

최            중  
연 구 보 고 서

한방제(황금, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자,  
방기 등)을 이용한 육계용 사료첨가제 개발

Development of Feed Additive of Broiler Chicks  
from Oriental Herbal Medicine

연구기관

경상대학교 수의과대학

농            립            부



최            중  
연 구 보 고 서

한방제(황금, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자,  
방기 등)을 이용한 육계용 사료첨가제 개발

Development of Feed Additive of Broiler Chicks  
from Oriental Herbal Medicine

연구기관

경상대학교 수의과대학

농            립            부

## 최 종 보 고 서

2000년도 농림 기술 개발사업에 의하여 완료한 한방제(황금, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자, 방기 등)를 이용한 육계용 사료첨가제 개발의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1 매

2002. 7.

주관연구기관 : 경 상 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 곤 섭 (인)

주관연구기관장 : 경상대학교총장 직인

농 립 부 장 관 귀 하

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한방제(황금, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자, 방기 등)을 이용한 육계용 사료첨가제 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 7월 25일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 김 곤 섭

세부연구책임자 : 강 호 조

세부연구책임자 : 강 정 부

세부연구책임자 : 김 곤 섭

연 구 원 : 하 정 기

## 요 약 문

### I. 제 목

한방제(황금, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자, 방기 등)를 이용한 육계용 사료첨가제 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라의 육계용 한방제 사료첨가제에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 특히 *Salmonella* 속균에 대한 경제적 피해 및 안정성에 대한 문제가 심각히 대두되고 있다. *Salmonella* 속균은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*) 등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 주며, 계육 및 계란은 살모넬라 식중독에서 가장 문제시되는 *S. enteritidis*와 *S. typhimurium*의 주된 오염원으로서 식품위생에서 가장 중요시하고 있다.

1992년 일본 오사카 지방에서 1800여명의 식중독 발생 사건이 있었는데 그 원인은 도시락에 사용된 계란부침에 *S. enteritidis*가 오염된 것으로 판명되었으며, 미국에서는 1985 - 1990년間に *S. enteritidis*에 의한 식중독 사건이 284건 발생하여 47명이 사망하였는데 대부분 계란과 관련된 식품인 것으로 보고되어 있고, 국내에서도 *Salmonella*에 의한 식중독이 전체 식중독 발생중 가장 높은 것으로 보고 되어있다. 더욱이 근래 와서 *S. enteritidis*에 의한 식중독 발생예가 세계적으로 급증하고 있어 이에 대한 예방대책의 중요성이 대두되고 있다. 1992년 영국에서 조사된 산란계에 있어서의 *S. enteritidis*의 분리율은 18.7%이었고, 1998년 국내에서도 도계육에서 2.3%, 장내용물에서 12.8%로 비교적 높은 분리율을 나타내었으며, 분리한 *Salmonella* 균주를 *S. enteritidis*가 12%로서 높은 분리율을 나타내고 있다. 이와 같이 *Salmonella* 속균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다. 더욱이 최근 가격이 저렴한 외국산 냉장 식육류가 수입되는 등 국내시장 점유율이 점차 증가하고 있어 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 *Salmonella* 속균의 오염방지를 위해서는 양계장에서 부터의 근원적인 감소대책이 수립되어야 할 것이다.

근년 양계 사육형태가 대형화됨에 따라 대량 밀집사육으로 인한 살모넬라 감염증이 증가되고, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및 오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다.

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

*Salmonella* 속균의 닭에서의 감소대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast,

mannose 및 formic acid 또는 propionic acid등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며, Salmonella의 편모는 장관내에서 정착 할 수 있는 특이성이 인정됨으로서 백신 및 항 감염증에 관한 연구가 수행되고 있지만 워낙 균종이 많아 백신예방에도 한계가 있다.

이상의 많은 보고를 통해서 볼 때 근래의 Salmonella 속균 감소를 위한 연구방향은 균체의 장관정착을 방지할 수 있는 항병성 사료 및 신기능성 물질 개발에 관심이 집중되고 있어 본 연구자들은 농장에서부터 원천적으로 Salmonella균의 감염을 방지할 수 있는 기술 개발의 필요성을 갖게 된다.

양계산업에서 가장 문제시 되는 것은 Salmonella 감염증을 비롯한 질병발생이다. 이는 생산성을 저하시켜 농가 소득증대에 막대한 지장을 초래할 뿐만 아니라 계육 및 계란에 병원체를 오염시키므로써 고품질의 안전축산물을 생산할 수 없게되어 국내소비를 위축시킬 수 있다.

따라서 농장에서부터 Salmonella 속균 감염증을 근원적으로 억제시켜 안전성이 높은 양질의 계육을 생산하는 것만이 국내 소비를 확대시킬 수 있고, 국내 경쟁력도 높일 수 있을 것이다.

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

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

이처럼 현재 국내 양계 사업의 제반 경쟁력(생산비, 원료비, 사육환경, 수익성 등)이 갈수록 열악, 양계 농가의 소득 증대는 요원하고, 국내 양계시장은 외국산 수입 육계로 대체되는 상황에 까지 놓여 있어 무엇보다 기존 양계 농가의 새로운 사육 기술 개발, 안전 축산물 생산 및 육계의 품질 향상에 경쟁력 있는 새로운 기술 개발이 무엇보다 시급하고 또한 대 정부 차원의 새로운 물질 개발 투자의 인식 전환 역시 시급한 실정이다. 따라서 본 연구는 육계 및 산란계 성장 기간동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 Salmonella 속균을 예방하고, 동시에 고품질 안전성 양계 식품을 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여 할 수 있는 한방사료 첨가제를 개발하고자 본 실험을 수행하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발사업 목표

본 연구는 한방사료첨가제를 이용하여 육계에 미치는 이화학적 효과, Salmonella 속균의 방제효과 및 면역활성도에 미치는 영향을 연구하여 한방사료첨가제를 개발하고 산업화 하고자 한다.

#### 2. 연구내용 및 범위

##### 가. 한방사료 첨가제의 Salmonella 및 S. enteritidis에 대한 방제 효과

- 1) 첨가농도별 항균성 시험
- 2) 혈청형별 항균시험
- 3) 시험계균의 분변중 Salmonella분리
- 4) 맹장내용물중 집중균의 수적변동 조사
- 5) 맹장내용의 양성계수 측정
- 6) 간장 및 비장의 양성계수 측정
- 7) 전자현미경에 의한 장관 정착확인
- 8) 시험계균의 분변중 분리빈도 조사
- 9) 한방사료첨가제 물질투여계균의 분변중 Salmonella분리빈도 조사
- 10) 한방사료첨가제 투여계균에 대한 감염증 발생 및 야외시험 조사
- 11) Salmonella균 외의 균에 대한 영향 분석

##### 나. 한방사료첨가제가 육계 계육에 미치는 이화학적 효과 및 경제성

- 1) 지방 조성
- 2) cholesterol 변화
- 3) 단백질 변화
- 4) 아미노산 조성
- 5) 포화 및 불포화지방산의 변화
- 6) 일평균증체량
- 7) 폐사율
- 8) 육성율
- 9) 관능검사
- 10) 사료요구율



다. 한방사료첨가제가 단백질 발현 및 *S. enteritidis*의 proteome에 미치는 영향

1) 혈중 NO측정

2) *S. enteritidis*의 proteome분석 및 한방사료첨가제의 단백질 발현에 관한 연구

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

##### 1. 연구개발 결과

본 연구는 육계농가의 극심한 피해와 식중독 원인균인 *Salmonella enteritidis*를 예방하고 고부가가치와 안전성있는 육계를 생산하기 위한 한방사료첨가제를 개발하고자 시도되었다.

가. 한방사료 첨가제의 *Salmonella* spp. 및 *enteritidis*에 대한 방제 효과

한방사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 섞은 후 육계성장기간동안 급여하여 *Salmonella*에 대한 방제효과를 연구하였다. 본 연구에서는 한방첨가제 (oriental herbal medicine feed additives; OHMFA)의 항균성과 broiler 유추에서 *Salmonella enteritidis*의 정착 억제효과를 조사하였다. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*는 0.25%농도의 OHMFA 첨가에 의해서 증식이 억제되었고 *Salmonella* spp 및 *Escherichia coli*는 2.0% 이상에서 억제되었다. 또한 *S. enteritidis*를  $10^7$  CFU/ml 수준으로 접종한 broiler유추에서 1.0%수준의 OHMFA를 급여한 결과 대조구에 비하여 유의적인 증체 효과를 나타내었고 ( $p < 0.05$ ), 감염 균은 7일 이후부터 간, 비장 및 맹장 내용으로부터 감소하기 시작하여 14일 이후에는 거의 분리되지 않았으며 ( $P < 0.005$ ), 혈청 역가는 대조구에 비하여 현저하게 낮게 나타났다. 한편, 본 연구에서 개발한 OHMFA에 대한 야외 적용효과를 검토하기 위하여 1.0 %수준으로 첨가한 사료를 broiler 유추에 급여하고 분변 중 *Salmonella* 분리율, serotype 분포 및 폐사율을 조사하였다.

*Salmonella* 속균의 분리율은 대조구의 24.2 % (347예 중 84예)에 비하여 OHMFA 첨가구는 10.5 % (239예 중 25예)로서 현저하게 낮았다. Serotype의 분포를 조사한 바 대조군의 경우 *S. typhimurium* (65.5 %), *S. enteritidis* (15.5 %) *S. gallinarum* (15.5 %), *S. pullorum* (2.4 %) 및 미분류 (1.2 %)의 5종류가 분리되었고, OHMFA 첨가구는 *S. typhimurium* (40.0 %), *S. enteritidis* (36.0 %), *S. pullorum* (20.0 %) 및 *S. gallinarum* (4.0 %)의 4종류이었다.

시험기간 중 유추의 폐사율은 대조구의 8.0 %에 비하여 OHMFA 첨가구는 5.1 %로서 현저하게 낮았고, 실험기간 중 폐사한 broiler 유추의 장기 및 분변에서 *Salmonella* 속균을 분리한 바 대조구는 10수 중 1수의 간 및 비장에서, 그리고 2수의 맹장에서

분리되었으나 첨가구는 7수 중 1예도 균이 분리되지 않았다.

한편, 본 연구에서 개발한 OHMFA에 대한 야외 적용효과를 검토하기 위하여 1.0 %수준으로 첨가한 사료를 broiler 유추에 급여하고 분변 중 *Salmonella* 분리율, serotype 분포 및 폐사율을 조사하였다.

*Salmonella* 속균의 분리율은 대조구의 24.2 % (347예 중 84예)에 비하여 OHMFA 첨가구는 10.5 % (239예 중 25예)로서 현저하게 낮았다. Serotype의 분포를 조사한 바 대조군의 경우 *S. typhimurium* (65.5 %), *S. enteritidis* (15.5 %) *S. gallinarum* (15.5 %), *S. pullorum* (2.4 %) 및 미분류 (1.2 %)의 5종류가 분리되었고, OHMFA 첨가구는 *S. typhimurium* (40.0 %), *S. enteritidis* (36.0 %), *S. pullorum* (20.0 %) 및 *S. gallinarum* (4.0 %)의 4종류이었다.

시험기간 중 유추의 폐사율은 대조구의 8.0 %에 비하여 OHMFA 첨가구는 5.1 %로서 현저하게 낮았고, 실험기간 중 폐사한 broiler 유추의 장기 및 분변에서 *Salmonella* 속균을 분리한 바 대조구는 10수 중 1수의 간 및 비장에서, 그리고 2수의 맹장에서 분리되었으나 첨가구는 7수 중 1예도 균이 분리되지 않았다.

#### 나. 한방사료첨가제가 육계 계속에 미치는 이화학적 효과 및 경제성

6가지의 한방제(황금10%, 석장포15%, 어성초10%, 홍화30%, 구기자10%, 방기10%, 기타15%)가 포함된 한방사료첨가제를 사료에 1%되게 하여 균질하게 섞어 육계의 성장기간 32일동안 급여하여 육계사양 및 계속의 이화학적 변화를 연구한 결과 사양면에서는 1%사료를 급여한 군에서 평균체중(+0.04kg) 및 육성률의 증가(+4%), 폐사율(-3%) 및 사료요구율(-0.09%)의 감소를 보였다. 계속에 미치는 이화학적 변화는 육질의 redness의 증가(2.64±1.37→3.38±0.46), 조지방(12.43±0.68→8.93±0.56) 및 콜레스테롤(69.6±1.10mg→61.2±0.96mg/100g)감소, 불포화지방산의 증가(62.75±0.87→63.53±0.92)와 포화지방산의 감소(37.25±0.87→36.47±0.92)가 나타났다. 관능검사에 있어서는 대조군에 비하여 다즙성의 증가(6.00→7.56), 연도의 증가(6.22→7.89), 종합적 기호도증가(6.33→7.78)증가를 나타내었다.

#### 다. 한방사료첨가제가 단백질 발현 및 *S. enteritidis*의 proteome에 미치는 영향

6가지의 한방제가 포함된 한방사료첨가제를 1%되게하여 육계성장기간동안 급여하여 한방사료첨가제의 체내 면역활성도를 평가하였다. microplate assay기법에 의한 nitric oxid의 농도는 1%한방사료첨가제군에서 대조군보다 증가하였고 2차원적 전기영동법에 의한 *S. enteritidis*의 표준균주와 야외균주를 조사한 결과 각 428, 422의 spot이 관찰되었다. 또한 한방사료첨가제의 단백질발현에서는 1%한방사료첨가제군이 대조군에서는 나타나지않는 3개의 spot이 발현되었다(spot 1 pI : 4.45 M/W :

43.94kd, spot 2 pI : 4.62 M/W : 43.79kd, spot 3 pI: 4.81 M/W : 33.31kd).

## 2. 활용에 대한 건의

한방사료첨가제(황금, 석장포, 어성초, 홍화, 구기자, 방기 등) 개발연구는 최근 발효된 CODEX의 유기축산지침의 한부분에도 부흥 할 수 있으며 한방사료첨가제의 사용으로 인하여 육계농가에는 소득증대, 소비자에게는 안정성 축산식품생산에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

## SUMMARY

### I. Title

Development of feed additive of broiler chicks from oriental herbal medicine

### II. Purpose and Significance of Research

This study was tried for the development of feed additive of broiler chicks from oriental herbal medicine containing such as *Scutellariae radix*, *Acori Graminei rhizoma*, *Houttuyniae herba*, *Carthami flos*, *Lgcii fructus*, *Stephaniae tetrandrae radix*.

*Salmonella enteritidis* is the cause of the food-borne salmonellosis pandemic in humans and chicks. The infection route to human involves colonization, survival and multiplication in the alimentary tract.

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

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

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

In view of the current increased public awareness of *Salmonella* food poisoning, the acceptance of oriental herbal medicine will probably increase, one additional aspect of the use of feed additives of oriental herbal medicines against *Salmonella* relates to their ability to colonize the alimentary tract (cecum). If feed additives of oriental herbal medicines are fed to broiler chicks, they will prevent colonization in the alimentary tract (cecum). This protection would then be obtained by this colonization-inhibition effect followed by the development of normal immunity. Therefore, administration of oriental herbal medicines in feed can produce a degree of protection against salmonellosis, positive effect of growth performance physical chemical properties in broiler chicks.

The overall objectives of the study were to develop a feed additive containing 6 oriental herbal medicines such as *Scutellariae radix*, *Acori graminei rhizoma*,

Houttuyniae herba, Carthami flos, Lgcii fructus, Stephaniae tetrandrae radix

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

#### **1. Effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on prevention effect of Salmonella in broiler chicks**

A study was conducted to investigate the effect of 1 % dietary supplementation of feed additives containing oriental herbal medicine such as Scutellariae radix, Acori graminei rhizoma, Houttuyniae herba, Carthami flos, Lgcii fructus, Stephaniae tetrandrae radix on Salmonella prevention and some organism. In this study, antibacterial activity of the chicken feed supplemented with a different concentration of feed additive of oriental herbal medicine was tested for some organisms and its preventive effect on the colonization of Salmonella enteritidis in the broiler chicks.

#### **2. Effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on growth performance physcial chemical properties in broiler chicks.**

This trail was aimed to investigate the effect of 1 % dietary supplementation of feed additives containing 6 oriental herbal medicines such as Scutellariae radix, Acori graminei rhizoma, Houttuyniae herba, Carthami flos, Lgcii fructus, Stephaniae tetrandrae radix on feed gain , incidence of death, weight gain, crude fat, cholesterol, sensory test, composition of fatty acids and amino acids in broiler chicks.

#### **3. Effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on protein expression, analysis of S. enteritidis by proteomics and nitric oxide in broiler chicks.**

Proteomics traditionally used the separation power of two-dimensional electrophoresis for the quantitative analysis of protein amount in complex extract. Two-dimensional electrophoresis can separate several hundred to a thousand of proteins in a single procedure with high resolution. Our study were examined to study effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on protein

expression, analysis of *S. enteritidis* by proteomics and nitric oxide in broiler chicks.

#### **IV. Results of Research**

This study was attempted for the development of feed additive from oriental herbal medicines in broiler chicks. We conducted experiment to investigate the effect of 1 % dietary supplementation of feed additives containing oriental herbal medicines such as *Scutellariae radix*, *Acori graminei rhizoma*, *Houttuyniae herba*, *Carthami flos*, *Lycii fructus*, *Stephaniae tetrandrae radix* on growth performance, physicochemical properties, prevention effect of *Salmonella* in broiler chicks.

The results of the study consist of the three main subjects including (1) Effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on prevention effect of *Salmonella* in broiler chicks, (2) Effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on growth performance, physicochemical properties in broiler chicks, (3) Effects of dietary supplementation of oriental herbal medicines on protein expression, analysis of *S. enteritidis* by proteome in broiler chicks.

First, to study the effect of 1 % dietary supplementation of feed additives containing 6 oriental herbal medicines on minimum inhibitory concentration on *Salmonella* spp. and other pathogen, occurrence of diarrhea, weight change, isolation of *S. enteritidis* from cecum, recovery of serogroups, identification of isolates and incidence were examined.

In this study, antibacterial activity of the chicken feed supplemented with a different concentration of oriental herbal medicine feed additives (OHMFA) extract was tested for some organisms and its preventive effect on the colonization of *Salmonella enteritidis* (SE) in broiler chickens was examined. The growth of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* was inhibited extraordinarily on the feed additived 0.25 % of OHMFA, and *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 was inhibited on the feed contained 2.0 % level. The broiler chickens feed a forage additived 1.0 % level of OHMFA after inoculation of a  $10^7$  CFU/ml of SE were increased in weight than the chicken feed forage did not additived OHMFA. The incidence of SE in liver, spleen and cecum of the chickens feed forage additived OHMFA was decreased after 7 days of postinfection and the SE was not isolated from the organs of the chickens after 14 days of postinfection. Serum antibody titers of the chickens was lowered than the control group. On the other hand, the preventive effect on *Salmonella* spp and

incidence of death during 32 days experiment with feed additive 1.0 % of level of OHMFA in 4,000 broiler chickens was investigated, and Salmonella isolates were examined for serotypes. The isolation rate of Salmonella spp (10.5 %) in feces samples of the chickens fed with OHMFA was lower than 24.2 % of control group.

A total of 109 Salmonella spp, belonging to five different serotypes, were isolated from poultry broiler farms. Among the serotypes isolated, Salmonella (S) typhimurium was the most prevalent (59.6 %), the next most common serotypes were S. enteritidis (20.2 %), S. gallinarum (12.8 %), S. pullorum (6.4 %) and others (0.9 %).

In incidence of death in chickens during experiment, the death rate of broiler chickens (5.1 %) in OHMFA group was lower than 8.0 % of control group. The incidence of Salmonella spp in chickens died in OHMFA group were detected from 1 chicken in liver and spleen, 3 chickens in cecum, while no organism was detected from the organs of the chickens in control group.

Second, to evaluate the effect of 1 % dietary supplementation of feed additive containing oriental herbal medicines such as Scutellariae radix, Acori graminei rhizoma, Houttuyniae herba, Carthami flos, Lycii fructus, Stephaniae tetrandrae radix on feed gain, death rate, meat color, pH, weight gain, crude fat, cholesterol, sensory test, composition of fatty acids and amino acids in broiler chicks were conducted.

From results of this study, our experiments demonstrated that the broiler chicks fed 1% feed additive decreased feed gain, death rates compared with control treatment. Weight gain, meat color, sensory test were higher in the 1% supplemented group than control. The supplementation of 1% feed additive increased unsaturated fatty acid, and reduced crude fat, cholesterol in the broiler chicks compared with those of control.

Third, studies on the analysis of S. enteritidis isolates and standard strain by proteomics were conducted, and the comparison of a possible spots involved in immune response were examined using proteome. The comparison of protein expression between control and 1 % dietary supplementation group were showed that dietary supplementation of feed additives group appeared three spots to stimulate the immune system of body in the broiler chicks. On the images of two-dimensional electrophoresis (2-DE), differences were observed between two groups and three bigger protein spots were observed from 1% supplemented group compared with the control treatment. It was able to identify protein spots,

having pI from 4 to 5 and molecular weight range from 33 to 44 kDa, involved in immune response, . The transformation of protein spots was suggested that these protein spots were involved in immune system, in addition oriental herbal medicines might induce the formation of factors and activate these factors on immune system. In comparison of the spot of *S. enteritidis* isolates and standard strain by proteomics, spots of *S. enteritidis* isolates could be observed to 422 and standard strain to 428.

In conclusion, results of the experiments suggest that feed additive containing oriental herbal medicines such as *Scutellariae radix*(10%), *Acori graminei rhizoma*(15%), *Houttuyniae herba*(10%), *Carthami flos*(30%), *Lgicii fructus*(10%), *Stephaniae tetrandrae radix*(10%), Etc.(15%) were effective in improving broiler chicks on growth performance, physical-chemical properties, prevention of *Salmonella*, and may increase economic return.



## CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	15
Section 1. Objective of research development.....	15
Section 2. The Significance of the study.....	18
Section 3. The scope of the study.....	19
Section 4. The process system of the study.....	21
<b>Chapter 2. Research Background</b> .....	22
Section 1. The trend of domestic and foreign study.....	22
Section 2. Relative importance of the study .....	23
<b>Chapter 3. Contents and Results</b> .....	26
Section 1. Introduction.....	26
Section 2. Material and Method.....	26
Section 3. Contents & Results.....	30
<b>Chapter 4. Contribution</b> .....	74
Section 1. The pointed aimed.....	74
Section 2. Progress of the study.....	75
Section 3. Contribution.....	76
<b>Chapter 5. Usefulness of the Results</b> .....	77
Section 1. Application of the results.....	77
Section 2. The industry of the results.....	77
<b>Chapter6. Information on foreign biotechnology</b> .....	78
<b>Chapter 7. References</b> .....	81

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	15
제 1 절 연구개발의 목적.....	15
제 2 절 필요성.....	18
제 3 절 연구범위.....	19
제 4 절 연구개발 추진체계.....	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	22
제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황.....	22
제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치.....	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	26
제 1 절 이론적 근거.....	26
제 2 절 실험적 접근방법.....	26
제 3 절 연구내용 및 결과.....	30
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야의 기여도.....	74
제 1 절 연구평가의 착안점.....	74
제 2 절 연구목표 달성도.....	75
제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도.....	76
제5 장 연구개발 결과의 활용계획.....	77
제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용.....	77
제 2 절 기업화 추진방안.....	77
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	78
제 7 장 참고문헌.....	81

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 연구개발의 필요성

우리 나라 국가 전반의 산업이 침체되면서 축산업계도 심각한 불황에 시달리고 있다. 작년 축산물의 전면 개방이 이루어진 후 생산과 유통 기반이 취약하고 가격과 품질 면에서 외국산 축산물보다 열등한 위치에 처해 있는 국내산 축산물은 수입축산물과의 경쟁에서 탈락될 위기에 놓여 있으며 이는 국내 축산업의 몰락으로까지 치달을 수도 있다.

축산물의 한 분야인 양계 시장도 많은 어려움에 봉착하고 있다. 특히 양계 산물의 경우 달걀 및 닭고기의 가격 진폭이 심하면서 유통 구조가 불안정하고, 또 일반적으로 양계 생산물인 계란이나 육계 가격을 생산 농가에서 마음대로 조정할수 없기 때문에 불황의 골은 더욱 깊다고 하겠다. 양계 산물이 전면 수입 개방된 가운데 외국산 양계 산물의 수입이 급격히 증가하고 있으며 환율의 폭등으로 인한 사료값 인상 및 동물용 의약품까지 인상되는 등 양계 농가의 수익성이 줄어들어 아예 생업을 포기하려는 농가까지 나타나고 있다.

현재 국내 양계 산업 동향을 살펴보면 14개 시도의 (1.경기,2.충남,3.전남,4.충북,5.경북,6.경남,7.제주순)20만 농가에서 연간 약 4억수(60만톤)의 육계를 사육,생산,약 1조원 이상의 시장을 형성하고 있으나 이 중 30-40%인 약 1억4천-1억5천만수/년간 는 국내 식품 관련 대기업인 (주)하림(8,000만수),해표푸드서비스(영육농산:3,500만수),(주)대상(미원 매니커:2,500만수)의 계열화 농장에서 연간 계약 재배로 생산, 공급되고 있는 실정이며 특히 양계 사업의 생산비 중 사료 비가 원가의 55-60%를 점하고 있어 무엇보다 큰비중을 차지하고 있고 또한 국내 사료는 원료의 전량을 외국 수입에 의존하고 있어 IMF사태 이후 외국 수입 원료비 인상으로 사료 비가 약 47%인상되어 사육 농가는 물론 국내 양계 산업 전반에 큰 어려움을 겪고 있는 실정이다. 육계 사육환경 역시 대부분 사육 농가 계사 1평당 평균 55-75수의 밀실 사육과 각종환경 오염등으로 폐사율이 평균5-10%이상 되어 예방제, 치료제(항생제)사용 역시 높은 비중을 차지, 사육 농가의 수익성을 저하시키고 있고, 일례로 1만수 이상 사육 농가의 (년간 3회전 생산시)년 평균 소득이 종전 약 1,500만 - 2천만원 수준이었으나, 사료비 47%인상등으로 연간 1천만원 이상의 소득 감소가 예상, 사육을 중단하는 폐업 농가나 전업 농가가 속출하고 있는 심각한 실정이다. 또한 국내에 사육되는 육계의 품질 면(35일 수 평균1.5kg)역시 다량의 항생제 사용으로 항생제 잔류 검사 기준을 초과, 수출계육의 중량(1.8kg/수)미달로 수출은 요원하고, 특히 외국 육계 생산비와 비교시(미국:914

원/kg, 태국: 600원/kg, 중국:580원/kg, 일본:5,951원/kg, 한국:1,400원/kg)일본을 제외한 수출계육의 경쟁력 역시 열악한 실정이다.

한편 Salmonella 속균에 대한 경제적 피해 및 안정성에 대한 문제가 심각히 대두되고 있다. Salmonella 속균은 닭에서 추백리(*S. pullorum*), 닭 티푸스(*S. enteritidis*)등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 주며, 계육 및 계란은 살모넬라 식중독에서 가장 문제시되는 *S. enteritidis*와 *S. typhimurium*의 주된 오염원으로서 식품위생에서 가장 중요시하고 있다.

1992년 일본 오사카 지방에서 1800여명의 식중독 발생 사건이 있었는데 그 원인은 도시락에 사용된 계란부침에 *S. enteritidis*가 오염된 것으로 판명되었으며, 미국에서는 1985 - 1990년간에 *S. enteritidis*에 의한 식중독 사건이 284건 발생하여 47명이 사망하였는데 대부분 계란과 관련된 식품인 것으로 보고되어 있고, 국내에서도 Salmonella에 의한 식중독이 전체 식중독 발생중 가장 높은 것으로 보고 되어있다. 더욱이 근래 와서 *S. enteritidis*에 의한 식중독 발생예가 세계적으로 급증하고 있어 이에 대한 예방대책의 중요성이 대두되고 있다. 1992년 영국에서 조사된 산란계에 있어서의 *S. enteritidis*의 분리율은 18.7%이었고, 1998년 국내에서도 도계육에서 2.3%, 장내용물에서 12.8%로 비교적 높은 분리율을 나타내었으며, 분리한 Salmonella 균주를 *S. enteritidis*가 12%로서 높은 분리율을 나타내고 있다. 이와 같이 Salmonella 속균은 닭의 분변 및 계육에서 높은 분리율을 나타내고 있어 이에 대한 감소 대책이 절실히 요구된다. 더욱이 최근 가격이 저렴한 외국산 냉장 식육류가 수입되는 등 국내시장 점유율이 점차 증가하고 있어 국내산 계육의 안전성 확보는 물론 Salmonella 속균의 오염방지를 위해서는 양계장에서부터의 근원적인 감소대책이 수립되어야 할 것이다.

#### 가. 기술적 측면

- 1) 근년 양계 사육형태가 대형화 됨에 따라 대량 밀집사육으로 인한 살모넬라 감염증이 증가되고, 주된 감염원이 동물성 사료라는 점을 고려할 때 닭에서의 감염 및오염을 방지하는 것은 대단히 어려운 일이다.
- 2) 또한 항균제 사용은 감염증 방지를 일시적으로 나타낼 뿐, 투약중지로 재감염이 문제시 되며, 무분별한 오 남용으로 인한 내성균의 출현증가 뿐만 아니라 계육 및 계란에서 약제 잔류로 사람의 건강을 위협하고 있다.
- 3) Salmonella 속균의 닭에서의 감소대책으로 fracto-oligosaccharide, dried yeast, mannose 및 formic acid 또는 proponic acid등을 급여하여 장관 정착을 감소시켰다는 보고가 있으나, 효율적인 방법이 되지 못하고 있으며,
- 4) Salmonella의 편모는 장관내에서 정착 할 수 있는 특이성이 인정됨으로서 백신 및 항 감염증에 관한 연구가 수행되고 있지만 워낙 균종이 많아 백신예방에도 한계가 있다.

- 5) 또 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 개발된 바 있으나 역시 효율적인 방법이 되지 못하고 있다.
- 6) 이상의 많은 보고를 통해서 볼 때 근래의 Salmonella 속균 감소를 위한 연구방향은 균체의 장관정착을 방지할 수 있는 항병성 사료 및 신기능성 물질 개발에 관심이 집중되고 있어 본 연구자들은 농장에서부터 원천적으로 Salmonella균의 감염을 방지할 수 있는 기술 개발의 필요성을 갖게 된다.

#### 나. 경제적 측면

- 1) 양계산업에서 가장 문제시 되는 것은 Salmonella 감염증을 비롯한 질병발생이다. 이는 생산성을 저하시켜 농가 소득증대에 막대한 지장을 초래할 뿐만 아니라 계육 및 계란에 병원체를 오염시키므로써 고품질의 안전축산물을 생산할 수 없게되어 국내소비를 위축시킬 수 있다.
- 2) 따라서 농장에서부터 Salmonella 속균 감염증을 근원적으로 억제시켜 안전성이 높은 양질의 계육을 생산하는 것만이 국내 소비를 확대시킬 수 있고, 국내 경쟁력도 높일 수 있을 것이다.

#### 다. 사회적 측면

- 1) 고품질의 저렴한 외국산 축산물의 수입이 확대됨에 따라 국민들의 선택폭이 다양해 졌고, 경제성을 감안할 때 국내 양계산업에서도 경쟁력 강화를 위한 대등한 혹은 우위를 점할 수 있는 계속생산이 절실히 요구되며 특히 병원성 미생물 등 안전성이 낮은 상태의 식육생산은 국민의 생명을 위협할 뿐 아니라, 국내 양계 산업에 치명적인 영향을 줄 수 있다.
- 2) 이제 우리국민은 양보다 질적인 면을 중시하고 있으며, 특히 식품의 안전성 문제는 소비자들의 중대한 관심사로 되어 있어, Salmonella 등 각종 위해요소의 오염에 기인한 계육의 비위생적 상태는 사회적인 불안과 산업의 존립을 초래 할 수 있다.  
이처럼 현재 국내 양계 사업의 제반 경쟁력(생산비, 원료비, 사육 환경, 수익성 등)이 갈수록 열약, 양계 농가의 소득 증대는 요원하고, 국내 양계시장은 외국산 수입 육계로 대체되는 상황에 까지 놓여 있어 무엇보다 기존 양계 농가의 새로운 사육 기술 개발, 안전 축산물 생산 및 육계의 품질 향상에 경쟁력 있는 새로운 기술 개발이 무엇보다 시급하고 또한 대 정부 차원의 새로운 물질 개발 투자의 인식 전환 역시 시급한 실정이다. 따라서 본 연구는 육계 및 산란계 성장 기간동안 항병력이 증가되어 기존의 항생제 사용을 억제하며, 또한 Salmonella 속균을 예방하고, 동시에 고품질 안전성 양계 식품을 생산하여, 농가의 소득증대 및 국민보건 향상에 크게 기여 할 수 있는 한방사료첨가제를 개발하고자 본 실험을 수행하였다.

## 제 2 절 필요성

농림부는 그동안 안전하고 환경친화적인 축산업을 지향하는 국제적인 추세에 부응하기 위해 유기축산에 관한 국제지침을 마련하기 위한 Codex 회의에 계속 참여, 국토면적이 협소한 아시아국가들과 연대하여 이번 지침안을 완화하는데 우리의 입장을 최대한 반영했다. 그 결과 가축복지가 보장되는 조건에서 각국의 전통적인 사양체제의 구조가 방목지에 접근하지 못하는 예외규정을 인정하고, 유기축산 예외규정을 오는 2005년까지 한시적으로 적용하는 규정도 삭제했다. 또 유기가축에는 유기농법으로 생산되고 유전자변형이 되지 않은 사료의 급여, 항생제, 번식 및 성장호르몬 사용금지, 휴약기간은 법적 요구기간의 2배를 준수해야 하는데 합의했다. 아울러 각국의 의견이 첨예하게 대립된 비유기가축에서 유기가축으로의 전환기간을 축소 조정하고, 특히 가금육은 당초 10주에서 각국의 인정기관에서 전환기간을 결정할 수 있도록 조정함에 따라 5주만에 생산되는 우리나라 고유식품인 삼계탕용 육계도 유기축산물로 생산할 수 있도록 합의했다. 과학화되고 신기능 물질을 가진 한방사료 첨가제는 체내에서 면역활성증강 및 항생기능을 가지고 있기 때문에 최근 문제시 되는 항생제 과다사용에 대하여 항생제의 양을 줄이면서 육계 및 산란계를 성장시킬 수 있고 육질 또한 organic chicken처럼 고품질의 양계를 생산할 수 있다. 그러나 국·내외적으로 과학화된 천연 복합 한방사료 첨가제가 개발된 경우는 거의 없는 실정이다. 따라서 이 연구의 목표는 한방제(황금, 석창포, 어성초, 홍화, 구기자, 방기 등)를 사용하여 분쇄 농축한 후 고형분을 과립화하여 사료보조제로 만든 후 육계에 적용하여 그 효과(1.Salmonella spp. 및 enteritidis의 방제 효과 2.육계 계육에 미치는 이화학적 효과 3.사료첨가제의 면역활성도 평가)등을 통하여 얻은 성과와 더불어 그 경제성을 조사하고자 한다. 또한 지속적 연구가 수행되어 진다면 양계뿐만 아니라 가축의 대다수에 적용될 수 있는 한방사료첨가제를 개발하여 농가 소득증대 및 축산물 안전성 확보에 주력하고자 한다.

### 제 3 절 연구범위

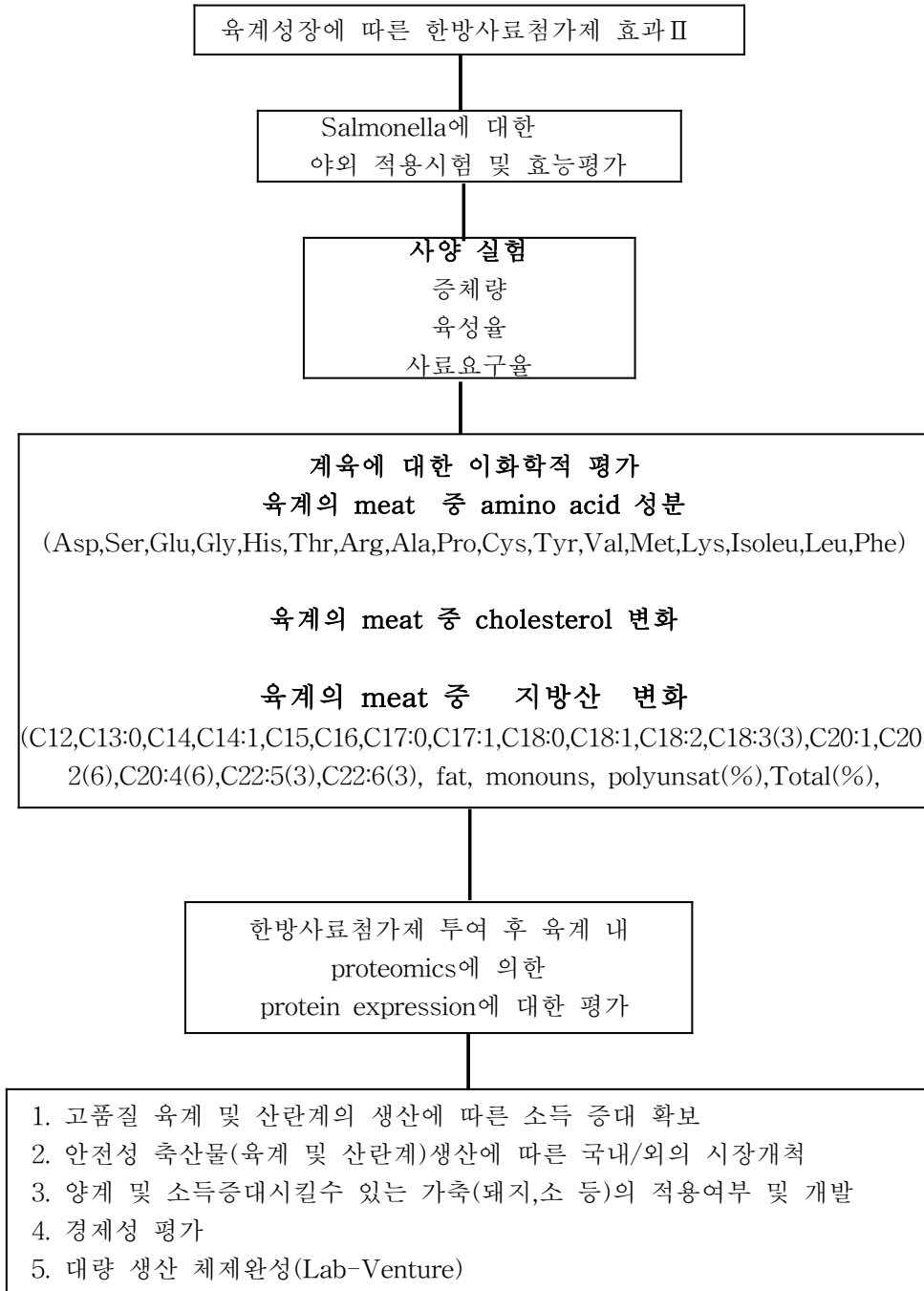
연차별 연구개발 목표와 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
	<p>한방사료 첨가제의 <i>Salmonella</i> spp. 및 <i>enteritidis</i>에 대한 방제 효과 (I)</p>	<p>첨가농도별 항균성 시험                      혈청형별 항균시험                      시험계군의 분변중 <i>Salmonella</i> 분리                      맹장내용물중 접종균의 수적변동 조사                      간장 및 비장의 양성계수 측정                      전자현미경에 의한 장관 정착확인                      기타 유익 미생물에 대한 영향 분석</p>
<p>1차년도 (2000-2001)</p>	<p>한방사료첨가제가 육계 계육에 미치는 이화학적 효과 및 경제성 (I)</p>	<p>지방 (I) 조성                      cholesterol (I) 변화                      단백질 변화 (I)                      아미노산 조성 (I)                      불포화지방산 (I)의 변화                      일평균증체량                      폐사율                      육성율                      관능검사                      사료요구율</p>
	<p>한방사료첨가제가 단백질 발현 및 <i>S. enteritidis</i>의 proteome 분석에 미치는 영향(I)</p>	<p>Proteome에 의한 단백질발현 및 NO 측정</p>

	<p>한방사료 첨가제의 <i>Salmonella</i> spp. 및 <i>enteritidis</i>에 대한 방제 효과 (Ⅱ)</p>	<p>시험계군의 분변중 분리빈도 조사  한방사료첨가제 물질투여계군의 분변중 <i>Salmonella</i> 분리빈도 조사  한방사료첨가제 투여계군에 대한 감염증 발생 및 야외시험 조사  Serotype 분포조사</p>
<p>2차년도 (2001-2002)</p>	<p>한방사료첨가제가 육계 계육에 미치는 이화학적 효과 및 경제성 (Ⅱ)</p>	<p>&lt;농장실험을 중심으로&gt;  근육의 색깔, pH  지방(Ⅱ) 변화  cholesterol(Ⅱ) 변화  단백질 변화(Ⅱ)  아미노산 조성 (Ⅱ)  불포화지방산 변화(Ⅱ)  관능검사 (Ⅱ)  한방사료첨가제의 경제성 분석 및 생산체계 확립</p>
	<p>한방사료첨가제가 단백질 발현 및 <i>S. enteritidis</i>의 proteome 분석에 미치는 영향(Ⅱ)</p>	<p>Proteome에 의한 <i>S. enteritidis</i> 야외주 및 표준균주의 비교  Immunoblotting  Maldi-Tof에 의한 단백질 분석</p>



## 제 4 절 연구개발 추진체계



## 제 2 장 국내 · 외 기술개발현황

### 제 1 절 국내 · 외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 우리나라의 유기농축산업

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

#### 2. 국외 연구동향

##### 가. 미국의 유기농업

1990년에 제정된 미국의 유기식품생산법은 모든 경작물, 야생작물, 가축, 그리고 유기농업이라는 보증을 원하는 모든 농산물은 미국의 유기농업프로그램을 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 2일이내부터 유기적 조건에서 사육되어야 한다.

합성물질이 함유된 사료첨가제나 공급제는 유기축산에 이용할 수 없다. 유기축산체 계속의 가축사료는 초지나 사료작물을 포함하여 전적으로 유기적으로 생산된 것이어야 한다. 생산자는 동물약품, 성장촉진호르몬을 사용할 수 없으며 정상적인 성장과 건강유지에 필요한 양 이상의 사료첨가제나 공급제는 사용하지 않는다. 또 일체의 동물성 사료의 급여나 사료첨가를 해서도 않는다. 예방적 차원에서 동물의 건강유지를 위한 관리를 해야하며 질병이나 기생충에 저항성이 있는 가축의 품종 선택과 환경관리를 해야하며 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 토

의하였으며, 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.

### 3. 앞으로의 전망

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

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

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

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

## 제 2 절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

### 1. 기술적 측면

#### 가. 사육 생산성 증대 효과

국내 사육 농가당 평균 사육 규모는 1회 약 30,000수 규모가 대부분으로 연간 약5~6회 정도로 년평균 90% 육성율로 1회 사육시 사육비 소득은 약700~800 만원(수당 약 300원 기준)으로 연간 농가당 약 3,500만원~4,000만원수준이나 천연 신기능 물질 사용시 추가수익은 약300만원이상 연간1,500~3,000만원)이상으로 순이익율이 약 50%이상 소득을 증대할 수 있고 국내 사육 농가 전체로보면 연간 약 800억 이상의 기대 이익을 창출할 수 있고 또, 국내 계육생산을 약 40%이상 증대 할 수 있는 효과(연간 104만톤 추가 생산 가능)기대된다.

나. 한국산 계육의 해외 수출 가능

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

다. 높은 육질의 계육 제공

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

라. Salmonella 속균의 방제로 고품질의 안전성이 높은 계육 및 계란 생산으로 고부가가치 상품 창출과 함께 질병 감소에 의한 생산성 향상으로 농가소득 증대가 예상된다.

마. 안전 축산물 생산 기술개발을 통한 살모넬라성 식중독 방제로 국민보건 향상 및 건강증진 된다.

2. 경제·산업적 측면

한방사료첨가제의 사용으로 발생하는 경제산업적 측면은 표1과 같다.

표 1. 한방사료첨가제의 사용으로 인한 경제성

사육두수:약30,000수(약35일기준)

구 분	실험 결과	경 제 성(1회 사육시)			년간 5회 사육시 기대 이익
		중 량(1.5kg)	단 가	기대 이익	
폐사 감소 (수수)	153수~310수	230수~465kg	1,500원/kg기준	345,000 ~697,500원	1,725,00 ~3,487,500원
증체 효과 (g)	30~100g/수당	900~3,000kg	1,500원/kg기준	1,350,000 ~4,500,000 원	6,750,000 ~22,500,000 원
사료 절감 (kg)	980~1,80kg	980~1,980kg	380원/kg기준	372,400 ~752,400원	1,862,000 ~3,762,000원
기타 영양제, 항생제 약값	40원~80원/수당	1,200,000 ~2,400,000원		1,200,000 ~2,400,00원	6,000,000 ~41,749,500 원
소 계				3,267,400 ~8,349,900 원	16,337,000 ~41,749,500 원
사료첨가제 사용시 비용 합계	사료첨가제 12kg/10.000수 × @40,000 × 3 = 1,440,000			~1,440,000 원	~7,200,000원
절감 비용 합 계	- 1회 사육시(30,000수 기준) : 평균 3백만원 이상 - 년간 이익(5회 사육 기준) : 평균 1천5백만원 이상 이익.			~1,827,400 원 ~6,909,900 원	~9,137,000원 34,549,900원

## 제 3 장 연구개발내용 및 결과

### 제 1 절 이론적 접근방법

유기 농산물에 이어 농약.항생제.화학비료.유전자 변형작물(GMO)등을 사용하지 않는 사료를 먹인 유기축산물이 시판된다. 농림부는 최근 국제식품규격위원회에 (CODE X)가 유기축산물 국제기준을 공포함에 따라 친환경 농업 육성법 시행 규칙을 마련했다. 시행규칙에 따르면 유기축산물은 전체 사료 중 유기사료가 80%이상 (돼지, 닭) 또는 85%이상 (소, 염소 등 반추동물) 함유된 사료를 먹여 기른 가축에서 얻은 고기, 젓, 알 등으로 한정했다.

유기사료는 농약, 화학비료를 뿌리지 않는 초지에서 생산된 건초와 항생제, 호르몬제, 성장촉진제, 유전자 변형된 콩과 옥수수등이 일절 첨가되지 않는 배합사료를 가리킨다.

국립농산물품질관리원은 이같은 유기사료를 1년 이상 먹인 소의 고기, 6개월 이상 먹인 돼지의 고기, 7주 이상 먹인 닭의 고기, 90일 이상 먹인 젓소의 우유, 5개월 이상 먹인 닭의 계란 등은 유기 축산물로 인증해 판매를 허용하게 한다. 현재 미국, 유럽연합의 경우 전체 축산물 가운데 3%가량이 유기 축산물로 시판되고 있다. 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.

### 제 2 절 실험적 접근방법

#### 1. 연구 목표

본 연구의 목표는 예비실험을 통하여 얻은 결과를 기초로 하여 황금,석창포,어성초,홍화,구기자,방기 등의 약리 효과에 의한 조성 비율을 조절하고 분말로 된 한방사료첨가제를 육계(5,000수)에 적용하여 그 효과(1.육계증체량 2.치사율 3.육성률 4.품질관능검사 5.이화학적 검사 : amino acid, cholesterol, 지방산, 수분, 회분, 조단백, 총지방)를 조사하고, 또한 양계의 Salmonella spp. 특히 S. enteritidis 대한 방제효과 등을 시행하여 얻은 성적과 더불어 그 경제성을 조사하고자 시도되었다.

2. 한방사료첨가제의 주요 성분 및 효과

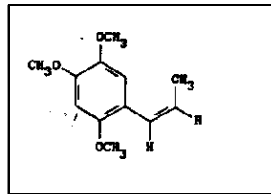
가. 황금 (Scutellariae Radix) : ~10% 비율

- 1) 주요 성분: baicalein, wogonin 등
- 2) 주요 효과: 항생 작용 등

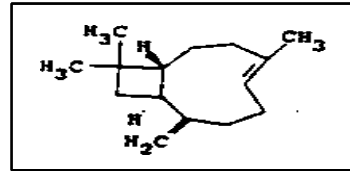


나. 석창포 (Acori Graminei Rhizoma) : ~15% 비율

- 1) 주요 성분:  $\beta$ -asarone ( $C_{12}H_{16}O_3$ )  
caryophyllene ( $C_{15}H_{24}$ )
- 2) 주요 효과: 지방합성 감소, 면역력 증가



$\beta$ -asarone



caryophyllene

다. 어성초 (Houttuyniae Herba) : ~10% 비율

- 1) 주요 성분: Decanoyl Acetaldehyde  
Capric Acid ( $CH_3(CH_2)_8COOH$ )
- 2) 주요 효과: 항균 작용, 지방합성 억제 등



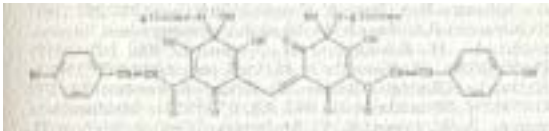
라. 홍화(Carthami Flos): ~30%비율

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

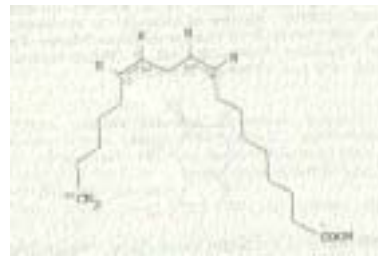
Linoleic acid

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

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



Carthamin



Linoleic acid

마. 구기자(Lgcii Fructus): ~10% 비율

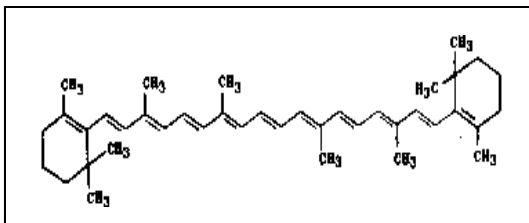
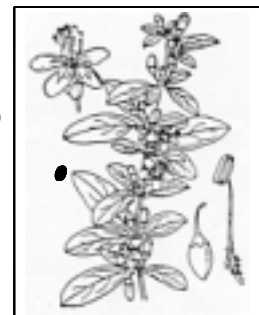
1) 주요성분: carotene ( $C_{40}H_{56}$ )

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

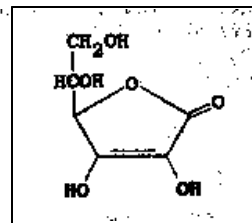
VitB complex 등

VitC

2) 주요효과: Cholesterol 합성억제, 면역력 증가 등



carotene



VitC



바. 방기 (Stephaniae Tetrandrae Radix): ~10% 비율

- 1) 주요성분: Flavonoid , Alkaloid(tetrandrine) 등
- 2) 주요효과: 지질합성억제, 항산화 작용등



사. 기타 :~15% 비율

3. 본연구를 시작하기전에 시행한 예비실험결과

가. 한방사료첨가제(황금, 석창포, 구기자 등을 사료 1kg 당 300g 첨가)가 Salmonella 속균에 미치는 효과

표2. 0.3%한방사료첨가제 첨가사료의 살모넬라 정착억제효과(예비시험)

구분	살모넬라 투여후의 일수		
	1일	7일	14일
무첨가 사료군	5.86±0.65 <sup>a</sup> (5.5) <sup>b</sup>	5.09±0.62 (5.5)	3.63±1.15 (4.5)
한방사료첨가제군	5.55±0.58 (5.5)	2.88±0.94 (4.5)	0* (0.5)

맹장내용물 1g중 살모넬라수(대수치로 표시)

a : 평균치±표준오차(n=5) b : (맹장내용물중 살모넬라 양성계수/검사계수)  
\* : 유의차가 있다.(P> 0.05)

표 3. 0.3% 한방 사료첨가제 첨가사료의 살모넬라 정착 억제효과(예비시험)

구분	살모넬라 투여후의 일수		
	1일	7일	14일
무첨가 사료군	7.3x10 <sup>5</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	4.3x10 <sup>8</sup>
한방사료첨가제군	3.6x10 <sup>5</sup>	7.6x10 <sup>5</sup>	0

맹장내용물 1g 중의 살모넬라수(실수치로 표시)

나. 한방사료첨가제가 육계 성장 및 품질에 미치는 영향

1) 실험디자인: Broiler 6,000수

무투약대조군 : 3,000수

신기능물질투여군 : 3,000수

2) 실험원칙: 육계 사육35일간 음수에 항생제 사용하지 않음

3) 실험결과

가) 사양에 미치는 효과

표 4. 한방사료첨가제의 사양에 미치는 효과

내 용	실 험 군	비 교 군	결 과	비 고
평균 체중	1.82kg	1.65kg	+0.17g	+10.3% 증체
육 성 율	95%	90%	+5%	-5%
폐 사 율	5%	10%	-5%	-5%
사료 요구율	2.05%	2.38%	-0.33%	-13.87%절감
사료 효율	49%	42%	+7%	

나) 품질부분에 미치는 효과

(1) 관능검사 : 색깔, 냄새, 다즙성이 우수하였다.

(2) 지방,cholesterol : 유의성있게 감소하였다.

### 제 3 절 연구내용 및 결과

1. 한방사료 첨가제의 Salmonella spp. 및 enteritidis에 대한 방제 효과

가. 당초추진계획 및 수행내용

당 초 추 진 계 획	수 행 내 용
혈청형별 항균시험	혈청형별 항균시험
감염계군의 분변중 Salmonella spp.의 분리	감염계군의 분변중 Salmonella spp.의 분리
맹장 내용물 중 접종균의 수적 변동 조사	맹장 내용물 중 접종균의 수적 변동 조사
간장 및 비장의 Salmonella 양성 계수 측정	간장 및 비장의 Salmonella 양성 계수 측정
전자현미경(SEM)에 의한 정책확인	전자현미경(SEM)에 의한 정책확인
감염계군의 혈청역가 측정	감염계군의 혈청역가 측정
시험계군의 분변중 Salmonella 분리 빈도 조사	시험계군의 분변중 Salmonella 분리 빈도 조사
Salmonella spp의 분포 조사	Salmonella spp의 분포 조사
Serotype 분포조사	Serotype 분포조사
야외 적용에 대한 폐사율 조사	야외 적용에 대한 폐사율 조사
	기타 유해 미생물에 대한 영향분석

## 나. 연구수행내용

### 1) 연구목표

Salmonella 속균은 닭에서 추백리(*S. pullorum*) 및 닭티푸스(*S. gallinarum*) 등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 일으키며 *S. enteritidis* 와 *S. typhimurium* 등은 살모넬라 식중독의 주된 원인균으로서 매우 중요시되고 있다. 근년 미국, 캐나다, 일본 및 유럽 등에서 *S. enteritidis*에 의한 식중독 발생이 급증하고 있으며 그 주된 원인이 닭고기와 계란에 기인된 것으로 보고되어 있다. 국내에서도 식중독 발생에 중 살모넬라 식중독이 가장 높은 분포를 나타냄으로서 닭에서 Salmonella 감소대책은 공중보건 상 대단히 중요한 과제로 되어 있다.

현재 우리나라의 양계산업에서 Salmonella 등의 감염증을 방지하기 위하여 대부분의 농가가 항균제를 사용하고 있지만, 일시적인 효과일 뿐 완전한 방제효과를 기대할 수 없는 실정이다. 항균제의 무분별한 오 남용은 다제 내성균을 출현시키고 병원세균의 정착을 저지하는 장내 상재균을 제거함으로써 병원균에 대한 저항성을 저하시킬 뿐만 아니라 계육 및 계란에의 잔류 등으로 사람의 건강을 위협하고 있다<sup>7</sup>. 최근 *Lactobacillus spp.* 및 *Bifidobacterium bifidum* 등의 유용 미생물을 이용한 항균제 (probiotics)를 사료첨가제 또는 예방약으로 개발하여 사용하고 있으며 이들 생균제는 장내 flora의 정상화, 유기산의 생산, 영양소 요구의 경합 등에 의한 병원균의 증식을 억제시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있지만 기대에 미치지 못하고 있다. 이상의 여러 문제점을 통해서 볼 때 농장에서부터 원천적으로 Salmonella 감염증을 방지할 수 있는 기술 개발의 필요성을 갖게 된다.

본 연구에서는 닭에서 Salmonella 감염증을 억제시킬 수 있는 한방사료 첨가제를 개발할 목적으로 한약재를 이용하여 Salmonella 속균에 대한 항균성과 *S. enteritidis*에 대한 장관정착 억제효과를 검토하였다.

### 2) 한방제의 항균시험

#### (1) 공시균주

항균시험에는 *S. enteritidis* ATCC #13076, *S. typhimurium* ATCC # 14028, *S. pullorum* ATCC # 9120, *S. gallinarum* ATCC # 9184, *Bacillus cereus* ATCC #11778 (국립수의과학연구소에서 분양), *Staphylococcus aureus* 와 *L. monocytogenes* scott A HPB #3 및 *Escherichia coli* O157:H7 (캐나다 후생성에서 분양)의 8 표준균주를 사용하였다. 각 균주를 10ml의 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 접종하여 37 C에서 18시간 배양한 다음 3,000g에서 10분간 원심침전하여 0.1M phosphate buffer 용액 (PBS, PH7.0)으로 2회 원심 세척한후 균수를 McFarland 표준탁도 0.5로 맞추어 사용하였다.

#### (2)첨가제의 조성 및 항균성 물질 추출

한방사료 첨가제 (Oriental herbal medicine feed additives; OHMFA)는 어성초 10

%, 황금 10 %, 석창포 15 %, 홍화 30 %, 구기자 10 %, 방기 10 %, 기타 15 %로 배합한 것에 10배 량의 물을 혼합하여 80℃의 수욕 상에서 3시간 동안 증탕한 다음 0.45  $\mu\text{m}$  pore size filter로 여과하여 사용하였다.

### (3) 최소발육억제농도 측정

공시균주에 대한 OHMFAs의 최소발육억제농도 (Minimum inhibitory concentration; MIC)는 National Committee Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 1997)기준에 따라 한천평판희석법 (agar dilution method)으로 측정하였다. 즉 OHMFAs 용액을 PBS로 2배수 희석하여 농도별로 함유하는 Mueller Hinton Medium (Difco)에  $10^5$  CFU/ml로 조정된 각 균액을 multiple inoculator로 접종하였다. 다음 37 °C에서 18-24 시간 배양하여 가장 낮은 농도의 OHMFAs를 함유하는 배지에서 균 발육이 억제된 농도를 MIC (%)로 나타내었다.

## 2) Salmonella enteritidis의 정착 억제 효과 검토

### (1) 실험동물

실험동물은 백색레구혼계 SPF계란 (성일과학에서 구입)을 부화시켜 사육한 2주령의 유추 40수와 농가에서 구입한 1주령의 육계 50수를 사용하였다. 실험구는 Salmonella 분리시험에서 음성을 나타내는 개체를 선별하여 시험구와 대조구로 나누어 5수씩 케이지 사육하였다. 시험구는 시판 육계전기사료 (도담테크사)에 OHMFAs를 1.0 % 첨가하여 급여하였고 대조구는 그대로 사용하였다. 사육장소는 경상대학교 무균 실험동물사육장을 이용하였고, 사료와 물은 1일 3회씩 급여하였다.

### (2) Salmonella 감염시험

S. enteritidis ATCC # 13076 균주를 TSB에 접종하여 37 °C에서 18시간 배양하여 사용하였다. 균액을 PBS (PH 7.2)로 10배 계단 희석하여  $10^7$  CFU/ml로 조정된 다음 경구 주입관 (Sonde)을 사용하여 2주령의 유추에 0.2ml씩 격일로 2회 경구접종 하였다.

### (3) 설사증 조사 및 체중 측정

모든 실험동물은 Salmonella 접종후 1, 7 및 14일에 설사발생 상태를 조사하고, 부검 전에 개체별 체중을 측정하여 평균치를 나타내었다.

### (4) 장기 및 맹장내용 중 Salmonella 균의 분리

목 동맥 절단법으로 도살하여 간 및 비장을 무균적으로 채취한 다음 약 1 g의 시료를 마쇄하여 10 ml의 Selenite broth (Difco)에 18시간 증균한 후 그 0.1 ml를 MacConkey agar 와 XLD agar (Difco)에 접종하여 37 °C에서 24시간 배양하였다.

한편, 맹장내용 1 g을 PBS로 10배 계단희석하고 그 0.1 ml를 MacConkey agar 와 XLD agar에 도말하여 37 °C에서 24시간 배양하였다. 다음 Salmonella균의 전형적인 특성을 나타내는 집락을 산정하고 log로 환산하여 평균치를 나타내었다.

(5) 장관정착 균의 주사전자현미경적 관찰

부검시 맹장을 적출하여 냉각된 PBS로 가볍게 세척한 다음 2.0% glutaraldehyde (Sorensen's, PH7.4)에 침적하여 4 °C에서 고정하였다. 다음 0.1 M sodium phosphate buffer 용액 (PH 7.2)으로 1시간 간격으로 3회 수세하고, 70, 80, 90, 95 % 및 absolute ethanol에서 탈수과정을 거쳐 임계건조기에서 건조시켰다. 건조된 조직편을 양면테이프를 이용하여 불력에 옮기고 ion sputtering coater 내에서 순금으로 100 Å 두께로 표면처리하여 주사전자현미경 (JSM 6400, Scanning Microscope, Oxford)으로 관찰하였다.

(6) 항체조사

균 접종 후 1, 7 및 14일에 혈청을 분리하여 microplate 응집반응에 의하여 항체가를 측정하였다.

항원제조 : *S. enneritidis* 표준균주를 Brain Heart Infusion Agar (BHIA)에 접종하여 37 °C에서 24시간 배양한 다음 0.5 % phenol 함유 생리식염수로 3,000 rpm에서 10분간 3회원심세척하였다. 다음 MacFaland No 3의 탁도로 현탁시키고 spectrophotometer 620 nm에서 O.D 0.42의 농도로 맞추어 항원으로 사용하였다.

Microplate 응집반응 (microplate agglutination test : MAT): Thain et al의 방법을 참고로 하여 0.05 ml의 혈청을 microplate (U-bottomed 96 well)에서 배수 희석한 다음 동량의 항원을 가하여 37 °C에서 2시간 반응시키고 4 °C에서 24시간 보존한 후 응집 여부를 관찰하였다.

(7) 통계분석

통계처리는 SAS (statistical analysis software)프로그램에 의해서 처리간의 유의성을 측정하였다.

3) 야외 적용 및 효능평가

(1) 공시동물

공시동물은 부화 후 5일령의 백색계통의 broiler를 입식하고 1.0 % OHMFA 첨가군과 대조군으로 나누어 각기 4,000수씩 배치하고 4주간 사육하였다. 사료는 육계전기 (도담테크사)를 사용하였고 사료와 물은 자유 급식토록 하였다. 입식 후 4일간 항생물질은 음수에 투여하였다.

(2) 시료채취

출하 직전에 OHMFA 첨가군의 분변 239예와 대조군의 분변 347예로 총 586예의 분변을 채취하였다. 분변 채취는 1회용 poly glove를 사용하여 약 5 g씩 채취하였고 24시간 이내에 균 분리를 실시하였다.

(3) *Salmonella* spp의 분리 및 동정

*Salmonella* 속균의 분리는 1 g의 분변을 10 ml의 Selenite cystein broth (Difco)에 접종하여 37 °C에서 24시간 증균한 후 그 0.1 ml를 MacConkey agar (Difco)와 XLD

(Difco)에 접종하여 37 °C에서 24시간 배양하였다. MacConkey agar에서 무색의 집락을 형성하고, XLD에서 중앙이 검고 주변이 노란색이나 주황색의 집락 (H<sub>2</sub>S 양성) 또는 중앙이 검정색으로 변하지 않았지만 전체적으로 분홍색이나 연한 노랑 색을 나타내는 집락 (H<sub>2</sub>S 음성)을 Neutrient agar에 순수 분리하였다. 다음 Triple sugar iron agar (Difco)에 접종하여 37 °C에서 24시간 배양한 후 alkaline slant/acid butt를 나타내는 균주를 Salmonella 속균으로 추정하였다.

#### (4) 혈청형 분리

분리 균의 혈청 조사는 Ewing의 방법에 따라 실시하였다. Difco제인 Salmonella O antiserum group (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E), Salmonella O antiserum factor (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), Salmonella H antiserum (a, b, c, d, i, k, m, r, y)등을 사용하여 평판응집반응 및 시험관응집반응을 실시하여 혈청형을 분류하였다.

#### (5) 야외적용에 대한 시험계균의 폐사율 조사

OHMFA 투여군과 대조군에서 입식 후 5일부터 출하 직전까지 4주간에 걸쳐 폐사한 개체 수를 집계하여 백분율 (%)로 환산하였다.

#### (6)감염 및 폐사체의 분변 및 장기중 Salmonella 분리

OHMFA의 급여 효과를 검증하기 위하여 3주령 이후에 폐사한 개체의 간, 비장 및 맹장 내용물로부터 Salmonella spp의 분리빈도를 조사하였다.

### 다. 결 과

#### 1)한방 사료첨가제의 항균효과

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

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

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

+; occurrence of colony

-; no occurrence of colony

## 2) *S. enteritidis*에 대한 정착 억제효과

### (1) 설사방지 및 증체효과

*Salmonella* 감염계균에 대한 설사발생 및 체중 변화를 조사한 결과는 Table 1-2에 서와 같다. OHMFA 첨가구는 균감염 7일후 5수중 1수, 대조구는 5수중 4수가 설사증 세를 나타내었으나 14일 후에는 모든 시험구에서 설사증을 보이지 않았다. 체중은 첨 가구의 경우 균 접종 후 1일에 404.30±9.60 g이었던 것이 14일에는 914.42±15.35 g으 로 증가하여 대조구의 370.8±12.60 g 및 792.60±8.57 g에 비하여 현저하게 증가하였 다 (p<0.05).

Table 1-2. Occurrence of diarrhea and weight change in chickens inoculated with *S. enteritidis*

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

a; Days after inoculation.

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

c; Values represent means±SD for 5 chickens.

A; row (p<0.05).

### (2) 맹장 내용물 중 *Salmonella* 균의 분포

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

Table 1-3. Isolation of Salmonella enteritidis from the cecum contents of chicks after orally inoculated

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

a; Each animal was inoculated with  $4.5 \times 10^7$  CFU/ml Salmonella enteritidis.

b; Values shown are the number of S. enteritidis was determined by direct plating culture using MacConkey agar and XLD agar, results are expressed as means±standard deviation( $\log_{10}$ ) of five chicks per group.

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

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

### (3) 감염 장기 중 Salmonella 분리 빈도

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



Table 1-4. Recovery of organisms from the tissues of chickens infected with *S. enteritidis*

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

(4) 주사전자현미경적 관찰

맹장의 균 정착상태를 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰한 바, Fig 1-1에서와 같이 균 감염후 7일에 대조구의 경우 장점막 상피표면에 다수의 간균 (A)과 장점막 상피조직의 염증반응 (B)이 관찰되었다. 14일 후 대조구 (C)의 경우 장점막에 다수의 균이 부착하고 있었으나 OHMFA 첨가구 (D)에서는 균이 거의 관찰되지 않았다.

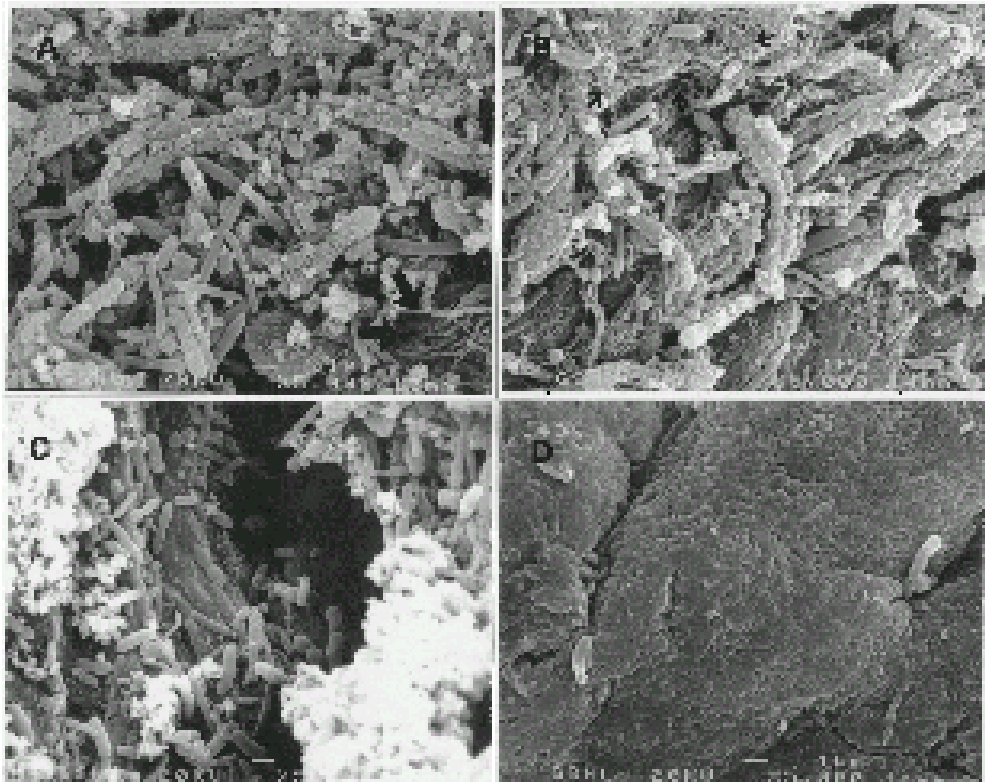


Fig 1-1. Scanning electron micrograph of cecum postinfection with *S. enteritidis*; Many bacteria were colonized to cecum epithelium at 7 days postinfection (A), and also inflammatory response was observed in villus epithelium (B) There were observed many bacteria of the control chickens at 14 days postinfection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

(5) 혈중 항체가

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

Table 1-5. Antibody titer of sera by the microplate agglutination test in broiler

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

chickens inoculated with *S. enteritidis*

NT; not tested

3) 야외 적용 및 효능평가

(1) *Salmonella* 속균의 방제효과

출하직전의 broiler 유추의 분변으로부터 *Salmonella* 속균의 분리율을 조사한 결과 Table 1-6 에서와 같이 대조군은 347예 중 84예에서 균이 분리되어 24.2 %의 분리율을 나타내었고, OHMFA첨가군은 239예 중 25예 (10.5 %)이었다.

Table 1-6. Frequency of recovery of *Salmonella* spp from chicken feces of poultry broiler farm

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

(2) Salmonella 속균의 serotype 분포

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

Table 1-7. Serogroups of Salmonella spp isolated from chicken feces in poultry broiler farms

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

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

Table 1-8. Identification of isolates of Salmonella from chicken feces samples

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

(3) 폐사율

실험계를 32일간 사육하는 동안 폐사율을 조사한 결과는 Table 1-9에서와 같이 OHMFA첨가군은 4,000수 중 202수가 폐사하여 5.1 %의 폐사율을 나타내었고, 대조군은 4,000수 중 320수 (8.0 %)이었다.

Table 1-9. Incidence of death in chickens during 32days experiment

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

4) 폐사한 유추의 장기 및 맹장 중 Salmonella 분리

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

Table 1-10. Isolation of Salmonella from the organs and cecum of chickens died during experiment

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

라. 고 찰

Salmonella 속균의 대부분은 가축 및 사람에서 감염증을 일으키는 인수공통 병원세균으로써 그 피해가 대단히 크며 근년 계육 및 계란을 원인 식품으로 하여 발생한 Salmonella 식중독 사례가 다수 보고됨으로서 닭에서 살모넬라 감염증을 예방하는 것은 공중보건에서 매우 중요시되고 있다.

본 연구에서는 닭에서 Salmonella 속균의 방제를 위한 한방사료 첨가제를 개발할 목적으로 어성초, 황금, 감초, 홍화, 구기자, 방기 등의 한약재 추출물을 사용하여 Salmonella 속균을 비롯한 몇 가지 식중독균을 대상으로 MIC를 측정된 결과 0.25% 이상의 농도에서 Bacillus cereus, Listeria monocytogenes 및 Staphylococcus aureus는 증식이 억제되었고, Salmonella 속균과 Escherichia coli는 2.0 % 이상에서 비로소 억제하며 각종 한약재 추출물의 항균력을 조사한 연구에서 감초는 S. tythimurium의 증식을 억제하였지만, 황금 및 구기가 추출물은 항균성이 없다고 보고하였고 신 등은 100 ppm의 감초 첨가에서 L. monocytogenes의 증식이 억제되었다고 하였다. 안 등은 L. monocytogenes에 대하여 10-50 ppm의 감초가 증식 억제효과를 보였지만 E. coli에 대하여는 100 ppm에서도 억제되지 않았다고 하였다. 이상과 같은 성적으로 미루어 볼 때 감초에서 나타난 항균성은 본 시험 결과와 유사한 패턴을 나타내었다.

따라서 본 연구에서 사용한 첨가제의 항균성은 여러 약재의 조성 가운데 주로 감초

및 어성초 등의 작용에 기인된 것으로 추측된다. 또한 대체적으로 본 시험에서는 그람양성균에 대하여는 높은 항균성을 나타낸 반면, 균의 구조상 저항성에 관계하는 당질층이 많은 Salmonella 속균과 같은 그람음성균에 대하여는 효과가 적은 것으로 사료된다.

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

이상의 결과를 통해서 볼 때 broiler 유추에서 1.0 %의 한방첨가제 투여는 Salmonella 속균 및 기타 장내 병원 세균을 사멸시켜 배설 균량을 감소시키고 배균기간을 단축시킴으로서 질병발생을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 증체 효과를 나타내어 육계의 출하기간을 약 5일간 단축시킬 수 있어 농가의 소득증대에 크게 기여할 것으로 사료된다.

#### 마. 결 론

본 연구에서는 한방첨가제 (oriental herbal medicine feed additives; OHMFA)의 항균성과 broiler 유추에서 Salmonella enteritidis의 정착 억제효과를 조사하였다. Bacillus cereus, Listeria monocytogenes 및 Staphylococcus aureus는 0.25%농도의 OHMFA 첨가에 의해서 증식이 억제되었고 Salmonella spp 및 Escherichia coli는 2.0% 이상에서 억제되었다. 또한 S. enteritidis를  $10^7$  CFU/ml 수준으로 접종한 broiler 유추에서 1.0%수준의 OHMFA를 급여한 결과 대조구에 비하여 유의적인 증체 효과를 나타내었고 ( $p<0.05$ ), 감염 균은 7일 이후부터 간, 비장 및 맹장 내용물로부터 감소하기 시작하여 14일 이후에는 거의 분리되지 않았으며( $P<0.005$ ), 혈청 역가는 대조구에 비하여 현저하게 낮게 나타났다. 한편, 본 연구에서 개발한 OHMFA에 대한 야외 적

용효과를 검토하기 위하여 1.0 %수준으로 첨가한 사료를 broiler 유추에 급여하고 분변 중 Salmonella 분리율, serotype 분포 및 폐사율을 조사하였다. Salmonella 속균의 분리율은 대조구의 24.2 % (347예 중 84예)에 비하여 OHMFA 첨가구는 10.5 % (239예 중 25예)로서 현저하게 낮았다. Serotype의 분포를 조사한 바 대조구의 n경우 S. typhimurium (65.5 %), S. enteritidis (15.5 %) S. gallinarum (15.5 %), S. pullorum (2.4 %) 및 미분류 (1.2 %)의 5종류가 분리되었고, OHMFA 첨가구는 S. typhimurium (40.0 %), S. enteritidis (36.0 %), S. pullorum (20.0 %) 및 S. gallinarum (4.0 %)의 4종류이었다.

시험기간 중 유추의 폐사율은 대조구의 8.0 %에 비하여 OHMFA 첨가구는 5.1 %로서 현저하게 낮았고, 실험기간 중 폐사한 broiler 유추의 장기 및 분변에서 Salmonella 속균을 분리한 바 대조구는 10수 중 1수의 간 및 비장에서, 그리고 2수의 맹장에서 분리되었으나 첨가구는 7수 중 1예도 균이 분리되지 않았다.

한편, 본 연구에서 개발한 OHMFA에 대한 야외 적용효과를 검토하기 위하여 1.0 %수준으로 첨가한 사료를 broiler 유추에 급여하고 분변 중 Salmonella 분리율, serotype 분포 및 폐사율을 조사하였다.

Salmonella 속균의 분리율은 대조구의 24.2 % (347예 중 84예)에 비하여 OHMFA 첨가구는 10.5 % (239예 중 25예)로서 현저하게 낮았다. Serotype의 분포를 조사한 바 대조구의 n경우 S. typhimurium (65.5 %), S. enteritidis (15.5 %) S. gallinarum (15.5 %), S. pullorum (2.4 %) 및 미분류 (1.2 %)의 5종류가 분리되었고, OHMFA 첨가구는 S. typhimurium (40.0 %), S. enteritidis (36.0 %), S. pullorum (20.0 %) 및 S. gallinarum (4.0 %)의 4종류이었다.

시험기간 중 유추의 폐사율은 대조구의 8.0 %에 비하여 OHMFA 첨가구는 5.1 %로서 현저하게 낮았고, 실험기간 중 폐사한 broiler 유추의 장기 및 분변에서 Salmonella 속균을 분리한 바 대조구는 10수 중 1수의 간 및 비장에서, 그리고 2수의 맹장에서 분리되었으나 첨가구는 7수 중 1예도 균이 분리되지 않았다.



2. 한방사료첨가제가 육계 계육에 미치는 이화학적 효과 및 경제성  
 가. 당초추진계획 및 수행내용

당 초 추 진 계 획	수 행 내 용
지방 조성 cholesterol 변화 단백질 변화 아미노산 조성 불포화지방산의 변화 일평균증체량 폐사율 육성율 사료요구율	한방보조사료제 조성 평가 실험 한방보조사료제 안전성 평가 사양실험 : 폐사율, 사료요구율, 육성율 등 이화학적 평가 : 지방, 단백질, 계육색깔 ,계육pH 계육조지방, 전수분, 지방산, 아미노산 변화 계육내 Ca 및 Pi변화 NMR에 의한 Pi분석

나. 연구수행 내용

1) 연구목표

본 연구의 목표는 예비실험을 통하여 얻은 결과를 기초로 하여 삼백초, 백급, 진교, 홍화, 결명 등의 약리 효과에 대한 조성 비율을 조절하여 분말로 된 한방 사료 첨가제를 육계에 적용하여 그 효과 (1.육계증체량 2.치사율 3.균일도 4.품질관능검사 5.생화학적 검사:amino acid, cholesterol, 지방산, 수분, 회분, 조단백, 총지방, )를 조사하고, 또한 양계의 Salmonella spp. 특히 S. enteritidis 대한 방제효과 등을 시행하여 얻은 성적과 더불어 그 경제성을 조사하고자 하였다.

2) 한방사료첨가제의 조성 비율 확정을 위한 평가 실험

한방보조사료제가 육계 계육에 미치는 이화학적 평가를 위하여 예상되는 한방제를 농도별로 다르게 첨가하여 예비실험을 수행한 바 다음(조성비율표)과 같은 결과를 얻었다.

조성비율 (1,2차 평가 : 이화학적 평가를 중심으로)  
 황금(~10%), 석장포(~15%), 어성초(~10%), 홍화(~30%), 구기자(~10%)  
 방기(~10%), 기타(~15%)

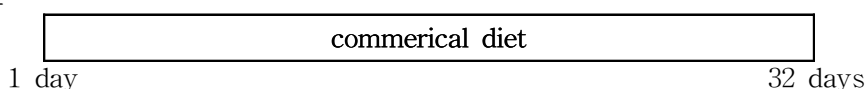
3) 한방보조사료첨가제의 제조

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

4) 실험동물 : 실험동물은 변화에 대한 Broiler chicks 500수(대조군 250수 ,실험군 250수 )를 2년차에는 육계농장(10,000수)에 한방보조사료제를 사료에 1%되게 섞은 후 공급하면서 출하직전 32일에 육계를 각각 20마리씩 선택하여 이화학적 검사에 사용하였다.

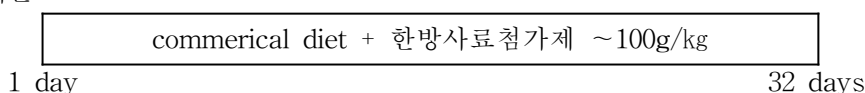
5) 실험 일정

대조군



한방사료첨가제

투여군



6) 일반성분 분석을 위한 실험

(1) 함유수분

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

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

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

(2) 조지방

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

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

(3) 조회분

조회분 함량은 회분 정량용 crucible을 105℃ drying oven에서 건조한 후 desicator에서 완전히 건조시킨 후 시료 1~3g을 건조된 crucible에 달아 넣고 시료가 든 crucible을 550℃ 회화로(Isotemp Muffle Furnace, Model No. 602025, Fisher Scientific USA)에서 2시간 동안 태웠다. 회화도가 200℃ 이하로 내려가면 시료를 태운 crucible을 꺼내어 desicator에 넣고 30분간 방냉한 다음 무게를 측정하여 함량을 구하였다.

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

7) 물리적 성질분석을 위한 실험

(1) pH

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

## (2) Color

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

## (3) 지방산 분석을 위한 실험

지방산 조성은 Folch법(1957)을 변형하여 수행하였다. 세절육 10g을 250ml 삼각 flask에 넣고 혼합 solvent(chloroform : methanol= 2:1) 150ml를 첨가한 다음 homogenizer로 12,500rpm에서 3분간 균질화하여 원심분리관(500ml)에 filtering (Whatman No. 1. 185mm)한 후 여기에 0.88% NaOH를 총여액의 1/4 정도 첨가하여 균형을 맞춘 후 원심분리기(Union 5KR, Made in KOREA; 3,000rpm, 10min)를 이용하여 원심분리하고 aspirator를 이용하여 연결된 모세관으로 상등액을 버리고 하층(lipid layer)을 취하였다.

유기용매층인 하층은 250ml 원형 flask에 하층을 여과하되 이때  $Na_2SO_4$ 를 이용하여 남은 수분을 흡착 여과한 후 감압농축기(evaporator, England; 55°C, 25min)를 이용하여 지질을 추출하였다. 지질을 추출한 후 40°C 이하에서 질소가스를 계속 주입하면서 농축하였다(유기용매 회수). 농축 lipid는 질소가스 주입 후 파라핀 필름으로 밀봉하고 Methylation(메틸유도체화)하기 전까지 냉동(-20°C 이하)하여 보관하였다.

순수 분리된 0.5~1.0mg의 lipid를 test tube에 넣은 후  $BF_3$  2ml를 추가하여 뚜껑을 닫고 후 water bath(90°C)에 20분간 boiling(5분마다 흔들어서)한 후 실온에 냉각하였다. test tube에 증류수 1ml와 Hexane 2ml를 넣어 shaking한 후 하층의 증류수를 제거하고 다시 증류수 2ml를 3회 반복하여 첨가한 후에 하층을 제거하고 난 후에  $Na_2SO_4$ 를 넣어 잔존하고 있는 수분을 완전히 제거하고, 상등액 2.5~3 $\mu$ l를 취하여 GC(HP 6890+ GC)에 주입하여 지방산을 분리 정량 하였으며 이때 GC조건은 Table 2-1과 같다.

Table 2-1. GLC(Shimadzu GC - 14A) conditions for analysis of fatty acid

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

8) 통계처리

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

다. 결과

1) 한방사료첨가제의 조성비율

한방사료첨가제의 조성비율은 황금 , 석창포 , 어성초, 홍화, 구기자, 방기 등으로 Table 2-2와 같다.

Table 2-2. Composition of experimental concentrate (%) for feed additive

한약재 (oriental herbal medicines)	비율 (ratios)	주요성분 및 기대효과 (components and effects)
황금(Scutellariae Radix)	10 %	주요 성분 : baicalein, wogonin 등 주요 효과 : 항생 작용 등
석창포(Acori Graminei Rhizoma)	15%	주요 성분 : $\beta$ -asarone( $C_{12}H_{16}O_3$ ) caryophyllene ( $C_{15}H_{24}$ ) 주요 효과 : 지방합성 감소, 면역력 증가
어성초(Houttuyniae Herba)	10 %	주요성분 : Decanoyl Acetaldehyde Capric Acid( $CH_3(CH_2)_8COOH$ ) 주요 효과 : 항균 작용, 지방합성 억제 등
홍화(Carthami Flos)	30 %	주요성분 : Carthamin( $C_{43}H_{42}O_{22}$ ) Linoleic acid ( $CH_3(CH_2)_4(CH=CH(H_2)_2(CH_2)_6COO$ ) 주요 효과 : 항산화 작용과 항암 효과(유암 등), 골다공증예방( $Ca^{++}$ ↑)등
구기자(Lgcii Fructus)	10 %	주요성분 : carotene( $C_{40}H_{56}$ ) Linoleic acid ( $CH_3(CH_2)_4(CH=CH(H_2)_2(CH_2)_6COO$ ) VitB complex 등 VitC 주요 효과 : Cholesterol 합성억제, 면역력증가 등
방기(Stephaniae Tetrandrae Radix)	10 %	주요성분 : Flavnoid , Alkaloid(tetrandrine) 등 주요효과 : 지질합성억제, 항산화 작용등
기타	15 %	주요효과 : cholesterol 합성수지 항생작용, 면역력 증가

2) 사료첨가제가 육계의 계육색깔에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 계육색깔에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육색깔에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 적색깔(redness)의 증가, 노란색깔(yellowness)의 감소가 있었다(Table 2-3).

Table 2-3. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on meat color in broiler chicks

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

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

3) 사료첨가제가 육계의 계육 pH에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 계육 pH에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육 pH에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 pH의 감소(5.68±0.11->5.67±0.04)를 나타내었다(Table 2-4).

Table 2-4. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on pH in broiler chicks

Treatments	pH
C	5.68±0.11
T	5.67±0.04

C : control group T: dietary supplementation group

4) 사료첨가제가 육계의 계육조지방, 조희분 및 전수분에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 계육내 조지방, 조희분 및 전수분에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육내 조지방, 조희분 및 전수분에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 조지방의 감소( $12.43 \pm 0.68 \rightarrow 8.93 \pm 0.56$ ), 조희분의 감소( $0.96 \pm 0.00 \rightarrow 0.95 \pm 0.00$ ) 및 전수분의 증가( $74.81 \pm 1.04 \rightarrow 75.34 \pm 0.25$ )를 나타내었다(Table 2-5).

Table 2-5. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on crude fat crude aches, and water in broiler chicks

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

·C : control group T: dietary supplementation group

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



5) 사료첨가제가 육계의 계육지방산에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 지방산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 계육내 지방산에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 stearate(C18:0)의 감소( $10.49 \pm 0.11 \rightarrow 10.07 \pm 0.17$ ), 불포화지방산의 증가( $65.75 \pm 0.87 \rightarrow 65.53 \pm 0.92$ ), 포화지방산의 감소( $37.25 \pm 0.87 \rightarrow 36.47 \pm 0.92$ )를 나타내었다(Table 2-6).

Table 2-6. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on fatty acids in broiler chicks

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

· C : control group T: dietary supplementation group

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

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

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

- UFA(Unsaturation fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C20:3, C20:4
- MUFA(Monounsaturatation fatty acid) : C16:1, C18:1
- PUFA(Polyunsaturatation fatty acid) : C18:2, C20:3, C20:4

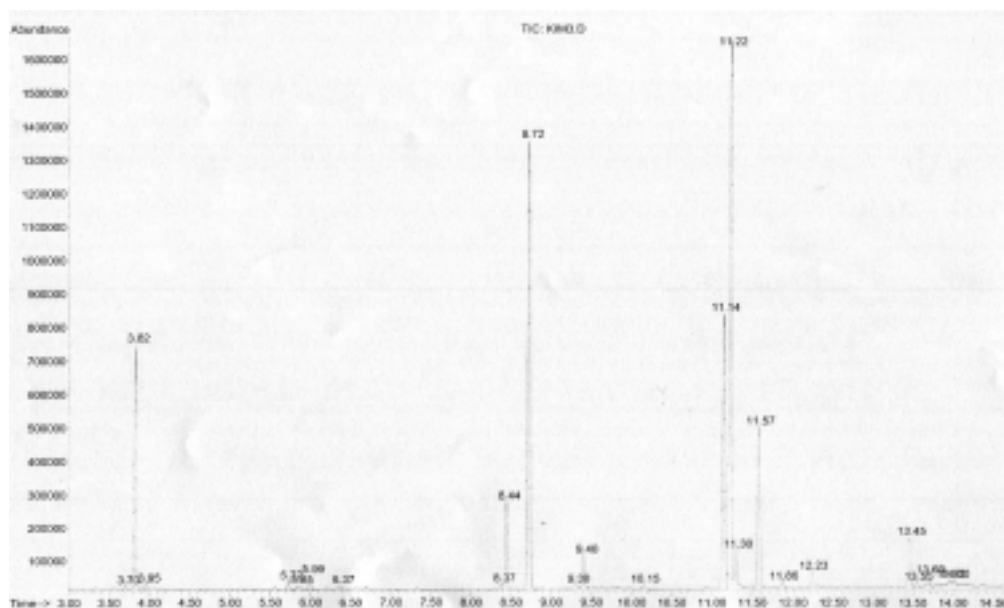


Fig 1. Fatty acid spectrum of control group in broiler chicks after 32 days

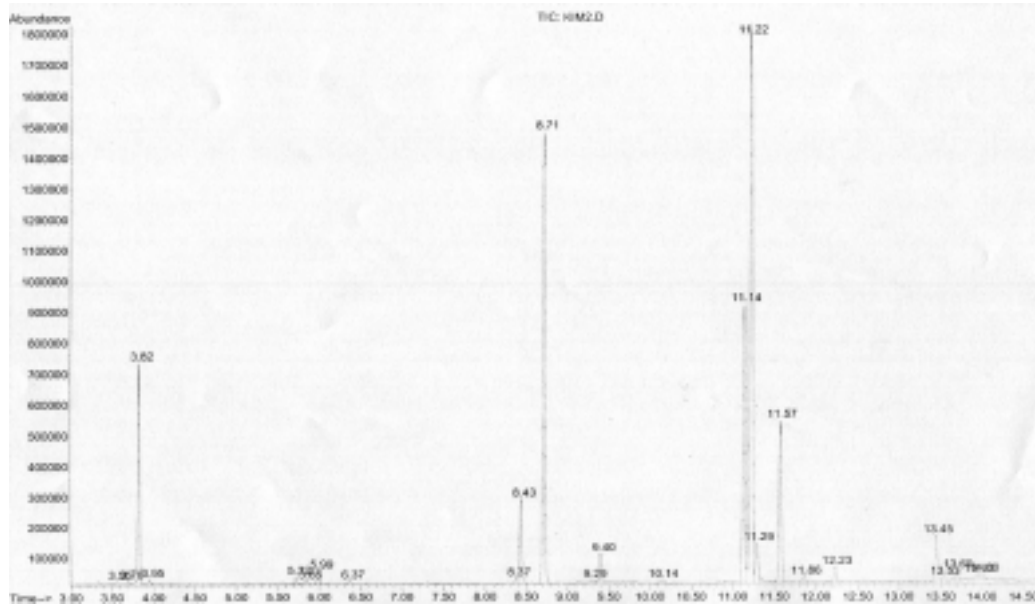


Fig 2. Fatty acid spectrum treated with 1% dietary supplementation group in broiler chicks after 32days

6) 사료첨가제가 육계의 관능에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 관능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 관능에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 다즙성의 증가(6.0→7.56) 연도의 증가(6.2→7.89) 및 종합적 기호도의 증가를(6.33→7.78) 나타내었다.(Table 2-7).

Table 2-7. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicine on sensory evaluation score in broiler chicks

항 목	대 조 군	사료첨가제 투여군
색 깔	7.56	7.44
냄 새	7.67	7.56
다 즙 성*	6.00	7.56*
연 도*	6.22	7.89*
종합적 기호도*	6.33	7.78*

\* 관능검사의 항목은 한국식품개발연구원 관능검사 항목에 의하여 실시함

## 관 능 검 사 표

이름 :

제시된 시료에 대하여 시료의 번호를 명기한 후 다음의 항목을 평가하여 주십시오

시료번호 \_\_\_\_\_

### 1. 색깔

점 수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
평 가									

### 2. 냄새

점 수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
평 가									

### 3. 다즙성

점 수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
평 가									

### 4. 연도

점 수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
평 가									

### 5. 종합적 평가

점 수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
평 가									

- 9 : 아주 매우 높다(또는 좋다)
- 7 : 매우 높다(또는 좋다)
- 5 : 보통이다(또는 좋지도 싫지도 않다)
- 3 : 매우 낮다(또는 싫다)
- 1 : 아주 매우 낮다(또는 싫다)

감사합니다.

7) 한방사료첨가제가 육계의 계육 아미노산 조성에 미치는 영향  
 한방사료첨가제가 육계의 계육 아미노산 조성에 미치는 영향을 조사하였던바,  
 대조군에 비해서 실험군에서 methionine asparatic acid 및 methionine 및 valine가  
 증가되었다(Table 2-8).

Table 2-8. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on amino acid composition in broiler chicks

	unit: mg/100g	
	C	T
Asp	1758.8±77.05	1867.2±65.16
Ser	795.7±32.23	770.8±22.32
Glu	2858.0±111.06	2511.5±1241.32
Gly	854.6±83.12	928.6±53.938
<b>His</b>	<b>583.4±25.97*</b>	<b>665.2±35.07*</b>
<b>Thr</b>	<b>813.2±8.55*</b>	<b>867.4±24.04*</b>
Arg	1365.2±86.31	1333.8±51.36
<b>Ala</b>	<b>593.2±48.49*</b>	<b>1489.7±71.16*</b>
<b>Pro</b>	<b>593.2±48.49**</b>	<b>774.8±68.22**</b>
Tyr	626.3±9.31	731.8±74.33
<b>Val</b>	<b>925.7±14.56**</b>	<b>1064.3±59.42**</b>
<b>Met</b>	<b>434.8±4.86*</b>	<b>484.0±25.53*</b>
Lys	1756.265.87	1766.9±59.66
<b>Isoleu</b>	<b>905.3±21.82*</b>	<b>1025.9±53.73*</b>
<b>Leu</b>	<b>1459.3±4.99**</b>	<b>1665.1±82.50**</b>
<b>phe</b>	<b>739.0±20.86*</b>	<b>814.1±46.15*</b>

· C : control group T: dietary supplementation group

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

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

8) 한방사료첨가제가 육계의 phosphorus, Ca 및 cholesterol에 미치는 영향

한방사료첨가제가 육계의 phosphorus, Ca 및 cholesterol에 미치는 영향을 조사하기 위하여 한방사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 관능에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 phosphorus의 증가(6.1-8.04mg/dl→6.3-8.7mg/dl), Ca의 증가(11.0-21.5mg/dl→11.3-23mg/dl) 및 cholesterol의 감소(68.7-70.5mg%→60.0-53.45mg%) 나타내었다(Table 2-9).

Table 2-9. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on phosphorus, Ca, cholesterol in broiler chicks

항목 \ 실험군	대조군	실험군	비고
phosphorus	6.1-8.04mg/dl	6.3-8.7mg/dl	1.serum내 2.auto P kit
Ca	11.0-21.5mg/dl	11.3-23mg/dl	1.serum내 2.auto Ca kit
cholesterol	68.7-70.5mg%	60.0-53.45mg%	1. 시료100g당 2. GC kit

9) 한방사료첨가제가 육계에 미치는 안전성평가

(1) 목적 및 방법

한방사료 첨가제의 첨가 후 육계의 안전성 평가를 실시하기 위하여 육계의 wing vein에서 혈액 1cc를 채취하여 4℃에서 3000rpm으로 15분간 원심분리한 수 혈청을 -80℃에서 냉동보관하면서 생화학분석기(RA-X7, Techmmicon, USA)로 생화학분석을 수행하였다.

(2) 측정결과

한방사료첨가제의 첨가후 안전성 평가를 실시한 결과 SGOT, SGPT, glucose, bilirubin, LDH가 정상범위내 있었다(Table 2-10).

Table 2-10. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on SGOT, SGPT, glucose, bilirubin, LDH in broiler chicks

항 목	범 위		실험군에 대한 평가
	대 조 군	실 험 군	
SGOT	87 - 201	85 - 200	정상범위내
SGPT	10.0 - 41.0	10.0 - 40.1	정상범위내
glucose	150 - 180	153 - 185	정상범위내
bilirubin	0.00 - 0.19	0.01 - 0.18	정상범위내
LDH	87 - 280	85 - 265	정상범위내

10) 한방사료첨가제가 육계의 사양에 미치는 영향

사료첨가제가 육계의 사양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료첨가제를 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 32일째 사양에 미치는 영향을 조사한 바 사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 평균체중의 증가(1.69kg→1.73kg), 육성율의 증가(92%→96%), 폐사율의 감소(8%→5%), 사료요구율의 감소(1.82→1.73)를 나타내었다 (Table 2-11).

Table 2-11. Effect of dietary supplementation of oriental herbal medicines on growth performance in broiler chicks

내 용	실 험 군	대 조 군	결 과	비 고
평균 체중	1.73kg	1.69kg	+0.04kg	
육 성 율	96%	92%	+4%	-4%
폐 사 율	5%	8%	-3%	-3%
사료 요구율	1.73%	1.82%	-0.09%	

11)  $^{31}\text{P}$  NMR에 의한 한방사료첨가제의 육계내의 Pi평가

한방사료첨가제가 육계의 뼈내에 Pi에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료에 1%되게 균질하게 혼합한 후 급여 1일, 16일 및 32일째에 Pi에 미치는 영향을 조사하였던바 한방사료첨가제를 투여한 군이 대조군에 비하여 Pi가 증가(3.6782→3.7041:상대적인 양)하는 경향을 나타내었다(그림3).

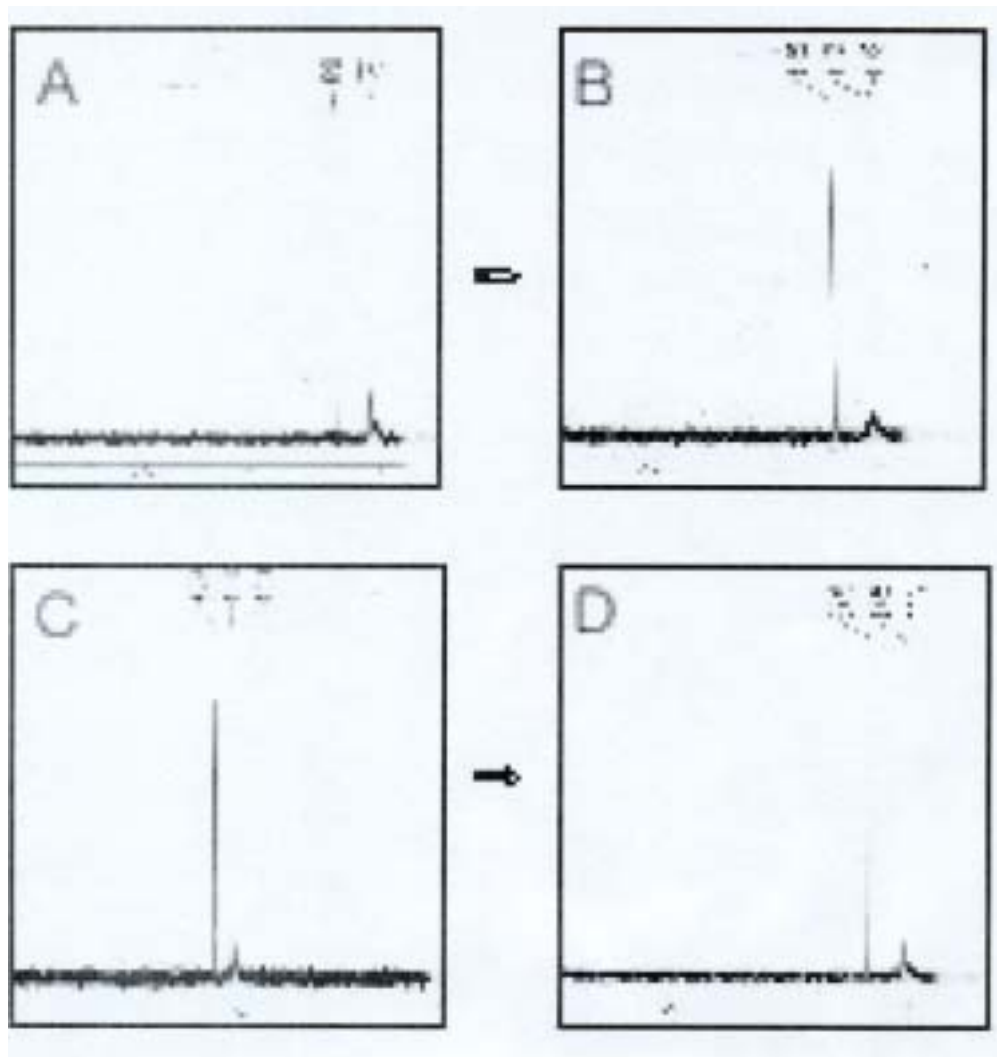


Fig. 3. Pi spectrum using  $^{31}\text{P}$ NMR. A,B: control group(A:1day, B: 32days), C,D: 1% dietary supplementation group(C:1day, D:32days)



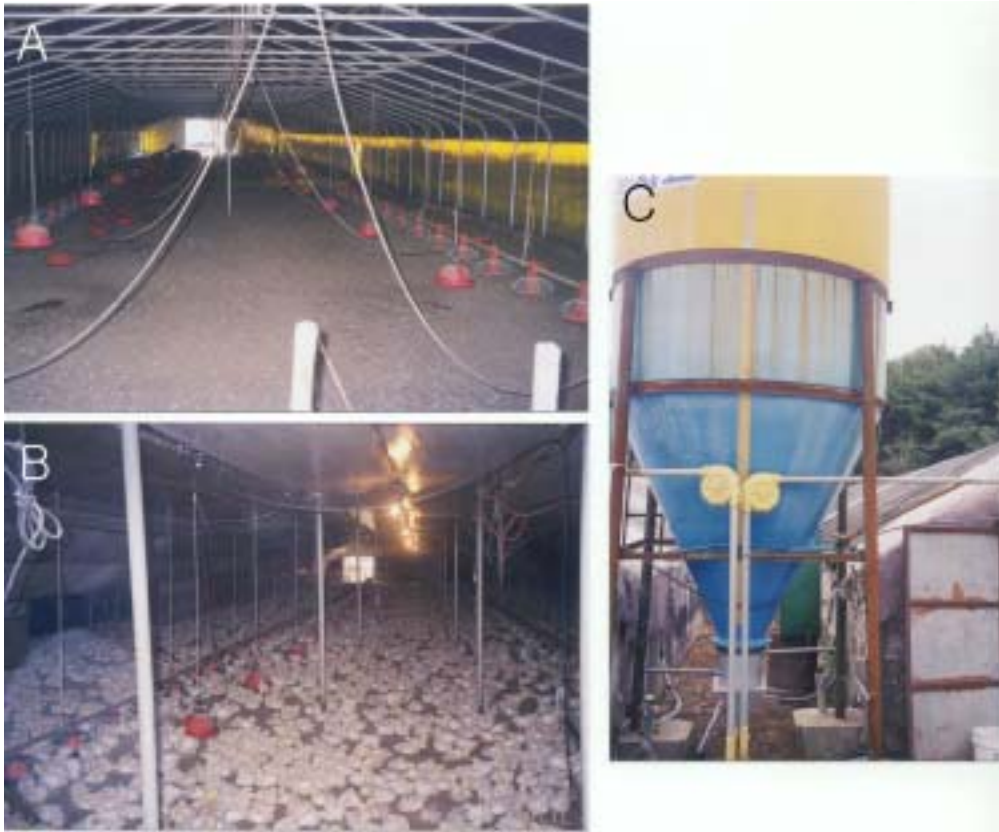


Fig 4. 사료 첨가제 실험을 위한 육계농장 A; 입추직전, B; 32일째 출하직전, C; 사료공급기

3. 한방사료첨가제가 단백질 발현에 미치는 영향 및 S. enteritidis의 proteome분석  
가. 연구목표

한방사료첨가제가 육계내에서 어떠한 기전으로 면역활성도를 나타내는가를 조사하기 위하여 proteomics을 이용한 S. enteritidis, 야외주 및 표준균주에 대한 proteome분석과 한방사료첨가제로 인한 단백질발현 및 NO농도를 측정하였다.

나. 당초추진계획 및 수행내용

당 초 추 진 계 획	연 구 수 행
면역활성도평가(II) : 이차원적 전기영동법을 이용한 단백질발현 조사, NO 측정	proteomics을 이용한 S. enteritidis 야외주 및 표준균주에 대한 proteome분석과 단백질 발현에 관한 실험 Immunoblotting, Maldi-Tof에 의한 단백질 분석 NO 측정

다. 연구수행내용

1) 실험동물

실험동물은 Broiler로 각각 20수씩 나누어 대조군에는 정상사료를, 실험군에는 사료 중의 1% 사료 첨가제를 첨가하여 10일, 20일, 30일 내 혈액을 채취하여 분석하였다.

2) 육계로부터 혈액 채취액 다형핵 백혈구 분리(PMN)

육계의 혈액내에서 다형핵 백혈구를 분리하기 위해 heparin 처리된 vacutainer를 이용하여, wing vein 2ml의 혈액을 채취하였다. 그리하여 혈액의 점도를 높이고 적혈구의 오염을 최대한으로 줄이고자 6% dextran (Sigma)을 혈액과 4:1로 혼합하여 1시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 정치시켰다. 백혈구가 풍부한 상층부유액을 채취하여 HBS(hepes buffered solution, 0.1% BSA 포함, Sigma)로 부유시킨 뒤, 600 xg, 10분, 20°C에서 원심분리하여 세척하였다. 수정된 percoll 비중 변화도 방법으로, 70% percoll (비중 1.092)을 분주한 후, 그 위에 percoll과 섞이지 않도록 조심스럽게 백혈구부유액을 분주한 다음 400 xg, 40분, 20°C에서 원심분리하였다. 상층에 분리된 다형핵 백혈구를 채취하여 1 x 10<sup>6</sup>cell/ml 수준으로 고정하였으며 trypan blue 염색법에 의해 viability가 95% 이상의 것을 실험에 사용하였다.

3) Nitrite(NO<sub>2</sub>)의 측정

PMN에서의 NO방출 양을 측정하기 위해 nitrite의 농도를 간접적으로 griess reaction method에 의해 측정하였다. 간단히 100 µl PMN 부유액을 10<sup>-7</sup> M FMLP 또는 50 ng/ml PMA로 자극하였다. nitrite standard (범위, 1µM~100µM, Sigma)을 사용 하였으며, medium은 96-well microplate에 서 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 1% sulfanilamide (Sigma)에 녹인후 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride(Sigma) 과

동량으로 혼합하여 100  $\mu$ l greiss reagent를 조제하여 사용하였다. Microplate reader (ELx808.BIO-TEK Instruments, Inc., USA)을 사용하여 10분후에 측정하였다.

#### 4) Salmonella enteritidis 단백질발현을 위한 사용균주

실험에 사용된 균주는 경남 보건 환경 연구원에서 분양 받은 Salmonella enteritidis (ATCC13076)과 사람의 분변에서 분리된 Salmonella enteritidis를 사용하였다.

#### 5) Salmonella enteritidis 배양조건 및 이차원 전기영동의 시료 사용조건

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

#### 6) 이차원 전기영동을 위한 시료 준비

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

#### 7) 이차원 전기영동

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

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

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

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

IEF가 끝난 IPG strip은 1%(w/v) DTT를 첨가한 equilibration buffer(1.5M tris-HCl, pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 15분간

반응시키고 다시 1.25%(w/v)의 iodoacetamide를 첨가한 equilibration buffer에 15분간 반응시킨 다음 IPG strip을 12.5% acrylamide gel의 상단부에 loading 시키고 빈공간은 phenol red를 첨가한 low melting agarose gel을 분주하였다. 10mA의 조건으로 agarose gel의 붉은색 dye가 strip을 완전히 빠져나가면 20mA로 변환시켜 bromophenol이 gel 하단부에 도달할 때까지 전개하였다.

### (3) 도은 염색

이차원 전기영동을 마친 gel에서 단백질 spot을 검출하기 위해 도은염색을 하였다. gel을 고정용액(50% MeOH, 12% AcOH, 37% HCOH)으로 한시간 이상 처리한 후, 50% EtOH으로 20분간 3회 반복 세척한 다음  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 1분간 전처리 하였다. gel을 3차 증류수로 20초간 3회 세척한 다음  $\text{AgNO}_3$ 와 37% HCOH로 30분간 처리하여  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 와 37% HCOH로 발색시키고, spot을 확인한 후 stop solution (50% MeOH, 12% AcOH)으로 발색을 중지하였다.

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

이차원 전기 영동을 한 gel에서 항원 spot을 검출하기 위하여 15초동안 MeOH에 전처리한 PVDF membrane에 60V에서 70분동안 전사시킨 후 5% skim milk를 가하여 4℃에서 하루동안 blocking 하였다.

5% skim milk에 1:200으로 희석한 *S. enteritidis* 특이 다가 혈청을 가하여 2시간동안 진탕 배양하면서 반응시킨 후 Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (tween20)을 0.1% 첨가한 tris buffered saline으로 세척한 후 다시 5% skim milk에 1:2000으로 희석한 anti rabbit horse radish conjugated IgG를 가하여 1시간동안 진탕하여 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 항원을 검출하였다.

### (5) 통계처리

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

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

### (1) spot excising

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

## (2) 탈염색과정

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

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

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

## (3) In-gel Reduction and Alkylation

Dry된 gel에 10mM DTT가 함유된 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 를 넣어 30분간 반응시킨후 다시 55mM iodoacetamide가 함유된 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 를 넣어 암실에서 30분간 다시 반응시킨다. 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 를 이용하여 한번 더 washing 한 후 acetonitrile을 이용하여 gel을 탈수시킨다.

## (4) In-gel Digestion

Dry된 gel에 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 와 5mM  $\text{CaCl}_2$ 의 digestion buffer를 넣어 녹인 12.5ng/ $\mu\text{l}$ 의 trypsin을 15 $\mu\text{l}$ 를 넣어 45분동안 ice에서 정치시키고 흡수되지 않고 남은 용액은 모두 제거한 후 20 $\mu\text{l}$ 의 trypsin이 포함되지 않은 digestion buffer를 넣어 37°C에서 16시간정도 digest시킨다.

## (5) Extraction of Peptides

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

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

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

## (7) Data analysis

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

라. 결과

1) 한방사료첨가제가 육계의 nitric oxide에 미치는 영향

microplate assay를 실시한 결과 대조군은  $12.8 \pm 0.7$  MM이었으나 한방사료첨가제 투여군은 10일에는  $14.24 \pm 0.6 \mu\text{M}$ , 20일 쯤에는  $15 \pm 0.6 \mu\text{M}$ , 그리고 30일 쯤에는  $15.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$  로 증가하는 경향을 보였다.(Fig. 3-1참조)

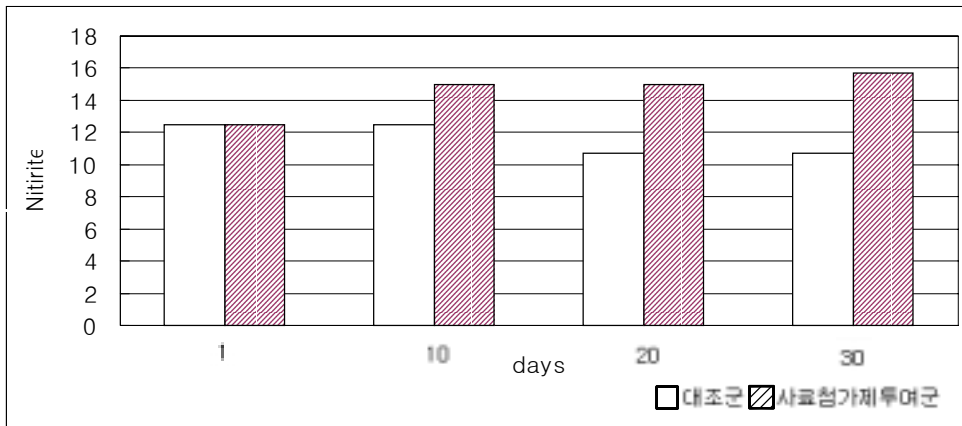


Fig. 3-1. The effects of feed additive on nitric oxide from chick Broilers

2) 시료량에 따른 2-dimensional electrophoresis(2-DE)gel 유형

흡광도  $1.0 (\lambda = 610\text{nm})$  수준으로 희석된 세균액을 각각 4ml, 8ml으로 시료의 양을 달리하여 시료를 제조하여 이차원 전기영동을 수행한 결과 8ml을 사용한 시료에서 양호한 결과를 보였다(Fig.3-2)

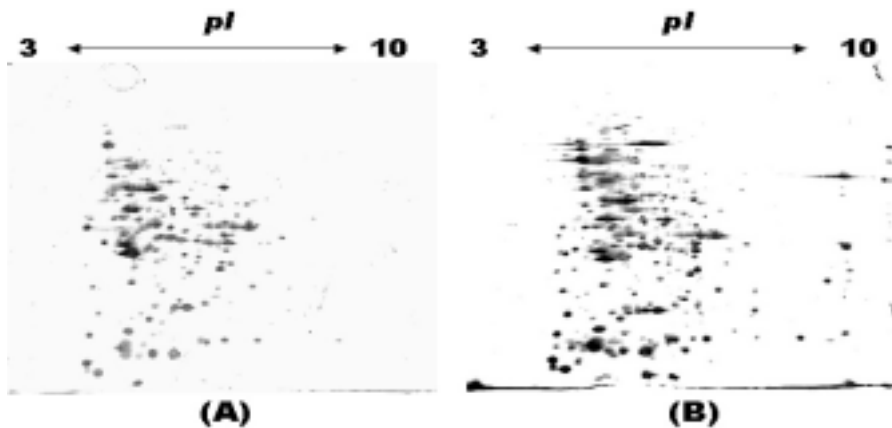


Figure 3-2. Comparison of the different sample volume for *S. enteritidis* ; were (A) A total of 166 spots were detected on 2-DE image and (B) A total of 240 spots were detected on 2-DE image. Gels were stained with silver nitrate, and spots were detected using Phoretix 2D software

3) IEF 조건에 따른 2-DE 유형

*S. enteritidis* 2-DE map 작성을 위한 최적의 IEF 조건을 구하기 위하여 이차원 전기영동시 IEF의 조건을 45,750 Vhr 조건과 rehydration 6시간, 30V에서 6시간, 200V에서 30분, 500V에서 30분, 1,000V에서 30분, 2,000V에서 30분, 4,500V에서 10시간 통전하여 최종 46,880Vhs까지 IEF를 실시한 것을 비교한 결과 46,880 Vhr 조건에서 적합한 2-DE gel image를 관찰할 수 있었다(Fig 3-3).

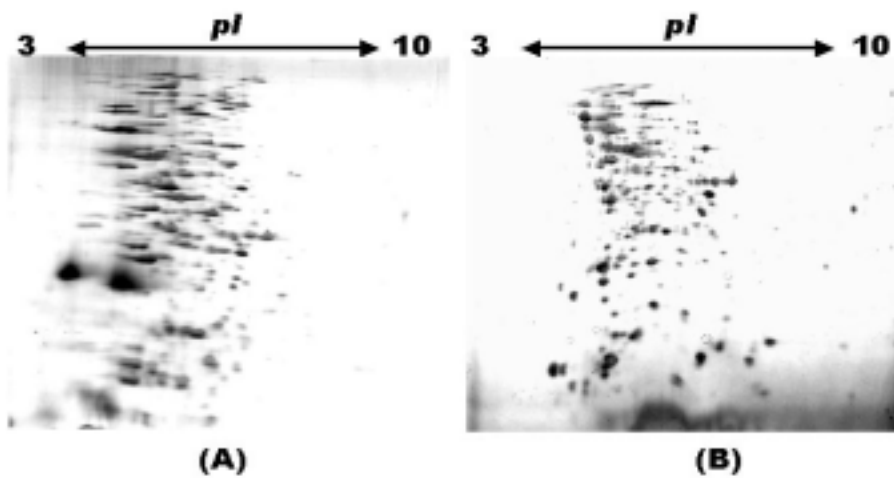


Figure 3-3. Comparison of the different IEF condition for *S. enteritidis* ; (A) 45,750 Vhr condition and (B) 46,880 Vhr condition. Gel were stained with silver nitrate, and analysis were performed using Phoretix 2D software

4) 균주의 차이에 따른 2-DE 유형

*S. enteritidis*의 표준균주와 야외균주를 각각 동일한 조건에서 60 $\mu$ g의 동일량의 protein을 적용하여 이차원 전기영동을 수행한 결과 각각 428개, 422개의 spot을 관찰할 수 있었고 다소의 발현의 차이는 있으나 두 균주의 spot 분포는 일치하였다(Fig 3-4).

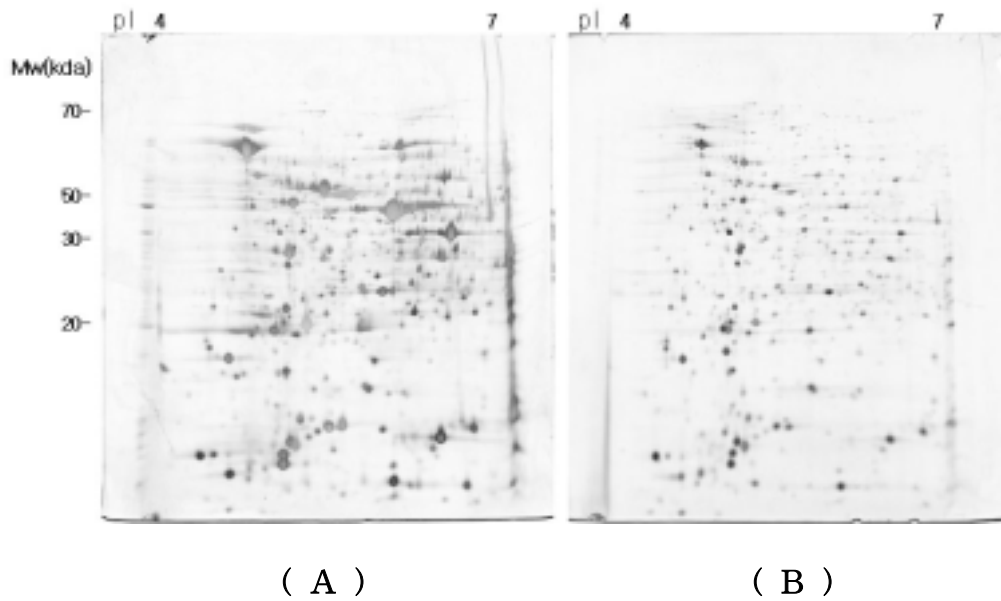


Figure 3-4. 2-DE image of *S. enteritidis* ; (A)A total of 428 spots were detected on 2-DE image (B) A total of 422 spots were detected on 2-DE image. Gels were stained with silver nitrate, and spots were detected using Phoretix 2D software



5) Immunoblotting 결과

*S. enteritidis* 표준균주의 protein 함량을 120ug으로 증가시켜 이차원전기영동한 다음 immunoblotting 한 결과 이다. 그림 A는 도은 염색한 것으로 748개의 protein spot 을 검출할 수 있었고 그림 B는 immunoblotting한 결과로 172개의 항원 spots 을 확인하였다(Fig 3-5).

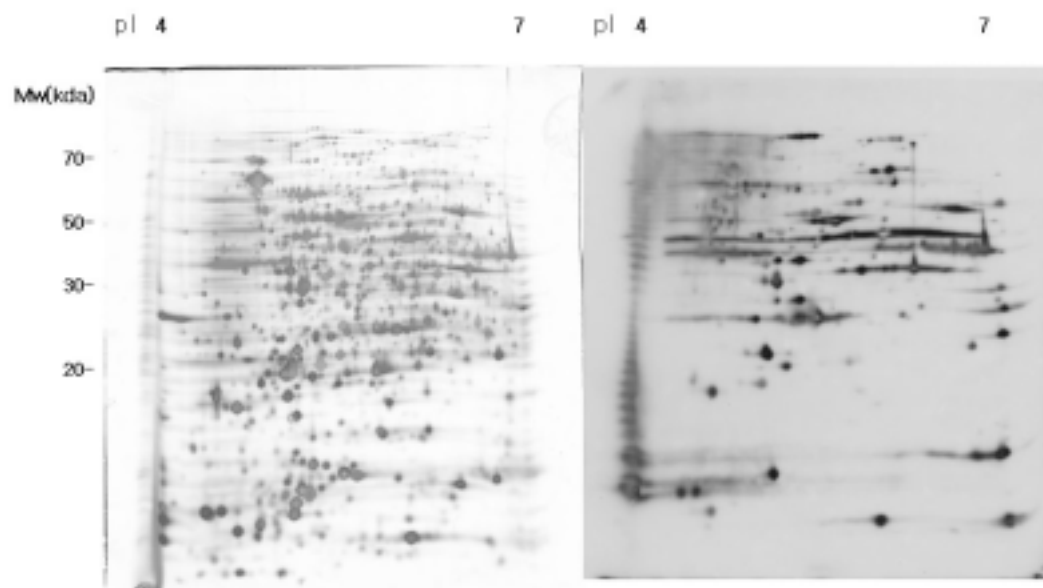


Fig. 3-5. 2-DE image (A) and its immunoblotting image (B) of *S. enteritidis*.

A total of 748 spots were detected on 2-DE image but 172 of 748 were identified as antigenic spots on ECL image using rabbit antiserum specific for *S. enteritidis*.

6) MALDI-TOF 결과

Salmonella enteritidis를 MALDI-TOF MS를 통해 분석되어진 표준균주의 단백질 분석 결과는 다음과 같다(Fig 3-6).



Fig. 3-6. Protein Identification on standard strain of *S. enteritidis* by MALDI-TOF mass spectrometry

spot No.	protein discription	NCBI Accession No.	No. of peptides matched	MOWSE score	Theoretical <i>Mr/pI</i>
1	GroEC protein	16763152	13	2.856e+ 005	57286/4.8
2	enolase	871717	15	4.100e+ 009	45599/5.3
3	ATP synthase beta subunite	16762461	15	6.787e+ 009	50248/4.9
4	Transaldolase elongation factor EF-Tu.A	16769207	11	8.009e+ 005	43284/5.3
5	malate dehydrogenose	16766654	8	2523e+ 005	32476/6.0
6	ND_mannose-specific II AB Component	16760719	12	3385e+ 004	35018/5.4
7	Pho Q	16764586	10	4.571e+ 006	25634/5.3
8	Inorganic pyrophosphatase	16763234	4	212	19676/5.1

Fig. 3-6. Protein identification on standard strain of *S. enteritidis* by MALDI-TOF mass spectrometry

7) 한방사료첨가제가 육계의 체내단백질 발현에 미치는 영향

한방사료첨가제가 육계의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2차원적 전기영동법(SDS PAGE+Isoelectric focusing)을 실시하였던바 실험군에서는 대조군에 비하여 3개의 단백질이 관찰되었다. (Fig.2-1 , Fig2-2참조: No 110 ; pI 4.45 ,분자량 43.94Kd, No 113 ; pI 4.62, 분자량 43.79 Kd ,No 115 ; pI 4.81 , 분자량 33.31 Kd)

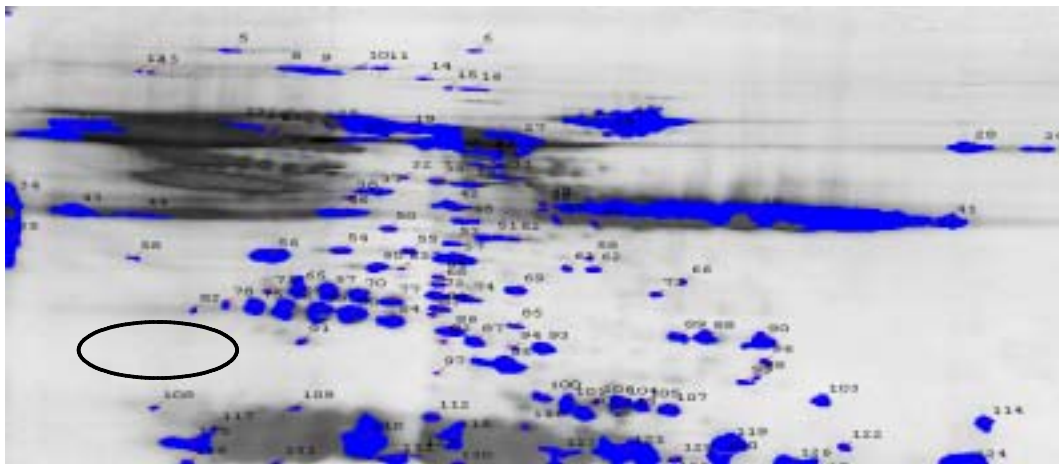


Fig. 3-7. Two-dimensional electrophoresis of the protein in control groups.

These proteins were separated according to their isoelectric pH in the horizontal direction and their apparent mass in the vertical direction

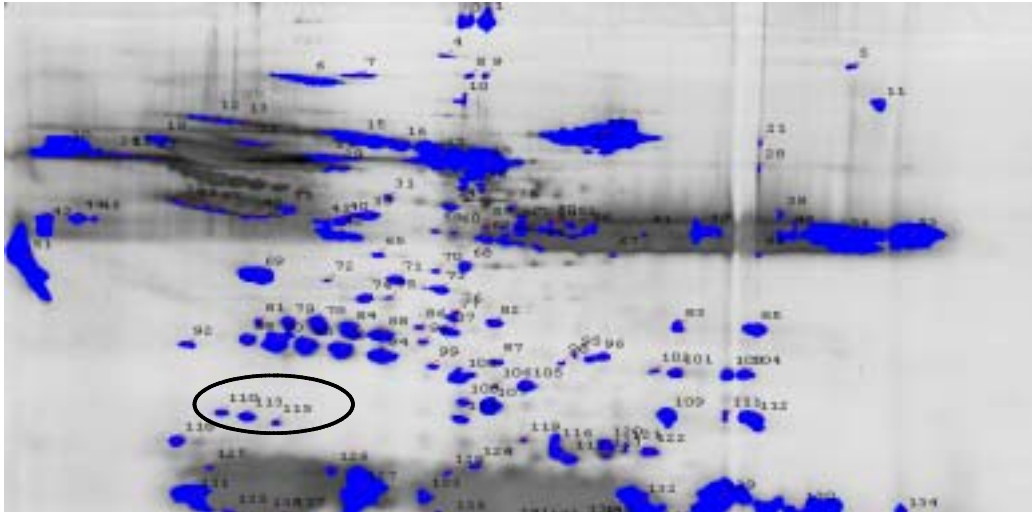


Fig. 3-8. Two-dimensional electrophoresis of the protein in groups treated with feed additive. These proteins were separated according to their isoelectric pH in the horizontal direction and their apparent mass in the vertical direction

**NOTE** : No. 110 ; pI 4.45 , M/W 43.94 Kd, No. 113 ; pI 4.62 , M/W 43.79 Kd , No. 115 ; pI 4.81 , M/W 33.31 Kd

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

### 제 1 절 연구평가의 착안점

구 분	평 가 의 착 안 점 및 척 도	
	착 안 사 항	척 도 (점 수)
1차년도(2000~2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한방사료첨가제의 효능 I</li> <li>○ 한방사료첨가제의 Salmonella 속균 및 enteritidis 방제효과 I</li> <li>○ 한방사료첨가제 투여후 육계 내 단백질 분석에 관한 평가 I</li> </ul>	<p>20</p> <p>20</p> <p>10</p>
2차년도(2001~2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한방사료첨가제의 효능 II</li> <li>○ 한방사료첨가제의 Salmonella 속균 및 enteritidis 방제효과 II</li> <li>○ 한방사료첨가제 투여후 육계 내 단백질 분석에 관한 평가 II</li> <li>○ 경제성 및 생산체제 (Lab-Venture)</li> </ul>	<p>25</p> <p>15</p> <p>5</p> <p>5</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한방사료 첨가제 효능 I, II</li> <li>○ Salmonella 속균 방제 효과</li> <li>○ Proteomics에 의한 S. enteritidis 단백질 분석</li> <li>○ 경제성 및 생산체제</li> </ul>	<p>45</p> <p>35</p> <p>15</p> <p>5</p>

제 2 절 연구개발목표달성도

세부과제명	연구개발 내용	진척도 (%)
한방사료 첨가제의 <i>Salmonella</i> spp. 및 <i>enteritidis</i> 에 대한 방제 효과 (I)	첨가농도별 항균성 시험	*****100
	혈청형별 항균시험	*****100
	시험계군의 분변중 <i>Salmonella</i> 분리	*****100
	맹장내용물중 집중균의 수적변동 조사	*****100
	맹장내용의 양성계수 측정	*****100
	간장 및 비장의 양성계수 측정	*****100
	전자현미경에 의한 장관 정착확인	*****100
	기타 유익 미생물에 대한 영향 분석	*****100
한방사료첨가제가 육계 계육에 미치는 이화학적 효과 및 경제성 (I)	지방 (I) 조성	*****100
	cholesterol (I) 변화	*****100
	단백질 변화 (I)	*****100
	아미노산 조성 (I)	*****100
	불포화지방산 (I)의 변화	*****100
	일평균증체량	*****100
	육성을	*****100
	관능검사	*****100
사료요구율	*****100	
안전성 평가(추가)	*****100	
한방사료첨가제가 단백질발현 및 <i>Salmonella enteritidis</i> 분석에 미치는 영향	2차원적 전기영동법에 의한 단백질발현 연구	*****100
	Proteome에 의한 <i>S. enteritidis</i> 의 단백질 분석	*****100
	Immunoblotting	*****100
	Maldi-Tof에 의한 단백질 분석	*****100
	NO 측정	*****100

### 제 3 절 관련분야의 기술발전의 기여도

1. 한방 첨가제의 개발로 인하여 육계 및 산란계 사육농가에 가급적 저렴한 가격으로 보급하여 고품질 육계를 생산하여 농가소득을 증대시킬 수 있다.
2. 나아가 항생제 및 백신을 최소 투여하여 육계의 축산물안전성을 확보할 수 있다.
3. 품질이 향상된 육계를 보급함으로써 국민건강에 크게 이바지 할 수 있다.
4. 이 기법을 토대로 육계외의 양계 및 다른 가축의 한방첨가제를 개발하여 농가소득 증대 및 축산물 안전성 확보에 크게 이바지 할 수 있다.
5. 뿐만 아니라 안정성이 확보된 축산물을 수출하여 해외시장의 개척에도 큰 기여를 할 수 있다.
6. 양계장에서의 살모넬라 감염 방지 및 식중독의 근원적 대책을 수립할 수 있다.
7. 계육처리공정에 HACCP 적용을 위한 기초자료가 될 수 있다.
8. 한방사료첨가제를 보조사료 등록하여 lab-venture를 만들어 공급체계를 확립하고 각 사료농가에 저렴한 가격으로 보급할 수 있다.
9. 이 첨가제로 사육한 육계(35일 : 성장일)를 국내시장에 보급하여 국민의 안전성 추구에 부합될 수 있고, 나아가 판매 신장 및 농가소득 증대에 직접적 기여를 할 수 있도록 한다.
10. 지속적 연구를 통하여 육계 외에 돼지, 젓소, 육우 및 양계의 사양관리에 필요한 신 천연 한방사료첨가제를 개발하고자 한다.



## 제 5 장 연구개발의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

2년간의 연구로 육계의 성장 및 S. enteritidis 등에 관한 연구를 수행하였다. 앞으로 Salmonella enteritidis에 관한 proteome연구를 할 예정이다.

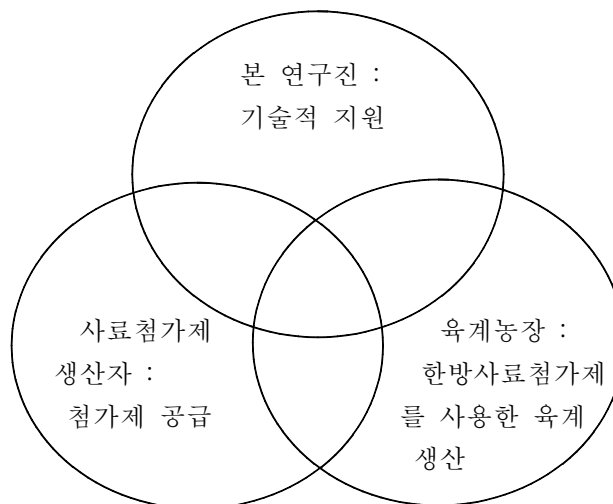
### 제 2 절 타 연구에의 응용

이 결과를 토대로 산란계, 돼지 등의 사료첨가제를 개발하기 위한 연구를 수행할 예정이다.

### 제 3 절 기업화 추진방안

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

<기업화 추진 안>



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

### 제 1 절 유기축산

국제식품규격위원회(CODEX)는 28차 회의에서 유기축산에 관한 지침을 마련하였고 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(California Certified Organic Farmers)를 중심으로 하여 연방 유기식품법을 제정하는 등 유기식품생산 및 유통에 관한 노력을 해 왔다. 이러한 결과로 유럽연합(EU)은 '99년 6월 EU 농장이사회에서 유기농축산물에 관한 통일기준을 승인하였으며, 유럽의 경우 '98년말 약 280만ha의 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 60억달러에 이를 것으로 추정하고 있다.

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

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

#### 1. 유기축산의 현황

##### 가. 덴마크의 유기축산

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

## 나. 미국의 유기축산

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

## 다. Codex 유기 축산에 필요한 신기술 개발

### 1) 제초제 대체물질 및 작부체계 개발

유기 조사료 생산을 위해서는 제초제, 살충제와 같은 농약의 사용이 금지되고 화학비료의 사용이 금지된다. 화학비료는 분뇨의 환원과 토양관리방법의 개선으로 해결될 수 있고 병충해 역시 생산량 감소를 가져오는 어려운 과제의 하나이지만 내병충성 품종의 육성으로 사료포에서는 해결이 가능하다. 그러나 아직 해결이 불가능한 가장 심각한 피해는 옥수수 밭에서의 잡초발생이며 다음이 멸강충의 피해이다. 잡초 발생을 억압할 수 있는 관리방법, 혼파방법, 작부체계개발, 대체작물 사용 등의 방법 개발과 더불어 제초제를 대체할 수 있는 천연 대체물질의 개발을 시도하여야 한다.

### 2) 면역력 증강을 위한 천연물질 개발

가축의 질병치료 외에 항생제 사용이 금지되며 휴약기간도 2배나 길어지고 2005년 이후는 항생제 사용이 전면 금지됨에 따라서 항생제 대응의 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 대응으로 사용이 가능한 천연물질의 범위를 구명하고 가능성이 있는 새로운 물질을 개발하여야 한다.

### 3) 병충해 적응성이 높은 품종 및 유전자원 개발

사료작물 종류나 품종가운데 병충해나 잡초에 대한 적응성이나 억압능력이 높은 품종을 선별하여 유기농업인이 쉽게 선택할 수 있도록 해야 한다.

### 4) Codex 유기 축산 기준에 맞는 천연 제품 개발

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

5) Codex 유기 축산 기준에는 분뇨처리 효소제 및 미생물 개발

유기 축산을 위한 가장 중요한 분야중의 하나가 분뇨를 자원으로 환원하는 것이다. 축 분뇨의 자원화를 위하여 효과적인 분뇨처리 효소제 및 미생물 제제를 codex기준에 벗어나지 않는 범위내에서 선정하여 유기축산농가가 쉽게 이용할 수 있도록 해야 한다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Anderson, R.K. , 1982. Surveillance: criteria for evaluation and desifn of epidemiologic surveillance systema for animal health and productivity. Proc.86th Ann.Meet.US.Anim.health Assoc.,pp.321-340
2. Barnouin, J.,1986a. Enquete eco-pathologique continue un elevages-observatoires chez les ruminants:objectifs et strategie. Ann.Rech.Vet., 17(3):209-211
3. Barnouin, J.,1986a. Enquete eco-pathologique continue un elevages-observatoires chez les ruminants:le systeme de codification et de verifications des donnees.Ann. Rech.
4. Barnouin, J. and Brochart, M.,1986.Enquete eco-pathologique continue: les objectifs et leur realisation,le choix et la typologie des slsvages. Ann.Rech, Vet.,17(3):201-207
5. Barnouin, J. ,Fayet,J.C.,Brochart,M.,Bouvier,A.and Paccard, P.,1986.Enquete eco-pathologique continue:hierarchie de la pathologie observee en elevage bovine latier.Ann. Rech. vet.,17(3):227-230
6. Bartlett,P.,Kaneene,J.,Kirk,J.,Wilke,M. and Martenuik,J.,1986.Development of a computerized dariy herd health data base epidemiologic research. Prev.Vet.Med.,4:3-14.
7. Beal,V.C.,Jr., 1977. Market cattle test program as an efficient surveillance tool. APHIS working paper,USDA-APHIS-VS,Hyattsville,MS,P.18.
8. Bigras-Poulin,M. and Harvey,D.,1986.FAHRMX as part of an integrated prevertive medicine program. In: EC. Mather and J.B. Kaneene(Editors),Economics of Animal Disease. McNaughton and Gunn, Saline,MI,pp.80-86.
9. Blackburn BO, Schalter LK, Swanson MR. Antibiotic resistance of members of the genes Salmonella isolated from chickens, turkeys, cattle and swine in the United States during October 1981 through September 1982. AJVR, 45(6), 1245, 1984.
10. Boyce. TG et al. : Recurrent out breaks Salmonella enteritidis infections in a Texas restaurant: phage type 4 arrives in the United States, Epidemiol infect. 117 : 29-34. 1996
11. Cochran,W.G.,1977.Sampling Techniques. Wiley,New York,pp65-66,89-110.
12. Davies RH and C.W ray : Distribution of Salmonella Contamination in 10 animal food mills. Vet Microbiol. 57: 159-169. 1997

13. Diesch,S.L.,1983. The interface between the Minnesota food animal disease reporting system and the APHIS 5-phase plan. In:Proc.87th Ann. Meet.US.Anim. Health Assoc.,16-21 October 1983, Las Vegas, NV, pp. 406-410.
14. Diesch,S.L. and Martin,F.B., 1979. Farmstead surveillance and disease reporting. Proc.83rd Ann.Meet.US.Anim.Health Assoc.,pp.13-20.
15. Dohoo,I.R. and Stahlbaum,B.W.,1986.Animal Production and Health Information Network(APHIN):Putting it all together.In:E.C. Mather and J.B. Kaneene (Editors),Economics of Animal Disease.McNaughton and Saline,MI,pp136-144.
16. Droleskey, RE. et al. : Colonization of cecal mucosal epithelium in chicks treated with a continuous flow culture of 29 characterized bacteria : confirmation by scanning electron microscopy. J Food Protect. 58(8): 837-842, 1995
17. Elandt-Johnson,R.,1977.Various estimators of conditional probabilities of death in follow-up studies: Summary of results.J.Chron.Dis.,30:247-256.
18. Ewing, WH : Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed.
19. Elsevier Science Publishing Co. Inc, New York, pp 27, 1986
- FAO/IOE,1975.Incidence of Animal Disease.
20. Genzler, DJ, et al. : Salmonella enteritidis in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks, Avian Dis. 38:37-43, 1994
21. Hopper SA, Mawe, S. Salmonella enteritidis in a commercial layer flock. Vet Res, 123; 351, 1989.
22. Humphrey, TJ, et al : Infection of egg-laying hens with Salmonella enteritidis PT4 by oral inoculation, Vet, Rec, 125:531, 1989
23. Humphrey. TJ. et al. : Isoates of Salmonella enterica enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. Epidemiol. Infect. 117 : 79-88. 1996
24. Humphrey, TJ, et al : poultry meat as source of Human salmonellosis in England and wales Epidemiol Infect, 100:175-184, 1998
25. Humphrey. TY. et al. : Contamination of hands and work surfaces with Salmonella enteritidis PT<sub>4</sub> during the preparation of egg dishes, Epidemiol. Infect.113 : 403-409. 1994
26. Humphrey TJ, Baskerville A, Mawer S, et al. Salmonella enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs; a study involving naturally infected

- hens. *Epidemiol Infect*, 103: 415-423, 1989.
27. Humphrey TJ, Baskerville A, Chart H and Rowe B. Infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* PT<sub>4</sub> by oral inoculation, *Vet Res*, 125, 531, 1989.
  28. Hurd, H.S. and Kaneene, J.B., 1990. The National Animal Health Monitoring System in Michigan. II. Methodological issues in the estimation of frequencies of disease in a prospective study of multiple dynamic populations. *Prev. vet. Med.*, 8: 115-125.
  29. Johansson TML, et al. : The first *Salmonella enteritidis* phage type 1 infection of a commercial layer flock in Finland, *Acta. Vet. Scand*, 37 : 471, 1996
  30. Kaneene, J.B. and Hurd, H.B., 1990. The National Animal Health Monitoring System in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Prev. Vet. Med.*, 8: 127-140
  31. Kim, C.J, Nagaraja KB, Pomeroy, BS : Enzyme linked immunosorbent assay from detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens, *Am, J Vet Res* 52 : 1069-1074, 1991
  32. Kleinbaum, D., Kepper, L. and Morgenstern, H., 1982. *Epidemiologic Research: Principles and Quantitative Methods*. Van Nostrand -Reinhold, New York , pp. 96-115.
  33. Lester, SA, : *Salmonella enteritidis* infection of broilers and broiler breeders, *Vet Rec*, 123: 350, 1988.
  34. Lillard, GS : The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses, *J Food Prot.* 53:202-204, 1990
  35. Limawongranee S, Hayashidani H, Okatani AT, et al. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. *J VET Med Sci*, 61(3); 255-259, 1999
  36. Linton AH. *Guideline on prevention and control of salmonellosis*, WHO, Geneva, 10, 1983.
  37. Line, JE, et al. : Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult Sci* 76:1227-1231. 1997
  38. Lloyd, J. and Schwab, G., 1987. Swine health information management system: A brief description and preliminary slaughter check data. *Research Report*,

- Agricultural Experiment Station, 487: 194-200.
39. Martin, S.W., Meek, A.H. and Willeberg, P., 1987. *Veterinary Epidemiology: Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 23-73
  40. Miettinen, O., 1976. Estimability and estimation in case-referent studies. *Am.J.Epidemiol.*, 103(2): 226-235
  41. Nabbut NH. Salmonella serotypes encountered in animal feed additives in Lebanon, *Am J Vet Res.* 39(5), 893, 1978.
  42. Nightingale SL. Salmonella foodborne illness. *Am Fam Physician*, 39; 387-388, 1989.
  43. Nair US, Saed AM, Muriana PM, et al. Plasmid profile and resistance to antimicrobial agents among *Salmonella enteritidis* isolates from human beings and poultry in the midwestern United States. *JAVIMA*, 206; 1339-1344, 1995.
  44. Plummer RAS. et al. : Salmonella contamination of retail chicken products sold in the UK, *J. Food protection*, 58:843-846, 1995
  45. Poppensiek, G.C. and Budd, D.L., 1966. A review of animal disease morbidity and mortality reporting. In: C.R. Schroeder, G. Poppensiek and D.L. Budd (Editors), *A Historical Survey of Animal Disease Morbidity and Mortality Reporting*. National Academy of Sciences, Washington, DC, pp. 1-24
  46. Riemann, H.P., 1982. A nationwide sine health system in Denmark. In: J.B. Kaneene and E.C. Mother (Editors), *Cost Benefits of Food Animal Health*. Thomson-Shore, Dexter, MI, pp. 73-79.
  47. Robert, D; Salmonella in chilled and frozen chicken, *Lancet* 337: 584-985, 1991
  48. Sato..S : Salmonella enteritidis infection in chicken *Morden Media.* 37:1 1991
  49. Shackelford, AD : Modification of processing methods to control Salmonella in poultry, *Poult, Sci.* 67:933-935, 1998
  50. Shivapeasad HL, TImoney JF, Morales S, Lucio B and Baker RC. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding and serological response, *Avian Disease*, 34, 548, 1990.
  51. Shivapeasad, HL et al. : Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens, L. studies on egg transmission, chemical signs, fecal shedding and serologic responses, *Avian Disease*, 34:548, 1990
  52. Stephens, A.J., Esslemont, R.J. and Ellis, P.R., 1982. A dairy herd information



- system for small computers. In: J.B. Kaneene and E.C. Mother (Editors), Cost Benefits of Food Animal Health. Thomson-shore, dexter, MI, pp. 117-152.
53. The FoodSite. 1999. UN, 유기축산식품 국제지침 작성착수
  54. Timononey, JF, et al. : Hagen and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals, 8th ed. Cornell univ. press : Ithaca and London, pp.74, 1988
  55. Todd, ECD. : Poultry-associated food-borne disease : its occurrence, cost, sources, and prevention, J Food prot, 43 : 129-139, 1980
  56. USDA, 1985. The national residue monitoring program. In: Meat and Poultry Inspection. National Academy Press, Washington, DC, pp. 49-67.
  57. USDA, 1986. Brucellosis Eradication: Uniform Methods and Rules. APHIS/US APHIS 91-1, pp. 46-47
  58. Waltman, OW and MA Horne : Isolation of Salmonella from chickens reacting in the pullorum-Typhoid agglutination test, Avian disease, 37:805, 1993
  59. WHO : Salmonellosis control : The role of animal and product hygiene. Reprint by a WHO Expert Committee.
  60. Willeberg, P., 1978. The Danish swine slaughter inspection data bank and some epidemiologic applications. In: Proceedings of International Symposium on Animal Health and Disease Data Banks, 4-6 December 1978, Washington, DC, pp. 133-144.
  61. Zivkovic, J, et al. : Salmonella serovars in chicken meat and chicken meat products in zagreb, croatia, Veterinarski Arhiv 67(4) : 169-175, 1997
  62. 김기석. Current situation of poultry diseases in korea. 한국가금 학회지 19(3), 137, 1992.
  63. 김기석, 이희수, 오인필, 김순재, 국내 닭에서의 가금티푸스(Foul Typhoid)발생. 농진청 농과 논문집(가축위생). 37(1), 544, 1995.
  64. 김능희, 탁연빈 : 대구지역 도계장에서 처리된 도계육의 Salmonella 오염에 관하여. 한국수의공중보건학회지. 22(4): 365. 1998
  65. 김정우 : Salmonella enteritidis의 편모향원에 대한 난황향체 생산, 한국가금학회지 25(4) : 161-167, 1998
  66. 신동화, 한지숙, 김문숙. 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 Listeria monocytogenes의 증식억제에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 26; 627-632, 1994.
  67. 지원대, 정민선, 정현채, 등. 오미자 추출물의 세균 증식 억제효과. J Fd Hyg Safety, 16(2); 89-95, 2001.

68. 안은영, 시동화, 백남인, 등. 감초로부터 항균성물질의 분리 및 구조 동정. 한국식품과학회지, 30; 680-687, 1998.
69. 윤영선, 김공수, 이영남. 키토산의 항세균 및 항진균 활성. 한국키토산키토산학회지, 4; 8, 1999.
70. 성찬우, 김재홍, 송창선, 오미필, 이지환, 김상희. 주요 닭질병에 대한 국내 종계균의 항체 보유현황, 농진청 농과논문집(가축위생).35(2), 604, 1993.
71. 오인필, 김기석, 권용국, 송창선, 우용구, 성환우, 이명주, 남상섭, 이윤정, 강민수, 권혁만. 주요 가금질병 검색 및 역학조사 농진청 수의과학 연구소 시험연구보고서 pp 318, 1996.
72. 오강희, 최원필 : 초생추 유래 Salmonella 속균의 생화학적 특성, 대한수의학회지. 34:501, 1994
73. 장기석, 정병곤, 강호조 : 동물성 원료사료에서 Salmonella 속균의 분리, 생존성 및 초생추에 대한 실험적 감염, 한국수의 공중보건 학회지, 12(2) : 171.1988
74. 홍중해 : 국내에서 보고된 동물성식품유래 식중독의 역학적 발생특징. 한국수의공중보건학회지. 18(2): 147. 1994



## 주 의

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