발 간 등 록 번 호
11-1541000-001255-01

항질병 강화 천연소재를 활용한 고효율 양돈 사료첨가제 개발

Development of the high efficiency porcine feedstuff additives using anti-pathogenic natural materials

연구기관
경상대학교

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “항질병 강화 천연소재를 활용한 고효율 양돈 사료첨가제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 2 월 일

주관연구기관명 : 경상대학교
주관연구책임자 : 김 곤 섭
세부연구책임자 : 김 석
연 구 원 : 박 광 일
연 구 원 : 박 현 수
연 구 원 : 이 도 훈
연 구 원 : 조 성 수
연 구 원 : 임 정 주
연 구 원 : 이 진 주
연 구 원 : 오 원 준
협동연구기관명 : 경북대학교
협동연구책임자 : 이 만 휘
(주)양 성 : 김 권 회

발 간 등 록 번 호

요 약 문

Ⅰ. 제 목

항질병 강화 천연소재를 활용한 고효율 양돈 사료첨가제 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

□ 국내에서도 Codex(국제식품규격) 기준에 적합한 '유기축산품질인증제'가 도입될 예정이다. 이를 위해 농림부는 국내여건에 적합한 유기축산 농가 모델과 프로그램을 개발, 우선 내년부터는 축종별로 유기 축산 시범농가 육성 및 시범 판매장을 설치하는 등 점차 유기축산을 확대해 나갈 계획이다. 농림부가 유기축산을 도입하게 된 것은 캐나다 오타와에서 개최된 제 28차 Codex 식품표시분과위원회에서 유기축산에 관한 지침 안에 합의했기 때문이다. 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 반영하고 있다.

□ 유기가축에는 유기농법으로 생산되고 유전자변형이 되지 않은 사료의 급여, 항생제, 번식 및 성장호르몬 사용금지, 휴약기간은 법적 요구기간의 2배를 준수해야 하는데 합의하였다.

□ 2003년 기준으로 연간 1400톤 이상의 항생제가 가축의 질병치료·예방뿐만 아니라 성장촉진 목적에 과도하게 사용되고 있음.

□ 배합사료에 첨가하는 항생제의 사용량은 가축에 사용되고 있는 항생제의 52 % 이상인 670톤 이상이며, 이 중 소에 사용된 것은 6.3%, 돼지에 사용된 것은 68.7% 그리고 닭에 사용된 것은 25%를 점하고 있음.

□ 현재 선진 각국에서는 축수산업의 항생제 사용이 인체에 여러 가지 부작용을 초래할 수 있는 것을 하여 질병치료를 목적으로 사용하고 있는 항생제를 제외한, 질병예방 및 성장촉진 등의 목적으로 사용하는 항생제의 사용을 금지시키는 추세임.

□ 따라서 선진국들은 사료첨가용 항생물질 대체제의 개발에 박차를 가하고 있으며, 항생제를 사용하지 않는 방향으로 전환하고 있음.

□ 국내에서도, 기존의 사료첨가용 항생제를 대체하기 위한 많은 연구가 수행되어 왔으나 실제 성사례가 거의 없으며, 대부분 외국 수입제품의 효능비교 수준을 벗어나지 못하고 있음.

□ 따라서, 우리나라가 보유하고 있는 동물, 식물, 미생물자원을 이용한 가축 사료용 항생물질 대체제 개발에 대해서는 지속적인 국내 축산산업 발전을 위해서 뿐 아니라 세계시장 개척을 위해서도 국가적 차원의 종합적 연구가 절실히 필요함.

□ 항생제 등 동물약품의 오·남용에 따른 식육 중 잔류문제, 내성균 출현문제 등 축산물의 안전성에 대해 소비자의 관심이 증대하고 있다.

□ 식육 중 잔류물질 검사결과 여전히 허용기준 초과 건수가 미국 등에 비하여는 낮은 편이나 일본보다는 높은 편임(한국: 115천건/236건, 미국: 34천건/154건, 일본: 7.5천건/4건).

□ 최근 소비자 단체에서 시중에 유통 중인 축산물을 수거, 검사 후 그 결과 발표(잔류기준초과)로 인한 축산물 소비 위축현상이 심화되고 있다.
□ 항생제 내성균에 대한 조사결과 페니실린 등 주요 항생제가 내성을 가지는 것으로 평가되고 있다.
□ 항생제의 사용량은 점차 줄어들고 있으나, 아직까지 사료첨가제로 혼입하는 항생제 량이 전체의 46%(2003년 기준) 수준임.
□ 농가에서 자가사료 배합시 항생제 별 용도, 작용기전 등에 대한 자문이나 지식 없이 임의처방으로 인한 남용사례 발생.
□ 식품의 62.7%에서 대장균 검출, 이중 약 93%의 항생제 내성확인(소비자보호원 2002년5월 통계).
□ 항생제 등 항균물질의 오·남용으로 인한 식육 중 잔류에 따라 소비자들이 우리축산물에 대한 불신 가중.
□ 웰빙시대에 따라 소비자들에게 안전한 축산물의 공급을 위한 대책마련이 요구됨.
□ 상당수의 축산 농가들이 안전축산물 생산을 위한 무 항생제 사용의 요구가 커짐.
□ 가축의 고밀도 사육, 열악한 사육환경, 축사 내 가스발생 등으로 질병에 대한 내병성 약화.
□ 면역력이 낮은 가축은 쉽게 병원체에 노출되어 질병으로 전이.
□ 항생제의 투여방법도 질병별로 적정한 약제를 투여하는 것이 아닌 무차별적으로 오용.
□ 한약제의 유효한 성분은 생체 내에서, 상승효과를 나타내어 생체내의 면역 시스템 중 보체계의 활성화, 여러 가지 cytokine의 활성화 및 일상의 식품 성분과의 상승작용으로 신체 항상성을 유지하도록 도와주는 역할을 해 왔다. 이러한 한약재 내의 유효 성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 대체 식품 첨가물이나 의약품 개발이 가능하다.
□ 양약의 경우 편중된 약 성분으로 인해 몸속의 조화를 깨뜨리는 수가 많지만 한약제의 경우 천연물 전체가 지니고 있는 전체적인 성질을 종합적으로 파악하여 원형 그대로를 사용하므로 부작용이 적고 안전할 뿐만 아니라 음식물의 일종이기 때문에 인체에 거부감이 없다는 장점도 지니고 있기 때문에 오늘날 세계적인 관심을 모으고 있다
□ 한방에서 해열, 거담, 이뇨, 건위 소종 등의 효능을 가지고 있다고 알려진 삼백초(*Saururus Chinensis* Bail.)는 삼백초 과 삼백초 속 식물로서 우리나라에서는 제주도 서쪽 습지에서 자생하는 것으로 알려져 있다. 1980년대까지 삼백초 성분에 대한 연구는 그리 활발히 이루어지지 않았다. 다만 잎에서는 quercertin, quercitrin, isoquercitrin, hyperin 등의 flavonoids 성분이, 지방부에서는 항균성분인 methyl-n-nonyl ketone, 뿌리에서는 amino acid, organic acid, sugar 및 tannin 등이 존재한다고 알려졌을 뿐 이었다.
□ 삼백초(*Saururus Chinensis)*에는 flavonoids 성분인 quercitrin, isoquercitrin, hyperin, rutin이 확인되었고 특히 *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 등에 강한 항균효과를 나타낸다고 보고하였다.
□ 황금(Scutellariae Radix)은 항균성분인 baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein 등이 함유되어 있으며, 이들 성분은 강력한 항균효과와 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높이는 작용, 이뇨작용, 염증치료 및 면역활성 등이 있어 민간요법의 항생효과를 지닌 치료제로 널리 사용되고 있다.
□ 국내산 약초 중 홍화(*Carthamus tinctorius L*)는 잇꽃이라 하는 국화과(Compoitae)에 속하는 일년생 초목으로 원산지는 아프가니스탄의 산악지대 또는 에티오피아이며, 중국, 티벳 등지

에서 재배되기도 하며 학명은 *Carthamus tinctorius*이다.

□ 홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원 작물이기도 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 acid의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고되었다.

□ 최근 이 홍화씨가 골절 및 골다공증 등의 뼈 질환에 뛰어난 효과가 있음이 민간인들 사이에 알려져 현재 국내에서 민간요법으로 사용되고 있다. 특히 금이 가거나 다친 뼈를 빠르고 튼튼하게 회복시켜 준다는 홍화씨의 효력에 대하여 과학적 근거 및 치료효과가 확립되어 있지 않다. 그러나 홍화씨의 효능에 대한 관심이 집중되면서 국내에서 연구가 활발히 진행되고 있으며, 볶은 홍화씨에서 생리활성물질인 lignan, flavonoid 및 serotonin 성분들을 분리하여 그 구조식을 밝혔다.

□ 홍화씨 성분 중 lignan과 flavonoid는 diphenol 성분으로서 estrogen과 화학구조가 비슷하며, estrogen과 비슷한 생리작용도 나타내기 때문에 식물성 estrogen(phytoestrogen) 이라 불려진다. 최근에 식물성 estrogen은 사람에서 뼈 보호작용, 항암작용 을 나타낸다고 알려졌는데, 그 외에도 항 산화 작용, 혈청 콜레스테롤과 그 외 지질을 낮추는 등 생체 조직을 보호하는 다양한 기능이 알려지면서 그 중요성에 대해 주목하고 있다.

□ IgY(Immunoglobulin in Yolk)는 어미 닭이 획득한 항체가 난황에 축척되어 새끼들에게 전해지는 원리를 이용한 특수 면역단백질이다. 어미 닭에 대장균 등 각종 원인균을 주입시킨 후 생산된 계란의 노른자에 이들 균을 막아 낼수 있는 특수면역단백질(항체)이 만들어 지도록 한 것이다. 이때 난황에 축척되어 있는 특수 단백질을 IgY라고 하며, 항생제와는 달리 내성과 부작용이 전혀 없는 것이 특징이다.

□ 본 연구에서 개발될 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 소화기질병의 주요 원인인 전염성질환을 예방하고 치료에 이용될 수 있다

□ 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 전염성질병의 항원을 면역시킨 닭으로 부터 얻어낸 계란의(Yolk)주성분으로 한 면역 난황항체에 전해질을 첨가한 제품으로, 기존 사료에 혼합(사료첨가제) 또는 보조 사료로 급여하므로 돼지의 소화기질병을 예방 및 치료 효과를 보는 것이다.

□ 현재 의약품 등의 항생제 오·남용이 사회적인 문제로 부각되고 있다. 그러나 IgY를 활용한 물질이 개발되면서 오·남용의 우려를 불식시킬 것으로 기대된다.

□ 따라서 난황 유래 사료첨가제를 상품화하여 기존사료에 첨가 또는 단일 사료로급여 돼지 사육에 있어 항생제의 사용을 지양하고, 어린 일령의 자돈이 질병으로 부터 피해를 줄이고 문제시 되는 소화기계통의 전염성질환을 예방 및 치료해 주는 것이다.

□ UR농산물 협상이 타결되어 돼지고기 등 축산물의 수입이 완전 개방됨에 따라 우리나라의 양돈산업은 무한경쟁시대에 돌입하였는데, 이러한 국면을 해소하기 위한 방법을 다각도로 모색하고 있으나 간단하지는 않은 듯하다. 이러한 난국타개의 일환으로 항병성 사료를 먹인 돼지의 고품질 유기축산돼지 생산의 중요성 부각도 매우 중요한 의미를 가지고 있다. 일반 사육기법으로 사육된 돼지는 품질과 안전성식품으로서 떨어지는 단점이 있다.

□ 축산업의 연간 총생산액은 약 11조8000억 원(2006년 농림통계자료)에 달하며 그 중에서 양돈업계의 생산액이 약 3조8000억 원(2006년 대한양돈협회)에 달한다. 그러나 돼지 질병으로 의한 경제적 손실은 총 생산액의 20%로 추정하고 있다.

□ 돼지의 질병은 성장별, 질병별 발생 양상이 복잡하고, 한 가지 원인으로 인한 피해보다는 복합적인 요소 또는 병원체에 의한 피해가 늘어 가고 있다.

□ 돼지질병은 폐사로 인한 직접적인 피해보다는 사료효율 감소, 성장률 저하, 위축돈 발생, 출하일령 연장 등을 가져오므로, 질병이 발병하기에 앞서, 질병을 차단하고, 예방하며, 근원을 찾아내는 일을 지속적으로 하여야 한다.

□ 돼지소화기 질환의 대표적 질병으로는 대장균증(E.Coli), 전염성위장염(Transmissible gasroenteritis: TGE), 유행성설사병(Porcin epidemic diarrhea: PED)이며 그 피해는 매우 심각하여 총 생산량의 20 %정도가 질병에 의한 손실로 추정되고 있다(2007. 대한 양돈협회).

□ 병원성 대장균에 의한 자돈의 설사병은 주로 Enterotoxigenic Escherichia coli가 생성하는 Enterotoxins에 의해서 발생되는 병원성 대장균성 감염증과 살모넬라 감염증이 대부분을 차지하고 있다.

□ 돼지의 질병 중에서 가장 큰 피해를 주는 것은 신생, 포유 자돈, 이유자돈에서 에서 발생하는 소화기성 소모성 질병인데, 이 시기의 감염은 설사 및 폐사에 따른 직접적 피해는 물론, 감염돈 개체의 면역력 약화, 설사로 인한 체내 항상성 상실, 각종 백신에 대한 면역 형성 억제, 다른 바이러스 및 호흡기 질병 유도 세균의 감염이 용이하여, 질병 방어력이 악화되기 때문이다.

□ 따라서 고품질과 항생제를 최소화하면서 돼지를 사육하여 소비자의 기호에 맞는 기능성생산물로서 소비확대와 생산비 보장을 이룩해야 할 시점이다. 일본이나 대만 등에서도 고품질 안전성 돼지고기의 생산으로 소비시장에 활력소 역할을 하고 있다.

□ 따라서 본 연구는 천연약재인 삼백초, 황금 등의 항균성분(baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein, methyl-n-nonyl ketone 등)과 홍화 등의 생리활성분성분인 Carthamin($C_{12}H_{22}O_{11}$)과 IgY를 이용하여, 사료첨가제로 먹인 후, 돼지 성장기간 동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 돼지 소화기 주요 질병인 대장균증(*E. Coli*), 살모넬라 감염증을 예방하고, 동시에 고품질 안전성 돼지를 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여 하고자 한다.

나. 연구개발대상 기술의 국내·외 현황

(1) 세계적 수준

개념정립 단계	O	기업화 단계		기술 안정화 단계	

미국의 유기농업

□ 1990년에 제정된 미국의 유기식품생산법은 모든 경작물, 야생작물, 가축, 그리고 유기농업이라는 보증을 원하는 모든 농산물은 미국의 유기농업프로그램을 적용하고 유기생산규정을 지켜야 한다. 유기농업의 기본 개념이나 의미는 유럽의 유기농업과 거의 유사한 형태를 취하고 있음. 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 사양되어야 함.

□ 합성물질이 함유된 사료첨가제나 공급제는 유기축산에 이용할 수 없기 때문에 유기축산체계 속의 가축사료는 초지나 사료작물을 포함하여 전적으로 유기적으로 생산되어야 함. 생산자는 동물약품, 성장촉진호르몬을 사용할 수 없으며 정상적인 성장과 건강유지에 필요한 양 이상의 사료첨가제나 공급제는 사용해서는 안됨.
□ 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 있음

CODEX 유기농업

□ 유기식품의 생산, 가공, 표시, 유통에 대한 지침을 Codex에서 논의한 것은 1990년부터이며, Codex집행위원회는 유기식품의 지침에 대하여 캐나다 행정부가 초안을 만들도록 하였으며, 1991년 제 19차 총회에서 지침서 초안을 캐나다 정부 대표가 발표함. 1993년 호주의 전문가회의에 지침이 송부되어, 제 22차 식품표시분과위원회에서 토의하였으며, 동 분과위원회에서는 재수정 지침을 작성하였다. 1994년 제 23차부터 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 못함. 그 주요 내용으로 일반기준을 보면 유기농업은 농업생태계의 건강, 생명의 다양성, 생물학적 순환 및 토양생물학적 활동을 촉진, 증진시키는 하나의 전체적인 생산관리체계임.

(2) 국내수준

□ 우리나라의 유기농업은 CODEX 유기농업과는 차이가 있지만 민간차원의 유기농업단체가 있어서 유기농업의 실현을 위한 노력을 해 왔으나 유기축산분야는 아직 전국적인 민간단체가 결성되지 못하였고 지역별로 몇 개의 농가가 연합한 형태 또는 개별적으로 유기축산업을 하려는 농민이 있을 뿐 소규모가 대부분임. 따라서 농림부에서는 우선적으로 동물사육에 항생제 사용을 억제하는 연구가 활발히 진행되고 있음.
□ 항생제 등 동물약품 안전사용교육, 검사실시와 계도, 배합사료 내 혼합가능동물약품의 종류 감축 등 항생제 사용절감을 위한 노력을 기울여 왔으나, 항생제 오·남용으로 인한 문제는 계속 상존하고 있는 실정임.
□ 안전한 축산물생산을 통한 소비자의 욕구충족 및 우리나라 축산업의 지속가능한 발전을 위해서는 항생제 등 동물약품의 절감을 위한 체계적인 점검 및 대책 수립, 추진이 필요함.
□ 열악한 사육환경에 의한 막연한 질병발생 우려에 따른 항생제 등 항균물질 과다 투여하고 있는 실정임.
□ 축산업의 연간 총생산액은 7조원(1997년 농림통계자료)에 달하며 그 중에서 양돈업계의 생산액이 2조원에 달한다. 그러나 돼지 질병으로 인한 경제적 손실은 총생산액의 20%로 추정하고 있음.
□ 돼지의 질병 중에서 가장 큰 피해를 주는 것은 신생 및 포유 자돈에서 발생하는 설사병과 이유자돈의 대표적인 질환임.
□ 특히 감염된 자돈은 대부분 폐사하며 회복되더라도 위축돈이 되므로 양돈업계에 큰 피해를 주기 때문에 질병에 의한 피해를 최소화하기 위해 신속·정확한 진단이 필요함.
□ 자돈의 설사병은 주로 장출혈성(EHEC), 장병원성(EPEC) 및 장독소혈청(ETEC) 대장균, 살

모넬라 균에 의해 유발되며, 수많은 혈청형이 알려져 있으나 혈청형 간의 생화학적 특징 및 genetic marker가 없기 대문에 원인균을 신속하게 진단하는데 어려움이 많고 긴 시간이 요구됨.

□ 양돈 및 양계 산업에서 IgY를 이용한 질병 예방용 제품을 개발하여 활용하고 있으나, 다양한 질병에 대한 포괄적 적용이 어려운 현실이며, 특히 양돈산업에서 문제가 되고 있는 대장균 및 살모넬라 균 감염에 의한 설사증을 포괄적으로 예방하기 위한 제품은 개발되어 있지 않음. 특히, 각 균의 혈청형이 다르고 항원의 다양성으로 인하여 포괄적 접근이 어려운 현실이기 때문에 이에 대한 보완이 시급한 실정임.

(3) 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국립수의과학검역원	항생제 대체물질 개발	개발연구중
(주) 애드바이오텍	IgY를 이용한 자돈 설사 및 가금 티푸스 예방용 사료첨가제 개발	사료첨가제로서 활용
(주) 퓨리나	혈장단백 및 IgY를 이용한 소모성 질환 예방용 사료첨가제 개발	사료첨가제로서 활용
강원대학교	IgY를 이용한 돼지 유행성 설사증(PED) 예방용 사료첨가제 개발	사료첨가제로서 활용

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

(1) 연구개발의 최종목표

□ 항생제 등 동물약품의 오·남용에 따른 식육 중 잔류문제, 내성균 출현문제 등 축산물의 안전성에 대해 소비자 관심이 증대하고 있으며, 식육 중 잔류물질 검사결과 여전히 허용기준초과 건수가 미국 등에 비하여는 낮은 편이나 일본보다는 높은 편임(한국: 115천건/236건, 미국: 34천건/154건, 일본: 7.5천건/4건).

□ 최근 소비자 단체에서 시중에 유통 중인 축산물을 수거 검사 후 그 결과 발표(잔류기준초과)로 인한 축산물 소비 위축현상이 심화되고 있으며, 항생제 내성균에 대한 조사결과 페니실린 등 주요 항생제가 내성을 가지는 것으로 평가되고 있고, 항생제의 사용량은 점차 줄어들고 있으나, 아직까지 사료첨가제로 혼입하는 항생제 량이 전체의 46%(2003년 기준) 수준임.

□ 농가에서 자가사료 배합시 항생제 별 용도, 작용기전 등에 대한 자문이나 지식 없이 임의처방으로 인한 남용사례 발생하고 있고, 식품의 62.7%에서 대장균 검출되었고, 이중 약 93%가 항생제 내성확인(소비자보호원 2002년 5월 통계)이 문제가 되고 있으며, 항생제 등 항균물질의 오·남용으로 인한 식육 중 잔류에 따라 소비자들이 우리축산물에 대한 불신이 가중되고 있으며 웰빙시대에 따라 소비자들에게 안전한 축산물의 공급을 위한 대책마련이 요구됨.

□ 상당수의 축산농가들이 안전축산물 생산을 위한 무 항생제 사용의 요구가 커지고 있고, 가축의 고밀도 사육, 열악한 사육환경, 축사 내 가스발생 등으로 질병에 대한 내병성이 약화되어 쉽게 병원체에 노출되어 질병으로 전이되어 심각한 경제적 손실을 유발함.

□ WTO이후 축산물 시장개방에 대항하기 위해서는 외래종과 차별되는 고품질의 특수 돼지고기생산이 필요하며 또한 기존의 돼지보다 성장이 빠르고 기능성을 가진 안전성 돼지의 사육으로 농가의 생산성을 높이는 것은 물론 균일화된 규격품의 돼지생산체제를 마련하고 대외수출을 통하여 국가 경쟁력을 높일 필요성이 대두되고 있음.

□ 홍화는 한국, 일본, 중국 등에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원 작물이기도 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 보고됨.

□ 황금은 항균성분인 baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein 등이 함유되어있으며 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높이고 이뇨작용, 염증치료 및 면역활성 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다. 뿐만 아니라 포화성 콜레스테롤을 저하시키며 질병에 대한 이완율을 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며 불포화지방산 함량을 높인다는 보고도 있다. 또 맛의 중요 인자인 아미노산을 증가시키며 계육의 보수력 및 연도 등을 향상시킨다고 보고하였음.

□ 삼백초에는 flavonoids 성분인 quercitrin, isoquercitrin, hyperin, rutin 등이 확인되었고, 특히 항균성분인 methyl-n-nonyl ketone 등은 *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* 등에 강한 항균효과를 나타낸다고 보고하였음.

□ IgY(Immunoglobulin in Yolk)는 어미 닭이 획득한 항체가 난황에 축적되어 새끼들에게 전해지는 원리를 이용한 특수 면역단백질이다. 어미 닭에 대장균 등 각종 원인균을 주입시킨 후

생산된 계란의 노른자에 이들 균을 막아 낼수 있는 특수면역단백질(항체)이 만들어 지도록 한 것이다. 이때 난황에 축척되어 있는 특수 단백질을 IgY라고 하며, 항생제와는 달리 내성과 부작용이 전혀 없는 것이 특징이다.

□ 본 연구에서 개발될 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 소화기질병의 주요 원인인 전염성질환을 예방하고 치료에 이용될 수 있다

□ 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 전염성질병의 항원을 면역시킨 닭으로 부터 얻어낸 계란의 (Yolk)주성분으로 한 면역 난황항체에 전해질을 첨가한 제품으로, 기존 사료에 혼합(사료첨가제) 또는 보조사료로 급여하므로 돼지의 소화기질병을 예방 및 치료 효과를 보는 것이다.

□ 현재 의약품 등의 항생제 오·남용이 사회적인 문제로 부각되고 있다. 그러나 IgY를 활용한 물질이 개발되면서 오·남용의 우려를 불식시킬 것으로 기대된다.

□ 따라서 난황 유래 사료첨가제를 상품화하여 기존사료에 첨가 또는 단일사료로급여 돼지 사육에 있어 항생제의 사용을 지양하고, 어린 일령의 자돈이 질병으로 부터 피해를 줄이고 문제시 되는 소화기계통의 전염성질환을 예방 및 치료해 주는 것이다.

□ 따라서 이 연구의 목표는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl ketone, 황금의 항균성분인 baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein 등과 홍화의 carthamin과 IgY를 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료첨가제로 만든 후 돼지에 적용하여

1)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명

2)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체내 조절 물질에 대한 이화학적 검정 및 안전성 평가

3)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가등에 관한 연구 하고저 한다. 또한 돼지성장 기간 동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 돼지 소화기질병(대장균증, 살모넬라 감염증)을 예방하고, 사료효율등을 증진 시킬수 있으며,동시에 고품질 안전성 돼지를 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여하고자 함.

나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

○ **세부과제(1) - 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체 내 조절 물질에 대한 사양및 이화학적 검정**

- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 사양 및 이화학적 효과에 미치는 영향
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 나타나는 질병 제어기전 규명
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 유효 농도 설정
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 돼지 생체내 안전성 평가
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 돼지 소화기 발육 평가

○ **세부과제(2) - 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명**

- 병원성 대장균 야외주를 이용한 공통 항원 선발
- 병원성 살모넬라 야외주를 이용한 공통 항원 선발
- 공통 항원을 이용한 난황 유래 IgY 정제
- 야외주 감염 실험을 통한 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY의 항균효과 규명
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 체내 면역체계에 미치는 영향 규명
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 사료 첨가시 체내 내재성 면역 활성에 미치는 영향 규명
- 야외주 세포감염을 통한 천연소재 약용자원, IgY의 질병 제어기전 규명

○ **협동과제(3) - 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가**

- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 질병 제어 효과 규명
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 경제성 평가
- 천연소재 약용자원, 난황유래 IgY와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 축산물의 안전성 평가

Ⅳ. 연구개발결과

1. 연구개발결과

가.천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체 내 조절 물질에 대한 사양및 이화학적 검정

1)돼지 혈청에 대한 사료 첨가제의 영향을 조사하기 위해 혈청에 대한 proteome을 실시 하였다. 즉, 항균 효과에 대한 단백질 발현을 조사하기 위하여 대조군 과 1% 사료첨가제 투여군에서 1일, 1주, 2주, 4주및 8주에 혈액을 채취하여 원심분리 한 후 돼지 혈청에서 단백질 발현을 조사 하였다. spot의 detection과 normaliziation은 nonlinear사의 samespot image analysis software로 실시 하였으며, MALDI-TOF peptide analysis는 mascot peptide search engine을 이용하여 분석하였다. proteome 분석결과 총23개의 spot이 발견되었으며 이중 7개의 spot이 MALDI-TOF peptide 분석결과 확인되었다. 이들 단백질 중 골격근의 이온 교환 channel 구성에 관련된 단백질인 Sarcolemmal membrane associated protein, cholesterol 대사 관련 지단백질인 Apolipoprotein A-IV, unnamed protein product, apolipoprotein 전구 물질로 작용하는 단백질인 apolipoprotein A-I preproprotein 등이 Up-regulation 되었으며, hypothetical protein isoform 4 는 Down-regulation 되는 경향을 나타내었다

2) IgY가 포함된 사료첨가제가 자돈 소화기 장관내에 미치는 영향을 조사하기위하여 경시별로 돼지 장관을 적출하여 소화기 장관내의 변화를 조사 하였다. 돼지의 장관에서 *Salmonella* 및 *E.coli*의 정착상태를 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, 대조군에서는 장 점막 상피 표면에 다수의 *Salmonella*균 및*E.coli* 이 관찰 되었으나, 사료첨가제1%를 급여한군 에서는 장 점막상피에 부착된 *Salmonella*균및 *E.col*i 가 감소하였다.

3) IgY가 포함된사료첨가제를 돼지의 사료에 1% 혼합하여 3주부터 ,6개월간 급여후 돼지 돈육내 조지방, 조회분 및 사료요구율에 미치는 영향을 조사한 결과, 1%사료첨가제를 투여한군 대조군에 비하여 조지방의 감소(6.63±0.48▶4.01±0.19),토탈 cholesterol의 감소(62.29±0.28▶52.18±0.27), 사료요구율(2.98▶2.57)의 감소, 체중(98.1▶100.12)의 증가를 나타내었다.

4) IgY가 함유된 사료첨가제가 돈육의 아미노산조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 이유후, 사료에 1% 되게 균질하게 혼합한 후 급여 6개월째 돈육 내 아미노산 조성에 미치는 영향을 조사한 바 IgY가 포함된 사료첨가제 1%를 투여 군이 대조군에 비하여Serine, Glutamic acid,Alanine, Asparatic acid, Histidine, Methioine이 증가하였다.

5)IgY가 함유된 사료첨가제가 돈육의 지방산조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 이유후,1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 6개월째 돈육 내 지방산에 미치는 영향을 조사한 결과 IgY 가 포함된 사료첨가제 (1%)를 투여한 군이 대조군에 비하여 Stearic acid(C18:0:15.29±0.10▶10.11±0.12) 및 Palmitic acid(C16:0:26.09±0.54▶21.09±0.06) 감소, Palmitoleic acid(C16:1:5.04±0.19▶4.86±0.10), Oleic acid(C18:1:40.17±0.10▶47.21±0.35), Linoleic acid (C18:2:13.58±0.10▶16.48±0.11)의 증가로 대조군에 비하여 IgY가 함유된 사료첨가제를 급여한 군 (1%)이 포화지방산의 감소,불포화지방산의 증가를 나타내었다

6)IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지 체내 안전성 평가를 실시하기 위하여 돼지의 귀정맥에서 혈액 1cc를 채취하여 4℃에서 3000rpm으로 15분간 원심분리한 혈청을 -80℃에서 냉동보관하면서 생화학분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였던바, Alkaline phosphate, SGOT, SGPT, Amylase, glucose, bilirubin, LDH, CPK등이 정상범위

내에 있었다.

나.천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명

1)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험결과 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력에는 큰 영향을 미치지 않았음

2)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험 결과 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균 증식능에 있어 억제효과가 입증되었음

3)황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험결과 살모넬라 균에 대해 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력이 억제 되는 것을 확인 함

4)황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험 결과 황금 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균 증식능에 있어 억제효과가 입증되었음

5)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 대식세포(RAW264.7 cell)에 대한 생리적 활성도 시험 결과 배양시간이 경과함에 따라 대식세포의 형태적 변화가 비처리 대조구에 비해 크게 증가되는 것을 확인할 수 있고 이를 통해 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물이 대식세포에 대해 생리적 활성화시킴을 입증할 수 있음.

6)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 및 면역 기전 시험을 확인하기위해 NO값을 측정해 본 결과, 균 감염시킨 비처리 대조구는 NO산생량이 크게 증가하는 반면, 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물을 처리한 균 감염 세포에서는 NO산생량이 다소 감소하는 양상을 보이나 유의적인 차이를 보이지 않음이 입증됨.

7)시험 전기간에 걸쳐 천연소재 사료첨가제 급여 시험군 및 비급여 시험군 모두에서 병원성 대장균 및 살모넬라균의 검출이 인정되지 않았으며, 소화기성 질병 및 폐사가 인정되지 않았음.

8)시험 전기간에 걸쳐 천연소재 사료 첨가제 급여 시험군내 총 세균수는 비투여 군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으나 투여군이 비 투여군에 비해 시험 급여 4주 후에 2배가량 적 돼지 소화기성 세균성 질병 원인체에 대한 삼백초 및 황금의 항균효과 규명 됨

9)돼지 소화기성 질병 원인체인 대장균과 살모넬라에 대한 IgY의 면역원성 규명 및 대식세포 내 증식 및 침입 억제 규명 됨

10)천연소재 약용자원과 IgY의 사료 급여를 통한 돼지 소화기성 질병에 대한 항질병효과가 규명 됨

11)천연소재 약용자원과 IgY의 사료 급여를 통한 돼지 정상 세균총에 대한 안전성이 확보됨

12)천연소재 약용자원과 IgY의 대식세포 활성 및 사료 급여를 통한 돼지 체내 면역 활성이 확인됨

었으며, 6개월 후에는 5배 가량 적은 것으로 나타났음

다)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가

1)본 연구를 토대로 돼지 소화기성 세균성 질병 원인체인 대장균과 살모넬라에 대한 닭 난황항체 IgY가 두 병원성 균체의 다양한 항원에 대해 특이적 반응을 보이는 것이 면역블럿팅

시험에서 확인을 할 수 있었으며, 또한 이들 IgY가 두 병원체의 숙주 상피세포에 침입 및 부착을 억제하는 것으로 밝혀져, 소화기성 질병을 예방할 것으로 평가되었다.

2)또한 천연소재 약용자원과 IgY를 첨가한 사료를 급여한 실험군에서 일반 사료 급여군에 비하여 높은 혈중 WBC 함양을 보여 면역활성 기능을 보여주었다.

3)다양한 천연소재 자원에 대한 생리 활성을 평가해본 결과 천년초 및 어성초 추출물의 성분인 quercetin과 CE6 성분이 항염증 및 혈소판 활성 저해 물질로 평가되었다.

4)이 결과로 유추해 보건대 천년초 에틸아세테이트 추출물은 in vitro 상에서 강력한 항산화 효과와, RAW264.7 세포에서의 항염증 효과 및 혈소판 활성 억제효과를 가지고 있는 물질임을 알 수 있었고 이는 천년초 에틸아세테이트 추출물이 혈전증이나 동맥경화증과 같은 심혈관계 질환의 치료에 사용할 수 있을 것이다.

5) 경제성평가:

본 시료첨가제 사용시 폐사율감소(MSY 증가 15.2에서 21이상)로 출하두수증가 및 사료요구율감소로 인한 수익증대 예상가 예상됨

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

□ 돼지 성장기간 중 돼지의 소화기 질병에 대한 항균효과를 나타낼 수 있는 사료첨가제 개발

□ 높은 육질의 돈육 제공 및 사육 생산성 증대효과를 가져올수 있다.

□ 안전축산물 생산기술개발을 통한 축산식품 공급할수 있다.

□ 연구개발과 동시에 산업화하여 양돈 농가에 보급하여 안전성 돼지 생산으로 소득증대할수 있다.

□ 양돈 농가의 소모성 질병으로 인한 피해 최소화 및 예방대책 수립힐수 있다.

□ 내성균 출현, 축산물 내 항생제 잔류 문제와 같은 항생제 오남용 예방할수 있다.

□ HDL의 증가 및 LDL감소 돈육생산을 위한 사료 첨가제 개발

□ 보수력 및 연도 등이 향상된 돈육생산을 위한 사료첨가제 개발

□ methionine, cysteine 등이 풍부한 고기호성 돈육 생산가능하다.

□ 국민 건강 증진 토대 구축할수 있다.

SUMMARY

Ⅰ.Title

Development of the high efficiency porcine feedstuff additives using anti-pathogenic natural materials

Ⅱ.Purpose and Signaificance of Research

This study was conducted for the development of the high efficiency porcine feedstuff additives using anti-pathogenic natural materials.

Herbal medicines have been used in traditional medical systems in developing countries for thousands of years, particularly in Eastern Asia. Herbal medicines generally have fewer side effects than synthetic medicines. Many studies have shown that the herbal component is also effective in regulating the pathogenic process in animals and humans. Scutellariae Radix (SR, the root of Scutellaria baicalensis Georgi, family Labiatae) is used as a medicinal herb in Eastern Asia, including China, Korea and Japan. It has a variety of medicinal properties including anti-microbial and anti-inflammatory activities.

Baicalein is the main flavonoid of scutellariae radix and has an antihepatotoxic effect . Safflower (Carthamus tinctoriusL, Asteraceae family) is a highly branched, herbaceous, annual plant. Its seed contains anatural pigment known as Carthamin. Carthamus tinctorius L. has pharmacological effects including antioxidant and neuroprotective effects. Saururus chinensis was reported to have antioxidant, anti-inflammatory , hypolipidemic , hypoglycemic , analgesic, antihypertensive and hepatoprotective
effects. Saururus chinensis is rich in flavonoids, such as quercetin, quercitrin and rutin. The egg yolks from laying hens are a good source of polyclonal antibodies. Specific egg yolk immunoglobulin (IgY) provides passive protection against ETEC infections in early post-weaning pigs . However, previous studies have reported that either organic acids or vitamins or individual natural herbs affect pigs orally challenged with E. coli and Salmonella typhimurium. There are no reports on the effects of multiple herbal mixtures as an additive to food on the protein metabolism.

Combining these individual natural herbs and specific IgY might induce an immune response in pigs orally challenged with E. coli and Salmonella typhimurium. Moreover, it is important to discover an alternative to the feeding of antibiotics to animals. Therefore, this study examined the effect of an additive mixture on thevarious changes on high efficiency porcine feedstuff additives using anti-pathogenic natural materials and To identify the antibacterial effects and diarrheal disease controlling

mechanisms of natural herb, multi-pathogen protective IgY antibody and bio-balance materials in swine model. To our knowledge, this is the first study to analyze the effects of an natural feed additive in pigs.

Ⅲ Contents and Scope of Research

1. Phsico-Biochemical Analysis on Natural Herb Additive Containing Immunoglobulin Yolk sac (IgY) in Pigs

All experiments were performed in accordance with the Gyeong-Sang National University experimental animal''s guidelines. Specific Immunoglobulin Yolksac (IgY) Production The specific antigen was collected from two different species, E. coli and Salmonella typhimurium. The antigen was then mixed with an oil adjuvant to produce a combined 478 H.-S. PARK et al. vaccine. This combined vaccine was injected into layer chickens three times at three week intervals. The eggs were collected two weeks after the final injection, washed with sodium hypochlorite and dried. The dried eggs were broken and the yolk sac was separated from the egg white. This dried egg yolk sac powder was tested for the antibody titer. The additive consisted of 20% Carthamus tinctorius L. extract powder, 30% Saururus chinensis leaf powder, 20% Scutellaria baicalensis root powder and 30% egg-originating dried specific IgY powder. The final mixture was added to the food at a concentration of 0.5% and 1.0%. A total of 30 male pigs (three weeks, Yangsung, Suwon, Korea) were infected orally with E. coli and Salmonella typhimurium and divided into the control and additive groups. The control group contained ten animals. The experimental groups were divided into two sub groups (0.5% and 1.0%) according to the additive concentrations; each sub group contained ten animals. The body weight and food intake were recorded at two stages (1st day and after eight weeks of additive feeding). After eight weeks, the animals were sacrificed with pentobarbital. The spleen and serum were collected from both the control and additive groups. The spleen was washed with cold saline and stored at 70C until further analysis.

For Biochemical Analysis, the experimental data was collected from both the control and experimental groups at two stages (1st day and after eight weeks of additive feeding). After eight weeks, all animals were sacrificed and the serum was collected. The serum glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels were determined using a GOT/GPT kit (Bio Clinical system, Anyang, Korea) according to the manufacturer''s protocol. The protein was extracted from the pig''s spleen of both the control and additive groups. Briefly, 0.1 g of the spleen sample was dissolved in 500 l of the sample buffer containing 7Murea, 2Mthiourea, and 4% (w/v) CHAPS. After sonication, the samples were centrifuged at 15,000 rpm

and 4C for 1 hour and the supernatant was collected. For protein precipitation, 100 l of the supernatant was treated with 10% TCA (v/v) and incubated at 20C for three hours. The samples were then centrifuged at 15,000 rpm and 4C for ten min and the supernatant was discarded. The protein pellets were dried in a lyophilizer, dissolved in 500 l of the sample buffer and centrifuged at 15,000 rpm and 4C for 30 min. The supernatant was transferred to another e-tube and stored at 80C until needed. The protein concentration was estimated using a modified Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer''s instructions.
For Two-Dimensional Electrophoresis, In the first dimension, a total of 200 g of protein from each sample was applied onto an IPG strip (Immobiline DryStripTM, pH 3--10 NL, 13 cm, GE Healthcare Life Sciences) for the IEF process. The protein samples were focused for a total of 64.3 kVh. The strips were equilibrated with 10 mg/ml DTT in an equilibration buffer for 15 min first and then with iodo-acetamide for 15 min with continuous shaking. In the second dimension, the equilibrated strips were placed onto 12% SDS-PAGE and run at a constant 20mA until the dye reached the bottom of the gel. The protein spots in the analytical gels were visualized by silver staining. Silver staining was performed using the methods reported elsewhere Image and Data Analysis .The gel images were acquired using a BIO-RADTM GS-800 scanner and imported into PhoretixTM 2D software (ver. 5.01, Nonlinear Dynamics, Newcastle, U.K.) for analysis. Protein spots showing more than a two-fold changes were considered to be differentially expressed proteins. All spots were confirmed visually and edited manually.
For Identification of Differentially Expressed Proteins by Mass Spectrometry, The selected protein spots were excised manually from the 2-DE gel for protein identification.In gel digestion of the selected protein spots on the gel was performed as described by Shevchenko et al. (1996). The excised protein spots were proteolyzed in-gel with trypsin. The tryptic fragment masses were detected by Matrix Assisted For Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF, MS, USA) using a PerSeptive Biosystems Voyager-DE STR mass spectrometer. The proteins were identified by a Mascot-Peptide Mass Fingerprint (www.matrixscience.com) database search. The following parameters were used for the database searches: taxonomy, mammalians; cleavage specificity, trypsin with one missed cleavages allowed; Peptide tolerance of 100 ppm for fragment ions; allowed modifications, Cys Carbamidomethyl (fixed), oxidation of Met (variable). The MOWSE score and species were considered to indentify the correct protein from the mascot results list. For Gene Ontology (GO) Analysis, The spot identities were submitted to a GO retriever (http://www.agbase.msstate.edu/) to obtain the GO annotations, which were then summarized based on the GOSlim set using a GOSlim Viewer
For statistical analysis. All the results are expressed as the mean SD. All statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS for Windows, ver. 10.0; SPSS

Inc. Chicago, IL, USA). The significance of the differences between the control and additive groups were analyzed using one-way ANOVA followed by a student''s t-test. A p value<0.05 was considered significant.

2. Antibacterial effects and disease control mechanism of natural herb, multi-pathogen protective IgY antibody and bio-balance materials

Preparation of pathogenic *E. coli* and *Salmonella typhimurium*
1)Characterization of IgY against *E. coli* and *Salmonella typhimurium*
2)dentification of antibacterial effects of natural herb and IgY antibody
3)Identification of intrinsic immune activation of natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed in swine
4) Identification of diarrheal disease controlling mechanisms of natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed in artificially infected swine

3. Pharmcological Evaulation and Economical Analysis on Natural Herb Additive Containing Immunoglobulin Yolk sac (IgY) in Pigs

1) Evaluation of physiological activation of natural herb, multi-pathogen protective IgY antibody and bio-balance materials
2) Measurment of various antibiotic residues in swine blood
3) Measurment of natural herb, multi-pathogen protective IgY antibody and bio-balance materials residues in swine blood
4) Measurment of various antibiotic residues after feeding of natural herb, multi-pathogen protective IgY antibody and bio-balance materials composing feed in swine
5) Evaluation of stability and ecomonic benefits

4 Results of Research

The effect of the natural herb additive on the serum GOT/GPT levels was examined by monitoring the pigs daily. On the 1st day, the GOT/GPT level was 67:4 3:1=69:65 7:56 IU/L (control group), 56:87 10:09=69:76 4:12 IU/L (0.5% additive group) and 102:81 7:13=86:46 10:28 IU/L (1% additive group). After eight weeks, the GOT/GPT level was 73:07 7:08=80:29 1:37 IU/L (control group), 46:29 4:28=81:44 3:36 IU/L (0.5% additive group) and 42:25 4:63=76:66 1:18 IU/L (1% additive group). On the 1st day, the body weight gain showed a similar course in the control and 0.5% and 1% additive groups. After eight weeks, the body weight gain was 39:9 1:25 kg (control group), 45:1 1:10 kg (0.5% additive group) and 42:5 1:27 kg (1% additive group). No impairment in the animal health status was observed.The proteins from the

spleens of the control and eight weeks additive supplemented pigs (0.1%) were extracted and resolved by 2DE using pH 3--10 IPG strips loaded with 100 g of the total proteins. The molecular weights of the spots ranged from 7 to 175 kDa. The differences in the spot intensity were identified as quantitative changes. A total of 31 differentially expressed protein spots were identified (more than two-fold was considered significant), and finally 19 were detected by MALDI-TOF/MS. Among the 19 protein spots, 7 and 12 proteins were significantly up-regulated and down-regulated, respectively.Thirty seven percent of the proteins identified were involved in the cellular components and cells (GO: 0005575 and GO: 0005623 respectively). Moreover, there were 17% intracellular proteins (GO: 0005623), 13% cytoplasm (GO: 0005634) and organelle involved proteins (GO: 0005737). For the biological process, the strongest associations were with the metabolic process (26%) (GO: 0008152). Another 22% associations were with the biological process (GO: 0008150), whereas 8% were associated with transport (GO: 0006810) and 7% with the carbohydrate metabolic process and the generation of precursor metabolites and energy (GO: 0005975 and GO: 0006091).From this study, we found that the antibacterial effects of *Saururus Chinensis* and Scutellariae Radix extract against *E. coli* and *Salmonella typhimurium in vitro* and IgY which is producted by *E. coli* and *Salmonella typhimurium* Ag immunization showed the inhibitory effect bacterial internalization and intracellular replication within phagocytes. *In vivo* test, swine group which is fed with natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed showed a lower virulence expression than those of the fed with normal feed. Moreovere, swine group which is fed with natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed did not affect the normal flora in the intestine and showed increasing WBC in whole blood comparing to untreated control groups. Conclusionly, natural herb and IgY showed an antibacterial effect against pathogenic bacterial but not normal intestinal bacteria, and natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed showed immune activation and diarrheal disease controlling in swine.

From this study, we found that the immunospecific IgY against *E. coli* and *Salmonella typhimurium* and IgY treatment inhibited the bacterial internalization and adherence on epitherial cells. Moreovere, swine group which is fed with natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed showed a higher white blood cells in whole blood than those of control groups, suggesting that natural herb, IgY antibody and bio-balance materials composing feed may increase immunostimulatory effect in swine. In addition, we found that quercetin, isolated from *O. humifusa* Raf, showed potent antioxidant and anti-inflammatory activities. Furthermore, these data suggest that quercetin has potent antioxidant and anti-inflammatory effect in vitro. Data of reporter gene luciferase assay suggest that anti-inflammatory effects might be mediated in the levels of transcription. Platelet aggregation was induced either by ADP, a potent agonist to platelet G protein-coupled P2Y receptor, by collagen, a potent ligand that

activates platelet integrin α2β1 and glycoprotein VI, or thrombin, a platelet protease-activated receptors subtype I and IV. This preliminary result suggests that *O. humifusa* may be taken as a candidate lead natural compound to be considered in the search for natural products with beneficial effects on aberrant platelet activation mediated cardiovascular disorders. Anti-platelet activities of CE6 were studied using rat platelets. We examined the effect of CE6 on intracellular Ca^{2+} mobilization using fura-2/AM, and determined ATP release and cyclic nucleotides production. These results suggested that cAMP elevating effect of CE6 might be due to the PDE inhibiting activity rather than AC activation.

In conclusion, results of the experiments suggest that Natural Herb Additive Containing Immunoglobulin Yolk sac (IgY) were effective in improving in pig on growth performance, physico-chemical properties and prevention of various digestive diseases and may increase economic return.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....23
Section 1. Objective of research development.....23
Section 2. The Significance of the study.....26
Section 3. The scope of the study.....32
Section 4. The process system of the study.....34
Chapter 2. Research Background.....36
Section 1. The trend of domestic and foreign study.....36
Section 2. Relative importance of the study 37

Chapter 3. Contents and Results 53
Section 1. Study of Phsico-Biochemical Analysis on Natural Herb Additive Containing Immunoglobulin Yolk sac (IgY)inPigs.....53
Section 2. Study of Antibacterial effects and disease control mechanism of natural herb, multi-pathogen protective IgY antibody and bio-balance materials...90
Section 3. Study of Pharmcological Evaulation and Economical Analysis on Natural Herb Additive Containing Immunoglobulin Yolk sac (IgY) in Pigs.....110

Chapter 4. Contribution.....134
Section 1. The pointed aimed.....134
Section 2. Progress of the study.....135
Section 3. Contribution.....136

Chapter 5. Usefulness of the Results.....140
Section 1. Plan of Industry.....140
Section 2. Application of the results.....141
Section 3. Papers and patent of Research.....142

Chapter 6. Information on foreign biotechnology.....150
Section 1. Organic livestock production.....150
Chapter 7. References.....155

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....23
제 1 절 연구개발의 목적.....23
제 2 절 필요성.....26
제 3 절 연구범위.....32
제 4 절 연구개발 추진체계.....34

제 2 장 국내외 기술개발 현황.....36
제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황.....36
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치.....37

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....53
제 1 절 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 생체 내 조절 물질에 대한 사양 및 이화학적 검정.....53
제 2 절 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전규명.....90
제 3 절 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가.....110

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야의 기여도.....134
제 1 절 연구평가의 착안점.....134
제 2 절 연구목표 달성도.....135
제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도.....136

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획.....140
제 1 절 실용화,산업화 계획.....140
제 2 절 교육,지도 ,홍보등기술확산계획.....141
제 3 절 특허,논문등지식재산권확보계획.....142

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보.....150
제 1 절 유기 축산.....150
제 7 장 참고문헌.....155

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

□ 항생제 등 동물약품의 오·남용에 따른 식육 중 잔류문제, 내성균 출현문제 등 축산물의 안전성에 대해 소비자 관심이 증대하고 있으며, 식육 중 잔류물질 검사결과 여전히 허용기준초과 건수가 미국 등에 비하여는 낮은 편이나 일본보다는 높은 편임(한국: 115천건/236건, 미국: 34천건/154건, 일본: 7.5천건/4건).

□ 최근 소비자 단체에서 시중에 유통 중인 축산물을 수거 검사 후 그 결과 발표(잔류기준초과)로 인한 축산물 소비 위축현상이 심화되고 있으며, 항생제 내성균에 대한 조사결과 페니실린 등 주요 항생제가 내성을 가지는 것으로 평가되고 있고, 항생제의 사용량은 점차 줄어들고 있으나, 아직까지 사료첨가제로 혼입하는 항생제 량이 전체의 46%(2003년 기준) 수준임.

□ 농가에서 자가사료 배합시 항생제 별 용도, 작용기전 등에 대한 자문이나 지식 없이 임의처방으로 인한 남용사례 발생하고 있고, 식품의 62.7%에서 대장균 검출되었고, 이중 약 93%가 항생제 내성확인(소비자보호원 2002년 5월 통계)이 문제가 되고 있으며, 항생제 등 항균물질의 오·남용으로 인한 식육 중 잔류에 따라 소비자들이 우리축산물에 대한 불신이 가중되고 있으며 웰빙시대에 따라 소비자들에게 안전한 축산물의 공급을 위한 대책마련이 요구됨.

□ 상당수의 축산농가들이 안전축산물 생산을 위한 무 항생제 사용의 요구가 커지고 있고, 가축의 고밀도 사육, 열악한 사육환경, 축사 내 가스발생 등으로 질병에 대한 내병성이 약화되어 쉽게 병원체에 노출되어 질병으로 전이되어 심각한 경제적 손실을 유발함.

□ WTO이후 축산물 시장개방에 대항하기 위해서는 외래종과 차별되는 고품질의 특수 돼지고기생산이 필요하며 또한 기존의 돼지보다 성장이 빠르고 기능성을 가진 안전성 돼지의 사육으로 농가의 생산성을 높이는 것은 물론 균일화된 규격품의 돼지생산체제를 마련하고 대외수출을 통하여 국가 경쟁력을 높일 필요성이 대두되고 있음.

□ 홍화는 한국, 일본, 중국 등에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원 작물이기도 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 보고됨.

□ 황금은 항균성분인 baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein 등이 함유되어있으며 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높이고 이뇨작용, 염증치료 및 면역활성 등이 있어 민간요법의 치료에 널리 사용되고 있다. 뿐만 아니라 포화성 콜레스테롤을 저하시키며 질병에 대한 이완율을 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며 불포화지방산 함량을 높인다는 보고도 있다. 또 맛의 중요 인자인 아미노산을 증가시키며 계육의 보수력 및 연도 등을 향상시킨다고 보고하였음.

□ 삼백초에는 flavonoids 성분인 quercitrin, isoquercitrin, hyperin, rutin 등이 확인되었고, 특히 항균성분인 methyl-n-nonyl ketone 등은 *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* 등에 강한 항균효과를 나타낸다고 보고하였음.

□ IgY(Immunoglobulin in Yolk)는 어미 닭이 획득한 항체가 난황에 축척되어 새끼들에게 전해지는 원리를 이용한 특수 면역단백질이다. 어미 닭에 대장균 등 각종 원인균을 주입시킨 후 생산된 계란의 노른자에 이들 균을 막아 낼수 있는 특수면역단백질(항체)이 만들어 지도록 한 것이다. 이때 난황에 축척되어 있는 특수 단백질을 IgY라고 하며, 항생제와는 달리 내성과 부작용이 전혀 없는 것이 특징이다.

□ 본 연구에서 개발될 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 소화기질병의 주요 원인인 전염성질환을 예방하고 치료에 이용될 수 있다

□ 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 전염성질병의 항원을 면역시킨 닭으로 부터 얻어낸 계란의 (Yolk)주성분으로 한 면역 난황항체에 전해질을 첨가한 제품으로, 기존 사료에 혼합(사료첨가제) 또는 보조 사료로 급여하므로 돼지의 소화기질병을 예방 및 치료 효과를 보는 것이다.

□ 현재 의약품 등의 항생제 오·남용이 사회적인 문제로 부각되고 있다. 그러나 IgY를 활용한 물질이 개발되면서 오·남용의 우려를 불식시킬 것으로 기대된다.

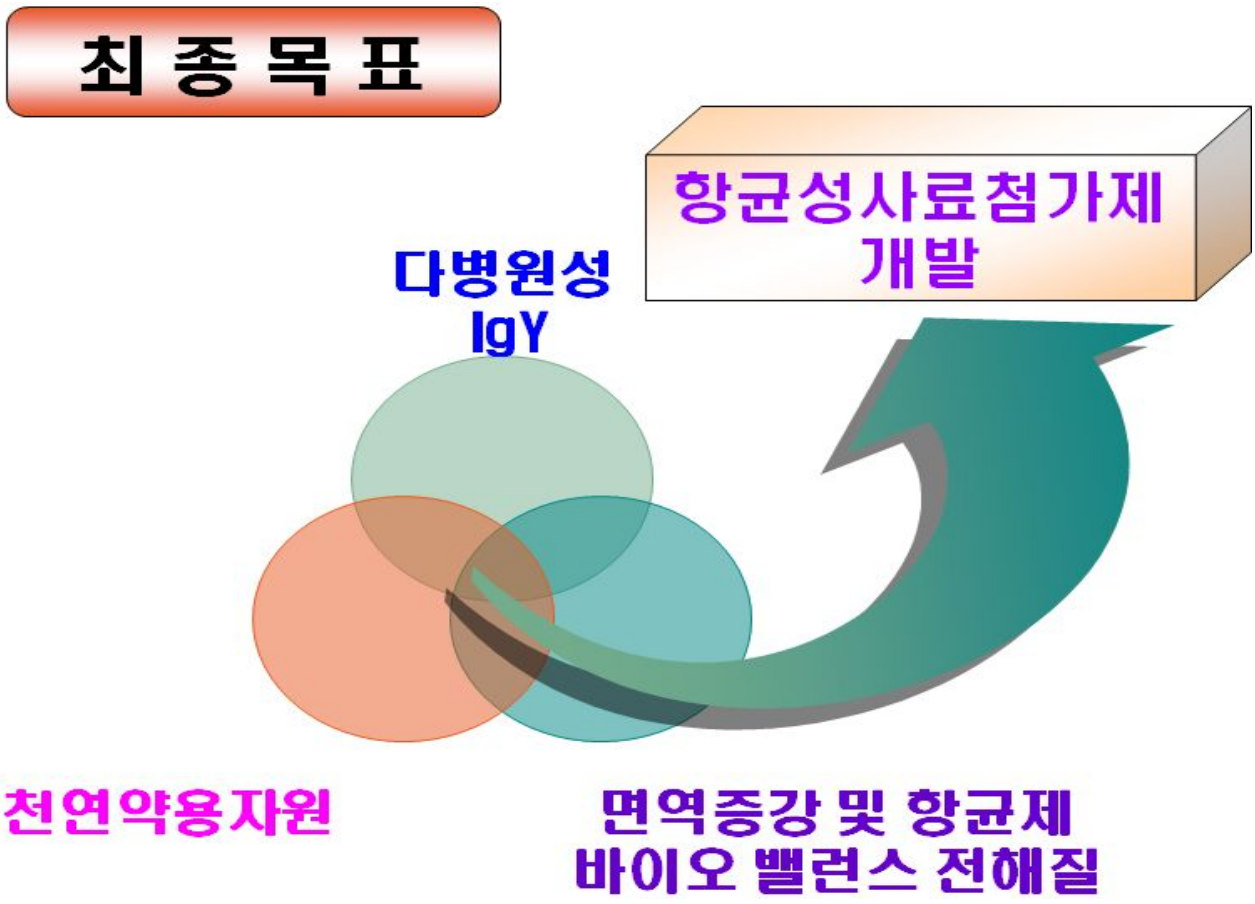
□ 따라서 난황 유래 사료첨가제를 상품화하여 기존사료에 첨가 또는 단일사료로급여 돼지 사육에 있어 항생제의 사용을 지양하고, 어린 일령의 자돈이 질병으로 부터 피해를 줄이고 문제시 되는 소화기계통의 전염성질환을 예방 및 치료해 주는 것이다.

□ 따라서 이 연구의 목표는 삼백초의 항균성분인 methyl-n-nonyl ketone, 황금의 항균성분인 baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein 등과 홍화의 carthamin과 IgY를 이용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료첨가제로 만든 후 돼지에 적용하여

1)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명

2)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체내 조절 물질에 대한 이화학적 검정 및 안전성 평가

3)천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가등에 관한 연구 하고저 한다. 또한 돼지성장 기간 동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 돼지 소화기질병(대장균증, 살모넬라 감염증)을 예방하고, 사료효율등을 증진 시킬수 있으며,동시에 고품질 안전성 돼지를 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여하고자 함.



< 연구의 최종목표>

제2절 필요성

1.연구의 필요성

□ 국내에서도 Codex(국제식품규격) 기준에 적합한 '유기축산품질인증제'가 도입될 예정이다. 이를 위해 농림부는 국내여건에 적합한 유기축산 농가 모델과 프로그램을 개발, 우선 내년부터는 축종별로 유기 축산 시범농가 육성 및 시범 판매장을 설치하는 등 점차 유기축산을 확대해 나갈 계획이다. 농림부가 유기축산을 도입하게 된 것은 캐나다 오타와에서 개최된 제 28차 Codex 식품표시분과위원회에서 유기축산에 관한 지침 안에 합의했기 때문이다. 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 반영하고 있다.

□ 유기가축에는 유기농법으로 생산되고 유전자변형이 되지 않은 사료의 급여, 항생제, 번식 및 성장호르몬 사용금지, 휴약 기간은 법적 요구기간의 2배를 준수해야 하는데 합의하였다.

□ 2003년 기준으로 연간 1400톤 이상의 항생제가 가축의 질병치료·예방뿐만 아니라 성장촉진 목적에 과도하게 사용되고 있음.

□ 배합사료에 첨가하는 항생제의 사용량은 가축에 사용되고 있는 항생제의 52 % 이상인 670톤 이상이며, 이 중 소에 사용된 것은 6.3%, 돼지에 사용된 것은 68.7% 그리고 닭에 사용된 것은 25%를 점하고 있음.

□ 현재 선진 각국에서는 축수산업의 항생제 사용이 인체에 여러 가지 부작용을 초래할 수 있는 것을 하여 질병치료를 목적으로 사용하고 있는 항생제를 제외한, 질병예방 및 성장촉진 등의 목적으로 사용하는 항생제의 사용을 금지시키는 추세임.

□ 따라서 선진국들은 사료첨가용 항생물질 대체제의 개발에 박차를 가하고 있으며, 항생제를 사용하지 않는 방향으로 전환하고 있음.

□ 국내에서도, 기존의 사료첨가용 항생제를 대체하기 위한 많은 연구가 수행되어 왔으나 실제 성사례가 거의 없으며, 대부분 외국 수입제품의 효능비교 수준을 벗어나지 못하고 있음.

□ 따라서, 우리나라가 보유하고 있는 동물, 식물, 미생물자원을 이용한 가축 사료용 항생물질 대체제 개발에 대해서는 지속적인 국내 축산산업 발전을 위해서 뿐 아니라 세계시장 개척을 위해서도 국가적 차원의 종합적 연구가 절실히 필요함.

□ 항생제 등 동물약품의 오·남용에 따른 식육 중 잔류문제, 내성균 출현문제 등 축산물의 안전성에 대해 소비자의 관심이 증대하고 있다.

□ 식육 중 잔류물질 검사결과 여전히 허용기준 초과 건수가 미국 등에 비하여는 낮은 편이나 일본보다는 높은 편임(한국: 115천건/236건, 미국: 34천건/154건, 일본: 7.5천건/4건).

□ 최근 소비자 단체에서 시중에 유통 중인 축산물을 수거, 검사 후 그 결과 발표(잔류기준초과)로 인한 축산물 소비 위축현상이 심화되고 있다.

□ 항생제 내성균에 대한 조사결과 페니실린 등 주요 항생제가 내성을 가지는 것으로 평가되고 있다.

□ 항생제의 사용량은 점차 줄어들고 있으나, 아직까지 사료첨가제로 혼입하는 항생제 량이 전체의 46%(2003년 기준) 수준임.

□ 농가에서 자가 사료 배합시 항생제 별 용도, 작용기전 등에 대한 자문이나 지식 없이 임의

처방으로 인한 남용사례 발생.

□ 식품의 62.7%에서 대장균 검출, 이중 약 93%의 항생제 내성확인(소비자보호원 2002년5월 통계).

□ 항생제 등 항균물질의 오·남용으로 인한 식육 중 잔류에 따라 소비자들이 우리축산물에 대한 불신 가중.

□ 웰빙 시대에 따라 소비자들에게 안전한 축산물의 공급을 위한 대책마련이 요구됨.

□ 상당수의 축산 농가들이 안전축산물 생산을 위한 무 항생제 사용의 요구가 커짐.

□ 가축의 고밀도 사육, 열악한 사육환경, 축사 내 가스발생 등으로 질병에 대한 내병성 약화.

□ 면역력이 낮은 가축은 쉽게 병원체에 노출되어 질병으로 전이.

□ 항생제의 투여방법도 질병별로 적정한 약제를 투여하는 것이 아닌 무차별적으로 오용.

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

□ 양약의 경우 편중된 약 성분으로 인해 몸속의 조화를 깨뜨리는 수가 많지만 한약제의 경우 천연물 전체가 지니고 있는 전체적인 성질을 종합적으로 파악하여 원형 그대로를 사용하므로 부작용이 적고 안전할 뿐만 아니라 음식물의 일종이기 때문에 인체에 거부감이 없다는 장점도 지니고 있기 때문에 오늘날 세계적인 관심을 모으고 있다

□ 한방에서 해열, 거담, 이뇨, 건위 소종 등의 효능을 가지고 있다고 알려진 삼백초(*Saururus Chinensis* Bail.)는 삼백초 과 삼백초 속 식물로서 우리나라에서는 제주도 서쪽 습지에서 자생하는 것으로 알려져 있다. 1980년대까지 삼백초 성분에 대한 연구는 그리 활발히 이루어지지 않았다. 다만 잎에서는 quercertin, quercitrin, isoquercitrin, hyperin 등의 flavonoids 성분이, 지방부에서는 항균성분인 methyl-n-nonyl ketone, 뿌리에서는 amino acid, organic acid, sugar 및 tannin 등이 존재한다고 알려졌을 뿐 이었다.

□ 삼백초(*Saururus Chinensis)*에는 flavonoids 성분인 quercitrin, isoquercitrin, hyperin, rutin이 확인되었고 특히 *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 등에 강한 항균효과를 나타낸다고 보고하였다.

□ 황금(Scutellariae Radix)은 항균성분인 baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein 등이 함유되어 있으며, 이들 성분은 강력한 항균효과와 체내에서 콜레스테롤을 저하시키고 불포화지방산의 함량을 높이는 작용, 이뇨작용, 염증치료 및 면역활성 등이 있어 민간요법의 항생효과를 지닌 치료제로 널리 사용되고 있다.

□ 국내산 약초 중 홍화(*Carthamus tinctorius L*)는 잇꽃이라 하는 국화과(Compoitae)에 속하는 일년생 초목으로 원산지는 아프가니스탄의 산악지대 또는 에티오피아이며, 중국, 티벳 등지에서 재배되기도 하며 학명은 *Carthamus tinctorius*이다.

□ 홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원 작물이기도 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 acid의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고되었다.
□ 최근 이 홍화씨가 골절 및 골다공증 등의 뼈 질환에 뛰어난 효과가 있음이 민간인들 사이에 알려져 현재 국내에서 민간요법으로 사용되고 있다. 특히 금이 가거나 다친 뼈를 빠르고 튼튼하게 회복시켜 준다는 홍화씨의 효력에 대하여 과학적 근거 및 치료효과가 확립되어 있지 않다. 그러나 홍화씨의 효능에 대한 관심이 집중되면서 국내에서 연구가 활발히 진행되고 있으며, 볶은 홍화씨에서 생리활성물질인 lignan, flavonoid 및 serotonin 성분들을 분리하여 그 구조식을 밝혔다.
□ 홍화씨 성분 중 lignan과 flavonoid는 diphenol 성분으로서 estrogen과 화학구조가 비슷하며, estrogen과 비슷한 생리작용도 나타내기 때문에 식물성 estrogen(phytoestrogen) 이라 불려진다. 최근에 식물성 estrogen은 사람에서 뼈 보호작용, 항암작용 을 나타낸다고 알려졌는데, 그 외에도 항 산화 작용, 혈청 콜레스테롤과 그 외 지질을 낮추는 등 생체 조직을 보호하는 다양한 기능이 알려지면서 그 중요성에 대해 주목하고 있다.
□ IgY(Immunoglobulin in Yolk)는 어미 닭이 획득한 항체가 난황에 축척되어 새끼들에게 전해지는 원리를 이용한 특수 면역단백질이다. 어미 닭에 대장균 등 각종 원인균을 주입시킨 후 생산된 계란의 노른자에 이들 균을 막아 낼수 있는 특수면역단백질(항체)이 만들어 지도록 한 것이다. 이때 난황에 축척되어 있는 특수 단백질을 IgY라고 하며, 항생제와는 달리 내성과 부작용이 전혀 없는 것이 특징이다.
□ 본 연구에서 개발될 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 소화기질병의 주요 원인인 전염성질환을 예방하고 치료에 이용될 수 있다
□ 난황 유래 사료 첨가제는 돼지 전염성질병의 항원을 면역시킨 닭으로 부터 얻어낸 계란의(Yolk)주성분으로 한 면역 난황항체에 전해질을 첨가한 제품으로, 기존 사료에 혼합(사료첨가제) 또는 보조사료로 급여하므로 돼지의 소화기질병을 예방 및 치료 효과를 보는 것이다.
□ 현재 의약품 등의 항생제 오·남용이 사회적인 문제로 부각되고 있다. 그러나 IgY를 활용한 물질이 개발되면서 오·남용의 우려를 불식시킬 것으로 기대된다.
□ 따라서 난황 유래 사료첨가제를 상품화하여 기존사료에 첨가 또는 단일 사료로급여 돼지 사육에 있어 항생제의 사용을 지양하고, 어린 일령의 자돈이 질병으로 부터 피해를 줄이고 문제시 되는 소화기계통의 전염성질환을 예방 및 치료해 주는 것이다.
□ UR농산물 협상이 타결되어 돼지고기 등 축산물의 수입이 완전 개방됨에 따라 우리나라의 양돈산업은 무한경쟁시대에 돌입하였는데, 이러한 국면을 해소하기 위한 방법을 다각도로 모색하고 있으나 간단하지는 않은 듯하다. 이러한 난국타개의 일환으로 항병성 사료를 먹인 돼지의 고품질 유기축산돼지 생산의 중요성 부각도 매우 중요한 의미를 가지고 있다. 일반 사육기법으로 사육된 돼지는 품질과 안전성식품으로서 떨어지는 단점이 있다.
□ 축산업의 연간 총생산액은 약 11조8000억원(2006년 농림통계자료)에 달하며 그 중에서 양돈업계의 생산액이 약 3조8000억 원(2006년 대한양돈협회)에 달한다. 그러나 돼지 질병으로 의한 경제적 손실은 총 생산액의 20%로 추정하고 있다.
□ 돼지의 질병은 성장별, 질병별 발생 양상이 복잡하고, 한 가지 원인으로 인한 피해보다는 복합적인 요소 또는 병원체에 의한 피해가 늘어 가고 있다.
□ 돼지질병은 폐사로 인한 직접적인 피해보다는 사료효율 감소, 성장률 저하, 위축돈 발생, 출하일령 연장 등을 가져오므로, 질병이 발병하기에 앞서, 질병을 차단하고, 예방하며, 근원을 찾

아내는 일을 지속적으로 하여야 한다.

□ 돼지소화기 질환의 대표적 질병으로는 대장균증(E.Coli), 전염성위장염(Transmissible gasroenteritis: TGE), 유행성설사병(Porcin epidemic diarrhea: PED)이며 그 피해는 매우 심각하여 총 생산량의 20 %정도가 질병에 의한 손실로 추정되고 있다(2007. 대한 양돈협회).

□ 병원성 대장균에 의한 자돈의 설사병은 주로 Enterotoxigenic Escherichia coli가 생성하는 Enterotoxins에 의해서 발생되는 병원성 대장균성 감염증과 살모넬라 감염증이 대부분을 차지하고 있다.

□ 돼지의 질병 중에서 가장 큰 피해를 주는 것은 신생, 포유 자돈, 이유자돈에서 에서 발생하는 소화기성 소모성 질병인데, 이 시기의 감염은 설사 및 폐사에 따른 직접적 피해는 물론, 감염돈 개체의 면역력 약화, 설사로 인한 체내 항상성 상실, 각종 백신에 대한 면역 형성 억제, 다른 바이러스 및 호흡기 질병 유도 세균의 감염이 용이하여, 질병 방어력이 악화되기 때문이다.

□ 따라서 고품질과 항생제를 최소화하면서 돼지를 사육하여 소비자의 기호에 맞는 기능성생산물로서 소비확대와 생산비 보장을 이룩해야 할 시점이다. 일본이나 대만 등에서도 고품질 안전성 돼지고기의 생산으로 소비시장에 활력소 역할을 하고 있다.

□ 따라서 본 연구는 천연약재인 삼백초, 황금 등의 항균성분(baicalein, baicalin, wogonin, β-sitosterol, scutellarein, methyl-n-nonyl ketone 등)과 홍화 등의 생리활성분성분인 Carthamin($C_{12}H_{22}O_{11}$)과 IgY를 이용하여, 사료첨가제로 먹인 후, 돼지 성장기간 동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 돼지 소화기 주요 질병인 대장균증(*E. Coli*), 살모넬라 감염증을 예방하고, 동시에 고품질 안전성 돼지를 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여 하고자 한다.

2. 연구개발대상 기술의 국내·외 현황

(1) 세계적 수준

개념정립 단계	O	기업화 단계		기술 안정화 단계	

미국의 유기농업

□ 1990년에 제정된 미국의 유기식품생산법은 모든 경작물, 야생작물, 가축, 그리고 유기농업이라는 보증을 원하는 모든 농산물은 미국의 유기농업프로그램을 적용하고 유기생산규정을 지켜야 한다. 유기농업의 기본 개념이나 의미는 유럽의 유기농업과 거의 유사한 형태를 취하고 있음. 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 사양되어야 함.

□ 합성물질이 함유된 사료첨가제나 공급제는 유기축산에 이용할 수 없기 때문에 유기축산체계 속의 가축사료는 초지나 사료작물을 포함하여 전적으로 유기적으로 생산되어야 함. 생산자는 동물약품, 성장촉진호르몬을 사용할 수 없으며 정상적인 성장과 건강유지에 필요한 양 이상의 사료첨가제나 공급제는 사용해서는 안됨.

□ 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 있음

CODEX 유기농업

□ 유기식품의 생산, 가공, 표시, 유통에 대한 지침을 Codex에서 논의한 것은 1990년부터이며, Codex집행위원회는 유기식품의 지침에 대하여 캐나다 행정부가 초안을 만들도록 하였으며, 1991년 제 19차 총회에서 지침서 초안을 캐나다 정부 대표가 발표함. 1993년 호주의 전문가회의에 지침이 송부되어, 제 22차 식품표시분과위원회에서 토의하였으며, 동 분과위원회에서는 재수정 지침을 작성하였다. 1994년 제 23차부터 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 못함. 그 주요 내용으로 일반기준을 보면 유기농업은 농업생태계의 건강, 생명의 다양성, 생물학적 순환 및 토양생물학적 활동을 촉진, 증진시키는 하나의 전체적인 생산관리체계임.

3. 국내수준

□ 우리나라의 유기농업은 CODEX 유기농업과는 차이가 있지만 민간차원의 유기농업단체가 있어서 유기농업의 실현을 위한 노력을 해 왔으나 유기축산분야는 아직 전국적인 민간단체가 결성되지 못하였고 지역별로 몇 개의 농가가 연합한 형태 또는 개별적으로 유기축산업을 하려는 농민이 있을 뿐 소규모가 대부분임. 따라서 농림부에서는 우선적으로 동물사육에 항생제 사용을 억제하는 연구가 활발히 진행되고 있음.

□ 항생제 등 동물약품 안전사용교육, 검사실시와 계도, 배합사료 내 혼합가능동물약품의 종류 감축 등 항생제 사용절감을 위한 노력을 기울여 왔으나, 항생제 오·남용으로 인한 문제는 계속 상존하고 있는 실정임.

□ 안전한 축산물생산을 통한 소비자의 욕구충족 및 우리나라 축산업의 지속가능한 발전을 위해서는 항생제 등 동물약품의 절감을 위한 체계적인 점검 및 대책 수립, 추진이 필요함.

□ 열악한 사육환경에 의한 막연한 질병발생 우려에 따른 항생제 등 항균물질 과다 투여하고 있는 실정임.

□ 축산업의 연간 총생산액은 7조원(1997년 농림통계자료)에 달하며 그 중에서 양돈업계의 생산액이 2조원에 달한다. 그러나 돼지 질병으로 인한 경제적 손실은 총생산액의 20%로 추정하고 있음.

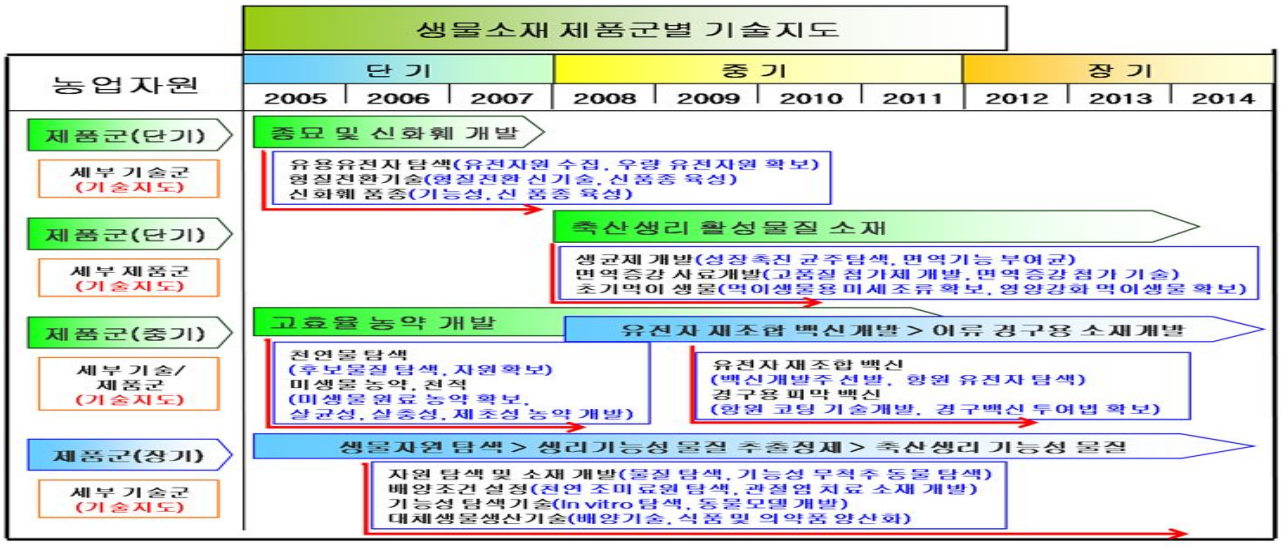
□ 돼지의 질병 중에서 가장 큰 피해를 주는 것은 신생 및 포유 자돈에서 발생하는 설사병과 이유자돈의 대표적인 질환임.

□ 특히 감염된 자돈은 대부분 폐사하며 회복되더라도 위축돈이 되므로 양돈업계에 큰 피해를 주기 때문에 질병에 의한 피해를 최소화하기 위해 신속·정확한 진단이 필요함.

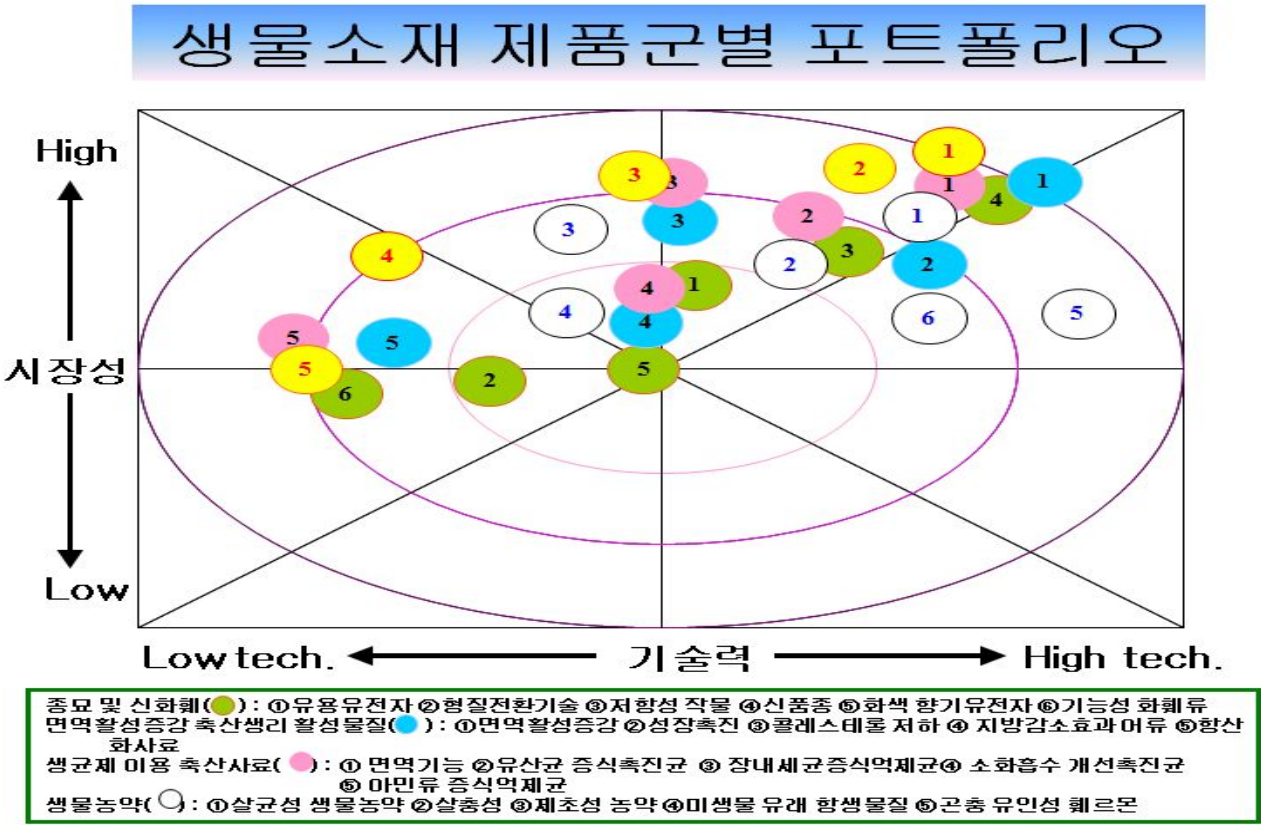
□ 자돈의 설사병은 주로 장출혈성(EHEC), 장병원성(EPEC) 및 장독소혈청(ETEC) 대장균, 살모넬라 균에 의해 유발되며, 수많은 혈청형이 알려져 있으나 혈청형 간의 생화학적 특징 및 genetic marker가 없기 대문에 원인균을 신속하게 진단하는데 어려움이 많고 긴 시간이 요구됨.

□ 양돈 및 양계 산업에서 IgY를 이용한 질병 예방용 제품을 개발하여 활용하고 있으나, 다양한 질병에 대한 포괄적 적용이 어려운 현실이며, 특히 양돈산업에서 문제가 되고 있는 대장균 및 살모넬라 균 감염에 의한 설사증을 포괄적으로 예방하기 위한 제품은 개발되어 있

지 않음. 특히, 각 균의 혈청형이 다르고 항원의 다양성으로 인하여 포괄적 접근이 어려운 현실이기 때문에 이에 대한 보완이 시급한 실정임.



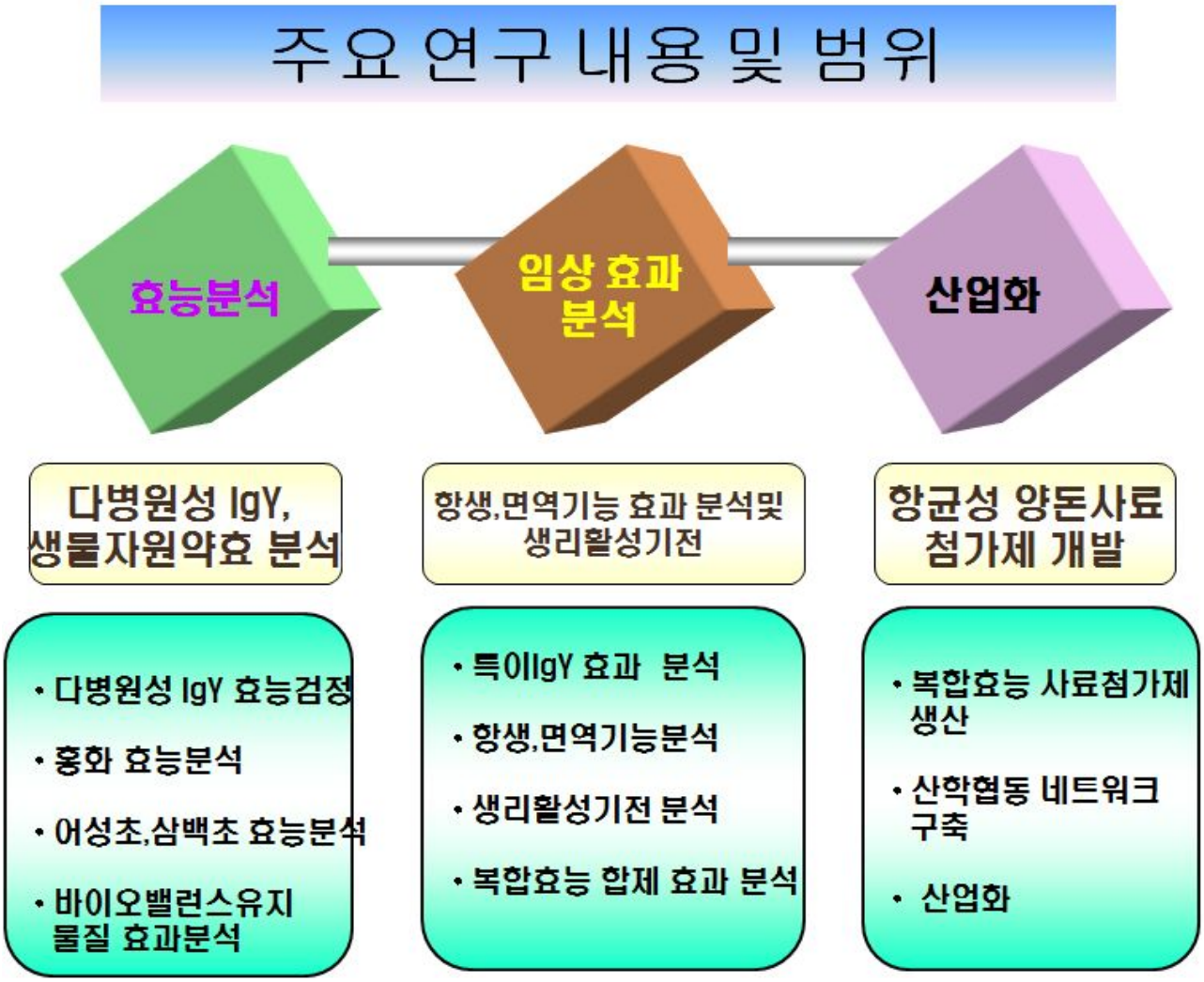
< 생물 소재별 기술지도>



<생물소재 제품군별 포트폴리오>

제3절 연구범위

1. 주요연구내용 및 범위

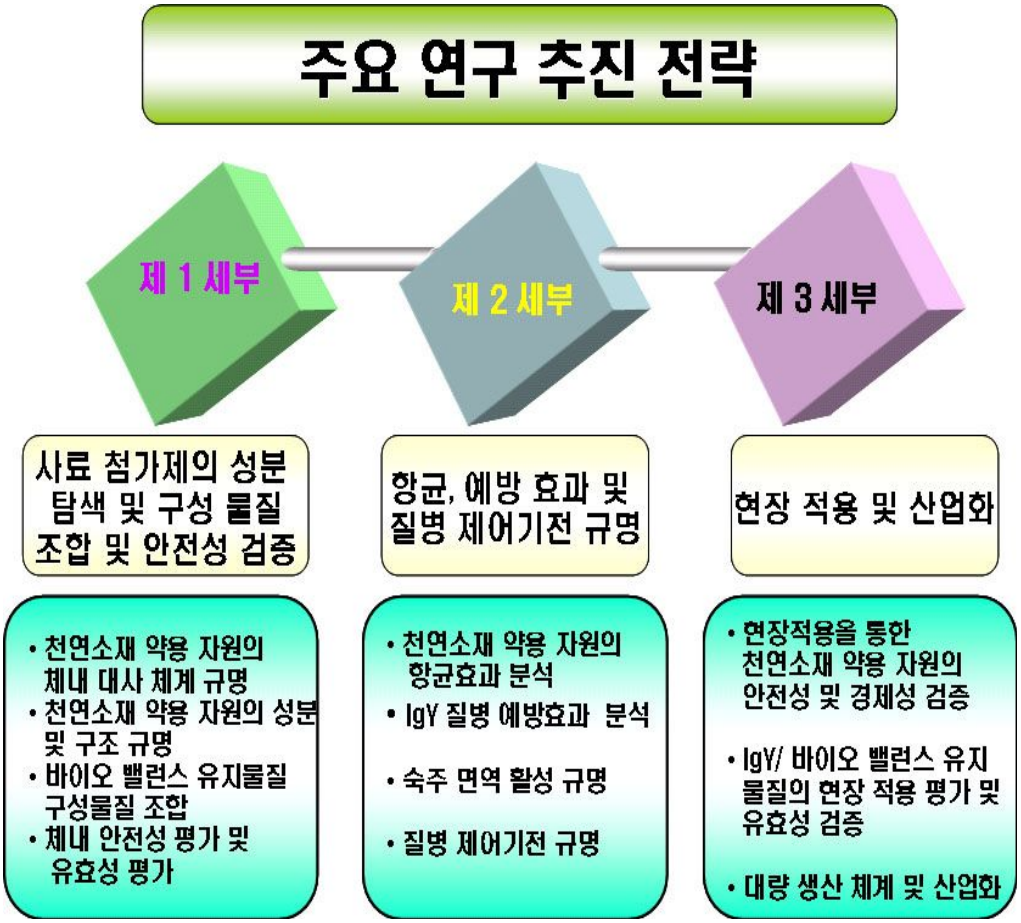


2.년차별 연구내용 및 범위

1차년도	2009	천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체 내 조절 물질에 대한 사양및 이화학적 검정	● 천연소재 약용자원의 돼지 사양에 미치는 영향 규명 ● 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명
		천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명	● 천연소재 약용자원의 돼지 소화기 질병 원인체에 대한 항균효과 검정 ● 난황유래 면역글로부린의 돼지 소화기 질병 원인체에 대한 항균효과 검정
		천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가	● 천연소재 약용자원및 난황 유래 면역글로부린의 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 유효 항생제 처치시 돼지 혈중 잔류량 측정
2차년도	2010	천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체 내 조절 물질에 대한 이화학적 검정	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 대사체계에 미치는 영향 규명 ● 현장 실험을 통한 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명
		천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 항균효과 규명 ● 현장 실험을 통한 면역 글로부린의 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 예방효과 규명
		천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원및 난황 유래 면역글로부린의 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 현장 실험을 통한 유효 항생제 처치시 돼지 혈중 잔류량 측정
3차년도	2011	천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체 내 조절 물질에 대한 이화학적 검정	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 대사체계에 미치는 영향 규명 ● 현장 실험을 통한 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명
		천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체 감염시 나타나는 면역 활성능 평가 ● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체 감염시 나타나는 질병 제어기전 해석
		천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원및 난황 유래 면역글로부린의 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 현장 실험을 통한 유효 항생제 처치시 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 축산물 안전성 및 경제성 평가

제4절 연구개발 추진계획

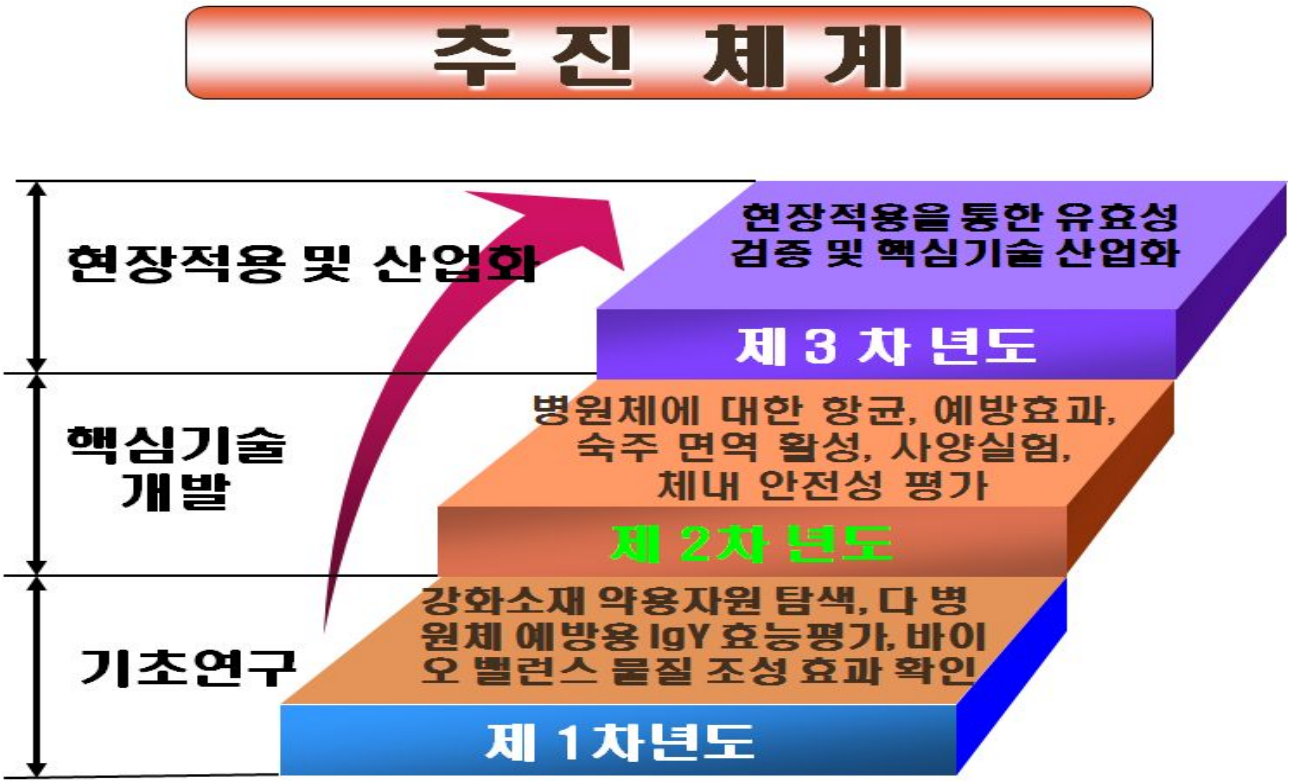
1.추진 전략



2.추진체계

1) 과제별 협력체계 및 목표

2) 추진체계



제2장 국내외의 기술개발현황

1절. 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 사양되어야 한다.

합성물질이 함유된 사료첨가제나 공급제는 유기축산에 이용할 수 없다. 유기축산체계속의 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 1990년부터 이다. 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/설폰아마이드 (12톤), 마크로라이드(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, 돼지에서의 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.

라. 국내의 연구동향

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국립수의과학검역원	항생제 대체물질 개발	개발연구중
(주) 애드바이오텍	IgY를 이용한 자돈 설사 및 가금 티푸스 예방용 사료첨가제 개발	사료첨가제로서 활용
(주) 퓨리나	혈장단백 및 IgY를 이용한 소모성 질환 예방용 사료첨가제 개발	사료첨가제로서 활용
강원대학교	IgY를 이용한 돼지 유행성 설사증(PED) 예방용 사료첨가제 개발	사료첨가제로서 활용

2절. 관련기술에 대한 신청연구팀의 선행연구결과

(1)항원에 대한 항체가 시험

돼지 전염성위장염 바이러스, 돼지 유행성설사병 바이러스, 로타 바이러스, 써코 바이러스, 대장균증 및 살모넬라감염증 항원을 산란계에 2차 접종한 다음 3주후 면역된 산란계의 계란을 수득하여 난황 내에 함유된 항체가를 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)으로 측정한 결과,

돼지 전염성위장염 바이러스에 대한 항체가 1,280배이상, 돼지 유행성설사병 바이러스 1,280~2,560배, 써코 바이러스 1,280배의 항체가를, 로타 바이러스의 항체가도 1,280배 이상을 각각 나타내었으며, 대장균증은 2,560배, 살모넬라감염증은 2,560배 이상의 항체가를 각각 나타내었다.

(2)자돈에 대한 효능시험

(가) 분말제제에 대한 시험

면역난황항체에 전해질이 첨가된 조성물의 효능시험을 생후 7일령 자돈 40마리를 선정하여 시험군 20마리에는 조성물을 사료에 0.5%(사료100kg당 500g) 혼합하여 5일간 1일 3회 급여한 결과 수양성설사(4/20), 탈수(3/20) 및 호흡곤란(3/20)등의 가벼운 임상증상을 나타내었으며, 대조군에 비해 빠른 회복상태를 보였다.

비 투여 대조군 20마리에서도 전형적인 수양성설사(7/20), 탈수(6/20) 및 호흡곤란(5/20) 등의 복합적인 임상증상을 나타내었다.(Table. 1)

Table. 1 분말제제에 대한 효능시험

구 분	자돈	임 상 관 찰				
		수양성 설 사	탈수	호흡곤란	구토	신경증상 (침울)
시험군	20마리	4/20	3/20	3/20	1/20	0/20
대조군	20마리	7/20	6/20	5/20	1/20	1/20

(나) 추출물제제에 대한 시험

난황내에 함유된 면역항체를 추출하여 전해질용액을 첨가한 조성물의 효능시험을 생후 1일령 포유자돈 40마리를 선정하여 시험군 20마리에는 조성물을 5㎖씩 2회 급여한 후 10일간 관찰한 결과 수양성설사(3/20), 탈수(2/20) 및 호흡곤란(3/20)등의 가벼운 임상증상을 나타내었으며 대조군에 비해 빠른 회복상태를 보였다.

비 투여 대조군 20마리에서도 전형적인 수양성설사(7/20), 탈수(3/20) 및 호흡곤란(5/20) 등의 복합적인 임상증상을 나타내었다.(Table. 2)

Table. 2 추출물제제에 대한 효능시험

구 분	자돈	임 상 관 찰				
		수양성 설 사	탈수	호흡곤란	구토	신경증상 (침울)
시험군	20마리	3/20	2/20	3/20	0/20	1/20
대조군	20마리	7/20	3/20	5/20	1/20	1/20

(다) 페이스트 제제에 대한 시험

면역이 형성된 분말형태의 면역 난황항체에 전해질을 첨가하고 프락토 올리고당을 첨가한 페이스트제제의 효능시험을 생후 1일령의 포유자돈 39마리를 선정, 시험군 19마리에 초유급여 전후 두당 5㎖씩 2회 급여한 후 10일간 관찰한 결과 수양성설사(4/19), 탈수(2/19) 및 호흡곤란(2/19)등의 임상증상을 나타내었으며, 대조군에 비해 빠른 회복상태를 보였다.

비 투여 대조군 20마리에서도 전형적인 수양성설사(6/20), 탈수(4/20) 및 호흡곤란(5/20) 등의 복합적인 임상증상을 나타내었다.(Table. 3)

Table. 3 페이스트제제에 대한 시험

구 분	자돈	임 상 관 찰				
		수양성 설 사	탈수	호흡곤란	구토	신경증상 (침울)
시험군	19마리	4/19	2/19	2/19	0/19	1/19
대조군	20마리	6/20	4/20	5/20	1/20	0/20

(3)홍화씨 등이 혈청 내의 효소 활성도 및 cholesterol에 미치는 영향

홍화씨 등이 혈청 내의 효소 활성도 및 cholesterol에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험 15주째에 rat의 혈청을 분석하였던 바 대조군과 처리군에서는 효소 활성도 간의 유의적인 차이를 발견할 수 없었으나 cholesterol의 농도는 처리군의 수컷이 43.12±1.31mg/dl, 암컷이 43.62±4.79mg/dl의 값으로 대조군의 수컷 52.6±3.14mg/dl 의 값에 비해 유의적($p<0.05$)으로 낮은 수치를 보였다(Table 4.).

Table 4. 홍화씨 등이 혈청 내의 효소 활성도 및 cholesterol에 미치는 영향

Groups		Parameters			
		ALP (I.U/L)	ALT (I.U/L)	AST (I.U/L)	Cholesterol (mg/dl)
Male (n=10)	C[1]	83.50±2.81	26.60±2.62	64.72±3.14	52.60±3.14
	S[2]	82.78±3.02	26.82±1.56	65.48±2.48	43.12±1.31*
Female (n=10)	C[1]	87.56±11.11	23.18±2.38	65.02±2.48	50.76±2.55
	S[2]	88.36±9.87	22.72±2.80	65.74±4.13	43.62±4.79*

1 ; The group fed control diet

2 : The group treated with safflower diet

(4) 황금, 삼백초 및 홍화 등이 포함된 사료첨가제의 항균효과

각종 병원세균에 대한 MIC를 조사한 결과는 Table. 5 에서 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. cereus에 대하여는 0.25%에서 항균효과를 나타내었다.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of OHMFA on Salmonella spp. and other pathogens

Microorganisms	MIC(%)				
	2	1	0.5	0.25	0.13
Badillus cerus	-	-	-	-	+
Escherichia coli O157:H7	-	+	+	+	+
Listeria monocytogenes Scott A	-	-	-	-	+
Salmonella enteritidis	-	+	+	+	+
Salmonella gallimarum	-	+	+	+	+
Salmonella pullorum	-	+	+	+	+
Salmonella typhimurium	-	+	+	+	+
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	+

(5). 황금, 삼백초, 홍화 의 약효 성분등에 의한 설사 방지 및 증체효과

Salmonella 감염계군에 대한 한방보조사료제 (HBF)의 설사발생 상태 및 체중 변화를 조사한 결과는 Table. 6에서와 같다. 사료첨가제 급여군은 균감염 7일에 5수중 1수가 설사증을 보였으나 대조군은 5수 중 4수가 설사증세를 나타내었고 14일에는 모두 설사증을 보이지 않았다.

균 접종 후 체중은 실험군의 경우 1일에 404.30±9.60g 이었던 것이 14일에는 914.42±15.35로 증가하여 대조군의 370.8±12.60 및 792.60±8.57에 비하여 현저하게 증가하였다.

Table. 6 Occurrence of diarrhea and body weight change in chickens inoculated with S. enteritidis

Treatment	Diarrhea			Body weight(g)		
	1[a]	7	14	1	7	14
Control	0	4[b]	0	370.18±12.60[C]	726.10±23.20[B]	792.60±8.57[A]
1%HBF added	0	1	0	404.30±9.60[C]	812.65±25.13[B]	914.42±15.35[A]

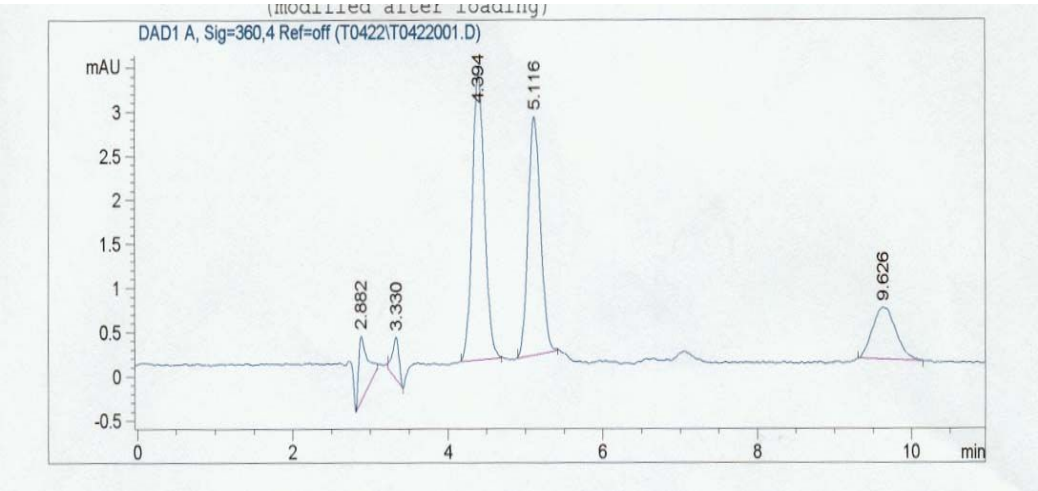
a: Days after inoculation, b: No. of positive chickens from each 5 chickens tested
c: values represent mean ± S.D. for 5 chickens, A: row ($p<0.05$)

(6) 항균성분(Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육 항생제 잔류대사 비교분석

항균성분(methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 계육 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%로 균질하게 혼합한 후 급여 57일째 일차적으로 tetracycline계에 대한 계육 항생제 잔류대사에 미치는 영향을 조사한 바 항균성분 (Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제를 투여한 군(실험군)과 대조군에서 모두 검출되지 않았다(Table. 7, Figs. 1-3).

Table.7 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	-	-
Chlorotetracycline	-	-



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/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 1. The chromatogram on standard of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. HPLC condition: Mobile phase, 0.01 Moxaliacid:acetonitrile:methanol(725:175:100); Column, μ-BondapakC18(3.9X 300mm, 10μm); Flow rate, 1ml/min.

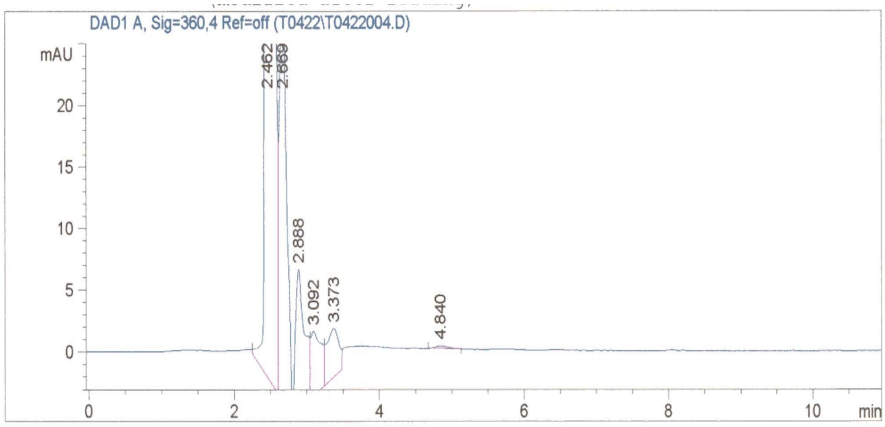


Fig 2. The chromatogram on oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline of control group in Korean native chickens after 57 days. HPLC condition: Mobile phase, 0.01 Moxalic acid:acetonitrile:methanol(725:175:100);Column, μ-BondapakC18(3.9X 300mm, 10μm); flow rate, 1ml/min.

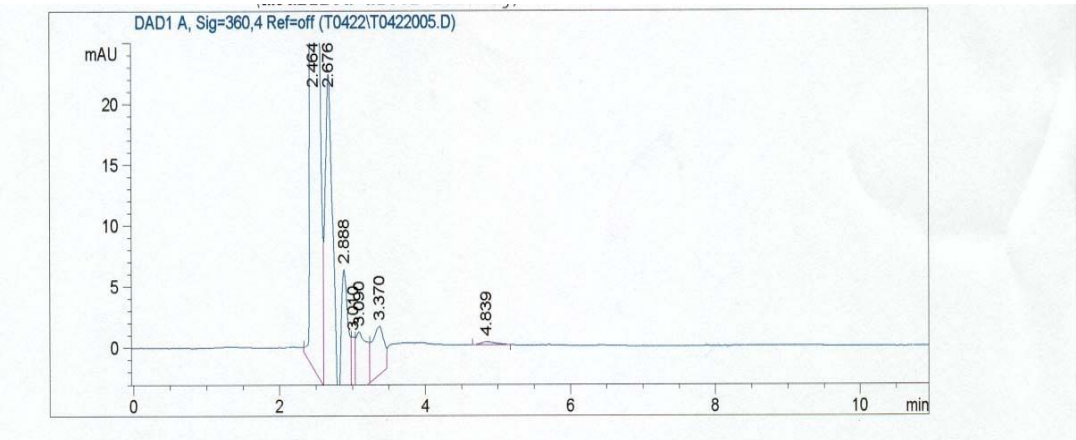


Fig 3. The chromatogram on oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline of treated with dietary supplementation group in Korean native chickens after 57 days. HPLC condition: Mobile phase, 0.01 Moxalic acid:acetonitrile:methanol(725:175:100); Column, μ-BondapakC18(3.9X 300mm, 10μm); flow rate, 1ml/min.

(7)항균성분(Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 단백질 발현에 미치는 영향

항균성분(Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 57일 째 혈청을 이용하여 이차원적 전기영동을 실시하였다.

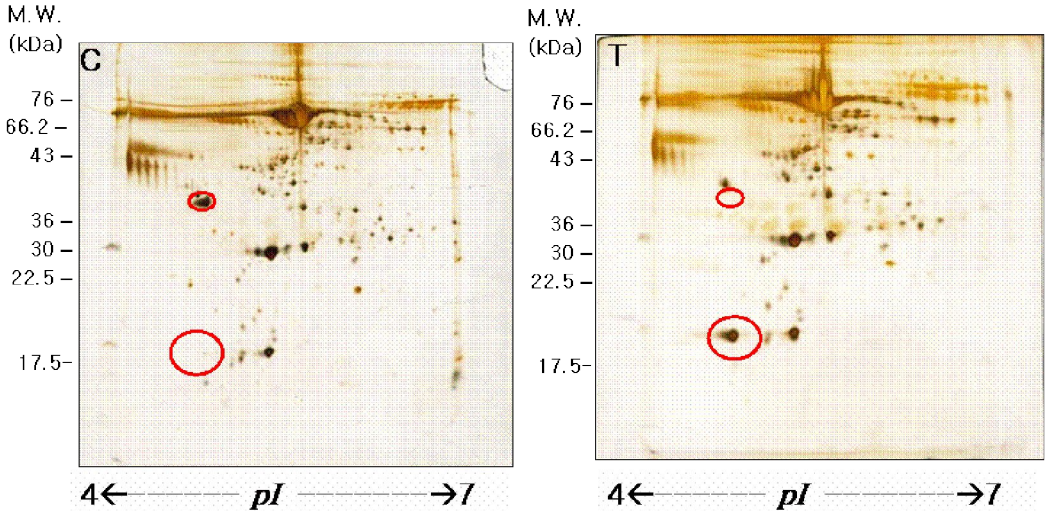


Fig 4. Silver-strained 2-DE parttern of the chickens serum.

C : control group, T : Dietary supplementation group

실험군에서는 대조군에서 보였던 39kDa, p*I* 4.6 부위와 19kDa, p*I* 4.6 부위에서 각각 down regulation과 up regulation이 된 것을 관찰할 수 있었다. MALDI-TOF MS.를 통해 동정을 시도하였으나 동정되지 않았다.

(8)항균성분(methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제에 의한 *Campylobacter jejuni*에 대한 주사 현미경 관찰

항균성분(Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제가 실용재래닭 *C. jejuni* 장관 정착에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 2주령의 재래닭에 *C. jejuni*를 2.3×10^{8} CFU/ml 수준으로 경구 접종한 후 대조군에는 일반 사료를, 실험군에는 사료첨가제를 사료에 1%로 균질하게 혼합한 후 소장(공장)에서의 정착 상태를 주사 전자 현미경으로 관찰 한 바, 대조군에서는 감염 후 7, 14, 21일에 균이 소장 점막 표면에 다수 부착하고 있는 것을 관찰 할 수 있었으며, 감염 후 14일에 가장 많은 정착을 나타내었다. 그러나 항균성분(Methyl-*n*-nonyl-ketone 등)과 홍화의 carthamin 성분 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 군에서는 시간이 지남에 따라 *C. jejuni* 균이 거의 관찰되지 않았다(Figs 5-6).

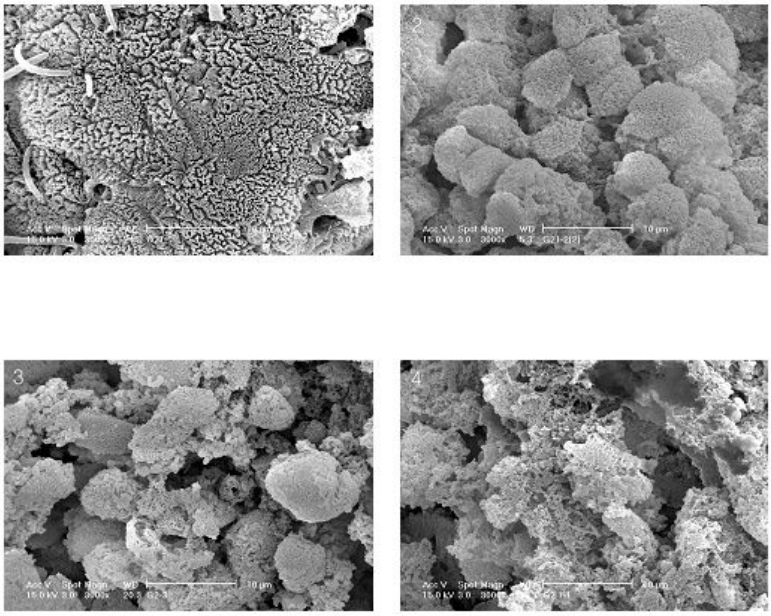


Fig 5. Scanning electron micrograph of jejunum on pre and post infection with *C. jejuni* in the control group. scanning electron micrograph of jejunum at 1 days pre-infection (1). There were observed in villus epithelia at 7 days post infection (2), and many bacteria of the control chickens were observed at 14, 20 days post infection (3, and 4)

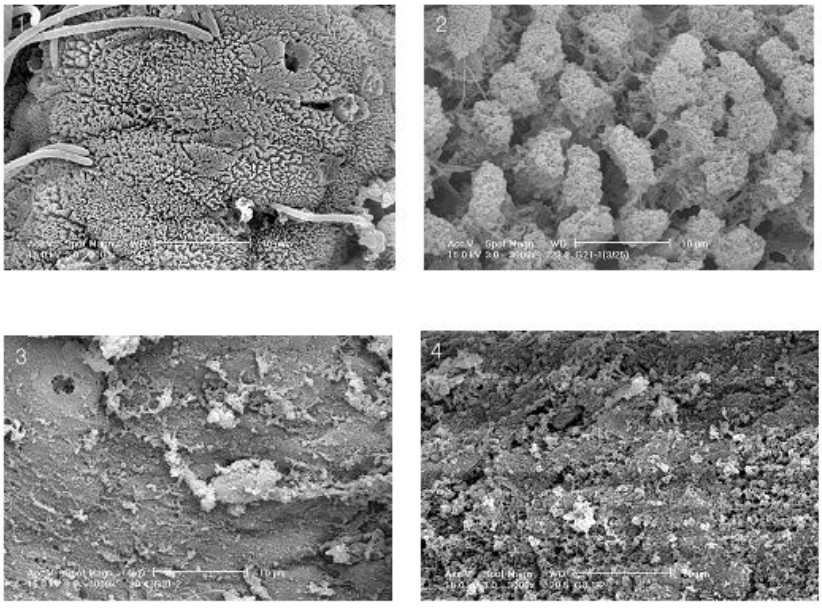


Fig 6. Scanning electron micrograph of jejunum on pre and post infection with C. jejuni on Korean native chickens treated with dietary supplementation group. Scanning electron micrograph of jejunum at 1 days pre-infection (1), and also there were observed in villus epithelia many bacteria at 7 days post infection (2) but not observed many bacteria at 14, 20 days post infection (3, and 4)

(9) 황금, 삼백초 및 홍화 등의 약효성분이 포함된 사료첨가제가 육계의 사양에 미치는 영향

한방사료첨가제가 육계의 사양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 한방사료첨가제를 사료에 1%로 균질하게 혼합한 후 급여 32일째에서 한방사료첨가를 투여한 군이 대조군에 비하여 평균체중의 증가(1.69kg→1.72kg), 육성율의 증가(91%→95%), 폐사율의 감소(9%→5%), 사료요구율의 감소(1.84->1.72)를 나타내었다(Table. 8).

Table 8. Effect of dietary supplementation on growth perforance of oriental herbal in broiler chicks.

Contents	Dietary supplementation group	Control groups	Results	Etc.
평균 체중	1.72kg	.69kg	0.03kg	
육 성 율	95%	91%	4%	+4%
폐 사 율	5%	9%	-4%	-4%
사료 요구율	1.72%	1.84%	-0.12%	

(10)홍화씨 등에 의한 골 생성 양(Ca) 및 골 유합시기에 미치는 영향

수술 후 방사선 사진을 촬영하여 Rat의 골 생성 양과 유합 시기를 비교한 결과 처리군이 대조군보다 1.5주 빠른 것으로 나타났으며 골 경화 시기도 빠른 경향을 보였다. 처리군은 수술 후 8주째 20두 중 12두(60%)가 이미 골 유합이 되었으나 대조군은 20두 중 3두(15%)가 골 유합 소견을 보였다.

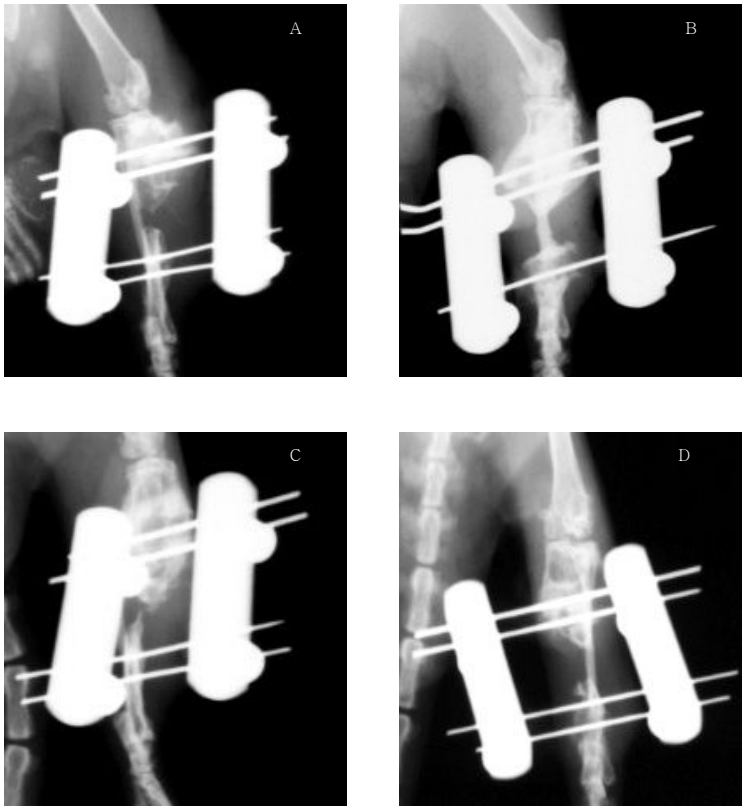


Fig.7. Radiographs at 8 weeks post operation. Rats were received bone defect (15% in size) surgery and they are divided into 2 groups, and then maintained either C-OP group by feeding normal diet for 15 weeks or S-OP group by providing safflower seed diet (30% of safflower seed was mixed with normal diet) for 15 weeks. A~D: Bone union was not completed in the radiographs of C-OP group.

(11) 홍화씨 등에 의한 토끼 혈청내의 Ca^{++} 농도 측정 결과

홍화씨 등을 사료에 급여한 토끼의 혈청 내 Ca^{++} 농도를 측정한 결과 대조군과 처리군에서 모두 유의적인 차이는 보이지 않았으나 홍화씨 처리군이 Ca^{++} 농도가 높은 경향을 보였다(Fig. 8).

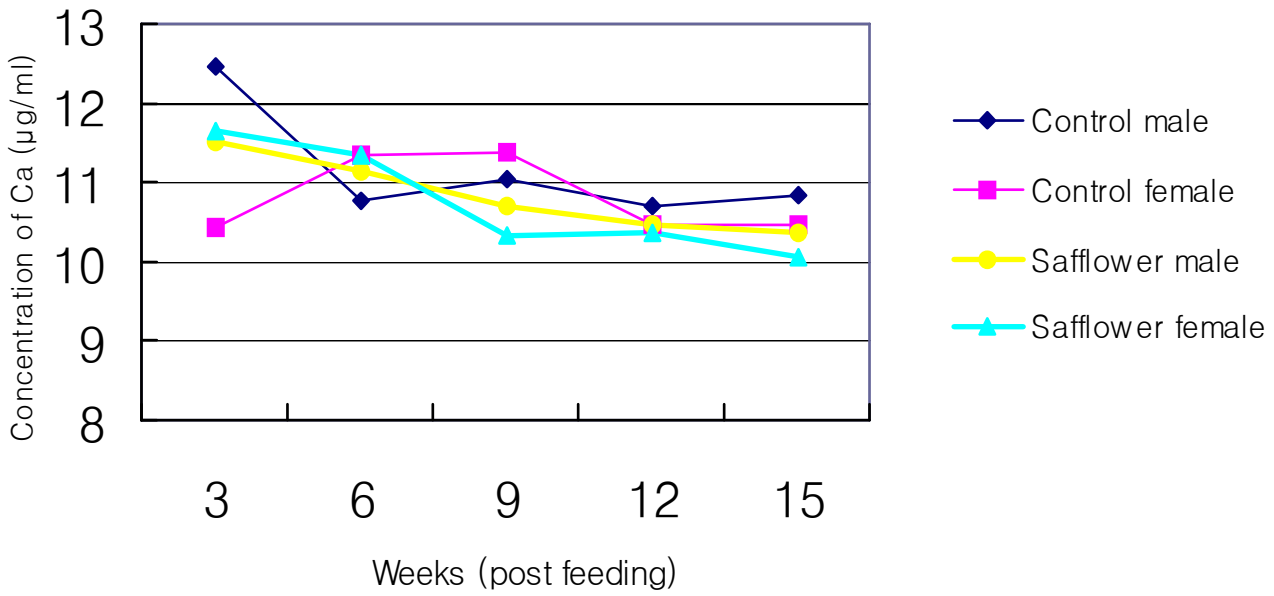


Fig 8. The comparison of Ca in serum between different groups feed either normal or safflower seed diet. In the concentration of Ca, the safflower seed groups were demonstrated low compared to control group.

(12) 황금, 삼백초, 홍화성분 등을 급여한 사료첨가제가 돈육에 미치는 이화학적 효과

•황금, 홍화, 삼백초 등은 flavin계 물질이 풍부하여 항균, 항생, 이뇨, 항암효과 등이 있다고 알려져 있다. •예비실험에 의하면 상기의 세 한약제가 일정비율로 섞어 사료에 먹였을 경우 : •돼지 돈육에서 포화성 콜레스트롤이 70% 이상 저하되었다. •특히 질병에 대한 이완률을 낮추고 LDL을 감소시켰으며 •돈육의 보수력 및 연도 등을 향상시켰다.

(13) 특수동물을 이용한 IgY의 전임상효과 시험

표. 특수실험동물을 이용한 임상시험 효과(1)

만성위염도					
헬리코박터 비감염군			헬리코박터 감염군		
음성 대조군	IgY 1mg 투여군	IgY 10mg 투여군	양성 대조군	IgY 1mg 투여군	IgY 10mg 투여군
0.33 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.71	2.00 ± 0.00	1.75 ± 0.45	1.27 ± 0.47

(14) 어성초 추출물의 항산화 효과

어성초의 수용성 추출물을 이용 농도에 따른 항산화 효과를 확인해 본 결과 최초 농도에서 부터 200 mg/ml 까지의 농도 증가에 따라 항산화 효과가 상당히 높게 나타나고 있는 것으로 확인됨.

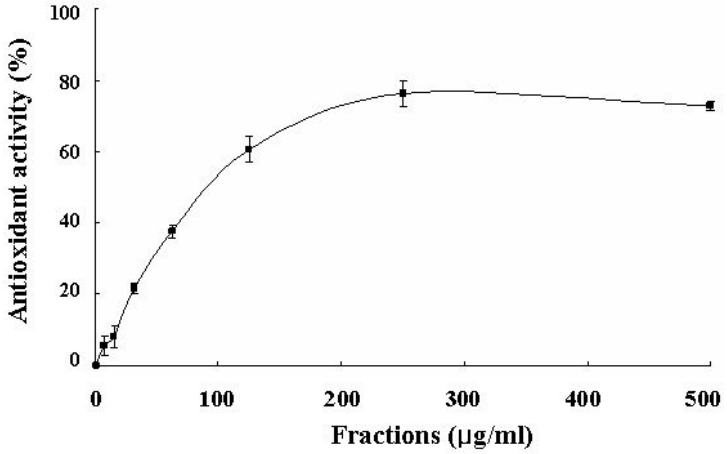


Fig 9. 어성초 추출물의 항산화 효과

(15) 살모넬라 감염증에 있어서 어성초 추출물의 치료효과

어성초의 수용성 추출물을 이용 살모넬라 감염증에 있어서 치료효과를 확인하기 위하여 실험동물인 마우스에 4 x 10^5 의 *S. enteritidis* 균을 복강에 접종한 후 어성초 추출물을 투여한 group과 생리 식염수를 투여한 대조군의 병원성 비교 검사를 수행해 본 결과 감염 후 어성초의 수용성 추출물을 투여하지 않은 마우스에서는 감염 후 7일 이내에 100% 폐사율을 보인 반면 어성초 투여 group에서는 최초 폐사가 7일에 1마리 나타난 후 12일까지 폐사4마리의 폐사가 (58%) 발생되고 생존율이 42%에 이르는 치료효과를 확인 함.

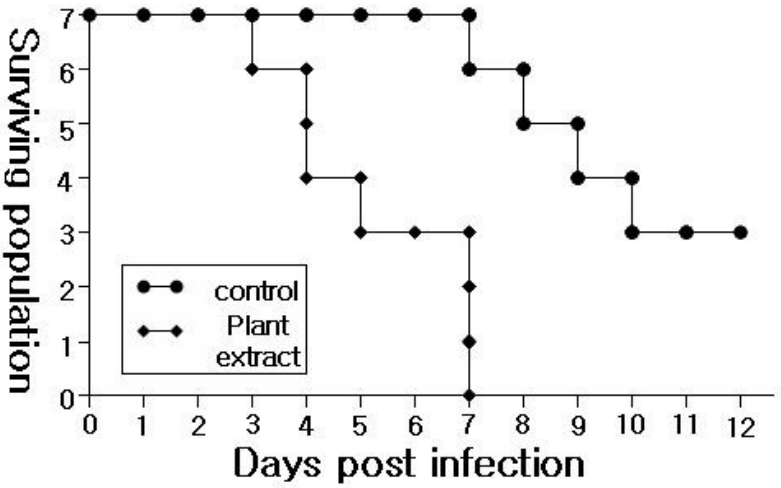


Fig 10. 살모넬라 감염증에 있어서 어성초 추출물의 치료효과

(16) 양돈장 설사 유발 주요 살모넬라 원인체 특성분석

1) 야외주의 분리 및 혈청형 조사

Table9. Features of *Salmonella* isolates

Strain No.	Serotype	O-serogroup	Isolated years	Origin	Sample from
ST1	S. typhimurium	B	2005	Pig	Lymph node
ST2	S. typhimurium	B	2004	Pig	Lymph node
ST3	S. typhimurium	B	2005	Pig	Lymph node
ST4	S. typhimurium	B	2005	Pig	Lymph node
ST5	S. typhimurium	B	2006	Pig	Lymph node
ST6	S. typhimurium	B	2007	Pig	Stool
SE1	S. enteritidis	D1	2006	Pig	Lymph node
SE2	S. enteritidis	D1	2005	Pig	Lymph node
SE3	S. enteritidis	D1	2004	Pig	Lymph node
SE4	S. enteritidis	D1	2003	Pig	Lymph node
SE5	S. enteritidis	D1	2004	Pig	Lymph node
SE6	S. enteritidis	D1	2005	Pig	Lymph node
SB1	S. bredeney	B	2006	Pig	Lymph node
SB2	S. bredeney	B	2001	Pig	Lymph node
SB3	S. bredeney	B	2001	Pig	Lymph node
SB4	S. bredeney	B	2005	Pig	Lymph node
SB5	S. bredeney	B	2004	Pig	Lymph node
SB6	S. bredeney	B	2001	Pig	Lymph node
SM1	S. Montevideo	C1	2003	Pig	Lymph node
SM2	S. Montevideo	C1	2001	Pig	Lymph node
SM3	S. Montevideo	C1	2007	Pig	Lymph node
SM4	S. Montevideo	C1	2006	Pig	Lymph node
SM5	S. Montevideo	C1	2001	Pig	Lymph node

SM6	S. Montevideo	C1	2006	Pig	Lymph node
SS1	S. schwarzengrund	B	2001	Pig	Lymph node
SS2	S. schwarzengrund	B	2006	Pig	Lymph node
SS3	S. schwarzengrund	B	2005	Pig	Lymph node
SS4	S. schwarzengrund	B	2005	Pig	Lymph node
SS5	S. schwarzengrund	B	2006	Pig	Lymph node
SS6	S. schwarzengrund	B	2007	Pig	Lymph node

(17) 분리 야외주의 병원성 분석

분리된 야외주의 대표적인 균주를 이용 탐식세포 내에서의 증식능을 평가하여 병원성을 확인한 하였다.

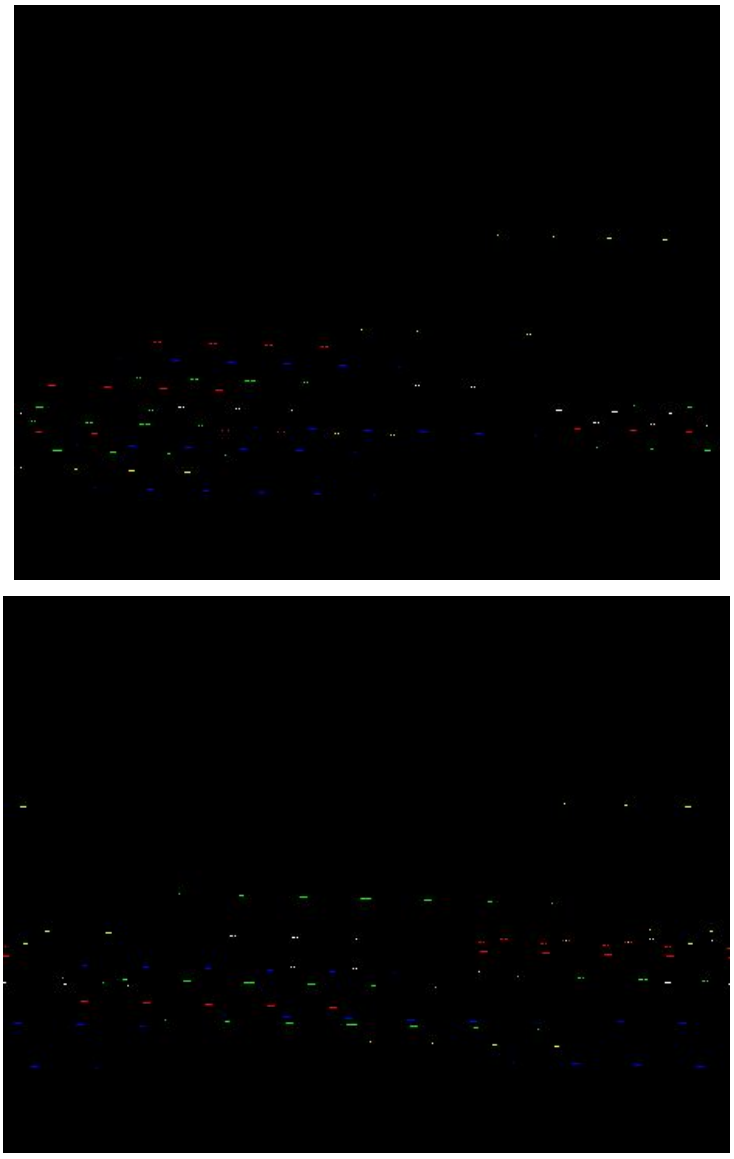


Fig. 11. Intracellular replication of salmonella isolates and reference strain within macrophages. Macrophages were infected with representative class Ⅰ(A) and class Ⅱ(B). At different times of incubation, the cells were lysed, and the numbers of viable intracellular bacteria were determined. Datum points and error bars represent the mean CFU of triplicate samples from a typical experiment (performed at least three times) and

their standard deviations.

(18) 분리 야외주의 항원성 분석

분리 야외주 중 대표적인 균주를 이용 표면항원 분석을 수행하여 각 균주의 항원성 및 특성을 분석하였다.

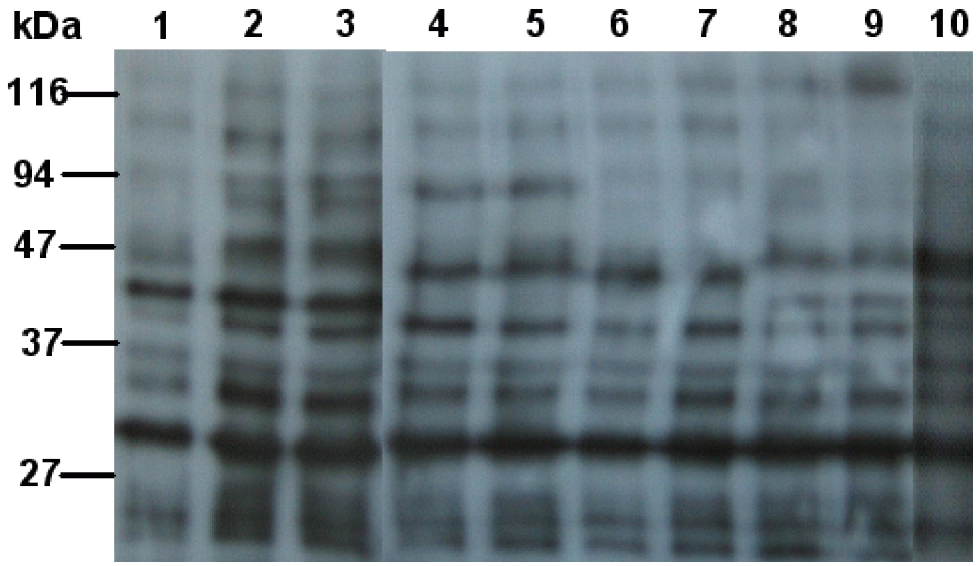


Fig. 12. Modification of surface proteins of salmonella strains. Surface proteins of 10 representative salmonella isolates and reference strain were labeled with Sulfo-NHS-Biotin and then detected by immunoblotting with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. The position of molecular mass markers (in kilodaltons) is shown on the left. Lane 1 to 11; reference strain, *S. typhimurium 2, S. typhimurium 3, S. enteritidis 3, S. enteritisis 4, S. bredeney 1, S. bredeney 2, S. montevideo 3, S. montevideo 5, S. swarzenground 2, S. swarzenground 6.*

(19) 앞으로의 전망

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

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, 캠필로박터, 대장균등 인수공통질병 원인체의 항생제 내성을 야기해 인류건강에 위해할 수도 있다.

성장촉진용 항생제의 사용금지를 위해 지금까지 쏟은 노력과 경제력은 이제 인간 과 동물의

합리적인 항생제 사용을 권장하기 위해 쓰여야 할 것이다. 또한 항생제 내성 세균과 내성 유전자의 얽힌 역학관계를 밝히고 치료와 예방 면에서의 성장촉진제의 적절한 위해성 평가도 이루어져야 한다.

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

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.

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

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

 이로 인하여 국내 양돈 산업에 새로운 국면을 맞게 될 것이며, 해외수출 시장개척 은 물론 각종 예방제 및 항생제를 최소화하게 사육가공하게 되어, 식품으로서의 안정성은 물론 고부가가치를 창출하여, 돈육의 품질 면에서도 획기적 계기가 마련, 국내는 물론 해외수출 양돈시장에도 큰 변화가 있으리라 사료된다. 지속적 연구로 다른 가축에도 응용시킬 수 있어 농가에 더 높은 고소득을 창출 할 수 있다.

제3장 연구개발수행내용 및 결과

제 1 절 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 생체 내 조절 물질에 대한 사양및 이화학적 검정

1. 연구목적:천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체내 조절 물질에 대한 사양및 이화학적 검정를 수행하기 위함

2.연구방법:

가. 동물실험을 통한 이화학적 검정 및 안전성 평가

①실험동물 : 돼지 72 수 ②실험군 : 대조군 : 24두, 실험군 : 각각 24두(0.5및1%)

③실험일정

나. 사료첨가제의 예정 조성비율(0.5및1% 범위내에서 설정)

강화소재: 0.5및1%범위내에서 농도설정함

(황금항균성분, 삼백초 항균성분, 홍화추출물, 특이IgY ,바이오밸런스물질등)

다. 사양 실험

(A군)돼지 24수(0.5 및 1%): 황금유효성분, 삼백초 유효성분, 홍화추출물, 특이IgY및 바이오밸런스물질을 예비실험후 조성결정

(B군)돼지 24수: 대조군

황금(~20%), 홍화(~20%), 삼백초(~30%), 바이오밸런스런스물질, IgY 등 (~30%)
--> 효능평가 후 조성 비율을 조정하여 배합함
사료 첨가제비율: (0.5%,1%범위내설정)

라. 사양 및 이화학적 연구를 위한 측정

① 사양관련: 증체량,사료요구율

② 돼지 육질 관련:

- 수분, 회분, 조단백, 조지방, 콜레스테롤의 변화
- 지방산 및 아미노산의 조성

③ 단백질발현에 미치는 영향

④ 안전성평가

⑤ 소화기 장관에 미치는 효과

마.사료첨가제의 제조

바.IgY의 제조

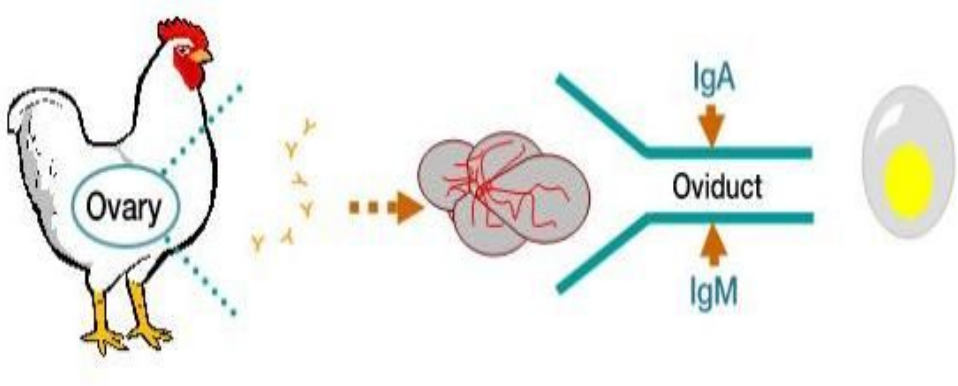
(1) IgY의 제조개요

(2) 다병원성 면역난황항체(IgY)의 생산원리

○ 계란내의 항체는 간접면역성에 의한 것이다; 즉 어미 닭에서 이미 만들어진 항체가 난황으로 이동되어 축적되고 이것이 부화되어 나온 병아리를 여러 가지 질병으로부터 보호하는 것이다. 이와 같이 조류에서 자손으로 항체를 이동시키는 기작은 포유동물에서 임신기간 중 난막(placenta)을 통하여 어미의 면역력을 전달하는 것과 동일한 현상이다.

○ 그 후, 많은 과학자들이 닭에 병원균(세균, 바이러스, 단백질)을 접종시킬 때 이에 대한 항체가 닭의 체내에서 형성되고, 또 그중 많은 양이 계란 형성과정 중 난황에 축적되는 것을 발견하였다.

○ 계란내의 항체는 간접면역성 에 의한 것이다; 즉 어미 닭에서 이미 만들어진 항체가 난황으로 이동되어 축적되고 이것이 부화되어 나온 병아리를 여러가지 질병으로부터 보호하는 것이다. 이와 같이 조류에서 자손으로 항체를 이동시키는 기작 은 포유동물에서 임신기간 중 난막(placenta)을 통하여 어미의 면역력을 전달하는 것과 동일한 현상이다.



[특이난황항체 제조공정]

직영농장

저장고

세척

분무건조

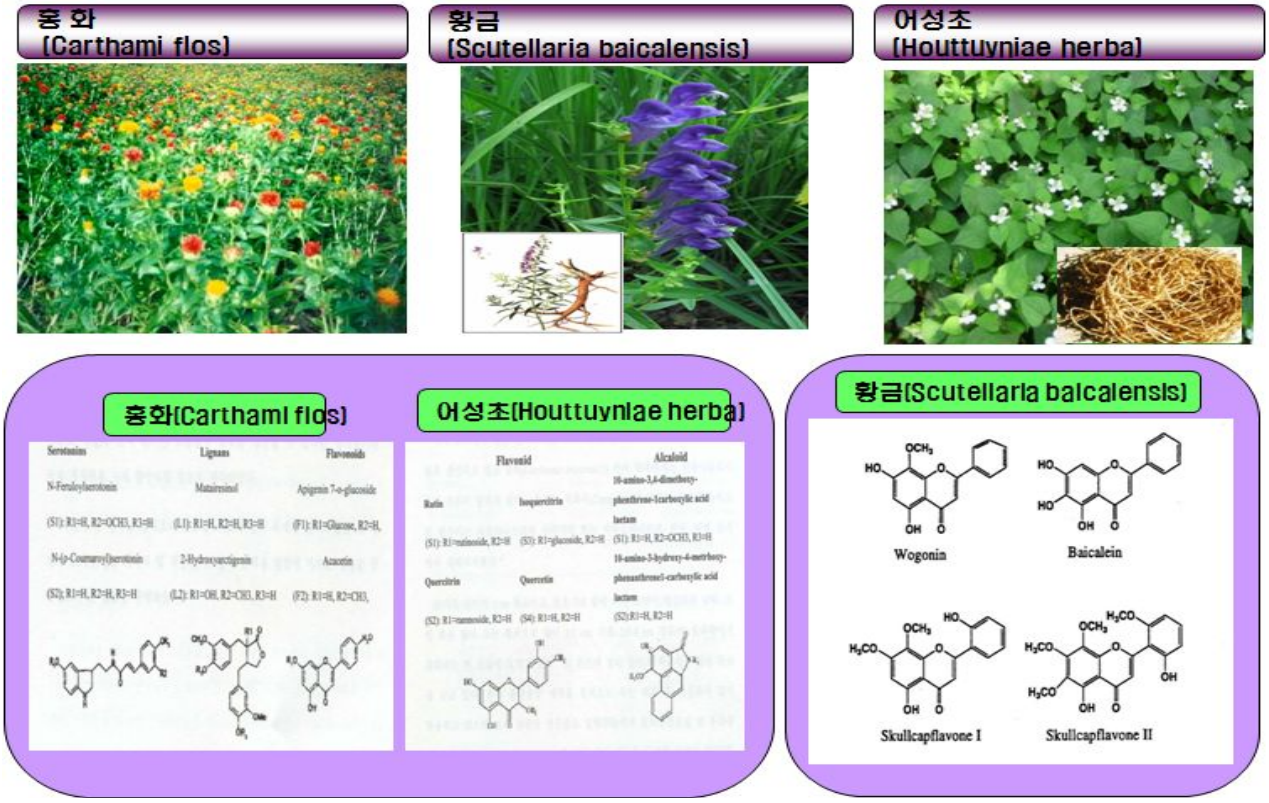
살균작업

할란작업

(3) IgY 의 분말

사. 바이오밸런스물질제조

아. 약용자원의 약효성분



자. 사료첨가제의 체내 단백질에 미치는 영향을 조사 하기위한 Proteomics 기법

(1) 이차원 전기영동의 시료 사용조건

혈청을 12시간 예비 배양한 후 100㎕를 50㎖의 LB broth에 접종하고, 37℃에서 220rpm으로 24시간 동안 진탕 배양하였다. 세균의 배양액은 4℃에서 6000rpm 15분 동안 원심 침전시키고 침전된 균괴는 40 mM tris-HCl buffer(pH 7.2)로 50 ml 부여시킨 다음 4℃에서 6000rpm으로 10분간 3회 세척한 후 흡광도 1.0(λ=610nm)수준으로 희석하였다. 희석된 세균액은 각각 8 ml으로 분주하고, 다시 원심 침전시켜 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

(2) 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

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

(3) 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㎕ 로딩한 후 13㎝ immobilized pH Grient (IPG) strip을 잘 올려놓고, 시료가 건조되지 않도록 cover fluid oil을 가하였다. IEF 조건은 전류가 IPG strip 당 50㎂가 넘지 않도록 하였으며, 20℃의 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.

(4) Second-dimension SDS-PAGE

IEF가 끝난 IPG strip은 1%(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer(1.5 M tris-HCl, pH 8.8, 6 M 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. 10 mA의 조건으로 agarose gel의 붉은색 dye가 strip을 완전히 빠져나가면 20 mA로 변환시켜 bromophenol이 gel 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

(5) 도은 염색

이차원 전기영동을 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위해 도은염색을 하였다. gel을 고정용액(50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 1시간 이상 처리한 후, 50% EtOH으로 20분간 3회 반복 세척한 다음 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$로 1분간 전 처리하였다. gel을 3차 증류수로 20초간 3회 세척한 다음 $AgNO_3$와 37% HCOH로 30분간 처리하여 Na_2CO_3와 37% HCOH로 발색시키고, spot을 확인한 후 stop solution (50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.

(6) Enhanced chemiluminescence(ECL)을 이용한 Immunoblotting

이차원 전기영동을 한 gel에서 항원 spot을 검출하기 위하여 15초 동안 MeOH에 전 처리한 PVDF membrane에 60V에서 70분 동안 전사시킨 후 5% skim milk를 가하여 4℃에서 하루 동안 blocking 하였다.

5% skim milk에 1:200으로 희석한 S. enteritidis 특이 다가 혈청을 가하여 2시간 동안 진탕 배양하면서 반응시킨 후 Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween 20)을 0.1% 첨가한 tris buffered saline으로 세척한 후 다시 5% skim milk에 1:2,000으로 희석한 anti rabbit horse radish conjugated IgG를 가하여 1시간동안 진탕하여 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 항원을 검출하였다.

(7) 통계처리

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

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

(9) spot excising

Proetix 2D program을 통해 분석된 2-D gel을 분석한 후, 관심 있는 단백질의 identification을 위해 관련 spot을 피펫 tip을 이용하여 1㎟ 크기로 잘라내었다.

(10) 탈염색과정

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

(11) In-gel Reduction and Alkylation

Dry된 gel에 10 mM DTT가 함유된 100 mM NH_4HCO_3를 넣어 30분간 반응시킨 후 다시 55 mM iodoacetamide가 함유된 100 mM NH_4HCO_3를 넣어 암실에서 30분간 다시 반응시킨다. 100mM NH_4HCO_3를 이용하여 한 번 더 washing 한 후 acetonitrile을 이용하여 gel을 탈수시킨다.

(12) In-gel Digestion

Dry된 gel에 50 mM NH_4HCO_3와 5 mM $CaCl_2$의 digestion buffer를 넣어 녹인 12.5 ng/㎕의 trypsin을 15 ㎕를 넣어 45분 동안 ice에서 정치시키고 흡수되지 않고 남은 용액은 모두 제거한 후 20 ㎕의 trypsin이 포함되지 않은 digestion buffer를 넣어 37℃에서 16시간정도 digest시킨다.

(13) Extraction of Peptides

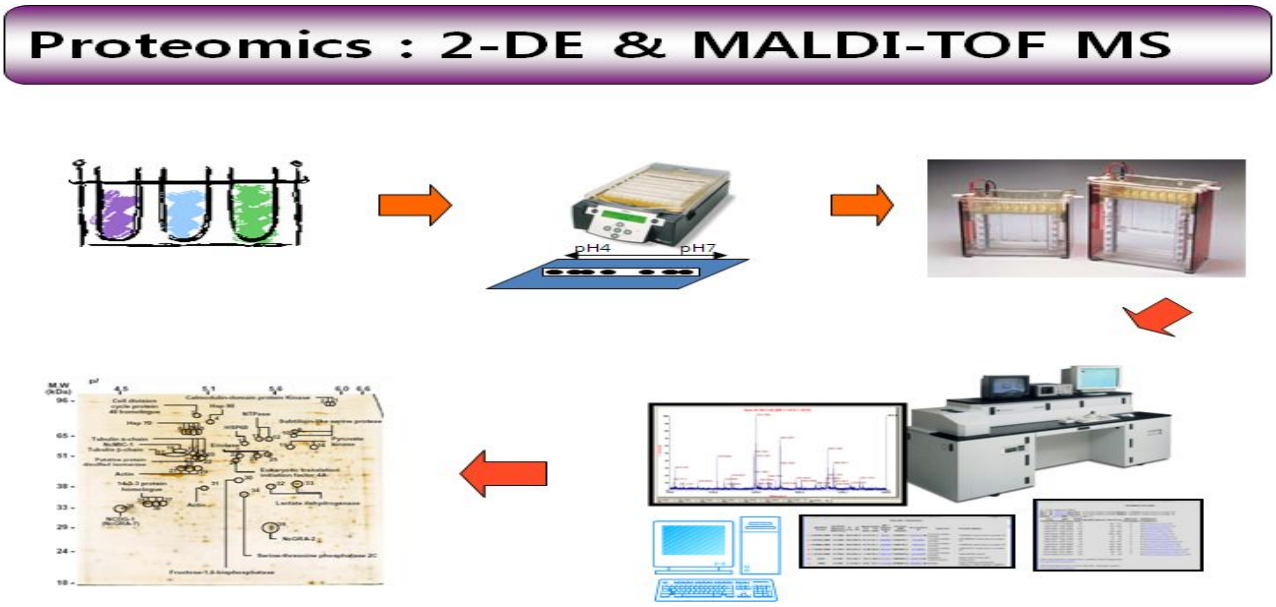
15㎕의 pure water를 넣어 30분간 vortex 시킨 후 20㎕의 acetonitrile을 넣어 다시 30분간 vortex 시킨 후 상층액만 수거, vacuum centrifuge를 이용하여 dry 시킨다.

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

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

(15) 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.



<Proteomics 의 실험절차>

차.장관정착 확인을 위한 조직학적(전자 현미경적 관찰) 방법

(1) 일반조직염색 및 분석

사료첨가제가 장 점막에 미치는 영향을 광학현미경적으로 조사하기 위하여 살처분한 돼지의 복강을 열고 소장 및 대장을 적출하여 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 후고정이 끝난 조직은 일반적인 조직포매 과정을 거쳐 4-5 ㎛ 두께의 조직절편을 제작하여 슬라이드에 부착하였다. Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색을 수행하여 각 장기의 조직학적인 변화를

광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 장관 조직의 SEM 실험방법

돼지를 살처분하여 소장 및 대장 조직을 채취하였으며 생리식염수에 조직이 손상되지 않게 부드럽게 한번 세척한 후 0.1M PBS에 5분 동안 3번 세척한 다음 2.5% Glutaladehyde에 조직을 냉장상태(4℃)에서 48시간 동안 전고정 하였다. 전고정한 조직을 0.1M PBS에 5분 동안 세척한 후 1% O_sO_4에 조직을 냉장상태에서 2시간 동안 보관하였다. 조직을 일반적인 탈수과정에 따라 50%-70%-80%-90%-95%-absolute alcohol I, II, III에 각 단계별로 30분 동안 담가둔 다음, acetone I, II 용액에 1시간씩 담가둔 후 HMDS I, II 용액에 각각 30분씩 담근 후 임계점 건조기에 보관하였다. Ion sputtering coater로 처리하여 주사전자현미경(JLEOL사, JEM600)으로 가속전압 10 KV하에서 촬영하여 사진을 관찰하였다.

3.연구결과

가.사료첨가제를 급여한 돼지에서 Proteomics 기법에 의한 단백질 발현 연구

사료첨가제가 자돈 체내 대사 단백질에 미치는 영향을 조사하기위하여 돼지 비장에 대한 proteome을 실시 하였다. 즉, 항균 효과에 대한 단백질 발현을 조사 하기 위하여 *E.coli* 및 *Salmonella*균($3x10^4$-10^5/ml)을 경구 투여 한후 , 대조군(Negative: 세균을 접종하지 않은 군,Positive: 세균접종후 일반사료 급여군) 에는 일반사료를, 실험군에는 0,5 및 1% 제조 사료첨가제를 급여 하며접종후1일, 1주, 2주, 4주및 8주에 돼지 비장을 적출하여 단백질 발현을 조사 하였다. 부검하여 적출한 돼지 비장을 즉시 cold saline 에 넣어 세척해준 뒤 액체질소에 넣어 동결시켰다. 동결시킨 조직은 잘게 마쇄하여 -70℃에서 실험을 실시 할때 까지 보관하였다. 2-D sample lysis buffer에 조직 0.1g/ml로 첨가해 주어 sonication 실시 한 뒤, 4℃, 15,000rpm에서 1시간동안 원심분리 하였다. 상층액0.1ml를 10% TCA(trichloroacetic acid)에 첨가하여 1시간 동안 단백질 침전 실시하였다. 원심분리 뒤 상층액을 제거하고 90% cold acetone으로 세척하였다. 그후동결건조 시켜 pellete을 만든 뒤 0.5ml의 lysis buffer에 녹이고 원심분리한 뒤 상층액을 분리하였고, 상층액에 함유된 단백질의 양을 protein assay로 측정하였다.spot의 detection과 normaliziation은 nonlinear사의 samespot image analysis software로 실시 하였으며, MALDI-TOF peptide analysis는 mascot peptide search engine을 이용하여 분석하였다. proteome 분석결과 총 29개의 spot이 발견되었으며 이중 21개의 spot이 MALDI-TOF peptide 분석결과 확인되었다. 이들 단백질중 항병성 및 면역대사체계에 관련되는단백질인 COFILIN protein, Peptidylprolyl isomerase A,Proteasome (prosome) subunit, Mitochondrial malate dehydrogenase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tropomyosin 3 이 대조군보다 upregulation 되었고, Transketolase, Heat shock 60kDa protein 1, Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2, Actin related protein 2/3 complex subunit 2, Elongation factor 1-gamma, Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor, F-actin capping protein subunit beta 2, Phosphoglycerate mutase 1은 downregulation 되었다.

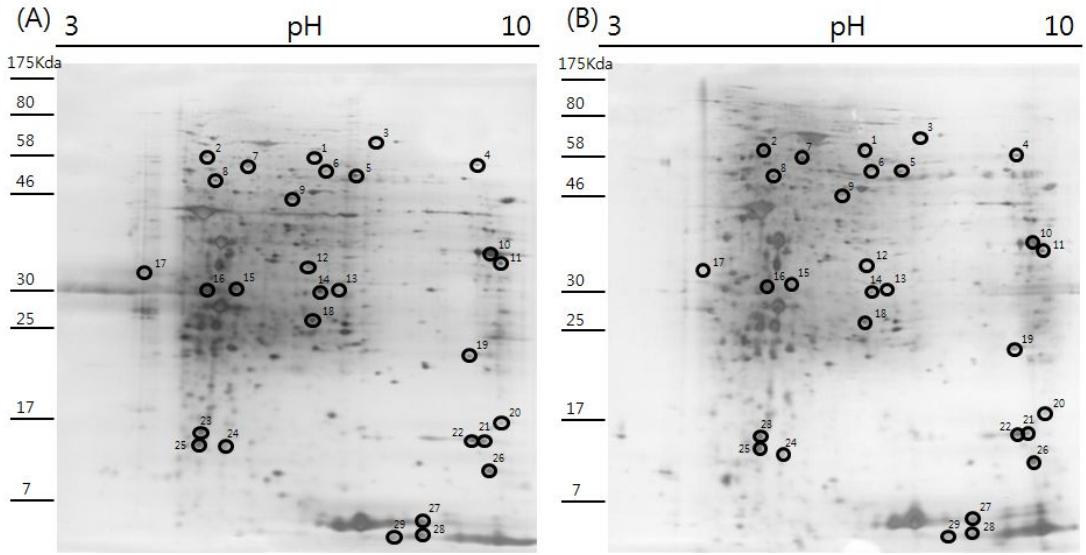


Fig. 1. 2-D pattern of control group(postive: challenged bacterial) (A) and feed additive-treated group for 8weeks (B) porcine spleen sample. Sample were resolved by 2-D on nonlinear pH 3-10 IPG strips followed by separation on a 12% SDS-PAGE gel in the second dimension. Proteins were visualized by silver nitrate stain.

Table 1. Identification of protein on 2-D pattern of control group(postive: challenged bacterial) (A) and feed additive-treated group for 8weeks(B)

Spot#	protein	Accession #(a)	Nominal mass(M_r)	Matched peptide	Sequence Coverage (%)
21	COFILIN protein	51592135	18792	7	48
27	Hemoglobin subunit beta	3041678	16212	9	72
26	peptidylprolyl isomerase A	47523764	18086	7	50
19	proteasome (prosome, macropain) subunit	109073357	22618	8	40
8	Glutamate carboxypeptidase-like protein 1	73945377	53009	8	29
3	Transketolase	162952052	68479	17	36
2	heat shock 60kDa protein 1	194044029	61040	14	35
11	mitochondrial malate dehydrogenase	89574151	29916	7	36
4	pyruvate kinase 3 isoform 2	194038726	58411	12	31
12	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	74006471	31730	8	32
14	actin related protein 2/3 complex subunit 2	194043819	42812	9	27
10	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5052383	20110	7	41
13	actin related protein 2/3 complex subunit 2	194043819	42812	9	27
9	Elongation factor 1-gamma	55977740	4935	15	47
7	T-complex protein 1 subunit alpha	194033403	60830	13	28
6	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	47522940	54721	9	23
15	F-actin capping protein subunit beta 2	148224365	30820	8	37
18	Phosphoglycerate mutase 1	194041795	29086	11	68
17	tropomyosin 3	80975533	29018	9	22

[a]Mascot search primary accession number

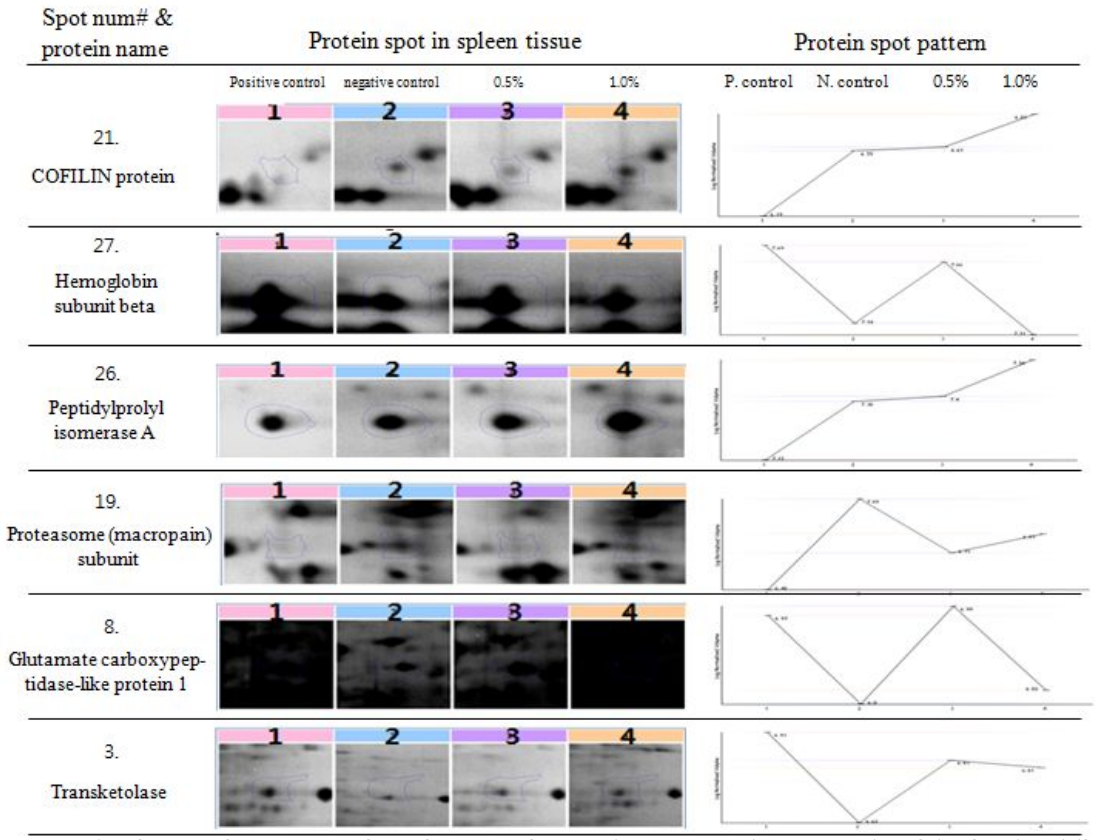


Fig. 2. Trend of protein expression for porcine spleen sample treated with feed additive for 8weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were perform with samespot software.

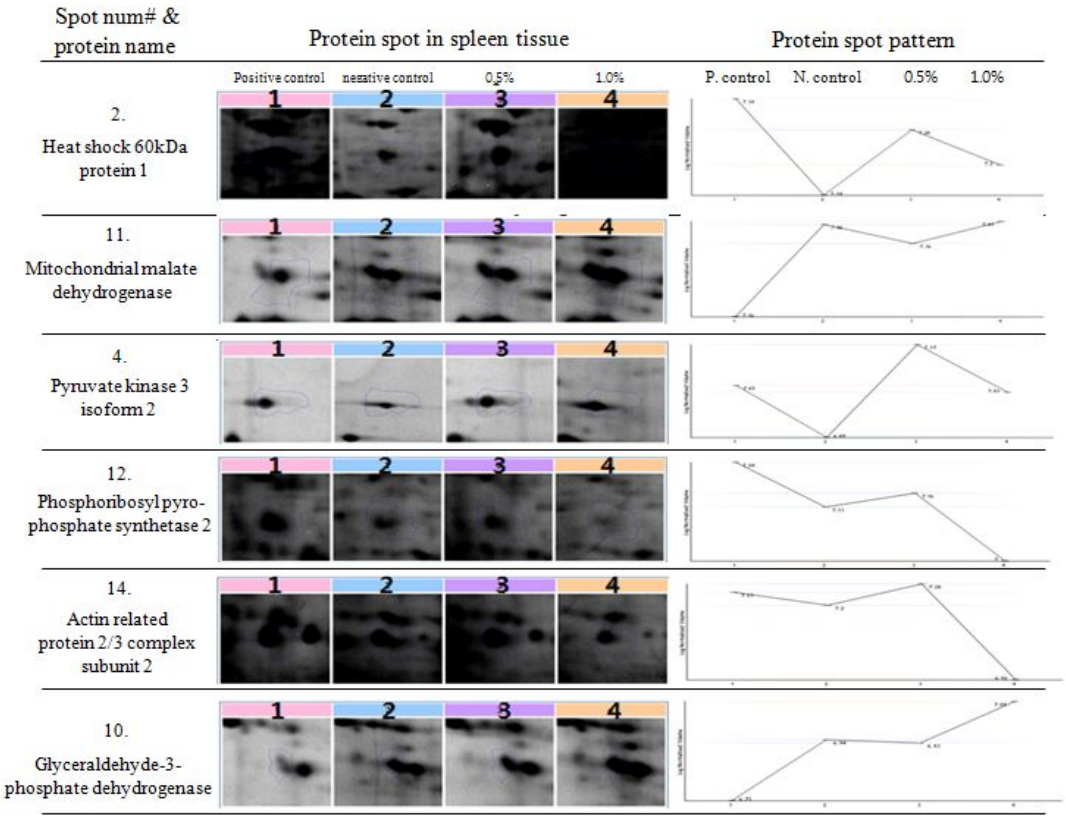


Fig. 3. Trend of protein expression for porcine spleen sample treated with feed additive for 8weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were performed with samespot software.

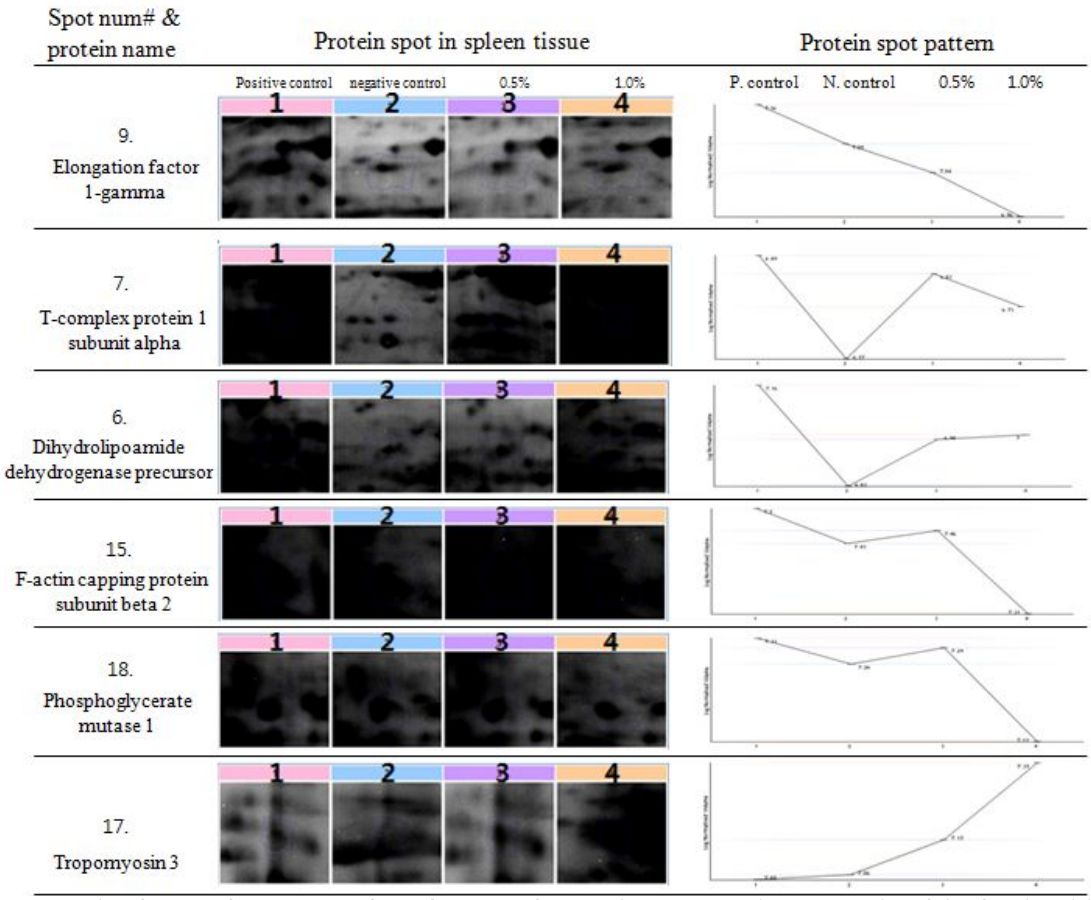


Fig. 4. Trend of protein expression for porcine spleen sample treated with feed additive for 8weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were performed with samespot software.

Table 2. Protein spot normalization. Spot normalization was performed with progenesis samespot software by dividing the volume.

spot num#	normal control group	positive control group	0.5% Exp. group	1.0% Exp. group
21	1.53E+06	3.86E+06	4.07E+06	6.49E+06
27	4.93E+07	3.43E+07	4.56E+07	3.26E+07
26	1.43E+07	2.41E+07	2.52E+07	3.50E+07
19	2.69E+06	5.47E+06	4.68E+06	5.68E+06
8	9.44E+06	6.27E+06	9.87E+06	6.68E+06
3	8.55E+06	4.16E+06	6.83E+06	6.44E+06
2	2.21E+07	1.38E+07	1.90E+07	1.60E+07
11	1.44E+07	2.62E+07	2.31E+07	2.67E+07
4	1.12E+07	7.75E+06	1.49E+07	1.07E+07
12	1.73E+07	1.35E+07	1.45E+07	9.94E+06
14	1.78E+07	1.59E+07	1.91E+07	8.34E+06
10	5.18E+06	8.78E+06	8.55E+06	1.23E+07
13	9.47E+06	4.17E+06	6.27E+06	2.16E+06
9	1.45E+07	1.24E+07	1.10E+07	9.20E+06
7	7.76E+06	3.76E+06	6.82E+06	5.41E+06
6	1.43E+07	6.82E+06	9.61E+06	9.94E+06
15	3.13E+07	2.72E+07	2.86E+07	2.06E+07
18	2.03E+07	1.81E+07	1.94E+07	1.27E+07
17	1.13E+07	1.16E+07	1.42E+07	2.22E+07

돼지 혈청에 대한 사료 첨가제의 영향을 조사하기 위해 혈청에 대한 proteome을 실시하였다. 즉, 항균 효과에 대한 단백질 발현을 조사하기 위하여 대조군 과 1% 사료첨가제 투여군에서 1일, 1주, 2주, 4주및 8주에 혈액을 채취하여 원심분리 한 후 돼지 혈청에서 단백질 발현을 조사 하였다. spot의 detection과 normaliziation은 nonlinear사의 samespot image analysis software로 실시하였으며, MALDI-TOF peptide analysis는 mascot peptide search engine을 이용하여 분석하였다. proteome 분석결과 총23개의 spot이 발견되었으며 이중 7개의 spot이 MALDI-TOF peptide 분석결과 확인되었다. 이들 단백질 중 골격근의 이온 교환 channel 구성에 관련된 단백질인 Sarcolemmal membrane associated protein, cholesterol 대사 관련 지단백질인 Apolipoprotein A-IV, unnamed protein product, apolipoprotein 전구 물질로 작용하는 단백질인 apolipoprotein A-I preproprotein 등이 Up-regulation 되었으며, hypothetical protein isoform 4 는 Down-regulation 되는 경향을 나타내었다(Fig.5-9, Table.3-4).

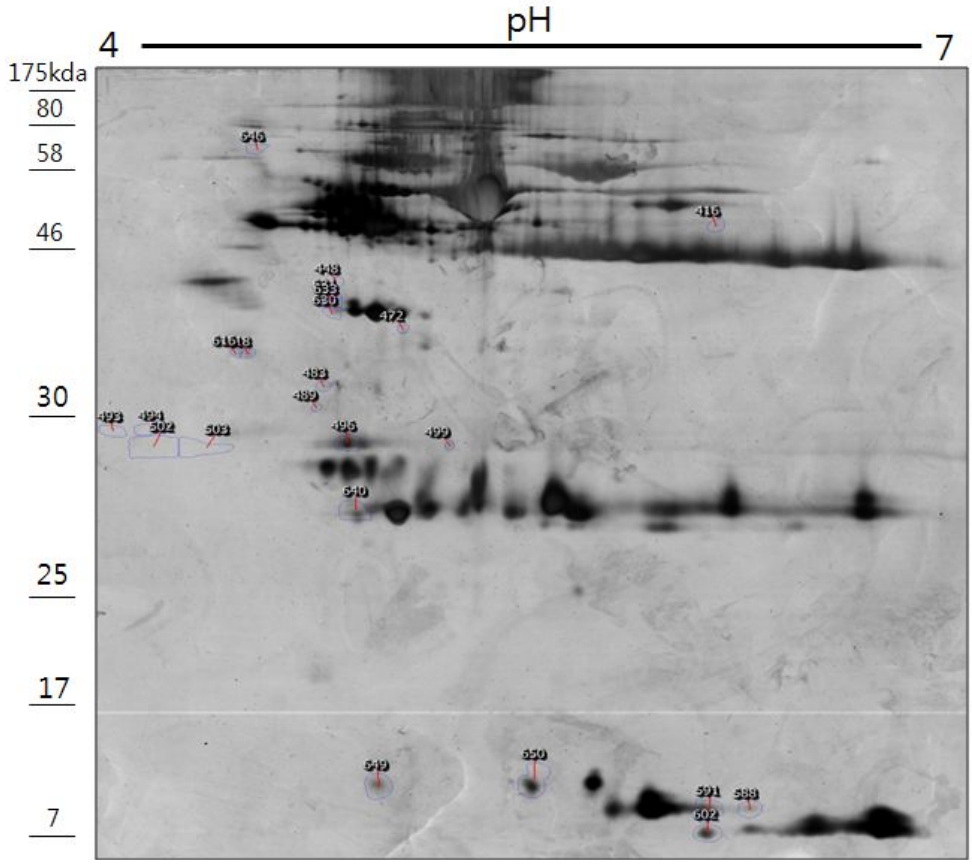


Fig.5. 2-DE pattern of porcine serum. Serum Sample were resolved by 2-D on nonlinear pH 4-7 IPG strips followed by separation on a 12% SDS-PAGE gel in the second dimension. Proteins were visualized by silver nitrate stain.

Table 3. Identification of protein on 2-D pattern of porcine serum.

Spot#	protein	Accession #	Nominalmass(M_r)	Matched peptide	Sequence coverage (%)
416	Sarcolemmal membrane associatedprotein	56605992	95141	13	20
472	Apolipoprotein A-IV	160221090	20282	10	58
499	unnamed protein product	189054178	66151	10	23
640	apolipoprotein A-I preproprotein	47523850	30236	16	51
591	beta-globin	120564455	14010	6	64
588	Chain B, Structure Determination Of Aquomet Porcine Hemoglobin At 2.8 Angstrom Resolution	809283	16082	6	46
602	hypothetical protein isoform 4	114568205	109474	12	19

Table 4. Protein spot normalization. Spot normalization was performed with progenesis samespots software by dividing the volume.

#	Anova (p)	Fold	Tags	Notes	pI	MW	Average Normalised Volumes					
							1Day Control	1Day Test	1st Month Control	1st Month Test	2nd Month Control	2nd Month Control
618	...	15.5					5747.000	1.526e+004	3264.167	1.142e+004	984.695	6042.847
630	...	4.8					8110.000	2.379e+004	2.497e+004	2.955e+004	6153.087	9072.274
616	...	5.9					2814.000	8217.378	1394.668	3930.504	1684.908	4050.768
588	...	11.8					1.168e+004	5.284e+004	3.881e+004	1.019e+004	4466.923	6186.909
602	...	30.5					4.030e+004	9.178e+004	5.933e+004	3012.599	1.678e+004	8232.172
631	...	8.9					1565.000	6201.861	5320.790	5265.435	698.330	2420.650
649	...	6.5					3.300e+004	1.221e+005	1.131e+005	9.618e+004	1.891e+004	7.449e+004
650	...	7.4					6.859e+004	1.441e+004	1.060e+005	4.148e+004	8.215e+004	8.245e+004
646	...	9.3					4108.000	1.588e+004	5765.798	6482.180	2066.101	1.919e+004
633	...	6.1					7501.000	2.523e+004	1.858e+004	2.347e+004	4106.454	6278.819
640	...	2.8					4.466e+004	9.249e+004	8.066e+004	6.787e+004	1.269e+005	5.973e+004
591	...	41.4					4.794e+004	1.014e+005	7.237e+004	1.557e+004	2447.293	1.590e+004
483	...	2.3					4019.000	9332.659	5820.766	7576.801	6104.731	4720.474
489	...	5.5					1811.000	5339.574	975.975	3232.085	3328.369	3787.945
472	...	2.4					2611.000	6331.872	3010.378	4195.577	6228.446	5477.443
416	...	8.2					5863.000	2.329e+004	5029.577	1.770e+004	5493.693	2846.639
448	...	11.9					2524.000	1.133e+004	9121.772	8202.620	952.039	4527.359
494	...	18.0					4441.000	4.271e+004	2444.324	2741.335	3105.431	2374.178
503	...	65.9					1.279e+004	1.925e+005	5209.685	2919.176	1.053e+004	5706.187
499	...	10.3					1709.000	4839.209	2147.263	2350.761	1956.830	468.330
502	...	61.5					1.315e+004	4.042e+005	1.713e+004	9796.995	6571.331	7426.666
493	...	19.5					4290.000	3.878e+004	1989.376	2858.395	4937.918	2526.502
496	...	17.8					6.169e+004	2.352e+004	1.811e+004	3474.647	9029.300	5161.437

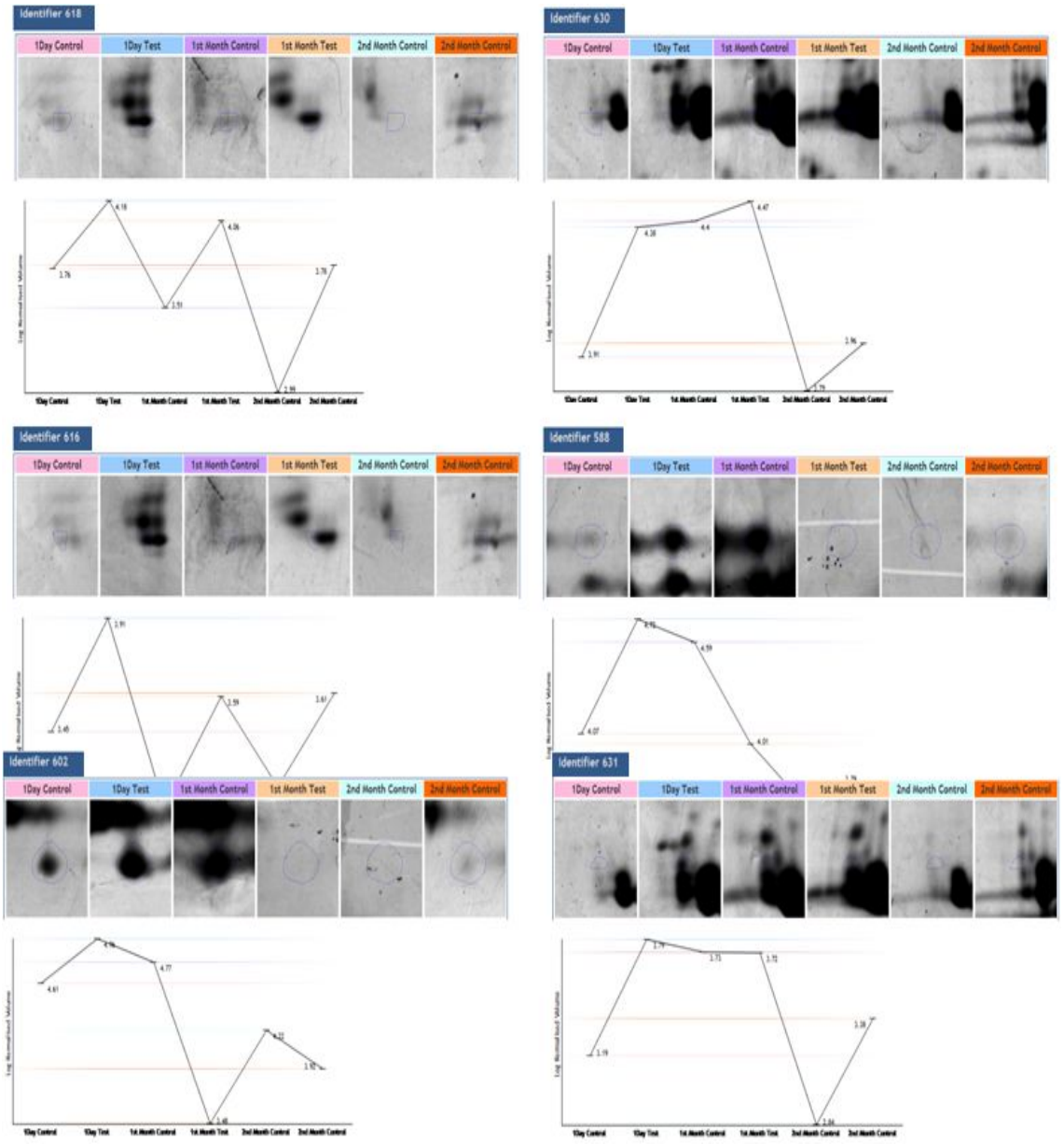


Fig.6. Trend of protein expression for porcine serum treated with feed additive for 8 weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were performed with samespot software.

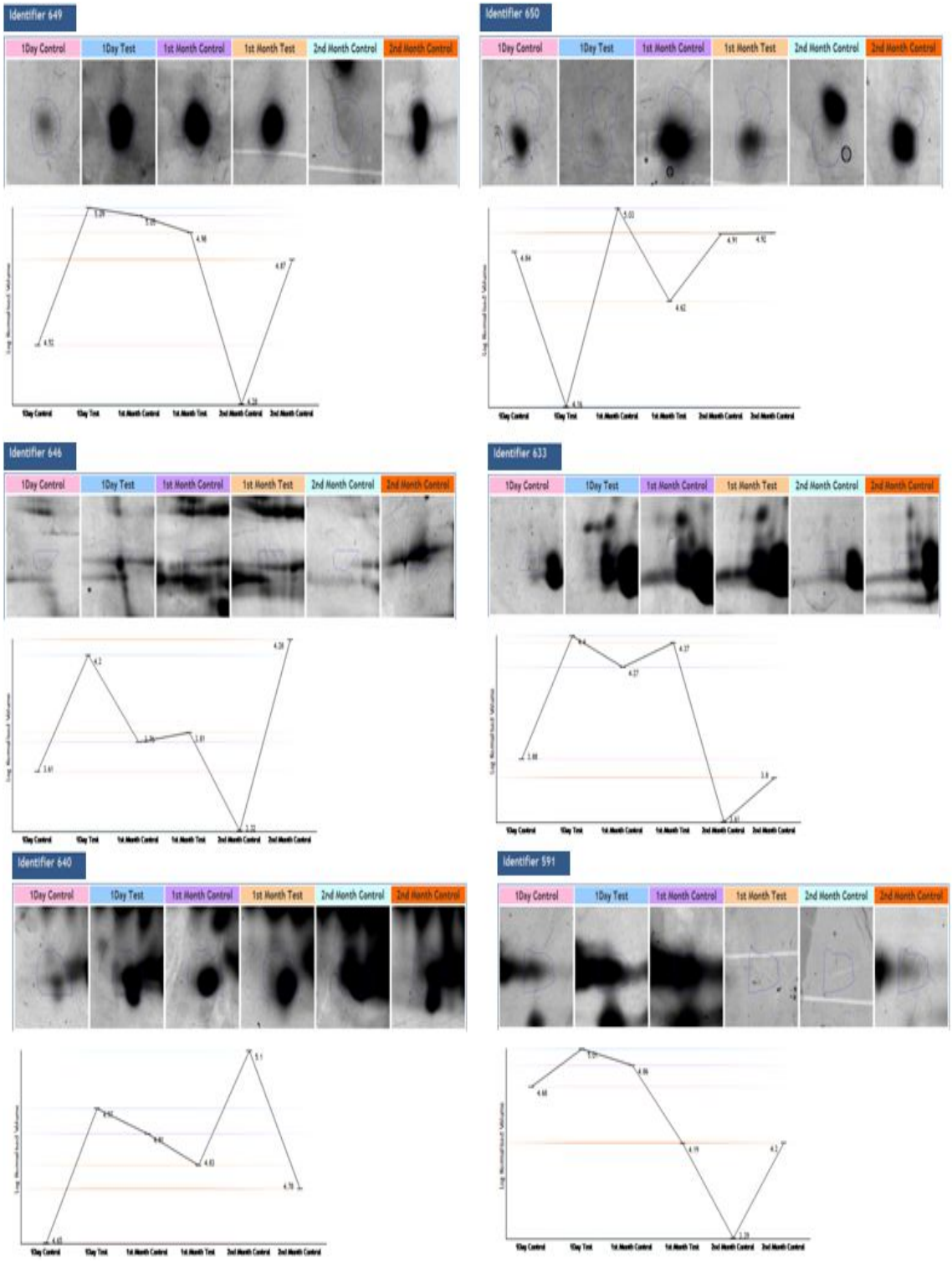


Fig.7. Trend of protein expression for porcine serum treated with feed additive for 8 weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were performed with samespot software.

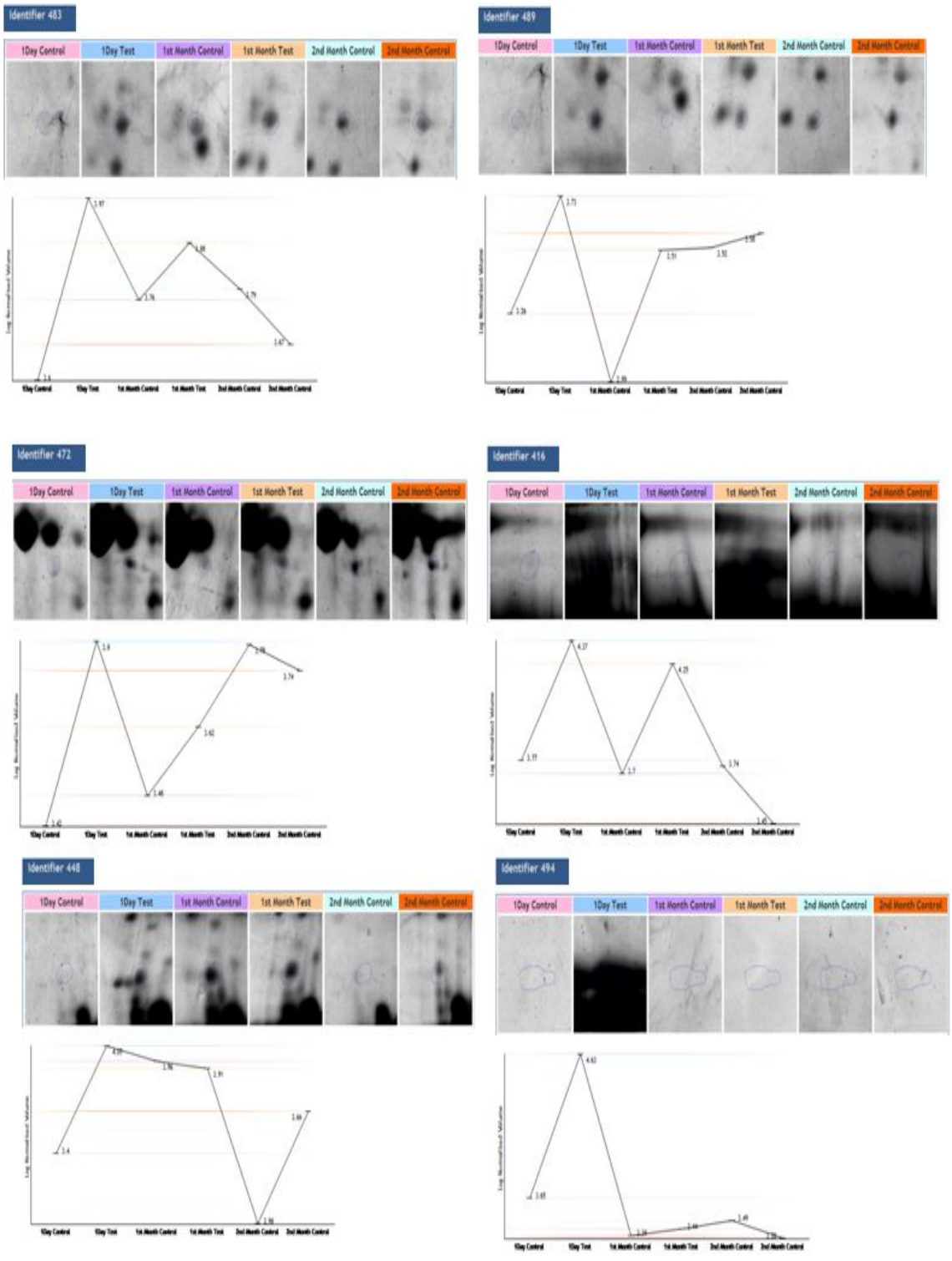


Fig.8. Trend of protein expression for porcine serum treated with feed additive for 8 weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were performed with samespot software.

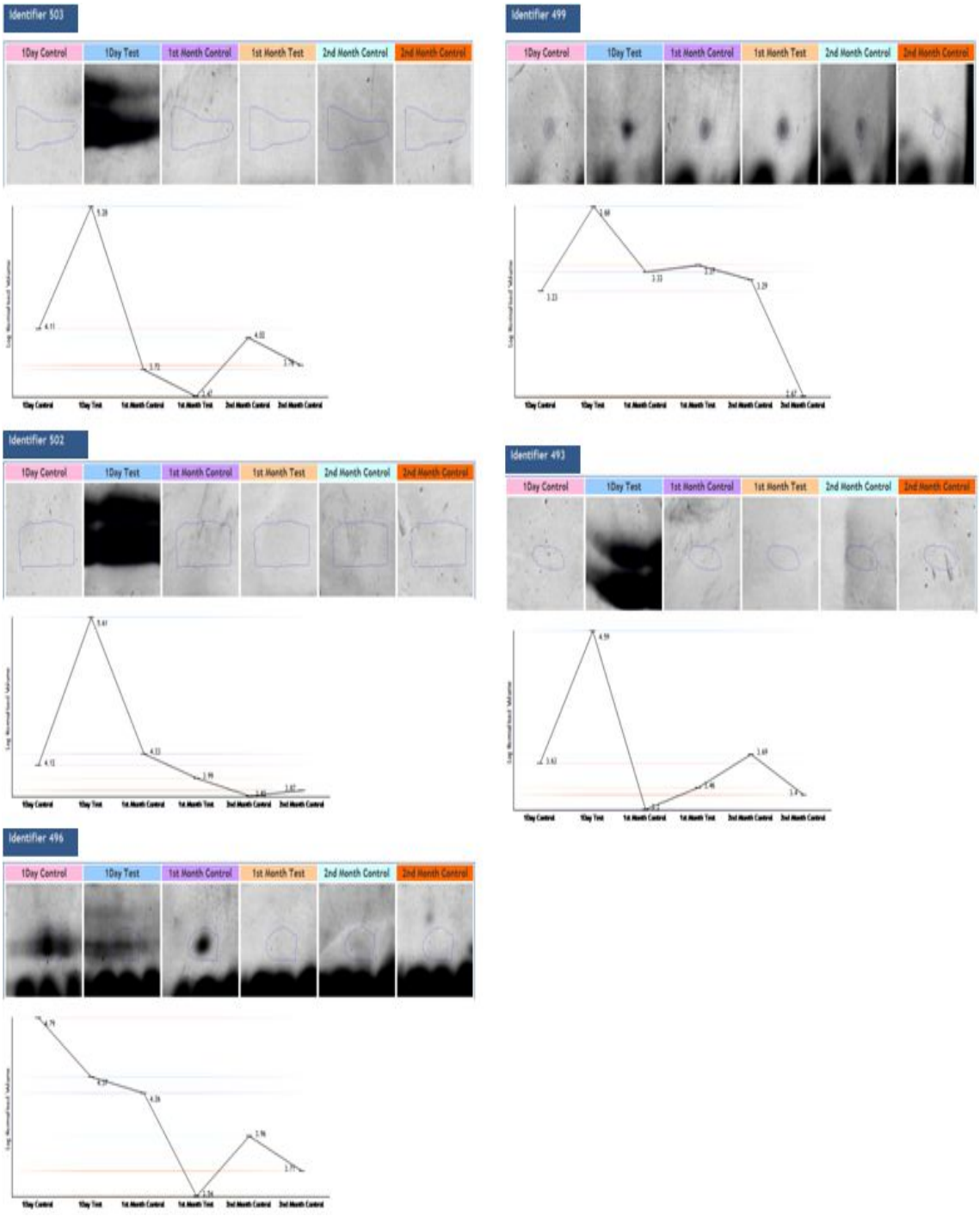


Fig.9. Trend of protein expression for porcine serum treated with feed additive for 8 weeks. Differentially expressed protein spot and spot pattern analysis were performed with samespot software

추가적인 실험을 위하여 IgY가 포함된 사료첨가제를 1%되게 Ig Y를 먹인후 대조군과 실험군의의 혈액을 각각 1주, 2주, 4주, 8주 뒤 채취하여 혈청을 분리하여 이차원적 전기영동을 실시한후 단백질 발현을 조사 하였다.분석결과 1주차 실험에서 총 66개의 spots, 2주차 실험에서 53개의 spots, Figure 2 4주차 실험에서 총 48개의 spots 그리고 8주차 실험에서 총 11개의

spots 가 다르게 발견되었으며 이중 유의적으로 변화하는 패턴을 보이는 단백질들을 선별하여 MALDI-TOF/MS peptide 분석 및 확인 하였다.(Fig.10-11,Table. 5)

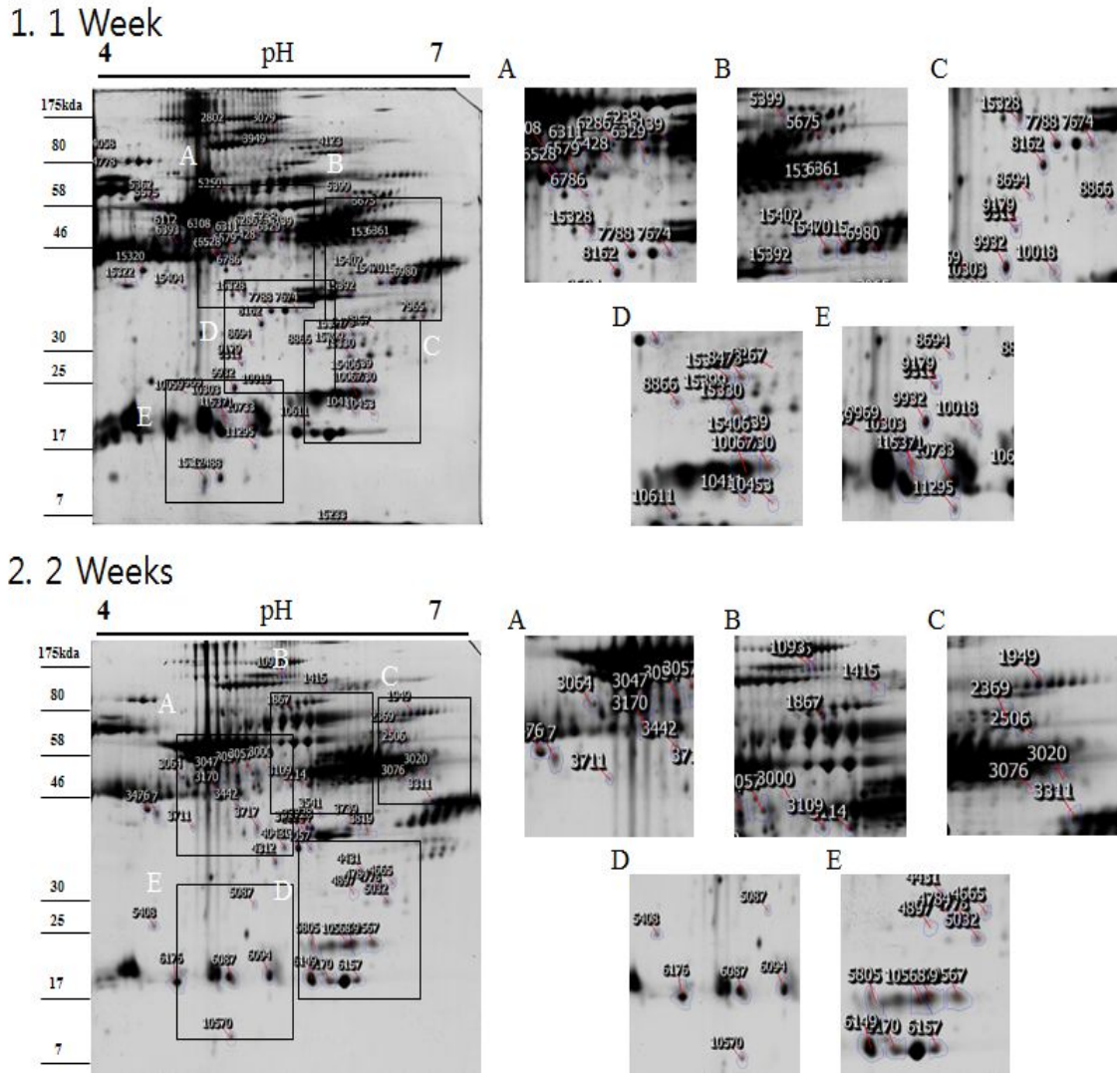
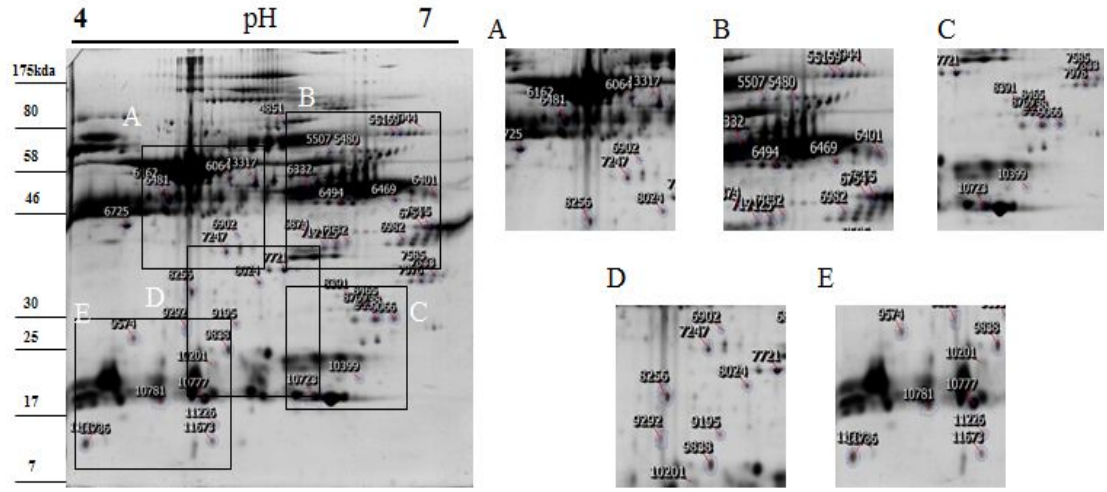


Fig. 10. Representative 2-DE pattern of 1 Week experiment group (A), 2 Weeks experiment group (B). Porcine serum sample were resolved by 2-DE on nonlinear pH 4-7 IPG strips followed by separation on a 10% SDS-PAGE gel in the second dimension. Proteins were visualized by silver stain.

3. 4 Weeks



4. 8 Weeks

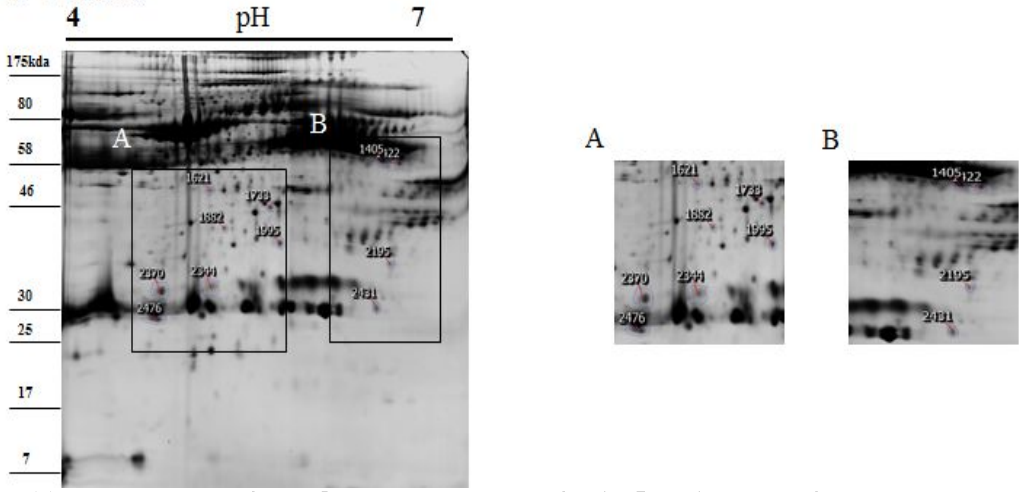


Fig. 11. Representative 2-DE pattern of 4 Week experiment group (A), 8 Weeks experiment group (B). Porcine serum sample were resolved by 2-DE on nonlinear pH 4-7 IPG strips followed by separation on a 10% SDS-PAGE gel in the second dimension. Proteins were visualized by silver stain.

Table 5. List of proteins that significantly expressed in porcine serum sample, as recognized by MALD-TOF/MS analysis.

Spot#	Protein	Accession #(a)	Nominal mass(M_r)	Matched peptide	Sequence Coverage (%)	Species
4W 8256	Albumin	833798	71362	17	30	Sus scrofa
4W 9838	hypothetical protein	291411522	184166	36	27	Oryctolagus cuniculus
4W 10723	apolipoprotein A-I	164359	30312	20	59	Sus scrofa
4W 6469	macrophin 1 isoform 2	17426164	532418	77	18	Homo sapiens
4W 9195	apolipoprotein E precursor	47523674	36634	11	36	Sus scrofa
4W 7721	apolipoprotein A-IV precursor	47523830	43268	16	50	Sus scrofa

나. IgY가 포함된 사료첨가제를 투여한 후 돼지의 장관에서 주사전자현미경적 변화

사료첨가제가 자돈 소화기 장관내에 미치는 영향을 조사하기위하여 *E.coli* 및 *Salmonella*균($3x10^4$-10^5/ml)을 경구 투여 한후 경시별로 돼지 장관을 적출하여 소화기 장관내의 변화를 조사 하였다. 즉 *E.coli* 및 *Salmonella*균($3x10^4$-10^5/ml) 경구투여한 후 대조군에는 일반사료를, 실험군에는 0,5 및 1% 제조 사료첨가제를 급여 하며,1일, 1주, 2주, 4주및 8주에 돼지의 장관을 적출하여 paraformaldehyde로 고정한 후 일반적인 조직 포매과정을 거쳐 주사전자현미경으로 관찰하였다.

돼지의 장관에서 *Salmonella* 및 *E.coli*의 정착상태를 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, 장독소생산대장균 감염 후 1일에서 장 점막 상피표면에 다수의 *Salmonella*균 및*E.coli* 이 관찰 되었으나(Fig.10B), *Salmonella*균 및 *E.coli*과 사료첨가제(0.5%, 1%)를 각각 1주 동안 병용 투여한 처리군에서는 장 점막상피에 부착된 *Salmonella*균및 *E.coli* 가 현저하게 감소하였다(Fig. 10C, 10D). 한편, *Salmonella*균 및 *E.coli*를 사료첨가제(0.5%, 1%)를 4주 동안 투여한 군에서는 *Salmonella*균및 *E.coli*가 현저하게 감소하였다(Fig. 10E,F). 이러한 결과는 8주 동안 1% 수준의 사료첨가제를 각각 투여한 군에서도 대조군과 유의한 차이를 나타내었다(Fig. 10G,10H). 한편, 돼지에 *Salmonella*균및 *E.coli*을 투여하지 않고 사료첨가제(0.5%)를 투여한 군과 대조군에서 소장의 형태학적 변화를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 사료첨가제를 4주 동안 투여한 후 소장의 장 점막 상피를 관찰한 결과 사료첨가제를 1주 투여군(0.5%)이 enterocyte(장세포)의 탈락률이 약간 억제됨을

확인하였다(Fig. 10C). 이러한 결과는 사료첨가제(0.5%)를 4주 동안 투여한 군에서도 대조군과 비슷하였다.

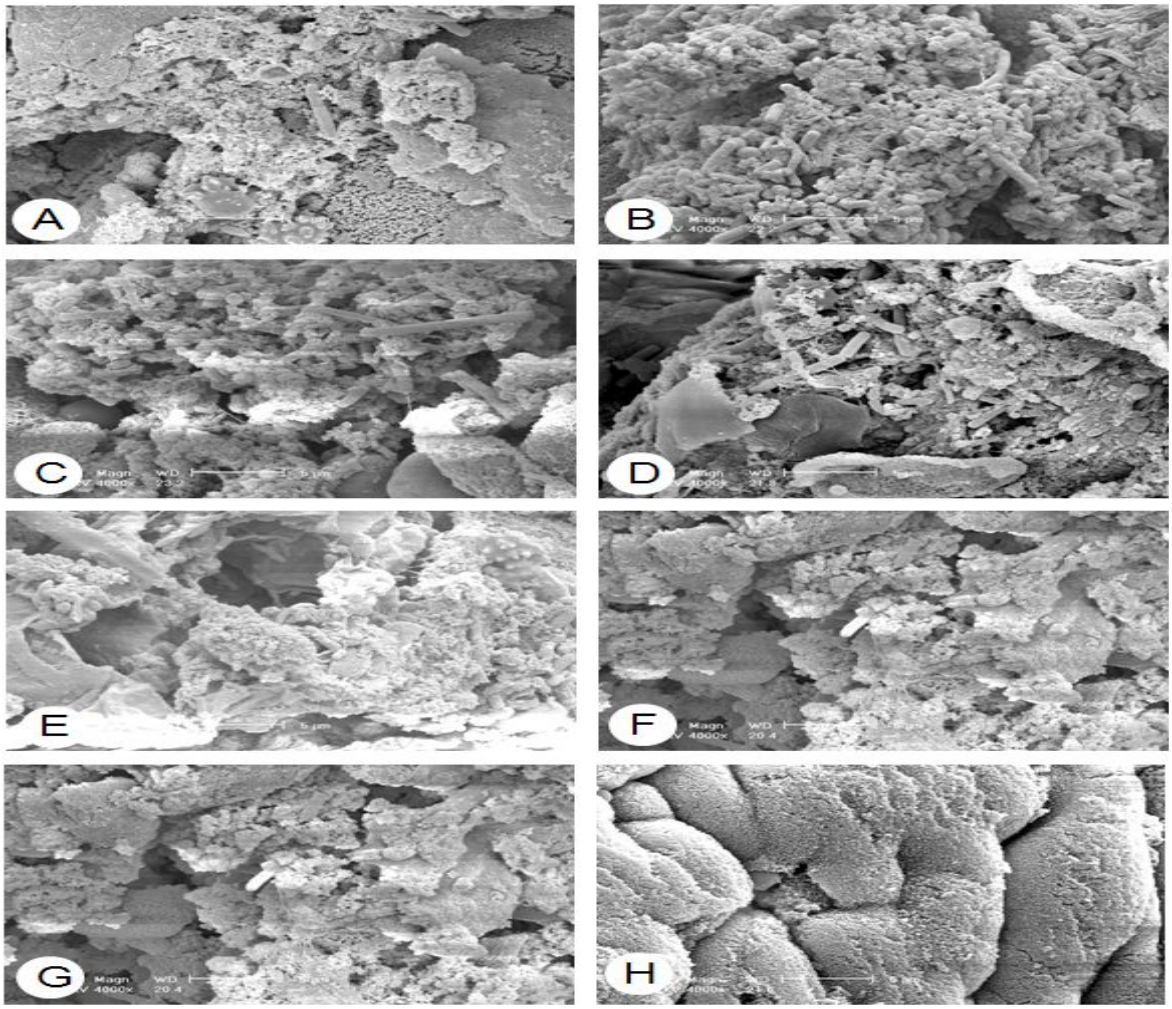


Fig.11. Scanning electron micrographs showing *Salmonella* and *E.coli* on the intestinal mucosa. A: pretreated group, B: 2 day after infection of Salmonella and E.coli, C: 1 week after infection of *Salmonella* and *E.coli* plus 0.5% dietary supplementation, D: 1 week after infection of *Salmonella* and *E.coli* plus 1% dietary supplementation, E: 4 week after infection of *Salmonella* and *E.coli* plus 0.5% dietary supplementation,, F: 4 week after infection of *Salmonella and E.coli* plus 1% dietary supplementation. G: 8 week after infection of Salmonella and *E.coli* plus 0.5% dietary supplementation. H: 8 week after infection of Salmonella and *E.coli* 1% dietary supplementation.

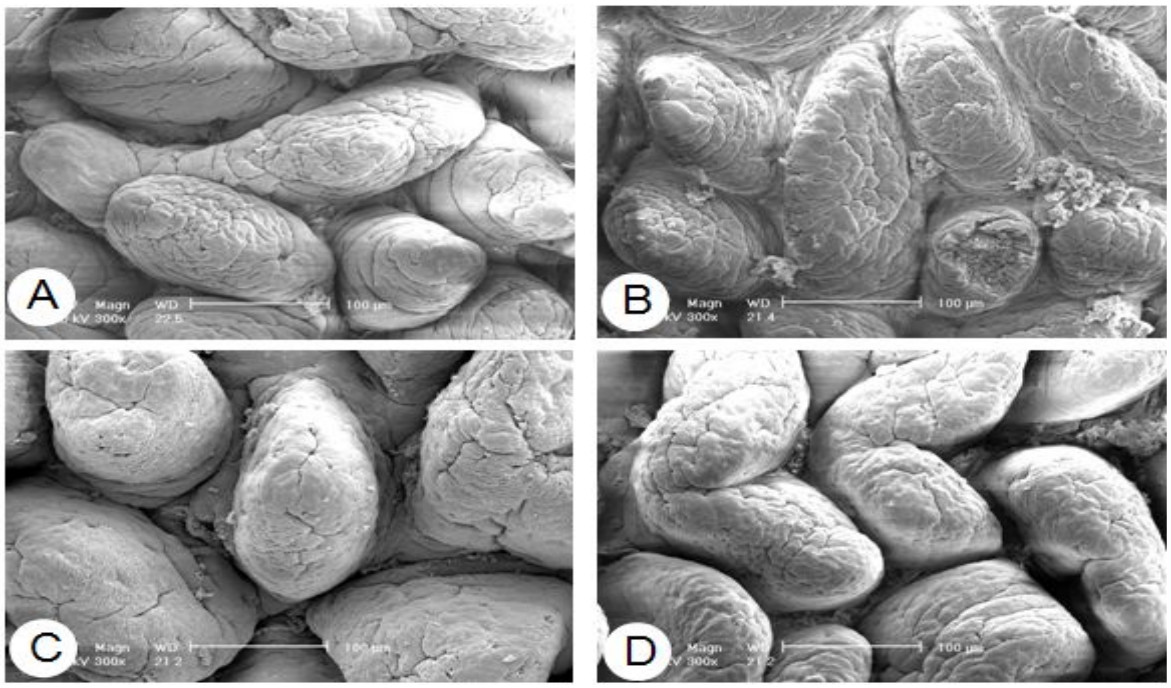


Fig.12. Scanning electron micrographs showing intestinal mucosa infected with *Salmonella* and *E.coli* A: pretreated group, B: 2 day after infection of,*Salmonella and E.coli* C: 1 week after infection of *Salmonella* and *E.coli* plus 0.5% dietary supplementation, D: 4 week after infection of *Salmonella and E.coli* plus 0.5% dietary supplementation.

다. 약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지(돈육)의 단백질, 지방, 회분 사료요구율, 체중에 미치는 영향

약용자원 및 IgY가 함유된사료첨가제를 돼지의 사료에 0,5%, 1% 혼합하여 이유후,6개월간 급여후 돈육내 조지방, 조회분 및 사료요구율에 미치는 영향을 조사한 결과, 사료첨가제를 투여한군(0.5%, 1%)이 대조군에 비하여 조지방의 감소(6.52±0.59→4.91±0.32:3.88±0.24),cholesterol의 감소(60.31±0.36→56.22±0.47:55.25±0.30) ,사료요구율(2.98→2.43:2.38)의 감소, 체중(97.6→100.34:100.02)의 증가를 나타내었다(Table 5).

Table 6. Effect of dietary supplementation of feed additive on crude fat, crude ash, crude protein, cholesterol and feed gain in pig (%)

Treatments	Crude fat(%)	Cholesterol (mg/fatg)	Crude protein(%)	Crude ashes(%)	Feed conversion (g/g)	weight gain (Inital→ Final)
Control	6.52±0.59	60.31±0.36	21.74±0.75	3.86±1.09	2.98±0.12	7.40→ 105.68 (97.6↑)
Treatment (0.5%)	4.91±0.32	56.22±0.47	20.86±0.34	3.85±1.17	2.43±0.08	6.85→ 107.19 (100.34↑)
Treatment (1%)	3.88±0.24	55.25±0.30	20.86±0.25	3.80±1.10	2.38±0.07	8.20→ 108.22 (100.02↑)

* Control(1%): 사료첨가제를 첨가하지 않은 군,
* Treatment(0.5%): 사료첨가제를 0.5% 첨가한군,
* Treatment(1%): 사료첨가제를 1% 첨가한 군
* Body weight :Final(180일 체중) -Inital(이유후 체중)

라. 약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지(돈육)의 지방산에 미치는 영향

약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지(돈육)의 지방산조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 이유후, 0.5%, 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 6개월째 돈육내 지방산에 미치는 영향을 조사한 결과 사료첨가제(0.5, 1%)를 투여한 군이 대조군에 비하여 Palmitic acid(C16:0) 및Stearic acid(C18:0) 감소, Oleic acid(C18:1), Palmitoleic acid(C16:1), Linoleic acid (C18:2), Dihomo-ɣ-linolenic acid(C20:3) 및 Arachidonic acid (C20:4)의 증가로 대조군에 비하여 약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제를 급여한 군(0.5%및 1%)이 포화지방산의 감소,불포화지방산의 증가, 를 나타내었다(Table 6).

Table 7. Effect of dietary supplementation of feed additive on fatty acids in pig

Fatty acids	Treatments		
	Control	Treatment(0.5%)	Treatment(1%)
C14:0 Myristic acid	13.90±0.10	13.87±0.11	13.09±0.01
C16:0 Palmitic acid	25.10±0.68	22.11±0.69	21.06±0.12
C16:1 Palmitoleic acid	4.11±0.26	4.23±0.53	4.78±0.12
C18:0 Stearic acid	16.34±0.09	12.05±0.20	10.10±0.04
C18:1 Oleic acid	41.40±0.02	49.30±0.68	50.11±0.59
C18:2 Linoleic acid	14.65±0.09	18.65±0.10	18.60±0.10
C20:3 Dihomo-ɣ-linolenic acid	1.02±0.01	1.73±0.07	1.76±0.20
C20:4 Arachidonic acid	1.46±0.03	2.59±0.03	2.61±0.21
Monounsaturation fatty acid	45.51±0.28	53.53±1.21	54.89±0.71
Polyunsaturation fatty acid	17.13±0.13	22.97±0.20	22.97±0.51

* Control: 사료첨가제를 첨가하지 않은 군,
Treatment(0.5%): 사료첨가제를 0.5% 첨가한 군,
Treatment(1%): 사료첨가제를 1% 첨가한 군

바. **약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지(돈육)의 아미노산 조성 에 미치는 영향**

약용자원 및 IgY가 함유된사료첨가제가 돼지(돈육)의 아미노산조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 이유후,사료에 0.5%, 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 6개월째 돈육 내 아미노산 조성에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제(0.5, 1%)를 투여한 군이 대조군에 비하여 asparatic acid, histidine, methioine이 증가하였다(Table 7).

Table 8. Effect of dietary supplementation of feed additive on amino acid in pigs

unit: mg/100g

Amino acids	Control	Treatment(0.5%)	Treatment(1%)
Phe	538.3±11.39	501.2±31.09	500.7±21.59
Gly	353.1±12.13	874.2±51.70	987.1±11.32*
Glu	1563.2±46.37	1673.2±23.23	1783.2±29.11
Ser	712.4±11.34	723.4±13.22	767.3±14.12
Met	508.1±2.24	523.3±11.38*	584.1±19.23*
Thr	403.2±4.20	442.1±16.17	459.2±10.32
Lys	801.3±59.27	904.3±13.25	923.7±09.10
Ala	354.1±22.32	383.5±10.14	386.5±11.09
Isoleu	576.0±15.54	701.2±11.65*	720.3±10.23*
Tyr	298.3±5.27	243.3±12.17	211.2±20.08
Val	801.2±09.20	877.9±11.35	998.3±19.18
His	203.6±1.32	397.4±10.23**	397.1±09.27**
Arg	654.2±23.25	669.3±38.01	656.3±28.14
Pro	673.1±35.41	753.1±23.24	778.1±48.16
Leu	879.2±2.54*	1016.3±10.34**	1205.4±10.13**
ASP	798.4±10.34	990.3±12.09	995.1±09.21

** $P<0.01$, * $P<0.05$.

Control: 사료첨가제를 첨가하지 않은 군, Treatment(0.5%): 사료첨가제를 0.5% 첨가한 군, Treatment(1%): 사료첨가제를 1% 첨가한 군

사. 약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지에 체내 미치는 안전성 평가

약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지 체내 안전성 평가를 실시하기 위하여 돼지의 귀 정맥에서 혈액 1cc를 채취하여 4℃에서 3000rpm으로 15분간 원심분리한 혈청을 -80℃에서 냉동보관하면서 생화학분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였던바, Alkaline phosphate, SGOT, SGPT, Amylase, glucose, bilirubin, LDH, CPK등이 정상범위 내에 있었다(Table 9).

Table 9. Effect of dietary supplementation of feed additive on safety test in pig

Parameter	Control group	Dietary supplementation group(0.5%)	Dietary supplementation group(1%)	Reference Normal range
SGPT(IU/l)	11.0-38	12.0-34.0	22-37	10.0-45
SGPT(IU/l)	29-61	32-55	11.0-52.0	30-61
Glucose(mg/dl)	66-110	64-120	75-110	60-130
Bilirubin(mg/dl)	0.00-0.56	0.01-0.13	0.01-0.11	0.00-0.60
LDH(IU/l)	30-98	35-76	34-67	32-100
CPK(IU/l)	88-163	81-145	84-151	85-170
Alkaline phosphate(IU/l)	33-109	41.3-103	44.7-104	35-110
Alkaline Phosphatase (IU/l)	14-27	14-26	15-29	16-36

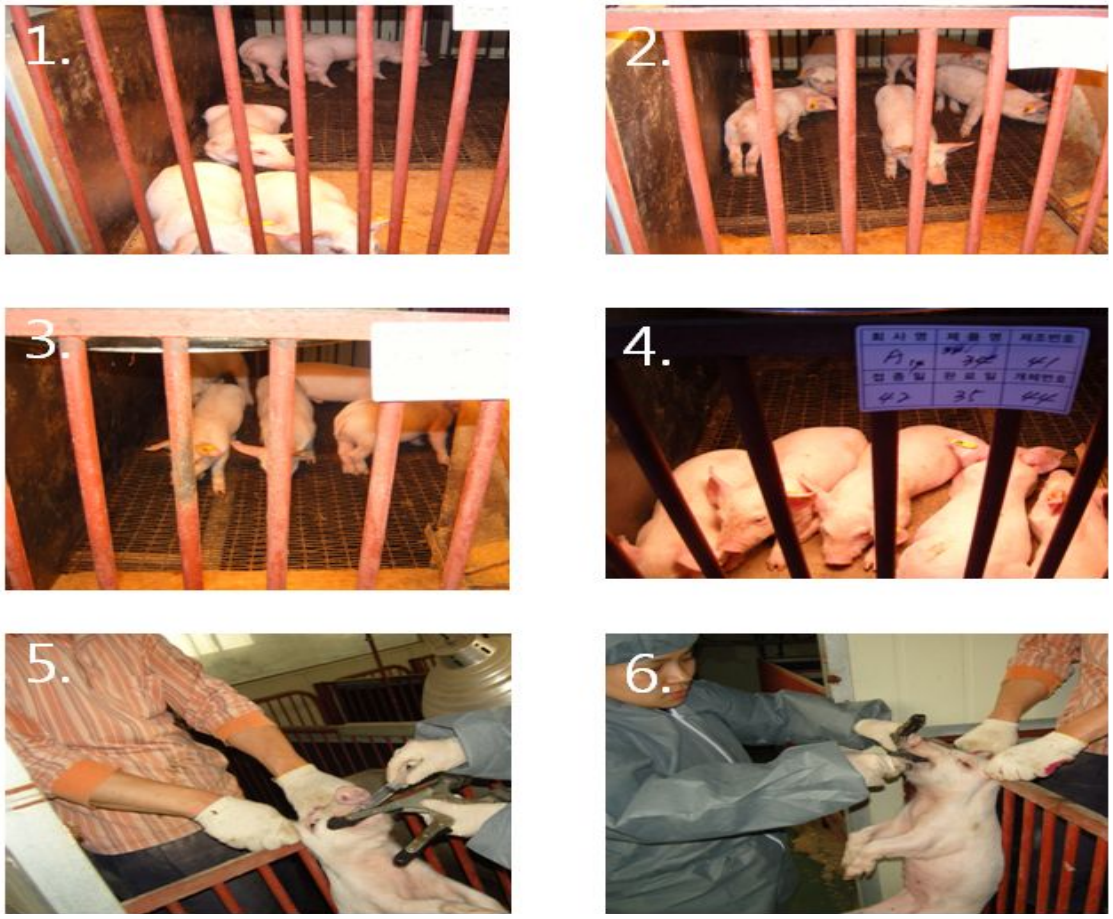


Fig. 13 : 항병성 사료첨가제의 돼지항균성 실험

그림1: Negative control: 세균(*E.coli, salmonella*)접종하지 않는 군.
그림2: Positive control: 세균 (*E.coli, salmonella*)접종하는 군.
그림3: 세균 (*E.coli, salmonella*)접종 후 사료 첨가제 0.5% 투여군.
그림4: 세균 (*E.coli, salmonella*)접종 후 사료 첨가제 1.0% 투여군.
그림5,6: 세균접종(경구 투여)

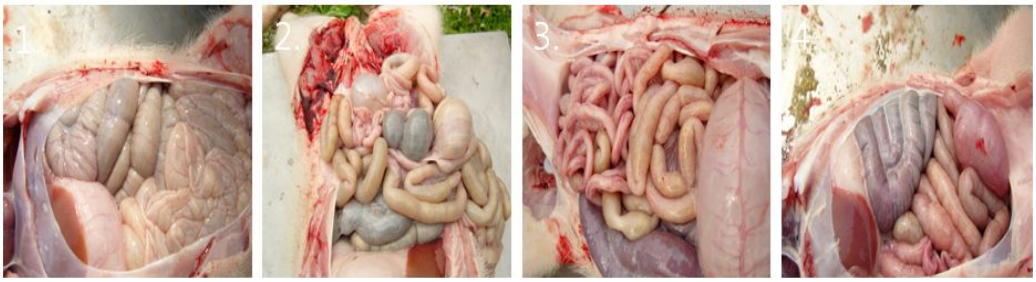


Fig. 14 : 세균 접종후 투여후 1일 경과한 돼지의 복강내 부검 사진

그림1: 투여하지 않은 Negative control group(정상소견)

그림2: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 Positive control group
;맹장, 결장 충혈 (severe), 감염이 관찰됨

그림3: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 사료첨가제 0.5% 경구 투여한 실험군
:맹장, 결장 충혈 (mild)

그림4: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 사료첨가제 1.0% 경구 투여한 실험군
: 장에 부종이 있으나 정상 소견

Fig. 15: 세균투여후 1일이 경과한 돼지의 외형사진

그림1: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 Positive control group
:심한 설사를 보임

그림2: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 강화소재 0.5% 경구 투여한 실험군
:설사 증상이 약간 있음

그림3: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 강화소재 1.0% 경구 투여한 실험군
:설사 증상이 없음

Fig. 16: 세균투여후 1주일 경과한 돼지의 복강내 부검 사진

그림1: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 Positive control group
:Glasser's Disease 감염증으로 흉복강 삼출물 형성, 장 충출혈소견, 복수형성
그림2: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 강화소재 0.5% 경구 투여한 실험군
:약간의복수, edema, 장 : 장벽 thin ,약간의 edema부종 형성,
비교적 정상
그림3: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 강화소재 1.0% 경구 투여한 실험군
:장 : 회맹부 충혈소견, edema형성(mild), 결장 정상5

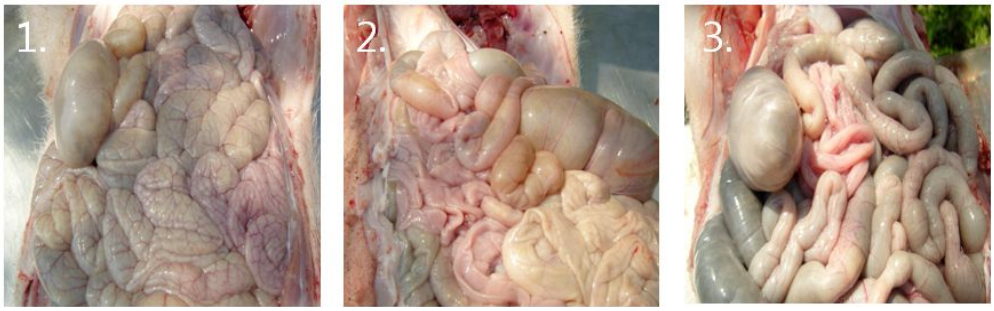


Fig. 17: 세균투여후 2주일이 경과한 돼지의 복강내 부검 사진

그림1: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 Positive control group
: 전형적인 살모넬라, 대장균 감염증상 보임, 부종과 장관충 출혈
그림2: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 사료첨가제 0.5% 경구 투여한 실험군
: edema가 경미 하게 있음
그림3: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 사료첨가제 1.0% 경구 투여한 실험군
: 정상소견

Fig. 18: 세균 투여후 4주일 경과한 돼지의 복강내 부검 사진

그림1: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 Positive control group
:회맹부 충혈소견,

그림2: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 강화소재 0.5% 경구 투여한 실험군
: 정상소견 보임

그림3: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 강화소재 1.0% 경구 투여한 실험군
: 정상소견 보임

Fig. 19: 세균투여 투여후 8주일 경과한 돼지의 복강내 부검 사진

그림1: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 Positive control group
: 폐사되지 않은 돼지중 생존한 돼지는 정상으로 회복된 소견 보임

그림2: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 사료첨가제 0.5% 경구 투여한 실험군
: 정상소견

그림3: 세균(*E.coli, salmonella*) 경구 투여한 뒤 사료첨가제 1.0% 경구 투여한 실험군
:결장부 충혈소견이 있으나 정상소견

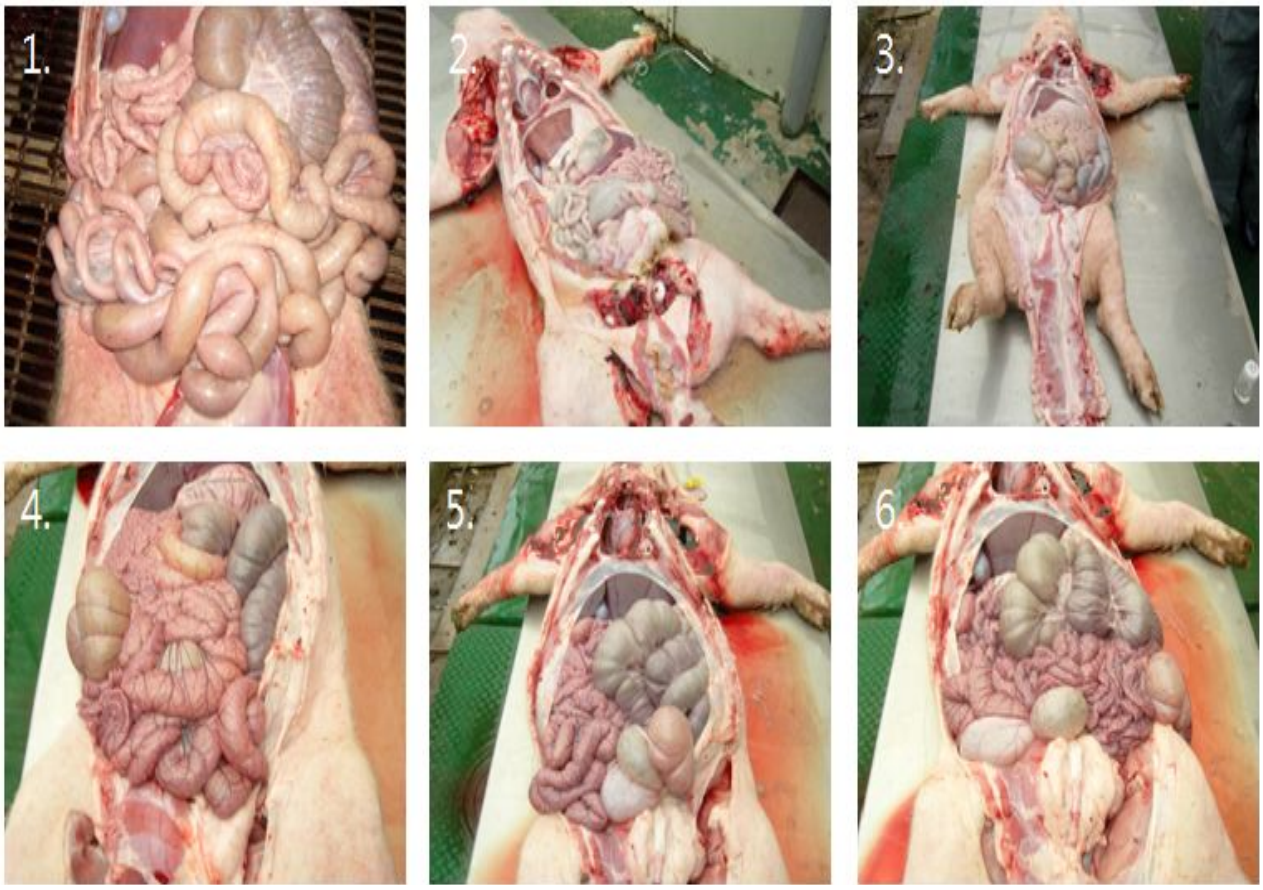


Fig. 20. 사료첨가제의 농장 적용 실험(1%)

1.대조군(2주) 2.대조군(4주) 3.대조군(8주) 4. 실험군(사료첨가제 투여 2주)
5.실험군((사료첨가제 투여 4주) 6.실험군(사료첨가제 투여 8주)

4. 결론

가.사료첨가제가 자돈 체내 대사 단백질에 미치는 영향을 조사하기위하여 돼지 비장에 대한 proteome을 실시 하였다. 즉, 항균 효과에 대한 단백질 발현을 조사 하기 위하여 *E.coli* 및 *Salmonella*균($3x10^4$-10^5/ml)을 경구 투여 한후 , 대조군(Negative: 세균을 접종하지 않은군,Positive: 세균접종후 일반사료 급여군) 에는 일반사료를, 실험군에는 0,5 및 1% 제조 사료첨가제를 급여 하며접종후 1일, 1주, 2주, 4주및 8주에 돼지 비장을 적출하여 단백질 발현을 조사 하였다. 실험한 결과 총 29개의 spot이 발견되었으며 이중 21개의 spot이 MALDI-TOF peptide 분석결과 확인되었다. 이들 단백질중 대사면역체계에 관련되는 단백질인 COFILIN protein, Peptidylprolyl isomerase A,Proteasome (prosome) subunit, Mitochondrial malate dehydrogenase, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Tropomyosin 3 이 대조군보다 up regulation 되었고, Transketolase, Heat shock 60kDa protein 1, Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2, Actin related protein 2/3 complex subunit 2, Elongation factor 1-gamma, Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor, F-actin capping protein subunit beta 2, Phosphoglycerate mutase 1은 down regulation 되었다,E 농장 시험에서는 돼지 혈청에 대한 사료 첨가제의 영향을 조사하기 위해 혈청에 대한 proteome을 실시 하였다. 즉, 항균 효과에 대한 단백질 발현을 조사하기 위하여 대조군 과 1%

사료첨가제 투여군에서 1일, 1주, 2주, 4주및 8주에 혈액을 채취하여 원심분리 한 후 돼지 혈청에서 단백질 발현을 조사 하였다. spot의 detection과 normaliziation은 nonlinear사의 samespot image analysis software로 실시 하였으며, MALDI-TOF peptide analysis는 mascot peptide search engine을 이용하여 분석하였다. proteome 분석결과 총23개의 spot이 발견되었으며 이중 7개의 spot이 MALDI-TOF peptide 분석결과 확인되었다. 이들 단백질 중 골격근의 이온 교환 channel 구성에 관련된 단백질인 Sarcolemmal membrane associated protein, cholesterol 대사 관련 지단백질인 Apolipoprotein A-IV, unnamed protein product, apolipoprotein 전구 물질로 작용하는 단백질인 apolipoprotein A-I preproprotein 등이 Up-regulation 되었으며, hypothetical protein isoform 4 는 Down-regulation 되는 경향을 나타내었다

나.사료첨가제가 자돈 소화기 장관내에 미치는 영향을 조사하기위하여 *E.coli* 및 *Salmonella*균($3x10^4$-10^5/ml)을 경구 투여 한후 경시별로 돼지 장관을 적출하여 소화기 장관내의 변화를 조사 하였다. 돼지의 장관에서 *Salmonella* 및 *E.coli*의 정착상태를 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, 장독소생산대장균 감염 후 1일에서 장 점막 상피표면에 다수의 *Salmonella*균 및*E.coli* 이 관찰 되었으나, *Salmonella*균 및 *E.coli*과 사료첨가제(0.5%, 1%)를 각각 1주 동안 병용 투여한 처리군에서는 장 점막상피에 부착된 *Salmonella*균및 *E.coli* 가 현저하게 감소하였다. 한편, *Salmonella*균 및 *E.coli*를 사료첨가제(0.5%, 1%)를 4주 동안 투여한 군에서는 *Salmonella*균및 *E.coli*가 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 8주 동안 1% 수준의 사료첨가제를 각각 투여한 군에서도 대조군과 유의한 차이를 나타내었다.

다.약용자원 및 IgY가 함유된사료첨가제를 돼지의 사료에 0,5%, 1% 혼합하여 6개월간 급여후 돈육내 조지방, 조회분 및 사료요구율에 미치는 영향을 조사한 결과, 사료첨가제를 투여한군(0.5%, 1%)이 대조군에 비하여 조지방의 감소,cholesterol의감소 ,사료요구율의 감소, 체중의 증가를 나타내었다

라. 약용자원 및 IgY가 함유된사료첨가제가 돼지(돈육)의 아미노산조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 0.5%, 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 6개월째 돈육내 아미노산 조성에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제(0.5, 1%)를 투여한 군이 대조군에 비하여 asparatic acid, histidine, methioine이 증가하였다.

마.약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제가 돼지(돈육)의 지방산조성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 0.5%, 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 6개월째 돈육내 지방산에 미치는 영향을 조사한 결과 사료첨가제(0.5, 1%)를 투여한 군이 대조군에 비하여 Palmitic acid의 감소, Palmitoleic acid의 증가, Stearic acid 감소, Oleic acid 증가, Linoleic acid증가, Dihomo-ɣ-linolenic acid, Arachidonic acid의 증가하였다.

바.약용자원 및 IgY가 함유된 사료첨가제는 돼지의 체내에 안전성이 확보 되었다.

제 2 절 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명

1. 연구목적: 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 명하고저함

2. 연구내용

가. 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.)에 대한 항균시험

(1) 황금, 삼백초 홍화, IgY가 포함된 사료제의 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.)에 대한 항균시험.

(2) 첨가농도에 따른 항균시험

(3) 정상세균총

나. 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 증; *Salmonells* spp.)의 장관점착 억제 시험

(1) 시험돈군 분변 중 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.) 원인체 분리 및 동정: 질병균를 접종한 자돈군의 장관 내 해당균의 존재여부를 가리기 위하여 장내용물을 VTP brucella-FBP broth에 증균하고 Campy-BAP agar에서 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.)원인체를 분리한 후 Ewing의 방법에 따라 동정 및 항원성 분석

(2) 접종균의(대장균증: *E.coli*, 살모넬라 균)의 체외 유출 균수 조사

(3) 장관내용의 양성계수 측정, 숙주의 채혈을 통한 천연소재 약물이 숙주의 면역 반응에 미치는 영향 분석

(4) 간장 및 비장의 *E. coli* 및 살모넬라 균의 원인균 양성계수 측정

(5) 전자현미경(SEM)에 의한 장관점착 확인: Schellenberg와 Pangborn(1980)의 방법을 참고로 하여 접종돈의 장상피세포에의 돼지 소화기질병균(대장균, 살모넬라 균)침투상태를 전자현미경으로 확인하고 비교 분석

다. 야외적용 및 효능평가(1)

(1) 실험동물: 이유자돈 48두에 대하여 IgY 및 황금, 삼백초, 홍화 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 시험군 24두 (4 두씩 6개 group)와 일반 사료를 급여한 대조군 24두 (4 두씩 6개 group)를 실험에 사용함

(2) 병원성 균 분리빈도 조사: 두 시험돈군의 분변 중 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.) 분리 빈도 조사를 위해 IgY 및 황금, 삼백초, 홍화 등이 포함된 사료첨가제를 급여하기 1일 전, 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 분변을 채취하여 1g 중 설사의 유무검사, 병원성 대장균(용혈성대장균) 및 살모넬라 균 검출 빈도를 조사하고 분변내 총 세균수 변화를 측정

(3) IgY 및 황금, 삼백초, 홍화 등이 포함된 사료첨가제 투여돈군과 비투여 대조군에 대하여 시험 전 기간인 6개월 간 소화기 질병 발생 여부 및 폐사율 조사

(4) 소화기 질병 및 폐사 발생 시 환돈 및 폐사돈의 분변 및 장기로부터 감염균의 분리 동정 및 병변 해석

(5) 이상의 야외시험결과를 대조군과 비교 분석하여 사료첨가제의 투여 효능을 평가

라. 야외적용 및 효능평가 (2)

(1) 시험돈군의 분변 중 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.) 빈도 조 사: 황금, 삼백초 및 홍화 등이 포함된 한방사료첨가제를 급여 실험할 돈군의 분변재료로부터 이전의 방법에 의해서 돼지대장균 및 살모넬라 균 보유를 조사

(2) 황금, 삼백초, 홍화, IgY가 포함된 사료첨가제 투여돈군의 분변 중 돼지소화기질병(대장균증, 살모넬라 감염증) 원인체 분리빈도 조사

(3) 황금, 삼백초 및 홍화 등이 포함된 사료첨가제 투여 돈군에 대한 감염증 발생 및 폐사률 조사

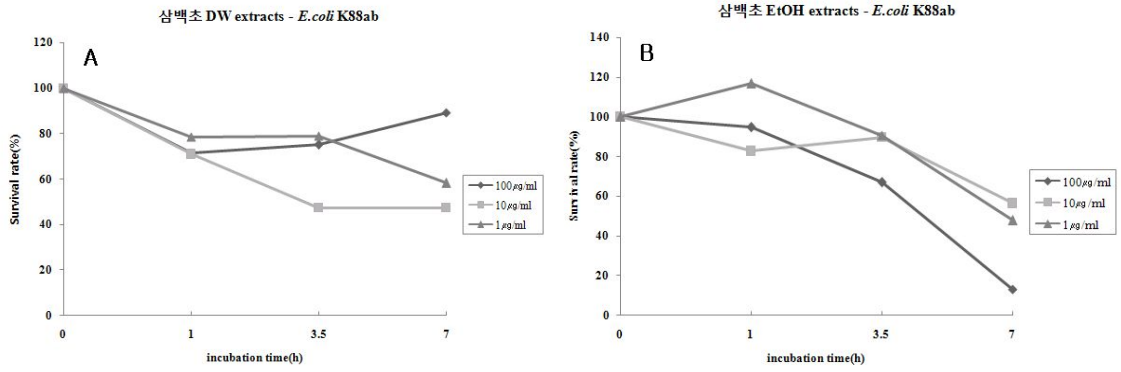
(4) 감염 및 폐사돈의 분변 및 장기로부터 접종균의 분리 동정 및 숙주의 면역 활성 조사

(5) 이상의 야외시험결과를 대조군과 비교 분석하여 사료첨가제의 투여효능을 평가

3. 연구결과

가. 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라 감염증; *Salmonells* spp.)에 대한 항균시험(in vitro)

(1) 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 병원성 대장균에 대한 항균효과: 삼백초 분말을 증류수 및 에탄올로 추출하여 건조한 후 추출물의 농도에 따라 병원성 대장균에 대한 항균효과를 검정해본 결과 증류수 및 에탄올 추출물 모두에서 항균효과가 입증되었으며, 증류수보다는 에탄올 추출물에서 높은 항균효과를 나타냄



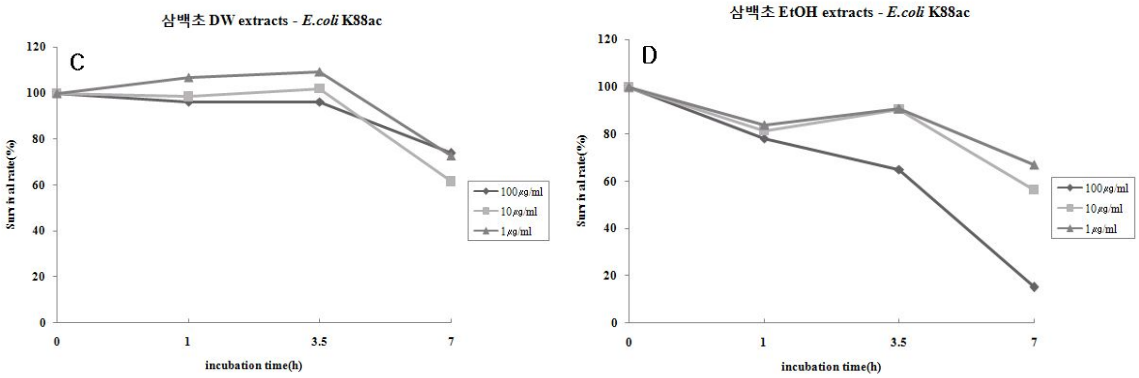


Fig. 1. 삼백초의 증류수 및 에탄올 추출물의 병원성 대장균에 대한 항균효과. 두 병원성 대장균 *E. coli* K88ab (A, B)및 *E. coli* K88ac(C, D) 균주에 대한 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물을 농도별로(1, 10, 100 mg/ml) 첨가하여 대조군으로 첨가하지 않은 균과 시간 경과별 생존율을 측정해 본 결과 대조군에 비하여 시간 경과별로 항균효과가 입증 됨

(2) 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 병원성 대장균에 대한 항균효과:황금 분말을 증류수 및 에탄올로 추출하여 건조한 후 추출물의 농도에 따라 병원성 대장균에 대한 항균효과를 검정해본 결과 증류수 및 에탄올 추출물 모두에서 항균효과가 입증되었으며, 증류수 추출물과 에탄올 추출물에서 비슷한 높은 항균효과를 나타냄

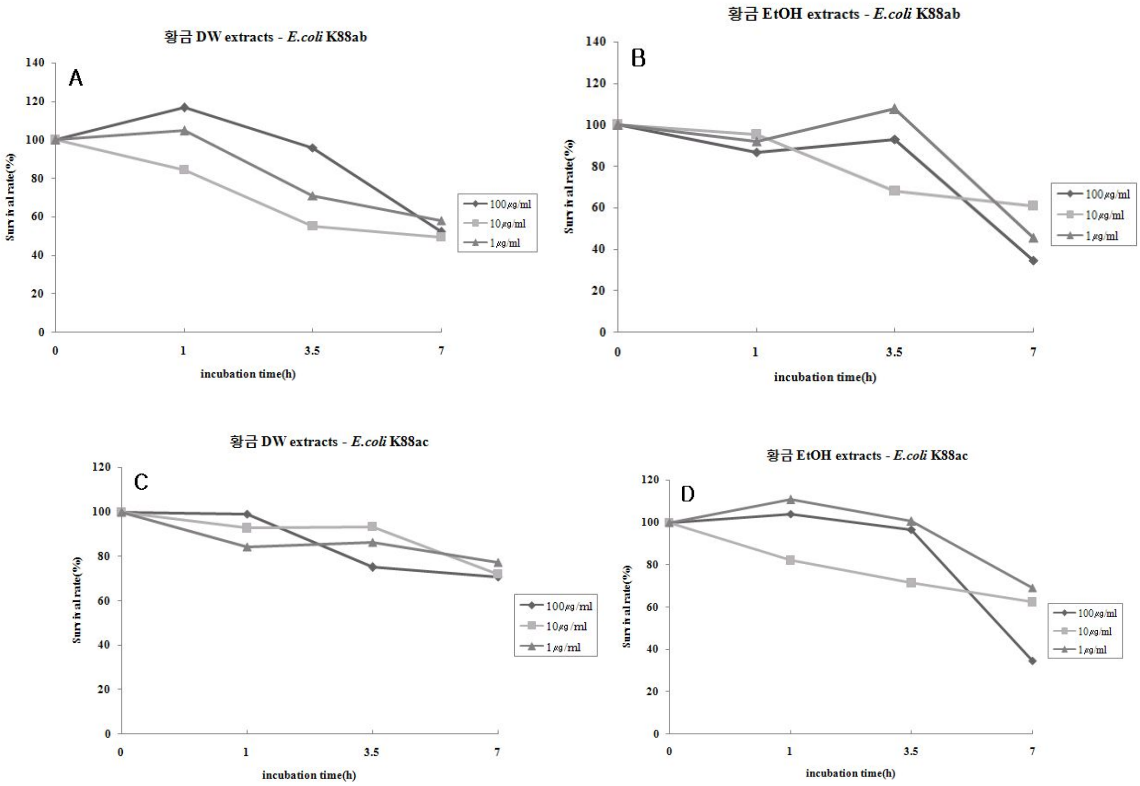


Fig. 2. 황금의 증류수 및 에탄올 추출물의 병원성 대장균에 대한 항균효과. 두 병원성 대장균

E. coli K88ab (A, B)및 *E. coli* K88ac(C, D) 균주에 대한 황금 증류수 및 에탄올 추출물을 농도별로(1, 10, 100 mg/ml) 첨가하여 대조군으로 첨가하지 않은 균과 시간 경과별 생존율을 측정해 본 결과 대조군에 비하여 시간 경과별로 항균효과가 입증 됨

(3) 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 항균효과: 삼백초 분말을 증류수 및 에탄올로 추출하여 건조한 후 추출물의 농도에 따라 살모넬라 균에 대한 항균효과를 검정해본 결과 증류수 및 에탄올 추출물 모두에서 항균효과가 입증되었으며, 증류수보다는 에탄올 추출물에서 높은 항균효과를 나타냄

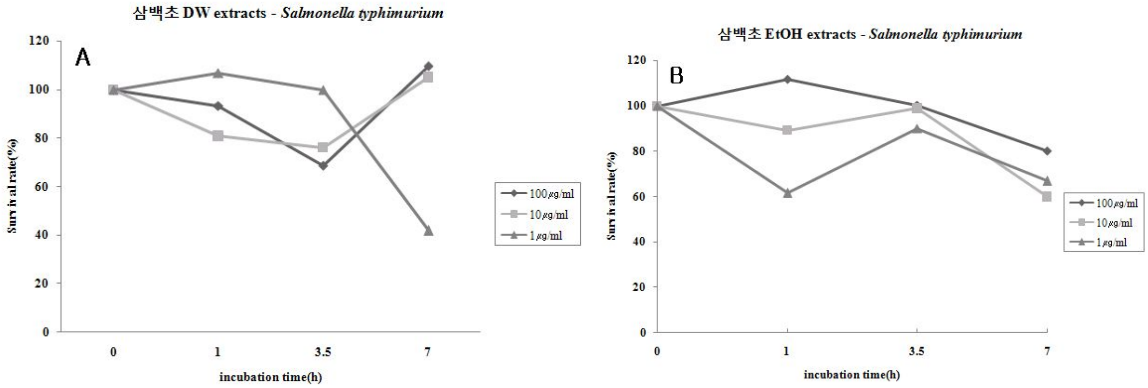


Fig. 3. 삼백초의 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 항균효과. 살모넬라 균주, *S. typhimurium*에 대한 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물을 농도별로(1, 10, 100 mg/ml) 첨가하여 대조군으로 첨가하지 않은 균과 시간 경과별 생존율을 측정해 본 결과 대조군에 비하여 시간 경과별로 항균효과가 입증 됨

(4) 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 항균효과: 황금 분말을 증류수 및 에탄올로 추출하여 건조한 후 추출물의 농도에 따라 살모넬라균에 대한 항균효과를 검정해본 결과 증류수 및 에탄올 추출물 모두에서 항균효과가 입증되었으며, 증류수 추출물과 에탄올 추출물에서 비슷한 높은 항균효과를 나타냄

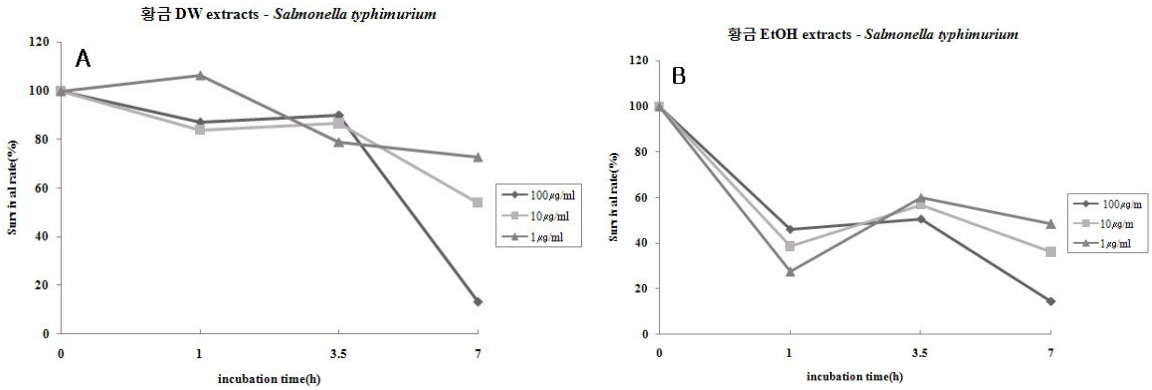
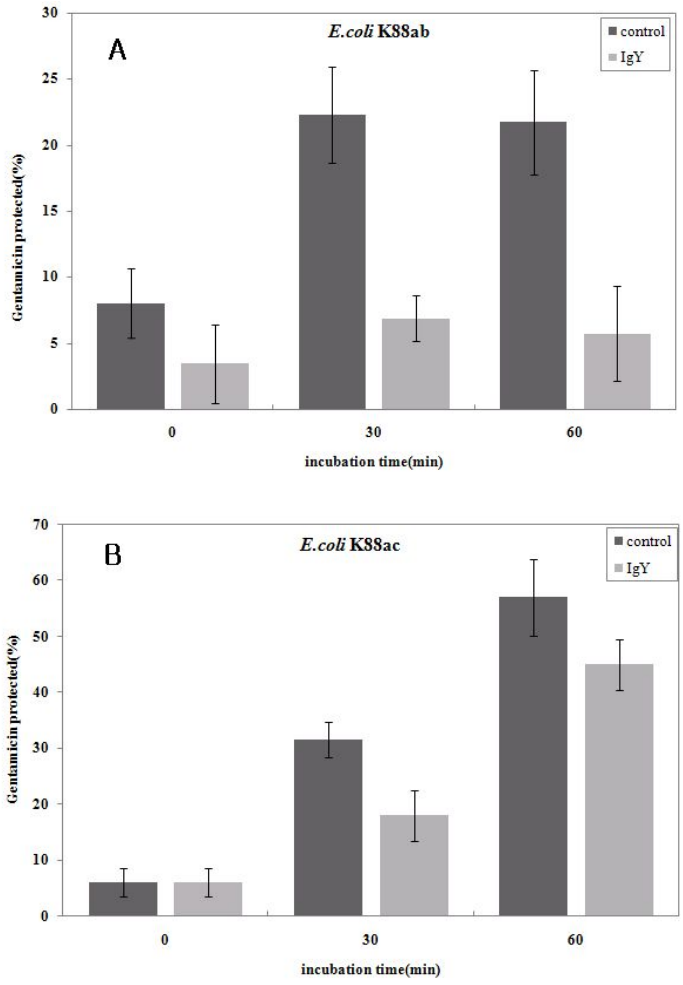


Fig. 4. 황금의 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 항균효과. 살모넬라 균주, *S. typhimurium*에 대한 황금 증류수 및 에탄올 추출물을 농도별로(1, 10, 100 mg/ml) 첨가하여

대조군으로 첨가하지 않은 균과 시간 경과별 생존율을 측정해 본 결과 대조군에 비하여 시간 경과별로 항균효과가 입증 됨

나. 천연소재, IgY의 돼지소화기질병 원인체의 장관점착 및 침입 억제 시험

(1) IgY의 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 상피세포(HeLa cell) 침입 억제 시험: 난황유래 IgY의 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 상피세포 침입 억제능력을 확인하기 위하여 일반 난황유래 IgY와 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY의 농도(MAT 2^6)를 세포감염 전 30분간 incubation 한 후 상피세포(HeLa)세포에 감염을 수행해 본 결과 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY의 전처리가 일반 난황유래 IgY(대조군)에 의해 상피세포로의 균 침입능력이 억제 되는 것을 확인 함(Fig. 5)



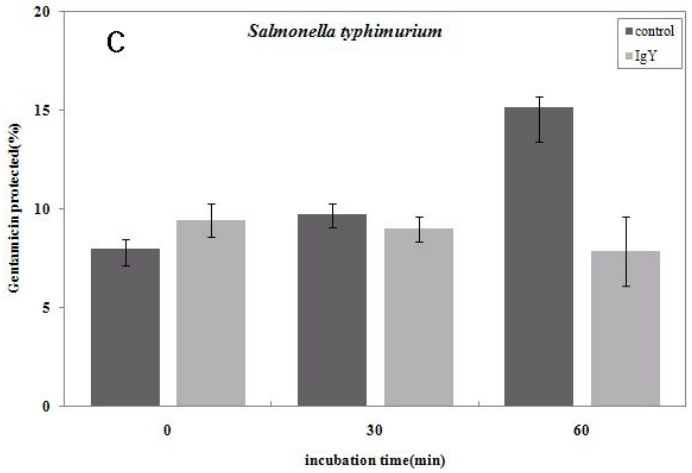
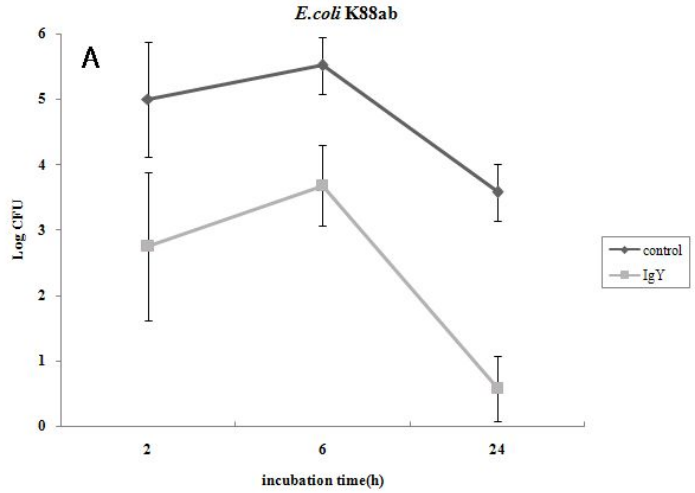


Fig. 5. IgY의 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 상피세포(HeLa cell) 침입 억제 시험. 일반 난황유래 IgY(control)와 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY(IgY)의 농도 (MAT 2^6)를 세포감염 전 30분간 incubation 한 후 상피세포(HeLa)세포에 감염을 수행해 본 결과 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY의 전처리가 일반 난황유래 IgY(control)에 의해 상피세포로의 균 침입능력이 억제 됨

(2) IgY의 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 상피세포(HeLa cell)내 증식 억제 시험: 난황유래 IgY의 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 상피세포내 증식 억제능력을 확인하기 위하여 일반 난황유래 IgY와 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY의 농도 (MAT 2^6)를 세포감염 전 30분간 incubation 한 후 상피세포(HeLa)세포에 감염을 수행해 24시간 경과 후 세포내 증식능을 확인 해 본 결과 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY의 전처리가 일반 난황유래 IgY(대조군)에 의해 상피세포 내 균 증식능에 있어 E. coli K88ab (Fig. 6A)에 억제효과가 입증되었으나 그 외 균에 대해서는 상피세포 내 균 증식에 있어 큰 영향을 미치지 않았음(Fig. 6B,C)



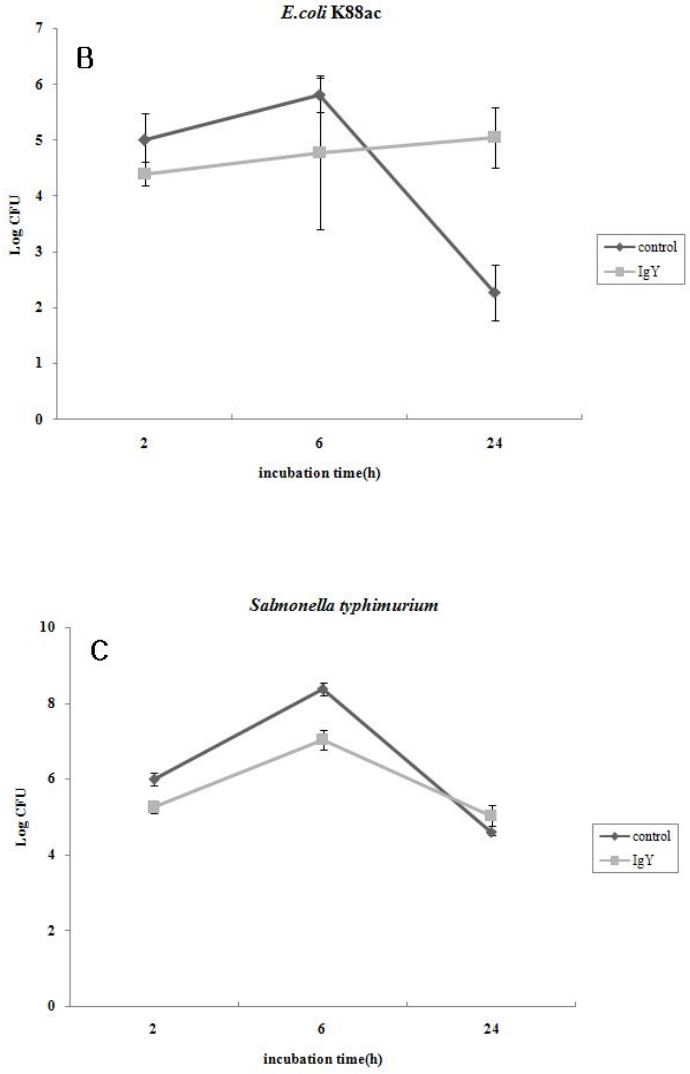


Fig. 6. IgY의 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 상피세포(HeLa cell)내 증식 억제 시험. 일반 난황유래 IgY(control)와 병원성 대장균과 살모넬라 균을 접종하여 얻어진 IgY(IgY)의 농도 (MAT 2^6)를 세포감염 전 30분간 incubation 한 후 상피세포(HeLa)세포에 감염을 수행해 24시간 경과 후 병원성 세균의 세포 내 증식능을 평가 해 본 결과 병원성 대장균 E. coli K88ab 균에는 세포내 증식이 억제됨이 확인 되었으나(A), 그 외 대장균과 살모넬라 균에 대해서는 세포내 증식억제가 확인되지 않음(B, C)

다. 천연소재 및 IgY의 대식세포 활성에 미치는 영향 평가

(1) 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험: 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포 침입 억제능력을 확인하기 위하여 대식세포 독성이 없는 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 농도

(100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 본 결과 살모넬라 균에 대해 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력에는 큰 영향을 미치지 않았음(Fig. 1)

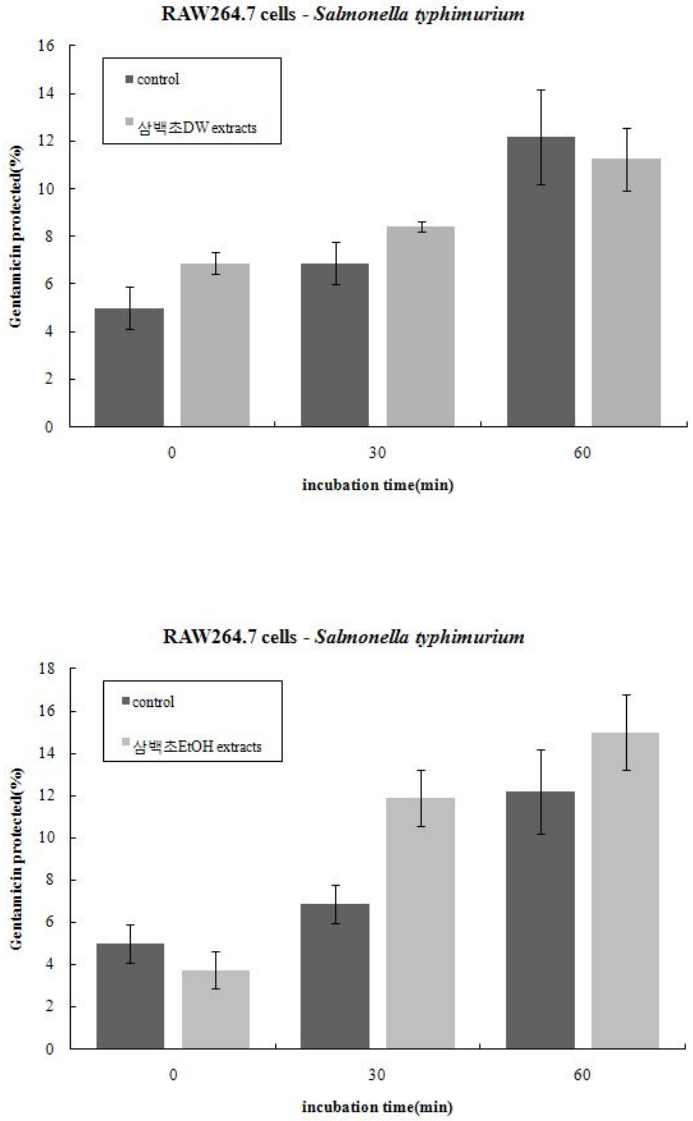


Fig. 1. 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험. 대식세포 독성이 없는 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 농도 (100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 본 결과 살모넬라 균에 대해 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 상피세포로의 균 침입능력에는 큰 영향을 미치지 않았음.

(2) 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험: 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포 내 증식 억제 능력을 확인하기 위하여 대식세포 독성이 없는 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 농도

(100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 24시간동안 시간경과에 따른 세포내 증식능을 확인 해 본 결과 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균 증식능에 있어 억제효과가 입증되었음(Fig. 2).

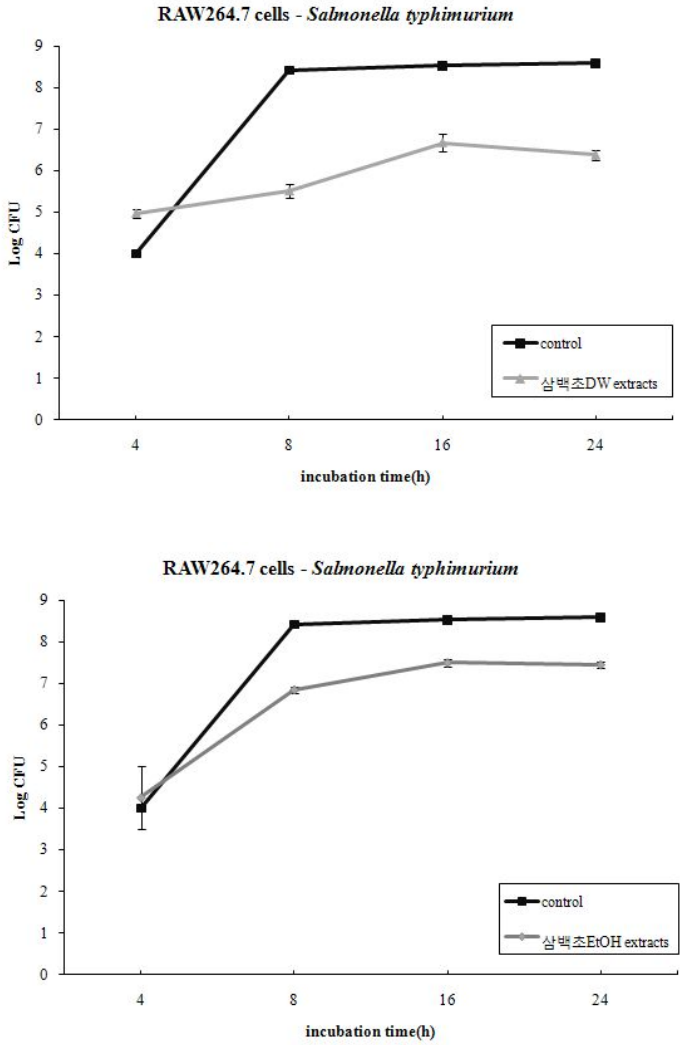


Fig. 2.삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험. 대식세포 독성이 없는 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 농도(100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 24시간동안 시간경과에 따른 세포내 증식능을 확인 해 본 결과 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균의 증식억제가 확인되었음.

(3) 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험: 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포 침입 억제능력을 확인

하기 위하여 대식세포 독성이 없는 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 농도 (100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 본 결과 살모넬라 균에 대해 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력이 억제 되는 것을 확인 함(Fig. 3)

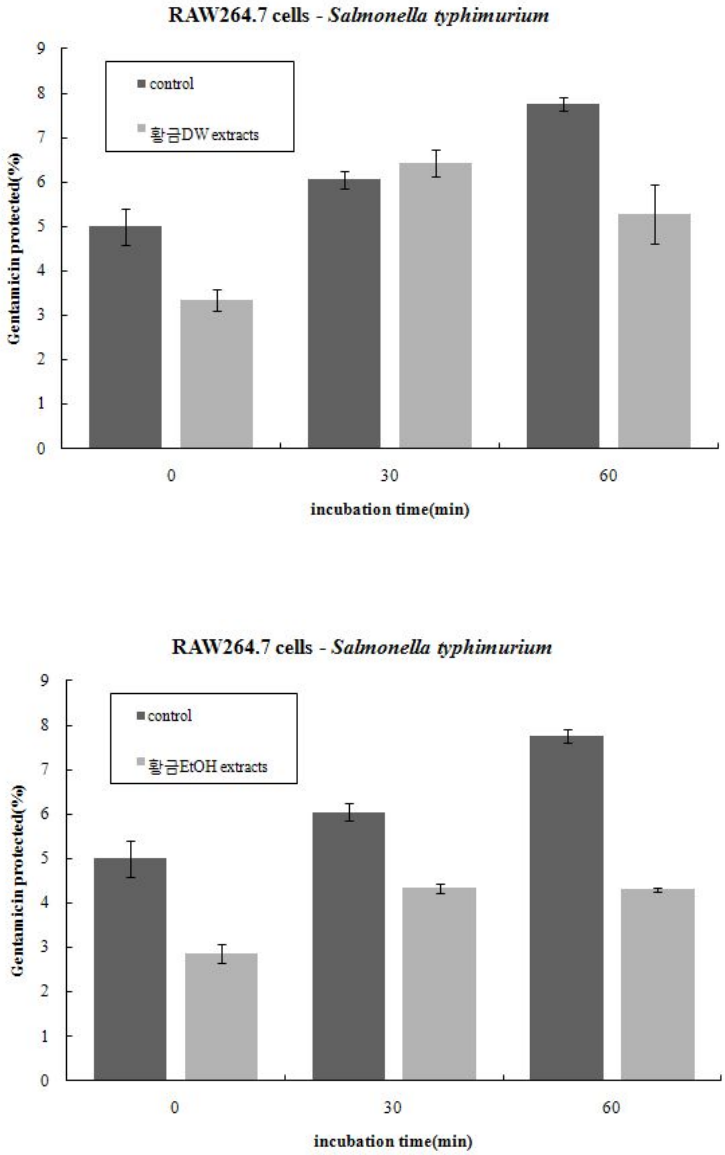


Fig. 3. 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험. 대식세포 독성이 없는 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 농도 (100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 본 결과 살모넬라 균에 대해 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력이 억제 되는 것을 확인 함.

(4) 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억

제 시험: 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포 내 증식 억제능력을 확인하기 위하여 대식세포 독성이 없는 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 농도(100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 24시간동안 시간경과에 따른 세포내 증식능을 확인 해 본 결과 황금 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균 증식능에 있어 억제효과가 입증되었음(Fig. 4).

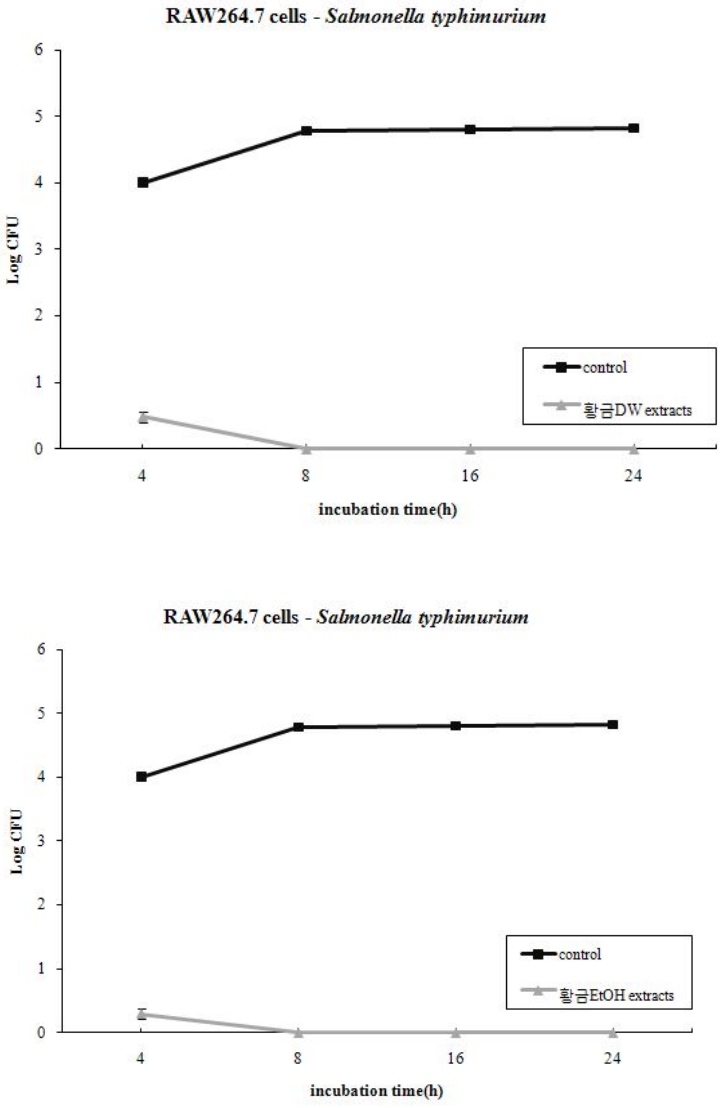


Fig. 4. 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험. 대식세포 독성이 없는 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 농도 (100mg/ml)를 세포감염 전 1시간동안 incubation 한 후 대식세포에 감염을 수행해 24시간동안 시간경과에 따른 세포내 증식능을 확인 해 본 결과 황금 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균의 증식억제가 확인되었음.

(5) 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물이 대식세포(RAW264.7 cell)에 대해 생리적 활성화시키는지를 세포의 형태변화를 통해 알아보기 위해 대식세포에 삼백초 증류수(Fig. 5A) 및 에탄올(Fig. 5B) 추출물을 대식세포 독성이 없는 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 농도

(100mg/ml)로 2, 4, 8, 16시간 동안 배양한 후 각 시간대별로 세포의 형태를 현미경하에서 관찰해 본 결과, 배양시간이 경과함에 따라 대식세포의 형태적 변화가 비처리 대조구에 비해 크게 증가되는 것을 확인할 수 있고 이를 통해 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물이 대식세포에 대해 생리적 활성화시킴을 입증할 수 있음.

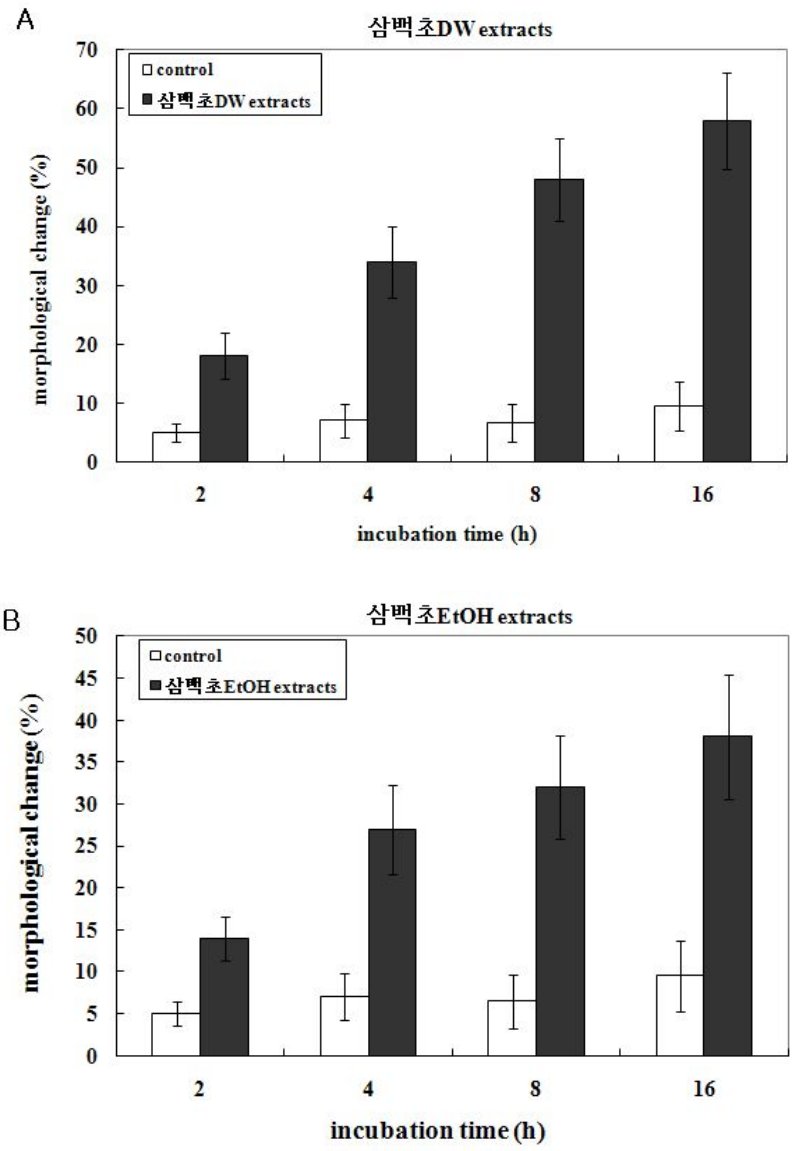


Fig. 5. 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 대식세포(RAW264.7 cell)에 대한 생리적 활성도 시험. 대식세포에 삼백초 증류수(Fig. 5A) 및 에탄올(FIg. 5B) 추출물을 대식세포 독성이 없는 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 농도 (100mg/ml)로 2, 4, 8, 16시간 동안 배양한 후 각 시간대별로 세포의 형태를 현미경하에서 관찰해 본 결과, 배양시간이 경과함에 따라 대식세포의 형태적 변화가 비처리 대조구에 비해 크게 증가되는 것을 확인할 수 있음.

(6) 선천면역에서 세포내 미생물을 죽이는데 중요한 역할을 한다고 알려진 Nitric oxide(NO)와 같은 reactive nitrogen intermediates(RNIs)가 살모넬라 균의 탐식세포 내 증식에 관여한다고 보고된 바 있어, 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 대식세포 내 살모넬라 균의 증식이 억제시키는 기전에서 이러한 NO가 관여하는 지 알아보기 위해 대식세포에 삼백초 증류수

(Fig. 6A) 및 에탄올(Fig. 6B) 추출물을 다양한 농도(0,25,50,100mg/ml)로 1시간 동안 incubation 한 후 대식세포에 살모넬라 균 감염을 수행한다. 감염 후 2, 4, 8, 24시간 동안 배양한 후 각 시간대별로 배지의 상층액 내의 NO값을 측정해 본 결과, 균 감염시킨 비처리 대조구는 NO산생량이 크게 증가하는 반면, 삼백초 증류수(Fig. 6A) 및 에탄올(Fig. 6B) 추출물을 처리한 균 감염 세포에서는 NO산생량이 다소 감소하는 양상을 보이나 유의적인 차이를 보이지 않음이 입증됨.

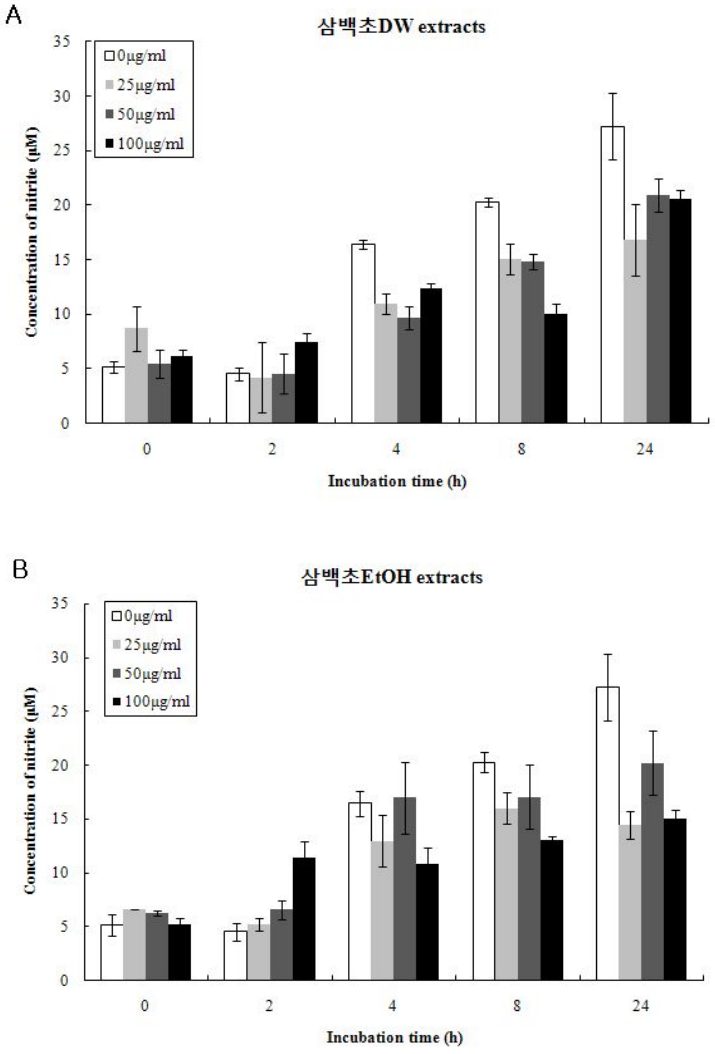


Fig. 6. Nitric oxide(NO) 측정을 통한 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 및 면역 기전 시험. 대식세포에 삼백초 증류수(Fig. 6A) 및 에탄올(Fig. 6B) 추출물을 다양한 농도(0,25,50,100mg/ml)로 1시간 동안 incubation 한 후 대식세포에 살모넬라 균 감염을 수행한다. 감염 후 2, 4, 8, 24시간 동안 배양한 후 각 시간대별로 배지의 상층액 내의 NO값을 측정해 본 결과, 균 감염시킨 비처리 대조구는 NO산생량이 크게 증가하는 반면, 삼백초 증류수(Fig. 5A) 및 에탄올(Fig. 5B) 추출물을 처리한 균 감염 세포에서는 NO산생량이 다소 감소하는 양상을 보이나 유의적인 차이를 보이지 않음이 입증됨.

라. 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 소화기성 질병 예방 및 치료효과 규명

(1) 형질전환을 이용한 항생제 내성 병원균 작제: *E. coli* K88ab, *E. coli* K88ac, *S. typhimurium* 균주에 ampicillin 내성 vector 인 pMAL plasmid를 transformation 실시하여 ampicillin 내성 균주를 작제 하였으며, 균 감염 실시 전 돼지 분변을 채취하여 ampicillin 내성 균주가 없음을 확인 함

(2) 이유 자돈 각 10두 4개의 시험 군으로 나누었으며(Group1; 병원체 비감염 +일반사료, Group2; 병원체감염 + 일반사료, Group3; 병원체 감염 + 0.5% 항균사료, Group4; 병원체감염 + 1% 항균사료), 감염일로부터 1일, 1주, 2주, 4주, 8주 경과 후 부검을 실시하여 분변내 배출 균의 수, 비장무게, 비장내 균수를 측정해본결과 항균사료를 급여한 group이 일반사료를 급여한 group 보다 분변을 통한 균의 배출이 증가되었으며(Fig. 1), 특히 비장내 균수가 감염 후 1일 경과한 후 급격히 증가되었다가 1주 후부터 안정화 되는것이 확인되어, 항균사료가 탐식세포의 탐식기능을 강화하고 면역기능을 증가시키는 것으로 사료됨(Fig. 2)

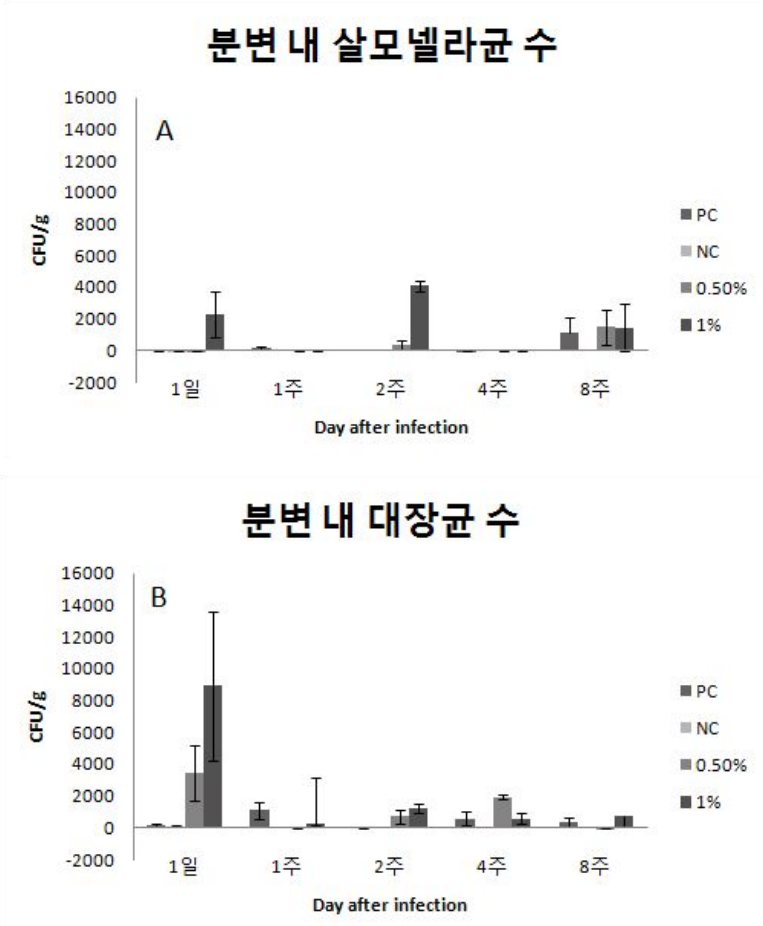


Fig. 1. 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 소화기성 질병 원인체 체외 배출에 미치는 영향 분석. 이유자돈 10두씩 4개의 Group(PC; 균감염+

일반사료급여, NC; 균비감염+일반사료급여, 0.5%; 균감염+0.5%항균사료급여, 1%; 균감염+1% 항균사료급여)에 대하여 균 감염후 분변으로 배출되는 살모넬라(A)와 병원성 대장균(B)배출량을 측정해 본 결과 감염 후 1일에 균 배출량이 1% 항균사료 급여한 돈군에서 높은 배출양을 나타냄

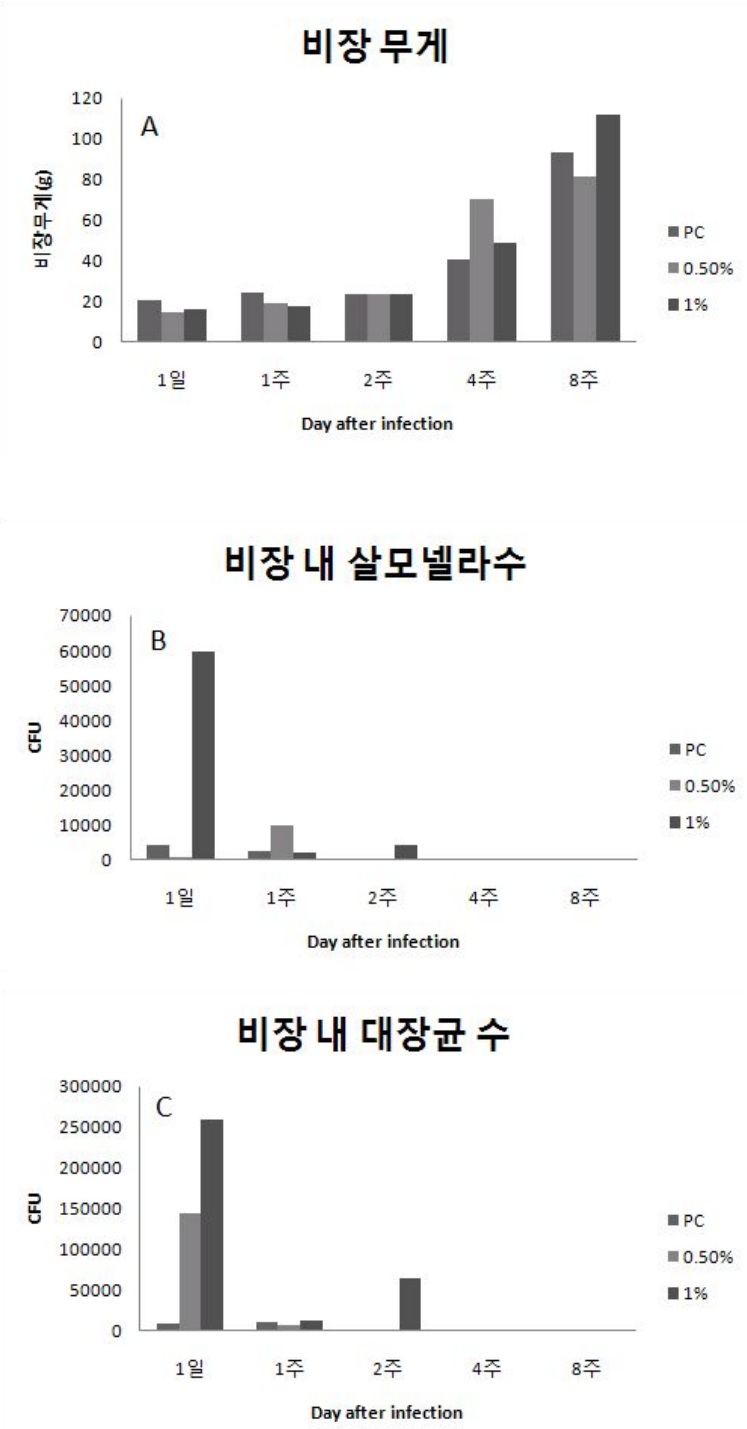


Fig. 2. 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 소화기성 질병 원인체 체내 탐식에 미치는 영향 분석. 이유자돈 10두씩 3개의 Group(PC; 균감염+일반사료급여, 0.5%; 균감염+0.5%항균사료급여, 1%; 균감염+1%항균사료급여)에 대하여 균 감

염 후 시간 경과별 부검을 통해 비장 증식(A), 비장내 존재하는 살모넬라(B)와 병원성 대장균(C)수를 측정해 본 결과 감염 후 1일에 균 배출량이 1% 항균사료 급여한 돈군에서 높은 비장내 균수를 확인할 수 있었음

(3) 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질(항균사료) 급여가 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 숙주의 면역반응에 미치는 영향 분석: 감염 후 각 군에서 채혈을 수행 한 후 소화기성 병원체에 대한 항체가를 측정해 본 결과(Microplate agglutination test;MAT), 항균사료의 급여가 항체 형성에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 확인되어, 항균사료의 급여가 탐식작용 및 면역세포의 증가와 밀접한 세포성 면역 강화 기능이 있는 것으로 판단됨(Table. 1)

Table. 1. 항균사료 급여에 따른 돼지소화기성 질병 원인체에 대한 항체가 비교

	2주차			4주차			8주차		
	PC*	1.0%	0.5%	PC	1.0%	0.5%	PC	1.0%	0.5%
E.coli k88ab	2^6	2^5	2^5	2^8	2^7	2^5	2^7	2^7	2^6
E.coli k88ac	2^6	2^4	2^4	2^7	2^7	2^4	2^7	2^4	2^5
S. typhimurium	2^3	2^0	2^0	2^4	2^2	2^2	2^3	2^3	2^4

* PC; 항균사료 비급여군, 1.0%; 1.0% 항균사료 급여군, 0.5%; 0.5% 항균사료 급여군

마. 천연소재 사료첨가가 목적동물에 미치는 영향 평가

(1) 정상세균총에 미치는 영향 분석: 천연소재 사료첨가제를 급여한 시험군과 일반사료를 첨가한 대조군으로부터 시험 시작 1일 전, 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 각 개체에 대해 항문 swab을 실시하여, 병원성 대장균(용혈성대장균) 및 살모넬라 균 검출 빈도를 조사 수행한 결과 시험 시작 1일전 수행한 시험군 48두 모두에서 용혈성 대장균 및 살모넬라 검출이 되지 않았으며, 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 동안 시험 전 기간에 걸쳐 병원성 대장균 및 살모넬라 균이 검출되지 않았음(Table 1). 또한 투여군 및 비투여군의 분변내 존재하는 총세균수의 변화를 측정하기 위해 각 신선한 분변 4점을 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 채취하여 분변 1 g 당 존재하는 총 세균수의 수치는 시험 전기간에 걸쳐 큰 차이를 보이지 않았으나, 투여군이 비 투여군에 비해 시험 급여 4주 후에 2배가량 적었으며, 6개월 후에는 5배 가량 적은 것으로 나타났지만, 정상세균총에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타남 (Fig. 1).

Table 1.천연소재 사료첨가에 따른 돼지 소화기 병원성 세균 검출 빈도

	병원성 대장균 및 살모넬라 검출(검출두수/시험두수)					
	급여 1일전	1주	2주	4주	8주	6개월
시험군	0/24	0/20	0/16	0/12	0/8	0/4
대조군	0/24	0/20	0/16	0/12	0/8	0/4

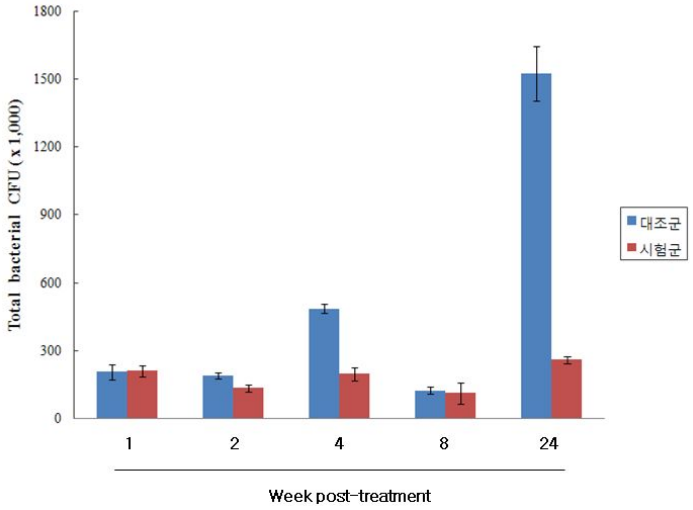


Fig. 1. 천연소재 사료첨가제 급여에 따른 돼지 분변 내 총 세균수 변화

(2) 천연소재 사료첨가제를 급여한 시험군과 일반사료를 첨가한 대조군에 대한 소화기성 질병 발생률 및 폐사율을 조사한 결과 시험 전기간에 걸쳐 시험군 및 대조군에서 소화기성 질병 및 폐사율이 발견되지 않음 (Table 2)

Table 2.천연소재 사료첨가에 따른 돼지 소화기 질병 및 폐사 발생 현황

	병원성 대장균 및 살모넬라 검출(검출두수/시험두수)					
	급여 1일전	1주	2주	4주	8주	6개월
소화기 질병	0/24	0/20	0/16	0/12	0/8	0/4
폐사	0/24	0/20	0/16	0/12	0/8	0/4

바. 천연소재 사료첨가가 목적동물의 면역활성에 미치는 영향 평가

(1) 숙주 면역활성에 미치는 영향 분석: 천연소재 사료첨가제를 급여한 시험군과 일반사료를 첨가한 대조군으로부터 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 각 개체에 대해 전혈을 채취하여 혈액내 백혈구 (WBC) 및 적혈구(RBC) 수치를 확인 해 본 결과 실험 전기간에 걸쳐 대조군에 비해 백혈구 수치가 상승한 것으로 평가되어 면역 활성을 증가시킨 것으로 나타남. 적혈구의 경우 실험 전기간에 걸쳐 대조군과 비교하여 약간 상승한 것으로 나타남 (Table 1) (Fig. 1 및 2).

Table 1. 천연소재 사료첨가에 따른 돼지 혈중 백혈구 (WBC) 및 적혈구 (RBC) 수치 변화

구분	1주		2주		4주		8주		6개월	
	대조군	실험군	대조군	실험군	대조군	실험군	대조군	실험군	대조군	실험군
WBC(m/mm^3)	13.19±0.33	12.82±0.43	16.05±1.30	19.38±2.03	12.49±0.34	18.84±1.89	12.30±2.11	11.7±0.12	21.29±0.11	23.25±3.39
RBC(M/mm^3)	6.06±0.12	5.94±0.40	6.74±0.27	6.30±0.25	6.35±0.27	6.93±0.09	5.12±0.26	5.51±0.09	6.59±0.06	7.62±0.12

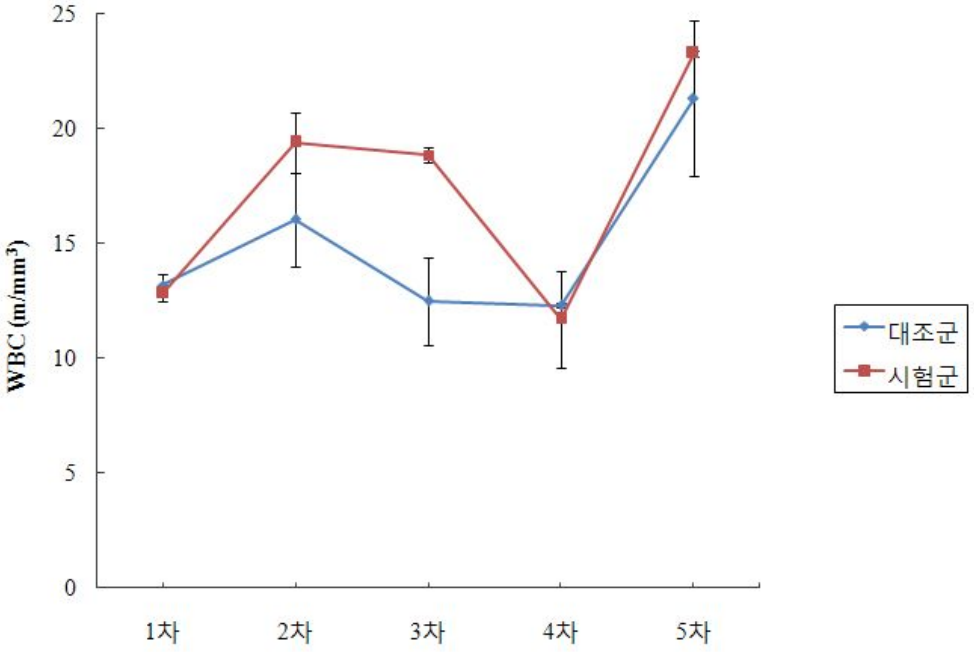


Fig. 1. 천연소재 사료첨가에 따른 돼지 혈중 백혈구 (WBC) 수치 변화; 1차, 2차, 3차, 4차 및 5차는 천연소재 사료첨가 투여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월을 의미함

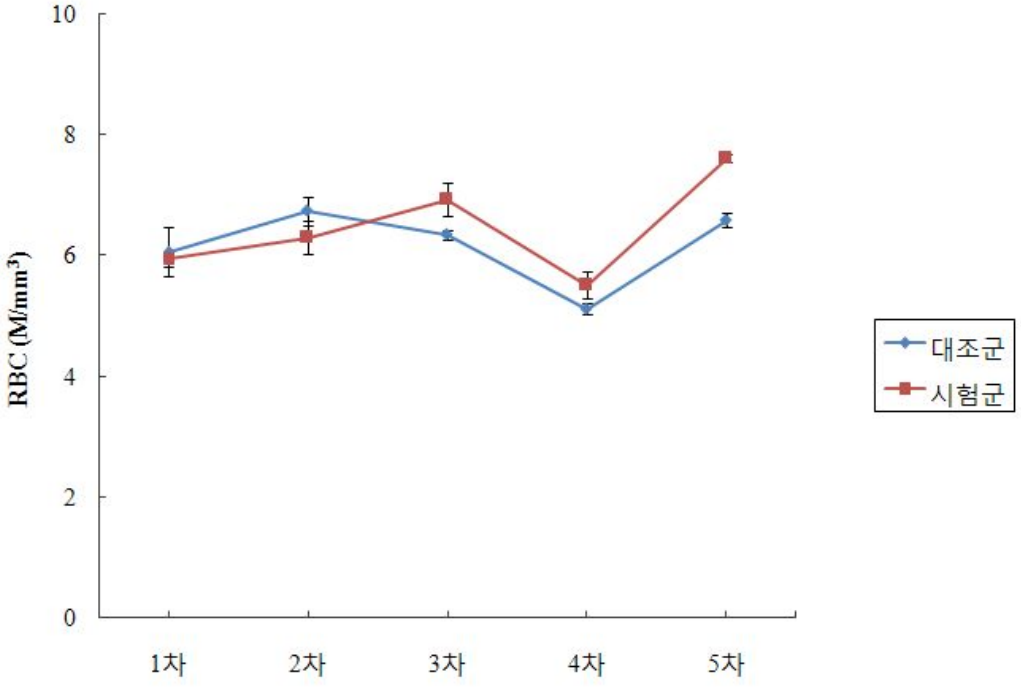


Fig. 2. 천연소재 사료첨가에 따른 돼지 혈중 적혈구 (RBC) 수치 변화; 1차, 2차, 3차, 4차 및 5차는 천연소재 사료첨가 투여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월을 의미함

4. 결론

1)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험결과 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력에는 큰 영향을 미치지 않았음

2)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험 결과 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균 증식능에 있어 억제효과가 입증되었음

3)황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell) 침입 억제 시험결과 살모넬라 균에 대해 황금 증류수 및 에탄올 추출물의 전처리가 대식세포로의 균 침입능력이 억제 되는 것을 확인 함

4)황금 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 시험 결과 황금 증류수 및 에탄올 추출물에 의해 대식세포 내 살모넬라 균 증식능에 있어 억제효과가 입증되었음

5)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 대식세포(RAW264.7 cell)에 대한 생리적 활성도 시험 결과 배양시간이 경과함에 따라 대식세포의 형태적 변화가 비처리 대조구에 비해 크게 증가되는 것을 확인할 수 있고 이를 통해 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물이 대식세포에 대해 생리적 활성화시킴을 입증할 수 있음.

6)삼백초 증류수 및 에탄올 추출물의 살모넬라 균에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)내 증식 억제 및 면역 기전 시험을 확인하기위해 NO값을 측정해 본 결과, 균 감염시킨 비처리 대조구는 NO산생량이 크게 증가하는 반면, 삼백초 증류수 및 에탄올 추출물을 처리한 균 감염 세포에서는 NO산생량이 다소 감소하는 양상을 보이나 유의적인 차이를 보이지 않음이 입증됨.

7)시험 전기간에 걸쳐 천연소재 사료첨가제 급여 시험군 및 비급여 시험군 모두에서 병원성 대장균 및 살모넬라균의 검출이 인정되지 않았으며, 소화기성 질병 및 폐사가 인정되지 않았음.

8)시험 전기간에 걸쳐 천연소재 사료 첨가제 급여 시험군내 총 세균수는 비투여 군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으나 투여군이 비 투여군에 비해 시험 급여 4주 후에 2배가량 적돼지 소화기성 세균성 질병 원인체에 대한 삼백초 및 황금의 항균효과 규명 됨

9)돼지 소화기성 질병 원인체인 대장균과 살모넬라에 대한 IgY의 면역원성 규명 및 대식세포 내 증식 및 침입 억제 규명 됨

10)천연소재 약용자원과 IgY의 사료 급여를 통한 돼지 소화기성 질병에 대한 항질병효과가 규명 됨

11)천연소재 약용자원과 IgY의 사료 급여를 통한 돼지 정상 세균총에 대한 안전성이 확보됨

12)천연소재 약용자원과 IgY의 대식세포 활성 및 사료 급여를 통한 돼지 체내 면역 활성이 확인됨

었으며, 6개월 후에는 5배 가량 적은 것으로 나타났음

제 3 절 천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오밸런스 유지물질의 현장 적용을 통한 유효성 및 경제성 평가

1. 연구목적

항산화와 항염증 물질로서의 천연물질은 민간요법으로 사용되기 시작해 오랜 기간 사용되어 왔다. 전통적으로 의학적용도로 사용되어져온 식물에 초점을 두는 것은 생물학적 활성화 물질을 가진 약초를 증명하는데 가장 효과적인 방법 중 하나이다. 선인장의 일종인 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)를 포함한 식물추출물이 항산화나 면역조절, 신경보호, 항암효과 같은 많은 생물학적 기능을 가지고 있다는 많은 증거들이 있다. 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)는 비가 적은 나라에 넓게 분포하는데, 특히 지중해지역과 중미 지역에 널리 분포한다. 한국에서 또한 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)는 오랜기간 재배되어 왔으며, 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)의 열수추출물은 BALB/c마우스에서 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB)에 의해 유발시킨 알러지성 접촉성 피부염을 억제시켰다는 보고가 있다. 뿐만 아니라 당뇨모델 동물에서 단선(*O. megacantha*)의 잎 추출물을 투여시 혈당의 감소뿐만 아니라, 체중감소의 효과도 나타낸다는 보고도 있다. 이전에 다른 용매를 사용했던 우리 연구에서 보여지듯이, 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)의 원추출물(crude extract)은 항산화 기능과 항염증 기능을 나타내고 있다. 그래서 우리는 천년초의 두가지 주요 성분인 Quercetin과 Taxifolin을 동정하였다.

급성 및 만성 염증은 복잡 다양한 과정으로서, 활성화된 염증세포나 면역세포에 의해 매개되어진다. 면역세포 중에서, 대식세포는 선천면역과 후천면역 모두에서 중요한 조절인자로 알려져 왔다. 이물질의 침입 시에 대식세포는 항원제시세포(APC)로서 활약을 해 후천면역반응을 이끌어낸다. 반면에 특정 환경 하에서 단핵세포(monocyte)는 조직구성세포 (상피세포나 내피세포)로부터 생산된 cytokine에 의해 대식세포로 분화될 수 있다. 한차례 이물질 과 접해있던 조직에 존재했던 대식세포는 전염증cytokine과 염증 매개물질(ROS, NO, PGE2)을 과생산하는 등 많은 다른 면역병리학적 현상을 나타내는데 중요하다. 산화적 스트레스의 경우, NO와 ROS는 실질적으로 염증반응의 매 단계에 영향을 끼친다. 대식세포는 chemokine(GM-CSF)과 cytokine(TNF-α, IL-1β, IL-6)의 분비를 통해 염증과정을 매개한다. 실제로 LPS와 전염증 cytokine같은 많은 염증자극들은 면역세포를 활성화시켜 그러한 염증단계를 up-regulate시키기 때문에 새로운 항염증약물의 개발을 위한 single compound를 찾는 것은 매우 중요하다.

그래서 우리는 이번 연구를 통해 LPS처리한 RAW264.7세포에서 Quercetin이 iNOS, COX-2, IL-6의 mRNA발현에 대한 억제영향 뿐 아니라 radical scavenging activity를 강하게 나타냄을 보임으로써 Quercetin의 항산화기능과 항염증기능뿐 아니라 면역조절에의 영향을 증명하였다. 게다가 우리는 이 compound의 작용기전이 NF-κB reporter gene활성화의 억제와 cAMP responsive element(CRE)의 자극을 통한 것과 연관되어 있을 것이라 사료 되어 본연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시약

Ascorbate, dimethylsulfoxide (DMSO), 2, 2-Diphenyl-lpicrylhydrazyl radical (DPPH), LPS, Griess's reagent, and xanthine oxidase는 Sigma Co (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

Xanthine은 Merck Co(Milwaukee, WI)에서 구입하였다. 다른 모든 regent들은 모두 1등급이었다.

나. Quercetin의 분리

Quercetin의 용매추출과 동정은 이전 보고서에 나타내었다. 간단히 설명하자면 천년초(*O. humifusa* Raf)는 한국의 아산지방에서 10월에 수집하였다. Quercetin 은 ion trap mass spectrometer, Finningan LCQ Advantage MAX (San Jose, CA) 와 ^{1}H-NMR(CD_3OD,300MHz), 그리고^{13}C-NMR(CD_3OD,75MHz를 사용한 ESI-LC-MS/MS에 의해 구조적으로 동정하였다.

다.세포배양

RAW264.7세포는 100U/ml의 페니실린과 100g/ml의 streptomycin, 그리고 10%의 FBS를 첨가한 DMEM에서 유지하였다. 세포는 습도를 유지시킨 air incubator안에서 37℃, 5% CO2의 환경에서 배양하였다.

마. DPPH Radical Scavenging Activity

DPPH assay는 활성화를 제공하는 수소원자(혹은 전자)를 측정한다. 그러므로 free radical scavenging activity의 결과로서 항산화 효과를 평가할 수 있다. The Blios method (Blios, 1958)를 약간 변형시킨 방법을 사용해 측정하였다. 간단하게 설명하자면 보라색의 안정한 free radical인 DPPH는 DPPH용액이 수소원자를 제공할 수 있는 물질과 섞이게 되면 노란색의 diphenyl-1-picrylhydrazine으로 변형되면서 감소하게 된다. 실험시 radical stock solution을 매일 1회분만 만들어 신선한 상태에서 assay를 실시하였다. DPPH의 감소 퍼센트인 EDA는 $EDA= 100(A_0- A_c)/A_0$로 정의되며 A_0는 처음의 흡광도를 나타내며, A_c는 첨가한 샘플농도C의 흡광도 값을 나타낸다.

바. Xanthine oxidase 화렁도 분석

기질로서의 Xanthine을 가지고 xanthine oxidase의 활성도를 Noro et al (1983)의 방법을 약간 변형하여 분광계를 이용해서 측정하였다. 요약하자면, Xanthine과 xanthine oxidase를 실험할 compound나 vehicle과 큐벳 안에서 잘 섞는다. 흡광도의 차이는 295nm에서 3분간 측정하였으며 효소활성은 reference를 가지고 산출하였다. 억제정도(%)는 아래와 같은 식으로 산출하였다:(the activity of control - the activity of the test mixture) / (the activity of control) x 100. xanthine oxidase의 최종농도는 0.1mM의 phosphate버퍼(pH7.4)에서 250❍U/ml이었다.

사.Nitric oxide assay

Nitric oxide의 안정한 산화생성물인 Nitrite는 nitric oxide의 생성물 indicator로서 평가되어진다. 간단히 설명하자면, RAW 264.7세포(1x10^{6}cells/ml)를 24시간동안 전 배양(preincubation)시킨 후에 30분간 Quercetin을 처리하고 LPS(0.1ug/ml)를 24시간 자극시켰다. 그리고 난 후에 상층액 100ul를 동량의Griess reagent (50ul1 % sulfanilamidein 5%phosphoricacidand 50ul 0.1% N-1-napthylethylenediaminedihydrochlorideinwater)와 섞었다. 실온에서 10분간 배양시킨

후 흡광도는 540nm에서 측정하였다. 상층액의 nitrite의 농도는 sodium nitrite로 준비한 standard curve를 이용해 산출하였다.

아. Cell viability assay

세포의 생존도에 대한 Quercetin의 효과는 MTT assay를 이용하여 평가하였다. 요약하자면 RAW 264.7세포는 96well-plate 각 well당 $1x10^4$개로 준비하였고, 37℃에서 24시간 배양하였다. 세포는 여러농도의 Quercetin만을 처리하거나 LPS(0.1ug/ml)과 함께 처리하였다. 37℃에서 24시간 추가로 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 50ul를 각각의 well에 첨가하고 4시간동안 배양하였다. 색의 변화의 원인인 formazan에 대한 흡광도는 450nm에서 측정하였다.

자. Extraction of total RNA

Total RNA는 manufacturer's protocol에 따라 Easy Blue kit (iNtRON Biotechnology Co., Korea)를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA는 사용하기전까지 -70℃에 보관하였다.

차.Semiquantitative RT-PCR amplification

Semiquantitative RT reactions은 RT premix를 사용하여 실시하였다(Bioneer Co., Korea). 요약하면, total RNAs (2 ㎍)는 oligo-dT_{18}을 첨가해 70℃에서 5분간 배양한 후 3분간 ice에서 cooling시킨다. 그리고 난 후 RT premix에 넣고 42.5℃에서 90분간 배양시킨다. 95℃에서 5분간의 처리로 reverse transcriptase를 불활성화시켜 반응을 종료시킨다. PCR반응은 Glyceraldehyde-3-phophatehydrogenase(GAPDH, sense, 5'-CAC TCA CGG CAA ATT CAA CGG C-3'; antisense, 5'-CCT TGG CAG CAC CAG TGG ATG CAG G-3'), iNOS (sense, 5'- CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3'; antisense, 5'- GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3'), TNF-㏊ (sense, 5'- TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG -3'; antisense, 5'- CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3'), IL-6 (sense, 5'- GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG-3'; antisense, 5'- TGC TGG TGA CAA CCA CGG CC-3')의 적절한 sense-, antisense primer를 가지고PCR premix(BioneerCo.,Korea)를 사용해 실시하였다. 배양은 94℃에서 5분간 denaturation time의 조건하에서 45초간 95℃의 cycle에 따라 실행하였다. 55~60℃에서 45초동안 annealing time을 가졌으며, 72℃에서 45초간 elongation time을 가졌다. Final extension은 모든 cycle이 끝난 후에 72℃에서 10분간 행해졌다. PCR products 는 BioRad Co.의 전기영동기를 사용하여 1% agarose에서 분획시켰다. 상대적인 명암도는 Eagle eyes image analysis software (Stratagene Co., La Jolla)를 사용해 산출하였다. iNOS, TNF-㏊, COX-2, IL-6 bands의 density는 같은 RNA샘플의 GAPDH bands의 density와 비교해 상대적으로 나타내었다. Housekeeping gene인 GAPDH는 RNA사이의 standard로서 사용되었다

카. Transient transfection and luciferase assay

RAW 264.7세포는 manufacturer의 사용설명서에 따라 TK Renilla-Luc (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 뿐만 아니라 NF-κB-Luc, AP-1, CRE-Luc reporter plasmids를 WELGENE reagent (WELFECT-TM, WELGENE Inc., Korea)를 사용해 transfectiont시켰다. 세포는 10%

FBS를 포함한 DMEM을 처리하기 전에 transfection solution에서 3시간 배양시켰다. Transfection시작 후 48시간에 Quercetin으로 세포를 30분간 전처리하였고 그 후에 LPS(1ug/ml)을 처리하였다. LPS처리 4시간 후에 세포는 용해되었고 용해물(lysate)은 microcentrifuse를 사용해 4℃, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액분획의 10ul에 luciferase기질 10ul를 가하고 상대적인 luciferase 활성도는 GloMax (Promega, Madison, WI)를 사용해 측정하였다. Reporter유전자 활성도는 TK Renilla luciferase활성도를 표준으로 하였다.

타. 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체 감염시 나타나는 면역 활성능 평가

① 실험동물: 이유자돈 48두에 대하여 IgY 및 황금, 삼백초, 홍화 등이 포함된 사료첨가제를 급여한 시험군 24두 (4 두씩 6개 group)와 일반 사료를 급여한 대조군 24두 (4 두씩 6개 group)를 실험에 사용함

② 숙주 면역세포 활성 평가: 천연소재 사료첨가제를 급여하기 1일 전, 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 두 시험돈군의 혈액을 채취하여 숙주 면역세포 (백혈구) 수 평가함

파. 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체 감염시 나타나는 질병 제어기전 해석

① 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY 특이 항원 검색

② 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY의 상피세포 부착 억제에 미치는 영향 분석

하. Statistical analysis

실험군과 대조군의 값 사이의 차이를 통계학적으로 유의성있게 나타내기 위해 유의성의 post hoc Dunnett multiple비교평가를 사용해 나타내었다. 0.05나 그 이하의 P값은 통계학적으로 유의성이 있다고 여겨진다. 자료들은 triplicate로 실시한 세 번의 실험결과를 평균± SEM으로 나타내었다.

3.결과

가. 어성초의 활성성분인 Quercetin의 항산화효과 측정

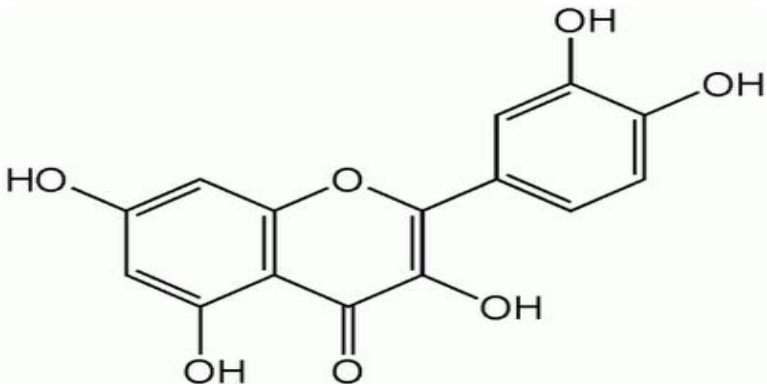


Fig. 1 실험에 사용된 quercetin의 화학구조식

(1) DPPH와 Xanthin oxidase assay를 이용한 항산화능 측정

Quercetin은 항산화 효과를 수반하는 강력한 radical scavenging activity를 나타내었음. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)와 Xanthine oxidase assay에서 Quercetin의 free radical scavenging activity는 IC50값이 각각 97.5 ± 5.1 nM과 23.5 ± 8.1 μM로 강력한 항산화 효과를 나타내었음. 이 결과는 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)가 직접적인 scavenging activity와 ROS생성의 억제, 그리고 염증 cytokine의 발현조절을 통해서 radical-induced toxicity를 조절함을 제시함.

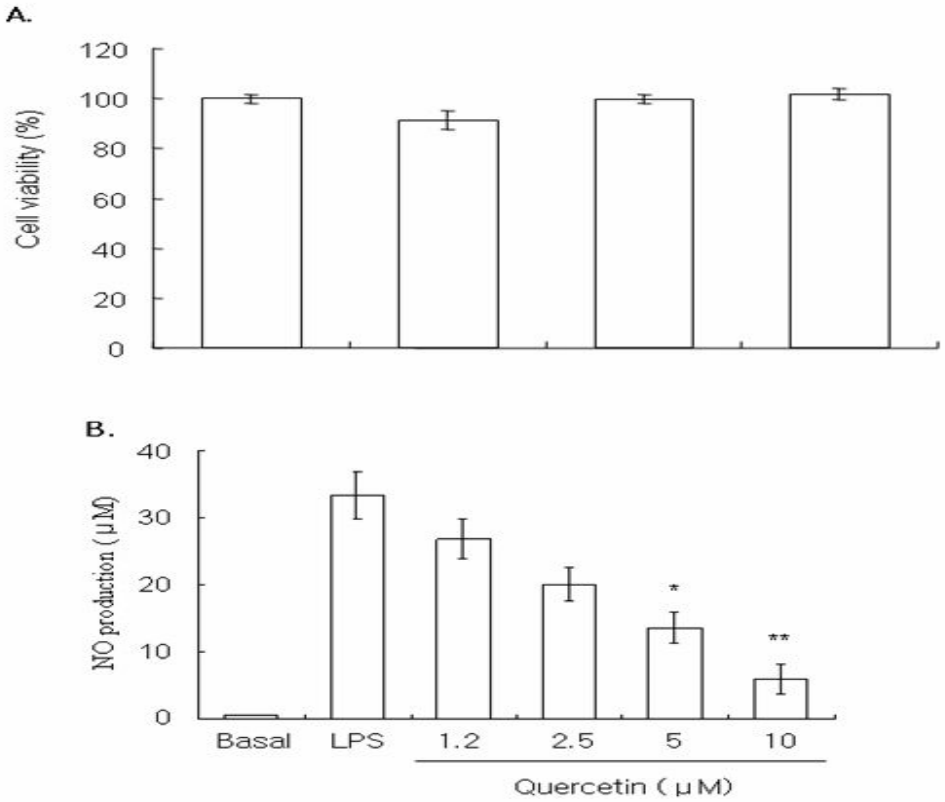


Fig. 2 Quercetin이 RAW 264.7세포에서 세포독성 (A), NO 생성 (B)그리고 iNOS 발현(C.D)에 미치는 효과. RAW264.7 세포($1x10^6$ cell/ml)는 LPS(0.1g/ml)를 처리하거나 처리하지 않은 채로 , 18시간동안 지시된 농도별로 배양되었다. **A**, 세포의 생존도는 MTT assay를 이용해 측정했다. B, NO 생성은 Griess's reagents로 측정했다. $^{*}P<0.01$ vs LPS + Quercetin(2.5M), 5: LPS + Quercetin (5M), 6: LPS + Quercetin (10M).

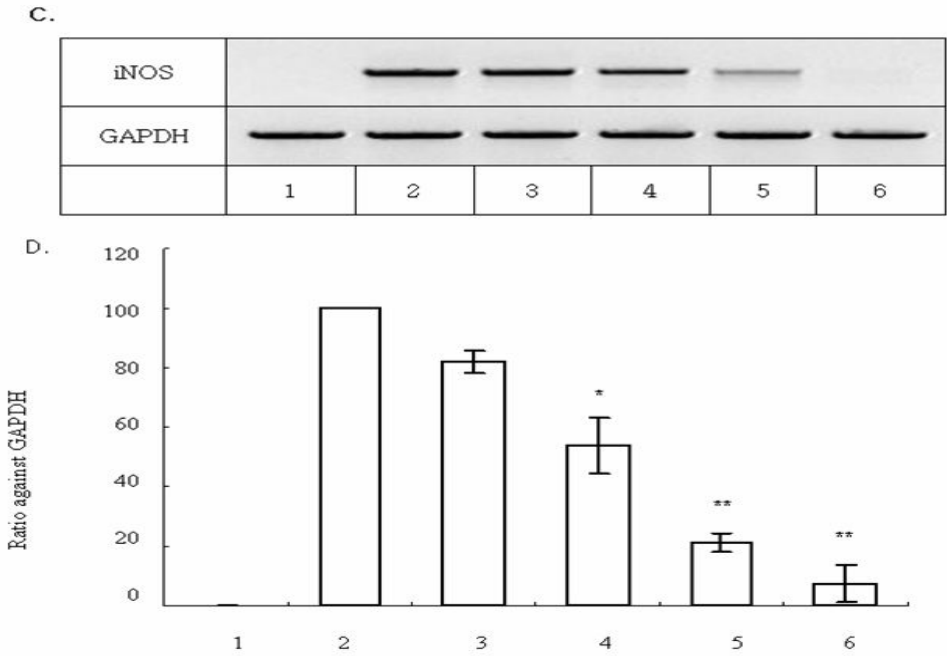


Fig. 3 C,D quercetin과 LPS, 또는 LPS 단독의 배양이 끝난 후, 총 RNA가 준비되었고 RT-PCR 을 행했으며, gel 사진은 각 실험의 대표로써 나타냈다. 각각의 수치는 세 번의 독립된 실험의 평균±표준오차로 나타냈다. *P<0.01 vs LPS + Quercetin(2.5M), 5: LPS + Quercetin (5M), 6: LPS + Quercetin (10M).

나. NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 Quercetin의 억제효과

Quercetin이 RAW264.7에 미치는 세포독성 효과를 평가하고자 RAW264.7에 다양한 농도의 Quercetin을 처리한 후 MTT assay를 실시하였음. 본 연구에서 사용된 10 μM에서조차도 quercetin은 세포의 생존율에 독성효과를 보이지 않았음. LPS에 의해 활성화된 세포는 33.3±3.5uM/10^6 cells/ml 농도의 NO가 유도되었으며, 이는 quercetin에 의해 농도 의존적으로 감소되었음. 또한, quercetin은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 강하게 억제시켰음. 따라서 quercetin의 억제효과가 부분적으로 iNOS 유전자의 발현의 억제를 통해 매개되었다고 사료됨.

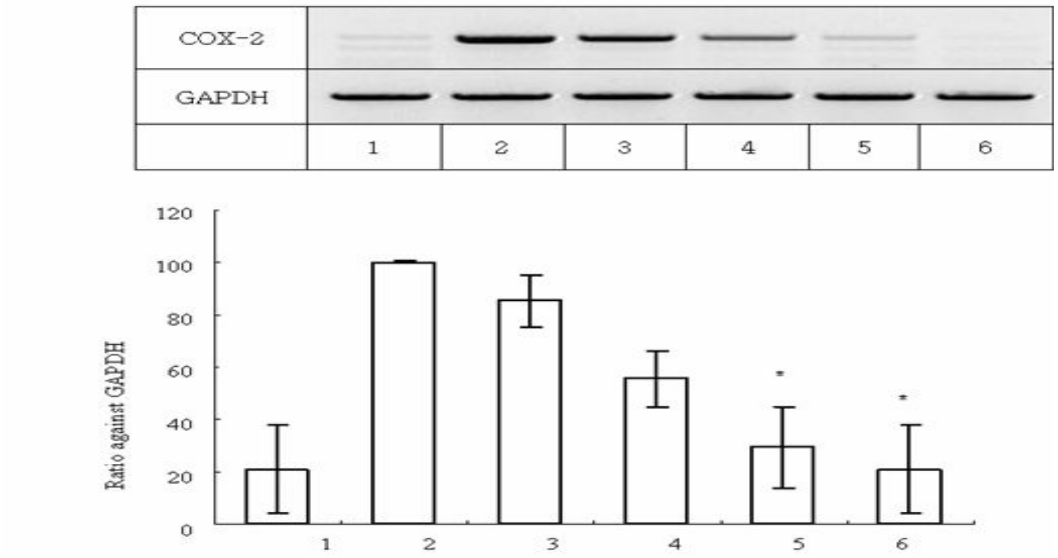


Fig. 4 Quercetin이 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포에서 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향. RAW 264.7 세포 (1x 10^6 cells/ml) 는 다양한 quercetin의 농도하에 배양되었다. quercetin(1.25, 2.5, 5, 10uM)과 LPS(0.1ug/ml)의 배양 ,그리고 LPS단독의 배양이 끝난 후에는 "Materials and Methods"에 적은 바대로 RT-PCR이 실행되었다. gel 사진은 각 실험의 대표로써 나타냈다 .각각의 수치는 세 번의 독립된 실험의 평균±표준오차로 나타냈다. *P<0.01 vs LPS + Quercetin(2.5M), 5: LPS + Quercetin (5M), 6: LPS + Quercetin (10M).

다. COX-2 mRNA발현에 있어서 Quercetin의 효과

COX-2는 매우 잘 알려진 전 염증 매개체(pro-inflammatory mediator)이기 때문에 RT-PCR분석을 통해 Quercetin의 억제효과가 전 염증매개효소인 COX-2 mRNA의 발현을 조절하는지를 조사하였음. 자극을 가하지 않은 RAW 264.7세포에서 COX-2 mRNA의 발현은 나타나지 않았음. 하지만 LPS 자극시에는 mRNA수준이 현저하게 상승하였으며, 이는 Quercetin을 전처리함으로써 농도의존성으로 현저하게 억제되었음 (Fig. 4).

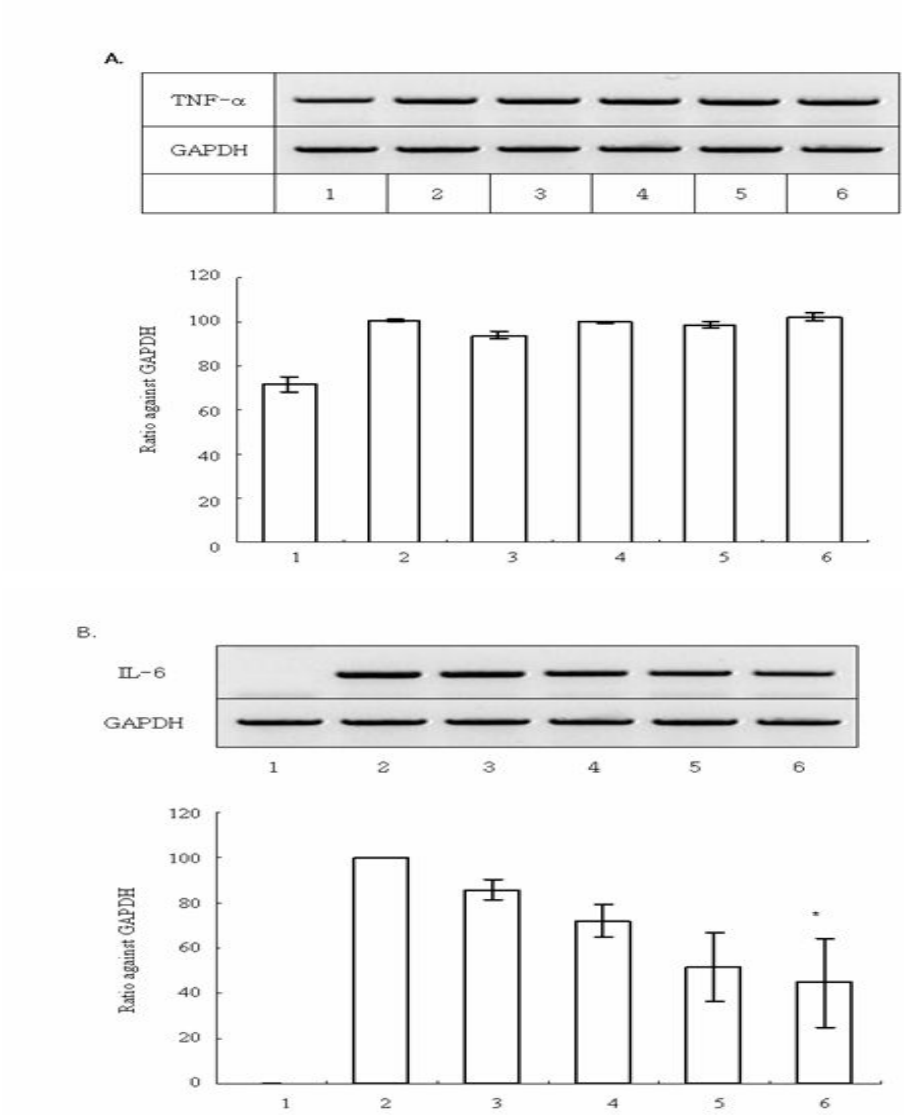


Fig. 5 LPS가 처리된 RAW264.7세포에서 Quercetin이 전염증반응 cytokine의 mRNA 발현에 미치는 영향. LPS가 처리된 RAW264.7세포에서 얻은 TNF-α(A)와 IL-6의 mRNA 발현 정도는 RT-PCR을 통해 측정했다. 각 그래프의 수치는 세 번의 독립된 실험의 평균±표준오차이다. *P<0.01 vs LPS + Quercetin(2.5μM), 5: LPS + Quercetin (5μM), 6: LPS + Quercetin (10μM).

라. 전 염증(pro-inflammatory) cytokine유전자 발현에서의 Quercetin의 효과

Quercetin은 LPS에 의한 IL-6 mRNA발현을 억제하였으나 TNF-α의 발현에는 아무런 영향을 주지 않았음. 이는 Quercetin의 억제효과가 부분적으로 IL-6를 통해 매개되어지나 TNF-α와는 무관하다는 것을 제시함.

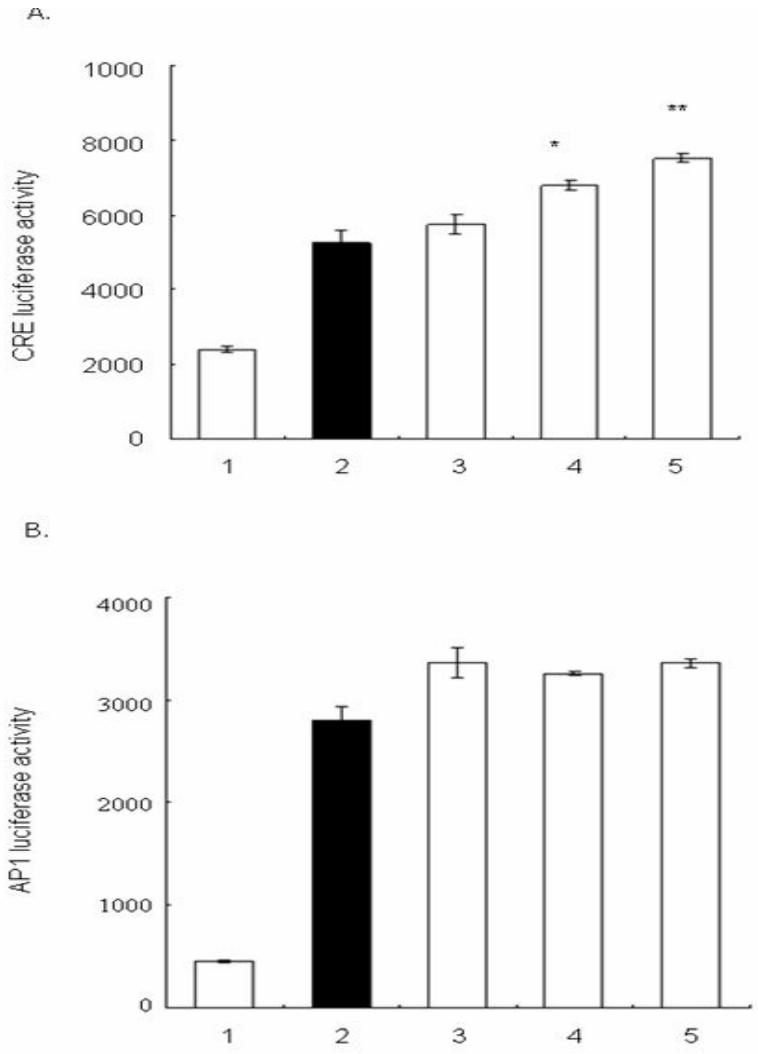


Fig. 6 Quercetin이 CRE(A), NF-κB(B) 그리고 AP-1 reporter 유전자(C)의 전사 활동에 미치는 영향. CRE, NF-κB, AP-1 그리고 TK Renilla의 cDNA는 cotransfection했다. luciferase assay 하루 전, 세포는 24 well plate에 옮겨 24시간동안 배양했다. Luciferase assay는 Materials & Methods에 기술한 바와 같이 Promega kit를 사용하여 이루어졌다. 각 그래프의 수치는 세 번의 독립된 실험(triplicate)의 평균±표준오차이다. RLU는 relative luciferase unit을 의미한다. $^{*}P<0.05$ vs PMA-activated, $^{**}P<0.01$ vs PMA-activated. A, Lane no. 1: basal, 2: Forskolin (1uM), 3: Forskolin (1uM) + Quercetin(2.5uM), 4: Forskolin (1uM) + Quercetin(5M), 5: Forskolin (1uM) + Quercetin(10uM). A,C, Lane no.1: basal, 2: PMA(0.1uM)), 3: PMA(0.1uM) + Quercetin (2.5M), 4:(0.1uM) + Qurcertin (5M), 5(0.1uM)+ Quercetin(10uM).

마. PMA에 의해 유도된 NF-κB, AP-1, CRE에 대한 Quercetin의 효과

NF-κB의 활성은 LPS에 의한 iNOS, COX-2, TNF-α, 그리고 IL-6 활성화와 관련되어 있으며 또한 NF-κB의 활성은 AP-1과 CRE 활성과 같은 전사인자의 활성과도 관계가 있음. Quercetin이 NF-κB, AP-1, CRE의 활성에 영향을 미치는지를 알아보고자 luciferase assay를 실시하였음. Quercetin은 PMA에 의해 유도된 NF-κB의 전사활성을 억제하였으나 AP-1의 활성에는 영향을 미치지 않았음. Quercetin은 농도의존성으로 PMA에 의해 유도된 CREB의

전사활성을 명확하게 향상시켰음.

2-2) 천년초 ethyl acetate 추출물의 혈소판 활성 억제

가. ADP에 의해 유도된 혈소판 응집반응에서의 천년초 에틸아세테이트 추출물 의 효과

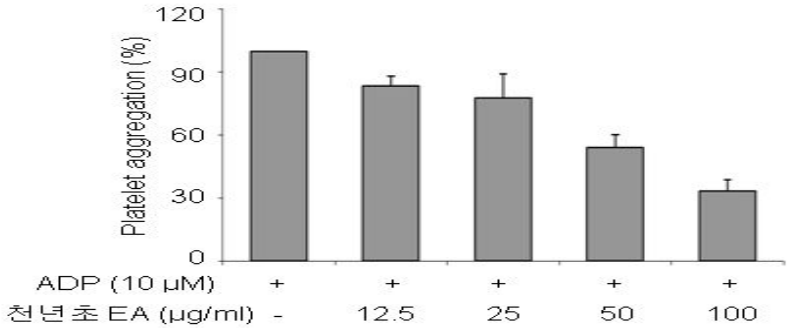


Fig. 7. 천년초 에틸아세테이트 추출물은 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집반응을 농도의존성으로 억제시켰다. 혈소판에 천년초 EtOAc 추출물을 각각의 농도로 1분간 처리한 후 ADP를 처리하여 총 반응시간 8분간 응집반응에 미치는 영향을 살펴보았다. 실험결과는 평균 ± S.E.M. (n=3 experiments)으로 나타내었다.

천년초 에틸아세테이트 추출물은 ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집반응을 농도의존성으로 억제시켰다. 천년초 100μg/ml에서 혈소판 응집률은 33%까지 감소하였다.

나. Collagen에 의해 유도된 혈소판 응집반응에서의 천년초 EtOAc 의 효과

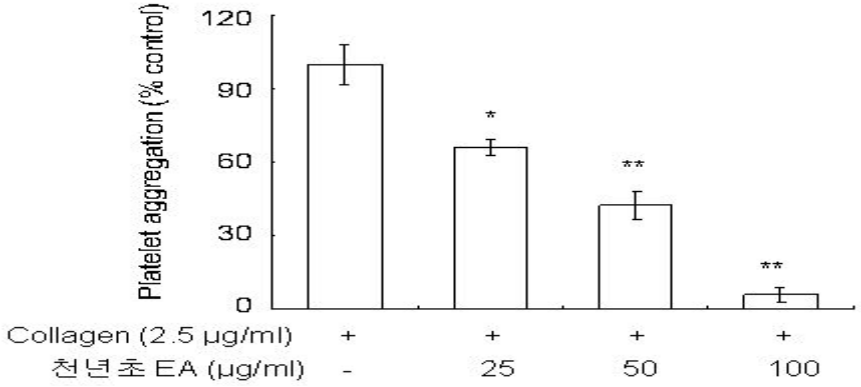


Fig. 8 천년초 에틸아세테이트 추출물은 콜라겐에 의해 유도된 혈소판 응집반응을 농도의존성으로 억제시켰다. 혈소판에 천년초 에틸아세테이트 추출물을 각각의 농도로 2분간 처리한 후 콜라겐를 처리하여 총 반응시간 8분간 응집반응에 미치는 영향을 살펴보았다. 실험결과는 평균 ± SEM (n=3 experiments)으로 나타내었다.

다음으로 collagen (2.5 μg/ml)에 의해 유도된 혈소판 응집반응에서의 천년초 에틸아세테이트

추출물의 효과에 대해 살펴보았음. 천년초 에틸아세테이트 추출물은 collagen에 의해 유도된 혈소판 응집반응을 농도 의존성으로 억제시킴을 확인할 수 있었고 IC_{50}은 38.3 ± 4.4 μg/ml을 나타내었음 (Fig. 8). 이로써 천년초 에틸아세테이트 추출물이 ADP 및 collagen에 의한 혈소판 응집반응에 있어 억제효과를 보인다는 것을 확인하였음.

다. **세포 내 칼슘분비에의 천년초 EA추출물의 효과**

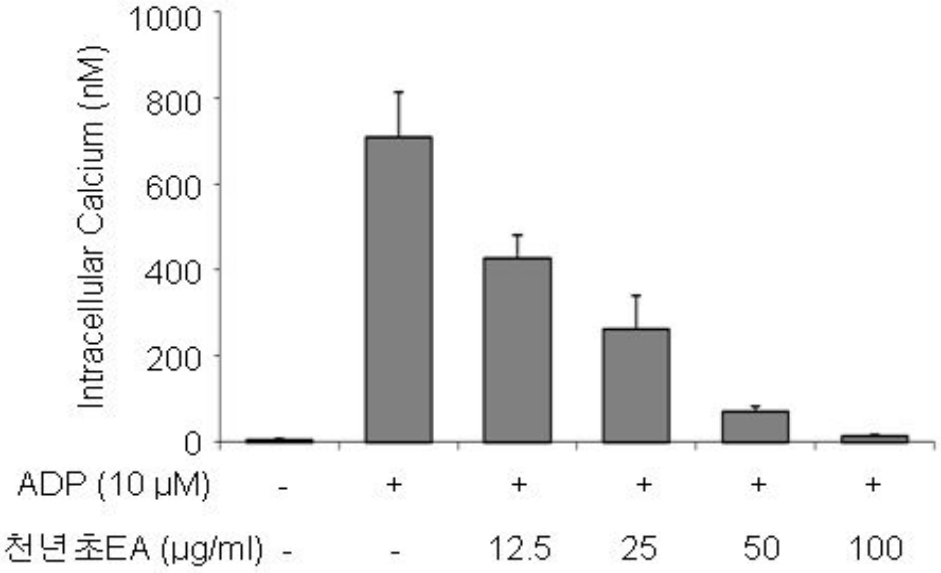


Fig. 9 ADP (10μM) 에 의해서 유도된 세포내 칼슘농도 변화에서의 천년초 추출물의 효과. 혈소판에 Fura-2/AM의 처리는 '재료 및 방법'에서 설명한 대로 진행하였다. 혈소판은 1mM의 $CaCl_2$를 처리하고 37℃에서 1min간 preincubation시킨 후 사용하였고, ADP (10μM)를 처리한 후 총 반응시간 3min간 변화를 살펴보았다. 이 데이터는 평균 ± S.E.M. (n=4 experiments)으로 나타내었다.

세포내 칼슘의 증가는 혈소판 활성시에 나타나는 현상으로 잘 알려져 있음. 그러므로 ADP에 의해 유도된 칼슘의 증가에서 천년초 에틸아세테이트 추출물이 어떤 효과를 보이는 지를 살펴보았음. ADP 10μM을 처리하였을 시에는 세포내 칼슘의 농도는 709.06 ± 102.64 nM까지 현저하게 증가하였음. 천년초 에틸아세테이트 추출물은 ADP 10μM에 의해 증가된 칼슘 level을 농도의존성으로 강하게 억제시켰음 (Fig. 9).

2-3) Chlorin e6가 ADP에 의한 혈소판 응집 반응에 미치는 영향

가. 혈소판 응집 반응

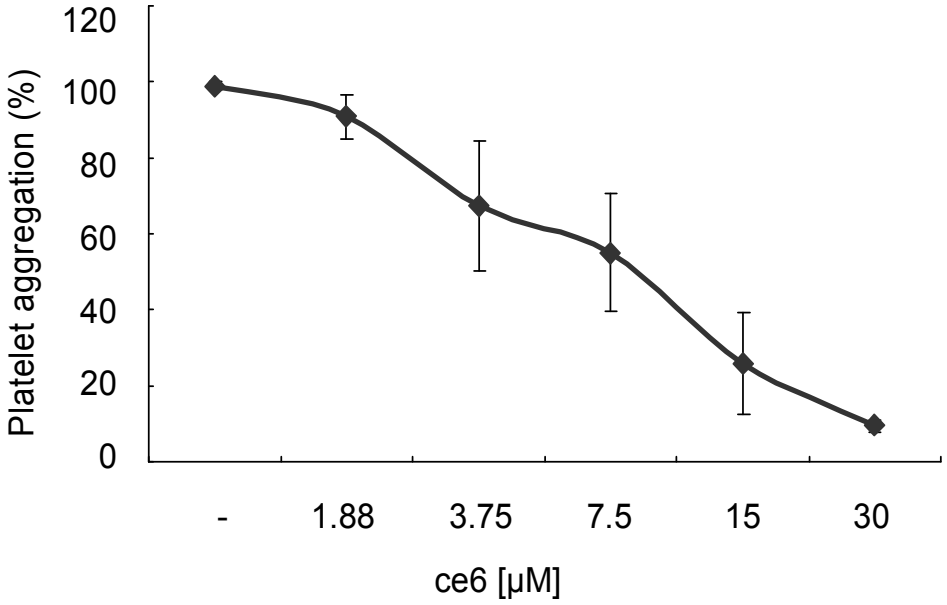


Fig. 10 **The inhibitory effect of CE6 on platelet aggregation induced by ADP** Platelets (3×10^8/ml) were pre-incubated with or without CE6 in the presence of 1mM $CaCl_2$ for 3min at 37°C.The platelets were stimulated with 10μM ADP. Agonists-induced platelet aggregation was recorded using a turbidometric aggregometer. The aggregation reaction was terminated at 5 min and the percent aggregation rate was determined. Each graph shows mean ± SEM of at least 4 independent experiments performed.

실험에 사용된 10 μM의 ADP는 혈소판 (3×10^8/ml)을 100% 응집시켰음. CE6는 ADP에 유도된 혈소판의 응집반응을 농도 의존적으로 억제하였음 (IC50 = 7.1 ± 0.65 μM).

나. CE6가 ADP에 유도된 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향

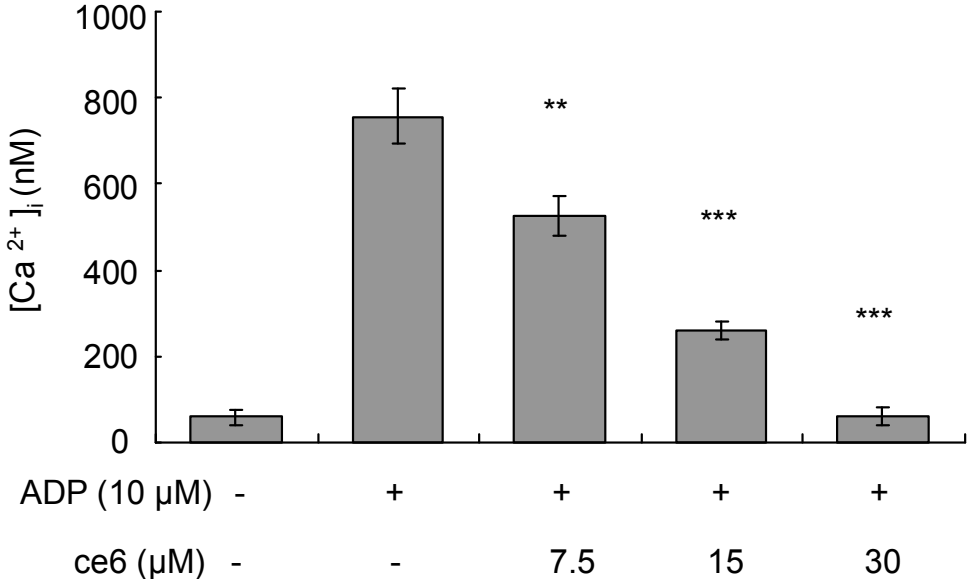


Fig. 11 The inhibitory effect of CE6 on $[Ca^{2+}]i$ mobilization induced by ADP Washed platelets were incubated with calcium fluorophore (fura-2/AM), stimulated with ADP and $[Ca^{2+}]i$ was determined as described in Materials and methods section for which CE6 significantly inhibited ADP-activated $[Ca^{2+}]i$. The results are a summary of at least 3 independent experiments performed and the bar graphs are presented as mean ± S.E.M. **: $p < 0.01$ compared with agonist control, ***: $p < 0.005$ compared with agonist control.

세포내 칼슘의 동원은 혈소판의 활성화와 과립 분비의 중요한 단계로 고려되므로, CE6가 ADP로 유도된 세포내 칼슘의 증가에 미치는 영향을 평가하였음. ADP 10 μM은 세포내 칼슘을 750 nM까지 증가시켰으며, 이는 CE6에 의해 농도 의존적으로 감소되었음. 이 결과는 CE6의 혈소판 응집 억제효과가 세포내 칼슘 동원을 억제함으로써 매개됨을 제안함.

다. CE6가 ADP에 의한 혈소판의 ATP 분비에 미치는 영향

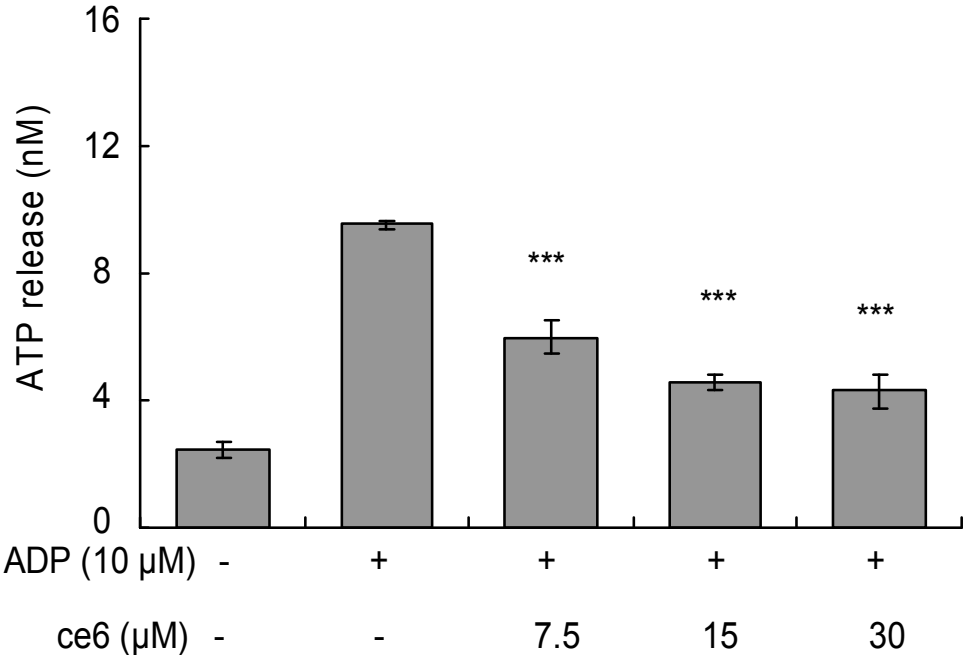


Fig. 12 Effects of CE6 on ADP-activated platelet dense-granule secretion Washed platelets were pre-incubated with CE6 at the concentrations indicated, stirred in an aggregometer for 3 min prior to ADP stimulation for 5 min, and then the reactions were terminated followed by ATP release assay. ATP release in response to agonist stimulation was performed as described in Material and Methods section. Bar graphs show mean ± SEM of at least 4 independent experiments performed. ***: $p < 0.01$ compared with agonist control.

혈소판의 dense granule의 분비는 혈소판 활성화 이후 빠르게 일어나는 현상이므로, dense granule 분비물의 하나인 ATP를 지표로 삼아 CE6가 ADP에 유도된 ATP의 분비에 미치는 영향을 실험하였음. CE6는 ADP를 단독 처리함으로써 유도된 ATP의 분비를 농도 의존적으로 감소시켰음.

라. CE6의 ADP에 의한 TXA2 생성에 미치는 영향

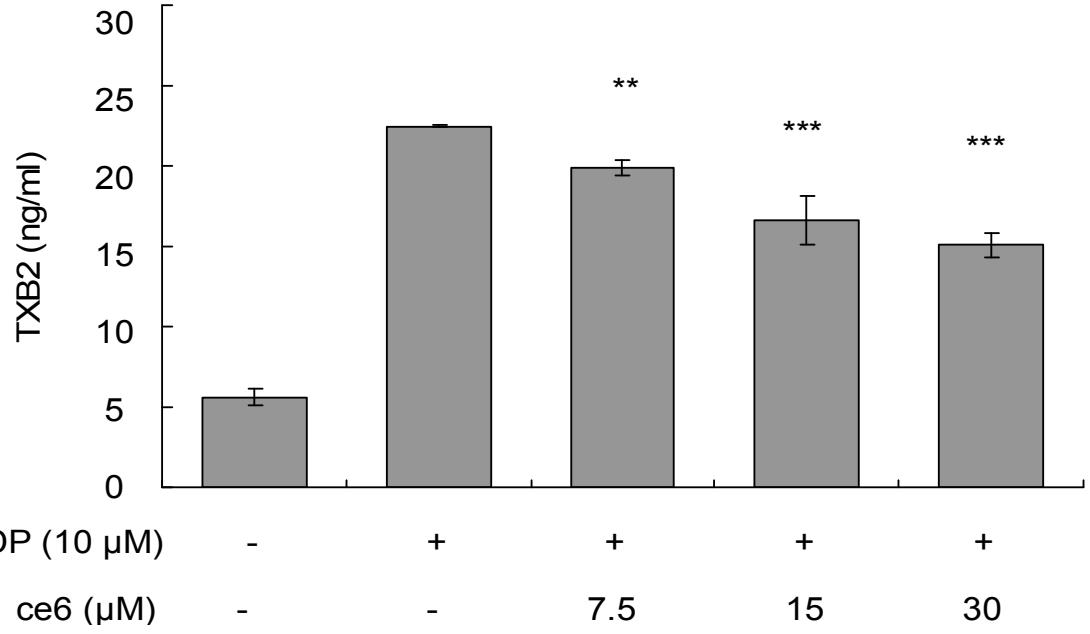


Fig. 13 **Effect of CE6 on ADP-induced TXA2 generation** ADP (10 μM) evoked TXB2 production (as measure of TXA generation) in washed suspension of platelet in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+}.TXB2 was measured at 5min after addition of ADP. TXB2 measure was performed using TXB2 EIA Kit . Bar graphs show mean ± SEM of at least 3 independent experiments performed. **:$p<0.01$ compared with agonist control, ***:$p<0.005$ compared with agonist control.

Thromboxane A2 (TXA2)는 G 단백질을 경유하는 하위 경로 물질으로 알려져 있으며, 활성화 신호를 증폭시킴. TXA2의 안정적인 대사물인 TXB2를 측정함으로써, CE6가 TXA2의 생성에 미치는 영향을 실험하였음. ADP는 TXB2의 생성을 대조군에 비해 5배가량 증가시켰으며, 이는 CE6의 처리에 의해서 농도 의존적으로 감소하였음.

마. CE6가 혈소판의 cAMP 농도에 미치는 영향

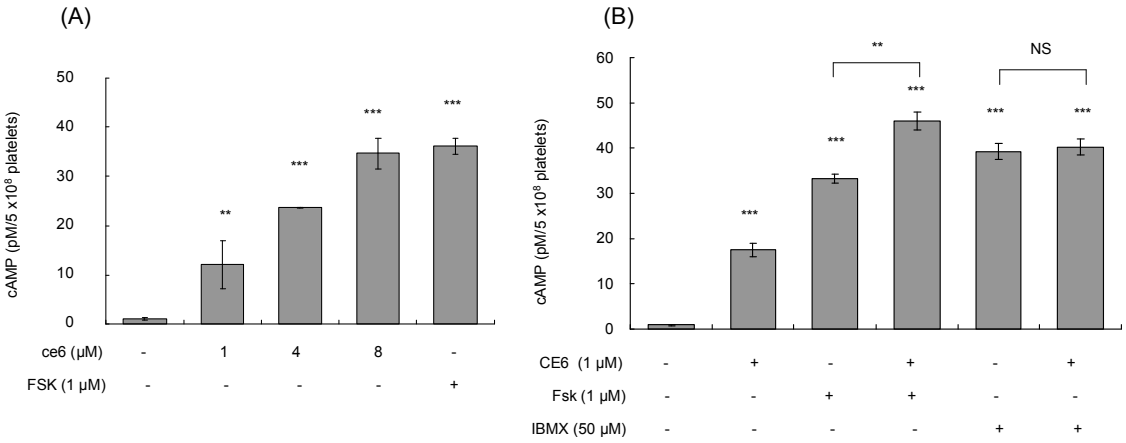


Fig. 14 Effects of CE6 on intracellular cyclic AMP concentration
Washed platelets were stirred with vehicle or CE6 (at the concentrations indicated), forskolin and IBMX in an aggregometer and stimulated with ADP for 5 min prior to the termination of the reaction and then cAMP enzyme immunoassays were performed as described in the Materials and methods section. A. CE6 significantly increased cAMP accumulation in a dose dependent manner. B. Co-incubation of CE6 with forskolin showed a synergistic effect on cAMP level elevation but not with IBMX. The results are a summary of at least 3 independent experiments performed and bar graphs presented as mean ± S.E.M. **: $p < 0.01$ compared with negative control, ***: $p < 0.005$ compared with negative control, NS: statistically not significant.

Adenylate cyclase (AC)는 Gs와 결합된 수용체에 작용하여 cAMP의 생성을 촉진하며, cAMP는 ADP에 의한 혈소판의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있음. CE6는 혈소판의 cAMP 양을 현저하게 증가시켰으며, 8 μM의 CE6는 forskolin이 유도한 cAMP 양의 95%에 달하였음. Fig. 14B에서 보는 것과 같이, AC 활성화 물질인 forskolin 1 μM과 동시에 처리하였을 때 시너지 효과를 나타내었음. 하지만, phosphodiesterase (PDE) 저해제인 IBMX와 동시에 처리하였을 때는 아무런 영향을 보이지 않았음.

바. CE6의 ADP에 의한 MAPK와 Akt의 인산화에 미치는 영향

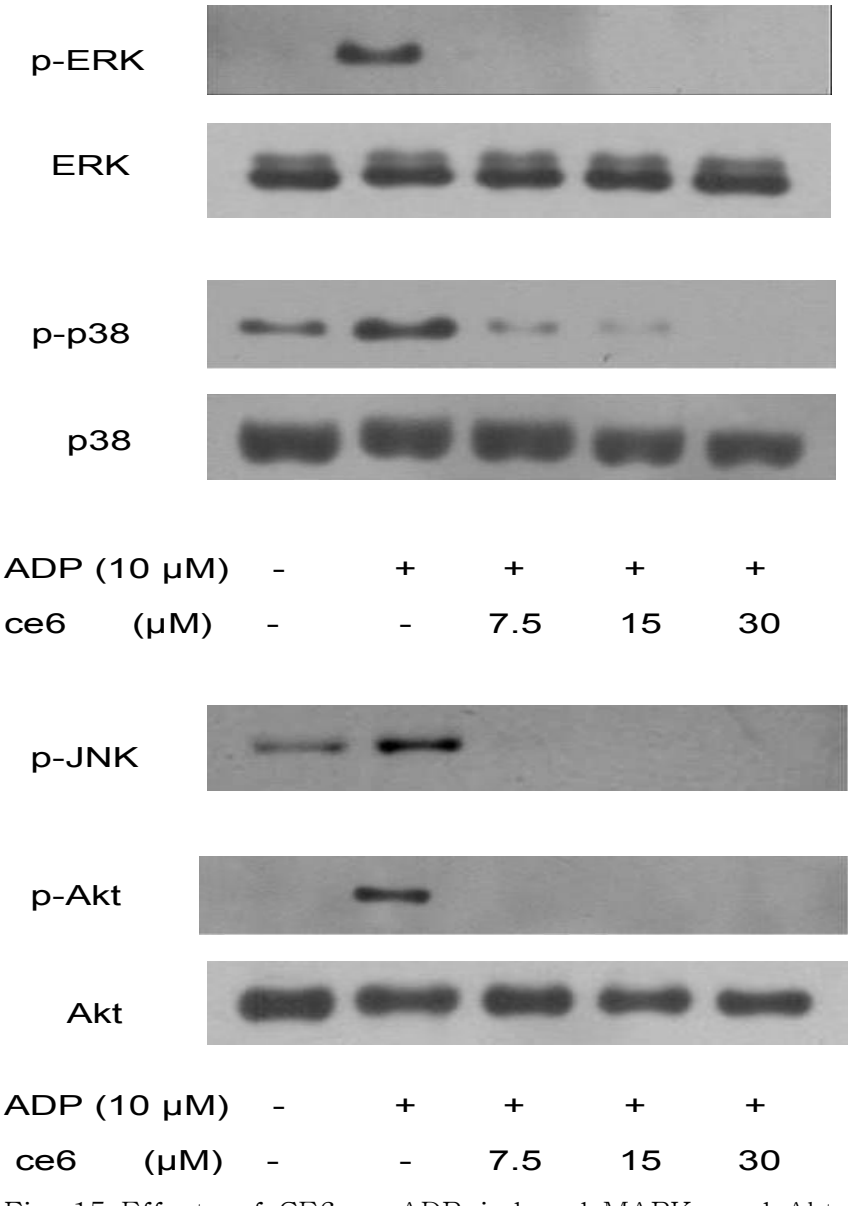


Fig. 15 Effects of CE6 on ADP-induced MAPKs and Akt phosphorylations.
Washed platelets were stirred in an aggregometer with vehicle or CE6 at the concentration indicated for 3 min prior to the addition of ADP for 5 min before the termination of the reactions. Proteins were extracted, separated by SDS-PAGE, blotted onto PVDF membrane and stained using antibodies against Erk1/2, phospho-Erk1/2, p38, phospho-p38, SAPK/JNK and phospho-SAPK/JNK. We also checked anti-phospho-Akt and anti-Akt antibodies. Blots were visualized by ECL and all immunoblots are representatives of 3-4 independent experiments

CE6가 어떠한 기전에 의해 혈소판의 활성화를 억제하는가 알아보기 위하여, CE6가 ERK, p38 그리고 JNK의 인산화에 미치는 영향을 western blotting을 통해 조사하였음. ERK, p38 그리고 JNK의 3가지 mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 CE6를 처리함으로써 완

벽하게 억제되었음. Akt는 Gi 단백질과 결합된 수용체의 활성화에 직접적으로 관련되어 있으므로, Akt의 인산화에 대한 CE6의 영향을 실험하였음. CE6는 Akt의 인산화 역시 농도 의존적으로 억제하였음.

사. CE6가 ADP에 의한 integrin 활성화에 미치는 영향

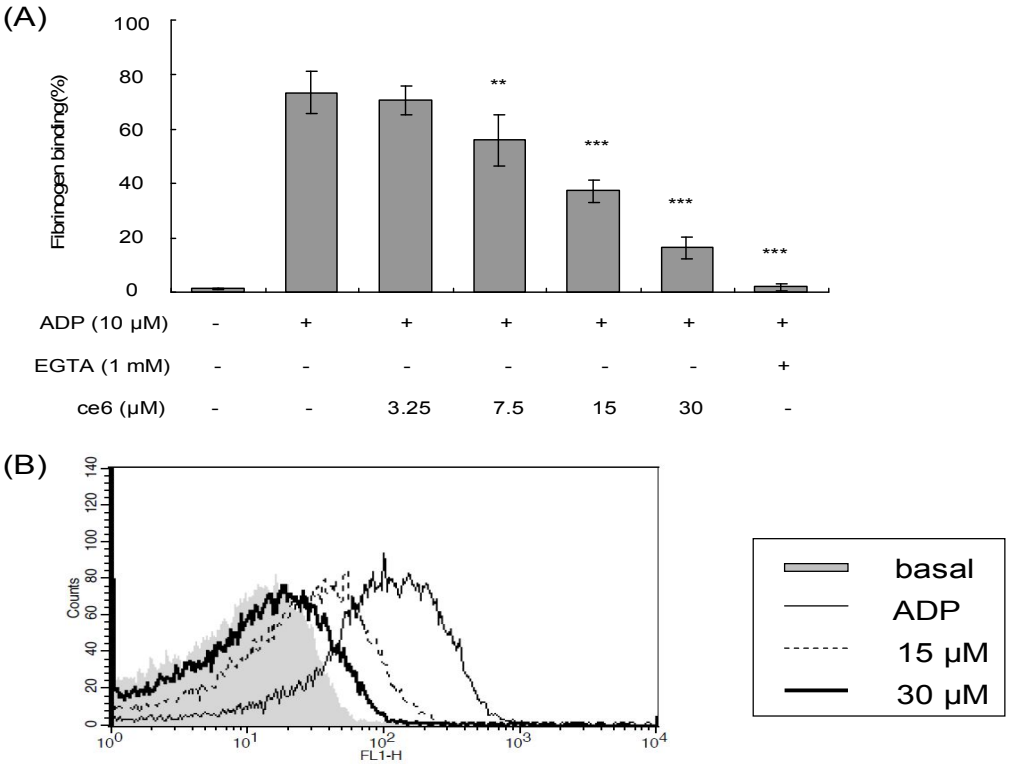


Fig. 16 Effects of CE6 on fibrinogen binding in ADP-activated platelets

The inhibitory effects of CE6 on fibrinogen binding to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in ADP-stimulated platelets were measured by flow cytometric analysis. A. Fluorescent intensity graphs are from one experiment but are representative of 4 independent experiments. Data exhibit mean fluorescence intensity (MFI) of fibrinogen-positive platelets. Washed platelets were pre-treated with vehicle or CE6 at the concentrations ranging from 3.25 μM to 30 μM. And, then ADP (10 μM) was added together with Alexa Fluor 488-human fibrinogen (20 μg/ml) for 5 min, fixed with 0.5% paraformaldehyde at 4°C for 30 min. Each graph was expressed as % of gated. B. Analysis graph shows representative of at least 4 independent experiments performed. **: $p < 0.01$ compared with agonist control, ***: $p < 0.005$ compared with agonist control.

대부분의 혈소판 agonist가 그러하듯 ADP에 의한 혈소판의 활성화는 당단백질 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$의 활성화를 유도하여 혈장의 fibrinogen과 결합함. integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$의 활성화를 측정하기 위하여 혈소판을 CE6로 전처리한 후, 형광 라벨된 fibrinogen의 결합을 측정하였음. CE6는 혈소판의 fibrinogen 결합을 농도 의존적으로 억제하였음.

아. 사료첨가제를 급여한 시험군과 일반사료를 첨가한 대조군으로부터 혈액내 백혈구 수치의 변화

천연소재 사료첨가제를 급여한 시험군과 일반사료를 첨가한 대조군으로부터 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 각 시험균 별 4두를 선발하여 혈액을 채취하여, 혈액내 백혈구 수치의 변화를 측정한 결과, 투여군이 비투여 균 보다 비교적 높은 백혈구 수치를 보이는 것으로 나타났으나, 통계적 유의성은 인정되지 않았음 (Fig. 17).

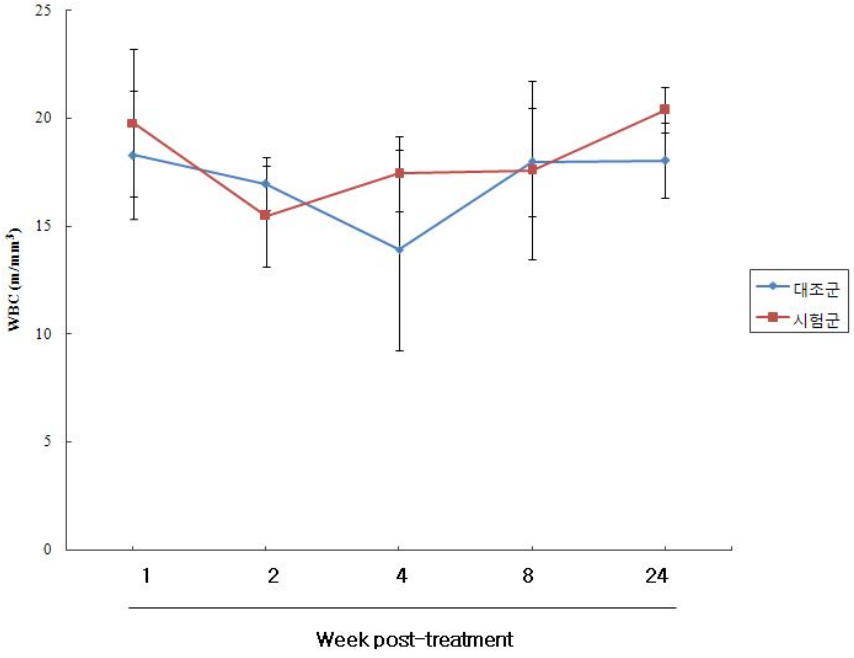


Fig. 17 천연소재 사료첨가제를 급여한 시험군과 일반사료를 첨가한 대조군으로부터 급여 후 1주, 2주, 4주, 8주 및 6개월 후 각 시험균 별 4두를 선발하여 혈액을 채취하여, 혈액내 백혈구 수치의 변화

자. 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY 특이 항원 검색

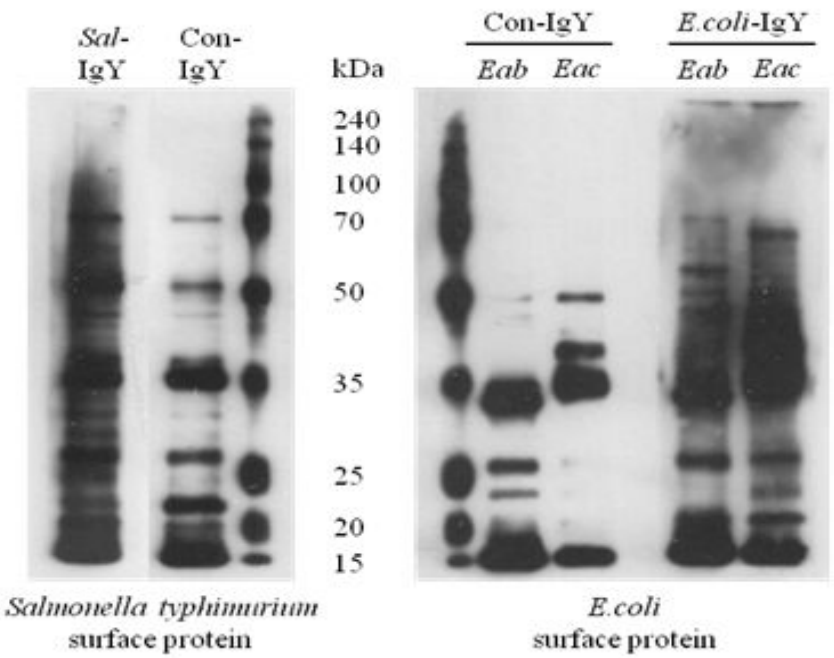


Fig. 18 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY 특이 항원 검색

차. 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY의 상피세포 부착 억제에 미치는 영향 분석

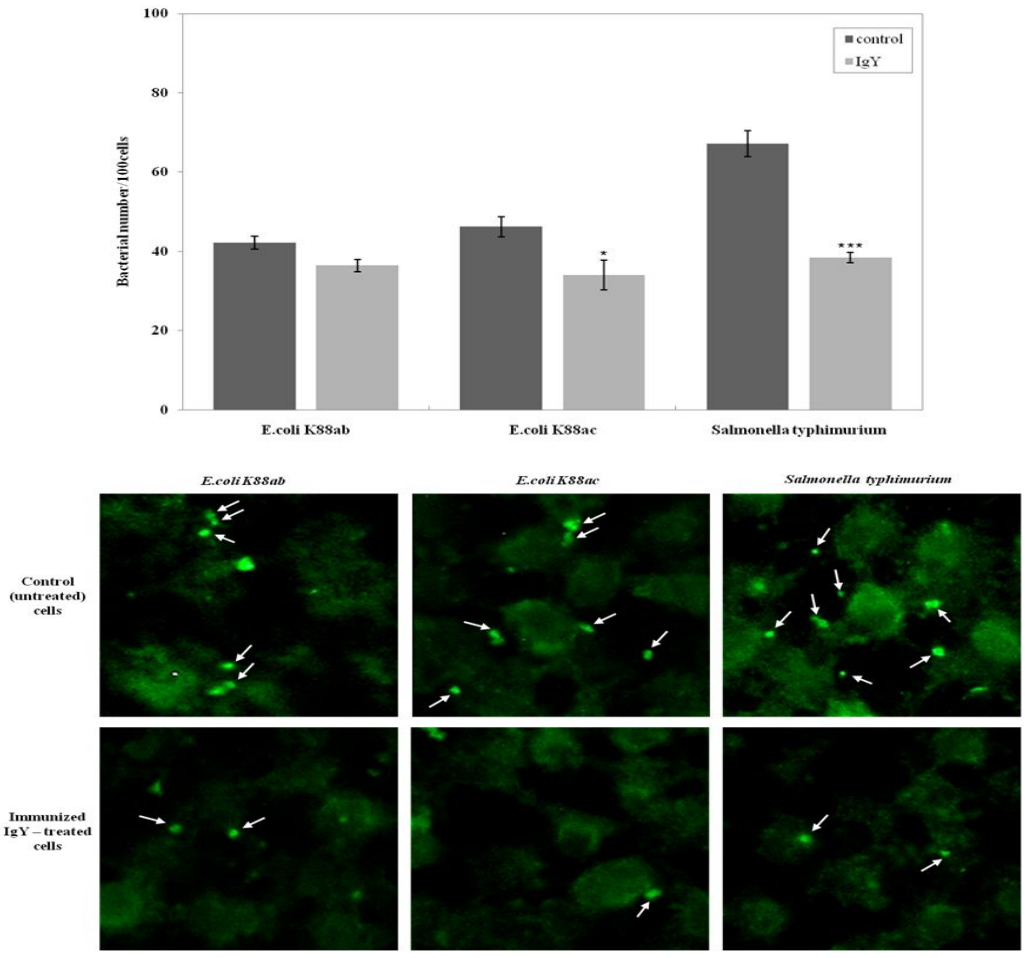
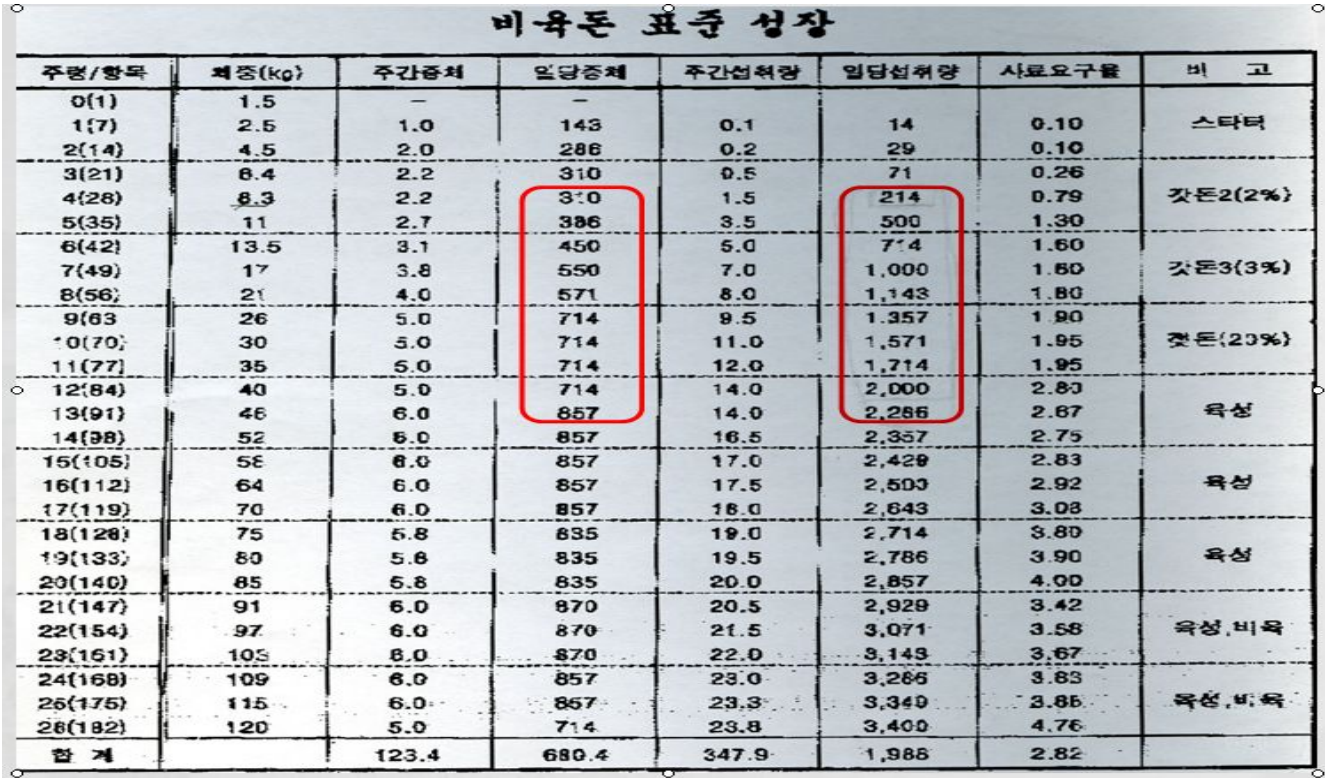


Fig. 19 병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY의 상피세포 부착 억제에 미치는 영향

카. 사료의 경제성평가.

1)사료첨가제의 경제성 (사료첨가제 1% 기준시)

구 분	단가	경 제 성(1마리 사육시)			비 고
		필요양(g)	가격(원)	조성비	
IgY	15,000원/1,000g	222g	3,330	22.2%	
약용자원,바이오밸런스분말등	25,000원/1,000g	518g	12,950원	51.8%	
제경비(이익)	3,320원		3,320원		
사육이익 (폐사율감소)	MSY 약 15.2에서 21이상으로 증가				
사료요구율감소	21,6% 이상				
1% 사료 첨가제 사용시 비용 합계	▷ 돼지 8주 평균 사료섭취량: 약 74.814Kg 1%사료첨가제 필요량(74.8Kg의 1%) 741g =**19,600원** ▷돼지 4주 평균 사료섭취량: 약 37.400Kg 1%사료첨가제 필요량 370g =**9,800원**				본연구에 의하면 이유후 4 주간에도 효과가 우수하였음
비 용 합 계	▷폐사율감소: MSY 증가 15.2에서 21이상)로 인한 출하두수 증가로인한 수익 ▷사료요구율감소 ▷돼지110Kg 출하시: 지육 약 76% ⇒4,500원 /Kg⇒83.6Kg X 4,500원 ⇒376,200원 (원가 280,000원: 사료비용 54.9%:151,200원 제비용 45.1%:128,800원) ⇒96,200원/1두수 출하시 예상수익 ▶본 사료첨가제 사용시 **MSY 증가:** ⇒ MSY 약 15.2에서 21이상으로 ▶사료요구율감소등으로 96,200원보다 증폭된 수익예상				돼지의 출하가격은 경제여건에 따라 변동이 있을수 있음



비육돈 표준 성장

주령/항목	체중(kg)	주간증체	일당증체	주간섭취량	일당섭취량	사료요구율	비 고
0(1)	1.5	–	–				
1(7)	2.5	1.0	143	0.1	14	0.10	스타터
2(14)	4.5	2.0	286	0.2	29	0.10	
3(21)	6.4	2.2	310	0.5	71	0.26	
4(28)	8.3	2.2	310	1.5	214	0.79	깃돈2(2%)
5(35)	11	2.7	386	3.5	500	1.30	
6(42)	13.5	3.1	450	5.0	714	1.60	
7(49)	17	3.8	550	7.0	1,000	1.60	깃돈3(3%)
8(56)	21	4.0	571	8.0	1,143	1.80	
9(63	26	5.0	714	9.5	1,357	1.90	
10(70)	30	5.0	714	11.0	1,571	1.95	깃돈(20%)
11(77)	35	5.0	714	12.0	1,714	1.95	
12(84)	40	5.0	714	14.0	2,000	2.80	
13(91)	46	6.0	857	14.0	2,286	2.67	육성
14(98)	52	6.0	857	16.5	2,357	2.75	
15(105)	58	6.0	857	17.0	2,429	2.83	
16(112)	64	6.0	857	17.5	2,500	2.92	육성
17(119)	70	6.0	857	18.0	2,643	3.08	
18(126)	75	5.8	835	19.0	2,714	3.80	
19(133)	80	5.8	835	19.5	2,786	3.90	육성
20(140)	85	5.8	835	20.0	2,857	4.00	
21(147)	91	6.0	870	20.5	2,929	3.42	
22(154)	97	6.0	870	21.5	3,071	3.58	육성,비육
23(161)	103	6.0	870	22.0	3,143	3.67	
24(168)	109	6.0	857	23.0	3,286	3.83	
25(175)	115	6.0	857	23.3	3,340	3.85	육성,비육
26(182)	120	5.0	714	23.8	3,400	4.76	
합 계		123.4	680.4	347.9	1,988	2.82	

4.결론

1) 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)잎의 메탄올, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, 물 등의 여러 용매에 의한 원추출물(crude extract)분획을 가지고 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) 와 Xanthine oxidase assay방법을 이용해 항산화기능과 항염증기능을 밝혀낸 바 있다. 한 예로서 물 층을 제외한 천년초(*Opuntia humifusa Raf*)의 모든 용매 분획은 강력한 radical scavenging효과를 나타내었는데, 특히 ethyl acetate분획은 DPPH와 Xanthine oxidase assay에서 각각 IC50이 3.6과 48.2ug mL^{-1} 으로, 다른 분획에 비해 더 높게 나타났다. 게다가 chloroform과 ethyl acetate분획은 항염증효과도 나타내었다.

2)Activity guided fraction평가는 활성성분을 동정하기 위해 실행하였고, 그 결과 2가지 물질 (Quercetin과 Taxifolin)이 ion trap mass spectrophotometer와 ^{13}C-NMR(CD_3OD,75MHz) 분석을 통해 구조적으로 동정되었다. Quercetin과 Taxifolin은 강한 항산화효과를 나타내었으며, Quercetin은 in vitro상에서 훌륭한 항산화 효과를 나타내었다.

이전에 flavonoid family로 실시했던 우리의 실험과 같은 맥락에서 현재의 결과는, Quercetin은 O_2^-, NO^-같은 RNS, $ONOO^-$를 포함하는 ROS의 가장 강력한 scavenginger라는 것을 볼 수 있었다.

3)시험 전기간에 걸쳐 천연소재 사료첨가제 급여 시험군이 비급여 시험군에 비해 유의성이 인정되지 않았으나, 혈중 면역세포의 증가가 다소 높게 나타나 면역세포의 활성이 인정되었

음.

4)병원성 대장균 및 살모넬라 균에 대한 IgY의 항원 반응을 Western blot 방법으로 검토해 본 결과 병원성 대장균의 경우 50-70kDa에서 약 6종의 35-50 kDa에서 약 10종 이상의 강한 반응을 보이는 항원이 검출되었고, 살모넬라 균에 대해서는 35-50 kDa에서 약 5종 이상의 항원과 반응하는 것으로 나타남. 추후 분석을 통해 컨트롤과 다르게 나타나는 항원에 대한 분석을 수행 할 예정임.

5)위 실험에 기초하여 IgY이 숙주상피세포와의 부착에 미치는 영향을 분석하기 위하여 숙주상피세포 (HeLa cell)에 균 부착능력을 평가해 본 결과 IgY 비처리균의 경우 숙주 부착능력이 처리균 보다 살모넬라 균과 병원성 대장균에 대해 각각 42.8%와 26.5%의 증가비율을 보이면서 각 병원성 균에 대하여 IgY가 숙주세포와의 부착을 억제하는 것으로 나타남

6)폐사율감소(MSY 증가 15.2에서 21이상)로 출하두수증가 및 사료요구율감소로 인한 로인한 수익증대가 예상 된다.

제4장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제1절연구평가의 착안점

구분	세부 연구목표	가중치 (%)	평가의 정량적 기준
1차년도	● 천연소재 약용자원의 돼지 사양및 대사체계에 미치는 영향 규명 ● 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명	30	천연소재 자원의 돼지 대사 및 생리활성에 미치는 영향에 대한 분석이 적정하게 이루어 졌는가?
	● 천연소재 약용자원의 돼지 소화기 질병 원인체에 대한 항균효과 검정 ● 난황유래 면역글로부린의 돼지 소화기 질병 원인체에 대한 항균효과 검정	35	천연소재의 항균효과 검정이 적정하게 이루어 졌는가?
	● 천연소재 약용자원및 난황 유래 면역글로부린의 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 유효 항생제 처치시 돼지 혈중 잔류량 측정	35	천연소재의 생체내 잔류 및 생체에 미치는 효과 분석이 적절한가?
2차년도	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 대사체계에 미치는 영향 규명 ● 현장 실험을 통한 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명	35	천연소재의 현장적용 실험에 대한 효과 규명이 유효한가?
	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 항균효과 규명 ● 현장 실험을 통한 면역 글로부린의 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 예방효과 규명	35	천연소재의 현장적용 실험에 대한 효과 규명이 유효한가?
	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원및 난황 유래 면역글로부린의 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 현장 실험을 통한 유효 항생제 처치시 돼지 혈중 잔류량 측정	30	천연소재의 현장적용 실험에 대한 효과 규명이 유효한가?
3차년도	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 대사체계에 미치는 영향 규명 ● 현장 실험을 통한 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명	30	천연소재의 경제성 분석이 유효한가?
	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체 감염시 나타나는 면역 활성능 평가 ● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체 감염시 나타나는 질병 제어기전 해석	30	천연소재의 현장적용시험에 대한 생체활성 효과에 대한 실제적 분석과 경제성 분석이 유효한가?
	● 현장 실험을 통한 천연소재 약용자원및 난황 유래 면역글로부린의 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 현장 실험을 통한 유효 항생제 처치시 돼지 혈중 잔류량 측정 ● 축산물 안전성 및 경제성 평가	40	천연소재의 생체 안전성 및 기존 치료제와의 약효 비교에서 우위에 있으며 경제적 가치가 있는가?

제2절 연구목표달성도

세부과제명	연구수행내용	구체적인내용	달성도
천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 돼지 생체 내 조절물질에 대한 사양및 이화학적 검정	● 천연소재 약용자원의 돼지 대사체계에 미치는 영향 규명 ● 난황유래 면역글로부린의 돼지 생체내 생리 활성에 미치는 영향 규명	**1)사료첨가제제조기법 및 조성** ①황금, 삼백초의 항균성분 및 홍화 및 아 이오 밸랜스 전해질이 포함된 사료첨가제 의 제조 **2) 사양 및 화학적 연구** 사양관련: 증체량, 폐사율, 육성율, 사료효율 ② 돼지 육질 관련: -수분, 회분, 조단백, 조지방, 콜레스테롤의 변화 - 지방산 및 아미노산의조성 ③ 단백질발현에 미치는 영향 ④ 안전성평가 ⑤ 소화기 장관에 미치는 영향 ⑥ 천연소재 안전성실험	100%
천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 항균효과 및 질병 제어기전 규명	● 천연소재 약용자원의 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 항균효과 규명 ● 면역 글로 부린의 돼지 소화기성 질병 원인체에 대한 예방효과 규명	**1) 효능평가** ①시험돈군의 분변 중 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라감염증; *Salmonells* spp.) 분리 빈도 조사: 황금, 삼백초및 홍화 등이 포함된 사료첨가제를 급여 실험할 돈군의 분변 재료로부터 이전의 방법에 의해서 돼지 소화기질병 보유 조사. ②황금, 삼백초 홍화, IgY가 포함된 사료첨가제 투여돈군의 분변 중 돼지소화기질병(대장균증: *E. coli*, 살모넬라감염증; *Salmonells* spp.) 원인체 분 ③황금, 삼백초 및 홍화 등이 포함된 사료첨가제 투여돈군에 대한 감염증 발생 및 폐사률 조사 ③황금, 삼백초 및 홍화 등이 포함된 사료첨가제 투여돈군에 대한 감염증 발생 및 폐사률 조사 ④감염, 폐사돈의 분변 및 장기로부터 접종균의 분리 동정 및 숙주의 면역 활성 조사 ⑤이상의 야외시험결과를 대조군과 비교분석하여 사료첨가제의 투여 효능을 평가 한다.	100%
천연소재 약용자원, 다병원체 예방용 난황항체와 바이오 밸런스 유지물질의 현장 적용을 위한 작용기작 및 동물 실험	● 삼백초, 어성초 및 바이오 밸런스 물질의 동물 면역증강 효과 ● 삼백초, 어성초 및 바이오 밸런스 물질의 혈행개선을 위한 동물적용 연구	①삼백초, 어성초 및 바이오밸런스 물질의 물 면역증강 효과 ②삼백초, 어성초 및 바이오밸런스 물질의 혈행개선을 위한 동물적용 연구	100%

제3절 관련분야의 기술발전의 기여도

(1) 기술적 측면

□ **HDL의 증가 및 LDL감소 돈육생산**을 위한 사료 첨가제 개발

□ 보수력 및 연도 등이 향상된 **돈육생산을 위한 사료첨가제 개발**

□ methionie, cysteine 등이 풍부한 돈육 생산

□ **돼지 성장기간동안 돼지 소화기 질병에 대한 항균효과**를 나타낼 수 있는 사료첨가제 개발

□ **사육 생산성 증대 효과**

□ 높은 육질의 돈육 제공

□ 안전 축산물 생산 기술개발을 통한 축산식품 공급

□ 연구개발과 동시에 산업화하여 양돈 농가에 보급하여 **안전성 돼지 생산으로 소득증대**

□ 양돈 농가에 **질병 예방대책 마련**

□ 한방사료첨가제의 개발로 인하여 돼지 사육 농가 가급적 저렴한 가격으로 보급하여 **고품질 돼지를 생산**하여 농가소득을 증대

□ 나아가 **항생제 및 백신을 최소 투여하여 돼지의 축산물안전성을 확보**

□ 품질이 향상된 돼지를 보급함으로써 **국민건강에 기여**

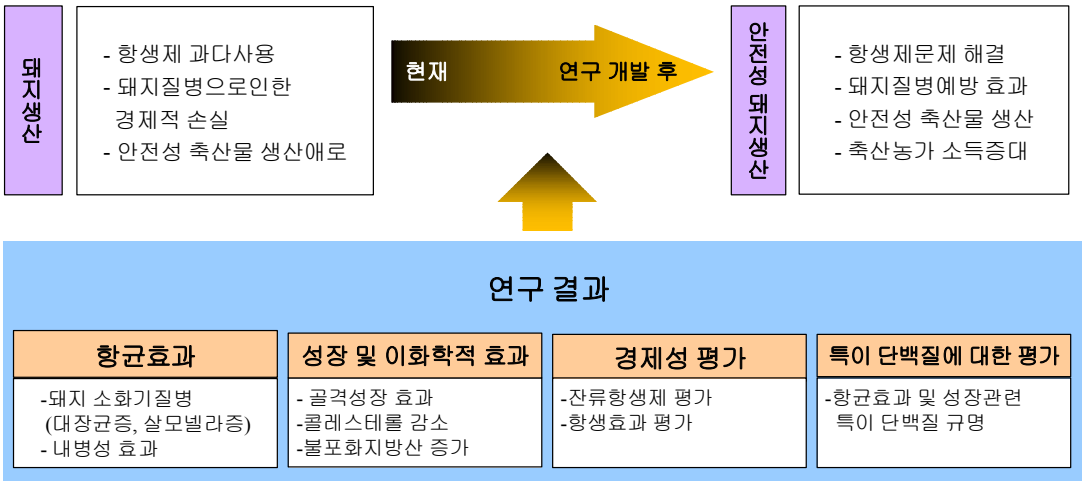
□ 본 과제를 토대로 타 **가축**의 사료첨가제를 개발하여 **농가소득증대 및 축산물 안전성 확보**

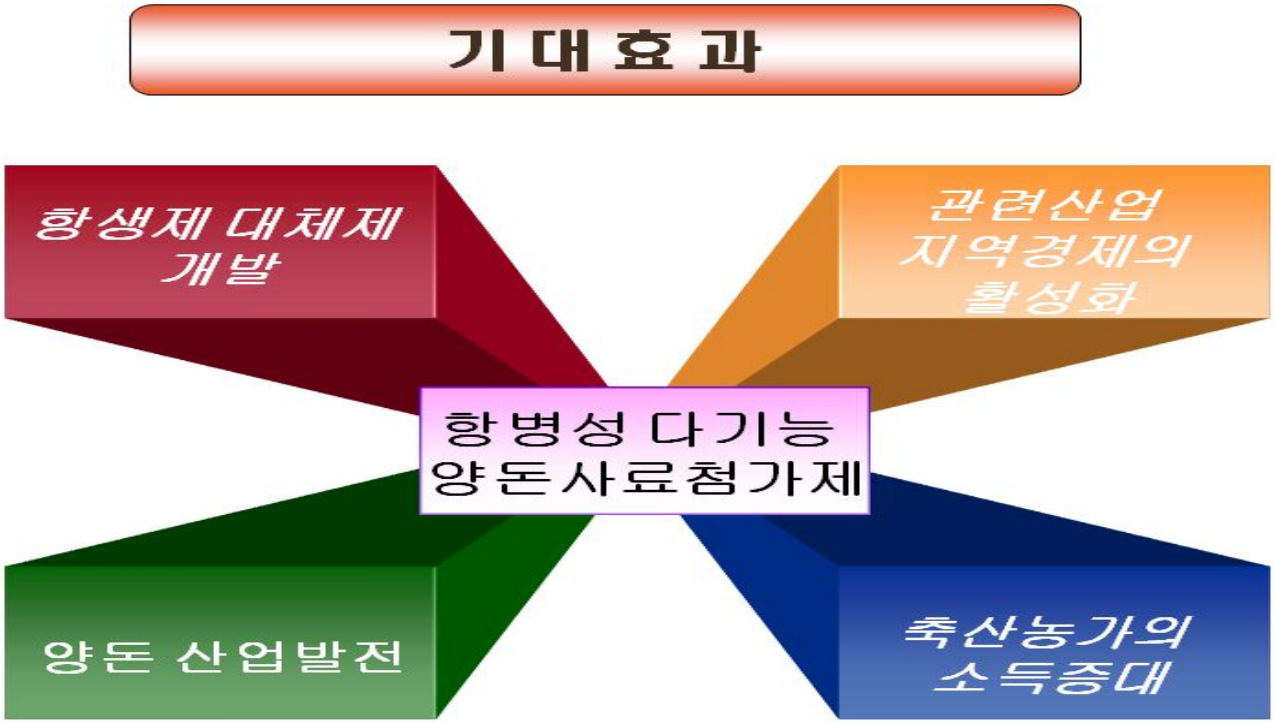
□ 뿐만 아니라 안정성이 확보된 축산물을 수출하여 **해외시장의 개척에도 큰 기여**

□ 도축장에서의 **감염 방지 및 식중독의 근원적 대책** 수립

□ 돈육처리공정에 **HACCP 적용**을 위한 기초자료 확립

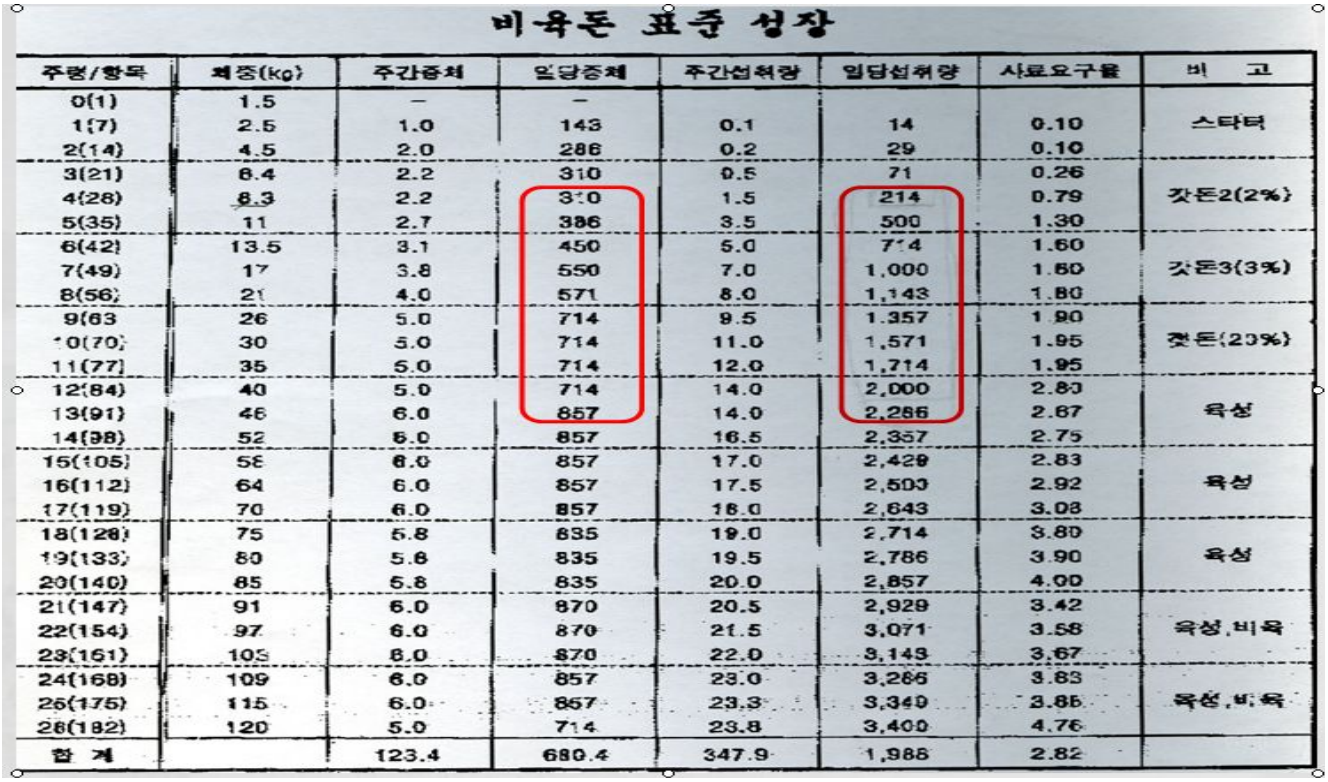
(2) 경제적·산업적 측면


돼지생산
- 항생제 과다사용
- 돼지질병으로인한 경제적 손실
- 안전성 축산물 생산애로
현재
연구 개발 후
안전성 돼지생산
- 항생제문제 해결
- 돼지질병예방 효과
- 안전성 축산물 생산
- 축산농가 소득증대
연구 결과
항균효과
-돼지 소화기질병 (대장균증, 살모넬라증)
- 내병성 효과
성장 및 이화학적 효과
- 골격성장 효과
-콜레스테롤 감소
-불포화지방산 증가
경제성 평가
-잔류항생제 평가
-항생효과 평가
특이 단백질에 대한 평가
-항균효과 및 성장관련 특이 단백질 규명


기 대 효 과
항생제 대체제 개발
관련산업 지역경제의 활성화
항병성 다기능 양돈사료첨가제
양돈 산업발전
축산농가의 소득증대

(3) 사료첨가제의 경제성 (사료첨가제 1% 기준시)

구 분	단가	경 제 성(1마리 사육시)			비 고
		필요양(g)	가격(원)	조성비	
IgY	15,000원/1,000g	222g	3,330	22.2%	
약용자원,바이오밸런스분말등	25,000원/1,000g	518g	12,950원	51.8%	
제경비(이익)	3,320원		3,320원		
사육이익 (폐사율감소)	MSY 약 15.2에서 21이상으로 증가				
사료요구율감소	21,6% 이상				
1% 사료 첨가제 사용시 비용 합계	▷ 돼지 8주 평균 사료섭취량: 약 74.814Kg 1%사료첨가제 필요량(74.8Kg의 1%) 741g =**19,600원** ▷돼지 4주 평균 사료섭취량: 약 37.400Kg 1%사료첨가제 필요량 370g =**9,800원**				본연구에 의하면 이유후 4 주간에도 효과가 우수하였음
비 용 합 계	▷폐사율감소: MSY 증가 15.2에서 21이상)로 인한 출하두수 증가로인한 수익 ▷사료요구율감소 ▷돼지110Kg 출하시: 지육 약 76% ⇒4,500원 /Kg⇒83.6Kg X 4,500원 ⇒376,200원 (원가 280,000원: 사료비용 54.9%:151,200원 제비용 45.1%:128,800원) ⇒96,200원/1두수 출하시 예상수익 ▶본 사료첨가제 사용시 **MSY 증가:** ⇒ MSY 약 15.2에서 21이상으로 ▶사료요구율감소등으로 96,200원보다 증폭된 수익예상				돼지의 출하가격은 경제여건에 따라 변동이 있을수 있음



비육돈 표준 성장

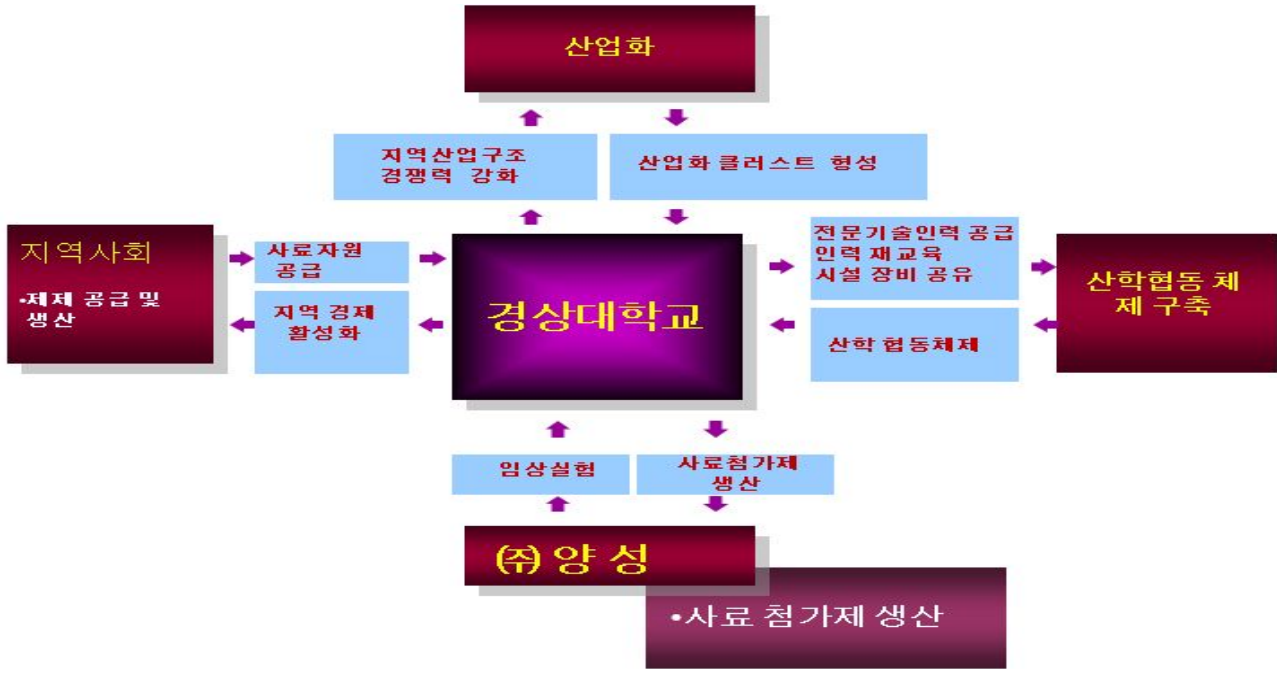
주령/항목	체중(kg)	주간증체	일당증체	주간섭취량	일당섭취량	사료요구율	비 고
0(1)	1.5	–	–				
1(7)	2.5	1.0	143	0.1	14	0.10	스타터
2(14)	4.5	2.0	286	0.2	29	0.10	
3(21)	6.4	2.2	310	0.5	71	0.26	
4(28)	8.3	2.2	310	1.5	214	0.79	갓돈2(2%)
5(35)	11	2.7	386	3.5	500	1.30	
6(42)	13.5	3.1	450	5.0	714	1.60	
7(49)	17	3.8	550	7.0	1,000	1.60	갓돈3(3%)
8(56)	21	4.0	571	8.0	1,143	1.80	
9(63	26	5.0	714	9.5	1,357	1.90	
10(70)	30	5.0	714	11.0	1,571	1.95	갓돈(20%)
11(77)	35	5.0	714	12.0	1,714	1.95	
12(84)	40	5.0	714	14.0	2,000	2.80	
13(91)	46	6.0	857	14.0	2,286	2.67	육성
14(98)	52	6.0	857	16.5	2,357	2.75	
15(105)	58	6.0	857	17.0	2,429	2.83	
16(112)	64	6.0	857	17.5	2,500	2.92	육성
17(119)	70	6.0	857	18.0	2,643	3.08	
18(126)	75	5.8	835	19.0	2,714	3.80	
19(133)	80	5.8	835	19.5	2,786	3.90	육성
20(140)	85	5.8	835	20.0	2,857	4.00	
21(147)	91	6.0	870	20.5	2,929	3.42	
22(154)	97	6.0	870	21.5	3,071	3.58	육성,비육
23(161)	103	6.0	870	22.0	3,143	3.67	
24(168)	109	6.0	857	23.0	3,286	3.83	
25(175)	115	6.0	857	23.3	3,340	3.85	육성,비육
26(182)	120	5.0	714	23.8	3,400	4.76	
합 계		123.4	680.4	347.9	1,988	2.82	

< 돼지의 주령에 따른 평균사료섭취량:자료출처 삼양사료>

제5장 연구개발 성과및 성과의 활용계획

제1절 실용화-산업화계획

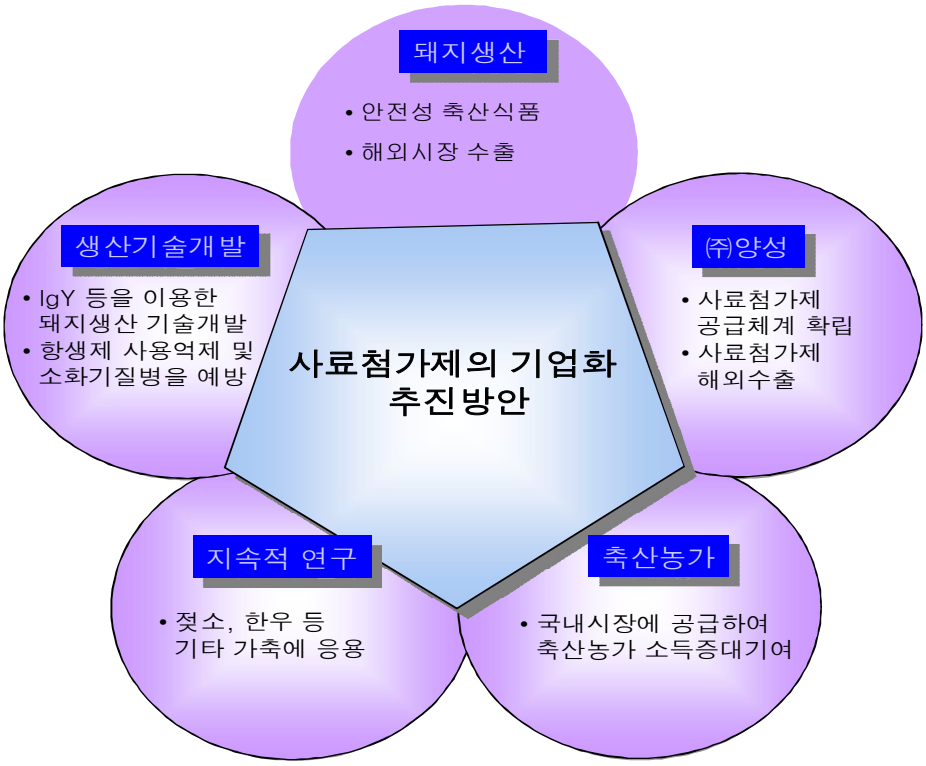
본 연구로 얻은 결과를 토대로 (주)양성과 사료첨가제 판매를위한 사업화를 추진할 예정이다.. 본 연구진은 지속적인 연구로 기술적인 면을 생산자 측에서 사료첨가제를 양돈농장에서는 사료첨가제를 사용한 돼지 생산하는 belt를 형성할 예정이다.



<사료첨가제 실용화,사업화 추진방안>

제 2 절 교육,지도,홍보 기술확산계획

1. 방안



2.연구성과 활용 목표

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1	1	1	1	3차년도 종료후
	달성						

제3절 특허,품종,논문등 지식재산권확보 계획

1. 연구성과

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표								0	0	3
	달성								1	0	5 (학술발표)
2차년도	목표	1							2	2	3
	달성	2	2						8	2	7 (학술발표)
3차년도	목표								1	2	4
	달성								9	0	4 (학술발표)
4차년도	목표										
	달성										
5차년도	목표										
	달성										
계 (1차년도~)	목표								3	4	10
	달성								17	2	16 **(학술발표)**

2. 연구논문

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Persistent Exposure to 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB118) Induces 4 Hyperalphacholesterolemia in Rats		0		Journal of Health Science	55(6)	국외	SCI 급
2010	Hypothyroidism Induced by Polychlorinated Biphenyls and Up-Regulation of Transthyretin		0		Bull Environ Contam Toxicol	84	국외	SCI
2010	Polychlorinated biphenyls have inhibitory effect on testicular steroidogenesis by downregulation of P45017a and P450scc		0		Toxicology and Industrial Health	26(5)	국외	SCI 급
2010	Characterization of a profile of the anthocyanins isolated from Vitis coignetiae Pulliat and their anti-invasive activity on HT-29 human colon cancer cells			0	Food and Chemical Toxicology	48	국외	SCI
2010	Differential Inhibitory Effects of Conjugated Linoleic Acid Isomers on Mouse Forestomach Neoplasia Induced by Benzo(a)pyrene			0	J. Agric. Food Chem	58	국외	SCI
2010	Superior Anticarcinogenic Activity of trans,trans-Conjugated Linoleic Acid in N-Methyl-N-nitrosourea-Induced Rat Mammary Tumorigenesis			0	J. Agric. Food Chem	58	국외	SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Determination of the change of flavonoid components as the defence materials of Citrus unshiu Marc. fruit peel against Penicillium digitatum by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry	0			Food Chemistry	128(2011)	국외	SCI
2010	Evaluation of Antibacterial Effects of a Combination of Coptidis Rhizoma, Lonicerae Flos, Paeonia japonica extracts, and Dioctahedral Smectite Against Salmonella typhimurium in Murine Salmonellosis			0	J. Fd Hyg. Safety	25(1)	국내	학진등재
2010	Antimicrobial Activity of Korean Herbal Complex Extract and Clay Mineral Mixture against Escherichia coli O157:H7			0	J. Fd Hyg. Safety	25(1)	국내	학진등재
2011	Flavonoids Isolated from Korea *Citrus Aurantium L.* Induces G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Human Gastric Cancer AGS Cells.		0		evidence-based Complimentary and Alternative 1 Medicine (eCAM)	2012.2	국외	SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Mechanism of anti-platelet activity of *Oligoporus tephroleucus* oligoporin A: involvement of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and cyclic nucleotide elevation			0	**Platelets**	2011.12	국외	SCI
2011	Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. on lipopolysaccharide -induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF-jB) and mitogen-activated protein signalling pathways		0		Food Chemistry	129 (2011)	국외	SCI
2011	Proteomic Analysis of Effects on Natural Herb Additive Containing Immunoglobulin Yolksac (IgY) in Pigs		0		The American Journal of Chinese Medicine	39(3)	국외	SCI급
2011	Comparative protein profile of Korean ginseng (*PanaxginsengC.A. Meyer*)andIndiangin seng*(Withaniasom nifera)*roots		0		The American Journal of Chinese Medicine	40(1)	국외	SCI급

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Korean Scutellaria baicalensis water extract inhibits cell cycle G1/S transition by suppressing cyclin D1 expression and matrix-metalloproteinase-2 activity in human lung cancer cells		0		Journal of Ethnopharmacology	133(2011)	국외	SCI
2011	Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF-jB) and mitogen-activated protein signalling pathways		0		Food Chemistry	129 (2011)	국외	SCI
2011	Suppressive Effect on Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Mediators by *Citrus* 4 *Aurantium L.* in Macrophage RAW 264.7 Cells via NF-κB Signal Pathway		0		evidence-based Complimentary and Alternative 1 Medicine (eCAM)	1155/2011	국외	SCI
2011	The inhibitory effect of *Opuntia humifusa* Raf. ethyl acetate extract on platelet aggregation		0		Journal of Medicinal Plants Research	5(8)	국외	SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Inhibitory effects of chicken egg yolk antibody (IgY) on invasion and intracellular survival of *Escherichia coli* in macrophage, Journal of veterinary science			0	Journal of veterinary science	2011.11 (submitted)	국내	SCI 급
2011	Anticoccidial effect of supplemental dietary *Galla Rhois* against infection with *Eimeria tenella* in chickens		0		Avian pathology	2011.11 (submitted)	국외	SCI

3. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009	돼지전염성질병예방용조성물	김곤섭외 4인	한국	10-2009-0129419	2010	천연약용식물과 난황황체를 이용한 양돈용사료첨가제 및 그제조방법	김곤섭	한국	10-0962236
2010	닭전염성질병 에방용조성물	김곤섭외 5인	한국	10-2010-0049992	2010	천연약용식물을 이용한 양돈용사료첨가제 및 그제조방법	김곤섭	한국	10-0962235

4. 추가연구 타연구에 활용계획

3년간의 연구로 항질병 강화 천연소재를 활용한 고효율 양돈 사료첨가제 개발관한 연구 등를 수행하였다. 앞으로는 추가적인 항균효과 및 경제성 극대화의 기전를 밝히며,유해미생물관한 연구를 할 수행할 예정이다.

5. 시제품 개발

< IgY가 포함된 사료첨가제 분말>

< IgY가 포함된 사료첨가제 분말>

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

제 1 절 유기축산

우리나라도 '유기축산품질인증제'에 합의하여 올해부터 유기축산을 확대해 갈 계획이다.

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(Califonia 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 농상이사회에서 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 이루어 져야한다.

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. 유기축산체계속의 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 천연제품을 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, 버지니아마이신의사용을 '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 때문이었다. 스웨덴의 경우에서 보듯이 성장촉진제의 금지는 동물의 건강과 복지, 그리고 농장주에게 좋지 만은 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 사용의사람 감염에서의 결과

동물용 사료첨가 성장촉진용 항생제는 주로 그람양성 세균에 효과적이기 때문에 유럽에서 주요 인수공통질병의 원인체인 그람 음성균 살모넬라와 캠필로박터 (*Campylobacter*)의 항생제 감수성은 성장촉진용 항생제 금지에 별 영향을 받지 않을 것이라 예상할 수 있다. (캠필로박터의 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 설폰아마이드에 대한 저항성이 증가했다. 캠필로박터의 경우는 이보다 더 심각하다. 덴마크에서는 지난 수십년간 계속적으로 캠필로박터가 증가했고, 동물보다 사람에서 분리된 캠필로박터의 테트라사이클린, 후로르퀴놀론 (fluoroquinolone)에 대한 내성이 더 심각하다. 이 두 가지 인수공통질병의 지속적 또는 증가된 발병은 사료첨가용 항생제의 사용금지 때문일 수도 있다. 예를 들

어 사료첨가제를 사용하지 않아 닭의 크기가 다양해지고, 이에 따라 도계장에서 소화관파열이나 분변의 유출이 다발하여 살모넬라와 캠필로박터의 오염이 빈번하게 일어나게 된다. 동물에서의 성장촉진제의 사용금지 이후 사람 분변에서의 VRE 분리율은 감소했다. 그럼에도 불구하고 사람에서의 장구균에 의한 감염증은 줄지 않았다. 스칸디나비아반도에서는 1975년이후 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 (벤코마이신 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 되었다. 클로스트리디움에 의한 양의 설사병, 소의 기종저같은 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

양돈산업은 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 조절함으로서 나타나는 효용성이 잘 알려져 있다.

양돈업에서의 항생제의 효과는 아직 논쟁의 여지가 있다. 최근 자료에 따르면 사료첨가용 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 산업동물

의 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 두드러지지는 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 β-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 관련성 과 동물에서 항생제 사용

동물에서 사람으로 항생제 내성 세균 전파의 근거는 주로 살모넬라증과 캠필로박터증 같은

인수공통 전염병이나 장구균과 대장균같은 동물에게는 발병이 되지 않지만 사람에게는 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 캠필로박터, 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 사용함으로 인해 버지니아마이신 내성 장구균이 선택적으로 살아남아서인 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. Arora, K., W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky

2. and S.L. Constant. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory

3. responses. J. Immunol. 175: 517 - -522, 2005.

4. Blecha, F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17: 621 - -633, viii, 2001.

5. Burkey, T.E., K.A. Skjolaas and J.E. Minton. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. J. Anim. Sci. 87: 1493 - -1501, 2009.

6. Cappello, F. HSP60 and HSP10 as diagnostic and prognostic tools in the management of exocervical carcinoma. Gynecol. Oncol. 91: 661, 2003.

7. Dieckgraefe, B.K., W.F. Stenson, J.R. Korzenik, P.E. Swanson and C.A. Harrington. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. Physiol. Genomics 4: 1 - -11, 2000.

8. Fedorka-Cray, P.J., S.C. Whipp, R.E. Isaacson, N. Nord and K. Lager. Transmission of Salmonella typhimurium to swine. Vet. Microbiol. 41: 333 - -344, 1994.

9. Hiramatsu, M., M. Komatsu, Y. Xu and Y. Kasahara. In vitro and in vivo study of antioxidant action in food plant (carthamus tinctorius linne). Pathophysiology 5: 79 - -79, 1998.

10. Hooper, L.V. and J.I. Gordon. Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science 292: 1115 - -1118, 2001.

11. Hwang, J.M., T.H. Tseng, Y.Y. Tsai, H.J. Lee, F.P. Chou, C.J. Wang and C.Y. Chu. Protective effects of baicalein on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rat hepatocytes. J. Biomed. Sci. 12: 389 - -397, 2005.

12. Kim, H., W.J. Kim, S.T. Jeon, E.M. Koh, H.S. Cha, K.S. Ahn and W.H. Lee. Cyclophilin A maycontribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrixdegrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. Clin. Immunol. 116:217 - -224, 2005.

13. Mahajan, S.G. and A.A. Mehta. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of Moringaoleifera Lam. in experimental immune inflammation. J. Ethnopharmacol. 130(1): 183 - -186,2010.

14. Marquardt, R.R., L.Z. Jin, J.W. Kim, L. Fang, A.A. Frohlich and S.K. Baidoo. Passive protectiveeffect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88+ infection inneonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23: 283 - -288, 1999.

15. Martin, J. and J. Dusek. The Baikal scullcap (Scutellaria baicalensis Georgi) a potential source ofnew drugs. Ceska. Slov. Farm. 51: 277 - -283, 2002.

16. McCarthy, F.M., N. Wang, G.B. Magee, B. Nanduri, M.L. Lawrence, E.B. Camon, D.G. Barrell,D.P. Hill, M.E. Dolan, W.P. Williams, D.S. Luthe, S.M. Bridges and S.C. Burgess. AgBase:a functional genomics resource for agriculture. BMC Genomics 7: 229, 2006.

17. Mortz, E., T.N. Krogh, H. Vorum and A. Gorg. Improved silver staining protocols for high sensitivityprotein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis.Proteomics 1: 1359 - -1363, 2001.

18. Mrozikiewicz, P.M., A. Bogacz, M. Karasiewicz, P.L. Mikolajczak, M. Ozarowski, A. Seremak-Mrozikiewicz, B. Czerny, T. Bobkiewicz-Kozlowska and Grzeskowiak E. The effect ofstandardized Echinacea purpurea extract on rat cytochrome P450 expression level. Phytomedicine17: 830 - -833, 2010.

19. Park, S.K., G.J. Oh, H.T. Kim, H.J. Kim, S.G. Chung and E.H. Cho. Analgesic constituent from theHerba of Saururus chinensis (Lour) Baill. Yakhak hoeji 42: 238 - -242,

1998.

20. Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68: 850 - -858, 1996.

21. Sun, H., Q.M. Che, X. Zhao and X.P. Pu. Antifibrotic effects of chronic baicalein administration in a CCl4 liver fibrosis model in rats. Eur. J. Pharmacol. 631: 53 - -60, 2010.

22. Sun, S., Q. Wang, A. Giang, C. Cheng, C. Soo, C.Y. Wang, L.M. Liau and R. Chiu. Knockdown of CypA inhibits interleukin-8 (IL-8) and IL-8-mediated proliferation and tumor growth of glioblastoma cells through down-regulated NF-kappaB. J. Neurooncol. 101(1): 1 - -14, 2011.

23. Sung, S.H. and Y.C. Kim. Hepatoprotective diastereomeric lignans from Saururus chinensis herbs.J. Nat. Prod. 63: 1019 - -1021, 2000.

24. Sung, S.H., E.J. Lee, J.H. Cho, H.S. Kim and Y.C. Kim. Sauchinone, a lignan from Saururus chinensis, attenuates CCl4-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. Biol. Pharm. Bull. 23: 666 - -668, 2000.

25. Umthong, S., S. Puthong and C. Chanchao. Trigona laeviceps propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. Am. J. Chin. Med. 37: 855 - -865, 2009.

26. Wang, L.S., D.Q. Zhao, D.Y. Cheng and Y.H. Liu. Ent-sauchinone from Saururus chinensis. Heterocycles 75: 1241 - -1246, 2008.

27. Wang, C., D. Zhang, G. Li, J. Liu, J. Tian, F. Fu and K. Liu. Neuroprotective effects of safflor yellow B on brain ischemic injury. Exp. Brain Res. 177: 533 - -539, 2007.

28. Yang, J., Y. Cui and M. Kolb. How useful is traditional herbal medicine for pulmonary fibrosis Respirology 14: 1082 - -1091, 2009.

29. Yokoyama, H., R.C. Peralta, R. Diaz, S. Sendo, Y. Ikemori and Y. Kodama. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets. Infect. Immun. 60: 998 - -1007, 1992.

30. Yoon, S.B., Y.J. Lee, S.K. Park, H.C. Kim, H. Bae, H.M. Kim, S.G. Ko, H.Y. Choi, M.S. Oh and WPark. Anti-inflammatory effects of Scutellaria baicalensis water extract on LPS-activatedRAW 264.7 macrophages. J. Ethnopharmacol. 125: 286 - -290, 2009.

31. Yu, M.H., H.G. Im, J.W. Lee, M.H. Bo, H.J. Kim, S.K. Kim, S.K. Chung and I.S. Lee. Effects ofethanol extract from Saururus chinensis (Bour.) Baill on lipid and antioxidant metabolisms inrats fed a high-fat diet. Nat. Prod. Res. 22: 275 - -283, 2008.

32. Yun, Y.R., M.J. Kim, M.J. Kwon, H.J. Kim, Y.B. Song, K.B. Song and Y.O. Song. Lipid-lowering effect of hot water-soluble extracts of Saururus chinensis Bail on rats fed high fat diets. J. Med.Food 10: 316 - -322, 2007.

33. DH Kim, JJ Lim, JJ Lee, HH Chang, DI Jang, SJ Lee, HJ Lee, WG Min, SH Kwon, SH Kim, KY Oh, S Kim, Bacteriocidal effects of ultraviolet irradiation for reducing bovine mastitis derived from environmental contamination J. Environ. Agri. 27(4); 435-440, 2008.

34. GS Kim, DH Kim, JJ Lim, Dy Han, WM Lee, WC Jung, WG Min, CG Won, MH Rhee, HJ Lee, S Kim Biological and antibacterial activities of the natural herb Houttyunia cordata water extract against the intracellular bacterial pathogen Salmonella within the RAW 264.7 macrophage. Biol. Pharm. Bull., 31; 2012-2017, 2008

35. DH Kim, JJ lim, JJ lee, WC jung, HJ shin, HJ lee, GS kim, S, Kim, Antibacterial and therapeutic effects of houttyunia cordata ethanol extract for murine salmonellosis. Korean. J. Environ. Agri. 27; 156-162, 2008.

36. BX Tang, LD Duan, Wang Y, LZ Zhao, YG Yu, XS Li. Shaoyang University (Natural Sciences), 2, 80-81, 2005

37. HM, Lu, YZ Liang, LZ Yi, XJ Wu. Anti-inflammatory effect of Houttuynia cordata

injection. J. Ethnopharmacol.,104, 245-249, 2006.
38. H Lu, WX Liang, Y Zhang. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of Houttuynia THUNB.54,936-40, 2006.
39. M Iqbal, RI Ohen, K Marzouk, SF Liu. Time course of nitric oxide, peroxynitrite, and antioxidants in the endotoxemic heart. Crit. Care. Med., 30, 1291-1296, 2002.
40. D Berendji, V Kolb-Bachofen, KL Meyer, KD Kroncke. Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress. Free Radic. Biol. Med., 27, 773-780, 1999.
41. E Park, S Kum, C Wang, SY Park, BS Kim., G Schuller-Levis. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-alpha secretion in an activated macrophage-like cell line. Am. J. Chin. Med., 33(3), 415-424, 2005.
42. GZ Li, OH Chai, MS Lee, EH Han, HT Kim, CH Song. Inhibitory effects of Houttuynia cordata water extracts on an aphylactic reaction and mast cell activation. .Biol. Pharm. Bull., 28(10), 1864-1868, 2005.
43. BJ Cherayil, D Antos. Inducible nitric oxide synthase and Salmonella infection. Microbes. Infect., 3, 771-776, 2001
44. C Nathan, MU Shiloh. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 8841-8848, 2000.
45. Acuna, U. M., Atha, D. E., Ma, J., Nee, M. H., Kennelly, E. J. (2002) Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother.Res.***16**:63-65
46. Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R., Livrea, M. A. (2002) Antioxidant activities of sicilian prickly pear (Opuntia ficus indica) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J.Agric.Food.Chem.***50**:6895-6901
47. Bwititi, P., Musabayane, C. T., Nhachi, C. F. (2000) Effects of Opuntia megacantha on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. *J.Ethnopharmacol.***69**:247-52.
Carreras, M. C., Franco, M. C., Peralta, J. G., Poderoso, J. J. (2004) Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol.AspectsMed.***25**:125-139
48. Dok-Go, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Lee, E. H., Lee, J., Song, Y. S., Lee, Y. H., Jin, C., Lee, Y. S., Cho, J. (2003) Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from Opuntia ficus-indica var. saboten. *BrainRes.***965**:130-136
49. Gerhauser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauft, J., Liu, G. Y., Sitthimonchai, S., Frank, N. (2003) Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat.Res.***523-524**:163-172
50. Halliwell, B., Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its

mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBSLett.***281**:9-19
51. Hogg, N. (1998) Free radicals in disease. *Semin.Reprod.Endocrinol.***16**:241-248
52. Kim, O. K., Murakami, A., Nakamura, Y., Takeda, N., Yoshizumi, H., Ohigashi, H. (2000) Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. *J.Agric.FoodChem.***48**:1557-63.
53. Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J., Jang, Y. S. (2002) Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of Opuntia ficus-indica var. saboten. *J.Agric.FoodChem.***50**:6490-6496
Park, E. H., Chun, M. J. (2001) Wound healing activity of Opuntia ficus-indica. *Fitoterapia***72**:165-167
54. Park, E. H., Kahng, J. H., Paek, E. A. (1998) Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch.PharmRes.***21**:30-34
55. Pinnell, S. R. (2003) Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J.Am.Acad.Dermatol.***48**:1-19
56. Song, Y. S., Park, E. H., Hur, G. M., Ryu, Y. S., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. M., Jin, C. (2002) Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *CancerLett.***175**:53-61

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.