

최 종 보 고 서

보안과제(), 일반과제(0) 과제번호 107043-3

Solto B를 이용한 PMWS예방 및 곰팡이 억제용 사료첨가제 개발

(Development of feed additives for prevention of PMWS
and mold by using Solto B)

(주)서봉바이오베스텍

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Solto B를 이용한 PMWS예방 및 곰팡이 억제용 사료첨가제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 05 월 29 일

주관연구기관명 : 서봉바이오베스텍

주관연구책임자 : 정 연 권

세부연구책임자 : 이 봉 주

연 구 원 : 이 창 기

연 구 원 : 박 천 식

연 구 원 : 최 형 규

연 구 원 : 김 가 현

연 구 원 : 김 인 호

연 구 원 : 유 종 상

연 구 원 : 장 해 동

연 구 원 : 이 제 현

연 구 원 : 정 복 기

연 구 원 : 봉 선 화

연 구 원 : 김 상 은

요 약 문

I. 제 목

Solto B를 이용한 PMWS예방 및 곰팡이 억제용 사료첨가제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 항생제 사용 규제에 따른 항생제 대체제 연구 진행
- 질병문제에 의한 우리나라의 양돈업에서의 경제적 손실
- 돼지에 있어 호흡기 질병과 소모성 질병으로 인한 양돈농가의 경제적 손실
- 특히, 연중 발생하는 PMWS (돼지 전신성 소모성 증후군)에 의해 농가의 피해 발생
- 면역증강 기능이 있는 천연광물질 제제의 개발에 따른 PMWS 및 PMWS에 의해 2차적으로 발생하는 호흡기 질병이나 바이러스 질병 예방 가능성 시사
- 또한, 여름철 사료의 곰팡이에 의한 오염을 막기 위한 광물질제제 첨가효과에 관한 연구 필요

III. 연구개발 내용 및 범위

- 젖돈에 있어 Solto B의 첨가수준 결정 및 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬의 변화 규명
- Solto B 급여 후 돼지의 면역기능 증강으로 항병력 증가효과 확인
- 사육밀도에 따른 젖돈의 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬의 변화 규명
- 마우스를 이용한 Solto B의 면역강화 기능을 확인 및 Solto B의 항곰팡이 제제로서의 가능성을 확인

IV. 연구개발결과

1. 1차 년도

가. 젖돈에 있어 Solto B의 첨가수준 결정 및 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬의 변화 규명

(1) 성장능력

- 개시체중, 종료체중, 일당 증체량, 일당 사료 섭취량 및 사료 효율에서도 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

(2) 영양소 소화율

- 질소 소화율에서는 Solto B 0.4% 첨가구가 대조구와 Solto B 0.2% 첨가구에 비해 유의적으로 높았다 (Linear effect = 0.016).
- 총에너지 소화율에서는 Solto B 0.4% 첨가구와 0.6% 첨가구가 대조구와 비교하여 유의적으로 높았다 (Linear effect = 0.008, Quadratic effect = 0.019).

(3) 혈액 내 면역학적 지표

- 혈액 내 적혈구, 백혈구, 림프구 및 IgG 함량은 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

(4) 혈청 내 스트레스 지표

- 혈청 내 코티졸, 에피네프린 및 노르에피네프린 함량은 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

(5) 분내 유해가스 발생량

- 황화수소(Hydrogen sulfide)는 5일과 10일에서 대조구에 비해 Solto B 첨가구가 유의적으로 감소하였다 (5일: Linear effect = 0.009, Quadratic effect 0.037; 10일: Linear effect = 0.009).
- 아세트산(Acetic acid)는 5일에서 대조구에 비해 Solto B 첨가구가 유의적으로 감소하였으며 (Linear effect < 0.001, Quadratic effect < 0.001), 15일에서도 대조구와 Solto B 0.6% 첨가구가 Solto B 0.2%와 0.4% 첨가구에 비해 유의적으로 감소하였다 (Quadratic effect 0.023).
- 메캅탄(Mercaptans)는 5일과 10일에서 대조구에 비해 Solto B 첨가구가 유의적으로 감소하였다 (5일: Linear effect = 0.029, Quadratic effect = 0.037; 10일: Linear effect = 0.029).
- 암모니아(Ammonia)는 5일, 10일 및 15일에서 Solto B 0.2%와 0.4% 첨가구가 대조구와 Solto B 0.6% 첨가구에 비해 유의적으로 감소하였다 (5일: Quadratic effect = 0.038; 10일 Quadratic effect = 0.045; 15일 Quadratic effect = 0.038).

나. Solto B를 급여한 돼지에서 면역기능 증강으로 PMWS와 PRRS에 대한 항병력 증가 확인을 위한 인공 감염실험

(1) Solto B의 PMWS 방어효과 실험 (1차 실험)

(가) 임상증상과 체중변화

- 임상증상에 있어서는 실험기간 동안 3일간격으로 체온을 측정된 결과 두 군간에 유의적인 차이는 없었지만 실험군의 체온이 약간 상승하는 경향이 있었다.
- 체중은 실험개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 측정하였지만 두 군간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

(나) 각 장기의 부검소견

- 비장의 크기에 있어서는 두 군 모두 평균적으로 17~18cm로 큰 차이를 보이지 않았다.
- 장간막 림프절의 크기는 큰 차이를 보이지 않았으나, Solto B 급여군에 비해 대조군의 회장벽이 얇아져 있었다.
- 서혜 림프절에 있어서는 두 군간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.
- 신장의 색깔이나 크기, 모양에서 큰 차이를 보이지 않았다.

- 폐에 있어서는 대조군이 Solto B 급여군에 비해 전체적으로 심한 폐렴 소견을 보였다.
- 편도에 있어서는 크기나 병변이 심하지 않아 큰 차이를 보이지 않았다.
- 흉강에 있어서는 대조군에서 흉수가 심하게 찬 소견이 관찰되었다.

(다) PCV2의 분포와 정량

- PCV2의 농도는 대부분의 장기에서 Solto B 급여군이 대조군에 비해 낮았다.

(2) Solto B의 PMWS 방어효과 실험 (2차 실험)

(가) 임상증상과 체중변화

- 실험기간동안 3일간격으로 체온을 측정한 결과 두 군간에 유의적인 차이는 없었지만 대조군의 체온이 약간 상승하는 경향이 있었다.
- 체중은 두 군간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

(나) 육안적 소견과 현미경적 소견

- 육안적으로는 큰 차이가 관찰되지 않았다.
- 현미경적 관찰 결과, Solto B 급여군의 폐는 공격접종 이후에도 염증세포의 침윤이나 병리적인 소견이 크게 관찰되지 않았지만, 대조군의 폐에서는 혈관으로부터의 광범위한 삼출, 폐포 격벽의 섬유질을 동반한 중정도의 증대, 대식세포와 중성호성백혈구를 포함한 염증세포들의 폐포강내의 침윤 등이 관찰되었다.

(다) PCV2의 분포와 정량

- 감염 28일후에 대부분의 시료에서 Solto B 급여군의 PCV2의 농도는 대조군에 비해 낮았으며 특히, 폐와 편도에서 그 농도가 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$).

(라) 혈청과 nasal swab에서 virus 측정

- 비강에서는 감염후 24일과 28일에 유의성있게 감소하였으며, 혈청에서 PCV2의 양은 공격 접종 28일 이후에 SoltoB 급여군에서 유의성있게 감소하는 경향을 보였다 ($P < 0.05$).

(3) Solto B의 PRRS 바이러스 방어효과 실험 (1차 실험)

(가) 임상증상과 체중변화

- 실험기간 동안 3일간 간격으로 체온을 측정한 결과 두 군간에 유의적인 차이는 없었지만 대조군의 체온이 약간 상승하는 경향이 있었다.
- 체중은 실험개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 측정을 하였지만 두 군 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다

(나) 각 장기들의 부검소견

- 비장의 크기에 있어서는 두 군 모두 평균적으로 17~18cm로 큰 차이를 보이지 않았다.
- 장간막 림프절의 크기나 회장의 병변에서는 유의적인 큰 차이를 보이지 않았다.
- 두 군 간의 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다.
- 대조군 비장의 색깔이 Solto B에 비해 좀 더 pale 하였다.

- 대조군의 폐는 Solto B 급여군에 비해 전체적으로 심한 폐렴 소견을 보였다.
- 편도의 크기나 병변이 심하지 않아 큰 차이를 보이지 않았다.

(다) 각 장기에서 PRRS 바이러스 농도 비교

- Solto B 급여군의 폐지의 장기에서는 대조군보다 전체적으로 적은 수의 바이러스가 검출되었으며, 그 중 폐와 기관지 림프절, 편도, 서혜림프절, 흉선에서는 유의적으로 바이러스 농도가 낮게 검출되었다.

2. 2차 년도

가. 사육밀도(3,4,5두/펜)에 따른 Solto B의 첨가급여 효과규명

(1) 시험설계

- 2*3 factorial design으로 1) T1 (기초사료, 3두/펜), 2) T2 (기초사료, 4두/펜), 3) T3 (기초사료, 5두/펜), 4) TS1 (기초사료+0.3% Solto B, 3두/펜), 5) TS2 (기초사료+0.3% Solto B, 4두/펜) 및 5) TS3 (기초사료+0.3% Solto B, 5두/펜)으로 하였다.

(2) 성장능력

- 일당증체량에 있어서는 T1과 TS1 처리구가 T2, T3 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 ($P < 0.05$), T3와 TS3 처리구는 T1과 TS2 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). 일당사료섭취량에 있어서는 TS1 처리구가 T2, T3 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 ($P < 0.05$), TS3 처리구는 T1, T2, TS1 및 TS2 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$).

(3) 영양소 소화율

- 건물과 질소 소화율에 있어서 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P > 0.05$).

(4) 혈액특성

- 혈액 내 백혈구(white blood cell) 함량에 있어서는 종료시 TS1 처리구가 T2, T3, TS2 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 가장 높았으며 ($P < 0.05$), T2 처리구는 T1과 TS1 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 ($P > 0.05$). 또한, 사육밀도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.01$).
- 혈액 내 적혈구(red blood cell) 함량에 있어서는 종료시 T2 처리구가 TS1, TS2 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 ($P < 0.05$), TS1 처리구는 T1, T2 및 T3 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). 또한, Solto B 급여에 따라 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.001$).
- 혈청 내 면역글로불린(IgG) 함량에 있어서는 종료시 Solto B 첨가와 사육밀도 간 상호작용 효과를 보였다 ($P < 0.05$).
- 혈청 내 코티졸(cortisol) 함량에 있어서는 종료시 T1, T2 및 T3 처리구가 TS1 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 ($P < 0.05$), Solto B 첨가에 따라 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.05$).

(5) 분내 악취물질 발생

- 분내 총 메캡탄(total mercaptans) 함량에 있어서는 5일과 10일째에 TS2 처리구가 T1와 T2 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았으며 ($P < 0.05$), Solto B 첨가에 따라 5일과 10일째 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.01$).
- 분내 암모니아(ammonia) 함량에 있어서는 10일째에 TS3 처리구가 T1과 T3 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). 또한, Solto B 첨가에 따라 5일과 10일째에 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

나. Solto B 급여 후 마우스의 면역능력증가반응 실험

(1) Solto B 급여가 cytokine gene expression에 미치는 영향 (실험 1)

- 실험 결과, 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 섭취한 그룹의 비장세포로부터의 사이토카인의 발현 정도가 Solto B 첨가 농도 의존적으로 유의성 있게 증가되었다.

(2) Solto B 급여가 대식세포의 탐식능 (phagocytic activity)에 미치는 영향 (실험 2)

- 실험 결과, 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 섭취한 그룹에서 채취한 대식세포의 탐식능이 Solto B의 사료 첨가 비율에 따라 유의성 있게 활성화되었으며, 특히 초기에 탐식능이 급속히 활성화되었다.

(3) Solto B 급여가 마우스의 항체생성능에 미치는 영향 (실험 3)

- 실험 결과, 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 섭취한 그룹의 항체 생성능이 증가되었음을 알 수 있었으며, 특히 Solto B가 0.3% 비율로 첨가된 사료를 섭취한 그룹의 항체 생성능이 월등히 증가되었다.

(4) Solto B 급여가 마우스의 비장 무게와 비장 세포 비율에 미치는 영향 (실험 4)

- 실험 결과, 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 급여한 그룹에서 비장의 무게 뿐만 아니라 B cell의 비율 또한 상당히 증가되었다.

다. Solto B의 곰팡이 형성 억제 및 곰팡이 독소억제에 미치는 영향

(1) Solto B의 사료에서의 곰팡이 형성 억제 효과 실험 (실험 1)

- 실험 결과, 대조군에 비해 Solto B를 첨가한 사료에서 농도 의존적으로 곰팡이 집락의 생성이 억제되었다.

(2) Solto B의 사료에서의 곰팡이 독소생성 억제 효과 실험 (실험 2)

- 실험 결과, 대조군에 비해 Solto B를 첨가한 사료에서 농도 의존적으로 Aflatoxin B1의 생성이 억제되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 육성돈에 Solto B 급여시 소화율 향상과 분내 유해가스 발생량이 감소하였고, 사육밀도가 증가하여도 Solto B 급여시 스트레스가 감소하여 동물복지와 사육환경 개선 및 농가 소득 향상에 기여할 것으로 사료된다.
2. 돼지에 있어 PMWS와 PRRS의 발생율이 감소하여 농가 생산성 향상에 기여할 것으로 사료된다.
3. 사료에 첨가시 곰팡이의 형성 및 곰팡이 독소생성을 억제하여 사료비 절감과 돼지의 질병 발생 예방 및 농가 생산성 향상에 기여할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title of the Research Project

Development of feed additives for prevention of PMWS and mold by using Solto B

II. Background and Objectives of the Project

- Research about antibiotic replacer have been conducted because of a ban of antibiotic use
- Economical lose in domestic swine industry by disease
- Especially, economical lose of farm by PRRS and PMWS in pigs
- Developing natural mineral substance improving immune system have possibility to prevent PMWS and respiratory and virus disease
- It is necessary to investigate effect of natural mineral supplementation to prevent feed contamination by fungi in summer season

III. Reserch Coverage and Scopes

- Study on determination of Solto B supplemental levels and change of immune cell and stress hormone in growing pigs
- Study on anti-viral effects of Solto B in experimental PMWS or PRRS affected pigs
- Effect of stocking density on change of immune cell and stress hormone in growing pigs
- Study on immune-enhancing effects of Solto B in mice

IV. Result

1. The first year

1) Study on determination of Solto B supplemental levels and change of immune cell and stress hormone in growing pigs

(1) Growth performance

- Initial BW, final BW, average daily gain, average daily feed intake and gain:feed ratio were not significant different ($P>0.05$) among treatment.

(2) Nutrient digestibility

- Nitrogen digestibility was significantly increased in pigs fed 0.4% Solto B compared to CON and pigs fed 0.2% Solto B (Linear effect = 0.016).
- Energy digestibility was significantly increased in pigs fed 0.4% Solto B and 0.6%

Solto B compared to CON treatment (Linear effect = 0.008, Quadratic effect = 0.019).

(3) Blood immunological parameters

- RBC, WBC, lymphocy and IgG concentration in blood were not significantly different ($P>0.05$) among treatment.

(4) Blood stress parameter

- Cortisol, epinephrine and norepinephrine concentration in blood were not significantly different ($P>0.05$) among treatment.

(5) Fecal malodor gas emissions

- Hydrogen sulfide concentration in feces was significantly decreased in pigs fed Solto B compared to CON treatment at 5 and 10 days (5 days: Linear effect = 0.009, Quadratic effect = 0.037; 10 days: Linear effect = 0.009).
- Acetic acid concentration in feces was significantly decreased in pigs fed Solto B compared to CON treatment at 5 days (Linear effect < 0.001 , Quadratic effect < 0.001), furthermore, was significantly decreased in pigs fed CON diet and 0.6% Solto B compared to pigs fed 0.2% and 0.4% Solto B (Quadratic effect = 0.023).
- Mercaptans concentration in feces was significantly decreased in pigs fed Solto B compared to CON treatment at 5 and 10 days (5 days: Linear effect = 0.029, Quadratic effect = 0.037; 10 days: Linear effect = 0.029).
- Ammonia concentration in feces was significantly decreased in pigs fed 0.2% and 0.4% Solto B compared to pigs fed CON diet and 0.6% Solto B (5 days: Quadratic effect = 0.038; 10 days: Quadratic effect = 0.045; 15 days: Quadratic effect = 0.038).

2) Study on anti-viral effects of Solto B in experimental PMWS or PRRS affected pigs

(1) Anti-PMWS effects of Solto B (In the first experiment)

a) clinical sign and rectal temperature

- Clinical signs and rectal temperature were observed every 3 days. Rectoal temperature in the Solto B feeding group showed a tendency to slightly increase compared with the control group, although in this instance the difference was not significant.
- Body weight was recorded at beginning of experiment, virus infection and at the end of experiment. This did not differ between the two groups.

b) Gross lesions

- Spleen : This did not differ between the two groups. Average seventeen – eighteen centimeters in both of groups.
- Mesentric lymph node : the Solto B feeding group showed less severe hypertrophy

in a wall of ileum compared with the control group, although in this instance not significant.

- Inguinal lymph node : This did not differ between the two groups.
- Kidney : This did not differ on size and shape between the two groups.
- Lung : The control group showed more severe pneumonia sign compared with the Solto B feeding group.
- Tonsil : This did not differ between the two groups, because gross lesions was mild in both of the groups.
- Pleural fluid : A mount of pleural fluid in the control group, but not in the Solto B feeding group.

c) Distribution and quantitation of PCV2

- The quantitation of PCV2 in the Solto B feeding group was lower than in the control group in most of samples.

(2) Anti-PMWS effects of Solto B (In the second experiment)

a) clinical sign and rectal temperature

- Clinical signs and rectal temperature were observed every 3 days. Rectoal temperature in the control group showed a tendency to slightly increase compared with the control group, although in this instance the difference was not significant.

b) Gross and microscopic lesions

- Gross lesion: This did not differ between the two groups.
- Microscopic lesion : In the present study, experimental PCV2 infected pigs showed interstitial pneumonia characterized by type 2 pneumocyte hypertrophy and hyperplasia and alveolar wall thickening by macrophages and lymphocytes. These lesions were milder in the 0.3% AS feeding group compared with in the control group.

c) Distribution and quantitation of PCV2

- The quantitation of PCV2 in the Solto B feeding group was decreased than in the control group in most of samples after 28 day post-infection (DPI), Especially, difference of this was significant in lung and thymus ($P < 0.05$).

d) Quantitation of PCV2 in nasal swab and serum

- og viral load in nasal swab of the 0.3% AS feeding group was calculated to be 9.39% at 14 DPI to 16.57% at 21 DPI lower than in those of the control group. This reduction in the viral load reached statistical significance at 28 DPI ($P < 0.05$) . A similar result was obtained in serum samples.

(3) Anti-PRRS effects of Solto B (In the first experiment)

a) clinical sign and rectal temperature

- Clinical signs and rectal temperature were observed every 3 days. Rectal temperature in the control group showed a tendency to slightly increase compared with the control group, although in this instance the difference was not significant.
- Body weight was recorded at beginning of experiment, virus infection and at the end of experiment. This did not differ between the two groups.

b) Gross lesions

- Spleen : This did not differ between the two groups. Average seventeen – eighteen centimeters in both of groups.
- Mesentric lymph node: This did not differ between the two groups.
- Lung : The control group showed more severe pneumonia sign compared with the Solto B feeding group.
- Tonsil : This did not differ between the two groups, because gross lesions was mild in both of the groups.

c) Distribution and quantitation of PRRS

- The quantitation of PCV2 in the Solto B feeding group was decreased than in the control group in most of samples. Especially, difference of this was significant in lung, bronchial lymph node, tonsil, inguinal lymph node and thymus ($P < 0.05$).

2. The second year

1) Effect of stocking density on change of immune cell and stress hormone in growing pigs

(1) Experimental design

- ① T1 (basal diet, 3pigs/pen), ② T2 (basal diet, 4pigs/pen), ③ T3 (basal diet, 5pigs/pen), ④ TS1 (basal diet+0.3% Solto B, 3pigs/pen), ⑤ TS2 (basal diet+0.3% Solto B, 4pigs/pen) and ⑥ TS3 (basal diet+0.3% Solto B, 5pigs/pen)

(2) Growth performance

- Average daily gain was significantly higher in T1 and TS1 treatments than T2, T3 and TS3 treatments ($P < 0.05$), and T3 and TS3 treatments was significantly lower than T1 and TS2 treatments ($P < 0.05$).
- Average daily feed intake was significantly higher in TS1 treatment than T2, T3 and TS3 treatments ($P < 0.05$), and TS3 treatment was significantly lower than T1, T2, TS1 and TS2 treatments ($P < 0.05$).

(3) Nutrient digestibility

- Dry matter and nitrogen digestibility were not significantly different ($P > 0.05$) among treatments.

(4) Blood characteristics

- WBC concentration at final was significantly increased in TS1 treatment compared to T2, T3, TS2 and TS3 treatments ($P < 0.05$), furthermore, it was significantly decreased ($P < 0.01$) by stocking density increased.
- RBC concentration at final was significantly increased in T2 treatment compared to TS1, TS2 and TS3 treatments ($P < 0.05$), and TS1 treatment was significantly decreased in T1, T2 and T3 treatments ($P < 0.05$). Furthermore, it was significantly decreased ($P < 0.001$) in when pigs that received diet supplemented with Solto B.
- Interaction effect between stocking density and Solto B was observed when IgG concentration was evaluated at final ($P < 0.05$).
- Cortisol concentration was significantly increased in T1, T2 and T3 treatments compared to TS1 treatment ($P < 0.05$), and decreased when pigs that received diet supplemented with Solto B ($P < 0.05$).

(5) Fecal malodor emission

- Total mercaptans concentration in feces was significantly decreased in TS2 treatment compared to T1 and T2 treatments ($P < 0.05$) at 5 and 10 days, and was significantly decreased when pigs that received diet supplemented with Solto B at 10 days ($P < 0.01$).
- Ammonia concentration in feces was significantly decreased in TS3 treatment compared to T1 and T3 treatments ($P < 0.05$) at 10 days, and was significantly decreased when pigs that received diet supplemented with Solto B at 5 and 10 days ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

2) Study on immune-enhancing effects of Solto B in mice

(1) Relative mRNA expression level of IFN- γ , IL-4 and TNF- α in mice splenocyte

- Relative mRNA expression levels of IL-4 and TNF- α of splenocytes stimulated by PHA for 4hrs significantly increased in the AS feeding groups compared with those in the control group in a dose dependent manner. In addition, relative mRNA expression levels of IFN- γ also significantly increased in the AS feeding groups compared with those in the control group, although no significant difference was observed between the 0.1% AS feeding group and the 0.3% AS feeding group.

(2) Phagocytic activity of mice peritoneal polymorphonuclear leucocytes

- To investigate whether dietary aluminosilicate supplementation could increase phagocytic activity of macrophages, luminal-dependent chemiluminescence analysis was carried out. When peritoneal PMNs of all groups were exposed to PMA, light emission was immediately increased to be a maximal peak at 2 min, and then

gradually decreased to the basal level until 10 min. However, RLU significantly increased in the AS feeding groups compared with those in the control group in a dose dependent manner at maximal peak time (P < 0.05, control vs. 0.1% AS feeding group; P < 0.01, control vs. 0.3% AS feeding group; P < 0.01, 0.1% AS feeding group vs. 0.3% AS feeding group).

(3) Antibody production level in mice serum after vaccination

- Although no significant difference was observed in the antibody titer and between the control and 0.1% AS feeding group, those of 0.3% AS feeding group were significantly greater than in the control group (P < 0.05).

(4) Lymphocyte subpopulation in mice spleen after vaccination

- Although no significant difference was observed in the antibody titer and B cell (CD3⁻/CD19⁺) lymphocyte ratio between the control and 0.1% AS feeding group, those of 0.3% AS feeding group were significantly greater than in the control group (P < 0.05).

3) The effects of Solt B on the growth and aflatoxin B1 of *Aspergillus flavus*.

(1) The effects of Solt B on the growth of *Aspergillus flavus*.

- It was observed that the growth of *A. flavus* got lower when the Solt B was added than when the mold grew alone in a dose –dependent manner (P < 0.05).

(2) The effects of Solt B on the Aflatoxin B1 of *Aspergillus flavus*.

- The concentration aflatoxin B1 in the Solt B supplemented feed was significantly lower than in the basal feed in a dose –dependent manner (P < 0.05).

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	16
Chapter 2. Result of Research Project	18
Section 1. Result of Research Project at The First Year	18
1.1. Study on determination of Solto B supplemental levels and change of immune cell and stress hormone in growing pigs	18
1.2. Study on anti-viral effects of Solto B in experimental PMWS or PRRS affected pigs	23
Section 2. Result of Research Project at The Second Year	42
2.1. Effect of stocking density on change of immune cell and stress hormone in growing pigs	42
2.2. Study on immune-enhancing effects of Solto B in mice	46
Chapter 3. Goal Achievement and Contribution in This Field	51
Section 1. Goal achievement	51
Section 2. Contribution in this field	52
Chapter 4. Research Performance and Plan of Research Performance Use	53
Section 1. Development and industrialization	53
Section 2. Use plan on further study	55

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	16
제 2 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절	1차 년도 연구개발수행 내용 및 결과	18
1.1.	젓돈 사료내 Solto B의 첨가수준 결정 및 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬 변화 규명	18
1.2.	Solto B를 급여한 돼지에서 면역기능 증강으로 PMWS 와 PRRS에 대한 항병력이 증 가되었는가를 확인하기 위한 인공 감염실험	23
제 2 절	2차 년도 연구개발수행 내용 및 결과	47
2.1.	사육밀도(3,4,5두/펜)에 따른 Solto B의 첨가급여 효과규명	47
2.2.	마우스를 이용한 Solto B의 면역강화 기능 확인 및 Solto B의 항곰팡이 제제로서의 가능성을 확인	52
제 3 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	59
제 1 절	연구개발목표 달성도	59
제 2 절	관련분야에의 기여도	60
제 4 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	61
제 1 절	산업화 계획	61
제 2 절	추가연구, 타연구에 활용 계획	63

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 국내에서는 최근까지도 축산에서 가축사료에 항생제를 첨가함으로써 인해서 병원균의 성장을 억제시키고 가축의 성장을 촉진시켜 생산성의 향상을 추구하고 있다. 하지만 이러한 항생제의 사용으로 인한 내성균 출현과 식육내의 항생제 잔류 문제 등은 국민위생에도 심각한 영향을 미치고 있다. 2005년 말 부터 EU는 가축의 성장 촉진(GPAs : Growth-promoting antibiotics)용 항생제 사용을 금지하도록 규제하고 있다. 양계와 양돈 사육업자들은 대부분 GPAs에 의존하고 있기 때문에 성장촉진용 항생제의 금지는 국내 축산업계에 커다란 충격을 주게 될 것이다. EU에서는 FP6(6th framework programme)의 일환으로 순수한 식물사료나, 건강에 해로운 항생제가 포함되는 사료를 대체하는 천연적 대안을 지지하는 REPLACE를 추진하고 있다. 따라서 최근 전 세계적으로 항생제 사용에 대한 규제가 강화되면서 그 대안으로 천연물질을 이용한 면역증강효과를 규명하는 다양한 연구가 진행되고 있다.
- 우리나라의 양돈산업은 최근들어 규모면이나 사양, 기술면에서 커다란 발전을 하였으나 아직까지 질병문제는 양축가에 많은 경제적인 손실을 주고 있다. 그 중에서도 소화기와 호흡기 질병이 전체 질병의 2/3를 차지할 정도로 비중이 크다. 특히 호흡기질병의 경우는 모든 일령을 통해 발병 및 지속적인 영향을 줄 수 있으므로 그 잠재적인 피해는 더욱 클 것으로 생각된다.
- 돼지의 주요 호흡기질병은 위축성 비염, 흉막 폐렴, 유행성 폐렴 및 파스튜렐라성폐렴 등이 주종을 이루고 있으며, 포유자돈에서 비육돈 출하시까지 모든 성장단계에 걸쳐 발생하며 대개 이로 인한 급작스러운 폐사보다는 만성 소모성 경과를 취하기 때문에 사료효율 저하, 증체율 감소, 출하일령 지연등 생산성 감소의 가장 큰 원인이 되고 있다. 이를 치료하기위해서 주로 항생물질을 사용하고 있으나 생체 내에서 항생물질의 내성과 잔류성이 문제되고 있으며, 약품비와 인건비의 과다지출로 인한 경쟁력약화의 원인이 되고 있다. 따라서 이러한 호흡기 질병들은 치료보다는 예방이 우선되어야 하고 치료는 최후의 수단으로 하여야 한다.
- 돼지 전신성 소모성 증후군 (PMWS) 감염증의 원인체로 porcine circovirus type-2(PCV-2)가 1996년 캐나다에서 최초보고 된 이후, 국내에서도 1997년에 처음보고 이후 해마다 급격한 폭발적인 발병양상을 보이고 있다. 이 질병은 이유자돈에서 위축, 호흡기질환 및 설사등을 일으키는 돼지의 중요 질병으로, 국내는 물론이고 세계적으로 치료와 예방이 어려운 고질적인 질병으로 각인되어있다. 이 질병은 한번 발생하면 근절하기

어려운 질병이며 일반적으로 겨울에만 발생하는 호흡기성 질병과는 달리 연중발생하여 막대한 손실을 유발한다.

- 특히 PMWS 감염의 가장 큰 특징은 감염동물의 면역력을 심하게 억제하여 2차적인 호흡기 바이러스(PRRS, 돼지 parvovirus 등) 및 세균감염(글래셔씨병, 흉막폐렴, 마이크플라스마, 파스튜렐라폐렴등)이 발생하여 큰 피해를 야기한다. 그러므로 돼지의 면역기능을 증강시킬 수 있는 면역 증강제를 급여하여 면역능력을 향상시킨다면 이러한 소모성질병으로부터 피해를 줄일 수 있을 것이다. 따라서 면역증강 기능이 있는 천연광물질을 사료에 첨가하여 급여함으로써 동물 체내에서 여러 면역세포들의 면역기능이 강화된다면 이러한 소모성 질병의 원인체에 대한 저항력을 증강시킬 수 있을 것이다.
- 여름철 사료에는 과습으로 인하여 곰팡이가 잘 자랄수 있는 환경의 조건이 된다. 이러한 곰팡이에 오염된 사료를 급여하게 되면 돼지의 생산성이 떨어지고 사료효율이 감소하며 폐사의 직접적인 원인이 되기도 한다. 따라서 일반적으로 사료에 곰팡이 성장 억제제를 첨가하게 되는데 이는 주로 유기산제제(프로피온산, 아세트산, 벤조산, 솔빅산, 등)를 사용하여 pH를 낮추어 곰팡이가 성장을 하지 못하도록 한다. 또한 곰팡이 독소를 제거하기 위하여 일반적으로 무기질 즉, 광물질이나 활성탄 같은 흡착제를 사용한다. 그동안 Solto B는 사료에 첨가되어 사용되면서 곰팡이 생성이 감소되는 효과를 보았지만 이러한 기능에 관한 연구가 부족하였다.
- Solto B를 이용한 면역기능강화 천연광물질 사료 첨가제가 개발되면 면역증강에 의해 여러 질병들을 예방할 수 있게 되어 사료첨가 및 치료용 항생제의 사용이 줄어들게 될 것이다. 더불어 항곰팡이 제제로서의 효과가 입증되면 이는 실로 큰 경제적 이익을 창출할수 있을 것이다. 이러한 질병없는 농장운영에 따른 인력 및 경비 절감으로 막대한 생산성을 추구할 수 있다. 또한 항생제등 항균제의 오·남용에 따른 식육 중 항생제 잔류 등 축산물 안전성에 관한 문제를 해결하는데 도움이 될 것이다. 따라서 동물의 면역기능 강화를 통한 건강한 가축의 사육을 통해 축산업의 생산성이 향상되어 축산농가에게 경제적 이익을 극대화 시켜주고 날로 위축되어 가는 국내 축산업의 경쟁력을 제고하고 농민의 축산의욕을 고취시키고 천연영농을 촉진시켜 향후 우리 축산업의 발전 방향인 친환경축산의 기반을 구축하는데 크게 기여할 것으로 기대한다.

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1차 년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 젓돈 사료내 Solto B의 첨가수준 결정 및 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬 변화 규명

가. 시험설계

- 1) 대조구(0%) 2) 0.2% 3) 0.4% 4) 0.6% : 총 4처리구
- 56일령 돼지(평균체중 29.45±1.35kg) 96두를 공시하여 개시 및 종료시 체중을 측정 및 혈액을 채취한다.
- 사료와 물은 자유 채식토록하며 수행
- 젓돈 폐사율, 면역세포(백혈구, 적혈구, 림프구, IgG), 스트레스관련호르몬(코티졸, 노르 에피네프린, 에피네프린)
- 종료시 분뇨를 채취하여 악취발생물질 분석

나. 성장능력

- Solto B 분말의 첨가 수준 급여가 육성돈의 성장능력에 미치는 영향은 table 1에 나타 내었다. 개시체중, 종료체중, 일당 증체량, 일당 사료 섭취량 및 사료 효율에서도 처리구 간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 1. Effect of dietary Solto B on growth performance in growing pigs

Items	CON ¹	Solt2 ¹	Solt4 ¹	Solt6 ¹	SE ²	P-value ³	
						Linear	Quadratic
Initial BW, kg	29.40	29.40	29.55	29.45	0.09	0.470	0.533
Final BW, kg	52.40	52.04	51.83	49.99	1.53	0.285	0.631
ADG, kg	0.605	0.596	0.586	0.541	0.04	0.256	0.673
ADFI, kg	1.615	1.529	1.570	1.505	0.04	0.181	0.766
G/F	0.374	0.387	0.375	0.359	0.02	0.620	0.558

¹Abbreviated CON, basal diet ; Solt2, 0.2% Solto B replaced in 0.2% corn; Solt4, 0.4% Solto B replaced in 0.4 % corn; Solt6, 0.6% Solto B replaced in 0.6% corn.

²Pooled standard error.

³Refers to the P-value of the corresponding effect of dose of the biotite

다. 영양소 소화율

- Solto B 급여가 육성돈의 영양소 소화율에 미치는 영향을 table 2에 나타내었다. 질소 소화율에서는 Solt4 처리구가 CON 과 Solt2 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타내었다(Linear effect = 0.016). 총에너지에서는 Solt4 와 Solt6 처리구가 CON 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타내었다(Linear effect = 0.008, Quadratic effect = 0.019). 하지만, 건물 소화율에서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서, 본 시험에서도 biotite 0.6% 급여한 처리구가 질소 및 총 에너지 소화율이 유의적으로 증가하였다.

Table 2. Effects of dietary Solto B on apparent digestibility in growing pigs

Item	CON ¹	Solt2 ¹	Solt4 ¹	Solt6 ¹	SE ²	P-value ³	
						Linear	Quadratic
DM, %	79.01	78.48	78.99	79.65	0.34	0.128	0.098
N, %	80.21 ^b	80.13 ^b	82.13 ^a	81.39 ^{ab}	0.49	0.016	0.510
GE, kcal/kg	80.19 ^b	81.08 ^{ab}	81.92 ^a	81.23 ^a	0.31	0.008	0.019

¹Abbreviated CON, basal diet ; Solto2, 0.2% Solto B replaced in 0.2% corn; Solt4, 0.4% Solto B replaced in 0.4 % corn; Solt6, 0.6% Solto B replaced in 0.6% corn.

²Pooled standard error.

³Refers to the P-value of the corresponding effect of dose of the biotite

라. 혈액 내 면역학적 지표

- Solto B 급여가 육성돈의 혈액 내 면역학적 지표에 미치는 영향을 table 3에 나타내었다. 혈액 내 적혈구, 백혈구, 림프구 및 IgG은 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 3. Effects of dietary Solto B on blood immunological parameters in growing pigs

Item	CON ¹	Solt2 ¹	Solt4 ¹	Solt6 ¹	SE ²	P-value ³	
						Linear	Quadratic
RBC, ×10⁶/μl							
Initial	6.92	7.02	6.48	6.72	0.19	0.219	0.733
Final	7.46	7.24	0.75	6.94	0.22	0.100	0.808
Difference	0.54	0.22	0.56	0.22	0.21	0.527	0.951
WBC, ×10³/μl							
Initial	14.03	13.74	13.63	14.19	0.86	0.920	0.630
Final	22.16	16.81	15.56	16.44	3.07	0.200	0.327
Difference	8.14	3.07	1.92	2.25	3.01	0.182	0.385
Lymphocyte, %							
Initial	59.55	51.88	59.17	56.60	3.99	0.931	0.533
Final	56.42	58.37	57.97	52.83	2.78	0.385	0.223
Difference	-3.13	6.48	-1.20	-3.77	5.61	0.708	0.295
IgG, mg/dL							
Initial	330.17	362.17	33.67	293.67	20.35	0.150	0.097
Final	768.50	672.00	830.33	748.00	36.75	0.564	0.849
Difference	438.33	309.83	496.67	454.33	43.08	0.242	0.333

¹Abbreviated CON, basal diet ; Solto2, 0.2% Solto B replaced in 0.2% corn; Solt4, 0.4% Solto B replaced in 0.4 % corn; Solt6, 0.6% Solto B replaced in 0.6% corn.

²Pooled standard error.

³Refers to the P-value of the corresponding effect of dose of the biotite

마. 혈청 내 스트레스 지표

- Solto B 급여가 육성돈의 혈액내 스트레스 지표에 미치는 영향을 table 4에 나타내었다. 혈청 내 코티졸, 에피네프린 및 노에피네프린에서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 4. Effects of dietary Solto B on blood stress parameter in growing pigs

Item	CON ¹	Solt2 ¹	Solt4 ¹	Solt6 ¹	SE ²	P-value ³	
						Linear	Quadratic
Cortisol, $\mu\text{g}/\text{dL}$							
Initial	3.18	3.90	2.58	3.70	0.66	0.938	0.766
Final	2.75	3.03	2.67	1.93	0.55	0.274	0.374
Difference	-0.43	-0.87	0.08	-1.77	0.82	0.421	0.404
Epinephrine, pg/mL							
Initial	53.85	54.67	62.73	66.25	9.54	0.305	0.889
Final	56.77	49.27	38.88	44.07	14.02	0.104	0.262
Difference	2.92	-5.40	-23.85	-22.18	16.09	0.051	0.366
Norepinephrine, pg/mL							
Initial	288.62	347.22	307.23	263.77	70.79	0.722	0.482
Final	673.17	401.92	405.88	321.97	152.98	0.145	0.549
Difference	384.55	54.70	98.65	58.20	156.92	0.202	0.371

¹Abbreviated CON, basal diet ; Solto2, 0.2% Solto B replaced in 0.2% corn; Solt4, 0.4% Solto B replaced in 0.4 % corn; Solt6, 0.6% Solto B replaced in 0.6% corn.

²Pooled standard error.

³Refers to the P-value of the corresponding effect of dose of the biotite

바. 분내 유해가스 발생량

- Solto B 급여가 육성돈의 분내 유해가스 발생량에 미치는 영향을 table 5에 나타내었다. 황화수소(Hydrogen sulfide)는 5 day 과 10 day에서 대조구에 비해 Solto B처리구가 유의적으로 감소를 하였다(5 day, Linear effect = 0.009, Quadratic effect = 0.037; 10 day, Linear effect = 0.009). 하지만, 15day에서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 아세트산(Acetic acid)는 5 day에서 대조구에 비해 Solto B처리구가 유의적으로 감소를 하였다(Linear effect <0.001, Quadratic effect < 0.001). 15 day에서도 CON 과 Solt6 처리구가 Solt2와 Solt4 처리구에 비해 유의적으로 감소를 하였다(Quadratic effect = 0.023). 하지만, 10 day에서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 메캡탄(Mercaptans)은 5 day 과 10 day에서 CON 처리구에 비해 Solto B처리구가 유의적으로 감소를 하였다(5 day, Linear effect = 0.029, Quadratic effect = 0.037; 10 day, Linear effect = 0.029). 15 day에서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 암모니아(Ammonia)는 5 day, 10 day 및 15 day에서 Solt2와 Solt4 처리구가 CON과 Solt6 처리구에 비해 유의적으로 감소하였다(5 day, Quadratic effect = 0.038; 10 day, Quadratic effect = 0.045; 15day, Quadratic effect = 0.038).

Table 5. Effects of dietary Solto B on fecal malodor gas emissions in growing pigs

Item, ppm	CON ¹	Solt2 ¹	Solt4 ¹	Solt6 ¹	SE ²	P-value ³	
						Linear	Quadratic
H₂S							
5 day	7.50 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	1.53	0.009	0.037
10 day	0.50 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.10	0.009	0.067
15 day	5.00	2.00	2.11	2.95	2.50	0.213	0.343
Acetic acid							
5 day	0.75 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.05	<0.001	<0.001
10 day	0.50	0.25	0.38	0.13	0.26	0.412	1.000
15 day	0.00 ^b	2.75 ^a	2.25 ^a	0.00 ^b	0.91	0.905	0.023
Mercaptan							
5 day	1.85 ^a	0.15 ^b	0.25 ^b	0.38 ^b	0.37	0.029	0.037
10 day	4.00 ^a	1.13 ^b	1.05 ^b	1.00 ^b	0.78	0.029	0.104
15 day	4.00	1.33	1.93	1.90	0.67	0.090	0.080
Ammonia							
5 day	2.50 ^a	1.50 ^b	1.50 ^b	3.50 ^a	0.62	0.304	0.038
10 day	1.00 ^a	0.50 ^b	0.50 ^b	1.63 ^a	0.35	0.261	0.045
15 day	2.50 ^a	1.50 ^b	1.50 ^b	3.50 ^a	0.61	0.304	0.038

¹Abbreviated CON, basal diet ; Solto2, 0.2% Solto B replaced in 0.2% corn; Solt4, 0.4% Solto B replaced in 0.4 % corn; Solt6, 0.6% Solto B replaced in 0.6% corn.

²Pooled standard error.

³Refers to the P-value of the corresponding effect of dose of the biotite

^{ab}Means in the same row with difference superscripts differ(P<0.05).

사. 결론

- 결론적으로, 육성돈에 Solto B 급여시 질소 소화율과 총 에너지에서 유의적으로 증가를 하였고, 분내 유해가스 함량에서는 유의적인 감소를 나타내었다.

2. Solto B를 급여한 돼지에서 면역기능 증강으로 PMWS 와 PRRS에 대한 항병력이 증가되었는가를 확인하기 위한 인공 감염실험

가. Solto B의 PMWS방어 효과 실험 (1차 실험)

(1) 실험 동물

- 양돈 농장에서 이유자돈 6마리를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험 시작 전에 이들로 부터 비강분비물과 혈액을 채취하여 PCR을 통해 PCV2 음성임을 확인한 후, 대조군 (3마리)과 Solto B 급여군 (3마리)로 나누었다. 대조군에는 일반사료를 실험 전(全)기간 동안 자유 급식시켰으며, 실험군 (Biotitie V 급여군)은 대조군과 동일한 사료에 0.3% Solto B를 첨가하여 실험 전(全)기간 동안 자유 급식시켰다.

(2) 실험 계획

- 대조군과 Solto B 급여군은 각 군의 사료에 1주일간의 적응기간을 거쳤다. 이 후, 두군 모두에 10^6 virus particle /ml 농도의 PCV2 2ml을 비강을 통해 감염시켰다. 바이러스 접종 12일 후에 각각 부검을 실시하여 시료를 채취하였다. 바이러스 농도는 Real-time PCR 방법을 이용하여 측정하여 사용하였다.

(3) 임상증상과 체중변화

- 실험 기간 동안 3일 간격으로 디지털 체온계를 이용하여 오전 9:30-10:00사이에 체온을 측정하였으며, 체중은 실험 개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 디지털 체중계를 사용하여 측정하였다. 육안적인 임상증상은 매일 관찰하였다.

(4) 부검조건

- 실험 종료 후, 서혜 림프절, 흉선, 편도, 기관 림프절, 폐, 간, 회장, 장간막 림프절의 병변 정도를 확인하였다. 특이적인 병변은 사진으로 남겨 병변의 정도를 자세히 비교하였다.

(5) 면역장기에서의 Real time에 의한 PCV2 titier 정량

- 실험 종료 후, 채취한 장기 중 기관 림프절, 편도, 서혜 림프절에서 바이러스 DNA를 추출하여 Quantitative real time PCR을 통해 조직 중의 PCV2의 농도를 정량하였다.

(가) Real-time PCR을 위한 장기로부터 Genomic DNA 추출

- 장기로부터 genomic DNA추출은 AccuPrep Genomic DNA extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 제품설명서에 따라 수행하였다. DNA추출을 위해서 혈청은 200 μ l, 조직은 25mg 그리고 비장은 50mg이 사용되었다. 최종적으로 100 μ l의 elution buffer에 희석하여 사용시까지 -20 $^{\circ}$ C에 저장되었다.

(나) Primer and Probe design

- Quantitative real time PCR을 위한 Primer와 Probe design은 Table 6에 정리하였다 (Alex et al., 2004).

Table 6. Sequence, localisation and properties of primers and probe designed for the PCV2 real time PCR by primer express

	Sequence(5'-3')
PVC2F	CCAGGAGGGCGTTGTGAC
PVC2R	CGCTACCGTTGGAGAAGGA
PVC2S	AATGGCATCTTCAACACCCGCCTC

(다) Standard curve

- PCV2가 삽입되어 있는 pGEMT-easy vector를 농도 별 (10^{10} to 10^2 PCV2 plasmid copies/ml)로 준비하여 Standard curve를 작성하여 바이러스 농도를 측정하는데 사용하였다.

(라) PCV2 TaqMan real time PCR reactions

- PCV2정량을 위한 real-time PCR은 Rotor-gene 6000(Corbett research, Australia)을 사용하여 수행되었다. 전체 25 μ l 반응액에는 12.5 μ l의 Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG와 0.5 μ l의 ROX Reference Dye(Invitrogen, USA)를 넣고 1 μ g/1 μ l의 genomic DNA, 0.5 μ M/0.5 μ l의 Forward primer와 Reverse primer 그리고 0.5 μ M/0.25 μ l의 Fluorogenic probe가 포함되었고, 나머지는 9.75 μ l의 DEPC-treated water로 채웠다. 반응 조건은 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분의 과정을 40회 반복하여 행해졌다.

(6) 통계적 처리

- 모든 데이터는 mean \pm SD로 표현되어졌다. 그룹간의 유의적인 차이는 Minitab Statistical Software 13.20 (USA)을 사용하여 one-way ANOVA analysis와 Turkey's multiple comparison test에 의해 평가되었다. 모든 경우에, $P < 0.05$ 는 유의적 차이가 있는 것으로 고려되었다.

(7) 결과

(가) 임상 증상과 체중변화

- 실험기간 동안 3일간 간격으로 체온을 측정한 결과 두 군간에 유의적인 차이는 없었지만 실험군의 체온인 약간 상승하는 경향이 있었다. 체중은 실험개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 측정을 하였지만 두 군간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

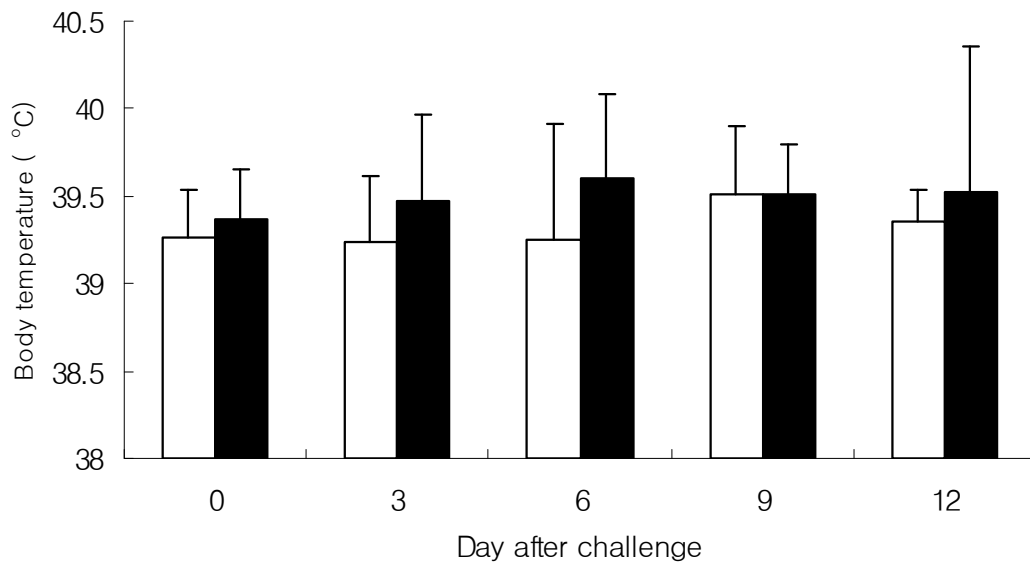


Figure 1. Evolution of the mean body temperature in Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars).

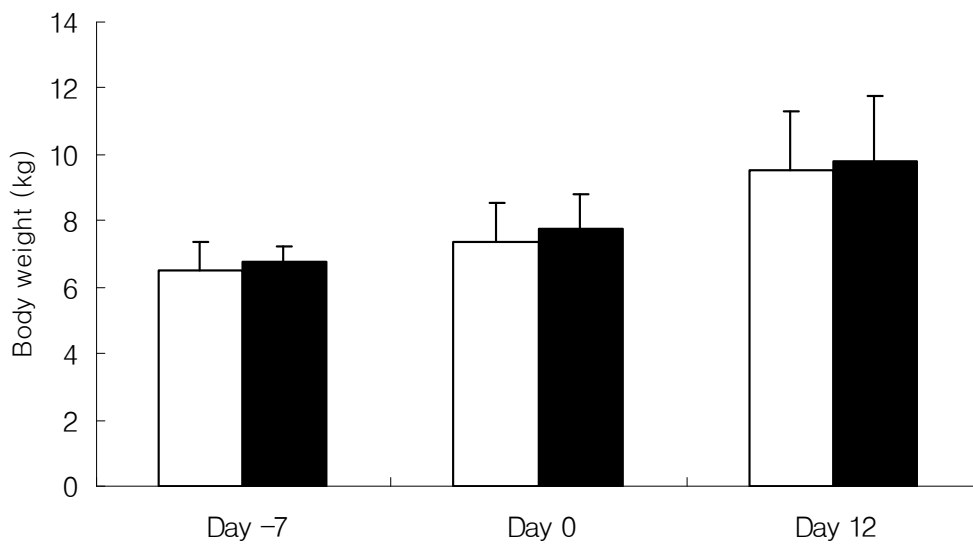















Figure 2. Evolution of the mean body weight in Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars).

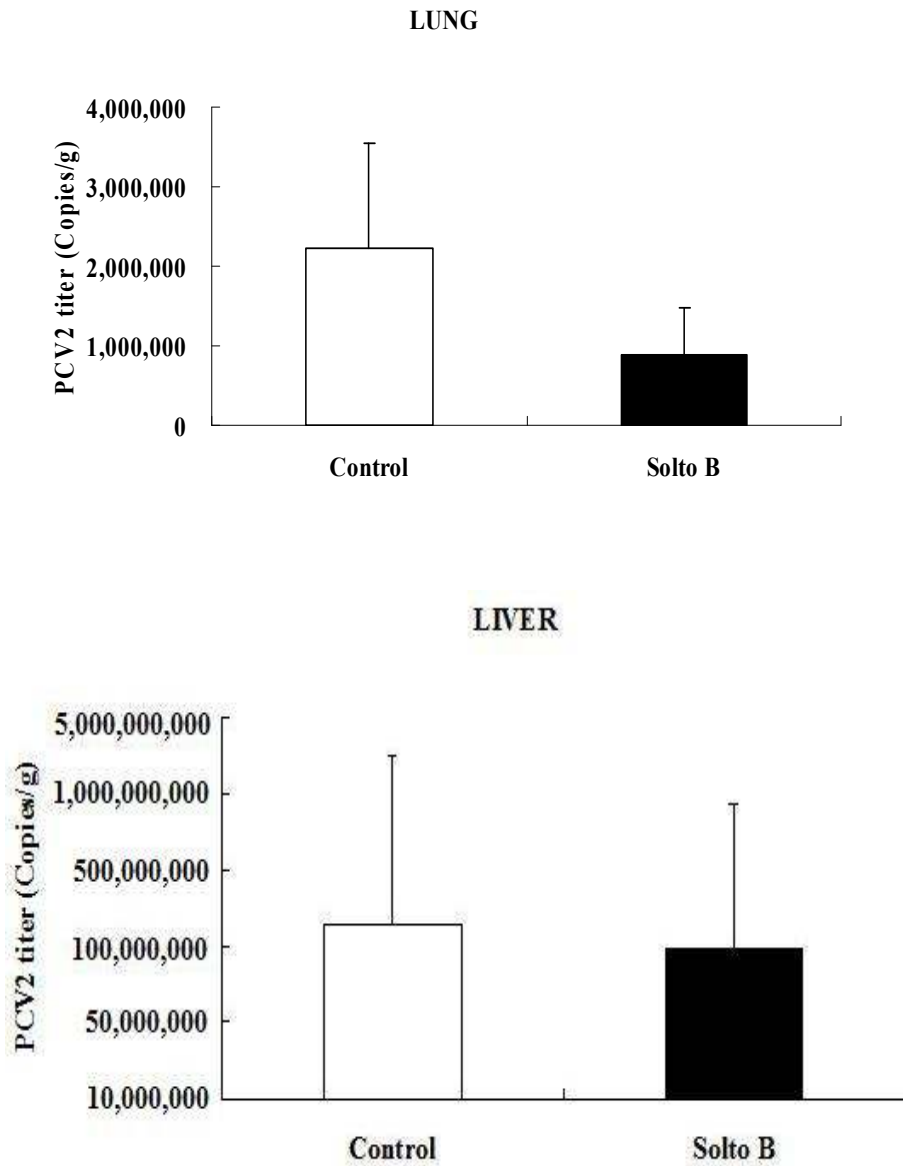
(나) 각 장기의 부검소견

	대조군	Solto B 급여군
비장		
부검소견	비장의 크기에 있어서는 2군 모두 평균적으로 17~18cm로 큰 차이를 보이지는 않는다	
장간막림프절 & 회장		
부검소견	장간막 림프절의 크기는 큰 차이를 보이지 않았으나 Solto B 급여군에 비해, 대조군의 회장벽이 얇아져 있음을 알 수 있었다	
서혜 림프절		
부검소견	두 군간의 뚜렷한 차이를 보이지 않았다	
신장		
부검소견	비장의 색깔이나 크기 모양에서 큰 차이를 보이지 않는다	

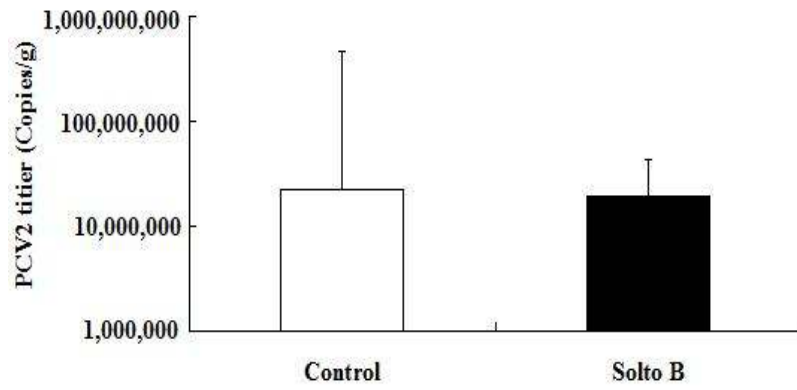
	대조군	Solto B 급여군
폐		
부검소견	대조군 폐는 Solto B 급여군에 비해 전체적으로 심한 폐렴 소견을 보였다	
편도		
부검소견	편도의 크기나 병변이 심하지 않아 큰 차이를 보이지 않음	
흉강		
부검소견	대조군의 흉강에 흉수가 심하게 찬 소견이 관찰됨	
전체적인 부검소견	대조군의 폐에서 폐렴소견이 보이며, 흉강에 흉수가 심하게 차 있었다. 또한 회장벽이 심하게 얇아진 소견을 보였다. 하지만, 대조군에 비해 Solto B 급여군의 폐와 회장벽에는 큰 병변이 보이지 않았다	

(다) PCV2의 분포와정량

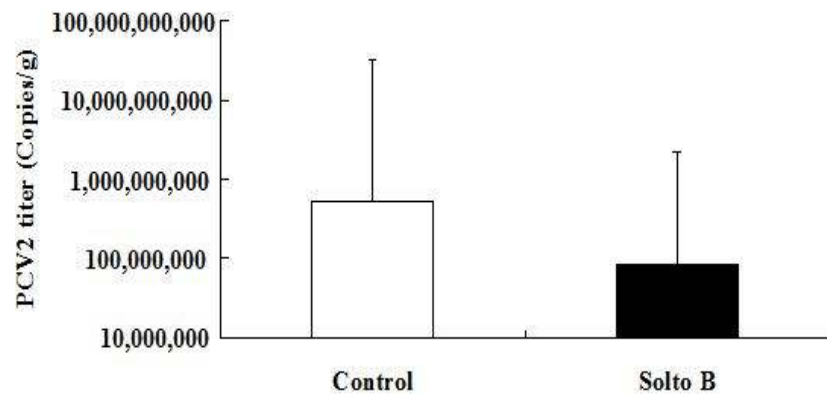
- Real time PCR을 이용하여 각 장기에 PCV2 바이러스의 감염 농도를 측정하였다. PCV2의 농도는 대부분의 장기에서 Solto B 급여 군이 대조군에 비해 낮았다(Figure 3). 특히, 기관지 림프절, 서혜림프절 그리고 편도선에서 Solto B 급여 군에서 대조군보다 유의성있게 감소하였다 ($P < 0.05$). 이는 Solto B의 급여가 PCV2 바이러스 감염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.



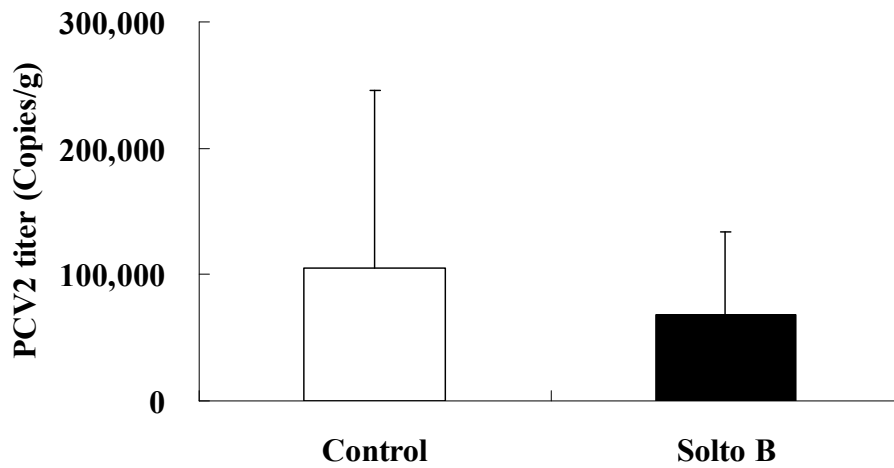
KIDNEY



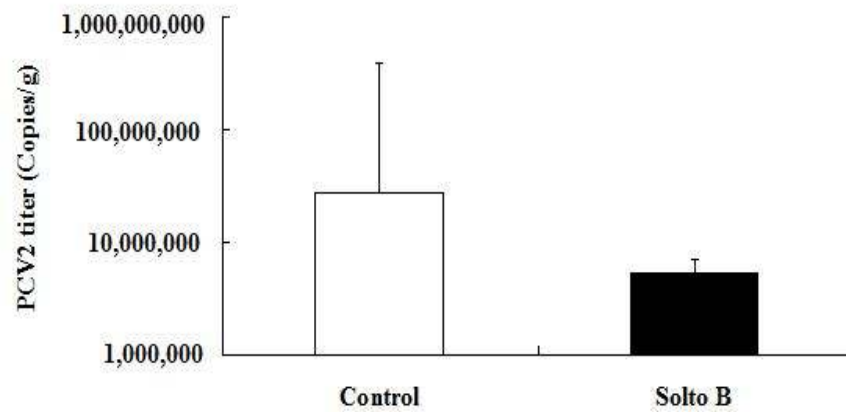
THYMUS



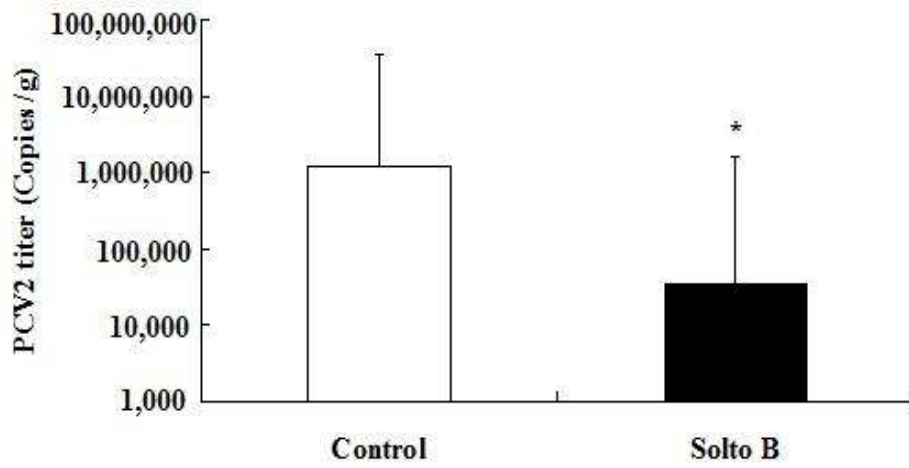
MESENTERIC LYMPH NODE



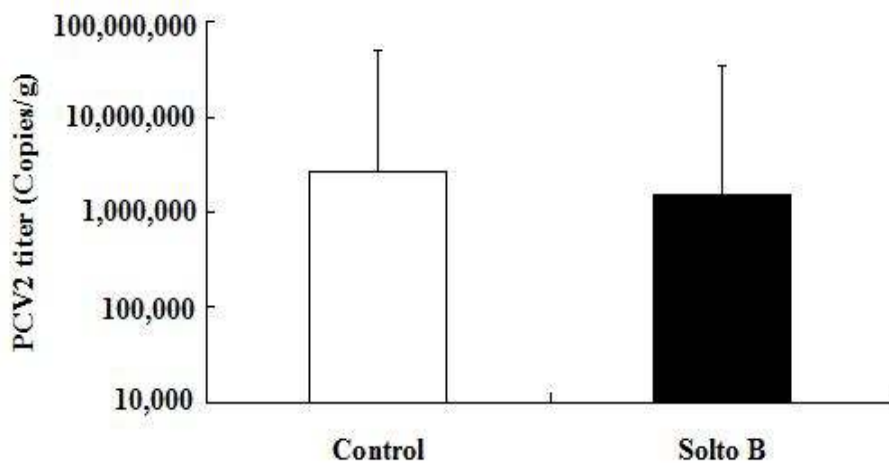
ILEUM



BRONCHIAL LYMPH NODE



SPLEEN



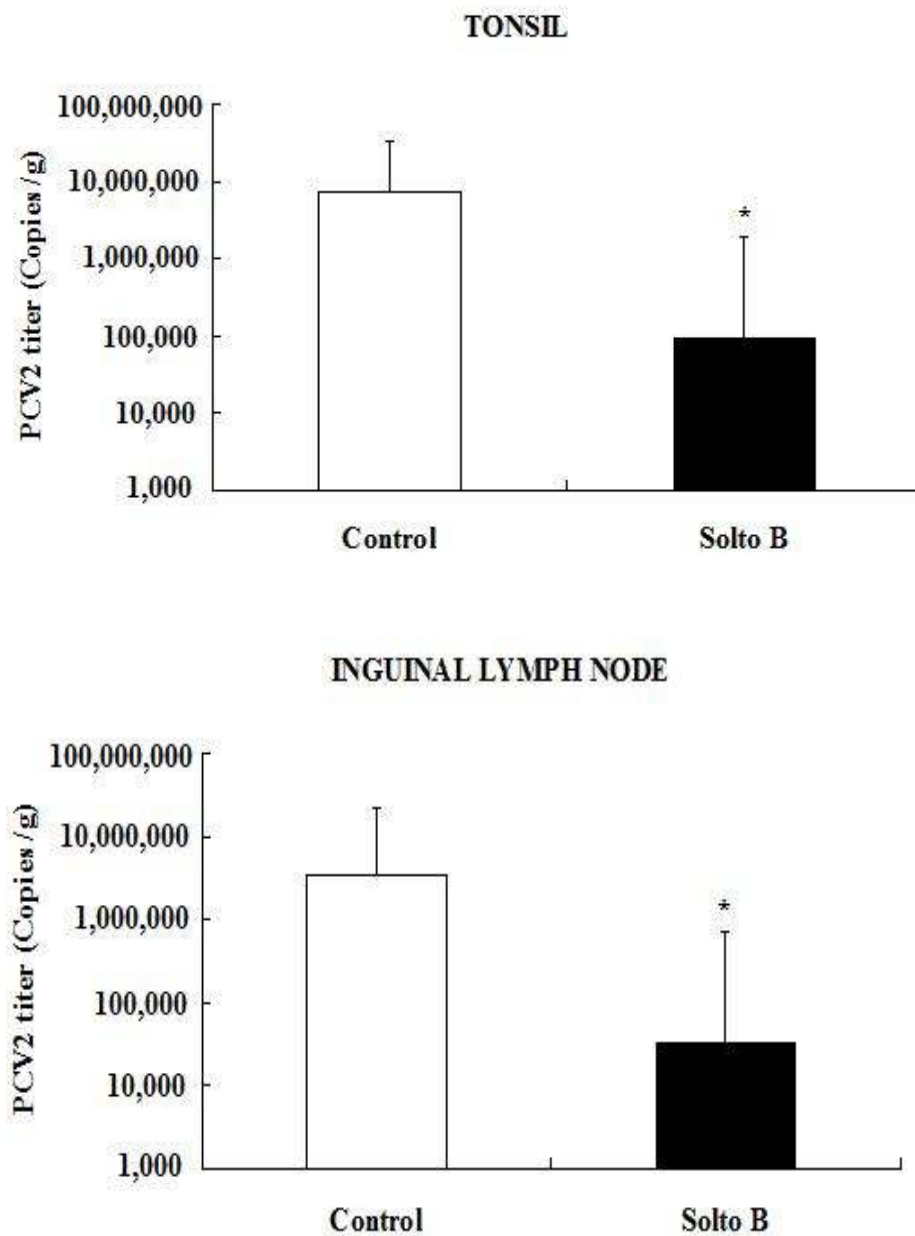


Figure 3. Distribution and quantitation of PCV2 in different treatment of Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars) after challenge 12. Significantly different from the control, *; $P < 0.05$.

나. Solto B의 PMWS방어 효과 실험 (2차 실험)

(1) 실험 동물

- 양돈 농장에서 이유자돈 6마리를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험 시작 전에 이들로 부터 비강분비물과 혈액을 채취하여 PCR을 통해 PCV2 음성임을 확인한 후, 대조군 (3마리)과 Solto B 급여군 (3마리)로 나누었다. 대조군에는 일반사료를 실험 전(全)기간 동안 자유 급식시켰으며, 실험군 (Solto B 급여군)은 대조군과 동일한 사료에 0.3% Solto B를 첨가하여 실험 전(全)기간 동안 자유 급식시켰다.

(2) 실험 계획

- 대조군과 Solto B 급여군은 각 군의 사료에 1주일간의 적응기간을 거쳤다. 이 후, 2군 모두에 10^6 copies/ml 농도의 PCV2 2ml을 비강을 통해 감염시켰다. 바이러스 접종 28일 후에 각각 부검을 실시하여 시료를 채취하였

(3) 임상증상과 체중변화

- 실험 기간 동안 3일 간격으로 디지털 체온계를 이용하여 오전 9:30-10:00사이에 체온을 측정하였으며, 체중은 실험 개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 디지털 체중계를 사용하여 측정하였다. 육안적인 임상증상은 매일 관찰하였다.

(4) 부검소견

- 실험 종료 후, 서혜 림프절, 흉선, 편도, 기관 림프절, 폐, 간, 회장, 장간막 림프절의 병변 정도를 확인하였다. 특이적인 병변은 사진으로 남겨 병변의 정도를 자세히 비교하였다.

(5) 면역장기에서의 Real time에 의한 PCV2 titier 정량

- 실험 종료 후, 채취한 장기 중 기관 림프절, 편도, 서혜 림프절에서 virus DNA를 추출하였으며, Solto B의 PCV2 방어 효과 1차 실험과 동일한 방법으로 Quantitative real time PCR을 통해 PCV2의 정량을 실시하였다.

(6) 조직학적 분석

- 조직학적 평가를 위하여, 공격접종 일주일 후 vaccine group과 control group으로부터 폐조직을 채취하였다. 샘플은 10% 중성 포르말린에 고정되었고 파라핀에 고정되었다. . Multiple 5- μ m sections은 hematoxylin and eosin (H & E)으로 염색되었다. 조직은 전체적인 형태를 가지고 평가되었다.

(7) 통계적 처리

- 모든 데이터는 mean \pm SD로 표현되어졌다. 그룹간의 유의적인 차이는 Minitab Statistical Software 13.20 (USA)을 사용하여 one-way ANOVA analysis와 Turkey's multiple comparison test에 의해 평가되었다. 모든 경우에, $P < 0.05$ 는 유의적 차이가 있는 것으로 고려되었다.

(8) 결과

(가) 임상 증상과 체중변화

- 실험기간동안 3일간 간격으로 체온을 측정한 결과 두 군간에 유의적인 차이는 없었지만 대조군의 체온인 약간 상승하는 경향이 있었다. 체중은 실험개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 측정을 하였지만 두 군간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

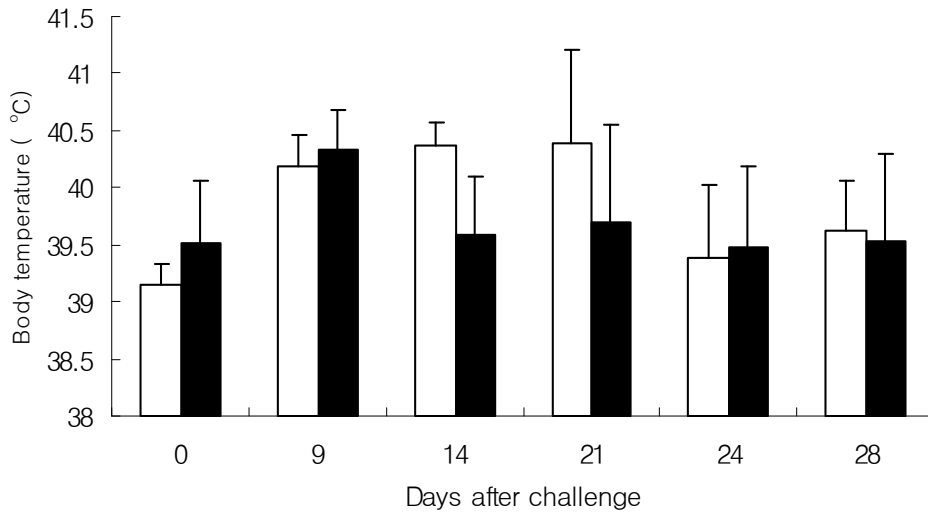


Figure 4. Evolution of the mean body temperature in Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars.).

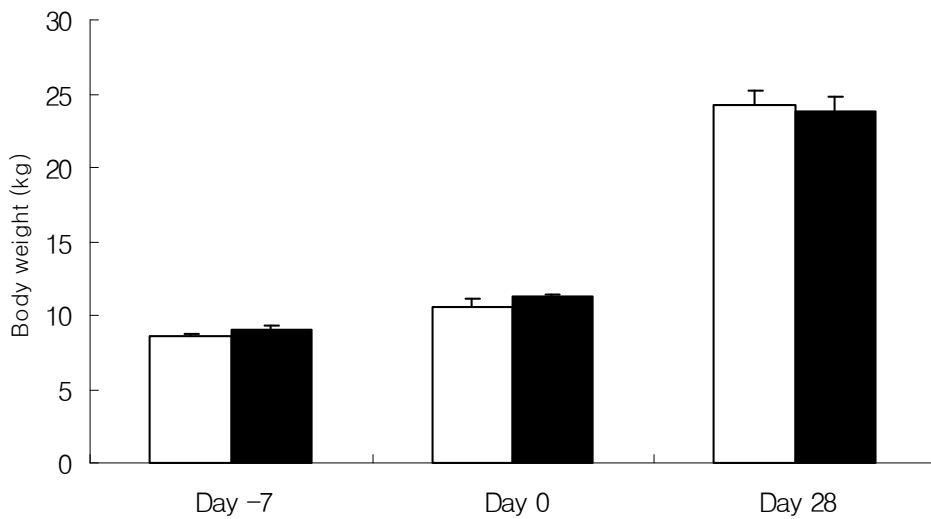


Figure 5. Evolution of the mean body weight in Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars).

(나) 육안적 소견과 현미경적 소견

- 본 실험에서 육안적인 큰 차이는 관찰되지 않았다. 현미경적인 소견을 보면, Solto B 급여군의 폐는 공격접종 이 후에도 염증세포의 침윤이나 병리적인 소견이 크게 관찰되지 않았지만 (b), control group의 폐에서는 혈관으로 부터의 광범위한 삼출, 폐포 격벽의 섬유질을 동반한 중정도의 증대, 대식세포와 중성호성백혈구를 포함한 염증세포들의 폐포강내의 침윤등이 관찰되었다 (a). 뿐만 아니라, Solto B 급여군의 흉선은(d) 공격접종 이후에도 대조군의 흉선에(c) 비해 명확한 수질과 피질의 구분이 가능한 것을 볼 수 있다.

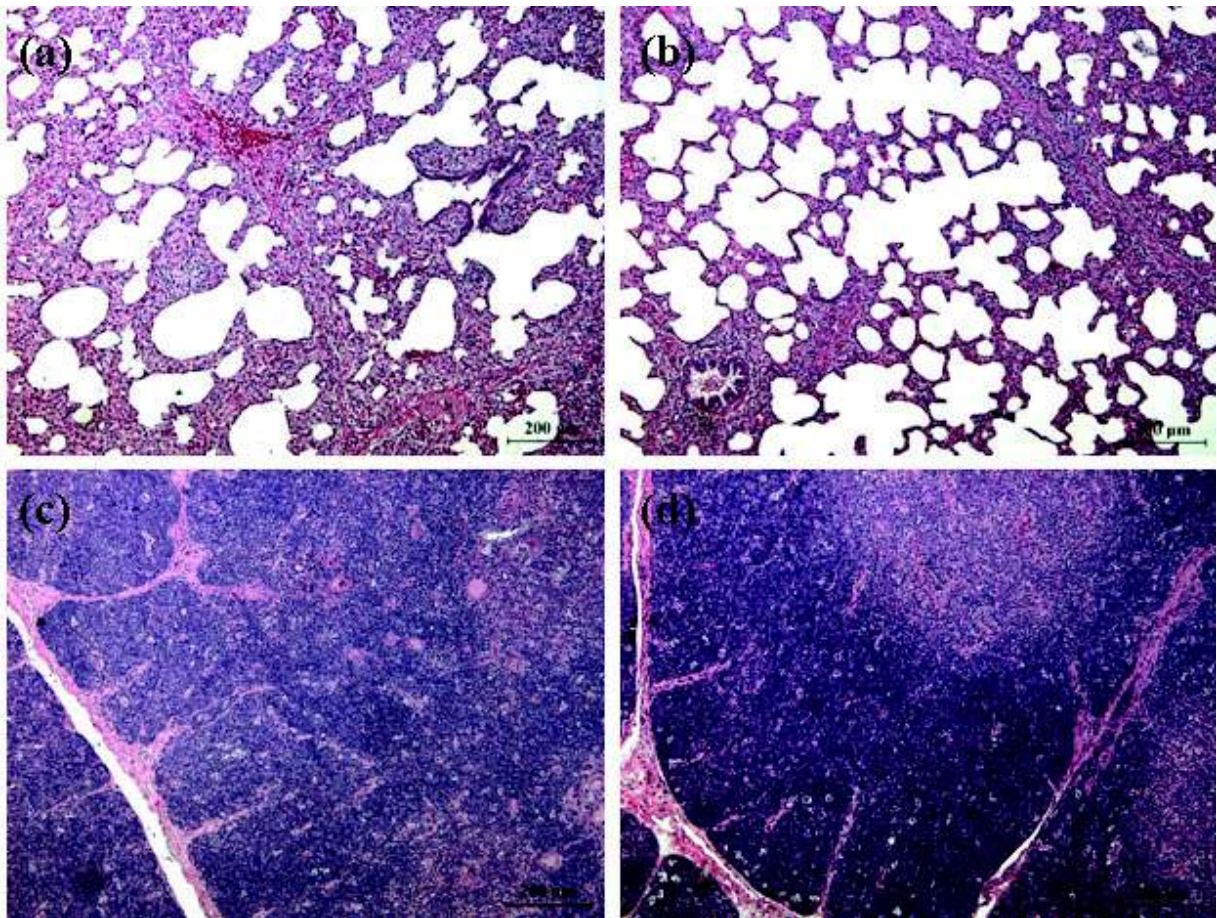
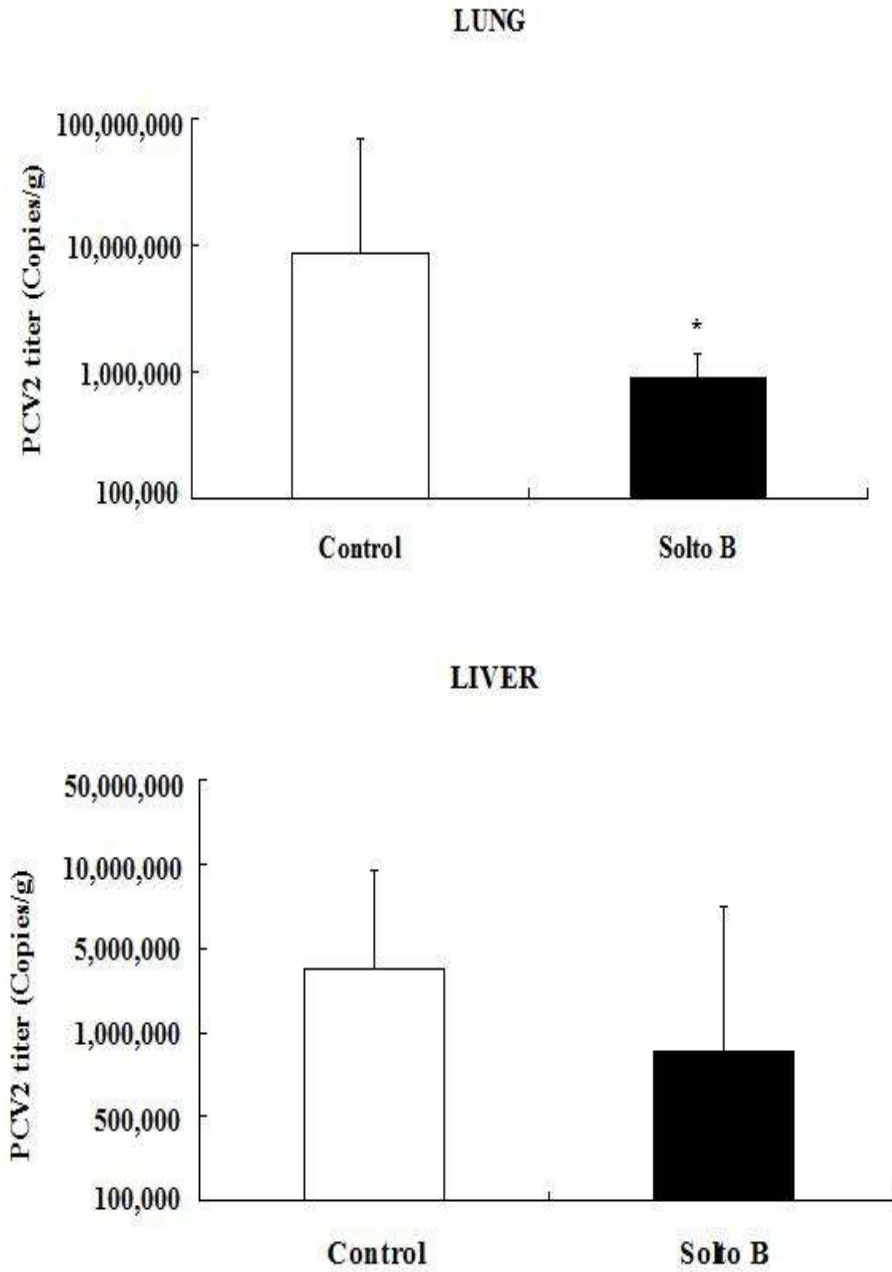


Figure 6. Pig lung and thymus pathology induced in Solto B pigs and control pigs after challenge with PCV2. Samples were submitted for observation in a blind fashion.

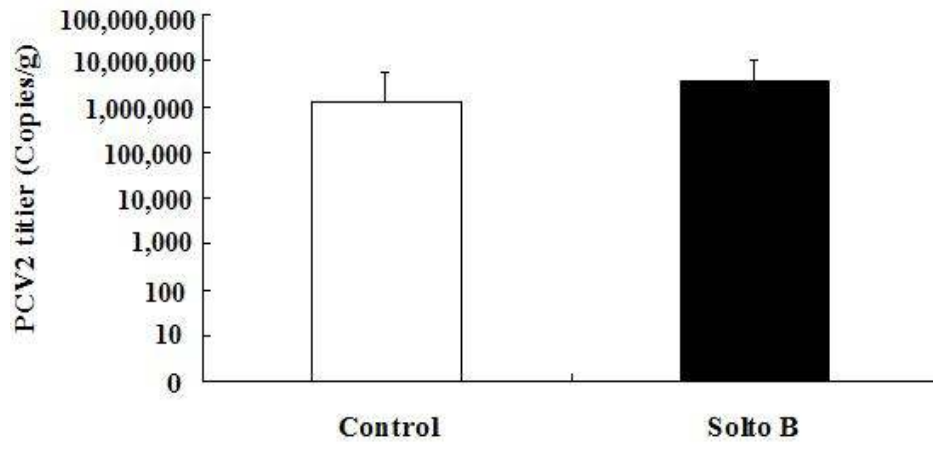
Representative sections of lungs after challenge with PCV2 28 days.

(다) PCV2의 분포와 정량

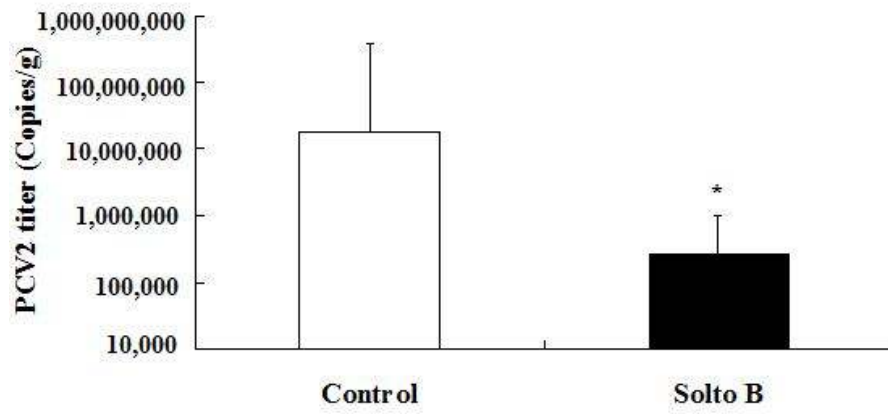
- 감염 28일후에 대부분의 시료에서 Solto B 급여군의 PCV2의 농도는 control group에 비해 낮았다(Figure 4). 특히, 폐와 편도에서 그 농도는 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). 하지만 나머지 조직에서의 PCV2의 농도차이에는 유의성이 없었다 ($P > 0.05$).



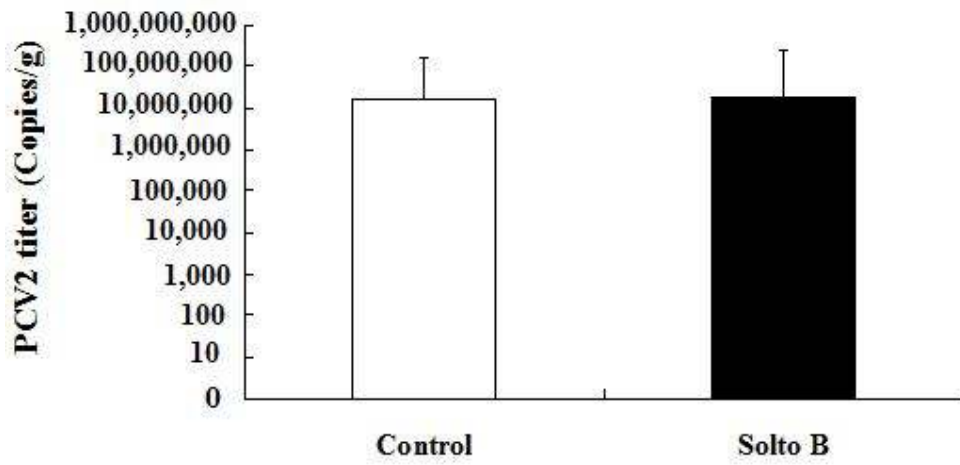
KIDNEY



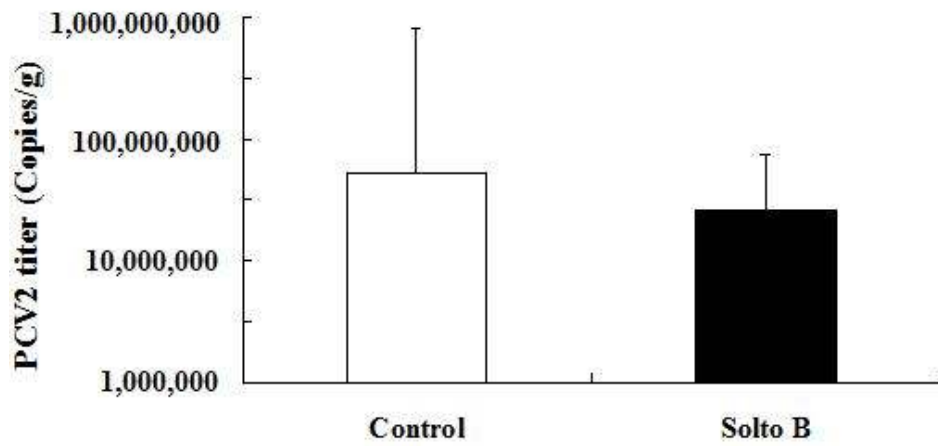
THYMUS



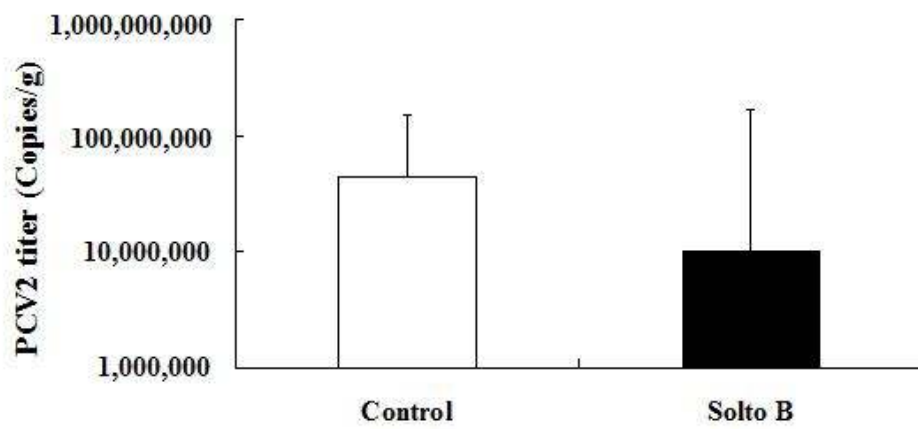
ILEUM



BRONCHIAL LYMPH NODE



TONSIL



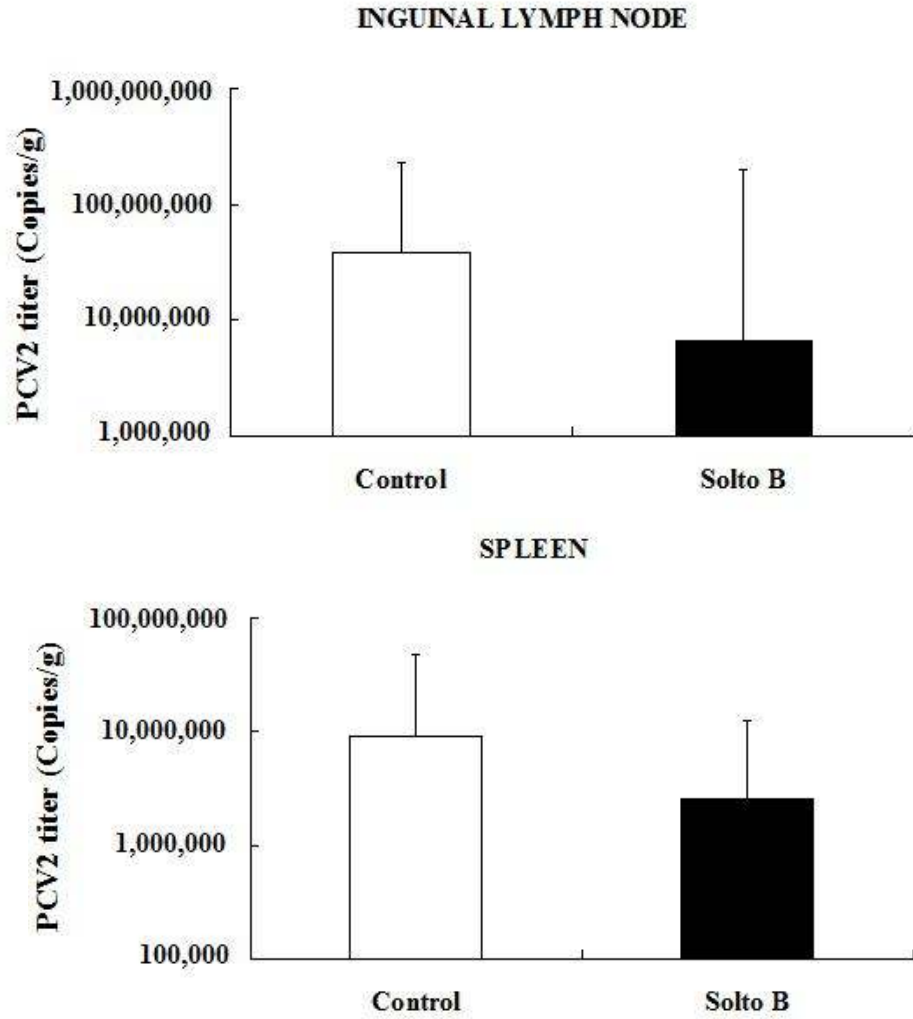


Figure 7. Distribution and quantitation of PCV2 in different treatment of Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars) after challenge 28 days. Significantly different from the control, *; $P < 0.05$.

(라) 혈청과 nasal swab에서 virus 측정

- 혈액내의 바이러스의 분포와 비강에서의 virus 확산은 혈청과 nasal swab에서 특정기간에 시료를 채취하여 측정하였다 (Figure 8). 비강에서는 감염후 24일과 28일에 유의성있게 감소하였으며, 혈청에서 PCV2의 양은 공력 접종 28일 이후에 SoltoB 급여군에서 유의성있게 감소하는 경향을 보였다 ($P < 0.05$).

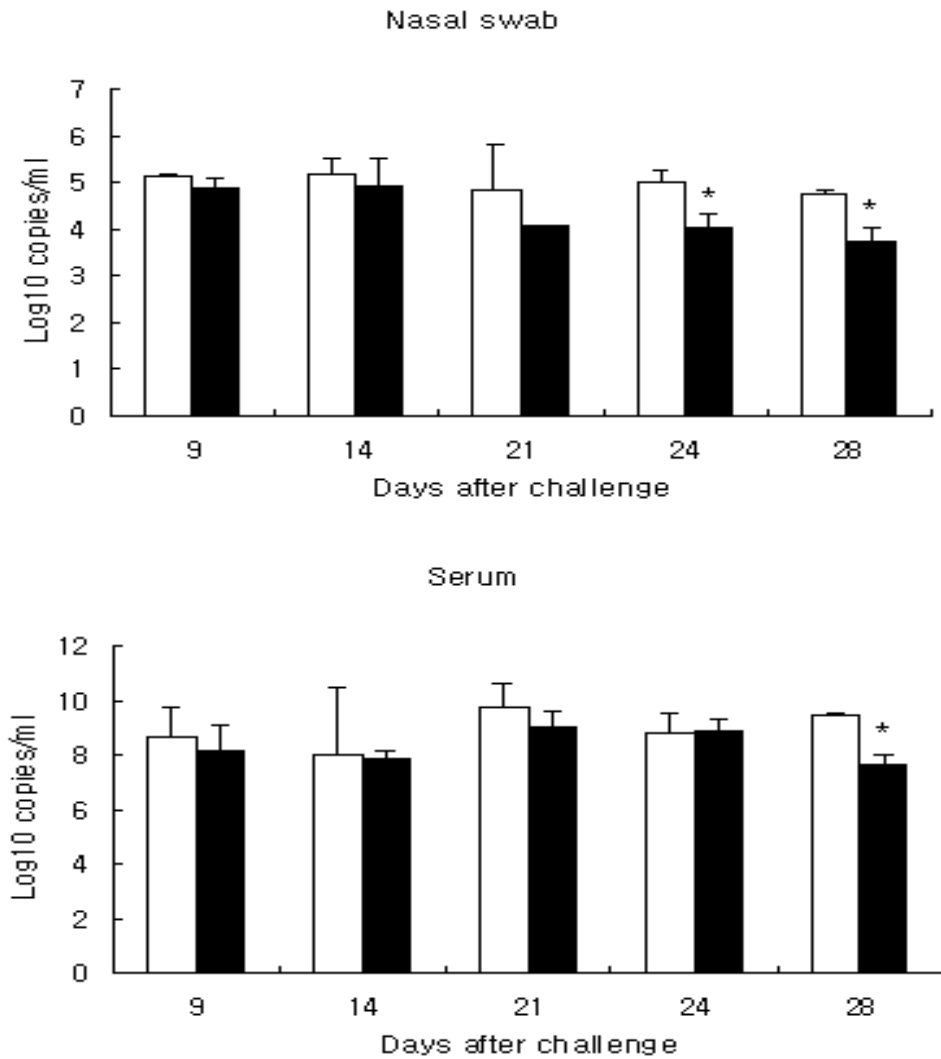


Figure 8. The quantitation of PCV2 in different treatment of Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars) in serum and nasal swabs after challenge 12 and 28 days.

Significantly different from the control, *; $P < 0.05$.

(마) 결론

- 돼지에 Solto B 급여후 PMWS감염증의 원인체 바이러스를 인공감염시킨후 병변의 정도와 각장기에서 바이러스의 농도를 측정 한 결과 대조군에 비교하여 SolroB 급여군의 돼지에서는 바이러스 농도의 검출이 감소되는 것으로 확인되었다, 이는 Solto B의 사용은 PMWS증에 효과가 있는것로 사료된다.

다. Solto B의 PRRS바이러스 방어 효과 실험 (1차 실험)

(1) 실험 동물

- 양돈 농장에서 이유자돈 6마리를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험시작전에 이들로부터 비강분비물과 혈액을 채취하여 PCR을 통해 PRRS 음성임을 확인한 후, 대조군 (3마리)과 Solto B 급여군 (3마리)로 나누었다. 대조군에는 일반사료를 실험 전(全)기간 동안 자유 급식시켰으며, 실험군 (Solto B 급여군)은 대조군과 동일한 사료에 0.3% Solto B를 첨가하여 실험 전(全)기간 동안 자유 급식시켰다.

(2) 실험 계획

- 대조군과 Solto B 급여군은 각 군의 사료에 1주일간의 적응기간을 거쳤다. 이 후, 2군 모두에 3×10^6 pfu/ml 농도의 PRRSv 2ml을 비강을 통해 감염시켰다. Virus 접종 12일 후에 부검을 실시하여, 시료를 채취하였다.

(3) 임상증상과 체중변화

- 실험 기간 동안 3일 간격으로 디지털 체온계를 이용하여 오전 9:30-10:00사이에 체온을 측정하였으며, 체중은 실험 개시전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 디지털 체중계를 사용하여 측정하였다. 육안적인 임상증상은 매일 관찰하였다.

(4) 부검소견

- 실험 종료 후, 서혜 림프절, 흉선, 편도, 기관 림프절, 폐, 간, 회장, 장간막 림프절의 병변 정도를 확인하였다. 특이적인 병변은 사진으로 남겨 병변의 정도를 자세히 비교하였다.

(5) 역장기에서의 Plaque assay에 의한 PRRSv titier 정량

- 실험 종료 후, 채취한 장기 중 폐, 기관 림프절, 편도, 흉선에서 plaque assay를 통해 PRRSv의 titier을 정량 하였다. 방법을 간단히 설명하면, 조직 1g을 9ml의PBS에 넣고 분쇄한 후, 원심분리를 통해 상층액만을 수집하였다. 수집한 상층액은 10배씩 계단 희석을 실시하였다. 바이러스 감염 24시간 전에 돼지 신장세포 (pk-15 cell)를 106cell/well이 되도록 분주한 뒤 10% FBS가 들어 있는 Alpha-MEM 배지를 첨가하여 세포가 배양접시 표면에 부착하여 배양하였다. 위에서 희석한 상층액 100 μ l를 넣고 2시간 감염시킨 후 2% CMC 배지와 5% FBS가 함유된 Alpha-MEM 배지를 첨가하여 바이러스를 배양하였다. 7일간 배양한 바이러스가 감염된 세포를 10% formaline으로 고정하였으며, crystal-violet 염색을 실시하여 생성된 plaque의 수를 세어 조직 g당 감염된 바이러스 PFU (plaque forming unit)를 계산하였다.

(6) 결과

(가) 임상 증상과 체중변화

- 실험기간 동안 3일간 간격으로 체온을 측정한 결과 두 군간에 유의적인 차이는 없었지만 대조군의 체온이 약간 상승하는 경향이 있었다. 체중은 실험개시 전과 바이러스 접종일 그리고 실험 종료일에 측정을 하였지만 두 군간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

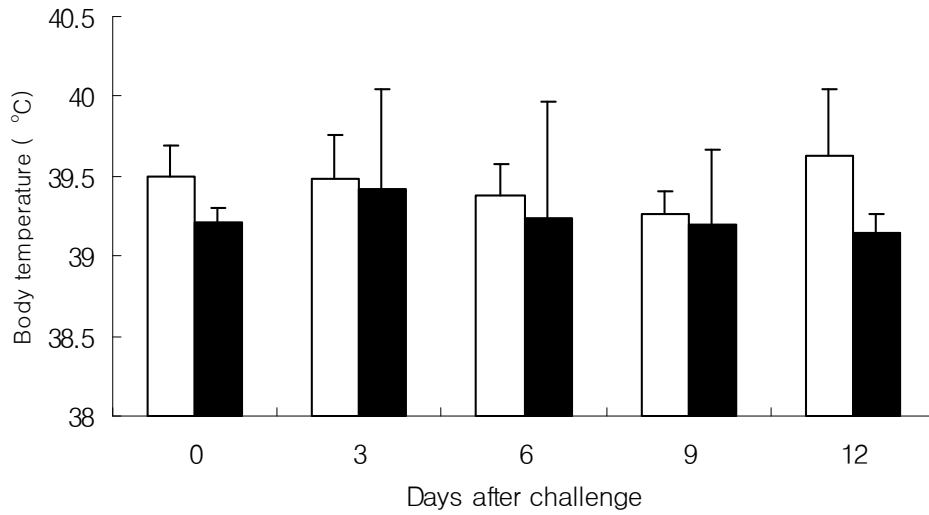


Figure 9. Evolution of the mean body temperature in Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars).

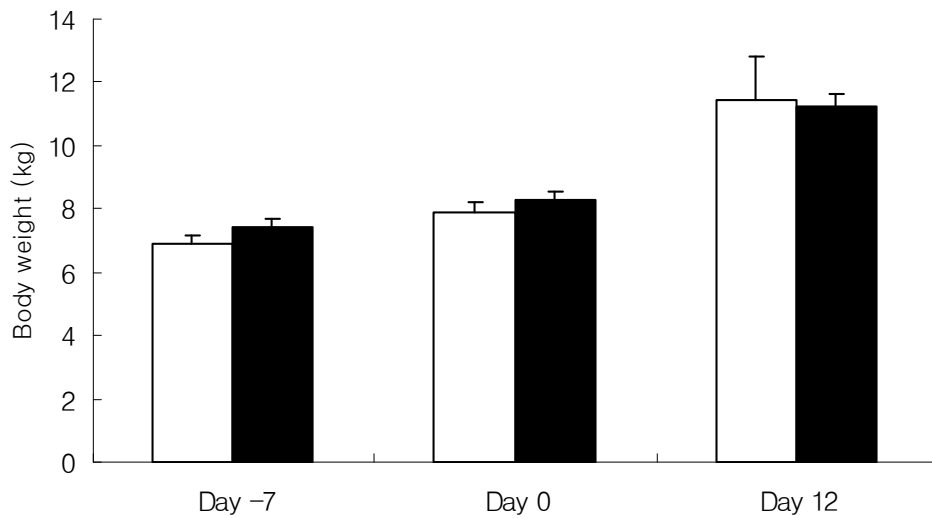








Figure 10. Evolution of the mean body weight in Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars).

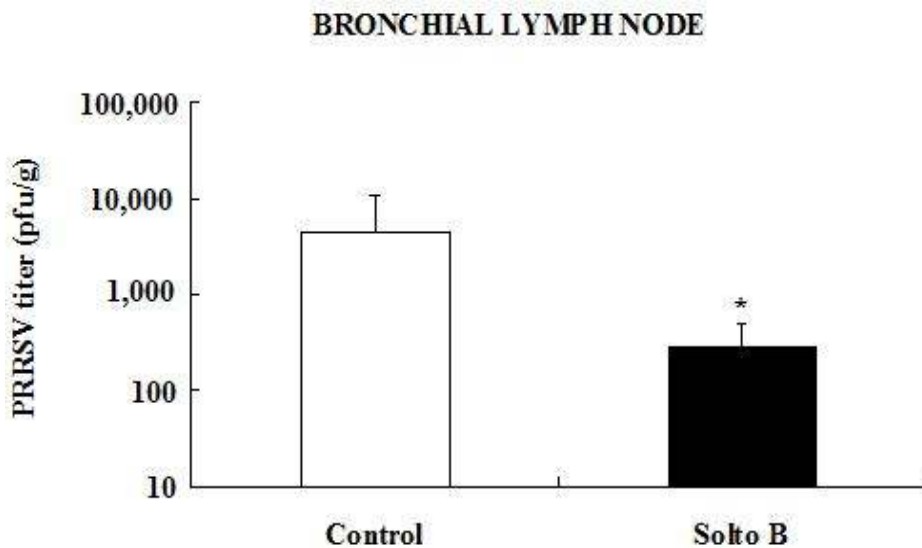
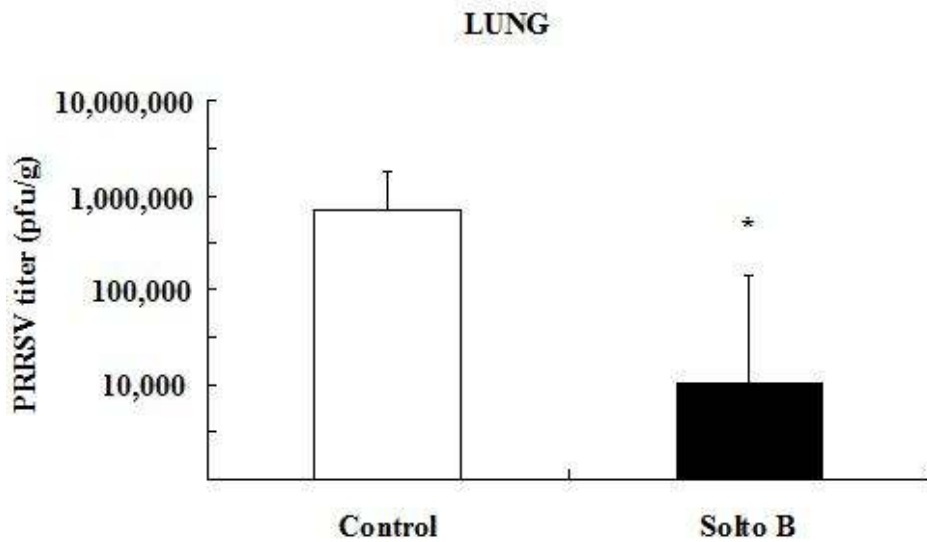
(나) 각 장기들의 부검소견

	대조군	Solto B 급여군
비장		
부검소견	비장의 크기에 있어서는 2군 모두 평균적으로 17~18cm로 큰 차이를 보이지는 않는다	
장간막림프절 & 회장		
부검소견	장간막 림프절의 크기나 회장의 병변에서는 유의적인 큰 차이를 보이지 않는다	
서혜 림프절		
부검소견	두 군간의 뚜렷한 차이를 관찰 할 수 없었다	
신장		
부검소견	대조군 비장의 색깔이 Solto B에 비해 좀 더 pale하다	

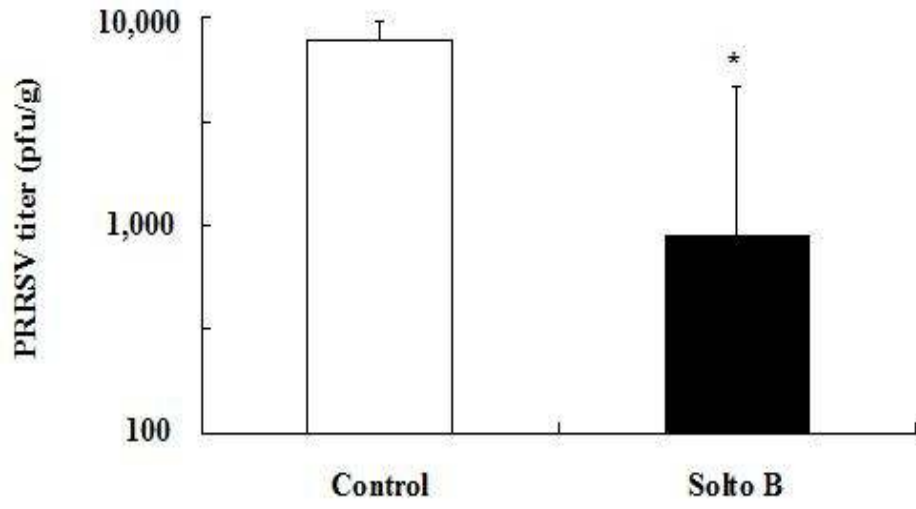
폐		
부검소견	대조군 폐는 Solto B 급여군에 비해 전체적으로 심한 폐렴 소견을 보였다	
편도		
부검소견	편도의 크기나 병변이 심하지 않아 큰 차이를 보이지 않음	
전체적인 부검 소견	대조군과 Solto B 급여군의 전체적인 부검소견은 큰 차이는 없었지만 폐의 소견에서 대조군에서 Solto B 급여군 보다 심한 폐렴 소견을 보였음	

(다) 각 장기에서 PRRS 바이러스 농도 비교

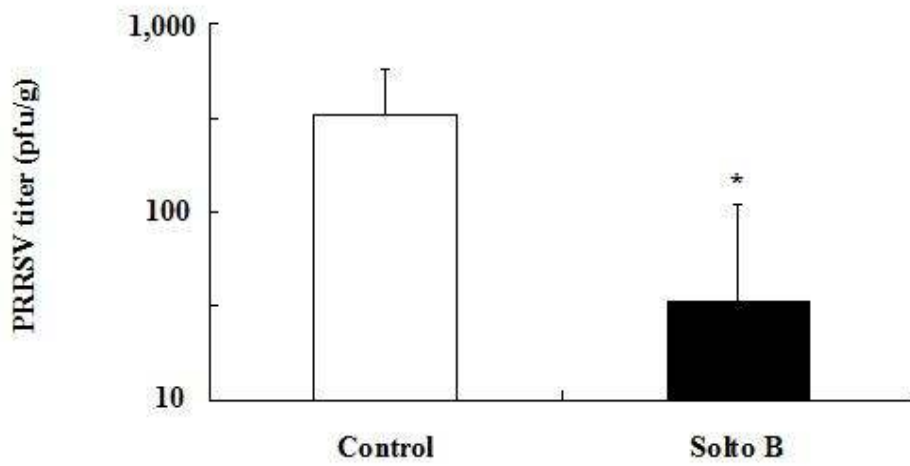
- 실험 종료 후 각 장기에서 PRRS 바이러스의 농도를 plaque assay를 이용하여 측정하였다. Solto B 급여군의 돼지의 장기에서는 대조군보다 전체적으로 적은 수의 바이러스가 검출되었다. 그 중 폐와 기관지 림프절, 편도, 서혜림프절, 흉선에서는 유의적으로 바이러스 농도가 낮게 검출되었다. 따라서 Solto B의 급여는 PRRS 바이러스의 감염증에서 바이러스 증식억제효과가 있는 것을 확인하였다.



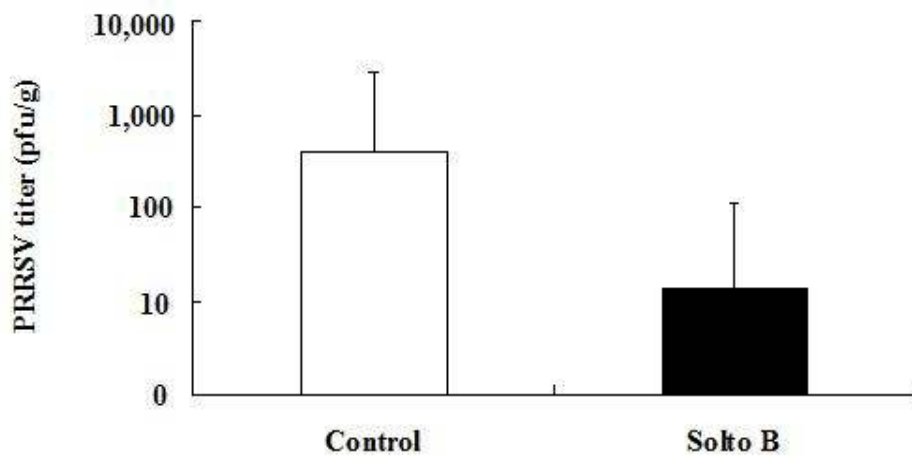
TONSIL



THYMUS



INGUINAL LYMPH NODE



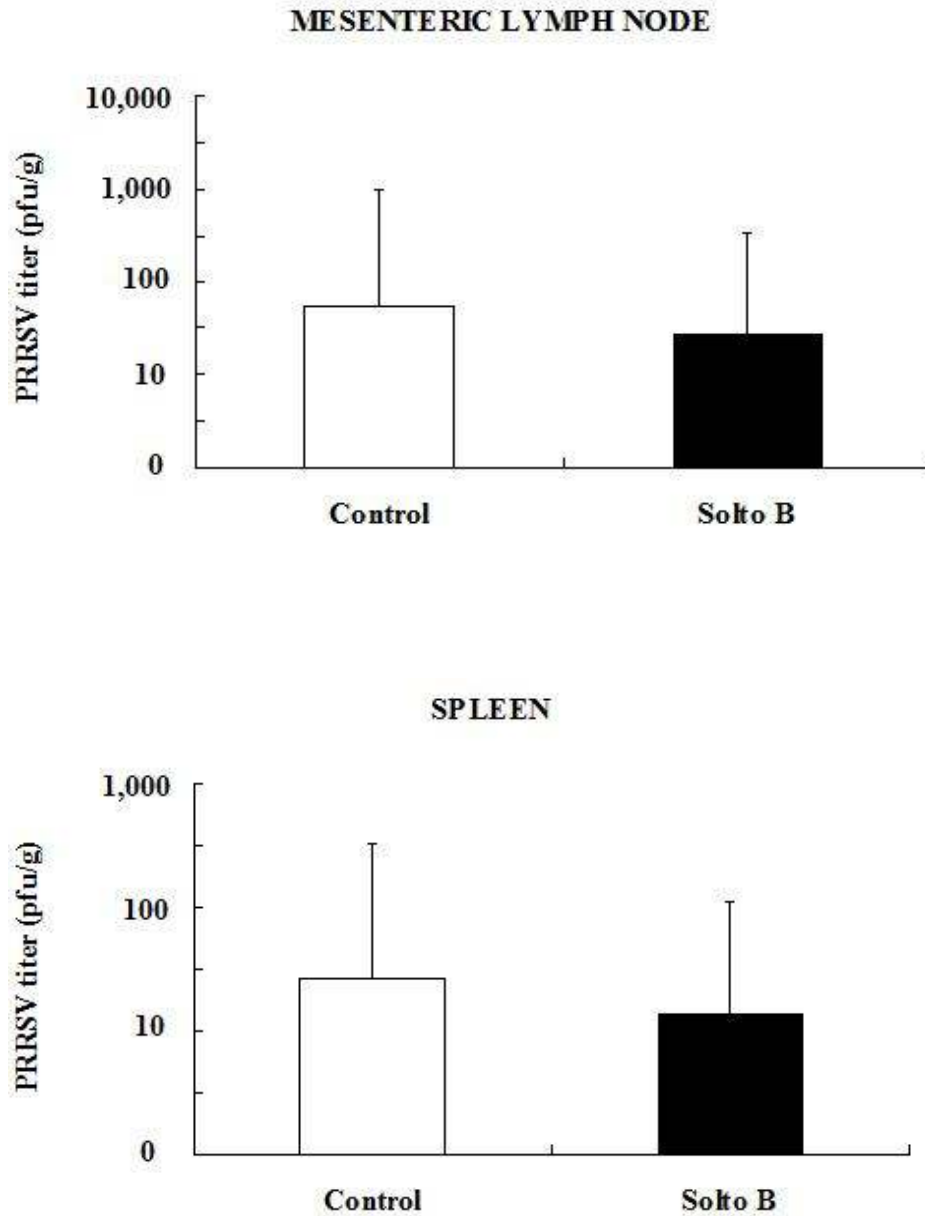


Figure 11. Distribution and quantitation of PRRSV in different treatment of Solto B feeding group (black bars) and control group (white bars) after challenge 12. Significantly different from the control, *, $P < 0.05$.

(라) 결론

- 돼지에 Solto B 급여후 PRRS 바이러스를 인공감염시킨 후 병변의 정도와 각장기에서 바이러스의 농도를 측정한 결과 대조군에 비교하여 SolroB 급여군의 돼지에서는 바이러스 농도의 검출이 감소되는 것으로 확인되었다, 이는 Solto B의 사용은 PRRS증에 효과가 있는것로 사료된다.

제 2 절 2차 년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 사육밀도(3,4,5두/펜)에 따른 Solto B의 첨가급여 효과규명

가. 시험설계

- 2*3 factorial design으로 1) T1 (기초사료, 3두/펜) 2) T2 (기초사료, 4두/펜) 3) T3 (기초사료, 5두/펜) 4) TS1 (기초사료+0.3%, 3두/펜) 5) TS2 (기초사료+0.3%, 4두/펜) 6) TS3 (기초사료+0.3, 5두/펜) : 총 6 처리구.
- 56일령 돼지(평균체중 19.60±0.61kg) 96두를 공시하여 개시 및 종료시 체중을 측정 및 혈액을 채취한다.
- 사료와 물은 자유 채식토록하며 수행
- 젖돈의 면역세포(백혈구, 적혈구, 림프구, IgG), 스트레스관련호르몬(코티졸)
- 종료시 분뇨를 채취하여 소화율 및 악취발생물질 분석

나. 성장능력

- 사육밀도별 Solto B 급여가 육성돈의 생산성에 미치는 영향은 표 1에 나타내었다. 일당 증체량에 있어서는 T1과 TS1 처리구가 T2, T3 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 (P<0.05), T3와 TS3 처리구는 T1과 TS2 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 (P<0.05). 일당사료섭취량에 있어서는 TS1 처리구가 T2, T3 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 (P<0.05), TS3 처리구는 T1, T2, TS1 및 TS2 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 (P<0.05). 또한, 사육밀도가 증가함에 따라 일당증체량과 일당사료섭취량이 증가하였다 (P<0.001).

Table 7. Effect of Solto B supplementation and different stocking density on growth performance in growing pigs

Item	T1 ¹	T2 ¹	T3 ¹	TS1 ¹	TS2 ¹	TS3 ¹	SE ²	Probability ³		
								Diet	Density	Diet×Density
ADG, kg	0.840 ^a	0.715 ^{bc}	0.639 ^c	0.835 ^a	0.754 ^{ab}	0.624 ^c	0.029	0.7971	†	0.6197
ADFI, kg	1.441 ^{ab}	1.280 ^{bc}	1.068 ^d	1.484 ^a	1.358 ^{ab}	1.163 ^{cd}	0.056	0.1450	†	0.8867
Gain/Feed	0.584	0.561	0.606	0.564	0.556	0.539	0.038	0.3276	0.9609	0.6871

¹ Abbreviated T1, basal diet (3 pigs/pen); T2, basal diet (4 pigs/pen); T3, basal diet (5 pigs/pen); TS1, basal diet + Solto B 0.3% (3 pigs/pen); TS2, basal diet + Solto B 0.3% (4 pigs/pen); TS3, basal diet + Solto B 0.3% (5 pigs/pen).

² Pooled standard error.

³ Probability of contrast: †, P<0.001.

^{abcd} Means in the same row with difference superscripts differ(P<0.05).

다. 영양소 소화율

- 사육밀도별 Solto B 급여가 육성돈의 영양소 소화율에 미치는 영향은 표 8에 나타내었다. 건물과 질소 소화율에 있어서 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$).

Table 8. Effect of Solto B supplementation and different stocking density on nutrient digestibility in growing pigs

Item, %	T1 ¹	T2 ¹	T3 ¹	TS1 ¹	TS2 ¹	TS3 ¹	SE ²	Probability ³		
								Diet	Density	Diet×Density
Dry matter	80.77	82.52	83.70	81.24	80.74	82.63	1.69	0.5769	0.2272	0.7789
Nitrogen	80.12	81.43	82.00	80.45	80.08	82.37	2.14	0.9037	0.3938	0.8938

¹ Abbreviated T1, basal diet (3 pigs/pen); T2, basal diet (4 pigs/pen); T3, basal diet (5 pigs/pen); TS1, basal diet + Solto B 0.3% (3 pigs/pen); TS2, basal diet + Solto B 0.3% (4 pigs/pen); TS3, basal diet + Solto B 0.3% (5 pigs/pen).

² Pooled standard error.

³ Probability of contrast.

라. 혈액특성

- 사육밀도별 Solto B 급여가 육성돈의 혈액특성에 미치는 영향은 표 9에 나타내었다. 혈액 내 white blood cell 함량에 있어서는 종료시에 TS1 처리구가 T2, T3, TS2 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 가장 높았으며 ($P<0.05$), 사육밀도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다 ($P<0.01$). 혈액 내 red blood cell 함량에 있어서는 종료시에 T2 처리구가 TS1, TS2 및 TS3 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 ($P<0.05$), TS1 처리구는 T1, T2 및 T3 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 ($P<0.05$). 또한, Solto B 급여에 따라 유의적으로 감소하였다 ($P<0.001$). 혈청 내 IgG 함량에 있어서는 종료시에 Solto B 첨가와 사육밀도 간 상호작용 효과를 보였다 ($P<0.05$). 혈청 내 cortisol 함량에 있어서는 종료시에 T1, T2 및 T3 처리구가 TS1 처리구와 비교하여 유의적으로 높았으며 ($P<0.05$), Solto B 첨가에 따라 유의적으로 감소하였다 ($P<0.05$). 그러나, 혈액 내 lymphocyte 함량에 있어서는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$).

Table 9. Effect of Solto B supplementation and different stocking density on blood characteristics in growing pigs

Item	T1 ¹	T2 ¹	T3 ¹	TS1 ¹	TS2 ¹	TS3 ¹	SE ²	Probability ³		
								Diet	Density	Diet× Density
WBC, 10 ³ /μl										
Initial	13.96	13.94	14.16	14.92	14.02	31.44	0.37	0.9239	0.6405	0.8084
Final	23.33 ^{ab}	18.20 ^b	19.53 ^b	28.67 ^a	20.34 ^b	17.49 ^b	2.20	0.3357	**	0.2580
RBC, 10 ⁶ /μl										
Initial	6.63	6.55	6.62	6.52	6.57	6.50	0.17	0.6311	0.9316	0.8982
Final	7.32 ^{ab}	7.64 ^a	7.19 ^{ab}	6.63 ^c	6.91 ^{bc}	6.82 ^{bc}	0.15	†	0.8466	0.4647
Lymphocyte, %										
Initial	47.8	50.8	49.0	51.3	48.1	48.9	6.39	0.9734	0.9289	0.8877
Final	61.1	62.5	61.6	61.8	61.5	59.8	1.85	0.6566	0.6796	0.7786
IgG, mg/dL										
Initial	317	294	284	270	316	293	25.96	0.8100	0.8557	0.3811
Final	640	802	890	861	654	679	78.49	0.4909	0.6732	*
Cortisol, μg/dL										
Initial	3.8	4.0	4.3	3.9	4.5	4.8	0.91	0.6113	0.3477	0.9683
Final	3.2 ^a	4.0 ^a	3.6 ^a	1.7 ^b	3.0 ^{ab}	3.1 ^{ab}	0.45	*	0.0686	0.5299

¹ Abbreviated T1, basal diet (3 pigs/pen); T2, basal diet (4 pigs/pen); T3, basal diet (5 pigs/pen); TS1, basal diet + Solto B 0.3% (3 pigs/pen); TS2, basal diet + Solto B 0.3% (4 pigs/pen); TS3, basal diet + Solto B 0.3% (5 pigs/pen).

² Pooled standard error.

³ Probability of contrast: * P<0.05; **, P<0.01; †, P<0.001.

^{abc} Means in the same row with difference superscripts differ(P<0.05).

마. 분내 악취물질 발생

- 사육밀도별 Solto B 급여가 육성돈의 분내 악취발생에 미치는 영향은 표10에 나타내었다. Total mercaptan 함량에 있어서는 5일과 10일째에 TS2 처리구가 T1와 T2 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았으며 (P<0.05), Solto B 첨가에 따라 5일과 10일째 유의적으로 감소하였다 (P<0.01). Ammonia 함량에 있어서는 10일째에 TS3 처리구가 T1과 T3 처리구와 비교하여 유의적으로 낮았다 (P<0.05). 또한, Solto B 첨가에 따라 5일과 10일째에 유의적으로 감소하였다 (P<0.05, P<0.01).

Table 10. Effect of Solto B supplementation and different stocking density on fecal malodor emission in growing pigs

Item, ppm	T1 ¹	T2 ¹	T3 ¹	TS1 ¹	TS2 ¹	TS3 ¹	SE ²	P=value ³		
								Diet	Density	Diet × Density
H₂S										
5 day	5.90	4.93	4.65	3.60	3.55	4.03	1.06	0.1155	0.7015	0.7271
10 day	7.10	6.23	6.15	4.80	4.55	5.13	0.16	0.0842	0.7904	0.8486
Acetic acid										
5 day	0.60	0.68	0.60	0.55	0.48	0.60	0.19	0.6037	0.8984	0.8600
10 day	1.55	1.68	1.10	1.40	1.30	1.35	0.32	0.3348	1.0000	0.9374
Total mercaptans										
5 day	1.03 ^a	1.10 ^a	0.78 ^{ab}	0.65 ^{ab}	0.30 ^b	0.48 ^{ab}	0.20	**	0.2944	0.4100
10 day	2.20 ^a	2.28 ^a	2.03 ^{ab}	1.55 ^{ab}	1.05 ^b	1.33 ^{ab}	0.32	**	0.5427	0.6138
Ammonia										
5 day	1.08	0.93	1.02	0.68	0.43	0.35	0.26	*	0.7029	0.7067
10 day	2.88 ^a	2.03 ^{abc}	2.35 ^{ab}	1.48 ^{bc}	1.45 ^{bc}	1.23 ^c	0.34	**	0.2667	0.5338

¹ Abbreviated T1, basal diet (3 pigs/pen); T2, basal diet (4 pigs/pen); T3, basal diet (5 pigs/pen); TS1, basal diet + Solto B 0.3% (3 pigs/pen); TS2, basal diet + Solto B 0.3% (4 pigs/pen); TS3, basal diet + Solto B 0.3% (5 pigs/pen).

² Pooled standard error.

³ Provability of contrast: * P<0.05; **, P<0.01.

^{abc} Means in the same row with difference superscripts differ(P<0.05).

바. 결 론

- 육성돈에 Solto B 급여시 스트레스 정도 지표로 쓰이는 혈액 내 cortisol 함량이 유의적으로 감소하였으며, 분내 유해가스인 total mercaptan과 ammonia 함량 또한 유의적으로 감소하였다.

2. 마우스를 이용한 Solto B의 면역강화 기능 확인 및 Solto B의 항곰팡이 제제로서의 가능성을 확인

가. Solto B 급여가 cytokine gene expression 에 미치는 영향 (실험 1)

- 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 3개의 그룹으로 나누어 각각에 일반사료 (**Control**), 0.1% Solto B 첨가사료(**0.1% Solto B**), 0.3% Solto B 첨가사료 (**0.3% Solto B**)를 급여하였다. 급여 4주 후, 각 그룹의 마우스로부터 비장세포를 채취하였다. 채취한 비장세포 (5×10^6 cells/ml)를 phytohaemagglutinin ($10 \mu\text{g/ml}$)으로 4시간동안 동일하게 자극 후, 각각 으로부터 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 cDNA로 합성하였고, 실시간 중합효소연쇄반응 (Real-time PCR)을 이용하여 IFN- γ , IL-4, 그리고 TNF- α 의 상대적인 발현 정도를 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 섭취한 그룹의 비장 세포로부터의 사이토카인의 발현 정도가 Solto B 첨가 농도 의존적으로 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다.

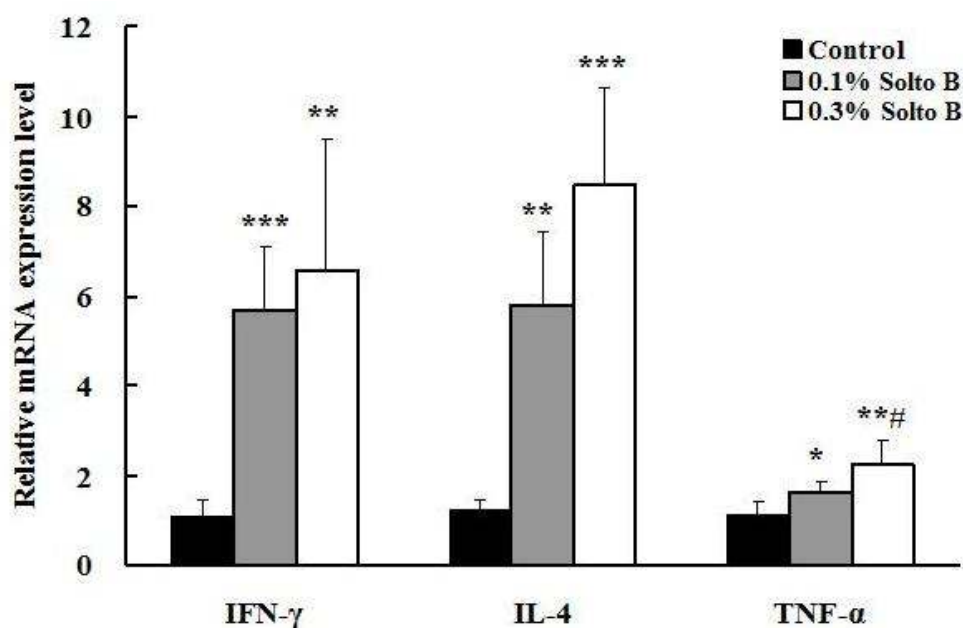


Figure 12. Relative mRNA expression levels of IFN- γ , IL-4 and TNF- α in splenocytes after stimulation with PHA.

나. Solto B 급여가 대식세포의 탐식능 (phagocytic activity)에 미치는 영향 (실험 2)

- 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 3개의 그룹으로 나누어 각각에 일반사료 (**Control**), 0.1% Solto B 첨가사료(**0.1% Solto B**), 0.3% Solto B 첨가사료 (**0.3% Solto B**)를 급여하

였다. 급여 4주 후, 각 그룹의 마우스의 복강에 ovalbumine (1mg)을 접종하여 대식세포를 동일하게 자극하였다. 자극 2일 후, 복강으로부터 대식세포를 채취하여 Luminometer를 이용하여 Luminol dependent phagocytic chemiluminescence를 측정하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다. Luminol ($6 \times 10^{-5} M$)와 대식세포 (2×10^6 cell)을 혼합하여 Luminometer chamber에 넣고, PMA($1 \mu g$)을 첨가하여 상대적인 발광 정도 (relative light units)를 20분 동안 2분단위로 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 섭취한 그룹에서 채취한 대식세포의 탐식능이 Solto B의 사료 첨가 비율에 따라 유의성 있게 활성화됨을 알 수 있었으며, 특히 초기에 탐식능이 급속히 활성화됨을 알 수 있었다.

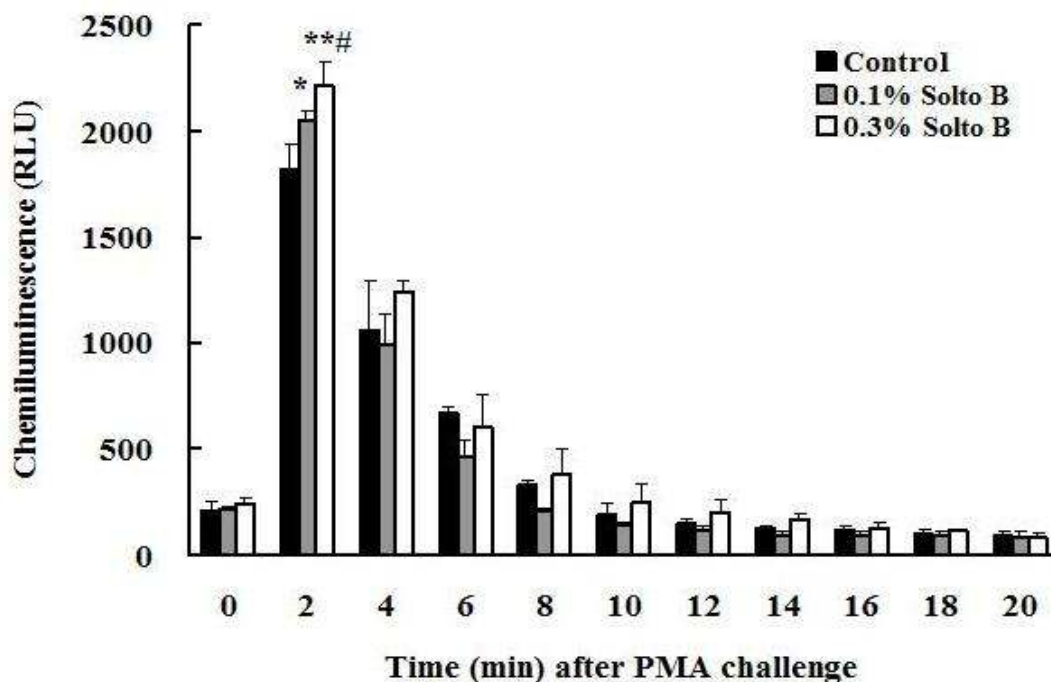


Figure 13. Effects of Solto B on phagocytic activity of peritoneal PMNs.

다. Solto B 급여가 마우스의 항체생성능에 미치는 영향 (실험 3)

- 항체생성에 Solto B가 어떠한 역할을 하는가를 규명하기 위하여, 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 3개의 그룹으로 나누어 각각에 일반사료 (Control), 0.1% Solto B 첨가사료 (0.1% Solto B), 0.3% Solto B 첨가사료 (0.3% Solto B)를 급여하였다. 급여 1주 후, 마우스에 *Pasteurella multocida* type A 항원 (1×10^9 cfu/ml)과 동량의 complete Freund's adjuvant 혼합제 0.3ml을 복강에 접종하였다. 일차 접종 2주 후 다시 *Pasteurella multocida* type A 항원 (1×10^9 cfu/ml)과 동량의 incomplete Freund's adjuvant의 혼합제 0.3ml을 복강에 2차 접종을 실시한다. 1주 후, 실험을 종료하고 마우스로부터 혈액과 비장을 채취하였다. 채취한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 *Pasteurella multocida* type A 항원에 대한 항체를 ELISA를

이용하여 측정하였다.

- 항체를 측정하기 위하여 *Pasteurella multocida* type A 항원을 96-well (ELISA용) plate에 20ug/well의 농도로 carbonate-bicarbonate buffer를 이용하여 12시간 전에 pre-coating을 실시하였다. 여기에 마우스 혈청 희석액을 반응시켰으며, 그 위에 다시 Peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG를 반응시킨 후, ABTS로 발색반응을 유도하여 항체 생성 여부 및 생성능을 확인하였다. 그 결과 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 섭취한 그룹의 항체 생성능이 증가되었음을 알 수 있었으며, 특히 Solto B가 0.3% 비율로 첨가된 사료를 섭취한 그룹의 항체 생성능이 월등히 증가됨을 알 수 있었다.

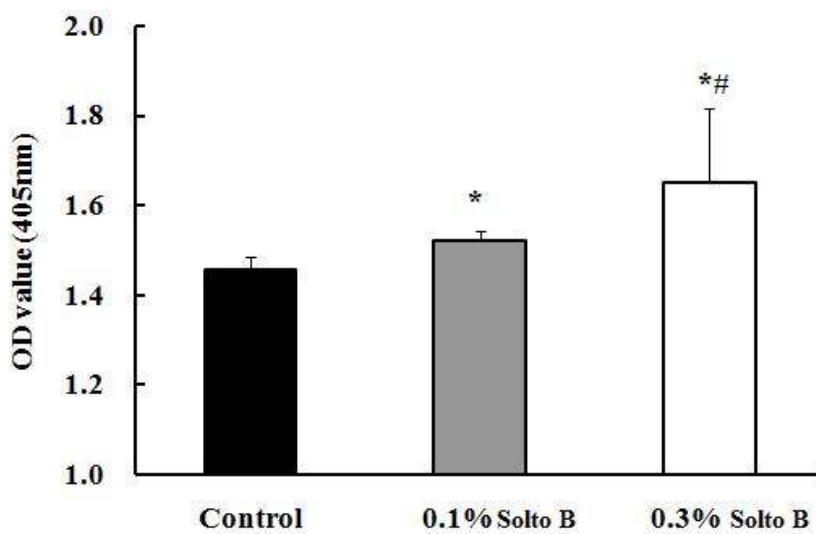


Figure 14. Effects of Solto B on antibody production level in mouse serum.

라. Solto B 급여가 마우스의 비장 무게와 비장 세포 비율에 미치는 영향 (실험 4)

- 항체 생성능의 증가를 확증하기 위해 채취한 비장의 체중 gram당의 상대적인 무게와 비장세포 중의 B cell의 비율을 측정 하였다. B cell의 비율 측정을 위해서 채취한 비장으로부터 림프구들을 분리해내어 CD19으로 염색하였으며, 이를 FACS를 이용하여 count하였다. 그 결과 대조군에 비해 Solto B가 첨가된 사료를 급여한 그룹에서 비장의 무게 뿐만 아니라 B cell의 비율 또한 상당히 증가되었음을 알 수 있었다.

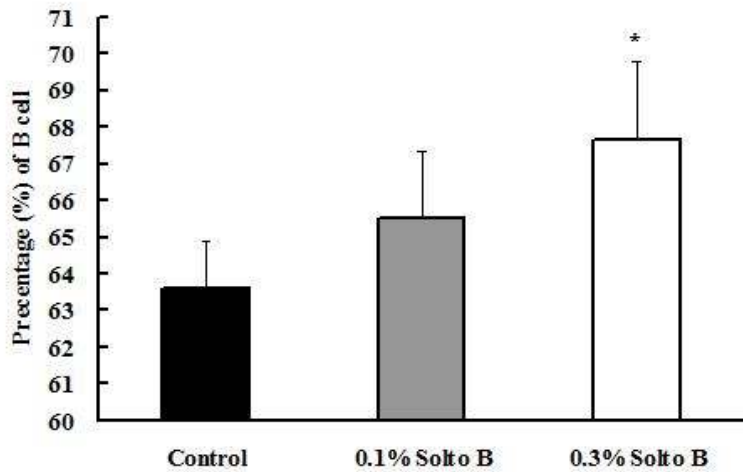
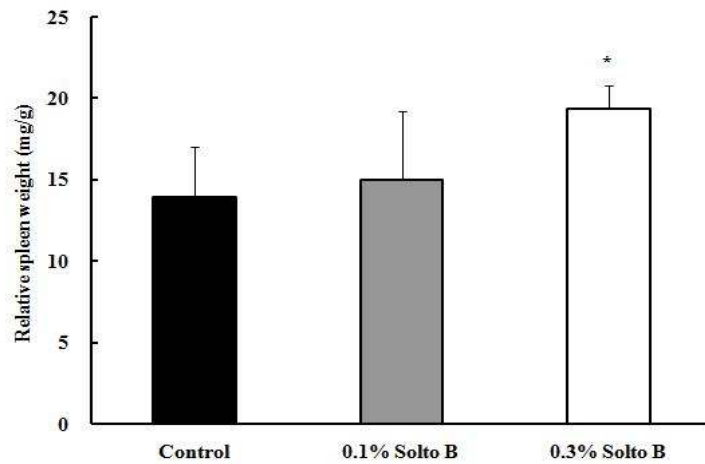


Figure 4. Effects of Solto B on spleen weight and lymphocyte subpopulation ratio of mouse

마. 결론

- 이상의 결과를 종합해 보면 Solto B가 첨가된 사료의 섭취로 인해 T cell과 대식세포에서 발현되는 항균성 및 항바이러스성 사이토카인들의 발현이 대조군에 비해 월등히 증가하였음을 알 수 있었을 뿐 만아니라, 대식세포의 탐식능 또한 초기에 급속히 증가하는 것을 알 수 있었다. 항체 생성능을 측정하는 실험을 통해 볼 때, Solto B의 사료 첨가는 면역 장기 (비장)의 무게를 증가 시키고 B cell의 비율을 증가시켜 그 능력을 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 모든 결과를 놓고 볼 때, Solto B의 사료 첨가는 세포성 면역 뿐만 아니라 체액성 면역 또한 증가시키는 것으로 보여진다.

3. Solto B의 곰팡이 형성 억제 및 곰팡이 독소억제에 미치는 영향

가. Solto B의 사료에서의 곰팡이 형성 억제 효과 실험 (실험 1)

- Solto B의 곰팡이 형성 억제능을 측정하기 위해 다음과 같이 실험 하였다. 먼저 고압증기멸균 (autoclave)한 50 gram씩의 돼지 사료 5 flask를 **Control** (Solto B 무첨가 +곰팡이 접종), **0.1% Solto B** (Solto B 0.1% 첨가 + 곰팡이 접종), **0.3% Solto B** (Solto B 0.3% 첨가 + 곰팡이 접종)으로 나누어 각각에 맞게 Solto B를 첨가하였으며, 그 후 *Aspergillus flavus* (1×10^3 spores/ml) 15ml을 접종하여 28°C에서 9일간 배양하였다. 곰팡이 접종 후 0, 6 그리고 9일에 각각 사료 1gram씩을 채취하여 PBS 9ml에 계단희석 후, 100ul의 부유액을 Saboraud Dextrose agar에 접종하여 2일 후 곰팡이 집락 수를 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Solto B를 첨가한 사료에서 농도 의존적으로 곰팡이 집락의 생성이 억제되었음을 알 수 있었다.

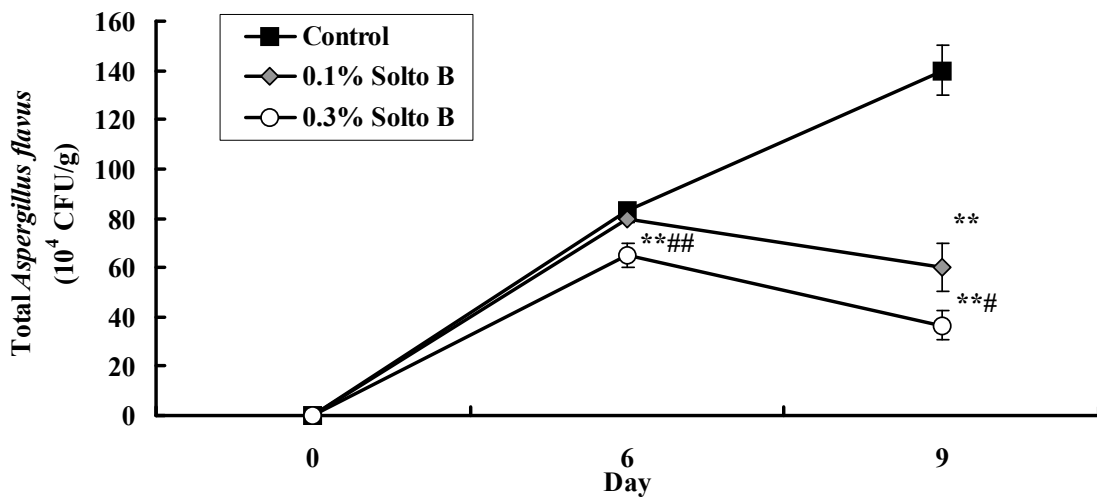


Figure 1. The effects of Solto B on *Aspergillus flavus* growth.

나. Solto B의 사료에서의 곰팡이 독소생성 억제 효과 실험 (실험 2)

- Solto B의 곰팡이 독소생성 억제능을 측정하기 위해 다음과 같이 실험 하였다. 먼저 고압증기멸균 (autoclave)한 50 gram씩의 돼지 사료 5 flask를 **Control** (Solto B 무첨가 +곰팡이 접종), **0.1% Solto B** (Solto B 0.1% 첨가 + 곰팡이 접종), **0.3% Solto B** (Solto B 0.3% 첨가 + 곰팡이 접종)으로 나누어 각각에 맞게 Solto B를 첨가하였으며, 그 후 *Aspergillus flavus* (1×10^3 spores/ml) 15ml을 접종하여 28°C에서 9일간 배양하였다. 곰팡이 접종 후 9일에 사료 1gram씩을 채취하여 80% Methanol 9ml에 부유시킨 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 수거하였다. 수거한 상층액에서 AFLATOXIN B1 EIA KIT (EURO-DIAGNOSTICA, Arnhem, Netherlands)를 이용하여 Aflatoxin B1의 농도 측정하였다. ELISA test는 2회 반복 측정하였으며, 아래 결과는 그 대표 값을 나타내었다. 그 결과를 분석하여 보면 대조군에 비해 Solto B를 첨가한 사료에서 농도 의존적으로 Aflatoxin B1의 생성이 억제되었음을 알 수 있었다.

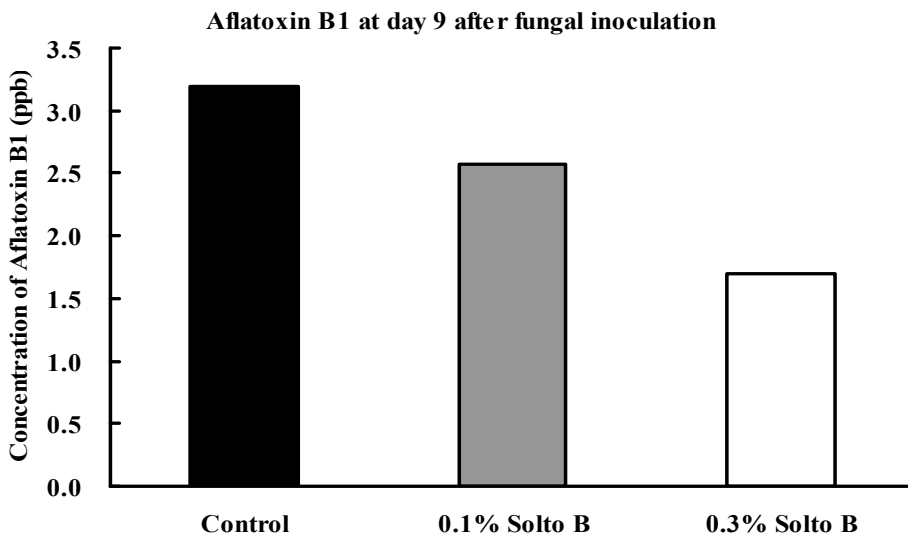


Figure 2. Aflatoxin B1 content in swine feed.

다. 결 론

- 이상의 결과를 종합해 보면 *Aspergillus flavus* 의 집락 형성이 사료에 첨가된 Solto B의 농도가 증가함에 따라 유의성있게 억제되었으며, 뿐만 아니라 곰팡이 접종 9일 후에는 *Aspergillus flavus* 에 의해 발생하는 Aflatoxin B1의 농도 또한 감소되는 것을 알 수 있었다. 이러한 모든 결과를 놓고 볼 때, Solto B의 사료 첨가는 *Aspergillus flavus* 의 생성을 억제시킬 뿐만 아니라 그 독소까지 감소시키는 것으로 여겨진다.

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연차	목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1 차 년 도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젖돈에 있어 Solto B의 첨가수준 결정, 폐사율 및 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬의 변화 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 젖돈 폐사율, 면역세포(백혈구, 적혈구, 림프구, IgG), 스트레스관련호르몬(코티졸, 노르에피네프린, 에피네프린) ▶ 종료시 분뇨를 채취하여 악취발생물질 분석 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Solto B를 급여한 돼지에서 면역기능 증강으로 PMWS와 PRRS에 대한 항병력이 증가되었는가를 확인하기 위한 인공 감염실험 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 돼지에 PMWS의 원인체인 PCV-2를 인공 감염시킨 후 질병발생 정도를 조사 ▶ 돼지에 PRRS바이러스를 인공 감염시킨 후 질병발생 정도를 조사 	100%
2 차 년 도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도에 결정된 첨가수준을 급여하여 사육밀도에 따른 젖돈의 폐사율 및 혈액내 면역세포 및 스트레스관련 호르몬의 변화 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사육밀도(3,4,5두/펜)에 따른 Solto B의 첨가 급여 효과규명 ▶ 시험설계 <ul style="list-style-type: none"> 1) 대조구(3두) 2) 대조구(4두) 3) 대조구(5두) 4) A%(3두) 5) A%(4두) 6) A%(5두): 총 6처리구 ▶ 젖돈 96두를 공시하여 개시 및 종료시 체중을 측정 및 혈액을 채취 ▶ 사료와 물은 자유 채식토록하며 수행한다. ▶ 젖돈 폐사율, 면역세포(백혈구, 적혈구, 림프구, IgG), 스트레스관련호르몬(코티졸, 노르에피네프린, 에피네프린) ▶ 종료시 분뇨를 채취하여 악취발생물질 분석 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마우스를 이용한 Solto B의 면역강화 기능을 확인 및 Solto B의 곰팡이 제제로서의 가능성을 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Solto B 급여 후 마우스의 면역능력증가반응 실험 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 마우스의 BAL을 실시하여 lymphocytes 수와 CD4 및 CD8를 flow-cytometry를 이용하여 측정한다 ○ Solto B 급여 후 마우스의 항체생성 반응 실험 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 마우스에 ovalbumin항원을 접종한 후 항체 농도를 ELISA를 이용하여 측정한다 ○ Solto B 급여 후 마우스의 혈액조성 변화 실험 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈액을 채취하여 헤파린으로 처리한 다음 혈액내의 백혈구수와 적혈구수 및 혈소판 수치등을 조사한다 ○ Solto B 급여가 cytokine gene expression 에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 혈액내의 macrophage를 배양하여 PHA로 자극하고 IFN-r, IL-2, IL-4 등의 cytokine gene expression을 RT-PCR 방법으로 측정한다. ○ Solto B의 in-vitro 사료 곰팡이 및 곰팡이 독소억제에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 멸균된 사료에 곰팡이를 접종한 후 곰팡이의 농도와 독소의 농도를 측정 한다 	100%

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 항생제 내성균에 대한 문제가 제기되면서 항생제 사용의 법적인 규제가 이루어지고 있으며 이에 따른 대체물질에 대한 연구가 진행되고 있다.
- 그러나, 이번 연구에서 흑운모의 동물에 대한 해부학적 소견과 바이러스와 곰팡이에 대한 독소억제능과 더불어 사양시험에 의한 돼지의 생산성 측정 및 분으로부터 발생하는 악취 물질 측정 등을 통한 통합적 연구가 수행되었다.
- 본 시험결과를 토대로 최근 필요시 되고 있는 항생제 대체제로써의 가능성을 가늠해볼 수 있었으며, 본 연구에서 사용된 Solto B의 양축농가에서의 이용을 통해 농가생산성 향상 및 질병감염으로부터의 예방에 의한 생산비 절감효과가 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 산업화 계획

1. 돼지질병 발생실태

- 국립수의과학검역원의 2009년 자료에 의하면 돼지생식기호흡기증후군(PRRS)의 연간 발병율이 타 질병과는 달리 지속적으로 증가하고 있는 실정이다 (그림 1).

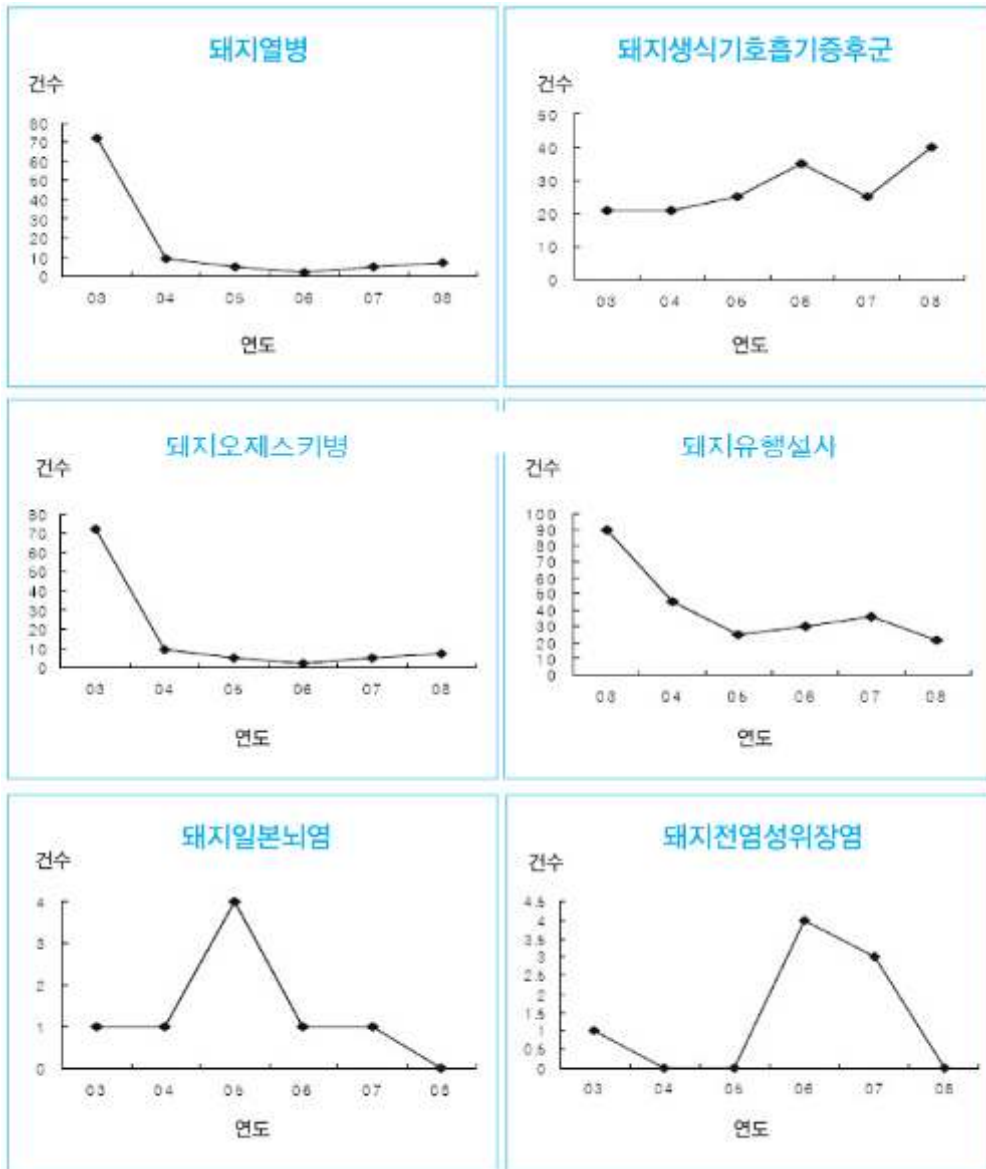


그림 1. 연도별 주요 돼지질병 발생현황('03~'08년)

- 결국, 이러한 돼지질병들은 농가의 생산성 저하로 이어져 소득이 감소하게 된다 (표 1).

표 1. 양돈농가의 질병발병 및 폐사율 변화에 따른 소득 감소 기준

단위: 만 원

폐사율 발병율	20%	30%	40%	50%	60%
20%	1,830	2,538	3,246	3,953	4,661
30%	2,720	3,782	4,838	5,905	6,966
40%	3,610	5,026	6,441	7,856	9,272
50%	4,500	6,270	8,039	9,803	11,577
60%	5,391	7,514	9,637	11,760	13,882

농림부 (2006)

- 본 연구에서 사용된 Solto B는 면역력을 향상시켜 질병예방을 통한 양돈농가의 생산성 향상과 함께 질병예방을 위해 소요되는 비용을 절감하여 소득을 증대시킬 뿐만 아니라 돈사내 악취를 감소시켜 사양환경을 개선시킬 것으로 사료된다.

(2) 사업추진 전략

(가) OFF 라인 전략

- 대형 유통업체와 독점 공급 조건으로 Solto B 판매
- 마케팅을 통한 양돈농가 방문 판매
- 사료 제조업체와의 협약을 통한 유통망 확대

(나) ON 라인 전략

- (주)서봉바이오베스텍의 웹홈페이지 및 블로그 상에서의 홍보

제 2 절. 추가연구, 타연구에 활용계획

- 본 연구에서는 이유자돈과 육성돈에서 실험이 진행되었으나, 최근 브랜드 돈육의 개발 및 생산이 필수불가결한 국내 돈육 시장 상황으로 볼 때 비육돈에서의 연구를 통해 면역력과 분내 악취물질 뿐만 아니라 육질에서의 효과까지 실험을 진행할 필요가 있다고 사료된다.
- 또한, 돼지 뿐만 아니라 산란계와 육계에 있어서도 연구가 진행될 필요가 있다고 본다.