한국가금학회지 제 40권 제 1호, 025~029 (2013)
Korean J. Poult. Sci. Vol.40, No.1, 025~029 (2013)
http://dx.doi.org/10.5536/KJPS.2013.40.1.025

한약재 추출 숙성물의 항균 및 항산화 효과 검증을 통한 가금 사료 내 항생제 대체 천연물질의 선발

신대근 · 김기웅 · 진민정 · 류경선†
전북대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

Assessment of Antimicrobial and Antioxidant Effects of Ripened Medicinal Herb Extracts to Select an Optimum Dietary Natural Antibiotic for Chickens

Daekeun Shin, Ki-Woong Kim, Min-Jeong Jin, Kyeong Seon Ryu†
Department of Animal Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT This study was conducted to evaluate the antimicrobial and antioxidant effects of ripened medicinal herb extracts from wood vinegar. The wood vinegar was collected from heated oaks. The *Allium sativum* (AS), *Atractylodes ovate* (AO), *Cin- namomum zeylanicum* (CZ), *Coptidis rhizome* (CR), *Houttuynia cordata* (HC), *Phellodendron chinense* (PC) and *Syzygium aromaticum* (SA) extracts were collected using wood vinegar, and they were ripened under room temperature for 50 days. All ripened medicinal herb extracts were used to test the antimicrobial and antioxidant activities. For the *Lactobacillus*, clear zone of 6 different medicinal herb except for CR ranged from 1.28 to 1.63 mm. 3.30 and 3.48 mm of clear zone were determined when CZ and SA were applied to *Salmonella* and *E*. coli, respectively ($p<0.05$), and they showed the largest clear zone as compared to other herbs. The clear zones of CR for *Salmonella* and *E*. coli were 2.21 and 3.34 mm, and each clear zone of CR was smaller than that of CZ ($p<0.05$) but was similar to that of SA ($p>0.05$). The amount of polyphenol and flavonoid was the highest in SA and CR, and they were 4.28 and 0.38 mg/mL, respectively ($p<0.05$). The CR shown 0.38 mg/mL flavonoid, had the highest DPPH, and it was 0.41 mM. The DPPH of HZ was significantly lowered in accordance with high amount of polyphenol and flavonoid, 2.56 and 0.20 mg/mL ($p<0.05$). In conclusion, CZ, SA, and CR showed high antimicrobial and antioxidant potentials, and therefore, may be used as alternatives to antibiotics for poultry diets.

(Key words : antibiotics, antimicrobial, antioxidant, medicinal herb, poultry)

서 론

경제 동물의 생산성 증진을 위한 사양 관리 중 사료 첨가용 항생제의 사용은 지난 50년 동안 축산업 특히, 육계와 산란계의 성장 촉진, 사료 효율 개선 및 질병 예방 등에 뛰어난 효과를 나타내었다(Guo et al., 2004; Yang et al., 2009). 더욱이, 닭고기에 대한 전반적인 구매 증가로 사료 첨가용 항생제의 사용은 크게 증가하여 2003년에는 총 53종의 항생제가 사료용 첨가제로 사용되었다(Kang et al., 2010). 사료 첨가용 항생제의 사용은 여름철 높아진 온도와 잦아진 강우로 인한 육계와 산란계의 장내 유해균을 손쉽게 제어할 수 있으나, 항생제의 오남용으로 인한 닭고기 내 잔류 항생제는 소비자들로의 전이 가능성과 더불어, 분뇨를 통한 내성 강화 병원균의 발생 가능성을 증가시킴으로 사회적인 문제로 부각되었다(Chae et al., 2011; Kim et al., 2011). 따라서 육계와 산란계의 생산성에 막대한 영향을 미치던 항생제의 사용이 2011년 7월 이후 전면 금지됨으로 인하여 장내 미생물로 인해 발생 가능한 피해에 많은 양계 농가들의 관심이 증가되고 있다(Park et al., 2012).

혐기성이면서 그램 양성균인 *Clostridium perfringens*와

† To whom correspondence should be addressed : seon@jbnu.ac.kr

같은 유해 미생물들은 닭의 장내에 증식하면서 가금의 괴사성 장염을 유발, 생산성에 큰 영향을 미치며, 육계와 산란계 농가의 소득에 부정적인 영향을 미치고 있다(Svobodova et al., 2007). 따라서 사료 첨가용 항생제의 사용 금지로 인한 육계와 산란계의 장내 발생 가능 질환을 유기산 혹은 천연 항균제를 이용하여 유해 미생물들의 활성을 최소화하려는 노력들이 진행 중에 있다(Dahiya et al., 2006). 현재까지 진행되어 온 연구 결과들에 의하면, 사료 내 첨가되어 시험된 항생제 유사 유기산 혹은 천연 항균제에 대한 적용 가능성은 그리 높지 않다. 그러나 주성분이 초산이면서 200여 가지의 유기물로 구성되어 있는 목초액을 이용한 항균 능력과 더불어 전통 생약 추출물에 의한 항균 능력이 결합된다면 장내 유해 미생물에 대한 성장 억제의 수행이 가능할 것으로 기대된다(성은일 등, 2006; 정사무엘 등, 2008).

따라서 본 연구는 유기산이 주성분인 목초액을 활용하여 전통 생약성분을 추출 및 숙성한 첨가물이 *Salmonella typhimurium*, *Eschericha coli*와 *Lactobacillus rhamnosus*의 생육에 미치는 영향과 항산화 역가를 측정하여 사료 내 항생제 대체제로서의 가능성을 검증하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 목초액을 이용한 한약재의 추출과 숙성

참나무를 숯가마에 넣고 고온에서 탄화시킬 때 발생하는 연기와 수증기를 냉각, 응축시키는 과정을 통해 수집된 목초액을 증류수와 함께 1.2:1(w/w)의 비율로 혼합하였다. 이후 희석한 목초액을 한약재(Table 1)와 1:3(w/w)의 비율로 재혼합하였으며, 곧 26℃의 온도에서 50일간 방치하며 한약재 내 존재하는 다양한 폴리페놀 계열 화합물의 추출과 더불어 숙성을 통한 추출물들의 화학적 변화를 유도하였다. 목초액과 한약재 혼합 숙성물을 거즈를 사용하여 액상만을 분리한 다음 3,000 rpm에서 20분간의 원심분리를 통해 순수 한약재 숙성물만을 수집하였다.

2. 목초액을 이용한 한약재 추출, 숙성액의 항균 능력 측정

목초액과 한약재 혼합 숙성물의 항균활성은 7주령의 토종닭 암컷에서 회장을 축출한 다음 100 mL의 펩톤수와 함께 1분간 흔들며 채취한 총균과 한국 미생물 보존 센터를 통해 구입한 *Eschericha coli* (KCCM11234)와 *Salmonella typhimurium* (KCCM11862) 그리고 *Lactobacillus rhamnosus*를 Kim et al. (2011)의 방법에 따라 측정하였다. 구체적으로 설명하면 멸균된 10 cm의 plate에 37℃에서 배양시킨(MCO-15AC, Tokyo, Japan) 각각의 균주와 총균 100 uL씩을 도말하였다. 이후 8 mm paper disc를 plate의 4분할 지점 중앙에 올리고, 각각의 혼합, 숙성액 50 uL를 paper disc에 주입시킨 다음 37℃의 항온기에서 균에 따라 24 또는 48시간 배양시키며 나타나는 paper disc 주위의 생육 저지환(clear zone) 직경(mm)을 측정하였다.

Table 1. List of medicinal herbs used in this experiment

Medicinal herb		Manufacturer
Scientific Name	Korean name	
Allium sativum	마늘	청운당농산, 경상남도 함양군
Atractylodes ovate	백출	휴먼허브, 경상남도 경산시
Cinnamomum zeylanicum	계피	경동정성재, 서울시
Coptidis rhizoma	황련	휴먼허브, 경상남도 경산시
Houttuynia cordata	어성초	글로벌 허브, 경상북도 안동시
Phellodendron chinense	황백	글로벌 허브, 경상북도 안동시
Syzygium aromaticum	정향	휴먼허브, 경상남도 경산시

3. 목초액을 이용한 한약재 추출, 숙성액의 항산화물가 측정

총 폴리페놀의 함량은 준비된 혼합, 숙성액 0.1 mL에 페놀 시약 1 mL를 넣고 혼합하며 실온에서 3분간 방치한 다음, 혼합액에 1N Na_2CO_3을 첨가하여 90분간 반응시켰다. 이후 2 mL의 증류수를 첨가한 다음 재 혼합과 함께 725 nm에서 흡광도(KR/Optizen 2,120 UV, 덕산 메카시스, 대전, 대한민국)를 측정하였다(Juan and Chou, 2010). 총 폴리페놀 농도 측정을 위한 표준 용액으로는 gallic acid를 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Juan and Chou (2010)의 방법에 따라 실시하였다. 혼합, 숙성액 25 uL에 10 mM의 Tris HCl 1 mL과 5% $NaNO_3$ 75 uL를 첨가한 다음, 실온에서 6분간의 방치와 10%의 $AlCl_3$ 150 uL 첨가 및 재 혼합과 5분간의 실온에서 재방치를 실시하였다. 이후, 1M NaOH 500 uL와 EtOH 275 uL를 첨가하며 510 nm에서 흡광도(KR/Optizen 2,120 UV, 덕산 메카시스, 대전, 대한민국)를 측정하였다. 총 플라보노이드 농도 측정을 위한 표준용액으로는 Quercetin을 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)를 이용한 추출액의 항산화물가 측정 (Juan and Chou, 2010)을 위하여 DPPH 16 mg을 100 mL의 에탄올에 녹인 후 증류수 100 mL를 첨가한 다음 여과하였다. 여과액 5 mL에 원심분리 후 습득한

목초액과 한약재 혼합, 숙성액을 각각 1 mL씩 넣고 혼합한 다음 실온에서 2분간 방치, 528 nm에서 흡광도(KR/Op- tizen 2,120 UV, 덕산 메카시스, 대전, 대한민국)를 측정하였다. 이때 대조구로는 원심분리 후 채취한 목초액 1 mL와 에탄올 5 mL를 혼합한 혼합액이 사용되었으며, 흡광도의 측정 이후 아래의 계산식에 대입함으로 항산화 능력, 즉 전자공여능(%)을 산출하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right] \times 100$$

통계분석

수집된 모든 데이터들은 SAS(Version 9.2, Cary, NC, 2008)을 이용한 분산 분석으로 결과를 분석하였으며, 목초액을 활용한 한약재 추출물의 항균 및 항산화 효과의 유의성 검정은 Duncan 다중검정법을 이용하여 처리구 간의 통계적인 차이를 95% 수준에서 구명하였다.

결과 및 고찰

Table 2는 목초액으로 추출한 7종 한약재의 항균 능력을 조사한 결과이다. 토종닭 암컷의 회장에 100 mL의 펩톤수를 첨가한 뒤 1분간 흔듦으로 채취한 총균은 수치적으로 목초액과 황백에서 약간 낮았을 뿐, 생육 저지환의 직경은 통계적으로 유의차가 나타나지 않았다(p>0.05). 닭의 장내 유익한 미생물 중 하나인 유산균을 황련으로 처리한다면 2.56 mm의 생육 저지환을 형성하였으나, 이외 목초액과 6종의 한약재의 생육 저지환은 1.28～1.63 mm로 황련보다 낮았다(p<0.05). 살모넬라와 같은 유해 미생물은 계피에서 생육 저지환의 직경이 유의적으로 넓은 3.30 mm이었으며, 목초액, 백출, 황련, 정향과 황백은 2.01～2.21 mm로 어성초보다는 유의적으로 넓었으나(p<0.05), 알린으로 인해 강한 항균 능력을 나타내는 마늘(경규항, 2006)과는 유사하였다(p>0.05). 특히, 어성초는 살모넬라에 대한 생육저지 능력이 목초액보다 떨어져 목초액으로 추출하여 어성초를 숙성한다면 살모넬라에 대한 항균 능력은 어성초 에탄올 추출액에 다소 미치지 못하는 것으로 판단된다(김동혁 등, 2008). 장내 또 하나의 유해 미생물 중 하나인 대장균에 대한 생육 저지환의 직경은 충치 예방과 방부제로 사용되는 정향(김미리, 2002)에서 가장 넓은 3.48 mm이었으나, 계피, 황련, 마늘 및 황백과는 통계적으로 유사하였다(p>0.05). 목초액의 대장균에 대한 생육 저지환은 유의적으로 가장 작은 2.69 mm이었다(p<0.05).

Table 2. Growth inhibiting activities of medicinal herbs extracts against different microbial strains

Medicinal herb[1]	Growth inhibition zone (mm)			
	Total plate count	*Lactobacillus*	*Salmonella*	*E. coli*
Wood vinegar	1.93	ND[2]	2.20[b]	2.69[c]
Allium sativum	2.04	1.55[b]	1.87[bc]	3.26[ab]
Atractylodes ovate	2.29	1.54[b]	2.01[b]	3.12[b]
Cinnamomum zeylanicum	2.09	1.48[b]	3.30[a]	3.32[ab]
Coptidis rhizoma	2.29	2.56[a]	2.21[b]	3.34[ab]
Houttuynia cordata	2.18	1.39[b]	1.60[c]	3.10[b]
Phellodendron chinense	1.86	1.28[b]	2.09[b]	3.26[ab]
Syzygium aromaticum	2.30	1.63[b]	2.18[b]	3.48[a]
SEM[3]	0.04	0.08	0.08	0.04

[1] n = 15.
[2] ND = not detected.
[3] SEM = standard error mean.
[a~c] Means followed by different letter within the column are significantly different(p<0.05).

7종의 한약재와 목초액의 혼합, 숙성액 중 정향의 폴리페놀 함량은 4.28 mg/mL로 유의적으로 높았으며, 이후 황련, 백출, 황백은 2.98～3.08 mg/mL이었다(p<0.05)(Table 3). 마늘, 계피와 어성초의 폴리페놀 함량은 2.56～2.60 mg/mL로 낮았으나, 목초액에서는 0.20 mg/mL로 가장 낮았다(p<0.05). 플라보노이드의 함량은 정향의 0.15 mg/mL보다는 황련과 황백에서 각각 유의적으로 높은 0.38과 0.22 mg/mL이었다(p<0.05). 활성 라디칼에 대한 전자의 공여로 산화에 대한 안정화 능력을 측정하는 DPPH(정사무엘 등, 2008)는 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 모두 높았던 황련에서 유의적으로 높은 0.41 mM이었으며, 이후 eugenol과 thymol 등의 페놀화합물을 함유한 정향이 0.26 mM이었다(김미리, 2002). 폴리페놀과 플라보노이드 함량에서 유의적으로 낮았던 마늘과 백출은 낮은 DPPH를 나타내었으며, 특히 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 가장 낮았던 어성초는 0.18 mM의 DPPH를 나타내었다(p<0.05).

Table 3. Polyphenol and flavonoid contents and antioxidant activities of medicinal herbs extracts

Medicinal herb[1]	Antioxidant concentration[2]		
	Polyphenol	Flavonoid	DPPH3
Wood vinegar	0.20[d]	-	0.21[e]
Allium sativum	2.59[c]	0.19[bc]	0.20[f]
Atractylodes ovate	2.99[b]	0.19[bc]	0.21[ef]
Cinnamomum zeylanicum	2.60[c]	0.20[bc]	0.24[c]
Coptidis rhizoma	3.08[b]	0.38[a]	0.41[a]
Houttuynia cordata	2.56[c]	0.20[bc]	0.18[g]
Phellodendron chinense	2.98[b]	0.22[b]	0.22[d]
Syzygium aromaticum	4.28[a]	0.15[c]	0.26[b]
SEM[4]	0.22	0.03	0.01

[1] n = 5.
[2] Polyphenol = mg/mL; Flavonoid = mg/mL; DPPH = mM.
[3] DPPH = 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl.
[4] SEM = standard error mean.
[a~g] Means followed by different letter within the column are significantly different(p<0.05).

적 요

본 실험은 목초액을 활용한 전통 한약재 추출, 발효액의 항균과 항산화 능력을 측정함으로써 가금 사료 내 항생제 대체제로의 사용 가능성을 타진하고자 실시하였다. 참나무를 숯가마에 넣고 고온에서 탄화시킴으로써 수집되는 목초액을 활용하여 마늘, 백출, 계피, 황련, 어성초, 황백과 정향과 혼합, 실온에서 50일간 숙성시킨 다음 숙성물을 분리, 항균과 항산화 능력을 측정하였다. 유산균에 대한 생육 저지환은 황련을 제외한 6종의 한약재 추출 숙성액에서 유의적으로 작은 1.28~1.63 mm이었으며, 장내 유해 미생물들인 살모넬라와 대장균에 대한 생육 저지환의 크기는 계피와 정향에서 각각 3.30과 3.48 mm로 가장 우수한 항균성을 나타내었다. 황련의 장내 유해 미생물에 대한 생육 저지환의 직경은 각각 살모넬라 2.21 mm와 대장균 3.34 mm로 살모넬라는 생육 저지환의 직경이 계피보다 유의적으로 작았으나(p<0.05), 대장균에서는 정향과 통계적 유의성이 없었다(p>0.05). 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 정향과 황련에서 가장 높은 4.28과 0.38 mg/mL이었으며, 황백은 정향과 황련보다는 다소 낮은 2.98 mg/kg과 0.22 mg/kg이었다. 라디칼 소거능을 나타내는 DPPH는 플라보노이드가 0.38 mg/mL인 황련에서 가장 높은 0.41 mM을 나타내었으며, 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 2.56 mg/mL과 0.20 mg/mL로 낮았던 어성초에서 유의적으로 낮은 0.18 mM의 DPPH를 나타내었다(p<0.05). 따라서 가금 사료 내 천연의 항생 대체제를 첨가하고자 한다면 항균 능력이 우수하면서도 라디칼 소거능력까지 양호하였던 계피, 황련과 정향 목초액 추출, 숙성물이 천연의 대체제로 활용 가능할 것으로 판단된다.

(색인어 : 항생제, 항균, 항산화, 한약재, 가금)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 지역전략작목 산학연 협력사업의 일환으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

Chae MH, Nam HM, Jang GC, Kim HJ, Kim SR, Jung SC, Kang D, Kim, J 2011 Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food animals and raw meats in slaughterhouse in Korea during 2010. Kor J Vet Publ Hilth 35:239-245.

Dahiya JP, Wilkie DC, Van Kessel AG, Drew MD 2006 Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. Anim Feed Sci Technol 129:60-88.

Guo FC, Kwakkel RP, Soede J, Williams BA, Verstegen MWA 2004 Effect of a Chinese herb medicine formulation, as an alternative for antibiotics, on performance of broilers. Br Poult Sci 45:793-797.

Juan MY, Chou CC 2010 Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. Food Microbiol 27:586-591.

Kang GH, Kim SH, Kim JH, Kang HK, Kim DW, Cho SH, Seong PN, Park BY, Kim DH 2010 Effects of environmental temperature and antibiotic substitute on quality of chicken breast meat. Korean J Food Sci Ani Resour 30:261-268.

Kim SR, Nam HM, Jang GC, Kim AR, Kang MS, Chae MH, Jung SC, Kang D, Kim JK 2011 Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated

from food animas and raw meats in slaughterhouse in Korea during 2010. Kor J Vet Publ Hlth 35:246-254.

Park YS, Kim JR, Kang BK, Choe YH, Kim BS 2012 Inhibitory effects of herbal medicine on coccidiosis. Korean J Vet Serv 35:25-31.

SAS 2008 SAS/STAT Software. Release 9.2, SAS Inst Inc Cary, NC, USA.

Svobodova I, Steinhauserova I, Nebola M 2007 Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in the Czech Republic. Acta Vet Brno 76:S25-S30.

Yang Y, IJI PA, Choct M 2009 Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. World Poult Sci J 65:97-114.

경규항 2006 마늘 황화합물의 병원성 미생물 번식 억제 작용. 한국식품위생안전성학회지 21:145-152.

김동혁 임정주 이진주 정원철 신현진 이후장 김곤섭 김석 2008 어성초 ethanol 추출물의 마우스 살모넬라 감염증에 대한 항균 및 치료효과 규명. 한국환경농학회지 27: 156-162.

김미리 2002 향신료의 기능성. 동아시아식생활학회지 12: 431-453.

성은일 유선종 안병기 조태수 안병준 최돈하 강창원 2006 목초액 함유 활성탄의 첨가가 육계 생산성 및 계란 내 항생제 잔류에 미치는 영향. 한국가금학회지 33:283-293.

정사무엘 송현파 최준호 김빛나 신명호 이봉덕 조철훈 2008 금은화, 황련, 상엽 추출물 혼합물과 항생제(Albac G150) 급여가 계육의 산화 안전성에 미치는 영향. 한국가금학회지 35:29-37.

(접수: 2013. 1. 31, 수정: 2013. 3. 14, 채택: 2013. 3. 15)