

Prevention of *Salmonella* Infection in Layer Hen Fed with Microbial Fermented Citrus ShellTaeYoon Kang<sup>1</sup>, SyungTae Kang<sup>1</sup>, YoungHo Ihn<sup>3</sup>, YangHo Lee<sup>3</sup>, DonYoung Cho<sup>4</sup>, Sung-Jin Lee<sup>7</sup>, WonGeun Son<sup>5</sup>, MoonSoo Heo<sup>6</sup> and DongKee Jeong<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Major of Animal Biotechnology, College of Applied Biosciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea<sup>2</sup>Research Institute of Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea<sup>3</sup>The research Institute for Biotechnology in CT&D Co, Jeju 690-708, Korea, <sup>4</sup>Global C&B Co. Ltd, Pyeongtaek 459-737, Korea<sup>5</sup>Department of Veterinary Sciences, College of Veterinary Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea<sup>6</sup>Faculty of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea<sup>7</sup>Department of Animal Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received October 19, 2009 / Accepted November 17, 2009

Nowadays many people use antibiotics to protect processed foods from many pathogenic bacteria. The abuse of antibiotics, however, can run the risk of creating resistant forms of bacterium. Our study focus is on making new substances that can not only replace antibiotics but also be friendly to the environment. In our experiments, we used fermented citrus fruit, soil microbes and coenzyme Q10 as probiotics and prebiotics. Chickens in the experimental group were fed these substances via oral route while those in the control group were not. After specific time periods, blood and feces samples were collected to test for *Salmonella spp.* It is interesting that fermented citrus fruit was the most effective in suppressing this bacterium. Furthermore, dissection of the experiment group chickens shows that their livers did not change to a yellow color, in contrast to the control group. The results confirmed our proposal that the chickens fed with these materials can be protected from infection by *Salmonella* and other pathogens. These probiotics and prebiotics are highly practical because they are natural substances that can be easily recycled in the environment. It can also be used as an animal feed ingredient because of its safety.

**Key words** : Antibiotics, citrus fruit, soil microbe, coenzyme Q10, food safety

## 서 론

매년 우리 생활에서 식중독 사고는 발생하고 줄어들지 않고 있다. 그리고 살모넬라균의 의한 식중독도 줄지 않은 상태이다. 식생활 개선 및 생활의 풍족함으로 현대인은 좀 더 안전한 먹거리를 찾는 시대가 왔다. 그 중 1차 가공만을 거쳐 우리의 식탁에 오르는 농산물은 안전 먹거리의 최전선에 있다고 볼 수 있다. 연간 항생제 사용이 선진국에 10배가 넘는 우리나라 실정으로서 앞으로 항생제 내성균의 발생 빈도가 증가하게 될 것으로 예상된다. 이를 위하여 선진국에서는 얼마 전부터 항생제 사용을 법적으로 규제하고 있고, 우리나라 또한 의약 분업을 통하여 항생제 남용을 규제하고 있다. 그러나 축산분야에서는 아직도 항생제 없이는 가축의 사육이 어려운 현실은 항생제 내성균 발생의 문제점을 초래한다. 이는 총체적 문제로 이를 해결하기 위해서는 축산 환경 개선을 통하거나 항생제를 대체할 수 있는 천연항균물질의 개발이 우선되어야 할 것으로 믿어진다. 제주도는 연간 60만톤 이상의 감귤을 생산

하며, 그 중 75%가 생식으로 17%가 가공으로 소비되고 있다. 가공 처리를 하고 생기는 가공 부산물도 50,000~60,000톤이 발생하고 있다[19]. 이런 부산물은 가축 사료로 일부 사용되고는 있지만 대부분은 방치 등 이용이 되고 있지 않아 환경오염을 일으키고 있는 실정이다. 감귤 부산물은 수용성 탄수화물과 조단백질의 함유 하고 있어 미생물의 발효기질로도 적합하다. Sakamoto 등[18]은 감귤 부산물이 feed yeast, vinegar, butylene glycol, citric acid, lactic acid 등의 발효생산을 위한 탄소원으로 이용할 수 있음을 보여 주었다. 또한 과피에 함유되어 있는 후라보노이드에 대한 여러 효과가 나타나면서 과피에 함유되어 있는 성분에 대한 관심이 증가 되고 있다[10,14,17]. 이러한 과피가 가지는 효과에는 항균효과[10,14], 항암효과, 인터페론생산 촉진으로 면역력 강화, 유해산소 억제, 항염증작용 등을 들 수 있다[14]. 이와 더불어 면역활성에 매우 효과적인 미생물 활성체와 Coenzyme Q10 첨가물은 항산화를 통한 사료 첨가제로써의 응용이 증가되고 있는 추세이나 관련 연구는 전무한 실정이다. 그래서 본 연구는 이와 같은 연구동향을 토대로 사료에 감귤박 발효균주, 토양미생물 발효체, Coenzyme Q10을 이용 살모넬라균에 대한 억제효과를 검증하고자 한다. 특히, 제주 지역에 주 생산물인 감귤 그 중에서도

**\*Corresponding author**

Tel : +82-64-754-3331, Fax : +82-64-725-2403

E-mail : dkjeong@jejunu.ac.kr

1차 가공부산물인 감귤부산물의 자원화 방향으로 특이하게 감귤에서 생성되는 천연 항균물질을 생산하는 균주를 이용하여 안정적인 사료 개발 및 부산물 재활용을 위한 연구와 이와 함께 복합첨가제 가능성이 높은 토양미생물제제, Coenzyme Q10에 대한 항균 및 폐사율 감소에 대한 효과를 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험대상의 준비

본 실험에서는 병아리를 사용하였으며, 병아리를 얻기 위해서 제주대학교 부속 실습센터에서 사육중인 이사브라운 계통의 건강한 산란계 암탉을 이용하여 인공수정을 통하여 수정란을 확보하였다. 인공수정 방법은 수탉 마사지 방법을 이용하여 5마리의 수탉에서 정액을 받아냈다. 희석하지 않은 정액을 1 ml 멸균 주사기를 이용 40마리의 암탉에 0.05 ml 씩 정액을 주입 하였고, 똑같은 방법으로 정액을 받아 인공수정을 3일 간격으로 2회 주입을 실시 하였다. 수정란 수집은 처음 정액주입 3일 후부터 5일간 실시하였다. 모든 수정란은 빛이 들지 않는 서늘한 곳에 모아 두었다가 수정란 표면에 이물질을 제거한 후 한꺼번에 부화기에 넣어 부화를 시켰다. 부화기의 온도는 38°C 습도는 50% 이상이 되도록 유지하였다. 부화된 병아리는 부화 후 5일령부터 실험에 사용되었으며 평균체중을 40 g으로 조정하여 수행하였다. 사용된 사료첨가제로는 감귤박 발효균주를 중심으로 실험에 이용하였다. 감귤박 발효균주는 본 연구에서 사용된 미생물 균주군인 광합성균, 토양 미생물균, 유산균 등을 이용하여 감귤박 발효실험을 통하여 생존율과 항균물질 생성 여부에 따라 동정한 균주를 선발하였으며 이는 이를 개발한 회사에 의하여 제공되었고 본 연구는 이를 제공받아 실험에 이용하였다. 그 외 토양 미생물균주는 해남 지역에서 생산되는 김치와 해안가의 미생물 균총에서 특이 분류한 미생물을 사용하였으며 Coenzyme Q10은 상업적으로 이용되는 것을 구매 후 사용하였다. 이러한 첨가제를 처리구에 따라 감귤박 균주 3처리구, COenzyme Q10 3처리구, 토양 미생물 균주 3처리구, 무항생제 1처리구로 나누어 10수 이상이 되도록 나누어 케이지에 넣어 실험을 실시하였다. 실험은 동절기인 1월에서 3월 사이에 실시하여 타 질병 감염에 의한 외부 요인을 차단하였다. 가로 30 cm, 세로 30 cm, 높이 30 cm 종이 박스를 이용하여 만든 케이지에 보온등을 설치하여 실험을 실시하였다.

### 사료 및 첨가제 급여

일주일 단위로 사료 급여량을 계산하여 첨가제를 혼합하여 급여하였고, 혼합 방법은 EM 원일 농장에서 사용하고 있는 병아리용 항생제 무첨가 상업용 사료를 공급 받아 첨가제 혼합비율에 따라 혼합을 실시하였다. 급여 방법은 일일 급여량

Table 1. Ratio of additive mixture

Citrus fermented by probiotics	The soil microbes	Coenzyme Q10
0.005%	0.005%	0.005%
0.01%	0.01%	0.01%
0.05%	0.05%	0.05%

Table 2. Ratio of additive mixture

Citrus fermented by probiotics	The soil microbial
1%	1%
3%	3%
5%	5%
10%	10%

을 반으로 나누어 아침 9시에 한번 저녁 6시에 급여를 실시하였고, 4주간 사료급여를 실시하였다(Table 1,2).

### 살모넬라균 배양 및 주입

사람에게 유해하지 않은 살모넬라균 *Salmonella gallinarum* (주식회사 CT&D에서 공급)를 배양하기 위해 우선 XLD agar (Difco™ XLD Agar Base) 배지를 삼각 플라스크와 HOT Plate를 이용하여 3차 증류수 1 l에 agar 59 g을 녹이고 패트리디쉬에 20 ml 씩 부어 배지를 만들었다. 배지를 만들때 넘치는 것을 방지하기 위해 플라스크는 용량의 절반만 만들어 사용하였고, 입자가 잘 녹은 선명한 붉은 색으로 될 때까지 가열하였다. XLD agar 배지에 백금봉을 이용 *S. gallinarum* 균을 접종 48시간 37°C 인큐베이터에 배양 하였고, 여기서 자란 검회색 콜로니를 패트리디쉬에 만들어 놓은 혈액배지에 백금봉을 이용 조심스럽게 균 접종하였고, 24시간 이상 자라지 않게 한 후 멸균 면봉을 이용 균을 5 ml 1X PBS (Phosphate Buffered Saline)에 수집하여, McFarland 세균수 측정법을 이용하여 균수가 10<sup>8</sup> CFU/ml 되도록 희석하였다. 이 균을 병아리 한 마리에 1 ml 씩 구강을 통해 주입하였다. 병아리의 머리 부분을 잠시 동안 잡아 뺄어내지 않도록 주입을 실시하였다. 살모넬라균 주입시는 부화 4주 후에 살모넬라균 주입을 실시하였다.

### XLT4 agar 배지에 샘플 배양

XLD agar 배지와 마찬가지로 XLT4 agar (Difco™ XLT4 Agar Base) 배지도 삼각 플라스크와 HOT Plate를 이용하여 3차 증류수 1 l에 agar 59 g을 녹이고 패트리디쉬에 20 ml 씩 부어 배지를 만들었다. HOT Plate에서 배지가 넘치지 않게 주의하여 선명한 붉은 색으로 변할 때까지 가열하였다. 균 주입 12, 24, 48시간 후 핀셋과 1 ml 주사기를 이용하여 분변과 혈액을 1.5 ml 튜브에 채취하였고 PBS를 이용 10배씩 1,000배 희석 하였고, XLT4 agar 배지는 100배와 1,000배 희석액을 루프를 이용 0.1 ml 씩 접종을 하여 37°C 인큐베이터에 48시간 배양하였다.

**XLT4 agar 배지에 형성된 콜로니 분석**

48시간 배양 끝난 Plate를 사진촬영을 하고 사진 파일을 TOMORO image DB2.1 프로그램을 이용 검정 콜로니를 카운트하였다.

**병아리 장기 해부**

살모넬라 감염되어 회복되거나 사망할 경우 주로 간과 소장, 대장부위의 침윤과 이상변화를 보인다. 그래서 본 연구에서도 실험 중 사망한 병아리와 실험이 끝난 병아리의 내장 상태를 검사하여 감염 후 각처리 구에 의한 회복 정도를 검사하기 위하여 CO<sub>2</sub> 가스를 이용하여 안락사 시킨 다음 항문 쪽에서 날개 쪽으로 V자 형태로 가죽과 복부 근육을 수술용 가위로 절개한 후 균에 의한 간장의 상태와 맹장의 팽대를 관찰하였다. 균에 의한 오염예방을 위해 해부가 끝난 병아리는 소각 처리 실시 하였다. 그리고 본 연구를 위하여 동물실험 규정 에 의하여 실시하였으며 본 대학의 수의학과 담당 교수의 안내에 따라 실험을 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**사료 첨가제의 살모넬라균에 대한 억제효과**

본 실험에 사용된 사료 첨가제 중 감귤박 균주 첨가제의 살모넬라균 억제 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 실시한 후 혈액과 분변에서 채취한 시료를 XLT4 agar 배지에 접종하여 배지에서의 콜로니 형성을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 1). 본 실험을 위하여 사용된 살모넬라를 닭에 접종했을 때 폐사 계군은 발생하지 않았다. 그러나 첨가제의 농도에 따라 혈액과 분변의 살모넬라균수에서는 확연한 차이를 보이고 있다. Fig. 1에서 보이는 결과에 따르면 접종한 농도에 따라 차이를 나타내고 있는데 농도 0.005%에서 0.05%까지는 12시간때 채취한 혈액에서 농도가 높을수록 살모넬라균 출현

이 낮게 나타났다. 그리고 일반항생제사료보다 0.05%가 첨가된 사료에서 매우 높은 살모넬라균 억제효과를 보여주고 있다. 또한 0.005% 수준에서는 매우 낮은 농도로 일반항생제 처리군과 유의적 차이는 보이지 않았다( $p < 0.05$ ). 그리고 24시간 부터는 모든 처리군에서 항생제와 유사한 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 그러나 반면에 분변에서의 연구결과는 좀 더 다른 양상을 보여주었는데 대조군인 일반 항생제 처리군에서는 시간이 증가함에 따라 약간의 증가 현상을 보여주고 있으며 0.05% 처리군의 경우에는 12시간에 매우 높은 살모넬라 출현을 보이다가 48시간에서는 항생제 처리군과 유사한 결과를 보여 주었다. 이 결과는 혈액 중에 나타난 살모넬라 출현율과 비교하여 비슷한 패턴을 보이고 있었다. 그 외 다른 처리군에서는 정확하게 감소나 증가에 대한 일정한 패턴을 분석하기 어려운 결과를 얻었다. 오히려 0.005%의 처리군에 경우 항생제 처리군보다 높은 출현율을 보여서 너무 적은 양은 오히려 억제효과가 나타날 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 살펴보면 유의적으로 감귤박 첨가제 사료에서 살모넬라를 억제하는 항생효과가 나타나고 있음을 알 수 있으며 이는 시간이 경과함에 따라 혈액내의 균은 급격하게 감소하는 것으로 보아 병원성균에 대한 면역활동과 체내의 다른 활성균에 의해 살모넬라의 억제가 일어나고 있음을 추정 할 수 있다[1,2] 그러나 Fig. 1에서 보면 실험군에 따라 초기에 억제되다가 다시 48시간에 병원성균이 다시 증가하는 것으로 보아서 면역활동과 체내의 다른 활성균에 의해 외부로 빠져나가지 않거나 살아 남은 병원성균의 활동으로 사료된다. 분변을 통한 살모넬라 균의 발생빈도를 보면 첨가제 농도 높은 군인 0.05% 실험군에 경우는 병원성균이 체내에 들어오는 것보다 많은 부분이 외부로 빠져나가는 것을 알 수 있었다. 이것은 체내의 활성균에 의해 병원성균이 체내에서의 감염 및 침투를 억제하는 메커니즘이 작용한 것으로 생각된다. Moon 등[15]은 감귤 가공 부산물 발효물을 가지고 어류질병세균에 대한 항균실험을 하였다고 보고하면서, 착즙박 추출물에서도 20%의 농도에서 항균활성을 나타내고 있으며, 미생물 발효물에서는 5~20% 모든 농도에서 항균효과가 나타났다고 보고하고 있다. 이것은 본 실험의 감귤박 발효균주가 병원성 균을 억제하는 결과와 비슷한 결과를 보여주고 있었다. Kim 등[11,13]의 연구에서는 바실러스균과 유산균의 발효시 생성되는 물질인 Saltose가 가금 병원성 세균의 증식을 억제한다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 감귤박 발효물의 일종인 바실러스 생성물질등이 가금 병원성균 살모넬라를 억제하는 비슷한 효과를 보인것으로 사료된다. 그리고 Kim 등[12]의 보고에서는 감귤박 또는 감귤박 추출액에 바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 사료첨가제에서 감귤박의 유효 물질과 풍미를 그대로 간직하며, 항균력이 높아 가축의 장내에 서식하는 유해세균의 증식을 저지하는 정장효과를 나타내며, 아울러 가축의 사료 이용율, 증체율 및 병에 대한 저항력이 향상되는 효과를 나타낸다는 보고하고 있다. 이와 비교실험을 위하여 복합

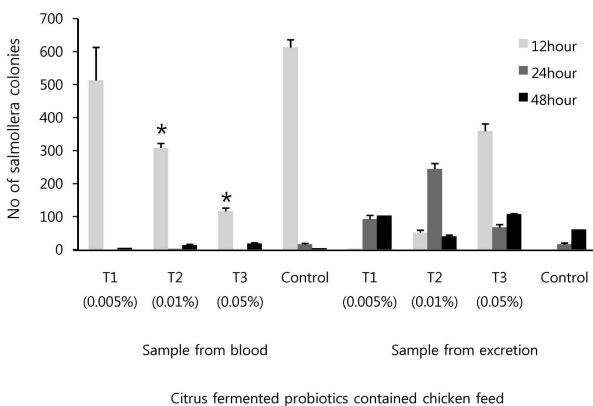


Fig. 1. The effect of anti-samollera in the chicken from the citrus fermented probiotics contained feed. Control: data from the commercialized anti-biotics contained feed. \* $p < 0.05$ : Significantly different between treatment and control.

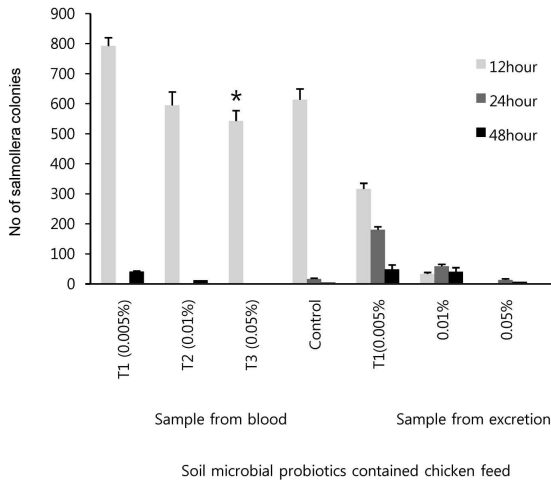


Fig. 2. The effect of anti-samollera in the chicken from the soil microbial probiotics contained feed. Control: data from the commercialized anti-biotics contained feed. \* $p < 0.05$ : Significantly different between treatment and control.

제제로서의 가능성이 매우 높은 토양미생물제제를 이용하여 병아리 장내에서의 살모넬라균 억제실험을 실시하였다(Fig. 2). 결과를 살펴보면 감귤박 균주 첨가제와 비교하였을 때 우수한 효과는 나타나지 않고 있으나 항생제 처리군과 유사한 결과를 보여주고 있다. 먼저 혈액내에서의 억제 효과를 살펴보면 일반항생제 처리군과 거의 유사한 억제결과를 보여주고 있었으며, 분변에서는 0.005% 처리군에서만 효과가 미비하였고 0.05%에서는 분변에서의 억제능력도 매우 높은 것으로 나타나고 있다. 항생제와의 비교에서는 큰 유의차는 보이지 않았다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과를 볼 때 토양미생물의 경우에도 살모넬라 억제효과가 유의적으로 나타나는 것으로 보아 일반항생제의 대체제 또는 감귤박 발효산물과의 복합 처방제로서 충분히 검토할 수 있을 것으로 사료된다. 분변에서 혈액과 같은 형태로 첨가제 농도가 낮을 때 증가하고 높을 때는 감소

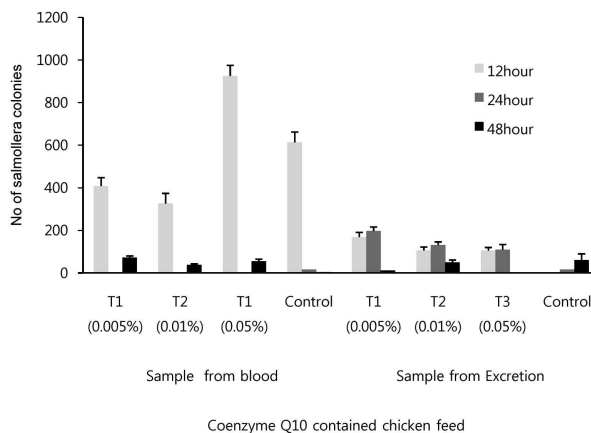


Fig. 3. The effect of anti-samollera in the chicken from the Coenzyme Q10 contained feed. Control: data from the commercialized anti-biotics contained feed.

하는 것으로 보아 첨가제의 장내에서의 살모넬라 억제 효과의 면역증강 효과가 있다고 볼 수 있다. Park 등[16]은 토양미생물 중에서도 젖산균이 특이적으로 살모넬라와 같은 세균에 항균효과 있는 것으로 보고하였다. Coenzyme Q10을 첨가한 실험군에서는 초반 12시간 후 검사한 결과에서 혈액 중에 0.05%의 첨가군에서조차 비교적 균인 항생제 처리군과 차이를 보였지만 시간이 경과함에 따라 효과는 감소하는 경향을 나타내고 있었다. 그리고 분변에서도 지속적으로 살모넬라균의 검출이 나타나고 있음이 결과에서 보여주고 있다. 결과를 전체적으로 평가할 때 결과의 일관성이 매우 떨어지는 경향을 보여주고 있어 첨가량 증가에 따른 효과를 검증할 수 없었다. 이는 이 첨가제의 사료 내 효과가 단시간에 걸쳐 나타나는 효과보다는 지속적인 면역증강 효과를 통한 강건성과 더 영향이 있을 것으로 추측된다[5-8]. 여러 보고에서도 Coenzyme Q10의 경우는 Ye 등 [20]이 보고한 바에 따르면 바이러스성 천식이나 알레르기를 감소시키는 효과와 Folker 등[34]이 보고한 면역력을 증가시킴으로 병원성균에 대한 저항성을 증가시킨 것으로 사료된다. 이와 비슷한 연구로 Jeong 등[9]은 사료 첨가제 실험에서 임부 포르테라는 첨가제를 사용한 연구를 통하여 사용된 사료첨가제에 의해 면역력 증강으로 미생물 억제효과가 있음을 보고하고 있다. 동물실험을 통한 사료첨가제 효과 실험을 개체에 따라, 조건에 따라 그리고 환경에 따른 요인이 실험 결과에 많은 영향을 끼치므로 실험 구성 시 이를 충분히 고려해야 한다. 그래서 본 연구에서는 가능한 개체의 특이적 특성을 배제하고자 노력하였고 XLT4배지가 살모넬라 배양의 최적 배지이기기는 하지만 다른 균의 우점을 완전히 배제하지 못하기 때문에 이점에 대한 고려를 통하여 예비실험을 충분히 실시 하므로써 본 연구의 신뢰도를 높이고자 하였다. Fig. 4은 XLT4배지에서 살모넬라균의 형성 상태를 보여주고 있다. A의 경우는 C와 달리 감귤박 균주에 의한 억제 형태를 보여주고 있으며 C의 경우는 살모넬라 억제 효과가 없는 Coenzyme Q10의 처리군을 보여주고 있다. 그리고 B의 경우에는 토양 미생물균주의 억제효과를 보여주는 것으로 무처리군인 대조군에 비하여 매우 높은 억제를 보여주고 있으나 A의 경우보다 다소 높은 콜로니 발현을 보이고 있다. D의 경우에는 실험 중 다른 균의 우점으로 인하여 살모넬라균의 생성이 억제된 경우로 대조군이 전형적인 형태를 보여주고 있으며 이 결과를 기준으로 XLT4 배

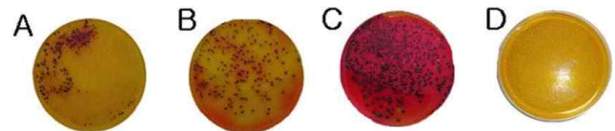


Fig. 4. State of formational colony in XLT4 agar plate. (A) Citrus fermented probiotics contained feed (B) Soil microbial probiotics contained feed (C) Coenzyme Q10 treated chicken product (D) Plate was contaminated by the several kinds of microbial organism.

지의 살모넬라 균 억제 효과를 배양된 Agar의 색깔로서 확인할 수 있는 매우 효율적인 방법이다. 그러므로 D의 경우에는 실험에서 다른 균의 우점으로 인한 살모넬라균이 억제된 것이 아니라 발현되지 않은 것으로 판정 할 수 있었다.

**고농도 처리구 분변에서 확인한 살모넬라 억제효과**

1차 실험 결과를 토대로 생후 직후의 어린 병아리를 이용하여 고용량의 처리를 통한 살모넬라 억제 효과를 분석하기 위하여 실험한 결과는 Fig. 5와 같다. 본 실험에서는 어린 연령에서의 체중 변화와 온도에 관련한 실험도 동시에 수행하였으며 생후 직후의 병아리인 점을 고려하여 혈액 중 살모넬라 검사는 수행하지 않고 분변의 상태를 분석하여 감염억제 여부를 분석하였다. 고농도 감귤박 균주 첨가제와 토양미생물 첨가제 사료를 실험한 결과를 보면 10% 첨가군에서 대조군인 C1의 일반항생제 사료보다 24시간 후에 살모넬라 억제 효과가 매우 높았다. 그리고 C2인 무항생제 사료에서는 계속적인 감염형태의 살모넬라 출현이 나타나고 있었으며 어린 병아리에서는 3-5%의 첨가수준에서 어느 농도가 유의적으로 효과를 보여주는지에 대한 결론은 내릴 수 없는 결과를 보여주고 있었다[16]. 특히, 10% 처리구에서 감귤박 발효 첨가군에서는 12시간 분석한 결과에서 다른 처리군보다 3배 가량 많은 살모넬라 출현율을 보여주고 있었으며 24시간에는 급격하게 감소하여 거의 검출되지 않는 것으로 판단 하건데 첫번째는 체외로 급격하게 배출시켜 체내의 생존가능성을 낮추는 효과와 두번째는 다른 처리군의 경향처럼 병아리에 주입된 살모넬라균이 면역학적 제거가 되는 시간과의 시간차가 있어 체내에서 활성을 급격하게 보이다가 체내의 T세포, B 세포 등이 발효첨가제의 영향을 받아 대조군인 무처리군에 비하여 빠르게 살모넬라를 제거하는 것으로 추정할 수 있다[18].

**사료 첨가제의 농도에 따른 체중변화 및 외형적 상태**

사료첨가제의 첨가 농도는 전체 사료 투입량에 영향을 끼칠 수 있다. 또한 비율적으로 과도한 양을 투입 할 경우 비용적인

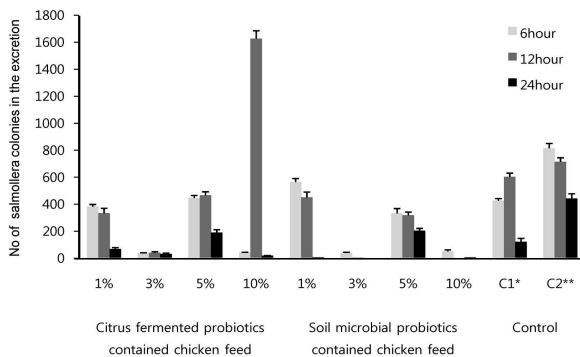


Fig. 5. The effect of anti-samollera in the chicken from the high concentrated citrus fermented probiotics and soil microbial probiotics contained feed. \*Commercialized antibiotics contained feed. \*\*No additive anti-biotics.

면과 영양학적 균형면에서 역할을 해야 한다. 단지 질병제어적인 면만 부각되면 추후 성장에 필요한 영양이 결핍될 수 있기 때문이다. 그래서 본 실험에서는 생후 22일까지 성장율을 측정하여 이와 관련된 영향을 분석하고자 하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 미비한 차이지만 체중변화를 측정할 결과 농도에 따라 차이가 나고 있으며, 일반항생제 또는 무항생제보다 높은 효과를 보여주지 못하고 있다. 그리고 첨가제 농도가 높을수록 성장율이 떨어지는 경향을 보이고 있다. 이 결과 토대로 보건대 아마도 현재 고농도의 사료첨가제의 경우 사료자체로서의 역할은 감소한다고 볼 수 있다. 이는 추후 전체 성장기간을 측정하여 이에 관한 영향 분석이 필요할 것으로 생각된다. 이와 반대로 Fig. 7에서는 첨가제 투여로 인하여 면역성과 강건성에 효과를 미친 것으로 추정되는 현상을 볼 수 있었다[11]. 동일한 조건하에서 첨가제를 투여한 실험군에서는 Fig. 7B와 같이 병아리들이 자유롭게 사료 섭취하면서 일정한 면적을 나누어서 위치하고 있는 반면에 Fig. 7A의 경우인 대조군에서는 열원이 있는 백열전구 주위로 병아리들이 집중되는 현상이 발견되었다. 이는 첨가제가 전체 실험 기간 동안 강건성에 영향을 주는 것으로 판단할 수 있는 결과라 볼 수 있다.

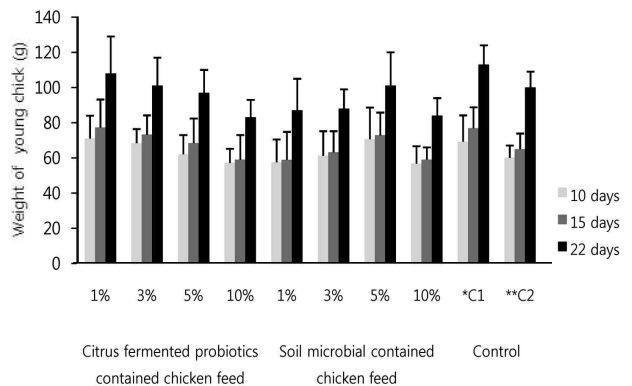


Fig. 6. The young chick's weight change which follows in consistency of feed additive. \*Commercialized antibiotics contained feed. \*\*No additive anti-biotics.

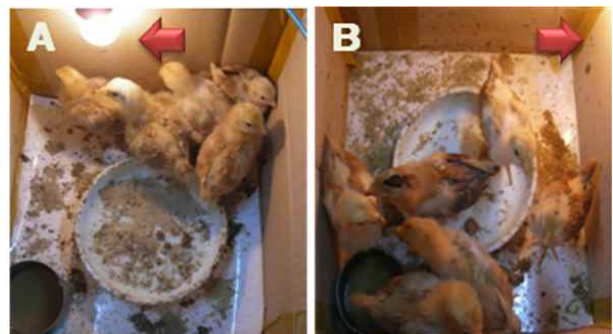


Fig. 7. Chick's health condition was controlled by additive feed. (A) Control group was showed all chicks gathering the light. (B) Treatment group was showed high activity. Red arrow indicate light bulb.



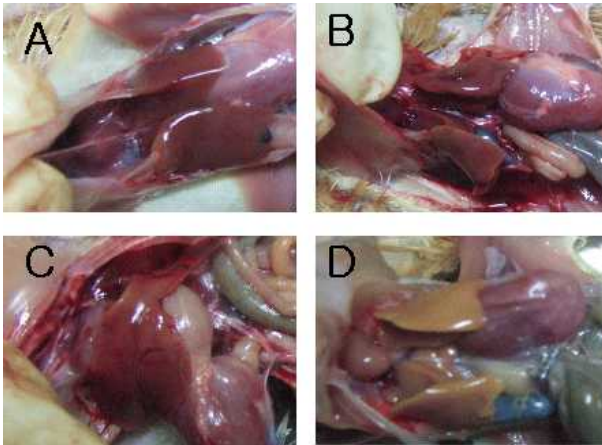


Fig. 8. The condition of liver which follows in consistency of citrus fermented probiotics contained chicken feed. A, B, C is 10%, 5%, 3% of feed additive. D is control. Control: No antibiotics additive.

#### 병아리 장기 해부를 통한 장기의 상태 확인

살모넬라 감염의 경우 바로 폐사되거나 폐사되지 않고 살아남을 경우에 다음 세대로 감염이 전이되거나 또는 생산성 저하를 매우 심하게 발생시키는 질병이다. 그러므로 감염 후 회복 정도를 통하여 이러한 문제점을 분석하기 위하여 실험규정에 따라 CO<sub>2</sub> 가스를 이용하여 안락사 시킨 다음, 이전에 실험 중 폐사된 병아리와 함께 장기의 상태를 관찰하였다(Fig. 8). 첨가제 농도에 따라 장기의 손상 상태를 유관으로 확인할 수 있는 결과를 보면, 먼저 간장의 경우에 손상 정도가 무항생제 살모넬라 주입 군에서는 첨가제 처리 주입군 보다 간의 손상이 심하게 나타났으며 특히, 맹장의 경우에는 감염이 심한 경우에는 팽대되고 약취가 심했다. 반면에 첨가제 처리 살모넬라 주입군에서는 농도에 따라 손상 정도가 미미하거나 아무런 간장에서의 병변을 전혀 발견 할 수 없는 건강상태의 간장이 관찰되었다. 이 결과를 토대로 현재 본 연구에서 사용된 감귤박 특이 균주의 경우 병아리 장기의 빠른 회복율과 더불어 생산성에도 영향을 끼칠 수 있다고 사료되며 추후 산란율에 미치는 연구 등도 수행할 필요가 있다고 생각된다. 기존에 발표되었던 많은 미생물첨가제 관련 연구 측면에서 볼 때 본 연구가 가지는 의의는 기존 연구를 통하여 항균작용이 있는 것으로 밝혀진 감귤박과 미생물과의 발효작용을 통하여 좀더 효과적인 항균물질 생성 및 동물에 대한 효과를 확인한 결과를 얻을 수 있었으며 제주도의 주요산물인 감귤의 부산물 활용 면에서 의미를 있다고 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2008년도 강원대학교 학술연구조성비 도움을 받았으며, 실험에 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

#### References

- Coulson, N. M. and R. W. Titball. 1993. Expression of Bacillus anthracis Protective Antigen in Salmonella typhimurium. *NATO ASI series. Series A, Life Sciences* **245**, 419.
- De Luca, C., I. Deeva, E. Mikhal'Chik, and L. Korkina. 2007. Beneficial effects of pro-/antioxidant-based nutraceuticals in the skin rejuvenation techniques. *Cell Mol. Biol.* **53**, 94-101.
- Folkers, K., R. Brown, W. V. Judy, and M. Morita. 1993. Survival of cancer patients on therapy with coenzyme Q10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 241-245.
- Folkers, K., M. Morita, and J. Jr McRee. 1993. The activities of coenzyme Q10 and vitamin B6 for immune responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 88-92.
- Gazdík, F., A. Gvozdjaková, R. Nádvorníková, L. Repická, E. Jahnová, J. Kucharská, M. R. Piják, and K. Gazdík. 2002. Decreased levels of coenzyme Q(10) in patients with bronchial asthma. *Allergy* **57**, 811-814.
- Geng, A. L., Y. M. Guo, and Y. Yang. 2004. Reduction of ascites mortality in broilers by coenzyme Q10. *Poult. Sci.* **83**, 1587-1593.
- Hoffmann, P. C., H. W. Kunz, W. Schmid, and M. Siess. 1994. The determination of the level and redox quotient of ubiquinone50 (Coenzyme Q10) in guinea pig heart in vivo. *Biochem. Z.* **339**, 548-558.
- Hoppe, U., J. Bergemann, W. Diembeck, J. Ennen, S. Gohla, I. Harris, J. Jacob, J. Kielholz, W. Mei, D. Pollet, D. Schachtschabel, G. Sauermann, V. Schreiner, F. Stäb, and F. Steckel. 1999. Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer. *Biofactors* **9**, 371-378.
- Jeong, J. Y., N. S. Ahn, J. S. Park, Y. H. Cho, J. W. Hwang, J. R. Park, S. J. Kim, Y. G. Lee, Y. H. Jeong, J. H. Jeong, S. H. Lee, Y. S. Park, B. G. Park, B. S. Kim, S. G. Kim, S. B. Lee, G. H. Lee, K. S. Kang, and Y. S. Lee. 2006. Research of immunological improvement using new material (immuneforte). *J. Fd Hyg. Safety* **21**, 113-117.
- Johann, S., V. Lopes de Oliveira, M. G. Pizzolatti, J. Schripsema, R. Braz-Filho, A. Branco, and A. Smânia. 2007. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**, 681-685.
- Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and D. S. Yoo. 1998. Identification of enzyme Characteristic of useful fungi isolation from Korea tradition malt. *Korean J. of Industrial Microbiology* **26**, 456-464.
- Kim, Y. K., Y. B. Kim, and D. J. Kim. 2006. Patent for the method of feed additive and production using citrus component. No. 10-0688441-0000.
- Kim, J. H. 2008. The effect of anti-bacterial against poultry bacteria using Saltose in mixed probiotic from bacillus. *Master thesis of Korea university.*
- Mandalari, G., R. N. Bennett, G. Bisignano, D. Trombetta, A. Saija, C. B. Faulds, M. J. Gasson, and A. Narbad. 2007. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a byproduct of the essen-

- tial oil industry. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2056-2064.
15. Moon, Y. G., K. J. Lee, K. Y. Kim, C. B. Song, Y. J. Jun, and M. S. Hue. 2006. Characterization of waste from citrus fermented product using probiotics. *J. of Korean Microbiology and Biotechnology* **34**, 158-165.
  16. Park, S. H. Y. A. Kim, D. K. Lee, S. J. Lee, M. J. Chung, B. Y. Kang, K. J. Kim, and N. J. Ha. 2007. Antibacterial activity and macrophage activation of lactic acid bacteria. *The Korean Journal of Environmental Toxicology* **22**, 287-297.
  17. Roza, J. M., Z. Xian-Liu, and N. Guthrie. 2007. Effect of citrus flavonoids and tocotrienols on serum cholesterol levels in hypercholesterolemic subjects. *Altern. Ther. Health Med* **13**, 44-48.
  18. Sakamoto, S., I. Shooro, and M. Arai. 1982. Reduced cellulose as substrate of cellulases. *J. Ferment. Technol.* **60**, 327.
  19. Yang, S. J., Y. H. Moon, B. W. Lee, S. M. Ko, and T. I. Yang. 2007. The research on the citrus byproducts production actual conditions, the conditions of utilizing feeds and the citrus byproducts ingredients analysis. pp. 17-72. *Research report for the development of functional poultry production technology using citrus.*
  20. Ye, C. Q., K. Folkers, H. Tamagawa, and C. Pfeiffer. 1988. A modified determination of coenzyme Q10 in human blood and CoQ10 blood levels in diverse patients with allergies. *Biofactors* **1**, 303-306.

초록 : 산란계 감염 살모넬라균 억제에 대한 감귤박 특이 발효 미생물 제제의 사료 첨가 효과

강태윤<sup>1</sup> · 강승태<sup>1</sup> · 인용호<sup>3</sup> · 이양호<sup>3</sup> · 조돈영<sup>4</sup> · 이성진<sup>7</sup> · 손원근<sup>5</sup> · 허문수<sup>6</sup> · 정동기<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>제주대학교 생명자원과학대학 동물생명공학전공, <sup>2</sup>아열대생명과학연구소, <sup>3</sup>주식회사 CT&D 생명과학연구소, <sup>4</sup>주식회사 글로벌씨엔비, <sup>5</sup>제주대학교 수의과대학 수의학과, <sup>6</sup>제주대학교 해양과학대학 수산생명의학전공, <sup>7</sup>강원대학교 동물생명공학과)

안전한 먹거리 생산은 축산물의 사육에서부터 시작된다. 현재 병원성 바이러스 및 균에 의해 먹거리의 안전성이 위협을 받고 있으며, 또한 항생제의 남용으로 인하여 병원성 균이 면역력을 갖게 되고 그에 따라 슈퍼 박테리아 등이 계속 생겨나고 있는 추세이다. 이런 시점에 항생제 대체 물질 개발이 절실하게 요구되고 있다. 이에 본 연구는 안전한 축산물생산과 국민의 식품안전의 최초단계인 축산업에서 항생제를 대체할 천연항생 사료첨가제를 개발하고자 본 실험을 실시하였다. 본 연구에서는 감귤박 특이 균주, 토양미생물 균주, Coenzyme Q10을 이용하였고, 무 항생제사료에 첨가하였다. 병아리 때 일정 기간 동안 사료첨가제를 급여 후 살모넬라균(*Salmonella gallinarium*)을 구강을 통해 주입하였다. 그리고 일정시간 동안 혈액과 분변을 채취하고 배지를 이용 살모넬라균 검사를 실시하였으며, 결과적으로 감귤박 특이 균주에서 가장 좋은 억제 효과를 얻었다. 이 결과를 살펴볼 때 병아리에서는 이러한 첨가제들이 장내 다른 병원성 균이 선점하지 못하도록 하는 것으로 사료된다. 장기의 해부를 통해서 장기의 손상 상태를 확인한 결과 감귤박 특이 균주 첨가제인 경우 간장색의 선홍색인 반면 일반 항생제 및 무 항생제 사료는 간장의 색의 황색으로 변한 것으로 미뤄 보아서 첨가제의 효과로 살모넬라균이 억제되어 간장의 손상을 방지한다는 효과를 얻었다. 이러한 결과는 천연항생제를 이용한 사육 기반 확립은 물론 먹거리 안전성을 보장하며, 사육부산물은 식물재배의 비료로 이용하여 완전 순환농업을 위한 좋은 재료가 될 수 있을 것으로 사료된다.