

# 항생제 대체 사료첨가제로서 매실추출 혼합물이 육계의 성장, 소화 효소 활성도 및 장내 미생물 균총에 미치는 영향

고영현 · 양혜영 · 강선영 · 김은숙 · 장인석

진주산업대학교 동물생명과학과, 동물생명산업센터

## Effects of a Blend of *Prunus Mume* Extract as an Alternative to Antibiotics on Growth Performance, Activity of Digestive Enzymes and Microflora Population in Broiler Chickens

Y. H. Ko, H. Y. Yang, S. Y. Kang, E. S. Kim and I. S. Jang

Department of Animal Science & Biotechnology, RAIC, Jinju National University

### ABSTRACT

The current study was designed to define whether a blend of *prunus mume* extract (25%) containing lactic acid (75%) and grape seed extract (10 ppm) could affect *in vitro* antimicrobial activity and growth performance, intestinal microflora, plasma biochemical profiles and digestive enzymes activities in broiler chickens. In paper disc agar diffusion test, we clearly observed antimicrobial activity against *E. coli* in response to *prunus mume* extract or a blend of *prunus mume* extract. For *in vivo* test, a total of ninety six 3-d-old male broiler chicks were assigned to basal diet (CON), basal diet supplemented with antibiotics (ANTI) and 0.5% a blend of *prunus mume* extract (PRNUS) until 35 days of age. Throughout the entire experimental period (3-35 days), there were no differences in BW and FCR between the birds fed the basal diet with antibiotics and the diet supplemented with a blend of *prunus mume*. However, ANTI group showed a significant increase in BW and total gain compared to CON group. The weights of digestive organs such as the pancreas and mucosal tissues were not affected by dietary treatments. There was no difference in plasma levels of glucose, cholesterol, AST and ALT activity. However, triglyceride in plasma increased (P<0.05) in the birds fed the diet supplemented with 0.5% a blend of *prunus mume* extract compared to those fed antibiotics supplemented diet. The activities of pancreatic trypsin and amylase, and intestinal hydrolase including disaccharidase were not affected by dietary treatment. The colony forming units (CFU) of *lactobacillus* in the lower ileal-cecum of the birds fed the diet supplemented with a blend of *prunus mume* extract was significantly (P<0.05) higher than that of birds fed antibiotic supplemented diet without affecting the CFU of *E. coli*. In conclusion, the birds fed the diet supplemented a blend of *prunus mume* as an alternative to antibiotics showed a similar growth performance and an significant increase in *lactobacillus* population compared with the birds fed basal and antibiotics supplemented diets.

(Key words : *Prunus mume* extract, Broiler, Antimicrobial activity, Digestive enzymes)

### I. 서론

1950년대 이후 어린 가축의 성장 촉진과 사료

효율을 개선하고 축산물의 생산효율을 향상시킬 목적으로 penicillin, bacitracin 등과 같은 항생제가 사료첨가제로서 널리 사용되어 왔다.

Corresponding author : I. S. Jang, Department of Animal Science & Biotechnology, RAIC, Jinju National University, 150, Chilamdong, Jinju, Gyeongnam, 660-758, Korea  
Tel : 055-751-3236, E-mail : isjang@jinju.ac.kr

항생제의 작용기전은 먼저 가축체내에 존재하는 살모넬라, 대장균, 클로스트리디움 등과 같은 장내 병원성균의 세포막을 분해하여 사멸시키고 (Leitner 등, 2001) 소장 흡수세포벽을 얇게 하여 영양소의 흡수율을 증대시켜 성장을 촉진시킨다고 알려져 있다 (Ravindran 등, 1984; Collington 등, 1990). 그러나 가축 생산성 증대와 같은 긍정적인 효과에도 불구하고 항생물질이 고기, 우유, 계란 등의 축산물에 잔류될 수 있다는 점과 축산물을 통하여 섭취된 항생물질이 인체의 내성을 증가시켜 항생물질에 대하여 저항성을 나타낼 수 있다는 일부 부정적인 효과가 밝혀지면서 최근 항생제의 사용에 문제점이 제기되고 있다 (Lee 등, 2001). 스웨덴, 덴마크 등과 같은 유럽 국가들을 중심으로 가축 사료첨가제로서 항생제 사용이 금지 또는 극도로 제한되고 있다. 최근 이와 같은 시대적 흐름에 따라 사료에 첨가되는 항생제를 53종에서 25종으로 대폭 축소하고, 2012년 농장에 대한 HACCP 제도를 도입하는 등 사료 위생관리를 엄격히 관리하는 단계로 접어들면서, 항생제를 대체할 수 있는 대체제에 대한 연구가 절실히 요구된다. 따라서 축산식품 소비자는 물론 생산자를 위해서도 사료에 첨가되는 항생제를 대체할 수 있는 안전성이 확보된 후보 물질의 연구 개발 및 효능 연구는 미래 지속가능한 동물산업을 위해 필연적으로 해결해야만 하는 향후의 숙제이다.

이러한 사실과 더불어 국민소득이 증가함에 따라 웰빙에 대한 관심 고조로 동물성 식품에 대한 선호도가 양 보다는 질 위주로 급격하게 변화되고 있어 천연자원을 이용한 다양한 항생제 대체 사료첨가제의 개발이 주목을 받고 있는바, 본 연구에서 사용된 매실 (*Prunus mume*)은 섬유소, 탄닌과 무기물이 풍부하고 시트릭산(구연산) 등을 포함한 각종 유기산이 다량 함유된 것으로 (임, 1999), 한방과 민간에서 잎, 청매(미성숙 매실)는 살균, 구충, 해독, 해열 등과 같은 다양한 효과를 나타내는 한약제로 널리 이용되고 있다. 매실의 효능은 다양한 연구에서 항균작용 (이 등, 2003), 항산화작용 (한 등, 2001), 간 기능 증진 (서 등, 1990) 등의 효

과들이 과학적으로 검증되었다. 특히 매실의 항균작용 연구에서 매실추출물로서 paper disc 법으로 항균작용을 조사한 결과 그람 (+) 세균인 *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 등과 그람 (-) 세균인 *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* 등에 효과적인 저해 활성을 나타내었다 (임, 1999; 이 등, 2003). 또한 유기산의 일종은 유산 (lactic acid)은 이미 위장관의 환경을 긍정적으로 조절하여 가축 사료첨가제로서 상당히 많이 이용되고 있다 (van de Broek, 2000). 그러나 장관내 환경조절물질로서 고품질의 축산물을 생산할 수 있는 천연 소재인 매실 또는 그 부산물을 이용하여 가축 사료첨가제로서의 가능성을 과학적으로 연구한 사례는 극히 일부분에 지나지 않고 있다.

따라서 본 연구는 매실추출 혼합물의 *in vitro* 항균효과를 검증하고 이를 근거로 육계사료에 위장관 환경조절제로서 매실추출물 및 유산 (lactic acid) 그리고 항산화제로서 포도씨앗추출물을 혼합한 제제를 급여하여 성장 및 사료효율, 혈액성상, 소장의 소화 효소 활성도 및 세균총에 미치는 작용에 대하여 조사하여 항생제 대체제로서의 가능성에 대한 연구를 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질 제조

#### (1) 시험물질 준비

사료첨가제로서 매실함유 혼합물을 제조하기 위해 사용한 시험물질은 다음과 같다. 먼저 매실 (청매실)은 시중에서 구입한 후 과육을 수거하여 완전히 동결 건조한 매실 분말을 메탄올 (1:1 비율)에 침지하여 5일 동안 정기적으로 흔들어 주어 매실의 유효 성분을 추출하였다. 추출 과정이 완료된 후, 그 여과액을 회전식 진공 증발장치 (60°C)에서 증발시켜 고농축 매실 조추출물 (crude extract)을 획득하였다. 유기산제제로서 사용한 유산 (lactic acid)은 순도 50%로서 울더베스트(주) 제품을 사용하였다. 또한 항

산화작용이 있는 것으로 알려진 포도씨앗추출물 (SUSA International Inc, USA)을 시중에서 구입하여 사용하였다.

## (2) *In vitro* 항균력 분석

위에서 언급한 매실 추출물, 유산 및 포도씨앗 추출물과 이들의 혼합물의 항균력 조사는 paper disc agar diffusion법 (Collins 및 Lyne, 1989)에 따라 분석하였다. 분석방법을 간단히 기술하면 먼저 *E. coli* (KCTC 2441)과 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)를 배양한 후 콜로니 1~2개를 순수 분리하여 영양 배지와 agar를 이용하여 각각 배양하였다. 이어서, 중층용 배지에 상기 배양물을 0.1 ml씩 넣어 미생물을 접종하고 평판 배지에 분주한 후 실온에서 방치하여 균했다. 앞서 제조된 각 성분의 특정 농도의 희석액 20 $\mu$ l를 디스크 (disk, 6mm)에 주입한 후 건조시켜 페트리 접시에 일정한 간격으로 배열하고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 클린 존(미생물 성장이 억제된 반경)을 측정하여 항균력의 범위로 간주하였다.

## 2. 육계 사양시험

### (1) 공시동물

본 시험에 공시된 시험동물은 육계 수컷 Ross종 96수로서 (주)올품에서 구입하였다. 구입 후 스트레스로 인한 부작용을 줄이기 위하여 2일간 적응기간을 거친 3일령 ( $49.2 \pm 0.32$  g) 병아리를 3개 처리구에 케이지 당 4수씩 각각 8반복으로 모두 96수를 완전임의 배치하였다. 일반사양관리는 온도 및 명암조절을 갖춘 사육 시설에서 본 대학의 사육 관리 지침에 따라 실시되었다. 체중은 시험개시, 21일령 및 35일령에 각각 측정하여 증체량을 측정하고 21일령 및 35일령에 사료섭취량을 측정하여 사료요구율을 계산하였다.

### (2) 시험사료 및 시험설계

시험사료는 육계전기 (3~21일령) 및 육계후기 (22~35일령) 등 2 종류 무항제 사료를 제조하

였으며 실험설계에 따라 무항생제구 (대조구, CON), 항생제첨가구 (ANTI) 및 매실혼합물첨가구 (PRUN) 등 3개의 처리구로 설정하였다. 항생제첨가구는 전기사료에 네오마이신 (33 ppm)과 옥시테트라사이클린 (100 ppm)을 혼합하였으며 후기사료에는 colistin (10 ppm)을 투여하였다. 또한 매실혼합물첨가구 (PRUN)는 *in vitro* 검정시험으로 확인된 매실함유 혼합체제 (매실추출물 25% + 유산 75% + 포도씨앗 추출물 10 ppm)를 0.5% (w/w) 수준으로 첨가하였다. 대조구 사료를 포함하여 모두 3종류의 시험사료를 제조한 후 밀봉하여 저온 (15 $^{\circ}$ C)에 보관하고 일정량 동물이 충분히 먹을 수 있는 양을 급여하여 자유 채식시켰다. 시험사료의 조성 및 화학적 성분은 Table 1에 나타난 바와 같다.

### (3) 샘플 채취

사양시험이 종료되는 35일령에 체중을 측정 한 후, 각 처리구당 평균 체중에 가까운 8수씩 모두 24수를 선발하여 도살 전 6시간 동안 절식을 실시하고 경정맥을 절단하여 혈액을 채취하여 혈장을 분리하였다. 이어서 복강을 가위로 절개하고 췌장 및 소장을 획득하여 무게를 측정하였으며, 장 미생물 분석을 위해 맹장 부위의 소화물을 채취하였다. 소장 점막세포를 분리하기 위해 냉각된 생리식염수로서 소장내부를 세척하고 소화물을 제거한 후 가위로 장관막 부위를 절개하여 생리식염수에 3차례 연속적으로 세척하였다. 여분의 수분을 제거하기 위하여 손으로 일정한 압력으로 압착한 후 소장 전체 무게를 측정하였다. 이어서 얼음으로 냉각된 알루미늄판위에서 절개된 소장을 펴서 glass slide를 이용하여 점막세포를 채취하여 무게를 측정하였다. 무게를 채취한 모든 조직은 액체질소에 냉동하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하여 분석에 사용하였다.

### (4) 분석항목

#### 1) 체중 및 사료섭취량 측정

체중 측정은 시험 개시 (3일령), 21일령 및 시험종료 (35일령)에 정해진 시간에 일정하게 체중을 측정하였다. 또한 본 사양시험 동안 사료

Table 1. Formula and chemical composition of experimental diets

Items	Diets	
	Starter	Finisher
Ingredients (%)		
Corn	38.26	44.28
Wheat	20.00	20.00
Wheat bran	5.00	4.00
Animal fat	2.20	3.00
Corn gluten meal	4.00	4.00
Soybean meal (44% CP)	23.00	16.50
Rapeseed meal	1.50	2.00
Fish meal	1.00	1.00
Meat meal	2.00	2.00
Salt	0.20	0.23
Calcium carbonate	0.40	0.20
Tricalcium phosphate	1.40	1.60
Lysine (liquid)	0.46	0.66
Methionine	0.13	0.12
Choline-HCl	—	0.01
Vitamin premix <sup>1)</sup>	0.20	0.20
Mineral premix <sup>2)</sup>	0.20	0.20
Maduramycin+nicarbazine	0.05	—
Blend of <i>Prunus mume</i> extract <sup>3)</sup> (PRUN group only)	0.5	0.5
Antibiotics <sup>4)</sup> (ANTI group only)	0.0133	0.001
Chemical composition (%) <sup>5)</sup>		
Crude protein	21.20	19.20
Ether Extract	4.65	5.10
Crude fiber	4.10	3.80
Crude ash	4.95	4.90

<sup>1)</sup> contained per kg : vit. A, 5,500,000 IU; vit D3, 1,500,000 IU; vit E, 15,000 mg; vit K, 800 mg; thiamin, 1,000 mg; riboflavin, 4,000 mg; niacin, 25,000 mg; biotin, 30 mg; folic acid, 500 mg; pantothenic acid, 5,000 mg; pyridoxine, 1,500 mg; vitamin B12, 15 mg.

<sup>2)</sup> contained per kg: Cu, 12,000 mg; Fe, 35,000 mg; Zn, 25,000 mg; Co, 150 mg; I, 500 mg; Co, 150 mg; Se, 120 mg; Mn, 38,000 mg.

<sup>3)</sup> *Prunus mume* crude extract(25%)+lactic acid (75%) + grape seed extract(10ppm).

<sup>4)</sup> Neomycin (33 ppm) + Oxytetracyclin (100 ppm) in the starter diet and colistin sulfate (10 ppm) in the finisher diet.

<sup>5)</sup> Analyzed data

섭취량을 조사하여 사료요구율을 계산하였다.

## 2) 혈장 생화학적 성분분석

혈장 AST (aspartate aminotransferase), ALT

(alanine aminotransferase), glucose, triglyceride, cholesterol, creatinine 분석은 자동생화학분석기 (Hitachi 747, Japan)를 사용하여 실시되었다.

## 3) 소화 효소 분석

소장 점막세포를 1:1 용량의 mannitol buffer로서 4,500xg에서 12 분간 원심 분리하여 세척한 후 얻은 펠렛을 2% triton X-100을 첨가한 mannitol buffer로서 4°C, 10,000xg에서 10분간 다시 원심 분리한 상청액을 분석에 사용하였다. 소장점막 세포내 존재하는 단백질은 Bicinchoninic Acid (BCA) 방법 (Pierce)을 이용하여 560 nm에서 ELISA로 측정하였으며 표준곡선은 BSA를 희석하여 사용하였다. Alkaline phosphatase (ALP)는 Sigma Diagnostic Assay Kit을 이용하여 매 1분간 5회 연속적으로 405nm에서 ELISA (Molecular devices Co.)로서 kinetic을 측정하였다. Sucrase 및 maltase는 Dahlgvist (1968)의 변형된 방법에 의해서 측정하였으며, 생성된 최종 분해산물인 glucose는 450 nm에서 ELISA을 이용하였다. Leucine aminopeptidase 활성도는 Rybina 등 (1997)의 변형된 방법에 의해 Leucine p-nitroaniline를 기질로 사용하여 96 well plate (Nunc)에서 반응시켜 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

췌장 효소분석을 위해 전체 췌장을 Tris buffer 용액 (pH; 7.4)에서 tissue grinder로서 균질화 한 후 3,000 rpm에서 10분간 분리하여 상등액을 취하였다. 췌장 α-amylase는 1% 전분기질을 분해 할 수 있는 효소량을 dinitrosalicylic 발색용액으로 발색시켜 540 nm 파장에서 spectrophotometer (Uvikon)를 이용하여 측정하였다. 표준 용액으로서는 maltose를 이용하여 표준곡선을 측정하였다 (Bernfeld, 1955). 췌장 trypsin은 균질액에 0.1 U enterokinase를 넣어 trypsinogen을 활성화시켜 benzoyl-L-arginine ethyl ester를 기질로 사용하여 spectrophotometer로 253 nm에서 5분 동안 매 1분 간격으로 kinetics 조사하여 활성도를 측정하였다 (Geiger 및 Fritz, 1986). 효소의 특이적 활성도 (specific activity)는 전체 활성도에서 단백질 mg당 농도로 나누어 표시하였다.

#### 4) 미생물 균총 조사

대장균 (*E. coli*) 조사는 맹장 소화물 1g을 획득하여 계단식으로 연속 희석하여 37°C에서 MacConkey agar (Difco)에 24시간 호기성 배양을 실시하여 colony forming units (CFU)을 측정하였다. 유산균 (*lactobacillus*)은 위와 동일한 방법으로 MRS agar (Difco)을 이용하여 CFU를 측정하였다.

#### (5) 통계처리

사료처리에 따른 육계의 사양성적 등을 비롯한 각종 data는 Proc-GLM (SAS, 1989)에 의한 분산분석을 실시하였으며, 처리 간 비교는 Duncan 방법(Duncan, 1955)에 의해  $P < 0.05$  수준에서 유의성 검정이 실시되었다.

### III. 결 과

#### 1. *In vitro* 항균력 시험 결과

매실추출물, 유산 및 포도씨앗추출물과 이들 3종류 혼합물을 농도별로 조합하여 paper disc agar diffusion 법에 따라 항균력을 조사하였다. 각 성분을 농도별로 조합하여 항균력을 관찰한 결과 유산 50% 이상 및 매실추출물 12.5% 이상에서 비교적 높은 항균력이 나타났다(자료 미제시). 최종적으로 항균 효과 및 경제성을 고려하여 육계사양시험에 필요한 최종 매실추출 혼합물은 매실추출물 25% + 유산 75% + 포도씨앗추출물 10 ppm으로 조성하였으며, 매실추출혼합물의 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 우수한 *in vitro* 항균효과를 보였다.

#### 2. 사양 성적 및 폐사율

시험에 공시한 육계를 개시 3일째에 무항생제 (CON), 항생제 (ANTI) 및 매실혼합물 (PRUN)을 첨가한 3개 처리구에 배치하여 35일령까지 시험사료를 급여하여 사양 성적을 조사한 결과는 Table 2에서 나타난 바와 같다. 시험결과를 살펴보면 매실혼합물첨가구에서 체중 및 일당 증체량은 항생제첨가구와 비교시 통계적 유의

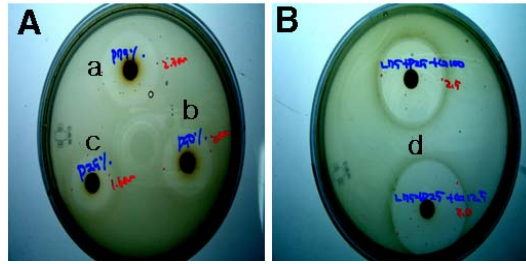


Fig. 1. *In vitro* (paper disc agar diffusion test) antimicrobial activity (*E. Coli*) of *Prunus mume* crude extract (A) and a blend of *Prunus mume* crude extract containing 25% *Prunus mume* crude extract, 75% lactic acid and 10ppm grape seed extract (B). Aa: 75% *Prunus mume* crude extract (clear zone diameter = 2.3 cm), Ab: 50% *Prunus mume* crude extract (clear zone diameter = 2.0 cm), Ac: 25% *Prunus mume* crude extract (clear zone diameter = 1.6 cm) and Bd: a blend of *Prunus mume* crude extract (clear zone diameter = 2.5 cm and 3.0 cm).

적인 차이 없으나 ( $P > 0.05$ ) 다소 감소하는 결과를 나타내었다. 대조구와도 비교시 전체 증체량, 사료 섭취량 및 사료 요구율에서 유의적 차이 없이 약간 증가되는 경향이 나타났다. 그러나 대조구는 항생제첨가구에 비해 유의적으로 낮은 ( $P < 0.05$ ) 체중 및 일당 증체량을 나타내었다. 따라서 매실혼합물 급여는 대조구 보다는 우수하고 항생제처리구 보다는 다소 낮은 중간 정도의 사양 성적을 나타내어 항생제 대체용 사료첨가제로서의 가능성이 있는 것으로 사료된다. 폐사율을 조사한 결과 대조구와 항생제첨가구에서만 각각 한 마리가 폐사되었으며, 매실혼합물급여구에서는 폐사가 발생되지 않았다.

#### 3. 소화 장기 변화

사료내 무항생제 (CON), 항생제 (ANTI) 및 매실혼합물 (PRUN) 첨가에 따른 육계의 소화 장기의 변화를 조사한 결과는 Table 3에서 나타난 바와 같다. 시험 결과 소장 길이는 매실혼합물첨가구에서 대조구와 비교시 유의적으로 ( $P <$

Table 2. Growth performance, feed intake and feed conversion ratio (RCR) from 35 day-old broiler chickens fed the basal diet (CON) and the diets containing antibiotics (ANTI) and a blend of *prunus mume* extract (PRUN)

Items	Treatments		
	CON	ANTI	PRUN
Initial BW, g (3-d)	49.0 ± 0.37	49.4 ± 0.33	49.1 ± 0.26
Final BW, g (35-d)	1776.8 ± 37.52 <sup>b</sup>	1901.2 ± 41.73 <sup>a</sup>	1808.9 ± 38.19 <sup>ab</sup>
Weight gain, g	1727.8 ± 37.45 <sup>b</sup>	1851.8 ± 41.70 <sup>a</sup>	1759.8 ± 38.05 <sup>ab</sup>
Feed intake, g	2663.6 ± 92.50	2942.7 ± 187.98	2960.4 ± 64.07
ADG, g	54.0 ± 1.18 <sup>b</sup>	57.9 ± 1.30 <sup>a</sup>	55.0 ± 1.18 <sup>ab</sup>
FCR	1.54 ± 0.06	1.58 ± 0.09	1.68 ± 0.06
Mortality, bird(%)	3.1%	3.1%	0

Values(mean±SE, n=8).

\* Values with superscripts in the same row differ significantly (P<0.05) among treatments.

Table 3. Apparent changes of digestive organs from 35 day-old broiler chickens fed the basal diet (CON) and the diets containing antibiotics (ANTI) and a blend of *prunus mume* extract (PRUN)

Items	Treatments		
	CON	ANTI	PRUN
Intestinal length (cm)	144.0 ± 4.19 <sup>b</sup>	146.6 ± 1.80 <sup>ab</sup>	155.2 ± 1.59 <sup>a</sup>
Mucosal weight (g)	15.50 ± 1.17	15.07 ± 0.94	15.55 ± 1.05
Pancreas (g)	3.15 ± 0.16	3.45 ± 0.27	3.39 ± 0.21

Values (mean ± SE, n=8).

\* Values with superscripts in the same row differ significantly (P<0.05) among treatments.

0.05) 증가되었으며 항생제첨가구와는 차이가 나타나지 않았다. 소장 점막세포 및 췌장 무게는 모든 처리구에서 비슷한 것으로 관찰되었다.

#### 4. 혈장내 생화학적 성상

매일 첨가사료를 육계에게 급여한 후 혈장에서 측정된 생화학 성분을 조사한 결과는 Table 4에 나타내었다. 혈중 생화학적 성분에서 간 독성지표로 알려진 AST, ALT 등에는 사료첨가제 급여에 따른 어떠한 차이도 발견할 수 없어 육계의 사료첨가 보조제로서 매실혼합물이 체내에 독성 작용 없이 사용될 수 있음이 나타났다. 한편 glucose, cholesterol 등의 함량에서 처리간 어떠한 변화가 관찰되지 않았으나, triglycerides 함량에서는 매실혼합물첨가구에서 항생제첨가구에 비해 유의적으로 (P<0.05) 감소되었다.

#### 5. 소화 효소 활성도 조사

육계에서 매실추출혼합물 급여에 따른 췌장 효소활성도 및 소장 점막효소 활성도를 조사한 결과 단백질 및 전분의 분해 작용에 관여하는 췌장 amylase와 trypsin 활성도는 사료의 처리에 따른 유의적 변화가 없었으나 전반적으로 매실혼합물급여구에서 활성도가 증가되는 수치를 보였다 (Table 5). 소장 점막상피세포에 존재하는 ALP, leucine aminopeptidase 및 이당류 분해 효소 (maltase, sucrase)의 활성도를 조사한 결과에서도, 매실추출혼합물의 첨가가 소장 흡수세포막 효소 (brush border membrane hydrolase)에 존재하는 효소의 활성도에 변화를 미치지 않는 것으로 관찰되었다 (Table 6).

#### 6. 맹장내 미생물 변화조사

맹장 부위의 소화물을 채취하여 대장균을 조

Table 4. Plasma biochemical profiles from 35 day-old broiler chickens fed the basal diet (CON) and the diets containing antibiotics (ANTI) and a blend of *prunus mume* extract (PRUN)

Items	Treatments		
	CON	ANTI	PRUN
AST, IU/L	318.3 ± 25.38	285.5 ± 17.36	263.5 ± 12.34
ALT, IU/L	3.38 ± 0.30	2.63 ± 0.18	2.25 ± 0.25
Total protein, g/dl	3.66 ± 0.24	4.10 ± 0.33	3.45 ± 0.23
Glucose, mg/dl	206.6 ± 30.27	268.13 ± 25.67	237.63 ± 8.20
Triglycerides, mg/dl	20.50 ± 1.87 <sup>b</sup>	31.75 ± 4.54 <sup>a</sup>	20.63 ± 1.15 <sup>b</sup>
Cholesterol, mg/dl	139.50 ± 10.59	158.75 ± 14.70	165.50 ± 6.65
Creatinine, mg/dl	0.43 ± 0.02	0.46 ± 0.05	0.50 ± 0.05

Values (mean ± SE, n=8).

\* Values with superscripts in the same row differ significantly (P<0.05) among treatments.

AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)

Table 5. Specific activities of Pancreatic trypsin and amylase from 35 day-old broiler chickens fed the basal diet (CON) and the diets containing antibiotics (ANTI) and a blend of *prunus mume* extract (PRUN)

Items	Treatments		
	CON	ANTI	PRUN
Pancreatic trypsin, unit/min/mg protein	0.121 ± 0.010	0.109 ± 0.010	0.132 ± 0.011
Pancreatic amylase, unit/min/mg protein	45.14 ± 4.21	43.11 ± 4.29	48.84 ± 3.73

Values (mean ± SE, n=8).

Table 6. Specific activities of intestinal brush border enzymes from 35 day-old broiler chickens fed the basal diet (CON) and the diets containing antibiotics (ANTI) and a blend of *prunus mume* extract (PRUN)

Items	Treatments		
	CON	ANTI	PRUN
Aalkaline phosphatase, U/min/mg protein	17.04 ± 2.49	18.41 ± 2.60	16.03 ± 2.45
Leucine aminopeptidase, U/min/mg protein	1.75 ± 0.14	1.82 ± 0.12	1.79 ± 0.18
Maltase, uM/min mg protein	41.31 ± 1.86	39.91 ± 2.29	41.92 ± 3.02
Sucrase, uM/min mg protein	4.10 ± 0.11	3.82 ± 0.22	3.79 ± 0.17

Values (mean ± SE, n=8).

\* Values with superscripts in the same row differ significantly (P<0.05) among treatments.

Table 7. The CFU of cecal microbial population from 35 day-old broiler chickens fed the basal diet (CON) and the diets containing antibiotics (ANTI) and a blend of *prunus mume* extract (PRUN)

Items	Treatments		
	CON	ANTI	PRUN
		CFU, log/g	
<i>E. coli</i>	5.28 ± 0.13	5.33 ± 0.19	5.21 ± 0.34
<i>Lactobacillus</i> spp.	5.56 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.63 ± 0.22 <sup>b</sup>	6.21 ± 0.17 <sup>a</sup>

Values (mean ± SE, n=8).

\* Values with superscripts in the same row differ significantly (P<0.05) among treatments.

사 결과 모든 처리구에서 대장균 수는 유의적 차이를 발견 할 수 없었다(Table 7). 한편 소화물에 존재하는 유산균은 매실혼합물 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 증가되어 본 매실추출물 급여가 장내 유익균의 정착에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.

#### IV. 고 찰

최근 천연자원을 이용한 항생제 대체 사료첨가제의 개발이 주목을 받고 있는바, 본 연구는 국내 식물자원인 매실과 장관내 환경조절물질인 유산 등을 이용하여 장내 유해 환경조절, 항산화 작용 등과 같은 효능을 보이는 천연소재를 이용하여 항생제 대체 효과를 지닌 사료첨가제를 검색하고자 하였다. 그러나 국내외적으로 매실 또는 그 부산물을 이용하여 항생제 대체 사료첨가제로서 과학적으로 연구된 결과는 거의 없는 실정이다.

매실의 주성분은 수분 85%, 당분 10%, 유기산 5%로서 구성되어 있으며 특히 산도가 높은 구연산을 비롯한 말릭산 등이 다량 함유되어 있다(임, 1999). 이러한 매실을 농축액으로 제조하면 계산적으로 구연산 48.0%, 사과산 14.0% 이상 등 모두 약 62% 이상의 유기산이 함유된 성분으로 만들 수 있다. 이러한 매실 농축액을 대장균과 고초균에 대한 항균력이 강하여 강한 살균효과를 나타낸다(김 및 이, 1986). 일반적으로 사료를 통해 위로 들어온 유해균은 위 속의 염산에 의해 대부분 죽지만 위 활동이 저하되면 소장이하로 내려가서 유해균이 정착된다. 그러나 매실 등에 다량 함유된 구연산 등과 같은 유기산은 소장을 일시적으로 산성화시켜 유해균이 살아남지 못하게 한다(Tsiloyannis 등, 2001). 이 등(2003)에 의하면, 3~5%의 매실추출액은 pH 3.34 정도를 나타내어 낮은 pH와 더불어 높은 구연산 농도가 미생물 군주에 대한 항균력을 보이는 원인으로 보고하였다. 또 다른 연구에 따르면 매실추출물을 급여시 *Helicobacter pylori* 균을 감소시켜 위의 염증을 완화할 수 있음이 보고되었다(Otsuka 등, 2005). 매실의 주요성분인 구연산을 쇠고기의 표면에 분무시에, 대장균 및 살모넬라와 같은

병원성균을 효과적으로 감소시킬 수 있다고 알려지고 있다(Castillo 등, 1999). 따라서 장내 유산균이 활발하게 증식될 경우, 장내 pH가 저하되어 장내 유해미생물 균의 번식이 억제되어 결과적으로 동물자체의 독성물질 생성 방지, 면역력 증강 등과 같은 효과 등이 나타날 수 있다. 특히, 장내 유해 병원성 세균은 대부분 그람 음성균(*E. coli*, *salmonella*, *clostridium*, *campylobacter*)으로 장내 pH 4.5 이상에서 번식이 활발하고 유산균인 경우에는 장내 pH가 4.5 이하에서 활발하므로 가축의 장내 pH를 저하시키는 사료첨가제를 개발하여 급여할 경우 유해 미생물의 번식을 억제하여 항생 효과를 나타낼 수 있다. 본 시험에서도 매실추출물이 *in vitro* 시험결과에서 항균작용이 입증되었으며, 육계를 이용한 *in vivo* 시험에서도 맹장내 유산균 증식에 유리한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

유산 역시 가축에서 소화관내 환경 조절제 역할을 하는 사료 첨가제로서 사용되고 있다(van de Broek, 2000). 유기산은 위장관에서 병원성균의 성장을 억제하여 체내 이로운 균의 정착을 좋은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(EKlund 등, 1980). 여러 연구에 따르면, 또한 가축에서 사료내 유산과 같은 유기산을 첨가시 췌장 효소의 분비를 촉진한다고 보고되고 있다(Ravindran 및 Kornegay 1993; Thaela 등, 1998; Khan, 2003). Jang 등(2004)의 연구에 의하면 약리식물로부터 추출 정제한 essential oil과 유산을 혼합하여 육계에게 급여한 경우 췌장 amylase 효소의 활성도를 증가시키는 것으로 보고하였다.

동물체에서도 매실 성분중 다량 함유된 구연산 등과 같은 유기산은 소화기관에 영향을 주어 위장, 췌장 및 간장 등에서 소화액의 분비를 촉진시키는 것으로 보고되었다(松本紘齋, 1995). 본 시험에서도 매실추출혼합물 급여시 다른 처리구에 비해 췌장 amylase 및 trypsin 활성도가 증가되는 경향을 보였다. 따라서 구연산 등이 다량 함유된 매실, 유산과 같은 유기산은 가축사료 첨가제로 급여시 위와 장내 pH 저하, 소화효소 활성화, 대장균 증식 억제, 영양소 소화 증진, 설사억제, 유산균의 성장촉진을



통한 유해균 억제 등과 같은 다양한 기전으로 가축에 유익한 것으로 사료된다. 그 외 매실 및 포도씨앗추출물은 천연 항산화제로서 세포의 항산화력 방어 작용이 기대되는 것으로 여러 연구에서 발표되고 있다(한 등, 2001; 장 등, 2007). 특히 포도씨앗은 폐놀 계열의 성분이 많아 체내 질병 및 노화 등의 항산화 방어 작용이 우수한 것이 알려져 있다(Bagchi 등, 1999). 최근에는 백리향이나 계피 등과 같은 천연 식물로부터 추출한 생리활성 오일이 항균작용, 항산화 작용 및 소화효소 활성화 작용이 보고되었다(Lee 및 Ahn, 1998; Jang 등, 2007).

본 시험에서 조사된 결과로서 유산을 함유한 매실혼합물을 섭취한 육계에서 증체 등에서 항생제첨가구에 비해 다소 낮았으나 유의적 차이는 없었으며, 오히려 장내 유산균이 증가하는 것으로 나타났다. 혈액 생화학적 성분을 조사한 결과에서 항생제첨가구에 비해 혈중 triglycerides 수준이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다. 또한 췌장에서 분비되는 amylase와 trypsin, 소장 미세용모에 존재하는 효소 활성화도 역시 대조구와 항생제첨가구에 비해 감소되지 않았다. 오히려 췌장 분비 효소들은 다른 구에 비해 증가되는 경향을 보였다. 이상의 결과와 고찰에서 매실추출물 등과 같은 천연 식물자원은 적절한 사양 조건하에서 가축사료 첨가제로서 일부분 항생제를 대체할 수 있는 효과가 있을 것으로 사료되며 이에 대한 효능연구는 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 요약

본 연구는 가축에서 매실추출물(*prunus mume* extract)을 함유하는 항생제 대체 사료첨가제를 탐색하기 위하여 먼저 매실추출물 등을 함유한 물질에서 *in vitro* 항균력 조사를 실시하고 이를 근거로 육계사료에 첨가하여 사양시험을 실시하였다. 먼저 *in vitro* 시험 결과 매실추출물(100%) 및 매실추출 혼합물(매실추출물 25% + 유산 75% + 포도씨앗추출물 10 ppm)에서 대장균에 대하여 강력한 항균효과가 확인되었다. 육계사양시험을 통한 *in vivo* 효과를 조사하기

위하여 대조구(무항생제, CON), 항생제첨가구(ANTI) 및 매실혼합물첨가구(PRUN, 0.5%) 등 3 처리구를 설정하여 35일령까지 사양시험을 실시하여 증체 및 사료이용성, 혈액성상, 장관내 소화효소 활성화도 및 미생물의 균총에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 육계 사료에 매실혼합물 0.5% 첨가시 육계의 증체, 사료 요구율 및 소화기 무게 등은 항생제 첨가구와 유사하였으며, 혈액성상에서 중성지방 함량이 항생제첨가구에 비해 유의적으로( $P<0.05$ ) 감소하는 것으로 나타났다. 매실혼합물 첨가에 따른 췌장 효소활성도 및 소장 점막효소 활성화도를 조사한 결과, 췌장 amylase와 trypsin 활성화도, 소장 점막세포의 ALP, leucine aminopeptidase 및 이당류 분해효소의 활성화도는 모든 처리구에서 유의적 변화 없었으나 PRUN구에서 췌장효소 활성화도가 증가되는 경향이 나타났다. 한편 PRUN구는 맹장내용물내 유산균의 증식을 유의적으로( $P<0.05$ ) 증가시켜 장내에서 체내 유익한 환경을 조성 할 수 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 매실추출 혼합물은 육계 사료에서 배합사료용 항생제대체제로서 가능성이 있다고 사료된다.

## VI. 사 사

본 연구는 산자부와 한국산업기술평가원(ITEP)의 지원하에서 설립된 진주산업대학교 동물생명산업센터 및 진주산업대학교 기성희 연구비(2006) 지원하에 수행되었습니다.

## VII. 인용 문헌

1. Bagchi, M., Milnes, M., Williams, C., Balmorri, J., Ye, X., Stochs, S. J. and Bagchi, D. 1999. Acute and chronic stress-induced gastrointestinal injury in rats and protection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Nutr. Res.* 19:1189-1199.
2. Bernfield, P. 1955. Amylases alpha and beta. In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds), *Methods in enzymology*. Vol 1. New York: Academic Press. 149-151.
3. Castillo, A., Lucia, L. M., Kemp, G. K. and

- Acuff, G. R. 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on beef carcass surfaces using acidified sodium chloride. *J. Food Prot.* 62:580-584.
4. Collington, G. K., Park, D. S. and Armstrong, D. G. 1990. The influence of inclusion of either an antibiotic and a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *Br. J. Nutr.* 64:59-70.
  5. Collins, C. H. and Lyne, P. M. 1989. Collins and Lyne's microbiological methods, 6th ed., p161.
  6. Dahlgvist, A. 1968. Assay of the intestinal disaccharidase. 1968. *Anal. Biochem.* 22:99-107.
  7. Ducan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11.
  8. Eklund, T. 1980. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 48(3):423-432.
  9. Geiger, R. and Fritz, H. 1986. Trypsin. In: Bergmeyer, H. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press. New York, Vol 5, pp. 119-128.
  10. Jang, I. S., Ko, Y. S., Yang, H. Y., Kang, Y. S., Kim, J. Y. and Lee, C. Y. 2004. Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 17(3):394-400.
  11. Jang, I. S., Ko, Y. H., Kang, S. Y. and Lee, C. Y. 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci & Tech.* 134:304-315.
  12. Khan, N. 2003. Feed acidifiers-blending for success. *Feed Mix.* 11:28-30.
  13. Lee, H. S. and Ahn, Y. J. 1998. Growing-inhibiting effects of cinnamon cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J. Agri. Food Chem.* 46:8-12.
  14. Lee, M. H., Lee, H. J. and Ryu, P. D. 2001. Public health risks: Chemical and antibiotic residues. *Review. Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14:402-413.
  15. Leitner, G., Waiman, R. and Heller, E. D. 2001. The effect of apramycin on colonization of pathogenic *Escherichia coli* in the intestinal tract of chicks. *Vet. Q.* 23(2):62-66.
  16. Otsuka, T., Tsukamoto, T., Tanaka, H., Inada, K., Utsunomiya, H., Mizoshita, T., Kumagai, T., Katsuyama, T., Miki, K. and Tatematsu, M. 2005. Suppressive effects of fruit-juice concentrate of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter pylori*-induced glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 6(3):337-341.
  17. Ravindran, V. and Kornegay, E. T. 1993. Acidification of weaning pig diets: A review. *J. Sci. Food Agri.* 62:313-322.
  18. Ravindran, V., Kornegay, E. T. and Webb, K. E. Jr. 1984. Effects of fiber and virginiamycin on nutrient absorption, nutrient retention and rate of passage in growing swine. *J. Anim. Sci.* 59(2): 400-408.
  19. Ryniba, I. V., Liu, H., Gor, Y. and Feinmark, S. J. 1997. Regulation of leukotriene A4 hydrolase activity in endothelial cells by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272(50):31865-31871.
  20. SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th Edition. Vol 2. 1989. SAS Ins., Cary, NC.
  21. Thaela, M. J., Jensen, M. S., Pierzynowski, S. G., Jakob, S. and Jensen, B. B. 1998. Effect of lactic acid supplementation on pancreatic secretion in pigs after weaning. *J. Anim. Feed Sci.* 7:181-183.
  22. Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J. and Sarris, K. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhea. *Res. Vet. Sci.* 70(3):287-293.
  23. van de Broek, Ir. G. 2000. Organic acid: Natural link between drug and growth promoter. *Feed Mix. Special.* 9-11.
  24. 松本紘齊. 1995. 梅實の神秘. 自然醫學士.
  25. 김경숙, 이인환. 1986. *Prun* 속 식물(종자)의 항균력과 활성물질에 관한 연구. 이화여자대학교 석사논문.
  26. 서화중, 이명렬, 정두례. 1990. 매실 추출물이 흰 쥐의 위액분비 및 사염화탄소로 유발시킨 가토의 간장 장애에 미치는 영향. *한국영양식량학회지.* 16(3):21-26.
  27. 이현애, 남은숙, 박신인. 2003. 매실(*Prunus mume*) 착즙액의 식중독 유발균에 대한 항균작용. *한국식품영양학회지* 16(1):29-34.
  28. 임재웅. 1999. 매실의 생리활성. *한국식품영양학회. 학술심포지움.* p19-37.
  29. 장인석, 고영현, 강선영, 문양수, 손시환. 2007. 천연 포도씨 분말첨가가 육용계의 성장 및 항산화 작용에 미치는 영향. *한국가금학회지.* 34(1):1-8.
  30. 한재택, 이상윤, 김경남, 백남인. 2001. 매실(*Prunus mume*)의 항산화활성 물질. *한국농화학회지.* 44(1):35-37.
- (접수일자 : 2007. 7. 25. / 채택일자 : 2007. 10. 19.)