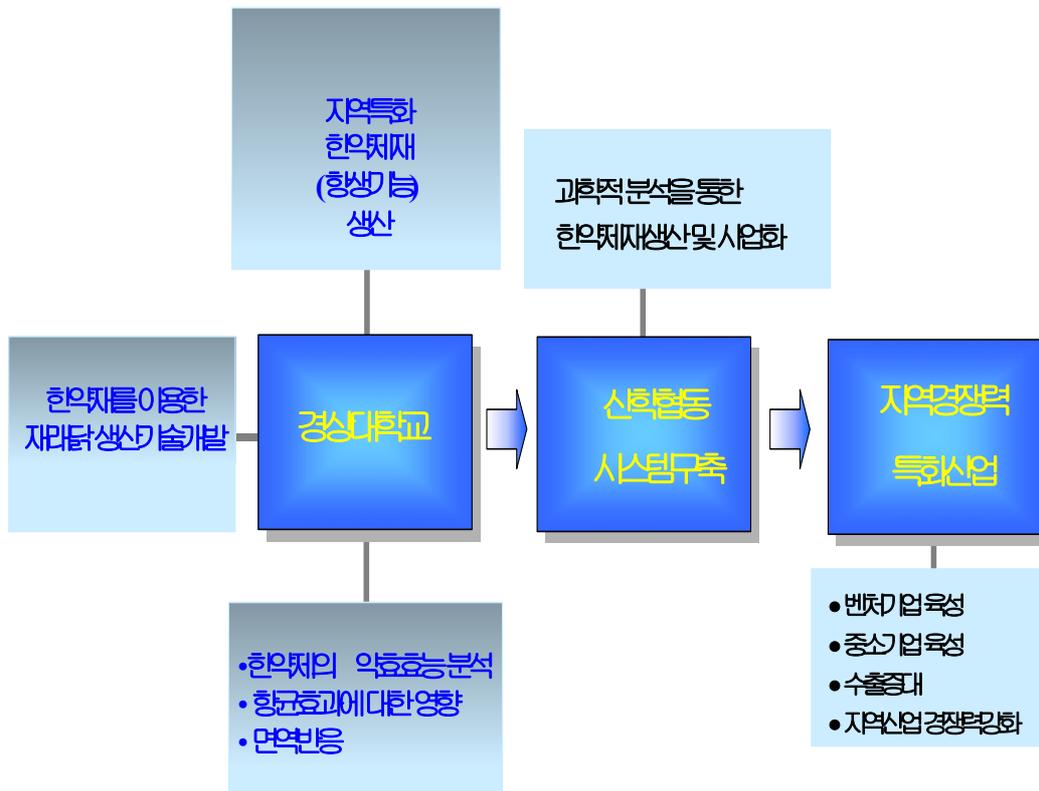
질병의 임상적인 상태를 정확히 정의하기는 어렵기 때문에 축산업에서의 치료용 항생제 사용의 효과를 정확한 수치로 나타내기는 어렵다. 그러나 치료용 항생제의 다양한 적용이 산업동물의 생산에 절대적으로 필요하다는 것은 분명하다. 게다가 항생제의 신중한 사용과 남용을 구별하기는 더 어렵다. 대체로 항생제는 능률적인 축산업 생산을 위해 반드시 필요하다. 최근 축산업은 지난 세기동안 단백질 공급원으로서 소비자의 요구에 맞춰, 주로 경제적인 측면에서 항생제를 다양한 각도로 적용하여 발전하여왔다.

과거에는 생산자와 소비자 모두 축산업에서의 항생제의 사용을 당연시하였으나 현재는 소비자와 소비단체 등의 항생제 위해를 염려하는 태도로 인해 항생제의 사용이 어려워지고 있다. 사료첨가용 항생제 사용금지는 소비자에게 매년 일인당 5~10달러, 많게는 40달러정도의 경제적 비용을 더 요구하고 있다.

환경적 측면에서의 항생제 사용의 고려는 경제적 측면에서의 고려에 비해서 두드러지지 않는다. 사료첨가용 항생제의 사용금지로 인한 사료효율의 저하로 인해 더 많은 농경지가 필요하게 된다. 일례로 미국의 경우 25억 평 정도의 추가 농경지가 필요한 것으로 예측하고 있으며, 이러한 변화가 환경에 어떤 영향을 줄지 상상하기는 어

럽다. 또한 축산업에서 특정 목적의 항생제의 사용 금지는 사료효율을 떨어뜨리고 이로 인해 동물의 생산량 당 폐기물 발생량이 증가할 것이다.

농림부는 그동안 안전하고 환경친화적인 축산업을 지향하는 국제적인 추세에 부응하기 위해 유기축산에 관한 국제지침을 마련하기 위한 Codex 회의에 계속 참여, 국토면적이 협소한 아시아 국가들과 연대하여 이번 지침 안을 완화하는데 우리의 입장을 최대한 반영했다. 그 결과 가축복지가 보장되는 조건에서 각국의 전통적인 사양체계의 구조가 방목지에 접근하지 못하는 예외규정을 인정하고, 유기축산 예외규정을 오는 2005년까지 한시적으로 적용하는 규정도 삭제했다. 또 유기가축에는 유기농법으로 생산되고 유전자변형이 되지 않은 사료의 급여, 항생제, 번식 및 성장호르몬 사용금지, 휴약기간은 법적 요구기간의 2배를 준수해야 하는데 합의했다. 아울러 각 국의 의견이 첨예하게 대립된 비유기 가축에서 유기가축으로의 전환기간을 축소 조정하고, 특히 가금육은 당초 10주에서 각국의 인정기관에서 전환기간을 결정할 수 있도록 조정함에 따라 5주 만에 생산되는 우리나라 고유식품인 삼계탕용 육계도 유기축산물로 생산할 수 있도록 합의했다. 과학화되고 신기능 물질을 가진 한방 사료 첨가제는 체내에서 면역 활성증강 및 항생기능을 가지고 있기 때문에 최근 문제시 되는 항생제 과다사용에 대하여 항생제의 양을 줄이면서 육계 및 산란계를 성장 시킬 수 있고 육질 또한 organic chicken처럼 고품질의 양계를 생산할 수 있다. 그러나 국·내외적으로 과학화된 천연 복합 한방사료 첨가제가 개발된 경우는 거의 없는 실정이다. 따라서 이본연구의 목표는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 1) *Camphylobacter jejuni* 및 유해미생물에 대한 항균효과 2) 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과 등을 통하여 얻은 성적과 더불어 사료제 생산 및 청정재래닭을 생산하여 농가의 소득증대에 이바지하려 한다.



<연구 필요성의 세부 모형도>

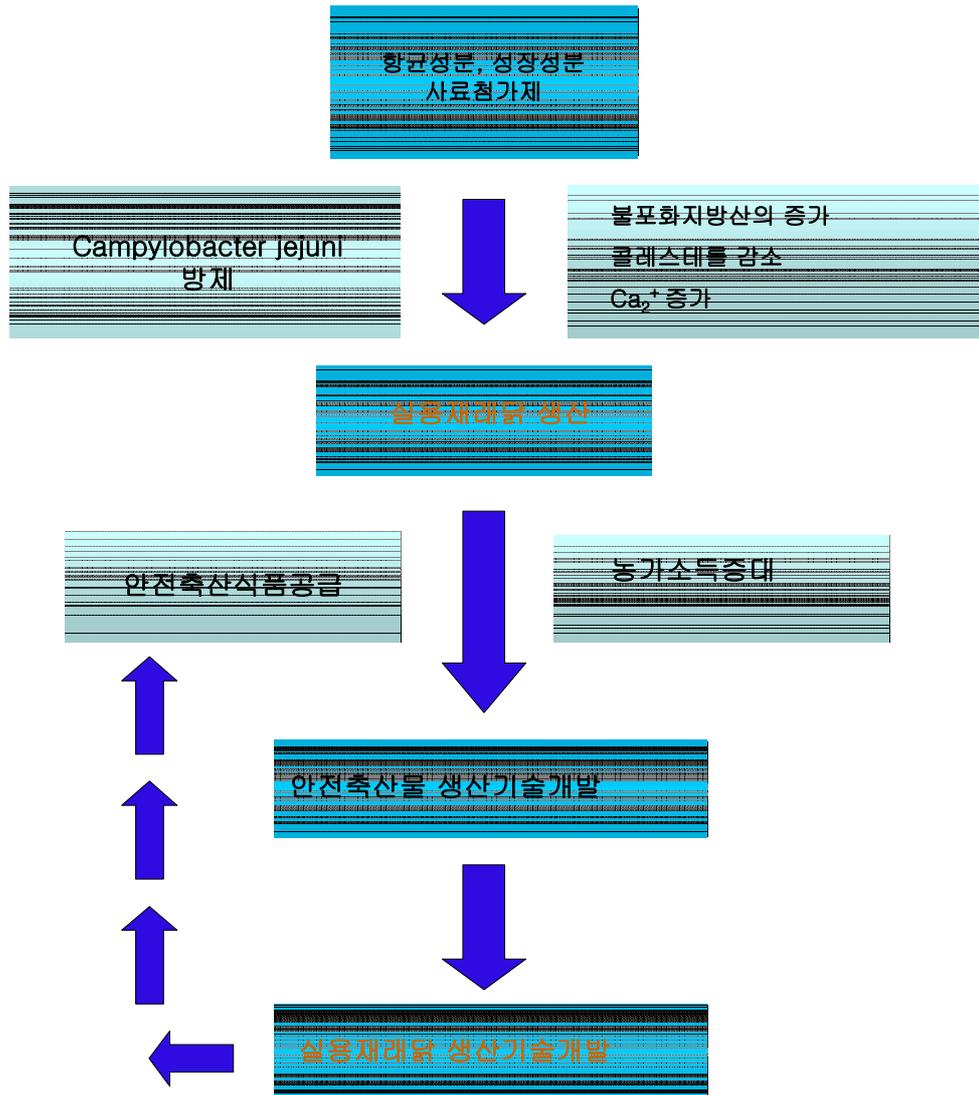
### 제 3 절 연구범위

#### 연차별 연구개발 목표와 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
	<p><i>Camphylobacter jejuni</i> 및 유해 미생물에 대한 항균효과 (I)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 첨가농도별 항균성 시험</li> <li>• 혈청형별 항균시험</li> <li>• 시험계군의 분변중 <i>camphylobacter jejuni</i> 분리</li> <li>• 전자현미경에 의한 장관 정착확인</li> <li>• 기타 유해 미생물에 대한 영향 분석</li> </ul>
<p>1차년도 (2003-2004)</p>	<p>실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과(I)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>※실용재래닭 계육에 대한 이화학적 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 골형성에 미치는 영향(Ca<sup>++</sup>, P)</li> <li>• 지방 (I) 조성</li> <li>• cholesterol (I) 변화</li> <li>• 단백질 변화 (I)</li> <li>• 아미노산 조성 (I)</li> <li>• 불포화지방산 (I)의 변화</li> <li>• 함유수분, 조지방, 조회분</li> </ul> </li> <li>※사양에 관한 관능평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 일평균증체량</li> <li>• 폐사율</li> <li>• 육성을</li> <li>• 사료요구율</li> </ul> </li> <li>※항생제잔류에 대한 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 성장기간동안의 경시별 근육 조직내 항생제잔류 비교분석(I)</li> </ul> </li> </ul>

	<p><i>Camphylobacter jejuni</i> 및 유해 미생물에 대한 항균효과(Ⅱ)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시험대조 계군의 분변중 <i>C.jejuni</i> 분리빈도 조사</li> <li>• 사료첨가제 투여계군의 분변중 <i>C.jejuni</i> 분리 빈도조사</li> <li>• 시험대조 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C.jejuni</i>양성계수 측정</li> <li>• 사료첨가제 투여 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C.jejuni</i> 양성계수 측정</li> <li>• 사료첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견 관찰</li> <li>• <i>Campylobacter</i> 분리주의 항생물질에 대한 감수성 시험</li> </ul>
<p>2차년도 (2004-2005)</p>	<p>실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과(Ⅱ)</p>	<p>〈농장실험을 중심으로〉</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 근육의 색깔, pH</li> <li>• 지방(Ⅱ) 변화</li> <li>• cholesterol(Ⅱ) 변화</li> <li>• 단백질 변화(Ⅱ)</li> <li>• 아미노산 조성 (Ⅱ)</li> <li>• 불포화지방산 변화(Ⅱ)</li> <li>• proteomics 기법에 의한 단백질 발현조사</li> <li>• 재래닭의 경제성 분석 및 생산체계 확립</li> </ul>

## 제 4 절 연구개발 추진체계



<연구 추진 체계의 모형도>

## 제 2 장 국내·외 기술개발현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 우리나라의 유기축산업과 항생제사용에 대한 현황

항생제내성에 관한 조사는 덴마크 (DANMAP, 2003), 스웨덴 (SVARM, 2003), 영국 (Veterinary Laboratories Agency, 2001), 네덜란드 (MARAN, 2002) 등 몇몇 유럽 국가에서 이루어져왔다. 국가적인 연구가 흥미로운 결과를 보이기는 했으나, 실험방법이 상이하여 각각의 국가간의 비교를 하기는 어렵다. 국제적인 비교를 위해서는 각각의 나라에서 표준화된 동일한 실험방법을 사용해야 한다. CEESA (the European Animal Health Study Centre, Brussels, Belgium) 는 이러한 연구를 수행하고 있다. EASSA (European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals)는 유럽 8개국의 축산 동물의 장내 *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* 의 내성을 조사하고 있다. 1999년과 2001년 사이 도계장과 소, 돼지 도축장에서 분변을 채취하여 검사한 결과 2118 *E. coli*, 271 *Salmonella*, 1325 *Campylobacter*가 분리되어 MIC (최소 항생제 억제 농도)를 측정하였다. 인의에서 중요한 항생제에 대한 MIC를 측정한 결과 특히 오래된 항생제일 수록 국가별로 내성 패턴이 확연한 차이를 보였다. 그러나 새로운 항생제 (fluoroquinolone, third cephalosporin)에 대한 내성 정도는 거의 없었다. 스웨덴 같은 북유럽은 스페인 같은 남쪽보다 항생제 내성 발생이 적었고 소의 분리주가 닭과 돼지 분리주보다 낮은 내성률을 보였다.

국가간의 내성 패턴이 다른 이유는 항생제 사용량, 사용 기간, 용법이나 적용 방법의 차이, 혹은 다른 역학적인 요소에 인한 것으로 여겨지고 있다.

위의 의견 중 국가간 항생제 사용량의 차이가 내성 패턴이 다른 가장 큰 이유라 보기 쉽다. 축산 산업 조직에서 유럽 각 국가의 항생제 판매량을 집계하고 있으나 소비량에 대한 자료는 얻기 힘들다. 동물약품업계에서 사용량을 측정하려는 시도는 각 국가간 공급 체계의 차이와 모든 동물약품회사를 포함하지 않는 이유로 무산되었다. 효과적인 방법은 정부차원에서 각각의 동물약품회사로부터 자발적으로 직접 정보를 얻거나 덴마크의 경우와 같이 의무적으로 판매량을 보고하도록 하는 법률을 제정하는 것이

우리나라의 유기농업은 CODEX 유기농업과는 차이가 있지만 민간차원의 유기농업단체가 있어서 유기농업의 실현을 위한 노력을 해왔다. 그러나 유기축산분야는 아직도 민간단체는 아직 전국적인 단체가 결성되지 못하였고 지역별로 몇 개의 농가가 연합한 형태 또는 개별적으로 유기축산업을 하려는 농민이 있을 뿐이다. 그러나 Codex의 유기농업규정에 합당한 유기농업이나 유기축산업을 실시하려는 시도는 아직은 없다. 현재 쟁점사항이 되고 있는 유기사료의 급여비율 등이 남아 있지만 유기농업단체, 축산관련단체, 관련업계, 학계 등으로부터 우리나라의 조건에 맞는 지침(안)에 대한 의

견을 수렴하고 정기적으로 지침(안)을 검토하는 것이 필요하다.

## 2. 국외 연구동향

### 가. 미국의 유기농업

1990년에 제정된 미국의 유기식품 생산법은 모든 경작물, 야생작물, 가축, 그리고 유기농업이라는 보증을 원하는 모든 농산물은 미국의 유기농업 프로그램을 적용하고 유기생산규정을 지켜야만 한다. 유기농업의 기본 개념이나 의미는 유럽의 유기농업과 거의 유사한 형태를 취하고 있다. 유기축산의 조건 역시 유럽과 비슷한데 유기축산물로서 판매되거나 표시된 모든 것은 태어나서부터 지속적으로 유기적 관리에서 유지되어 온 것만을 의미한다고 규정하고 있다. 단 닭의 경우는 부화한지 2일 이내부터 유기적 조건에서 사육되어야 한다.

합성물질이 함유된 사료첨가제나 공급제는 유기축산에 이용할 수 없다. 유기축산체 계속의 가축사료는 초지나 사료작물을 포함하여 전적으로 유기적으로 생산된 것이어야 한다. 생산자는 동물약품, 성장촉진호르몬을 사용할 수 없으며 정상적인 성장과 건강유지에 필요한 양 이상의 사료첨가제나 공급제는 사용해서 안된다. 또 일체의 동물성 사료의 급여나 사료첨가를 해서도 안된다. 예방적 차원에서 동물의 건강유지를 위한 관리를 해야 하며 질병이나 기생충에 저항성이 있는 가축의 품종 선택과 환경관리를 해야 하며 동물의 영양소 요구량에 맞는 비타민, 미네랄 및 기타 첨가제를 사용할 수 있다.

### 나. CODEX 유기농업

유기식품의 생산, 가공, 표시, 유통에 대한 지침을 Codex에서 논의한 것은 1990년부터이다. Codex집행위원회는 유기식품의 지침에 대하여 캐나다 행정부가 초안을 만들도록 하였으며, 1991년 제19차 총회에서 지침서 초안을 캐나다 정부대표가 발표하였다. 1993년 호주의 전문가회의에 지침이 송부되어, 제22차 식품표시분과위원회에서 토의하였으며, 동 분과위원회에서는 재수정 지침을 작성하였다. 1994년 제23차부터 1999년 27차에 이르기까지 많은 논의가 계속되어 유기식품에 대한 "허용물질(자재) 검토를 위한 규정"은 확정하였지만, 축산물 관련규정은 각국의 의견을 다시 수렴하기로 하였으며 아직 합의에 이르지 못하였다. 그 주요 내용으로 일반기준을 보면 유기농업은 농업생태계의 건강, 생명의 다양성, 생물학적 순환 및 토양생물학적 활동을 촉진, 증진시키는 하나의 전체적인 생산관리체계이다.

### 다. 외국의 항생제 사용현황

사료첨가용 항생제의 사용 금지 이후 유럽에서는 산업동물의 치료용 항생제의 사용이 상당히 증가했다. 영국 수의약품부(Veterinary Medicines Directorate)는 2002년의 동물용 항생제 판매량이 2000년보다 증가했다고 발표했다. 1999년 유럽의 사료첨가용 항생제 사용금지 이후 치료용 항생제의 판매량은 1999년 383톤에서 2000년 439톤으로 증가했다. 주로 테트라사이클린 (36톤), 트리메토프림/설펜아마이드 (12톤), 마크로라이

드(12톤)에 의한 것이다. 양돈산업에서는 7톤, 닭에서는 13톤, 그 외 한 종 이상의 동물에서 37톤의 치료용 항생제의 사용이 이루어졌다. 양돈산업에서 치료용 항생제의 사용이 증가한 이유는 유럽의 1999년 사료첨가용 항생제 사용금지로 인한 돼지 피부염, 신장염, 이유자돈의 전신소모성질환의 증가때문이라고 여겨지고 있다. 덴마크에서 치료용 항생제의 사용량은 1996년 48톤에서 2001년 94톤으로 증가했다. 이와 관련된 주요 항생제를 살펴보면, 돼지에서 테트라사이클린이 12.9톤에서 27.9톤 (116%)으로 증가했으며 마크로라이드와 린코사마이드는 7.1톤에서 11.9톤(68%)으로, 아미노글라이코사이드는 7.1톤에서 11.9톤 (68%)으로 증가했다. 이는 축산분야에서의 다른 위해요소 제거를 위한 다양한 시도에도 불구하고 성장촉진제의 사용금지로 인한 결과로 판단된다. 스웨덴의 경우에는 재정적인 부담에도 불구하고 성장촉진용 항생제의 금지가 효과적일 수도 있겠으나 스칸디나비아와 축산 상황이 판이하게 다른 여타의 유럽국가에서는 그렇지 않을 수도 있다.

### 3. 앞으로의 전망

가. 동물용 사료첨가 성장촉진용 항생제의 사용 금지로 인해 동물에서의 항생제 사용량이 감소했다는 많은 보고가 있었다. 그러나 성장촉진용 항생제의 사용으로 인한, 예전에는 미처 몰랐던 동물 건강의 증진이나 질병 예방 등의 많은 이득이 확인되었다.

나. 성장촉진용 항생제의 사용금지 이후 다양한 축산 환경 개선에도 불구하고 동물의 건강상태는 악화되었고, 사람에서 사용되는 약과 동일한 항생제가 수의분야에서도 치료를 위해 사용량 면에서 증가하게 되었다. 이는 곧 살모넬라, 캄필로박터, 대장균 등 인수공통질병 원인체의 항생제 내성을 야기해 인류건강에 위해할 수도 있다.

다. 성장촉진용 항생제의 사용금지를 위해 지금까지 쏟은 노력과 경제력은 이제 인간과 동물의 합리적인 항생제 사용을 권장하기 위해 쓰여야 할 것이다. 또한 항생제 내성 세균과 내성 유전자의 얽힌 역학관계를 밝히고 치료와 예방면에서의 성장촉진제의 적절한 위해성 평가도 이루어져야 한다.

라. 아직 유럽에서 사용되고 있는 성장촉진용 항생제는 성장촉진과 예방의 관계가 명확히 규명될 때까지 금지되서는 안되고 최근에 이루어진 금지령은 전체적으로 수정될 수도 있다.

마. 유럽에서의 1997년 동물 사료첨가 성장촉진용 항생제의 사용금지는 치료용 항생제의 사용 증가로 이어질 것이고 성장촉진용 항생제의 사용 금지를 일방적으로 시행한 나라의 축산업 생산량이 현저히 감소될 것이다.

바. 앞으로 국내외적 양계시장은 항생제 및 백신 사용을 최소화한 organic chicken 시대가 도래할 것이며, 항생기능 및 계육 및 산란계 품질향상을 시킬 수 있는 복합 천연 생리활성물질(natural-product)개발에 상당수의 연구자들이 집중될 것으로 사료된다.

사. 천연 유기사료첨가제의 사용으로 인하여 항생제의 양을 최소화시켜 축산물 안전성 추구에 부합될 수 있는 계기가 될 수 있으리라 사료된다.

아. 이로 인하여 국내 양계산업에 새로운 국면을 맞게 될 것이며, 해외수출 시장개척은 물론 각종 예방제 및 항생제를 최소화하게 사육가공하게 되어, 식품으로서의 안정성은 물론 고부가가치를 창출하여, 육계의 품질면에서도 획기적 계기가 마련, 국내는 물론 해외수출 육계시장에도 큰 변화가 있으리라 사료된다.

자. 지속적 연구로 산란계 등 다른 가축에도 응용시킬 수 있어 농가에 더 높은 고소득을 창출 할 수 있다.

## 제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

### 1. 기술적 측면

#### 가. 실용재래닭 육계생산으로 인한 소득증대

사료첨가제를 먹인 재래닭의 경제성은 출하체중을 1.5kg으로 기준으로 할 때 출하 일령은 전용육계는 35일이고 실용재래닭은 65일이 된다. 연간 사육가능횟수는 재래닭이 4회, 전용육계는 6회이지만 사료첨가제를 먹인 재래닭을 사육할 때는 사료 첨가제를 먹이지 않은 재래닭보다 연간 수익면에서 2.5배 이상의 경제성이 있다.

#### 나. 안전 축산물 생산 기술개발을 통한 축산식품 공급

다. *Camphylobacter jejuni*의 방제로 고품질의 안전성이 높은 계육 및 계란 생산으로 고부가가치 상품 창출과 함께 질병 감소에 의한 생산성 향상으로 농가소득 증대

라. 안전 축산물 생산 기술개발을 통한 *camphylobacter jejuni* 및 유해미생물 항균효과가 있는 축산식품공급으로 국민보건 향상 및 건강증진

#### 마. 한국산 재래닭 계육의 해외 수출 가능

지금까지의 한국산 계육이 생산 원가가 높고 각국의 엄격한 항생제 잔류검사의 규제로 인해 계육이 수출되지 못했는데, 최저량의 항생제의 사용으로 양계 축산이 가능하게 되어 한국산 계육을 수출 할 수 있게 된다.

#### 바. 높은 육질의 계육 제공

맛이 자연 방사한 organic chicken(촌닭)과 같은 우수한 육질의 계육의 생산이 가능하여 닭고기의 소비를 촉진시켜 시장 확대 가능하다.

2.경제적 측면

한방사료첨가제의 사용으로 발생하는 재래닭의 경제산업적 측면은 표1과 같다.

표 1. 사료첨가제 사용으로 인한 재래닭 생산 경제성

사육두수:약30,000수(57일기준)

구 분	예비실험 결과	경 제 성(1회 사육시)			년간 4회 사육시 기대 이익
		증 량(1.5kg)	단 가	기대 이익	
폐사 감소 (수수)	150~300수	230g~465g	1,500원/kg기준	345,000 ~697,500원	1,380,000 ~2,790,000원
증체 효과 (g)	40~100g/수당	900~3,000g	1,500원/kg기준	1,350,000 ~4,500,000원	5,400,000 ~18,000,000원
사료 절감 (kg)	960~1,800g	980~1,980g	380원/kg기준	372,400 ~752,400원	1,489,600 ~3,009,600원
기타 영양제, 항생제 약값	40~80원/수당	1,200,000 ~2,400,000원		1,200,000 ~2,400,000원	4,800,000 ~9,600,000원
소 계				3,267,400 ~8,349,900원	13,069,600 ~33,399,600원
사료 첨가제 사용시 비용 합계	사료첨가제 12kg/10,000수 × @30,000 × 3 = 1,080,000			-1,080,000원	-4,320,000원
절감 비용 합 계	- 1회 사육시(30,000수 기준) : 평균 8백만원 이상 - 연간 이익(4회 사육 기준) : 평균 1천8백만원 이상 이익.			-2,187,400원 -7,269,900원	+8,749,600원 +29,079,600원

## 제 3 장 연구개발내용 및 결과

### 제 1 절 이론적 접근방법

한약제의 유효한 성분은 생체 내에서, 상승효과를 나타내어 생체내의 면역 시스템 중 보체계의 활성화, 여러 가지 cytokine의 활성화와 일상의 식품 성분과의 상승작용으로 신체 항상성을 유지하도록 도와주는 역할을 해 왔다. 이러한 한약제 내의 유효 성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 대체 식품 첨가물이나 의약품의 개발이 가능하다.

홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기 부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원작물이기도 하다. 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 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 약재로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid 등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고 되었다. 뿐만 아니라 홍화에 포함된 성분 등은 포화성 콜레스테롤을 저하시키며 질병에 대한 이완율을 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며 불포화지방산함량을 높인다는 보고도 있다. 또 맛의 중요인자인 아미노산을 증가시키며 계육의 보수력 및 연도 등을 향상시킨다고 하였다.

삼백초는 항균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonyl-ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde 등이 함유되어 있어 항균작용 및, 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 하였다. 뿐만 아니라 이뇨작용, 혈압조절작용등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.

따라서 이 연구의 목표는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 1.Campylobacter jejuni 대한 항균효 2.실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과 등을 통하여 얻은 성적과 더불어 사료제 생산 및 청정재래닭을 생산하여 농가의 소득증대에 이바지하려 한다.

## 제 2 절 실험적 접근방법

### 1. 연구 목표

연구의 목표는 삼백초의 향균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장 성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 1.Campylobacter jejuni 대한 항균효과 2.실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과 등을 통하여 얻은 성적과 더불어 사료제 생산 및 청정재래닭을 생산하여 농가의 소득증대에 이바지하려 한다.

2. 사료첨가제의 주요 성분 및 효과

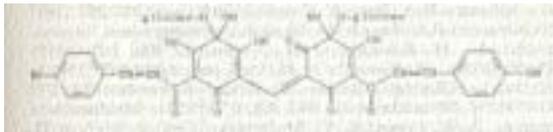
가. 홍화(Carthami Flos): ~70%비율

1) 주요성분: Carthamin( $C_{43}H_{42}O_{22}$ )

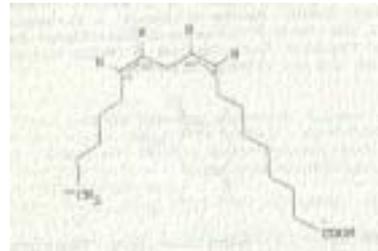
Linoleic acid

$(CH_3(CH_2)_4(CH=CH(H_2))_2(CH_2)_6COO$

2) 주요 효과: 항산화 작용과 항암 효과(유암 등),  
골다공증예방( $Ca^{++} \uparrow$ ) 등



Carthamin



Linoleic acid

나. 삼백초(Saururi Herba Seu Rhizoma) :~30% 비율

Flavonoid		Alcaloid
<b>Rutin</b>	<b>Isoquercitrin</b>	<b>10-amino-3,4-dimethoxy-phenanthrene-1-carboxylic acid laetam</b>
(S1): R1=rutinoside, R2=H	(S3): R1=glucoside, R2=H	(S1): R1=H, R2=OCH3, R3=H
<b>Quercitrin</b>	<b>Quercetin</b>	<b>10-amino-3-hydroxy-4-methoxy-phenanthrene-1-carboxylic acid laetam</b>
(S2): R1=ramnoside, R2=H	(S4): R1=H, R2=H	(S2):R1=H, R2=H

다. 기타 :~% 비율

3. 본연구를 시작하기 전에 시행한 육계연구에 대한 실험결과  
(한방사료첨가제의 *S. enteritidis* 방제효과 및 이화학적 변화)

1) 한방 사료첨가제의 항균효과

각종 병원세균에 대한 MIC를 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *E. coli* O157:H7에 대해서는 2.0 % 이상의 농도에서, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 및 *B. cereus*에 대하여는 0.25 %에서 항균효과를 나타내었다.

Table 1. Minimum inhibitory concentration of OHMFA on *Salmonella* spp. and other pathogens

Microorganisms	MIC(%)				
	0.2	0.1	0.5	0.25	0.13
<i>Badillus cerus</i>	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	-	-	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	+	+	+	+
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	+	+	+	+
<i>Salmonella pullorum</i>	-	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+

+; occurrence of colony

-; no occurrence of colony

2) *S. enteritidis*에 대한 정착 억제효과

(1) 설사방지 및 증체효과

Salmonella 감염계균에 대한 설사발생 및 체중 변화를 조사한 결과는 Table 2에서와 같다. OHMF A 첨가구는 균감염 7일후 5수중 1수, 대조구는 5수중 4수가 설사증세를 나타내었으나 14일 후에는 모든 시험구에서 설사증을 보이지 않았다. 체중은 첨가구의 경우 균 접종 후 1일에 404.30±9.60 g이었던 것이 14일에는 914.42±15.35 g으로 증가하여 대조구의 370.8±12.60 g 및 792.60±8.57 g에 비하여 현저하게 증가하였다 (p<0.05).

Table 2. Occurrence of diarrhea and weight change in chickens inoculated with *S. enteritidis*

Treatment	Diarrhea			Weight (g)		
	1 <sup>a</sup>	7	14	1	7	14
Control	0 <sup>b</sup>	4	0	370.18±12.60 <sup>C</sup>	726.10±23.20 <sup>B</sup>	790.60±78.57 <sup>A</sup>
1.0 % OHMF A added	0	1	0	404.30±9.60 <sup>C</sup>	812.65±25.13 <sup>B</sup>	914.42±15.35 <sup>A</sup>

a; Days after inoculation.

b; Number of positive chickens from each 5 chickens tested.

c; Values represent means±SD for 5 chickens.

A; row (p<0.05).

(2) 맹장 내용물 중 *Salmonella* 균의 분포

감염계군의 맹장 내용물로부터 *Salmonella* 균을 분리한 결과는 Table 3과 같다. 첨가구는 균 접종 후 1일에 log 5.95±0.27 CFU/g에서 7일에 log 5.67±0.76 CFU/g수준으로 감소하다가 14일 후에는 분리되지 않았다. 이에 반하여 대조군은 균 접종 후 log 6.01±0.36 CFU/g에서 7일 후에 7.27±0.51 CFU/g 으로 증가하다가 14일에는 3.15±1.25 CFU/g 로 분리되었다.(p<0.05).

Table 3. Isolation of *Salmonella enteritidis* from the cecum contents of chickens after orally inoculated

Treatment	Days after inoculation <sup>a</sup>		
	1	7	14
Control	6.01±0.36 <sup>B</sup> (5/5)	7.27±0.51 <sup>Aa</sup> (5/5)	3.15±1.25 <sup>Ba</sup> (4/5)
1.0% OHMFA added	5.59±0.27 <sup>A</sup> (5/5)	5.67±0.76 <sup>Ab</sup> (5/5)	0 <sup>Bb</sup> (0/5)

a; Each animal was inoculated with 4.5×10<sup>7</sup>CFU/ml *Salmonella enteritidis*.

b; Values shown are the number of *S. enteritidis* was determined by direct plating culture using MacConkey agar and XLD agar, results are expressed as means±standard deviation(log<sub>10</sub>) of five chickens per group.

c; Number of positive chickens/Number of chickens inoculated.

A; row, a; column (p<0.05).

(3) 감염 장기 중 Salmonella 분리 빈도

균 접종 후 7일과 14일에 간, 비장 및 맹장으로부터 균을 분리한 결과는 Table 4와 같다. OHMFA 첨가구의 경우 감염 후 7일에 간에서 5수중 2수, 비장은 5수중 3수에서 분리되었으나 14일 후에는 전 장기에서 분리되지 않았다. 이에 반하여 대조구는 7일에 5수 모두의 간과 비장에서 균이 분리되었고, 14일 후에는 각각 4수중 2수에서 분리되었다. 맹장에서는 14일 후에 대조구의 경우 전 개체에서 균이 분리되었으나 첨가구에서는 분리되지 않았다. 또한 대조구의 경우 8일경에 1수가 폐사하였고 폐사체의 각 장기로부터 균이 분리되었다.

Table 4. Recovery of organisms from the tissues of chickens infected with *S. enteritidis*

Treatment group	Chickens	No. poitive samples/No. examined		
		Liver	Spleen	Cecum
Control	Alive at 7 days	5/5	5/5	5/5
	Alive at 14 days	2/4	2/4	4/4
	Died during experiment	1/10	1/10	1/10
1.0 % OHMFA added	Alive at 7 days	2/5	3/5	5/5
	Alive at 14 days	0/5	0/5	0/5
	Died during experiment	0/10	0/10	0/10

(4) 주사전자현미경적 관찰

맹장의 균 정착상태를 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰한 바, Fig 1-1에서와 같이 균 감염후 7일 이후에도 대조군의 경우 장점막 상피표면에 다수의 간균과 장점막 상피조직의 염증반응이 관찰되었다. 그러나, 실험군에서는 21일 이후에는 실험군의 경우 장점막에 균이 거의 관찰되지 않았다(Fig 1-2).

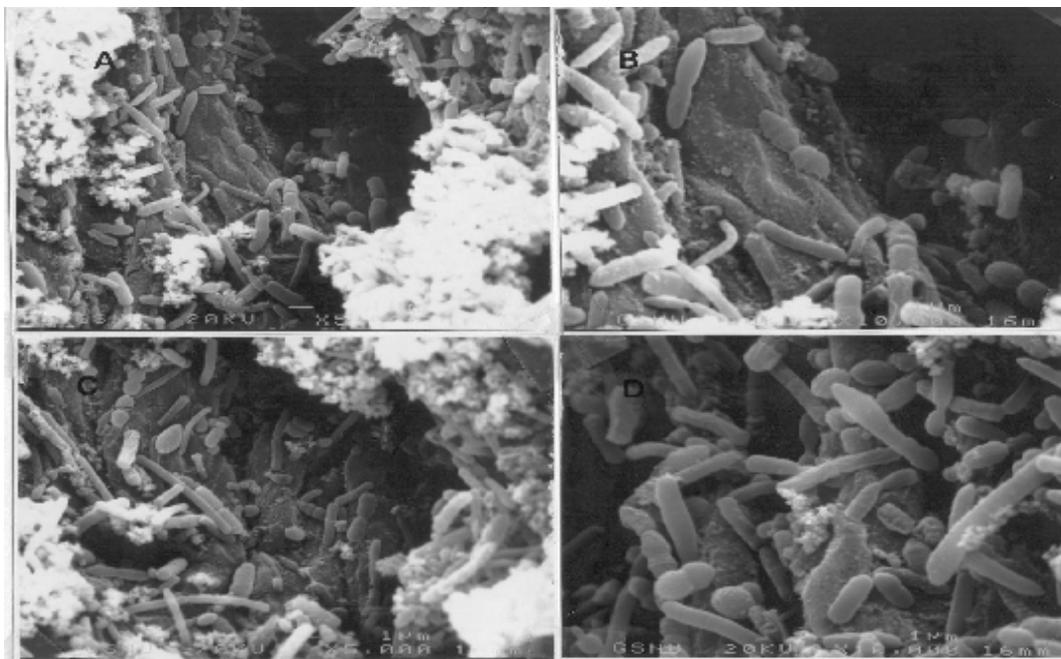


Fig 1-1. Scanning electron micrograph of *S. enteritidis* interacting with intestinalepithelium after infection : bacteria were attached in large numbers to cecumepithelia at 1~7 days postinfection(A, B, C, D).

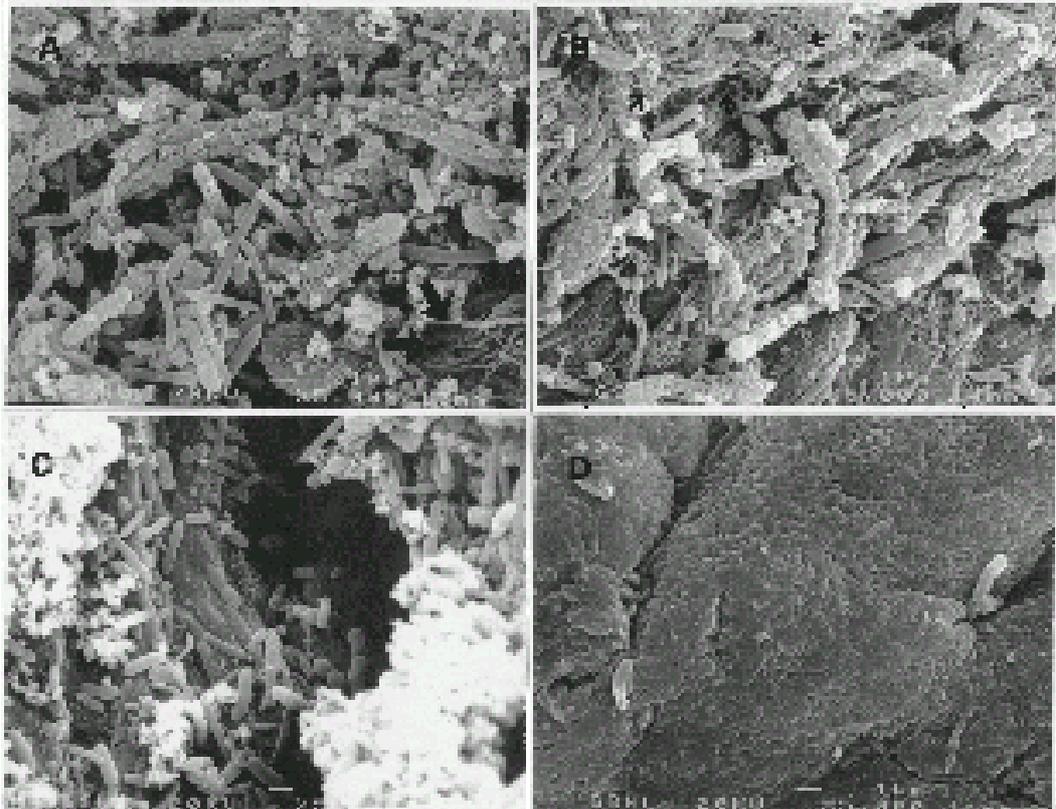


Fig 1-2. Scanning electron micrograph of cecum postinfection with *S. enteritidis*. Many bacteria were colonized to cecum epithelium at 7 days postinfection (A), and also inflammatory response was observed in villus epithelium (B). There were observed many bacteria of the control chickens at 14 days postinfection (C), but bacteria were observed occasional in the chicken fed a forage additive (OHMFA) (D).

(5) 혈중 항체가

균 접종 후 1, 7 및 14일에 혈청을 분리하여 항체의 추이를 조사한 바 7일 및 14일에 첨가구는 모두 1:4배 수준이었으나 대조구는 1:4에서 1:8 내지 1:16배로 상승하였다(Table 5).

Table 5. Antibody titer of sera by the microplate agglutination test in broiler chickens inoculated with *S. enteritidis*

Group	Number of chicken	Days after inoculation		
		1	7	14
Control	1	<1:2	1:4	1:8
	2	<1:2	1:4	1:16
	3	<1:2	1:2	NT
	4	1:4	1:4	1:16
OHMFA added	1	<1:2	1:4	1:4
	2	<1:2	1:4	1:4
	3	<1:2	1:2	1:4
	4	NT	1:4	1:4

NT; not tested

3) 야외 적용 및 효능평가

(1) *Salmonella Spp.*의 방제효과

출하직전의 broiler 유추의 분변으로부터 *Salmonella Spp.*의 분리율을 조사한 결과 Table 6 에서와 같이 대조군은 347예 중 84예에서 균이 분리되어 24.2 %의 분리율을 나타내었고, OHMFA첨가군은 239예 중 25예 (10.5 %)이었다.

Table 6. Frequency of recovery of *Salmonella spp* from chicken feces of poultry broiler farm

Group	No of feces tested	No of positive	% positive
Control	347	84	24.2
1.0% OHMFA	239	25	10.5
Total	586	109	18.6

(2) *Salmonella* 속균의 serotype 분포

분리한 *Salmonella Spp.*의 O group 혈청형을 조사한 결과는 Table 7와 같이 총 109 균주 중 B group이 65균주 (59.6 %)로서 가장 많았고, 다음 D1 group 43균주 (39.4 %) 및 기타 1균주 (0.9 %)이었다. 시험군 별로 보면 대조군의 경우 84균주 중 B group 55균주 (65.5 %), D1 group 28균주 (33.3 %) 및 기타 1균주 (0.9 %)이었고, 첨가군은 25균주 중 B group 10균주(40.0 %) 및 D1 group 15균주 (60.0 %)이었다.

Table 7. Serogroups of *Salmonella spp* isolated from chicken feces in poultry broiler farms

Serogroups	Number of <i>Salmonella</i> isolates(%)		Total(%)
	Control	Feed additive	
B	55 (65.5)	10 (40.0)	65 (59.6)
D <sub>1</sub>	28 (33.3)	15 (60.0)	43 (39.4)
others	1 (1.2)	0	1 (1.0)
Total	84	25	109 (100)

분리유래별 serotype 분포를 조사한 바 대조군에서는 84균주 중 *S. typhimurium* 55균주 (65.5 %), *S. enteritidis* 13균주 (15.5 %), *S. gallinarum* 13균주 (15.5 %), *S. pullorum* 2균주 (2.4 %) 및 기타 1균주 (1.2 %)의 5균종이 분리되었고, OHMFA 첨가군은 25균주 중 *S. enteritidis* 9균주 (50.0 %), *S. pullorum* 5균주 (27.8 %), *S. typhimurium* 3균주 (16.7 %) 및 *S. gallinarum* 1균주 (5.5 %)의 4균종이 분리되었다 (Table 1-8).

Table 8. Identification of isolates of Salmonella from chicken feces samples

	O group (strains)	Salmonella species	Frequency of species(%)
Control	B (55)	S. typhimurium	55 (65.5)
	Untypable (1)	other	1 (1.2)
	D1 (28)	S. enteritidis	13 (15.5)
		S. gallinarum	13 (15.5)
		S. pullorum	2 (2.4)
1.0%OHMFA added	B (10)	S. typhimurium	10 (40.0)
		S. enteritidis	9 (36.0)
	D1 (15)	S. pullorum	5 (20.0)
		S. gallinarum	1 (4.0)

(3) 폐사율

실험계를 32일간 사육하는 동안 폐사율을 조사한 결과는 Table 9에서와 같이 OHMFA첨가군은 4,000수 중 202수가 폐사하여 5.1 %의 폐사율을 나타내었고, 대조군은 4,000수 중 320수 (8.0 %)이었다.

Table 9. Incidence of death in chickens during 32days experiment

Group	No of chickens	No of death	%
Control	4,000	280	8.0
1.0%OHMFA added	4,000	202	5.1

4) 폐사한 유추의 장기 및 맹장 중 *Salmonella* 분리

실험기간 중에 폐사한 broiler 유추의 간, 비장 및 맹장내용물로부터 *Salmonella Spp.*을 분리한 바 대조구는 10수 중 1수의 간과 비장 및 3수의 맹장에서 분리되었으나, 첨가구에서는 7수 중 1예에서도 균이 분리되지 않았다(Table 10).

Table 10. Isolation of *Salmonella* from the organs and cecum of chickens died during experiment

	No. of chickens examined	Numbers positive		
		Liver	Spleen	Cecum
Control	10	1	1	3
OPMFA added	7	0	0	0

2) 사료첨가제가 육계의 계육색깔에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 계육색깔에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육색깔에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 적색깔(redness)의 증가, 노란색깔(yellowness)의 감소가 있었다(Table 11).

Table 11. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on meat color in broiler chickens

Treatments	Color		
	L	a	b
C	51.89±4.47	2.64±1.37	9.82±3.03
T	49.96±1.02	3.38±0.46	9.71±0.79

C : control group T: dietary supplementation group L : lightness a : redness  
b: yellowness

3) 사료첨가제가 육계의 계육 pH에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 계육 pH에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육 pH에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 pH의 감소( $5.68 \pm 0.11 \rightarrow 5.67 \pm 0.04$ )를 나타내었다(Table 12).

Table 12. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on pH in broiler chickens

Treatments	pH
C	$5.68 \pm 0.11$
T	$5.67 \pm 0.04$

C : control group T: dietary supplementation group

4) 사료첨가제가 육계의 계육 조지방, 조회분 및 전수분에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 계육내 조지방, 조회분 및 전수분에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육내 조지방, 조회분 및 전수분에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 조지방의 감소( $12.43 \pm 0.68 \rightarrow 8.93 \pm 0.56$ ), 조회분의 감소( $0.96 \pm 0.00 \rightarrow 0.95 \pm 0.00$ ) 및 전수분의 증가( $74.81 \pm 1.04 \rightarrow 75.34 \pm 0.25$ )를 나타내었다(Table 13).

Table 13. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on crude fat crude aches, and water in broiler chickens

Treatments	조지방	전수분	조회분
C	$12.43 \pm 0.68^A$	$74.81 \pm 1.04$	$0.96 \pm 0.00^A$
T	$8.93 \pm 0.56^B$	$75.34 \pm 0.25$	$0.95 \pm 0.00^B$

C : control group T: dietary supplementation group

<sup>A,B</sup> : Means with different capital letter superscript in the same column of comparison between control and treatment to significantly different at  $p < 0.05$ .

5) 사료첨가제가 육계의 계육지방산에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 지방산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육 내 지방산에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 stearate(C18:0)의 감소( $10.49 \pm 0.11 \rightarrow 10.07 \pm 0.17$ ), 불포화지방산의 증가( $65.75 \pm 0.87 \rightarrow 65.53 \pm 0.92$ ), 포화지방산의 감소( $37.25 \pm 0.87 \rightarrow 36.47 \pm 0.92$ )를 나타내었다(Table 14).

Table 14. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on fatty acids in broiler chickens

Fatty acids	Treatments	
	C	T
C14:0	0.76±0.06	0.77±0.03
C16:0	26.00±0.71	25.62±0.87
C16:1	5.16±0.18	5.31±0.08
C18:0	10.49±0.11 <sup>A</sup>	10.07±0.17 <sup>B</sup>
C18:1	35.53±1.01	36.30±0.75
C18:2	17.81±0.15	17.80±0.18
C20:3	0.74±0.04	0.69±0.04
C20:4	3.52±0.87	3.43±0.26
SFA	37.25±0.87	36.47±0.92
UFA	62.75±0.87	63.53±0.92
MUFA	40.69±0.84	41.62±0.72
PUFA	22.06±0.05	21.91±0.40

· C : control group T: dietary supplementation group

· <sup>A,B</sup> : Means with different capital letter superscript in the same column of comparison between control and treatment to significantly different at  $p < 0.05$ .

· C14:0 ; Myristic acid, C16:0 ; Palmitic acid, C16:1 ; Palmitoleic acid, C18:0 ; Stearic acid, C18:1 ; Oleic acid, C18:2 ; Linoleic acid, C20:3 ; Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, C20:4 ; Arachidonic acid,

· SFA(Saturation fatty acid) : C14:0, C16:0, C18:0

· UFA(Unsaturation fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C20:3, C20:4

· MUFA(Monounsaturatation fatty acid) : C16:1, C18:1

· PUFA(Polyunsaturatation fatty acid) : C18:2, C20:3, C20:4

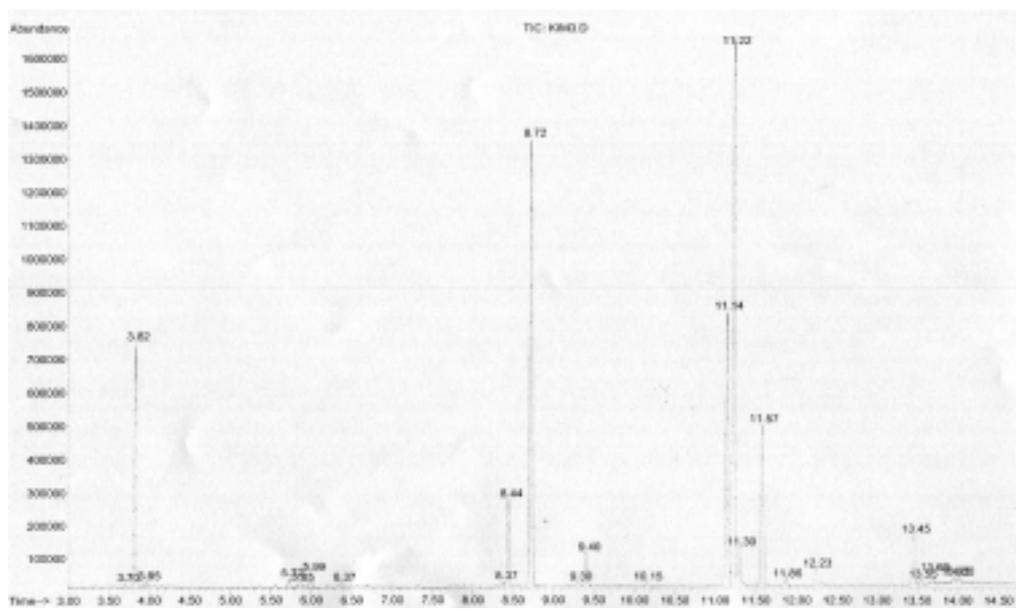


Fig 2. Fatty acid spectrum of control group in broiler chickens after 32 days

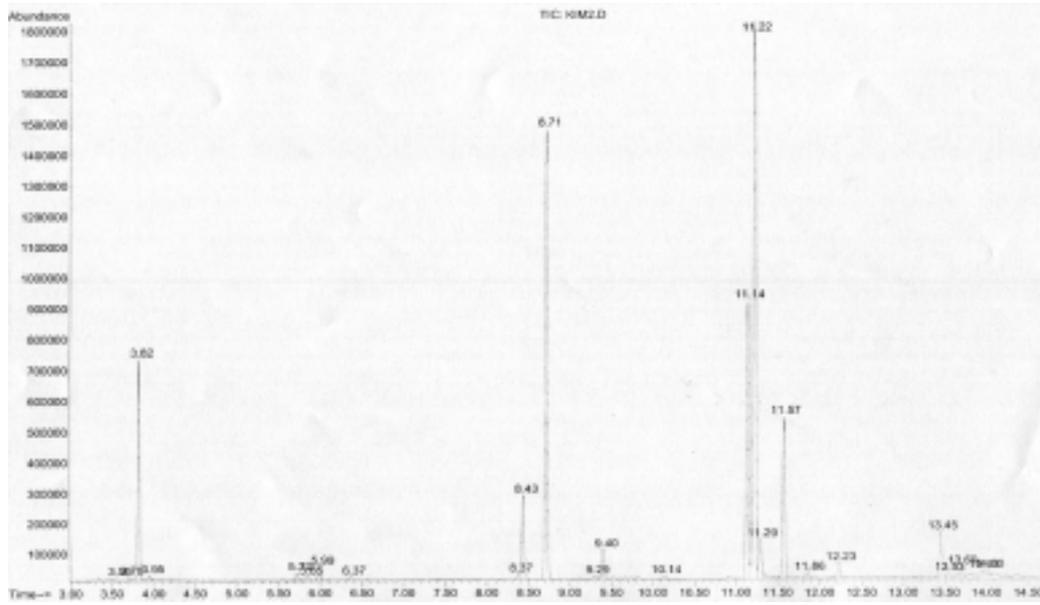


Fig 3. Fatty acid spectrum treated with 1% dietary supplementation group in broiler chickens after 32days

### 제 3 절 연구내용 및 결과

#### 1. *Campylobacter jejuni* 및 유해미생물에 대한 항균효과

##### 가. 당초 추진 계획 및 수행 내용

당초 추진 계획	수행 내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 첨가 농도별 항균성 시험</li> <li>○ 닭의 분변에서 <i>Campylobacter</i> 속군의 분리</li> <li>○ 분리군의 생물형 및 혈청 형별</li> <li>○ 시험 계군의 분변 중 <i>C. jejuni</i>의 분리</li> <li>○ 시험 감염 계군의 직장 내용물의 양성계수 측정</li> <li>○ 전자 현미경에 의한 장관 정착 확인</li> <li>○ 시험대조 계군의 분변 중 <i>C. jejuni</i> 분리빈도 조사</li> <li>○ 사료첨가제 투여계군의 분변중 <i>C. jejuni</i> 분리 빈도조사</li> <li>○ 시험대조 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C. jejuni</i> 양성계수 측정</li> <li>○ 사료첨가제 투여 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C. jejuni</i> 양성계수 측정</li> <li>○ 사료첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견 관찰</li> <li>○ <i>Campylobacter</i> 분리주의 항생물질에 대한 감수성 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 첨가 농도별 항균성 시험</li> <li>○ 닭의 분변중 <i>Campylobacter</i> 속군의 분리</li> <li>○ 분리군의 생물형 및 혈청 형별</li> <li>○ 시험 계군의 분변 중 <i>C. jejuni</i>의 분리</li> <li>○ 시험 감염 계군의 직장 내용물의 양성계수 측정</li> <li>○ 전자 현미경에 의한 장관 정착 확인</li> <li>○ 시험대조 계군의 분변 중 <i>C. jejuni</i> 분리빈도 조사</li> <li>○ 사료첨가제 투여계군의 분변 중 <i>C. jejuni</i> 분리 빈도조사</li> <li>○ 시험대조 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C. jejuni</i> 양성 계수 측정</li> <li>○ 사료첨가제 투여 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C. jejuni</i> 양성계수 측정</li> <li>○ 사료첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견 관찰</li> <li>○ <i>Campylobacter</i> 분리주의 항생물질에 대한 감수성 시험</li> </ul>

## 나. 연구 수행 내용

### 1) 연구목표

항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 *Campylobacter jejuni* 및 유해미생물에 대한 항균효과를 실험하고자 한다.

#### 1-1) 공시 균주

항균 시험에 사용한 균주는 국립보건 환경 연구원에서 분양 받은 *C. jejuni* ATCC#3356 및 *coli* ATCC#2758, 수의과학 검역원에서 분양 받은 *S. enteritidis* ATCC#13076, *S. pullorum* ATCC#9120, 경상대 낙농학과에서 분양 받은 *L. acidophilus* LACH5, 국내 분리균 *E. coli* O157:H7의 6 주를 사용하였다.

*Campylobacter Spp.*은 소의 혈액을 5% 첨가한 100ml의 Brucella broth에 10ml의 VTP brucella-FBP broth(VTP: vancomycin 0.002%, trimethoprim lactate 0.001% 및 polymixin B 5,000 IU/L complex, Sodium pyrubate 0.025% complex)에 접종하고, gas pack(Gibfco)을 이용하여 CO<sub>2</sub> 10%, O<sub>2</sub> 5% 분압에서 42°C에서 48시간 배양하였다. *Salmonella Spp.*과 대장균은 10ml의 tryptic soy broth(TSB, Gibfco)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였으며, Lactobacillus 균은 Deman, Rogosa, Sharpe(MRS, Difco) 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 각 균의 배양액을 3,000g에서 10분간 원심 침전하여 0.1M phosphate buffer(PBS, pH7.0)로 2회 원심 세척한 후 균수를 MacFarland 표준 탁도 0.5로 맞추어 사용하였다.

#### 1-2) 최소 발육 억제 농도 측정

항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제 (MCF) 20g을 100ml 증류수에 가하고 30분간 중탕하여 얻은 여액을 4°C에 보관하면서 사용하였다. 공시 균주에 대한 MCF의 최소 발육 억제 농도(Minimal inhibitory concentration; MIC)는 National Committee Clinical Laboratory Standard(NCCLS, 1997) 기준에 따라 한천 평판 희석법으로 측정하였다. 즉, MCF용액을 PBS로 2배 계단 희석하여 농도별로 함유하는 Muller Hilton Medium(MHM, Difco)에, *Campylobacter Spp.*을 소의 혈액 10%와 MCF 희석액을 각 농도로 첨가한 MHM에, *L. acidophilus* 균은 각 농도의 KGS를 첨가한 MRS 배지에 희석한 균액을 Multiple inoculator로 접종하였다.

*Campylobacter Spp.*은 gas pack을 사용하여 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 분압으로 42°C에서, 그 외의 균은 37°C 배양기에서 24~48시간 배양하여 가장 낮은 온도의 MCF를 함유한 배지에서 균의 발육이 억제된 농도를 MIC로 나타내었다.

2) 닭의 분변에서 *C. jejuni*의 분리동정

2-1) 세균분리: 2003. 8월부터 2004. 4월 사이 재래닭의 직장 분변을 채취하여 균 분리 재료로 하였다. 멸균한 면봉으로 직장 내의 분변을 채취하여 5% 소의 혈액을 첨가한 VTP brucella-FBP broth 10ml에 넣어 실험실로 옮겨 단시간에 균 분리를 실시하였다.

균 분리 방법은 재료 채취시에 사용한 증균배지를 42°C에서 18~24시간 증균 배양 한 후 배양액 0.03ml를 취하여 Campy-BAP agar(Gibco)에 도말 접종하여 42°C에서 48~72시간 배양하였다. 배양 조건은 gas pack을 이용하여 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 및 85% N<sub>2</sub>의 미호기 상태에서 배양하였다.

2-2) *Campylobacter Spp.*의 동정 시험: 순수 분리한 세균의 동정은 Holdeman 등의 방법에 따라 *Campylobacter* 특유의 형태와 운동성, catalase 생성, oxidase 생성, 43°C 및 25°C에서의 발육성, nalidixic acid(30µg disc)에 대한 감수성, cephalothin(30µg disc)에 대한 저항성, H<sub>2</sub>S 생성, nitrate 환원, 1% glycine 및 3.5% NaCl 첨가 배지에서 발육성 등에 관한 실험을 실시하였다.

2-3) Biotyping: *Campylobacter*로 동정한 균의 biotype을 Lior의 방법에 준하여 rapid H<sub>2</sub>S 시험, hipurate 및 DNA 가수분해 시험을 실시하여 그 결과로써 분류하였다 (Table 1).

**Table 1. Biotyping scheme for thermophilic *Campylobacter***

Test	C. jejuni				C. coli		C. laridis	
	I	II	III	IV	I	II	I	II
Hipurate hydrolysis	+	+	+	+	-	-	-	-
Rapid H <sub>2</sub> S production	-	-	+	+	-	-	+	+
DNA hydrolysis	-	+	-	+	-	+	-	+

2-4) Serotyping: 분리균의 혈청형별 분류는 Lior 등의 방법에 따라 평판 응집 반응 결과에 따라 분류하였다. 표준 면역 혈청은 Gifco에서 구입하여 사용하였으며, 항원은 각 *Campylobacter*의 단일 집락을 Campy-BAP에 접종하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양한 것을 집균하여 DNase를 0.5% 첨가한 0.01M phosphate buffer에 고농도로 부유시킨 균액을 항원으로 사용하였다.

분리균의 항원형 검사는 면역 혈청 5종을 혼합한 다가 혈청으로 먼저 screening test 를 한 다음 다가 혈청과 응집반응을 일으킨 항원에 대하여 50 $\mu$ l의 항원과 1:6으로 희석한 단가 혈청을 혼합하여 30~60초 내에 응집 반응이 일어나면 I 혈청형으로 판정하였다. 단가 혈청에 교차 면역 반응을 일으킨 항원에 대해서는 흡착 면역 혈청을 사용하여 같은 방법으로 최종형별하였다.

3) 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제에 의한 *Campylobacter jejuni*의 장관 정착 억제 효과

### 3-1) 실험동물

실험동물은 유추 각 50수를 사용하여 2주령에 실험에 사용 하였다. 실험구는 *C. jejuni* 분리 시험에서 음성을 나타내는 개체를 선발하여 시험구와 대조구로 나누어 5수씩 케이지 사육하였다. 시험구는 시판 육계 전기 사료(Dodam Tec.)에 MCF를 2% 함유되게 첨가하였고, 대조구는 그대로 사용하였다.

### 3-2) *C. jejuni* 감염시험

*C. jejuni*(ATCC) 균주를 소혈액 5%를 첨가한 VTP-brucella-FBP broth에 접종하여 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>의 미호기 조건으로 42℃에서 24시간 배양하였다. 배양 균액을 2,000rpm에서 15분간 원심 침전하고 PBS(pH 7.2)로 10배 계단 희석하여 2.3×10<sup>8</sup> CFU로 조정된 다음, 경구 주입관(Sonde)을 사용하여 0.5ml 경구접종 하였다.

### 3-3) 증상 및 체중 측정

모든 시험 동물은 *C. jejuni* 접종 후 1, 7, 14 및 21일에 설사 및 체 증상의 발생 상태를 조사하고, 부검 전에 개체별 체중을 측정하여 5수의 평균치를 나타내었다.

### 3-4) 감염 계균의 분변에서 *C. jejuni*의 분리(양성 계수의 측정)

균 접종 계균의 감염 및 장관 정착 상태를 조사하기 위하여 균 접종중 1일전,접종 후 7, 14 및 21일에 직장 분변을 채취하고, 도살하여 공장을 무균적으로 채취하였다. 분변 재료는 VTP-brucella-FBP broth에 접종하여 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>의 미호기 조건으로 42℃에서 24시간 증균 배양하였다. 증균 배양액 0.03ml을 Campy-BAP에 도말하여 미호기 조건으로 48~72시간 배양하여 감염 유무를 판정하였다.

### 3-5) *C. jejuni* 접종균의 장관 정착에 대한 주사 전자 현미경적 관찰

*C. jejuni* 균의 장관 정착 상태를 확인하기 위하여 균 접종전 1일 접종후7, 14 및 21일에 공장을 적출하여 냉각된 PBS로 가볍게 세척한 다음 2% glutaraldehyde(Sorensen, pH 7.4)에 침적하여 4℃에서 고정하였다. 다음 0.1M sodium

phosphate buffer(pH 7.2)로 1시간 간격으로 3회 수세하고, 70, 80, 90, 95% absolute ethanol에서 탈수과정을 거쳐 임계 건조기에서 건조시켰다. 건조된 조직편을 양면 테이프를 이용하여 블록에 옮기고 ion sputtering coater 내에서 순금으로 100Å 두께로 표면 처리하여 주사 전자 현미경(JSM 6400, oxford)로 관찰하였다.

#### 4) 한방 사료 첨가제의 야외 적용 시험

야외 적용 시험은 2005. 1월부터 2005.6월 까지 경기도 용인소재 양계장에서 실시 하였다.

공시동물은 부화 4~5일령의 육계(Acre broiler) 로서 한방사료 첨가제(Oriental herbal medicine feed additives : OHMFA) 첨가군(250수) 대조군(250수)으로 나누어 사육하면서 2주간격으로 각 20마리에서 가검 재료를 채취하였다.

사료는 육계전기 (우성양계사료)를 사용하였으며, 사료와 물은 자유 급식되게 하였다. OHMFA의 조성은, 홍화 ~70%, 삼백초 ~30%, 기타 ~(W/W)를 혼합한 것으로, 육계 전기사료에 1.0%수준으로 첨가하였다.

#### 5)시료 채취

사료급여 1주후부터 2주 간격으로 5회에 걸쳐 대조구 및 한방사료 첨가군 각 20마리에서 분변, 비장, 및 간으로부터 시료를 채취하였다. 분변재료는 직장분변을 멸균된 면봉을 이용하여 채취하였으며. 비장 및 간의 시료는 1회용 poly glove를 사용하여 무균적으로 채취한다음 약 1g의 사료를 마쇄한 후 각각의 시료를 소의 혈액을 5%로 첨가한 VTP brucella FBP broth (VTP: vancomycin 0.002%, trimethoprine lactate 0.001% 및 polymixin 5.000IU/L complex ; FBP: ferrous sulfate) 각 10ml에 접종하였다.

#### 6) *Campylobacter Spp.*의 분리 동정

##### 6-1) *Campylobacter Spp.*의 배양

직장분변, 비장, 및 간 시료를 5% 소혈액을 첨가한 VTP Brucella-FBP broth 10ml에 접종한 것을 실험실로 옮겨 단시간에 균분리를 실시하였다.

균분리 방법은 시료채취시 사용한 증균배지를 Campy pack 2(BBL, USA)와 혐기성 jar(Ditco, USA)를 이용하여 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 및 85% N<sub>2</sub>의 미호기 상태에서 42°C에서 18~24시간 증균배양하였다. 증균배양액 0.03ml를 취하여 agar에 접종하고 증균배양과 동일한 미호기 조건으로 42°C에서 48~72시간 배양한 다음 각각의 평판배지에서 *Campylobacter Spp.*으로 의심되는 집락 3개씩을 선발하였다.

## 6-2) *Campylobacter Spp.*의 동정시험

분리한 세균의 동정은 Modiros와 Hotman의 MFLP-46 Isolation of thermophilic *Campylobacter*의 방법에 따라 campy BAP agar에서 작은 (폭 0.2~0.8 $\mu$ m) 집락을 선발하여 G(-)로서 만곡또는 S자형의 corkscrew-like motility 나타내는 균을 선발하였다.

선발된 세균은 catalase 생성, oxidase 생성, 43 $^{\circ}$ C 및 25 $^{\circ}$ C에서의 발육성, nalidixic acid (30 $\mu$ g, disc)에 대한 감수성, cephalothin (30 $\mu$ g, disc)에 대한 저항성, H<sub>2</sub>S 생성, nitrate 환원, 1% glycine 및 3.5% NaCl 첨가배지에서 발육성등에 관한 생화학적 성상 검사를 다음과 같이 실시하였다.

①Catalase test: 배지에서 배양된 집락을 백금이로 Slide glass에 1 loopful 되게 취하여 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 한방울을 가하여 기포가 생성되는 것을 양성으로 판정하였다.

②Oxidase test: 배지에서 배양된 집락을 Oxidase strip (BBL, USA)에 도말하여 5~10초 내에 균피가 짙은 자색을 나타낸 것을 양성으로 판정하였다.

③Nalidixic acid 감수성/ cephalothin 저항성 시험: Muller-Hinton 배지에 분리균을 희석 접종하고 nalidixic acid 및 cephalothin disc를 평판배지 접촉시킨 다음 미호기 조건에서 42 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 발육저지대가 13~14mm 이상인 것을 저항성으로 판정하였다.

④Nitrate 환원, H<sub>2</sub>S 생성, 1% glycine 과 3.5% NaCl 첨가 배지에서 배양성 및 glucose 분해 시험: Brucella broth에 배양된 균액을 pasteur pipette를 이용하여 Cystein, glycine, NaCl 및 glucose를 각각 첨가한 5개의 Brucella semisolid media(0.15% agar, 0.02% neutral red를 첨가한 Brucella broth)의 표면(10mm 층)에 2방울을 접종하고 미호기 조건으로 37 $^{\circ}$ C에 3~5일 배양하였으며, 배양 기간 중 screw cap은 느슨하게 조인상태로 배양하였다.

각 실험의 결과 판정은, nitrate 환원 시험에서는 semisolid nitrate 시험관에 (0.5~1.0)ml의 nitrate reagent를 첨가하여 1분후 선흥색을 띤 것과 색깔이 없는 시험관에서는 Zinc dust를 소량가하여 색깔이 나타내지 않을 때 양성으로 판정하였으며, Zinc dust를 가하여 붉은색을 띤 것을 음성으로 판정하였다.

H<sub>2</sub>S 생성시험은 Brucella cystein medium에 lead acetate strip (2%)을 메달아 검은색을 나타낸 것을 양성으로 판정하였다. 1% glycine 및 3.5% NaCl첨가 배지에서의 발육성은 배지의 상층부에 균이 증식한 것을 양성으로 판정하였다. glucose 발효성은 Brucella semisolid glucose medium에서 증식한 것을 양성으로 판정하였으며, 25 $^{\circ}$ C에서 발육한 균은 폐기하였다.

6-3) 분리균의 biotyping: *Campylobacter*로 동정한 균의 biotyping은 Lior 등의 방법에 준하여 rapid H<sub>2</sub>S 생성시험, Hipurate 및 DNA 가수분해 시험의 그 결과에 따라 분류하였다 (1차년도 방법 Table 1).

①Rapid H<sub>2</sub>S 생성시험: Brucella BAP에 24시간 배양한 균을 백금이로 5mm loopful 되게 취하여 rapid H<sub>2</sub>S test medium의 상 1/3 부위에 가볍게 부유시켜 37°C 항온수조에서 2시간 배양한 후 30~45분 사이에 세균과 주위가 흑변하는 것을 양성으로 판정하였다.

②Hipurate hydrolysis: Muller-Hinton blood agar에서 24시간 배양한 균과 1loopful을 취하여 0.5ml sodium hipurate 용액을 분주한 작은 Screw cap 시험관에 접종하여 37°C에서 3시간 호기성 조건에서 배양하고 0.2ml의 ninhydrind 용액을 가하여 5분내에 짙은 자색을 띠는 것을 양성으로 판정하였다.

③DNA 가수분해 시험: Blood agar에서 24~48시간 배양한 균을 백금이로 3mm loopful되게 취하여 Toluidine blue-DNA agar(USA)의 5mm 직경에 누르면서 원형으로 접종하여 42°C 미호기 조건에서 24~48시간 배양한 후 접종부가 무색 또는 옅은 분홍색을 나타내는 것을 양성으로 판정하였다.

6-4) 분리균의 serotyping: 분리균의 혈청학적 분류는 Lior 등의 방법에 따라 36종 표준혈청을 사용하여 평판응집 반응의 결과에 따라 분류하였다. 표준 면역혈청은 Gifco에서 구입하여 사용하였으며, 항원은 각 *Campylobacter*의 단일 집락을 Campy-BAP에 접종하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양한 것을 집균하여 DNase를 0.5% 첨가한 0.01M phosphate buffer에 고농도로 부유시킨 균액을 항원으로 사용하였다. 분리균의 항원형 검사는 면역혈청 5종을 혼합한 다가 혈청으로 먼저 screening test를 한 다음 다가 혈청과 응집반응을 일으킨 항원에 대하여 50 $\mu$ l의 항원과 1:6으로 희석한 단가 혈청을 혼합하여 30~60초 내에 응집반응이 일어나면 I 혈청형으로 판정하였다. 단가 혈청에 교차 면역반응을 일으킨 항원에 대해서는 흡착면역 혈청을 사용하여 같은 방법으로 최종형별하였다.

7)OHMFA 투여군과 시험 대조군의 분변, 간 및 비장에서 *Campylobacter* 양성계수 측정

입식 1주일 후부터 2주 간격으로 5회에 걸쳐 OHMFA첨가군과 대조군으로부터 각 20마리에서 직장분변, 간 및 비장재료를 채취하여 장기별 *Campylobacter* 양성계수를 측정하였다.

8)OHMFA 투여군과 대조군의 감염증 발생 및 병리 해부소견 관찰

OHMFA 및 시험대조군을 대상 입식 1주일부터 2주간격으로 5회에 걸쳐 각 실험군으로부터 20마리를 무작위 수거하여 임상증상 및 회맹장, 간, 비장 재료에서 병리 해부소견을 관찰하였다.

9)*Campylobacter* 분리주의 항생물질에 대한 감수성

항균성 물질에 대한 감수성시험 : 분리동정한 *C. jejuni*의 항균성물질에 대한 감수성 시험은 karmali등의 방법에 따라 한천 평판 희석법으로 실시하였다. 배지는 면양혈구 5%첨가한 Muller Hinton Agar 배지를 사용하였고, 항균성물질은 ampicillin(Ap), cephalothin(Cep), chloramphenicol(Cp), erythromycin(Em), gentamycin(Gm) kanamycin(Km), rifampin(re),

nalidixic acid (NA), streptomycin(Sm), tetracyclin(Tc)의 10종류를 사용하였다. 먼저 각종 항균물질을 Muller Hinton Agar 배지에 가하여 최종 농도 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 3.13, 1.15, 0.78, 0.39, 및 0.2 $\mu$ g/ml가 되는 한천 평판 배지를 만들었다. 다음 시험 균액을 10<sup>8</sup>CFU/ml 로 맞추어 multiple inoculator로써 MHA평판 배지상에 접종한 다음 37 $^{\circ}$ C 미호기 조건 (5%O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 및 85% N<sub>2</sub>의 혼합가스 )에서 24~48시간 배양하였다. MIC는 접종균의 발육여부로서 판정하였고, 판정기준은 통상의 방법에 따라 Cp, Tc 및 Sm은 12.5 $\mu$ g/ml, NA와 Cep는 30 $\mu$ g/ml ,그 외의 약제는 25 $\mu$ g/ml의 농도에 발육하는 것을 내성균으로 하였다.

다)결과

1)항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제에 의한 *Campylobacter jejuni*의 장관 정착 억제 효과의 *Campylobacter* 및 주요 중합 세균에 대한 항균효과

각종 병원성 세균에 대한항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 Carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제 (OHMFA) 의 발육 최소 억제 농도(MIC)를 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 *C. jejuni*는 1%에서 항균효과를 나타내었고, *C. coli*, *S. enteritidis*는 2% 농도에서는 항균효과를 나타내었다. *S. pullorum*, *E. coli* O157:H7, *L. acidophilus* 및 *Sta. aureus*는 2% 농도에서도 항균효과가 나타나지 않았다.

**Table 2. Minimum inhibitory concentration of OHMFA on *Campylobacter* and other competitive bacteria**

Microorganisms	MIC( %)				
	2.0	1.0	0.5	0.25	0.13
<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+
<i>C. coli</i>	-	+	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>	-	+	+	+	+
<i>S. pullorum</i>	+	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157	+	+	+	+	+
<i>Sta. aureus</i>	+	+	+	+	+

+; occurrence of colony      -; no occurrence of colony

2) 닭의 분변에서 Thermophilic *Campylobacter Spp.*의 분리

2-1) Thermophilic *Campylobacter* 분리율: 닭의 분변재료에서 thermophilic *Campylobacter* 속균의 분리율은 125 예에서 39주가 분리되어 31.2%였다. 균종별 분리율은 *C. jejuni* 26 예로 20.8%, *C. coli* 12 예로 9.6%, *C. laridis*는 1 예로 0.8% 순이었다(Table 3.).

Table 3. Isolation of thermophilic campylobacter from chicken feces

No. of sample testes	Total No. of isolates(%)	No. of isolates(%)		
		C. jejuni	C. coli	C. laridis
125	39(31.2)	26(20.8)	12(9.6)	1(0.8)

2-2) 분리균의 biotype: 균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 26주는 biotype I이 12주(46.1%)로 가장 많았고, II는 9주(34.6%), IV는 5주(19.2%) 순이었다. *C. coli*는 분리균주 중에서 biotype I이 12주(58.3%), II는 5주로서 41.6%였다. *C. laridis*는 biotype I이 1주 분리되었다(Table 4).

Table 4. Biotypes of Campylobacter isolated from chicken

No. of isolates	C. jejuni				No. of isolates	C. coli		No. of isolates	C. laridis	
	I	II	III	IV		I	II		I	II
26	12 (46.1)	9 (34.6)	0	5 (19.2)	12	7 (58.3)	5 (41.6)	1	1	0

( ) : %

2-3) 분리균의 serotype: 분리균의 serotype은 Lior 등의 혈청학적 분류 방법에 따라 36종의 표준 항혈청으로 조사하였다. 분리한 *C. jejuni* 20 주에 대하여 serotyping을 실시한 결과 17주가 형별 가능하여 10 종류의 혈청형으로 분류하였다. 10 종류의 혈청형 간에 형별 분포는 뚜렷한 차이는 없었으나 이들 중 혈청형 36, 17, 4, 5, 9, 26 형이 많았다(Table 5).

Table 5. Serotype of C. jejuni isolated from chickens

serotypes	36	17	4	5	9	26	27	18	22	untypabl	total
No. of serotypes	3	3	2	2	2	2	1	1	1	3	20

3)항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제에 의한 *Campylobacter jejuni*의 장관 정착 억제 효과의 *Campylobacter jejuni* 정착 억제 효과

3-1) 감염 계군의 분변에서 *C. jejuni*의 분리

항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제 (OFA) 급여에 의한 *C. jejuni*의 장관 정착 억제 효과를 조사하기 위하여  $2.3 \times 10^8$  cell/ml의 균액 0.5ml을 접종하고 접종전1일, 7, 14 및 21일에 직장 분변을 취하여 *C. jejuni*의 분리율을 조사한 성적은 Table 6.와 같다.

**Table 6. Isolation of organism from feces of chickens infected with *C. jejuni***

Treatment groups	During of times after inoculation	No. of positive/No of tested
control fed	1 day	5/5
	7 days	4/5
	14 days	4/5
	21 days	4/5
1%MCF added	1 day	5/5
	7 days	3/5
	14 days	2/5
	21 days	1/5

접종전 1일경에는 대조군 및 1% MCF 첨가 사료 급여군(시험군) 모두 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 대조군에서는 1주일 경과 후부터 3주까지 5마리의 실험군 중 4마리에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 그러나 1% MCF 급여군에서는 1주 후 5마리의 실험군 중에서 3마리, 2주일 후 2마리, 3주 후에는 1마리에서만 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다.

4) 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제의 thermophilic *Campylobacter Spp.*에 대한 방제효과.

입식후 1주부터 2주간격으로 5회에 걸쳐 OHMFA 첨가군과 대조군 각 20두의 직장 분변, 간 및 비장재료로부터 시간의 결과에 따른 *Campylobacter Spp.*의 분리빈도는 Table 7과 8 같다.

직장 분변재료에서 대조군은 입식후 20두 중 5 (25%)에서 thermophilic *Campylobacter* 가 분리되었으며 그 후 분리율이 점차 증가하였으며 7주 후에서 20

두 중 16(80%)에서 균이 분리 되었다.

직장 분변 재료에서 OHMFA 첨가 균의 경우 입식 일주후 20두중 5 두(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으나 그 후 분리율이 다소 감소하여 7주 후에는 20두중 3(15%)에서 분리되어 OHMFA첨가 사료의 thermophilic *Campylobacter*의 방제효과가 입증되었다.

간 및 비장 재료에서 대조구에서는 80두중 각 11(13.7%)두 및 8(10%)두에서 균이 분리되었으나 OHMFA 첨가 균에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)두에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 종대되어 있었다.

**Table 7. Prevalence of thermophilic Campylobacter in feces, liver and spleen sample of broiler chickens with oriental herbal medicine feed additives during 2 weeks interval.**

Week interval	Group	No. of chickens examined	No. of sample Positive (%)		
			Liver	Spleen	Rectal swabs
first week	Control	20	2(10)	2(10)	5(25)
	Treated	20	1(5)	1(5)	5(25)
Third week	Control	20	2(10)	1(5)	8(40)
	Treated	20	1(5)	1(5)	4(20)
Fifth week	Control	20	3(15)	2(10)	10(50)
	Treated	20	.	.	3(15)
Seventh week	Control	20	4(20)	3(15)	16(80)
	Treated	20	.	.	3(15)
Total	Control	80	11(13.7)	8(10)	40(50)
	Treated	80	2(2.5)	2(2.5)	15(18.7)

**Table 8. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* in feces, of broiler chickens with oriental herbal medicine feed additives during 2 weeks interval**

Treatment groups	During of times	No. of positive/ No of tested
control fed	first week	5/20(25%)
	third week	8/20(40%)
	fifth week	10/20(50%)
	seventh week	16/20(80%)
1% OHMFA added	first week	5/20(25%)
	third week	4/20(20%)
	fifth week	3/20(15%)
	seventh week	3/20(15%)

5) Thermophilic *Campylobacter*의 분리율 : 160두의 broiler chicken의 직장분변에서 55주(34.4%)의 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며, 이들은 *C. jejuni* 가 43주(26.9%)로 가장 높은 분포를 보였으며, *C. coli* 12주(7.5%) 및 *C. laridis* 1주 순으로 분류되었다 (Table 9).

**Table 9. Isolation of thermophilic *Campylobacter* from chicken feces**

No. of sample testes	Total No. of isolate(%)	No. of isolates(%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. laridis</i>
160	54(34.3)	43(26.9)	12(7.5)	1(0.6)

6) 분리균의 biotype :균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 43주는 biotype I 이 26주(60.4%)로 가장 높았으며, II는13주(30.2%), IV 3주 (6.8%) 및 III 2주 (4.6%) 순 이었다. *C. coli* 1주는 biotype I 이 9주 대부분 이었으며 II도 2주 (16.6%) 분리되었 다. *C. laridis*는 1주가 분리되었으며 biotype I 으로 분류 되었다(Table10).

Table 10. Biotyep of Campylobacter isolated from chickens

C. jejuni					C. coli			C. laridis		
No. of isolates	I	II	III	IV	No. of isolates	I	II	No. of isolates	I	II
43 (100)	26 (60.4)	13 (30.2)	2 (4.6)	3 (6.9)	12(100)	10 (83.3)	2 (16.6)	1 (100)	1 (100)	.

7) 분리균의 serotype : 분리균의 serotype은 Lior등의 혈정학적 분류방법에 따라 36 종의 표준 항혈청으로 조사 하였으며, 결과는 표 10 및 11과 같다. *C. jejuni* 43주중 41주가 serogrouping이 가능하여 11종류의 serotype으로 분류하였다. serotype별 형별 분포는 뚜렷한 차이가 없었으나 이들중 type36(18.6%)과 17(13.9%)이 비교적 많았다. *C. coli*의 serotype은 12주중 10주가 serogrouping 가능하여 5종류의 serotype으로 분류되었으며 type31(33.3%)과 20(25%)이 많은 편이었다.

Table 11. Serotype of C. jejuni isolated from chickens

Serotype	4	5	9	10	17	18	22	26	27	30	36	Untypabal	Total
No.of serotype (%)	4 (9.3)	4 (9.3)	4 (9.3)	1 (2.3)	6 (13.6)	2 (4.6)	2 (4.6)	4 (9.3)	4 (9.3)	2 (4.6)	8 (18.3)	2(4.6)	43 (100)

Table 12. serotype of C.coli isolates from chickens

Serotype	8	20	20	25	31	Untypabal	Total
No. of serotype(%)	1 (8.3)	3 (25.0)	1 (8.3)	1 (8.3)	4 (33.3)	2 (16.6)	12 (100)

8) .사료 첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견  
 간 및 비장 재료에서 대조구에서는 80두 중 각 11(13.7%)두 및 8(10%)두에서 균이 분리되었으나 OHMFA 첨가 균에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)두에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 증대되어 있었다.

9) 항생제 감수성 시험

분리한 *Campylobacter* 55주에 대하여 항생물질에 대한 감수성시험을 실시한 결과는 표 13와 같다.

*C. jejuni*(43주) 및 *C. coli*(12주) 는 NA, Am, Gm, Cl 및 Cp에 대하여 90%이상의 균주가 높은 감수성을 보였으며, Km, Em, Ap 및 Tc에 대하여 50%이상의 균주가 감수성이었으나, Cep에 대해서는 분리균 모두 감수성 균이 없었다. *C. jejuni* 및 *C. coli* 는 항생물질에 대한 감수성 차이가 뚜렷하지 않았다.

**Table 13. Antimicrobial susceptibility of thermophilic Campylobacters isolated from chickens**

Drugs	concentration (µg/ml)	No. of susceptible strains	
		C.jejuni(%)	C.coli(%)
Nalidixic acid (NA)	30.0	42(97.6)	12(100)
Amikacin (Am)	25.0	42(97.6)	11(91.6)
Gentamacin(Gm)	25.0	41(95.3)	11(91.6)
Colistin(CI)	12.5	40(93.0)	11(91.6)
Chloramphenicol(Cp)	25.0	39(90.6)	11(91.6)
Kanamycin(Km)	25.0	36(83.7)	10(83.3)
Erythromycin(Em)	25.0	34(79.0)	8(66.6)
Ampicillin(Ap)	25.0	27(62.7)	7(58.3)
Tetracyclin(Tc)	12.5	25(58.1)	7(58.3)
Streptomycin(Sm)	12.5	23(53.4)	5(41.6)
Cephalotin(Cep)	25.0	0(0)	0(0)

No. of tested strains were 43g C.jejuni and 12 of C.coli

3-2)항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제에 의한 *Campylobacter jejuni*에 대한 주사 현미경 관찰

항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 *C. jejuni* 장관 정착에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 2주령의 재래닭에 *C. jejuni*를  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml 수준으로 경구 접종한 후 대조군에는 일반 사료를, 실험군에는 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 소장(공장)에서의 정착 상태를 주사 전자 현미경으로 관찰 한 바, 대조군에서는 감염 후 7, 14, 및 21일에 균이 소장 점막 표면 부위에 다수 부착하고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다(Fig.1). 그러나 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 군에서는 시간이 지남에 따라 *C. jejuni* 균이 거의 관찰되지 않았다 (Fig .2).

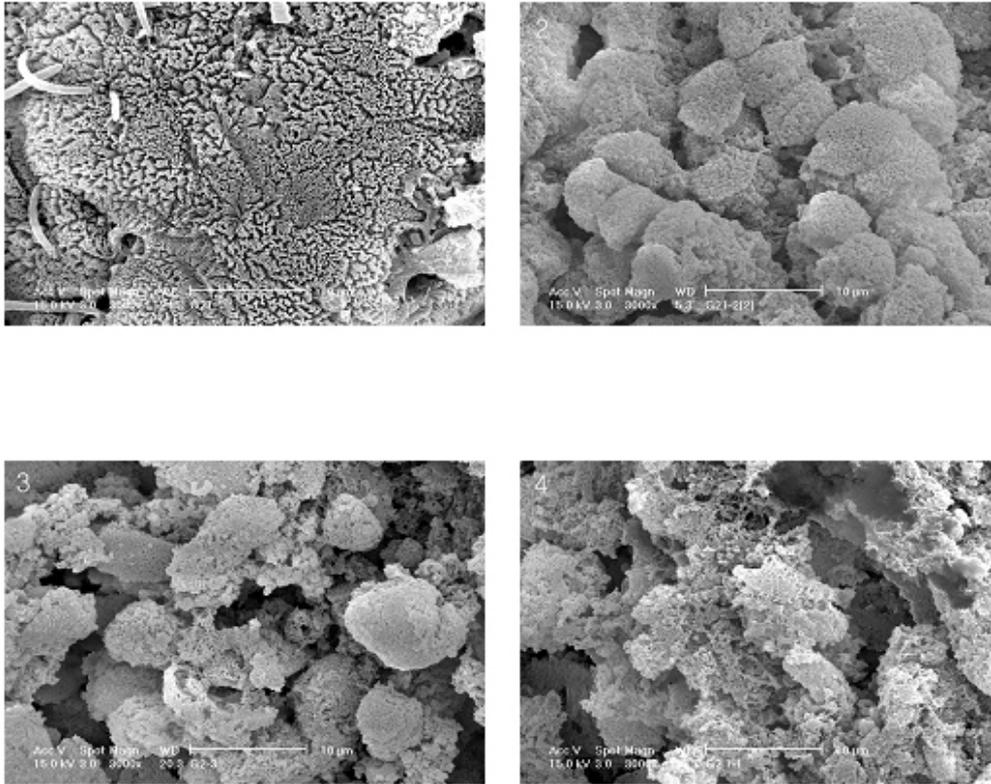


Fig 1. Scanning electron micrograph of jejunum on pre and postinfection with *C. jejuni* in the control group ; scanning electron micrograph of jejunum at 1 days preinfection (1)there were observed in villus epithelia at 7 days postinfection(2) there were observed many bacteria of the control chickens at 14, 20 days postinfection(3, and 4)

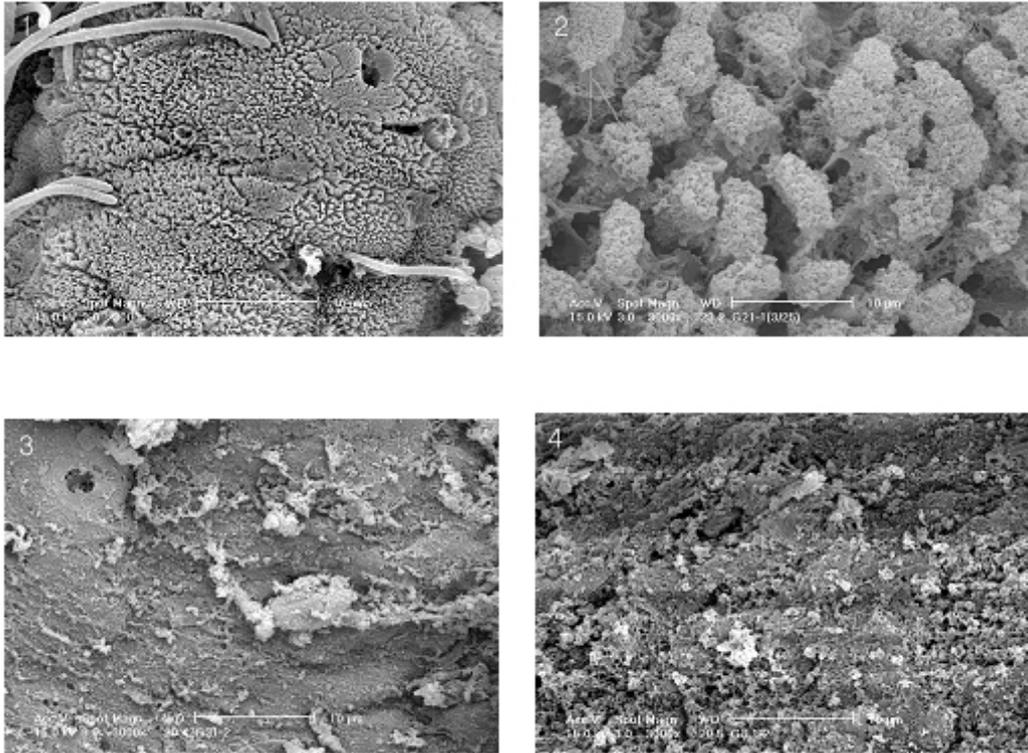
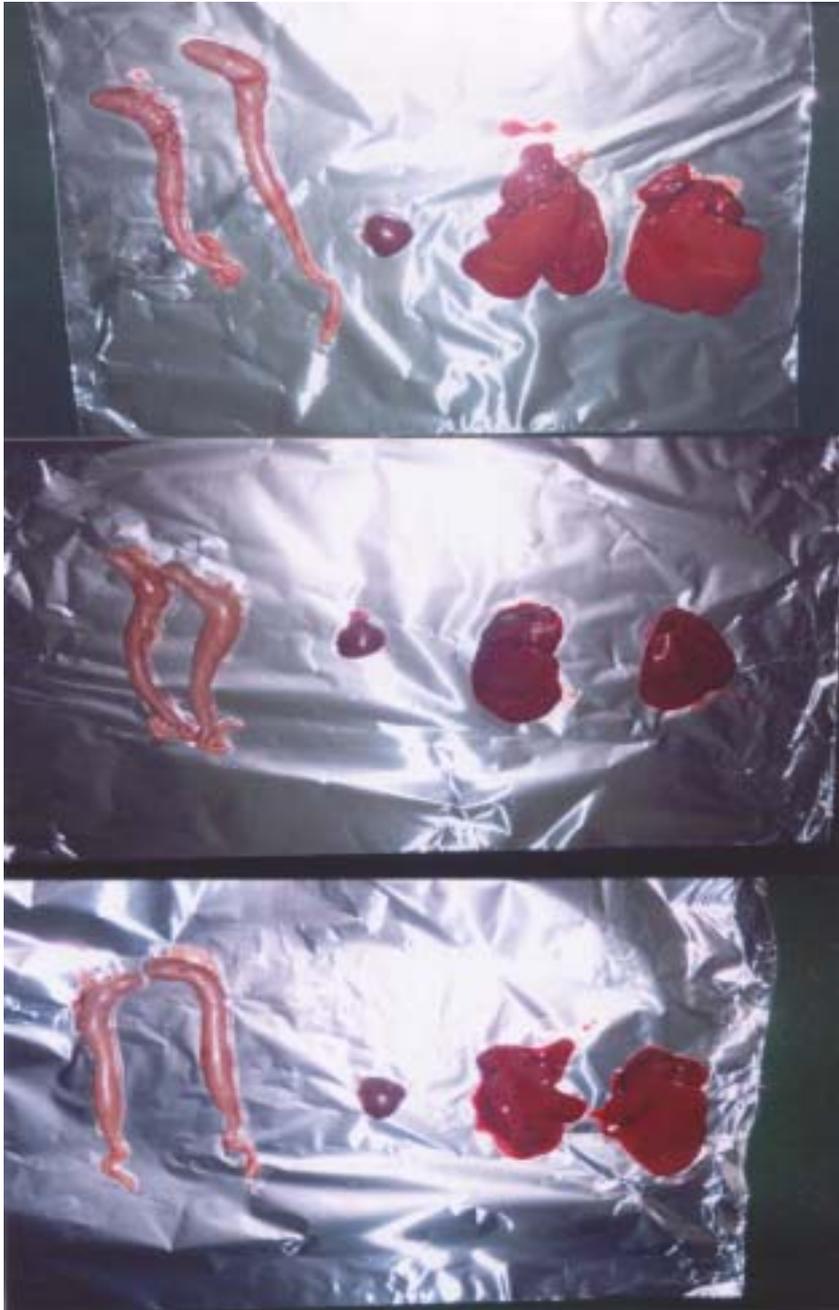


Fig 2. Scanning electron micrograph of jejunum on pre and postinfection with *C. jejuni* on Korean native chickens treated with dietary supplementation group ; scanning electron micrograph of jejunum at 1 days preinfection (1), and also there were observed in villus epithelia many bacteria at 7 days postinfection(2) there were not observed many bacteria at 14, 20 days postinfection(3, and 4)



Fig 3. (1) 입추 병아리의 사진  
(2) *C. jejuni* 감염 실험을 위한 특수 vinyl isolater (사육진)  
(3) *C. jejuni* 감염 실험모습



<Fig. 4 재래닭 장기채취 사진>

## 라. 고 찰

*Camphylobacter Spp.* Gram 음성의 만곡형 또는 나선형의 간균으로서 균체의 양극에 단일 편모를 가지고 있다. 근년 양계 사육형태가 대형화 됨에 따라 대량 밀집사육으로 인한 *Camphylobacter jejuni* 감염증이 증가되고, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및 오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다. 또한 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약중지로 재감염이 문제시 되며, 무분별한 오남용으로 인한 내성균의 출현증가 뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약제 잔류로 사람의 건강을 위협하고 있다.

*Camphylobacter jejuni*의 감염율은 4주령의 닭에서는 40%, 7주령의 닭에서는 90%이상으로 보고되어 있으며, 사람에게서는 위장염, 복막염 등의 감염증상이 있다. 경제적 손실로서는 미국에서는 약 0.6~1.06 billion \$로 집계되어있다.

*Camphylobacter jejuni*의 닭에서의 감소대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast, mannose 및 formic acid 또는 proponic acid등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며,

또 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나 역시 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.

*Camphylobacter jejuni*은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등과 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 준다. *Camphylobacter jejuni* 속균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다.

따라서 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Camphylobacter Spp.*에 대한 진단 방법의 개발과 예방대책에 대한 연구는 시급한 실정이다.

*Campylobacter Spp.*의 대부분은 가축 및 사람에서 감염증을 일으키는 인수공통 병원세균으로써 그 피해가 대단히 크며 근년 계육 및 계란을 원인 식품으로 하여 발생한 식중독 사례가 다수 보고됨으로서 닭에서 *Campylobacter Spp.*을 예방하는 것은 공중보건에서 매우 중요시되고 있다.

본 연구에서는 향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제의 *Campylobacter Spp.*의 방제를 위한 재래닭 생산기술을 개발할 목적으로 홍화, 삼백초 등의 한약재 추출물을 사용하여 *Campylobacter Spp.*을 비롯한 몇 가지 식중독균을 대상으로 MIC를 측정 한 결과 1%이상의 농도에서 *Campylobacter Spp.*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*는 증식이 억제되었다. *Salmonella Spp.*과 *Escherichia coli*는 2.0 % 이상에서 비로소 억제하며 각종 한약재 추출물의 향균력을 조사한 연구에서 감초는 *S. tythimurium*의 증식을 억제하였지만, 황금 및 구기가 추출물은 향균성이 없다고 보고하였고 신 등은 100 ppm의 감

초 첨가에서 *L. monocytogenes*의 증식이 억제되었다고 하였다. 안 등은 *L. monocytogenes*에 대하여 10-50 ppm의 감초가 증식 억제효과를 보였지만 *E. coli*에 대하여는 100 ppm에서도 억제되지 않았다고 하였다. 이상과 같은 성적으로 미루어 볼 때 감초에서 나타난 항균성은 본 시험 결과와 유사한 패턴을 나타내었다.

따라서 본 연구에서 사용한 첨가제의 항균성은 여러 약제의 조성 가운데 주로 홍화, 삼백초등 등의 작용에 기인된 것으로 추측된다.

한편 *S. enteritidis*를 broiler 유추에 경구 접종하여 첨가제에 의한 억제효과를 조사한 이전의 실험결과에서는 7일경에 대조구의 경우 반수 이상이 설사증세를 나타내었으나 첨가구에서는 거의 볼 수 없었고, 전 실험기간을 통하여 첨가구에서 체중이 유의적으로 증가 ( $p < 0.05$ )한 것은 한방 사료첨가제가 *Salmonella Spp.*의 증식을 억제시키고 사료효율을 증대시킨 것으로 추측된다. 또한 맹장내용물로부터 *Salmonella Spp.*의 수를 경시적으로 조사한 결과에서 첨가구의 경우 7일 이후부터 감소하기 시작하여 14일 후에는 거의 분리되지 않았고 대조구에서는 다수의 개체에서 많은 수의 균이 분리되었다. 맹장에서의 정착상태를 주사전자현미경으로 관찰한 소견에서도 대조구의 경우 7일경에 장 점막상피표면에 다수의 균과 염증반응이 관찰되었고, 감염14일 후에도 다수의 균이 관찰되었으나 첨가구에서는 균이 거의 보이지 않았으며 장 상피조직도 비교적 건강한 것으로 관찰되었다. 더욱이 한방사료첨가제 첨가구의 경우 감염 7일 이후부터 간과 비장에서 균의 검출빈도가 감소하기 시작하여 14일 이후에는 전혀 분리되지 않았는데 이는 첨가제 급여에 의한 항균성 내지는 개체의 저항성 증강에 따른 결과인 것으로 추측된다. 그리고 전 실험기간을 통하여 조사한 혈청 역가에서 첨가구의 경우 대조구에 비하여 대체적으로 낮게 나타난 것은 첨가제 급여에 의해서 감염된 균이 7일 이후부터 간과 비장에서 거의 제거되고 감염증이 회복됨으로서 균이 항체 생성에 큰 영향을 미치지 못한 것으로 해석된다.

본연구에서 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 1%되게 균질하게 섞은 후 재래닭 성장기간동안 57일간 급여하여 에 *Campylobacter jejuni* 및 대한 항균효과를 연구한 결과 각종 병원성 세균에 대한항균성분 (methyl-n-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제 (MCF)의 발육 최소 억제 농도(MIC)를 조사한 결과는 *C. jejuni*는 1%에서 항균효과를 나타내었고, *C. coli*, *S. enteritidis*는 2% 농도에서는 항균효과를 나타내었다. *S. pullorum*, *E. coli* O157:H7, *L. acidophilus* 및 *Sta. aureus*는 2% 농도에서도 항균효과가 나타나지 않았다. 닭의 분변재료에서 thermophilic *Campylobacter Spp.*의 분리율은 125 예에서 39주가 분리되어 31.2%였다. 균종별 분리율은 *C. jejuni* 26 예로 20.8%, *C. coli* 12 예로 9.6%, *C. laridis*는 1 예로 0.8% 순이었다 균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 26주는 biotype I이 12주(46.1%)로 가장 많았고, II는 9주(34.6%), IV는 5주(19.2%) 순이었다. *C. coli*는 분리균주 중에서 biotype I이 12주(58.3%), II는 5주로서

41.6%였다. *C. laridis*는 biotype I이 1주 분리되었다 분리군의 serotype은 Lior 등의 혈청학적 분류 방법에 따라 36종의 표준 항혈청으로 조사하였다. 분리한 *C. jejuni* 20주에 대하여 serotyping을 실시한 결과 17주가 형별 가능하여 10 종류의 혈청형으로 분류하였다. 10 종류의 혈청형 간에 형별 분포는 뚜렷한 차이는 없었으나 이들 중 혈청형 36, 17, 4, 5, 9, 26 형이 많았다 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제(OFA) 급여에 의한 *C. jejuni*의 장관 정착 억제 효과를 조사하기 위하여  $2.3 \times 10^8$  cell/ml의 균액 0.5ml을 접종하고 접종전 1일 접종후 7, 14 및 21일에 직장 분변을 취하여 *C. jejuni*의 분리율을 조사한 결과 접종전 1일경에는 대조군 및 1% MCF 첨가 사료 급여군(시험군) 모두 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 대조군에서는 1주일 경과 후부터 3주까지 5마리의 실험군 중 4마리에서 *C. jejuni*가 검출되었다. 그러나 1% MCF 급여군에서는 1주 후 5마리의 실험군 중에서 3마리, 2주일 후 2마리, 3주 후에는 1마리에서만 직장 분변에서 *C. jejuni*가 검출되었다.

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 *C. jejuni* 장관 정착에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 2주령의 재래닭에 *C. jejuni*를  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml 수준으로 경구 접종한 후 대조군에는 일반 사료를, 실험군에는 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 소장(공장)에서의 정착 상태를 주사 전자 현미경으로 관찰 한 바, 대조군에서는 감염 후 7, 14, 및 21일에 균이 소장 점막 표면 부위에 다수 부착하고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다. 그러나 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 군에서는 시간이 지남에 따라 *C. jejuni* 균이 거의 관찰되지 않았다. 이는 삼백초와 홍화의 첨가가 세균의 장관 정착을 억제하는 것으로 사료된다.

농장실험에서는 입식후 1주부터 2주간격으로 5회에 걸쳐 사료첨가제 첨가군과 대조구 각 20두의 직장 분변, 간 및 비장재료로부터 시간의 결과에 따른 *Campylobacter Spp.*의 분리빈도를 조사한 결과 직장 분변재료에서 대조구는 입식후 20두 중 5 (25%)에서 thermophilic *Campylobacter* 가 분리되었으며 그 후 분리율이 점차 증가하였으며 7주 후에서 20 두중 16(80%)에서 균이 분리 되었다.

직장 분변 재료에서 사료첨가 균의 경우 입식 일주일후 20두중 5 두(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으나 그 후 분리율이 다소 감소하여 7주 후에는 20두중 3(15%)에서 분리되어 사료첨가제 첨가 사료의 thermophilic *Campylobacter*의 방제효과가 입증되었다.

간 및 비장 재료에서 대조구에서는 80두중 각 11(13.7%)두 및 8(10%)두에서 균이 분리되었으나 사료첨가제 군에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)두에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 종대되어 있었다.

Thermophilic *Campylobacter*의 분리율은 160두의 broiler chicken의 직장분변에서

55주(34.4%)의 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며, 이들은 *C. jejuni* 가 43주(26.9%)로 가장 높은 분포를 보였으며, *C. coli* 12주(7.5%) 및 *C. laridis* 1주 순으로 분류되었다. 균종별 biotype의 분포는 분리한 *C. jejuni* 43주는 biotype I이 26주(60.4%)로 가장 높았으며, II는13주(30.2%), IV 3주 (6.8%) 및 III 2주 (4.6%) 순이었다. *C. coli* 1주는 biotype I이 9주 대부분 이었으며 II도 2주 (16.6%) 분리되었다. *C. laridis*는 1주가 분리되었으며 biotype I으로 분류 되었다. 분리균의 serotype은 Lior등의 혈정학적 분류방법에 따라 36종의 표준 항혈청으로 조사 하였다. *C. jejuni* 43주중 41주가 serogrouping이 가능하여 11종류의 serotype으로 분류하였다. Serotype 별 형별분포는 뚜렷한 차이가 없었으나 이들중 type36(18.6%)과 17(13.9%)이 비교적 많았다. *C. coli*의 serotype은 12주중 10주가 serogrouping 가능하여 5종류의 serotype으로 분류되었으며 type31(33.3%)과 20(25%)이 많은 편이었다. 분리한 *Campylobacter* 55주에 대하여 항생물질에 대한 감수성시험을 실시한 결과 *C. jejuni*(43주) 및 *C. coli* (12주) 는 NA, Am, Gm, Cl 및 Cp에 대하여 90%이상의 균주가 높은 감수성을 보였으며, Km, Em, Ap 및 Tc에 대하여 50%이상의 균주가 감수성 이었으나, Cep에 대해서는 분리균 모두 감수성 균이 없었다. *C. jejuni* 및 *C. coli* 는 항생물질에 대한 감수성 차이가 뚜렷하지 않았다.

이상의 결과를 통해서 볼 때 재래닭 에서 1.0 %의 한방사료첨가제 투여는 *Campylobacter Spp.* 및 기타 장내 병원 세균을 사멸시켜 배설 균량을 감소시키고 배균 기간을 단축시킴으로서 질병발생을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 증체 효과를 나타내어 재래닭의 출하기간을 약 단축시킬 수 있어 농가의 소득증대 및 안전성 축산물생산에 크게 기여할 것으로 사료된다.

## 마. 결 론

1. 향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제에 의한 *Campylobacter Spp.*에 대한 방제효과.

1)입식후 1주부터 2주간격으로 5회에 걸쳐 한방사료첨가제 첨가균과 대조구 각 20두의 직장 분변, 간 및 비장재료로부터 시간의 결과에 따른 *Campylobacter Spp.*의 분리 빈도는 .한방사료첨가제 첨가균이 대조군에 비하여 분리율이 낮았다.

2)직장 분변재료에서 대조구는 입식후 20두 중 5 (25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으며 그 후 분리율이 점차 증가하였으며 7주 후에서 20 두 중 16(80%)에서 균이 분리 되었다.

3)직장 분변 재료에서 한방사료첨가제 균의 경우 입식 일주후 20두중 5 두(25%)에서 thermophilic *Campylobacter*가 분리되었으나 그 후 분리율이 다소 감소하여 7주 후에는 20두중 3(15%)에서 분리되어 한방사료첨가제 의 thermophilic *Campylobacter* 의

방제효과가 입증되었다.

4) 간 및 비장 재료에서 대조군에서는 80두중 각 11(13.7%)두 및 8(10%)두에서 균이 분리되었으나 한방사료첨가제군에서는 간 및 비장재료 각 2(2.5%)두에서 균이 분리되었다. 균이 분리된 간은 염증 소견이 관찰되었으며 비장은 다소 종대되어 있었다.

5) 2주령의 재래닭에 *C. jejuni*를  $2.3 \times 10^8$  CFU/ml 수준으로 경구 접종한 후 대조군에는 일반 사료를, 실험군에는 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 소장(공장)에서의 정착 상태를 주사 전자 현미경으로 관찰 한 바, 대조군에서는 감염 후 7, 14, 및 21일에 균이 소장 점막 표면 부위에 다수 부착하고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다. 그러나 항균성분(methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 군에서는 시간이 지남에 따라 *C. jejuni* 균이 거의 관찰되지 않았다

2. 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등 이용한 실용재래닭 사양 및 이화학적 변화에 미치는 효과

가. 당초추진계획 및 수행 내용

당초추진계획	수행내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지방 조성</li> <li>• cholesterol 변화</li> <li>• 단백질 변화</li> <li>• 아미노산 조성</li> <li>• 불포화지방산의 변화</li> <li>• 일평균증체량</li> <li>• 폐사율</li> <li>• 육성율</li> <li>• 사료요구율</li> <li>• 항생제 잔류검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사료첨가제 조성 평가 실험</li> <li>• 사료첨가제 안전성 평가 : GOT,GPT ,bilirubin, glucose, LDH 등</li> <li>• 사양실험 : 폐사율, 사료요구율, 육성율 등</li> <li>• 이화학적 평가 : 수분, 회분, 조단백, 조지방, Ca, P, cholesterol 등</li> <li>• 안전성 평가</li> <li>• 아미노산 조성</li> <li>• 지방산 변화</li> <li>• 항생제 잔류검사</li> <li>• NMR에 의한 Pi 실험</li> <li>• Proteomics 기법에 의한 단백질 발현 조사</li> </ul>

나. 연구수행내용

1) 연구목표

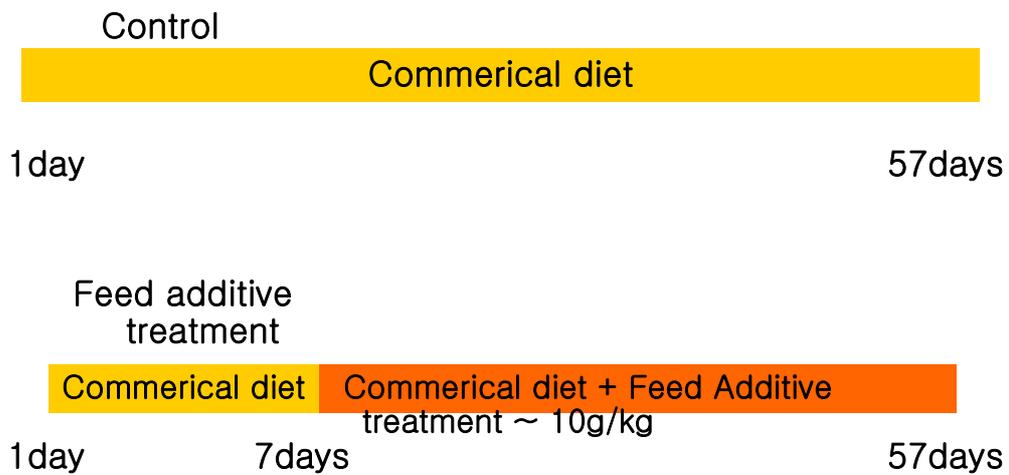
본 연구의 목표는 예비실험을 통하여 얻은 결과를 기초로 하여 삼백초의 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 성분 등) 과 홍화의 골격성장 및 콜레스테롤 조절기능이 있는 carthamin 등의 약리 효과에 의한 조성 비율을 조절하여 사료에 첨가한 후, 재래닭에 적용하여 1.사양실험 2.치사율 3.육성율 등 4.이화학적 검사 : amino acid, cholesterol, 지방산, 수분, 회분, 조단백, 총지방, 변화)를 조사하고, 얻은 성적과 더불어 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등 이용한 실용재래닭 생산기술을 개발하고자 한다.

2) 실험방법

(1) 실험동물

- ※ 재래닭 500 birds
- ※ 실험군 대조군 : 250수
- 1% 사료첨가제(삼백초, 홍화성분 등)투여군 : 250수

(2) 실험일정



(3)삼백초, 홍화성분 등 투여 조성비율

삼백초, 홍화성분 등이 포함된 사료 첨가제가 재래닭에 미치는 평가를 위하여 삼백초, 홍화성분 등 농도별로 다르게 첨가하여 다음과 같은 비율로 실험하였다.

(A군) 재래닭 250수: 대조군(일반사료)

(B군) 재래닭 250수: 삼백초(~30%), 홍화(~70%), 기타 (~%): **특허관계로 인하여 조성을 정확하게 기재할 수 없음**

■ 삼백초(*Saururi Herba Seu Rhizoma*) :~30% 비율

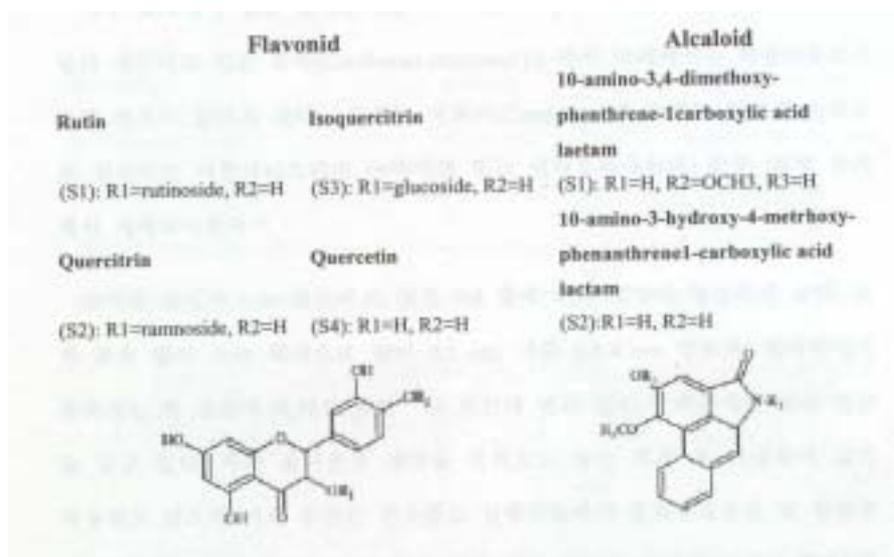
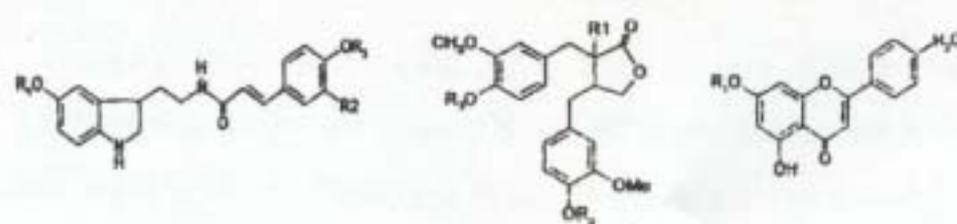


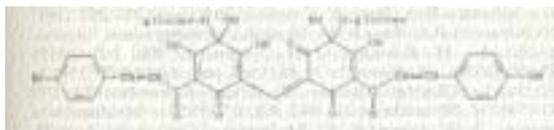
Fig 1. Chemical structures of six polyphenolic compounds isolated from *Saururi Herba Seu Rhizoma*

■ 홍화(*Carthami Flos*) : ~70% 비율

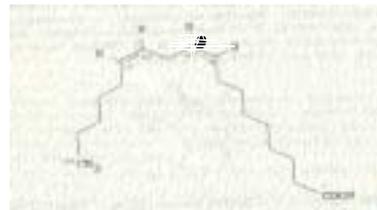
Serotonins	Lignans	Flavonoids
N-Feruloylserotonin	Matairesinol	Apigenin 7-o-glucoside
(S1): R1=H, R2=OCH3, R3=H	(L1): R1=H, R2=H, R3=H	(F1): R1=Glucose, R2=H,
N-(p-Coumaroyl)serotonin	2-Hydroxyarctigenin	Acacetin
(S2): R1=H, R2=H, R3=H	(L2): R1=OH, R2=CH3, R3=H	(F2): R1=H, R2=CH3,



- 주요 성분: Carthamin(C<sub>43</sub>H<sub>42</sub>O<sub>22</sub>)  
 Linoleic acid  
 (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(CH=CH(H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COO



Carthamin



Linoleic acid

Fig 2. Chemical structures of six polyphenolic compounds isolated from *Carthami Flos*

- 주요성분: Methyl-n-nonyl- ketone  
Decanoyl Acetaldehyde  
Capric Acid(CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>COOH)
- 주요 효과: 항균 작용, 지방합성 억제 등

■ 기타 : ~% 비율

- 주요효과: cholesterol 합성수지 항생작용, 면역력 증가

(4)한방사료 첨가제의 제조(일반적 제조공정만 기술)

- ① 원료(한약재)를 구입하여 각각의 재료를 정량 배합하여 분쇄 공장에서 분쇄한 후 보관한다.
- ② 원료와 효소를 반응기에 투입하여 온도 70℃에서 12시간 반응시킨다.
- ③ 분쇄된 성분을 교반기에서 부형제와 반죽한다.
- ④ 반죽된 교형분을 과립기에 넣어 과립화시킨다.
- ⑤ 과립으로 만든후 건조실에서 45℃~50℃로 건조후 시험에 사용한다.

(5) 측정항목

사양에 관한 부분	실용재래닭 육질 및 이화학적 부분	성장기간중 항생제잔류 및 단백질 발현에 대한 비교분석
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 일평균증체량</li> <li>• 폐사율</li> <li>• 육성율</li> <li>• 사료효율</li> </ul>	<p>※ 이화학적 검사에 대한 전반적인 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 수분, 회분, 조단백, 조지방, 콜레스테롤의 변화</li> <li>• 지방산의 조성(35일 후)</li> <li>• 아미노산의 조성</li> <li>• 관능검사</li> <li>• 계육pH, 계육색깔</li> <li>• NMR에 의한 Pi 실험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 성장기간동안의 경시별 근육 조직내 항생제잔류 비교분석</li> <li>• Proteomics 기법에 의한 단백질 발현 조사</li> </ul>

6) 일반성분 분석을 위한 실험

(1) 함유수분

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

전수분은 시료를 건조된 petri-dish(a)를 무게를 잰 후 시료를 넣어 다시 무게를 잰 후(b)에 drying oven(24hr, 105℃)에서 건조시킨 후 무게(c)를 측정하였다.

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

(2) 조지방

조지방 함량은 Folch 등(1957)의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 2g을 50ml test tube에 넣고 Folch I(chloroform : methanol = 2:1)용액을 20ml 넣고 Homogenizer(polytron)에서 14000rpm으로 30초간 균질화 한 다음 Folch I용액 15ml로 Homogenizer 균질봉을 세척하여 test tube cap을 한 다음 4℃냉장고에서 2시간동안 방치하면서 20분 간격으로 shaking 해준다. Test tube에 균질화 된 시료를 100ml mess cylinder에 whatman No.1 filter paper 용지를 이용해서 여과하였다. Mess cylinder 눈금을 읽고 여액의 25%에 해당하는 0.88% NaCl을 첨가하여 mess cylinder cap를 한 다음 격렬히 흔든 후 1시간 방치하였다. 이때 Folch II(chloroform : methanol : H<sub>2</sub>O = 3 : 47 : 48) 용액 10ml으로 mess cylinder 벽면을 세척한 후 눈금을 읽는다(a). 상층을 aspirator를 이용해서 제거하고 하층 10ml을 무게를 알고 있는 수기(b)를 drying oven(50℃)에 넣고 건조한 후 무게 (c)를 측정한다. 계산식은 다음과 같다.

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

(3) 조회분

조회분 함량은 회분 정량용 crucible을 105℃ drying oven에서 건조한 후 desicator에서 완전히 건조시킨 후 시료 1~3g을 건조된 crucible에 달아 넣고 시료가 든

crucible을 550℃ 회화로(Isotemp Muffle Furnace, Model No. 602025, Fisher Scientific USA)에서 2시간 동안 태웠다. 회화도가 200℃ 이하로 내려가면 시료를 태운 crucible을 꺼내어 desicator에 넣고 30분간 방냉한 다음 무게를 측정하여 함량을 구하였다.

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

## 7) 물리적 성질분석을 위한 실험

### (1) pH

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

### (2) Color

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

### (3) 지방산 분석을 위한 실험

지방산 조성은 Folch법(1957)을 변형하여 수행하였다. 세절육 10g을 250ml 삼각 flask에 넣고 혼합 solvent(chloroform : methanol= 2:1) 150ml를 첨가한 다음 homogenizer로 12,500rpm에서 3분간 균질화하여 원심분리관(500ml)에 filtering (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 aspirator를 이용하여 연결된 모세관으로 상등액을 버리고 하층(lipid layer)을 취하였다.

유기용매층인 하층은 250ml 원형 flask에 하층을 여과하되 이때  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 이용하여 남은 수분을 흡착 여과한 후 감압농축기(evaporator, England; 55℃, 25min)를 이용하여 지질을 추출하였다. 지질을 추출한 후 40℃ 이하에서 질소가스를 계속 주입하면서 농축하였다(유기용매 회수). 농축 lipid는 질소가스 주입 후 파라핀 필름으로 밀봉하고 Methylation(메틸유도체화)하기 전까지 냉동(-20℃ 이하)하여 보관하였다.

순수 분리된 0.5~1.0mg의 lipid를 test tube에 넣은 후  $\text{BF}_3$  2ml를 추가하여 뚜껑을 닫고 후 water bath(90℃)에 20분간 boiling(5분마다 흔들어 줌)한 후 실온에 냉각하

었다. test tube에 증류수 1ml와 Hexane 2ml을 넣어 shaking한 후 하층의 증류수를 제거하고 다시 증류수 2ml를 3회 반복하여 첨가한 후에 하층을 제거하고 난 후에 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 잔존하고 있는 수분을 완전히 제거하고, 상등액 2.5~3 $\mu$ l를 취하여 GC(HP 6890<sup>+</sup> GC)에 주입하여 지방산을 분리 정량 하였으며 이때 GC조건은 Table 1과 같다.

Table 1. GLC(Shimadzu GC - 14A) conditions for analysis of fatty acid

Item	Condition
Column	Allech AT - Silar capillary column 30m $\times$ 0.32mm $\times$ 0.25 $\mu$ l Initial temp.; 140 $^{\circ}$ C, Final temp.; 280 $^{\circ}$ C, Injector temp.: 240 $^{\circ}$ C Detector temp.; 250 $^{\circ}$ C, Programming rate : 2 $^{\circ}$ C/min.
Detector	Flame Ionization Detector
Carrier gas	He
flow rate	50ml/min
Split ratio	100 : 1

#### 8) 통계처리

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

#### 9) 이차원 전기영동의 시료 사용조건

혈청을 12시간 예비 배양한 후 100 $\mu$ l를 50ml의 LB broth에 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 220rpm으로 24시간 동안 진탕배양하였다. 세균의 배양액은 4 $^{\circ}$ C에서 6000rpm 15분동안 원심 침전시키고 침전된 균괴는 40mM tris-HCl buffer(pH 7.2)로 50ml 부여시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 6000rpm으로 10분간 3회 세척한 후 흡광도 1.0( $\lambda$ =610nm)수준으로 희석하였다. 희석된 세균액은 각각 8ml로 분주하고, 다시 원심침전시켜 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

#### 10) 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

이차원 전기영동을 위한 단백질 추출은 O' Farrell의 방법을 준용하였으며, 준비된 시료에 500 $\mu$ l의 lysis buffer(9M urea, 4%CHAPS, 40mM Tris-HCl)을 첨가하여 얼음에서 1시간 반응시킨 다음 13,000 $\times$ g에서 1시간 원심시켜 상층액을 회수하고, 회수된

상층액은 Bradford 법을 준용하여 단백질을 정량하였다.

## 11) 이차원 전기영동

### (1) First-dimension Isoelectric focusing(IEF)

IPGphor system을 이용하여 IEF를 수행하였다. Rehydration buffer(9M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-HCL, 65mM DTT, and 0.5% IPG buffer, bromophenol blue)에 정량한 시료의 단백질을 IPGphore strip holder 에 250 $\mu$ l 로딩한 후 13cm immobilized pH Grient (IPG) strip을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 cover fluid oil을 가하였다.

IEF 조건은 전류가 IPG strip 당 50 $\mu$ A가 넘지 않도록 하였으며, 20 $^{\circ}$ C의 온도조건에서 12시간 rehydration 후, 30V에서 2시간, 200V에서 1시간, 500V에서 1시간, 1000V에서 1시간, 2000V에서 2시간, 8000V에서 10시간 통전하여 최종 83760Vhr까지 실시하였다. IEF가 끝난 IPG strip은 2차원 SDS-PAGE를 수행하였다.

### (2) Second-dimension SDS-PAGE

IEF가 끝난 IPG strip은 1%(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer(1.5M tris-HCl, pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 15분간 반응시키고 다시 1.25%(w/v)의 iodoacetamide를 첨가한 equilibration buffer에 15분간 반응시킨 다음 IPG strip을 12.5% acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈공간은 phenol red를 첨가한 low melting agarose gel을 분주하였다. 10mA의 조건으로 agarose gel의 붉은색 dye가 strip을 완전히 빠져나가면 20mA로 변환시켜 bromophenol이 gel 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

### (3) 도은 염색

이차원 전기영동을 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위해 도은염색을 하였다. gel을 고정용액(50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 한시간 이상 처리한 후, 50% EtOH으로 20분간 3회 반복 세척한 다음 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O로 1분간 전처리 하였다. gel을 3차 증류수로 20초간 3회 세척한 다음 AgNO<sub>3</sub>와 37% HCOH로 30분간 처리하여 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 37% HCOH로 발색시키고, spot을 확인한 후 stop solution (50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.

### (4) Enhanced chemiluminescence(ECL)을 이용한 Immunoblotting

이차원 전기 영동을 한 gel에서 항원 spot을 검출하기 위하여 15초동안 MeOH에 전처리한 PVDF membrane에 60V에서 70분동안 전사시킨 후 5% skim milk를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루동안 blocking 하였다.

5% skim milk에 1:200으로 희석한 S. enteritidis 특이 다가 혈청을 가하여 2시간동안

진탕 배양하면서 반응시킨 후 Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (tween20)을 0.1% 첨가한 tris buffered saline으로 세척한 후 다시 5% skim milk에 1:2000으로 희석한 anti rabbit horse radish conjugated IgG를 가하여 1시간동안 진탕하여 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 항원을 검출하였다.

#### (5) 통계처리

도은 염색한 gel과 immunoblotting 결과는 scanning 한 후 전용이미지 분석프로그램인 Phoretix 2D program(Ver. 5.01)을 이용하여 재료를 분석하였다.

## 12) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOFMS) 시료준비

### (1) spot excising

Proetix 2D program을 통해 분석된 2-D gel을 분석한 후, 관심 있는 단백질의 identification을 위해 관련 spot을 피펫 tip을 이용하여 1mm<sup>2</sup> 크기로 잘라내었다.

### (2) 탈염색과정

잘라낸 spot은 도은 염색 상태이므로 30mM Potassium ferricyanide 와 100mM Sodium thiosulfate를 1:1로 혼합한 용액에 넣어 5분 동안 반응시켜 destaining 해 준다.

destaining 한 gel은 pure water를 이용하여 5분 동안 3-4회 세척해준다.

gel 내부의 수분을 제거 시켜주기 위해 acetonitrile을 넣어 15분 동안 반응시킨 후 gel이 하얀색으로 탈수상태가 된 것을 확인한 후 acetonitrile을 제거시켜주고 gel은 vacuum centrifuge를 이용하여 완전 dry한다.

### (3) In-gel Reduction and Alkylation

Dry된 gel에 10mM DTT가 함유된 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 넣어 30분간 반응시킨후 다시 55mM iodoacetamide가 함유된 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 넣어 암실에서 30분간 다시 반응시킨다. 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>를 이용하여 한번 더 washing 한 후 acetonitrile을 이용하여 gel을 탈수시킨다.

### (4) In-gel Digestion

Dry된 gel에 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>와 5mM CaCl<sub>2</sub>의 digestion buffer를 넣어 녹인 12.5ng/ul의 trypsin을 15 $\mu$ l를 넣어 45분동안 ice에서 정치시키고 흡수되지 않고 남은 용액은 모두 제거한 후 20 $\mu$ l의 trypsin이 포함되지 않은 digestion buffer를 넣어 37 $^{\circ}$ C

에서 16시간정도 digest시킨다.

(5) Extraction of Peptides

15 $\mu$ l의 pure water를 넣어 30분간 vortex 시킨 후 20 $\mu$ l의 acetonitrile을 넣어 다시 30분간 vortex 시킨 후 상층액만 수거, vacuum centrifuge를 이용하여 dry 시킨다.

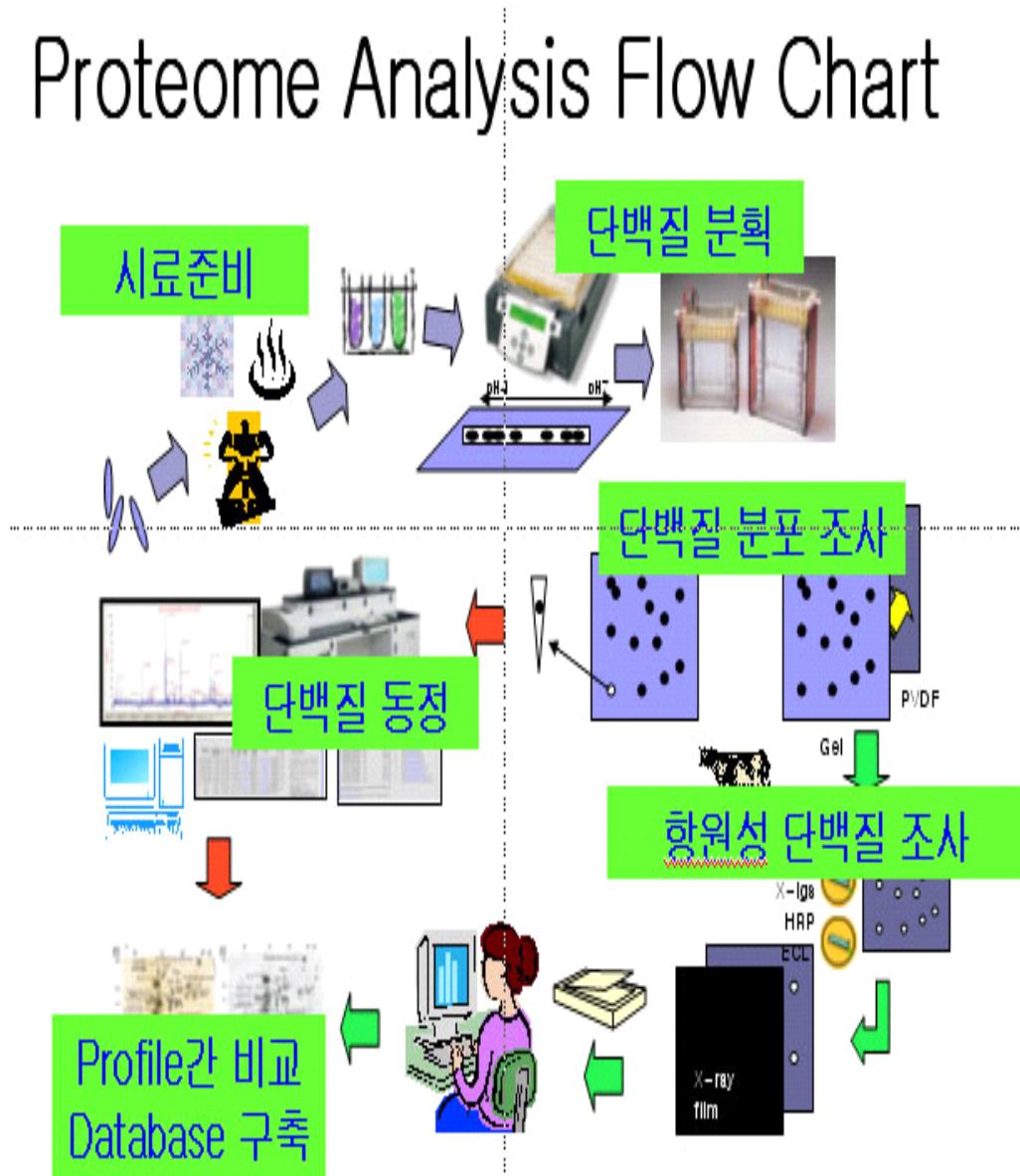
(6) On Target sample preparation (Dried-Droplet Method)

Matrix solution으로 40mg의 HCCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 50% acetonitrile과 0.3%TFA 1ml에 녹인 상층액에 적당량의 calibrant(Bradykinin, Angiotensin)를 섞어 dry된 sample과 mix 한 후 MALDI target에 2 $\mu$ l targetting 한 후 dry 시켜 MALDI-TOF를 시행한다.

(7) Data analysis

얻어진 peptide의 mass는 Protein Prospector에 있는 MS-Fit program을 이용하여 NCBInr database에 접속하여 protein을 동정하였다. 이때 mass tolerance 는 50ppm 이내로 하였고 최소 4개 이상의 peptide가 matching 되어진 protein만을 선택하였다.

# Proteome Analysis Flow Chart



다. 결과

1. 향균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 Carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 사양에 미치는 영향

향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 사양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 조사 하였던바 평균체중은 대조군이 1.63kg, 실험군이 1.68kg으로 향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 1% 포함된 사료첨가제군(이하,실험군)을 먹인군이 대조군에 비하여 0.05kg 이 증가 하였다.

육성율은 대조군이 92%, 실험군이 99%로 대조군에 비해 실험군이 7% 증가하였고, 폐사율은 대조군이 9%, 실험군 1%이었다. 사료요구율은 대조군은 1.75, 실험군은 1.62으로 실험군이 대조군에 비해 0.13 감소하는 경향을 나타내었다. (Table 2).

Table 2. Effect of dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on growth performance in Korea native chickens

Item	Control	Dietary supplementation group	Remark
Weight gain	1.63kg	1.68kg	+0.05kg
Growth rate	92%	99%	+7%
Mortality	9%	1%	-8%
Feed gain	1.75	1.62	-0.13

2. 향균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 Carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 이화학적변화에 미치는 영향

향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 에 미치는이화학적 평가를 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 조사하였던바 , 지방은 대조군이11.37±0.59 ,사료첨가제를먹인군(이하,실험군)이 11.37±0.59 cholesterol은 대조군이63.7±2.18 mg% ,실험군이63.7±2.18 mg% , 조단백은대조군은18.28 ±1.54 실험군은 20.24± 1.14, Ca은 대조군 13.5 ±0.12 mg/dℓ 실험군은16.5 ±0.19 mg/dℓ, P은대조군은7.2-8.5 mg/dℓ,실험군은 8.1-9.3 mg/dℓ군으로 실험군이 대조군에 비하여, 지방, cholesterol의 감소, 조단백, Ca 및P의 증가를 나타내었다 (Table 3).

**Table 3. Effect of dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on physio-chemical in Korea native chickens**

Item	Control	Dietary supplementation group	Remark
Crude fat	11.37±0.59	8.98±0.34	sample 100 g (%)
Cholesterol	63.7±2.18 mg%	59.9 ±1.32 mg%	sample 100 g , GC kit
Moisture	67.53±1.68	67.56± 69.45	sample 100 g (%) )
Crude ash	1.10 ± 0.06	0.89 ± 0.09%	sample 100 g , Mohr
Crude Protein	18.28 ± 1.54	20.24± 1.14	sample 100 g , Kiljedal
Ca	13.5 ±0.12 mg/dℓ	16.5 ±0.19 mg/dℓ	serum
P	7.2-8.5 mg/dℓ	8.1-9.3 mg/dℓ	serum

3. 향균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭에 미치는 안전성 평가

3-1). 목적 및 방법

향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 체내 안전성 평가를 실시하기 위하여 재래닭의 wing vein에서 혈액 1cc를 채취하여 4℃에서 3000rpm으로 15분간 원심분리한 수 혈청을 -80℃에서 냉동보관하면서 생화학분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였던바 SGOT, SGPT, glucose, bilirubin, LDH 등이 정상범위 내에 있었다. (Table 4)

**Table 4. Effect of dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on safety test in Korea native chickens**

Parameter	Control	Dietary supplementation group	Remark
SGOT	89-204	88-201	Normal
SGPT	10.1-41.2	10.0-40.2	Normal
Glucose	152-190	154-190	Normal
Bilirubin	0.00-0.20	0.01-0.19	Normal
LDH	89-290	88-280	Normal
CPK	235-800	235-800	Normal
Alkaline phosphate	24.5-44.4	24.0-40.4	Normal
Amylase	160-345	160-345	Normal

4. 향균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 아미노산 조성에 미치는 영향

향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 아미노산 조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 계육 내 아미노산조성에 미치는 영향을 조사한 바, 향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 asparatic acid, glutamate, glycine, histidine, argine, proline, valine, lysine, isoleucine, leucine이 증가되었다. (Table 5).

Table 5. Effect of dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on amino acid composition in Korea native chickens

unit: mg/100g		
Item	Control	Dietary supplementation group
Thr	918.4±5.67	953.2±19.32
Arg	681.3±51.38	1574.6±69.14
Ala	593.2±48.49*	1489.7±71.16*
Pro	685.2±46.59**	853.2±59.22**
Tyr	514.2±8.30	632.4±54.22
Val	824.3±11.54**	1237.2±58.35**
Met	413.2±3.59*	514.2±23.52*
Lys	1542.2 ±65.32	1932.6±54.32
Isoleu	867.1±19.84*	1132.3±43.74*
Leu	1512.3±3.98*	1775.1±821.42*
Phe	639.4±19.42	714.1±39.13
Asp	1858.7±67.05	1967.2±59.16
Ser	895.7±37.23	870.8±19.28
Glu	2758.1±104.54	2609.3±940.27
Gly	754.3±74.19	1012.3±63.72
His	685.7±16.54	754.2±26.54*

‡ C : control group T: dietary supplementation group

‡ Means±SD with different superscripts in the same row differ significantly(P<0.05).

\*\* P<0.01, \*P<0.05.

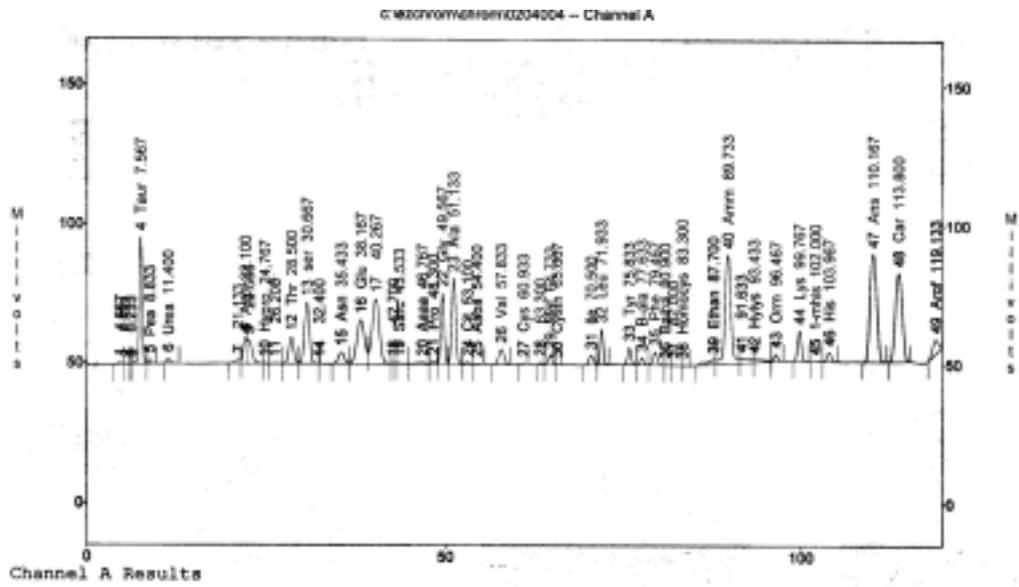


Fig 3. Amino acid spectrums of control group in Korean native chickens after 57 days

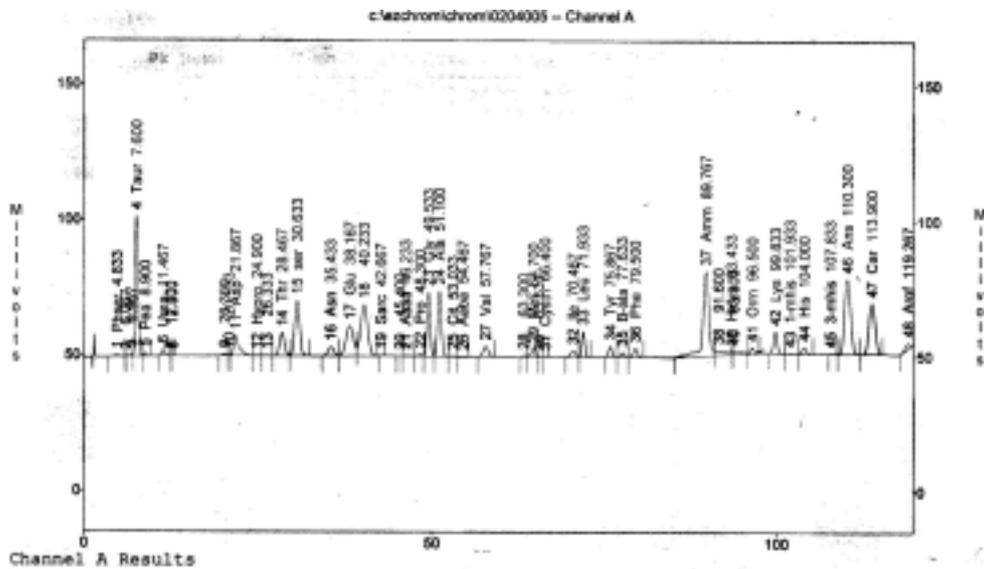


Fig 4. Amino acid spectrums of treated with dietary supplementation group in Korean native chickens after 57 days

5. 향균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 지방산 조성에 미치는 영향

향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 지방산 조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 계육 내 지방산에 미치는 영향을 조사한 바 향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 포화지방산인 Palmitic acid (C16:0)의 감소( $25.14 \pm 0.65 \rightarrow 24.59 \pm 0.74$ ), Stearic acid(C18:0)의 감소( $11.53 \pm 0.13 \rightarrow 10.07 \pm 0.17$ ) 불포화지방산인Oleic acid(C18:1)증가 ( $34.43 \pm 0.04 \rightarrow 36.23 \pm 0.64$ ), Linoleic acid (C18:2)증가( $18.81 \pm 0.15 \rightarrow 18.98 \pm 0.11$ )하였고, 실험군이 대조군에 비하여 전반적으로 포화지방산의 감소, 불포화지방산의 증가를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on fatty acid composition in Korea native chickens

Fatty acids	Groups	
	Control group	Dietary supplementation group
Myristic acid (C14:0)	0.72±0.04	0.73±0.02
Palmitic acid (C16:0)	25.14±0.65 <sup>A</sup>	24.59±0.74 <sup>B</sup>
Palmitoleic acid (C16:1)	4.19±0.15	4.20±0.06
Stearic acid (C18:0)	11.53±0.13 <sup>A</sup>	10.07±0.17 <sup>B</sup>
Oleic acid (C18:1)	34.43±0.94 <sup>A</sup>	36.23±0.64 <sup>B</sup>
Linoleic acid (C18:2)	18.81±0.15	18.98±0.11
Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid (C20:3)	1.69±0.03	1.72±0.04
Arachidonic acid(C20:4)	3.49±0.64	3.48±0.14
Saturated Fatty Acid	37.39±0.82	35.39±0.91
Unsaturated Fatty Acid	62.61±2.01	64.61±0.90

<sup>A,B</sup> : Means with different capital letter superscript in the same column of comparison between control and treatment to significantly different at  $p < 0.05$ .

6. 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 혈청 내 Pi 농도에 미치는 영향

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 혈청 내 Pi 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 하여 급여한 후, 1, 2, 3, 4 주 혈청 내 Pi의 농도변화에 대한 back screen 으로 실시한 NMR 결과 역시 유의적인 차이를 발견할 수 없었으나 대조군의 경우, 실험2주 이후 점차 감소하는 반면, 실험군의 경우 첨가제를 급여하기 시작하는 2주에는 잠시 감소하였으나 다시 그 값이 증가하는 경향을 보였다.

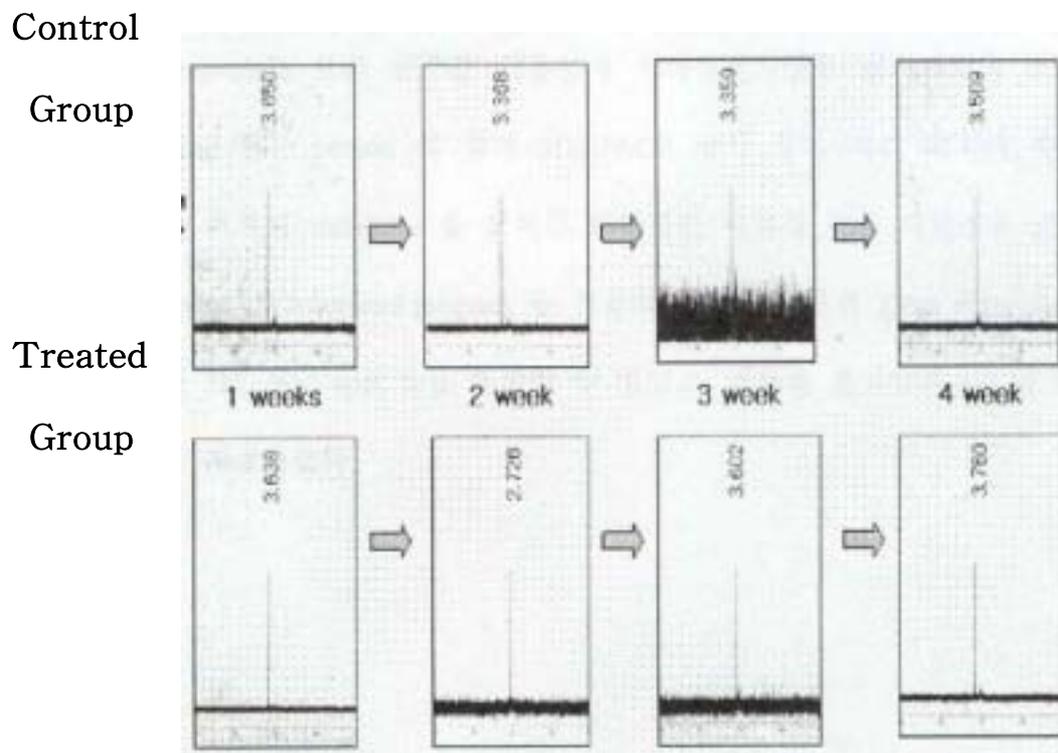


Fig 5. The concentration of Pi measured using  $^{31}\text{P}$  NMR

7. 향균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육색깔에 미치는 영향

향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육색깔에 미치는 영향을 조사하기 위하여 향균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 계육색깔에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 적색깔(red)의 증가, 노란색깔(yellow)의 감소가 있었다(Table 7).

Table 7. Effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on meat color in Koran native chickens

Treatments	Color		
	Lightness	Redness	Yellowness
Control group	52.79±4.56	2.94±1.67	9.92±2.03
Dietary supplementation group	50.95±1.21	3.48±0.38	9.69±0.58

8. 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육 pH에 미치는 영향

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육 pH에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 계육 pH에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 pH의 감소(5.69±0.10->5.67±0.09)를 나타내었다(Table 8).

Table 8. Effect of 1% dietary supplementation of feed additive containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on pH in Korean native chickens

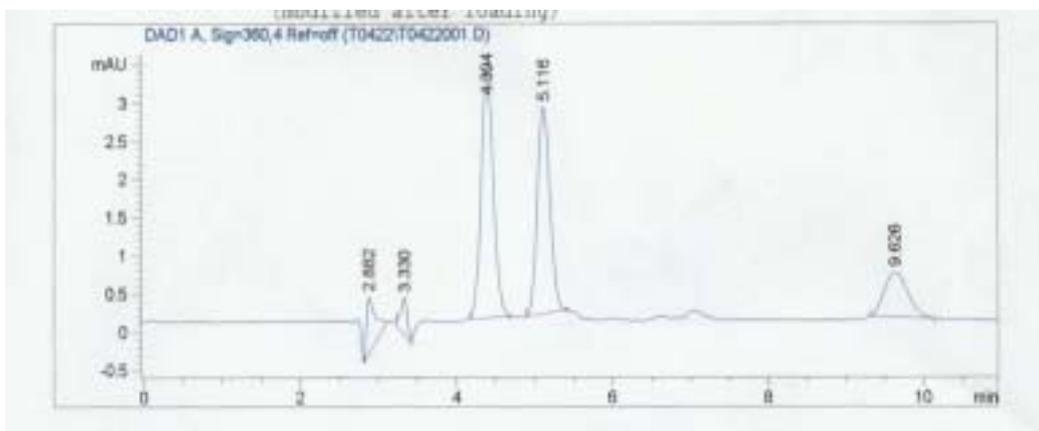
Treatments	pH
Control group	5.69±0.10
Dietary supplementation group	5.67±0.09

9. 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육 항생제 잔류대사 비교분석

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 일차적으로 tetracycline 계에대한 계육 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군(실험군)과 대조군에서 모두 검출되지 않았다(Table 9).

**Table. 9 Effect of 1% dietary supplementation of feed additives containing such as methyl-*n*-nonyl-ketone and carthamin on antibiotics residues in Korean native chickens**

Antibiotics	Control group	Dietary supplementation group
Oxytetracycline	-	-
Tetracycline	-	-
Chorotetracycline	-	-



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Ant/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
4.394	BB	35.77019	1.11289e-2	3.98082e-1		OTC
5.116	BB	30.60295	1.31214e-2	4.01553e-1		TC
9.626	BB	12.41423	3.12673e-2	3.88160e-1		CTC

Fig 6. The chromatogram on standard of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline . HPLC condition: Mobile phase,0.01Moxalic acid:acetonitrile:methanol(725:175:100);Column, $\mu$ -BondapakC18(3.9X300mm,10 $\mu$ m);Flow rate, 1ml/min.

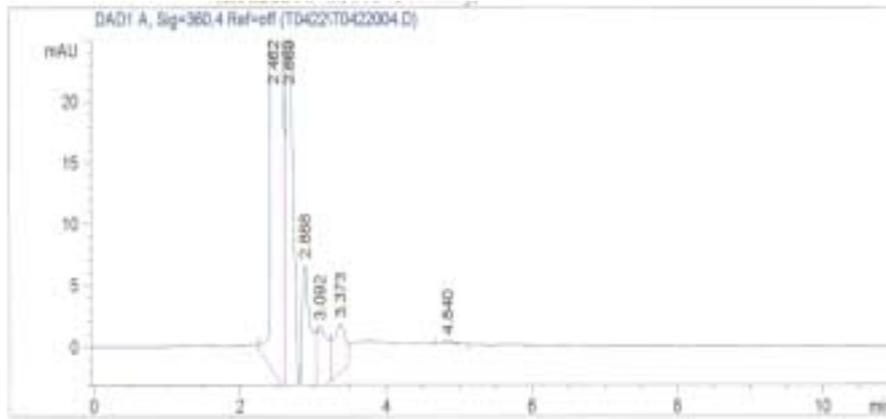


Fig 7. The chromatogram on oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline of control group in Korean native chickens after 57 days.HPLC condition: Mobile phase, 0.01Moxalic acid:acetonitrile:methanol(725:175:100);Column, $\mu$ -BondapakC18(3.9X300mm,10 $\mu$ m);Flow rate,1ml/min.

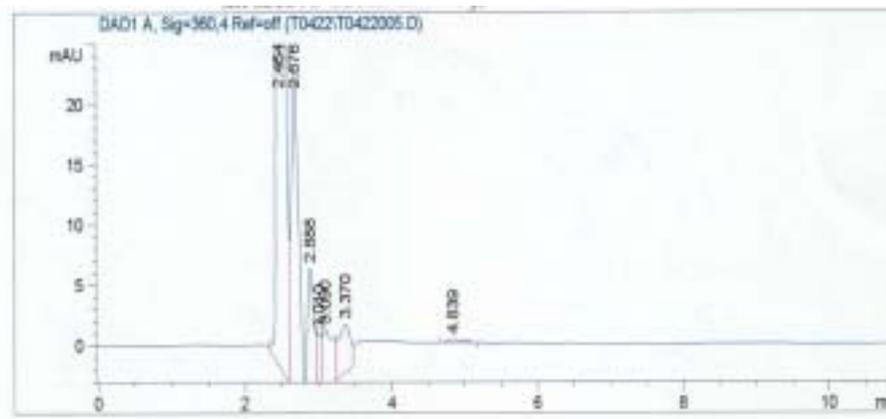
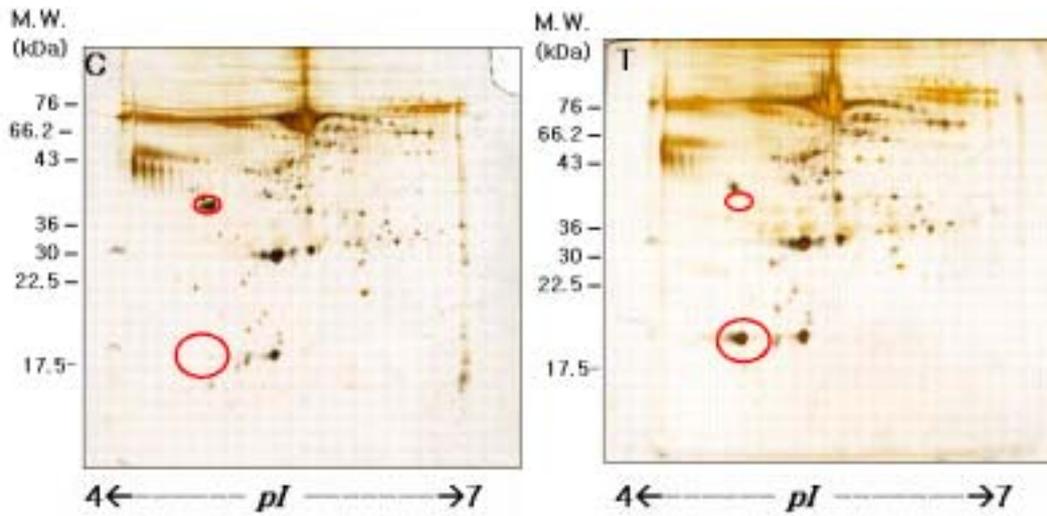


Fig 8. The chromatogram on oxytetracycline,tetracycline and chlortetracycline of treated with dietary supplementation group in Korean native chickens after 57 days.HPLC condition: Mobile phase,0.01Moxalic acid:acetonitrile:methanol(725:175:100); Column, $\mu$ -BondapakC18(3.9X300mm,10 $\mu$ m);Flow rate,1ml/min.



**Fig 9. Silver-stained 2-DE parttern of the chickens serum.**

**C : control group, T : Dietary supplementation group**

그 결과 대조군에서 보였던 39kDa, pI 4.6 부위와 19kDa, pI 4.6 부위에서 각각 down regulation 와 up regulation이 된 것을 관찰할 수 있었다. MALDI-TOF MS.를 통해 동정을 시도하였으나 동정되지 않았다.

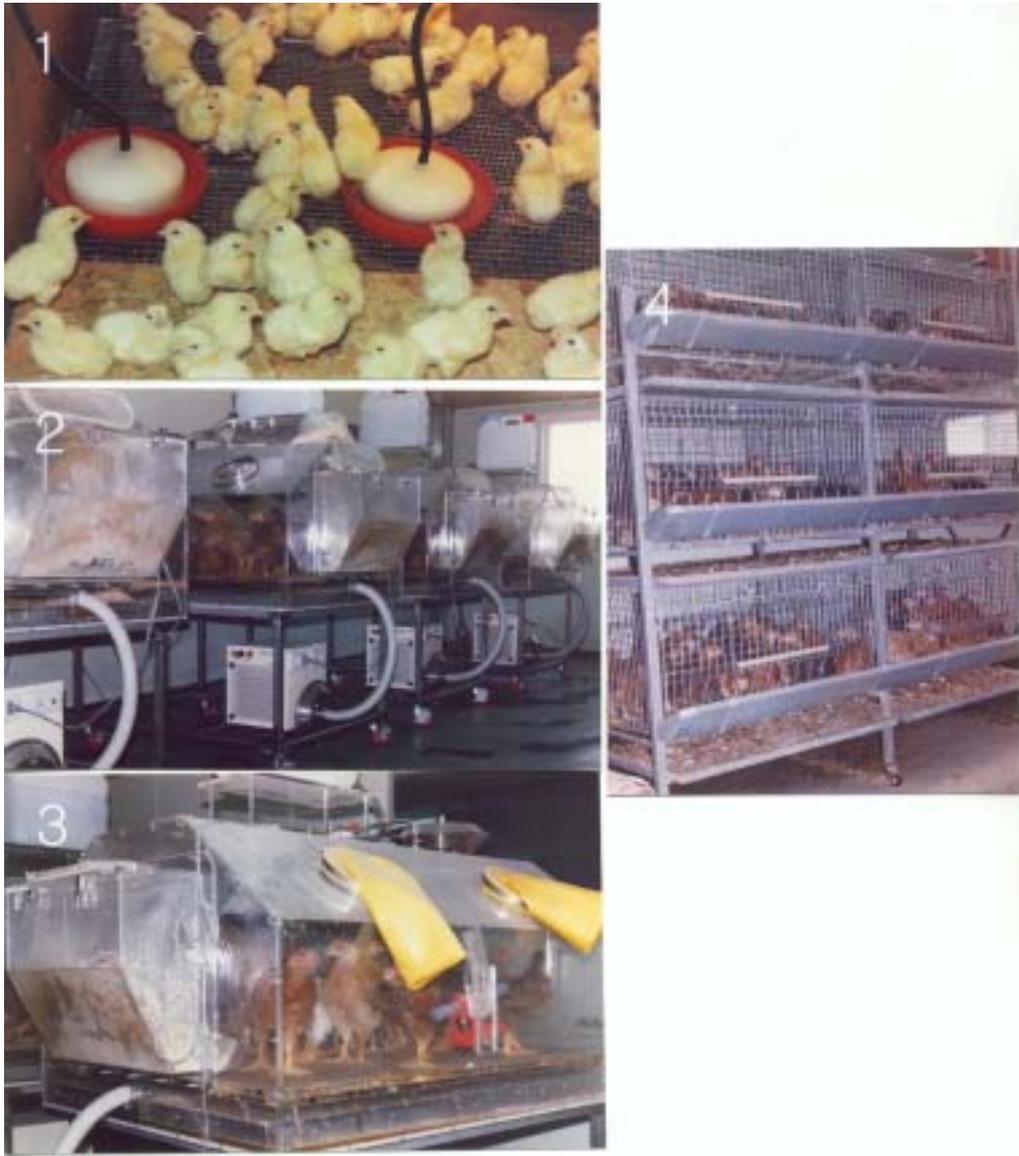
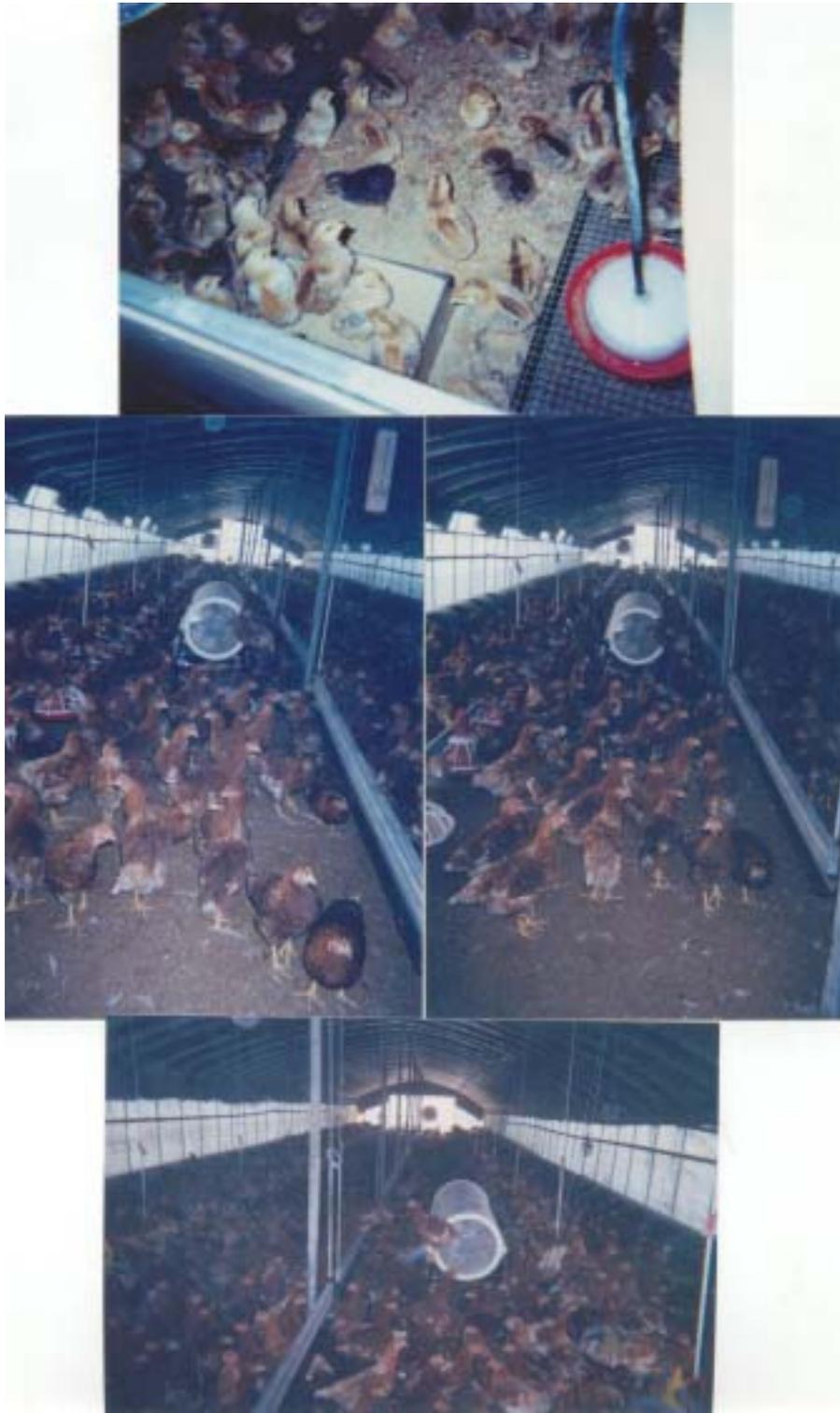


Fig 10. 실용재래닭 사양실험을 위한 사진

- 1) 입추시 사진
- 2) 사양실험을 위한 특수제작된 비닐 isolator
- 3) 사양실험을 위한 특수제작된 비닐 isolator
- 4) 성장되어 6주 후 사육사진



<Fig  
11.  
재래닭  
사육  
실험  
농장  
사진>

## 바. 고 찰

재래닭은 기호성은 좋으나 발육이 늦어 사육비가 많이 들고 경제성이 낮은 것이 취약점이다. WTO이후 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.

한약제의 유효한 성분은 생체 내에서, 상승 효과를 나타내어 생체내의 면역 시스템 중 보체계의 활성화, 여러 가지 cytokine의 활성화와 일상의 식품 성분과의 상승작용으로 신체 항상성을 유지하도록 도와주는 역할을 해 왔다. 이러한 한약재 내의 유효성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 대체 식품 첨가물이나 의약품의 개발이 가능하다.

홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원작물이기도 하다. 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 carthamin ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) 인데, 한방의 처방 예로는 홍화당, 활혈통경당 등이 있으며, 꽃은 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐만 아니라 혈장 콜레스테롤과 중성지방의 저하 기능도 있어 여성들의 통경약이나 어혈을 푸는 약재로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid 등의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고되었다. 뿐만 아니라 홍화에 포함된 성분 등은 포화성 콜레스테롤을 저하시키며 질병에 대한 이완을 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며 불포화지방산함량을 높인다는 보고도 있다. 또 맛의 중요인자인 아미노산을 증가시키며 계육의 보수력 및 연도 등을 향상시킨다고 하였다.

삼백초는 항균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonyl-ketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde 등이 함유되어 있어 항균작용 및, 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다고 하였다. 뿐만 아니라 이뇨작용, 혈압조절작용등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과를 조사하였다. 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료에 1%되게 균질하게 섞은 후 재래닭 성장기간동안 57일간 급여하여 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과를 실험한 결과, 평균체중은 대조군이 1.63kg, 실험군이

1.68kg으로 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 1% 포함된 사료첨가제군(이하,실험군)을 먹인 군이 대조군에 비하여 0.05kg이 증가 하였다.

육성율은 대조군이 92%, 실험군이 99%로 대조군에 비해 실험군이 7% 증가하였고, 폐사율은 대조군이 9%, 실험군 1%이었다. 사료요구율은 대조군은 1.75, 실험군은 1.62로 실험군이 대조군에 비해 0.13 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 홍화의 carthamin등과 삼백초 methyl-*n*-nonyl-ketone 등의 이 재래닭 성장에 관여한 것으로 사료된다.

삼백초와 홍화의 안전성 평가를 위하여 대조군과 처리군 간의 혈청 내 효소 활성도를 측정하였다. 두 군 사이의 혈청 내 효소 활성도 측정결과 모두 정상범위에 위치하고 있었으므로 한방 사료첨가제의 급여가 간 기능 및 간 손상에는 별다른 영향을 나타내지 않은 것으로 사료된다.

지방은 대조군이  $11.37 \pm 0.59$ , 사료첨가제를 먹인 군(이하,실험군)이  $11.37 \pm 0.59$  cholesterol은 대조군이  $63.7 \pm 2.18$  mg%, 실험군이  $63.7 \pm 2.18$  mg%, 조단백은 대조군은  $18.28 \pm 1.54$  실험군은  $20.24 \pm 1.14$ , Ca은 대조군은  $13.5 \pm 0.12$  mg/dl, 실험군은  $16.5 \pm 0.19$  mg/dl, P은 대조군은  $7.2-8.5$  mg/dl, 실험군은  $8.1-9.3$  mg/dl군으로 실험군이 대조군에 비하여 지방의 감소 또한 사료첨가제에서 대조군에 비하여 cholesterol의 감소, 조단백, Ca 및 P의 증가를 나타내었다. 이는 홍화의 성분인 N-feruloylserotonin과 linoleic acid 와 홍화의 약용성분인 cartharmin ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )등이 작용한 것으로 사료 된다.

재래닭 계육내 아미노산조성에 미치는 영향을 조사한 바, 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 aspartic acid, glutamate, glycine, histidine, argine, proline, valine, lysine, isoleucine, leucine이 증가되었다. 이와 같은 결과는 농촌 영양 개선 연구원의 식품성분 와 유사한 경향을 나타내고 있다.

Oleic acid는 단일 불포화지방산으로 다량 섭취시 혈중 중성지방이나 콜레스테롤의 감소를 가져오므로 동맥 경화증과 같은 성인병에 유익한 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다. 또한 식육의 맛과 관련하여oleic acid 함량이 높으면 식육의 맛을 좋게 하고 관능평가에서 높은 점수를 얻는다는 보고가 있었고 이러한 이유 때문에 건강을 위해서 palmitic acid 같은 포화지방산을 oleic acid 로 대체한 식육을 섭취할 것을 권장한 바 있다.

Hood 등은 닭, 돼지 등과 같은 단위동물의지방산 조성은 급여되는 사료의 지방산 조성에 따라 영향을 받는다고 보고한 바 있다.

지방산에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 포화지방산인 palmitic acid (C16:0)의 감소( $25.14 \pm 0.65 \rightarrow 24.59 \pm 0.74$ ), stearic acid(C18:0)의 감소( $11.53 \pm 0.13 \rightarrow 10.07 \pm 0.17$ ), 불포화지방산인 Oleic acid(C18:1)증가 ( $34.43 \pm 0.04 \rightarrow$

36.23±0.64), linoleic acid (C18:2)증가(18.81±0.15→18.98±0.11)하였고, 실험군이 대조군에 비하여 전반적으로, 포화지방산의 감소, 불포화지방산의 증가를 나타내었다. 홍화에는 불포화지방산을 증가 시키고, 포화지방산을 감소시키며, Ca를 증기시키는 것으로 알려져 있다. 이상의 결과는 삼백초 항균성분인 decanoyl acetaldehyde, methyl-*n*-nonyl-ketone, myrcene, capric aldehyde 등이 함유되어있어 항균작용 및, 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높인다는 선인들의 연구결과와 일치된다.

1, 2, 3, 4 주 혈청 내 Pi의 농도변화에 대한 back screen으로 실시한 NMR 결과 역시 유의적인 차이를 발견할 수 없었으나 대조군의 경우, 실험2주 이후 점차 감소하는 반면, 실험군의 경우 첨가제를 급여하기 시작하는 2주에는 잠시 감소하였으나 다시 그 값이 증가하는 경향을 보였다. 계육색깔에 미치는 영향을 조사하기 위하여 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 계육색깔에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 적색깔(redness)의 증가, 노란색깔(yellowness)의 감소가 있었다. 계육 pH에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 pH의 감소(5.69±0.10→5.67±0.09)를 나타내었다. 이는 박과 유의 한약제 부산물 처리와 일치하는 결과를 보였으며, 낮은 명도는 높은 pH 와 상호관련성이 있다고 등의 결과(Bendall),와 일치하는 결과를 보였다.

항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 일차적으로 tetracycline 계에 대한 계육 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군(실험군)과 대조군에서 모두 검출되지 않았다. 이같은 결과는 본연구진의 실험 환경에 따른 결과로 사료되며 앞으로 더 연구해야 할 것으로 사료된다.

프로테오믹스는 세포의 생리적 상태변화에 따른 분자적인 현상과 세부적인 기준을 규명할 수 있으며, 질병이나 약물 처리에 따라 단백질의 표현형이 어떻게 변화하는지를 분석할 수 있으며 세포 내 단백질의 생리 상태별 변형상태, 그리고 상호관계 등을 효과적으로 규명하여 각종 질환의 marker 와 치료표적 단백질의 발굴, 동식물 성장 조절 단백질의 규명, 생식기전 및 약물 독성과 신약의 개발에 이용될 수 있다.

항균성분 (methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 단백질 발현에 미치는 영향 조사하기 위하여 대조군과 실험군의 혈청은 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다. 그 결과 39kDa, pI 4.6 부위와 19kDa, pI 4.6 부위에서 각각 down regulation 와 up regulation이 된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 MALDI-TOF MS를 통해 동정을 시도하였으나 동정되지 않았다.이 39kDa, pI 4.6 부위와 19kDa, pI 4.6 부위에서 각각 down regulation 와 up regulation이 된 것이 사료

첨가제에 의한 면역반응, 항균작용등에 관여 하는 것으로 사료되나, 지속적인 연구가 수행 되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 미루어 볼 때 삼백초의 항균성분 (methyl-n-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분은 재래닭 성장 및 이화학적 변화에 positive-effect 로 작용할 수 있는 사료 첨가제로 이용될 수 있으며, 이 사료첨가제로 안전성 재래닭 생산 및 농가소득 향상에 크게 이바지 할 수 있는 재래닭 생산기술에 이바지 할수 있을 것이라 사료된다.

#### 마. 결 론

삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 1%되게 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 적용하여 실용재래닭의 사양, 이화학적 변화에 미치는 효과를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 1%되게 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 급여 결과, 사료 요구율, 치사율의 감소하였다. 체중, 육성율은 증가하였다.

2) 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 1%되게 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 급여 결과, 지방, 콜레스테롤은 감소하였다.

3) 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 1%되게 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 급여 결과, 불포화 지방산의 증가, 포화 지방산의 감소가 나타났다.

4) 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 1%되게 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 급여 결과, 관능에 영향을 미치는 특정 아미노산의 증가가 나타났다.

5) 항균성분인 methyl-n-nonyl-ketone 등과 홍화의 골격성장성분인 carthamin 등을 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 1%되게 사료에 첨가한 후 실용재래닭에 급여 결과, 면역체계의 영향을 미칠 수 있는 39kDa, pI 4.6 부위와 19kDa, pI 4.6 부위에서 각각 down regulation 와 up regulation이 있었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

### 제 1 절 연구평가의 착안점

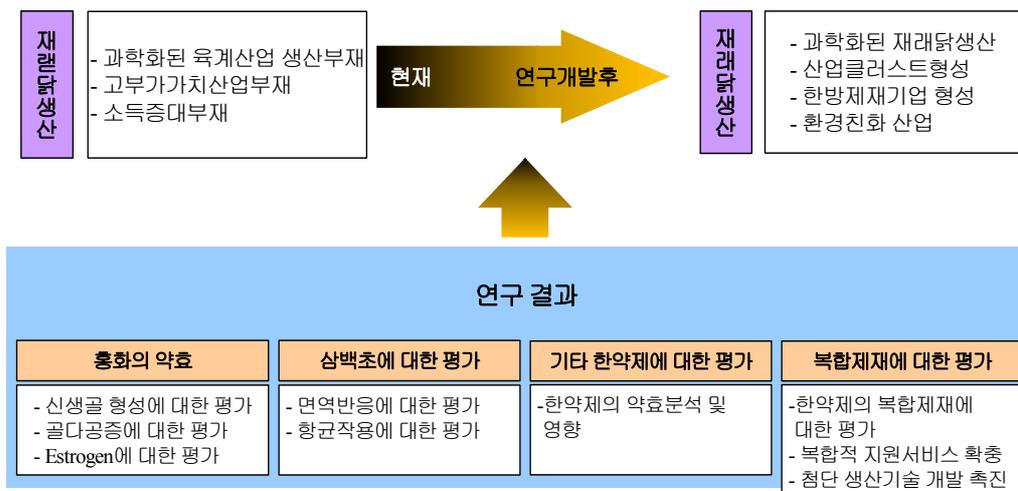
구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2003~2004년)	○ <i>Camphylobacter jejuni</i> 및 유해미생물에 대한 항균효과 I	20.0
	○실용재래닭의 사양, 이화학적 변화 및 항생제 잔류에 미치는 효과 I	30.0
2차년도(2004~2005년)	○ <i>Camphylobacter jejuni</i> 및 유해미생물에 대한 항균효과 II	15
	○실용재래닭의 사양, 이화학적 변화 및 항생제 잔류에 미치는 효과 II	25
	○경제성 및 생산체계 (Lab-Venture)	10
최종평가	○ <i>Camphylobacter jejuni</i> 및 유해미생물에 대한 항균효과 I, II	35
	○실용재래닭의 사양, 이화학적 변화 및 항생제 잔류에 미치는 효과 I, II	55
	○실용재래닭 생산, 경제성 및 생산체계	10

## 제 2 절 연구개발목표달성도

세부과제명	연구개발 내용	진척도 (%)	
<i>Campylobacter jejuni</i> 및 유해미생물에 대한 항균효과	○ 첨가 농도별 항균성 시험	*****100	
	○ 닭의 분변중 <i>Campylobacter</i> 속군의 분리	*****100	
	○ 분리군의 생물형 및 혈청 형별	*****100	
	○ 시험 계군의 분변 중 <i>C. jejuni</i> 의 분리	*****100	
	○ 시험 감염 계군의 직장 내용물의 양성 계수 측정	*****100	
	○ 전자 현미경에 의한 장관 정착 확인	*****100	
	○ 시험대조 계군의 분변중 <i>C.jejuni</i> 분리 빈도 조사	*****100	
	○ 사료첨가제 투여계군의 분변중 <i>C.jejuni</i> 분리 빈도조사	*****100	
	○ 시험대조 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C.jejuni</i> 양성계수 측정	*****100	
	○ 사료첨가제 투여 계군의 분변, 간 및 비장의 <i>C.jejuni</i> 양성계수 측정	*****100	
	○ 사료첨가제 투여계군 및 시험대조군에 대한 감염증 발생 및 병리해부 소견 관찰	*****100	
	○ <i>Campylobacter</i> 분리주의 항생물질에 대한 감수성 시험	*****100	
	실용재래닭 사양 및 이화 학적 변화에 미치는 효과	○ 사료첨가제 조성 평가 실험	*****100
		○ 사료첨가제 안전성 평가 :	*****100
○ GOT, GPT ,bilirubin, glucose, LDH 등		*****100	
○ 사양실험 :		*****100	
○ 폐사율, 사료요구율, 육성율 등		*****100	
○ 이화학적 평가 :		*****100	
○ 수분, 회분, 조단백, 조지방, Ca, P,cholesterol 등		*****100	
○ 안전성 평가		*****100	
○ 아미노산 조성		*****100	
○ 지방산 변화		*****100	
○ 항생제 잔류검사		*****90	
○ NMR에 의한 Pi 실험		*****100	
○ Proteomics 기법에 의한 단백질 발현 조사	*****100		

### 제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도

1. 유기축산에 이바지 할수 있는 한방 사료첨가제의 개발로 인하여 재래닭 사육농가에 가급적 저렴한 가격으로 보급하여 고품질 재래닭을 생산하여 농가소득을 증대시킬 수 있다.
2. 나아가 항생제 및 백신을 최소 투여하여 재래닭의 축산물안전성을 확보할 수 있다.
3. 품질이 향상된 재래닭을 보급함으로써 국민건강에 크게 이바지 할 수 있다.
4. 이 기법을 토대로 재래닭외의 양계 및 다른 가축의 한방첨가제를 개발하여 농가소득증대 및 축산물 안전성 확보에 크게 이바지 할 수 있다.
5. 뿐만 아니라 안정성이 확보된 축산물을 수출하여 해외시장의 개척에도 큰 기여를 할 수 있다.
6. 양계장에서서 *Camphylobacter jejuni* 방지 및 식중독의 근원적 대책을 수립할 수 있다.
7. 계육처리공정에 HACCP 적용을 위한 기초자료가 될 수 있다.
8. 한방사료첨가제를 보조사료 등록하여 재래닭 생산 lab-venture를 만들어 공급체계를 확립할 수 있다..
9. 사료 첨가제로 사육한 재래닭을 국내시장에 보급하여 국민의 안전성 추구에 부합될 수 있고, 나아가 판매 신장 및 농가소득 증대에 직접적 기여를 할 수 있도록 한다.
10. 지속적 연구를 통하여 재래닭에 돼지, 젓소, 육우 및 양계의 사양관리에 필요한 신 한방사료첨가제를 개발하고자 한다.



## 제 5 장 연구개발의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

2년간의 연구로 재래닭의 성장, 이화학적효과, *Camphylobacter jejuni* 및 유해미생물관한 연구 등을 수행하였다. 앞으로는 항균효과의 기전을 밝히는 재래닭의 성장 *Camphylobacter jejuni* 및 유해미생물관한 연구를 할 수행할 예정이다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

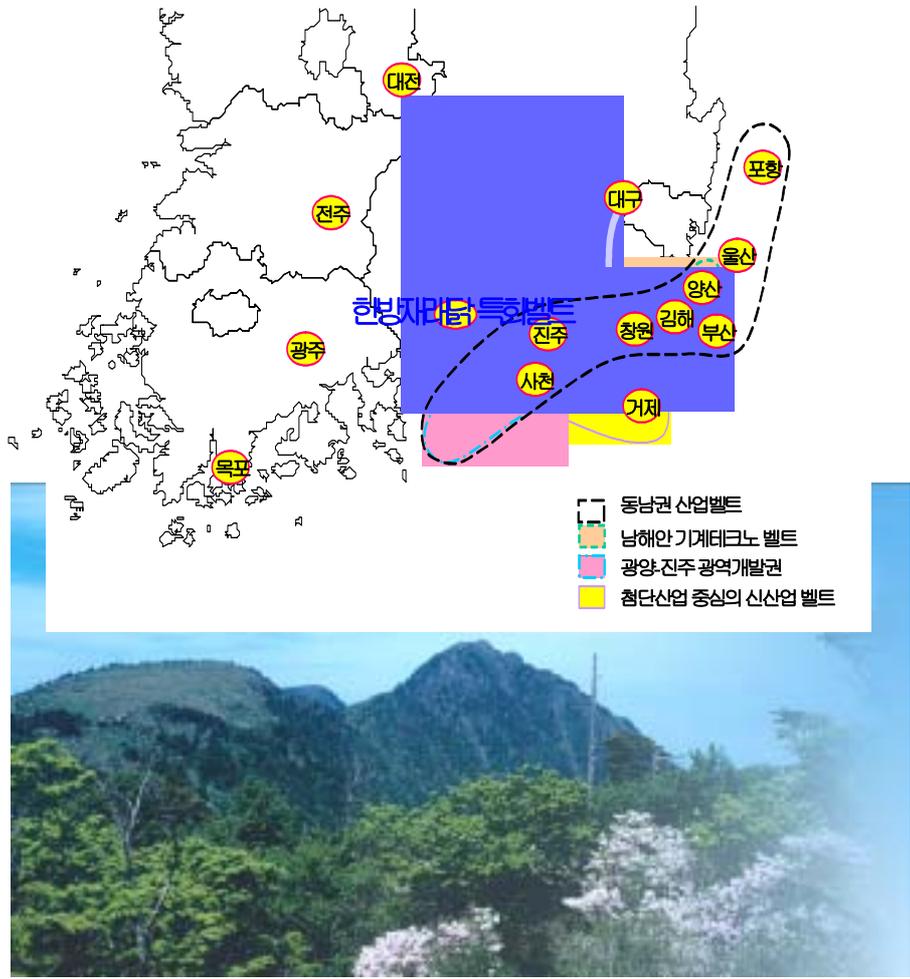
이 결과를 토대로 산란계, 돼지 등의 사료첨가제를 개발 및 안전축산물생산 하기 위한 연구를 수행할 예정이다.

### 제 3 절 기업화 추진방안

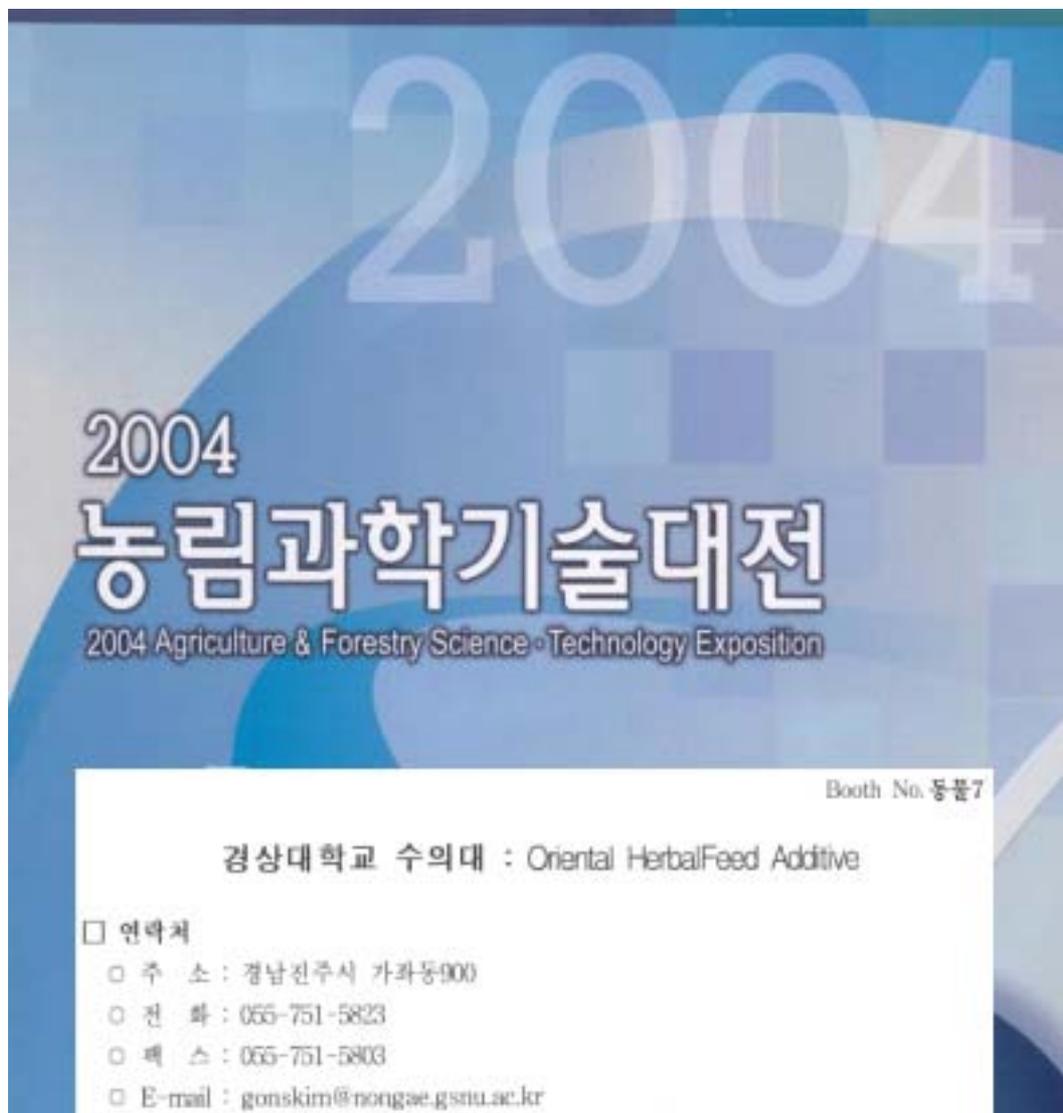
본 연구로 얻은 결과를 토대로 경남지역을 토대로 한 Lab-Venture를 추진할 계획이다. 본 연구진은 지속적인 연구로 기술적인 면을 생산자 측에서 사료첨가제를 양계농장에서는 사료첨가제를 사용한 재래닭 생산하는 3각 belt를 형성할 예정이다.



<기업화 추진방안의 모형도>



<기업화추진방안의 특화 모형도>



< 본연구진이 개발한 사료첨가제의  
ARPC주관 농림과학대전 참가표지 >

# 농림기술개발사업 항생제 대체제 개발 관련 연찬회

- 핵심전략과제 연구협의회 및 관련 연구과제 발표회 -



일시: 2005년 6월 17일 13:30 ~ 18:00

장소: 중앙대학교 안성캠퍼스 창업보육센터 2층 세미나실

주최: 농림기술관리센터(ARPC), 중앙대 생명환경연구원

< ARPC 주관 항생제 대체제 개발 연찬회 발표:  
발표제목 다음장 에 계속 >

항균성분 Methyl-n-nonyl-ketone  
등과 Carthamin 등을 이용한  
실용 재래닭 생산기술 개발



총괄연구책임자

경상대학교 수의대  
김 곤 섭

< ARPC 주관 항생제 대체제 개발 연찬회 발표:  
발표제목 >

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

### 제 1 절 유기축산

우리나라도 ‘유기축산품질인증제’에 합의하여 올해부터 유기축산을 확대해 갈 계획이다. 이 법안은 국제식품규격위원회(CODEX)는 28차 회의에서 유기축산에 관한 지침을 마련하였기 때문이다.

유럽은 1972년에 설립된 UN의 공식적인 비정부기구(NGO)인 IFOAM(International Federation of Organic Agriculture Movements, 국제유기농업운동동맹)을 중심으로 유기농업운동을 해왔고 미국의 경우도 1973년에 설립된 유기농업단체인 CCOF(California Certified Organic Farmers)를 중심으로 하여 연방 유기식품법을 제정하는 등 유기식품생산 및 유통에 관한 노력을 해 왔다. 이러한 결과로 유럽연합(EU)은 '99년 6월 EU 농장이사회에서 유기농축산물에 관한 통일기준을 승인하였으며, 유럽의 경우 '98년말 약 280만 ha의 면적(113,000농가)에서 유기농업 수행하였으며 2001년까지 전체 농가수의 10-30%까지 확대할 전망이다. 미국의 USDA 소속 전역의 유기농축산업 실태조사 결과를 보면 '99년 전국유기농축산물 생산농가는 12,200여호에 달하며, 이들이 생산한 농축산물의 소매총액은 60억 달러에 이를 것으로 추정하고 있다.

2005년 이후에는 "유기축산물"에 대한 항생제 사용도 허용되지 않는다. 유전공학을 이용한 번식기법도 사용되어서는 안된다. 결국 유기식품 코덱스 기준은 유기농업과 유기축산이 하나의 통합된 체계로서 확립되어야 한다는 점을 강조하고 있고, 유기축산을 먼저 하건, 유기농업을 먼저 하건, 우선은 유기축산으로 생산된 유기퇴비가 있어야 하고, 이를 가지고 유기농산물을 재배하고, 여기서 나오는 부산물로 다시 유기축산을 하는, 지역적으로 하나의 완결된 농업체계가 형성되어야 한다.

유기축산은 80%의 유기조사료와 NON-GMO 농후사료, 성장촉진제 사용금지, 성장용첨가제의 규제, 무항생제로 이루어져야 한다.

#### 1. 유기축산의 현황

##### 가. 덴마크의 유기축산

덴마크는 1987년에 유기농업에 대한 법률제정을 하였다. 그 내용은 가축의 복지에 최선을 다하면서 환경적으로나 사회적으로 지속적 농업을 수행하며 그 결과로서 얻어지는 고품질의 소비자를 위한 건전식품을 유기농산물로 규정하였다. 이후 유기농산물 생산에 대한 국가적인 노력과 더불어 소비자들의 관심이 증가하여 1988년에 219농가가 유기농산물 생산에 참여하였으나 1999년에는 약 2200농가로 증가하였고 계속 증가하고 있다.

## 나. 미국의 유기축산

합성물질이 함유된 사료첨가제나 공급제는 유기축산에 이용할 수 없다. 유기축산계 계속의 가축사료는 초지나 사료작물을 포함하여 전적으로 유기적으로 생산된 것이어야 한다. 생산자는 동물약품, 성장촉진호르몬을 사용할 수 없으며 정상적인 성장과 건강유지에 필요한 양 이상의 사료첨가제나 공급제는 사용해서 안된다. 또 일체의 동물성 사료의 급여나 사료첨가를 해서도 안된다. 예방적 차원에서 동물의 건강유지를 위한 관리를 해야 하며 질병이나 기생충에 저항성이 있는 가축의 품종 선택과 환경관리를 해야 하며 동물의 영양소 요구량에 맞는 비타민, 미네랄 및 기타 첨가제를 사용할 수 있다.

## 다. Codex 유기 축산에 필요한 신기술 개발

### 1) 면역력 증강을 위한 천연물질 개발

가축의 질병치료 외에 항생제 사용이 금지되며 휴약기간도 2배나 길어지고 2005년 이후는 항생제 사용이 전면 금지됨에 따라서 항생제 대용의 천연물질 개발이 매우 시급하다. 이미 선진국에서는 다수의 천연물질을 개발하여 실용화 단계에 있으며 국내에서도 몇 개 분야에서 면역력 증가를 위한 천연물질 개발을 시도하고 있다. 이 가운데 항생제 대용으로 사용이 가능한 천연물질의 범위를 구명하고 가능성이 있는 새로운 물질을 개발하여야 한다.

### 2) Codex 유기 축산 기준에 맞는 천연 제품 개발

가축의 사양에 필요한 각종 첨가제 가운데 유기우유를 생산하는데 사용 가능한 천연 제품을 선별하여 유기축산을 시도하는 농민이 쉽게 이용 할 수 있도록 해야 한다.

### 3) 동물용 사료첨가 성장촉진제등의사용 금지

1986년 스웨덴의 모든 성장촉진용 항생제의 사용 금지를 시작으로 덴마크에서는 1995년 아보파신, 1998년 버지니아마이신의 사용을 금지했고 1997년 EU에서 아보파신을, 1999년 바시트라신, 스피라마이신, 타이로신, 버지니아마이신의 사용을 '혹시 사람에게 전이되어 발생될 수 있을 것을 우려하여 사전 예방의 목적 (Precautionary Principle)'으로 금지했다. 이러한 조치는 소비자와 정치적인 의견, 그리고 과학자들이 동물의 항생제 내성이 사람으로 전이해 위험을 줄 수도 있다고 주장하였기 때문이었

다. 스웨덴의 경우에서 보듯이 성장촉진제의 금지는 동물의 건강과 복지, 그리고 농장주에게 좋지 않은 않다. 게다가 사람의 건강에도 악영향을 미칠 수 있다는 주장도 제기되고 있다. 성장촉진제의 금지 이후 유럽에서 나온 여러 문헌들을 주의 깊게 살펴보면 이런 주장을 뒷받침하고 있다.

성장촉진제 금지 이후, 의도대로 성장촉진제의 사용은 급격히 감소되거나 없어졌다. 예를 들어 덴마크의 경우 1996년 105톤 이상의 항생제가 성장촉진제로 사용됐으나 2000년에는 0으로 떨어졌다. 이는 곧 동물 분변에서 분리되는 지표세균(indicator)인 장구균의 아보파신, 마크로라이드, 버지니아마이신에 대한 저항성 감소로 나타났다. 그러나 VRE는 여전히 닭과 돼지 샘플에서 분리되고 있으며 다른 항생제에 대한 저항성도 감소했지만 여전히 나타나고 있다.

#### 4) 항생제 사용의 사람 감염에서의 결과

동물용 사료첨가 성장촉진용 항생제는 주로 그람양성 세균에 효과적이기 때문에 유럽에서 주요 인수공통질병의 원인체인 그람 음성균 살모넬라와 캄필로박터(*Campylobacter*)의 항생제 감수성은 성장촉진용 항생제 금지에 별 영향을 받지 않을 것이라 예상할 수 있다. (캄필로박터의 경우 마크로라이드의 경우를 제외하고) 그러나 사람의 살모넬라 감염증감소를 위한 유럽 일부 지역의 노력은 별 성과를 보이지 못했고 덴마크의 경우 3년간 감소한 이후 2001년 다시 증가하고 있는 추세이다. 살모넬라의 항생제 저항성의 증가는 성장촉진제 사용 금지 이후 치료용 항생제의 사용이 증가했기 때문이라고 생각되고 실제로도 2001년 덴마크에서 돼지와 사람에서 분리된 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)의 경우 테트라사이클린과 설피아마이드에 대한 저항성이 증가했다. 캄필로박터의 경우는 이보다 더 심각하다. 덴마크에서는 지난 수십년간 계속적으로 캄필로박터가 증가했고, 동물보다 사람에서 분리된 캄필로박터의 테트라사이클린, 후로르퀴놀론(fluoroquinolone)에 대한 내성이 더 심각하다. 이 두 가지 인수공통질병의 지속적 또는 증가된 발병은 사료첨가용 항생제의 사용금지 때문일 수도 있다. 예를 들어 사료첨가제를 사용하지 않아 닭의 크기가 다양해지고, 이에 따라 도계장에서 소화관과열이나 분변의 유출이 다발하여 살모넬라와 캄필로박터의 오염이 빈번하게 일어나게 된다. 동물에서의 성장촉진제의 사용금지 이후 사람 분변에서의 VRE 분리율은 감소했다. 그럼에도 불구하고 사람에서의 장구균에 의한 감염증은 줄지 않았다. 스칸디나비아반도에서는 1975년 이후 아보파신이 성장촉진제로 널리 쓰였으나 VRE감염증은 보고된 바가 거의 없다. 오히려 아보파신이 동물에게 사용된 적이 없는 미국에서 사람의 VRE감염증이 다발한 것과 유사하게, 유럽에서도 사람에서의 MRSA 감염증가에 따른 글라이코펩타이드(밴코마이신 등)와 스트렙토그라민(버지니아마이신 등)의 사용이 증가한 지역에서 VRE 감염증이 늘어나고 있다.

#### 5) 외국에서의 항생제 사용

항생제의 사용 등 수의학의 발전에 따라 농업경제가 다양한 부분에서 진보하게 되었

다. 클로스트리디움에 의한 양의 설사병, 소의 기종지같은 세균 질환은 많은 손실을 야기하나 예방백신으로 대처할 수 있으며, FMD나 소의 전염성 폐렴같은 큰 경제적 손실을 야기하는 질병을 근절하고 재발생을 막기 위해 많은 예산을 투입하고 있다. 또한 소 부루셀라병 (brucellosis), 우결핵 (tuberculosis)과 같은 심각한 인수공통전염병의 방제를 위해서도 많은 예산이 쓰이고 있다. 소 바베시오시스와 같은 몇몇 질병은 생활사의 특성상 근절이 현실적으로 가능하다. 그러나 많은 세균성 질병에 대한 효과적인 백신은 아직 없으며 산업동물같은 숙주의 공생관계와 넓은 숙주 범위로 인해 그 근절이 불가능하다. *Pasteurella multocida* 는 다양한 종에서 질병을 일으키며 질병증상이 없는 경우에도 분리가 된다. *Streptococcus suis*, *Mannheimia haemolytica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* 등은 다른 세균들과 숙주가 비슷하다. 이러한 세균에 의한 질병은 풍토성이고 산발적이며 다인성이므로 효과적인 통제 방법을 마련하기는 어렵다. 백신이 여러 국가에서 개발되고 있지만, 임상적인 효과는 기대하기 어려운 실정이다.

복잡한 원인에 의한 세균성 질병이나 대안적인 조치로 치유되지 않는 세균성 질병의 경우 임상증상이 없는 단계에서 질병을 관리하고 치료하는 유일한 방법은 항생제 사용이다. 질병이 예방되지 않았을 경우의 치료는 경제적, 학문적인 관점에서 이루어져야 한다. 축산업에서 항생제의 사용은 동물을 더 건강하게 만들며, 성장촉진제로서의 효과는 인정받아야 한다.

## 6) 항생제와 축산업

양계산업은 풍부한 자료와 전문적인 의견을 바탕으로 전문적으로 생산이 이루어지고 있다. 이러한 전문적인 생산에서 항생제의 효용성은 비록 공공연하게 알려지지는 않았지만, 생산성면에서 항생제의 지속적인 사용에 따라 질병률, 사망률, 성장, 사료효율 등의 개선을 보여주었다. 또한 소에서 장내 정상 세균총을 조절함으로써 나타나는 효용성이 잘 알려져 있다.

양돈업에서의 항생제의 효과는 아직 논쟁의 여지가 있다. 최근 자료에 따르면 사료 첨가용 항생제의 사용은 자돈의 경우 효과가 있으나 성돈의 경우에는 그렇지 않다. 그러나 다양한 각도에서의 평가는 아직 이루어지지 않았고 치료용 항생제에 대한 평가도 이루어지지 않았다. 게다가 이러한 결과는 한정된 축사의 경우에서만 적용할 수 있을 뿐 일반화할 수는 없다. 그러므로 돼지 관리의 개선으로 성장촉진용 항생제의 필요성이 강조되기는 하지만 특정 시기에는 역시 항생제가 불가피하게 사용될 수 밖에 없는 실정이다.

질병의 임상적인 상태를 정확히 정의하기는 어렵기 때문에 축산업에서의 치료용 항생제 사용의 효과를 정확한 수치로 나타내기는 어렵다. 그러나 치료용 항생제의 다양

한 적용이 산업동물의 생산에 절대적으로 필요하다는 것은 분명하다. 게다가 항생제의 신중한 사용과 남용을 구별하기는 더 어렵다. 대체로 항생제는 능률적인 축산업 생산을 위해 반드시 필요하다. 최근 축산업은 지난 세기동안 단백질 공급원으로서 소비자의 요구에 맞춰, 주로 경제적인 측면에서 항생제를 다양한 각도로 적용하여 발전하여왔다.

과거에는 생산자와 소비자 모두 축산업에서의 항생제의 사용을 당연시하였으나 현재는 소비자와 소비단체 등의 항생제 위해를 염려하는 태도로 인해 항생제의 사용이 어려워지고 있다. 사료첨가용 항생제 사용금지는 소비자에게 매년 일인당 5~10달러, 닭계는 40달러정도의 경제적 비용을 더 요구하고 있다.

환경적 측면에서의 항생제 사용의 고려는 경제적 측면에서의 고려에 비해서 두드러지지 않는다. 사료첨가용 항생제의 사용금지로 인한 사료효율의 저하로 인해 더 많은 농경지가 필요하게 된다. 일례로 미국의 경우 25억 평 정도의 추가 농경지가 필요한 것으로 예측하고 있으며, 이러한 변화가 환경에 어떤 영향을 줄지 상상하기는 어렵다. 또한 축산업에서 특정 목적의 항생제의 사용 금지는 사료효율을 떨어뜨리고 이로 인해 동물의 생산량 당 폐기물 발생량이 증가할 것이다.

#### 7) 동물과 사람의 항생제 사용과 내성 문제

사람에게 사용되는 항생제가 동물에게 사용되는 항생제와 정확히 일치하지는 않으나 같은 계열의 항생제 내에서 그 작용기전은 동일하다.

사용 가능한 항생제의 범위 내에서 성공적으로 질병을 치료하는 것이 가능하며, 이러한 항생제의 효용성은 지역사회나 병원 모두에서 분명히 나타나고 있다. 치료가 실패하는 원인은 오진이나 항생제로 치료할 수 없을 정도로 질병이 진행된 경우 등이며, 여기에 신중한 항생제 사용의 함정이 있다.

항생제 내성이 임상적으로 문제가 전혀 없다고는 단정하기 어렵다. 일차적으로 항생제를 개발한 제조회사가 내성 문제에 대처할 물질이나 내성 문제를 해결할 새로운 물질의 개발을 준비할 책임이 있으나 지난 20년간 새로운 항생 물질의 개발은 거의 없었다. 이는 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinebacter spp.*, Enterobacteriae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) 같은 그람 음성 세균의 치료를 어렵게 했고 최근에는 *Staphylococcus aureus* (MRSA), CNS (coagulase-negative staphylococci), 연쇄상구균, 장구균과 같은 그람 양성세균이 항생제 내성을 보이면서 심각한 문제를 야기하고 있다.

지금까지 국제적으로 항생제 내성 세균을 조사한 경우는 별로 없고, 그나마도 제약회사같은 정도의 관점에서만 이루어져왔다. 덴마크, 미국 등에서 지속적인 모니터링

결과가 보고되고 있지만 다른 나라도 동일하다고 볼 수는 없다. 이러한 문제해결을 위해 국제적으로 여러 국가들이 공동으로 연구하여 해결책을 강구하는 것이 바람직할 것이다.

#### 8) 사람에서의 항생제 내성 관련성과 동물에서 항생제 사용

동물에서 사람으로 항생제 내성 세균 전파의 근거는 주로 살모넬라증과 캄필로박터 증 같은 인수공통 전염병이나 장구균과 대장균같은 동물에게는 발병이 되지 않지만 사람에게에는 문제가 되는 원인체의 역학 연구에 있다. 그러나 산업동물만이 아닌 다른 여러 원인들도 관련되어 있기 때문에 이들 질병의 역학 연구는 간단하지 않다.

현재 중요한 항생제 내성 세균은 다제 약제 내성 살모넬라, 대장균과 마크로라이드나 플루오르퀴놀론 내성 캄필로박터, 글라이코펩타이드나 스트렙토그라민 내성 장구균이며 대부분의 경우 음식물이 주요 전파 경로일 것이라는 가설이 있다. 이러한 가설은 옳다고 보여지며 위해인자가 존재한다고 생각되나, 이 가설이 과학적으로 증명된 것은 아니다.

항생제가 동물에 사용될 때 장관내 정상 세균총과 병원균 중 내성 세균이 선택적으로 살아남고 그 출현 빈도가 높아질 것이라 예상되었다. 미국의 경우 스트렙토그라민 계열 항생제인 버지니아마이신이 성장 촉진제로 널리 사용되어 스트렙토그라민 내성 장구균이 동물에서 흔히 발견되게 되었으나 글라이코펩타이드 계열 항생제 아보파신은 사용된 적이 없어 VRE(글라이코펩타이드 계열 항생제인 밴코마이신 내성 장구균)는 발견되지 않는다. 항생제의 사용을 중지하거나 감소시키는 경우, 내성 세균은 항생제 내성 유전자를 보유하고 있지만 장관내 환경의 변화로 감수성 세균으로 대체되어 결국 내성 세균은 줄어든다. 유럽에서 성장 촉진용 항생제 사용과 금지의 결과 나타난 장구균의 내성 패턴 변화를 통해 이를 확인할 수 있다. 1995년 아보파신이 성장촉진제로 사용될 때에는 75%의 장구균이 VRE였으나 성장촉진용 항생제 사용 금지 이후 2000년에는 5%로 내성율이 떨어졌다. 그러나 미국과 노르웨이의 경우는 성장촉진용 항생제 사용 금지 이후에도 내성이 오랫동안 유지되고 있다. 버지니아마이신의 사용 금지 이후에도 내성 세균이 사라지지 않는 이유는 페니실린의 사용이나 사료 첨가제로 구리를 사용함으로써 버지니아마이신 내성 장구균이 선택적으로 살아남아서 인 듯 하다. 이와 같이 서로 다른 항생제에 대한 내성이 유전적으로 연관되어있어 한 가지 항생제를 사용하지 않더라도 다른 항생제의 사용으로 인해 두 물질에 대한 내성이 없어지지 않고 유지될 수도 있다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Anderson, R.K. , 1982. Surveillance: criteria for evaluation and desirability of epidemiologic surveillance systems for animal health and productivity. Proc.86th Ann.Meet.US.Anim.health Assoc.,pp.321-340
2. Austin RA, Trust TJ. Detection of plasmids in the related group of genus *Campylobacter* *FEMS Microbiol lett* 1980;8:201~204.
3. Barnouin, J.,1986a. Enquete eco-pathologique continue un elevages-observatoires chez les ruminants:objectifs et strategie. Ann.Rech.Vet., 17(3):209-211
4. Barnouin, J.,1986a. Enquete eco-pathologique continue un elevages-observatoires chez les ruminants:le systeme de codification et de verifications des donnees.Ann. Rech.
5. Barnouin, J. and Brochart, M.,1986.Enquete eco-pathologique continue: les objectifs et leur realisation,le choix et la typologie des elevages. Ann.Rech, Vet.,17(3):201-207
6. Barnouin, J. ,Fayet,J.C.,Brochart,M.,Bouvier,A.and Paccard, P.,1986.Enquete eco-pathologique continue:hierarchie de la pathologie observee en elevage bovine laitier.Ann. Rech. vet.,17(3):227-230
7. Bartlett,P.,Kaneene,J.,Kirk,J.,Wilke,M. and Martenuik,J.,1986.Development of a computerized dairy herd health data base epidemiologic research. Prev.Vet.Med.,4:3-14.
8. Beal,V.C.,Jr., 1977. Market cattle test program as an efficient surveillance tool. APHIS working paper,USDA-APHIS-VS,Hyattsville,MS,P.18.
9. Bendall, J.R. and Swatland, H.F.A. 1998, A review of the relationship of pH with physical aspects of pork quality. Meat Sci 20(2): 85-126
10. Benjamin JS, Leaper S, Owen RJ, et al. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Current Microbiol* 1983;8:231~238.
11. Bigras-Poulin,M. and Harvey,D.,1986.FAHRMX as part of an integrated preventive medicine program. In: EC. Mather and J.B. Kaneene(Editors),Economics of Animal Disease. McNaughton and Gunn, Saline,MI,pp.80-86.
12. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 1979;7:1513~1523.
13. Blackburn BO, Schalter LK, Swanson MR. Antibiotic resistance of members of

- the genes Salmonella isolated from chickens, turkeys, cattle and swine in the United States during October 1981 through September 1982. *AJVR*, 45(6), 1245, 1984.
14. Bopp CA, Birkness KA, Wachsuth IK, et al. In vitro antimicrobial susceptibility, plasmid analysis, and serotyping of epidemic associated *Campylobacter jejuni* *J Clin Microbiol* 1985;21:4~7.
  15. Boyce. TG et al. : Recurrent out breaks Salmonella enteritidis infections in a Texas restaurant: phage type 4 arrives in the United States, *Epidemiol infect.* 117 : 29-34. 1996
  16. Bradbury WC, Marko MA, Hennessy JN, et al. Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains of *Campylobacter coli*. *Infect Immun* 1983;40:460~463.
  17. Bradbury WC, Munroe DL. Occurrence of plasmid and antibiotic resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy and diarrheic animal. *J Clin Microbiol* 1983;22:339~346.
  18. Butzler JP. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton Florida: CRC press, 1984;1~246.
  19. Cochran,W.G.,1977.Sampling Techniques. Wiley,New York,pp65-66,89-110.
  20. Davies RH and C.W ray : Distribution of Salmonella Contamination in 10 animal food mills. *Vet Microbiol.* 57: 159-169. 1997
  21. Diesch,S.L.,1983. The interface between the Minnesota food animal disease reporting system and the APHIS 5-phase plan. In:Proc.87th Ann. Meet.US.Anim. Health Assoc.,16-21 October 1983, Las Vegas, NV, pp. 406-410.
  22. Diesch,S.L. and Martin,F.B., 1979. Farmstead surveillance and disease reporting. Proc.83rd Ann.Meet.US.Anim.Health Assoc.,pp.13-20.
  23. Dohoo,I.R. and Stahlbaum,B.W.,1986.Animal Production and Health Information Network(APHIN):Putting it all together.In:E.C. Mather and J.B. Kaneene (Editors),Economics of Animal Disease.McNaughton and Saline,MI,pp136-144.
  24. Droleskey, RE. et al. : Colonization of cecal mucosal epithelium in chickens treated with a continuous flow culture of 29 characterized bacteria : confirmation by scanning electron microscopy. *J Food Protect.* 58(8): 837-842, 1995
  25. Dryden, F.D. and Marchello. J. A. 1970, Influence of total lipid and fatty acid composition upon the palatability of three bovine muscles. *J. Anim. Sci.*, 31: 36-
  26. Dugan, M.E.R., Alhus, J.L., Jeremiah, L.E., Kramer, J.K.G. and Schaefer, A.L. 1999,

- The effects of feeding conjugated linoleic acid on subsequent pork quality. *Can. J. Anim. Sci.*, 79, 45-
27. Elandt-Johnson,R.,1977.Various estimators of conditional probabilities of death in follow-up studies: Summary of results.*J.Chron.Dis.*,30:247-256.
  28. Elsevier Science Publishing Co. Inc, New York, pp 27, 1986  
FAO/IOE,1975.Incidence of Aninal Disease.
  29. Ewing, WH : Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed.
  30. Gebhart CJ, Ward GE, Chang K, er al. *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileutis. *Am J Vet Res* 1983;44:361~367.
  31. Genzler, DJ, et al. : Salmonella enteritidids in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks, *Avian Dis.* 38:37-43, 1994
  32. Grundy, S.M. 1986, Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N. Engl. J. Med.*, 314: 745-
  33. Hood, R.L. 1984, Cellular and biochemical aspects of fat deposition in the broiler chicken. *Poult. Sci.* 40: 160-164
  34. Hopper SA, Mawe, s. Salmonella enteritidis in a commercial layer flock. *Vet Res*, 123; 351, 1989.
  35. Humphrey, TJ, et al : Infection of egg-laying hens with Salmonella enteritidis PT4 by oral inoculation, *Vet, Rec*, 125:531, 1989
  36. Humphrey. TJ. et al. : Isoates of Salmonella enterica enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. *Epidemiol. Infect.* 117 : 79-88. 1996
  37. Humphrey, TJ, et al : poultry meat as source of Human salmonellosis in England and wales *Epidemiol Infect*, 100:175-184, 1998
  38. Humphrey. TY. et al. : Contamination of hands and work surfaces with Salmonella enteritidis PT<sub>4</sub> during the preparation of egg dishes, *Epidemial. Infect.*113 : 403-409. 1994
  39. Humphrey TJ, Baskerville A, Mawer S, et al. Salmonella enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs; a study involving naturally infected hens. *Epidemiol Infect*, 103; 415-423, 1989.
  40. Humphrey TJ, Baskerville A, Chart H and Rowe B. Infection of egg-laying hens with Salmonella enteritidis PT<sub>4</sub> by oral inoculation, *Vet Res*, 125, 531,

- 1989.
41. Hurd, H.S. and Kaneene, J.B., 1990. The National Animal Health Monitoring System in Michigan. II. Methodological issues in the estimation of frequencies of disease in a prospective study of multiple dynamic populations. *Prev. vet. Med.*, 8: 115-125.
  42. Johansson TML, et al. : The first *Salmonella enteritidis* phage type 1 infection of a commercial layer flock in Finland, *Acta. Vet. Scand.*, 37 : 471, 1996
  43. Kaneene, J.B. and Hurd, H.B., 1990. The National Animal Health Monitoring System in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Prev. Vet. Med.*, 8: 127-140
  44. Kim, C.J, Nagaraja KB, Pomeroy, BS : Enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens, *Am. J Vet Res* 52 : 1069-1074, 1991
  45. King EO. Human infection with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio J Infect Dis* 1957;101:119-128.
  46. Kleinbaum, D., Kepper, L. and Morgenstern, H., 1982. *Epidemiologic Research: Principles and Quantitative Methods*. Van Nostrand - Reinhold, New York , pp. 96-115.
  47. Kotlarski SF, Merriwether TL, Tkalecic BT, et al. Genetic studies of kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30: 225-230.
  48. Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, et al. Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun* 1987;55:2786-2796.
  49. Lambert T, Gebraud G, Tricu-cuot P, et al. Structure relationship between the gene encoding 3-aminoglycoside phosphotransferase in *Campylobacter* and in gram positive cocci. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1985;136:136-150.
  50. Lester, SA, : *Salmonella enteritidis* infection of broilers and broiler breeders, *Vet Rec*, 123: 350, 1988.
  51. Levy A J. A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale J Biol Med* 1946;18:243-258.
  52. Lillard, GS : The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses, *J Food Prot.* 53:202-204, 1990
  53. Limawongnane S, Hayashidani H, Okatani AT, et al. Prevalence and

- persistence of Salmonella in broiler chicken flocks. J VET Med Sci, 61(3); 255-259, 1999
54. Linton AH. Guideline on prevention and control of salmonellosis, WHO, Geneva, 10, 1983.
  55. Line, JE, et al. : Yeast treatment to reduce Salmonella and Campylobacter populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. Poultry Sci 76:1227-1231. 1997
  56. Lloyd, J. and Schwab, G., 1987. Swine health information management system: A brief description and preliminary slaughter check data. Research Report, Agricultural Experiment Station, 487: 194-200.
  57. Lunt, D.K. and Smith, S.B. 1991. 8. Wagyu beefs holds profit potential for U.S. feed lot. Feedstuffs. 19: 18-19, 23-24
  58. Martin, S.W., Meek, A.H. and Willeberg, P., 1987. Veterinary Epidemiology: Principles and Methods. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 23-73
  59. McFadyean J, Stockman S. Abortion in sheep. In report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix V part 3rd 7157, XII *Board of Agriculture and Fisheries*, London, 1913;101~137.
  60. Miettinen, O., 1976. Estimability and estimation in case-referent studies. *Am.J.Epidemiol.*, 103(2): 226-235
  61. Monroe DL, Prescott JF, Penner JL. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotypes isolated from chickens, cattle and pigs. *J Clin Microbiol* 1983;18: 877~881.
  62. Nabbut NH. Salmonella serotypes encountered in animal feed additives in Lebanon, *Am J Vet Res.* 39(5), 893, 1978.
  63. Nair US, Saed AM, Muriana PM, et al. Plasmid profile and resistance to antimicrobial agents among Salmonella enteritidis isolates from human beings and poultry in the midwestern United States. *JAVIMA*, 206; 1339-1344, 1995.
  64. Neil SD, Campbell JN, O'Brien JJ, et al. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp *Nov Int J Syst Bacteriol* 1985;35:342~356.
  65. Nightingale SL. Salmonella foodborne illness. *Am Fam Physician*, 39; 387-388, 1989.
  66. Plummer RAS. et al. : Salmonella contamination of retail chicken products sold in the UK, *J. Food protection*, 58:843-846, 1995

67. Poppensiek, G.C. and Budd, D.L., 1966. A review of animal disease morbidity and mortality reporting. In: C.R. Schroeder, G. Poppensiek and D.L. Budd (Editors), A Historical Survey of Animal Disease Morbidity and Mortality Reporting. National Academy of Sciences, Washington, DC, pp. 1-24
68. Riemann, H.P., 1982. A nationwide sine health system in Denmark. In: J.B. Kaneene and E.C. Mother (Editors), Cost Benefits of Food Animal Health. Thomson-Shore, Dexter, MI, pp. 73-79.
69. Robert, D;Salmonella in chilled and frozen chicken, Lancet 337: 584-985, 1991
70. Roop RM II, Simbert RM, Johnson JL, et al. *Campylobacter mucosalis* (Lawsonn, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb nov : Emended description. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:189~192.
71. Sato..S : Salmonella enteritidis infection in chicken Morden Media. 37:1 1991
72. Shackelford, AD : Modifecation of processing methods to contral Salmonella in poultry, Poult, Sci. 67:933-935, 1998
73. Shin, K.K., Park, H.I., Lee, S.K., and Kim, C.J. 1998, Studies on fatty acids composition of different portions in various meat. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 18: 261-268.
74. Shivapeasad HL, TImoney JF, Morales S, Lucio B and Baker RC. Pathogenesis of Salmonella enteritidis infection in laying chickens. Studies on egg transmission, clinical signs, feed shedding and serological response, *Avian Disease*, 34, 548, 1990.
75. Shivapeasad, HL et al. : Pathogenesis of Salmonella enteritidis infection if laying chickens, L. studies on egg transmission, chemical signs, fecal shedding and serologic responses, *Aviam Disease*, 34:548, 1990
76. Simbert RM. *Campylobacter* in *Bergy's manual of determinative bacteriology* 8th ed. Baltimore;Williams & Willkins, 1974;207.
77. Stephens, A.J., Esslemont, R.J. and Ellis, P.R., 1982. A dairy herd information system for small computers. In:J.B. Kaneene and E.C. Mother (Editors), Cost Benefits of Food Animal Health. Thomson-shore, dexter, MI, pp. 117-152.
78. Sturdivant, C.A., Lunt, D.K., Smith, G.C. and Smith, S.B. 1992, Fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular adipose tissues and M. Longissimus dorsi of Wagyu cattle. *Meat Sci.*, 32: 449-458
79. The FoodSite. 1999. UN, 유기축산식품 국제지침 작성착수

80. Tanner ACR. Characterization of *Wolinella* spp, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis* and *Eikenella corrodens* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1986;24:562~565.
81. Taylor DE, Garner RS, Allan BJ. Characterization of tetracycline resistance plasmid from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;24:930~935.
82. Taylor DE, De Grandis S, Kamali MA, et al. Transmissible plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19:831~835.
83. Taylor DE. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* : Expression in *Escherichia coli* and identification of homology with streptococcal class M determinant. *J Bacteriol* 1968;1037~1039.
84. Tenover FC, Bronsdon MA, Cordon KP, et al. Isolation of plasmids encoding tetracycline resistance from *Campylobacter jejuni* strains isolated from simians. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:320~322.
85. Tenover FC, Williams S, Gordon KP, et al. Survey of plasmid and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:37~41.
86. Timoney, JF, et al. : Hagen and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals, 8th ed. Cornell Univ. Press : Ithaca and London, pp.74, 1988
87. Todd, ECD. : Poultry-associated food-borne disease : its occurrence, cost, sources, and prevention, *J Food Prot*, 43 : 129-139, 1980
88. Totten PA, Fennel CL, Tenover FC, et al. *Campylobacter cinaedi* (spp nov.) and *Campylobacter fennelliae* (spp nov): Two new campylobacter species associated with enteric disease in homosexual man. *J Infect Dis* 1985;151:131~139.
89. USDA, 1985. The national residue monitoring program. In: Meat and Poultry Inspection. National Academy Press, Washington, DC, pp. 49-67.
90. USDA, 1986. Brucellosis Eradication: Uniform Methods and Rules. APHIS/US APHIS 91-1, pp. 46-47
91. Veron M, Chatelain R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for species, *Campylobacter fetus*(smith and Taylor) Sebald and Veron. *J Syst Bacteriol* 1973;23:124~134.
92. Waltman, OW and MA Horne : Isolation of *Salmonella* from chickens reacting in the pullorum-Typhoid agglutination test, *Avian disease*, 37:805, 1993

93. WHO : Salmonellosis control : The role of animal and product hygiene. Reprot by a WHO Expert Committee.
94. Willeberg, P., 1978. The Danish swine slaughter inspection data bank and some epidemiologic applications. In: Proceedings of International Symposium on Animal Health and DiseaseData Banks, 4-6 December 1978, Washington, DC, pp. 133-144.
95. Zivkovic, J, et al. : Salmonella serovars in chicken meat and chicken meat products in zagreb, croatia, Veterinarski Arhav 67(4) : 169-175, 1997
96. 김기석. Current situation of poultry diseases in korea. 한국가금 학회지 19(3), 137, 1992.
97. 김기석, 이희수, 오인필, 김순재, 국내 닭에서의 가금티푸스(Foul Typhoid)발생. 농진청 농과 논문집(가축위생). 37(1), 544, 1995.
98. 김능희, 탁연빈 : 대구지역 도계장에서 처리된 도계육의 Salmonella 오염에 관하여. 한국수의공중보건학회지. 22(4): 365. 1998
99. 김정우 : Salmonella enteritidis의 편모향원에 대한 난황항체 생산, 한국가금학회지 25(4) : 161-167, 1998
100. 농수산부 농촌진흥청 농촌영양개선연수원, 1991, 식품성분표, 농촌진흥청농업 영양개선연수
101. 박성진, 유성오. 1999, 한약재 부산물 첨가가 육계의 성장과 생리적 변화에 미치는 영향. 가금지 26(3): 195-201
102. 신동화, 한지숙, 김문숙. 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 Listeria monocytogenes의 증식억제에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 26; 627-632, 1994.
103. 지원대, 정민선, 정현채, 등. 오미자 추출물의 세균 증식 억제효과. J Fd Hyg Safety, 16(2); 89-95, 2001.
104. 안은영, 시동화, 백남인, 등. 감초로부터 항균성물질의 분리 및 구조 동정. 한국식품과학회지, 30; 680-687, 1998.
105. 윤영선, 김공수, 이영남. 키토산의 항세균 및 항진균 활성. 한국키토산학회지, 4; 8, 1999.
106. 성찬우,김재홍,송창선,오미필,이지환,김상희.주요 닭질병에 대한 국내 종계균의 항체 보유현황, 농진청 농과논문집(가축위생).35(2), 604, 1993.
107. 오인필, 김기석, 권용국, 송창선, 우용구, 성환우, 이명주, 남상섭, 이운정, 강민수, 권혁만. 주요 가금질병 검색 및 역학조사 농진청 수의과학 연구소 시험연구보고서 pp 318, 1996.
108. 오강희, 최원필 : 초생추 유래 Salmonella 속균의 생화학적 특성, 대한수의학회지.

34:501, 1994

109. 장기석, 정병곤, 강호조 : 동물성 원료사료에서 Salmonella 속균의 분리, 생존성 및 초생추에 대한 실험적 감염, 한국수의 공중보건 학회지, 12(2) : 171.1988
110. 홍중해 : 국내에서 보고된 동물성식품유래 식중독의 역학적 발생특징. 한국수의 공중보건학회지. 18(2): 147. 1994



## 주 의

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