

최 중
연구보고서

T6624368

장내 미생물 균총 조절에 의한 영양적
자돈설사방지기술 개발에 관한 연구

Study for Nutritional Diarrhea Prevention in
Weaning Pigs by Controlling Intestinal Microflora

연구기관
서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “장내 미생물 균총 조절에 의한 영양적 자돈설사방지기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 23일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 김 유 용 교수

세부연구책임자 : 김 유 용 교수

연 구 원 : 최 준 호

연 구 원 : 전 홍 렬

연 구 원 : 오 화 균

연 구 원 : 주 원 석

연 구 원 : 용 홍 봉

연 구 원 : 박 용 국

연 구 원 : 장 영 달

연 구 원 : 윤 진 현

연 구 원 : 이 소 연

참여 기업명 : (주) CTC 바이오

요 약 문

I. 제 목

장내 미생물 균총 조절에 의한 영양적 자돈설사방지기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 국내 양돈의 현황은 사육두수는 증가하지만, 도축(출하)두수는 감소하는 이상 현상이 나타나고 있으며 이와 같은 현상이 발생하는 이유는 자돈기의 20%가 넘는 폐사율에 있다. 특히 이유자돈에서 설사가 발생하게 되면 TGE, PED 등의 바이러스성 질병은 원인 규명이 가능하지만 세균성, 즉 병원성 미생물에 의한 설사는 구체적인 원인을 밝히지 못하고 있는 실정이다.

이유자돈의 소화관 내 미생물 및 병원성 미생물 균총을 규명하기 위해 계대배양의 방법을 이용하고 있는 실정이지만, 분리하고 동정하는데 최소한 3-5일이 소요되어 조기에 검출하여 어려움이 있다. 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위해 신속하고 특이적인 대체방법으로 개발된 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction :PCR) 기법이 개발되어 16S rDNA 부분을 이용하여 여러 병원성 미생물 및 장내 미생물을 분류하고 검출하는 데 이용되고 있다. 이 PCR법은 분석의 특이성과 민감성이 높고 표적 유전자를 매우 빠른 속도로 증폭시킴으로써 아주 적은 수의 균도 짧은 시간 내에 검출이 가능하게 되었다. 그러나, 이러한 PCR 기법도 직접 미생물을 검출하기 위해서는 검체 중에 존재하는 여러 가지의 증폭억제물질 제거해야 하는 문제가 남아 있고, 실행상의 또 다른 문제점으로서는 검체의 오염 또는 PCR 자체적 반응산물의 축적 등에 의해서 일어날 수 있는 반응들이 있다.

기존의 중합효소연쇄반응에 의한 검체내 세균과 바이러스 분석의 한계를 극복하기 위한 대안으로 실시간 중합효소반응법 (Real time PCR)법이 개발되어 세

균과 바이러스를 진단하고 검출하는 데 있어서 더욱 정확하고 신속하게 검사하게 할 수 있으며 여기에 세균과 바이러스 양을 정량까지 가능하게 하였다. 그러나 돼지 장내 미생물을 real time PCR 방법으로 절대정량 분석 하는 접근은 아직 진행되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 분자생물학적 기법을 이용한 real time PCR을 이용하여 자돈 장내의 유익한 미생물 균총을 정확히 측정하는 방법을 확립하고 자돈의 설사방지를 위해 유익한 미생물의 증식을 촉진할 수 있는 영양, 사료적인 방법이 개발하여 우리나라 양돈 산업의 생산성을 한층 높이고자 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제 중 1년차에는 분자생물학적 기법을 이용한 돼지 장내 미생물수 측정 방법 확립을 수행하였다. 자돈의 장내에 서식하며, 생균제로써의 효과를 가지고 있는 총 4 균종으로 *L.acidophilus*, *S.bovis*, *B.subtilis*, *E.coli K88*에 대해서 미생물 균총을 조사하였다. 이렇게 선정된 미생물을 검출하기 위한 PCR 수행을 실시하기 위하여 돼지 장내 미생물 중 특이적인 primer를 제작하였으며, *Streptococcus bovis*, *E. coli K88+*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* 각각에 대해 16S rDNA 부분을 이용하여 PCR primer 및 real time PCR을 위한 특이적 primer를 제작하였다. 선정된 각 미생물의 DNA와 internal control 의 두 가지 template를 사용하여 PCR을 수행하고 UV spectrometry로 band의 강도 비율을 측정하여 계산식을 정립하는 Competitive PCR 기법을 사용하였으나 이보다 소량의 DNA의 정량에도 민감한 SYBR green 시약을 이용한 형광 발색법으로 standard plasmid DNA의 농도를 측정하는 real time PCR 기법을 이용하여 plasmid의 농도 측정방법으로 사용하였다. 이후 제작한 RT-primer를 이용하여, 미생물과 무관한 비특이적인 band가 나타나는지 확인하였으며, 본 연구에서 비특이적 band가 나타나지 않았다. 이를 바탕으로 소장 샘플에서도 PCR band가 미생물 특이적으로 검출 되는지를 확인하기 위하여 무작위로 추출한 돼지 공장 샘플에서 real time PCR에 맞게 제작된 특이적 primer를 이용하여 real time PCR을 수행하였을 때 특이적인 단일 밴드를 확인하였다. 따라서 이를 이용하여 돼지 장내 미생물 균총 중 대표적인 미생물인 *Streptococcus bovis*, *E.coli K88+*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*에 대한 real time PCR용 primer를 제작하였다. 본 과제에서 이유자돈 장내 미생물 균총수를 real time PCR법에 의해 절대정량적으로 분석하고자 수행하고자 이를 위해 종 특이적인 DNA 단편이 들어간

plasmid vector를 제작하여 standard plasmid DNA를 제작하였다. 이를 위해 RT-primer를 이용하여 순수 배양된 target 미생물의 특이적인 band를 증폭시킨 후, 증폭된 DNA 단편을 정제하여 준비된 Vector(pGEM-T easy vector)에 삽입하였다. 이후 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 competent cell에 heat shock method를 이용하여 transformation을 하였으며, 항생제 선택배지 (LB+AMP media)에 Xgal과 IPTG와 함께 도말하여 target 유전자가 삽입된 plasmid를 가진 Competent cell을 선발하였다. 이 후 선발된 transformed competent cell을 계대 배양하여 plasmid를 추출하고, 얻어진 plasmid에 대한 PCR과 Gel Electrophoresis를 수행하여 Target 미생물의 특이적인 유전자가 제대로 삽입되었는지를 규명하였다. 이렇게 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 대량 추출하여 농도측정 후 standard plasmid DNA stock solution으로 사용하였으며 serial dilution을 실시한 standard solution을 가지고 standard plasmid DNA를 농도별로 희석하여 standard curve들 작성하였으며 이는 이유자돈 장내 미생물균총 수를 정량적으로 측정하기 위해 수행하였다.

본 2년차 연구과제에서는 자돈의 설사를 예방할 수 있는 영양, 사료적인 방법으로 자돈 사료에서는 잘 사용되지 않는 섬유소원료인 sugar beet pulp(SBP)를 소량 첨가하여 prebiotics로서의 가능성을 평가하였다. 사료첨가제로 사용될 수 있는 섬유소인 beet pulp의 첨가가 장내 유익한 미생물 균총의 수를 증가시키고 유해한 미생물 균총의 수를 감소시키는 효과가 있는지를 1년차 과제에서 개발된 분자생물학적 기법을 이용한 미생물수 측정을 통하여 정확히 구명하고 이에 따른 숙주동물의 건강증진 효과를 조사함과 동시에 이유자돈의 소화관내에 유익한 생물 균총들이 우점될 수 있는 적정 섬유소의 첨가 수준을 확립하고자 하였다. 본 실험을 위해 이유자돈 사료내 SBP를 첨가하여 성장능력(일당증체량, 일당사료섭취량, 사료효율), 혈중유리아태 질소, 장의 형태학적 고찰(용모와 용와의 발달) 등을 조사하였다. SBP 첨가로 인한 자돈의 장내 유익균의 미생물 균총(*S. bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*)과 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K88ac 미생물 균총수를 정량적으로 분석하기 위해 본 연구과제 1년차 연구 결과를 토대로 하여 실시하였다. Real time PCR을 실험을 실시하기 위하여 각 균종에 특이적인 primer(real-time PCR primer) 제작하였다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 standard는 증폭 DNA 염기서열로 유전자 재조합된 순수 배양 *E. coli*로부터 추출된 plasmid DNA를 연쇄 희석하여 확립하였다. 5가지 각각의 미생물 균총인 *L. casei*, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*, *E. coli* K88+을 공장, 맹장, 횡행결장, 직장 부위에서 측정된 Ct value를 나타냈으며, PCR efficiency의 회귀식에 대입하여 절대정량 분석값을 구하였다. 다만 Ct value로 표기한 이유는 통계적 검증을 통해 미생물 균총의 차이를 비교하기

위해서 이다. *S. bovis*, *E. coli*, *L. plantarum*, *B. subtilis*, *L. casei* 에 대한 정량 분석 결과, 0.9978, 0.9975, 0.9992, 0.9994, 0.9949의 상관계수가 각각 도출되었다. 또한, 섬유소 원료인 SBP의 첨가가 영양소 소화율 및 질소 대사에 미치는 영향 및 장내의 면역 유도 반응에 의한 면역 능력을 확인하였다. 자돈에게 SBP가 첨가된 사료를 급여하여 전분채취법을 이용하여 영양소 소화율을 조사함으로써 자돈 원료사료로서 SBP의 특성을 파악하고, LPS를 통한 면역 반응을 유도하여 생성되는 면역 글로불린을 통해 조사하며, 소장의 발달 및 변화를 측정하기 위해 morphology 연구를 수행하였다.

본 3년차 연구과제에서는 무기산제가 이유자돈의 성장, 장내 미생물 균총, 영양소 소화율, 건강상태 및 면역능력에 미치는 영향을 조사하였으며, 사료에 신 무기산제를 소량 첨가하여 이유자돈의 성장, 혈중 유리아태 질소, 설사 발생 빈도 및 장내 미생물 균총에 대해 조사하였다. 특히 새로운 무기산제 첨가로 인한 자돈의 장내 유익한 미생물 균총(*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*)에 대한 우점여부와 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K88ac 미생물 균총수를 확인하기 위해, 1년차 과제에서 개발된 분자생물학적 기법을 이용한 미생물수 측정을 통하여 정확히 구명하고 이에 따른 숙주동물의 건강증진 효과를 조사함과 동시에 이유자돈의 소화관내에 유익한 미생물 균총들이 우점될 수 있는 적정 무기산제의 첨가 수준을 확립하고자 하였다. 미생물 균총수를 정량적으로 분석하기 위해 본 연구과제 2년차 연구과제에서 수행했던 분자생물학적 기법과 동일하게 수행하였다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응에는 iCycler[®] Optical Module (Bio-Rad, USA)과 iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, USA)가 사용되었다. *S. bovis*, *E. coli*, *L. plantarum*, *B. subtilis*, *L. casei* 에 대한 정량 분석 결과, 0.996, 0.994, 0.998, 0.998, 0.999의 상관계수가 각각 도출되었다. 이 결과는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 방법의 높은 정확성과 신뢰성을 나타내는 것이다. 또한, 자돈에게 무기산제가 첨가된 사료를 급여하여 전분채취법을 이용하여 영양소 소화율을 조사함으로써 무기산제의 특성을 파악하고, 면역 능력에 미치는 영향에 대해 LPS를 통한 면역 반응을 유도하여 생성되는 면역 글로불린을 통해 조사하였고, 소장의 발달 및 변화를 측정하기 위해 morphology 연구를 실시하였다. 또한 영양소 소화율 조사를 위해 조단백질, 조지방, 조수분, 조회분, 칼슘, 인, 섬유소의 소화율을 조사하여 소화율 및 질소 축적율에 대해 분석하였다. 또한 설사 빈도를 조사함으로써 무기산제가 설사 예방에 미치는 효과에 대해 규명하고, VFA의 조사를 통해 자돈의 장내 생성 정도를 파악하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

자돈 장내 유익균 정착에 관한 연구에 있어서 현재까지 가장 문제가 되고 있는 것은 미생물균총수를 분리하고 동정하는 데 시간이 많이 소요되며, 각 반복간의 변이가 심하고 또한 죽은 미생물에 관한 측정은 불가능하다는 것이다. 따라서 본 과제에서 수행한 분자생물학적 기법을 이용한 실시간 중합효소반응 (real time PCR)은 기존 일반 PCR에 비해서 분석시간을 많이 단축할 수 있어 수 시간 내에 많은 샘플 분석을 가능하게 했다. 또한, real time PCR 기법은 더욱 신속하고 정확한 분석을 가능하게 하였고, 여기에 미생물 균총의 양을 정량까지 분석할 수 있게 되었다. 본 과제에서는 미생물의 최대한의 DNA량을 얻기 위해서 세포벽 성분인 peptidoglycan 성분을 제거할 수 있는 방법으로 bead beater를 이용하여 가능한 한 모든 genomic DNA를 추출하였다. 일반적으로 그람 양성균의 세포막에 존재하는 peptido-glycan이 화학적인 방법으로서의 DNA의 추출로 일반 PCR 효율을 방해하게 되어 결과의 정확도를 떨어뜨릴 수 있는 문제점이 있다.

Real time PCR 기법에서 사용하는 미생물 중 특이적 primer 제작은 상당히 중요하다. 일반적인 PCR에 사용되는 specific primer는 real time PCR을 수행하기에는 product size가 커서 real time PCR에 맞는 primer(RT-primer)를 별도로 제작하였다. 특히 정량을 위한 real time PCR에서는 비 특이적 band뿐만 아니라 일반적인 PCR에서 나타나는 primer dimer도 실험오차에 많은 영향을 주므로 이를 제거하기 위한 방향으로 primer 설계 및 PCR condition을 조절 하였다. 미량의 DNA 정량에 알맞은 SYBR green을 이용하여 Real time PCR으로 이유자돈 장내 소화물에 있는 미생물 균총인 *S. bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K88ac 수를 절대 정량적으로 분석하였다. 기존 계대배양에서는 특정 미생물 총 수만 측정할 수 있었으나, real time PCR에 의해 특정 미생물의 종 특이적 계통 분석과 정량을 가능케 했다. 이유자돈의 경우 분변으로 분비되는 작은 수의 설사 원인균인 대장균에 의해 전체 돼지가 감염을 일으킬 수 있는데 본 과제에서 수행한 분자생물학적 기법을 이용한 real time PCR을 이용하면 적은 수의 대장균도 감지할 수 있기 때문에 예방을 위한 프로그램에도 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 2년차 연구과제에서는 자돈의 설사를 예방할 수 있는 영양, 사료적인 방법으로 자돈 사료에서는 잘 사용되지 않는 섬유소원료인 sugar beet pulp(SBP) 수준별 첨가가 자돈의 성장을 및 장내 미생물 균총에 관한 연구결과에서, sugar beet pulp를 5% 이상 첨가하였을 때, 성장 개선 효과가 체중, 일당 증체량, 사료효율에서 나타났다. 장내 미생물 균총에서도 sugar beet pulp 첨가구에서 유익균인 *L.*

casei, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. 또한, *Bacillus subtilis*, *S. bovis*의 경우 공장과 횡행결장에서 sugar beet pulp 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 높았으며, 이는 일일 증체량과 성장효율이 SBP 5% 이상 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 개선된 결과와 일치한 결과였다. 이는 이유자돈에서의 성장능력의 향상은 이유시기부터 sugar beet pulp를 급여로 장내 유익한 미생물 균총이 유지 되었기 때문으로 사료된다. 따라서, 자돈 사료에 첨가한 섬유소가 장내에 정착하고 있는 유익한 미생물에 영향을 주어 자돈의 성장 향상에 도움을 준다고 사료된다. 본 과제 1년차 연구에서 확립한 real-time PCR을 이용한 미생물 균총의 정량화 기술을 통해 자돈 사료내 SBP 첨가가자돈의 장내 유익 미생물 균총 유지 및 이유자돈의 성장 개선 효과를 구명할 수 있었다고 사료한다.

본 3년차 연구과제를 통해서, 무기산제 0.1%를 첨가한 처리구가 다른 무기산 처리구에 비해 *Bacillus subtilis*의 경우 회장에 있어서 유의적인 차이를 보이며 높았으며, 이는 일일 증체량과 면역력이 무기산제 0.1% 첨가한 처리구가 다른 무기산제 처리구에 비해 유의적으로 개선된 결과와 일치한 결과였다. 이는 이유자돈에서의 성장능력의 향상은 이유시기부터 무기산제를 급여로 장내 유익한 미생물 균총이 유지 되었기 때문으로 사료된다. 따라서, 자돈 사료에 첨가한 무기산제가 장내에 정착하고 있는 유익한 미생물에 영향을 주어 자돈의 면역력과 성장 향상에 도움을 준다고 사료한다. 본 과제 1년차 연구에서 확립한 real-time PCR을 이용한 미생물 균총의 정량화 기술을 통해 자돈의 사료내 무기산제 첨가가 자돈의 장내 미생물 균총의 변화를 유도하여 면역능력을 증진과 성장개선에 미치는 효과를 구명할 수 있었다고 사료한다.

한편, 본 과제에서 분자생물학적 기법을 이용하여 이유자돈 장내 미생물 5종을 구명 하였으나, 자돈의 장내에는 더욱 다양한 미생물 균종이 서식하고 있으며, 항생제대체물질로 첨가되는 생균제용 미생물 균종도 다양하게 사용하고 있어 앞으로 더 많은 균종을 본 과제에서 확립한 분자생물학적 기법을 이용하여 미생물을 정량적인 분석이 가능 할 것으로 사료한다. 자돈 사료용 생균제에는 자돈의 장내 서식하는 미생물만을 이용하는 것이 아니라, 본래 알려져 있는 유익한 미생물이 다양하게 이용된다. 이러한 생균제의 첨가에 의한 이유자돈에게 있어 장내 유익 미생물 균총 유지 및 병원균 제어에 미치는 영향에 대한 평가가 본 과제에서 개발한 분자생물학적 기법을 이용하여 가능 할 것이다.

따라서 본 연구를 통하여 분자생물학적 기법(real time PCR)을 이용하여 자돈 장내의 유익한 미생물 균총의 특징을 규명하고 기존 계대배양법의 문제점을 개선한 정확한 미생물 수 측정 기술을 확립하며, 생균제용 미생물 제제의 장내 분

포 추적 방법을 확립함으로써 자돈의 영양적 설사를 예방할 수 있는 대안을 제시하였다. 또한 자돈 장내 미생물 균총을 개선할 수 있는 설탕비료 체제(sugar beet pulp) 및 경제성이 우수한 무기산제(inorganic acidifier)의 이유 자돈 사료 내 첨가를 통하여 그 첨가수준을 설정하고 장내 미생물 균총에 대한 개발된 분자생물학적 기법(real time PCR)을 통한 검증으로 국내 양돈 산업의 발전을 위해 해결해야 할 문제에 대한 다방면의 접근과 우리나라 양돈 산업 경쟁력 제고에 필수적인 자돈 폐사율 감소, 이를 통한 생산성 향상의 결과를 창출해 낼 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

The GI tract of the swine is an active environment with fermenting microorganisms, both aerobic and anaerobic microbes, and digestive enzymes. Researches on the structure and function of the microbiota of the GI tract and the activities of these micro-organisms are needed for the development of feed supplemented antibiotic alternatives such as probiotics or prebiotics. Most of the research on GI tract microbiota of the swine has been conducted by traditional culturing methods, and the results from the cecal and colonic samples of the growing pigs showed that the majority of the microbiota are strictly anaerobic and gram-positive (Stewart, 1997). But considerable number of strictly anaerobic bacteria were difficult to culture by traditional methods, thus stand in the way for analyzing many other bacteria species. This problem could be overcome by molecular biological analytical methods. While traditional culturing methods could only analyze live micro-organisms, molecular methods target extracted DNAs or RNAs, providing the solution to such limitation. This methodical change was rapidly developed following the introduction of 16S ribosomal RNA (rRNA) as the marker for micro-organism classification by Woese (1987). This method has been recently introduced to the GI tract micro-organism research area, and suggested new hypothesis that the intestinal environment is affected by supplemented feed and the host itself.

Young pigs are generally weaned approximately at 21 days old from commercial farms, facing sudden change in feed and translocated to large scale production facilities. These complex stress factors caused piglet diarrhea or growth retardation. Antibiotics were supplemented to prevent such growth retardation and micro-organism oriented diarrhea (Cromwell, 2002). But the use of antibiotics in the livestock industry revealed the danger of antibiotic resistance of micro-organisms present in both livestock and human, creating public worries, thus increasing the need for researches on antibiotic alternatives such as probiotics and prebiotics. This need also stimulated nutritional knowledge as well as other factors influencing the

microbiota. As invasive pathogens are influenced by the animal's condition, including the microbiota, it will be possible to prevent the invasion of pathogenic bacteria by finding factors that are responsible for the change of microbiota. A method for an accurate observation of the microorganism shift has to be preceded via controlling the microbiota.

In the first experiment, a method was established using real-time PCR, one of the methods favored as micro-organism detecting tools, for detection of the microbita in the gastrointestinal tract of pigs such as *E.coli* K88, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus bovis*.

A culture independent quantitative real-time PCR method was evaluated for enumeration of the bacteria species *E.coli* K88, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus bovis* from intestinal samples of weaning pigs. Total genomic DNA was extracted by bead-beating method using the Ultra Clean™ Dry Soil Kit (MoBio, USA). Species-specific primer sets of *E.coli* K88 and *S. bovis* were designed and tested for species-specificity. The standard for real-time PCR was established by serial dilution plasmid of DNA concentration from pure cultured transgenic *E. coli* which contained target DNA sequence. The quantification of DNA (as DNA copy/g samples) by real-time PCR was performed with iCycler® Optical Module (Bio-Rad, USA) using the iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA). The result showed 1.000 (*S. bovis*), 0.999 (*E. coli* K88+) of correlation coefficient, indicating high reliability.

In the second experiment, a method was established using real-time PCR, one of the methods favored as micro-organism detecting tools, for evaluation of the effect of various supplementation levels of sugar beet pulp (SBP) on the microbiota shift in weaning pigs. Sugar beet pulp, by-product of the sugar industry, is characterized by a high non-starch polysaccharides content and a low level of amino acids, minerals and lignin. One of the alternatives for antibiotics could be the concept of prebiotics. The concept is based on the phenomenon of colonial resistance, in which beneficial bacteria control opportunist pathogens, mainly through secretion of volatile fatty acids and competition for nutrients and binding sites . And fiber source can stimulate intestinal secretion and intestinal epithelial cell proliferation. Due to the good quality and high digestibility of the fibrous fraction, SBP can partially be used to pig's diet as prebiotics. Therefore, the object of this

study was to evaluate the effect supplementation of beet pulp as prebiotics on growth performance nutrient digestibility, intestinal morphology, and microflora in the gastrointestinal tract of weaning pigs. A culture independent quantitative real-time PCR method was evaluated for enumeration of the bacteria species *L. casei*, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*, *E. coli* K88+ from intestinal samples of weaning pigs. Total genomic DNA was extracted by bead-beating method using the Ultra Clean™ Dry Soil Kit (MoBio, USA). Species-specific primer was designed for each bacterium and tested for species-specificity. The standard for real-time PCR was established by serial dilution plasmid of DNA concentration from pure cultured transgenic *E. coli* which contained target DNA sequence. The iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) generates a standard curve vs. log DNA concentration for all standards and determines the DNA concentration of unknowns by interpolation. The result showed 0.9992 (*L. plantarum*), 0.9994 (*B. subtilis*), 0.9978 (*S. bovis*), 0.9975 (*E. coli* K88+), 0.9949 (*L. casei*,) of correlation coefficient, indicating high reliability. The CT value of *Bacillus subtilis*, *S. bovis* in the jejunum and colon digesta of pigs was significant lower in SBP supplementation groups by real-time PCR method. Therefore, it could indicate that addition of SBP to weaning diet might increase the population of health promoting bacteria. During the whole experimental period, body weight (BW), average daily gain (ADG) and feed efficiency (G/F ratio) in 5.0, 7.5, 10.0 % SBP supplementation groups were higher ($P < 0.05$) than those of control group, especially for the first 3 weeks. From this study, supplementation of SBP as prebiotics was positive effect on growth performance and intestinal microflora of weaning pig.

In the third experiment, it was to evaluate the effect supplementation of inorganic acidifier on growth performance nutrient digestibility, intestinal morphology, and microflora in the gastrointestinal tract of weaning pigs using real-time PCR, one of the methods favored as micro-organism detecting tools. The iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) generates a standard curve vs. log DNA concentration for all standards and determines the DNA concentration of unknowns by interpolation. The result showed 0.999 (*L. casei*,), 0.998 (*L. plantarum*), 0.998 (*B. subtilis*), 0.996 (*S. bovis*), 0.994 (*E. coli* K88+) of correlation

coefficient, indicating high reliability. This result demonstrated a culture independent quantification of the intestinal microbes with known DNA sequence could be reliable analytical method based upon the accuracy and efficiency. The CT value of *Bacillus subtilis* in the ileum digesta of pigs fed diet supplemented antibiotics and HCl 0.1% was significantly lower than other groups. However, the CT value of *Lactobacillus casei* in the cecum digesta of pigs fed diet supplemented HCl 0.1% was significantly higher than other groups. It could indicate that addition of HCl 0.1% to weaning diet might increase the population of health promoting bacteria. During the whole experimental period, average daily gain (ADG) in HCl 0.1 % supplementation groups were higher ($P<0.05$) than other HCl supplemented groups. The level of IgA were affected by HCl 0.1% ($P<0.05$). From this study, supplementation of 1g/kg HCl in the diet of weaning pigs increased the population of health promoting bacteria, resulted in alleviation immune function and improvement of growth performance of weaning pigs.

From these experiments, the high PCR efficiency and correlation coefficient together with acceptable real-time PCR results indicated that the culture-independent quantitative real-time PCR method could be a reliable and efficient when quantifying the intestinal microbials. Establishment of analytical methods for other microbials that are popularly used as probiotics and that are responsible for diarrhea occurrences are needed. With this powerful analytical method, further studies to reduce diarrhea occurrences and evaluate the quality of probiotics will be accurate and efficient.

CONTENTS

(영 문 목 차)

1. Introduction of The Research	25
1) The Needs and Aims of The Research	25
a. The Aims of The Research	25
b. The Needs of The Research	28
2. The Internal and External Research Status	32
1) The Internal Research Status	33
2) The External Research Status	33
3. Experiments and Results of the Research	37
1) The Evaluation of Intestinal Microorganism by Molecular Biological Method	37
a. Introduction	37
b. Materials and Methods	38
c. Results and Discussion	38
2) The Development of Quantitative Analysis Method : <i>Lactobacillus casei</i> from Piglet Intestine	51
a. Introduction	51
b. Materials and Methods	51
c. Results and Discussion	56
3) The Effects of Sugar Beet Pulp(SBP) on Growth Performance, Blood Urea Nitrogen, Diarrhea Incidence and Intestinal Microflora in Weaning Pigs	62

a. Introduction	62
b. Materials and Methods	65
c. Results and Discussion	70
4) The Effects of Sugar Beet Pulp(SBP) on Nutrient Digestibility and Immune Response in Weaning Pigs	93
a. Introduction	93
b. Materials and Methods	93
c. Results and Discussion	94
5) The Effects of Inorganic Acidifier on Growth Performance, Blood Urea Nitrogen, Diarrhea Incidence and Intestinal Microflora in Weaning Pigs	102
a. Introduction	102
b. Materials and Methods	104
c. Result and Discussion	110
6) The Effects of Inorganic Acidifier on Nutrient Digestibility in Weaning Pigs	143
a. Introduction	143
b. Materials and Methods	143
c. Results and Discussion	144
7) The Effects of Inorganic Acidifier on Immune Response in Weaning Pigs	149
a. Introduction	149
b. Materials and Methods	149
c. Results and Discussion	150
4. The Accomplishment and Contribution of the Research	155
5. Planned Use of the Research	167

6. Collection of Related Foreign Science Technology about the Research	170
1) The Evaluation of Intestinal Microorganism by Molecular Biological Method	170
2) The Effects of Sugar Beet Pulp(SBP) on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Immune Response and Intestinal Microflora in Weaning Pigs	173
3) The Effects of Inorganic Acidifier on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Immune Response and Intestinal Microflora in Weaning Pigs	175
7. Reference	179

목 차

제 1 장 연구 개발 과제의 개요	25
제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성	25
제 1 항 연구개발의 목적	25
제 2 항 연구 개발의 필요성	28
제 2 장 국내외 기술개발 현황	32
제 1 절 국내 연구 현황	33
제 2 절 해외 연구 현황	33
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과	37
제 1 절 분자 생물학적 기법을 이용한 장내 미생물 균총의 측정	37
제 1 항 서 론	37
제 2 항 실험 방법 및 재료	38
제 3 항 연구 결과 및 고찰	42
제 2 절 자돈의 장 내용물에서 <i>Lactobacillus casei</i> 의 정량 분석 기술 개발	51
제 1 항 서 론	51
제 2 항 실험 방법 및 재료	51
제 3 항 연구 결과 및 고찰	56
제 3 절 Sugar beet pulp(SBP)가 이유자돈의 성장, 혈중유리아태 질소, 설사 발생 빈도 및 장내 미생물 균총에 미치는 영향	62
제 1 항 서 론	62
제 2 항 실험 방법 및 재료	65
제 3 항 연구 결과 및 고찰	70
제 4 절 Sugar beet pulp(SBP)가 영양소 이용유르 질소대사 및 면역 능력에 미치는 영향	93
제 1 항 서 론	93

제 2 항 실험 방법 및 재료	93
제 3 항 연구 결과 및 고찰	94
제 5 절 무기산제가 이유자돈의 성장, 혈중유리아태 질소, 설사 발생빈도 및 장내 미생물 균총에 미치는 영향	102
제 1 항 서 론	102
제 2 항 실험 방법 및 재료	104
제 3 항 연구 결과 및 고찰	110
제 6 절 무기산제가 이유자돈의 영양소 소화율 및 질소 대사에 미치는 영향 ·	
제 1 항 서 론	143
제 2 항 실험 방법 및 재료	143
제 3 항 연구 결과 및 고찰	143
제 7 절 무기산제가 이유자돈의 면역능력에 미치는 영향	144
제 1 항 서 론	149
제 2 항 실험 방법 및 재료	149
제 3 항 연구 결과 및 고찰	150
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	155
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획	167
제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학기술정보	170
제 1 절 분자생물학적 기법을 이용한 장내 미생물 균총 측정	170
제 2 절 이유자돈 사료에 Sugar beet pulp 첨가가 성장 및 영양소 소화율, 면 역 능력, 장내 미생물 균총에 미치는 영향	173
제 3 절 이유자돈 사료에 무기산제의 첨가가 성장 및 영양소 소화율, 면역 능 력, 장내 미생물 균총에 미치는 영향	175
제 7 장 참고 문헌	179

목 차 <표>

표 1 계대배양의 문제점과 분자적 분석방법의 장점	29
표 2 Common bacteria in the hindgut of pigs	43
표 3 돼지 장내 미생물 균총 확인후 특정 미생물에만 있는 특이적인 유전정보를 검출할 수 있는 specific primer	44
표 4 real time PCR용 primer	44
표 5 계대배양법을 이용한 <i>E.coli</i> 미생물 수 측정 및 real time PCR 기법을 이용 한 <i>E.coli</i> K88+ 미생물 수 측정	48
표 6 <i>Lactobacillus casei</i> CLW-011의 특이적 primer	56
표 7 각 균종에 따른 특이적 real-time PCR primer	57
표 8 <i>Lacobacillus plantarum</i> 의 첨가가 자돈의 미생물 균총에 미치는 영향	61
표 9 Sugar beet pulp의 조성	64
표 10 각 원료사료의 섬유소 함량	64
표 11 실험사료 배합 성분표(Diet 1)	67
표 12 실험사료 배합 성분표(Diet 2)	68
표 13 실험사료 배합 성분표(Diet 3)	69
표 14 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 급여가 자돈의 성장에 미치는 영향	72
표 15 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 급여가 자돈 소장의 형태학적 성장에 미치는 영향	81
표 16 Real time PCR에 맞는 각 균종 특이적 primer의 제작완료	83
표 17 공장, 멩장, 횡행 결장, 직장의 전반적 균총수 조사를 위한 real0time PCR 을 이용한 Ct value	85
표 18 Real-time PCR을 이용한 <i>Lactobacillus casei</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	87
표 19 Real-time PCR을 이용한 <i>Lactobacillus plantarum</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	88

표 20 Real-time PCR을 이용한 <i>Bacillus subtilis</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	89
표 21 Real-time PCR을 이용한 <i>Streptococcus bovis</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	90
표 22 Real-time PCR을 이용한 <i>Escherichia coli</i> K88+의 Ct value 및 PCR efficiency	91
표 23 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 첨가가 자돈의 소화율에 미치는 영향 ·	96
표 24 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 첨가가 자돈의 질소 축적에 미치는 영향	97
표 25 산제의 수준별 첨가에 따른 수용액의 pH 변화	104
표 26 실험사료(phase I)	106
표 27 실험사료(phase II)	107
표 28 실험사료(phase III)	108
표 29 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향	113
표 30 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 설사빈도에 미치는 영향	116
표 31 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈 소장의 형태학적 성장에 미치는 영향	119
표 32 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 장관 내 소화물의 VFA 농도에 미치는 영향	128
표 33 회장, 맹장, 결장, 직장의 전반적 균총수 조사를 위한 real-time PCR을 이용한 Ct value	133
표 34 Real-time PCR을 이용한 <i>Streptococcus bovis</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	136
표 35 Real-time PCR을 이용한 <i>Lactobacillus casei</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	137
표 36 Real-time PCR을 이용한 <i>Lactobacillus plantarum</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	138

표 37 Real-time PCR을 이용한 <i>Escherichia coli</i> K88+의 Ct value 및 PCR efficiency	139
표 38 Real-time PCR을 이용한 <i>Bacillus subtilis</i> 의 Ct value 및 PCR efficiency	140
표 39 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 소화율에 미치는 영향	146
표 40 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 위내 pH에 미치는 영향	146
표 41 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 질소 축적에 미치는 영향	148
표 42 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 LPS 주입시 자돈 면역에 미치는 영향	152
표 43 장관 내 미생물 균총 분석을 위한 다양한 기술의 활용 및 단점	172
표 44 Formulas, physical and chemical characteristic of organic acids used as dietary acidifiers for pigs	175
표 45 Effect of fumaric acid and citric acid addition in piglet diets	176
표 46 Effects different HCl levels on pH of experimental diet and gastro-intestinal tracts of 3-wk-old weaning pig	177

목 차 <그림>

그림 1 <i>S.bovis</i> 와 <i>E.coli</i> K88+의 RT-primer로 순수배양균 및 미지시료를 PCR 한 후 전기영동	45
그림 2 Transformation에 사용된 vector	46
그림 3 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid로 형질 전환된 <i>E.coli</i> 를 배양 후 추출한 plasmid를 전기영동	46
그림 4 Real time PCR을 이용한 장내미생물 균총 정량	47
그림 5 Real time PCR 기법을 이용한 <i>E.coli</i> K88+의 standard curve 제작 및 미생물 수 측정	48
그림 6 계대배양법에 의한 미생물 수 측정법	49
그림 7 각각 순수배양균 및 미지시료를 PCR 한 후 전기영동	58
그림 8 Transformation에 사용된 vector	59
그림 9 <i>Lacobacillus casei</i> CLW-011의 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid로 형질 전환된 <i>E.coli</i> 를 배양 후 추출한 plasmid를 전기영동	59
그림 10 Real time PCR을 이용한 장내미생물 균총 정량(<i>Lacobacillus casei</i>)	60
그림 11 설탕 가공 부산물로서 Sugar beet pulp의 생산과정	63
그림 12 사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향	73
그림 13 사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향	74
그림 14 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 급여가 자돈의 BUN 농도에 미치는 영향	76
그림 15 용모 높기와 형태학적 특징을 관찰하기 위해 공장 중앙부위를 전자현미경으로 촬영한 사진	79
그림 16 용모 높기와 용와 깊이를 측정하기 위해 공장 중앙부위의 Eosin-stained section화하여 촬영한 사진	82
그림 17 각 균주의 순수 배양균 및 미지시료를 PCR 한 후 전기영동	84

그림 18 Standard curve graph for <i>Lactobacillus casei</i>	87
그림 19 Standard curve graph for <i>Lactobacillus plantarum</i>	88
그림 20 Standard curve graph for <i>Bacillus subtilis</i>	89
그림 21 Standard curve graph for <i>Streptococcus bovis</i>	90
그림 22 Standard curve graph for <i>E.coli K88+</i>	91
그림 23 Sugar beet pulp를 수준별 급여한 자돈에게 LPS를 복강주입 하였을 때 체온의 변화	99
그림 24 Sugar beet pulp를 수준별 급여한 자돈에게 LPS를 복강주입 하였을 때 Ig A의 변화	100
그림 25 Sugar beet pulp를 수준별 급여한 자돈에게 LPS를 복강주입 하였을 때 Ig A의 변화	101
그림 26 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 혈중 BUN 농도에 미치는 영 향	114
그림 27 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 시기별 자돈의 설사빈도	117
그림 28 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈의 십이지장 형태	120
그림 29 자돈의 십이지장 중앙부위를 Eosin-stained section화하여 촬영한 사진	121
그림 30 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈의 공장 형태	122
그림 31 자돈의 공장 중앙부위를 Eosin-stained section화하여 촬영한 사진	123
그림 32 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈의 회장 형태	124
그림 33 자돈의 회장 중앙부위를 Eosin-stained section화하여 촬영한 사진	125
그림 34 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 회장 내 소화물의 VFA 발생량	129
그림 35 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 맹장 내 소화물의 VFA 발생량	130
그림 36 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 결장 내 소화물의 VFA 발생량	131
그림 37 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 직장 내 소화물의 VFA 발생량	

.....	132
그림 38 Standard curve graph for <i>Streptococcus bovis</i>	136
그림 39 Standard curve graph for <i>Lactobacillus casei</i>	137
그림 40 Standard curve graph for <i>Lactobacillus plantarum</i>	138
그림 41 Standard curve graph for <i>E.coli</i> K88+	139
그림 42 Standard curve graph for <i>Bacillus subtilis</i>	140
그림 43 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 LPS 주입시 자돈의 Ig G 농도 변화 에 미치는 영향	153
그림 44 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 LPS 주입시 자돈의 Ig A 농도 변화 에 미치는 영향	154

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

제 1 항 연구개발의 목적

현재 국내 양돈 산업은 한미 FTA 협상 타결로 인한 수입육의 개방과 매년 치솟는 돼지의 폐사율로 상당히 어려움을 겪고 있다. 돼지의 사육두수는 2004년 890만두, 2005년 896만두 그리고 2006년 9월까지 930만두로 증가하고 있다. 이에 반해 돼지의 도축 두수(출하 두수)는 2004년 1,461만두, 2005년 1,346만두, 2006년은 6월까지 월 100만두가 채 되지 않아 연간 1,300만두 출하도 어려운 실정에 놓여있다. 사육두수는 증가하지만, 도축(출하)두수는 감소하는 이상 현상으로 현재 국내 돼지값은 출하돈 1두당 24 ~ 25만원선으로 매우 높은 실정이다. 이와 같은 현상이 발생하는 이유는 자돈기의 20%가 넘는 폐사율에 있다. 돼지에 있어서 이유와 더불어 자돈기의 관리는 폐사율과 직결되며, 이는 이후 복당 출하두수(MSY)에 지대한 영향을 미친다. 특히 현재 양돈 농가에서는 체감 폐사율이 30%가 넘는다고 보고되고 있으며, 이는 이유자돈에서 돼지의 소모성 질병, 즉 4P(PED, PRRS, PRDC, PMWS)가 빈번히 발생하기 때문으로 추정된다. 돼지의 소모성 질병의 주된 병변으로 설사를 들 수 있다. 설사는 이유자돈에 있어서 액상 사료(모유)의 섭취가 고형 사료(사료)로 바뀌면서 발생하는 경우가 많으며, 이에 관해 병원성 미생물과 관련이 높다는 다양한 연구결과가 보고되고 있다. 따라서 정부와 학계, 산업계 및 양축 농가에서는 미생물에 의한 질병발생을 감소시키기 위해 다양한 연구와 노력이 이루어지고 있다. 특히 이유자돈에서 설사가 발생하게 되면 TGE, PED 등의 바이러스성 질병은 원인 규명이 가능하지만 세균성, 즉 병원성 미생물에 의한 설사는 구체적인 원인을 밝히지 못하고 있는 실정이다. 현재까지는 이유자돈의 소화관 내 미생물 및 병원성 미생물 균총을 규명하기 위해 계대배양의 방법을 이용하고 있는 실정이지만, 분석방법이 정확하지 않고, 재연성이 부족하여 많은 문제점이 노출되고 있다. 또한 반추동물이나 유제품에서는 유해미생물의 정확한 분석을 위해 분자생물학적 기법인 PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법을 이용하는 것이 보편화 되어 있지만, 아직까지 단위동물의 장내 미생물 균총을 측정하기 위해 분자 생물학적인 측정방법이 도입된 적이 없었다.

돼지는 소화기관에 출생할 당시 미생물이 존재하지 않지만, 분만 후 3시간 이내부터 모돈의 분변이나 주위 환경에 의해 미생물을 섭취하게 되어, 이 후 자돈의 소화관 내에 미생물 균총이 형성된다(Ducluzeau, 1983). 모유를 섭취하는 포

유기에는 모든에 의한 수동 면역과 소화기관에 부담을 주지 않는 액상의 모유 섭취로 설사 발생 빈도가 낮다. 시간이 경과하고 이유를 하면서 소화기관에 우점하는 미생물 군종이 변하게 되고, 이러한 미생물들은 숙주동물인 자돈과 많은 상호작용을 한다. 장내 미생물의 가장 큰 역할은 경쟁적 배제 (competitive exclusion) 를 통한 외부 병원균의 침입을 억제한다는 것이다. 또한 미생물의 장관 내 정착은 영양소의 흡수 및 소화기관의 건강에 매우 중요하고, 독성 물질의 생성을 억제하며, 소화효소 및 비타민 B 군을 생성하여 가축의 영양, 면역기능 및 생리기능에 많은 영향을 미친다. 또한 많은 소화 장애 및 결핍이 장내 미생물 군종의 불균형에 기인한다고 보고되고 있다. 특히 돼지의 건강 상태에 따라서 소화기관 내 우점하는 미생물 군종도 변화하는데, 건강한 돼지일수록 직장 내 *Bacteriodes*, *Streptococci* 및 *Lactobacilli* 종의 비율이 높고, 병에 걸린 돼지일수록 *Anaerovibrio*, *Selenomonas* 및 *E. coli*의 비율이 높다 (Robinson, 1984). 이유 후에는 고형 사료의 섭취와 수동 면역의 제거, 환경(돈사 이동, 온도 등) 변화 및 사회적 행동 등에 따라 설사 발생 빈도가 높아지게 된다. 특히 자돈에게 현재 가장 문제가 되고 있는 설사의 경우, 병원성 미생물, 즉 *E. coli*가 주원인이다. 따라서 자돈의 장내에 유익한 미생물 군종이 형성되는 것은 이유 후 자돈사양에 있어서 생산성을 향상시키는데 중요한 요인 중 하나가 될 수 있다. 이 시점에 이유자돈의 장내에 유익한 미생물이 정착될 수 있다면 설사를 유발하는 해로운 미생물들의 성장을 억제할 수 있을 것이다. 또한 이를 통하여 자돈의 설사 방지를 위해 첨가되는 항생제(antibiotics), ZnO 및 CuSO₄ 등의 첨가량을 낮출 수 있을 것으로 사료된다. 현재 양돈장에서는 장내 유익한 미생물의 증식을 돕기 위한 사료용 생균제(probiotics)의 첨가가 보편화되고 있지만, 생균제 내의 정확한 미생물 군종의 측정이 어려운 관계로 사료용 생균제의 종류가 300가지가 넘을 정도로 시장이 극도로 혼란스러운 상태이다. 이 문제 또한 분자 생물학적 기법을 이용한 정확한 미생물 군종 측정법의 확립을 통해 해결이 가능하며, 검증된 생균제의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

자돈 장내 유익균 정착에 관한 연구에 있어서 현재까지 가장 문제가 되고 있는 것은 미생물수가 정확히 측정이 되지 않으며, 각 반복간의 변이가 심하고 또한 죽은 미생물에 관한 측정은 불가능하다는 것이다. 최근 16S rDNA 부분을 이용하여 미생물을 분류하고 다양한 PCR 방법으로 미생물의 DNA를 정량하여 미생물 수를 계산하는 실험들이 발달하였다. 그러나 돼지 장내 미생물을 PCR 방법으로 분석하는 접근은 아직 연구되지 않았다. 이러한 분자생물학적 방법을 이용하면 돼지 장내 미생물 군종에 대한 정확한 측정이 가능하고 더 나아가 장내 유익균 정착에 관한 연구에 있어서 많은 발전이 있을 것으로 사료된다.

자돈의 장내에 유익한 미생물 균총이 형성되는 것은 이유 후 자돈사양에 있어서 생산성을 향상시키는데 중요한 요인 중 하나가 될 수 있다. 이유자돈의 장내 유익균 우점을 위하여 미생물 균총을 조절하는 영양학적 방법 중 가장 널리 알려진 방법이 사료에 생균제를 첨가하는 것이다. 자돈에게 유익한 균을 주종으로 한 생균제를 사료에 첨가하여 꾸준히 급여하면 유익균이 장내에 지속적으로 유입되면서 우점하게 되어 미생물 균총이 변하게 된다. 이에 따라 숙주 동물인 자돈에게 유익한 영향을 미칠 수 있다. 최근 유산균을 주성분으로 하는 생균제가 개발되어 양돈 농가에서 다양하게 이용되고 있다. 그러나 생균제의 효과를 명확하게 구명하기 위해서는 자돈의 장관 내에 target 미생물이 얼마나 우점하고 있는지를 정확히 측정하여야 한다. 그러나 유산균을 자돈에게 급여 시 장관 내에서 생존성을 판별하기 위해 가축의 배설물에 포함된 유산균을 선택배지에 도말하여 얻은 콜로니 중 유산균의 수를 측정하는 계대배양법을 이용해야 하는데, 돼지의 배설물에는 유산균 외에 다양한 균종이 있을 뿐만 아니라 선택배지에서 형성된 콜로니의 모양만을 관찰하여 생균제에서 사용된 유산균의 종류를 판별하는 것은 어려움이 많다. 또한 가축사료 첨가용 미생물에는 여러 종의 유산균이 이용되고 있으며, 현재까지의 기술로는 선별한 primer을 이용한 내재형 플라스미드의 정성적인 분석은 가능하나 정량적인 분석은 불가능한 상태이다. 따라서 효과적으로 유익균의 존재여부를 밝히기 위해서, 즉 첨가한 생균제의 정확한 효능을 검증하기 위해서 다양한 PCR 방법을 이용하여 추가적인 정량방법이 필수적이다.

이유 후 자돈의 장내에 유익한 미생물을 정착시키기 위한 방법 중 하나로 사료 내 섬유소를 소량 첨가하는 것이 있다. 과거 연구 결과에 의하면 섬유소가 많은 사료를 급여한 돼지에게서 대장균성 부종이 발생하지 않았고 (Smith와 Halls, 1968), 조섬유 함량이 높은 사료를 섭취한 3주령 이유자돈에게서 심한 설사가 감소하였고, 설사 발생 기간 또한 감소하였다 (Ball과 Aherne, 1982). Drochner 등 (1978)은 사료 내 조섬유가 돼지의 소화기관 내 박테리아의 활성을 감소시킨다고 보고하였다. 이러한 섬유소의 효과에 대한 작용 기작은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 섬유소 분해 미생물의 활성이 증가하여 장내 pH가 감소하고 이에 따라 유해한 미생물의 활성이 감소한다는 이론과, 섬유소의 물리적 특징으로 인하여 미생물의 장내 상피세포에 부착이 방해되어 장내에 서식하지 못한다는 이론 등이 있다.

이유 후 자돈의 장내에 유익한 미생물을 정착시키기 위한 방법 중 또 하나의 방법은 사료 내 산제를 첨가하는 것이다. 자돈사료 내 산제의 첨가는 일반적으로 사료 내 pH를 낮춤으로써 위내 산도를 증가시켜서, 단백질 소화율을 증가시키고,

유해한 미생물의 증식을 억제하므로 궁극적으로 설사를 방지하는 효과가 있다고 알려져 있다 (Ravindran과 Kornegay, 1993). 이러한 산제의 종류에는 유기산제와 무기산제가 있는데 현재까지 학계에서는 유기산제에 대한 연구가 많이 이루어져왔고, 산업계에서도 유기산제가 많이 사용되어왔다. 그러나 무기산제는 산의 강도와 가격 면에서 유기산제보다 더욱 우수하고, 최근 본 연구실에서는 무기산을 국산 부형제를 이용한 새로운 무기산제를 개발하였다. 새로이 개발된 무기산제의 첨가를 통하여 자돈의 위내 pH 및 이에 따른 장내 유익한 미생물 균총의 조절로 기존의 유기산제의 효과보다 더욱 개선된 효과를 나타낼 수 있을 것이라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 이유자돈의 소화관 내에 존재하는 미생물 균총을 정확히 측정할 수 있는 방법을 분자생물학적 기법을 통해 개발하고, 이를 통해 자돈의 미생물 균총의 측정하며, 이유 자돈의 설사방지를 위해 유익한 미생물의 증식을 촉진할 수 있는 영양, 사료적인 방법의 개발하는 데에 그 목적이 있다. 이를 통해 국내 양돈 산업의 발전을 위해 해결해야할 문제에 대한 다방면의 접근과 우리나라 양돈 산업 경쟁력 제고에 필수적인 자돈 폐사율 감소, 이를 통한 생산성 향상의 결과를 창출해 낼 것이다.

제 2 항 연구개발의 필요성

돼지의 장내 미생물 균총을 측정하는 방법으로 현재 일반적으로 사용하는 방법은 계대 배양(Cultured-based method)이다. 하지만 이 방법은 분석 시간이 오래 걸리고 실험실의 환경에 영향을 많이 받으며, 미생물 군락(colony)의 수를 측정하는데 있어서 상당히 주관적이므로 분석에 대한 정확성이 떨어진다는 보고가 있으며(L.marco 등, 2007), 특히 우리나라에서 정확하게 분석할 수 있는 기관이 미비한 상태이다. 또한 계대 배양법에 의한 분석은 살아있는 미생물에 대한 측정만 가능하며, sample의 채취 및 보관 중에 발생하는 사균에 대한 분석을 할 수 없다는 문제점이 있다. 계대배양법 이외에도 미생물 수를 측정하는 데에 있어서 효소 발색 반응을 이용한 방법(Bibiloni 등, 2000)이나 Hemagglutination 방법, real time PCR 방법(Vitali 등, 2003) 등이 이용 가능한 방법으로 제시되고 있으며, 많은 연구가 진행되고 있다. 이중 분자생물학적인 기법, 즉 PCR 방법을 이용한 미생물 측정은 미생물의 종 특이적인(specific) DNA sequence를 이용함으로써 사균까지도 분석이 가능하며, 계대 배양법과 비교한 결과 분자 생물학적 분석법(Molecular-based analysis)이 재현성이 보다 높은 것으로 나타났다(표

1. Pryde 등, 1999). 특히 real time PCR은 음식에 있어서 다양한 미생물의 정량 및 검출에 이용되고 있는데, lactic acid bacteria(Pinzani 등 2004; Furet 등 2004)이나 병원성 미생물 등의 정량 및 검출에 대한 연구가 이루어지고 있다.

따라서 기존의 계대배양법이 아닌 분자 생물학적 기법을 이용한 기술을 단위 동물의 소화관내 미생물 균총 측정에 도입함으로써 기존 방식에 대한 문제점을 해결하고, 특히 돼지 장내 미생물 균총에 영향을 주는 여러 가지 영양, 사료학적 방법 및 항생제 대체제 개발 등에 이 기술을 통하여 그 효과를 명확하게 검증할 수 있으며, 새로운 영양, 사료학적 방법을 통하여 자돈의 장내 유익한 미생물 균총이 우점할 수 있는 기술 개발이 가능하다.

일반적으로 자돈의 장관 내 미생물 균총은 안정적으로 유지되고 있지만 이유 (weaning), 사료의 교체 등 환경 및 사료적 변화에 민감하게 변화한다고 알려져 있다. 또한 자돈의 장내 미생물 균총 변화에 영향을 주는 인자로 항생제의 사용 여부, 수송 및 돈사 환경 변화에 의한 스트레스, 유해 미생물의 침입 등을 들 수 있다. 어릴수록 장내 미생물 균총은 불안정한 상태이며, 야생동물보다 가축이 환경 변화에 신속히 적응하지 못하여 장내 세균총의 안정성이 떨어지는 것으로 보고되고 있다. 또한 Konstantinov 등(2006)은 일반 자돈의 출생 이 후 미생물 균총의 변화를 측정하기 위해 출생 후 2, 5, 12, 19(이유)일령의 자돈의 회장에서 미생물 균총을 real-time PCR 방법으로 분석하였다. *Lactobacillus sobrius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *E.coli* 에 대해 정량 분석을 하였으며, 이유 전에는 *L.sobrius*와 *L.reuteri* 가 회장에서 우점하고 있으며, $7.0 \times 10^8/g$ 정도의 미생물 균총을 갖는다. 그러나 *E.coli* 같은 경우에는 12일령 자돈에서 1개, 23일령 이유 자돈에서 2개의 sample에서만 검출되었다고 밝혔다. 또한 Marisol 등 (2006)에 의하면 이유자돈 장내 소화물에 서식하고 있는 총 박테리아, *enterobacteria*, *lactobacilli* 수를 real time PCR과 계대배양을 실시하여 정량적으로 비교분석 한 결과, real time PCR을 이용한 나온 총 bacteria의 수는 계대배양에 의해 얻은 수치보다 더 높게 나왔으며, 이는 사균까지 분석되었기 때문으로 기인한다고 보고하였다.

표 1. 계대배양의 문제점과 분자적 분석방법의 장점

Culture-based	Molecular-based
<ul style="list-style-type: none"> - 살아있는 미생물만 측정 가능 - Sample을 채취한 후 즉시 분석해야 함. 	<ul style="list-style-type: none"> - DNA 양으로 죽어있는 미생물까지 측정할 수 있음 - 시료를 냉동고에 보관하였다가 분석할 수 있음.
<ul style="list-style-type: none"> - 혐기상태에서만 측정 가능 	<ul style="list-style-type: none"> - DNA만 추출하면 호기성 상태에서도 측정 가능
<ul style="list-style-type: none"> - 일정농도 이하의 미생물은 측정 시 변이가 높아짐 	<ul style="list-style-type: none"> - 적은 수의 미생물 측정에도 사용가능
<ul style="list-style-type: none"> - 여러 미생물이 섞여 있기 때문에 분리가 어렵고 정확성이 떨어짐 	<ul style="list-style-type: none"> - 여러 미생물 중 중 특이적인 primer를 사용하여 특정미생물만 특이적으로 분석할 수 있음
<ul style="list-style-type: none"> - 액체상태의 물질만 plate에서 측정 - 소장 내용물 같은 고형물질은 plate에 분주하여 키우기 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> - 고형물질에서도 DNA만 추출한다면 특정 미생물의 측정도 가능

따라서 자돈의 장내 미생물 균총의 안정적 유지 및 영양적 설사를 예방하기 위한 영양, 사료학적 기법의 개발과 이에 대한 분자생물학적 기법(real-time PCR)을 이용한 장내 미생물 균총의 명확한 규명을 통해 최근 몇 년 사이 급증한 질병 발생 빈도와 자돈의 폐사율을 낮출 수 있는 근본적인 대책을 제시하며, 나아가 우리나라 양돈 산업의 생산성 향상에 기여할 수 있겠다.

또한 기존의 미생물 수 측정방법의 부정확성으로부터 기인되는 반복 측정 및 결과치의 신뢰성 문제를 해결할 수 있으며, 이를 통해 미생물 수 측정에 소요되는 비용 및 시간을 절약할 수 있으며, 자돈의 소화관 내 유익한 미생물의 우점을 통해 기준에 첨가되는 항생제, 광물질(Zn, Cu)의 양을 현저하게 줄일 수 있으며, 특히 자돈 설사를 억제하기 위해 사용되는 합성물질이나 중독광물질의 사용을 억제하고 섬유소나 산제 등의 천연물질의 이용을 높일 수 있다. 또한 이를 통해 소비자들이 항생제 잔류나 이상 돈육에 대한 걱정 없이 안심하고 섭취할 수 있는 친환경적이며, 안전한 자돈의 생산이 가능하다. 그리고 현재 정확한 검증 없이 외국에서 수입되거나 국내에서 생산, 유통되고 있는 300가지가 넘는 사료용 생균제(probiotics) 내의 미생물 균총을 측정함으로써 이를 사용하는 양축 농가가 검증된 첨가 물질을 사용할 수 있도록 유도하며, 또한 생균제 자체의 품질(quality)을 높일 수 있다는 장점이 있다. 특히 돼지 장내에 유익한 미생물을 우점시킬 수 있는 영양, 사료적인 방법을 본 연구를 통해 자체 개발함으로써 자돈

의 이유(weaning) 후에 발생하는 성장 지체현상(postweaning lag)을 방지할 수 있게 되며, 성장촉진효과도 기대할 수 있다. 또한 기존의 산제보다 경제성에서 우수한 새로운 무기산제를 첨가하여 생산비를 절감할 수 있으므로 전체적인 양돈 생산성 증가효과도 기대된다.

유럽에서는 자돈의 설사를 방지하기 위하여 항생제를 첨가하는 대신 이유일령의 연장, 유기축산, 천연물질을 첨가하는 등의 대체 방법을 사용하고 있으며, 특히 2006년 1월 1일부로 항생제 사용 금지에 따라 자돈의 병원성 미생물에 의한 설사를 예방하고, 성장 촉진 효과를 가지는 항생제 대체제를 탐색하고 있다. 또한 국내에서는 2005년 5월, 사용 가능 항생제 종류를 53종에서 25종으로 줄이고, 앞으로 항생제 사용을 점차 규제하고 있는 상황이다. 또한 소비자의 웰빙(well-being)을 추구하는 방향으로의 식습관의 전환과 친환경 축산물에 대한 관심이 증가하는 계속적으로 이루어지고 있으나, 아직도 양돈장에서는 이유자돈에 있어서 빈번한 설사를 억제하기 위해 항생제나 ZnO, CuSO₄와 같은 광물질을 사용하고 있다. 이러한 문제의 개선과 더불어 정부와 학계 그리고 업계에서는 질병 발생의 감소와 설사 예방 등을 위한 항생제 대체제의 개발 및 이유자돈의 건강상태와 면역상태 등을 가늠할 수 있는 다양한 기법의 개발에 힘을 기울이고 있으며, 많은 연구 성과들이 나타나고 있다.

따라서 본 연구 또한 분자생물학적 기법(real time PCR)을 이용하여 자돈 장내의 유익한 미생물 균총의 특징을 규명하고 기존 계대배양법의 문제점을 개선한 정확한 미생물 수 측정 기술을 확립하며, 생균제용 미생물 제제의 장내 분포 추적 방법을 확립함으로써 자돈의 영양적 설사를 예방할 수 있는 대안을 제시하며, 또한 자돈 장내 미생물 균총을 개선할 수 있는 설탕비료 제제(sugar beet pulp) 및 경제성이 우수한 무기산제(inorganic acidifier)의 이유 자돈 사료 내 첨가를 통하여 그 첨가수준을 설정하고 장내 미생물 균총에 대한 개발된 분자생물학적 기법(real time PCR)을 통한 검증으로 항생제나 광물질을 첨가하지 않는 자돈사료 개발의 가능성을 제시하는데 그 목적이 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 축산 식품 내의 병원성 세균, 즉 *Listeria*, *E.coli O157:H7*, *Salmonella*, *Campylobacter* 등에 대한 신속한 검출을 위한 연구가 다양하게 진행되고 있었지만, 미생물을 정량적으로 측정하는 연구는 아직까지 미비한 상태이다. 또한 반추동물에 있어서 반추위내의 미생물을 측정하기 위한 PCR 방법은 광범위하게 연구되어 있으며, 미생물 측정에 있어서 일반적으로 사용하는 기법으로 널리 이용되고 있으나, 단위동물의 장내 미생물 측정을 위한 PCR 방법의 이용은 아직까지 시도된바가 없는 실정이다. 국내에서는 단위동물의 장내 미생물 측정을 위해서 계대 배양 방법(cultured-based method)이 이용되고 있지만 정확도가 떨어지고 주관적인 분석결과로 인해 정확하고 객관적인 결과를 도출해내기가 매우 어려운 상태이다. 특히 국내에서 검증되지 않은 상태로 유통되는 자돈 사료용 생균제(probiotics)가 약 300여종에 이르는 것으로 조사되었으며, 이는 항생제 오남용 문제와 더불어 효과의 검증 없는 항생제 대체제의 이용으로 오히려 생산비만 증가시키는 결과를 가져오고 있다. 외국에서도 식육 내의 병원성 미생물에 대한 real time PCR 방법을 이용한 정량 분석이 다양하게 이루어지고 있으며, 질병을 일으키는 Virus 검출을 위해 PCR 기법을 이용한 연구 결과가 지속적으로 발표되고 있다. 그러나 돼지의 건강상태를 직간접적으로 측정할 수 있는 돼지 소화관내의 미생물 균총을 측정하는 데에 있어서는 아직 계대배양법의 수준을 벗어나지 못하고 있다. 특히 자돈의 장내 미생물 분석은 아직까지 우리나라에서 시행한 적이 없다는 것이 문제이지만 현재 국내 기술로도 충분히 분석 가능하므로 외국에 royalty를 주고 기술 도입을 해야 할 대상이 아니라고 사료된다. 따라서 분자 생물학적 기법(real time PCR)을 이용한 돼지 소화관내 미생물 균총의 측정은 전 세계적으로도 처음 시도되는 기술이라고 할 수 있으며, 앞으로 돼지의 영양 및 사양에 관한 연구와 질병 연구에 다방면으로 적용할 수 있는 연구 성과라고 할 수 있겠다. 또한 자돈의 장내에 이로운 균들이 우점 할 수 있도록 다양한 연구가 국내에서도 진행되고 있는데, 특히 생균제는 어떠한 유익균이, 얼마의 양이 첨가되어 있는지가 그 효과에 주요 요소(key factor)라고 할 수 있다. 본 연구를 통해 개발된 생균제에 함유된 미생물의 양을 정확히 측정하며, 이를 섭취한 자돈의 장내 미생물 균총을 측정하여, 생균제의 자돈에서의 효능 및 장관내의 이송, 장관 내에서의 우점 여부 등에 대해 정확한 검증을 할 수 있으며, 이를 통해 소비자들이 항생제 내성이나 잔류 문제에 대해서 안심하고 소비할 수 있는 돈육생산의 기반을 마련할 것으로 사료된다.

제 1 절 국내연구 현황

축산물 내 식중독균과 미생물 균총을 검출하기 위한 전통적인 방법은 계대 배양(cultured-based method)을 이용하여 분리하고 동정되므로 최소한 3-5일이 소요되어 조기에 검출하여 식중독이나 질병을 차단하는 것이 불가능하다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 신속하고 특이적인 대체방법으로 개발된 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction :PCR) 기법은 열에 안정한 DNA polymerase를 이용하면서 부터 본격적으로 발전되어 여러 병원성 미생물을 검출하는 데 이용되고 있으며, 이 PCR법은 분석의 특이성과 민감성이 높고 표적 유전자를 매우 빠른 속도로 증폭시킴으로써 아주 적은 수의 균도 짧은 시간 내에 검출이 가능하다. 최 등(2004)은 시유 또는 기타 관련 유제품이 제조되는 공정 중에 부적절한 살균온도와 시간에 의해 생존할 수 있는 살모넬라균을 역전사중합효소연쇄반응에서 검출하였다. 이 연구에서 의하면 역전사중합효소연쇄반응에서 검출할 수 있는 활력이 있는 살모넬라의 최소 세균 수는 100개/ml이었다고 보고하면서 10,000 배의 민감도의 차이를 규명하였다. 석 등(1998)은 닭고기로부터 *L. monocytogenes* 신속검출을 위하여 식품 중에 존재하는 여러 가지의 증폭 억제물질들을 최소화하고 PCR 분석효율을 높이고자 PCR 기법을 개선하여 실험을 수행한 결과, swabbing 법에 의해서 채취한 시료를 직접 PCR 하는 기법은 검출효율이 매우 높고 검출시간도 6시간에 불과하여 닭고기에서 *L. monocytogenes*를 스크리닝 하는 효율적인 방법이 되었다고 보고하였다. 위의 연구들에서 사용한 중합효소연쇄반응 (PCR) 기법은 표적유전자를 매우 빠른 속도로 증폭시킴으로써 아주 작은 수의 균도 짧은 시간 내에 검출이 가능하여 분석의 특이성과 민감성이 우수하다는 장점이 있다. 그러나 이러한 PCR 기법도 식품 중에서 직접 병원체를 검출하기 위해서는 식품 중에 존재하는 여러 가지의 증폭억제물질을 제거해야 하는 문제가 남아 있고, 실험상의 또 다른 문제점은 가검물간의 오염 또는 PCR 자체적 반응산물의 축적 등에 의해서 일어날 수 있는 반응들이 문제점이 있다.

기존의 중합효소연쇄반응에 의한 검체 내 세균과 바이러스 분석의 한계를 극복하기 위한 대안으로 실시간 중합효소반응법 (real time PCR)법이 개발되어 세균과 바이러스를 진단하고 검출하는 데 있어서 더욱 정확하고 신속하게 검사하게 할 수 있으며, 여기에 세균과 바이러스 양을 정량까지 가능하다. 실시간 중합효소연쇄반응법은 PCR 증폭량을 실시간으로 확인하면서 해석하는 방법으로 전기영동이 필요 없이 신속하게 정량할 수 있는 장점을 가지고 있다. 고 등(2005)은 real time PCR법을 이용하여 개 파보바이러스 감염 시 분변 내로 분비되는 바이

러스의 정량을 분석한 연구를 수행하였다. 그 연구결과에 의하면, 고전적인 방법인 형광 항체를 이용하여 파보바이러스를 검출할 경우 많은 시간이 소요되며, 준임상형인 상태에서 회복기에 있는 개의 경우에는 오진을 할 수 있으며 이로 인해서 감염된 분변으로 환경을 오염시킬 뿐 만 아니라 다른 동물을 감염시킬 수 있다고 보고하고 있다. 더욱이 대단위 사육장이나 동물보호시설에서 다수의 개가 사육되는 경우에는 분변으로 분비되는 작은 수의 바이러스에 의해 전체 개가 감염을 일으킬 수 있는데 이러한 경우에 real time PCR을 이용하면 적은 수의 바이러스도 감지할 수 있기 때문에 예방을 위한 프로그램에도 사용할 수 있다고 보고하였다. 이 연구에서 사용한 real time PCR은 일반 PCR에서 증폭하여 agarose gel에서 전기영동을 실시한 것보다 log2개의 파보바이러스의 DNA copy를 검출할 수 있을 정도로 더 민감하다는 것을 보여주었다.

이유자돈은 소화기 장애를 유발하여 설사를 일으키는 경우가 발생되기 쉬우며, 그 발병양상은 이들이 생성하는 병원성 인자에 따라서 다양하다. 최근 많은 연구들은 이유자돈에게 설사를 예방하기 위한 항생제 대체물질을 급여하였을 때 분내 대장균과 유산균에 미치는 효과에 대해 활발히 진행되고 있다. 국내에서는 계대배양을 통하여 장내 미생물의 측정이 이루어지고 있지만 현재까지 자돈 장내 유익 미생물 균총 정착에 관한 연구에 있어서 가장 문제가 되고 있는 것은 미생물수를 정확히 측정하는데 어려움이 있는 것이다. 홍 등(2001)은 설사병을 나타내는 이유자돈에게 난황황체를 투여하였을 때 계대배양을 이용하여 분내 대장균 수가 감소하였고 유산균이 증가하였다는 결과를 얻었고, 이는 난황황체의 첨가가 돼지 소장 내 장벽 부착을 저해함과 동시에 장독소의 분비를 억제함으로써 설사증이 치료되었다고 보고하였다. 이 연구에서 같이 분변 내 미생물 균총을 계대배양을 이용하여 측정할 경우 결과에 대한 정확도가 떨어지고 주관적인 분석결과로 인해 객관적인 자료를 얻기가 어려운 상태이므로 한계가 있다.

이러한 문제점을 보완하기 위해 16S rDNA 부분을 이용하여 일반 PCR 방법으로 미생물과 바이러스의 DNA를 정량하여 미생물과 바이러스를 검출하고 진단하는 연구들이 발달되고 있다. 임숙경 등 (1999)은 돼지 증식성 장염 원인체인 *Lawsonia intracellularis*가 일반 인공배지에서 자라지 않고 쥐의 장세포에서만 자라기 때문에 분리동정이 어려운 점을 감안하여 multiplex PCR 기법을 적용함으로써 보다 신속하고 정확한 진단이 가능하다고 보고하였다.

그러나 돼지 장내 미생물을 real time PCR 방법으로 분석하는 접근은 아직 연구되지 않고 있다. 이러한 분자생물학적 방법을 이용하면 돼지 장내 미생물 균총에 대한 정확한 측정이 가능하고 더 나아가 장내 유익균 정착에 관한 연구가 더 많이 필요하리라 사료된다. 더욱이, 축산식품내의 병원성 세균 (리스테리아, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 여시나아, 캄피로박터) 등의 신속한 검출을 위한 연구 사업은

이전에 있었지만, 미생물을 정량적으로 측정하는 연구는 아직까지 시행되지 않은 설정이므로 이에 대한 연구는 시급히 이루어져야 한다고 사료된다.

제 2 절 국외연구 현황

최근 많은 연구결과들에 의하면, 병원균과 부패균 분석을 위한 전통적인 방법으로 사용되는 계대배양법은 고유한 한계성 때문에 결과의 정확성을 충족시킬 수 없다고 보고되어지고 있다. 다시 말해 정상적인 박테리아의 한 세대가 20-40분이기 때문에 박테리아 배양이나 대사에 기초한 검출법을 사용하려면 미생물의 증식이 충분히 일어나야 하며 여기에는 18시간 내지 수일이 소요되어 계대배양의 한계가 나타나고 있다는 것이다. 따라서 더 민감하고 빠른 미생물 검출법이 필요한 데 이런 요구를 만족시키는 최근의 방법 중의 하나가 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 방법이다.

PCR 기법은 여러 가지 미생물을 신속히 검출하고, 특성을 규명하고 확인하는데 사용되어 왔다. 이 방법에서는 DNA 조각의 증식은 1-2 분 내에 완성되며 이 증식은 대수적으로 증가하기 때문에 몇 번 반복하면 검출하기에 충분한 양을 얻을 수 있다. 따라서 한 개의 주형도 수 시간 정도면 검출 할 수 있다고 많은 연구들에 의해 보고되어지고 있다 (Hirasawa 등, 1994; Olsen 등, 1995; Hirayama 등, 2005). Olsen 등 (1995)은 식품에 오염된 미생물인 *Salmonella*, *E.coli*, *Vibrio spp*, *Yersinia enterocolitica*, 포자 형성 박테리아인 *Bacillus*, *Clostridium* 을 DNA-probe, RNA probe를 이용하여 PCR 기법으로 검출하여 조기에 식중독을 차단할 수 있었다고 보고하였다. *Salmonella* 및 병원균을 검출하기 위해 전통적인 방법인 미생물배양법은 최소한 3-5일이 소요되나 분자유전학적 기술을 이용한 PCR 방법에 의해 특이성과 민감성이 높고 검출시간도 6시간 대로 단축이 가능하게 되었다. 또한, Matsuba 등(1992)은 DNA probe를 이용하여 일본의 *T. serenti*의 genome를 분석하였으며, Hirano와 Kirisawa(1991)는 DNA probe를 이용하여 *T. serenti* 감염된 소를 검출하는 방법에 관하여 보고하였다. Cohen 등 (1996)은 *Salmonella* 에 특이적인 염기서열을 primer로 사용하여 PCR을 한 결과 379계통의 *Salmonella* 는 양성을 나타냈으며, 40종류의 비 *Salmonella*는 음성이었다고 보고하여 식품에 오염된 극미량의 *Salmonella* DNA를 증폭시켜 단시간 내에 검출할 수 있다고 보고하였다.

그러나 이러한 PCR 방법도 몇 가지 문제점을 갖고 있다. 비특이적 증식이 주요한 문제이다. 특히 저온과 같은 덜 엄격한 조건에서 시발물질은 잘못된 영역에

결합할 수 있고 상관없는 PCR 생성물이 증폭하게 된다. 상보적 염기순서를 갖는 두 시발물질이 결합하여 시발물질 이합체를 형성하게 된다. 또한, 젤 전기영동법에 의한 표적 DNA 조각의 검출은 PCR 증폭을 실행한 후에 수행하여야 한다. 이것은 추가적인 노력이 필요하고 또한 PCR 생성물에 오염물이 들어 갈 수도 있는 문제점도 보고되었다.

이러한 PCR 방법의 문제점을 개선하기 위해 최근 발전은 Real time PCR 기기의 개발과 새로운 증폭 생성물-검출 화학의 응용이다. 이 방법은 전체 복제과정을 통해서 DNA를 검출할 수 있는 능력이 기존 PCR에 비해 우수하며 미생물과 바이러스의 양을 정량까지 할 수 있어 사용되어지고 있다 (Aberham 등, 2001; Decaro 등, 2005). 이 기기의 장점은 증폭 효율의 편차를 쉽게 알 수 있고 더 정밀하게 정량할 수 있으며 하나의 반응에서 하나 이상의 표적 DNA 조각을 검출할 수 있다는 것이다. 더욱이 실시간 PCR은 한 반응용액에서 여러 개의 표적들을 검출할 수 있고 1 CFU/g의 낮은 양의 박테리아도 검출할 수 있다고 보고되어지고 있다.

한편, 분자생물학적 기법에 의해 동물의 장내 미생물 종류는 다양하며 아직까지 알려지지 않은 미생물 종류가 대부분이라고 밝혀졌다 (Pryde 등, 1999; Leser 등, 2002). 전통적인 방법인 계대배양으로 미생물을 검출할 경우 대부분의 미생물들이 일반 배지에서 성장하지 않으므로 정확한 결과를 얻기에는 한계가 있다고 보고되고 있다 (Langendijk 등, 1995; Huiltdens 등, 2003). 따라서 정량적인 분자생물학적 기법을 이용한 미생물의 정량적 측정은 정확하고 신속한 결과를 얻을 수 있다고 한다. Marisol 등 (2006)은 이유자돈 장내 소화물에 서식하고 있는 총 박테리아, *enterobacteria*, *lactobacilli* 수를 real time PCR과 계대배양을 실시하여 정량적으로 미생물 균총수를 비교분석 한 결과, real time PCR을 이용한 총 bacteria와 *Lactobacillus* 균수는 계대배양을 이용한 미생물 균총 수보다 더 높은 것으로 나왔으며, 이는 사균까지도 분석이 가능하기 때문으로 보고하였다. 이 연구결과에서 real time PCR을 이용한 장내 미생물 균총 수 측정은 신속하고 민감한 분석을 통하여 이루어질 것이라고 보고하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 분자 생물학적 기법을 이용한 장내 미생물 군총의 측정

제 1 항 서론

돼지는 출생 시 소화관 및 장관내의 미생물 군총이 아직 형성되지 않아 무균 상태로 존재하게 된다. 그러나 출생 후에는 어버이나 환경으로부터 급속히 미생물을 섭취하게 되어 장관 내의 미생물 군총을 형성하고 유지하게 된다. 특히 어미인 모돈은 자돈의 출생부터 이유 시까지 가장 밀접하게 접촉하고 있으며, 오랜 시간을 공유하게 됨으로써 자돈의 미생물 군총 구성에 매우 중대한 영향을 미치게 된다. 이렇게 형성된 자돈의 미생물 군총은 매우 복잡하며, 각각 종이 다른 미생물 약 300여종 이상이 장내 미생물로 존재하게 된다. 특히 이러한 미생물 중에는 유익균인 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus bovis*, *Bacillus subtilis* 등도 존재하지만, 유해균인 *E.coli*, 포도상구균 등도 함께 존재하게 된다. 따라서 자돈의 장내 미생물은 다양한 장내 미생물 간의 상호작용(interaction)을 통해 미생물의 양과 종류를 조절하게 되며, 숙주동물인 자돈과도 상호작용을 통해 미생물 군총을 균형(balance)있게 유지하게 된다. 그러나 자돈의 신변상의 변화 즉 이유, 돈사 변화, 환경 변화, 사료의 변화 등으로 인해 미생물간의 상호작용이나 자돈과 미생물과의 상호작용이 깨어 질 수 있으며, 이는 설사를 비롯한 여러 가지 질병으로 발전할 가능성이 있다. 자돈의 소화기관인 위장, 소장, 대장에 서식하는 장내 미생물은 숙주의 장관에서 유입된 사료를 소화, 분해하면서 미생물 자체에 필요한 영양 성분을 흡수하고 생체 유지를 하게 되며, 다음 세대로의 번식을 하게 된다. 이 중에 존재하는 유익균은 다른 유해한 미생물들의 생육과정을 억제하고, 독성물질(toxic materials)을 제거하는 등 장관내의 미생물 군총을 유지하는데 매우 중대한 역할을 하며, 이는 생균제(probiotics)의 개발에 중요한 미생물로 이용가치가 높다. 따라서 국내에서 사육되는 자돈의 장관에 존재하는 미생물 군총의 특징을 규명하고, 이를 PCR을 이용하여 정량분석 기법을 개발하여 미생물 수를 정확히 측정함으로써, 자돈 장관 내 미생물 군총에 대한 검증을 실시하고, 이를 기반으로 자돈의 장관 내 미생물 군총을 균형 있게 유지할 수 있는 생균제나 prebiotics 같은 영양, 사료학적 기법 개발 및 질병 양상 분석, 질병 전이, 자돈의 영양적 설사 예방 등 다양한 분야에 적용 가능할 것으로

사료된다.

제 2 항 실험 방법 및 재료

국내 자돈의 장내에서 검출 되는 미생물 균총의 특징을 조사하여, 자돈의 장내에 존재하는 유익균과 유해균에 대한 분류와 이 중 다수를 차지하는 종에 대한 미생물 선정 후 각각의 미생물 특징을 조사하였다. 이 중 자돈의 장내에서 다수를 차지하는 총 4종에 대해 선정한 후, PCR 분석을 위한 돼지 장내 미생물 종 특이적인 primer를 제작하였다. 일반적인 PCR에 사용되는 specific primer는 real time PCR을 수행하기에는 PCR product size가 커서 PCR efficiency를 떨어뜨리기 때문에 DNA 정량에 error로 작용할 가능성이 있으며, 따라서 2종에 대하여 이를 방지할 수 있는 PCR product size가 작은 real time PCR에 맞는 primer를 제작하였다. 비특이적인 band와 primer dimer의 형성은 실험 오차를 발생시키기 때문에 RT-primer 제작 후, target DNA 이외의 비특이적인 band가 나타나는지를 확인하였다.

Real time primer를 이용하여 순수 배양된 target 미생물의 genomic DNA와 함께 PCR 실험을 실시하여 target 미생물의 특이적인 band를 증폭시키고 이를 PCR product purification kit(iNtRON biotechnology, INC) 이용하여 정제한 후, 증폭된 DNA 단편을 준비된 Vector(pGEM-T easy vector system, promega)에 삽입하였다. 이후 특정 단편이 삽입된 plasmid를 준비된 Competent cell 에 Transformation을 실시한다. 이후 transformation 된 Competent Cell을 계대 배양하여 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid (plasmid DNA purification kit, iNtRON biotechnology)를 대량 추출하여 DNA 농도를 측정한다. 이 후 standard plasmid DNA를 농도별로 희석하는 serial dilution을 실시하여 sample과 함께 real time PCR을 수행하였다.

가. 미생물의 genomic DNA의 추출

선정된 미생물의 특이적 genomic DNA를 추출하는 데에는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (intronbiotechnology Cat. No. 17121)를 사용하였다. 먼저 배양된 미생물을 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후, 상층액을 제거한다. 이 후 RNase A와 Proteinase K가 첨가된 buffer을 300ul 첨가하고 mix한다. 15분간 65℃에서 incubation을 실시하고 genomic DNA의 binding을 위해 250ul의 binding buffer를 첨가하고 섞어 준다. 생성된 cell lysates를 column tube에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리한다. genomic DNA 이외의 물질을

제거하기 위해 washing buffer A를 500ul 첨가한 후 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하고 washing buffer B로 같은 방식으로 washing 한다. 이후 washing buffer를 완전히 제거하기 위하여 13,000rpm에서 1분간 원심분리를 한 번 더 실시한 후 50~200ul의 elution buffer를 첨가하고 1분간 실온에서 incubation한 후, 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 genomic DNA를 수집한다.

나. PCR analysis and PCR product purification

수집된 각각의 미생물의 genomic DNA의 비특이적인 band 형성을 검출하기 위하여 제작된 미생물 특이적 primer를 이용하여 PCR을 실시한다. 각각의 미생물의 genomic DNA에 대한 PCR condition은 다음과 같다.

PCR Condition

Denature temp. 94°C - 3:00

Denature temp. 94°C - 0:30

Anneal temp. X°C - 0:30

Extention temp. 72°C - 0:30

Extention temp. 72°C - 5:00

Total Cycle No. - 35 cycles

Annealing temperatures

1. *E.coli_K88* - 56.8°C

2. *Streptococcus bovis* - 58.0°C

PCR product는 때문에 정제를 실시하여 순수한 PCR product를 얻어낸 후, vector에 삽입하여야 그 효율이 높기 때문에 PCR product purification을 실시하였다. PCR product의 정제는 PCR quick-spin™ PCR product purification kit(iNtRON biotechnology, INC)를 이용하였다. PCR product를 binding 시키는 binding buffer를 500ul 첨가한 후 섞어 준다. 이후 100bp 이상의 DNA fragment이기 때문에 isopropanol을 150ul 첨가하여 DNA 정제 효율을 높여 주었다. 이를 실온에서 1분간 incubation 한 후 spin column에 sample을 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리 한다. flow-through을 버린 후 700ul의 washing buffer을 첨가하여 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고, dry한 spin

membrane을 만들고 ethanol에 의한 반응의 방해를 막기 위해 빈 상태로 한 번 더 원심분리를 실시한다. 이후 elution buffer를 50ul 첨가하여 1분간 실온에서 incubation한 후, 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하여 순수한 PCR product를 얻고 농도를 측정한다.

다. Vector preparation

정제된 PCR product를 이용하여 3.0kb정도의 base pair를 가진 vector를 제작한다. vector 제작은 pGEM-T easy vector를 이용하였다. 2X Rapid ligation Buffer, T4 DNA ligase를 5ul, pGEM-T easy vector(50ng)을 1ul, T4 DNA ligase를 1ul 넣고 정제 후 농도를 측정한 PCR product를 vector와 1:5의 비율로 X ul 첨가하여 섞어 준 후, 1시간동안 실온에서 incubation 하여 vector plasmid를 제작한다.

라. Transformation of plasmid DNA in competent cell

준비된 vector를 competent cell에 transformation하기 위하여 Heat shock method를 이용하였다. 준비된 vector 3ul 를 준비된 50ul 의 competent cell에 넣고 Ice 상태에서 30분간 incubation한 후 42°C의 water bath에서 90초간 heat shock을 준다. 이를 ice에서 5분간 incubation한 후 LB 를 1ml 첨가하고 37°C에서 1시간동안 incubation 한다.

마. Selection of transformed competent cell

준비된 transformed Competent cell을 Ampicillin이 첨가된 LB media에 Xgal, IPTG와 함께 도말하여 37°C에서 overnight 한 후 white colony를 selection한다.

바. plasmid DNA purification of transformed competent cell

선발된 transformed competent cell을 계대 배양하여 plasmid를 추출하기 위하여 DNA-spinTM plasmid DNA purification kit(iNtRON biotechnology, INC)를 사용하였다. 배양된 transformed cell을 멸균 튜브에 2ml을 넣고 13,000rpm에서 30초간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 RNase A가 첨가된 resuspension buffer를 250ul 첨가하고 섞어 준 후 250ul의 lysis buffer를 첨가하여 5분간

cell을 lysis시킨다. 이 후 중화시키기 위하여 350ul의 neutralization buffer를 넣고 4°C에서 5분간 incubation 한 후 plasmid 이외의 물질을 spin down 하기 위해 13,000rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한다. 원심분리 후 상층액을 column tube에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 filtrate를 버린 후 500ul washing buffer A를 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 filtrate를 버린다. 700ul의 washing buffer B를 이용해 앞의 단계를 반복한 후 dry filter membrane을 만들기 위해 빈 상태의 튜브를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 멸균된 micro-tube에 column을 옮겨 50ul의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에서 incubation 한 후 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 순수한 plasmid를 얻는다. 이 후 DNA sequencing 작업을 통해 Target gene의 존재 여부를 확인한다.

사. sample의 genomic DNA의 추출

Sample의 genomic DNA는 Fecal DNA kit(UltraClean™ Fecal DNA Kit, MO BIO, 12811-100)를 이용하였다. 최대한의 DNA량을 얻기 위해서 세포벽 성분인 peptidoglycan 성분을 제거 할 수 있는 방법으로 bead beater를 이용하여 가능한 한 모든 genomic DNA를 추출하였다.

아. real time PCR analysis(PCR condition)

앞에서 얻어진 plasmid DNA의 농도를 측정한 후 standard를 제작하기 위해 serial dilution을 실시하고 real time PCR 분석을 실시한다. real-time PCR 분석은 MyiQ™ Single Color Real-time PCR Detection System(BIO-RAD Laboratories)를 사용하였으며, iQ™ SYBR Green Supermix(BIO-RAD)를 형광 발색 시약으로 이용하였다. PCR mixture는 primer를 각각 1ul씩 넣고, Template DNA를 2ul 넣은 후, SYBR Green을 16ul 첨가하여 총 20ul가 되도록 하였다. real time PCR analysis의 condition은 다음과 같다.

real time PCR Condition

Denature temp. 95°C - 3:00
Denature temp. 95°C - 0:30
Anneal temp. X°C - 0:30
Extention temp. 72°C - 0:30

Extention temp. 72°C - 5:00

Total Cycle No. - 35 cycles

Annealing temperatures

1. *E.coli_K88* - 56.8°C
2. *Streptococcus bovis* - 58.0°C

제 3 항 연구 결과 및 고찰

국내 자돈의 장내에서 검출되는 미생물 중 다수를 차지하는 *Streptococcus bovis*, *E. coli K88+*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*를 선정하여 미생물의 특징을 조사 (Barnes 등, 1986; Fuller 등, 1982; Maxwell 등, 1995)하였다. 돼지는 인간과 비슷한 단위 동물로써 공통의 유익균이 장내 세균총으로 자리잡고 있다. 주로 미생물은 돼지의 대장 내에 서식하게 되는데 보통은 혐기성 세균이 다수 존재하고 있다. 특히 *Bifidobacterium* 이나 *Lactobacillus spp.* 와 같은 Lactic acid bacteria가 존재하여 장내 미생물 균총을 유지하고 있다. Briggs 등(1954)은 *Lactobacillus* 나 *Enterococcus* 가 돼지의 분변에 많이 존재하며, *E.coli*는 그 수가 적음을 보고하였다. 또한 다양한 연구를 통해서 정상 돼지에는 *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bacteroidaceae spp.* 등이 주요 존재하는 것으로 알려져 있다. 특히 출생 시 자돈은 장내에 무균 상태로 존재하다가 점차 환경으로부터 미생물을 섭취하게 되면서 장내 미생물 균총을 형성하게 되는데, 이는 돼지의 일생에 있어서 많은 변화를 갖게 된다. 출생 후에는 곧 *Clostridium spp.*, *Bacteroidaceae spp.*, *Enterococcus spp.*가 빠르게 증식하여 우점 하고, 이유 시점에는 *Bifidobacterium* 이나 *Lactobacillus spp.*가 우점하는 것으로 알려져 있다. 또한 소화관 각부위의 미생물 균총을 확인해본 결과 소장(small intestine) 및 대장(large intestine)에 *Lactobacillus spp.*가 가장 우점하고 있으며, *E.coli* 는 대장에서 다수 검출된다(Heyde 1973). 또한 총 미생물 수는 맹장에서 직장까지 $10^9/g$ 으로 가장 높게 나타나며, 회장에서는 $10^8/g$ 정도가 나타난다. Varel과 Wells(2005)에 의하면 돼지의 대장(large intestine)에는 다양한 종류의 미생물이 서식하는데, 그 종류는 다음과 같다(표 2).

표 2. Common bacteria in the hindgut of pigs

<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>
<i>Bacteroides suis</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Methanobrevibacter spp.</i>
<i>Peptostreptococcus productus</i>	<i>Prevotella bryantii</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Proteus spp.</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Streptococcus intestinalis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Veillonella spp.</i>

이렇게 다양한 종류의 미생물이 돼지의 장관 내에서 서식하고 있으며, 각 개체 간의 작용 및 상호작용을 통해 장내 미생물 균총을 유지하고 살아간다. 이러한 미생물과 함께 장내 미생물 균총을 개선하는 효과를 가진 다양한 미생물들이 생균제로서 사용되어지고 있으며, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium* 등이 AAFCO에서 승인되어 사용되고 있다. 본 연구에서는 자돈의 장내에 서식하며, 생균제로써의 효과를 가지고 있는 총 4 균종(*L.acidophilus*, *S.bovis*, *B.subtilis*, *E.coli K88*)에 대해서 미생물 균총을 조사하였다. 이렇게 선정된 미생물을 검출하기 위한 PCR 수행을 실시하기 위하여 돼지 장내 미생물 중 특이적인 primer를 제작하였으며, *Streptococcus bovis*, *E. coli K88+*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* 각각에 대해 PCR primer를 제작하였으며 2종(*Streptococcus bovis*, *E. coli K88+*)에 대해서 real time PCR을 위한 특이적 primer를 제작하였다. PCR 용 primer는 표 3 과 표 4 에 나타난 바와 같다. 선정된 각 미생물의 DNA와 internal control 의 두 가지 template를 사용하여 PCR을 수행하고 UV spectrometry로 band의 강도 비율을 측정하여 계산식을 정립하는 Competitive PCR 기법을 사용하였으나 이보다 소량의 DNA의 정량에도 민감한 SYBR green 시약을 이용한 형광 발색법으로 standard plasmid DNA의 농도를 측정하는 real time PCR 기법(Joseph 등, 2003)을 이용하여 plasmid의 농도 측정방법으로 사용하였다. 또한 일반적인 PCR에 사용되는 specific primer는 real time PCR을 수행하기에는 product size가 커서 real time PCR에 맞는 primer(RT-primer)를 제작하였다. 이를 바탕으로 소장 샘플에서도 PCR band

가 미생물 특이적으로 검출 되는지를 확인하기 위하여 무작위로 추출한 돼지 공장 샘플에서 real time PCR에 맞게 제작된 특이적 primer를 이용하여 real time PCR을 수행하였을 때 특이적인 단일 밴드를 확인하였다. 따라서 이를 이용하여 돼지 장내 미생물 균종 중 대표적인 미생물인 *Streptococcus bovis*, *E.coli K88+*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*에 대한 real time PCR용 primer를 제작하였다.

표 3. 돼지 장내 미생물 균종 확인 후 특정 미생물에만 있는 특이적인 유전정보를 검출할 수 있는 specific primer

균종 및 Amplification 위치	Primer	
<i>Bacillus subtilis</i> group 16S rRNA	Forward	AAGTCGAGCGGACAGATGG
	Reverse	CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC
<i>Streptococcus bovis</i> 16S rRNA(AY442813)	Forward	CTAATACCGCATAACAGCAT
	Reverse	AGAAACTTCCTATCTCTAGG
<i>Escherichia coli K88ac</i> adhesion antigen gene(U19784)	Forward	GGTGATTTCAATGGTTCGGT
	Reverse	AATGCTACGTTACGCGGAGC
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Forward	AGCTGAACCAACAGATTAC
	Reverse	ACTACCAGGGTATCTAATCC

표 4. real time PCR용 primer(RT-primer)-(size 100-300bp 정도)

(i) 각 균종에 따른 특이적 real time PCR Primer

균종 및 Amplification 위치	RT-Primer	
<i>Streptococcus bovis</i> 16S rRNA(AY442813)	Forward	AAGGCAGTGGCTTAACCATTGT
	Reverse	CGAGCCTCAGCGTCAGTTAC
<i>Escherichia coli K88ac</i> adhesion antigen gene(U19784)	Forward	CGGTGTGTTAGGGAGAGG
	Reverse	CTTTGAATCTGTCCGAGAATATC

(ii) PCR product size

S. bovis - 157bp

E. coli K88 - 192bp

특히 정량을 위한 real time PCR에서는 비 특이적 band뿐만 아니라 일반적인 PCR

에서 나타나는 primer dimer도 실험오차에 많은 영향을 주므로 이를 제거하기 위한 방향으로 primer 설계 및 PCR condition 조절을 하였다. 이후 제작한 RT-primer를 이용하여, 미생물과 무관한 비특이적인 band가 나타나는지 확인하였으며, 그림 1에서 보는바와 같이 비특이적 band가 나타나지 않았다.

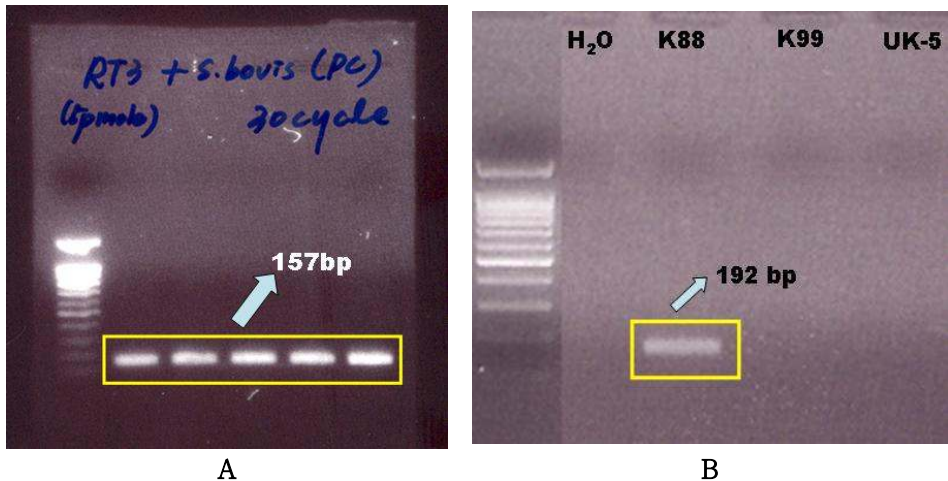


그림 1. *S. bovis*(A) 와 *E. coli* K88+(B)의 RT-primer로 순수배양균 및 미지 시료를 PCR한 후 전기영동 - 비특이적인 band 및 primer dimer가 형성되지 않음

다음으로 종 특이적인 DNA 단편이 들어간 plasmid vector를 제작하여 Standard DNA로 이용하였으며 RT-primer를 이용하여 순수 배양된 Target 미생물의 특이적인 band를 증폭시킨 후, 증폭된 DNA 단편을 정제하여 준비된 Vector(pGEM-T easy vector)에 삽입하였다(그림 2). 이후 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 Competent cell에 Heat shock method를 이용하여 transformation을 하였으며, 항생제 선택배지(LB+AMP media)에 Xgal과 IPTG와 함께 도말하여 Target 유전자가 삽입된 plasmid를 가진 Competent cell을 선발하였다. 이 후 선발된 transformed competent cell을 계대 배양하여 plasmid를 추출하고, 얻어진 plasmid에 대한 PCR과 Gel Electrophoresis를 수행하여 Target 미생물의 특이적인 유전자가 제대로 삽입되었는지를 규명하였다(그림 3).

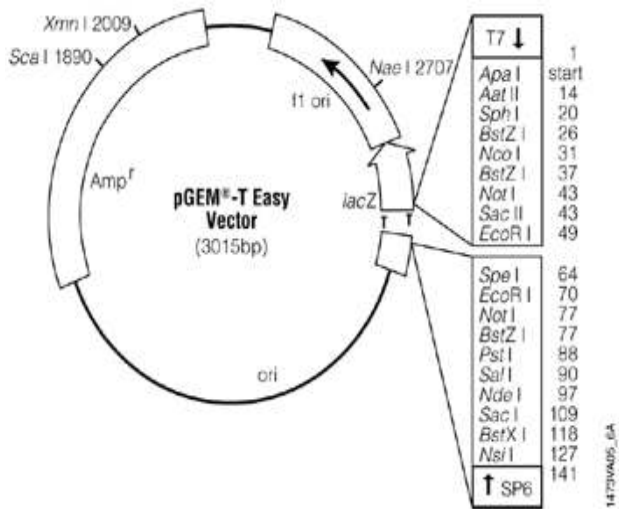


그림 2. Transformation에 사용된 Vector (pGEM-T Easy vector, 3015bp)

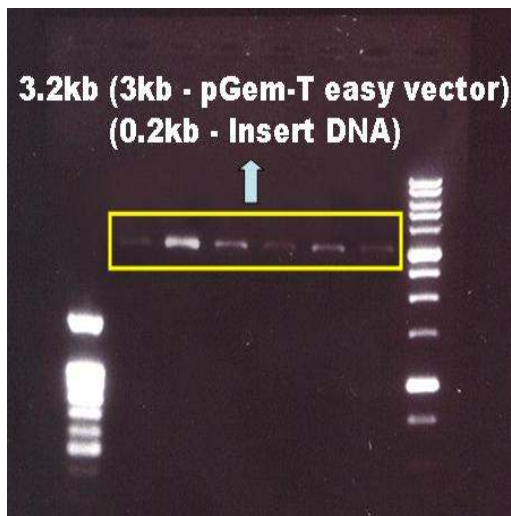
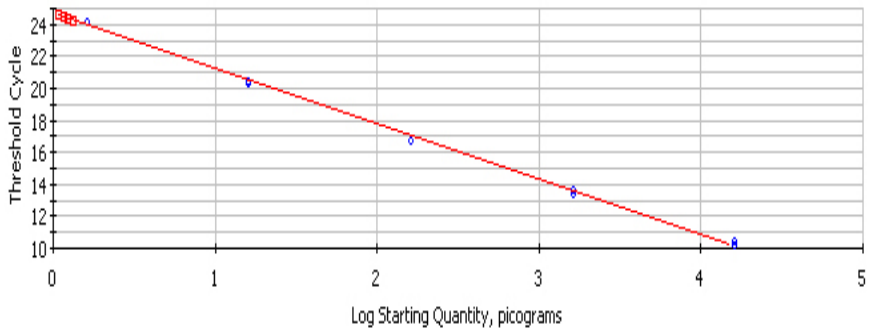


그림 3. 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid로 형질전환된 E. coli를 배양 후 추출한 plasmid를 전기영동(원래 vector size와 삽입된 DNA의 size가 함께 반영되어 3.2kb 정도의 크기를 나타냄)

이렇게 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 대량 추출하여 농도측정 후 Standard plasmid DNA Stock solution으로 사용하였으며 serial dilution을 실시

한 standard solution을 가지고 Standard plasmid DNA를 농도별로 희석하여 샘플과 함께 real time PCR을 수행하였으며 결과는 그림 4에 나타난 바와 같다.

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.440 Intercept: 24.663 $Y = -3.440 X + 24.663$ □ Unknowns ◇ Standards
 PCR Efficiency: 95.3 %



a) Standard curve graph for *E.coli* K88+

Correlation Coefficient: 1.000 Slope: -3.331 Intercept: 36.084 $Y = -3.331 X + 36.084$ □ Unknowns ◇ Standards
 PCR Efficiency: 99.6 %



b) Standard curve graph for *S.bovis*

그림 4. Real time PCR을 이용한 장내 *E.coli* K88+ 및 *S.bovis* 미생물 균총 정량 (농도별 희석하여 Standard Curve 완성)

real time PCR 기법과 일반 계대배양법의 미생물 균총 측정에 대한 비교조사를 실시하였다. 표 5 는 계대 배양법을 이용하여 *E.coli*에 대한 미생물 수와 real time PCR 기법을 이용하여 *E.coli* K88+에 대한 미생물 수를 조사한 것이다. 앞에서 설명한 바와 같이 계대배양법에 의한 분석은 CFU라는 단위를 사용하여 그림 6 에 나타나 있는 것과 같이 colony를 세어 그 값을 나타낸다. real time PCR

기법을 이용하면 그림 6에 나타나 있는 standard curve와 이에 따른 회귀식을 이용하여 직접 미생물 수를 계산하게 된다. 그 결과 계대배양법을 이용한 *E.coli*의 CFU 단위 측정은 1.948×10^3 의 수가 나왔으며, real time PCR 기법을 이용한 *E.coli* K88+의 미생물 수는 1.322×10^1 이다.

표 5. 계대배양법을 이용한 *E.coli* 미생물 수 측정 및 real time PCR 기법을 이용한 *E.coli* K88+ 미생물 수 측정

	Ct value	No. of bacteria
<i>E.coli</i> K88+	30.32	1.322×10^1
<i>E.coli</i> (CFU)	-	1.948×10^3

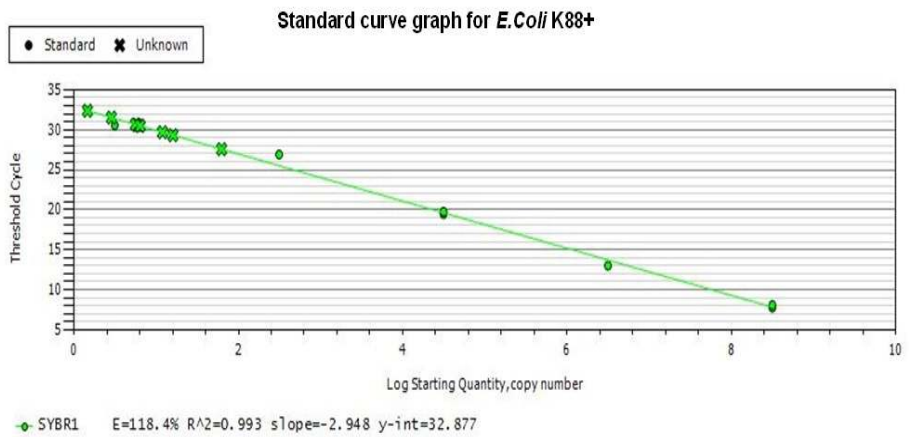


그림 5. Real time PCR기법을 이용한 *E.coli* K88+의 standard curve 제작 및 미생물 수 측정

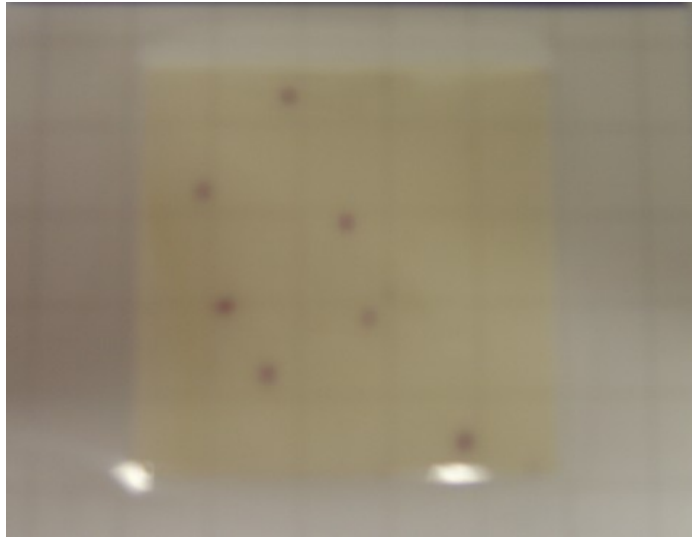


그림 6. 계대배양법에 의한 미생물 수 측정법

본 실험에서 real time PCR 기법을 이용하여 장내 미생물 균총을 분석하는데 있어 가장 핵심은 정확하게 정량된 Standard plasmid DNA의 확보와 오염되지 않고 균일하게 미지 시료의 genomic DNA를 추출하는 것이다. 본 실험에서 plasmid DNA에 대한 target gene의 삽입여부와 비특이적 밴드의 존재여부에 대해 분석해본 결과, target gene이 정상적으로 삽입 된 것을 확인 하였으며, 비특이적 밴드가 존재 하지 않음을 알 수 있었다. 특히 정확하게 standard plasmid DNA를 정량하기 위해서는 기존에 사용된 UV spectrometer를 이용한 방법보다는 DNA 이중나선구조에 결합되어 형광을 발광하는 성질을 가져서 미량의 DNA 정량에 알맞은 SYBR green을 이용한 방법이 더 효율적이라고 사료되어 competitive PCR 방법이 아닌 real time PCR 방법을 이용하여 분석을 실시하여 계산식을 설정하였다. 또한 sample에 존재하는 내용물에는 그람 양성균과 음성균이 함께 분포되어 있는데 그람 양성균의 세포막에 존재하는 peptido-glycan이 화학적인 방법으로의 DNA의 추출을 방해하므로 물리적인 방법이 사용되어야 했으며, bead beater를 이용한 genomic DNA 추출 방법을 사용하여 미지시료의 genomic DNA 추출 효율을 극대화하였다. 또한 일반적 PCR에 사용되는 primer는 PCR product size의 크기가 real time PCR의 PCR efficiency에 영향을 미치므로 이를 방지하기 위해 PCR product size가 적은(100-300bp) 특이적 primer가 필요하다고 판단되어 real time PCR용에 특이적인 RT-primer를 제작하여 사용하였다. 특히 기존의 real time PCR을 이용하여 DNA를 정량한 연구에서는

standard plasmid DNA의 농도 측정을 위해 일반적인 UV 방법을 많이 사용하였지만 본 실험에서는 SYBR green을 이용한 형광 발색방법을 사용하여 standard plasmid DNA의 정량이 UV 방법보다 더욱 정밀하게 이루어 졌으며, 이로 인해 비교대상이 되는 샘플도 보다 정확한 정량이 가능해졌다.

계대배양법과 real time PCR 기법을 이용한 미생물 수 측정 결과는 표 5 와 같다. 결과에 나타난 바와 같이 계대배양법에 의한 미생물 수가 real time PCR 기법을 이용하여 측정한 미생물 수 보다 높음을 알 수 있다. real time PCR 기법은 미생물 중 특이적인 primer를 이용하여 하나의 특이적 strain을 분석해내는 반면에 계대배양법에 의한 미생물 측정은 *E.coli* strain에 관계없이 *E. coli* 전체에 대한 미생물 수를 측정하는 것이기 때문에 사료된다. 따라서 *E. coli*에 대한 전반적인 미생물 수를 측정할 때에는 계대배양법을 이용하는 것이 효율적이며, 어떠한 질병의 원인균이나 특이적인 한 균종에 대한 분석을 실시하여야 할 때에는 real time PCR 기법을 이용하는 것이 더욱 효과적일 것으로 사료된다. 따라서 real time PCR 기법이 계대배양법에 비해 보다 정밀하고, 정확한 분석 기법이며, 폐지의 장내 미생물 균총 측정에 있어서 더욱 정밀한 결과를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절 자돈의 장 내용물에서 *Lactobacillus casei*의 정량 분석 기술 개발

제 1 항 서 론

자돈의 장내에 유익한 미생물 균총이 형성되는 것은 이유 후 자돈사양에 있어서 생산성을 향상시키는데 중요한 요인 중 하나가 될 수 있다. 이유자돈의 장내 유익균 우점을 위하여 미생물 균총을 조절하는 영양학적 방법 중 가장 널리 알려진 방법이 사료에 생균제를 첨가하는 것인데, 자돈에게 유익한 균을 주종으로 한 생균제를 사료에 첨가하여 계속 급여 하면 유익균이 장내에 지속적으로 유입되면서 우점하게 되어 미생물 균총이 변하게 된다. 이에 따라 숙주 동물인 자돈에게 유익한 영향을 미칠 수 있다. 최근 유산균인 *Lactobacillus spp.*를 주 성분으로 하는 생균제가 개발되었다. 그러나 생균제의 효과를 명확하게 구명하기 위해서는 자돈의 장관 내에 target 미생물이 얼마나 우점하고 있는지를 정확히 측정하여야 한다. 그러나 *Lactobacillus spp.*를 자돈에게 급여 시 장관 내에서 생존성을 판별하기 위해 가축의 배설물에 포함된 유산균을 선택배지에 도말하여 얻은 콜로니 중 *Lactobacillus*의 특정 균종의 수를 측정하여야 하는데 배설물에는 유산균 외에 다양한 균종이 있을 뿐만 아니라 선택배지에서 형성된 콜로니의 모양만을 관찰하여 유산균 중 어느 것이 원하는 *Lactobacillus* 균종인지 판별하는 것은 어려움이 많다. 또한 가축사료 첨가용 미생물에는 여러 종의 유산균이 이용되고 있으며, 현재까지의 기술로는 선별한 primer을 이용한 내재형 플라스미드의 정성적인 분석은 가능하나 정량적인 분석은 불가능한 상태이다. 따라서 효과적으로 *Lactobacillus spp.*의 소화관내 존재여부 및 분포상황을 밝히기 위해서, 즉 첨가한 생균제의 정확한 효능을 검증하기 위해서 다양한 PCR 방법을 이용하여 추가적인 정량방법이 필수적이다.

따라서 본 연구는 이유자돈의 장 내용물에서 특정 *Lactobacillus spp.*를 정확하게 정량분석하기 위하여 특정 *Lactobacillus spp.*의 내재형 플라스미드의 존재 여부를 확인하고, 이 플라스미드의 염기서열에 특이성을 갖는 primer를 제작 이용하여 PCR 방법을 이용하여 특정 *Lactobacillus spp.*를 정확하게 정량분석 할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 수행되었다.

제 2 항 실험 방법 및 재료

*Lactobacillus spp.*에 대한 분자생물학적 기법을 통한 장내 미생물 균총 측정

기법을 확립하기 위하여 자돈의 장내에 존재하는 유익균과 유해균에 대한 분류와 이 중 다수를 차지하는 종에 대한 미생물 선정 후, PCR 분석을 위한 돼지 장내 미생물 중 특이적인 primer를 제작하였다. 일반적인 PCR에 사용되는 specific primer는 real time PCR을 수행하기에는 PCR product size가 커서 PCR efficiency를 떨어뜨리기 때문에 DNA 정량에 error로 작용할 가능성이 있으며, 이를 방지할 수 있는 PCR product size가 작은 real time PCR에 맞는 primer(RT-primer)를 제작하였다. 비특이적인 band와 primer dimer의 형성은 실험 오차를 발생시키기 때문에 RT-primer 제작 후, target DNA 이외의 비특이적인 band가 나타나는지를 확인하였다.

RT-primer를 이용하여 순수 배양된 target 미생물의 genomic DNA와 함께 PCR 실험을 실시하여 target 미생물의 특이적인 band를 증폭시키고 이를 PCR product purification kit(iNtRON biotechnology, INC)를 이용하여 정제한 후, 증폭된 DNA 단편을 준비된 Vector(pGEM-T easy vector, promega)에 삽입하였다. 이후 특정 단편이 삽입된 plasmid를 준비된 competent cell에 transformation을 실시한다. 이후 transformation 된 competent Cell을 계대 배양하여 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid(plasmid DNA purification kit, iNtRON biotechnology, INC)를 대량 추출하여 DNA 농도를 측정한다. 이 후 Standard plasmid DNA를 농도별로 희석하는 serial dilution을 실시하여 sample과 함께 real time PCR을 수행하였다. **같은 방법을 통하여 *Lactobacillus casei*를 합하여 총 5종(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus bovis*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* K88)의 미생물에 대한 real time PCR 용 primer 제작을 완료하였으며, primer는 표에 나타나 있다.** 이 중 *E.coli* K88을 제외한 4종의 유익균에서 *Lactobacillus plantarum*을 선정하여, 유산균 섭취시 자돈의 소화관내 미생물 균총 형성 여부를 밝히기 위해서, 24±3일의 삼원 교잡종 이유 자돈 40두를 공시하여 completely random design (CRD)에 의하여 2처리 5반복에 배치하여 사양 실험 및 해부 실험을 실시하였다. 처리구는 총 2처리였으며, 1) Control (basal diet), 2) basal diet + *Lactobacillus plantarum* 0.2% 로 하였다. 실험기간은 총 5주로 하였으며, 매주 사료섭취량과 증체량을 측정하고, phase II의 자돈 6두를 도살하여 회장, 맹장, 결장, 직장 내에서 *Lactobacillus plantarum* 수를 real time PCR 기법을 이용하여 측정하였다.

가. 미생물의 genomic DNA의 추출

선정된 미생물의 특이적 genomic DNA를 추출하는 데에는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON biotechnology, INC)를 사용하였다. 먼

저 배양된 미생물을 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후, 상층액을 제거한다. 이 후 RNase A와 proteinase K가 첨가된 buffer을 300ul 첨가하고 mix한다. 15분간 65°C에서 incubation을 실시하고 genomic DNA의 binding을 위해 250ul의 binding buffer를 첨가하고 섞어 준다. 생성된 cell lysates를 column tube에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심 분리한다. genomic DNA 이외의 물질을 제거하기 위해 washing buffer A를 500ul 첨가한 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 washing buffer B로 같은 방식으로 washing 한다. 이후 washing buffer를 완전히 제거하기 위하여 13,000rpm에서 1분간 원심분리를 한 번 더 실시한 후 50~200ul의 elution buffer를 첨가하고 1분간 실온에서 incubation한 후, 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 genomic DNA를 수집한다.

나. PCR analysis and PCR product purification

수집된 각각의 미생물의 genomic DNA의 비특이적인 band 형성을 검출하기 위하여 제작된 미생물 특이적 primer를 이용하여 PCR을 실시한다. 각각의 미생물의 genomic DNA에 대한 PCR condition은 다음과 같다.

PCR Condition

Denature temp. 94°C - 3:00
Denature temp. 94°C - 0:30
Anneal temp. X°C - 0:30
Extention temp. 72°C - 0:30
Extention temp. 72°C - 5:00

Total Cycle No. - 35 cycles

Annealing temperatures

1. *Lactobacillus casei* - 55.6°C

PCR product는 때문에 정제를 실시하여 순수한 PCR product를 얻어낸 후, vector에 삽입하여야 그 효율이 높기 때문에 PCR product purification을 실시하였다. PCR product의 정제는 PCR quick-spin™ PCR product purification kit(iNtRON biotechnology, INC)를 이용하였다. PCR product를 binding 시키는

binding buffer를 500ul 첨가한 후 섞어 준다. 이후 100bp 이상의 DNA fragment이기 때문에 isopropanol을 150ul 첨가하여 DNA 정제 효율을 높여 주었다. 이를 실온에서 1분간 incubation 한 후 spin column에 sample을 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리 한다. flow-through을 버린 후 700ul의 washing buffer를 첨가하여 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고, dry한 spin membrane을 만들고 ethanol에 의한 반응의 방해를 막기 위해 빈 상태로 한 번 더 원심분리를 실시한다. 이후 elution buffer를 50ul 첨가하여 1분간 실온에서 incubation한 후, 13,000rpm에서 1분간 원심분리 하여 순수한 PCR product를 얻고 농도를 측정한다.

다. Vector preparation

정제된 PCR product를 이용하여 3.0kb정도의 base pair를 가진 vector를 제작한다. vector 제작은 pGEM-T easy vector를 이용하였다. 2X rapid ligation buffer, T4 DNA ligase를 5ul, pGEM-T easy vector(50ng)을 1ul, T4 DNA ligase를 1ul 넣고 정제 후 농도를 측정한 PCR product를 vector와 1:5의 비율로 X ul 첨가하여 섞어 준 후, 1시간동안 실온에서 incubation 하여 vector plasmid를 제작한다.

라. Transformation of plasmid DNA in competent cell

준비된 vector를 competent cell에 transformation하기 위하여 Heat shock method를 이용하였다. 준비된 vector 3ul를 준비된 50ul의 competent cell에 넣고 Ice 상태에서 30분간 incubation한 후 42°C의 water bath에서 90초간 heat shock을 준다. 이를 ice에서 5분간 incubation한 후 LB 를 1ml 첨가하고 37°C에서 1시간동안 incubation 한다.

마. Selection of transformed competent cell

준비된 transformed competent cell을 ampicillin이 첨가된 LB media에 Xgal, IPTG와 함께 도말하여 37°C에서 overnight 한 후 white colony를 selection한다.

바. plasmid DNA purification of transformed competent cell

선발된 transformed competent cell을 계대 배양하여 plasmid를 추출하기 위하여 DNA-spin™ plasmid DNA purification kit(iNtRON biotechnology, INC)를 사용하였다. 배양된 transformed cell을 멸균 튜브에 2ml을 넣고 13,000rpm에서 30초간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 RNase A가 첨가된 resuspension buffer를 250ul 첨가하고 섞어 준 후 250ul의 lysis buffer를 첨가하여 5분간 cell을 lysis시킨다. 이 후 중화시키기 위하여 350ul의 neutralization buffer를 넣고 4℃에서 5분간 incubation 한 후 plasmid 이외의 물질을 spin down 하기 위해 13,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리 한다. 원심분리 후 상층액만을 column tube에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 filtrate를 버린 후 500ul washing buffer A를 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 filtrate를 버린다. 700ul의 washing buffer B를 이용해 앞의 단계를 반복한 후 dry filter membrane을 만들기 위해 빈 상태의 튜브를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하고 멸균된 micro-tube에 column을 옮겨 50ul의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에서 incubation 한 후 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 순수한 plasmid를 얻는다. 이 후 DNA sequencing 작업을 통해 target gene의 존재 여부를 확인한다.

사. sample의 genomic DNA의 추출

Sample의 genomic DNA는 Fecal DNA kit(UltraClean™ Fecal DNA Kit, MO BIO, 12811-100)를 이용하였다. 최대한의 DNA량을 얻기 위해서 세포벽 성분인 peptidoglycan 성분을 제거 할 수 있는 방법으로 bead beater를 이용하여 가능한 한 모든 genomic DNA를 추출하였다.

아. real time PCR analysis(PCR condition)

앞에서 얻어진 plasmid DNA의 농도를 측정한 후 standard를 제작하기 위해 serial dilution을 실시하고 real time PCR 분석을 실시한다. real-time PCR 분석은 MyiQ™ Single Color Real-time PCR Detection System(BIO-RAD Laboratories)를 사용하였으며, iQ™ SYBR Green Supermix(BIO-RAD)를 형광 발색 시약으로 이용하였다. PCR mixture는 primer를 각각 1ul씩 넣고, Template DNA를 2ul 넣은 후, SYBR Green을 16ul 첨가하여 총 20ul가 되도록 하였다. real time PCR analysis의 condition은 다음과 같다.

real time PCR Condition

Denature temp. 95°C - 3:00

Denature temp. 95°C - 0:30

Anneal temp. X°C - 0:30

Extention temp. 72°C - 0:30

Extention temp. 72°C - 5:00

Total Cycle No. - 35 cycles

Annealing temperatures

1. *Lactobacillus casei* - 55.6°C

제 3 항 연구결과 및 고찰

PCR을 위한 돼지 장내 미생물 중 특이적인 primer를 제작하였으며, *Lactobacillus casei* CLW-011에 대해 PCR primer 및 real time PCR을 위한 특이적 primer를 제작하였다. PCR용 primer는 표 6 에 나타난 바와 같다. 선정된 각 미생물의 DNA와 internal control 의 두 가지 template를 사용하여 PCR을 수행하고 소량의 DNA 의 정량에도 민감한 SYBR green 시약을 이용한 형광 발색법으로 standard plasmid DNA 의 농도를 측정하는 real time PCR 기법(Joseph 등, 2003)을 이용하여 plasmid의 농도 측정방법으로 사용하였다. 또한 일반적인 PCR에 사용되는 specific primer는 real time PCR을 수행하기에는 product size가 커서 real time PCR에 맞는 primer(RT-primer)를 제작하였다. 이를 이용하여 돼지 장내 미생물 균총 *Lactobacillus casei* CLW-011에 대한 real time PCR용 primer를 제작하였다. *Lactobacillus casei*를 합하여 총 5종의 미생물에 대한 real time PCR 용 primer 제작을 완료하였으며, primer는 표 7 에 나타나 있다.

표 6. *Lactobacillus casei* CLW-011의 특이적 Primer (일반 PCR용)

균종 및 Amplification 위치	Primer	
<i>Lactobacillus casei</i> CLW-011 16s rRNA	Forward	AAGCACCTAACGGGTGCGA
	Reverse	GCGATGCGAATTTCTTTTTC

특히 정량을 위한 real time PCR에서는 비 특이적 band뿐만 아니라 일반적인 PCR에서 나타나는 primer dimer도 실험오차에 많은 영향을 주므로 이를 제거하기 위한 방향으로 primer 설계 및 PCR condition 조절을 하였다. 이후 제작한 RT-primer를 이용하여, 미생물과 무관한 비특이적인 band가 나타나는지 확인하였으며, 그림 7에서 보는바와 같이 비특이적 band가 나타나지 않았다.

표 7. 각 균종에 따른 특이적 real-time PCR Primer

균종 및 Amplication 위치	Real-time PCR Primer	
<i>Lactobacillus casei</i> 16s rRNA	Forward	CCGTCACACCATGAGAGTTT
	Reverse	CCTTGTTACGACTTCACCTT
PCR product size		106 bp
<i>Streptococcus bovis</i> 16S rRNA(AB002482)	Forward	AAGGCAGTGGCTTAACCA
	Reverse	CGAGCCTCAGCGTCAGTT
PCR product size		157 bp
<i>Escherichia coli</i> K88ac F4 Adhesion antigen gene(U19784)	Forward	CGGTGTGTTAGGGAGAGG
	Reverse	CTTTGAATCTGTCCGAGAATATC
PCR product size		192 bp
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Forward	CCCGTCACACCATGAGAGAGTT
	Reverse	GGCTACCTTGTTACGACTTC
PCR product size		110 bp
<i>Bacillus subtilis</i> 16S rRNA(DQ112340)	Forward	GTGCAGAAGAGGAGAGTGG
	Reverse	TCAGCGTCAGTTACAGAC
PCR product size		104 bp

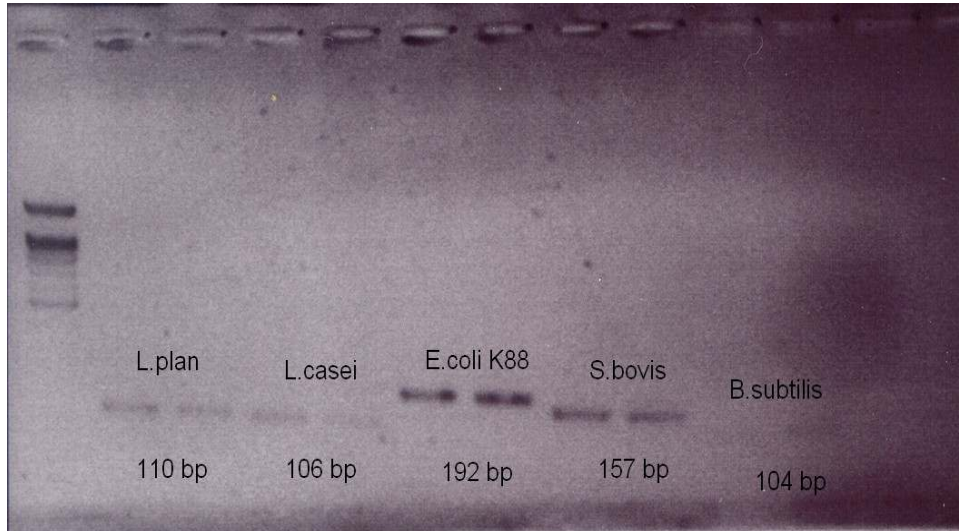


그림 7. 각각 순수배양균 및 미지시료를 PCR한 후 전기영동 - **비특이적인 band 및 primer dimer가 형성되지 않음**

다음으로 종 특이적인 DNA 단편이 들어간 plasmid vector를 제작하여 standard DNA로 이용하였으며 RT-primer를 이용하여 순수 배양된 target 미생물의 특이적인 band를 증폭시킨 후, 증폭된 DNA 단편을 정제하여 준비된 Vector(pGEM-T easy vector)에 삽입하였다(그림 8). 이후 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 competent cell에 Heat shock method를 이용하여 transformation을 하였으며, 항생제 선택배지(LB+AMP media)에 Xgal과 IPTG와 함께 도말하여 target 유전자가 삽입된 plasmid를 가진 competent cell을 선발하였다. 이 후 선발된 transformed competent cell을 계대배양하여 plasmid를 추출하고, 얻어진 plasmid에 대한 PCR과 Gel electrophoresis를 수행하여 Target 미생물의 특이적인 유전자가 제대로 삽입되었는지를 규명하였다(그림 9).

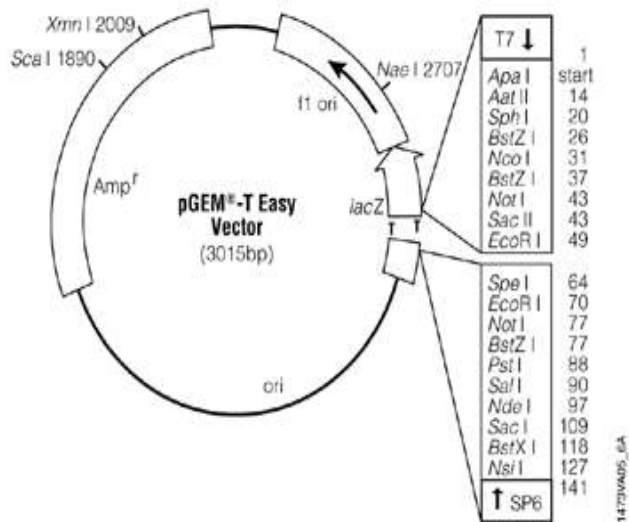


그림 8. Transformation에 사용된 Vector(pGEM-T Easy vector, 3015bp)

이렇게 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 대량 추출하여 농도측정 후 standard plasmid DNA Stock solution으로 사용하였으며 serial dilution을 실시한 standard solution을 가지고 standard plasmid DNA를 농도별로 희석하여 샘플과 함께 real time PCR을 수행하였으며 결과는 그림 10에 나타난 바와 같다.



그림9. *Lacobacillus casei* CLW-011의 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid로 형질 전환된 *E.coli*를 배양 후 추출한 plasmid를 전기영동(원래 vector size와 삽입된 DNA의 size가 함께 반영되어 3.2kb 정도의 크기를 나타냄)

Correlation Coefficient: 1.000 Slope: -3.331 Intercept: 36.084 $Y = -3.331 X + 36.084$
 PCR Efficiency: 99.6 %

□ Unknowns
 ○ Standards



그림 10. Real-time PCR을 이용한 장내 미생물 균총 정량(Serial dilution을 통한 Standard Curve 완성)

자돈에 있어서 사료로 첨가되어 섭취한 생균제가 장내 미생물 균총에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 결과가 표 8에 나타나 있다. *Lactobacillus plantarum*이 10^8 이상 함유된 생균제를 자돈 사료에 0.2% 첨가하였을 때 수치상으로 보았을 때, *Lactobacillus plantarum* 첨가구에서 *Lactobacillus plantarum*이 더 많이 서식하고 있는 것으로 나타났다. 하지만 통계적으로 유의적인 차이는 발생하지 않는 것으로 나타났으며, 이는 생균제로 섭취하는 미생물이 위나 소장을 지나는 동안 생존하지 못하였기 때문으로 판단된다. 건강 증진 및 면역력 강화 등을 위해서 사용되는 생균제는 첨가되는 미생물의 수 뿐만 아니라 그 미생물의 생육력(viability), 장관(gastrointestinal tract)내에서의 생존능(survival capacity), 군집형성능(colonization potential), 면역 증진 능력(immunological properties)에 대한 검증이 매우 중요하다(L.masco et.al., 2007). 따라서 위내의 낮은 pH나 소장으로 진입하면서의 pH의 급격한 상승 등 외부 환경 변화에 빠르게 적응하거나, 저항성이 있는 생균제의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

표 8. *Lactabacillus plantarum* 의 첨가가 자돈의 미생물 균총에 미치는 영향

	Control	<i>L.plantarum</i> 첨가구
No. of <i>L.plantarum</i> (Ct value) in cecum	2.19 x 10 ⁵ (14.78)	4.31 x 10 ⁵ (13.96)
No. of <i>L.plantarum</i> (Ct value) in colon	8.23 x 10 ⁵ (13.11)	9.00 x 10 ⁵ (13.07)

제 3 절 : Sugar beet pulp (SBP)가 이유자돈의 성장, 혈중유리아태 질소, 설사발생 빈도 및 장내 미생물균총에 미치는 영향

제 1 항 서 론

이유 후 자돈의 장내에 유익한 미생물을 정착시키기 위한 방법 중 하나로 사료내 섬유소를 소량 첨가하는 것이다. 과거 연구 결과에 의하면 섬유소가 많은 사료를 급여한 돼지에게서 대장균성 부종이 발생하지 않았고 (Smith와 Halls, 1968), 조섬유 함량이 높은 사료를 섭취한 3주령 이유자돈에게서 심한 설사가 감소하였고, 설사 발생 기간 또한 감소하였다 (Ball과 Aherne, 1982). Drochner 등 (1978)은 사료 내 조섬유가 돼지의 소화기관 내 박테리아의 활성을 감소시킨다고 보고하였다. 이러한 섬유소의 효과에 대한 작용 기작은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 섬유소 분해 미생물의 활성이 증가하여 장내 pH가 감소하고 이에 따라 유해한 미생물의 활성이 감소한다는 이론과, 섬유소의 물리적 특징으로 인하여 미생물의 장내 상피세포에 부착이 방해되어 장내에 서식하지 못한다는 이론 등이 있다. 따라서 이유자돈 내 섬유소를 첨가하면 장내 유익균의 활성을 증가시키고 유해균의 활성을 억제시켜 자돈의 건강상태 및 생산성이 향상될 것이라고 사료된다. Sugar beet(사탕무)는 가공되지 않은 사탕무 자체를 말하는 것으로 다른 특정 지역에서는 그대로 sugar beet의 뿌리를 돼지에 급여하기도 한다. 뿌리 자체의 높은 수분함량 때문에 비육돈이나 모돈에 주로 사용된다. 건조된 sugar beet의 뿌리는 어린 자돈에게 상당히 높은 수준으로 이용될 수 있다. 대부분의 sugar beet는 설탕제조를 위해 재배되지만 때로는 소나 돼지와 같은 가축에게 급여할 목적으로 경작되기도 한다. 하지만 그 경도가 높아서 사료로 이용될 때에는 얇게 박을 만들거나 분쇄한 후 이용되어야 한다. Sugar beet에서 설탕을 추출하고 나면 크게 두 종류의 부산물이 생산되는데 바로 sugar beet pulp와 sugar beet molasses (사탕무 당밀)이다. 이 두 가지의 부산물은 동물용 사료제조에 많이 쓰이고 있다. Sugar beet pulp (사탕무박, OECD 2002)은 설탕제조를 위해 공장으로 이송된 sugar beet는 제척하고, 얇게 썰고 나서 물에 담궈 대부분의 설탕을 추출한다 (그림 10). 이러한 추출과정 후 남은 찌꺼기를 sugar beet pulp라 한다. 이 상태의 sugar beet pulp는 수분함량이 약 800~850 g/kg이며, 외국에서는 이러한 상태 그대로 원료사료로 판매되기도 하지만 운송 상의 어려움으로 인해 건조 (수분함량 : 100 g/kg)되어 판매되게 된다. 이렇게 추출되고 건조되기 때문에 수용성 영양소 (water-soluble

nutrients)들이 빠져나가게 되고, 따라서 건조된 sugar beet pulp에는 높은 수준의 비전분성다당류 (Non-starch polysaccharide) 및 조섬유 함량 (약 200 g/kg-건물)이 들어 있다. 이러한 특성 때문에 조단백질이나 인의 함량은 건물 1kg 당 약 100 g정도만이 함유되어 있다(표 9).

이러한 특성 때문에 sugar beet pulp는 돼지 사료로 사용하기에 너무 섬유소 함량이 높아 모돈에서만 일부 사용되고 있을 뿐이다. **하지만 최근 일련의 연구 결과들은 sugar beet pulp의 섬유소는 돼지에 있어 이용성이 높을 뿐만 아니라 자돈에서의 소화율이 80~85%에 달한다는 보고가 있다.** 이러한 이용성 때문에 육성돈에서는 약 15%, 비육돈에서는 20%까지 사용하여도 어떠한 성장의 차이를 보이지 않는다는 보고도 있다.

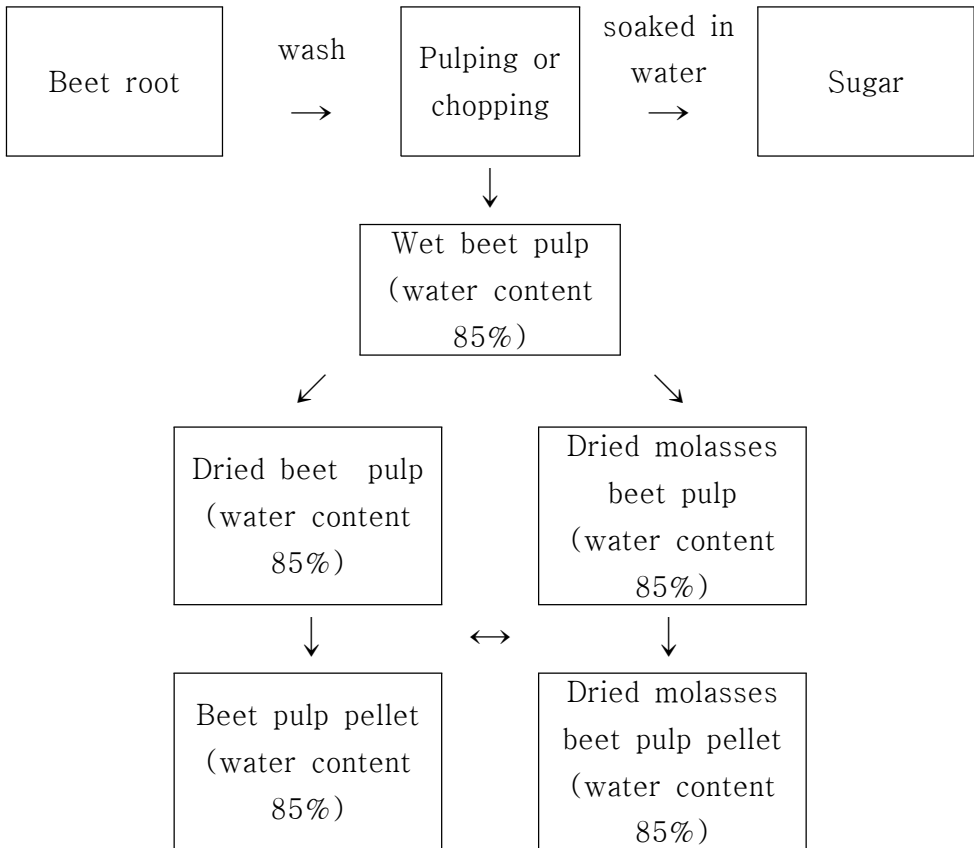


그림 11. 설탕가공 부산물로서 Sugar beet pulp의 생산 과정 (OECD, 2002)

표 9 . Sugar beet pulp의 조성

entry number	Description	International Feed Number	Dry Matter (%)	DE (kcal/kg)	ME (kcal/kg)	NE (kcal/kg)	Crude Protein (%)	Crude Fat (%)
			91	2,865	2,495	1,860	8.6	0.8
07	Beet, Sugar pulp, dried	4-00-669	Linoleic Acid (%)	NDF (%)	ADF (%)	Calcium (%)	Phosphorus (%)	Bioavailability of Phosphorus
			-	42.4	24.3	0.70	0.10	-

(NRC, 1998)

표 10 . 각 원료 사료의 섬유소 함량

Feedstuff	CF (%)	NDF (%)	ADF (%)	TDF (%)	Total FOSc (mg/g)
Alfalfa meal, 17% CP	24.0	41.2	30.2		2.1
Barley grain	5.0	18.0	6.2	17.3	1.7
Corn grain, yellow	2.6	9.6	2.8	9.0	0.0
Soybean Hulls	36.4		45	86.0	0.1
Soybean meal, 44% CP	6.2	13.3	9.4		0.0
Beet pulp		41.4		56.3	0.1

따라서 본 연구에서는 사료첨가제로 사용될 수 있는 섬유소인 beet pulp의 첨가가 장내 유익한 미생물 균총의 수를 증가시키고 유해한 미생물 균총의 수를 감소시키는 효과가 있는지를 1년차 과제에서 개발된 분자생물학적 기법을 이용한 미생물수 측정을 통하여 정확히 구명하고 이에 따른 숙주동물의 건강증진 효과를 조사함과 동시에 이유자돈의 소화관내에 유익한 미생물 균총들이 우점될 수 있는 적정 섬유소의 첨가 수준을 확립하고자 한다.

제 2 항 실험 방법 및 재료

가. 실험 동물

사양실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유했던 평균체중 5.87 ± 0.02 kg의 삼원교잡종 ([Landrace × Large White Yorkshire] × Duroc) 이유자돈 120두를 공시하여 5처리 6반복에 체중과 성별을 고려하여 난괴법 (randomized completely block (RCB) design)으로 돈방 당 4두씩 배치하였다. 처리구는 다음과 같다 : 1) 대조구 (Control; Basal diet), 2) A 처리구 (Basal diet의 2.5%를 sugar beet pulp (SBP)로 대체), 3) B 처리구 ((Basal diet의 5.0%를 SBP로 대체), 4) C 처리구 (Basal diet의 7.5%를 SBP로 대체), 5) D 처리구 (Basal diet의 10.0%를 SBP로 대체). SBP의 첨가수준에 따른 섬유소 함량을 제외한 다른 모든 영양소의 함량은 처리별로 차이 없게 하였으며, NRC 사양표준 (1998)에 따라 충족시켰다. 실험은 총 5주간 서울대학교 부속실험목장에서 수행되었다.

나. 실험 사료

총 3가지의 사료가 배합되어 단계별 자돈사양 프로그램에 따라 급여되었다. 총 35일간의 자돈기 실험 기간 동안 급여한 실험사료 (Basal diet)의 열량가는 약 3,289 ME kcal/kg였다. Diet 1 (0 - 7일), diet 2 (7 - 21일), 그리고 diet 3 (21-35일)의 단계별 사료들의 조단백질 함량은 각각 23, 21, 19 %였다. 조섬유를 제외한 다른 모든 영양소 함량은 NRC 사양표준 (1998)과 같거나 많았다. Sugar beet pulp는 당밀이 첨가되지 않은 건조 사탕수수박을 입자도를 작게 분쇄하여 첨가하였으며, 처리별로 sugar beet pulp의 첨가 수준이 높아짐에 따라 옥수수 (Corn), 대두박 (Soy bean meal), 대두유 (Soy-oil)을 조절하여 각 처리별 주요 영양소 함량의 차이가 없게 하였다. 각 단계별 실험사료 배합 성분표를 표 11, 12, 13에 나타내었다.

다. 사육 환경 및 혈액 채취

모든 실험돈은 돈방 당 4두씩 배치되었으며, 돈방은 반 콘크리트-슬롯 바닥 (0.90×2.15 m²) 구조로 각각 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어 있어 실험기간 동안 물과 사료를 자유 채식토록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30℃를 유지하였으며, 매주 1℃씩 낮추어 마지막 5주째에는 26℃가 되게 하였다. 체중과 사료섭취량을 매주 측정하여 일당중체량 (average daily

gain; ADG), 일당사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 구하였다.

혈액은 매주 각 돈방에서 임의로 2두씩을 선택하여 경정맥에서 채취하여 BUN (blood urea nitrogen)을 분석하였다. 혈액은 일회용 유리관에 포집하여 3,000 rpm, 4°C 상태로 15분 동안 원심 분리하였다. 그 후 플라스틱 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20°C에 보관하였다. BUN은 혈액분석기를 이용하여 분석하였다 (Ciba-Corning model, Ciba Corning Diagnostics Co.).

표 11. 실험사료 배합 성분표 (Diet 1)

Item	Control	A	B	C	D
Ingredients (%)					
Corn	44.66	41.59	38.41	35.20	31.92
SBM-46	25.32	24.63	24.63	24.63	24.63
Soyprotein K ^a	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Sugar beet pulp	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
DSM ^b	0.97	2.04	2.16	2.30	2.48
Lactose	16.20	16.20	16.20	16.20	16.20
Soy oil	0.00	0.24	0.82	1.40	2.00
MCP	1.26	1.28	1.30	1.32	1.35
Limestone	0.53	0.48	0.45	0.42	0.40
L-Lysine-HCL	0.05	0.03	0.02	0.01	0.00
DL-methionine	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10
Vitamin mix. ^c	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Mineral mix. ^d	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Neomycin ^e	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
ZnO	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-chloride	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ^f					
ME (kcal/kg)	3302.06	3296.87	3296.71	3296.74	3296.84
CP (%)	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00
Lysine (%)	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine (%)	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
Ca (%)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
P (%)	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65

^a Soy Protein Concentrate manufactured by ADM; Europoort BV.

^b Dry skimmed milk

^c Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64 g; riboflavin, 3.2 mg; calcium pantothenic acid, 8 mg; niacin, 16 mg; vitamin B₁₂, 12 g; vitamin K, 2.4 mg.

^d Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1 mg; I, 0.3 mg; Mn, 24.8 mg; Cu-SO₄, 54.1 mg; Fe, 127.3 mg; Zn, 84.7 mg; Co, 0.3 mg.

^e Antibiotics: Neomycin sulfate 110g/kg

^f Calculated value.

표 12. 실험사료 배합 성분표 (Diet 2)

Item	Control	A	B	C	D
Ingredients (%)					
Corn	53.48	50.27	47.08	43.83	40.72
SBM-46	23.55	23.65	23.75	23.85	23.94
Soyprotein K ^a	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Sugar beet pulp	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
Lactose	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Soy oil	0.29	0.91	1.52	2.15	2.72
MCP	1.30	1.33	1.35	1.38	1.36
Limestone	0.38	0.34	0.31	0.30	0.28
L-Lysine-HCL	0.04	0.03	0.02	0.01	0.00
DL-methionine	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06
Vitamin mix. ^b	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Mineral mix. ^c	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Neomycin ^d	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
ZnO	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-chloride	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ^e					
ME (kcal/kg)	3288.47	3288.95	3288.89	3288.73	3288.22
CP (%)	21.00	21.00	21.00	21.00	21.00
Lysine (%)	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19
Methionine (%)	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
Ca (%)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
P (%)	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63

^a Soy Protein Concentrate manufactured by ADM; Europoort BV.

^b Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64 g; riboflavin, 3.2 mg; calcium pantothenic acid, 8 mg; niacin, 16 mg; vitamin B₁₂, 12 g; vitamin K, 2.4 mg.

^c Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1 mg; I, 0.3 mg; Mn, 24.8 mg; Cu-SO₄, 54.1 mg; Fe, 127.3 mg; Zn, 84.7 mg; Co, 0.3 mg.

^d Antibiotics: Neomycin sulfate 110g/kg

^e Calculated value.

표 13. 실험사료 배합 성분표 (Diet 3)

Item	Control	A	B	C	D
Ingredients (%)					
Corn	71.95	68.73	65.53	62.32	59.06
SBM-46	16.42	16.52	16.63	16.73	16.85
Soyprotein K ^a	8.50	8.50	8.50	8.50	8.50
Sugar beet pulp	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
Soy oil	0.92	1.54	2.15	2.77	3.40
MCP	1.22	1.25	1.27	1.30	1.32
Limestone	0.17	0.14	0.11	0.08	0.07
L-Lysine·HCL	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04
DL-methionine	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04
Vitamin mix. ^b	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Mineral mix. ^c	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Neomycin ^d	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-chloride	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ^e					
ME (kcal/kg)	3281.27	3281.27	3281.27	3281.27	3281.27
CP (%)	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
Lysine (%)	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Methionine (%)	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
Ca (%)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
P (%)	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60

^a Soy Protein Concentrate manufactured by ADM; Europort BV.

^b Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64 g; riboflavin, 3.2 mg; calcium pantothenic acid, 8 mg; niacin, 16 mg; vitamin B₁₂, 12 g; vitamin K, 2.4 mg.

^c Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1 mg; I, 0.3 mg; Mn, 24.8 mg; Cu·SO₄, 54.1 mg; Fe, 127.3 mg; Zn, 84.7 mg; Co, 0.3 mg.

^d Antibiotics: Neomycin sulfate 110g/kg

^e Calculated value.

라. 해부 실험 (Anatomy trial)

해부실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유한 평균체중 5.15 ± 0.23 kg의 삼원 교잡종 ([Landrace \times Large White Yorkshire] \times Duroc) 이유자돈 20두를 공시하여 처리당 4두씩 총 21일간 실험사료를 처리별로 급여한 후 그중 3두씩을 선발하여 해부를 실시하였다 (평균체중 7.21 ± 1.33 kg). 선발된 실험돈은 하루 전에 각 개체별로 대사통에 배치되었고, 12시간 절식 후 해부 전 3시간에 동일한량의 사료와 물을 채식토록 하였다. 도살 후 소장(small intestine), 대장(Large intestine), 직장(rectum)을 분리하였다. 전자현미경 촬영 (Scanning electron microscopy, $\times 100$)을 위해 소장 정 중앙부위 약 2mm^2 를 채취하여 0.4M KCL (Cera, 1988)로 행구어, 2% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde가 함유된 4°C 의 고정액 (0.05M sodium cacodylate buffer, pH 7.2)에 보관하였다. 또한 공장 (jejunum) 부위를 2cm 길이로 채취한 후 10% neutral buffered formalin에 고정하였다가 alcohol과 xylene step과정을 거쳐 탈수 하여 hematoxylin과 eosin(HE)-stained section ($4\mu\text{m}$)으로 만들어 융모 (villi) 및 융와 (crypt)를 관찰하여 형태학적 특징 (morphology)을 조사하였다. 장내 미생물 군총 조사를 위해 회장 (ileum), 맹장 (cecum), 횡행결장 (transverse colon), 직장 (rectum)에서 소화물을 채취하여 -80°C 상태로 보관하였다.

마. 화학 분석 및 통계 분석 방법

실험사료의 일반성분 (조수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유) 분석은 AOAC (1995)의 방법에 따라 실시하였다. 사료의 칼슘과 인은 회화한 후 전처리과정을 거쳐 AAS (atomic absorption spectrophotometer, Shimadzu, AA-6401, Japan)를 이용하여 측정하였다. 통계분석은 SAS (SAS Institute, 2004)의 일반선형모형 (general linear model; GLM)을 이용하여 수집된 자료에 대한 유의성 검정을 실시하였으며, 최소 유의차 (LSD) 요인분석법에 의해 처리한 결과를 비교하였다.

제 3 항 연구 결과 및 고찰

가. 성장 성적 (Growth performance)

사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향

을 표 14 및 그림 11과 그림 12에 정리하여 나타내었다. 실험 전 기간 (5 주) 동안 사료내 SBP를 첨가한 처리구의 체중 (body weight), 일당증체량 (ADG), 사료효율 (G/F ration)이 증가하였다 ($P < 0.05$). 실험 개시 후 3주째부터 체중 및 일당증체량에 있어 SBP 첨가 여부 및 그 첨가 수준에 따라 차이가 있었다. 5 % 이상의 SBP 첨가구 (B, C, D 처리구)의 체중은 실험 종료 시까지 유의적인 차이를 보이며 대조군에 비해 높았으며, 그 중 7.5 % 첨가구의 체중 및 일당증체량이 가장 많이 개선되었다 ($P < 0.05$). SBP를 2.5 % 첨가한 처리구 (A 처리구)의 경우 대조군 (control)이나 다른 처리구에 비해 유의적으로 낮거나 높은 차이를 보이지 않았지만 대조군에 비해 개선되는 경향을 보였다. 일당사료섭취량 (ADFI)의 경우 전 실험 기간 동안 어떠한 유의적인 차이도 보여주지 않았다 ($P > 0.39$). 다만 SBP 첨가군이 대조군에 비해 섭취량이 증가하는 경향을 띠었으나 SBP 첨가 수준에 따른 일관된 섭취량 증가는 관찰되지 않았다. 사료효율 (G/F ratio)의 경우 SBP가 5 % 이상 첨가된 처리구에 있어서 대조군에 비해 고도의 유의적인 차이를 보이며 개선되었다 ($P = 0.011$). 사료효율의 경우 체중이나 일당증체량과는 약간 다른 효과를 보여주었는데, 체중과 일당 증체량은 SBP를 7.5 % 급여한 처리구에서 가장 나왔던 반면, 사료효율은 SBP 첨가량이 증가함에 따라 개선되면서 SBP가 가장 많이 첨가된 D 처리구 (SBP 10% 첨가)에서 가장 높았고, 뒤를 이어 7.5 %를 첨가한 처리구가 뒤를 이었다. SBP가 2.5 % 첨가된 A 처리구의 사료효율은 대조군에 비해 확연한 차이를 보여주지는 않았지만 SBP 첨가량과 사료효율 개선의 linear 한 경향을 나타내고 있다고 사료된다. 이번 실험의 이러한 결과는 소맥 (wheat) 위주의 사료에 SBP를 6 % 첨가하였을 때 이유자돈의 성장 성적이 개선되었다는 Lizardo 등 (1997)의 결과 및 육성·비육돈 사료내 에 15 % 첨가 시 일당증체량이 증가하였다는 Martelli 등 (1999)의 보고와 일치하는 것이다. 표 5에 나타나 있듯이 SBP의 사료 내 첨가로 인한 성장의 개선은 3주 ~ 5주간 보다는 이유 후 3주 동안에서 뚜렷이 나타났다. 이는 SBP가 이유 후 급격한 환경 변화 및 미성숙한 장관에 의한 스트레스가 가장 심한 21일령 (이유시점) ~ 42일령에 성장 능력 개선에 긍정적인 영향을 미치기 때문인 것으로 사료된다.

표 14. 사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향^c

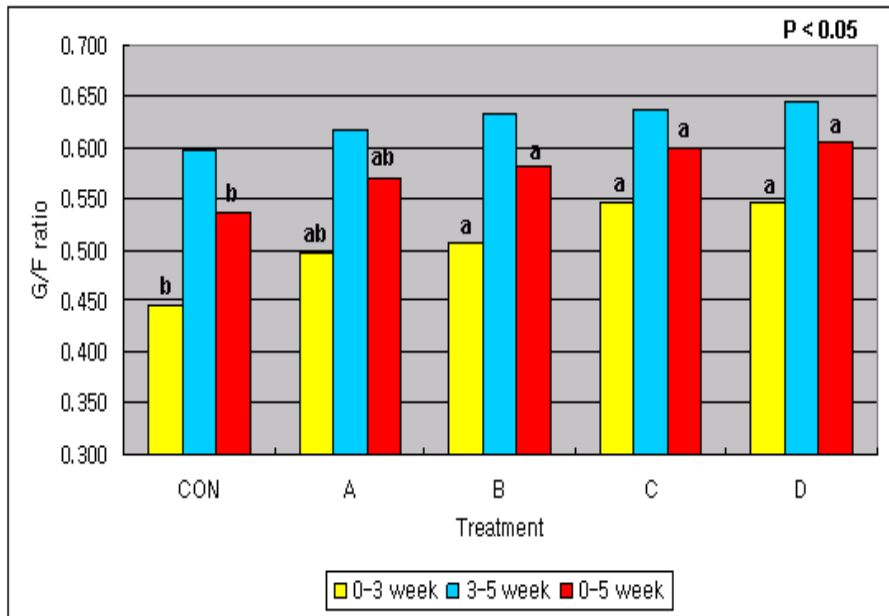
Item	Control	A	B	C	D	SEM ^d
Body weight (kg)						
Initial ^e	5.87	5.86	5.86	5.87	5.89	0.08
3 week	9.28 ^b	9.73 ^{ab}	10.21 ^a	10.42 ^a	10.29 ^a	0.14
5 week	16.31 ^b	17.16 ^{ab}	17.99 ^a	18.30 ^a	18.13 ^a	0.26
Average daily gain ^c (g)						
0-3 week	162 ^b	186 ^{ab}	207 ^a	218 ^a	210 ^a	6.22
3-5 week ^e	502	531	556	562	560	10.62
0-5 week	298 ^b	324 ^{ab}	347 ^a	356 ^a	350 ^a	7.08
Average daily feed intake ^{ce} (g)						
0-3 week	365	374	407	399	385	7.85
3-5 week	838	860	878	882	866	14.18
0-5 week	554	568	595	592	578	8.80
Gain:Feed ratio ^c						
0-3 week	0.445 ^b	0.499 ^{ab}	0.508 ^a	0.546 ^a	0.547 ^a	0.01
3-5 week ^e	0.599	0.617	0.634	0.638	0.646	0.01
0-5 week	0.538 ^b	0.570 ^{ab}	0.582 ^a	0.601 ^a	0.606 ^a	0.01

^{a,b} Mean within rows with different superscripts differ, $P < 0.05$

^c A total of 120 crossbred pigs was fed from average initial body weight 5.86 ± 0.02 kg and the average of final weight was 17.58 kg.

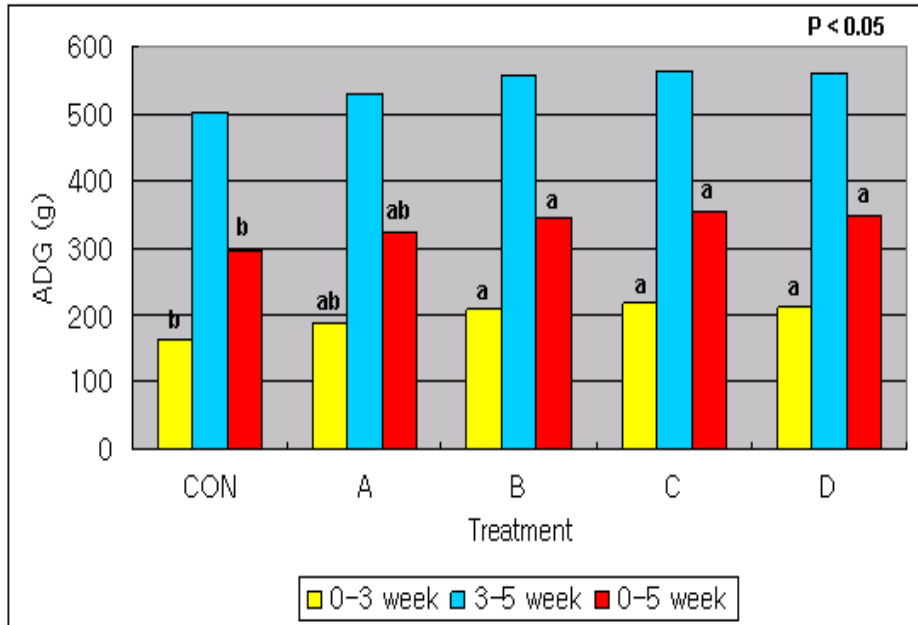
^d Standard error of mean.

^e Not significantly different ($P > 0.80$).



처리별 일당증체량 비교 ($P < 0.05$)

그림 12. 사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향



처리별 사료효율 비교 ($P < 0.05$)

그림 13. 사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향

나. 혈액 분석 (Blood assay)

BUN (blood urea nitrogen) 분석을 위해 실험 개시 시부터 매주 돈방당 2 두로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 -20°C 상태에서 보관하였다. 2주차에서 B, CON 처리구들이 A, C, D 처리구들보다 BUN이 유의적으로 높았으며 ($P < 0.01$), 그 이후로는 큰 차이를 보이지 않았다 (그림 13). 일반적으로 BUN은 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표로 쓰인다(Eggum, 1970). BUN은 단백질 섭취와 그 품질에 직접적인 연관성을 가지며(Eggum, 1970; Hahn 등, 1995), 섭취한 질소의 체내 유지에 관여한다(Whang and Easter, 2000). BUN value는 일당증체량 및 사료효율과 negative correlation을 갖는다 (Hahn 등, 1995). 따라서 2주차에서 나타난 BUN의 이러한 차이는 3주까지의 일당증체량 및 사료효율이 sugar beet pulp를 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조군에 비해 높다는 결과에 비추어 설명 가능하다고 사료된다.

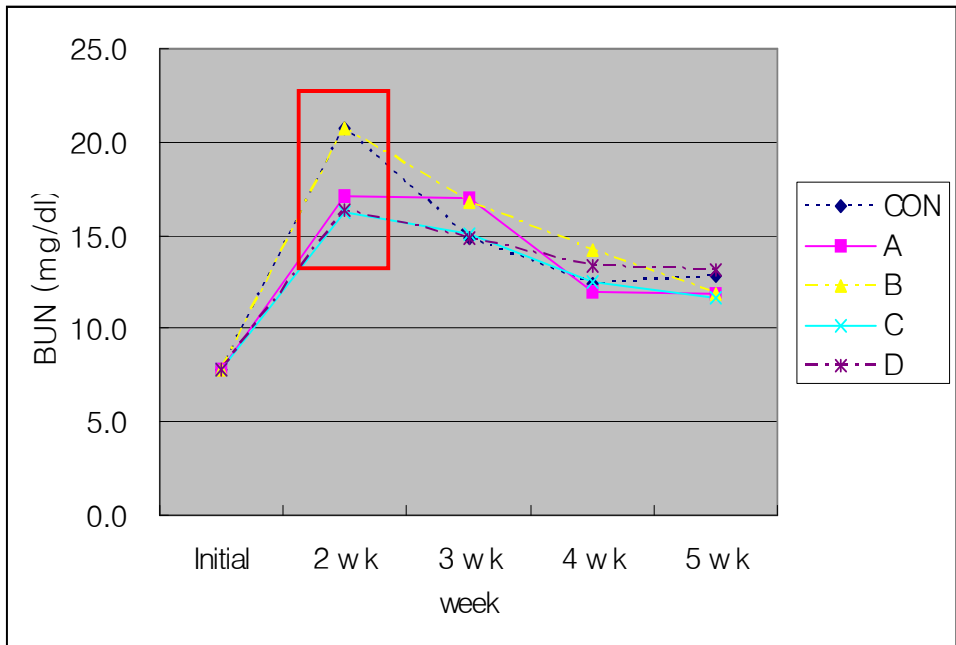


그림 14. 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 첨가가 자돈의 BUN 농도에 미치는 영향

다. 설사 (diarrhea) 빈도 조사

이유 자돈의 설사는 과거 단순하게 수양성 설사를 하며, 위축되다가 일정기간 후 회복되는 경향을 보여 왔으며, 항생제로 치료할 경우 개선되는 것으로 나타났다. 그러나 현재 이유자돈의 설사는 항생제에 대한 반응성이 감소하거나 전혀 없고, 이유후전인소모성질병 (PMWS; postweaning multisystemic wasting syndrome) 유사 증상을 보이며, 그 원인도 다양하다. 보통 설사를 하는 이유 자돈은 열이 나고, 떨며, 복식호흡을 하고, 위축되어 심하면 폐사에 이르게 되며, 설사로만 끝나는 것이 아니라 호흡기 질병을 동반한다. 설사의 원인으로는 주로 5가지를 들 수 있다. 먼저 과식성 설사로 이유 후 1~2주 사이에 발생한다. 둘째, 영양성 설사로 사료 교체에 의해 발생하며, 주로 결장염으로 진단된다. 셋째로, 기계적 설사로 사료에 자돈이 감당하지 못할 정도로 단단하거나 거친 원료가 포함되어 있을 때 발생한다. 넷째로, 알러지에 의한 설사이다. 이것은 특정 사료, 그중에도 단백질 성분에 의해 발생한다. 다섯째, 원인으로써 가장 중요한 것은 병원성 미생물에 의한 설사이다. 이유 후 설사를 유발하는 원인체로는 대장균, 로타바이러스, TGE 및 PED 바이러스, 살모넬라, 기생충 등이 있으며, 대장균에 의한 설사가 가장 빈번하다고 할 수 있다. 자돈의 설사는 영양적 설사의 발생도 그 원인 중 하나이지만, 일반적으로 대장균이나, 살모넬라 등 병원균에 의해 일어나는 설사가 대부분을 차지한다. 특히 대장균에 의한 설사는 병원균에 의한 설사 중 40%정도의 비율을 차지한다. 따라서 본 실험에서는 여러 가지 다양한 설사의 원인 중에 대장균과 유익균에 대한 조사를 통해 SBP가 미치는 영향을 연구하려 하였으며, 과식에 의한 설사가 일어나는 지를 파악하기 위해 사료섭취량을 측정하였고, 소장의 형태학적 고찰을 통해 영양성 설사로 인한 장의 손상이 있었는지 여부를 파악하였으며, 소화율 실험을 통해 전반적인 영양소 소화율에 이상이 있는 지를 검토하였다.

하지만, 각 처리별로 설사의 빈도 또는 설사의 정도를 조사하였으나, 전 실험 기간동안 설사로 분류할 만한 특이성을 보인 실험돈군이 없었으며, 간혹 처리와는 상관없이 불특정 개체에서의 미약한 연변만이 관찰되어 설사빈도 조사가 불가능 하였다. 설사 빈도나 정도를 조사하는 방법은 다양하게 존재하나 가장 널리 쓰이는 방법은 분의 색깔, 연도 (수분함량), 실험돈의 상태를 3단계 혹은 5단계로 구분하여 점수를 부여하여 판단하게 되는데 이는 자칫 개인의 의도가 반영되거나 객관적이지 못할 수 있는 위험이 있다. 만약 설사에 대한 관찰 및 조사를 하려면 깨끗한 환경 (clean nursery) 보다는 더러운 환경 (dirty nursery)상태를 조성하거나, 의도적인 병원균의 감염을 유발하는 것이 용이하리라 사료된다. 몇몇의 연구결과들은 beet pulp 또는 비전분성다당류 (non-starch polysaccharide

)가 다량 함유된 원료를 자돈 사료 내 첨가하였을 때 자돈 설사 발생이 감소하였다는 보고를 하였다 (Ball과 Aherne, 1982; Göransson 등, 1995).

라. 소장외 형태학적 관찰 (Morphology of the small intestine)

1) SEM (Scanning electron microscopy)

소장 중앙 부위인 공장을 채취하여 소화관벽을 전자현미경을 이용하여 100배율로 촬영하였다 (그림 14). 대조구 (CON)는 sugar beet pulp가 첨가된 처리구에 비해 용모의 길이가 짧고 마모가 심한 것으로 관찰되었다. 하지만 이러한 육안의 관찰로는 정확한 분석이 불가능하므로 Eosin(HE)으로 염색하여 파라핀으로 고정한 후 절편을 만들어 용모의 높이 및 용와의 깊이를 측정하였다.

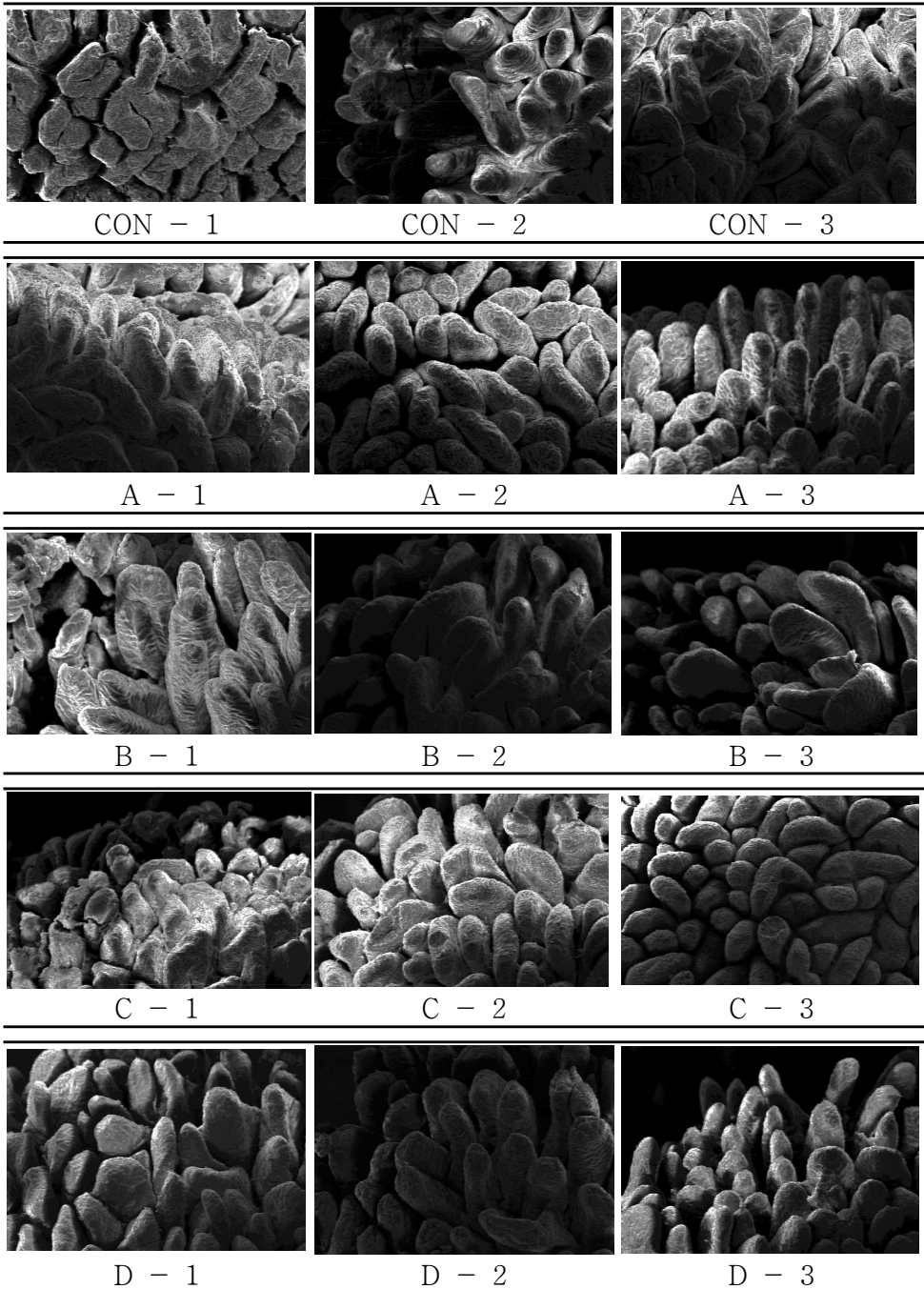


그림 15. 용모 높이와 형태학적 특징을 관찰하기 위해 공장 중앙 부위를 전자현미경 (scanning electron microscopy, $\times 100$)으로 촬영한 사진.

2) 용모 높이 및 용와 깊이 (Villi hight and crypt depth)

표 15에 용모의 높이, 용와의 깊이 그리고 그 둘의 비율 (villi hight : crypt depth)을 표시하였다. 그리고 그림 15 에 측정을 하기위해 전처리를 하여 절편을 잘라 찍은 사진을 나타내었다. 일반적으로 자돈의 소장 용모 형태는 이유 후 섭취한 고품 사료의 영향으로 약간 짧아지고 중간부분이 굽어진 혀의 모양을 하고 있다. Cera 등 (1998)에 의하면 용모의 길이는 이유 후 3일 안에 급격히 감소하며, 그 후 천천히 발달한다고 보고하였다. 처리간에 용모의 높이, 용와의 길이, 그리고 그 비율에 있어 통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 하지만 대조구 (CON)에 비해 SBP를 첨가한 첨가구의 용모의 높이와 용와의 길이가 커지는 경향이 관찰되었다. 특히 SBP를 7.5 %, 10 % 첨가한 C, D 처리구에서의 그 크기가 다른 처리구보다 커지는 경향을 보였지만 유의성은 없었다. 이러한 경향이 발생하는 원인은 사료 내 첨가한 SBP가 장표면의 상피세포를 자극하여 손상된 용모의 탈락 및 영양소의 공급을 원활히 하여 용모의 복원 및 발달을 촉진하였기 때문인 것으로 사료된다. Jin 등 (1996) 과 Mathew 등 (1994)은 높은 수준의 식이 섬유소를 첨가하였을 때 용모의 높이는 약간 감소하였으나 용와의 깊이는 더 깊어진다고 하였으며, 용모의 경우 본 실험과 일치하는 결과를 나타내고 있다. 반면, Moore 등 (1988)은 높은 수준의 섬유소를 급여해도 육성돈의 공장부위 용모에 어떠한 영향도 주지 않는다고 하였으며, 조기 이유한 자돈의 경우 공장부위와 회장부위의 용모 길이가 약 15%까지 감소되었다는 보고를 하였다. 본 실험에서 사용한 SBP는 그 입자도를 매우 작게 분쇄하였는데, 아마도 이러한 입자도의 차이와 섬유소 원료상의 차이 때문에 상반된 결과를 보여주었으리라 사료된다.

표 15. 사료 내 SBP의 수준별 첨가가 자돈 소장의 형태학적 성장에 미치는 영향

Item	Control	A	B	C	D	SEM ^b
Morphological growth (3week, μm)						
Villi height	425.3	490.1	454.3	545.2	512.9	16.97
Crypt depth	175.4	197.7	179.0	212.6	197.8	7.97
V:C	2.42	2.48	2.54	2.57	2.59	0.08

^a A total of 15 crossbred pigs were anatomized from average body weight 7.21 ± 1.33 kg.

^b Standard error of mean.

^c Not significantly different ($P > 0.17$).

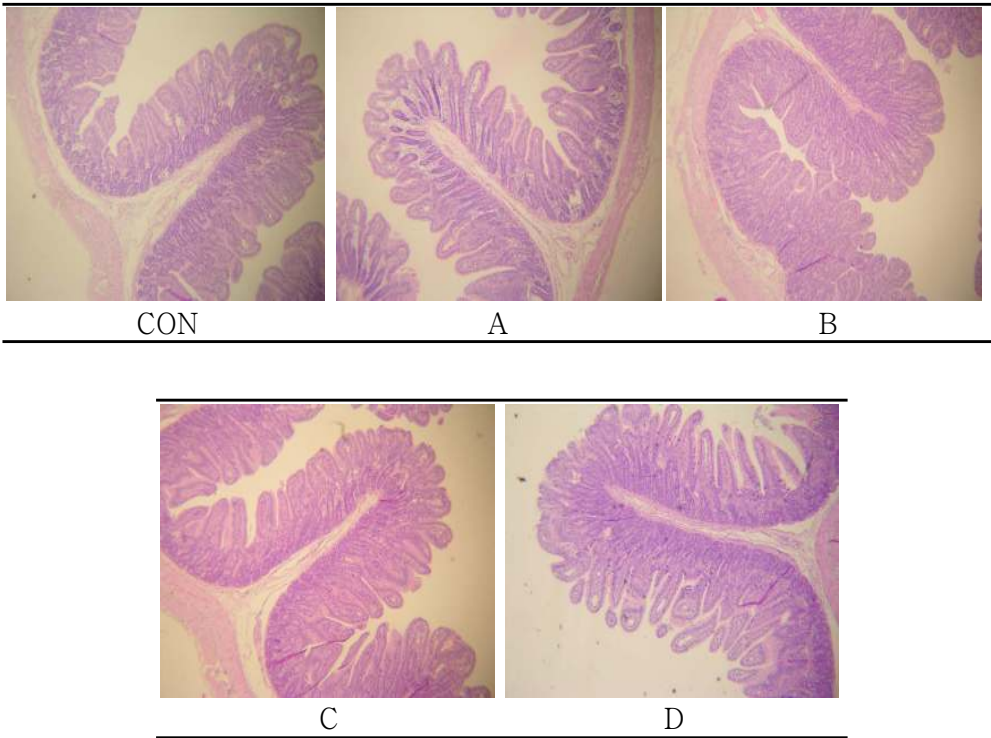


그림 16. 용모 높이와 용와 깊이를 측정하기 위해 공장 중앙 부위를 Eosin(HE)-stained section화하여 촬영한 사진

마. 장내 미생물 균총 (intestinal microfla) 조사

해부실험을 위하여 처리당 3두 씩 총 15두를 선발하여 해부를 실시하였다 (평균체중 7.21 ± 1.33 kg). 도살하여 장내 미생물 균총 조사를 위해 회장 (ileum), 맹장 (cecum), 횡행결장 (transverse colon), 직장 (rectum)에서 소화물을 채취하여 -80°C 상태로 보관하였다. Real time PCR을 실험을 실시하기 위하여 각 균종에 특이적인 primer(real-time PCR primer) 제작하였으며, 일반적인 PCR primer는 PCR product의 size가 커서 에러의 소지가 있으므로 100 ~ 200 bp 정도의 PCR product size로 증폭 시키는 real-time PCR primer를 제작하였다. 제작한 primer는 아래의 표 16 에 나타내었다. Real-time PCR primer를 제작 후, 비특이적인 band가 나타나는지 PCR과 전기영동(gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였고, 비특이적인 band가 나타나지 않음을 그림 16 을 보면 알 수 있다. 이 후 Standard plasmid DNA를 농도별로 희석하여 샘플과 함께 real-time PCR을 수행하여 분석하였다.

표 16. Real-time PCR에 맞는 각 균종의 특이적 primer(real-time PCR primer)의 제작 완료

균종 및 Amplication 위치	Real-time PCR Primer
<i>Lactobacillus casei</i> 16s rRNA	Forward CCGTCACACCATGAGAGTTT Reverse CCTTGTTACGACTTCACCT
PCR product size	106 bp
<i>Streptococcus bovis</i> 16S rRNA(AB002482)	Forward AAGGCAGTGGCTTAACCA Reverse CGAGCCTCAGCGTCAGTT
PCR product size	157 bp
<i>Escherichia coli</i> K88ac F4 Adhesion antigen gene(U19784)	Forward CGGTGTGTTAGGGAGAGG Reverse CTTTGAATCTGTCCGAGAATATC
PCR product size	192 bp
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Forward CCCGTCACACCATGAGAGAGTT Reverse GGCTACCTTGTTACGACTTC
PCR product size	110 bp
<i>Bacillus subtilis</i> 16S rRNA(DQ112340)	Forward GTGCAGAAGAGGAGAGTGG Reverse TCAGCGTCAGTTACAGAC
PCR product size	104 bp

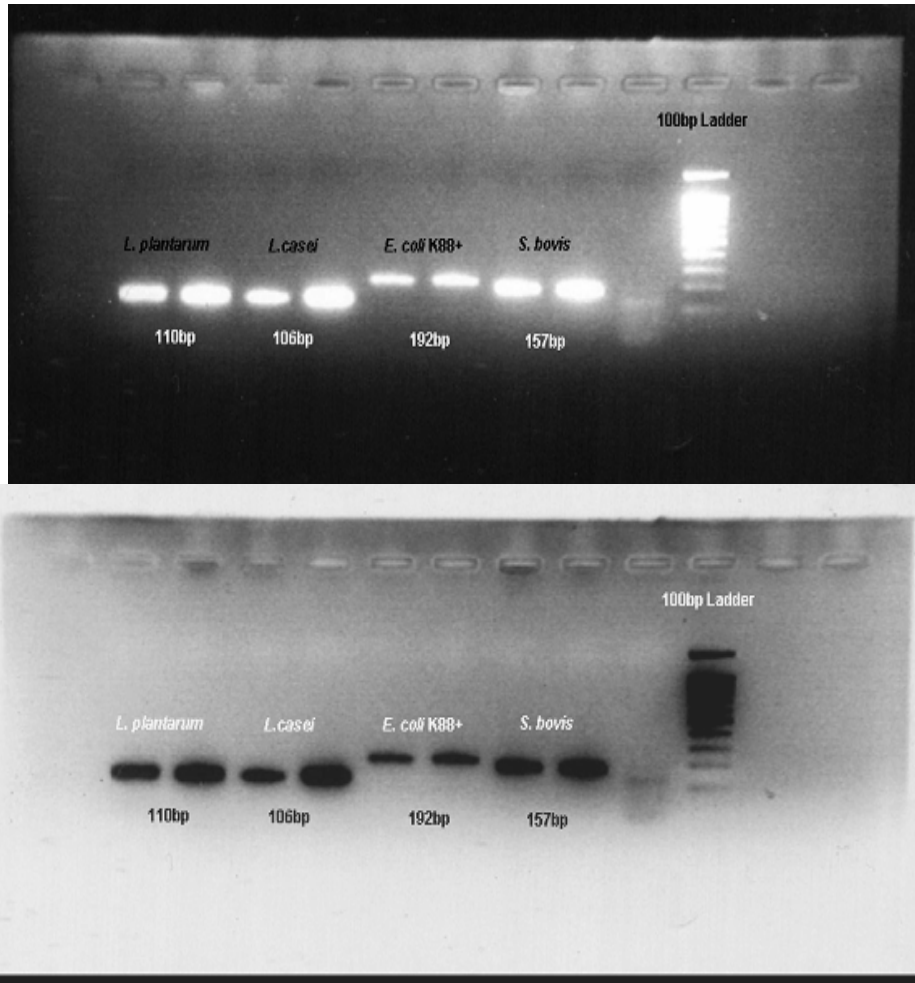


그림 17. 각 균주의 순수배양균 및 미지시료를 PCR한 후 전기영동
 - 비특이적인 band 및 primer dimer가 형성되지 않음

4) 균총 조사 결과

표 17. 공장, 맹장, 결장, 직장의 전반적 균총수 조사를 위한 real-time PCR을 이용한 Ct value

	Con	A	B	C	D	P value	SEM ^d
<i>L. casei</i>	28.589 ^a	26.147 ^a	23.735 ^b	24.740 ^b	25.730 ^a	0.0449	1.62
<i>L. plantarum</i>	23.139	20.850	17.691	19.115	19.430	0.0870	2.10
<i>B. subtilis</i>	21.495 ^a	20.817 ^a	16.957 ^c	17.589 ^b	20.101 ^a	0.0188	1.52
<i>E. coli</i>	33.306	30.672	28.834	30.060	30.869	0.0502	1.48
<i>S. bovis</i>	24.778	21.402	19.760	21.826	21.932	0.2140	2.34

^{a,b,c} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^d Standard error of mean

본 실험에서는 총 5종류의 미생물 균총을 real-time PCR을 이용하여 조사하였다. Real-time PCR은 민감한 fluorescent dye의 사용으로 정량이 편리해지고 exponential phase의 상황을 바로 볼 수는 있으나, 측정된 fluorescence값으로 copy number가 바로 얻어지는 것은 아니다. 이를 위해서는 여전히 standard를 써야 하나 고전적인 방법에 비해서는 훨씬 간편하다. Real-time PCR의 정량에서 가장 중요한 개념은 crossing point 혹은 Higuchi 등 (1993)이 정의한 Ct (Threshold Cycle) value 이라는 수치이다. 이 값은 probe의 reporter fluorescence 값이 base line 값을 지나는 시점의 cycle number이다. 이 값은 PCR 반응의 어느 한 요소도 limiting이 아닐 때의 값이며, target의 수에 정확히 반비례하는 값으로 target의 양을 판단할 때 가장 적합한 척도가 될 수 있다. 실제로 아주 똑같이 시행 한 PCR 결과도 그 plot은 매우 다르게 나타날 수 있으나, 이 값은 일치하게 되므로 항상 동일 sample에 대해서는 일정한 값을 얻게 되는 것이다. 따라서 본 표에 제시된 Ct value는 probe의 reporter fluorescence 값이 base line 값을 지나는 시점을 의미하므로 그 절대값이 낮을수록 sample 내 존재하는 미생물 균총의 수가 많음을 의미하게 된다.

SBP가 자돈의 미생물 균총 및 면역에 영향을 미치리라고 예상하는 이유는 다음과 같다. 항생제 대체제로서 많은 종류의 물질들이 거론되고 있는데, 그 중 하나가 “prebiotics”이다. Prebiotics의 작용 기작은 장내 유익균들이 이용하기 쉬운 섬유소를 공급하고 그것을 이용한 후 생성되는 휘발성 지방산 (VFA; volatile fatty acid)이 장관내 pH를 저하시켜 유산균의 증식 및 병원성 미생물의 감소를

촉진하여 결과적으로 유익균이 병원성 미생물과 영양적 경쟁을 벌이게 되어 미생물 균총을 조절하게 되는 것이다. 그와 더불어 특히 *E. coli*에 binding site를 제공하여 장관벽에 부착하기 보다는 소화물의 섬유소에 부착하게 하여 분으로의 배출을 유도한다(Koopman et al., 1999). 또한 장관 내 영양소 공급 및 분비물의 분비를 촉진하여 장 표면세포의 분화를 용이하게 한다 (Jin et al., 1994).

표 17은 공장 (jejunum), 맹장 (cecum), 횡행결장 (transverse colon), 직장 (rectum)에서 채취한 소화물 (chyme)에서 정량한 Ct value를 나타낸 것이다. *L. casei*의 경우 대조구에 비해 SBP를 5, 7.5 % 첨가한 처리구에거 유의적으로 많았으며 ($P<0.05$), 2.5, 10 % 첨가한 처리구도 유의적 차이는 없었으나 더 많은 경향을 보여주었다. *L. plantarum*, *S. bovis*의 경우에는 통계적으로 뚜렷한 차이가 나타나지는 않았지만 SBP를 첨가한 처리구 (특히 5, 7.5 % 첨가구)가 대조구에 비해 많이 서식하고 있던 것으로 관찰되었다. *B. subtilis*의 경우에는 5 % 첨가구에서 가장 미생물 수가 높았으며 대조구와 2.5 % 첨가구가 가장 낮았다 ($P=0.0188$). 유해균인 *E. coli* K88+의 경우 예상과 동일하게 대조구 보다 SBP 첨가구의 소화물에서 근소하게 더 많은 것처럼 보이나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

표 18. Real-time PCR을 이용한 *Lactobacillus casei*의 Ct value 및 PCR efficiency

	Con	A	B	C	D	P value	SEM ^a
Jejunum	29.607	28.005	25.091	26.899	25.616	0.4784	2.70
Cecum	27.681	27.525	23.132	22.590	25.172	0.1382	2.50
Colon	29.700	26.012	23.051	24.197	25.782	0.3494	3.86
Rectum	27.070	24.044	23.667	24.706	28.553	0.1138	2.29

^a Standard error of mean

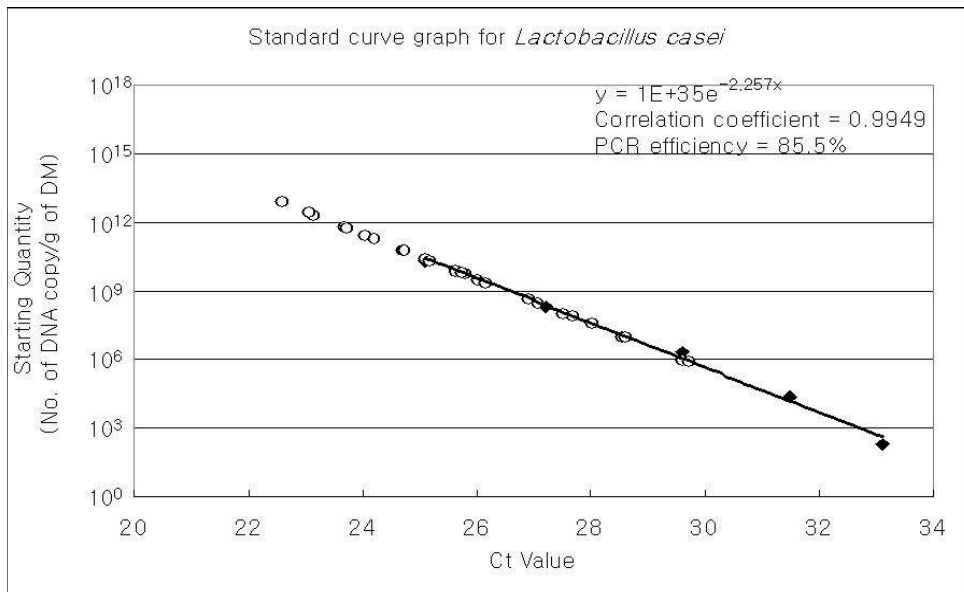


그림 18. Standard curve graph for *Lactobacillus casei*

표 19. Real-time PCR을 이용한 *Lactobacillus plantarum*의 Ct value 및 PCR efficiency

	Con	A	B	C	D	P value	SEM ^a
Jejunum	27.548	25.897	18.659	24.287	23.121	0.0594	3.17
Cecum	23.043	20.465	17.137	17.843	16.920	0.2422	3.53
Colon	23.705	18.567	17.424	16.545	16.793	0.0515	2.70
Rectum	18.260	18.470	17.544	17.784	20.090	0.6675	2.21

^a Standard error of mean

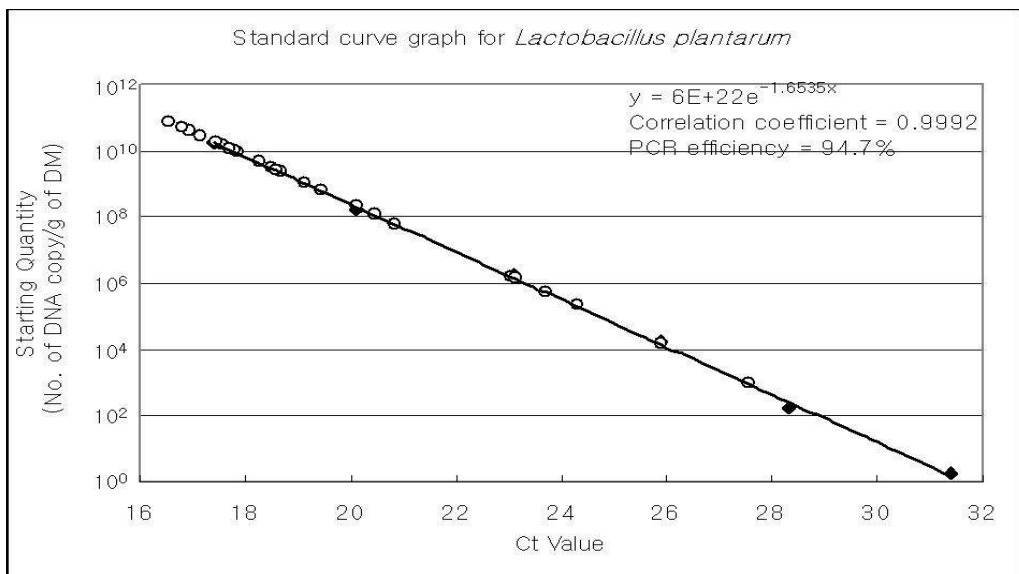


그림 19. Standard curve graph for *Lactobacillus plantarum*

표 20. Real-time PCR을 이용한 *Bacillus subtilis*의 Ct value 및 PCR efficiency

	Con	A	B	C	D	P value	SEM ^d
Jejunum	20.793 ^{ab}	22.214 ^a	16.021 ^c	17.996 ^{bc}	20.502 ^{ab}	0.0299	2.03
Cecum	20.856	21.570	17.297	17.674	19.248	0.1029	2.00
Colon	24.761 ^a	19.985 ^b	17.736 ^b	16.735 ^b	18.062 ^b	0.0267	2.57
Rectum	19.570	19.500	16.776	17.950	21.671	0.2221	2.42

^{a,b,c} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^d Standard error of mean

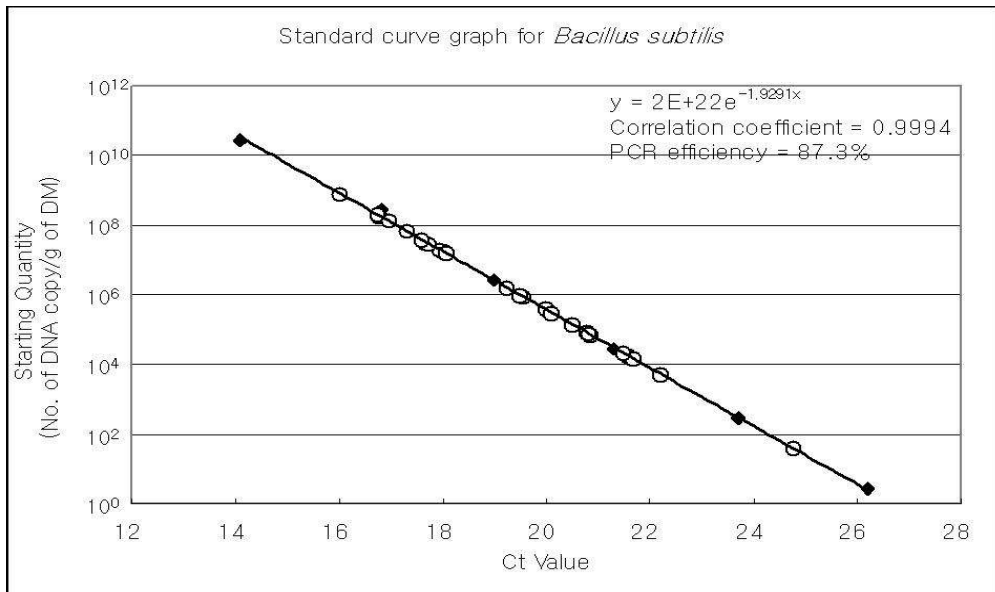


그림 20. Standard curve graph for *Bacillus subtilis*

표 21. Real-time PCR을 이용한 *Streptococcus bovis*의 Ct value 및 PCR efficiency

	Con	A	B	C	D	P value	SEM ^c
Jejunum	23.898	20.109	18.522	20.161	23.208	0.0570	2.93
Cecum	22.814	18.319	17.803	23.761	24.730	0.1290	3.02
Colon	21.483 ^a	18.537 ^b	19.079 ^b	20.568 ^b	20.403 ^b	0.0354	2.64
Rectum	23.334	27.085	26.454	22.814	21.514	0.6336	5.43

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

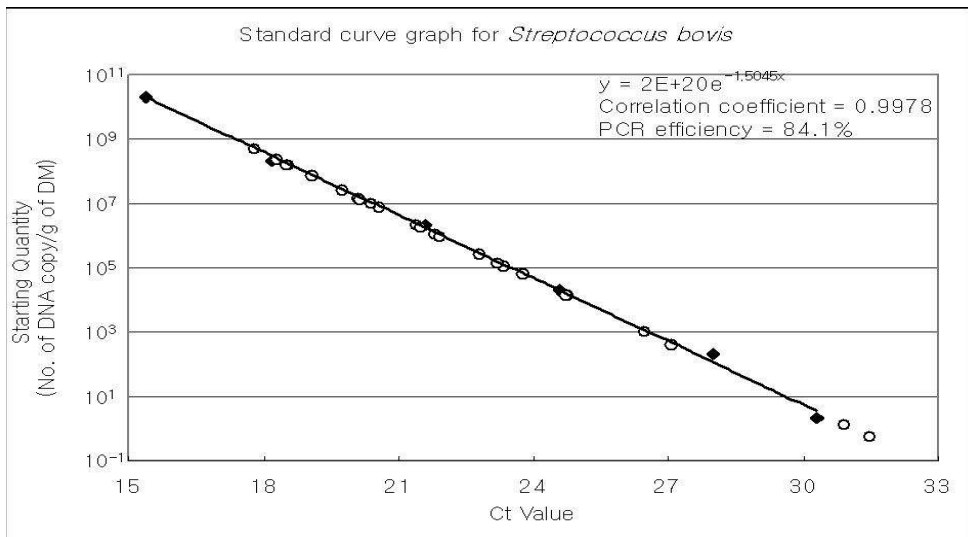


그림 21. Standard curve graph for *Streptococcus bovis*

표 22. Real-time PCR을 이용한 *Escherichia coli* K88+의 Ct value 및 PCR efficiency

	Con	A	B	C	D	P value	SEM ^c
Jejunum	33.504 ^a	29.914 ^a	26.764 ^b	30.583 ^b	31.683 ^b	0.0229	1.87
Cecum	32.980	31.585	29.648	30.538	30.483	0.5738	2.53
Colon	34.364	30.679	29.457	29.031	29.460	0.0630	2.08
Rectum	32.377	29.455	29.467	30.088	31.465	0.6749	2.58

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of the mean

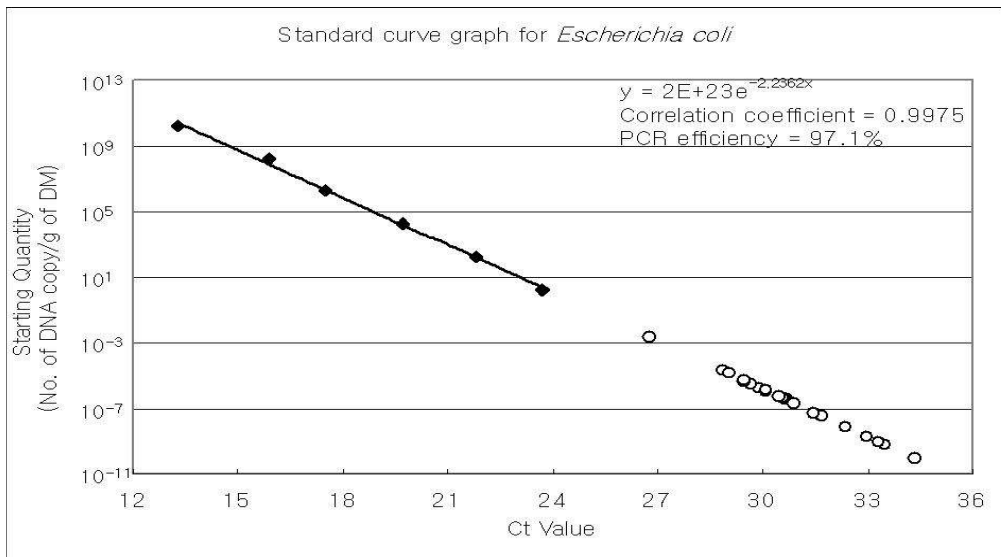


그림 22. Standard curve graph for *E.coli* K88+

Real-time의 특성상 측정된 fluorescence값 (Ct value)으로 copy number (미생물 균총수)가 바로 얻어지는 것은 아니다. 이를 위해서는 여전히 standard를 써서 회귀식을 구한 후에 계산을 해야 한다. 표 18, 19, 20, 21, 22 은 5가지 각각의 균총 (*L. casei*, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*, *E. coli* K88+)을 공장, 맹장, 횡행결장, 직장 부위에서 측정한 Ct value를 나타낸 것이며, 각 표의 아래에 있는 PCR efficiency의 회귀식에 대입하면 절대정량을 구할 수 있다. 다만 Ct value로 표기한 이유는 통계적 검증을 통해 미생물 균총의 차이를 비교하기 위해서 이다.

Bacillus subtilis, *S. bovis*의 경우 공장과 횡행결장에서 SBP를 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 높았으며 ($P < 0.05$), *E. coli* K88+의 경우 공장부위에서 SBP를 5, 7.5, 10 % 첨가한 처리구의 경우 더 많은 것으로 나타났다. 유의적 차이를 보이는 결과는 상기된 3가지 균주이지만 전반적인 경향은 유익균주 *L. casei*, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*가 대조구 보다는 SBP 첨가구에서 더욱 많았고, *E. coli*의 수 또한 첨가구에서 많은 경향을 보였다. 이러한 사실은 소화물에 fiber의 존재가 *E. coli*에 binding site를 제공하여 체외 배설을 유도한다는 기존의 연구결과를 통해 설명 가능하다 (Koopman et al., 1999). 하지만 본 실험에서 분석한 소화물에서 볼 수 있었던 이러한 차이가 *E. coli*가 소화물에 많이 부착해서 인지, 아니면 단순히 그 양이 많은 것인지를 밝히기 위해서는 새로운 하나의 실험의 구상이 필요하다. 또한 prebiotics는 속효성 효과를 보이는 것이 아니라 지속적 급여를 통해 균총을 개선해 나간다는 mechanism을 지니고 있다. 따라서 본 sample의 채취시기가 실험 사료를 급여한지 2주후의 어느 한 시점에서 이루어진 것이기 때문에 추가적인 해부를 통한 sample의 채취를 할 기회가 주어진다면 보다 많은 정보를 얻을 수 있으리라 사료된다. 본 실험에서 사용한 real-time PCR을 이용한 미생물 균총의 정량화 기술이 앞으로 장내 미생물 연구에 많은 도움이 되리라 기대한다.

제 4 절 Sugar beet pulp (SBP)가 영양소 이용율, 질소 대사에 및 면역능력에 미치는 영향

제 1 항 서 론

일반적으로 사료 내 섬유소 함량이 과다하면 섬유소의 일반적인 물리·화학적 특징에 의해서 소장 내 영양소 소화·흡수율이 감소한다. 그러나 대장 내 미생물의 활성이 증가하여 미생물에 의하여 생산된 VFA를 통하여 유지에너지의 상당부분을 보충할 수 있다. 따라서 본 실험은 사료 내 소량으로 첨가되는 섬유소가 이유 자돈에 있어서 영양소 소화율에 어떠한 영향을 미치는지 그리고 첨가 수준에 따른 영양소 소화율의 변화를 구명하고자 수행하였다.

사료 내 섬유소 첨가로 인하여 장내 미생물 군총이 변화하면 장내 면역 반응이 다르게 나타날 수 있다. 즉 유해한 미생물의 감소와 유익한 미생물의 증가로 인하여 장내 면역 조직에서 감지되는 항원이 감소하여 장내로 분비되는 항체인 IgA의 농도 또한 변화 할 것이다. 따라서 본 연구는 SBP의 첨가가 이유자돈의 면역능력에 미치는 효과를 조사하기 위하여 혈중 IgA 및 IgG 농도를 구명하기 위하여 수행하였다.

제 2 항 실험 방법 및 재료

가. 소화율 실험

소화율 실험을 위하여 42 ± 3 일령의 평균체중 9.11 ± 0.87 kg의 삼원교잡종 ([Landrace \times Large White Yorkshire] \times Duroc) 이유자돈 수컷 15두를 공시하여 5처리 3반복에 완전임의배치법 (completely random design; CRD)으로 개체별로 대사틀에 배치하였다. 오전 8시, 오후 8시에, 즉 하루에 두 번으로 나누어 매일 총 260g의 처리별 실험 사료를 급여하였다. 4일간의 적응기간 (adaptation period) 후에 5일 동안 분 과 뇨를 채취한다. 분은 매일 채취하며, 채취된 분은 냉동 보관 한 후 60°C에서 72시간 건조 한 후 Wiley mill을 이용하여 직경 분쇄 한 후 영양소 분석을 실시했다. 뇨는 1.25N HCl 25 ml를 미리 부어 놓은 플라스틱 통으로 매일 채취하였다. Glass wool을 통하여 이물질이 걸러진 후 수거된 뇨는 매일 부피를 측정하여 뇨 수거통에 옮긴 후 즉시 냉동 보관하였다. Sampling 기간이 끝나면 냉동 보관되었던 뇨를 녹여 잘 섞은 후 일정량을 채취 한 후 질소 분석을 실시하였다.

나. 면역 실험

면역실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유했던 평균체중 5.12 ± 0.26 kg 이유했던 20두를 공시하여 처리당 4두씩을 난괴법에 의해 배치하여 처리 사료를 급여했다. 2 주일 후에 모든 자돈에게서 혈액을 채취 한 후 Lipolysaccharide (LPS; 면역반응 유도)를 복강에 주입하였다 (평균체중 6.27 ± 0.99 kg). 주입 후 2, 4, 8, 12, 24 시간에 혈액을 채취하여 체온을 조사하고, ELISA 방법을 통하여 혈중 immunoglobulin A (IgA) 및 immunoglobulin G (IgG) 함량을 분석하였다.

다. 화학 분석 및 통계 분석 방법

실험사료 및 분뇨의 일반성분 (조수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유) 분석은 AOAC (1995)의 방법에 따라 실시하였다. 사료 및 분 내 acid detergent fiber 및 neutral detergent fiber의 분석은 ANKOM technology method를 이용하였다 (ANKOM 220 fiber analyzer, USA). 사료 및 분뇨의 칼슘과 인은 회화한 후 전처리 과정을 거쳐 AAS (atomic absorption spectrophotometer) (Shimadzu, AA-6401, Japan)를 이용하여 측정하였다. 통계분석은 SAS (SAS Institute, 2004)의 일반선형모형 (general linear model; GLM)을 이용하여 수집된 자료에 대한 유의성 검정을 실시하였으며, 최소 유의차 (LSD) 요인분석법에 의해 처리한 결과를 비교하였다.

제 3 항. 연구 결과 및 고찰

가. 영양소 소화율 (nutrient digestibility)

본 실험에 있어서 건물 (dry matter), 조단백질 (crude protein), 조지방 (crude fat), 조회분 (curde ash), 칼슘 (Ca), 인 (p)의 소화율에 있어 모든 처리에 있어 어떠한 유의적인 차이도 발견되지 않았다 (표 8 참조). 다만 조섬유 (crude fiber)에 있어서는 차이가 있었는데, 대조군 (CON)의 조섬유 소화율이 가장 높았고, B (SBP 5 % 첨가)처리구가 가장 낮았으며, 나머지 A, C, D 처리간에는 차이가 없었다. Rijnen 등 (2001)의 연구결과에 따르면 모든 사료 내 sugar beet pulp를 0, 10, 20, 30 % 첨가함에 따라 비전분성다당류의 소화율이 각각 70.6, 74.3, 78.4, 80.6 %였다 (Scipioni 등, 2001). 본 실험에서는 비전분성다당류의 분석이 이루어지지 않아 그 소화율은 알 수 없지만, 대조구에 비해

sugar beet pulp가 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 %씩 첨가됨에 따라 조섬유의 함량이 유의적으로 증가 하였고, 따라서 단위동물인 돼지의 소화효소가 분해하지 못하는 섬유소 성분의 비율이 높아졌기 때문에 이러한 결과를 보였으리라 사료된다. 반면 NDF (neutral detergent fiber)의 경우 SBP를 7.5, 10.0 % 첨가한 처리구에서 소화율이 가장 높았으며, 2.5, 5 % 첨가구가 뒤를 이었고, 대조군이 가장 낮아 조섬유 소화율과는 상반된 결과를 보여주었다 ($P < 0.0001$). ADF (acid detergent fiber)의 경우 B, D 처리구가 다른 처리구에 비해 소화율이 높았으며, NDF 소화율이 가장 높았던 C의 경우 B, D 처리구 및 A 처리구와 유의적인 차이는 보이지 않았다. C 처리구의 뒤를 이어 A 처리구, 대조구 순으로 소화율이 낮았다 ($P < 0.001$) (표 23).

일반적으로 탄수화물을 분류하는 방법에는 크게 두 가지가 있다. 일반적으로 조섬유는 수분과 지방을 제거한 다음 약산 (황산 1.2%)과 약알칼리 (가성소다 1.25%)에서 각각 30분씩 끓인 다음 여과해서 회분을 제외하여 구하는 Weende의 방법을 따른 것이다. 하지만 Weende의 분류법에는 가용 무질소물과 조섬유의 성상을 판단하는데 큰 오차를 보일 수 있기 때문에 이를 보완하여 van Soest 방법이 제시되었다. 본 실험에서는 조섬유 외에 NDF와 ADF를 구하였는데, NDF는 중성세제에 용해되지 않는 부분으로서 세포막성분을 가리키며, cellulose, hemicellulose, lignin, 그리고 silica 등을 함유하게 된다. 이 중 cellulose와 hemicellulose는 섬유소 원료의 목질화 (lignification)에 따라 그 소화율이 좌우되고, lignin과 silica는 소화가 전혀 되지 않는 부분이다. ADF는 NDF 부분 중에서 산성세제에 용해되지 않는 섬유질을 말하는 것으로 cellulose, lignin, acid detergent insoluble nitrogen (ADIN), acid insoluble ash, 그리고 silica 등이 포함된다. ADF와 NDF의 차이점은 NDF에는 대분분의 hemicellulose와 ADF에 들어있는 소량의 단백질 (ADIN)을 제외한 중성세제에 불용인 모든 단백질이 포함되어 있다는 점이다. 본 실험의 경우 NDF 및 ADF의 소화율이 SBP를 많이 첨가할 수록 높아지는 경향을 보였는데, 이는 자돈의 장내 미생물이 cellulose, hemicellulose 등의 섬유질을 잘 이용하였고, 이러한 섬유질을 이용하여 휘발성 지방산 및 아미노산과 같은 영양소 생성에 효율적으로 이용하고 있음을 보여주는 것이라 사료된다. Varel 등 (1984)에 의하면 단위동물인 돼지의 장내에도 *Fibrovacter succinogenes*나 *Ruminococcus flavofaciens* 와 같은 섬유소 분해 미생물 (cellulolytic bacteria)가 서식하며, 섬유소의 이용율이 좋거나 비전분성 다당류의 함량이 많은 경우 (예-SBP) 그 활력이 증가하고 휘발성 지방산의 생성량도 증가한다고 하였다. 과도하고 부적절한 섬유소의 급여는 영양소 소화율을 감소시키고, 소화기관에 무리를 줄 수 있다. 하지만, 적정 수준의 소화가 잘되는 섬유소의 급여는 생체의 영양소 이용에는 부의 영향을 주지 않으며 영양적 보상

및 prebiotics의 기작을 통해 유익할 수 있다는 기존의 주장과 일치하는 결과이다.

표 23. 사료 내 SBP의 수준별 첨가가 자돈의 소화율에 미치는 영향^d

Item	Control	A	B	C	D	SEM ^e
Dry matter ^f	91.31	91.20	90.85	91.29	90.54	0.21
Crude protein ^f	87.37	86.92	87.06	88.86	87.14	0.46
Crude fat ^f	82.09	80.18	79.48	81.10	79.40	1.52
Crude ash ^f	68.53	58.48	62.76	63.62	63.12	0.82
Crude fiber	84.63 ^a	80.92 ^b	76.47 ^c	81.63 ^b	79.38 ^b	0.79
NDF ^g	77.94 ^c	86.93 ^b	87.91 ^b	93.55 ^a	93.17 ^a	1.54
ADF ^h	67.37 ^c	74.06 ^b	79.42 ^a	78.48 ^{ab}	80.78 ^a	1.45
Ca ^f	40.26	36.37	60.06	38.57	48.11	3.50
P ^f	45.57	47.97	70.32	53.01	64.12	3.57

^{a,b,c} Mean within rows with different superscripts differ, $P < 0.01$

^d Fifteen pigs were used from an average initial BW of 9.11 ± 0.87 kg to an average final BW of 9.63 ± 0.79 kg.

^e Standard error of mean.

^f Not significantly different ($P > 0.80$).

^g Neutral detergent fiber; ^h Acid detergent fiber

나. 질소 축적율 (nitrogen retention)

질소 축적율에 있어 모든 처리구 간에 어떠한 뚜렷한 효과도 관찰되지 않았다. 다만 대조군 (CON)과 sugar beet pulp를 7.5, 10 %첨가한 C, D 처리구에서 뇨로 손실되는 질소의 양이 적은 경향이 있었고, 이러한 경향이 결과적으로 질소 축적량에 영향을 미쳐 상기된 세 처리구의 질소 축적율이 A, B 처리구보다 높은 경향을 띠었지만 여기에는 통계적인 차이는 없었다(표 24).

표 24. 사료 내 sugar beet pulp의 수준별 첨가가 자돈의 질소 축적에 미치는 영향 (g/day)^{ac}

Item	Control	A	B	C	D	SEM ^b
N intake	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	—
Fecal N	1.02	1.05	1.09	0.94	1.05	0.06
Urinary N	1.67	1.94	1.92	1.53	1.18	0.13
N retention ^d	4.38	4.08	4.06	4.61	4.84	0.17

^a Fifteen pigs were used from an average initial BW of 9.11 ± 0.87 kg to an average final BW of 9.63 ± 0.79 kg.

^b Standard error of mean.

^c Not significantly different ($P > 0.25$).

^d N retention = N intake (g) - Fecal N (g) - Urinary N (g)

다. 면역반응 (Immune response)

각 처리별로 2주간 실험사료를 급여한 자돈 20두를 12시간 절식 시킨 후 혈액을 채취하고 Lipolysaccharide (LPS; 면역반응 유도; $75\mu\text{g}/\text{kg}$ -체중)를 복강에 주입하였다 (평균체중 6.27 ± 0.99 kg). 주입 후 2, 4, 8, 12, 24 시간에 혈액을 채취고 동시에 체온을 측정하였다. 그림 221 은 LPS 주입 후 24시간동안의 체온의 변화를 나타내고 있다. 분석 결과 면역반응 유도제인 LPS가 복강 내 주입되어 구토, 무기력 등의 증상이 나타났으나 체온에 있어 처리구에 따른 어떠한 유의적인 차이도 발견되지 않았다. LPS를 복강 내로 주입하였을 때 가장 critical time 인 2시간과 4시간 이후의 LPS 주입에 대한 IgA와 IgG의 수준에 대해 측정하였다. IgA와 IgG의 수준은 LPS를 주입하였을 때 시간이 지나면서 감소하는 경향을 보였다. 그림 23, 24 에는 IgA, IgG 수준의 변화가 나타나 있으며, Sugar beet pulp의 첨가는 serum Ig A, Ig G의 농도 변화에 처리간 차이를 보이지 않았다. secretory Ig A와 Ig G를 포함한 IgA 및 IgG는 장관 내 병원성 미생물에 영향을 미친다. 그러므로 serum IgA 및 IgG의 농도 측정은 장관내 병원성 미생물의 성장을 반영한다(Oh, 2004). 본 실험의 결과에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 대조구에 비해 모든 산제 첨가구에서 IgA 및 IgG의 농도가 높게 나타났다. LPS 주입 전인 0시간의 IgA와 IgG의 농도는 다른 시간대에 비해 높게 나타났으며, 시간이 지나면서 감소하였지만 sugar beet pulp 첨가구에서는 Ig A와 IgG의 농도의 감소 정도가 낮았다. LPS 주입 등에 의한 염증성 면역 반응 유도시 염증성 사이토카인은 증가하지만, IgA 및 IgG의 농도는 감소한다. sugar beet pulp를 10% 첨가한 처리구 D에서 IgG의 농도가 가장 적게 감소하였으며, 2시간 및 4시간에서 가장 많은 serum IgG 을 가지고 있어, 면역적 반응에 가장 저항성이 높고, 면역능력이 가장 높은 것으로 나타났다.

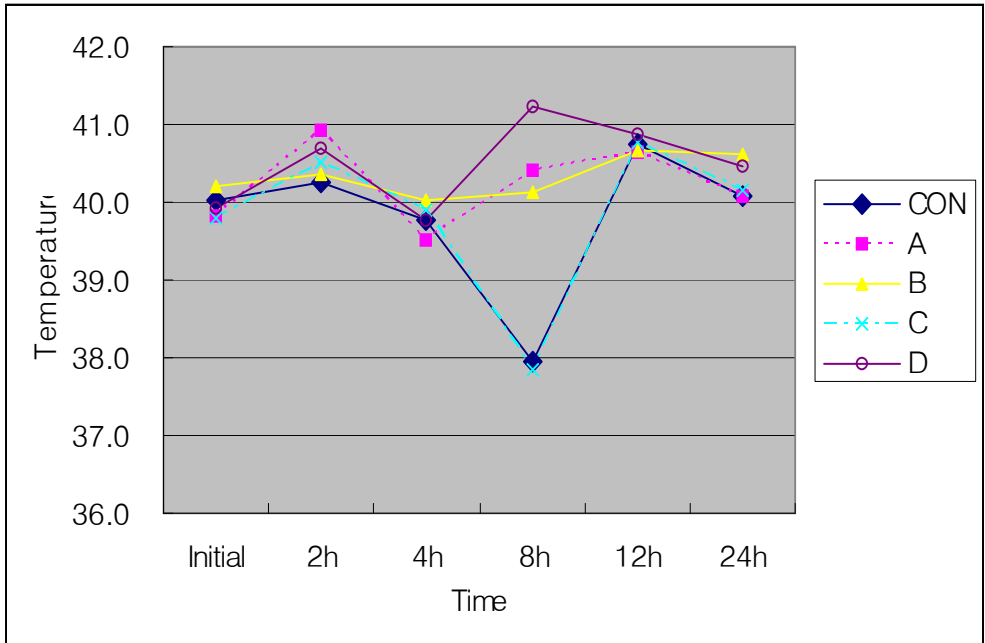


그림 23. Sugar beet pulp를 수준별 급여한 자돈에게 LPS를 복강주입 하였을 때 체온의 변화

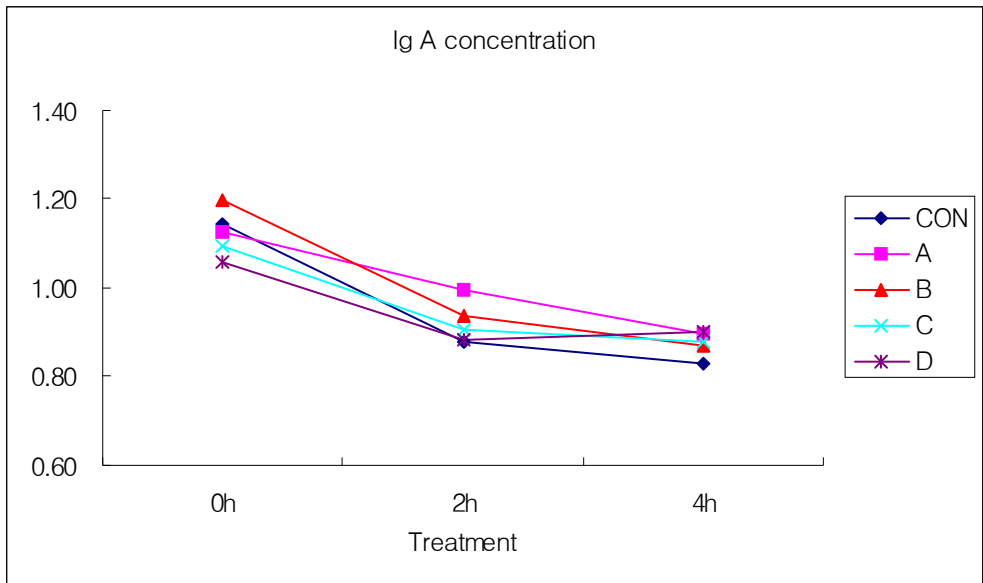


그림 24. Sugar beet pulp를 수준별 급여한 자돈에게 LPS를 복강주입 하였을 때 Ig A의 변화

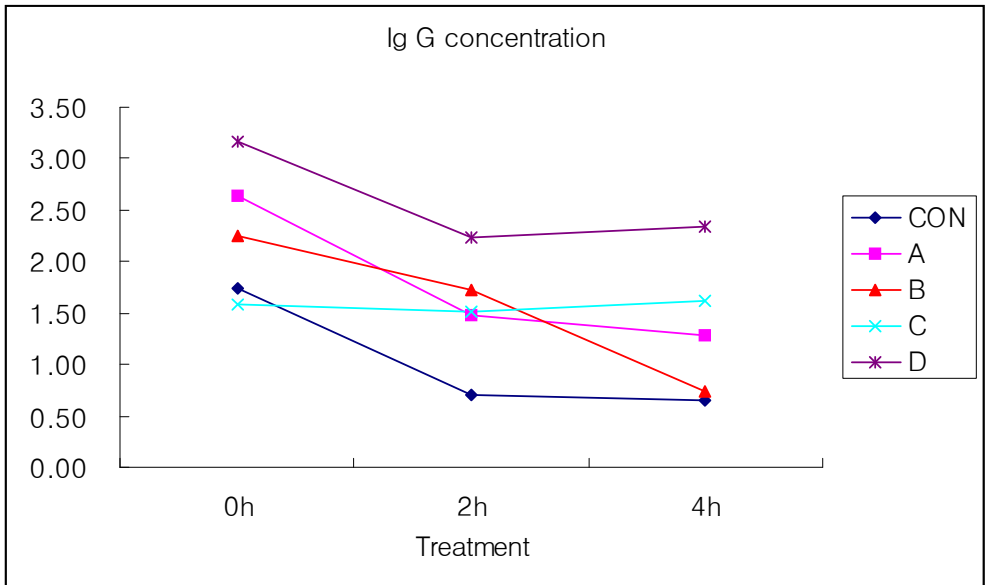


그림 25. Sugar beet pulp를 수준별 급여한 자돈에게 LPS를 복강주입 하였을 때 Ig G의 변화

제 5 절 무기산제가 이유자돈의 성장, 혈중유리아 태 질소, 설사발생 빈도 및 장내 미생물 균총에 미치는 영향

제 1 항 서 론

양돈 농가에서는 1990년대 후반, 미국에서 시작된 격리 조기 이유 및 조기 이유를 모든의 생산성을 향상시킨다는 미명 아래 무분별하게 도입하여 자돈의 이유일령을 앞당겼다. 하지만 이유일령이 너무 앞당겨져 자돈은 보다 많은 이유 스트레스에 시달리게 되었으며, 결과적으로 성장 지체 및 설사 등의 이유 증후군을 야기하게 되었다(Barnett 등, 1989). 이러한 현상이 나타나는 이유는 이유 시점의 자돈에게서 충분한 양의 염산이 분비되지 않아 위내 pH가 높고, 사료와 함께 외부로부터 유입된 유해미생물들의 증식(Cranwell 등, 1976)과 소화관 내 용모의 탈락 결과로 발생하는 것이다(Nabuurs 등, 1993). 이 같은 결과로 이유자돈에서는 빈번한 설사와 탈수현상이 자주 관찰되며 심한 경우는 높은 폐사율을 나타낼 뿐만 아니라 음의 성장 및 많은 위축돈의 발생으로 양축농가에게 큰 피해를 주고 있다. 현재 전 세계적으로 돼지의 성장 촉진 및 설사 예방을 목적으로 항생제가 많이 사용되고 있으나, 항생제 내성 및 항생제 저항성 미생물의 출현 등으로 가축 사료에 있어서 점차 규제되고 있는 상황이다. 이에 따라 항생제를 대체할 수 있는 물질의 탐색 및 검증이 신중하게 이루어지고 있다. 특히 생균제, 천연 추출물, 효소제, prebiotics 등 다양한 사료 첨가제가 항생제 대체용으로 연구가 이루어지고 있다. 특히 여러가지 항생제 대체제 중에서 자돈의 위내 pH를 인위적으로 낮출 수 있는 산제의 사용은 자돈의 성장률을 향상시키고, 이유 후 설사 빈도를 감소시키는 효과를 갖는 것이 증명되고 있으며, 유기산을 중심으로 유·무기산제에 대한 항생제 대체 효과에 대한 연구가 활발하다.(Risley 등, 1991; Mahan 등, 1999; Roth 등, 1998), 유기산을 중심으로 하는 산제들이 많이 개발되어 사용되고 있는 실정이다. 따라서 산제는 항생제 대체제로서 각광을 받고 있는 대안으로서, 그 종류에는 유기산제와 무기산제가 있다. 연구는 유기산제를 중심으로 다양하게 이루어지고 있지만 무기산제는 산의 강도와 가격 면에서 유기산제보다 더욱 우수하기 때문에 현재 이에 대한 검증 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 최근 본 연구실에서는 무기산을 새로운 부형제에 부착을 시킨 새로운 무기산제를 개발하였다. 새로이 개발된 무기산제를 통하여 자돈의 위내 pH 및 이에 따른 장내 유익한 미생물 균총의 확립을 기존의 유기산제 보다

더욱 효과적으로 개선시킬 수 있으리라 사료된다.

또한 이유자돈 사료에 새로 개발된 무기산제의 첨가가 장내 유익한 미생물 균총의 수를 증가시키고 유해한 미생물 균총의 수를 감소시키는 효과를 1년차 과제에서 개발된 분자생물학적 기법을 이용한 미생물수 측정을 통하여 정확히 구명하고 이에 따른 숙주동물의 건강증진 효과를 조사함과 동시에 정확한 산제의 첨가 수준을 확립하고자 한다.

가. 무기산제

현재 양돈 산업에서 많이 이용 되고 있는 것은 유기산제를 이용한 산제이다. 그러나 유기산제는 동물 사료로써 경제성이 떨어진다. 무기산제는 유기산제와 비교했을 때 가격 면에서 훨씬 경쟁력을 가질 수 있다. 가격은 싸면서 유기산제와 효과 면에서는 차이가 없다면 가격이 저렴한 것을 사용하여야 할 것이다. 이러한 이유로 많은 연구자들이 무기산제를 연구가 진행되고 있으며, 무기산제로는 염산(HCl)과 인산(phosphoric acid)을 들 수 있는데 HCl이 많이 연구되고 있다. HCl은 앞에서 보았듯이 pepsinogen을 pepsin으로 활성화 시키면서 위내 pH를 낮은 상태로 유지시켜주는 중요한 역할을 하는 물질이다. 하지만 HCl을 직접 급여했을 때, 위나 소장엔 손상을 줄 수 있다는 문제점도 가지고 있다.

표 25. 산제의 수준별 첨가에 따른 수용액의 pH 변화

Acidifier	Level of acidifier (in DW)	
	0.5%	1.0%
Acetic acid	2.87	2.83
Butyric acid	3.00	2.96
Propionic acid	2.98	2.93
Fumaric acid	2.41	2.26
Formic acid	2.38	2.21
Lactic acid	2.52	2.39
HCl	1.39	1.27

(Kim, 2002)

본 실험에서 사용된 무기산제는 본 실험실에서 개발한 방법(특허번호 : 10-2002-0014580 ; 등록일자 : 02.03.18. ;무기산제와 규산염광물질을 함유한 자돈사료첨가용 혼합조성물의 제조방법, 상기 혼합조성물 및 사료)으로 본 실험실에서 제조하여 사용하였으며, 흰색의 특 쏘는 향을 지는 고운 가루 형태이다 (표 25).

제 2 항 실험 방법 및 재료

가. 실험 동물

사양실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유했던 평균체중 7.57 ± 0.02 kg의 삼원 교잡종 ([Landrace × Large White Yorkshire] × Duroc) 이우자돈 80두를 공시하여 4처리 5반복에 체중과 성별을 고려하여 난괴법 (randomized completely block design)으로 돈방당 4두씩 배치하였다. 처리구는 다음과 같다 : 1) 항생제 처리구 (Positive Control; Basal diet+Avliamycin 0.12%), 2) HCl 0.1% 처리구 (Basal diet에 HCl함량이 0.1%가 되도록 무기산제 0.95% 첨가), 3) HCl 0.2% 처리구 (Basal diet에 HCl함량이 0.2%가 되도록 무기산제 1.90% 첨가), 4) HCl 0.3% 처리구 (Basal diet에 HCl함량이 0.3%가 되도록 제 2.85% 첨가). 대조구의 항생제 및 무기산제의 첨가수준에 따른 첨가제를 제외한 다른 모든 영

양소의 함량은 처리별로 차이 없게 하였으며, NRC 사양표준 (1998)에 따라 충족시켰다. 실험은 총 5주간 이루어졌으며, 경기도 수원시 권선구 서둔동 탑동에 위치한 서울대학교 부속실험목장의 자돈사에서 수행되었다.

나. 실험 사료

총 3가지의 사료가 배합되어 단계별 자돈사양 프로그램에 따라 급여되었다. 총 35일간의 자돈기 실험 기간 동안 급여한 실험사료 (Basal diet)의 열량가는 약 3,266 ME kcal/kg 였다. Phase I (0 - 7일), Phase II (7 - 21일), 그리고 Phase III (21 - 35일)의 단계별 사료들의 조단백질 함량은 각각 23, 21, 21 % 였다. 조섬유를 제외한 다른 모든 영양소 함량은 NRC 사양표준 (1998)과 같거나 많았다. 항생제 대체제로서 첨가한 무기산제는 본 실험실에서 개발한 방법(특허번호 : 10-2002-0014580 ; 등록일자 : 02.03.18. ;무기산제와 규산염광물질을 함유한 자돈사료첨가용 혼합조성물의 제조방법, 상기 혼합조성물 및 사료)으로 본 실험실에서 제조하여 첨가하였으며, 처리별로 무기산제의 첨가 수준이 높아짐에 따라 옥수수(Corn), 대두유 (Soy-oil)을 조절하여 각 처리별 주요 영양소 함량의 차이가 없게 하였다. 각 단계별 실험사료 배합 성분을 표 26, 27, 28에 나타내었다.

표 26. 실험사료(Phase I)

Item	P-Con	HCl (0.1%)	HCl (0.2%)	HCl (0.3%)
Ingredient				
Corn	35.24	33.61	31.74	29.87
SBM-44	24.68	24.68	24.68	24.68
Soy protein con. ¹	13.48	13.48	13.48	13.48
DSM ²	2.92	2.92	2.92	2.92
Lactose	20.17	20.17	20.17	20.17
Soy Oil	0.50	1.30	2.22	3.14
MCP	1.19	1.19	1.19	1.19
Limestone	1.11	1.11	1.11	1.11
DL-Met	0.07	0.07	0.07	0.07
Vit. Mix ³	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix ⁴	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin ⁵	0.12	-	-	-
Acidifier HCl (0.1%)	-	0.95	1.90	2.85
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ⁶				
ME(kcal/kg)	3266.84	3266.72	3266.73	3266.74
CP(%)	23.41	23.28	23.14	23.00
Lys (%)	1.41	1.40	1.40	1.40
Met (%)	0.45	0.44	0.44	0.44
Ca (%)	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P (%)	0.66	0.66	0.65	0.65

¹ Soy protein concentrate

² Dried Skim Milk

³ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64 g; riboflavin, 3.2 mg; calcium pantothenic acid, 8 mg; niacin, 16 mg; vitamin B12, 12 g; vitamin K, 2.4 mg.

⁴ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1 mg; I, 0.3 mg; Mn, 24.8 mg; Cu-SO₄, 54.1 mg; Fe, 127.3 mg; Zn, 84.7 mg; Co, 0.3 mg.

⁵ 2% Avlimycin

⁶ Calculated value

표 27. 실험사료(Phase II)

Item	P-Con	HCl (0.1%)	HCl (0.2%)	HCl (0.3%)
Ingredient				
Corn	45.57	43.94	42.07	40.20
SBM-44	28.31	28.31	28.31	28.31
Soy protein con. ¹	8.17	8.17	8.17	8.17
Lactose	14.16	14.16	14.16	14.16
Soy Oil	0.79	1.59	2.51	3.43
MCP	1.22	1.22	1.22	1.22
Limestone	1.10	1.10	1.10	1.10
DL-Met	0.04	0.04	0.04	0.04
Vit. Mix ²	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix ³	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin ⁴	0.12	—	—	—
Acidifier HCl (0.1%)	—	0.95	1.90	2.85
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ⁵				
ME(kcal/kg)	3268.58	3268.46	3268.47	3268.48
CP(%)	21.40	21.28	21.14	20.99
Lys (%)	1.24	1.23	1.23	1.22
Met (%)	0.37	0.37	0.37	0.37
Ca (%)	0.75	0.75	0.75	0.75
Total P (%)	0.64	0.64	0.63	0.63

¹ Soy protein concentrate

² Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64 g; riboflavin, 3.2 mg; calcium pantothenic acid, 8 mg; niacin, 16 mg; vitamin B12, 12 g; vitamin K, 2.4 mg.

³ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1 mg; I, 0.3 mg; Mn, 24.8 mg; Cu-SO₄, 54.1 mg; Fe, 127.3 mg; Zn, 84.7 mg; Co, 0.3 mg.

⁴ 2% Avilamycin

⁵ Calculated value

표 28. 실험사료(Phase III)

Item	P-Con	HCl (0.1%)	HCl (0.2%)	HCl (0.3%)
Ingredient				
Corn	49.49	48.66	47.71	46.76
SBM-44	38.70	38.70	38.70	38.70
Lactose	6.00	6.00	6.00	6.00
Soy Oil	3.11	3.11	3.11	3.11
MCP	1.00	1.00	1.00	1.00
Limestone	1.06	1.06	1.06	1.06
Vit. Mix ²	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix ³	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl	0.10	0.10	0.10	0.10
Avilamycin ⁴	0.12	-	-	-
Acidifier (0.1%)	HCl	-	0.95	1.90
		0.95	1.90	2.85
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ⁵				
ME(kcal/kg)	3357.08	3329.14	3297.17	3265.19
CP(%)	21.11	21.05	20.97	20.90
Lys (%)	1.19	1.19	1.19	1.18
Met (%)	0.32	0.32	0.32	0.31
Ca (%)	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P (%)	0.60	0.60	0.60	0.60

¹ Soy protein concentrate

² Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64 g; riboflavin, 3.2 mg; calcium pantothenic acid, 8 mg; niacin, 16 mg; vitamin B12, 12 g; vitamin K, 2.4 mg.

³ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1 mg; I, 0.3 mg; Mn, 24.8 mg; Cu-SO₄, 54.1 mg; Fe, 127.3 mg; Zn, 84.7 mg; Co, 0.3 mg.

⁴ 2% Avilamycin

⁵ Calculated value

다. 사육 환경 및 혈액 채취

모든 실험돈은 돈방 당 4두씩 배치되었으며, 돈방은 반 콘크리트-슬롯 바닥 ($0.90 \times 2.15 \text{ m}^2$) 구조로 각각 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어 있어 실험기간 동안 물과 사료를 자유 채식토록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30°C 를 유지하였으며, 매주 1°C 씩 낮추어 마지막 5주째에는 26°C 가 되게 하였다. 체중과 사료섭취량을 매주 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일당사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 구하였다.

혈액은 매주 각 돈방에서 임의로 2두씩을 선택하여 경정맥에서 채취하여 BUN (blood urea nitrogen)을 분석하였다. 혈액은 일회용 유리관에 포집하여 $3,000 \text{ rpm}$, 4°C 상태로 15분 동안 원심분리하였다. 그 후 플라스틱 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석시까지 -20°C 에 보관하였다. BUN은 혈액분석기를 이용하여 분석하였다 (Ciba-Corning model, Express Plus, Ciba Corning Diagnostics Co.).

라. 해부 실험(Anatomy trial)

해부실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유향 평균체중 $7.57 \pm 0.02 \text{ kg}$ 의 삼원교잡종 ([Landrace \times Large White Yorkshire] \times Duroc) 이유향자돈 20두를 공시하여 처리당 4두씩 총 35일간 실험사료를 처리별로 급여한 후 그중 3두씩을 선발하여 해부를 실시하였다 (평균체중 $15.69 \pm 0.16 \text{ kg}$). 선발된 실험돈은 하루 전에 각 개체별로 대사틀에 배치되었고, 12시간 절식 후 해부전 3시간에 동일량의 사료와 물을 채식토록 하였다. 도살 후 소장(small intestine), 대장(Large intestine), 직장(rectum)을 분리하였다. 소장의 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ilium) 부위를 2cm 길이로 채취한 후 10% neutral buffered formalin에 고정하였다가 alcohol과 xylene step과정을 거쳐 탈수 하여 hematoxylin과 eosin(HE)-stained section ($4\mu\text{m}$)으로 만들어 융모(villi) 및 융와(crypt)를 관찰하여 형태학적 특징(morphology)을 조사하였다. Real-Time PCR을 이용한 장내 미생물 군총 조사 및 장내 미생물로 인한 VFA 발생량을 알아보기 위해 회장(ileum), 맹장(cecum), 횡행결장(transverse colon), 직장(rectum)에서 소화물을 채취하여 -80°C 상태로 보관하였다.

마. 설사빈도(Diarrhea Score)

설사 빈도나 정도를 조사하는 방법은 다양하게 존재하나 가장 널리 쓰이는 방법은 분의 색깔, 연도 (수분함량), 실험돈의 상태를 3단계 혹은 5단계로 구분하여 점수를 부여하여 판단하게 되는데 이는 자칫 개인의 의도가 반영되거나 객관적이지 못할 수 있는 위험이 있다.

따라서 설사빈도 측정을 위하여, 실험개시 후 매일 오전·오후 8시에 사양실험돈을 대상으로 실시하였으며, 각 돈방별로 4두의 자돈들을 대상으로 항문 주위의 수양성 설사 흔적을 가진 개체 수를 파악하여 설사빈도를 측정하였다. 수양성 설사 흔적이 없는 돈방의 설사빈도(Diarrhea Score)를 0으로 측정하였으며, 모든 개체의 항문 주위가 수양성 설사 흔적을 보였을 때의 설사빈도를 4로 하여, 실험기간 35일 동안 측정하였으며, 전체적인 경향 파악을 위하여, 각 실험 단계별 (Phase I - II - III)로 나누어 통계 분석을 하였다.

바. 화학 분석 및 통계 분석 방법

실험사료의 일반성분 (조수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유) 분석은 AOAC (1995)의 방법에 따라 실시하였다. 사료의 칼슘과 인은 회화한 후 전처리 과정을 거쳐 AAS (atomic absorption spectrophotometer) (Shimadzu, AA-6401, Japan)를 이용하여 측정하였다. 통계분석은 SAS (SAS Institute, 2004)의 일반선형모형 (general linear model; GLM)을 이용하여 수집된 자료에 대한 유의성 검정을 실시하였으며, 최소 유의차 (LSD) 요인분석법에 의해 처리한 결과를 비교하였다.

제 3 항 연구 결과 및 고찰

가. 성장성적(Growth Performance)

사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향을 표 29 에 정리하여 나타내었다. 실험 전 기간(5 주) 동안 사료 내 무기산제를 첨가한 처리구의 체중 (body weight), 일당증체량 (ADG), 사료효율 (G/F ration)이 증가하였다 ($P < 0.05$). 체중은 실험 개시 후 3주째부터 체중 및 일당증체량에 있어 무기산제 첨가 여부 및 그 첨가 수준에 따라 차이가 있었다. 0.1 % 이상의 HCl 첨가구(HCl 0.1%, HCl 0.2%, HCl 0.3%)의 체중은 실험 종료 시까지 항생제 첨가 대조군에 비해 낮았으나, 유의적인 차이가 없이 비슷한 효과를 나타내었으며,

그 중 HCl 0.1% 첨가구의 체중이 다른 처리구에 비해서 높은 경향을 보였다($P < 0.05$). HCl 0.1%의 처리구는 HCl 0.2% 처리구와 HCl 0.3% 처리구보다 높으며, 유의적으로 항생제 처리구 비슷한 효과를 나타내었다. 일당증체량(ADG)는 사양 기간 0-3주 동안에 항생제 처리구가 무기산제를 첨가한 다른 처리구에 비해서 유의적으로 높은 경향을 보였다($P < 0.05$) 하지만 3-5주 동안에는 HCl 0.1% 처리구 및 HCl 0.3% 처리구가 항생제 처리구보다는 낮지만, 유의적으로 항생제와 비슷한 효과를 나타내었으며, HCl 0.2% 처리구는 일당증체량에서 다른 처리구와 유의적인 차이를 나타내었다. 전체적으로 5주의 자돈 사양기간 동안의 일당증체량은 HCl 0.1% 처리구가 항생제 처리구와 유의적으로 같은 효과를 나타내었으며, HCl 0.2% 및 HCl 0.3% 처리구가 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). 특히 산제는 이유 자돈에 있어서 이유 초기 단계에서 성장성적의 개선에 효과를 보인다(Mahan 등, 1999). 본 실험에서도 phase I(0-3주)에 있어서 무기산제 처리구가 항생제 처리구의 성장성적에 비해 유의적으로 낮지 않은 경향을 보였으며, 이는 Mahan 등(1999)의 결과와 일치한다. 일당사료섭취량 (ADFI)의 경우, 0-3주 동안에 유의적인 차이를 보였는데, 항생제 처리구가 가장 높았으며, 무기산제의 처리구와 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). 이 기간 동안, 항생제 처리구 다음으로 HCl 0.1% 처리구의 일당사료섭취량(ADFI)가 가장 높았으며, 다음으로 HCl 0.3% 처리구, HCl 0.2% 처리구 순이었다($P < 0.05$). 사료효율(Gain : Feed Ration)의 경우, 전 실험 기간 동안 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, 항생제 처리구가 다른 처리구에 비해서 높은 경향을 계속 유지하였으며, HCl 0.1% 처리구가 항생제 처리구와 낮지만 비슷한 효율을 보이며 다른 무기산제 처리구 중에서 가장 높은 경향을 유지하였으며, HCl 0.2% 처리구가 사료효율(Gain : Feed Ration)에서 가장 낮은 수치를 나타내었다. 이는 이유 후, 사료 변화에 민감한 자돈들이 강한 향을 지닌 무기산제에 대해서 거부감을 나타내면서 사료섭취량이 줄어들었기 때문이며, 이를 반영하듯이 무기산제의 첨가량이 가장 작은 HCl 0.1% 처리구가 다른 처리구에 비해서 유의적으로 높은 사료 섭취량을 보이고 있다. 이러한 이유 자돈 초기의 사료 섭취량의 영향으로 실험 종료시의 체중에서 항생제 처리구에 비해서 무기산제 처리구가 낮은 체중을 보이고 있다. 하지만 사료에 대한 적응도가 높아진, 3주후부터는 일당증체량 및 사료섭취량에 있어서 HCl 0.1% 처리구와 HCl 0.3% 처리구가 항생제 처리구과 비슷하거나 높은 경향을 보이며 자돈기가 끝나는 실험 종료시에는 이미 언급하였지만, 체중에 있어서 HCl 0.1% 처리구 및 HCl 0.3% 처리구가 항생제 처리구와 유의적인 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 전체적으로 항생제 처리구가 무기산제 처리구에 비하여 높은 성적을 나타내었으며, HCl 0.1% 처리구가 체중(Body Weight) · 일당증체량(Average Daily Gain) 및 일당사료섭취량(Average Daily Feed Intake)에서

항생제와 비슷한 효과를 나타내며 성장 개선 효과를 보였다. HCl 0.3% 처리구는 HCl 0.1% 처리구와 비슷한 효과를 나타내었으나, 항생제 처리구만큼 뚜렷한 효과를 나타내지 않았고, HCl 0.2% 처리구는 가장 낮은 성장 성적을 보이며 항생제와 개선 효과를 나타내지 않았다. 그러나 Mahan 등(1996)은 23±2일령에 이유한 자돈에 HCl을 0 - 0.1% 첨가한 결과 일당 증체량($P<0.01$), feed intake($P<0.08$), gain:feed ratio ($P<0.08$)의 개선 효과가 나타났다고 밝혔다. 또한 22±1일령에 이유한 6.4kg BW를 가진 이유자돈에 hydrochloric acid(HCl)을 첨가한 사료를 급여하였을 때, N retention의 개선($P < .01$)과 apparent N digestibility가 linear한 증가($P < .01$)를 보였다. 이것은 Cl의 증가가 protein digestibility를 개선시켜준다는 것을 말한다. 자돈은 이유 시에 HCl의 분비가 부족한데 N digestibility를 개선하기 위해서는 Cl의 공급이 필요하며, 일령이 증가할수록 그 필요성은 적어진다. 그러므로 이유 후 초기 2주 동안에는 0.35~0.40%의 Cl 공급이 요구된다고 하겠다. 그리고 Straw 등(1991)은 이유자돈의 pH와, mineral(Ca, P, Na, Cl)이 자돈의 growth performance와 stomach의 acidity에 미치는 영향에 대해 조사하였는데 28일령에 이유한 자돈에 pH 6.0 이하의 사료를 급여하였을 때 일당증체량 및 사료섭취량이 가장 높았다고 보고하였다. 본 실험은 무항생제 첨가구가 아닌 항생제 첨가구로 실험을 하였으며, 무기산제의 첨가가 항생제 첨가구에 비해 뒤지지 않는 성적을 나타낸 것으로 나타났다.

표 29. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향

Item	Treatment				SEM ^d
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Body Weight(kg)					
Initial	7.57	7.57	7.57	7.57	N/A
3 week	10.69 ^a	10.18 ^{ab}	9.29 ^b	9.84 ^{ab}	0.29
5 week	16.39 ^a	15.65 ^a	13.87 ^b	15.27 ^{ab}	0.39
Average daily gain ^c (kg)					
0-3 week	0.149 ^a	0.124 ^{ab}	0.082 ^b	0.108 ^{ab}	8.83
3-5 week	0.407 ^a	0.387 ^a	0.327 ^b	0.388 ^a	11.08
0-5 week	0.252 ^a	0.229 ^a	0.180 ^b	0.220 ^{ab}	8.86
Average daily feed intake ^c (kg)					
0-3 week	0.347 ^a	0.293 ^b	0.242 ^c	0.275 ^{bc}	12.88
3-5 week	0.917	0.966	0.884	0.952	35.89
0-5 week	0.575	0.562	0.499	0.546	18.38
Gain:Feed ration ^c					
0-3 week	0.428	0.417	0.326	0.392	0.02
3-5 week	0.450	0.420	0.376	0.422	0.02
0-5 week	0.439	0.417	0.362	0.411	0.01

^{a,b} Mean within rows with different superscripts differ, $P < 0.05$

^c A total of 80 crossbred pigs was fed from average initial body weight 7.57 ± 0.02 kg and the average of final weight was 15.35 kg.

^d Standard error of mean.

나. 혈액 분석 (Blood assay)

BUN (blood urea nitrogen) 분석을 위해 실험 개시 시부터 매주 돈방당 2 두로부터 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리(3,000rpm, 15min, 4℃)하여 -20℃상태에서 보관하였다. 전체 실험 기간 중, 자돈의 혈중 BUN 농도는 처리구별로 유의적인 차이를 보이지 않았으나(그림 26), HCl 0.1% 처리구가 시간이 경과함에 따라서 항생제 처리구보다 낮은 경향을 보이면서, 아미노산의 이용율에 있어서는 항생제 처리구에 비해서 개선 효과를 보였다. 일반적으로 BUN은 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표로 쓰인다 (Eggum, 1970). BUN은 단백질 섭취와 그 품질에 직접적인 연관성을 가지며 (Eggum, 1970; Hahn 등, 1995), 섭취한 질소의 체내 유지에 관여한다 (Whang and Easter, 2000). BUN value는 일당증체량 및 사료효율과 negative correlation을 갖는데 (Hahn 등, 1995). 이를 비추어 보았을 때, 낮은 사양성적을 보였던 HCl 0.2% 처리구와 HCl 0.3% 처리구의 BUN value가 전체적으로 다른 처리구에 비해서 높음을 알 수 있다.

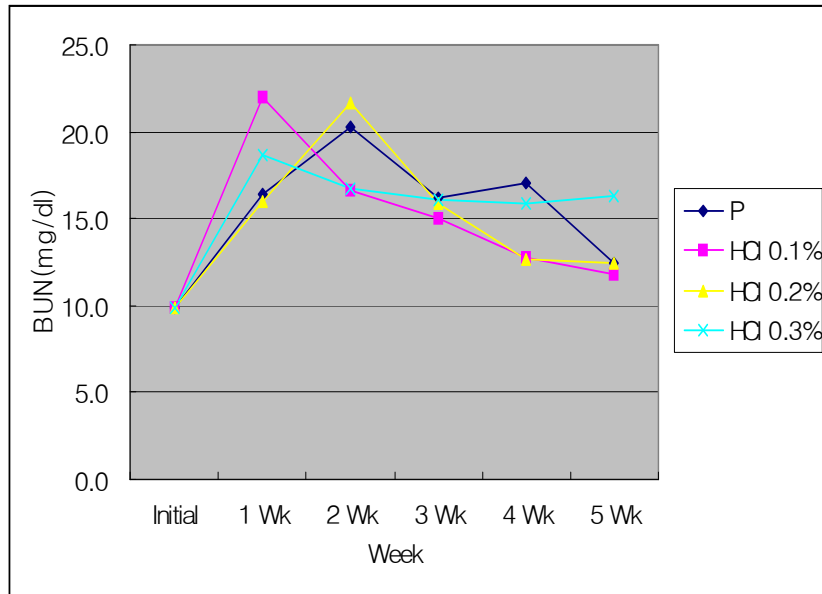


그림 26. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 혈중 BUN 농도에 미치는 영향

다. 설사빈도 (Diarrhea Score)

이유 자돈의 설사는 과거 단순하게 수양성 설사를 하며, 위축되다가 일정기간 후 회복되는 경향을 보여 왔으며, 항생제로 치료할 경우 개선되는 것으로 나타났다. 그러나 현재 이유자돈의 설사는 항생제에 대한 반응성이 감소하거나 전혀 없고, 이유후소모성질병 (PMWS; postweaning multisystemic wasting syndrome) 유사 증상을 보이며, 그 원인도 다양하다. 보통 설사를 하는 이유 자돈은 열이 나고, 떨며, 복식호흡을 하고, 위축되어 심하면 폐사에 이르게 되며, 설사로만 끝나는 것이 아니라 호흡기 질병을 동반하며, 낮은 생산성의 주원인이기도 하다. 따라서 자돈에 있어서 설사는 농장의 성적과 직결된 것이며 이를 방지하는 것이 항생제의 주목적이라고 할 수 있다.

전체 실험 기간 중, 사양 실험군의 평균 설사 빈도는 1.73으로 나타났다. 이는 이유 자돈에 있어서 설사는 빈번한 것임을 나타내는 것이며, HCl 0.2% 처리구가 다른 처리구에 비해서 높은 수치를 나타내었다(표 30). 기간별로는 1주차에서 유의적인 차이는 없었지만, HCl 0.1% 처리구가 가장 높았으며, 2~3주차에는 HCl 0.1% 처리구가 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였으며, 항생제 처리구는 이보다 높았다. 4~5주차에서는 전체적으로 비슷한 경향의 설사 빈도를 보였다. 전체적으로는 비슷한 설사빈도이나 사양 성적에서 HCl 0.1% 처리구와 항생제 처리구가 높게 나온 이유가 이유 후 초기의 낮은 빈도의 설사가 자돈 후기의 성장에 큰 영향을 미친 것으로 사료된다. 이와 관련하여, 시기별에 따른 처리구의 설사빈도는 그림 27과 같다.

HCl 0.1% 처리구보다 높은 함량의 무기산제를 첨가한 처리구(HCl 0.2% 및 HCl 0.3% 첨가)의 높은 설사 빈도는 무기산제의 또 다른 형태인 무기황산염의 첨가량에 따른 신생자돈의 설사 유발 실험 결과에서 일정량 이상의 무기 황산염의 첨가구가 지속적인 비병원성 설사를 지속시켰다는 결과와 유사하다(G. Gomez 등, 1995). 따라서 무기산제 0.1%의 첨가가 자돈의 설사 예방에 가장 효과가 있으며, 과량의 무기산제의 직접적인 작용은 자돈의 설사를 줄이는데 큰 효과를 나타내지 못하는 것으로 사료된다.

표 30. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 설사빈도에 미치는 영향^c

Item	Treatment				SEM ^d
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Diarrhea Score					
0-1 week	1.76	1.83	1.70	1.46	0.06
1-3 week	1.92 ^{bc}	1.77 ^c	2.32 ^a	2.11 ^b	0.06
3-5 week	1.43	1.51	1.41	1.52	0.05
0-5 week	1.70	1.70	1.81	1.69	0.04

^{a,b} Mean within rows with different superscripts differ, $P < 0.01$

^c A total of 80 crossbred pigs was fed from average initial body weight 7.57 ± 0.02 kg and the average of final weight was 15.35 kg.

^d Standard error of mean.

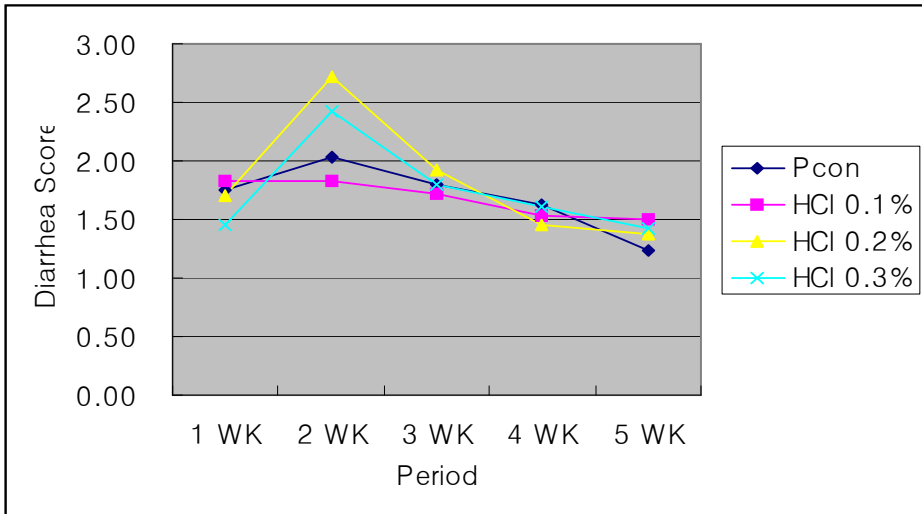


그림 27. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 시기별 자돈의 설사빈도

라. 소장의 형태학적 관찰 (Morphology of the small intestine)

이유 자돈에 있어서 소장의 용모의 높이와 융와의 깊이는 이유 후 사료의 영향을 많이 받으며, 이유 시기 및 대용유 급여 여부에 따라 다르게 나타난다. 포유 시기가 길수록, 대용유를 급여할수록 용모의 높이와 융와의 깊이가 높은 경향을 보인다.(Hetty M. G. 1998)

처리당 4두씩 총 35일간 실험사료를 처리별로 급여한 후 그중 3두씩을 선발하여 해부를 실시하였다 (평균체중 15.69 ± 0.16 kg). 소장의 십이지장 (Duodenum), 공장 (Jejunum), 회장 (Ilium) 부위를 2cm 길이로 채취한 후 10% neutral buffered formalin에 고정하였다가 alcohol과 xylene step과정을 거쳐 탈수 하여 hematoxylin과 eosin(HE)-stained section ($4\mu\text{m}$)으로 만들어 용모 (villi) 및 융와 (crypt)를 관찰하여 형태학적 특징(morphology)을 조사하였으며, 표 31 에 십이지장, 공장, 회장의 용모의 높이, 융와의 깊이 그리고 그 둘의 비율 (villi height : crypt depth)을 표시하였다. 일반적으로 자돈의 소장 용모 형태는 이유 후 섭취한 고형 사료의 영향으로 약간 짧아지고 중간부분이 굽어진 혀의 모양을 하고 있다. Cera 등 (1998)에 의하면 용모의 길이는 이유 후 3일 안에 급격히 감소하며, 그 후 천천히 발달한다고 보고하였다. 실험 기간 중, 전체적으로 처리간에 용모의 높이, 융와의 길이, 그리고 그 비율에 있어 통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 하지만, 각 부위별 · 처리별로 특정한 경향을 보이고 있다.

표 31. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈 소장의 형태학적 성장에 미치는 영향^a

Item	Treatment				SEM ^b
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Duodenum(μm)					
Villi height	586	667	639	654	19.60
Crypt depth	242	272	247	269	14.54
V:C	2.49	2.51	2.58	2.49	0.09
Jejunum(μm)					
Villi height	505	403	601	504	22.00
Crypt depth	186	254	206	195	7.54
V:C	2.71	2.52	2.92	2.57	0.11
Ilium(μm)					
Villi height	469	452	496	359	23.35
Crypt depth	199	193	202	198	7.60
V:C	2.36	2.36	2.57	1.81	0.14

^a A total of 15 crossbred pigs were anatomized from average body weight 15.69 \pm 0.16 kg.

^b Standard error of mean.

1) 십이지장

그림 29은 각 처리별로 전처리를 하여 절편을 잘라 찍은 십이지장 사진으로, 이를 바탕으로 융모의 높이, 융와의 깊이 그리고 그 둘의 비율 (villi height : crypt depth)을 측정하였다. 표 31의 십이지장을 바탕으로 처리별 비율을 도식화 하면 그림 28과 같다. 그림 28에서 볼 수 있듯이, 전체적으로 융와의 깊이는 비슷하나, 융모의 높이에 있어서는 무기산제 처리구가 항생제 처리구에 비해 대체적으로 높은 경향을 보였다. 하지만, 융모의 높이와 융와의 깊이는 영양적인 측면 외에도, 사료 입자 등 다양한 환경적인 요소에 의해서도 많은 영향을 받는다. 이유 후에는 일반적으로 소장 villus height의 감소와 crypt depth의 증가가 일어나며, 이는 영양소 흡수 능력의 감소로 이어진다(Pluske 등, 1997). 하지만 본 실험에서는 십이지장의 융모 길이가 HCl 0.1% 첨가구에서 가장 길게 나타났고, 항생제 첨가구에서 가장 낮게 나타났다. 이는 무기산제의 첨가가 십이지장의 융모 길이를 유지하고, 영양소의 흡수율을 높이는 것으로 사료된다.

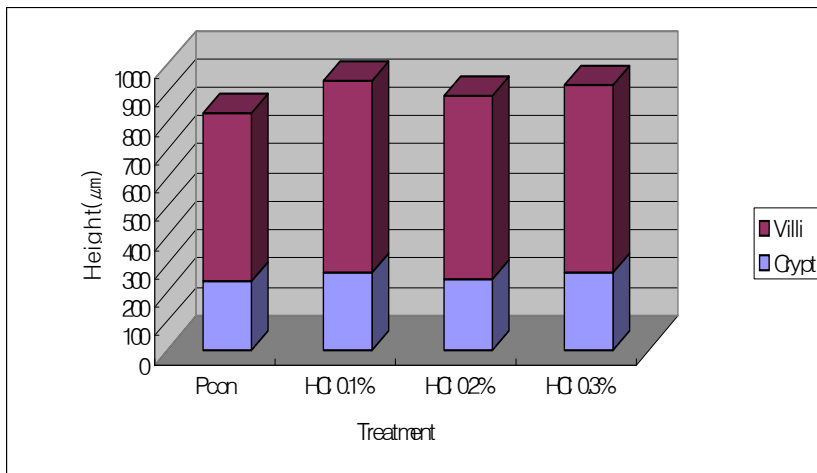


그림 28. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈의 십이지장의 형태

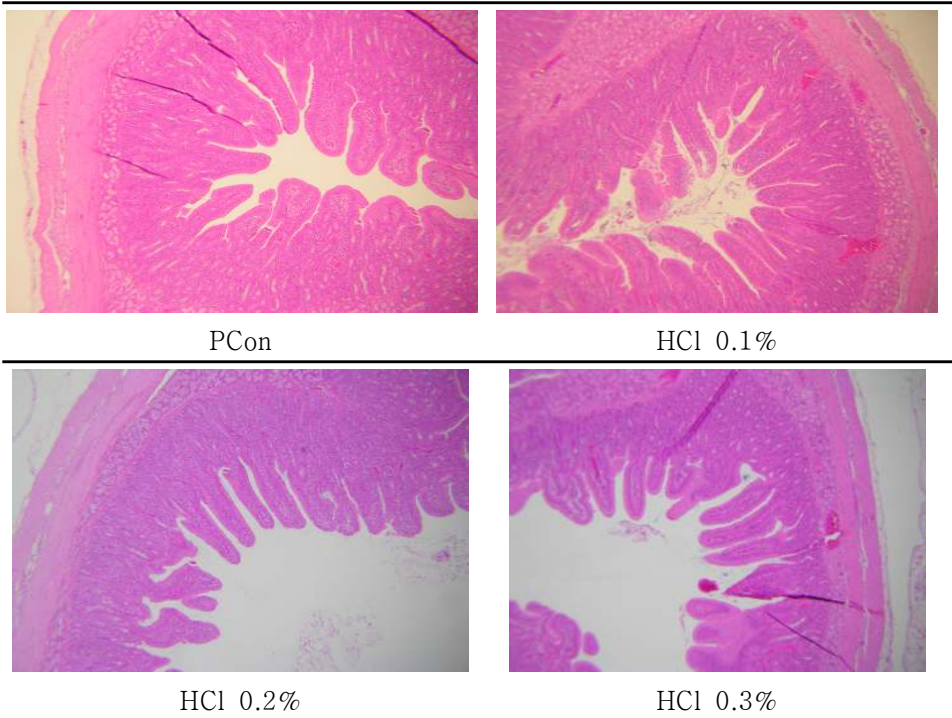


그림 29. 자돈의 십이지장 중앙 부위를 Eosin(HE)-stained section화하여 촬영한 사진

2) 공장

그림 31은 각 처리별로 전처리를 하여 절편을 잘라 찍은 공장 사진으로, 이를 바탕으로 융모의 높이, 융와의 깊이 그리고 그 둘의 비율 (villi height : crypt depth)을 측정하였다. 표 30의 공장을 바탕으로 처리별 비율을 도식화하면 그림 30과 같다. 설사의 빈도가 가장 심했던, HCl 0.2% 처리구의 공장의 융모의 높이가 가장 높으며, HCl 0.3% 처리구가 가장 낮았다. 이는 십이지장에서 언급되었던 결과와 다른 결과이지만, 산제 처리구인 HCl 0.2% 첨가구에서 소장 융모의 길이를 유지할 수 있는 효과를 나타냈다.

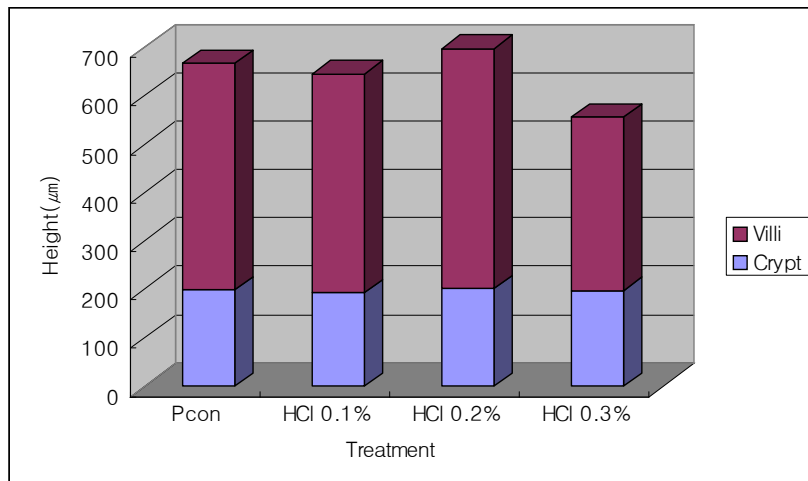
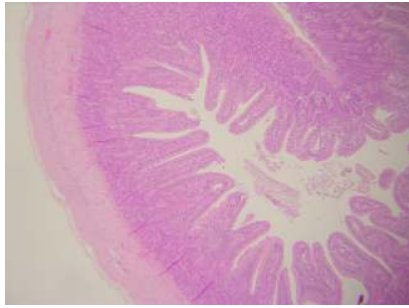
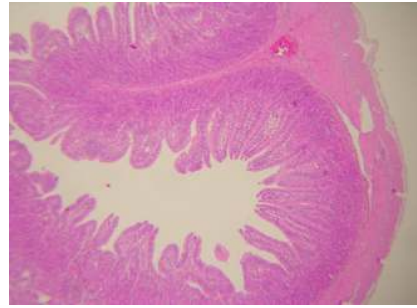


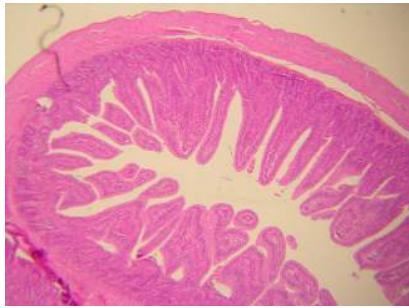
그림 30. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈의 공장의 형태



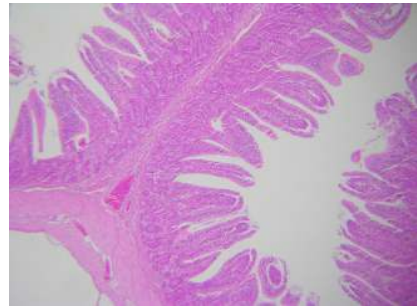
PCon



HCl 0.1%



HCl 0.2%



HCl 0.3%

그림 31. 처리별 자돈의 공장 중앙 부위를 Eosin(HE)-stained section화하여 촬영한 사진

3) 회장

그림 33는 각 처리별로 전처리를 하여 절편을 잘라 찍은 회장 사진으로, 이를 바탕으로 융모의 높이, 융와의 깊이 그리고 그 둘의 비율 (villi height : crypt depth)을 측정하였다. 표 30의 회장을 바탕으로 처리별 비율을 도식화하면 그림 32와 같다. 회장에서도 역시 공장과 비슷하게 HCl 0.2% 처리구의 융모의 높이가 가장 높으며, 융와의 깊이는 전체적으로 유사하게 나타났다. 따라서 이유자돈의 소장 내 융모의 길이를 유지하여 영양소 흡수율을 향상시키는 데에는 무기산제를 0.2% 첨가하는 것이 권장된다고 할 수 있겠다.

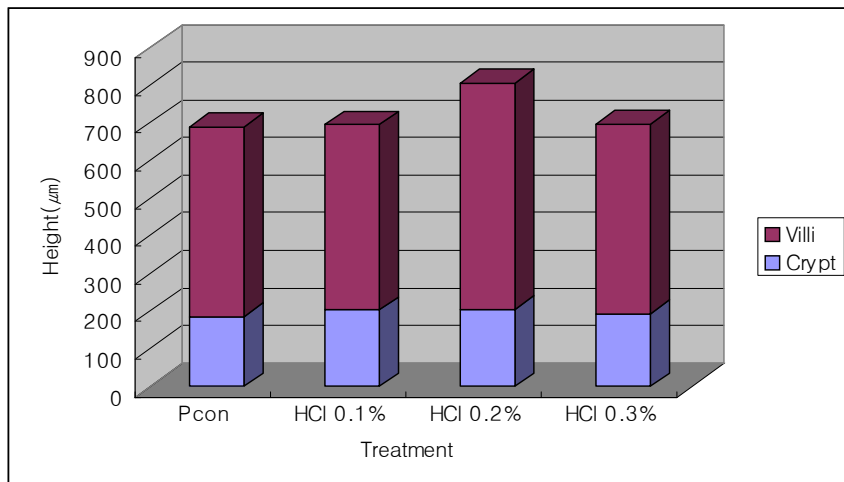
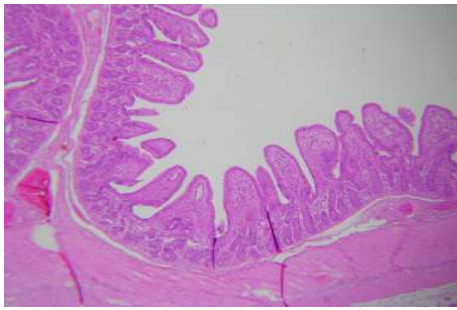
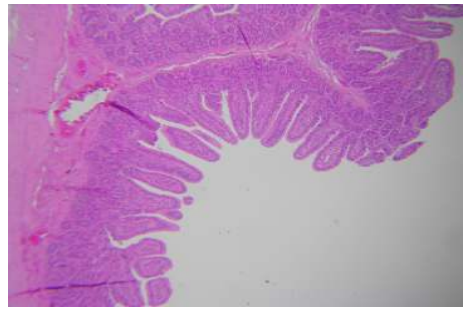


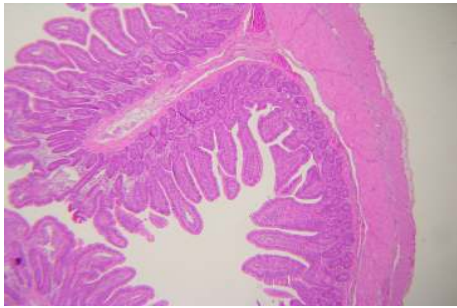
그림 32. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈의 회장의 형태



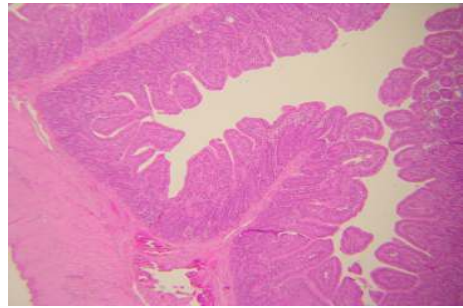
PCon



HCl 0.1%



HCl 0.2%



HCl 0.3%

그림 33. 자돈의 회장 중앙 부위를 Eosin(HE)-stained section화 하여 촬영한 사진

마. 장관 내 VFA 농도

장관 내 VFA 농도를 알아보기 위해 일단 동결시킨 샘플의 분을 2g씩 채취하여, 8ml의 증류수에 희석시킨 후, HCl(Concentrate HCl) 2 방울을 떨어뜨린다. 그런다음에 원심분리(17,400g, 10 min, 4°C)를 하여 상층액을 0.22 μ m 필터(Millipore., Bedford, MA)를 이용하여 거른 후, Gas Chromatography용 2.0ml의 Vial(Supelco, Cat. No. 27265, Bellefonte, PA)에 담아서 Gas Chromatography(Hewlett Packard, HP 6890 Series GC System)를 이용하여 측정하였다. Standard의 농도는 10mmol/ml이며, Acetate, Propionate, Isobutyrate, Butyrate, IsoValerate, Valerate을 측정하였다.(L. D. Topping et al., 2001., E. R. Otto., 2003)

본 실험에서는 해부 실험을 통하여, 무기산제 및 항생제 처리별 자돈의 회장·맹장·결장·직장 내 소화물을 채취하여 VFA의 농도를 측정한 결과 표 32와 같다. 그리고 각 부위별·처리별 VFA 발생량을 비교해 보면 그림 34, 35, 36, 37과 같다.

회장에서는 처리별 VFA 발생량은 유의적인 차이가 없었으나, 전체적으로 HCl 0.2%처리구와 HCl 0.3% 처리구에서 Acetate 발생량이 상대적으로 높은 경향을 보였으며, 맹장에서는 전체적으로 각 처리별로 소화물 내 VFA 발생량이 비슷한 경향을 보였으나, HCl 0.1% 처리구에서는 Propionate 발생량이 다른 처리구에 비해서 상대적으로 낮았다.

결장에서는 소화물 내 Acetate 발생량이 HCl 0.1%처리구가 다른 처리구에 비해서 유의적으로 높았으며($P < 0.05$), Propionate 발생량은 HCl 0.3%처리구가 다른 처리구에 비해서 유의적으로 높았다($P < 0.05$). Butyrate 및 Isovalerate 발생량은 양적인 측면에서 약간의 차이가 있었으나, 통계적으로 처리에 따른 유의차가 없었다($P < 0.05$).

직장에서의 Acetate 발생량은 통계적으로 유의차가 없었지만, HCl 0.1% 처리구가 가장 높은 발생량을 보였으며, Propionate 발생량은 HCl 0.3% 처리구가 다른 처리구에 비해서 유의적인 차이를 보이며 가장 높았다($P < 0.05$). 반대로 사양 성적이 가장 안 좋았던 HCl 0.2%처리구가 다른 처리구에 비해서, 직장 내에서 가장 낮은 Acetate 및 Propionate($P < 0.05$) 발생량을 보였다. 직장의 소화물 내 Isobutyrate·Butyrate·Isovalerate 및 Valerate 발생량은 항생제 처리구가 무기산제 처리구에 비해서 유의적으로 높은 발생량을 보였으며, HCl 0.1% 처리구는 HCl 0.2%처리구와 같이 전체 처리구에서 상대적으로 낮은 발생량을 보였다.($P < 0.05$)

Acetate, Propionate, Isobutyrate, Butyrate, Isovalerate, Valerate는 저급휘발

성지방산은 동물에 있어서 중요한 에너지원으로 사용되거나, 다시 미생물에 의해서 이용되어 미생물 균총의 변화를 유도한다. 이런 미생물 균총의 변화는 장내에서 섬유소 분해율을 바꿀 수 있다(Burroughs et. al., 1950). 이런 장내 미생물에 의한 소화율의 변화는 동물의 성장에 영향을 주고, 영양적인 이점을 통한 면역기능의 향상을 유도하여 전체적으로 건강 증진 효과를 볼 수 있다.

전체적으로 VFA 발생량을 보면 사양성적이 좋았던 HCl 0.1%처리구와 항생제 처리구 및 상대적으로 낮은 사양성적을 보였던 HCl 0.2%처리구 및 HCl 0.3%처리구가 따로 비슷한 경향을 보이지는 않고 있다. 이는 VFA 발생이 미생물에 의한 결과이며, 이런 장내 다양한 미생물의 조절은 더욱 복잡한 것으로 생각되어진다.

표 32. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 장관 내 소화물의 VFA 농도에 미치는 영향^d

Item	Treatment				SEM ^e
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Ilium(mmol/ml)					
Acetate	5.70	5.10	22.35	15.56	3.19
Propionate	0.76	0.90	1.79	1.80	0.21
Isobutyrate	0.52	1.29	1.47	2.28	0.37
Butyrate	0.63	0.97	0.51	2.30	0.36
Isovalerate	1.97	2.82	1.21	4.22	0.47
Valerate	3.23	2.96	1.18	4.06	0.48
Cecum(mmol/ml)					
Acetate	83.54	89.92	88.05	83.15	2.65
Propionate	33.25	23.89	28.77	30.81	1.63
Isobutyrate	1.89	1.69	1.78	1.97	0.09
Butyrate	11.49	8.83	12.72	13.78	0.82
Isovalerate	2.11	1.84	1.56	2.15	0.16
Valerate	1.76	1.93	2.20	2.31	0.12
Colon(mmol/ml)					
Acetate	79.83 ^c	106.09 ^a	95.94 ^{ab}	91.89 ^b	3.14
Propionate	26.08 ^b	24.19 ^b	28.86 ^{ab}	31.52 ^a	1.09
Isobutyrate	2.63	1.90	2.22	2.43	0.17
Butyrate	18.09 ^a	12.02 ^a	15.34 ^a	16.84 ^a	1.00
Isovalerate	3.38 ^a	2.38 ^a	2.57 ^a	3.07 ^a	0.22
Valerate	3.03	2.61	3.39	2.84	0.18
Rectum(mmol/ml)					
Acetate	72.54	76.19	61.25	69.03	3.52
Propionate	23.20 ^{ab}	19.80 ^{bc}	15.93 ^c	27.38 ^a	1.48
Isobutyrate	4.48 ^a	2.72 ^b	3.17 ^{ab}	4.52 ^a	0.30
Butyrate	15.19 ^a	9.90 ^b	8.77 ^b	14.26 ^a	0.97
Isovalerate	6.20 ^a	3.17 ^b	3.85 ^b	5.29 ^{ab}	0.44
Valerate	4.08 ^a	2.36 ^b	2.90 ^b	3.12 ^{ab}	0.24

^{a,b,c} Mean within rows with different superscripts differ, $P < 0.05$

^d A total of 15 crossbred pigs were anatomized from average body weight 15.69 ± 0.16 kg.

^e Standard error of mean.

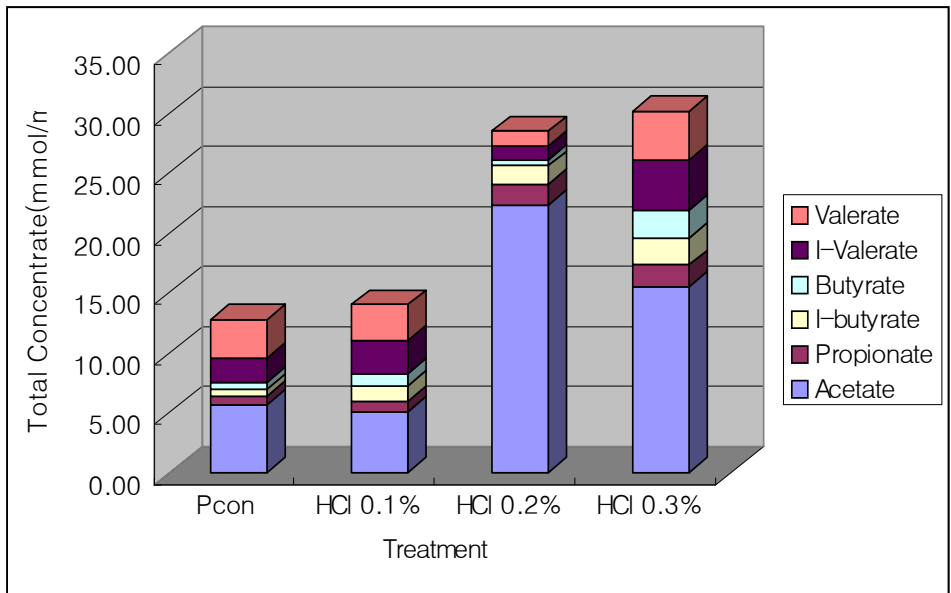


그림 34. 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 회장 내 소화물의 VFA 발생량

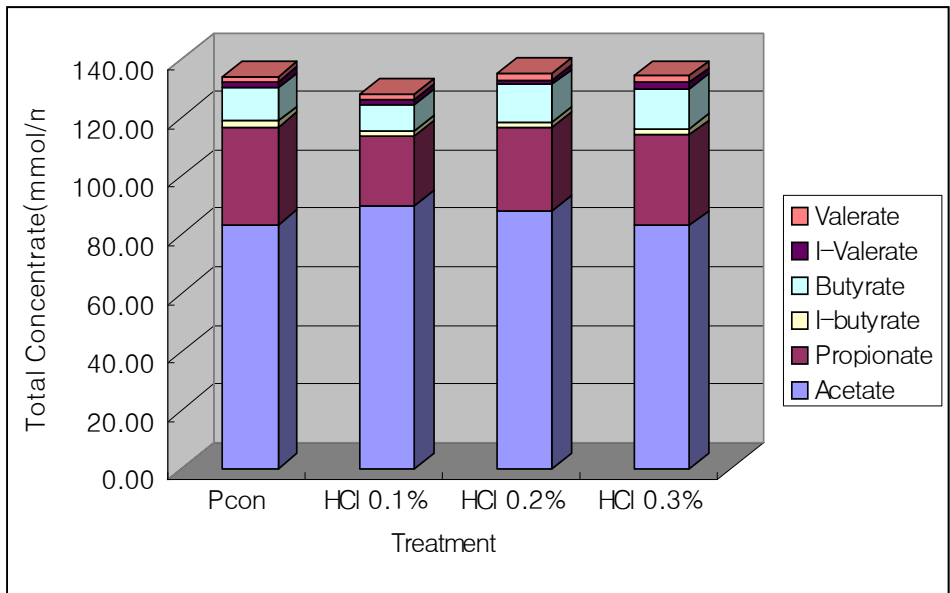


그림 35. 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 맹장 내 소화물의 VFA 발생량

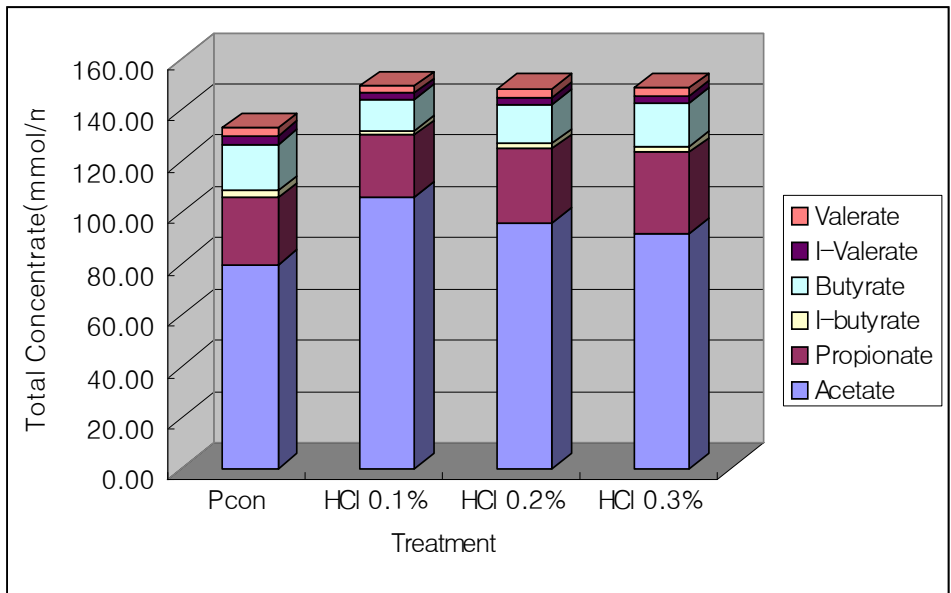


그림 36. 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 결장 내 소화물의 VFA 발생량

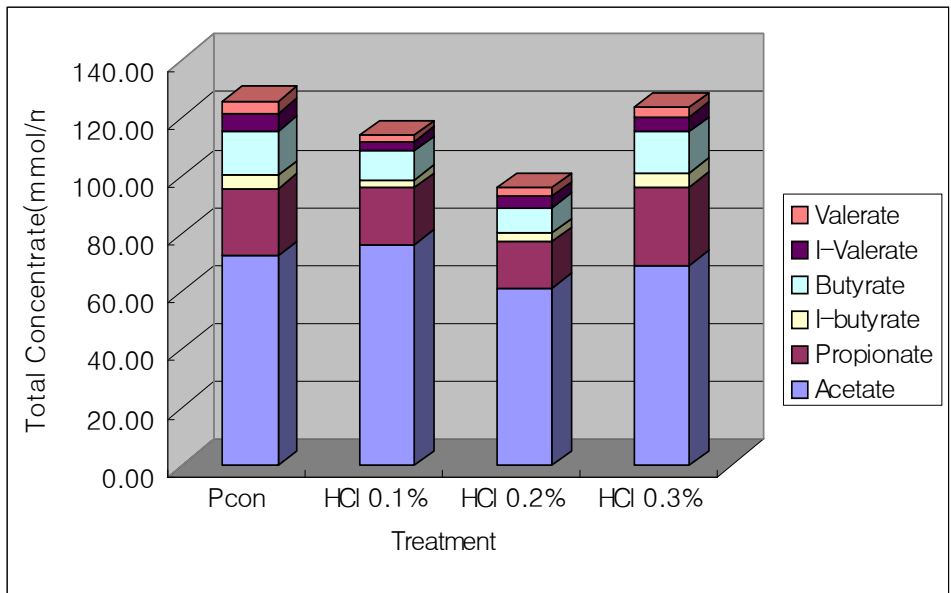


그림 37. 무기산제의 수준별 첨가에 따른 자돈 직장 내 소화물의 VFA 발생량

바. 장내 미생물 균총 조사

표 33 . 회장, 맹장, 결장, 직장의 전반적 균총 수 조사를 위한 real time PCR을 이용한 Ct value

	Pcon	HCl(0.1%)	HCl(0.2%)	HCl(0.3%)	P-value	SEM
<i>S. bovis</i>	21.97 ^b	24.50 ^a	23.10 ^{ab}	23.87 ^{ab}	0.085	0.377
<i>L. casei</i>	18.49	18.40	18.86	19.19	0.565	0.204
<i>L. plantarum</i>	16.65	18.31	17.26	16.66	0.515	0.368
<i>B. subtilis</i>	19.55	19.67	19.71	20.89	0.257	0.257
<i>E.coli K88+</i>	30.79	31.61	31.74	32.35	0.176	0.233

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

본 실험에서는 총 5종류의 미생물 균총을 real-time PCR을 이용하여 조사하였다(표 33). real-time PCR은 민감한 fluorescent dye의 사용으로 정량이 더욱 정밀해지고 간편해 졌다. 그러나 fluorescence 값으로 copy number를 즉각적으로 얻어낼 수는 없으며, 이를 위해 standard 회귀식을 사용한다. real time PCR의 정량에서 가장 중요한 개념은 Ct(Threshold Cycle) value 이라는 수치이다. 이 값은 probe의 reporter fluorescence 값이 base line 값을 지나는 시점의 cycle number이다. 이 값은 PCR 반응의 어느 한 요소도 제한되지 않았을 때의 값이며, target의 수에 정확히 반비례하는 값으로 target의 양을 판단할 때 가장 적합한 척도가 될 수 있다. 따라서 본 표에 제시된 Ct value는 probe의 reporter fluorescence 값이 base line 값을 지나는 시점을 의미하므로 그 절대값이 낮을수록 sample 내에 존재하는 미생물 균총 수가 많음을 의미하게 된다.

자돈은 이유 시 소화 효소 역가의 불충분, HCl의 분비 부족 등으로 인해 자돈은 위내에서 사료를 완전히 소화하지 못하고 소장으로 내려 보내게 된다. 이것은 자돈의 소장에서 pathogenic bacteria나 *E.coli*의 성장배지로 이용된다. 이유 후 5일째에 자돈의 소장에서는 duodenum 과 ileum에 *E.coli*가 우점하는 것으로 보고되고 있다(Rantzer et al., 1996). 산제는 이러한 자돈의 미성숙한 소화기관, 이에 따른 소화효소의 불충분 및 위내 pH의 상승 등으로 인한 설사 발생 등의 문제를 해결해 줄 수 있는 항생제 대체제로서 다양한 연구가 이루어지고 있다. 특히 무기 산제는 유기산제와는 달리 위내에서 분비되는 염산을 직접적으로 공

급함으로써 위내 pH를 떨어뜨리는 효과와 더불어 즉시 사료의 소화에 이용될 수 있다는 가능성을 가지고 산제로써 사용되고 있다. 염산을 직접 섭취함으로써 발생하는 구강 및 식도의 문제점으로 그 첨가 수준에 대한 적절한 설정이 매우 중요하다. 이러한 산제는 다양한 기능을 통해 장내 미생물 군총에 영향을 미친다. 산제를 3주령에 이유한 자돈에 low buffering capacity를 가진 사료로 급여했을 때, intestinal microflora 에 영향을 주며, jejunum 내의 clostridium 와 cecum 내의 clostridium와 coliforms을 줄여준다는 연구 결과가 있으며(Biagi et al., 2003), 28일령에 이유한 자돈에 1.8%의 K-diformate를 급여했을 때, postweaning feces 내의 coliforms이 감소하는 것을 볼 수 있었다(Canibe et al., 2001).

특히 해리되지 않은 산제는 H⁺와 A⁻의 해리와 함께 bacteria의 intestinal pH를 급증시킨다. 이로 인해 외부와의 pH차이가 많이 나게 되어 bacteria는 이를 자신들이 서식할 수 있는 정상 pH로 돌려놓기 위해 다양한 활동을 하면서 에너지를 소모하고 증식에 사용되는 에너지가 적어지므로 증식이 억제되어 사멸하게 된다. 또한 internal pH가 낮아지면 bacteria내에서 glycolysis가 억제되고, 물질의 active transport를 방해하며, signal transduction을 방해하는 mechanism을 가지고 있어 산제를 통한 bacteria 억제효과가 나타난다고 보고되어 있다.

표 33은 회장(ileum), 맹장(cecum), 결장(colon), 직장(rectum)에서 채취한 소화물(chyme)에서 정량한 Ct value를 나타낸 것이다. 산제를 섭취한 *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* K88, 총 5 종의 미생물에 대한 real time PCR 분석을 실시한 결과, 전체적으로 유의적인 차이가 발생하지 않았다. 그러나 *S. bovis*의 경우 항생제 처리구에 다른 처리구에 비해 낮은 Ct value를 갖는 경향을 나타내었다 (P=0.08). 이것은 항생제 첨가구에 있어서 *S. bovis*가 다른 산제 처리구에 비해 많이 서식하고 있음을 나타낸다. 또한 HCl 0.1%에서는 *S.bovis*가 가장 적게 서식하고 있음을 알 수 있다. 특히 *E.coli* K88 균종의 경우 다른 미생물 (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*)에 비해 Ct value가 매우 높은 수치를 나타냈으며, 이는 다른 미생물에 비해 병원성 설사 유발 미생물인 *E.coli* K88이 장관 내에 거의 존재 하지 않음을 나타낸다. 실제로 위의 Ct value를 standard 정량 회귀식에 대입하여 보면 10⁰의 양이나 그 이하의 양이 나오거나 real time PCR cycle 상 detection 되지 않은 sample도 다수 존재하였다. 따라서 존재하지 않는 미생물에 대한 통계적인 처리는 그 의미가 낮다고 사료되며, 병원성 미생물인 *E.coli* K88은 자돈의 장관 내 존재 하지 않고, 이 bacteria에서 기인한 설사는 발생가능성이 낮음을 알 수 있다. 만약 이유자돈에 있어서 설사가 발생하였더라도 이 수치를 보면 그 원인이

E.coli K88은 아니라는 것을 알 수 있다. 통계적으로 뚜렷한 유의차는 발생하지 않았지만 HCl 0.3% 첨가구에서 *L.casei*와 *B.subtilis*의 Ct value가 가장 높아 *L.casei*와 *B.subtilis*가 근소한 차이지만 가장 낮은 수가 서식하고 있음을 알 수 있었다. 또한 *L.plantarum* 균종에 있어서는 통계적인 유의차는 발생하지 않았지만 항생제 첨가구와 HCl 0.3% 첨가구에서 낮은 Ct value를 나타내었으며, 이는 *L.plantarum*이 다른 처리구에 비해 많이 서식하고 있음을 나타낸다.

미생물 균종으로는 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus bovis*, *E.coli* K88의 순서로 미생물 수가 높은 것을 알 수 있으며, 유익균이 유해균 보다 우점하고 있고, 유산균인 *Lactobacillus spp.*가 더 많은 수가 서식하고 있다. 건강한 돼지 일수록 직장 내 *Bacteriodes*, *Streptococci* 및 *Lactobacilli* 종의 비율이 높고, 병에 걸린 돼지일수록 *Anaerovibrio*, *Selenomonas* 및 *E. coli*의 비율이 높다고 알려져 있다(Robinson, 1984). 본 실험에서도 *Lactobacillus spp.*가 우점하고 있으며, 병원성 미생물인 *E.coli* K88은 거의 발견되지 않아 이와 일치하는 경향을 보였다.

표 34. Real-time PCR을 이용한 *Streptococcus bovis*의 Ct value 및 PCR efficiency

	Pcon	HCl(0.1%)	HCl(0.2%)	HCl(0.3%)	P-value	SEM
Ileum	21.52	26.68	24.98	26.59	0.085	0.806
Cecum	21.77	24.50	23.19	23.20	0.562	0.567
Colon	22.19	23.51	21.39	21.92	0.436	0.495
rectum	21.87	23.30	23.04	23.43	0.804	0.542

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

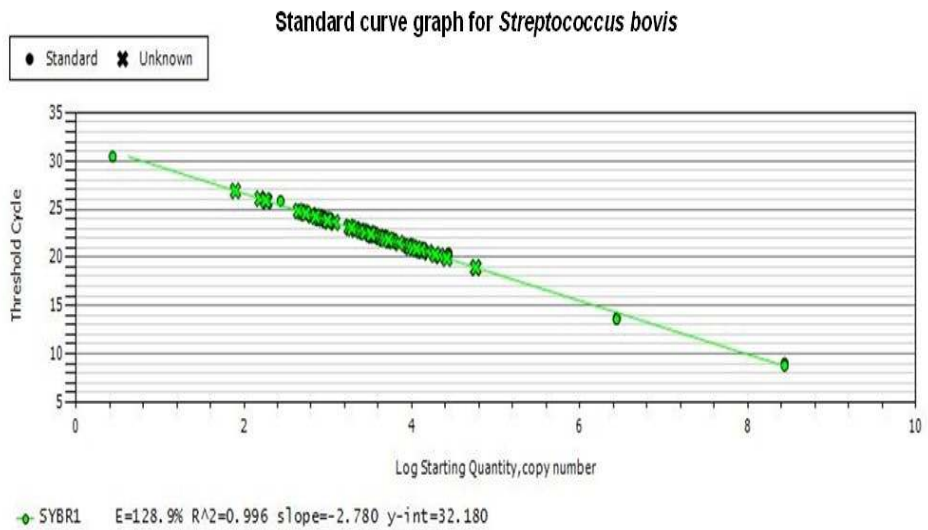


그림 38. Standard curve graph for *Streptococcus bovis*

표 35. Real-time PCR을 이용한 *Lactobacillus casei*의 Ct value 및 PCR efficiency

	Pcon	HCl(0.1%)	HCl(0.2%)	HCl(0.3%)	P-value	SEM
Ileum	18.80	17.49	20.84	20.84	0.492	0.913
Cecum	20.75 ^b	22.52 ^a	20.08 ^b	20.03 ^b	0.004	0.310
Colon	17.00	15.90	16.03	17.25	0.637	0.375
Rectum	17.42	19.19	18.49	18.64	0.244	0.291

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

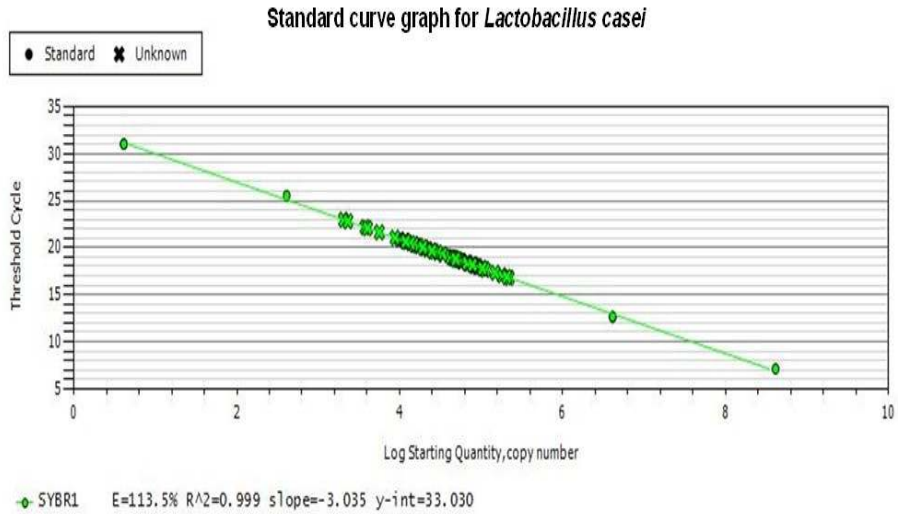


그림 39. Standard curve graph for *Lactobacillus casei*

표 36. Real-time PCR을 이용한 *Lactobacillus plantarum* 의 Ct value 및 PCR efficiency

	Pcon	HCl(0.1%)	HCl(0.2%)	HCl(0.3%)	P-value	SEM
Ileum	22.76	23.53	23.24	22.29	0.827	0.508
Cecum	14.78	16.37	14.36	14.56	0.063	0.271
Colon	13.11	13.99	13.15	13.58	0.370	0.194
Rectum	15.53	19.34	18.28	16.20	0.069	0.606

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

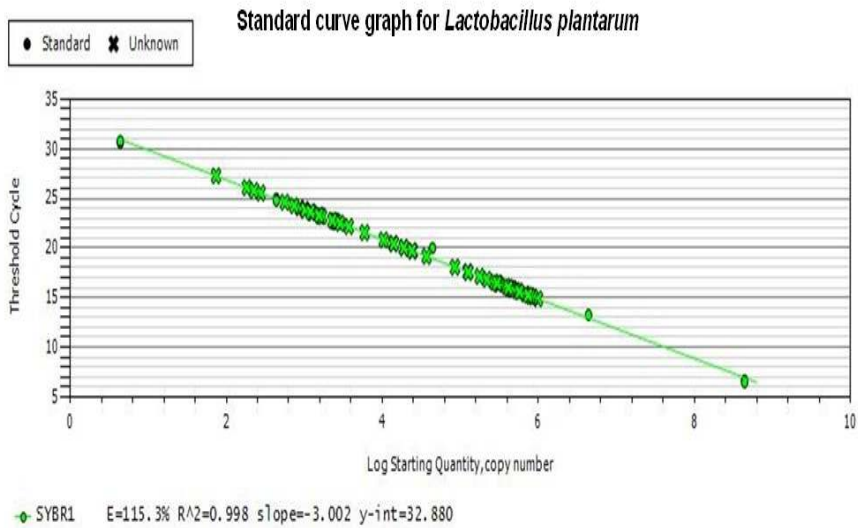


그림 40. Standard curve graph for *Lactobacillus plantarum*

표 37. Real-time PCR을 이용한 *E.coli* K88ac 의 Ct value 및 PCR efficiency

	Pcon	HCl(0.1%)	HCl(0.3%)	Hci(0.3%)
Ileum	31.42	32.20	32.12	32.29
Cecum	N/A	32.54	30.33	32.68
Colon	29.55	N/A	32.02	N/A
Rectum	30.69	30.50	32.30	31.87

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

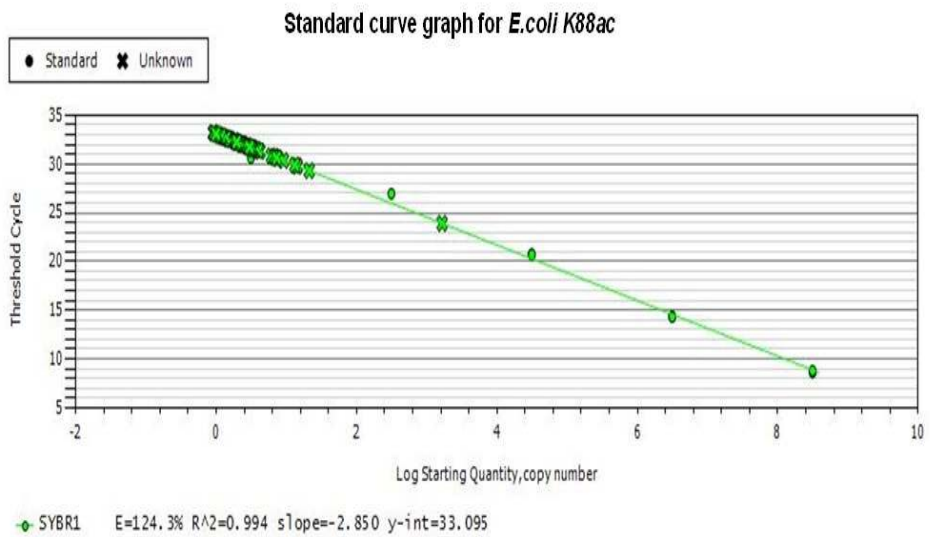


그림 41. Standard curve graph for *E.coli* K88+

표 38. Real-time PCR을 이용한 *Bacillus subtilis* 의 Ct value 및 PCR efficiency

	Pcon	HCl(0.1%)	HCl(0.2%)	HCl(0.3%)	P-value	SEM
Ileum	19.13 ^b	20.97 ^{ab}	21.58 ^a	22.34 ^a	0.031	0.427
Cecum	20.97	21.74	20.16	20.99	0.452	0.269
Colon	20.37	19.61	19.44	21.04	0.563	0.456
Rectum	17.58	16.95	17.66	19.21	0.354	0.437

^{a,b} Values with different superscripts in the same row are different (P<0.05)

^c Standard error of mean

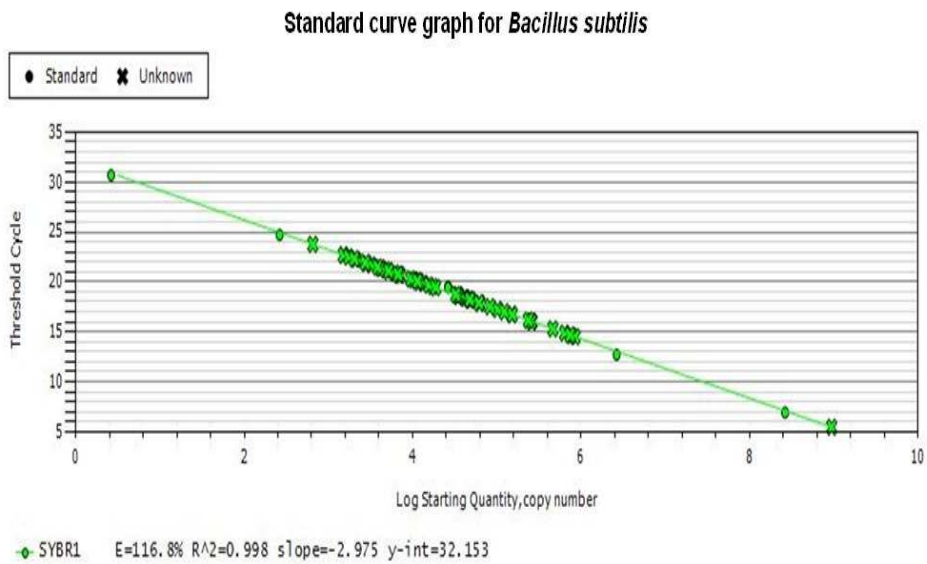


그림 42. Standard curve graph for *Bacillus subtilis*

real time PCR의 분석 특성상 얻어진 Ct value로 바로 미생물 DNA copy number를 얻을 수 있는 것은 아니다. 이를 위해서는 standard를 사용하여 회귀식을 구한 후에 계산을 해야 한다. 표 34, 35, 36, 37, 38에 각각 5가지 균종 (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*)에 대한 회장, 맹장, 결장, 직장 부위에서 real time PCR 기법을 통해 측정된 Ct value를 나타내었다. 각 표의 아래에 있는 standard 그래프(그림 38, 39, 40, 41, 42)의 회귀식에 Ct value를 대입하면 각 미생물의 절대 정량 값을 구할 수 있다. 다만 Ct value로 표기한 이유는 통계적 검증을 통해 미생물 균종의 차이를 비교 분석하기 위함이다.

*Bacillus subtilis*의 경우 회장에 있어서 항생제 처리구가 무기산제 처리구에 비해 유의적으로 낮은 Ct value를 나타내었으며($P < 0.05$), *Lactobacillus casei*의 경우에는 맹장에서 HCl 0.1% 처리구에서 Ct value가 가장 높게 나타났다($P < 0.01$). *Streptococcus bovis*의 경우에는 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 무기산제 처리구가 항생제 처리구에 비해 Ct value가 높게 나타나는 경향을 띄었다($P = 0.085$). 유의적인 차이를 보이는 미생물 균종은 위에 나타난 바이다. 전반적으로 유익균인 *L.casei*, *L.plantarum*, *S.bovis*, *B.subtilis*의 경우에는 자돈의 소화관 내에 많은 수가 존재함을 Ct value가 나타내고 있으며, *E.coli K88*의 경우에는 Ct value의 값이 매우 높거나, 검출되지 않는 sample이 다수 존재하여, *E.coli K88* strain이 자돈의 소화관 내에 매우 소량 존재하였거나, 거의 존재하지 않음을 알 수 있었다. L.masco 등(2007)의 연구 결과에서도 *Bifidobacterium*에 대한 미생물 수가 낮게 측정된 이유는 *Bifidobacterium*에 특이적인 primer가 결합하지 못하였기 때문이며, 이는 sample의 *Bifidobacterium*의 농도가 검출하지 못할 정도로 낮은 농도가 존재하였기 때문이거나 미지의 PCR inhibitor가 존재하기 때문이라고 밝혔다. 따라서 본 실험에서는 자돈에서 설사를 유발하는 고병원성 미생물인 *E.coli K88+*에 대한 미생물 수 분석을 실시하였으며, 급성 설사 등이 발현되지 않았으므로 detection 수치가 낮은 것으로 사료된다. 또한 *L.casei* 미생물 균종에 있어서는 0.1% HCl 첨가구가 회장 및 결장에서 가장 높은 수의 미생물 수가 우점하고 있었으며, 맹장과 직장에서는 가장 낮은 수가 서식하고 있었다. *L.plantarum*의 경우 0.1% HCl 첨가구에서 맹장과 결장 내의 미생물 수가 가장 낮았으며, HCl 0.2% 및 0.3% 첨가구에서 HCl 0.1% 첨가구에 비해 우점하는 경향을 보였다. 또한 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 항생제 첨가구는 다른 산제 첨가구에 비해 *L.plantarum*이 많은 수가 서식하고 있는 경향을 나타내었다. *B.subtilis*의 경우에는 항생제 첨가구 및 HCl 0.1% 첨가구의 회장내 미생물 수가 가장 높게 측정 되었으며, 결장 및 직장에서도 HCl 0.1% 첨가구에서 가장 높은 미생물 수가 존재하였다. *S.bovis*의 경우에도 앞에서 밝힌바

와 같이 항생제 첨가구에서 회장 내 미생물 수가 가장 높은 경향을 보였으며, 맹장 및 직장에서는 항생제 처리구가 다른 산제 처리구에 비해 *S.bovis*의 미생물 수가 많은 것으로 측정되었다. HCl 0.1% 첨가구는 *S.bovis*의 수가 가장 낮았으며, HCl 0.2% 첨가구에서 가장 높은 수의 미생물이 서식하는 것으로 나타났다. 또한 각각의 유익균에 대한 미생물 균총(*L.casei*, *L.plantarum*, *S.bovis*, *B.subtilis*) 내에서 살펴보면 대체로 항생제 첨가구의 Ct value가 낮은 것을 알 수 있으며, 이는 유익균이 다른 산제 처리구에 비해 많은 수가 서식하고 있음을 나타낸다. 항생제의 첨가로 인해 유해균의 사멸 및 유익균의 우점이 산제 첨가에 비해 더욱 효과가 높은 경향을 보이는 것으로 사료된다. 그러나 HCl 0.1% 첨가구에서 각각의 장관 내 유익균의 균총 수가 우점하고 있는 처리구가 다수 존재하였으며, HCl 0.2% 및 0.3% 첨가구에서도 항생제 첨가구와 비슷한 정도의 미생물 균총을 나타내는 것으로 나타났다. 이는 뚜렷하지는 않지만 무기산제의 첨가가 장내 미생물 균총을 개선하는데 영향을 미치는 것으로 사료된다. 자돈은 이 유시 염산 분비 부족 및 소화효소의 미발달로 인한 사료의 소화 능력 부족으로 미소화된 사료가 소장내로 유입되고 미생물의 성장 배지로 사용되는 기작에 대한 산제의 개선 효과로서 설명이 가능하다(Kim et al., 2004). 앞의 연구 결과에서 보인 무기 산제 첨가로 인해 위내 pH가 하강하는 경향을 보이며, 이는 단백질 소화율 개선 및 미생물 성장 배지의 감소로 항생제 첨가구와 비슷한 미생물 균총을 유지하는데 도움이 된 것으로 사료된다. 또한 무기산제의 첨가로 인해 외부와 bacteria 내의 pH차이가 많이 나게 되고 이를 정상 pH로 돌려놓기 위해 에너지를 소모 시키고 증식이 억제되어 사멸하게 된다. 또한 internal pH가 낮아지면서 glycolysis를 억제하고, active transport를 방해하며, signal transduction을 방해하는 mechanism으로 bacteria를 억제한다. 따라서 장내 미생물 균총을 개선하는데에 있어서 무기산제(HCl)의 0.1% 첨가를 권장할 수 있을 것으로 사료된다.

제 6 절 무기산제가 이유 자돈의 영양소 소화율 및 질소 대사에 미치는 영향

제 1 항 서 론

포유기의 자돈은 lactose의 함량이 높은 모유를 섭취하기 때문에 고단백질 사료를 소화하기 위한 HCl의 분비나 여타의 다른 호르몬 분비의 필요성이 적다. HCl은 위내에서 pepsinogen을 단백질 소화효소인 pepsin으로 전변시키는 역할을 하며, 또한 이 pepsin의 활성이 가장 높은 pH 2를 유지시켜주는 역할을 한다. 그러나 자돈은 소화기관의 발달 미숙으로 인해 HCl의 분비가 완전치 못하여 위내 pH가 상승하며, 단백질 소화율이 떨어지게 되는 것이다. 낮은 단백질 소화율은 장관 내에서 미생물에 의한 미정상적인 발효를 유발하며, 설사를 일으킨다. 또한 낮은 단백질 이용성으로 성장에도 부정적인 영향을 미친다. 동물의 위내에서 염산은 외부로부터 유입되는 유해미생물을 사멸시키는 역할 뿐만 아니라 위벽의 chief cell에서 분비되는 펩시노겐 (pepsinogen)을 펩신 (pepsin)으로 전변시켜 단백질의 소화능력을 향상시킨다(Kim, 2003). 그러나 이유자돈은 소화 기관의 미성숙으로 염산의 분비가 충분하지 못하며, 소화 효소의 분비도 부족하다. 따라서 단백질 소화능력이 떨어진다. 또한 이유자돈이 유제품이 많은 사료를 섭취하거나 사료를 과다섭취하면 염산의 생산을 감소시킬 수 있다. 특히 자돈의 부족한 염산 분비에 대해 사료 내 단백질 등이 염산을 완충시켜 그 효과를 떨어뜨릴 수 있다. 따라서 무기산인 염산을 자돈사료에 첨가하면 위내의 pH를 떨어뜨릴 수 있을 뿐만 아니라 위내 단백질분해효소의 전변작용을 원활히 하여 단백질 소화율의 향상을 기대할 수 있게 된다. 높은 수준의 유기산 첨가는 비용문제를 고려해 볼 때 경제적이지 않을 수 있지만, 무기산의 경우에는 상대적으로 저렴한 비용으로 유기산을 대체할 수 있다. Mahan 등 (1999)은 이유자돈의 사료에 염산을 첨가하여 염소이온의 농도를 0.38%로 맞춘 결과 이유 후 첫 2 주 동안의 질소 축적률 및 외관상 질소 소화율이 향상되었다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 무기산제의 첨가에 따른 위내 pH 조절에 의한 자돈의 영양소 소화율(조단백질, 조회분, 조지방, 조수분, 조섬유, 칼슘, 인) 및 질소 대사를 규명한다.

제 2 항 실험 방법 및 재료

가. 소화율 실험

소화율 실험을 위하여 42 ± 3 일령의 평균체중 7.79 ± 1.91 kg의 삼원교잡종 ([Landrace \times Large White Yorkshire] \times Duroc) 이유자돈 수컷 12두를 공시하여 4처리 3반복에 완전임의배치법 (completely random design; CRD)으로 개체별로 대사들에 배치하였다. 오전 8시, 오후 8시에, 즉 하루에 두 번으로 나누어 매일 총 200g의 처리별 실험 사료(Phase II)를 급여하였다. 4일간의 적응기간 (adaptation period) 후에 5일 동안 분 과 뇨를 채취한다. 분은 매일 채취하며, 채취된 분은 냉동 보관 한 후 60°C에서 72시간 건조 한 후 Wiley mill을 이용하여 직경 분쇄 한 후 영양소 분석을 실시했다. 뇨는 1.25N HCl 25 ml를 미리 부어 놓은 플라스틱 통으로 매일 채취하였다. Glass wool을 통하여 이물질이 걸러진 후 수거된 뇨는 매일 부피를 측정하여 뇨 수거통에 옮긴 후 즉시 냉동 보관하였다. Sampling 기간이 끝나면 냉동보관되었던 뇨를 녹여 잘 섞은 후 일정량을 채취 한 후 질소 분석을 실시하였다.

나. 화학 분석 및 통계 분석 방법

실험사료 및 분뇨의 일반성분 (조수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 조섬유) 분석은 AOAC (1995)의 방법에 따라 실시하였다. 사료 및 분뇨의 칼슘과 인은 회화한 후 전처리 과정을 거쳐 AAS (atomic absorption spectrophotometer) (Shimadzu, AA-6401, Japan)를 이용하여 측정하였다. 통계분석은 SAS (SAS Institute, 2004)의 일반선형모형 (general linear model; GLM)을 이용하여 수집된 자료에 대한 유의성 검정을 실시하였으며, 최소 유의차 (LSD) 요인분석법에 의해 처리한 결과를 비교하였다.

제 3 항 연구 결과 및 고찰

가. 영양소 소화율 (nutrient digestibility)

본 실험에 있어서 건물 (dry matter), 조단백질 (crude protein), 조지방 (crude fat), 조회분 (curde ash), 칼슘 (Ca), 인 (p)의 소화율에 있어 모든 처리에 있어 어떠한 유의적인 차이도 발견되지 않았다(표 39). 하지만 조단백질 (Crudr Protein)에서는 HCl 0.1% 처리구를 제외하고, 무기산제 처리구가 항생제 처리구보다 높은 단백질 소화율을 보였으며, 조지방(Crude Fat)에서는 무기산제의 처리구가 항생제 처리구보다 높은 소화율을 보였다. 산제는 위내의 pH를 낮춤으로써 단백질을 소화시킬 수 있는 염산의 분비를 촉진함으로써 단백질 소화율을 향상시키고, 이렇게 소화율을 높임으로써 소화되지 않은 물질들이 소장

및 대장으로 이송되어 소장의 용모를 잘라 내거나 대장 내의 미생물이 이용할 수 있는 성장배지를 제공하고, 설사를 유발하는 등의 문제를 해결할 수 있다고 알려져 있다. 특히 무기산제 중 염산(HCl)을 첨가하는 것은 위내의 pH를 낮추는 것은 물론 염산이 분비가 적어도 직접 염산을 섭취하여 이용할 수 있는 효과가 있다. 이는 본 실험에서 무기산제를 첨가한 자돈의 위내 pH를 측정하였을 때, 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 표 40 과 같이 무기산제의 첨가량이 많을수록 위내 pH가 낮아지는 경향을 보인 결과로 설명이 가능하다고 사료된다. 각각 유의적인 차이는 보이지는 않았지만, 염산의 수준이 증가할수록 위내 pH는 더욱 낮아지고, 염산이 직접 작용하거나, 위내 pH를 낮춰 위 분비성 염산의 양을 증가 시킴으로써 단백질 소화율을 개선하는 것으로 사료된다. 유기산제나 무기산제를 첨가함으로써 위내 pH를 낮춘 연구결과도 있지만(Radicliffe 등, 1998), 많은 논문들이 사료를 섭취한 자돈의 위내 소화물의 pH를 조사한 결과 pH를 감소시키는 효과가 뚜렷하지 않는다는 결과를 밝혔다(Burnell 등, 1988; Risley 등, 1992; Canibe 등 2001).

표 39. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 소화율에 미치는 영향^a

Item	Treatment				SEM ^b
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Dry matter	91.78	91.99	91.86	92.38	0.24
Crude protein	90.36	90.11	90.82	91.27	0.36
Crude fat	66.23	64.96	60.31	61.88	1.15
Crude ash	81.76	80.57	81.45	82.54	0.71

^a Twelve pigs were used from an average initial BW of 7.79 ± 1.91 kg to an average final BW of 8.14 ± 1.58 kg. Phase II

^b Standard error of mean.

표 40. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 위 내 pH에 미치는 영향

Item	Treatment				SEM*
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Stomach	4.65	4.50	4.46	4.32	0.08

* Standard error of mean

나. 질소 축적율 (nitrogen retention)

단백질 이용성을 알아보는 질소 축적율에 있어 모든 처리구 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(표 41). 무기산제의 첨가구가 항생제 처리구보다 높은 질소 축적율 및 뇨를 통한 질소 배출량 감소율을 보였으나, 첨가량에 따른 어떠한 경향을 보이지는 않았다. 산제를 첨가하였을 때 이유 자돈의 소화율 및 질소 축적율을 개선한다는 연구 결과도 있지만(Roth 등, 1998), 산제의 첨가가 단백질 소화율이나 질소 축적율을 개선하는데 뚜렷한 효과를 보이지 않는다는 연구 결과도 있다(Giesting and Easter, 1991; Gabert 등, 1995). 이것을 보면 무기 산제의 첨가에 대한 질소 축적율에의 효과가 뚜렷하게 밝혀지지 않는 것이다. 본 실험에서도 마찬가지로 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 HCl 0.1% 및 0.2% 첨가구에서 질소 축적율을 개선한 결과를 보이고 있으며, 이는 영양소 소화율 중 단백질 소화율의 개선 효과와 일치하는 결과라고 할 수 있다. 특히 HCl 0.1% 및 0.2% 첨가구에서는 뇨로 손실되는 질소의 양이 낮은 경향을 보였으며, 이는 체내의 단백질 이용율이 높다는 것을 나타낸다. 또한 HCl의 첨가량이 증가할수록 분으로 배출되는 질소의 양이 낮은 경향을 보였으며, 이는 사료로 섭취된 단백질의 소화 및 흡수율이 개선되어 대사 후 배출되는 대사 분 질소가 낮은 것으로 사료되며, 이로 인해 무기산제인 HCl의 첨가가 이유자돈의 단백질 소화율 개선에 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

표 41. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 자돈의 질소 축적에 미치는 영향 (g/day)^a

Item	Treatment				SEM ^b
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
N intake ^c	6.48	6.48	6.48	6.48	—
Fecal N ^c	0.62	0.64	0.59	0.57	0.02
Urinary N ^c	2.43	2.22	2.03	2.42	0.14
N retention ^{cd}	3.43	3.62	3.86	3.49	0.14

^a Twelve pigs were used from an average initial BW of 7.79 ± 1.91 kg to an average final BW of 8.14 ± 1.58 kg. Phase II

^b Standard error of mean.

^c Not significantly different ($P > 0.80$)

^d N retention = N intake (g) - Fecal N (g) - Urinary N (g)

제 7 절 무기산제가 이유 자돈의 면역 능력에 미치는 영향

제 1 항 서 론

자돈은 생시 어미로부터 모유를 섭취함으로써 면역능력을 획득한다. 자돈 생시에는 아직 면역능력이 완전히 성숙되지 않은 상태이기 때문에 모유에서 전이되는 면역 글로불린 및 여타의 단백질을 흡수함으로써 수동면역을 통해 자신의 체내의 병원균의 감염 등에 대해 저항하게 된다. 그러나 생후 24 - 36시간이 지나면 소장 내에서 분자가 큰 면역 단백질을 흡수하지 못하게 된다(gut closing). 그러나 모유에서 존재하는 수동 면역을 통해 모유를 섭취하는 동안에는 건강한 상태를 유지하다가 이유를 하면서 갑자기 사료가 변하게 되고, 환경이 변하게 되면서 이유 stress를 받게 되고, 이로 인해 병원균의 감염, 설사의 발생이 일어나며, 면역적인 도전(challenge)을 받게 된다. 따라서 이유 시점에서의 자돈의 면역 능력 및 면역능력의 발달 상태는 이유자돈이 이 후의 일생을 살아가는 데에 매우 중요한 요인이 될 수 있다. 이유 후 자돈의 면역 능력이 약하다면 자돈은 쉽게 질병에 감염되며, 설사를 하게 되고 심하게는 폐사에 이르기 때문에 양돈 생산성을 증진시키는 데에 면역 능력의 개선은 필수적이라고 할 수 있다. 특히 항생제 사용의 제한으로 병원성 미생물이나 면역적 도전에 대한 숙주의 저항성 향상이 매우 중요한 요소로 여겨지며, 이러한 면역 능력을 개선시킬 수 있는 항생제 대체제 관련 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 면역 글로불린의 농도는 이유자돈의 면역 능력을 간접적으로 측정할 수 있는 지표로서, 다양한 연구가 이루어지고 있다. 사료에 산제를 첨가하면 사료 내 pH가 변화하고, 따라서 1차적으로 유해균들의 사멸을 유도하고, 또한 위 내 pH를 낮춰서(표 40), 2차적으로 미생물 균총의 변화를 유도한다. 이러한 기작으로 미생물 균총이 변화하면 장내 면역 반응이 다르게 나타날 수 있다. 즉 유해한 미생물의 감소와 유익한 미생물의 증가로 인하여 장내 면역 조직에서 감지되는 항원이 감소하여 장내로 분비되는 항체인 Ig A의 농도 또한 변화 할 것이다. 따라서 본 연구는 무기산제를 이유자돈의 사료에 첨가하여 급여하였을 때, LPS를 주입한 이유자돈의 Ig A 및 Ig G 농도에 미치는 영향을 규명하기 위하여 수행하였다.

제 2 항 실험 방법 및 재료

가. 면역실험

면역실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유한 평균체중 7.79 ± 1.91 kg 이유 자돈 20두를 공시하여 처리당 4두씩을 난괴법에 의해 배치하여 처리 사료를 급여했다. 2 주일 후에 모든 자돈을 대상으로 24시간 절식시킨 후, Lipopolysaccharide (SIGMA L-2880, LPS; 면역반응 유도)를 체중에 맞게 $25\mu\text{g}/\text{kg}$ 씩 복강에 주입하였다(평균체중 7.65 ± 2.60 kg). 주입 후 0.0, 1.5, 3.0, 4.5 시간에 혈액을 채취하여 혈중 immunoglobulin A (Ig A) 및 immunoglobulin G (Ig G) 함량을 분석한다. 혈액은 경정맥에서 채취하여 일회용 유리관에 포집하여 3,000 rpm, 4°C 상태로 15분 동안 원심분리하였다. 그 후 플라스틱 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석시까지 -20°C 에 보관하였다.

나. 화학 분석 및 통계 분석 방법

분석은 ELISA를 이용하였으며, ELISA Starter Accessory Package(BETHYL) 및 Pig IgA ELISA Quantitation Kit · Pig IgG ELISA Quantitation Kit(BETHYL)의 Kit를 사용하였다. 통계분석은 SAS(SAS Institute, 2004)의 일반선형모형 (general linear model; GLM)을 이용하여 수집된 자료에 대한 유의성 검정을 실시하였으며, 최소 유의차 (LSD) 요인분석법에 의해 처리한 결과를 비교하였다.

제 3 항 연구 결과 및 고찰

표 42는 LPS 주입 후, 각 처리별 시간에 따른 혈중 Ig G와 Ig A의 함량을 나타낸 것이다. IgG는 2차 면역 반응 동안 생성되는 것으로, 혈중으로 분비되는 주된 면역글로불린이다. 태반을 통해서 태아에게 전달되는 유일한 항체이기도 하며, 모유에서도 분비가 되는 물질로 실험 기간 동안 각 처리별 Ig G 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 그림 43와 같이 LPS 주입 후 HCl 0.1% 처리구가 다른 처리구에 비해서 1.5시간 뒤에 가장 활발하게 나타났다. Ig A는 침샘이나 눈물샘, 유선 및 장에서 생성되는 기본적인 면역 물질로 실험 기간 중 초기 3시간 동안 각 처리별로 유의적인 차이가 나타났다. HCl 0.1% 처리구가 항생제 처리구와 비슷한 수준의 면역 반응을 보였으며, HCl 0.3% 처리구는 HCl 0.1% 처리구와 유사한 면역 반응을 보였으나 항생제 처리구와 많은 차이를 보였다. 또한 HCl 0.2% 처리구는 가장 약한 면역 반응을 보이면서 처리별 간 유의적인 차이 보이지 않은 4.5시간이 흐른 뒤에도 가장 낮은 Ig A 농도를 보였다. 이처럼 Ig A에서 큰 차이를 보이는 이유는, LPS가 장내 존재하는 *Escherichia coli* O55:B5이 만들어 내는 물질로, 급성 설사를 유발하는 원인체이기 때문에 장내에

서 분비되는 Ig A가 영양 상태에 따라서 급격하게 반응한 것으로 사료된다.

그림 44에서 볼 수 있듯이, 똑같이 무기산제를 첨가하였음에도 불구하고 상대적으로 작은 양을 첨가하여 위내에서 높은 pH를 유지한 HCl 0.1%처리구의 면역력이 항생제 처리구와 비슷한 결과를 낳았다. 반대로 상대적으로 위내 높은 pH를 유지하는 HCl 0.2%처리구의 낮은 농도의 Ig A는 HCl 0.1%처리구보다 면역력이 낮음을 의미하며, 이는 무기산제의 강한 향으로 인하여, 이유 후 초기 사료 섭취량이 작아짐에 따라 충분한 영양소를 섭취하기 못하였고, 이에 주변 환경에 대한 저항성이 떨어져서 잦은 설사를 유발하였으며, 따라서 가장 낮은 사양 성적을 보였다고 사료된다. Oh(2004)는 자돈의 면역 글로불린과 면역반응에 대한 실험에서 유의적인 차이를 발견하지 못하였으며, 이는 무기산제의 첨가가 자돈의 면역 및 소장 내 villus에 아무런 악영향을 미치지 않는 것으로 보인다고 보고하였다.

표 42. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 LPS 주입시 자돈 면역에 미치는 영향^d

Item	Treatment				SEM ^e
	Pcon	HCl 0.1%	HCl 0.2%	HCl 0.3%	
Ig G(ng/ml)					
0.0 h	4.02	3.76	3.55	3.83	0.11
1.5 h	3.22	4.13	3.44	3.72	0.15
3.0 h	2.10	2.81	2.28	2.77	0.13
4.5 h	2.09	2.46	2.19	2.69	0.09
Ig A(ng/ml)					
0.0 h	1.86 ^a	1.76 ^b	0.99 ^c	1.40 ^{ab}	0.11
1.5 h	1.83 ^a	1.58 ^a	0.91 ^b	1.40 ^a	0.12
3.0 h	1.79 ^a	1.69 ^a	1.08 ^b	1.07 ^b	0.12
4.5 h	1.36	1.01	0.84	1.03	0.09

^{a,b,c} Mean within rows with different superscripts differ, $P < 0.05$

^d A total of 20 crossbred pigs were injected LPS from average body weight 7.65 ± 2.60 kg.

^e Standard error of mean.

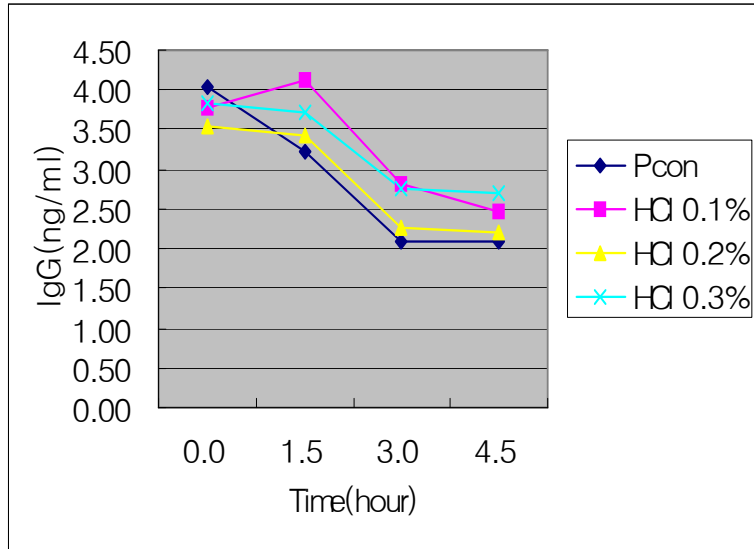


그림 43. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 LPS 주입시 자돈의 Ig G 농도 변화에 미치는 영향

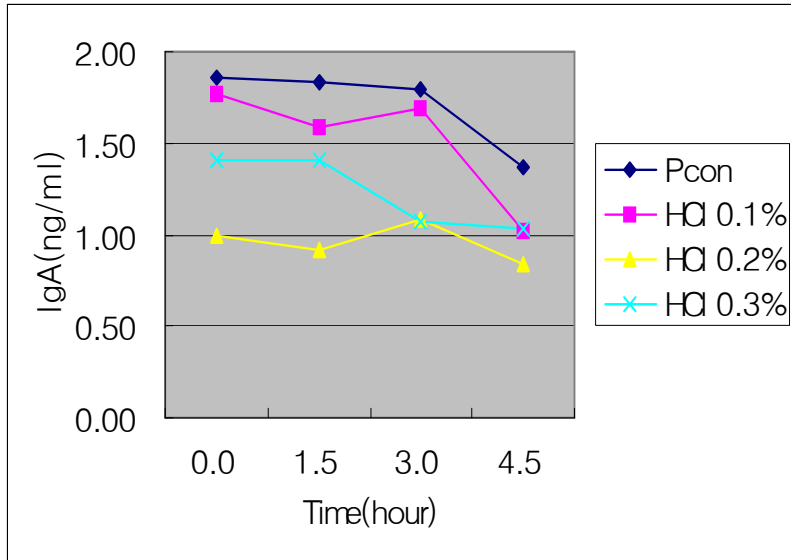


그림 44. 사료 내 무기산제의 수준별 첨가가 LPS 주입시 자돈의 Ig A 농도 변화에 미치는 영향

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구에서는 이유자돈의 소화관 내에 존재하는 미생물 균총수를 정확히 측정할 수 있는 방법을 분자생물학적 기법을 통해 개발하고, 이를 통해 분석된 자돈의 장내 미생물 균총수를 파악하여 이유 자돈의 설사방지를 위해 유익한 미생물의 증식을 촉진할 수 있는 영양, 사료적인 방법의 개발하고자 수행하였다.

현재 국내 양돈의 현황은 사육두수는 증가하지만, 도축(출하)두수는 감소하는 이상 현상이 나타나고 있으며 이와 같은 현상이 발생하는 이유는 자돈기의 20%가 넘는 폐사율에 있다. 특히 현재 양돈 농가에서는 체감 폐사율이 30%가 넘는다고 보고되고 있으며, 이는 이유자돈에서 돼지의 소모성 질병, 즉 4P(PED, PRRS, PRDC, PMWS)의 빈번히 발생하기 때문으로 추정된다. 돼지의 소모성 질병의 주된 병변으로 설사를 들 수 있는데, 특히 이유자돈에서 설사가 발생하게 되면 TGE, PED 등의 바이러스성 질병은 원인 규명이 가능하지만 세균성, 즉 병원성 미생물에 의한 설사는 구체적인 원인을 밝히지 못하고 있는 실정이다.

이유자돈의 소화관 내 미생물 및 병원성 미생물 균총을 규명하기 위해 계대배양의 방법을 이용하고 있는 실정이지만, 몇 가지 어려움이 있다. 예를 들어 정상적인 박테리아의 한 세대가 20-40분 동안에 생존하기 때문에 박테리아 배양이나 대사에 기초한 검출법을 사용하려면 미생물의 증식이 충분히 일어나야 하는데 여기에는 18시간 내지 수일이 걸리므로 높은 특이성과 감도로 미생물을 검출하는 데 한계가 있다. 또한, 돼지의 장내 미생물 종류는 다양하며 아직까지 알려지지 않은 미생물종류가 대부분이라고 밝혀졌고 (Pryde 등, 1999; Leser 등, 2002), 미생물수가 정확히 측정이 되지 않다는 것이다. 전통적인 방법인 계대배양으로 돼지 분내 미생물을 분석할 경우 장내 미생물이 소장에서 대장으로 이동하는 동안 미생물수가 점차적으로 증가되어 소화물내 ml당 10^{11} 에서 10^{12} 까지 이르게 되어 장내 미생물수를 정확하게 분석하는데 있어서 한계가 있다. 더욱이 배양이 어려운 미생물인 경우에는 배양조건이 까다로워 측정하는데 어려움이 있다.

따라서 이러한 문제점을 보완하기 위해 신속하고 특이적인 대체방법으로 개발된 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction :PCR) 기법은 열에 안정한 DNA polymerase를 이용하면서 본격적으로 발전되어 16S rDNA 부분을 이용하여 여러 병원성 미생물을 분류하고 검출하는 데 이용되고 있다. 이 PCR법은 분석의 특이성과 민감성이 높고 표적 유전자를 매우 빠른 속도로 증폭시킴으로써 아주 적은 수의 균도 짧은 시간 내에 검출이 가능하게 되었다. 그러나, 이러한 PCR 기법도 직접 미생물을 검출하기 위해서는 검체 중에 존재하는 여러 가지의

증폭억제물질 제거해야 하는 문제가 남아 있고, 실행상의 또 다른 문제점으로는 검체의 오염 또는 PCR 자체적 반응산물의 축적 등에 의해서 일어날 수 있는 반응들이 있다.

기존의 중합효소연쇄반응에 의한 검체내 세균과 바이러스 분석의 한계를 극복하기 위한 대안으로 실시간 중합효소반응법 (Real time PCR)법이 개발되어 세균과 바이러스를 진단하고 검출하는 데 있어서 더욱 정확하고 신속하게 검사하게 할 수 있으며 여기에 세균과 바이러스 양을 정량까지 가능하게 하였다. 그러나 돼지 장내 미생물을 real time PCR 방법으로 절대정량 분석 하는 접근은 아직 진행되지 않고 있다.

따라서, 본 과제는 기존의 중합효소연쇄반응에 의한 돼지 장내 미생물 분석의 한계를 극복하기 위한 대안으로 실시간 중합효소반응법 (Real time PCR)법을 이용하여 장내 미생물 균총수를 정량적으로 진단하고 검출 하고자는 데 그 목적이 있다. 이러한 분자생물학적 방법을 이용하면 돼지 장내 미생물 균총수에 대한 정확한 측정이 가능하고 더 나아가 장내 유익균 정착에 관한 연구에 있어서 더 많이 발전되리라 사료된다. 더욱이, 축산식품내의 병원성 세균 (리스테리아, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 여시나아, 캄피로박터) 등의 신속한 검출을 위한 연구사업은 이전에 있었지만, 이유자돈 장내미생물을 정량적으로 측정하는 연구는 아직까지 시행되지 않은 실정이므로 이에 대한 연구는 시급히 이루어져야 한다고 사료된다.

본 과제 중 1년차에는 분자생물학적 기법을 이용한 돼지 장내 미생물수 측정 방법 확립을 수행하였다. 국내 자돈의 장내에서 검출되는 미생물 중 다수를 차지하는 *Streptococcus bovis*, *E. coli K88+*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*를 선정하여 미생물의 특징을 조사 (Barnes 등, 1986; Fuller 등, 1982; Maxwell 등, 1995)하였다. 돼지는 인간과 비슷한 단위 동물로써 공통의 유익균이 장내 세균총으로 자리잡고 있다. 주로 미생물은 돼지의 대장 내에 서식하게 되는데 보통은 혐기성 세균이 다수 존재하고 있다. 특히 *Bifidobacterium* 이나 *Lactobacillus spp.* 와 같은 Lactic acid bacteria가 존재하여 장내 미생물 균총을 유지하고 있다. 또한 다양한 연구를 통해서 정상 돼지에는 *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bacteroidaceae spp.* 등이 주요 존재하는 것으로 알려져 있다. 특히 출생시 자돈은 장내에 무균 상태로 존재하다가 점차 환경으로부터 미생물을 섭취하게 되면서 장내 미생물 균총을 형성하게 되는데, 이는 돼지의 일생에 있어서 많은 변화를 갖게 된다. 출생 후에는 곧 *Clostridium spp.*, *Bacteroidaceae spp.*, *Enterococcus spp.*가 빠르게 증식하여 우점 하고, 이유 시점에는 *Bifidobacterium* 이나 *Lactobacillus spp.*가 우점하는 것으로 알려져 있다. 이렇게 다양한 종류의 미생물이 돼지의 장관 내에서 서식하고 있으며, 각 개체간 작

용 및 상호작용을 통해 장내 미생물 균총을 유지하고 살아간다.

본 1년차 연구에서는 자돈의 장내에 서식하며, 생균제로써의 효과를 가지고 있는 총 4 균종으로 *L.acidophilus*, *S.bovis*, *B.subtilis*, *E.coli K88*에 대해서 미생물 균총을 조사하였다. 이렇게 선정된 미생물을 검출하기 위한 PCR 수행을 실시하기 위하여 돼지 장내 미생물 중 특이적인 primer를 제작하였으며, *Streptococcus bovis*, *E. coli K88+*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* 각각에 대해 16S rDNA 부분을 이용하여 PCR primer 및 real time PCR을 위한 특이적 primer를 제작하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 종특이적 시발체로서, AAGGCAGTGGCTTAACCATTTGT (순행)과 CGAGCCTCAGCGTCAGTTAC (역행)의 염기서열을 갖는 *S. bovis*, CGGTGTGTTAGGGAGAGG (순행)과 CTTTGAATCTGTCCGAGAATATC (역행)의 염기서열을 갖는 *E. coli*, AAGTCGAGCGGACAGATGG (순행)과 CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC (역행)의 염기서열을 갖는 *B. subtilis*, AGCTGAACCAACAGATTCAC(순행)과 ACTACCAGGGTATCTAATCC(역행)의 염기서열을 갖는 *L. acidophilus*가 각각 설계되었으며, 종특이성을 위한 검증실험이 수행되었다.

일반적 PCR에 사용되는 primer는 PCR product size의 크기가 real time PCR의 PCR efficiency에 영향을 미치므로 이를 방지하기 위해 PCR product size가 적은(100-300bp) 특이적 primer가 필요하다고 판단되어 real time PCR용에 특이적인 RT-primer를 제작하여 사용하였다. 특히 정량을 위한 real time PCR에서는 비 특이적 band뿐만 아니라 일반적인 PCR에서 나타나는 primer dimer도 실험 오차에 많은 영향을 주므로 이를 제거하기 위한 방향으로 primer 설계 및 PCR condition 조절을 하였다. 이후 제작한 RT-primer를 이용하여, 미생물과 무관한 비특이적인 band가 나타나는지 확인하였으며, 본 연구에서 비특이적 band가 나타나지 않았다.

정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 standard는 증폭 DNA 염기서열로 유전자 재조합된 순수 배양 *E. coli*로부터 추출된 plasmid DNA를 연쇄 회색하여 확보하였다. 이를 위해 종 특이적인 DNA 단편이 들어간 plasmid vector를 제작하여 Standard plasmid DNA를 제작하였다. 이를 위해 RT-primer를 이용하여 순수 배양된 Target 미생물의 특이적인 band를 증폭시킨 후, 증폭된 DNA 단편을 정제하여 준비된 Vector(pGEM-T easy vector)에 삽입하였다. 이후 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 Competent cell에 Heat shock method를 이용하여 transformation을 하였으며, 항생제 선택배지(LB+AMP media)에 Xgal과 IPTG와 함께 도말하여 Target 유전자가 삽입된 plasmid를 가진 Competent cell을 선발하였다. 이 후 선발된 transformed competent cell을 계대 배양하여 plasmid를 추출하고, 얻어진 plasmid에 대한 PCR과 Gel Electrophoresis를 수행

하여 Target 미생물의 특이적인 유전자가 제대로 삽입되었는지를 규명하였다. 이렇게 특정 DNA 단편이 삽입된 plasmid를 대량 추출하여 농도측정 후 Standard plasmid DNA Stock solution으로 사용하였으며 serial dilution을 실시한 standard solution을 가지고 Standard plasmid DNA를 농도별로 희석하여 Standard curve들 작성하였으며 이는 이유자돈 장내 소화물 내 미생물균총 수를 정량적으로 측정하기 위해 수행하였다.

본 실험에서 plasmid DNA에 대한 Target gene의 삽입여부와 비특이적 밴드의 존재여부에 대해 분석해본 결과, target gene이 정상적으로 삽입된 것을 확인하였으며, 이는 비특이적 밴드가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 특히 정확하게 Standard plasmid DNA를 정량하기 위해서는 기존에 사용된 UV spectrometer를 이용한 방법보다는 DNA 이중나선구조에 결합되어 형광을 발광하는 성질을 가져서 미량의 DNA 정량에 알맞은 SYBR green을 이용한 방법이 더 효율적이라고 사료되어 Competitive PCR 방법이 아닌 real time PCR 방법을 이용하여 분석을 실시하여 계산식을 설정하였으며, 이로 인해 비교대상이 되는 샘플도 보다 정확한 정량이 가능해졌다.

또한 sample에 존재하는 내용물에는 그람 양성균과 음성균이 함께 분포되어 있는데 그람 양성균의 세포막에 존재하는 peptido-glycan이 화학적인 방법으로서의 DNA의 추출을 방해하므로 물리적인 방법이 사용되어야 했으며, Bead beater를 이용한 genomic DNA 추출 방법을 사용하여 미지시료의 genomic DNA 추출 효율을 극대화 하였다. 본 1년차 과제에서는 비배양적 실시간 중합효소연쇄반응 방법을 통한 *Streptococcus bovis*와 *Escherichia coli* K88+의 정량에 대한 연구가 수행되었다. *Streptococcus bovis*와 *E. coli*에 대한 정량분석 결과, 99.6%와 95.3%의 중합효소연쇄반응 효율과 1.000과 0.999의 상관계수가 각각 도출되었다. 이 결과는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 방법의 정확성과 신뢰성을 나타내며, 이는 DNA 염기서열이 밝혀진 장내 미생물에 대한 분석방법으로 비배양적 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 방법에 의한 분석법이 효율적이면서도 정확하다는 결론을 입증한다. Real time PCR 기법은 특정 미생물내 중 특이적인 primer를 이용하여 중 특이적 strain을 분석이 가능하여 돼지의 장내 미생물 균총 측정에 있어서 더욱 정밀한 결과를 제시할 수 있었다. 본 1년차 연구를 통해, Real time PCR 기법을 이용하여 장내 미생물 균총을 분석하는데 있어 가장 핵심은 정확하게 정량된 Standard plasmid DNA의 확보와 오염되지 않고 균일하게 미지 시료의 genomic DNA를 추출하는 것이라고 사료된다.

본 과제 2년차에서는 sugar beet pulp (SBP)가 영양소 이용율, 질소 대사 및 면역능력에 미치는 영향에 관한 연구를 수행하였다. 이유 후 자돈의 장내에 유익한 미생물을 정착시키기 위한 방법 중 하나로 사료내 섬유소를 소량 첨가하는

것이다. 과거 연구 결과에 의하면 섬유소가 많은 사료를 급여한 돼지에게서 대장균성 부종이 발생하지 않았고 (Smith와 Halls, 1968), 조섬유 함량이 높은 사료를 섭취한 3주령 이유자돈에게서 심한 설사가 감소하였고, 설사 발생 기간 또한 감소하였다. 이러한 섬유소의 효과에 대한 작용 기작은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 섬유소 분해 미생물의 활성이 증가하여 장내 pH가 감소하고 이에 따라 유해한 미생물의 활성이 감소한다는 이론과, 섬유소의 물리적 특징으로 인하여 미생물의 장내 상피세포에 부착이 방해되어 장내에 서식하지 못한다는 이론 등이 있다. 따라서 이유자돈내 섬유소를 첨가하면 장내 유익균의 활성을 증가시키고 유해균의 활성을 억제시켜 자돈의 건강상태 및 생산성이 향상될 것이라고 사료된다. Sugar beet (사탕무)는 가공되지 않은 사탕무 자체를 말하는 것으로 다른 특정 지역에서는 그대로 sugar beet의 뿌리를 돼지에 급여하기도 한다. 최근 일련의 연구결과들은 sugar beet pulp의 섬유소는 돼지에 있어 이용성이 높을 뿐만 아니라 자돈에서의 소화율이 80~85%에 달한다는 보고가 있다.

따라서 본 연구에서는 사료첨가제로 사용될 수 있는 섬유소인 beet pulp의 첨가가 장내 유익한 미생물 군총의 수를 증가시키고 유해한 미생물 군총의 수를 감소시키는 효과가 있는지를 1년차 과제에서 개발된 분자생물학적 기법을 이용한 미생물수 측정을 통하여 정확히 구명하고 이에 따른 숙주동물의 건강증진 효과를 조사함과 동시에 이유자돈의 소화관내에 유익한 미생물 군총들이 우점될 수 있는 적정 섬유소의 첨가 수준을 확립하고자 하였다.

사양실험을 위하여 21 ± 3 일령에 이유향 평균체중 5.87 ± 0.02 kg의 삼원교잡종 ([Landrace \times Large White Yorkshire] \times Duroc) 이유자돈 120두를 공시하여 5처리 6반복에 체중과 성별을 고려하여 난괴법 (randomized completely block (RCB) design)으로 돈방당 4두씩 배치하였다. 처리구는 다음과 같다 : 1) 대조구 (Control; Basal diet), 2) A 처리구 (Basal diet의 2.5%를 sugar beet pulp (SBP)로 대체), 3) B 처리구 ((Basal diet의 5.0%를 SBP로 대체), 4) C 처리구 (Basal diet의 7.5%를 SBP로 대체), 5) D 처리구 (Basal diet의 10.0%를 SBP로 대체). SBP의 첨가수준에 따른 섬유소 함량을 제외한 다른 모든 영양소의 함량은 처리별로 차이 없게 하였으며, NRC 사양표준 (1998)에 따라 충족시켰다. 체중과 사료섭취량을 매주 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일당사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 구하였다. 장내 미생물 군총 조사를 위해 회장 (ileum), 맹장 (cecum), 횡행결장 (transverse colon), 직장 (rectum)에서 소화물을 채취하여 미생물 군총수를 분석하였다.

사료 내 sugar beet pulp (SBP)의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향

을 살펴보면, 실험 전기간 (5 주) 동안 사료내 sugar beet pulp (SBP)를 첨가한 처리구의 체중 (body weight), 일당증체량 (ADG), 사료효율 (G/F ration)이 증가하였다 ($P < 0.05$). 실험 개시 후 3주째부터 체중 및 일당증체량에 있어 SBP 첨가 여부 및 그 첨가 수준에 따라 차이가 있었다. 5 % 이상의 SBP 첨가구 (B, C, D 처리구)의 체중은 실험 종료 시까지 유의적인 차이를 보이며 대조군에 비해 높았으며, 그 중 7.5 % 첨가구의 체중 및 일당증체량이 가장 많이 개선되었다 ($P < 0.05$). 일당사료섭취량 (ADFI)의 경우 전 실험 기간 동안 어떠한 유의적인 차이도 보여주지 않았다 ($P > 0.39$). 다만 SBP 첨가군이 대조군에 비해 섭취량이 증가하는 경향을 띠었으나 SBP 첨가 수준에 따른 일관된 섭취량 증가는 관찰되지 않았다. 사료효율 (G/F ratio)의 경우 SBP가 5 % 이상 첨가된 처리구에 있어서 대조군에 비해 고도의 유의적인 차이를 보이며 개선되었다 ($P = 0.011$). 사료효율의 경우 체중이나 일당증체량과는 약간 다른 효과를 보여주었는데, 체중과 일당 증체량은 SBP를 7.5 % 급여한 처리구에서 가장 나왔던 반면, 사료효율은 SBP 첨가량이 증가함에 따라 개선되면서 SBP가 가장 많이 첨가된 SBP 10% 첨가구에서 가장 높았고, 뒤를 이어 7.5 %를 첨가한 처리구가 뒤를 이었다. 본 실험에서는 여러 가지 다양한 설사의 원인 중에 대장균과 유익균에 대한 조사를 통해 SBP가 미치는 영향을 연구하려 하였으며, 과식에 의한 설사가 일어나는 지를 파악하기 위해 사료섭취량을 측정하였고, 소장내 형태학적 고찰을 통해 영양성 설사로 인한 장의 손상이 있었는지 여부를 파악하였으며, 소화율 실험을 통해 전반적인 영양소 소화율에 이상이 있는 지를 검토하였다. 각 처리별로 설사의 빈도 또는 설사의 정도를 조사하였으나, 전 실험기간동안 설사로 분류할 만한 특이성을 보인 실험돈군이 없었으며, 간혹 처리와는 상관없이 불특정 개체에서의 미약한 연변만이 관찰되어 설사빈도 조사가 불가능 하였다. 만약 설사에 대한 관찰 및 조사를 하려면 깨끗한 환경 (clean nursery) 보다는 더러운 환경 (dirty nursery)상태를 조성하거나, 의도적인 병원균의 감염을 유발하는 것이 용이하리라 사료된다. 몇몇의 연구결과들은 beet pulp 또는 비전분성다당류 (non-starch polysaccharide)가 다량 함유된 원료를 자돈 사료 내 첨가하였을 때 자돈 설사 발생이 감소하였다는 보고를 하였다. 소장내 융모의 높이, 융와의 깊이 그리고 그 둘의 비율 (villi height : crypt depth)을 관찰한 결과, 처리간에 융모의 높이, 융와의 길이, 그리고 그 비율에 있어 통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 하지만 대조구 (CON)에 비해 sugar beet pulp를 첨가한 첨가구의 융모의 높이와 융와의 길이가 커지는 경향이 관찰되었다. 특히 sugar beet pulp를 7.5 %, 10 % 첨가한 C, D 처리구에서의 그 크기가 다른 처리구보다 커지는 경향을 보였지만 유의성은 없었다. 이러한 경향이 발생하는 원인은 사료내 첨가한 SBP가 장표면의 상피세포를 자극하여 손상된 융모의 탈락 및 영양

소의 공급을 원활히 하여 용모의 복원 및 발달을 촉진하였기 때문인 것으로 사료된다.

해부실험을 위하여 처리당 3두 씩 총 15두를 선발하여 해부를 실시하였다 (평균체중 7.21 ± 1.33 kg). 도살하여 장내 미생물 균총 조사를 위해 회장 (ileum), 맹장 (cecum), 횡행결장 (transverse colon), 직장 (rectum)에서 소화물을 채취하여 장내 미생물 중 *Lactobacillus casei*, *Streptococcus bovis*, *Escherichia coli* K88ac, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* 균총수를 본 과제 1년차 연구결과를 토대로 하여 분석하였다. Real time PCR을 실험을 실시하기 위하여 각 균종에 특이적인 primer(real-time PCR primer) 제작하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 종특이적 시발체로서, AAGGCAGTGGCTTAACCATTTGT (순행)과 CGAGCCTCAGCGTCAGTTAC (역행)의 염기서열을 갖는 *S. bovis*, CGGTGTGTTAGGGAGAGG (순행)과 CTTTGAATCTGTCCGAGAATATC (역행)의 염기서열을 갖는 *E. coli*, AAGTCGAGCGGACAGATGG (순행)과 CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC (역행)의 염기서열을 갖는 *B. subtilis*, CCGTCACACCATGAGAGTTT (순행)과 CCTTGTTACGACTTCACCCT(역행)의 염기서열을 갖는 *L. casei*, CCCGTCACACCATGAGAGAGTT (순행)과 GGCTACCTTGTTACGACTTC (역행)의 염기서열을 갖는 *L. plantarum*가 각각 설계되었으며, 종특이성을 위한 검증 실험이 수행되었다. 일반적인 PCR primer는 PCR product의 size가 커서 예리의 소지가 있으므로 100 ~ 200 bp 정도의 PCR product size로 증폭 시키는 real-time PCR primer를 제작하였다. Real-time PCR primer를 제작 후, 비특이적인 band가 나타나는지 PCR과 전기영동(gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였고, 비특이적인 band가 나타나지 않았다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 standard는 증폭 DNA 염기서열로 유전자 재조합된 순수 배양 *E. coli*로부터 추출된 plasmid DNA를 연쇄 희석하여 확립하였다. Real-time의 특성상 측정된 fluorescence값 (Ct value)으로 copy number (미생물 균총수)가 바로 얻어지는 것은 아니다. 이를 위해서는 여전히 standard를 써서 회귀식을 구한 후에 계산을 해야 한다. 5가지 각각의 미생물 균총인 *L. casei*, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*, *E. coli* K88+을 공장, 맹장, 횡행결장, 직장 부위에서 측정된 Ct value를 나타냈으며, PCR efficiency의 회귀식에 대입하여 절대정량 분석값을 구하였다. 다만 Ct value로 표기한 이유는 통계적 검증을 통해 미생물 균총의 차이를 비교하기 위해서 이다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응에는 iCycler[®] Optical Module (Bio-Rad, USA)과 iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, USA)가 사용되었다.

S. bovis, *E. coli*, *L. plantarum*, *B. subtilis*, *L. casei* 에 대한 정량분석 결과,

0.9978, 0.9975, 0.9992, 0.9994, 0.9949의 상관계수가 각각 도출되었다. 이 결과는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 방법의 높은 정확성과 신뢰성을 나타내며, 이는 DNA 염기서열이 밝혀진 장내 미생물에 대한 분석방법으로 비배양적 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 방법에 의해 효율적이면서도 정확한 분석을 가능하게 한다는 것을 의미한다.

본 연구에서, *L. casei*의 경우 대조구에 비해 SBP를 5, 7.5 % 첨가한 처리구에 유의적으로 많았으며 ($P<0.05$), 2.5, 10 % 첨가한 처리구도 유의적 차이는 없었으나 더 많은 경향을 보여주었다. *L. plantarum*, *S. bovis*의 경우에는 통계적으로 뚜렷한 차이가 나타나지는 않았지만 SBP를 첨가한 처리구 (특히 5, 7.5 % 첨가구)가 대조구에 비해 많이 서식하고 있던 것으로 관찰되었다. *B. subtilis*의 경우에는 5 % 첨가구에서 가장 미생물 수가 높았으며 대조구와 2.5 % 첨가구가 가장 낮았다 ($P=0.0188$). 유해균인 *E. coli* K88+의 경우 예상과 동일하게 대조구보다 SBP 첨가구의 소화물에서 근소하게 더 많은 것처럼 보이나 유의적인 차이는 보이지 않았으며, CFU으로 환산하면 거의 발견되지 않았다. *Bacillus subtilis*, *S. bovis*의 경우 공장과 횡행결장에서 SBP를 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 높은 ($P<0.05$) 것으로 나타났다. 유의적 차이를 보이는 결과는 상기된 2가지 균주이지만 전반적인 경향은 유익균주 *L. casei*, *L. plantarum*, *S. bovis*, *B. subtilis*가 대조구 보다는 SBP 첨가구에서 더욱 많은 경향을 보였다. 또한 prebiotics는 속효성 효과를 보이는 것이 아니라 지속적 급여를 통해 장내 미생물 균총을 개선해 나간다는 mechanism을 지니고 있다고 본다. 따라서 본 sample의 채취시기가 실험사료를 급여한지 2주후의 어느 한 시점에서 이루어진 것이기 때문에 추가적인 해부를 통한 sample의 채취를 할 기회가 주어진다면 보다 많은 정보를 얻을 수 있으리라 사료된다.

Sugar beet pulp를 5% 이상 첨가하였을 때, 성장 개선 효과가 체중, 일당 증체량, 사료 효율에서 나타났으며, 장내 미생물 균총에서도 *Bacillus subtilis*, *S. bovis*의 경우 공장과 횡행결장에서 sugar beet pulp 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 높았다. 이는 일일 증체량과 성장효율이 SBP를 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 개선된 결과와 일치한 결과였다. 결론적으로, 이유자돈에서의 성장능력의 향상은 이유시기부터 sugar beet pulp를 급여로 장내 유익한 미생물 균총이 유지 되었기 때문으로 사료된다. 자돈 사료에 첨가한 섬유소가 장내에 정착하고 있는 유익한 미생물에 영향을 주어 자돈의 성장 향상에 도움을 준 것이라고 사료된다. 본 과제 1년차 연구에서 확립한 real-time PCR을 이용한 미생물 균총의 정량화 기술을 통해 자돈 사료 내 SBP 첨가가자돈의 장내 유익 미생물 균총 유지 및 이유자돈의 성장 개선 효

과를 구명할 수 있었다고 사료한다.

본 과제 3년차에서는 무기산제가 이유자돈의 성장, 혈중유리아태 질소, 설사발생 빈도 및 장내 미생물 균총에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였다. 항생제 대체제로서 각광을 받고 있는 대안으로서, 여러 물질이 있으나 그 중 산제의 종류에는 유기산제와 무기산제가 있는데 현재까지 학계에서는 유기산제에 대한 연구가 많이 이루어져왔고 산업계에 실제 많이 사용되어 왔다. 하지만 무기산제는 산의 강도와 가격 면에서 유기산제보다 더욱 우수하고, 최근 본 연구실에서는 무기산을 새로운 부형제에 부착을 시킨 새로운 무기산제를 개발하였다.

또한 이유자돈 사료에 새로 개발된 무기산제의 첨가가 장내 유익한 미생물 균총의 수를 증가시키고 유해한 미생물 균총의 수를 감소시키는 효과를 1년차 과제에서 개발된 분자생물학적 기법을 이용한 미생물수 측정을 통하여 정확히 구명하고 이에 따른 숙주동물의 건강증진 효과를 조사함과 동시에 정확한 산제의 첨가 수준을 확립하고자 하였다.

본 실험에서는 총 5종류의 미생물 균종인 *S. bovis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. subtilis*, *E. coli* K88+을 2년차 연구과제에 수행했던 분자생물학적 기법을 이용하여 분석하였다. 본 2년차 연구과제에서 확립한 이유자돈의 장내 소화물로부터 비배양적 실시간 중합효소연쇄반응 방법을 통한 *S. bovis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. subtilis*, *E. coli* K88+의 정량에 대한 연구가 수행되었다. 시료내 미생물의 전체 DNA는 Ultra Clean™ Dry Soil Kit (MoBio, 미국)를 사용한 bead-beating 방법으로 추출하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 종특이적 시발체는 2년차 연구과제에서 제작한 것으로 사용하였다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 standard는 증폭 DNA 염기서열로 유전자 재조합된 순수 배양 *E. coli*로부터 추출된 plasmid DNA를 연쇄 희석하여 확보하였다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응에는 iCycler® Optical Module (Bio-Rad, USA)과 iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA)가 사용되었다. *S. bovis*, *E. coli*, *L. plantarum*, *B. subtilis*, *L. casei*에 대한 정량분석 결과, 0.996, 0.994, 0.998, 0.998, 0.999의 상관계수가 각각 도출되었다. 이 결과는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 방법의 높은 정확성과 신뢰성을 나타내는 것이다.

*Bacillus subtilis*의 경우 회장에 있어서 항생제 처리구와 무기산제 0.1% 처리구에서 유의적으로 낮은 Ct value를 나타내었으며(P<0.05), *Lactobacillus casei*의 경우에는 맹장에서 HCl 0.1% 처리구에서 Ct value가 높게 나타났다. 특히 *E. coli* K88 균종의 경우 다른 미생물(*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*)에 비해 Ct value가 매우 높은 수치를 나타냈으며, 이는 다른 미생물에 비해 병원성 설사 유발 미생물인 *E. coli* K88이 장관 내에 거의 존재 하지 않음을 나타낸다. 생물 균총으로는 *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus bovis*, *E.coli* K88의 순서로 미생물 수가 높은 것을 알 수 있으며, 유익균이 유해균 보다 우점하고 있고, 유산균인 *Lactobacillus spp.*가 더 많은 수가 서식하고 있다.

LPS 주입 후 HCl 0.1% 처리구가 다른 처리구에 비해서 1.5시간 뒤에 가장 높게 나타났다. HCl 0.2% 처리구는 가장 약한 면역 반응을 보이면서 처리별간 유의적인 차이를 보이지 않은 4.5시간이 흐른 뒤에도 가장 낮은 Ig A 농도를 보였다. 이처럼 Ig A에서 큰 차이를 보이는 이유는, LPS가 장내 존재하는 *Escherichia coli* O55:B5이 만들어 내는 물질로, 급성 설사를 유발하는 원인체이기 때문에 장내에서 분비되는 Ig A가 건강 상태에 따라서 급격하게 반응한 것으로 사료된다.

실험 전 기간(5 주) 동안 사료내 무기산제를 첨가한 HCl 0.1% 처리구와 항생제 처리구에 있어 일당증체량이 통계적 유의적으로 가장 높았다. 전체 실험 기간 중, 사양 실험군의 평균 설사 빈도는 1.73으로 나타났다. 이는 이유 자돈에 있어서 설사는 빈번한 것임을 나타내는 것이며, HCl 0.2% 처리구가 다른 처리구에 비해서 높은 수치를 나타내었다. 2~3주차에는 HCl 0.1% 처리구가 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였으며, 항생제 처리구는 이보다 높았다. 전체적으로는 비슷한 설사빈도이나 사양 성적이 HCl 0.1% 처리구와 항생제 처리구가 우수하게 나온 이유는 이유 초기의 적은 빈도의 설사가 자돈 후기의 성장에 큰 영향을 미친 것으로 사료된다. 본 3년차 연구과제를 통해서, 무기산제 0.1%를 첨가한 처리구가 *Bacillus subtilis*의 경우 회장에 있어서 다른 무기산제 처리구에 비해 유의적인 차이를 보이며 높았다. 면역반응 실험 결과에 있어서는, LPS 주입 후 1.5시간과 3시간에 항생제 처리구와 HCl 0.1% 처리구에서 IgA 농도가 유의적으로 가장 높게 나타났다. 일일 증체량과 면역력이 무기산제 0.1% 첨가한 처리구에서 다른 무기산제 처리구에 비해 유의적으로 개선된 결과와 일치한 결과였다. 이는 이유 자돈에서의 성장능력의 향상은 이유시기부터 무기산제를 급여로 장내 유익한 미생물 균총이 유지 되었기 때문으로 사료된다. 따라서, 자돈 사료에 첨가한 무기산제가 장내에 정착하고 있는 유익한 미생물에 영향을 주어 자돈의 면역력과 성장 향상에 도움을 준다고 사료된다. 본 과제 1년차 연구에서 확립한 real-time PCR을 이용한 미생물 균총의 정량화 기술을 통해 자돈의 건강 증진 효과를 조사함과 동시에 이유자돈의 성장 개선 및 면역력 향상 효과를 구명할 수 있었다고 사료한다. 사료에 무기산제를 첨가하면 사료내 pH가 변화하고, 따라서 1차적으로 유해균들의 사멸을 유도하고, 또한 위 내 pH를 낮춰서 2차적으로 미생물 균총의 변화를 유도하여 장내 면역 반응이 다르게 나타날 수 있다는 것을 보였다. 즉 유해한 미생물의 감소와 유익한 미생물의 증가로 인하여 장내 면역 조직에서 감지되는 항원이 감소하여 장내로 분비되는 항체인 IgA의 농도 또한 변화

를 보였으며, 이는 무기산제는 장내 미생물 균총의 변화를 유도하여 면역 능력을 증진시킬 수 있다는 기능을 보였다.

한편, 실시간 중합효소반응 (real time PCR)은 기존 일반 PCR에 비해서 분석시간을 많이 단축할 수 있어 수 시간 내에 많은 샘플 분석이 가능하게 하였고, 더욱 신속하고 정확한 측정할 수 있으며 여기에 미생물 균총의 양을 정량까지 분석 할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 미량의 DNA 정량에 알맞은 SYBR green을 이용한 Real time PCR을 이용하여 이유자돈 장내 소화물에 있는 미생물을 정량적으로 분석하였다. 기존 계대배양에서는 특정 미생물 총 수만 측정할 수 있었으나, real time PCR은 특정 미생물의 종 특이적 계통 분석과 정량을 가능케 했다. 본 연구에서 사용한 real time PCR은 일반 PCR에서 증폭하여 agarose gel에서 전기영동을 실시한 것보다 더 민감하다는 것을 보여주었다. 이와 같이 본 연구에서 확립한 real time PCR은 재현성에서 탁월하였으며 10 에서 10 까지 분석이 가능하였다. 따라서 돈사내에서 사양되는 이유자돈의 경우 분변으로 분비되는 작은 수의 설사 원인균인 대장균에 의해 전체 돼지가 감염을 일으킬 수 있는데 이러한 경우에 real time PCR을 이용하면 적은 수의 대장균도 감지할 수 있기 때문에 예방을 위한 프로그램에도 사용할 수 있을 것으로 사료한다.

한편, 본 과제에서 분자생물학적 기법을 이용하여 이유자돈 장내 미생물 5종을 구명 하였으나, 자돈의 장내에는 더욱 다양한 미생물 균종이 서식하고 있으며, 항생제대체물질로 첨가되는 생균제용 미생물 균종도 다양하게 사용하고 있어 앞으로 더 많은 균종을 본 과제에서 확립한 분자생물학적 기법을 이용하여 미생물을 정량적인 분석이 가능 할 것으로 사료한다. 자돈 사료용 생균제에는 자돈의 장내 서식하는 미생물만을 이용하는 것이 아니라, 본래 알려져 있는 유익한 미생물이 다양하게 이용된다. 이러한 생균제의 첨가에 의한 이유자돈에게 있어 장내 유익 미생물 균총 유지 및 병원균 제어에 미치는 영향에 대한 평가가 본 과제에서 개발한 분자생물학적 기법을 이용하여 가능해졌다.

특히 인체에도 이용되는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*와 같은 효모도 생균제로 사용되므로 분자 생물학적 기법을 이용한 장내 효모 수 측정에 대한 연구가 추가적으로 이루어 져야 할 것으로 사료된다. 더욱이, 생균제 연구에 있어서 현재 각각의 미생물 자체의 특성을 이용할 뿐만 아니라 그 미생물의 상호작용(interaction)을 이용한 시너지(synergy)효과를 이용하는 경우가 많은데 자돈의 장내 미생물 수 측정 뿐 아니라 이의 상호작용을 규명을 본 과제에서 수행한 분자생물학적 기법을 이용하여 생균제 개발과 검증에 있어서 더욱 효율적으로 사용될 것으로 사료된다.

따라서 본 연구를 통하여 분자생물학적 기법(real time PCR)을 이용하여 자돈

장내의 유익한 미생물 균총의 특징을 규명하고 기존 계대배양법의 문제점을 개선한 정확한 미생물 수 측정 기술을 확립하며, 생균제용 미생물 제제의 장내 분포 추적 방법을 확립함으로써 자돈의 영양적 설사를 예방할 수 있는 대안을 제시하며, 또한 자돈 장내 미생물 균총을 개선할 수 있는 설포유소 제제(sugar beet pulp) 및 경제성이 우수한 무기산제(inorganic acidifier)의 이유 자돈 사료 내 첨가를 통하여 그 첨가수준을 설정하고 장내 미생물 균총에 대한 개발된 분자생물학적 기법(real time PCR)을 통한 검증으로 국내 양돈 산업의 발전을 위해 해결해야 할 문제에 대한 다방면의 접근과 우리나라 양돈 산업 경쟁력 제고에 필수적인 자돈 폐사율 감소, 이를 통한 생산성 향상의 결과를 창출해 낼 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

현재 우리나라에서 가장 문제가 되고 있는 양돈상의 문제는 돈콜레라와 자돈의 설사증세로서, 조사 보고에 의하면 포유 자돈의 경우 우리 나라 전체 농가의 82.6%가 세균성 설사로 큰 피해를 받고 있다. 이러한 세균성 설사증의 주된 원인은 enterotoxin을 생산하는 *Enterotoxigenic Escherichia coli*(ETEC)로서 주로 K88이나 K99 antigen과 같은 적은 수의 serotype에 한정되어 있으나, *Salmonella*나 *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* 등의 병원성 미생물도 자돈의 세균성 설사증의 주된 원인으로 보고되고 있다. 이러한 설사증의 예방을 위해서는 자돈의 장내 미생물 균총의 조절이 가장 중요하며, 이들의 조절을 위한 본 연구과제를 비롯한, 항생제 대체용 각종 첨가제 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

본 연구를 통하여 국내에서 사육되고 있는 자돈의 장내 미생물 균총의 특징을 규명하고 실시간 중합효소연쇄반응방법을 이용하여 미생물들을 정량적으로 정확하게 측정할 수 있는 기술이 개발 되었으며, 국내의 이유자돈에서 빈번히 발생하는 설사의 원인 중에서 세균성 설사의 원인을 구체적으로 규명할 수 있게 되었다.

한편, 자돈의 장내에 유익한 미생물 균총이 우점될 수 있도록 하는 sugar beet pulp 및 생균제, 무기산제 등 다양한 기술 개발의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 국내에서 유통되는 자돈용 생균제(probiotics)의 품질 및 효능 검증을 위한 분석 방법으로 보급되어 이용 될 것으로 사료된다. 특히 기존의 계대배양법의 문제점인 시간과 주관성의 문제점을 해결함으로써 자돈의 장내 미생물 균총을 PCR 방법을 이용하여 경제적이면서도 효율적인 분석 결과를 얻을 것이다. 또한 이유자돈의 설사를 방지하기 위하여 사료 중에 사용되는 항생제(antibiotics), ZnO, CuSO⁴ 등의 첨가량을 줄이거나 사용하지 않도록 하여 사료비의 약 5 원/kg 이상의 절감 효과를 기대할 수 있다. 국내의 양돈 산업에 가장 큰 비중을 차지하고 있는 이유자돈의 폐사율이 약 15 ~ 20% 정도로 보고되어 있는데, 장내 미생물 균총을 조절함으로써 건강한 자돈을 사육한다면 5% 정도의 폐사율을 낮출 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구가 이러한 개선 효과에 대한 기본 자료 및 지침으로 이용 가치가 있다.

특히 무분별하게 사용되는 자돈용 생균제(probiotics)의 정확한 품질 평가를 통하여 효율적인 생균제의 개발뿐만 아니라 장내에 유익한 미생물 균총들이 우점할 수 있는 영양, 사료적 사양체계의 개발이 가능할 것으로 사료된다. 인체에도 이용되는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*와 같은 효모 생균제

등에 대해 분자 생물학적 기법을 이용한 장내 효모 수 측정에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 하며 본 과제에서 확립한 분자생물학적 방법을 이용할 수 있는 것으로 사료된다. 또한 생균제 연구에 있어서 현재 각각의 미생물 자체의 특성을 이용할 뿐만 아니라 그 미생물의 상호작용(interaction)을 이용한 시너지(synergy)효과를 이용하는 경우가 많은데 자돈의 장내 미생물 수 측정 뿐 아니라 이의 상호작용을 규명하는 데 있어서 본 과제의 분자생물학적 기법으로 사료용 생균제 개발과 검증에 더욱 효율적으로 사용될 것으로 사료된다. 더군다나 산소가 희박한 장관내 환경상 혐기성 생균제가 가장 효과적이나, 사료용 첨가제로서의 생균제는 대부분 호기성이나 통기성인 경우가 많기 때문에, 환경에 따른 생균제 내의 균주로 사용된 미생물의 검증이 필요하며 본 과제에서 확립한 기법을 이용하여 생균제 균총의 검증도 가능하다.

또한, 본 연구를 통해 우리나라 이유자돈의 장내 미생물 균총의 양상을 외국의 경우와 비교, 분석하는 데에 활용하며, 자돈의 장내 미생물에 관한 연구를 위한 정확한 분석 기법을 제시함으로써 국내의 산업현장 및 학계에 보다 정확한 돼지 장내 미생물 정보를 전달하며, 이유자돈의 장내 미생물 균총을 조절할 수 있는 섬유소 수준의 확립과 새로운 무기산제를 통한 경제적이고 효율적인 산제의 첨가 수준을 제시함과 더불어 장내 미생물 균총의 변화를 통하여 자돈의 면역능력 증진 효과를 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

현재 본 연구에서 분자생물학적 기법을 이용하여 분석 가능한 미생물은 총 5종이다. 장내 미생물 균총의 조절이 한정된 공간 내에서의 특정균 우점을 통해서 이루어지기 때문에 유익한 미생물인 생균제를 중심으로 연구가 이루어졌으며, 이들 중 병원성 미생물들은 *E. Coli* K88로, 상대적으로 병원성 미생물의 비율은 작았다. 하지만 자돈의 장내에는 더욱 다양한 미생물 균종이 서식하고 있으며, 이유자돈 사료에 첨가되는 생균제용 미생물 균종도 다양하다. 또한 자돈 사료용 생균제에는 자돈의 장내 서식하는 미생물만을 이용하는 것이 아니라, 본래 알려져 있는 유익한 미생물이 다양하게 이용된다.

본 연구에서 개발된 real time PCR 기법을 통하여, 면역 능력 및 장내 미생물 균총에 영향을 주는 항생제 대체제나 환경 개선용 첨가제, prebiotics, oligosaccharides와 같은 물질의 개발에 이용될 수 있으며, 자돈의 미생물 균총 뿐 아니라 육성·비육돈의 장내 미생물 균총에 대한 연구에도 적용이 가능하다. 특히 육성·비육돈에 있어서는 분변의 양을 줄이거나, 분변에서 유래되는 악취를 저감하는 미생물의 연구 개발에 본 연구결과가 효과적으로 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

특히 본 연구는 반추위에 서식하는 미생물이나, 토양이나 물에 서식하는 미생물에 대한 real time PCR 기법을 이용한 미생물 수 측정 방법은 매우 보편화 되

어 있으나, 아직까지 단위동물의 장관 내에서 미생물 균총 연구에 있어서 분자생물학적 기법을 사용한 연구 결과가 없다는 것을 미루어 봤을 때, 그 활용도가 매우 높다고 할 수 있다. 세계적으로도 현재 양돈 분야에는 생명공학 기술이 많이 도입되지 않고 있는 실정이며, 이에 따라 본 연구에서 확립한 장내 미생물 균총의 측정을 위한 real time PCR 기법이 갖는 의미는 매우 크다고 할 수 있다. 그러므로 본 연구 결과를 통해 생명공학 기술에 대한 양돈 산업에의 적용으로 첨단 기술을 수용하고, 활용하는 축산업으로 새롭게 도약하는 계기가 될 수 있으며, 국내외의 학술회이나 저널에 발표함으로써 기술의 우수성을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 사료용 첨가제가 *Salmonella*나 *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* 등의 병원성 미생물의 공격 접종 후의 장내 미생물 균총에 미치는 영향도 real time PCR 기법을 통해서 보다 정확한 분석이 가능하다. 전통적인 계대 배양을 통한 CFU 개념의 미생물 개체수 판별은 부정확하며, 설사 발생과 관련한 정확한 기준을 제시 할 수 없기 때문에 조기에 검출하여 질병을 차단하는 것은 불가능하다. 하지만, real time PCR 기법으로 설사를 유도하는 병원성 미생물 및 바이러스의 공격 접종을 통한 장관내 미생물 균총 분석은 돼지 질병도 측정시에 기술적·산업적으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

자돈의 세균성 설사 뿐만 아니라 폐사에 있어서 치명적인 Rotavirus나 돼지 유행성 설사병(PED) 바이러스, 돼지 전염성 위장염(TGE) 바이러스, *Enterotoxigenic Escherichia coli*(ETEC) K99 등의 각종 설사병 원인균을 선정하여 그 미생물에 대한 종특이적 시발체를 제작하고 본 과제에서 확립한 정량적 실시간 증합효소연쇄반응을 통해 병원성 미생물 균총에 대한 정확하고 신속하게 검사 뿐만 아니라 정량분석까지도 가능하다고 사료된다. 따라서 국내 농가에 빈번하게 발생되어지는 돼지 유행성 설사병(PED)의 농가별 감염 실태를 보다 정확하게 분석할 수 있으며 농가별 개체 방역 관리를 통한, 국내 바이러스성 설사 발생을 유럽 수준으로 낮출 수 있는 가능성을 가지고 있다.

따라서 본 연구를 통한 이유자돈의 영양적 설사를 예방할 수 있는 자돈 설사 방지 기술의 개발 및 장내 미생물 균총의 분자생물학적 기법을 이용한 측정 방법의 확립을 통해 현재 문제되고 있는 양돈장의 자돈 폐사율 감소 및 건강한 이유자돈의 생산, 연간 출하돈의 증가 및 생산성 증대 효과를 기대할 수 있으며, 기존의 계대배양법의 오차를 개선한 분자생물학적 기법을 통해 돼지의 장관 내 미생물 균총 연구가 더욱 활기를 띌 수 있고, 궁극적으로 장내 미생물 균총을 조절할 수 있는 다양한 영양, 사료적 방법의 개발 및 검증을 통해 보다 건강하게 자돈을 사육하는 친환경 축산에 가능성을 더욱 높일 수 있을 것으로 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 1 절 분자생물학적 기법을 이용한 장내 미생물 군총 측정

돼지의 장관 내에는 다양한 미생물이 존재하며 이들의 대부분은 혐기성 (anaerobic) 미생물이다. 과거에는 미생물 군총(microbial community)을 측정하기 위하여 culture technique을 이용하여 실시하였다. 이것은 돼지의 분이나 결장의 미생물을 분리하여 배양해야 한다(Stewart C.S., 1997). 분리되는 Gram 양성의 혐기성 미생물은 *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* 종류이며, Gram 음성균으로 *Bacteroides*, *Prevotella* 등이 속한다. 그러나 여기서 계대배양(culture)할 수 있는 bacteria는 약 10%에 속한다(Konstantinov, 2004). 장관내에 존재하는 다수의 완전 혐기 미생물을 배양하는 것은 아직도 매우 어려운 실정이며, 이전에 이루어진 계대배양 방법으로는 검출되지 않는 경우도 있다(Pryde et. al., 1999; Vaughan et. al., 2000). 이러한 문제점을 획기적으로 개선된 것은 16S rRNA가 미생물의 taxonomy에 대한 분자생물학적 marker 소개 되면서 부터이다(Woese, 1987). 이것은 생체의 장관내에 대한 연구를 하는 데에 있어서 매우 새로운 접근으로써 돼지의 장내 미생물 군총을 연구하고, 미생물 군총의 구성에 대한 숙주의 영향이나 돼지의 성장이나 건강을 증진 시키는 다양한 영양, 사료적 방법에 대한 영향을 연구하는데 있어서 매우 중요한 역할을 할 수 있다(Heilig et. al., 2002; Konstantinov et. al., 2002; Leser et. al., 2004; Simpson et. al., 2000). 따라서 다양한 분자생물학적 기법이 미생물 군총을 측정하는 데에 있어서 연구되고 있으며, 이에 대한 활용 및 단점 등에 대해 표 43에 나타내었다. 또한 Konstantinov 등(2006)은 일반 자돈의 출생 이 후 미생물 군총의 변화를 측정하기 위해 출생 후 2, 5, 12, 19 (이유)일령의 자돈의 회장에서 미생물 군총을 real-time PCR 방법으로 분석하였다. *Lactobacillus sobrius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *E.coli* 에 대해 정량 분석을 하였으며, 이유 전에는 *L.sobrius*와 *L.reuteri* 가 회장에서 우점하고 있으며, $7.0 \times 10^8/g$ 정도의 미생물 군총을 갖는다. 그러나 *E.coli* 같은 경우에는 12일령 자돈에서 1개, 23일령 이유 자돈에서 2개의 sample에서만 검출되었다고 밝혔다. 또한 Marisol 등 (2006)에 의하면 이유자돈 장관 소화물에 서식하고 있는 총 박테리아, *enterobacteria*, *lactobacilli* 수를 real time PCR과 계대배양을 실시하여 정량적으로 비교분석 한 결과, real time PCR

을 이용한 나온 총 박테라이수는 계대배양에 의해 얻은 수치보다 더 높게 나왔으며 이는 사균까지 분석되었기 때문으로 기인한다고 보고하였다.

표 43. 장관 내 미생물 군총 분석을 위한 다양한 기술의 활용 및 단점

방법	활용	단점
Cultivation	- 군집의 수 측정	- 대표성이 없음 - 오랜 시간 소요 - 노동력 필요
분자생물학적 기법		
DGGE/TGGE/TTGE	- 빠르고, 재현성이 높음 - 쉽게 비교 분석이 가능 - gel로부터 특이적 band의 추출이 가능함	- semiquantitative - band를 동정하기 위해 cloning과 sequencing 작업이 필요
T-RFLP	- 빠르고 민감한 fingerprinting 방법 - 표준화된 비교 가능	- Southern blot hybridization이 불가능함
FISH	- 검출에 이용 - 자동화된 비교분석이 가능함	- 자동화가 안되어 노동력 필요 - probe design과 validation에 대한 sequencing 정보가 필요함
Dot-blot hybridization	- 검출 - 상대적으로 다수의 rRNA 정량분석 가능	- 세포 수를 측정하는 데에 상대적으로 어려움 - 노동력 필요
Quantitative PCR	- 검출 - 다수 측정 가능	- 노동력 필요
16S rRNA gene sequencing	- 계통발생 추적 가능	- 큰규모의 monitoring 필요
Non 16S rRNA gene based diversity analysis	- 빠른 비교분석 가능	- 추가적인 16S rRNA 분석이 필요
Diversity DNA array	- 검출, 동정 가능	- 분석비가 높음 - 정량분석이 아님

제 2 절 이유자돈 사료에 Sugar beet pulp 첨가가 성장 및 영양소 소화율, 면역 능력, 장내 미생물 균총에 미치는 영향

Sugar beet pulp는 사탕무우(sugar beet)에서 설탕을 추출하고 남은 부산물의 한 종류로써 수분 함량이 약 800~950g/kg 정도이며, 동물용 사료제조에 다양하게 사용되고 있다. 그러나 높은 수분 함량으로 인해 운송상의 어려움이 있으며, 건조되어 이용되기도 한다. 추출과 건조 공정으로 인해 수용성 영양소(water-soluble nutrients)들이 빠져나가게 되고 따라서 건조된 sugar beet pulp에는 높은 수준의 비 전분성 다당류(non-starch polysaccharides) 및 조섬유의 함량이 높아지게 된다. 이러한 특성으로 조단백질이나 인의 함량이 낮아지게 된다. 이러한 특성 때문에 sugar beet pulp는 돼지 사료로 사용하기에 너무 섬유소 함량이 높아 모돈에서만 일부 사용되고 있을 뿐이다. 그러나 섬유소의 첨가는 돼지에게서 대장균성 부종이 발생을 없앴으며(Smith와 Halls, 1968), 조섬유 함량이 높은 사료를 섭취한 3주령 이유자돈에게서 심한 설사가 감소하였고, 설사 발생 기간 또한 감소하였다(Ball과 Aherne, 1982). Drochner 등(1978)은 사료내 조섬유가 돼지의 소화기관 내 박테리아의 활성을 감소시킨다고 보고하였다. 특히 3주~4주령의 이유자돈에는 소화 능력의 부족과 섬유소 이용능력이 미성숙한 상태이기 때문에 높은 섬유질 사료의 급여는 사료 섭취량을 낮추고 성장 성적에 부정적인 영향을 끼치며, 설사와 같은 소장 질병의 위험성을 증가시킨다는 보고도 있다(Low, 1995). 그러나 다른 연구에서는 이유자돈에 발효된 섬유소 원료인 sugar beet pulp를 상당한 수준 급여한 결과, 성장성적에 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 밝혔으며(Longland et al., 1994; Lizardo et al., 1997), 이러한 발효한 섬유소의 사용은 낮은 팽창성효과(bulking effect)와 높은 VFA 생산 및 장관 내 비병원성 미생물의 빠른 증식을 자극하는 등의 이익을 가져다준다는 연구 결과도 있다(Williams et al., 2001). 특히 섬유질은 병원성 미생물이나 toxin으로부터 숙주를 보호할 수 있는 intestinal epithelial tissue의 에너지 원으로도 사용이 된다(Piva et al., 2002). 또한 발효한 섬유소의 활용은 장관내의 환경을 변화시켜 이유자돈의 설사 예방 및 항생제 대체용으로도 이용 가능성이 크다(Mosenthin et al., 2001). 또한 이유자돈의 사료에 Sugar beet pulp를 12% 정도 첨가하였을 때 폐사율 및 위축돈이 줄어드는 효과를 보였으며, 성장은 대조구에 비해 떨어지는 경향을 나타내었다. 섬유소 소화율에서도 성장할수록 소화율은 증가하였지만 대조구에 비해 떨어지는 결과를 보였으나 장내 VFA 생성은 대조구에 비해 Acetic acid, Propionic acid가 증가하였다. 또한 미생물에 있어서

는 유해균인 대장균의 수가 줄어드는 효과를 나타내었다(Schiavan et al., 2004). 그리고 이유자돈 사료에 sugar beet pulp를 12% 대체하였을 때, 섬유소의 소화 능력의 미성숙으로 사료 섭취량과 체중이 감소하는 경향이 있고, 이에 따른 일당 증체량도 감소하는 경향이 있다는 연구 결과도 있다(Lizardo et al., 1997; Gill et al., 2000). 그러나 이유자돈의 분내 VFA 생성이 증가한다는 연구 결과가 다양하게 존재하며(Bauer et al., 2001; Sunvold et al., 1995), 이렇게 생성된 VFA는 E.coli의 장관내 군집형성을 억제한다는 연구 결과가 있다(Mathew et al., 1996). Sugar beet pulp의 급여로 병원성 미생물의 증식이 억제되고, 장 점막을 보호하며, 숙주의 면역능력을 향상시킨다는 보고도 있다(Rumney et al., 1993; Zunft et al., 1997; Williams et al., 2001).

이러한 섬유소의 효과에 대한 작용 기작은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 섬유소 분해 미생물의 활성이 증가하여 장내 pH가 감소하고 이에 따라 유해한 미생물의 활성이 감소한다는 이론과, 섬유소의 물리적 특징으로 인하여 미생물의 장내 상피세포에 부착이 방해되어 장내에 서식하지 못한다는 이론 등이 있다. 따라서 이유자돈 내 섬유소를 첨가하면 장내 유익균의 활성을 증가시키고 유해균의 활성을 억제시켜 자돈의 건강상태 및 생산성이 향상될 것이라고 사료된다.

제 3 절 이유자돈 사료에 무기산제의 첨가가 성장 및 영양소 소화율, 면역 능력, 장내 미생물 균총에 미치는 영향

산제는 항생제 대체제로써 오래전부터 알려진 물질로써 위내 pH를 하강시킴으로써 자돈의 미성숙된 소화 효소 분비 능력에 대한 개선 효과를 가지며, 소화율을 향상시킴으로써 미생물의 성장 배지를 감소시켜 병원성 미생물의 증식으로 인한 설사 및 질병 발생을 예방하는 효과를 가지고 있다. 산제는 유기산제와 무기산제 두 종류가 있으며, 유기산제가 주로 자돈 사료의 첨가제로써 많이 이용되고 있으나, 경제성이 좋은 무기산제도 다양한 연구가 이루어지고 있다. 유기산제는 식물이나 동물의 tissue를 구성함으로써 자연계에 널리 분포하고 있다. 그리고 이것은 대장 내에서 carbohydrate의 미생물 발효를 통해 형성된다. 표 44에는 pig diet에서 acidifier로 사용되고 있는 organic acid의 물리 화학적 구성을 나타내 있다(Foegeding 과 Busta, 1991).

표 44. Formulas, physical and chemical characteristic of organic acids used as dietary acidifiers for pigs

Acid	Formula	MM (g/mol)	Density (g/ml)	Form
Formic	HCOOH	46.03	1.220	liquid
Acetic	CH ₃ COOH	60.05	1.049	liquid
Propionic	CH ₃ CH ₂ COOH	74.08	0.993	liquid
Butyric	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	88.12	0.958	liquid
Lactic	CH ₃ CH(OH)COOH	90.08	1.206	liquid
Sorbic	CH ₃ CH:CHCH:CHCOOH	122.14	1.204	solid
Fumaric	COOHCH:CHCOOH	116.07	1.635	solid
Malic	COOHCH ₂ CH(OH)COOH	134.09		liquid
Tartaric	COOHCH(OH)CH(OH)COOH	150.09	1.760	liquid
Citric	COOHCH ₂ C(OH)(COOH)CH ₂ COOH	192.14	1.665	solid

MM, molecular mass expressed in grams

∞, soluble in all proportions; v, very soluble; s, sparingly soluble.

주로 사용되고 있는 유기산제는 Fumaric acid와 citric acid, formic acid이다. Fumaric acid와 citric acid는 intermediary metabolism으로 형성되며 citric acid cycle에 중요한 intermediary metabolite로 작용한다. Giesting et al.(1991)은 30±3일령에 이유한 자돈에 0,2,3%의 Fumaric acid를 dried skim milk와 함께 첨가하였을 때, feed utilization이 개선되었으며(P<0.01, 표 45), weight gain의 증가(P<0.05)와 gain/feed의 증가(P<0.001)도 나타났다고 밝혔다. 또한 Blank et al.(1999)는 14일령에 조기 이유한 자돈에 fumaric acid를 1,2,3% 첨가하였을 때, 2% fumaric acid의 첨가구에서 apparent ileal amino acid digestibility가 4.9~12.8% unit의 개선을 보였으며, low buffering capacity를 가진 diet에 급여하였을 때 fumaric acid와의 긍정적인 효과를 나타낸다고 하였다. Citric acid는 9.6kg BW시에 이유한 자돈에 급여하였을 때, dietary pH와 stomach pH의 감소(P<.05)를 가져왔으며, ADG와 feed efficiency 그리고 Ca digestibility의 개선 효과(P<.05)도 있었다(Radcliffe et al., 1998). 또한 3, 6%의 citric acid를 첨가한 사료를 급여한 자돈에서는 gain:feed(P<.05), metatarsal ash(P < 0.08)의 증가 효과가 있었다(Boling et al., 2000).

표 45. Effect of Fumaric acid and Citric acid addition in piglet diets

Acid type	level of add. (%)	Weaning (day)	Improvement		Basal diet	Reference
			ADG(g)	G/F(g/kg)		
FA	2	30±3	320 ^a	580 ^b	Corn/SBM	Giesting et al.,(1991)
FA	1.5	21±2	99	278	Corn/SBM	Risley,(1993)
CA	1.5	21±2	85	272	Corn/SBM	Risley,(1993)
FA	2	24	265±28 ^c		Corn/SBM	Giesting and Easter(1991)
CA	3.0	28	340	500	Corn/SBM	Radcliffe et al,(1998)
CA	3	21	379 ^a	547 ^a	Corn/SBM	Boling et al, (2000)

^{a,b} 대조구에 비해 유의적인 차이가 남 (p<0.05, p<0.01)

FA : fumaric acid, CA : citric acid

Formic acid는 무색의 투명한 액체로 매운 냄새가 나며 *lactobacilli*에 의해 lactic acid의 생산을 위해 포함되는 기질 생성물이다. formate는 동물의 tissue나 blood의 구성 물질이며, purine bases의 생합성을 위한 기질로써도 작용한다. 그

리고 formic acid는 효과적인 acidulant이지만 catalase같은 효소와 microbial decarboxylase를 억제한다(Partnen and Morz, 1999). Canibe 등(2001)은 28일령에 이유한 자돈에 1.8%의 K-diformate를 급여한 결과 Growth performance($P \geq 0.73$)와 gastrointestinal pH($P \geq 0.30$)에는 영향이 없었지만, gastric epithelium에 부정적인 영향을 끼치지 않았으며, stomach에서 small intestine, cecum, colon 까지 미생물(anaerobic bacteria, lactic acid bacteria, yeast, coliform)의 수를 감소시키거나($P \leq 0.04$) 줄이는 경향($P \leq 0.10$)이 있었음을 관찰하였다. 또한 K-diformate를 growing-finishing pig에 급여하였을 때 growth performance가 개선되었다는 결과도 있다(Overland et al., 2000).

현재 양돈 산업에서 많이 이용 되고 있는 것은 organic acid를 이용한 acidifier이다. 그러나 organic acidifier는 동물 사료로써 경제성이 떨어지며, Inorganic acid는 organic acid와 비교했을 때 가격 면에서 훨씬 경쟁력을 가질 수 있다. inorganic acid로는 HCl과 Phosphorous를 들 수 있는데 HCl이 많이 연구되고 있다. HCl은 앞에서 보았듯이 pepsinogen을 pepsin으로 활성화 시키면서 위내 pH를 낮은 상태로 유지시켜주는 중요한 역할을 하는 물질이다. 하지만 HCl을 직접 급여했을 때, 위나 소장에 손상을 줄 수 있다는 문제점도 가지고 있다.

표 46. Effects different HCl levels on pH of experimental diet and gastrointestinal tracts of 3-wk-old weaning pig

	Con	H0.1	H0.2	H0.3	SEM*
Diet	6.30	6.13	5.96	5.82	
Stomach	3.22 ^a	2.70 ^b	3.15 ^a	2.90 ^{ab}	0.08
Ileum	6.82 ^a	5.07 ^c	5.73 ^b	5.84 ^b	0.18
Caecum	5.57 ^c	5.75 ^b	5.66 ^{bc}	5.91 ^a	0.04
Rectum	7.70 ^a	6.89 ^c	7.19 ^b	7.20 ^b	0.09

^{a,b,c,d} Means with different superscripts in the row differ($p < 0.05$)

* standard error mean

Oh(2004)는 Inorganic acidifier을 이용하여 growth performance, nutrient digestibility, 소장의 morphology, 면역 반응을 연구한 실험에서, 6.28 kg BW에 이유한 자돈에 HCl을 급여하였을 때 0.1% HCl 급여구에서 stomach의 pH가 다

른 처리구보다 더 낮았음($P < 0.05$)을 보고하였다(표 46). 또한 0.1% HCl 첨가구에서 일당증체량($P < 0.01$)과 사료섭취량($P < 0.05$)이 증가하였으며, 사료내의 HCl 첨가수준이 증가할수록 사료섭취량은 감소하는 경향을 보였다고 보고하였고, 소장의 morphology와 자돈의 IG와 면역반응에 대한 실험에서도 유의적인 차이를 발견하지 못하여 무기산제의 첨가가 자돈의 면역 및 소장 내 villus에 아무런 악영향을 미치지 않는 것으로 보인다고 보고하였다. 또한 Kil(2004)의 실험에서는 무기산제의 첨가에 의해 성장이 증가하였으며 N utilization도 향상하는 경향이 관찰되었으며 HCl의 첨가에 의한 소화기관 내 형태 및 면역반응에 어떠한 유해성도 발견하지 못하여 inorganic acidifier가 organic acidifier를 대체할 수 있는 충분한 가능성을 가졌다고 보고하였다. 또한 Mahan 등(1996)은 23 ± 2 일령에 이유한 자돈에 HCl을 0~0.1% 첨가한 결과 일당 증체량($P < 0.01$), feed intake($P < 0.08$), gain:feed ratio ($P < 0.08$)의 개선 효과가 나타났다고 밝혔다.

제 7 장 참고문헌

- Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. 2001. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* 92 : 183-191
- AOAC. 1995. Official methods of analysis (15th ed). Association of official analytical chemists. Washington, D. C., USA
- Ball, R. O. and F. X. Aherne. 1982. Effect of diet complexity and feed restriction on the incidence and severity of diarrhea in early-weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 62:907-913
- Barnes, E. 1986. Anaerobic bacteria of the normal intestine microflora of animals. In: *Anaerobic Bacteria in Habitats Other than MAN* (Ed. E. M. Barnes and G. C. Mead). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. pp. 225
- Bauer, E., Williams, B.A., Voigt, C., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2001. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Anim. Sci.* 73: 313-322
- Biagi, G., A. Piva, T. Hill, D. K. Schneider, and T. D. Crenshaw. 2003. Low buffering capacity diets with added organic acids as a substitute for antibiotics in diets for weaned pigs. *Proc. 9th Int. Symp. Dig. Physiol. Pig.* 2:217-219
- Black, J.L., Bray, H.J., Giles, L.R., 1999. The thermal and infectious environment. In: I. Kyriazakis (ed.) *A quantitative biology of pig*. CABI publishing, Oxon, UK, pp 71-97
- Blank, R., R. Mosenthin, W. C. Sauer and S. Huang. 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77:2974-2984

- Bibiloni R., P.F. Perez and G.L. De Antoni. 2000. An enzymatic–colorimetric assay for the quantification of Bifidobacterium, Journal of Food Protection 63 (2000), pp. 322–326
- Boling, S. D., D. M. Webel, I. Mavromicalis, C. M. Parsons, and D. H. Baker. 2000. The effect of citric acid on phytate–phosphorous utilization in young chicks and pigs. J. Anim. Sci. 78:682
- Briggs, C. A. E., J. M. Willingale, R. Braude, and K. G. Mitchell. 1954. The normal intestinal flora of the pig. I. Bacteriological methods for quantitative studies. Vet. Rec. 17:241–242
- Burnell, T. W., G. L. Cromwell, and T. S. Stahly. 1988. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. J. Anim. Sci. 66:1100–1108
- Canibe, N., S. H. Steien, M. Overland and B. B. Jensen. 2001. Effect of K–diformate in starter diets on acidity, microbiotia, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglet, and on gastric alterations. J. Anim. Sci. 79:2123–2133
- Cera, K. R., D. C. Mahan, R. F. Cross, G. A. Reinhart and R. E. Whitmoyer. 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. J. Anim. Sci. 66:574–584
- Changsun Choi and Chanhee Chae, 1999. Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in Escherichia coli isolated from diarrheic piglets in Korea. Veterinary Microbiology 67:307–310
- Cohen, H.J., Mechancla S. M. and Lin, W. 1996. PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, specific method for dection of Salmonella spp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4303–4308

- Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A. 2005. real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 2005; 105(1): 19–28
- Ducluzeau R. 1983. Implantation and development of the gut flora in the newborn animal. *Ann Rech Vet* 14: 354–359
- Drochner, W., A. S. Hazem, H. Meyer, and F. W. Rensmann. 1978. Praktische Versuche mit Modellstudien zur Pathogenese nutritive bedingter. *Fortschr. Vetmed.* 28:220–225
- Eggum, B. O. 1970. Blood urea measurement as a technique for assessing protein quality. *Br. J. Nutr.* 24:983
- Fuller, R. 1982. Development and dynamics of the aerobic gut flora in gnotobiotic and conventional animals. *Advances in Veterinary Medicine.* 33:7
- Furet J.P., P. Qu  n  e and P. Tailliez, 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR, *International Journal of Food Microbiology* 97 (2004), pp. 197–207
- Gabert, V. M. and W. C. Sauer. 1995. The effect of fumaric acid and sodium fumarate supplementation to diets for weanling pigs on amino acid digestibility and volatile fatty acid concentration in ileal digesta. *Anim. Feed Sci. Technol.* 53:243–254
- Giesting, D. W. and R. A. Easter. 1991. Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent digestibility of nutrients by young pigs. *J. Anim. Sci.* 69(6): 2497–2503
- Gill, B.P., Mellange, J., Rooke, J.A., 2000. Growth performance and apparent

nutrient digestibility in weaned piglets offered wheat-, barley- or sugar beet pulp-based diets supplemented with food enzymes. *Anim. Sci.* 70: 107-118

Guillermo G. Gomez, Robert S. Sandler, and Elston Seal, Jr. 1995. High Levels of Inorganic Sulfate Cause Diarrhea in Neonatal Piglets. *Journal of Nutrition* Vol. 125 No. 9 September 1995, pp. 2325-2332

Göransson, L., S. Lange, and I. Lönnroth. 1995. Post weaning diarrhea: Focus on diet. *Pig News Info.* 16:89N-91N

Hahn, J. D., R. R. Biehl and D. H. Baker. 1995. Ideal digestible lysine for early and late finishing swine. *J. Anim. Sci.* 73:773

Heilig H., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D.L., de Vos W.M., 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 114-123

Hetty M. G., van Beers-Schreurs H. M., Nabuurs M. J. A., Vellenga L., Kalsbeek-van der Valk H. J., Wensing T., Breukink H. J. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J. Nutr.* 1998;128:947-953

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR : Real monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026

Hirano A, Kirisawa R., 1991. Evaluation of high sensitive DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* infection in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 933-935

Hirasawa T, Kaneshige T, Mikazuki K. 1994. Sensitive detection of canine

- parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 41 : 135–145
- Hirayama K, Kano R, Hosokawa–Kanai T, Tuchiya K, Tsuyama S, Nakamura Y, Sasaki Y, Hasegawa A. 2005. VP2 gene of a canine parvovirus isolate from stool of a puppy. *J. Vet. Med. Sci.* 67 : 139–143
- Huijsdens, X. W., Linskens, R.K., Mak, M., Meuwissen, S.G.M., Vandenroucke–Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M., 2003. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real–time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 4423–4427
- Jin, L.,L. P. Reynolds, D. A. Redmer, J. S. Caton, J. D. Crenshaw. 1994. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation, and morphology in growing pigs. *J Anim Sci.*72:2270–2278
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Ali MA, Jalaludin S, 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of Chicken.. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 67–71
- Joseph A. W., Nick B. R. and Michael A. W. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real–time PCR *J. Immunol. Methods* 278(1–2):261–269
- Konstantinov S. R, Ajay A. Awati, Barbara A. Williams, Bevis G. Miller, Philip Jones, Christopher R. Stokes, Antoon D. L. Akkermans, Hauke Smidt and Willem M. de Vos, 2006. Post–natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology* (2006)8 (7), 1191–1199
- Konstantinov S. R., Christine F. Favier, Wei Yun ZHU, Barbara A. Williams, Jeannette KLÜß, Wolfgang–Bernhard Souffrant, Willem M. DE VOS, Antoon D.L. Akkermans, Hauke Smidt. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53 (2004) 317–324

- Konstantinov, S.R., Zhu, W.-Y., Williams, B.A., Tamminga, S., de Vos, W.M., and Akkermans, A.D.L. 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 225-235
- Konstantinov S.R., Fitzsimons N., Vaughan E.E., Akkermans A.D.L., From composition to functionality of the intestinal microbial communities, in: Tannock, G.W. (Ed.), *Probiotics and Prebiotics: Where are we going?* aister Academic Press, London, 2002. p59 – 84
- Kil, D. Y. 2004. Comparison of growth performance, nutrient digestibility and white blood cell counts by organic or inorganic acid supplementation in weaned pigs. MS thesis. Seoul National University, Korea
- Kim, Y. Y., Kil, D. Y., and Oh, H. K. 2004 Acidifier as an alternative material of antibiotics in animal feed. Seoul National University, Korea
- Koopman, J.P., Mroz, B.A. Williams, and others. 1999. Voeding en gezondheid van het maagdarmkanaal. *Onderzoeksreeks 4, Productschap diervoeder, uni 1999*
- Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G. C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H.F., Welling, G.W., 1995. Quantitative fluorescence in *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3069-3075
- Leser T.D., Vindecrona R.H., Jensen T.K., Jensen B.B., Moller K., Changes in the colon of pigs fed different experimental diet and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3290-3296
- Leser T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen T.K., Jensen B.B., Lindecrona, R.H.,

- Boye, M., Moller K., 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria, the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 673-690
- Lizardo, R., J. Peiniau, Y. Lebreton, and A. Aumaitre, 1997. Effects de l'incorporation de pulpe de betterave dans les aliments du porcelet et du porc en croissance: performances de croissance, digestibilite et composition corporelle. *An. Zootech.*, in press
- Longland, A.C., Carruthers, J., Low, A.G., 1994. The ability of piglets 4 to 8 weeks old to digest and perform on diets containing two contrasting sources of non-starch polysaccharide. *Anim. Prod.* 58: 405-410
- Mahan, D. C., T. D. Wiseman, E. Weaver and L. Russell. 1999. Effect of supplemental sodium chloride and hydrochloric acid added to initial diets containing sprayed-dried blood plasma and lactose on resulting performance and nitrogen digestibility of 3-week-old weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77:3016-3021
- Mahan, D. C., E. A. Newton and K. R. Cera. 1996. Effect of supplemental sodium chloride, sodium phosphate, or hydrochloric acid in starter pig diets containing dried whey. *J. Anim. Sci.* 74:1217-1222
- Manners, M. J. 1976. Symposium on quantitative aspects of pig nutrition. The development of digestive function in the pig. *Proc. Nutr. Soc.* 35:49
- Marisol, C., Martin-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martin, M., Gasa, J. 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 16:114(1-2):165-70.
- Martelli, G., P. Parisini, L. Sardi, R. Scipioni, G. Vignola, A. Panciroli, A. Mordenti. 1999. Interet zootechnique de l'utilisation de la pulpe de

- betterave ensilee dans l'alimentation du porc lourd. *Ann. Zootech.* 48:173–188
- Mathew, A. G., T. Jones and M. A. Franklin, 1994. Effect of creep feeding on selected microflora and short-chain fatty acids in the ileum of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 72:3163–3168
- Matsuba T, Kawakami Y, Iwai H., 1992. Genomic analysis of *Theileria sergenti* stocks in Japan with DNA probes. *Vet. Parasitol.* 41: 35–43
- Maxwell, F. J. Koopman, J. P., B. Mroz, A. Williams. 1999. Voeding en gezondheid van het maagdarmkanaal. *Onderzoeksreeks 4, Productschap diervoeder*, juni 1999
- Maxwell, F. J. and C. S. Stewart. 1995. The microbiology of the gut and the role of probiotics. In: *The Neonatal Pig Development and Survival* (Ed. M. A. Varley). CAB International, Oxon, UK. p. 155
- Mosenthin, R. 1998. Physiology of small and large intestine of swine. *Asian–Aust. J. Anim. Sci.* 11:608–619
- NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine* (10th Ed.). National Academy press, Washington, D. C.
- Oh, H. K. 2004. Effect of dietary supplements on growth, nutrient digestion and intestinal morphology in monogastric animals. Ph.D. Thesis. Seoul National University, Korea
- Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K. Granum, P. E., Popovic, T., Rasmussen, H. N. and Olsvik, O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 1–78
- Organisation for Economic Co-operation and development, 2002. *Consensus*

document on compositional considerations for new varieties of sugar beet : key food and feed nutrients and antinutrients, Series on the safety of novel foods and feeds, No. 3

- Øverland, M., T. Granli, N. P. Kjos, O. Fjetland, S. H. Steien and M. Stokstad. 2000. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing–finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 78:1875–1884
- Partanen Kirsi H. and Zdzislaw Morz. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12:117–145
- P. Pinzani, L. Bonciani, M. Pazzagli, C. Orlando, S. Guerrini and L. Granchi, 2004. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real–time quantitative PCR, *Letters in Applied Microbiology* 38 (2004), pp. 118–124
- Piva, A., Prandini, A., Fiorentini, L., Morlacchini, M., Galvano, F., Luchansky, J.B., 2002. Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 670–680
- Pluske, J. R., Hampson D. J. and I. H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig:a review. *Livestock Production Science.*51:215–236
- Pryde S.E., Richardson A.J., Stewart C.S., Flint H.J., Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 5372–5377
- Radcliffe, J. S., Z. Zhang and E. T. Kornegay. 1998. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn–soybean meal–based diet for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 76:1880–1886

- Rantzer, D., Kiela, M.J., Thaela, M.J., Svendsen, J., Ahren, B., Karlsson, S. and Pierzynowski, S.G. 1997. Pancreatic exocrine secretion during the first days after weaning in pigs. *J. Anim. Sci.* 75:1324–1331
- Ravindran, V., and E. T. Kornegay. 1993. Acidification of weaner pig diets: A review. *J. Anim. Sci. Food Agric.* 62:313–322
- Rijnen, M. M., M. W. Verstegen, M. J. Heetkamp, J. Haaksma, J. W. Schrama, 2001. Effects of dietary fermentable carbohydrates on energy metabolism in group-housed sows. *J. Anim. Sci.* 79(1):148–154
- Risley, C. R., E. T. Kornegay, M. D. Lindemann, C. M. Wood and W. N. Eigel. 1992. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *J. Anim. Sci.* 70:196–206
- Robinson, I. M., Whipp, S. C., Bucklin, J. A. & Allison, M. J. 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Microbiol* 48, 964–969
- Roth F. X and M. Kirchgeßner 1998. Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. In: *Journal of Animal and Feed Sciences*. Vol 7, Supplement 1, 1998 Satellite Symposium. 49th Annual Meeting of the EAAP. 22–23 August 1998, Jablonna, Poland
- Rumney, C.J., Rowland, I.R., Coutts, T.M., Randerath, K., Reddy, R., Shah, A.B., O' Neill I.K., Ellul, A., 1993. Effects of risk-associated human dietary macrocomponents on processes related to carcinogenesis in human-flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis*. 14: 79–84
- SAS. 2004. SAS User's Guide. SAS. Institute. Cray. NC.
- Simpson, J. M., V. J. McCracken, H. R. Gaskins, and R. I. Mackie. 2000.

Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4705-4714

Simpson J.M., McCracken V.J., Gaskins H.R., Mackie R.I., Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4705-4714

Smith, H. W., S. Halls, 1968. The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *J. Med. Microbiol.* 1(1):45-59

Sunvold, G.D., Hussein, H.S., Fahey, G.C. JR., Merchen, N.R., Reinhart, G.A., 1995. In vitro fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using faecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 3639-3648

Stewart, C.S. (1997) Microorganisms in hindgut fermentors. In *Gastrointestinal Microbiology*. Mackie, R.I., White, B.A., and Isaacson, R.E. (eds). New York, USA: Chapman & Hall, pp. 142-186

Straw, M. L., E. T. Kornegay, J. L. Evans and C. M. Wood. 1991. Effects of dietary pH and phosphorus source on performance, gastrointestinal tract digesta, and bone measurements of weanling pigs. *J. Anim Sci.* 69:4496-4504

Tajima, K. R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and Y. Benno. 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* pp. 2766-2774

- van der Heyde, D. Giesecke and H. K. Henderickx, 1973. Microbiology of the digestion in pigs – Biology and Biochemistry of the Microbial Digestion. ed. BLV Verlagsgesellschaft, Munich, Germany
- Vaughan E.E., Schut F., Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Akkermans A.D.L., A molecular view of the intestinal ecosystem, *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1 (2000) 1-12
- Vitali et al., 2003 B. Vitali, M. Candela, D. Matteuzzi and P. Brigidi, Quantitative detection of probiotic Bifidobacterium strains in bacterial mixtures by using real-time PCR, *Systematic and Applied Microbiology* 26 (2003), pp. 269-276
- Wattiau, P., M. E. Renard, P. Ledent, V. Debois, G. Blackman and S. N. Agathos. 2001. A PCR test to identify Bacillus subtilis and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:816-819
- Wells, J. E., Berry, E. D., Varel, V. H. (2005). Effects of Common Forage Phenolic Acids on Escherichia coli O157:H7 Viability in Bovine Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7974-7979
- Whang, G. Y. and R. A. Easter. 2000. Blood urea nitrogen as an index of feed efficiency and lean growth potential in growing-finishing swine. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 13(6):811
- Williams, B.A., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr. Res. Rev.* 14: 207-227
- Woese C.R., Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51 (1987) 221-271
- Zunft, H.J., Goldin LANG, P., Dongowski, G., 1997. DNA adducts in tissues of germ-free and conventional rats fed high- and low-esterified pectins. *Cancer Lett.* 114: 43-46

- 고민수, 신소연, 김용환, 고바라다, 이봉주. 2005. 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 개 파보바이러스 감염증의 분변에서 바이러스 정량 분석. J. Vet. Clin. 22(4) : 348-352
- 석주명, 강호조, 송원근. 1998. 중합효소연쇄반응에 의한 닭고기 중 *Listeria monocytogenes*의 직접 검색. Kor. J. Vet. Publ. Hlth, Vol. 22, No. 3. 207-214
- 임숙경, 이회수, 우승룡, 윤순식, 문운경, 이유영, 고흥범. 1999. 중합효소연쇄반응을 이용한 돼지 증식성 장염 진단기법 확립. Korean J. Vet. Res. 39(1):118-125
- 최석호, 이승배. 2004. 우유 내 활력있는 *Salmonella*를 검출하기 위한 *fimA* 유전자의 역전사중합효소연쇄반응의 개발. J. Anim. Sci. & Technol.(Kor.) 46(5) 841-848
- 홍종욱, 김인호, 김정우, 권오석, 이상환, 홍의철. 2001. 조기이유자돈에서 난황항체를 이용한 장독성 대장균 987P(F6) 설사증 방어효과. Korean J. Vet. Res. 41(1) : 29-35

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.