

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001467-01

가축전염병 제어용 신소재를 이용한 백신기능 면역복합제제 개발 최종보고서

2016.12. .

주관연구기관 / 경북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 충북대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주)삼양애니팜

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

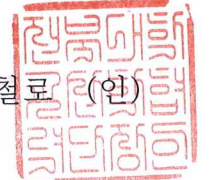
본 보고서를 “가축전염병 제어용 신소재를 이용한 백신기능 면역복합제제 개발”(개발기간 : 2011.08.19 ~ 2016.08.18)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 10. 28.

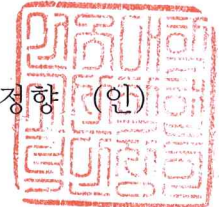
주관·협동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 황의욱 (인)



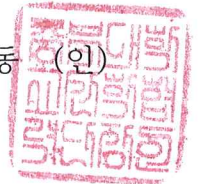
협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 이철호 (인)



협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 서정향 (인)



협동연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 우수동 (인)



협동연구기관명 : (주)삼양애니팜 (대표자) 민필홍 (인)



주관연구책임자 : 박최규

협동연구책임자 : 이창희, 장형관, 박찬규, 김양훈, 홍창호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	311007-5	해 당 단 계 연 구 기 간	2011.08.19.- 2016.08.18	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	중 사업명	가축질병대응기술개발사업			
	세부 사업명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과제명	가축전염병 제어용 신소재를 이용한 백신기능 면역복합제제 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	박최규	해당단계 참 여 연구원 수	총: 58명 내부: 58명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부: 700,000천원 민간: 10,500천원 계: 801,250천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 346명 내부: 346명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 3,500,000천원 민간: 278,750천원 계: 3,778,750천원
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 산학협력단			참여기업명 (주) 삼양에니팜	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<p>요약 : 본 과제를 통하여 개발한 난황항체제제와 유용 생균제, 항균 기능이 있는 리소좀제제, 천연물제제, 앵타머제제, 항미생물 펩타이드제제 등에 대한 연구를 수행하여 관련 특허를 출원(13건) 및 등록(12건)하여 신소재로서의 우수성과 창의성이 입증되었음. 개발 신소재 중, 비교적 생산단가가 저렴한 면역제제(난황 및 초유)와 유용생균제 등을 이용한 면역복합제제 19종을 개발하여 제품화하였음. 이들 면역복합제제는 가축 소모성 질병 및 설사병 치료 및 예방을 위한 사료 첨가제로서 사용되어 축산농가의 질병 발생 제어에 기여할 것으로 기대됨. 리소좀, 식물추출물, 앵타머 및, 항미생물펩타이드 제제는 현 수준으로는 생산단가가 높아 축산용 제품으로 이용되기에는 한계가 있지만 부가가치가 높은 인체 의학 분야에 항생제대체제, 항바이러스제제 등으로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.</p>				<p>보고서 면수 : 639면</p>	

국문 요약문

과제명	가축전염병 제어용 신소재를 이용한 백신기능 면역복합제제 개발
연구의 목적 및 내용	<p>□ 다양한 신소재를 이용하여 가축전염병의 발생을 사전에 차단할 수 있는 백신 및 치료제 기능의 면역복합제제(18종) 개발</p> <p>1. 신소재 개발 분야의 연구의 목적</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 고면역 복합난황항체 이용 첨가제 개발 2) 역단백질 및 유용생균제를 이용한 첨가제 개발 3) 기능성 세포소기관 리소좀 유래 항균 신소재 개발 4) 항바이러스용 천연물(식물추출물) 사료첨가제 개발 5) 식물바이러스를 이용한 가금류의 바이러스성 질병 치료예방제 개발 6) 앵타머기반 치료 및 진단제제 개발 7) 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발 <p>2. 개발된 신소재 및 시제품의 효능평가 분야</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 가금분야 신소재 및 시제품 효능평가기법 확립 및 적용 2) 양돈분야 신소재 및 시제품 효능평가기법 확립 및 적용 3) 축우분야 신소재 및 시제품 효능평가기법 확립 및 적용 <p>3. 개발된 신소재를 이용하여 제작한 면역복합제품들에 대한 현장적용 및 효능평가를 실시하고, 이를 이용한 제형 개발 및 산업화 (18종의 축산용 면역복합제품 등록)</p>
연구개발성과	<p>□ 신소재 개발 분야의 연구개발성과</p> <p>1. 고면역 복합난황항체 이용 첨가제 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 고역가 고면역 바이러스 항원 생산에 필요한 면역보강분자 Fc 분자 발현 세포주(외피 바이러스용-돼지; PEDV, PRRSV) 및 바이러스 재조합 단백질 발현 세포주(비외피 바이러스용-돼지; PEDV spike, PCV2b capsid, 소; BCV spike) 개발 2) 개발된 세포주로부터 산란계 접종용 cFc-harboring 바이러스 항원 (PEDV, PRRSV, BVDV) 및 cFc-tagged 재조합 바이러스 단백질 항원(PEDV spike, PCV2b capsid, BCV spike) 들을 생산할 수 있는 시스템 구축 3) 구축된 시스템을 통해 제작된 산란계용 불활성화 다가 면역항원을 이용하여 기존보다 효과적이고 고역가의 복합난황항체 생산 시스템 구축 4) 돼지용 복합난황항체 생산 기반을 최적화하고 목적동물에서 안전성, 안정성 및 유효성 평가를 수행한 결과 대량 생산된 돼지용 고면역 난황항체가 충분한 안전성 및 안정성은 물론 질병 방어에 대한 효과를 증명하였으며 시제품 생산 및 산업화 기반 마련 5) 이 연구 결과들은 7편의 논문게재 및 1건의 특허등록의 정량적 성과 달성 <p>2. 면역단백질 및 유용생균제를 이용한 첨가제 개발</p>

	<ol style="list-style-type: none"> 1) auto-cloning system, 위치 특이적 재조합 기술과 <i>Pichia pastoris</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>와 같은 효모를 이용한 항바이러스 면역 단백질 시스템 구축 2) 면역 단백질 발현에 사용되는 다양한 발현 host cell line 구축 3) 효모에서 발현된 면역 단백질의 초고속 스크리닝법 구축과 면역 단백질 발현 및 검출을 위한 tagging system 구축 4) <i>Pichia</i>와 <i>Bacillus</i>에서 발현된 면역 단백질의 발현 확인 및 동정 5) 면역 단백질 발현 재조합 균주의 제제화 및 생존률 확인과 사료 첨가용 생균제 2종의 활성 확인 <p>3. 기능성 세포소기관 리소좀 유래 항균 신소재 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 진핵 미생물 내 유용 기능성 세포소기관인 리소좀의 효율적인 분리 기술을 개발하였으며 리소좀의 최적 활성을 지니는 세포 배양 조건 확립 및 다량 확보를 위한 기술을 확립 2) 리소좀 내 유용효소들의 나노 집적화를 위한 고정화 기술을 개발하고, 항균활성이 강화된 리소좀 분리, 효능 검증 및 리소좀의 안정성 평가하였으며 항균 지속력 유지와 산업화를 위한 in vivo 능력 검증 3) 산업화를 위해 리소좀의 대량 생산 공정화 방법 구축 <p>4. 항바이러스용 천연물(식물추출물) 사료첨가제 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 다양한 천연물자원으로부터 neuraminidase 억제제를 탐색함. 2) 모과, 진흙버섯 등 활성소재로부터 활성성분 정제 및 화학구조 규명 3) 추출물 및 분리한 화합물의 생물활성 및 활성기전, 독성 등을 평가 <p>5. 식물바이러스를 이용한 가금류의 바이러스성 질병 치료예방제 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 남풍과 대풍을 이용한 조직배양 및 재분화 최적화 성공 2) Gene silencing suppressor인 p19과 2b가 발현되는 형질전환체에서 더 높은 외래단백질을 발현 완료 3) 가축 질병 원인체(PRRSV, BCV, 인플루엔자바이러스)의 주요 유용 유전자 발현을 위한 Binary vector 제작 4) 유용 유전자 벡터를 도입한 <i>Agrobacterium</i>을 식물체에 접종하여 유용유전자(PMAP36과 BVC-S1) 발현 확인 <p>6. 앵타머 기반 치료 및 진단제제개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 가축전염병 유전자에 특이적으로 결합하는 앵타머 기반 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - PRRS virus 치료 및 진단용 앵타머 3종 확보 - bacteria 4종에 대한 각각의 검출용 앵타머 총 9종 확보 - 병원성 단백질원 2종에 대한 각각의 진단용 앵타머 7종 확보 2) 항균펩타이드 PG1, PR26, PMAP36에 친화력을 갖는 앵타머 확보 3) DNA 앵타머를 활용한 새로운 단백질 탐지 시스템 기술을 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Apta-blotting 및 Aptamer-based Sandwich assay (ABSA)시스템 개발 <p>7. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발</p>
--	---

	<p>1) insoluble GFP와 항미생물 펩타이드를 fusion protein의 형태로 발현시키는 신기술 개발, 이와 관련된 논문 및 특허관련 성과 도출</p> <p>2) 돼지 유래 유전자 3종 (PG1, PMAP, PR26), 개구리 유래의 Buforin II에 대한 클론 확보, 대량 발현 및 다양한 정제 기술 최적화</p> <p>3) 정제된 항미생물 펩타이드들의 항균력 검정 및 세포 독성 실험, SEM과 TEM을 이용한 PR26 항균 메카니즘 구명</p> <p>4) cyclic 항미생물 펩타이드 2종의 유전자를 선정, in vitro 발현, cyclization 시스템 구축</p> <p>□ 개발된 신소재 및 시제품의 효능평가 분야의 연구 성과</p> <p>1. 가금분야 신소재 및 시제품 효능평가기법 확립 및 적용</p> <p>1) 5개의 가금질병모델(조류인플루엔자 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 피사성 장염/콕시듐 복합감염, 병원성 대장균)을 확립하여 개발된 단일 및 복합제제에 대한 평가 실시</p> <p>2) 조류인플루엔자 바이러스모델에서 장수진흙버섯추출물과 청국장 추출물의 방어효능을 확인</p> <p>3) 스테비아 EM제제에서 장염에 대한 예방 및 치료효과가 우수함을 확인</p> <p>4) 가금티푸스 및 병원성 대장균 유발모델을 이용하여 난황항체제제의 방어율 확인</p> <p>5) 질병 발생유형별 면역복합제제의 가금농장 적용 프로그램 개발</p> <p>2. 양돈분야 신소재 및 시제품 효능평가기법 확립 및 적용</p> <p>1) 청국장 추출물질, 초유 및 난황 유래 항원, 담벳잎 및 미생물 (Bacillus와 효모) 발현 항원, 버섯 및 다양한 곡물에서 추출되는 β-glucan과 돼지 항미생물성 펩타이드(AMP)의 살모넬라, 대장균, PRRSV와 PEDV에 대한 제어효과를 평가함.</p> <p>2) 양돈용 복합제제 시제품의 PRRSV, PEDV, 살모넬라와 대장균에 대한 개선 효과를 동물실험을 통해 증명함</p> <p>3. 축우분야 신소재 및 시제품 효능평가기법 확립 및 적용</p> <p>- 개발된 축우용 신소재 3종 및 시제품 3종에 대한 소 적용시험을 통한 효능 평가 완료</p> <p>□ 개발 면역복합제제의 현장적용 효능평가 및 산업화 성과</p> <p>1. 개발 신소재를 이용한 면역복합제제 조성 개발</p> <p>1) 개발된 신소재 및 기존에 사용하던 성분들을 이용하여 면역복합제제 조성 최적화</p> <p>2) 시제품에 대한 안정성시험(장기보존시험 등)을 통한 안정성 확보</p> <p>2. 시제품 생산 및 농장적용 효능평가 시험 실시(제1세부과제 공동수행)</p> <p>1) 개발 제품 19종에 대한 농장 적용 효능평가지험 실시 완료</p>
--	---

	<p>2) 축종별 주요 질병(돼지설사병, 송아지 설사병, 닭 대장균, 살모넬라 등)에 대한시제품의 치료 및 예방 효능 평가 실시</p> <p>3. 개발 시제품의 동물용의약품 인허가 및 등록</p> <p>- 당초 목표(18종) 대비 19종의 제품을 동물용의약품으로 등록 완료</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p><input type="checkbox"/> 본 과제에서 개발한 예방 및 치료제 기능의 난황항체제제와 면역단백질 제제, 성장촉진제로서의 유용 생균제, 항균 기능이 있는 리소좀제제, 항바이러스 기능이 있는 천연물제제, 치료 및 진단제로서의 앵타머제제, 항미생물 기능을 가지는 항미생물 펩타이드제제 등은 관련 특허 출원(13건) 또는 등록(12건)되어 신소재로서의 우수성과 창의성이 입증되었음.</p> <p>- 따라서 앞으로 이들 개발 신소재들을 활용하여 다양한 질병 제어용 제제를 산업화할 수 있는 기반이 조성되었으며, 향후 동물용의약품 뿐만 아니라 부가가치가 높은 인체용 의약품으로 개발이 이루어질 수 있을 것으로 기대됨.</p> <p><input type="checkbox"/> 개발 신소재 중에서 비교적 생산단가가 저렴한 면역제제(난황 및 초유)와 유용생균제 등을 이용한 면역복합제제 19종을 개발하여 제품화하였음.</p> <p>- 이들 면역복합제제는 가축 소모성 질병 및 설사병 치료 및 예방을 위한 사료 첨가제로서 사용되어 축산농가의 질병 발생 제어에 기여할 것으로 기대됨.</p> <p>- 리소좀, 식물추출물, 앵타머 및, 항미생물펩타이드 제제는 현 수준으로는 생산단가가 높아 축산용 제품으로 이용되기에는 한계가 있지만 부가가치가 높은 인체 의학 분야에 항생제대체제, 항바이러스제제 등으로 활용될 수 있을 것으로 기대됨</p> <p><input type="checkbox"/> 효능평가팀에 의해 확립된 질병유발모델 및 효능평가기법은 면역원성 및 생리활성 시험, 안전성 시험 등 다양한 수의학분야 연구 수행에 활용 가능</p> <p><input type="checkbox"/> 본 과제에서 개발된 면역복합제제를 국내 축산농가에 보급함으로써 국내 축산업의 질병 발생감소, 축산농가의 소득증대에 기여할 수 있음. 또한 관련 제품을 해외에 수출함으로써 한국 동물용의약품의 수출증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대됨.</p>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>바이오신소재</p>	<p>면역복합제제</p>	<p>가축질병제어</p>	<p>동물용의약품</p>	<p>항생제대체제</p>

< SUMMARY >
(영문요약문)

		코드번호	D-02
Title	Development of immune-complex products with vaccine efficacy using new materials for animal diseases control		
Purpose& Contents	<p><input type="checkbox"/> For the development and commercialization of immune-complex products with the preventive and therapeutic features using new bio-materials, researches were carried out for the development of new bio-materials, efficacy assessment, field trial test and production of livestock products(total 18 products).</p> <p>1. Research goals of developing new materials research areas are as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Development of feed additives using high-immune IgY complex 2) Development of feed additives using immune protein and useful microbial material 3) Development of antibacterial agents originated from lysosome 4) Development of feed additives using natural plant extracts with anti-viral activity 5) Development of preventive and therapeutic materials for poultry viral disease using plant virus engineering 6) Development of therapeutics and diagnostic tool for animal disease using aptamer-based techniques 7) Development of anti-microbial peptides for control animal disease agents <p>2. To evaluate the efficacy of developed new materials and prototypes of animal feed additives, efficacy assessment research team established <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> evaluation tools and evaluated developed new materials and prototype products provided by the bio-material developing team.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Evaluation of new bio-materials and prototype products for poultry. 2) Evaluation of new bio-materials and prototype products for pigs. 3) Evaluation of new bio-materials and prototype products for cow(calf) <p>3. Finally, for launching 18 kinds of livestock immune complex products for livestock, the appropriate formulation of those products were developed and the efficacy of the products were tested animal or herd levels by efficacy team and industrialization team. And then it conducted a license for the products by the industrialization team.</p>		

Results	<p><input type="checkbox"/> Results of study for the development of new bio-materials are as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Development of feed additives using high-immune IgY complex <ol style="list-style-type: none"> 1) Development of stable cell lines expressing the chicken Fc (cFc) fragment for enveloped viruses (PEDV, PRRSV) or cFc-tagged recombinant viral protein (PEDV spike, PCV2b capsid, BCV spike) for production of high-titer & high-immune viral antigens 2) System establishment to generate cFc-harboring enveloped viral antigens or cFc-tagged recombinant protein antigens for immunization of hens 3) Establishment of production system for effective and high-immune multiple chicken egg yolk antibodies against the inactivated multi-valent antigens 4) Optimization of bulk production for multiple egg yolk antibodies (IgY) for pigs, demonstration of safety, stability, and immunoprophylactic effect of IgY in piglets, and establishment of related-goods production and industrialization 5) Achievement of quantitative results of this study including 7 research articles and 1 patent 2. Development of feed additives using immune protein and useful microbial material <ol style="list-style-type: none"> 1) Construction of antiviral immune protein expression system using auto-cloning system, site-specific recombination, yeast such as <i>Pichia pastoris</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. 2) Construction of expression host cell line for immune protein expression. 3) Construction of Rapid screening method and tagging system for stabilizing expression and detection of immune protein in yeast 4) Confirmation and identification of immune protein from <i>Pichia</i> and <i>Bacillus</i> strain. 5) Manufacture of recombinant strain and activity confirmation of useful microbial material for livestock feed additive 3. Development of antibacterial agents originated from lysosome <ol style="list-style-type: none"> 1) Establishment for effective isolation of lysosome from Eukaryotic cells, cell culture system with high activity and mass production of lysosome 2) Development of stabilization method for nanoparticulation of useful enzymes in the lysosomes 3) Isolation of anti-microbial activity-enhancing lysosome and assessment for efficacy and stability of lysosome 4) Establishment of mass production process of lysosome for industrialization
---------	---

	<p>4. Development of feed additives using natural plant extracts with anti-viral activity(neuraminidase inhibitor)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Screening of neuraminidase inhibitors from various natural resources 2) Isolation and structure determination of active substances from the fruit of <i>Pseudocydonia sinensis</i>, <i>Phellinus</i> sp., etc. 3) Investigation on biological activity, mode of action, and toxicity. <p>5. Development of preventive and therapeutic materials for poultry viral disease using plant virus engineering</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Since the regeneration ability which is required to generate transformant, was optimized using Daepung and Nampung, recommended cultivars of Korea. 2) Expression of foreign protein using transformant with gene silencing suppressor (p19 and 2b) 3) Construction of Binary vector for expression of useful genes of PRRSV, BCV and influenza virus(subtype H1N1) 4) It will contribute to the commercialization of useful protein due to effective expression of the useful protein through inoculation of plant virus carrying gene of PMAP36 and of BVC-S1 to plant introduced gene silencing suppressor. <p>6. Development of therapeutics and diagnostic tool for animal disease using aptamer-based techniques</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Development of aptamer-based material that specifically binds to the animal epidemic disease causing viruses, bacteria and predisposing factors <ul style="list-style-type: none"> - 3 aptamer selected for diagnosis and treatment of the PRRS virus - 9 aptamer selected for detection of each of the 4 bacteria - 7 diagnostic aptamers selected for the 2 animal pathogenic protein sources 2) Development of an affinity aptamer with the antimicrobial peptides (PG1, PR26, PMAP36) 3) Development of a new protein detection system using the DNA aptamer technology <ul style="list-style-type: none"> - Apta-blotting and Aptamer-based Sandwich assay (ABSA) system <p>7. Development of anti-microbial peptides for control animal disease agents</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) The development of new technique to express antimicrobial peptide in E.coli using insoluble GFP as scaffold (PCT application and published paper in Scientific Report) <ul style="list-style-type: none"> - cDNA insurance with expressed antimicrobial peptide in pig tissues
--	--

	<ul style="list-style-type: none"> - The AMP choice of virtually expressed AMP in pig to express, carrying out MTT assay using bacteria pannel 2) Optimization to increase the production yield to each step in peptide production (culture condition, purification and disulfide bond installation) 3) The MTT and cytotoxicity assay for purified AMPs 4) The identification of different mechanism of AMP using transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy(SEM) 5) The development of production system with cyclic antimicrobial peptides <ul style="list-style-type: none"> - The selection of two cyclic antimicrobial peptides in 10 genes from different species through screening - Optimization of expression with cyclic antimicrobial peptides in E. coli - The study for cyclization step to increase yield and efficiency <p><input type="checkbox"/> Results of efficacy evaluation study for new developed bio-materials and prototype products</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Establishment of evaluation tools and its application for evaluation of new materials and prototype products in poultry <ol style="list-style-type: none"> 1) To determine the effects of five developed materials (immune adjuvant±Probiotics, extracts of plants (Phellinus baumii, three extracts of Cheonggukjang), extracts of plants±Probiotics, minerals, organic acid agent) in poultry disease model. 2) Extracts of Phellinus baumii and Cheonggukjang showed anti-influenza effects in influenza virus model 3) Stevia EM showed excellent effects prevention and treatment in enteritis model. 4) Oral administration IgY immune complex products were led to a significant improvement of protection rate in fowl typhoid model and pathogen E. coli model. 5) Establishment of application programs of immune-complex products for poultry farms with different disease outbreak patterns. 2. Establishment of evaluation tools and its application for evaluation of new materials and prototype products in swine production <ol style="list-style-type: none"> 1) Evaluation of effect and safety of Poly-γ-glutamic acid(PGA), colostrum- or egg yolk-driven antigens, tobacco-, bacillus- or yeast-expressed antigens, Mushroom- or grains-driven β-glucan, and porcine antimicrobial peptide(AMP) against salmonella, pathogenic E coli, PRRSV and PEDV 2) Evaluation of effect and safety of porcine combination pilot products gainst salmonella, pathogenic E coli, PRRSV and PEDV by pig challenge studies
--	---

	<p>3. Establishment of evaluation tools and its application for evaluation of new materials and prototype products in cow production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of 3 bio-materials and 3 prototype products developed in the study were carried out by in vivo animal test. <p><input type="checkbox"/> Results of field evaluation and commercialization for immune-complex products using developed new bio-materials</p> <p>1. Optimization of formula and stability for immune-complex products</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) The formulation has been completed using the developed new materials and existing components. 2) A stability test was run in the trial products and obtained the stability. <p>2. Field evaluation test for prototype of immune-complex products</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) It is confirmed the efficiency of the 19 products by clinical field application test in farms. 2) The therapeutic and preventive efficacy for major livestock disease, such as porcine and bovine enteric diseases, and colibacillosis and salmonellosis of chicken) were confirmed by farm-level animal challenge studies. <p>3. Commercialization of the developed immune-complex products</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nineteen products were successfully licensed and launched as a veterinary medicine.
<p>Expected Contribution</p>	<p><input type="checkbox"/> New bio-materials developed in this study, such as, high-immune chicken egg yolk immunogloblins (IgY) and immuno-proteins as a preventive and therapeutic agent, probiotics as growth promotor, svaccine, lysosomal material with antibacterial activity, natural plant extracts with anti-viral activity, Aptamers as anti-microbial agent or disease diagnostic tool, anti-microbial peptides as antibiotic alternatives, has proven its excellance and creativity by acquiring patent pending (13 cases) or registration (12 cases).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Therefore, these new bio-materials are expected to be used as a raw material for veterinary drugs as well as human medicine. <p><input type="checkbox"/> Among the new materials developed in the study, immune agents (colostrum antibody and IgY) and probiotics with relatively low production cost were used for the development of 19 immune-complex products and the products has been licensed as a veterines.</p> <ul style="list-style-type: none"> - These medicines are expected to be used as feed additives for control animal wasting disease and enteric disease. - Some bio-materials including lysosome, plant extract, Aptamer or

	<p>anti-microbial peptides have limitations for the use of raw materials of animal products due to high production costs. However, these materials are expected to be used for high-value human medicine as antibiotic alternatives or anti-viral agents.</p> <p><input type="checkbox"/> Animal disease inducing model and efficacy evaluation techniques developed by efficacy evaluation team are expected to be applied for a basic techniques for veterinary researches including physiological or safety study.</p> <p><input type="checkbox"/> By supplying the immune-complex products on domestic animal farms, it would be expected to reduce animal disease outbreaks and economic loss of farmers, and it will contribute to increasing income of the farmers. Moreover, it will contribute to increasing export of the veterinary medicines.</p>				
Keywords	Bio-materials	Immune-complex product	animal disease control	Veterinary medicine	Anti-microbial alternatives

< CONTENTS >
(영문목차)

Chapter 1. Outline of research & development project	15
Section 1. Purpose of research & development	15
Section 2. Necessity and range of research & development	15
Chapter 2. Current states of domestic and international technical development	18
Section 1. Current states of domestic and international technology developments from analysis of paper, patent, and product	18
Chapter 3. Content and results of research & development	34
Section 1. Result of research & development in 1 st year	34
Section 2. Result of research & development in 2 nd year	139
Section 3. Result of research & development in 3 rd year	244
Section 4. Result of research & development in 4 th year	345
Section 5. Result of research & development in 5 th year	444
Section 6. Summary and assessment of five years' research results	575
Section 7. Commercialization and revenue performance	586
Chapter 4. Goal achievement and the contribution of the related fields	589
Section 1. Goal achievement	589
Section 2. Contributiveness of related field	603
Chapter 5. Research & development results and result utilization plan	612
Chapter 6. Collected overseas scientific and technical information in research and development process	618
Chapter 7. Security level of research & development	625
Chapter 8. States of laboratorial facility and equipment that registered at national science and technology information system	626
Chapter 9. Implementation of safety measures for research carried out laboratory	627
Chapter 10. Representative performance in research & development	628
Chapter 11. Other detail	635
Chapter 12. Reference	636

〈 목 차 〉

제 1장. 연구개발과제의개요	15
제 1절. 연구개발 목적	15
제 2절. 연구개발의 필요성 및 범위	15
제 2장. 국내외 기술개발 현황	18
제 1절. 논문, 특허, 시장 분석을 통한 국내외 기술 및 시장 현황	18
제 3장. 연구수행 내용 및 결과	34
제 1절. 1차년도 연구 수행 내용 및 결과	34
제 2절. 2차년도 연구 수행 내용 및 결과	139
제 3절. 3차년도 연구 수행 내용 및 결과	244
제 4절. 4차년도 연구 수행 내용 및 결과	345
제 5절. 5차년도 연구 수행 내용 및 결과	444
제 6절. 5년간 연구수행 결과 요약 및 평가	575
제 7절. 사업화 성과 및 매출실적	586
제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	589
제 1절. 목표달성도	589
제 2절. 관련분야 기여도	603
제 5장. 연구결과의 활용계획 등	612
제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	618
제 7장. 연구개발성과의 보안등급	625
제 8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	626
제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	627
제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	628
제 11장. 기타사항	635
제 12장. 참고문헌	636

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발 목적

1. 최종 목표

- 가. 다양한 신소재를 이용하여 가축전염병의 발생을 사전에 차단할 수 있는 백신기능의 면역 복합제제 개발
- 나. 가축의 축종별, 사육단계별 질병발생 위험도와 위험요인 분석에 근거한 맞춤형 제형 개발과 축종별 임상평가 기법적용을 통한 최고 품질의 고효능 제품(총 18종) 산업화
- 다. 농장의 질병 발생 및 피해 감소를 통한 축산 경쟁력 강화 및 친환경 무항생제 안전축산 기반 조성

2. 세부목표

- 가. 다양한 신소재를 이용하여 가축전염병의 발생을 사전에 차단할 수 있는 신소재 개발
 - (1) 축종별 제어대상 핵심 가축전염병에 대한 미생물 유전자원 확보 및 소재 개발 재료 지원
 - (2) 식물 및 동물체 발현 면역항체제제, 식물 및 효모 발현 단백질제제, 바이오화학물질(lysozyme) 및 RNA 앵타머를 이용한 항미생물(세균 및 바이러스)제제 등
- 나. 개발 신소재에 대한 효능평가를 통한 유용 물질 선별 및 제형 개발(시제품 제작)
 - (1) 축종별 in vitro 및 in vivo 효능평가기법 확립 및 표준화
 - (2) 개발 신소재들에 대한 효능평가를 통한 유용 소재 선별 및 단일·복합 시제품 제작
 - (3) 단일제제 및 복합제제에 대한 효능 및 안전성 평가
- 다. 개발제품의 현장적용 효과분석, 축종별, 사육단계별 적용 프로그램 개발 및 산업화
 - (1) 축종별 지정 농장에 대한 개발제품의 현장적용 및 적용효과 분석
 - (2) 축종별, 사육단계별 질병 발생위험도를 고려한 단일·복합제제의 적용 프로그램 개발
 - (3) 완제품에 대한 인허가 획득 및 대량생산 산업화

제 2절. 연구개발의 필요성 및 범위

1. 최근 국내에는 구제역(foot and mouth disease; FMD), 고병원성 조류인플루엔자(highly pathogenic avian influenza; HPAI) 등 악성 가축전염병 주기적인 발생과 상재성 가축질병들의 상시 발생으로 인한 경제적 피해가 막대함. 이들 가축질병의 발생은 국내 축산업의 생산성을 저하시켜 축산농가의 경제적 손실을 초래할 뿐만 아니라 국내 축산업의 국제 경쟁력을 약화시켜 축산업의 존립기반을 위협하고 있음. 또한 배합사료 첨가용 항생제의 사용 금지에 따른 가축의 성장 부진과 세균성 질병 발생의 증가가 예상되므로, 가축전염병에 대한 종합적인 조기예방 및 제어대책이 국내 축산업 분야의 현실적인 문제로 대두되고 있음.
2. 다제내성균과 같은 항생제 내성균주의 출현으로 인하여 축산분야에서의 항생제 사용이 엄격하게 규제되고 있으며, 특히 가축의 성장촉진 목적으로 사용되어오던 배합사료 첨가

용 항생제의 사용이 2011년 7월부터는 국내에서도 완전히 사용이 금지될 예정이다. 또한, 식품의약품안전청이 2005년 4월부터 7개월간 조사한 ‘식품 중 식중독균 항생제 내성 모니터링’ 결과에 따르면, 육류에서 검출된 대장균이 항생제에 92.5%의 내성률을 보이는 등 식품산업에서도 항생제 내성균 문제가 큰 문제점으로 대두되고 있음.

3. 현재 국내에는 가축전염병을 예방·치유할 수 있는 여러 종류의 예방약, 항생제대체제, 면역증강제, 생균제, 미네랄제제 등이 개발되어 시판되고 있으나, 그 효능과 사용지침에 대한 연구결과는 거의 전무한 상태임. 따라서, 새로운 개발 물질들의 효능 및 안전성을 과학적이며 객관적으로 평가할 수 있는 효능평가기법의 개발이 필요한 상황임.
4. 면역결핍을 유발하는 질병에 대한 통제와 예방은 직접적인 가축의 폐사는 물론 농가 생산성 향상을 위해 매우 중요함. 소의 바이러스성설사병(BVD), 닭의 전염성 F낭병(IRD)이나 전염성 빈혈(CIA), 돼지의 썬코바이러스병(PCVD)나 돼지생식기호흡기증후군(PRRS) 등은 가축의 면역결핍을 유발하는 대표적인 질병으로서, 이와 같은 면역저하 질병에 대한 방어면역은 일반적으로 예방접종을 통하여 이루어짐. 따라서 축종별 주요 면역결핍 질병에 대한 면역능력을 강화할 수 있는 백신 기능의 면역증강제를 개발하여, 사료첨가제로 사용하거나 질병 발생 시기 이전에 투여해 줌으로써 질병의 발생을 사전에 예방하는 수단으로 사용할 수 있음.
5. 최근 성장촉진용 항생제를 대체할 수 있는 여러 범주의 천연제제가 개발되고 있는데, 이를 비항생제 성장촉진제 또는 성장촉진용 천연물질이라고 함. 이러한 비항생제 성장촉진제는 기존의 성장촉진용 항생제에 비하여 세균의 내성을 유발하지 않고, 축산물(육류, 우유, 계란)에 항생제 잔류 문제가 발생하지 않는 장점이 있을 뿐만 아니라 건강한 장내 미생물총의 신속한 발달, 소화기능의 안정화와 설사병 감소, 성장촉진과 사료효율 개선, 면역자극과 빠른 성숙, 폐사율 감소와 이윤 증대 등 다양한 유용효과가 있음.
6. 다양한 항생제대체제들은 각 제형마다 고유의 효능효과를 가지고 있으므로, 여러 제품의 기능이 상호보완된 복합제제일 경우 더욱 좋은 투여효과를 나타낼 수 있음. 최근에는 Probiotics와 Prebiotics를 포함하는 Synbiotics라는 개념의 복합제제에 대한 개발 및 시판이 이루어지고 있으나, 축종별 투여효과를 극대화할 수 있는 맞춤형 복합제제의 개발은 미흡한 상황임.
7. 현재 의학 및 식품분야에서 주목받고 있는 항미생물 펩타이드(Anti-microbial peptide; AMP)는 포유동물, 어류, 곤충 등을 포함한 다양한 생물체에서 생성된 천연항생물질로써 유전적 제어가 가능하고 내재성면역(innate immunity)을 통한 생체방어에 중요한 역할을 한다. 또한 외부물질에 의해 유발될 수 있는 부작용의 가능성이 적어 항생제 내성균 문제의 해결책 중 하나로 주목받고 있음.
8. 재조합 면역단백질 생산 시스템 중 대장균을 이용한 방법은 각종 수식(posttranslational modification)이 이뤄지지 않는 치명적인 단점 및 단백질의 폴딩(folding)의 문제가 많이

발생함으로써 성공적인 발현율이 매우 떨어지며, 곤충 세포(insect cell)나 포유류 세포(mammalian cell)를 이용한 방법은 대장균의 문제점을 많이 극복할 수 있는 반면에 생산 단가가 매우 높아 연구 개발 시에도 대량 스크리닝이 거의 불가능한 단점이 있음. 이에 반해 효모(yeast)를 이용한 면역단백질 발현시스템은 대장균과 비교할만한 성장속도와 낮은 생산 단가, 정상적인 단백질 발현 등 각종 장점을 함께 가지고 있으므로 효모를 이용한 초고속, 대량 적용 발현시스템을 구축할 필요성이 있음.

10. 최근 수년간 수많은 종류의 나노 입자들이 실용화와 산업화를 위하여 합성되어져 왔으나, 이들의 유해성 부분에 대한 논란이 있어 왔음. 바이오화학물질인 세포 소기관 기반 유해세균의 처리기술은 모든 생명체가 내부에 가지고 있는 나노 사이즈의 리소좀을 이용하는 것으로써 그 유해성이 전혀 없음이 사전 실험을 통하여 검증되었고, 리소좀을 이용하여 환경물질을 처리하고 유해세균을 제거하는 기술은 차후에 부수적인 환경문제와 인체 유해성이 발생하지 않아 현재까지 개발되지 않은 새로운 개념의 원천기술임.
11. 특정 단백질에 대한 높은 친화성을 가지며, 생물 내 투여 시 일정 시간이 지나면 자연 분해 되어 잔류하지 않고 내성을 유발하지 않는 등 차세대 치료제로서의 활용 및 성과가 매우 주목받고 있는 RNA/DNA 앵타머를 가축전염병 치료제로 개발할 필요성이 있음.
12. 식물체에서 생산된 항체(plant body)에 대한 연구는 주로 미국, 유럽과 같은 선진국에서 진행되어 상용화 단계에 근접 했으나, 우리나라의 경우 몇몇 학자들이 연구를 진행하고 있을 뿐 여전히 인프라가 부족한 상황임. 이에 따른 plant body 기술 개발에 대한 집중적인 투자와 선진국 기술이 국내 시장을 완전히 잠식하기 전에 기술 상용화가 필요한 상황임.
- 13 따라서 이 과제에서는 가축전염병을 예방하고 치료할 수 있는 면역복합제제 즉, 질병을 예방하는 백신으로의 기능, 질병을 치료/통제하는 치료제로서의 기능, 항생제 사료배합을 대체하는 성장 촉진제로서의 기능, 성장단계별 동물의 필수영양소를 공급하는 영양제제로서의 기능, 그리고 가축의 특정 사육단계에서 과하게 가해지는 스트레스를 완화해주는 스트레스완화제로서의 기능 등을 복합적으로 발휘할 수 있는 면역복합제제 즉, 기존의 연구와는 다른 방향과 수준을 보여줄 수 있는 Immuno-combiotics (ImmunoCom) 제제를 개발하고자 하였음 또한 본 과제에서는 기존 시판제제들의 실제 효과가 미흡함을 고려하여 개발 신소재 및 제품에 대한 효능 및 안전성을 정확하게 평가할 수 있는 기준과 객관적인 평가기법을 우선적으로 개발하여 개발제품에 적용할 수 있도록 임상평가와 현장적용 연구부분을 더욱 강화하였음.

제 2장. 국내외 기술개발 현황

제 1절. 논문, 특허, 시장 분석을 통한 국내외 기술 및 시장 현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
고면역 복합난황항체 개발 기술 -세부기술1 : 산란계 면역을 위한 고역가 고면역 항원 생산용 세포주 개발 기술 -세부기술2 : 산란계 접종용 면역강화 백신 보조제 개발 -세부기술3 : 고역가 고면역 항원을 이용한 축종별 맞춤형 고면역 복합 난황항체 개발	한국, 미국	30	70	100	산란계에서 고면역을 유도할 수 있는 고역가 고면역 항원 생산용 세포주 및 면역강화 백신 보조제 개발하고 이를 활용하여 각 축종에 맞는 고면역 복합난황항체 개발
내인성 항미생물 펩타이드 (defensin)활용	유럽, 미국	30	30	70	
내인성 항미생물 펩타이드 발굴기술	유럽, 미국	70	70	80	
Auto-cloning system	미국	70	70	100	Invitrogen에서 관련기술 및 특허 독점. 기술협력 필수
효모 발현 체계 개발	미국	70	70	100	효모 세포 내부 및 외부에서의 목적 면역 단백질의 효과적 발현을 위한 발현 vector의 제작 및 발현 최적화
가축 항바이러스용 천연물 사료첨가제 개발	미국	60	60	90	
유용세포소기관 리소좀을 이용한 가축전염병 전용 항균제 개발 기술	한국, 미국	20	80	100	
RNA 앵타머 기반의 질환 치료제 개발	미국	30	70	100	
프로테오믹스 기법을 통한 독성평가	미국	10	70	100	
식물바이러스 이용 가금류인플루엔자 치료 예방제 고발현 벡터 개발	미국	40	60	90	

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), SCOPUS DB(www.scopus.com), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목 및 초록 및 키워드

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	고면역 복합난황항체 개발 기술	내인성 항미생물 펩타이드 생산, 활용
Keyword	Porcine cells, Chicken egg yolk Immunoglobulin	(항미생물 펩타이드 AND 동물) OR (antimicrobial peptide AND defensin AND cathelicidin) OR animal
검색건수	209	국내 41, 국외 122
유효특허건수	14	국내 7, 국외 46
핵심특허 및 관련성	특허명	Cellular permissivity factor for vipuses and thereof
	보유국	미국
	등록년도	2005
	관련성(%)	10
	유사점	돼지생식기호흡기증후군 바이러스 감수성 세포주 구축
차이점	돼지 유래 초대배양세포 불멸화를 통해 감수성 세포주를 구축하고 다시 닭유래 면역증강인자 발현시켜 고역가 고면역 바이러스 항원 생산용 세포주 제작	항미생물 펩타이드를 유전자 치료용으로 활용
핵심특허 및 관련성	특허명	천연약용식물과 난황항체를 이용한 양돈용 사료첨가제 및 그 제조 방법
	보유국	한국
	등록년도	2009
	관련성(%)	30
	유사점	난황항체 생산 방법
차이점	항원구성과 난황항체 생산을 위한 고역가 고면역 항원 생산 방법	사용 항미생물 펩타이드의 차별성
핵심특허 및 관련성	특허명	돼지질병의 항원 제조 방법 및 면역 난황항체 생산과 전해질을 첨가한 돼지질병 방제용 조성물
	보유국	한국
	등록년도	2009
	관련성(%)	30
	유사점	난황항체 생산 방법
차이점	난황항체 생산을 위한 고역가 고면역 항원 생산 방법 및 축종별 맞춤형 복합 난황항체 개발 방법	사용 벡터 및 항균 펩타이드 유전자의 차별성

개발기술명		항미생물 펩타이드의 발굴	Auto-cloning system
Keyword		(동물 AND 질병저항성 AND 유전자 AND 항미생물 펩타이드) OR (disease resistance AND animal AND gene AND "antimicrobial peptide")	Clonase enzyme expression system
검색건수		국내 20, 국외 632	45
유효특허건수		국내 2, 국외 179	3
핵심특허 및 관련성	특허명	Antimicrobial peptide and methods of use thereof	Use of multiple recombination sites with unique specificity in recombinational cloning
	보유국	미국	미국
	등록년도	2009	2008
	관련성(%)	80	60
	유사점	특정 모티프를 이용하여 항균 펩타이드를 발굴하고 이를 산업적으로 이용함.	Multiple recombination site의 도입으로 autocloning system의 편리성 증진
차이점	사용 항미생물 펩타이드 유전자의 차별성 및 이에 따른 기능적 차이	본 연구에서는 효모에서의 면역단백질 발현만을 target으로 특정목적의 auto-cloning system을 도입하고자 하므로 판매용 범용기술이 아닌 특수목적의 기술임	
핵심특허 및 관련성	특허명	Anti-microbial defensin-related peptides and methods of use	Methods and compositions for synthesis of nucleic acid molecules using multiple recognition sites
	보유국	미국	미국
	등록년도	2009	2007
	관련성(%)	60	50
	유사점	디펜신을 이용한 산업적 활용방안의 제시	Auto-cloning system을 위한 편리성 증대
차이점	사용 항미생물 펩타이드의 차별성	본 특허는 Invitrogen 사의 clonase를 이용한 auto-cloning system을 위한 primer sequence 및 primer 합성방식에 특허를 건 전형적 보호특허로 본 연구에서는 특수목적의 특수 system만을 사용하므로 특허 저촉 등의 관련성이 없음	
핵심특허 및 관련성	특허명	Method of vaccination comprising administering an antigen and a cathelicidin derived antimicrobial peptide	Tobacco rattle virus vectors and related compositions and methods
	보유국	미국	미국
	등록년도	2007	2007
	관련성(%)	70	70
	유사점	펩타이드를 이용한 동물의 질병 저항성 증가	Auto-cloning system을 도입한 vector의 제작
차이점	사용 항미생물 펩타이드 유전자의 차별성 및 이에 따른 기능적 차이	본 특허는 tobacco rattle virus vector를 제작함에 있어서 cloning의 편의성을 위해 auto-cloning system을 사용한 것으로 본 연구의 목적인 특수목적의 효모용 vector 개발과는 거리가 있음	

개발기술명		효모 발현 체계 개발	유용세포소기관 리소좀을 이용한 가축전염병 전용 항균제 개발 기술
Keyword		Pichia pastoris expression vector system immune protein	lysozyme, Antimicrobial
검색건수		98	450
유효특허건수		8	15
핵심특허 및 관련성	특허명	Vector system	Charge-Modified lysozyme antimicrobial compositions, surfactants, and methods for infections and cystic fibrosis
	보유국	미국	미국
	등록년도	2007	2008
	관련성(%)	50	10
	유사점	Immune protein의 외래 발현	리소좀 내의 효소인 라이소자임이라는 효소를 이용하여 항균제 개발
차이점	본 특허는 주로 mammal tumor cell에서 antibody를 발현시킬 수 있는 vector system에 관한 것으로 본 연구의 외래면역단백질 대량 발현시스템과는 차이가 있음	본 연구에서는 단일효소가 아닌 세포소기관 자체를 이용하여 세포 내에서 안정성이 뛰어난 항균제 개발	
핵심특허 및 관련성	특허명	Yeast-origin promoter and vector and expression system using the same	Antibacterial and antifungal peptides
	보유국	미국	미국
	등록년도	2008	2010
	관련성(%)	70	10
	유사점	Yeast 특이성 promoter를 도입하여 yeast expression system의 개발	항균, 항진균제
차이점	본 특허는 yeast에서 cold-inducible promoter를 도입하여 제작한 vector에 관한 것으로 본 연구에서도 이와 같은 yeast specific promoter를 도입할 예정이나 발현조절의 용이성을 위해 물질 유도형으로 제작할 것이므로 차이점이 있음	천연물질이 아닌 합성물질을 사용하여 항균제 개발	
핵심특허 및 관련성	특허명	Modified transferrin fusion proteins	
	보유국	미국	
	등록년도	2007	
	관련성(%)	70	
	유사점	Modified transferrin과 같은 fusion system을 효모발현시스템으로 개발	
차이점	본 특허는 효모에 사용가능한 modified transferrin을 fusion하여 serum half-life 등을 증대시키려는 것으로 본 연구에서 사용할 각종 tagging system에는 포함되어 있지 않음 참고로 본 연구의 tagging system은 순수 공개건으로 tagging 단백질 자체가 특허청구가 되어있지 않은 것을 사용할 예정		

개발기술명		RNA 앵타머 기반의 질환 치료제 개발	앵타머의 체내 안정성 및 효능평가
Keyword		RNA aptamer, Therapy, Care, Anti-bacterial, Anti-viral	stability, aptamer, Toxicity
검색건수		7,547	4,781
유효특허건수		510	250
핵심특허 및 관련성	특허명	Use of tam receptor inhibitors as antimicrobials	Liver cell toxicity assay
	보유국	World Intellectual Property Organization(WIPO)	World Intellectual Property Organization(WIPO)
	등록년도	2009	2010
	관련성(%)	30	40
	유사점	특정 세균을 저해함으로서 치료제로 활용	체내의 조직에서의 독성 평가
	차이점	세균의 저해 기작이 receptor에 국한되지 않음	특정 조직에 제한되지 않고 aptamer가 다양한 조직에 미치는 영향을 고려
핵심특허 및 관련성	특허명	Nuclease-resistant RNA aptamer inhibiting replication of hepatitis C virus replicon	Protein markers for pharmaceuticals and related toxicity
	보유국	World Intellectual Property Organization(WIPO)	European Patent Office
	등록년도	2008	2003
	관련성(%)	60	60
	유사점	앵타머의 구조안정화를 통한 저항성 확보 및 바이러스의 증식 억제	발굴한 바이오마커가 치료제로서 활용 가능한지 proteomics 기술 기반의 독성 평가 실시
차이점	Nuclease 저항성 외 가축 내에서 영향을 받을 수 있는 다양한 인자의 저항성 확보	가축전염병 치료용 RNA 앵타머를 소재로 체내안정성 평가 실시	
핵심특허 및 관련성	특허명	Aptamer therapeutics useful in ocular pharmacotherapy	Biomarker for liver fibrotic injury
	보유국	World Intellectual Property Organization(WIPO)	Japanese Patent Office
	등록년도	2004	2007
	관련성(%)	20	10
	유사점	앵타머 치료제	치료제제로 활용 가능한 생체분자의 체내 독성평가
차이점	항미생물제제로서 가축전염병치료제로 활용	앵타머 기반의 치료제제의 체내 영향력을 주는 조직에서의 안정성평가	

개발기술명		식물바이러스 이용 가금류인플루엔자 치료 예방제제 고발현 벡터개발	
Keyword		Plant virus, animal disease, vaccine	
검색건수		218	
유효특허건수		9	
핵심특허 및 관련성	특허명	Production of a parvovirus vaccine in plants as viral coat protein fusions	
	보유국	미국	
	등록년도	2008	
	관련성(%)	75	
	유사점	식물바이러스를 이용 Parvovirus epitope을 발현 식물바이러스의 외피단백질에 epitope을 fusion 시킴	
	차이점	TMV를 이용 하였으나 본 실험에서는 PVX나 SMV 등의 다른 바이러스를 이용할 것임 Parvovirus epitope을 발현 시켰으나 본 실험에서는 가금류에 병을 유발하는 바이러스의 epitops를 발현 시킬 것임 하나의 epitope를 하나의 바이러스에 도입하여 이용 하였으나 본 연구는 몇개의 epitopes를 하나의 바이러스성 벡터에 도입하여 예방의 효율을 극대화함	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽, 한국
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), SCOPUS DB(www.scopus.com)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문 분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		고면역 복합 난황항체 개발 기술	내인성 항미생물 펩타이드 활용
Keyword		Porcine cells and Chicken egg yolk immunoglobulin	(Defensin OR antimicrobial peptide OR cathelicidin) AND "innate immunity"
검색건수		284	619
유효논문건수		48	40
핵심논문 및 관련성	논문명	Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus	Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number
	학술지명	Journal of Virological Methods	Nat Genet. 40:23-25
	저자	Lee, YJ	Hollox E 등
	게재년도	2010	2008
	관련성(%)	30	90
	유사점	고역가 바이러스 감수성 세포 개발	Beta defensin 유전자 copy수와 질병발병 정도와의 상관관계 분석
차이점	초대배양세포의 불멸화와 면역증강인자 발현을 통한 산란계 면역 고역가 고면역 항원 생산용 세포 개발 방법	Beta defensin 유전자수가 많은 경우에 psoriasis의 발생빈도가 더 높았으며, 현재의 예측과 반대되는 결과를 나타냄	
핵심논문 및 관련성	논문명	Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin(IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets.	Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria
	학술지명	Journal of Veterinary Science	Mol Immunol. 45:386-94
	저자	Kwon, CH	Taylor K, Barran PE, Dorin JR
	게재년도	2000	2008
	관련성(%)	50	100
	유사점	IgY 항체를 이용한 돼지설사병 예방	돼지 beta-defensin2의 경우 소장 존재하는 박테리아에 대한 광범위한 항미생물효과를 나타냄
차이점	난황항체 생산을 위한 고면역 항원 제작 방법 및 적용대상질병	여러종의 beta-defensin 중에서 beta defensin2에 대하여서만 조사한 결과	
핵심논문 및 관련성	논문명	난황항체를 이용한 돼지 호흡기질병방제에 관한 연구	Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virusinfection
	학술지명	대한수의학회지	J Immunol. 177:8658-66
	저자	신나리	Hazrati E 등
	게재년도	2000	2006
	관련성(%)	50	100
	유사점	IgY항체를 이용한 돼지질병방제	Alpha 및 beta defensin의 발현에 의하여 herpes simplex virus가 억제되는 결과가 나타남
차이점	항원생산 방법 및 적용대상질병	In vivo 연구가 아닌 in vitro 연구의 결과	

개발기술명		항미생물 펩타이드의 발굴	Auto-cloning system
Keyword		(disease resistance AND livestock) or antimicrobial peptide genes	Clonase enzyme expression system
검색건수		923	4
유효논문건수		25	3
핵심논문 및 관련성	논문명	Differential immunity in pigs with high and low responses to porcine reproductiveland respiratory syndrome virus infection	Efficient conditional and promoter-specific in vivo expression of cDNAs of choice by taking advantage of recombinase-mediated cassette exchange using FIEx gene traps.
	학술지명	J Anim Sci. 85:2075-2092.	Nucleic Acids Res
	저자	Petry DB 등	Schebelle L 등
	게재년도	2007	2010
	관련성(%)	70	50
	유사점	양돈산업의 주요 질병인 PRRS에 대한 저항성과 유전자사이의 상관관계 분석	Auto-cloning system을 사용하여 expression system 구축
차이점	Genome scanning 방법을 통하여 candidate 지역을 분석	본 논문은 promoter에 특이적인 in vivo cDNA 발현시스템을 개발함에 있어서 recombinase를 응용하는 것으로 본 연구의 대량, 고속 cloning system 구축을 위한 것과 차이가 있음	
핵심논문 및 관련성	논문명	Bioinformatic and expression analysis of novel porcine b-defensins	Flexible tools for gene expression and silencing in tomato
	학술지명	Mamm Genome.17:332-9	Plant Physiol
	저자	Yongming Sang 등	Fernandez AI 등
	게재년도	2006	2009
	관련성(%)	90	30%
	유사점	항미생물 펩타이드 중 하나인 beta-defensin을 돼지에서 발굴해냄	Auto-cloning system의 응용
차이점	조직특이성에 대한 내용이 부족하고 발굴된 defensin의 범위가 단순함	본 논문은 recombinase와 관련 sequence를 응용하여 식물(토마토)에서 gene exprression과 repression을 통제하려는 논문으로 본 연구와는 거리가 있음	
핵심논문 및 관련성	논문명	Genetic management strategies for controlling infectious diseases in livestock populations.	Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation.
	학술지명	Genet Sel Evol,35 Suppl 1:S3-17	J Biosci Bioeng
	저자	Bishop SC, MacKenzie KM	Nakagawa T 등
	게재년도	2003	2007
	관련성(%)	90	70
	유사점	Genetic management를 통한 disease controlling	Auto-cloning system을 도입한 vector series의 개발
차이점	항미생물 펩타이드를 활용한 부분이 아닌 현재까지 알려진 일반적인 후보유전자를 활용	Target cell과 발현 규모, 대상, tagging system 등에서 차이를 보임 참고로 본 논문의 연락처자와는 지속적으로 교류, 협력 중임	

개발기술명		효모 발현 체계 개발	유용세포소기관 리소좀을 이용한 가축전염병 전용 항균제 개발 기술
Keyword		Pichia pastoris expression vector system immune protein	lysosomes and antimicrobial
검색건수		4	65
유효논문건수		3	7
핵심논문 및 관련성	논문명	Expression and analysis of the recombinant human interleukin-21 (rhIL-21) in Pichia pastoris	Antimicrobial activity of the cell organelles, lysosomes, isolated from egg white
	학술지명	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao	Journal of Microbiology and Biotechnology
	저자	Li D, Yu H, Huo R, Chen J, Cheng G.	Yoon, J
	게재년도	2009	2009
	관련성(%)	50	50
	유사점	Pichia에서 면역관련단백질의 발현	세포소기관인 lysosomes을 이용하여 항균제 개발
차이점	논문은 중국어로 기술되어 있으며 뚜렷한 기술적 난점 없이 발현이 가능하다고 기술하고 있으나 발현 vector 등을 기술하지 않고 있음.	Egg source가 아닌 다른 진핵생물의 lysosome을 이용하여 항균제 개발	
핵심논문 및 관련성	논문명	High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in Pichia pastoris.	Autophagy as an antimicrobial strategy
	학술지명	Appl Microbiol Biotechnol	Expert Review of Anti-Infective Therapy
	저자	Cai H 등	Subauste, C.S.
	게재년도	2008	2009
	관련성(%)	50	30
	유사점	Pichia에서 면역관련단백질의 발현	세포소기관 lysosome이 항균의 중요한 역할
차이점	기존의 상업 P. pastoris 발현 vector를 사용하여 발현한 결과로 본 연구의 대량발현시스템 구축과는 차이가 있음.	In vitro상에서 lysosome을 항균제제로 개발	
핵심논문 및 관련성	논문명	Secreted expression of signaling protein 14-3-3 of Schistosoma japonicum in Pichia pastoris system with primary evaluation on its antigenicity	Animal antimicrobial peptides: Ancient players in innate immunity
	학술지명	Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi	Journal of Immunology
	저자	Zheng MJ 등	Haggie, P.M.
	게재년도	2007	2009
	관련성(%)	50	10
	유사점	Pichia에서 면역관련단백질의 외부 발현	동물에 적용하기 위한 항균제 개발
차이점	상업 P. pastoris 발현 vector를 사용하여 면역관련단백질을 외부 발현한 결과로 본 연구의 대량발현시스템 구축과는 차이가 있음	세포소기관이 아닌 펩타이드를 이용한 항균제 개발	

개발기술명		RNA 앵타머 기반의 질환 치료제 개발	앵타머의 체내 안정성 및 효능평가
Keyword		RNA aptamer, therapy, care, anti-bacterial, anti-viral	stability, aptamer, Toxicity
검색건수		543	1,009
유효논문건수		10	95
핵심논문 및 관련성	논문명	Drug targets in hepatitis B virus infection	Utilizing toxicogenomic data to understand chemical mechanism of action in risk assessment
	학술지명	Infectious Disorders-Drug Targets	Toxicology and Applied Pharmacology
	저자	Stein, L.L., Loomba, R.	Wilson VS 등
	게재년도	2009	2011
	관련성(%)	15%	15%
	유사점	바이러스에 감염시 앵타머 치료제	프로테옴 분석을 통한 위험 요인 분석
	차이점	앵타머의 독성 평가를 통한 안정성 확보	가축 체내에서의 앵타머의 위험성 평가
핵심논문 및 관련성	논문명	Protection of HIV neutralizing aptamers against rectal and vaginal nucleases: implications for RNA-based therapeutics	Proteomic analysis identifies prohibiting down-regulation as a crucial event in the mitochondrial damage observed in HIV-infected patients
	학술지명	The Journal of Bio Chemistry	Antiviral Therapy
	저자	Moore MD 등	Ciccosanti F 등
	게재년도	2011	2010
	관련성(%)	20%	20%
	유사점	특정 바이러스 치료제로 활용 가능한 RNA 앵타머	프로테옴 기반의 바이러스 감염시의 변화 여부 분석
	차이점	HIV 외의 다양한 미생물의 증식 저해를 위한 RNA 앵타머 발굴	특정 바이러스 감염시 조직에 RNA 앵타머를 처리 후 안정성 평가 여부
핵심논문 및 관련성	논문명	Inhibition of vaccinia virus replication by peptide aptamers.	Stem cell-based in vitro models as alternative methods for toxicity and efficacy tests in animals
	학술지명	Antiviral Research	Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz
	저자	Saccucci L 등	Klemm M 등
	게재년도	2009	2008
	관련성(%)	40%	40%
	유사점	바이러스 증식 저해 RNA 앵타머 개발	동물에서의 독성 분석
	차이점	항바이러스제제 및 항미생물제제로 활용하기 위한 구조 안정화를 통한 체내 안정성 확보	바이러스 또는 세균에 감염된 동물에 앵타머 처리시의 동물 세포에의 안정성 평가

개발기술명	식물바이러스 이용 가금류인플루엔자 치료 예방제 고발현 백터개발	
Keyword		
검색건수	76	
유효논문건수	31	
핵심논문 및 관련성	논문명	Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform
	학술지명	Vaccine
	저자	Denis, J 등
	게재년도	2008
	관련성(%)	75%
	유사점	식물바이러스를 이용 influenza epitope을 발현 식물바이러스의 외피단백질에 epitope을 fusion 시킴
	차이점	PapMV를 이용 하였으나 본 실험에서는 PVX나 SMV 등의 다른 바이러스를 이용할 것임 Influenza epitope을 발현 시켰으나 본 실험에서는 가금류에 병을 유발하는 바이러스의 epitops를 발현 시킬 것임

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장현황

(가) 동물용의약품 : 551,442백만원

(나) 사료첨가제 : 129,107백만원, 동물투여 : 407,551백만원, 원료의약품 : 14,783백만원)

(다) 항생제대체제 제품 및 시장현황 : 144,177백만원

- 사료첨가 : 23,424백만원, 동물투여 : 120,752백만원

(라) 사료첨가제(생균제) 제품 및 시장현황 : 6,491백만원

(마) 백신 제품 및 시장현황 : 127,916백만원

- 기능성 면역증강제(IgY, 초유 제제 등) 제품 및 시장 현황 : 1,202백만원

(바) 국내의 항미생물 펩타이드 관련 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정임

(사) Defensin관련 연구는 선진국에서도 아직 상업화 단계까지는 진입하지 못하였음.

(아) 국내 동물용의약품 산업의 총 시장규모는 2000년 기준으로 약 5,500억원(출처 : 한국동물약품협회)이며, 2007년에는 상반기에만 2,150억원 시장규모(한국동물의약품협회)를 보임. 그러나 우리나라는 거대 동물의약품 시장 중 백신을 제외한 거의 모든 제품의 원자재를 해외 수입에 의존하고 있어, 동물의약품의 가격이 국제 시세 및 환율 등에 많은 영향을 받아 영세 농가에게 큰 부담으로 작용하고 있음.

(자) 따라서 국내의 기술력을 기반으로 한 동물의약품의 개발을 통해 국가 경쟁력을 확보하고 농가에 저렴하게 보급함으로써 질환을 조기에 대처하는 것이 시급함.

그러나 현재까지 가축의 바이러스 및 세균성 질환의 치료제는 개발은 미미한 수준임.

(2) 국외 제품생산 및 시장현황

(가) 세계동물약품 시장 규모(2009년) : USD18.6billion(약 22조 3천억원)

(나) 항병원성약 : 2.7billion, 생물학적제제 : 4.7billion, 사료첨가제 : 2.2billion

(다) Defensin 관련 연구는 아직까지는 선진국에서도 상업화 단계까지는 진입하지 못하였으나 현재 매우 활발한 연구가 진행되고 있는 분야이며, Defensin을 활용한 형질전환 가축의 질병저항성 증대에 대한 개념은 아직 초기단계로 분석됨.

(라) 2000년에는 11,000 백만 달러 정도였던 세계 동물의약품 시장은 2004년에는 13,700 백만 달러에 이르렀으며 현재에도 시장 규모가 꾸준히 확대되고 있음. 동물의약품은 구충제, 생물학적 제제, 항감염제(백신), 백신사료 등으로 구분할 수 있으며, 전 세계 동물의약품 시장의 90%가 동물성 질환을 예방, 치료하기 위한 구충제, 생물학적 제제, 항감염약 제조분야가 차지하고 있음. 이중 가축 질환관련 동물의약품은 전체 시장의 60% 이상을 차지하고 있을 정도로 그 비중이 높음.

(마) 전 세계의 동물의약품 시장을 약효별로 구분해 보면 항바이러스제 및 항미생물제제는 생물학적 제제로 분류되고 있으며, 전 세계 동물의약품 시장의 약 23% 이상을 차지하고 있고, 현재 다국적 기업에 의해 주도되고 있음. 특히, 항생제 및 사료첨가제의 시장이 정체하고 있는 반면, 항바이러스제 및 항미생물제제 시장은 꾸준한 성장세를 보이고 있음. 그러나 앵타머 기반의 항바이러스제 및 항미생물제제는 현재까지 전무한 실정임. 따라서 본 연구를 통하여 제품화 될 앵타머 기반의 차세대 가축전염성질환 치료제는 장기적으로 안정적인 시장으로의 진입 및 시장 창출이 예상됨.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향): 개발된 신소재를 이용하여 다양한 유형의 사료첨가제, 항생제대체제 및 백신 기능을 가진 면역증강제를 개발

(2) 사료첨가제

(가) 한우 송아지용 신소재 복합제제

(나) 한우 육성, 비육용 신소재 복합제제

(다) 젖소 체세포 감소용 신소재 복합제제

(라) 포유 및 이유자돈용 신소재 복합제제

(마) 육성, 비육돈용 신소재 복합제제

(바) 육계용 신소재 복합제제

(사) 산란계용 신소재 복합제제

(3) 항생제대체제(동물용의약품으로서)

(4) 기능성 면역증강제

(가) 각 축종별 소모성 질환에(돼지; 대장균, 살모넬라, 돼지 유행성 설사병, 돼지 생식기 호흡기증후군, 돼지 썬코바이러스; 닭-콕시듐, 대장균; 소-소 바이러스성 설사병, 로타바이러스, 대장균) 감염시 설사, 호흡기 질병, 성장부진, 사료효율 저하, 폐사율 증가되어 사육농가의 경제적 피해를 가중 시키고 있는데 각 축종별 일령병 맞춤형

고면역 복합 난황항체가 첨가된 제품으로 상기 질병의 예방 효과를 증진시킬 수 있고, 유용세포소기관 리소좀이 포함된 항균제품으로 상기 질병의 예방효과를 증진시키고, 다른 제품 사용 시 발생하는 부작용과 거부감을 감소시킬 수 있음.

- (나) 향후 항미생물 펩타이드를 활용한 의약품 개발이 예상되며 이를 위한 항미생물 펩타이드 대량생산 기법이 중요한 기술로 등장할 것으로 예상됨. 본 연구의 결과로 개발된 내인성 항미생물 펩타이드는 향후 항생제대체제로서의 발전이 기대됨.
- (다) RNA 앵타머는 높은 특이성 및 일정시간 후 체내에서 자연분해되는 성질로 인체 치료제로도 각광받는 추세임. 이와 같은 특징을 기반으로 인간이 섭취하는 가축의 치료제로 활용한다면 약물의 잔여 또는 부작용을 초래하지 않는 장점을 가질 것으로 기대됨. 특히, 현재까지 전무한 앵타머 기반의 항미생물(세균 및 바이러스)제제를 통한 지적재산권 창출 및 시장 창출이 가능할 것으로 예상됨.

5. 연구결과가 국내외 기술개발에 차지하는 위치분석

가. 특허 분석 측면

(1) 난황항체 생산 및 적용

- (가) 기존 특허는 각 축종에 대한 치료 및 예방분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 각 축종별 맞춤형 난황항체 개발 방향으로 연구를 추진하여 고면역 복합난황항체 특허를 출원.
- (나) 기존 특허는 전체 항원을 이용한 산란계 면역으로 항원 생산 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 고역가 고면역 바이러스 항원 또는 재조합 단백질 생산용 세포주 및 면역 강화 백신보조제 개발을 통해 새로운 항원 생산 기술에 대한 특허등을 국내외에 출원할 계획임 확립하고 이를 이용하여 생산된 복합면역항체의 질병 예방 및 치료 효과에 관한 논문을 국내외 전문 학술지에 게재.

(2) 항미생물펩티드 생산 및 적용

- (가) 기존 특허는 일부 항미생물 펩타이드의 치료제로써의 활용 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 돼지에서 처음 규명되는 항미생물 펩타이드를 포함한 다양한 펩타이드를 분석하여 동물약품에 응용하도록 연구를 추진하여 특허 출원.
- (나) 항미생물 펩타이드 단일단백질의 효과에 대한 특허만 존재하며 2가지 이상의 항미생물 펩타이드를 콕테일로 사용하였을 때의 효능증대에 특허는 없는 것으로 판단되며, 특정 항미생물 펩타이드 콕테일에 대한 특허 출원.

(3) 효모발현 시스템 개발 및 적용

- (가) 기존 특허는 auto-cloning system의 범용화 및 범용 활용 분야에 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 이를 high-throughput cloning을 위한 방향으로 연구를 추진하여 효모에서의 외래 면역단백질 발현 vector series의 특허를 출원.

(4) 리소좀 제제 개발 및 적용

- (가) 기존 특허는 합성물질 및 효소를 직접적으로 사용한 항균분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 리소좀이라는 유용기능성 세포소기관을 사용하여 항균과 in

vivo 상에서 부작용이 발생하지 않는 방향으로 연구를 추진하여 독성 없는 가축전염병 전용 항균제 특허를 출원.

(나) 기존 특허는 가축 전염성 병원균의 여러 종이 아닌 한 가지 종에 대한 항균분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 가축전염병 관련 유해세균에 대한 항균활성 능력을 향상 시킨 나노집적화 기술 방향으로 연구를 추진하여 나노 집적화된 가축 전염병 전용 항균제를 특허 출원.

(5) 앵타머 기반의 치료제 개발 및 적용

(가) 기존 특허는 인체 치료제 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 인체 치료제의 안정성을 적용한 가축전염병치료제 방향으로 연구를 추진하여 바이러스 및 세균의 증식을 저해할 수 있는 RNA 앵타머 기반 가축전염병치료제 관련 특허 출원.

(나) 또한, 기존의 국내외 앵타머 기반의 특허는 앵타머 제작 기술 및 인체 치료제로서의 앵타머의 가능성에 대한 특허에 치우쳐져 있으며 항바이러스 또는 항세균성 앵타머 관련 특허는 매우 미미한 실정임. 특히, 앵타머 안정성 평가 관련 연구는 국내외적으로 전무함에 따라서 바이러스 및 세균의 증식저해 관련 RNA 앵타머를 개발하고 이의 가축 내에서의 안정성을 확보 및 독성평가 관련 기술에 대한 특허 출원.

(6) 식물발현 제제 개발 및 적용

(가) 기존의 특허는 백신을 식물체에 발현 시키는 측면에 치중하였으나 본 연구는 식물바이러스성 벡터에 도입하여 예방의 효율을 극대화하는 방향으로 추진하여 벡터개발과 사료첨가제로서 특허를 출원.

(나) 기존의 특허는 하나의 epitope를 하나의 바이러스에 도입하여 이용 하는 측면에 치중하였으나 본 연구는 몇 개의 epitopes를 하나의 식물바이러스성 벡터에 도입하여 예방의 효율을 극대화하는 방향으로 추진하여 벡터개발과 사료첨가제로 특허 출원.

(다) 기존의 특허는 비가금류 치료 및 예방의 측면에 치중하였으나 본 연구는 가금류의 바이러스성 질병을 사전에 예방하는 방향으로 추진하여 특허 출원.

나. 논문 분석 측면

(1) 난황항체 생산 및 적용

(가) 기존 논문은 각 축종에 대한 치료 및 예방분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 각 축종별 맞춤형 난황항체 개발 방향으로 연구를 추진하여 고면역 복합난황항체의 예방효과에 대한 논문 등을 국내외 전문 학술지 등에 게재.

(나) 기존 논문은 전체 항원을 이용한 산란계 면역으로 항원 생산분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 고역가 고면역 바이러스 항원 또는 재조합 단백질 생산용 세포주 및 면역 강화 백신보조제 개발을 통해 생산된 복합면역항체의 질병예방 및 치료 효과에 관한 논문을 국내외 전문 학술지에 게재.

(2) 항미생물 펩티드 생산 및 적용

(가) 기존 논문은 일부의 항미생물 펩티드의 기능연구 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 보다 다양한 항균 펩티드의 기능분석방향을 연구 추진하여 논문 등을 국제저명학술지 등에 게재.

(나) 돼지의 항미생물 펩티드 연구는 제한적으로 이루어져 이에 대한 본격적인 연구를 실시하여 결과를 도출.

(3) 효모발현 시스템 개발 및 적용

(가) 기존 논문은 효모에서의 외래 면역단백질 발현 및 그 활성 조사 분야에 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 단일 외래 면역단백질의 발현에는 관심이 없고 high-throughput system을 이용한 대량 발현에 치중할 계획으로 발현한 단백질은 모두 활성 조사팀으로 이관하여 나온 결과 전체를 관련 학술지 등에 게재.

(4) 리소좀 제제 개발 및 적용

(가) 기존 논문은 in vitro 상에서 항균활성을 확인하고 항균기능분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 in vivo 상에서 항균활성과 독성이 나타나지 않는 가축전염병 전용 항균제방향으로 연구를 추진하여 in vivo 상에서 항균활성 효과 논문 등을 국내외 전문 학술지 등에 게재.

(나) 기존 논문은 가축전염성 병원균의 여러 종이 아닌 한 가지 종에 대한 항균분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 가축전염병 관련 유해세균에 대한 항균활성 능력을 향상 시키는 나노집적화 기술 방향으로 연구를 추진하여 나노집적화된 가축전염병 전용 항균제에 관한 논문 등을 국내외 전문 학술지 등에 게재.

(5) 앵타머 기반의 치료제 개발 및 적용

(가) 기존 논문은 앵타머의 개발 방법 및 앵타머를 통한 인체치료제 혹은 바이러스 및 세균의 검출 관련 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 바이러스 및 세균의 증식 저해용 RNA 앵타머 개발을 통한 고위험성 가축전염병의 치료제를 개발하는 방향으로 연구를 추진하여 항바이러스성/항세균성 앵타머 치료제 관련 논문을 국내외 전문 학술지에 게재.

(나) 또한, 앵타머의 가축내 안정성을 확보하고 in vitro/in vivo 수준에서의 효능 평가를 우선 수행함으로써 가축에 활용시 나타날 수 있는 부작용을 미연에 방지할 수 있는 연구를 실시하고자 함. 관련 연구는 현재까지 전 세계적으로 보고된 바 없는 독창적인 연구로 국내외 우수 학술지게 게재.

(6) 식물발현 제제 개발 및 적용

(가) 기존의 논문은 백신을 식물체에 발현시키는 측면에 치중하였으나 본 연구는 식물 바이러스성 벡터에 도입하여 예방의 효율을 극대화하는 방향으로 추진하여 벡터개발에 대한 논문을 국내외 전문 학술지에 게재.

(나) 기존의 논문은 하나의 epitope를 하나의 바이러스에 도입하여 이용 하는 측면에 치중하였으나 본 연구는 다수의 epitopes를 하나의 식물바이러스성 벡터에 도입하여 예방의 효율을 극대화하는 방향으로 추진하여 벡터개발과 사료첨가제에 대한 논문을 국내외 전문 학술지에 게재.

(다) 기존의 논문은 비가금류 치료 및 예방의 측면에 치중하였으나 본 연구는 가금류의 바이러스성 질병을 사전에 예방 및 치료에 관한 논문을 국내외 전문 학술지에 게재.

다. 제품 및 시장분석 측면

(1) 난황항체 생산 및 적용

(가) 국내 및 국외 시장분석결과 각 질병별 난황항체 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 본 연구과제에서는 각 축종별 고면역난황항체 개발 방향으로 연구를 추진하여 맞춤형 복합난황항체 제품 등을 생산 및 판매.

(2) 향미생물 펩타이드 생산 및 적용

(가) 향미생물 펩타이드의 경우는 항생제대체제로써의 광범위한 활용이 기대되나 그 연구역사가 짧은 관계로 현재 연구초기 단계에 있음.

(나) 특정제품으로 개발되기에는 후속연구들이 동반되어야 하며 이러한 측면에서 향미생물 펩타이드관련 연구는 제품개발 및 시장수요를 고려할 때 매우 적절한 시점으로 판단됨.

(다) 동물산업에 향미생물 펩타이드를 적용할 경우 사람에 대한 적용과의 시너지 효과를 가지며 향후 실용화 가능성이 매우 높음.

(3) 효모발현 시스템 개발 및 적용

(가) 국내 및 국외시장 분석결과 Invitrogen사의 범용 cloning system인 GATEWAY 제품과 clonase 등으로 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 본 연구에서는 범용의 확장 한계를 넘어선 120종 이상의 면역단백질 발현용 vector를 구축하고 상업 clonase의 대안으로서 극한미생물 유래의 recombinase를 도입하여 제품화 추진.

(4) 리소솜 제제 개발 및 적용

(가) 국내 및 국외시장 분석결과 가축전염병 유해세균 제어 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 부작용이나 항생제와 같은 물질에 대한 인식이 좋지 않으므로 본 연구과제에서는 독성이 없는 항균제 방향으로 연구를 추진하여 유용세포 소기관인 리소솜을 이용한 친환경 가축전염병 유해세균 저해제 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매.

(5) 앵타머 기반의 치료제 개발 및 적용

(가) 국내 및 국외시장 분석결과 동물 의약품에 대한 시장은 점차 확대되고 있으나, 항생제, 백신과 관련한 시장이 대부분을 차지하고 있음.

(나) 따라서 본 연구과제에서는 가축전염병을 치료할 수 있는 가축 치료제 시장을 활성화하기 위하여 표적 물질과의 높은 친화력과 높은 안정성을 가지는 RNA 앵타머를 기반으로 가축전염병질환 치료제 개발 연구를 통하여 치료제를 생산하여 판매.

(6) 식물발현 제제 개발 및 적용

(가) 국내 및 국외시장 분석결과 예방을 위한 약이나 사료첨가제가 시판되지 않고 있어 본 연구과제를 식물바이러스를 이용하여 사료 작물에서 고효율로 발현시켜 가금류에 발생하는 조류인플루엔자 예방 제품을 사료첨가제 형태로 판매.

제 3장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절. 1차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 신소재 산업화를 위한 현장적용 및 효능평가 연구(제1세부)

가. 축종별 현장적용 대상농장 선정 및 질병발생 위험도 분석

(1) 현장적용 대상 실험농장 선정

- 축종별 효능평가 실험 농장의 선정은 정기적으로 질병을 모니터링하고 있는 농가들을 대상으로 효능평가 대상질병이 단일 혹은 복합으로 발생하는 농장을 우선 선정함.
- 동시에 평가대상 질병이 관찰되지 않은 질병관리가 우수한 농장을 축종별 1개소 선정하여 음성대조군으로 선정함(표 1-1).

표 1-1. 현장적용 대상 실험 농장 현황

축종	모니터링 농장수	선정농장수	선정농장 평균사육규모	비고 (연계분석)
소	7	4(음성대조농장 1 포함)	100두	제2협동 소 효능평가팀
돼지	7	4(음성대조농장 1 포함)	12,800두	제2협동 돼지 효능평가팀
닭	7	4(음성대조농장 1 포함)	57,100수	제2협동 닭 효능평가팀

(2) 대상농장에 대한 질병 모니터링 및 축종별 질병발생 위험도 분석

(가) 소농장의 질병발생 조사 및 분석결과

① 검사대상 질병 및 검사방법

- 소농장의 세부 정보는 표 1-2와 같으며 소농장의 모니터링 대상 질병과 이에 대한 검사방법은 표 1-3과 같음.

표 1-2. 모니터링 대상 소농장 정보

소농장	지역	사육규모	이전 병력
B-1	전북 부안	100두(한우)	소 로타바이러스, 콕시듐증
B-2	전북 부안	60두(한우)	소 코로나바이러스, 소 로타바이러스
B-3	전북 김제	120두(한우)	BVD, 소 코로나바이러스
B-4	전북 남원	80두(한우)	IBR, 대장균증
B-5	충남 서산	120두(젖소)	대장균증, 소 로타바이러스
B-6	전북 임실	80두(한우)	요네병
B-7	전북 정읍	100두(한우)	-

표 1-3. 소농장의 모니터링 대상 질병에 대한 검사방법

질병명	검사방법		비고
	항원	항체	
소 바이러스성 점막설사병(BVD-MD)	RT-PCR	ELISA	
소 코로나바이러스	RT-PCR	ELISA	
소 로타바이러스	RT-PCR	ELISA	
대장균증	균 분리동정	MAT	
살모넬라증	균 분리동정	MAT	



그림 1-1. 질병 모니터링 대상 소농장 사진

② 질병 모니터링 결과

- ㉔ B-1 농장. 전북 부안의 한우 100두 규모 농장으로 기왕병은 생후 2주령 이하 송아리에서 로타바이러스와 5개월령 전후에서 콕시듐증에 의한 설사증이 있었음.
 - 2011년 9월부터 2012년 5월까지 전두수를 검사한 결과, 소 로타바이러스에 대한 항체 양성이나 RT-PCR 검사 결과 유전자는 검출되지 않았으며 분변 검사 결과 콕시듐 양성이 확인됨.
- ㉕ B-2 농장. 전북 부안의 60두 규모 한우 농장으로 기왕병은 생후 3~4주령에서 소 코로나바이러스, 감염증, 소 로타바이러스에 이환된 기록이 있음.
 - 2011년 10월부터 2012년 5월까지 전 두수를 검사한 결과 소 코로나바이러스와 소 로타바이러스에 대한 항체가가 전 연령에서 검출되었고, 주로 생후 1개월령 송아지에서 RT-PCR 결과 소 코로나바이러스와 소 로타바이러스 유전자가 검출되어 이 농장에는 이 두 질병이 문제가 되고 있음을 확인하였음.
- ㉖ B-3 농장. 전북 김제의 120두 규모 한우 농장으로 기왕병은 BVD와 소 코로나바이러스에 이환되었던 경력이 있음.
 - 2011년 8월부터 2012년 5월까지 전 두수를 검사한 결과 일부 임신우에서 BVDV 유전자검사 양성을 확인하였고, 생후 1개월령 송아지에서 RT-PCR 및 소 코로나바이러스 유전자를 검출한 결과 이 농장에는 이 두 질병이 문제가 되고 있음을 확인하였음.
- ㉗ B-4 농장. 전북 남원 소재 80두 사육규모의 농장으로 소전염성비기관염(IBR)과 대장균증 발생 사실이 확인되었으며, 현재 주로 호흡기 질병이 문제되는 농장이었음.
 - 질병 모니터링을 시작한 2011년 9월부터 2012년 5월까지 전두수를 검사 결과, 대장균증은 경미하였지만 IBR에 의한 폐렴이 문제가 되고 있음.
 - 모니터링 대상 질병이 검출되지 않아 선정 농장에서는 제외함
- ㉘ B-5 농장. 충남 서산 지역 120두 규모의 젃소농장으로 기왕병은 대장균증과 로타바이러스 감염이 있었음.
 - 2011년 9월부터 2012년 5월까지 전두수를 검사한 결과, 대장균증과 소 로타바이러스가 확인되었으며, 기타 모니터링 대상 질병들은 검출되지 않음
- ㉙ B-6 농장. 전북 임실 지역의 한우 80두 규모 농장으로 기왕병은 요네병이 있었음.
 - 2011년 10월부터 2012년 5월까지의 검사 결과, 요네병 항체가가 높은 수준으로 나

타났으며 분변에서의 PCR 검사상 양성으로 확인됨.

- 기타 모니터링 대상 질병들은 검출되지 않아 대상 농장에서 제외함.

㉔ B-7 농장. 전북 정읍 지역 100두 규모의 한우 농장으로 기왕 병력은 없었음.

- 2011년 10월부터 2012년 5월까지의 모니터링 결과, 대상 질병이 전혀 검출되지 않아 대조 농장으로 활용 가능할 것으로 판단되었음.

표 1-4. 모니터링 및 현장적용 대상으로 선정된 소농장 정보

농장명	지역	사육규모	현장 상재 질병	현장적용대상
B-1	전북 부안	100두(한우)	콕시듐증	×
B-2	전북 부안	60두(한우)	소 코로나바이러스, 소 로타바이러스	○
B-3	전북 김제	120두(한우)	소 바이러스성 점막설사병, 소 코로나바이러스	○
B-4	전북 남원	80두(한우)	소전염성비기관염	×
B-5	충남 서산	120두(젃소)	대장균증, 소 로타바이러스	○
B-6	전북 임실	80두(한우)	요네병	×
B-7	전북 정읍	100두(한우)	-	○

③ 제어대상 질병의 발생 위험도 분석결과

- 소에서 제어대상으로 지정한 주요 질병은 주로 설사병을 유발하는 병원체로써 점막 설사병(BVD)은 소의 사육 전 기간에 걸쳐서 문제가 되고 있으며, 기타 제어대상 질병들은 주로 포유기와 이유기에 집중적으로 발생하고 있음. 따라서 축우용 제품의 개발 방향은 어린 송아지의 설사병을 예방 및 치료할 수 있는 초유 대응 면역강화제로 설정하는 것이 타당한 것으로 분석됨.



그림 1-2. 소의 사육단계별 제어대상 질병의 발생위험시기 분석

(나) 돼지농장의 질병발생 조사 및 분석결과

① 검사대상 질병 및 검사방법

- 모니터링 대상 양돈장의 세부 정보는 표 1-5와 같으며, 농장의 모니터링 대상 질병과 이에 대한 검사방법은 표 1-6과 같음.

표 1-5. 모니터링 대상 돼지농장 정보

돼지농장	지역	사육규모	이전 병력	비고
P-1	전북 정읍	5,000두	홍막폐렴 양성	
P-2	전북 김제	25,000두	PRRS, PCV2 양성	
P-3	경북 성주	20,000두	PRRS, PCV2, APP 양성	
P-4	전남 무안	5,000두	PRRS, PCV2, 양성	
P-5	전북 진안	10,000두	PRRS, PCV2, 대장균, 살모넬라, PED 양성	
P-6	경북 경산	10,000두	PRRS, PCV2 양성	
P-7	경기 용인	15,000두	PRRS, PCV2, PED 양성	

표 1-6. 돼지농장의 모니터링 대상 질병에 대한 검사방법

질병명	검사방법		비고
	항원	항체	
돼지생식기호흡기증후군(PRRS)	RT-PCR	ELISA	
돼지썩코바이러스병(PCV2)	PCR	ELISA	
돼지인플루엔자(SIV)	RT-PCR	ELISA	
돼지유행성설사병(PED)	RT-PCR	-	
돼지로타바이러스	RT-PCR	-	
살모넬라	균 분리동정	ELISA	
대장균	균 분리동정	ELISA	
홍막폐렴(APP)	균 분리동정	ELISA	



그림 1-3. 질병 모니터링 대상 돼지농장 사진

② 질병 모니터링 결과

- ㉔ P-1 농장. 2011년 9월에서 2012년 5월까지 포유, 이유, 육성, 모돈, 후보돈 및 웅돈 130두를 검사한 결과 PRRS, PCV2, SIV, 홍막폐렴이 검출되지 않았으며, 살모넬라 및 대장균증에 의한 설사 또한 발생하지 않음.
- ㉕ P-2 농장. 2011년 9월에서 2012년 5월까지 포유, 이유, 육성, 모돈, 후보돈 및 웅돈에 대한 검사 결과, PRRS 바이러스가 포유, 이유 및 40일령 육성돈군에서 검출되었으며, PCV2 역시 항원 음성을 유지하였음(그림 1-4). 기타 모니터링 대상 질병들은 검출되지 않음.

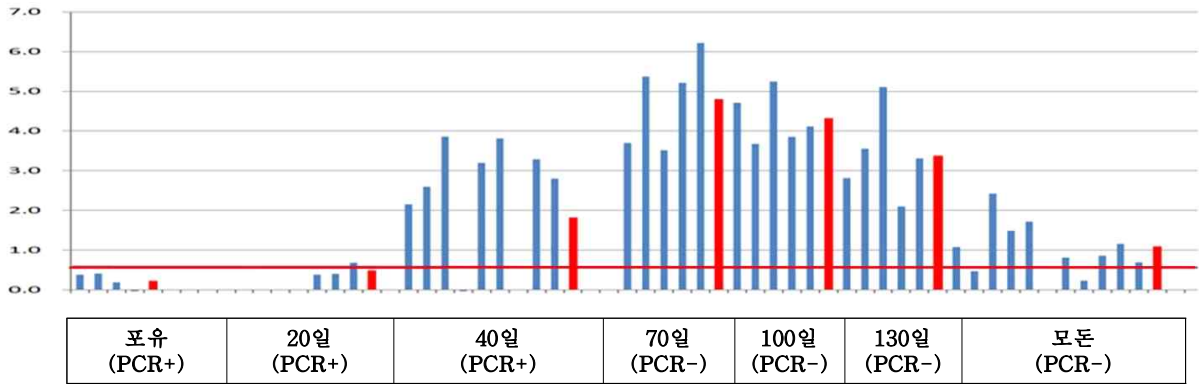


그림 1-4. P-2 농장의 PRRS 항원 및 항체 검사 결과. Y축은 ELISA 결과 OD값을 나타내며, 0.4 이상 양성으로 판독. 붉은색 바는 각 구간의 평균항체가를 나타냄.

- ㉔ P-3 농장. 2011년 9월에서 2012년 5월까지 포유, 이유, 육성, 모돈, 후보돈 및 웅돈 200두를 검사한 결과 40~100일령의 육성 및 비육돈에서 PRRS 바이러스가 발견되었으며, PCV2는 항원음성을 유지하였음(그림 1-5).
- 70~130일령의 육성 및 비육돈에서 설사증이 발생하였으며, chloramphenicol, gentamycin, tylosin, ceftiofur, tetracycline 등 다양한 항생제에 높은 저항성을 가지는 살모넬라가 분리됨. 다른 모니터링 대상 질병은 검출되지 않았음.

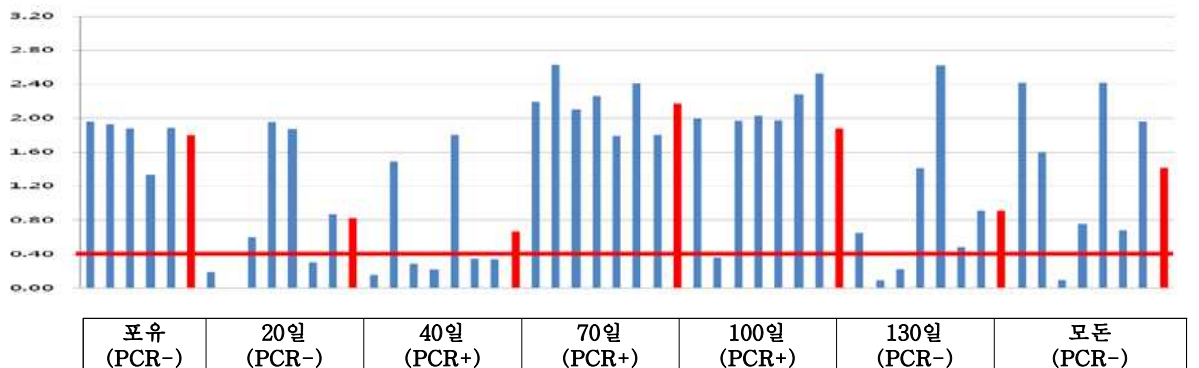


그림 1-5. P-3 농장의 PRRS 항원 및 항체 검사 결과. Y축은 ELISA 결과 OD값을 나타내며 0.4 이상 양성으로 판독. 붉은색 바는 각 구간의 평균항체가를 나타냄

- ㉕ P-6 농장. 2011년 9월에서 2012년 5월까지 포유, 이유, 육성, 모돈, 후보돈 및 웅돈 46두를 검사한 결과 PRRS 와 PCV2의 항원은 검출되지 않았음(그림 1-6).
- 40~100일령의 육성 및 비육돈에서 흉막폐렴균이 발견되었으며, 70일령의 육성돈부터 높은 수준의 흉막폐렴균에 대한 항체가 검출되었음.
 - 100일령의 육성돈에서 설사 및 전신 감염증에 의한 폐사가 발생하였으며, STX2e, LT, F6 및 STb 독성 유전자를 가지는 대장균이 장을 포함한 폐, 간 및 비장 등의 실질 장기에서도 분리됨. Ampicillin, amikacin, gentamycin, tylosin, ceftiofur, penicillin, tetracycline 등의 항생제에 높은 저항성을 가지는 것으로 분석됨.

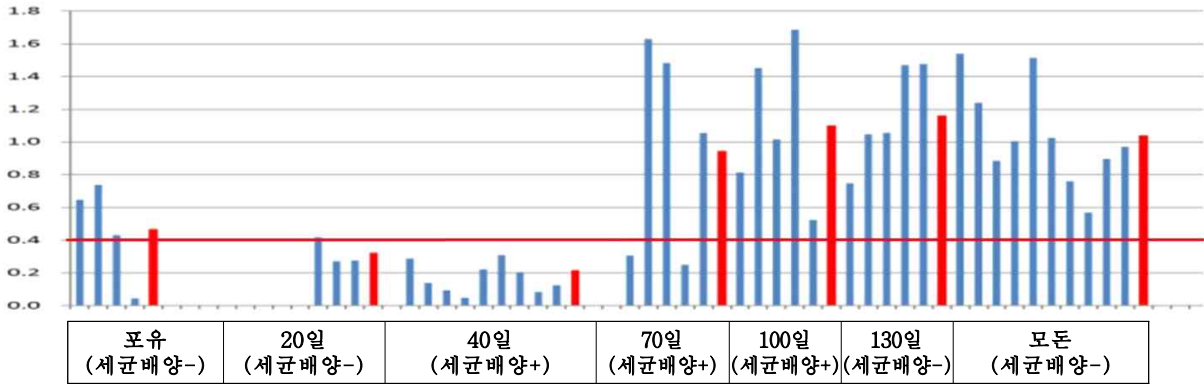


그림 1-6. P-6 농장의 APP 항원 및 항체 검사 결과. Y축은 ELISA 결과 OD값을 나타내며 0.4 이상 양성으로 판독. 붉은색 바는 각 구간의 평균 항체가를 나타냄

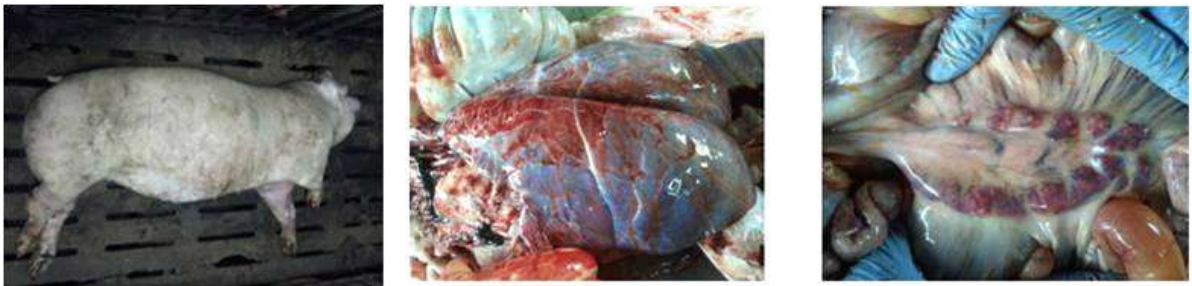


그림 1-7. P-6 농장의 100일령의 육성돈에서 발생한 대장균증(부종병)

표 1-7. 모니터링 및 현장적용 대상으로 선정된 돼지농장 정보

농장명	지역	사육 규모	현장 상재 질병	현장적용 대상	비고
P-1	전북 정읍	5,000두	없음	○	음성대조 농장
P-2	전북 김제	25,000두	PRRS 양성	○	PRRS 적용농장
P-3	경북 성주	20,000두	PRRS, 살모넬라 양성	○	PRRS 및 살모넬라 적용농장
P-4	전남 무안	5,000두	PRRS 양성	×	P-2와 중복으로 제외
P-5	전북 진안	10,000두	PRRS 안정화	×	상재 질병 없으므로 제외
P-6	경북 경산	10,000두	APP, 병원성 대장균 양성	○	APP, 대장균증 적용농장
P-7	경기 용인	15,000두	PRRS 양성	×	P-2와 중복으로 제외

③ 제어대상 질병의 발생 위험도 분석결과

- 대부분의 양돈장에서 전 구간에서 지속적인 문제를 일으키는 질병은 PRRS 바이러스인 것으로 분석되었음.
- 대부분의 양돈장에서 PCV2 백신을 접종하고 있으며 백신접종 농장에서는 PCV2가

높은 수준으로 발견되고 있지는 않음.

- 돼지인플루엔자 바이러스는 모니터링 농장에서 검출되지 않았음.
- 홍막폐렴은 일부 농장의 이유 및 육성돈에서 문제가 되었으며 간혹 비육돈에서도 발생이 되었음.
- PED 및 로타바이러스는 대부분 표유기의 자돈에서 발생되었으며 PED는 이유자돈에서도 일부 농장에서 문제가 됨.
- STX2e, LT, F6 및 STb 등의 독성 유전자를 가진 높은 항생제 내성의 대장균에 의한 설사병은 주로 포유와 이유자돈에서 문제가 되었으나 봄이 시작되는 환절기를 전·후로 100일령의 육성돈에서도 일부 농장에서 문제가 되기도 하였음.
- 다양한 항생제에 내성을 보이는 살모넬라에 의한 설사병은 육성 및 비육돈에서 일부 발생하였음.
- 분석결과 PRRS에 대한 치료제나 예방제제의 개발이 가장 절실한 것으로 분석되었으며 높은 항생제 내성을 보이는 대장균 및 살모넬라에 의한 설사가 포유 및 이유자돈에서 많은 문제를 일으키는 것으로 보임. 따라서 PRRS와 PCV2 및 포유 및 이 유구간의 설사병에 대한 면역제제 개발이 필요함.

태아기	포유기	이유기	육성기	비육기
PRRS	PRRS PED 대장균증 Rotavirus	PRRS 홍막폐렴 PED 대장균증	PRRS 홍막폐렴 대장균증 Salmonella	PRRS 홍막폐렴 Salmonella

그림 1-8. 돼지의 사육단계별 제어대상 질병의 발생위험시기 분석

(다) 닭농장의 질병발생 조사 및 분석결과

① 검사대상 질병 및 검사방법

- 닭의 주요감염 질병인 저병원성 조류인플루엔자(LPAI), 뉴캐슬병(ND), 살모넬라감염증(Salmonellosis), 대장균증(colibacillosis), 클로스트리듐증(Clostridium infection)을 스크리닝할 수 있는 분자생물학적인 방법 및 혈청학적인 방법을 확립함(표 1-8).
- 조류인플루엔자 바이러스는 matrix protein을 타겟으로 PCR법으로 진단함.
- 뉴캐슬병 바이러스 PCR진단법은 F, HN gene을 타겟으로 설계하였으며, 항체검사는 혈구응집억제반응(HI)을 적용함.
- 닭에서 질병을 발생시키는 주요 살모넬라증인 *Salmonella* Enteritidis(SE), *Salmonella* Typhimurium(ST), *Salmonella* Gallinarum(SG), *Salmonella* Pullorum(SP)을 진단하기 위한 Multiplex-PCR법을 확립하여 적용하였으며 SP, SG의 혈청학적 검사를 위해 평판응집반응(PA)법을 적용함.
- 클로스트리듐증은 원인체 타입별 특이 독소를 감별할 수 있는 Multiplex-PCR법을 이용하여 진단함.
- 대장균증은 avian pathogenic *Excherichia coli*(APEC)를 진단할 수 있는

Multiplex-PCR법을 확립하여 적용함.

표 1-8. 닭농장의 모니터링 대상 질병에 대한 검사방법

질병명	검사방법		비고
	항원	항체	
조류인플루엔자(저병원성)	PCR	HI	
뉴캐슬병	PCR	HI	
살모넬라감염증	균 분리동정	PA	
대장균증	균 분리동정	-	
클로스트리듐증	균 분리동정	-	

표 1-9. 모니터링 대상 닭농장 정보

농장명	지역	사육규모	이전 병력
C-1	경기 이천	100,000수	조류인플루엔자, 대장균증
C-2	전북 부안	50,000수	뉴캐슬병, 감보로병, 전염성기관지염
C-3	충북 음성	80,000수	-
C-4	전북 남원	40,000수	대장균증
C-5	전북 김제	60,000수	클로스트리듐증
C-6	경기 안성	20,000수	클로스트리듐증, 감보로병
C-7	전북 정읍	50,000수	-



그림 1-9. 질병 모니터링 대상 닭농장 사진

② 질병 모니터링 결과

㉠ C-1 농장 (그림 1-10, 표 1-10).

- 조류인플루엔자 검사 결과, 10일령 및 20일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었으며 20일령 혈청검사 결과에서도 6 HI역가를 보여 사육초기의 조류인플루엔자 감염이 확인됨.
- 뉴캐슬병 검사결과, 10일령 혈청검사에서 양성율 90%, 평균 HI역가 4를 나타내어 방어 항체수준이 다소 낮았으나, 전 사육기간 내 뉴캐슬병 감염은 없었음.
- 살모넬라감염증, 대장균증, 클로스트리듐증은 발생하지 않았음

C-1	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	6	70	1	0	0
10일령	90	4	60	2	0	0
20일령	100	6	100	6	0	0
30일령	100	5	100	7	0	0



그림 1-10. C-1 농장의 혈청검사 결과

표 1-10. C-1 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	×	×	×
10일령	○	×	×	×	×
20일령	○	×	×	×	×
30일령	×	×	×	×	×

㉞ C-2 농장 (그림 1-11, 표 1-11)

- 뉴캐슬병 검사 결과, 10일령 및 20일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었으며, 20일령 혈청검사 결과에서도 9 HI역가를 보여 사육초기의 뉴캐슬병 감염을 확인함. 이전 병력에서도 뉴캐슬병 발생이력이 있어 농장에 상재하면서 빈번히 감염을 일으키는 것으로 보임.
- 살모넬라감염증은 10일령 및 20일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었음.
- 조류인플루엔자, 대장균증, 클로스트리듐증은 발생하지 않았음.

C-2	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	3	70	3	0	0
10일령	100	4	60	2	0	0
20일령	100	9	20	2	0	0
30일령	100	8	20	1	0	0



그림 1-11. C-2 농장의 혈청검사 결과

표 1-11. C-2 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	×	×	×
10일령	×	○	○	×	×
20일령	×	○	○	×	×
30일령	×	×	×	×	×

㉔ C-3 농장 (그림 1-12, 표 1-12)

- 대장균증 검사 결과, 10일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었음. papc, irp2, astA, cvi/va, vat 병원성 유전자를 보유한 대장균이 간에서 분리됨.
- 조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 대장균증, 클로스트리듐증은 발생하지 않았음.

C-3	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	6	40	2	0	0
10일령	100	4	10	1	0	0
20일령	100	6	10	1	0	0
30일령	100	5	10	1	0	0

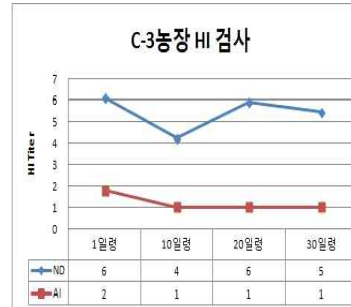


그림 1-12. C-3 농장의 혈청검사 결과

표 1-12. C-3 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	×	×	×
10일령	×	×	×	○	×
20일령	×	×	×	×	×
30일령	×	×	×	×	×

㉕ C-4 농장 (그림 1-13, 표 1-13)

- 조류인플루엔자 검사 결과, 20일령 및 30일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었으며, 20일령 혈청검사 결과에서도 5 HI 역가를 보여 사육전기 및 후기의 조류인플루엔자 감염을 확인함.
- 대장균증 검사 결과, 10일령 및 20일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었음. tsh, papc, irp2, iss, astA, cvi/va, vat 병원성 유전자를 보유한 대장균이 간에서 분리됨. 이전 병력에서도 대장균증 발생이력이 있어 농장에 상재하면서 빈번히 감염을 일으키는 것으로 보임
- 뉴캐슬병, 살모넬라, 클로스트리듐증은 발생하지 않았음

C-4	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	6	20	2	0	0
10일령	100	5	0	0	0	0
20일령	100	7	100	5	0	0
30일령	100	6	100	6	0	0



그림 1-13. C-4 농장의 혈청검사 결과

표 1-13. C-4 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	×	×	×
10일령	×	×	×	○	×
20일령	○	×	×	○	×
30일령	○	×	×	×	×

㉞ C-5 농장 (그림 1-14, 표 1-14)

- 클로스트리듐증 검사 결과, 10일령, 20일령 및 30일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었으며, 10일령 이후 전 사육기간 내 피사성장염 부검소견을 보였음. 이전 병력에서도 클로스트리듐증 발생이력이 있어 농장에 상재하면서 빈번히 감염을 일으키는 것으로 보임.
- 조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 살모넬라감염증, 대장균증은 발생하지 않았음.

C-5	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	7	10	2	0	0
10일령	100	4	10	1	0	0
20일령	100	5	0	0	0	0
30일령	100	6	10	1	0	0



그림 1-14. C-5 농장의 혈청검사 결과

표 1-14. C-5 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	×	×	×
10일령	×	×	×	×	○
20일령	×	×	×	×	○
30일령	×	×	×	×	○

㉞ C-6 농장 (그림 1-15, 표 1-15)

- 살모넬라감염증 검사 결과, 1일령 및 10일령 항원검사 결과 양성으로 확인되었으며, 이는 난계대에 의한 감염으로 보임.
- 조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 대장균증, 클로스트리듐증은 발생하지 않았음.

C-6	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	7	20	2	0	0
10일령	90	4	20	1	0	0
20일령	100	6	0	0	0	0
30일령	100	6	10	1	0	0

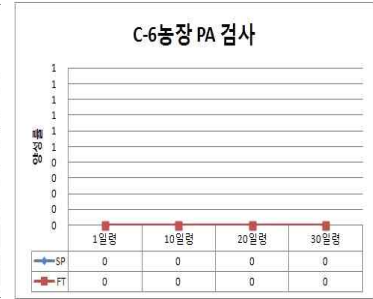
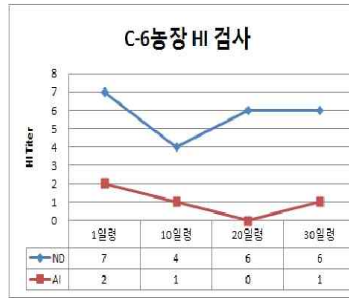


그림 1-15. C-6 농장의 혈청검사 결과

표 1-15. C-6 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	○	×	×
10일령	×	×	○	×	×
20일령	×	×	×	×	×
30일령	×	×	×	×	×

㉠ C-7 농장(그림 1-16, 표 1-16)

- 뉴캐슬병 검사 결과, 혈청검사에서 전 사육기간 내 6 HI 역가 이상을 보임으로써 양호한 방어 항체수준을 나타냈으며, 전 사육기간 내 뉴캐슬병 감염도 없었.
- 조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 살모넬라감염증, 대장균증, 클로스트리듐증은 발생하지 않았음.

C-7	HI				PA	
	ND		AI		SP	FT
	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	평균 역가	양성률 (%)	양성률 (%)
1일령	100	7	10	1	0	0
10일령	100	6	0	0	0	0
20일령	100	7	10	2	0	0
30일령	100	7	0	0	0	0



그림 1-16. C-7 농장의 혈청검사 결과

표 1-16. C-7 농장의 항원검사 결과

검사일령	LPAI	ND	Salmonellosis	Colibacillosis	Clostridium
1일령	-	-	×	×	×
10일령	×	×	×	×	×
20일령	×	×	×	×	×
30일령	×	×	×	×	×

㉡ 제어대상 질병의 발생 위험도 분석결과 (그림 1-17)

- 모니터링 결과, 10~20일령 때 세균성질병(대장균증, 살모넬라증, 클로스트리듐증)의

발생 위험도가 큰 것으로 확인되었음. 특히 대장균증은 전일령에 발생하여 영향을 미치는 것으로 분석됨. 또한 클로스트리듐증의 경우, 질병 발생 이후 출하시점까지 꾸준히 피사성장염을 일으켜 생산성에 상당한 피해를 주는 것으로 분석됨.

- 뉴캐슬병은 부화장에서 1일령 백신 의무화 이후 발생이 상당히 줄었으며 이번 발생 사례의 경우는 뉴캐슬병 상재 농장에서 충분한 항체형성 이전의 감염에 의한 것으로 추정됨.
- 난계대성질병 발생도 확인 되었으나 육계농장의 생산성에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 판단됨.



그림 1-17. 닭(육계)의 사육단계별 제어대상 질병의 발생위험시기 분석

나. 축종별 주요 질병 원인체 특성조사 및 신소재 개발과제 제공

- 축종별 제어대상 질병별로 표준주를 확보하였고, 질병 문제로 검사 의뢰된 농장으로부터 국내 농장 분리주를 확보함. 바이러스인 경우에는 분리주의 유전자 염기서열을 분석하여 유전적 특성을 조사하였으며, 세균인 경우에는 분리동정을 거친 다음, 해당 세균에 대한 항생제 감수성을 분석하여 향후 효능평가 시험에 대비한 기초자료를 확보함. 축종별 제어대상 병원체의 확보 및 특성분석결과는 다음과 같음;

(1) 소 주요 질병 원인체의 특성조사 및 소재 확보

(가) 소 바이러스성 점막설사병 바이러스

- 표준주는 2주 확보되었으며 이 중에서 NADL주는 세계적으로 백신에 사용되는 바이러스주로 BVDV-1에 속하며, 나머지 08Q723주는 국내에서 분리된 BVDV-2에 속하는 바이러스로 향후 국내백신주로 사용될 예정임. 국내분리주는 총 5주 분리되었으며 3주는 BVDV-1에 속하고 2주는 BVDV-2에 속하였으며 모두 세포에서 CPE를 일으키지 않았음(표 1-17).

표 1-17. 확보(제공)된 소 바이러스성 점막설사병 바이러스 목록

구분	확보량	균독주명	분리연도	비고
표준주	2주	NADL(BVDV-1)	-	CPE형
		08Q723(BVDV-2)	2008	CPE형
분리주	5주	11Q472 (BVDV-1)	2012	Non-CPE형
		11Q275(BVDV-1)	2012	Non-CPE형
		10D367(BVDV-2)	2012	Non-CPE형
		10Q330(BVDV-1)	2012	Non-CPE형
		12Q057(BVDV-2)	2012	Non-CPE형

(나) 소 코로나바이러스

- 표준주는 2005년도 소의 분변에서 분리된 바이러스로 국내에서 혈청중화시험 등의 표준주로 사용되고 있으며, 국내분리주(5주)는 동물원의 야생 반추동물로부터 분리되었으며 소 코로나바이러스와 99% 일치하여 유전적으로 유사하였음(표 1-18).

표 1-18. 확보(제공)된 소코로나바이러스 목록

구분	확보량	균독주명	분리연도	비고
표준주	2주	BcoV-0501	2005	
		BcoV-0502	2005	
분리주	5주	Wisent/2010		
		Sitatunga/2010	2010	
		Nyala/2010	2010	
		Himalayan Tahr 1/2010	2010	
		Himalayan Tahr 1/2010	2010	

(다) 소 로타바이러스

- 6주의 로타바이러스는 송아지의 설사 분변에서 분리하여 확보하였음(표 1-19).

표 1-19. 확보(제공)된 소 로타바이러스 목록

구분	확보량	균독주명	분리연도	비고
분리주	6주	12R42-4	2012	
		12R42-6	2012	
		12R42-8	2012	
		12R42-10	2012	
		12R42-18	2012	
		12R42-25	2012	

(2) 돼지 주요 질병 원인체의 특성조사 및 소재 확보

(가) 돼지생식기호흡기증후군 바이러스

- 돼지에서 분리한 PAM세포를 이용하여 NA형 2주 및 유럽형 3주의 PRRSV를 분리하여 확보하였음(표 1-20).

표 1-20. 확보(제공)된 돼지생식기호흡기증후군바이러스 목록

구분	확보량	균독주명	분리연도	분리재료	비고(유전형)
분리주	5주	D42	2011	편도	NA
		D76	2011	폐	NA
		D159	2011	폐	EU
		D189	2011	폐	EU
		D28	2012	폐	EU

(나) 돼지씨코바이러스

- PMWS 및 PRDC의 임상증상을 보이는 돼지에서 16개의 PCV2 양성 시료와 설사판련 개체에서 검색된 8개의 PCV2 양성 시료를 확보함.
- 분리(확보)주의 유전적 특성 분석 결과, 22개 확보주에 대한 PCV2 ORF2 유전자에 대한 염기서열 분석결과 20개는 PCV2b에 속하였고, 2개는 PCV2a로 분류됨.
- PCV2a 확보주간에는 높은 상동성(99.7%)을 보였으며, PCV2b 확보주간에는 93.1~99.8%의 상동성을 보임. PCV2b 분리주는 다시 2개의 PCV2b-1A, 11개의 PCV2b-1B 및 7개의 PCV2b-1C로 분석됨에 따라 국내에서는 PCV2b-1B가 가장 많이 검색되는 바이러스형인 것으로 분석됨(그림 18).

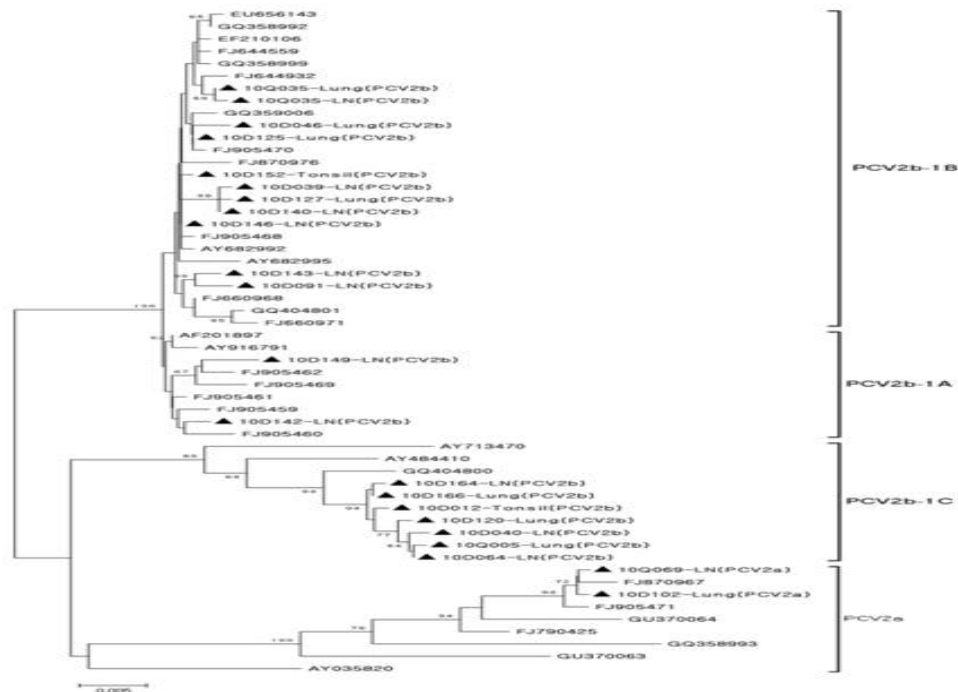


그림 18. 국내 발생 PCV2의 ORF2 gene에 대한 phylogenetic tree

(다) 돼지유행성설사병 바이러스

- PED 발생농장 4개소에 대한 포유자돈 및 설사분변으로부터 PEDV 확인 및 원시료 냉동 보관하며 시험에 사용.
- PED 발생 4개소 농장의 바이러스에 대한 염기서열 분석결과, S gene은 2개의 group으로 구분되었으며, group간에는 95.3%의 nucleotide(nt) 상동성을 보였고, ORF3, M, N, E gene은 100%, 99.1%, 98.9%, 97.8%의 상동성을 보임.
- 국내 보고된 다른 PEDV와 spike protein의 amino acid(aa) 상동성을 분석한 결과, 최대 6.1%의 차이를 보였고, 생독백신주, 불활화백신주와는 8.2%, 8.9%의 차이를 보였으며, 중화 epitope 변이에서는 COE epitope의 변이가 심하였으나, endodomain epitope의 변이는 없었음.

표 1-21. 야외 PEDV 검출 내역

군주명	지역	농장규모 (모돈수)	발생 사항
KD10YO	경기	1,500	'08년 6월 발생, '10년 2월 재발생(자돈 800두 폐사), 인공감염 후('10년 3월) 안정화
KD10YJ	전북	350	'10년 신규 발생 농장
KD10NJ	전남	1,000	'09년 11월 항원 검출(임상증상 없음), '10년 3월 재발생, 인공감염 후('10년 4월) 안정화
KD10DA	경기	2,200	'09년 9월 발생, '10년 1월 재발생, 인공감염 후('10년 3월) 안정화

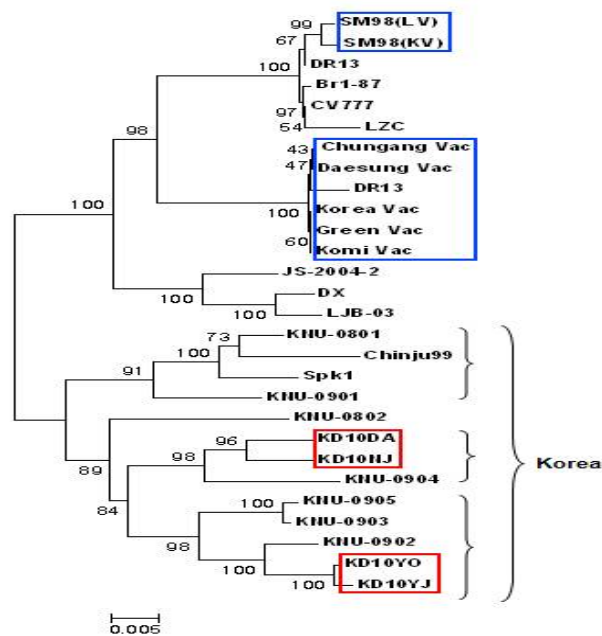


그림 1-19. 국내 발생 PEDV의 S gene의 phylogenetic tree. □백신주, □야외주

	KD10YO	KD10DA	KNU-0801	KNU-0902	KNU-0904	LV	KV (SM98P)	CV777	
Field strains	KD10YO	-	95.2	94.5	98.6	95.0	93.1	92.5	93.4
	KD10DA	93.9	-	95.5	95.6	97.8	93.3	92.7	93.5
	KNU-0801	93.9	94.4	-	94.8	95.1	94.1	93.1	93.9
	KNU-0902	97.8	94.0	94.0	-	95.3	93.3	92.6	93.5
	KNU-0904	93.9	97.7	94.4	94.0	-	92.9	92.6	93.4
Vaccine strains	LV	91.8	91.9	93.6	92.2	91.9	-	96.0	96.8
	KV (SM98P)	91.1	91.2	92.1	91.5	91.2	94.7	-	99.0
	CV777	92.5	92.4	93.3	92.9	92.5	95.8	98.3	-

Amino acid

nucleotide

그림 1-20. 국내 발생 및 백신주 PEDV의 S gene의 상동성 비교

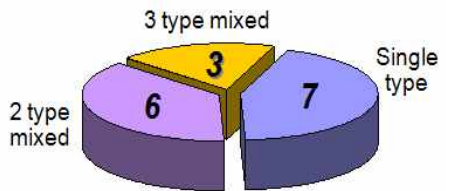
표 1-22. 국내 발생 PEDV의 각 ORF별 상동성 비교

ORF	KD10YO & KD10DA		KD10YO & others	
	nucleotide	amino acid	nucleotide	amino acid
S	95.3	93.9	92.5~97.2	91.1~97.8
ORF3	100.0	100.0	90.3~99.8	89.7~100.0
E	97.8	98.7	96.1~97.8	97.3~98.6
M	99.1	99.6	96.2~99.6	95.9~100.0
N	98.8	99.1	94.4~98.4	93.7~98.3

(라) 돼지로타바이러스

- 총 16개소 농장의 돼지로타바이러스를 분석한 결과, 1개의 type만 감염된 농장이 7개소(43.8%), 2개의 type이 혼합감염된 농장이 6개소(37.5%), 3개의 type이 혼합감염된 농장이 5개소(18.7%)로 조사됨.
- 돼지로타바이러스 type별 감염농장을 분석한 결과, G5 type 감염농장이 가장 많았고, 그 다음으로는 G4, G9으로 조사되어 다른 연구결과와 동일하게 우리나라의 돼지로타바이러스 type은 G4, G5, G9이 대다수를 차지하고 있었고, 그 이외에 G2, G3, G11 type도 일부 농장에서 검색되었음.

<설사 발생 농장에 대한 돼지로타바이러스 검색결과>



<농장별 단일 및 혼합감염 상황>

<G type별 감염농장 빈도>

G type	농장수	G type	농장수
G2	2	G5	11
G3	1	G9	6
G4	7	G11	1

- 최종 돼지로타바이러스 총 6주를 선발하고, 그 중 5주에 대한 전체염기서열 분석 완료하였음
- 분리(확보)주의 유전적 특성 분석 결과, 돼지로타바이러스의 동일 G type내 상동성을 확인한 결과, G5형은 82.5~99.8%, G4형은 83.2~95.6%, G9형은 92.5~99.7%로 G5와 G4형의 변이가 심하였음(표 1-23).
- 돼지로타바이러스(5주)의 전체 염기서열을 분석하여 각 ORF별 type을 분류한 결과, NSP1 gene은 모두 A8형으로 돼지 유래 Gottfried주와 동일하였고, NSP5 gene은 사람의 H2형을 가진 바이러스 2주(09KDG9A, 10KDG5A)가 확인됨(표 1-24).

표 1-23. 동일 유전형간 돼지 로타바이러스 상동성 비교

G type	Identity(%)	
	nucleotide	amino acid
G2	81.3~85.5	86.1~89.8
G4	83.2~95.6	89.0~96.8
G5	82.5~99.8	89.0~100
G9	92.5~99.7	94.3~99.6

표 1-24. 돼지 로타바이러스(5주)의 전체염기서열 분석을 통한 유전형 분류

	Strains	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Field strains	09KDG9A	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H2
	10KDG9A	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
	10KDG3A	G3	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E9	H1
	10KDG5A	G5	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H2
	10KDG3B	G3	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E9	H1
Standard strains	Wa*	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	DS-1*	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	A131	G3	P[7]	I5	R1	C2	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	Gottfried	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
	OSU	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

* Human strains. ※ 10KDG4A는 전체염기서열 미분석

(마) 돼지 살모넬라균

- 돼지 설사병 유래 살모넬라균은 대부분 *S. Typhimurium*으로 확인되었으며(표 1-25), 분리(확보)주의 항생제 감수성 분석결과는 표 1-26와 같음.

표 1-25. 돼지 설사병 예에서 분리한 살모넬라균 목록

분리균주	분리장기	농장수
<i>S. Typhimurium</i>	설사분변	5
<i>S. Typhimurium</i>	비장	2
<i>S. Typhimurium</i>	편도	2
<i>S. Typhimurium</i>	림프절	1
<i>S. Montevideo</i>	소장	1

표 1-26. 분리(확보) 살모넬라균의 항생제 감수성 분석 결과

항생제	S. typhimurium	S. montevideo
apramycin	-	-
gentamicin	-	++
kanamycin	-	++
neomycin	-	-
spectinomycin	-	-
streptomycin	-	+
amoxicillin	-	-
ampicillin	+	-
ceftiofur	-	+
cephalexin	-	+
colistin	-	++
florfenicol	++	++
enrofloxacin	-	++
flumequine	-	-
sulfadiazine	++	+
sulfamethoxazole	++	+
doxycyclin	+	-
oxytetracyclin	-	-

(바) 돼지 대장균

- 돼지 설사병에에서 대장균을 분리한 결과, 장독성대장균(ETEC) F4 pathotype이 가장 많았고, 이중 F4:LT:STb type과 F4:LT:STb:EAST1 type이 가장 높은 분리율을 나타냄(표 1-27).
- 분리균에 대한 항생제 감수성결과 설파계 항생제인 ceftiofur, cephalexin 및 amoxicillin에만 감수성이 있으며, 테트라사이클린, 아미노글리코시드계 및 설파계 항생제에는 높은 내성을 나타냄(표 1-28)

표 1-27. 병원성대장균의 병원성인자 분석

분리균주	병원성구분	병원성인자
KEFS074	ETEC (F4)	F4:LT:STa:STb:Paa:EAST1
KEFS075	ETEC (F4)	F4:LT:STa:STb:EAST1
KEFS0180	ETEC (F4)	F4:STa:STb:Paa
KEFS0181	ETEC (F4)	F4:LT:STb
KEFS0182	ETEC (F5)	F5:Sta:EAST

표 1-28. 분리(확보) 대장균의 항생제 감수성 분석 결과

항생제	KEFS074	KEFS075	KEFS0180	KEFS0181	KEFS0182
apramycin	++	-	++	-	-
gentamicin	-	-	-	-	-
kanamycin	-	-	-	-	-
neomycin	++	++	-	++	++
spectinomycin	++	++	++	-	-
streptomycin	++	++	++	++	++
amoxicillin	-	-	-	-	-
ampicillin	-	-	-	-	-
ceftiofur	-	-	-	-	-
cephalexin	-	-	-	-	-
colistin	-	-	-	-	-
florfenicol	-	-	-	-	-
enrofloxacin	-	-	-	-	-
flumequine	-	-	-	-	-
sulfadiazine	-	-	-	-	-
sulfamethoxazole	-	-	-	-	-
doxycyclin	-	-	-	-	-
oxytetracyclin	-	-	-	-	-

(사) 돼지홍막폐렴균

- 국내 양돈장에서 호흡기증상을 보이는 돼지로부터 분리한 홍막폐렴균은 대부분 1형, 2형 및 5형이었으며(표 1-29), 분리균에 대한 항생성 감수성 분석결과는 표 1-30과 같음.

표 1-29. 국내 양돈장에서 분리한 홍막폐렴균 목록

분리주	혈청형	APX 독소 유전자	분리장기
1	APP1	APX I,IV	폐
2	APP2	APX II,IV	폐
3	APP5	APX II,III,IV	폐
4	APP5	APX II,III,IV	폐
5	APP5	APX II,III,IV	폐

표 1-30. 분리(확보) 흉막폐렴균의 항생제 감수성 분석 결과

항생제	APP1	APP2	APP5
apramycin	-	-	-
gentamicin	-	++	-
kanamycin	-	-	-
neomycin	-	+	+
spectinomycin	-	-	++
streptomycin	+	-	-
amoxicillin	-	+	-
ampicillin	-	+	-
ceftiofur	-	++	++
cephalexin	++	++	++
colistin	-	++	-
florfenicol	++	++	++
enrofloxacin	-	++	-
flumequine	++	+	++
sulfadiazine	++	+	+
sulfamethoxazole	-	++	-
doxycyclin	-	-	-
oxytetracyclin	++	-	-

(3) 닭 주요 질병 원인체의 특성조사 및 소재 확보

(가) 저병원성 조류인플루엔자 바이러스

- H9N2 표준주 1주(분리년도 1996년)와 전북대에서 가금농장으로부터 분리한 H9N1 및 H1N2 아형의 분리주 2종(분리년도 2011년)을 확보하였음.
- 분리(확보)주에 대한 유전적 특성 분석결과, H9N2 바이러스는 조류 유래의 바이러스로 확인되었으며 기존의 분리된 조류 유래 바이러스와 HA gene은 97~99%의 상동성을 보였고, N2는 99%, PB1은 97~98%, PB2는 98~99%, PA는 98~99%의 상동성을 보였음. 반면, 돼지, 개 및 사람 유래 바이러스와 HA는 84~86%, N2는 85~87%, PB1은 89~91%, PB2는 87~92%, PA는 88~90%의 비교적 낮은 상동성을 보였음(그림 1-21).
- H1N2 바이러스 역시 조류 유래의 바이러스로 확인되었으며 기존의 분리된 조류 유래 바이러스와 HA gene은 97~99%의 상동성을 보였고, N2는 98~99%, PB1은 98~99%, PB2는 98~99%, PA는 96~97%의 상동성을 보였음. 반면, 돼지, 개 및 사람 유래 바이러스와 HA는 76~92%, N2는 88~97%, PB1은 87~94%, PB2는 85~97%, PA는 76~92%의 상동성을 보였음(그림 1-22)

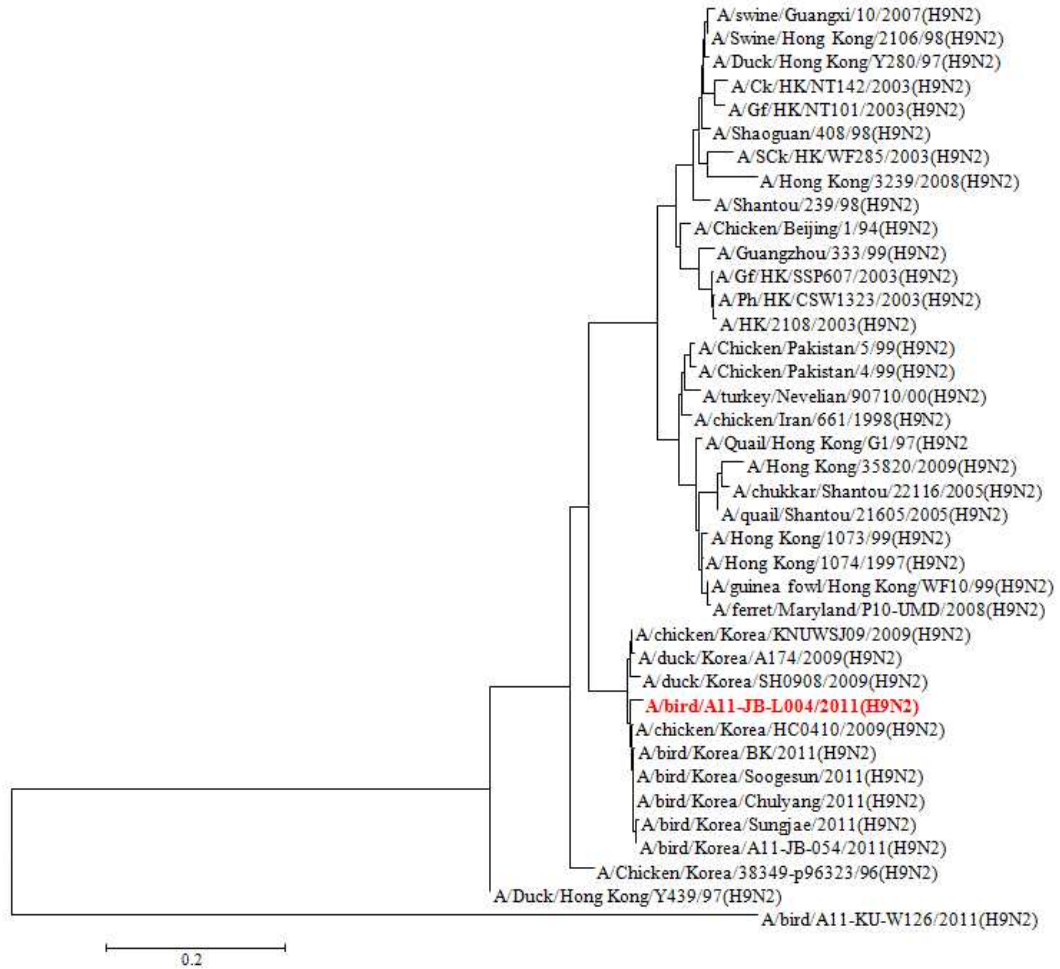


그림 1-21. H9N2 아형 분리주의 HA 유전자 근연관계 분석

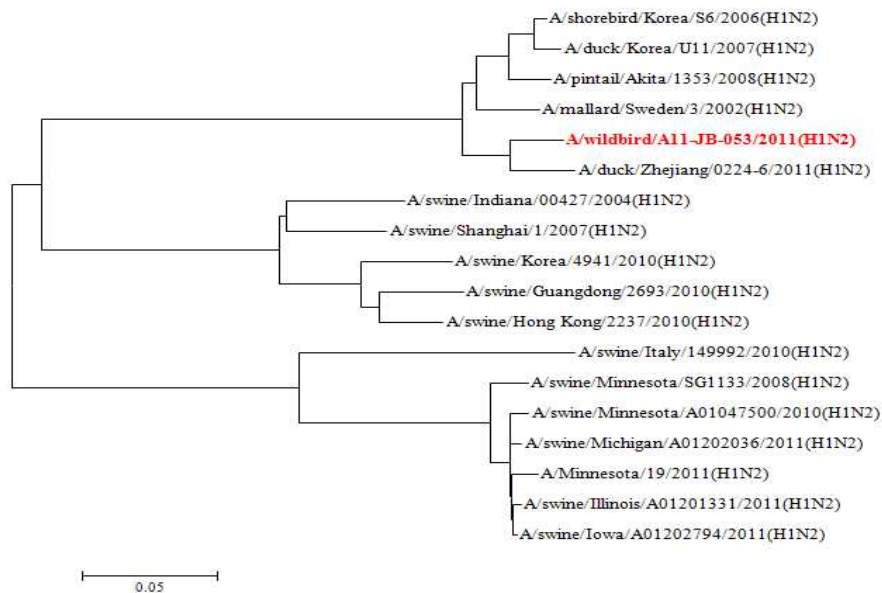


그림 1-22. H1N2 아형 분리주의 HA 유전자 근연관계 분석

(나) 뉴캐슬병 바이러스

- 표준주인 라소타주(LaSota strain) 1주와 2012년도 분리주(A12-HL-015 strain) 1주를 확보하였음.
- 분리(확보)주의 특성 분석을 위하여 NDV 독력과 관련 있는 F0 단백질의 F1/F2 분절부위의 아미노산 서열을 분석하여 분리된 A12-HL-015는 R-R-Q-K-R-F의 다염기성 아미노산 서열을 가지고 있는 것을 확인함.
- 국내 백신주(LaSota주, Ulster2C주, B1주)는 G-K-Q-G-R-L는 동일 부위에서 약독 바이러스의 특징인 단염기성 아미노산 서열을 가지고 있음
- 뉴캐슬병 바이러스는 9개의 대표적인 유전형이 있으며, 이미 알려진 정보를 이용하여 비교분석 하여 A12-HL-015가 계통 분류학상 유전형 VII형에 속함.

(다) 닭 대장균

- 2006년도 분리된 조류 병원성 대장균 표준주 4주(APEC4, APEC5, APEC6 및 APEC7)와 2012년도 설사병 발생 농장으로부터 분리한 야외 분리주 3주(A12-HL-012, A12-HL-023 및 A12-HL-025)를 확보하였으며, 야외 분리 대장균에 대한 항생제 감수성 분석 결과는 표 1-31과 같음.

표 1-31. 닭 병원성 대장균 분리주에 대한 항생제 감수성 분석 결과

항생제	A12-HL-012	A12-HL-023	A12-HL-025
Amikacin	++	++	++
Gentamicin	++	++	-
Kanamycin	+	++	-
Neomycin	+	+	+
Streptomycine	+	-	-
Ceftiofur	+	+	++
Cephalothin	+	-	+
Linco-Spectin	++	++	+
Erythromycin	-	-	-
Tylosin	-	-	-
Ciprofloxacin	++	++	-
Enoxacin	-	-	-
Norfloxacin	++	-	-
Amoxicillin/Clavulanic Acid	+	++	-
Ampicillin	-	++	-
Sulfisoxazole	-	-	-
Doxycyclin	-	++	-
Oxytetracyclin	-	-	-
Tetracycline	-	+	-

(라) 닭 살모넬라균

- 살모넬라증 감염이 의심되는 양계장에서부터 살모넬라균을 분리하여 혈청형을 동정한 결과, *S. Typhimurium* 6주(간장) *S. Enteritidis* 2주(간장) 및 *S. Agona* 1주(소장)가 분리되었으며, 분리 균주에 대한 항생제 감수성 분석결과는 표 1-32과 같음.

표 1-32. 닭 살모넬라 분리균주에 대한 항생제 감수성 분석결과

항생제	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Agona</i>
Amikacin	++	++	++
Gentamicin	++	++	-
Kanamycin	-	++	-
Neomycin	-	++	++
Streptomycine	-	-	-
Ceftiofur	-	+	-
Cephalothin	-	-	-
Linco-Spectin	++	++	++
Erythromycin	-	-	-
Tylosin	-	-	-
Ciprofloxacin	-	-	-
Enoxacin	-	-	-
Norfloxacin	-	-	-
Amoxicillin/Clavulanic Acid	+	-	++
Ampicillin	-	-	-
Sulfisoxazole	-	-	-
Doxycyclin	+	-	-
Oxytetracyclin	-	-	-
Tetracycline	-	-	-

(마) 닭 클로스트리듐균

- 닭 클로스트리듐 표준주 3주[typeA (cpe), typeA (cpb2), typeC(cpb)]와 분리주 2주 (A11-HL-002, A11-HL-053, 분리년도 2011년)를 확보하였으며, 분리균주에 대한 항생제 감수성 분석결과는 표 1-33와

표 1-33. 닭 클로스트리듐 분리주에 대한 항생제 감수성 분석 결과

항생제	A11-HL-002	A11-HL-053
Amikacin	-	+
Gentamicin	-	-
Kanamycin	+	+
Neomycin	-	-
Streptomycine	-	-
Ceftiofur	-	-
Cephalothin	-	-
Linco-Spectin	++	-
Erythromycin	+	+
Tylosin	+	+
Ciprofloxacin	-	-
Enoxacin	-	-
Norfloxacin	-	++
Amoxicillin/Clavulanic Acid	-	-
Ampicillin	++	++
Sulfisoxazole	-	-
Doxycyclin	-	-
Oxytetracyclin	-	-
Tetracycline	-	+

2. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발 (제2세부)

가. 고면역 면역난황제제를 이용한 첨가제 개발

(1) 닭 유래 면역보강분자 선발 유전자 클로닝 및 발현 분석

(가) IgY의 Fc 분자(cFc) 클로닝

- ① 먼저 닭 비장조직으로부터 닭 IgY의 힌지, CH2 및 CH3 도메인에 해당하는 full-length Fc 도메인 유전자를 RT-PCR 기법을 통하여 증폭하고 이 PCR 산물을 pGEM-T vector를 이용하여 클로닝을 실시한 후 염기서열을 분석하여 증폭 되어진 RT-PCR 산물이 닭 Fc 유전자인지를 확인함. 이 클로닝 된 cFc 유전자의 발현을 확인하기 위해 다시 mammalian expression vector인 pcDNA3.1에 subcloning을 실시하여 pBud-cFc plasmid DNA를 확보함

(나) 닭 유래 transferrin receptor(TFR) transmembrane(TM) domain과 결합되어진 재조합 cTFR-cFc 유전자 구축

- ① 닭 Fc 분자의 세포막 발현을 유도하기 위하여 N-말단이 세포질 쪽을 향하고 C-말단이 세포바깥쪽을 향하는 2형 당단백질중 하나인 TFR의 TM 도메인을 활용함. 먼저 닭 신장조직으로부터 TFR의 TM 도메인을 포함하고 있는 N-말단 부분에 해당하는 부분을 RT-PCR 기법을 통하여 증폭하고 이 PCR 산물을 pGEM-T vector를 이용하여 클로닝을 실시한 후 염기서열을 분석하여 증폭 되어진 RT-PCR 산물이 닭 TFR의 TM domain인지를 확인함. 닭 IgY의 Fc 도메인을 코딩하는 유전자의 N-말단에 닭 TFR의 TM 도메인을 코딩하는 유전자를 ligation하고 이를 벡터에 삽입함으로써(TFR TM-cFc) 재조합 단백질의 N-말단에 위치하는 TFR의 TM이 세포막에 고정되고 C-말단에 위치하는 IgY의 Fc 도메인을 구성하는 힌지, CH2 및 CH3 세포 표면에 노출되도록 발현을 유도함(그림 1-23)

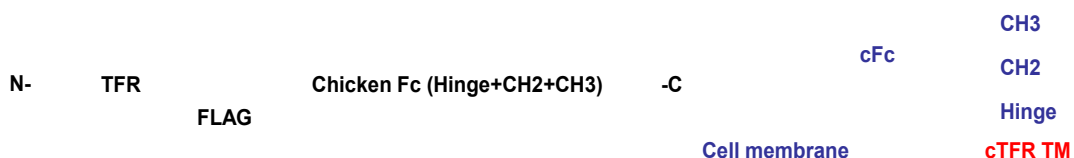


그림 1-23. 재조합 닭 TFR-cFc 재조합 단백질 유전자 모식도 및 세포내 발현 모식도

(다) 재조합 레트로바이러스 제작용 retroviral vector pFB-Neo-cTFR/TM-cFc 구축

- ① 닭 TFR TM-cFc 재조합 단백질 유전자를 지속적으로 세포막 발현하는 세포주를 구축하기 위하여 retroviral gene expression system 적용함. 이를 위해 구축된 재조합 단백질 유전자를 레트로바이러스 벡터인 pFB-Neo plasmid vector에 삽입시켜 pFB-Neo-cTFR/TM-cFc를 제작함(그림 1-24)

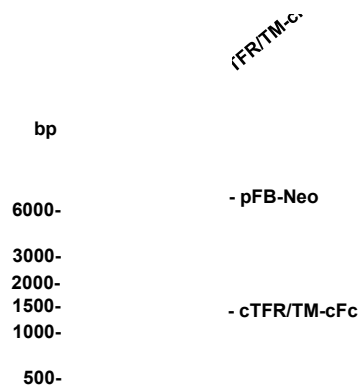


그림 1-24. 레트로바이러스 벡터 내 삽입되어진 닭 TFR TM-cFc 재조합 유전자 전기영동 사진

- (2) 바이러스 고역가 증식능 및 닭 Fc 분자 발현 고면역 축종별 유래 세포주 개발 및 생산 최적화
- (가) PED 바이러스 생산용 Vero-cFc 세포주, PRRS 바이러스 생산용 PAM-pCD163-cFc 세포주 및 BVD 바이러스 생산용 MDBK-cFc 세포주 제작
- ① 닭 TFR TM-cFc를 안정적으로 발현하는 세포주를 구축을 위해 retroviral gene expression system을 활용함(그림 1-25). DNA transfection 기법을 이용하여 pFB-Neo-cTFR/TM-cFc plasmid DNA와 retrovirus 조립에 필요한 각각의 단백질을 발현하는 expression vector들을 HEK-293T 세포에 co-transfection 한 후 cTFR/TM-cFc RNA를 packaging한 retrovirus 입자를 수거함. 이 recombinant retrovirus를 각 타겟 세포주(Vero, PAM-pCD163 및 MDBK)에 접종한 후 neomycin selection을 통하여 cTFR/TM-cFc를 안정적이고 지속적으로 발현하는 세포주들을 클로닝함. 이 확립되어진 세포주들로부터 cTFR/TM-cFc 발현 여부를 먼저 특이 primer를 이용한 RT-PCR를 통하여 확인함. 다음은 단백질 level에서 발현 정도를 확인하기 위해 형광항체법과 western blot을 실시하고 fluorescence-activated cell sorting(FACS) 분석을 이용하여 cFc의 세포 표면 발현 여부를 확인하였고 이들 세포 클론들 중에서 가장 발현 정도가 높은 세포주를 선택하여 배양되고 있으며 향후 생산용으로 활용될 예정임(그림 1-26)

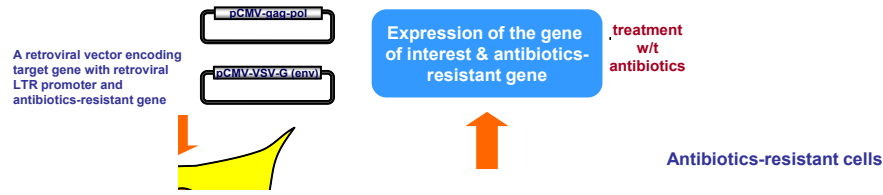


그림 1-25. 레트로바이러스 유전자 발현시스템 모식도

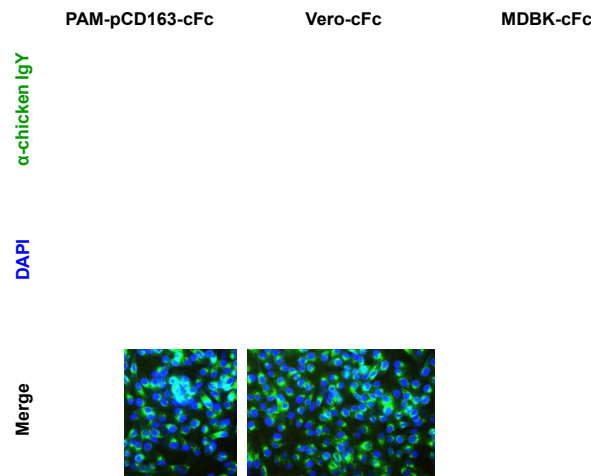


그림 1-26. 구축된 세포주에서 cFc 발현 확인을 위한 형광항체법

(3) 닭 Fc 분자가 포함된 바이러스 유래 재조합 단백질 유전자 클로닝 및 발현 세포주 개발

(가) 고면역 PED 바이러스 단백질 항원 생산용 cFc-tagged 재조합 PED 바이러스 spike 단백질 발현 PK-15 세포주, 고면역 돼지췌코바이러스 단백질 항원 생산용 cFc-tagged 재조합 PCV2b capsid 단백질 발현 PK-15 세포주 및 고면역 소 코로나바이러스 단백질 항원 생산용 cFc-tagged 재조합 소 코로나바이러스 spike 단백질 발현 MDBK 세포주 제작

① 돼지췌코바이러스는 외피 바이러스가 아닌 naked 바이러스 형태이므로 cFc가 장착되어진 바이러스이 제작이 불가능하여 바이러스 단백질 항원 중 가장 면역원성이 뛰어난 ORF2 capsid 단백질 유전자에 cFc가 tagging되어진 재조합 단백질 항원 제작을 시도함. 또한, PED 바이러스와 소 코로나바이러스의 spike(S) 단백질을 subunit항원으로 활용하기 위하여 세포수용체 결합 및 중화항체 유도에 관여하는

S1 도메인에 cFc tagging한 재조합 단백질 유전자를 제작함. 이를 위해 cFc 발현 레트로바이러스 벡터인 pFB-Neo-cTFR/TM-cFc plasmid를 이용하여 PCV2b-ORF2, PEDV-S1 및 BCV-S1 각각을 cTFR/TM-cFc의 N-말단에 DNA cloning 기법을 이용하여 삽입시켜 재조합 fusion 단백질을 코딩한 레트로바이러스 벡터를 제작하여 염기서열을 분석함(그림 1-27). 클로닝 되어진 각각의 바이러스 단백질-cFc를 안정적으로 발현하는 stable cell line의 확립을 위해 retroviral gene expression system을 이용하여 돼지유래 PK-15(PCV2b-ORF2 및 PEDV-S1)와 소 유래 MDBK(BCV-S1) 세포주에 각각의 재조합 유전자 도입을 실시함. 항생제 (Neomycin) 처리에 의해 선택된 각각의 세포 클론(PK-PEDV-S1-cFc, PK-PCV2b-ORF2-cFc 및 MDBK-BCV-S1-cFc)들에서 RT-PCR을 통하여 pCD163 mRNA 발현을 검출함으로써 재조합 유전자가 성공적으로 세포내에 삽입 되었음을 확인함. 각각의 재조합 바이러스 단백질 유전자의 mRNA 발현이 확인된 세포 클론들에서 형광항체법과 western blot을 실시하고 FACS 분석을 통하여 cFc가 tagging되어진 재조합 바이러스 단백질의 발현 여부를 확인하였고 이들 세포 클론들 중에서 가장 발현 정도가 높은 세포주를 선택하여 배양되고 있으며 재조합 단백질 항원 생산용으로 활용될 예정임(그림 1-28)

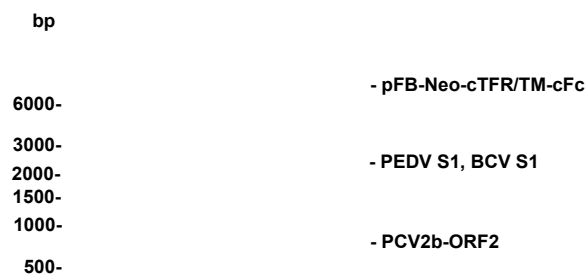


그림 1-27. pFB-Neo-cTFR/TMcFc vector 내 삽입되어진 바이러스 단백질 유전자 전기영동 사진

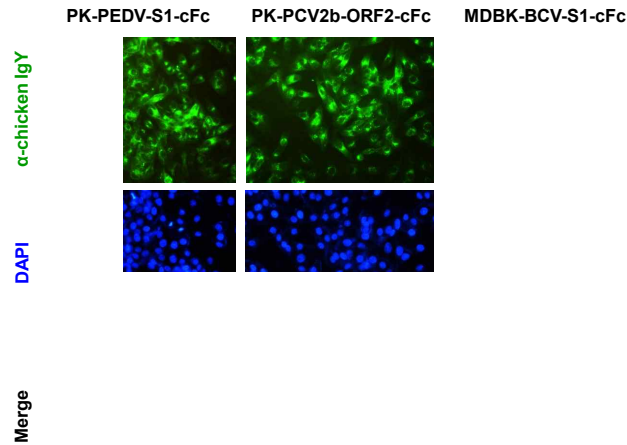


그림 1-28. 구축 세포주에서 cFc-tagged 바이러스 단백질 발현 확인을 위한 형광항체법

나. 면역단백질의 고속, 대량 발현 체계의 개발

(1) 유전자 auto-cloning 시스템의 설계 및 구축 (그림 1-29)

(가) 유전자 auto-cloning 시스템의 설계 및 구축

① auto-cloning 시스템 설계

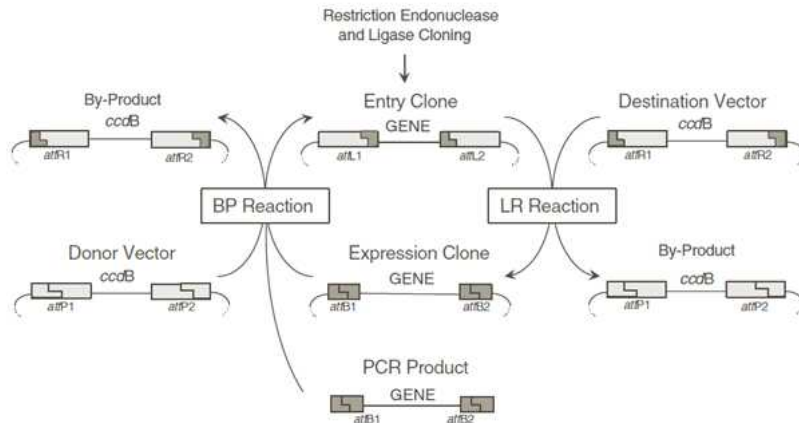


그림 1-29. Site specific recombination을 이용한 auto-cloning 시스템 모식도

㉔ *Vaccinia* DNA topoisomerase, recombinase를 이용, site-specific recombination을 유도하여 효율적인 벡터간 유전자 이동을 시도함. DNA recombinase을 이용한 auto-cloning 시스템은 reading frame과 방향성을 그대로 유지한 상태로 원하는 유전자를 restriction endonuclease와 ligase를 이용하여 효율적으로 옮길 수 있음 (그림 1-30).

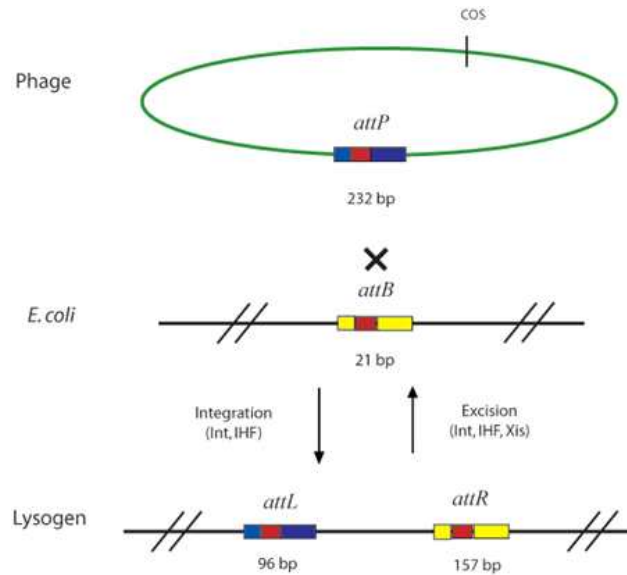


그림 1-30. Site specific recombination of λ phage

㉞ Site specific sequence를 이용한 auto-cloning을 수행함. site-specific recombination은 특정 염기서열에 의해 이루어지는데, bacteriophage λ 가 가지고 있는 *attP* site와 bacteria가 가지고 있는 *attB* site sequence를 이용하여 각 site를 recombinase를 인식하여 각각 *attL*, *attR* site를 만들며 이러한 site는 서로 반응하여 다시 *attP*와 *attB* site를 만들 수 있는 원리를 이용하여 auto-cloning 시스템을 설계하였고 면역단백질 coding gene을 이용한 벡터 construction에 사용함.

② 1차 공여 auto-cloning 시스템 설계

㉞ 1차 클로닝 시스템의 작동 여부를 확인하기 위하여 test용 바이러스 구조 유전자를 이용하여 *attB* PCR product를 생산함. 높은 효율의 1차 auto-cloning 시스템을 작동하기 위해 PCR 수행과정 중 오류가 적고 최적의 증폭 효율을 보이는 PCR polymerase가 요구됨. *Thermococcus kodakaraensis* KOD1의 DNA polymerase gene을 이용하여 Site-directed mutagenesis를 통하여 새로운 DNA polymerase(KOD-M)를 개발함(그림 1-31).

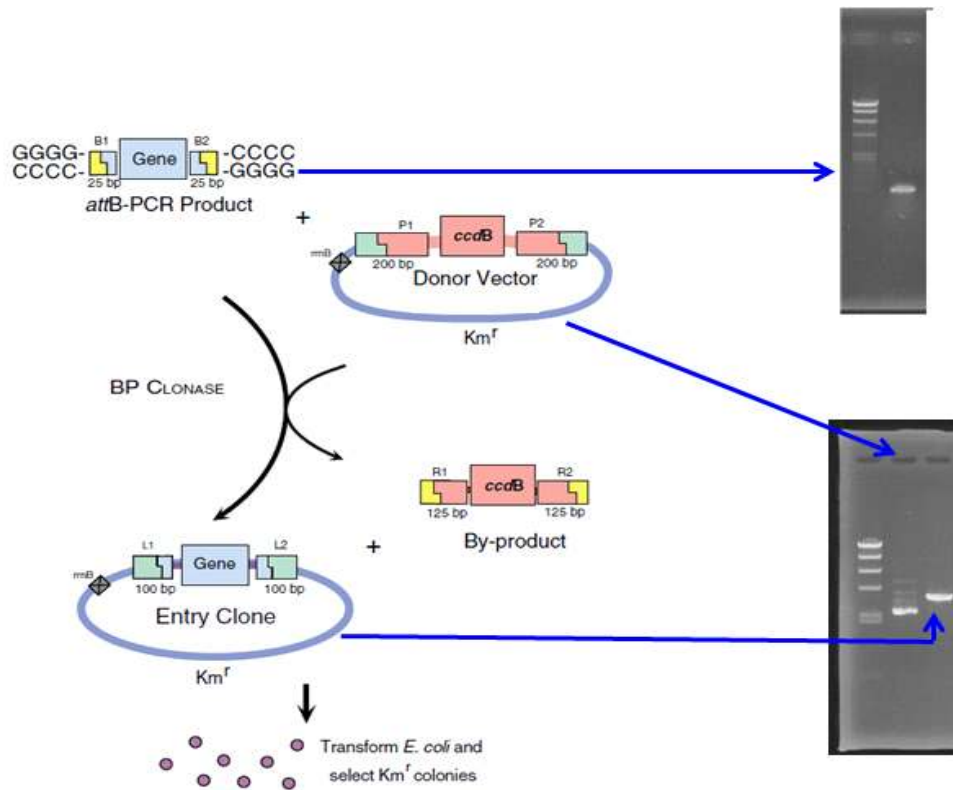


그림 1-31. *attB*, *attP* sequence를 이용한 전기 공여벡터 생산 autocloning system

⊕ KOD-M polymerase는 내열성, 안정성, DNA 증폭효율이 기존의 효소와 대비해 크게 개선됨. 유전자 탐색, 조작 및 효모에서 면역단백질 발현에서 시간과 노력을 단축시킬 수 있는 효율적인 cloning 의 도구로 작용하였음(그림 1-32).

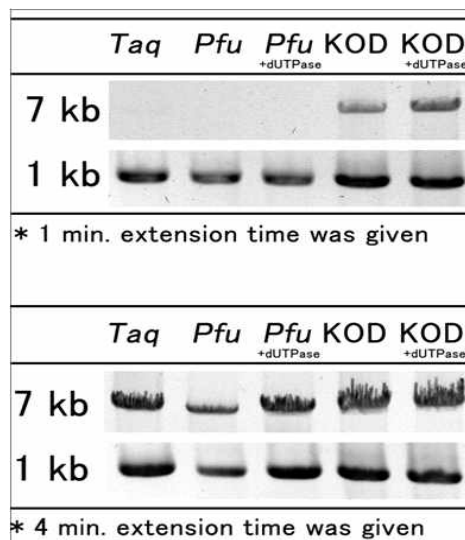


그림 1-32. 고속 발현용 DNA polymerase(KOD-M)의 특징. 0.25U의 KOD-M과 1U의 *Pyrococcus kandleri* dUTPase 사용

- ㉔ 바이러스 구조 유전자를 이용한 1차 auto-cloning 시스템의 작동 여부를 확인한 결과, PCR을 통한 *attB*의 tagging과 topoisomerase에 의한 유전자간 recombination을 확인함.
- ③ 2차 유전자 발현 auto-cloning 시스템 설계
 - ㉔ 2차 auto-cloning 시스템(expression vector cloning) 구축을 위하여 대장균 vector를 이용하여 6종의 expression vector를 제작함. 단백질 발현효율 및 용해성, 활성 증가를 위해 N, C-terminal 에 histidine, MBP tag를 결합시켜 다종의 발현 vector system을 구축(그림 1-33).

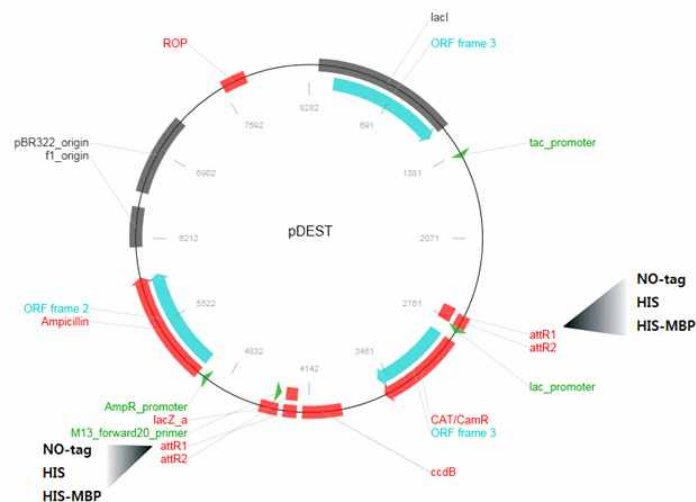


그림 1-33. 대장균 발현용 auto-cloning/expression vector 개발

(2) 면역단백질 발현용 host 효모 균주 및 면역단백질 발현 확인의 방법 구축

(가) 효모용 auto-cloning/expression 시스템의 설계 및 구축

- ① 면역 단백질 발현용 효모균주의 확보
 - ㉔ 효율적인 발현이 유도되는 것으로 알려진 2종의 *S. cerevisiae*와 *P.pastoris* 발현 균주를 확보함 (표 1-34).

표 1-34. auto-cloning 시스템 적용 host 효모균주

Strains	Relevant characteristics	Source
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> BJ5464	<i>ura3-52 trp1 leu2D1 hisD200 pep4</i>	ATCC
<i>P. pastoris</i> X-33	wild-type(Mut ⁺)	Invitrogen

- ㉔ *S. cerevisiae* 2차 발현용 auto-cloning vector를 제작하기 위하여 *attB* Site specific sequence를 적용하고 2종의 promoter와 7종의 표지인자, 4종의 selection maker를 이용하여 288종의 expression vector를 구축함(그림 1-34).

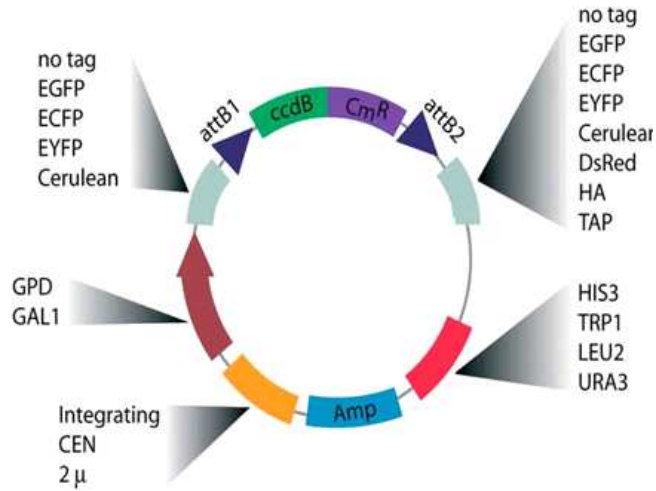


그림 1-34. 228종의 *S. cerevisiae* auto-cloning expression vector

㉔ *Pichia pastoris* 2차 발현 auto-cloning vector를 제작하기 위하여 pPICZ (invitrogen) vector에 attB Site specific sequence를 적용하여 expression vector를 제작하였고 다양한 tagging과 marker를 이용하여 다종의 expression vector를 구축(그림 1-35).

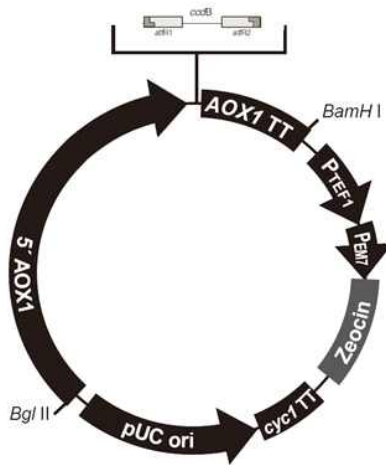


그림 1-35. pPICZ vector를 이용한 *P. pastoris* auto-cloning expression vector

㉔ 효모 균주에서 재조합 면역 단백질 발현을 확인하기 위하여 Western blotting을 이용하여 단백질 발현을 확인함. 대장균에 비해 재조합 유전자의 발현량이 적을 것을 감안하여 최소 발현량이 1 pmol 이상일 때 원하는 단백질을 확인할 수 있도록 실험법을 확립함. 향후 다양한 종류의 면역단백질 유전자를 발현하고 확인하는데 사용하였음(그림 1-36).

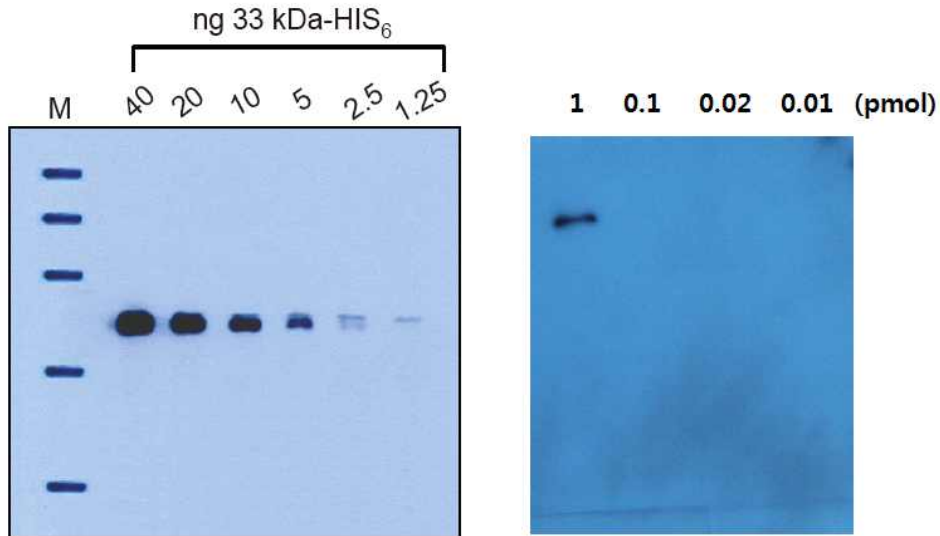


그림 1-36. Western blotting을 이용한 면역단백질 발현 확인 및 정량

3. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립 (제1협동)

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 리소좀 분리 기술 확보와 동물모델에 적용하기 위한 리소좀 스크리닝 및 리소좀과 퍼옥시좀 분리기술 개발

(가) 진핵생물 내에 존재하는 순수한 리소좀 분리 기술 개발

① 리소좀 추출을 위한 진핵생물 선택

㉞ 진핵미생물인 효모를 이용한 리소좀 분리 기술

- 빵과 술 제조에 많이 쓰이는 유용 효모로 알려진 *S. cerevisiae*를 선택함
- *S. cerevisiae*의 경우, 일상에서 많이 쓰이는 균주로 독성이 나타나지 않아 사용하기 안전하며, 외부에서 자극을 주어 리소좀의 활성을 조절할 수 있다는 장점이 있음.

㉟ 진핵생물인 동물세포를 이용한 리소좀 분리 기술

- 동물세포로는 암세포의 한 종류인 HeLa cell 을 선택함.
- 암세포의 경우, 불멸의 세포로 오랫동안 살아 있고 성장속도가 빨라 계속적으로 리소좀을 추출하는데 있어서 경제적이며, 진핵미생물에 비해 더 많은 효소를 포함하고 있어 효과가 좋음.
- *S. cerevisiae*와 HeLa cell에서 리소좀을 분리 시, 세포 외벽을 깬 후 원심분리법을 이용하여 리소좀 분리함(그림 1-37).

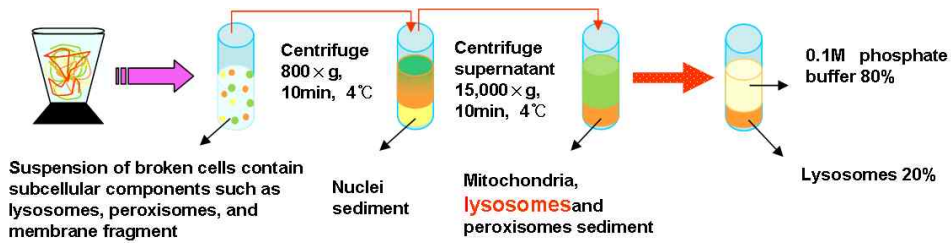


그림 1-37. 세포 소기관인 리소좀의 분리 방법

(나) 분리된 리소좀의 유해세균 처리 능력 평가

① 대장균을 이용한 리소좀의 항균성 기능 조건 확립

- *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀의 유해세균 처리능력을 검증하기 위하여 대장균을 이용함

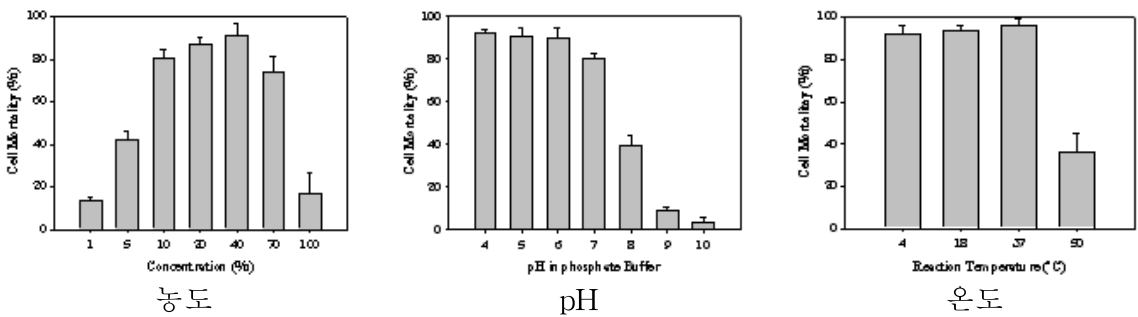


그림 1-38. *S. cerevisiae*에서 분리된 리소좀의 항균

- 리소좀의 활성 조건을 확립하기 위하여 리소좀의 농도, 용매의 pH, 리소좀의 활성온도를 확인한 결과, 40%의 농도에서 활성이 가장 높게 나타났으며 pH4-7로 산성뿐만 아니라 중성에서도 항균활성이 나타남. 또한 50°C 이상을 제외한 넓은 범위의 온도에서 활성이 높게 나타남을 확인함(그림 1-38)

② 리소좀의 유해세균 처리기능 검증

- 유해세균 처리 기능 검증을 위해 그람 음성/양성균과 진핵 미생물을 이용하여 항균 활성을 검증한 결과, 포자를 형성하는 *Streptomyces albus*를 제외한 대부분의 미생물에서 높은 항균활성이 나타남을 확인함(그림 1-39).

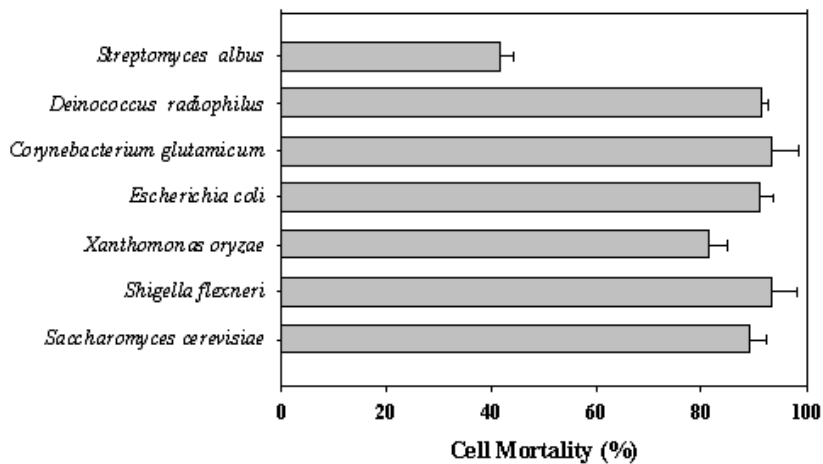


그림 1-39. 리소좀의 유해세균 처리기능 검증

③ 용매의 pH에 따른 리소좀의 이미지 분석

- *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀이 용매의 pH에 따라 제형 변화를 확인하고자 하였으며, 그 결과 pH4와 6에서는 리소좀의 모양을 잘 유지하고 있었으나 염기성인 pH10에서는 리소좀의 제형을 잃고 aggregation 된 형태로 존재함을 확인함. 따라서 리소좀의 제형 변화로 인하여 리소좀의 활성이 감소됨을 확인함(그림 1-40)

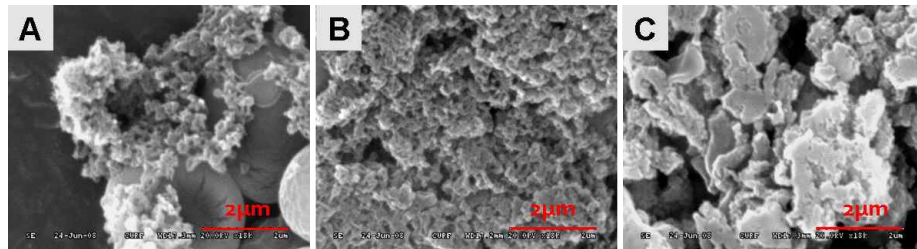


그림 1-40. *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀의 pH에 따른 SEM 이미지
[A:pH4.0, B: pH6.0, C: pH10.0]

④ 산화적 스트레스에 의한 리소좀의 활성 변화 분석

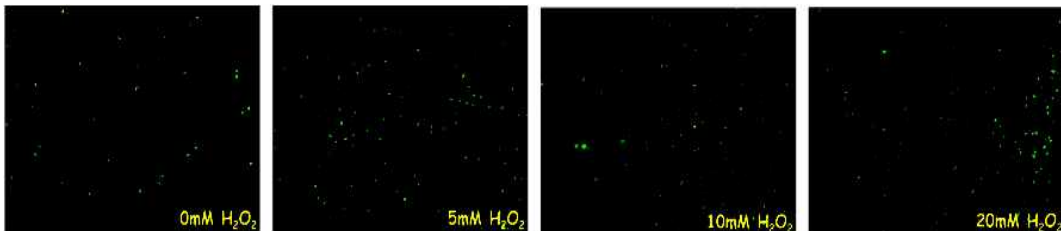


그림 1-41. *S. cerevisiae*에 H₂O₂를 처리한 후 LysoTracker를 통한 리소좀 내의 효소들의 활성분석

- *S. cerevisiae*에 H₂O₂를 처리하여 리소좀 내의 효소들을 활성화 시킨 후, 리소좀을 추출하여 유해세균에 대한 처리 능력을 확인한 결과, 리소좀 내의 유용효소들의 평균 활성이 향상됨을 확인하였고(그림 1-41), 이러한 결과는 표 1-35에 정리된 바와 같이 세균 처리 능력의 향상으로 관찰되었음. 특히 평균활성이 낮게 나타났던 *S. albus*의 경우 약 2배 정도 증가함을 확인함.

표 1-35. 정상 리소좀과 활성화 시킨 리소좀의 항균성 비교

Strain	Cell mortality of normal lysosomes (%)	Cell mortality of H ₂ O ₂ treated lysosomes (%)	Cell mortality ratio
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89.12	90.10	1.00 : 1.01
<i>Deinococcus radiophilus</i>	93.45	93.47	1.00 : 1.00
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	81.40	85.10	1.00 : 1.05
<i>Escherichia coli</i>	90.94	92.20	1.00 : 1.01
<i>Xanthomonas oryzae</i>	93.27	93.34	1.00 : 1.01
<i>Shigella flexneri</i>	91.21	95.67	1.00 : 1.05
<i>Streptomyces albus</i>	41.64	76.33	100 : 1.83

(다) 리소좀과 퍼옥시좀 기능 분리 기술 개발

- 세포 소기관인 리소좀과 퍼옥시좀은 크기가 비슷하여 소기관 분리 시 같은 분리층에 속하게 되어 잘 분리되지 않음. 본 연구에서 쓰인 리소좀의 경우 퍼옥시좀과 분리되지 않고 같이 존재하여 리소좀 또는 퍼옥시좀의 각각의 기능만이 아닌 두 소기관의 기능이 함께 작용하여, 리소좀과 퍼옥시좀의 기능이 섞여 나타남. 따라서 본 연구에서는 리소좀과 퍼옥시좀의 기능을 분리하는 기술을 확립하고자 하였음.

① 여러 가지 화학물질에 대한 리소좀과 퍼옥시좀의 활성 비교분석

- 동물세포에 화학물질을 처리하여 리소좀과 퍼옥시좀의 활성이 변화하는지 확인해 보고자 하였음. 선택한 화학물질은 리소좀을 활성화 시킨다고 알려진 것, 억제시키는 것과 퍼옥시좀의 활성을 억제하는 것이고 그에 따른 리소좀과 퍼옥시좀의 활성이 변화됨을 관찰하였음.
- 그 결과, 10mM salicylic acid, 200 μ M 6-hydroxydopamine, 200 μ M hydrogen peroxide를 처리한 경우 리소좀의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 10 μ M rolipram과 10mM ammonium chloride를 처리한 경우에는 리소좀의 활성이 저해됨을 확인함. 그러나 퍼옥시좀의 경우, 10mM salicylic acid에서는 감소하는 경향을 보였고, 200 μ M hydrogen peroxide에서는 증가하는 경향을 보였으며 0 μ M rolipram과 10mM ammonium chloride에서는 변화가 없었음(그림 1-42, 표 1-36).
- 따라서 리소좀의 활성만 증대되고, 퍼옥시좀의 기능을 억제시키는 10mM salicylic acid의 경우, 리소좀의 활성을 알아볼 수 있는 좋은 조건인 반면, 0.1mM phenylhydrazine과 1mM sodium azide의 경우는 리소좀의 활성에는 변화가 없지만 퍼옥시좀의 활성이 감소하였음.

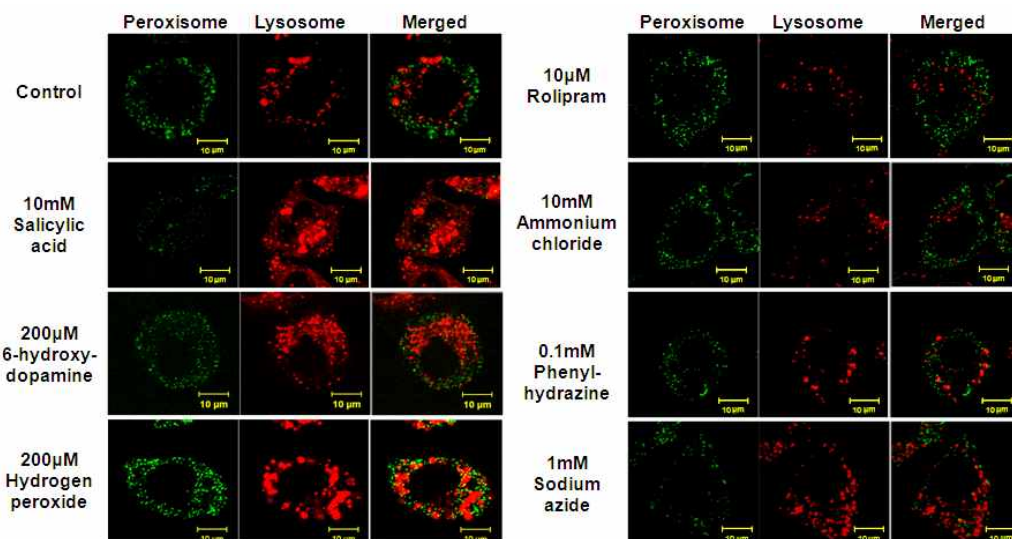


그림 1-42. Confocal microscope를 이용한 여러 가지 화학물질에 대한 리소좀과 퍼옥시좀의 활성분석

표 1-36. 여러 가지 화학물질에 따른 리소솜과 퍼옥시솜의 활성 비교 분석

Chemicals	Lysosomal intensity (Ratio expression)	Peroxisomal intensity (Ratio expression)
control	1	1
10 mM Salicylic acid	5.6	1.3
200 μ M 6-hydroxydopamine	2.3	1.1
200 μ M Hydrogen peroxide	2.7	1.3
10 μ M Rolipram	0.3	1.2
10 mM Ammonium chloride	0.2	1.1
0.1 mM Phenylhydrazine	1.1	0.5
1 mM Sodium azide	0.8	0.4

② 여러 가지 화학물질에 대한 리소솜의 항균활성 비교분석

- 동물세포에 화학물질을 처리하여 리소솜과 퍼옥시솜의 활성을 변화 시킨 후, 각각의 동물세포에서 리소솜을 추출하여 대장균에 그에 대한 항균활성을 확인한 결과, 리소솜의 활성이 증가하였던 10mM salicylic acid, 200 μ M 6-hydroxydopamine, 200 μ M hydrogen peroxide에서 항균활성이 증가함을 확인하였고, 특히 리소솜과 퍼옥시솜의 활성이 함께 증가하였던 200 μ M hydrogen peroxide에서 가장 높게 나타남.
- 또한, 리소솜의 활성이 감소하였던 10 μ M rolipram과 10mM ammonium chloride에서 항균활성이 가장 낮게 나타났으며, 리소솜의 변화는 없었지만 퍼옥시솜의 활성이 감소하였던 0.1mM phenylhydrazine과 1mM sodium azide의 경우, 대조군에 비해 약간 감소함을 확인함(그림 1-43).
- 따라서 항균활성을 나타내는 소기관은 리소솜임을 확인함과 동시에 리소솜의 독립된 기능에 비해 퍼옥시솜이 활성화 되었을 때 같이 작용함을 확인함.

③ 여러 가지 화학물질에 대한 리소솜의 항암활성 비교분석

- 리소솜의 또 다른 기능인 항암효과에도 어떠한 변화가 있는지 확인해 보기 위하여 암세포인 HeLa cell에 각각의 조건에서 추출한 리소솜을 처리하여 본 결과, 항암 효과와 같이 리소솜의 활성화 되었던 10mM salicylic acid, 200 μ M 6-hydroxydopamine, 200 μ M hydrogen peroxide에서 항암효과가 가장 좋았으며, 반면 리소솜의 활성이 감소하거나 퍼옥시솜의 활성이 감소한 경우는 항암활성이 나타나지 않으며, 오히려 그 효과가 저하되는 것을 확인함(그림 1-44).

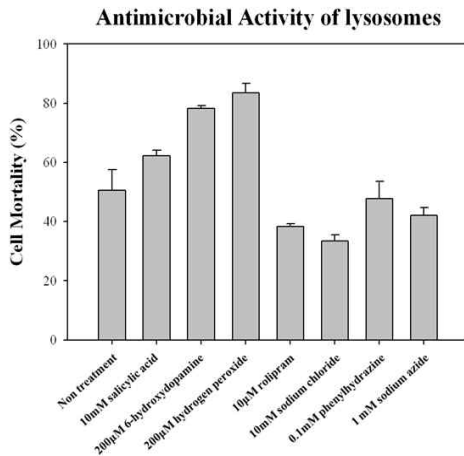


그림 1-43. 리소좀의 항균활성 분석

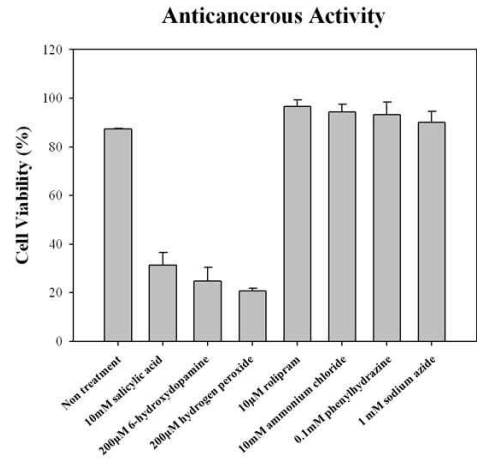


그림 1-44. 리소좀의 항암활성 분석

④ 여러 가지 화학물질에 대한 퍼옥시좀의 멜라닌 분해효율 분석

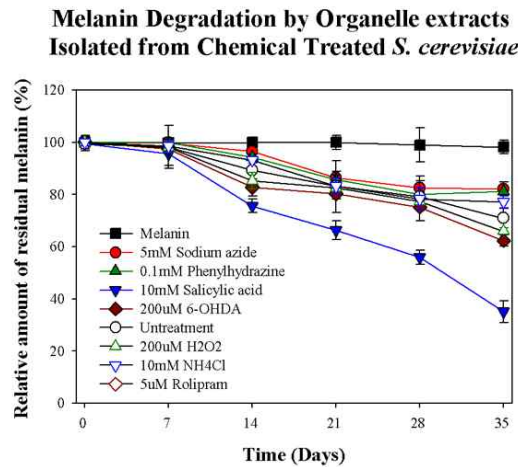


그림 1-45. 여러 조건에서 추출한 퍼옥시좀의 멜라닌 분해 효율 분석

- 리소좀과 퍼옥시좀 추출물에 의해 멜라닌이 분해됨을 확인하였고, 그 기능이 퍼옥시좀과 리소좀 중 어느 소기관의 기능인지 확인하기 위하여 각각의 조건에서 추출한 소기관의 효소를 이용하여 멜라닌의 분해 효율 변화를 확인함.
- 그 결과, 리소좀의 활성이 좋았던 10mM salicylic acid에서 멜라닌 분해 효율이 가장 좋았으며 퍼옥시좀의 활성이 감소되었던 조건에서는 대조군에 비하여 그 분해효율이 감소함을 확인함(그림 1-45).
- 따라서, 멜라닌 분해 시 리소좀과 퍼옥시좀은 두 가지가 복합적으로 작용함을 인해 그 효율이 증대되는 것으로 확인됨.

⑤ 여러 가지 화학물질에 대한 산화적 스트레스 분석

- 리소좀과 퍼옥시좀의 활성이 산화적 스트레스와 관계가 있는지 확인하기 위하여 DCF-DA를 이용하여 각각의 조건에서 동물세포 내의 산화적 스트레스 정도를 확인함
- 그 결과 리소좀의 활성이 증가하였던 조건에서 산화적 스트레스가 높게 나타남을 확인하였고, 퍼옥시좀의 활성과는 별다른 관계가 없음을 확인함. 즉, 산화적 스트레스에 의해 리소좀의 활성이 증가됨을 확인함.

⑥ 시간에 따른 리소좀의 ROS 변화 분석

- 리소좀의 활성이 가장 높았던 10mM salicylic acid를 처리하였을 때 리소좀의 활성이 언제 증대되는지 확인해 보기 위하여 10mM salicylic acid를 시간별로 처리한 후, ROS의 변화를 확인함.
- 그 결과, 10mM salicylic acid 처리 6시간 후부터 세포 전체에 ROS가 나타나기 시작했으며, 12시간 후부터 세포소기관인 리소좀 내에서 진하게 발생했으며, 24시간 후에는 리소좀 내에서만 ROS가 진하게 나타남을 확인함.
- 10mM salicylic acid처리 후 24시간 정도 되었을 때, 리소좀에서 ROS가 발생하면서 리소좀의 활성이 증대됨을 확인함. 따라서 화학물질 처리 후 리소좀 추출시 24시간 처리하는 것이 적당함을 확인함(그림 1-46).

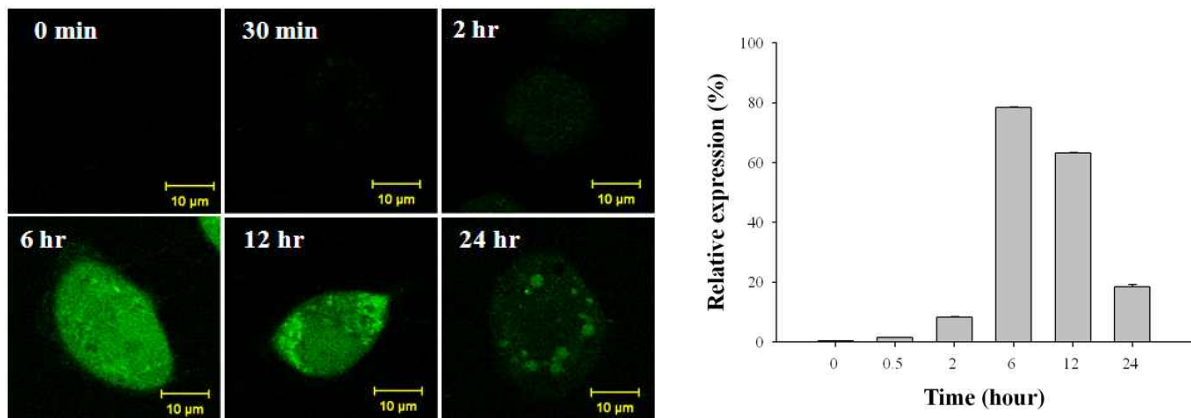


그림 1-46. Salicylic acid 처리 시 시간에 따른 리소좀의 ROS 측정

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 항바이러스 활성소재의 탐색을 위한 천연물 소재의 확보 및 추출물 제조

(가) 농산소재의 확보 및 메탄올 추출물의 제조

- 항바이러스 활성 천연소재의 탐색을 위하여 수급이 용이한 농산소재를 우선적으로 선별하여 확보하였다. 대파, 시금치, 미나리, 냉이, 쪽파, 무, 도라지, 고추, 모과, 쪽갓, 꿀, 배추, 당근, 양파 등의 14종의 농산물을 구매하여 메탄올로 추출한 후 감압 농축하여 10 mg/ml의 농도로 메탄올 추출물을 제조하였음(그림 1-47).



그림 1-47. 수급이 용이한 농산소재 추출물의 제조

(나) 식물 추출물의 확보

- 식물 추출물을 대상으로 항바이러스 활성 천연소재의 탐색을 위하여 충남대학교 약학대학으로부터 분양받은 자생식물 및 약용식물 추출물 약 3,200 여점(그림 2)에 대하여 스크리닝을 수행하였음(그림 1-48).



그림 1-48. 항바이러스 활성검정을 위한 자생식물 추출물 라이브러리의 확보

(다) 자생 균류 자원의 확보

- 덕유산, 용문산, 오대산 등에서 채취한 410 여종의 자생균류 추출물을 메탄올로 추출하여 100 µg/mL의 농도로 제조한 후 neuraminidase 저해제의 스크리닝에 활용하였음(그림 1-49).



그림 1-49. 자생 균류 자원 추출물 라이브러리

(라) 목질진흠버섯 균주의 확보 및 목질진흠버섯 균주 배양 산업부산물의 확보

- 목질진흠버섯 균사체 배양물이 항바이러스 활성을 나타내어 본 연구에서는 농촌진흥청 및 한국농수산대학으로부터 2종의 목질진흠버섯 균주를 분양받아 배양한 후

배양추출물을 제조하였음(그림 1-50). 또한 목질진흙버섯 균사체 배양액은 면역력을 향상시키는 항암보조제인 목질진흙버섯 다당체를 생산한 후 버려지는 산업부산물로 현재 환인제약 등에서 생산 판매하고 있음. 따라서 본 연구에서는 환인제약으로부터 산업부산물인 목질진흙버섯 균사체 배양액을 확보하여 neuraminidase 저해제 탐색을 위한 자원으로 활용하였음(그림 1-51).



농진생 목질진흙버섯 균주



안농대 목질진흙버섯 균주

그림 1-50. 항바이러스 활성검정을 위한 목질진흙버섯 균주

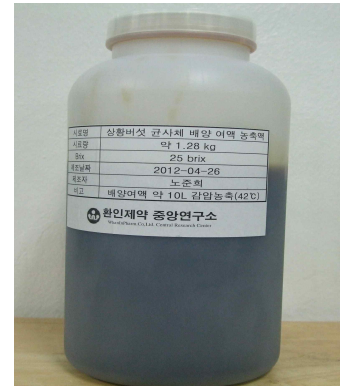


그림 1-51. 목질진흙버섯 산업 부산물의 확보

(2) 산업부산물 목질진흙버섯 배양액으로부터 neuraminidase 저해 물질의 정제, 화학구조 및 생물활성. 상황버섯 유래 다당체는 제약산업에서 면역세포를 활성화시키는 항암보조제로 개발되어 시판되고 있음. 제약회사의 경우 다당체를 확보하기 위하여 상황버섯 균주를 대량 배양한 후 배양액은 버리고 균사만을 취하여 이로부터 다당체를 추출하여 활용하고 있음. 만일 진흙버섯 균주배양액이 neuraminidase 저해활성성분을 함유한다면 버려지는 산업부산물을 사료첨가제로 활용할 수 있을 것으로 판단되었음. 따라서 목질진흙버섯 다당체를 생산하여 판매하는 환인제약으로부터 버려지는 산업부산물인 목질진흙버섯 배양여액을 제공받아 이로부터 활성성분을 분리 정제하고, 화학구조를 규명한 후 생물활성을 평가하였음.

(가) 산업부산물 목질진흙버섯 배양액 유래 neuraminidase 저해물질의 분리 및 정제

- 환인제약으로부터 공급받은 배양액 10 L를 1 L로 농축한 후 여기에 동량의 ethyl acetate를 넣어 분배 추출한 후 ethyl acetate 분획을 감압 농축하였음. 농축된 ethyl acetate 분획은 70% aqueous methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였으며, 활성분획은 다시 70% aqueous methanol을 이용하여 reversed-phase TLC를 이용하여 2종의 활성화합물 compound 1 및 compound 2를 분리, 정제하였음(그림 1-52).

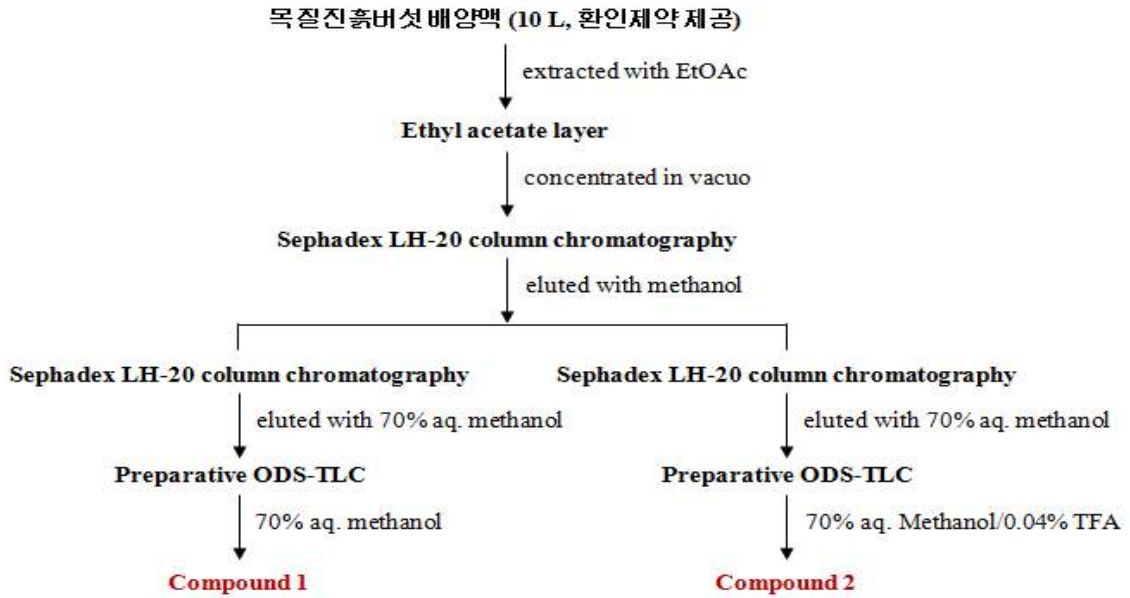


그림 1-52. 목질진흙버섯 배양액으로부터 neuraminidase 저해 물질의 정제

(나) 산업부산물 목질진흙버섯 배양액으로부터 분리한 compound 1 및 2의 화학구조
 - 산업부산물 목질진흙버섯 배양액으로부터 정제한 화합물의 화학구조를 규명하기 위하여 목질진흙버섯에서 보고된 화합물을 대상으로 HPLC로 비교분석한 결과, compound 1은 hispidin과, compound 2는 hypholomine B와 동일한 HPLC retention time을 나타내었음(그림 1-53). 따라서 활성성분을 hispidin과 hypholomine B로 규명하였음.

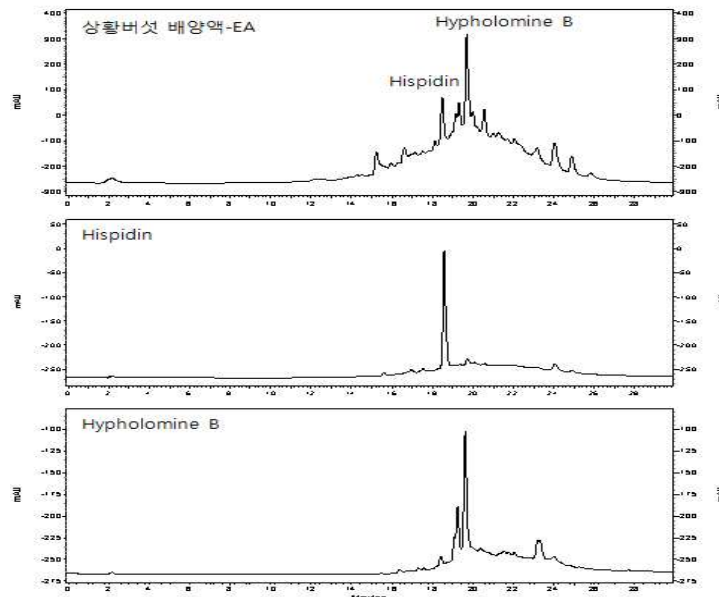


그림 1-53. 산업부산물 목질진흙버섯 배양액으로부터 분리한 활성물질의 HPLC retention time의 비교. compound 1은 hispidin, compound 2는 hypholomine B와 일치함.

(다) 산업부산물 목질진흙버섯 배양액으로부터 분리한 compound 1 및 compound 2의 neuraminidase 저해 활성

- 환인제약으로부터 공급받은 목질진흙버섯 배양 부산물로부터 정제한 compound 1 및 compound 2의 neuraminidase 저해 활성을 측정하였음. 그 결과 compound 1은 13.1 μM 에서, compound 2는 0.03 μM 에서 IC50 값을 나타내었다(그림 1-54). 특히 compound 2는 강력하게 neuraminidase 저해 활성을 나타내어 목질진흙버섯 배양액에서 나타내는 저해활성의 주요 원인으로 나타났음.

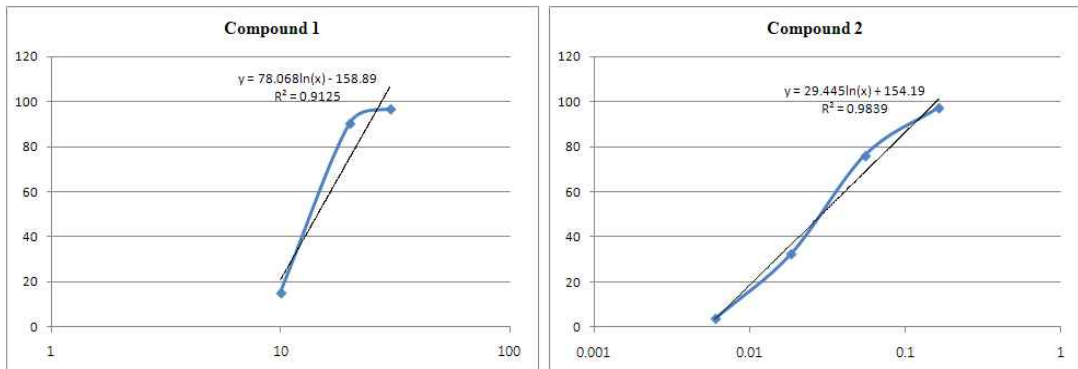


그림 1-54. 정제한 활성물질 compound 1 및 2의 neuraminidase 저해 활성

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) 식물바이러스의 탐색 (그림 1-55)

- 식물바이러스를 이용한 유용 단백질을 발현하기 위한 많은 viral vector들이 개발되어 있지만 특허를 회피하여 산업화를 진행시키기 위하여 새로운 viral vector이 개발되어야 함. 그 선결 조건으로 신규 바이러스를 확보가 필요하기 때문에 바이러스 감염증상을 보이는 식물을 수집하여 PCR을 이용하여 감염여부를 확인하였음.
- 바이러스 감염증상을 보이는 식물을 수집하여 PCR을 이용하여 감염여부를 확인한 결과, *Soybean mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Potato leafroll virus*, *Barley dwarf virus*, *Pulm pox virus*, *Pepper cryptic virus*의 7개의 바이러스가 확인되었고 많은 식물이 비록 전형적인 바이러스 감염 증상을 보이더라도 바이러스가 검출되지 않았음. 이는 2가지의 경우로 생각 할 수 있는데 식물의 생리장애와 바이러스 감염증상이 유사한 결과일 수 있으며, 다른 가능성은 비록 바이러스가 정말로 감염이 되었다 하더라도 아직까지 밝혀지지 않아 정보가 부족한 미지의 바이러스에 감염되었을 경우임.





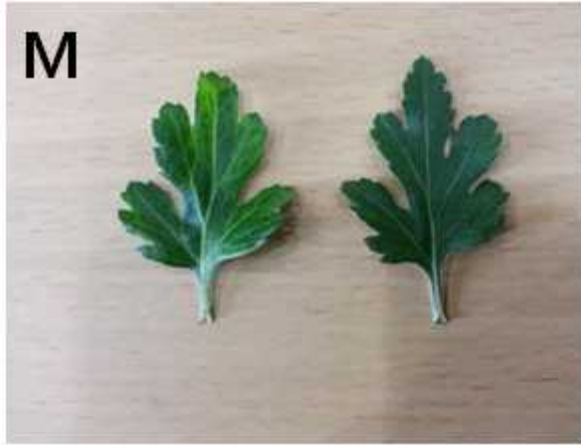


그림 1-55. 바이러스 감염 증상을 보이는 식물

A) *Soybean mosaic virus* 감염 강낭콩, B) 바이러스감염 증상을 보이는 마(바이러스 확인 안 됨), C) *Cucumber mosaic virus* 감염 고추, D) *Watermelon mosaic virus* 감염 수박, E) 바이러스 감염증상을 보이는 환삼덩쿨(확인 안 됨), F) 바이러스 감염증상을 보이는 우영(확인 안 됨), G) *Potato leafroll virus* 감염 감자, H) 바이러스 감염증상을 보이는 곰보배추(확인 안 됨), I) *Barley dwarf virus* 감염 보리, J) 바이러스 감염증상을 보이는 오가피(확인 안 됨), K) *Cucumber mosaic virus* 감염 오이, L) 바이러스 감염증상을 보이는 이팝나무(확인 안 됨), M) 바이러스 감염증상을 보이는 국화(확인 안 됨), N) 바이러스 감염증상을 보이는 들깨(확인 안 됨), O) 바이러스 감염증상을 보이는 달개비(확인 안 됨), P) *Pulm pox virus* 감염 자두, Q) *Pepper cryptic virus* 감염 고추

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

(1) 실험실적 평가기법 확립

(가) 효능 범위(항균성, 항바이러스성, 면역증강제)에 따른 실험실적 평가기법 확립

- 신소재 물질의 효능평가는 그림 1-56과 같은 흐름으로 진행되었으며, 효능평가를 위한 각각 검사의 세부 내용은 아래와 같음.



그림 1-56. 신소재 물질의 평가 절차 흐름도

① 항균 효능평가

- 항균 효능평가를 수행하기 위해 각 축종별 표준 세균을 선정함. 축종간 공통 세균인 *E. coli*, *Salmonella typhimurium* 와 축종별로 특이 세균인 *C. perfringens*(닭), APP(돼지)를 추가 선정함.

㉞ *E. coli*, *Salmonella typhimurium* 평가기법

- 세균 배양 : *E. coli*, *Salmonella typhimurium*을 일반세균 배지를 이용하여 배양함. 초콜릿 배지에 접종하여 colony forming unit(CFU/ml)을 측정하고, 세균수가 1000CFU/ml이 되도록 PBS에 희석하여 검사에 사용함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 PBS를 사용하여 80µg/ml로 재차 희석하고, 희석한 물질을 PBS를 사용하여 24-well plate에서 총량이 0.5ml이 되도록 2배수 연속 희석하여 40, 20, 10, 5, 2.5µg/ml까지 희석하여 검사하였음. 이때 2.5µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시하였음.
- 물질의 반응 : 위에서 배양한 세균액 500µl를 희석한 동량의 물질에 혼합한 다음 4°C에서 30분간 배양함. 세균액 대신에 PBS 500µl를 접종한 음성대조군과 검사물질이 포함되지 않은 PBS에 세균액을 접종한 양성대조군을 같은 방법으로 준비함.

- 세균의 증식여부 판정 : 물질의 반응 후 혼합액 200 μ l을 초콜릿 배지에 도말하여 37°C, 5% CO²조건에서 24시간 동안 배양함. 배양 후 배지의 colony 개수를 세고 양성대조군과 비교하여 물질 처리군의 세균 증식의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 하였음.

㉞ *C. perfringens* 평가기법

- 닭의 주요 세균성 질병의 원인균 *C. perfringens* 대해 생장을 저해하는 신소재를 평가하기 위한 실험실적 효능평가기법을 확립함. 실험실적 효능평가기법은 paper disc법을 적용하여 양성대조군으로 사용할 항생제들을 설정함. *C. perfringens*는 *C. perfringens* Base에 배양하여, 각 세균 배양액의 흡광도를 측정하여 OD 1.0이 되도록 설정함. *C. perfringens*는 schaedler agar 배지에 위 배양액 200 μ l씩 도말하였음. 세균들이 도말된 배지에 19종의 항생제 disc를 올려놓고, 37°C에서 24시간 배양한 후 형성되는 투명환을 관찰하여, 양성대조군으로 사용할 항생제들의 종류와 농도를 설정하였음. 각 세균에 작용하는 항생제들의 종류와 농도를 상, 중, 하로 분류하였으며, Amicillin 10 μ g에서 직경 3cm의 투명환이 형성되었고, Erythromycin 15 μ g과 Kanamycin 30 μ g에서 각각 직경 2cm와 0.9cm의 투명환이 형성됨을 확인하였음(그림 1-57).

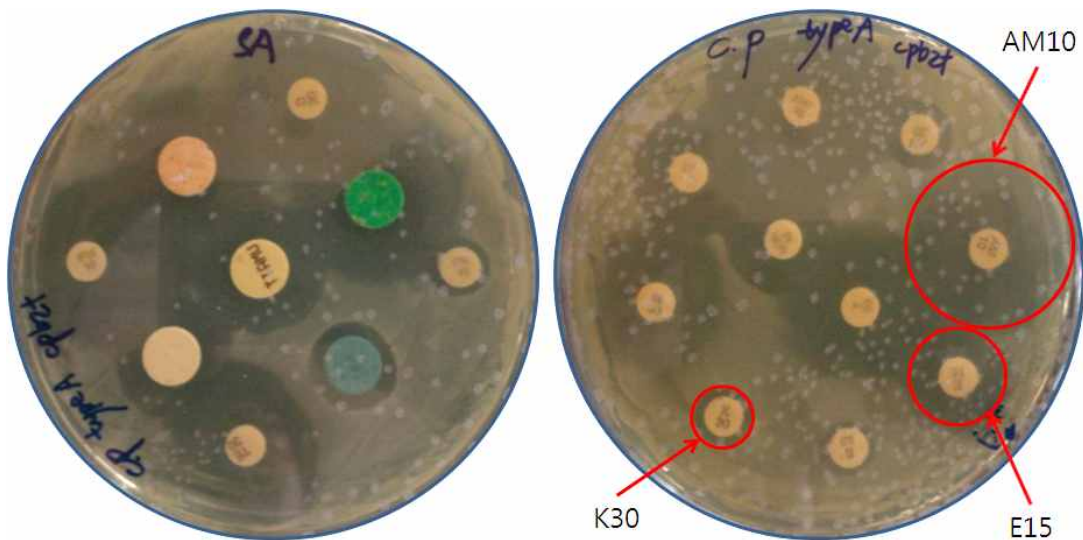


그림 1-57. Paper disc법을 적용한 *C. perfringens*균에 감수성이 있는 항생제 및 농도 탐색
K30; Kanamycin 30 μ g, E15; Erythromycin 15 μ g, AM10; Amicillin 10 μ g

㉟ *A. pleuropneumoniae* 평가기법

- 세균 배양 : *A. pleuropneumoniae* 5형(JBNU12061)을 초콜릿 배지를 이용하여 배양함. 초콜릿 배지에 접종하여 colony forming unit(CFU/ml)을 측정함. 세균수가 1000CFU/ml이 되도록 PBS에 희석하여 검사에 사용함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 PBS를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석하였고,

희석한 물질을 PBS를 사용하여 24-well plate에서 총량이 0.5ml이 되도록 2배수 연속 희석하여 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.

- 물질의 반응 : 배양한 세균액 500 μ l를 희석한 동량의 물질에 혼합한 다음 4°C에서 30분간 배양함. 세균액 대신에 PBS 500 μ l를 접종한 음성대조군과 검사물질이 포함되지 않은 PBS에 세균액을 접종한 양성대조군을 같은 방법으로 준비함. 이후 세균 증식여부를 판정하기 위해 물질의 반응 후 혼합액 200 μ l을 초콜릿 배지에 도말하여 37°C, 5% CO²조건에서 24시간 동안 배양함. 배양 후 배지의 colony 개수를 세고 양성대조군과 비교하여 물질 처리군의 세균 증식의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 함.

② 항바이러스 효능평가

㉠ 양계

㉠ 조류인플루엔자 바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : 공시 표준주(조류인플루엔자 바이러스; A/MS96/96주)를 10일령 계태아 발육란에 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용함. 바이러스액은 EID₅₀/ml 표준역가산정법에 준해 바이러스 역가를 확인함. 10^{7.0}EID₅₀/ml 이상의 역가를 보이는 바이러스액을 사용함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 인플루엔자 배양배지와 PBS를 각각 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 인플루엔자 배양배지와 PBS를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 배양한 바이러스액 500 μ l와 준비된 동량의 PBS로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함. 효능을 중화시키기 위해 반응액과 동량의 중화용액을 넣어 혼합함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 중화처리가 끝난 반응액은 PBS를 이용하여 10진 단계 희석(원액, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 및 10⁻⁵)하여 희석배수당 5개의 10일령 계태아 발육란의 요막강(allantoic cavity) 내에 0.2ml씩을 접종하고 37°C의 부화기 내에서 5일간 배양함. 매일 검란을 실시하였으며, 접종 후 24시간 이내에 죽은 발육란은 접종사로 간주하고 시험성적에서 제외함. 접종 24시간부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4°C에 보관하고, 5일 후, 모든 접종란을 회수하여 요막강액(allantoic fluid)을 채취 즉시 96-well microplate 상에서 혈구응집(HA) 여부를 확인하여 감염여부를 최종 판정함.
- 바이러스 함유량 : Kaeber method에 준해 산정하며, 대조군과 비교하여 물질 처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희

석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 함.

㉠ Newcastle disease 바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : 공시 표준주(뉴캐슬병 바이러스; SNU4152주)를 chicken embryo fibroblast(CEF) 세포에서 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용함. 바이러스액은 TCID₅₀/ml 표준역가산정법에 준해 바이러스 역가를 확인함. 10^{7.0}TCID₅₀/ml 이상의 역가를 보이는 바이러스액을 사용함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 인플루엔자 배양배지와 PBS를 각각 사용하여 80µg/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 인플루엔자 배양배지와 PBS를 사용하고 2배수 연속 희석하여 40, 20, 10, 5, 2.5µg/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 확인하기 위해 배양한 바이러스액 500µl와 준비된 동량의 PBS로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함. 효능을 중화시키기 위해서 반응액과 동량의 중화용액을 넣어 혼합함
- 바이러스 증식여부 판정 : 중화처리가 끝난 반응액은 DMEM 배지를 이용하여 10진 단계희석(원액, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 및 10⁻⁵)하여 PBS로 2회 세척한 96 well tissue culture plate의 단층을 형성한 CEF 배양세포 4 well씩에 50µl를 각각 접종한 다음 30~60분 동안 흡착시킴. 흡착이 끝난 후 다시 PBS로 2회 세척하고 0.2ml의 유지배지(DMEM + 2% FBS 함유)를 첨가하여 37°C CO₂ 배양기에서 5일간 배양함. 배양하는 5일 동안 매일 현미경으로 CPE(세포변성효과) 형성여부를 관찰하여 바이러스의 증식유무를 최종 판정함.
- 바이러스 함유량 계산 : Kaeber method에 준해 산정하며, 대조군과 비교하여 물질 처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 함.

㉡ 양돈

㉠ 돼지인플루엔자 바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : Mardin-Darby canine kidney(MDCK) 세포를 MDCK 배양배지 사용하여 계대 배양하고, H1N1 subtype(strain 명) 바이러스를 MDCK에서 배양하여 TCID₅₀ 역가 측정함. 바이러스 역가가 100 TCID₅₀/100µl가 되도록 PBS에 바이러스를 희석하여 검사에 사용함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비하였고, 희석한 물질은 인플루엔자 배양배지와 PBS를 각각 사용하고 80µg/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 인플루엔자 배양배지와 PBS를 사용하여 2배수 연속 희석하여 40, 20, 10, 5, 2.5µg/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.

g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.

- 물질의 반응 : 배양한 바이러스액 500μl와 물질 희석시 동량의 PBS로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 인플루엔자 바이러스의 접종을 위하여 96-well plate에 준비된 MDCK 단층세포를 인플루엔자 접종배지로 3회 세척한 후 배지를 완전히 제거함. 위에서 반응이 완료된 혼합액 100μl를 MDCK 세포에 접종함. 접종 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 인플루엔자 접종배지로 3회 세척하고 배지를 완전히 제거함. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 PBS에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비함. 또한 검사물질 대신 PBS로 희석한 바이러스만 접종한 양성대조군과 PBS만 접종한 음성대조군을 같은 방법으로 준비함. 준비된 인플루엔자 배양배지에 희석된 물질 200μl를 검사 well과 물질대조군에 분주하고 5일 동안 관찰하였으며, 양성 및 음성대조군에는 인플루엔자 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰함.
- 바이러스 역가 측정 : 배양 5일 후 상층액을 수거하여 PBS를 사용하여 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석하고, MDCK 단층세포가 형성된 96-well plate에 희석배수 당 8-well에 중화된 반응액 100μl를 접종함. 접종 후 37°C에서 5일 동안 배양하며, 접종 5일 후 인플루엔자 특이 단클론항체를 이용하여 면역화학 염색을 실시한 후 바이러스의 존재유무를 최종 판정함.
- 바이러스 함유량 계산 : Kaeber method에 준해 산정하며, 대조군과 비교하여 물질 처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 함.
- 배지조성 : Bovine Serum Albumin(7.5%)은 3.75g의 bovine serum albumin을 50ml의 PBS에 넣고 진탕하여 용해하고, 0.22μm의 필터를 이용하여 멸균한 후 분주하여 -20°C에 보관하도록 함. TPCk-treated trypsin(1mg/ml)은 100mg의 TPCk treated trypsin을 100ml의 Earle's Balanced Salt Solution에 넣고 진탕하여 용해하고, 0.22μm의 필터를 이용하여 멸균한 후 분주하여 -70°C에 보관하도록 함. MDCK 배양배지는 다음과 같음.

100ml	250ml	500ml	준비 배지량
88ml	220ml	440ml	Dulbecco's Modified Eagle's(Sigma D5796 or equivalent)
10ml	25ml	50ml	Heat-inactivated Fetal Bovine Serum
1ml	2.5ml	5ml	Anti-, Antimycog(Gibco or equivalent)
1ml	2.5ml	5ml	L-glutamine(Sigma G7513 or equivalent)

- 돼지인플루엔자 바이러스 접종배지(Rollins Grinding Media)는 다음과 같음

100ml	250ml	500ml	준비 배지량
96.9ml	242.25ml	484.5ml	Earle's Balanced Salt Solution(Sigma)
3ml	7.5ml	15ml	Anti-, Antimycog(Gibco or equivalent)
0.1ml	0.25ml	0.5ml	TPCK-treated Trypsin (Prepared)

- 인플루엔자 배양배지는 다음과 같음

100ml	250ml	500ml	준비 배지량
93ml	232.5ml	465ml	Dulbecco's Modified Eagle's(Sigma D5796 or equivalent)
4ml	10ml	20ml	7.5% Bovine Serum Albumin Solution(Sigma A2153-50G)
3ml	7.5ml	15ml	Anti-, Antimycoc(Gibco or equivalent)

㉠ PRRS 바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : MARC-145 세포를 배양배지 사용하여 계대 배양하고, VR2332 바이러스를 배양하여 TCID₅₀ 역가를 측정함. 바이러스 역가가 100TCID₅₀/100μl 가 되도록 배양배지에 바이러스를 희석하여 검사에 사용함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml 의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지를 사용하여 80μg/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5μg/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5μg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625μg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 배양한 바이러스액 500μl와 준비된 동량의 배양배지로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 배양배지와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 위에서 반응이 완료된 혼합액 100μl를 MARC-145 세포에 접종하고 37°C에서 1시간 동안 배양함. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 배양배지에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비하고, 또한 검사물질 대신 배양배지로 희석한 바이러스만 접종한 양성대조군과 배양배지만 접종한 음성대조군을 같은 방법으로 준비함. 준비된 배양배지에 희석된 물질 200μl를 검사 well과 물질대조군에 분주하고 5일 동안 관찰하였으며, 양성 및 음성대조군에는 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰함.
- 바이러스 역가 측정 : 배양 5일 후 상층액을 수거하여 배양배지를 사용하여 원액, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 로 희석하고, MARC-145 단층세포가 형성된 96-well plate에 희석배수 당 8-well에 중화된 반응액 100μl를 접종함. 접종 후 37°C에서 5일 동안 배양하며, 접종 5일 후 PRRS 바이러스 특이 단클론항체를 이용하여 면역화학염색을 실시한 후 바이러스의 존재유무를 최종 판정함.
- 바이러스 함유량 계산 : Kaeber method에 준해 산정하며, 양성대조군과 비교하여 물질 처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 함. MARC-145 배지 조성은 다음과 같음.

100ml	250ml	500ml	준비 배지량
88ml	220ml	440ml	RPMI1640(Sigma D5796 or equivalent)
10ml	25ml	50ml	Heat-inactivated Fetal Bovine Serum
1ml	2.5ml	5ml	Anti-, Antimycro(Gibco or equivalent)
1ml	2.5ml	5ml	L-glutamine(Sigma G7513 or equivalent)

㉔ 축우

㉔ 소 로타바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : MA104 세포(이와 동등한 세포 CV-1, TF104 세포)와 MDBK 세포를 계대 배양함. 소 로타바이러스는 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml을 CV-1, MA104 또는 TF104 세포가 단층 배양된 microplate well에 접종함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물 희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 바이러스 배양배지와 PBS를 각각 사용하여 80µg/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 바이러스 배양배지와 PBS를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5µg/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 배양한 바이러스액 500µl와 준비된 동량의 PBS로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 5% CO₂ incubator에 4~7일간 배양 후 세포변성효과를 관찰하여 효능평가함.

㉔ 소 코로나바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : MDBK 세포를 계대 배양하였고, 소 코로나바이러스는 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml을 MDBK 세포가 단층 배양된 microplate well에 접종함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 바이러스 배양배지와 PBS를 각각 사용하여 80µg/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 바이러스 배양배지와 PBS를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5µg/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 배양한 바이러스액 500µl와 준비된 동량의 PBS로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 5% CO₂ incubator에 4~7일간 배양 후 세포변성효과를 관찰하여 효능평가함.

- ③ 독성검사 : 독성검사는 농림수산검역검사본부 고시 제2009-18호에 근거하여 동물용 의약품 등 독성시험을 수행함.
- ㉠ 일반 동물용의약품(사료첨가제 제외)
- ㉡ 먼저 일반 동물용의약품(사료첨가제 제외)을 대상으로 동일 검체에 대해 급성독성시험과 아급성독성시험 및 만성독성시험을 실시함.
- ㉢ 급성독성시험
- 동물 : 2종 이상의 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그 중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 지정함.
 - 동물 수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 5수 이상으로 하고 비설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 2수 이상으로 함.
 - 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로를 포함하여 경구 및 비경구 경로함
 - 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 50% 치사량(LD₅₀) 또는 개략의 치사량을 구하기에 충분한 용량단계의 군수를 설정함. 독성이 약하여 치사량을 구할 수 없을 경우에는 기술적으로 투여 가능한 최대량을 최고용량으로 함.
 - 투여횟수 : 원칙적으로 1회.
 - 관찰기간 : 경구투여 시에는 2주 이상, 비경구투여 시에는 1주 이상으로 함.
 - 검색방법 : LD₅₀(설치류) 또는 개략의 치사량(비설치류)을 구함. 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 관찰기간 중에 3회 이상 측정함. 관찰기간 종료 시(또는 사망 시)에 각 군의 전 예(또는 사망 예)를 부검하여 모든 기관·조직을 육안으로 관찰하고 필요시에는 병리조직학적 검사함.
- ㉣ 아급성독성시험
- 동물 : 1종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 함. 일반적으로 소동물로서는 랫트 또는 마우스를 사용하도록 함.
 - 동물 수 : 암·수 각각에 대하여 1군 5수 이상으로 함.
 - 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 투여해야하며, 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있음.
 - 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둠. 급성독성시험 또는 예비적인 단기간의 연속투여 시험결과를 참고로 유해반응을 종류와 강도를 명확히 하여 중독량, 최소중독량 및 무독성량(No Observable Adverse Effect Level : NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수로 함. 중독량은 일부의 동물을 치사시키거나 또는 확실한 독성변화가 나타나는 양으로 하고, 최소중독량은 어떤 독성변화가 나타나는 최소량으로 함. 무독성량(NOAEL)은 어느 동물에서도 독성변화가 나타나지 않는 양으로 하였으며, 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체섭취량을 산출함.
 - 대조군 : 음성대조는 검체투여 시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 하였으며, 또한 기타 무처리 대조군을 둠.
 - 투여기간 : 3주 이상으로 하여 투여는 주 7일로 함

- 검색방법 : 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 주 2회 이상 측정함. 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 주 2회 이상 측정함. 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 하고, 검체의 화학구조, 약리작용 및 일반상태로부터 유추하여 적절한 임상검사를 추가함. 투여기간 중에 폐사한 예는 부검을 실시하여 기관·조직을 육안으로 관찰하고 필요시에는 병리조직학적 검사를 실시함. 투여종료 시의 생존 예에 대해서는 24시간 후에 도살 부검하여 전 예에 대해 기관·조직을 육안으로 관찰하고, 필요시에는 병리조직학적 검사를 하였으며, 또한 도살 시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 실시함.

㉔ 만성독성시험

- 동물 : 1종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 실시함. 일반적으로 소동물로서는 랫트 또는 마우스가 사용됨.
- 동물 수 : 암·수 각각에 대해서 1군 10수 이상으로 하였으며, 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도 도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물 수를 미리 추가하도록 함.
- 투여경로 : 임상적용 경로 또는 경구투여로 하였으며, 경구투여의 경우 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법 또는 강제투여 방법이 있음.
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둠. 아급성독성시험의 결과를 참고로 어떤 독성변화가 나타나는 양 및 무독성량(NOEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수를 결정함. 시료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체섭취량을 산출함.
- 대조군 : 음성대조는 검체투여 시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 하였으며, 또한 기타 무처리 대조군을 둠.
- 검색방법 : 투여기간은 3개월 이상으로 하며, 투여는 주 7일로 함. 검색방법은 각 군의 전 예에 대해서 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함. 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함. 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대해서 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 하며, 필요시 기타 임상검사를 실시함. 투여기간 중의 사망 예에 대해서는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사를 실시함. 투여종료 시의 생존 예에 대해서는 도살 부검하여 각 군의 전 예에 대하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정함. 병리조직학적 검사는 원칙적으로 대조군 및 최고용량군의 전 예에 대해 실시하나, 다른 시험군에서 육안적 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전 예에 대해서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사함.

- ㉠ 생식독성시험 : 원칙적으로 신 동물용의약품에 대해 「최기형성시험」을 실시함.
- 생식과정에 대해서 영향을 미치는 것이 의심되는 동물용의약품에 대해서는 「1세대 생식독성시험」을 실시함.
 - 임신 전부터 이유기까지 걸친 생식과정을 3구분하여 각각을 투여기간으로 하여 「임신 전 및 임신초기 투여시험」 및 「주산기 및 수유기 투여시험」을 실시함.
 - 시험동물 : 종 및 계통의 선택에 있어서는 수태능력 등의 생식에 관한 지식, 자연 발생 기형의 발생빈도, 생식발생에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질에 대한 감수성 등을 고려하여 정함.
 - 시험방법
- ㉡ 최기형성시험
- 동물 : 랫트 또는 마우스 등의 설치류 및 토끼 등의 비설치류에서 각각 선택한 각 1종 이상의 암놈으로 선정함. 일반적으로는 시험이 비교적 용이하고 일반적인 대사 양식 등이 비교적 알려져 있는 동물종이 사용됨.
 - 동물 수 : 랫트 또는 마우스에서는 1군 20수 이상, 토끼에서는 1군 8수 이상으로 함.
 - 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여를 원칙으로 하며 강제투여법은 확실하게 일정량을 투여할 수 있다는 점 등에서 사료 또는 음수에 혼입함.
 - 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둔. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중 증가의 억제 등 어떤 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 함.
 - 대조군 : 음성대조군을 두었으며, 필요에 따라 양성대조 또는 비교대조를 두었다. 양성대조에는 최기형성을 갖고 있는 것이 확실히 알려져 있는 물질을, 비교대조에는 화학구조 또는 약효가 유사한 기존약물을 사용함.
 - 투여기간 : 태자의 기관형성 기간에 매일 투여함.
 - 검색방법 : 시험기간 중 어미에 대하여는 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정함. 어미는 전 예를 임신말기에 부검하여 황체수, 착상수 및 흡수수와 태자의 사망 유무를 조사하고 한편 생존태자에 대하여는 성별, 체중 등의 측정 및 외형이상, 골격 및 내부장기의 기형 등 형태학적 검색함. 사망태자에 대하여는 가능한 한 사망 시기를 추정할 근거가 되는 소견을 기록함. 또한 어미에 대하여는 기관·조직의 육안적 관찰과 필요에 따라 병리조직학적 검사함.
- ㉢ 1세대 생식독성시험
- 동물 : 설치류 등에서 선택한 1종 이상의 암·수 동물로 함. 일반적으로는 랫트 또는 마우스가 사용됨.
 - 동물 수 : 1군 20수 이상의 수놈과 임신 말기에서 원칙적으로 1군 20수 이상의 임신 동물을 확보하기 위하여 필요한 암놈으로 함.
 - 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시킴.

- 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둬. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중증가의 억제 등 어떤 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 함. 기술적으로 투여 가능한 최대용량에서도 독성징후가 나타나지 않는 경우에는 그 양을 최고용량으로 함. 최저용량은 부모동물, 태자 또는 출생새끼의 어느 것에도 장애가 나타나지 않는 양으로 함. 중간용량(복수인 것도 있음)은 원칙적으로 최고용량과 최저용량의 등비중량으로 함. 용량단계 중에는 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정 임상 상용량과 가까운 용량이 포함되는 것이 좋음.
- 대조군 : 음성대조를 두었으며, 필요에 따라서 양성대조 또는 비교대조를 둬.
- 투여기간 : 설치류의 경우 암·수 모두 8주령부터 8주간 이상 매일 투여한 후 교배시킴. 교배는 3주간을 한도로 하여 동일한 수놈과 암놈을 1 : 1로 동거시킴. 수놈에 대하여는 교배기간 중에도 연속투여하고, 암놈에 대하여는 교배기간 중, 임신기간 중 및 분만 후 신생자의 이유까지의 기간에 투여를 계속함.
- 검색방법 : 시험기간중 각 군의 전 예에 대해 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정함. 교배기간이 종료된 수놈은 도살 부검하여 기관·조직을 육안으로 관찰함. 교미가 성립하지 않은 암·수에 대하여는 그 원인을 조사함. 교미율 및 수태율로 확인하였고, 다음의 산출법에 의해 확인함.

$\text{교미율} = (\text{교미동물} / \text{동거동물}) \times 100$ $\text{수태율} = (\text{수태동물} / \text{교미동물}) \times 100$

- 각 군의 전 예를 분만포육 시킴. 분만 시에는 분만의 장애나 지연의 징후 등에 대하여 관찰하고, 어미의 수유·포육본능에 대한 영향 등을 조사하였으며, 다음 산출법으로 출산율을 산출함.

$\text{출산율} = (\text{생자출산 암놈수} / \text{임신암놈수}) \times 100$
--

- 신생자에 대해서는 산자수, 그의 생사, 성별 및 외표에서의 변화 등을 검색하고 체중을 측정함. 동복생자수를 조절하는 경우에는 생후 비교적 빠른 시기에 어미 한 마리당 수놈과 암놈이 거의 동수가 되도록 일정 마리수를 무작위로 채취하고 여분의 새끼를 도태함. 랫트 또는 마우스에서는 통상 생후 4일령에서 8마리 정도로 함.
- 출생자에 대하여는 성장 및 발달과 함께 특이한 증상의 유무나 행동의 이상 등에 관하여 검색함. 출생자에 이상소견이 보인 경우에는 필요에 따라 새로이 유모포육 시험을 실시하여 생후 어느 시기에서의 영향에 의한 것인가를 분석함. 성장 및 발달에 대하여는 형태, 기능 및 행동에 관하여 검색하였으며, 필요에 따라서 다시 장기간 관찰함. 다음 산출법으로 출생으로부터 이유까지의 사이에 출생율, 생존율 및 이유율을 구함.

$$\text{출생율} = (\text{출산생자수} / \text{착상두수}) \times 100$$

$$\text{4일 생존율} = (\text{생후 4일생자수} / \text{출산생자수}) \times 100$$

$$\text{이유율} = (\text{이유시생자수} / \text{생후 4일의 생자수 또는 도태직후의 생자수}) \times 100$$

- 처치된 어미는 적당한 시기에 부검하여 기관·조직을 육안으로 관찰함.

㉔ 변이원성시험 : 원칙적으로 신 동물용의약품에 대해 유전자 돌연변이 유발성을 지표로 하는 「세균을 이용하는 복귀변이시험」, 염색체이상 유발성을 지표로 하는 「포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험」 및 「설치류를 이용하는 소핵시험」을 실시함.

㉑ 세균을 이용하는 복귀변이 시험

- 균주 : *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 등.
- 용량단계 : 5~6단계의 시험용량을 설정하는 것과 함께 별도로 대조를 둬. 최고용량은 원칙적으로 5mg/plate를 한도로 하고 항균성을 나타내는 약물에서는 항균성을 나타내는 최소량으로 함.
- 대조군 : 음성 및 양성대조를 두었으며, 음성대조는 원칙으로 용매대조로 하고, 양성대조로서는 이미 알려진 변이원성 물질(S9mix를 필요로 하지 않는 물질과 필요로 하는 물질)을 사용함.
- 대사활성화 : S9mix를 가한 시험과 가하지 않은 시험을 병행하여 실시함. 포유류(통상은 랫트)에 적절한 약물대사 효소계의 유도제를 투여한 후 간장으로부터 S9를 제조함. 이 S9에 보호소 등을 가한 S9mix를 사용함.
- 시험방법 : preincubation법을 실시
- 결과 : 복귀변이 colony수의 실측치와 그의 평균치를 표시(그림 포함)함. 복귀변이 colony수가 음성대조군의 2배 이상이거나 통계학적으로 유의성을 나타낼 때 양성으로 판정함.

㉒ 포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상 시험

- 세포 : 포유류의 초대 또는 계대 배양 세포를 사용함. Chinese hamster 섬유아 세포(CHL, CHO)등 가능한 한 감수성이 높은 것을 사용하는 것이 바람직함.
- 용량단계 : 3단계 이상의 시험용량을 설정하였고, 최고용량은 세포증식(또는 분열)이 50% 억제되는 농도를 지표로 하여 그 전·후의 용량을 사용함. 세포독성이 인정되지 않는 경우는 10mm상당 또는 5mg/ml 농도를 한도로 함.
- 대조군 : 음성 및 양성대조를 둬. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 하고, 양성대조로서는 이미 알려진 염색체이상 유발물질을 사용함.
- 대사활성화 : 적절한 대사활성화 방법을 병용하는 것이 바람직함. 포유류(통상은 랫트)에 적절한 약물대사효소계의 유도제를 투여한 후 간장으로부터 S9 제조함. 이 S9에 보호소 등을 가한 S9mix를 사용함.
- 검색방법 : 검체처리 후 적절한 시기에 염색체 표본을 만들. 농도당 100개의 분열중기상에 대하여 염색체의 형태이상 및 배수성 세포에 대하여 검색함. 형태이

상에서는 염색분체 또는 염색체에서 보이는 구조이상의 종류를 명기함.

- 결과 : 염색체이상을 지닌 세포와 출현빈도 또는 세포당 염색체 이상빈도를 표시(그림 포함)함. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 양성으로 판정함.

㉔ 설치류를 이용하는 소핵시험

- 동물 : 원칙적으로 순계 또는 균일계의 수놈을 사용하나, 일반적으로는 마우스가 사용됨.
- 동물 수 : 1군 5수 이상
- 투여경로 : 복강 내, 임상적용경로 또는 경구투여로 하며, 경구투여는 원칙적으로 강제투여로 함.
- 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정함. 최고용량은 체중증가의 억제 등 어떤 독성징후가 나타나는 최소량(대체로 LD₅₀의 1/2)으로 함.
- 대조군 : 음성 및 양성대조를 둠. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 하고, 양성대조로서는 이미 알려진 소핵유발물질을 사용함.
- 투여횟수 : 1회 투여를 원칙으로 하며, 필요에 따라 24시간 간격으로 2~5회 연속 투여함. 단, 연속투여하는 경우에는 적절한 단일용량을 설정하였으며, 투여용량의 선정이유를 명기함.
- 검색방법 : 검체 투여 후 적절한 시기에 각 군의 전 예를 도살하여 골수도말 표본을 만듦. 표본제작은 일반적으로 검체 투여 후 18~72시간째에 하는 것이 바람직함. 원칙적으로 개체당 1,000개의 다염성적혈구에 대하여 소핵의 유무를 검색함. 동시에 전 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도를 구함. 다염성적혈구 대신에 망상적혈구의 빈도를 구함.
- 결과 : 소핵을 갖는 다염성적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 전 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도를 표시함. 양성결과가 얻어진 경우에는 용량 의존성 대하여 그림으로 나타냄. 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 양성으로 판정함.

㉕ 암원성 시험 : 원칙적으로 화학구조 또는 약리작용, 독성시험의 결과, 기타의 원인으로 암원성이 의심되는 경우에는 암원성 시험을 실시함.

㉖ 시험동물 : 종 및 계통의 선택에 있어서는 감염성 질환에 대한 저항성, 수명, 자연발생 종양의 발생빈도, 이미 알려진 암원성물질에 대한 감수성 등을 고려함.

㉗ 동일 검체에 대하여 암원성 예비시험 및 암원성 시험을 실시하는 경우에는 동일한 종 및 계통의 동물을 사용함.

㉘ 시험방법

- 동물 : 2종 이상의 암·수 동물로 함. 또 동일주령으로 순조로이 발육한 6주령까지의 동물을 사용함. 일반적으로는 랫트, 마우스 또는 햄스터가 사용됨. 이유 후 가능한 한 빠른 시기에 개시함.

- 동물 수 : 암·수 각각에 대하여 1군 50수 이상으로 하고, 각 군에의 동물의 배치에는 체중증별 등에 의한 적절한 무작위 추출법을 사용함.
- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시킴. 검체를 사료에 혼입하여 투여하는 경우에는 검체농도는 최고 5%까지 함.
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둠. 고용량은 독성증상을 나타내는 양으로서 동물이 장기 생존 가능하다고 생각되는 최대량으로 하고, 최저용량은 원칙으로 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상용량을 감안하여 설정함. 중간용량은 최고용량과 최저용량과의 등비중항을 취하는 것이 바람직함. 일반적으로는 최저용량은 최고용량의 10% 이상인 것이 바람직함. 단, 최저용량과 추정임상용량이 현저하게 떨어져 있는 경우에는 최고용량의 10% 미만의 용량을 별도로 설정함. 검체를 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료섭취량 또는 음수량을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정하여 검체섭취량을 산출함. 또 시험 개시 전 및 시험 중에 필요에 따라 검체의 순도, 안정성 및 불순물을 가능한 한 정성적 또는 정량적으로 분석함.
- 대조군 : 음성대조군을 두고, 음성대조는 검체투여 시에 각종용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 함. 또한 기타 무처리 대조군을 둠.
- 투여기간 : 랫트에서는 24개월 이상 30개월 이내, 마우스 및 햄스터에서는 18개월 이상 24개월 이내로 하고, 투여는 원칙적으로 주 7일로 함. 강제투여의 경우 주 5일 이상의 투여도 용인됨.
- 시험기간 : 투여종료 시 또는 투여종료 후 1~3개월까지로 함. 단, 시험의 최장기간은 랫트에서는 30개월, 마우스 및 햄스터에서는 24개월로 하고, 최저용량군 또는 대조군의 누적 사망률이 75%가 되는 경우에는 그 시점에서 생존 예를 도살하여 시험을 종료함. 종양 이외의 원인에 의한 사망률이 투여 개시 후 랫트에서는 24개월, 마우스 및 햄스터에서는 18개월의 시점에서 50% 이내일 것이 요구됨.
- 검색방법 : 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함. 시험기간 중의 사망 예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 실시함. 병리조직학적 검사는 다음의 기관·조직에 대하여 실시함. [피부유선, 임파절, 타액선, 흉골, 추골 또는 대퇴골(골수를 포함), 흉선, 기관·폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 정소, 난소, 자궁, 질, 안구, 뇌, 하수체, 척수, 기타 육안으로 종양성 병변이 인정된 기관·조직] 종양성 병변의 기재 시에는 종양발생에 이르는 각종변화(전암병변)의 소견도 부가할 필요가 있음. 시험기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 격리 또는 도살 부검하여, 위와 같이 기관·조직의 육안적 관찰 및

병리조직학적 검색함. 또 도살시 필요에 따라 혈액을 채취하여 말초혈액의 적혈구 수 및 백혈구 수를 측정하는 것과 함께 도말표본을 만들어 빈혈, 임파절, 간장, 비장의 종대 등 혈액질환을 예상시키는 예에 대하여는 도말표본을 검사함 시험 종료 시의 생존 예는 빨리 부검하여 각 군의 전 예에 대하여 위와 같이 기관·조직을 육안으로 관찰함.

- ㉓ 미생물학적 독성시험 : 원칙적으로 다음의 것에 모두 해당되는 경우에는 시험관 내 또는 생체내에서 미생물학적 독성을 지표로 하는 ㉑ 장점막 균집락 방어벽교란성시험, ㉒ 내성유발성시험 또는 ㉓ 대사능이상시험을 실시함.
 - 공시물질의 항균작용의 특징 등에 따라 시험해야할 미생물학적 독성지표를 결정할 수 있으며 관련된 정보가 없는 경우 원칙적으로 장점막 균집락 방어벽교란성 시험과 내성유발성시험 및 대사능이상시험을 실시함.

- ㉔ 국소독성시험 : 원칙적으로 동물용의약품의 특성에 따라 우발적으로 또는 의도적으로 사람 및 동물의 피부 또는 점막에 접촉가능성이 있는 경우 백색토끼를 이용한 피부자극성시험을 실시함. 또한 접촉가능부위 및 다른 독성시험 결과로부터 필요하다고 인정되는 경우에 안점막자극성시험 등을 추가하여 실시함.

㉑ 피부자극성시험방법

- 동물 : 원칙적으로 4개월령의 건강한 암컷 백색토끼가 사용됨.
- 동물 수 : 원칙적으로 3마리 이상의 동물을 사용함. 단, 부식성이 의심되는 물질의 경우 우선 1마리의 토끼를 사용하여 시험을 수행하여 피부부식성이 나타나는 경우는 더 이상의 시험을 수행하지 않으며 의심되는 경우는 2마리의 토끼를 이용하여 추가시험을 수행함.
- 투여량 : 시험물질이 액상인 경우는 일반적으로 0.5ml 그리고 고형상이거나 분말인 경우는 0.5g을 검체로 함. 이때 고형상인 경우 분쇄하여 증류수 또는 피부에 무해한 적절한 용매에 습윤시켜 균일하게 적용함.
- 투여부위 : 약 24시간 전에 미리 등 부위의 털을 깎아 상처가 없는 것을 확인하고, 등 부위의 6cm²의 비찰과 피부 2개소 및 찰과 피부 2개소로 함.
- 투여방법 : 6cm²의 비찰과 피부 및 찰과 피부 각 1개소에 시험물질을 적용한 후 거즈로 덮고, 테이프로 고정한 다음 시험물질의 증발을 막기 위해 침투성 및 반응성이 없는 고형재질의 박지 등으로 덮은 후에 비자극성 테이프를 사용하여 고정함. 나머지 6cm²의 비찰과 피부 및 찰과 피부 각 1개소는 대조구획으로 생리 식염수나 거즈 등을 동일한 방법으로 적용함.
- 투여기간 : 원칙적으로 4시간동안 적용한 후 거즈를 제거한 후 투여부위에 시험물질이 남아 있지 않도록 증류수나 식염수로 가볍게 씻어냄.
- 관찰기간 : 시험물질을 증류수나 식염수로 세척하여 제거한 후 홍반과 부종의 정도 등 피부반응을 24, 48, 72시간에 관찰하여 찰과 및 비찰과 부위의 피부반응을 대조구획과 비교하여 관찰함.
- 검색방법 : 개별동물의 찰과 및 비찰과 부위의 피부 반응을 평가 등급표(표

1-37)에 의해 점수화함. 각 관찰 시기별로 모든 투여동물의 홍반 및 부종 점수를 더해서 그 평균값을 일차피부자극지수로 함. 시험물질에 대한 자극성은 가장 높은 일차피부자극지수를 가지고 표 1-38에 의해 구분하여 평가함. 이때 시험물질의 자극성은 일차피부자극지수 외에도 시험기간 중에 관찰된 임상증상 등을 고려하여 평가함.

표 1-37. 피부반응의 평가 등급표

홍반과 가피형성	등급
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
중등도 및 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가피형성으로 홍반의 관찰이 어려움	4
부종 형성	등급
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4

표 1-38. 피부자극성 판정 지표

일차피부자극지수	분 류
0.0~0.5	비자극성
0.6~2.0	약한 자극성
2.1~5.0	중등도 자극성
5.1~8.0	강한 자극성

㉔ 면역계이상시험 : 아급성·만성 독성시험 결과 면역반응이상이 의심되거나 생체 내에서 항원으로 작용할 수 있는 경우에 면역계에 미치는 영향을 검사하는 시험으로서 이에는 면역독성시험, 항원성시험, 피부감작성시험이 있음.

- 피부감작성시험의 경우 기니피그를 이용한 피부감작성시험 또는 마우스를 이용한 국소임파절증식성시험 및 기타 피부감작성시험 등을 포함함.

㉕ 면역독성시험

- 시험동물 : 병원체 및 기생충 등 특정병원체 부재(SPF) 마우스 또는 랫트로서 암컷과 수컷 중 시험물질에 대하여 좀 더 예민한 반응이 예상되는 하나의 성을 선택할 수 있음. 암컷을 사용하는 경우에는 임신이 되지 않은 상태이며 출산경험이 없는 동물을 사용함. 어리고 건강한 동물을 선택하며 체중은 시험개시 시점 평균체중 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 함. 투여는 6~8주령에 개시함.
- 동물 수 : 시험물질 투여군은 원칙적으로 1군당 10수 이상으로 하며 각 면역독성 지표에 대한 대조군에도 10수 이상의 동물을 사용함.

- 대조군 : 용매대조군, 무처치군, 양성대조군을 둬. 용매대조군에는 면역독성의 회복성, 지속성 또는 지발성 시험을 추가적으로 시행하는 경우를 대비하여 충분한 수의 동물을 배치함. 용매의 독성이 불확실한 경우에는 무처치군을 배치함. 양성대조군에는 최소한 5수 이상을 두며 기히 확인된 면역억제제를 선택하여 면역독성이 확실히 유발되는 용량으로 투여함.
- 위성군(Satellite group)에는 20수 이상의 시험동물을 배치하며 시험물질 고용량 투여군과 동일 용량으로 하여 30일간 투여한 후 이후 최소 30일간 면역독성의 회복성, 지속성 또는 지발성 등을 관찰함.
- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로를 포함하여 경구 및 비경구 경로로 투여하도록 함. 임상적용 경로가 특수하여 시험동물에서의 실시가 불가능한 경우에는 다른 적절한 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있음.
- 용량설정 : 용량-반응성을 확인하고 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)을 구할 수 있도록 최소 3단계 이상의 용량 시험군을 두며 이와 함께 별도의 대조군을 둬. 최고용량은 유의한 수준의 스트레스, 영양결핍 및 치사를 유발하지 않으나 측정 가능한 수준의 일반 독성을 유발하는 양으로 함. 최저용량은 어떤 면역독성이 나타나지 않는 양으로 함.
- 투여기간 : 최소 30일 이상으로 하며 투여는 주 7일로 함.
- 관찰기간 : 시험동물의 관찰은 최소 30일 이상으로서 투여기간 내내 이루어짐. 위성군의 경우 투여중지 후 30일간 회복성 또는 지속성 또는 지발성을 관찰함.
- 검색방법 : 임상증상 검사(시험물질 투여기간 동안 각 시험동물에 대하여 최소 1일 1회 이상 관찰하여 특이적인 임상증상이 관찰되면 기록함. 기록사항으로는 증상발현시기, 증상의 심한 정도 및 지속기간을 포함하며 피부 및 피모, 안구 및 점막, 호흡기계, 자율신경계 및 중추신경계 관련 이상, 순환계 이상, 운동성, 행동양식, 감염 저항성 항목을 주요 관찰대상으로 함).
- 사료 및 음수 섭취량은 매주 확인하고, 체중 측정은 투여 전, 투여 후 매주 및 시험종료 시에 실시함.
- 빈사 상태의 시험동물은 발견 즉시 안락사를 시행하며, 부검은 빈사 상태의 시험동물과 시험기간 중 폐사한 동물 전체에 대하여 시행함. 혈액학적, 생화학적 검사를 위해 다음의 항목은 각 용량군 및 대조군에서 10수에 대하여 검사하며 시험동물은 부검 전날 밤에 절식함.
- 먼저 혈액학적 검사는 헤마토크리트치, 헤모글로빈 농도, 적혈구수, 총 백혈구수 및 감별 백혈구수, 혈소판수 등을 포함하여 검사함. 혈액화학적 검사는 혈당, GPT(Serum glutamic-pyruvic transaminase 또는 alanine amino transaminase, ALT), 요소질소, 알부민, 총혈청단백, 면역글로불린, cytokine(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MIP-1 β , TNF- α 등) 등을 포함하여 검사함. 장기 육안검사는 부검 직전 체중을 측정하며 장기를 채취하여 중량을 측정함. 흉선과 비장의 경우 적출 즉시 습윤상태에서 장기중량을 측정하며 기타 장기에 대해서도 건조되지 않도록 주의해야 함.
- 조직병리 검사는 각 용량시험군 및 대조군 10수에 대하여 조직병리 검사를 수행

함. 육안소견에서 이상이 관찰된 장기에 대하여 조직병리 검사를 실시하며 특이적 및 비특이적 세포매개성 면역반응이상으로 인한 면역계 이상이 관찰되면 흉선, 비장, 간장, 폐장, 신장, 골수(대퇴골, 흉골, 늑골 늑연골 부위 중 선택), 임파절(점막연관 및 변연부), 부신, 송과선, 난소 또는 고환에 대하여 병리조직학적 검사를 실시함. 조직병리검사대상 장기를 채취하여 조직병리검사가 가능하도록 적정 고정액에 보관함. 비장, 흉선 및 골수에서의 세포수(cellularity) 및 세포 생존율(cell viability)은 각 용량군 및 대조군에서 최소 10수에서 측정함.

- 면역독성 검사는 면역독성 검사에는 체액성 면역시험과 특이적 및 비특이적 세포 매개성 면역시험이 있으며 이들에 대하여 각 1종 이상의 시험을 실시함. 필요시 추가적인 2단계 면역독성시험을 실시함.
 - a. 체액성 면역시험은 시험물질이 체액성 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 항원 접종 후 항체 플라그-형성 세포 검사(Antibody plaque-forming cell assay) 또는 면역글로불린 역가 시험을 실시함.
 - a-1. 항체 플라그-형성 세포 검사(Antibody plaque-forming cell assay) : 시험물질을 30일간 투여한 후 비장으로부터 채취한 항체형성세포에 대한 시험물질의 영향을 검사함. 시험에 사용하는 시험동물의 종 및 계통에 따라 플라그-형성 세포의 적정 생성시기를 결정함. 30일간의 시험물질 투여가 비장의 항체 생성세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 T세포 의존성 항원인 양적혈구(Sheep red blood cells; SRBC)를 시험물질 투여 개시일로부터 26일째에 정맥내로 투여함. 새로운 보체가 사용될 때 마다 이의 활성도를 확인함. 본 시험의 민감도를 검증하기 위하여 기히 알려져 있는 면역억제제(예, 싸이클로포스파미드 등)를 처치한 양성대조군을 둠. 비장 세포 생존율 및 플라그-형성 세포수를 검사함.
 - a-2. 면역글로불린 정량검사(Immunoglobulin quantification) : 시험물질을 30일간 투여하면서 시험물질이 항원에 대한 항체의 반응성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시험동물에 적절한 흉선 의존성 항원을 감각시킨 후 적절한 시점에 항원을 2차 접종함. 시험동물에서 혈청을 채취하여 면역글로불린(IgG 및 IgM) 역가를 검사함. 면역글로불린 검사는 충분한 빈도로 시행하여 시험군과 대조군에서 1차 및 2차 항체반응성에 대한 비교가 적절히 이루어 질 수 있도록 함. 최종 면역글로불린(IgG 및 IgM) 역가 측정은 시험물질 투여 30일이 경과한 후에 시행함.
 - b. 특이 세포 매개성 면역시험 : 시험물질을 30일간 투여한 후 아래의 3종의 시험 중 1종 이상을 선택하여 실시함. 각각의 시험방법은 다음과 같음.
 - b-1. 일원 혼합 임파구 배양 검사(One-way mixed lymphocyte culture assay; MLC) : 30일간 시험물질을 시험동물에 투여한 후 시험동물과 동종이면서 다른 개체 유래 임파구(allogeneic lymphocytes)에 의해 유도되는 임파구 발생(lymphocyte blastogenesis)을 검사함. 임파구 발생정도를 알기 위하여 방사선 표지물질(주로 ³H-thymidine)이 DNA내로 합성되어 표지된 양을 측정하며 검사 시 주의할 점은 다음과 같음. 차단되지 않은 반응세포(unblocked responder cells)는 대조군 및 시험군 시험동물의 비장으로부터 무균적으로 채취함. 자극유도세포(stimulator cells)는 동종의 무처리 시험동물의 비장으로부터

터 무균적으로 채취하며 마이토마이신 C 또는 X방사선을 처리하여 DNA 합성을 차단함. 반응세포(responder cells)와 자극세포(stimulators)의 생존율을 조사함. 자극세포(stimulator cells)의 반응성이 없음을 확인하거나 무처리 세포의 DNA합성 수준(baseline levels)을 알고 세포채취 기술의 효율성을 확인하기 위하여 3반복 또는 4반복 수준의 시험법 대조군이 필요함. 완전무처리 또는 용매대조군에 대해서도 검사를 실시함. 임파구발생(lymphocytes blastogenesis) 검사결과는 반응세포(responder cells)와 자극세포(stimulator cells)를 함께 최대 4일간 배양한 후 반응세포(responder cells)에서의 방사선 표시 정도를 검사함으로써 얻어짐. 결과는 nCPM 값으로 표시하는데 이는 자극세포와 반응세포의 총 CPM 평균값에서 자극세포가 없이 배양된 세포의 총 CPM 평균값(baseline level)을 뺀 값을 의미함. 아울러, 시험물질 처치군과 대조군과의 차이정도는 $\{1 - (\text{처치군의 nCPM} / \text{대조군의 nCPM})\} \times 100$ 으로 표시함. 본 검사의 민감도를 확인하기 위하여 적합한 면역억제제를 처치한 양성대조군이 필요함.

- b-2. 지발성 과민반응시험(Delayed-type hypersensitivity reaction; DTH) : 일반적으로 시험물질을 30일간 투여하면서 시험동물에 1종의 흥선-의존성 항원을 감각시키고 이후 동일 항원으로 공격접종함. 공격접종 후 24~48시간에 시험군과 대조군에서 지발성 과민반응 정도를 비교함. 면역유발 및 공격접종 물질의 종류, 면역유발물질 접종횟수 및 접종경로, 공격접종시기 및 동위원소 사용여부 등을 결정할 때는 선택한 시험동물에서 DTH 반응이 충분히 양호하게 발현될 수 있는 조건으로 함. 본 검사는 최소 30일간 시험물질을 투여한 후 실시함.
- b-3. Cytotoxic T-임파구 검사(Cytotoxic T-lymphocyte assay; CTL) : Cytotoxic T-임파구를 유도하기 위해 동종의 타개체 유래 종양세포를 사용함. 처치군 및 대조군에서 비장세포(effector cells)를 채취하여 ^{51}Cr 이 표시된 동종의 타개체 유래 종양세포(target cells)와 함께 배양함. 4시간동안 효능세포(effector cells)와 표적세포를 함께 배양한 후 표적세포(target cells)로부터 방출된 방사선량은 T-임파구의 세포용해성의 지표가 됨. 본 검사시 주의할 점은 다음과 같음. 적합한 시험결과를 얻기 위해서는 효능세포(effector cells) 부재시 표적세포(target cells)에서 자발적으로 방출되는 방사선량과 표지 표적세포의 총 방출량을 측정할 수 있는 시험법 대조군이 필요함. 시험에 사용되는 시험동물의 cytotoxic T-임파구 생성가능 여부를 확인하고 검사법의 적합성을 확인함.
- c. 비특이적 세포매개성 면역시험 : 시험물질을 30일간 시험동물에 투여한 후 비특이적 세포매개성 면역반응을 알기위해서 자연살해세포의 활성화도 검사, 대식세포 검사가 있음. 각각의 시험방법은 다음과 같음.
 - c-1. 자연살해세포 활성화도 검사(Natural killer cell activity; NK) : 시험물질을 30일간 투여한 후 처치군 및 대조군에서 채취한 비장세포(effector cells)를 ^{51}Cr 이 표시된 YAC-1 임파종 세포(target cells)와 함께 4시간 배양함. 배양 후 표적세포(target cells)로부터 방출된 방사선량은 자연살해세포 활성화도의 지표

임. 본 검사 시 주의할 점은 다음과 같음. 적합한 시험결과를 얻기 위해서는 효능세포(effector cells) 부재 시 표적세포(target cells)에서 자발적으로 방출되는 방사선량과 방사선 표식 표적세포 총 방출량을 측정할 수 있는 시험법 대조군을 둬. YAC-1 임프종 세포 외에 다른 표적세포(target cells)도 사용될 수 있으며, 표적세포의 생존율은 항상 확인함.

c-2. 대식세포(Macrophages) 검사 : 시험물질을 30일간 시험물질에 투여한 후 시험물질이 대식세포의 수와 대식세포의 탐식작용에 미치는 영향을 파악하기 위하여 다음의 검사를 실시함. 잔류 복수세포(resident peritoneal cell)의 총 갯수 및 감별 개수, 증폭인자(예, 감마 인터페론 또는 세균성 lipopolysaccharide) 유무시 복수세포(peritoneal cells)에 의한 미세입자(예, 형광 라텍스 비드) 탐식작용성.

d. 2단계 추가 면역독성 시험 : 다음과 같음. 상기 면역독성 검사에서 면역계의 기능이상이나 손상이 확인되는 경우, 정확하게 면역독성 여부를 판정할 수 없는 경우 또는 시험물질 또는 시험물질과 구조상 관련된 물질(대사물질 및 분해산물)이 면역독성물질로서 확인될 경우에는 추가적인 2단계 면역독성시험이 요구될 수 있음.

- 상기 면역독성 검사에서 면역계의 기능이상이나 손상이 유발되지 않음이 분명하거나 시험물질 또는 시험물질과 구조상 관련된 물질(대사물질 또는 분해산물)의 면역독성이 유발되지 않음이 입증될 경우 2단계 추가 면역독성시험은 필요하지 않음.
- 2단계 추가 면역독성 시험으로는 면역독성회복성시험, 숙주저항성시험, 기타 면역세포기능성시험 등을 포함함. 이중 면역독성회복성시험은 상기 면역독성시험에서 조직병리학적 변화를 포함하여 유의한 수준의 면역독성이 관찰될 경우 시험동물 5수 이상이 배치된 위성군 및 대조군에서 시험물질 투여 종료 후 7, 14 및 28일째 경시별 면역독성의 회복성을 평가하는 시험을 말함.
- 숙주저항성시험은 *Listeria monocytogenes* 등의 세균이나 PYB6 fibrosarcoma 등의 암세포 또는 Herpes simplex virus type I(HSV-1) 등의 바이러스를 공격 집중한 후 숙주저항성을 검색하는 시험을 말함.
- 기타 면역세포기능성시험은 T 또는 B 임파구 세포의 아군 정량시험 등을 포함함. 이의 구체적인 시험법은 OECD 지침 등을 참고할 수 있음.

⑤ 항원성시험 : 아나필락시스 쇼크 반응시험과 수동 피부 아나필락시스 반응시험으로 함.

a. 아나필락시스 쇼크 반응시험

- 시험동물 : 기니픽을 사용함.
- 시험군 : 원칙적으로 1군당 5수 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질 투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정함.
- 투여물질 : 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여 시험을 실시

하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용함. 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이중단백을 사용함.

- 시험방법 : 투여용량은 추정되는 임상용량 또는 노출량을 근거로 설정함. 투여 경로는 피하 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용경로가 경구인 경우 시험물질만을 경구 또는 피하투여에 의해 감작시키는 경우가 많음. 임상적용경로가 정맥내 투여일 경우에는 피하투여 감작군에서 음성결과가 얻어지면 임상적용경로에 의한 감작이 필요 없다고 보지만, 양성반응이 의심될 경우에는 그 결과를 보완할 목적으로 투여경로를 임상적용경로로 설정하는 것이 바람직함. 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감작과 야기 시, 원하는 농도로 준비함. 감작 시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조물질을 투여하여 감작함. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복투여(주 2~3회, 2~4주간)하여 감작함. 면역보조제를 사용하는 시험군은 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1~3주)으로 3회 이상 반복투여하여 감작함. 최종 감작 1~3주 후에 시험물질(야기항원)을 정맥내 투여하여 아나필락시스 쇼크 증상의 발현 유무를 검색함. 야기항원량은 원칙적으로 감작에 이용한 저용량의 수배로 함.
- 결과판정 : 아나필락시스 쇼크 반응시험 판정기준에 따라 판정함(표 1-39).

표 1-39. 아나필락시스 쇼크 반응 판정기준

1. 불안(Restlessness)	2. 기모(Piloerection)	3. 기침(Coughing)	4. 과호흡(Hyperpnea)
5. 배뇨, 배변에 의한 얼룩 관찰 (Urination & evacuation)	6. 유루(Lacrimation)	7. 호흡곤란(Dyspnea)	8. 청색증(Cyanosis)
9. 보행불안(Staggering gait)	10. 도약(Jumping)	11. 헐떡거림(Gasping)	12. 경련(Convulsion)
13. 사망(Death)			

[-] : 무증상, [±] : 1~2의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우

[+] : 1~2의 증상이 대부분 관찰되면서 3~6의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우

[++] : 1~6의 증상이 대부분 관찰되면서 7~12의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우

[+++] Death : 사망

b. 수동 피부 아나필락시스 반응시험

- 동물 : 항혈청 제조에 C57BL/6계 마우스 또는 적당한 근교계 마우스를 사용하며, 반응 야기에는 랫트를 사용하고, 동종 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우 항혈청제조 및 반응 야기에 기니피크를 사용함.
- 동물 수 : 시험군은 원칙적으로 1군당 5수 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질 투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정함.
- 용량 및 투여경로 선정 : 용량은 추정되는 임상용량으로부터 선정하고, 투여경로는 피하, 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용 경로로 투여하여도 무방함.
- 시험방법 : 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여 시험을 실시

하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용함. 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이종단백을 사용함. 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감각과 야기 시 원하는 농도로 준비함. 감각 시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조 물질을 투여하여 감각함. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복투여(주 2~3회, 2~4주간)하여 감각함. 면역보조제를 사용하는 시험군은 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1~3주)으로 3회 이상 반복투여하여 감각함. 최종 감각 1~3주 후에 채혈하여 항혈청을 개체별로 분리함. 반응 야기를 위하여 위에서 얻은 개체별 항혈청을 제모한 시험동물의 등부위에 피내주사함. 항혈청은 적당한 배율까지 연속 2배수 희석해서 약 0.05~0.1ml정도 주사하며, 이때 대조군 시험동물의 혈청도 동량 주사함 각 혈청당 2~3수의 시험동물에 주사함. 감각시킨 시험동물은 사육상자에 넣어 수용하며 24시간 후에 시험물질(야기항원)을 시험동물에 투여함. 이때 투여할 시험물질 용액은 동량의 1~3%(w/v) Evans blue와 혼합하여 각 시험동물의 정맥내에 투여함. 야기항원량은 원칙적으로 감각에 이용한 저용량의 수배로 하였다. 야기항원 주사 30분 후에 시험동물 각 개체를 경추탈골 또는 마취하에 치사시켜 등부위 피부를 절취해서 피부안쪽의 청색 반점을 관찰함.

- 결과판정 : 출현한 청색반의 장경과 단경의 평균치가 5mm 이상이면 양성으로 하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청희석액의 희석 배수(최대 희석 배수)를 그 혈청의 최종 역가(항체가)로 정함.

㉔ 피부감작성 시험 : 피부감작성 시험과 마우스를 이용한 국소임파절증식성시험을 실시함.

a. 피부감작성 시험

- 동물 : 순조로이 발육한 동일 주령의 기니픽을 사용함. 암컷을 사용할 경우에는 임신이 되지 않고 출산경험이 없는 동물을 사용함.
- 동물 수 : 시험군은 각 군당 10수 이상으로 하며 원칙적으로 시험물질군, 용매 대조군 및 양성대조군을 둔.
- 시험물질 : 시험물질이 액제 또는 반고형제인 경우 희석하지 않고 사용하고 고형제일 경우 증류수 또는 적절한 용매에 습윤시켜 균일하게 적용함.
- 감각 및 야기항원량 결정시험 : 피내주사에 의한 감각 항원량의 결정해야 함. 시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모된 2수 이상의 기니픽 등에 0.1ml씩 좌우대칭이 되도록 피내주사함. 피내주사 24시간 후에 주사부위를 관찰하여 모든 동물에서 약한 자극성 혹은 중등도 자극성을 나타내는(피부괴사가 나타나지 않는 최고농도)농도를 감각항원량으로 정함. 패색칩포에 의한 감각 및 야기 항원량의 결정을 위해 시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모된 2수 이상의 기니픽의 측복부에 시험물질 단계별 희석액 0.2ml을 포함하는 패취(1×1cm)를 부착하여 24시간 패색칩포함. 패취 제거 후 24시간 및 48시간째에 관찰하여 약하거나 중등도

의 홍반이 나타나는 최저농도를 감각항원량으로 하며, 야기항원량은 홍반(자극)이 나타나지 않는 최대농도를 사용함.

- 본 시험 방법 : 1차 감각은 제모한 시험동물의 등부위 피부(약 2×4cm)의 상부, 중부, 하부에 아래의 용액 0.1ml씩을 좌우 대칭으로 피내주사하며 이중 ①와 ②의 주사는 머리 쪽으로 서로 근접하도록 함.

- ① 증류수(또는 생리식염수)/Freund's Complete Adjuvant(FCA)의 유화물(1 : 1 혼합물)
- ② 시험물질 용액 또는 용매대조군의 경우 시험물질을 녹인 용매
- ③ 시험물질 용액(또는 시험물질을 녹인 용매)과 증류수(또는 생리식염수)/FCA 유화물(1 : 1 혼합물)의 혼합액(1 : 1 혼합물)

- 2차 감각은 1차 감각 1주 후 피내 주사한 부위를 다시 제모한 뒤 시험물질(또는 시험물질을 녹인 용매)을 포함하는 패취(2×4cm)를 부착하여 48시간동안 폐색칩포시킴. 단, 시험물질이 피부자극성이 없는 경우는 피부자극성을 유도하기 위해 24시간 전에 0.5ml의 10% 라우릴 황산나트륨이 들어 있는 바세린으로 도포한 후에 시험물질을 도포함. 야기는 폐색칩포 2주 후 시험동물의 한쪽 등부위 또는 측복부(감작부위와는 다른 부위)를 제모하고 시험물질을 포함하는 패취(2×2cm)를 부착하여 24시간동안 폐색칩포하여 야기시킴. 또 다른 한쪽에는 용매대조군의 용매를 적용할 수도 있음.
- 관찰기간 : 폐색칩포 제거 후 시험물질을 증류수나 식염수로 세척하고 21시간째에 제모한 후 24시간 및 48시간째에 피부반응을 평가기준에 의해 기록함.
- 검색방법 : 폐색칩포 제거 후 24시간 및 48시간에 개체별로 홍반 및 부종 반응을 표 1-40의 피부반응 평가기준표에 의해 점수를 기록하고 투여군별 평균점수를 구함. 피부감작성 평가는 전체 공시동물 중 피부반응이 일어난 개체의 비율(감작율, %)로 구함(1-41). 시험기간 중의 피부반응이외에 전신적인 증상을 기록하고 의심되는 반응을 명확히 하기 위해서 병리조직학적 소견 관찰, 피부두께 측정 등을 할 수 있음.

표 1-40. 피부반응 평가기준

점 수	증 상
0	무반응
1	홍반이 적용부위에 흩어져 나타남
2	홍반이 적용부위 전체에 나타남
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남

표 1-41. 피부감작성 평가기준

감작율(%)	등 급	분 류
0~8	1	매우약함
9~28	2	약 함
29~64	3	보 통
65~80	4	강 함
81~100	5	매우강함

b. 마우스를 이용한 국소임파절증식성시험

- 동물 : 순조로이 발육한 동일 주령의 암컷 CBA 마우스를 사용함. 이때 암컷은 임신이 되지 않고 출산경험이 없는 동물을 사용함. 시험 시작 시기에 동물은 8 주령 내지 12주령 사이이고 평균체중의 20% 표준편차 범위 이내로 함.
- 동물 수 : 각 시험물질군은 적어도 4수 이상을 사용함.
- 용량단계 : 시험물질군 및 용매대조군을 두며 시험물질군은 3용량 이상으로 함. 이때 최대 투여용량은 급성독성 및 피부자극성을 고려하여 체독성이나 과도한 국소자극성이 일어나지 않는 농도이어야함. 시험 시 알려진 물질을 양성대조군으로 둘 수도 있음. 단, 시험물질의 용매는 시험물질의 적용을 위해 적절한 용액 또는 현탁액을 만들 수 있는 것으로 아세톤/올리브오일용액(4/1) 또는 시험에 영향을 미치지 않는다고 보고된 용매 등이 권장됨.
- 시험방법 : 시험기간 동안 공시동물에 대하여 매일 임상증상을 관찰하고 개체별 체중을 기록하는 것을 원칙으로 함. 시험시작 일에 개체별로 각 동물을 확인하고 체중을 기록하고 양쪽 귀의 배부에 시험물질용액 25 μ l을 1회씩 투여함. 시험 2, 3일째에도 “시험방법”에서의 맨 첫 번째 시험절차와 같이 하고 시험 4, 5일에는 투여를 중지함. 시험 6일째에 각 동물의 체중을 기록하고 20uCi의 ³H-methyl thymidine(또는 2uCi의 ¹²⁵I-iododeoxyuridine, 10⁻⁵M fluorodeoxyuridine)을 포함하는 인산완충식염수 250 μ l를 미정맥을 통해 주사함. 주사 후 5시간에 동물을 부검하여 양쪽 귀밑의 이하임파절을 채취하여 시험군별(또는 개체별) 인산완충식염수에 함침. 함침 이하임파절을 200 μ m 망에서 물리적으로 갈아 단일 세포 부유액을 만듦. 임파절세포를 인산완충식염수로 2회 세척하고 5% trichloroacetic acid(TCA)로 4°C에서 18시간 정치하여 침강시킴. 침강물을 1ml TCA로 부유시켜 1ml의 신틸레이션액이 들어 있는 바이알에 옮겨 β (또는 γ)-방사성 동위원소 측정기로 ³H(또는 ¹²⁵I) 양을 DPM(disintegrations per minute)단위로 측정함. 또는 세포부유액을 형광기질액에 섞어 형광분석기를 이용하여 형광강도를 측정함.
- 검색방법 : 결과는 시험군의 방사성동위원소 표지량((또는 형광강도)을 용매대조군의 방사성동위원소 표지량(또는 형광강도)으로 나눈 값을 자극지수(stimulation index, SI)로 하여 용량반응성 및 통계학적 유의성을 고려하여 SI값이 3이상인 경우 감작성으로 판정함. 이때 시험물질의 감작성은 SI값 외에도 시험기간 중에 관찰된 임상증상 등을 고려하여 평가하는 것이 바람직함.

㉞ 사료첨가제

- ㉞ 사료첨가제의 독성시험은 급성독성시험, 아급성독성시험 및 만성독성시험을 실시함. 시험동물은 일반 동물용의약품과 같음. 각각의 시험방법은 다음과 같음.
- ㉞ 급성독성시험방법 : 일반 동물용의약품 급성독성시험에 따름.
- ㉞ 아급성독성시험
 - 동물 : 2종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그 중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 함.

- 동물 수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 10수 이상으로 하고 비설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 3수 이상으로 함. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물 수를 미리 추가함.
- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용경로로 투여하며, 경구투여의 경우에는 강제 투여 또는 사료 아니면 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있음.
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둠. 급성독성시험 또는 예비적인 단기간의 연속투여 시험결과를 참고로 유해반응의 종류와 강도를 명확히 하여 중독량, 최소중독량 및 무독성량(No Observable Adverse Effect Level : NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수로 함. 중독량은 일부의 동물을 치사 시키거나 또는 확실한 독성변화가 나타나는 양으로 하고, 최소중독량은 어떤 독성변화가 나타나는 최소량으로 함. 무독성량(NOAEL)은 어느 동물에서도 독성변화가 나타나지 않는 양으로 함. 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로 부터 검체섭취량을 산출함.
- 대조군 : 음성대조를 두고, 음성대조는 검체투여 시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 함. 또한 기타 무처리 대조군을 두는 것이 바람직함.
- 투여기간 : 설치류는 3개월 이상, 비설치류는 6개월 이상으로 하며 투여는 주 7일로 함.
- 검색방법
 - 각 군의 전 예에 대해서 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상 그 후는 4주에 1회 이상 측정함.
 - 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 투여 개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상 그 후는 4주에 1회 이상 측정함. 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사함. 또, 검체의 화학구조, 약리작용 및 일반상태로부터 유추하여 적절한 임상검사를 추가하는 것이 바람직함.
 - 투여기간 중 사망 예에 대해서는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰, 중량 측정 및 병리조직학적 검색함. 병리조직학적 검사의 대상으로 되는 기관·조직은 다음과 같으나 육안소견 등으로부터 그 필요성이 인정되지 않는다고 판단되는 경우에는 그의 일부를 생략할 수 있음. [피부, 유선, 임파절, 타액선, 흉골, 대퇴골(골수포함), 흉선, 기관·폐 및 기관지, 심장*, 갑상선 및 상피소체, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간장*, 췌장, 비장*, 신장*, 부신*, 방광, 정낭, 전립선*, 정소*, 난소*, 자궁, 질, 뇌*, 하수체*, 척수, 안구, 부누선(Harder's gland) 기타 육안으로 변화가 인정된 기관·조직] 상기의 기관·조직 중 *를 붙인 것에 대해서는 그 중량을 측정함.
 - 투여기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 도살 부검하여 “검색방법” 중 네 번째와 같이 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사

하였다. 또 도살 시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 하는 것이 바람직함.

- 투여종료 시의 생존 예에 대하여는 도살 부검하여 “검색방법” 중 네 번째와 같이 각 군의 전 예에 대하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정함. 병리조직학적 검색은 원칙으로 대조군 및 최고용량군의 전 예에 대하여 실시하나, 다른 시험군에서 육안으로 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전 예에 대하여서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사함. 또, 도살 시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사를 함. 검사항목은 가능한 많은 항목에 걸치는 것이 바람직하며, 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로 널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용함.

㉔ 만성독성시험

- 동물 : 2종 이상의 동일 주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그 중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 함.
- 동물 수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 10수 이상으로 하고, 비설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 3수 이상으로 함. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도 도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물 수를 미리 추가함.
- 투여경로 : 임상적용경로 또는 경구투여로 함. 경구투여의 경우에는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법 또는 강제투여에 의한 방법이 있음.
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둬. 아급성독성시험의 결과를 참고로 어떤 독성변화가 나타나는 양 및 무독성량(NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수를 결정함. 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로 부터 검체 섭취량을 산출함.
- 대조군 : 음성대조를 둔다. 음성대조는 검체투여 시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 함. 또한 기타 무처리 대조군을 두는 것이 바람직함.
- 투여기간 : 설치류는 2년 정도로 하고, 비설치류는 2년 이상으로 하며 투여는 주 7일로 함.
- 검색방법
 - 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여 개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함.
 - 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 투여 개시 후 1개월까지는 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함.
 - 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 함. 또, 필요하면 기타 임상검사를 실시함.
 - 투여기간 중의 사망 예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰,

중량 측정 및 병리조직학적 검사를 함. 병리조직학적 검사의 대상으로 되는 기관·조직은 다음과 같으나 육안소견 등으로부터 그 필요성이 안정되지 않는다고 판단되는 경우에는 그의 일부를 생략할 수 있음. [피부, 유선, 임파절, 타액선, 흉골, 대퇴골(골수포함), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장*, 갑상선 및 상피소체, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간장*, 췌장, 비장*, 신장*, 부신*, 방광, 정낭, 전립선*, 정소*, 난소*, 자궁, 질, 뇌*, 하수체*, 척수, 안구, 부누선(Harder's gland), 기타 육안으로 변화가 인정된 기관·조직] 상기의 기관·조직 중 *를 붙인 것에 대해서는 그 중량을 측정함.

- 투여기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 도살 부검하여 “검색방법” 중 네 번째와 같이 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사 함. 또 도살 시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사를 하는 것이 바람직함.
- 투여종료시의 생존 예에 대하여는 도살 부검하여 “검색방법” 중 네 번째와 같이 각 군의 전예에 대하여는 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정함. 병리조직학적 검사는 원칙으로 대조군 및 최고용량군의 전 예에 대하여 실시하나, 다른 시험군에서 육안으로 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전 예에 대하여서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사를 실시함. 또, 도살 시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 실시함.
- 검사항목 : 가능한 한 많은 항목에 걸치는 것이 바람직하며 각 항목의 측정에는 각각 국제적으로 널리 이용되는 방법 및 측정단위를 채용함.

㉠ 사료첨가제의 생식독성시험 : 최기형성시험과 후세대 생식독성시험이 있음. 시험 동물은 종 및 계통의 선택에 있어서는 수태능 등의 생식에 관한 지식, 자연발생 기형의 발생빈도, 생식·발생에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질에 대한 감수성 등을 고려함. 기형새끼의 자연발현율이 낮은 종 및 계통을 선택하는 것이 바람직함. 최기형성시험 및 후세대 생식독성시험에 공통으로 사용되는 동물은 종 및 계통이 동일한 것이 바람직함.

㉡ 최기형성시험은 일반 동물용의약품의 최기형성시험에 따름.

㉢ 후세대 생식독성시험

- 동물 : 설치류 등에서 선택한 1종 이상의 암·수 동물로 함. 일반적으로 랫트 또는 마우스가 사용됨.
- 동물 수 : 1군 20수 이상의 수놈과 임신말기에서 원칙적으로 1군 20수 이상의 임신 동물을 확보하기 위하여 필요한 암놈으로 함.
- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있음.
- 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둬. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중증가의 억제 등 어떤 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 함. 기술적으로 투여 가능한 최대량에서도 독성징후가 나타나지 않는 경우에는 그 양을 최고용량으로 함. 최저용량은 부모동물, 태자 또는 출

생새끼의 어느 것에도 장애가 나타나지 않는 양으로 함. 중간용량(복수인 것도 있음)은 원칙으로 최고용량과 최저용량의 등비중향으로 함. 용량단계중에는 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상상 용량과 가까운 용량이 포함되는 것이 바람직함.

- 대조군 : 음성대조를 둔다. 또 필요에 따라 양성대조 또는 비대조를 둬. 음성대조는 검체 투여시에 각종용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 원칙으로 그것만을 투여하는 군으로 함. 또 양성대조에는 생식에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질을, 비교대조에는 화학구조 또는 약효가 유사한 기존 약물을 사용함.
- 투여기간 : 제1세대 생식독성시험의 경우 설치류일 때는 암·수 모두 8주령부터 8주간 이상 매일 투여한 후 교배시킴. 교배는 3주간을 한도로 하여 동일한 수놈과 암놈을 1 : 1로 동거시킴. 수놈에 대하여는 교배기간 중에도 연속 투여하고, 암놈에 대하여는 교배기간중, 임신기간중 및 분만 후 신생자의 이유까지의 기간에 투여를 계속함. 제2세대 생식독성시험의 경우 제1세대 생식독성시험에서 출산한 암·수 동물에 대하여 똑같은 방법으로 투여함.
- 검색방법 : 시험기간중 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정함. 교배기간이 종료된 수놈은 도살 부검하여 기관·조직을 육안으로 관찰함. 교미가 성립하지 않은 암·수에 대하여는 그 원인을 조사함. 다음 산출법으로 교미율 및 수태율을 구함.

$$\text{교미율} = (\text{교미동물} / \text{동거동물}) \times 100$$

$$\text{수태율} = (\text{수태동물} / \text{교미동물}) \times 100$$

- 각 군의 전 예를 분만포육 시킴. 분만 시에는 분만의 장애나 지연의 징후 등에 대하여 관찰하고, 어미의 수유·포육 본능에 대한 영향 등을 조사함. 다음 산출법으로 출산율을 구함.

$$\text{출산율} = (\text{생자출산 암놈수} / \text{임신 암놈수}) \times 100$$

- 신생자에 대하여는 산자수, 그의 생사 성별 및 외표에서의 변화 등을 조사하고 체중을 측정함. 동복생자수를 조절하는 경우에는 생후 비교적 빠른 시기에 어미 한마리당 수놈과 암놈이 거의 동수가 되도록 일정 마리수를 무작위로 채취하고 여분의 새끼를 도태함. 랫트 또는 마우스에서는 통상 생후 4일령에서 8마리 정도로 함. 출생자에 대하여는 성장 및 발달과 함께 특이한 증상의 유무나 행동의 이상 등에 관하여 조사함. 출생자에 이상소견이 보인 경우에는 필요에 따라 새로이 유모포육 시험을 실시하여 생후 어느 시기에서의 영향에 의한 것인가를 분석함. 성장 및 발달에 대하여는 형태, 기능 및 행동에 관하여 검색함. 또한 필요에 따라서 다시 장기간 관찰함. 출생으로부터 이유까지의 사이에 출생율, 생존율 및 이유율을 다음 산출법으로 구함.

$$\begin{aligned} \text{출생율} &= (\text{출산생자 수} / \text{착상두 수}) \times 100 \\ \text{4일 생존율} &= (\text{생후 4생일자 수} / \text{출산생자 수}) \times 100 \\ \text{이유율} &= (\text{이유시 생자수} / \text{생후 4일의 생자수 또는 도태 직후의 생자수}) \times 100 \end{aligned}$$

- 처치된 어미에 대하여는 적당한 시기에 부검하여 기관·조직을 육안으로 관찰하고, 필요에 따라서 검체의 투여를 계속하여 다세대에 관한 검사를 실시함.

㉔ 사료첨가제의 변이원성시험, 암원성시험, 미생물학적 독성시험, 국소독성시험, 면역게이상시험은 일반 동물용의약품의 각 시험법을 따름.

③ 실험실적 면역증강 효능평가

- 각 축종별로 실험실적 면역증강 효과를 평가하기 위해 다음과 같은 검사를 수행함. 면역증강 효과가 *in vitro*에서 확인되면 목적동물에 적용하기 위한 농도, 급여시기 및 기간(용법, 용량)을 설정함.

㉕ NO 생산능 효능평가기법

㉕ 양계

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스, 조류인플루엔자 바이러스에 음성인 닭 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6 / 100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 24시간 배양함. 양성대조군의 경우는 LPS(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 24시간의 배양 후 원심분리하여 상층액을 수거함.
- NO 생산능 측정 : 수거한 상층액 100 μ l에 동량의 Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선은 NaNO₃를 사용하여 구함.

㉕ 양돈

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 PRRS, SIV, M. hyopneumoniae 음성인 돼지 5마리에서 전혈을 채취한 후

Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고, 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.

- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 24시간 배양함. 양성대조군의 경우는 LPS(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 24시간의 배양 후 원심분리하여 상층액을 수거함.
- NO 생산능 측정 : 수거한 상층액 100 μ l에 동량의 Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선은 NaNO₃를 사용하여 구함.

㉞ 축우

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 BRV, BCV, BVDV 음성인 소 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 24시간 배양함. 양성대조군의 경우는 LPS(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 24시간의 배양 후 원심분리하여 상층액을 수거함.
- NO 생산능 측정 : 수거한 상층액 100 μ l에 동량의 Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선은 NaNO₃를 사용하여 구함.

㉟ 림프구 증식능 효능평가기법

㉠ 양계

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 ND, AI 음성인 닭 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^5/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/100 μ l로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/100 μ l까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/100 μ l까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/100 μ l까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 준비된 동량의 희석물질을 96-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 24시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. WST-8 검사를 위해 24시간 배양 후 WST-8 용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양함. 배양 후 부드럽게 섞어 450nm에서 흡광도를 측정함.

㉡ 양돈

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 PRRS, SIV, M. hyopneumoniae 음성인 돼지 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^5/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/100 μ l로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/100 μ l까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/100 μ l까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/100 μ l까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 준비된 동량의 희석물질을 96-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 24시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. WST-8검사를 위해 24시간 배양 후 WST-8 용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양함. 배양 후 부드럽게 섞어 450nm에서 흡광도를 측정함.

㉢ 축우

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 BRV, BCoV, BVDV 음성인 소 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^5/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/100 μ l로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/100 μ l까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/100 μ l까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/100 μ l까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 준비된 동량의 희석물질을 96-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 24시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. WST-8 검사를 위해 24시간 배양 후 WST-8 용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양함. 배양 후 부드럽게 섞어 450nm에서 흡광도를 측정함.

㉔ Cytokine 발현능 효능평가기법

㉔ 양계

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 ND, AI에 음성인 닭 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 72시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 배양 후 원심분리하여 세포와 상층액을 분리하여 수거함.
- Cytokine 생산능 측정 : 원심분리한 세포에서 total RNA를 분리하고 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성함. 합성한 cDNA는 chicken INF- α , INF- β , TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, 및 IL-6 특이 프라이머와 함께 SYBr real-time PCR

로 증폭하여 각 cytokine의 mRNA 발현을 정량함. β -actin의 mRNA 발현량을 동시에 측정하여 cytokine의 발현값을 조정함.

㉠ 양돈

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 PRRS, SIV, M. hyopneumoniae 음성인 돼지 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 72시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 배양 후 원심분리하여 세포와 상층액을 분리하여 수거함.
- Cytokine 생산능 측정 : 원심분리한 세포에서 total RNA를 분리하고 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성함. 합성한 cDNA는 swine INF- α , INF- β , TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, 및 IL-6 특이 프라이머와 함께 SYBG real-time PCR로 증폭하여 각 cytokine의 mRNA 발현을 정량함. β -actin의 mRNA 발현량을 동시에 측정하여 cytokine의 발현값을 조정함.

㉡ 축우

- Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) 준비 : 헤파린 튜브를 이용하여 BRV, BCoV, BVDV 음성인 소 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 μ l의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6/100\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지(RPMI1640, 10% FBS)를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.

- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 72시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A(10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하여, 음성대조군의 경우는 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 배양 후 원심분리하여 세포와 상층액을 분리하여 수거함.
- Cytokine 생산능 측정 : 원심분리한 세포에서 total RNA를 분리하고 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성함. 합성한 cDNA는 swine INF- α , INF- β , TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, 및 IL-6 특이 프라이머와 함께 SYBr real-time PCR로 증폭하여 각 cytokine의 mRNA 발현을 정량함. β -actin의 mRNA 발현량을 동시에 측정하여 cytokine의 발현값을 조정함.

(나) 단일 제제의 목적동물 및 마우스에 대한 효능평가 적용 시험

① 양계

㉞ 닭에 대한 베타글루칸 효능평가 적용 시험

- 닭 PBMC proliferation 측정(*in vitro*)하기 위해 먼저 SPF 백색 산란계로부터 PBMC를 분리한 후, 분리된 세포는 96-well plate에 5 \times 10⁶cell/ml로 분주하여 48시간 배양 후, MTS assay를 수행하여 proliferation을 측정함.
- 양성 control로 LPS와 proanthocyanidin(PAE)을 사용함. 시험군으로서 베타글루칸(BP)을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%로 처리하였음(그림 1-58).
- PBMC에 LPS와 베타글루칸을 동시에 처리하여 실험을 수행한 결과, PBMC proliferation이 LPS만을 단독 처리한 그룹에 비해 소폭 증가함을 알 수 있었고, *in vitro*상에서의 최적 농도는 0.05%로 사료됨.
- 또한 PBMC에 베타글루칸만을 단독 처리하여 실험을 수행한 결과, PBMC proliferation이 LPS만을 단독 처리한 그룹과 비슷한 정도의 proliferation을 나타냈음. 따라서 베타글루칸이 LPS와 같은 mitogenic activity를 가지고 있고 이로 인하여 PBMC의 proliferation이 증가되는 것으로 사료되며, *in vitro*상에서의 최적 농도는 0.05%로 사료된다(표 1-42, 표 1-43).

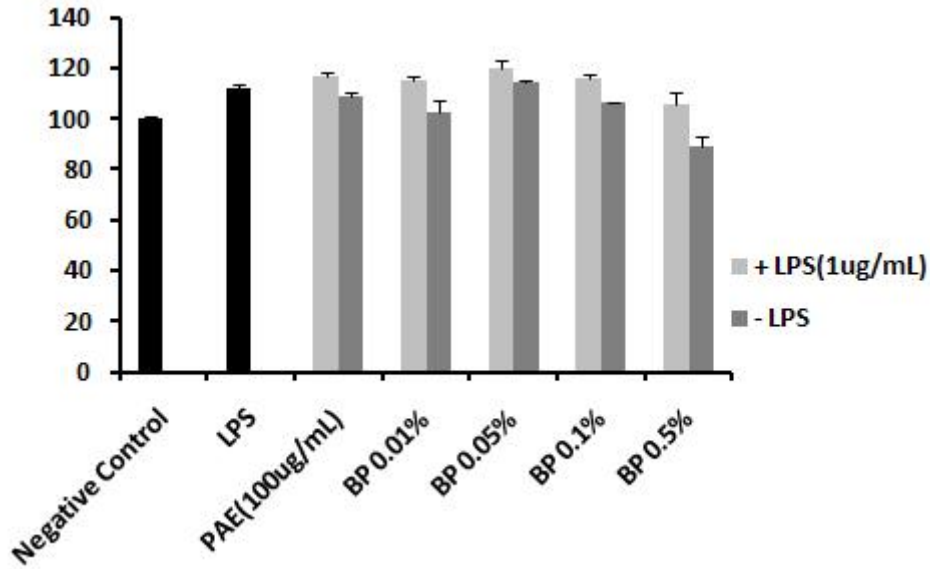


그림 1-58. LPS를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹에서의 PBMC proliferation

표 1-42. LPS를 동시에 처리한 그룹에서의 PMBC proliferation

	PBMC proliferation(%)	표준오차	t-test
Negative Control	100.00	0.885881	
LPS	111.85	1.451733	$P < 0.05$
PAE(100 μ g/ml) + LPS	117.02	1.517803	$P < 0.05$
BP 0.01% + LPS	115.12	1.460426	$P < 0.05$
BP 0.05% + LPS	120.05	3.420843	$P < 0.05$
BP 0.1% + LPS	116.31	1.250297	$P < 0.05$
BP 0.5% + LPS	105.81	4.379834	0.332351

표 1-43. LPS를 처리하지 않은 그룹에서의 PMBC proliferation

	PBMC proliferation(%)	표준오차	t-test
Negative Control	100.00	0.885881	
LPS	111.85	1.451733	$P < 0.05$
PAE(100 μ g/ml)	108.99	1.328822	$P < 0.05$
BP 0.01%	102.86	4.065071	0.621409
BP 0.05%	114.64	0.442941	$P < 0.05$
BP 0.1%	106.36	0.275585	$P < 0.05$
BP 0.5%	89.34	3.535479	0.073856

- PBMC에 Con A와 베타글루칸을 동시에 처리하여 실험을 수행한 결과, PBMC proliferation이 Con A만을 단독 처리한 그룹에 비해 소폭 증가함을 알 수 있었고, *in vitro*상에서의 최적 농도는 0.05%로 사료됨.
- 또한, PBMC에 베타글루칸만을 단독 처리하여 실험을 수행한 결과, PBMC proliferation이 Con A을 단독 처리한 그룹과 비슷한 정도의 proliferation을 나타

냄. 따라서 베타글루칸이 Con A와 같은 mitogenic activity를 가지고 있고 이로 인하여 PBMC의 proliferation이 증가되는 것으로 사료되며, *in vitro*상에서의 최적 농도는 0.05%로 사료됨(그림 1-59, 표 1-44, 표 1-45).

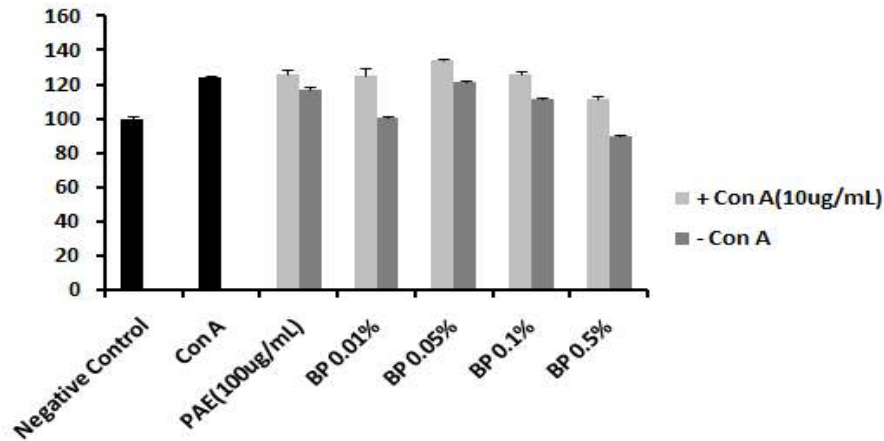


그림 1-59. Con A를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹에서의 PBMC proliferation

표 1-44. Con A를 동시에 처리한 그룹에서의 PMBC proliferation

	PBMC proliferation(%)	표준오차	t-test
Negative Control	100.00	1.554891	
Con A	124.18	0.442751	$P < 0.05$
PAE(100 μ g/ml) + Con A	125.66	2.767706	$P < 0.05$
BP 0.01% + Con A	124.67	5.285033	$P < 0.05$
BP 0.05% + Con A	134.46	0.817623	$P < 0.05$
BP 0.1% + Con A	126.09	1.567769	$P < 0.05$
BP 0.5% + Con A	111.49	1.480372	$P < 0.05$

표 1-45. Con A를 동시에 처리하지 않은 그룹에서의 PMBC proliferation

	PBMC proliferation(%)	표준오차	t-test
Negative Control	100.0001	1.554891	
Con A	124.18	0.442751	$P < 0.05$
PAE(100 μ g/ml)	117.16	1.929908	$P < 0.05$
BP 0.01%	100.50	0.905152	0.747901
BP 0.05%	121.13	0.817623	$P < 0.05$
BP 0.1%	111.27	1.535373	$P < 0.05$
BP 0.5%	89.37	1.412612	0.068413

- 닭 PBMC NO 생산 측정(*in vitro*)을 다음과 같이 진행함. PBMC에 LPS와 베타글루칸을 동시에 처리하여 실험을 수행한 결과, NO 생산이 LPS만을 단독 처리한 그룹과 비슷한 정도로 베타글루칸은 NO 생산의 증가에는 영향을 주지 않는 것으로 사료됨. 이는 베타글루칸만을 단독 처리하여 실험을 수행한 결과도 비슷한 결과를 보여줌.
- 베타글루칸은 *in vitro*상에서 닭의 PBMC proliferation을 증가시키고, 이는 LPS와 Con A 등과 유사한 면역증진 효능을 보이는 것으로 사료됨(그림 1-60). 따라서 베타글루칸은 PBMC에 존재하는 T 세포와 B 세포 모두의 proliferation을 증가시키는 것으로 예상할 수 있음.

- 반면, 베타글루칸은 *in vitro*상에서 닭 PBMC에서의 NO 생산에는 아무런 영향을 주지 않는 것으로 판단됨. 따라서 닭에서 대식세포와 같은 면역세포의 자극에는 영향을 주지 않을 것으로 예상됨.
- 현재 PBMC에서의 cytokine 발현양상에 대해 실험을 진행하였으며, 현재까지의 결과를 보면, *in vitro*상에 베타글루칸의 최적 농도는 0.05%로 이를 참고하여 *in vivo* 실험을 수행하였음.

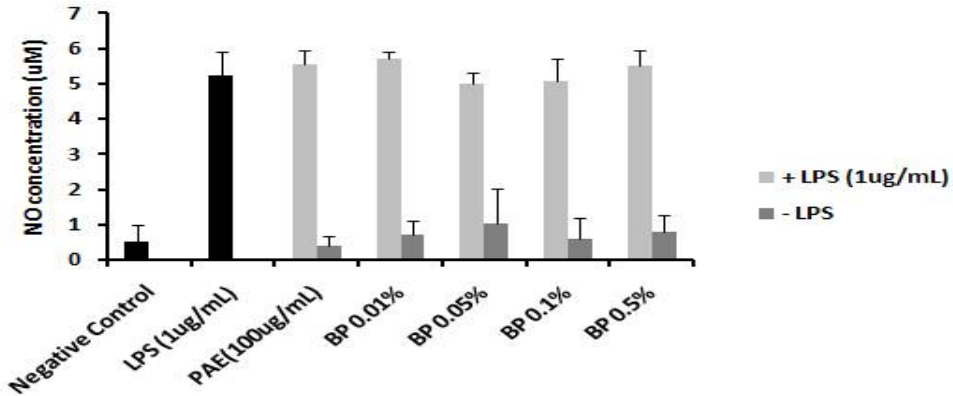


그림 1-60. LPS를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹에서의 NO 생산 측정

② 양돈

㉞ 베타글루칸 효능평가 적용 시험

- 동물실험 수행방법은 4~5주령의 돼지 23마리를 같은 농장에서 구입하여 각각 5마리의 돼지를 4개의 돈방에 나누어 사육하고, 나머지 3마리의 돼지들은 나머지 1개의 돈방에 사육함.
- 7일간의 순치기간 후에 표 1-46과 같이 BG 그룹의 돼지들에게는 베타글루칸을 사료와 함께(베타글루칸을 3%로 첨가) 14일 동안 섭취하게 하고 BG-X 그룹의 돼지들에게는 베타글루칸과 함께 천연물을 같은 기간 동안 섭취하게 함.
- BG-AM의 돼지들에게는 베타글루칸과 살모넬라 생육 억제균을 첨가된 사료를 NF(normal feeds) 그룹의 돼지들에게는 일반사료만을 같은 기간 동안 섭취하게 함.
- 그룹 5의 돼지들은 음성군(Neg)으로 실험이 끝날 때까지 아무런 처치 없이 정상적으로 사육함.
- 첫 번째 처치 후 그룹 5를 제외한 모든 돼지들에 약 1×10^8 CFU/ml로 준비된 *Salmonella typhimurium* 균과 LT 독소 양성대장균을 생리식염수에 준비하여 4ml을 구강으로 접종함.

표 1-46. 동물실험 방법 요약

시험군 (동물수)	처치(14일간)	공격감염	비고
BG (5)	베타글루칸	살모넬라 감염	베타글루칸 처치군
BG-X (5)	베타글루칸 및 천연물	살모넬라 감염	베타글루칸 및 천연물 처치군
BG-AM (5)	베타글루칸 및 길항미생물	살모넬라 감염	베타글루칸 및 길항미생물 처치군
NF (5)	무처치	살모넬라 감염	양성대조군
Neg (3)	무처치	무처치	음성대조군

- 첫 번째 처치 전과 공격감염 전 모든 돼지들의 체중을 측정하고 혈액을 채취함. 공격감염 후에는 매주 체중을 측정하고 혈액을 채취함. 공격감염 후 살모넬라 배출과 설사유무를 확인하기 위하여 접종 후 매일 1주간 분변을 채취함. 공격접종 1과 4주후에 각 그룹의 3마리와 2마리의 돼지를 안락사 시키고 병리검사를 실시하여 살모넬라 특이 병변의 유무를 확인함.
- 임상증상 및 증체율에 대한 효과를 확인하기 위해 베타글루칸과 천연물 및 길항미생물이 첨가된 사료 및 정상사료를 공격감염 전 2주간 동안 공급한 결과, 베타글루칸과 첨가물이 첨가된 사료를 공급받은 돼지들의 사료 섭취율이 다소 떨어지는 것을 볼 수 있었고, 2주간의 일일평균증체량이 정상사료를 공급받은 돼지와 비교해 약 40~80g 정도 감소하는 것으로 나타났음(표 1-47).
- 그러나 살모넬라와 대장균을 공격감염 후 2주 동안 베타글루칸 또는 베타글루칸과 천연물을 첨가한 사료를 공급받은 돼지들은 정상사료를 공급받은 돼지들에 비해 약 60g이상 높은 일일평균증체율을 보임.
- 또한 표 1-48와 같이 정상사료를 공급받은 돼지 5마리 모두가 공격감염 2일 후 부터 5일까지 설사를 보인 반면, 베타글루칸 또는 베타글루칸과 천연물을 첨가한 사료를 공급받은 돼지들은 공격감염 후에도 설사를 보이지 않아 베타글루칸이 소화기성 세균이 유발하는 설사를 효과적으로 막아내는 결과를 관찰하였음

표 1-47. 공격접종 이전과 이후의 일일평균증체율(Average Daily Weight Gain, ADWG)

Group	ADWG(kg/day)	
	Before Challenge	After Challenge
No challenge	0.376 ± 0.027	0.624 ± 0.043
β-glucan	0.344 ± 0.123	0.500 ± 0.052
β-glucan+NP	0.306 ± 0.058	0.509 ± 0.247
β-glucan+AM	0.326 ± 0.202	0.337 ± 0.311
Normal feed	0.384 ± 0.069	0.436 ± 0.038

표 1-48. 공격접종 후 자돈의 설사 유무

Group	Days After Challenge						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
No challenge	0/3*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
β-glucan	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
β-glucan+NP	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
β-glucan+AM	0/5	2/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5
Normal feed	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5

* No. of pigs contracted diarrhea/Total No. of pigs

- 살모넬라와 대장균 배출 및 육안적, 현미경적 병변의 평가를 위해 공격감염 후 7일간 채취한 분변을 PBS를 이용하여 30% 유제로 만든 후 MagMax[®] Total Nucleic Acid Isolation Kit(Applied Biosystems)를 이용하여 DNA를 추출함.
- 추출한 DNA는 살모넬라 Stn 와 대장균 LT 유전자를 타겟으로 하는 SYBG real-time PCR을 이용하여 살모넬라와 대장균의 배출을 정량적으로 각각 분석함.
- 베타글루칸을 첨가한 사료를 공급받은 돼지들은 공격감염 후 7일 동안 분변에 살모넬라를 배출하지 않았고, 일반사료를 먹인 돼지들보다 유의성 있는($p < 0.05$) 낮은 수의 병원성 대장균을 배출함(그림 1-61).
- 공격감염 7일 후에 각 그룹에서 3마리의 돼지를 안락사 시켜 육안적 병리검사를 실시한 후 십이지장, 공장, 회장과 대장을 한 부분씩 채취하여 현미경적 병리검사를 실시하고 병변을 측정함.
- 살모넬라와 대장균을 감염시킨 돼지들이 전반적으로 공격접종을 하지 않은 돼지들에 비해 높은 육안적인 장의 충출혈이 관찰됨.
- 공격접종을 한 그룹들에서는 베타글루칸을 급여한 돼지들에서 장의 충혈, 림프절 비대와 장점막 비후 같은 육안적 병변이 정상사료를 급여한 돼지들에 비해서 감소하였고 장점막의 충혈, 염증, 용모의 퇴축 등의 현미경적 병변도 감소하였으나 통계적인 유의차는 확인되지 않았음(그림 1-62).

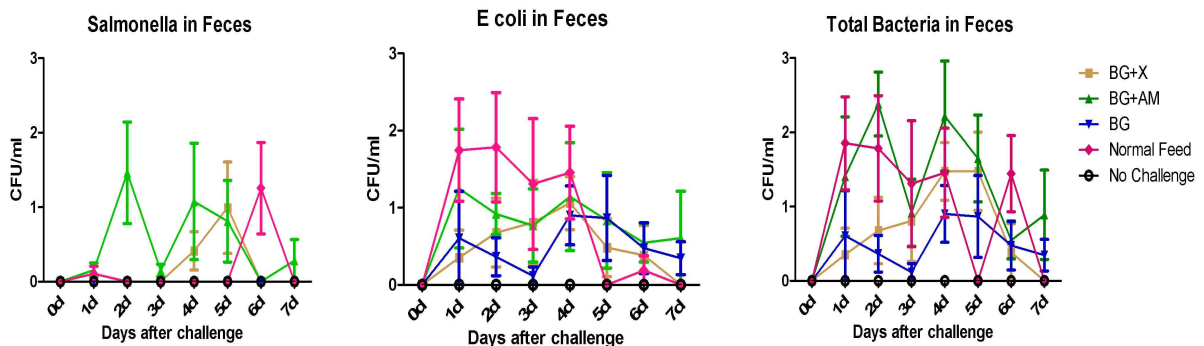


그림 1-61. 공격감염 후 1주일 동안의 살모넬라와 대장균 배출량

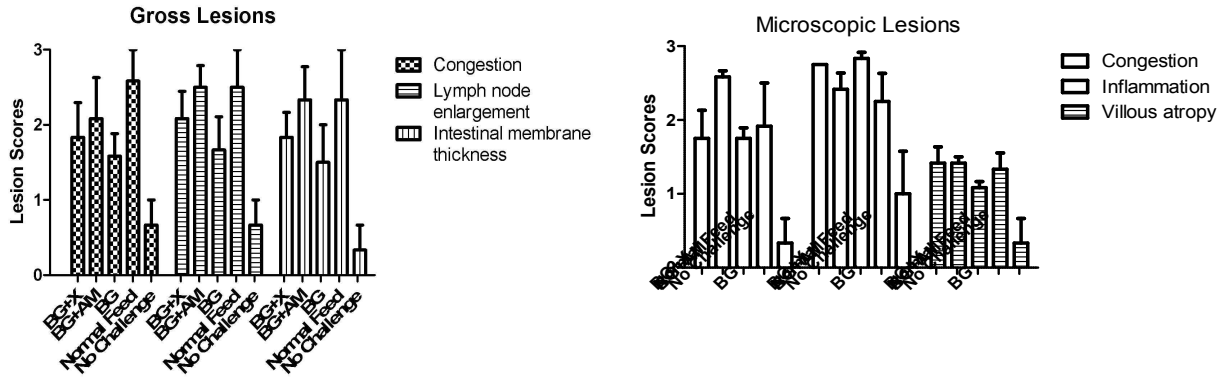


그림 1-62. 공격감염 1주 후 육안병변 및 현미경적 병변 점수(1=mild, 2=moderate, 3=severe)

- 베타글루칸 및 첨가물에 의한 면역반응을 분석하기 위해 먼저 ELISA를 이용한 살모넬라 특이 항체를 분석함. 살모넬라 LPS 항원을 100mg의 농도로 코팅한 plate를 이용하여 살모넬라 특이 IgG를 검출함. 즉, 채취한 혈청은 IgG검출을 위해 샘플 buffer로 1 : 40으로 희석하여 plate에서 한 시간 배양한 후 세척하고 peroxidase가 레이블 되어있는 anti-swine IgG mouse 단클론항체를 1 : 10000의 농도로 첨가하여 한 시간 뒤 세척 후에 TMB로 20분간 발색함.
- 살모넬라 공격감염을 한 후 IgG와 IgA가 공격감염 전과 비교하여 유의성 있게 증가하는 결과를 얻었으나 베타글루칸 급여그룹과 비급여그룹의 항체역가에는 통계적인 유의차가 발견되지 않았음(그림 1-63).

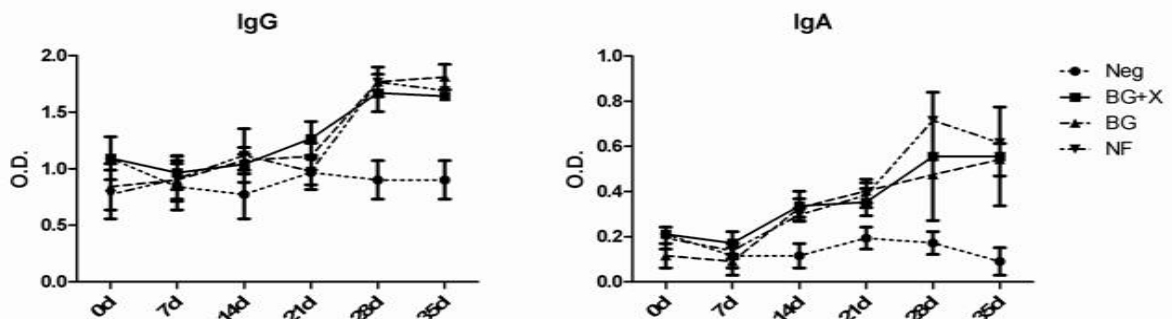


그림 1-63. *Salmonella* LPS-특이 IgG 및 IgA 농도

- 다음으로 SYBG real-time PCR과 ELISA를 이용하여 cytokine 발현을 분석하였음. EDTA 처리로 항응고된 혈액에서 Histopaque-1.077을 이용하여 peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)을 분리함. 분리된 PBMCs는 5×10^6 cells/ml의 농도로 24-well plates에 분주한 뒤 살모넬라 LPS(10 μ g/ml)를 첨가하여 감작시킴.
- 37°C에서 24시간 동안 배양한 PBMCs는 원심분리하여 상층액과 세포를 따로 분리하여 수거함. 수거한 세포에서 total RNA를 추출하여 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성한 후 SYBG real-time PCR을 이용하여 TNF- α , INF- α , INF- β 등의 염증관련 cytokine과 IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ 등의 후천적 면역 관련 cytokine들의 발현을 정량적으로 분석함.

- 또한 β -actin 유전자의 증폭을 분석하여 검출한 cytokine의 발현을 표준화함.
- 수거한 상층액은 TNF- α , IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ 특이 ELISA를 이용하여 cytokine의 발현을 단백질 수준에서 측정함.
- 베타글루칸 급여 일주일 후에 베타글루칸을 급여한 그룹의 돼지들에게도 보다 높은 수준의 INF- α 와 INF- β 의 발현이 관찰되었으나 급여 2주 후에는 발현량이 다소 감소되는 결과를 얻음(그림 1-64).

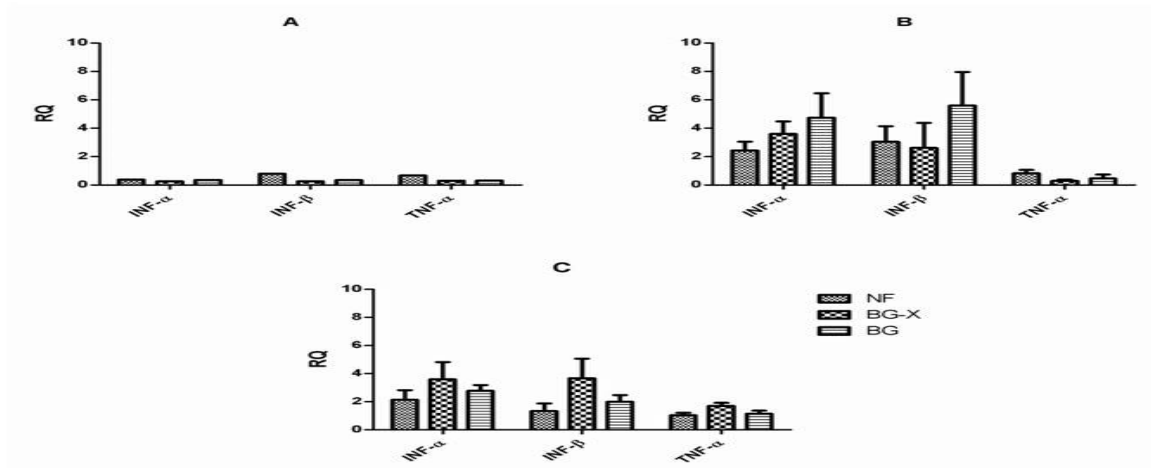


그림 1-64. Cytokine의 발현량 측정

(A) 베타글루칸 급여 전 (B) 베타글루칸 급여 1주일 후 (C) 베타글루칸 급여 2주일 후

③ 축우

㉔ 리소좀 효능평가 적용 시험

- 동물실험 수행 방법은 8주령 SD rat 수컷 70마리를 7개 그룹으로 나누어 그룹당 10마리씩 사용함. *E. coli* (ATCC 10536)는 5×10^9 /ml 농도로 사용하였고 리소좀은 5×10^8 /rat 농도로 IV 함.
- 그룹 1은 대장균 접종 후 5분 후 리소좀 투여, 그룹 2는 대장균 접종 후 10분 후 리소좀 투여, 그룹 3은 대장균 접종 후 20분 후 리소좀 투여, 그룹 4는 대장균 접종 후 30분 후 리소좀 투여, 그룹 5는 대장균 접종 후 1시간 후 리소좀 투여하였고, 대장균만 투여한 PC와 리소좀만 투여한 대장균과 리소좀 처리 없이 생리식염수를 IV 한 NC로 나누어 실험함(그림 1-65).
- 채취한 혈액은 항응고제가 첨가된 액체 배지에 희석하여 실험에 48시간 까지 매시간 흡광도를 측정함(그림 1-66).

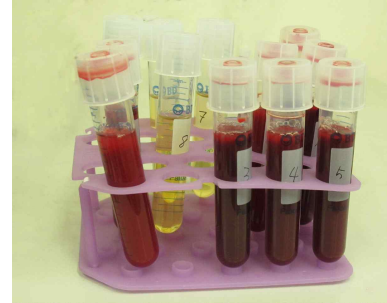


그림 1-65. 랫드의 미정맥을 통한 리소솜 투여

그림 1-66. 세균 배양을 위한 혈액과 액체 배지의 혼합

- 혈액내 세균 배양 결과, 실험군들의 세균 배양 결과는 그림 1-67과 같음. 리소솜 처리 시간에 따라 세균의 증식 시간이 지연되는 것을 확인하였으며 대장균 투여 후 리소솜 효과가 확인됨.

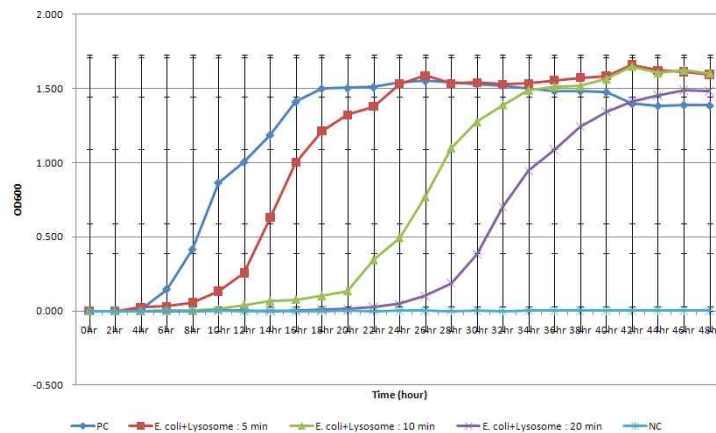


그림 1-67. 대장균 유발 랫드 균혈증 모델에서의 리소솜 효과

4. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발 (제2협동)

가. 가축전염병 제어용 항미생물 펩타이드 발현시스템의 개발 및 확보

(1) 돼지 defensin 및 cathelicidin 20종에 대하여 펩타이드 발현을 위한 full-length cDNA 확보를 시도하고 조직에서 발현이 확인된 18종에 대한 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)를 이용한 클로닝을 실시하여 DH10B에 형질전환한 glycerol stock을 확보

(가) 확보된 유전자 리스트 : PG1, PR26, PMAP36, pBD3, pBD4, pBD104, pBD106, pBD108, pBD114, pBD115, pBD119, pBD123, pBD124, pBD125, pBD127, pBD128, pBD129, pBD133

(나) 클로닝을 위해 cDNA 증폭에 사용한 primer 서열은 표 1-49와 같음

표 1-49 펩타이드 발현을 위한 cDNA 증폭에 사용한 primer 서열

Gene symbol	Accession number	Nucleotides position	Primer sequences (5'-3')	A.T. (°C)	E.P. (bp)
pBD105	FP102601.2	20573-25396	F - CTCAATTTACATCAGGGTGC R - ACAACCTTCTCGTCCTCAGT	60	135
pBD112	CU041392.3	49146-58607	F - TGTGTAGACGGAAGCTTGAG R - GTCACATTCTTCATGCAGC	60	244
pBD4*		63852-70272	F - GTGGCTTGGATTTGAGGAGAGAGT R - AGTGATACACAGGCCTGGAAGGAT	58	232
pBD114		94921-105728	F - ACCTTGGTGGATCCTGAACGATGC R - TCAAACGCCCTCTGAATGCAGCA	64	128
pBD133		111793-117208	F - GTGCCATGAAAGACACCTAT R - CAGACTTCTCCATGCAACAG	60	125
pBD108*		1195-6843	F - GACGATTGTCATTCTTCTGATCCTGG R - TAGGTTGACTTGTGGTGCCCGAAA	58	258
pBD116		21853-26511	F - CTGATCCTGGTTCATAAGAC R - GAATCCTCCTTCTCGTTAG	60	211
pBD118	CU442750.3	75980-87519	F - CTGTTCCCTACCACAAGTGAT R - GTGCGAGAAGTGACAGTATT	60	184
pBD119		89342-101888	F - CTGTTTCTTGCCATCCTT R - TACATAGGACTGGAGGCAGC	56	168
pBD122		125631-133938	F - GCTGCACTATTGCTCTTGTC R - TCACACAGCACAGTTTACCA	62	158
pBD123		143565-150992	F - TGGAATCTTCACGGCAAAT R - TGATACTTGGGCTTCACACA	68	100
pBD124		158778-164429	F - CTTCTGCTTATTGTGGCTCT R - ATCTTGGCCATCTTGAGTC	56	187
pBD115		CU627978.3	88572-92708	F - CTTAGCTGTCCTTGTGGTCC R - CAAGCCTTAGCTGTAATTGC	64
pBD128	18063-21789		F - GGTTCTCATTATCCTGCTGT R - TGTGTTCACTGTGACAGTGG	60	258
pBD129*	CU606854.2	119234-124263	F - CAAAGACCACTGTGCCGTGAATGA R - TTGATGCTGGCGAAAGGGTTGGTA	58	239
pBD3*			F - CTTCCATCCAGTCTCAGTGTCTGC R - GGCTTCTGTAGACTTCAAGGAGACAT	58	308
pBD104*			F - TCCTTCCACGTATGGAGGCTTGTT R - TTACAATACCTCCGGCAGCGAGAA	58	332

나. 돼지 항미생물 펩타이드의 *in vitro* 대량생산용 발현시스템의 개발

(1) 대장균을 활용한 일반적 단백질 발현방법을 활용하였을 경우 숙주세포인 대장균자체에 대한 발현된 펩타이드의 bacteriocidal effect에 의해 대량배양이 어려운 것으로 확

인(그림 1-68)

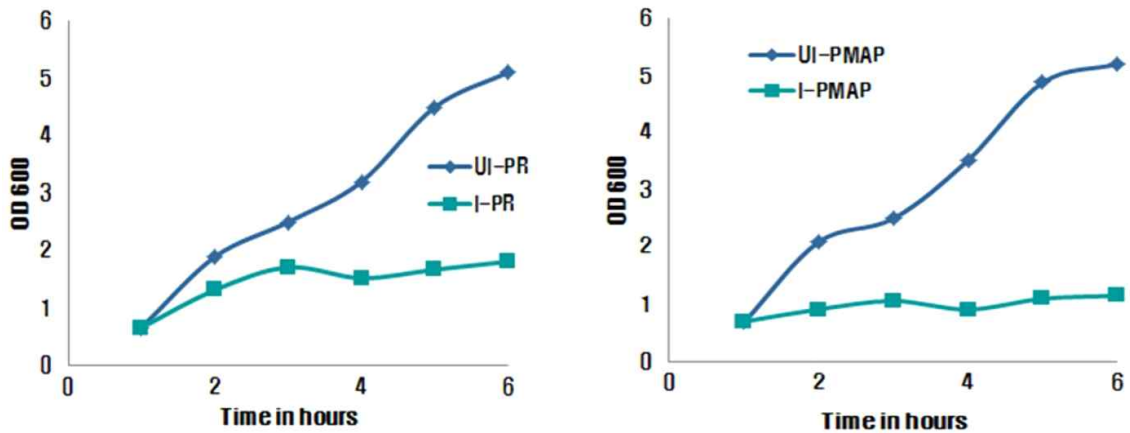


그림 1-68. 항미생물 펩타이드를 발현시킨 대장균(BL21)의 성장억제

(2) pGEX-4T-1 발현시스템을 활용한 항미생물 펩타이드 pMAP36의 발현

(가) SDS polyacrylamide 전기영동 및 western blot을 활용한 발현효율의 분석을 실시하였으나 효율성이 낮았음(그림 1-69).

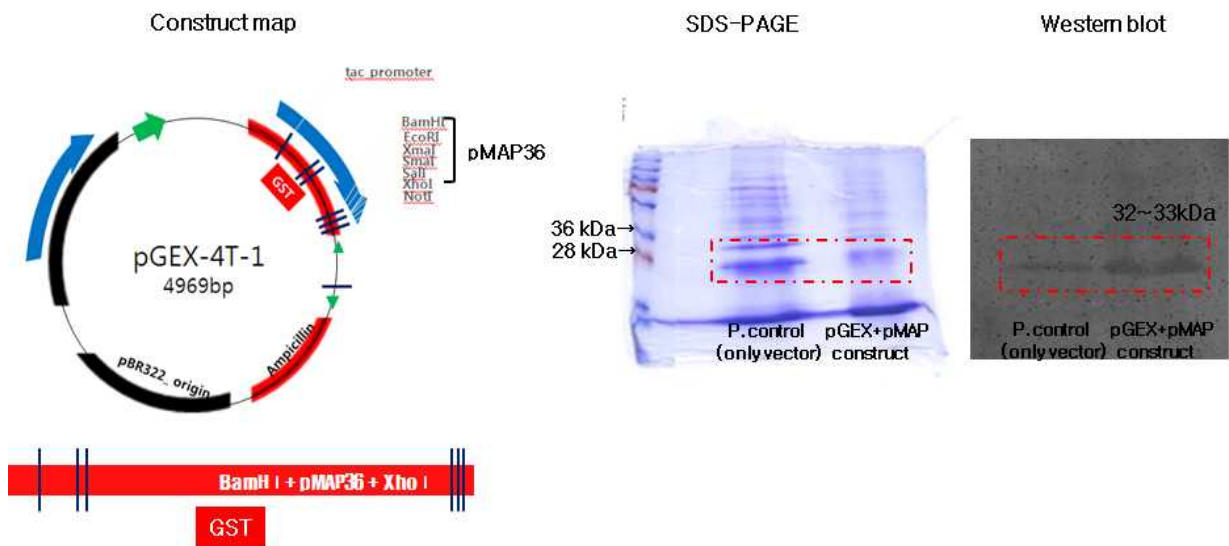


그림 1-69. pGEX-4T-1 발현시스템 활용 항미생물 펩타이드 pMAP36의 발현 효율 분석

(3) pET31b(+) 발현시스템을 활용한 PR26의 발현

(가) SDS polyacrylamide 전기영동 및 western blot을 활용한 발현효율의 분석을 실시하였으나 효율성이 낮았음(그림 1-70).

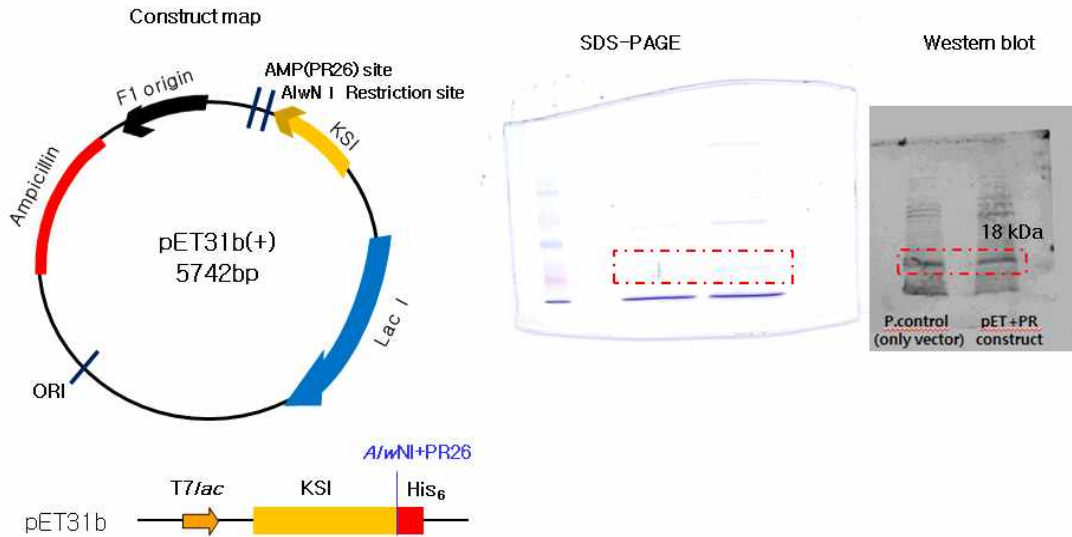


그림 1-70. pET31b(+) 발현시스템을 활용한 PR26의 발현효율 분석

(4) 효모(pichia) 발현시스템인 pPIC3.5K를 활용한 AMP의 발현

(가) SDS polyacrylamide 전기영동 및 western blot을 활용한 발현효율의 분석을 실시하였으나 효율성이 낮았음(그림 1-71).

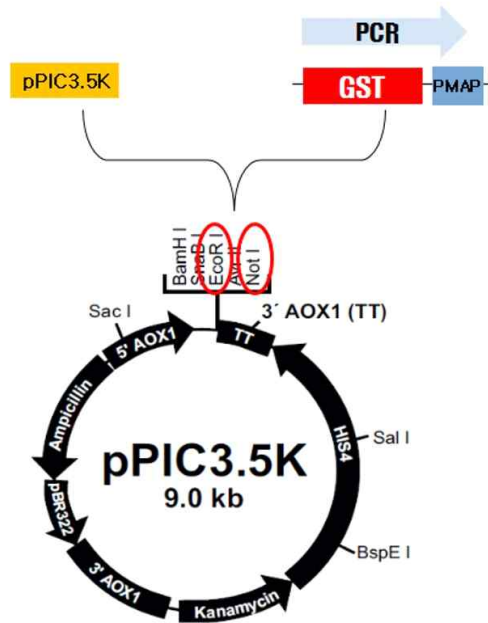


그림 1-71. 효모(pichia) 발현시스템인 pPIC3.5K를 활용한 AMP의 발현

(5) Insoluble GFP fusion을 이용한 발현시스템의 성공적 개발

(가) AMP를 insoluble GFP와 결합시켜 비활성 형태로 만들어 박테리아 증식상대에서는 AMP의 불활성화를 유도하여 대량생산을 해내는 방법을 활용하는 아이디어를 pET30b(+) vector에 결합하여 불활성 fusion protein을 정상적인 발현 효율을 확보함(그림 1-72).

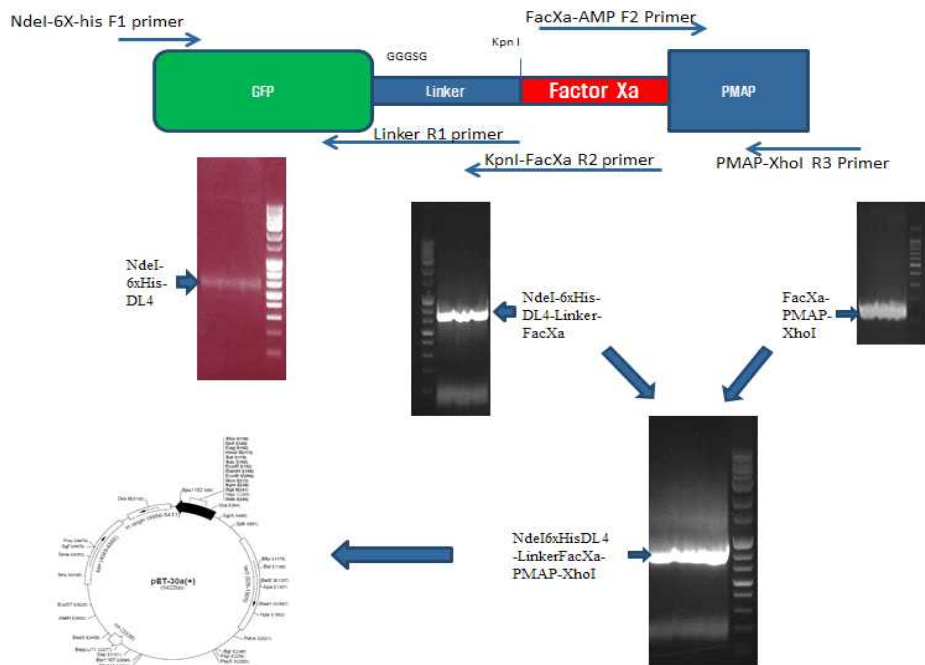


그림 1-72. PMAP construct 클로닝 strategy 및 결과

(나) Insoluble GFP fusion에 의한 형광발생

- ① Insoluble fraction에서 GFP 형광 발현을 확인한 결과 AMP가 발현됨을 확인(그림 1-73).

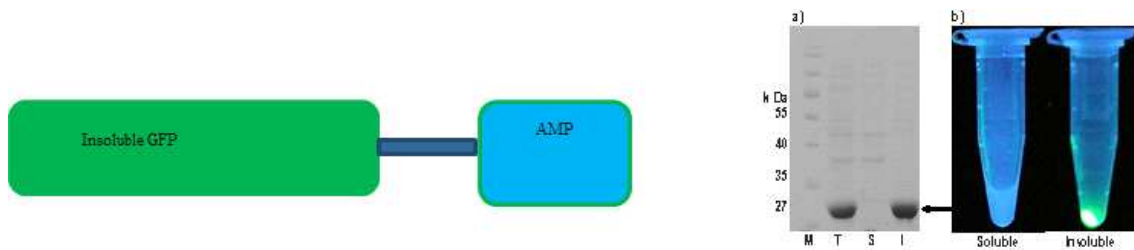


그림 1-73. Insoluble GFP fusion 모식도 및 Insoluble fraction에서의 GFP형광 발현

(다) Insoluble GFP fusion 발현시스템을 AMP의 대량발현

- ① 항미생물 효과의 억제에 따른 정상적인 수준의 AMP 발현양을 확보함(그림 1-74).

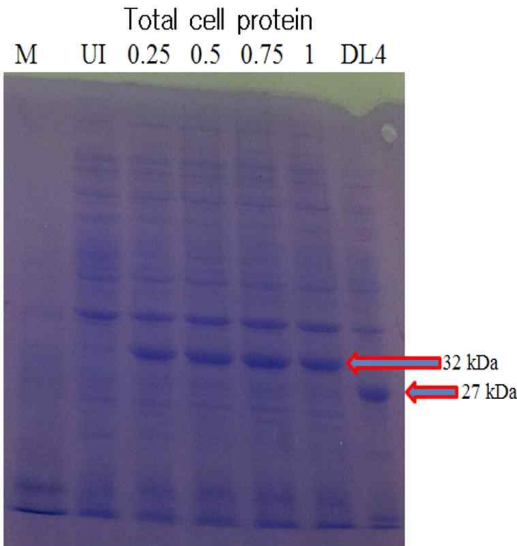


그림 1-74. Insoluble GFP 시스템을 활용한 AMP 발현 결과를 SDS-PAGE 분석결과

다. 향미생물 펩타이드의 대량발현을 위한 곤충 및 식물발현체 시스템 검토

- (1) Baculo virus를 활용한 AMP의 곤충세포주 발현시스템의 발현소요비용 분석결과 대장균 및 효모시스템에 비하여 월등히 고가로 판단되어 사용하지 않음
- (2) 식물체 발현시스템의 경우 공동연구를 통하여 발현을 시도하였으나 결과를 확보하지 못함

라. 1차년도 연구결과 요약 및 평가

(1) 가축전염병 제어용 향미생물 펩타이드 대량발현시스템의 개발

- (가) 돼지 게놈을 기반으로 한 향미생물 펩타이드 유전자의 활용연구를 위하여 향미생물 펩타이드 유전자 20종에 대하여 cDNA 클로닝을 실시하여 유전자 자원을 확보하였으며, 이들 유전자 자원의 산업적 활용을 위한 핵심 기술로써 *in vitro*에서의 향미생물 펩타이드 대량생산을 위한 기술개발을 실시하였음. 효율적 *in vitro* 시스템의 선정을 위하여 다양한 시스템의 효율을 비교분석하였으며 최종적으로 Insoluble GFP fusion을 이용한 박테리아 발현시스템을 개발하였음
- (2) 1차년도 세부 연구 목표였던 돼지 게놈에 존재하는 향미생물 펩타이드 유전자 20종에 대한 발현용 cDNA클로닝을 실시, *In vitro* 발현시스템을 활용한 향미생물 펩타이드 최적 발현시스템의 구축을 문제없이 달성하였음

5. 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 및 상용화 기반 구축 (제3협동)

가. 고위험성 가축전염병유발 질환 관련 핵심 인자의 문헌 조사 및 세균 및 바이러스의 침투, 세포 내 증식 등에 관여하는 핵심 유전자 발굴

- (1) 가축전염병질환 유발 관련 세균 및 바이러스, 관련 핵심 유전자 등에 대해 종래 보고된 논문

및 서열 정보를 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Nucleotide 정보를 통해 확보

- (2) 확보한 세균 및 바이러스, 관련 핵심 유전자 서열 정보를 토대로 핵심인자의 대량 확보를 위한 세균 및 바이러스는 대량 배양을 통한 확보를 진행하고, 관련 핵심 유전자는 PCR을 통한 서열의 대량 확보 후 PET/pGEX system 등의 재조합 발현 벡터를 활용하여 가축전염병유발 질환 관련 핵심 유전자의 클로닝을 진행(그림 1-75)
- (3) 본 연구에서는 인수공통 전염병을 유발하는 것으로 알려진 리스테리아증을 유발하는 리스테리아균의 특정 항원성 단백질을 선정하여 클로닝을 수행하고자 하였음. 먼저 리스테리아증을 유발하는 질환 관련 핵심 유전자에 보고된 논문 및 서열 정보를 미국 국립생물정보센터를 통해 확보하였으며, 이를 기반으로 *L. monocytogenes*의 리스테리아증 관련 핵심 유전자인 *prfA*를 선정하였음. 또한 *L. monocytogenes*부터 PCR을 통해 얻은 *prfA* 유전자를 제한효소 처리를 통해 pGEX-4T-1 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제작하였음. 재조합 벡터는 동일한 제한효소 처리 후 전기영동을 통해 *prfA* 유전자가 삽입된 것을 확인하였으며(그림 1-75), 재조합 벡터를 *E. coli* BL21 숙주세포에 열충격법(Heat shock)을 이용하여 형질전환을 수행하였음. 이를 통하여 형질전환된 단일클론을 확보할 수 있었음. 그 외에도 전염성 세균 및 바이러스의 핵심 단백질 ipaH, SP2등의 유전정보를 파악하고 단백질을 발현하여 확보하였음



그림 1-75. 가축전염병유발 질환 관련 핵심인자의 유전자 염기서열 정보 확보 및 클로닝 실험 결과

나. 가축전염병질환 유발 바이러스 및 세균의 증식 저해 관련 표적 단백질의 확보

- (1) 기 확보한 가축전염병질환 유발 관련 핵심 유전자를 확보해둔 발현 벡터를 포함하고 있는 세포를 배양함으로써 각 유전자에 해당하는 단백질의 과발현을 유도하여 해당 단백질을 확보
- (2) 확보한 단백질을 Ni-NTA resin 및 glutathione agarose beads를 이용하여 목적 단백질만을 순수하게 분리, 정제함으로써 회수
- (3) 상기의 연구 과정을 통하여 확보한 *prfA*가 재조합된 pGEX 4T-1 vector를 포함하고 있는 *E. coli* BL21(DE3) 재조합 클론을 획득하여, LB broth에 seed culture를 위하여 12시간 이상 배양한 후 본 배양배지에 접종하여 세포의 성장과 함께 *prfA* 단백질의

과발현을 유도함으로써 대량 확보 할 수 있었음. 또한 확보한 균체 내에서 발현된 단백질 중 활성형의 GST 융합 prfA 단백질만을 순수 정제하기 위하여 글루타티온 세파로오스 4B resin을 이용한 단백질 분리, 정제를 진행함으로써 목적 단백질을 순수하게 분리해 낼 수 있었음(그림 1-76, lane 2). 이후 차년도 실험에 단백질을 활용하기 위하여 dialysis를 통하여 확보 단백질을 분리, 정제된 단백질을 순수 정제된 단백질을 대량 확보할 수 있었음. 확보한 단백질을 Bradford assay를 통해 발현된 단백질의 양을 정량적으로 확인 할 수 있었으며, SDS-PAGE를 통하여 단백질을 확인할 수 있었음(그림 1-76, lane 3, 4). 뿐만 아니라 선행연구를 통해 확보한 바이러스성 가축질환유발 관련 SP2 단백질과 쉬겔라(*Shigella*) 속의 질환유발 관련 핵심 단백질인 ipaH 단백질의 대량발현을 통해 확보하고 있음. 향후, 기 확보한 단백질에 특이적인 앵타머를 제작함으로써 앵타머기반 질환치료제를 개발하고자 함



그림 1-76. 가축전염병유발 질환 관련 핵심단백질을 확보한 실험 모식도 및 결과

다. 가축전염병질환을 유발하는 원인균의 선정 및 배양

- (1) 가축전염병질환 유발 원인 병원성 세균의 논문 및 보고자료를 통한 선정 및 병원성 질환 원인균의 배양을 통한 확보
- (2) 본 연구팀은 가축전염병질환 유발 관련 핵심 단백질의 선정 및 확보 외에도 가축전염병질환 유발하는 원인 세균에 대해서 조사하였으며, 원인균 중 큰 피해를 유발하는 비브리오(*Vibrio sp.*), 쉬겔라(*Shigella sp.*)종을 선정하였음(그림 1-77). 비브리오 및 쉬겔라 속의 가축전염병질환 유발 원인 세균은 식수, 토양 등에 잠복해 있다가 가축의 상처 혹은 교미를 통해 감염되어 증상을 유발하여 심각한 피해를 초래하는 세균임. 따라서 선정한 세균을 확보하고 세균 배양을 통하여 대량 확보하였음. 향후 세균이 특이적인 앵타머를 제작하여 세균을 바로 검출하고 치료할 수 있는 시스템을 개발하는 데 활용하고자 함

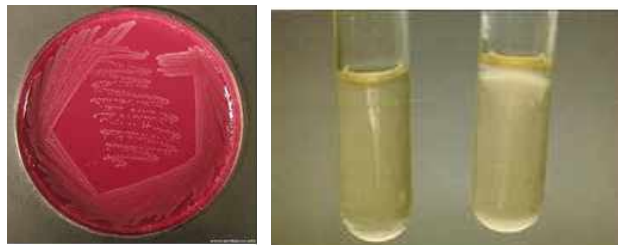


그림 1-77. 가축전염병유발 세균

- (3) 선정, 확보한 가축전염병 질환 유발 세균의 증식 저해 관련 표적 단백질인 prfA의 확보를 위하여 재조합 벡터를 보유한 대장균의 대량 배양을 유도하고, 셀을 확보하여 prfA의 순수 분리를 수행하였음
- (가) prfA 유전자를 재조합한 벡터를 포함하고 있는 대장균을 LB broth에서 배양하여 셀을 확보하고, 확보한 cell을 sonication하여 세포내의 단백질을 추출하였음. 추출한 단백질 중 prfA를 순수 분리하기 위하여 재조합 벡터에 fusion protein인 GST를 이용하였음. GST는 글루타티온 세파로오스 4B resin에서 purification이 가능한 성질을 이용하여 GST 융합 prfA 단백질을 순수분리 할 수 있었음
- (나) 순수 분리하여 확보한 GST 융합 prfA 단백질을 dialysis를 수행하였으며, bradford법을 이용하여 회수된 단백질의 총량을 정량하여 농도를 확인할 수 있었고, 각 결과는 12% SDS-PAGE상에서 확인하였음

6. 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화 (제4협동)

- 경구투여제(분말제 또는 펠렛형)로 제조법을 완성하여 시제품을 생산하고, 본사의 품질관리부에서 가혹시험 또는 장기보존시험을 실시하여 시제품의 안정성을 확보하고 농가에 경구투여시험을 실시하여 안전성을 확보함. 또한 임상평가 및 현장적용시험 완료된 제형의 인허가를 추진하여 동물용의약품으로 허가를 받고 대량생산 체제를 갖추는 목표를 함.

가. 개발 신소재를 이용한 복합제제 생산

(1) 포유자돈 및 이유자돈용 복합제제

(가) 제품명 : 다이스톱-피그산 1호(가칭, 그림 1-78)

(나) 원료약품 및 분량

원료명	포물량(g/kg중)
난황분말(IgY)	25
초유분말	25
펩타이드아연	87
복합미네랄(구마트)	20
프락토올리고당	50
생균제 3종(도아)	15.75
비타민 A	10
비타민 D3	2
비타민 E	4
포도당	741.25
Tixosil-38	20
합계	1,000

(다) 색상 : 옅은 갈색~검은 회색의 분말

(라) 효능 및 효과 : 포유자돈 및 이유자돈의 설사예방, 성장, 비육촉진, 면역력증강, 장내용모강화로 소화와 흡수 촉진, 배설물의 악취감소, 장내세균총 정상화, 미네랄 및 비타민 공급

(마) 용법 및 용량 : 사료 톤당 1~2kg을 균등히 혼합하여 투여



그림 1-78. 다이스톱-피그산 1호

(2) 육성 및 비육돈용 복합제제

(가) 제품명 : 다이스톱-피그산 2호(가칭, 그림 1-79)

(나) 원료약품 및 분량

원료명	포몰라(g/kg중)
난황분말(IgY)	25
초유분말	25
펩타이드아연	87
복합미네랄(구마트)	20
프락토올리고당	50
생균제(도아)	15.75
포도당	757.25
Tixosil-38	20
합계	1,000

(다) 성상 : 엷은 갈색~검은 회색의 분말

(라) 효능 및 효과 : 포유자돈 및 이유자돈의 설사예방, 성장, 비육촉진, 면역력증강, 장 내용모강화로 소화와 흡수 촉진, 배설물의 악취감소, 장내세균총 정상화, 미네랄 공급

(마) 용법 및 용량 : 사료 톤당 0.5~1kg을 균등히 혼합하여 투여



그림 1-79. 다이스톱-피그산 2호

(3) 산란계용 복합제제

(가) 제품명 : 다이스톱-폴츄리산 1호(가칭, 그림 1-80)

(나) 원료약품 및 분량

원료명	포물라(g/kg중)
난황분말(양계용 IgY)	50
복합미네랄(구마트)	200
프락토올리고당	50
생균제 3종(도아)	15.75
비타민 A	50
비타민 D3	10
비타민 E	20
Tixosil-38	20
포도당	584.25
합계	1,000

- (다) 성상 : 옅은 갈색~검은 회색의 분말
- (라) 효능 및 효과 : 산란계의 설사예방, 성장촉진, 면역력증강, 장내용모강화로 소화와 흡수 촉진, 배설물의 악취감소, 장내세균총 정상화, 미네랄, 비타민 공급
- (마) 용법 및 용량 : 사료 톤당 초생추는 1kg, 중추는 0.5~1kg, 중추이후는 500g을 균등히 혼합하여 투여



그림 1-80. 다이스트롭-폴츠히리산 1호

(4) 육계용 복합제제

- (가) 제품명 : 다이스트롭-폴츠히리산 2호(가칭, 그림 1-81)
- (나) 원료약품 및 분량

원료명	포물라(g/kg중)
난황분말(IgY)	50
복합미네랄(구마트)	200
프락토올리고당	50
생균제 3종(도아)	15.75
비타민 A	10
비타민 D3	2
비타민 E	4
Tixosil-38	20
포도당	648.25
합계	1,000

- (다) 성상 : 옅은 갈색~검은 회색의 분말
- (라) 효능 및 효과 : 육계의 설사예방, 성장, 비육촉진, 면역력증강, 장내용모강화로 소화와 흡수 촉진, 배설물의 악취감소, 장내세균총 정상화, 미네랄 공급
- (마) 용법 및 용량 : 사료 톤당 초생추는 1kg, 중추는 0.5~1kg, 중추이후는 500g을 균등

히 혼합하여 투여



그림 1-81. 다이스트롬-폴츄리산 2호

나. 개발 신소재를 이용한 복합제제의 안정성 시험

(1) 양돈, 양계용 복합제제 시제품의 생균제, 비타민 등 주요한 유효성분에 대하여 기준과 시험방법을 설정하는 시험을 본사품질관리부와 외부 위탁기관을 통하여 진행

(2) 시험방법

(가) 당화균(Bacillus mesentericus To-A)

① 원료 실험법

- 제제 약 1g을 정밀하게 달아 37°C로 가온한 멸균 염화나트륨·펩톤 99ml을 넣어 잘 흔들어 섞은 다음(호모게나이저 사용), 이 액 1.0ml를 취하여 멸균한 염화나트륨·펩톤액을 넣어 10.0ml로 하고, 단계별로 희석하여 약 30~300개의 바실루스 메센테리쿠스 토아균을 함유하도록 희석하여 검액으로 함. 이 검액 1ml씩을 멸균페트리접시 3개에 각각 넣고, 미리 45~50°C로 식힌 스트렙토코카스 페칼리스 티 110 균·g 바실루스 메센테리쿠스 토아균측정용 배지 15~20ml을 넣어 잘 혼합하고 굳힌 다음 37°C에서 24~48시간 배양하여 나타난 집락을 세어 평균치를 구함

$$\text{이 약 1g 중의 생균수} = \frac{\text{집락수의 평균치} \times \text{희석배수}}{\text{이 약의 채취량 (g)}}$$

㉞ 염화나트륨·펩톤액 : 펩톤 1g, 염화나트륨 5g을 가해 전체량이 1L가 되게 표선함 pH6.9~7.0

㉟ 배지

- Nutrient agar+염화나트륨 5g pH 7.0~7.2

- 스트렙토코카스 페칼리스 티 110균·g바실루스 센테리쿠스 토아균 측정용 배지

효모엑스 : 10g

펩톤 : 10g

포도당 : 10g

폴리소르베이트80 : 1ml

B-염류 : 5ml

- 이상을 달아 물에 녹인 1L와 수산화나트륨액 또는 1 mol/L 염산시액으로 pH를

6.8~7.0으로 조절한 다음, 한천 15g. 탄산칼슘 3g 및 실리콘수지(액상) 4~5방울을 넣어 녹인 다음 121°C에서 멸균 후 사용함

< B-염류의 조성 >

황산마그네슘 : 4g
황산제일철 : 0.2g
황산망간 : 0.2g
염화나트륨 : 0.2g

이상을 달아 물에 녹인 100ml로 함.

② 제품 실험법

- 제제 약 1g을 정밀하게 달아 37°C로 가온한 멸균 염화나트륨·펩톤 99ml을 넣어 잘 흔들어 섞은 다음(호모게나이저 사용) 이 액 1.0ml을 취하여 멸균한 염화나트륨·펩톤액을 넣어 10.0ml로 하고, 단계별로 희석하여 약 30~300 개의 바실루스 메센테리쿠스 토아균을 함유하도록 희석하여 검액으로 함(80°C 수욕에서 10 분간 가열한 다음 식힘). 이 검액 1ml씩을 멸균페트리접시 3개에 각각 넣고 미리 45~50°C로 식힌 스트렙토코카스 페칼리스 티 110 균·g바실루스 메센테리쿠스 토아균 측정용배지 15~20ml을 넣어 잘 혼합하고 굳힌 다음 37°C에서 24~48시간 배양하여 나타난 집락을 세어 평균치를 구함

$$\text{이 약 1g 중의 생균수} = \frac{\text{집락수의 평균치} \times \text{희석배수}}{\text{이 약의 채취량 (g)}}$$

㉠ 염화나트륨·펩톤액 : 펩톤 1g, 염화나트륨 5g을 가해 전체량이 1L가 되게 표선함 pH6.9~7.0

㉡ 배지

- Nutrient agar+염화나트륨 5g pH 7.0~7.2
- 스트렙토코카스 페칼리스 티 110균·g바실루스 메센테리쿠스 토아균 측정용 배지

호모엑스 : 10g
펩톤 : 10g
포도당 : 10g
폴리소르베이트80 : 1ml
B-염류 : 5ml

- 이상을 달아 물에 녹인 1L와 수산화나트륨액 또는 1 mol/L 염산시액으로 pH를 6.8~7.0으로 조절한 다음, 한천 15g. 탄산칼슘 3g 및 실리콘수지(액상) 4~5방울을 넣어 녹인 다음 121°C에서 멸균 후 사용함

< B-염류의 조성 >

- 황산마그네슘 : 4g
- 황산제일철 : 0.2g
- 황산망간 : 0.2g
- 염화나트륨 : 0.2g

이상을 달아 물에 녹인 100ml로 함

(나) 유산균(*Streptococcus faecalis* T-110)

① 원료 실험법

- 제제 약 1g을 정밀하게 달아 37°C로 가온한 멸균 염화나트륨·펩톤 99ml을 넣어 잘 흔들어 섞은 다음(호모게나이저 사용) 이 액 1.0ml을 취하여 멸균한 염화나트륨·펩톤액을 넣어 10.0ml로 하고 단계별로 희석하여 약 30~300개의 바실루스 메센테리쿠스 토아균을 함유하도록 희석하여 검액으로 함. 이 검액 1ml씩을 멸균페트리 접시 3개에 각각 넣고, 미리 45~50°C로 식힌 스트렙토코카스 페칼리스 티 110 균·g바실루스 메센테리쿠스 토아균측정용배지 15~20ml를 넣어 잘 혼합하고 균한 다음 37°C에서 24 ~ 48시간 배양하여 나타난 집락(탄산칼슘을 녹여 투명한 환을 나타내는 흰색~유백색의 원형집락)을 세어 평균치를 구함

$$\text{이 약 1g 중의 생균수} = \frac{\text{집락수의 평균치} \times \text{희석배수}}{\text{이 약의 채취량 (g)}}$$

- ㉔ 염화나트륨·펩톤액 : 펩톤 1g, 염화나트륨 5g을 가해 전체량이 1L가 되게 표선함 pH6.9~7.0

㉕ 배지

- Nutrient agar+염화나트륨 5g pH 7.0~7.2
- 스트렙토코카스 페칼리스 티 110균·g바실루스 메센테리쿠스 토아균 측정용 배지

- 호모엑스 : 10g
- 펩톤 : 10g
- 포도당 : 10g
- 폴리소르베이트80 : 1ml
- B-염류 : 5ml

- 이상을 달아 물에 녹인 1L와 수산화나트륨액 또는 1 mol/L 염산시액으로 pH를 6.8~7.0으로 조절한 다음,한천 15g. 탄산칼슘 3g 및 실리콘수지(액상) 4~5방울을 넣어 녹인 다음 121°C에서 멸균 후 사용함

< B-염류의 조성 >

- 황산마그네슘 : 4g
- 황산제일철 : 0.2g
- 황산망간 : 0.2g
- 염화나트륨 : 0.2g

- 이상을 달아 물에 녹인 100ml로 함. 원료 실험에서는 ㉕배지를 사용해도 무방함

② 제품 실험법

- 제제 약 1g을 정밀하게 달아 37°C로 가온한 멸균 염화나트륨·펩톤 99ml을 넣어 잘 흔들어 섞은 다음(호모게나이저 사용) 이 액 1.0ml을 취하여 멸균한 염화나트륨·펩톤액을 넣어 10.0ml로 하고 단계별로 희석하여 약 30~300개의 바실루스 메센테리쿠스 토아균을 함유하도록 희석하여 검액으로 함. 이 검액 1ml씩을 멸균페트리 접시 3개에 각각 넣고, 미리 45~50°C로 식힌 스트렙토코카스 페칼리스 티 110 균·g바실루스 메센테리쿠스 토아균측정용배지 15~20ml를 넣어 잘 혼합하고 균한 다음 37°C에서 24~48시간 배양하여 나타난 집락(탄산칼슘을 녹여 투명한 환을 나타내는 흰색~유백색의 원형집락)을 세어 평균치를 구함

$$\text{이 약 1g 중의 생균수} = \frac{\text{집락수의 평균치} \times \text{희석배수}}{\text{이 약의 채취량 (g)}}$$

㉞ 염화나트륨·펩톤액 : 펩톤 1g, 염화나트륨 5g을 가해 전체량이 1L가 되게 표선함 pH6.9~7.0

㉟ 배지

- Nutrient agar+염화나트륨 5g pH 7.0~7.2
- 스트렙토코카스 페칼리스 티 110균·g바실루스 메센테리쿠스 토아균 측정용 배지

호모엑스 : 10g
 펩톤 : 10g
 포도당 : 10g
 폴리소르베이트80 : 1ml
 B-염류 : 5ml

- 이상을 달아 물에 녹인 1L와 수산화나트륨액 또는 1 mol/L 염산시액으로 pH를 6.8~7.0으로 조절한 다음,한천 15g, 탄산칼슘 3g 및 실리콘수지(액상) 4~5방울을 넣어 녹인 다음 121°C에서 멸균 후 사용함

< B-염류의 조성 >

황산마그네슘 : 4g
 황산제일철 : 0.2g
 황산망간 : 0.2g
 염화나트륨 : 0.2g

- 이상을 달아 물에 녹인 100ml로 함. 제품 실험에서는 ㉟배지를 사용함

(다) 비타민(다이스트롭-피그산 1호)

제품 1g 중
 비타민 A : 10mg
 비타민 D3 : 2mg
 비타민 E : 4mg

① 분석조건

㉞ Column : X-Tera(or Symmetry C18)

㉟ Detector

비타민 A : 326nm

비타민 D3 : 264nm

비타민 E : 280nm

㉞ Flow rate : 1.0ml/min 컬럼의 내경과 길이에 따라 0.5~1.0ml/min 상관없음

㉞ Mobile phase : MtOH(0.5µm membrane filter로 여과 후 사용함)

② 검액조제

㉞ ST

- 표준품 비타민 A : 500,000unit 해당량(10mg)을 취해 DMSO 10ml로 용해 후 50°C 15min Ultrasonic 방냉 후 MtOH 30ml 넣고 50°C 15min Ultrasonic 방냉 후 MtOH로 100ml 표선함

- 표준품 비타민 D3 : 500,000unit에 해당량(2mg)을 취해 Ethanol로 Sonication 후 100ml 표선함

- 표준품 비타민 E : 4mg을 취해 MtOH로 용해하여 100ml 표선함. 0.45µm syringe filter로 여과 후 injection 함

㉟ SA

- 제품 1g을 정확히 취한 뒤, 각각의 방법에 따라 용해함. 0.45µm syringe filter로 여과 후 injection 함

③ 계산

$$\text{함량(\%)} = \text{표준품의 함량} \times \frac{\text{SA의 peak 면적}}{\text{ST의 peak 면적}} \times \frac{\text{ST의 희석농도}}{\text{SA의 희석농도}}$$

(라) 비타민(다이스톱-폴츄리산 2호)

제품 1g 중

비타민 A : 10mg

비타민 D3 : 2mg

비타민 E : 4mg

① 분석조건

㉞ Column : X-Tera(or Symmetry C18)

㉟ Detector

비타민 A : 326nm

비타민 D3 : 264nm

비타민 E : 280nm

㉞ Flow rate : 1.0ml/min 컬럼의 내경과 길이에 따라 0.5~1.0ml/min 상관없음

㉔ Mobile phase : MtOH(0.5µm membrane filter로 여과 후 사용함)

② 검액조제

㉔ ST

- 표준품 비타민 A : 500,000unit 해당량(10mg)을 취해 DMSO 10ml로 용해 후 50°C 15min Ultrasonic 방냉 후 MtOH 30ml 넣고 50°C 15min Ultrasonic 방냉 후 MtOH로 100ml 표선함

- 표준품 비타민 D3 : 500,000unit에 해당량(2mg)을 취해 Ethanol로 Sonication 후 100ml 표선함

- 표준품 비타민 E : 4mg을 취해 MtOH로 용해하여 100ml 표선함. 0.45µm syringe filter로 여과 후 injection 함

㉔ SA

- 제품 1g을 정확히 취한 뒤, 각각의 방법에 따라 용해함. 0.45µm syringe filter로 여과 후 injection 함

③ 계산

$$\text{함량(\%)} = \text{표준품의 함량} \times \frac{\text{SA의 peak 면적}}{\text{ST의 peak 면적}} \times \frac{\text{ST의 희석농도}}{\text{SA의 희석농도}}$$

다. 제5협동과제 연구결과 요약 및 평가

(1) 이유자돈용, 육성비육돈용, 육계용, 산란계용 복합제제 제조법 완성 및 시제품 생산 완료, 안정성시험 착수

(가) 포유·이유자돈용, 육성·비육돈용, 산란계용, 육계용의 경구투여제(분말제) 포물라 및 제조법을 시험하여 완성하여 시제품을 생산하였고, 각 제제의 생균제, 비타민 등 주요 성분에 대한 안정성시험을 위한 기준 및 시험방법을 설정하는 시험을 본사 품질관리부와 외부 위탁기관에서 진행하고 있음

(2) 1차년도 연구수행 내용 평가

(가) 1차년도 연구수행 계획 및 목표를 문제없이 달성하였으며, 양돈, 양계 제품에 대하여 안정성시험을 계속 실시, 완성하여 동물용의약품으로 허가받을 수 있도록 할 것임

(나) 2차년도에도 1차년도에 계속하여 경구투여제에 대하여 안정성시험을 실시하고, 양돈 및 양계 축종별 농장을 선정하여 안전성시험을 실시함으로써 시제품 효능평가에 기초자료를 제공하고, 동물용의약품으로 허가받는데 활용하고자 함

제 2절. 2차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 축종별 현장적용 및 효능 안정성 평가 프로그램 구축(제1세부)

가. 항생제대체제 및 첨가제의 축우장 적용 및 평가 프로그램 구축

(1) 축우용 면역복합제제 기초제품 개발(제4협동 공동수행)

(가) 면역복합제제 생산 대상 질병

- 1차년도 질병 모니터링 축우장에 대한 질병발생 위험도 분석결과, 소의 경우 송아지 설사병이 주로 문제가 되고 있었고, 특히 소 바이러스성 점막설사병(BVD-MD)가 사육기간 전반에 걸쳐서 문제 되고 있음. 대장균증, 살모넬라증, 로타바이러스 및 코로나바이러스가 위험도가 높아서 면역복합제제의 개발방향을 송아지의 설사병을 예방 및 치료할 수 있는 초유 대용 면역강화제 개발로 설정하였으며, 기타 수송 스트레스 등에 의해 문제될 수 있는 세균성 호흡기질환을 포함하였음.

(나) IgY 제제 생산(산란계 면역용)

① 산란계 면역용 항원

- 소화기질병 : bovine rota virus, bovine corona virus, *E. coli*(K99, F41), *S. typhimurum*, *S. enteritidis*
- 호흡기질병 : *M. haemolytica*, *P. multocida* type A,

② IgY 생산을 위한 산란계 면역용 백신 제조 및 산란계 접종 프로그램은 양돈용 제조과정과 동일하게 수행함.

(다) 면역 초유제제 생산(젖소)

① 젖소 면역용 항원 (IgY제제와 동일)

- 소화기질병 : bovine rota virus, bovine corona virus, *E. coli*(K99, F41), *S. typhimurum*, *S. enteritidis*
- 호흡기질병 : *M. haemolytica*, *P. multocida* type A,

② 초유면역제제를 생산하기 위한 면역용 백신 제조 및 젖소 접종 프로그램은 양돈용 제조과정과 동일하게 수행함.

(2) 질병발생 상황에 따른 축우용 면역복합제제(첨가제) 적용 프로그램 구축

(가) 질병발생 위험도 분석결과에 따른 제형 개발 및 적용 프로그램 구축

① 송아지용 면역복합제제 시제품(현탁제) 조성

표 2-1. 육계농장의 면역복합제제 시제품 효능평가

구분	성분명	용량	비고
면역제제	IgY	3,000mg	
	초유분말	1,000mg	
비타민 및 부형제	비타민 C	10mg	
	Bacillus coagulans	1 × 10 ⁶ CFU	균수
	포도당	600mg	
	증류수	4,159ml	
총 용량		10g	

② 면역복합제제 시제품의 적용방법(용법 및 용량)

- 분만 후 초유 급여 전에 1두당 1시린지(10g)를 경구투여함
- 설사 발생시 1일 1두당 1시린지(10g)씩 2~3일간 경구투여함

(3) 축우장에 대한 면역복합제제 적용 및 효능평가 프로그램 구축

(가) 한우농장에 대한 시제품 적용 효과 분석

① 대상농장 : 경북 경산 소재 하늘채목장

- 4주령 한우 및 젖소 송아지 45두를 2개 우사에 구분 수용하여 시험 실시

② 시험기간 : 1개월간(2013. 04. 01 ~ 04. 30)

③ 시험군 구분 : 송아지 분만 또는 구입일자가 다양하여 시험군을 동일하게 설정하지는 못하였으며, 각 15두씩 권장량 투여군과 2배 권장량 투여군 및 무투여군으로 설정하였음. 권장량 투여군은 이동/구입 후 두당 10g 분량을 경구투여 하였고, 2배 권장량 투여군은 두당 20g 분량을 경구투여하였고, 무투여 대조군은 사료만 급여하였음.

④ 효능평가 조사항목

- 시험기간 중 매일 임상증상을 관찰하여 소화기증상(설사/연변), 호흡기증상(기침, 비루) 및 폐사 발생 여부를 기록하였음.

⑤ 시험결과

시험군	시험 두수	임상증상 발현두수			비고
		소화기증상 (연변/설사)	호흡기증상 (기침, 비루)	폐사	
권장량 투여군	15두	0	1	0	
2배 권장량 투여군	15두	0	0	0	
무투여 대조군	15두	3	2	0	로타바이러스 진단

⑥ 결론

- 30일간 임상증상 관찰 결과, 2배 권장량 투여군에서는 호흡기 및 소화기 증상이 관찰되지 않았으나, 권장량 투여군에서는 호흡기증상이 1두 나타났고, 무투여 대조군에서는 소화기증상이 3두 및 호흡기증상이 2두 나타났으며, 이중 2두는 소화기와 호흡기 증상이 동시에 나타남
- 권장량 투여군이나 2배 권장량 투여군에서는 설사증상이 전혀 나타나지 않았던 반면, 무투여 대조군에서는 설사증상 발현율이 비교적 높게 나타나 면역제제 시제품은 조성과 일치하게 소화기질병 예방에 효과가 탁월한 것으로 판단됨
- 그러나 호흡기질병에 대한 예방효과는 비교적 낮은 것으로 추정되어 차년도 면역제제 조성에는 호흡기질병 면역성분을 보강할 필요가 있는 것으로 판단됨
- 무투여 대조군의 설사 개체는 설사 발생 2일째부터 면역제제와 항생제를 복합처방하였으며, 처방 3일후부터 설사증상이 개선됨
- 목장에서 송아지에 대한 면역복합제제의 효능시험은 송아지의 분만 또는 구입일

자가 다양하여 시험군을 설정하기가 곤란하며, 시험군 개체에 임상증상이 발현될 시에는 농장에서 즉각적인 치료를 요구하기 때문에 시험의 진행이 사실상 불가능하였음. 따라서 이후 목장 적용시험에는 기록관리가 가능한 대단위 사육목장을 대상으로 하고, 개발시제품 투여군과 기존 시판제품 투여군으로 구분하여 농장단위로 적용하는 방법을 검토해야 할 것으로 보임.

나. 항생제대체제 및 첨가제의 양돈장 적용 및 평가 프로그램 구축

(1) 양돈용 면역복합제제 기초제품 개발(제4협동 공동수행)

(가) 면역복합제제 생산 대상 질병

- 1차년도 양돈장의 사육단계별 질병발생 위험도 분석결과, PRRS에 대한 치료제나 예방제제의 개발이 가장 절실한 것으로 분석되었으며 높은 항생제 내성을 보이는 대장균 및 살모넬라에 의한 설사가 포유 및 이유자돈에서 많은 문제를 일으키는 것으로 나타났음(그림 1-2)
- 이러한 분석결과에 따라 IgY 및 면역초유제제 생산용 면역항원(백신)을 제작하되, 문제가 되는 모든 대상 질병의 원인체를 모두 포함하도록 하였음
- IgY 및 초유면역제제 생산에 포함된 면역항원
 - ① 소화기질병 : PED virus, TGE virus, Rota virus, *E. coli*, *S. typhimurum*
 - ② 호흡기질병 : *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*
 - ③ 전신성질병 : PRRS virus PCV2, *S. suis*

(나) IgY 제제 생산(산란계)

- ① 산란계 면역용 항원
 - PEDV, TGEV, Rota virus, *E. coli*(K88ab, K88ac, K99, 987p, F41 등 표준주 5종과 야외분리주 10종), *S. typhimurum*, PRRSV(NA 및 EU 분리주), PCV2(재조합항원), *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*(야외분리주 7종), *S. suis*(야외분리주 5종)
- ② 면역용 백신 제조 : 농축항원에 부형제(ISA 70, 면역증강제-겨우살이추출액, 스트레스 완화제) 첨가 혼합하여 제조
 - 산란계 접종용 백신은 부형제 ISA70 오일이 70%가 첨가되기 때문에 항원(바이러스, 세균)을 농축하지 않고는 고역가의 난황항체생산을 위한 백신으로 사용할 수 없기 때문에 바이러스는 Pellicon fliter(5K, 10K. Millipore)을 이용하여 농축하였고, 세균은 원심분리기를 이용하여 항원을 농축한 다음 부형제와 혼합함
- ③ 산란계 접종 : 산란전 3주 간격으로 3회 가슴근육으로 접종 후 계란수거, 2개월마다 추가접종함
 - 대퇴부 접종시에는 스트레스가 가중되기 때문에 접종부위를 가슴근육으로 하였으며, 백신제조 시에 스트레스 완화제를 첨가하여 백신 제조함
- ④ 생산된 면역란을 이용한 IgY 제제 생산
 - 생산된 면역란에서 난황만 수거한 다음, 동결건조 후 각 병원체에 대한 항체가를 측정하였으며, 일정 항체가 수준 이상인 경우 제품 원료로 사용함

(다) 면역 초유제제 생산(젖소)

- ① 젖소 면역용 항원(IgY 제제와 동일)
 - 접종용 항원 : PEDV, TGEV, Rota virus, *E. coli*(K88ab, K88ac, K99, 987p, F41형 표준주 5종과 야외분리주 10종), *S. typhimurum*, PRRSV(NA 및 EU 분리주), PCV2(제조합항원), *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*(야외분리주 7종), *S. suis*(야외분리주 5종)
- ② 면역용 백신 제조 : 농축항원에 부형제(ISA 25, Alum hydroxide, 면역증강제-겨우살이추출액, 스트레스 완화제) 첨가 혼합하여 제조
- ③ 백신접종 : 건유기 시작부터 분만 전까지 3주 간격으로 3회 접종(건유부터 분만까지는 약 2개월 소요)
- ④ 면역 초유 수거 : 면역 젖소가 송아지를 분만한 경우, 분만 당일 및 다음날 생산된 초유를 수거하여 동결보관 하였으며, 수거된 초유에 대한 항체 역가를 측정하여 기준역가 이상 되는 면역초유만 저온 동결건조하여 제품 원료로 사용함

(2) 양돈용 질병발생 상황에 따른 항생제대체제 및 첨가제 적용 프로그램 구축

(가) 질병 발생 위험도 분석결과에 따른 제형 개발 및 적용 프로그램

- ① 사육단계별 자돈용 면역복합제제 시제품 조성(제4협동 공동수행)
- ㉠ 포유 및 이유자돈용 면역복합제제 조성

원료성분명	함량(g/kg중)	비고
난황분말(IgY)	25	면역제제
초유분말(특이초유)	25	면역제제
펩타이드아연	87	
복합미네랄(구마트)	20	
프락토올리고당	50	
생균제 3종(도아)	15.75	
비타민 A	10	
비타민 D3	2	
비타민 E	4	
포도당	741.25	
Tixosil-38	20	
합계	1,000	

㉡ 육성 및 비육돈용 면역복합제제 조성

원료성분명	함량(g/kg중)	비고
난황분말(IgY)	25	면역제제
초유분말	25	면역제제
펩타이드아연	87	
복합미네랄(구마트)	20	
프락토올리고당	50	
생균제(도아)	15.75	
포도당	757.25	
Tixosil-38	20	
합계	1,000	

② 면역복합제제 시제품의 농장 적용방법(용법 및 용량)

㉠ 포유 및 이유자돈용 면역복합제제

- 사료 톤당 1~2kg을 균등히 혼합하여 투여
- 효능 및 효과 : 포유자돈 및 이유자돈의 설사예방, 성장, 비육촉진, 면역력증강, 장내용모강화로 소화와 흡수 촉진, 배설물의 악취감소, 장내세균총 정상화, 미네랄 및 비타민 공급

㉞ 육성 및 비육돈용 면역복합제제

- 사료 톤당 0.5~1kg을 균등히 혼합하여 투여
- 효능 및 효과 : 포유자돈 및 이유자돈의 설사예방, 성장, 비육촉진, 면역력증강, 장내용모강화로 소화와 흡수 촉진, 배설물의 악취감소, 장내세균총 정상화, 미네랄 공급

(3) 양돈장에 대한 면역복합제제 시제품 적용 및 효능평가 프로그램 구축

(가) 포유 및 이유자돈용 시제품 적용 효과 분석

① 대상농장 : 경기도 포천시 소재 일관사육농장

② 시험기간 : 42일간(2013. 04. 20 ~ 05. 31)

③ 시험군 구분 : 시험돈군은 25일령에 이유한 자돈을 30두씩 3개군을 구분하여 별도의 돈방에 수용하였으며, 권장량 투여군은 사료 톤당 1kg, 2배 권장량 투여군은 사료 톤당 2kg의 비율로 시제품을 첨가하여 투여하였으며, 무투여 대조군은 사료(카길퓨리나 이유자돈사료 1, 2, 3호)만 급여함

※ 시제품 외에 사료나 음수 투여는 동일한 조건으로 적용함

④ 효능평가 조사항목

- 임상증상 발현, 체중 변화 및 사료섭취량을 조사함
- 실험 개시 전 모든 자돈군의 체중을 이동식체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제함
- 실험기간 중 투여되는 사료의 양을 기록하고, 실험 종료시 모든 자돈의 종료체중을 측정함
- 매일 일정시간에 설사, 발열, 기침 등 임상증상을 관찰하여 기록하였으며, 설사 발생시에는 설사변을 채취하여 병원체 감염 여부를 확인함

⑤ 시험결과

㉞ 임상증상 관찰

- 시험기간 중 각 시험군의 자돈 폐사수를 조사한 결과, 권장량 투여군 및 2배 권장량 투여군에서는 폐사가 발생하지 않았으나 무투여 대조군에서는 1두가 폐사함
- 무투여군에서 발생한 폐사자돈은 사료섭취 저하 후 급사하였으며, 다른 자돈군에서는 특이한 임상증상은 나타나지 않았음. 다만 시험 개시 20일 이후 무투여 대조군(3두) 및 권장량 투여군(2두)에서 체중감소와 사료섭취 저하를 나타내는 개체가 관찰됨
- 무투여군에서 폐사한 자돈 1두는 안검부 부종과 장간막 부종 등 부종병으로 의심되는 육안 및 병리소견을 보임. 부종이 특징적으로 나타났으며, 장간막 림프절에서 채취한 샘플에서 대장균이 검출됨

표 2-2. 시험군에 대한 이상증상 발현 및 폐사두수 조사

시험군	시험두수	이상증상 발현두수	폐사두수	비고
권장량 투여군	30	2	0	사료섭취량 저하
2배 권장량 투여군	30	0	0	
무투여 대조군	30	3	1	대장균증

㉔ 생산성 분석 결과

- 3개 시험군에 대한 생산성을 비교하기 위해 개시체중과 종료체중을 측정하고, 시험기간 동안 총사료섭취량을 측정함
- 개시체중은 권장량 투여군이 6.71kg, 2배 권장량 투여군이 6.56kg 및 무투여 대조군이 6.78kg으로 전체적으로 유의성 있는 차이는 없었지만, 무투여군과 권장량군이 2배 권장량군 보다 개시체중평균이 높았음. 반면 종료체중은 2배 권장량 투여군과 권장량 투여군이 각각 29.35kg 및 29.82kg으로 무투여 대조군 21.87kg에 비해 높게 나타났고, 일당증체량 또한 2배 권장량 투여군 및 권장량 투여군이 각각 554g 및 539g으로 무투여 대조군 521g에 비해 유의성 있는 차이를 나타냄
- 시험군의 사료섭취량 측정 결과, 총사료섭취량은 2배 권장량 투여군과 권장량 투여군이 각각 1,294kg 및 1,287kg로 나타나 무투여 대조군(1,235kg)에 비하여 섭취량이 높게 나타났으며, 일일사료섭취량 또한 2배 권장량 투여군과 권장량 투여군이 각각 1,027g 및 1,021g으로 무투여 대조군(1,014g)에 비해 높았음
- 총사료섭취량을 총증체량으로 나눈 사료요구율을 비교해 보면 2배 권장량 투여군, 권장량 투여군 및 무투여 대조군이 1.85, 1.89 및 1.95 순으로 나타나 사료요구율의 개선효과가 있는 것으로 분석됨

표 2-3. 양돈용 시제품 적용 시험 자돈군의 체중 및 증체량 측정 결과

시험군	시험두수	개시평균체중 (28일령, kg)	종료평균체중 (70일령, kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량 투여군	30	6.71	29.35	679.2	539
2배 권장량 투여군	30	6.56	29.82	697.8	554
무투여 대조군	29	6.78	28.65	634.6	521

표 2-4. 양돈용 시제품 적용 시험 자돈군의 사료섭취량 및 사료요구율 분석 결과

시험군	시험두수	총사료섭취량 (kg)	일일사료섭취량 (g/두/day)	사료요구율
권장량 투여군	30	1,287	1,021	1.89
2배 권장량 투여군	30	1,294	1,027	1.85
무투여 대조군	29	1,235	1,014	1.95

⑥ 결론

- 양돈용 시제품 중 이유자돈용에 대한 양돈장 적용시험 결과, 육성률은 3개 자돈군 모두 양호하였으나 권장량 투여군과 무투여 대조군에서 임상증상을 보이는 자돈이 일부 나타났으며, 특히 무투여 대조군에서 폐사가 1두 발생함. 권장량 투여군은 사료섭취량 저하가 2두에 나타났으나 2일후 회복됨. 무투여 대조군은 3두에서 사료섭취 감소와 체중감소가 나타남
- 증체율과 사료효율은 2배 권장량 투여군, 권장량 투여군 및 무투여 대조군 순으로 나타나 이유자돈용 시제품은 권장량보다 2배 더 투여하는 것이 증체율 향상과 사료 요구율 개선효과가 높으며, 투여에 따른 부작용은 전혀 없는 것으로 나타남
- 2배 권장량 투여군에서 어떠한 병적인 임상증상이 발생하지 않았고 오히려 생산성 증대에 더 좋은 결과가 나와 안전성에도 문제가 없는 것으로 나타남

(나) 육성 및 비육돈용 시제품 적용 효과 분석

① 대상농장 : 경기도 파주시 소재 일관사육농장

② 시험기간 : 99일간(2013. 02. 06 ~ 05. 15)

③ 시험군 구분 : 시험돈군은 70일령의 육성돈을 20두씩 3개군을 구분하여 별도의 돈방에 수용하였으며, 권장량 투여군은 사료 톤당 0.5kg, 2배 권장량 투여군은 사료 톤당 1kg의 비율로 시제품을 첨가하여 투여하였으며, 무투여 대조군은 사료(카길퓨리나 사료)만 급이함

※ 시제품 외에 사료나 음수 투여는 동일한 조건으로 적용함

④ 효능평가 조사항목

- 임상증상 발현, 체중 변화 및 사료섭취량을 조사함
- 실험 개시 전 모든 자돈군의 체중을 이동식체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제함
- 실험기간 중 투여되는 사료의 양을 기록하고, 실험 종료시 모든 자돈의 종료체중을 측정함
- 매일 일정시간에 설사, 발열, 기침 등 임상증상을 관찰하여 기록하였으며, 설사 발생시에는 설사변을 채취하여 병원체 감염 여부를 확인함

⑤ 시험결과

㉠ 임상증상 관찰

- 시험기간 중 각 시험군의 폐사수를 조사한 결과, 2배 권장량 투여군에서는 폐사가 발생하지 않았으나, 권장량 투여군에서는 1두, 무투여 대조군에서는 2두가 폐사함
- 3개 시험군 모두 호흡기증상이 발생하였음
- 2배 권장량 투여군은 가벼운 기침과 설사증상이 나타났다가 5일후에는 호흡기증상과 설사는 없어졌으며, 사료섭취 감소는 3일 더 지속되다가 모두 회복되었음
- 권장량 투여군은 75일령에 급성으로 호흡기증상이 나타나서 4두는 7일후 회복되었고 1두는 회복되는 듯 하다가 다시 증상이 악화되어 증상발현 6일후 폐사되었음. 폐사돈은 부검을 실시하였고 부검소견은 폐조직의 검은 출혈 병변과 기관지

림프절의 충출혈이 나타났고 비출혈이 목격되었음. 실험실 검사결과 Actinobacillus pleuropneumoniae가 검출되었음(표 2-5)

- 무투여 대조군에서는 총 20두 중 10두에서 임상증상이 나타났으며 7두에서 호흡기증상 및 소모성질환이 나타났고 3두에서 설사 및 소모성질환을 나타내었음. 임상증상을 나타낸 10두에서 모두 체중감소와 쇠약증상이 나타났고 그 중 2두가 증상발현 7일, 1일후 폐사하였음. 폐사된 1두는 폐의 황색염에서 경계가 뚜렷한 미만성 부종 및 기관지 농양과 포말을 나타내었으며, 실험실 검사 결과, PCV2와 Pasteurellosis가 복합된 복합호흡기증상(PRDC)을 나타내었음. 나머지 1두는 73일령에 사료섭취 감소가 나타나 다음날 급사하였다. 폐사된 1두는 외견상 복부팽만이 심했고 코와 귀 부위에 청색증을 나타내었음. 부검소견상 결장부에 단추상 궤양 소견이 관찰되었고 장간막의 충혈소견이 보였음. 실험실에서 살모넬라균이 검출되었음.

표 2-5. 육성, 비육돈 시제품 실험군에서의 임상증상 발현 및 폐사수 비교

시험군	시험두수	임상증상 발현두수	폐사수	비 고
권장량 투여군	20	5	1	홍막폐렴
2배 권장량 투여군	20	4	0	
무투여 대조군	20	10	2	복합호흡기증상(1두) 살모넬라증(1두)

㉠ 생산성 분석 결과

- 3개 시험군에 대한 생산성을 비교하기 위해 개시체중과 종료체중을 측정하고, 시험기간 동안 총사료섭취량을 측정함
- 개시체중은 권장량 투여군이 28.47kg, 2배 권장량 투여군이 29.11kg 및 무투여 대조군이 30.24kg으로 전체적으로 유의성 있는 차이는 없었지만, 무투여 대조군과 권장량 투여군이 2배 권장량 투여군보다 개시체중평균이 높았음. 개시일령은 70일령으로 3개 돈군이 동일하였으나 종료일령은 권장량 투여군과 2배 권장량 투여군이 165일인데 반해, 무투여 대조군이 169일령으로 출하가 4일 늦었다. 일당증체량은 권장량 투여군이 851g, 2배 권장량 투여군이 861g으로 무투여 대조군 827g 보다 높았음(표 2-6).
- 두당 일일사료섭취량은 2배 권장량 투여군이 가장 많았고 권장량 투여군과 무투여 대조군이 비슷하였다. 사료요구율은 무투여 대조군이 4.77로 가장 좋지 않았고 권장량 투여군과 2배 권장량 투여군이 비슷하였음. 2배 권장량 투여군이 증체율은 좋았지만 사료섭취량이 높아 사료요구율이 권장량 투여군과 비슷하게 나타났음(표 2-7).

표 2-6. 육성, 비육돈용 시제품 적용 시험군의 증체량 및 일당증체량 분석 결과

시험군	실험 두수	개시 일령	종료 일령	개시평균 체중(kg)	종료평균 체중(kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량 투여군	19	70	165	28.47	109.29	1,536	851
2배권장량 투여군	20	70	165	29.11	110.85	1,635	861
무투여 대조군	18	70	169	30.24	112.07	1,473	827

표 2-7. 육성, 비육돈용 시제품 적용 시험군의 사료섭취량 및 사료요구율 분석 결과

구분	실험두수	총사료 섭취량(kg)	두당일일사료 섭취량(g/day)	사료요구율
권장량 투여군	19	7,121	3.95	4.64
2배권장량 투여군	20	7,572	3.99	4.63
무투여 대조군	18	7,023	3.94	4.77

㉞ 결론

- 양돈용 시제품 중 육성, 비육돈용에 대한 양돈장 적용시험 결과, 3개 돈군 모두에서 임상증상이 발현되었으며 임상증상은 주로 호흡기증상이 나타났으며 무투여 시험군에서는 살모넬라증으로 인한 폐사도 1두에서 나타났음. 임상증상은 권장량 시험군이 5두, 2배 권장량 시험군이 4두 나타난 것에 비해 무투여 시험군은 20두중 10에서 나타나 임상증상 발현율이 무투여 시험군이 높게 나타났음. 폐사는 권장량 시험군에서 홍막폐렴으로 인해 1두가 폐사했고, 무투여 시험군에서는 PRDC로 인한 폐사가 1두, 살모넬라증으로 인한 폐사가 1두 발생하였음. 2배 권장량 시험군에서는 폐사가 발생하지 않았음
- 2배 권장량 시험군에서 증체율은 권장량 시험군과 무투여 시험군에 비해 높게 나타났으나 사료섭취량이 권장량 시험군과 무투여 시험군 보다 높아 사료요구율이 다른 2개 시험군보다 좋지 않았음
- 2배량을 투여한 군에서 어떠한 병적인 임상증상이 발생하지 않았고 오히려 생산성 증대에 더 좋은 결과가 나와 안전성에도 문제가 없는 것으로 나타났음

(5) 청국장 추출물의 농장적용 평가

(가) 연구배경과 농장 선정 및 평가 방법

- 청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* sups. *chungkookjang*에서 생산된 1000kDa 이상의 고분자 중합체 poly-γ-glutamate(PGA)는 최근 다양한 마우스모델과 본 연구팀의 돼지를 이용한 실험모델을 바탕으로 선천성 및 후천성 면역반응의 증대와 PRRS 바이러스에 대한 저항성을 높이는 것으로 실험실적인 평가를 통해 증명되었음. 따라서 PGA의 PRRS 감염에 대한 예방 및 치료 효능과 안전성을 평가를 위해

일반 양돈장에서 적용하여 평가하고자 함

- 1차년도에 PRRS 관련 평가를 실시하기 위해 선정된 전북 김제 소재 P-2 양돈장을 청국장 추출물의 항바이러스 효능과 안전성 평가를 위해 선정함
- 같은 날 분만한 8두의 모돈에서 분만된 포유자돈 100두를 선정하여 분만 후 3일에 이표를 부착하고 동일한 조건에서 사육한 후 4주에 이유돈사로 무작위적으로 이동한 후 체중을 측정하고 채혈을 실시한 뒤에 50두는 PGA 5ml을 근육접종하고 나머지 50두는 무처치함
- 이 후 6주 및 10주에 각각 전체 100두의 자돈들의 체중을 측정하고 채혈을 실시하여 PGA 처치 그룹과 무처치 그룹의 폐사율, 일당 증체량, 혈중바이러스 농도 및 PRRS ELISA 항체가를 비교하였음

(나) PGA의 항바이러스 효능과 안전성 평가

- PGA를 접종한 그룹은 관찰 10주 동안 두 마리의 폐사가 일어나 반면, 무처치 그룹은 4마리의 폐사가 일어남
- 하지만 10주 동안의 일당 증체량은 차이가 없는 것으로 관찰됨(표 2-8)

표 2-8. PGA 투여에 따른 평균 일당 증체량 측정 결과

시험군	시험두수	일당증체량 (kg/day)	표준편차
PGA 투여군	48	0.3682	0.1019
무투여 대조군	46	0.3728	0.1076

- PGA를 접종한 그룹과 무처치 그룹의 혈중 바이러스 농도를 관찰한 결과 PGA를 접종한 그룹은 6주까지 바이러스의 감염 및 혈중 바이러스 농도가 통계적으로 유의성 있게 감소하는 것으로 관찰되었으나 그 이후에 감염이 지속적으로 발생하여 10주에는 무처치 그룹보다 오히려 높은 혈중 바이러스 농도가 관찰되었음(그림 2-1)

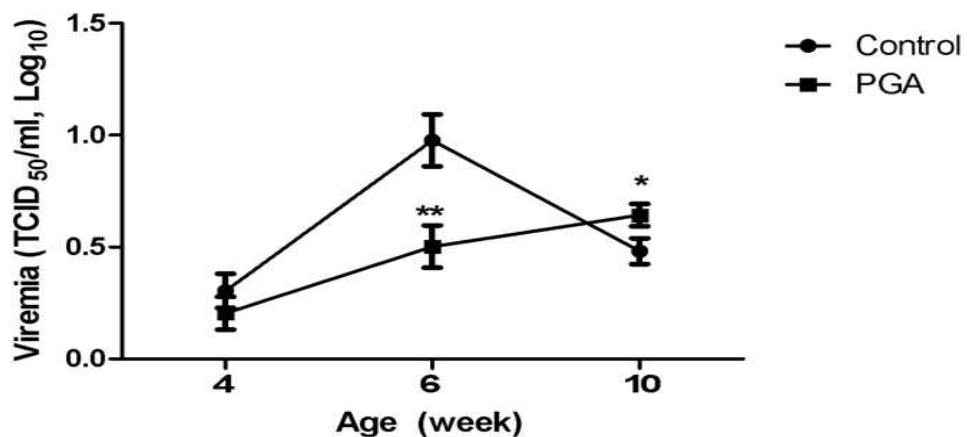


그림 2-1. PGA 투여/미투여 시험군의 바이러스혈증 수준 비교

- 채취한 혈청의 PRRSV 특이 항체가를 ELISA(AniGen)으로 검사해 본 결과, PGA 처치 전의 4주령에서는 비슷한 양성률과 평균 항체가를 보였으나 PGA 처치 2주 후인 6주령에서는 PGA 처치 그룹의 양성률은 38%로 control의 58.3%에 비해 유의성

있게 낮았고 평균 항체가도 낮았음. 하지만 PGA 처치 6주 후인 10주령에서는 양성률과 평균 항체가가 두 그룹 모두 비슷하여 PGA 그룹의 자돈은 6주 이후에 많은 개체가 PRRSV에 감염이 된 것을 관찰할 수 있었음(표 2-9)

표 2-9. PGA 투여/미투여군의 돼지생식기호흡기증후군 바이러스 ELISA 항체가 조사

구분	미투여 대조군			PGA 투여군		
	4주	6주	10주	4주	6주	10주
항체가 평균 (S/P mean)	0.360562	1.173891	2.786997	0.368108	0.763068	3.046103
양성두수.시험두수 (양성율, %)	11/50 (22%)	28/48 (58.3)	45/46 (97.8)	9/50 (18)	19/50 (38)	48/48 (100)
항체양전두수 (양진율, %)	-	18/48 (37.5)	19/46 (41.3)	-	10/50 (20)	30/48 (62.5)

다. 항생제대체제 및 첨가제의 양계장 적용 및 평가 프로그램 구축

(1) 양계용 면역복합제제 기초제품 개발(제4협동 공동수행)

(가) 면역복합제제 생산 대상 질병

- 1차년도 질병 모니터링 대상 양계장에 대한 질병발생 위험도 분석결과, 대장균증, 살모넬라증, 클로스트리듐증과 같은 세균성 질병에 의한 피해가 10~20일령구간에서 문제가 되는 것으로 나타났음(그림 1-4). 따라서 경구용으로 적용하여 실질적인 효과를 기대할 수 있는 대장균증, 살모넬라증 및 클로스트리듐증을 방제 목표로 하여 면역복합제제 시제품을 시범 생산하였음

(나) IgY 제제 생산(산란계)

① 산란계 면역용 항원

- Clostridium perfringens*
- E.coli*(양계분리주 10주)
- Salmonellarbsa* 4종 : *S. pullorum*, *S. gallinatum*, *S. enteritidis*, *S. typhimurum*

② IgY 생산을 위한 산란계 면역용 백신 제조 및 산란계 접종 프로그램은 양돈용 제조과정과 동일하게 수행하였음

(2) 양계용 질병발생 상황에 따른 항생제대체제 및 첨가제 적용 프로그램 구축

(가) 질병 발생 위험도 분석결과에 따른 제형 개발 및 적용 프로그램 구축

① 산란계용 면역복합제제 시제품 조성

- 산란계의 경우 산란을 시작한 이후 지속적으로 체내 칼슘 및 미네랄이 소모되어 산란계로서의 수명이 단축됨은 물론 면역력 저하 및 소화기능 저하로 인한 살모넬라균 감염의 위험에 노출됨. 또한 무더운 여름철에는 연변 및 설사의 발생빈도가 높아짐
- 따라서 산란계용 면역복합제제 시제품(가칭 다이스톱-폴츄리산1호)는 산란계 농장에서 문제되는 세균성질병에 대한 항체가 함유된 IgY와 생균제 및 천연미네랄을 주조성으로 하여 산란율 및 파란율 개선과 함께 산란계 농장에서 문제되는 세균성 질

병에 대한 방어효과를 나타내도록 함(표 2-10)

② 육계 병아리용 면역복합제제 시제품 조성

- 육계의 경우, 최근 성장속도가 빠른(30일령경에 1.5kg 도달) 대형 종이 대부분이기 때문에 육계농장에서는 빠른 성장시기 동안 각종 골격 및 관절 관련 질병이 이전에 비해 다발하고 있는 것으로 조사됨
- 따라서 육계용 면역복합제제 시제품은 주요 세균성 질병의 면역항체 체제를 포함시키는 한편 충분한 골격형성에 필요한 천연 미네랄과 비타민(A, D, E), 생균제(3종)를 포함시켜 면역 증진과 함께 종합적으로 부족한 영양분을 보충할 수 있도록 조성하였음(표 2-10).

표 2-10. 산란계 및 육계용 면역복합제제(분말제제) 시제품의 조성

구분	성분명	조성 용량(g)		비고
		산란계용	육계용	
면역제제	IgY	50.0	50.0	
미네랄 및 부형제	복합미네랄(구마트)	200.0	200.0	
	프락토올리고당	50.0	50.0	
	포도당	604.25	668.25	
생균제제	유산균(<i>Streptococcus faecalis</i> T-110)	1×10^{11}	1×10^{11}	균수
	당화균(<i>Bacillus mesentericus</i> To-A)	1×10^9	1×10^9	균수
	낙산균(<i>Clostridium butyricum</i> To-A)	1×10^9	1×10^9	균수
비타민	비타민 A	50.0	10.0	
	비타민 D3	10.0	2.0	
	비타민 E	20.0	4.0	
총 용량		1000.0	1000.0	

③ 면역복합제제 시제품의 적용방법(용법 및 용량)

- 산란계 및 육계에 대하여 동일한 용법과 용량을 적용하였으며, 사료 톤당 초생추는 1kg, 중추는 0.5~1kg, 중추이후는 500g을 균등히 혼합하여 투여함

(3) 양계장에 대한 면역복합제제 적용 및 효능평가 프로그램 구축

(가) 산란계농장에 대한 시제품 적용 효과 분석

① 대상농장 : 경기도 포천시 소재 산란계 농장

- 계사는 원치커튼 유창계사를 선정하여 실시하였음. 실험계군은 38주령의 하이라인 갈색 산란계로서 실험 전 1주간 산란율 평균은 88.5%로 분석되었음

② 시험기간 : 30일간(2013. 04. 05 ~ 05. 04)

③ 시험군 구분 : 시험군은 권장량군, 2배 권장량군, 무투여군 등 3개 계군으로 구분하였고, 권장량군은 사료톤당 0.5kg을 사료에 첨가하였으며, 2배 권장량군은 사료톤당 1kg을 사료에 첨가하였고 무투여군은 사료만 급여함

- 시제품 외에 사료(중양사료)는 동일한 제품을 사용하였으며 음수는 니플시스템으로 급수함. 시제품 이외 다른 영양제나 생균제는 첨가하지 않았음

④ 효능평가 조사항목

- 산란성적과 임상증상 발현율 조사
- 산란성적 조사를 위하여 시제품 투여전 7일간 및 시제품 투여 후 30일간의 산란율과 연란 및 파란 발생률을 기록함
- 임상증상 발현율은 매일 연변 및 설사 발생 현황을 관찰 기록하였으며, 시험기간 내 폐사율을 조사하였고, 폐사원인을 분석함

⑤ 시험결과

㉠ 산란성적

- 산란율에 대한 조사결과 전시험군에서 투여 전 보다 투여 후에 산란율이 저하되어 농장 관리 상에 문제가 있었음을 알 수 있음. 그러나 산란율의 저하폭은 무투여 대조군(3.0%)에 비해 권장량 투여군(1.0%) 및 2배 권장량 투여군(0.8%)이 3배 이상 낮은 것으로 나타나 시제품이 산란율 향상에 효과가 있는 것으로 나타남
- 연란·파란율에 대한 조사 결과, 무투여 대조군(0.6%)은 피해가 증가한 반면, 권장량 투여군(-0.7%) 및 2배 권장량 투여군(-1.1%)은 피해가 감소되어 시제품이 연란 및 파란율의 방지에는 효과가 탁월함을 알 수 있었음(표 2-11)

표 2-10. 산란계용 시제품 적용에 따른 양계장 산란성적

시험군	평균 산란율		평균 연란·파란율	
	투여 전	투여 후	투여전	투여후
권장량 투여군	87.4 (85.5-89.1)	86.4 (84.2-88.1)	5.1 (4.9-5.2)	4.4 (3.8-6.0)
2배 권장량 투여군	88.2 (86.2-90.2)	87.4 (85.8-88.9)	5.1 (4.2-5.9)	4.0 (2.3-5.0)
무투여 대조군	88.8 (88.2-89.3)	85.8 (83.5-88.8)	4.7 (4.6-4.8)	5.3 (4.1-6.7)

㉡ 임상관찰 성적

- 임상증상(연변 및 설사) 발현율은 권장량 투여군과 2배 권장량 투여군은 각각 15.7%, 16.2%로서 무투여군 24.8% 보다 발현율이 상대적으로 낮았음. 폐사율은 권장량 투여군과 2배 권장량 투여군이 각각 2.3% 및 3.1%로서 무투여군 4.5% 보다 낮게 나타남(표 2-12)

표 2-12. 시험계군별 임상증상 발현율

구분	실험수수	임상증상 발현율(%)		비 고
		연변 및 설사	폐사	
권장량 투여군	2,300	15.7%	2.3%	
2배 권장량 투여군	2,500	16.2%	3.1%	
무투여 대조군	2,500	24.8%	4.5%	살모넬라감염증

⑥ 결론

- 산란계농장에 대한 시제품 적용 결과, 산란율 향상 및 연란·파란 발생을 저하에

효과가 있음이 확인되었으며, 연변 및 설사발생률 및 폐사율을 감소시키는 효과가 있음이 확인되었음

- 또한 권장량 투여군에 비하여 2배 권장량 투여군에서 투여효과가 더 양호한 것으로 나타나 산란계 적용에 따른 안전성에 대해서는 문제가 전혀 없는 것으로 나타났음
- 다만, 1개 농장에 대한 성적만으로는 제품의 효능과 안전성을 보증하기 곤란하기 때문에 추후 시험 농장을 확대할 필요가 있음.

(나) 육계농장에 대한 시제품 적용 효과 분석 1

① 대상농장 : 경기도 가평군 소재 육계농장

- 계사는 유창계사 형태의 농장에서 실시하였음. 시험계군은 로스품종의 육계로서 권장량 투여군 1만수, 2배 권장량 투여군 1만수, 무투여 대조군 9,000수 계군을 선정

② 시험기간 : 33일간(2013. 03. 12 ~ 04. 15)

- 입추 후 1주일부터 출하 시까지 사료에 시제품 첨가 투여

③ 시험군 구분 : 시험군은 권장량 투여군, 2배 권장량 투여군 및 무투여 대조군으로 계군을 3개 계군으로 구분 한 다음, 권장량 투여군은 사료톤당 시제품 0.5kg, 2배 권장량 투여군은 사료톤당 시제품 1kg을 첨가하였고 무투여군은 사료만 급여함

- 입추 계군은 동일한 부화장의 초생추를 사용하였으며 실험에 사용된 계사는 동일한 방향을 가진 동일 환경의 계사를 사용함
- 시제품 외에 사료(제일사료)는 동일한 제품을 사용하였으며 음수는 원통형 급수기를 이용함. 시제품 이외 다른 영양제나 생균제는 첨가하지 않았음

④ 효능평가 조사항목

- 육성률(%), 총 사료소비량과 사료요구율, 총 출하체중 및 평균 출하체중을 조사함

⑤ 시험결과

- 3개 시험계군은 동일한 부화장에서 부화된 초생추로서 도착 당시 건강 상태가 양호하였으며, 시험기간 동안 호흡기증상이나 설사 등의 질병문제는 발생하지 않았음
- 3개 계군 모두 육성률이 98% 이상으로 양호하게 나타났으며, 33일령 출하체중은 권장량 투여군 1.65kg, 2배 권장량 투여군 1.53kg, 무투여 대조군이 1.52kg으로 권장량 투여군이 비교적 높게 나타남
- 사료요구율은 권장량 투여군 및 2배 권장량 투여군이 각각 1.64 및 1.69였고, 무투여 대조군은 1.68로 권장량 투여군이 비교적 양호한 것으로 나타났으며, 2배 권장량 투여군과 무투여 대조군간에는 차이가 없었음(표 2-13)

⑥ 결론

- 육계농장에 대한 시제품 적용 결과, 권장량 투여군에서 육성성적, 출하체중 및 사료요구율이 개선되는 것으로 나타났으며, 시험계군 모두 폐사 등 임상증상이 나타나지 않아 시제품의 안전성에 대해서는 문제가 전혀 없는 것으로 나타남
- 육계농장 역시 1개 농장에 대한 성적만으로는 제품의 효능과 안전성을 충분히 보증하기 어렵기 때문에 3차년도에는 다수 육계농장으로 시험을 확대할 계획임

표 2-13. 시험계군 별 임상증상 발현율

시험군	입추 수수	출하 수수	육성률 (%)	총사료 소비량	총출하 체중(kg)	평균출하 체중(kg)	사료 요구율
권장량 투여군	10,000	9,894	98.9	26,773	16,325	1.65	1.64
2배 권장량 투여군	10,000	9,923	99.2	25,657	15,182	1.53	1.69
무투여 대조군	9,000	8,870	98.5	22,649	13,482	1.52	1.68

(다) 육계농장에 대한 시제품 작용 효과 분석 2

① 대상물질 : BetaPolo

- β -1,3-glucan이 3% 함유된 시험물질임
- β -1,3-glucan: 비특이적인 면역반응 유도, 항암, 항진균 및 항균효능이 있음

② 대상농장 : 전북 익산시 소재 육계농장

- 계사는 무창계사이며, 시험계군은 코브품종의 육계로서 권장량 투여군 1만수, 5배 권장량 투여군 1만수, 무투여 대조군 1만수로 계군을 선정함

③ 시험기간 : 30일간(2012. 10. 26 ~ 12. 01)

- 입추 후 1주일부터 출하 시까지 사료에 시제품 첨가 투여

④ 시험군 구분 : 시험군은 권장량 투여군(음수희석 0.1%), 5배 권장량 투여군 (음수희석 0.5%) 및 무투여 대조군으로 계군을 3개 계군으로 구분 한 다음, 권장량 투여군 과 5배 권장량 투여군은 음수희석하여 첨가하였고 무투여군은 물만 급여함

- 입추 계군은 동일한 부화장의 초생추를 사용하였으며 실험에 사용된 계사는 동일한 방향을 가진 동일 환경의 계사를 사용함

⑤ 효능평가 조사항목

- NO production, cell proliferation, cytokine등 면역학적 지표를 조사함

⑥ 시험결과 (표 2-14)

- 시험에 사용된 3개 계군은 동일한 부화장에서 부화된 초생추로서 도착 당시 건강 상태가 양호하였으며, 시험기간 동안 호흡기증상이나 설사 등의 질병문제는 발생하지 않았음
- 3계군 모두 대식세포의 활성을 나타내는 NO에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 면역세포(PBMC, splenocyte, thymocyte)의 증식력에서는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였음
- Cytokine 발현능은 Th1 계열뿐만 아니라 Th2 계열 cytokine의 발현을 촉진시키는 것을 확인하였으며, 농도 의존적인 결과를 나타냄

표 2-14. 시험계군 별 면역적 지표

시험군	입추 수수	면역세포 증식능			Cytokine	
		PBMC	Splenocyte	Thymocyte	Th1	Th2
권장량 투여군	10,000	++	++	++	++	++
5배 권장량 투여군	10,000	+++	+++	+++	+++	+++
무투여 대조군	10,000	-	-	-	-	-

⑦ 결론

- 육계농장에 대한 시제품 적용 결과, 권장량 투여군에서 면역증진 효과를 확인하였으며, 농도 의존적으로 향상되는 것을 확인할 수 있었음
- 면역증진 효과는 비특이적인 증진효과를 보였으며, Th1과 Th2 모든 계열의 cytokine 수준을 증진시킴을 확인하였음

라. 제1세부과제 연구결과 요약 및 평가

- (1) 축우장, 양돈장 및 양계장의 면역복합제제 시제품의 현장 효능평가 프로그램 구축을 위하여 1차년도 문제 질병을 대상으로 기초 면역제제를 생산하였고, 제4협동 연구팀과 연계하여 시제품을 생산하여 농장별로 효능 및 안정성을 평가함
 - (가) 축우용 면역복합제제 시제품의 경우, 2배 권장량 투여군에서는 호흡기 및 소화기 증상이 관찰되지 않았으나 권장량 투여군에서는 호흡기증상이 1두 나타났으며, 무투여 대조군에서는 소화기증상이 3두 및 호흡기증상이 2두 나타났으며, 이중 2두는 소화기와 호흡기증상이 동시에 나타남. 이와 같은 결과로 보아 면역제제 시제품은 조성과 일치하게 소화기질병 예방에 효과가 탁월한 것으로 판단됨. 그러나 호흡기 질병에 대한 예방효과는 비교적 낮은 것으로 추정되어 차년도 면역제제 조성에는 호흡기질병 면역성분을 보강할 필요가 있는 것으로 판단됨
 - (나) 양돈용 면역복합제제 시제품의 경우, 이유자돈용에 대한 양돈장 적용시험 결과, 증체율과 사료효율은 2배 권장량 투여군, 권장량 투여군 및 미투여 대조군 순으로 나타나 이유자돈용 시제품은 권장량 보다 2배 더 투여하는 것이 증체율 향상과 사료 요구율 개선 효과가 높으며, 투여에 따른 부작용은 전혀 없는 것으로 나타남
 - (다) 양계용 면역복합제제 시제품의 경우, 산란계용과 육계용으로 구분하여 시제품을 제작하여 농장시험을 실시함
 - ① 산란계농장에 대한 시제품 적용 결과, 산란율 향상 및 연란·파란 발생률 저하에 효과가 있음이 확인되었으며, 연변 및 설사발생률 및 폐사율을 감소시키는 효과가 있음이 확인됨. 또한 권장량 투여군에 비하여 2배 권장량 투여군에서 투여효과가 더 양호한 것으로 나타나 산란계 적용에 따른 안전성에 대해서는 문제가 전혀 없는 것으로 나타났음.
 - ② 육계농장에 대한 시제품 적용 결과, 권장량 투여군에서 육성성적, 출하체중 및 사료 요구율이 개선되는 것으로 나타났으며, 시험계군 모두 폐사 등 임상증상이 나타나지 않아 시제품의 안전성에 대해서는 문제가 전혀 없는 것으로 나타남

(2) 면역복합제제 시제품에 대한 2차년도 농장 적용시험 결과, 3차년도 효능평가 프로그램의 일부 보완이 필요하며, 효능평가 프로그램 적용농장의 확대가 필요함

(가) 축우장에서 송아지에 대한 면역복합제제의 효능시험은 송아지의 분만 또는 구입 일자가 다양하여 시험군을 설정하기가 곤란하며, 시험군 개체에 임상증상이 발현될 시에는 농장에서 즉각적인 치료를 요구하기 때문에 시험의 진행이 사실상 불가능하였음. 따라서 3차년도 축우장 적용시험에는 기록관리가 가능한 대단위 사육목장을 대상으로 하고, 개발시제품 투여군과 기존 시판제품 투여군으로 구분하여 농장 단위로 적용하는 방법을 검토해야 할 것으로 판단됨

(나) 양돈장에 대한 효능평가시험은 부경양돈농협과 기술자문 협약을 통하여 조합농장을 대상농장으로 확대하고, 효능평가 프로그램을 구체화하여 돈군단위 병원체 모니터링을 통한 효능평가방법과 면역복합제제 적용 전·후 사육단계별 돈군에 대한 임상관찰과 채취시료(분변, 타액)에 대한 원인체 검사 및 농장생산성 기록 분석 등으로 면역복합제제 적용에 따른 효능평가 프로그램을 강화하였음

(다) 양계장에 대한 효능시험은 효능평가 대상 산란계 및 육계농장을 확대할 필요가 있음(제 2세부 닭 효능평가팀과 연계)

(3) 2차년도 연구수행 내용 평가

(가) 2차년도에 연구수행 계획대로 축우장, 양돈장 및 양계장의 현장적용 및 효능 안정성 평가 프로그램 구축 및 시제품 적용을 완료하여 세부과제의 목표를 충분히 달성하였다고 평가됨

(나) 3차년도에는 신소재 개발 연구팀에서 개발한 제제를 추가하여 시제품을 생산하고(제4협동 공동수행), 개발 시제품의 효능평가 적용농장 수를 확대하여 평가자료를 더 구체화할 필요가 있음. 특히 주어진 예산으로 농장수를 확대할 수 있는 효과적인 방안 수립이 요구되며, 농장 현장평가가 사실상 불가능한 축종 및 평가항목(특히 축우장 시험의 경우)에 대해서는 축종별 효능평가팀(전북대)에서 목적동물 실험 수준에서 평가하는 방안도 검토할 필요가 있음

2. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발 (제2세부)

가. 고면역 면역난황제제를 이용한 첨가제 개발

(1) 고역가 고면역 바이러스 생산 최적화

(가) 닭 면역보강인자 발현 세포주 cFc 발현 최적화

① 1차년도에 개발된 닭 면역보강인자 cFc 막발현 세포주 3종(Vero-cFc, PAM-pCD163-cFc 및 MDBK-cFc)에 대해 fluorescence-activated cell sorting(FACS) 기법을 이용하여 최적 발현 세포 population을 수거하여 배양함(그림 2-2). 2차 sorting되어진 cFc 발현 세포주(P2)는 기존 세포주보다 cFc 발현율이 향상되었으며, 이 세포주들을 이용하여 타겟 바이러스 항원 생산을 시도함.

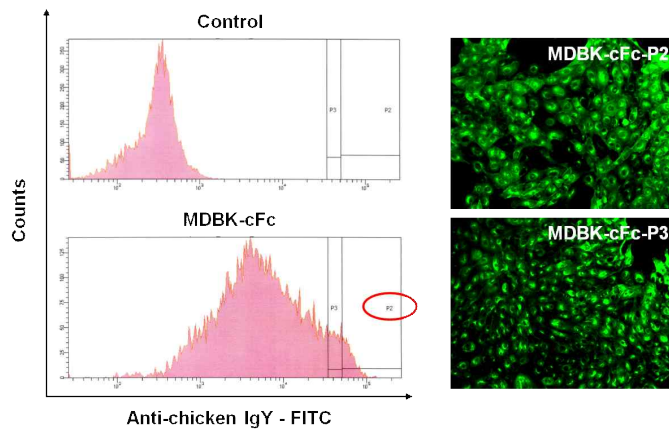


그림 2-2. cFc 발현 세포주의 FACS(좌) 및 2차 sorting된 cFc 발현. 세포주(P2)에서 cFc 발현 확인을 위한 형광항체법(우)

(나) 최적화 cFc 발현 세포주를 이용한 닭 접종용 고역가 고면역 바이러스 항원 생산

- ① 정상 세포주(Vero, PAM-pCD163 및 MDBK)를 이용하여 각각의 타겟 바이러스 (PEDV, type 1 PRRSV, type 2 PRRSV 및 BVDV)를 감염시켜 배양하여 각 타겟 세포주에서 역가를 측정함(표 2-15)

표 2-15. 정상 세포주에서 배양되어진 바이러스 역가

세포주	바이러스	역가
Vero	PEDV	2×10^6 PFU/ml
PAM-pCD163	유럽형 PRRSV-KNU-07	$10^{6.12}$ TCID ₅₀ /ml
PAM-pCD163	북미형 PRRSV-KNU-12-KJ4	$10^{6.51}$ TCID ₅₀ /ml
MDBK	BVDV	$10^{6.21}$ TCID ₅₀ /ml

- ② cFc-harboring 바이러스를 생산하기 위해 개발된 3종의 세포주(Vero-cFc, PAM-pCD163-cFc 및 MDBK-cFc)에 목표 역가를 가진 각각의 바이러스를 감염시켜 배양함. cFc-harboring 바이러스 여부를 확인하기 위해 감염 48시간 후 바이러스 감염 cFc 발현 세포주에서 먼저 co-staining을 통하여 cFc 발현(green)과 타겟 바이러스(red)가 감염된 것을 확인함(그림 2-3). 또한 western blot assay를 이용하여 cFc-harboring 바이러스를 확인함. 이를 위해 먼저 20% sucrose에 정상 바이러스 상층액과 cFc-harboring 바이러스 상층액을 분주하고 ultracentrifuge를 이용하여 40,000rpm에서 2시간 동안 초고속원심분리 한 후 바이러스 정제 pellet 얻어냄. 이 바이러스 정제 pellet은 lysis buffer를 이용하여 용해시킨 후 western blot assay를 수행함. 정상 바이러스에서는 cFc 단백질에 해당하는 밴드가 확인되지 않았으나 cFc-harboring 바이러스에서는 cFc 분자량(55kDa)에 해당하는 타겟 밴드가 뚜렷하게 확인되어 cFc 발현 세포주에서 생산되는 바이러스는 cFc가

harboring된 것으로 증명됨(그림 2-4).

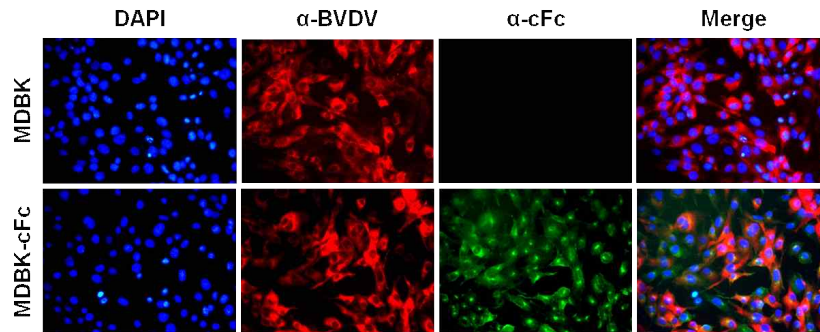


그림 2-3. 타겟 바이러스 감염된 최적화된 cFc 발현 세포주에서 cFc 발현(green) 및 바이러스 감염(red) 확인을 위한 co-staining

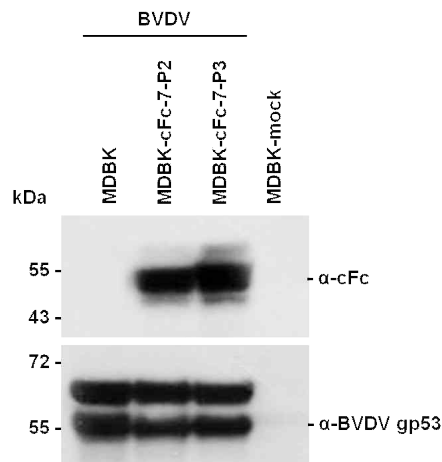


그림 2-4. 타겟 바이러스 감염된 최적화된 cFc 발현 세포주에서 cFc-harboring 바이러스 확인을 위한 western blot

③ 개발된 cFc 발현 세포주에서 cFc-harboring 바이러스가 확인된 후 각각의 세포주에서 바이러스를 감염시킨 후 cFc-harboring 바이러스의 역가를 측정된 결과 기존 바이러스 역가와 유사한 양상을 보임(표 2-16). cFc-harboring 바이러스 역가 확인 이후 산란계 면역접종을 위한 고역가 고면역 유도용 cFc-harboring 바이러스 항원 생산을 시도하고 최적화함.

표 2-16. 정상 세포주에서 배양된 바이러스 역가

세포주	바이러스	역가
Vero-cFc	PEDV-cFc	2.5×10^6 PFU/ml
PAM-pCD163-cFc	유럽형 PRRSV-KNU-07-cFc	$10^{6.15}$ TCID ₅₀ /ml
PAM-pCD163-cFc	북미형 PRRSV-KNU-12-KJ4-cFc	$10^{6.45}$ TCID ₅₀ /ml
MDBK-cFc	BVDV-cFc	$10^{6.23}$ TCID ₅₀ /ml

(2) 재조합 바이러스 단백질-면역보강인자 항원 생산 최적화

(가) 닭 Fc 분자가 포함된 바이러스 유래 재조합 단백질 발현 세포주 배양 최적화

- ① 1차년도에 개발된 3종의 세포주, 즉 PK-PEDV-S1-cFc (고면역 PED 바이러스 단백질 항원 생산용 cFc-tagged 재조합 PED 바이러스 spike 단백질 발현 PK-15 세포주), PK-PCV-2b-ORF2-cFc (고면역 돼지췌코바이러스 단백질 항원 생산용 cFc-tagged 재조합 PCV2b capsid 단백질 발현 PK-15 세포주) 및 MDBK-BCV-S1-cFc (고면역 소 코로나바이러스 단백질 항원 생산용 cFc-tagged 재조합 소 코로나바이러스 spike 단백질 발현 MDBK 세포주)을 무혈청 배지를 이용하여 배양을 최적화하여 일반 혈청이 포함되어진 배지로 배양했을 때와 유사한 성장을 보임.

(나) 바이러스 유래 재조합 단백질-cFc 발현 세포주로부터 재조합 고면역 단백질 항원 생산 최적화

- ① 개발된 재조합 단백질-cFc 발현 세포주로부터 재조합 단백질 항원을 정제하기 위해 먼저 배양된 세포를 수거하여 lysis buffer를 이용하여 cell lysate를 만들고, 여기에 chicken IgY precipitating resin(GenScript)을 첨가하여 4°C에 하룻밤 동안 immunoprecipitation(IP)을 실시함. IP 된 샘플은 anti-chicken IgY antibody를 이용하여 western을 실시하였고, 그 결과 약 170kDa에 달하는 cFc-tagged PEDV S1 단백질을 검출함(그림 2-5). 각각의 단백질 항원 발현 세포주를 6-well 세포배양 plate에서 배양하였을 때 약 15 μ g 정도의 재조합 단백질 항원을 생산할 수 있었고 100mm² 세포배양 dish에서 scale up 하였을 경우 약 100 μ g의 cFc-tagged 바이러스 단백질 항원을 생산할 수 있음. 닭 면역집중용으로 현재 200 μ g 단백질 항원 확보를 위해 진행하는 중임.

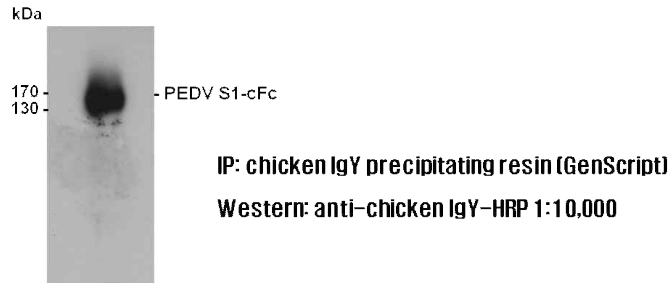


그림 2-5. 최적화된 재조합 바이러스 단백질-cFc 발현 세포주에서 정제된 고면역 단백질 항원 확인을 위한 western blot

(3) 산란계 항원 접종 후 면역반응 유도능 *in vitro* 평가 시스템 구축

(가) 면역항원 접종에 따른 cytokine 변화 확인을 위한 real-time PCR 시스템 구축

- ① 3차년도 닭 면역접종 후 숙주내 면역반응 변화양상을 확인하기 위한 시스템 구축하기 위해 혈액내 cytokine 변화를 real-time RT-PCR를 통해 정량화 할 예정이다. 이를 위해 접종 후 시기 별로 혈액을 채취하여 백혈구를 분리한 이후 real-time RT-PCR를 수행하여 타겟 cytokine의 변화를 확인할 예정이다. 이를 위해 각각의 cytokine을 검출하기 위한 프라이머 디자인 및 합성을 실시하여 해당 프라이머를 확보함(표 2-17).

표 2-17. 닭 유래 cytokine 검출용 프라이머 리스트

Cytokine	프라이머 염기서열
IL-6	Fwd: 5'-CAAGGTGACGGAGGAGGAC-3'
	Rev: 5'-TGGCGAGGAGGGATTTCT-3'
IL-8	Fwd: 5'-CCAAGCACACCTCTCTTCCA-3'
	Rev: 5'-GCAAGGTAGGACGCTGGTAA-3'
IFN- α	Fwd: 5'-ATCCTGCTGCTCACGCTCCTTCT-3'
	Rev: 5'-GGTGTGCTGGTGTCCAGGATG-3'
IFN- β	Fwd: 5'-GCCTCCAGCTCCTTCAGAATACG-3'
	Rev: 5'-CTGGATCTGGTTGAGGAGGCTGT-3'
IFN- γ	Fwd: 5'-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3'
	Rev: 5'-GGCTTTGCGCTGGATTC-3'
TNF- α	Fwd: 5'-GAAGCAGCGTTTGGGAGT-3'
	Rev: 5'-GTTGTGGGACAGGGTAGG-3'
TNFSF15	Fwd: 5'-CCTGAGTATTCCAGCAACGCA-3'
	Rev: 5'-ATCCACCAGCTTGATGTCACTAAC-3'
GAPDH	Fwd: 5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3'
	Rev: 5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'

나. 면역단백질의 고속, 대량 발현 체계의 개발

(1) 효모용 auto-cloning/expression 시스템 설계 및 구축

(가) 효모용 expression 시스템 구축 및 시험 적용

- ① Plasmid copy number가 다른 origin을 가진 벡터의 제작과 적용

㉞ 면역 단백질 발현용 효모균주 추가 및 cloning용 대장균 확보(표 2-18).

표 2-18. auto-cloning 시스템 관련 균주

Strains	Relevant characteristics	Source
<i>P. pastoris</i> GS115	mutant-type(His ⁻)	Invitrogen
<i>E. coli</i> (Top10F')	<i>F'</i> { <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>Tn10</i> (<i>TetR</i>)} <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrrhsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , λ - <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

㉞ Plasmid copy number가 다른 origin

㉞ CEN(low-copy number : ~3)

- Centromeric 서열을 통해 유전적으로 여러 세대가 지나도 안정적으로 벡터가 유지, 자율 복제 서열(ARS)로 독립적으로 자가 복제가 가능함

㉞ 2 μ origin(high-copy number : ~40)

- *S. cerevisiae*의 2 μ 플라스미드 origin을 이용한 벡터로 자가 복제가 가능하고, 높은 확률로 형질 전환되어 실험적으로 사용하기 용이

㉞ Integration(copy number : ≥ 1)

- 자가 복제가 되지 않지만, 형질전환 후 플라스미드가 genomic DNA에 삽입되어 영구적으로 유지 가능

㉞ 효모용 auto-cloning 시스템 적용 (그림 2-6)

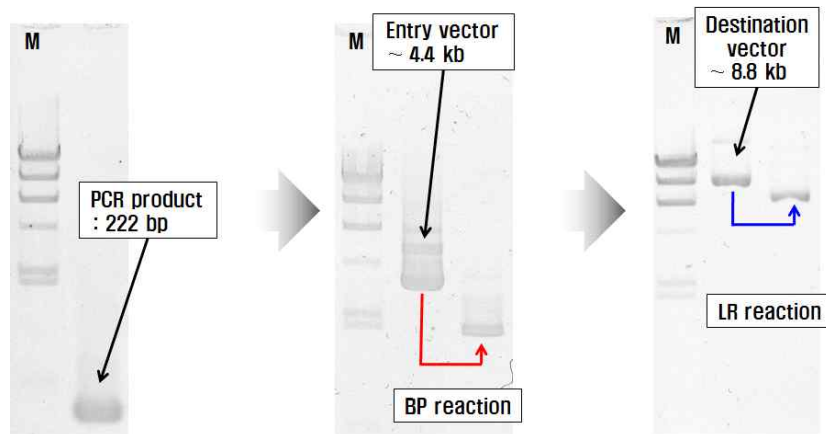


그림 2-6. *S. cerevisiae*용 auto-cloning 시스템 적용 벡터의 구축 확인

㉞ Expression level의 차이에 따른 벡터의 제작과 적용

㉞ Galactose inducible promoter(GAL1)

- Galactose에 의해 활성화된 Gal4와 Gal80에 의해 GAL1 promoter가 활성화, promoter 이후의 유전자가 발현되는 것을 이용하여 벡터를 제작함. 하지만 이 promoter는 glucose에 의해 강력하게 조절되기 때문에 보다 효율적으로 조작이 가능함(그림 2-7).

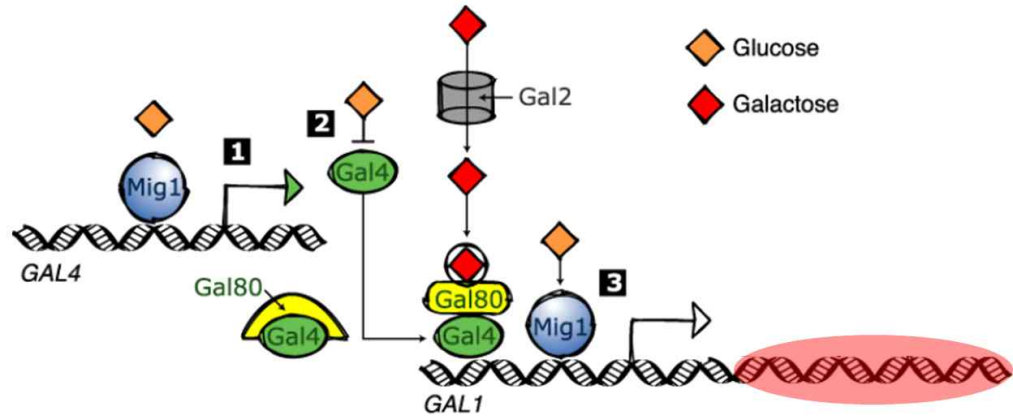


그림 2-7. *S. cerevisiae* GAL1 promoter 모식도

④ Constitutive promoter(GPD) vector

- GAL1 promoter와는 다르게 galactose와 같은 인자가 필요 없이 항상 발현되는 promoter로 형질전환 후 별다른 조작 없이 바로 단백질 발현이 되기 때문에 보다 간편하고 빠르게 목적 단백질 detection이 가능함.

③ 각종 tagging system을 가진 벡터의 제작과 적용

- ④ Fluorescent protein을 이용한 selection marker (그림 2-8)

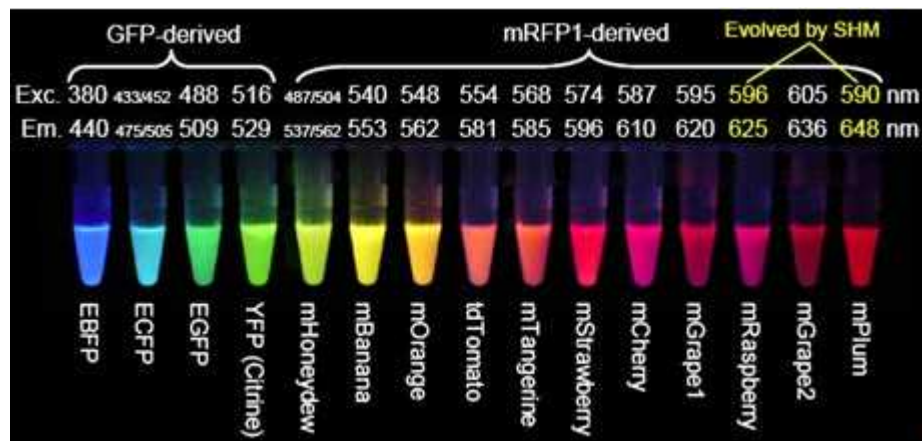


그림 2-8. Fluorescent protein 발색

- ECFP, EGFP, EYFP, MsRed, celurian marker 보유
- 형질전환 시 항생제와는 별도로 selection marker로 사용가능. 손쉽게 보다 빠르게 screening이 가능함

④ Epitope을 이용한 면역단백질 발현 확인

- Antigen-antibody 반응을 이용한 면역단백질 발현 확인, 아주 미량의 단백질도 확인 가능함. *S. cerevisiae*에서 발현하여도 확인이 힘든 면역단백질의 검출을 위해 필수적인 선택임.

㉔ Tag의 특성에 따른 Solubility 증가

- Tag protein에 의한 solubility 증가로 불용성 단백질을 가용화, 실험 과정의 간소화를 기대할 수 있음

(2) 타 세부과제 공여 후보 면역단백질(PEDV 1종) 발현의 초고속 스크리닝 및 시험 생산

(가) 공여 받은 1종의 후보 면역단백질 발현 (그림 2-9 및 2-10)

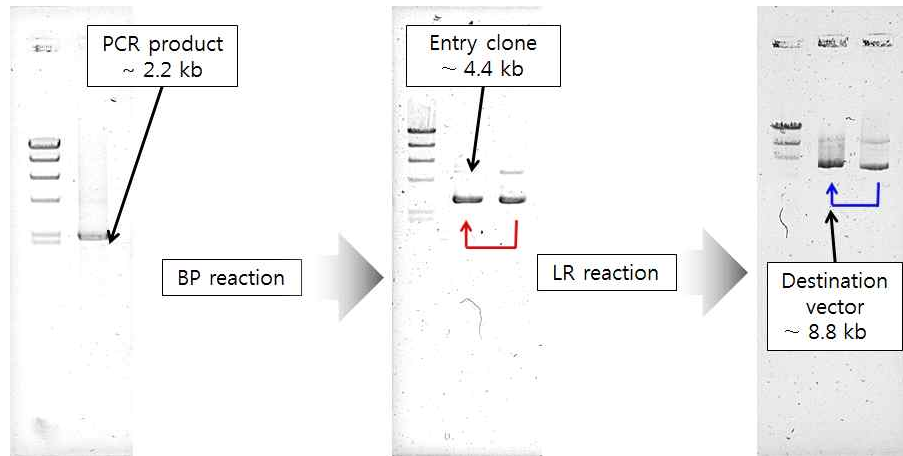


그림 2-9. 면역단백질 발현을 위한 auto-cloning 시스템 적용 전기영동 결과

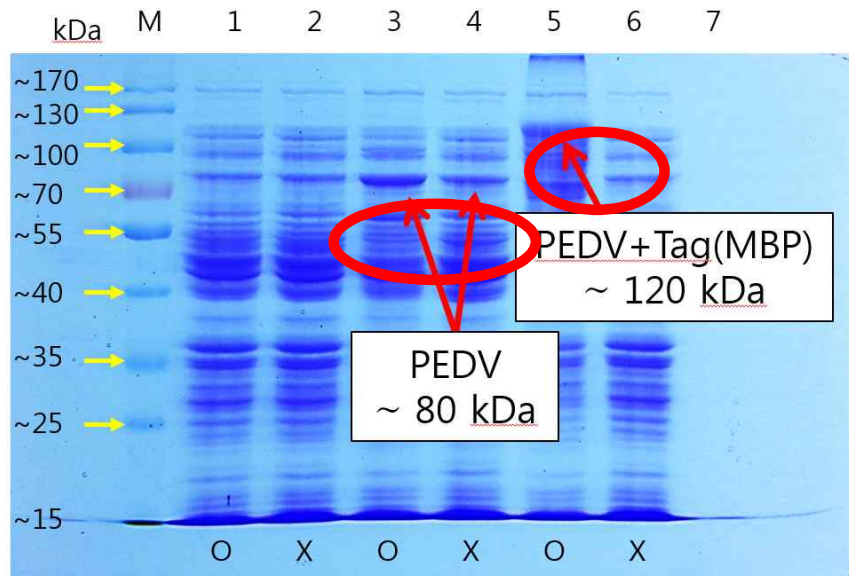


그림 2-10. 대장균에서 면역단백질 발현 SDS-PAGE 결과

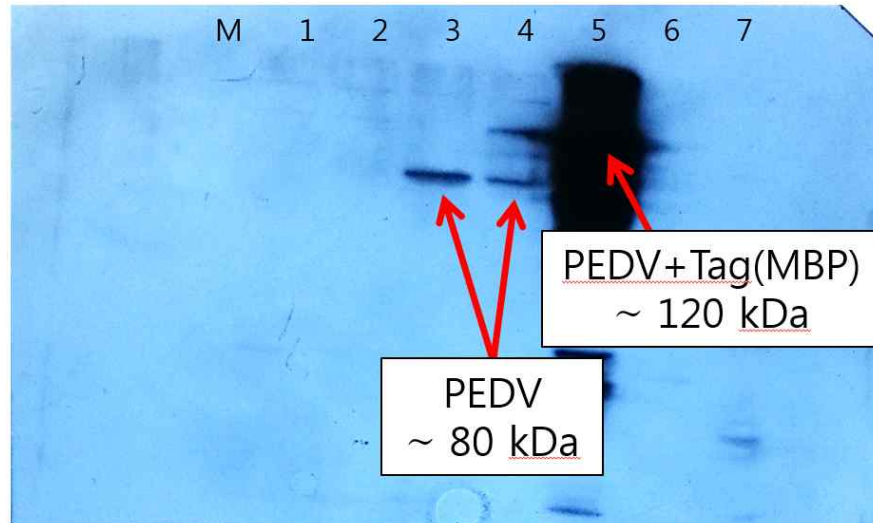


그림 2-11. Western blot 기법을 사용한 면역단백질 발현 결과

- ① Auto-cloning 시스템을 이용한 면역단백질 발현을 시도해 본 결과 정상적으로 작동하여 cloning된 것을 확인 하였고, 단백질 발현을 유도하여 SDS-PAGE 후 western blot 결과 실제로 단백질이 발현된 것을 확인함(그림 2-11). Tag이 있는 벡터의 경우 발현이 잘되는 현상을 보임. Tag에 의해 좀 더 안정적으로 단백질 발현 가능성이 있는 것으로 보임.
 - ② PEDV 단백질 발현을 대장균이 아닌 *S. cerevisiae*에서 지속적으로 시도할 계획임. 효모에서의 단백질 발현량은 적을 것으로 예상되지만 현재 1 pmol 수준까지 western blot 기법을 이용하여 확인이 가능함.
- (3) 사료 첨가 생균제 개발을 위한 유용 미생물 분리 및 시험
- (가) 유용 미생물 탐색을 위한 균 분리 실시
- ① 전통식품에서의 유용 미생물 분리
 - ㉞ 우리나라 전통발효식품인 김치, 된장 등의 샘플을 전국 각지에서 채집을 실시함
 - ㉟ 가축 질병을 일으키는 병원성 미생물인 *Salmonella enterica* 와 *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus agalactiae* 3종에 대한 분리균의 길항 테스트 실시 (표 2-19).

표 2-19. 병원성 미생물 3종(길항 테스트용)

Strains	Characteristics	Cultivation condition
<i>Salmonella enterica</i> (KACC10763)	Infects cattle and poultry	37°C Nutrient broth
<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 1926)	Causes gastroenteritis to mammals	37°C Nutrient broth
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC 13813)	Causes mastitis of milk cow	37°C Tryptic Soy broth

② 병원성 미생물에 대한 길항력 테스트

- ㉠ 병원성 미생물에 대한 1차 길항테스트 스크리닝 결과 52종 미생물이 분리됨.
- ㉡ 병원성 미생물에 대한 2차 길항테스트 스크리닝 결과 길항력이 우수한 균주 4종을 선발함(표 2-20).
- ㉢ 특징적인 결과를 보면 *Salmonella typhimurium*에 대해 모두 길항력이 우수한 것으로 나타났고, 그 중 K14-3 균주가 가장 우수한 것으로 판단됨.

표 2-20. 전통식품 분리 유용 미생물의 2차 길항테스트 결과

Indicator	K14-3	K44-1	K35-1	K4501
<i>Salmonella enterica</i> (KACC 10763)	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 1926)	+ (8.0 mm)	+ (8.0 mm)	+ (6.0 mm)	+ (5.0mm)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC 13813)	-	-	-	-

③ 우수한 길항균에 대한 동정 및 제제화

- ㉠ 길항력이 우수한 균주 4종에 대한 16s rRNA 동정을 실시한 결과, 4종 모두 *Lactobacillus sp.* 로 동정 결과를 얻음
- ㉡ 이 중 *S. typhimurium* 에 길항력이 가장 우수한 K14-3 균주를 KNU-02로 이름을 변경하였음(그림 2-12). 또한 상기 균주를 배양 한 후, 상등액을 동결 건조 하여 제제화를 실시함

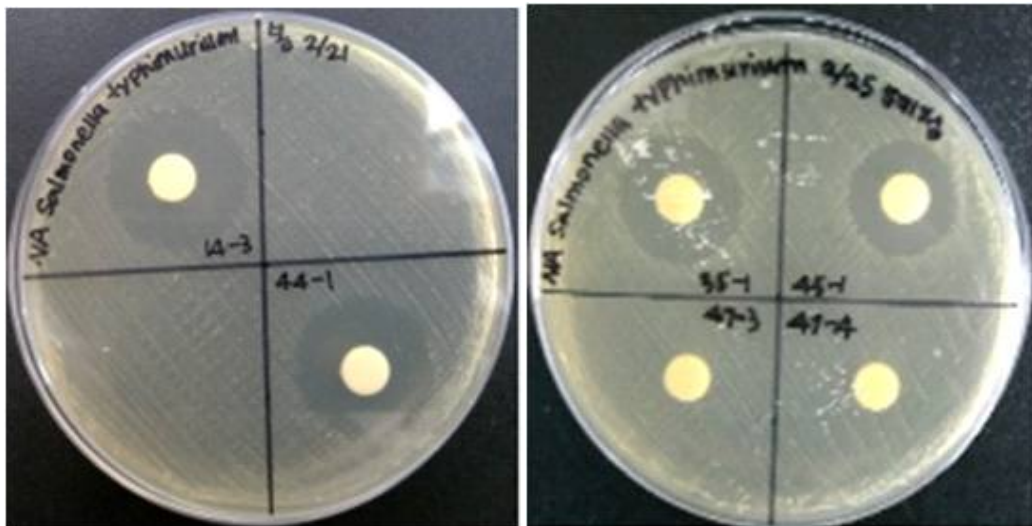


그림 2-12. 2차 길항테스트 스크리닝 결과

3. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립 (제1협동)

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 리소좀 내 유용 효소들의 나노 집적화를 위한 고정화 기술 개발

(가) 진핵세포에 외부적인 스트레스를 주어 세포내 리소좀의 활성화

- 앞서 선정된 진핵세포의 리소좀의 활성을 증가시키기 위해 세포 외부에서 스트레스를 주어 리소좀 내의 유용효소들이 집적화 될 수 있는 기술 개발 하고자 하였음. 효모에 직접적으로 산화적 스트레스, 탄소결핍 스트레스, 화학물질 스트레스를 주어서 나노집적화를 유발함(그림 2-13).

① 단백질체 분석을 통해 리소좀 내의 유용효소의 동정

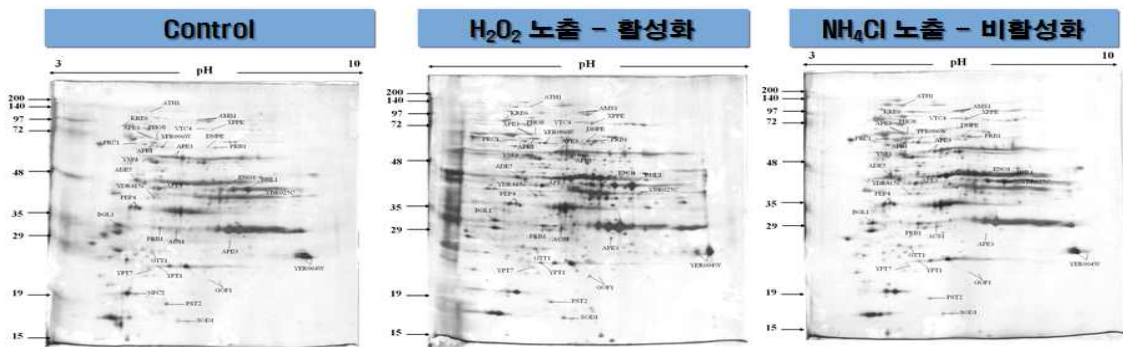


그림 2-13. 효모 내의 리소좀의 세 가지 조건별 단백질체 분석

- 효모 내의 리소좀의 세 가지 조건별 단백질체 분석을 2DE를 통해 실행하고 특정 조건에 노출 시 targeting에 변화가 생기는 단백질 발현 양상을 분석하였으며, 분석결과를 통해 리소좀 내의 유용기능성 효소를 선정함(그림 2-14).

	control		H ₂ O ₂		NH ₄ Cl		Spot name	Protein name	Fold change		
	2D	3D	2D	3D	2D	3D			control	H ₂ O ₂	NH ₄ Cl
APE3							APE3	Aminopeptidase Y	1	4.65	0.32
PRB1							PRB1	Vacuolar protease B	1	2.23	1.73
AMS1							BHL1	Cystein proteinase1	1	0.87	0.62
XPPE							YPS3	Subtilisin-like protease3	1	1.27	0.74
VTC4							AMS1	Alpha-mannosidase	1	1.43	2.05
PRC1							ATH1	Acid trehalase	1	1.07	1.81
DNPE							YDR415C	Probable aminopeptidase	1	1.02	0.78
							XPPE	Putative Xaa-Pro aminopeptidase	1	2.01	1.65
							VTC4	Vacuolar transporter chaperone 4	1	2.58	2.35
							PRC1	Carboxypeptidase Y	1	1.22	0.90
							DNPE	Putative aspartyl aminopeptidase	1	1.89	1.26

그림 2-14. 리소좀 내의 유용기능성 효소

② *Saccharomyces cerevisiae*에 APY 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제작

표 2-21. 유전자 동정을 위한 프라이머 서열

	프라이머 서열	비고
APY-F	5'- GCC GGT ACC ATG CAC TTT TCT TTG AAG C -3'	KpnI
APY-R	5'- TGT GCG GCC GCA ATA ATC AAG AAG TCG G -3'	NotI
GFP-F	5'- ATT TCT AGA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G -3'	NotI
GFP-R	5'- ATA GCG GCC GCG TGA AGG GCG AGG A -3'	XbaI

- 진핵미생물인 *S. cerevisiae* s2805를 사용하였으며, 단백질 발현 벡터로 알려진 pYES2 (Invitogen, Carlsbad, CA, USA) 벡터를 사용하여 클로닝 실시.
- *S. cerevisiae*의 유전체 데이터로부터 APY gene의 DNA 서열을 NCBI의 genebank (www.ncbi.nlm.nih.gov)로부터 확보하였고, pEGFP-C1 (BD Bioscience Clontech, USA) 벡터로부터 GFP gene을 확보하여 서열번호 1에 해당하는 DNA 단편 1(F1) 및 서열번호 2에 해당하는 DNA 단편 2(F2)를 각각 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 갖는 뉴클레오티드 프라이머를 제작함.
- 다음으로, *S. cerevisiae*로부터 게놈 DNA를 추출하고, 이를 주형으로 하여 서열번호 3 및 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머(primer) 쌍을 사용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하여 APY gene 유전자의 단편 1(F1)의 뉴클레오티드 서열(서열번호 1)을 증폭하였음(표 2-21). 또한 pGFP-C1을 주형으로 하여 서열번호 5 및 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 GFP gene 유전자의 단편 2(F2)의 뉴클레오티드 서열(서열번호 2)을 증폭함(표 2-21).
- PCR 증폭 산물을 아가로스 겔에서 전기영동한 결과 APY gene은 1.67kb의 DNA 단편을 얻었고, GFP gene은 798bp의 단편을 가지는 유전자를 확인함.

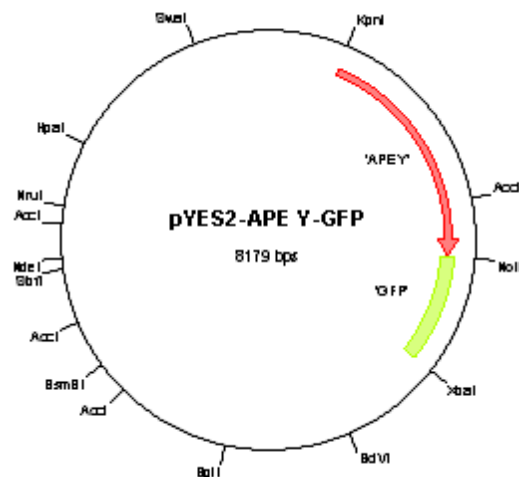


그림 2-15. 리소좀 내의 효소인 APY gene을 포함하는 단백질 발현벡터

③ 재조합 벡터 (pYES2::APY::GFP)의 제조

- 효모-단백질 발현벡터인 pYES2 (Invitogen, Carlsbad, CA, USA)를 기본 벡터로 사용하여 APY 발현용 벡터인 pYES2::APY::GFP를 제작함(그림 2-15).

- 증폭한 APY gene DNA절편을 KpnI과 NotI으로 절단하여 동일한 제한 부위를 절단한 pYES2 벡터에 도입하였으며, 이를 pYES2::APY로 명명함
 - GFP gene 유전자를 NotI과 XbaI로 절단한 후 동일한 제한부위를 절단한 벡터에 도입하여 이를 pYES2::APY::GFP로 명명함
 - 제조한 벡터 pYES2::APY::GFP를 효모인 *S. cereviaie* s2805에 전기천공법 (electroporation)으로 형질전환 하였으며, SD 고체평판배지에서 얻은 콜로니를 새로운 배지에 옮겨 단일콜로니를 얻어 DNA 염기서열 결정법(sequencing)으로 pYES2::APY::GFP에 삽입 된 APY gene과 GFP gene의 DNA 염기서열을 확인하였으며, pYES2::APY::GFP를 포함하는 재조합 미생물을 MBTL-JH-1이라 명명함
- ④ 재조합 효모에서 APY 단백질의 과발현 유도 및 봉입체 생성 억제
- 재조합 균주 MBTL-JH-1을 SD액체 배지(6.7g/L Yeast nitrogen base, 5g/L amino acid 및 20g/L glucose) 15ml에 접종하여 30℃, 160rpm으로 OD값이 3.0이 될 때까지 진탕 배양하였음. 얻어진 배양액에서 미생물만 남기고 제거한 다음 SG액체 배지 (6.7g/L Yeast nitrogen base, 5g/L amino acid 및 20g/L galactose) 15 ml을 넣어줌. 이렇게 얻어진 배양액 6.67ml (OD값이 0.4가 되도록 계산)을 SG액체 배지 50ml에 넣어 30℃에서 160rpm으로 10시간동안 본 배양하여 단백질 과발현을 유도함.
 - 유도 반응시킨 세포를 리소솜에만 특이적으로 반응하는 LysoTracker를 처리하여 APY의 발현정도와 리소솜 내로 잘 targeting되어 들어가는지 형광현미경으로 관찰한 결과 단백질이 과발현 되는 것을 확인하였으나, 봉입체 (inclusion body)가 생성되어 리소솜 내로 targeting되지 못하는 것을 확인함(그림 2-16).
 - 단백질의 봉입체 생성을 방지하기 위하여 배양 온도를 28℃로 낮추어 배양시킨 재조합 효모를 형광현미경으로 분석한 결과 APY가 봉입체를 형성하지 않고 리소솜 내로 targeting됨을 확인함(그림 2-17).

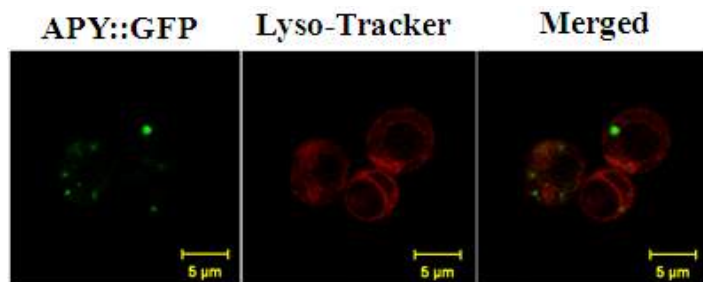


그림 2-16. MBTL-JH-1의 형광현미경의 분석 결과

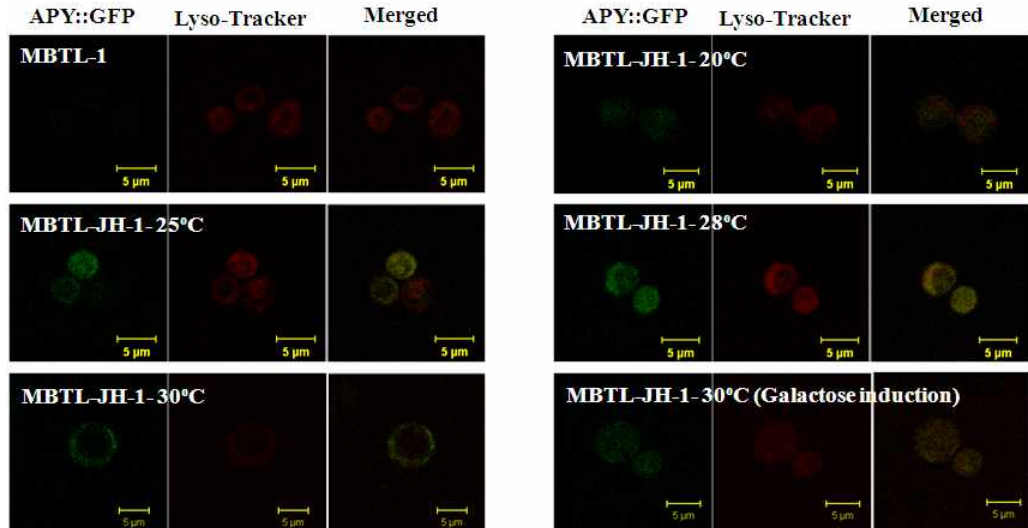


그림 2-17. 배양온도(20, 25, 28 및 30°C)와 MBTL-JH-1의 과발현과 리소좀의 발현 관계

⑤ 항균활성이 강화된 재조합 효모의 제작

- 리소좀의 항균기능이 강화된 재조합 효모를 제작, 진핵미생물의 리소좀 내 효소인 aminopeptidase Y (APY) 생산에 필요한 유전자가 포함된 벡터에 의하여 제조된 재조합 균주를 이용한 높은 생산성을 갖게 함.
- APY는 산화적 스트레스에 의해 증가하는 리소좀 내에 효소 중에 하나로 진핵미생물인 효모에 APY gene을 도입시켜 APY를 과발현 시켜 리소좀의 기능을 향상 시킬 수 있었음(그림 2-18).

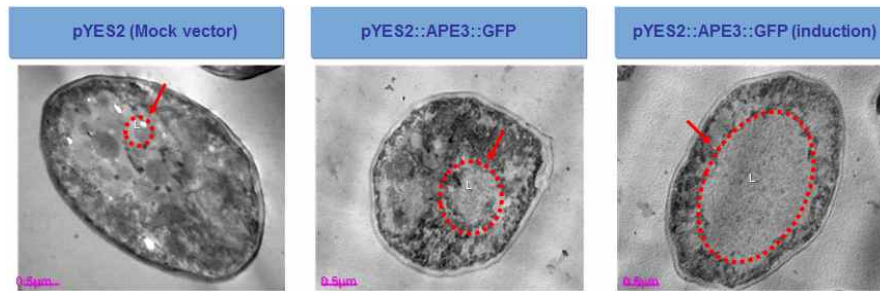


그림 2-18. 리소좀의 항균기능이 강화된 재조합 효모

⑥ 재조합 효모에서 추출한 리소좀의 항균활성 비교

- 재조합 효모인 MBTL-JH-1을 배양한 것과 galactose induction시킨 것에서 리소좀을 추출하였고, 추출된 리소좀 10%를 이용하여 8가지 균주(*E. coli*, *S. flexneri*, *D. radiophilus*, *X. oryzae*, *S. aureus*, *C. glutamicum*, *S. albus*, *S. cerevisiae*)에 실험한 결과 APY를 과발현 시킨 *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀의 항균활성이 높았으며, galactose induction시킨 *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀의 항균활성이 가장 높게 나타남 (그림 2-19).

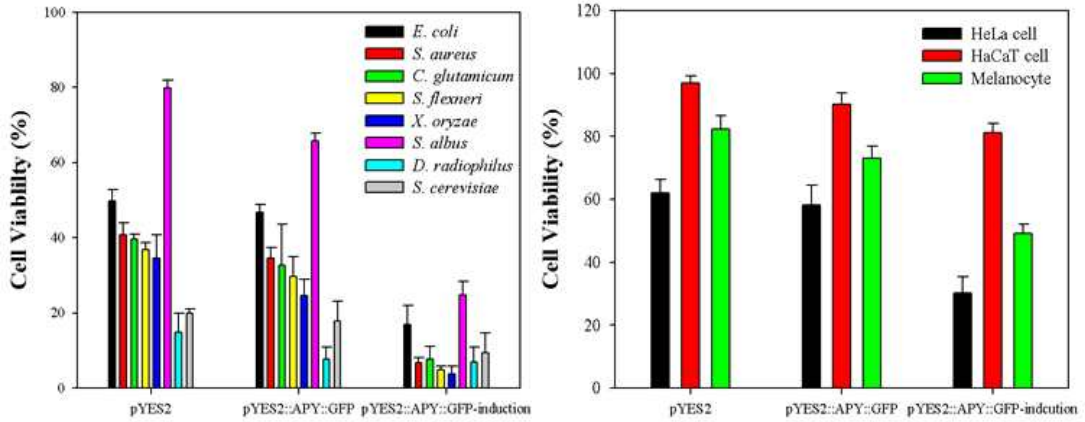


그림 2-19. 재조합 효모에서 추출한 리소좀의 antimicrobial/anticancerous activity

⑦ 재조합 효모에서 추출한 리소좀의 항암활성 비교

- 재조합 효모인 MBTL-JH-1을 배양한 것과 galactose induction시킨 것에서 리소좀을 추출하였고, 추출된 리소좀 10%를 이용하여 암세포인 HeLa cell line, HaCaT cells, Melanocytes와 정상세포인 BAECs에 실험한 결과, APY를 과발현 시킨 *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀이 암세포들을 죽이는 것을 확인하였고, galactose induction시킨 *S. cerevisiae*에서 추출한 리소좀의 항암활성이 더욱 높게 나타남. 하지만 정상 세포인 BAEC의 경우 아무런 영향이 없음을 확인함(그림 2-20).

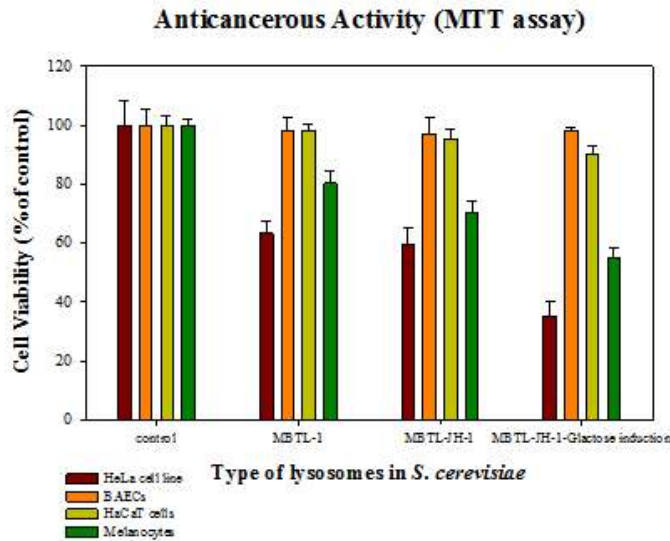


그림 2-20. 재조합 효모에서 추출한 리소좀의 Anticancerous activity

(나) 리소좀 내 유용효소들의 나노입자에 고정화 기술

① 고정화율과 항균활성이 뛰어난 나노입자의 선택

- 리소좀은 항균활성이 높을 뿐만 아니라 내부에 많은 유용 효소들이 포함되어 있으며, 이러한 효소들을 리포좀 안에 넣어 리소좀과 같은 항균활성을 갖는 물질로 만들고자 나노입자를 선택함(그림 2-21).

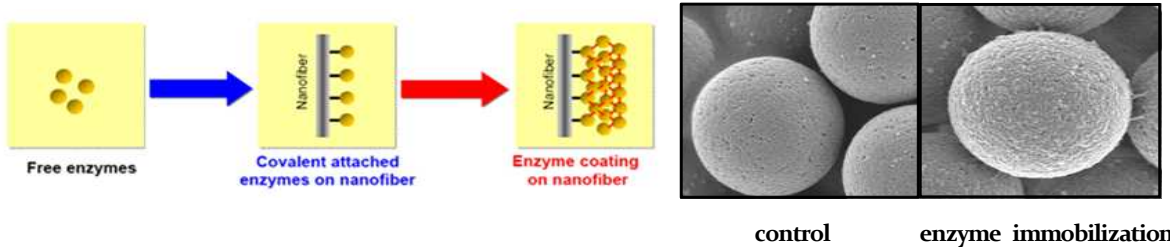


그림 2-21. 효소 고정적화 기술과 나노입자 기술과의 융합

② 리소좀 표면 막 단백질을 리포좀(Liposome) 표면에 고정화

- 리포좀 제조 전 지질과 리소좀 막 단백질을 일정한 비율로 섞어 필름을 제조한 후 리소좀효소를 encapsulation 하여 리포좀을 제조하였고, 두 번째로 리포좀을 제조한 후에 리소좀 막 단백질을 섞어서 리포좀 표면 개질을 시도함(2-22).

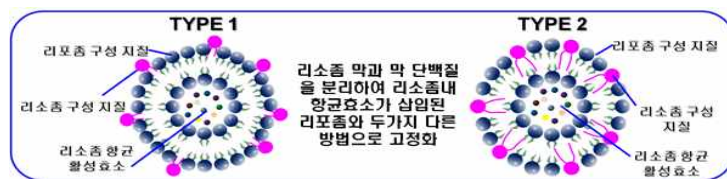


그림 2-22. 2가지 type의 리소좀 표면단백질을 융합시킨 리포좀 제작

- 이러한 두 가지 방법으로 리소좀과 두가지 방법 모두 표면이 흡사한 것을 FE-SEM으로 확인하였고, 항균활성을 확인한 결과, 리포좀 개질을 하기 전에는 항균활성이 없었던 반면, 개질을 하고 난 후에 항균 활성을 보이는 것을 확인함
- 리포좀 제조 후에 표면 개질을 한 경우가 리포좀 제조 전 지질과 리소좀 막 단백질을 섞었을 경우보다 항균활성이 큰 것을 확인함

③ 세균인식을 위한 리소좀 막 단백질의 기능 검증

- 효모균에서 추출된 효소를 리포좀 안에 넣어서 항균활성을 확인해본 결과 항균 활성을 갖고 있지 않음을 확인함(그림 2-23).

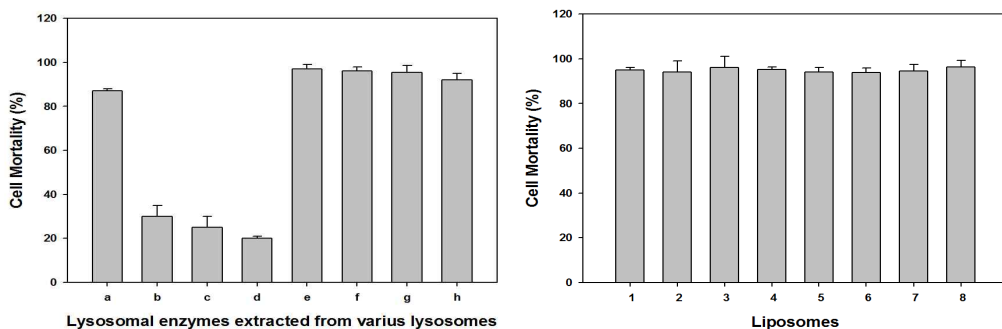


그림 2-23. 효모균에 다양한 물질을 처리한 후 얻은 리소좀 내의 효소를 이용하여 항균 활성 확인과 리포좀을 제조한 후 항균 활성 확인

[a, 1] : 아무것도 처리하지 않은 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [b, 2] : 10mM salicylic acid 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [c, 3] : 0.2mM 6-OHDA 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [d, 4] : 0.2mM H₂O₂ 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [e, 5] : 0.01mM rolipram 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [f, 6] : 10mM NH₄Cl 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [g, 7] : 0.1mM phenylhydrazine 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성, [h, 8] : 0.1mM sodium azide 처리된 리소좀에서 추출된 효소의 항균 활성

④ 리포솜의 제작

- 리포솜의 항균 활성을 갖도록 하고자 리소솜 표면 막 단백질을 리포솜 표면에 고정화하여 항균 활성을 갖도록 하는 기작 역할을 할 수 있도록 유도하였고, 그에 따라 리포솜 제조시 리소솜 표면으로부터 분리된 막 단백질을 이용하여 고정화(그림 2-24).
- (a) PBS를 이용한 리포솜 제조 (b) 250 μ g의 리소솜 내 효소 이용한 리포솜 형성 (c) 1,000 μ g의 라이소소멸 엔자임을 이용한 리포솜 형성 (d) 2,000 μ g의 라이소소멸 엔자임을 이용한 리포솜 형성함.

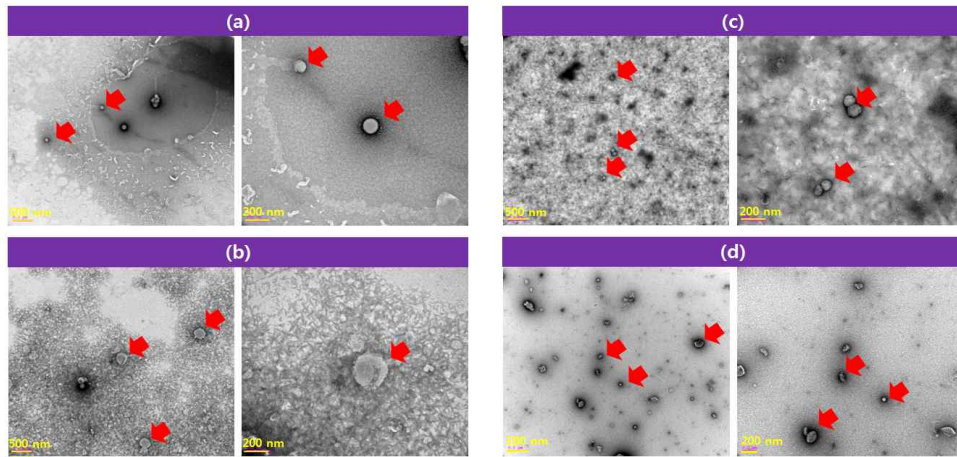


그림 2-24. bio-TEM 이미지를 통한 리포솜 형성 확인

⑤ 효소를 넣은 변형된 리포솜의 항균활성 검증

- 변형된 리포솜 안에 효소를 넣은 후, 대장균을 이용하여 항균력을 확인하였으며 리포솜 표면 변화를 SEM 이미지를 통하여 확인(그림 2-25 및 2-26)

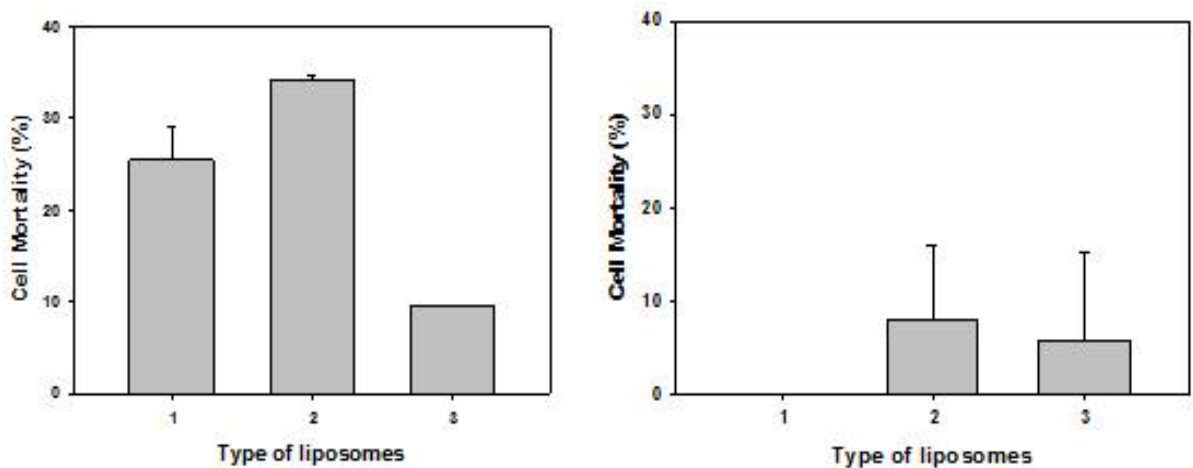


그림 2-25. 리포솜의 항균활성

- 1: 아무것도 처리하지 않은 리소솜에서 추출된 막 단백질을 이용하여 표면 개질된 리포솜
- 2: 과산화수소를 처리하여 추출된 리소솜 막 단백질을 이용하여 표면 개질된 리포솜
- 3: 염화암모늄을 처리하여 추출된 리소솜 막 단백질을 이용하여 표면 개질된 리포솜

- 분리된 리소솜과 지질이 어울려 알맞은 리포솜의 형태와 크기를 확인함

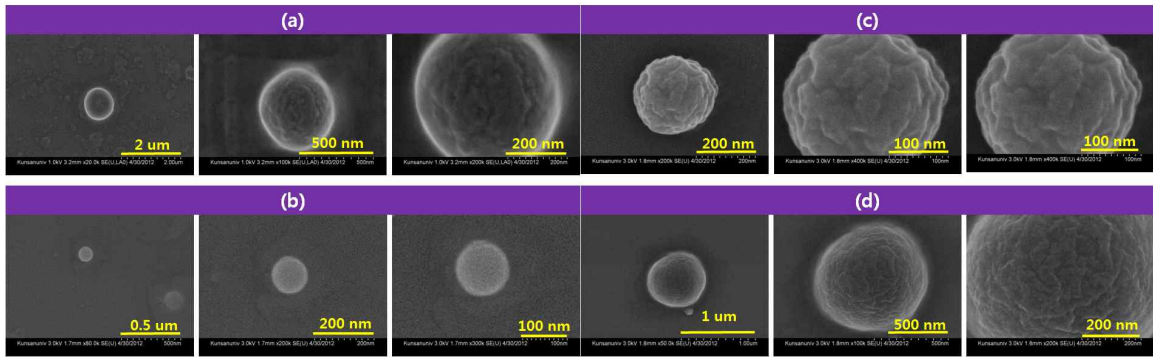


그림 2-26. SEM을 이용한 리포솜 표면변화.

(a) 리소솜, (b) 표면개질 하지 않은 리포솜, (c) 리포솜 제조 후 리소솜 막 단백질을 섞은 후 만들어진 표면 개질 리포솜, (d) 리포솜 제조 전 리소솜 막 단백질을 지질과 섞어 만들어진 표면 개질 리포솜.

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 농산소재로부터 neuraminidase 저해제의 탐색

(가) 농산소재 유래 neuraminidase 저해제의 스크리닝

① Neuraminidase 저해 활성 측정

- Neuraminidase 저해 활성 측정은 기보고된 Potier 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정함.
- 기질 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate (Sigma사, M8639)를 50 mM sodium acetate buffer(pH5.0)에 녹여 50 mM 농도로 만들었으며, neuraminidase(Sigma사, N2876)는 50 mM acetate buffer에 1 U/ml로 용해시켜 사용함.
- 96-well plate에 acetate buffer 160 μ l, methanol에 희석된 다양한 농도의 시료 10 μ l, enzyme 10 μ l, substrate 20 μ l를 차례로 넣고 잘 섞어 주어 상온에서 반응함.
- 그 결과 유리된 4-methylumbelliferone의 양을 형광분광계를 이용하여(excitation wavelength: 365 nm, emission wavelength: 450 nm) 상대적인 fluorescent unit 값을 측정한 다음, 활성(%)은 아래의 식으로 나타내었고, 50%의 저해율을 나타내는 농도를 IC₅₀으로 기술함.

② Neuraminidase (recombinant influenza A virus, rvH1N1) 저해 활성 측정

- Neuraminidase (recombinant influenza A virus, rvH1N1) 저해 활성 측정방법은 다음과 같음. 즉, Influenza virus 등과 같이 바이러스의 침입과 증식에 바이러스 표면의 haemagglutinin과 neuraminidase 단백질을 이용하는 바이러스들에 대한 항바이러스 활성 여부를 neuraminidase inhibition assay로 조사함.
- Neuraminidase 저해활성을 측정하기 위해 1918년 스페인 독감으로부터 분리된 바이러스(A/Bervig-Mission/1/18)의 recombinant neuraminidase(rvH1N1)를 사용함.
- 기질 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate (Sigma사, M8639)를 50 mM Tris buffer(pH 7.5)에 녹여 800 μ M 농도로 만들었으며, neuraminidase(R&D system, 4858)는 50 mM Tris buffer에 200 ng/ml로 용해

함.

- 96-well plate에 50 mM Tris buffer 90 μ l, methanol에 희석된 다양한 농도의 시료 10 μ l, enzyme 50 μ l, substrate 50 μ l를 차례로 넣고 잘 섞어 주어 상온에서 반응함.
- 그 결과 유리된 4-methylumbelliferone의 양을 형광분광계를 이용하여(excitation wavelength: 365nm, emission wavelength: 450nm) 상대적인 fluorescent unit 값을 측정함. 또한 활성(%)은 아래의 식으로 나타내었고, 50%의 저해율을 나타내는 농도를 IC₅₀으로 기술함.

$$\frac{\text{Control의 RFU} - \text{시료의 RFU}}{\text{Control의 RFU}} \times 100$$

Control : 시료를 넣지 않은 실험구

③ Neuraminidase 저해 활성 측정 결과

- 대파, 시금치, 미나리, 냉이, 쪽파, 무, 도라지, 고추, 모과, 쪽갓, 굴, 배추, 당근, 양파 등 14종의 농산 추출물을 0.1 mg/ml의 농도로 하여 neuraminidase 저해 활성을 측정하였으며, 그 결과를 그림 2-27에 나타냄.

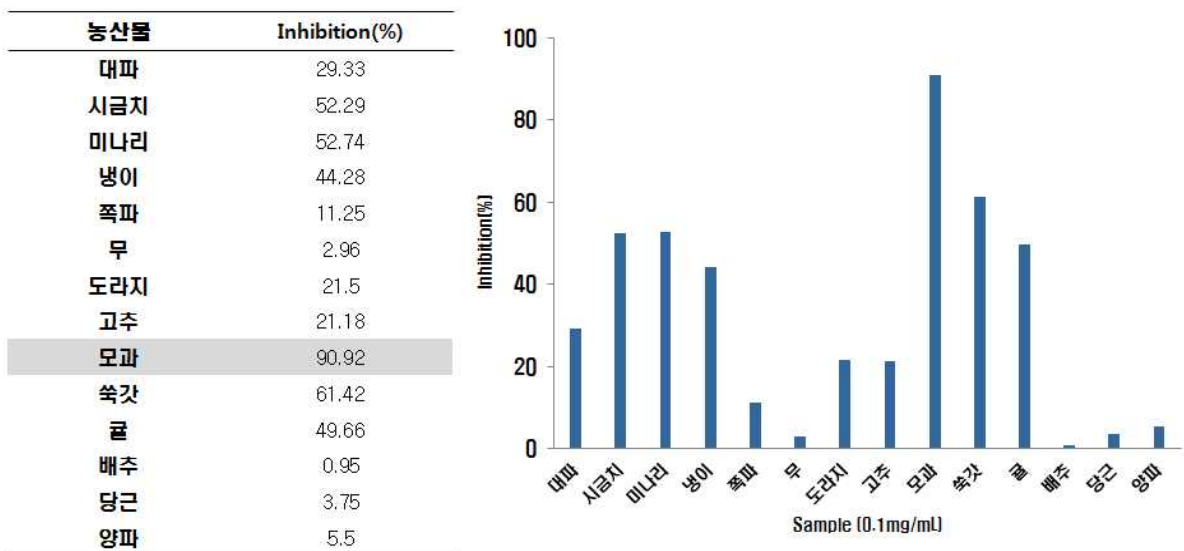


그림 2-27. 농산물 추출물의 neuraminidase 저해 활성

- 수급이 용이한 14종의 농산물 추출물 중에서 시금치, 미나리, 모과, 쪽갓, 굴겉질 등이 50% 이상의 저해활성을 나타내었으나, 그 외의 추출물은 30% 미만의 낮은 저해활성을 나타냄. 농산 추출물 중에서는 특히 모과가 90% 이상의 매우 높은 neuraminidase 저해 활성을 나타냄. 따라서 모과로부터 항바이러스 활성소재를 분리하기 위한 연구를 수행함.

(나) 모과 유래 neuraminidase 저해물질의 분리, 화학구조 및 활성평가

- 건조된 모과를 메탄올로 추출한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물을 확보함. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁한 후 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 butanol을 순차적으로 부가하여 추출한 후 용매 분획물을 확보함. 분획물의 neuraminidase 저해 활성 평가 결과 ethyl acetate 분획물이 강한 활성을 나타냄. 따라서 저해활성효과가 강한 ethyl acetate 분획물을 chloroform-methanol(100:1 → 1:1, v/v)을 용출용매로 이용하여 silica gel column chromatography를 실시한 후 9개의 분획(Fr. 1-9)으로 나누었으며, 분획물에서 결정으로 분리되어 단일물질로 정제된 triterpenoid 계 화합물인 CS-1~CS-3은 활성을 나타내지 않음. 활성을 나타낸 분획에 대하여 70% aqueous methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행함. 이중 가장 활성이 강한 분획물을 preparative-HPLC로 정제하여 화합물 CS-4, CS-5 및 CS-6을 정제함(그림 2-28).

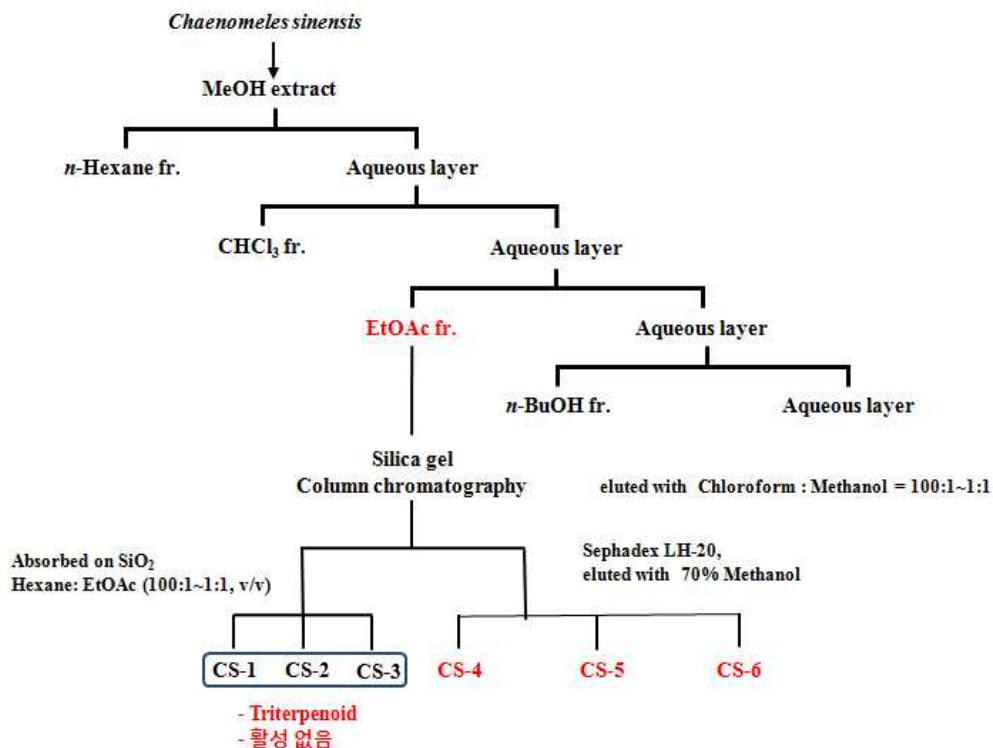


그림 2-28 모과로부터 neuraminidase 저해 활성 물질의 분리 및 정제 과정

(다) 모과로부터 분리한 neuraminidase 저해 활성 물질 CS-4, CS-5, CS-6의 화학구조

① 화합물 CS-4의 화학구조

- 모과로부터 정제한 화합물 CS-4의 화학구조를 규명하기 위하여 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum 및 ¹³C NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- ¹H NMR (600 MHz) spectrum을 측정한 결과(그림 2-29), 2.75 (1H, dd, *J* = 16.9, 2.8, H-4ax), 2.86 (1H, dd, *J* = 16.9, 4.8, H-4eq), 4.17 (1H, m, H-3), 4.81 (1H, s, H-2), 5.91 (1H, d, *J* = 2.1, H-6), 5.94 (1H, d, *J* = 2.1, H-8), 6.75 (1H, d, *J* = 8.2, H-5'), 6.79 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0, H-6'), 6.97 (1H, d, *J* = 2.0, H-2') ppm에서

피크가 관찰됨.

- ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum을 측정된 결과(그림 2-30), 각각 29.4 (C-4), 67.6 (C-3), 80.0 (C-2), 96.0 (C-8), 96.5 (C-6), 100.2 (C-10), 115.4 (C-2'), 116.0 (C-5'), 119.5 (C-6'), 132.4 (C-1'), 145.9 (C-3'), 146.1 (C-4'), 157.5 (C-9), 157.8 (C-5), 158.1 (C-7) ppm에서 피크가 관찰됨.
- ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 측정 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 epicatechin으로 동정함(그림 2-31). 즉 ^1H 및 ^{13}C NMR 피크가 문헌상의 epicatechin 피크와 일치함.

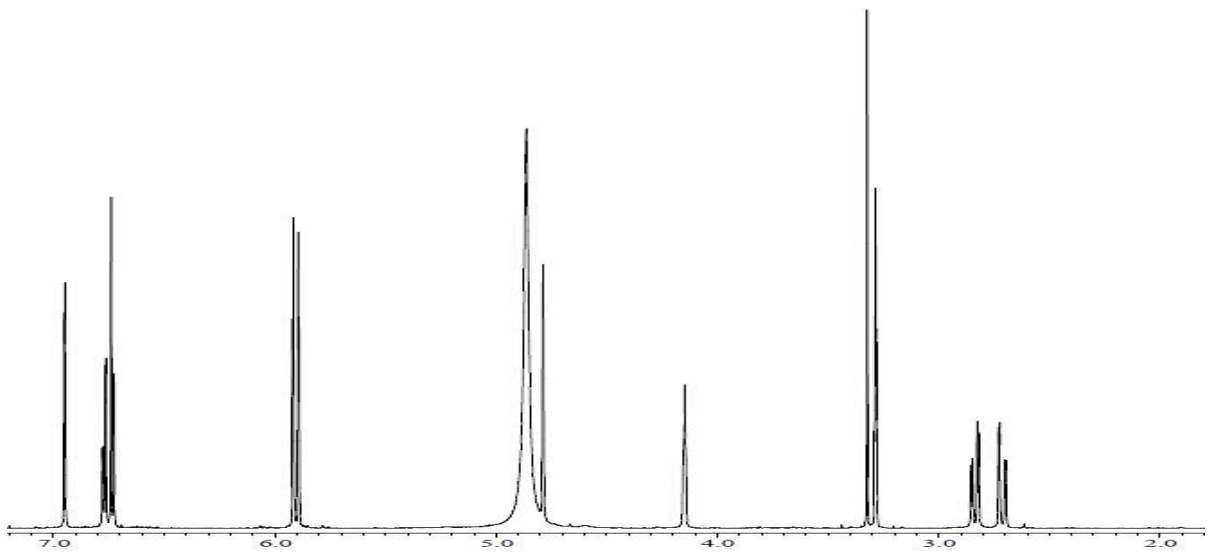


그림 2-29. 화합물 CS-4의 ^1H NMR spectrum

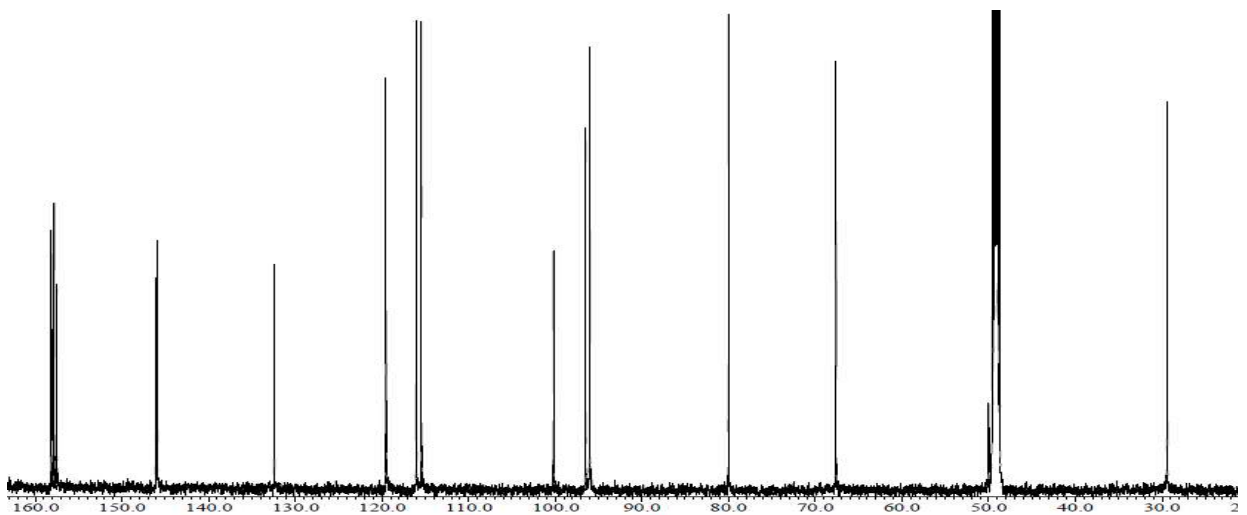


그림 2-30. 화합물 CS-4의 ^{13}C NMR spectrum

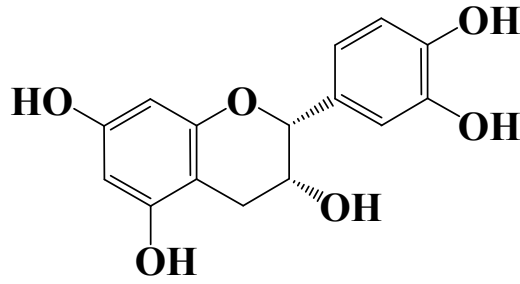


그림 2-31. 화합물 CS-4의 화학구조

② 화합물 CS-5의 화학구조

- 모과로부터 정제한 화합물 CS-5의 화학구조를 규명하기 위하여 CD_3OD 에 녹여 1H NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- 1H NMR (600 MHz) spectrum을 측정한 결과(그림 2-32), 2.50 (1H, dd, $J = 16.2, 7.9$, H-4ax), 2.84 (1H, dd, $J = 16.2, 5.2$, H-4eq), 3.97 (1H, m, H-3), 4.56 (1H, d, $J = 7.6$, H-2), 5.85 (1H, d, $J = 2.0$, H-6), 5.92 (1H, d, $J = 2.0$, H-8), 6.72 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$, H-5'), 6.83 (1H, d, $J = 2.0$, H-2') ppm에서 피크가 관찰됨.
- 1H NMR 측정 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 catechin으로 동정함(그림 2-33).

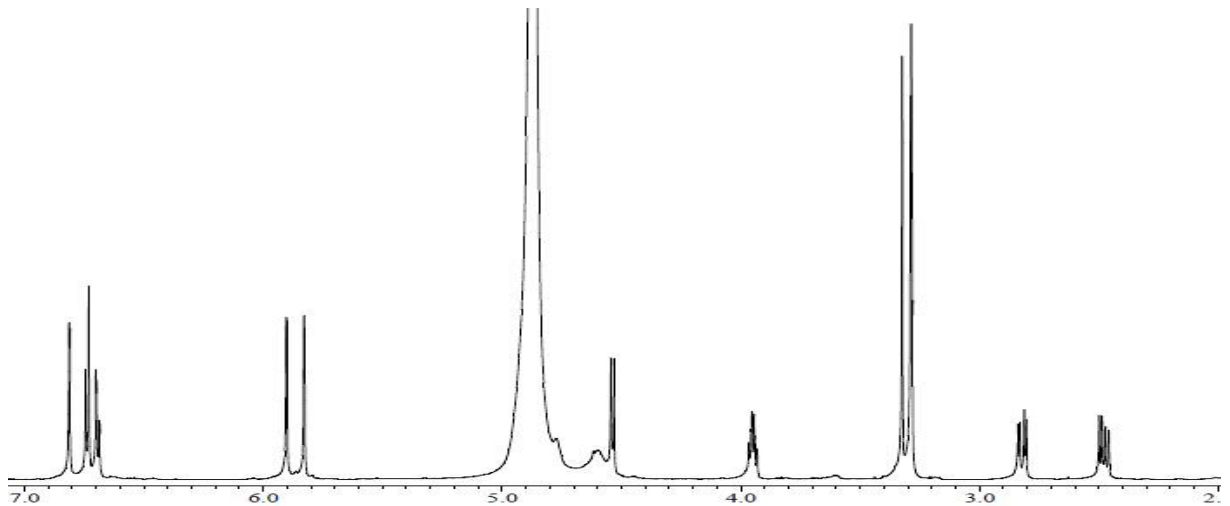


그림 2-30. 화합물 CS-5의 1H NMR spectrum

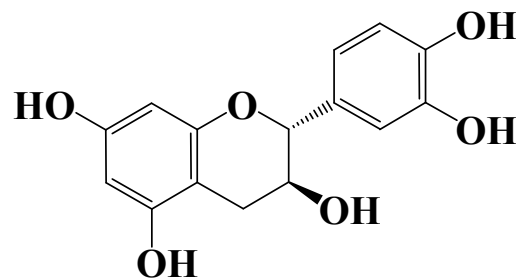


그림 2-33. 화합물 CS-5의 화학구조

③ 화합물 CS-6의 화학구조

- 모과로부터 정제한 화합물 CS-6의 화학구조를 규명하기 위하여 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum 및 ¹³C NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- ¹H NMR spectrum을 측정한 결과(그림 2-34), 7.31 (1H, d, *J* = 2.0, H-2'), 7.28 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0, H-6'), 6.88 (1H, d, *J* = 8.2, H-5'), 6.34 (1H, br s, H-8), 6.17 (1H, d, *J* = 1.4, H-6), 5.32 (1H, d, *J* = 1.4, H-1''), 4.19 (1H, m, H-2''), 3.72 (1H, dd, *J* = 9.7, 3.5, H-3''), 3.39 (1H, m, H-5''), 3.28 (1H, t, *J* = 9.7, H-4''), 0.91 (3H, d, *J* = 6.2, H-6'') ppm에서 피크가 관찰됨.
- 화합물 CS-6은 rhamnose를 지니고 있음. 즉 0.91 ppm에서 rhamnose의 CH₃ proton signal이 doublet으로 나타났으며, 5.32 ppm에서 rhamnose의 anomeric proton signal이 doublet으로 나타났고, 3.28 ~ 3.72 ppm에 rhamnose에 기인하는 전형적인 proton signal이 관찰됨. 또한, ¹³C NMR spectrum을 측정한 결과(그림 2-35), 159.43(C-2), 136.4(C-3), 179.8(C-4), 123.0(C-5), 100.1(C-6), 166.4(C-7), 94.9(C-8), 158.7(C-9), 105.9(C-10), 120.4(C-1'), 116.5(C-2'), 146.6(C-3'), 150.0(C-4'), 117.1(C-5'), 123.1(C-6'), 103.7(C-1''), 72.1(C-2''), 72.3(C-3''), 73.4(C-4''), 72.2(C-5''), 17.8(C-6'') ppm에서 피크가 관찰됨. 즉 179.8 ppm에서 carbonyl기가 관찰되었고 그 외에 rhamnose에 유래하는 피크들이 관찰됨.
- 이상의 결과를 근거로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 quercitrin으로 동정하였으며(그림 2-36), 그림 2-37에 화합물 CS-4, CS-5, CS-6의 화학구조를 도시함.

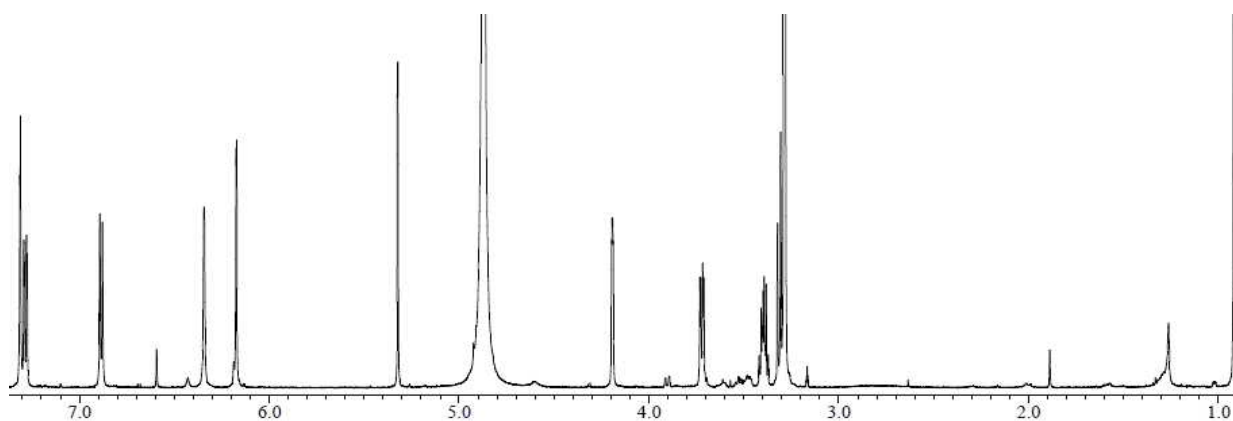


그림 2-34. 화합물 CS-6의 ¹H NMR spectrum

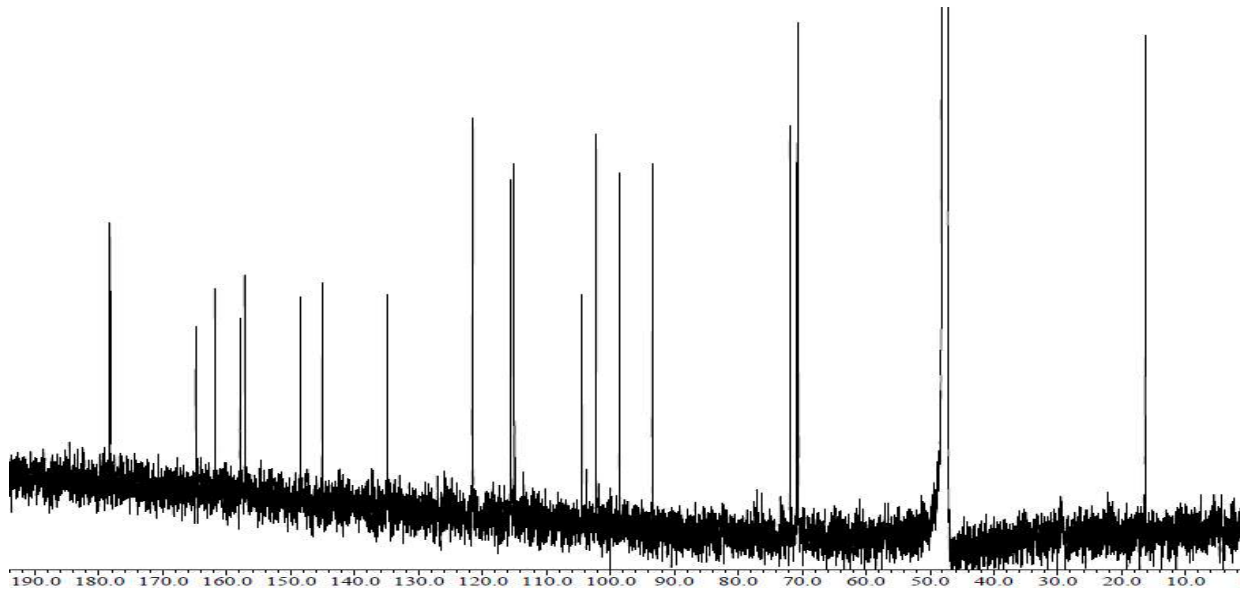


그림 2-35. 화합물 CS-6의 ^{13}C NMR spectrum

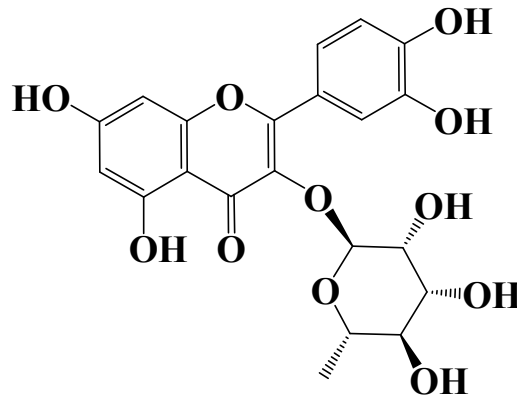


그림 2-36. 화합물 CS-6의 화학구조

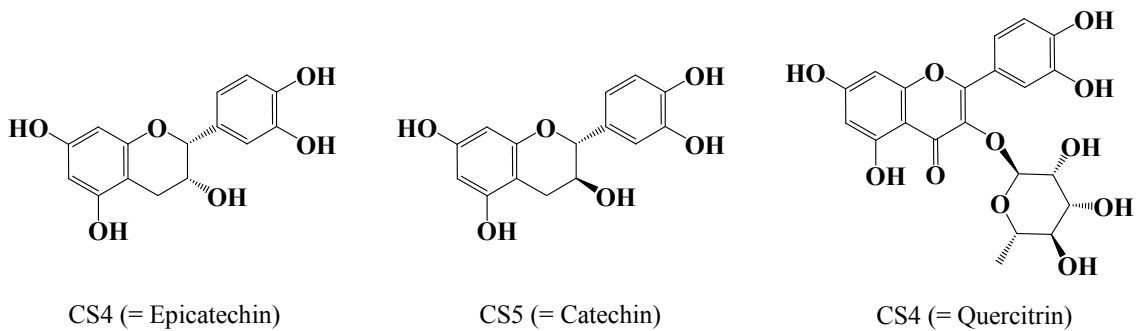


그림 2-37. 모과로부터 분리한 neuraminidase 저해 활성 물질의 화학구조.

(라) 모과로부터 분리한 화합물 CS-4, CS-5 및 CS-6의 neuraminidase 저해 활성
 - 모과로부터 정제한 화합물 CS-4, CS-5 및 CS-6의 neuraminidase 저해 활성을 측정함. 그 결과 CS-4, CS-5 및 CS-6은 82.1, 117.6, 116.9 μM 에서 각각 IC_{50} 값을 나타냄. 이들 화합물은 모과의 neuraminidase 저해 활성의 핵심 화합물로 규명됨.

(2) 목질진흙버섯 균주(농촌진흥청 분양 균주) 배양액 유래 neuraminidase 저해물질의 정제, 화학구조 및 생물활성

(가) 목질진흙버섯 균주 배양액 유래 neuraminidase 저해물질의 분리 및 정제

- 농촌진흥청으로부터 분양받은 목질진흙버섯 균주의 배양물이 강력한 neuraminidase 억제 활성을 나타냄. 따라서 목질진흙버섯 균주 배양물의 활성성분을 규명하고자 하였음.
- 목질진흙버섯 균주를 potato dextrose broth(3L)에 접종하여 28°C에서 10일간 배양함. 배양물은 80% aqueous acetone으로 추출한 후 추출물을 감압 농축하여 acetone을 제거함. 각각의 농축물은 ethyl acetate를 부가하여 용매분획하고 저해 활성을 나타낸 ethyl acetate 층을 분획하여 활성물질을 분리, 정제함. 농축된 ethyl acetate 분획은 methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행함. 활성분획은 40-90% aqueous methanol gradient를 이용하여 C18 Sep-pak cartridge를 수행하였으며 그 결과 두 개의 활성분획을 얻음. 첫 번째 활성분획은 60% aqueous methanol을 이용하여 preparative ODS-TLC를 수행하였으며 그 결과 compound 1을 정제함. 두 번째 활성분획은 70% aqueous methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였으며, 그 결과 compound 2를 정제함(그림 2-38).

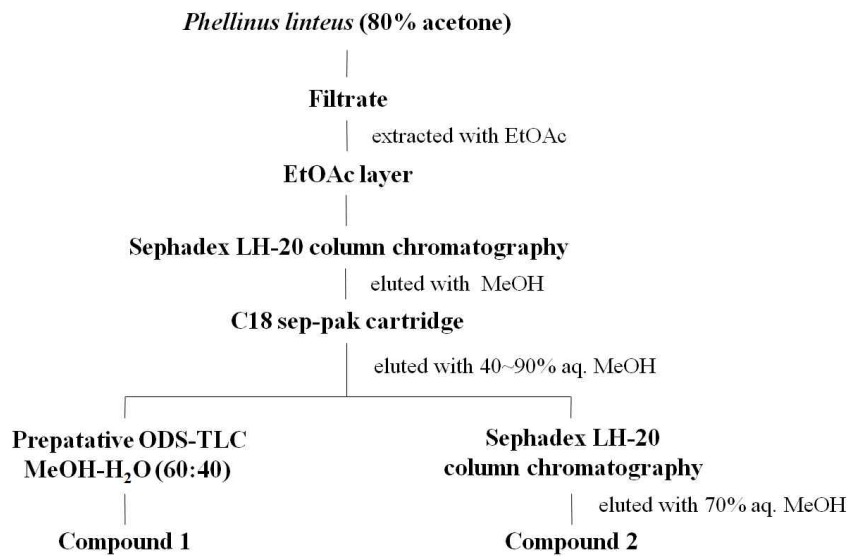


그림 2-38. 목질진흙버섯 배양액으로부터 neuraminidase 저해 활성 물질의 분리 및 정제

(나) 목질진흙버섯 유래 neuraminidase 저해물질의 화학구조

- 목질진흙버섯 배양 부산물로부터 정제한 compound 1 및 compound 2의 화학구조를 규명하기 위하여 1차원 및 2차원 NMR spectrum과 mass spectrum을 측정하고, 기존에 목질진흙버섯으로부터 분리 보고된 화합물을 대상으로 검색을 수행함.

① Compound 1의 화학구조

- 목질진흙버섯 배양물로부터 정제한 화합물 compound 1의 화학구조를 규명하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하고, CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- Compound 1의 분자량을 알아보기 위하여 negative mode에서 ESI-mass spectrum을 측정하였으며, 그 결과 *m/z* 245에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되어 분자량을 246으로 확인함(그림 2-39).

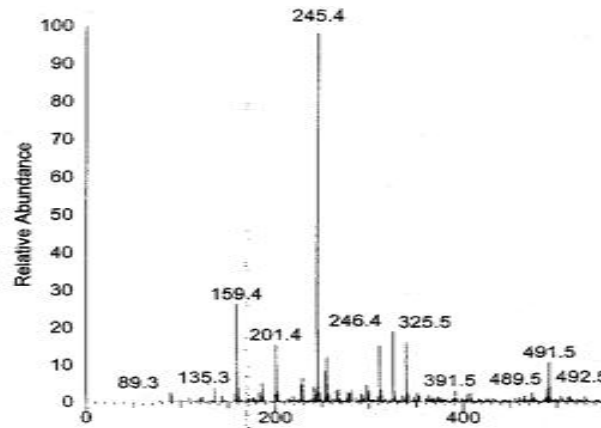


그림 2-39. Compound 1의 ESI-mass spectrum

- ¹H NMR spectrum을 측정한 결과(그림 2-40), 7.01 (d, *J*=1.5 Hz), 6.93 (dd, *J*=8.3, 1.5 Hz), 6.76 (d, *J*=8.3 Hz) ppm에서 한 개의 1,2,4-trisubstituted benzene, 7.29 (d, *J*=16.0 Hz), 6.54 (d, *J*=16.0 Hz) ppm에서 *trans*-1,2-disubstituted double bond unit, 6.05 ppm에서 sp² singlet methine proton 피크가 관찰됨.
- Mass 측정 결과와 NMR spectrum의 측정 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 hispidin으로 동정함(그림 2-41).

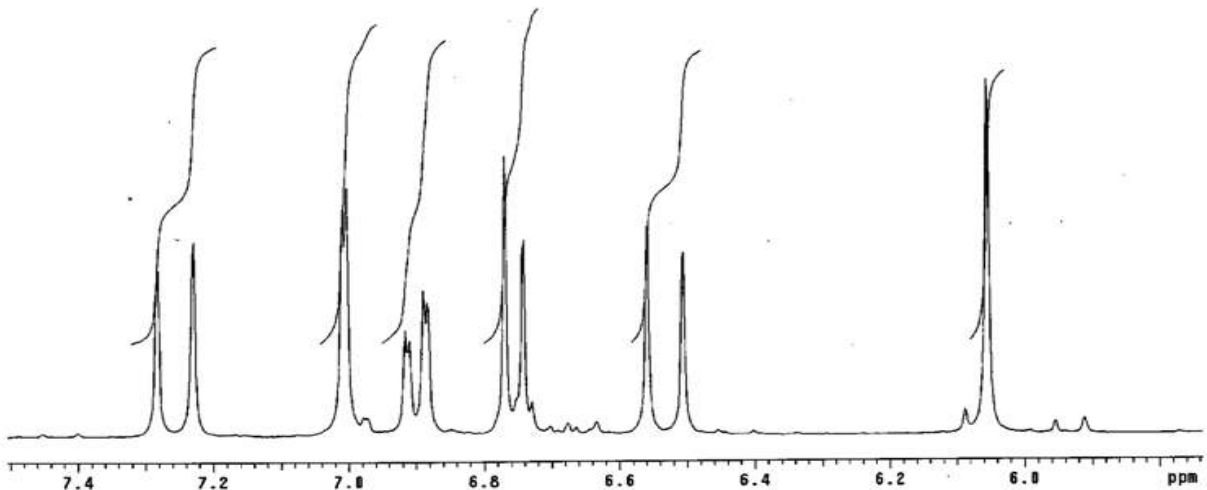


그림 2-40. Compound 1의 ¹H NMR spectrum

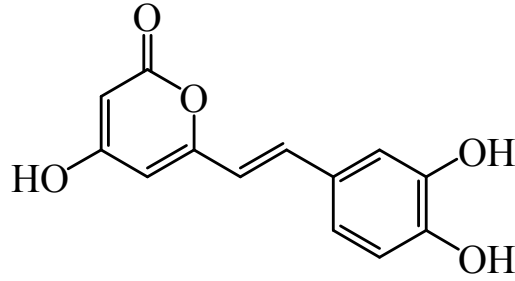


그림 2-41. Compound 1의 화학구조

② Compound 2의 화학구조

- 목질진흠버섯 배양물로부터 정제한 화합물 compound 2의 화학구조를 규명하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하고, CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석함. 또한 표준품을 이용한 HPLC retention의 비교에 의하여 화학구조를 확인함.
- Compound 1의 분자량을 알아보기 위하여 negative mode에서 ESI-mass spectrum을 측정하였으며, 그 결과 *m/z* 489에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되어 분자량을 490으로 확인함(그림 2-42).

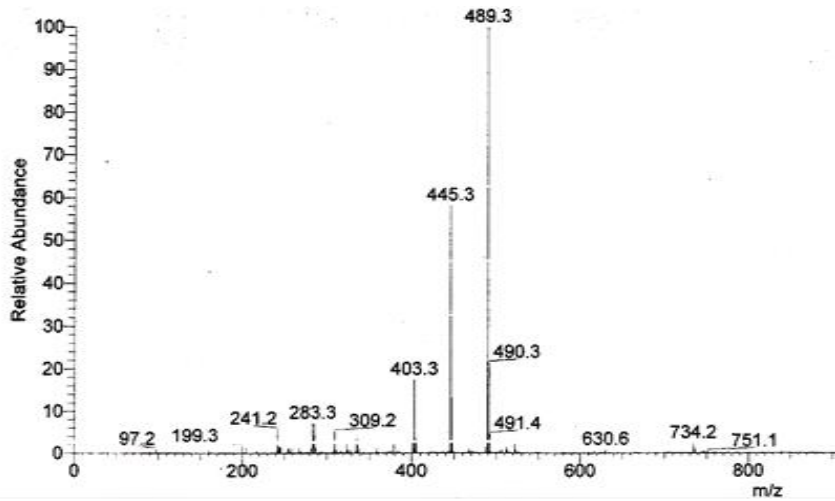


그림 2-42. Compound 2의 ESI-mass spectrum (negative mode)

- ¹H NMR spectrum을 측정한 결과(그림 2-43), 7.03(d, *J*=2.0 Hz), 6.93(dd, *J*=8.3, 2.0 Hz), 6.79(d, *J*=2.0 Hz), 6.78(d, *J*=8.3 Hz), 6.72(d, *J*=8.3 Hz), 6.70(dd, *J*=8.3, 2.0 Hz)ppm에서 두 개의 1,2,4-trisubstituted benzene, 7.35(d, *J*=16.1 Hz), 6.63(d, *J*=16.1 Hz)ppm에서 *trans*-1,2-disubstituted double bond unit, 5.76(d, *J*=6.4 Hz), 4.30(d, *J*=6.4 Hz)ppm에서 두 개의 methine proton, 6.36, 6.08ppm에서 두 개의 sp² singlet methine proton 피크가 관찰됨.
- Mass 측정 결과와 ¹H NMR spectrum의 측정 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 hypholomine B로 동정함(그림 2-44).

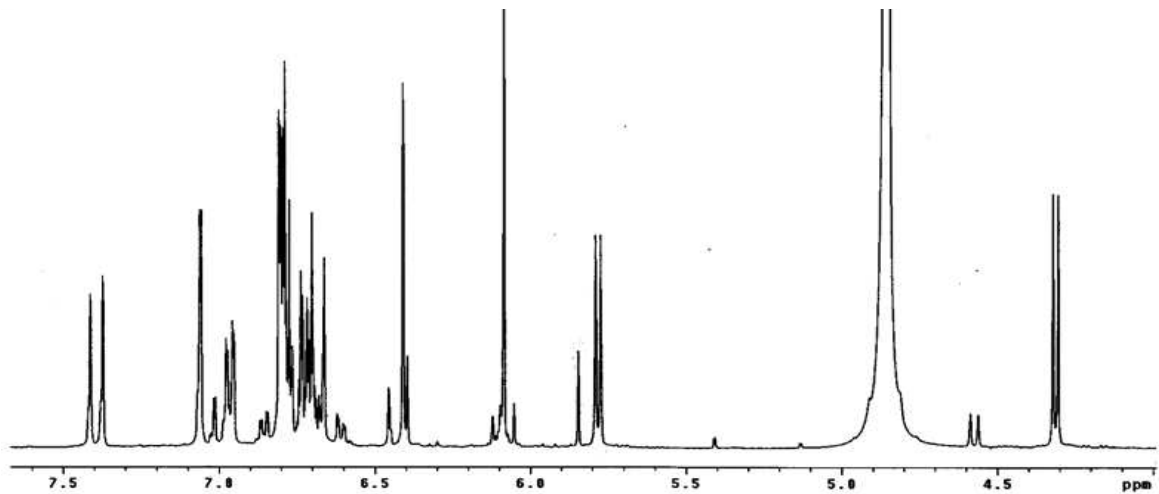


그림 2-43. Compound 2의 ^1H NMR spectrum

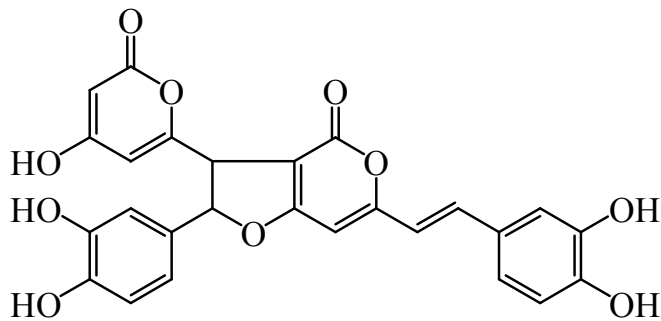


그림 2-44. Compound 2의 화학구조

(다) 목질진흙버섯 배양액 유래 화합물의 neuraminidase 저해활성

- 목질진흙버섯 배양물로부터 정제한 compound 1 및 compound 2의 neuraminidase 저해 활성을 측정한 결과, compound 1은 13.1 μM 에서, compound 2는 0.03 μM 에서 IC_{50} 값을 나타냄(그림 2-45). 특히 compound 2는 강력한 neuraminidase 저해 활성을 나타냄.

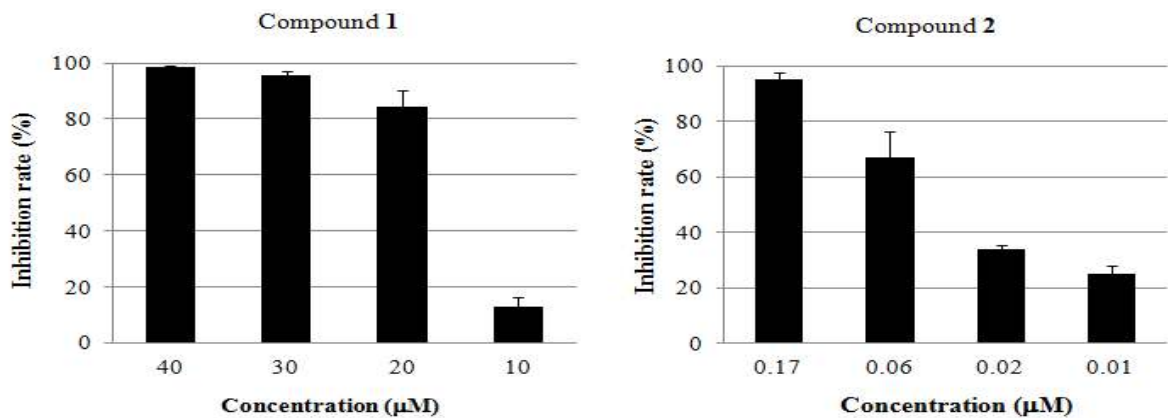


그림 2-45. Compound 1 및 compound 2의 neuraminidase 저해 활성

(3) 자생식물 및 약용식물 추출물로부터 neuraminidase 저해제의 탐색

(가) 자생식물 및 약용식물 유래 neuraminidase 저해제의 스크리닝

- 자생식물 추출물 라이브러리 약 3,200 여점 중에 구매 등을 통하여 수급이 가능한 소재를 중심으로 neuraminidase 저해 활성을 측정하였으며, 그 결과를 그림 2-46에 나타냄.

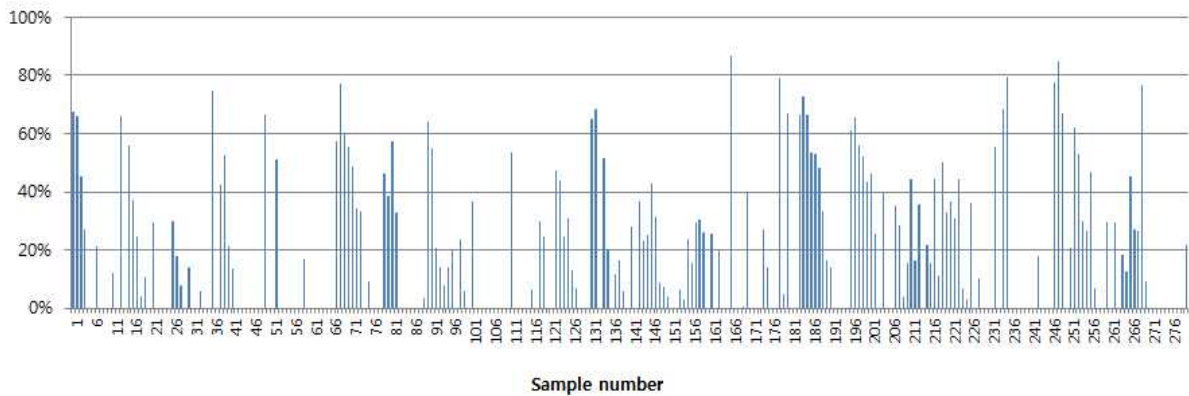


그림 2-46. 자생식물 추출물의 neuraminidase 저해 활성

- 약용식물 중에서는 소엽(=자소엽), 산두근, 음양곽, 복령피 등에서 높은 활성을 나타내었고(표 2-22). 자생식물 중에서는 섬단풍나무, 생달나무, 단풍나무, 사스레피나무, 섬나무딸기/섬산딸기, 생강나무, 분비나무, 비파나무, 생달나무 등에서 90% 이상의 높은 활성을 나타냄(표 2-23).
- 활성이 우수하며 수급이 용이한 생강나무, 녹나무, 하고초, 소엽, 복령피, 육계, 백작약 등 7종의 식물을 각각 600 g 씩 구매하여 메탄올로 추출한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물을 제조하고 neuraminidase 억제 활성의 재현성을 확인함(그림 2-47). 그러나 재현성의 확인과정에서 효능이 불안정하게 나타났으며 이는 원료의 표준화가 이루어지지 않아 원료 출처에 따라 효능이 달리 나타나는 것으로 유추됨. 또한 활성의 측면에서도 균류나 앞에 기술한 모과 등에 비하여 효능이 높게 나타나지 않아 추가적인 연구를 수행하지 않음.

표 2-22. 약용식물 추출물의 neuraminidase 저해 활성

품명	라틴생약명	부위	Inhibition (%)
소엽(=자소엽)	<i>Perillae Herba</i>	잎 및 끝가지	97.3
산두근	<i>Sophorae Subprostratae Radix</i>	월남귀 뿌리	97.0
음양곽	<i>EpimediumHerba</i>	삼지구엽초의 지상부	96.4
복령피	<i>Hoelen</i>	균핵	94.4
육계(계피)	<i>Cinnamomi Cortex Spissus</i>	줄기껍질	88.9
백작약	<i>Paeoniae Radix alba</i>	뿌리	87.3
단삼	<i>Salviae Radix</i>	뿌리	86.6
몰약	<i>Myrrha</i>	고무수지	86.4
계혈등	<i>Mucunae Caulis</i>	밀화두의 덩굴줄기	83.3
노회	<i>Aloe</i>	잎에서 얻은 액즙을 건조	78.8

표 2-23. 자생식물 추출물의 neuraminidase 저해 활성

국명	학명	부위	Inhibition (%)
섬단풍나무	<i>Acer takesimense</i>	잎	96.3
생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i>	줄기-심재	95.0
단풍나무	<i>Acer palmatum</i>	줄기-심재	94.6
사스레피나무	<i>Eurya japonica</i>	줄기-심재	93.6
섬나무딸기/섬산딸기	<i>Rubus takesimensis</i>	뿌리	93.5
생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	잎, 줄기	93.4
분비나무	<i>Abies nephrolepis</i>	잎, 줄기	92.8
비파나무	<i>Eriobotrya japonica</i>	줄기-심재	91.4
생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i>	줄기-수피	90.9
비파나무	<i>Eriobotrya japonica</i>	잎	89.5
태산목	<i>Magnolia grandiflora</i>	잎	89.5
도둑놈의갈고리	<i>Desmodium oxyphyllum</i>	전초	89.4
돌배나무	<i>Pyrus pyrifolia</i>	잎	88.9
떡윤노리	<i>Pourthiaea villosavar.brunnea</i>	잎	88.2
비목나무	<i>indera erythrocarpa</i>	줄기	87.0
다래	<i>Actinidia arguta</i>	줄기	87.0
눈갯버들	<i>Salix graciliglans</i>	지상부	86.6
갈기조팝나무	<i>Spiraea trichocarpa</i>	줄기	85.4
깽깽이풀	<i>Jeffersonia dubia</i>	전초	84.7
사스레피나무	<i>Eurya japonica</i>	줄기-수피	83.6
삼나무	<i>Cryptomeria japonica</i>	잎, 소지	83.5
시닥나무	<i>Acertschonoskii var. rubripes</i>	줄기	81.9
누리장나무	<i>Clerodendrum trichotomum</i>	열매	79.5
녹나무	<i>Cinnamomum camphora</i>	줄기-수피	79.4
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i>	줄기	78.5
냉초	<i>Veronicastrum sibiricum</i>	전초	76.9
개가시나무	<i>Quercus gilva</i>	줄기-수피	76.6
층층이꽃	<i>Clinopodium chinense</i>	전초	74.6
공단풀	<i>Sidaspinosa</i>	전초	72.8
하고초(꿀풀)	<i>Prunella vulgaris</i>	전초	72.8
성인봉천남성/섬남성	<i>Arisaema takesimense</i>	잎	72.3
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i>	전초	71.2
꼭두서니	<i>Rubia akane</i>	전초	71.2



그림 2-47. Neuraminidase 저해 활성이 우수한 자생식물 및 약용식물

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) Identification of PCV by RNA 염기서열

- 바이러스 감염증상을 보이는 그림 1-Q 고추의 잎에서 총 RNA를 추출하여 *Cucumber mosaic virus*, *Broad bean wilt virus 2*, *Pepper mild mottle virus*, *Pepper mottle virus*, *Tobacco mild green mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus*의 primer를 이용하여 검정한 결과 이들 바이러스가 감염되지 않은 것으로 확인되었음.
- 동일한 RNA를 Illumina HiSeq2500 플랫폼을 이용하여 RNA seq를 수행하고 Raw 데이터를 분석한 결과 *Pepper cryptic virus1* 와 2가 확인되었고(그림 2-48), PCV1과 2의 외피단백질을 이용하여 RT-PCR 수행결과 PCV1과 2로 재확인되었음(그림 2-49).
- 그림 2-48에서 보는 바와 같이 RNA seq에 의해 밝혀진 PCV1과 2의 RNA 염기서열은 미국에서 밝혀진 PCV1 (Genbank accession No. JN117277) 과 PCV2 (Genbank accession No. JN117279)와 99% 유사성을 보이고 있고 이 PCV1과 PCV2의 외피단백질의 염기서열은 Genebank에 KR676353과 KR676354로 각각 등록하였음.

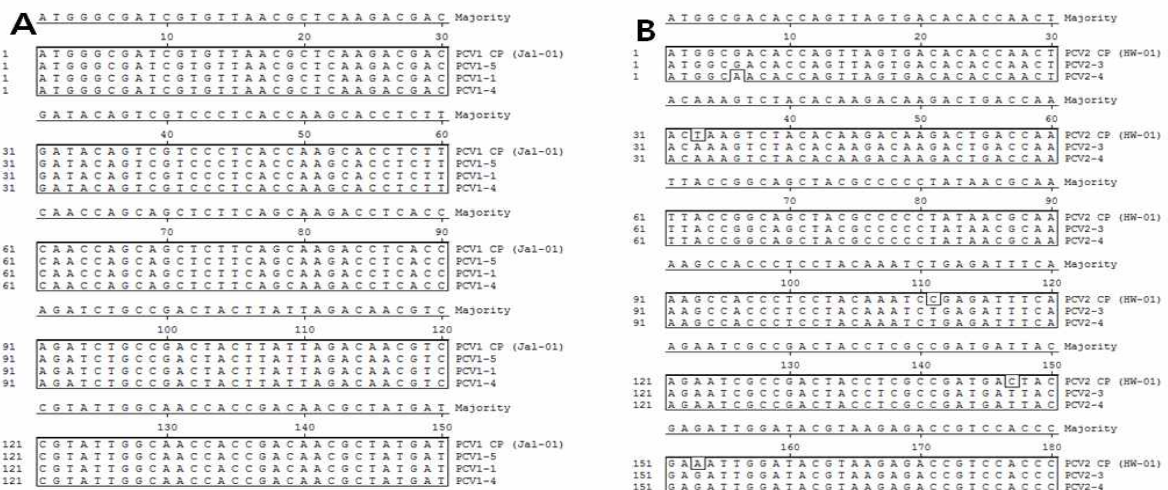


그림 2-48. RNA seq 후 PCV1과 PCV2의 alignment primer. PCV1 (Genbank accession No. JN117277) 과 PCV2 (Genbank accession No. JN117279)와 99% 유사성을 보임

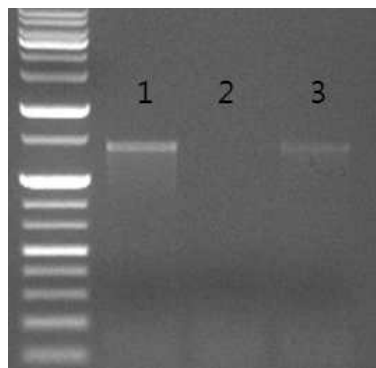


그림 2-49. RT-PCR 결과. lane 1, 2, 3은 각각 고추RNA, 아마란스 RNA, 고추 RNA를 특이 프라이머를 사용하여 실시한 RT-PCR 결과임.

- 그림 2-49의 1과 3은 각각 고추에서 추출한 RNA를 이용하여 PCV1과 PCV2의 primer를 이용하여 수행한 것이며, 2번은 PCV1에 의해 false positive를 보인 아마틸리스에서 추출한 RNA를 이용하여 PCV1 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과임. 이로서 고추에 바이러스 감염 증상을 보인 바이러스는 PCV1과 PCV2임이 확인되었음.

(2) 국산콩의 재분화

- 콩은 식물성 단백질 공급원으로서 우리나라 기원을 가지는 작물중의 하나로 식용 및 사료용등의 다양한 용도로 사용되는 아주 중요한 작물로서 세계 많은 나라에서 재배되고 있으며, 이를 이용하고자 하는 많은 연구들이 이루어지고 있음. 그 중요성에 걸맞게 다른 어느 작물보다도 형질전환에 관한 많은 연구가 이루어 졌고 이미 유전자 변형된 콩이 상업화 되고 있는 상황이지만 우리나라 콩을 형질전환하여 사용된 예가 없는데, 아무래도 서구선진국 중심으로 콩에 대한 형질전환체 연구가 많이 진행되었고, 그들의 품종을 사용했기 때문일 것이며, 다른 하나는 다른 작물보다 콩 형질전환이 어렵기 때문임. 특히 형질전환체를 만드는데 있어서 가장 근본적인 기술 중의 하나는 식물체 재분화 능력이 아닌가 생각되며, 재분화 능력은 품종마다 다르기 때문에 우리나라 콩을 이용하여 형질전환체를 만드는 기초 연구로서 먼저 재분화의 최적화가 이루어 져야 함.
- 이 연구에서 사용된 콩은 우리나라의 장려품종인 남풍과 대풍을 사용하였음. 최적화를 위해 발아배지선발, 조직절편의 종류, vitamins 및 식물호르몬의 적정화 등을 통하여 콩의 재분화 최적화를 실시하였음.
- 발아에 최적의 배지 조성은 배지 1mg/L의 BAP와 0.25mg/L의 GA3를 포함한 MS vitamin 고체배지로 97.78%의 높고 빠른 발아율을 보였으며(그림 2-50의 G.), 최적의 캘러스 유도배지는 Gamborg B5 vitamin 배지로 5 μ M BAP 과 0.5 μ M GA3를 포함한 배지였으며(그림 2-51의 C), Gamborg B5 vitamin 배지로 5 μ M BAP를 포함한 배지가 최적의 Shoot induction media였음(그림 2-51의 G).
- 다양한 종류의 식물절편의 자엽절에서 재분화가 가장 양호하게 진행되었음(그림 2-52의 J 과 그림 2-53).



그림 2-50. 조직배양용 콩의 최적의 발아 배지

A) 증류수, B) MS 고체배지, C) MS비타민 액체배지, D) MS 비타민 고체배지, E) MS 비타민 + NAA 고체배지, F) MS 비타민 + BAP 고체배지, G) MS 비타민 + BAP+GA3 고체배지

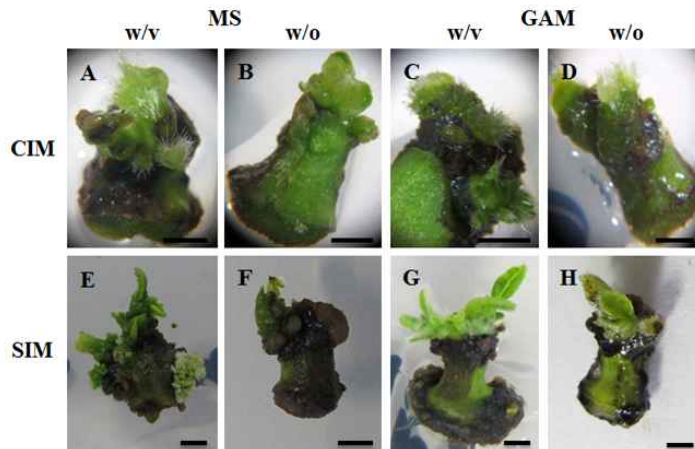


그림 2-51. 조직배양용 콩의 최적의 캘러스 유도배지 와 지상부 유도배지에서 식물체 재분화

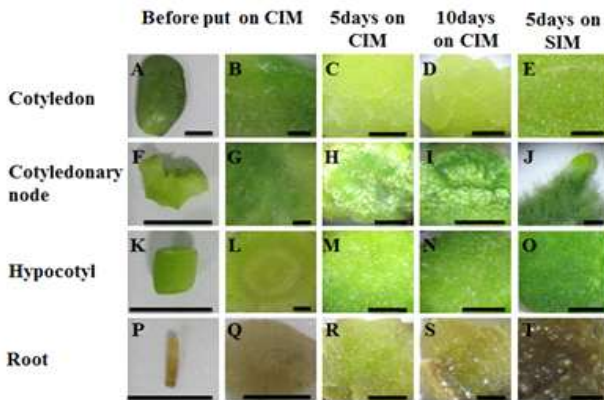


그림 2-52. 콩 다양한 절편에서의 재분화 점정

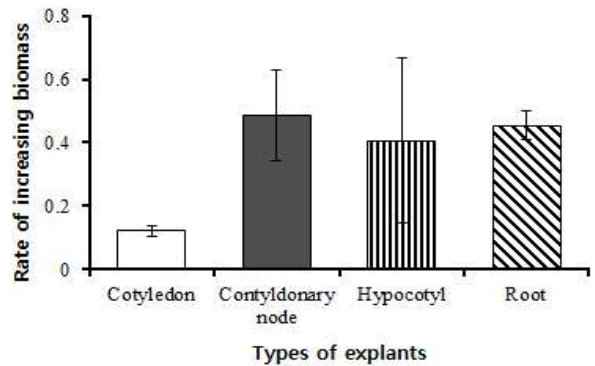


그림 2-53. 절편 부위별 재분화 능력

- 남풍과 대풍 두 품종이 재분화 실험에 사용되었는데 캘러스 증가량과 지상부 유도 및 신장을 관찰하여 두 품종의 재분화 능력을 비교 하였을 때 남풍보다 대풍이 재분화 능력이 우수한 것으로 판단됨. 그림 2-54의 A에 의하면 캘러스의 증가량은 두 품종 간 차이가 없었으나, 지상부가 재분화는 궁극적으로 차이가 없었으나 초기 2주와 3주에 대풍이 빠른 재분화를 보였음(그림 2-54 B). 초기 빠른 재분화(그림 2-55)에 의한 빠른 성장량 증가로 이어지므로 초기 재분화율이 높은 대풍이 형질전환체를 만들기에 유리한 품종으로 생각됨.

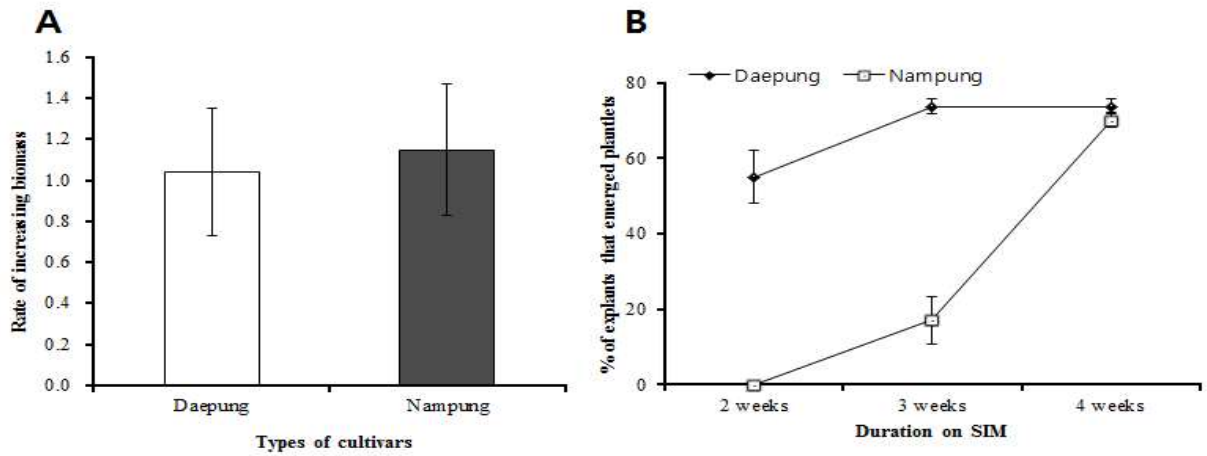


그림 2-54. 콩의 재분화능력 비교

A) 배치 치상 2주 후 캘러스 증가량, B) 지상부 출현 경향

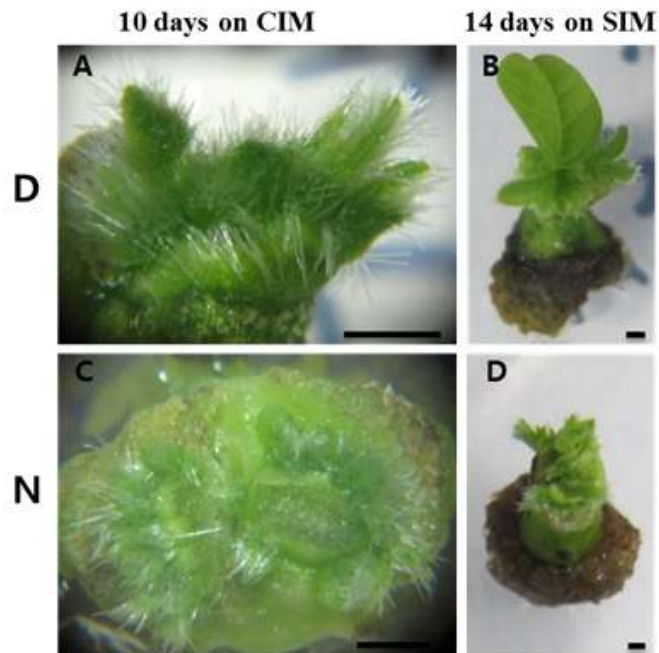


그림 2-55. 콩의 지상부 분화. A와 B는 대풍, C와 D는 남풍

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

(1) 개발물질에 대한 실험실적 평가

(가) 양계

- ① 항미생물 펩타이드(Porcine protegrins; PG-1). 제2협동에서 개발된 항미생물 펩타이드 물질인 PG-1에 대한 효능평가를 진행하였음.
 - ㉠ 표준균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Clostridium perfringens* KCTC (cpb2), *C. perfringens* KCTC (cpe)이며, 실험방법은 Spot test로 실시하였음.
- 이 방법은 목적하는 균에 대하여 개발된 항생제 대체물질들의 최소억제농도 (minimum inhibitory concentrations, MICs)를 평가하는 방법으로 paper disc법과

- 유사하며, 실험균주가 접종된 배지위에 물질을 적하(dropping) 하였을 때 균의 억제(inhibition) 유무를 1차적으로 확인할 수 있음.
- 현재는 항생제내성균이나 슈퍼박테리아의 치료제 또는 대체물질을 탐색하는 과정에서 bacteriophage를 분리할 때 사용하는 실험방법임.
 - 그림 2-56에서 시료번호 2에서 5번까지는 bacterial lawn에 박테리오파지를 적하하여 균의 용해를 확인하는 방법임. 따라서 물질에 대한 항균효능을 확인하기에 앞서 본 실험에서는 균의 억제능을 확인할 수 있는 spot test 방법을 실험에 적용하였음(그림 2-57).

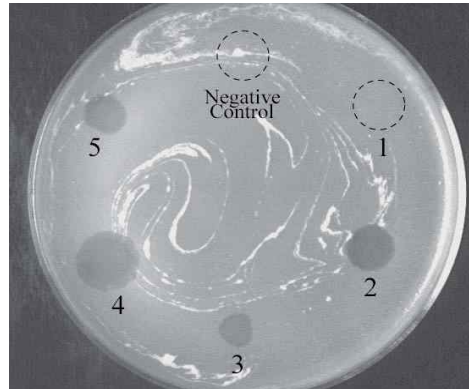


그림 2-56. Spot test (세균을 용해시키기 위한 박테리오파지의 적하실험법)

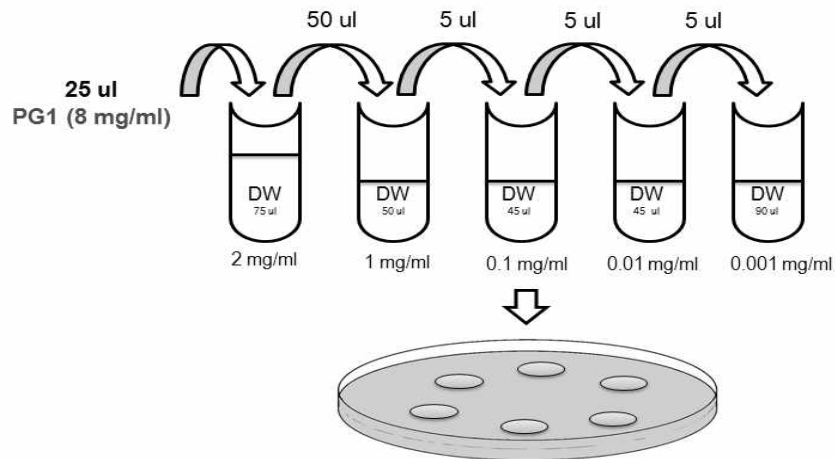


그림 2-57. Spot test에 의한 펩타이드 PG-1 물질의 세균의 최소억제농도 실험

- ㉠ 실험방법은 다음과 같음. 즉, 제2협동에서 개발한 항미생물 펩타이드(PG-1) 물질은 증류수를 사용하여 8mg/ml 농도로 준비한 것을 사용하였음.
- 물질은 증류수를 사용하여 두 가지 희석법으로 실험에 사용하였음. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 기준농도: $512\mu\text{g}$, $256\mu\text{g}$, $128\mu\text{g}$, $64\mu\text{g}$, $32\mu\text{g}$, $16\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$, $4\mu\text{g}$, 실험실 기준농도 : $2,000\mu\text{g}$, $1,000\mu\text{g}$, $100\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$.
 - 목적하는 세균을 배양할 수 있는 한천배지에서 증식한 집락 3~4개를 액체배지에 접종하고 균종별로 4~5시간 진탕 배양하였음.
 - Clean bench 내에서 균배양액 1ml를 Mueller-Hinton 한천배지에 넣고 배지 표면

에 완전히 적신 다음 나머지 균액은 마이크로 피펫으로 제거하고 약 5분간 건조시켰음.

- 농도별로 준비된 물질 4 μ l를 배지위에 적하하고, 건조한 후에 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양하였으며, 다음날 균의 억제능을 관찰하고 물질에 대한 최소억제농도를 관찰하였음.

㉞ 농도별 PG-1 물질의 적하량에 따른 세균의 최소억제농도를 비교하였음.

- 물질을 농도별로 각각 다른 양(1, 2, 4, 6 μ l)으로 배지에 적하하여 MIC를 비교하였음(그림 2-58).
- *S. aureus* ATCC 25923에 대한 PG-1 물질의 MIC는 8 μ g으로 확인되었음.
- PG-1을 6 μ l 적하하였을 때 8 μ g 농도에서 약간의 억제능이 관찰되었지만, 다른 배지와 비교하였을 때 양에 따른 억제능의 차이는 없었으며, 이후 실험부터는 물질을 4 μ l 기준으로 실험에 적용하였음.
- 본 연구에서 항균물질에 대한 실험실적 효능평가를 위해 spot test 실험방법으로 최소억제농도를 측정할 수 있었고, 제2협동에서 개발된 항미생물 펩타이드를 본 연구에서 고안한 실험방법을 통하여 균의 억제능과 항균효과를 실험실적으로 평가하였음.

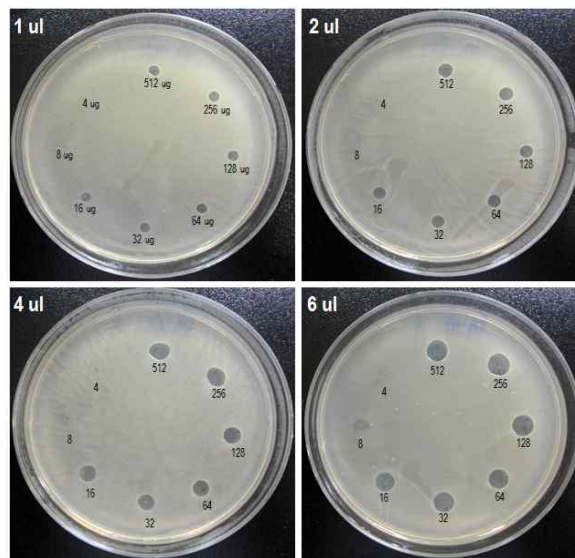


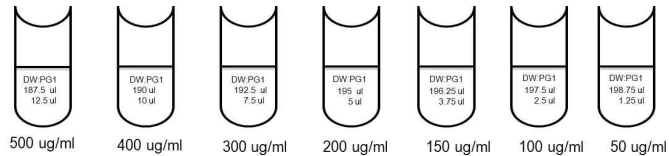
그림 2-58. 농도별 PG-1 물질의 투여량에 따른 세균의 최소억제농도

㉞ 개발된 물질에 대한 실험실적 항균효능 실험방법은 다음과 같음.

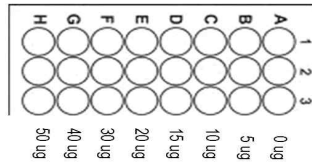
- 즉, 8mg/ml의 PG-1 물질을 농도별로 희석하여 준비하였음(PG-1 희석농도, 500 μ g, 400 μ g, 300 μ g, 200 μ g, 150 μ g, 100 μ g, 50 μ g).
- 한천배지에서 배양한 집락 4~5개를 7ml의 Mueller-Hinton (MH) 액체배지에 접종하고 3~5시간동안 진탕 배양하였음.
- 균배양액 180 μ l를 3개의 well (#1~#3)에 각각 넣어주고 PG-1 물질을 농도별로 10배 희석되게 20 μ l씩 넣어 잘 섞어주고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양하였음(그림 2-59, 가).
- 최초 접종된 균수(colony forming unit, CFU)를 측정하기 위하여 6 \times 6 drop plate (Journal of Microbiological Methods, 55 (2003) 475-479) 방법을 사용하였음.

- 먼저, 96-well plate A #1에 250 μ l의 배양액을 넣고 #2에서 #8까지 180 μ l의 MH 액체배지를 넣어주고 멀티채널피펫(multichannel pipet)으로 균액이 들어있는 well에서 20 μ l를 10배씩 계단 희석(10-1에서 10-7)함.
- 멀티채널피펫을 사용하여 희석된 6개의 well (10-2에서 10-7)로부터 10 μ l씩 MH 한천배지에 6번씩 나누어서 적하하고 건조시킨 다음, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양한 후 균수를 측정하였음(그림 2-59, 나).
- 다음날, 농도별로 PG-1이 포함된 실험군과 포함되지 않은 대조군을 동일한 방법으로 세균 수를 측정하여 항균능 여부를 관찰하였음.

(가)



- ① 180 μ l의 세균배양액을 3개의 Well (#1 to #3)에 넣어줌
- ② 농도 별로 준비된 PG-1 물질을 10배 희석농도(20 μ l)로 섞어줌
- ③ 배양액의 생균수는 6x6 dropping method로 측정함



37도에서 18시간 배양.
 배양 후, 세균수 (CFU/ml) 측정

(나)

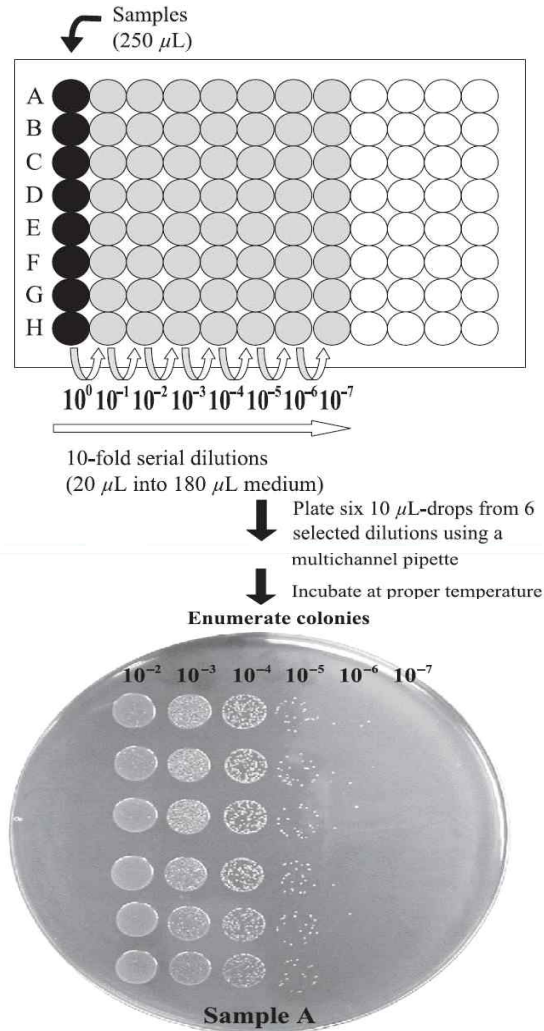


그림 2-59. PG-1 농도에 따른 *S. aureus*의 항균효능평가 과정(가) 및 6×6 drop plate 방법(나)

㉔ *S. aureus* ATCC 25923에 대한 PG-1의 항균효능 결과는 다음과 같음.

- 본 연구에서 고안한 실험실적 항균효능평가 실험기법은 제2협동과제에서 개발한 물질을 평가하는데 활용되었음.
- 총 2번의 실험결과를 비교하였을 때, PG-1 물질이 *S. aureus* ATCC 25923에 항균능력이 있음을 증명하였고, 세균수의 차이에 따라 항균능력에도 현저한 차이가 있음을 확인하였음.
- Spot test 방법과 물질이 혼합된 액체배양(coculture)법에 의한 세균수 측정법을 통하여 PG-1 물질이 *S. aureus* ATCC 25923 표준균주에 항균효과(bactericidal effect)가 있는 것으로 증명됨에 따라, 슈퍼박테리아로 불리면서, 면역이 저하된 사람이나 병원 수술환자, 또는 병원환경에서 전파나 전염이 용이하게 이루어지면서 패혈증이나 폐렴증상을 유발하고 전 세계적으로 항생제의 다제내성으로 인해 치료하기가 어려운 병원환자 유래 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 균주들에서도 개발된 물질(PG-1)이 항균효과가 있는지를 조사하기 위해 최소억제농도 실험을 수행하였음.

㉞ MRSA 균주들에 대한 PG-1 물질의 MIC 실험방법은 다음과 같음.

- 즉, MIC는 CLSI 기준에 따라 그림 2-60와 같이 PG-1 농도를 512 μ g에서 4 μ g까지 2배농도로 계단 희석하였음.
- 앞서 진행한 항균효능평가실험과 동일하게 액체배지에 4시간 배양된 균액을 배지에 접종하고 PG-1 물질을 농도별로 적하한 후, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양하였음.
- 20주의 환자유래 MRSA 분리주에 대한 MIC를 관찰하였음.

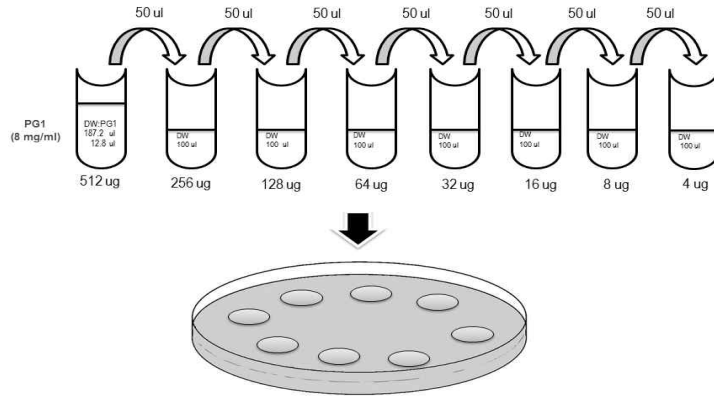


그림 2-60. MRSA 균주에 대한 PG-1 물질의 최소억제농도 측정

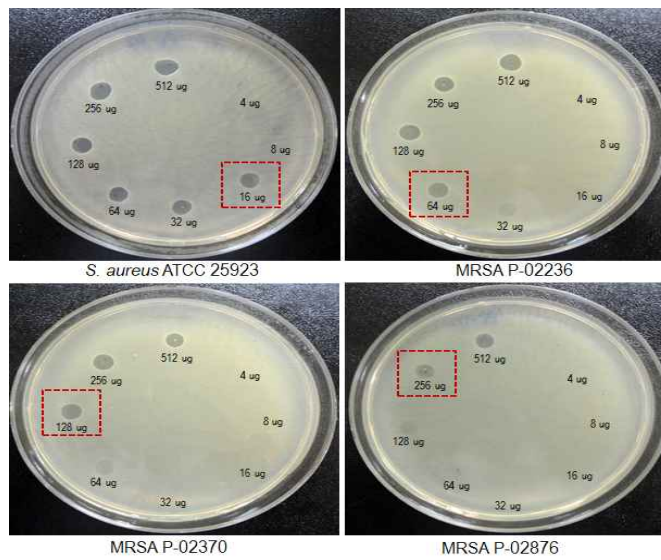


그림 2-61. Mueller-Hinton 한천배지에서 PG-1의 최소억제농도

표 2-24. MRSA 균주들에 대한 PG-1 물질의 최소억제농도

No. of strains ^a	MICs to PG-1 (ug)								MICs
	512	256	128	64	32	16	8	4	
ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	+	+	16
KBN06P02184	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02236	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02254	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02278	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02356	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02370	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02374	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02420	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02426	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02512	-	-	+	+	+	+	+	+	256
KBN06P02513	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02539	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02580	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02611	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02623	-	-	-	-	+	+	+	+	64
KBN06P02758	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02760	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P02876	-	-	+	+	+	+	+	+	256
KBN06P03057	-	-	-	+	+	+	+	+	128
KBN06P03061	-	-	-	+	+	+	+	+	128

^a MRSA 분리주들은 전북대학교병원-국가병원체자원은행에서 분양받았음

- ⊙ MRSA 균주들에 대한 PG-1의 최소억제농도 결과, MRSA 분리주들에 대한 PG-1의 MIC는 128 μ g에서 10주, 64 μ g에서 8주, 256 μ g에서 2주로 대부분 64에서 128 μ g 범위 내에 있는 것으로 조사되었음(그림 2-61, 표 2-24).
 - MRSA 분리주들의 PG-1에 대한 MIC 범위는 표준균주 *S. aureus* ATCC 25923에 비해 3~4배정도 높은 것으로 확인되었음. 본 실험결과에서는 PG-1 물질이 환자 유래 MRSA 분리주들에서도 균의 증식이 억제되었음을 확인할 수 있었음.
- ⊙ PG-1 농도에 따른 닭괴사성장염 유래 *C. perfringens*의 MIC 결과, 표준균주인 *C. perfringens* KCTC (cpb2)의 MIC는 100 μ g으로 확인되었음.
 - 육계농장에서 괴사성장염으로 확인된 닭의 소장에서 *C. perfringens*를 분리하였으며, 이들 균주들을 대상으로 PG-1 물질을 농도별로 (500 μ g, 400 μ g, 300 μ g, 200 μ g, 150 μ g, 100 μ g, 50 μ g) 적하하여 MIC를 관찰하였고, 실험에 사용한 14주중 9주에서 억제능이 관찰되었음.
 - PG-1 물질에 대한 MIC 범위는 100에서 200 μ g 정도로 확인되었고, 나머지 5주에서는 억제능이 관찰되지 않았음(그림 2-62).

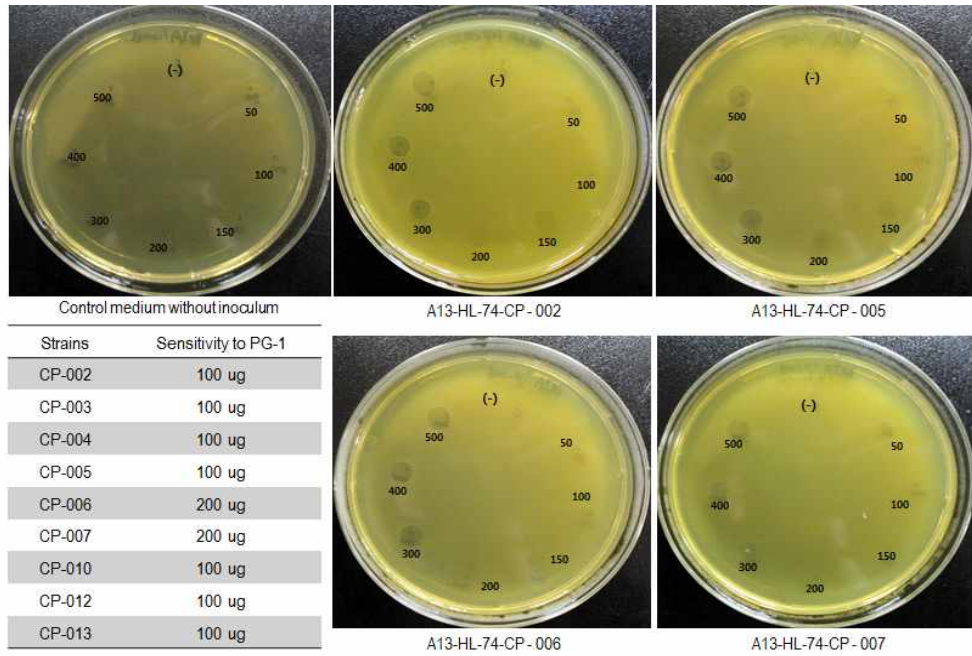


그림 2-62. Spot test에 의한 *C. perfringens* 분리주들에 대한 PG-1의 최소억제농도

② 닭 질병제어를 위한 효능평가

㉠ 본 연구에서는 개발된 물질을 가지고 닭 세균성 질병제어를 위한 효능평가를 수행하기에 앞서, 특정병원체에 대한 정확한 증상이 유발되는 동물모델을 확립하는 차원에서 1차년도에 진행된 괴사성장염모델을 보완하고 개선하기 위한 실험모델을 구축하였음.

㉡ 전년도에 *cpb2* 유전자를 가진 *C. perfringens* KCTC 표준균주가 장염모델을 위한 공격접종주로 사용되었는데 결과적으로 병변지수(lesion scoring)가 거의 없거나 약하게 발현(그림 2-63, 2-64)하여 실제 농장에서 발생하는 괴사성장염의 병변수준에 적합하지 않고, 연구목적인 신소재 물질에 대한 목적동물의 효능평가를 수행하기에 적합한 모델이 될 수 없었음.

- 따라서 이번 연구에서는 괴사성장염 증상이 있는 닭의 소장에서 원인균인 *C. perfringens*를 분리하여 균의 독소타입과 독소유전자들을 파악하고 괴사성장염모델을 개선하기 위한 균주들을 선발하여 동물실험을 수행하였음.

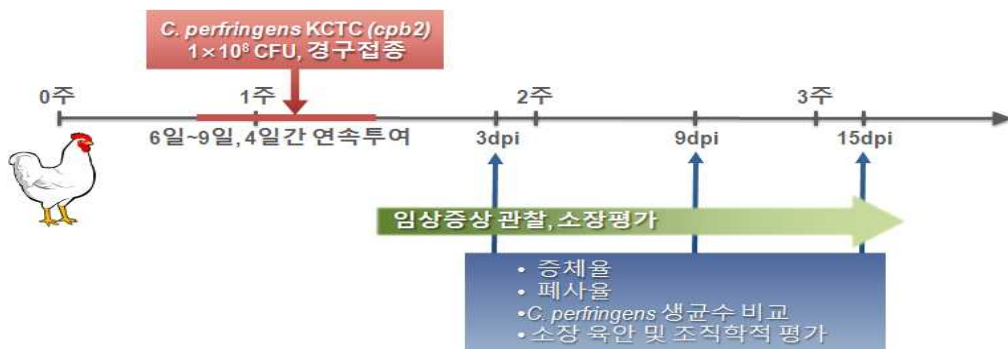


그림 2-63. 괴사성장염모델을 위한 동물실험 모식도(1차년도)

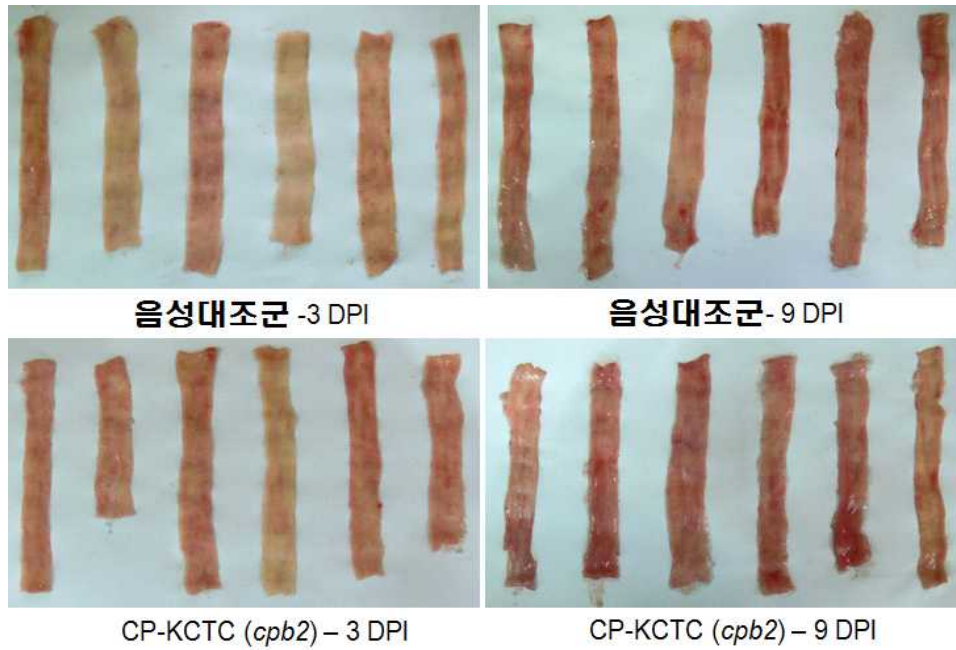


그림 2-64. 표준균주로 접종 후 닭 소장(내) 병변(1차년도 수행결과)

- ㉔ 균주 분리 및 독소유전자를 탐색하기 위해 닭괴사성장염 증상이 있는 닭에서 14주의 *C. perfringens*를 분리하였음.
- 이들 분리 주들은 모두 *cpa* 유전자를 가진 Type A로 확인되었고, *cpb2* (beta toxin-2) 유전자도 보유하고 있었으며, 특히, 괴사성장염의 원인독소로 알려진 *netB*와 *tpeL*을 가진 균주도 2주가 확인되어 병변이 심한 개체에서 분리균주와 독소유전자를 가진 분리균 주를 포함하여 총 4주를 닭괴사성장염모델을 확립하기 위한 실험균주로 선발하였음(표 2-25).

표 2-25. *C. perfringens* 분리주에 대한 독소유형 및 보유유전자

균주명	Multiplex PCR	독소 유형	독소유전자 PCR		
			<i>cpb2</i>	<i>netB</i>	<i>tpeL</i>
A13-HL-071-CP001	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-071-CP002	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-071-CP003	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-071-CP004	<i>cpa</i>	Type A	+	+	+
A13-HL-071-CP005	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-071-CP006	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-071-CP007	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-071-CP008	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-077-CP009	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-077-CP010	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-077-CP011	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-077-CP012	<i>cpa</i>	Type A	+	+	+
A13-HL-077-CP013	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-
A13-HL-077-CP014	<i>cpa</i>	Type A	+	-	-

㉔ 닭괴사성장염모델을 위한 실험방법은 다음과 같음.

- 혈액한천배지에서 배양된 *C. perfringens* 집락 4~5개를 7ml의 fluid thioglycollate medium (FTM) 배지에 접종하고 혐기배양조건으로 37°C에서 15시간 배양하였음.
- 동물(닭)에 접종하기 전에 6×6 drop plate 방법(그림 2-65)을 통해 접종균수를 확인하였음.
- 균배양액은 1cc 주사기에 0.5cc씩 주입하고 oral gavage needle(18 gauge)을 사용하여 경구접종에 사용하였음.
- 접종은 육계 15일령에서 17일령까지 연속 3일 동안 경구투여하고 15일령과 16일령에는 2회, 17일령에는 3회 접종하였음(표 2-26). 접종 후, 8일까지 임상관찰 및 폐사율을 확인하고 부검을 통해 접종균주의 재분리와 육안 및 조직학적 병변을 관찰하였음.

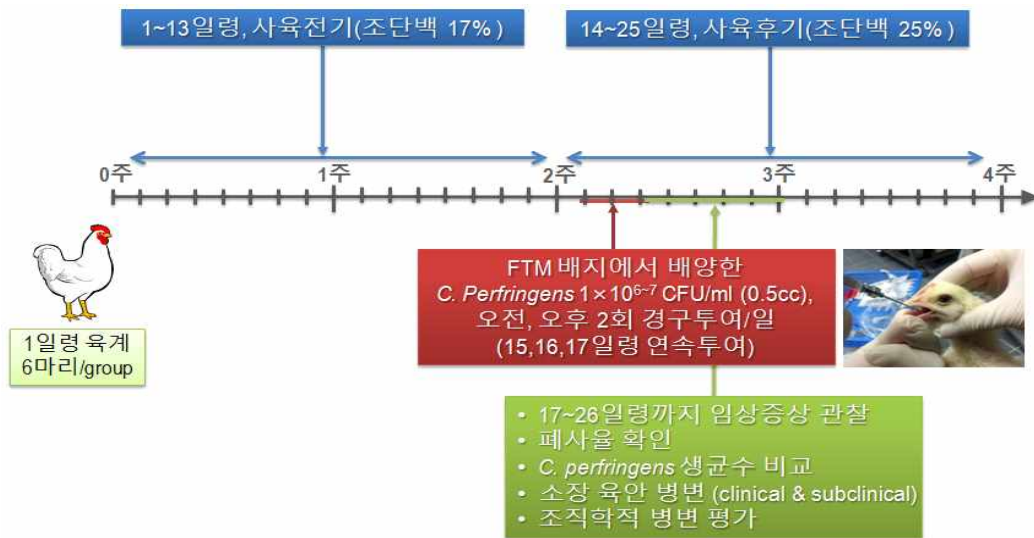


그림 2-65. 괴사성장염모델 개선을 위한 동물실험 모식도(2차년도)

표 2-26. 닭괴사성장염모델 구축을 위한 접종일과 접종균수

실험군	공시 수수	접종일 (0.5cc 경구투여/회)						
		15 일령		16일령		17일령		
		1회	2회	1회	2회	1회	2회	3회
음성 대조군	6수	FTG	FTG	FTG	FTG	FTG	FTG	FTG
CP-004	6수	1.4×10^6	7.3×10^5	1.5×10^6	9.6×10^4	2.4×10^6	2.6×10^5	1.9×10^5
CP-006	6수	1.0×10^6	2.6×10^5	5.4×10^5	4.5×10^4	1.0×10^6	3.8×10^5	0.7×10^5
CP-012	6수	1.2×10^6	6.0×10^5	1.4×10^6	7.2×10^4	3.1×10^6	2.3×10^5	1.2×10^5
CP-013	6수	2.2×10^3	1.3×10^2	7.8×10^4	2.4×10^4	2.4×10^5	4.4×10^4	1.4×10^4

㉔ 공격접종에 의한 균주 재분리와 임상증상 및 병변을 확인한 결과는 다음과 같다. 닭괴사성장염모델에서 임상증상의 병변지수는 1차년도에 확립한 평가표를 참조하였으며(표 2-27), 접종 후 8일째 모든 실험군을 대상으로 부검을 실시하였음.

- 대조군을 포함한 모든 그룹에서 폐사율은 확인되지 않았으며, 임상증상에 있어서 CP-012와 CP-013 실험군 일부에서 접종 6일부터 행동이 둔해지고 기립하기 힘든 개체들이 관찰되었음.
- 접종군의 재분리를 실시한 결과, 실질장기인 간과 소장으로부터 *C. perfringens*를 분리하였음(그림 2-66). CP-004, CP-012, CP-013 실험군(6개체)의 소장에서 *C. perfringens* 의심집락들이 분리되었고 간에서도 CP-004와 CP-013 실험군에서 각각 1개체와 CP-012 실험군의 2개체에서도 균이 분리되었음. 분리된 균주들은 유전적 동정 및 독소유전자들의 PCR 검출을 통하여 접종균주임을 확인하였음(표 2-28).

표 2-27. 접종그룹별 실질장기에서 *C. perfringens* 재분리율

평가항목	평가방법	병변지수 (lesion scoring)
부검소견	소장의 육안적 병변 관찰	0 = 정상 1 = 얇아진 소장벽 및 충출혈 2 = 얇아진 소장벽 및 부분적 염증, 괴사 3 = 얇아진 소장벽 및 광범위 염증, 괴사 4 = 소장내의 전반적 염증, 괴사
조직소견	소장조직 관찰	0 = 정상 1 = 소장 용모가 약간 짧아짐 2 = 소장 용모의 부분적 탈락 또는 붕괴 3 = 소장 용모의 붕괴와 염증 4 = 소장 용모의 광범위 탈락과 염증



그림 2-66. 실질장기에서 분리된 *C. perfringens* 재분리

표 2-28. 접종그룹별 실질장기에서 *C. perfringens* 재분리율

실험군주	실질장기에서 균 분리율(%)	
	간	소장
음성대조군	0/6 (0.0)	0/6 (0.0)
CP-004	1/6 (16.7)	6/6 (100)
CP-006	0/6 (0.0)	3/6 (50.0)
CP-012	2/6 (33.3)	6/6 (100)
CP-013	1/6 (16.7)	6/6 (100)

- 임상증상 및 병변 소견은 다음과 같다. 음성대조군은 모든 개체군에서 균분리 및 임상증상이 관찰되지 않았음(그림 2-67-1).
- CP-004와 CP-006은 각각의 실험군에서 1~2개체들이 충출혈(병변지수 1)이 관찰되었음(그림 2-67-1). CP-012 실험군은 1번과 5번 개체는 비교적 정상에 가깝지만 그 이외의 장에서는 흰노란색의 변성과 탄력이 소실된 상태이고, 장막을 통해서 관찰되는 병소는 점막괴사나 궤양이 관찰되었음.
- 그림 2-67-2의 12-④번의 소장외막에서는 괴사소가 관찰되었으며 점막이 비후되었음. CP-13 실험군은 점막의 충출혈 소견이 관찰되었고, 3번 개체에서는 노란색 반점들이 보이는데 다발성 괴사소로 확인되었으며, 시간이 경과하면 사이즈가 커지고 궤양의 형태로 발전될 것으로 판단되었음. 4번과 6번 개체에서도 괴사반점이 관찰되었음.
- 실험군의 병변지수 평가결과, 음성대조군을 포함한 5개 실험군 중에서 병변지수가 고르게 분포하는 CP-012 그룹과 80% (5/6) 이상의 가장 심한 병변지수(3과 4)를 보인 CP-013 그룹(그림 2-67-3, 표 2-29)이 닭농장에서 발병하는 괴사성장염의 병변과 유사한 결과로 확인됨에 따라 개발된 물질을 대상으로 효능평가를 수행하기에 적합한 모델로 판단되었음.

표 2-29. 닭괴사성장염모델에서 실험군별 소장 병변지수

평가 항목	실험군 (6수)	실험군에 따른 소장 병변지수 (%)				
		0	1	2	3	4
부검 소견	음성대조군	6/6 (100)	-	-	-	-
	CP-004	3/6 (50.0)	3/6 (50.0)	-	-	-
	CP-006	4/6 (66.7)	2/6 (33.3)	-	-	-
	CP-012	-	1/6 (16.7)	2/6 (33.3)	2/6 (33.3)	1/6 (16.7)
	CP-013	1/6 (16.7)	-	-	2/6 (33.3)	3/6 (50.0)



그림 2-67-1. *C. perfringens* 접종에 의한 음성대조군 및 CP-004와 CP-006 실험군들의 소장(내) 병변



그림 2-67-2. *C. perfringens* 접종에 의한 CP-012 실험군의 소장(내) 병변



그림 2-67-3. *C. perfringens* 접종에 의한 CP-013 실험군의 소장(내) 병변

(나) 양돈

① 항미생물 펩타이드(AMP) 효능평가

㉞ 배경 및 목적

- 1-2차년도에 걸쳐 제2협동과제팀에 의해 개발된 항미생물 펩타이드(Antimicrobial peptide, AMP)에 대한 양돈에서 중요한 *E. coli* K88와 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균효과를 평가하기 위하여 실시하였음.

㉟ 평가 방법

- 항미생물 펩타이드(PG-1)의 항균효능평가는 먼저 PG1을 24-well 플레이트에 80-2.5 μ g/ml 농도로 LB broth로 2배 단계 희석한 후 *E. coli* K88와 *Salmonella* Typhimurium을 배양하여 세균수가 200CFU/ml이 되도록 PBS에 희석하여 PG1이 포함된 배지에 각각 접종하였음. 이 후 37°C에서 16시간 동안 배양한 후 각 배양액 200 μ l을 LB 플레이트에 도말하여 다시 37°C에서 24시간 동안 배양하였음. 배양 후 배지의 colony 개수를 세고 양성대조군과 비교하여 물질 처리군의 세균 증식의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하였음.

㊱ 평가 결과

- PG1은 40 또는 10 μ g/ml의 농도에서 살모넬라 또는 대장균 K88주의 증식을 완벽하게 억제하였음(그림 2-68).
- *Streptococcus suis*, *Pasteruella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*,

Haemophilus parasuis 등의 다른 병원성 세균에 대한 항균효과 평가 추가 진행 예정.

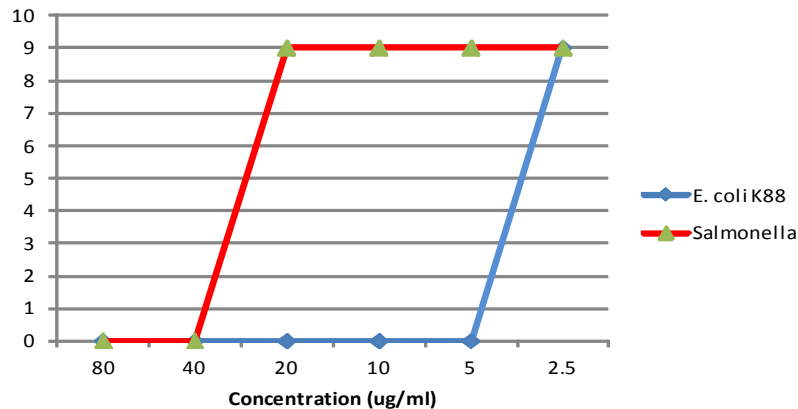


그림 2-68. AMP PG1의 *E. coli* K88 및 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균효과

② 천연물질의 항미생물(항세균) 평가

㉠ 배경 및 목적

- 2차년도에 천연물 소재 개발팀(윤봉식교수)에서 추출하여 공급한 20종의 천연물질의 *E. coli* K88와 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균효과를 평가하기 위하여 실시

㉡ 평가 방법

- 천연물질의 항균효능평가는 20종의 천연물질을 각각 24-well 플레이트에 1,000~62.5µg/ml 농도로 LB broth로 2배 단계 희석한 후 *E. coli* K88와 *Salmonella* Typhimurium을 배양하여 세균수가 200CFU/ml이 되도록 PBS에 희석하여 PG1이 포함된 배지에 각각 접종하였음.
- 이후 37°C에서 16시간 동안 배양한 후 각 배양액 200µl을 LB 플레이트에 도말하여 다시 37°C에서 24시간 동안 배양하였음. 배양 후 배지의 colony 개수를 세고 양성대조군과 비교하여 물질 처리군의 세균 증식의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 판정하였음

㉢ 평가 결과

- 20종의 천연물질 중 CSE-4, LOE-16, PRM-19 등 3종은 1mg/ml의 농도에서 대장균의 증식을 100~50,000배 정도 억제하였으며 CSE-4, CSB-5, CSD-6, PCM-7, PCC-9, PCB-11, PCD-12, LOM-13, LOE-16, LOB-17, PRM-19, CCM-20, PHM-22, CCSM-23 등 14종은 1mg/ml의 농도에서 살모넬라의 증식을 완전히 억제하거나(PHM-22) 100~100,000배 억제하는 것으로 관찰되었음(표 2-30).

표 2-30. 천연물질의 *E. coli* K88 and *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균효과

시료정보	<i>E. coli</i> K88		<i>Salmonella</i>	
	유효농도	CFU/ml	유효농도	CFU/ml
CSM-1	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^8
CSH-2	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^8
CSC-3	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^9
CSE-4	1mg/ml	1×10^7	1mg/ml	1.65×10^2
CSB-5	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	2.15×10^2
CSD-6	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	5.95×10^2
PCM-7	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^7
PCH-8	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^9
PCC-9	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^3
PCE-10	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^9
PCB-11	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	4×10^3
PCD-12	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	7.85×10^2
LOM-13	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1.15×10^2
LPH-14	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^9
LOC-15	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^9
LOE-16	1mg/ml	2×10^2	1mg/ml	1×10^7
LOB-17	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	2.3×10^3
LOD-18	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^8
PRM-19	1mg/ml	1×10^6	1mg/ml	1×10^7
CCM-20	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1.25×10^2
PVM-21	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^8
PHM-22	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	0
CCSM-23	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	2.6×10^2
PHE-24	1mg/ml	1×10^9	1mg/ml	1×10^9

③ 천연물질의 항바이러스 효능평가

㉠ 배경 및 목적

- 2차년도에 천연물 소재 개발팀(윤봉식교수)에서 추출하여 공급한 20종의 천연물질의 인플루엔자 바이러스와 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 평가하기 위하여 실시

㉡ 평가 방법

- PRRS 바이러스에 대한 효능평가는 MARC-145 세포에서 실시하였음. 즉, 천연물질 20종을 각각 1000-62.5 μ g/ml 농도로 PBS를 이용하여 2배 연속 희석하여 준비하고 천연물이 포함된 배지에 1000TCID₅₀/ml로 준비된 VR2332 바이러스액 동량을 혼합한 다음 4°C에서 정확히 1시간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 주었음. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리하였음. 1시간 반응 후, 24-well plate에 준비된 MARC-145 단층세포에 반응이 완료된 혼합액 100 μ l를 접종함. 접종 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 접종액을 제거하고 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 배양배지를 넣고 5일 동안 관찰하였음. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 PBS에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비하였으며, 양성 및 음성대조

균에는 RPMI-1640 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰하였음.

- 돼지인플루엔자 바이러스에 대한 효능평가는 Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 세포에서 실시하였음. 즉, 천연물질 20종을 각각 1000-62.5 μ g/ml 농도로 PBS를 이용하여 2배 연속 희석하여 준비하고 천연물이 포함된 배지에 1000TCID₅₀/ml로 준비된 H1N1 바이러스액 동량을 혼합한 다음 4°C에서 1시간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 주었음. 바이러스 대조군의 경우도 해당 물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리하였음. 1시간 반응 후, 24-well plate에 준비된 MDCK 단층세포에 반응이 완료된 혼합액 100 μ l를 접종하였음. 접종 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, TPCCK-treated 트립신이 포함된 인플루엔자 접종배지로 3회 세척하고 배지를 완전히 제거하였음. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 PBS에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비하였으며, 검사물질 대신 PBS로 희석한 바이러스만 접종한 양성대조군과 PBS만 접종한 음성대조군을 같은 방법으로 준비하였음. 이 후 준비된 인플루엔자 배양배지를 분주하고 5일 동안 관찰하였으며, 양성 및 음성대조군에는 인플루엔자 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰하였음. 천연물 20

㉔ 평가 결과

- 천연물 20종의 PRRS 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 검사한 결과, 유의성 있는 항바이러스 효능은 관찰되지 않았음.
- 천연물 20종의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 검사한 결과, 유의성 있는 항바이러스 효능은 관찰되지 않았음(2차년도 이후 확인).

③ 청국장 유래 물질(PGA)에 대한 목적동물의 효능평가

㉕ 청국장 유래 물질(PGA)의 자돈에 대한 평가

㉖ 배경 및 목적

- 청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* spps. *chungkookjang*은 poly- γ -glutamate (PGA)라고 하는 1000kDa 이상의 고분자 중합체를 생산하는데, 최근 이 중합체는 효과적으로 면역반응을 자극하는 것으로 마우스모델을 사용한 다양한 연구들에 의해 증명이 된바 있음. 따라서 돼지를 이용한 항미생물 효과 및 안전성 평가 기법 구축을 위하여 PGA를 모델로 사용하였고, PGA의 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)에 대한 항바이러스 효과 및 안전성을 돼지를 이용하여 평가하였음.

㉗ 평가 방법

- 돼지를 이용하여 동물실험 평가를 하였으며, 방법은 다음과 같이 세 종류의 동물 실험을 수행하였음.
- 실험 1에서는 돼지에서 심각한 부작용 없이 효과적인 면역반응 자극을 유도할 수 있는 적절한 접종량을 측정하였음. 즉, 12마리의 4주령 돼지를 PRRS 음성 농장에서 구입하여 3마리씩 4그룹으로 나누어 사육하고, 0(no treatment, NT), 1, 3 또는 5ml의 PGA를 근육접종 실시하였음. 모든 돼지는 PGA 접종 후 4주간 관찰하였으며 매주 체중을 측정하고 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)과 혈청을 분리하기 위하여 혈액을 채취하였음. PGA 접종 4주에 모든 돼지는 안락사를

실시하고 부검하여 병리 및 독성검사를 진행하였음.

- 실험 2에서는 돼지에서 북미형 PRRSV(MN184)에 대한 PGA의 항바이러스 효능평가를 실시하였음. 즉, 12 마리의 4주령 돼지를 구입하여 4그룹으로 사육한 뒤 모든 돼지에 $10^3\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 북미형 PRRS 바이러스, MN184, 1ml을 근육접종하여 감염시켰음. 그 후 바이러스 감염 후 0, 3 또는 7 일에 PGA 5ml을 근육접종하여 치료하였으나 한 그룹은 치료하지 않고 방치(challenge control)하였음.
- 실험 3에서는 돼지에서 MN184와 ORF5 기준으로 10% 이상의 유전적 차이를 보이는 북미형 PRRSV(JA142)에 대한 PGA의 항바이러스 효능평가를 실시하였음. 즉, 12 마리의 4주령 돼지를 구입하여 4그룹으로 사육한 뒤 모든 돼지에 $10^3\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 JA142, 1ml을 근육접종하여 감염시켰음. 그 후 바이러스 감염 3일 전(-3) 또는 감염 후 0 또는 3일에 PGA 5ml을 근육접종하여 치료하였으며, 한 그룹은 치료하지 않고 방치(challenge control)하였음. 실험 2와 3의 모든 돼지는 바이러스 감염 후 4주간 관찰하였으며 매주 체중을 측정하고 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)과 혈청을 분리하기 위하여 혈액을 채취하였음.
- 헤파린 처리로 항응고 된 혈액에서 Histopaque-1.077을 이용하여 분리한 PBMC는 $5 \times 10^6\text{cells}/\text{ml}$ 의 농도로 24-well plates에 분주한 뒤 ConA($10\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 자극시켰음. 37°C 에서 24시간 동안 배양한 PBMCs는 원심분리하여 상층액과 세포를 따로 분리하여 수거하였다. 수거한 세포에서 total RNA를 추출하여 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성한 후 SYBG real-time PCR을 이용하여 TNF- α , INF- α , INF- β 등의 염증관련 cytokine과 IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ 등의 후천적 면역 관련 cytokine들의 발현을 정량적으로 분석하였음. 또한 β -actin 유전자의 증폭을 분석하여 검출한 cytokine의 발현을 표준화하였음.

㉔ 평가 결과

- PGA의 적정 접종량을 확인하기 위해 4주령의 자돈들에 PGA를 0, 1, 3, 5ml을 각각 접종하였을 때, PGA를 접종한 돼지들은 control 그룹과 비교하여 70~160g/day 높은 증체율(ADWG)를 보였음(표 2-31).

표 2-31. PRRS-음성 돼지에 대한 PGA 투여에 따른 평균 일당 증체량(ADWG)

시험군	일당증체량(ADWG, kg/day)		
	After 1st dose	After 2nd dose	Total
1ml	0.371 ± 0.103	0.381 ± 0.097	0.465 ± 0.030
3ml	0.405 ± 0.145	0.633 ± 0.186	0.522 ± 0.098
5ml	0.171 ± 0.112	0.590 ± 0.054	0.435 ± 0.035
Control	0.124 ± 0.068	0.514 ± 0.089	0.367 ± 0.021

- PGA를 접종한 돼지들에서는 PGA를 처치한 후 3일과 7일에 분리한 PBMC의 TNF- α , INF- α , INF- β 등의 염증관련 cytokine의 발현이 control 그룹(NT)에 비해 높았으며, 특히 5ml의 PGA를 접종한 그룹은 접종 후 7일에 control 그룹에 비해 4배 이상의 높은 INF- β 발현을 보였음(그림 2-69). 또한 모든 PGA 접종

돼지에서 control 그룹과 비교하여 의미 있는 병리학적, 독성학적 차이를 보이지 않아 PGA 접종에 의한 중요한 부작용은 없는 것으로 관찰되었다. 따라서, PGA의 적정 접종량을 5ml로 결정하였음.

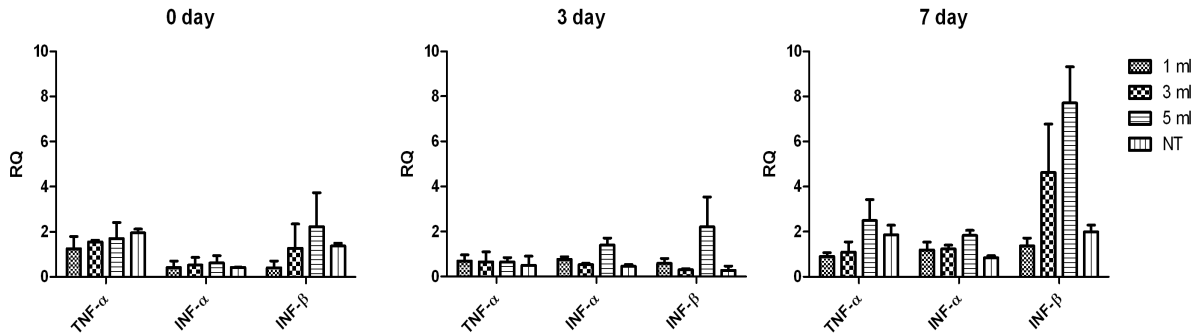


그림 2-69. PGA 접종 돼지의 선천면역(innate immunity) 활성화 효과

- PRRSV에 대한 PGA의 항바이러스 효능을 평가하기 위해 강병원성의 MN184 바이러스주를 접종한 후 0, 3, 7일에 PGA 5ml을 근육접종하고 증체율과 혈중바이러스 농도 등을 평가하였음. PGA를 접종한 그룹은 control 그룹과 비교하여 120~230g/day 높은 증체율을 보였으며 특히 바이러스 감염 후 3일과 7일에 PGA를 처치한 그룹은 200g 이상의 일당 증체율을 보여 통계적으로 유의차가 있었음 (표 2-32).

표 2-32. PGA 접종후 PRRSV (MN184)를 공격접종한 돼지의 평균일당 증체량

Group	Pig No.	Days after challenge					일당증체량 (ADWG)	Group average (<i>p</i> -value)*
		0d	7d	14d	21d	28d		
Challenge Control	1	8	10	11	10	9	0.04	0.12 ± 0.07
	2	9	12	11	12	13	0.14	
	3	8	11	11.5	11	13	0.17	
PGA 7d	4	8	10	8	15	22	0.50	0.35 ± 0.14 (0.034)
	5	6.5	9	9	12	15	0.30	
	6	7	9	10	12	13.5	0.23	
PGA 3d	7	10	11	10	15	22	0.42	0.31 ± 0.15 (0.059)
	8	8	9	13	15.5	18	0.35	
	9	8	10	10	11	12	0.14	
PGA 0d	10	8	12	12	14	19	0.39	0.23 ± 0.14 (0.158)
	11	9	10	12	12	13	0.14	
	12	11	11	13	14	15	0.14	

* Comparison to challenge control

- 또한 바이러스의 혈중 농도를 측정하기 위하여 real-time PCR을 실시하였음. 즉, 혈청에서 MagMax[®]1836(Applied biosystems) 키트를 이용하여 바이러스 RNA를 분리 후 AgPath-ID[™] one-step RT-PCR 키트를 이용하여 real-time PCR를 실시하였음. 반응조건은 a) reverse transcription for 30min at 50°C; b) a 15min activation step at 95°C; 그리고 c) 35 cycles of 15sec at 94°C and 60sec at 60°C 였으며 10배로 단계 희석한 바이러스 양성 대조 샘플과 대조하여 TCID₅₀/ml

로 표시하였다. PGA를 접종한 그룹들은 control 그룹과 비교하여 통계적인 유의차는 없으나 최대 1 로그 정도 낮은 혈중 바이러스 농도를 보였으며 PGA를 접종한 그룹 사이에는 차이가 없었음(그림 2-70).

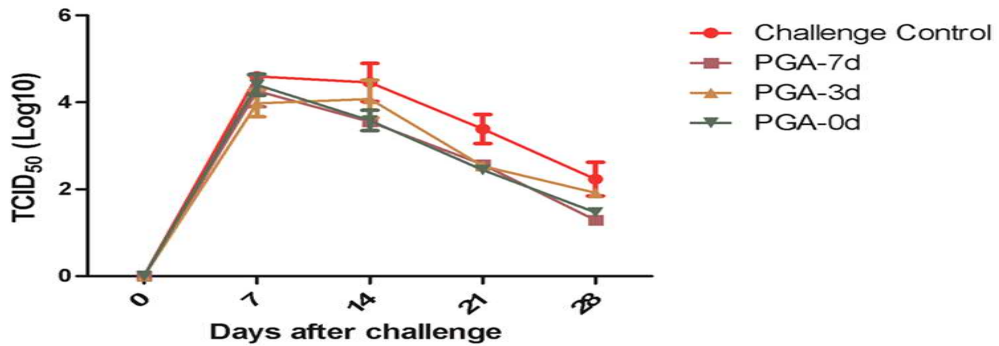


그림 2-70. PGA 투여가 PRRS바이러스 바이러스혈중 수준에 미치는 영향

- 바이러스 접종 후 4주에 채취한 혈청에서 MN184에 대한 중화항체를 측정된 결과, 특히 바이러스 접종 후 7일에 PGA를 접종한 그룹의 중화항체가 평균 4배 정도 증가한 것으로 관찰되어 PGA의 접종이 방어면역 유도를 개선하는 것으로 관찰되었음(그림 2-71).

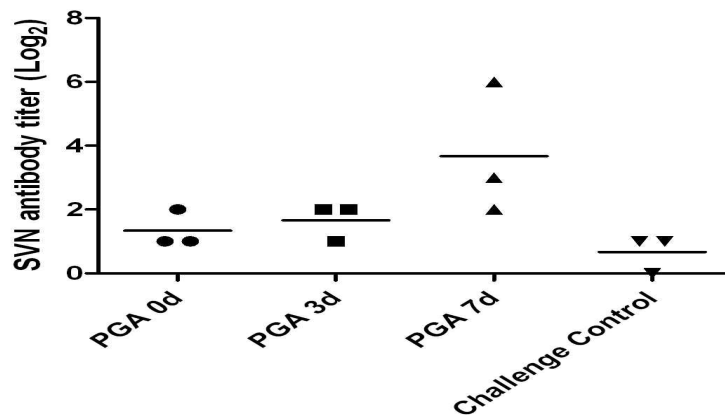


그림 2-71. PGS 투여가 PRRSV에 대한 중화항체가에 미치는 영향

- 북미형 PRRSV, JA184에 대한 PGA의 항바이러스 효과와 안전성을 확인하였음.. 먼저 PRRSV에 대한 PGA의 항바이러스 효능을 평가하기 위해 증병원성의 JA142 바이러스주를 접종 전 3일(-3)과 접종 후 0와 3일에 PGA 5ml을 근육접종 하고 증체율과 혈중바이러스 농도 등을 평가하였음. PGA를 접종한 그룹은 control 그룹과 비교하여 40~70g/day 높은 증체율을 보였으며 특히 바이러스 감염 후 3일과 7일에 PGA를 처치한 그룹은 200g 이상의 일당 증체율을 보여 통계적으로 유의차가 있었음을 확인하였음(표 2-33).
- 바이러스의 혈중 농도를 측정하기 위하여 앞서 설명한 데로 real-time PCR을 실시하였음. PGA를 접종한 그룹들은 control 그룹과 비교하여 통계적인 유의차는 없으나 전체적으로 낮은 혈중 바이러스 농도를 보였으며 PGA를 접종한 그룹 사이에는 차이가 없었다(그림 2-72).

표 2-33. PGA 투여 후 PRRSV (JA142) 공격감염 돼지의 일당증체량(ADWG) 변화

Group	Pig No.	Days after challenge					ADWG	Group average (p-value)*
		0d	7d	14d	21d	28d		
Challenge Control		8	9	13	16	17.5	0.33	0.32 ± 0.09
		7.5	9	12	15	15.5	0.29	
		10	10	13	17	13.5	0.18	
		10	11	15	20	20.5	0.41	
		9.5	9	13	17	19	0.38	
PGA -3d		9	15	11	13	18	0.39	0.38 ± 0.07 (0.154)
		10	11	12	16	20	0.42	
		10	12	13	16	19	0.36	
		10	10	11	16	15	0.27	
		10.5	12	14	17	22	0.45	
PGA 0d		10	11	16	19	22	0.45	0.39 ± 0.06 (0.058)
		9	10.5	12	16.5	20	0.42	
		9.5	10	11	18.5	19	0.39	
		9.5	9	11	14.5	15.8	0.30	
		8	10.5	12	15.5	19	0.41	
PGA 3d		7	8	10	11	15	0.27	0.36 ± 0.08 (0.264)
		7.2	11	12	17	20	0.42	
		10	11	15	18	22	0.39	
		6	9	11	13	16	0.27	
		7	12	15	18	20	0.42	

* Comparison to challenge control

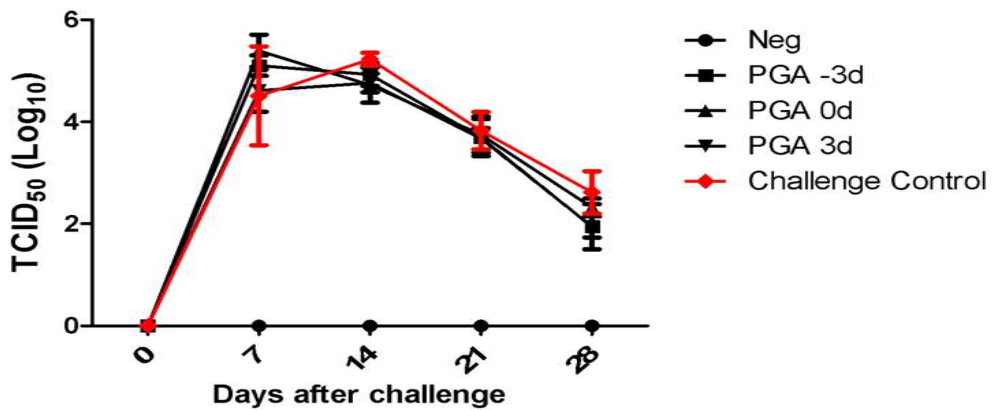


그림 2-72. The levels of viemia (JA142) after PGA inoculation

- 분리한 PBMC는 5×10^6 cells/ml의 농도로 24-well plates에 분주한 뒤 JA142를 0.1m.o.i로 첨가하여 감염시켰음. 37°C에서 24시간 동안 배양한 PBMCs는 원심분리하여 상층액과 세포를 따로 분리하여 수거함. 수거한 세포에서 total RNA를 추

출하여 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성한 후 SYBG real-time PCR 을 이용하여 TNF- α , INF- α , INF- β 등의 염증관련(proinflammation) cytokine, IL-2, IL-12, IFN- γ 등의 type 1 cytokine과 IL-4, IL-6, IL-10 등의 type 2 cytokine의 발현을 앞에서 설명한 것과 같은 방법으로 정량적으로 분석하였음.

- PGA를 접종한 돼지들에서는 PBMC의 TNF- α 와 INF- α 의 염증관련 cytokine의 발현이 control 그룹에 비해 높았으며 IL-2와 IFN- γ 의 세포매개성(type 1) 면역 반응 높았음. 또한 IL-4와 IL-6 같은 체액성(type 2) 면역반응도 통계적으로 유의 차는 없었으나 control 그룹에 비해 높게 발현하였음. 면역반응 조절에 관련된 것으로 알려진 IL-10의 반응은 control 그룹에 비해 전반적으로 낮게 발현되는 것으로 관찰되었음(그림 2-73). 따라서 PGA를 접종한 그룹은 control 그룹과 비교하여 증가된 일당 증체율을 보이고 혈중 바이러스 농도도 전반적으로 낮았으나 강독 바이러스인 MN184를 감염시킨 실험 2의 경우와 비교하여 다소 효과가 떨어지는 것으로 관찰되었음. 이는 강독 바이러스의 피해가 상대적으로 크므로 효과가 증대되는 것으로 생각한다. 바이러스 접종 전후에 PGA를 접종한 경우에도 실험 1과 같이 염증관련 초기 면역반응을 개선하는 것으로 관찰되었으며 세포매개 면역반응과 체액성 면역반응의 전신성 면역반응 또한 개선하는 것으로 판단 됨.

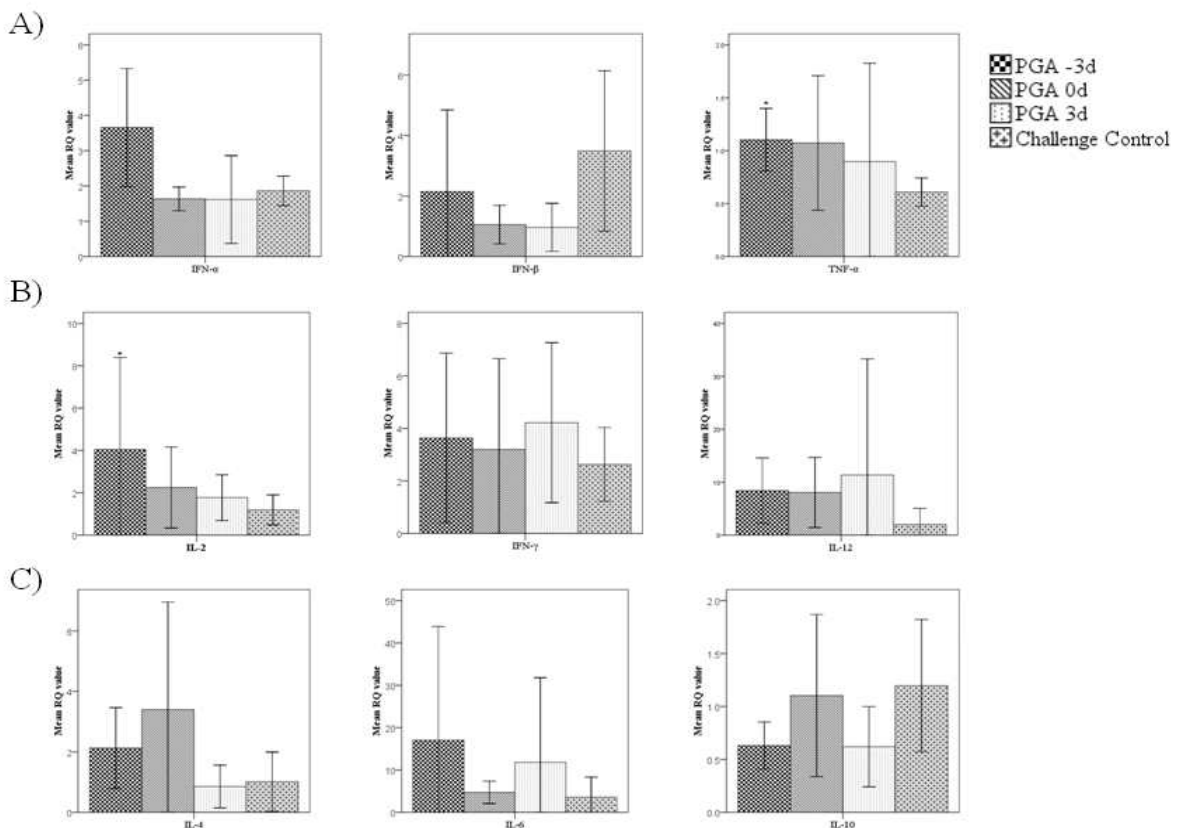


그림 2-73. PRRSV (JA142) 공격접종에 따른 돼지의 Cytokine 반응

A : proinflammatory cytokine responses, B : Type 1 cytokine responses, C : Type 2 cytokine responses

- 바이러스 접종 후 4주에 채취한 혈청에서 JA142에 대한 중화항체를 측정 한 결과, PGA를 접종한 그룹은 control 그룹과 비교하여 높은 중화항체를 유도하는 것

으로 관찰되었으며 특히 바이러스 접종 후 3일에 PGA를 접종한 그룹의 중화항체가 평균 3배 정도 증가한 것으로 관찰되고 통계적으로 유의차가 있었음(그림 2-74).

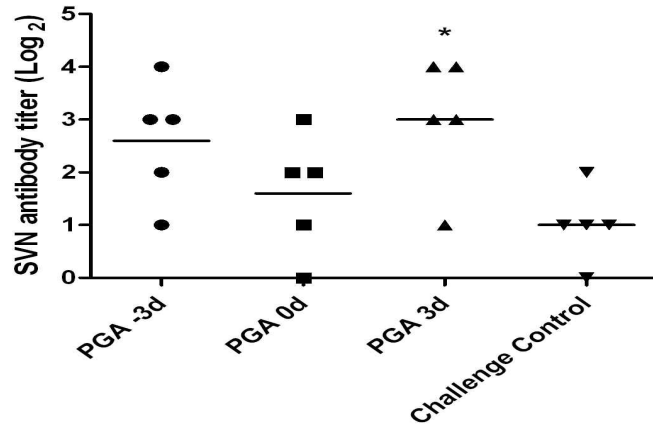


그림 2-74. PGA 처리/비처리 돼지의 PRRSV (JA142) 공격접종에 따른 혈청중화항체가 변화

4. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발 (제2협동)

가. 가축전염병 제어용 최적 항미생물 펩타이드 스크리닝 및 대량 발현시스템의 구축

(미생물 테스트 패널에 대한 평가를 통한 최적 항미생물 펩타이드의 평가 및 선발)

(1) CNBr cleaved PG1과 His-tagging PG1의 activity 비교(그림 2-75)

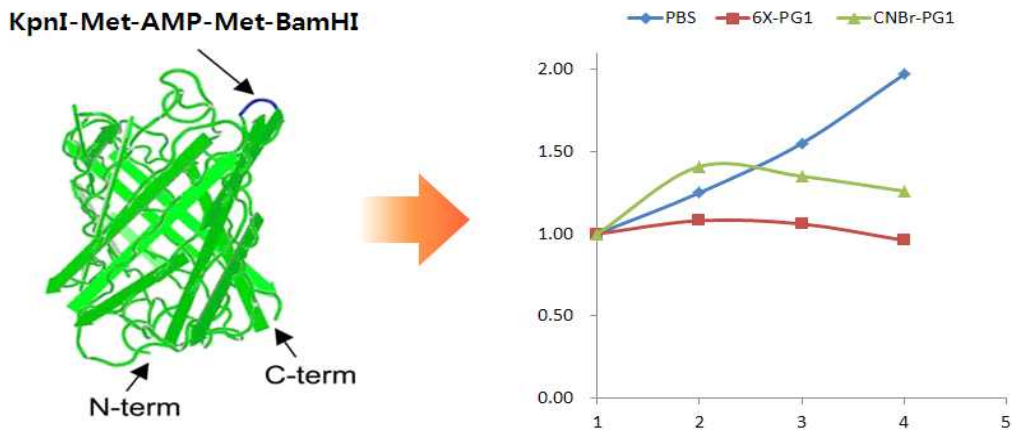


그림 2-75. CNBr cleaved PG1과 His-tagging PG1의 activity 비교

(가) GFP와 fusion시 PG1을 pET30b와 결합하여 도입한 E.coli DH5a를

mid-exponential phase까지 배양한 뒤 배양액을 OD 600값이 0.5가 되도록 100 μ l LB로 희석한 샘플에 음성대조군인 PBS, 합성된 6X-PG1, CNBr cleaved PG1을 첨가한 뒤 OD 600값을 1시간 단위마다 측정함

(나) 음성대조군의 경우 시간이 경과할수록 박테리아가 잘 성장하는 반면, 6XHis-PG1,

CNBr cleaved PG1의 경우 성장이 억제하는 것을 확인함

(2) 정제된 PG1의 spot assay

(가) 실험 방법 (그림 2-76)

- ① 8mg/ml 농도의 PG1을 각각 1/4, 1/8, 1/80, 1/800, 1/8000로 희석하여 박테리아가 성장한 plate에 첨가하여 다양한 균주들에 대한 항균력과 최저 농도를 측정함

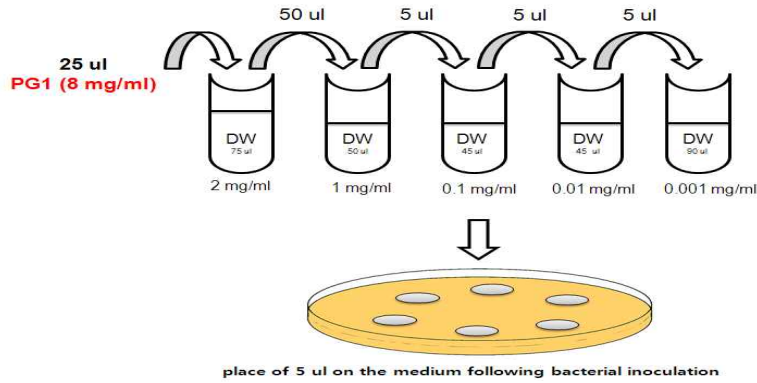


그림 2-76. Serial dilution 기법을 이용한 항균력 테스트

(나) PG1의 항균력 테스트 결과 (그림 2-77)

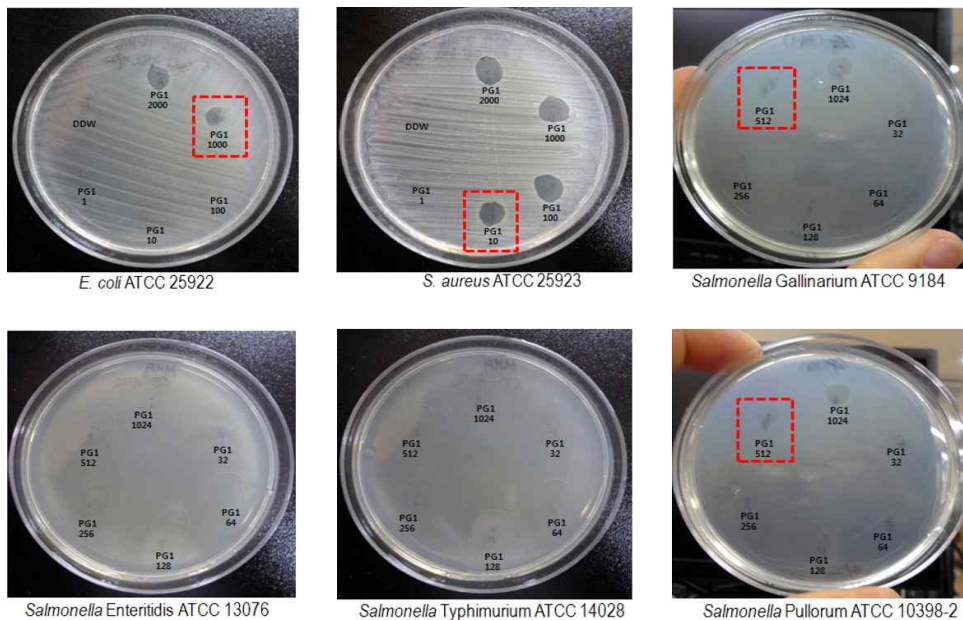


그림 2-77. PG1의 spot assay 결과

- ① Salmonella Typhimurium ATCC 14028과 Salmonella Enteritidis ATCC 13076을 제외한 실험균주들에게서 항균작용을 보였으며, 특히 Staphylococcus aureus ATCC 25923에 대해서 뛰어난 효율성을 나타냄

(3) E.coli에 대한 MIC (Broth microdilution assay) & MBC

(가) 실험 방법 (그림 2-78)

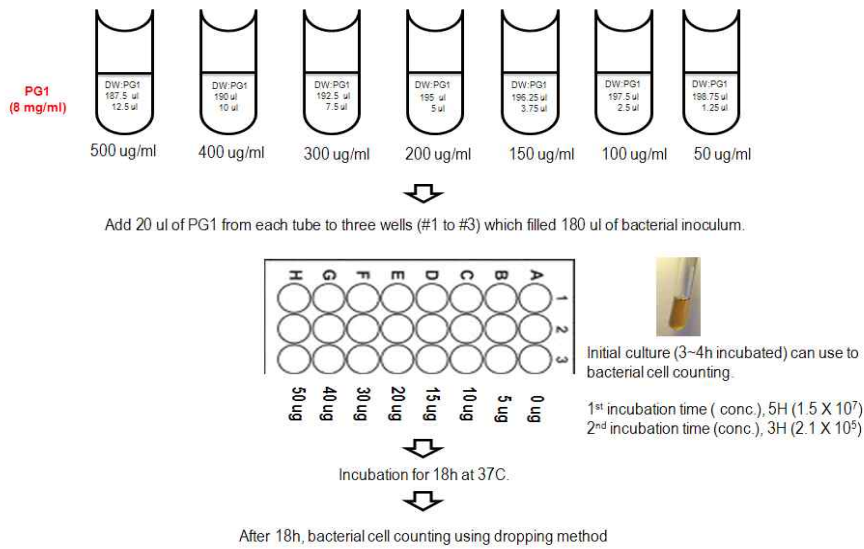


그림 2-78. Broth microdilution assay를 통한 PG1의 항균력 테스트

- ① 배양 초기 각각 3시간(2nd), 5시간(1st) 동안 자란 박테리아 수를 측정 한 다음 그로부터 180 μ l의 배양액을 plate에 넣은 뒤 초기 농도 8mg/ml로부터 각각 500 μ g/ml, 400 μ g/ml, 300 μ g/ml, 200 μ g/ml, 150 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml로 희석한 PG1 20 μ l를 첨가함
 - ② 37 $^{\circ}$ C에 18시간 동안 배양한 뒤 dropping method를 이용하여 박테리아 수를 측정함
- (나) 실험 결과 (그림 2-79, 2-80, 2-81)

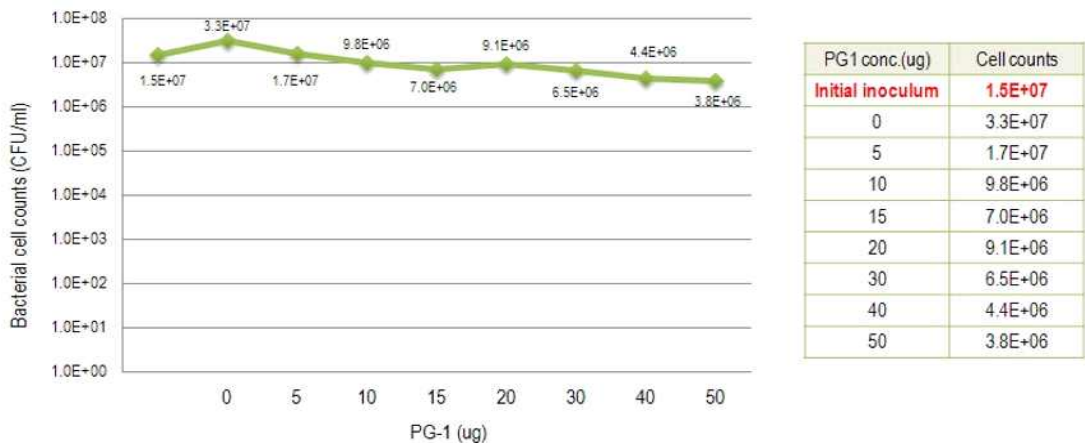


그림 2-79. Staphylococcus aureus ATCC 25923에 대한 PG1의 항균작용 테스트 결과

- ① 5시간 동안 배양된 Staphylococcus aureus ATCC 25923 (표준균주)의 수는 1.5×10^7 으로 37°C, 18시간 배양 후 PG1을 첨가하지 않은 대조군에서의 세포 수는 3.3×10^7 으로 2배 이상 증가함
- ② 각각 PG1의 농도를 증가시켜 첨가한 샘플들을 비교하였을 때 그 수가 서서히 감소함을 확인

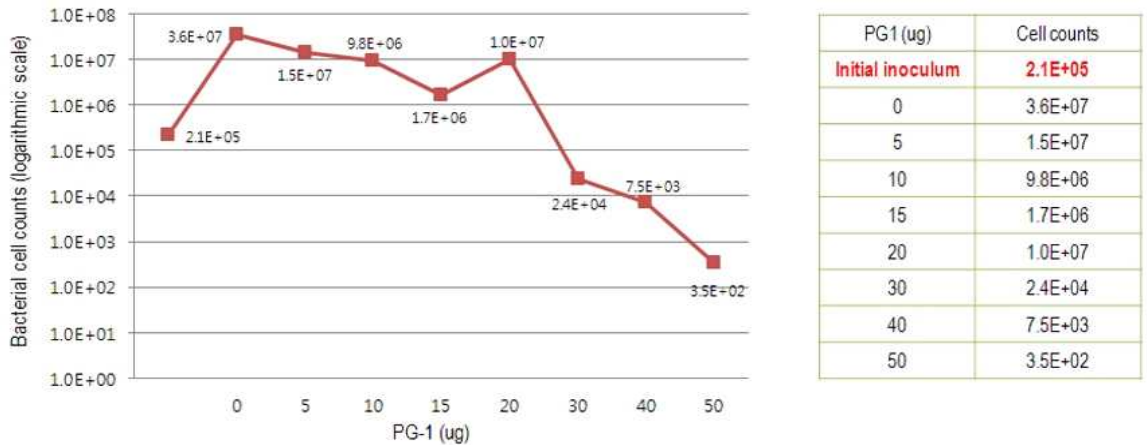


그림 2-80. Staphylococcus aureus ATCC 25923에 대한 PG1의 항균작용 테스트 결과

- ③ 같은 표준균주를 이용하여 3시간 동안 배양시킨 경우 그 수가 2.1×10^5 , 동일 조건으로 배양 시킨 뒤 대조군의 박테리아 수가 3.6×10^7 으로 위 실험의 결과와 유사하게 2배 이상 증가됨을 확인
- ④ 다른 농도의 PG1이 처리된 샘플들의 경우 첨가된 PG1의 농도가 증가됨에 따라 박테리아 수가 급격하게 감소함

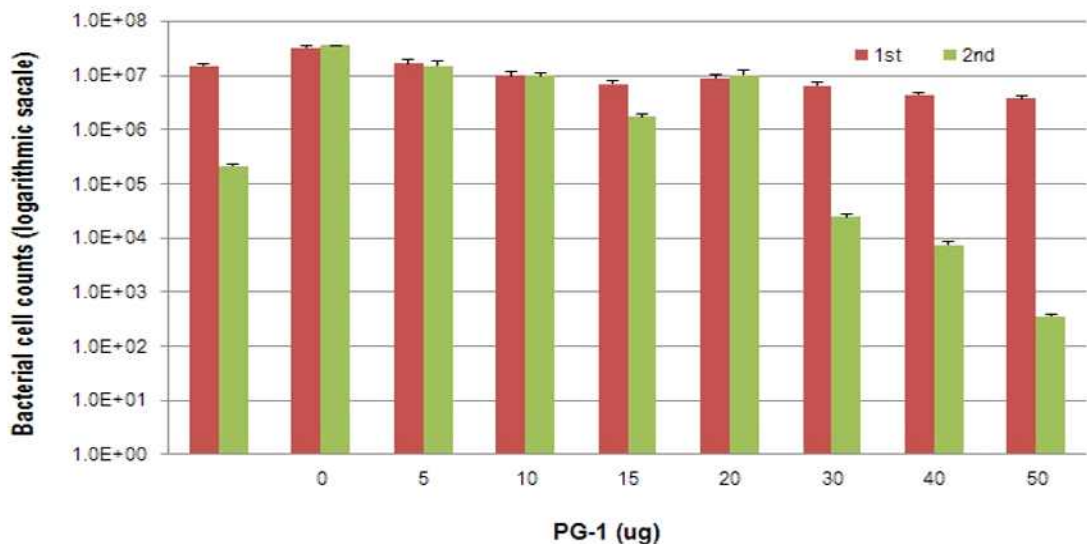


그림 2-81. Initial inoculum (1st & 2nd) 시 농도에 따른 PG1의 항균력 비교

- ⑤ 배양 시간 조건 (3시간, 5시간)을 달리한 두 실험군을 비교 분석 : 5시간 동안 배양된 박테리아에서는 PG1의 농도를 높이더라도 박테리아의 수가 크게 감소하지는 않으나, 3시간 배양의 경우 PG1의 증가되는 농도에 따라 박테리아의 수가 현저히 감소됨
- ⑥ 박테리아 성장 초기에 PG1을 처리할 경우 항균력이 더욱 뛰어난 것을 확인

표 2-34. 다른 실험균주들에 대한 PG1의 민감도 측정 결과

No.	Reference strains tested	Sensitivity (ug) to PG1
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,000
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10
5	<i>Salmonella</i> Gallinarium ATCC 9184	512
6	<i>Salmonella</i> Pullorum ATCC 10398	512
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	Resistant
8	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Resistant

- ⑦ *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028과 *Enteritidis* ATCC 13076 균주들을 제외하고 PG1이 항균작용을 하는 다른 실험균주들의 민감도를 측정
- ⑧ 특히 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain의 경우 PG1에 대한 민감성이 강한 것으로 확인됨 (표 2-34)

나. 항미생물 펩타이드 대량 발현시스템의 최적화

- (1) 최적 항미생물 펩타이드의 선정 및 대량 발현을 위한 클로닝
 - (가) 돼지 조직에서 발현이 확인된 18종의 항미생물 펩타이드 중 항균력이 높은 PG1, PMAP36, PR26를 최적 유전자로 선정, 대량 발현 시스템 구축
 - (나) 대장균을 활용한 일반적 단백질 발현방법을 활용하였을 경우 숙주세포인 대장균자체에 대한 발현된 펩타이드의 bacteriocidal effect에 의한 대량배양이 어려움
 - (다) Bacteriocidal effect를 극복하기 위해 pGEX-4T-1, pET31b(+) 및 효모 발현 시스템을 통해 발현시켰으나 효율성이 낮았으므로 AMP를 insoluble GFP와 결합시켜 박테리아 증식상태에서는 AMP의 불활성화를 유도, 대량생산을 해내는 방법을 통해 pET30b(+) vector에 결합된 불활성 fusion protein의 형태로 정상적인 발현량을 확보함

(라) 3가지 최적 항미생물 펩타이드 중 PG1을 GFP 172-173번 아미노산 사이에 삽입한 뒤 pET30a(+) vector에 결합하여 E.coli BL21으로 형질전환 및 클로닝

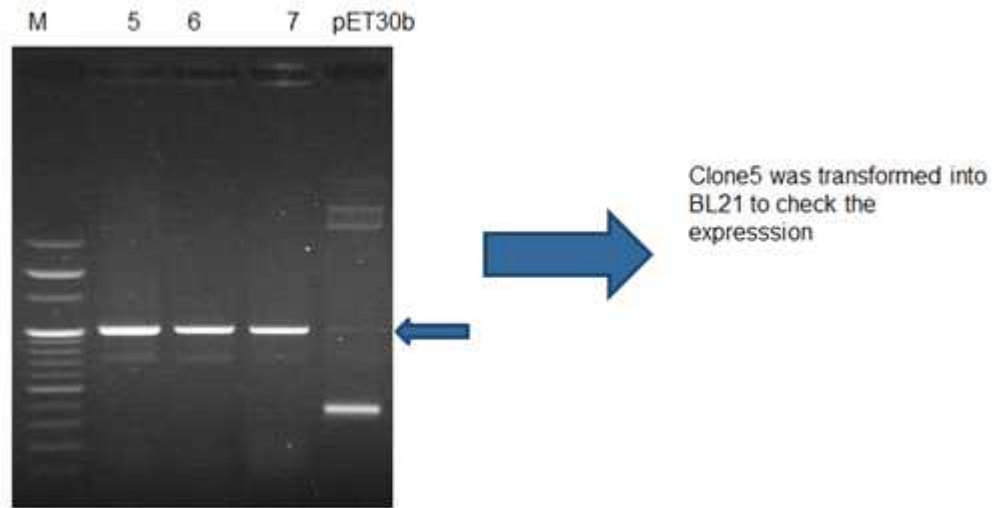
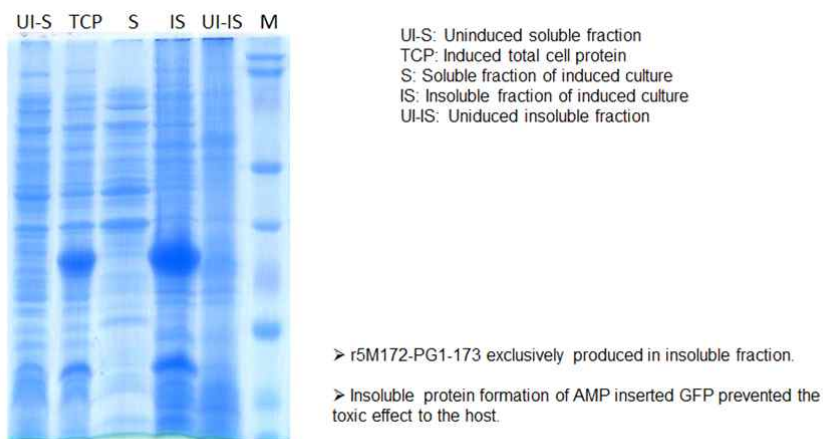


그림 2-82. pET30b(+) 내 r5M172-PG1-173의 insertion 확인을 위한 PCR

(2) 항미생물 펩타이드 대량 발현시스템의 최적화

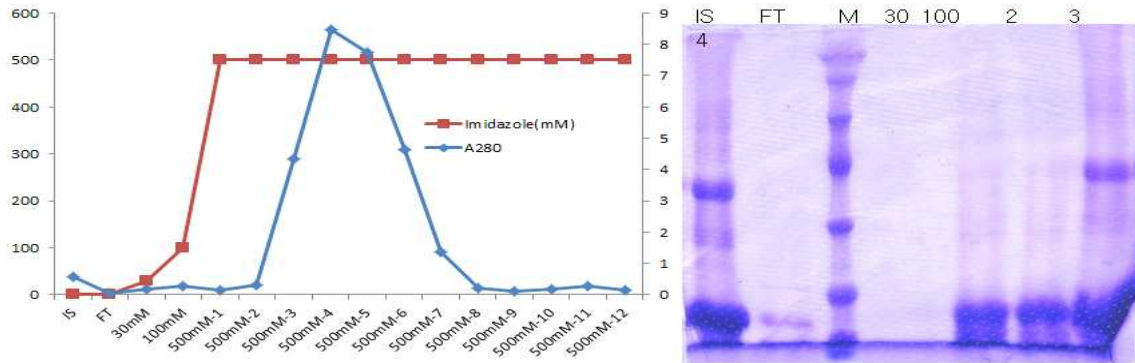
- (가) 3가지 최적 항미생물 펩타이드 중 PG1을 GFP 172-173번 아미노산 사이에 삽입, pET30b(+) vector와 결합시킨 뒤 E.coli BL21으로 형질전환 및 클로닝하여 얻은 클로니를 500µg kanamycin이 첨가된 10ml의 LB medium에 pre-inoculum
- (나) 37°C, 220rpm, 14시간동안 배양된 pre-inoculum을 50mg kanamycin이 첨가된 1ℓ의 LB medium으로 transfer, OD₆₀₀ 값이 0.9~1.0이 될 때까지(보통 2~3시간) 배양한 뒤 0.1mM IPTG와 1mg kenamycin을 첨가하여 37°C, 220rpm, 8시간동안 GFP와 fusion된 PG1의 발현을 유도함
- (다) SDS-PAGE gel을 통해 PG1의 발현량이 매우 뛰어난 것을 확인 (그림 2-83)



> Expression of loop engineered r5M-172-PG1-173

그림 2-83. GFP-r5M loop region에 삽입된 PG1의 발현

(라) 발현된 insoluble fusion PG1이 6개의 히스티딘 아미노산을 가지도록 디자인 하였으므로 이를 이용하여 denaturation Ni-NTA 기법을 이용하여 추출함 (그림 2-84)



Purification of 172PG1173 by denaturation Ni-NTA

그림 2-84. GFP-r5M에 삽입되어 발현된 PG1의 denaturation purification

(마) GFP-PG1으로부터 PG1을 분리해내기 위해 70% formic acid와 cyanogen bromide (CNBr) 1g을 첨가하여 하루 동안 처리한 뒤 lyophilization을 통해 파우더 형태의 PG1을 만들어 reverse phase-high performance liquid chromatography (HPLC) 기법으로 PG1을 정제함



그림 2-85. Ni-NTA 기법을 이용한 정제 후 최종 정제 전까지 수행될 실험과정 설명

다. 돼지유래 이외의 주요 향미생물 펩타이드의 확보 및 효력평가

(1) 후보 유전자 선정 및 확보

표 2-35. 돼지 유래 이외의 항미생물 펩타이드 확보를 위한 스크리닝

AMP	Source	sequence	amino acid	charaterization	existence of Cys	identification of structure	family	others
CD-1	Plant	GADGFCGESCYPICISYLVGCS CDTIEKVCKRN	34	X	O	X		
Glopa A	Plant	GIPCGESCWIPICISAALGCSCK NKVCYRN	30	X	O	X	Glopa A-G	
Glopa A	Plant	GIPCGESCVPICITAAIGCSCKT KVCYRN	30	X	O	X	Glopa A-E	
cycloviololin A	Plant	GVIPCGESCVPICISAAGCSCK NKVCYRN	31	X	O	O	cycloviololin A-D	
psyle A	Plant	GIACGESCFLGCFIPGCSCKSK VCYFN	28	X	O	O	psyle A-E	anti-cancer
varv peptide B	Plant	GLPVCGETCFGGTCNTPGCS CDPWPMCSRN	30	X	O	O	varv A-F	
rugosin A	Frog	GLLNTFKDWABIAKAGAGK GVLTTLSCKLDKSC	33	X	O	X	rugosin B-C	
cycloviolacin O1	Plant	GIPCAESCVPICITVALLGCS NRVCYN	30	X	O	O	cycloviolacin O1-O25	anti-cancer, subclass O2 was characterized. Molluscicidal, nematocidal.
cycloviolacin HI	Plant	GIPCGESCVPICITSAIGCSCK KVCYRN	30	X	O	O		
cycloviolacin TI	Plant	GIPVCGEFCVGGTCNTPGCS CDPWPMCSRN	29	X	O	O		
cycloviolacin Y1	Plant	GGTIFDCGETCFLGTCTYTPGCS CGRNYGFCYGTN	33	X	O	O		Anti-HIV, hemolytic, nematocidal.
vhrl	Plant	CAESCVPICITVALLGCSCK VCYNGIP	30	X	O	O		
vitri A	Plant	GESCVPICITSAIGCSCKSK VCYRNGIPC	30	X	O	O		
tricyclon A	Plant	GGTIFDCGESCFLGTCTYTKGCS CGRWKLCTYGTN	33	X	O	O		hemolytic

(가) 식물과 양서류 등 돼지이외 유래의 아직 그 항균력이 밝혀지지 않은 cyclic AMP

14종을 선발, 그 중 hemolytic function을 가지거나 유사 sequence를 가지는 것들을 제외하여 총 8종의 항미생물 펩타이드를 선정, 그 sequence를 확보함

(나) 그 외에도 이미 그 항균활성도가 매우 뛰어난 것으로 밝혀진 원숭이 유래의 RTD-1과 갑각류 유래의 Tarchypleisin을 추가로 선정함

표 2-36. 최종 선정된 8종의 항미생물 펩타이드

AMP	Source	sequence	amino acid	charaterization	existence of Cys	identification of structure	family	others
CD-1	Plant	GADGFCGESCYPICISYLV GCSCDTIEKVCKRN	34	X	O	X		
Glopa A	Plant	GIPCGESCWIPICISAALGC SCKNKVCYRN	30	X	O	X	Glopa A-G	
cycloviololin A	Plant	GVIPCGESCVPICISAAGC SCKNKVCYRN	31	X	O	O	cycloviololin A-D	
psyle A	Plant	GIACGESCFLGCFIPGCS CKSKVCYFN	28	X	O	O	psyle A-E	anti-cancer
varv peptide B	Plant	GLPVCGETCFGGTCNTPG CSCDPWPMCSRN	30	X	O	O	varv A-F	
rugosin A	Frog	GLLNTFKDWABIAKAGAG KGVLTLSCKLDKSC	33	X	O	X	rugosin B-C	
vhrl	Plant	CAESCVPICITVALLGCS CKSKVCYNGIP	30	X	O	O		
vitri A	Plant	GESCVPICITSAIGCSCK SKVCYRNGIPC	30	X	O	O		

(2) 효력 평가를 위한 클로닝 및 대량 발현 시스템 구축

(가) 2 종류의 intein을 template로 시작하여 클로닝을 위한 효소 인식 부위, stop codon, 크로마토그래피를 위한 히스티딘 등을 첨가하기 위해 PCR 기법을 이용한 발현 모델을 개발

- (나) E.coli를 이용하여 대량 발현을 위해 bactericidal effect를 극복하고 발현 후 cyclic 형태로 만들기 위한 방안으로 2 종류의 intein 사이에 항미생물 펩타이드를 삽입하여 발현 시킨 뒤 pH와 화학적 처리를 통해 펩타이드를 분리한 뒤 cyclic 형태로 만드는 아이디어를 적용함

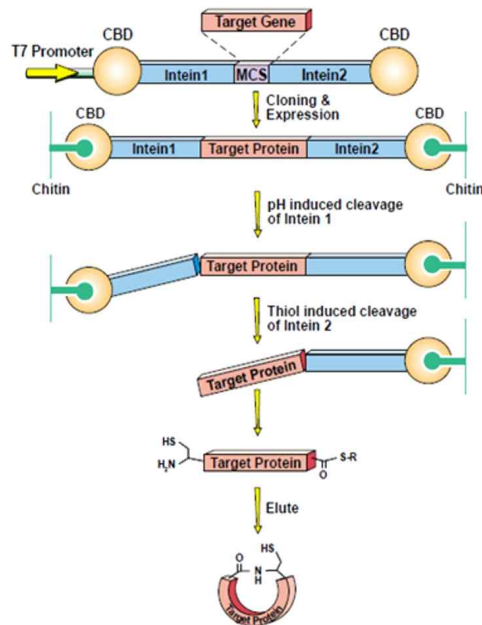


그림 2-86. Cyclic 항미생물 펩타이드 생산을 위해 적용한 아이디어

다. 2차년도 연구결과 요약 및 평가

(1) 항미생물 펩타이드 대량발현 시스템의 개발 및 최적화

- (가) 대장균을 활용한 일반적 단백질 발현방법을 활용하였을 경우 발생하는 bacteriocidal effect에 의한 대량 배양의 문제점을 극복하기 위해 효모 및 다양한 발현 시스템을 이용하고자 했으나 효율성이 낮아 insoluble GFP와 pET 30b(+)-결합시켜 박테리아 증식상태에서 AMP를 불활성시키는 방법을 적용함으로써 대량생산 시스템을 구축
- (나) 최적 항미생물 펩타이드 중 하나인 PG1을 클로닝한 뒤 발현 시스템을 최적화 시켜 GFP-PG1 fusion protein의 발현 효율을 극대화함
- (다) Denaturation Ni-NTA, FPLC, RP-HPLC 등 다양한 기법을 통해 GFP-PG1 fusion protein으로부터 PG1을 분리, 정제하는 시스템을 구축

(2) 미생물 테스트 패널에 대한 평가를 통한 최적 항미생물 펩타이드의 평가 및 선발

- (가) 여러 가지 테스트 기법을 통해 다양한 미생물들에 대한 PG1의 평균 활성도를 측정, 실제 Salmonella Typhimurium ATCC 14028과 Salmonella Enteritidis ATCC 13076을 제외한 실험균주들에게서 평균작용을 보였으며, 특히 Staphylococcus aureus ATCC 25923에 대해서 뛰어난 효율성을 나타냄
- (나) 미생물을 성장 정도를 달리한 조건을 이용하여 PG1의 항균력을 확인, 특히 배양

초기 단계에서 그 효율이 매우 뛰어난 것이 확인됨

(3) 돼지유래 이외의 주요 항미생물 펩타이드의 확보 및 효력평가

(가) 식물과 양서류 등 돼지이외 유래의 아직 그 항균력이 밝혀지지 않은 cyclic AMP 14종 중 8종과 이미 항균활성도가 매우 뛰어난 것으로 밝혀진 원숭이 유래의 RTD-1과 갑각류 유래의 Tarchypleisin이 추가된 총 10종의 cyclic peptide를 선정

(나) E.coli를 이용한 대량 발현을 위해 bactericidal effect를 극복하고 발현 후 cyclic 형태로 만들기 위한 방안으로 PCR 기법을 이용하여 클로닝을 위한 효소 인식 부위, stop codon, 크로마토그래피를 위한 히스티딘 등이 첨가된 항미생물 펩타이드를 2 종류의 intein 사이에 삽입하여 발현 시킨 뒤 pH와 화학적 처리를 통해 펩타이드를 분리한 뒤 cyclic 형태로 만드는 아이디어를 이용, 클로닝 실시

(4) 2차년도 연구결과 평가

(1) 2차년도에 계획된 연구내용들을 계획대로 수행하였으며 in vitro에서 항미생물펩타이드 생산기술의 개발을 완료하였음

5. 가축전염병 유발 관련 세균 및 바이러스의 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머의 제작, 선별 및 확보 (제3협동)

가. 기 확보한 가축전염병 유발 관련 세균 병원성 관련 단백질인 *PrfA* 및 *IpaH*에 특이적으로 결합하는 앵타머의 개발 및 특이성 평가를 통한 최적 앵타머의 선정

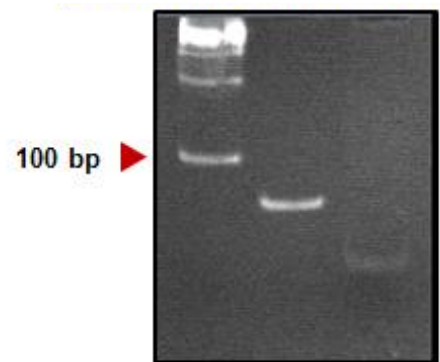
(1) 가축전염성 유발 관련 목적 단백질인 *PrfA* 및 *IpaH*에 특이적으로 결합하는 앵타머 개발을 위한 SELEX 수행

(가) 앵타머 제작을 위한 library 합성 및 SELEX round를 진행하기 위한 증폭 조건 확립

① 1차년도 연구를 통해 확보한 *PrfA* 단백질 및 *IpaH* 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 확보를 위하여 먼저 앵타머의 초기 Library를 제작

② 앵타머의 기본 구성은 앵타머폴의 증폭을 위한 양쪽 말단의 primer 자리를 18nt씩 첨가하였고 중간의 40nt의 random 서열을 포함하도록 설계하였음

③ 또한 앵타머 폴의 증폭을 위한 PCR 및 single strand로의 제작 조건을 확인하였음. 앵타머 폴을 증폭시 5' primer에 biotin을 modification 하였으며, 이를 이용하여 PCR 및 PCR purification을 수행한 후, 증폭된 앵타머 폴을 streptavidin agarose resin에 결합시켜 streptavidin-biotin 결합을 이용하여 biotin이 결합된 앵타머가 제거되어 단일 가닥의 앵타머를 회수함으로써 앵타머를 제작하였음(그림 2-87).



M : DNA size marker
1 : dsDNA (PCR 산물)
2 : ssDNA

그림 2-87. 앵타머 증폭 확인

(나) 가축전염성 유발 관련 목적 단백질에 결합하는 앵타머 제작을 위한 SELEX 조건

확립

- ① 기 확보한 *PrfA* 단백질 및 *IpaH* 단백질의 SELEX 수행을 위한 affinity column으로의 고정
 - ㉠ 가축에서 리스테리아증을 유발하는 *L. monocytogenes*의 병원성 조절 단백질인 *PrfA*와 쉬겔라증을 유발하는 *S. sonnei*의 병원성 관련 단백질인 *IpaH*의 fusion tagging system을 통하여 Ni-NTA resin 및 glutathione agarose beads에 목적 단백질을 affinity column에 고정함.
- ② *PrfA* 단백질 및 *IpaH* 단백질 특이결합 앵타머 제작을 위한 SELEX 조건 확립
 - ㉠ 단백질 고정된 column과 앵타머 결합조건 (반응시간, 온도, buffer 조성 등), 고정된 단백질에 결합된 앵타머의 회수조건을 고려하여 SELEX 조건을 확립하였음.
 - ㉡ 조건이 확립된 방법을 토대로, affinity column에 고정된 목적 단백질에 앵타머 풀을 처리하여 반응을 유도하고, 이후 목적 단백질에 고정된 앵타머만을 특이적으로 선별하여, 증폭시키는 과정을 반복적으로 수행하는 SELEX 과정을 실시함.
 - ㉢ 각 과정에서 회수되는 DNA 앵타머풀은 PCI 및 EtOH precipitation 방법을 이용하여 정제하였으며, 각 round 후에 확보된 앵타머는 다시 PCR 기법을 통해 증폭하여 다음 SELEX round에 사용하였음.
- (다) 가축 전염성 관련 각 단백질 (*IpaH*, *PrfA*)에 결합하는 최적 앵타머 SELEX round의 선별 및 앵타머 후보군들의 서열 정보 확보
 - ① 조건 확립한 SELEX 기법을 이용하여 각각 *PrfA* 단백질 및 *IpaH* 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머 제작 및 최적 round 선별

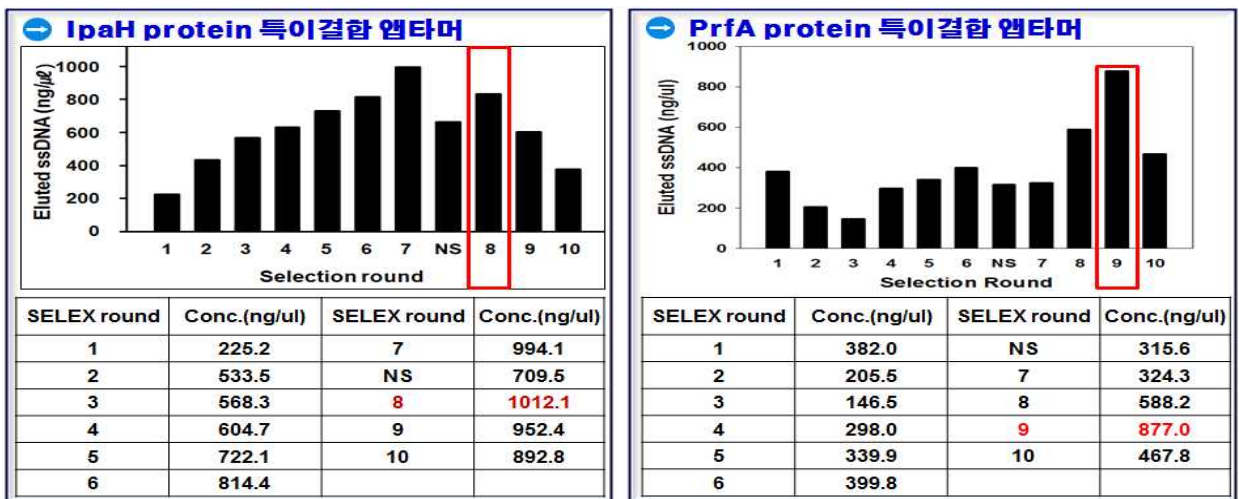


그림 2-88. 가축전염병유발 질환 관련 목적 단백질(*IpaH*, *PrfA*)에 특이적으로 결합하는 앵타머 선별을 위한 SELEX round 후 회수 결과

- ㉠ 각각의 단백질(*IpaH*, *PrfA*)에 특이적으로 결합하는 앵타머의 확보를 위하여 *PrfA* 및 *IpaH*의 tagging system을 이용하여 affinity column에 고정된 단백질에 앵타머 풀을 반응을 유도하여 단백질-앵타머 간의 결합을 통해 최적의 결합력을 보이는 앵타머를 개발하기 위한 SELEX를 수행하였으며, 반복적으로 수행한 각 라운

드에서 각 단백질과 결합 후 회수되는 앵타머의 농도는 Nanodrop spectrophotometer (Thermo, USA)를 이용하여 측정하였음 (그림 2-88).

㉞ 또한 목적 단백질이 고정되어있지 않은 affinity column에 결합하는 등의 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 단백질이 고정되지 않은 affinity column에 앵타머 풀을 결합시켜 결합하는 앵타머를 제거하는 negative selection을 수행하였음. 본 실험 과정을 통해서 보다 목적 단백질에 특이적인 앵타머를 선별하는데 효과적일 것으로 예상함.

㉞ SELEX round의 앵타머가 회수된 농도를 측정 결과 *IpaH* 단백질 결합 앵타머 풀의 경우, 비특이적인 결합이 제거되는 negative selection 이후 8 round에서 가장 회수되는 농도가 높았으며, *PrfA* 단백질 결합 앵타머는 negative selection 이후 9 round에서 가장 높은 회수율을 보이는 것을 확인함. 따라서 *IpaH* 단백질 결합 앵타머는 8 round를, *PrfA* 단백질 결합 앵타머는 9 round를 최종 SELEX round로 선정하였음. 그에 따른 농도 값은 그림 2-88 아래 표에 표기하였음.

② 선정된 SELEX round의 앵타머 서열 확보를 위한 T-vector cloning 및 sequence 분석을 통한 *PrfA* 단백질 및 *IPaH* 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머 확보

㉞ 선정된 최종 SELEX round의 앵타머 풀은 각각 t-vector에 cloning을 수행하여 최종 앵타머 clone을 확보하였음. 확보된 앵타머 clone 중 무작위로 선정하여 colony PCR을 통해 제대로 앵타머가 형성되었는지 전기영동을 통해 형성된 앵타머 크기 (bp)의 확인 후, 각각의 clone을 서열 분석을 의뢰하였음.

㉞ 확보한 앵타머 서열은 Cluster X 프로그램을 이용하여 중복된 앵타머 서열이 있는지 확인 후 제거하였음. *IpaH* 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머의 경우 총 35개의 앵타머 clone 중 중복 서열을 제외하고 최종 19개의 *IpaH* 특이결합 앵타머를 확보할 수 있었으며, *PrfA* 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머의 경우 총 30개의 앵타머 clone 중 중복서열을 제외하고 최종 13개의 *PrfA* 특이결합 앵타머를 확보할 수 있었음.

(2) Surface plasmon resonance (SPR) 분석을 통한 목적 단백질 (*IpaH*, *PrfA*) 결합 앵타머의 표적과의 결합력 평가 및 최적 앵타머 선정 및 최종 확보

(가) 앵타머 및 각각의 목적 단백질 (*IpaH*, *PrfA*)간의 결합력 정량적으로 평가하기 위한 SPR 기반의 sensor chip 제작

① 선별, 확보한 각각의 목적단백질 (*IpaH*, *PrfA*)과 앵타머간의 결합력을 정량적으로 평가하기 위하여 각 단백질이 고정된 chip을 제작

㉞ Biacore사에서 제공하는 CM5 chip을 이용하여 각 목적 단백질을 고정하고자 하였음. CM5 chip은 표면에 반응기인 카르복실 그룹을 가지고 있으므로, 여기에 EDC/NHS를 처리하여 단백질을 고정할 수 있었음(그림 2-89).

㉞ 그림 2-89와 같이 목적 단백질인 *IpaH* 및 *PrfA* 단백질을 CM5 chip 표면에 고정하였으며, 이후 반응할 수 있는 잔기를 제거하기 위하여 Ethanolamine을 이용하여 잔여된 active site를 모두 blocking 하였음.

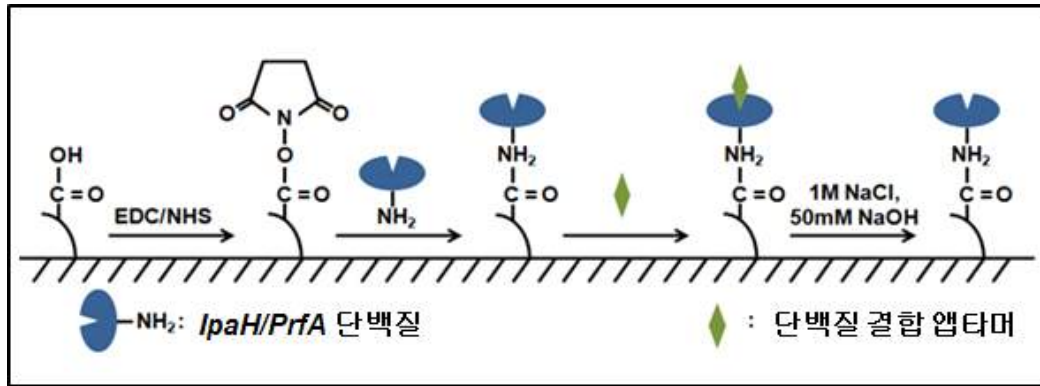


그림 2-89. SPR을 통한 앵타머의 친화도 평가를 위한 CM5 chip 도식

(나) 기 확보한 각 목적 단백질 특이결합 앵타머의 SPR 기반 결합력의 정량적 평가를 통한 최적 결합력을 보이는 *IpaH* 및 *PrfA* 특이결합 앵타머 선정

- ① 각 목적 단백질이 고정된 chip에 기 확보한 각 목적 단백질 특이 결합 앵타머 후보군의 결합을 유도하여 결합력을 비교함으로써 최적 앵타머 선정
- ② *IpaH* 및 *PrfA* 단백질이 고정된 각각의 CM5 chip에 각각의 목적 단백질 특이결합 앵타머 후보군을 순차적으로 반응시켰음. 고정된 앵타머를 제거하기 위해서는 1M NaCl과 50mM NaOH 시약을 처리하여 제거하였으며, 이 과정 후 앵타머를 고정시키는 과정을 반복적으로 수행하여 결합력을 평가하였음.
- ③ 수행 결과 *IpaH* 단백질 특이결합 앵타머 후보군 19종 중 *IpaH*-3, *IpaH*-7, *IpaH*-8, *IpaH*-17 4종이 타 앵타머 후보군에 비해 *IpaH* 단백질과의 결합력이 높은 것으로 평가되었으며 (그림 2-90), *PrfA* 단백질 특이결합 앵타머 후보군 13종 중 LMPA7, LMPA9, LMPA12 의 앵타머가 타 앵타머 후보군에 비해 *PrfA* 단백질과 민감한 결합력을 가지는 것으로 평가되었음 (그림 2-91).

Name	K_d (nM)	Name	K_d (nM)
<i>IpaH</i> -1	112.2000 ± 7.4138	<i>IpaH</i> -11	0.2180 ± 0.019
<i>IpaH</i> -2	0.1874 ± 0.0131	<i>IpaH</i> -12	0.2420 ± 0.018
<i>IpaH</i> -3	0.0047 ± 0.0002	<i>IpaH</i> -13	0.0449 ± 0.035
<i>IpaH</i> -4	0.0206 ± 0.0013	<i>IpaH</i> -14	289.0 ± 9.8520
<i>IpaH</i> -5	0.0368 ± 0.0032	<i>IpaH</i> -15	0.0338 ± 0.0014
<i>IpaH</i> -6	0.0700 ± 0.0085	<i>IpaH</i> -16	0.0078 ± 0.0007
<i>IpaH</i> -7	0.0056 ± 0.003	<i>IpaH</i> -17	0.0028 ± 0.0002
<i>IpaH</i> -8	0.0032 ± 0.004	<i>IpaH</i> -18	0.0291 ± 0.0023
<i>IpaH</i> -9	0.0224 ± 0.0012	<i>IpaH</i> -19	0.0284 ± 0.0036
<i>IpaH</i> -10	0.1640 ± 0.027		

그림 2-90. *IpaH* 단백질 특이결합 앵타머 후보군의 친화력 평가 결과

Name	K_d (pM)	Name	K_d (pM)
LMPA1	53.4 ± 13.6	LMPA8	38.2 ± 12.4
LMPA2	35.8 ± 12.2	LMPA9	2.94 ± 0.22
LMPA3	58.7 ± 19.8	LMPA10	53.7 ± 15.1
LMPA4	60.6 ± 5.8	LMPA11	52.0 ± 21.5
LMPA5	11.4 ± 2.3	LMPA12	4.25 ± 0.16
LMPA6	144 ± 38.5	LMPA13	63.3 ± 9.2
LMPA7	4.81 ± 0.71		

그림 2-91. *PrfA* 단백질 특이결합 앵타머 후보군의 친화력 평가 결과

나. 가축전염병 유발 관련 세균 (*Shingella* spp. *Vibrio* spp.)의 생균 표면에 특이적으로 결합하는 앵타머의 개발 및 특이성 평가를 통한 최적 앵타머의 선정

- (1) 가축전염성 유발 관련 세균 (*Vibrio* spp., *Shigella* spp. 등) 결합 앵타머 개발을 위한 Whole cell-SELEX 수행

(가) Whole-cell SELEX 수행을 위한 앵타머 증폭 조건 및 반응 조건 확립

- ㉠ 가축전염병 관련 병원성 미생물인 *Shigella sonnei* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 특이적 앵타머 제작을 위한 앵타머 풀 제작
- ㉡ 앵타머 풀은 5'과 3' 말단에 18nt의 프라이머 결합을 위한 자리 및 40nt의 random sequence를 보유하고 있는 총 76nt의 pool로 PCR을 이용하여 증폭시 각기 다른 앵타머 풀이 10^{16} 개 정도 생성되도록 제작하였음
- ㉢ 증폭한 앵타머 풀은 PCR purification을 통해 정제 후, streptavidin resin에 결합을 유도하여 3'에 biotin을 보유하고 있는 PCR product가 ssDNA로 회수되는 원리를 통해 ssDNA 앵타머를 확보하였음(그림 2-92, lane 2). ssDNA 확보 결과를 확인하기 위하여 아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동을 통해 결과를 확인하였음. 확인 결과 PCR로 증폭한 double strand DNA와는 size에서 확실히 구분되는 single strand의 앵타머가 제작됨을 확인함.

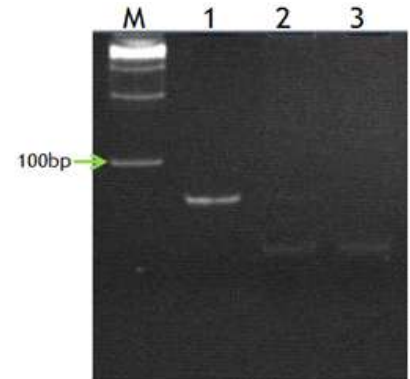


그림 2-92. 앵타머 증폭 확인
(1:dsDNA, 2&3:ssDNA)

(나) 가축전염성 유발하는 병원성 세균의 표면에 직접 결합하는 앵타머 제작을 위한 whole-cell SELEX 조건 확립

- ㉠ *Shigella sonnei* 및 *Vibrio parahaemolyticus*의 표면에 특이적으로 결합하는 앵타머 제작을 위한 앵타머 반응 조건
- ㉡ 1 차년도에 확보된 각 병원성 미생물 및 각 미생물의 배양 조건을 토대로 *Shigella* 및 *Vibrio*를 Nutrient broth, 37°C에서 15시간 배양하여 cell을 확보하였음. 또한 확보된 bacterial cell과 특이적으로 결합하는 앵타머를 개발하기 위하여, 앵타머와 결합하기 전에 배양 요소 및 부산물을 제거하여 bacterial cell membrane에 앵타머가 결합하기 위한 최적화를 위하여 Tris Based Saline (TBS) solution 500 μ l를 이용하여 bacteria cell을 washing 함.
- ㉢ SELEX의 각 라운드마다 생균을 확보하기 위하여 새로 배양하여 *S. sonnei*를 확보하였으며, 앵타머와 결합 직전에 TBS로 washing하였음. 또한 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*의 배양 조건에 맞추어 앵타머를 결합시키기 위하여, 확보한 앵타머를 Nutrient broth에 녹여 3차원 구조를 형성 하도록 유도하였음. 각 과정은 그림 2-93에 간략한 모식도로 나타냄.
- ㉣ 그림 10에서 보듯이, ssDNA로 확보된 앵타머는 3차원 구조 형성을 유도한 뒤, 각각 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*과 각각 결합을 시켰고, 한 시간 동안 교반기에서 반응하였음 반응 후, 각각의 세균과 결합하지 않은 앵타머를 제거하기 위하여 무게의 차이를 이용하여 centrifugation 및 washing을 통해 각각의 세균에 결합되지 않은 앵타머는 제거하고, *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*와 결합된 앵타머는 Tris-EDTA (TE) buffer를 넣고 85도에서 5min과 반응하여 회수하였음.

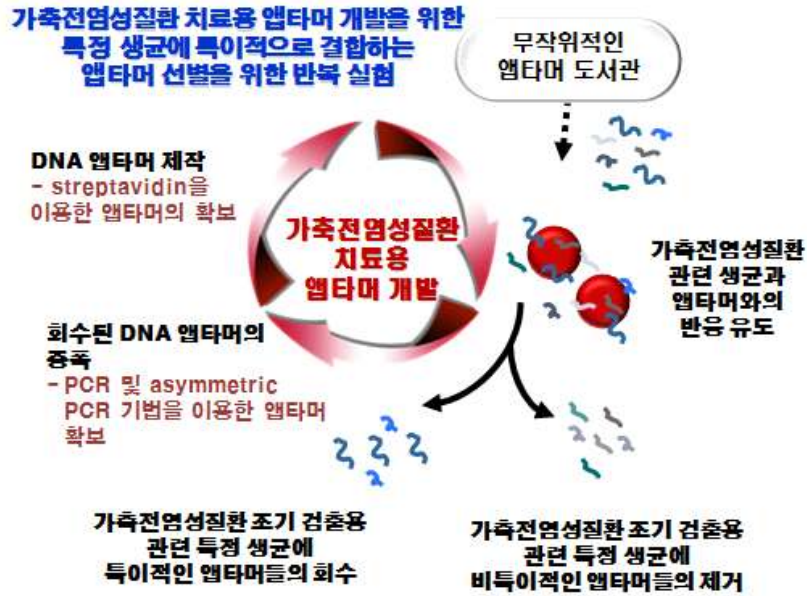
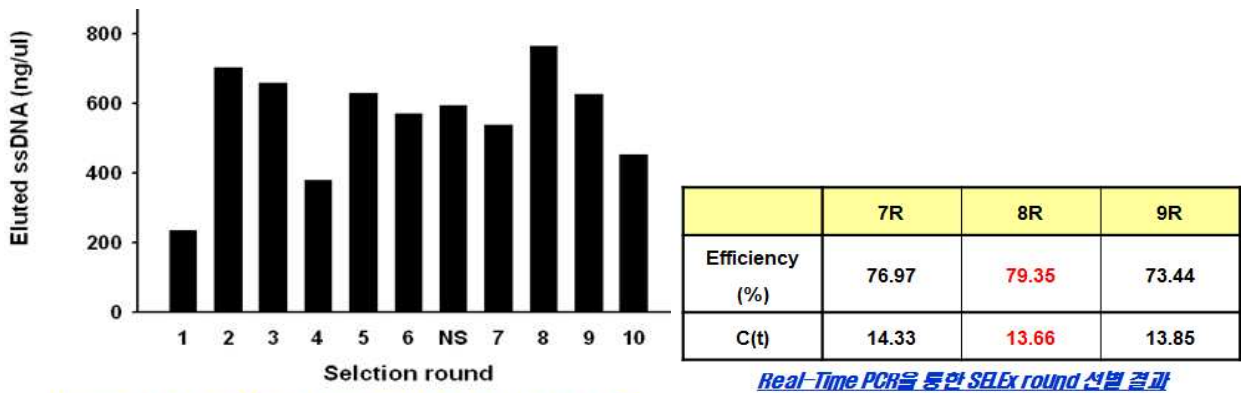


그림 2-93. 병원성미생물 치료용 앵타머의 제작을 위한 Whole-cell SELEX 과정

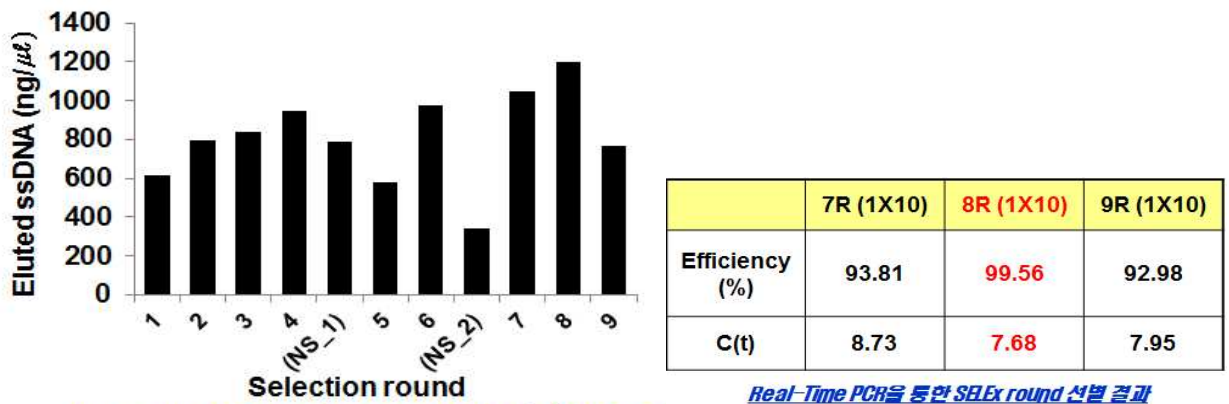
- ㉠ 회수된 앵타머 풀은 PCI 및 EtOH precipitation 과정을 통해 정제하고, 다시 PCR 을 이용하여 증폭하는 과정을 반복적으로 수행함으로써 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*에 특이적인 앵타머를 제작하였음. 본 실험법은 Anal Chem. 2008(80;20):7812-9에 게재된 방법을 modification 하여 수행됨.
- (다) 가속 전염성을 유발하는 각 병원성 미생물에 결합하는 최적 앵타머 SELEX round 의 선별 및 앵타머 후보군들의 서열 정보 확보
 - ① Whole-cell SELEX 과정의 수행을 통해 각각 *Shigella sonnei* 및 *Vibrio parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머 제작 및 최적 round 선별
 - ㉠ 각각의 병원성 미생물에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제작하기 위하여 Whole-cell SELEX를 수행하였으며, 각 라운드에서 각 단백질과 결합 후 회수되는 앵타머의 농도를 Nanodrop spectrophotometer를 이용하여 측정하고, Real-time PCR을 이용하여 최적 라운드를 선정하고자 하였음.
 - ㉡ 또한 선정한 병원성 미생물 외 다른 병원성 미생물에 결합하는 것을 방지하기 위하여 SELEX 중간에 다른 미생물과 결합을 유도하는 counter-SELEX 과정을 수행하였음. 본 과정에서는 대표적인 병원성 미생물 *E. coli*를 이용하였으며, *E. coli*의 경우 특히, *Vibrio parahaemolyticus* 및 *Shigella sonnei*와 동일하게 결합하는 특징을 가지고 있으며, 특히 *Shigella sonnei*와는 매우 유사한 성질을 지니고 있어서 이를 이용하였음.
 - ㉢ SELEX round 농도 측정 결과 *S. sonnei* 결합 하는 앵타머의 경우, 비특이적인 결합이 제거되는 negative selection 이후 8 round에서 가장 회수되는 농도가 높았으며, *V. parahaemolyticus*에 결합하는 앵타머의 경우, negative selection 이후 8 round에서 가장 회수되는 농도가 높았음. Real time PCR 결과에서도 모두 8

round의 efficiency 값과 C(t) 값이 가장 최적의 결과를 나타냄으로써 모두 8 round의 앵타머를 선정하였음(그림 2-94, 2-95).



Nano-drop을 이용한 각 round에서 회수된 앵타머 농도

그림 2-94. *Shigella sonnei*에 특이적으로 결합하는 앵타머 선별을 위한 SELEX round 후 회수 결과



Nano-drop을 이용한 각 round에서 회수된 앵타머 농도

그림 2-95. *Vibrio parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머 선별을 위한 SELEX round 후 회수 결과

- ② 선정된 SELEX round의 앵타머 서열 확보를 위한 T-vector cloning 및 sequence 분석을 통한 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머 확보
- ㉠ 선정된 최종 SELEX round의 앵타머 풀은 각각 t-vector에 cloning을 수행하여 최종 앵타머 clone을 확보하였음. 확보된 앵타머 clone 중 무작위로 선정하여 colony PCR을 통해 제대로 앵타머가 형성되었는지 전기영동을 통해 형성된 앵타머 크기 (bp)의 확인 후, 각각의 clone을 서열 분석을 의뢰하였음.
- ㉡ 확보한 앵타머 서열은 Cluster X 프로그램을 이용하여 중복된 앵타머 서열이 있는지 확인 후 제거하였음. *S. sonnei*에 특이적으로 결합하는 앵타머의 경우 총 40개의 앵타머 clone 중 중복 서열을 제외하고 최종 27개의 *S. sonnei* 특이결합 앵타머를 확보할 수 있었으며, *V. parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머의

경우 총 28개의 앵타머 clone 중 중복서열을 제외하고 최종 26개의 *V. parahaemolyticus* 특이결합 앵타머를 확보할 수 있었음.

(2) Nanodrop spectrophotometer 및 SPR 분석을 통한 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus* 결합 앵타머의 표적과의 결합력 평가 및 최적 앵타머 선정 및 최종 확보

(가) 선별한 각 병원성 미생물 결합 앵타머 후보군들의 결합력의 정량적 평가를 위한 Nanodrop spectrophotometer를 이용한 회수량 측정

① 선별, 확보한 앵타머 후보군들간의 각 병원성 미생물과의 결합력의 정량적 평가를 위한 Post-SELEX 진행 후, 앵타머의 회수 농도 비교를 통한 결합력 평가

② 각각의 병원성 미생물에 결합하는 앵타머를 다시 병원성 미생물과 반응 후 회수되는 농도를 측정하여 회수되는 농도를 비교함으로써 실제 병원성 미생물과의 결합력을 평가하고자 하였음. *S. sonnei* 에 특이적으로 결합하는 앵타머 후보군 27종 중, SS-2, SS-7, SS-12가 다른 후보군에 비해 회수율이 높아 선정하였으며, *V. parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머 후보군은 총 26개 중 VPCA-1과 VPCA-2가 회수율이 높은 것으로 확인되어 최종 병원성 미생물 치료를 위한 앵타머로 각각 선정되었음.

(나) 기확보한 각 병원성 미생물 결합 앵타머의 SPR 기반 결합력의 정량적 평가를 통한 최적 앵타머 선정

① 각 병원성 미생물에 대한 앵타머의 결합력의 정량적 평가를 위한 SPR 분석

② 먼저, 앵타머와 각 병원성 미생물간의 결합력을 정량적으로 평가하기 위하여, 동일한 growth phage 중 동일하게 log phage에 접어들도록 배양하였으며, 최종 병원성 미생물의 개수를 CFU/mL 단위로 동일하게 맞추었음. 이후, Biacore 사에서 제공하는 SPR 분석 장치에 사용되는 streptavidin이 고정되어 있는 SA chip에 각각의 선정한 앵타머인 *S. sonnei* 결합 SS-2, SS-7, SS-12를 고정하였으며, 또하나의 다른 SA chip에는 *V. parahaemolyticus* 결합용 앵타머 VPCA-1, VPCA-2를 고정하였음. 이후, 동일하게 배양된 각각의 병원성 미생물을 결합시켜 반응시켜 결합력을 평가하고자 하였음.

③ 실험 수행 후에는 결과 분석을 통해 *S. sonnei* 결합 앵타머 3종은 모두 uM 수준으로 *S. sonnei*와 결합력을 보유하고 있는 것으로 확인되었으며, 특히, SS-12의 경우 SS-12가 1.58×10^{-8} (M)로 가장 좋은 결합력을 보임을 확인하였음. 또한 *V. parahaemolyticus* 결합용 앵타머 2종은 *V. parahaemolyticus*와 nM 수준의 결합력을 보유하는 것으로 확인되었으며, VPCA-01은 2.04×10^{-9} (M), VPCA-02는 3.86×10^{-9} (M)의 결합력을 보이는 것으로 확인되었음.

6. 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화 (제4협동)

가. 개발신소재를 이용한 면역복합제제 기본 제형 생산

□ 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물별 주요 대상질병에 대한 면역항체 성분이 함유된 기초 면역제제를 생산하였고, 이를 이용하여 양돈용, 축우용 및 양계용 면역복합제제 기본제형을 개발하고, 시제품을 생산하였음(제1세부과제 공동수행)

나. 개발 면역복합제제 시제품의 안정성 시험

(1) 시험대상 품목

- 양돈, 양계용 면역복합제제 시제품의 일반성분(생균제, 비타민 등)과 면역제제 성분에 대한 안정성 시험을 실시하였음

(2) 시험방법

(가) 일반성분

- 면역복합제제 시제품 조성에 포함되는 기본 제제인 생균제 3종 즉, 당화균(*Bacillus mesentericus* To-A), 유산균(*Streptococcus faecalis* T-110), 낙산균(*Clostridium butyricum* To-A), 그리고 비타민(A, D3, E)과 일반 구성성분에 대한 안정성 시험은 1차년도에 확립된 방법에 따라 2012년 8월부터 2013년 5월 현재까지 9개월 동안 3개월 간격으로 각 성분의 균수 및 함량을 측정하여 안정성을 확인하였음

(나) 면역제제성분

- 4종 면역복합제제 시제품 조성에 공통적으로 대장균과 살모넬라균에 대한 면역항체를 포함시켰기 때문에 이 2종의 면역항체를 지표성분으로 하여 하체가 변동을 조사하여 면역성분의 안정성을 1차적으로 확인하였음.

① IgY 제제 항체역가검사

㉠ 검사방법 : Indirect ELISA Antibody Titer test

㉡ 검사내역 : *E. coli*, *Sal. Typhimurum*

㉢ 역가측정 : P/N value

- 음성시료의 OD치 2배 이상 되는 시료의 항체가를 역산하여 계산함. 예를 들어 음성시료의 항체가 OD치가 0.1일 때 시료의 항체가의 OD치가 320배에서 0.25, 640배에서 0.16이면 항체가는 320배로 측정함. S/P값으로 처리하지 않은 것은 전체적으로 희석배수별로 항체역가를 check하기 위함.

㉣ 음성시료 대조균 : SPF란에서 추출한 난황추출액

- Enzyme : Anti-chicken IgY HRPO enzyme 20ng/ml 농도로 사용

- Substrate : TMB

- 결과치 판독 : 파장 450nm

- ELISA 항원농도

- *Sal, E.coli* : 300ng/ml 농도로 coating

- ELISA용 항원

- 세균 : 각각의 세균을 배양 후 cell pellet를 초음파처리하여 OMP 정제한 후 BCA kit로 항원농도측정(300ng/ml 농도로 사용)

- 시료처리 : Spray dry처리한 IgY분말 1g을 DW 10ml 희석한 혼합액을 초음파처리 한 후 원심한 상층액을 시료로 사용

- 시료 희석 : 10배부터 20,480배까지 2진 희석

- 항체가 : P/N value 계산 (예, 음성시료 OD(10배 희석시 : 0.118)

- Sample 시료 640배 희석시 OD : 0.245, 1280배에서는 0.198시 음성시료의 OD값의 2배이상 되는 희석배수를 cut off하여 640배로 항체역가 판정

② 초유 제제 항체역가검사

㉠ 검사방법 : Indirect ELISA Antibody Titer test

㉔ 검사내역 : *E. coli*, *Sal. typhimurum*

㉕ 역가측정 : P/N value

- 음성시료의 OD치 2배이상 되는 시료의 항체가를 역산하여 계산. 예를 들어 음성 시료의 항체가 OD치가 0.1일 때 시료의 항체가의 OD치가 320배에서 0.25, 640배에서 0.16이면 항체가는 320배로 측정. S/P값으로 처리하지 않은 것은 전체적으로 희석배수별로 항체역가를 check하기 위함.

㉖ 음성시료 대조군 : 초유섭취하지 않은 송아지혈청

- Enzyme : Anti-Bovine IgG HRPO enzyme 20ng/ml 농도로 사용
- Substrate : TMB
- Reading : 450nm
- ELISA 항원농도
 - *Sal, E.coli* : 300ng/ml 농도로 coating
- ELISA용 항원
 - 세균 : 각각의 세균을 배양 후 cell pellet를 초음파처리하여 OMP정제한 후 BCA kit로 항원농도측정(300ng/ml 농도로 사용)
- 시료처리 : Spray dry처리한 IgY분말 1g을 DW 10ml 희석한 혼합액을 초음파처리 한 후 원심한 상층액을 시료로 사용
- 시료 희석 : 10배부터 20,480배까지 2진 희석
- 항체가 : P/N value 계산 (예, 음성시료 OD(10배 희석시 : 0.118)
- Sample Sample 시료 640배 희석시 OD : 0.245, 1280배에서는 0.198시 음성시료의 OD값의 2배이상 되는 희석배수를 cut off하여 640배로 항체역가 판정

(3) 시험결과

(가) 생균 및 일반성분 안정성 시험결과

- ① 양돈용 제제 2종(다이스트롭-피그산1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2012년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 3개 제품에 실시한 일반제제 안정성 시험결과는 각각 표 2-37에서 2-42와 같음.
 - 양돈용 2개 제제 시제품에 대하여 2012년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균제의 균수함량을 측정한 결과, 유의성 있는 균수의 감소가 관찰되지 않아 제품으로서의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.
 - 비타민 및 기타 구성분들의 함량도 제조시 함량의 90% 이상을 유지하고 있어 시험기간 동안함량의 변화가 제품의 효능에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음.

표 2-37. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2012-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2012. 8. 21)	1개월 (2012. 9. 21)	3개월 (2012. 11. 21)	6개월 (2013. 2. 21)	9개월 (2013. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	99.6%	99.6%	96.4%	94.2%
		20℃	100%	99.6%	99.8%	95.6%	93.6%
		40℃	100%	98.4%	97.4%	94.2%	93.0%
비타민 D3	2g	5℃	100%	102.3%	100.5%	98.8%	96.4%
		20℃	100%	97.8%	97.4%	96.2%	95.2%
		40℃	100%	98.4%	97.2%	96.0%	94.0%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.5%	98.8%	96.2%	94.8%
		20℃	100%	98.8%	97.6%	95.8%	94.2%
		40℃	100%	98.4%	97.6%	95.4%	94.2%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.2%	98.8%	98.6%	96.6%
		20℃	100%	100.4%	99.2%	98.8%	96.0%
		40℃	100%	98.6%	96.6%	97.4%	95.6%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.2%	101.4%	97.2%	95.4%
		20℃	100%	98.6%	98.4%	96.8%	92.2%
		40℃	100%	98.2%	98.0%	96.6%	92.8%

표 2-38. 양돈용 제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2012-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2012. 8. 21)	1개월 (2012. 9. 21)	3개월 (2012. 11. 21)	6개월 (2013. 2. 21)	9개월 (2013. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	99.6%	98.4%	95.8%	93.2%
		20℃	100%	99.2%	98.2%	96.0%	93.0%
		40℃	100%	98.4%	96.2%	94.8%	93.4%
비타민 D3	2g	5℃	100%	101.2%	99.8%	98.0%	95.4%
		20℃	100%	98.8%	97.8%	97.2%	94.8%
		40℃	100%	98.4%	97.4%	96.4%	94.0%
비타민 E	4g	5℃	100%	102.2%	100.0%	98.0%	96.6%
		20℃	100%	101.4%	100.8%	97.4%	95.2%
		40℃	100%	98.7%	96.6%	96.0%	95.4%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	98.8%	99.2%	98.2%	97.8%
		20℃	100%	99.6%	98.4%	97.8%	95.6%
		40℃	100%	98.4%	98.0%	98.0%	95.8%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.6%	98.8%	96.0%	93.2%
		20℃	100%	101.5%	98.2%	95.4%	93.4%
		40℃	100%	99.6%	98.4%	96.0%	93.2%

표 2-39. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2012-3)의 일반성분에 대한
안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2012. 8. 21)	1개월 (2012. 9. 21)	3개월 (2012. 11. 21)	6개월 (2013. 2. 21)	9개월 (2013. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.3×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.4×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	98.8%	97.8%	96.0%	94.6%
		20℃	100%	99.2%	98.2%	95.6%	93.2%
		40℃	100%	101.8%	97.4%	95.0%	93.0%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.6%	99.4%	97.2%	95.4%
		20℃	100%	99.2%	98.0%	96.8%	94.0%
		40℃	100%	98.6%	97.4%	96.4%	93.2%
비타민 E	4g	5℃	100%	101.2%	100.0%	97.2%	95.2%
		20℃	100%	99.4%	98.6%	96.7%	94.4%
		40℃	100%	99.0%	96.6%	95.4%	94.0%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.5%	99.6%	98.2%	96.6%
		20℃	100%	99.6%	98.8%	97.4%	95.4%
		40℃	100%	98.8%	96.6%	97.0%	94.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.8%	97.4%	96.5%	92.2%
		20℃	100%	99.8%	96.6%	96.0%	91.0%
		40℃	100%	98.2%	98.4%	97.2%	90.4%

표 2-40. 양돈용제제(다이스트립-피그산2호-제조번호 2012-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2012. 8. 21)	1개월 (2012. 9. 21)	3개월 (2012. 11. 21)	6개월 (2013. 2. 21)	9개월 (2013. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
웹타이드아연	87g	5℃	100%	102.2%	100.2%	98.4%	96.6%
		20℃	100%	100.6%	98.8%	96.0%	95.8%
		40℃	100%	100.4%	98.4%	96.4%	95.2%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.6%	98.5%	96.4%	94.4%
		20℃	100%	98.6%	99.2%	95.2%	93.6%
		40℃	100%	97.6%	97.2%	94.8%	92.8%

표 2-41 양돈용제제(다이스톱-피그산2호-제조번호 2012-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2012. 8. 21)	1개월 (2012. 9. 21)	3개월 (2012. 11. 21)	6개월 (2013. 2. 21)	9개월 (2013. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
웹타이드아연	87g	5℃	100%	100.4%	98.8%	97.4%	95.6%
		20℃	100%	98.8%	97.2%	98.0%	95.0%
		40℃	100%	98.0%	97.2%	98.4%	95.2%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.6%	97.6%	96.0%	93.8%
		20℃	100%	97.6%	98.8%	95.8%	92.6%
		40℃	100%	98.0%	97.4%	95.0%	91.8%

표 2-42. 양돈용제제(다이스트롭-피그산2호-제조번호 2012-3)의 일반성분에 대한
안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2012. 8. 21)	1개월 (2012. 9. 21)	3개월 (2012. 11. 21)	6개월 (2013. 2. 21)	9개월 (2013. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.3×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.5×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.5×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	98.0%	97.4%	96.4%	94.2%
		20℃	100%	98.2%	96.8%	95.7%	92.2%
		40℃	100%	100.5%	98.6%	96.0%	93.8%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.6%	96.7%	95.4%	92.2%
		20℃	100%	101.8%	98.4%	94.6%	91.0%
		40℃	100%	99.0%	96.2%	94.0%	90.2%

② 양계용 제제 2종(다이스트롭-폴추리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2012년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 로트별로 실시한 일반제제 안정성 시험결과는 각각 표 2-43에서 2-48과 같음.

- 양계용 2개 제제 시제품에 대하여 생균제의 균수를 측정한 결과, 유의성 있는 균수의 감소가 관찰되지 않아 제품으로서의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.
- 비타민 및 기타 구성분들의 함량도 제조시 함량의 92% 이상을 유지하고 있어 시험기간 동안함량의 변화가 제품의 효능에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음.

표 2-43. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2012-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2012. 6. 6)	1개월 (2012. 7. 9)	3개월 (2012. 9. 5)	6개월 (2012. 12. 5)	9개월 (2013. 3. 5)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	102.4%	100.7%	98.8%	97.6%
		20℃	100%	100.6%	98.2%	98.0%	97.0%
		40℃	100%	100.2%	97.2%	96.8%	96.2%
비타민 D3	2g	5℃	100%	101.4%	98.6%	97.2%	95.8%
		20℃	100%	99.6%	97.6%	97.0%	95.2%
		40℃	100%	98.8%	96.2%	95.8%	93.6%
비타민 E	4g	5℃	100%	102.4%	98.8%	97.2%	95.4%
		20℃	100%	100.2%	97.8%	96.6%	94.2%
		40℃	100%	99.2%	97.45	95.8%	94.0%
웹타이드아연	87g	5℃	100%	98.8%	98.6%	98.0%	97.2%
		20℃	100%	99.6%	98.6%	97.6%	97.0%
		40℃	100%	98.2%	98.0%	97.0%	96.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	102.4%	98.4%	95.6%	93.2%
		20℃	100%	103.7%	98.6%	95.4%	93.0%
		40℃	100%	99.6%	97.8%	95.0%	92.6%

표 2-44. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2012-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2012. 6. 6)	1개월 (2012. 7. 9)	3개월 (2012. 9. 5)	6개월 (2012. 12. 5)	9개월 (2013. 3. 5)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.4×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	105.2%	101.1%	99.8%	98.4%
		20℃	100%	102.0%	100.4%	98.8%	97.8%
		40℃	100%	103.2%	99.6%	98.4%	98.0%
비타민 D3	2g	5℃	100%	98.8%	96.4%	95.8%	95.2%
		20℃	100%	97.2%	96.4%	95.6%	95.0%
		40℃	100%	98.8%	97.8%	95.8%	94.6%
비타민 E	4g	5℃	100%	102.4%	98.8%	97.8%	95.6%
		20℃	100%	102.6%	99.6%	97.6%	95.2%
		40℃	100%	100.8%	98.4%	97.4%	94.2%
웹타이드아연	87g	5℃	100%	102.4%	100.2%	99.2%	98.6%
		20℃	100%	99.6%	97.4%	97.0%	96.8%
		40℃	100%	102.2%	100.6%	98.2%	96.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.8%	96.6%	95.8%	93.2%
		20℃	100%	100.4%	98.2%	95.6%	93.0%
		40℃	100%	99.2%	98.4%	95.0%	92.8%

표 2-45. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2012-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2012. 6. 6)	1개월 (2012. 7. 9)	3개월 (2012. 9. 5)	6개월 (2012. 12. 5)	9개월 (2013. 3. 5)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.4×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	104.2%	101.5%	100.2%	98.6%
		20℃	100%	102.2%	99.4%	99.4%	98.2%
		40℃	100%	102.4%	99.2%	98.6%	97.6%
비타민 D3	2g	5℃	100%	99.6%	97.8%	96.8%	95.8%
		20℃	100%	101.4%	98.8%	95.4%	94.6%
		40℃	100%	98.8%	96.4%	94.2%	93.2%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.8%	98.2%	96.6%	95.6%
		20℃	100%	98.4%	96.6%	95.2%	94.6%
		40℃	100%	98.8%	96.2%	94.4%	93.8%
웹타이드아연	87g	5℃	100%	103.4%	98.8%	98.2%	98.4%
		20℃	100%	104.4%	102.2%	98.0%	97.6%
		40℃	100%	102.6%	100.4%	98.2%	96.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.8%	97.4%	96.6%	94.2%
		20℃	100%	99.6%	99.2%	95.8%	93.4%
		40℃	100%	99.8%	99.4%	96.0%	93.0%

표 2-46. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2012-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2012. 6. 6)	1개월 (2012. 7. 9)	3개월 (2012. 9. 5)	6개월 (2012. 12. 5)	9개월 (2013. 3. 5)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.6%	100.2%	99.6%	98.2%
		20℃	100%	100.2%	99.4%	98.8%	98.0%
		40℃	100%	98.8%	97.2%	96.8%	95.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	102.7%	98.8%	96.2%	94.4%
		20℃	100%	97.6%	98.4%	96.0%	94.0%
		40℃	100%	98.4%	97.2%	95.4%	93.6%

표 2-47. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2012-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2012. 6. 6)	1개월 (2012. 7. 9)	3개월 (2012. 9. 5)	6개월 (2012. 12. 5)	9개월 (2013. 3. 5)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	103.3%	100.2%	98.4%	98.2%
		20℃	100%	102.2%	101.4%	99.2%	98.4%
		40℃	100%	100.4%	99.6%	98.0%	97.6%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	102.2%	101.4%	98.0%	95.4%
		20℃	100%	103.65	98.8%	96.4%	94.6%
		40℃	100%	100.8%	97.2%	96.2%	94.2%

표 2-38. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2012-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2012. 6. 6)	1개월 (2012. 7. 9)	3개월 (2012. 9. 5)	6개월 (2012. 12. 5)	9개월 (2013. 3. 5)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	102.6%	98.4%	98.2%	98.0%
		20℃	100%	102.2%	99.2%	98.4%	97.6%
		40℃	100%	100.2%	96.7%	97.4%	97.0%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	101.5%	99.4%	96.6%	94.2%
		20℃	100%	99.6%	98.0%	95.2%	94.0%
		40℃	100%	99.6%	97.4%	95.2%	93.4%

(나) 면역성분 안정성 시험결과

- ① 양돈용 제제 2종(다이스트롭-피그산1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃)에 보관하면서 2012년 8월부터 9개월동안 매월 대장균과 살모넬라에 대한 항체역가를 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 IgY 및 초유 면역성분의 안정성(항체역가 변화) 시험결과는 각각 표 2-49에서 2-52와 같음.
- 양돈용 2개 제제 시제품에 대하여 2012년 8월부터 9개월동안 매월 IgY 항체가를 측정한 결과 제조시의 역가와 동일한 항체가 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음(표 2-49 및 2-50).
 - 또한 초유제제에 대한 항체가를 측정한 결과에서도 대장균 및 살모넬라에 대한 항체역가가 제조 시와 동일한 수준으로 유지되고 있음을 확인할 수 있었음(표 2-51 및 2-52).

표 2-49. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 1호-제조번호 2012-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	320	320	640	320	640	640	320	320	320
	2	640	640	320	640	640	640	640	320	640
	3	640	320	640	640	640	320	640	640	320
<i>S. Typhimurium</i>	1	320	320	160	320	320	160	320	320	320
	2	320	640	320	320	640	640	640	320	640
	3	320	320	640	320	320	320	640	320	320

표 2-50. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 2호-제조번호 2012-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	320	320	320	320	640	320	320	320	320
	2	640	640	320	640	320	640	640	320	640
	3	640	320	320	320	640	640	320	320	320
<i>S. Typhimurium</i>	1	320	320	320	320	320	320	320	160	320
	2	320	640	320	320	640	320	640	320	640
	3	320	320	320	640	320	320	640	320	320

표 2-51. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 1호-제조번호 2012-1~3)의 초유 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	1280	1280	1280	2560	1280	1280	2560	1280	2560
	2	2560	2560	2560	1280	2560	2560	2560	2560	2560
	3	1280	1280	1280	2560	1280	1280	2560	1280	1280
<i>S. Typhimurium</i>	1	2560	2560	5120	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	2	5120	5120	2560	5120	5120	5120	5120	5120	5120
	3	2560	2560	2560	5120	2560	2560	2560	2560	2560

표 2-52. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 2호-제조번호 2012-1~3)의 초유 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	1280	1280	1280	2560	1280	1280	1280	1280	2560
	2	2560	2560	1280	2560	2560	2560	1280	2560	2560
	3	2560	1280	1280	2560	1280	1280	1280	1280	1280
<i>S. Typhimurium</i>	1	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	2	5120	5120	2560	5120	2560	5120	5120	5120	5120
	3	2560	2560	2560	2560	5120	2560	2560	2560	2560

② 양계용 제제 2종(다이스트롭-폴츄리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃)에 보관하면서 2012년 8월부터 9개월동안 매월 대장균과 살모넬라(닭의 경우 *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* 및 *S. Enteritidis*)에 대한 항체역가를 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 IgY 성분의 안정성(항체역가 변화) 시험결과는 각각 표 2-53에서 2-54와 같음.

- 양계용 2개 제제 시제품에 대하여 2012년 8월부터 9개월동안 IgY 항체가를 매월 측정된 결과 제조시의 역가와 동일한 항체가 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음(표 2-53 및 2-54).

표 2-53. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 1호-제조번호 2012-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	160	160	160	160	160	160	80	160	160
	2	320	320	160	160	320	320	160	160	320
	3	160	320	320	160	320	160	320	160	160
<i>S. Gallinarum</i>	1	160	160	160	320	160	160	160	320	160
	2	320	320	320	320	160	320	320	320	320
	3	320	320	320	320	320	320	320	160	160
<i>S. Pullorum</i>	1	160	160	320	160	160	160	160	320	160
	2	160	160	160	320	160	160	160	160	160
	3	160	320	160	160	160	160	160	160	160
<i>S. Enteritidis</i>	1	160	160	320	160	160	160	160	320	160
	2	160	160	160	320	160	160	160	160	160
	3	160	320	160	160	160	160	160	160	160

표 2-54. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2012-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	160	80	160	160	160	160	80	160	160
	2	320	320	160	320	320	320	160	320	320
	3	320	160	160	160	160	320	320	160	160
<i>S. Gallinarum</i>	1	160	320	160	320	160	160	320	320	160
	2	320	160	320	320	160	320	160	320	320
	3	320	320	320	160	320	160	160	160	160
<i>S. Pullorum</i>	1	160	320	160	160	320	160	160	320	160
	2	320	160	160	320	160	160	160	160	160
	3	320	320	160	160	160	160	160	160	160
<i>S. Enteritidis</i>	1	160	320	160	320	320	160	320	160	160
	2	320	320	320	160	160	320	320	320	160
	3	320	320	160	160	160	160	160	320	160

다. 제4협동과제 연구결과 요약 및 평가

(1) 개발신소재를 이용한 면역복합제제 기본 제형 생산

(가) 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물별 주요 대상질병에 대한 면역항체 성분이 함유된 기초 면역제제를 생산하였고, 이를 이용하여 양돈용, 축우용 및 양계용 면역복합제제 기본제형을 개발하고, 시제품을 생산하였음(제1세부과제 공동수행)

(2) 개발 면역복합제제 시제품에 대한 일반 및 면역성분에 대한 안정성 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

(가) 생균 및 일반성분 안정성 시험결과

- 양돈용 제제 2종(다이스트롭-피그산 1호 및 2호) 및 양계용 제제 2종(다이스트롭 폴츄리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트씩 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2012년 8월부터 3개월 간격으로 9개월 동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 일반제제 안정성 시험결과, 생균수와 제품의 함량에 있어유의성 있는 변화가 관찰되지 않아 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음

(나) 면역성분 항체가 측정시험 결과

- 양돈용 제제 2종(다이스트롭-피그산 1호 및 2호)의 경우, 표지 병원체인 대장균과 살모넬라균(*S. Typhimurium*)에 대한 IgY 항체가 및 초유항체가 제조시의 역가와 동일한 수준의 항체가를 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음

- 양계용 제제 2종(다이스톱-폴츄리산 1호 및 2호)의 경우, 표지 병원체인 대장균과 살모넬라(*S. Gallinarum*, *S. Pullorum* 및 *S. Enteritidis*)에 대한 IgY 항체가 제조시의 역가와 동일한 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음

(3) 2차년도 연구수행 내용 평가

- (가) 개발 면역복합제제 시제품에 대한 일반성분과 면역성분에 대한 안정성 시험을 실시한 결과, 각 제제별로 제조시의 성분함량과 9개월 동안의 측정결과에 유의성있는 변화가 관찰되지 않아 시제품의 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되었으며, 3차년도 제품 개발의 기본제형으로 활용 가능성이 확인됨
- (나) 3차년도에도 2차년도에 계속하여 포유이유자돈용, 육성비육돈용, 육계용, 산란계용 면역복합제제 경구투여제(분말제)에 대한 안정성시험을 실시하고 축종별 농장을 선정하여 안전성시험을 실시함으로써 시제품 효능평가에 기초자료를 제공하고 동물용 의약품으로 허가받는데 활용하고자 함

제 3절. 3차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 면역복합제제 시제품에 대한 농장 적용 효과분석 및 적용 프로그램 개발(제1세부)

가. 면역복합제제 시제품에 대한 축우장 적용 및 효과 분석

(1) 축우용 면역복합제제(항생제대체제 및 첨가제) 최적 조성 개발

(가) 송아지 설사병 예방 및 치료목적의 면역복합제제 시제품 제작

- 2차년도에 제작한 시제품에 대한 효능평가결과, 송아지설사병에 대한 예방효과가 높은 것으로 확인되어 축우장용 면역복합제제 시제품은 송아지 설사병 방제용으로 개발 방향을 확정함.

- 제2세부과제에서 개발된 Fc분자가 결합된 BVDV 항원으로 생산된 IgY와 제4협동과제에서 제공한 생균제를 추가하여 제조함(표 3-1).

(나) 시제품의 투여 용량

- 시제품의 용량(투여량)은 2차년도 시험결과, 2배 용량 투여시 1배 용량 투여시보다 효과가 우수한 것으로 나타나 면역제제 등 유효성분의 조성을 약 2배로 증가하여 조성을 확정함.

표 3-1. 송아지 설사병 방제용 면역복합제제 최적 조성(시제품) 보완 제작

구분	성분명	함량	비고
면역제제	난황분말(IgY, cFc분자 결합항원 이용 생산)	5,000mg	제2세부과제 제공
	초유분말	2,000mg	
생균제	생균제 3종(도아)	1 × 10 ⁶ CFU 이상	균수
	Bacillus coagulans	1 × 10 ⁶ CFU 이상	균수
비타민 및 부형제	비타민 C	20mg	
	포도당	1200mg	
	증류수	8.0ml	
총 용량		20g	

(2) 축우용 면역복합제제 시제품의 효과분석

(가) 2차년도 축우장 적용시험 결과, 주어진 예산으로 농장수를 확대하기가 곤란하여 축종별 효능평가팀(전북대)에서 목적동물 실험수준에서 효능평가를 실시.

(나) 농장 효능평가 시험은 송아지 번식기(2015년 상반기)에 한우개량사업소(농협)에 시제품을 제공하여 확대시험하기로 협의.

(3) 효능평가 대상 축우장의 문제 질병에 따른 최적 투여 프로그램(안) 개발

(가) 범용: 분만 직후 송아지에 초유급여 전, 1회, 경구투여로 확정

(나) 설사병 발생시 : 초유급여 전 1회 투여 후 2-3일간 추가 투여

나. 면역복합제제(단일·복합제제)에 대한 양돈장 적용 및 효과 분석

(1) 개발 면역제제를이용한 단일·복합제제 제형 제작(제4협동 공동수행)

(가) 2013년 동절기 이후 돼지유행성설사병(PED)이 국내에서 다시 전국적으로 발생이 확대됨에 따라 PED 방지용 면역제제 개발이 요구됨(표 3-2).

※ 전국적 PED 발생 확산에 따라 방역상 문제로 당초 시험 대상 양돈장들에 대한 현장 효능평가 시험 수행이 곤란하게 되어 PED 발생농장(1개 농장)을 시험대상 농장으로 선정하여 표능평가를 실시함.

(나) 양돈 현장의 PED 방지용 제제 개발을 위하여 2차년도 개발된 포유자돈용 면역복합제제의 구성을 기본으로 하되, 제1세부과제에서 개발된 Fc 분자 결합 PED 바이러스 항원으로 면역된 닭에서 생산된 난황분말과 PED 바이러스를 고도면역시킨 젖소 초유분말을 보강한 면역복합제제(가칭 “페드문-PED-Immune”) 구성을 추가 개발하였으며, 해당 시제품의 조성은 표 3-3과 같음.

- 일반자돈용 면역복합제제인 가칭 “피그문(Pig-Immune)”에 비하여 “페드문(PED-Immune)”의 경우 PED 방어면역성분을 함유한 초유분말을 2배 용량으로 첨가하였음(표 3-3).

표 3-2. 최근 6년간 돼지유행성설사병(PED) 발생통계(농림축산검역본부)

구분	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년 4월말현재	계
발생건수	18	12	5	1	12	63	111
발생두수	6,850	3,092	289	10	4,703	16,400	31,344

표 3-3. 돼지 유행성설사병(PED) 예방용 면역복합제제(PED-Immune) 시제품의 최적 조성

구분	성분명	함량(g/kg중)	비고
면역제제	난황분말(IgY, Fc분자 결합항원 이 용 생산)	25.0g	제2세부과제 제공
	초유분말 (PED 고도면역 젖소 초 유)	50.0g	일반자돈용은 25.0g
생균제	생균제 3종(도아)	15.75g	
비타민 및 부형제	펩타이드아연	87.0g	
	복합미네랄(구마트)	20.0g	
	프락토올리고당	50.0g	
	비타민 A	10.0g	
	비타민 D3	2.0g	
	비타민 E	4.0g	
	포도당	716.25g	일반자돈용은 741.25g
	Tixosil-38	20g	
총 용량		1,000g	

(2) 자돈용 면역복합제제 시제품의 효과분석

(가) 자돈 설사방지용 면역복합제제 “페디문(PED-Immune)”의 목적동물 효능평가 시험

- “페드문(PED-Immune)”의 효능평가를 위하여 제1 협동과제(전북대학교) 양돈 효능평가 팀(김원일교수)에서 포유자돈에 대한 효능평가시험을 실시한 결과(제2협동 보고서 부분 참조), PED 바이러스 공격시험에서 PED로 인한 설사병 방제효과가 탁월한 것으로 확

인됨.

- 따라서 2014년 3월경 PED가 발생한 양돈장 2개 농장에 “페드문(PED-Immune)” 시제품을 제공하여 농장 효능평가 시험을 실시함

(나) PED 발생농장에 대한 “페드문(PED-Immune)” 시제품 적용 효과

① 시험농장 : 경북 D농장

- 3월 초순 PED로 의심되는 설사병이 포유자돈에서 확인되어 설사분변에 대한 RT-PCR 검사결과, PED 바이러스 양성으로 확인됨.

② 시험기간 : 4주간

- 신생자돈 97두(모든 10복)에 시제품 투여 후 이유시까지의 생존율을 조사

③ 투여방법: 두당 1-2회

④ 시험결과

- PED 발생 후 시제품을 적용하지 않은 모든 5두의 분만 자돈 46두는 생후 1주일 이내에 설사 및 탈수로 인하여 모두 폐사하였음. 반면에 시제품을 적용한 모든 10두의 분만 자돈 97두의 경우, 설사증상은 모든 4두의 자돈 13두에서 나타났으며, 총 9두가 폐사하였으나 86두가 이유시까지 생존하여 88.6%의 높은 생존율을 나타내었음(표 3-4).
- 이는 개발된 PED 방지용 면역복합제제 조성인 “페드문(PED-Immune)”이 PED 발생농장의 자돈 폐사 방지에 탁월한 효과가 있음을 입증하는 것임.
- 단, 이번 PED 발생농장 시험은 현장 적용시험 결과로 시험자돈의 모든에 대한 PED 면역수준 등 시험에 영향을 미칠 수 있는 요인에 대한 사전검사가 이루어지지 못하여 향후 보완시험이 필요할 것으로 판단됨. 이에 따라 제1협동과제 효능평가팀과 공동으로 4차년도에 추가 공격접종 시험을 진행할 계획임.

표 3-4. PED 발생농장의 “페드문(PED-Immune)” 시제품 적용 효과

구분	투여두수	설사증상	폐사두수	생존두수	생존율
투여군	97두(10복)	13두(4복)	9두	86두	88.6
비투여군	46두(5복)	46두	46두	-	0%

(다) 일반 양돈장(PED 비발생)에 대한 자돈용 면역복합제제 시제품 (가칭 “피그문, Pig-Immune”)의 효능평가시험

- “피그문, Pig-Immune”의 양돈장 적용에 의한 설사병에 대한 효과를 평가하기 위해 로타바이러스, 대장균, 클로스트리디움균 등 일반적인 포유자돈 설사병이 문제되는 양돈장에서 분만된 포유자돈을 대상으로 효능평가 추진 예정.

다. 면역복합제제(단일·복합제제)에 대한 양계장 적용 및 효과 분석

(1) 개발 면역복합제제의 단일·복합제제 제형 제작(제4협동 공동수행)

- (가) 양계장용 면역복합제제는 제4협동과제 산업화팀에서 보유하고 있는 제제를 활용하여 시험을 실시하되, 본 과제에서 조성 개발한 가칭 “다이스톱-폴츄리산 제제”, 생

균제(락토바실러스), 복합생균제(EM생균제)를 비교검토하여 향후 양계용(육계용) 제제 개발의 기본 조성으로 활용하고자 시험을 실시하였음.

(2) 육계농장에 대한 다이스톱 폴츄리산 2호(IgY+생균제), 생균제, 농장적용시험

(가) 시험개요

- 시험농장 : 전북 부안 소재 육계농장 (축주: 김○○)
- 사육규모 : 2개동, 각 25,000수
- 시험기간 : 입추일에서 출하일까지 사육 전기간 ('13.11.26-'13.12.25)
- 시험군 : 일반생균제 투여군과 시제품(다이스톱-폴츄리산 2호) 투여군(표 3-5)
- 평가방법 : 사육 전기간동안 일반 생균제와 다이스톱-폴츄리산을 사료에 첨가하여 투여하였고, 생산성 기록을 비교 평가하였음.

표 3-5. 육계농장의 생균제 및 다이스톱-폴츄리산 2호 효능평가 비교시험 개요

시험군(동)	적용물질	투여용량	투여경로	시험기간
1	생균제(락토바실러스 등)	0.1%	사료 첨가	사육 전기간
2	다이스톱-폴츄리산 2호	0.2%	사료 첨가	사육 전기간

(나) 시험결과

- 일반 생균제 투여군(대조군-1동)에 비하여 다이스톱-폴츄리산 2호 투여군(시험군-2동)의 육성률, 생산지수 및 사료요구량(FCR)이 각각 1.0P, 21P, 0.01P 증가하였으며, 평균중량은 또한 0.09g 증가하였음.
- ※ 효능평가팀에서 조사한 결과에 따르면 개체수 기준(10마리/동)으로 평균증체율이 대조군 대비 15% 증가하였으며, 소장의 육안병변지수는 29일령 기준으로 20% 감소한 것으로 평가됨(그림 3-6).
- 결과적으로 생산지수가 생균제 투여군(265)에 비하여약 8% 증가한 286으로 나타나 농장에서 사료첨가제로 투여하는 생균제보다 복합제제투여군인 다이스톱-폴츄리산 2호투여군이 생산성 향상효능이 있는 것으로 확인됨(표 3-6).

표 3-6. 육계농장의 생균제/다이스톱-폴츄리산 2호 투여에 따른 생산성 평가 결과

시험군	적용물질	사육기간	육성율 (%)	평균체중 (kg)	사료요구량 (FCR)	생산지수
1동	일반생균제	30일	96.8	1.31	1.59	265
2동	다이스톱-폴츄리산 2호	30일	97.8	1.39	1.58	286

(3) 육계농장에 대한 비오쓰리엠(생균제), EM 생균제, 다이스톱 폴츄리산 2호(IgY+생균제) 적용시험

(가) 시험개요

- 시험농장 : 전북 익산 소재 육계농장 (축주: 서○○)
- 사육규모 : 3개동, 각 25,000수
- 시험기간 : 입추일에서 출하일까지 사육 전기간 ('13.12.02-'13.01.04/01.07)

- 시험군 : 일반생균제 투여군, EM 생균제 투여군 및 시제품(다이스톱-폴추리산 2호-IgY 첨가) 투여군(표 3-7)
- 평가방법 : 사육 전기간동안 일반 생균제(락토바실러스 등), EM 생균제 및 다이스톱-폴추리산 2호(+IgY)을 사료에 첨가하여 투여하였고, 생산성 기록을 비교 평가하였음.

표 3-7. 육계농장의 일반생균제와 다이스톱-폴추리산 2호(+IgY) 효능평가 비교시험 개요

시험군(동)	적용물질	투여용량	투여경로	시험기간
1	생균제(락토바실러스 등)	0.1%	사료 첨가	사육 전기간
2	EM 생균제	0.2%	음수 투여	사육 전기간
3	다이스톱-폴추리산 2호	0.2%	사료 첨가	사육 전기간

(나) 시험결과

- 일반 생균제 투여군(대조군-1동)에 비하여 EM 생균제투여군의 육성률, 평균중량 및 생산지수는 각각 5.8%, 0.21g, 32P 증가하였으며, 다이스톱-폴추리산 2호투여군의 육성률, 평균중량 및 생산지수는 각각 7.1%, 0.13g 및 18P 증가하였음(표 3-8).
- ※ 효능평가팀에서 조사한 결과에 따르면 개체수 기준(10마리/동)으로 평균 증체율은 대조군(생균제 투여군) 대비 각각 17%, 20% 증가하였으며, 소장 육안병변 지수는 32일령 기준으로 각각 50% 감소된 것으로 평가됨.
- 결과적으로 농장에서 사료첨가제로 투여하는 생균제보다 다양한 장내 유용균들이 혼합된 EM 생균제제나 다이스톱 폴추리산 2호투여군이 생산성 향상효능이 우수한 것으로 확인됨(표 3-8).

표 3-8. 육계농장의 일반생균제, EM 생균제 및 다이스톱-폴추리산 2호(+IgY) 투여에 따른 생산성 평가 결과

시험군	적용물질	사육기간	육성율 (%)	평균체중 (kg)	사료요구량 (FCR)	생산지수
1동	일반생균제	34일	91.0	1.66	1.57	282
2동	EM 생균제	37일	96.8	1.87	1.87	314
2동	다이스톱-폴추리산 2호	37일	98.1	1.79	1.79	300

라. 제1 세부과제 연구결과 요약 및 평가

- (1) 양돈용 면역복합제제로 최근 국내에서 크게 문제가 되고 있는 PED 방지용 제제인 “페드문(PED-Immune)”을 개발하여 PED 발생농장에 적용한 결과, 88.6%의 높은 자돈 생존율을 나타내어 향후 PED로 인한 자돈 설사병 방제용으로 시판할 수 있을 것으로 판단됨.
- (2) 양계용 면역복합제제의 경우 현장에서 사용되고 있는 일반 생균제(대조군)에 비하여 본 연구과제에서 개발된 면역제제(난황항체)와 생균제(프로바이오틱)가 혼합된 면역

복합제제인 다이스톱 폴츄리산 제제가 육성률, 평균중량, 사료요구율 및 생산지수가 크게 향상되어 육계산업의 생산성 및 경제성에 기여할 것으로 생각됨.

- (3) 축우용 면역복합제제인 경우, 시험 수행에 적절한 사육규모의 축우장 확보가 곤란하여, 4차년도에는 적절한 시험농장을 섭외하여 시험을 실시하기로 합의함.
- (4) 개발제제에 대한 농장 적용시험은 예산이 많이 소요되는 연구분야이므로 현재의 예산규모로는 농장시험을 확대하기가 곤란한 상황임. 따라서 본격적인 제품 출시를 준비하는 단계인 4차년도부터는 소재개발팀의 연구예산을 조정하여 축종별 효능평가팀에 연구예산을 추가로 집중 배정하여 목적동물과 농장에 대한 효능 평가 및 현장적용시험을 강화할 계획임
 - 닭(목적동물)에 대한 효능평가 및 양계장 적용시험 - 제1협동과제 효능평가팀(전북대) 장형관교수 전담.
 - 돼지(목적동물)에 대한 효능평가 및 양돈장 적용시험 - 제1세부과제 및 제1협동과제 효능평가팀(전북대) 김원일교수 전담.
 - 소(목적동물)에 대한 효능평가 및 축우장 적용시험 - 효능평가팀(전북대) 조호성교수 전담.

2. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발 (제2세부)

가. 고면역 면역난황제제를 이용한 첨가제 개발

(1) 고면역 유도 바이러스 항원 및 바이러스 단백질 항원 생산 최적화 시스템 구축 및 생산 항원을 이용한 불활화 다가 면역항원 제작

(가) 고역가 고면역 바이러스 항원 생산 및 불활화

- ① 산란계 면역접종을 위해 cFc 발현이 최적화된 3종의 세포주(Veroky5-cFc, PAM-pCD163-cFc 및 MDBK-cFc)에 각각의 타겟 바이러스(PEDV, 유럽형 PRRSV, 북미형 PRRSV 및 BVDV)를 감염시켜 배양함.
- ② 생산된 바이러스는 형광항체법과 western blot assay를 이용하여 cFc가 harboring 되었음을 확인하였으며, 4종의 cFc-harboring 바이러스 항원(PEDV-cFc, 유럽형 PRRSV-KNU-07-cFc, 북미형 PRRSV-KNU-12-KJ4-cFc 및 BVDV-cFc)의 역가를 측정된 결과 기존 바이러스와 유사한 바이러스 역가나 나타남을 확인하였음.
- ③ 고역가 고면역 cFc-harboring 바이러스 항원은 BEI(binary ethylenamine)을 이용하여 불활화 처리함.

(나) 고면역 재조합 바이러스 단백질-면역보강인자 항원 생산 및 정량

- ① 산란계 면역접종을 위해 바이러스 유래 재조합 단백질-cFc 발현이 최적화된 3종의 세포주(PK-15-PEDV-S1-cFc, PK-15-PCV-2b-ORF2-cFc 및 MDBK-BCoV-S1-cFc)를 대량으로 배양한 다음, 세포 lysates를 만들고 여기에 chicken IgY precipitating resin(GenScript)을 첨가해서 면역침전법을 수행함.
- ② 이를 통해 약 100 µg/ml의 농도를 가지는 3종의 바이러스 유래 cFc-tagged 재조합 단백질 항원(PEDV-S1-cFc, PCV-2b-capsid-cFc 및 MDBK-BCoV-S1-cFc)을 생산함.

(다) Adjuvant를 이용한 면역난황항체 생산용 다가 면역항원 제조

- ① 생산된 cFc-harboring 바이러스 항원 및 cFc-tagged 바이러스 단백질 항원과 ASA70 adjuvant를 1:2 비율로 혼합하여 면역난황항체 생산용 다가 면역항원을 제조함(표 3-9).

표 3-9. 시험군별 산란계 접종용 면역항원의 조성

타겟 동물	접종 항원
돼지용	G1 : PEDV whole virus antigen (cFc-harboring)
	G2 : PEDV Whole virus antigen
	G3 : PEDV spike protein antigen (cFc-tagged)
	G4 : PEDV spike protein antigen
	G5 : PRRSV 북미형 Whole virus antigen (cFc-harboring)
	G6 : PRRSV 북미형 Whole virus antigen
	G7 : PCV2b capsid protein antigen (cFc-tagged)
	G8 : PRV whole virus antigen
소용	G9 : BVDV whole virus antigen (cFc-harboring)
	G10 : BCoV spike protein antigen (cFc-tagged)
	G11 : BRV whole virus antigen
	G12 : No antigen (Control)



그림 3-1. 면역항원 산란계 접종 일정

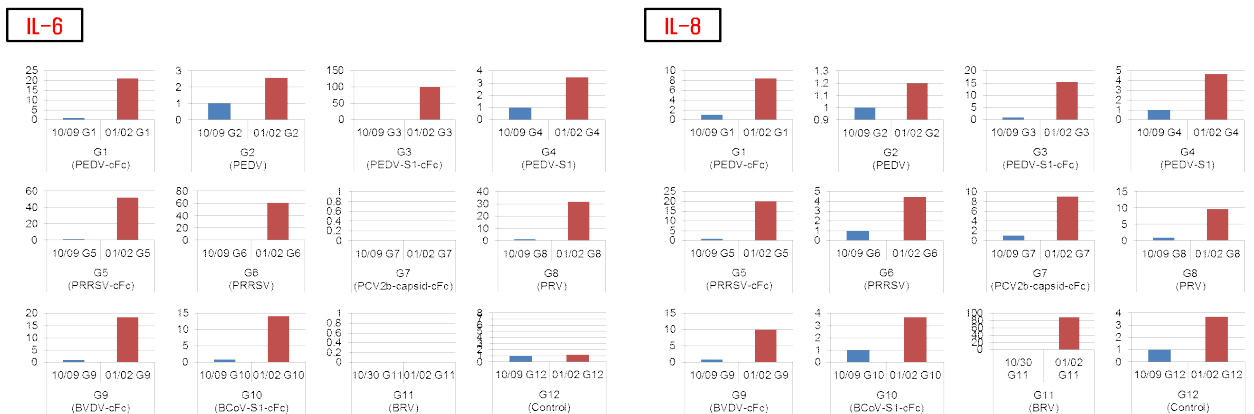
(2) 고면역 항원 접종에 따른 산란계의 면역반응 평가

(가) 불활화 다가 백신 접종 후 접종시기별 혈액 채취 및 백혈구 분리

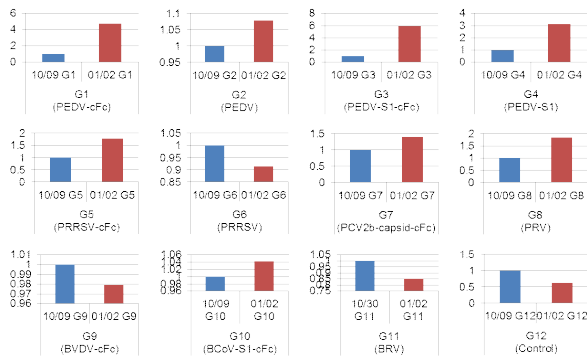
- ① 항원 그룹별로 산란계 4수씩 총 48마리를 준비하고(표 3-9), 제조된 축종별 불활화 백신을 백신보조제와 함께 산란계에 3주 간격으로 4회 접종함(그림 3-1).
- ② 접종 전에 불활화 백신을 충분히 섞어준 뒤 산란계의 흉근에 0.8 ml씩 근육접종을 실시함. 산란계의 익정맥을 통하여 접종시기별로 총 5회 4 ml씩 채혈하였고, 채혈 즉시 항응고제가 첨가된 베큐테이너 튜브에 절반을 옮겨 담음. 베큐테이너 튜브의 혈액에 Histopaque을 첨가하여 원심분리로 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell) 층을 분리 후 PBS 세척을 진행함. 주사기에 있던 혈액은 원심분리를 통해 혈청을 분리함.

(나) 싸이토카인 변화 분석을 통한 면역반응 평가

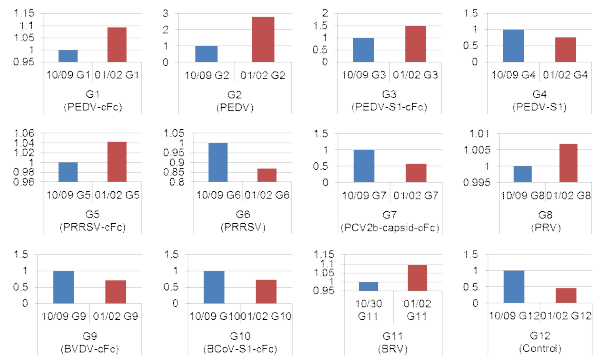
- ① real-time RT-PCR을 이용한 싸이토카인 변화 분석을 통해 산란계 면역접종 후 4주 내 세포성 면역반응의 변화양상을 확인하였음.
- ② 우선 분리된 닭 PBMC에 TRIzol을 처리해서 RNA를 추출한 다음 cDNA를 합성하고 1µg씩 정량함. 이후에 기존에 확보한 7종의 닭 유래 싸이토카인 검출용 primer를 사용해서 real-time 정량 RT-PCR을 진행하여 결과를 분석함(그림 3-2).



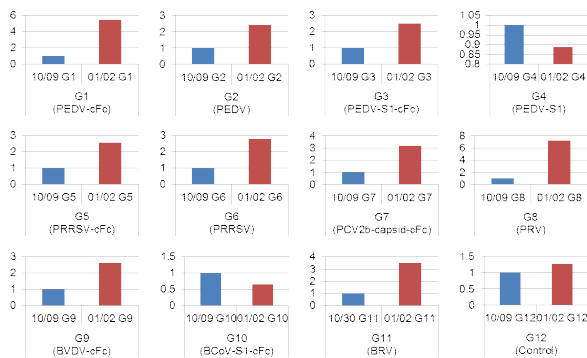
IFN- α



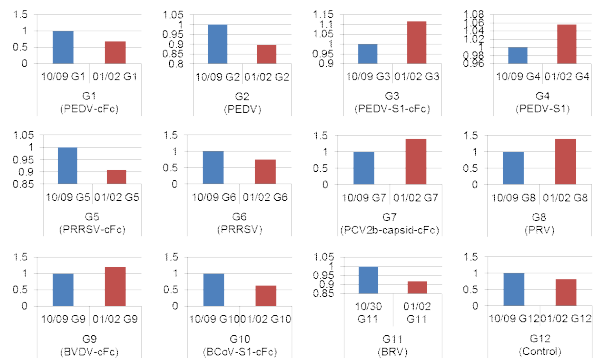
IFN- β



IFN- γ



TNF- α



TNFSF15

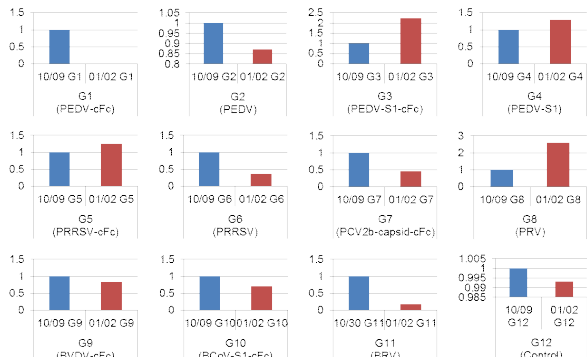


그림 3-2. Cytokine primer 사용 Real-time 정량 RT-PCR

(다) 타겟 항원에 대한 혈청 항체반응 분석

- ① PEDV 항원 접종 그룹(1~4번 그룹)의 혈청으로 중화시험을 진행함. 그 중 4번 그룹(PEDV-S1-hFc 접종)의 중화항체가가 가장 높게 나타남(그림 3-3). PCV 항원 접종 그룹(7번 그룹)의 혈청은 VDP^{ro} PCV2 NC AB ELISA kit(메디안 디노스틱)로 ELISA를 진행함. ELISA 결과가 음성값으로 관찰되었으며, 이는 2차 항체가 적합하지 않기 때문으로 추정됨.
- ② BVDV 항원 접종 그룹(9번 그룹)의 혈청으로 중화시험을 진행함. 채혈시기별 중화항체가의 증가는 관찰되지 않음(그림 3-4).

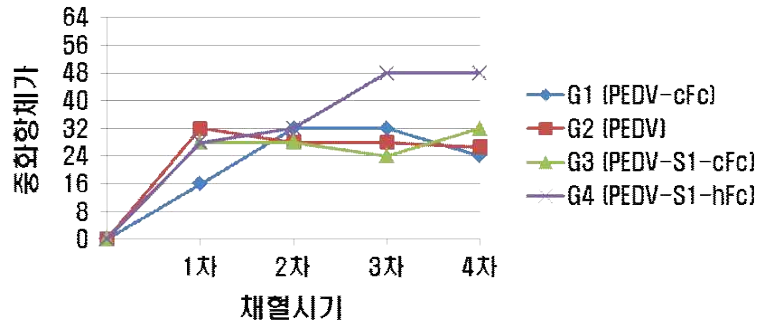


그림 3-3. 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV) 항원 혈청 중화시험

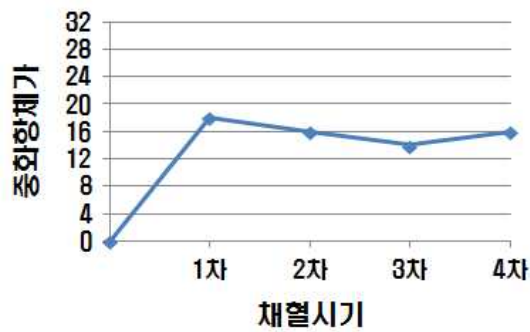


그림 3-4. 소 바이러스성 설사병 바이러스(BVDV) 항원 혈청 중화시험

(3) 고역가 복합난황항체 생산 시스템 구축 및 최적화

(가) 면역난황을 농축분말화 후 고면역 복합난황항체 생산

- ① 면역 산란계에서 생산한 계란을 그룹별로 분류한 다음, 락스로 세척하고 70% 에탄올로 소독을 실시함. 이후에 소독한 계란을 조심스럽게 깬 다음 난황을 분리하고 난황 부피 7배의 1차 증류수를 첨가함.
- ② 총 부피 대비 0.02% 강산성 이온수를 첨가하고 4°C에서 24시간 정치 후 상층액을 수거하는데 이 상층액에 난황항체가 포함되어 있음. 수거한 상층액을 원심분리한 다음 다시 상층액을 수거해서 -20°C에 냉동 보관하다가 농축분말화함.

나. 효모용 expression 시스템 구축 및 시험 적용

(1) 효모용 expression 시스템에 대한 검토

(가) *Saccharomyces cerevisiae* auto-cloning expression system의 확보, 중복성 검토 및 체계화

- ① 제작, 확보한 72 개 auto-cloning vector의 염기서열 확인
 - M13 forward primer를 이용하여 auto-cloning site와 tagging을 확인하는 sequencing을 진행하였으며, 총 72개의 vector의 염기서열을 확인(그림 3-5).
- ② 확보된 *S. cerevisiae* auto-cloning vector의 체계화
 - 3종의 origin과 2종의 promoter, 7 종의 tagging system, tagging의 위치, tagging의 조합 등 총 72 개의 vector의 중복성 및 체계화 완료(표 3-10)

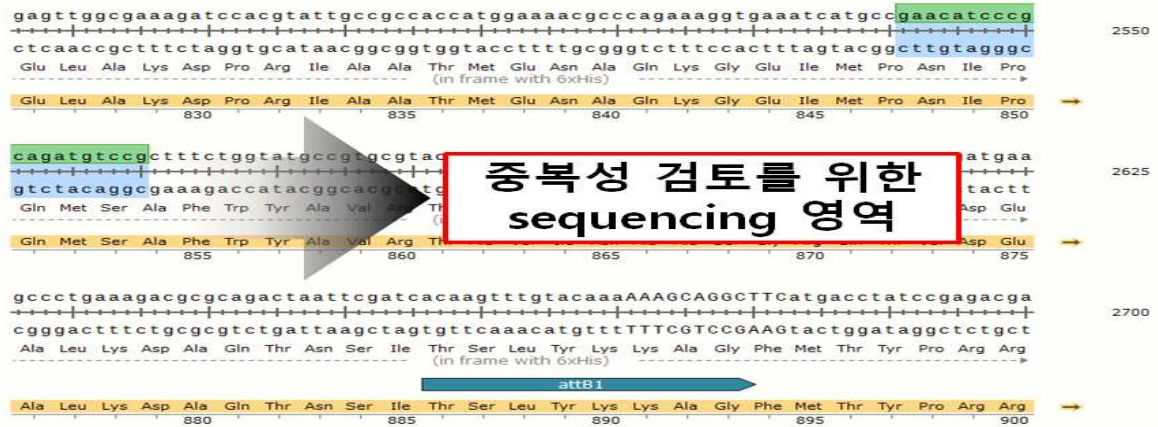


그림 3-5. Vector 중복성 검토를 위한 염기서열 분석

표 3-10. *S. cerevisiae* auto-cloning vector 구성표

pGALI	1-A1	pGALI-DsRed-C	2-A1	pGALI-EGFP-N	3-A1
pGALC	1-A2	pGALC-DsRed-C	2-A2	pGALC-EGFP-N	3-A2
pGAL2	1-A3	pGAL2-DsRed-C	2-A3	pGAL2-EGFP-N	3-A3
pGALI-EGFP-C	1-A4	pGALI-Cerulean-C	2-A4	pGALI-EGFP-N	3-A4
pGALC-EGFP-C	1-A5	pGALC-Cerulean-C	2-A5	pGALC-EGFP-N	3-A5
pGAL2-EGFP-C	1-A6	pGAL2-Cerulean-C	2-A6	pGAL2-EGFP-N	3-A6
pGALI-EGFP-C	1-A7	pGALI-HA-C	2-A7	pGALI-EYFP-N	3-A7
pGALC-EGFP-C	1-A8	pGALC-HA-C	2-A8	pGALC-EYFP-N	3-A8
pGAL2-EGFP-C	1-A9	pGAL2-HA-C	2-A9	pGAL2-EYFP-N	3-A9
pGALI-EYFP-C	1-A10	pGALI-TAP-C	2-A10	pGALI-Cerulean-N	3-A10
pGALC-EYFP-C	1-A11	pGALC-TAP-C	2-A11	pGALC-Cerulean-N	3-A11
pGAL2-EYFP-C	1-A12	pGAL2-TAP-C	2-A12	pGAL2-Cerulean-N	3-A12
pGPDI	1-B1	pGPDI-DsRed-C	2-B1	pGPDI-EGFP-N	3-B1
pGPDC	1-B2	pGPDC-DsRed-C	2-B2	pGPDC-EGFP-N	3-B2
pGPD2	1-B3	pGPD2-DsRed-C	2-B3	pGPD2-EGFP-N	3-B3
pGPDI-EGFP-C	1-B4	pGPDI-Cerulean-C	2-B4	pGPDI-EGFP-N	3-B4
pGPDC-EGFP-C	1-B5	pGPDC-Cerulean-C	2-B5	pGPDC-EGFP-N	3-B5
pGPD2-EGFP-C	1-B6	pGPD2-Cerulean-C	2-B6	pGPD2-EGFP-N	3-B6
pGPDI-EGFP-C	1-B7	pGPDI-HA-C	2-B7	pGPDI-EYFP-N	3-B7
pGPDC-EGFP-C	1-B8	pGPDC-HA-C	2-B8	pGPDC-EYFP-N	3-B8
pGPD2-EGFP-C	1-B9	pGPD2-HA-C	2-B9	pGPD2-EYFP-N	3-B9
pGPDI-EYFP-C	1-B10	pGPDI-TAP-C	2-B10	pGPDI-Cerulean-N	3-B10
pGPDC-EYFP-C	1-B11	pGPDC-TAP-C	2-B11	pGPDC-Cerulean-N	3-B11
pGPD2-EYFP-C	1-B12	pGPD2-TAP-C	2-B12	pGPD2-Cerulean-N	3-B12

※ 기본 cassette : *attR1* - KmR - *ccdB* - *attR2*

- Origin : Integrating, CEN, 2 μ
- Promoter : GPD, GAL1
- N-ter tag : no tag, EGFP, ECFP, EYFP, Cerulean
- C-ter tag : no tag, EGFP, ECFP, EYFP, Cerulean, DsRed, HA, TAP
- Selection marker : His3

예) pGPDI-EGFP-N : Integrating origin, GPD promoter, N-ter EGFP
 pGALC-HA-C : CEN origin, GAL1 promoter, C-ter HA tag
 pGAL2 : 2 μ origin, GAL1 promoter, no tag

(나) 효모에서 면역단백질 발현의 초고속 스크리닝 시도

① 제작된 auto-cloning vector를 이용한 cloning

㉞ Ligation에 의한 cloning 법과 비교할 때 획기적으로 cloning의 시간을 줄이고 성공확률이 높은 것으로 확인됨.

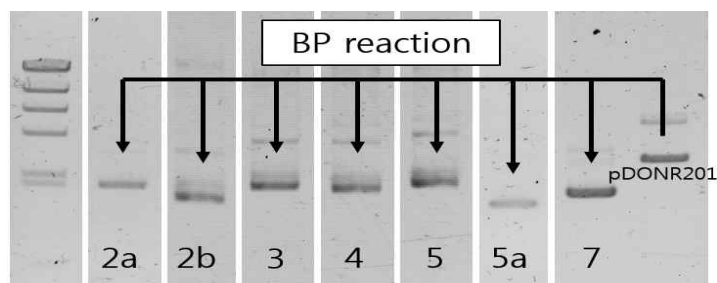


그림 3-6. 효모 auto-cloning 시스템을 이용한 결과 (PRRSV 7-1 ORF 2a, 2b, 3, 4, 5, 5a, 7 동시 진행)

표 3-11. Auto-cloning 시스템을 이용한 cloning 현황

Entry	PRRSV 7-1							PEDV opti-S1
	2a	2b	3	4	5a	5	7	
pDONR201	**	**	**	**	**	**	**	**
Destination	2a	2b	3	4	5a	5	7	PEDV opti-S1
pGALI	*	*	*	*	*	**	*	**
pGALC	*	*	*	*	*	**	*	**
pGAL2	*	*	*	*	*	**	*	**
pGPDI	*	*	*	*	*	**	*	*
pGPDC	*	*	*	*	*	**	*	**
pGPD2	*	*	*	*	*	**	*	**
pGALI-EGFP-N	*	*	*	*	*	**	*	**
pGALC-EGFP-N	*	*	*	*	*	**	*	**
pGAL2-EGFP-N	*	*	*	*	**	**	*	**
pGPDI-EGFP-N	*	*	*	*	*	**	*	**
pGPDC-EGFP-N	*	*	*	*	*	*	*	**
pGPD2-EGFP-N	*	*	*	*	*	**	*	**
pDEST-MBP	*	*	*	*	**	**	*	**
pDEST-His	*	*	*	*	**	**	*	**
pDEST-No	*	*	*	*	**	**	*	**

*, 제작; **, 발현 확인

② Auto-cloning system을 이용한 면역 단백질 발현 및 확인

㉞ *S. cerevisiae* INVSc1에서 PRRSV 7-1 ORF5 발현

- 6x His-tag Western blot 결과, PRRSV 7-1 ORF5의 경우 Galactose promoter를 이용한 no-tagging integration vector에서 발현이 되는 것으로 확인됨(그림 3-7).

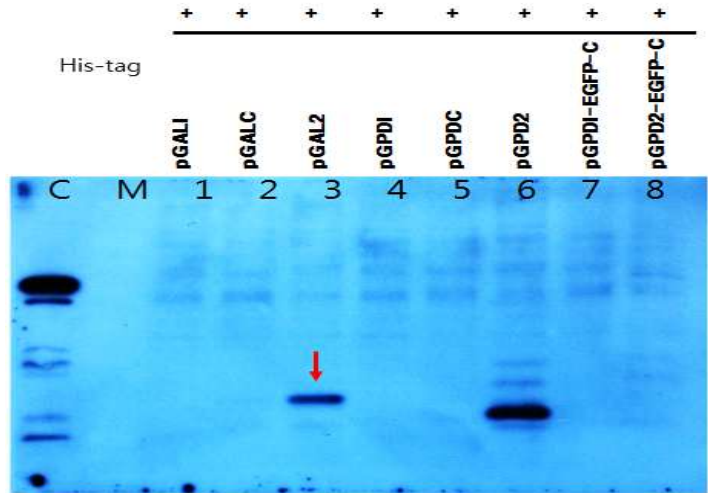


그림 3-7. *S. cerevisiae* INVSc1에서 면역 단백질 PRRSV 7-1 ORF5 발현 결과

㉔ *S. cerevisiae* INVSv1에서 PEDV-S1 발현

- 6x His-tag antibody를 이용한 Western blot 결과(그림 3-8), PEDV-S1의 경우 GPD promoter (constitutive) 보다 galactose promoter (inducible)에서 발현이 되는 것을 확인 하였으며, Western-blot 결과에서 실제 단백질 size인 80 kDa보다 더 큰 약 200 kDa 이상의 큰 형태로 발현이 되는 것을 확인, hyper glycosylation pattern으로 판단됨. 차후 glycosidase (PNGase F)를 이용한 digestion을 통해 glycosylation 유무를 확인할 예정.

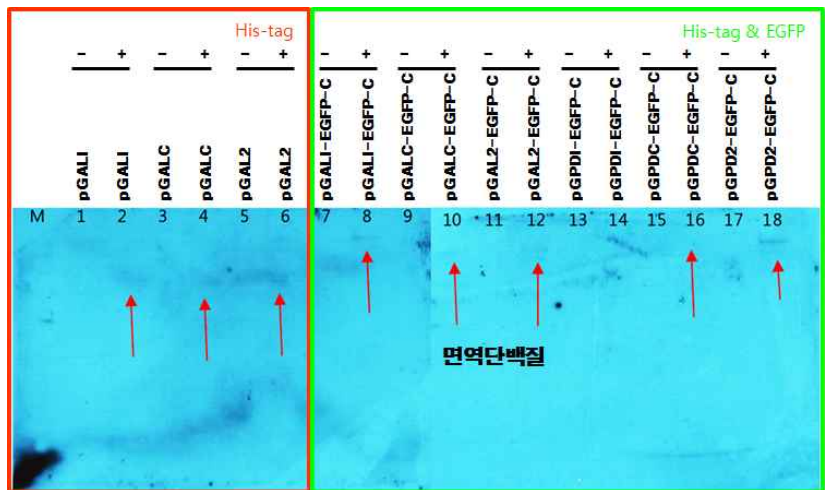


그림 3-8. *S. cerevisiae* INVSc1에서 면역 단백질 PEDV-S1 발현 결과

(다) *Pichia* 용 auto-cloning 시스템 적용 및 expression 시도

- ① *Pichia* 용 vector 확보 및 expression 시스템 구축 (그림 3-9)

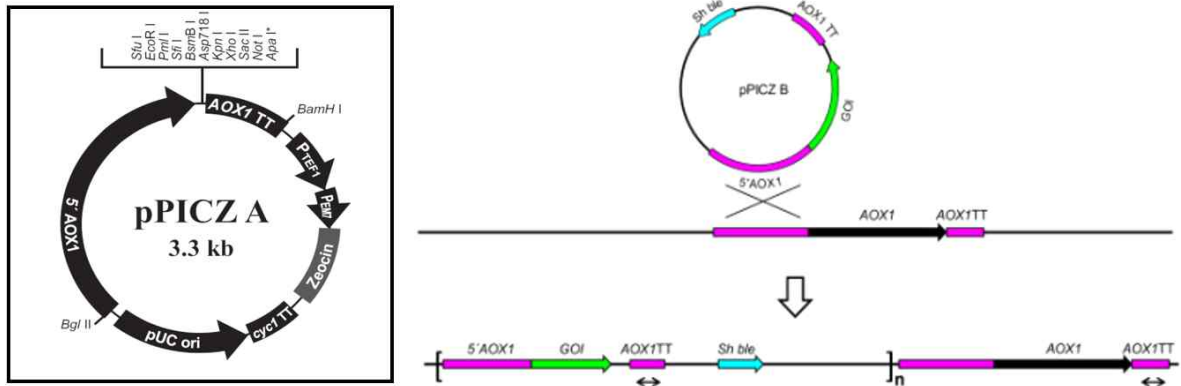


그림 3-9. pPIC vector 및 AOX1 region을 이용한 integration 원리

- ㉔ 경구용 제제를 만들기 위한 intra-cellular 형태로 단백질을 형성하는 *P. pastoris* vector인 pPICZ A, B, C를 확보.
- ㉕ 면역 단백질 발현량을 늘리기 위하여 *P. pastoris* codon usage에 맞게 gene codon optimization 실시(그림 3-10).

UUU 24.1(1963)	UCU 24.4(1983)	UAU 16.0(1300)	UGU 7.7(626)
UUC 20.6(1675)	UCC 16.5(1344)	UAC 18.1(1473)	UGC 4.4(356)
UUA 15.6(1265)	UCA 15.2(1234)	UAA 0.8(69)	UGA 0.3(27)
UUG 31.5(2562)	UCG 7.4(598)	UAG 0.5(40)	UGG 10.3(834)
CUU 15.9(1289)	CCU 15.8(1282)	CAU 11.8(960)	CGU 6.9(564)
CUC 7.6(620)	CCC 6.8(553)	CAC 9.1(737)	CGC 2.2(175)
CUA 10.7(873)	CCA 18.9(1540)	CAA 25.4(2069)	CGA 4.2(340)
CUG 14.9(1215)	CCG 3.9(320)	CAG 16.3(1323)	CGG 1.9(158)
AUU 31.1(2532)	ACU 22.4(1820)	AAU 25.1(2038)	AGU 12.5(1020)
AUC 19.4(1580)	ACC 14.5(1175)	AAC 26.7(2168)	AGC 7.6(621)
AUA 11.1(906)	ACA 13.8(1118)	AAA 29.9(2433)	AGA 20.1(1634)
AUG 18.7(1517)	ACG 6.0(491)	AAG 33.8(2748)	AGG 6.6(539)
GUU 26.9(2188)	GCU 28.9(2351)	GAU 35.7(2899)	GGU 25.5(2075)
GUC 14.9(1210)	GCC 16.6(1348)	GAC 25.9(2103)	GGC 8.1(655)
GUA 9.9(804)	GCA 15.1(1228)	GAA 37.4(3043)	GGA 19.1(1550)
GUG 12.3(998)	GCG 3.9(314)	GAG 29.0(2360)	GGG 5.8(468)

그림 3-10. *P. pastoris* codon usage table

- ㉖ *P. pastoris*의 codon usage의 major codon으로 치환하는 optimization과정을 통해 면역단백질 발현을 상승을 도모(그림 3-11, 3-12 및 3-13).

Optimized	1	ATGACATACCCTAGAAAGATACAGAAAGAAAGACATAGACCTAGATCACATTTGGGA
Original	1	ATGACCTATCCGAGACGAAGGTACAGACGAAGGAGACACCGTCCACGTAGTCATCTGGGG
Optimized	61	CAGATTTTGAGAAGAGACCTTGGTTGGTTCATCCAAGACACAGATACAGATGGAGAAGA
Original	61	CAAATCCTGAGGAGGCGACCATGGTTGGTTCATCCAGACACAGGTACAGATGGAGGCGT
Optimized	121	AAGAAATGGAATCTTTAACACCAGATTGCTAGAACTTTCCGGTTACACAGTTAAGAGAACT
Original	121	AAGAACGGCATCTTCAACACGCGTCTGTCAAGGACCTTCGGATACACGGTTAAGCGCACC
Optimized	181	ACAGTCACCACTCCATCATGGGCCGTTGATATGATGAGATTCAAATTGGATGACTTCGTC
Original	181	ACAGTGACTACCCCTTCTGGGCAGTCGACATGATGCGGTTCAAGCTGGACGACTTTGTG
Optimized	241	CCACCTGGTGGAGGTACAAATAAGATTTCTATCCCTTTTCCGAATACTACAGAATTAGAAAAG
Original	241	CCACCTGGCGGCGGACTAACAAAGATCAGCATCCCTTTCCGAGTACTACCGCATCCGAAAAG
Optimized	301	GTTAAGGTGAGTTCTGGCCATGTTCTCTATCACACAAGGTGACAGAGGATTGGTTCA
Original	301	GTGAAGGTGGAATCTGGCCTTGCTCTCCATAACGCAGGGTGATAGGGGTGTTGGCAGT
Optimized	361	ACCGCTGTCATTTGGATGACAACTTGGTCCAAAGGCTACAGCATTGACCTATGACCCCT
Original	361	ACTGCTGTCATCCTGGACGACAACTTGGTCCGAAAGCAACTGCGCTCACATACGACCCA
Optimized	421	TACGTTAACTACTCTTCAAGACATACTATCCCAACCTTTTTCCTACCACAGTAGATAT
Original	421	TACGTGAACCTACAGCTCTAGGCACACTATCCCTCAGCCATTTAGCTACCACTCCAGGTAC
Optimized	481	TTACCCCAAAACCTGTTTAGATTCCACTATGACTACTTTCAGCCTAACAAACAAGAGA
Original	481	TTTACCCTAAACCGGTCCTTGATAGCACCATCGACTACTTCCAGCCCAACAACAAGCGG
Optimized	541	AACCAATTGTGGTTGAGATTGCAGACTTCAGAAACGTTGATCATGTCGGATTGGGTACA
Original	541	AATCAGCTTTGGCTTCGTCTGCAAACCTCACGTAACGTGGATCACGTGGGCTCGGAACG
Optimized	601	GCAATTCGAAAATAGTAAGTACGATCAGGACTATAACATTAGAGTTACTATGTATGTCCAG
Original	601	GCTTTCGAGAACTCCAAGTACGACCAGGACTACAACATCAGGGTTACGATGTACGTGCGAC
Optimized	661	TTTAGAGAGTTAATTTGAAAGACCCACCATTTGAAGCCT
Original	661	TTCAGGGAGTTCAACCTGAAGGATCCGCCACTTAAGCCC

그림 3-11. *P. pastoris* codon usage를 이용한 PCV2b ORF2 codon optimization

Optimized	1	ATGTGTTAGCCAAACCAATTTTGAAGATTTTCTCAAAGTTCAATGTCCAAGCACCA
Original	1	ATGTGCTCCGCCAACCAACTTCCGCCGCTTCTTCTCAAAGTTCAACGTGACGGCCCCC
Optimized	61	GCCGTCGTCGTTAGGAGGATACTTACCAATTGGTGAAAACCAAGGATTAAATCTACA
Original	61	GCCGTGGTGGTCTGGCGGCTACCTGCCATCGGCGAGAACCAGGGCGTGAACCTCCACC
Optimized	121	TGGTATTGTGCAAGTAGACATCCAACCGCCTCCGGTGTTCACGGAATTTCTTGAAGTCAT
Original	121	TGGTACTGCGCCGGCCACCCACCGCCTCCGGGTGCACGGCATCTTCTGTGCCAC
Optimized	181	ATCAGAGGTGGACACGGTTTGAATTTGGAACTCTCAAGAGCCATTCGATCCTTCAAGT
Original	181	ATCCGCGGCGGCCACGGCTTCGAGATCGGCATCTCCAGGAGCCCTTCGACCCCTCCGGC
Optimized	241	TATCAGTTGTACTTACATAAGGCAACTAATGGAACACCAATGCAACTGCCAGATTGAGA
Original	241	TACCAGCTGTACCTGCACAAGGCCACCAACGGCAACCAACGCCACCGCCCGCTGCGC
Optimized	301	ATCTGTCAATCCCATCTTCAAAGACTTTAGGTCTACAGCTAACGATGACGTTACTACA
Original	301	ATCTGCCAGTCCCTCCTCCAAGACCCTGGGCCCCACCGCAACGACGACGTGACCACC
Optimized	361	GGAAAGAACTGTTGTTCAAATAGGCCATCCCTGCTCATATGTCTGAACACTCAGTTGTC
Original	361	GGCCGCAACTGCCTGTTCAACAAGGCCATCCCGCCACATGTCCGAGCACTCCGTGGTG
Optimized	421	GGTATTACCTGGGATAATGACAGATTACTGTCTTTCTGATAAGATCTACACTTCTAC
Original	421	GGCATCACCTGGGACAACGACCGGTGACCGTGTCTCCGACAAGATCTACCACTTCTAC
Optimized	481	TTCAAGAACGACTGGTCAAGAGTTGCTACTAAGTGTATAATTCCGGTGGATGCGCAATG
Original	481	TTCAAGAACGACTGGTCCCGGTGGCCACCAAGTGTACAACCTCCGGCGGTGCGCCATG
Optimized	541	CAATACGTTTACGAACCAACATACTACATGTTGAACGTCACCTCCGCTGGAGAGGATGGA
Original	541	CAGTACGTGTACGAGCCACCTACTACATGCTGAACGTGACCTCCGCCGGCGAGGACGGC

Optimized	601	ATCAGTTATCAGCCTTGACAGCCAACCTGCATTGGTTACGCTGCAAAATGTTTTGCTACT
Original	601	ATCTCCTACCAGCCTGCACCGCCAACCTGCATCGGCTACGCCGCCAACGTGTCGCCACC
Optimized	661	GAATCTCCAGGTCATATTCCTGAGGGATTTTCATTCAATAACTGGTCTTGTGTCCAAC
Original	661	GAGTCCCCCGGCCACATCCCCGAGGGCTTCTCCTCAACAACCTGGTCTGCTGTCCAAC
Optimized	721	GATAGTACTTTGTTCCACGGTAAAGTTGTCTTAACCAACCATGTTGGTTAACTGTTTG
Original	721	GACTCCACCCTGTTCCACGGCAAGGTGGTGTCCAACCAGCCCCTGCTGGTGAACGCCTG
Optimized	781	TGGGCTATTCCTAAGATCTACGGTTTGGGACATTTCTTTCTTTAATCAAACAATCGAT
Original	781	TGGGCCATCCCCAAGATCTACGGCTGGGCCACTTCTCTCCTCAACCAGACCATCGAC
Optimized	841	GGTGTGTTGCAATGGAGCCGCTGCACAGAGAGCACCAGAAGCCTTGAGATTCAACATCAAC
Original	841	GGCGTGTGCAACGGCCGCCGCCAGCGGCCGCCGAGGCCCTGCGCTTCAACATCAAC
Optimized	901	GACACTTCTGTATCTTAGCAGAGGGTTCAATTGTCTTGCATACCGCCTTAGGAACAAC
Original	901	GACACTCCGTGATCCTGGCCGAGGGCTCCATCGTGTGCACACCGCCCTGGGCACCAAC
Optimized	961	TTGTCTTCGTGTTTCAAAATTCAGTGATCCTCACTTAGCTACATTCGCAATTCATTG
Original	961	CTGTCTTCGTGCTCCAACCTCCTCGACCCCACTGGCCACCTTCGCCATCCCCCTG
Optimized	1021	GGTGCAACCCAAGTTCCTTATTACTGCTTTTGAAGTCGACACATAATAATTCTACCGTT
Original	1021	GGCGCCACCCAGGTGCCCTACTACTGCTTCTGAAGGTGGACACCTACAACCTCACCGTG
Optimized	1081	TACAAGTCTTGGTGTCTTACCACCTACTGTTAGAGAATCGTCATCACAAAGATGGT
Original	1081	TACAAGTCTCCTGGCCGTGCTGCCCCCAACGTCGCGGAGATCGTGATCACAAGTACGGC
Optimized	1141	GACGTTTACGTCAACGGTTTTGGATACTTGCATTTGGGATTGTTAGACGCTGTTACTATT
Original	1141	GACGTGTACGTGAACGGCTTCCGGCTACCTGCACCTGGGCCTGCTGGACGCCGTGACCATC
Optimized	1201	AAATTCACAGGTCACGGAACCGATGACGATGTCCTCGGTTTTTGGACTATCGCTAGTACA
Original	1201	AACTTCACCGGCCACGGCACCGACGACGATGTCCTCGGCTTCTGGACCATCGCTCCACC
Optimized	1261	AACTTCGTGATGCATTGATGAAAGTCCAAGGAAGTCAATTCAGAGAATCTTATATTGT
Original	1261	AACTTCGTGGACGCCCTGATCGAGGTGCAGGGCACCGCATCCAGCGCATCCTGTACTGC
Optimized	1321	GACGATCCAGTTTCCCAATTGAAGTGCAGTCAGGTCGCCTTTGATTTGGACGATGGTTTC
Original	1321	GACGACCCCGTGTCCAGCTGAAGTGTCCAGGTGGCCTTCGACCTGGACGACGGCTTC
Optimized	1381	TACCCATCTCTTCAAGAAATTTGTGTCTCATGAGCAACCAATCTATTGCTTACATTG
Original	1381	TACCCATCTCCTCCGCAACCTGCTGTCCACGAGCAGCCATCTCCTTCGTGACCCTG
Optimized	1441	CCTTCTTTAACGATCATTCAATTCGTTAACATCACTGTCTCCGCTAGTTTCGGTGGACAC
Original	1441	CCCTCCTCAACGACCACTCCTTCGTGAACATCACCGTGTCCGCTCCTTCGGGGGCCAC
Optimized	1501	TCTGGTGCCAACCTGATCGCTTACAGTACCACCTATTAATGGATTTCCAGTTTCTGTGT
Original	1501	TCCGGCGCAACCTGATCGCCTCCGACACCACCATCAACGGCTTCTCCTCCTTCGCGTG
Optimized	1561	GACACCAGACAGTTACTATCAGATTATTCATAAAGTTACATCTTCATATGGTTACGTC
Original	1561	GACACCCGCCAGTTCACCATCCGCTGTTCTACAACGTGACCTCCTCCTACGGCTACGTG
Optimized	1621	TCTAACTCACAAGATTCCTACTGCTTTTACTTTGTCAGTCTGTTAACGACTACTTGTCC
Original	1621	TCCAACCTCCAGGACTCCAACCTGCCCTTCACCTGCAGTCCGTGAACGACTACCTGTCC
Optimized	1681	TTTAGTAAGTTCTGTCTCTACTTCAATTTAGCTTCTGCATGCACAATGATTTGTTT
Original	1681	TTCTCCAAGTTCTGCGTGTCCACCTCCCTGCTGGCCTCCGCTGCACCATCGACCTGTT
Optimized	1741	GGTTATCCTGACTTCGGTTCCGGTGTAAAGTTTACCAGTTTGTACTTCCAATTCACCTAAG
Original	1741	GGCTACCCGACTTCCGGTCCGGGTGAAGTTACCTCCCTGTACTTCCAGTTCACCAAG
Optimized	1801	GGTGAATTGATCACAGGAACCCCAAGCCTTTGGAGGGTGTACTGATGTCCTATTCATG
Original	1801	GGCGAGCTGATCACGGCACCCCAAGCCCTGGAGGGGTGACCGACGTGTCCTTCATG
Optimized	1861	ACATTGGACGTTTGTACAAGTACACCATCTATGGTTTTAAGGGTGAAGGAATCATCACT
Original	1861	ACCCTGGACGTTGTCACCAAGTACACCATCTACGGCTTCAAGGGCGAGGGCATCATCACC
Optimized	1921	TTGACAACCTCCAGTTCTTGGCTGGTGTATTACACTTCCGATAGTGGACAATGTTA

Original	1921	CTGACCAACTCCTCCTTCTGCGCGGGTGTACTACACCTCCGACTCCGGCCAGCTGCTG
Optimized	1981	GCCTTTAAAAATGTTACCTCCGGTGCCTTTATAGTGTCACTCCATGTTCTTTCTCAGAA
Original	1981	GCCTTCAAGAACGTGACCTCCGGCGCGTGTACTCCGTGACCCCTGCTCCTTCTCCGAG
Optimized	2041	CAGGCCGCTTACGTTGACGATGACATTTGTTGGTGCATCTCTTCATTTGCCAAATAGTACT
Original	2041	CAGGCCGCTACGTGACGACGACATCGTGGCGGTGATCTCTCCCTGTCCAACCTCCACC
Optimized	2101	TTTAATAACACCAGAGAGTTACCTGGATTCTTTATCACTCAAACGATGGAAGTAACTGC
Original	2101	TTCAACAACACCCGCGAGCTGCCCGGCTTCTTCTACCACTCCAACGACGGCTCCAACCTGC
Optimized	2161	ACCGAACCTGTCTTGGTC
Original	2161	ACCGAGCCCGTCTGGTG

그림 3-12. *P. pastoris* codon usage를 이용한 PEDV-S1 codon optimization

Optimized	1	ATGTTGGAGAAATGTTTGACTGCTGGTTGCTGTAGTAGATTGTTGTCCTTGTGGTGTATC
Original	1	ATGTTGGAGAAATGCTTGACCGCGGGTGTGCTCGCGATTGCTTTCTTTGTGGTGTATC
Optimized	61	GTTCCTTTTGCTTCGCTGTTTTGGCAAATGCATCCAACGATTCTTCATCCCATTTGCAA
Original	61	GTGCCGTTCTGTTTTGCTGTGCTCGCCAACGCCAGCAACGACAGCAGCTCCCATCTACAG
Optimized	121	TTGATCTATAATTTGACTTTGTGTGAATTGAACGGTACAGATTGGTTAGCAAATAGTTT
Original	121	CTGATTTACAACCTTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAGCTAACAAATTT
Optimized	181	GACTGGGCCGTTGAGTCATTTTCCAGTTTTGACCCATATCGTTTCATACGGA
Original	181	GATTGGGCAGTGGAGAGTTTTGTCATCTTCCCGTTTTGACTCACATTGTCTCCTATGGT
Optimized	241	GCTTTAACTACATCCCACTTTTTGGACACTGTGCTTTAGTTACCGTCTCTACTGCAGGT
Original	241	GCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAGTCGCTTTAGTCACTGTGTCTACCGCCGGG
Optimized	301	TTCGTCCACGGAGATATGTTTTGAGTTCTATCTATGCCGTCTGTGCTTTGGCTGCATTA
Original	301	TTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTAAGTAGCATCTACGCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTG
Optimized	361	ACATGCTTTGTTATCAGATTCGCCAAAACCTGTATGAGTTGGAGATATGCTTGCACAAGA
Original	361	ACTTGCTTCGTATTAGGTTTGCAAAAGAAATGCAATGCTGCGCTACGCGTGTACCAGA
Optimized	421	TACACCAATTTCTTGTGGATACTAAGGGTAGATTGTATAGATGGAGATCTCCTGTTATT
Original	421	TATACCAACTTCTTCTGGACACTAAGGGCAGACTCTATCGTTGGCGGTCCGCTGTCATC
Optimized	481	ATCGAAAAGAGAGGTAAGTTGAAGTCGAGGGACATTTGATTGACTTAAAGAGAGTTGTC
Original	481	ATAGAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTCGAAGGTCATCTGATCGACCTCAAAGAGTTGTG
Optimized	541	TTGGACGGTTCACTCGCAACCAATCACAAGAGTCAGTGCCGAGCAATGGGGAAACCT
Original	541	CTTGATGGTTCCGTGGCAACCCCTATAACCAGAGTTTCAGCGGAACAATGGGGTCTGCTC

그림 3-13. *P. pastoris* codon usage를 이용한 PRRSV 7-1 ORF5 codon optimization

㉠ PCV2b ORF2/ PRRSV 7-1 ORF2a, 2b, 3, 4, 5/ PEDV-S1을 DNA 합성을 통한 codon optimization을 실시하였으며 pPICZ A vector에 cloning 실시.

㉡ *P. pastoris* X-33 transformation 기법 적용 및 최적화

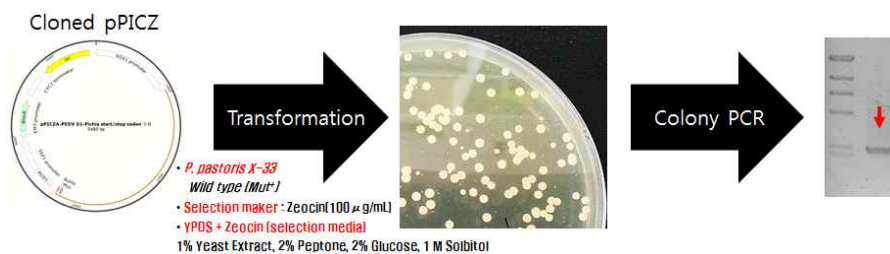


그림 3-13. colony PCR을 통한 transformation 유무 확인

- ③ *P. pastoris* X-33을 위한 small scale (25 mL) 배양을 통한 electroporation 기법 확립 및 PCR을 통한 transformation 유무 확인
- ④ AOX1 promoter을 이용한 methanol induction 실시 및 단백질 발현 확인

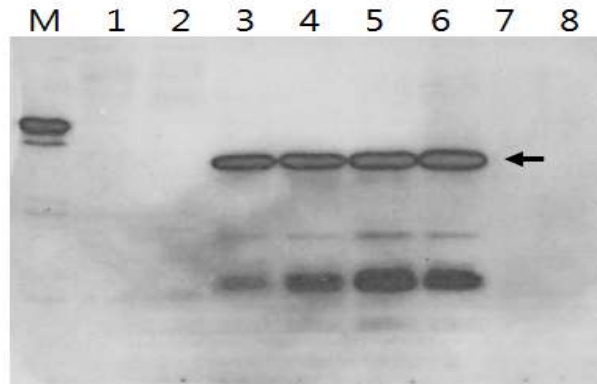


그림 3-14. Western blot을 이용한 *P. pastoris*에서 발현된 PCV2b ORF2; size, ~36 kDa

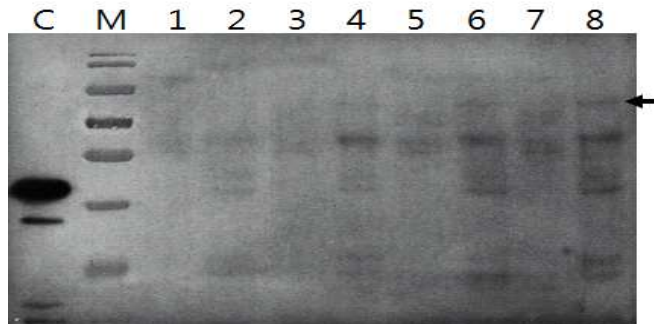


그림 3-15. Western blot을 이용한 *P. pastoris*에서 발현된 PEDV-S1; size, ~80 kDa

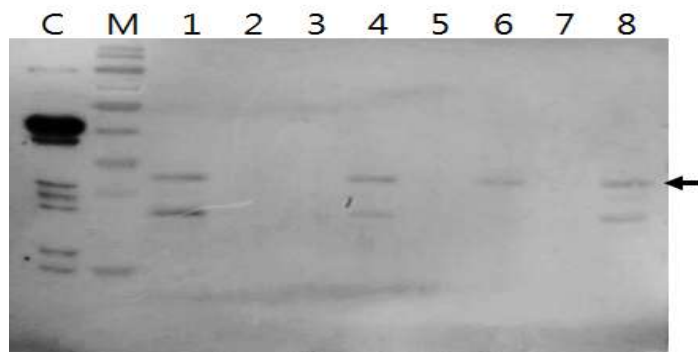


그림 3-16. Western blot을 이용한 *P. pastoris*에서 발현된 PRRSV 7-1 ORF5; size, ~26 kDa

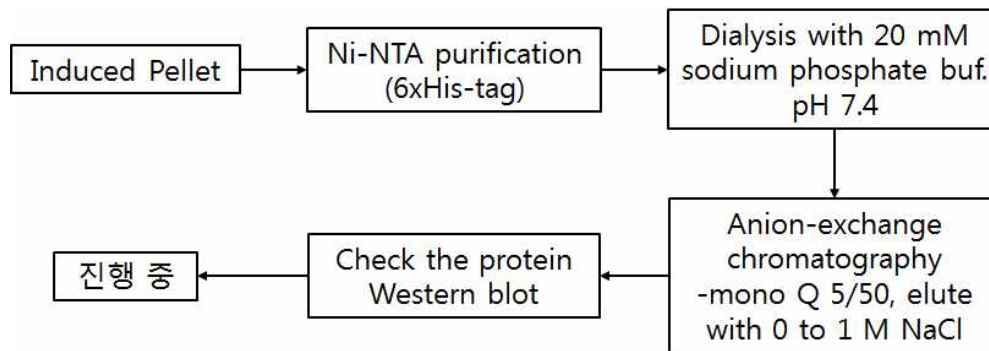


그림 3-17. 발현된 면역단백질에 대한 정제 모식도

- ㉔ Western blot 결과에서처럼 *P. pastoris* X-33에서 성공적으로 모든 단백질이 발현 되는 것을 확인할 수 있었으며, Ni-NTA resin을 통한 단백질 정제 과정 진행 중

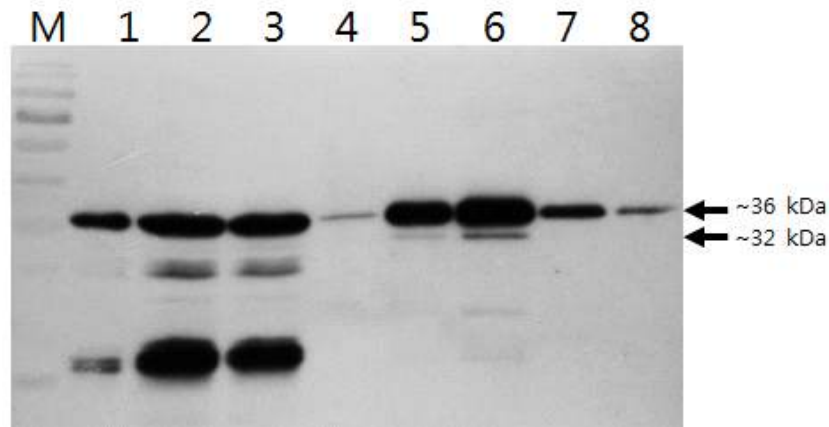


그림 3-18. Western blot 결과. Ni-NTA resin을 이용한 발현된 PCV2b ORF2 정제. imidazole 농도별 elution fraction. Lane 1, flow through; lane 2, cell debris; lane 3, crude extract; lane 4, 100 mM; lane 5, 200 mM; lane 6, 300 mM; lane 7, 400 mM; lane 8, 500 mM.

- ㉕ PCV2b ORF2에 대해서는 현재 6x His-tag에 의한 정제가 되는 것을 확인하였으나 비특이적 단백질이 같이 정제 되는 것으로 확인이 되어 ion exchange chromatography 진행 중
- ㉖ *P. pastoris* X-33에서 발현된 PCV2b ORF2의 경우 실제 단백질 크기(32 kDa) 보다 약 2~5 kDa보다 큰 35 kDa 이상으로 확인이 되며, 이는 143 amino acid 잔기의 asparagine에 N-glycosylation이 일어난 것으로 예상 됨.

3. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립 (제1협동)

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 항균활성이 강화된 리소좀 분리, 효능 검증 및 리소좀의 안정성 평가

(가) 유전자 재설계를 통해 활성이 강화된 리소좀 분리 및 효능 검증

- 효모 내의 리소좀의 세 가지 조건별 단백질체 분석을 2DE를 통해 실행하고 특정 조건에의 노출 시 targeting에 변화가 생기는 단백질 발현 양상 분석결과를 통해 리소좀 내의 유용기능성 효소를 선정하여 재조합 균주 제작함

① 본 과제에서 확보한 세 가지 유형의 리소좀

- Normal 효모에서 추출한 리소좀, H₂O₂를 처리하여 리소좀의 활성을 증가시킨 효모에서 추출한 리소좀, 그리고 특정 조건에서 노출 시 변화가 생기는 target 단백질을 재조합한 균주에서 추출한 리소좀임(그림 3-19).

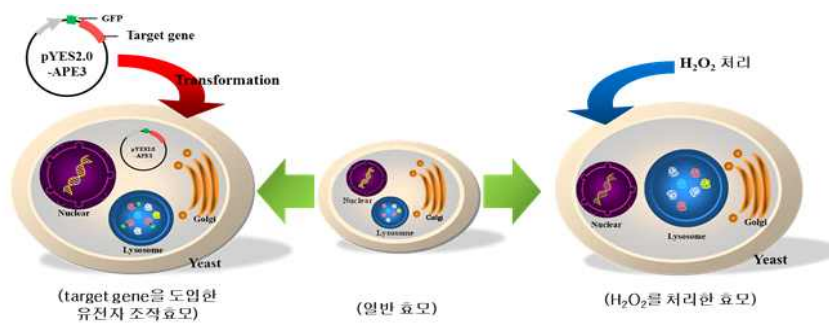


그림 3-19. 세 가지 유형의 리소좀

② *S. cerevisiae*에 특정 조건에서 변화하는 유전자를 포함하는 재조합 균주의 제작

- 진핵미생물인 *S. cerevisiae* s2805를 사용하였으며, 단백질 발현 벡터로는 pYES2 (Invitogen, Carlsbad, CA, USA) 벡터를 사용함
- *S. cerevisiae*로부터 게놈 DNA를 추출, PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하여 target 유전자를 증폭, 효모-단백질 발현벡터인 pYES2 (Invitogen, Carlsbad, CA, USA)를 기본 벡터로 사용, 전기천공법 (Electroporation)으로 형질전환 → 단일콜로니 확보, DNA 염기서열 결정법(Sequencing)으로 염기서열을 확인, aminopeptidase Y, acid trehalase, GTP-binding protein, vacuolar protease B, thioredoxin 2 gene를 포함하는 재조합 미생물을 각각 pMBTL-JH, pMBTL-M1, pMBTL-M2, pMBTL-T1, pMBTL-T2 라 명명함.

③ 세 가지 유형의 리소좀의 항균/항암활성 분석(표 3-12)

- 일반 리소좀에 비해 나노 집적화된 리소좀의 항균/항암활성이 높음
- 재조합 균주에서 분리한 리소좀 중 aminopeptidase Y가 도입된 균주에서 분리된 리소좀의 항균활성이 가장 높게 나타남
- 나노 집적화된 리소좀과 비교하였을 때에도 aminopeptidase Y가 도입된 재조합된 균주에서 분리된 리소좀의 항균활성이 가장 높게 나타남

표 3-12. 세 가지 타입의 리소좀의 항균/항암활성

리소좀의 종류 (5% 리소좀)	리소좀의 Mortality (%)			
	Host cell	target protein	Antimicrobial activity on <i>E. coli</i>	Anticancerous activity on HeLa
Normal 리소좀	Normal 효모	-	50.62	37.95
나노집적화된 리소좀	H ₂ O ₂ 처리된 효모	-	76.88	90.45
재조합 균주에서 분리된 리소좀	pMBTL-JH	Aminopeptidase Y	83.13	69.79
	pMBTL-M1	Acid trehalase	53.75	20.54
	pMBTL-M2	GTP-binding protein	67.90	23.14
	pMBTL-T1	Vacuolar protease B	73.14	26.47
	pMBTL-T2	Thioredoxin 2	52.64	19.51

(나) 피부조직상에서 리소좀의 독성 검증 및 *In vivo*상에서의 리소좀의 항균활성 검증

① 초원심분리기 (ultracentrifuge)를 이용한 리소좀 분리

㉔ *In vivo*상에서 리소좀의 항균활성을 확인하기 위하여 순수한 리소좀 분리를 시도함

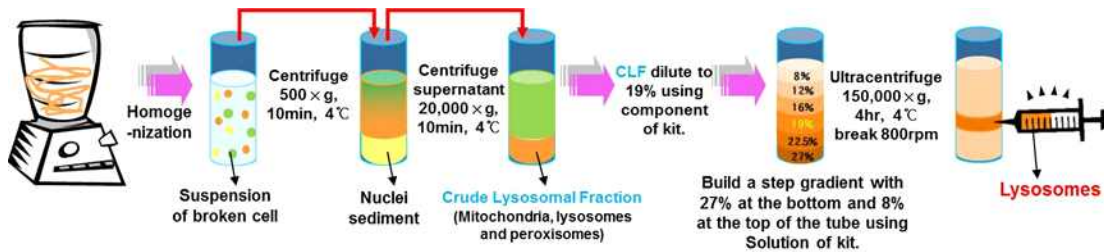


그림 3-20. Ultracentrifuge를 이용한 순수한 리소좀 분리방법

㉔ 실험 방법 : 초원심분리기를 이용한 순수한 리소좀을 분리법(그림 3-20)

㉑ 효모를 키운 후, cell down해서 모은 효모에 Tris-SO₄ buffer에 DTT를 첨가 한 용액을 넣어 15분간 배양 → 효모의 세포벽을 부드럽게 함

㉒ sorbitol K⁺ buffer를 넣어 suspension한 후 40%, 10s on/10s off, 10분간 sonication하여 세포벽을 깨주고, breaking buffer를 첨가하여 세포벽을 완전히 분해하여 미토콘드리아, 퍼옥시좀이 같이 포함된 crude 리소좀 (CLF: crude lysosomal fraction)을 분리

㉓ 초 원심분리를 위해 농도별로 27, 22.5, 19, 16, 12, 8% sucrose용액을 제조하고 19% sucrose용액에 CLF를 첨가하여 넣은 후 ultracentrifuge에서 150,000×g, 4hr 동안 시행

㉔ 순수한 리소좀 분리

② 정상 쥐 모델에서 리소좀의 독성 검증

㉑ 리소좀의 독성여부를 판단하기 위하여 정상 쥐 모델에 리소좀을 주입하여 혈액검사 (complete blood count), 혈액 화학적 분석(blood chemistry), 조직병리학 (histopathology) 분석을 진행함

표 3-13. 리소좀이 주입된 쥐 모델에서의 혈액 검사 (complete blood count)

Group	1	2	3	4	5	Ref.
WBC	2.30±0.14	2.35±0.21	2.30±2.26	2.45±0.35	2.50±0.28	3.0-15.0
RBC	6.65±0.15	6.83±0.01	7.43±0.66	6.52±0.10	6.14±0.20	5.0-12.0
HGB	13.4±0.00	12.0±0.21	10.55±0.78	14.3±0.14	12.9±0.00	11.1-18.0
HCT	41.8±0.35	41.3±0.14	45.55±4.03	40.5±0.00	36.8±0.57	36.0-52.0
PLT	50.0±0.00	454±571	305±233	50.0±0.00	292±328	140-600
MCV	62.5±2.12	60.5±0.71	61.0±0.00	62.0±1.41	60±1.41	44-69
MCH	20.2±0.35	17.7±0.21	15.45±0.64	21.9±0.21	21.0±0.64	12.0-24.5
MCHC	32.1±0.42	29.2±0.57	25.45±0.64	35.3±0.29	35.1±0.42	21.6-42.0

- ㉞ 그 결과, 혈액검사에서 적혈구, 백혈구 등 모든 수치에서 기준치 범위 안에 포함되었고, 화학적 분석에서도 특별한 이상이 나타나지 않는 것을 확인함(표 3-13)
- ㉞ 조직병리학에서도 간, 심장, 폐, 신장, 뇌의 조직에서 아무런 독성이 나타나지 않음 (그림 3-21)

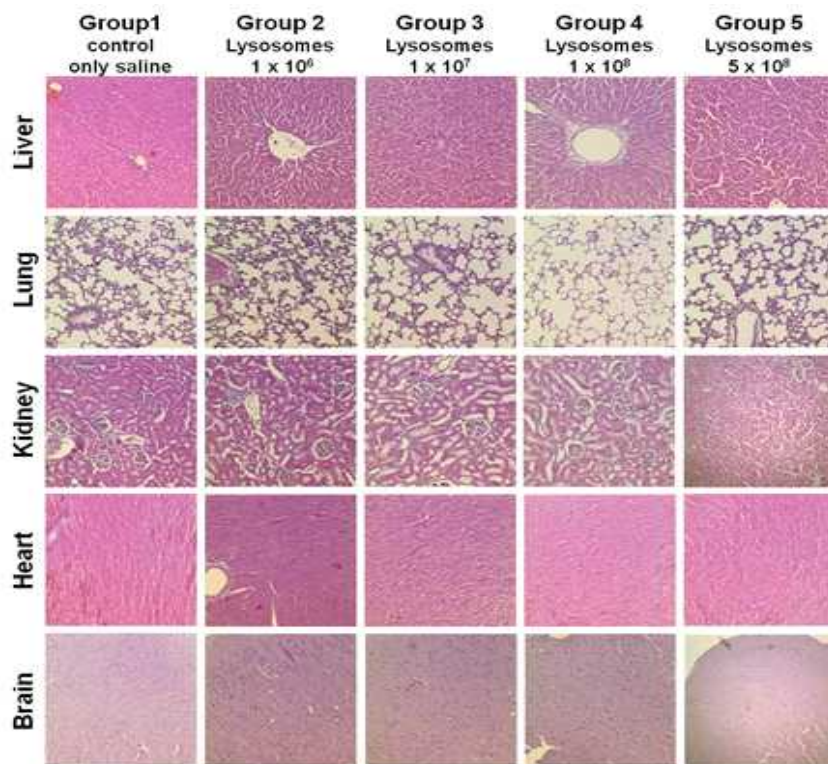


그림 3-21. 리소좀이 주입된 쥐 모델에서의 조직 검사

- ③ *In vivo* 상에서의 리소좀의 항균활성 검증
- ㉞ 병원균에 감염된 쥐 모델에 리소좀을 주입 후, 혈액내의 병원균 수치를 확인
- ㉞ 실험 방법
- 8주령 male mice, 250g, 10마리 - 병원균 주입 농도 1×10^{13} CFU, 리소좀 주입 농도 1×10^7 개 리소좀을 주입한 후 5, 10, 20, 30, 60분후에 혈액 내 병원균의 수치를 확인

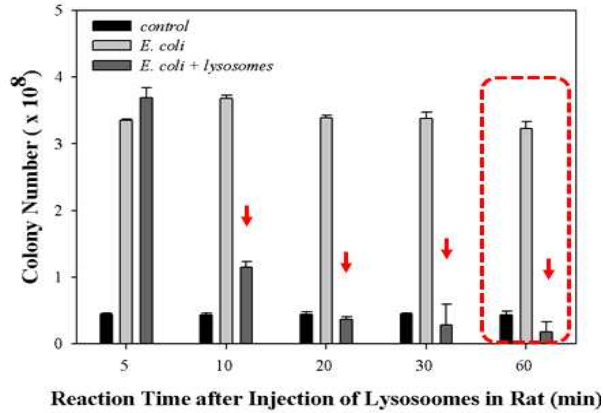


그림 3-22. 병원균에 감염된 쥐 모델에서 리소좀의 항균활성 검증

㉔ 실험 결과

- 리소좀을 주입하지 않은 쥐 모델에서는 병원균의 수치가 변화하지 않음을 확인하였으며, 리소좀을 주입한 쥐 모델에서는 10분 후부터 병원균의 수치가 줄었다가 20분 이후부터 정상 쥐 모델의 수치와 비슷해지는 것을 관찰함(그림 3-22)

④ 인공피부조직에서 리소좀의 안전성 검증

- Kojic acid의 경우는 인공세포가 손상되어 생존력이 약 10% 정도로 나타났으며, 리소좀의 경우에는 농도와 상관없이 인공피부조직의 생존력에 영향을 주지 않음을 확인함(그림 3-23)

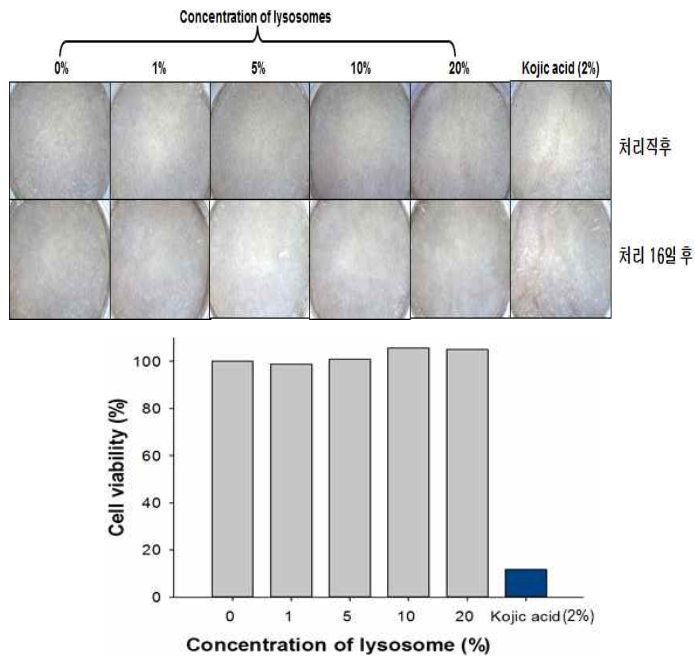


그림 3-23. 인공피부조직에서 리소좀의 안전성

(다) 리소좀의 안정성 및 활용가능성 평가

① 보관 온도에 따른 리소좀의 안정성 확인(그림 3-24)

- 4°C와 20°C에서 보관 시 활성의 변화를 관찰
- 20°C에서는 약 90일까지는 리소좀의 활성이 높게 유지되는 것이 관찰되었으며, 90일

이후부터 활성이 급격히 감소, 200일 경과 시 약 40%로 급감

- 4°C에서는 90일이 지난 후에도 활성이 잘 유지, 천천히 활성이 감소하며, 200일 경과 시 50% 이상의 활성을 보임

② 보관온도에 따른 나노 집적화된 리소좀의 안정성 확인(그림 3-25)

- 5%로 확인 결과, 170일까지 확인하였을 때 활성의 변화 없이 약 90% 까지 유지되었으며, 리소좀내로의 유용효소 나노집적화를 통해 장기간 안정성이 증가함

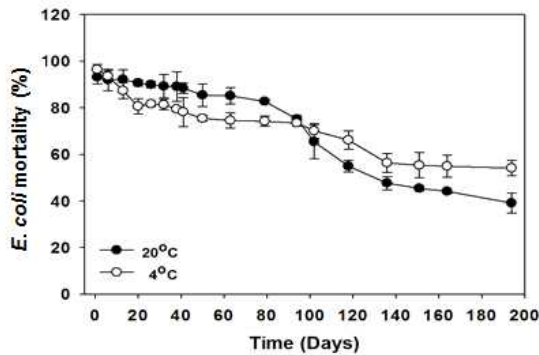


그림 3-24. 보관온도에 따른 리소좀의 안정성

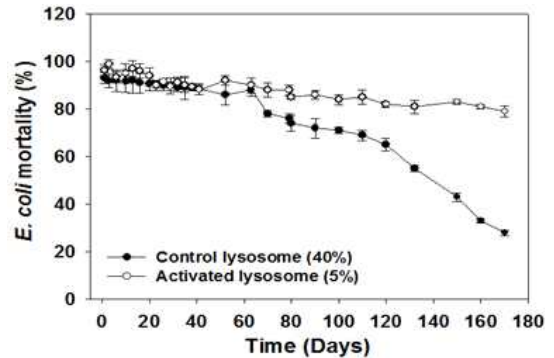


그림 3-25. 나노 집적화된 리소좀의 안정성

③ 리소좀의 경구 투여 활용을 위한 검증

- 리소좀을 경구 투여용으로 활용 : 알지네이트와 알지네이트 올리고당에 리소좀을 고정함
- 위와 같은 pH1.2인 용액에서 particle이 형성, 장액과 같은 pH6.8용액에서는 particle이 용해됨
- pH에 따라 particle이 유지 및 용해 될 수 있는 알지네이트를 이용하는 것이 적합함
- 알지네이트와 알지네이트 올리고당에 고정한 리소좀을 이용하여 항균활성을 확인한 결과, 고정화된 리소좀의 항균활성이 잘 유지되면서 약 90% 활성이 나타남을 확인함(그림 3-26).

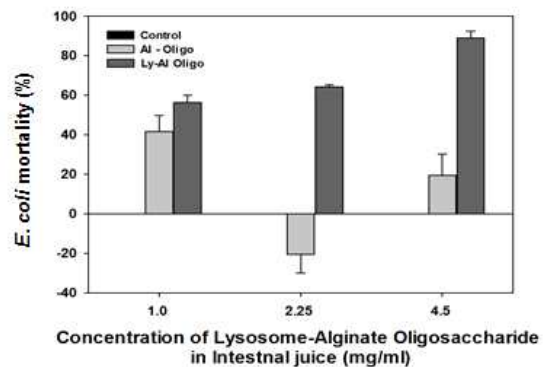
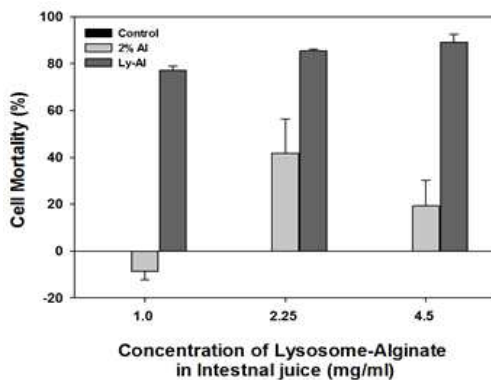


그림 3-26. 알지네이트와 알지네이트 올리고당에 고정화한 리소좀의 항균활성

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 균류 자원으로부터 neuraminidase 저해제의 탐색

(가) 균류 추출물을 이용한 neuraminidase 저해제의 스크리닝

- 덕유산, 용문산, 오대산 등에서 채취한 410 여종의 자생균류 추출물을 메탄올로 추출하여 100 µg/mL의 농도로 제조한 후 neuraminidase 저해활성을 측정함. 그 결과 장수진흙버섯으로 불리고 있는 장수진흙버섯이 강력한 neuraminidase 저해활성을 나타냄(표 3-14, 그림 3-27). 따라서 본 연구에서는 장수진흙버섯으로부터 활성성분을 분리, 정제하고 화학구조를 규명한 후 생물활성을 평가함.

표 3-14. 자생균류 추출물의 neuraminidase 저해 활성

Samples	Scientific name	Inhibition rate (%)	Samples	Scientific name	Inhibition rate (%)
장수진흙버섯	<i>Phellinus baumii</i>	87.0	꽃송이버섯	<i>Sparassis crispa</i>	35.4
기와충 버섯	<i>Inonotus xeranticus</i>	84.4		<i>Pholiota</i> sp.	34.5
털귀신그물버섯	<i>Strobilomyces confusus</i>	54.7	미친쓴맛그물버섯	<i>Tylophilus fumosipes</i>	34.5
솔버섯	<i>Tricholomopsis rutilans</i>	54.4	까치버섯	<i>Polyozellus multiplex</i>	34.4
	<i>Stereopsis</i> sp.	53.5	자주출각버섯	<i>Laccaria amethystina</i>	34.3
제주쓴맛그물버섯	<i>Tylophilus neofelleus</i>	53.2	꽃잎우단버섯	<i>Paxillus curtisii</i>	34.0
	<i>Pisolithus tinctorius</i>	52.6	젓비단그물버섯	<i>Suillus granulatus</i>	33.0
	<i>Suillus</i> sp.	50.7	다형공교두리버섯	<i>Xylaria polymorpha</i>	32.6
은빛쓴맛그물버섯	<i>Tylophilus eximius</i>	50.7	절구버섯	<i>Russula nigricans</i>	32.5
깎배기무당버섯	<i>Russula foetens</i>	50.0		<i>Strobilomycetacea</i> sp.	32.2
				<i>Sterium</i> sp.	31.7
비늘버섯	<i>Pholiota squarrosa</i>	48.1	혈색무당버섯	<i>Russula sanguinea</i>	31.5
흙무당버섯	<i>Russula senecis</i>	45.4	붉은비단그물버섯	<i>Suillus pictus</i>	31.5
황갈색시루뻐버섯	<i>Inonotus mikadoi</i>	40.0		<i>Xeromphalina tenuipes</i>	30.5
밀진색 무당버섯	<i>Russula laurocerasi</i>	38.9	말굽버섯	<i>Fomes fomentarius</i>	30.1
갈색꽃구름버섯	<i>Stereum ostrea</i>	38.5	넓은솔버섯	<i>Oudemansiella platyphylla</i>	29.8
이끼살이버섯	<i>Xeromphalina campanella</i>	37.9	은행잎우단버섯	<i>paxillus panuoides</i>	28.4
명아주개떡버섯	<i>Tyromyces sambuceus</i>	37.1	죽제비논물버섯	<i>Psathyrella candolleana</i>	27.5
능이버섯	<i>Sarcodon asprata</i>	37.0	재비늘버섯	<i>Pholiota highlandensis</i>	26.2
망공버섯	<i>Entonaema splendens</i>	36.7	빨간구멍그물버섯	<i>Boletus subvelutipes</i>	25.9
괘리틀버섯	<i>Pholiota lubrica</i>	36.7		<i>Paxillus</i> sp.	25.6
망피만가닥버섯	<i>Lyophyllum shimeji</i>	36.6	검은잔나비버섯	<i>Fomitopsis nigra</i>	25.1
털귀신그물버섯	<i>Strobilomyces confusus</i>	36.5	큰갯버섯	<i>Macrolepiota procera</i>	40.0
녹슨비단그물버섯	<i>Suillus laricinus</i>	36.4			

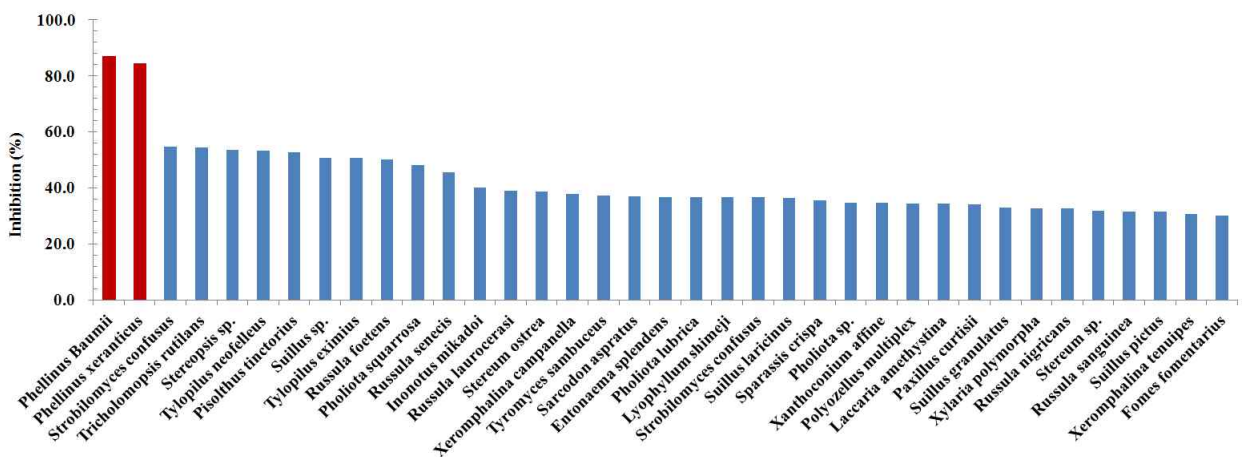


그림 3-27. 자생균류 추출물의 neuraminidase 저해 활성. *Phellinus* 속 균류에서 월등히 우수함.

(나) 장수진흙버섯 유래 neuraminidase 저해물질의 분리, 화학구조 및 활성평가

① 장수진흙버섯 유래 neuraminidase 저해물질의 분리 및 정제

- 장수진흙버섯 메탄올 추출물로부터 활성성분을 분리, 정제하였으며 그 과정은 다음과 같음. 장수진흙버섯을 메탄올로 추출한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물을 확보함. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁하고, n-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 butanol 순으로 극성에 따라 분획하여 분획물을 확보함. 분획물의 neuraminidase 저해 활성 측정 결과, ethyl acetate 분획물이 강한 활성을 나타냄(그림 3-28).

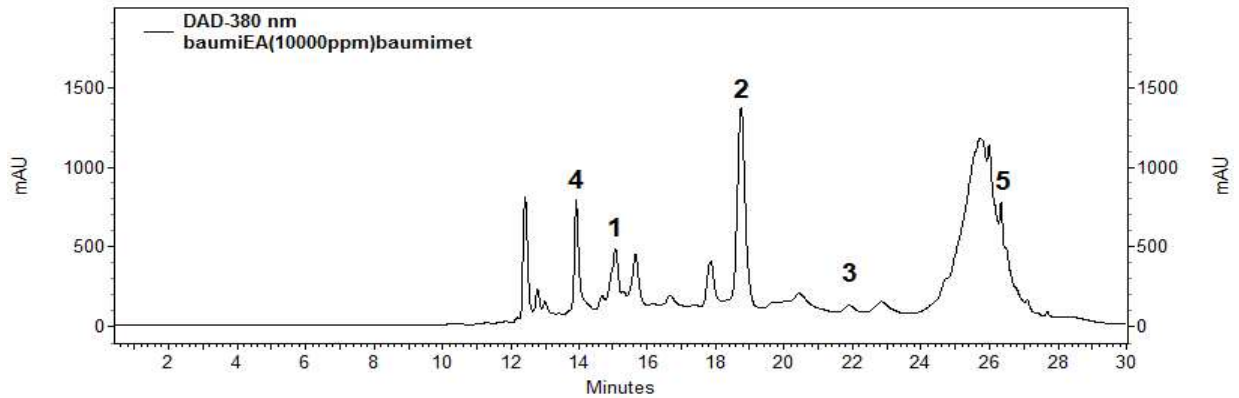


그림 3-28. 장수진흙버섯 에틸아세테이트 분획물과 활성화합물의 HPLC profile.

1, hispidin; 2, hypholomine B; 3, Inoscavin A; 4, davallialactone; 5, phelligridin D

- 저해활성이 강한 ethyl acetate 분획물을 chloroform-methanol (40:1 → 1:1)을 용출 용매로 한 silica gel column chromatography를 실시하여 9개의 분획 (Fr. 1-9)으로 나눔. 주 화합물이 포함된 활성분획 Fr. 3을 preparative HPLC을 이용하여 retention time 35분의 PB-1 화합물을 정제함. 활성분획 Fr. 4에 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography (methanol)를 실시하여 노란색 분획물을 얻음. 노란색 분획물을 ODS column chromatography (20-100% methanol)와 Sephadex LH-20 (70% methanol) column chromatography를 실시하여 얻어진 활성물질 순도를 높이기 위하여 preparative HPLC (40% methanol, 0.04% trifluoroacetic acid)를 실시하여 화합물 PB-2를 정제함. 또 다른 활성분획 Fr. 6은 Sephadex LH-20 column chromatography (70% methanol)를 실시한 후 ODS Sep-pak (20-100% methanol)과 preparative HPLC (40% methanol, 0.04% trifluoroacetic acid)를 수행하여 화합물 PB-3을 정제함. 활성분획 Fr. 7은 Sephadex LH-20 column chromatography (70% methanol)와 preparative HPLC (40% methanol, 0.04% trifluoroacetic acid)를 실시하였고, 그 결과 화합물 PB-4와 PB-5을 정제함 (그림 3-29).

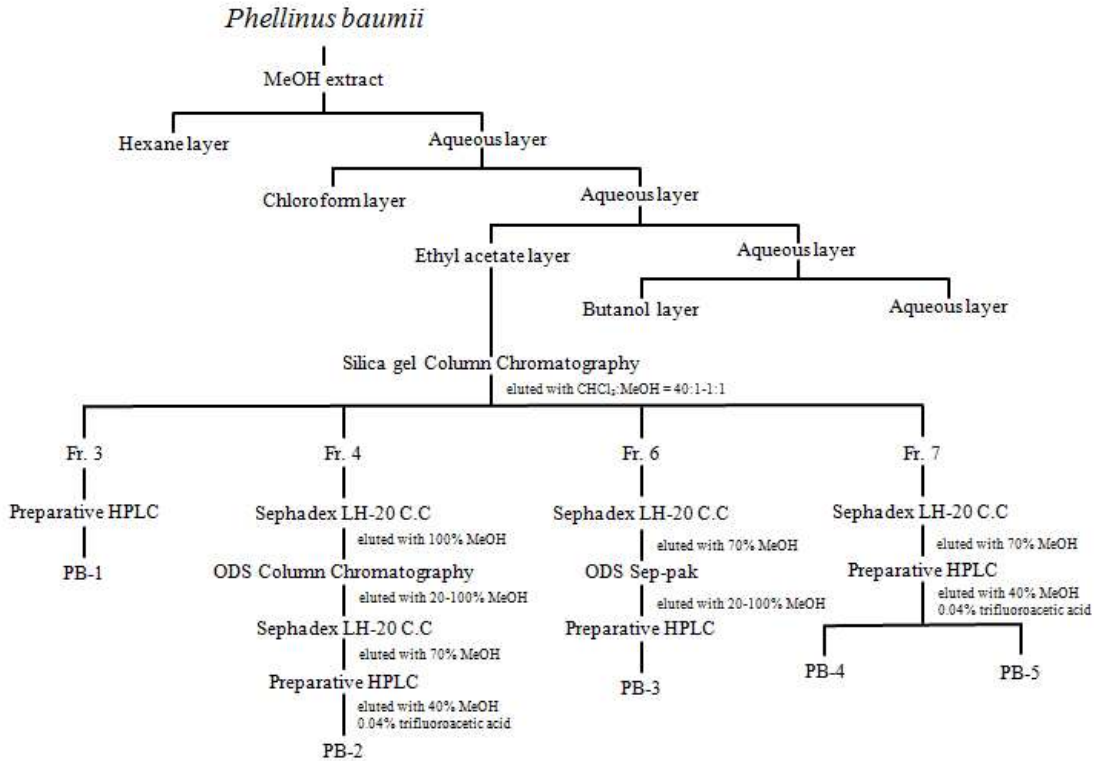


그림 3-29. 장수진흙버섯의 메탄올 추출물로부터 활성물질의 분리 및 정제

② 장수진흙버섯 유래 neuraminidase 저해물질의 화학구조 규명

㉞ 화합물 PB-1의 화학구조

- 장수진흙버섯으로부터 정제한 화합물 PB-1의 화학구조를 규명하기 위하여 CD_3OD 에 녹여 1H NMR spectrum을 측정하여 해석함. 그 결과 7.20 (1H, d, $J = 15.8$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.84 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.49 (1H, d, $J = 15.8$ Hz), 6.01 (1H, s) ppm에서 피크가 관찰됨(그림 3-30). 이같은 결과와 문헌검색을 통하여 본 화합물을 hispidin으로 동정함(그림 3-31).

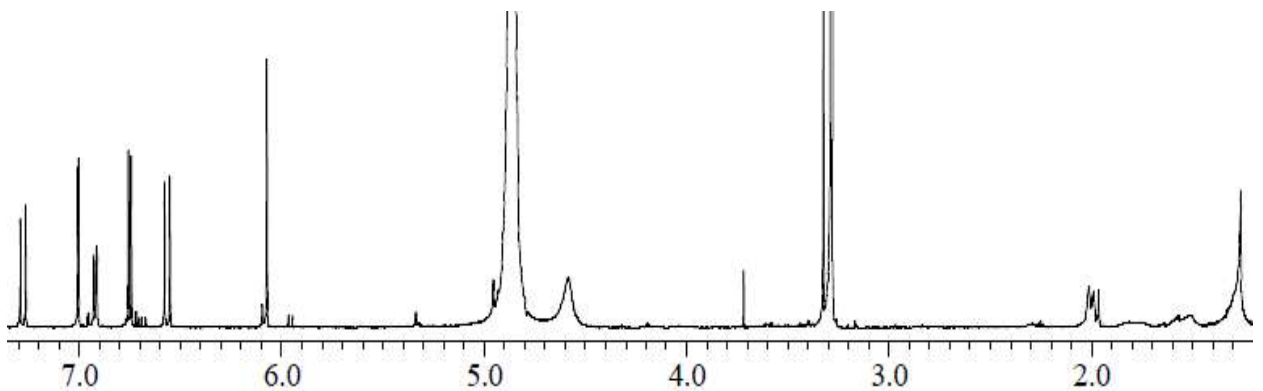
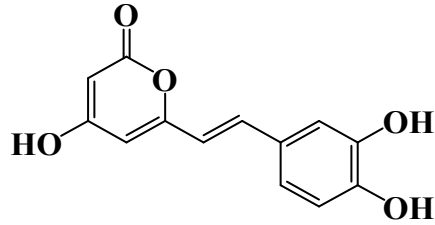


그림 3-30. 활성물질 PB-1의 1H NMR spectrum



PB-1 (= Hispidin)

그림 3-31. 활성물질 PB-1의 화학구조

㉞ 화합물 PB-2의 화학구조

- 정제한 활성 화합물 PB-2의 화학구조를 규명하기 위하여 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석함. ¹H NMR (600 MHz) spectrum을 해석한 결과, 7.38 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-8), 7.05 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-10), 6.96 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-14), 6.80 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-10'), 6.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-13'), 6.78 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-13), 6.72 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-14'), 6.67 (1H, dd, *J* = 15.8 Hz, H-7), 6.40 (1H, s, H-5), 6.08 (1H, s, H-5'), 5.77 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-8'), 4.30 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-7') ppm에서 피크가 관찰됨(그림 3-32). 이 같은 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 hypholomine B로 동정함(그림 3-33).

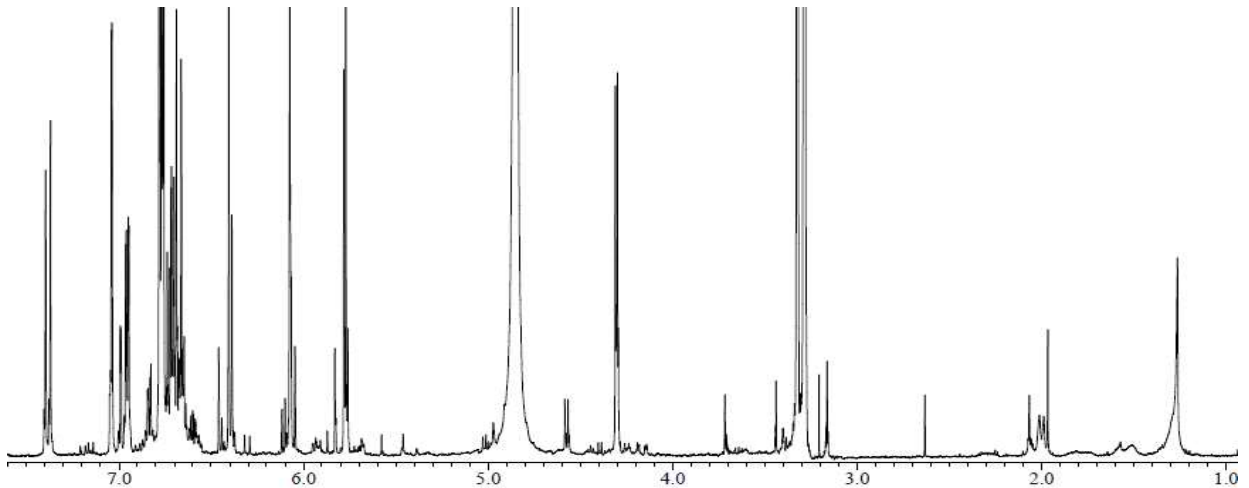


그림 3-32. 활성물질 PB-2의 ¹H NMR spectrum

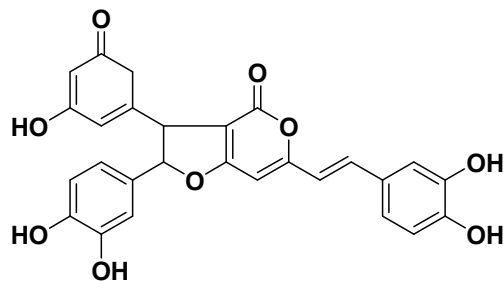


그림 3-33. 활성물질 PB-2의 화학구조

㉔ 화합물 PB-3의 화학구조

- 정제한 활성 화합물 PB-3의 화학구조를 규명하기 위하여 DMSO- d_6 에 녹여 ^1H NMR spectrum)을 측정하여 해석함. ^1H NMR (600 MHz) spectrum을 해석한 결과, 7.33 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 7.09 (1H, s, H-9), 7.01 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-13), 6.80 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-12), 6.78 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-10'), 6.74 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.68 (1H, d, $J=8.3$, H-7'), 6.54 (1H, dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, H-11'), 6.50 (1H, s) 5.66 (1H, s, H-5'), 5.63 (1H, s, H-2), 1.98 (3H, s, H-1') ppm에서 피크가 관찰됨(그림 3-34). 이 같은 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 inoscavin A로 동정함(그림 3-35).

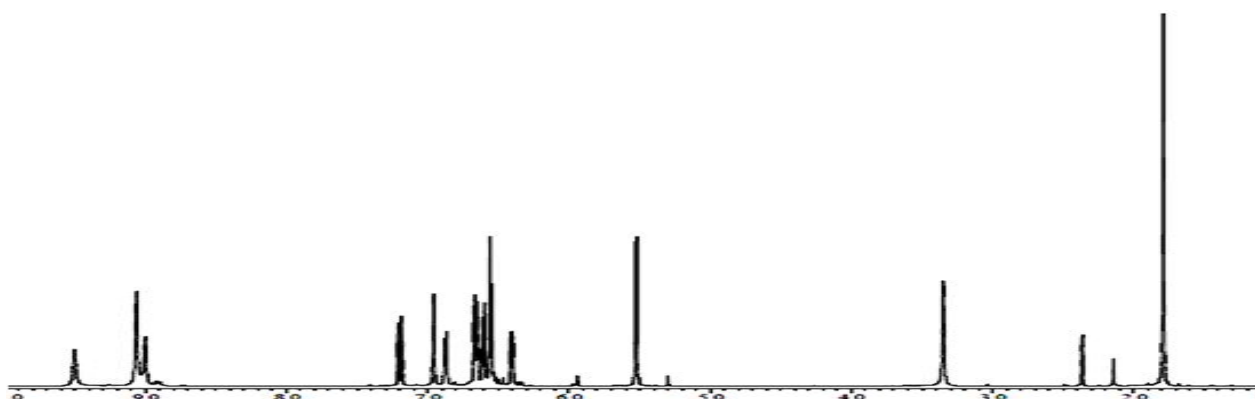


그림 3-34. 활성물질 PB-2의 ^1H NMR spectrum

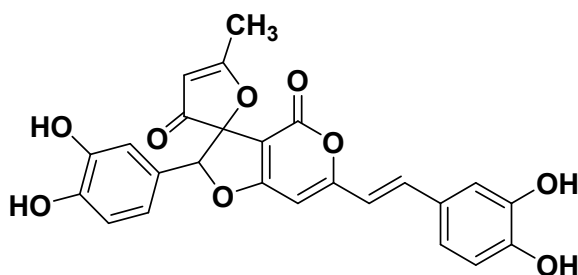


그림 3-35. 활성물질 PB-3의 화학구조

㉕ 화합물 PB-4의 화학구조

- 목질진흙버섯으로부터 정제한 화합물 PB-4의 화학구조를 규명하기 위하여 CD_3OD 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석함. ^1H NMR (600 MHz) spectrum을 해석한 결과 7.22 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6.99 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-9), 6.91 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-13), 6.87 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-8'), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-12), 6.71 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-5), 6.68 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-11'), 6.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-6'), 5.96 (1H, s, H-4), 5.76 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-8'), 5.49 (1H, s, H-3'), 4.28 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-5') ppm에서 피크가 관찰됨(그림 3-36). 이 같은 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 davallialactone으로 동정함(그림 3-37).

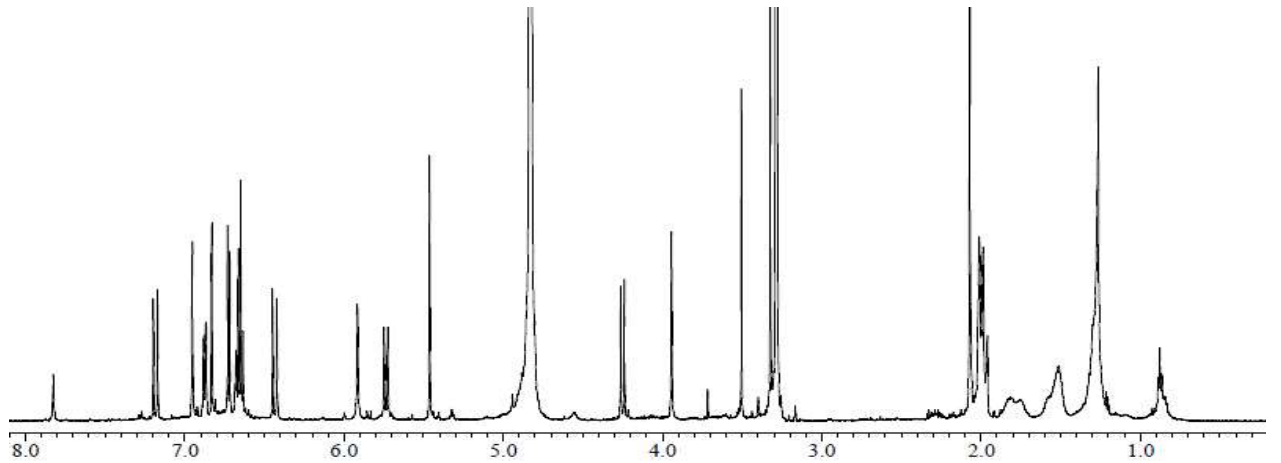


그림 3-36. 활성물질 PB-4의 ^1H NMR spectrum

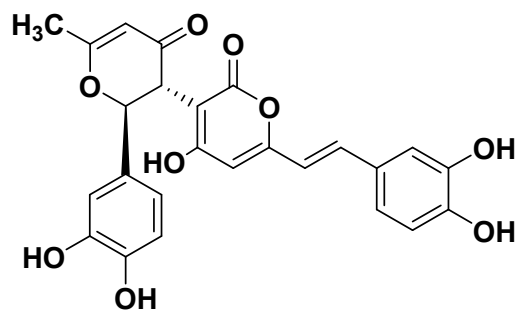


그림 3-37. 활성물질 PB-4의 화학구조

㉞ 화합물 PB-5의 화학구조

- 정제한 활성 화합물 PB-5의 화학구조를 규명하기 위하여 CD_3OD 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석함. ^1H NMR (600 MHz) spectrum을 해석한 결과, 8.34 (1H, s), 7.59 (1H, s), 7.37 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 7.05 (1H, br s), 6.96 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.86 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 15.6$ Hz) ppm에서 피크가 관찰됨(그림 3-38). 이 같은 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 phelligridin D로 동정함(그림 3-39).

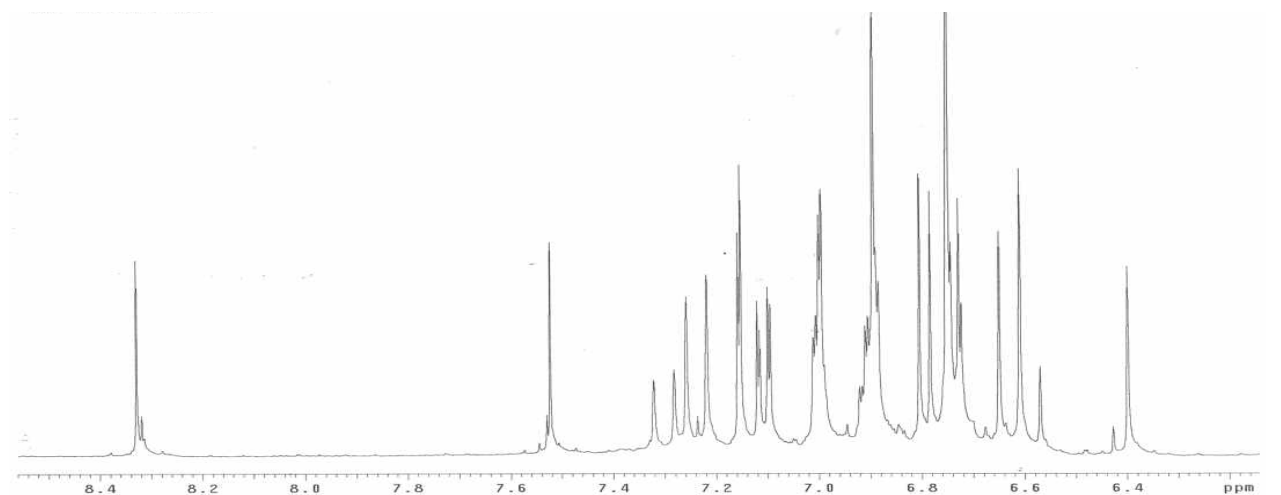


그림 3-38. 활성물질 PB-5의 ^1H NMR spectrum

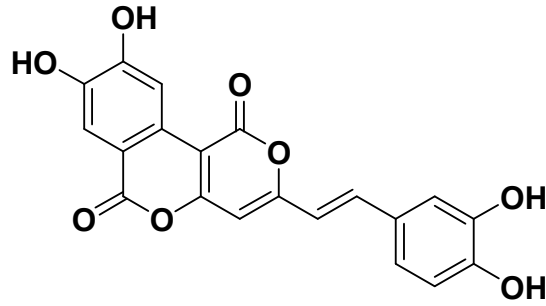


그림 3-39. 활성물질 PB-5의 화학구조

③ 장수진흙버섯으로부터 분리한 활성물질의 neuraminidase 저해 활성 및 활성 기전

㉔ 장수진흙버섯 유래 화합물의 neuraminidase 저해 활성

- 장수진흙버섯으로부터 분리한 neuraminidase 저해 활성물질 hispidin, hypholomine B, inoscavin A, davallialactone, phelligridin D의 활성을 평가한 결과, 각각 IC₅₀ 값이 50.9, 22.9, 20.0, 14.2, 8.8 μM이었음(표 3-15). 이들 화합물은 장수진흙버섯의 neuraminidase 저해 활성의 핵심 화합물로 규명됨. 다섯 개의 분리한 화합물 중에서 phelligridin D가 8.8 μM로 가장 높은 저해활성을 나타냄.

표 3-15. 장수진흙버섯 유래 화합물의 neuraminidase(H1N1, H5N1, H3N2) 저해 활성

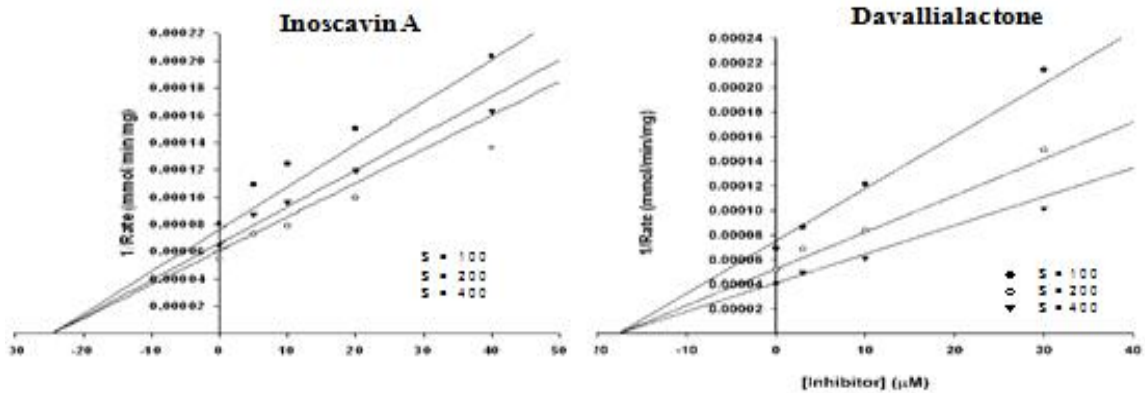
Compounds	IC ₅₀ (μM)			Inhibition type (K _i , μM)
	H1N1	H5N1	H3N2	
PB-1 (Hispidin)	50.9	16.9	45.2	Noncompetitive (43.0)
PB-2 (Hypholomine B)	22.9	12.3	14.6	Noncompetitive (20.9)
PB-3 (Inoscavin A)	20.0	18.5	18.5	Noncompetitive (24.5)
PB-4 (Davallialactone)	14.2	21.8	21.1	Noncompetitive (27.6)
PB-5 (Phelligridin D)	8.8	10.9	10.3	Noncompetitive (15.9)
Zanamivir (Relenza®, nM)	1.5	1.9	3.4	NT

㉕ Neuraminidase 저해활성 기전

- 분리한 화합물의 kinetic parameter를 SigmaPlot Enzyme Kinetics Module(version 1.3, Systat, USA) program을 사용하여 분석함. 그 결과 장수진흙버섯으로부터 분리한 화합물들은 모두 noncompetitive inhibition type으로 나타남(그림 3-40). 이는 임상에 활용되고 있는 neuraminidase 저해제들이 competitive inhibition을 나타내는 것으로 알려져 있어 이들 화합물과는 저해 기전이 상이함을 나타내는 것임.

Hispidin

Hypholomine B



Phelligrudin D

그림 3-40. 장수진흙버섯 neuraminidase 저해활성물질의 inhibition type

㉔ 항인플루엔자 활성 및 세포 독성

- 장수진흙버섯에서 분리한 화합물들을 대상으로 세포에서의 항인플루엔자 활성을 평가함. 그 결과, 분리한 5종의 화합물은 20-70 μM에서 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 이 같은 활성은 항인플루엔자 의약품인 oseltamivir 보다 대부분 강한 활성임(표 3-16).
- 특히 이들 화합물은 활성보다 낮은 독성을 나타내었으며 특히 항인플루엔자 활성

이 강하게 나타난 화합물 phelligridin D와 inoscavin A는 매우 낮은 농도에서 세포독성을 나타냄. 분리한 화합물 모두 항인플루엔자 의약품인 oseltamivir 보다 TI 값이 높게 나타나 활성이 우수하면서 독성은 낮은 것으로 판명됨(그림 3-41).

- 비록 분리한 화합물들이 neuraminidase 억제활성에서는 의약품인 oseltamivir보다 낮은 활성을 나타냈으나 세포를 이용한 실험에서는 우수한 것으로 나타남. 이는 분리한 화합물이 세포내에서 또 다른 항인플루엔자 기전을 지닌 것으로 유추됨.

표 3-16. 분리 화합물의 세포독성 및 인플루엔자 바이러스 증식 저해 효과

Samples	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	TI
PB-1 (Hispidin)	>100	57.90 ± 2.27	>1.73
PB-2 (Hypholomine B)	>100	72.80 ± 4.25	>1.37
PB-3 (Inoscavin A)	679.61	42.80 ± 2.67	2.34
PB-4 (Davallialactone)	>100	24.60 ± 7.17	>4.07
PB-5 (Phelligridin D)	432.62	22.60 ± 1.29	4.42
Oseltamivir (Tamiflu®)	176.42	64.72 ± 7.65	1.55

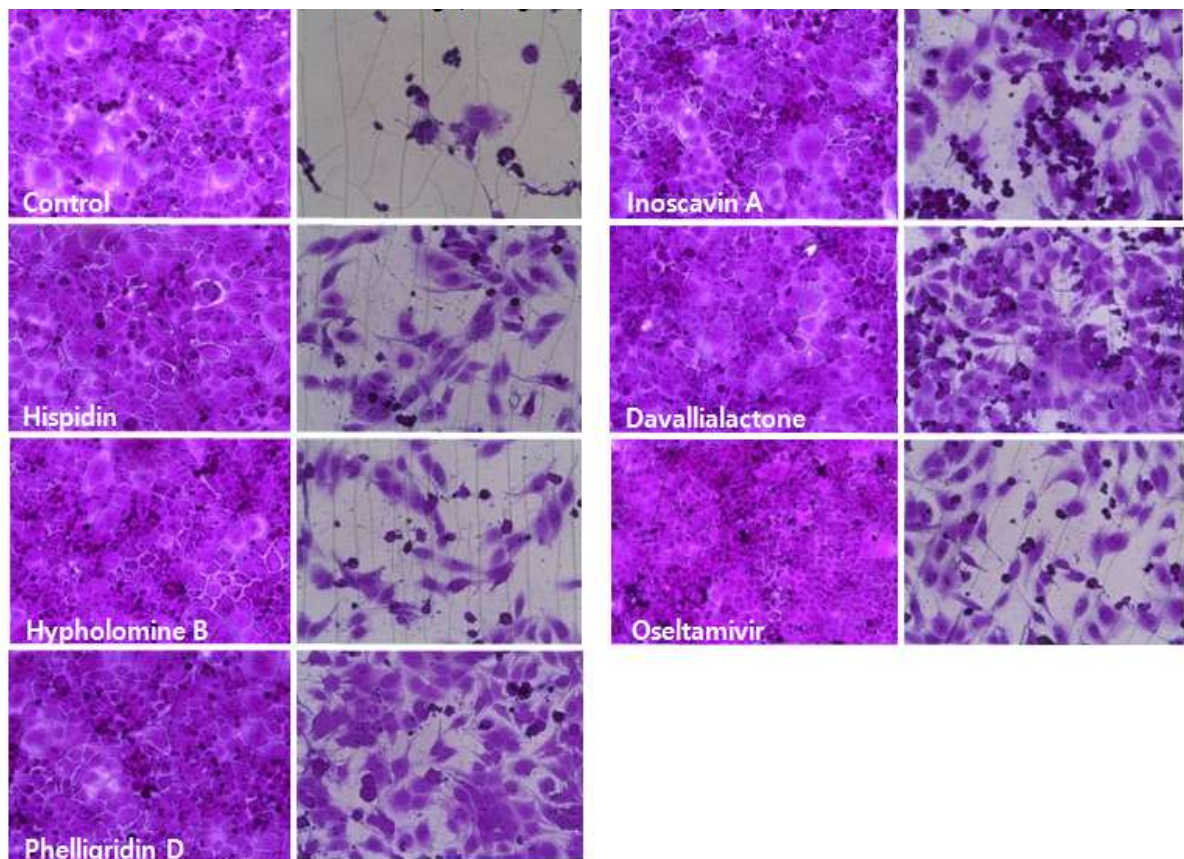


그림 3-41. 세포독성과 인플루엔자 바이러스에 대한 증식 저해 효과

(2) 균류 배양액의 neuraminidase 저해활성 및 활성성분 규명

(가) 목질진흙버섯 균주 배양액의 연구 배경

- 1차년도 및 2차년도 연구결과 진흙버섯류의 배양액이 강력한 neuraminidase 저해활성과 더불어 바이러스 증식을 강력하게 억제하는 것을 알았음. 2차년도에 수행한 농촌진흥청 분양 목질진흙버섯은 한국농수산대학교에서 분양한 목질진흙버섯과는 성분에 있어서 많은 차이를 나타냄. 따라서 3차년도에는 한국농수산대학교로부터 분양받은 목질진흙버섯 균주를 배양한 후 배양액의 neuraminidase 저해 활성을 평가하고 활성성분의 분리 및 정제를 수행함.

(나) 목질진흙버섯 액체 및 고체 배양물의 neuraminidase 저해활성 및 HPLC 분석

- 농촌진흥청 및 한국농수산대학교로부터 2종의 목질진흙버섯(상황버섯) 균주를 확보하여 고체배지와 액체배지에서 각각 배양함. 액체배양은 potato dextrose broth에, 고체배양은 potato dextrose agar에 접종한 후 28°C에서 약 30일간 배양함. 배양물은 acetone으로 추출한 후 추출물을 감압 농축하여 acetone을 제거하였으며, 각각의 농축물은 ethyl acetate를 부가하여 용매분획한 후 neuraminidase 저해 활성을 측정함. 그 결과 목질진흙버섯 배양 추출물이 강력하게 neuraminidase 저해 활성을 나타냄. 따라서 활성을 나타낸 ethyl acetate 층을 HPLC로 분석한 결과(그림 3-42 및 3-43), 두 균주가 생산하는 화합물의 HPLC pattern이 매우 상이함을 알 수 있었음. 따라서 한국농수산대학교에서 분양받은 균주를 배양하여 활성성분을 규명함.

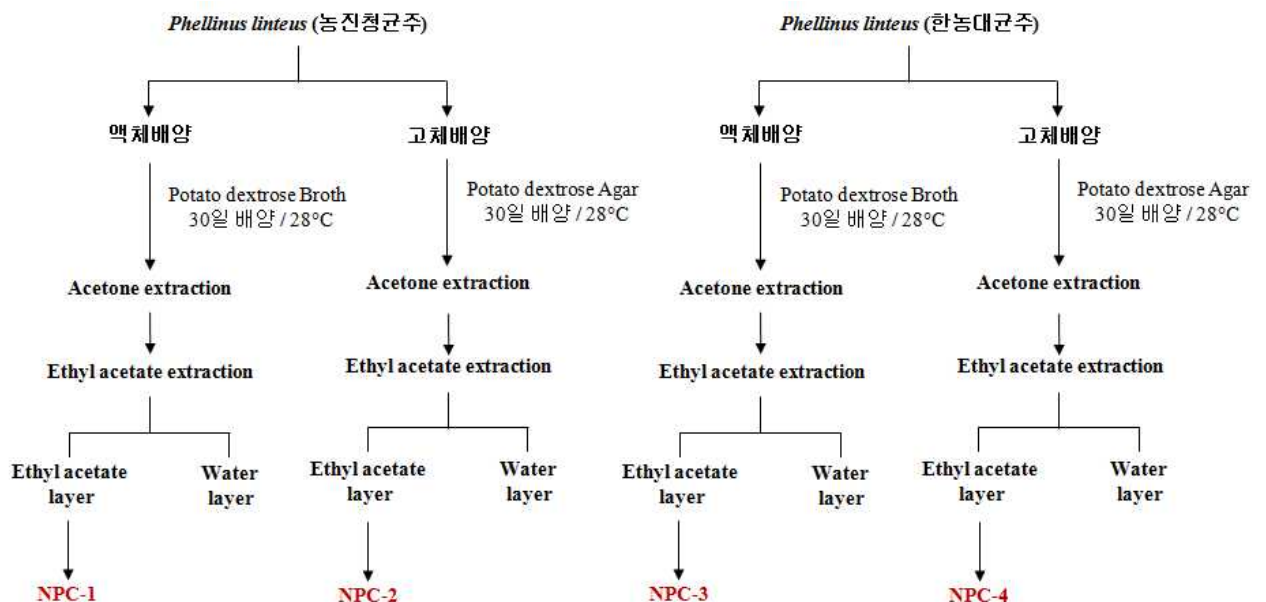


그림 3-42 목질진흙버섯 균주 배양 추출물의 제조

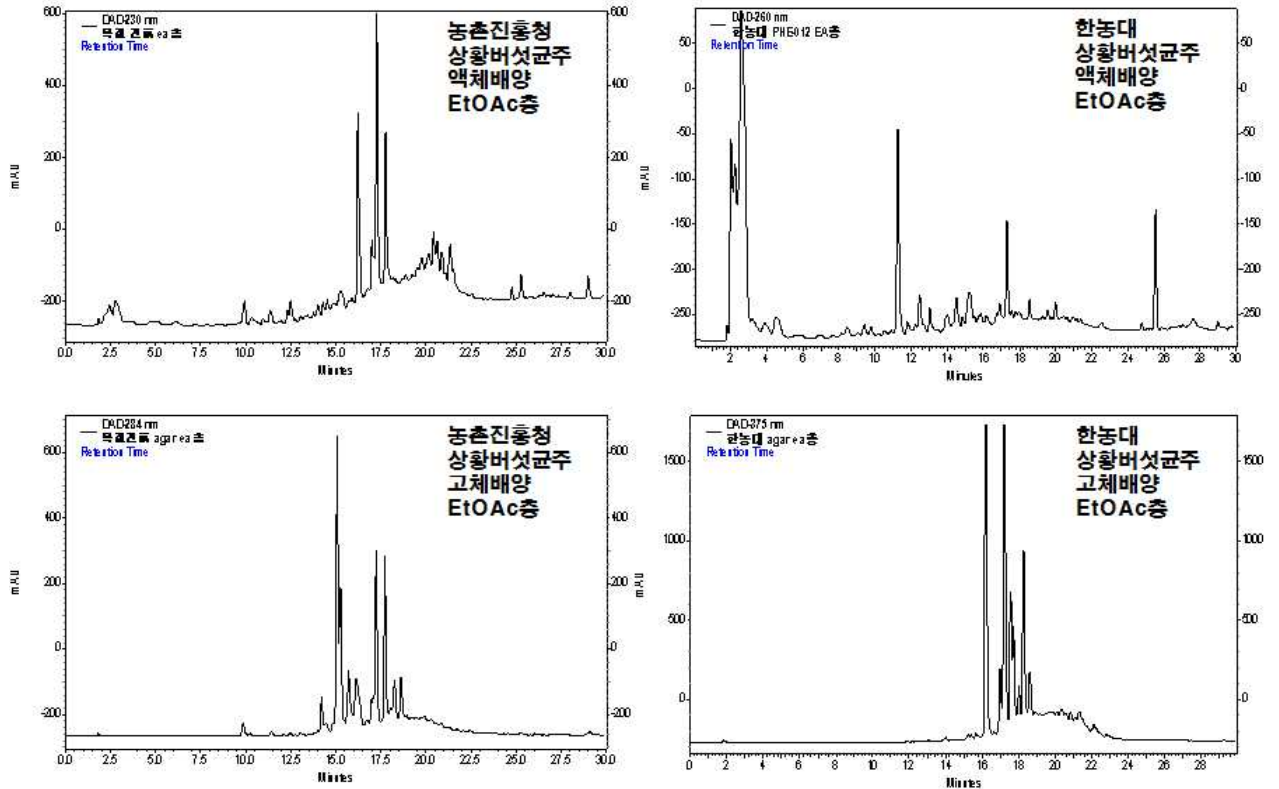


그림 3-43. 목질진흠버섯 균주 배양물 활성분획의 HPLC profile

(다) 목질진흠버섯 균주(한국농수산대학 분양 균주) 배양액 유래 neuraminidase 저해물질의 정제, 화학구조 및 생물활성

① 목질진흠버섯 균주 배양액 유래 neuraminidase 저해물질의 분리 및 정제

- 한국농수산대학과 농촌진흥청으로부터 분양받은 2종의 목질진흠버섯(상황버섯) 균주를 배양하여 HPLC로 분석한 결과 구성성분이 매우 상이하였음. 따라서 이들을 각각 배양하여 활성성분을 규명하였으며, 먼저 한국농수산대학 분양 균주에 대한 연구를 수행함.
- 한국농수산대학으로부터 분양받은 목질진흠버섯 균주를 potato dextrose broth (26 L)에 접종하여 27°C에서 30일간 배양하였으며, 배양물은 acetone으로 추출한 후 추출물을 감압 농축하여 acetone을 제거함. 각각의 농축물은 ethyl acetate를 부가하여 용매분획하고 저해 활성을 나타낸 ethyl acetate 층을 분획하여 활성물질을 분리, 정제함. 농축된 ethyl acetate 분획은 50% aqueous methanol을 이용하여 ODS open column chromatography를 수행하였으며, 활성분획은 70% aqueous methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 2종의 활성화합물 compound 1 및 compound 2를 분리, 정제함(그림 3-44).

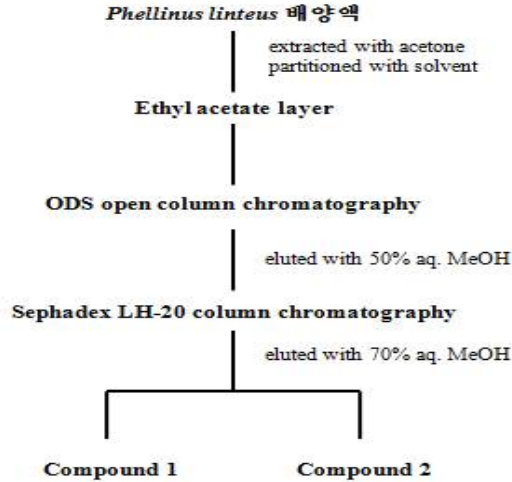


그림 3-44. 목질진흠버섯 배양액으로부터 neuraminidase 저해 물질의 분리 및 정제

② 목질진흠버섯 유래 neuraminidase 저해물질의 화학구조

- 목질진흠버섯 배양 부산물로부터 정제한 compound 1 및 2의 화학구조를 규명하기 위하여 1차원 및 2차원 NMR spectrum과 mass spectrum을 측정하고, 기존 목질진흠버섯으로부터 분리 보고된 화합물을 대상으로 검색을 수행함.

㉠ Compound 1의 화학구조

- 목질진흠버섯 배양물로부터 정제한 화합물 compound 1의 화학구조를 규명하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하고, CD₃OD에 녹여 ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC spectrum을 측정하여 해석함.
- Compound 1의 분자량을 알아보기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정한 결과, *m/z* 219에서 [M+H]⁺ peak가 관찰되어 분자량을 218로 확인함(그림 3-45).

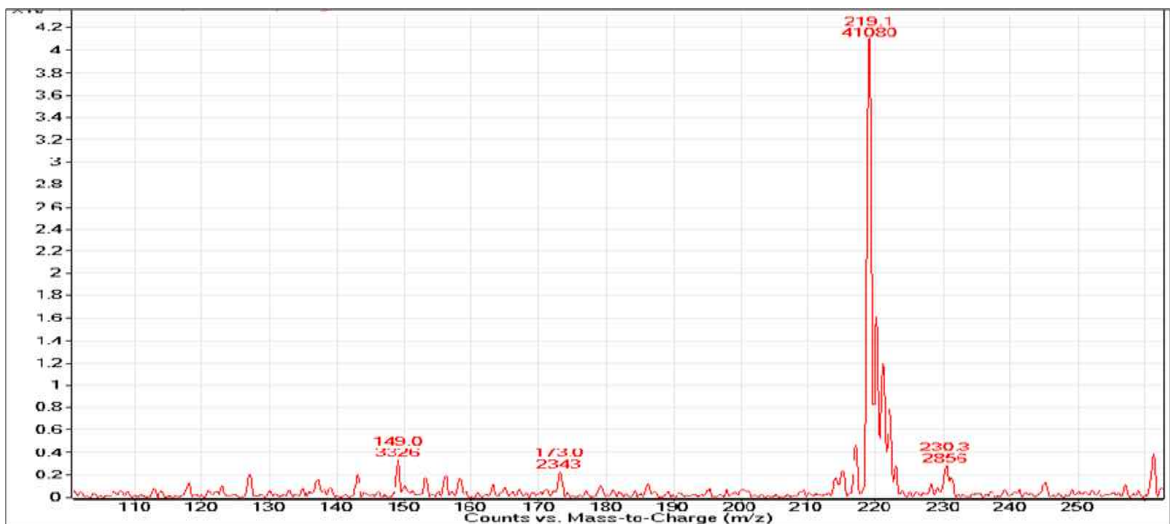


그림 3-45. Compound 1의 ESI-mass spectrum

- ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 7.43 (d, 1H, *J*=2.0 Hz), 7.17 (dd, 1H, *J*=8.4, 2.0 Hz), 6.82 (d, 1H, *J*=8.4 Hz), 6.61 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 2.43 (s, 3H) ppm에서

피크가 관찰됨(그림 3-46).

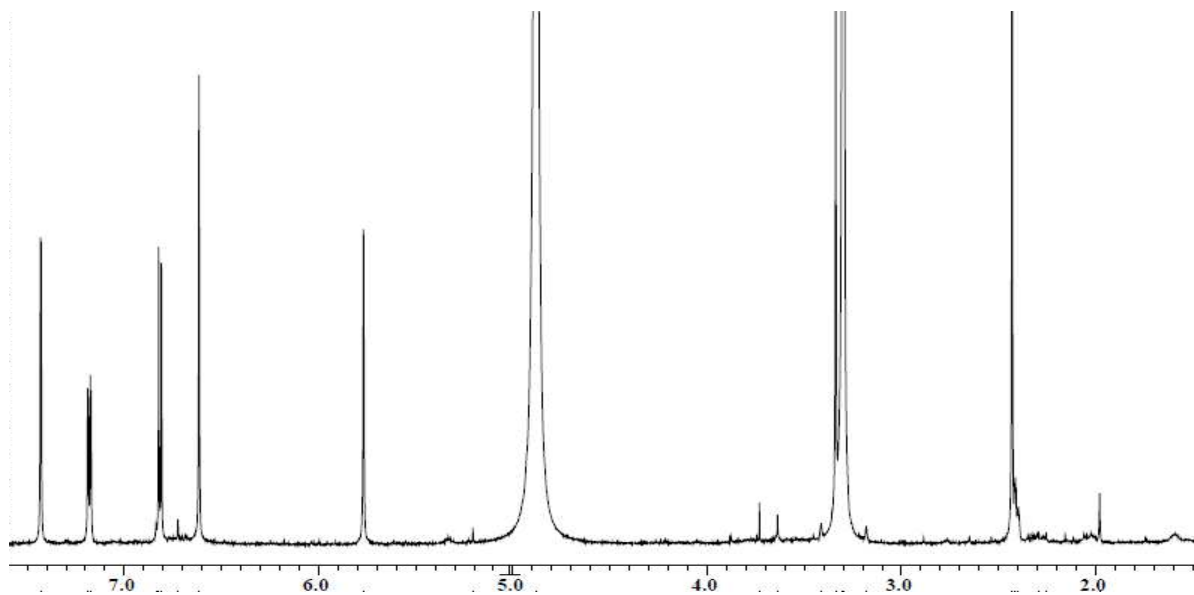


그림 3-46. Compound 1의 ¹H NMR spectrum

- ¹³C NMR spectrum을 측정한 결과 총 12개의 피크가 관찰됨. 즉 187.0 ppm에서 carbonyl carbon, 180.9, 148.4, 145.7, 144.6 ppm에서 네 개의 oxygenated sp²carbon, 123.1, 118.2, 116.2, 112.3, 105.7 ppm에서 5개의 sp² methine carbon, 125.0 ppm에서 한 개의 sp² quaternary carbon, 15.9 ppm에서 한 개의 methyl carbon이 관찰됨(그림 3-47).

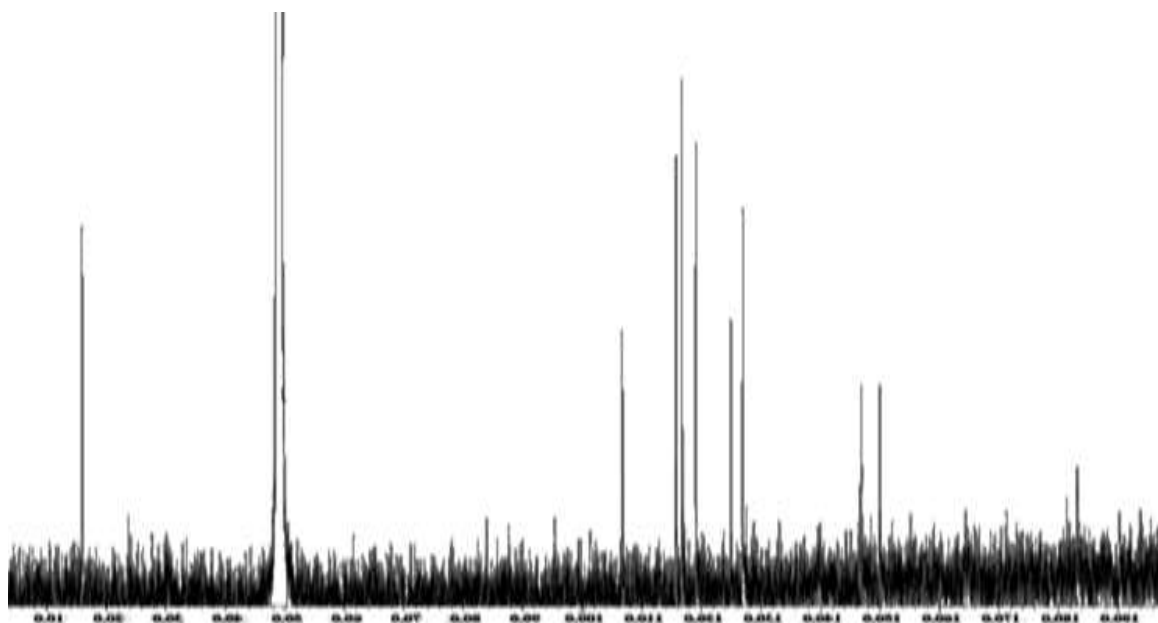


그림 3-47. Compound 1의 ¹³C NMR spectrum

- 모든 proton-bearing carbon은 HMQC spectrum의 해석으로부터 규명됨(그림

3-48).

- 또한 HMBC spectrum을 해석한 결과 2.55 ppm의 methyl proton으로부터 180.9, 105.7 ppm의 carbon에, 5.80 ppm의 sp^2 methine proton으로부터 180.9, 144.6 ppm의 carbon에, 6.50 ppm의 sp^2 methine proton으로부터 180.9, 144.6, 123.1, 112.3 ppm의 carbon에 long-range correlation이 관찰됨(그림 3-49).
- 이상의 결과로부터 본 화합물의 화학구조를 그림 3-50과 같이 결정함. 또한 화학구조를 이용하여 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 inotilone으로 동정함.

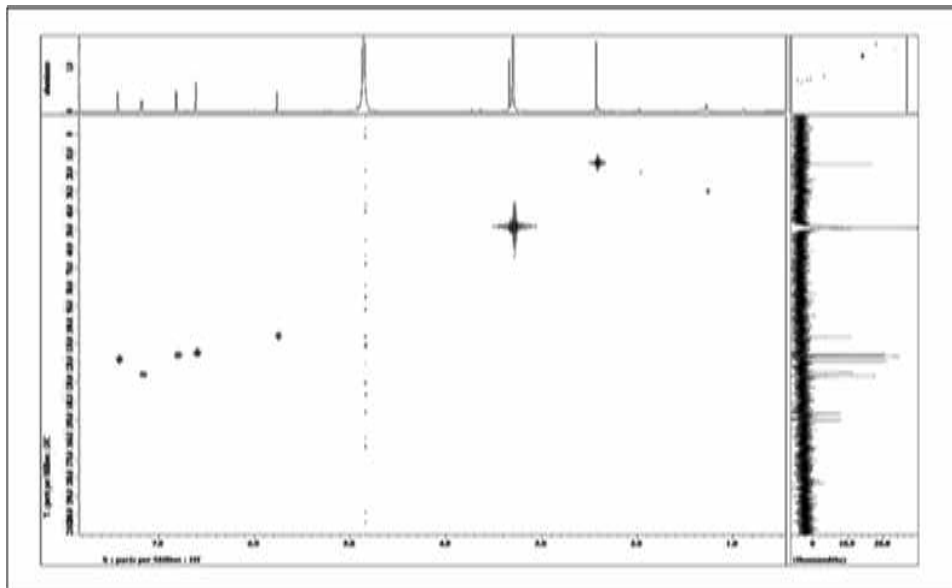


그림 3-48. Compound 1의 HMQC spectrum

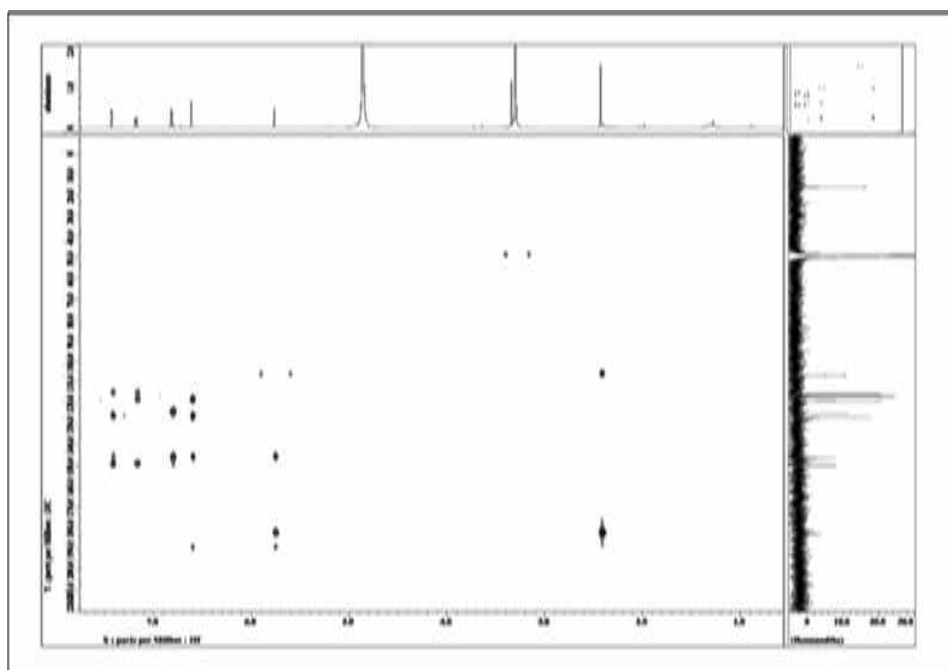


그림 3-49. Compound 1의 HMBC spectrum

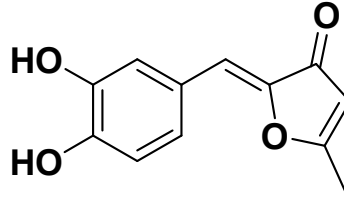


그림 3-50. Compound 1의 화학구조

Ⓢ Compound 2의 화학구조

- 목질진흠버섯 배양물로부터 정제한 화합물 compound 2의 화학구조를 밝히기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하고, CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- Compound 2의 분자량을 알아보기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정한 결과, *m/z* 177에서 [M+H]⁺ peak가 관찰되어 분자량을 176으로 확인함(그림 3-51).

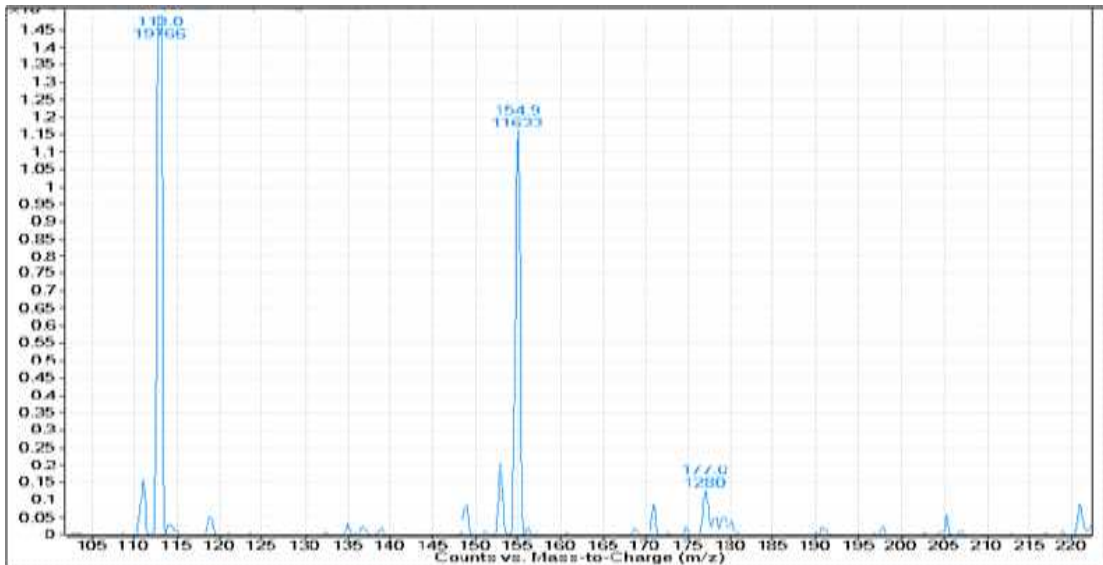


그림 3-51. Compound 2의 ESI-mass spectrum

- ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석한 결과 δ 7.51 (d, 1H, *J*=16.4 Hz), 7.07 (d, 1H, *J*=2.4 Hz), 6.98 (dd, 1H, *J*=2.4, 8.4 Hz), 6.78 (d, 1H, *J*=8.4 Hz), 6.54 (d, 1H, *J*=16.4 Hz), 2.32 (s, 3H) ppm에서 피크가 관찰됨(그림 3-52). Mass 측정 결과와 NMR spectrum의 측정 결과를 바탕으로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one으로 동정함(그림 3-53).

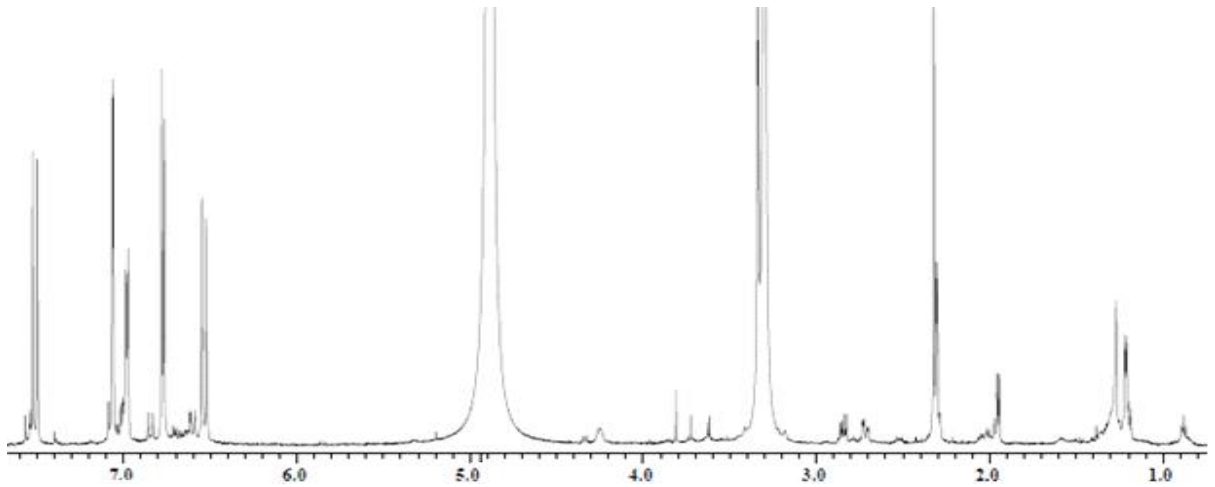


그림 3-52. Compound 2의 ^1H NMR spectrum

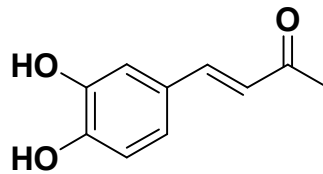


그림 3-53. Compound 2의 화학구조

③ 목질진흙버섯 배양액 유래 화합물의 neuraminidase 저해활성 및 항바이러스 활성

㉞ Neuraminidase 저해활성

- 목질진흙버섯 배양물로부터 정제한 compound 1 및 compound 2의 neuraminidase 저해 활성을 측정된 결과, compound 1은 29.1 μM 에서, compound 2는 125.6 μM 에서 IC_{50} 값을 나타냄(그림 3-54). 특히 compound 1은 강력하게 neuraminidase 저해 활성을 나타내어 목질진흙버섯 배양물에서 나타내는 저해 활성의 주요 원인물질로 밝힘.

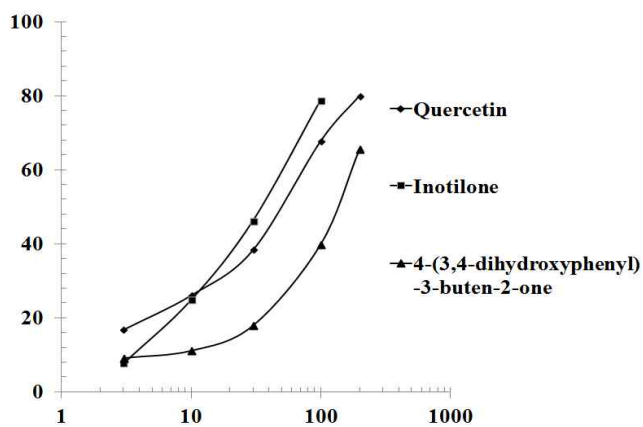


그림 3-54. Compound 1과 compound 2의 neuraminidase 저해 활성

㉟ 항바이러스 활성 및 세포 독성

- MDCK 세포를 이용한 항인플루엔자 활성 측정 결과, 분리한 화합물은 각각 61.5, 52.3 μM 에서 IC_{50} 값을 나타내었으며(표 3-17), 이 같은 활성은 항인플루엔자 의약품인 oseltamivir 보다 강한 활성임.
- 특히 이들 화합물은 낮은 독성을 나타내었으며, 특히 분리한 화합물 모두 항인플루엔자 의약품인 oseltamivir 보다 TI 값이 높게 나타나 활성이 우수하면서 독성은 낮은 것으로 나타남(그림 3-55).

표 3-17. 분리 화합물의 세포독성 및 인플루엔자 바이러스 증식 저해 효과

Samples	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	TI
Compound 1 (inotilone)	>100	61.5 \pm 6.4	>1.6
Compound 2 (4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one)	>100	52.3 \pm 5.4	>1.9
Oseltamivir (Tamiflu®)	176.4	64.7 \pm 7.6	1.6

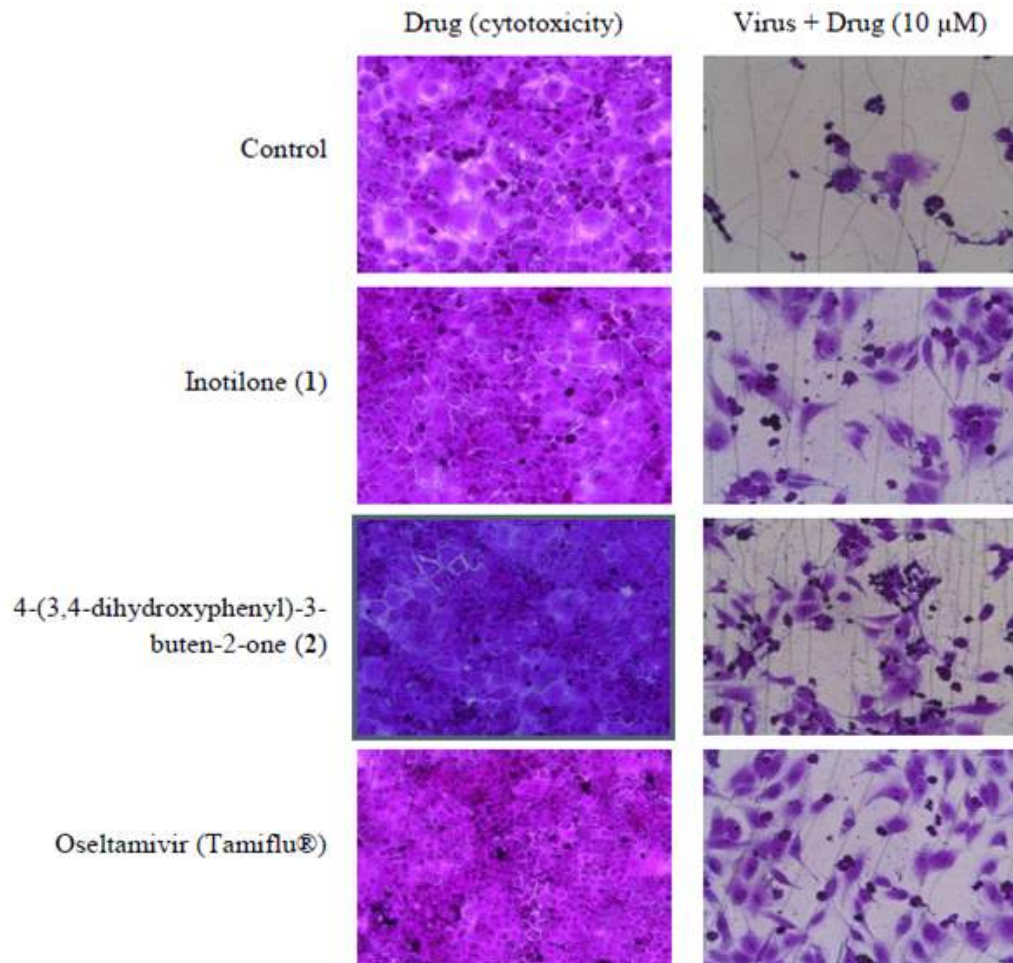


그림 3-55. 세포독성과 인플루엔자 바이러스에 대한 증식 저해 효과

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) Homologous recombination에 의한 PLRV 조작(그림 3-56)

- TMV의 경우 mutant에서 외래단백질 발현이 증가 되었는데 확보하고 있는 PLRV도 이를 테스트 할 필요가 있어 mutant 라인을 만들어 시험한 결과, PLRV의 경우는 TMV와 달리 wild type에서 가장 높게 발현됨에 따라 wild type을 이용하는 것이 외래단백질 발현에 유리 하다고 볼 수 있음

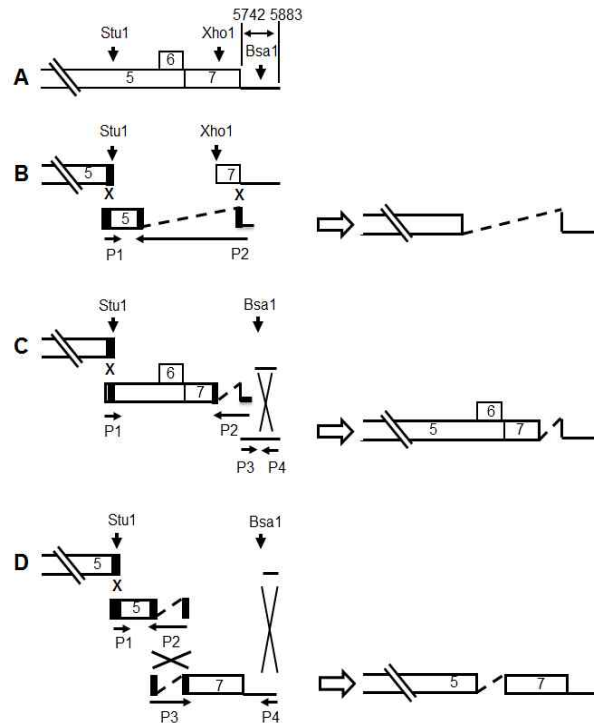


그림 3-56. PLRV의 homologous recombination에 의한 조작.

- A) wild type의 PLRV, B) mutant 1에서 6(PLRV-RTVC1~6), C) mutant 7(PLRV_RTC7), D) mutant 8(PLRV-RTC8)

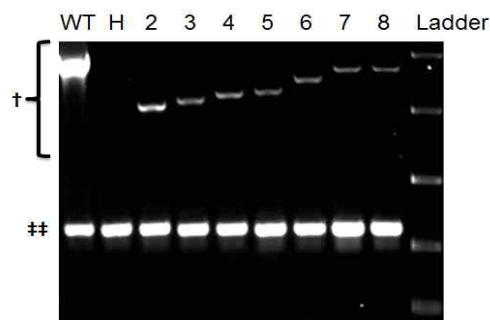


그림 3-57. PLRV mutants (RTC2~8)의 식물에 발현.

윗 밴드는 PLRV primer에 의한 밴드이며, 아래의 ##로 표시된 밴드는 액틴 primer에 의한 밴드

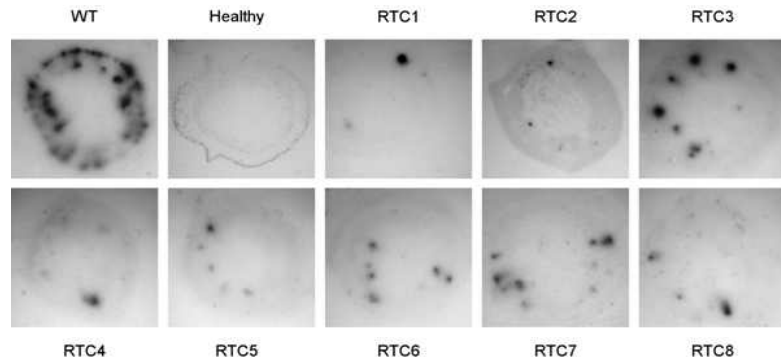


그림 3-58. PLRV wild type와 mutants의 식물체내 분포와 발현

- 그림 3-58은 PLRV wild type와 mutants의 식물체내 분포와 발현 정도를 보여 주는 것으로 모두가 유관속에 분포를 하고 있으며 wild type의 경우 가장 발현 정도가 높게 나왔는데 이는 그림 3-57에서 보여준 결과와 일치하고 있음.

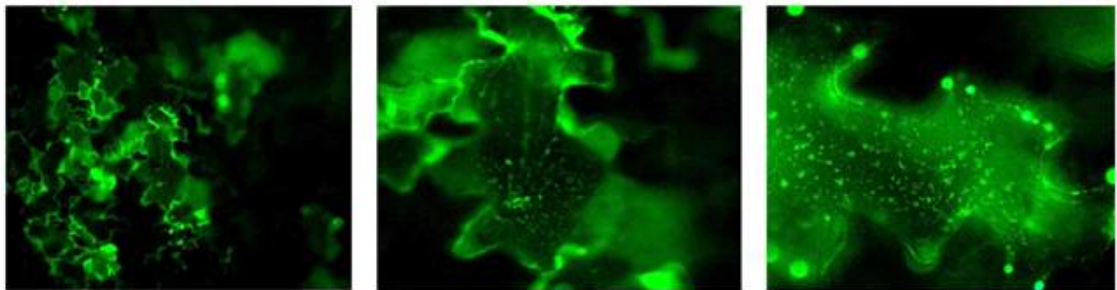


그림 3-59. *Nicotiana tabaccum*에서 PLRV:eGFP의 발현

- 그림 3-59 (PLRV:eGFP)의 경우는 wild type에 eGFP를 융합시켜 PLRV의 localization을 보여 주는데 이번 연구에서 얻어진 mutants의 localization에 대한 연구를 더 진행 시키면 mutants의 발현량이 wild type보다 낮게 나왔는데 (그림 3-57과 3-58), 세포생물학적 측면에서 이에 대한 실마리를 제공 하리라 생각이 됨.

(2) 유용유전자 발현용 바이러스 벡터 제작 (BYDV infectious clone 제작)

- 귀리 재배지에서 줄기가 마르면서 붉은색을 보이는 잎을 채집 후 맥류에 감염 가능한 바이러스 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였음. 370bp의 RT-PCR 산물 (그림 8)을 T-easy vector에 삽입 후 염기서열 비교 분석 결과(그림 3-60) BYDV serotype PAV로 확인되었고, 이 바이러스는 중국에서 보고된 isolate과 높은 염기서열 동일성을 보여주었음(그림 3-61). 이를 이용한 전체 BYDV 유전자를 T-easy vector에 클로닝 하였고 (+)클론을 얻었음(그림 3-62).

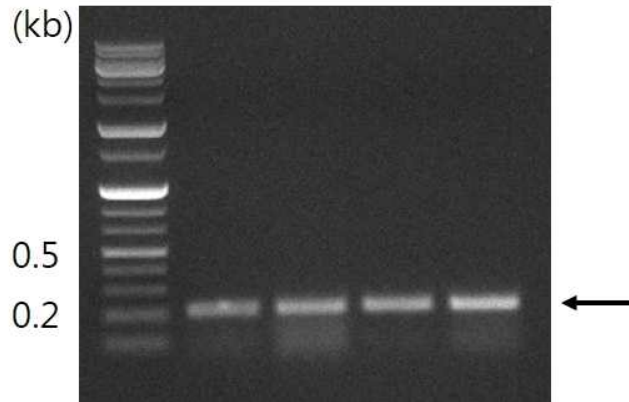


그림 3-60. BYDV 진단을 위한 특이 프라이머(375 프라이머)를 이용한 시료의 RT-PCR 결과. 회살표는 375 bp 사이즈 밴드임

Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 06ZZ5 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332336.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 06JN4 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332331.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 06JN2 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332330.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05ZZ6 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332322.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05ZZ4 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332321.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05ZZ1 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332320.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05YL5 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332317.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 04ZZ5 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	566	566	100%	9e-158	99%	EU332308.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 06WH1 RNA-dependent RNA polymerase_P1_	560	560	100%	4e-156	99%	EU332334.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05ZZ9 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	560	560	100%	4e-156	99%	EU332324.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05ZZ7 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	560	560	100%	4e-156	99%	EU332323.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 06ZZ4 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	555	555	100%	2e-154	99%	EU332335.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05WH6 RNA-dependent RNA polymerase_P1_	555	555	100%	2e-154	99%	EU332314.1
Barley yellow dwarf virus-PAV strain Y108 coat protein gene_complete cds	549	549	100%	9e-153	98%	FJ875303.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05ZZ10 RNA-dependent RNA polymerase_P1_	549	549	100%	9e-153	98%	EU332325.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05YL8 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	549	549	100%	9e-153	98%	EU332318.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05JZ4 RNA-dependent RNA polymerase_P1_a	549	549	100%	9e-153	98%	EU332312.1
Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 05GG5 RNA-dependent RNA polymerase_P1_	549	549	100%	9e-153	98%	EU332310.1
Barley yellow dwarf virus - PAV coat protein (CN-PAV) gene_complete cds	549	549	100%	9e-153	98%	AF192967.1
Barley yellow dwarf virus - PAV strain PAV-CN_complete genome	549	549	100%	9e-153	98%	AY855820.1

그림 3-61. BYDV 375 primer를 이용한 RT-PCR 및 염기서열 분석 결과

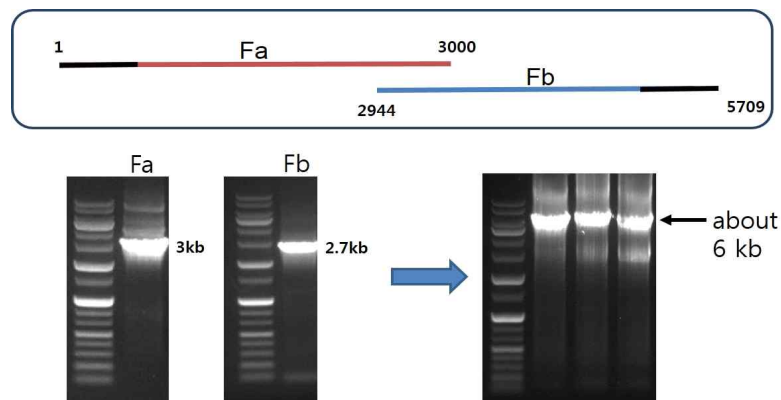


그림 3-62. BYDV 전체 지놈을 얻기 위한 template PCR 및 overlapping PCR 결과

- 이러한 전체 염기서열을 바탕으로 귀리에 감염되었던 BYDV의 전체 염기서열을

확인하였음. 그리고 이 바이러스는 BYDV-PAV isolate UB으로 명하였고, 외피단백질의 유전정보는 GenBank에 보고하였다(KU097016). 시료의 전체 염기서열은 5,709bp의 길이로 확인되었음. 기존에 보고된 BYDV-PAV isolate들과 염기서열 분석한 결과, 중국 유래 isolate와 98% 정도 상동성을 확인하였고 일본, 미국, 독일 등의 isolate와는 좀 더 낮은 상동성이 확인되었음(그림 3-63). 이러한 염기서열을 바탕으로 Phylogenetic tree 분석하였다. 이 연구에서 분석한 시료에서 추출한 BYDV 지놈의 염기서열은 중국 isolate와 가장 가까운 유연관계를 알 수 있었음(그림 3-64).

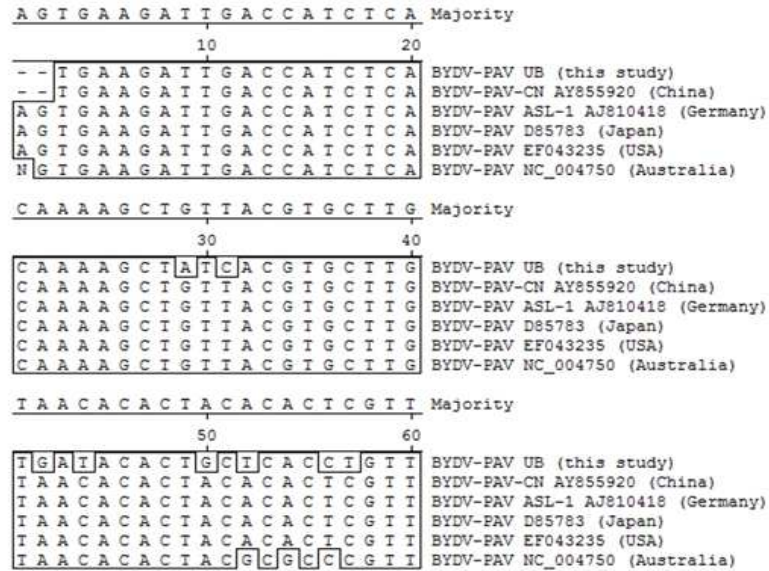


그림 3-63. BYDV-PAV UB의 전체 염기서열 및 다른 isolate들과의 염기서열 비교 분석 결과

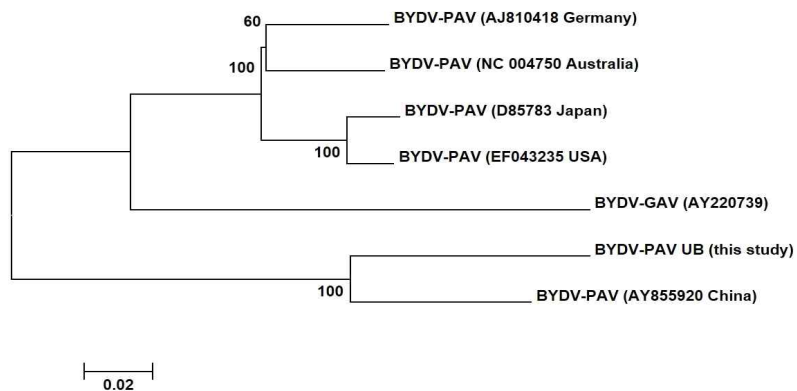


그림 3-64. BYDV isolate들의 전체 염기서열을 이용한 Phylogenetic tree 분석 결과

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

(1) 단일제제 및 복합제제의 목적동물에 대한 효능평가

(가) 항미생물펩타이드(AMP) 항균효능평가

- 제3협동과제팀에서 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물펩타이드 개발의 일환으로 2년차와 추가로 3년차에 개발한 PG1, PMAP36, PR26 물질에 대하여 목적동물(소, 돼지, 닭)유래 병원체들을 대상으로 항균효능평가를 수행하였으며(표 3-18), AMP 3종에 대한 항균효능 실험결과는 다음과 같음.

표 3-18. AMP의 항균효능평가를 위한 공시균주 목록

분류		세균명	균주번호	배양조건
닭	표준균주	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	혐기
		<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	호기
		<i>Salmonella Gallinarum</i>	ATCC 9184	호기
	닭 질병 야외분리주	<i>Clostridium perfringens</i>	CP-012	혐기
		<i>Escherichia coli</i>	MRA-076	호기
		<i>Salmonella Gallinarum</i>	MRA-236	호기
소 & 돼지 공통	표준균주	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	ATCC 10708	호기
		<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 15480	호기
		<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 13076	호기
		<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	호기
	돼지질병 야외분리주	<i>Escherichia coli</i>	F18	호기
		<i>Escherichia coli</i>	K88	호기
		<i>Escherichia coli</i>	K99	호기

① PG1의 항균효능

- PG1의 항균능력은 주로 닭유래 병원체들인 *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella Gallinarum* 등에서 나타났지만 대부분 고농도($\geq 2,048$)에서 활성을 보였음(표 3-19).

표 3-19. 공시균주들에 대한 PG1의 항균효능 평가결과

PG1 conc. (ug/ml)	Reference strains													
	CP ATCC 13124	CP 12	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> MRA 076	SG ATCC 9184	SG MRA 236	SC ATCC 10708	SD ATCC 15480	SE ATCC 13076	ST ATCC 14028	<i>E. coli</i> F18	<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> K99	
2,048	+++	-	+++	+++	+++	+	++	++	++	+++	++	+++	++	
1,024	+++	-	++	+	+++	-	+	+	-	++	-	++	-	
512	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	
256	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	
128	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
64	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Complete Inhibitory Conc.	$\geq 2,048$	-	$\geq 2,048$	$\geq 2,048$	$\geq 2,048$	-	-	-	-	$\geq 2,048$	-	$\geq 2,048$	-	

No zone of inhibition, -; low zone of inhibition, + or ++; strong zone of inhibition, +++.

② PMAP36 항균효능

- PMAP36은 *C. perfringens*, *S. Gallinarum*을 제외한 대부분의 *E. coli*와 *Salmonella* 병원체에서 강한 항균활성이 나타났다. 특히, 소, 돼지유래 병원체들에서 최소 ≥ 64 에서 ≥ 256 ug/ml 농도범위에서 완전한 억제능이 관찰되었고, 닭유래 병원체들은 *E. coli* 표준균주와 야외주에서 높은 항균력이 관찰되었음(표 3-20).

표 3-20. 공시균주들에 대한 PMAP36의 항균효능 평가결과

PMA P36 conc. (ug/ml)	Reference strains												
	CP ATCC 13124	CP 12	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> MRA 076	SG ATCC 9184	SG MRA 236	SC ATCC 10708	SD ATCC 15480	SE ATCC 13076	ST ATCC 14028	<i>E. coli</i> F18	<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> K99
2,048	-	-	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1,024	-	-	+++	+++	-	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
512	-	-	+	+++	-	-	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
256	-	-	-	+++	-	-	++	+	+++	++	+++	+++	+++
128	-	-	-	++	-	-	+	+	++	+	++	+++	+++
64	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	++	+++
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Complete Inhibitory Conc.	-	-	$\geq 2,048$	≥ 256	-	-	≥ 512	$\geq 2,048$	≥ 256	≥ 512	≥ 256	$\geq 2,048$	≥ 64

No zone of inhibition, -; low zone of inhibition, + or ++; strong zone of inhibition, +++.

③ PR26 항균효능

- 닭괴사성장염 병원체인 *C. perfringens*를 제외한 나머지 11주의 공시균주들은 PR26 peptide 512 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 강한 항균활성이 있는 것으로 확인되었음.

④ AMP 3종 항균효능평가 결과

- PG1의 항균활성은 닭의 장염병원체인 *C. perfringens*와 *S. Gallinarum* 표준균주에서 확인되었고 다른 균주들에서는 나타나지 않았음. PMAP36, PR26은 *C. perfringens*를 제외한 소, 돼지, 닭유래 병원체들을 포함한 모든 공시균주들에서 높은 항균활성을 가진 것으로 관찰되었음.

(2) 닭세균성질병제어를 위한 닭질병 모델에서 시제품 및 외부개발물질 효능평가

(가) 삼양애니팜 제공 시제품 2종 육계장염모델 효능평가

- 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형개발 및 산업화의 일환으로 제5협동인 삼양애니팜에서 만든 난황항체제제(IgY+생균제)인 다이스롭 폴츄리산 2호와 생균제인 비오쓰리엠 2종의 제품을 대상으로 양계질병인 육계장염모델에서 방어효과를 평가하였음.
- 닭질병모델에서 복합제제인 다이스롭 폴츄리산 2호(폐사율 25% 개선)와 비오쓰리엠(폐사율 18% 개선)은 닭괴사성장염 예방 및 치료제로서 활용 가능성이 높을 것으로 기대됨(표 3-21).

표 3-21. 육계장염모델에서 시제품 2종에 대한 질병의 방어효과

그룹	다이스톱 플유리산 2호 (IgY+생균제)		비오쓰리엠 (생균제)	
	폐사율	소장병변지수	폐사율	소장병변지수
음성대조군	0/11	0.18	0/11	0.18
양성대조군	7/11	2.73	7/11	2.73
물질투여군	4/11 (25% 감소)	1.55 (약 2배 감소)	5/11 (18% 감소)	1.73 (1.5배 감소)

(나) 외부개발물질 육계장염모델 효능평가

- 본 과제에서 생산된 제품이외에 외부에서 개발된 물질(규산염제제, 스테비아EM제제)을 선발하여 육계장염모델에서 방어효과를 평가하였음.
- 광물질(미네랄)제제투여군은 양성대조군 대비 폐사율이 36% 개선되었고 복합제제인 스테비아 EM제제투여군은 폐사율이 45% 개선되어 장염초기발생 후, 물질 급여 시 대량폐사 예방과 치료제로서 활용 가능성이 높을 것으로 기대됨(표 3-22)

표 3-22. 육계장염모델에서 외부개발물질 2종에 대한 질병의 방어효과

분류	광물질(규산염) 제제		스테비아EM 제제	
	폐사율	소장병변지수	폐사율	소장병변지수
음성대조군	0/11	0.18	0/11	0.18
양성대조군	7/11	2.73	7/11	2.73
물질투여군	3/11 (36% ↓)	1.64 (약 1.7배 ↓)	2/11 (45% ↓)	0.73 (약 3.7배 ↓)

(다) 식물추출물 항균효능평가

- 총 30여종의 야생식물추출물을 에탄올로 추출, 동결 건조시켜 항균활성을 평가함.
- 총 30여종의 식물추출물 중에서 둥근이질풀은 0.5% 농도에서 물푸레나무 수피추출물은 1.0% 농도에서 닭괴사성장염균인 *C. perfringens*를 강하게 억제하는 뛰어난 항균효과가 관찰되었고 둥근이질풀추출물이 물푸레나무보다 약 2배정도 항균효과가 더 높은 것으로 확인되었음(표 3-23 및 3-24).

표 3-23. Disc 확산법과 Spot-on-lawn 방법에 의한 식물추출물 30종 항균효능 결과

No.	Korean name	Scientific name ^a	Part	Inhibitory effects by	
				Disc assay ^b	Spot assay ^c
P1	밤나무	<i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc.	leaf	+	+
P2	땅두릅	<i>Aralia cordata</i> Thunb.	stem, branch	-	-
P3	기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch. & Mey.	leaf	-	-
P4	가래나무	<i>Juglans mandshurica</i> Maxim.	leaf	+	+
P5	방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	root	-	-
P6	물엉겅퀴	<i>Cirsium nipponicum</i> (Maxim.) Makino	leaf	+	+
P7	기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i> Fisch. & Mey.	flower	+	+
P8	가죽나무	<i>Allanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	leaf	+	+
P9	물푸레나무	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance	bark	+++	+++
P10	땅두릅	<i>Aralia cordata</i> Thunb.	flower	-	-
P11	미국속부쟁이	<i>Aster pilosus</i> Willd.	leaf, flower, stem	-	-
P12	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.	flower	-	-
P13	느릅나무	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> (Rehder) Nakai	leaf	+	+
P14	개나래나무	<i>Actinidia polygama</i> (Siebold & Zucc.) Planch. Ex Maxim	leaf, stem	-	-
P15	배초향	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. & Mey.) Kuntze	leaf, flower, stem	-	-
P16	미나리	<i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC.	leaf	-	-
P17	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.	leaf	-	-
P18	다래나무	<i>Actinidia polygama</i> (Siebold & Zucc.) Planch. exMiq. var. <i>arguta</i>	leaf	-	-
P19	개머루	<i>Ampelopsis brevipedunculata</i> (Maxim.) Trautv.	leaf, stem	++	+
P20	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.	root	-	-
P21	돌단풍	<i>Aceriphyllum rossii</i> (Oliv.) Engl.	leaf	+	+
P22	뽕나무	<i>Geum japonicum</i> Thunb.	leaf	-	-
P23	비타민나무	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	root	-	-
P24	만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D.Don ex G.Don	root	++	+
P25	등근이질풀	<i>Geranium koreanum</i> Kom.	leaf, stem, flower	+++	+++
P26	고사리	<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i> (Desv.) Underw. Ex Hell.	leaf	-	-
P27	병꽃나무	<i>Weigela subsessilis</i> L.H.Bailey	leaf, stem	-	-
P28	만병초	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D.Don ex G.Don	leaf	-	-
P29	고추냉이	<i>Wasabia japonica</i> (Miq.) Matsum.	leaf	-	-
P30	불나무	<i>Rhus javanica</i> L.	leaf, stem	-	-

^a Four percent of each plant extract loaded on paper disc and agar medium, respectively.
^b Zone diameter of a blank disc (6 mm), -; > 6 mm ~ < 7 mm, +; ≥ 7 mm ~ < 9 mm, ++; ≥ 9 mm, +++.
^c No zone of inhibition, -; low zone of inhibition, +; strong zone of inhibition, +++.

표 3-24. 물푸레나무 수피와 등근이질풀 추출물에 대한 항균활성

Strains	Growth performance according to the plant extract concentrations											
	물푸레나무 수피추출물 (%)						등근이질풀 추출물 (%)					
	4	2	1	0.5	0.25	0.125	4	2	1	0.5	0.25	0.125
ATCC	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-
CP-12	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-
CP-19	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-
CP-22	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-
CP-24	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-

(라) 양계분야 질병예방 항생제대체제 적용프로그램(안)

- 육계장염모델에서 평가물질들의 효능을 바탕으로 장염을 예방하고 방어할 수 있는 항생제대체제 적용프로그램을 아래 그림과 같이 구성하였음(그림 3-65).

장염예방 : 기본프로그램 (Standard Program)



장염발생 : 강화프로그램 (Intensive Program)



그림 3-65. 개발 신소재의 육계 장염 효능평가 모델

(3) 돼지 질병제어를 위한 단일제제 효능평가

(가) 모돈과 포유자돈에서 청국장 추출물(PGA)의 난산을 개선 및 PRRSV에 대한 항바이러스 효과평가

① 청국장 유래 물질(PGA)의 모돈 및 포유자돈에 대한 평가

- 청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* *sups. chungkookjang*은 poly-γ-glutamate (PGA)라고 하는 1000 kDa 이상의 고분자 중합체를 생산하며, 이 중합체는 효과적으로 면역반응을 자극하고 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)에 대한 항바이러스 효과가 있는 것으로 평가되었음. 따라서 전북 정읍 소재 양돈장에서 모돈 및 포유자돈에 적용하여 난산을 개선과 포유자돈의 항바이러스 효과를 평가하였음.

② 모돈 및 포유자돈에 청국장 유래 물질의 적용 및 평가방법

㉠ 실험 1(임신 모돈에서의 접종량 결정 실험)

- 2%의 PGA 0, 5, 7, 10 ml을 분만 5일전 임신모돈에 각 5마리씩, 총 20마리에 접종하였음.
- 분만 후 각 모돈에서 초유를 50 ml을 수거하여 lymphocyte를 분리하고, 채혈 후 PBMC 수행하였음.
- 항바이러스 효능평가를 위해 먼저 분리된 초유 lymphocytes와 PBMC는 5 x 10⁶ cells/ml의 농도로 24-well plates에 분주한 뒤 concanavalin A (ConA, 10 ug/ml)와 PRRSV 항원을 첨가하여 감염(37°C, 24시간) 하였음. 수거 후 각각 두 개의 튜브에 나누어 준비하고, 그 중 하나의 튜브의 lymphocytes 또는 PBMC에서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RN을 이용하여 real-time PCR로 정량분석하여 면역증강 효과를 검증하였음 (돼지유래 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ 와 TNF-α 특이 primers를 이용). 다른 하나의 튜브에 준비된 lymphocytes 또는 PBMC는 CD14(monocyte marker), CD19(B cell marker) 및

CD4와 CD8(T cell marker) 특이 항체와 반응시키고 정제 후 flow cytometry로 분석하였고, monocyte, B cell 및 T cell의 증식과 분포 변화를 평가하였음.

- PGA 접종에 의한 유산 또는 기타 임상적인 부작용에 대한 평가를 체온, 식욕변화, 호흡기와 소화기증상, 이상행동 및 주사부위 반응 등을 확인하고 분만 후 분만 자돈의 생시 체중을 측정하고 이상을 확인하였음.

㉞ 실험 2(PGA의 모돈 주사에 의한 포유자돈의 PRRSV에 대한 저항성 평가)

- 실험 1의 20마리의 임신 모돈에서 분만된 자돈에 1주일간 초유를 공급하고, 모돈에서 5마리씩의 자돈을 선별하여 총 100 마리의 포유자돈을 선발하였음.
- 선발된 자돈을 5그룹으로 나누어 각 그룹마다 2마리씩을 선정하여 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 근육접종을 실시하였고, 4주간 PRRSV 전파 상황을 관찰하였음. 바이러스 전파 평가를 위해 바이러스 감염 후 매 주 채혈을 실시(혈중 바이러스 농도와 ELISA 항체 형성 확인)하였고, 증체량을 확인하였음.

㉟ 실험 3(비접종 임신 모돈과 비교)

- 임신 모돈 60 마리의 돼지에 2%의 PGA 7 ml을 분만 5일전에 각각 접종하고, 분만을, 난산율 및 분만자돈 수 등의 번식 성적을 비접종 임신 모돈과 비교 평가하였음.

③ 모돈 및 포유자돈에 청국장 유래 물질의 적용 및 평가 결과

- ㉠ PGA를 접종한 돼지들에서는 PGA를 처치한 후 3일과 7일에 분리한 PBMC의 TNF- α , INF- α , INF- β 등의 염증관련 cytokine의 발현이 control 그룹(NT)에 비해 높았으며 특히 7 ml의 PGA를 접종한 그룹은 접종 후 7일에 control 그룹에 비해 4배 이상의 높은 INF- β 발현을 보였음(그림 3-66).

- ㉡ 분만 모돈 초유 lymphocyte의 cytokine 발현 검사는 현재 진행 중이며 7월까지 완료될 예정임. 또한 모돈 PGA 접종 돼지에서 control 그룹과 비교하여 의미있는 병리학적, 독성학적 차이를 보이지 않아 PGA 접종에 의한 중요한 부작용은 없는 것으로 관찰되었음. 따라서, PGA의 적정 접종량을 7ml로 결정하였다.

- ㉢ PGA를 접종하지 않은 모돈에서 분만된 포유자돈들에 비해 PGA를 7 또는 10ml을 접종한 모돈에서 분만된 포유자돈들의 PRRSV 전파에 대한 저항성이 높은 것으로 평가하였음. 7 또는 10ml을 접종한 모돈에서 분만된 포유자돈그룹은 공격접종 7일까지도 동거자돈들에 바이러스 전파에 의한 감염이 일어나지 않은 반면, 5ml 접종 그룹과 비접종그룹에서는 공격감염 7일 만에 2마리의 동거자돈들에 바이러스가 전파되는 것을 관찰하였음.

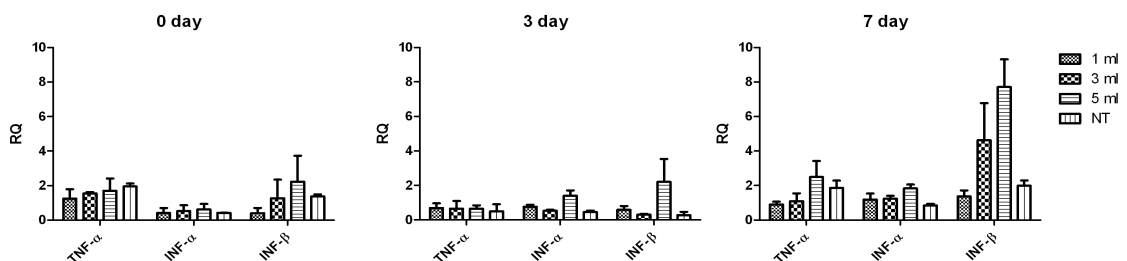


그림 3-66. PGA 접종 후 선청성 면역 자극

- ㉣ 이 후 공격감염 14일까지도 10 또는 7ml 접종그룹에서는 11 또는 12마리의 동거자

돈들에 바이러스가 전파된 반면, 5ml 접종그룹에서는 14마리, 비 접종그룹에서는 16마리의 동거자돈에 바이러스가 전파되는 것으로 관찰되었음(그림 3-67). 또한 7 또는 10ml 접종그룹의 평균 혈중바이러스 농도는 5ml 접종그룹과 비접종그룹과 비교해 공격접종 후 7일 또는 14일에 보다 낮게 유지되는 것으로 관찰되었다(그림 3-68).

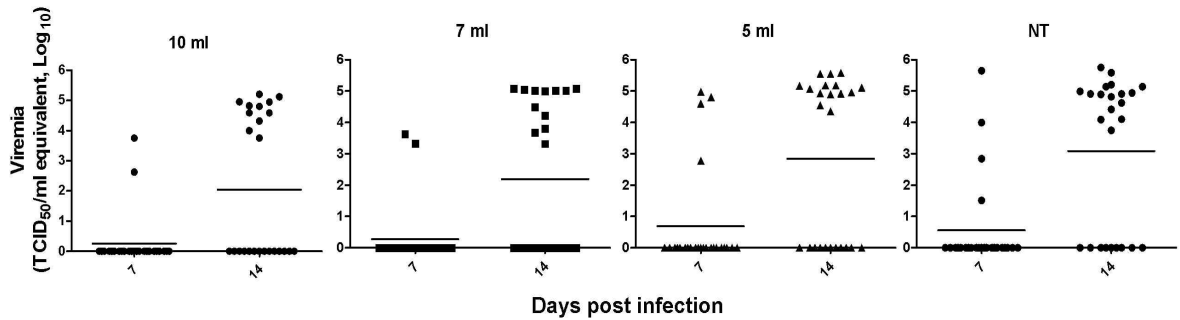


그림 3-67. PRRSV 접종 후 PGA 접종 및 비접종 그룹 포유자돈의 혈중 바이러스 농도. 그룹당 25마리의 자돈 중 2 마리에 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 근육접종을 실시한 후 매주 혈액을 채취하여 검사하였음.

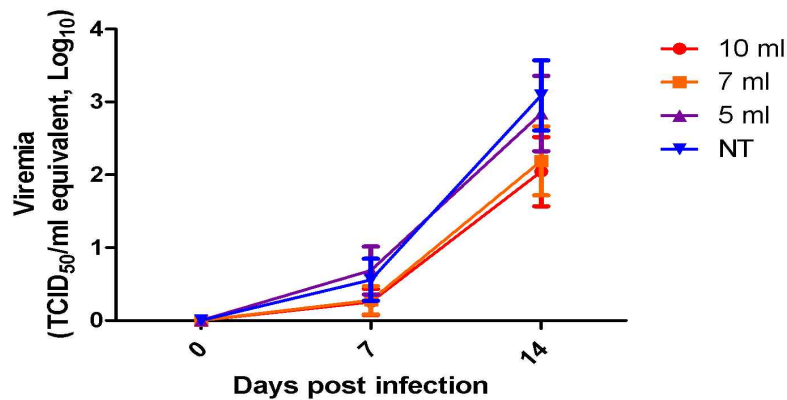


그림 3-68. PRRSV 접종 후 PGA 접종 및 비접종 그룹 포유자돈의 평균 혈중 바이러스 농도 그룹당 25마리의 자돈 중 2 마리에 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 근육접종을 실시한 후 매주 혈액을 채취하여 검사하였음.

㉞ 공격접종 2주 후에 그룹 당 15마리의 돼지를 안락사하여 부검을 실시하고 병리학적인 분석을 진행함. 또한 폐를 수거하여 PRRSV real-time RT-PCR을 이용하여 폐의 바이러스 농도를 정량하였음. 분석결과, 10 또는 7ml 접종그룹에서는 6마리와 8마리의 폐에서 PRRSV가 검출되었고, 5ml 접종그룹과 비접종그룹에서는 9마리의 폐에서 바이러스가 검출되었다. 또한 10 또는 7ml 접종그룹에서는 5ml 접종그룹과 비접종그룹에 비해 상대적으로 낮은 수준의 폐 내 바이러스 농도가 검출되었음(그림 3-69).

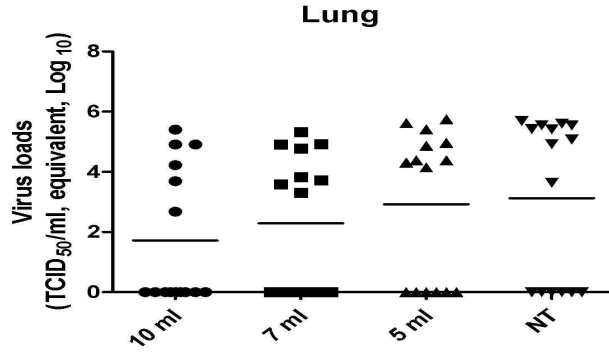


그림 3-69. PRRSV 접종 후 PGA 접종 및 비접종 그룹의 폐 바이러스 농도

㉞ 공격접종 후 2주간의 체중의 증감을 분석하여 2주 동안의 일당증체율을 분석하였음(그림 3-70). 10ml 접종그룹은 0.153 ± 0.007 kg/day의 증체율을 보여 비접종그룹(0.129 ± 0.041 kg/day)과 비교해 유의성 있게($p > 0.05$) 높은 증체율을 보였고, 7(0.1487 ± 0.033 kg/day) 또는 5ml 접종그룹(0.1491 ± 0.007 kg/day)들도 비접종그룹에 비교하여 상대적으로 높은 증체율을 보였음(p 값은 각각 0.0634 또는 0.0570임).

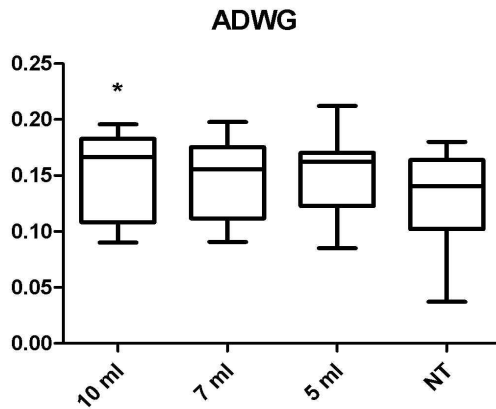


그림 3-70. PRRSV 접종 후 PGA 접종 및 비접종 그룹의 2주간의 일당증체율(ADWG)
* $p < 0.05$

(나) 고도면역 초유 유래 물질의 포유자돈 설사병에 대한 평가

- 대장균, 살모넬라 클로스티리디움 등의 주요 양돈 소화기 병원성 세균과 PED와 로타 바이러스 등 주요 병원성 바이러스 정제 항원을 접종하여 고도면역시킨 초유를 바탕으로 개발된 신생포유자돈용 초유제제(IC-F1)의 포유자돈에서의 설사질병 예방에 대한 효과를 평가하였다.

① 모돈 및 포유자돈에 고도면역 초유 유래 물질의 적용 및 평가 방법

- 모돈 및 포유자돈에 고도면역 초유 유래 물질의 적용 및 평가 방법은 다음과 같음
- 첫 번째로 포유자돈의 IC-F1에 의한 PED 바이러스에 대한 방어효과를 평가(실험 1)를 실시하였다. 접종량은 동일한 모돈에서 분만된 자돈 중 5두는 분만 직후 IC-F1 2 ml을 하루 두 번 이틀 동안 처치하고 나머지 5두는 무처리, 이후 1주일간 동일하게 초유를 공급하였음. 위의 10마리의 포유자돈을 처치군과 비처치군으로 나

누어 PED 바이러스를 1×10^3 TCID₅₀/ml equivalent (real-time PCR 정량)의 농도로 경구 접종하였다. 이후 7일간 분변을 채취하고 바이러스 접종후 7일째 안락사 및 부검 병리 검사를 실시하였음.

- 두 번째로 IC-F1의 양돈장 적용에 의한 설사병에 대한 효과를 평가(실험 2)를 실시하였음. 평가 대상을 선발하기 위해 로타바이러스, 대장균과 클로스티리디움에 의한 포유자돈의 지속적인 설사증을 보이는 전북 김제소재의 양돈장을 선정하였음. 2014년 4월에서 5월 사이에 분만된 포유자돈 500두에 분만 직후 IC-F1 2ml을 하루 두 번씩 처음 이틀 동안 처치하고 나머지 무처리 포유자돈들과 비교하여 설사 발생률 및 복당 생시체중 및 이유체중을 측정하였고, 설사병의 원인을 검사하였음.

② 포유자돈에서 IC-F1의 PED 및 설사병 예방 평가 결과

- 분만 후 IC-F1를 경구 투여한 포유자돈 그룹은 비경구투여 포유자돈 그룹과 비교하여 PED 바이러스 접종 이후에도 5일 이후에 약한 설사를 보인 반면 비경구투여 군은 감염 3일부터 강한 설사 증상을 보이며 설사는 실험종료일까지도 계속 지속되었음(그림 3-71).
- 감염 후 7일째 포유자돈들을 안락사시켜 부검을 실시한 결과, IC-F1 비투여 그룹에서는 전형적인 소장 용모의 파괴에 의한 장벽의 비박화 병변을 보인 반면 IC-F1 투여 그룹은 특이 병변이 상대적으로 약하게 관찰되었다(그림 3-72). 일주일간의 체중 증체량을 평가한 결과 IC-F1를 경구 투여한 포유자돈 그룹은 비투여 군에 비해 일당 증체율이 높은 것으로 평가되었다(표 3-25).
- 일주일간의 분변으로 배설되는 PED 바이러스의 농도 측정한 결과, 특히 감염 후 3일에 IC-F1를 경구 투여한 포유자돈 그룹에서 비투여 그룹 보다 100배 이상 낮은 바이러스 배출이 관찰되었고 이후에도 비투여 그룹과 비교하여 낮은 수준의 바이러스 배출이 관찰되었다(그림 3-73).



<IC-F1 투여군>



<비투여군>

그림 3-71. IC-F1 투여 또는 비투여군의 PEDV 공격접종 후 임상적 소견



<IC-F1 투여군>



<비투여군>

그림 3-72. IC-F1 투여 또는 비투여군의 PEDV 공격접종 후 육안적 소견

표 3-25. 시험군 포유자돈의 평균 일당증체량(ADG)

	Ave. of ADG (kg/day)	Std	N
No treatment	0.1728	0.0762	5
IC-F1 treatment	0.3682	0.1019	5

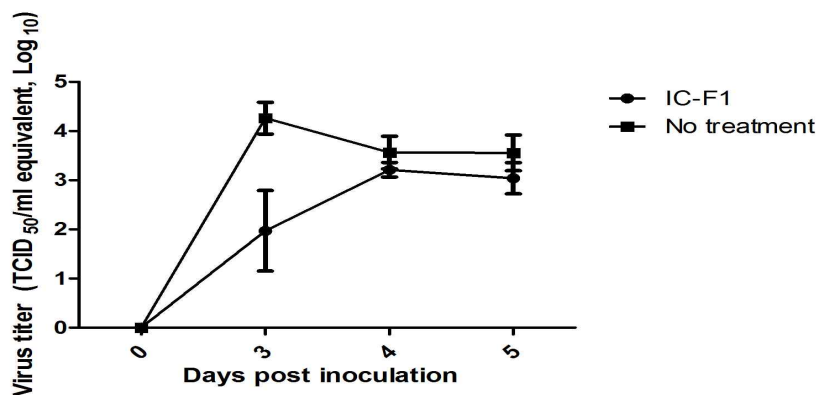


그림 3-73. IC-F1 투여 또는 비투여군의 PEDV 공격접종 후 분변 내 바이러스 배출 농도

③ IC-F1의 농장적용 및 설사병 예방 평가

- IC-F1의 양돈장 적용에 의한 설사병에 대한 효과를 평가하기 위해 로타바이러스, 대장균과 클로스티리디움에 의한 포유자돈의 지속적인 설사증을 보이는 양돈장에서 분만된 포유자돈 500두를 대상으로 설사 발생률 및 복당 생시체중 및 이유체중을 측정이 진행함. 설사가 발생하는 개체에서는 분변을 수거하여 설사병의 원인에 대한 검사가 진행 중으로 7월말까지 평가가 완료될 것으로 예상됨.

(다) 1, 2차년도 개발 신소재 물질의 효능 및 안정성 평가

① 유효 개발 물질들을 바탕으로 양돈장 적용 프로그램 개발

- 3차년도까지 평가가 완료된 천연물 또는 신소재 물질을 이용해 국내 양돈장에 고질적으로 발생하는 질병과 문제의 해결을 위해 양돈장 관리 프로그램을 개발하였음.

② 천연물과 신소재 물질을 이용한 국내 양돈장 관리 프로그램 개발 및 평가

㉠ 청국장 추출물질인 PGA

- 효능 및 안정성 평가 결과, 선천성 면역반응의 증가, 증체율 개선, PRRS 등의 바

이러스 질병에 대한 저항성 증가 및 모돈의 난산을 개선 등의 효능과 반복된 동물 실험과 농장적용 실험을 통해 안전성이 증명되었음.

- 모돈의 난산 및 유산 관련 문제 해결을 위해 사용이 권장되며 포유 및 이유자돈의 질병 저항성을 높이는 목적으로 사용될 수 있을 것으로 판단됨.

㉠ 초유 유래 물질인 IC-F1

- 효능 및 안정성 평가 결과, PED를 포함한 다양한 포유자돈 설사 병원체들의 항체가 포함된 제제로 PED에 대한 방어효과와 농장적용을 통한 포유자돈의 설사증 개선 효과가 증명되었음.
- 포유자돈의 초기 설사병 예방을 위해 사용될 수 있을 것으로 판단됨.

㉡ 버섯 및 다양한 곡물에서 추출되는 β-glucan

- 효능 및 안정성 평가 결과, 선천성 면역반응의 증가 및 장내 유익균을 증가시키는 효과 등이 관찰되었고, 이유자돈을 이용한 살모넬라 공격접종 실험을 통해 살모넬라 감염증에 대한 저항성을 높이고 증체율을 개선하는 효과가 증명되었음.
- 이유기부터 비육기까지 사료에 첨가하여 다양한 소화기성 질병의 예방하기 위해 사용될 수 있을 것으로 판단됨.

㉢ 리소좀

- 효능 및 안정성 평가 결과, 세포 유래의 천연 효소로 다양한 병원성 세균에 대한 항균효과가 증명됨.
- 분무제, 사료 첨가제 또는 음수첨가제 등으로 이유기에서 비육기까지의 세균성 감염을 예방하는 목적으로 사용될 수 있을 것으로 판단됨.

㉣ Antimicrobial peptide(AMP)

- 효능 및 안정성 평가 결과, 돼지의 천연 펩타이드로 다양한 병원성 세균에 대한 항균효과가 증명됨.
- 분무제, 사료 첨가제 또는 음수첨가제 등으로 이유기에서 비육기까지의 세균성 감염을 예방하는 목적으로 사용될 수 있을 것으로 판단됨.

③ 이러한 평가결과를 바탕으로 아래와 같은 양돈장 구간별 질병 관리 프로그램이 제안되었으며 이 질병 관리 프로그램은 다음연도에 실제 양돈장에서 적용을 통하여 프로그램 적용 전 후의 질병 발생과 생산성 향상 등에 대한 평가를 진행하고 프로그램을 개선해 나가고자 함(그림 3-74).

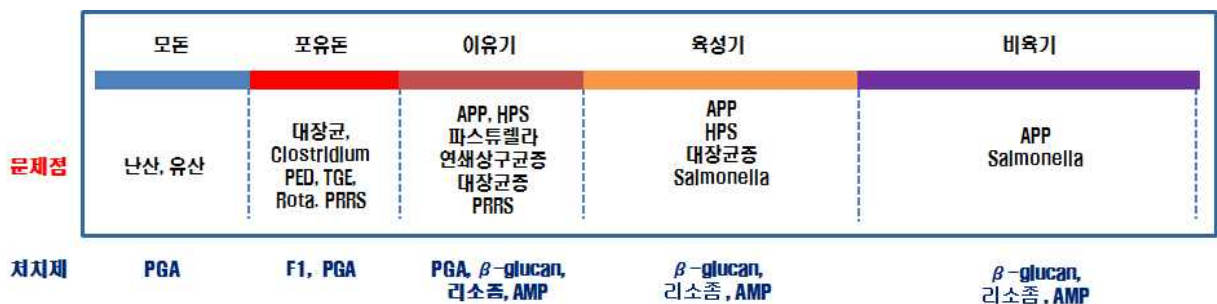


그림 3-74. 양돈장 구간별 질병 관리 프로그램

(4) 송아지에서의 개발된 물질들의 효능 및 안정성 평가

(가) 항균력 강화 리소좀의 효능평가

- ① 나노집적화된 리소좀 및 재조합된 균주에서 분리된 리소좀의 in vitro 항균 효과 시험
- 대상 병원체는 *E. coli* K99, *Salmonella choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin* 및 *Clostridium perfringens*로 하였음.
 - 실험방법은 항균력 특성 측정(agar well diffusion method)으로 하였다. 먼저 병원체를 준비하기 위해 선별된 균주를 TSB(Dfico BRL) broth에서 배양(37°C, 150rpm, 24hrs) 한 후, 원심분리(15,000 rpm, 30min, 4°C)하여 상등액을 회수한 다음 membrane filter (0.2 µm, Dismic, Advantec)로 여과하여 항균력 측정을 위한 시료로 준비하였음. 그런 다음 Agar well diffusin 측정을 위하여 멸균한 450 ml의 TSB soft agar (0.8%, w/v)에 50ml의 1.0M Tris-HCL buffer (pH 6.8)를 첨가한 후 감수성 균주 (1.0%, 1×10⁶ CFU/ml)를 섞어서 혼합한 뒤 배지를 25 ml씩 분주하여 완전히 굳힌 다음 살균된 tip을 이용하여 직경 5 mm의 구멍을 형성하였다. 냉동 보관했던 상등액 시료 100 µl를 준비한 test plate의 hole에 분주 후, 4°C에서 2-3시간 정도 방치하여 상등액이 확산 시킨 후 감수성 균주의 생육 최적 온도에서 18시간 이상 배양하여 저해환(Clean zone) 생성여부를 확인하였음.
 - 리소좀의 항균력 결과, 일부 및 다수의 균주에 항균력을 보이는 균주들의 확인하였으며, 특히 재조합된 리소좀이 다양한 병원체에 항균력을 보이는 것으로 평가됨.

(나) 유효 개발 물질들을 바탕으로 축우장 적용 프로그램 개발

- 3차년도까지 평가가 완료된 천연물 또는 신소재 물질을 이용해 국내 축우장에 고질적으로 발생하는 질병과 문제의 해결을 위해 축우장 관리 프로그램을 개발하였음.
- ① 난황항체 제제
- 효능 및 안정성 평가 결과, 송아지에서의 장염 병원체에 대한 방어효과와 농장적용을 통한 송아지의 설사증 개선 효과가 증명되었음.
 - 초기 설사병 예방을 위해 사용될 수 있을 것으로 판단된다.
- ② 리소좀
- 효능 및 안정성 평가 결과, 세포 유래의 천연 효소로 다양한 병원성 세균에 대한 항균효과가 증명되었음.
 - 알지네이트 처리된 형태로 장염 예방 및 치료 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨.



그림 3-75. 송아지 난황항체제제 효능평가 시험 동물

4. 항미생물 펩타이드의 안정성 및 효능 증대기술의 확보

가. 최적 항미생물 펩타이드의 생산량 증대를 위한 기술 개발 및 활성증대기술 개발

(1) 생산이 진행 중인 PG1의 정제단계 최적화 및 생산효율 극대화

(가) 2차년도 Bacteriocidal effect를 극복하기 위해 도입한 방법으로 PG1을 GFP 172-173번 아미노산 사이에 삽입, pET30b(+ vector와 결합시킨 뒤 E.coli BL21으로 형질전환하여 얻은 클론의 발현을 시작으로 3차년도에서는 여러 가지 배양 조건을 달리하여 발현량을 극대화함.

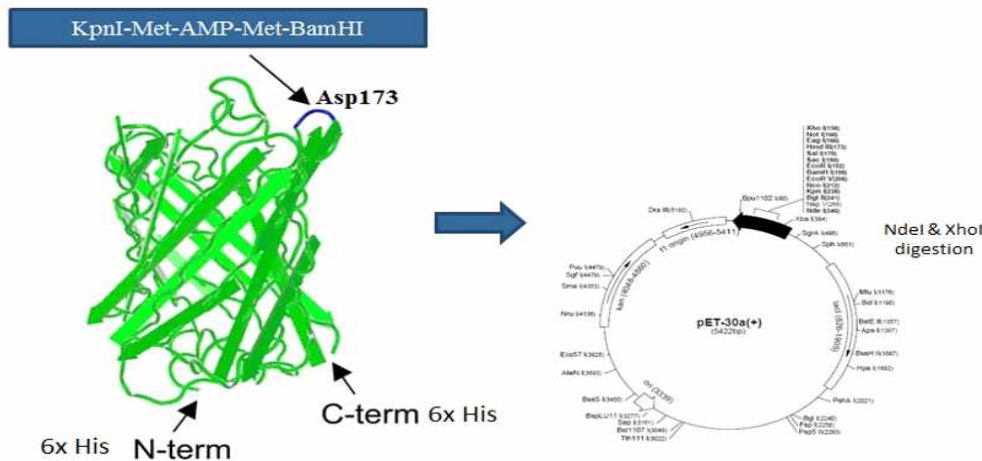


그림 3-76. GFP-r5M 및 pET30b(+를 이용한 E.coli 발현용 클로닝의 확보

- (나) 500 μ g kanamycin이 첨가된 10ml의 LB medium에 pre-inoculum, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm, 14시간동안 배양한 후 50mg kanamycin이 첨가된 1 ℓ 의 LB medium으로 transfer, OD₆₀₀ 값이 1.0을 넘기지 않도록 (0.8~1.0) 배양하여 발현량을 극대화함.
- (다) 최적화된 inducer 농도를 판별, 1mM IPTG 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 220rpm, 6시간동안 GFP와 fusion된 PG1의 발현을 유도, 발현 유도 3시간 후 1mg kanamycin을 한번 더 첨가하여 생산 효율을 극대화함.
- (라) pET30b(+ vector에 결합된 fusion protein은 insoluble 형태로 발현되므로 이를 추출하기 위해 lysis buffer(20mM sodium phosphate, 250mM NaCl) 및 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 0.5% Triton X100를 첨가, sonication 방식을 통해 박테리아의 세포벽과 세포막을 파괴시킨 뒤 여러 단계의 washing step을 통해 최적의 insoluble 단백질을 추출함.
- (마) 12% SDS-PAGE를 통해 fusion된 PG1이 매우 높게 발현되며, 물에 의해 녹지 않는 완전한 insoluble 형태로 발현됨을 확인, 바로 affinity chromatography 기법을 이용한 1차 정제가 가능함.
- (바) 발현이 극대화된 PG1을 affinity chromatography 기법을 이용하여 정제할 경우 그 발현량이 매우 뛰어나 column의 capacity를 넘게 되므로 손실을 줄이고 효율적으로 정제하기 위해 2번에 걸쳐 정제함으로써 생산량을 증가시킴.
- (사) GFP-PG1으로부터 순수한 PG1을 분리해내기 위한 70% formic acid와 cyanogen

bromide (CNBr) 처리 과정에서의 처리 시간을 최적화, lyophilization을 통해 파우더 형태의 PG1을 만든 후 reverse phase-high performance liquid chromatography (HPLC) 기법의 최적화를 통해 향상된 생산량을 확보함.

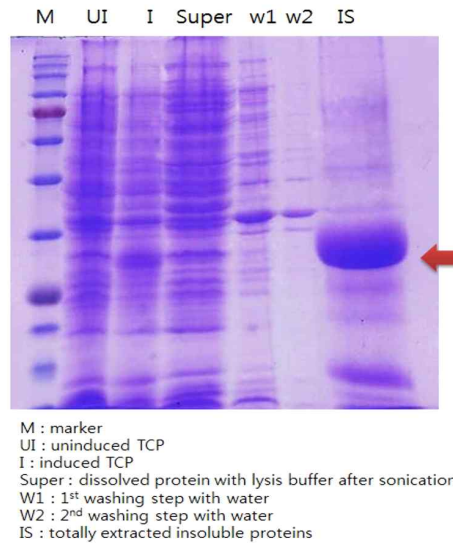


그림 3-76. Insoluble extraction 방법의 최적화

(2) PG1 클로닝을 기반으로 나머지 두 항미생물 펩타이드 PMAP36, PR26의 클로닝 확보 및 안정적인 발현, 정제시스템 구축

(가) PMAP36와 PR26의 클로닝 확보

① GFP 172-173번 아미노산 사이에 위치한 PG1이 삽입된 pET30b(+) vector construct를 이용하여 제한효소 NdeI과 XhoI을 이용하여 절단한 뒤 PCR 기법을 통해 합성된 PMAP36 및 PR26를 도입 후 발현용 호스트인 E.coli BL21로 형질전환, 클론을 확보함.

(나) PMAP36와 PR26 클론의 발현 시스템 안정화

① 500 μ g kanamycin이 첨가된 10ml의 LB medium, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm, 14시간의 배양 조건, pre-inoculum을 50mg kanamycin이 첨가된 1 ℓ 의 LB medium으로 transfer 하여 적정 OD₆₀₀ 값(0.8~1.0이)까지 배양 후 적정 농도의 inducer (1mM IPTG)를 첨가하는 등 최적화된 PG1 발현 시스템을 도입하여 PMAP36과 PR26의 발현 시스템을 안정화시킴.

② PMAP36 및 PR26 역시 insoluble 형태로 발현되므로 이를 추출하기 위해 PG1과 유사한 조건의 불활성 단백질을 추출함 (lysis buffer(20mM sodium phosphate, 150mM NaCl)와 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 0.5% Triton X100를 첨가, 동일한 sonication 방식을 이용).

③ PG1에 비해 PMAP36과 PR26는 insoluble 단백질 추출 과정에서 점성이 높아 washing step을 늘리는 방법을 선택, 12% SDS-PAGE를 통해 fusion된 PMAP36과 PR26 역시 이 물에 의해 녹지 않는 완전한 insoluble 형태로 발현됨을 확인함.

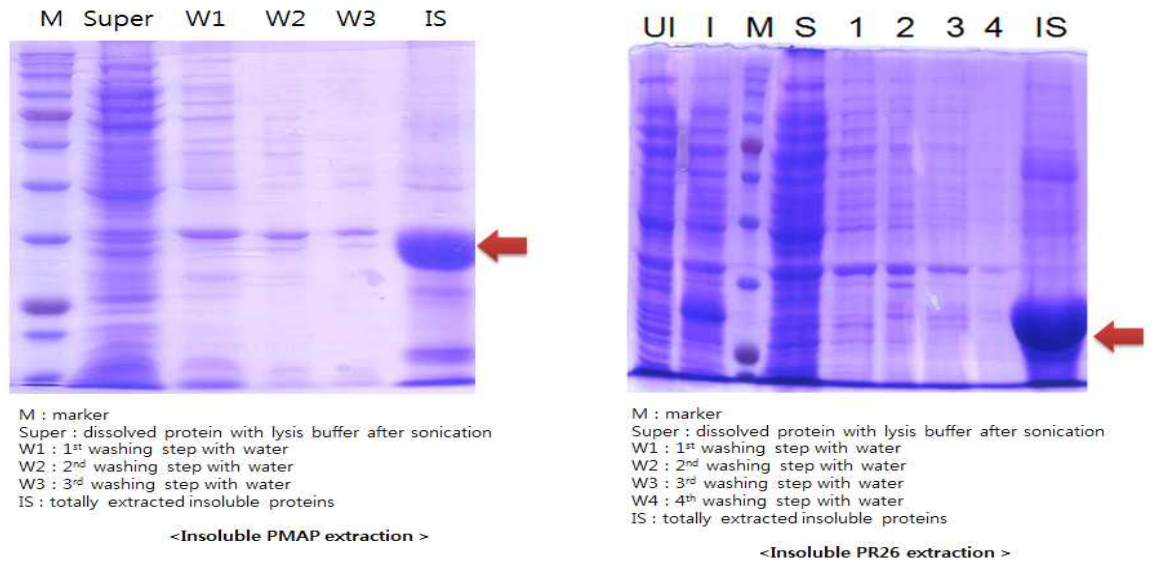
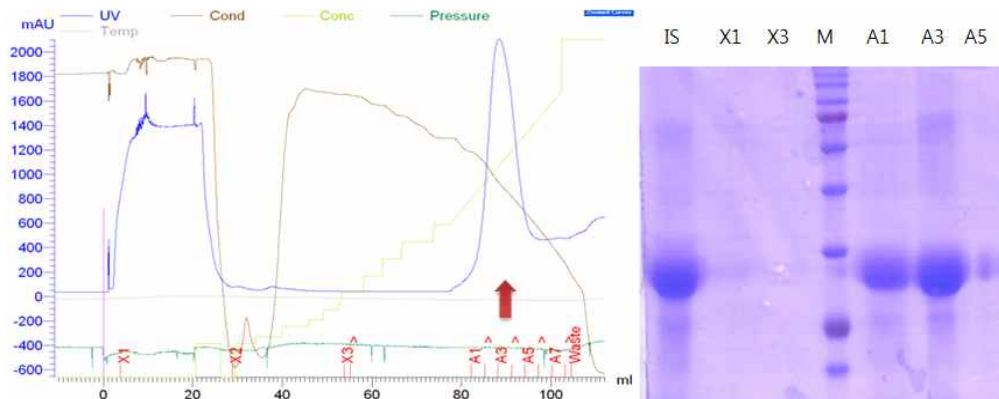


그림 3-77. PMAP36과 PR26 클론을 이용한 발현 및 insoluble extraction 결과

(다) PMAP36와 PR26 정제시스템 구축

- ① PG1 construct를 기반으로 클론된 PMAP36와 PR26 또한 insoluble fusion PG1이 6개의 히스티딘 아미노산을 가지도록 디자인 하였으므로 HisTrap HP column을 이용하여 denaturation Ni-NTA 기법을 이용하여 추출함.
- ② Fusion된 insoluble PMAP36와 PR26의 chromatography peak이 PG1과 유사함을 확인, 그러나 His tag에 대해 친화력을 가지는 imidazole의 농도가 PG1의 경우 약 400mM 일 때 elution되었으나, PMAP36의 경우 300mM, PR26의 경우 500mM일 때 elution되는 차이를 확인함.



< PMAP36 FPLC 결과 >

그림 3-78. PMAP36의 FPLC를 이용한 affinity chromatography 결과

- ③ GFP와 결합된 형태의 펩타이드에서 순수한 PMAP36와 PR26를 분리해내기 위해

PG1과 동일하게 70% formic acid와 cyanogen bromide (CNBr)를 이용하여 digestion, 16% tricine gel을 통해 N-terminal과 C-terminal 부분의 GFP 단편과 PMAP 혹은 PR26로 분리됨을 확인함. (그림 3-79)

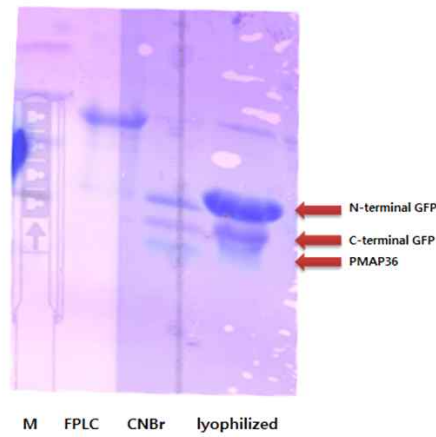


그림 3-79. CNBr을 이용한 PMAP36의 cleavage

- ④ 70% formic acid와 cyanogen bromide (CNBr)가 처리된 PMAP36과 PR26를 동결 건조하여 얻어진 파우더 형태의 샘플은 PG1과 달리 다른 chromatography 기법인 Gel filtration (GF) 기법을 이용하여 최종적으로 추출함. (그림 3-80)

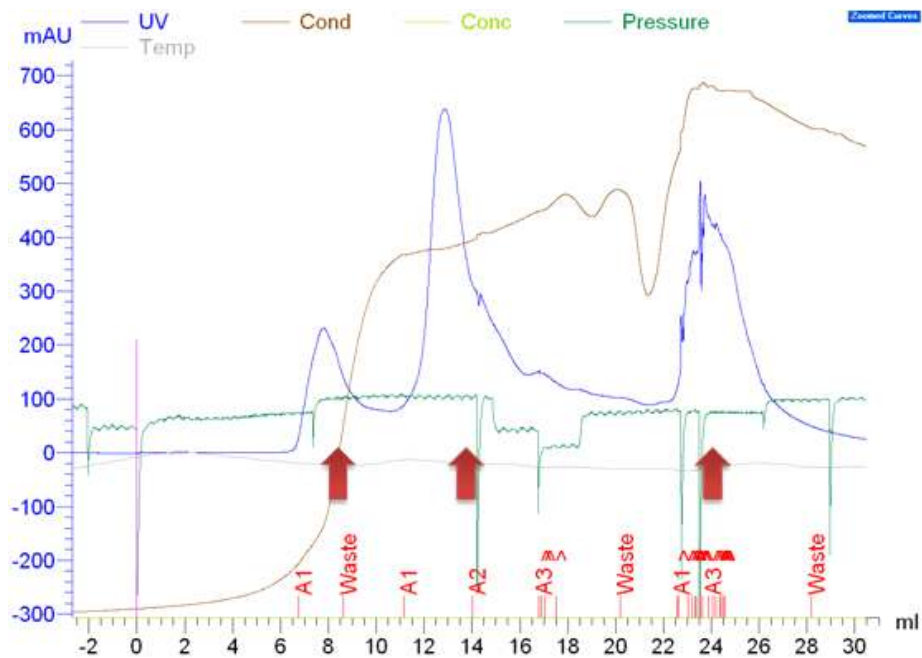


그림 3-80. Gel filtration 기법을 이용한 PMAP36의 정제

- ⑤ 분자량 차이를 기반으로 정제가 가능한 Gel filtration은 GE Superdex 75HR column과 sodium phosphate buffer를 이용하여 0.5ml/min의 조건으로 수행되었으며 CNBr treatment로 절단된 GFP와 PMAP36, PR26로부터의 3개의 peak을 확인

함.

⑥ 현재 항미생물 활성을 테스트를 위해 제 1협동에 발현, 정제된 PMAP36과 PR26를 제공 완료하였음.

(3) 활성 증대를 위한 disulfide bond installation 과정의 최적화

(가) Gel filtration 혹은 HPLC를 이용하여 정제 후 8M urea, 50mM glycine, 5mM GSSH, 0.5mM GSSG를 포함한 1x PBS를 첨가한 뒤 상온에서 24시간 동안 투석시킴으로써 disulfide bond installation을 유도 최적화시킴.

(나) Membrane에 투석된 펩타이드는 lyophilization을 통해 파우더 형태로 보관함으로써 그 안정성을 높이고, 항미생물 활성 테스트를 위해 후에 buffer 사용이 용이.

나. 전자현미경을 활용하여 항미생물 펩타이드의 박테리아 세포벽 파괴기전 분석 및 비교

(1) PR26의 박테리아 세포벽에 대한 작용 기전에 대한 분석 및 비교

(가) 최적 항미생물 펩타이드 유전자 중 하나로 선정된 PR26는 wild type PR39의 truncated 형태로 PR39와 같은 항균력을 가지는 것으로 알려져 있으나 현재까지 PR26나 PR39의 항균 메커니즘에 대해 명확히 규명되지 않았기에 PR26 작용 기전 연구에 그 의의가 있음.

(나) 극히 일부 연구에서 PR26가 박테리아의 세포막과 상호작용하여 파괴시키거나 세포막을 통과하여 직접적으로 DNA 복제 혹은 단백질의 생합성을 차단함으로써 항균력을 가지는 것으로 알려졌으나 정확하게 완전한 기작에 대해서 증명하지 못함.

(다) PR26의 작용기전을 이해하기 위해 E.coli에 PR26를 처리하였을 때 scanning electron microscope (SEM)과 transmission electron microscope (TEM)을 이용하여 membrane integrity와 structure를 관찰함으로써 PR26가 박테리아의 세포막과 상호작용을 하는 지에 대한 연구를 진행.

다. 항미생물 펩타이드 정제기술 개발 1단계

(1) GFP-AMP 발현, insoluble fusion protein 추출, affinity chromatography 기법 및 cyanogen bromide cleavage를 이용한 정제 이후 reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) 기법을 이용한 마지막 정제단계 최적화

(가) GFP-PG1 클론을 inducer IPTG를 이용한 발현 기법을 여러 가지 배양 조건을 달리하여 극대화된 발현효율 시스템을 구축

(나) 발현된 insoluble fusion PG1의 His-tag 시스템을 이용, HisTrap HP column을 이용한 denaturation Ni-NTA 기법을 이용하여 추출, chromatography 기법의 다양한 변수를 고려하여 정제 방법을 최적화

(다) chromatography peak을 기반으로 SDS-PAGE 확인한 결과 대량의 fusion PG1의 정제 및 기술의 최적화를 확인

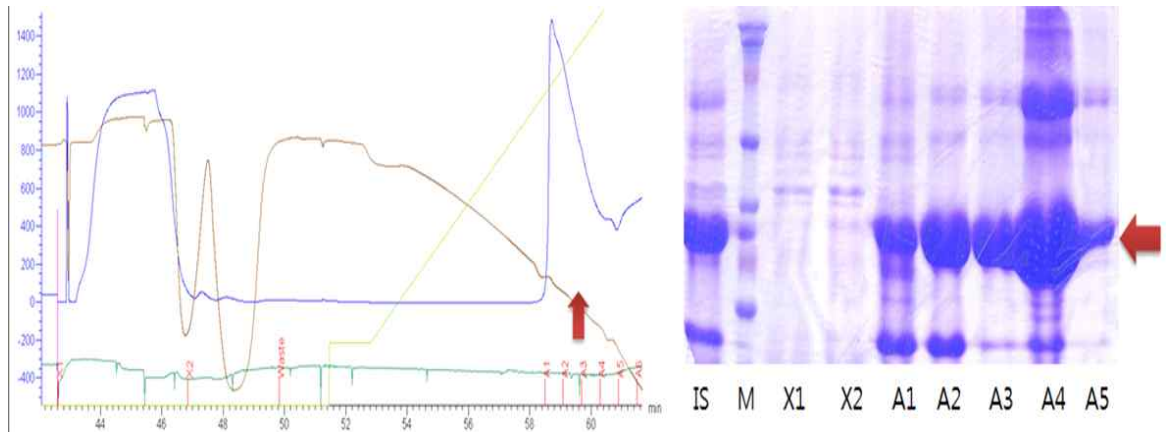


그림 3-81. Denaturaton Ni-NTA 기법을 이용한 PG1 정제기법 최적화

(라) GFP-PG1으로부터 PG1을 분리해내기 위해 70% formic acid와 cyanogen bromide (CNBr)을 이용한 cleavage step에서 digestion 시간 단축을 위해 shaking 방법을 이용, 시료의 손실을 줄이기 위해 lyophilizer에 speed vac을 결합한 방식을 이용하여 동결건조한 뒤 reverse phase-high performance liquid chromatography (HPLC) 기법으로 최종적으로 PG1을 정제, 제 1협동과의 협업을 위해 필요에 따라 PG1을 생산.

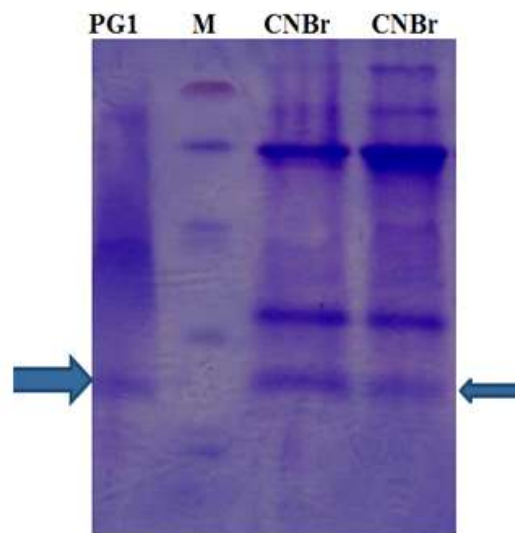


그림 3-82. FPLC를 이용한 Ni-NTA 이후 정제 과정 및 CNBr를 위한 cleavage

라. Cyclic 항미생물 펩타이드 대량 발현 시스템 구축 및 효력평가

(1) 안정성이 높은 cyclic 항미생물 펩타이드의 클론 확보 및 발현

(가) 2차년도에 돼지 이외 유래의 항미생물 펩타이드 중 단백질 분해효소에 의한 분해 작용을 억제하기 위해 아직 그 효능이 밝혀지지 않은 cyclic AMP 후보 유전자 8종 중 식물 유래의 CD1과 이미 그 항균활성도가 매우 뛰어난 것으로 밝혀진 원숭이 유래의 RTD-1, 총 2종의 cyclic AMP를 선정 후 sequence를 모두 확보, 클로닝을

위한 효소 인식 부위, stop codon, 크로마토그래피를 위한 히스티딘 등을 첨가하기 위해 PCR 기법을 이용하여 2종의 발현벡터 클론이 확보된 상태임.

표 3-26. CD1과 RTD1의 아미노산 서열 정보

AMP	Source	a.a sequence	amino acid	rearrangement of a.a
CD-1	Chassalia discolor	GADGFCGESCIVIPICISYLVGCSCDTIEKVCKRN	34	CGESCIVIPICISYLVGCSCDTIEKVCKRN GADGF
RTD-1	rhesus macaque	GFCRCLCRRGVCRICTR	18	CRCLCRRGVCRICTR GF

(나) CD1과 RTD-1의 클론은 대량 발현을 위해 bactericidal effect를 극복하고 cyclic 형태로 만들기 위한 방안으로 2종류의 intein 단백질 사이에 삽입하여 pET30b(+)와 결합, E.coli BL21으로 형질전환하여 얻은 콜로니를 IPTG를 inducer로 이용하여 발현.

(3) 시간 경과에 따른 OD₆₀₀ 값을 측정, 샘플을 채취한 후 12% SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 PG1, PMAP, PR26와 같은 linear 형태 AMP에 비해 E.coli가 다소 느리게 자라나 CD1과 RTD-1이 발현됨을 확인, 현재 안정적인 발현량 확보를 위한 최적화 추진(그림 3-83 및 3-84).

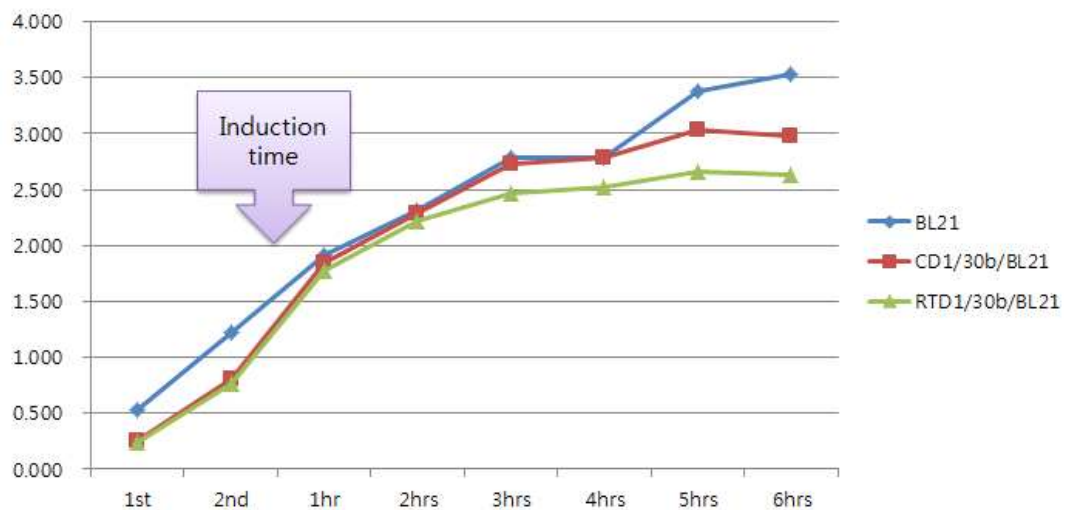


그림 3-83. CD1과 RTD1 발현에 따른 박테리아 성장 확인

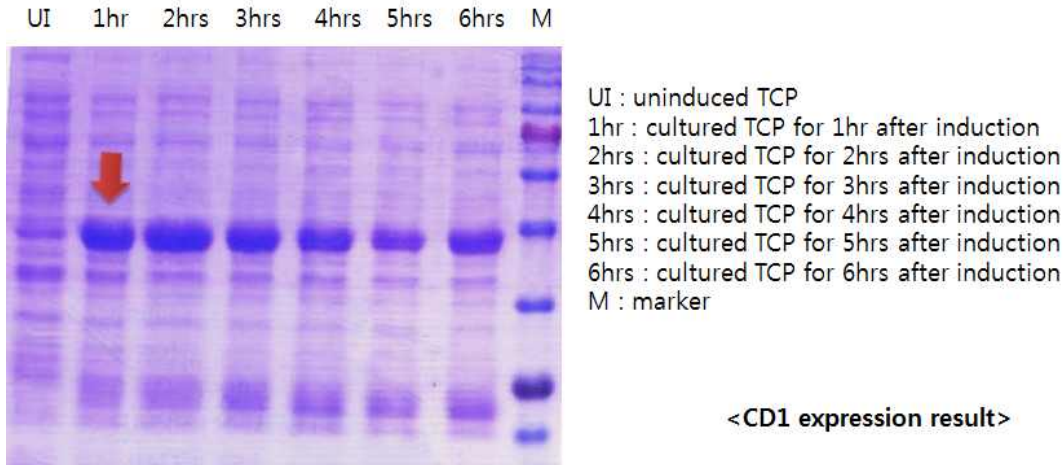


그림 3-84. 발현 시간에 따른 CD1의 발현 정도 확인

마. 3차년도 연구결과 요약 및 평가

(1) PG1의 정제단계 최적화 및 생산효율 극대화

- (가) 3가지 최적 항미생물 펩타이드 중 PG1을 GFP 172-173번 아미노산 사이에 삽입, pET30b(+ vector와 결합시킨 뒤 발현용 호스트인 E.coli BL21으로 형질전환 후 얻은 클론을 selection marker인 kenamycin과 발현 유도를 위한 IPTG가 첨가된 LB medium을 이용한 발현 시스템을 최적화
- (나) GFP-PG1 fusion protein의 발현에 영향을 미치는 IPTG 농도와 배양시간을 최적화하여 발현효율을 극대화
 - ① 여러 가지 조건의 실험을 통해 denaturation Ni-NTA, FPLC, RP-HPLC 등 다양한 정제 기법에 대한 최적화를 통해 GFP-PG1 fusion protein으로부터 PG1을 분리, 정제하는 시스템을 안정화시키고 생산효율을 극대화

(2) PG1 클로닝을 기반으로 항미생물 펩타이드 PMAP36, PR26의 클로닝 확보 및 안정적인 발현, 정제시스템 최적화

- (가) GFP와 fusion된 형태로 pET30b(+ vector에 삽입된 PG1 construct를 이용, PCR 증폭 기법을 통해 PMAP36과 PR26의 유전자를 확보하고 두 제한효소 NdeI과 XhoI을 이용한 digestion을 통해 pET30b(+ plasmid로 도입한 뒤 E.coli BL21으로 형질전환 시켜 클론 확보에 성공
- (나) CD1과 RTD-1의 클론은 대량 발현을 위해 bactericidal effect를 극복하고 cyclic 형태로 만들기 위한 방안으로 2종류의 intein 단백질 사이에 삽입하여 pET30b(+와 결합, E.coli BL21으로 형질전환하여 얻은 콜로니를 IPTG를 inducer로 이용하여 발현
- (다) 여러 가지 조건의 실험을 통해 denaturation Ni-NTA, FPLC, RP-HPLC 등 다양한 정제 기법에 대한 최적화를 통해 GFP-PG1 fusion protein으로부터 PG1을 분리, 정제하는 시스템을 안정화시키고 생산효율을 극대화

- (3) 전자현미경을 활용하여 항미생물 펩타이드의 박테리아 세포벽 파괴기전 분석 및 비교
- (가) E.coli에 PR26를 처리하였을 때 scanning electron microscope (SEM)과 transmission electron microscope (TEM)을 이용하여 membrane integrity와 structure를 관찰함으로써 박테리아의 세포막과 상호작용을 하는 지에 대한 분석이 진행 중에 있음
- (4) Cyclic 항미생물 펩타이드 대량 발현 시스템 구축 및 효력평가
- (가) 패지이외 유래의 cyclic AMP 2종 CD1 및 RTD-1의 클론을 확보
- (나) CD1과 RTD-1의 클론은 대량 발현을 위해 bactericidal effect를 극복하고 cyclic 형태로 만들기 위한 방안으로 2종류의 intein 단백질 사이에 삽입하여 pET30b(+)와 결합, E.coli BL21으로 형질전환하여 얻은 콜로니를 IPTG를 inducer로 이용하여 발현
- (다) PG1, PMAP, PR26와 같은 linear 형태 AMP에 비해 E.coli가 다소 느리게 자라나 CD1과 RTD-1이 발현됨을 확인, 현재 안정적인 발현량 확보를 위한 최적화 연구 진행
- (5) 3차년도에 계획된 연구내용들을 계획대로 수행하였으며 in vitro 항미생물펩타이드 생산기술을 최적화시킴
- (6) 3차년도 연구결과를 활용하여 항미생물펩타이드의 병원성미생물 억제제로써의 효과평가를 통해 4차년도 가축전염병 제어용 신소재로써의 효과 검증 및 개발된 신소재를 활용한 항생제 대체 또는 보조 제제개발을 위한 연구를 위한 기반을 마련함.

5. 가축전염병 치료용 앵타머의 상용화를 위한 in vitro에서의 앵타머의 활성 평가 구축 (제3협동)

가. 가축전염병 관련 단백질에 특이적인 앵타머의 결합 최적화를 위한 in vitro에서의 결합력 및 특이성 등의 효능 평가

- (1) 가축전염성 관련 단백질 *S. sonnei*의 IpaH와 *Listeria monocytogenes*의 PrfA에 특이적으로 결합하는 각각의 앵타머의 SPR을 이용한 농도별 결합 반응 평가
- (가) 가축전염병 관련 병원성 미생물인 *Shigella sonnei*관련 병원성 단백질인 IpaH에 특이적으로 결합하는 앵타머의 농도별 결합 반응 평가
- ① SPR 기반의 IpaH 단백질 - IpaH 특이결합 앵타머 간의 농도별 결합 반응성 평가
- ② 2차년도에 앵타머의 결합력 정량화 평가시 사용했던 방법과 동일하게 Biacore사의 SPR system을 활용하여 IpaH 단백질에 앵타머를 농도별로 처리하여 결합반응을 평가해보고자 함. 이를 위하여 IpaH 단백질을 Chip에 고정화 하는 작업이 요구되었는데, 고정화를 위하여 단백질에 존재하는 amine을 사용하여 고정하기 위하여, 카복실기가 존재하는 CM5 chip을 이용하였으며, EDC/NHS를 처리하여 잔기를 활성화 시키고, 단백질을 처리한 후, Ethanolamine을 처리하여 blocking하였음.

㉔ 앵타머는 2차년도 연구를 통해 선별된 4종의 IpaH-3, IpaH-7, IpaH-8, IpaH-17에 대해서만 수행하였으며, 300 nM, 500 nM, 700 nM, 1000 nM의 농도로 준비하여 10 ul/min의 flow rate으로 처리하였음. 분석 결과, 700 nM, 1000 nM의 경우 앵타머의 농도가 높아 그래프가 경향성 분석이 어려웠으며, 300 nM, 500 nM에서 반응성을 확인할 수 있었음. Chip에 고정된 0.16 ug/ul의 IpaH 단백질에는 300 - 500 nM 수준의 앵타머가 최적의 결합반응을 보이는 것을 확인할 수 있었음 (그림 3-85).

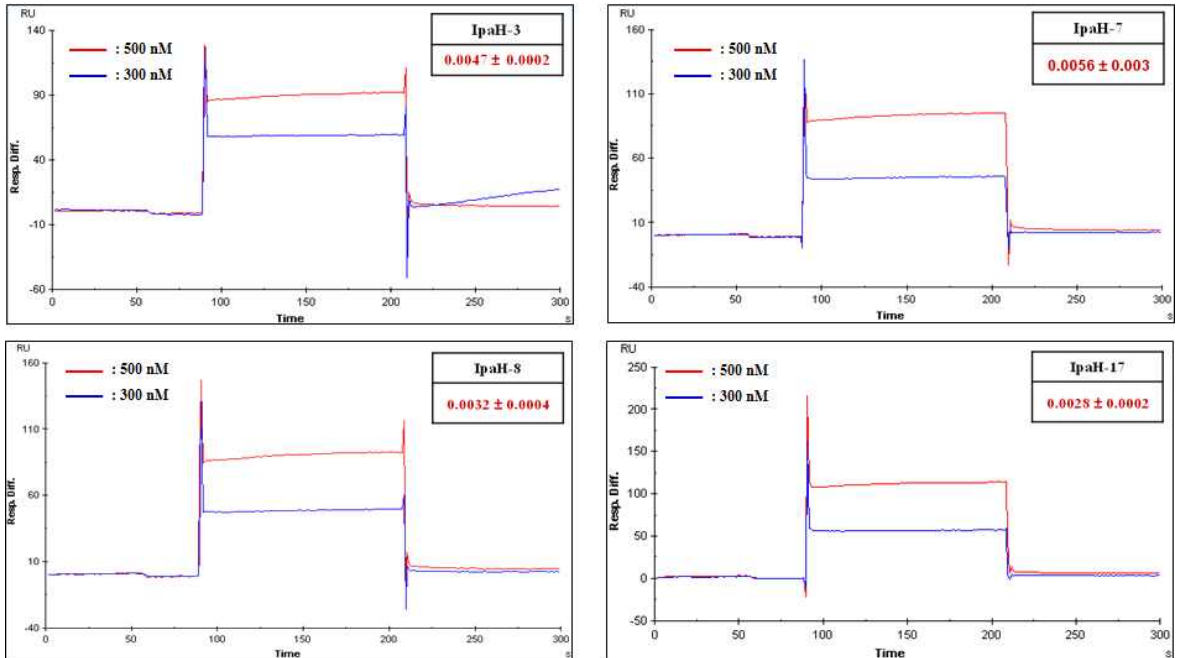


그림 3-85. IpaH 특이결합 앵타머 간의 최적 결합 조건 평가

㉔ 상기와 같은 방법으로 *Listeria monocytogenes*의 PrfA 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머와 PrfA 단백질간의 최적 결합조건을 확인하였음. 동일하게 앵타머를 300 nM, 500 nM, 700 nM, 1000 nM의 농도로 준비하여, 10 ul/min의 flow rate으로 처리하였음. 분석 결과, 300, 500, 00 nM, 7000 nM에서 결합의 경우 앵타머의 농도별로 결합반응이 나타나는 것을 확인하였음. 1000 nM에서는 분석할 수 없었음(그림 3-86).

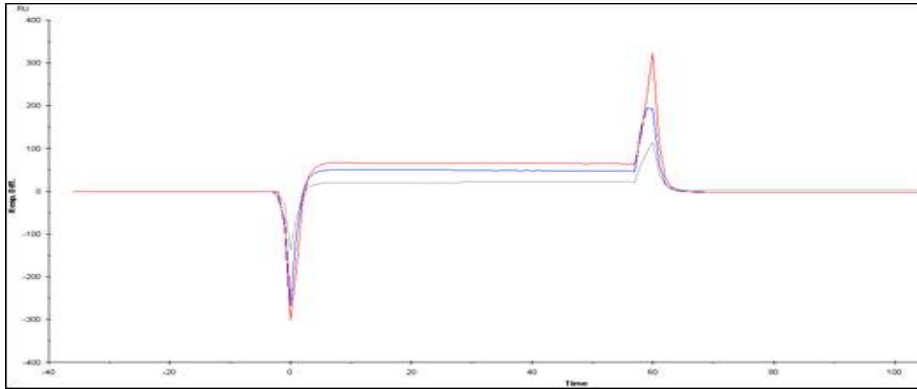


그림 3-86. PrfA 특이결합 앵타머 간의 최적 결합 조건 평가

(2) IpaH 및 PrfA 단백질에 특이적으로 결합하는 최적 앵타머의 구조적 특이성 분석

(가) 가축전염병 관련 병원성 단백질인 IpaH와 PrfA 단백질에 대한 앵타머의 특이성을 분석하기 위한 구조 분석 수행

① 선정된 IpaH 및 PrfA 앵타머의 구조적 특성을 분석하기 위한 2차원 구조 분석

㉔ 앵타머의 구조 분석을 위하여 m-fold program을 이용하여 분석하였음 (Nucleic Acids Res. 2003 (31;13):3406-15). m-fold는 web 기반의 nucleic acid 구조를 예측해주는 프로그램으로 구조적 특성을 이해하는데 활용됨. 본 방법을 기반으로 개발한 IpaH 및 PrfA에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머의 구조를 분석해본 결과, 2차원적으로 다양한 loop을 나타내는 형태로 분석되었음(그림 3-87).

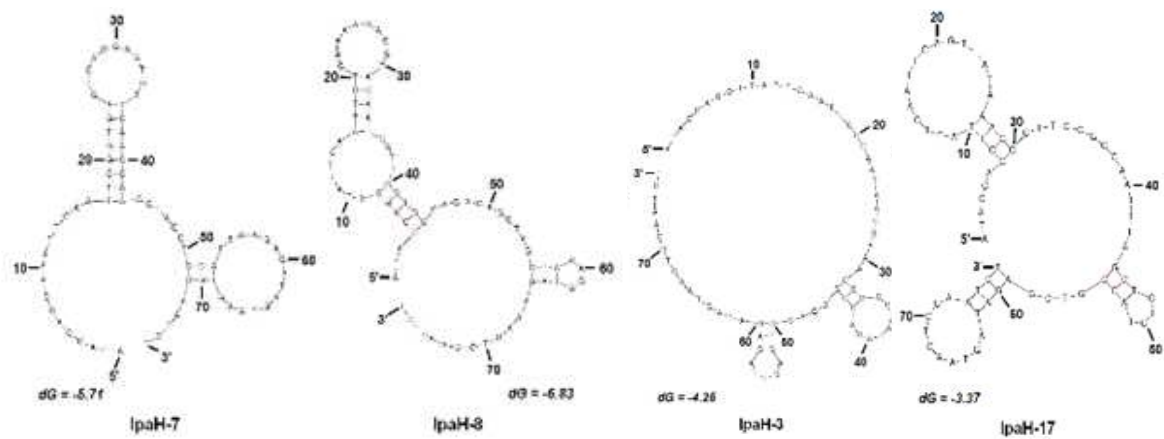


그림 3-87. IpaH 단백질에 높은 친화력을 갖는 앵타머 4종 구조(M-fold)

㉔ 분석된 각각의 앵타머 구조는 표적 단백질과의 결합시 구조상으로 fitting에 의하여 결합력을 좌우하므로, 앵타머의 특성 분석에 중요함. 구조 분석시 자유에너지를 분석함으로써 실제 앵타머가 구조가 유연하게 형성된다는 것을 확인 할 수 있으며, 각각의 loop의 상세한 분석이 수행된다면 각 표적 단백질과의 결합 부위를 예측하는 데 활용 될 수 있을 것임.

나. 가축전염성 관련 병원성 미생물 (*S. sonnei*, *V. parahaemolyticus*)과 바이러스 (PRRS virus)에 특이적으로 결합하는 앵타머의 특이성 분석

(1) *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 최적 앵타머의 복합 시료 내에서 특이성 평가

(가) 가축전염병 관련 병원성 미생물인 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머의 다중의 타 병원성 미생물과의 결합력 비교

① 선정된 각 병원성 미생물에 특이적인 앵타머의 표적물질에의 선택적 특이성을 확인하기 위한 SPR 기반의 결합 특이성 평가

㉞ 각각의 병원성 미생물에 높은 친화력을 보이는 앵타머로 선정된 최적의 앵타머 1종을 이용하여, 타 병원성 미생물과의 결합을 유도하여 표적 병원성 미생물에 특이적으로 결합하는지 여부를 평가하고자 하였음. 이를 위하여 SPR system을 이용하였으며, 선정된 병원성 미생물에 특이적인 앵타머를 chip 상에 고정시키는 과정이 요구되었음. 앵타머의 고정을 위하여 Biacore사에서 제공하는 Streptavidin이 고정된 SA chip을 이용하였으며, 앵타머의 5' 말단에 Biotin을 modification 시켜 Streptavidin-biotin 결합을 통해 앵타머를 chip상에 고정함(그림 3-88).

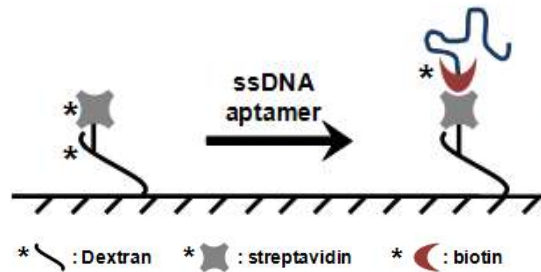


그림 3-88. 앵타머의 특이 결합력을 평가하기 위한 앵타머 고정 chip 제작 모식도

㉞ 앵타머가 고정된 chip에는 각각의 병원성 미생물에 높은 친화력을 보이는 앵타머로 선정된 최적의 앵타머 1종을 이용하여, 타 병원성 미생물과의 결합을 유도하여 표적 병원성 미생물에 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하였음 (그림 3-89와 3-90).

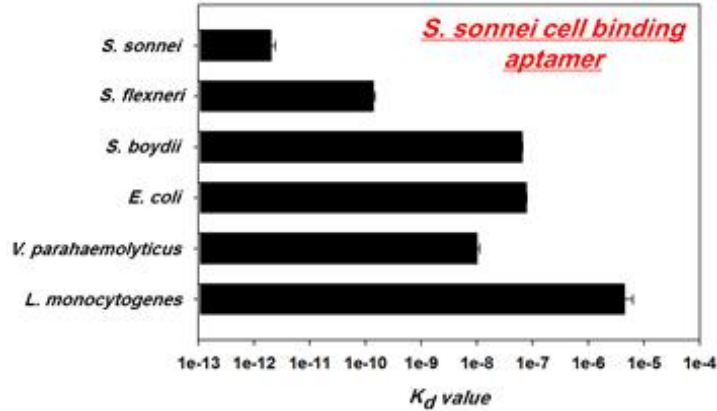


그림 3-89. *S. sonnei* 앱타머의 타 병원성 미생물과의 친화력 비교

Target microbe	Kd value
<i>V. parahaemolyticus</i>	3.00e ⁻¹⁰ ± 0.87
<i>E. coli</i>	1.24e ⁻⁷ ± 0.75
<i>L. monocytogenes</i>	2.30e ⁻⁷ ± 0.98
<i>S. sonnei</i>	5.28e ⁻⁷ ± 0.79
<i>V. fischeri</i>	1.25e ⁻⁶ ± 1.12

그림 3-90. *V. parahaemolyticus* 앱타머의 타 병원성 미생물과의 특이성 비교

- ㉔ 앱타머를 고정된 chip에서 타 병원성 미생물과 표적 병원성 미생물과의 결합력을 비교해본 결과, *S. sonnei*에 대한 앱타머 그리고 *V. parahaemolyticus*에 대한 앱타머 모두 타 병원성 미생물에 비해 1000배 이상의 결합력의 차이를 보이는 것으로 분석되었음. 특히, *S. sonnei*의 경우에 같은 속인 *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*와 같이 *Shigella spp.* 내에서도 결합력의 차이를 보이며 *S. sonnei*에만 높은 선택적 특이성을 나타내었음.
- (나) 가축전염병 관련 병원성 미생물에 대한 앱타머의 특이성과 민감성의 평가를 위한 sandwich assay 기반의 검출방법 개발
- ① 선행 연구를 통해 확보한 *Listeria monocytogenes* 특이결합 앱타머를 이용하여 병원성 cell의 검출 민감성 평가
 - ② 병원성 미생물과 앱타머 간의 민감성을 평가하기 위하여 선행연구를 통해 확보한 *L. monocytogenes*의 병원성 미생물에 결합하는 앱타머를 이용하여 민감성 평가를 수행하였음. 본 실험에서는 앱타머에 병원성 미생물을 10 ~ 10⁶ CFU로 나누어 처리했을 때, 검출 한계를 측정해보는 실험으로, 앱타머를 이용한 결합력 정량 평가를 수행할 수 있는 여부를 평가한 실험임.
 - ③ 본 실험을 위해서 앱타머의 5'말단에는 amine기로 modification 하였으며, amine기를 고정할 수 있는 chip에 앱타머를 고정하고, 이후 병원성 미생물을 개수별로 처리한 뒤, 이를 검출 할 수 있는 detector (Cy5와 같은 형광물질 등의 인자가 붙어

있는 앵타머)를 처리하여 민감성을 평가하고자 하였음 (그림 3-91).

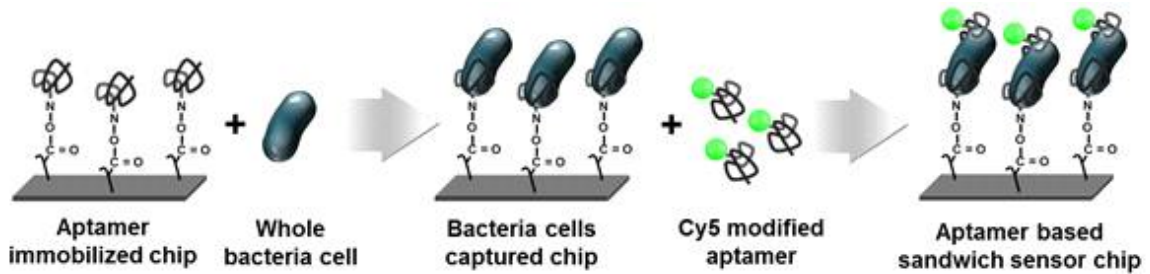


그림 3-91. 앵타머 고정을 통한 병원성 미생물 결합능력의 민감성 평가를 위한 Sandwich assay 기반의 측정방법을 위한 방법 모식도

㉔ 상기와 같은 방법으로 앵타머를 고정한 후, 병원성 미생물을 CFU단위로 처리하였음. 실험 결과, 그림 3-92에서 보는 바와 같이 Cy5로 처리한 검출 방법은 20 CFU/mL부터 검출 할 수 있었으며, 순차적으로 10^6 CFU/mL 까지 정량적으로 검출 할 수 있었음. 이로써 병원성 미생물에 대한 앵타머가 20 CFU/mL 까지 검출 할 수 있는 민감도를 가지는 것으로 평가되었음.

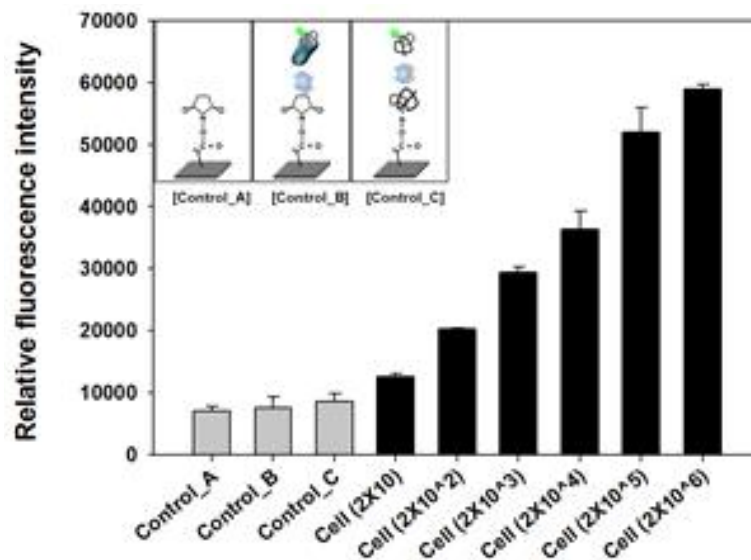


그림 3-92. 앵타머의 검출 민감성 평가 결과

㉔ 민감성 외에도, 본 방법을 통해서 특정 시료내에 미생물의 양을 정량화 하여 제시 할 수 있는 정량적 검출법으로도 활용될 수 있는 것으로 분석되었음(그림 3-93).

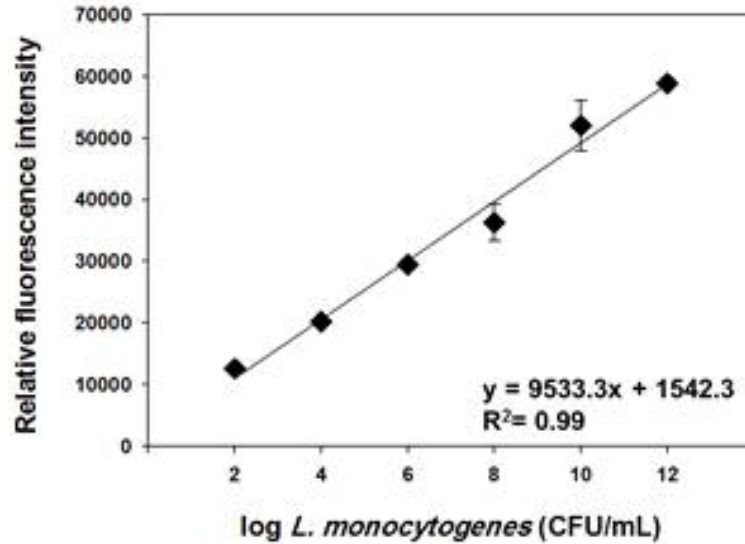


그림 3-93. 앵타머를 이용한 병원성 미생물 검출방법의 정량적 평가

- ㉞ 상기의 결과는 선행연구를 통해서 수행하였지만, 본 과제에서 확보한 *S. sonnei*, *V. parahaemolyticus* 앵타머에도 활용 가능하며, 민감성을 평가하는데 적용 가능함.
- (2) 가축전염성 질환을 유발하는 PRRSV에 특이적인 앵타머 개발을 위한 PRRSV 특이 앵타머 개발
 - (가) PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 감염에 따른 가축에서의 (mammalian cell)의 변화를 이용하여 PRRSV의 감염 여부를 검출 할 수 있는 앵타머를 개발을 위한 SELEX 조건 확립
 - ① 바이러스의 감염 여부에 따른 가축 세포 수준에서의 변화가 초래됨을 인식하여 세포주에 PRRSV를 감염시킨 감염 세포와, PRRSV가 감염되지 않은 정상 세포를 이용하여 순차적으로 앵타머 풀을 결합시키면서 PRRSV가 감염되었을 때 변화를 감지할 수 있는 앵타머를 개발하고자 함.
 - ② PRRSV 감염주와 PRRSV 비감염주에 앵타머 풀을 결합시키고, 반응을 유도한 후, 세포주를 palte에서 떼어 원심분리하여 세포주에 결합되지 않은 앵타머는 제거하고, 세포주에 결합된 앵타머만을 선택적으로 증폭하는 방법으로 SELEX 수행 조건을 확립하였음. 특히, PRRSV 비감염주와 PRRSV 감염주를 순차적으로 반응 시키면서 PRRSV의 감염여부에 따라 달라지는 것 외에 세포주에 결합하는 비특이적인 앵타머 결합 반응을 최소화하고자 하였고, 앵타머가 PRRSV의 감염여부에 따라 달라지는 membrane을 인식하고, 달라지는 부분에만 특이적으로 결합하는 앵타머를 제작하고자 함. 현재 PRRSV 앵타머 개발을 위한 SELEX 과정을 수행중임.
- (3) 가축전염병 관련 병원성 인자에 대한 앵타머 개발 및 이를 통한 세균 생육 저해 등의 항균 능력 평가
 - (가) 항균성 펩타이드에 특이적으로 결합하는 앵타머의 개발
 - ① 항균 능력을 보유하고 있는 펩타이드 (PG1, PMAP, PR26)에 특이적으로 결합하는 앵타머의 개발을 위한 SELEX 조건 확립(그림 3-94)

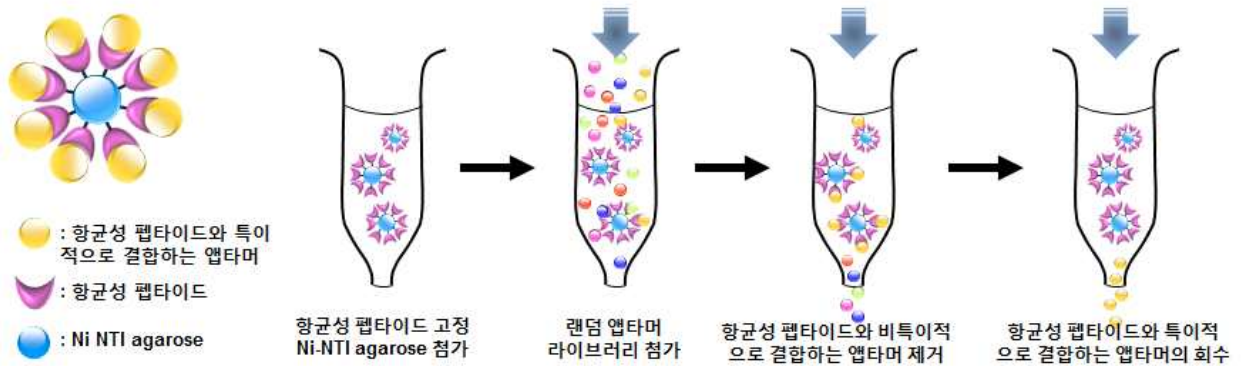


그림 3-94. 항균성 펩타이드에 특이적으로 결합하는 앵타머 개발 방법 모식도

- ㉓ PG1, PMAP, PR26 펩타이드에 특이적인 앵타머를 개발하기 위하여, 먼저 각 펩타이드를 고정화하여 반복적으로 앵타머 풀을 처리해줄 수 있는 방법이 필요함. 따라서 본 실험에서는 각 펩타이드를 Histidin으로 modification하며, His tagging을 이용하여 Ni-NTA resin에 각 펩타이드를 고정화 할 수 있었음.
- ㉔ 이후, 각 펩타이드가 고정된 resin에 앵타머를 처리하여 항균성 펩타이드에 특이적으로 결합하는 앵타머 풀을 결합시키고, 결합, 세척, 회수의 과정을 최적화 하였음. 5차년도에는 항균 펩타이드 3 종에 대한 앵타머를 개발을 위한 SELEX 과정을 수행하여 앵타머를 확보하였으며. 향후 항균성 펩타이드 결합용 앵타머를 이용하여, 가축전염병의 항균성 평가에 활용하고자 함.

다. *Shigella* 및 *Vibrio* 에 대한 앵타머의 균주 억제 효능 평가를 위한 실험 조건 최적화

- (1) *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus*에 특이적으로 결합하는 앵타머를 통한 병원성 미생물의 생육 저해 유발을 위한 실험 조건 최적화(그림 3-95)

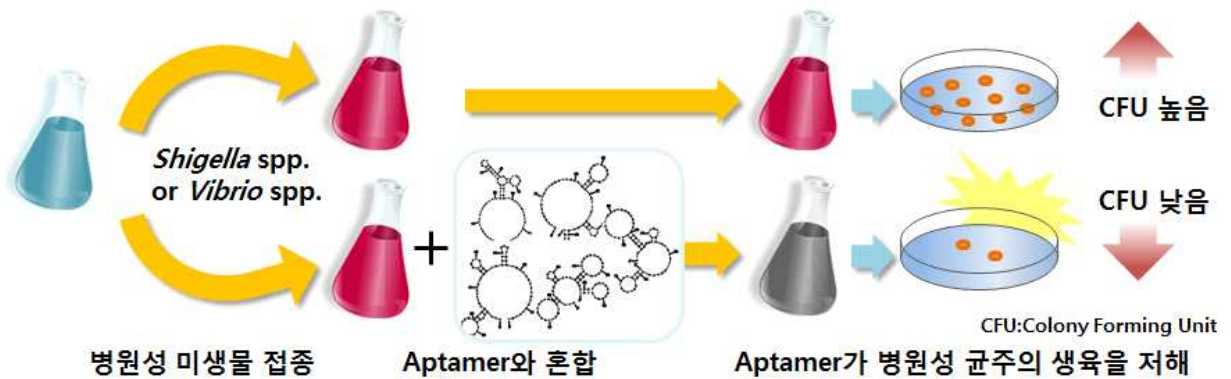


그림 3-95. 병원성 미생물의 표면에 결합하는 앵타머를 이용하여 병원성 미생물의 생육 저해를 통한 앵타머 기반의 항균력 평가 실험 모식도

- 병원성 미생물(*S. sonnei*, *V. parahaemolyticus*)에 특이적으로 결합하는 앵타머는 미생물의 표면에 결합 하는 것으로 앵타머가 병원성 미생물의 특정 표면에 결합하여

생존을 위한 membrane pump 또는 channel을 blocking 함으로써 생육 저해가 가능함.

- 따라서 상기와 같은 원리를 이용하여 앵타머를 처리하여 병원성 미생물의 항균력을 평가하고자 하며, 이를 위하여 확보된 앵타머 풀을 처리하여 항균력을 보유한 앵타머를 선정하는 작업을 수행 중에 있음. 항균 효과가 있는 병원성 미생물의 표면에 특이적으로 결합하는 앵타머의 선정 후, 앵타머와 병원성 미생물간의 결합 부위를 밝히고 항균 pathway를 분석하고자 함.

(2) 가축 전염성 관련 병원성 미생물에 결합하는 앵타머 및 병원성 관련 단백질에 결합하는 앵타머의 modification을 통한 항균력 평가

- 기존의 lysozyme 및 lactoperoxidase, Xanthine oxidase 등은 항균력을 보유하고 있는 물질의 하나로, 앵타머에 고정화 하여 항균 효능을 높일 수 있을 것으로 기대됨. 따라서 현재 개발된 앵타머에 기존의 항균 물질을 고정화 하여 실제 미생물에서의 항균력을 비교하고자 함.

6. 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화 (제4협동)

- 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물별 주요 대상질병에 대한 면역항체 성분이 함유된 기초 면역제제를 생산하였고, 이를 이용하여 양돈용, 축우용 및 양계용 면역복합제제 기본제형을 개발하고, 시작품을 생산하여 현장 적용시험을 실시하였음(제1세부과제 공동수행).

가. 개발 면역복합제제 시제품의 안정성 시험

(1) 시험대상 품목

- 양돈, 양계용 면역복합제제 시제품의 일반성분(생균제, 비타민 등)과 면역제제 성분에 대한 안정성 시험을 실시하였음

(2) 시험방법

(가) 일반성분

- 면역복합제제 시제품 조성에 포함되는 기본 제제인 생균제 3종 즉, 당화균(*Bacillus mesentericus* To-A), 유산균(*Streptococcus faecalis* T-110), 낙산균(*Clostridium butyricum* To-A), 그리고 비타민(A, D3, E)과 일반 구성성분에 대한 안정성 시험은 1, 2차년도에 확립된 방법에 따라 2013년 8월부터 2014년 5월 현재까지 9개월 동안 3개월 간격으로 각 성분의 균수 및 함량을 측정하여 안정성을 확인하였음

(나) 면역제제성분

- 면역복합제제 시제품 조성에 공통적으로 대장균과 살모넬라균에 대한 면역항체를 포함시켰기 때문에 이 2종의 면역항체를 지표성분으로 하여 하체가 변동을 조사하여 면역성분의 안정성을 1차적으로 확인하였음

① IgY 제제 항체역가검사

㉠ 검사방법 : Indirect ELISA Antibody Titer test

㉡ 검사내역 : *E. coli*, *Sal. Typhimurum*

㉢ 역가측정 : P/N value

- 음성시료의 OD치 2배이상 되는 시료의 항체가를 역산하여 계산
- 예시로 음성시료의 항체가 OD치가 0.1일 때 시료의 항체가의 OD치가 320배에서 0.25, 640배에서 0.16이면 항체가는 320배로 측정)
- * S/P값으로 처리하지 않은 것은 전체적으로 희석배수별로 항체역가를 측정하기 위함

㉣ 음성시료 대조군 : SPF란에서 추출한 난황추출액

- Enzyme : Anti-chicken IgY HRPO enzyme 20ng/ml 농도로 사용
- Substrate : TMB
- 결과치 판독 : 파장 450nm
- ELISA 항원농도
 - *Sal, E.coli* : 300ng/ml 농도로 coating
- ELISA용 항원

- 세균 : 각각의 세균을 배양 후 cell pellet를 초음파처리하여 OMP 정제한 후 BCA kit로 항원농도측정(300ng/ml 농도로 사용)
- 시료처리 : Spray dry처리한 IgY분말 1g을 DW 10ml 희석한 혼합액을 초음파처리 한 후 원심한 상층액을 시료로 사용
- 시료 희석 : 10배부터 20,480배까지 2진 희석
- 항체가 : P/N value 계산
 - 예) 음성시료 OD(10배 희석시) : 0.118
- Sample 시료 640배 희석시 OD : 0.245, 1280배에서는 0.198시 음성시료의 OD값의 2배이상 되는 희석배수를 cut off하여 640배로 항체역가 판정

② 초유 제제 항체역가검사

㉠ 검사방법 : Indirect ELISA Antibody Titer test

㉡ 검사내역 : *E. coli*, *Sal. typhimurum*

㉢ 역가측정 : P/N value

- 음성시료의 OD치 2배이상 되는 시료의 항체가를 역산하여 계산함.
- 예시로 음성시료의 항체가 OD치가 0.1일 때 시료의 항체가의 OD치가 320배에서 0.25, 640배에서 0.16이면 항체가는 320배로 측정함.

* S/P값으로 처리하지 않은 것은 전체적으로 희석배수별 항체역가를 측정하기 위함

㉣ 음성시료 대조군 : 초유섭취하지 않은 송아지혈청

- Enzyme : Anti-Bovine IgG HRPO enzyme 20ng/ml 농도로 사용
- Substrate : TMB
- Reading : 450nm
- ELISA 항원농도

- *Sal. E.coli* : 300ng/ml 농도로 coating

- ELISA용 항원

- 세균 : 각각의 세균을 배양 후 cell pellet를 초음파처리하여 OMP정제한 후 BCA kit로 항원농도측정(300ng/ml 농도로 사용)
- 시료처리 : Spray dry처리한 IgY분말 1g을 DW 10ml 희석한 혼합액을 초음파처리 한 후 원심한 상층액을 시료로 사용
- 시료 희석 : 10배부터 20,480배까지 2진 희석
- 항체가 : P/N value 계산
 - 예) 음성시료 OD(10배 희석시) : 0.118
- Sample Sample 시료 640배 희석시 OD : 0.245, 1280배에서는 0.198시 음성시료의 OD값의 2배이상 되는 희석배수를 cut off하여 640배로 항체역가 판정

(3) 시험결과

(가) 생균 및 일반성분 안정성 시험결과

- ① 양돈용 제제 2종(다이스톱-피그산1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2013년 8

월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음.
 각 롯데별로 3개 제품에 실시한 일반제제 안정성 시험결과는 각각 표 3-27~3-29
 및 3-30~3-32와 같음.

- 양돈용 2개 제제 시제품에 대하여 2013년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균
 제의 균수함량을 측정한 결과, 유의성 있는 균수의 감소가 관찰되지 않아 제품으로
 서의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음
- 비타민 및 기타 구성분들의 함량도 제조시 함량의 90% 이상을 유지하고 있어 시험
 기간 동안함량의 변화가 제품의 효능에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음

**표 3-27. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2013-1)의 일반성분에 대한
 안정성 시험결과**

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	99.4%	98.2%	96.4%	96.0%
		20℃	100%	99.2%	98.0%	96.6%	94.2%
		40℃	100%	98.8%	97.0%	95.3%	93.0%
비타민 D3	2g	5℃	100%	99.3%	98.6%	97.8%	96.0%
		20℃	100%	98.8%	97.0%	95.8%	95.0%
		40℃	100%	98.6%	96.8%	95.4%	94.4%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.7%	99.2%	97.3%	95.1%
		20℃	100%	99.1%	98.3%	96.4%	94.8%
		40℃	100%	99.0%	98.1%	95.9%	94.5%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.3%	98.7%	98.4%	96.7%
		20℃	100%	100.2%	99.5%	98.7%	96.3%
		40℃	100%	98.8%	97.1%	96.6%	95.7%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.4%	99.2%	98.3%	96.6%
		20℃	100%	98.7%	98.2%	97.7%	93.1%
		40℃	100%	98.5%	96.1%	94.7%	92.7%

표 3-28. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2013-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	99.7%	98.8%	97.5%	96.1%
		20℃	100%	99.4%	98.6%	97.1%	94.2%
		40℃	100%	98.3%	96.1%	94.3%	93.5%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.3%	99.9%	99.3%	98.5%
		20℃	100%	99.2%	98.2%	97.9%	95.7%
		40℃	100%	98.1%	96.8%	96.3%	94.1%
비타민 E	4g	5℃	100%	101.9%	100.7%	99.8%	98.6%
		20℃	100%	100.6%	100.1%	98.7%	96.5%
		40℃	100%	98.8%	97.1%	96.2%	95.3%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.8%	99.6%	99.1%	98.9%
		20℃	100%	99.4%	98.7%	97.4%	96.1%
		40℃	100%	98.3%	98.0%	97.2%	95.3%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.7%	98.5%	97.8%	97.4%
		20℃	100%	99.5%	97.8%	95.5%	93.1%
		40℃	100%	99.1%	98.0%	95.8%	92.3%

표 3-29. 양돈용제제(다이스트립-피그산1호-제조번호 2013-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.4×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.4×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	99.8%	98.9%	97.1%	96.4%
		20℃	100%	99.2%	98.4%	96.1%	94.1%
		40℃	100%	101.1%	96.9%	94.6%	92.4%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.7%	99.6%	98.7%	97.4%
		20℃	100%	99.5%	98.7%	97.2%	95.3%
		40℃	100%	98.2%	97.1%	95.8%	93.3%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.8%	100.3%	99.8%	98.8%
		20℃	100%	99.5%	98.2%	96.4%	95.7%
		40℃	100%	99.2%	96.4%	94.8%	93.1%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.0%	99.8%	99.4%	98.8%
		20℃	100%	99.2%	98.7%	97.7%	95.1%
		40℃	100%	98.3%	96.2%	94.0%	92.5%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.8%	98.8%	97.6%	96.8%
		20℃	100%	99.4%	97.1%	95.3%	93.7%
		40℃	100%	98.2%	97.6%	95.7%	91.3%

표 3-30. 양돈용제제(다이스톱-피그산2호-제조번호 2013-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.5×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.5×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶	0.6×10 ⁶
웹타이드아연	87g	5℃	100%	102.4%	100.7%	99.7%	98.9%
		20℃	100%	100.1%	99.6%	98.6%	96.7%
		40℃	100%	99.9%	98.1%	96.3%	95.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.3%	98.8%	97.7%	96.8%
		20℃	100%	98.7%	98.3%	96.0%	95.7%
		40℃	100%	97.7%	96.8%	95.2%	93.1%

표 3-31. 양돈용제제(다이스트립-피그산2호-제조번호 2013-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.4×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.5×10 ⁶	0.3×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.5×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.2%	99.8%	98.7%	97.9%
		20℃	100%	99.1%	98.6%	98.1%	96.3%
		40℃	100%	98.3%	97.9%	96.3%	94.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.7%	98.7%	98.2%	97.7%
		20℃	100%	99.4%	98.9%	96.1%	93.8%
		40℃	100%	97.2%	96.4%	94.1%	91.5%

표 3-32. 양돈용제제(다이스트롭-피그산2호-제조번호 2013-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.5×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶	0.5×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.5×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.2%	98.8%	96.2%	94.6%
		20℃	100%	99.7%	97.2%	94.9%	91.4%
		40℃	100%	100.9%	97.4%	95.8%	92.3%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.8%	97.9%	95.1%	91.8%
		20℃	100%	100.7%	99.1%	95.6%	92.1%
		40℃	100%	98.7%	96.7%	93.9%	91.5%

② 양계용 제제 2종(다이스트롭-폴추리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가축조건(40℃)에 보관하면서 2013년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 일반제제 안정성 시험결과는 각각 표 3-33~3-35 및 3-36~3-38과 같음.

- 양계용 2개 제제 시제품에 대하여 생균제의 균수를 측정한 결과, 유의성 있는 균수의 감소가 관찰되지 않아 제품으로서의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음
- 비타민 및 기타 구성분들의 함량도 제조시 함량의 92% 이상을 유지하고 있어 시험기간 동안함량의 변화가 제품의 효능에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음

표 3-33. 양계용제제(다이스트립-폴츄리산 1호-제조번호 2013-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	100.9%	99.2%	97.9%	96.8%
		20℃	100%	101.1%	97.9%	97.5%	96.3%
		40℃	100%	99.8%	97.1%	95.6%	94.7%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.5%	99.2%	99.0%	97.3%
		20℃	100%	100.8%	98.2%	96.5%	94.4%
		40℃	100%	101.4%	98.6%	95.4%	94.1%
비타민 E	4g	5℃	100%	99.9%	99.3%	98.9%	95.6%
		20℃	100%	101.5%	98.7%	95.4%	93.5%
		40℃	100%	100.1%	98.1%	96.7%	92.7%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.9%	98.8%	97.6%	96.2%
		20℃	100%	99.8%	99.2%	97.5%	96.1%
		40℃	100%	99.1%	97.2%	95.7%	94.4%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	101.7%	99.5%	96.3%	94.1%
		20℃	100%	100.2%	99.5%	95.4%	93.4%
		40℃	100%	98.2%	96.1%	93.5%	91.9%

표 3-34. 양계용제제(다이스트립-폴츄리산 1호-제조번호 2013-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.6×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	100.4%	99.9%	99.2%	97.8%
		20℃	100%	101.2%	100.5%	98.3%	97.5%
		40℃	100%	102.8%	100.4%	98.8%	97.1%
비타민 D3	2g	5℃	100%	99.9%	98.9%	96.2%	95.5%
		20℃	100%	99.7%	98.8%	97.4%	96.7%
		40℃	100%	101.4%	98.7%	97.6%	95.1%
비타민 E	4g	5℃	100%	99.5%	97.9%	96.8%	94.5%
		20℃	100%	103.5%	100.7%	98.5%	96.4%
		40℃	100%	101.7%	98.9%	96.2%	94.8%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.2%	100.0%	98.4%	97.7%
		20℃	100%	99.4%	98.5%	97.1%	96.2%
		40℃	100%	103.5%	100.0%	97.6%	96.1%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	98.5%	97.7%	96.8%	94.4%
		20℃	100%	102.5%	100.1%	98.2%	96.3%
		40℃	100%	100.6%	97.5%	96.9%	93.5%

표 3-35. 양계용제제(다이스트립-폴츄리산 1호-제조번호 2013-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.4×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	101.4%	100.5%	99.9%	98.2%
		20℃	100%	101.8%	99.2%	98.4%	97.7%
		40℃	100%	100.1%	98.8%	97.6%	96.1%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.2%	99.2%	98.1%	96.9%
		20℃	100%	100.8%	99.6%	97.6%	95.5%
		40℃	100%	102.1%	98.2%	95.4%	93.1%
비타민 E	4g	5℃	100%	101.1%	99.7%	98.6%	96.2%
		20℃	100%	99.9%	98.5%	96.1%	95.3%
		40℃	100%	101.3%	98.8%	96.9%	94.4%
펙타이드아연	87g	5℃	100%	100.7%	99.3%	98.7%	98.1%
		20℃	100%	102.1%	99.5%	97.1%	96.6%
		40℃	100%	103.3%	99.2%	97.4%	95.3%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.6%	98.4%	97.9%	95.1%
		20℃	100%	99.9%	98.7%	97.3%	96.1%
		40℃	100%	102.5%	99.6%	96.9%	94.2%

표 3-36. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2013-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.4×10 ⁶	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	102.6%	101.2%	99.6%	98.4%
		20℃	100%	99.8%	98.2%	97.7%	97.0%
		40℃	100%	98.1%	96.3%	95.5%	94.2%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	101.1%	99.3%	97.2%	96.2%
		20℃	100%	102.2%	99.3%	97.7%	95.2%
		40℃	100%	99.6%	97.4%	95.1%	94.0%

표 3-37. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2013-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	102.3%	100.1%	99.4%	98.5%
		20℃	100%	100.9%	100.1%	99.6%	98.9%
		40℃	100%	103.4%	101.1%	99.3%	97.1%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	102.1%	101.6%	100.2%	98.8%
		20℃	100%	101.1%	98.6%	97.8%	95.3%
		40℃	100%	99.7%	97.5%	95.9%	93.5%

표 3-38. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2013-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2013. 8. 21)	1개월 (2013. 9. 21)	3개월 (2013. 11. 21)	6개월 (2014. 2. 21)	9개월 (2014. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
렙타이드아연	87g	5℃	100%	100.2%	99.1%	98.9%	97.7%
		20℃	100%	101.8%	99.4%	97.5%	96.4%
		40℃	100%	102.1%	99.3%	97.9%	95.5%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.2%	99.9%	98.8%	97.9%
		20℃	100%	100.6%	98.4%	97.1%	95.6%
		40℃	100%	102.1%	100.3%	98.6%	95.9%

(나) 면역성분 안정성 시험결과

- ① 양돈용 제제 2종(다이스트롭-피그산1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃)에 보관하면서 2013년 8월부터 9개월동안 매월 대장균과 살모넬라에 대한 항체역가를 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 IgY 및 초유 면역성분의 안정성(항체역가 변화) 시험결과는 각각 표 3-39~3-40 및 3-41~3-42과 같음
- 양돈용 2개 제제 시제품에 대하여 2012년 8월부터 9개월동안 매월 IgY 항체역가를 측정하여 결과 제조시의 역가와 동일한 항체가 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.
 - 또한 초유제제에 대한 항체역가를 측정하여 결과에서도 대장균 및 살모넬라에 대한 항체역가가 제조 시와 동일한 수준으로 유지되고 있음을 확인할 수 있었음.

표 3-39. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 1호-제조번호 2013-1~3)의 IgY 항체가
(ELISA) 측정결과

측정항목	제조 번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	640	320	640	320	320	640	320	320	320
	2	640	640	320	320	640	640	640	320	640
	3	640	320	640	640	640	320	320	640	320
<i>S.</i> Typhimurium	1	320	320	160	320	320	160	320	160	320
	2	320	640	320	320	640	320	640	320	640
	3	320	320	640	640	320	320	640	320	320

표 3-40. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 2호-제조번호 2013-1~3)의 IgY 항체가
(ELISA) 측정결과

측정항목	제조 번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	640	320	320	640	320	320	320	320	320
	2	640	640	320	640	320	320	640	320	640
	3	640	320	640	320	640	640	320	320	320
<i>S.</i> Typhimurium	1	320	320	320	320	160	320	320	160	320
	2	640	640	320	320	640	320	320	320	640
	3	640	320	320	640	320	320	640	320	320

표 3-41. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 1호-제조번호 2013-1~3)의 초유 항체가
(ELISA) 측정결과

측정항목	제조 번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	2560	1280	1280	2560	1280	2560	2560	1280	2560
	2	2560	2560	2560	1280	2560	2560	1280	2560	2560
	3	1280	2560	1280	2560	1280	1280	2560	1280	1280
<i>S.</i> Typhimurium	1	5120	2560	5120	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	2	5120	5120	2560	5120	5120	5120	2560	5120	5120
	3	2560	5120	2560	5120	2560	2560	2560	2560	2560

표 3-42. 양돈용제제(다이스트롭-피그산 2호-제조번호 2013-1~3)의 초유 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	2560	1280	1280	2560	1280	1280	1280	1280	2560
	2	2560	2560	1280	2560	1280	2560	1280	2560	2560
	3	2560	1280	1280	2560	2560	1280	1280	1280	1280
<i>S. Typhimurium</i>	1	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	1280	2560
	2	5120	5120	2560	5120	2560	5120	2560	5120	5120
	3	5120	2560	2560	2560	5120	2560	2560	2560	2560

② 양계용 제제 2종(다이스트롭-폴츄리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃)에 보관하면서 2013년 8월부터 9개월동안 매월 대장균과 살모넬라(닭의 경우 *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* 및 *S. Enteritidis*)에 대한 항체역가를 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 IgY 성분의 안정성(항체역가 변화) 시험결과는 각각 표 3-43과 3-44와 같음

- 양계용 2개 제제 시제품에 대하여 2013년 8월부터 9개월동안 IgY 항체가를 매월 측정한 결과 제조시의 역가와 동일한 항체가 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.)

표 3-43. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 1호-제조번호 2013-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	160	160	160	160	80	160	80	160	160
	2	320	320	160	320	320	320	160	160	320
	3	320	320	320	160	320	160	160	160	160
<i>S. Gallinarum</i>	1	160	320	160	320	160	160	160	320	160
	2	320	320	160	320	160	320	320	320	320
	3	320	320	320	160	320	320	320	160	160
<i>S. Pullorum</i>	1	320	160	320	160	320	160	160	320	160
	2	160	320	160	160	160	160	160	160	160
	3	320	320	160	160	160	160	160	160	160
<i>S. Enteritidis</i>	1	320	160	320	160	160	160	160	320	160
	2	320	320	160	320	160	160	160	160	160
	3	160	320	160	320	160	160	160	160	160

표 3-44. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2013-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	160	80	160	160	80	160	80	160	160
	2	320	320	160	320	160	320	160	320	320
	3	320	320	160	160	160	320	320	160	160
<i>S. Gallinarum</i>	1	320	320	160	320	160	160	320	320	160
	2	320	160	320	160	160	320	160	320	320
	3	320	320	320	160	320	320	160	160	160
<i>S. Pullorum</i>	1	320	320	160	160	320	160	160	320	160
	2	320	160	320	320	160	160	160	160	160
	3	320	320	160	160	160	320	160	160	160
<i>S. Enteritidis</i>	1	160	320	160	320	320	160	320	160	160
	2	320	320	160	160	160	320	160	320	160
	3	320	320	320	160	160	160	160	320	160

나. IgY 성분이 포함된 개발 면역복합제제 시제품의 안전성 및 임상시험

(1) 다이스트롭-피그산 1(이유자돈용 면역복합제제) 실험 결과 보고서 II

(가) 시험배경

- 2011년 우리나라에서 배합사료내 항생제첨가가 전면 금지된 이후 성장촉진용 항생제를 대체하기 위한 제제 개발이 전세계적으로 이루어지고 있으며, 추출물(허브 등), 유기산, Probiotics, IgY, 초유항체, 박테리오파지 등 다양한 제제가 개발 연구되어져 왔으며, 많은 상용제품들이 시장에 출시되고 있음.
- 이 중 IgY를 이용한 항생제대체제는 항균작용은 물론 항바이러스 작용까지 가지고 있어 필드에서 우수한 효과가 보고되고 있음. IgY제제는 제품에 따라 효능이 다양한데 이는 IgY 생산과정에서의 기술차이에 의한 것으로 사료됨. IgY 생산을 위해서는 산란계 접종용 항원의 제조가 중요하며, IgY 분말을 최종적으로 생산하기까지의 과정에서 기술적 노하우가 필요하여 제품별로 효능 면에서 차이가 많음.
- ㈜삼양애니팜은 IgY의 농축 및 제조기술에서 오랜 노하우를 가지고 있으며, 상용제품을 통해 효과를 입증받은 바 있음. 따라서 지난 2012년 1차 실험에 이어 이유자돈에 대한 IgY 사료첨가제의 효능을 확인하고자 함.

(나) 재료 및 방법

- 본 실험은 충남 서산시 운산면에 위치한 농장에서 실시하였으며 실험돈군은 권장량 투여군(권장량군), 권장량 2배 투여군(2배권장량군), 무투여 대조군(무투여군) 각각 30두씩 별개의 돈방에 나누어 실시하였음.
- 본 실험은 2013.7.8부터 8.16일까지 40일간 실시하였다.
- 본 실험에 사용된 제품은 그림 3-96의 “다이스트롭-피그산1”이며, 포유자돈 및 이유자돈용으로 개발된 사료첨가제임. 실험을 위해 위와 같이 3개의 자돈군으로 나누고 권장량군, 2배권장량군, 무투여군 각각 30두로 실험을 시작하였음. 실험제품 이외에 사

료나 음수 등 다른 요인은 동일하게 적용하였음.

- 실험자돈은 26일령의 이유한 자돈을 3개 자돈군 각 30두씩 나누어 권장량군은 다이 스톱을 사료톤당 1kg 비율로 40일간 투여하였고, 2배권장량군은 다이 스톱을 사료톤 당 2kg 비율로 40일간 투여하였음. 무투여군은 다이 스톱을 첨가하지 않은 사료만 급 이하였다. 사료는 대한사료 이유자돈사료(큐업 1, 2, 3)를 사용하였음.
- 실험 시작전 모든 자돈군의 체중을 이동식체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정 하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제 하였음. 실험중 투여되는 사료의 양은 정확히 기록하였으며, 자돈군에서 설사가 발생시 설사변을 채취하여 임프로AH 실험실에 의뢰하였음. 또한 매일 일정시간에 설사, 발 열, 기침 등 임상증상을 체크하여 기록하였으며, 실험 종료시 모든 자돈의 종료체중 을 측정하였으며, 그 때까지 섭취한 사료량을 정확히 기록하였음.



그림 3-96. 양돈용 다이 스톱-피그산 1호(좌) 및 다이 스톱-피그산 2호(우) 시제품

(다) 결 과

① 임상증상

- 각 자돈 구간의 폐사수는 권장량군이 1두, 2배권장량군이 1두, 무투여군이 3두 발생 하였음(표 3-45).

표 3-45. 시험 자돈의 임상증상 발현 및 폐사수 비교

구 분	시험두수	임상증상 발현두수	폐사수	비 고 (설사병원인체)
권장량군	31	5	1	로타바이러스
2배권장량군	32	3	1	로타바이러스
무투여군	32	8	4	로타바이러스/대장균

- 이유 1일뒤부터 무투여군에서 황색 설사가 동복자돈에서 발생하였음. 즉시 자돈사 전체에 소독을 실시하였고 해당 모든 스톱에 대해 분말형 소독제(스탈로산F,성원) 를 매일 바닥과 스톱에 도포하였음. 설사증은 무투여군에서 전체 32두중 8두에서 증상이 발현되었고, 권장량군에서는 31두중 5두에서, 2배권장량군에서는 32두중에서 3두에서 임상증상이 나타났다. 폐사수는 무투여군에서 4두로 권장량군 1두와 2배권 장량군 1두에 비해 월등히 높았음.

- 무투여군에서 폐사한 자돈 4두에 대한 육안소견 및 병리소견(임프로AH)에서 로타바이러스감염증과 대장균증의 혼합감염으로 확인되었음. 육안소견으로 장용모의 위축과 장내 황백색의 내용물 및 장간막 부종이 특징적으로 나타났으며, 장간막 림프절에서 채취한 샘플에서 로타바이러스와 대장균이 검출되었음.

② 생산성

- 3개 자돈군에 대한 생산성을 비교하기 위해 개시체중과 종료체중을 측정하고 실험기간 동안 총사료섭취량을 측정하였음(표 3-46).
- 표 3-46에서 보는 바와 같이 개시체중은 권장량군이 6.05kg, 2배권장량군이 6.24kg, 무투여군이 6.17kg으로 전체적으로 유의있는 차이는 없었음. 그러나 종료체중은 권장량군이 27.37kg, 2배권장량군이 27.82kg, 무투여군이 26.45kg으로 권장량군과 2배권장량군이 종료체중이 높았으며, 일당증체량도 권장량군과 2배권장량군이 각각 533g, 539g으로 무투여군 507g보다 높았음.

표 3-46. 시험 자돈군간 증체량 비교

구분	실험두수	개시평균체중 (26일령,kg)	종료평균체중 (66일령,kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량군	30	6.05	27.37	639.2	533
2배권장량군	31	6.24	27.82	668.9	539
무투여군	28	6.17	26.45	567.8	507

- 자돈군간 사료섭취량을 살펴보면 총사료섭취량은 2배권장량군과 권장량군이 각각 1,282kg, 1,234kg이었고 무투여군은 1,139kg이었으며, 두당일일사료섭취량은 2배권장량군과 권장량군이 1,034g, 1,028g으로 무투여군 1,017g보다 높았음(표 3-47).
- 총사료섭취량을 총증체량으로 나눈 사료요구율을 비교해 보면 2배권장량군이 1.91로 가장 좋았고, 권장량군 1.93, 무투여군 2.01 순으로 나타났음.

표 3-47. 시험 자돈군간 사료섭취량 비교

구분	실험두수	총사료섭취량 (kg)	두당일일사료섭취량 (g/day)	사료요구율
권장량군	30	1,234	1,028	1.93
2배권장량군	31	1,282	1,034	1.91
무투여군	28	1,139	1,017	2.01

(라) 고 찰

- 본 실험기간동안 이유후 로타바이러스성 설사가 발생하여 전반적으로 증체량이나 사

료요구율이 전년도 실험 성적보다 좋지 않았음. 그러나 급회 실험에서도 2배권장량 군이 일당증체량과 사료요구율이 539g/day, 1.91로서 가장 좋았고 권장량군이 533g/day, 1.93으로 다음으로 좋았으며, 무투여군은 일당증체량과 사료요구율이 507g/day, 2.01로 가장 낮았음.

- 특히 무투여군에서 로타바이러스 임상증상 발현개체의 폐사율이 50%로 다른 두 그룹보다 월등히 높아 IgY가 로타바이러스와 대장균의 폐사율 감소에 효과가 있음을 확인할 수 있었음. 또한 생산성지수도 무투여군에 비해 권장량군과 2배권장량군이 유의차 있게 좋아 IgY를 함유한 사료첨가제가 질병 감소 및 생산성 향상에 효과가 있음을 알 수 있었음.

(2) 다이스톱-피그산 2(육성 및 비육돈용) 실험 결과 보고서 II

(가) 시험 배경

- 배합사료내 항생제 첨가가 전면 금지된 이후 이를 대체하기 위한 일명 항생제대체제의 개발을 위한 노력들이 이루어져 왔으며, 이들 항생제대체제는 주로 식물추출물을 이용한 것과 각종 유기산 복합제를 이용한 것 그리고 생물공학 기술을 이용한 것들이 개발되어져 왔음.
- 식물추출물로는 항균성분을 함유하는 허브식물과 한방식물을 이용한 복합제제들이 주로 개발되었음. 이들 식물추출물은 일부 항균기능이 입증되기는 하였으나 항균스펙트럼이 좁고 제품이 고가라는 단점을 있음. 유기산제는 항균기능보다는 단지 병원성미생물의 증식을 억제하고 유익균의 증식을 촉진하는 범위에서 효과를 나타내어 엄밀한 의미에서 항생제대체제라고 할 수 없음. 따라서 최근 생물공학을 이용한 항생제대체제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 이의 대표적인 물질이 난황항체임. 난황항체를 IgY(Immunoglobulin Yolk)라고 하며 IgY는 병원성세균에만 작용하는 것이 아니라 병원성 바이러스에도 뛰어난 효과를 발휘하여 돼지에서 문제가 되는 로타바이러스감염증, 돼지전염성설사(PED) 전염성위장염(TGE) 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나 시판 제품의 현장 적용 효과는 확인되지 않았음.
- 따라서 본 시험에서는 주요 돼지 질병 10종에 대한 고면역 난황항체(IgY)를 생산하기 위하여 산란계에 특이 제조된 항원을 3번 접종하여 일정기간이 경과하여 항체가 충분히 형성된 후 수거된 계란의 난황성분을 추출하였음.
- 본 실험에 사용된 시제품은 돼지의 사육단계별에서 육성돈 구간에 최적화된 조성으로 제조된 것으로 돼지질병에 항생제대체제로서 효과를 가진 IgY와 3종의 Probiotics 및 Prebiotic으로서 프락토올리고당이 첨가되었고, 추가적으로 펩타이드아연 및 천연미네랄이 첨가되어 효율적으로 생산성을 향상시킬 수 있도록 배합되었음. 이 복합제를 이용해 육성돈에서의 생산성을 실험하였음.

(나) 재료 및 방법

- 본 실험은 경기도 충남 서산시 운산면 원평리에 위치한 농장에서 실시하였으며 실험돈군은 권장량 투여군(권장량군), 권장량 2배 투여군(2배권장량군), 무투여 대조군(무

- 투여군) 각각 20두씩 별개의 돈방에 나누어 실시하였음.
- 본 실험은 2013.8.20부터 12.2일까지 104일간 실시하였음.
 - 본 실험에 사용된 제품은 다이스톱-피그산2(그림 3-96)로서 육성 및 비육돈용으로 개발된 사료첨가제이임.
 - 실험을 위해 위와 같이 3개의 돈군으로 나누고 권장량군, 2배권장량군, 무투여군 각각 20두로 실험을 시작하였으며, 실험제품 이외에 사료나 음수 등 다른 요인은 동일하게 적용하였음.
 - 실험돈은 70일령의 육성돈을 3개 돈군 각 20두씩 나누어 권장량군은 다이스톱2를 사료톤당 0.5kg 비율로 104일간 투여하였고, 2배권장량군은 다이스톱2를 사료톤당 1kg 비율로 투여하였으며, 무투여군은 다이스톱2를 첨가하지 않은 사료만 급이하였음. 사료는 대한제분 곰표사료를 사용하였음.
 - 실험 시작전 모든 돈군의 체중을 체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제하였음. 실험 중 투여되는 사료의 양은 정확히 기록하였으며, 실험기간중 설사 및 호흡기증상 같은 임상증상 발생시 자세히 기록하였음. 종료체중은 출하시 체중으로 측정하였음.

(다) 결 과

① 임상증상

- 3개 돈군 모두에서 임상증상을 나타내었고, 호흡기증상이 3개돈군 모두에서 관찰되었음. 무투여군에서 호흡기증상 외에 소화기증상도 나타났는데 실험실 진단결과 살모넬라감염증으로 확인되었음. 무투여군의 폐사한 2두 모두 마이코플라즈마페렴과 홍막페렴의 혼합감염으로 확인되었음.
- 2배 권장량군은 80일령까지 임상증상이 발생하지 않다가 85일령에 갑작스런 기침과 사료섭취량 감소를 동반한 호흡기증상이 3두에서 나타나 이후 총 6두에서 기침을 동반한 호흡기증상이 나타났음. 이 중 1두는 증상이 나타난지 5일째에 폐사하여 부검한 결과 폐에 검은 출혈소견이 나타나고 세균배양 결과 Actinobacillus pleuropneumoniae로 확인되었음. 권장량군은 92일령에 2두에서 호흡기증상을 나타내어 이후 총 출하시까지 5두에서 호흡기증상을 나타내었으나 폐사는 없었음(표 3-48).

표3-48. 시험 육성돈군에서의 임상증상 발현 및 폐사수 비교

구 분	두수	임상증상 발현두수	폐사수	비 고
권장량군	20	5	0	
2배권장량군	20	6	1	급성홍막페렴
무투여군	20	8	2	PRDC(2두)

② 생산성 비교

- 3개 돈군에 대한 생산성을 비교하기 위해 개시체중과 종료체중을 측정하고 실험기

간 동안 총사료섭취량을 측정하였음.

- 표 3-49에서 보는 바와 같이 개시체중은 권장량군이 29.45kg, 2배권장량군이 29.11kg, 무투여군이 29.84kg으로 전체적으로 비슷하였다. 개시일령은 70일령으로 3개 돈군이 동일하였으며 종료일령도 권장량군과 2배권장량군 그리고 무투여군이 174일령으로 동일하였음. 일일증체량은 2배권장량군이 766g으로 권장량군 758g, 무투여군 738g 보다 높았음.

표 3-49. 시험 육성돈군간 증체량 비교

구분	실험 두수	개시 일령	종료 일령	개시평균 체중(kg)	종료평균 체중(kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량군	20	70	174	29.45	108.32	1,577	758
2배권장량군	19	70	174	29.11	108.86	1,515	766
무투여군	18	70	174	29.84	106.57	1,381	738

- 두당 일일사료섭취량은 무투여군이 3.83kg/day로 가장 높았는데 이는 2두 폐사에 기인한다. 두당일일사료섭취량은 2배권장량군이 권장량군보다 조금 높았음(표 3-50). 또한 사료요구율은 권장량군과 2배권장량군이 4.81과 4.80으로 거의 비슷했으며, 무투여군은 5.20으로 다른 2군에 비해 높게 나타났음.

표 3-50. 시험 육성돈군간 사료섭취량 비교

구분	실험두수	총사료섭취량 (kg)	두당일일사료섭취량 (kg/day)	사료요구율
권장량군	20	7,583	3.65	4.81
2배권장량군	19	7,278	3.68	4.80
무투여군	18	7,186	3.83	5.20

(라) 고 찰

- 육성돈군에 대한 다이스톱2의 주된 기대효과는 사료효율 증진과 증체량 증가이며, 실제 실험에서 다이스톱2를 투여한 권장량군과 2배권장량군이 무투여군에 비해 일당증체량과 사료요구율에서 유의차 있는 결과를 나타내었음.
- 또한 임상증상 발현율과 폐사수에서도 무투여군에 비해 권장량군과 2배권장량군이 유의차 있는 결과를 나타내어 육성비용돈에 대한 다이스톱2의 사용이 경제성이 있음을 실험을 통해 확인할 수 있었음.

(3) 산란계용 다이스톱-폴츄리산1호 실험 보고서 II

(가) 시험 배경

- 산란계의 경우 산란을 시작한 이후 지속적으로 체내 칼슘 및 미네랄이 소모되어 산란계로서의 수명이 단축됨은 물론 면역력 저하 및 소화기능 저하로 인한 살모넬라균 감염의 위험에 노출되게 됨. 따라서 산란계는 산란기간 동안 살모넬라균(Salmonella typhimurium)에 의한 가금티푸스의 감염위험에 노출되며, 특히 무더운 여름철에는 연변 및 설사의 발생빈도가 높아지게 됨.
- 본 실험에서 사용한 다이스톱-폴츄리산1호(산란계용, 그림 3-97)는 생균제와 천연미네랄을 주성분으로 하고, 산란계 농장에서 문제되는 질병의 항체가 함유된 IgY를 포함하고 있어 살모넬라균에 대한 우수한 예방효과가 기대됨.
- 따라서 본 실험에서는 다이스톱-폴츄리산1호를 산란계 농장에 적용 시 산란율 및 연란 및 과란 발생을 감소 여부 그리고 연변 및 설사 발생 여부를 실험하였음.



그림 3-97. 양계용 다이스톱-폴츄리산 1호(좌) 및 다이스톱-폴츄리산 2호(우) 시제품

(나) 재료 및 방법

- 다이스톱-폴츄리산1호에 대한 2차실험도 1차실험과 동일하게 경기도 포천시 영중면에 위치한 산란계 농장에서 실시하였음.
- 실험기간은 2013.9.2.부터 10.1일까지 30일 동안 이루어졌으며 계사는 원치커튼 유창계사 농장이었음. 실험계군은 45주령의 하이라인 갈색 산란계로서 질병이 없는 건강한 계군을 선정하였음.
- 실험제품은 (주)삼양애니팜에서 제조한 다이스톱-폴츄리1호 제품을 사용하였으며, 실험군은 권장량군(2,500수), 2배권장량군(2,700수), 무투여군(2,600수) 등 3개 계군으로 나누었다. 권장량군은 사료톤당 0.5kg을 사료에 첨가하였으며, 2배권장량군은 사료톤당 1kg을 사료에 첨가하였고 무투여군은 사료만 투여하였음.
- 실험제품 외에 사료(중양사료)는 동일한 제품을 사용하였으며 음수는 넵플시스템으로 급수하였다. 그 외에 다른 영양제나 생균제는 첨가하지 않았음.
- 산란율 측정을 위해 다이스톱 첨가전 1주간의 산란율 변화를 기록하고 다이스톱 첨가후 30일간의 산란율을 기록하였으며, 연란 및 과란 발생율도 별도로 기록하였음.
- 실험기간 동안 일일 평균기온을 매일 일정시간에 측정하여 기록하고 매일 연변 및 설사 발생 현황을 관찰 기록하였음.

(다) 결 과

- 3개 계군 모두 실험전 1주일간 산란율은 83~86%까지로 3개 계군이 비슷하였으나 무투여군이 다른 2개 계군보다 약간 높았음. 실험직전일 산란율은 권장량군 83.5%, 2배권장량군 84.3%, 무투여군 84.5%로 3개 계군이 큰 차이가 없었음. 실험개시후 산란율은 무투여군은 점차적으로 산란율이 감소하여 실험 30일후 81%까지 산란율이 감소되었으나 권장량군과 2배권장량군은 오히려 산란율이 증가하여 87%까지 증가하였음. 이는 권장량군의 경우 실험전보다 약4%, 2배권장량군의 경우 약3.5% 증가한 것으로 다이스톱 첨가 계군 모두 산란율이 증가하였음. 권장량군과 2배권장량군간의 산란율은 권장량군이 소폭 높았으나 통계상 유의성 있는 차이는 아니었음(표 3-51 및 그림 3-98).
- 연란이나 파란발생율은 13일령까지는 3개 계군에서 유의성 있는 차이는 없었으나 이후 무투여군의 연파란 발생율이 증가하여 다이스톱 첨가군과 차이를 보였음. 권장량군과 2배권장량군 사이의 유의있는 산란율 차이는 나타나지 않았음(표 3-51 및 그림 3-99).

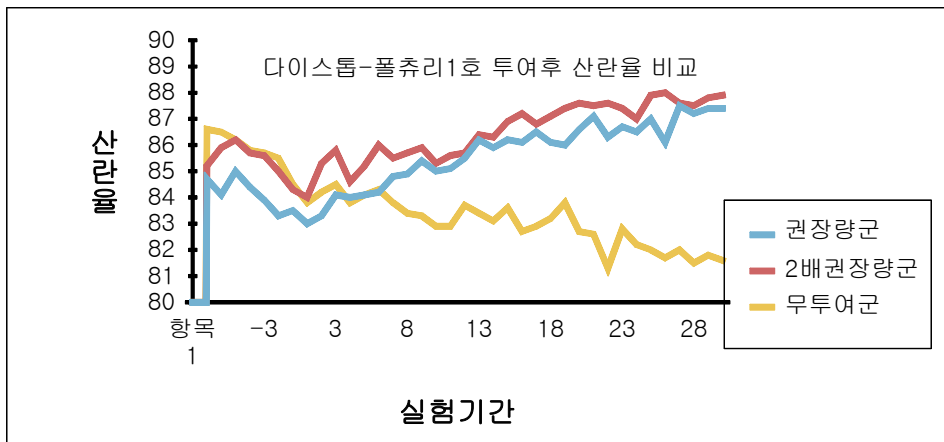


그림 3-98. 시험 계군의 산란율 비교

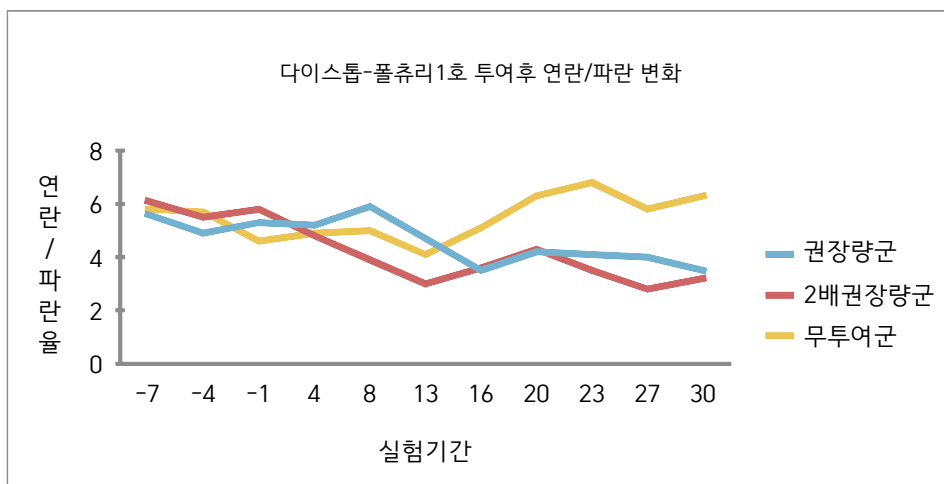


그림 3-99. 시험 계군의 연란 및 파란율 비교

표 3-51. 시험계군별 산란율 및 연란·파란율 비교

실험기간	산란율			연란·파란율		
	권장량군 (%)	2배권장량군 (%)	무투여군 (%)	권장량군 (%)	2배권장량군 (%)	무투여군 (%)
-7	84.7	85.2	86.6	5.6	6.1	5.8
-6	84.1	85.9	86.5			
-5	85.0	86.2	86.2			
-4	84.4	85.7	85.8	4.9	5.5	5.7
-3	83.9	85.6	85.7			
-2	83.3	85.0	85.5			
-1	83.5	84.3	84.5	5.3	5.8	4.6
1	83.0	84.0	83.8			
2	83.3	85.3	84.2			
3	83.1	85.8	84.5			
4	84.0	84.6	83.8	5.2	4.8	4.9
5	84.1	85.2	84.1			
6	84.2	86.0	84.3			
7	84.8	85.5	83.8			
8	84.9	85.7	83.4	5.9	3.9	5.0
9	85.4	85.9	83.3			
10	85.0	85.3	82.9			
11	85.1	85.6	82.9			
12	85.5	86.0	83.7			
13	86.2	86.4	83.4	4.7	3.0	4.1
14	85.9	86.3	83.1			
15	86.2	86.9	82.6			
16	86.1	87.2	82.7	3.5	3.6	5.1
17	86.5	86.8	82.9			
18	86.1	87.1	83.2			
19	86.0	87.4	83.8			
20	86.6	86.6	82.7	4.2	4.3	6.3
21	87.1	87.5	82.6			
22	86.3	87.6	81.3			
23	86.7	87.4	82.8	4.1	3.5	6.8
24	86.5	87.0	82.2			
25	87.0	87.9	82.0			
26	86.1	88.0	81.7			
27	87.5	87.6	82.0	4.0	2.8	5.8
28	87.2	87.5	81.5			
29	87.4	87.8	81.5			
30	87.4	87.9	81.6	3.5	3.2	6.3

- 임상증상은 권장량군과 2배권장량군에서 카니발리즘(cannibalism)에 의한 탈항증상과 무투여군에서 탈항 및 일부 폐사계에서 살모넬라균 감염이 확인되었음(표 3-52).
- 폐사율은 권장량군이 3.3%, 2배권장량군이 2.5%로서 무투여군 4.2% 보다 낮았다. 무투여군에서 폐사한 5수의 부검소견에서는 간부종 및 간괴사반점이 발견되어 가급티푸스가 의심되어 실험실 진단 결과 Salmonella typhimurium이 검출되었음(표 3-52).

표 3-52. 시험계군별 임상증상 발현 및 폐사율 비교

구분	실험수수	폐사율	비 고
권장량군	2,500	3.3%	Cannibalism
2배권장량군	2,700	2.5%	Cannibalism
무투여군	2,600	4.2%	Salmonellosis

(라) 고 찰

- 다이스톱-폴츠티산 1호는 산란계 농장의 상존질병인 Salmonellosis와 대장균증에 대한 IgY를 함유하고 있어 기존 산란계 농장의 질병문제를 감소시킬 수 있음. 이번 실험에서도 무투여군에서 Salmonella typhimurium이 폐사계에서 검출되었으나 권장량군과 2배권장량군에서는 나타나지 않았음.
- 다이스톱-폴츠티산 1호가 살모넬라증과 대장균증 예방 뿐만 아니라 산란율 향상에도 효과적이라는 사실을 또한 실험을 통해 확인하였음. 무투여군이 30일간 산란율이 약 5%정도 감소한데 반해 권장량군과 2배권장량군에서는 산란율이 3~4% 증가하여 산란율 증가에 효과가 있음을 확인하였음.
- 연란/파란율에서도 무투여군에 비해 권장량군과 2배권장량군이 유의적으로 높음을 확인하였음.
- 다이스톱-폴츠티산 1호는 IgY와 Probiotics 및 미네랄이 함유된 제제로서 산란계의 Salmonellosis와 Colibacillosis 등의 질병예방은 물론 산란율 향상과 연파란율 향상에 효과를 나타냄으로써 산란계 농장에서 경제성이 있을 것으로 사료됨.

(4) 육계용 다이스톱-폴츠티산 2호 실험 보고서II

(가) 시험 배경

- 우리나라에서 사육하고 있는 육계의 대표적인 품종들은 코브, 로스, 아바에이카, 인디안리버 등이 있는데 이들 모두 과거보다 증체율이 빠르고 근육발달이 좋은 반면에 근육만큼 골격발달이 따라가지 못해 골격 및 관절관련 질환이 다발하고 있음.
- 따라서 이를 극복하기 위해 빠른 증체에 필요한 단백질과 기본 영양소는 물론 부족하기 쉬운 비타민과 미네랄을 충분히 공급해 주어야 함.
- 다이스톱-폴츠티산 2호(육계용, 그림 3-97)는 3종의 Probiotics와 프락토올리고당(Prebiotic) 및 미네랄을 이상적으로 배합시켰음. 또한 육계에 다발하는 Salmonellosis와 Colibacillosis에 대한 IgY항체가 함유되어 있어 이들 질병의 예방에도 우수한 효과를 나타낼 수 있도록 설계되었음.
- 2012년 1차 실험에서 다이스톱폴츠티산2호는 무투여군에 비해 육성율 및 사료요구율에

서 유의있는 효과를 나타내었음..

- 따라서 이번 실험에서도 육성을 및 사료요구율의 차이를 재확인하고자 실험을 실시하였다.

(나) 재료 및 방법

- 2012년에 이어 2013년도 실험도 경기도 가평군 설악면에 위치한 육계 농장에서 실시하였음.
- 실험은 2013.3.6부터 4.6일까지 32일간 이루어졌으며 계사는 유창계사 형태의 농장에서 실시하였음.
- 실험계군은 로스품종의 육계로서 권장량군 9천수, 2배권장량군 1만수, 무투여군 9,000수로 계군을 선정하였음.
- 실험제품은 (주)삼양애니팜에서 제조한 다이스톱-폴츄리2호 제품을 사용하였으며, 실험군은 권장량군, 2배권장량군, 무투여군 등 3개 계군으로 구분하였음. 권장량군은 사료톤당 0.5kg을 사료에 첨가하였으며, 2배권장량군은 사료톤당 1kg을 사료에 첨가하였고 무투여군은 사료만 투여하였음. 실험제품 외에 사료(중양사료)는 동일한 제품을 사용하였으며 음수는 님플급수기로 급수하였고, 그 외에 다른 영양제나 생균제는 첨가하지 않았음.
- 입추 계군은 동일한 부화장의 초생추를 사용하였으며 실험에 사용된 계사는 동일한 방향을 가진 동일 환경의 계사를 사용하였음.
- 폴츄리산 2호는 1주령부터 사료에 첨가하여 출하 때까지 투여하였으며, 출하시 각 계군의 출하체중을 정확히 측정하고 사육기간동안 소비된 총사료량을 기록하였음.

(다) 결 과

- 다이스톱-폴츄리산 2호를 급여한 권장량군과 2배권장량군은 육성율이 98.6%와 99.0%로 97.5%의 육성율을 나타낸 무투여군에 비해 육성율이 높았음. 또한 평균출하체중도 권장량군과 2배권장량군이 각각 1.52kg과 1.50kg으로 무투여군 1.39kg보다 높게 나타났음(표 3-53).
- 사료요구율도 권장량군과 2배권장량군이 1.68과 1.65로 나타나 무투여군 1.72보다 우수하였음(표 3-53).

표 3-53. 시험 계군별 생산성 비교

구분	입추 수수	출하 수수	육성율 (%)	총사료 소비량	총출하 체중(kg)	평균출하 체중(kg)	사료요구율
권장량군	9,000	8,877	98.6	22,743	13,515	1.52	1.68
2배권장량군	10,000	9,903	99.0	25,419	15,427	1.50	1.65
무투여군	9,000	8,779	97.5	22,845	13,293	1.39	1.72

(라) 고 찰

- 육계용 다이스톱-폴츄리산 2호는 짧은 기간내에 증체가 이루어지도록 개량된 육계품종에 필요한 미네랄과 생균제가 함유되어 있으며 이와 함께 Salmonella와 E.coli에

대한 예방효과를 가진 IgY항체가 함유되어 있어 육계의 생산성 향상에 도움을 줄 수 있도록 개발되었음.

- 이번 실험에서 다이스톱제 품은 무투여군에 비해 육성율과 평균출하체중 및 사료요구율 모두 향상시킴으로써 야외 농장에서 경제성이 있음을 입증되었음.

다. 제4협동과제 연구결과 요약 및 평가

(1) 개발신소재를 이용한 면역복합제제 기본 제형 생산

- 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물별 주요 대상질병에 대한 면역항체 성분이 함유된 기초 면역복합제제를 생산하였고, 이를 이용하여 양돈용, 축우용 및 양계용 면역복합제제 기본제형을 개발하고, 시작품을 생산하였음(제1세부과제 공동수행).

(2) 개발 면역복합제제 시작품 4종에 대한 일반 및 면역성분에 대한 안정성 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

(가) 생균 및 일반성분 안정성 시험결과

- 양돈용 제제 2종(다이스톱-피그산 1호 및 2호) 및 양계용 제제 2종(다이스톱 폴츄리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트씩 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2013년 8월부터 3개월 간격으로 9개월 동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 일반제제 안정성 시험결과, 생균수와 제품의 함량에 있어 유의성 있는 변화가 관찰되지 않아 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.

(나) 면역성분 항체가 측정시험 결과

- 양돈용 제제 2종(다이스톱-피그산 1호 및 2호)의 경우, 표지 병원체인 대장균과 살모넬라균(*S. Typhimurium*)에 대한 IgY 항체가 및 초유항체가 제조시의 역가와 동일한 수준의 항체가를 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.
- 양계용 제제 2종(다이스톱-폴츄리산 1호 및 2호)의 경우, 표지 병원체인 대장균과 살모넬라(*S. Gallinarum*, *S. Pullorum* 및 *S. Enteritidis*)에 대한 IgY 항체가 제조시의 역가와 동일한 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.

(3) 3차년도 연구수행 내용 평가

- (가) 개발 면역복합제제 시작품 4종에 대한 일반성분과 면역성분에 대한 안정성 시험을 실시한 결과, 각 제제별로 제조시의 성분함량과 9개월 동안의 측정결과에 유의성있는 변화가 관찰되지 않아 시작품의 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되었으며, 4차년도 제품 개발의 기본제형으로 활용 가능성이 확인됨.

- (나) 4차년도에도 3차년도에 계속하여 포유이유자돈용, 육성비육돈용, 육계용, 산란계용 4종의 면역복합제제(경구, 분말제)에 대한 안정성시험을 실시하고 축종별 농장을 선정하여 안전성시험을 실시함으로써 시작품 효능평가에 기초자료를 제공하고 동물용 의약품으로 허가받는 데 활용하고자 함.

제 4절. 4차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 신소재 산업화를 위한 현장적용 및 효능평가 연구(제1세부)

가. 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성

(1) 양돈장, 양계장, 축우장 최적 적용 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성

- 4차년도는 양돈용 면역복합제제 시제품(2종)을 이용하여 동물투여 및 공격접종시험을 실시하여 최적 적용 프로그램을 개발하였음.

(가) 적용 시제품 : 돼지 설사 예방용 복합면역제제 (시제품명 : 아이지피그 S산, 아이지 피-디산)

(나) 시험 목적 : 아이지피그 S산, 아이지 피-디산의 PED 방어효과를 확인

- 실험용 포유자돈에 대한 면역력증강제 투여에 따른 PED 예방 및 치료 효과 확인

(다) 시험 방법

① 공시동물 : 15일령 22두

- 분만 당일 아이지피그 S산을 공히 6시간 간격으로 2회(2ml/회) 투여 후, 12일간 사육하 다음, 격리 시험돈사로 이동하여 3일간 적응시킨 후 15일령부터 시험을 실시.

② 시험군설정 : 아이지 피-디산의 효능 검증에 초점을 맞추어 아래 표와 같이 시험군을 설정하여 실험을 실시(표 4-1)

표 4-1. 양돈용 면역력증강제 시제품의 효능 검증을 위한 시험군 설정

그룹	내용	두수	투여 방법
A	아이지 피-디산 예방효과 측정군	5 (1-5)	1) 13, 14, 15일령 3일간 체제 1일 2회 투여 2) 공격접종 직전 체제 투여 후 공격접종
B	아이지 피-디산 치료효과 측정군	5 (6-10)	1) 15일령에 공격접종 2) 공격접종후 1일 2회 3일간 투여 * 6시간째 스스로 먹지 않으면 인공투여 실시
C	아이지 피-디산 예방 및 치료효과 측정군	5 (11-15)	1) 13, 14, 15일령 3일간 체제 1일 2회 투여 2) 공격접종후 1일 2회 3일간 투여 * 6시간째 스스로 먹지 않으면 인공투여 실시
D	공격접종 대조군	5 (16-20)	- 15일령 공격접종. 체제 미투여
E	미접종 대조군 (별도돈방)	2 (21-22)	- 공격접종 미실시, 체제 미투여

③ 면역력증강제 처치 및 시험일정 : 공격접종 당일 오전 10시에 공격접종하고, 치료군(B)과 치료/예방군(C)은 공격접종후 아이지 피-디산을 1일 2회 3일간 투여

- * 체제는 맘마급이통을 이용하여 액상공급(1회투여량 : 40ml/두)

④ 공격접종 : 10^5 TCID₅₀ 이상 역가의 야외 PEDV를 구강으로 2ml 공격접종

⑤ 시험결과 확인 및 분석방법

㉠ 임상관찰 : 매일 1회

㉡ 치료 채취 : 분변시료 스왑

- 공격접종전(15일령), 공격접종후 1일(16일령), 3(18일령), 5(20일령), 7(22일령), 9(24일령), 12(26일령)일자에 분변(직장)스왑

㉔ 부검 및 시료 채취(전두수)

- 공격접종 3일후 각 시험군(1-5)에서 2두씩 선발하여 부검 및 시료 채취
- 시험기간 종료시 전두수 부검하고, 시료 채취

㉕ 채취시료에 대한 PED 바이러스 검사

- 검사방법: RT-PCR (Kim 등, 2007)
- 시판되는 one-step RT-PCR premix (Inclone, Korea)에 forward 5'-CGCAAAGACTGAAC CCACTAATTT-3' 및 reverse 5'-TTGCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT-3' primer를 첨가하여 premix를 제조하였으며, 제조한 RT-PCR-premix 20 ul에 시료로부터 추출한 RNA 5ul를 첨가 혼합한 다음, 핵산증폭기(Genetech, USA)를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 즉, 50 °C에서 30 분간의 RT 과정을 거친 후, 95 °C에서 15 분간 처리한 다음, 35 회전의 PCR 과정(denaturation 95 °C 20 초, annealing 60 °C 30 초, extension 72°C 30초)를 수행한 다음, 72 °C에서 10 분간 최종 반응하였다. RT-PCR 증폭산물은 2.0 % agarose gel에 전기 영동한 후 UV transilluminator (Bio-Rad, USA)로 198 bp의 특이 단편 증폭 여부를 확인.

(라) 시험결과

① 공격접종에 따른 시험군별 설사 발생지수(표 4-2, 그림 4-1)

- 시험군별 설사발생지수를 측정한 결과, 공격접종대조군은 공격접종 1일차부터 9일 차까지 시험 전기간 동안 설사가 지속되어 설사발생지수가 28로 나타났다.
- 면역력증강제를 투여한 시험군의 경우, 예방효과측정군(A)는 9, 치료효과측정군(B)는 10 및 예방 및 치료효과측정군(C)은 4로 나타나 공히 공격접종 대조군에 비하여 설사발생지수가 낮았으며, 특히 예방 및 치료효과 측정군이 설사병 방어 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.
- 별도 격리한 비접종 대조군에서는 PED 공격접종과는 무관하게 공격접종 7일 및 9 일차에 연변이 관찰되었으나 전반적으로 정상적인 소견을 나타내었다.

표 4-2. 면역력증강제 투여 및 공격접종에 따른 시험군별 설사발생지수 조사 결과

시험군	시험 두수	공격접종후 접종군별 설사 발생지수 변화(일자별)							비고
		0	1	3	5	7	9	계	
A	3	0	3	3	2	1	0	9	시험군별 부검돈 2두 성적 제외
B	3	0	4	3	2	1	0	10	
C	3	0	2	1	1	0	0	4	
D	3	0	6	8	7	4	3	28	
E	2	0	0	0	0	1	1	2	

※ 설사발생지수 : 경고한 정상변(0), 형태가 있는 죽상연변(1), 형태가 없는 연변(2), 수양 성하리(3). 시험군별로 시험기간 중 부검개체를 제외한 나머지 돼지의 측정치를 기준으로 결과 산정

<A군>



공격접종후 1일



공격접종후 3일



공격접종후 7일

<B군>



공격접종후 1일



공격접종후 3일



공격접종후 7일

<C군>



공격접종후 1일



공격접종후 3일



공격접종후 7일

<D군>



공격접종후 1일



공격접종후 3일



공격접종후 7일

<E군>



그림 4-1. 15일령 자돈 시험군의 공격접종 일자별 임상증상

② 공격접종에 따른 시험군별 체중변화(표3)

- PEDV 공격접종전 및 공격접종 9일후에 각 시험군별 돼지의 체중을 측정하여 평균 체중 변화를 관찰한 결과, 공격접종대조군(D)는 평균 0.82 kg 체중이 감소되었음.
- 예방효과측정군(A), 치료효과 측정군(B) 및 예방 및 치료효과측정군(C)는 각각 0.26 kg 감소, 0.29 kg 증가 및 0.59 kg 증가 소견을 나타내어 면역력증강제 투여군은 체중이 감소되지 않았으며, 특히 예방 및 치료효과 측정군(C)의 경우 비접종 대조군보다 체중이 더 증가된 것으로 나타났음.

표 4-3. 면역력증강제 투여 및 PED 공격접종에 따른 시험군별 체중변화 측정 결과

시험군	시험 두수	접종군별 체중변화(Kg)			비고
		공격접종전(A)	공격접종 9일후(B)	체중변화 (C=B-A)	
A	3	5.53	5.27	-0.26	시험군별 부검돈 2두 성적 제외
B	3	5.79	6.08	0.29	
C	3	4.84	5.43	0.59	
D	3	4.47	3.65	-0.82	
E	2	4.44	4.96	0.53	

* 시험군별 시험기간 중 부검개체를 제외한 나머지 돼지의 측정치를 기준으로 결과 산정

③ 공격접종에 따른 시험군별 바이러스 배설 조사(표 4-4, 그림 4-2 및 4-3)

- PEDV 공격접종전 및 공격접종 후 1, 3, 5, 7, 9일차에 각 개체별로 채취한 분변도 말시료를 대상으로 RT-PCR로 PEDV 배설 여부를 확인한 결과, 공격접종대조군(D)는 설사증상이 개선된 이후에도 분변에 바이러스가 약하게 검출되어 시험 전 기간 동안 전두수에서 바이러스가 배설되었음.
- 예방효과 측정군(A)과 치료효과 측정군(B) 역시 9일차까지 1두에서 바이러스가 배설되었다. 그러나 예방 및 치료효과 측정군(C)의 경우에는 공격접종 5일차 이후 바

이러스 배설이 되지 않아 바이러스 배설 및 전파 방지에 가장 효과가 높은 것으로 나타났음.

표 4-4. 면역력증강제 투여 및 PED 공격접종에 따른 시험군별 바이러스 배설검사 결과

시험군	개체 번호	공격접종후 접종군별 바이러스 배설지수 (일자별)							비고
		0	1	3	5	7	9	계	
A	소계	0	3	3	3	1	1	11	시험군별 부검돈 2두 성적 제외
B	소계	0	3	3	3	2	1	12	
C	소계	0	3	2	1	0	0	6	
D	소계	0	3	3	3	3	3	15	
E	소계	0	0	0	0	0	0	0	

※ 분변도말시료에서 RT-PCR로 바이러스 배설 여부 조사: 배설(1), 비배설(0)

* 시험군별 시험기간 중 부검개체를 제외한 나머지 돼지의 측정치를 기준으로 결과 산정

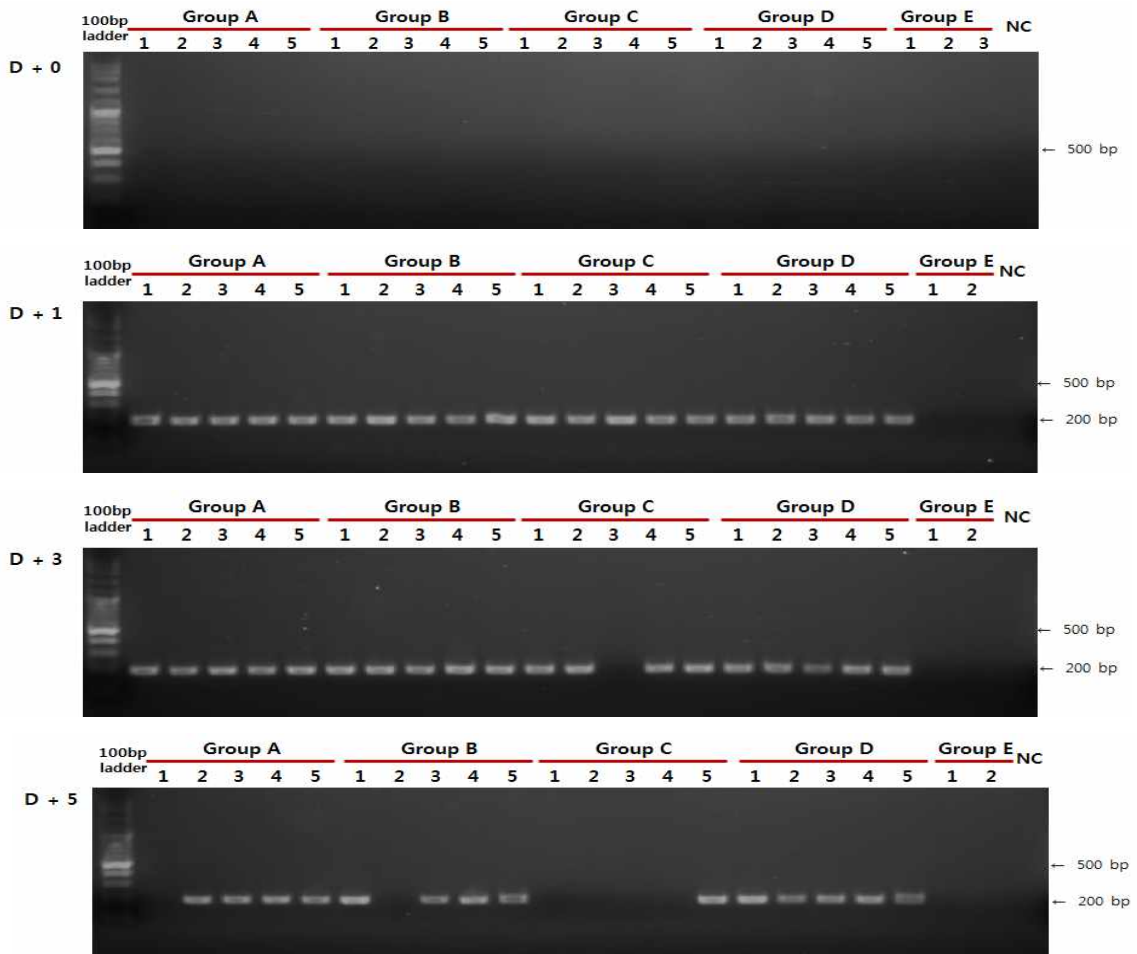


그림 4-2. 접종군별 경시적 채취시료 대상 RT-PCR에 의한 PEDV 검사결과 (공격접종전 및 접종후 1-5일간 분변시료에서 PEDV 검출)

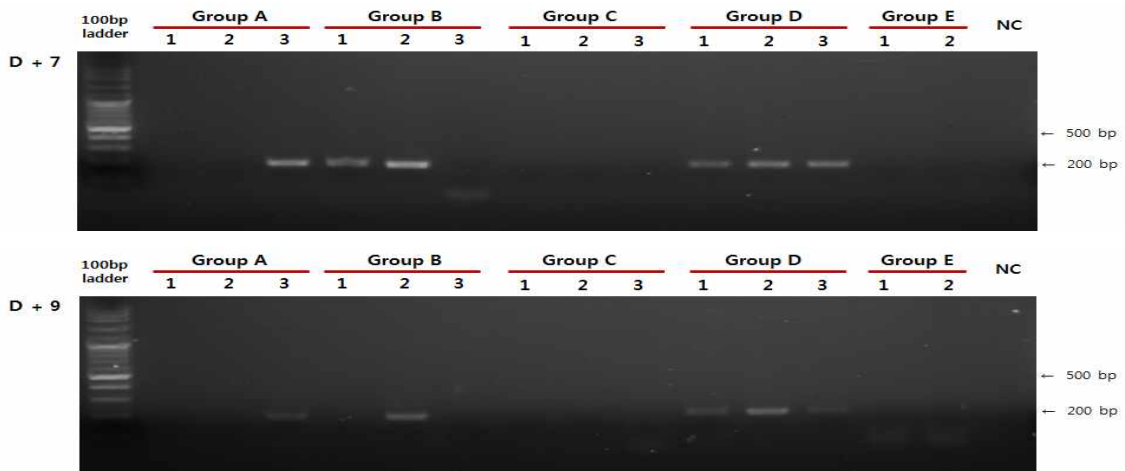


그림 4-3. 접종군별 경시적 채취시료 대상 RT-PCR에 의한 PEDV 검사결과.
(공격접종후 7-9일간 분변시료에서 PEDV 검출)

(마) 결론

- 15일령 포유자돈을 대상으로 최근 발생한 PEDV 변이주 공격접종에 따른 면역력증강제 투여효과를 확인한 결과, 아이지피그 S산 급여 후 아이지 피-디산을 치료 또는 예방 목적으로 투여하였을 때 비급여군에 비하여 설사증상과 폐사율이 감소하였으며, 특히 아이지 피-디산을 치료/예방목적으로 지속투여할 경우 가장 효과가 좋은 것으로 나타났음.

나. 개발 시제품의 농장적용에 따른 생산성 개선 및 경제성 분석

(1) 연구내용 및 방법

(가) 시험농장: 경북소재 S양돈장(모돈 1,500두 규모)

- 해당농장은 2014년 하반기 급성형 PED가 발생한 이후, 상재성으로 전환되어 피해를 보고 있던 농장임.
- 분만모돈 약 30%의 포유자돈에서 설사증상을 나타내며, 설사 자돈 일부가 구토증상을 보이는 상재성 PED의 전형적인 양상을 나타냄.

(나) 공시동물 : 분만 모돈 20두의 포유자돈 총 222두(포유개시두수)

(다) 시험군 설정 (표 4-4)

- 급여군 10복 110두(포유개시두수)
- 비급여군 10복 112두(포유개시두수)
- 분만이 임박한 모돈 20두를 선정하 다음, 각 10두에서 태어난 자돈을 면역력증강제 급여군(110두) 및 비급여군(112두)으로 구분하 다음, 급여군에는 면역력증강제를 투여하고, 비급여군은 농장의 일반 사양관리 방식으로 사육하였음.

(2) 시험결과 확인 및 분석방법

- 임상관찰 : 이유시까지 복당 설사 발생 및 폐사두수 관찰 기록
- 체중측정 : 복단위로 생시체중, 이유체중 및 일당증체율을 측정

표 4-4. 면역력증강제(아이지피그 S산 및 아이지 피-디산) 효능 검증용 시험군 설정

그룹	모돈수	포유개시 자돈수	투여 방법
급여군	10두	110두	1) 분만직후 아이지피그 S산 2일간 1일 2회 투여(2ml/회) 2) 분만후 5-7일, 3일간 아이지 피-디산 1일 2회 투여(40ml/두)
비급여군	10두	112두	1) 무투여

* 아이지피그 S산 : 구강으로 직접 경구투여(1회투여량 : 2ml)

* 아이지 피-디산 ; 맘마급이통을 이용하여 액상공급(1회투여량 : 40ml/두)

(3) 시험결과

(가) 급여군 및 비급여군의 설사 및 폐사 발생현황(표 4-5)

- 면역력증강제 급여군의 복당 설사발생율은 최대 평균 12.7%인 반면에 면역력증강제 비급여군에서는 29.5%로 나타났으며, 설사 발생기간도 급여군(2.5일)에 비하여 비급여군(10.2일)이 평균 7일 정도 길게 나타나 면역력증강제 급여가 PED에 의한 설사 증상을 현저하게 완화시키는 것이 확인되었음.
- 설사 증상의 완화에 따라 이유전 폐사두수도 비급여군(19.6%)에 비해 급여군(4.5%)이 약 1/4 수준으로 감소함을 확인하였음.

표 4-5. PED 발생농장에 대한 면역력증강제 급여 및 비급여군의 설사 및 폐사 발생현황

시험군	시험모돈 두수	포유 개시두수	복당최대설사발생율		설사발생 기간(일)	이유전 폐사율	
			두수	%		두수	%
급여군	10	110	14	12.7	2.44	5	4.5
비급여군	10	112	33	29.5	8.94	22	19.6

* 복당최대설사발생율은 시험기간 중 매일 임상관찰하여 설사 발생두수를 기록한 다음, 가장 많은 두수가 설사증상을 나타낸 일자의 두수를 기준으로 복당 최대 설사 발생율을 산정. 설사발생기간은 복단위로 관찰하여 설사 개시 후 종식될 때까지 일자를 기록.

(나) 면역력증강제 급여군 및 비급여군의 자돈 체중 변화 (표 4-6)

- 면역력증강제 급여자돈군 및 비급여자돈군의 일당 증체율은 각각 0.26과 0.24로 나타나 급여군이 다소 높았으나 유의성 있는 차이는 나타나지 않았음. 이는 면역력증강제 비급여군의 설사 발생 허약자돈이 이유전에 폐사함으로써 측정치에서 제외되었기 때문으로 해석됨.

(4) 결론

- 경북 소재 PED 발생농장의 포유자돈군에 대하여 면역력증강제(아이지피그 S산 및 아이지 피-디산) 투여시험 결과, 자돈 설사증상(발생두수 및 설사기간)이 현저하게 완화되었고, 이에 따라 자돈의 이유전 폐사율도 1/4 수준으로 개선됨.

- 개발한 양돈용 면역증강제 시제품 2종(아이지피그 S산 및 아이지 피-디산)을 대상으로 PED가 상재성으로 문제되는 농장에 적용한 결과, 포유자돈의 설사증상 완화 및 폐사율 개선에 현저한 효과가 있는 것으로 평가됨.

표 4-6. PED 발생농장 포유자돈에 대한 면역력증강제 급여 및 비급여군 자돈의 체중 변화

시험군	모돈두수	포유 개시두수	평균생시 체중(A)	평균이유 체중(B)	평균이유 일자(C)	일당증체율 [C/(B-A)]
급여군	10두	110	1.63	9.46	29.9	0.26
비급여군	10두	112	1.63	8.39	28.7	0.24

다. 양돈용 면역증강제의 최적 농장 적용 프로그램 (안) 개발

- (1) 시험양돈장에 대한 면역증강제 시제품 적용 결과에 따라 설사병 발생시 뿐만 아니라 평상시 허약자돈(체미돈 또는 유즙 불량 모돈의 자돈)의 설사병 예방 및 활력 증진을 위한 최적 적용 프로그램을 그림 4-4와 같이 개발하여 농장에 적용 가능함.
- (2) 개발된 면역증강제를 이용한 자돈 면역증강 프로그램을 일반 양돈장에서 평시에 이용할 수 있도록 제품화하여 보급할 계획임.

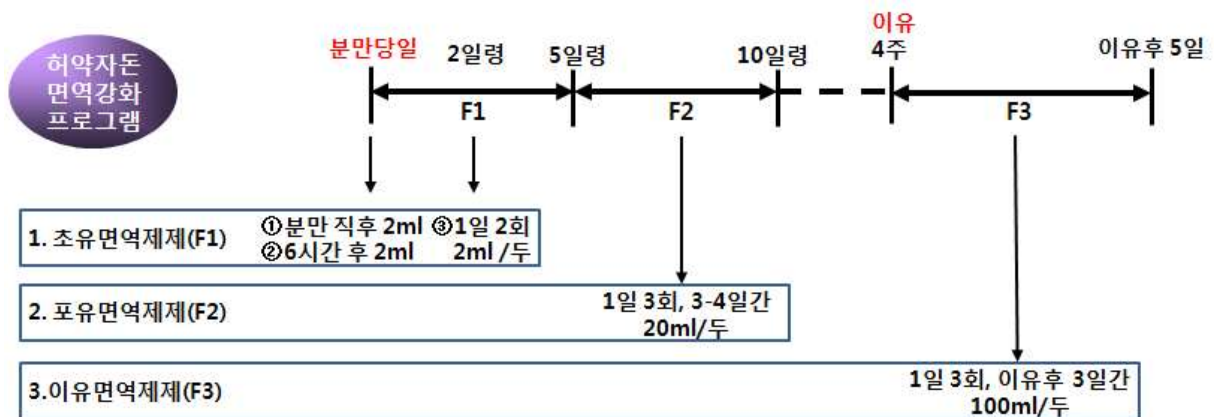


그림 4-4. 양돈장의 최적 면역증강제 적용 프로그램 개발

라. 제1세부과제 연구결과 요약 및 평가

- (1) 양돈용 면역증강제 시제품 2종을 개발하여 동물접종시험 및 농장 적용시험을 실시한 결과, 최근 문제되는 PED에 대하여 예방효과가 있는 것으로 평가됨.
- (2) PED 이외 장내 병원체 감염에 의한 설사병 예방 및 허약 자돈의 면역력 증진 및 식이성 설사병 예방에도 효과가 있을 것으로 기대됨.
- (3) 일반 양돈장에서 평시 적용할 수 있는 면역증강 프로그램을 개발하였고, 이를 5차년도에 보강(시제품 보강 및 추가적용)하여 양돈장에 보급할 계획임.

2. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발 (제2세부)

가. 고면역 면역난황제제를 이용한 첨가제 개발

(1) 고면역 난황항체의 안전성 및 효능 평가

(가) 고면역 난황항체 안전성 평가를 위한 마우스 경구 투여 실험

① 시험 목적

- 고면역 유도 바이러스 항원 및 바이러스 단백질 항원을 접종한 산란계에서 생산한 고면역 난황항체(표 4-7)의 안전성 평가

② 시험 방법

㉠ 공시동물 : 5주령 BALB/c 수컷 마우스 4마리(그림 4-5)

㉡ 시험내용 : G1(PEDV-cFc 바이러스 항원 접종) 고면역 난황항체 분말을 물에 녹인 용액(0.1 g/ml) 2 ml을 물 200 ml에 넣어 잘 섞어준 다음 물통에 담아서 마우스 2마리에 경구 투여하고 나머지 2마리는 대조군으로 물 200 ml만 넣어 경구 투여함. 7일간 체중 변화를 측정, 실험 시작 7일 뒤 부검을 실시

㉢ 시험 결과

- 실험군과 대조군 모두 정상적인 체중 증가 양상을 보임(그림 4-6).
- 부검을 실시해 간과 비장 상태를 관찰한 결과 정상 소견을 보임(그림 4-7)
- 따라서 생산된 고면역 난황항체가 충분히 안전하다고 판단됨.

표 4-7. 1차 산란계 접종용 면역항원 및 접종두수

타겟 동물	접종 면역 항원	두수
돼지	G1 : PEDV whole virus antigen (cFc-harboring)	4
	G2 : PEDV Whole virus antigen	4
	G3 : PEDV spike protein antigen (cFc-tagged)	4
	G4 : PEDV spike protein antigen	4
	G5 : PRRSV 북미형 Whole virus antigen (cFc-harboring)	4
	G6 : PRRSV 북미형 Whole virus antigen	4
	G7 : PCV2b capsid protein antigen (cFc-tagged)	4
	G8 : PRV whole virus antigen	4
소	G9 : BVDV whole virus antigen (cFc-harboring)	4
	G10 : BCoV spike protein antigen (cFc-tagged)	4
	G11 : BRV whole virus antigen	4
	G12 : Placebo; Control group	4



그림 4-5. 고면역 난황항체 마우스 경구투여 실험 모식도

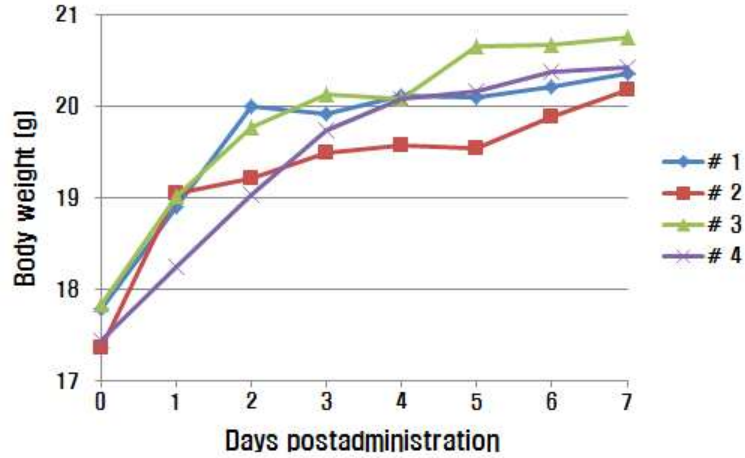


그림 4-6. 마우스 개체별 체중 변화

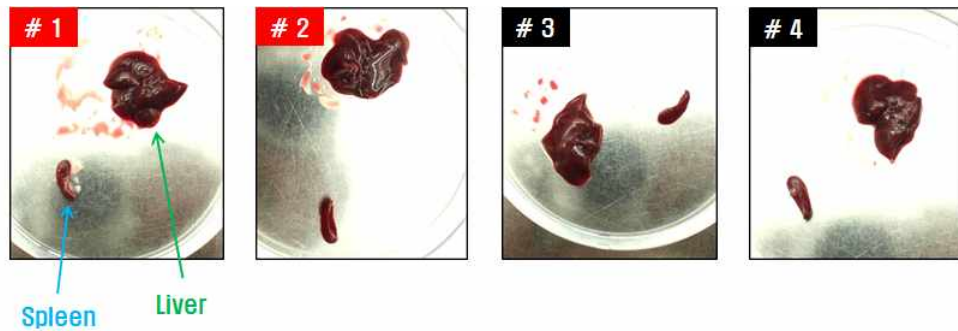


그림 4-7. 마우스 개체별 부검 결과(간, 비장)

(나) 고면역 난황항체 효능 평가를 위한 신생자돈 경구 투여 실험

① 시험 목적

- 고면역 유도 바이러스 항원 및 바이러스 단백질 항원을 접종한 산란계에서 생산한 고면역 난황항체의 효능 평가

② 시험 방법

㉞ 공시 동물 : 신생자돈 18마리르 공시하여 PEDV 공격 접종 전후 경구 투여 실험을 수행함(표 4-8).

표 4-8. PEDV 공격접종 전후 신생자돈 경구투여용 고면역 난황항체

Group	고면역 난황항체	두수
1	IgY against PEDV-cFc	6
2	IgY against PEDV-S1-cFc	6
3	IgY against placebo	3
4	IgY against placebo (No challenge; Control)	3

㉟ 시험 내용

㉟ 시험군 설정 : 분만직후의 PED 음성 신생자돈을 난황항체 그룹별로 6마리씩으로

구분함. 그룹 1은 G1(PEDV-cFc 바이러스 항원 접종), 그룹 2은 G3(PEDV-S1-cFc 단백질 항원 접종), 그룹 3은 G12(항원 비접종) 고면역 난황항체 용액(0.25 g/ml)과 면역제를 혼합해 2 ml씩 6시간 간격으로 2회 경구 투여함. 자동급이기로 먹이와 물을 공급함.

㉠ 공격접종 : PEDV 야외주 감염돈 소장 유제액($10^{4.64}$ TCID₅₀/ml) 1 ml씩 경구 투여로 공격 접종함. 접종 1, 2일 뒤 분만 직후에 투여했던 것과 마찬가지로 포유자돈에 고면역 난황항체 용액(0.25 g/ml)과 면역제를 혼합해 2 ml씩 6시간 간격으로 2회 경구 투여함.

㉡ 시험 결과 확인 및 분석 방법

- 임상 관찰 : 접종 후 5일 동안 매일 동일 시간에 개체별 활력도와 설사 정도를 관찰
- 시료 채취 : 분변 샘플을 채취해 무혈청 배지에 넣어 냉동 보관
- 부검 및 시료 채취 : 접종 5일 뒤 혈액 샘플을 채취하고 안락사 및 부검 실시 후 소장 샘플을 채취해 10% formalin에 넣어 24시간 동안 고정
- 바이러스 검사 : Real-time RT-PCR, 중화 시험, 조직염색(H&E 염색 및 IFA)

㉢ 시험 결과

㉠ 임상관찰 : 그룹 1, 2 자돈의 설사 증상이 시간 경과에 따라 완화된 것을 확인했으며 활력도는 점차적으로 증가함(표 4-9)

㉡ 바이러스 검사

- Real-time PCR 결과, 그룹 1, 2 자돈의 분변 내 바이러스 배출 감소를 확인함(그림 4-10)
- 중화시험 실시 결과, 그룹 1, 2의 혈청 내 중화항체 역가 증가를 확인함(그림 4-9)
- 조직염색(H&E 염색 및 IFA) 결과, 그룹 1, 2의 소장 용모 위축 및 탈락 정도 감소와 바이러스 검출량 감소를 확인함(그림 4-11, 4-12)

㉢ 결론

- 고면역 난황항체가 바이러스로부터 개체를 충분히 방어할 수 있는 효능이 있다고 판단됨.

표 4-9. 자돈 개체별 설사 정도

Group	Piglet No.	Days after oral challenge					
		0	1	2	3	4	5
1	1	-	-	++	++	++	+
	2	-	+++	+++	++	++	+
	3	-	-	+++	+++	+++	+
	4	-	-	+++	++	++	++
	5	-	+	+++	+++	+	+
	6	-	-	+++	+++	++	+
2	1	-	+++	++	+++	+++	+

	2	-	-	++	++	+	+
	3	-	-	+++	+++	++	++
	4	-	-	++	++	++	+
	5	-	+++	+++	++	+	+
	6	-	+++	+++	++	++	++
3	1	-	+++	++	++	+++	+++
	2	-	+++	+++	+++	+++	+++
	3	-	+++	Died	ND	ND	ND
4	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-

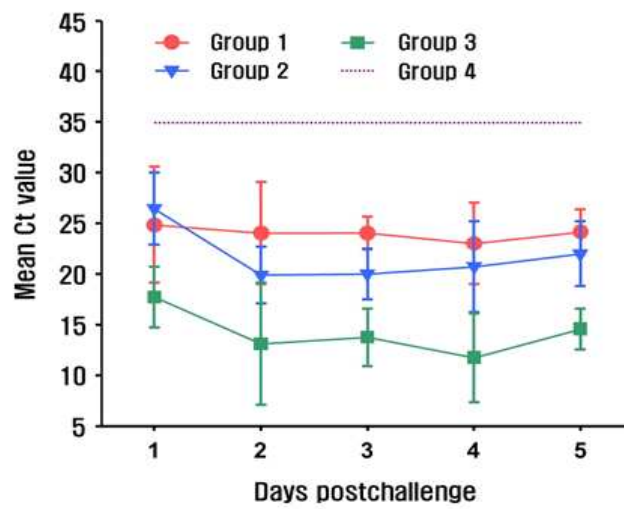


그림 4-8. 자돈 그룹별 분변 샘플 Real-time RT-PCR

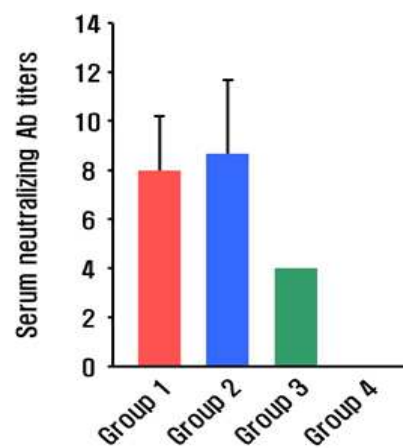


그림 4-9. 자돈 그룹별 혈청 샘플 PEDV 중화시험

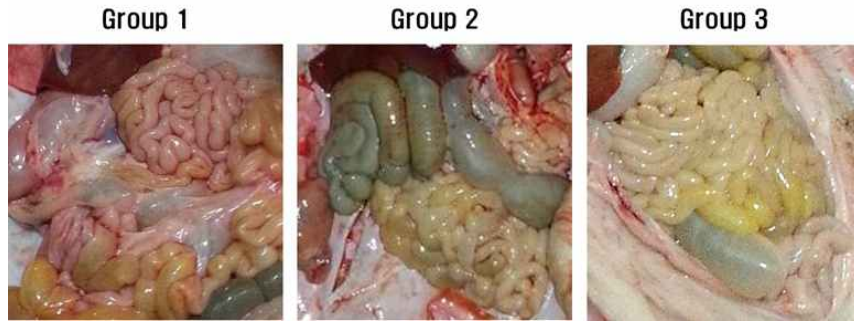


그림 4-10. 자돈 그룹별 부검 결과

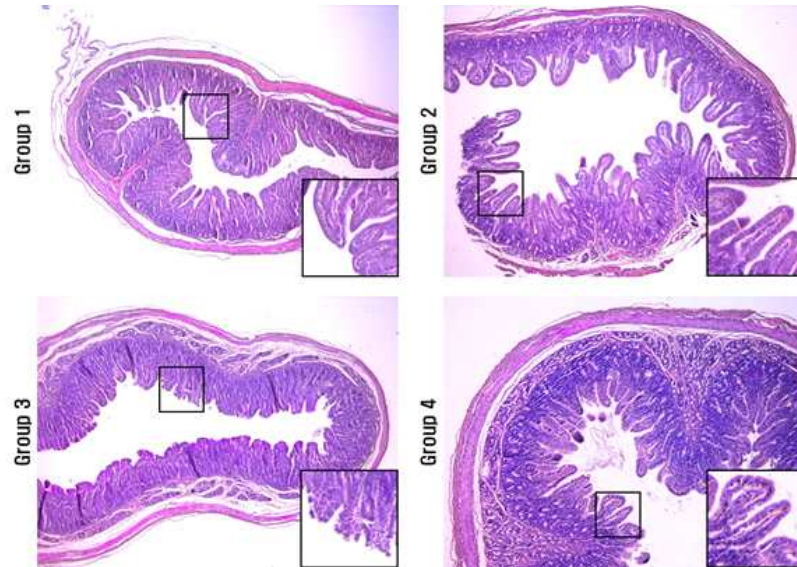


그림 4-11. 자돈 그룹별 소장 조직 샘플 H&E 염색 결과

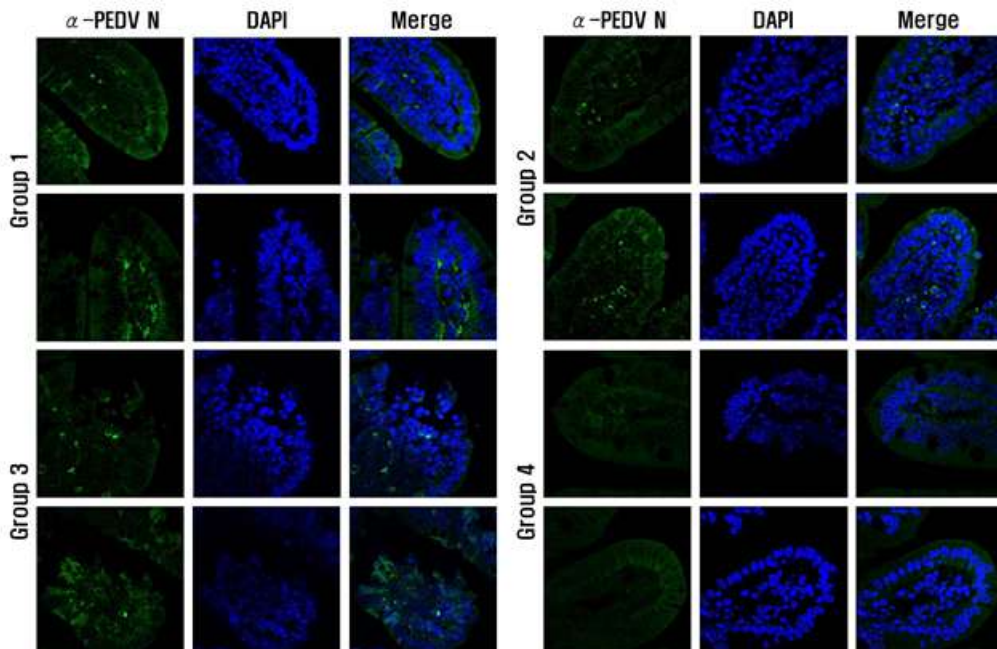


그림 4-12. 자돈 그룹별 소장 조직 샘플 IFA 결과

(2) 불활화 고면역 백신 제조 계속 및 시스템 최적화

(가) 고역가 고면역 cFc-harboring 바이러스 항원 생산 및 불활화

① 산란계 면역접종을 위해 cFc 발현이 최적화된 3종의 세포주(Vero-ky5-cFc, PAM-pCD163-cFc 및 MDBK-cFc)에 각각의 타겟 바이러스(PEDV, 북미형 PRRSV 및 BVDV)를 감염시켜 배양함. 생산된 바이러스는 IFA와 western blot assay를 이용해 cFc가 harboring된 것을 확인함. 5종의 cFc-harboring 바이러스 항원(PEDV 야외주-cFc, PEDV 백신주-cFc, 북미형 PRRSV VR-2332-cFc, 북미형 PRRSV KNU-12-KJ4-cFc 및 BVDV-cFc)의 역가를 측정된 결과 기존 바이러스와 유사한 고역가를 보임. 고역가 고면역 cFc-harboring 바이러스 항원은 BEI(Binary ethylenimine)을 이용해 불활화함.

(나) 고면역 재조합 바이러스 단백질-면역보강인자 항원 생산 및 정량

① 산란계 면역접종을 위해 바이러스 유래 재조합 단백질-cFc 발현이 최적화된 3종의 세포주(PK-15-PEDV-S1-cFc, PAM-PCV2b-ORF2-cFc 및 MDBK-BCV-S1-cFc)를 대량으로 배양함. 세포 배양 상층액 수거 및 lysates 생산 후 chicken IgY precipitating resin(GenScript)을 첨가해서 면역침전법을 수행함. 이를 통해 약 100 µg/ml의 농도를 가지는 3종의 바이러스 유래 cFc-tagged 재조합 단백질 항원(PEDV-S1-cFc, PCV2b-capsid-cFc 및 MDBK-BCV-S1-cFc)을 생산함.

(다) Adjuvant를 이용한 면역난황항체 생산용 다가 면역항원 제조

① 생산된 불활화 cFc-harboring 바이러스 항원 및 cFc-tagged 바이러스 단백질 항원과 Montanide ISA 70 VG(Seppic) adjuvant를 1:2 비율로 혼합하여 면역난황항체 생산용 다가 면역항원을 제조함.

(3) 고면역 난황항체 대량생산 계속 및 시스템 최적화

(가) 불활화 다가 백신에 대한 2차 산란계 면역접종

① 항원 그룹별로 10주령 산란계 4수씩 총 48마리를 준비하고(표 4-10), 제조된 축종별 불활화 백신을 산란계에 3주 간격으로 4회 접종함(그림 4-13). 접종 전에 불활화 백신을 충분히 섞어준 다음 산란계의 흉근에 0.8 ml씩 근육접종을 실시함. 최초 접종일부터 6주 간격으로 산란계의 익정맥에서 총 3회 3 ml씩 채혈해 혈청을 분리 및 비동화하고 3번째 접종일부터 6주 동안 채란을 실시함.

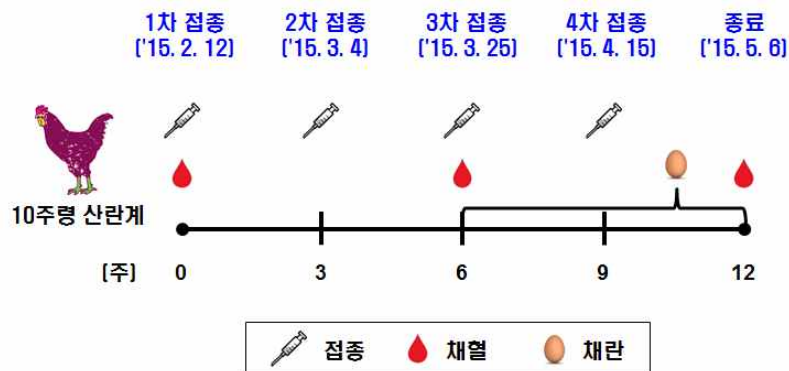


그림 4-13. 면역항원 산란계 접종 일정

표 4-10. 2차 산란계 접종용 면역항원

타겟 동물	접종 항원	두수	Egg
돼지	G1 : PEDV whole virus antigen (cFc-harboring); Field strain	4	157
	G2 : PEDV whole virus antigen (cFc-harboring); Vaccine strain	4	155
	G3 : PEDV spike protein antigen (cFc-tagged)	4	162
	G4 : PEDV spike protein antigen	4	156
	G5 : PRRSV 북미형 whole virus antigen (cFc-harboring); VR-2332	4	150
	G6 : PRRSV 북미형 whole virus antigen; KNU-12-KJ4	4	161
	G7 : PCV2b capsid protein antigen (cFc-tagged)	4	148
	G8 : PRV whole virus antigen	4	157
소	G9 : BVDV whole virus antigen (cFc-harboring)	4	126
	G10 : BCoV spike protein antigen (cFc-tagged)	4	144
	G11 : BRV whole virus antigen	4	164
	G12 : Placebo; Control group	4	152

(나) 타겟 항원에 대한 혈청 항체반응 분석

- PEDV 항원 접종 그룹(G1~4), PRRSV 항원 접종 그룹(G5, 6) 및 BVDV 항원 접종 그룹(G9)의 혈청으로 각각 타겟 바이러스에 대한 중화시험을 수행함. PCV 항원 접종 그룹(G7)의 혈청은 VDPro[®] PCV2 NC AB ELISA kit(메디안 디노스틱)로 ELISA를 수행함.

(다) 면역난황을 농축분말화 후 고면역 복합난황항체 생산

- 산란계에서 얻은 계란을 그룹별로 분류한 다음 bleach 세척과 70% 에탄올로 소독을 실시함. 이후에 소독한 계란을 조심스럽게 깬 다음 난황을 분리하고 난황 부피 7배의 1차 증류수를 첨가함. 그 다음 총 부피의 0.02% 강산성 이온수를 첨가하고 4°C에서 24시간 정치 후 상층액을 수거하는데 이 상층액에 난황항체가 포함되어 있음. 수거한 상층액을 원심분리한 다음 다시 상층액을 수거해서 -20°C에 냉동 보관하다가 녹여서 농축분말화함.

나. 면역단백질의 고속, 대량 발현 체계의 개발

(1) 면역단백질 발현 및 동정과 생균제를 이용한 면역증강제 활용가능성 탐색

(가) 후보 면역단백질 발현체 균주의 다수 확보를 통한 목적 단백질의 안정적 생산

① Generally-Recognized-As-Safe (GRAS) 균주인 *Bacillus* 이용 면역단백질 발현

㉞ 목적 재조합 면역단백질의 발현 확인

- *Bacillus subtilis* 및 *B. licheniformis*, 두 종의 *Bacillus* 균주를 대상으로 PCV2b, PRRSV, PEDV로 대표되는 목적 면역단백질 유전자를 cloning, 이후 제작된 발현 체로부터 목적 재조합 면역단백질의 발현을 확인함. 기존에 수행된바 있는 면역단백질의 *Pichia* 균주 내 발현 연구결과를 바탕으로, 표 4-11과 같이 총 14종의 조합을 기본으로 *Bacillus* 균주를 이용한 면역단백질 발현을 시도함.

표 4-11. *Bacillus* 균주 내 후보 면역단백질의 cloning 및 발현을 위해 제작 사용된 재조합 vector

Sample	Host strains	Vectors	Inserted DNA
PCV2b 발현을 위해 제작된 재조합 vector			
1	<i>Bacillus subtilis</i>	pMM1522	PCV2b ORF2
2	<i>Bacillus subtilis</i>	pMM1522	PCV2b ORF2-FLAG
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PCV2b ORF2
4	<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PCV2b ORF2-FLAG
5	<i>Bacillus subtilis</i>	pDG1730	PCV2b ORF2-FLAG
PRRSV 발현을 위해 제작된 재조합 vector			
6	<i>Bacillus subtilis</i>	pMM1522	PRRSV 7-1 ORF5
7	<i>Bacillus subtilis</i>	pMM1522	PRRSV 7-1 ORF5-FLAG
8	<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PRRSV 7-1 ORF5
9	<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PRRSV 7-1 ORF5-FLAG
10	<i>Bacillus subtilis</i>	pDG1730	PRRSV 7-1 ORF5-FLAG
PEDV-S1 발현을 위해 제작된 재조합 vector			
11	<i>Bacillus subtilis</i>	pMM1522	PEDV-S1-1
12	<i>Bacillus subtilis</i>	pMM1522	PEDV-S1-3
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PEDV-S1-1
14	<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PEDV-S1-3

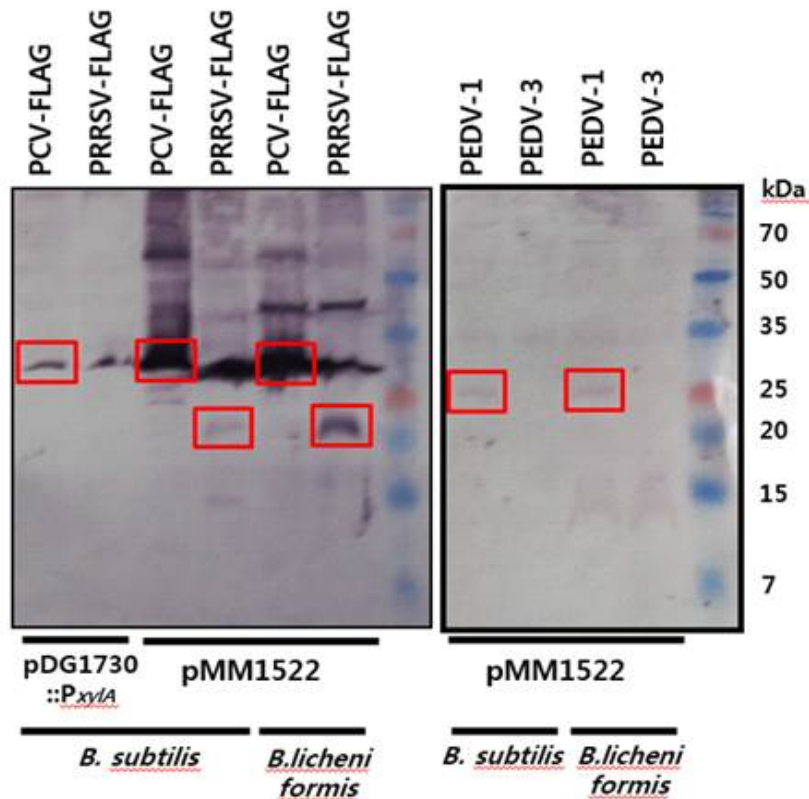


그림 4-14. Western blot을 이용한 *Bacillus* 균주 내 목적 면역단백질의 발현 확인.
Red box, 목적 면역 단백질의 western-blot signal.

㉠ 목적 면역 단백질의 발현 확인

- GRAS 균주인 *Bacillus subtilis*와 *B. licheniformis*에서 PCV2b, PRRSV, PEDV의 면역 단백질 발현을 시도, 이후 FLAG을 이용한 Western-blot을 통해 목적 면역 단백질의 성공적 발현 여부를 확인함 (그림 4-14).
- 그 결과, 3종의 목적 면역 단백질 모두 *Bacillus* 균주 내에서 성공적으로 발현함을 확인하였으며, 특히 PCV2b ORF2의 경우에는 PRRSV 7-1 ORF5, PEDV-S1 보다 높은 발현율을 보이는 것으로 확인됨.

㉡ PEDV-S1 면역 단백질의 발현

- 비교적 size가 큰 단백질 발현에는 약점을 보이는 *Bacillus* 균주의 특성을 고려하여, PEDV-S1 면역 단백질의 발현을 위해 약 2 kb 크기의 PEDV-S1 유전자를 약 700 bp 크기의 3부분으로 나눈 후 각 단편에 대한 단백질 발현을 시도함.
- 그 결과, 두 번째 partial 부분은 cloning이 되지 않았으며, 이창희교수에게서 공여 받은 PEDV-S1 항혈청을 이용한 Western-blot 결과, 첫 번째 partial 부분에서만 binding signal 양상이 나타남을 확인(그림 4-14).
- 이들 결과를 종합해 볼 때, PEDV-S1 면역 단백질의 경우에는 약 2 kb 크기의 PEDV-S1 유전자 중에서 앞쪽의 약 700 bp 부분으로부터 만들어지는 단백질이 면역반응에 관여할 것으로 추정됨.

㉢ 면역단백질 발현체 미생물 균주로부터 생산되는 후보 면역단백질의 동정 확인

㉣ *Pichia* 및 *Bacillus*에서 발현된 후보 면역단백질의 발현 확인 및 동정

- 면역단백질의 동정 분석을 위하여 *Pichia* 균주 및 *Bacillus* 균주를 기반으로 생산되는 재조합 면역단백질을 대상으로 LC-MS/MS 및 MALDI-TOF법을 사용하여 각 재조합 면역단백질의 동정 분석을 실시함.

㉤ 생균제로서의 활용 가능성 확인 시험

- 분석 결과, GRAS 균주 내에서의 목적 면역단백질의 정상 발현을 확인, 이후 이들 발현체 균주의 제제화 및 면역증강용 축산사료첨가 생균제로서의 활용 가능성 확인(그림 4-15 및 4-16).

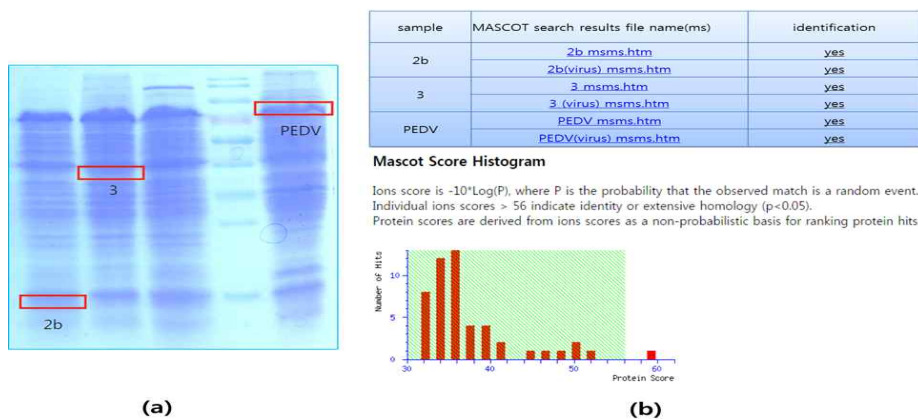


그림 4-15 *Pichia* 균주 기반의 후보 면역단백질의 발현 확인 및 생산 재조합 면역단백질의 동정. (a) *Pichia* 균주 기반의 후보 면역단백질의 발현 확인을 위한

SDS-PAGE 결과, (b) LC-MS/MS 기반의 *Pichia* 균주 발현 재조합 면역 단백질의 동정 확인.

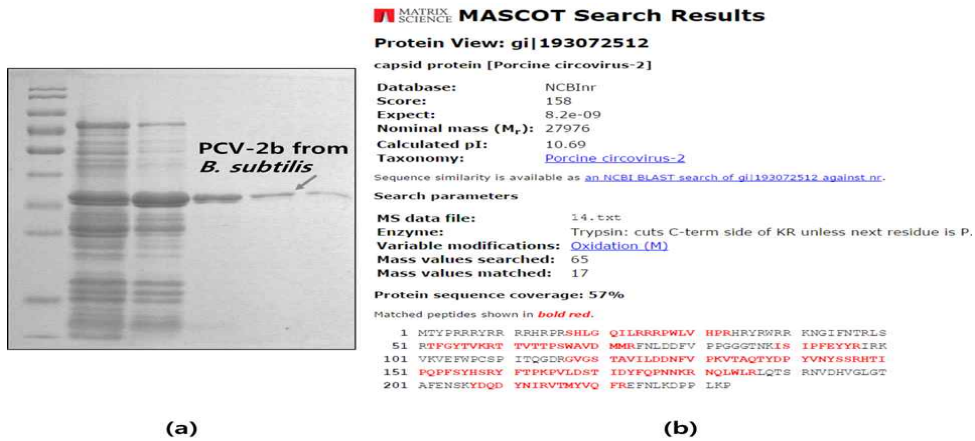


그림 4-16. *Bacillus* 균주 기반의 후보 면역단백질의 발현 확인 및 생산 재조합 면역 단백질의 동정. (a) *Bacillus* 균주 기반의 후보 면역단백질의 발현 확인을 위한 SDS-PAGE 결과, (b) MALDI-TOF 기반의 *Bacillus* 균주 발현 재조합 면역 단백질의 동정 확인.

- ③ 면역단백질 발현 재조합 균주 및 면역 증강용 *Lactobacillus* 균주에 대한 제제화
 - ㉠ 면역 단백질 발현체 *Bacillus* 균주군 및 축산사료첨가 생균제용 분리 균주 *Lactobacillus* sp. KNU-02의 제제화 및 생존률 조사
 - 목적 면역 단백질의 안정적 발현 및 발현 유지: 면역 단백질 발현 재조합 균주 *B. licheniformis*의 제제화를 위해 동결건조를 실시, 동결건조 후 이들 단백질 발현체 균주의 생존률을 확인하여 목적 면역 단백질의 안정적 발현 및 발현 유지를 위한 미생물 활성정도를 확인함 (표 4-12). 일반적으로 *Bacillus* 균주는 endospore 형성을 특징으로 가짐에 따라, 면역 단백질 발현체 *Bacillus* 균주 역시 dipicolinic acid, CaCl₂ 처리 및 가열 등으로 endospore 형성을 유도한 후 제제화를 한다면 더 높은 수준의 면역 단백질 발현체 생존률 확보가 가능할 것으로 예상된다.

표 4-12. 면역 단백질을 발현, 생산하는 *Bacillus* 균주의 동결건조 후 생존률 확인

Stain	Vector	Insert DNA	동결건조 후 균주 생존률(%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PCV2b ORF2-FLAG	3.25
<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PRRSV 7-1 ORF5-FLAG	9.43
<i>Bacillus licheniformis</i>	pMM1522	PEDV-S1-1	3.21

- 축산사료첨가 생균제용 분리 균주 *Lactobacillus* sp.의 동결건조 후 생존률 확인: 축산사료첨가 생균제용 분리 균주 *Lactobacillus* sp. KNU-02의 경우, 동결 건조

후 균주 생존률은 약 17.9%로 확인됨. 이는 일반적으로 동결건조에 따른 미생물 균주의 생존률이 약 1% 정도 수준으로 보고되는 기존 결과들과 비교할 때 높은 수준의 생존률을 보임(표 4-13).

표 4-13. 축산사료첨가 생균제용 분리 균주 *Lactobacillus* sp.의 동결건조 후 생존률 확인

Stain	동결건조 후 균주 생존률(%)
<i>Lactobacillus</i> sp. KNU-02	17.9

㉞ 분리 균주 *Lactobacillus* sp. KNU-02의 면역증강제로의 활용 가능성 탐색

- *Lactobacillus* sp. KNU-02 균주의 배양 및 생균수 측정을 통한 내산성 조사 실시: 분리 균주 *Lactobacillus* sp. KNU-02에 대한 내산성 확인 결과, 산성 조건에서 배양 시 배양 초기 생균수 대비 배양 시간의 경과에 따른 CFU값 증가 양상을 확인함(그림 4-17).
- 분리 균주 *Lactobacillus* sp. KNU-02의 내산성을 보여주는 이들 결과는, 본 균주의 실제 축산 사료 내 생균제로 첨가 이용 시 pH 2~3으로 알려진 돼지 위산에 대하여 충분한 내성을 가짐에 따라 이후 가축의 장내 도달에 높은 이점을 가질 것으로 예상됨.

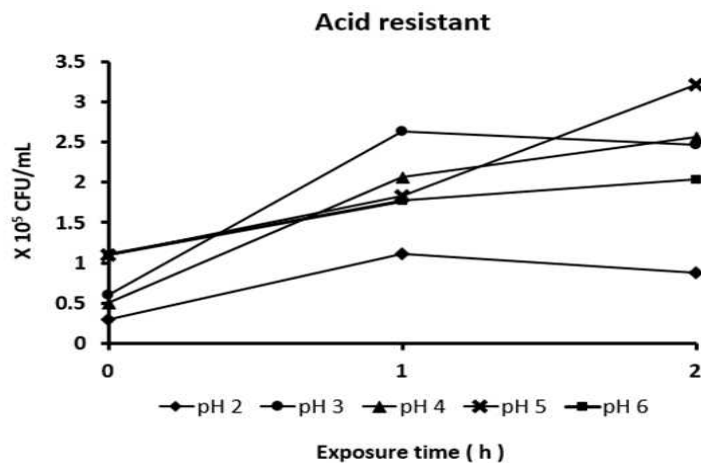


그림 4-17. *Lactobacillus* sp. KNU-02의 내산성 확인

㉞ 제제화된 확보 미생물 소재의 *in vivo* 효능 시험에의 활용 예상

- PCV2b, PRRSV, PEDV의 면역 단백질 발현체 *P. pastoris*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 재조합 균주 및 생균제용 *Lactobacillus* sp. KNU-02에 대한 제제화 가능성.
- 제제화된 소재는 타 효능 평가 연구팀으로 공급, 제제 1 kg 당 사료 1톤 규모와의 혼합에 상응하는 조건으로 실제 *in vivo* 효능 평가 시험에 이용 가능할 것으로 예상됨.

3. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립 (제1협동)

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 리소좀의 항균 지속력 분석 및 산업화를 위한 *in vivo* 분석

(가) 항균활성이 강화된 리소좀의 항균활성 및 안정성 검증

① 재조합 균주에서 추출한 리소좀의 항균활성 및 long term assay

- 리소좀의 항균력 계산: 대장균 1×10^6 CFU/1mg 리소좀 (효모 1L 배양시 150mg 리소좀 분리가능), 효모 1L 배양을 위해 실험실 수준에서 6,700원의 비용이 발생.

표 4-14. 재조합 균주에서 추출한 리소좀의 항균활성

리소좀의 종류 (5% 리소좀)	리소좀의 Mortality (%)					
	Host cell	target protein	Antimicrobial activity			장기보관 80% 활성유지 (상온, 저온)
			<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>X. oryzae</i>	
Normal 리소좀	Normal 효모	-	50.62	45.56	53.21	100일
나노집적화된 리소좀	H ₂ O ₂ 처리된 효모	-	76.88	56.22	61.35	170일
재조합 균주에서 분리된 리소좀	pMBTL-JH	Aminopeptidase Y	83.13	71.28	78.95	100일
	pMBTL-M1	Acid trehalase	53.75	-	-	-
	pMBTL-M2	GTP-binding protein	67.90	69.21	74.54	100일
	pMBTL-T1	Vacuolar protease B	73.14	77.03	81.29	100일
	pMBTL-T2	Thioredoxin 2	52.64	-	-	-

② 알지네이트-올리고당의 제조 방법에 따른 고정화된 리소좀의 항균활성 검증

- alginate lyase 처리시간에 따른 3가지 유형의 알지네이트-올리고당을 제조
- 2% alginate를 준비하여 alginate lyase($\geq 10,000$ unit/g)를 20 unit/g으로 처리
- 반응조건 : Shaking incubation 37 °C에서 150rpm으로 분해
- 반응시간 : 6시간, 12시간, 24시간 (3가지 유형의 알지네이트-올리고당 제조)
- Inactivation : 100°C 끓는 물에 10분 동안 끓인 후 4°C로 식힘
- 동결 건조하여 powder 형태로 -4 °C에서 보관

③ 알지네이트-올리고당의 분석

- MALDI-TOF MS를 통하여 제조한 3가지 유형의 알지네이트-올리고당의 질량분석 진행함. 분석된 알지네이트 단위체는 나트륨이온과 결합한 형태로 측정되어지므로 표 4-15 및 그림 4-18에 나타냄.
- 알지네이트는 6개의 단위체가 붙어있는 Hexamer의 형태를 보이는 것을 확인함
- 효소 분해하여 제조한 3가지 유형의 알지네이트-올리고당의 경우 6시간과 12시간 분해하여 제조한 알지네이트-올리고당은 4개의 단위체가 붙어있는 Tetramer의 형태까지 확인되며, 24시간 분해하여 제조한 알지네이트-올리고당은 3개의 단위체가 붙어있는 Trimer의 형태가 확인됨.

표 4-15. 알지네이트-올리고당 단위체에 따른 질량

Mass(m/z)	Type	
199.5168	M + Na	Monomer
375.5905	M2 + Na	Dimer
551.5859	M3 + Na	Trimer
727.5658	M4 + Na	Tetramer
903.4875	M5 + Na	Pentamer
1080.1603	M6 + Na	Hexamer

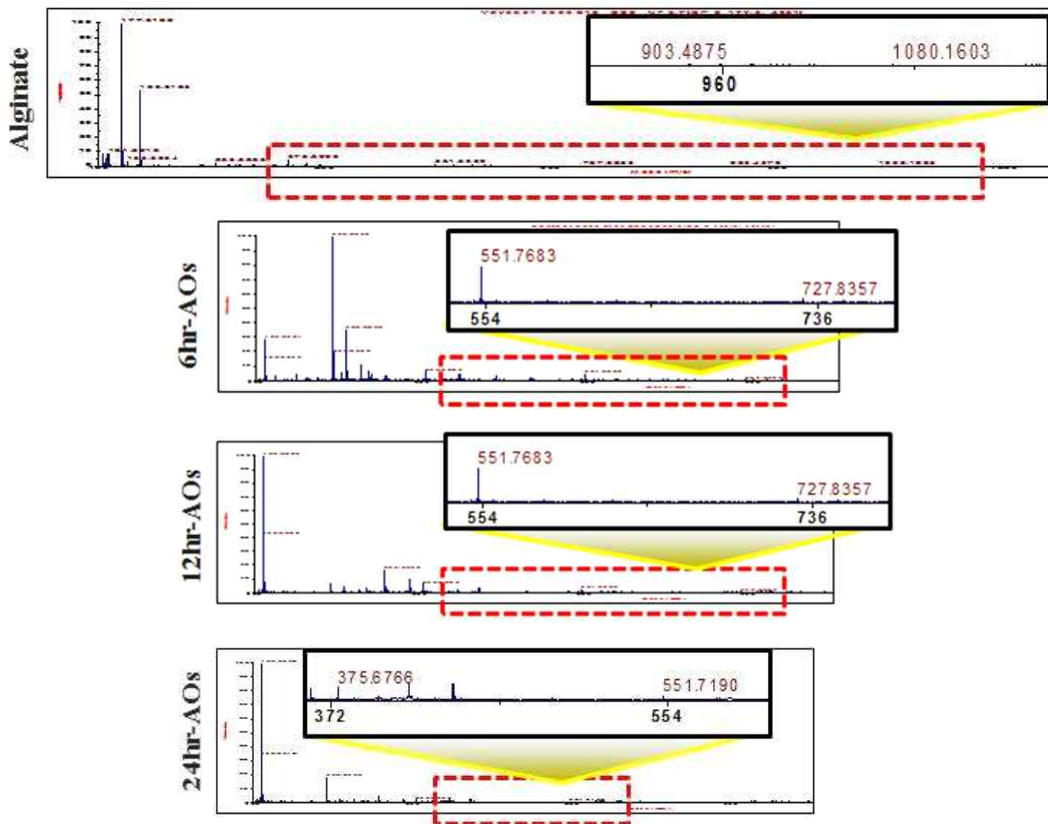


그림 4-18. MALDI-TOF MS에 의한 알지네이트-올리고당의 질량분석

④ 알지네이트에 리소좀을 고정화하여 항균활성 검증

- 알지네이트와 알지네이트-올리고당에 고정된 리소좀을 이용하여 항균활성을 확인한 결과, 고정화된 리소좀의 항균활성이 잘 유지되면서 약 90% 활성이 나타남을 확인함(그림 4-19).
- 3가지 형태의 알지네이트-올리고당에 리소좀을 고정화된 리소좀의 항균활성 모두 농도가 증가할수록 농도에 의존하여 항균력도 증가하는 것을 확인함(그림 4-20).
- 알지네이트 올리고당에 고정된 리소좀을 이용하여 항균활성을 확인한 결과, 12시간 동안 효소처리하여 제조한 알지네이트-올리고당이 가장 높은 항균활성을 보임.

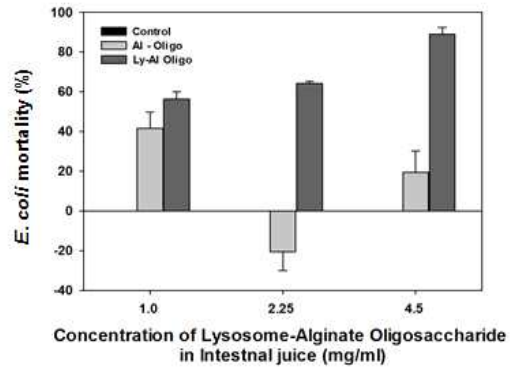
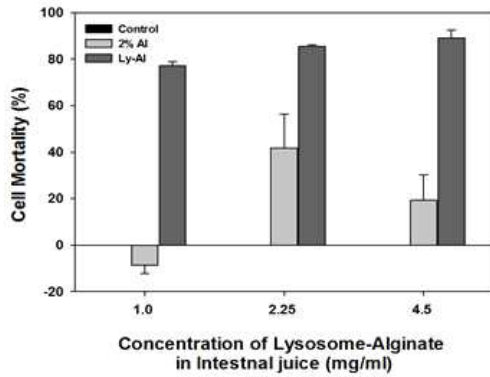


그림 4-19. 알지네이트와 알지네이트-올리고당에 고정화된 리소좀의 항균활성

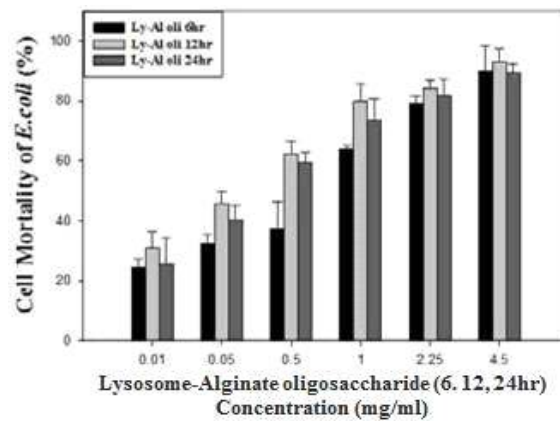


그림 4-20. 3가지 유형의 알지네이트-올리고당에 고정화된 리소좀의 항균활성 비교분석

⑤ 보존제 안에서 리소좀의 활성 유지 확인

- 약물로 사용하기 위하여 약물 보존제에 넣어 리소좀의 활성이 유지되는지 확인
- 타과제에서 리소좀의 활성 평가 : 리소좀을 2013년 8월 화장품 (아이오*세럼)안에 넣은 리소좀의 활성을 확인한 결과, 화장품에 첨가 후 리소좀의 활성이 10개월까지 유지됨을 확인함(그림 4-21).
- 화장품 보존제 : 토코페놀, 파라벤, 페녹시에탄올, 벤질알콜, 이미다졸리디닐우레아, 디아졸리디닐우레아, 15퀴터늄, 디엠디엠히단토인, 프로필렌글라이콜 중 토코페놀, 파라벤, 페녹시에탄올, 벤질알콜, 이미다졸은 의약품 보존제로도 쓰임.
- 화장품 보존제와 동물의약품 보존제에 들어가는 성분이 비슷함으로 동물 의약품에 넣어도 문제가 없을 것으로 예상됨.

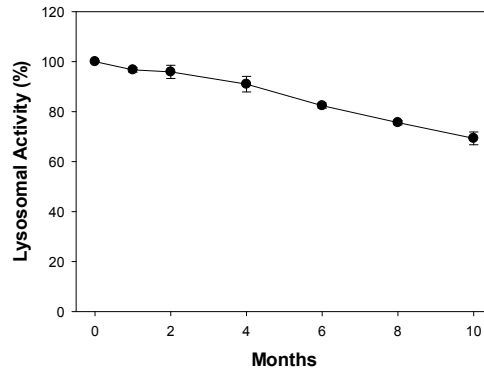


그림 4-21. 화장품에 넣은 리소좀의 항균활성

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

- (1) 말뚝진흙버섯 유래 항인플루엔자 활성물질의 정제, 화학구조 및 생물활성
- 항바이러스 천연물소재 탐색 결과 원료의 수급성과 활성 등을 종합적으로 고려하여 가장 활용성이 높은 소재로 장수진흙버섯(*Phellinus baumii*)을 선발하여 활성성분을 규명하고 neuraminidase 저해 활성, 세포수준에서의 항바이러스 효과를 규명함.
 - 그러나 사료첨가제로서 사용하기에는 원료의 높은 단가가 문제점으로 대두되었고, 이에 따라 가격이 상대적으로 저렴한 중국산 상황으로 불리는 말뚝진흙버섯(*Phellinus igniarius*)에 대하여 활성성분을 규명하고 생물활성을 평가함.

(가) 말뚝진흙버섯 유래 항바이러스 활성물질의 분리 및 정제

- 말뚝진흙버섯 메탄올 추출물로부터 활성성분을 분리, 정제하였으며 그 과정은 그림 4-22와 같음.
- 말뚝진흙버섯을 메탄올로 추출한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물을 확보하였음. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁하고, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 극성에 따라 분획하여 분획물을 확보함.
- 분획물의 neuraminidase 저해 활성 측정 결과, ethyl acetate 분획물이 가장 강한 활성을 나타냄.
- 활성이 강한 ethyl acetate 분획물을 methanol을 용출용매로 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 fraction 1, 2, 3을 얻음. Fraction 2는 순도를 HPLC로 확인한 결과 높은 순도를 나타내어 PIE-1로 명명함. Fraction 1과 fraction 3은 각각 70% aqueous methanol을 용출용매로 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시함. 그 결과 fraction 1과 3으로부터 각각 화합물 PIE-2, PIE-3을 정제함.

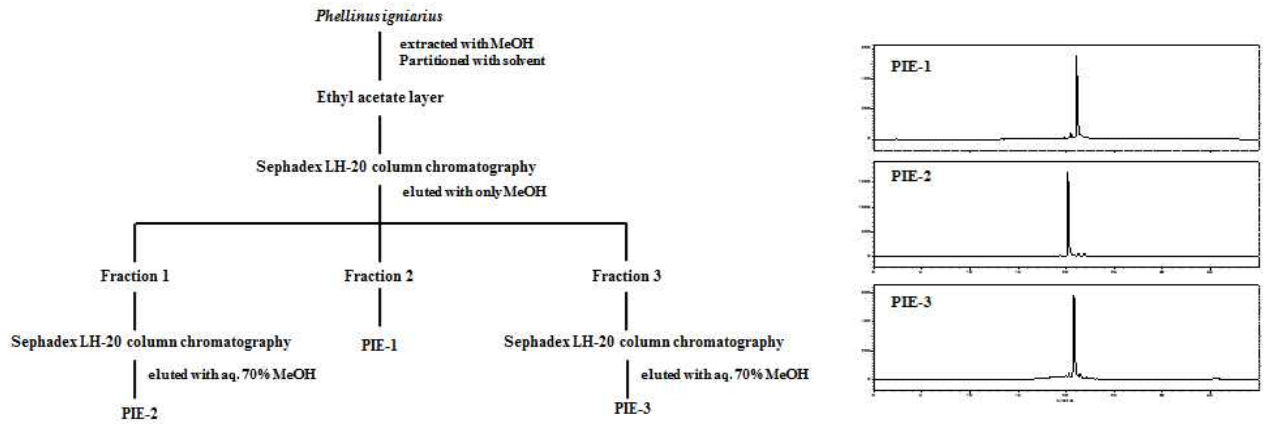


그림 4-22. 말뚝진흙버섯 메탄을 추출물로부터 활성성분의 분리, 정제 및 정제한 화합물의 HPLC profile

(나) 말뚝진흙버섯으로부터 분리한 neuraminidase 저해 물질의 화학구조

① 화합물 PIE-1의 화학구조

- 말뚝진흙버섯으로부터 정제한 화합물 PIE-1의 화학구조를 규명하기 위하여 pyridine- d_6 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- ^1H NMR spectrum을 측정한 결과, 9.17 (1H, s, H-10), 8.28 (1H, s, H-7), 7.67 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-2'), 7.64 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-4'), 7.29 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7'), 7.20 (1H, H-8'), 6.84 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-1'), 6.43 (1H, s, H-4) ppm에서 피크가 관찰되었으며(그림 4-23), 이들 데이터를 근거로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 phelligridin D로 동정함(그림 4-24).

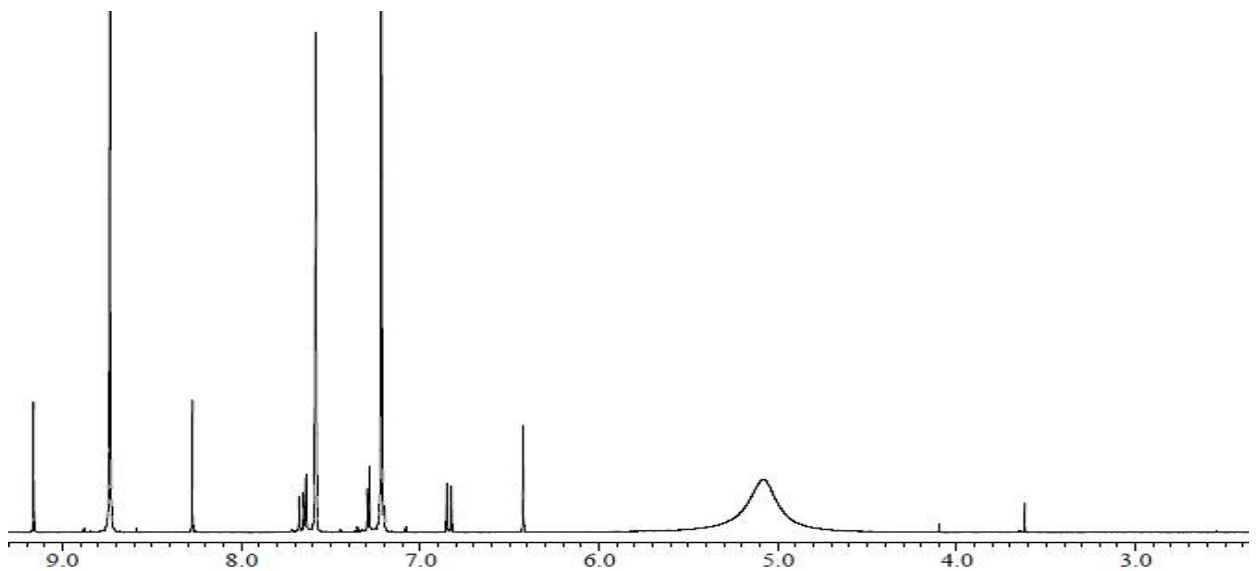


그림 4-23. 활성물질 PIE-1의 ^1H NMR spectrum

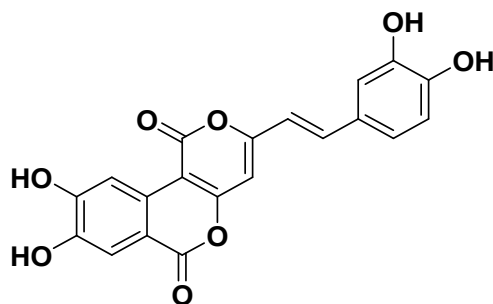


그림 4-24. 활성물질 PIE-1의 화학구조

② 화합물 PIE-2의 화학구조

- 말뚝진흙버섯으로부터 정제한 화합물 PIE-2의 화학구조를 규명하기 위하여 DMSO-*d*₆에 녹여 NMR spectrum을 측정하여 해석함.
- ¹H NMR spectrum 을 측정한 결과 8.30 (1H, s, H-10), 7.86 (1H, s, H-3'), 7.48 (1H, s, H-7), 6.98 (1H, s, H-4'), 6.62 (1H, s, H-7'), 6.16 (1H, s, H-4). 6.09 (1H, s, H-4''), 2.49 (1H, s, H-6'') ppm에서 피크가 관찰되었으며(그림 4-25), 이들 데이터를 근거로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 phelligridin E로 동정함(그림 4-26).

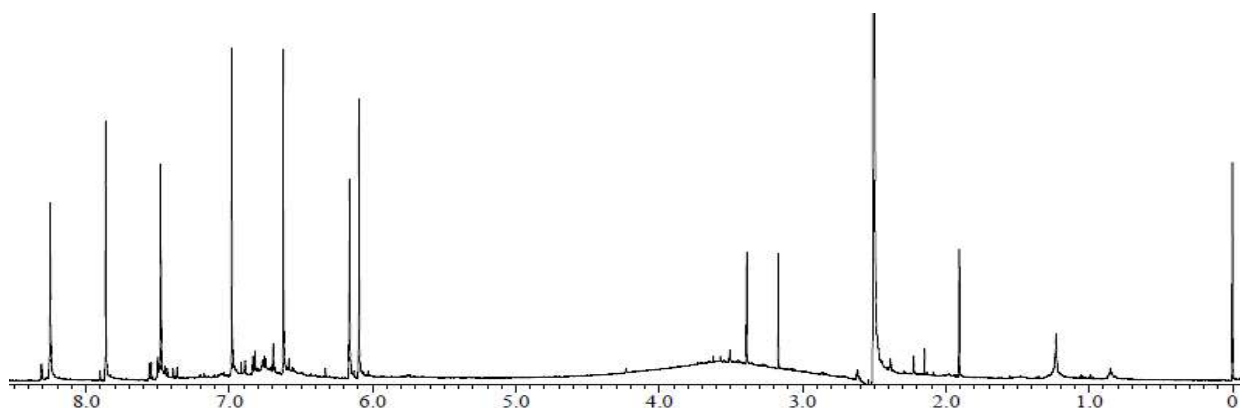


그림 4-25. 활성물질 PIE-2의 ¹H NMR spectrum

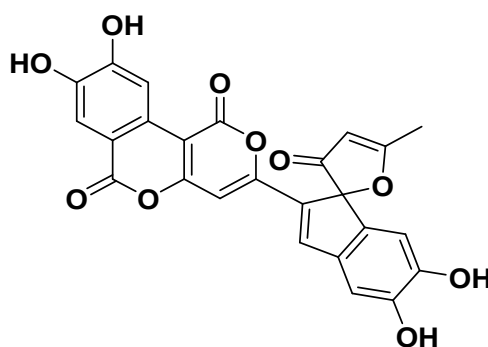


그림 4-26. 활성물질 PIE-2의 화학구조

③ 화합물 PIE-3의 화학구조

- 말뚝진흙버섯으로부터 정제한 화합물 PIE-3의 화학구조를 규명하기 위하여 DMSO-*d*₆에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석함.

- ^1H NMR spectrum을 측정한 결과 8.28 (1H, s, H-10), 7.86 (1H, s, H-3'), 7.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-2''), 7.49 (1H, s, H-7), 7.17 (1H, d, $J = 2.1$ H-10b), 7.10 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-9), 7.09 (1H, d, $J = 2.1$ H-3'a), 7.01 (1H, s, H-1), 6.80 (1H, d, H-7'''), 6.62 (1H, s, H-7'), 6.25 (1H, s, H-4''), 6.02 (1H, s, H-4) ppm에서 피크가 관찰되었으며(그림 4-27), 이들 데이터를 근거로 문헌 및 database 검색을 실시한 결과, 본 화합물을 phelligridin G로 동정함(그림 4-28).

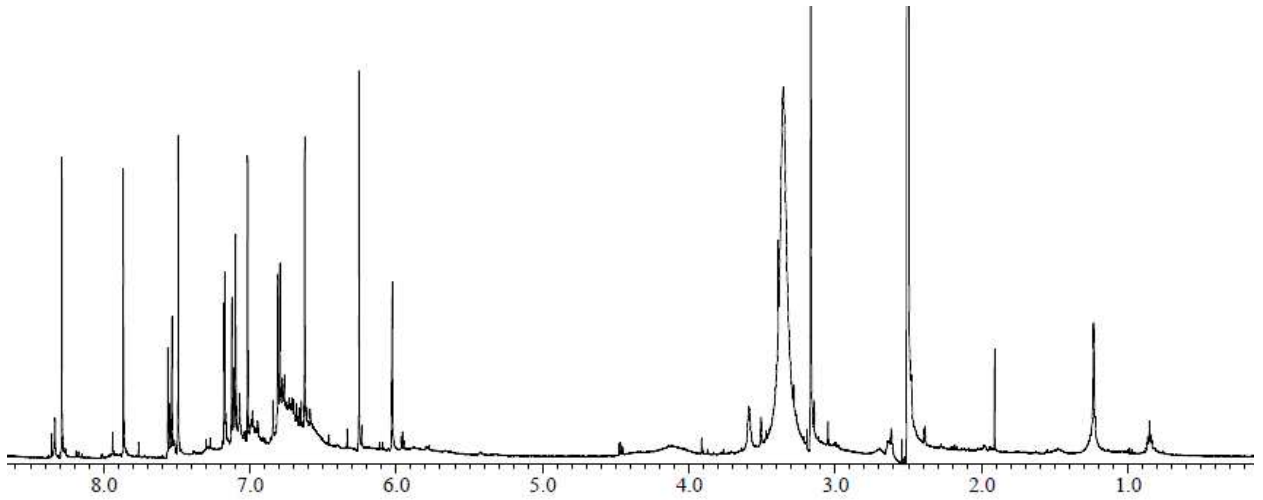


그림 4-27. 활성물질 PIE-3의 ^1H NMR spectrum

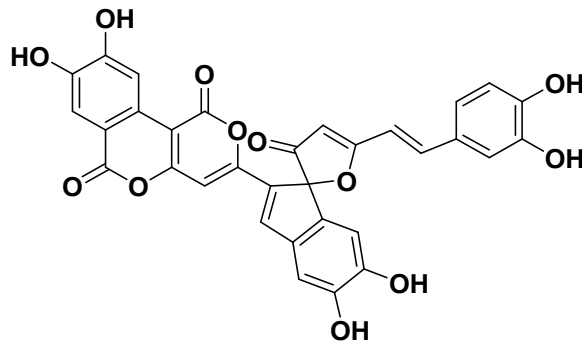


그림 4-28. 활성물질 PIE-3의 화학구조

(다) 말뚝진흙버섯 활성화합물의 neuraminidase 저해 활성

- 말뚝진흙버섯의 neuraminidase (H1N1) 저해활성물질로 phelligridin D, phelligridin E, phelligridin G를 분리하고 동정함.
- 이들 화합물의 neuraminidase 저해 활성에 대한 IC_{50} 값은 각각 11.62, 8.09, 7.99 μM 이었음(표 4-16). 이들 화합물은 말뚝진흙버섯의 neuraminidase 저해 활성의 주요 원인 물질로 강한 저해활성을 나타냄.

표 4-16. 말뚝진흙버섯 활성화합물의 neuraminidase (H1N1, H3N2) 저해 활성

Samples	IC ₅₀ (μM)	
	H1N1	H3N2
PIE-1 (Phelligridin D)	11.62	10.10
PIE-2 (Phelligridin E)	8.09	6.69
PIE-3 (Phelligridin G)	7.99	6.67
Zanamivir (nM)	1.29	1.90

(2) 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 추출물의 활용성 검토

(가) 장수진흙버섯 및 말뚝진흙버섯 추출물의 제조

- 전술한 바와 같이 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 자실체 추출물이 강력한 neuraminidase 저해 활성을 나타내는 것을 밝히고, 장수진흙버섯으로부터 5종의 활성성분인 hispidin, hypholomine B, inoscavin A, davallialactone, phelligridin D를 분리하고, 말뚝진흙버섯으로부터 3종의 활성성분인 phelligridin D, phelligridin E, phelligridin G를 분리하여 이들의 항인플루엔자 활성을 조사함.
- 본 연구에서는 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 중 보다 우수한 소재를 선발한 후 산업화 연구를 수행하기 위하여 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯의 활성분획인 ethyl acetate 분획물을 그림 4-29와 같이 제조하여 HPLC로 비교함.

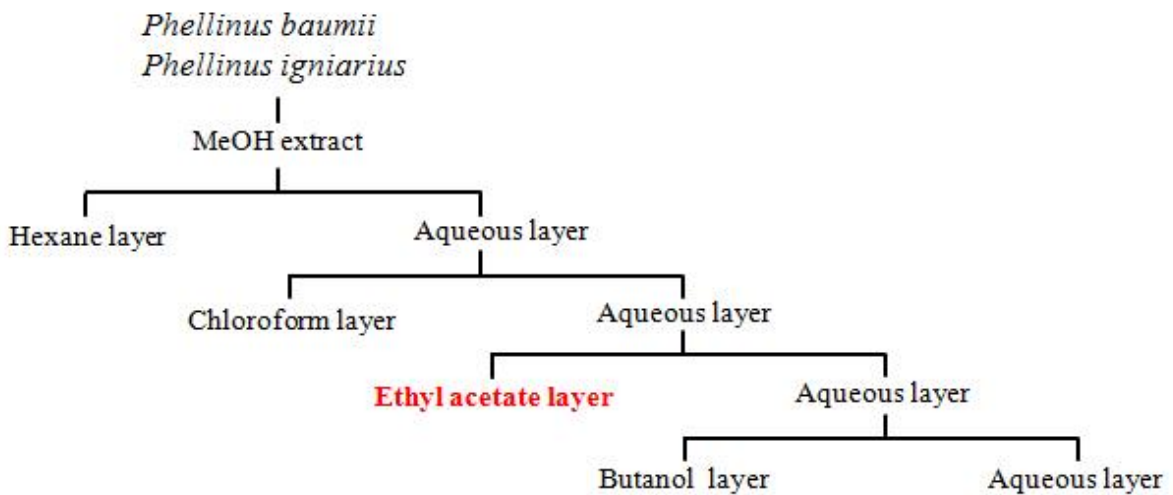


그림 4-29. 활성물질 PIE-3의 화학구조

(나) 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 ethyl acetate 분획물의 HPLC profile의 비교

- 본 연구를 통하여 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 추출물이 강력한 neuraminidase 저해활성을 나타내는 것을 확인함. 따라서 산업화 가능성을 타진하고 보다 우수한 소재를 선별하기 위하여 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯의 ethyl acetate 분획물을 제조한 후 HPLC를 이용하여 pattern 분석을 수행함(그림 4-30).
- HPLC 조건으로 기기는 HITACHI (ELITE Lachrom, Japan)를 사용하였고, column 은 C₁₈ (TOSOH, i.d. 4.6 × 150 mm)을 사용하였으며, 이동상으로는 A: 5%

methanol/0.04% trifluoroacetic acid, B: methanol 용매를 이용하여 10-100% methanol gradient (40 min)를 사용함. 유속은 1.0 ml/min로, 검출은 UV 380 nm에서 수행함.

- 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 ethyl acetate 분획물 10 mg을 정확히 달아 HPLC 용매탄을 1 mL에 녹인 후 0.45 μ m membrane filter로 여과한 여액을 HPLC로 분석함. 그 결과 활성물질의 조성과 함량이 매우 다르며 장수진흙버섯은 davallialactone, phelligrudin D 등이 주성분인 반면 말뚝진흙버섯은 phelligrudin D, phelligrudin E (Rt 28.3), phelligrudin G (Rt 28.8)가 주성분임을 확인함.
- 추출물의 수율과 활성성분의 상대적인 함량에서 장수진흙버섯이 우수하게 나타남. 따라서 장수진흙버섯 ethyl acetate 분획물을 이용한 추가적인 효능평가를 수행함.

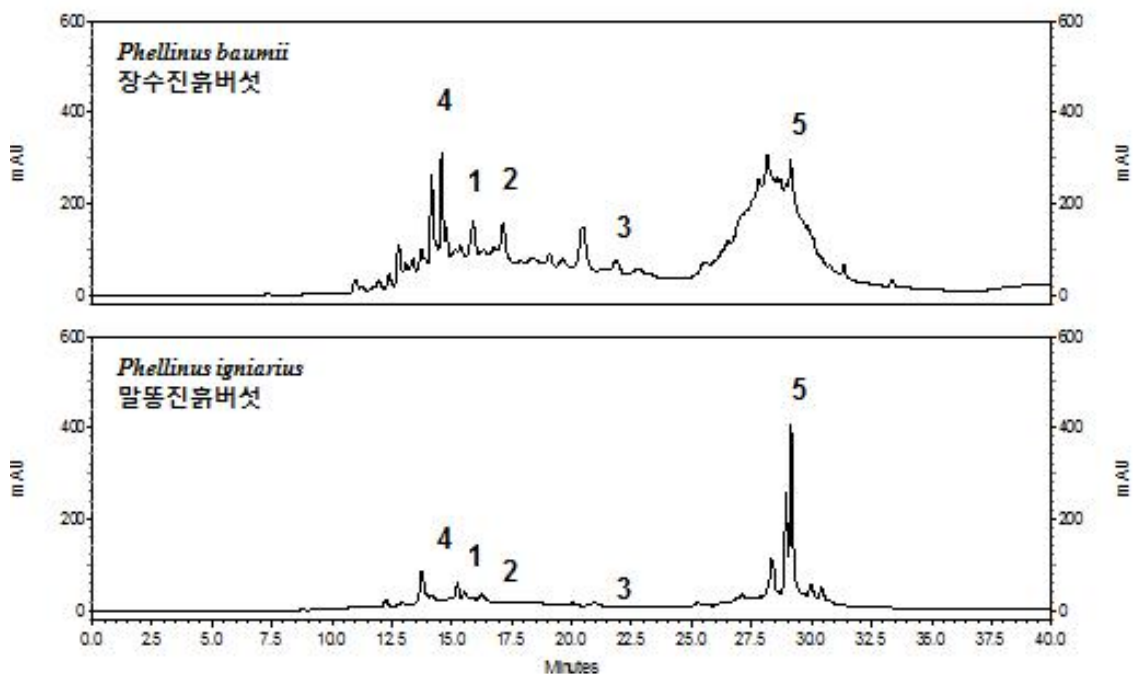


그림 4-30. 장수진흙버섯과 말뚝진흙버섯 ethyl acetate 분획물의 HPLC profile
1, hispidin; 2, hypholomine B; 3, Inoscavin A; 4, davallialactone; 5, phelligrudin D.

(다) 장수진흙버섯 ethyl acetate 분획물의 바이러스 억제능과 세포독성 분석

① Neuraminidase 저해활성 검정

- 장수진흙버섯 ethyl acetate 추출 분획물의 neuraminidase H1N1과 H9N2 저해활성을 측정한 결과 각각 IC₅₀ 값이 34.55, 424.69 μ g/ml로 나타남(표 4-17).
- 이는 항바이러스제인 zanamivir에 비하여 현저히 약한 활성임. 그러나 활성 화합물들의 경우에서도 neuraminidase 저해활성은 낮게 나타났으나 세포실험에서는 우수한 활성을 나타낸 바 세포수준에서의 인플루엔자 바이러스에 대한 증식 저해 효과를 검정함.

표 4-17. 장수진흙버섯 ethyl acetate 추출 분획물의 neuraminidase 저해활성

Samples	IC ₅₀ (µg/mL)	
	H1N1 (NWS)	H9N2 (MS96)
장수진흙버섯 ethyl acetate 추출물	34.55 ± 3.31	424.69 ± 14.74
Zanamivir (Relenza®)	0.44 ± 0.23	0.73 ± 0.18

② 세포독성 및 인플루엔자 바이러스에 대한 증식 저해 효과

- 장수진흙버섯 ethyl acetate 추출 분획물의 세포독성을 측정함. 그 결과, 50 µg/ml에 서도 세포독성을 나타내지 않음. 그러나 인플루엔자 바이러스에 대한 증식 저해 효과는 1.05 µg/ml로 항인플루엔자제제인 oseltamivir와 유사한 활성을 나타냄(표 4-18).
- 비록 neuraminidase의 저해 효과는 neuraminidase 저해활성을 기전으로 하는 항인플루엔자 제제들 즉 zanamivir, oseltamivir 보다 낮은 활성을 나타내었으나 인플루엔자 바이러스에 대한 증식 저해 효과는 항인플루엔자 제제들에 버금가는 효과를 나타냄.
- 이 같은 이유는 장수진흙버섯 ethyl acetate 추출 분획물이 neuraminidase 저해 효과 이 외에 다른 항인플루엔자 기전을 통하여 강한 바이러스 증식 저해 효과를 나타내는 것으로 유추됨.

표 4-18. 장수진흙버섯 ethyl acetate 추출물의 세포독성과 인플루엔자 바이러스 증식 저해 효과

Samples	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	TI
PBE	> 50	1.05 ± 0.09	> 28.90
Oseltamivir	-	1.08 ^a	-

CC₅₀ : Concentration required to reduce cell growth by 50%

IC₅₀ : 50% inhibitory concentration

TI : Therapeutic index = CC₅₀/IC₅₀

^aOseltamivir IC₅₀ reported by Sharma et al., 2013

(Emerging Microbes and Infections, 2013, 2, e54)

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) Organelle marker 형질전환 식물체 개발

- 식물바이러스를 세포생물학적인 측면에서 연구를 진행시키기 위하여 각각의 세포소기관에서 GFP를 발현하는 식물체가 필요하므로 이를 제작하였음(그림 4-31).

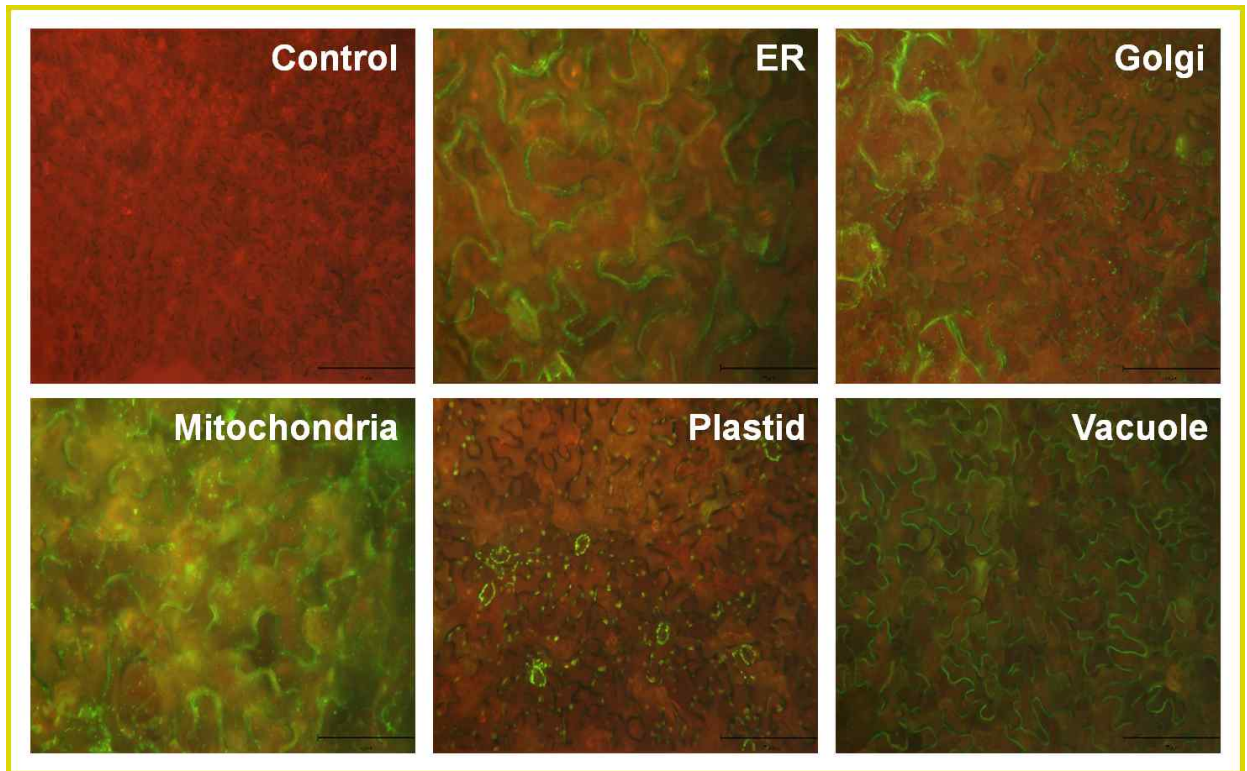


그림 4-31. Organelle marker. Endoplasmic reticulum (ER), golgi, mitochondria, plastid and vacuole에서 형광단백질을 발현하는 형질전환 *Nicotiana bethamiana*

(2) Gene silencing suppressor 와 형질전환 식물체 개발

- 아래에 기술한 Gene silencing suppressor를 pBin61 binary vector에 넣어 *Nicotiana bethamiana*와 *N. tobaccum* 형질전환체를 만드는데 사용하였으며 외래유전자인 GFP 발현 증가에 관하여 조사하였음(그림 4-32).
- Gene silencing suppressor가 없는 빈 벡터만을 넣은 형질전환체인 pBin61은 wild type와 거의 차이를 보이지 않았으나, gene silencing suppressor가 발현하는 형질전환체는 gene silencing suppressor가 발현하는 형질전환체는 *N. bethamiana*나 *N. tobaccum*에 관계없이 wild type와 다른 외관(키)을 보였음(그림 4-33).
- Gene silencing suppressor가 GFP발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 형질전환체는 *N. bethamiana*를 이용하여 실험을 진행 시켰음(그림 4-34와 4-35).
- Gene silencing suppressor p19과 2b를 발현하는 형질전환 *Nicotiana bethamiana*에서 Agrobacterium infiltration법에 의한 외래유전자의 GFP 발현과 PVX 기반 viral vector 의한 외래유전자의 GFP 발현을 조사한 결과(그림 4-34와 그림 4-35). Gene silencing suppressor p19과 2b가 발현되는 형질전환체에서 더 높은 GFP의 발현양을 보였음.

Rice yellow mottle virus P1

atgacacggttggaagttcttatacaccgactcagcagactgtggcaaaagccatcggcgggctatacgcactcgtcacctgggttgga
ttctcagacctgggacgttgacgcagtgaaacgatccagttctcagcggcacttcaaccggagagggttggtgggtgctcagtgctgttgcct
gtactcgggtacggctactactacacgtgtgagcaggtgaagtattctgtaataaccacctgtgcactacgacgtggtgtgtgccattgcg
agcgcagtgttcaagaggacgacgagatcgaccgtgagcacaacgagcgtaacgcagagatttctgctgcaacgctcgggctctgagtgag
ggccggccagcaaccctgggttacctctctcgagacgttgtgatatccccgagcactccggtacgtccggttcgacaagtacctcaatttctga

Tomato bushy stunt virus P19

atggaacgagctatacaaggaacgacgctagggacaagctaacagtgaacgttgggatggaggatcaggaggtaccacttctccctcaaa
cttctgacgaaagtccgagttggactgagtgggcgtacataacgatgagacgaattcgaatcaagataatccccttggttcaaggaaagctg
gggttcgggaaagtgtatttaagagatatctcagatacagcaggacggaagcttactgcacagagtcttggatcttgacgggagattcgg
ttaactatgcagcatctcgattttcggtttcgaccagatcggatgtacctatagtattcggtttcgaggagttagtaccggttctggagggtcgc
gaacttctcagcatctctgtgagatggcaattcgggttaagcaagaactgctacagcttgcccaatcgaagtggaaagtaatgtatcaaggagat
gcctgaaggtactcaaaccttcgaaaaagaaagcgagtaa

African cassava mosaic virus AC2

atgcaatctcatcaccctcacagaaccacttactcaggttccaatcaaagtcaatcacagacaattcaagaagcgagccatccggcgtagggcg
gtggatctgtctgtggctgttcatattacctccatataactgtctcaatcatggattacgcacaggggaactcatcactgtctcctcaagcaatga
atggcgtgtatacctgggaaataaacaatcccctgtatttcacaataaccaggcaccaacaacgaccattctgtgaaccaggacatcataacag
tccaggttcgattcaatcacaacctgaggaaggcgtggggattcacaatgttttctcaactcaagatctggacaccttacagcctccgactg
gtcttttctaagggtctttaa

Cucumber mosaic virus 2b

atggatgtgtgacagtagtggtgtcgaccgccacctccactagcccacctgcaggaggtgaaacgtcgaagacgaaggctcacgtcaga
aaccggcgagcgaggggttacaaaagtcccagcgagagagcgcgatctatagcgagactttccagatgtaccattccacggagtagatccc
gtggattggttctctgatgctgttcgctctccgtccgttaccagcctgtttcctacgaatcctttgatgatactgattggttctggtaacgaatggg
ccaagggtcgttttga

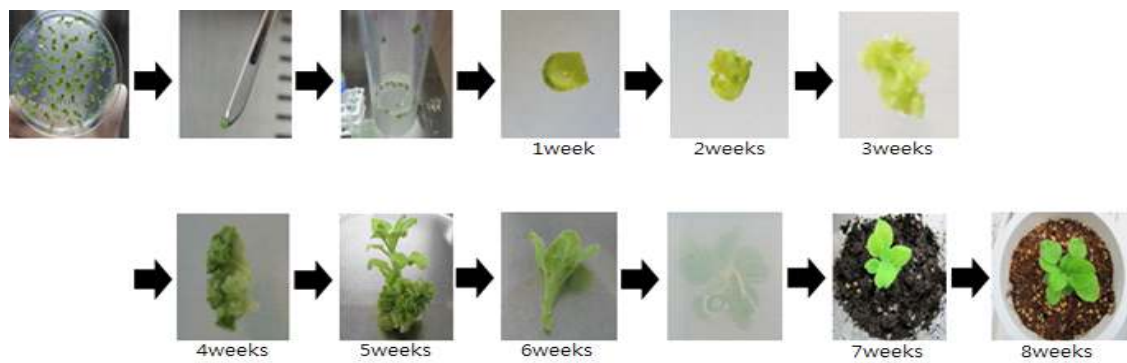


그림 4-32. 형질 전환체 만드는과정

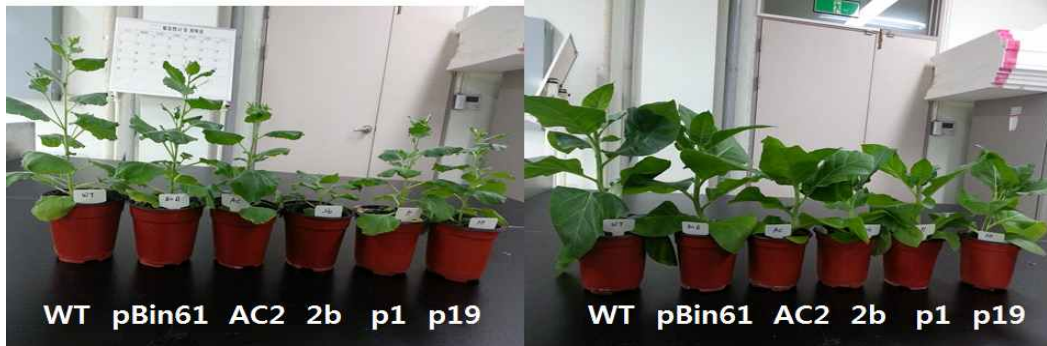


그림 4-33. Gene silencing suppressor을 발현하는 형질전환. *Nicotiana bethamiana*. *N. tobaccum*. African cassava mosaic virus-AC2, Cucumber mosaic virus-2b, Rice yellow mottle virus-P1, Tomato bushy stunt virus-P19, WT는 비형질전환체이고 pBin61은 gene silencing suppressor가 없는 빈 벡터만을 넣은 형질전환체임

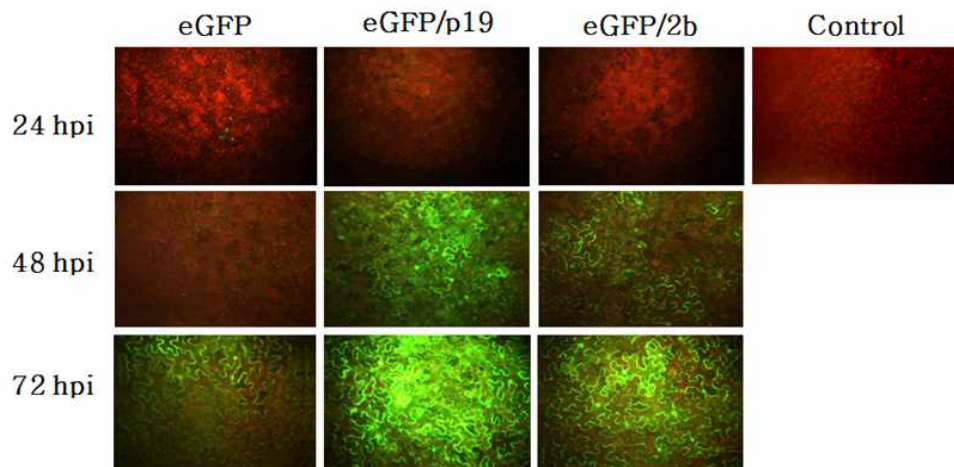


그림 4-34. Gene silencing suppressor p19과 2b를 발현하는 형질전환 *Nicotiana bethamiana*에서 Agrobacterium infiltration법에 의한 외래유전자의 GFP 발현

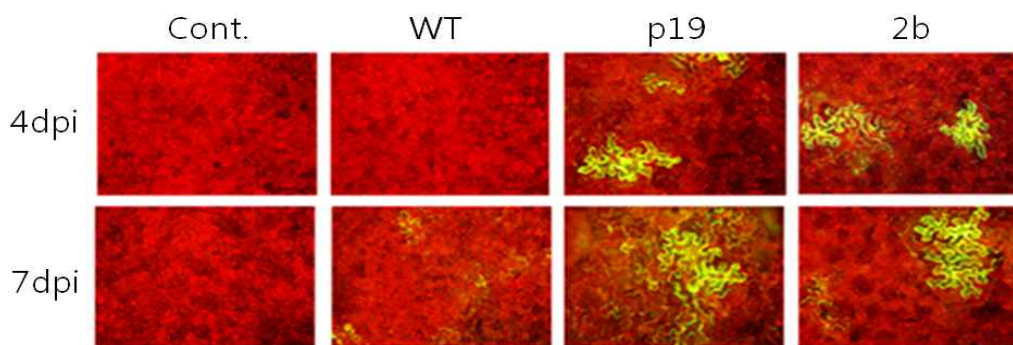


그림 4-35. Gene silencing suppressor p19과 2b를 발현하는 형질전환 *Nicotiana bethamiana*에서 PVX 기반 viral vector 의한 외래유전자의 GFP 발현

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

(1) 신소재 구조구명 및 단일·복합제제의 목적동물에 대한 효능평가

(가) 항미생물펩타이드(AMP) 항균효능평가

- 제3협동에서 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물펩타이드(AMP) 개발의 일환으로 4년차에 개발한 PR26과 buforin(BFV II)에 대하여 표준균주들을 대상으로 항균효능평가를 수행하였음.
- ① BFV II에 대한 표준균주들의 최소억제농도(표 4-19와 4-20)
 - AMP의 항균효능은 두 가지 방법(Spot assay & Microbial Viability Assay Kit인 WST-8)을 이용하여 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC)와 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 확인하였음.
 - AMP 항균효능을 위한 공시균주 11종중에서 *S. Gallinarum* ATCC 9184와 *S. Typhimurium* ATCC 14028의 최소살균농도는 128 ug/ml로 가장 감수성이 높은 것으로 확인되었고, 최소살균농도보다 2~3배 낮은 농도에서도 항균활성이 있는 것으로 관찰되었음.
 - 7종의 표준균주들을 대상으로 BFV II에 대한 항균력을 확인한 결과, *S. Gallinarum* ATCC 9184에 높은 감수성이 관찰되었고, 반면에 나머지 6종의 표준균주들에 대한 감수성은 아주 낮은 것으로 확인되었음.

표 4-19. PR26에 대한 공시균주들의 최소살균농도

No.	Reference strains	complete inhibition to PR26(ug/ml)
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512
2	<i>Escherichia coli</i> MRA-076 (야외주)	512
3	<i>Salmonella</i> Gallinarum ATCC 9184	128
4	<i>Salmonella</i> Gallinarum MRA-236 (야외주)	512
5	<i>Salmonella</i> Cholerasuis ATCC 10708	512
6	<i>Salmonella</i> Dublin ATCC 15480	256
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	128
8	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	256
9	<i>Escherichia coli</i> F18	1,024
10	<i>Escherichia coli</i> K88	>2,048
11	<i>Escherichia coli</i> K99	256

표 4-20. BFV II에 대한 표준균주들의 최소억제농도

No.	Reference strains	Sensitivity to BFV II (ug/ml)
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>512
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>512
3	<i>Salmonella</i> Gallinarum ATCC 9184	16
4	<i>Salmonella</i> Pullorum ATCC 10398	>512
5	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	>512
6	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	>512
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>512

② 백혈구 용해능 평가

- 혈액 내 세포들의 안전성(safety)을 평가하기 위해 배양된 chicken red blood cell에 총 4종의 AMP를 각각 농도별로 혼합하고 2시간 반응한 후 백혈구의 용해능을 OD 590nm에서 측정하였음.
- 4종의 AMP 중에서 PR26은 백혈구의 용해능 수치가 처리농도들 간에 큰 차이가 없었고 상위농도인 256ug/ml에서도 <10으로 나머지 AMP들보다 용해능이 가장 낮은 것으로 확인되었음(표 4-21).

표 4-21. AMP의 백혈구 용해능 평가^a

AMP conc. (ug/ml)	Hemolytic rate (%) by AMP treatment			
	PG1	PMAP36	PR26	BFV II
양성대조군	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
음성대조군	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
256	15.9±1.76	32.0±4.63	9.1±1.81	46.8±6.35
128	15.1±0.21	24.2±3.80	9.0±1.72	30.9±2.22
64	13.5±2.23	17.0±2.32	8.3±2.29	19.3±2.00
32	11.6±2.87	10.8±1.60	7.7±1.10	13.4±1.23
16	9.0±1.86	7.5±0.95	6.4±1.59	11.4±1.31
8	8.0±0.81	5.1±0.79	6.3±0.46	10.9±0.06

^a양성대조군, 0.1% Triton-X100 처리; 음성대조군, PBS 처리. 백혈구 용해능(%)은 3회 반복시험 평균

③ AMP 향균성 평가

- SPF 닭 혈청과 3종의 AMP를 각각 혼합하여 0, 1, 2, 4, 8시간 반응시키고 그 혼합액들을 96 well microtiter plate에 농도별로 희석(2,048, 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1ug/ml)한 후, 목적하는 세균배양액(AMP 감수성 균주)을 넣고 37도에서 일주야 배양, OD 값을 측정하여 세균의 최소억제농도를 관찰하였음.
- 3종의 AMP 중에서 PR26은 혈청과 4시간까지 반응시킨 혼합액에서 가급티프스에 대한 향균효능이 지속되는 것을 확인할 수 있었고, 반면에 나머지 2종의 AMP는 기존 억제농도보다 약 3~4배 증가하였다(표 4-22).

표 4-22. 혈청처리에 따른 AMP 항균성 평가

Reaction time with chicken serum(hour)	MICs(ug/ml) of target strains by AMPs		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Gallinarum</i> ATCC 9184	
	PMAP36	PR26	BFV II
No reaction	≥64	≥64	≥16
0	>256	64	>256
1	>256	64	>256
2	>256	64	>256
4	>256	64	>256
8	>256	1,024	>256

④ 결과요약

- 4차년도에 만들어진 2종의 항미생물펩타이드 PR26과 BFV II에 대한 최소살균농도와 최소억제농도를 확인한 결과, 가금티프스균인 *Salmonella Gallinarum*에서 높은 감수성이 관찰되었다. AMP의 안전성을 확인하기 위해, AMP를 혈액과 반응시켰을 때 PR26은 혈중 백혈구 용해능이 가장 낮은 것을 확인하였고, 혈청과 반응에서도 항균능력이 지속되었음.
- 본 과제의 연구기간동안 총 4종의 AMP에 대한 항균효능이 확인되었는데 이들 중에서 PMAP36과 PR26이 대부분의 공시균주들에서 높은 항균효능을 가지고 있었음.

(나) 천연물소재추출물의 항바이러스 활성

- 제1협동에서 제공한 천연물소재 장수진흙버섯 추출물인 PB-E를 대상으로 neuraminidase 활성과 저해효과를 평가하였음.

① Neuraminidase 저해활성 측정 결과

- 장수진흙버섯 추출물 PB-E 물질을 2개의 농도로 설정하여 H1N1의 측정결과에서 효소활성의 50%를 억제하는 농도인 IC₅₀ 값이 각각 34.55 ± 3.31ug/ml, 26.35 ± 10.99ug/ml로 확인되어 높은 저해활성이 확인되었음(표 4-23).
- 그러나 H9N2와의 측정결과에서 IC₅₀ 값은 각각 424.69 ± 114.74ug/ml, 575.59 ± 18.74ug/ml로 중등도 활성을 확인하였음. 항인플루엔자 바이러스 의약품으로 사용되는 자나미비르(zanamivir)는 2종류의 인플루엔자 바이러스에서 IC₅₀ 값이 각각 0.44 ± 0.23ug/ml, 0.73 ± 0.18ug/ml로 뛰어난 neuraminidase 저해활성을 가지고 있었음.

② PB-E의 항바이러스 활성 및 세포독성

- MDCK 증식세포에 H1N1을 감염시키고 neuraminidase 저해활성이 있는 PB-E 물질을 투여하여 항바이러스능 여부를 판정하였음.
- PB-E 물질은 항인플루엔자 의약품인 osteltamivir와 유사하게 강한 활성을 보였고 독성이 낮은 것으로 관찰되었다(표 4-24).

③ 결과요약

- 3차년도 연구기간부터 제1협동에서는 천연물소재인 장수진흙버섯과 목질진흙버섯에

- 서 여러 종류의 화합물을 정제하여 항바이러스 효능을 지속적으로 관찰하였음.
- 4차년도 연구기간에 5종의 정제물질 중에서 1종(PB-E)을 제공받아 양계분야 효능 평가팀에서 neuraminidase 활성과 항바이러스 효능을 확인하였음.

표 4-23. Neuraminidase 저해활성 측정 결과

No.	Compound	IC ₅₀ (μg/ml)	
		H1N1(NWS)	H9N2(MS96)
1	PB-E(10.8mg)	34.55 ± 3.31	424.69 ± 114.74
2	PB-E(7.9mg)	26.35 ± 10.99	575.59 ± 18.74
대조군	Zanamivir	0.44 ± 0.23	0.73 ± 0.18

IC₅₀, 50% inhibitory concentration. Zanamivir(Relenza®). Inhibitory effects to IC₅₀: ≤10 ug/ml, Excellent; ≤500, Good; >500, Medium.

표 4-24. MDCK 세포에서 PB-E의 세포독성 및 인플루엔자 바이러스(H1N1) 증식 저해효과

No.	Compound	CC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)	TI
1	PB-E	>50	1.05±0.09	>28.90
대조군	Oseltamivir (Tamiflu®)	-	1.08 ^a	-

CC₅₀, Concentration required to reduce cell growth by 50%.

IC₅₀, Concentration required to inhibit virus-induced cytopathic effect(CPE) by 50%.

TI, Therapeutic index = CC₅₀ / IC₅₀.

^a,Oseltamivir IC₅₀ was reported by Sharma *et al.*, 2013(Emerging Microbes and Infections, 2013 2, e54).

(다) 양계질병모델 대상 물질효능평가

- 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형개발 및 산업화의 일환으로 제5협동인 삼양애니팜에서 만든 양계용 신규 난황항체제제(IgY)를 가금티프스 감염모델에 사료첨가제로 투여하여 폐사율을 포함한 평가지표들을 분석하여 방어효과를 확인하였음.

① 가금티프스 질병모델 구축

- 난황항체제제 효능평가에 앞서 육계에서 가금티프스 질병모델 구축하였음.
- 산란계는 가금티프스에 대한 생균백신을 투여하기 때문에 육계를 질병모델로 이용하였다. 접종군 선발은 가금티프스가 발생한 토종닭에서 분리한 야외균주를 사용하였음.
- 1주령과 2주령 닭 병아리에 근육접종 결과, 10^{8~9}CFU 접종수준에서 약 50~60% 폐사율 관찰되었음(표 4-25와 4-26).

표 4-25. 닭 병아리 1주령에서 *Salmonella Gallinarum*(SG) 야외주 접종에 따른 폐사율

Strains (N=6)	Challenge (CFU)	Mortality(day post inoculation, DPI)										No. of dead bird (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Control	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6 (0.0)
SG	1.8×10^5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1/6 (16.7)
	1.8×10^8	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3/6 (50.0)

표 4-26. 닭 병아리 2주령에서 SG 야외주 접종에 따른 폐사율

Strains (N=5)	Challenge (CFU)	Mortality(DPI)										No. of dead bird(%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Control	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0.0)
SG	1.8×10^5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0/5 (0.0)
	1.8×10^9	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3/5 (60.0)

② 양계용 신규 IgY 제품 효능평가 결과

- 농장에서 사료첨가로 투여하는 제품들의 기본 농도에 준하여 양계용 IgY를 0.2%로 음수와 사료로 각각 전 사육기간 급여하였다. 닭 병아리 1주령에 SG 야외주를 근육으로 접종하여 평가지표를 확인한 결과, 양성대조군(G2)의 폐사율은 75%, IgY 0.1%와 0.2% 사료처리군들은 모두 66.6%로 확인하였음(표 4-27).
- 양성대조군 폐사율 대비 IgY 사료처리군들의 방어율은 11.2% 이었다. IgY 투여 후 1주령과 2주령 병아리의 혈청에서 가금티프스 역가를 측정된 결과, 1주령에는 확인되지 않았고 2주령에 생존개체들의 70~80%에서 2¹ FT 역가를 확인하였음(표 4-28).

표 4-27. 가금티프스 1주령 감염모델을 이용한 양계용 난황항체(IgY) 급여에 따른 방어효과

그룹 (N=12)	용법/용량	공격접종	평가지표				
			폐사율 (%)	방어율 (%) ^a	실질장기 및 혈액 내 SG 세균검출율(%)		
					간	비장	혈액
G1	음성대조군	-	0/12 (0.0)	-	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
G2	양성대조군	SG 야외주 (10^8 CFU)	9/12 (75.0)	-	9/12 (75.0)	11/12 (91.7)	10/12 (83.3)
G3	IgY [0.1%/사료]		8/12 (66.7)	11.2%	8/12 (66.7)	10/12 (83.3)	8/12 (66.7)
G4	IgY [0.2%/사료]		8/12 (66.7)	11.2%	8/12 (66.7)	9/12 (75.0)	8/12 (66.7)

^a 방어율(%) = [(양성대조군 폐사율 - 실험군폐사율) / 양성대조군 폐사율]×100

표 4-28. 닭 가금티프스 질병모델대상 IgY 투여 후 혈청에서 가금티프스 항체역가 측정

Group		Survived birds	Antibody titer* by MPA on	
			8 day old	15 day old
G1	음성대조군	12/12	-	-
G2	양성대조군	3/12	-	-
G3	IgY 0.1%/사료	4/12	-	2 ¹ (4/6)
G4	IgY 0.2%/사료	4/12	-	2 ¹ (3/4)

* The antibody titer of fowl typhoid (FT) was measured by microtiter plate agglutination test [Barsoum & Awad., Applied Microbiology (23)2. 1972] with the serums which were collected from both the 5 chicks per group on 8 day old and the survived birds on 15 day old, respectively.

- 가금티프스(FT) 1주령 감염모델에서 2주령 생존개체들의 FT 항체역가가 확인됨에 따라, 2주령까지 난황항체제제를 투여하고 2주령 FT 감염모델에서 투여물질의 방어효과를 관찰하였음.
- 닭 병아리 2주령에 SG 야외주를 근육으로 접종하여 평가지표를 확인한 결과, 양성대조군(G2)의 폐사율은 75%, IgY 0.1% 사료처리군은 33.3%, 0.2% 사료처리군들은 16.7%로 나타났다(표 4-29).
- 양성대조군 폐사율 대비 IgY 사료처리군들의 방어율은 각각 55.6%, 77.3%으로 확인되었다. SG균 분리율은 IgY 사료처리군들의 실질장기와 혈액에서 낮은 빈도로 검출되었고 양성대조군 대비 간과 비장의 병변이 낮은 수준으로 관찰되었다(그림 4-36).

표 4-29. 가금티프스 2주령 감염모델을 이용한 양계용 난황항체(IgY) 급여에 따른 방어효과

그룹 (N=12)	용법/용량	공격접종	평가지표				
			폐사율 (%)	방어율 (%) ^a	실질장기 및 혈액 내 SG 세균 검출율(%)		
					간	비장	혈액
G1	음성대조군	-	0/12 (0.0)	-	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
G2	양성대조군	SG 야외주 (10 ⁹ CFU)	9/12 (75.0)	-	7/12 (58.3)	7/12 (58.3)	7/12 (58.3)
G3	IgY [0.1%/사료]		4/12 (33.3)	55.6%	5/12 (41.6)	6/12 (50.0)	4/12 (33.3)
G4	IgY [0.2%/사료]		2/12 (16.7)	77.3%	3/12 (25.0)	5/12 (41.7)	3/12 (25.0)

^a 방어율(%) = [(양성대조군 폐사율 - 실험군폐사율) / 양성대조군 폐사율]×100



(A) SG 비접종군 (B) SG 접종군 (C) IgY 처리군

그림 4-36. 가금티프스 2주령 감염모델대상 IgY 방어효능평가에서 SG 병원체 비접종군(A), 접종군(B, C) 그리고 IgY 처리군(C)들의 대표적인 간 병변. 비접종군의 간은 짙은 선홍색을 띠며 병변이 없음. 접종군은 간 종대, 회색괴사반점, 창백한 색깔 등의 병변이 관찰됨. IgY를 급여한 생존개체들의 간은 간 종대와 출현흔적이 있지만 괴사는 거의 없는 것으로 확인됨

③ 개발물질 효능평가 결과

- 본 과제에서 생산된 제품 이외에 외부에서 개발된 물질(스테비아 EM)을 선발하여 가금티프스 질병모델에서 방어효과를 확인하였음.
- 스테비아 EM 0.2%와 0.4%를 사료에 첨가하여 전 사육기간 급여하였다. 닭 병아리 1주령에 SG 야외주를 근육으로 접종하여 평가지표를 확인한 결과, 양성대조군(G2)의 폐사율은 75%, 스테비아 EM 0.2% 처리군(G3)은 50%, 0.4% 처리군(G4)은 41.7%로 확인되었음(표 4-30).
- 양성대조군 폐사율 대비 스테비아 EM 0.2%와 0.4% 처리군들의 방어율은 각각 33.3%, 44.4%로 IgY 처리군들보다 개선된 것으로 보인다. 스테비아 EM 처리군들의 혈중세균수는 양성대조군보다 각각 100배, 1,000배정도 감소한 것으로 나타남.

표 4-30. 가금티프스 감염모델대상 Stevia EM 급여에 따른 방어효과

그룹 (N=12)	용법/용량	공격접종	평가지표		
			폐사율(%)	방어율(%) ^a	혈중 세균수(ml) ^b
G1	-	-	0/12 (0.0)	-	-
G2	-	SG 야외주 (10 ⁸ CFU)	9/12 (75.0)	-	1.4×10 ⁵
G3	Stevia EM [0.2%/사료]		6/12 (50.0)	33.3%	1.1×10 ³
G4	Stevia EM [0.4%/사료]		5/12 (41.7)	44.4%	3.1×10 ²

^a 방어율(%) = [(양성대조군 폐사율 - 실험군폐사율) / 양성대조군 폐사율]×100

^b 혈중세균수 측정: 균 접종 후 부검일에 생환계 혈액에서 분리한 ml당 평균 SG 균수

④ 결과요약

- 가금티프스 질병모델을 1주령과 2주령 닭 병아리에서 구축하였음.
- 가금티프스 항체보유 난황항체제제(IgY)를 1주일동안 급여 후 인위적으로 질병을 감염시켰을 때 방어율이 낮은 것으로 확인되었음.

- 반면에 난황항체제제를 2주일동안 급여하였을 때 질병에 대한 방어율이 높은 것으로 확인되었음.

(라) 돼지 질병제어를 위한 단일제제 효능평가

① 담뱃잎 발현 PRRSV 항원의 PRRSV 예방 효능 및 안전성 평가

㉠ 시험방법 및 내용

- PRRSV(JA142)의 ORF4 및 ORF5 항원을 담뱃잎에 발현하여 동량으로 혼합한 다 음 대조군 담배항원과 함께 3마리씩의 PRRS 음성 4주령 자돈에 20g의 담배항원 을 2주간 간격으로 2회 경구 투여하였음(그림 4-27).
- 두 번째 항원 급여 2주 후에 각 그룹의 자돈에 JA142를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도 로 비강접종을 실시한 후 2 주간 PRRSV 감염 상황을 관찰하였음.
- 매 주 채혈을 실시하여 IFA법과 중화항체 검사법을 이용하여 PRRSV 항원 특이 항체생성을 검사하였음.
- 매 주 체중을 측정하여 증체량을 확인하고 감염 후 2주까지 관찰 후 안락사 및 부 검 병리 검사 실시하였음.
- 모든 통계 분석은 SAS사의 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 실시하였고, 혈중바 이러스 농도같은 반복적인 데이터는 repeated measures ANOVA 분석법을 이용하 여 분석하였으며, 증체율 및 폐병변 score 등의 단일 데이터는 Wilcoxon Rank Sum test를 이용하여 분석하였음.



그림 4-37. 담뱃잎 발현 항원의 경구 투여

㉡ 시험결과

- 담뱃잎 발현 PRRSV 항원과 담뱃잎 대조 항원을 투여한 자돈에 공격접종 후 혈중 바이러스 농도와 부검 후 폐의 잔존 바이러스 농도를 측정한 결과, PRRS 항원을 접종한 그룹에서 공격접종 14일 후 약 10배 정도 낮은 수준의 혈중바이러스 농도 가 관찰되었으나 폐에 잔존하는 바이러스의 농도는 거의 비슷한 수준으로 검출되 었음(그림 4-38).

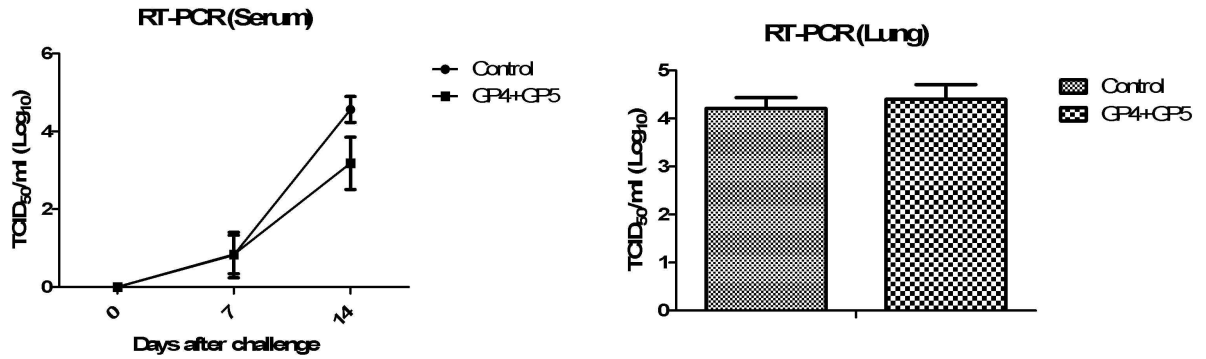


그림 4-38. 담뱃잎 발현 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 혈중 바이러스 농도 및 폐 잔존 바이러스 농도. 그룹 당 3마리의 자돈에 항원을 3회에 걸쳐 경구투여 한 후 JA142를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 비강접종을 실시한 후 매주 혈액을 채취하여 혈중바이러스 농도와 항체가를 검사하고 부검 후 폐병변을 검사하였음.

- 담뱃잎 발현 PRRSV 항원과 담뱃잎 대조 항원을 투여한 자돈에 공격접종 후 투여 항원별 항체가를 검사해 본 결과, 유의성 있는 ORF4(GP4) 또는 ORF5(GP5) 특이 항원을 검출할 수는 없었으나(그림 4-39) PRRSV 항원 투여 그룹의 IFA 항체가가 공격접종 전에도 대조군과 비교하여 다소 높은 수준으로 검출되었으며, 공격접종 1주 후에는 대조군과 비교하여 약 2배 가량 높은 항체가가 측정되어 PRRSV 항원 투여에 의한 면역기억 효과가 존재하는 것으로 판단됨(그림 4-40).
- 담뱃잎 발현 PRRSV 항원과 담뱃잎 대조 항원을 투여한 자돈에 공격접종 후 폐에서 PRRSV의 특징적인 병변인 간질성 폐렴 병변 스코어를 측정해 본 결과, PRRSV 항원을 투여한 그룹의 폐병변이 대조군과 비교하여 유의성 있게 낮은 것으로 평가되어 PRRSV 항원 투여가 병변을 감소시키는 효과가 있는 것으로 판단됨(그림 4-41).

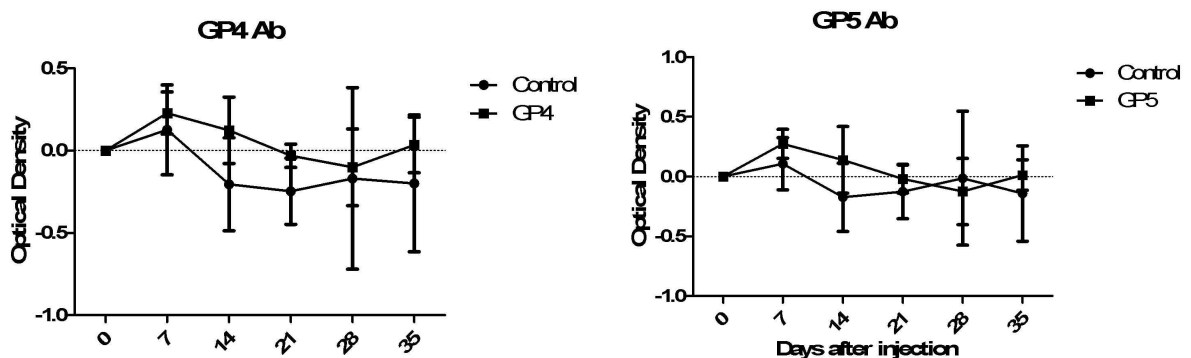


그림 4-39. 담뱃잎 발현 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 PRRSV 항원별 유도 항체가

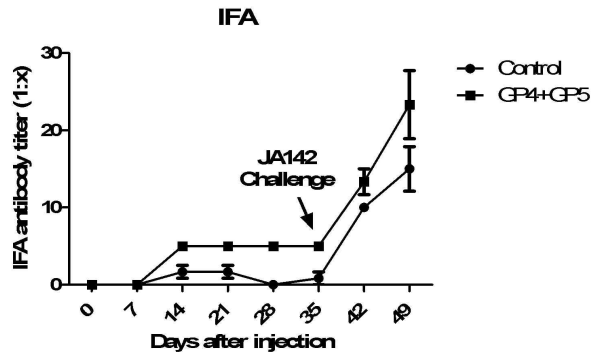


그림 4-40. 담배잎 발현 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 IFA 항체가

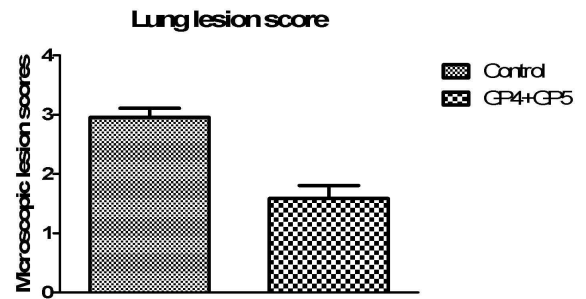


그림 4-41. 담배잎 발현 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 폐의 병변 스코어

② 효모 발현 PRRSV, PCV2, PEDV 항원의 효능 및 안전성 평가

㉠ 시험방법 및 내용

- PRRSV(VR2332)의 ORF2 및 ORF3 항원, PCV2의 ORF2 항원, PEDV의 S-1을 *Pichia pastoris* 효모균주에서 각각 발현한 것을 혼합하여 평가하였음.
- 대조군 효모항원과 함께 그룹 당 3마리씩의 PRRSV, PCV2 및 PEDV 음성 4주령 자돈에 2주간 간격으로 3회 경구 투여하였음.
- 두 번째 항원 급여 2주 후에 각 그룹의 자돈에 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 비강접종을 실시한 후 1주간 PRRSV 감염 상황을 관찰하였음.
- 매주 채혈을 실시하여 IFA법과 ELISA 검사법을 이용하여 PRRSV, PCV2 또는 PEDV 항원 특이 항체생성을 검사하였음.
- 매 주 체중을 측정하여 증체량을 확인하고 감염 후 1주까지 관찰 후 안락사 및 부검 병리 검사 실시하였음.
- 모든 통계 분석은 SAS사의 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 실시하였고 혈중바이러스 농도와 같은 반복적인 데이터는 repeated measures ANOVA 분석법을 이용하여 분석하였으며, 증체율 및 폐병변 score 등의 단일 데이터는 Wilcoxon Rank Sum test를 이용하여 분석하였음.

㉡ 시험결과

- 효모 발현 PRRSV 항원과 효모 대조 항원을 투여한 자돈에 공격접종 후 투여 IFA 항체를 검사한 결과, 공격접종 1주 후에 무처리 대조군과 비교하여 다소 높은 수준의 항체가 관찰되어 효모발현 PRRSV 항원 투여에 의한 면역기억 효과가 있는 것으로 판단됨(그림 4-42).
- 공격접종 후 바이러스 감염 상황을 평가한 결과, 효모발현 PRRSV 항원을 투여한 그룹에서 대조군과 비교하여 10배 정도 낮은 수준의 혈중 바이러스 농도 및 폐 잔존 바이러스 농도가 검출되었음(그림 4-42).

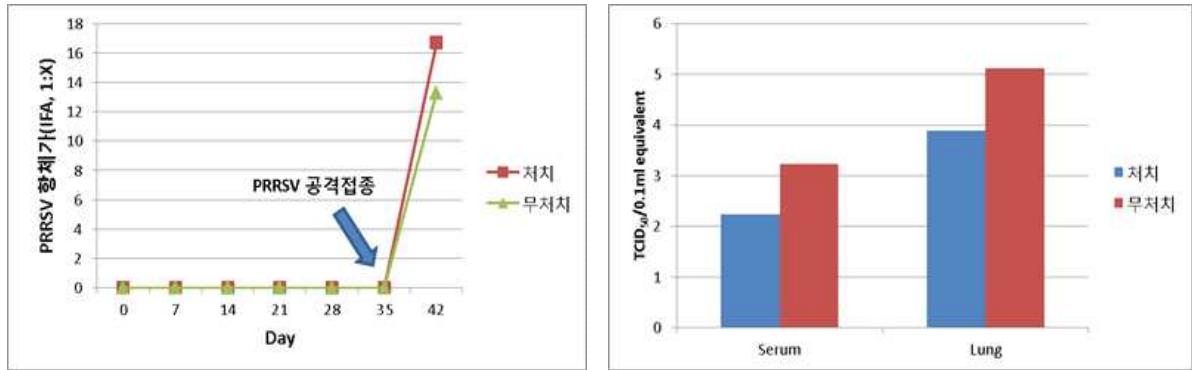


그림 4-42. 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 IFA 항체가, 혈중 바이러스 농도 및 폐 잔존 바이러스 농도. 그룹 당 3마리의 자돈에 항원을 3회에 걸쳐 경구 투여 한 후 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 비강접종을 실시한 후 매주 혈액을 채취하여 IFA 혈청가와 혈중바이러스 농도를 검사하고 부검 후 폐 잔존 바이러스 농도를 검사하였음.

- 효모 발현 PEDV 항원과 효모 대조 항원을 투여한 자돈에 공격접종 후 S 단백질 특이 항체 검출용 ELISA 검사를 실시한 결과, 두 그룹에서 높은 수준의 항체가 검출되지 않아 투여 항원의 항원성이 낮거나 투여량이 다소 낮은 것으로 판단되어 추가 연구 후 재검사를 실시하기로 하였음(그림 4-43).

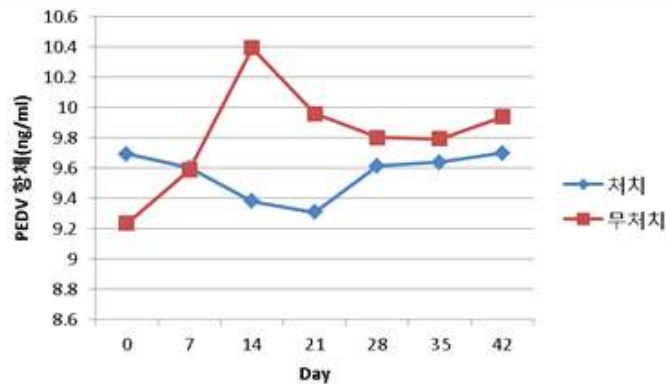


그림 4-43. 효모발현 PEDV 항원 접종 또는 및 비접종 그룹 이유자돈의 평균 항체가

- 효모 발현 PCV2 항원과 효모 대조 항원을 투여한 자돈에 공격접종 후 ORF2 단백질 특이 항체 검출용 ELISA 검사를 실시한 결과, 두 그룹에서 높은 수준의 항체가 검출되지 않아 투여 항원의 항원성이 낮거나 투여량이 다소 낮은 것으로 판단되어 추가 연구 후 재검사를 실시하기로 하였음(그림 4-44).

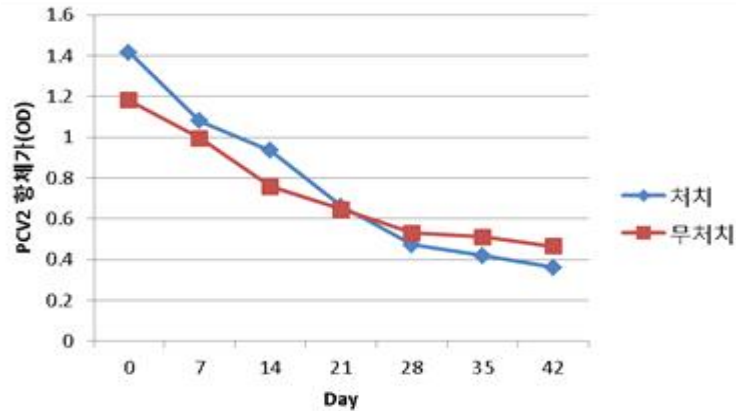


그림 4-44. 효모발현 PCV2 항원 접종 또는 및 비접종 그룹 이유자돈의 평균 항체가

- ③ 모돈의 청국장 추출물(PGA) 투여에 의한 효능 및 안전성 평가
- ㉞ 청국장 유래 물질(PGA)의 모돈 및 포유자돈에 대한 평가
 - 청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* spps. *chungkookjang*은 poly- γ -glutamate (PGA)라고 하는 1000 kDa 이상의 고분자 중합체를 생산한다. 전북 정읍 소재 양돈장에서 모돈에 적용하여 난산을 개선과 포유자돈의 증체율 개선 등의 효과를 평가하였음.
 - ㉞ 모돈 및 포유자돈에 청국장 유래 물질의 적용 및 평가 방법
 - 모돈 및 포유자돈에 청국장 유래 물질의 적용 및 평가 방법은 다음과 같다. 먼저 2%의 PGA 0, 5, 7ml을 분만 5일전 총 30마리의 임신모돈(각 12, 11 또는 7마리)에 접종하고(표 4-31), 분만 모돈의 난산 개선을 평가하여 분만 자돈의 생시체중(birth weight)을 복당 측정하였다. 성공적으로 분만된 339 마리 자돈들의 폐사율 및 증체율을 20일간 측정하였음.

표 4-31. PGA 농장적용 실험 개요

그룹	처리	모돈 수	총산	생시체중 (kg)	20일 증체율 (kg)
P7	PGA 7 ml	12	144	1.18	0.25
P5	PGA 5 ml	11	115	1.21	0.23
NT	무처리	7	80	1.03	0.21
총계		30	339	-	-

- ㉞ 모돈 및 포유자돈에 청국장 유래 물질의 평가 결과
 - PGA를 접종한 모돈에서는 어떠한 부작용이 관찰되지 않았으며 원할한 분만이 관찰되었다. 분만사고가 많지 않아 본 농장적용 실험에서는 난산율에 대한 평가가 어려워 추가로 농장적용을 섭외하여 실시하기로 결정하였음.
 - 청국장에서 분리된 *Bacillus subtilis* spps. *chungkookjang*은 poly- γ -glutamate (PGA)을 7ml을 접종한 그룹(P7)의 모돈에서 분만된 자돈들의 생시체중이 평균

- 1.70kg으로 1.37 또는 1.28 kg의 P5 또는 무처치(NT) 그룹과 비교하여 높았으며 무처치 그룹과 비교해서는 유의성($p<0.01$) 있는 차이를 보였음(그림 4-45).
- 또한 그룹(P7)의 모돈에서 분만된 자돈들의 20일간의 일당증체율이 평균 0.25kg으로 0.22 또는 0.20kg의 P5 또는 무처치(NT) 그룹과 비교하여 높았으며, 무처치 그룹과 비교해서는 유의성($p<0.05$) 있는 차이를 보였다(그림 4-45).

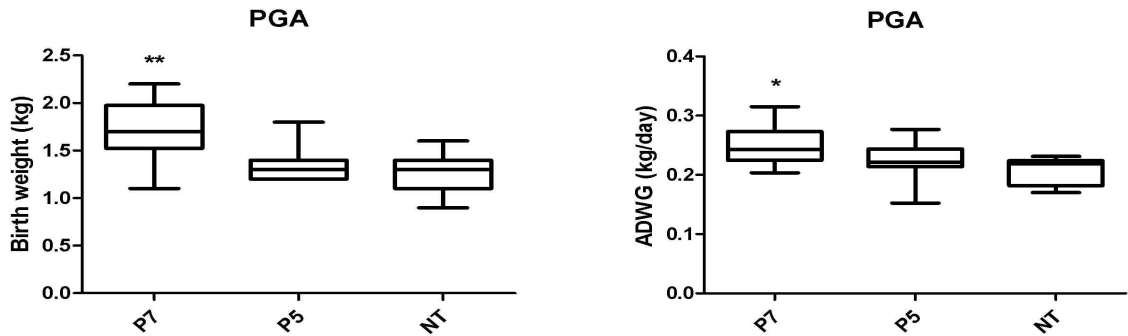


그림 4-45. PGA 접종 및 비접종 모돈에서 분만된 분만자돈들의 생시체중(Birth weight) 및 20일간의 일당증체율(ADWG) * $p<0.05$, ** $p<0.01$

- ④ 고도면역 초유 유래 물질의 포유자돈 설사병에 대한 평가
 - ㉞ 모돈 및 포유자돈에 고도면역 초유 유래 물질의 적용 및 평가 방법
 - 대장균, 살모넬라 클로스티리디움 등의 주요 양돈 소화기 병원성 세균과 PED와 로타바이러스 등 주요 병원성 바이러스 정제 항원을 접종하여 고도면역시킨 초유를 바탕으로 개발된 신생포유자돈용 초유제제(IC-F1)의 포유자돈에서의 설사질병 예방에 대한 효과를 평가하였음(표 4-32).

표 4-32. 신생자돈용 면역복합제제(F1) 농장적용 실험 개요

그룹	모돈 수	총산	생시체중 (kg)	20일 증체율 (kg)	설사발생 (마리+일수)
F1	14	191	1.18	0.24	178
무처치	16	210	1.10	0.22	219
총계	30	401	-	-	-

- ㉞ IC-F1의 농장적용 및 설사병 예방 평가 결과
 - IC-F1의 양돈장 적용에 의한 설사병에 대한 효과를 평가하기 위해 로타바이러스, 대장균과 클로스티리디움에 의한 포유자돈의 지속적인 설사증을 보이는 양돈장에서 30두의 모돈에서 분만된 포유자돈 401두를 대상으로 설사 발생률, 폐사율 및 20일간의 일당평균증체율을 측정하였음.
 - F1을 처치한 분만자돈들을 20일간 관찰한 결과, 무처치 대조군과 비교하여 유의성($p<0.05$) 있게 낮은 수준의 설사발생이 관찰되었음(그림 4-46).
 - 또한 20일간의 일당평균증체율(ADWG)을 관찰한 결과, F1을 처치한 분만자돈들의 20일간의 일당증체율이 평균 0.25kg으로 0.22의 무처치(NT) 그룹과 비교하여 유의성($p<0.05$) 있게 높은 것으로 관찰되었다(그림 4-47).

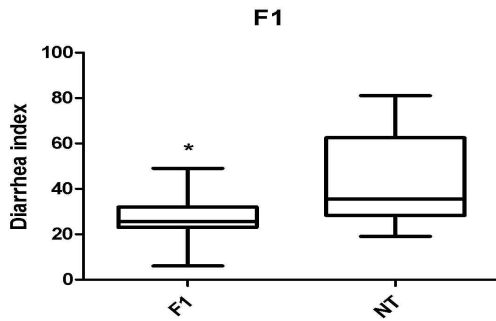


그림 4-46. IC-F1 투여 또는 무처치군의 설사발생지표

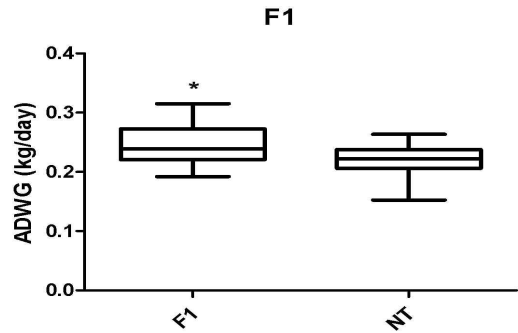


그림 4-47. IC-F1 투여 또는 무처치군의 20일간 평균일당증체율(ADWG)

(마) 송아지를 대상으로 한 면역복합제제 효능평가

① 공시 송아지 선발 및 실험 설계

- 3개월령 송아지 15마리를 대상으로 다음 5개의 실험군으로 나누어 실험을 수행하였음(표 4-33).
- 실험전 모든 송아지는 분변에서 *Salmonella dublin*이 검출되지 않는지 여부를 real-time PCR을 통해 확인하였음.
- 살모넬라 공격 접종외의 경우 실험 개시 3일, 6일, 9일째 살모넬라(10^8 CFU/ml)를 투여하여 총 20일간 수행하였으며, 기존 항생제와의 효율을 평가하기 위해 송아지 장염 예방을 위해 사용되는 네오마이신을 체중 10kg당 1일 0.2을 경구 투여하였음.

표 4-33. 송아지 대상 면역복합제제(아지원샷) 실험 개요

그룹	처치	마리수	비고
1	무처치 대조군	3	-
2	아이지원샷 투여군	3	-
3	아이지원샷 투여군 및 살모넬라 투여군	3	실험 개시 3일, 6일, 9일째 <i>Salmonella dublin</i> (10^8 CFU/ml)투여
4	기존 항생제 처치군 및 살모넬라 투여군	3	실험 개시 3일, 6일, 9일째 <i>Salmonella dublin</i> (10^8 CFU/ml)투여
5	아이지원샷 투여군 및 살모넬라 투여군	3	실험 개시 3일, 6일, 9일째 <i>Salmonella dublin</i> (10^8 CFU/ml)투여

② 송아지 분변 내 살모넬라균 검사

- 분변 채취는 실험 기간 동안 무균적으로 채취하고 살모넬라 유전자 검사를 위해 70°C에서 보관하였음. 분변에서의 살모넬라균의 DNA 추출은 AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 살모넬라균의 정량 검사는 PowerChek *Salmonella* Real-time PCR Kit(Kogene biotech, Korea)를 이용하였음.

③ 혈액 채취

- 실험 기간 동안 처치 전 후에 혈액을 경정맥에서 채취하여 혈청을 분리한 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 이용하였음.
- ④ 송아지 혈중 사이토카인 검사
 - 면역 증강 효과를 평가하기 위한 IL-2와 패혈증 마커인 IL-6를 ELISA를 이용하여 실험 기간 동안 측정, 비교 하였으며, 결과는 흡광도를 측정하여 이를 비교 분석하였음.
- ⑤ 송아지에서 의 항균력 평가시험 결과
 - ㉠ 송아지 분변 내 살모넬라균 검사
 - real-time PCR을 통한 Ct 값으로 살모넬라균의 분변 내 양을 측정함바 Ct value 40 이상을 음성으로 평가하였음.
 - 실험 과정 동안 살모넬라균의 검출 결과는 표 4-34와 같음. 즉, 무처치 대조군인 그룹 1과 아이지원샷만 급여한 그룹 2는 전반적으로 Ct 값은 39-40 사이로 살모넬라가 거의 검출되지 않은 반면 아이지원샷 급여기간 동안 살모넬라균으로 공격 접종한 그룹3은 투여 후 Ct 값이 일시적으로 낮아지기는 하나 정상 수준으로 회복하는 결과를 확인 할 수 있었으며 이는 살모넬라균만 접종한 그룹 5와 비교하면 큰 차이를 나타내었음.
 - 살모넬라 투여에 대한 아이지원샷의 방어효과를 보여주는 그룹3은 기존에 사용하던 린코마이신 투여군(그룹 4)와 비교할 때 전 기간에 걸쳐 10% 이내의 차이를 확인 할 수 있었음.

표 4-34. 실험 그룹 별 분변 내 살모넬라균 검출 결과

그룹	그룹명	Ct			
		Day 4	Day 7	Day 10	Day 20
1	무처치 대조군	40.2±3.1	40.3±2.1	39.7±1.2	39.3±0.8
2	아이지원샷 급여	39.7±2.3	40.2±1.5	39.2±2.4	39.0±0.7
3	아이지원샷 급여 + 살모넬라 투여	31.5±3.3	29.1±1.4	27.3±2.2	36.0±0.9
4	항생제 + 살모넬라 투여	32.0±2.4	29.1±1.3	31.1±1.1	36.1±0.7
5	아이지원샷 미급여 + 살모넬라 투여	17.0±2.5	18.3±2.3	14.9±1.7	27.2±1.7

- ④ 송아지 혈중 IL-2 검사 결과
 - 면역 증강 효과를 평가하기 위한 IL-2를 측정하였으며 결과는 표 4-35과 같음. 즉, 아이지원샷 급여군인 그룹 2에서는 실험 초기에는 대조군과 차이가 없었으나 실험 20일에 증가하는 것이 확인되었으며 면역 증강 효과를 확인하기 위해서는 보다 장기적인 실험이 필요하다고 판단되었음. 아이지원샷 급여군과 항생제 처치 투여군에서의 살모넬라 투여 이후의 반응은 아이지원샷 급여군과 큰 차이를 보이지 않았음.

표 4-35. 실험 그룹 별 송아지 혈청내 IL-2 농도 변화

그룹	그룹명	OD			
		Day 4	Day 7	Day 10	Day 20
1	무처리 대조군	0.72±0.04	0.82±0.03	0.81±0.02	0.84±0.05
2	아이지원샷 급여	0.70±0.03	0.83±0.04	0.85±0.06	1.12±0.10
3	아이지원샷 급여 + 살모넬라 투여	0.63±0.07	0.72±0.05	0.87±0.08	0.98±0.11
4	항생제 + 살모넬라 투여	0.66±0.04	0.73±0.06	0.91±0.09	1.02±0.12
5	아이지원샷 미급여 + 살모넬라 투여	0.67±0.07	0.63±0.06	0.71±0.07	0.82±0.08

㉔ 송아지 혈중 IL-6 검사 결과

- 패혈증을 확인하기 위한 혈중 IL-6를 측정하였으며 결과는 표 4-36과 같음. 즉, 살모넬라 투여군인 그룹 5와 비교할 때 그룹3과 4에서 패혈증 표지자인 IL-6의 농도가 상대적으로 감소함을 확인할 수 있었음.
- 아이지원샷 급여군과 항생제 처리 투여군에서의 살모넬라 투여 이후의 반응은 아이지원샷 급여군과 큰 차이를 보이지 않아 효과가 유사함을 확인하였음.

표 4-36. 실험 그룹 별 송아지 혈청내 IL-6 농도 변화

그룹	그룹명	OD			
		Day 4	Day 7	Day 10	Day 20
1	무처리 대조군	0.42±0.06	0.47±0.03	0.41±0.01	0.45±0.04
2	아이지원샷 급여	0.40±0.04	0.41±0.02	0.47±0.05	0.35±0.14
3	아이지원샷 급여 + 살모넬라 투여	0.48±0.08	0.54±0.07	0.63±0.06	0.50±0.07
4	항생제 + 살모넬라 투여	0.39±0.06	0.63±0.10	0.70±0.08	0.58±0.17
5	아이지원샷 미급여 + 살모넬라 투여	0.57±0.09	0.83±0.04	1.02±0.17	0.99±0.18

4. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발 (제2협동)

가. 가축전염성 유해미생물 패넬에 대한 항미생물 억제제로써의 효과평가를 통한 가축전염병 제어용 신소재로써의 효과의 검정

(1) Anti VS-2 내에서 정제된 PG1의 항미생물 효과 및 안정성 연구

(가) 최적화된 정제 시스템을 통해 생산된 PG1 펩타이드와 단백질 침전 방지를 위한 0.01% acetic acid, carrier protein으로 0.2% BSA를 포함한 1X PBS를 이용하여 혼합물을 준비

(나) 준비된 혼합물의 농도는 4mg/ml로 이와 같은 부피로 Anti VS-2를 혼합하여 E.coli ATCC25922에 대한 MIC assay를 수행

PG1 (50% dilution with Anti-VS2 & 30 min in 4°C)

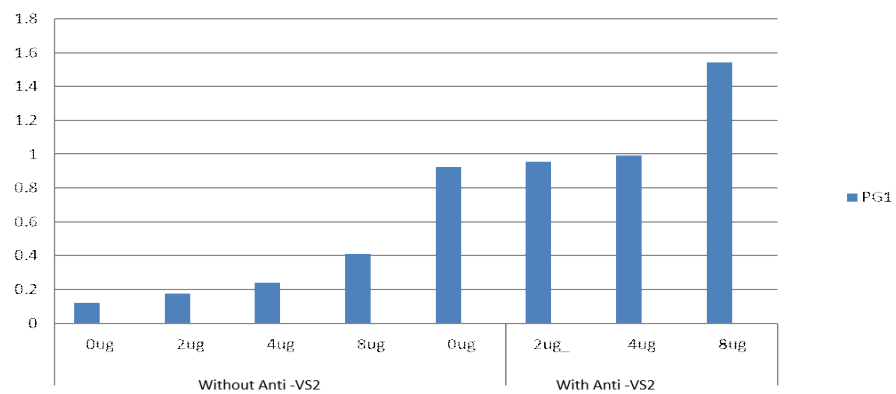


그림 4-48. Anti VS-2와 혼합된 PG1의 MIC assay 결과 (1:1 비율)

(다) Anti VS-2를 포함하지 않은 control의 경우 PG1 2µg일 때, Anti VS-2와의 혼합물의 경우 8µg일 때 항균 효과를 가짐을 확인

(라) Anti VS-2와 PG1을 1:1로 혼합하였으므로 Anti VS-2와 PG1을 19 :1의 비율로 바꿔 MIC assay를 다시 수행

PG1 (95% dilution with Anti-VS2 & 30 min in RT)

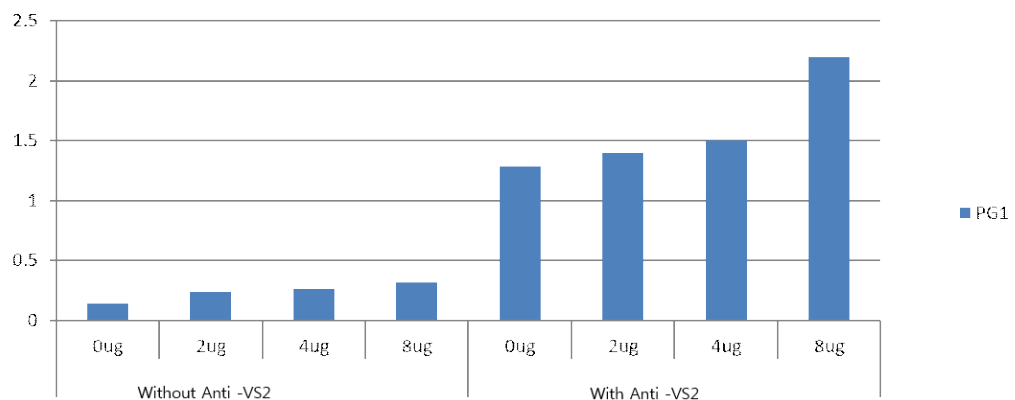


그림 4-49. Anti VS-2와 혼합된 PG1의 MIC assay 결과 (19:1 비율)

(마) 그 결과 Anti VS-2와 혼합하지 않은 PG1의 경우 2 μ g에서 항균 작용을 보이는 동일한 결과를 보였으나 혼합물의 경우 negative control에 관측 UV 흡수값에 대한 background가 높게 나타나는 것으로 보아 Anti VS-2의 구성 물질이 이 test를 위한 reagent와 반응하는 것으로 예상되므로 다른 방법을 이용한 실험 설계가 필요

(2) MTT assay를 통한 PG1의 포유동물 세포에 대한 독성 검정

(가) 질병 제어를 위한 신소재로서의 가능성을 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 포유동물 세포에 대한 항미생물 펩타이드의 독성을 검정

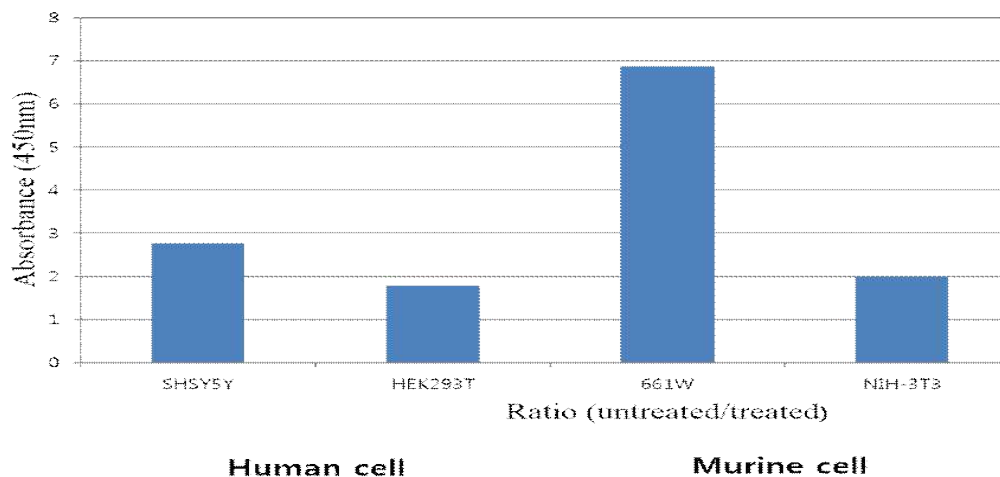


그림 4-50. PG1의 포유동물 세포에 대한 독성을 검정하기 위한 MTT assay 결과

(나) Human cell 중 neuron cell SHSY5Y과 fibroblast cell HEK293T, murine cell 중 neuron cell 661W와 fibroblast cell NIH-3T3에 PG1을 처리하였을 때 세포 독성을 가지는 것을 관측하였고, fibroblast cell에 비해 neuron cell에 더 독성을 가짐을 관측

나. 전자현미경을 활용한 항미생물 펩타이드의 박테리아 세포벽 파괴기전 분석 및 비교

(1) 전자현미경을 활용한 PR26의 항균 활성 기전 분석

(가) 현재까지 항균 메커니즘에 대해 명확히 규명되지 않은 PR26의 항균 작용 메커니즘 규명을 위하여 생산된 PR26를 처리한 후 scanning electron microscope (SEM)과 transmission electron microscope (TEM)을 이용하여 membrane integrity와 structure를 관찰함으로써 박테리아의 세포막과 상호작용을 하는 지에 대한 연구를 수행함

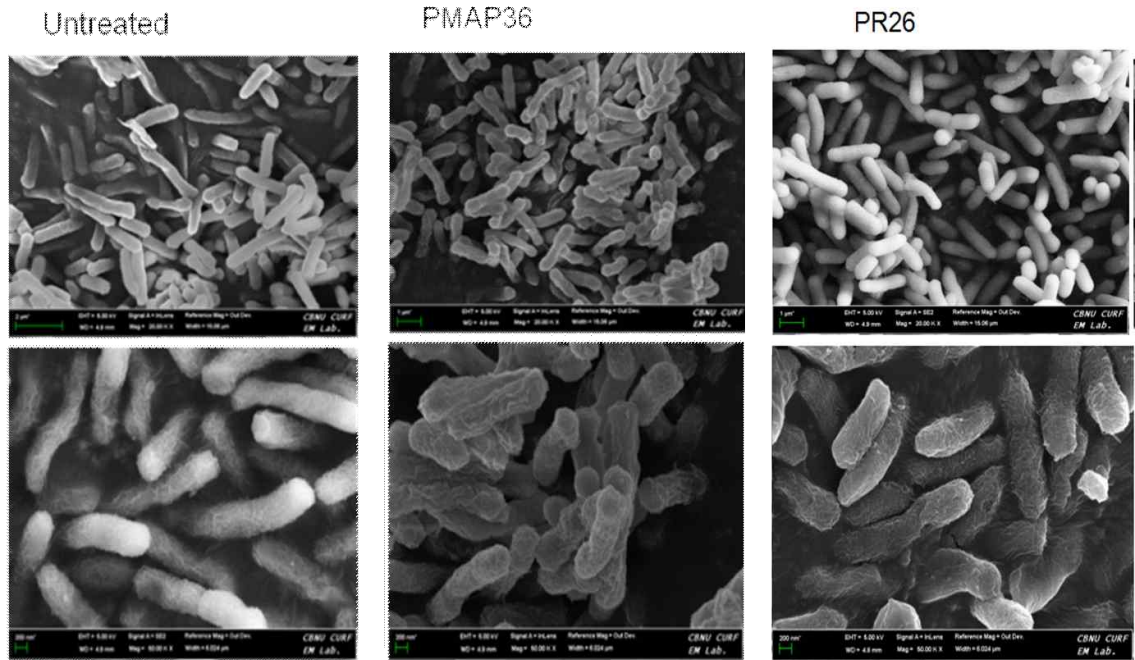


그림 4-51. 생산된 PR26의 항균 작용 연구를 위한 SEM의 이용

- (나) 펩타이드 처리를 하지 않은 순수 E.coli 샘플을 negative control로, PMAP36을 positive control로 사용하여 PR26와 함께 SEM을 통해 관측한 결과, PR26의 경우 PMAP36과 달리 박테리아의 형태가 변하지 않는 것으로 보아 PMAP36과는 다른 메카니즘에 의해 항균작용을 하는 것으로 생각됨
- (다) 따라서 TEM을 통한 메카니즘 규명을 위해 추가 실험 진행 필요

다. 항미생물 펩타이드 정제기술개발 2단계

- (1) 다양한 정제 기법을 활용한 PG1 펩타이드 최종 정제단계의 최적화된 시스템 구축
 - (가) 3차년도 GFP 172-173번 아미노산 사이에 PG1을 삽입하여 Bacteriocidal effect를 극복하고 얻어진 클론을 여러 가지 배양 조건 연구를 통한 극대화된 발현량 확보한 이후 GFP-PG1으로부터 순수한 PG1을 분리해내기 위한 cyanogen bromide (CNBr) 처리 및 마지막 정제 단계인 reverse phase-high performance liquid chromatography (HPLC) 기법의 최적화를 통해 향상된 생산량을 확보
 - (나) 4차년도에서는 cyanogen bromide (CNBr) 처리를 통한 cleavage 단계 이후 lyophilization을 통해 powder 형태의 PG1을 얻은 뒤 생산량을 극대화시키기 위하여 Gel filtration 기법을 도입
 - (다) CNBr 처리 및 lyophilization을 통해 얻어진 powder에 8M urea, 50mM glycine, 5mM GSSH, 0.5mM GSSG를 포함한 buffer를 첨가, 불순물 제거를 위해 filtering 후 sodium phosphate와 sodium chloride를 이용하여 equilibration된 column에 loading하여 확인함
 - (라) Flow rate의 다양한 변화를 주어 1ml/min의 flow rate로 70분간, 이후 1.5ml/min의

flow rate으로 60분간 running 및 buffer를 교체해줌으로써 정제 시간 단축, 경제적 손실 감소 및 정제 효율 최적화

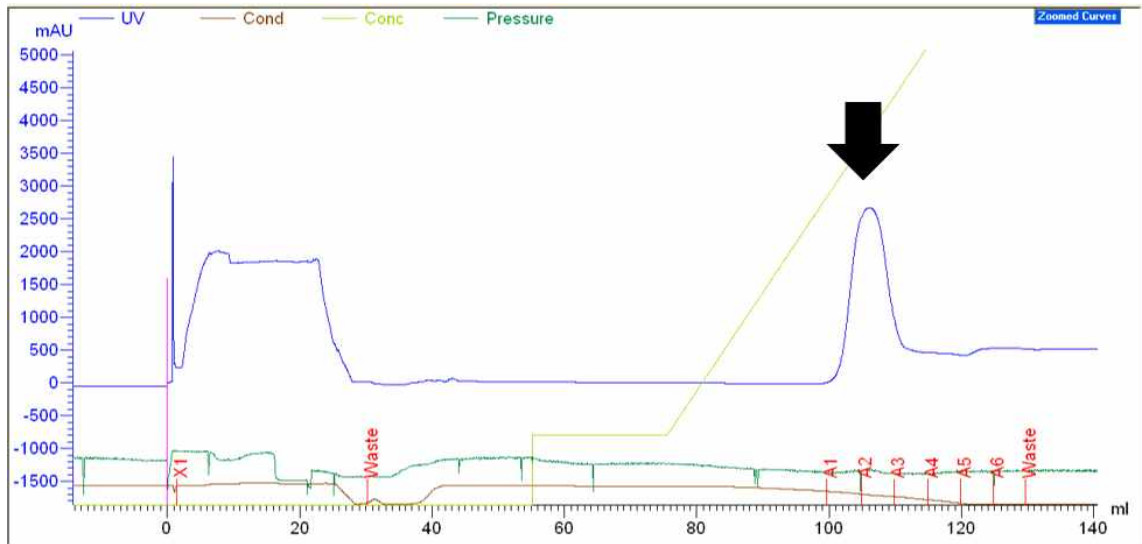


그림 4-52. FPLC를 이용한 GFP-r5M172PG1173 fusion protein의 정제

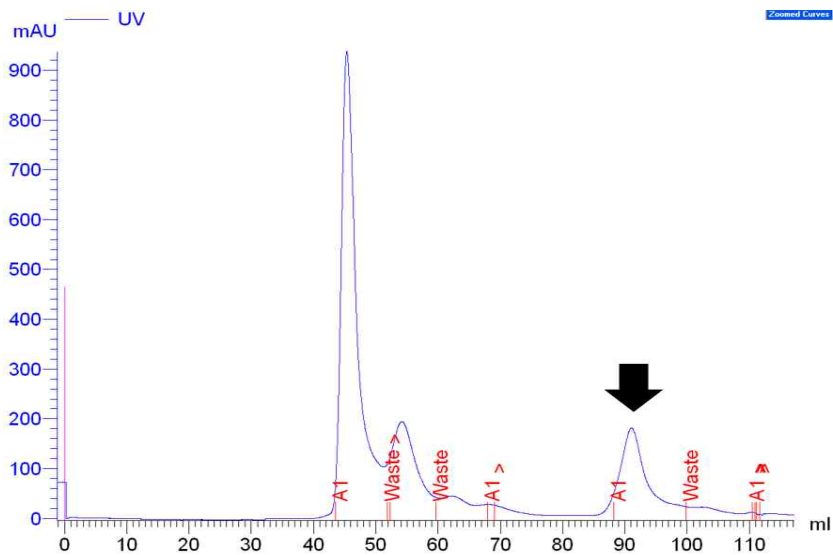


그림 4-53. Gel filtration을 이용한 순수 PG1의 정제

- (2) PMAP36, PR26의 클론을 이용한 발현량 극대화 및 정제시스템 최적화 실시
- (가) PG1 construct를 기반으로 PMAP36와 PR26 클론 확보, insoluble의 형태로 발현됨을 확인, 발현 조건 최적화 완료
- (나) PG1과 동일하게 6개의 히스티딘 아미노산을 가지도록 디자인 하였으므로 HisTrap HP column을 이용하여 denaturation Ni affinity chromatography기법을 이용하여 추출

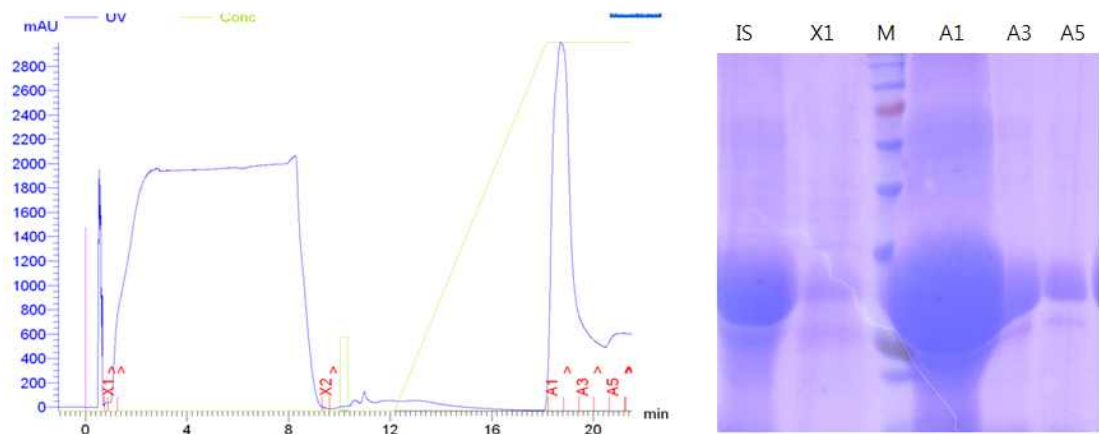


그림 4-54. Ni-NTA를 이용한 PR26의 정제

(다) FPLC를 이용한 Ni affinity chromatography를 통해 정제된 fusion 단백질을 투석하고 동결건조 한 뒤 순수한 PMAP36과 PR26를 70% formic acid와 cyanogen bromide (CNBr)를 이용하여 단백질을 절단, 동결건조를 통해 농축 시킨 뒤 HPLC와 gel filtration을 이용하여 최종 정제

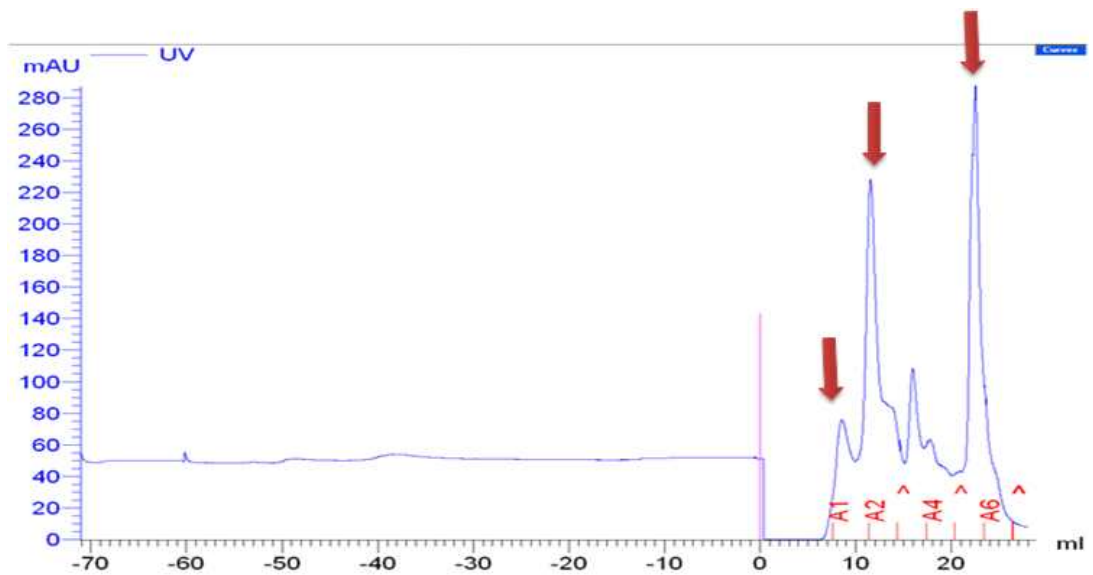


그림 4-55. Gel filtration을 이용한 순수 PR26의 정제

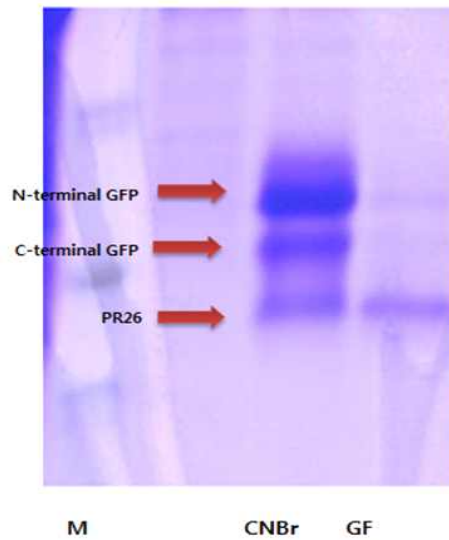


그림 4-56. PR26의 CNBr cleavage 및 gel filtration으로 정제된 최종 산물

(라) 최종 정제 이후 3차년도에 수행된 최적화된 disulfide bond installation 조건을

이용하여 단백질 활성을 유도, 동결 건조 후 powder 형태로 보관 및 농도 측정

(마) PMAP36과 PR26 또한 PG1과 유사하게 극대화된 생산량을 확인 (1리터당 15mg)

(3) Buforin II에 대한 클론 확보 및 발현 시스템 안정화 및 정제 시스템 구축

(가) 최적 유전자로 선정된 PG1, PMAP36, PR26을 통해 구축된 클론 시스템이

bactericidal effect를 완벽하게 극복한 것을 확인, 동일한 construct를 이용하여

3가지 유전자 외에도 강한 항균력을 가진 Buforin II에 대한 클론 확보

(나) 다른 유전자들의 정제 조건을 적용한 결과 Buforin II의 클론의 경우도 또한

insoluble fusion 단백질의 형태로 대량 발현됨을 확인

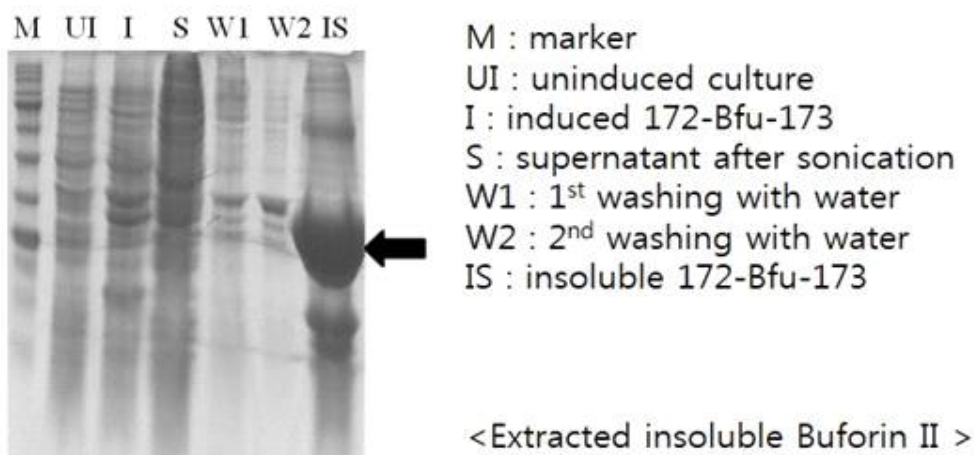


그림 4-57. 기존 construct를 이용한 Buforin II의 발현 및 insoluble extraction 결과

(다) Bufenin II 또한 6개의 히스티딘을 가지도록 디자인하였으므로 His trap column을 이용한 denaturation Ni affinity chromatography와 FPLC를 이용하여 정제

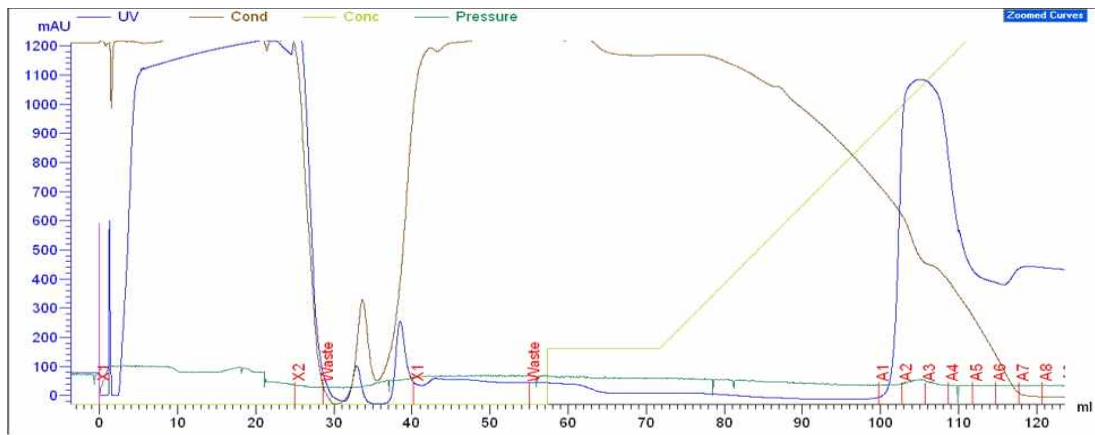


그림 4-58. FPLC를 이용한 GFP-r5M과 결합된 fusion Bufenin II의 정제

(라) GFP 아미노산 172번과 173번으로 fusion된 insoluble Bufenin II 또한 다른 3가지 유전자와 유사한 chromatography 결과를 확인하였고, elution되는 조건의 경우 imidazole 농도 300mM로 PMAP36과 유사함을 확인

(마) FPLC를 이용하여 정제된 GFP172-Bufenin II-173 fusion 단백질을 membrane을 이용하여 투석, 동결건조를 통해 powder 형태로 만든 뒤 순수한 Bufenin II 펩타이드를 얻기 위해 다른 3가지 유전자와 동일하게 70% formic acid와 cyanogen bromide (CNBr)를 이용하여 cleavage를 수행

(바) Cyanogen bromide (CNBr)을 넣은 후 incubation 시간을 주어 cleavage가 효율적으로 일어나도록 유도한 뒤 동결건조를 통해 formic acid와 CNBr을 제거, 물을 이용한 washing 단계를 거쳐 powder 형태로 만든 뒤 HPLC 시스템을 이용하여 최종적으로 정제



그림 4-59. CNBr cleavage 및 HPLC를 통해 정제된 Bufenin II

(사) 다른 3가지 유전자와 동일하게 disulfide bond installation 과정, 동결건조 과정을 거쳐 powder 형태의 Buforin II을 생산, 2nd batch까지 제 1 협동에 전달

라. Cyclic 항미생물 펩타이드의 대량 발현 시스템 구축 및 효력평가

- (1) 2차년도 단백질 분해효소에 의한 분해 작용을 억제하기 위한 cyclic AMP 후보 유전자 8종 중 아직 그 효능이 밝혀지지 않은 식물 유래의 CD1과 이미 그 항균활성도가 매우 뛰어난 것으로 밝혀진 원숭이 유래의 RTD-1, 총 2종을 선정 후 클론 확보
- (2) 3차년도 확보된 CD1과 RTD1의 클론을 이용하여 발현을 시작, PG1, PMAP, PR26와 같은 linear 형태 AMP에 비해 E.coli의 성장속도가 더더 이에 대한 최적화가 요구됨에 따라 4차년도에는 발현 조건에 대한 실험을 수행
- (3) CD1과 RTD1 클론은 bactericidal effect를 극복하고 cyclization을 위해 2 종류의 intein과 fusion된 형태로 디자인 되었으나, N-terminal intein이 자동적으로 cleavage됨을 확인
- (4) CD1과 RTD1 클론을 kanamycin이 포함된 5ml LB 배지에 (1% pre-culture) 37, 12시간 이상 배양, 500 μ l를 kanamycin이 포함된 50ml LB배지에 옮겨 배양한 뒤 IPTG의 농도를 각각 0.1mM, 0.3mM, 0.5mM, 1mM로 다르게 하여 soluble과 insoluble 상태에서 각각 발현되는 양을 확인

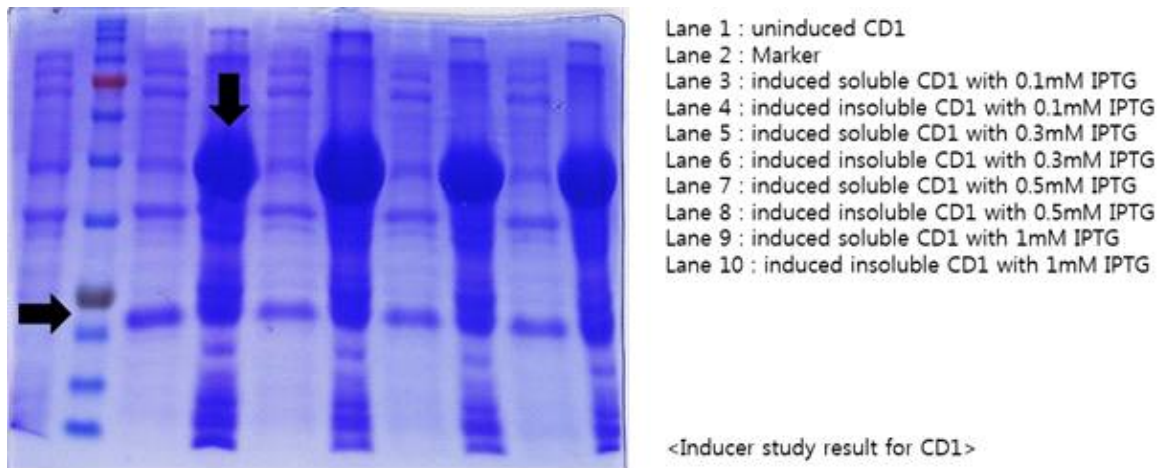
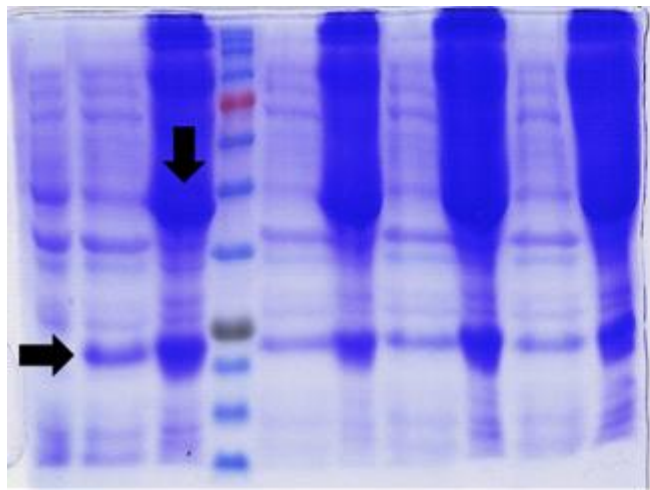


그림 4-60. IPTG 농도에 따른 CD1의 solubility 확인

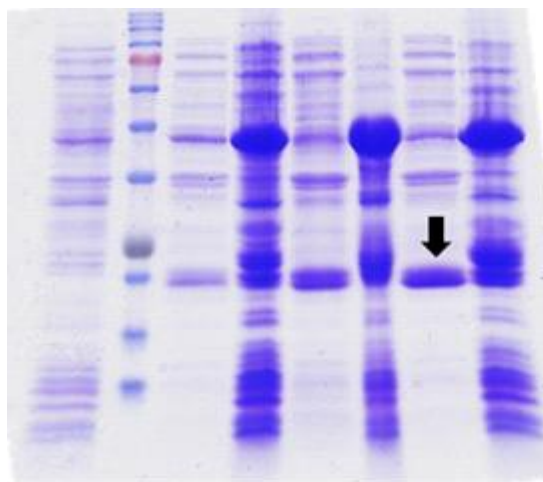


Lane 1 : uninduced RTD1
 Lane 2 : induced soluble RTD1 with 0.1mM IPTG
 Lane 3 : induced insoluble RTD1 with 0.1mM IPTG
 Lane 4 : Marker
 Lane 5 : induced soluble RTD1 with 0.3mM IPTG
 Lane 6 : induced insoluble RTD1 with 0.3mM IPTG
 Lane 7 : induced soluble RTD1 with 0.5mM IPTG
 Lane 8 : induced insoluble RTD1 with 0.5mM IPTG
 Lane 9 : induced soluble RTD1 with 1mM IPTG
 Lane 10 : induced insoluble RTD1 with 1mM IPTG

<Inducer study result for RTD1>

그림 4-61. IPTG 농도에 따른 RTD1의 solubility 확인

- (가) 아주 큰 차이를 보이지는 않았으나 CD1과 RTD1 모두 IPTG를 0.1mM로 한 조건에 발현이 가장 좋았으며 fusion 단백질은 주로 insoluble 형태 발현
- (5) 0.1mM로 inducer 농도를 최적화 시킨 후 배양 온도에 대해서도 각각 37℃, 30℃, 25℃로 달리하여 각각 5시간, 5시간 반, 6시간 배양



Lane 1 : uninduced Int.-CD1-Int.
 Lane 2 : Marker
 Lane 3 : induced soluble Int.-CD1-Int. from 37°C culture
 Lane 4 : induced insoluble Int.-CD1-Int. from 37°C culture
 Lane 5 : induced soluble Int.-CD1-Int. from 30°C culture
 Lane 6 : induced insoluble Int.-CD1-Int. from 30°C culture
 Lane 7 : induced soluble Int.-CD1-Int. from 25°C culture
 Lane 8 : induced insoluble Int.-CD1-Int. from 25°C culture

<Temperature study result for CD1>

그림 4-62. 배양 온도에 따른 CD1의 solubility 확인

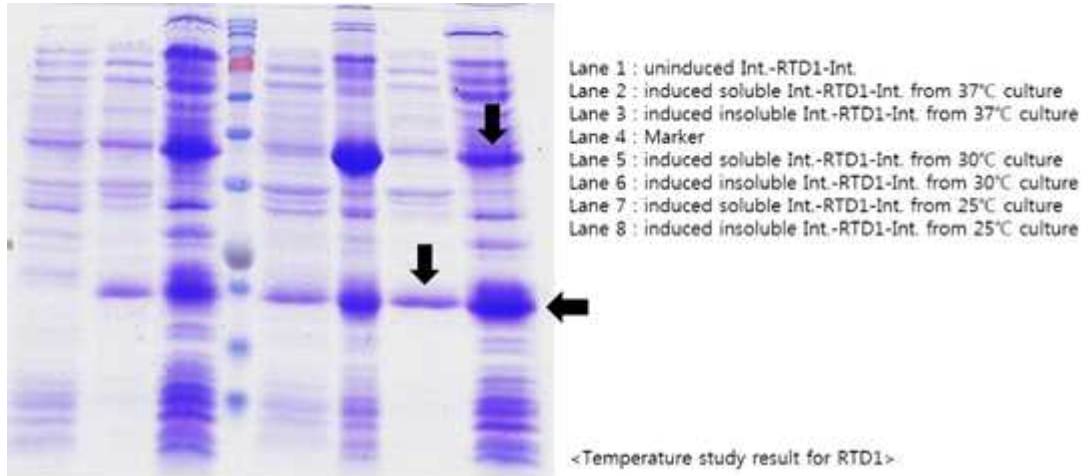


그림 4-63. 배양 온도에 따른 RTD1의 solubility 확인

- (가) CD1의 경우 25°C에서 배양 시 solubility가 가장 뛰어나고, fusion 단백질이 insoluble 형태로 발현 시 N-terminal intein cleavage는 거의 일어나지 않았으며, RTD1의 경우도 큰 차이는 보이지 않았으나 25°C에서 solubility가 더 높게 나타났으나, insoluble 형태로 발현된 fusion 단백질의 양을 비교한 결과 N-terminal cleaved protein이 CD1의 비해 확연히 많음을 확인
- (6) IPTG와 배양 온도에 대한 최적화를 시도했음에도 solubility 향상에 크게 도움이 되지 않았으므로 이를 극복하기 위해 chaperon과의 co-expression 실험을 디자인

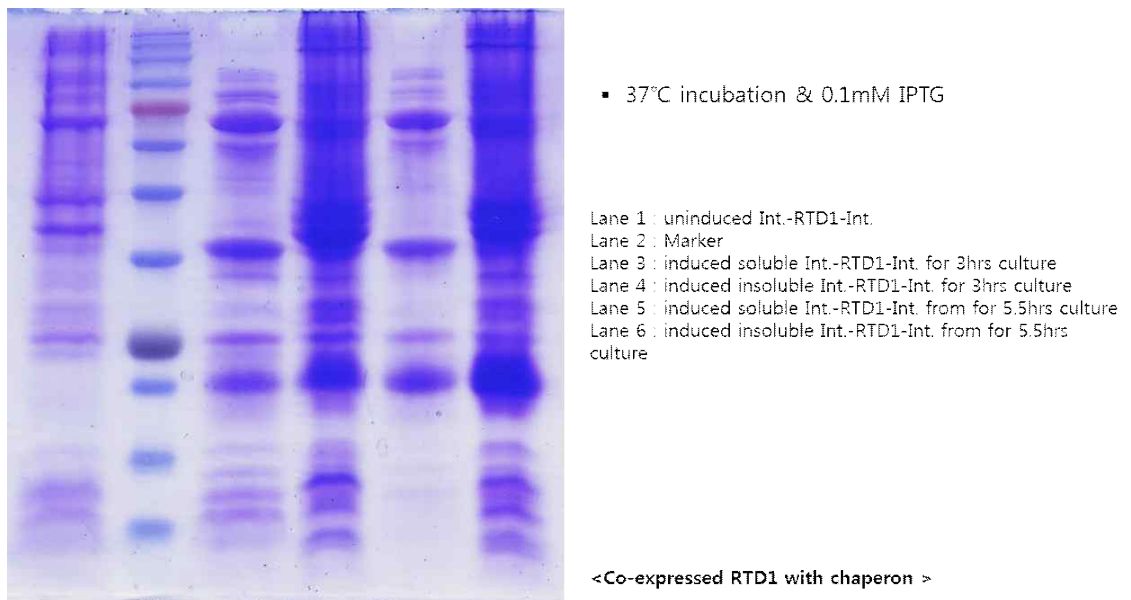


그림 4-64. RTD1의 Solubility 향상을 위한 chaperon과의 co-expression

- (가) 0.1mM IPTG로 발현유도, 37°C, 5.5시간 동안 배양 결과 발현량이 증가함을 확인 하였으나 그 차이가 크지 않아 induction 후 배양 온도를 25°C로 하여 다시 실험을 수행한 뒤 chaperon과 co-expression 시킨 culture와 동일한 조건이나 chaperon

없이 발현된 샘플을 비교하기 위해 western blot을 수행

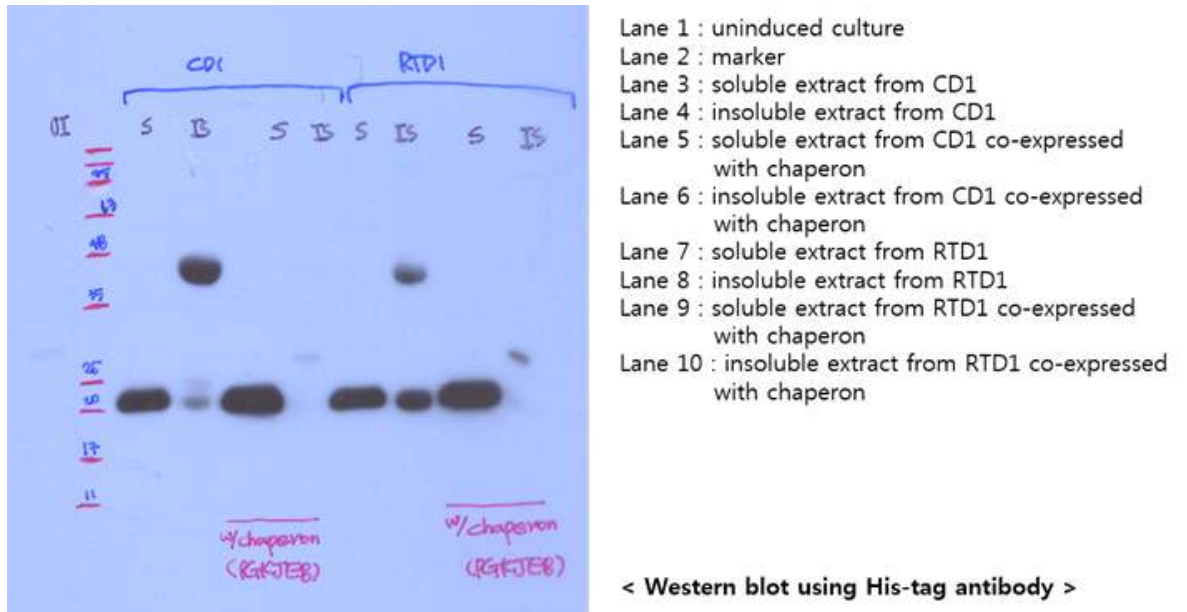


그림 4-65. Western blot을 이용한 CD1과 RTD1의 co-expression solubility 비교 실험

(나) 그 결과 chaperon과의 co-expression 시킨 경우 CD1, RTD1 모두 fusion 단백질이 soluble의 형태를 띠며 N-terminal intein의 internal cleavage되었다는 흥미로운 결과를 도출함으로써 발현 조건 최적화

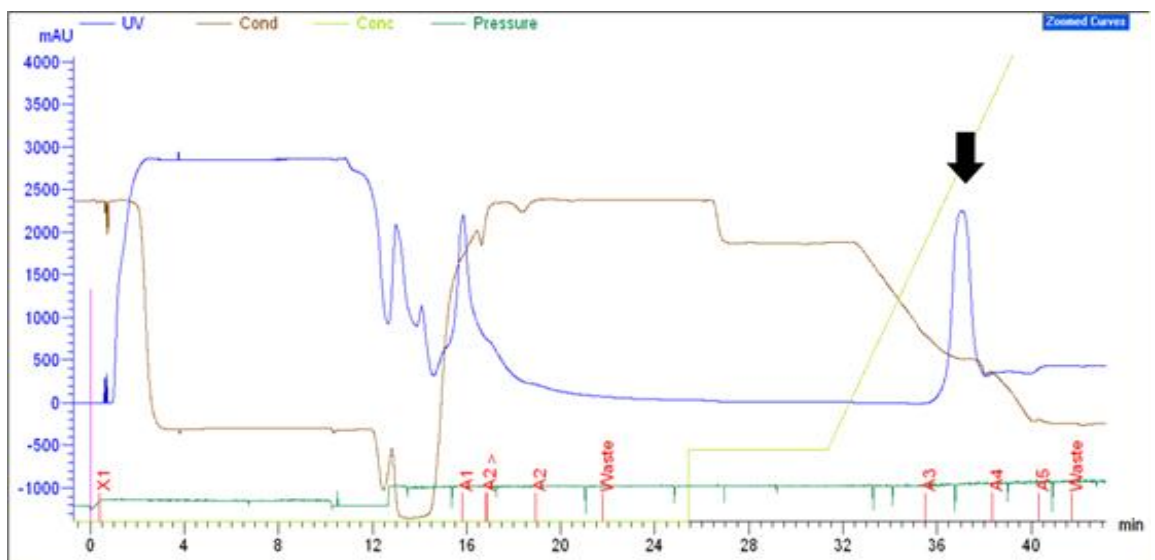
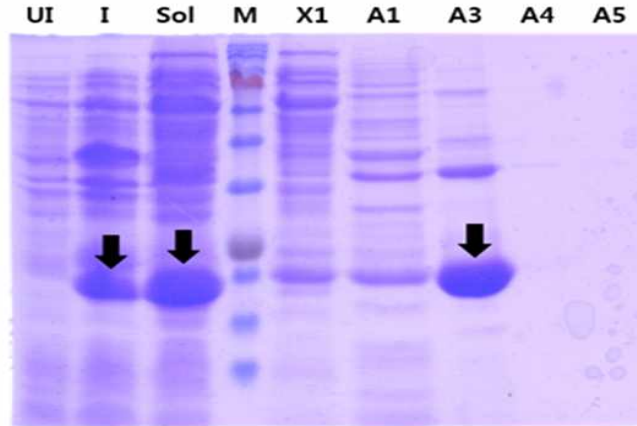


그림 4-66. Ni-NTA를 이용한 co-expression된 CD1의 정제 (chromatogram)



< Purification of Int-CD1-Int expressed with chaperon >

그림 4-67. Ni-NTA를 이용한 co-expression된 CD1의 정제 (SDS-PAGE)

(다) 최적화된 배양 조건을 바탕으로 1ℓ culture 후 FPLC를 수행하여 purification 최적화 연구를 수행 중

마. 임상실험을 위한 항미생물 펩타이드의 생산

(1) 다른 3가지 유전자와 동일하게 disulfide bond installation 과정, 동결건조 과정을 거쳐 powder 형태의 Buforin II을 생산, 2nd batch까지 제 1 협동에 전달

바. 4차년도 연구결과 요약 및 평가

- (1) 가축전염병 제어용 신소재로써 백신 스트레스 완화용 투여제인 Anti VS-2의 보조적인 첨가제로써의 효과를 검정하고자 정제된 PG1의 항미생물 효과 및 안정성에 대한 연구를 위해 실험을 설계 후 일부 수행하였고, 이를 지속하고자 하였으나 펩타이드 생산의 고비용 문제로 인해 동물 산업을 위한 상품화는 어려울 것으로 판단됨
- (2) 전자현미경을 활용하여 PR26와 박테리아 세포벽과의 상호작용, 파괴기전 분석을 위해 SEM을 이용하여 관측한 결과 PMAP36과는 다른 메카니즘에 의해 항균작용을 하는 것으로 보임
- (3) 3차년도, 4차년도를 통해 항미생물 펩타이드 정제기술개발은 이미 완료된 단계로 PG1, PMAP36, PR26, Buforin II 4종의 항미생물 펩타이드의 지속적인 정제가 문제없이 수행됨
- (4) Linear 형태의 항미생물 펩타이드 뿐만 아니라 cyclic 형태의 항미생물 펩타이드의 발현 시스템을 4차년도를 통해 최적화시킴
- (5) 제 1 협동과의 협업을 위해 4종의 항미생물 펩타이드를 지속적으로 공급

5. 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 및 상용화 기반 구축 (제3협동)

가. 가축 전염병 관련 병원성 균주 및 바이러스에 특이적인 앵타머 개발

(1) *Salmonella*(S.) Typhimurium 특이 결합용 DNA 앵타머 소재 개발

(가) 병원성 *S. Typhimurium* 균주 확보 및 증식성 확인

- ① *S. Typhimurium*균의 배양 온도 및 증식 조건을 확인함. 배지는 BHI medium 5 ml 를 사용하였으며, 성장 온도는 30℃와 37℃에서 실험을 실시하였음. 배양은 shaking incubator에서 180 rpm으로 배양하였으며, 25분 마다 OD값 (600nm)을 측정하였음(그림 4-68). 실험 결과 *S. Typhimurium*은 37℃에서 더 빠른 증식속도를 보였으며, 최적 배양 조건에서의 CFU를 측정하였음(표 4-37).

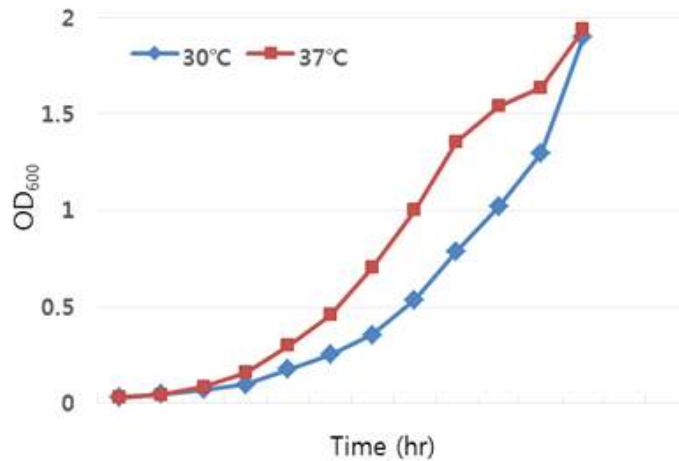


그림 4-68. *Salmonella Typhimurium*의 growth curve 측정 결과

표 4-37. *Salmonella Typhimurium*의 CFU 측정 결과

희석배수	Colony 수(개)	CFU(CFU/ml)	평균(CFU/ml)
10 ⁻⁶	512	2.56×10 ⁹	3.43×10 ⁹
10 ⁻⁷	75	3.75×10 ⁹	
10 ⁻⁸	8	4.0×10 ⁹	

- ② CFU 측정 결과, OD값(600nm) 0.7-0.8 일 때, 평균 3.43x10⁹ CFU/mL임을 확인하였으며, *S. Typhimurium* 특이 결합용 DNA 앵타머를 위한 SELEX 실험 시 균주의 배양 조건을 37℃, 3.43x10⁹ CFU/mL로 결정함.

(나) *S. Typhimurium*에 특이적으로 결합하는 앵타머 선별 과정 확립

- ① 가축 전염병의 원인이 되는 *S. Typhimurium*와 특이적으로 결합하는 앵타머를 제작하기 위해 100 bp의 주형 DNA와 이를 증폭할 수 있는 프라이머 한 쌍을 제작, 확보하였음. 랜덤 DNA 라이브러리는 PCR (Biorad, USA)을 사용하여 증폭하였으며 PCR purification을 통해 dsDNA만을 확보함 (그림 4-69).
- ② 순수한 ssDNA만을 확보하기 위하여, 정제한 dsDNA에 열-냉각기법과 스트렙타아비딘(Pierce, USA)을 사용하였으며 회수한 ssDNA는 10% 아크릴아마이드 겔 전기영동을 통하여 dsDNA와 비교하여 크기를 확인함(그림 4-70).

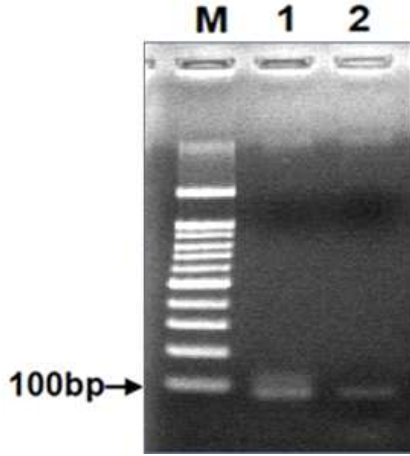


그림 4-69. PCR을 통한 랜덤 DNA
 앵타머 풀의 제작

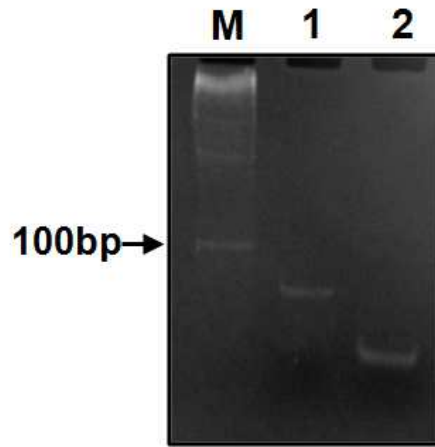


그림 4-70. 확보한 ssDNA 앵타머
 확인

③ 확보한 ssDNA는 85°C에서 5분 동안 끓인 후 상온에서 서서히 식혀 안정한 3차원 구조를 형성한 후 *S. Typhimurium*과 혼합함. *S. Typhimurium*에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머만을 선별하기 위해 원심분리와 PBS를 이용한 세척 방법으로 균에 결합하지 못한 앵타머를 제거하고, elution buffer(TE buffer)를 이용해 *S. Typhimurium*에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 회수함. *S. Typhimurium*가 아닌 다른 물질에 비특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제거하기 위해 SELEX 5회와 6회, 7회와 8회 사이에 각각 *Escherichia coli*와 *S. Enteritidis*를 이용한 네가티브 선별 (negative selection)을 진행하여, *S. Typhimurium*에만 특이적으로 결합할 수 있는 DNA 앵타머를 선별함.

(다) 나노드롭 (Nanodrop)과 real-time PCR을 이용한 최적 라운드 확인 및 클로닝을 통한 *S. Typhimurium*과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 후보군 확보

① SELEX를 10회까지 마친 후, 각 라운드에서 회수된 ssDNA 앵타머 풀의 친화성을 정량적으로 확인하기 위하여 나노드롭과 real-time PCR을 이용해 회수된 ssDNA의 농도를 정량화함. 그 결과, 네가티브 선별 이후에 8라운드의 앵타머 풀이 *S. Typhimurium*과 가장 특이적으로 결합하는 최적 라운드인 것을 확인함(그림 4-71과 표 4-38).

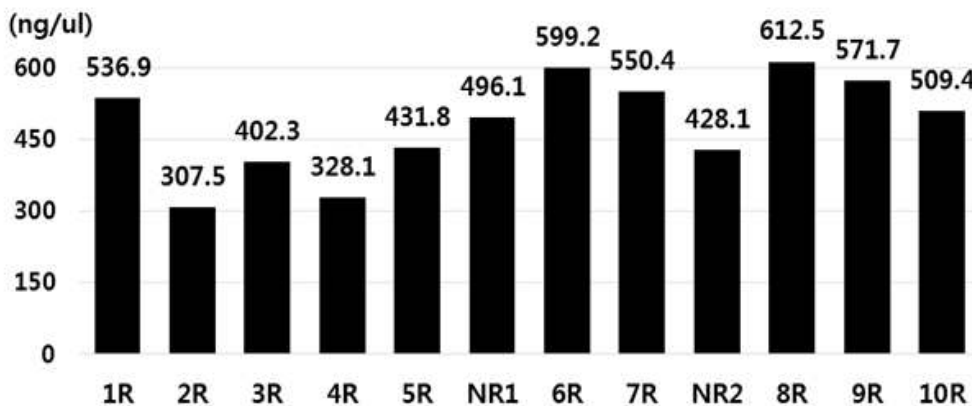


그림 4-71. 각 라운드에서 회수된 ssDNA의 농도

표 4-38. Real-time PCR 결과

Selection	Dilution rate	Ct Value	Dilution rate	Ct Value
8 round	1x10 ⁰	15.49	1x10 ⁻¹	18.79
9 round	1x10 ⁰	19.22	1x10 ⁻¹	21.44
10 round	1x10 ⁰	17.70	1x10 ⁻¹	20.22

- ② 이후 *S. Typhimurium*과 결합 효율이 가장 높은 것으로 판단된 8 라운드 앵타머 풀을 T-벡터 클로닝을 통해 각각의 후보군 클론으로 확보하고, 각 클론의 서열분석을 통하여 앵타머 후보군의 서열을 확보함. 서열 분석 결과, 비정상적인 서열을 제외하고 중복되지 않는 *S. Typhimurium* 결합 DNA 앵타머 후보군 26개를 확보함.
- (라) POST-SELEX와 SPR을 이용한 *S. Typhimurium* 결합 앵타머 후보군의 친화도 테스트

- ① T-벡터 클로닝과 서열분석을 통해 확보한 26개의 *S. Typhimurium* 결합 DNA 앵타머 후보군과 *S. Typhimurium*의 친화도를 정량하기 위하여 POST-SELEX와 SPR 기반의 BIAcore 시스템을 이용하여 SPR 실험을 실시하였음. 먼저 동일 농도의 앵타머 후보군 26개를 준비 한 후, SELEX를 진행하여 나노 드롭을 통한 elution 농도를 비교 하였음(표 4-39). POST-SELEX를 결과, 13번과 40번 앵타머가 최적의 농도를 보였으며, 이 두 앵타머를 SPR을 이용하여, 친화도 테스트를 실시하였음. 스트렙트아비딘이 고정되어있는 SA 센서칩 표면에 Biotin이 모디피케이션(modification) 되어있는 13번과 40번 앵타머를 각각 흘려 칩에 고정하였음. 이후, *S. Typhimurium*와 *Escherichia coli*, *S. Enteritidis*를 주입하여 후보군의 해리상수(K_d , dissociation)로 친화도를 확인함.

표 4-39. POST-SELEX 결과

앵타머 No.	Elution 농도 (ng/ul)	앵타머 No.	Elution 농도 (ng/ul)
1	933.8	15	980.7
3	900.5	16	945.7
4	869.4	18	980.2
6	955	22	992
7	897.4	23	931.5
8	876.4	29	702.5
9	841.2	30	934
10	956.5	33	984.9
11	856.3	36	1001.5
12	785.8	37	529.2
13	1008.5	38	873.1
14	959.8	40	1011.2

- ② *S. Typhimurium*과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 후보군 13번과 40번의 해리상수(K_d , dissociation)를 확인한 결과, 비교 균주 *S. Enteritidis*와 *E. coli*에는 결합하지 않고 *S. Typhimurium*에만 특이적으로 결합하는 양상을 확인할 수 있었으며, 앵타머 13번은 2.67×10^{-13} M, 40번은 3.54×10^{-14} M 의 해리상수를 확인할 수 있었음(그림 4-72).

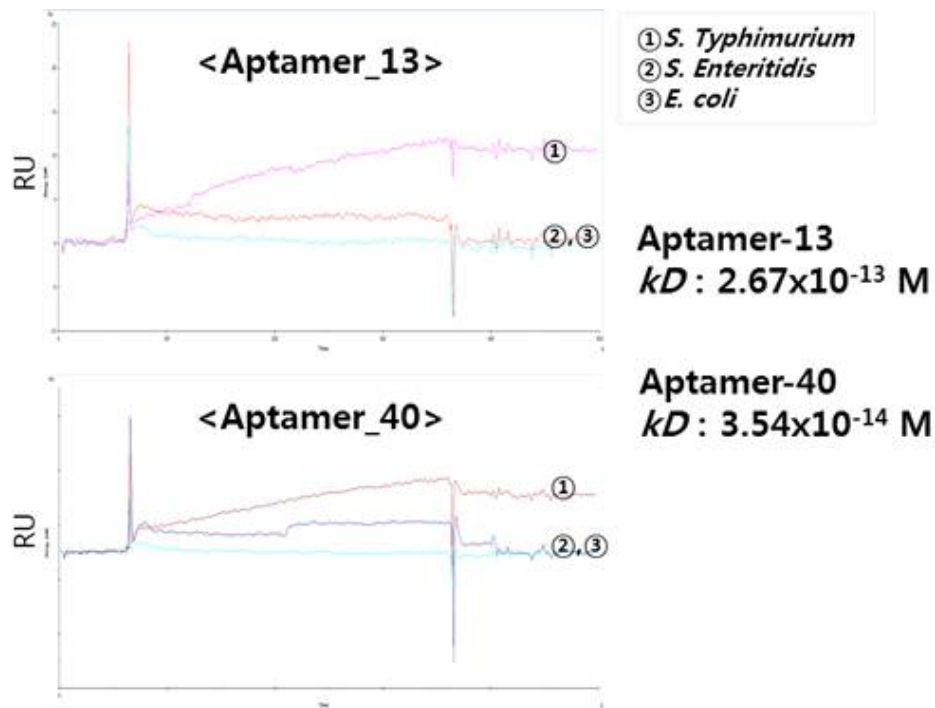


그림 4-72. SPR 측정 결과

(2) PRRSV(porcine reproductive and respiratory syndrome virus)에 특이적인 앱타머 개발

(가) PRRSV에 특이적으로 결합하는 앱타머 선별 과정 확립

① 가축 전염병의 원인이 되는 PRRSV와 특이적으로 결합하는 앱타머를 제작하기 위해 100 bp의 주형 DNA와 이를 증폭할 수 있는 프라이머 한 쌍을 제작, 확보하였음. 랜덤 DNA 라이브러리는 PCR (Biorad, USA)을 사용하여 증폭하였으며 PCR purification을 통해 dsDNA만을 확보함(그림 4-73).

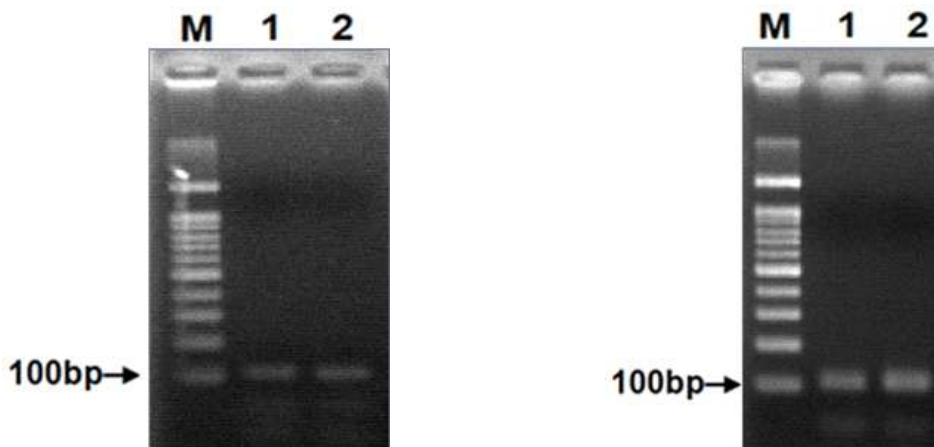


그림 4-73. PCR을 통한 랜덤 DNA 앱타머 풀의 제작

② 순수한 ssDNA만을 확보하기 위하여, 정제한 dsDNA에 열-냉각기법과 스트랩트아비딘(Pierce, USA)을 사용하여 회수함. 확보한 ssDNA는 85°C에서 5분 동안 끓인

후 상온에서 서서히 식혀 안정한 3차원 구조를 형성한 후 세포 표면에 PRRSV를 지닌 MARC-145 cell line을 결합시킴.

- ③ PRRSV에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머만을 선별하기 위해 원심분리와 PBS를 이용한 세척 방법으로 PRRSV에 결합하지 못한 앵타머를 제거하고, elution buffer(TE buffer)를 이용해 PRRSV에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 회수함. PRRSV가 아닌 MARC-145 cell line에 비특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제거하기 위해 매 SELEX 과정마다 PRRSV를 가지고 있지 않은 MARC-145 cell line을 이용한 네가티브 선별 (negative selection)을 진행하여, PRRSV에만 특이적으로 결합할 수 있는 DNA 앵타머를 선별함.

(나) 나노드롭을 이용한 최적 라운드 확인 및 클로닝을 통한 PRRSV와 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 후보군 확보

- ① SELEX를 11회까지 마친 후, 각 라운드에서 회수된 ssDNA 앵타머 풀의 친화성을 정량적으로 확인하기 위하여 나노드롭을 이용해 회수된 ssDNA의 농도를 정량화함. 그 결과, 농도가 서서히 증가함을 확인할 수 있었으며 9라운드 이후로 감소하는 것을 확인함. 총 11번의 반복적인 SELEX 과정 결과, 9라운드의 앵타머 풀이 PRRSV와 가장 특이적으로 결합하는 앵타머가 많이 확보됨을 확인할 수 있었으며 다양성도 높은 최적 라운드임을 확인함 (그림 4-74).

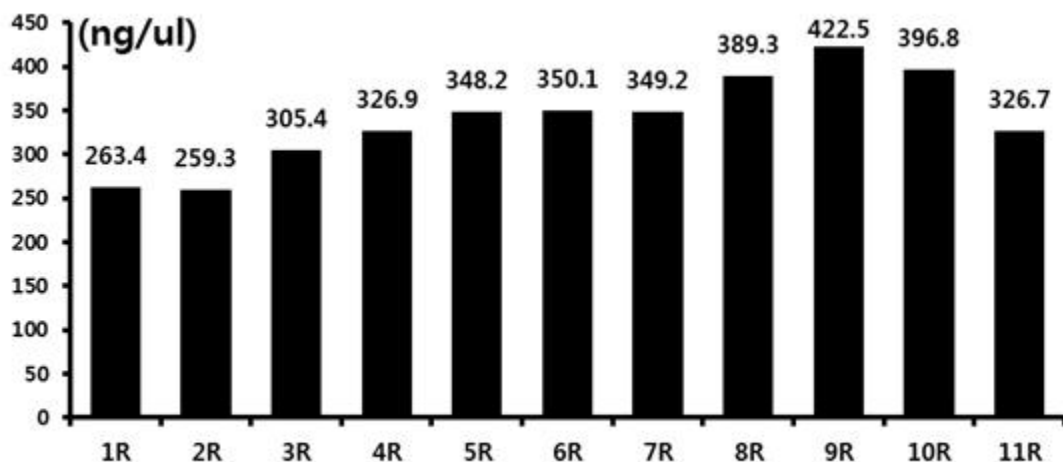


그림 4-74. 각 라운드에서 회수된 ssDNA의 농도

- ② 이후 PRRSV와 결합 효율이 가장 높은 것으로 판단된 9라운드 앵타머 풀을 T-벡터 클로닝을 통해 각각의 후보군 클론으로 확보하고, 각 클론의 서열분석을 통하여 앵타머 후보군의 서열을 확보함. 서열 분석 결과, 비정상적인 서열을 제외하고 중복되지 않는 PRRSV 결합 DNA 앵타머 후보군 24개를 확보함.

(다) POST-SELEX와 SPR을 이용한 PRRSV 결합 앵타머 후보군의 친화도 테스트

- ① T-벡터 클로닝과 서열분석을 통해 확보한 24개의 PRRSV 결합 DNA 앵타머 후보군과 PRRSV의 친화도를 정량하기 위하여 POST-SELEX와 SPR 기반의 BIAcore 시스템을 이용하여 SPR 실험을 실시하였음. 먼저 동일 농도의 앵타머 후보군 24개를 준비 한 후, SELEX를 진행하여 나노드롭을 통한 elution 농도를 비교하였음(표 4-40).

표 4-40. POST-SELEX 결과

애타머 No.	Elution 농도 (ng/ul)	애타머 No.	Elution 농도 (ng/ul)
1	569.4	31	587.4
2	522.3	36	566.3
3	496.5	42	555.1
4	588.7	46	516.7
7	568.3	47	648.2
12	574.2	52	623.4
15	526.4	59	617.4
16	635.4	62	489.5
17	521.4	65	421.5
18	496.3	71	544.3
27	502.4	77	521.3
29	684.3	78	522.6

- ② POST-SELEX 결과, 16번, 29번, 47번, 52번 애타머가 최적의 농도를 보였으며, 이 두 애타머를 SPR을 이용하여, 친화도 테스트를 실시하였음. 스트렙트아비딘이 고정되어있는 SA 센서칩 표면에 바이오틴이 모디피케이션 되어있는 PRRSV 특이 결합용 애타머를 각각 흘려 칩에 고정하였음. 이후, PRRSV를 가지고 있는 MARC-145 cell line을 주입하여 후보군의 해리상수(K_d , dissociation)로 친화도를 확인함.
- ② PRRSV와 특이적으로 결합하는 DNA 애타머 후보군 24개의 해리상수 (K_d , dissociation)를 분석함. 애타머들 PRRSV에 가장 친화력이 높았던 애타머 4종(16번, 29번, 47번, 52번)을 선별하였음. 애타머 16번이 6.87×10^{-14} M로 가장 높았으며, 29번은 1.08×10^{-12} M, 47번은 8.99×10^{-13} M, 52번은 2.12×10^{-13} M의 해리상수를 확인할 수 있었음 (그림 4-75).

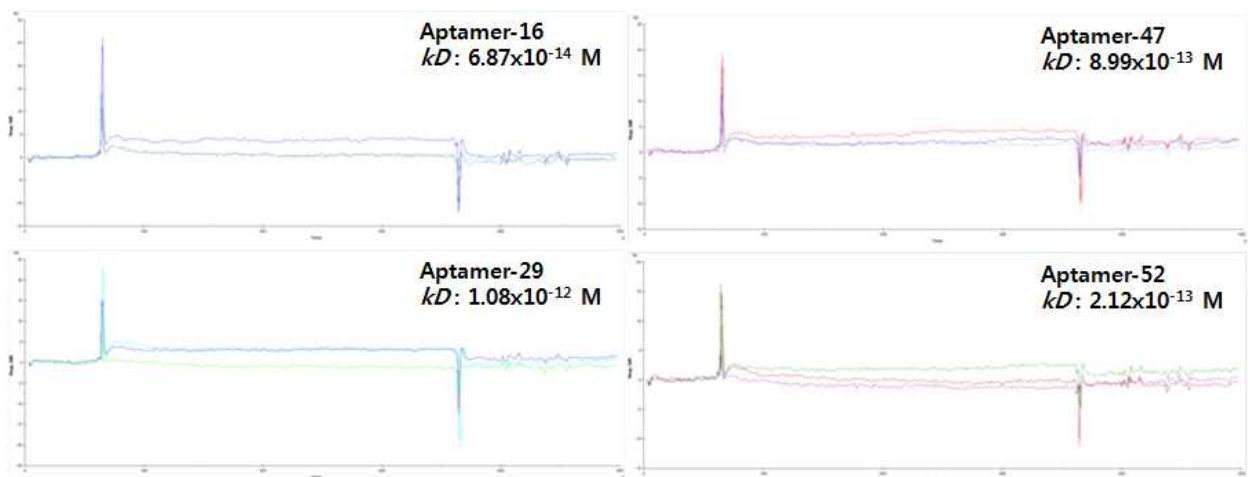


그림 4-75. SPR 측정 결과

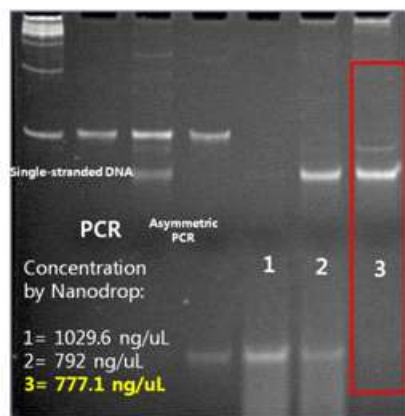
나. 항균성 펩타이드 및 가축 전염병 치료 후보용 애타머의 항균활성 및 효능평가

- (1) 항균성 펩타이드에 특이적인 애타머 개발 및 효능 평가

- 항균 펩타이드라 불리는 생체내 분자들은 선천면역 반응물 중 하나로서 미생물의 종류에 크게 상관없이 항균력을 나타냄. 면역력이 생기는 기존 항생제와 달리 내성 문제가 없으며 후천면역에 대한 부작용이나 거부 반응이 없음. 초기 단계이긴 하나, 면역학적으로 중요하고 산업적으로도 폭넓은 가능성을 갖고 있어 동물 산업 기술 개발 활용에 적극 활용될 것으로 기대됨.
- 돼지에서 발견되는 항균 펩타이드 PG1, PMAP, PR26 3종의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 앵타머를 개발하여 최적 앵타머를 선별하고, 선별된 앵타머와 항균펩타이드를 활용하여 가축전염병 관련 미생물의 항균성 평가에 활용하고자 함.

(가) Asymmetric PCR로 앵타머 pool 준비

- ① 항균 펩타이드와 특이적으로 결합하는 앵타머 후보군을 선별하고, 이를 이용하여 항균펩타이드에 앵타머를 접목시켜 가축병원성 미생물의 생육억제를 확인하고자 함. DNA 앵타머를 선별하기 위하여 DNA 앵타머 100bp 주형과 이를 증폭할 수 있는 프라이머 한쌍을 확보함. 임의의 DNA 라이브러리 100bp 주형은 PCR을 이용하여 증폭함. dsDNA 중 ssDNA 만을 증폭하기 위하여 비대칭 PCR을 진행한 후, PCI(Phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1) 용액을 처리한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 회수함. tRNA와 3 M 소듐 아세테이트 (sodium acetate, pH 4.5), 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에서 1시간 이상 반응시킴. 반응 후에는 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 ssDNA만을 회수함. 회수한 ssDNA는 65°C에서 건조시킨 후, 50 μ l의 증류수에 녹였다. 회수한 ssDNA 중 10 μ l를 취하여 10% 아크릴아마이드 겔을 이용하여 dsDNA와 비교하여 정확한 크기의 밴드가 나타나는지 확인함 (그림 4-76).



0.5X TBE buffer, Acrylamide gel
 Lane1:100bp ladder marker
 Lane2:dsDNA(PCR product)
 Lane3:Asymmetric PCR-1 product
 Lane4:Asymmetric PCR-2 product
 Lane5:After Streptavidin, ssDNA-1
 Lane6:After Streptavidin, ssDNA-2
 Lane7:After Streptavidin, ssDNA-3

그림 4-76. ssDNA 앵타머 pool의 아크릴아마이드겔 확인

(나) Ni-NTA resin을 활용한 앵타머 선별 SELEX 조건 확립

- ① Ni-NTA agarose resin과 히스티딘(His)이 결합되어있는 항균펩타이드(AMP)를 사용하여 항균펩타이드에 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하고자함. 먼저 히스티딘이 결합된 항균펩타이드를 획득한 ssDNA 앵타머 pool과 혼합하여 4°C에서 1시간동안 반응시킴. Ni-NTA agarose resin을 1X PBS buffer로 활성화시킨 후, 상층액을 제거함. 앞서 히스티딘결합 항균펩타이드와 ssDNA 앵타머 풀을 반응시킨 반응액을 활성화된 Ni-NTA agarose와 4°C에서 1시간 동안 추가로 반응시킨 후, 세척과정을 통해 항균펩타이드와 결합하지 못한 ssDNA 앵타머를 제거함. Ni-NTA

agarose로부터 히스티딘결합 항균펩타이드와 이에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 용출하기 위하여 DNA 앵타머 용출 용액을 넣어 4°C에서 1시간동안 교반하며 용출액을 얻음. 이후, 항균펩타이드와 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머만을 회수하기 위하여 PCI 법을 통하여 회수된 상층액에 tRNA와 3M 소듐 아세테이트 (pH 4.5), 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에서 1시간 이상 반응시켰고, 반응액을 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리함. 이를 통하여 항균펩타이드와 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머만을 회수할 수 있었으며, 회수된 DNA 앵타머는 65°C에서 건조시킨 후, 50 μ l의 증류수에 녹임(그림 4-78).

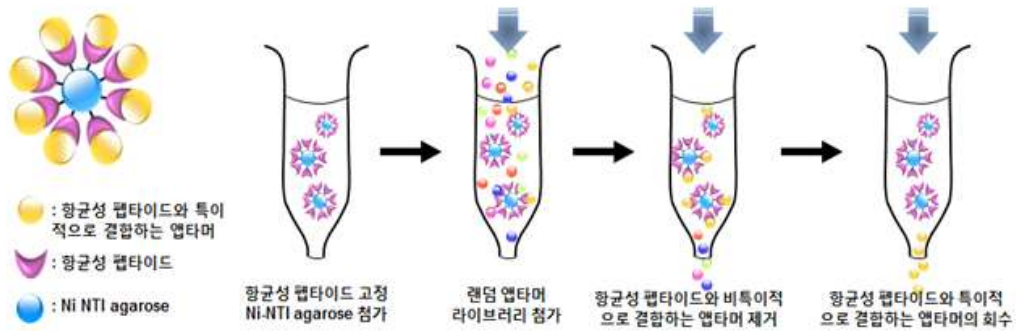


그림 4-78. Ni-NTA agarose resin을 통한 항균펩타이드 특이결합 앵타머 SELEX 조건 확립

(다) Nanodrop과 Real-time PCR을 통한 최적 SELEX round 선별

① 항균펩타이드와 DNA 앵타머 pool 간의 결합과정(SELEX)에서 Ni-NTA resin과 히스티딘 각각에 특이적으로 결합하는 앵타머를 제거하기 위하여 Negative SELEX를 진행함. 항균펩타이드가 존재하지 않는 Ni-NTA agarose resin과 히스티딘만을 앵타머 pool과 반응시킨 후 결합한 용액을 제거하고 상층에 비결합 앵타머만을 확보하여 다음 SELEX round에 사용함. 항균펩타이드 특이결합 앵타머 확보를 위하여 반응시키는 SELEX 과정을 11회 반복 수행함. 각 SELEX round로부터 확보된 앵타머 pool들의 농도는 Nano drop를 사용하여 측정함. 전체 11round의 SELEX 중 9round에서 352.6 ng/ μ l로 가장 높은 농도의 앵타머 pool이 확보됨 (그림 4-79).

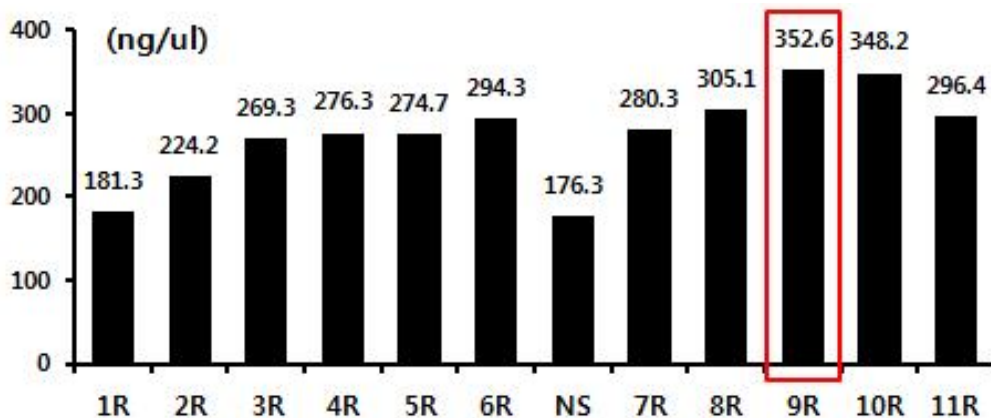


그림 4-79. 항균펩타이드 특이결합 앵타머 SELEX 반응 최적 round 선별

② 9 round의 DNA가 서열이 보존된 고농도의 ssDNA임을 확인하기 위하여

real-time PCR을 진행함. 네가티브 선별 이후인 8, 9 및 10 round에서 용리된 각각의 ssDNA 앵타머들을 PCR 기법을 이용하여 증폭하고, 가열-냉각 기법을 이용하여 ssDNA를 확보함. 이를 통하여 획득된 각 ssDNA들은 원액과 10^{-1} 로 각각 희석하여 실시간 PCR 기법의 주형 DNA로 사용함. iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad, USA)를 이용하였으며, real-time PCR 반응 결과는 원액과 10^{-1} 로 희석된 샘플을 주형 DNA로 이용한 실험 모두에서 9 round가 가장 낮은 C(t)값인 16.87을 갖는 것을 확인할 수 있었음. 8 round와 10 round에서 획득한 ssDNA를 주형 DNA로 이용한 real-time PCR C(t)값은 17.21, 19.42로 9 round Ct값 보다 높게 나옴. 이는 나노드롭을 이용하여 확인한 각 라운드에서 회수된 앵타머 농도 측정 결과와도 일치하는 것을 확인할 수 있었음. 농도확인과 real-time PCR을 통하여 9 round의 앵타머 pool이 항균펩타이드와 결합 효율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었음(그림 4-80).

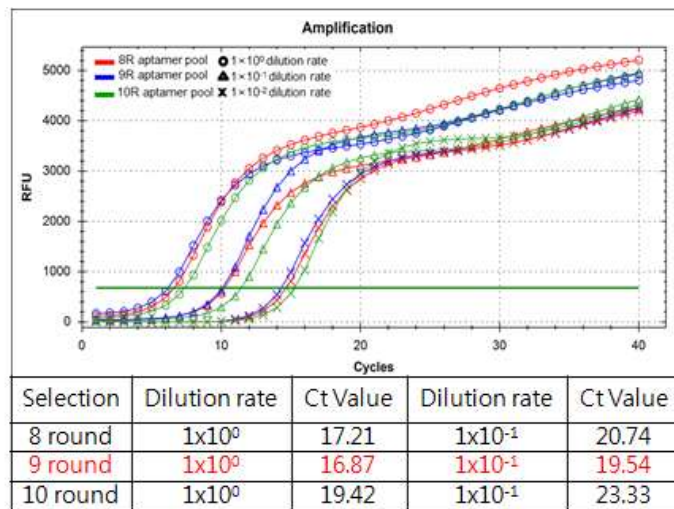


그림 4-80. Real-time PCR을 통한 항균펩타이드 특이결합 앵타머 최적 round 선별

(라) 항균펩타이드와 앵타머 혼합물의 병원성 미생물에 대한 효능 평가

① 9 round로부터 선별된 DNA 앵타머 pool을 항균펩타이드와 혼합하여 가축 전염병 유발 병원균에 처리하였을 때, 균의 성장이 억제되는 것을 보고자 함. 균주는 *Shigella sonnei*를 사용하였으며 tryptic soy broth 배지를 사용함. control로서 *S. sonnei* 균주만 자라는 배양액을 사용하였으며 항균력 펩타이드를 추가로 넣은 *S. sonnei* 배양액, 항균펩타이드에 선별한 앵타머도 추가로 넣은 배양액까지 실험함. 배양액은 96well plate의 well에 각각 $200\mu\text{l}$ 로씩 배양하였으며 각 배양액은 시간별로 well 내부에 있는 균체의 OD값을 측정함. 측정결과, *S. sonnei*와 항균펩타이드를 혼합한 배양액이 control인 *S. sonnei* 배양액의 균주 성장 속도보다 느리게 자라는 것을 확인하였으며 균주와 항균펩타이드 혼합 용액에 앵타머까지 혼합되어있는 배양액은 균주의 성장이 더욱 지연되는 것을 확인함. 앵타머를 통하여 균주의 성장 억제 효과가 극대화됨을 확인함(그림 4-81).

그림 4-81. *Shigella sonnei*에 대한 항균펩타이드와 앵타머의 항균 효능 평가

다. 가축 전염병 관련 병원성 인자인 *Shigella sonnei*와 *Vibrio parahaemolyticus*에 특이적인 앵타머의 항균활성 평가 및 안정성 평가

(1) *S. sonnei*와 *V. parahaemolyticus* 균주에 대한 앵타머의 항균활성 평가

(가) 앵타머 확보 및 *S. sonnei*와 *V. parahaemolyticus* 균주 준비

① 2, 3차년도에 확보된 *S. sonnei* 및 *V. parahaemolyticus* 특이결합 앵타머를 활용하여 가축 전염병 균주에 대한 항균활성을 평가함. *S. sonnei*에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 2종을 선별하여 1X SELEX buffer에서 1uM 농도로 85°C에서 5min 가열한 후 상온에서 1시간동안 구조화 함. *V. parahaemolyticus* 특이적 DNA 앵타머 2종을 선별하여 1X SELEX buffer에서 1uM 농도로 85°C에서 5min 가열한 후 상온에서 1시간동안 구조화 함. *S. sonnei*와 *V. parahaemolyticus* 각각의 균주를 Nutrient broth 5ml에 각각 seed culture하여 37°C에서 하룻밤 배양함.

② Seed culture 배양액을 Nutrient broth 5ml에 1/50 비율로 접종하여 배양함. 접종 시 *S. sonnei* 배양액에는 *S. sonnei* 결합용 앵타머 2종을 1uM로 혼합하고 *V. parahaemolyticus*는 *V. parahaemolyticus* 결합용 앵타머 2종을 1uM로 혼합하여 96well plate well에 200μl씩 분주하여 37°C에서 배양하여 균의 성장에 대한 억제력을 확인함 (그림 4-82).

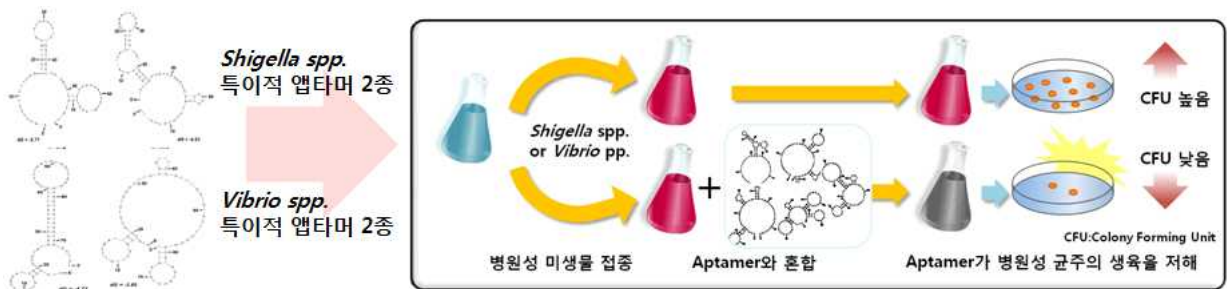


그림 4-82. 앵타머를 이용한 가축 전염병관련 미생물의 성장 억제 효능 평가

(나) 앵타머를 이용한 *S. sonnei*와 *V. parahaemolyticus* 성장 억제 평가

- ① 배양이 끝난 후 배양액 각각의 well에 남아있는 *Shigella spp.*와 *Vibrio spp.*의 균체를 확보하여 *S. sonnei* 특이결합 앵타머와 *V. parahaemolyticus* 앵타머 각각을 첨가한 배양액과의 차이를 확인하고자 함. 확인 결과, 앵타머가 첨가된 *S. sonnei* 배양액과 *V. parahaemolyticus* 배양액 각각은 앵타머를 넣지 않은 배양액보다 균체량이 적었으며 OD 값 측정 시 균주만 배양한 용액보다 초반 배양에서 비교적 낮은 OD값을 나타내어 균의 성장이 지연되거나 억제되었음을 확인할 수 있었음. 실질적인 메카니즘은 확인할 수 없었으나 각각의 균주 결합 앵타머가 *S. sonnei*와 *V. parahaemolyticus* 균의 성장을 억제하거나 지연시켜 최종 균체량과 성장 과정에서의 OD 값이 낮아지는 것을 확인할 수 있었음(그림 4-83).

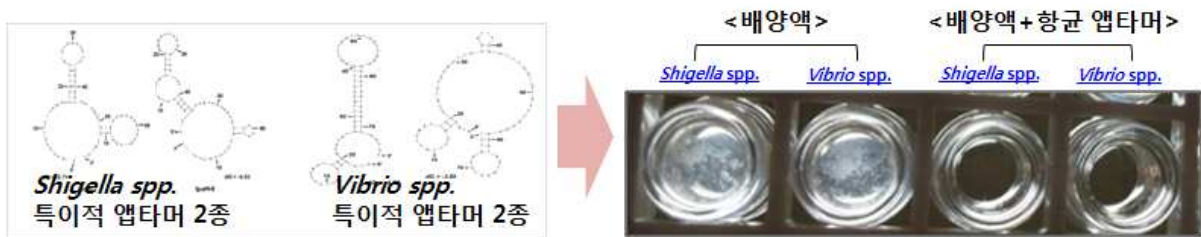


그림 4-83. *Shigella spp.*와 *Vibrio spp.*균주에 대한 앵타머 이용 항균 활성 효과

(다) Modification 앵타머의 열에 의한 안정성 평가

- ① 가축 전염병 관련 미생물 및 인자에 특이적인 앵타머를 개발하고 이를 실제 시료에 적용하기 위해서 다양한 조건에서 안정적인 앵타머의 개발이 필요함. 또한 앵타머의 재현성을 위하여 회수가 가능할 수 있도록 DNA 또는 RNA로 이루어진 앵타머에 화학적 변화(modification)를 통하여 확보가 가능하여야 하며 확보 후 표적물질에 대한 결합력의 지속 효과도 중요함. 이에 앵타머의 안정성 및 재현성을 향상시킬 수 있도록 앵타머 말단에 methylation에 따른 분해 방지 및 Biotin 또는 형광물질을 표지하여 앵타머 회수와 추적이 가능하도록 개발이 가능함. 본 연구에서는 streptavidin과 biotin의 결합력을 활용하여 앵타머 biotin modification을 진행하였으며 DNA 말단에 biotin이 modification된 앵타머의 열에 의한 안정성 실험을 진행함.
- ② 안정성 실험을 위하여 가축 전염병 관련 미생물 및 인자인 *Shigella sonnei*의 독성 인자인 IpaH 단백질에 특이적인 앵타머 1종을 선정, DNA 앵타머의 3' 말단에 Biotin을 결합시켜 modified DNA 앵타머를 확보함. Biotin의 modification 과정은 Bioneer사(Korea)를 통하여 합성 제작함. 표적물질과 앵타머의 결합력 확인 후 열을 통한 표적물질 제거에 대한 DNA 앵타머의 안정성을 확인하기 위하여 85°C의 반복 가열에서의 DNA 앵타머 안정성을 확인하고자 하였으며 가열 횟수는 각각 0, 1, 5, 10, 15회 가열 시 앵타머의 결합력 활성 능력을 평가함. 앵타머의 확인을 위하여 5' 말단에는 Cy5 형광물질을 표지하여 잔여 앵타머를 형광값으로 확인함.
- ③ 양쪽에 각각 Cy5-biotin으로 modification된 앵타머를 1nM로 tube에 200 μ l씩 분주한 후 85°C에서 5min 가열, ice에서 5min 가열하여 가열횟수 실험 1회로 정함. 동일한 조건으로 가열 회수 각각 0회, 1회, 5회, 10회, 15회를 진행한 후 가열 진행이

끝난 샘플을 ice에서 보관함. 모든 실험과정은 Cy5형광물질의 안정성을 위하여 호일로 감싸 샘플의 빛을 차단하여 진행함. Tube에 Streptavidin agarose resin을 500 μ l씩 분주한 후 각각의 가열 조건으로 확보된 5종의 샘플들 (0, 1, 5, 10, 15회 가열)을 혼합하여 1시간 동안 반응시킴. 반응 후 streptavidin agarose resin과 결합되지 않은 Cy5-biotin 앵타머를 제거하기 위하여 13,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층을 일부 제거함(완전히 제거했을 경우, streptavidin agarose resin의 손실이 발생함). 상층 일부 제거 후 제거한 만큼 멸균된 증류수를 추가하여 혼합한 다음, 다시 동일한 세척과정을 3회 진행함. 세척된 Cy5_Biotin 앵타머가 결합되어 있는 streptavidin agarose resin은 멸균된 DW와 함께 amine group이 코팅되어 있는 plate로 옮겨진 후 ELISA reader 장비로 형광값 측정함.

- ④ Cy5 형광측정 실험결과, 여러차례 가열된 앵타머의 결합력은 가열 횟수와 관계없이 표적 물질에 대하여 결합력이 계속적으로 유지되어 90%이상의 일정한 형광값을 나타냄을 확인하였으며 DNA 앵타머의 열에 의한 안정성이 확인됨(그림 4-84).

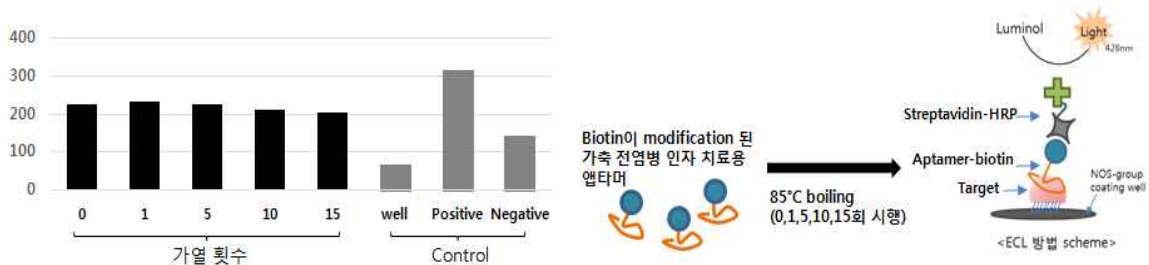


그림 4-84. 가속 전염병 특이결합 앵타머의 modification에 따른 안정성 평가

6. 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화 (제4협동)

- 개발신소재를 이용한 면역복합제제 기본 제형 생산하고, 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물별 주요 대상질병에 대한 면역항체 성분이 함유된 기초 면역제제를 생산하였고, 이를 이용하여 양돈용, 축우용 및 양계용 면역복합제제 기본제형을 개발하고, 시제품을 생산하였음(제1세부과제 공동수행).

가. 개발 면역복합제제 시제품의 안정성 시험

(1) 시험대상 품목

- 양돈, 양계용 면역복합제제 시제품의 일반성분(생균제, 비타민 등)과 면역제제 성분에 대한 안정성 시험을 실시하였음.

(2) 시험방법

(가) 일반성분

- 면역복합제제 시제품 구성에 포함되는 기본 제제인 생균제 3종 즉, 당화균(*Bacillus mesentericus* To-A), 유산균(*Streptococcus faecalis* T-110), 낙산균(*Clostridium butyricum* To-A), 그리고 비타민(A, D3, E)과 일반 구성성분에 대한 안정성 시험은 1, 2, 3차년도에 확립된 방법에 따라 2014년 8월부터 2015년 5월 현재까지 9개월 동안 3개월 간격으로 각 성분의 균수 및 함량을 측정하여 안정성을 확인하였음

(나) 면역제제성분

- 면역복합제제 시제품 구성에 공통적으로 대장균과 살모넬라균에 대한 면역항체를 포함시켰기 때문에 이 2종의 면역항체를 지표성분으로 하여 항체가 변동을 조사하여 면역성분의 안정성을 1차적으로 확인하였음.

① IgY 제제 항체역가검사

㉠ 검사방법 : Indirect ELISA Antibody Titer test

㉡ 검사내역 : *E. coli*, *Sal. Typhimurum*

㉢ 역가측정 : P/N value

- 음성시료의 OD치 2배이상되는 시료의 항체가를 역산하여 계산함.
- 예로 음성시료의 항체가 OD치가 0.1일 때 시료의 항체가의 OD치가 320배에서 0.25, 640배에서 0.16이면 항체가는 320배로 측정함.

㉣ 시약 및 처리내용

- 음성시료 대조균 : SPF란에서 추출한 난황추출액
- Enzyme : Anti-chicken IgY HRPO enzyme 20ng/ml 농도로 사용
- Substrate : TMB
- 결과치 판독 : 파장 450nm
- ELISA 항원농도: *Sal*, *E.coli*의 경우: 300ng/ml 농도로 coating
- ELISA용 항원: 세균의 경우 각 세균을 배양 후 cell pellet를 초음파처리하여 OMP를 정제한 후 BCA kit로 항원농도를 측정하여 300ng/ml 농도로 사용
- 시료처리 : Spray dry처리한 IgY분말 1g을 DW 10ml 희석한 혼합액을 초음파처리 한 후 원심한 상층액을 시료로 사용
- 시료 희석 : 10배부터 20,480배까지 2진 희석
- 항체가 : P/N value 계산 (음성시료의 OD값의 2배이상 되는 희석배수를 cut off하

여 640배로 항체역가 판정

② 초유 제제 항체역가검사

㉠ 검사방법 : Indirect ELISA Antibody Titer test

㉡ 검사내역 : *E. coli*, *Sal. typhimurum*

㉢ 역가측정 : P/N value

- 음성시료의 OD치 2배이상 되는 시료의 항체를 역산하여 계산

- 예시) 음성시료의 항체가 OD치가 0.1일 때 시료의 항체의 OD치가 320배에서 0.25, 640배에서 0.16이면 항체는 320배로 측정

㉣ 시약 및 처리내용

- 음성시료 대조군 : 초유섭취하지 않은 송아지혈청

- Enzyme : Anti-Bovine IgG HRPO enzyme 20ng/ml 농도로 사용

- Substrate : TMB

- Reading : 450nm

- ELISA 항원농도: *Sal*, *E.coli* : 300ng/ml 농도로 coating

- ELISA용 항원: 각 세균을 배양 후 cell pellet를 초음파처리하여 OMP를 정제한 후 BCA kit로 항원농도를 측정하여 300ng/ml 농도로 사용

- 시료처리 : Spray dry처리한 IgY분말 1g을 DW 10ml 희석한 혼합액을 초음파처리 한 후 원심한 상층액을 시료로 사용

- 시료 희석 : 10배부터 20,480배까지 2진 희석

- 항체가 : P/N value 계산 (음성시료의 OD값의 2배 이상 되는 희석배수를 cut off 하여 640배로 항체역가 판정

(3) 시험결과

(가) 생균 및 일반성분 안정성 시험결과

① 양돈용 제제 2종(다이스트롭-피그산1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2014년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 3개 제품에 실시한 일반제제 안정성 시험결과는 각각 표 4-41에서 4-46의 성적과 같음.

㉠ 양돈용 2개 제제 시제품에 대하여 2014년 8월부터 3개월 간격으로 9개월 동안 생균수의 균수함량을 측정한 결과, 유의성 있는 균수의 감소가 관찰되지 않아 제품으로서의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.

㉡ 비타민 및 기타 구성분들의 함량도 제조시 함량의 90% 이상을 유지하고 있어 시험기간 동안함량의 변화가 제품의 효능에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음.

표 4-41. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2014-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	99.8%	98.5%	98.4%	97.0%
		20℃	100%	99.2%	98.1%	97.6%	95.2%
		40℃	100%	98.2%	96.1%	95.2%	92.3%
비타민 D3	2g	5℃	100%	99.5%	98.9%	98.2%	97.0%
		20℃	100%	99.2%	98.2%	97.8%	96.3%
		40℃	100%	98.5%	96.4%	95.4%	94.1%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.5%	99.8%	99.1%	98.4%
		20℃	100%	99.3%	98.4%	97.4%	96.8%
		40℃	100%	98.9%	98.1%	95.4%	94.1%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.6%	99.2%	98.6%	98.5%
		20℃	100%	100.2%	99.6%	98.2%	97.5%
		40℃	100%	99.2%	98.1%	96.5%	95.3%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.1%	99.8%	98.9%	98.2%
		20℃	100%	99.7%	98.7%	97.9%	95.4%
		40℃	100%	98.6%	97.1%	94.5%	92.3%

표 4-42. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2014-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	100.1%	99.7%	98.7%	97.4%
		20℃	100%	99.5%	98.7%	97.6%	95.4%
		40℃	100%	98.5%	96.0%	94.1%	93.3%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.2%	99.9%	99.4%	98.7%
		20℃	100%	99.8%	99.2%	98.7%	96.7%
		40℃	100%	98.3%	97.5%	96.3%	95.1%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.7%	100.1%	99.6%	98.4%
		20℃	100%	100.5%	99.5%	98.6%	97.2%
		40℃	100%	98.7%	97.2%	96.1%	95.0%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.1%	99.9%	99.3%	98.8%
		20℃	100%	99.9%	99.5%	98.4%	98.1%
		40℃	100%	99.1%	98.5%	97.6%	96.3%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.9%	98.7%	98.4%	97.7%
		20℃	100%	99.8%	98.7%	97.6%	95.2%
		40℃	100%	99.1%	98.2%	96.2%	93.5%

표 4-43. 양돈용제제(다이스트롭-피그산1호-제조번호 2014-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.5×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.6×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	100.3%	99.8%	99.1%	98.4%
		20℃	100%	99.7%	98.8%	97.5%	96.4%
		40℃	100%	99.1%	97.3%	94.2%	92.6%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.5%	99.9%	99.5%	98.8%
		20℃	100%	99.9%	99.3%	98.2%	97.3%
		40℃	100%	98.5%	97.6%	96.5%	94.6%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.5%	100.1%	99.7%	98.9%
		20℃	100%	99.8%	98.7%	97.2%	96.6%
		40℃	100%	99.2%	97.8%	95.4%	93.4%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.3%	100.0%	99.5%	98.9%
		20℃	100%	100.1%	99.6%	98.7%	96.2%
		40℃	100%	99.3%	98.2%	96.0%	93.6%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.1%	99.7%	98.5%	97.7%
		20℃	100%	99.8%	98.3%	97.4%	94.5%
		40℃	100%	98.5%	97.7%	96.4%	92.5%

표 4-44. 양돈용제제(다이스트롭-피그산2호-제조번호 2014-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.6×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶	0.6×10 ⁶
웹타이드아연	87g	5℃	100%	101.5%	101.2%	99.9%	99.5%
		20℃	100%	100.8%	100.5%	99.6%	98.7%
		40℃	100%	100.1%	99.2%	97.4%	96.7%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.2%	99.8%	99.2%	98.7%
		20℃	100%	99.7%	98.7%	97.1%	96.8%
		40℃	100%	97.9%	96.5%	95.7%	94.2%

표 4-45. 양돈용제제(다이스트롭-피그산2호-제조번호 2014-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.5×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.6×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.8×10 ⁶
웹타이드아연	87g	5℃	100%	101.2%	100.8%	100.5%	99.9%
		20℃	100%	100.9%	100.5%	100.1%	99.4%
		40℃	100%	100.6%	100.1%	99.5%	98.6%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.8%	99.7%	99.2%	98.9%
		20℃	100%	99.5%	99.1%	98.7%	97.8%
		40℃	100%	99.1%	98.2%	97.2%	96.3%

표 4-46. 양돈용제제(다이스트롭-피그산2호-제조번호 2014-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.3×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁹ CFU/g	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	99.9%	99.8%	99.3%	98.6%
		20℃	100%	99.7%	99.1%	98.5%	98.4%
		40℃	100%	99.9%	98.4%	97.8%	96.7%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.8%	99.7%	99.1%	98.5%
		20℃	100%	100.1%	99.8%	99.4%	98.3%
		40℃	100%	99.5%	98.7%	98.2%	97.5%

- ② 양계용 제제 2종(다이스트롭-폴추리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2014년 8월부터 3개월 간격으로 9개월동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 일반제제 안정성 시험결과는 각각 표 4-47~4-49 및 4-50~4-52의 성적과 같음.
- ㉠ 양계용 2개 제제 시제품에 대하여 생균제의 균수를 측정한 결과, 유의성 있는 균수의 감소가 관찰되지 않아 제품으로서의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.
- ㉡ 비타민 및 기타 구성분들의 함량도 제조시 함량의 90% 이상을 유지하고 있어 시험기간 동안함량의 변화가 제품의 효능에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었음.

표 4-47. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2014-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	100.9%	100.5%	99.9%	98.8%
		20℃	100%	100.1%	99.3%	98.5%	97.4%
		40℃	100%	99.9%	98.1%	96.8%	95.4%
비타민 D3	2g	5℃	100%	101.5%	101.1%	100.7%	99.5%
		20℃	100%	101.8%	101.3%	100.5%	98.8%
		40℃	100%	101.3%	100.1%	98.5%	96.3%
비타민 E	4g	5℃	100%	100.1%	99.8%	98.7%	97.5%
		20℃	100%	101.3%	100.7%	99.1%	97.2%
		40℃	100%	101.1%	99.0%	96.2%	93.5%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.0%	99.7%	99.3%	98.7%
		20℃	100%	99.9%	99.5%	98.6%	98.0%
		40℃	100%	99.7%	98.3%	97.6%	95.6%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	101.3%	100.9%	100.2%	98.5%
		20℃	100%	100.5%	99.9%	98.4%	96.7%
		40℃	100%	98.7%	96.3%	94.6%	92.8%

표 4-48. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2014-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.7×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.6×10 ⁸	0.5×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.6×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶	0.6×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	100.3%	99.9%	99.1%	98.3%
		20℃	100%	101.1%	100.2%	98.5%	97.7%
		40℃	100%	102.5%	100.2%	98.3%	97.0%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.1%	100.0%	99.2%	98.6%
		20℃	100%	100.3%	99.7%	98.5%	97.6%
		40℃	100%	101.2%	98.9%	97.5%	95.3%
비타민 E	4g	5℃	100%	99.8%	98.8%	97.5%	96.4%
		20℃	100%	102.4%	101.5%	98.7%	96.4%
		40℃	100%	101.5%	98.4%	96.1%	95.7%
펩타이드아연	87g	5℃	100%	100.1%	100.0%	99.6%	98.8%
		20℃	100%	99.9%	99.5%	98.6%	97.3%
		40℃	100%	101.5%	100.7%	98.9%	97.6%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	99.8%	99.6%	98.7%	97.8%
		20℃	100%	101.4%	100.3%	99.2%	97.5%
		40℃	100%	100.5%	98.6%	96.4%	94.1%

표 4-49. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2014-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.4×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.7×10 ⁶
비타민 A	10g	5℃	100%	101.5%	100.8%	100.1%	99.5%
		20℃	100%	101.3%	99.8%	99.1%	98.6%
		40℃	100%	100.1%	98.6%	97.4%	96.5%
비타민 D3	2g	5℃	100%	100.3%	100.0%	99.3%	98.9%
		20℃	100%	100.7%	100.1%	99.3%	98.6%
		40℃	100%	102.0%	100.1%	97.3%	95.2%
비타민 E	4g	5℃	100%	101.3%	100.5%	99.3%	98.5%
		20℃	100%	100.4%	99.8%	98.7%	97.4%
		40℃	100%	101.2%	98.8%	96.5%	94.1%
웹타이드아연	87g	5℃	100%	100.4%	100.1%	99.8%	99.2%
		20℃	100%	102.0%	101.3%	99.2%	98.7%
		40℃	100%	102.3%	100.4%	98.7%	97.2%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.5%	100.1%	99.7%	98.2%
		20℃	100%	99.9%	99.2%	97.1%	96.4%
		40℃	100%	101.3%	99.7%	96.5%	95.0%

표 4-50. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2014-1)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.5×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	102.1%	101.9%	100.7%	100.6%
		20℃	100%	100.3%	99.9%	99.8%	98.9%
		40℃	100%	99.8%	98.7%	97.4%	96.1%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	101.2%	100.4%	99.8%	99.3%
		20℃	100%	100.2%	99.2%	98.6%	96.4%
		40℃	100%	100.6%	99.3%	96.2%	94.8%

표 4-51. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2014-2)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조시 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.8×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.1×10 ⁸	0.9×10 ⁸	0.7×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.7×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	102.1%	101.8%	101.7%	100.9%
		20℃	100%	100.7%	100.2%	99.7%	98.8%
		40℃	100%	101.4%	100.5%	99.5%	98.2%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	101.7%	101.5%	100.9%	100.2%
		20℃	100%	101.3%	100.5%	99.7%	99.1%
		40℃	100%	101.3%	100.1%	98.7%	96.8%

표 4-52. 양계용 제제(다이스톱-폴츄리산 2호-제조번호 2014-3)의 일반성분에 대한 안정성 시험결과

원 료 명	기준량	조건	제조사 (2014. 8. 21)	1개월 (2014. 9. 21)	3개월 (2014. 11. 21)	6개월 (2015. 2. 21)	9개월 (2015. 5. 21)
Streptococcus faecalis T-110	7.5g	5℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		20℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.3×10 ⁸	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.9×10 ⁸
		40℃	1.0×10 ⁸ CFU/g	1.2×10 ⁸	1.0×10 ⁸	0.8×10 ⁸	0.6×10 ⁸
Bacillus mesentericus To-A	2.75g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.9×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	0.8×10 ⁶
Clostridium butyricum To-A	5.5g	5℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.3×10 ⁶	1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶
		20℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
		40℃	1.0×10 ⁶ CFU/g	1.2×10 ⁶	1.1×10 ⁶	0.9×10 ⁶	0.8×10 ⁶
펩타이드아연	87g	5℃	100%	101.2%	100.9%	101.0%	100.5%
		20℃	100%	101.5%	101.1%	100.5%	99.3%
		40℃	100%	102.2%	100.5%	99.9%	99.1%
프락토올리고당	50g	5℃	100%	100.7%	100.6%	100.1%	99.8%
		20℃	100%	100.3%	99.5%	99.1%	98.5%
		40℃	100%	101.5%	100.6%	99.5%	97.8%

(나) 면역성분 안정성 시험결과

- ① 양돈용 제제 2종(다이스톱-피그산1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃)에 보관하면서 2014년 8월부터 9개월동안 매월 대장균과 살모넬라에 대한 항체역가를 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 IgY 및 초유 면역성분의 안정성(항체역가 변화) 시험결과는 각각 표 4-53~4-54 및 4-55~4-56의 성적과 같음.
- ㉠ 양돈용 2개 제제 시제품에 대하여 2014년 8월부터 9개월동안 매월 IgY 항체가를 측정한 결과 제조사의 역가와 동일한 항체가 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음(표 4-53 및 표 4-54).
- ㉡ 또한 초유제제에 대한 항체가를 측정한 결과에서도 대장균 및 살모넬라에 대한 항체역가가 제조 시와 동일한 수준으로 유지되고 있음을 확인할 수 있었음(표 4-55 및 표 4-56).

표 4-53. 양돈용제제(다이스톱-피그산 1호-제조번호 2014-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조 번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	640	640	640	320	640	640	320	320	320
	2	640	640	320	320	640	640	640	320	640
	3	640	640	640	320	640	320	320	640	320
<i>S. Typhimurium</i>	1	320	320	320	320	160	160	320	160	320
	2	640	640	320	640	640	320	640	320	640
	3	320	640	640	320	320	320	640	320	320

표 4-54. 양돈용제제(다이스톱-피그산 2호-제조번호 2014-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조 번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	640	640	320	640	640	320	320	320	320
	2	640	640	320	640	320	320	640	320	640
	3	640	320	640	320	640	640	640	320	320
<i>S. Typhimurium</i>	1	320	320	160	320	160	320	320	160	320
	2	640	640	320	640	640	320	320	320	640
	3	640	320	640	640	320	320	640	320	320

표 4-55. 양돈용제제(다이스톱-피그산 1호-제조번호 2014-1~3)의 초유 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조 번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	2560	1280	2560	2560	1280	1280	2560	1280	2560
	2	2560	2560	2560	1280	2560	1280	1280	2560	2560
	3	2560	2560	1280	2560	1280	1280	2560	1280	1280
<i>S. Typhimurium</i>	1	5120	2560	5120	2560	5120	2560	2560	2560	2560
	2	5120	5120	2560	5120	2560	5120	2560	5120	5120
	3	2560	5120	2560	5120	5120	2560	2560	2560	2560

표 4-56. 양돈용제제(다이스톱-피그산 2호-제조번호 2014-1~3)의 초유 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 IgY 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	2560	2560	1280	2560	1280	1280	2560	1280	2560
	2	2560	2560	1280	2560	1280	2560	2560	2560	2560
	3	2560	1280	1280	2560	2560	1280	2560	1280	1280
<i>S. Typhimurium</i>	1	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	2	5120	5120	2560	5120	5120	5120	2560	5120	5120
	3	5120	5120	2560	2560	5120	2560	5120	2560	2560

- ㉔ 양계용 제제 2종(다이스톱-폴츄리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트를 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃)에 보관하면서 2014년 8월부터 9개월동안 매월 대장균과 살모넬라(닭의 경우 *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* 및 *S. Enteritidis*)에 대한 항체역가를 측정하였음. 각 로트별로 실시한 IgY 성분의 안정성(항체역가 변화) 시험결과는 각각 표 4-57 및 4-58의 성적과 같음.
- ㉕ 양계용 2개 제제 시제품에 대하여 2014년 8월부터 9개월동안 IgY 항체가를 매월 측정된 결과 제조시의 역가와 동일한 항체가 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음(표 4-57 및 표 4-58)

표 4-57. 양계용제제(다이스톱-폴츄리산 1호-제조번호 2014-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	160	160	160	160	160	160	80	160	160
	2	320	320	160	320	320	320	160	320	320
	3	320	320	320	160	320	160	320	160	160
<i>S. Gallinarum</i>	1	320	320	160	320	160	160	160	320	160
	2	320	320	160	320	160	160	320	320	320
	3	320	320	320	160	320	320	320	160	320
<i>S. Pullorum</i>	1	320	320	320	160	320	160	160	320	160
	2	160	320	160	320	160	160	160	160	160
	3	320	320	160	160	320	160	160	160	160
<i>S. Enteritidis</i>	1	320	320	320	160	160	320	160	320	160
	2	320	320	160	320	320	160	160	160	160
	3	320	320	160	320	160	320	160	160	160

표 4-58. 양계용제제(다이스트롭-폴츄리산 2호-제조번호 2014-1~3)의 IgY 항체가 (ELISA) 측정결과

측정항목	제조번호	측정회수별 항체역가								
		1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회	9회
<i>E. coli</i>	1	160	160	80	160	80	160	80	160	160
	2	320	320	160	320	320	320	160	320	320
	3	320	320	320	160	160	320	320	160	160
<i>S. Gallinarum</i>	1	320	320	160	320	320	160	320	320	160
	2	320	320	320	160	160	320	160	320	320
	3	320	320	160	160	320	320	160	160	160
<i>S. Pullorum</i>	1	320	320	160	320	320	160	160	320	160
	2	320	160	320	320	160	160	320	160	160
	3	320	320	160	320	160	320	160	160	160
<i>S. Enteritidis</i>	1	160	320	160	320	320	160	160	160	160
	2	320	320	320	160	160	320	160	320	160
	3	320	320	320	160	320	160	160	320	160

나. 면역초유성분이 포함된 개발 면역복합제제 시제품의 안전성 및 임상시험

(1) 면역초유성분이 포함된 다이스트롭-피그산 1(이유자돈용 복합제제) 실험결과 보고서 II

(가) 시험배경

- 최근 10년간 양돈산업의 생산원가가 꾸준히 높아진 바 생산성을 절감시킬 수 있는 제품의 수요가 증가되어 왔다. 자돈의 면역력을 향상시키고 생산성을 높이기 위한 다이스트롭-피그산1(이하 다이스트롭1)의 효능 시험을 2013년에 이어 2014년에도 실시 하였음.
- 우리나라 양돈업은 점차 규모화되고 시설도 현대화되었지만 사육밀도가 높아지고 면역력이 떨어지면서 질병에 시달리는 농장이 증가하고 있음. 포유자돈과 이유자돈은 Roravirus, PED virus, TGE virus, E.coli, Salmonella 등 많은 바이러스 및 세균에 의한 소화기질병에 노출되어 있음. 세균성 질환은 농장에서 항생제와 Probiotics를 이용해 컨트롤이 가능하지만 바이러스성 질환은 한번 발생하면 쉽게 컨트롤하기 어렵다. 따라서 바이러스 질환은 백신과 함께 자돈의 면역력을 강화시켜주는 보조제가 필요한 실정임.
- 다이스트롭1은 자돈에 문제를 일으키는 소화기질병(세균 및 바이러스)에 대한 초유항체를 함유하고 있어 직접적으로 소화기질병을 감소시킬 수 있으며, 또한 미네랄과 Probiotics가 복합적으로 함유되어 있어 자돈의 소화기질병 예방에 큰 도움이 되리라 사료됨.

(나) 재료 및 방법

- 실험농장 : 고은농장(경기도 포천시 연천군 이동리)
- 생산규모 : 모돈 120두(일관사육)
- 시험기간 : 2014.8.28 ~ 10.10(43일간)

(다) 실험방법

① 초유항체 생산

- 초유면역항체 생산을 위한 젖소 접종용 항원은 설사병 3종 바이러스(TGEV, PEDV, RotaV)를 적합 세포주에서 배양하여 농축후 불활화하였으며, *E. coli*, *S. typhimurium*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *P. mutocida*, *S. suis* 등의 세균은 배양후 불활화하여 원심 농축하였으며, 바이러스 배양이 힘든 PCV2의 경우 그 주요 면역 단백질(capsid 단백질)을 배큐로바이러스 발현 시스템을 이용하여 발현후 그 배양액과 세포를 파쇄한후 불활화하여 사용하였음. 이러한 항원들은 적정 농도로 혼합 및 희석하고 부형제인 수산화알루미늄 겔과 면역증강제(oil adjuvant, ISA25)를 섞어 유제화하여 임신 젖소에 분만 2개월전부터 3주간격으로 3회 접종하여 고도면역시켰음. 면역된 젖소로부터 분만 30시간이내의 초유를 수거하고, 분말건조화한 후 부형제와 혼합하여 최종 초유면역항체제제를 제조하였으며, 각 병원체별 정제 항원을 이용한 효소면역측정법(ELISA)과 응집반응으로 초유에 함유되어 있는 면역항체의 역가를 측정하였음.

② 동물시험

- 27 일령 이유자돈 90 두에 대해 70 일령까지 폐사율 및 증체율을 측정하였다. 이유자돈은 3 개의 권장량군, 2 배권장량군, 무투여군의 3 개 돈군으로 구분하여 각각 별개의 돈방에 격리하였음.
- 실험자돈은 27 일령의 이유한 자돈을 3 개 자돈군으로 나누어 권장량군은 다이스트톱을 사료톤당 1kg 비율로 43 일간 투여하였고, 2 배권장량군은 다이스트톱을 사료톤당 2kg 비율로 43 일간 투여하였다. 무투여군은 다이스트톱을 첨가하지 않은 사료만 급이하였음. 사료는 대한제당 사료(무지개사료)를 사용하였음.
- 실험 시작전 모든 자돈군의 체중을 이동식체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제하였음. 실험중 투여되는 사료의 양은 정확히 기록하였으며, 자돈군에서 설사가 발생시 설사변을 채취하여 임프로 AH 실험실에 의뢰하였음. 또한 매일 일정시간에 설사, 발열, 기침 등 임상증상을 체크하여 기록하였다. 실험 종료시 모든 자돈의 종료체중을 측정하였으며, 그 때까지 섭취한 사료량을 정확히 기록하였음.

(라) 결과

① 임상증상

- 실험기간동안 무투여군은 설사와 신경증상 등 8 건의 임상증상이 나타나서 그 중 4 두의 자돈이 폐사하였다. 권장량군은 총 4 두에서 임상증상이 나타났으며 그 중 2 두가 폐사하였다. 2 배권장량군은 3 두에서 임상증상이 나타났으나 폐사는 없었음 (표 4-59).
- 2 배권장량군과 권장량군이 0 두와 2 두의 폐사가 발생한 것에 비하여 무투여군은 4 두의 폐사가 발생하였으며, 무투여군은 6 두에서 설사가 발생하여 다이스트톱 1 이 설

사 예방에 효과가 있음을 확인하였음. 반면 다이스톱이 호흡기질환 임상증상 발현에는 효과가 없었으나 폐사율은 감소시켜 호흡기질환으로 인한 폐사율 감소에 효과가 있을 것으로 사료됨.

표 4-59. 3 개 실험군간 임상증상 및 폐사율 비교

구 분	두 수	임상증상 발현두수	폐사율	비 고
권장량군	30	4	2	설사2두, 기침2두
2배권장량군	32	3	0	설사1두, 기침2두
무투여군	28	8	4	설사6두, 기침2두

② 생산성(증체율) 평가

- 권장량군, 2 배권장량군, 무투여군의 3 개 돈군간의 생산성 시험에서는 총사료섭취량이 2 배권장량군이 726.7kg, 권장량군 642.8kg, 무투여군이 558.1kg 으로서 2 배권장량군이 월등히 높았다. 이는 시험두수가 2 배권장량군이 많은 것이 가장 큰 이유라고 분석됨.
- 두당 일일사료섭취량은 오히려 무투여군이 541g 으로 가장 높아 총사료섭취량과 대조를 이루었으며, 권장량군도 534g 으로서 2 배권장량군의 528g 보다 높았음.
- 시험 종료시 평균체중은 2 배권장량군이 29.2kg 으로 가장 높았고, 권장량군 28.7kg, 무투여군 28.4kg 순으로 높았다. 사료요구율은 2 배권장량군이 0.97 로 가장 좋았고, 권장량군 1.02, 무투여군 1.05 순으로 나타났음(표 4-60).

표 4-60. 자돈군간 생산성(증체율) 평가

구 분	두 수	총사료섭 취량 (kg)	두당일일 사료섭취량 (g/day/두)	개시평 균체중 (kg)	종료평 균체중 (kg)	총증체 량(kg)	사료 요구율
권장량군	28	642.8	534	6.2	28.7	630.0	1.02
2배권장량군	32	726.7	528	5.9	29.2	745.6	0.97
무투여군	24	558.1	541	6.3	28.4	530.4	1.05

(마) 고찰

- 이유자돈용 다이스톱1을 사용한 이유자돈 시험에서 다이스톱1을 권장량의 2배 사용한 돈군이 임상증상 발현이 가장 적고 폐사율도 가장 낮아서 이유후 성장기에 다이스톱1을 투여함으로써 이유자돈의 설사증상 감소 및 폐사율 감소에 효과가 있을 것으로 사료됨.
- 다이스톱1을 이용한 생산성 시험에서는 2배권장량군이 종료평균체중이 가장 잘 나왔으며 권장량군도 무투여군에 비해 높게 나타났음.

- 사료요구율은 2배권장량군이 가장 좋았으며 권장량군도 무투여군에 비해 좋은 결과를 나타내었는데 이는 자돈 폐사율과 밀접한 관련이 있음.
- 이번 다이스톱1의 효능 시험을 통해서 다이스톱을 이유자돈 구간에 사용하는 것이 자돈의 유병율과 폐사율을 감소시키며, 사료요구율을 향상시켜 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료됨.

(2) 면역초유성분이 포함된 다이스톱-피그산 2(육성 및 비육돈용) 실험 결과 보고서 II

(가) 시험 배경

- 우리나라 양돈장의 생산성에 영향을 끼치는 요인중 하나는 육성구간에서의 폐사율임. 생산성 상위농장은 육성돈 폐사율이 낮은 반면, 하위농장은 폐사율이 높다. 농장 생산성을 높이고 경제성을 높이기 위해 다이스톱-피그산(이하 다이스톱 2)의 육성돈 시험을 기획하였음.
- 다이스톱 2는 육성돈에 문제가 되는 질병에 대한 초유항체와 면역력을 높여주는 미네랄과 생균제가 복합적으로 혼합된 제제로서 폐사율 감소와 증체율을 높여주어 농장 생산성 향상에 도움을 줄 것으로 기대됨.
- 면역제제는 과거에 면역혈청을 제작하여 사람이나 동물에 사용되어온 일종의 치료 및 예방용 제제로서 최근 국내에서는 산란계에 사람이나 동물의 병원체를 고도면역시켜 생산된 난황내 존재하는 IgY 항체를 이용하여 주요 질병을 치료 및 예방하는 방법이 많이 개발되어 사용되고 있음. IgY 제제는 기존의 면역혈청제제보다 생산량이나 부작용이 적은 장점이 있고, 면역된 산란계로부터 손쉽게 연속적으로 IgY 항체를 얻을 수 있다는 장점이 있지만 별도의 산란계 사육시설이 필요하고 지속적인 항원 접종 및 관리가 필요한 단점이 있음. 이러한 단점을 극복하고 고역가의 항체제제를 생산하기 위해 적용될 수 있는 방법이 젖소를 대상으로 병원체를 고도면역시켜 생산된 초유를 이용하는 것임.
- 젖소가 분만 후 수일간 분비하는 초유(colostrum)는 단백질, 당, 지질, 비타민, 미네랄 등의 영양소를 함유하고 있을 뿐만 아니라 다양한 성장인자(growth factor)와 항미생물인자(anti-microbial factor)등의 생체 활성성분을 가지고 있음. 또한 여러 가지 성장인자는 신생자우의 성장과 발달을 촉진시킴.
- 항미생물인자로는 면역글로불린, 락토페린(lactoferrin) 및 라이소자임(lysozyme) 및 락토페록시다제 (lactoperoxidase) 등이 있으며, 특히 어미로부터 섭취된 초유에는 생후 몇주간 병원체로부터 방어에 중요한 역할을 하는 면역글로불린인 IgG, IgM, IgA 의 농도가 정상적인 우유에 비해 약 100 배가 함유되어 있다. 송아지에서 다발하는 질병, 특히 소화기 질병에 대한 치료를 목적으로 젖소에 여러 가지 병원체를 고도면역시켜 제작한 면역제제가 개발되고 일부 상용화되어 사용되고 있음.
- 그러나 국내에는 이러한 항체 역가가 높고, 치료 및 예방효과가 우수한 초유를 이용한 돼지용 초유면역제제는 개발이 시작되지 얼마되지 않았음. 돼지는 일반적으로 소보다 사육 밀도가 높고, 질병에 더욱 취약하기 때문에 많은 예방 백신이나 치료 제제를 사용하게 된다. 특히 모돈군의 질병에 대한 면역수준이 균일하지 못하고, 초유 및 유즙이 불량하거나 정상적인 포유 기능이 저하될 경우 그

자돈은 질병에 감염될 가능성이 높음. 포유자돈 구간에서 면역 결핍에 의한 질병 감염은 자돈 폐사와 같은 직접적인 피해뿐만 아니라 성장이 정체되고 위축이 발생되면서 농장의 생산성 저하를 초래하여 더 큰 경제적인 피해를 초래함.

- 다이스톱 2는 초유항체와 미네랄 및 Probiotics 복합제로서 육성돈에 면역력을 증가시키고 농장의 생산성을 향상시키는 효과를 가지고 있으므로 이번 실험을 통해 다이스톱 2의 육성돈에서의 생산성 향상 효과를 확인하고자 함.

(나) 실험농장 및 방법

① 실험농장

- 실험농장 : 성운농장(경기도 파주시 파주읍 소재)
- 생산규모 : 모돈 320두(일관사육)
- 시험기간 : 2014.9.9 ~ 12.14
- 공시동물 : 육성돈 60두

② 실험방법

㉠ 재료준비: 다이스톱-피그산2(육성 및 비육돈용)용 초유항체

- 초유면역항체 생산을 위한 젖소 접종용 항원은 설사병 3종 바이러스(TGEV, PEDV, RotaV)를 적합 세포주에서 배양하여 농축후 불활화하였으며, *E. coli*, *S. typhimurium*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *P. multocida*, *S. suis* 등의 세균은 배양후 불활화하여 원심 농축하였으며, 바이러스 배양이 힘든 PCV2의 경우 그 주요 면역 단백질(capsid 단백질)을 배큐로바이러스 발현 시스템을 이용하여 발현후 그 배양액과 세포를 파쇄한후 불활화하여 사용하였음.
- 이러한 항원들은 적정 농도로 혼합 및 희석하고 부형제인 수산화알루미늄 겔과 면역증강제(oil adjuvant, ISA25)를 섞어 유제화하여 임신 젖소에 분만 2개월전부터 3주간격으로 3회 접종하여 고도면역시켰음. 면역된 젖소로부터 분만 30시간 이내의 초유를 수거하고, 분말건조화한 후 부형제와 혼합하여 최종 초유면역항체제제를 제조하였으며, 각 병원체별 정제 항원을 이용한 효소면역측정법(ELISA)과 응집반응으로 초유에 함유되어 있는 면역항체의 역가를 측정하였음.

㉡ 동물시험

- 돈군을 3개군(권장량군, 2배권장량군, 무투여군)으로 분류하고 권장량군은 다이스톱2를 사료톤당 0.5kg을 실험기간 내내 투여하였으며, 2배권장량군은 다이스톱2를 사료톤당 1kg을 실험기간동안 투여하였음.
- 무투여군은 어떠한 제제도 투여하지 않았다. 사료(카길사료)와 음수는 동일한 조건으로 하였으며 각 그룹은 별개의 돈방에 격리하여 실험하였다. 돈방의 환기와 시설조건은 동일하게 하였음.
- 71일령 육성돈을 권장량군, 2배권장량군, 무투여군의 3개 돈군으로 나누고, 182일령에 출하될 때까지 사료섭취량을 측정하였음. 실험 개시시에 개시체중을 체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하고, 종료체중은 출하체중으로 대신하였음.
- 실험 전과정에서 설사발생율을 매일 조사하여 기록하였다. 설사가 발생하면 분변 샘플을 북부축산위생연구소(경기도 양주시)에 의뢰하여 원인균을 동정하였음.

(다) 결과

- 각 그룹 20두씩 총 60두의 육성돈을 대상으로한 다이스톱2 효능시험은 육성돈 71일령부터 182일령까지 111일간 실시되었으며, 3개 돈군 모두 폐사는 발생하지 않았음.
- 개시평균체중은 권장량군이 28.3kg, 2배권장량군이 29.2kg, 무투여군이 28.9kg이었고, 종료평균체중은 권장량군이 111.0kg, 2배권장량군이 113.7kg, 무투여군이 109.4kg이었다. 총증체량은 2배권장량군이 1,690kg으로서 권장량군 1,654kg과 무투여군 1,610kg보다 높았음.
- 두당 일당증체량은 2배투여군이 761.3g으로 권장량군 745.0g보다 높았다. 무투여군은 725.2g으로 일당증체량이 가장 낮았음(표 4-61).

표 4-61. 시험돈군간 증체량 비교

구 분	실험 두수	개시 일령	종료 일령	개시평균 체중(kg)	종료평균 체중(kg)	총증체량 (kg/20두)	일당증체량 (g/day/두)
권장량군	20	71	182	28.3	111.0	1,654	745.0
2배권장량군	20	71	182	29.2	113.7	1,690	761.3
무투여군	20	71	182	28.9	109.4	1,610	725.2

- 두당일일사료섭취량은 2배권장량군이 3.76kg으로 가장 높았으며, 권장량군이 3.75kg, 무투여군 3.72kg 순으로 높았다. 사료요구율은 2배권장량군이 4.94로 가장 낮았으며, 권장량군이 5.03, 무투여군이 5.13순으로 나타났음(표 4-62).

표 4-62. 시험군의 사료섭취량 비교

구 분	실험두수	총사료섭취량 (kg)	두당일일사료섭취량 (kg/day/두)	사료요구율
권장량군	20	8,325	3.75	5.03
2배권장량군	20	8,347	3.76	4.94
무투여군	20	8,258	3.72	5.13

(라) 고찰

- 다이스톱-피그산2는 2배권장량(1kg/사료톤)으로 투여했을 때 일당증체량과 사료요구율이 가장 좋았음.
- 권장량(0.5kg/사료톤)으로 투여하였을 때도 무투여시보다 일당증체량과 사료요구율이 좋아 다이스톱-피그산2를 육성돈에 투여하였을 때 충분히 경제성이 있을 것으로 사료됨.

(3) 산란계용 다이스톱-폴츄리산1호 실험 보고서 II

(가) 서 론

- 2013년 실험에서 다이스톱-폴츄리1(이하 다이스톱)은 산란율을 3%이상 향상시켰고 연란과 파란도 현저히 감소시킨 바 있음. 이번 실험은 농장을 변경하고 일령도 달리

하여 산란율과 난중(egg weight)을 조사하였다.

- 다이스톱은 산란계의 요구에 맞추어 미네랄 함량을 강화하고 생균제 3종과 살모넬라(Salmonella typhimurium)에 대한 난황항체를 함유한 제제로서 여름철 산란계에 문제되는 살모넬라 발병을 감소시키고 장내 살모넬라균의 수를 감소시켜 생산성 향상을 도모하고자 개발되었음.
- 본 실험은 고온의 여름철 산란율이 감소하고 이상란이 증가하는 시점에 실험을 실시하여 고온스트레스에 대한 다이스톱의 효과를 관찰하였음.

(나) 재료 및 방법

- 경기도 포천시 창수면 소재 산란계농장에서 실험을 실시하였으며, 실험군은 권장량군, 2배권장량군, 무투여군의 3개 계군으로 나누어 동일조건에서 실시하였음.
- 실험기간은 2014.9.2.부터 11.1일까지 약 8주간 실시하였으며 계사는 유창계사 농장이었으며, 실험계군은 28주령의 이사브라운 갈색 산란계로서 실시하였음.
- 실험제품은 (주)삼양애니팜에서 제조한 다이스톱-폴츄리1호 제품을 사용하였으며, 실험군은 권장량군(3,200), 2배 권장량군(2,900수), 무투여군(3,100수) 등 3개 계군으로 나누었다. 권장량군은 사료톤당 0.5kg을 사료에 첨가하였으며, 2배권장량군은 사료톤당 1kg을 사료에 첨가하였고 무투여군은 사료만 투여하였음.
- 실험제품 외에 사료(축협사료)는 동일한 제품을 사용하였으며 음수는 넵플시스템으로 급수하였음. 그 외에 다른 영양제나 생균제는 첨가하지 않았음.
- 산란율은 1주일의 평균값을 기록하였고, 난중(egg weight)도 측정하였다.

(다) 결 과

- 고온다습한 기후가 이어지는 8~9월 사이에 실시된 산란율 및 난중측정 실험에서 다이스톱을 권장량으로 투여한 계군에서는 산란율의 일시적인 감소가 보이다가 점차 증가하여 29주령에 88.58%에서 35주령 90.09%로 증가하였음.
- 2배권장량군은 29주령 87.46%까지 떨어졌다가 35주령에 91.71%로 증가하였다. 이에 반해 무투여군은 29주령 90.42%에서 34주령에 87.17%까지 떨어져 권장량군과 2배권장량군과 달리 점차 산란율이 하락하는 경향을 나타내었음(표 4-63 및 그림 4-85).

표 4-63. 시험계군별 산란율 및 난중 비교

실험기간	산란율(%)			난중(g/hen/day)		
	권장량군	2배권장량군	무투여군	권장량군	2배권장량군	무투여군
28주령	92.07	88.05	90.11	53.31	51.39	51.25
29주령	88.58	87.46	90.42	51.73	50.27	52.11
30주령	86.03	87.88	88.78	50.59	51.19	51.09
31주령	87.97	88.09	87.42	52.06	52.37	50.46
32주령	88.66	88.57	87.19	52.84	53.79	51.44
33주령	89.50	89.63	88.01	53.70	54.32	50.14
34주령	90.98	91.18	87.17	54.95	55.28	50.49
35주령	90.09	91.71	88.22	54.69	56.02	51.17

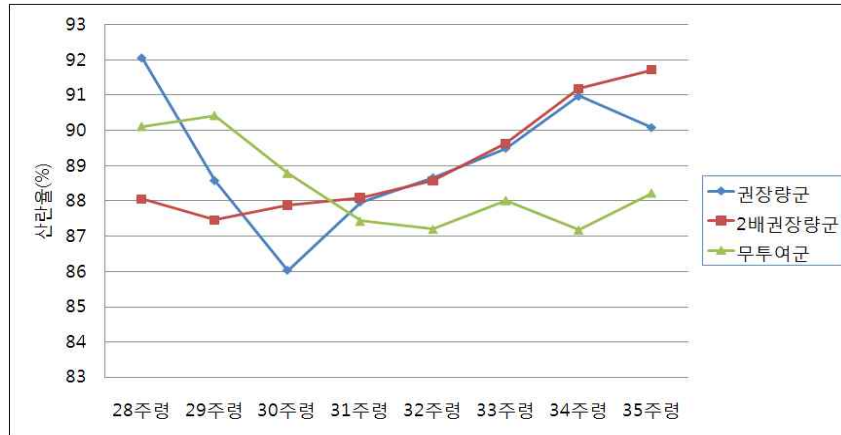


그림 4-85. 시험계군간 산란율 비교 그래프

- 난중도 권장량군이 50.59g에서 54.95g까지 증가하였고, 2배 권장량군도 50.27g에서 56.02g까지 증가하여 다이스톱이 난중 향상에 특히 효과적인 것으로 나타났음. 이에 반해 무투여군은 52.11g에서 50.14g까지 감소하여 다이스톱 투여가 난중에 미치는 영향이 크음을 알 수 있었음.
- 다이스톱 투여 4주 동안은 산란율에서 권장량군 및 2배 권장량군과 무투여군이 차이가 크지 않았으나 4주 이후부터 다이스톱 투여군의 산란율이 꾸준히 증가한 반면 무투여군은 정체되어 8주이후 다이스톱 투여군과 무투여군의 산란율의 차이가 커졌음.
- 난중 측정 결과에서도 실험 3주까지는 다이스톱 투여군과 무투여군 사이에 큰 차이가 없었으나, 이후 차이가 점점 벌어져 8주이후에는 무투여군과 투여군 사이에 현저한 난중 차이가 발생하였음. 권장량군과 2배 권장량군 사이에는 산란율과 난중에서 유의있는 차이를 나타내지 않았음(그림 4-86).

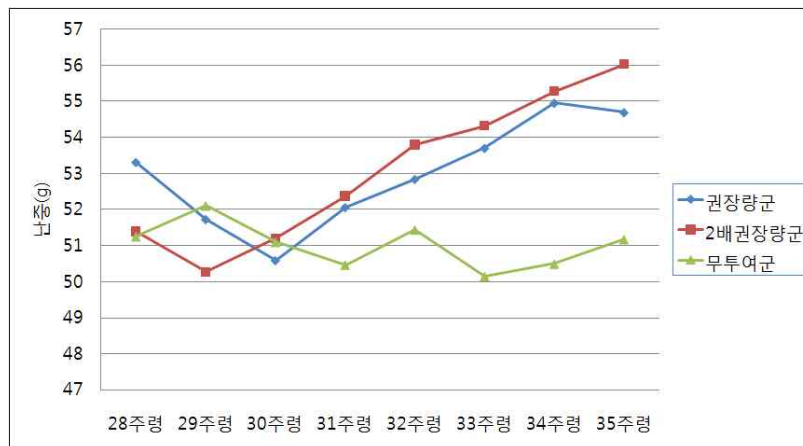


그림 4-86. 시험계군간 난중(egg weight) 비교 그래프

- 실험기간동안 권장량군과 2배권장량군의 폐사율은 각각 2.7%와 2.5%로서 3.9%의 폐사율을 나타낸 무투여군과 차이를 나타내었음. 폐사계중 살모넬라균 발견율은 권장량군이 15.6%, 2배권장량군이 9.4%인데 반해, 무투여군은 38.5%로서 살모넬라균

의 발견율이 현저히 높았음(표 4-64).

표 4-64. 시험계군별 임상증상 발현율 비교

구분	실험수수	폐사율	폐사계중 Salmonella 검출율
권장량군	3,200	2.7%	15.6%
2배권장량군	2,900	2.5%	9.4%
무투여군	3,100	3.9%	38.5%

(라) 고찰

- 본 실험으로 다이스톱-폴츄리산1호의 산란계 투여는 산란율과 난중의 개선효과는 물론 살모넬라균의 증식을 억제시키고 이로 인한 폐사도 감소시킴을 확인할 수 있었음.

(4) 육계용 다이스톱-폴츄리산2호 실험 보고서 II

(가) 시험배경

- 2011년 7월부터 배합사료내 성장촉진용 항생제의 첨가가 금지된 이후 이들을 대체할 새로운 성장촉진제의 필요성이 대두되었음. 이를 위해 유기산, 생균제, 광물질제제 등 다양한 물질들이 항생제대체제로 거론되어 일부는 실제 필드에 사용되기도 하였음. 그러나 아직까지 성장촉진용 항생제만큼 효과적인 대체제는 찾지 못한 실정이다. 이에 생균제가 가지는 장점에 미네랄을 함유한 천연물질이 가지는 항균 및 항바이러스 효과를 가진 난황항체를 함유한 다이스톱을 육계에 실제로 적용함으로써 그 효과를 알아보려고 하였음.

(나) 재료 및 방법

- 실험은 경기도 가평군에 위치한 7만수 규모의 육계농장에서 실시하였으며, 실험기간은 실험은 2014년 9월 1일부터 10월 2일까지 32일간 실시하였다. 유창계사로 시설은 오래되었으나 시험계사의 위치나 환경이 유사하고 조건이 동일하여 시험에 적합하여 위 농장에서 시험을 실시하였다. 실험군은 다이스톱(폴츄리 육계용, (주)삼양애니팜)을 7일령부터 출하시까지 사료톤당 1kg씩 사료에 첨가하였다. 대조군은 어떤 첨가제도 사용하지 않았다.
- 먼저 실험군과 대조군을 분류한다. 3동을 실험군으로 나머지 3동을 대조군으로 나누고 실험군에는 전기사료가 들어가는 7일령부터 다이스톱을 사료톤당 1kg을 첨가하여 출하시까지 투여한다. 대조군은 어떠한 첨가제도 투여하지 않았다. 백신 등은 사양프로그램에 준하여 실험군과 대조군 모두 동일하게 적용하였다.

(다) 결과

- 실험군과 대조군에 봉입체성간염(Adenovirus infection)에 감염된 병아리가 입추되어 초기 폐사 다수 발생. 다만 실험군은 다이스톱이 첨가된 7일령 이후부터 폐사가 감소하여 11일령에 폐사가 정상으로 돌아옴. 대조군은 지속적으로 폐사가 발생하였으며, 14일령 이후 콕시듐과 혼합감염되어 폐사와 증체율 저하가 지속적으로 나타남.

- 폐사율은 실험군이 2.2%, 대조군이 3.3%였고 평균출하체중은 실험군이 1.67kg, 대조군이 1.56kg으로 나타나 실험군의 증체가 우수하였음을 확인할 수 있었다.
- 사료요구율도 실험군이 1.59, 대조군이 1.76으로 실험군이 우수하였으며 생산지수도 실험군이 320, 대조군이 268로서 실험군이 월등히 우수하였다(표 4-65).

표 4-65. 시험 육계군별 폐사율 및 생산지수 비교

구분	입추 수	출하 일령	폐사 수	폐사율 (%)	사료섭취량(톤)	평균출하체중(kg)	사료요구율	생산지수
실험군	33,500	32	726	2.2	87	1.67	1.59	320
대조군	27,800	32	926	3.3	74	1.56	1.76	268

(라) 고찰

- 이번 실험에서 Adenovirus 감염에 의한 변수가 있었지만 동일한 감염군임에도 불구하고 다이스톱 사용계군의 폐사율과 생산성이 월등히 우수해 다이스톱이 아데노바이러스성 질병시 폐사율 감소와 생산성 감소에 효과가 있을 것으로 사료됨..

다. 제4협동과제 연구결과 요약 및 평가

(1) 개발신소재를 이용한 면역복합제제 기본 제형 생산

- (가) 3차년도에 이어 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물별 주요 대상질병에 대한 면역항체 성분이 함유된 기초 면역복합제제를 생산하였고, 이를 이용하여 양돈용, 축우용 및 양계용 면역복합제제 기본제형을 개발하고, 시작품을 생산하였음(제1세부과제 공동수행)

- (나) 개발 면역복합제제 시작품 4종에 대한 일반 및 면역성분에 대한 안정성 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

① 생균 및 일반성분 안정성 시험결과

- 양돈용 제제 2종(다이스톱-피그산 1호 및 2호) 및 양계용 제제 2종(다이스톱 폴츄리산 1호 및 2호)을 각각 3개 롯트씩 생산하였고, 생산된 제품을 냉장조건(5℃), 실온조건(20℃) 및 가혹조건(40℃)에 보관하면서 2014년 8월부터 3개월 간격으로 9개월 동안 생균수 및 일반성분 역가 및 함량을 측정하였음. 각 롯트별로 실시한 일반제제 안정성 시험결과, 생균수와 제품의 함량에 있어 유의성 있는 변화가 관찰되지 않아 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.

② 면역성분 항체가 측정시험 결과

- 양돈용 제제 2종(다이스톱-피그산 1호 및 2호)의 경우, 표지 병원체인 대장균과 살모넬라균(*S. Typhimurium*)에 대한 IgY 항체가 및 초유항체가가 제조사의 역가와 동일한 수준의 항체가를 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.
- 양계용 제제 2종(다이스톱-폴츄리산 1호 및 2호)의 경우, 표지 병원체인 대장균과 살모넬라(*S. Gallinarum*, *S. Pullorum* 및 *S. Enteritidis*)에 대한 IgY 항체가가 제조사의 역가와 동일한 수준을 유지하고 있어 면역성분의 안정성이 양호함을 확인할 수 있었음.

수 있었음.

(다) 4차년도 연구수행 내용 평가

① 3차년도에 이어 개발 면역복합제제 시작품 4종에 대한 일반성분과 면역성분에 대한 안정성 시험을 실시한 결과, 각 제제별로 제조시의 성분함량과 9개월 동안의 측정결과에 유의성있는 변화가 관찰되지 않아 시작품의 안정성에는 문제가 없는 것으로 확인되었으며, 이를 기반으로 6종의 제품허가를 득하고, 차후 개발될 5차년도 제품 개발의 기본제형으로 활용 가능성이 확인됨.

- 5차년도에는 4차년도에 허가를 득한 6종의 제품을 기반으로 하여 포유이유자돈용, 육성비육돈용, 육계용, 산란계용 등 최소 12종의 면역복합제제(경구, 분말제)를 동물용의약품으로 허가받고자 함.

② 4차년도 허가 승인제품의 조성 및 용법 용량

㉞ 이유자돈용 면역복합제제

원료성분명	함량(g/kg중)	비고
난황분말(IgY)	25	면역제제
초유분말(특이초유)	25	면역제제
펩타이드아연	87	
복합미네랄(구마트)	20	
프락토올리고당	50	
생균제 3종(도아)	15.75	
비타민 A	10	
비타민 D3	2	
비타민 E	4	
포도당	741.25	
Tixosil-38	20	
합계	1,000	

- 효능 및 효과 : 면역증강, 장기능 개선, 성장작용, 분변의 악취감소
- 용법 및 용량 : 사료 톤당 1~2kg을 균등히 혼합하여 투여

㉟ 육성돈용 면역복합제제

원료성분명	함량(g/kg중)	비고
난황분말(IgY)	25	면역제제
초유분말	25	면역제제
펩타이드아연	87	
복합미네랄(구마트)	20	
프락토올리고당	50	
생균제(도아)	15.75	
포도당	757.25	
Tixosil-38	20	
합계	1,000	

- 효능 및 효과 : 면역증강, 장기능 개선, 정장작용, 분변의 악취감소
- 용법 및 용량 : 사료 톤당 1kg을 균등히 혼합하여 투여

㉔ 비육돈용 면역복합제제

원료성분명	함량(g/kg중)	비고
난황분말(IgY)	25	면역제제
초유분말	25	면역제제
펩타이드아연	87	
복합미네랄(구마트)	20	
프락토올리고당	50	
생균제(도아)	15.75	
포도당	757.25	
Tixosil-38	20	
합계	1,000	

- 효능 및 효과 : 면역증강, 장기능 개선, 정장작용, 분변의 악취감소
- 용법 및 용량 : 사료 톤당 0.5kg을 균등히 혼합하여 투여

㉕ 산란계 및 육계용 면역복합제제

구분	성분명	조성 용량(g)		비고
		산란계용	육계용	
면역제제	IgY	50.0	50.0	
미네랄 및 부형제	복합미네랄(구마트)	200.0	200.0	
	프락토올리고당	50.0	50.0	
	포도당	604.25	668.25	
생균제제	유산균(<i>Strepto. faecalis</i> T-110)	1×10^{11}	1×10^{11}	균수
	당화균(<i>B. mesentericus</i> To-A)	1×10^9	1×10^9	균수
	낙산균(<i>Clos.butyricum</i> To-A)	1×10^9	1×10^9	균수
비타민	비타민 A	50.0	10.0	
	비타민 D3	10.0	2.0	
	비타민 E	20.0	4.0	
총 용량		1000.0	1000.0	

- 효능 및 효과 : 면역증강, 장기능 개선, 정장작용, 분변의 악취감소
- 용법 및 용량 : 사료 톤당 초생추는 1kg, 중추는 0.5~1kg, 중추이후는 500g을 균등히 혼합하여 투여

㉞ 송아지용 면역복합제제

구분	성분명	조성 용량	비고
면역제제	IgY	4,000mg	
	초유분말	6,000mg	
비타민 및 부형제	비타민 C	40mg	
	Bacillus coagulans	1×10^6 CFU	
	프락토올리고당	800mg	
	기타 부형제(포도당 등)	적량	
총 용량		20g/병	

- 효능 효과 : 면역증강, 장기능 개선, 정상작용
- 용법 및 용량
- 분만 후 초유 급여 전에 1두당 1병(20g)을 적당량의 음수에 녹여 경구투여함
- 설사 발생시 1일 1두당 1두당 1병(20g)을 적당량의 음수에 녹여 경구투여함

제 5절. 5차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 신소재 산업화를 위한 현장적용 및 효능평가 연구(제1세부)

가. 추진배경

- 제4 협동과제(산업화팀)와 공동으로 시제품에 대한 농장 현장적용 및 효능평가를 실시하여 4차년도 6종 제품에 대한 인허가를 완료하였으며, 5차년도에는 13종에 대한 시제품에 대한 현장 적용시험을 실시하여 13종 제품에 대한 인허가를 획득하였음.
- 제4 협동과제팀과 공동 수행한 현장 적용 연구 내용은 제4협동과제 연구결과에 기술하였으며, 그 외 실제 질병 발생이 문제되는 농장에 대한 현장적용시험을 통하여 개발 제품의 확대 적용 가능성을 확인하였음.

나. 양돈장에 대한 면역복합제제 확대 적용 프로그램 개발

- 양돈용 면역복합제제에 대해서는 4차년도에 돼지유행성설사병(PED) 발생농장에 대하여 포유 및 이유자돈 구간에 개발 면역제제를 적용하여 PED 발생에 따른 설사 예방 및 치료효과가 입증되었음.
- 5차년도에는 양돈용 면역복합제제의 확대 적용을 위하여 국내 양돈장의 일반적인 돼지 설사병 발생현황을 사육단계별로 파악하고, 면역설사병이 문제되는 농장 1개소를 선별하여 면역복합제제를 적용한 다음, 그 효과를 분석하였음.

1) 국내 양돈장의 돼지 설사병 발생현황 분석

가) 설사병 발생상황: 75개 양돈장에 대하여 사육구간별 임상관찰을 통하여 설사병(설사 및 연변) 발생상황을 조사한 결과(표 5-1), 설사병 발생은 포유자돈 구간에서 73.3%로 가장 높았으며, 이유자돈 61.3%, 육성초기돈 32.0%, 육성후기돈 10.7% 및 비육돈 5.3%로 연령대가 어릴수록 설사병 발생율이 높은 것으로 나타났음. 또한 연령대가 어릴수록 설사병의 증상도 심하게 나타나 포유자돈 구간인 경우 약 50%의 돈군에서 설사 증상이 관찰된 반면에 이후 연령대가 증가하면서 설사 증상보다는 연변을 보이는 돈군이 상대적으로 증가하는 경향을 나타내었음.

표 5-1. 75개 양돈장의 사육단계별 주요 돼지 설사병 발생 빈도

돼지구분	조사돈군수	설사병 발생 돈군수(%)		
		연변	설사	계
포유자돈	75	17 (22.7)	38 (50.6)	55 (73.3)
이유자돈	75	25 (33.3)	21 (28.0)	46 (61.3)
육성초기돈	75	20 (26.7)	4 (5.3)	24 (32.0)
육성후기돈	75	5 (6.7)	3 (4.0)	8 (10.7)
비육돈	75	3 (4.0)	1 (1.3)	4 (5.3)
계	375	70 (18.6)	67 (17.9)	137 (36.5)

나) 사육구간별 주요 설사병 원인체 검출상황: 75개 양돈장의 사육구간별 채취한 분변 시료에 대하여 7종 설사병 원인체 검사결과, PEDV와 TGEV는 전 검사농장에서 검출되지 않아 이후 자료 분석에서 제외하였으며, 나머지 5종의 병원체는 사육구간

별로 다양한 비율로 검출되었다(표 5-2). 전체 사육구간에 대한 검출율은 병원성 대장균(14.4%), 돼지로타바이러스(12.5%), 증식성회장염균(4.5%), 살모넬라균(2.9%) 및 돈적리균(1.1%) 순으로 높게 나타났다. 이를 사육구간별로 분석해보면 돼지 로타바이러스는 포유자돈 및 이유자돈에서 각각 26.7%와 25.3%로 비교적 높은 비율로 검출되었으며, 이후 연령대에서는 5.3%에서 2.7%의 낮은 검출율을 나타내어 포유 및 이유자돈 구간에서 집중적으로 발생함을 알 수 있었음. 병원성 대장균은 포유자돈 구간 37.3%, 이유자돈 구간 17.3%, 육성초기 구간 13.3%, 육성후기 및 비육구간 1.3% 및 2.7%로 포유구간에서 가장 높은 검출율을 나타내었으며, 이후 감소하는 경향을 나타내었음. 반면에 살모넬라균과 증식성회장염균은 사육 전구간에 걸쳐서 0.3%에서 6.7%의 비율로 고루 검출되는 경향을 나타내었으며, 돈적리균의 경우는 포유 및 이유자돈구간에서는 검출되지 않는 반면에 육성초기 이후 구간에서 1.3-2.7%의 수준으로 검출되었음.

표 5-2. 75개 양돈장 사육단계별 채취 분변시료 대상 주요 돼지설사병 원인체 검출

병원체	설사병 원인체 검출 돈군수 (%)					
	포유자돈 (n=75)	이유자돈 (n=75)	육성초기돈 (n=75)	육성후기돈 (n=75)	비육돈 (n=75)	계 (n=375)
PEDV	0	0	0	0	0	0
TGEV	0	0	0	0	0	0
Rotavirus	20 (26.7)	19 (25.3)	4 (5.3)	2 (2.7)	2 (2.7)	47 (12.5)
Pathogenic E. coli	28 (37.3)	13 (17.3)	10 (13.3)	1 (1.3)	2 (2.7)	54 (14.4)
Salmonella sp.	2 (2.7)	4 (5.3)	2 (2.7)	1 (1.3)	2 (2.7)	11 (2.9)
L. intracellularis	1 (1.3)	2 (2.7)	5 (6.7)	4 (5.3)	5 (6.7)	17 (4.5)
B. hyodysenteriae	0	0	1 (1.3)	2 (2.7)	1 (1.3)	4 (1.1)

다) 돈군의 설사증상과 설사병 원인체 검출현황 비교: 조사 돈군의 설사증상 유무와 설사병 원인체 검출현황을 비교한 결과(표 5-3), 돼지 로타바이러스, 병원성 대장균 및 살모넬라균은 설사 증상이 없는 돈군보다 설사병 증상이 있는 돈군에서 상대적으로 높은 비율로 검출되었음. 반면에 증식성회장염균은 설사증상 유무와 상관없이 유사한 수준으로 검출되었으며, 돈적리균은 설사 증상이 없는 돈군에서 오히려 비교적 높게 검출되었음.

표 5-3. 돈군의 설사 증상 유무와 주요 설사병 병원체 검출율

설사병 원인체	설사병 원인체 검출돈군수(%)		
	설사증상 돈군 (n=137)	비설사증상돈군 (n=238)	계 (n=375)
Rotavirus	37 (27.0)	10 (4.2)	47 (12.5)
Pathogenic E. coli	42 (30.7)	12 (5.0)	54 (14.4)
Salmonella sp.	9 (6.6)	2 (0.8)	11 (2.9)
L. intracellularis	6 (4.4)	11 (4.6)	17 (4.5)
B. hyodysenteriae	1 (0.7)	3 (1.3)	4 (1.1)

라) 설사병 원인체의 단독 및 복합감염 상황: 75개 양돈장의 각 사육구간별 설사병 원인체 단독 및 복합감염 상황을 파악한 결과 (표 5-4), 총 375개 돈군 중에서 113개 돈군에서 1종 이상의 병원체가 검출되어 돈군 검출율은 30.1%이었으며, 이중 단독 감염이 25.1% (94/375), 복합감염이 5.1%(19/375)로 나타났다.

표 5-4. 75개 양돈장의 사육단계별 주요 설사병 원인체 단일 및 복합감염 현황

감염상황	설사병 원인체 검출 돈군수(%)					
	포유자돈	이유자돈	육성초기돈	육성후기돈	비육돈	계
단일감염 소계	26 (34.7)	26 (34.7)	20 (26.7)	10 (13.3)	12 (16.0)	94 (25.1)
Rotavirus	9 (12.0)	14 (18.7)	4 (5.3)	2 (2.7)	2 (2.7)	31 (8.3)
Pathogenic E. coli	16 (21.3)	10 (13.3)	9 (12.0)	1 (1.3)	2 (2.7)	38 (10.1)
Salmonella sp.	1 (1.3)	1 (1.3)	2 (2.7)	1 (1.3)	2 (2.7)	7 (1.9)
L. intracellularis	0	1 (1.3)	4 (5.3)	4 (5.3)	5 (6.7)	14 (3.7)
B. hyodysenteriae	0	0	1 (1.3)	2 (2.7)	1 (1.3)	4 (5.3)
복합감염 소계	12 (16.0)	6 (8.0)	1 (1.3)	0	0	19 (5.1)
Rotavirus + E. coli	10 (13.3)	3 (4.0)	0	0	0	13 (3.5)
Rotavirus + Salmonella sp.	0	2 (2.7)	0	0	0	2 (0.5)
Rotavirus + E. coli + Salmonella sp.	1 (1.3)	0	0	0	0	1 (0.3)
E. coli + L. intracellularis	1 (1.3)	0	1 (1.3)	0	0	2 (0.5)
Salmonella sp. + L. intracellularis	0	1 (1.3)	0	0	0	1 (0.3)
Negative	37 (49.3)	43 (57.3)	54 (72.0)	65 (86.7)	63 (84.0)	262 (69.9)
계	75 (100.0)	75 (100.0)	75 (100.0)	75 (100.0)	75 (100.0)	375 (100.0)

- 사육단계별 단독 및 복합감염의 비율은 포유자돈군이 34.7%(26/75) 및 16.0%(12/75), 이유자돈군이 34.7%(26/75) 및 8.05(6/75), 육성초기돈군이 26.7%(20/75) 및 1.3%(1/75)이었으며, 육성후기돈군과 비육돈군은 복합감염 없이 단독감염만 각각 13.3%(10/75) 및 16.0%(12/75)로 파악되어 포유자돈군 및 이유자돈군에서 복합감염이 빈번하게 일어나며, 이후 연령대가 증가하면서 복합감염보다 단독감염의 비율이 높아짐을 알 수 있었음. 병원체별로는 포유자돈군 및 이유자돈군에서 로타바이러스와 대장균의 복합감염이 각각 13.3%(10/75) 및 4.0%(3/75)로 가장 흔한 복합감염 유형으로 파악되었으며, 이유자돈군에서의 로타바이러스와 살

모넬라균 복합감염이 2건(2,7%) 그리고 포유자돈군에서의 로타바이러스와 병원성 대장균 및 살모넬라 복합감염이 1건(1.3%) 검출되어 로타바이러스와 병원성 대장균이 복합감염에 관여하는 비율이 가장 높은 것으로 파악되었음. 기타 포유자돈군 및 육성초기돈군에서 병원성대장균과 증식성회장염균 복합감염이 각 1건(1.3%)씩 그리고 이유자돈군에서 살모넬라균과 증식성회장염균 복합감염이 1건(1.3%) 검출되었음.

마) 조사결과 분석

- 국내 75개 양돈장에 대하여 사육단계별로 설사병 임상증상 발현 여부를 조사하고, 해당돈군에서 채취한 분변시료를 대상으로 주요 설사병 원인체를 검출한 결과, 포유 및 이유자돈구간에서 병원성 대장균과 로타바이러스의 이환율이 가장 높고, 복합감염되는 양상을 나타내었음. 따라서 자돈용 면역복합제제의 경우 이 두 가지 질병에 대한 고면역 항체를 포함시켜야 개발 면역제제의 양돈농가 보급에 따른 파급효과가 클 것으로 판단되었으며, 개발 면역복합제제에 대장균 및 돼지로타바이러스에 대한 고농도의 난황항체 및 초유면역항체를 포함시켜 시제품을 제작하여 양돈장 적용 프로그램을 개발하였음.

2) 설사병 문제 양돈장의 적용 프로그램 개발

가) 시험농장: SC 농장 (경북 경산 소재)

- 사전검사로 포유자돈구간에서 병원성 대장균과 돼지 로타바이러스 감염 확인농장

나) 시험군 : 해당농장은 분만사가 1층, 2층으로 구분되어 운영하고 있는 농장으로 분만사별로 1층은 면역복합제제를 투여하고, 2층은 비투여한 상태에서 시험을 실시

다) 시험기간 : 1개월 (2016. 4. 1-4.30)

- 1개월간 분만되는 자돈군을 대상으로 면역복합제제를 투여하여 시험군간 설사병 이환 모돈복수와 이유 당시 포유자돈 총 폐사율을 산정하여 비교

라) 면역복합제제 투여 : 4차년도 개발 프로그램을 그대로 적용

마) 시험결과

- 설사병 문제 농장의 포유자돈에 대하여 면역복합제제 적용에 따른 설사병 및 폐사율 개선효과를 분석한 결과, 투여군은 대조군에 비하여 설사병 이환율이 현격하게 개선되었으며, 설사병 발생 자돈의 경우도 생존율이 높아서 대조군(65.8%) 대비 투여군의 생존율(91.8%)이 약 35% 개선되었음(표 5-5).

표 5-5. 설사병 발생농장의 면역복합제제 적용결과

시험군	투여복수	포유개시 자돈수	모돈복당 설사 발생상황		이유시 생존율	
			이환복수	이환율%	생존두수	생존율(%)
투여군	39	416	7	18.0%	382	91.8
대조군	33	345	17	51.5%	196	56.8
계	72	761	24	33.3%	578	76.0%

바) 경제성분석

- 시험농장의 자돈폐사율을 기준으로 병원성 대장균과 돼지로타바러스 복합감염농장의 보유자돈 폐사율을 약 40%로 그리고 면역복합제제 투여에 따른 자돈폐사율 개선효과를 약 30%로 산정하였을 때 모든 100두 규모 농장에서의 추정수익액은 연간 19,800,000원으로 추정됨(표 5-6).

사) 시험결과 종합

- 설사병 발생이 만연되어 있는 국내 양돈장에서 개발된 보유 및 이유 자돈용 면역복합제제를 이용한 면역증강 프로그램을 보급할 경우, 설사병 이환에 따른 자돈 폐사와 이에 따른 양돈농가의 경제적 손실을 크게 개선할 수 있을 것으로 판단되며, 이를 적극 보급할 필요가 있음.

표 5-6. 설사병 이환농장의 면역복합제제 투여에 따른 경제적 이익 분석

손실적 요소(A)	이익적 요소(B)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 면역복합제제 투여비용 <ul style="list-style-type: none"> - 2,200두×300원 = 6,600,000원 - 계(A) : 6,600,000원 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 설사병 이환 자돈의 폐사율 감소 이익 <ul style="list-style-type: none"> - 자돈폐사율(40%), 자돈가격: 100,000원 기준 손실액: 0.4×100,000원×2,200두 = 88,000,000원 - 면역제제 투여후 폐사율 감소(30%)에 따른 이익 추정액: 88,000,000원×0.3=26,400,000원 - 계(B): 26,400,000원
○추정수익액(B-A): 26400,000원 - 6,600,000원 = 19,800,000원	

나. 양계장(육계)의 면역복합제제 확대 적용 프로그램 개발

- 질병 감염에 취약한 육계농장을 대상으로 양계용 면역복합제제의 농장 적용효과를 분석하기 위하여 제1협동과제 양계분야 효능평가팀과 공동으로 대장균감염증이 문제되는 육계농장을 선발하여 농장 적용시험을 실시하였음.

- 1) 시험농장 : 최○○농장 (전북 김제 소재)
- 2) 시험군 : 35,500수 사육규모의 2개 사육동을 대상으로 각각 투여군과 비투여군 1개동을 구분하여 시험을 실시
- 3) 시험기간 : 32일 (입추 2016. 5. 28, 출하 2016. 6. 28)
- 4) 면역복합제제 투여방법(용법/용량) : 2개동의 육계농장 가운데 1동 계군에는 양계용 면역복합제제(다이스톱 폴츄리산-3호)를 1일령에서 2일령까지 2일 동안 음수로 급여하고 이후부터 출하일령까지 사료에 첨가하여 0.2%씩 급여.
- 5) 육계농장 적용시험 결과
 - 가) 생산성 개선 평가. 복합면역제제 첨가 급여에 따른 생산성 개선효과를 평가한 결과(표 5-8), 처리군(1동)은 비처리군(2동)보다 1주일간의 초기폐사율이 감소하였고 육성률도 약 2% 증가하였음. 반면, 평균체중의 경우 처리군과 대조군간에 차이가 없었다. 제제처리군의 사료요구율은 1.585로 비처리군보다 낮았고 생산지수는 296.3으로 비처리군보다 높게 나타남에 따라 제제를 투여한 1동에서 생산성이 높은 것으로

로 확인되었음.

표 5-7. 농장 정보 및 물질 평가 계획

농장명	품종	지역	입추일	출하일	사육규모
최**	육계(로스)	전북 **	2016.05.28	2016.06.28	35,500수×2동
동	적용물질		농도(전기/후기)	투여경로	사육기간
1	다이스톱-폴츄리산 3호		0.2%/0.1% (w/v)	-음수(2일) -사료(전기간첨가)	32일
2	미투여		미투여	미투여	

나) 임상증상 개선. 시험농장은 2개동 모두 병원성 대장균증 감염이 확인되었으며, 시험군(동)간 대장균 감염증의 임상증상을 관찰한 결과, 3주령 전후에 난황항체제제를 투여한 1동의 개체들은 활발한 움직임을 보인 반면에 2동 개체들은 설사변이 많아지고 움직임을 둔해지며 사료섭취량도 저조하여 항생제를 투여하였음(20~22일령/3일간 음수 투약).

표 5-8. 면역복합제제 투여에 따른 육계농장 생산성 평가

동	입추수	도폐사 수	출하수	육성률 (%)	평균중량(kg)	급이 사료	사료 요구율	생산 지수
1	35,520	1,233	34,287	96.5	1.557	84,664	1.585	296.3
2	35,500	1,922	33,578	94.6	1.511	87,680	1.729	258.3

6) 경제성 분석 : 면역복합제제를 투여한 그룹(1동)은 질병에 대한 방어효과가 우수하고 생산성 증대에도 도움을 주는 것으로 판단되었으며, 경제성 분석을 통해 면역복합제제투여군은 비투여군에 비해 1,953,869원의 수익이 발생한 것으로 분석됨(표 5-9).

표 5-9. 육계농장에 대한 면역복합제제 투여에 따른 경제적 효과 분석(금액:원)

구분	사료구매 단가	생계구매 금액	지수 성과금	병아리 구매비	약품비	사료 첨가비 ¹	수익 ²	차액
1동	38,521,927	62,746,554	281,276	12,804,960	0	3,017,700	8,683,243	1,953,869
2동	39,894,400	59,601,524	0	12,797,750	180,000	0	6,729,374	

¹사료첨가물질 구매비용은 음수와 사료에 첨가한 양과 제품 단가를 가지고 다음과 같이 계산하였다.

A: 음수첨가용 물질(20,000수/1kg/50L급여) → 1.5kg × 66,000원/kg = 99,000원

B: 사료첨가용 물질 → (전기사료 42.3ton × 2kg(0.2%) × 23,000원) + (후기사료 42.3ton × 1kg(0.1%) × 23,000원) = 1,945,800원 + 972,900원 = 2,918,700원 ⇒ 음수/사료 첨가물질 총액은 3,017,700원(A + B)

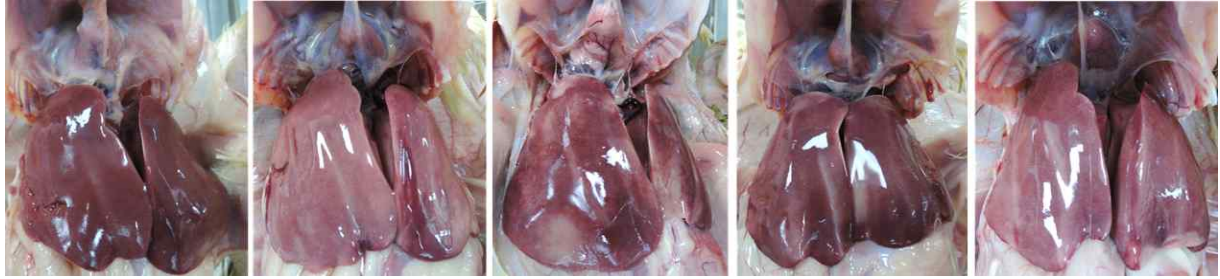
²수익 : 생계구매금액-사료구매단가-병아리구매비-사료첨가비(1동)/약품비(2동)+지수성과금

7) 병변 및 균 배설 감소효과

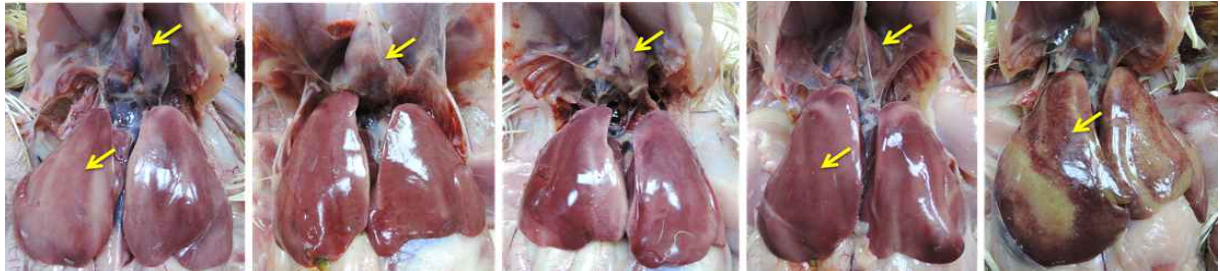
- 가) 상기 병원성 대장균 감염이 확인된 1동 및 2동으로부터 10일령, 20일령, 30일령에 15수씩 꺼내서 체중 측정, 부검을 통한 실질장기 육안병변 관찰 및 병원균 분리동정을 실시하여 면역복합제제 투여군(1동)과 비투여군(2동)간 병변 발생 및 균 배설 정도를 비교하였음(표 5-10).
- 나) 각 개체를 부검하여 육안병변을 관찰한 결과, 처리군 개체들의 실질장기들은 대부분 병변이 관찰되지 않은 반면, 비처리군의 개체들은 간과 심장이 종대되고 포막형성과 괴사반점 등 대장균증 관련 병변들이 관찰되었음.
- 다) 또한, 각 개체별 간장 시료를 대상으로 균 분리동정을 실시한 결과, 30일령에서는 공히 균이 분리되지 않았음. 10일령 및 20일령에 있어서는 처리군은 10일령 1수에서만 대장균이 분리된 반면에 처리군은 10일령 및 20일령에서 각각 3수 및 8수에서 균이 분리되었음. 비처리군 30일령에서 균은 분리되지 않았지만 여전히 실질장기들에서 병변이 관찰되었음(그림 5-1B).
- 라) 이를 종합할 때 대장균증에 이환된 계군에 대한 복합면역제제 투여가 계군의 대장균증 감염증상 발현과 전파를 억제하여 준다는 것을 확인하였으며, 이를 보급할 경우 계군의 감염 방제를 통한 생산성 향상은 물론 균 오염 및 항생제 투여에 따른 식품위생상의 문제 해결에 도움이 될 것으로 기대됨.

표 5-10. 병원성 대장균증 감염 농장에 대한 면역복합제제 투여 효과

농장(동)	시험수수	적용물질	적용방법(사육기간)	일령별 평균체중(g)			실질장기(간)					
							육안병변율(%)			대장균분리율(%)		
				10	20	30	10	20	30	10	20	30
1동	45	IgY 3호	1~2일(음수) 3~32일(사료)	176.4 ±33.0	535.1 ±51.5	885.1 ±101.2	0.0 (0/15)	6.7 (1/15)	13.3 (2/15)	6.7 (1/15)	0.0 (0/15)	0.0 (0/15)
2동	45	-	-	173.5± 26.0	527.3 ±47.3	867.2 ±142.7	13.3 (2/15)	40.0 (6/15)	33.3 (5/15)	20.0 (3/15)	53.3 (8/15)	0.0 (0/15)



A. 처리군: 심장과 간에 뚜렷한 병변이 관찰되지 않았음



B. 비처리군: 심장포막이 심하게 나타나고 간 종대 및 흰색의 괴사반점 출현

그림 5-1. 30일령 육계에서 면역복합제제 처리군과 비처리군의 실질장기 육안병변

다. 축우장의 면역복합제제 확대 적용 프로그램 개발

1) 송아지용 면역복합제제(아이지칼프산, 송아지용)의 설사병 예방효과

가) 시험농장: 경북 경산군 소재 H 목장

- 병원성대장균 및 소 로타바이러스 감염 확인농장

나) 시험군 : 1개월령 젖소 송아지 10두 (투여군 5두, 비투여 대조군 5두) (그림 5-2).

다) 시험기간 : 10일간 (2016. 4. 13.- 4. 22)

라) 용법용량 : 투여군은 시험개시일에 1두당 20g을 50ml의 온수에 현탁하여 경구투여하고, 이후 매일 1회 추가급여하였으며, 대조군은 면역제제 비투여(그림 5-3).

- 비투여군의 경우, 설사증상이 3일이상 지속되어 폐사가 우려될 경우에는 면역제제와 광범위 항생제를 투여하여 해당 송아지의 폐사를 방지함

마) 공격접종 : 면역제제 투여 2일차 (면역복합제제 투여 24시간 경과 후)에 국내 분리 병원성 대장균(10^5 CFU/ml)과 소 로타바이러스(10^4 TCID₅₀/0.1ml) 배양액을 1ml를 우유 50에 혼합하여 경구투여

마) 면역제제 투여효과 평가

- 매일 정해진 시간에 투여군 및 비투여군 송아지의 설사 증상 유무를 관찰하여 기록

- 설사병 임상관찰지수는 정상(0), 연변(1), 설사(2), 폐사(3)으로 구분하여 기록하고 시험군별 및 개체별 누적지수를 산출



그림 5-2. 시험농장(H목장)의 시험군 송아지. (좌)면역제제투여군, (우) 면역제제비 투여군



그림 5-3. 시험농장(H목장)의 시험군 송아지에 대한 면역제제 투여전경(좌) 및 투여전 면역제제 시제품(우)



그림 5-4. 공격접종 송아지에서의 연병 및 설사증상 관찰. 미투여군 송아지의 설사 증상 및 축사 바닥의 설사분변

바) 시험결과

- 시험군 송아지에 면역제제를 투여한 후 2일차에 소 대장균 및 로타바이러스를 공격접종하였고, 이후 7일간 설사증상 여부를 관찰하여 기록한 결과, 그림 5-4와 같이 황색 또는 녹색의 연변 또는 설사분변을 배설하는 송아지가 관찰되었음.
- 면역제제 투여군의 송아지의 경우, 일부에서 연변 증상을 나타내었으나 면역제제

비투여군 송아지의 경우, 전 두수가 연변 및 설사 증상을 나타내었고, 5일차에 1두가 폐사하여 농장측의 요청으로 더 이상의 실험 진행을 중단하고, 비투여군에 대한 치료조치(면역제제 3배 용량 지속 투여 및 광범위 항생제 투여)를 적용하였음(표 5-11).

- 설사증상 임상지수는 전체적으로 투여군(15) 대비 비투여군(52)에서 월등히 높았으며, 설사증상 지속기간도 투여군은 공격접종 2-5일차에 설사증상이 중단되었으나 비투여군은 관찰 기간 전기간에 걸쳐 설사 및 연변증상을 나타내었음.

표 5-11. 면역복합제제 투여 및 미투여 송아지군에서의 설사 임상증상 관찰 결과

구분	개체 구분	공격접종 후 일자별 임상관찰지수 ^a									비고
		0	1	2	3	4	5	6	7	계	
투여군	S1	0	1	1	1	0	0	0	0	3	
	S2	0	1	1	0	0	0	0	0	2	
	S3	0	1	2	1	1	1	0	0	6	
	S4	0	1	1	1	0	0	0	0	3	
	S5	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
	소계	0	4	6	4	1	1	0	0	16	
비투여군	C1	0	1	1	2	2	1	1	1	9	
	C2	0	1	1	1	2	2	2	2	11	
	C3	0	1	1	2	2	2	2	1	11	
	C4	0	1	2	2	1	1	1	1	9	
	C5	0	1	2	2	2	2	3	-	12	7일차 폐사
	계	0	5	7	9	9	8	9	5	52	

^a 0 (정상), 1 (연변), 2(설사), 3 (폐사)

사) 시험결과 종합

- 소 목장에서 가장 흔히 발생하는 송아지 설사병의 원인체인 병원성 대장균과 로타 바이러스 감염에 의한 설사병에 대하여 개발 면역복합제제의 설사병 방제효과를 평가한 결과, 설사병의 증상 완화와 설사병 발생기간을 단축시킬 수 있음이 확인되었음.
- 이를 통하여 개발 면역복합제제는 신생송아지의 초유 면역 증진을 통한 설사병 방제효과 뿐만 아니라 이유 후 1개월령의 어린 송아지에서 다발하는 설사병에 대한 치료제로도 사용이 가능성이 입증되었음.
- 향후 이를 이용한 축우장 확대 적용 프로그램에 적용할 수 있을 것으로 판단됨.

2. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발 (제2세부)

가. 고면역 면역난황제제를 이용한 첨가제 개발

(1) 불활화 고면역 혼합백신 제조 계속 및 문제점 보완을 통한 시스템 최적화

(가) 고역가 고면역 cFc-harboring 돼지 바이러스 항원 생산 및 불활화

① 돼지용 복합난황항체 생산을 위해 먼저 산란계 면역접종을 위한 다가 혼합백신을 제조함. 면역보강제 cFc 발현이 최적화된 3종의 세포주(Vero-ky5-cFc 및 PAM-pCD163-cFc)에 각각의 타겟 바이러스(PEDV 및 북미형 PRRSV)를 감염시켜 배양함. 생산된 바이러스는 IFA와 western blot assay를 이용해 cFc가 harboring된 것을 확인함. 4종의 cFc-harboring 바이러스 항원(PEDV 야외주-cFc, PEDV 백신주-cFc, 북미형 PRRSV VR-2332-cFc 및 북미형 PRRSV KNU-12-KJ4-cFc)의 역할을 측정 한 결과 기존 바이러스와 유사한 고역가를 보임. 고역가 고면역 cFc-harboring 바이러스 항원은 BEI(Binary ethylenimine)을 이용해 불활화 시킴.

(나) 고면역 재조합 돼지 바이러스 단백질-면역보강인자 항원 생산 및 정량

① 돼지용 복합난황항체 생산을 위해 먼저 산란계 면역접종을 위한 다가 혼합백신을 제조를 위해 바이러스 유래 재조합 단백질-cFc 발현이 최적화된 2종의 세포주(PK-15-PEDV-S1-cFc 및 PAM-PCV2b-ORF2-cFc)를 대량으로 배양함. 세포 배양 상층액 수거 및 lysates 생산 후 chicken IgY precipitating resin(GenScript)을 첨가해서 면역침전법을 수행하여 2종의 바이러스 유래 cFc-tagged 재조합 단백질 항원(PEDV-S1-cFc 및 PCV2b-capsid-cFc)을 확인함.

(다) 고면역 유도 돼지 바이러스 및 바이러스 단백질 항원을 혼합 후 농축하여 ISA 70 adjuvant를 이용한 면역난황항체 생산용 다가 면역 항원 제조

① 4종의 불활화 cFc-harboring 바이러스 (PEDV 야외주-cFc, PEDV 백신주-cFc, 북미형 PRRSV VR-2332-cFc 및 북미형 PRRSV KNU-12-KJ4-cFc) 배양액 각 1 L, PEDV-S1-cFc 발현 세포주 배양액 2 L 및 PCV2b-capsid-cFc 발현 세포주 lysates 10 mL 총량을 필터농축기를 이용하여 15배 농축하여 400 mL을 혼합항원을 제조함. 생산된 다가 혼합 바이러스·단백질 항원을 Montanide ISA 70 VG(Seppic) adjuvant를 1:2 비율로 혼합하여 면역난황항체 생산용 다가 면역항원을 제조함.

(2) 고면역 난황항체 대량생산 계속 및 문제점 보완을 통한 시스템 최적화

(가) 고면역 혼합 다가백신으로 3차 산란계 면역접종 후 접종시기별 채혈 및 채란

① 돼지용 복합난황항체 생산을 위해 10주령 산란계 총 300마리를 준비하고, 제조된 돼지용 불활화 다가 백신을 산란계에 3주 간격으로 4회 접종함(그림 5-5). 접종 전에 불활화 백신을 충분히 섞어준 다음 산란계의 흉근에 0.8 ml씩 근육접종을 실시함. 최초 접종일부터 6주 간격으로 산란계의 익정맥에서 총 3회 3 mL씩 채혈해 혈청을 분리 및 비동화하고 3번째 접종일부터 6주 동안 채란을 실시함(그림 5-6).

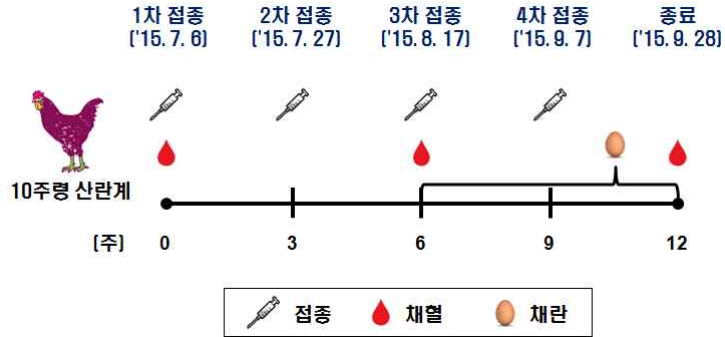


그림 5-5. 돼지용 다가 면역항원 대량 생산을 위한 산란계 접종 일정



그림 5-6. 경남고성 산란계 시험농장과 산란계 접종 및 채혈 사진

(나) 타겟 항원에 대한 혈청 항체반응 분석을 위한 바이러스 중화시험

- ① PEDV 및 PRRSV 항원에 대한 면역반응 확인은 혈청 샘플을 이용하여 각각 타겟 바이러스에 대한 중화시험을 수행함. PCV 항원에 대한 항체형성 확인은 채혈 혈청을 이용하여 VPro[®] PCV2 NC AB ELISA kit(메디안 디노스틱)로 ELISA를 수행함.
- ② PEDV에 대한 중화시험 결과 돼지용 다가 혼합백신으로 면역화된 산란계에서 항체형성을 확인할 수 있었음(그림 5-7).



그림 5-7. PEDV 혈청 중화시험 결과

(다) 면역난황을 농축분말화 후 고면역 난황항체 대량생산 시스템 구축

- ① 산란계에서 얻은 달걀을 그룹별로 분류한 다음 표백제 세척과 70% 에탄올로 소독을 실시함. 이후에 소독한 달걀을 조심스럽게 깬 다음 난황을 분리하고 난황 부피 7배의 1차 증류수를 첨가함. 그 다음 총 부피의 0.02% 강산성 이온수를 첨가하고 4

°C에서 24시간 정치 후 상층액을 수거하는데 이 상층액에 난황항체가 포함되어 있음. 수거한 상층액을 원심분리한 다음 다시 상층액을 수거해서 -20 °C에 냉동 보관하다가 녹여서 분무건조기에서(분무건조조건: 입풍온도, 180 °C; 배풍온도, 80 °C; 디스크 회전속도, 11,000 rpm) 건조분말화를 시도함(그림 5-8).

- ② 난황항체 대량생산 제조공정 과정: 원료입고(냉장) → 호머믹스 투입(알갱이 분쇄) → 탱크이송 → 하이프레스(건조기챔버로 파이프라인으로 이송) → 전란액 분사 → 열풍투입(약 180 °C로 5초 - 6초 난황 낙하하면서 건조) → 채분기통과(50매시망 통과) 및 전자석 통과 → 포장기 → 포장비닐내부에 분말투입 → 계근 → 지대봉합 → 제품완성



그림 5-8. 분무건조기(오가와라 ODA-40) 사진

(라) 고면역 난황항체 역가 측정을 위한 *in vitro* 및 바이러스 중화시험

- ① 분리된 난황 추출액 및 농축분말화 생산된 난황항체(10% 희석액)를 이용하여 돼지 용 바이러스 및 단백질 항원에 대한 항체 역가를 확인하기 위해 PEDV에 대한 중화시험을 수행함.
- ② 난황 추출액 샘플 및 난황항체 분말에서 PEDV에 대한 중화항체 역가를 확인함(그림 5-9).

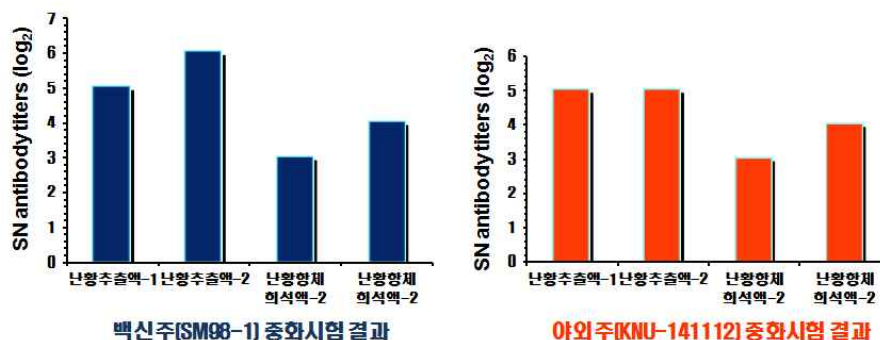


그림 5-9. 난황추출액 및 난황항체 분말에 대한 PEDV 중화시험 결과

(2) 고면역 난황항체의 안전성 및 효능 평가 계속

(가) 타겟동물에 대한 고면역 난황항체 안전성 평가

- ① 시험 목적 : 돼지용 다가 혼합 바이러스·단백질 항원을 접종한 산란계에서 생산한 고면역 난황항체의 안전성 평가
- ② 시험 방법
 - ㉠ 공시 동물 : 1주령(7일령) 자돈 4마리
 - ㉡ 시험 설정 : 고면역 난황항체 분말을 물에 녹인 용액(0.1 g/mL) 2 ml을 대용유 10 ml에 넣어 잘 섞어준 다음 물통에 담아서 자돈 2마리에 경구 투여하고 나머지 2마리는 대조군으로 대용유 10 mL만 넣어 경구 투여함. 7일간 체중 변화를 측정, 실험 시작 7일 뒤 부검을 실시.
 - ㉢ 시험 결과 : 실험군(난황투여군)과 대조군 모두 정상적인 체중 증가 양상을 보였으며(그림 5-10) 육안 관찰 및 부검을 실시해 관찰한 결과 정상 소견을 보임. 따라서 생산된 고면역 난황항체가 충분히 안전하다고 판단되었음.

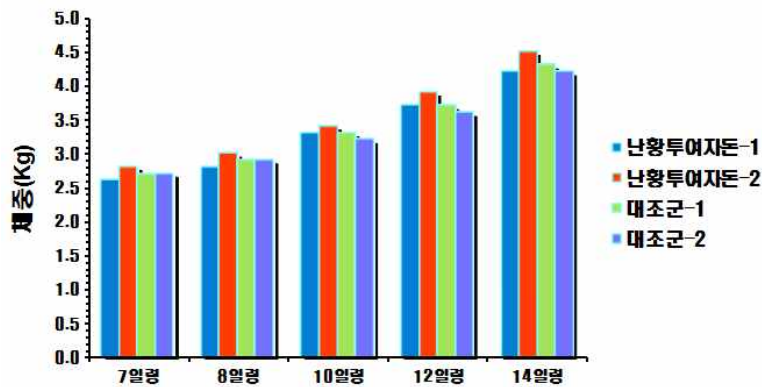


그림 5-10. 돼지 개체별 7일간 체중 변화

(나) 타겟동물에 대한 고면역 난황항체 효능 평가(바이러스 공격접종 실험)를 위해 기본 원료 효능평가팀에 제공함.

(3) 고면역 난황항체의 안전성, 안정성 및 효능평가 결과 요약

(가) 닭 면역보강 인자 cFc 발현이 최적화된 2종의 세포주를 이용해 4종의 cFc-harboring 바이러스 항원을 생산함. 생산된 cFc-harboring 바이러스 항원은 고역가를 나타냈으며 BEI를 이용해서 불활화함. 바이러스 유래 재조합 단백질-cFc 발현이 최적화된 2종의 세포주를 이용해 2종의 cFc-tagged 재조합 바이러스 단백질 항원을 생산함. 생산된 cFc-harboring 바이러스 항원 및 cFc-tagged 바이러스 단백질 항원과 ISA 70 adjuvant를 1:2 비율로 혼합하여 돼지용 복합난황항체 생산용 다가 면역항원을 제조함.

(나) 돼지용 불활화 다가 백신을 10주령 산란계 300수에 3주 간격으로 4회 접종하고 채혈 및 채란을 실시함. 혈청 분리 및 비동화 후 PRRSV 및 PEDV에 대한 중화시험 및 PCV에 대한 ELISA를 이용하여 백신 항원의 체액성 면역 평가를 수행함. 채취한 면역란을 세척 및 소독하고 난황을 분리해서 증류수와 강산성 이온수를 첨가함. 이후에 정치와 원심분리를 통해 난황항체가 포함된 상층액을 수거하여 분무건조에서 건조분말화함. 추출한 난황 및 난황항체 분말을 이용하여 PEDV에 대한 중화시험을 진행하여 백신 항원의 항체 형성을 확인함.

- (다) 고면역 난황항체의 안전성 평가를 위해 돼지용 고면역 복합난황항체 용액을 5일령 자돈에 경구 투여함. 실험군과 대조군 모두 정상적으로 체중이 증가하였고 육안 관찰 및 부검 관찰 모두 정상 소견을 보임. 돼지용 고면역 난황항체의 효능 평가를 위해 신생자돈에 PEDV 공격 접종 전후로 고면역 복합난황항체 용액과 면역제를 혼합해 6시간 간격으로 2회 경구 투여함. 시간 경과에 따라 난황항체 경구투여한 그룹의 자돈들의 설사 증상이 완화되었고 활력도는 증가하였으며 분변 내 바이러스 배출 감소가 확인됨. 부검 및 소장 샘플 조직염색 결과 난황항체 투여한 자돈의 육안 병변이 완화되었고 소장 용모 위축 및 탈락 정도 감소와 바이러스 검출량 감소가 확인됨. 이 결과들을 종합하면 대량 생산된 돼지용 고면역 난황항체가 충분한 안전성 및 효능을 나타낸다고 판단됨.
- (라) 돼지용 복합 난황항체 시제품 생산을 위해 가축실험을 통한 안정성 평가를 진행함. 또한 시제품 생산을 위한 면역첨가제 및 보관용기 선정을 진행하여 돼지용 고면역 복합 난황항체의 상품화를 진행함.

나. 면역단백질의 고속, 대량 발현 체계의 개발

(1) 면역 단백질 발현 재조합 균주 및 생균제용 분리 확보된 미생물 균주의 제제화

(가) PCV, PEDV, PRRSV 면역 단백질 발현 재조합 균주 및 생균제용 분리 미생물 균주의 제제화

① 면역 단백질 발현 재조합 균주의 제제화

㉠ 제제화를 위한 동결건조

- 동결 건조란 압력이 낮아지고 온도가 낮아진 상태에서 낮은 끓는점을 이용하여 열처리 없이 시료를 건조하는 방법이며, 미생물의 장기 보관에 사용할 뿐만 아니라, 동결 건조 후 생성되는 파우더를 배양 접종원으로 사용함. 본 연구에서는 동결 건조 시 미생물의 생존율을 증가시키기 위해 skim milk를 첨가하였으며, 이를 통해 제조된 미생물 분말은 다양한 형태의 제제화를 위한 초기 재료로써 사용하였음.

㉡ PCV, PEDV, PRRSV 면역 단백질 발현 재조합 균주의 생균제 제조

- PCV, PEDV, PRRSV 면역 단백질 발현을 위한 재조합 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* 균주 및 분리 균주인 *Lactobacillus* sp.를 이용하여 생균제 제조를 실시하였음. 제조된 생균제는 추가적인 효능 평가를 위해 효능평가팀 소속 전북대학교 수의과대학 김원일 교수에게 제공 완료함(그림 5-11).

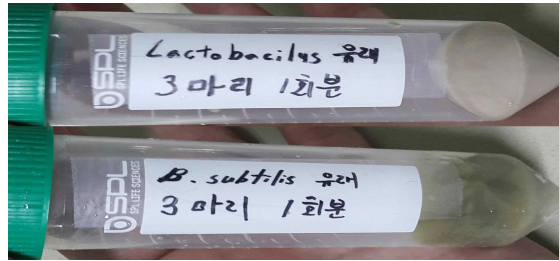


그림 5-11. 생균제 형태의 면역 단백질 발현
재조합 균주

(2) 제제화된 미생물 소재의 효능평가 시험 및 대량 생산을 위한 최적 배양 조건 탐색

(가) 제제화된 미생물 소재의 효능평가 시험

① 미생물 소재의 효능 평가

㉔ 면역 단백질 발현 재조합 균주 및 생균제용 분리 미생물의 효능평가

- 제제화된 면역 단백질 발현 재조합 균주와 생균제용 분리 미생물의 효능 평가를 위해 효능 평가팀 소속 전북대학교 수의과대학 김원일 교수에게 생균제를 전달하여 효능 평가를 실시하였음. 효능 평가는 이유자돈을 대상으로 실시하였으며, PCV, PEDV 및 PRRSV를 공격접종한 다음 면역 단백질 발현 재조합 균주와 생균제용 분리 미생물을 경구투여하여 바이러스에 대한 항체 유도 및 일당증체율, 혈중 바이러스 농도, 폐 병변 완화를 확인하였음.

(나) 면역 단백질 발현 균주 및 생균제용 분리 미생물의 대량생산을 위한 최적 배양 조건의 탐색

① 최적 배양 조건의 확립

㉔ Bench-top fermenter를 이용한 미생물 배양.

- Bench-top fermenter는 소규모의 크기, 간편한 이용성이라는 장점을 가지고 있어 large scale로 대량 배양하기 전 배양 조건을 확립 하는 목적으로 많이 사용됨. 본 연구에서는 bench-top fermenter를 이용하여 재조합 바실러스, 재조합 효모 균주의 대량생산을 위한 최적 배지의 탐색 및 생균제용으로 분리된 미생물인 *Lactobacillus* sp. KNU-02균주의 최적배지 탐색에 사용하였음. 실험에 사용된 bench-top fermenter는 경상북도 군위군 소재 경북대학교 친환경농업연구센터에 있는 INFORS HT社 minifos fermenter와 multifos fermenter를 사용하였음(그림 5-12).

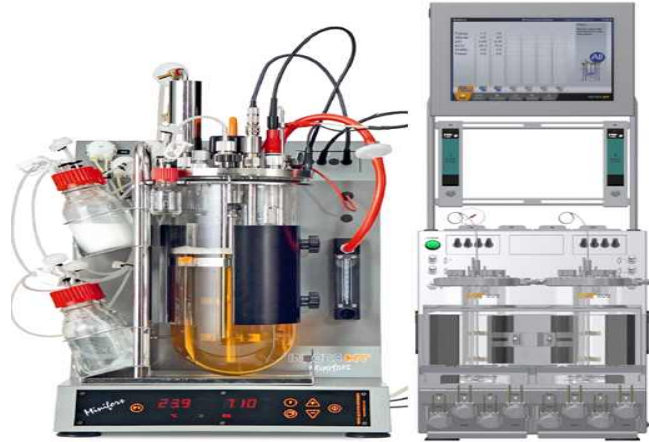


그림 5-12. Bench-top fermenter

㉞ 최적 배지 조건 확립

- 최적 배지 조건의 확립에는 Plackett and Burman design을 이용하여 실시하였음. Plackett and Burman design은 다수의 변수를 고려해야하는 실험에 적합한 실험 디자인 기법으로 최적 배지 조건의 확립에서는 다양한 유기 및 무기 영양원의 변화를 실험 기법에 적용하여 최적 배지 조성의 확립을 목적으로 실험을 진행하였음(표 5-12).

표 5-12. 최적 배지 조성 탐색을 위한 Plackett and Burman design

	L-Threonine	Monopotassium phosphate	Dipotassium phosphate	Sodium acetate trihydrate	Amino acid
A-1	0	1	0.5	1	0.5
A-2	0.015	1	0.5	1	0.5
A-3	0.03	1	0.5	1	0.5
B-1	0.02	0	0.5	1	0.5
B-2	0.02	0.5	0.5	1	0.5
B-3	0.02	2	0.5	1	0.5
C-1	0.02	1	0	1	0.5
C-2	0.02	1	0.25	1	0.5
C-3	0.02	1	1	1	0.5
D-1	0.02	1	0.5	0	0.5
D-2	0.02	1	0.5	0.5	0.5
D-3	0.02	1	0.5	2	0.5
E-1	0.02	1	0.5	1	0
E-2	0.02	1	0.5	1	1
E-3	0.02	1	0.5	1	2
Control	0.02	1	0.5	1	0.5
*Commercial medium	0.02	1	0.5	1	0.5

* *Pichia pastoris* X-33: YPD broth, *Bacillus* sp. : LB broth, *Lactobacillus* sp. : MRS broth

㉞ 면역 단백질 재조합 균주의 배양 최적 조건 확립

- ㉠ 재조합 효모 소재의 대량 생산을 위한 최적 배지 탐색에서는 위에서 설정한 Plackett and Burman design을 적용하여 다양한 조건별로 배양을 실시하였고(그림 5-13), 최적 배양이 이뤄진 배지의 조성은 표 5-13과 같음.

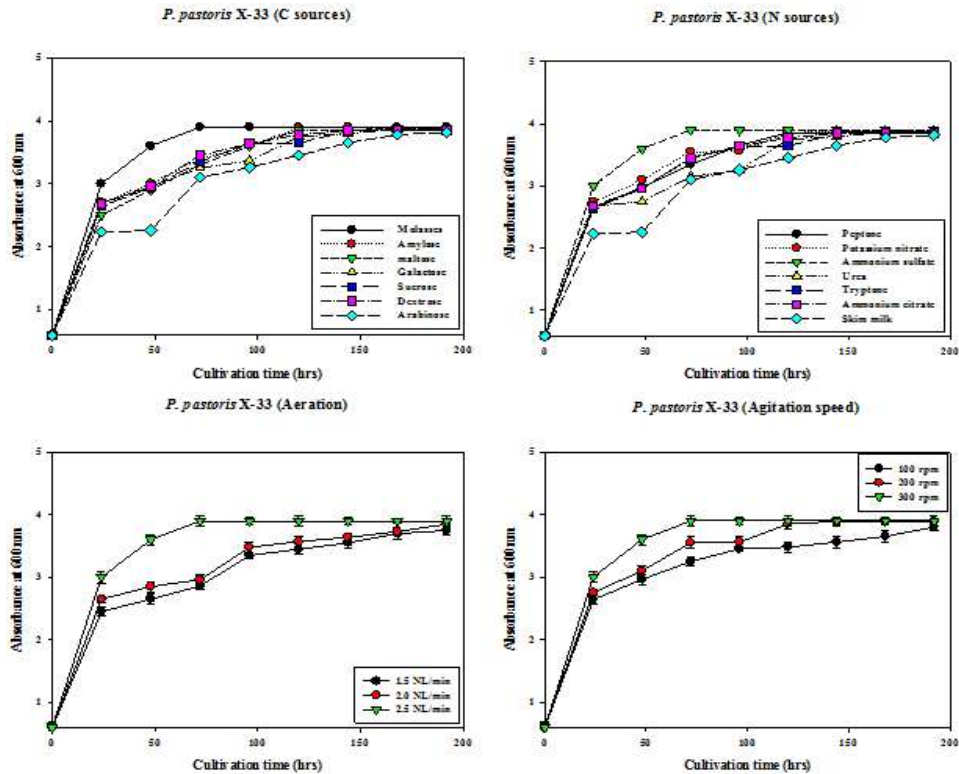


그림 5-13. 최적 배지 조성의 차이에 따른 재조합 효모 균주의 성장 곡선

표 5-13. 재조합 효모 균주의 최적 배양을 위한 최적 배지 조성

Components	(%)
Glucose	0.5
Yeast extract	0.6
Dipotassium phosphate	0.2
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.1
Ammonium citrate (dibasic)	0.4
L-글루타민산나트륨(MSG)	0.2

㉠ 재조합 바실러스 소재의 대량 생산을 위한 최적 배지 탐색 역시 위에서 설정한 Plackett and Burman design을 적용하여 다양한 조건별로 배양을 실시하였고 (그림 5-14), 최적 배양이 이뤄진 배지의 조성은 표 5-14와 같음.

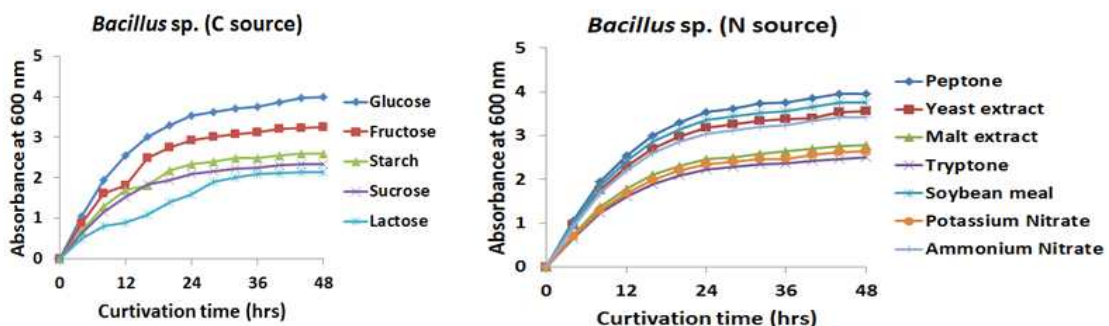


그림 5-14. 최적 배지 조성의 차이에 따른 재조합 바실러스 균주의 성장 곡선

표 5-14. 재조합 바실러스 균주의 최적 배양을 위한 최적 배지 조성

Components	(%)
Glucose	0.8
Yeast extract	0.6
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.1
Dipotassium phosphate	0.1
Ammonium citrate (dibasic)	0.2
L-글루타민산나트륨(MSG)	0.2

㉔ 생균제용 분리 미생물인 *Lactobacillus* sp. KNU-02 균주의 대량 생산을 위한 최적 배지 탐색 역시 위에서 설정한 Plackett and Burman design을 적용하여 다양한 조건별로 배양을 실시하였고(그림 5-15), 최적 배양이 이뤄진 배지의 조성은 표 5-15와 같음.

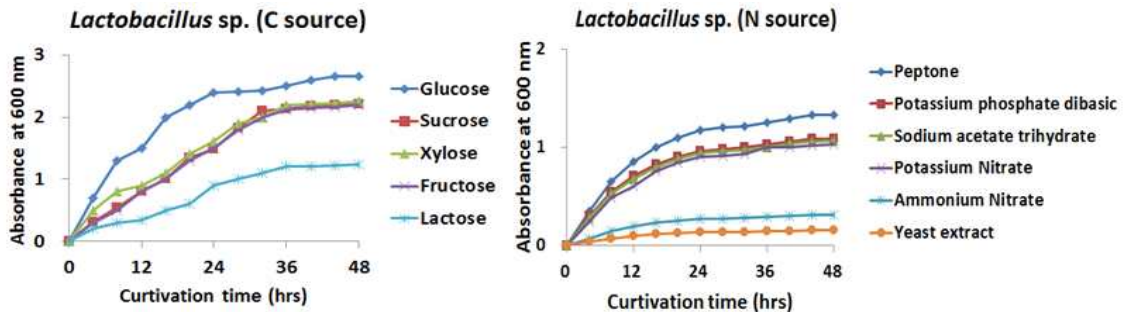


그림 5-15. 최적 배지 조성의 차이에 따른 *Lactobacillus* sp. KNU-02 균주의 성장 곡선

표 5-15. *Lactobacillus* sp. KNU-02의 최적 배양을 위한 최적 배지 조성

Components	<i>Lactobacillus</i> sp. (%)
Glucose	0.8
Yeast extract	0.6
Dipotassium phosphate	0.1
Sodium acetate	0.06
Magnesium sulfate 7H ₂ O	0.04
Ammonium citrate (dibasic)	0.2
L-글루타민산나트륨(MSG)	0.2

(3) 축산 사료 첨가 미생물 생균제를 위한 미생물 균주 소재의 확보 및 적합성 확인과 미생물 생균제로서의 개발 활용 가능성 확인

(가) 축산 사료 첨가 미생물 *Lactobacillus acidophilus* KNU-02와 *Clostridium butyricum* KNU-L09의 확보 및 적합성 확인

① 축산 사료 첨가 미생물 *Lactobacillus* sp. KNU-02의 계통발생학적 동정과 적합성

확인

- ㉞ 생균제용 분리 미생물인 *Lactobacillus* sp. KNU-02의 동정을 위하여 16S rRNA gene sequencing을 실시하였으며, 그 결과 *Lactobacillus acidophilus*와 99%의 상동성을 가지고 있는 것으로 확인되었음. 따라서 균주명을 *Lactobacillus acidophilus* KNU-02로 명명하였으며, 계통발생학적 모식도는 그림 5-16과 같음.

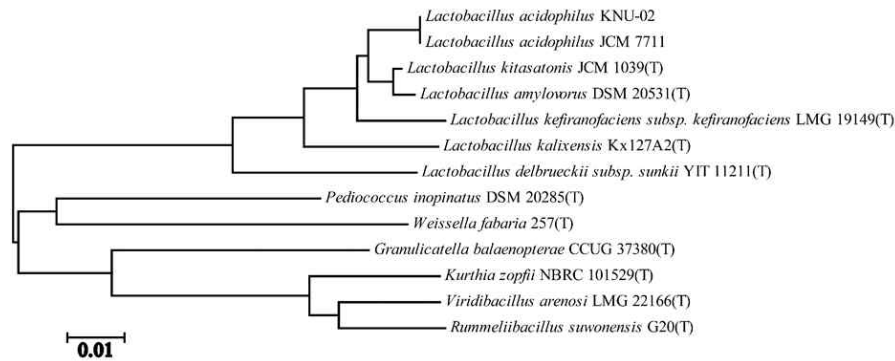


그림 5-16. 축산 사료 첨가 미생물 *L. acidophilus* KNU-02 균주의 계통발생학적 모식도

- ㉞ 또한 효능 평가팀 소속 전북대학교 수의과대학 김원일 교수에게 전달하여 효능평가를 실시하였음. 이유자돈을 대상으로 실시한 결과, 일당 증체율 증가, 혈중 바이러스 농도 감소 및 폐 병변 완화 효과를 확인하였음.

- ② 축산 사료 첨가 미생물 *Clostridium butyricum* KNU-L09의 분리 및 동정과 적합성 확인

- ㉞ 축산 사료 첨가 미생물 *C. butyricum* KNU-L09는 경북 영주시 축산농가에서 관능적으로 건강함이 증언된 모돈의 장내 미생물에서 분리 되었으며 16S rRNA gene sequencing을 통한 동정 결과 *C. butyricum*과 99% 상동성을 가지고 있는 것으로 확인되었음. 따라서 균주명을 *C. butyricum* KNU-L09로 명명하였으며, 계통발생학적 모식도는 그림 5-17과 같음.

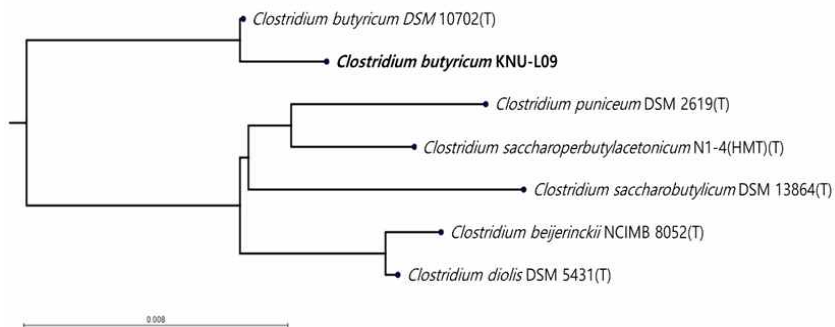
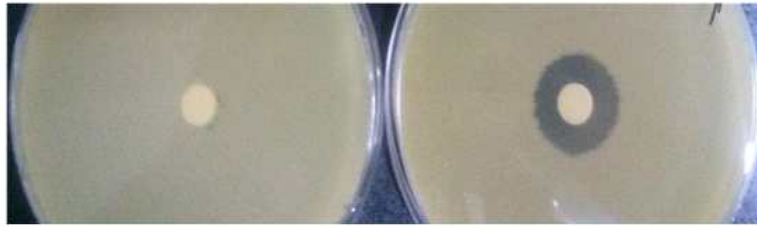


그림 5-17. 축산 사료 첨가 미생물 *C. butyricum* KNU-L09 균주의 계통발생학적 모식도

- ㉔ 또한 KNU-L09 균주를 이용하여 인축 공통 병원성 미생물에 대한 항균활성 테스트를 실시하였음. 항균활성 테스트에 사용된 병원성 미생물은 식중독을 유발하는 *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, 콜레라를 유발하는 *S. choleraesuis*, 젖소 유방염을 유발하는 *Streptococcus agalactiae*를 사용하였으며, 실험결과 KNU-L09 균주는 실험에 사용된 모든 인축 공동 병원성 미생물에 대해 항균 효과가 있는 것으로 확인되었음(그림 5-18).

(A) 무처리 대조군 (B) 균주처리



Test microorganisms	Inhibition
<i>B. cereus</i> KACC 10097	○
<i>S. choleraesuis</i> KCTC 2929	○
<i>S. enterica</i> KACC 10763	○
<i>S. typhimurium</i> KCTC 1928	○
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	○

그림 5-18. *C. butyricum* KNU-L09 균주의 항균 효과

- ③ Next generation sequencing (NGS) 기법을 활용한 축산 사료 첨가 미생물 *Clostridium butyricum* KNU-L09의 적합성 확인
- ㉔ 최근 들어 유전체 수준에서 원하는 미생물의 특성 및 정보를 확인하는 방법으로 next generation sequencing (NGS) 기술을 이용한 유전체 분석 (whole genome sequencing, WGS) 을 실시하고 있음. 본 연구에서는 *C. butyricum* KNU-L09 균주의 독성 유전자 존재유무 조사를 통해 안전성을 평가하고자 3세대 NGS기술인 Pacbio RSII system을 이용한 single molecule real-time (SMRT) sequencing을 이용하였음. 이 기술은 2세대 NGS기술에 비해 더 긴 라이브러리를 확보할 수 있으며 더 높은 정확성을 가지고 있다는 장점을 가지고 있으므로, 미생물 생균제 목적의 확보 미생물 균주에 대한 WGS를 실시하여 유전체 분석 결과 및 독성 유전자 존재유무를 확보하고자 하였음(그림 5-19).
- ㉔ 분리 및 동정을 완료한 *C. butyricum* KNU-L09를 이용하여 유전체 분석을 실시하였고, 분석 결과를 온라인 database인 ClanTox에 업로드하여 독성유전자의 존재유무를 조사하였음. 그 결과 유전체는 약 4.65 Mbp인 것으로 확인되었으며, 총 4,152개의 open reading frame 중 독성유전자가 없는 것으로 확인되어 인축에 무해한 것으로 최종 판정하였음(그림 5-20).

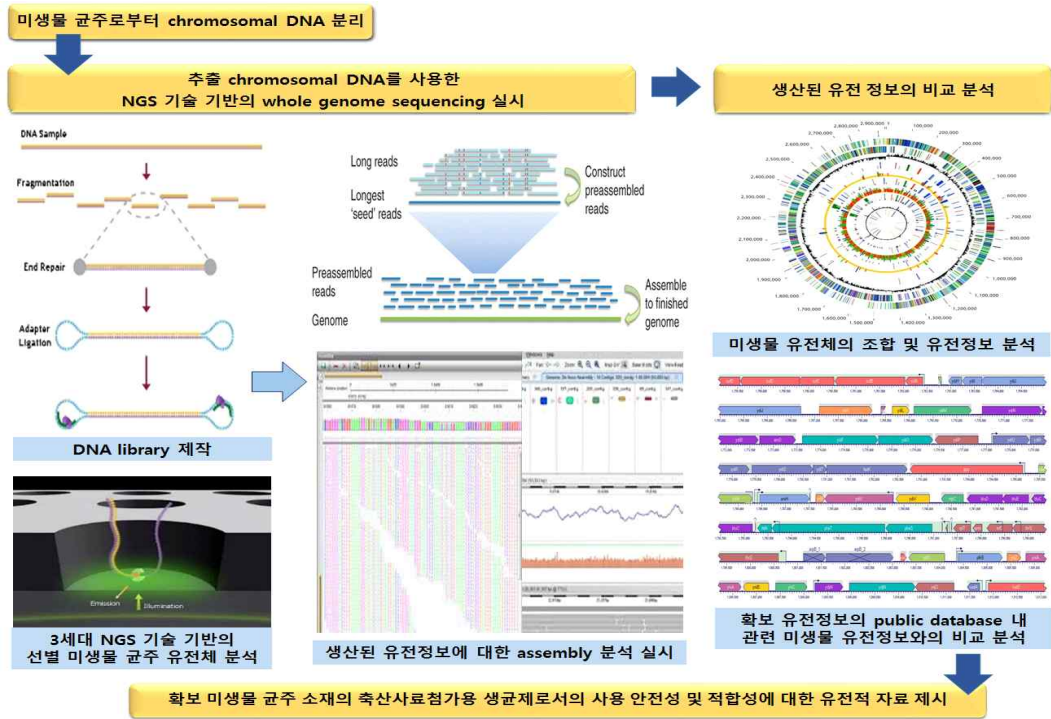


그림 5-19. NGS기술을 이용한 whole genome sequencing과 유전적 자료 제시의 모식도

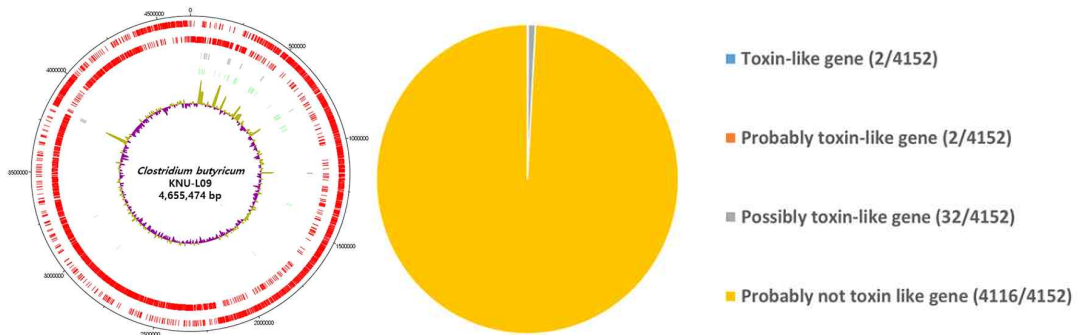


그림 5-20. *C. butyricum* KNU-L09의 전장 유전체 및 독성유전자 분석

(나) 생균제 2종에 대한 미생물 생균제로서의 개발 활용 가능성 제시

- ① 축산 사료 첨가 미생물 *Lactobacillus acidophilus* KNU-02, *Clostridium butyricum* KNU-L09의 동결건조 전, 후 생존률 조사
- ㉠ 분리한 미생물 생균제인 *L. acidophilus* KNU-02와 *C. butyricum* KNU-L09를 이용하여 축산 사료 첨가 미생물로서의 개발 활용 가능성을 확인하기 위하여 추가적으로 동결건조를 실시하고 동결건조 전, 후의 생존률을 조사하였음. KNU-02 균주와 KNU-L09 균주를 각각 5 L, 2.5 L 배양한 후 25배 농축하여 동결건조를 실시하였고 동결건조 후 생존률을 높이기 위해 skim milk를 첨가하였음. 그 결과, 동결건조 후 약 30 g의 KNU-02 균주 분말과 약 15 g의 KNU-L09 균주 분말을 확보할 수 있었으며, 동결건조 전, 후의 미생물 밀도에 대한 결과는 표 5-16과 같음. 제제화를 통해 만들어진 면역증강용 생균제 KNU-02와 KNU-L09 두 균주의 동결

건조 분말은 삼양 애니팜으로 전달하여 시제품 제조에 활용하였음(그림 5-21).

표 5-16. 축산 사료 첨가용 미생물 생균제 2종에 대한 동결건조 전, 후의 미생물 농도

<i>Clostridium butyricum</i> KNU-L09	
동결 건조 전	동결 건조 후
2.22×10^8 cfu/mL	2.55×10^9 cfu/g
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KNU-02	
동결 건조 전	동결 건조 후
1.67×10^9 cfu/mL	2.04×10^{10} cfu/g



그림 5-21. 미생물 생균제 2종의 동결건조 분말

3. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립 (제1협동)

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 산업화를 위한 리소좀의 대량생산 공정화 방법 구축

(가) 리소좀의 정량화 방법 제시

① 콜레스테롤 분석을 통한 리소좀 정량방법의 제시

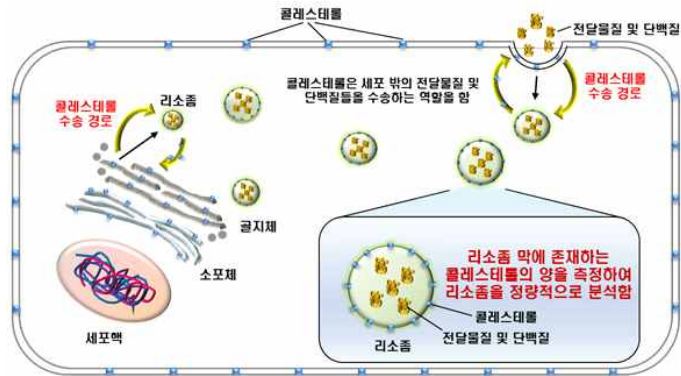


그림 5-22. 콜레스테롤을 이용한 리소좀 정량화 모식도

- 리소좀을 형성하는 과정에서 소포체, 골지체 및 세포벽에 존재하는 콜레스테롤이 리소좀 막에 포함되는 원리를 이용하여 리소좀이 갖는 콜레스테롤 양의 측정을 통하여 리소좀 정량화에 접근함(그림 5-22).
- 대조군(Mock vector)과 재조합 효모(pMBTL-JH)에서 각각 추출한 리소좀의 콜레스테롤을 분석한 결과, 재조합 효모의 콜레스테롤 측정량이 약 2배정도 높은 것을 확인함. 이를 통하여, 재조합 효모에서 분리된 리소좀의 양이 대조군에서 분리된 리소좀의 양보다 많은 것을 확인함(그림 5-23).

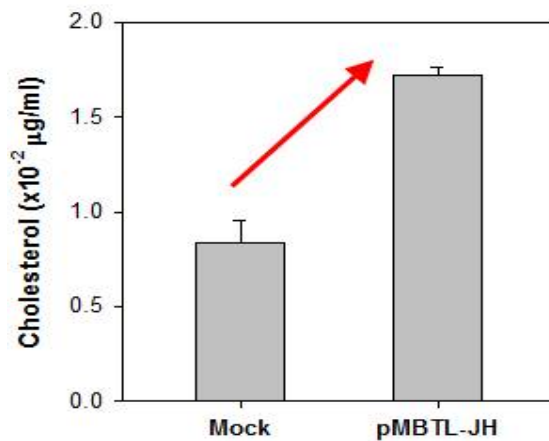


그림 5-23. 리소좀의 콜레스테롤 분석

② 콜레스테롤 양에 따른 리소좀 정량화 지표 제시

- 리소좀 막의 콜레스테롤을 측정함으로써 리소좀의 양을 정량화 할 수 있는 지표를 제시함(표 5-17).

표 5-17. 리소좀 정량화 지표

Lysosome (%)	1	5	10	20	50	100
Cholesterol ($\times 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$)	0.032	0.16	0.32	0.64	1.28	2.56
Cell mortality (%)	17	41	80	87	92	98

* 실험에 사용한 균주 : E. coli 1×10^8 CFU

(나) 세포 내 염증 관련 효과 검증

- Inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 각각 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성하며 염증반응을 일으킴. iNOS에 의해 생성된 NO는 조직 손상, 유전자 변이 등의 염증을 유발하고, 염증반응 부위에서 발견되는 COX-2는 염증 유발 사이토카인, 세포 성장인자, 암세포촉진인자, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등에 의하여 일시적으로 발현되어 염증 매개물질인 PGE₂를 형성시킴.

① ¹H-NMR 분석을 통한 알지네이트 올리고당의 생성여부 확인

- 알지네이트 올리고당의 생성여부를 확인하기 위하여 JEOL JNM-ECA 600MHz FT-NMR Spectrometer를 이용하여 알지네이트 올리고당을 D₂O에 용해시켜 피크를 확인함.
- 알지네이트를 분석한 결과는 그림 5-3의 (A)를 alginate backbone으로 각각의 알지네이트 올리고당에서 새로운 피크가 발견된 것을 확인함. 또한, 새로운 피크가 6hr-AOs, 12hr-AOs, 24hr-AOs에서 모두 동시에 발견되었으며, 분해시간이 길어질수록 피크의 높이가 높아지는 것을 확인함(그림 5-24).

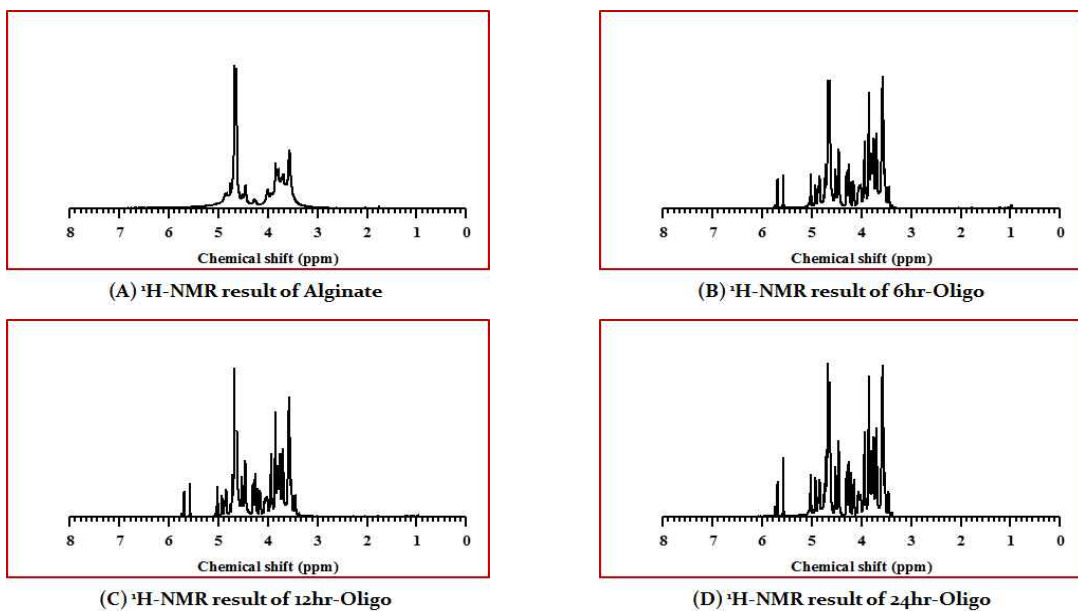


그림 5-24. 알지네이트 올리고당의 ¹H NMR 분석

② 알지네이트 올리고당의 ROS 분석

- 3가지 유형의 알지네이트 올리고당의 활성산소종을 분석하여 알지네이트 올리고당이 세포 내에서 염증반응에 미치는 영향을 확인함.
- 확인한 결과, 6hr-AOs와 12hr-AOs의 경우 알지네이트 올리고당의 농도가 증가할수록 활성산소종의 생성도 감소하는 것을 확인함(그림 5-25).

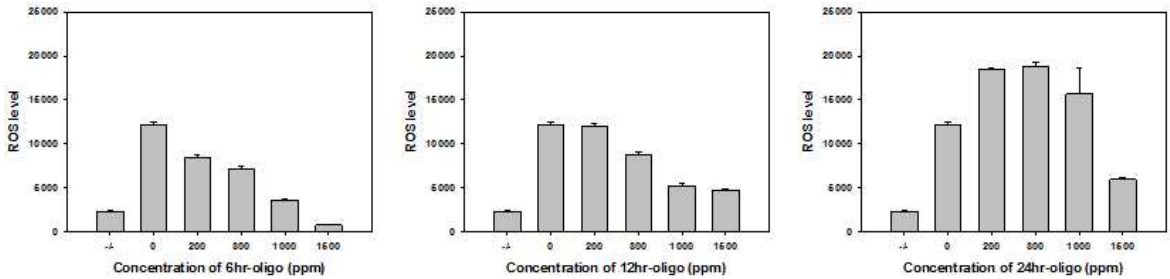


그림 5-25. 3가지 유형의 알지네이트 올리고당의 ROS 측정

③ 알지네이트 올리고당의 NO 생성 억제 효과

- 3가지 유형의 알지네이트 올리고당의 NO를 분석하여 알지네이트 올리고당이 세포 내에서 염증반응에 미치는 영향을 확인함.
- 그 결과, 6hr-AOs와 12hr-AOs에서 400ppm이상의 농도부터 NO생성 억제효과가 나타나는 것을 확인함(그림 5-26).

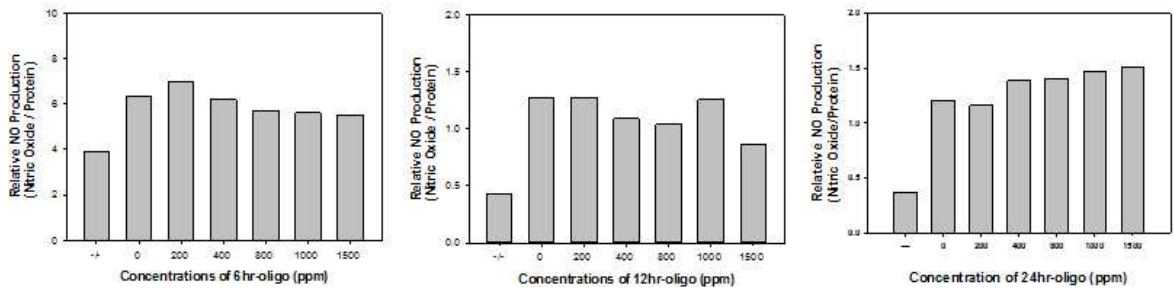


그림 5-26. 3가지 유형의 알지네이트 올리고당의 NO 생성량 측정

④ 알지네이트 올리고당의 iNOS와 COX-2의 확인

- 위의 두 결과를 토대로 6hr-AOs와 12hr-AOs의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현양을 웨스턴 블랏을 통해 확인함(그림 5-27).

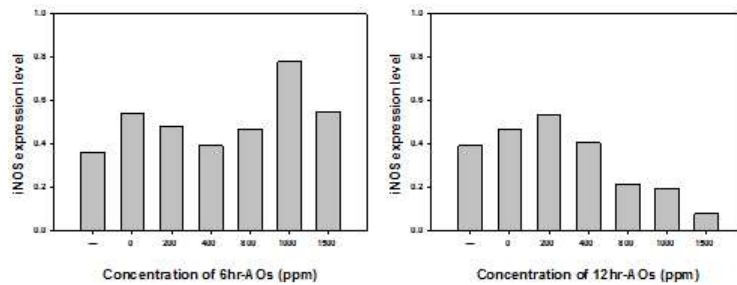


그림 5-27. 6hr-AOs와 12hr-AOs의 iNOS 단백질 발현양

- 확인한 결과, 6hr-AOs와 12hr-AOs의 알지네이트 올리고당 모두 항염 효과를 보이는 것을 확인하였으나 6hr-AOs의 경우 1000ppm이상의 고농도로 처리한 경우에

는 오히려 염증에 영향을 끼치는 것으로 확인됨(그림 5-28).

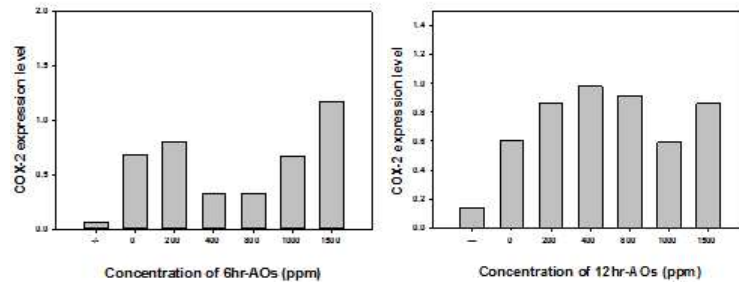


그림 5-28 6hr-AOs와 12hr-AOs의 COX-2 단백질 발현양

(다) 대량 생산을 위한 리소좀 분리공정 단순화

① Glass bead를 이용한 세포 파쇄법 제시(그림 5-29)



그림 5-29. 세포 파쇄법을 이용한 분리공정 단순화 모식도

② 분리공정 단순화에 따른 리소좀의 항균활성 검증

- Wild type의 균주와 재조합 균주 pMBTL-JH의 단순화된 공정에 의해 분리된 리소좀의 항균활성을 확인함.
- 대량생산을 위해 고안한 세포 파쇄법을 통한 분리방법과 기존의 원심분리법에 의해 분리한 리소좀의 항균활성을 확인한 결과, 세포파쇄법(whole extract)으로 분리한 리소좀도 높은 항균활성을 갖는 것을 확인함(그림 5-30 및 5-32).

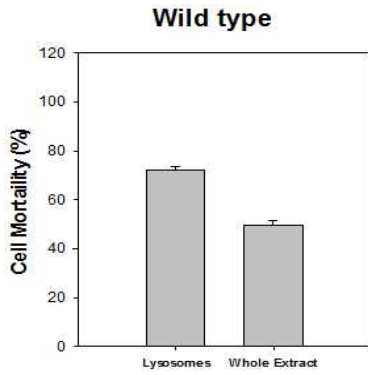


그림 5-30. 원심분리법에 의해 분리한 리소좀의 항균활성

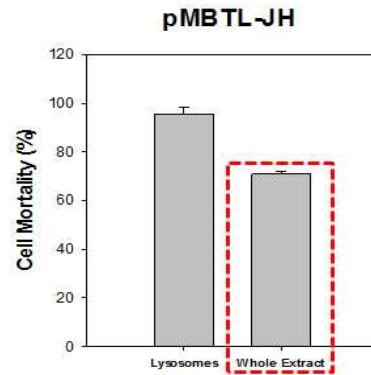


그림 5-31. 세포 파쇄법에 의해 분리한 리소좀의 항균활성

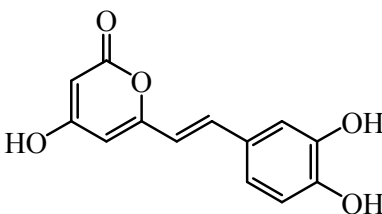
나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 지표성분 설정 및 시험법 밸리데이션

(가) 지표성분의 설정

- 본 연구에서 발견한 소재 중에서 생물학적 효능과 원료의 수급성을 고려할 때 장수진흙버섯과 이의 배양산물이 산업화의 가능성이 가장 높은 소재로 판단되었음. 따라서 이들 소재에 공통적으로 분포하며 활성이 우수한 hispidin 화합물을 지표성분으로 설정함(표 5-18).

표 5-18. 지표성분 hispidin의 특성

성분명	Hispidin 
CAS Number	555-55-5
Chemical name	6-(3,4-dihydroxystyryl)-4-hydroxy-2-pyrone
Molecular formula	C ₁₃ H ₁₀ O ₅
Molecular weight	246

① 지표성분 정량 분석 조건

㉞ 분석시료 : 장수진흙버섯 60% 메탄올 추출물

㉞ 지표성분 : Hispidin

㉞ 분석법 검증 및 분석결과 요약: 장수진흙버섯 60% 메탄올 추출물 중 hispidin의 함량을 확인하기 위하여 분석법의 유효성을 검증함(표 5-19).

표 5-19. 장수진흙버섯 추출물 중 hispidin 분석법의 유효성 검증 및 정량분석 결과

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간 (Retention time), spectrum, peak purity 검토	- 검출시간 : 약 15.8-16.4분 - spectrum : λ_{max} 약 369 nm 표준용액과 시험용액 일치 - peak purity: 시험용액 중 hispidin의 UV peak 가 5 points 일치, 단일물질로 확인됨
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도에 서 직선성 확인	- Hispidin 농도 10.0~500 mg/L에서 확인 - R^2 : 0.9999
검출한계	$3.3 \cdot \sigma / S$ (σ : y절편 표준편차, S: 기울기)	- 검출한계 : 7.16 ppm
정량한계	$10 \cdot \sigma / S$	- 정량한계 : 21.70 ppm
함유량	3반복 분석	- 0.0978±0.0014%

② 분석방법

㉠ 장비

- HPLC system : HITACHI Chromaster, HITACHI, Japan
Pump 5110, Autosampler 5210,
Column Oven 5310, Diode Array Detector
- Sonicator : POWERSONIC 410, WHASHIN Tech., Korea

㉡ 시약

- Hispidin : 자체 제작, 98.8%
- DMSO : Sigma, D2650
- Acetonitrile : J.T.Baker, 4L, 9017-03
- Trifluoroacetic acid (TFA) : ACROS, 139721000

㉢ 표준용액의 조제

- 표준물질 hispidin 5 mg을 정밀히 달아 acetonitrile 5 mL (1000 ug/mL)에 녹인 후 1 mL 씩 분주하여 냉동보관 하며 acetonitrile로 희석하여 working solution으로 사용

㉣ 시험용액의 조제

장수진흙버섯 추출물분말 50 mg 에 acetonitrile 20 ml을 넣어 1시간동안 초음파를 이용하여 용해시킨 후, 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 사용

㉤ 분석조건

- Instrument : HPLC system
- Detector : UV detector DAD (380nm)
- Column: TSK-gel C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5 μ m), TOSOH, Japan
- Column Oven : 25°C
- Injection vol. : 10 μ l

- Flow rate : 1.0ml/min
- Mobile phase : A, MeCN, B, 3rd distilled water in 0.04% TFA

min	A (%)	B (%)
0	18	82
20	18	82
22	100	0
30	100	0
32	18	82
42	18	82

㉞ 계산:

$$\text{Hispidin (\%)} = \frac{\text{시험용액 농도 (ug/mL)}}{\text{시료 (mg)}} \times \frac{\text{표준품순도 (\%)}}{1000}$$

③ 분석법 검증 및 정량분석 결과

㉞ 특이성(Specificity)

- 장수진흙버섯 추출물 중 hispidin의 retention time과 peak 분리도 확인을 위하여 Hispidin 표준물질과 장수진흙버섯 추출물을 분석하여 검출된 peak를 확인함. 표준용액과 장수진흙버섯 추출물 시험용액에서 약 16분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였으며, 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었음(그림 5-32).

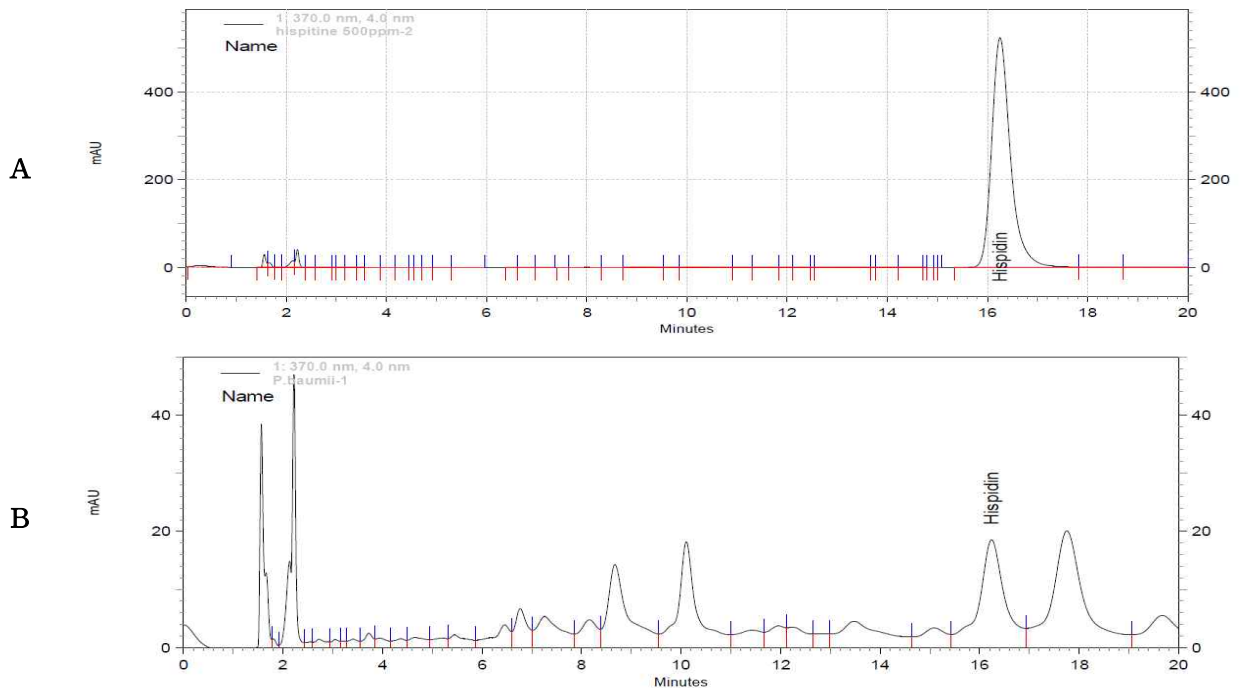
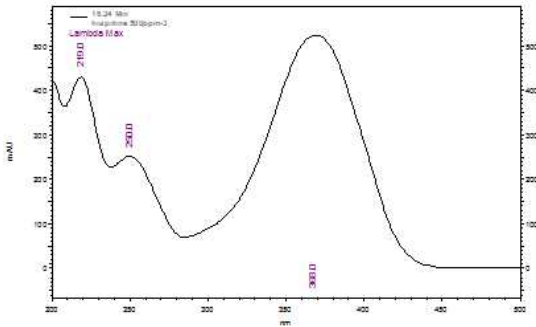


그림 5-32. 표준용액과 시험용액 중의 hispidin의 HPLC chromatogram

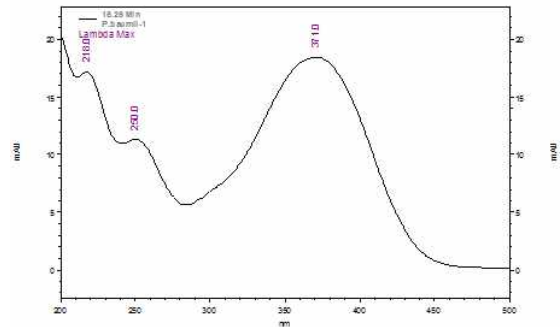
(A: hispidin 표준용액, B: 장수진흙버섯 추출물 시험용액)

㉔ 장수진흙버섯 추출물 중 hispidin의 spectrum과 peak purity 확인

- 시험용액 중 검출된 chromatogram이 표준용액인 hispidin과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인함. 약 16분대에서 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 369 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인함(그림 5-33).



[Hispidin]



[장수진흙버섯 추출물 시험용액]

그림 5-33. Hispidin과 장수진흙버섯 추출물 시험용액의 UV spectrum

- 또한 시험용액의 hispidin peak의 purity를 확인하기 위하여 peak의 5 point UV spectrum을 표시하였으며, 그 결과 5개의 지점에서 모두 일치하는 UV spectrum을 나타내어 hispidin이 단일물질임을 확인함(그림 5-34).

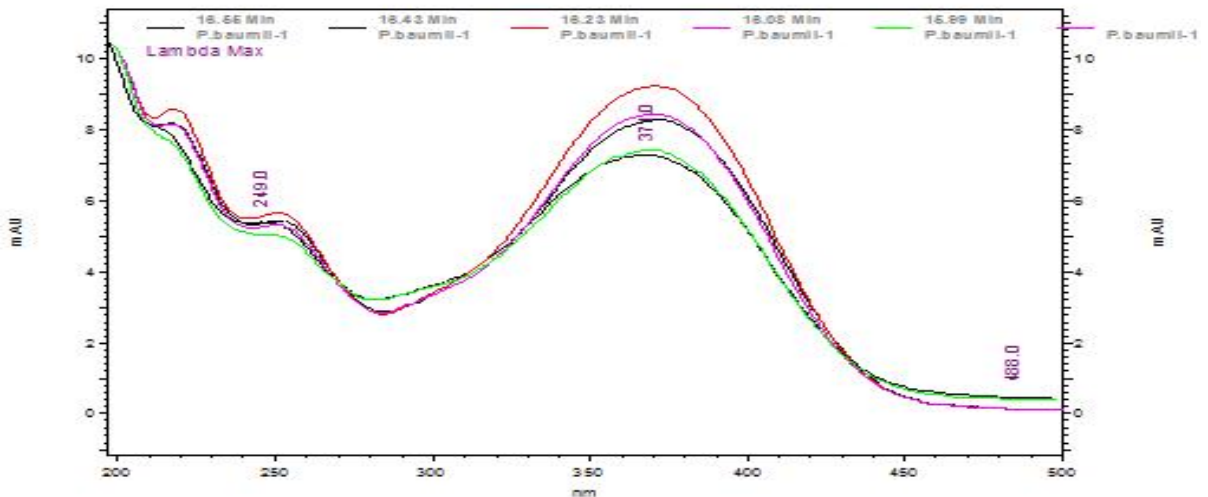


그림 5-34. 장수진흙버섯 추출물 시험용액 중 hispidin peak 각 5개 지점의 UV spectrum 분석

㉔ 직선성(Linearity)

- 표준물질에 대한 직선성: Hispidin을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가함. Hispidin의 농도 10.0~500 ug/ml 범위에서 평가하여 분석한 결과, 농도별로 직선성을 확인하였으며, R^2 는 0.9999로 99.99%의 직선성을 나타냄(그림 5-35).

$y = 9.18934e-006x - 2.30175$
 Goodness of fit (r^2): 0.999901

Peak: Hispidin -- ESTD -- 1: 370.0 nm, 4.0 nm

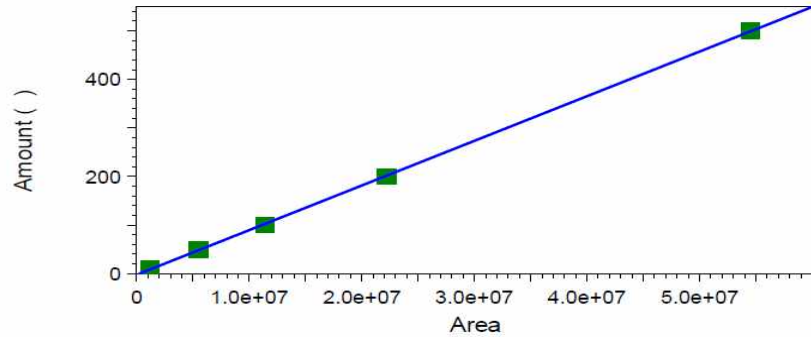


그림 5-35. Hispidin의 calibration curve

- ㉔ Hispidin의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)
- 검출한계 및 정량한계 값을 직선성 확인을 위해 얻은 측정값을 이용하였음. 즉, calibration curve를 작성하기 위해 HPLC로 분석한 결과를 통계 프로그램을 이용하여 liner regression equation을 계산함. 이때 3반복하여 얻은 값을 각각 계산하여 LOD(limit of detection)는 $3.3 \times SD/S$, LOQ(limit of quantification)는 $10 \times SD/S$ (SD는 Y 절편의 표준편차, S는 기울기의 평균)로 값을 계산함. 즉, 지표성분인 hispidin은 7.16 ppm 범위의 검출한계를, 21.70 ppm의 정량한계를 나타냄.

- ㉕ 장수진흙버섯 추출물에 함유된 hispidin의 정량분석
- 장수진흙버섯 추출물에 함유된 hispidin의 정량분석 결과, $0.0978 \pm 0.0014\%$ 의 농도로 함유되어 있음을 확인함(표 5-20).

표 5-20. 장수진흙버섯 추출물에 함유된 hispidin의 정량분석 결과

Hispidin 함량 (%)	반복	검량선결과 (mg/l)	최종량 (ml)	시료무게 (mg)	표준품순도 (%)	결과값 (%)
시료	1	10.71	1	10	90	0.0964
	2	10.885	1	10	90	0.0980
	3	11.014	1	10	90	0.0991
평균						0.0978 ± 0.0014

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) 유용물질을 식물에 발현

- 유용물질을 식물에 발현시켜 가축에게 구강투여를 함으로써, 가축 질병을 예방하고 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV)의 ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6, ORF7, Bovine coronavirus의 S1, 돼지게놈에 존재하는 항미생물펩타이드(PMAP36), 누에에 존재하는 Cecropin A, HINI의 HA 등의 다양한 후보물질 유전자를 대상으로 유용유전자 발현 Binary vector를 제작하고자 시도하였음.

- 2개의 후보물질 유전자가 식물체에서 정상적으로 발현되었다. PMAP36 와 BVC-S1 을 식물체발현 벡터인 pEarley103 벡터에 도입하여 (PMAP36 경우 pEarley103-PMAP:GFP, BVC-S1 경우 pEarley103-BCV-S1:GFP 라고 명명함), 식물에 접종하여 GFP 발현으로 PMAP와 BVC-S1의 발현을 확인하였음(그림 5-36과 그림 5-37).

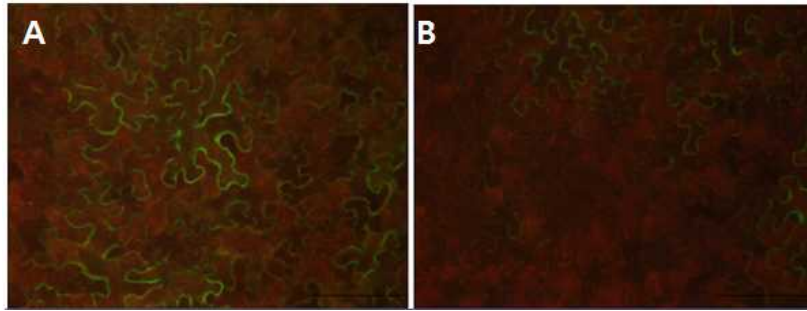


그림 5-36. pEarley103-PMAP:GFP에 의한 PMAP의 식물체 발현
A) Agrobacterium infiltration 후 2일, B) Agrobacterium infiltration 후 3일

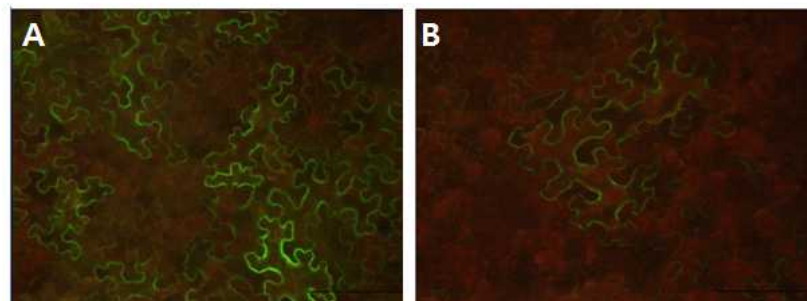
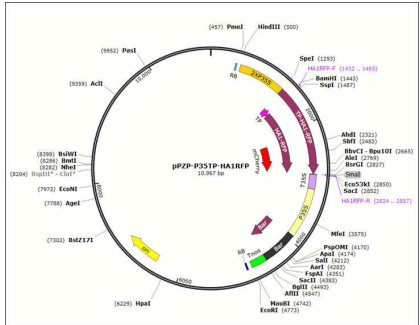


그림 5-37. pEarley103-BCV-S1:GFP에 의한 S1의 식물체 발현
A) Agrobacterium infiltration 후 2일, B) Agrobacterium infiltration 후 3일

- 식물 발현 벡터는 일시적으로 발현되어 최대 발현 후 감소하는데 PMAP:GFP과 S1:GFP 모두 접종 후 2일에 최대 발현을 보였으며 3일에는 발현양이 감소함을 확인하였음. GFP를 유용유전자 앞에 위치시키면 GFP인지 아니면 GFP:유용단백질 인지 혼돈과 논란이 야기되므로 GFP를 유용유전자 뒤에 위치시킴으로서 GFP발현은 GFP:유용단백질이라는 발현 전략을 세워 실험을 진행하였음. 상기 그림에서 보는 바와 같이 GFP발현이 확인 되었으므로 목표로 하는 GFP:유용단백질이 발현 되었다고 판단됨. 따라서 식물 바이러스에 유용단백질을 발현하는 유전자를 도입하면, 식물바이러스가 활동을 하는 한 지속적인 발현이 가능하리라 생각되므로 차후 이에 대한 연구가 필요함.
- 현재 HINI의 HA를 식물체에 발현하는 Binary vector를 제작하여(그림 5-38) 식물체에 발현시킨 결과 발현 정도가 높지 않으나 발현이 확인되어, 발현 정도를 높이는 방안에 대하여 코돈 최적화, 분해 억제방안 등과 같은 여러 각도에서 살펴보는 추가 연구가 필요한 실정임.



PCR	TA digestion	Enzyme digestion
HA1-RFP size : 1.3Kb	BamH1/SacI : 1.3Kb	BamH1/SacI : 1.3Kb

그림 5-38. pPZP-P35TP-HA:RFP 개념도와 클로닝 결과

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

(1) 양계분야

(가) 연구개발물질 추진전략 및 추진체계

- 양계분야 효능평가팀은 본 과제에서 개발된 바이오신소재 후보물질들의 실험실 및 목적동물 효능평가에 대한 추진체계를 아래와 같이 확립하고 물질들에 대한 기능별 카테고리를 분류하여 평가를 수행하였음(그림 5-39).
- 먼저, 1단계에서 개발물질에 대한 기능별 카테고리를 분류하여 항병성, 면역원성, 생리활성을 평가하고 실제 효능이 있는 후보물질을 스크리닝하는 단계를 거친 다음, 이후 2단계에서 동물모델에서 안정성에 대한 평가를 거쳐 실제 목적동물 질병유발 모델에서 물질의 효능을 평가하고 최종 현장실증시험을 통해 질병별 개발물질의 효능을 확인할 수 있는 체계를 구축하였음.

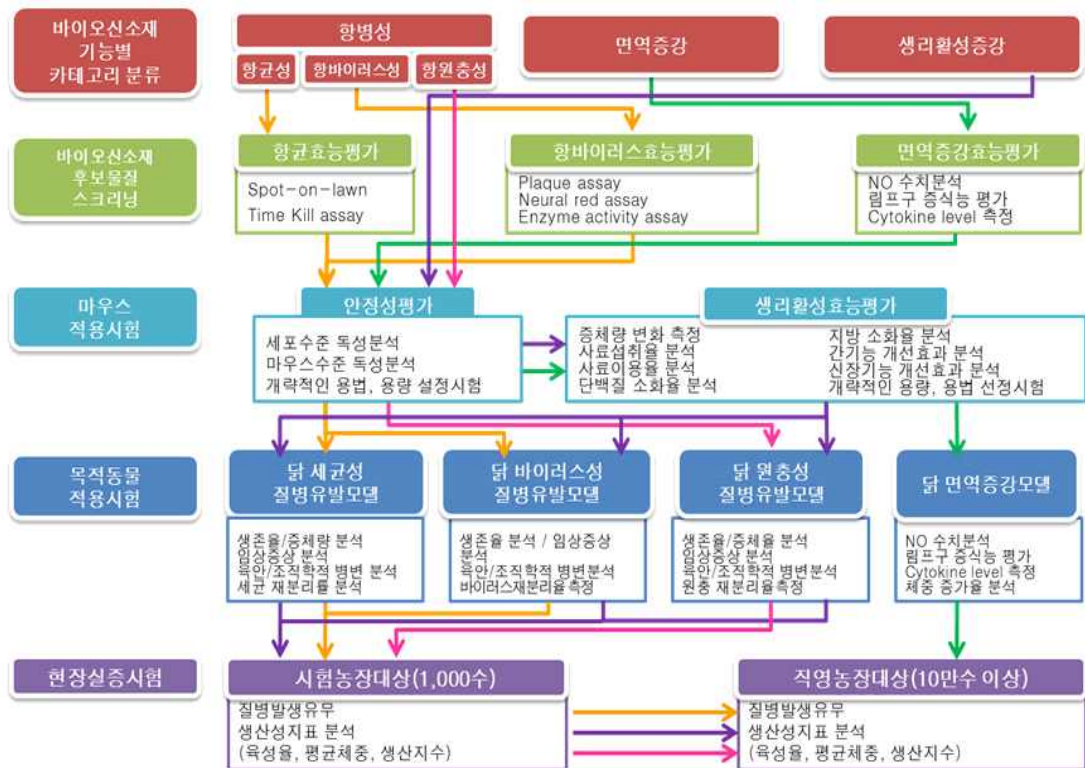


그림 5-39. 신소재 개발물질 효능평가 추진체계

(나) 바이오신소재 개발물질 항병성 평가방법

① 항균성 평가

㉞ Spot-on lawn assay 방법은 목적하는 균에 대하여 개발된 항균효능이 있는 물질의 최소억제농도(minimum inhibitory concentrations, MICs)를 평가하는 방법으로 paper disc법과 유사함. Paper disc 방법은 물질에 대한 항균효능이 있음에도 디스크 억제존(inhibition zone)으로 확인되지 않는 경우가 있는데 spot-on lawn assay는 세균의 억제(inhibition) 유무를 배지상에서 보다 확실하게 육안적으로 확인할 수 있음. 현재는 항생제내성균이나 슈퍼박테리아의 치료제 또는 대체물질을 탐색하는 과정에서 bacteriophage를 분리할 때 사용하는 실험방법으로 알려져 있음. 실험방법은 다음과 같음(Lima et al., 2007).

- 목적하는 세균을 배양할 수 있는 한천배지에서 증식한 집락 3~4개를 액체배지에 접종하고 균종별로 4~5시간 진탕 배양함.
- 무균작업대에서 균배양액 1 ml를 Mueller-Hinton 한천배지에 넣고 배지 표면에 완전히 적신 다음 나머지 균액은 마이크로 피펫으로 제거하고 약 5분간 건조시킴.
- 농도별로 희석하여 준비된 물질 5~10 μl 를 배지위에 적하하고, 건조한 후에 37°C 배양기에서 18시간 배양함.
- 다음날 균의 억제능을 관찰하고 물질에 대한 최소억제농도를 관찰함.
- 항균효능을 확인하기 위해 한천배지에서 배양한 집락 2~3개를 4 ml의 Mueller-Hinton 액체배지에 접종하고 3~4시간동안 진탕 배양함.
- 균배양액을 10^4 cfu/ml이 되게 O.D. 600 nm에서 반복측정하고 96-well plate에 100 μl 씩 분주하고 억제능이 있는 물질의 농도를 균액이 들어있는 plate에 각각 5 μl 씩 넣어주고 시간대별로 (1, 3, 6, 12, 24H) 균액을 꺼내어 균수를 측정함.
- 세균수를 측정하기 위하여 6×6 drop plate 방법을 사용함(Chen et al., 2003). 먼저, 96-well plate A #1에 250 μl 의 배양액을 넣고 #2에서 #8까지 180 μl 의 MH 액체 배지를 넣어주고 다채널피펫(multichannel pipet)으로 균액이 들어있는 well에서 20 μl 를 10배씩 계단 희석(10^{-1} 에서 10^{-7})함.
- 다채널피펫을 사용하여 희석된 6개의 well (10^{-2} 에서 10^{-7})로부터 10 μl 씩 새로운 MH 한천배지에 6번씩 나누어서 적하하고 건조시킨 다음, 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후 균수를 측정함.
- 다음날, 농도별로 물질이 포함된 실험군과 포함되지 않은 대조군을 대상으로 세균수를 측정하여 항균효능을 확인하였다.

② 항바이러스성 평가

㉞ 조류인플루엔자 바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : 질소탱크에 보관되어 있는 조류인플루엔자 바이러스 공시균주 H9N2를 10일령 계태아 발육란의 요막강 내에 0.1 ml씩 접종하고 연속 2~3회 계태 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용함. 바이러스액은 EID₅₀/ml 표준역가산정법에 준해 역가를 확인함. $10^{7.0}$ EID₅₀/ml 이상의 역가를 보이는 바이러스액을 사용함(Zhang et al., 2010).
- 물질의 희석 : 개발물질은 조건에 맞게 유기물 희석액, 증류수 또는 경수를 사용하

- 여 8 mg/ml의 농도로 희석함. 희석한 물질은 인플루엔자 배양배지와 PBS를 사용하여 각각 80 ug/ml로 다시 희석함. 희석한 물질은 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 ug/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 ug/ml까지 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 ug/ml까지 단계 희석함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 바이러스액 500 μ l와 동량의 PBS로 희석한 물질을 96-well titer tube에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응시키며 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함. 효능을 중화시키기 위해서 반응액과 동량의 중화 용액을 넣어 혼합함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 중화처리가 끝난 반응액은 PBS를 이용하여 10진 단계 희석(원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5})하여 희석배수 당 5개의 10일령 계대아 발육란의 요막강 내에 0.2 ml씩 접종하고 37°C 부화기에서 5일간 배양하면서 매일 검란을 실시함. 접종 후 24시간 이내에 죽은 발육란은 접종사로 간주하고 시험성적에서 제외함. 접종 24시간부터 5일 이내에 죽은 접종란은 모두 4°C에 보관하고 5일 후에 모든 접종란을 회수하여 요막강액을 채취한 후 즉시, 96-well microplate 상에서 혈구응집(HA) 여부를 확인하여 감염여부를 최종 판정함.
- 바이러스 함유량 계산 : Spearman-Kaerber method (Deboosere et al., 2011)에 준해 산정하여 대조군과 비교하여 물질처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과의 중위수(median)로 함.

㉞ 뉴캐슬병 바이러스에 대한 효능평가

- 바이러스 배양 : 질소탱크에 보관되어 있는 공시 표준주 SNU4152를 10일령 계대아 발육란의 요막강 내에 0.1 ml씩 접종하고 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용함. 바이러스액은 TCID₅₀/ml 표준역가산정법에 준해 역가를 확인함. 10^{7.0}TCID₅₀/ml 이상의 역가를 보이는 바이러스액을 사용함(Zhang et al., 2010).
- 물질의 희석 : 개발물질은 조건에 맞게 유기물 희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8 mg/ml의 농도로 희석함. 희석한 물질은 인플루엔자 배양배지와 PBS를 사용하여 각각 80 ug/ml로 다시 희석함. 희석한 물질은 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 ug/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 ug/ml까지 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 ug/ml까지 단계 희석함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 바이러스액 500 μ l와 준비한 동량의 PBS로 희석한 물질을 96-well titer tube에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응시키며 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 PBS와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함. 효능을 중화시키기 위해서 반응액과 동량의 중화용액을 넣어 혼합함.
- 바이러스 증식여부 판정 : 중화처리가 끝난 반응액은 DMEM 배지를 이용하여 10진 단계희석(원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5})하여 PBS로 2회 세척한 96 well tissue culture plate의 단층을 형성한 CEF 배양세포 4 well씩에 50 μ l를 각각 접

중간 다음 30~60분 동안 흡착시킴. 흡착이 끝난 후 다시 PBS로 2회 세척하고 0.2 ml의 유지배지를 첨가하여 37°C CO₂ 배양기에서 5일간 배양함. 배양하는 5일동안 현미경으로 CPE(세포변성효과) 형성여부를 관찰하여 바이러스의 증식유무를 최종 판정함.

- 바이러스 함유량 계산 : Spearman-Kaerber method (Deboosere et al., 2011)에 준해 산정하여 대조군과 비교하여 물질처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과와 중위수(median)로 함.

③ 면역원성 평가 : 각 축종별로 실험실적 면역증강 효과를 평가하기 위해 NO 생산능, 림프구 증식능, Cytokine 발현능과 같은 검사들을 수행하였고((Zu et al., 2012) 면역증강 효과가 *in vitro*에서 확인되면 목적동물에 적용하기 위한 농도, 급여시기 및 기간(용법, 용량)을 설정함.

㉠ NO 생산능

- Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) : 헤파린 튜브를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스 또는 조류인플루엔자 바이러스에 음성인 닭 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077 시약을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 µl의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue 염색약을 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수 측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^6 / 0.1$ ml가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 개발물질을 조건에 맞게 유기물 희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8 mg/ml의 농도로 희석함. 희석한 물질은 배양배지인 RPMI1640(10% FBS)을 사용하여 80 µg/ml로 다시 희석함. 희석한 물질은 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 µg/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 µg/ml까지 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 µg/ml까지 단계 희석함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 µl를 1 ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양함. 양성대조군은 LPS (10 µg/ml)를 배양배지에 첨가하고 음성대조군은 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 24시간 배양 후 원심분리하여 상층액을 수거함.
- NO 생성능 측정 : 수거한 상층액 100 µl에 동량의 Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선은 NaNO₃를 사용하여 값을 구함.

㉡ 림프구 증식능

- Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) : 헤파린 튜브를 이용하여 조류인플루엔자 바이러스 음성인 닭 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 µl의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수 측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 $1 \times 10^5 / 0.1$ ml가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 개발물질을 조건에 맞게 유기물 희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여

여 8 mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지인 RPMI1640(10% FBS)을 사용하여 80 ug/0.1 ml로 다시 희석함. 희석한 물질은 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 ug/0.1 ml까지 희석함. 이때 2.5 ug/0.1 ml까지 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 ug/0.1 ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함.

- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 ul를 준비한 희석물질과 동량으로 96-well plate에서 혼합한 다음 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양함. 양성대조군은 Con A (10 ug/ml)를 배양배지에 첨가하고 음성대조군은 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. WST-8 검사는 24시간 세포 배양 후 WST-8 용액 20 ul를 각 well에 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양함. 배양 후 부드럽게 섞어 450 nm에서 흡광도를 측정함.

㉔ Cytokine 발현능

- Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) : 헤파린 튜브를 이용하여 ND, AI에 음성인 닭 5마리에서 전혈을 채취한 후 Histopaque 1077을 이용하여 PBMC를 분리함. 분리된 PBMC는 PBS로 4회 세척한 후 500 ul의 PBS에 각각 준비함. Trypan blue를 이용하여 PBMC를 염색하고 세포수 측정기를 사용하여 살아있는 PBMC의 수가 1×10^6 /0.1 ml가 되도록 PBS로 희석하여 각각 준비함.
- 물질의 희석 : 유기물 희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8 mg/ml의 농도로 준비함. 희석한 물질은 배양배지인 RPMI1640(10% FBS)를 사용하여 80 ug/ml로 다시 희석함. 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 ug/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 ug/ml까지 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 ug/ml까지 희석함.
- 물질의 반응 : 위에서 준비한 PBMC 100 μ l를 1 ml의 배양배지에 준비된 희석물질을 24-well plate에서 혼합한 다음 37°C에서 72시간 배양함. 양성대조군의 경우는 Con A (10 μ g/ml)를 배양배지에 첨가하고 음성대조군은 배양배지만을 사용하여 동일한 방법으로 배양함. 배양 후 원심분리하여 세포와 상층액을 분리하여 수거함.
- Cytokine 생산능 측정 : 원심분리한 세포에서 total RNA를 분리하고 random hexamer를 이용하여 cDNA를 합성함. 합성한 cDNA는 chicken INF- α , INF- β , TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, 및 IL-6 특이 프라이머와 함께 SYBr real-time PCR로 증폭하여 각 cytokine의 mRNA 발현을 정량함. β -actin의 mRNA 발현량을 동시에 측정하여 cytokine의 발현값을 조정함.

(다) 바이오신소재 개발물질 항병성 평가 결과

- 본 연구과제에서 개발된 물질 6종과 외부에서 개발된 물질 7종을 추가하여 총 12종을 대상으로 항균/항바이러스/면역원성을 물질의 특성과 기능에 따라 적절한 평가방법들을 선택하여 실험실적 효능을 확인하였음(표 5-21).

표 5-21. 5차년도 양계분야 실험실 평가용 개발물질

병원체	신소재 개발물질						
	본 연구과제 개발물질(6종)			외부개발물질(7종)			
	항미생물 펩타이드 (AMP)	식물 추출물	재조합 효모	면역 증강제	식물 추출물	광물질 제제	식물추출물 + Probiotics
조류 인플루엔자 바이러스	-	상황버섯 추출물 (PBE)	-	-	청국장 3종		-
괴사성장염	PG1 PMAP36 PR26 BFV II	-	리소좀	프로안토시아닌 베타글루칸	물푸레나무/ 동근이질풀	규산염/ 식물추출물 7종	Stevia EM
가금티푸스		-		-	-		
병원성대장균증		-		-	-		-

① 항균 효능평가

- 연구기간 동안 본 과제에서 개발된 물질들과 외부 개발물질들에 대한 항균효능을 평가하였음(표 5-22).

표 5-22. 개발물질 항균 효능평가 결과

개발물질	Spot-on lawn assay (세균 억제능, 256 ug/ml 기준)					
	괴사성장염	살모넬라증			병원성대장균증	
	<i>C. perfringens</i>	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	
물푸레나무추출물	+++	NT	NT	NT	NT	
동근이질풀추출물	+++	NT	NT	NT	NT	
규산염 광물질 외 7종	규산염	++	NT	NT	NT	NT
	갈근추출물	+++	NT	NT	NT	NT
	감초추출물	+++	NT	NT	NT	NT
	쑥추출물	+++	NT	NT	NT	NT
	어성초	+++	NT	NT	NT	NT
	오가피	+++	NT	NT	NT	NT
	오매자	+++	NT	NT	NT	NT
	편백	+++	NT	NT	NT	NT
스테비아 EM	-	-	-	-	-	
리소좀	-	+	+	+	+	
AMPs	PG1	+++	++	++	+	-
	PMP36	-	-	+++	++	+++
	PR26	-	+++	+++	+++	++
	BFV II	-	-	+++	+++	+++
IgY-3호	++	++	++	++	++	

- 천연추출물중에서 식물추출물 30종을 대상으로 닭괴사성장염 원인체인 *C.*

- perfringens*에 대한 항균효능을 spot-on lawn assay를 통해 확인한 결과, 물푸레나무(수피)추출물과 등근이질풀추출물에서 우수한 항균효과가 관찰되었음.
- 또한 세균에 대한 최소억제농도의 물질을 정상세포에 첨가 후 24시간 동안 관찰했을 때에도 세포 증식이나 세포형태에 큰 변화가 관찰되지 않았음. 규산염과 식물추출물 7종이 포함된 규산염광물질제제는 괴사성장염균에 우수한 항균효능이 있음을 확인하였음.
 - 스테비아 EM에서 스테비아는 *Stevia rebaudiana*라는 식물추출물로서 하나의 당쇄물질(Steviol glycoside)로 알려져 있음. 유럽에서는 2008년부터 식품첨가제로도 사용하고 있고 미 식품의약품안전청(FDA)에서도 식물과 추출물 모두 허가하고 있는 물질로서 안전성에 있어서도 문제가 없음. 스테비아 EM은 Stevia 식물추출물에서 발생한 부산물과 유용미생물들을 혼합하여 제조한 제품임. 양계질병유발모델에서 이 제품을 사용한 시험균은 접종균의 폐사율보다 20~40% 수준으로 방어효과가 우수한 것으로 확인됨에 따라 항균효능 검사를 수행하였는데 모든 병원체들에서 항균효과는 거의 없었음. 결과적으로 이들 물질들은 항균 또는 길항작용보다는 숙주의 면역원성에 관여할 것으로 판단되는바 이들에 대한 면역원성 연구가 필요함.
 - 본 과제에서 개발된 리소좀을 양계질병병원체들을 대상으로 항균효능을 확인하였는데 결과적으로 균수가 낮은($<1 \times 10^4$ cfu/ml) 수준에서는 균 억제능이 확인되었지만 이후 시간이 지남에 따라 항균효과가 급격하게 떨어져 항균효과에 대한 지속성은 낮다는 것을 확인하였음. 다음으로 4종의 항미생물펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 대상 병원체에 대부분 항균효과는 입증되었지만 양계에서의 안정성에서 있어서는 아직 확인되지 않았기 때문에 추가적인 연구가 필요함. 본 과제의 5년차에 개발된 양계용 면역제제(가칭 IgY-3호)는 총 9종의 항원을 면역시킨 난황항체제제로서 동결 건조된 난황분말을 PBS에 녹인 다음 이들에 대한 항균효능을 평가하였을 때 대상세균들에서 억제존이 관찰되었음. 결과적으로 IgY-3호 제품은 양계분야에서 고병원성 병원체들(조류인플루엔자; 저병원성)로 면역화된 항체제제로서 이들 제품에 대한 질병방어효과 및 생산성에 있어서 높은 기대효과를 가져올 수 있을 것으로 판단됨.

② 항바이러스 효능평가

- H1N1과 H9N2 아형의 인플루엔자 바이러스를 대상으로 neuraminidase 억제효과를 통해 항바이러스능을 측정하였음(표 5-23). 대조군에 반해 PBE 물질은 사람인플루엔자 바이러스인 H1N1에 억제효과가 아주 높은 것(34.55 ± 3.31)으로 확인되었고 조류인플루엔자 바이러스인 H9N2에서는 H1N1보다는 효능이 약 10배 정도 낮았지만(424.69 ± 14.74) 청국장 추출물들의 항바이러스 효능에 비하면 우수한 효능을 가진 것으로 판단할 수 있었음.
- 청국장 추출물 3종은 모두 항바이러스 효능은 가지고 있지만 대조군이나 PBE 물질보다는 그 효능이 많이 떨어지는 것으로 관찰되었고 A8의 효능이 가장 좋은 것으로 나타났음.

표 5-23. 개발물질의 항바이러스 효능평가 결과

개발물질		항바이러스능 IC ₅₀ (ug/ml) ¹			
		H1N1		H9N2	
		Neuraminidase inhibitory effect	효과	Neuraminidase inhibitory effect	효과
대조군[Zanamivir(Relenza®)]		0.44 ± 0.23	++++	0.73 ± 0.18	++++
장수진흙버섯추출물(PBE)		34.55 ± 3.31	++++	424.69 ± 14.74	+++
청국장 추출물	EtOAc extract	8482.5 ±124.3	+	-	-
	A3	17611.1 ±3052.7	+	-	-
	A8	3058.8 ±218.9	++	-	-

¹IC₅₀, 50% inhibitory concentration. +++++, 높다; +++, 좋다; ++, 보통이다; +, 낮다.

③ 면역원성 효능평가

- SPF 산란계로부터 PBMC를 분리하여 48시간 배양 후, MTS assay를 수행하여 cell proliferation을 측정하였음. 양성대조군으로 LPS를 사용하였고 대상물질로는 외부개발물질인 프로안토시아닌(PAE)과 베타글루칸(BG)을 시험에 적용하였음.
- 먼저, 배양세포에 물질과 LPS를 동시에 투여한 그룹들 중에서 0.05% 처리한 BG와 LPS 처리군이 120.05%로 LPS군에 비해 세포 증식성이 증가하였고 다음으로 PAE와 LPS 처리군이 117.02%를 차지하였음. 또한 PBMC에 BG를 단독으로 처리한 결과에서도 대조군보다 세포 증식성이 높게 관찰되었음. 따라서 BG와 PAE는 LPS와 같은 mitogenic activity에 의해 PBMC의 proliferation이 증가되는 것으로 판단됨 (표 5-24).
- PBMC에 Con A와 PAE 그리고 BG를 각각 동시에 처리한 결과에서도 PBMC proliferation이 Con A만을 단독 처리한 그룹에 비해 증가함을 알 수 있었고, BG 0.05%농도에서 121.13%, PAE는 117.16%로 각각 PBMC proliferation이 증가하는 것을 알 수 있었음. 이 결과 역시 BG와 PAE가 Con A와 같은 mitogenic activity에 의해 PBMC proliferation이 증가되는 것으로 판단됨(표 5-25).
- PBMC에 LPS와 BG를 동시에 처리하여 실험을 수행한 결과, NO 생산이 LPS만을 단독 처리한 그룹과 비슷한 정도로 BG와 PAE는 NO 생산의 증가에는 영향을 주지 않는 것으로 판단됨. 결과적으로 BG와 PAE는 *in vitro*에서 닭의 PBMC proliferation을 증가시키고, 이는 LPS와 Con A 등과 유사한 면역증진 효능을 보이는 것으로 사료됨. 따라서 평가한 2종의 물질은 PBMC에 존재하는 T 세포와 B 세포 모두의 proliferation을 증가시키는 것으로 예상할 수 있었으며, 반면, BG는 *in vitro*에서 닭 PBMC에서의 NO 생산에는 아무런 영향을 주지 않기 때문에 닭의 면역세포인 대식세포 등에 아무런 영향을 주지 않을 것으로 판단할 수 있음.

표 5-24. LPS 처리구 및 비처리구에 대한 프로안토시아닌과 베타글루칸의 PBMC 증식 결과

그룹	PBMC proliferation(%)	표준오차	t-test
비처리구	100.00	0.885881	-
LPS 처리구	111.85	1.451733	$P < 0.05$
PAE (100 ug/ml)+LPS	117.02	1.517803	$P < 0.05$
PAE (100 µg/ml)	108.99	1.328822	$P < 0.05$
BG 0.05%+LPS	120.05	3.420843	$P < 0.05$
BG 0.05%	114.64	0.442941	$P < 0.05$

표 5-25. Con A 처리구 및 비처리구에 대한 프로안토시아닌과 베타글루칸의 PBMC 측정 결과

그룹	PBMC proliferation(%)	표준오차	t-test
Negative control	100.00	0.885881	-
Con A	124.18	0.442751	$P < 0.05$
PAE (100 ug/ml)+Con A	125.66	2.767706	$P < 0.05$
PAE (100 µg/ml)	117.16	1.929908	$P < 0.05$
BG 0.05%+ConA	134.46	0.817623	$P < 0.05$
BG 0.05%	121.13	0.817623	$P < 0.05$

(라) 효능평가를 위한 양계질병 유발모델 확립

- 양계분야 효능평가팀에서는 연구제안서에서 제시한 바와 같이 연구기간동안 목적동물인 마우스와 SPF 닭, 실용계(육계)를 대상으로 현장(농장) 중심의 치사율에 근거하여 총 5종의 양계질병유발모델을 모두 구축하였음(표 5-26).

표 5-26. 양계분야 목적동물 질병모델 구축 현황

대상 질병	목적동물	접종시기	야외 병원체	치사율 (LD)
조류인플루엔자	마우스	6주령	Avian Influenza Virus	60~80%
뉴캐슬병	육계, SPF	14일령	Newcastle Disease Virus	70~100%
괴사성장염	육계	1, 2주령	<i>Clostridium perfringens</i>	30~80%
가금티푸스	육계	1, 2, 3주령	<i>Salmonella Gallinarum</i>	50~60%
병원성대장균증	육계	2, 3주령	<i>Escherichia coli</i>	60~100%

① 조류인플루엔자 질병유발모델

㉠ 조류인플루엔자 바이러스 접종

- 질소탱크에 보관되어 있는 조류인플루엔자 바이러스 공시균주 H9N2과 사람인플루엔자 바이러스 H1N1을 10일령 계태아 발육란의 요막강 내에 0.1 ml씩 접종하고 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용하였음(Zhang et al., 2010). 바이러스액은 EID₅₀/ml 표준역가산정법에 준해 역가를 확인하였음(Deboosere et al, 2011). 접종군과 비접종군의 실험수수는 각각 10마리씩 사용하였음. 조류인플루엔자 바이러스액 10^{7.0}EID₅₀/ml 100 µl를 피펫을 사용하여 6주령

BALB/c 마우스의 비강(intranasal)에 접종하였음(그림 5-40). 접종 후 10일까지 임상증상과 치사율 및 부검을 통한 실질장기 병변과 조직 등을 관찰하였음. 바이러스 질병유발모델 실험은 2회 반복하여 수행하였음.

㉔ 실험결과

- 바이러스 접종 후 2일부터 접종군 개체들은 비접종군과 다르게 운동성이 둔해지고 식욕도 감소되어 시간이 지남에 따라 대조군의 체중보다 20~30% 감소되었음. 접종 후 10일까지 치사율은 60~80% 수준이었음. 또한, 접종 후 7일에 비접종군과 접종군에서 5마리씩 부검하여 병변을 관찰한 결과, 접종군의 뇌는 비접종군보다 종대 되어 있었고 뇌의 일부분 또는 전체적으로 출혈이 관찰되었음(그림 5-41a). 폐 역시 접종군에서 대부분 종대 되어 있었고 출혈이 심하게 관찰되었음(그림 5-3b). 폐 조직을 확인한 결과, 접종군의 폐에서 원형세포가 침윤되어 있었고 염증이 다발적으로 관찰되었음(그림 5-41d).

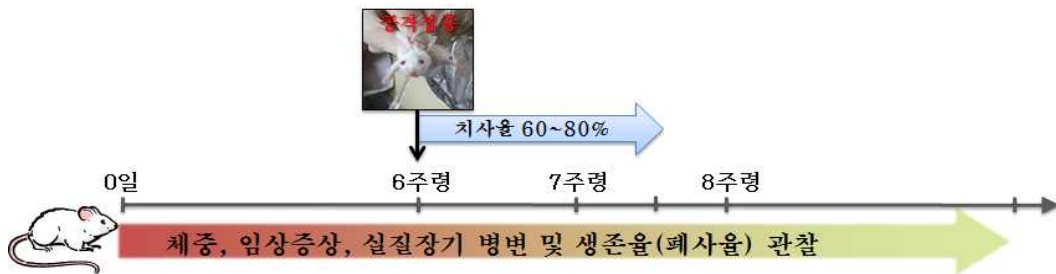


그림 5-40. 조류인플루엔자 바이러스 질병유발모델을 위한 공격접종

<p>접종군 뇌 병변</p>		
	<p>종대, 출혈 관찰</p>	
<p>접종군 폐 병변</p>		
	<p>종대, 심한 출혈 관찰</p>	
<p>폐 조직</p>		
	<p>비접종군 정상 폐 조직</p>	<p>접종군 폐 조직 (기관지 주위에 원형세포 침윤)</p>

그림 5-41. 조류인플루엔자 바이러스 접종 후 실질장기 병변 및 조직사진

② 뉴캐슬병 질병모델

㉠ 뉴캐슬 바이러스 KR-005 야외주 공격접종

- 뉴캐슬(ND) 바이러스 야외주는 농림축산검역본부에서 geonotype 7로 동정된 KR-005를 분양받았음. 질소탱크에 보관된 ND 바이러스 야외주를 10일령 계태아 발육란의 요막강 내에 0.1 ml씩 접종하고 연속 2~3회 계대 배양하여 활력이 있는 바이러스를 사용하였음(Zhang et al., 2010). 바이러스액은 EID₅₀/ml 표준역가산정법에 준해 역가를 확인하였음(Deboosere et al., 2011). 비접종군, 접종군, 백신접종군의 실험수수는 각각 20마리씩 사용하였으며, 시험대상은 1일령 SPF 병아리와 1일령 육계병아리로 진행하였고 1일령에 각각 혈청을 분리하여 HI 항체역가를 측정하였음. 역가측정은 농림축산검역본부 조류질병과에서 제공한 뉴캐슬병 진단액(대성미생물연구소)을 사용하였음. 백신접종군은 수수당 1수분씩 각각 분무와 점안으로 접종하였음. 백신접종군은 1일령에 상업용 ND 백신을 접종하고 14일령에 모든 개체들을 대상으로 ND 바이러스액 10^{5.0}ELD₅₀/ml 0.1 ml를 대퇴부 근육에 접종하였음. 접종 후 14일까지 임상증상(무기력, 설사, 결막염, 호흡곤란, 마비)과 폐사율을 관찰하였음.

㉡ 시험결과

- SPF 병아리와 육계병아리를 대상으로 ND 바이러스를 접종한 결과는 표 5-27과 같음. 먼저, SPF 1일령 병아리에서 ND 항체역가는 모두 확인되지 않았음. 백신접종군의 2주 후 항체역가는 분무와 점안으로 각각 3.80 ± 1.00과 3.73 ± 1.17으로 분석되었다. 비접종군은 임상증상과 폐사가 없었음. 접종군은 ND 바이러스 접종 후 4~5dpi에서 모두 폐사하였음. 폐사 직전까지 개체들은 개구호흡, 신경증상, 사경, 주저앉음, 식욕감퇴 등의 임상증상이 관찰되었음(그림 5-42). 백신접종군은 공격접종 후 점안접종군, 분무접종군에서 각각 1마리씩 10dpi에서 사경이 왔지만 차차 회복하여 실험이 마무리 되는 14dpi까지 생존하였음.

표 5-27. SPF 병아리에서 뉴캐슬 바이러스 접종에 의한 평가결과

그룹 (n=20)		항체역가 ¹⁾ (mean ± SD)		평가항목		
		1일령	백신 2주후	임상증상(%) ²⁾	폐사율(%) ³⁾	방어율(%) ⁴⁾
Group 1	비접종군	0.0	0.0	0/20 (0)	0/20 (0)	-
Group 2	접종군	0.0	0.0	20/20 (100)	20/20 (100)	0/20 (0.0)
Group 3	ND 백신	분무	3.80 ± 1.00	0/30 (0)	0/30 (0)	30/30 (100)
		점안	3.73 ± 1.17	0/30 (0)	0/30 (0)	30/30 (100)

¹⁾HI titers log₂. ²⁾임상증상발현수수/시험수수. ³⁾폐사수수/시험수수. ⁴⁾ 시험기간 종료 시까지 임상증상 또는 폐사가 없는 수수/시험수수

- 1일령 육계병아리에서 ND 항체역가는 최저 6.07 ± 1.17에서 최고 7.55 ± 0.69까지 분석되었다(표 5-28). 2주후 항체역가는 비접종군에서 2.50 ± 1.15로 1일령 항체역가보다 약 2배 정도 감소하였음. 폐사율은 SPF 병아리보다 2~3일 늦은 7~8dpi에 모두 폐사하였음. 이러한 원인은 모계에서 모체이행항체에 의한 방어능력으로

인해 SPF 병아리보다 늦게 폐사한 것으로 판단됨. 폐사한 병아리들의 임상증상은 SPF 병아리에서 나타난 증상들과 동일하였음. 백신접종군에서 분무접종군에서 3마리가 사경, 마비 등의 신경증상을 보였으나 폐사는 없었음. 점안접종군에서도 3마리가 사경, 마비 등의 신경증상을 보였고 이중 1마리는 폐사하였음.

표 5-28. 육계병아리에서 뉴캐슬 바이러스 접종에 의한 평가결과

그룹 (n=20)		항체역가 ¹⁾ (mean ± SD)		평가항목			
		1일령	백신 2주후	임상증상(%) ²⁾	폐사율(%) ³⁾	방어율(%) ⁴⁾	
Group 1	비접종군	7.45 ± 1.70	2.50 ± 1.15	0/20 (0)	0/20 (0.0)	-	
Group 2	접종군	7.55 ± 0.69	2.60 ± 0.82	20/20 (100)	15/20 (75)	0/20 (0)	
Group 3	ND 백신	분무	6.93 ± 1.14	3.77 ± 0.89	3/30 (10.0)	0/30 (0.0)	27/30 (90.0)
		점안	6.07 ± 1.17	3.63 ± 1.00	3/30 (10.0)	1/30 (3.3)	27/30 (90.0)

¹⁾HI titers log₂. ²⁾임상증상발현수수/시험수수. ³⁾폐사수수/시험수수. ⁴⁾ 시험기간 종료 시까지 임상증상 또는 폐사가 없는 수수/시험수수



그림 5-42. 뉴캐슬병 바이러스 임상증상

③ 괴사성장염 유발모델

㉞ 괴사성장염 *Clostridium perfringens* 야외주 공격접종

- 육계농가에서 폐사계들을 수거하여 장염으로 의심되는 병변으로부터 원인균인 *C. perfringens* (CP)균들을 분리하였음. 분리과정은 먼저 장 병변이 있는 점막조직부위를 면봉을 이용하여 무균적으로 채취하여 난황(egg yolk)이 들어있는 선택배지

에 도달하고 37°C에서 혐기적으로 배양하였음. 다음날 배양된 집락 중에서 lecithinase 효소에 의해 clear zone이 형성된 집락을 백금이로 채집하여 다시 혈액 한천배지에 재접종하고 다음날 베타 용혈상(β -hemolysis) 집락을 확인하였음. CP 동정 PCR을 위해 집락 2~3개를 100 μ l 멸균수가 있는 E-tube에 부유시키고 10 0°C에서 15분간 꽃아두었음. E-tube를 얼음에 5분 동안 넣고 꺼낸 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액만을 새로운 tube에 넣고 PCR 주형 DNA로 사용하였음. PCR을 통해 CP 양성균주를 확인하고 괴사성장염 원인독소인 *netB* 유전자 양성균주임을 확인하였음(그림 5-43)(Keyburn et al., 2010). 배양된 CP 집락을 fluid thioglycollate medium (FTM) 액체배지에 접종하고 혐기조건하에서 3 7°C, 15시간 배양하였음. 다음날부터 1주령과 2주령의 병아리에 각각 2cc의 배양액을 1일 2회, 연속 3일 동안 존대를 이용하여 경구(oral gavage)로 접종하였음(표 5-29) (Shojadoose et al., 2012). 접종 후, 10일까지 임상증상 및 폐사율을 확인하고 부검을 통해 집중균의 재분리와 육안 및 조직학적 병변을 관찰하였음.

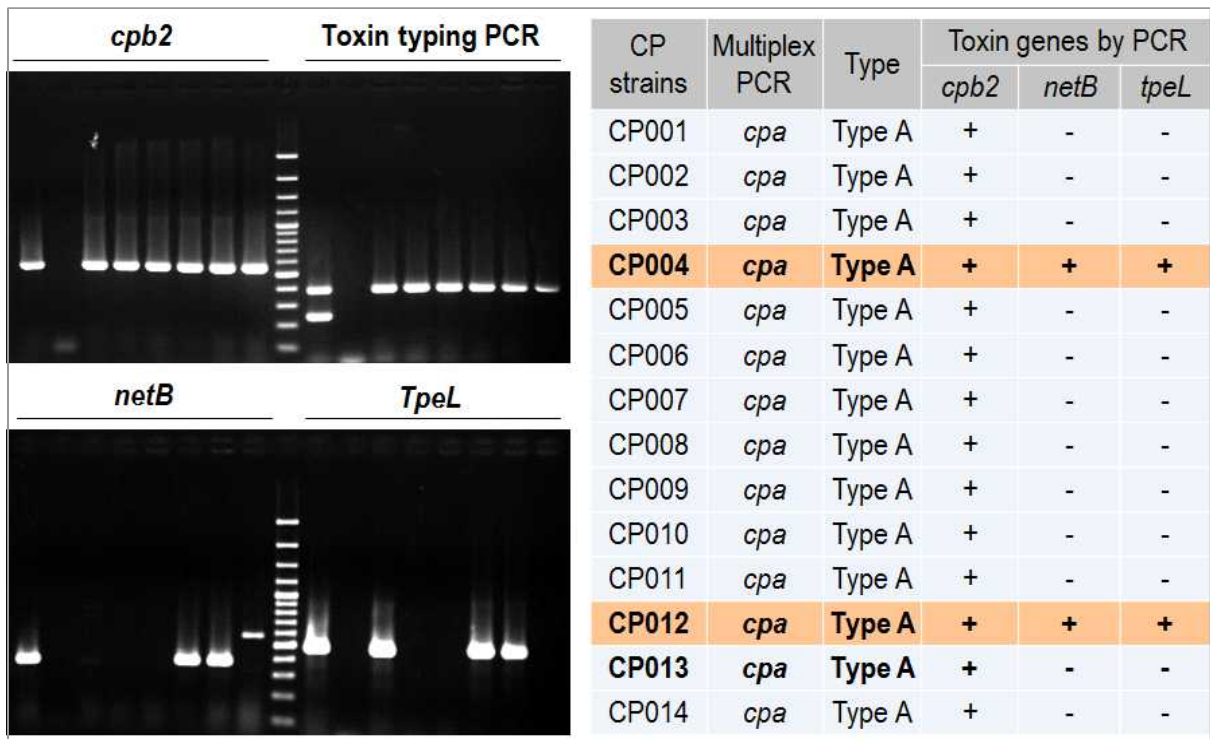


그림 5-43. 육계 괴사성장염 병변에서 분리된 *C. perfringens*의 독소유전자 PCR 결과

표 5-29. 육계 피사성장염 유발모델 구축을 위한 접종일과 접종균수

그룹 (균주명)	시험 수수	접종일 (2cc 경구투여/회)					
		그룹1 : 08일령 그룹2 : 14일령		그룹1 : 09일령 그룹2 : 15일령		그룹1 : 10일령 그룹2 : 16일령	
		1회	2회	1회	2회	1회	2회
Group 1 (비접종균)	12	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM	FTM
Group 2 (CP-012)	12	1.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.4×10 ⁶	1.2×10 ⁶	2.1×10 ⁶	2.3×10 ⁶
Group 3 (CP-012/CP-013)	12	1.2×10 ⁶ /2.2×10 ⁶	1.0×10 ⁶ /1.1×10 ⁶	1.4×10 ⁶ /1.3×10 ⁶	1.2×10 ⁶ /1.2×10 ⁶	2.1×10 ⁶ /2.1×10 ⁶	2.3×10 ⁶ /1.4×10 ⁶

㉞ 시험결과

- CP 균 접종 후, 비접종균(Group 1)에서 폐사율은 관찰되지 않았음. 1주령에 연속 3일 동안 단일균주로 접종한 Group 2에서 폐사율은 5~8 dpi에 50% (6/12)로 확인되었고, 혼합 접종한 Group 3은 Group 2보다 더 빠른 2~4 dpi에서 75%(9/12)의 폐사율이 확인되었음(표 5-30). 2주령에 연속 3일 동안 단일균주로 접종한 Group 2에서 폐사율은 8~9 dpi에 33.3% (4/12)로 확인되었고, 혼합 접종한 Group 3은 6~8 dpi에서 50%(6/12)의 폐사율이 확인되었음(표 5-31). Group 2와 Group 3 개체들은 접종 4일 후부터 사료와 물을 먹지 않고, 고개를 숙이고 행동이 둔하면서 쌀뜨물 설사 증상이 관찰되었음. 또한 Group 2와 Group 3의 간과 소장에서 *C. perfringens* 의심 집락들이 분리되었고 이들 균주들은 모두 접종균이 보유한 *netB* 유전자를 가지고 있어서 접종균주임을 확인할 수 있었음.

표 5-30. 육계 병아리 1주령에서 *Clostridium perfringens* 접종에 따른 폐사율

그룹 (n=12)	Mortality (DPI)										No. (%) of dead bird	No. (%) of re-isolation	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Group 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)
Group 2	0	0	0	0	2	0	3	1	0	0	6/12 (50.0)	12/12 (100)	
Group 3	0	5	3	1	0	0	0	0	0	0	9/12 (75.0)	12/12 (100)	

표 5-31. 육계 병아리 2주령에서 *Clostridium perfringens* 접종에 따른 폐사율

그룹 (n=12)	Mortality (DPI)										No. (%) of dead bird	No. (%) of re-isolation
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)
Group 2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	4/12 (33.3)	12/12 (100)
Group 3	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	6/12 (50.0)	12/12 (100)

- 육계 피사성장염 유발모델에서 소장 병리소견과 조직학적 병변을 확인하였음. 비

접종군 일부 개체들은 소장에서 약간의 충출혈이 관찰되었으나 거의 모든 개체군에서 균 분리 및 임상증상은 관찰되지 않았음. 접종군들의 소장막은 얇은 상태로 팽창되어 있었고 부분적으로 암적색의 괴사와 장막을 통해서 관찰되는 점막괴사나 궤양이 관찰되었음. 점막에는 충출혈 소견이 관찰되고 노란색의 다발성 괴사소(궤양으로 발전)와 괴사반점들이 나타나는 아급성 장염수준으로 확인할 수 있었음(그림 5-44a). 또한 점막에 있는 용모가 거의 탈락되어 있고 조직의 출혈과 광범위 괴사가 확인되는 급성 장염수준의 모델들이 관찰되었음(그림 5-44b).

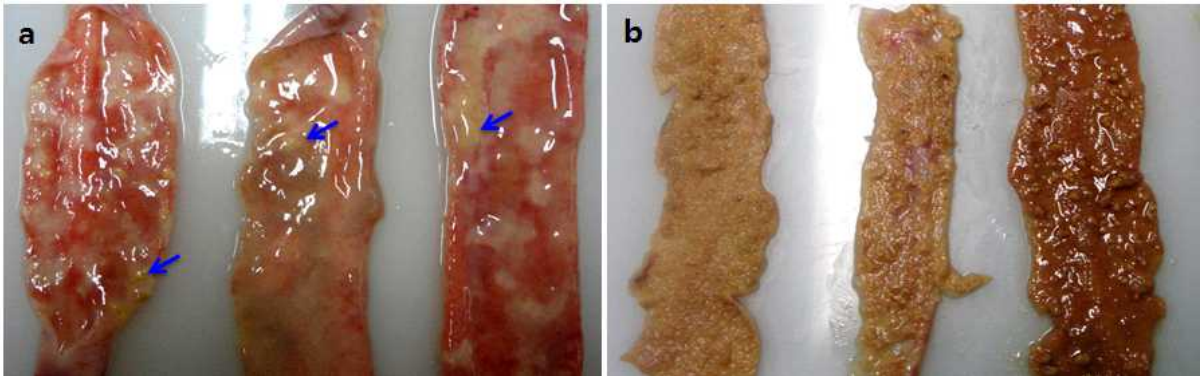


그림 5-44. 육계 괴사성장염 모델에서 소장 병변

- 조직학적 병변 소견에서도 그림 5-45a처럼 정상적인 소장 조직은 근육조직과 점막조직의 용모 등이 완전하게 결합되어 있지만, 그림 5-45b와 5-45c처럼 괴사성장염모델의 소장은 장 점막의 용모가 소실(탈락)되고 근육과 점막에서 출혈이 관찰되었음. 급성 장염의 경우, 근육조직까지 손상되거나 출혈이 심하게 나타났음. 이러한 연구결과들을 바탕으로 양계팀은 괴사성장염 모델에서 신소재 개발물질의 효능을 평가하기 위해 아급성과 급성의 장염 유발모델을 구축하였고, 평가지표로서 소장 육안병변 지수와 조직학적 병변지수를 확립하였음(그림 5-46, 그림 5-47).

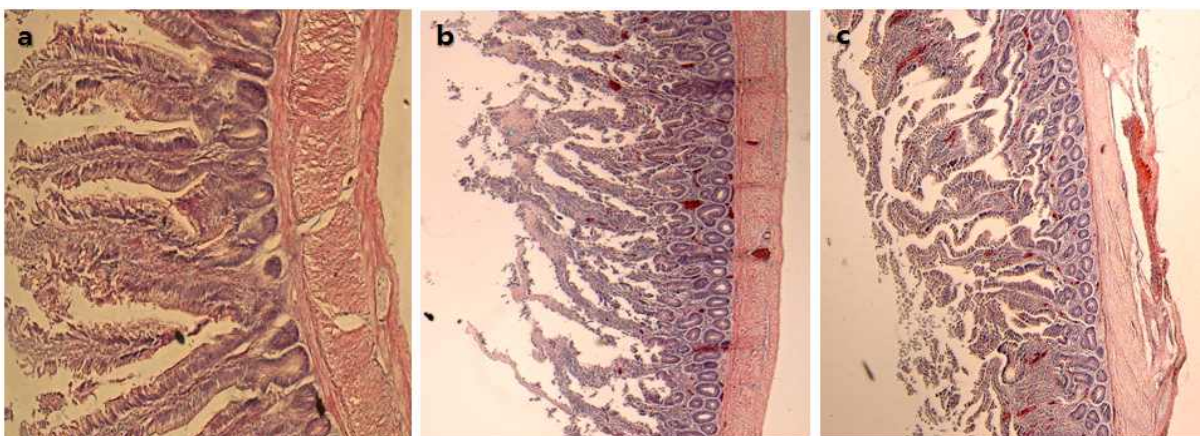


그림 5-45. 육계 괴사성장염 모델에서 소장의 조직학적 병변






Lesion Score					
	0	1	2	3	4
병변	- 정상	- 부분적 충출혈	- 점막의 비후, - 광범위 충출혈 - 염증	- 얇아진 소장벽 - 광범위 출혈 - 심화된 염증 - 부분적 괴사	- 얇아진 소장벽 - 위막 형성과 탈락 - 광범위 괴사 - 폐사

그림 5-46. 괴사성장염 유발모델에서 소장 육안병변 지수

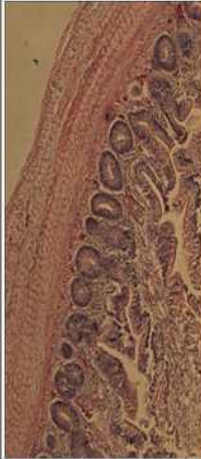
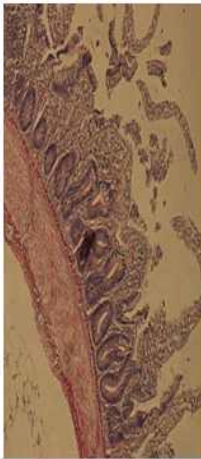
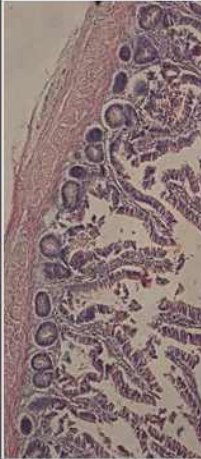
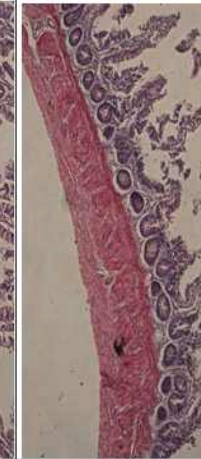
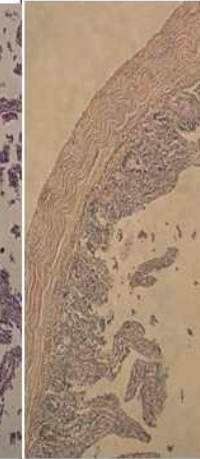
Lesion Score					
	0	1	2	3	4
병변	✓ 정상	✓ 소장 융모가 짧아짐	✓ 소장 융모의 부분적 탈락 또는 붕괴	✓ 소장 점막근육 조직 출혈 ✓ 융모의 광범위 탈락	✓ 소장 점막의 광범위 탈락과 염증

그림 5-47. 괴사성장염 유발모델에서 소장 조직학적 병변 지수

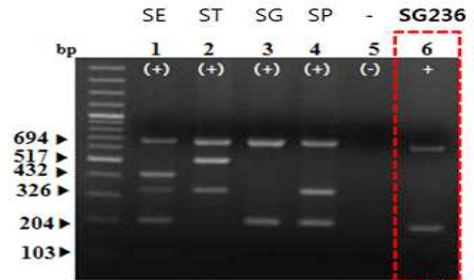
④ 가금티푸스 유발모델

㉞ 가금티푸스 *Salmonella Gallinarum* 야외주 공격접종

- 육계농장에서 가금티푸스가 발생한 폐사체의 간에서 *Salmonella enterica serovar Gallinarum* SG-236 균주를 순수 분리하였고 평판응집반응시험에 의한 살모넬라 혈청형 동정과 특이유전자 감별 PCR 결과로 최종 *Salmonella Gallinarum*으로 동정하였음(그림 5-48). 동결 보관된 SG균을 꺼내어 혈액한천배지에 배양하고 단일

집락을 MacConkey agar 배지에 재접종하였음. 다음날 단일집락 2~3개를 LB 액체배지에 접종하고 37°C 진탕배양기에서 20시간 배양하였음. 다음날 배양액(10^9 cfu/ml)과 PBS로 각각 희석한 균액(10^8 , 10^7 , 10^6 cfu/ml) 0.5cc를 2주령 육계의 대퇴부위의 근육(intramuscular, IM)에 각각 접종하였음. 그룹별로 육계수수는 5마리씩 접종하였고 접종 후 임상증상, 실질장기 육안병변, 폐사율(치사율), 혈액 내 세균 수 측정(cfu/ml) 등을 비접종군과 비교 평가하였음.

- 농장 : 전북 K농장(2013년 11월)
- 품종 : 삼계, 8일령
- 분리 : 간(종대 및 괴사 병변 관찰)
- 동정 : *Salmonella enterica serovar Gallinarum*
- 진단 : 가금티푸스(FT) 확진
- 번호 : A13-MRA-SG236



[SG 동정, Multiplex PCR 결과]

그림 5-48. *Salmonella Gallinarum* 분리주 이력 및 동정 결과

㉞ 실험결과

- 1주령 육계병아리에서 가금티푸스 접종군에 의한 폐사율을 확인하였음. 배양원액에서 10,000배 희석농도(1.8×10^5 cfu/ml)로 접종한 Group 2와 10배 희석농도(1.8×10^8 cfu/ml)로 접종한 Group 3은 각각 16.7% (1/6), 50% (3/6)의 폐사율이 관찰되었음(표 5-32). 2주령 병아리에서 가금티푸스 접종군에 의한 폐사율을 확인하였음. 1.4×10^8 cfu/ml 농도로 접종한 Group 4에서 20% (1/5), 1.6×10^9 cfu/ml 농도로 접종한 Group 5에서 60% (3/5) 폐사율이 관찰되었음(표 5-33).
- 부검을 통한 실질장기의 병변을 확인한 결과, 비접종군의 간은 선홍색인 반면에 접종군의 간은 대부분 종대 되어 있었고 선홍색보다 옅은 색깔로 흰색의 괴사반점들이 관찰되었음(그림 5-49). 비장 또한 비접종군보다 접종군에서 대부분 종대 되어 있고 마블링 병변이 확인되었음(그림 5-50). 2주령 질병모델 결과, Group 5의 개체들 중에서 폐사한 3마리 개체들의 실질장기에서 접종균이 분리되었고 2마리의 생존개체들 중 1마리는 혈액과 실질장기에서 $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml 균이 분포하여 전체 폐사율은 60%이지만 감염률은 80% 이상인 것으로 확인되었음. 결과적으로 SG균을 1주령 병아리에 10^8 cfu/ml 농도로 접종하였을 때 50%의 폐사율을 확인하였고, 2주령 병아리에 10^9 cfu/ml 농도로 접종하였을 때 병아리의 치사율은 60% 수준으로 가금티푸스 질병모델이 확립된 바 이 결과를 효능평가지험에 반영하였음.

표 5-32. 육계 병아리 1주령에서 *Salmonella Gallinarum* 접종균수에 따른 폐사율

그룹 (n=6)	접종균수 (cfu/ml)	Mortality (day post inoculation, DPI)										No. (%) of dead bird	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group 1	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6 (0.0)
Group 2	1.8×10^5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1/6 (16.7)
Group 3	1.8×10^8	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3/6 (50.0)

표 5-33. 육계 병아리 2주령에서 *Salmonella Gallinarum* 접종균수에 따른 폐사율

그룹 (n=5)	접종균수 (cfu/ml)	Mortality (DPI)										No (%). of dead bird	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group 1	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
Group 2	1.5×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
Group 3	1.6×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
Group 4	1.4×10^8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/5 (20.0)	
Group 5	1.6×10^9	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3/5 (60.0)	

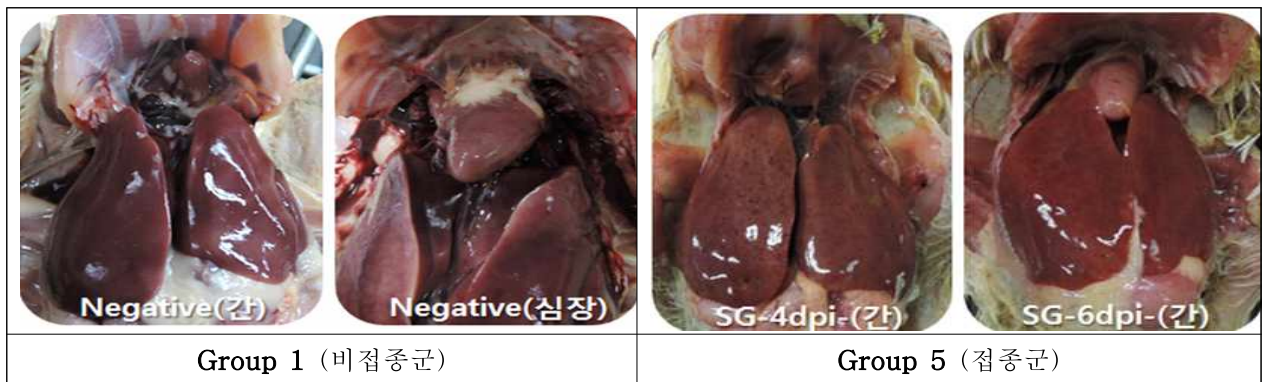


그림 5-49. 비접종균과 접종균의 실질장기(간, 심장) 병변 비교



그림 5-50. 비접종균과 접종균의 비장 병변 비교

⑤ 병원성대장균증 유발모델

㉔ 병원성 대장균증 야외주 접종

- 육계농장에서 병원성대장균증이 발생한 폐사체의 간에서 *Escherichia coli* EC-076 균주를 순수 분리하였고 생화학적 동정방법(API 20E)에 의해 대장균으로 동정하였음. 동결 보관된 대장균을 꺼내어 혈액한천배지에 배양하고 단일집락을 MacConkey agar 배지에 재접종하였음. 다음날 단일집락 2~3개를 LB 액체배지에 접종하고 37°C 진탕배양기에서 20시간 배양하였음. 다음날 배양액(10^9 cfu/ml)과 PBS로 각각 희석한 균액 0.5cc를 1주령, 2주령, 3주령 육계의 대퇴부위의 근육(intramuscular, IM)에 각각 접종하였음. 그룹별로 육계수수는 5~6마리씩 접종하였고 접종 후 임상증상, 실질장기 육안병변, 폐사율(치사율), 혈액 내 세균 수 측정(cfu/ml) 등을 비접종균과 비교 평가하였음.

㉔ 실험결과

- 1주령 병아리에 배양원액 10배 희석농도(2.0×10^8 cfu/ml)을 접종하였을 때 다음날 100% 폐사가 관찰되었음. 반면에 10,000배 희석한 농도(2.0×10^5 cfu/ml)로 접종하였을 때 16.7% (1/6) 폐사가 관찰되었음(표 5-34). 10일령에 부검을 통해 실질장기들을 관찰하였을 때 병변은 없었고 접종균 재분리도 2마리 정도에서 검출되었음. 2주령 육계 병아리에 배양 원액을 10배, 100배, 1,000배 희석하여 각각 접종하였을 때 1,000배 희석액으로 접종한 그룹에서 폐사율은 관찰되지 않았음(표 5-35). 그러나 10배, 100배 희석액으로 접종한 그룹들에서 폐사율은 각각 80%(4/5)로 관찰되었음. 3주령 육계 병아리에 10배, 100배 희석액을 접종하였을 때 폐사율은 각각 100%, 60%로 관찰되었음(표 5-36). 실질장기들에 대한 병변을 관찰한 결과, 비접종군의 장기들과 대조적으로 접종군들의 간과 심장은 심하게 종대 되어 있었고 포막이 두껍게 형성되어 있었음. 비장에서는 두 그룹 간에 큰 차이는 확인되지 않았고 주로 간과 심장에서 병변이 관찰되었고, 접종군도 간과 심장에서 검출되었음. 접종군들 중에서 생존개체들에 대한 부검에서도 대부분 간에 포막이 관찰되었음(그림 5-51). 양계농장에서 병원성대장균증은 사육 전 일령에 걸처서 발생하기 때문에 주령별로 치사율은 약간씩 다르지만 물질평가를 위해 다양하게 질병유발모델을 구축하였음.

표 5-34. 육계 병아리 1주령에서 *Escherichia coli* 접종에 따른 폐사율

그룹 (n=6)	Dose (cfu/ml)	Mortality (DPI)										No. (%) of dead bird	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group1	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6 (0)
Group 2 (EC-076)	2.0×10^5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/6 (16.7)
	2.0×10^8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6/6 (100)

표 5-35. 육계 병아리 2주령에서 *Escherichia coli* 접종에 따른 폐사율

그룹 (n=5)	Dose (cfu/ml)	Mortality (DPI)										No. (%) of dead bird	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group 1	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
Group 2 (EC-076)	2.4×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	2.4×10^7	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	4/5 (80.0)
	2.4×10^8	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	4/5 (80.0)

표 5-36. 육계 병아리 3주령에서 *Escherichia coli* 접종에 따른 폐사율

그룹 (n=5)	Dose (cfu/ml)	Mortality (DPI)										No. (%) of dead bird	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Group 1	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
Group 2 (EC-076)	1.2×10^7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3/5 (60.0)
	1.3×10^8	2	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	5/5 (100)

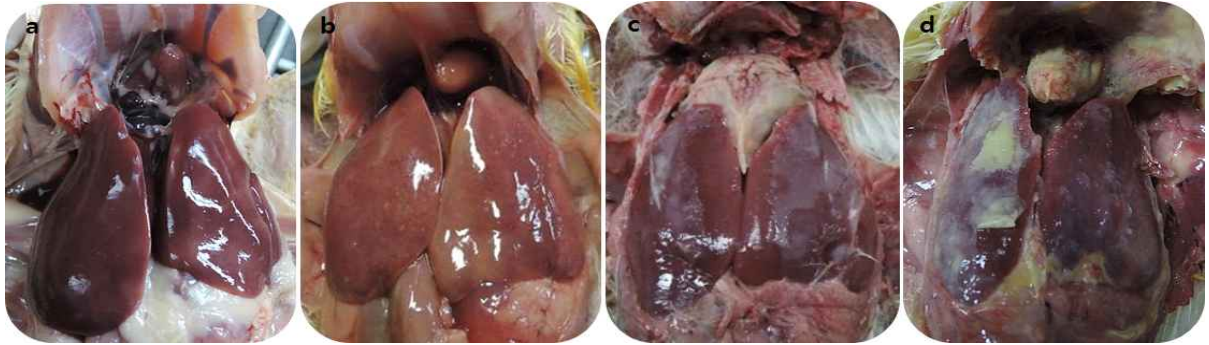


그림 5-51. 비접종군과 접종군의 실질장기(간) 병변 비교

(마) 신소재 개발물질 양계질병 유발모델 대상 효능평가 결과

① 양계분야 질병유발모델 대상 효능평가용 개발물질

- 본 연구과제의 개발물질 중에서 5종을 양계질병유발모델에서 효능평가를 수행하였고 최종목표로 설정된 ‘양계장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성’을 위해 양계분야 효능평가팀 자체적으로 총 6종의 외부개발물질들을 추가로 평가하였음. 양계분야 동물질병모델에서 평가한 개발물질은 총 11종으로 표 5-37에 제시함.

표 5-37. 양계질병모델 대상 효능평가용 개발물질

질병모델	신소재 개발물질 ¹					
	본 연구과제 개발물질		외부개발물질			
	면역보조제 ± Probiotics	식물 추출물	식물 추출물	식물추출물± Probiotics	광물질 제제	유기산 제제
조류인플루엔자 바이러스	-	장수진흙 버섯추출물 (PBE)	청국장 추출물 3종	-	-	-
괴사성장염	IgY-I+EM	-	-	Stevia EM 음수제제	규산염	낙산균
	EM		-	EM		
가금티푸스	IgY-II+EM	-	-	Stevia EM 사료제제		-
병원성대장균증	IgY-III+EM	-	-	-	-	-

¹IgY+EM (Immunoglobulin yolk + Effective microorganism): 양계질병 병원체 고면역 난황항체와 유용미생물제제. IgY-I은 *Clostridium perfringens*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* 4종 표준항원(CP/SE/ST/SP)들에 대한 면역항체들로 구성된 제제. IgY-II는 *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Riemerella anatipestifer* 5종 항원(SG/SE/ST/EC/RA)들에 대한 면역항체제제. IgY-III는 가금농장에서 고병원성으로 확인된 바이러스와 세균성 질병 병원체 9종을 선별하여 만들어진 난황항체제제로서 avian influenza virus H9N2, Newcastle disease virus (genotypes 3, 7), *Clostridium perfringens*-012, *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Gallinarum -236, *Escherichia coli*-076, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium (AI/ND/SP/SG /SE/ST/EC/CP) 항체들이 포함된 혼합제제.

② 양계분야 개발물질 실험실 평가 및 질병모델 효능평가 결과

- 양계분야 효능평가팀은 연구기간동안 5개 가금질병모델을 확립한 가운데 본 과제에서 개발된 바이오 신소재 개발물질들과 외부개발물질들을 단일 및 복합제제로 구성하여 평가한 결과, 효능 및 효과가 우수한 개발물질들을 확인할 수 있었음(표 5-38).

표 5-38. 양계분야 병원체 및 질병유발모델 대상 효능 우수 내·외부 개발물질

연차	질병모델 (병원체)	개발물질 (내부/외부 통합)	평가 기준	실험실 평가	현장 평가
1, 2	조류인플루엔자 모델 구축 뉴캐슬병 모델 구축 괴사성장염 모델 구축	식물추출물 30종	생리활성 항병성	물푸레나무, 둥근이질풀 → 괴사성장염균 (<i>Clostridium perfringens</i>) 항균효능	
	괴사성장염/콕시듐 (CP + Eimeria) 복합감염모델 구축	물푸레나무추출물 둥근이질풀추출물	항병성	증체율 평균 12~13% 증가 소장병변 평균 2.5배 개선	
3	괴사성장염 유발모델 대상 효능평가 병원성 대장균 모델 구축	난황항체제제 1호 (CP-IgY+생균제) 규산염(Si)광물질	면역증강 생리활성 항병성	0.5% IgY사료 →42.8% 방어 규산염, 음수 →57.1% 방어	0.2%IgY사료 → 육성율 8.1% ↑
	괴사성장염 유발모델 대상 효능평가 농장 현장실증시험 평가	스테비아 EM	생리활성 항병성	0.2%사료 첨가 →71.4% 방어	0.2%사료첨가 → 육성율 5.8% ↑
	[소/돼지/닭] 질병유래 공시균주 13종 항균검사 임상분리주(MRSA)에 대한 항균검사	항미생물펩타이드 (PG-1/PMAP-36)	항병성	PG1: <i>S. aureus</i> (MRSA)에 대한 항균효능 확인 PMAG-36: <i>E. coli</i> (APEC)에 대한 항균효능 확인	
4	가금티푸스 유발모델 구축 가금티푸스 유발모델 대상 효능평가	난황항체제제 2호 (SG-IgY+EM) 스테비아 EM	생리활성 면역증강	IgY 0.2%사료→55.5% 방어 SteviaEM0.2%→ 38.8% 방어	
	[소/돼지/닭] 공시균주 13종 항균 효능검사	항미생물펩타이드 (PR26, Buforin II)	항병성	PR26 / Buforin II (BfrII): <i>Salmonella Gallinarum</i> 에 항균효능 확인	
	조류인플루엔자 바이러스 유발 마우스모델 대상 효능평가	상항버섯추출물 (PBE)	항바이러스 면역증강	MDCK cell 에서 항바이러스 효능 확인	
5	병원성대장균 유발모델 대상 효능평가 농장현장실증시험 평가	난황항체제제 3호 (항원 9종 면역): (IgY+EM)	면역증강 항병성	병원성대장균증 오염농장 질병방어효과 확인	

③ 양계질병유발모델 대상 바이오신소재 개발물질 효능 평가결과

- 양계분야 효능평가팀은 사람과 조류인플루엔자 바이러스 및 세균성질병 유발모델에서 평가한 개발물질들의 효능을 다음과 같이 평가하였음.
- H1N1 마우스유발모델 대상 개발물질 효능: 장수진흙버섯추출물인 PBE 물질과 청국장 추출물 3종에 대한 평가를 수행한 결과, 물질투여에 따른 개체군들의 임상증상이나 체중 등에서 큰 변화가 나타나지 않았음(표 5-39). 효능평가에서는 접종군 대비 PBE 투여군의 방어율은 22.2%, A8 추출물은 11.1%로 마우스에서 위 2종의 물질들이 항바이러스 효능과 질병수준에서도 방어효과가 있는 것으로 확인되었음.

표 5-39. H1N1 대상 개발물질 항바이러스 억제효과 및 마우스질병모델 대상 효능평가 결과

개발물질		H1N1 바이러스 질병모델 평가						
		항바이러스능 IC ₅₀ (ug/ml) ¹		개체 안전성 평가			방어율 (%)	
		Neuraminidase inhibitory effect	효과	세포 독성	체중 증가	효과	효능	효과
Zanamivir (Relenza®)		0.44 ± 0.23	++++	×	○	○	-	-
장수진흙버섯추출물(PBE)		34.55 ± 3.31	++++	×	○	○	22.2	○
청국장 추출물	EtOAc extract	8482.5 ±124.3	+	×	○	○	0	×
	A3	17611.1 ±3052.7	+	×	○	○	0	×
	A8	3058.8 ±218.9	++	×	○	○	11.1	○

¹IC₅₀, 50% inhibitory concentration. +++++, 높다; +++, 좋다; ++, 보통이다; +, 낮다.

④ 피사성장염 유발모델 대상 개발물질 효능

- 피사성장염 유발모델에서는 본 과제에서 개발한 IgY에서 42.8%의 방어효과가 관찰되었지만, 외부개발물질인 스테비아 EM제제와 규산염광물질제제는 각각 71.4%와 57.1%로 방어효과가 매우 우수하였음(표 5-40). 스테비아 EM제제는 소장병변도 개선된 효과가 관찰됨에 따라 장염에 대한 예방 및 치료효과에도 우수한 물질임을 확인할 수 있었음.

표 5-40. 닭피사성장염 유발모델 대상 개발물질 효능평가 결과

개발물질	소장병변지수	폐사율 (%)	방어율 (%) ¹	물질 안전성 ²
음성대조군	0.18	0/11 (0.0)	-	-
양성대조군	2.73	7/11 (63.6)	-	-
IgY-1호 + EM(생균제)	1.55	4/11 (36.4)	42.8	무
EM(유용 미생물균)	1.73	5/11 (45.5)	28.5	무
광물질제제(규산염)	1.64	3/11 (27.3)	57.1	무
스테비아 EM 사료첨가제	0.73	2/11 (18.2)	71.4	무
유기산제제(낙산균)	2.02	6/11 (54.5)	14.3	무

¹방어율 (%) = 양성대조군 폐사율 (%) - 물질투여군 폐사율 (%) / 양성대조군 폐사율 (%).

²물질 안전성 평가는 질병모델군이 아닌 개체군들에게 물질을 투여했을 때 투여하지 않은 음성대조군보다 체중이 비슷하거나 증가하고, 임상증상이나 부검소견에서 아무런 병변이 없음이 확인되었을 때를 기준으로 평가하였다.

㉔ 가금티푸스 유발모델 대상 개발물질 효능

- 가금티푸스 유발모델에서는 본 과제에서 개발한 난황항체제제(IgY) 음수제제와 외부물질인 스테비아 EM제제를 사료첨가로 급여하였을 때 0.2% IgY 음수제제에서 55.5%의 높은 방어율이 관찰되었고(표 5-41), 0.2% 스테비아 EM제제에서도 38.8% 방어율을 통해 이들 물질들이 단일제제뿐 아니라 혼합으로 급여할 경우 질병방어에 대한 높은 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었음. 또한 이들 제제들은 혈액 내에서도 접종군보다 낮은 접종군분포율을 통해 이들이 혈액 내 항원을 약화시키거나 또는 면역세포 증식을 통해 면역원성이 증가되는 것을 예측할 수 있어 추후 물질들에 대한 면역원성 연구가 필요하다고 사료됨.

표 5-41. 닭 가금티푸스 질병모델 대상 개발물질 효능평가 결과

개발물질	혈액 내 접종군 분포율 (cfu/ml)	사육전기간 증체율 (%)	폐사율 (%)	방어율 (%) ¹	물질 안전성 ²
음성대조군	-	1,012.9	0/30 (0.0)	-	-
양성대조군	1.3×10^5	998.7	18/30 (60.0)	-	-
0.1% IgY-II+EM 음수	1.3×10^3	1,043.8	10/30 (33.3)	44.5	무
0.2% IgY-II+EM 음수	9.8×10^2	1,012.2	8/30 (26.7)	55.5	무
0.1% Stevia EM 사료첨가	1.4×10^4	1,075.5	14/30 (46.7)	22.1	무
0.2% Steiva EM 사료첨가	8.0×10^3	1,035.1	11/30 (36.7)	38.8	무

¹방어율 (%) = 양성대조군 폐사율 (%) - 물질투여군 폐사율 (%) / 양성대조군 폐사율 (%)

²물질 안전성 평가는 질병모델군이 아닌 개체군들에게 물질을 투여했을 때 투여하지 않은 음성대조군보다 체중이 비슷하거나 증가하고, 임상증상이나 부검소견에서 아무런 병변이 없음이 확인되었을 때를 기준으로 평가하였다.

㉕ 병원성대장균증 유발모델 대상 개발물질 효능(표 5-42, 5-43)

- 이 평가는 가금티푸스 유발모델에서 평가한 물질들을 동일하게 적용시켰음. 0.2% 난황항체제제와 스테비아 EM제제의 방어율은 각각 28.6%, 14.3% 수준이었지만 증체율은 음성대조군보다 높게 나타났음. 이러한 낮은 방어율의 원인은 본 과제에서 개발한 난황항체제제에 면역시킨 대장균이 고병원성 대장균이 사용된 것이 아니라 병원성이 없는 표준균주가 사용되었기 때문으로 판단됨.
- 이에 따라 5년차에 개발된 난황항체제제(IgY-3호)는 고병원성의 면역항원을 사용했기 때문에 이들에 대한 방어효과는 매우 우수할 것으로 예측되었으며, 이러한 예측은 농장실험을 통해 입증되었음. 1일령 난계대 질병검사를 통해 병원성대장균증에 감염된 농장에 IgY-3호를 음수(3일)와 사료(사육전기간)로 처리했을 때 간과 심장에 포막이 심하게 형성된 무처리군과는 달리 처리군의 병변은 종대되거나 피사 흔적이 거의 관찰되지 않았음. 무처리군의 체중이 20일령에 물질처리군보다 약간 증가하였지만 개체군들이 차이로 생각됨.
- 그러나 이들 개체들은 실질장기인 간과 심장이 종대되고 포막과 피사반점 등의 임상병변들이 확인되었고 균분리를 통해 대장균증임을 확인할 수 있었음. 결국 이 농가는 더 큰 피해를 막기 위해 항생제를 처방하였으나 30일령에서도 여전히 실질

- 장기들에서 병변이 심하게 진행된 상태를 확인할 수 있었음.
- 결과적으로 고면역 난황항체제제 처리군들은 체중에 있어서 비처리군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 실질장기들에서 임상병변율과 원인균 분리율 감소 등을 확인할 수 있었음.
 - 따라서 본 과제에서 개발된 IgY-3호를 양계농장 적용 시, 난계대 질병들이 예상되는 초생추(1일령)부터 3~5일간 음수로 급여하고 이후 사료첨가로 급여했을 때 질병예방 및 방어를 위한 백신보조제와 치료제로서의 역할을 할 수 있을 것으로 판단됨.

표 5-42 닭 병원성대장균증 유발모델 대상 개발물질 효능평가 결과

개발물질	혈액 내 접종균 분포율 (cfu/ml)	사육전기간 증체율 (%)	폐사율 (%)	방어율 (%) ¹	물질 안전성 ²
음성대조군	-	1,012.9	0/30 (0.0)	-	-
양성대조군	1.3×10^5	998.7	21/30 (70.0)	-	-
0.1% IgY-II+EM 음수	1.7×10^4	1,013.7	18/30 (60.0)	14.3	무
0.2% IgY-II+EM 음수	1.1×10^4	1,035.2	15/30 (50.0)	28.6	무
0.1% Stevia EM 사료첨가	1.4×10^5	1,015.4	19/30 (63.3)	9.6	무
0.2% Stevia EM 사료첨가	1.5×10^5	1,041.8	18/30 (60.0)	14.3	무

¹방어율 (%) = 양성대조군 폐사율 (%) - 물질투여군 폐사율 (%) / 양성대조군 폐사율 (%)

²물질 안전성 평가는 질병모델균이 아닌 개체군들에게 물질을 투여했을 때 투여하지 않은 음성대조군보다 체중이 비슷하거나 증가하고, 임상증상이나 부검소견에서 아무런 병변이 없음이 확인되었을 때를 기준으로 평가하였다.

표 5-43. 병원성대장균증 오염농장 개발물질(IgY-3호) 급여에 따른 효능평가

농장 (동)	시험 수수	개발 물질	적용방법 (사육전기간)	일령별 평균체중(g)			실질장기(간) 육안병변율(%)			대장균(간) 분리율(%)		
				10	20	30	10	20	30	10	20	30
1동	15	IgY-3호	1~3일, 음수 4~30일, 사료	176.4 ±33.0	495.1 ±49.5	865.1 ±80.2	0.0 (0/15)	6.7 (1/15)	13.3 (2/15)	6.7 (1/15)	0.0 (0/15)	0.0 (0/15)
2동	15	-	20일령에 항생제 투여	173.5± 26.0	527.3 ±47.3	867.2 ±142.7	13.3 (2/15)	40.0 (6/15)	33.3 (5/15)	20.0 (3/15)	53.3 (8/15)	0.0 (0/15)

④ 농장현장적용시험 및 생산성 평가

- 신소재 개발물질에 대한 농장적용시험은 총 3회 실시하였음.

㉠ 농장시험-1

- 농장시험-1에서는 전북에 있는 육계농장 3개동을 대상으로 2동은 생균제를 첨가한 대조군으로 정하고 1동과 2동은 난황항체제제인 다이스톱 폴츠헨산 2호를 전 사육기간 사료로 첨가하였음. 다이스톱 폴츠헨산 2호를 첨가한 1동과 3동의 개체 평균 중량은 1.38kg과 1.39kg로 2동보다 0.07~0.08kg 증가하였고 생산지수도 10~20정도 높은 차이를 나타내었음(표 5-44).

표 5-44. 양계용 면역복합제제 시제품(다이스톱폴츄리산 2호) 농장적용 결과 1

동	입추수수	출하수수	육성률 (%)	사육기간	평균중량 (kg)	FCR	생산지수
1	25,000	23,750	95.0	30	1.38	1.58	276
2	24,500	23,710	96.8	30	1.31	1.59	265
3	24,500	23,940	97.8	30	1.39	1.58	286

㉠ 농장시험-2

- 농장시험-2에서는 육계농장 3개동을 대상으로 1동은 농장에서 적용하는 생균제를 대조군으로 하였고 2동과 3동은 개발물질 스테비아 EM제제와 난황항체제제인 다이스톱 폴츄리산 2호를 0.2% 음수첨가와 0.2% 사료첨가로 각각 급여하였음. 스테비아 EM제제를 첨가한 2동에서 개체들의 평균은 1.87kg으로 가장 높은 체중을 보였고 다음으로 다이스톱 폴츄리산 2호가 1.79kg이었음. 생균제를 투여한 1동의 평균체중은 1.66kg으로 물질을 투여한 나머지 동들보다 0.13~0.21kg 정도의 차이를 보였음. 또한, 스테비아 EM제제를 투여한 2동의 생산지수는 314, 난황항체제제를 투여한 3동은 300인 반면 생균제를 투여한 1동은 282로 물질을 투여한 나머지 2동보다 최소18에서 최대 32의 높은 차이를 나타내었음. 결과적으로 생균제만을 투여하는 육계농장에서 면역증강물질과 유용미생물군으로 구성된 스테비아 EM제제나 양계병원체들에 대한 다양한 항체와 비타민제제, 유용미생물군 등으로 구성된 난황항체제제는 육계의 생산성을 높이는 물질임을 확인하였음(표 5-45).

표 5-45. 양계용 면역복합제제 시제품(다이스톱폴츄리산 2호) 농장적용 결과 2

동	입추수수	출하수수	육성률(%)	사육기간	평균중량 (kg)	FCR	생산지수
1	25,000	22,750	91.0	34	1.66	1.57	282
2	25,000	24,200	96.8	37	1.87	1.56	314
3	25,000	24,530	98.1	37	1.79	1.58	300

㉡ 농장시험-3

- 농장시험-3에서는 육계농장을 대상으로 개발물질에 대한 생산성을 평가하였음. 1동에는 본 과제에서 개발한 난황항체제제(다이스톱-폴츄리산 3호)를 1일령부터 2일령까지 음수로 0.2% 투여하고 3일령부터 32일령까지는 사료첨가로 투여하였음. 2동은 물질을 투여하지 않은 음성대조군으로 하였음. 계군들의 생활사를 관찰해본 결과, 물질처리군(1동)은 비처리군(2동)보다 1주일간의 초기폐사율이 감소하였고 육성률도 약 2% 증가하였음. 평균체중에서는 근소한 차이로 물질처리군이 증체하였음. 물질처리군의 사료요구율은 1.585로 비처리군보다 낮았고 생산지수는 296.3으로 비처리군보다 높게 측정됨에 따라 난황항체제제를 투여한 동에서 우수한 효과를 확인할 수 있었음(표 5-46). 추가적으로 이 농장은 1일령부터 2개동 모두 병원성 대장균증이 확인되었는데 상대적으로 난황항체제제를 투여한 1동의 개체들은

활발한 움직임을 보인 반면에 2동 개체들은 설사변이 많아지고 움직임을 둔해지며 사료섭취량도 저조하여 3주령(20~22일령/음수)에 항생제를 투여하였음. 결과적으로 8종의 가금병원체 항원에 대한 항체로 만들어진 난황항체제제를 투여한 그룹(1동)은 질병에 대한 방어효과가 우수하고 생산성 증대에도 도움을 주는 것으로 판단되었음.

표 5-46. 양계용 면역복합제제 시제품(다이스트롭폴츄리산 3호) 농장적용 결과 3

동	입추수수	출하수수	육성률 (%)	사육기간	평균중량 (kg)	FCR	생산지수
1	35,520	34,287	96.5	32	1.557	1.585	296.3
2	35,500	33,578	94.6	32	1.511	1.729	258.3

(바) 개발물질 효능평가에 따른 농장 맞춤형 적용 프로그램 확립

① 조류인플루엔자 바이러스 농장 맞춤형 적용 프로그램

- H9N2는 국내 가금에서 빈번하게 발행하거나 유행하는 조류 인플루엔자 바이러스로서 5년차에 양계분야 효능평가팀에서 삼양애니팜에 제공한 9종의 가금유래 병원체 분리주 항원들을 가지고 산란계에서 생산 및 개발된 다이스트롭 폴츄리산 3호(난황항체제제 IgY-3호)에 이 바이러스에 대한 항체가 포함되어 있음.
- 또한 동물실험을 통해 장수진흙버섯추출물인 PBE 물질이 항바이러스 효과가 우수한 점 등을 고려하여 IgY-3호 0.2%와 PBE 0.1%를 육계와 산란계에 각각 2주간 음수와 사료첨가로 동시에 투여하면 백신보조제로서 조류 인플루엔자 바이러스 예방 및 방어와 함께 생산성도 긍정적인 효과가 나타날 것으로 판단됨(그림 5-52).



그림 5-52. 조류 인플루엔자 바이러스 개발물질 급여에 따른 예방 프로그램

② 뉴캐슬병 바이러스 농장 맞춤형 적용 프로그램

- 뉴캐슬병 바이러스는 현재 국내에서 상용화되고 있는 백신 프로그램을 통해 현장에서 거의 100% 방어 하는 것으로 알려져 있기 때문에 농장 프로그램으로는 1일령 ND 백신 후에 2주 동안 생산성에 기여하는 스테비아 EM 0.2%를 사료첨가로 급여하고 역가가 낮아지는 2주 후부터 IgY-3호(뉴캐슬병 바이러스 야외주 2종에 대한 항체 보유)와 스테비아 EM을 각각 0.1% 사료첨가로 급여하면 장 활성에 의한 면역력 증대와 생산성 그리고 산란율 증체도 기대할 수 있을 것으로 판단됨(그림 5-53).

육계/산란계 뉴캐슬 바이러스 예방 프로그램



그림 5-53. 뉴캐슬병 바이러스 개발물질 급여에 따른 예방 프로그램

③ 피사성장염 농장 맞춤형 적용 프로그램

- 피사성장염은 모든 가축에서 발생하는 세균성질병으로 알려져 있음. 2011년 7월 이후로 항생제의 사료첨가가 금지된 이후 가금류에서 피사성장염 피해가 꾸준히 증가하고 있음. 특히, 육계의 경우, 사육 후반기에 콕시듐과 함께 피사성장염 발생률이 꾸준히 증가하고 있어 농가에 적지 않은 피해를 주고 있는 실정임. 이에 따라 장염을 예방하고 치료하기 위한 사료보조제들이 제품으로 판매되고 있지만 실질적인 효능이나 효과는 입증된바 없다. 본 연구에서는 치사율이 있는 피사성장염모델을 확립하여 본 연구과제에서 개발되거나 외부에서 판매하는 장염 예방 및 치료보조제로서 기능이 있는 제품들을 선별하여 효능평가를 수행하였음.
- 그림 5-54는 장염을 예방할 수 있는 항생제대체제들의 기본프로그램과 장염을 완화하거나 치료단계까지의 효능이 있는 개발물질들의 강화프로그램으로 구분하였음. 기본프로그램에서는 일차적으로 면역증강물질을 사육 전 기간 투여하고 초생추부터 1주 동안 생균제와 유용미생물들을 투여하여 장 활성을 촉진시키고, 이후 2주부터는 피사성장염 원인균의 항체를 보유하고 있는 IgY-3호와 생산성에 기여하는 스테비아 EM을 사료첨가로 급여하여 장염을 예방하는 프로그램으로 구성하였음. 강화프로그램은 장염 발생이 빈번한 2~3주령에 1주일 정도 규산염광물질제제와 식물추출물로서 장염에 효과적인 허브식물로서 등근이질풀추출물과 물푸레나무추출물 등을 사료첨가나 음수첨가로 급여 시 장염을 완화시키거나 치료할 수 있을 것으로 기대됨(그림 5-54).

장염예방 : 기본프로그램 (Standard Program)



장염발생 : 강화프로그램 (Intensive Program)

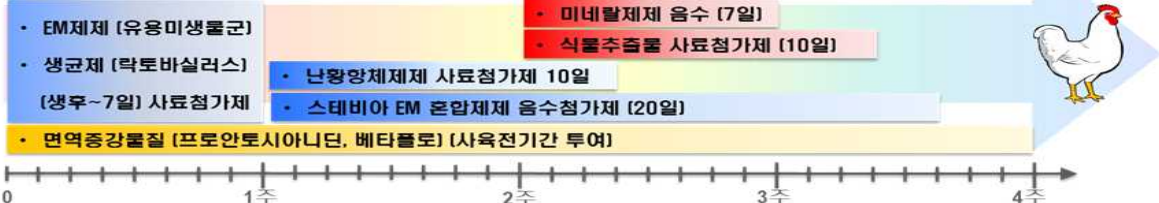


그림 5-54. 피사성장염 개발물질 급여에 따른 예방 프로그램

④ 가금티푸스 농장 맞춤형 적용 프로그램

- 가금티푸스는 어린 일령의 병아리에서 산란중인 성계에 이르기까지 모든 일령의 닭에서 높은 폐사율을 보이는 것이 특징임. 이들에 대한 예방을 위해 가금티푸스 사균백신과 생균백신이 현장에서 상용화되고 있지만 국내에서는 아직까지 이 질병에 대한 피해가 육계, 산란계, 종계 농가 등에서 보고되고 있음. 그러나 백신을 접종하더라도 가금티푸스가 오염된 농장이 많고 또한 현재 피해가 나타나고 있지는 않다 하더라도 보균계로 존재하고 있는 경우가 많아 이 시기에 생균백신을 접종하면 폐사가 증가한다던지 하는 피해가 촉발될 수 있음.
- 따라서 본 과제에서 제시하는 가금티푸스 적용 프로그램은 육계농장의 경우, 초생추부터 2주 동안 가금티푸스 야외균주의 항체를 보유한 IgY-3호와 유용미생물과 면역기능을 강화시키는 스테비아 EM을 동시에 음수와 사료첨가로 급여하면 사육초기 어린 일령에서 가금티푸스의 발생을 예방하거나 피해를 최소화할 수 있을 것으로 판단됨. 산란계의 경우, 사육초기에 백신을 투여하지 않는 농가는 IgY-3호와 스테비아 EM을 급여하고 백신을 투여한 농가는 스테비아 EM만을 급여하더라도 가금티푸스 예방에 상승효과를 기대할 수 있음(그림 5-55).



그림 5-55. 가금티푸스 개발물질 급여에 따른 예방 프로그램

⑤ 병원성대장균증 농장 맞춤형 적용 프로그램

- 농장이나 부화장에서 1일령 병아리의 난계대검사를 진행하였을 때 최소 10% 최대 30% 정도 실질장기인 간에서 대장균이 분리되면 사육과정 중 1~2주내에 간과 심장 등에 포막이 생기는 병원성대장균증이 발생되어 폐사로 이어지는 것을 현장에서 확인할 수 있음. 병원성대장균증은 질병모델에서도 치사율이 상당히 높은 수준이며, 예방차원에서 사균 백신을 투여하더라도 병원성대장균들의 혈청형이 다양하기 때문에 이를 예방하기란 쉽지 않음.
- 본 과제에서 개발한 IgY-3호는 고병원성 대장균증을 유발하는 대장균 항체를 보유하고 있음. 육계농장에서 병원성대장균증이 있는 2개동을 선별하여 초생추부터 출하일령까지 총 4회에 걸쳐서 개체들을 조사한 바에 의하면 대장균 항체를 보유한 IgY를 투여한 그룹(1동)은 체중이 증가하고 실질장기에서 간 포막이나 대장균 분리가 거의 확인되지 않았다. 그러나 급여하지 않은 그룹(2동)은 조사 개체들 중 20~

30% 정도가 간에서 병변(포막)소견이 관찰되었고 사육 후반으로 갈수록 병변이 심화되고 폐사율도 증가하였음. 따라서 1일령부터 IgY-3호와 스테비아 EM을 사육 전 기간 투여할 경우, 병원성대장균증을 예방하거나 완화 시킬 수 있을 것으로 판단됨(그림 5-56).



그림 5-56. 병원성대장균증 개발물질 급여에 따른 예방 프로그램

(2) 양돈분야

(가) 효모와 Bacillus 발현 PRRSV 항원과 Lactobacillus의 PRRSV 감염에 대한 효능 및 안전성 평가

① 시험방법

- PRRSV(VR2332)의 ORF2 및 ORF3 항원을 *Pichia pastoris* 효모균주(yeast group)와 Bacillus(bacillus group)에서 각각 발현한 것을 혼합하여 평가하였고 또한 유효 유산균 중의 하나인 Lactobacillus를 급여한 그룹(lactobacillus 그룹)을 포함하여 그룹 당 3마리씩의 PRRSV 음성 4주령 자돈에 2주간 간격으로 3회 경구 투여함.
- 추가적으로 동일 조건으로 구매한 3마리의 자돈을 일반사료 급여하고 대조군(Control group)으로 유지함
- 두 번째 항원 급여 2주 후에 각 그룹의 자돈에 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 비강접종을 실시한 후 2주간 PRRSV 감염 상황을 관찰함
- 매주 채혈을 실시하여 IFA법을 이용하여 PRRSV 항원 특이 항체생성을 검사
- 매 주 체중을 측정하여 증체량을 확인하고 감염 후 1주까지 관찰 후 안락사 및 부검 병리 검사 실시함.
- 모든 통계 분석은 SAS사의 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 실시하고 혈중바이러스 농도같은 반복적인 데이터는 repeated measures ANOVA 분석법을 이용하여 분석하고 증체율 및 폐병변 score 등의 단일 데이터는 Wilcoxon Rank Sum test를 이용하여 분석

② 시험결과

- 효모 및 bacillus 발현 PRRSV 항원과 lactobacillus를 투여한 자돈에 공격접종 후

혈중 바이러스 농도와 부검 후 폐의 잔존 바이러스 농도를 측정된 결과 일반사료 급여 대조군 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성 있는 수준의 혈중바이러스 농도의 차이가 관찰되지 않았고 폐에 잔존하는 바이러스의 농도도 거의 비슷한 수준으로 검출되었음(그림 5-57)

- 효모 및 bacillus 발현 PRRSV 항원과 lactobacillus를 투여한 자돈에 공격접종 후 PRRSV에 대한 IFA 항체가를 검사해 본 결과 공격접종 전 유의성 있는 항체가를 검출할 수는 없었으나(그림 5-58) 공격접종 후 7일에는 그룹별로 비슷한 수준의 항체가가 형성 되었고 14일 후에는 lactobacillus 투여 그룹이 대조군 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성 있는 항체가가 관찰되었음.
- 효모 및 bacillus 발현 PRRSV 항원과 lactobacillus를 투여한 자돈의 공격접종 전(0 dpt)과 공격접종 후 0일(42 dpt)과 14일(56 dpt)에 채취한 혈액에서 TNF- α 와 IL-12 발현 수준을 검사한 결과 그룹별 유의성 있는 결과는 관찰하지 못하였음(그림 5-59).

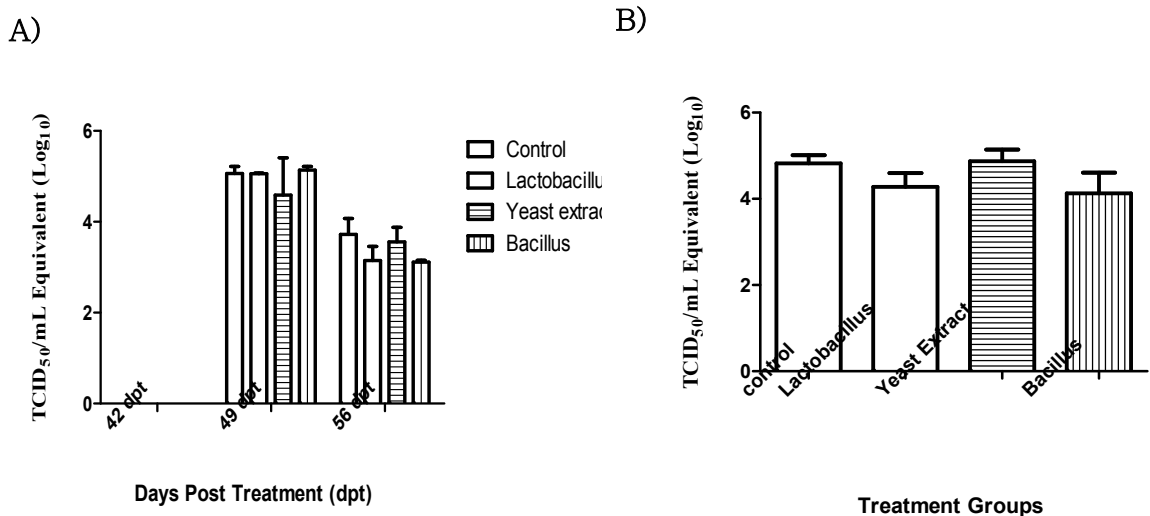


그림 5-57. 효모 및 bacillus 발현 PRRSV 항원 급여군, lactobacillus 급여군과 일반사료 급여 대조군(control) 그룹 이유자돈의 공격감염 후 혈중 바이러스 농도(A) 및 폐 잔존 바이러스 농도(B). 그룹 당 3마리의 자돈에 항원을 3회에 걸쳐 경구투여 한 후 VR2332를 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 비강접종을 실시한 후 매주 혈액을 채취하여 혈중바이러스 농도와 항체가를 검사하고 부검 후 폐병변을 검사하였음.

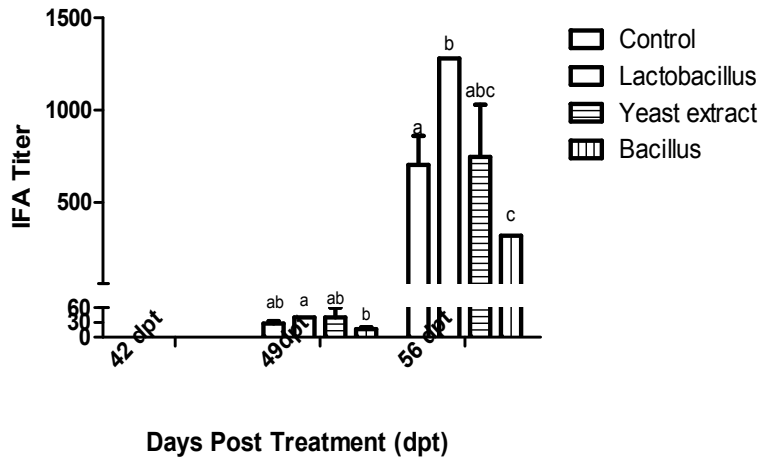


그림 5-58. 담배잎 발현 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 PRRSV 항원별 유도 항체가

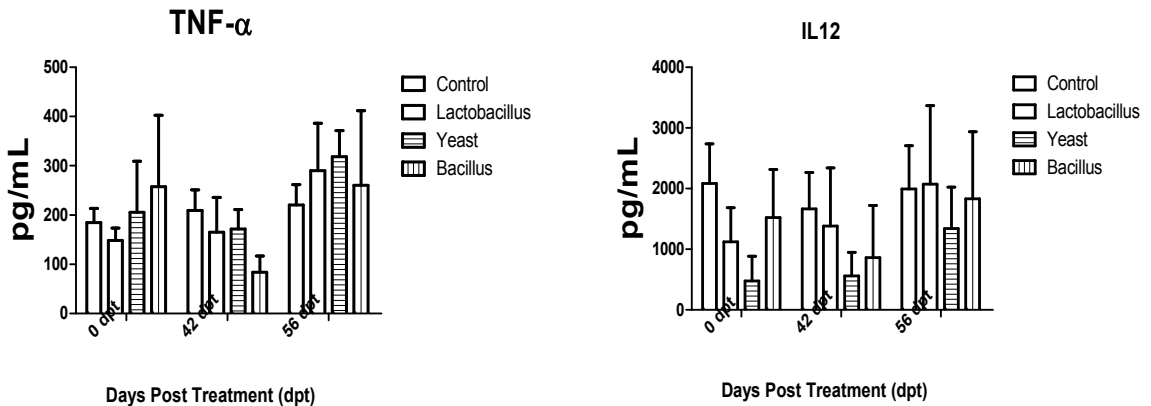


그림 5-59. 담배잎 발현 효모발현 PRRSV 항원 접종 또는 비접종 그룹 이유자돈의 공격감염 후 IFA 항체가

(나) 신소재 물질 선별을 바탕으로 시제품 평가

① 동물실험 수행방법(표 5-47)

- 4주령의 돼지 30마리를 같은 농장에서 구입하여 각각 6마리의 돼지를 5개의 돈방에 나누어 사육함.
- 7일간의 순치기간 후에 표 30과 같이 각 그룹의 돼지들에게 생균제(락토바실러스 $1g(2 \times 10^{10}/g)$ + 클로스트리디움 $1g(2.5 \times 10^9/g)$ + 포도당 998g, 그룹 1), 초유난황항체(특이항체 초유난황분말 50g + 포도당 950g, 그룹 2) 또는 합제(특이항체 초유난황분말 50g + 바실러스 메센테리쿠스 1×10^9 + 클로스트리디움 부티리쿰 1×10^9 + 비타민 C 5g + 비타민 A 2,500,000 I.U. + 비타민 D3 1,000,000 I.U. + 비타민 E 4g + 타우린 40g + 미네랄 + 포도당 약 740g, 그룹 3)와 음수합제(합제와 동일, 그룹 4)를 14일 동안 섭취하게 하고 무처치 대조군(그룹 5)을 동일한 조건에서 유지하였음.
- 초유난황항체는 PEDV, TEGV, Rotavirus, pathogenic E.coli, Salmonella

- Typhimurium를 이용하여 특이 항체를 생산한 후 합제로 생산한 것임.
- 14일 처치 후 모든 그룹에 1×10^5 TCID₅₀/ml로 준비된 PEDV와 1×10^8 CFU/ml로 준비된 *Salmonella* Typhimurium 균을 생리식염수에 준비하여 4 ml을 구강으로 접종함.

표 5-47. 양돈용 면역복합제제 동물실험 방법 요약

그룹이름 (동물 수)	처치(14일간)	공격감염	비고
그룹 1 (6)	생균제	PED 및 살모넬라 감염	생균제 처치군
그룹 2 (6)	초유난황항체	PED 및 살모넬라 감염	초유난황항체 처치군
그룹 3 (6)	초유난황항체+생균제	PED 및 살모넬라 감염	초유난황항체과 생균제 처치군
그룹 4 (6)	초유난황항체+생균제(음수)	PED 및 살모넬라 감염	초유난황항체과 생균제 음수 처치군
그룹 5 (6)	무처치	PED 및 살모넬라 감염	무처치대조군

- 첫 번째 처치 전과 공격감염 전 모든 돼지들의 체중을 측정하고 혈액을 채취하였다. 공격감염 후에는 매주 체중을 측정하고 혈액을 채취하였다. 공격감염 후 살모넬라 배출과 설사유무를 확인하기 위하여 접종 후 매일 1주간 분변을 채취하였다. 공격접종 1과 2주후에 각 그룹의 3마리 돼지를 안락사 시키고 병리검사를 실시하여 특이 병변의 유무를 확인하였음.

(3) 축우분야

(가) 가축 주사부위 농양형성균에 대한 리소좀의 억제 효과

① 대장균, 살모넬라균에 대한 항균 효과 확인

- 가축 주사부위 농양형성균인 *Treperella pyogenes*의 항균력 실험을 수행하였으며, *Trueperella pyogenes* (이전 *Arcanobacterium pyogenes*) 균주를 사용하였음.
- 리소좀 10^2 농도에서 항균효과가 인정되었음(그림 5-60).

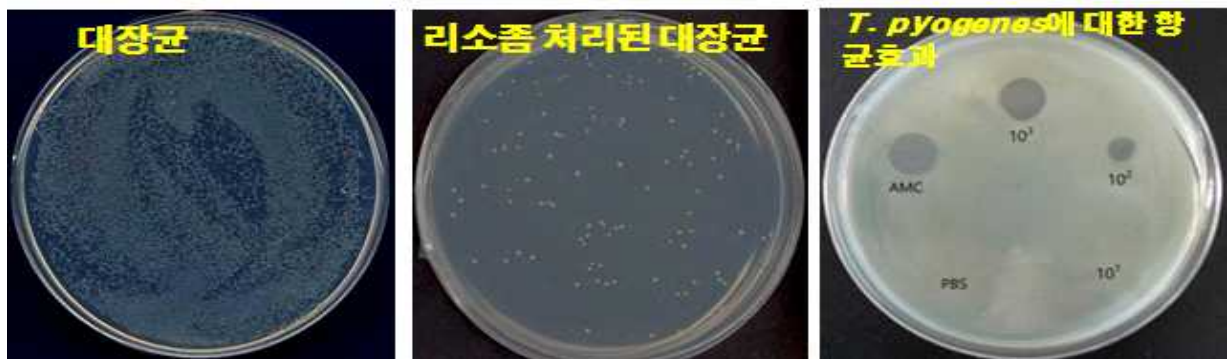


그림 5-60. *Trueperella pyogenes*의 대장균에 대한 항균력 평가 결과

4. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발 (제2협동)

가. 병원성 미생물에 대한 항미생물 펩타이드의 항균력 검정

- (1) 백신 스트레스 완화용 투여제의 보조 첨가제로써의 상품화를 위하여 안정성과 항균력에 대한 연구를 진행하였으나 펩타이드 생산단가의 한계로 인하여 가축에서 인간 대상으로 적용 목표의 전환
- (2) 확보된 미생물 펩타이드의 경우 가축의 전염병과 관련된 gram positive, gram negative, fungi 뿐만 아니라 인간에게도 질병을 유발하는 미생물로 구성
- (3) 항미생물 펩타이드 대량 생산을 위해 최적화된 발현, 정제시스템을 이용하여 PG1, PMAP36, PR26, Buforin II에 대한 지속적인 생산 및 제 1협동과의 협업을 통해 현재 까지 확보된 병원성 미생물 패널에 대한 펩타이드들의 항균력을 검정하고자 하였으나, 건국대 동물생명과학대학 호흡기 질병발생으로 인한 건물폐쇄로 실험실 및 기기에 대한 접근 불가로 인해 미뤄짐
- (4) 실험실 및 기기에 대한 접근이 가능해짐에 따라 PG1, PMAP36, PR26 총 3종의 항미생물 펩타이드의 생산을 진행

나. 생산된 PG1 펩타이드를 이용한 세포 독성 및 안정성 검정

- (1) 4차년도 수행된 PG1의 세포독성 연구에 대한 추가적인 연구로써, NaCl 농도를 변수로 세포 독성 연구를 위한 MTT assay 및 PG1의 hemolytic activity assay 수행
- (2) Serum 내에서 생산된 PG1의 안정성 검정

다. Transgenic mouse (TG)를 이용한 PG1의 체내 영향 연구

- (1) 건국대 호흡기 질병 관련 문제로 인해 5차년도에 계획했던 연구 수행에 차질이 생김에 따라 수행이 가능한 항미생물 펩타이드와 관련된 다른 연구를 진행
- (2) Transgenic mouse를 만들기 위한 클로닝(그림 5-61)

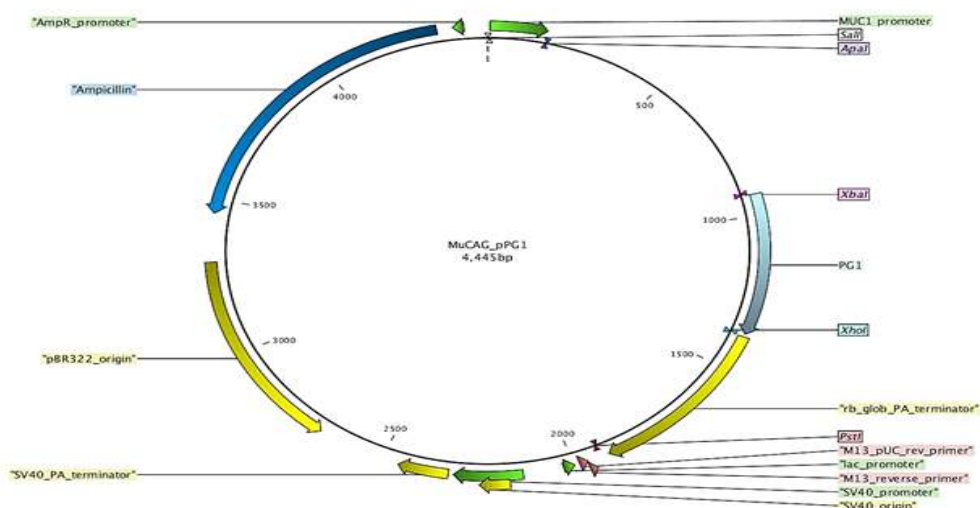


그림 5-61 Transgenic mouse를 위해 이용한 pCAGGS vector map

- (가) PG1 transgenic mouse를 만들기 위해 pCAGGS vector 및 porcine mucin1 promoter를 이용
- (나) pCAGGS vector의 제한 효소 XbaI과 XhoI을 이용하여 preproPG1 sequence를 CDS 부분에 삽입
- (3) PG1 transgenic mouse 조직별 발현 확인
 - (가) pCAGGS vector 및 porcine mucin1 promoter를 이용하여 만든 PG1 transgenic mouse의 각 조직별 발현 정도를 확인하고자 brain, eye, lung, thymus, liver, kidney, stomach, small intestine, spleen, ovary, uterus, testis, muscle, skin의 총 14종의 조직을 수집하고, 각 조직별 발현량을 비교하기 위해 mRNA를 추출, cDNA를 합성한 뒤 house keeping gene 중 하나인 GAPDH를 control로 하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행

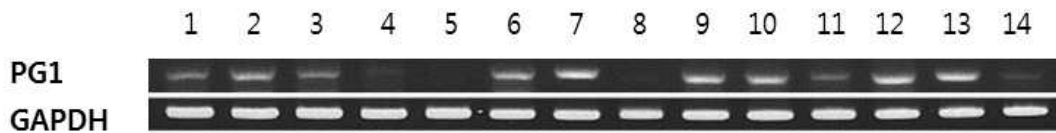


Figure 1. PG1 expression pattern of multiple transgenic mouse tissues by semi-quantitative RT-PCR. Total 14 different tissues of transgenic mouse were used for RT-PCR. Lane 1. brain, 2. eye, 3. lung, 4. thymus, 5. liver, 6. kidney, 7. stomach, 8. small intestine, 9. spleen, 10. ovary, 11. uterus, 12. testis, 13. muscle, 14. skin

그림 5-62. Semi-quantitative PCR을 이용한 조직별 발현 비교

- (나) 14종의 조직들에 대한 semi-quantitative PCR 후 전기영동 한 결과 liver와 small intestine을 제외한 다른 조직들에서는 gel 상의 band를 확인(그림 5-62)
- (4) PG1 발현에 따른 transgenic mouse의 표현형 발견
 - (가) 4주령 된 transgenic mouse에서 각막이 불투명 (corneal opacity)한 현상이 나타나고 시간이 흐름에 따라 염증 반응 극심해져 눈을 뜨지 못함(그림 5-63)

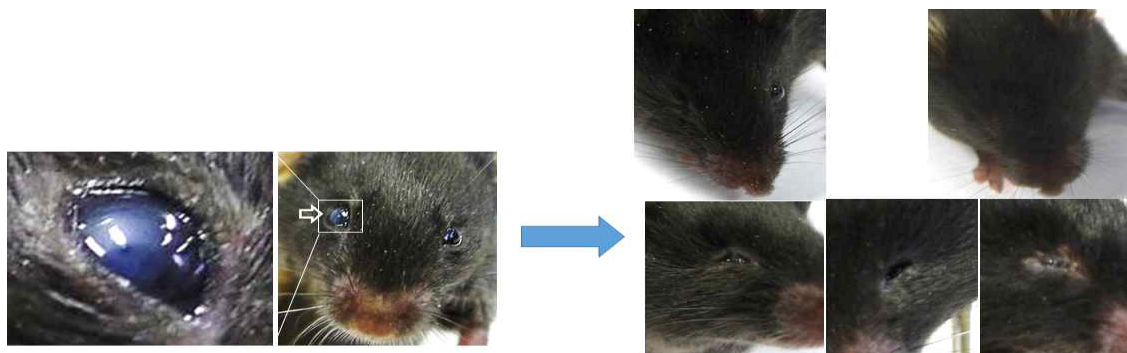
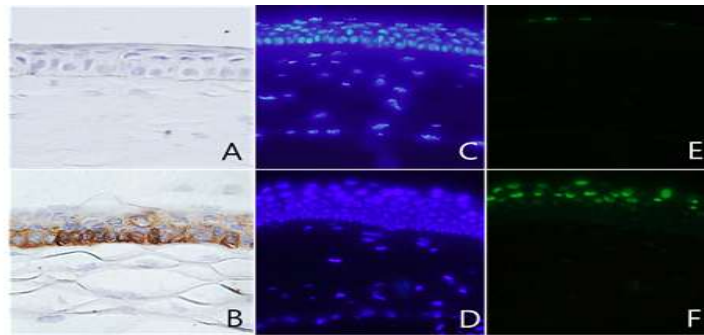


그림 5-63. Corneal opacity 및 염증 반응을 보이는 4주령 암컷 형질전환 쥐

- (5) ~PG1 transgenic mouse cornea에 대한 immunohistochemistry(IHC) 및 TUNEL

assay

- (가) Transgenic mouse가 보이는 corneal opacity 및 염증 반응이 PG1 발현에 의한 것인지 확인하기 위해 쥐의 각막 (cornea)에 대한 immunohistochemistry 및 TUNEL assay를 수행(그림 5-64)

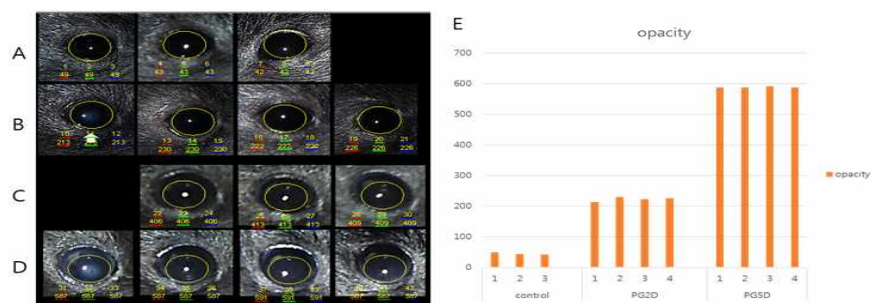


< Result of Immunohistochemistry and TUNEL assay of cornea >

- (A) Dab staining with anti-PG1 antibodies of corneal region from C57BL/6
 (B) Dab staining with anti-PG1 antibodies of corneal region from PG-1 transgenic mouse
 (C, E) DAPI and Fluorescein staining on the corneal region of C57BL/6
 (D, F) DAPI and Fluorescein staining on the corneal region of PG-1 transgenic mouse
 (F) In the TUNEL assay, cell death signal was detected from flat cells of transgenic cornea (400X)

그림 5-64. Cornea region에 대한 IHC 및 TUNEL assay 수행 결과

- (나) PG1 antibody와 transgenic mouse의 background가 되는 C57BL/6 mouse를 negative control로 이용하여 Dab staining을 수행한 결과 C57BL/6 mouse에서는 signal이 보이지 않았고, PG1에서는 뚜렷한 signal을 확인
- (다) C57BL/6와 PG1 transgenic mouse cornea에 대해 DAPI 및 Fluorescein staining 후 비교한 결과 transgenic mouse의 경우에서만 flat cell death signal을 확인
- (6) PG1 펩타이드의 corneal opacity 현상 유도 확인
- (가) PG1 transgenic mouse 각막에 대한 immunohistochemistry와 TUNEL assay를 통해 PG1이 발현되는 것을 확인함에 따라 실제 이 현상이 발현된 PG1에 의한 것인지 확인하기 위해 생산된 PG1을 처리하여 관찰(그림 5-65)



< Evaluation of degree of corneal opacity after the PG1 treatment >
 Corneal pictures of PBS (A) and PG1 treatment (B) groups during 2 days. Corneal pictures of PBS (C) and PG1 treatment (D) groups during 5 days. Evaluation of opacity level using image studio (E).

그림 5-65. PG1 처리에 따른 corneal opacity 현상 검정

- (나) PG1 transgenic mouse를 두 그룹으로 분리하여 한 그룹에는 PBS를, 다른 그룹에

는 PG1을 처리한 뒤 5일 동안 관측한 결과 시간이 지남에 따라 PG1을 처리한 그룹의 쥐들에게서 corneal opacity가 점점 증가하는 것을 확인

라. PreproPG1의 proregion 기능에 관한 연구

(1) PreproPG1 연구에 대한 배경

- (가) PreproPG1 sequence를 이용하여 만든 transgenic mouse에서 corneal opacity와 같은 phenotype이 나타남에 따라 이에 대한 추가적인 연구로써 preproPG1의 proregion에 대한 연구를 수행
- (나) PG1은 in vivo에서 발현 시 signal sequence 부분이 cleavage 되고, cap 부분인 ProS (cathelin)은 protease inhibitor로써 PG1이 분해되는 것을 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있음(그림 5-66)



그림 5-66. PG1의 유전자 구조 (precursor)

- (다) 또한 preproPG1은 항균 작용을 하지 않는 것으로 알려져 있었으나, 클로닝을 통해 E.coli에서 발현 시 숙주가 성장을 하지 못하는 것을 발견
- (라) 이를 통해 preproPG1이 E.coli 내에서 intracellular cleavage가 일어나는 것으로 생각되어짐에 따라 이를 연구하기 위해 클로닝을 실시
- (마) PCR 기법을 이용하여 His-tag을 도입한 다음 발현용 vector인 pQE80-L에 삽입한 뒤 발현용 숙주인 BL21에 형질전환 시킨 클론을 확보(그림 5-67)



그림 5-67. His-tag을 포함한 preproPG1 construct

(2) 6xHis-preproPG1의 발현 유도에 따른 숙주의 성장 저해

- (가) His-tag preproPG1이 삽입된 construct는 앰피실린 저항성 유전자를 가지고 있으므로 single colony를 앰피실린이 첨가된 5ml LB media에 넣어 pre-inoculum을 준비 (37°C, 220rpm 조건 하에서 배양)
- (나) Pre-inoculum을 이용하여 앰피실린이 첨가된 200ml LB media에 1% inoculation을 수행, 같은 조건하에서 배양하여 OD₆₀₀ 값이 0.6에 도달했을 때 IPTG를 첨가하여 6시간 동안 그 값을 측정
- (다) 발현을 유도하지 않은 배양액 (uninduced sample, UI)을 control로 하여 비교한 결과, 발현 유도 후 1시간 이후부터 숙주의 성장이 억제되는 것을 확인(그림 5-68)
- (라) 숙주의 성장이 저해 되는 현상이 preproPG1의 intracellular cleavage에 의해 활성화된 mature PG1에 의한 것인지, 기존의 결과와 달리 preproPG1 자체가 항균 작용

을 하는 것인지에 대한 추가 연구가 필요

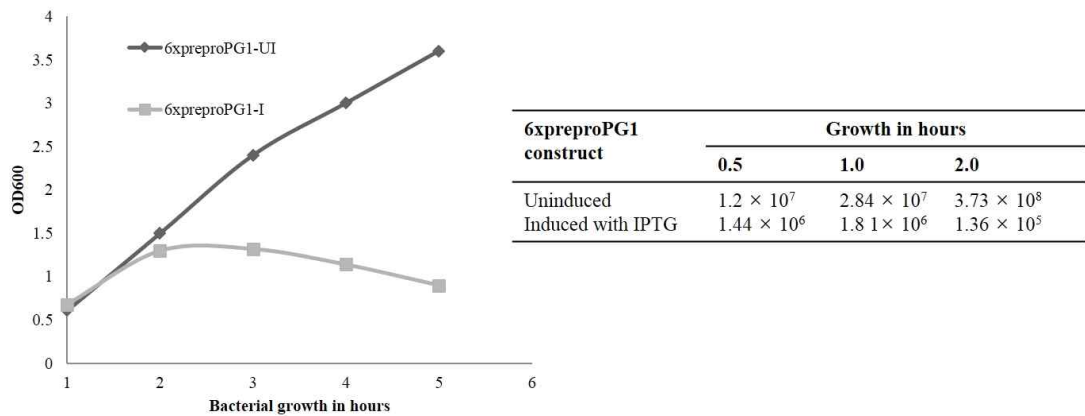


그림 5-68 발현 유도 후 배양 시간에 따른 E.coli 성장 정도 측정

- (마) 따라서 preproPG1의 intracellular cleavage를 확인 하기 위해 발현 유도 후 각각 0.25시간 (15분), 0.5시간 (30분), 0.75시간 (45분), 1시간, 1.5시간, 2시간에 배양액으로부터 샘플을 수집
- (바) 수집한 샘플들을 16% tricine 혹은 12% SDS-PAGE gel에 전기영동 한 뒤 rabbit anti-PG1 antibody와 rabbit anti-6xHis tag antibody를 이용하여 western blot을 수행
- (사) Western blot 결과 mature PG1 (2.2kDa)은 detection되지 않았고, preproPG1 (16kDa)만 확인이 가능하였으며, 2종의 antibody 모두 동일한 결과를 보임에 따라 이는 intracellular cleavage가 발생하지 않았거나 그 일부만 발생했을 경우, 혹은 cleavage 되었다 하더라도 PG1은 protease에 의해 분해되었을 것으로 추정(그림 5-69)

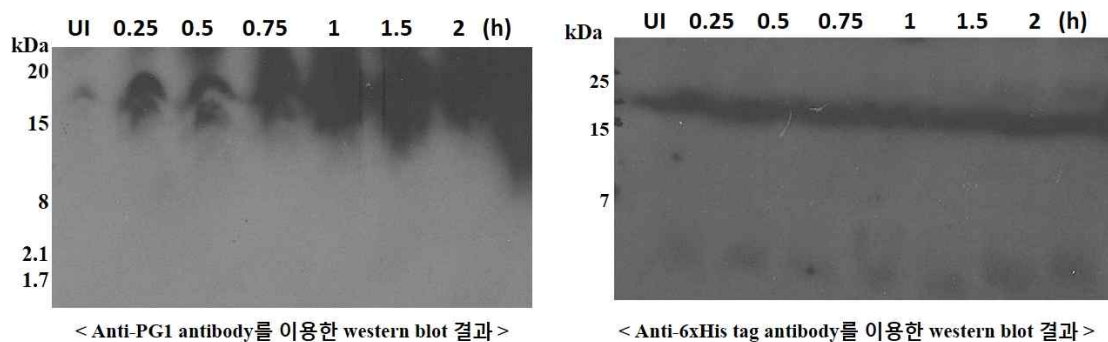


그림 5-69. 6xhis-preproPG1 발현에 대한 western blot 분석 결과

(3) Immuno-gold transmission electron microscopy (TEM)를 통한 preproPG1의 발현

및 활성 연구

- (가) Intracellular cleavage 발생 여부를 확인하기 위해 transmission electron microscopy (TEM)을 이용한 연구를 수행
- (나) PreproPG1을 형질전환 시키지 않은 E.coli를 negative control로 이용하였고 모든 발현된 샘플들은 IPTG를 이용한 발현 유도 후 1.5시간에 수집
- (다) PreproPG1을 확인하기 위해 anti-6x his antibody를 사용, mature PG1을 확인하기 위해 anti-PG1 antibody를 1차 antibody로 사용 후 gold가 부착된 antibody를 2차 antibody를 이용하여 signal을 강화
- (라) 그 결과 negative control로 이용된 E.coli에서는 그 어떤 signal도 확인되지 않았고, PreproPG1은 발현 후 세포 표면과 inclusion body에 위치하는 것으로 확인되었으며, 그 활성으로 인해 세포벽에 천공 (pore)이 생긴 것을 확인(그림 5-70)

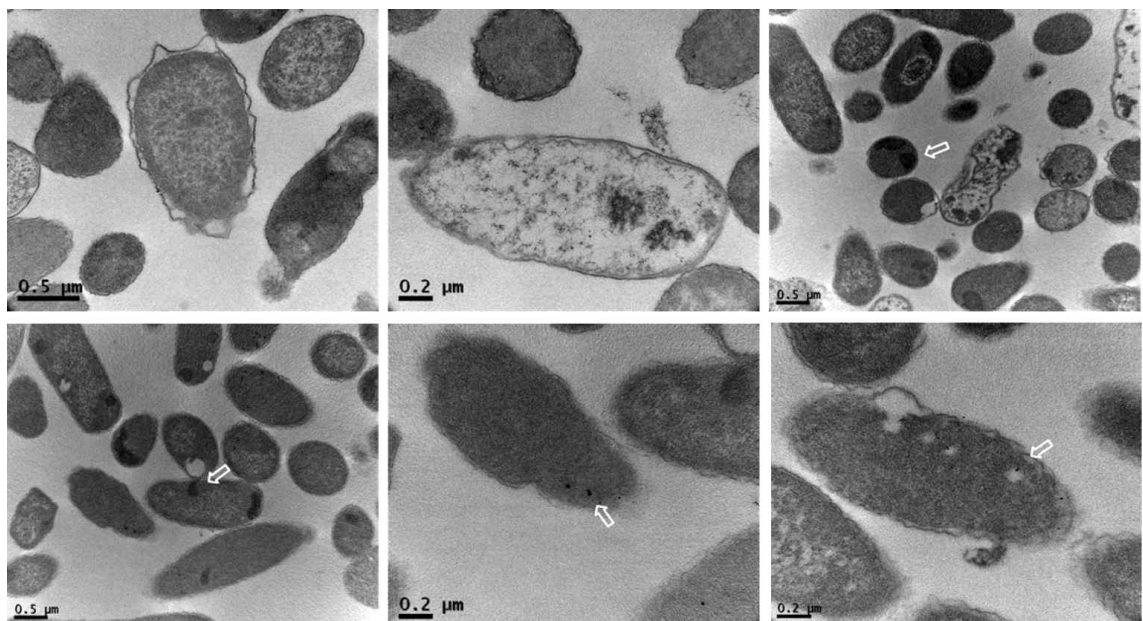


그림 5-70. PreproPG1 발현 및 활성에 대한 Immuno-gold TEM 분석 결과

- (4) 발현된 6xHis-preproPG1의 solubility 및 intracellular cleavage 확인
 - (가) Immuno-gold transmission electron microscopy (TEM) 분석 결과 발현된 preproPG1이 inclusion body에 위치함이 확인됨에 따라 solubility 확인 및 intracellular cleavage 확인을 위한 western blot을 수행
 - (나) IPTG를 이용한 발현 유도 후 0.25시간 (15분), 0.5시간 (30분), 1시간, 1.5시간 마다 샘플을 수집, soluble과 insoluble로 분리하여 샘플을 준비
 - (다) 생산된 PG1을 positive control로 하여 16% tricine gel을 이용하여 전기영동 수행 후 anti-PG1 antibody를 처리한 결과 mature 형태의 PG1 (2.2kDa)은 soluble, insoluble 어디에서도 detection 되지 않았고, preproPG1의 경우 양쪽 모두에서 detection 되었으나 대부분 insoluble의 형태로 발현됨을 확인(그림 5-71)

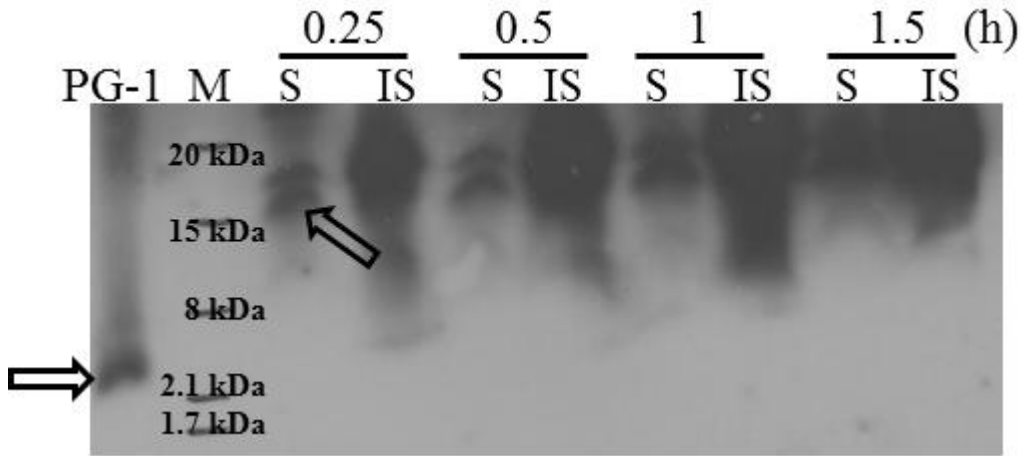


그림 5-71. 발현된 preproPG1의 solubility 및 cleavage 확인을 위한 western blot 결과

(5) PreproPG1 연구 결과 요약 및 향후 연구 계획

- (가) Cathelicidin family 중 하나인 PG1은 signal sequence, ProS (cathelin), PG1으로 구성된 유전자 구조를 가지고 있고, in vivo 발현 시 signal sequence 부분이 절단된 뒤 cap 부분의 ProS는 protease inhibitor로써 PG1이 분해되는 것을 막는 역할을 하는 것으로 알려짐
- (나) 또한 preproPG1은 활성을 갖지 않는 것으로 알려져 있으나 본 연구 결과 E.coli에서 발현 유도 시 세포벽을 파괴하고 천공 (pore)을 내어 항균 활성을 가지고, intracellular cleavage에 의한 것이 아님을 확인
- (다) 따라서 ProS (cathelin) 부분이 다른 기능을 가질 것으로 예상되어 추후 연구를 위한 새로운 클로닝을 실시(그림 5-72)

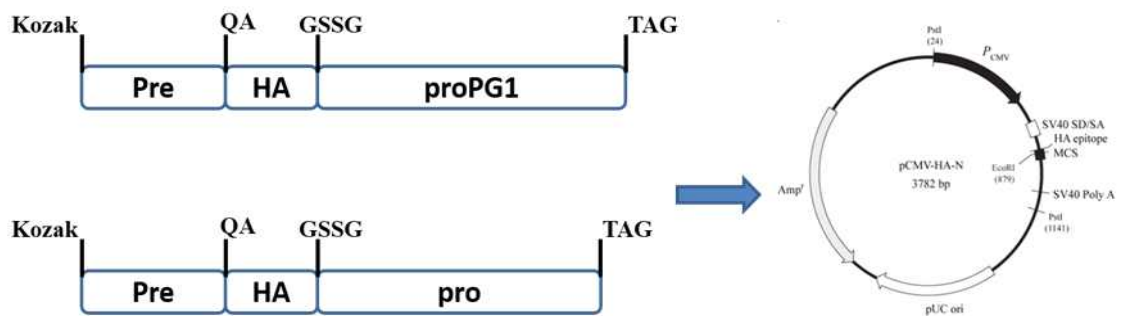


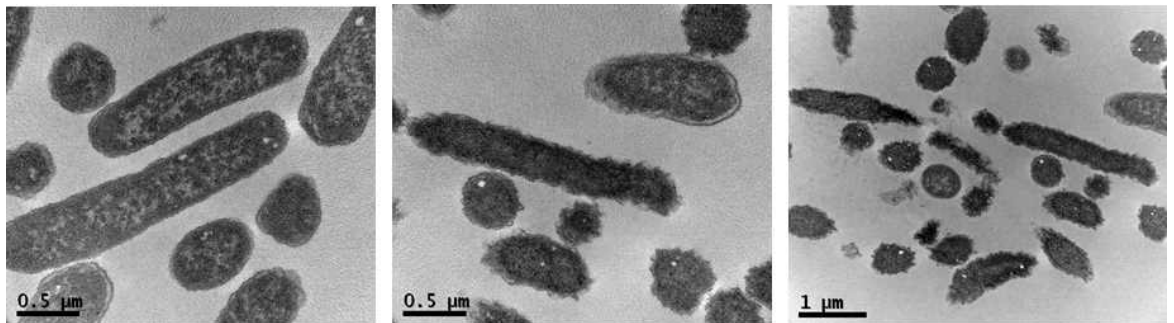
그림 5-72. Mouse neutrophil로의 transfection을 위한 construct

- ① PCR 기법을 이용하여 HA tag를 포함한 pro- 및 proPG1을 각각 pCMV vector로 삽입하는 2종의 클로닝을 수행, 현재 sequencing 기법을 이용한 sequence 확인 중
- ② 추후 mouse neutrophil로의 transfection을 수행하여 pro region의 기능 연구를 수행.

마. 전자현미경을 이용한 항미생물 펩타이드의 세포벽 파괴기전 연구

(1) 전자현미경을 활용한 PR26의 항균 활성 기전 분석

- (가) 4차년도 PR26의 항균 기전 연구에 대한 일환으로 PMAP36을 positive control로 사용하여 scanning electron microscope (SEM)을 이용하여 분석한 결과 PMAP36과는 다른 기전으로 항균력을 가지는 것으로 판단되므로 5차년도에는 transmission electron microscope (TEM)을 이용한 실험을 수행
- (나) 최적 항미생물 펩타이드 유전자 중 하나로 선정된 PR26는 wild type PR39의 truncated 형태로 wild type과 같은 antimicrobial activity를 가지는 것으로 알려져 있으나 현재까지 항균 메커니즘에 대해 명확히 규명되지 않았음
- (다) 이를 이해하기 위해 PR26를 처리한 후 transmission electron microscope (TEM)을 이용하여 membrane integrity와 structure를 관찰함으로써 박테리아의 세포막과 상호작용을 하는 지에 대한 연구를 수행하고자 함
- (라) 아무것도 처리하지 않은 E.coli를 negative control로 사용하고 생산된 PR26를 처리한 뒤 관찰한 결과 세포가 lysis 된 것을 확인하였고, 박테리아의 inner membrane의 integrity에 영향을 줌으로써 항균 작용을 하는 것으로 생각됨(그림 5-73)



< Negative control >

< Cell lysis by treatment of PR26 >

그림 5-73. TEM을 이용한 PR26의 항균작용 연구

바. Cyclic 항미생물 펩타이드 2종에 대한 정제시스템 구축 및 효력평가

(1) Cyclic 항미생물 펩타이드의 co-expression (1 l 배양액으로 scale-up)

- (가) 두 개의 intein과 결합된 fusion cyclic 항미생물 펩타이드를 chaperon과의 co-expression 시스템을 이용하여 solubility를 향상시킴에 따라 5차년도에서는 정제 및 cyclization 단계에 대한 최적화 연구를 수행(그림 5-74)



그림 5-74. Cyclic 항미생물 펩타이드 생산을 위한 construct

- (나) pET30b(+)와 pG-KJE8가 함께 형질전환된 BL21 single colony를 kanamycin과 chloramphenicol이 들어간 LB media 10ml에 넣어 37°C, 220rpm 조건 하에 12시간 동안 배양한 pre-inoculum을 이용하여 동일한 항생제 및 chaperone 발현을 위한 L-arabinose가 첨가된 1ℓ LB media에 inoculation 한 뒤 동일한 조건으로 OD₆₀₀ 값이 0.6~0.8 될 때까지 배양
- (다) Temperature와 inducer study를 통해 최적화 시킨 방법에 따라 100μM IPTG을 첨가 후 25°C, 220rpm 조건하에 6시간 배양한 뒤 500ml씩 나누어 centrifuge를 통해 pellet형태로 만들어 보관

(2) Cyclic 항미생물 펩타이드 생산을 위한 정제 및 cyclization 최적화

- (가) Co-expression된 Pellet으로부터 soluble 형태의 CD1과 RTD1을 분리하기 위해 sonication 기법을 이용, centrifuge를 통해 supernatant에 존재하는 soluble protein을 분리
- (나) One-step method 기법
 - ① Cyclic 항미생물 펩타이드 생산을 위한 construct는 클로닝 단계에서 his-tag을 가지도록 설계되었으므로 Ni-NTA chromatography 기법의 이용이 가능하기 때문에 fusion protein을 his-trap column에 binding 시킨 후 cyclization을 위해 화합물을 처리하는 one-step method 기법을 고안
 - ② 이는 His-trap column을 이용하여 purification과 cyclization을 한번에 수행하여 정제 과정을 단축시키기 위한 목적
 - ③ 선정된 RTD1과 CD1 중 CD1은 연구가 아직 진행되어 있지 않은 펩타이드 이므로 본 연구에서 이용한 intein에 대해 현재 나와 있는 제품의 매뉴얼을 따라 MESNA를 cyclization을 위한 화합물로 이용하고 (NEB. IMPACTTM-TWIN) RTD1의 경우 상대적으로 연구가 많이 이루어진 cyclic 항미생물 펩타이드로 이전의 유사한 연구를 토대로 reduced glutathione (GSSH)을 처리하도록 설계 (Gould, Andrew, et al. 2012)
 - ④ RTD1을 His-trap column에 binding시킨 후 100mM GSSH를 처리한 뒤 column을 막아 상온에서 이틀 동안 incubation한 뒤 500mM imidazole을 이용하여 column으로부터 elution(그림 5-75, 5-76)

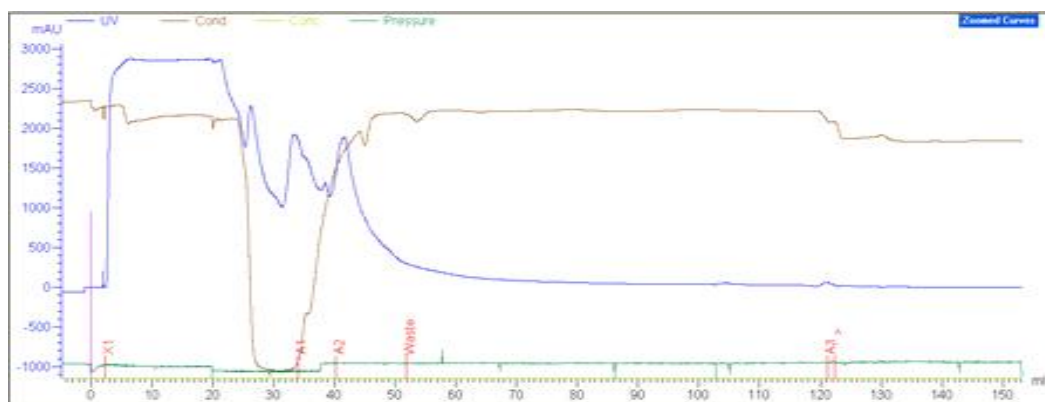


그림 5-75. His-trap column을 이용한 RTD1의 정제 및 cyclization (GSSH 처리 전)

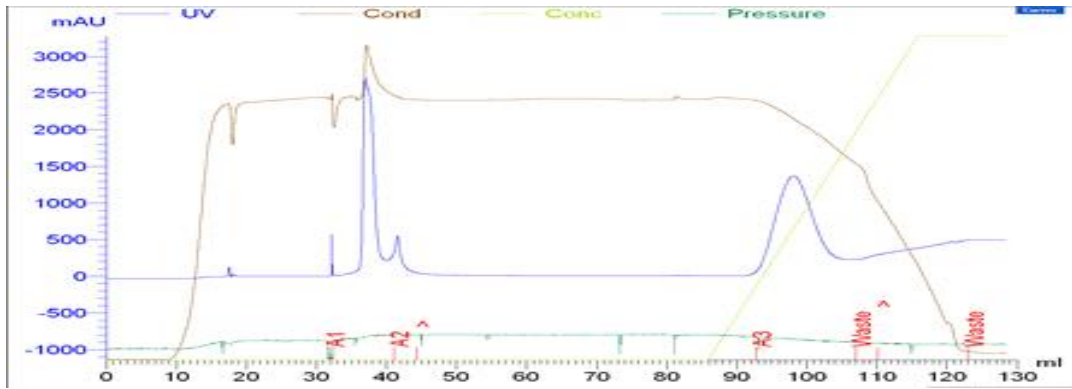


그림 5-76. His-trap column을 이용한 RTD1의 정제 및 cyclization (elution)

- ⑤ 각각 단계에서 수집한 샘플들을 16% tricine gel을 이용하여 전기영동하여 coomassie blue 염색 및 anti his-tag antibody를 이용한 western blot을 수행
- ⑥ 그 결과 RTD1 (2.2kDa)은 detection 되지 않았으나 C-말단에 위치했던 intein bands가 두 개 보임에 따라 cleavage가 일어났으나 cyclization 효율이 떨어지는 것으로 판단됨(그림 5-77)

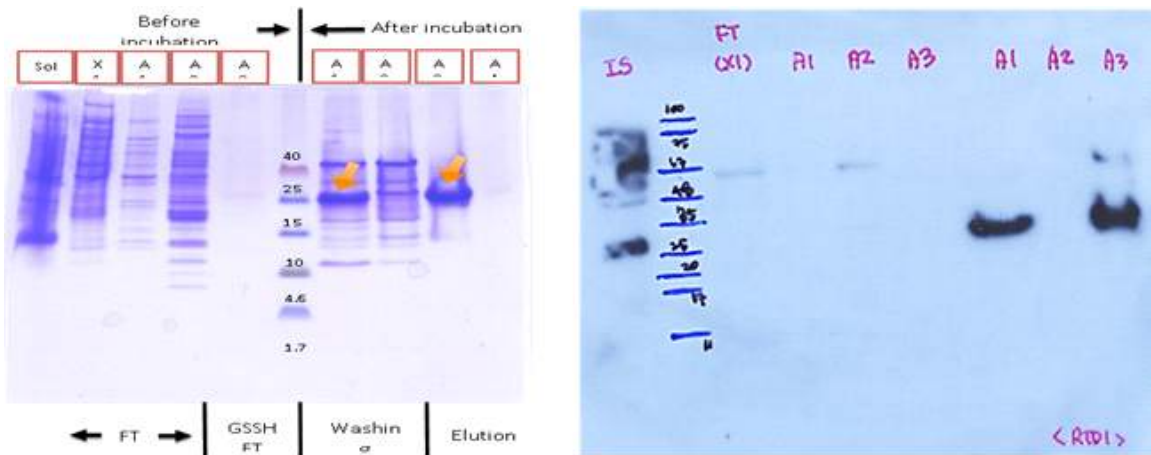


그림 5-77. One-step method 기법을 이용한 cyclization 결과

- ⑦ CD1의 경우 RTD1과 동일하게 soluble CD1을 His-trap column에 binding시킨 다음 화합물 처리 후 column을 막아 상온에서 이틀 동안 incubation한 뒤 500mM imidazole을 이용하여 column으로부터 elution하는 방법을 이용하였으나 단 cyclization을 위한 화합물을 GSSH 대신 MESNA를 이용(그림 5-78, 5-79)

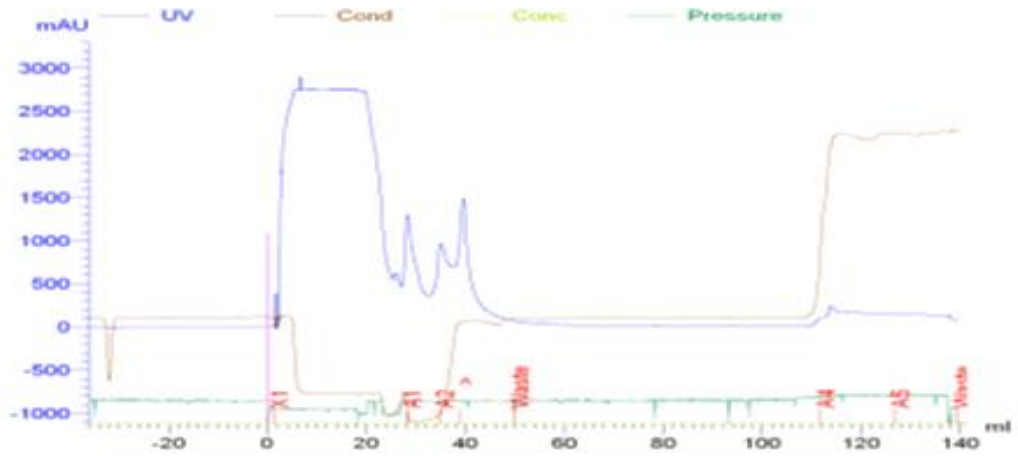


그림 5-78. His-trap column을 이용한 CD1의 정제 및 cyclization (MESNA 처리 전)

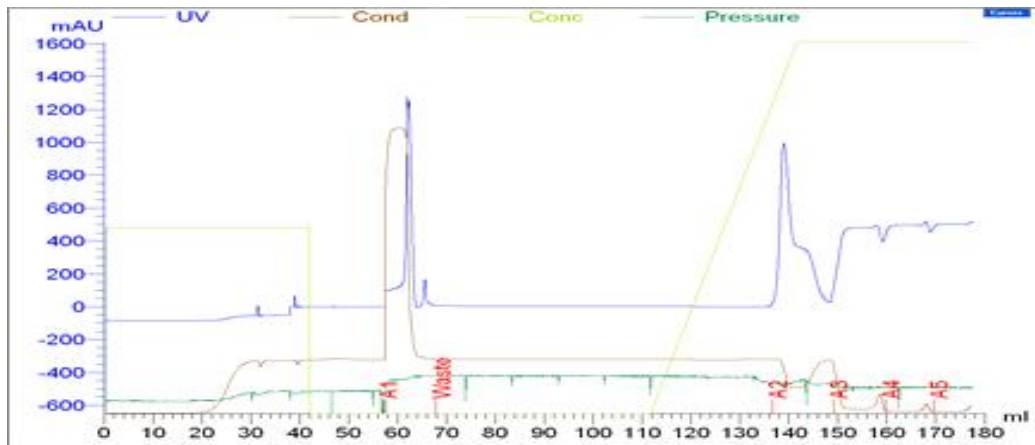


그림 5-79. His-trap column을 이용한 CD1의 정제 및 cyclization (elution)

- ⑧ 각각 단계에서 수집한 샘플들을 16% tricine gel을 이용하여 전기영동 하여 coomassie blue 염색 및 anti his-tag antibody를 이용한 western blot을 수행
- ⑨ 그 결과 CD1 (3.1kDa)이 detection되지 않았고 C-말단 intein band가 RTD1과 달리한 개만 detection됨에 따라 이 band가 cleavage된 intein 인지 cleavage가 되지 않은 intein인지 판단이 어려우며, cleavage가 일어났다 하더라도 cyclization 효율이 떨어지는 것으로 판단됨(그림 5-80)

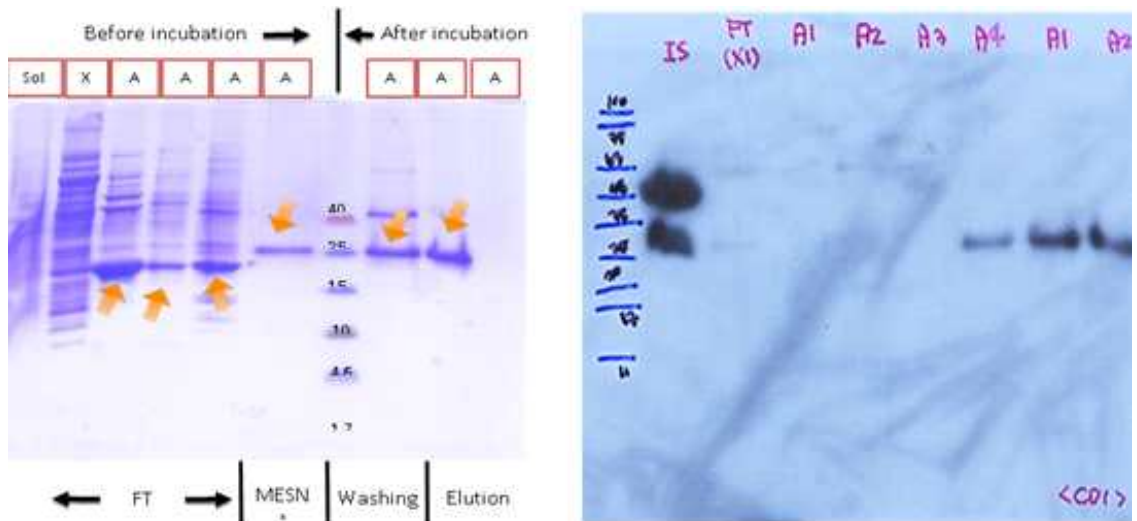


그림 5-80. One-step method 기법을 이용한 cyclization 결과

(다) Two-step method 기법

- ① Purification과 cyclization을 한번에 수행하여 정제 과정을 단축시키고자 One-step method를 적용하고자 하였으나 cyclization 효율이 떨어지는 것으로 판단 되어 MESNA 혹은 GSSH 농도 및 incubation 온도, 시간 등에 대한 연구를 수행하였에도 불구하고 cyclization 효율이 높지 않았음
- ② 따라서 His-trap column을 이용한 one-step method의 경우 cyclization 진행 시 단백질의 농도가 높아 MESNA 혹은 GSSH와의 상호작용이 어려운 것으로 생각됨
- ③ 이를 극복하기 위해 먼저 FPLC를 이용한 정제, 단백질 정량 후 His-trap column 대신 chitin beads를 이용하여 cyclization을 수행, purification과 cyclization step을 분리하여 수행하는 two-step method를 적용할 계획임

사. 항미생물 펩타이드의 지속적인 생산 및 관련과제 제공

- (1) 제 1 협동과의 협력연구를 위한 PG1, PMAP36, PR26, 총 3종의 펩타이드에 대한 발현 및 HPLC 정제를 수행하고 결과물을 협동과제에 제공

아. 5차년도 연구결과 요약 및 평가

- (1) 4차년도 펩타이드 생산의 고비용 문제로 인해 동물 산업을 위한 상품화는 어려울 것으로 판단되어 가축에서 인간을 대상으로 목표를 전환, 5차년도에서는 구축된 병원성 미생물 패널에 대한 항균력 검정 및 NaCl 농도에 따른 세포 독성연구, serum 내에서 생산된 PG1의 안정성 검정을 수행하고자 하였으나 건국대 호흡기 질병 관련 문제로 지연됨
- (2) 뿐만 아니라 협업을 위한 펩타이드 제공 및 생산된 펩타이드와 관련된 모든 연구들이 지연되었으나 현재 실험실 및 실험 기기들에 대한 접근이 가능해짐에 따라 펩타이드 생산을 시작함
- (3) 실험실이 폐쇄된 기간 동안 진행한 실험들 (PG1 transgenic mouse 및 preproPG1)에 대한 논문들을 준비 중임

- (4) 4차년도 PR26의 항균 기전 연구에 대한 일환으로 scanning electron microscope (SEM)을 이용하여 분석한 결과에 이어 5차년도에서 transmission electron microscope (TEM)을 이용한 실험을 완료
- (5) 두 개의 intein을 이용한 cyclic 항미생물 펩타이드의 대량생산 시스템을 구축을 위해 정제 및 cyclization 단계에 대한 최적화 연구를 수행 중이나 cyclization 효율이 높지 않아 이를 극복하기 위한 최적화 연구 수행 중
- (6) 펩타이드 생산이 끝나는 대로 협업을 위해 3종의 항미생물 펩타이드를 공급 예정

5. 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 및 상용화 기반 구축 (제3협동)

가. 가축 전염병 관련 병원성 균주에 특이적인 앵타머 개발

- (1) *Salmonella typhimurium* 특이 결합용 DNA 앵타머 소재 상용화 기반 구축
 - (가) 가축 전염병 관련 병원성 균주 *Salmonella typhimurium* 특이 결합용 최적 앵타머 2종 선별 및 2차원 구조 분석
 - ① 4차년도에 Post-SELEX를 통하여 확보한 *Salmonella typhimurium*에 특이적으로 결합하는 최적 DNA 앵타머 2종의 2차원 구조를 예측하기 위하여 Rensselaer polytechnic institute에서 제공하는 M-fold 프로그램을 이용하여 2차 구조로 이미지화함. *Salmonella typhimurium*에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 2종의 구조 형성 시 사용되는 buffer의 조성 및 구조 형성 온도를 입력하여 2차원 구조를 분석해본 결과, 다양한 loop를 나타내는 형태로 분석되었음 (그림 5-81).

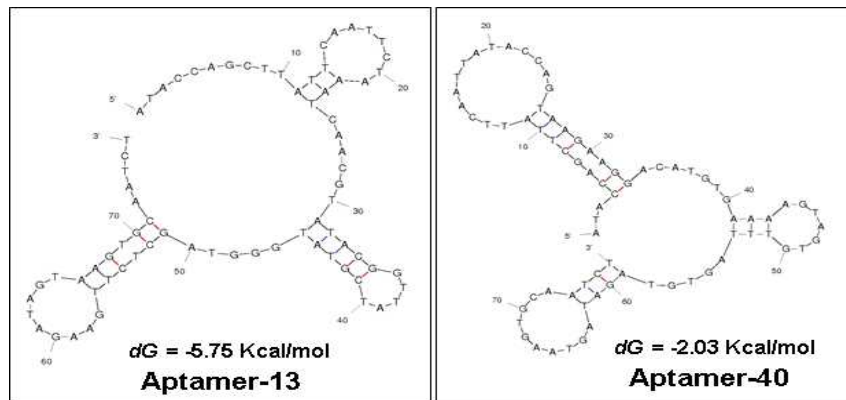


그림 5-81. *S. typhimurium* 특이결합 앵타머의 2차원 구조 분석

- (나) *Salmonella typhimurium* 특이 결합용 최적 DNA 앵타머 2종의 특이성 평가
 - ① 최적의 결합력을 갖는 앵타머로 선정된 STA_13과 STA_40 앵타머를 각각 SPR (Surface Plasmon Resonance) 기법을 이용하여 *Salmonella typhimurium* 균주에만 특이적으로 결합하는지 확인하기 위하여 *Salmonella typhimurium* 외 총 10종의 균주들과 친화력을 비교하고자 함. 먼저 스트렙타비딘이 고정되어있는 SA 센서 칩 표면을 활성화시키기 위하여 HBS-EP buffer를 유속 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 흘려주었고, 바이오틴이 표지된 STA_13과 STA_40을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 흘려줘 센서 칩 표면에 고정함 (그림 5-82).

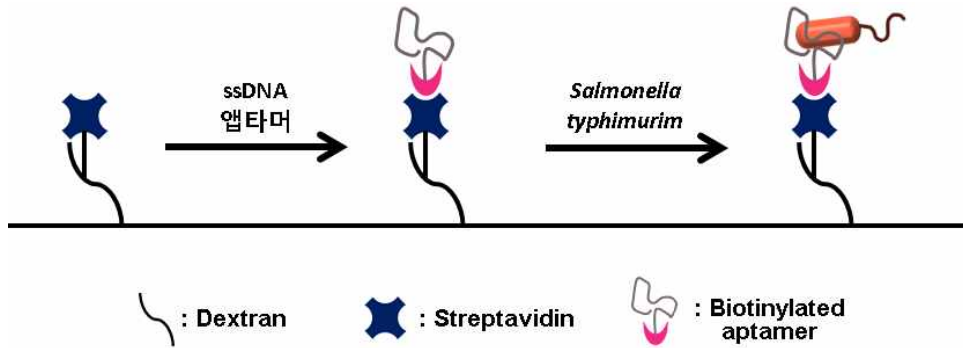


그림 5-82. 센서 칩 고정된 *Salmonella typhimurium* 검출용 앵타머 모식도

- ② *Salmonella typhimurium* 표면에 결합력을 갖는 최적 DNA 앵타머가 고정된 SA 센서 칩에 *Salmonella typhimurium*를 포함한 살모넬라 속 균주들을 대조균으로 처리하여 DNA 앵타머가 *Salmonella typhimurium*에 특이적으로 결합하여 친화력을 갖는지 측정함. 대조균 균주로서는 살모넬라 속 (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*), *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*가 사용됨.
- ③ STA_13 또는 STA_40 앵타머가 고정된 센서 칩에 살모넬라 속 (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*), *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* 균주들을 각각 LB 배지에 생장시킨 후 생균의 표면을 세척하여 BHI 배지에 풀어주고 각각 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 10분 동안 흘려주어 측정함. 정략적 친화도 평가를 위하여 각각의 균주들은 아무것도 결합시키지 않은 센서 칩 (채널 1)과 *Salmonella typhimurium* 특이 결합 DNA 앵타머가 고정된 센서 칩 (채널 2)에 균주 용액을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 처리하여 *Salmonella typhimurium* 특이 결합 DNA 앵타머와의 친화도를 정량화함(그림 5-83, 5-84).

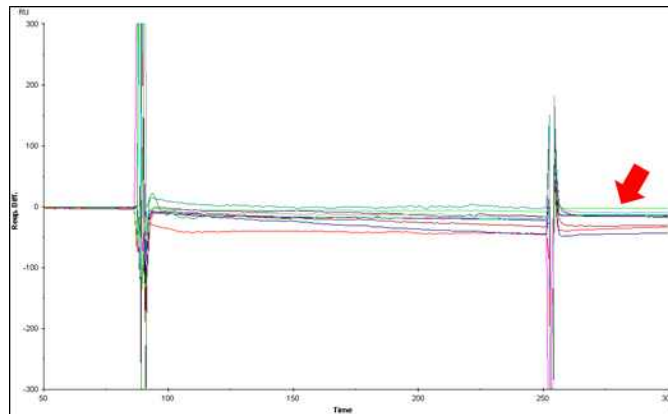


그림 5-83. STA_13 앵타머 SPR 실험 결과

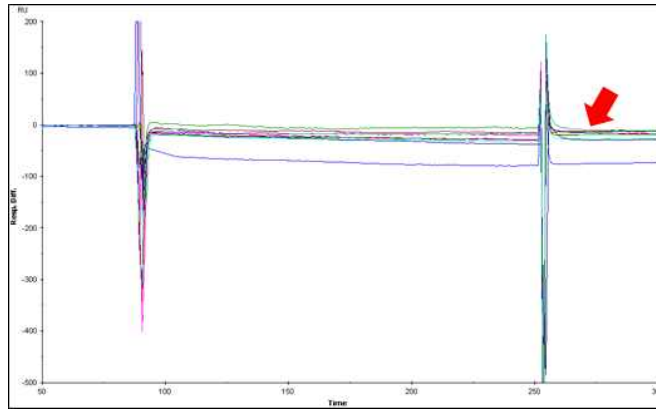


그림 5-84. STA_40 앵타머 SPR 실험 결과

Sample Name	STA_13 앵타머 Affinity (K_d)	STA_40 앵타머 Affinity (K_d)
<i>Salmonella typhimurium</i>	$4.41e^{-12}$	$3.57e^{-11}$
<i>Salmonella dublin</i>	$7.98e^{-09}$	$3.14e^{-08}$
<i>Salmonella choleraesuis</i>	$3.35e^{-08}$	$3.07e^{-08}$
<i>Salmonella enteritidis</i>	$1.63e^{-08}$	$3.12e^{-08}$
<i>Escherichia coli</i>	$3.02e^{-08}$	$3.11e^{-08}$
<i>Enterobacter cloacae</i>	$3.12e^{-08}$	$5.15e^{-08}$
<i>Klebsiella pneumonia</i>	$3.03e^{-08}$	$3.07e^{-08}$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$3.06e^{-08}$	$3.04e^{-08}$
<i>Shigella sonnei</i>	$3.2e^{-08}$	$1.67e^{-08}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4.86e^{-08}$	$3.07e^{-08}$

그림 5-85. *Salmonella typhimurium* 특이 결합 DNA 앵타머 STA_13와 STA_40의 *Salmonella typhimurium* 균주 특이성 평가

- ④ 실험결과, STA_13 앵타머, STA_40 앵타머 모두 대조군과 비교하여 *Salmonella typhimurium* 균주에서 가장 높은 친화력을 가지고 있는 것을 확인함(그림44,45). STA_13 앵타머의 경우, 대조군에 비해 표적 균주인 *Salmonella typhimurium*에서 가장 낮은 해리상수 (K_d)를 갖는 것을 확인하였고, STA_40 앵타머에서도 대조군에 비해 *Salmonella typhimurium*에서 가장 낮은 해리상수를 갖는 것을 확인함. 이를 통해 *Salmonella typhimurium*에 대하여 앵타머의 높은 친화력으로 해리상수가 낮게 측정되는 것을 확인할 수 있었음(그림 5-85).

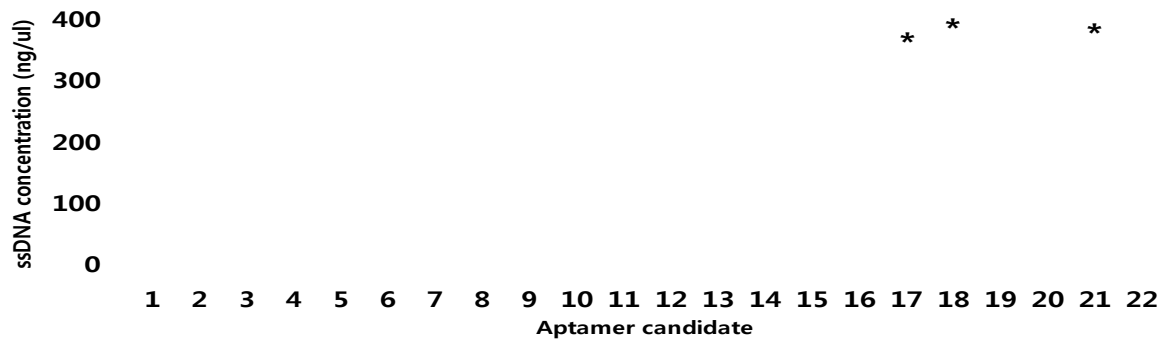
나. 가축병원성 바이러스에 특이적으로 결합하는 앵타머의 친화력 및 특이성 평가

(1) 가축병원성 바이러스인 PRRSV 결합용 DNA 앵타머의 소재 개발 및 친화력 평가

(가) POST-SELEX를 통한 PRRSV 최적 앵타머 3종 선별

- ① 4차년도에서 확보한 9round에서 높은 친화력을 보였던 4종 (앵타머번호 16, 29, 47, 52)의 앵타머가 8round에서 서열분석 진행 시 일치하던 앵타머가 있는 것을 확인함. 8round에서 POST-SELEX 시 9round에서 선별된 앵타머와 동일한 앵타머가 선별될 것을 예상하고 최적 앵타머 선별을 위하여 8round 에서도 POST-SELEX를 진행함.

- ② 8round로부터 확보한 22종의 앵타머 100 bp의 주형 DNA들은 PCR을 통해 증폭하여 준비하였으며 순수한 ssDNA만을 확보하기 위하여, 정제된 dsDNA에 열-냉각기법과 스트렙트아비딘(Pierce, USA)을 사용하여 회수함. 확보한 22종의 ssDNA들은 85°C에서 5분 동안 끓인 후 상온에서 서서히 식혀 안정한 3차원 구조를 형성한 후 세포 표면에 PRRSV를 지닌 MARC-145 cell line과 결합시킴.
- ③ PRRSV에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머만을 선별하기 위해 원심분리와 PBS를 이용한 세척 방법으로 PRRSV에 결합하지 못한 앵타머를 제거하고, elution buffer(TE buffer)를 이용해 PRRSV에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 회수함. PRRSV가 아닌 MARC-145 cell line에 비특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제거하기 위해 매 SELEX 과정마다 PRRSV를 가지고 있지 않은 MARC-145 cell line을 이용한 네가티브 선별 (negative selection)을 진행하여, PRRSV에만 특이적으로 결합할 수 있는 DNA 앵타머를 선별한 후 각각의 녹여낸 ssDNA 앵타머들의 농도를 측정하여 POST-SELEX를 통해 높은 농도로 회수된 3종의 앵타머를 확인하였음(그림 5-86).



No.	Conc. (ng/uL)	No.	Conc. (ng/uL)	No.	Conc. (ng/uL)
1	168	9	201.1	17*	356.2
2	137.8	10	306.4	18*	379.2
3	134.6	11	163.8	19	134.3
4	161.2	12	169.7	20	282.6
5	179.9	13	180.2	21*	370.7
6	165.6	14	172.9	22	194.3
7	168.6	15	106.9		
8	131.4	16	242.9		

그림 5-86. POST-SELEX 결과

- ④ POST-SELEX를 결과, 17번, 18번, 21번, 3종의 앵타머가 최적의 농도를 회수될 수 있었으며 최적 농도로 회수된 앵타머 3종의 구조 분석을 위하여 m-fold program을 이용하여 분석하였음 (Nucleic Acids Res. 2003 (31;13):3406-15). m-fold는 web 기반의 nucleic acid 구조를 예측해주는 프로그램으로 구조적 특성 예측에 활용됨. PRRSV에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 3종의 구조 형성 시 사용되는 buffer의 조성을 입력하여 2차원 구조를 분석해본 결과, 다양한 loop을 나타내는 형태로 앵타머가 분석되었음 (그림 5-87).

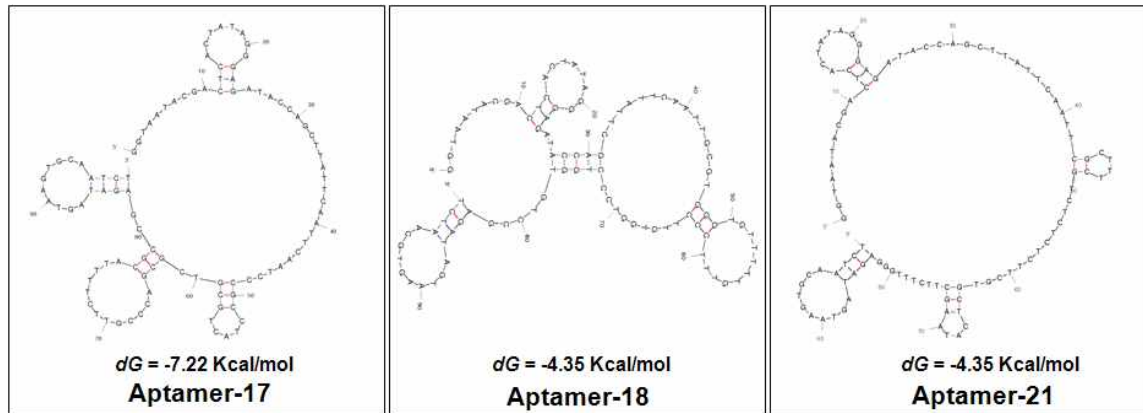


그림 5-87. PRRSV에 특이적으로 결합하는 앵타머 3종의 2차 구조

(나) PRRSV 특이결합용 최적 앵타머 3종의 PRRSV에 대한 특이적 결합력 평가

- ① 앵타머 3종이 PRRSV 감염 cell에만 특이적으로 결합하여 PRRSV 감염 cell만을 검출할 수 있는지 확인하기 위하여 앵타머 기반의 샌드위치 플랫폼 (Aptamer-based Sandwich assay; ABSA)을 개발하고자 하였음 (그림 49). Streptavidin이 코팅된 96-well plate (Corning, USA)에 Biotin이 라벨된 앵타머 17, 18, 21 번 각각을 1 μ M로 계산하여 처리함. 상온에서 30분 동안 교반하며 고정시킨 후 용액을 제거하였음. DNA 앵타머가 고정된 well를 1X PBS 버퍼 100 μ l로 3회 헹궈준 후, PRRSV 감염 cell (PRRSV-infected cell)과 Negative control로서 돼지인플루엔자바이러스에 감염된 cell (SIV-infected cell)을 처리한 후 4°C에서 1시간 동안 교반하며 반응시킴.
- ② 이후 각 well 마다 들어있는 용액들을 제거하고 1X PBS 버퍼 100 μ l로 3회 헹궈주어 결합하지 못한 비특이적인 물질들을 세척하여 제거될 수 있도록 함. HRP-conjugated aptamer를 100ul 처리하고 상온에서 20분 반응시켜 샌드위치 구조로 PRRSV를 잡을 수 있도록 함.
- ③ 각 well마다 존재하는 용액을 제거한 후 1X PBS buffer로 washing 한 후, TMB substrate를 100ul 씩 처리함. 상온에서 5min 반응 후 Stop solution (H₂SO₄)을 넣어 반응을 종결시키고 Absorbance 450 nm에서 각 well마다의 색 차이를 ELISA Reader(Molecular Device)로 측정하였음(그림 5-88).

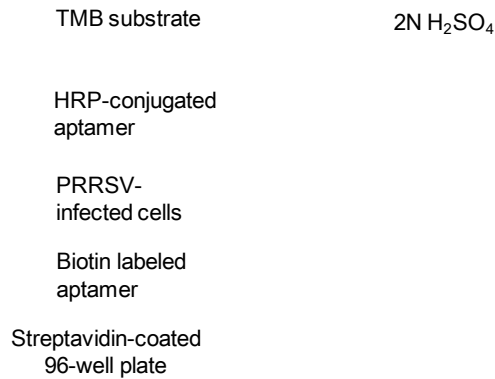


그림 5-88. 앵타머 기반의 PRRSV 검출 시스템 (ABSA) 모식도

- ④ 분석결과, 앵타머 17, 18, 21번을 고정시켰던 well에서만 PRRSV 감염 cell들이 결합하여 TMB가 HRP에 의해 분해되어 높은 수치로 측정되어 검출된 결과를 확인할 수 있었음. Negative control과 PRRSV 감염 cell이 없었던 well에서는 검출이 되지 않았음. PRRSV 결합용 DNA 앵타머가 PRRSV 감염 cell에 특이적으로 결합하여 선택적으로 검출 및 진단 할 수 있음을 확인할 수 있었으며 PRRSV에 대한 선택적 진단 및 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었음(그림 5-89).

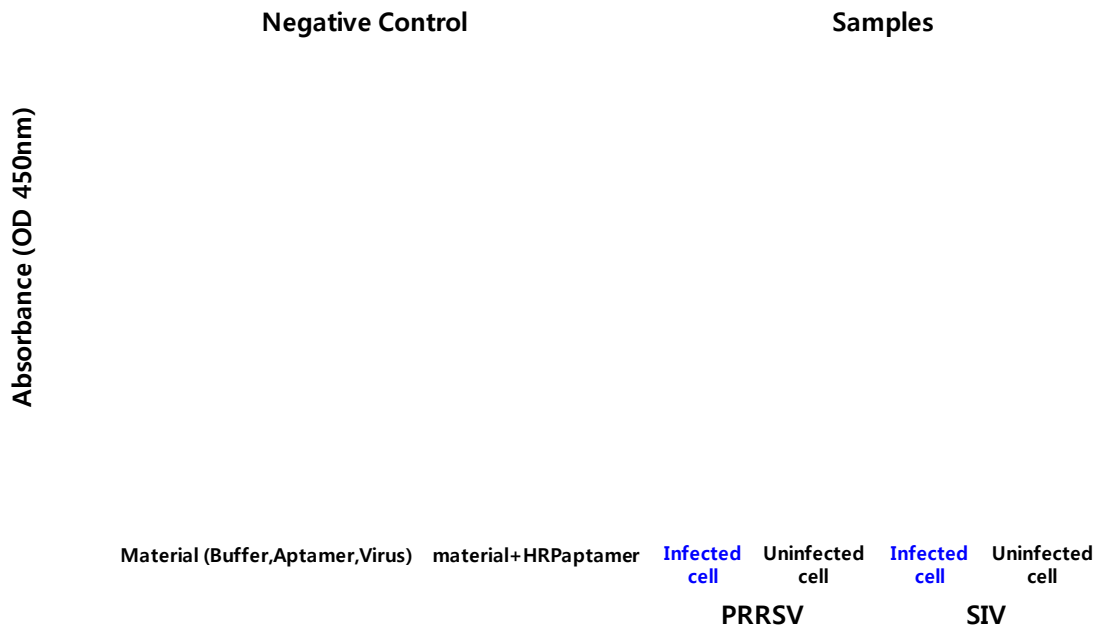


그림 5-89. 가축 전염병 특이결합 앵타머의 modification에 따른 안정성 평가

(다) PRRSV 특이결합용 최적 앵타머 기반의 ELISA kit 활용 가능성 확인

- ① PRRSV의 앵타머를 이용하여 ELISA kit 형태의 육안으로 확인이 가능한 검출 시

시스템을 개발하고자 하였음. 본 연구실의 세포배양 설비가 구축되어있지 않아 선행 연구로서 세균(bacteria)을 이용한 선별 플랫폼을 시행해보고자 하였음. 세균을 검출하기 위한 앵타머로서 2차년도와 3차년도에 연구되었던 *Salmonella typhimurium* 과 *Shigella sonnei*를 이용하고자 하였으며 두 균주에 각각 높은 친화력을 보였던 앵타머를 이용하여 진행함(그림 5-90).

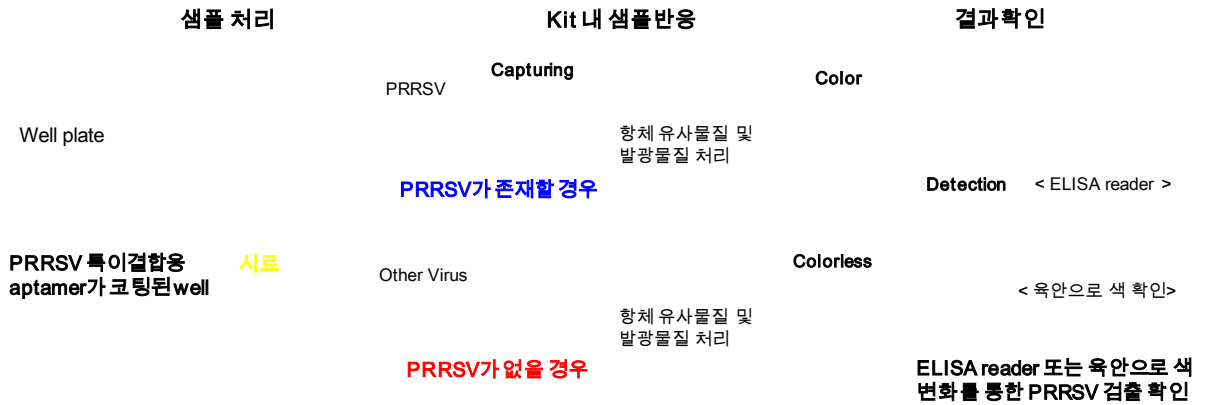


그림 5-90. 앵타머 기반의 PRRSV 검출 시스템 ELISA kit 예상 모식도

- ② 본 연구과제를 통해 확보한 *Salmonella typhimurium*과 *Shigella sonnei*의 최적 앵타머를 각각 사용하여 표적 균주만을 특이적으로 검출한지 확인하며 균주들의 CFU (colony forming Unit, CFU/ml)가 농도별로 처리되었을때도 농도별로 민감하게 검출되는지를 확인하고자 함. *Salmonella typhimurium* 검출용 앵타머로서 선별된 앵타머 13번(ST-13)을 이용하고자 하였으며 *Shigella sonnei* 검출용 앵타머로서 SS-12 앵타머를 사용함.
- ③ 앵타머 2종 ST-13과 SS-12는 앵타머 서열의 5'방향에 아민기(-NH₃)를 modification하여 Bioneer에 합성 의뢰하여 확보함. ST-13과 SS-12는 1uM로 계산하여 넣어준 후 50ul 용량까지 멸균수로 채워주고 2X SELEX buffer를 50ul 넣어 준비함. 85°C에서 5분간 끓여준 후 상온에서 식혀주며 3차원 구조를 형성시킴. 3차 구조를 만든 *Salmonella typhimurium*과 *Shigella sonnei* 결합용 앵타머 ST-13과 SS-12를 각각 아민기가 결합할 수 있도록 NOS group (N-N-oxysuccinimide esters group)코팅된 96well plate에 1uM 농도로 100ul씩 처리하여 1시간 교반하며 반응시킴. 상층액을 제거 한 후 1X TBS buffer 100ul씩 처리하여 결합하지 못한 앵타머들을 제거하였음. 각 broth medium에서 배양한 *S. typhimurium*과 *S. sonnei* 균체를 OD₆₀₀ 0.7까지 배양한 후 각각 동일한 CFU로 희석하여 계산한 후 각각의 앵타머가 처리된 well에 최종 용액이 100ul이 되도록 처리한 후 1시간 교반하며 4°C에서 반응시킴. CFU는10⁻¹단위로 희석하며 10⁸~10³CFU/ml까지 6개의 샘플을 처리하였음.
- ④ 각 well마다 들어있는 용액들을 제거하고 1X TBS buffer 100ul로 3회 헹궈주어 앵타머와 결합하지 못한 물질 및 세균들은 세척하여 제거될 수 있도록 함. 해당 well에 *Salmonella typhimurium* 1차 항체를 1:10000으로 희석하여 100ul씩 처리하고

Shigella sonnei 1차 항체도 1:15000으로 희석하여 해당 well에 100ul씩 처리하고 1시간 반응시킴. 상층 제거 후 해당 well에 HRP가 고정된 2차 항체를 1:20000으로 희석하여 각각의 well에 100ul씩 처리한 후 1시간 반응시킴. 반응이 끝난 후 모든 well에 TMB substrate를 100ul씩 처리한 후 5분 반응시킴. Stop solution(1M H₂SO₄)을 처리하여 반응시킨 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였음.

- ⑤ Control 샘플들로서 salmonella typhimurium와 Shigella sonnei 균주, 1차 항체, 2차 항체, 배양 배지 (BHI broth medium,, Nutrient broth medium), 1X TBS buffer를 처리하여 negative control로서 사용하였으며 positive control 로서 균주들을 직접적으로 well에 고정시킨 후 항체들을 처리하여 확인하였음(그림 5-91).

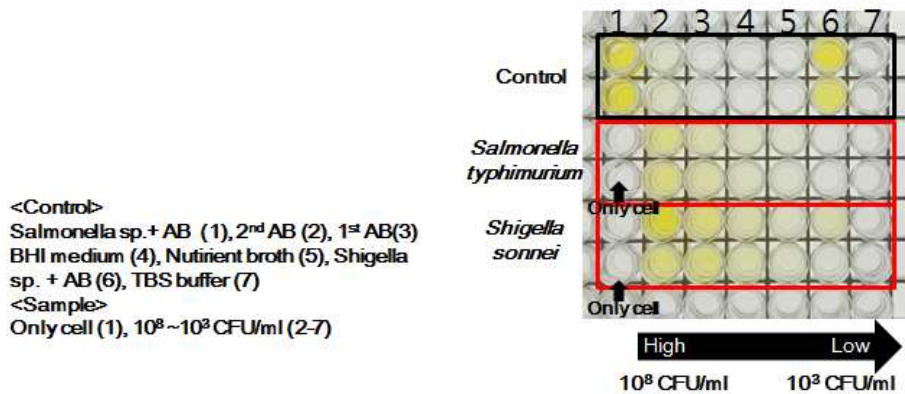


그림 5-91. salmonella sp.와 Shigella sp. 농도별 검출 앵타머 기반 kit

- ⑥ 각 균주에 특이적으로 결합하는 앵타머를 well 바닥에 각각 코팅하여 균주들을 처리한 결과, 코팅된 앵타머가 균주와 민감하게 결합하여 균주의 희석 배수에 따라 검출 결과도 비례적인 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었음(그림47). salmonella sp. 의 경우, 10⁸ CFU/ml부터 10³ CFU/ml 까지 비례적으로 감소하는 것으로 나타났으며 shigella sp.의 경우, 10⁶ CFU/ml부터 10³ CFU/ml 까지는 균체 양에 따라 수치가 감소하는 것을 확인하였음 (그림 5-92).
- ⑦ ELISA kit방법으로 적용한 실험으로서, salmonella spp.와 Shigella spp.처럼 가축전염병 유발 세균(bacteria) 수준에서 농도별 검출이 가능한지 여부를 판단할 수 있는 실험이었음. 본 ELISA kit 시스템 기반의 앵타머 활용 평가 실험은 PRRSV처럼 바이러스에 표적물질 검출용으로도 적용 가능할 기술임을 보여주었으며 PRRSV 감염 cell과 감염되지 않은 cell 수준에서도 진단할 수 있을 것으로 사료됨.

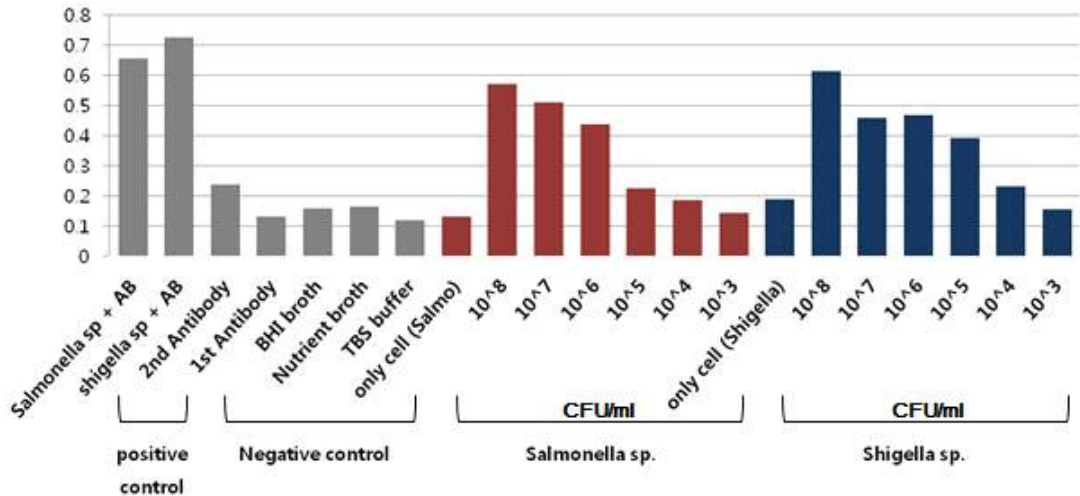


그림 5-92. 앵타머 기반 ELISA kit의 세균 농도별 처리 결과

다. 앵타머 상용화를 위한 대량 생산 시스템 구축

(1) 효율적인 대량생산 (Scale-up)을 위한 PCR 조건 확인

(가) 수인성 질환 인자 *Vibrio* spp. 검출용 앵타머 대량 생산 시스템 구축

- ① 지속적인 앵타머 공급을 위하여 대량 생산 (Scale-up) 시스템을 구축하고자 하였으며 생산된 앵타머의 기존 친화력을 재연하여 보여줄 수 있을지 확인함. 확인 앵타머로서 본 연구 4차년도를 통해 확보한 *Vibrio parahaemolyticus*를 특이적으로 검출할 수 있는 선별된 앵타머 VPCA-1를 사용함.
- ② 100bp 크기의 VPCA-1을 증폭하여 회수하기 위한 방법으로 PCR을 사용하였으며 여러 조건의 Taq polymerase의 처리에 따른 VPCA-1의 회수율을 확인함. 100 bp VPCA-1 주형 DNA 1ul, 10X PCR 완충용액 5ul, 각 2.5 mM dNTP 4ul, 25 μM 정방향 프라이머 2ul, 25 μM 비오틴화된 역방향 프라이머 2ul 로 구성되도록 함. Ex Taq polymerase (Takara, Japan)는 0.3ul (1 unit/ul)는 여러 농도로 처리하여 최적 PCR 발현 농도를 확인하고자함. 0.0125, 0.025, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3 ul로 다양하게 처리하였으며 최종 volume이 50μl가 되도록 증류수로 채워주었음.
- ③ PCR 반응 조건은 우선 95°C에서 5분간 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초간 반응을 20주기 반복한 후, 72°C에서 5분간 추가로 신장시키는 반응을 이용하였음. PCR 반응 후 4 μl를 취하여, 2% 아가로스 겔 전기영동을 통하여 100bp 크기에서 밴드가 나타나는지 증폭 산물을 확인하였음(그림 5-93).

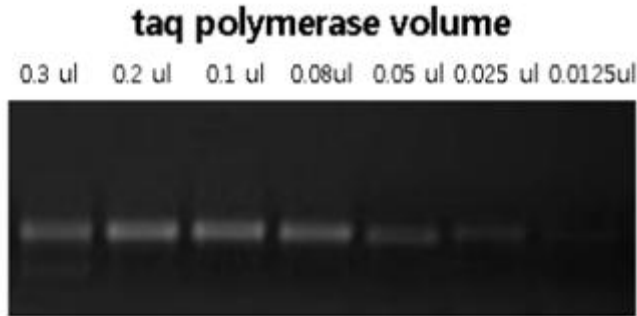


그림 5-93. Taq polymerase 처리양에 따른 VPCA-1의 PCR 결과

- ④ Taq polymerase의 처리 양에 따라 PCR 반응 결과가 다르게 나타남. Taq polymerase 농도가 0.2ul 이하로 처리될 경우 20cycle의 반응 대비 얻을 수 있는 DNA의 농도가 낮은 것을 확인할 수 있었으며 Taq polymerase를 0.2ul 보다 많이 처리할 경우 오히려 비특이적인 반응으로 인해 20cycle 반응 대비 100bp 보다 낮은 크기에 DNA 밴드가 생긴 것을 확인할 수 있었음. 최적 DNA 앵타머 증폭 농도 조건으로는 Taq polymerase가 0.2ul 일 때이며 이 조건은 20cycle로 전체 volume 50ul를 진행하였을 시 최적임을 알 수 있었음 (그림 5-93).
- ⑤ PCR 반응을 통해 확보한 DNA는 2% 아가로즈 겔에서 전기영동을 통해 확인 후 실제 정량적인 농도 확인도 하기 위하여 Nano drop을 이용하여 PCR 결과 생성된 DNA들의 농도를 측정하였음. Taq polymerase 농도 확인 시 0.2ul 이상부터는 PCR product 농도가 0.8 mg/ul로서 큰 차이가 확인되지 않아 최적 농도로서 0.2ul를 사용하는 조건으로 확인함 (그림 5-94).

Taq polymerase volume (μl)	PCR product concentration ($\text{mg}/\mu\text{l}$)
0.3	0.83
0.2	0.83
0.1	0.79
0.08	0.76
0.05	0.48
0.025	0.21
0.0125	0.02

그림 5-94. Taq polymerase 처리양에 따른 VPCA-1 앵타머 확보 농도

- ⑥ 앵타머는 ssDNA 로 이뤄진 구조로서 PCR 진행 후 ssDNA를 확보하기 위하여 streptavidin을 이용하여 ssDNA를 확보하거나 Asymmetric PCR을 통해 ssDNA 만을 상대적으로 많이 확보하여 회수함. 두 방법 모두 PCR 진행 후 DNA 만을 확보하기 위하여 PCR 정제(purification) 단계가 필수적이며 정제 시 손실되는 DNA의 양도 최소로 해야 대량생산을 위한 조건 확립이 이뤄질 것으로 판단하였음. 본 실험은 PCR product로부터 ssDNA로 이루어진 앵타머의 회수는 dsDNA용으로 개발된 상용화된 kit를 이용하는 것 보다 이론을 바탕으로 직접 정제하는 에탄올 침전법(EtOH precipitation)이 더 높은 효율로 ssDNA 앵타머를 회수할 수 있을 것이라 예상하였으며 실제 회수율을 확인하고자 실험을 진행함.

- ⑦ 확보한 ssDNA에 단백질 및 불순물 제거를 위하여 동량의 PCI(Phenol:chloroform: isoamylalcohol=25:24:1)를 처리한 후 vortexing 하여 강하게 섞어준 후 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액만을 회수함. tRNA와 3 M 소듐 아세테이트 (sodium acetate, pH 4.5), 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에서 1시간 이상 반응시킴. 반응 후에는 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 ssDNA만을 tube 바닥에 가라앉게 하여 회수함. 회수한 ssDNA는 65°C에서 건조시킨 후, 50ul의 증류수에 녹였음. 회수한 ssDNA 중 4ul를 취하여 2% 아가로스 겔을 이용하여 실험 방법에 따른 ssDNA 회수율을 비교하여 정확한 크기의 밴드가 나타나는지 확인함 (그림 56). 비교 실험으로서 상용화되어있는 PCR purification kit (QIAGEN)을 이용하여 ssDNA의 회수율을 확인함(그림 5-95).

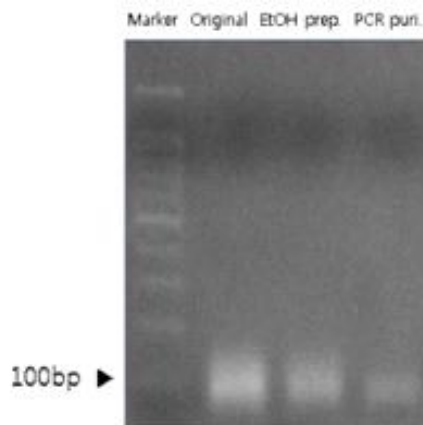


그림 5-95. 정제 방법에 따른 VPCA-1 앵타머 회수율 확인

- ⑧ ssDNA 앵타머의 회수율을 확인한 결과, PCR purification kit를 사용하여 정제한 DNA의 회수율 보다 에탄올 침전법으로 정제하여 회수된 DNA 농도가 더 높은 것을 확인할 수 있었음. 정제하기전 농도(Original)보다 정제한 농도들이 비슷하지는 않지만 ssDNA 확보를 위한 에탄올 침전법(EtOH prep.)을 사용한 것이 PCR purification (PCR puri.) kit를 사용한 것 보다 전기영동상에서 더 높은 농도로 회수되는 것을 확인함.
- (나) SPR을 통한 대량생산 (scale-up) 앵타머의 안정성 평가
- ① 앵타머 대량 공급을 위하여 대량 생산 (Scale-up) 시스템을 구축하고자 하였으며 구축한 생산 시스템으로 앵타머를 확보한 후 기존의 앵타머와의 효능의 재연성을 확인하고자 친화력을 측정함. 합성 의뢰하여 제작한 앵타머와 대량증폭하여 본 연구실에서 제작한 앵타머를 각각 SPR SA칩에 고정시킨 후 *Vibrio* spp. 균주를 사용하여 친화력을 측정하였음.
- ② SA칩에 각각의 앵타머를 고정시킨 후 동일한 조건으로 *Vibrio parahaemolyticus*를 흘려줌. SPR 친화력 실험 결과, 합성하여 제작한 앵타머와 직접 연구실에서 대량 생산으로 확보한 ssDNA 앵타머의 친화력에서 큰 차이가 확인되지 않았으며, 합성한 앵타머만큼 대량발현하여 확보한 앵타머도 높은 친화력으로 앵타머의 *Vibrio* spp에 대한 특이성 및 친화력에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었음 (그림 57). SA칩에 고정하여 확인한 SPR 결과는 기존 앵타머와 동일한 특이성과 친화력

으로 Scale-up 생산을 통한 앵타머의 안정성을 평가할 수 있는 기회가 될 수 있었음(그림 5-96).

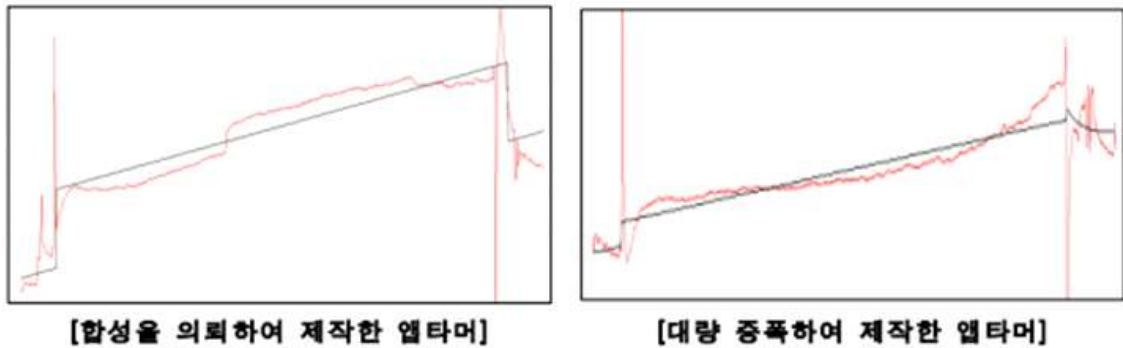


그림 5-96. 정제 방법에 따른 VPCA-1 앵타머 회수율 확인

라. 목적 단백질 탐지하는 앵타머 블랏 (Aptamer blotting) 시스템 개발

(1) GST 단백질 특이결합 앵타머 소재 개발

(가) DNA 앵타머 라이브러리 준비 및 GST 단백질과의 SELEX

- ① 단백질 정제 시 융합 단백질로 많이 사용되는 GST 단백질 탐지에 널리 활용되고 있는 기존의 anti-GST 항체를 대체할 수 있는 DNA 앵타머 기반으로 하는 새로운 형태의 GST 단백질 탐지 시스템을 개발하고자 하였음. 또한 일반적인 생물학적 분자를 시각화하기 위하여 널리 활용되고 있는 Dig 탐지에 널리 활용되고 있는 기존 anti-Dig을 이용한 탐지 시스템을 대체하는 DNA 앵타머 기반의 새로운 형태의 Dig 탐지 시스템을 개발하고자 하였음.
- ② GST 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선별하기 위하여 기 제작 확보한 ssDNA 95 ul에 증류수 55 ul을 첨가하고, 2X PBS 용액 150 ul을 첨가한 후 95°C에서 5분간 끓여 변성(Denaturation) 시켰다가 상온에서 서서히 식혀 ssDNA 앵타머의 안정한 3차원 구조를 형성시킴.
- ③ GST 결합 컬럼(Affinity column)을 제작하기 위하여 먼저 pGEX 4T-1 벡터가 BL21(DE3) 균주에 형질전환 된 형질전환체를 LB 배지(0.5% 효모 추출물, 1% 박토펙톤, 0.5% NaCl)에 종균 배양함. 접종 후, 37°C, 200 rpm 조건에서 12 시간 이상 배양 후, 종균 무세포 배양액의 일부를 2차 배양 배지(LB 배지 + 100 mg/L 암피실린)에 접종(1%)한 다음 37°C에서 200 rpm으로 배양함. 배양 중 OD₆₀₀ 값이 0.6 - 0.7에 이르렀을 때에 IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)를 1 mM의 농도로 첨가하고 동일한 조건에서 4시간 더 배양하는 방법으로 GST 단백질의 과발현을 유도함. GST 단백질 과발현을 수행한 세포 배양액을 10분간 13,000 rpm의 조건으로 원심분리를 수행하여 균체만 따로 분리하고, 상기 원심분리를 통하여 수득한 균체는 10 mM Tris-HCl을 이용하여 재현탁한 후, 초음분쇄기를 이용하여 균체를 파괴하였음. 또한, 상기 배양액은 13,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리를 수행하여 활성형 단백질과 비활성형 단백질로 분리함.
- ④ 활성형 단백질은 1X PBS 버퍼로 활성화되어 있는 glutathione agarose resin과 4°C에서 1 시간 동안 반응시키고, 레진과 결합하지 않는 단백질들을 제거하기 위하여

레진 부피의 5배 양의 1X PBS 버퍼를 이용하여 레진을 씻어줌. 이렇게 GST 단백질이 glutathione agarose resin에 고정된 GST 결합 컬럼(Affinity column)을 제작하고, 제작된 GST 결합 컬럼에 상기 준비한 ssDNA 앵타머를 4°C에서 1시간 동안 반응시킴. GST 결합 컬럼과 ssDNA 앵타머 반응 후, GST 단백질과 결합하지 못한 ssDNA 앵타머 제거를 위하여 레진 부피의 5배 양의 1X PBS 버퍼를 이용하여 레진을 씻어줌.

- ⑤ GST 단백질이 아닌 glutathione agarose resin에 비특이적으로 흡착하는 ssDNA 앵타머를 제거하기 위하여 SELEX 7회와 8회 사이에는 GST 단백질을 고정되어 있지 않은 pre 컬럼을 제작하여 negative SELEX을 진행함. 1X PBS 버퍼를 이용하여 레진 평형 및 활성화된 glutathione agarose resin으로 충전시킨 pre 컬럼에 상온에서 식힌 ssDNA 앵타머를 1시간 동안 반응시킨 후 컬럼에 결합하지 않고 나온 ssDNA 앵타머 용액을 8회 SELEX에 이용하였음. 이후, SELEX는 10회까지 진행하였으며, SELEX의 결합 조건은 횃수가 증가할수록 ssDNA 앵타머 양과 반응 시간을 줄였으며, 횃수가 거듭될수록 반응 조건을 거칠게 하여 목표 물질인 GST에 특이적으로 결합하는 앵타머를 얻고자 함.

(나) GST 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 후보군의 클로닝

표 5-48. GST 결합 DNA 앵타머 후보군 15종

Clone	Selected sequences	Sequence size (bp)
GST-1	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT ACCGCTGCAATCG TGTGCCATACACAGATGATCCGCACA AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호1)	39
GST-2	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT CAGGGTTGGAGA GGTTTGGTGGTTATCATAAGCGGTACAC AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호2)	41
GST-3	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT TAGGTTTGGGTAG GTTGGAAATGGTGAATAATAATGGGACCG AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호3)	40
GST-4	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT CGGACGTTGCACCT GGAAAAGGAGGTTTGGTTCGGTTGGTTC AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호4)	40
GST-5	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT AGACAGCATAGC ACTGTAACGATTGGTTTGGTGTGGTTGG AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호5)	40
GST-6	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT AGATATCAGGAG CGGGGTTTGGGTTGGTTCGGTGGACG AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호6)	40
GST-7	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT GCTCTAAGTATAC CGTAGGTTGGCTGCGGTTTGGCTCG AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호7)	40
GST-8	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT ACTATCGGATTTT CTTGGTTTGGATTCGGTTGGCAGCGAGTG AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호8)	40
GST-9	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT GCTCTAAGTATTC CGGTAGGTTGGCTGCGGTTTGGCTCA AGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호9)	40
GST-10	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTGGGCATGTGGACTTG CGATTTTGGTTTGGTGTGGTTGGGGAGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호10)	40
GST-11	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTTCAGCGCTCCCCACG CGGACATTTGCTCAGTTCTACGGCCCCAGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호11)	40
GST-12	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTAGATAGCGTAGGACT GTAACGATTGGTTTGGTGTGGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호12)	40
GST-13	GGTAATACGACTCACTATA/GGGAGATACCAGCTTATTCAATTCCACGTTTCCACGTA TCCTCGGAGCTTGCTTAAACCGTACGAGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호13)	40
GST-14	GGTAATACGACTCACTATAGG/GAGATACCAGCTTATTCAATTTCGCGCGGCACTTAA TGCTGTGCATCAACCCCTGGGCGAGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호14)	40
GST-15	GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTAGATAGCATAGCACT GTAACGATTGGTTTGGTTTGGTTACGAGATAGTAAGTGCAATCT(서열번호15)	40

- ① 10회 반복 수행한 SELEX에서 8회 수행에서 GST 단백질과 DNA 앵타머가 결합 효율이 높은 것으로 판단되어 8 라운드의 ssDNA 앵타머에 대해 PCR을 수행하여 dsDNA를 확보하고자 하였음. 이렇게 획득한 dsDNA는 RBC의 T&A 클로닝 키트를 이용하여 TA 클로닝을 수행하였음. TA 클론들은 200 ul의 DH5a와 섞은 후 42°C에서 1분 30초 동안 열충격(heat shock)을 주고 얼음에 놓아둠. 여기에 800 ul의 LB broth 800 ul을 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양함. 배양 후, 200 ul의 용액을 취하여 앰피실린(ampicillin, 50 ng/ml), X-gal(50 ul/ml), IPTG (5 ul/ml)이

포함되어 있는 LB plate에 스프레딩하고 37°C에서 15시간 동안 배양시킨 후 흰색 콜로니만을 선별하여 솔젠트(solgent, Korea)에 의뢰하여 앵타머의 염기서열을 결정 하였음(표 5-48).

- ② SPR 장비를 사용하여 최적 앵타머 15종을 선별하였으며 GST 앵타머 15종 중 GST-2 앵타머가 해리상수 0.002 ± 0.003 nM로 가장 결합력이 좋은 앵타머임을 확인할 수 있었음. 기 SPR 분석을 통하여 획득한 GST 단백질 결합 DNA 앵타머 후보군의 구조는 Rensselaer polytechnic institute에서 제공하는 DNA mfold 프로그램을 활용하여 이미지화 할 수 있었음 (그림 5-97).

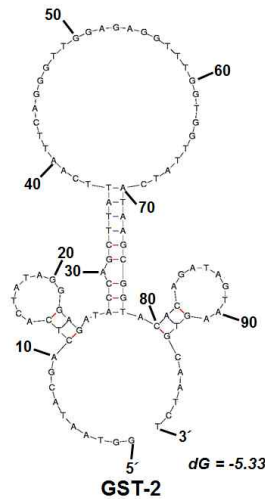


그림 5-97. GST 결합 DNA 앵타머 GST-2의 2차원 예측 구조

(다) GST 단백질 결합 DNA 앵타머와 anti-GST 항체와의 GST 단백질 탐지능 비교

- ① GST 단백질 결합 DNA 앵타머 및 anti-GST 항체를 이용한 GST 단백질 탐지능을 비교 분석하기 위하여 먼저 GST 활성형 단백질과 정제된 GST 단백질을 확보하고자 함. 이를 위하여 pGEX4T-1 벡터 형질 전환체의 단일 클론을 확보하고, LB (0.5% 효모 추출물, 1% 박토-펩톤, 0.5% NaCl) 배지에 종균을 배양함. 이후 하루 종일 배양된 종균 배양액의 일부를 본 배양 배지 (LB 배지 + 100 mg/L 암피실린)에 접종 (1%)한 다음 37°C에서 200 rpm으로 배양하여, GST 단백질 발현을 세포의 성장과 함께 유도함. 형질 전환체의 배양액의 OD₆₀₀값이 0.4 - 0.6에 이르렀을 때, GST 단백질의 과발현을 유도하기 위하여 1 mM의 IPTG를 첨가한 후, 37°C에서 200 rpm의 조건에서 3-4 시간 더 배양함. 이렇게 획득한 세포 배양액은 원심분리기를 이용하여 균체만을 따로 분리(13,000 rpm, 10분)하고, 10 mM Tris-HCl을 이용하여 재현탁함.
- ② 획득된 균체는 초음분쇄기를 이용하여 파괴하였으며, 다시 한번 원심분리기 (13,000 rpm, 10분)를 이용해 활성형 단백질과 비 활성형 단백질로 분리하였음. GST 활성형 단백질만을 순수 분리 정제하기 위해서는 glutathione agarose를 이용하였음. 전체 pGEX 4T-1 세포 활성형 단백질과 GST 순수 분리 정제 단백질은 SDS-PAGE (12%) 분석을 통하여 확인하였음. SDS-PAGE 분석을 통하여 전체 pGEX 4T-1 세포 활성형 단백질 중 GST 단백질은 20%의 활성형 단백질로 존재하며, 약 26 kDa의 크기를 가짐을 확인할 수 있었음 (그림 5-98a).

- ③ 이렇게 획득된 자연 상태의 GST 정제 단백질과 GST 결합 DNA 앵타머와의 결합을 확인하기 위하여 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 수행함 (그림 59 b). 먼저 자연 상태의 GST 정제 단백질 38.46 pmol과 dig-modified GST-2 앵타머-2 30.8 pmol을 섞고 4°C에서 12시간 동안 반응 시킨 후, 5% pour acrylamide gel에 loading 한 후, Bio rad (USA)의 Mini Trans Blot Cell을 이용하여 methanol로 활성화된 PVDF membrane으로 옮겨졌음.
- ④ 이렇게 획득한 membrane은 1X PBS (pH 7.2) buffer를 이용하여 2번에 걸쳐 washing한 후, 샘플이 고정된 membrane은 blocking buffer (5% nonfat dry milk, 1X PBS (pH 7.2), tween 20 (0.1% v/v)를 이용하여 비특이적인 단백질과의 반응을 차단하였음. 이후 blocking buffer에 1:5,000로 희석한 anti-Dig-Alkaline phosphatase conjugated (Roche, Germany) 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰으며, 모두 반응과 반응 사이는 washing buffer (PBS (pH 7.2), 0.5% tween 20)를 이용하여 15분씩 2회에 걸쳐 washing을 실시함.
- ⑤ Dig 으로 변형된 GST-2 DNA 앵타머와 자연 상태의 GST 정제 단백질과 결합한 dig으로 변형된 GST-2 DNA 앵타머의 시각화에는 NBT/BCIP 시스템을 활용함. EMSA를 통하여 GST 결합 DNA 앵타머가 자연 상태의 GST 정제 단백질과 특이적으로 결합하는 것을 확인 할 수 있었음(그림 5-98b).

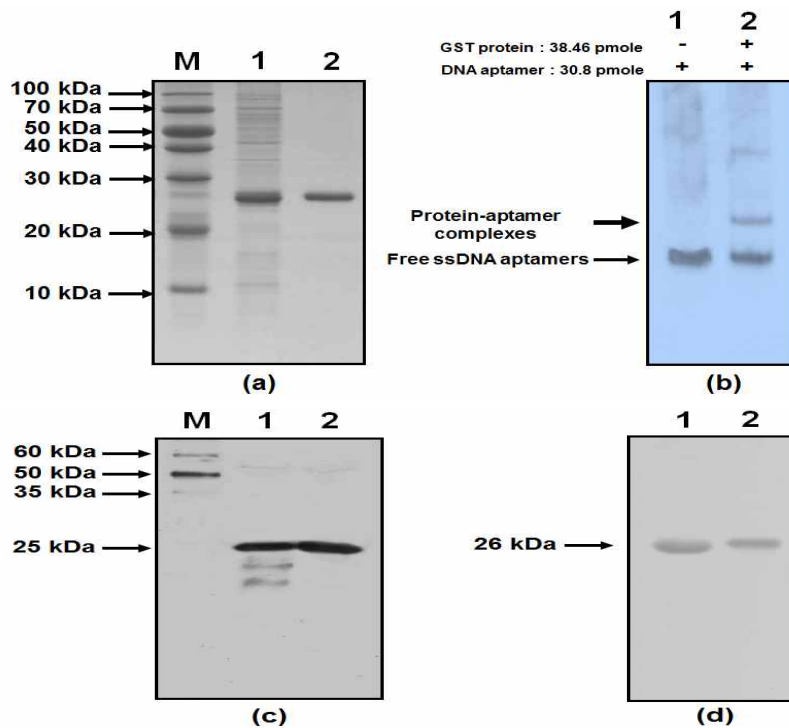


그림 5-98. GST 단백질 결합 DNA 앵타머와 anti-GST 항체의 탐지능 비교 결과

- ⑥ 이후, GST 단백질 결합 DNA 앵타머 및 anti-GST 항체를 이용한 GST 단백질 탐지능 비교를 위하여, 기 확보한 전체 pGEX 4T-1 세포 활성형 단백질과 GST 순수 분리 정제 단백질을 활용함. SDS-PAGE를 통하여 확인 된 단백질은 Mini Trans Blot Cell을 이용하여 methanol로 활성화된 PVDF membrane으로 옮겨졌음. 이때 2장

의 membrane을 제작하여 하나의 membrane은 HRP로 변형된 anti-GST 항체를 이용한 WB (Western blotting) 기법을 활용하여 GST 단백질을 탐지하였으며, 다른 한 장은 HRP로 변형된 GST 단백질 결합 DNA 앵타머-2를 이용한 aptamer blotting을 이용하여 GST 단백질을 탐지하였음.

- ⑦ 이와 같은 실험을 위하여 먼저 전체 pGEX 4T-1 세포 활성형 단백질과 GST 순수 분리 정제 단백질이 고정된 두 장의 membrane을 확보하고 이들 membrane 모두를 1X PBS (pH 7.2) buffer를 이용하여 2번에 걸쳐 washing한 후, 샘플이 고정된 membrane은 blocking buffer (5% nonfat dry milk, 1X PBS (pH 7.2), tween 20 (0.1% v/v)를 이용하여 비특이적인 단백질과의 반응을 차단하였음. WB의 경우 blocking buffer에 1 : 1,000로 희석한 HRP로 변형된 anti-GST 항체 (Sigma, USA) 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰으며, aptamer blotting의 경우 blocking buffer에 HRP로 변형된 1ug/ml 농도의 GST-2 앵타머 희석 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰음. GST-항체 및 GST-2 앵타머와 반응을 마친 membrane은 시각화를 위하여 ECL kit (GE Healthcare, Sweden)을 사용하였음.
- ⑧ 이를 통하여 anti-GST 항체를 기반으로 한 WB 방법 및 GST 결합 앵타머를 기반으로 한 AB(aptamer blotting) 방법을 활용하여 약 26 kDa에서 GST 단백질 signal을 확인 할 수 있었음 (그림 5-98c-d). 하지만 이 실험을 통하여 GST 탐지 시 동일한 실험 시간을 투자할 때, anti-GST 항체를 기반으로 하는 WB보다 GST 결합 DNA 앵타머를 기반으로 하는 aptamer blotting 시스템 하에서 GST 단백질을 탐지할 때, 비특이적인 반응 없이 더욱 깨끗한 signal을 확인 할 수 있었음(그림 5-98c-d).

(2) Digoxigenin 특이결합 앵타머 소재 개발

(가) Digoxigenin에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 개발을 위한 SELEX

- ① Dig과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 선별하기 위하여 기 제작 확보한 ssDNA 95 ul에 증류수 55 ul을 첨가하고, 2X PBS 용액 150 ul을 첨가한 후 95°C에서 5분간 끓여 변성(Denaturation) 시켰다가 상온에서 서서히 식혀 ssDNA 앵타머의 안정한 3차원 구조를 형성시킴.
- ② Dig 결합 컬럼(Affinity column)을 제작하기 위하여 먼저 5'은 Biotin으로 변형되어 있으며, 3' 쪽은 Dig으로 변형된 ATT TTT GGT TGG TTG CTT CG (서열 번호 34) 서열을 Bioneer에서 주문 제작하였음. Dig 결합 컬럼 제작을 위하여 주문 제작 확보한 Biotin-Dig 변형 주형은 10 pmol/ul 농도 희석하여 사용하였음. Biotin-Dig 변형 주형 200 ul에 100 ul의 streptavidin bead를 첨가한 후, 4°C에서 1시간 동안 반응 시킨 후, PBS buffer와 원심분리기를 이용하여 streptavidin bead에 결합하지 않은 주형들은 제거하였음. 이렇게 제작된 Dig 결합 컬럼에 기 제작 확보한 ssDNA aptamer pool 100 ul을 첨가한 후, 4°C에서 1시간 동안 Dig과 ssDNA 앵타머가 결합할 수 있도록 반응을 진행함. 반응 종료 후 PBS buffer와 원심분리기를 이용하여 결합하지 못하고 남아있는 비특이적인 ssDNA 앵타머를 분리 제거함. 이후, Dig 결합 컬럼에 PBS 100 ul을 첨가한 후, 85°C에서 5분 동안 반응시킴으로써 Dig과 특이적으로 결합하는 ssDNA 앵타머만을 분리 회수하였음. 회수된 Dig 결합 ssDNA 앵타머 용액에 PCI 100 ul를 첨가한 후 원심분리를 하여 상층액을 회

수하였으며, 이후 회수용액은 1/10 부피의 3 M NaOAc (pH4.5)과 2~3 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에서 1시간 동안 방치함. 반응 후에는 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 Dig과 특이적으로 결합하는 ssDNA 앵타머만을 회수하였음.

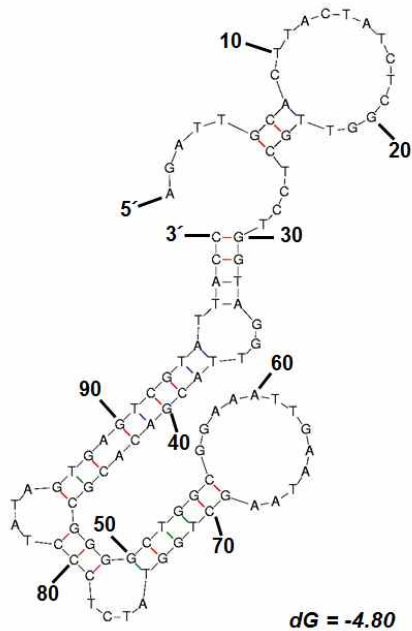
- ③ Dig이 아닌 streptavidin bead 또는 Biotin과 ATT TTT GGT TGG TTG CTT CG 주형 서열에 비특이적으로 흡착하는 ssDNA 앵타머를 제거하기 위하여 Dig과 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 선별을 위한 SELEX 7회와 8회 사이에는 Biotin으로만 변형된 ATT TTT GGT TGG TTG CTT CG 주형 서열로 제작된 컬럼을 이용하여 negative SELEX 과정을 진행함. Streptavidin bead에 Biotin으로 변형된 ATT TTT GGT TGG TTG CTT CG 주형을 결합 시킨 후, 상온에서 식힌 ssDNA 앵타머를 4°C에서 1시간 동안 반응시켰음. 이후, negative 컬럼과 결합되지 않고 분리, 회수된 ssDNA 앵타머를 8회 SELEX에 활용하였음. 이후, SELEX는 10회까지 계속 진행되었으며, SELEX의 결합 조건은 횟수가 증가할수록 ssDNA 앵타머 양과 반응 시간을 줄였으며, 횟수가 거듭될수록 반응 조건을 거칠게 하여 목표 물질인 Dig과 더욱 특이적으로 결합하는 앵타머를 얻고자 하였음.

(나) Digoxigenin에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 후보군의 클로닝

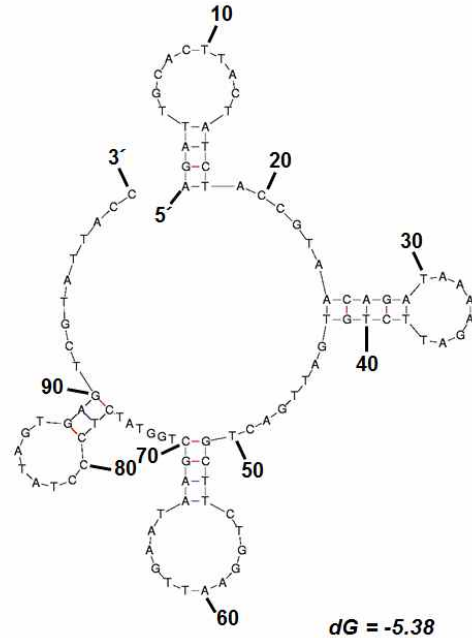
표 5-49. Dig 결합 DNA 앵타머 후보군 12종

Clone	Selected sequences	Sequence size (bp)
Dig-1	AGATTGCACTTACTATCTCGGTTGCTCCTGGTAGGTTACGACACGCGGGGCTGGCG GAAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호16)	100
Dig-2	AGATTGCACTTACTATCTACCGTAACAGATAAAAGATTCTGTGATTGACTGCTTCT GGAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호17)	100
Dig-3	AGATTGCACTTACTATCTCGCCGGCTAGGAAACAATTGGTTGGTGTGTTCCGGCCCC TTAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호18)	100
Dig-4	AGATTGCACTTACTATCTCAGTGAAACTTTGGTTGGCCGCCTGTAGGGTCACTTTG TGAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호19)	100
Dig-5	AGATTGCACTTACTATCTCCCGCCAAGGTTTTGTCAGTTGGTCCCTCCGGTGATT CGAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호20)	100
Dig-6	AGATTGCACTTACTATCTCGCATTCGACATAGCCGGTAGTAAAAGCATGGTCGCTT CAAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호21)	100
Dig-7	AGATTGCACTTACTATCTCCAAGTGGGATTTTTAGTGGTTGCATCGGAGACAG CTAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호22)	100
Dig-8	AGATTGCACTTACTATCTCGAGGTAGCAGGTTGCTTGC GGCTAAAGCATTTTCATG CTAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호23)	100
Dig-9	AGATTGCACTTACTATCTCACAAAGGAATGAACGATGCGATCTGGTAGCTTCTTTG GCAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호24)	100
Dig-10	AGATTGCACTTACTATCTCGTGAATGTTGTTGCTTCTGCTACGATACGTC AACCC TCAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호25)	100
Dig-11	AGATTGCACTTACTATCTAGGTGTAGATACCCAGGCGTATGGTTGCGCTGTTTCGT GGAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호26)	100
Dig-12	AGATTGCACTTACTATCTCAAGGTGTCGCACTTTTTGACGTTGGACTGCTTCGAAC AGAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACC (서열번호27)	100

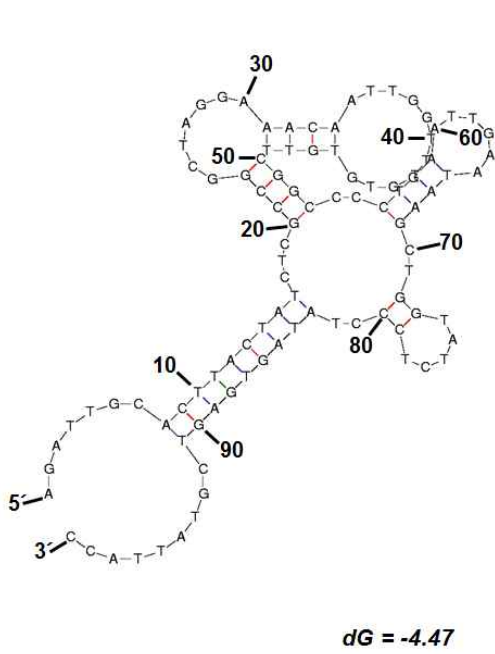
- ① 10회 반복 수행 결과, 가장 높은 효율로 DNA 앵타머가 확보되었던 9라운드의 ssDNA의 앵타머에 대하여 서열들을 확보하기 위하여 TA 클로닝을 수행함. PCR을 통해 획득한 획득된 dsDNA 산물은 RBC의 T&A 클로닝 키트를 이용하여 TA 클로닝을 수행하였음. 열충격(heat shock) 방법을 이용하여 DH5a에 각각의 클론들을 형질전환함. 형질전환체는 앰피실린, X-gal, IPTG가 포함되어 있는 LB plate에 스프레딩한 후, 37°C에서 12시간이상 배양한 후 흰색 콜로니만을 선별하여 솔벤트에 의뢰하여 앵타머의 염기서열을 결정함. 반복적으로 나타나고 온전한 서열로 이루어진 12종의 Dig 특이결합 앵타머 서열을 확보할 수 있었음(표 5-49).
- ② 상기 클로닝 및 시퀀싱을 통하여 획득된 Dig 결합 DNA 앵타머 후보군들의 구조는 Rensselear polytechnic institute에서 제공하는 DNA mfold 프로그램을 활용하여 이미지화 할 수 있었음(그림 5-99).



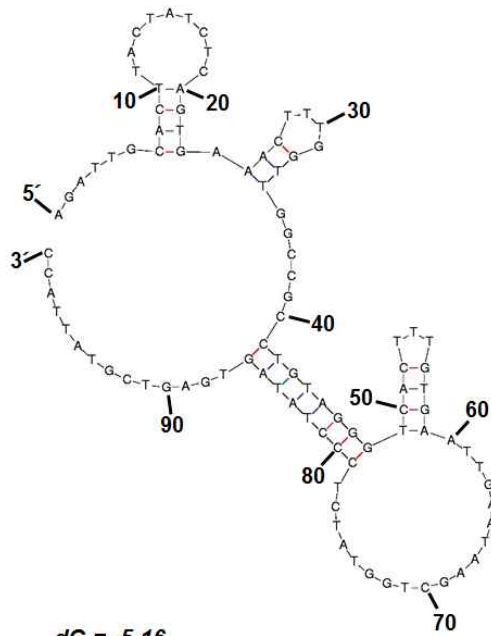
Dig-1



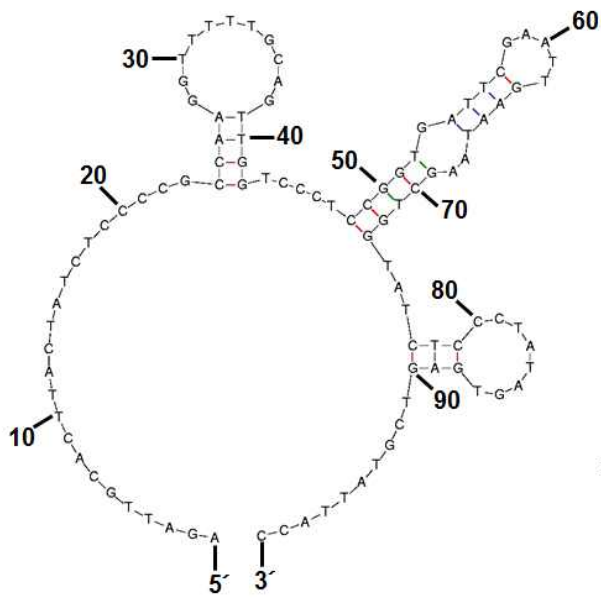
Dig-2



Dig-3

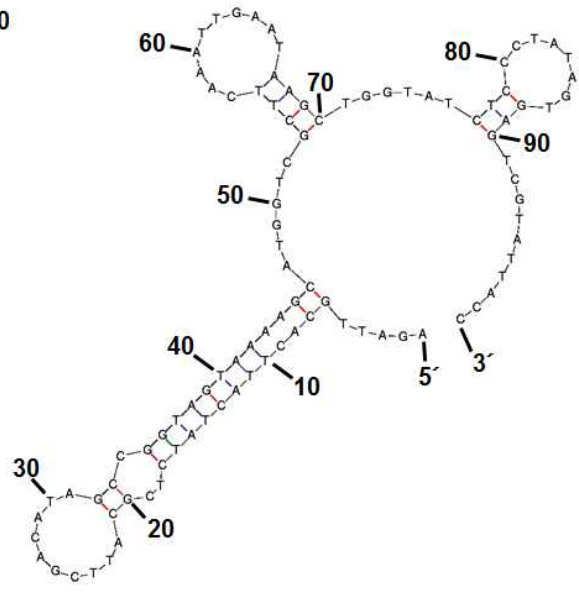


Dig-4



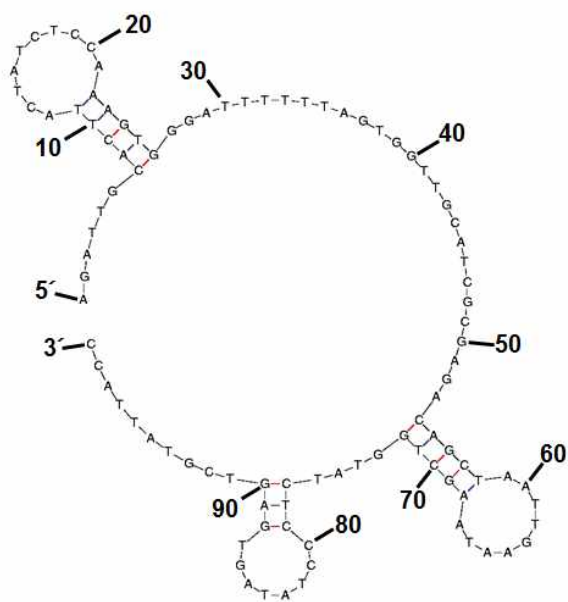
$dG = -5.03$

Dig-5



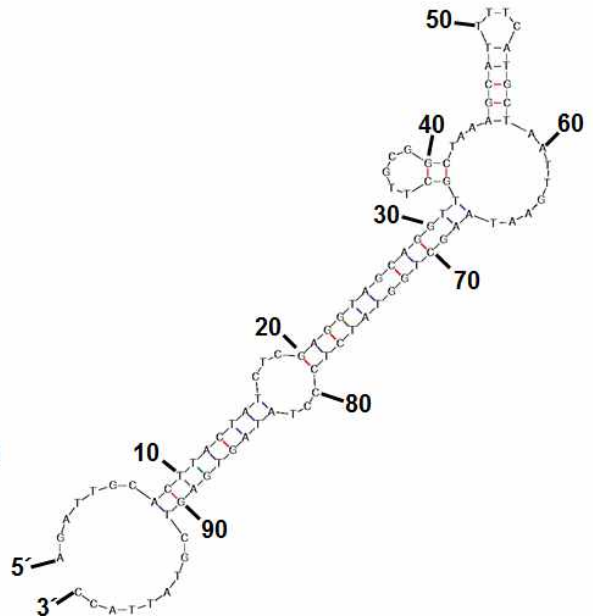
$dG = -6.20$

Dig-6



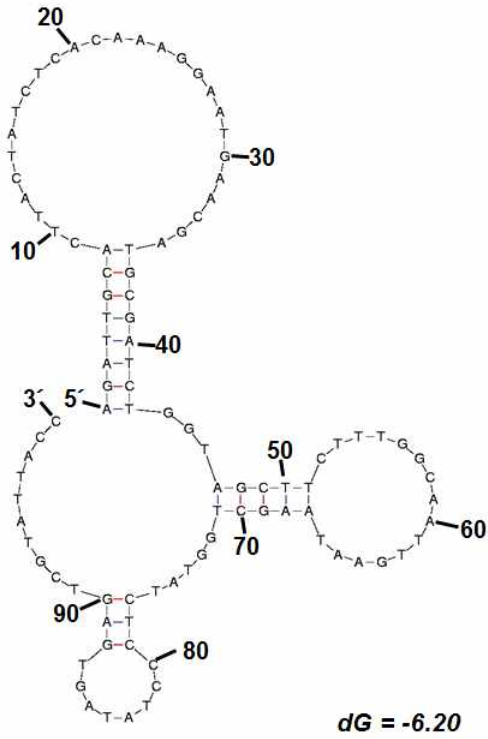
$dG = -8.07$

Dig-7

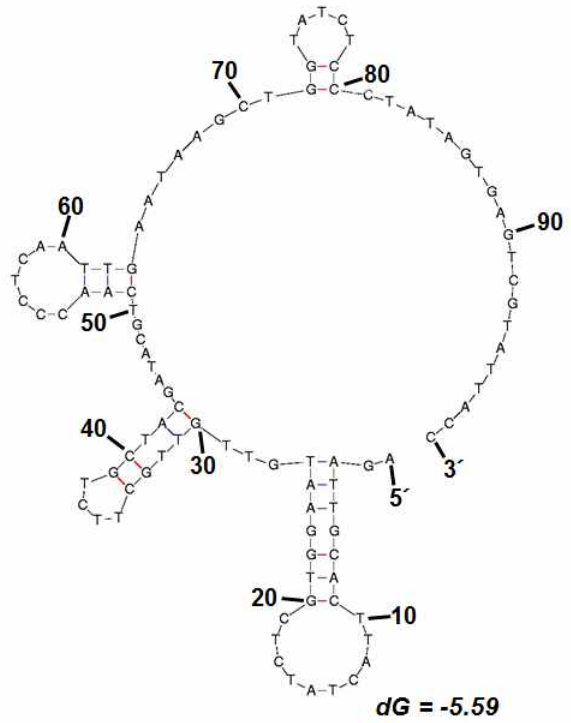


$dG = -9.41$

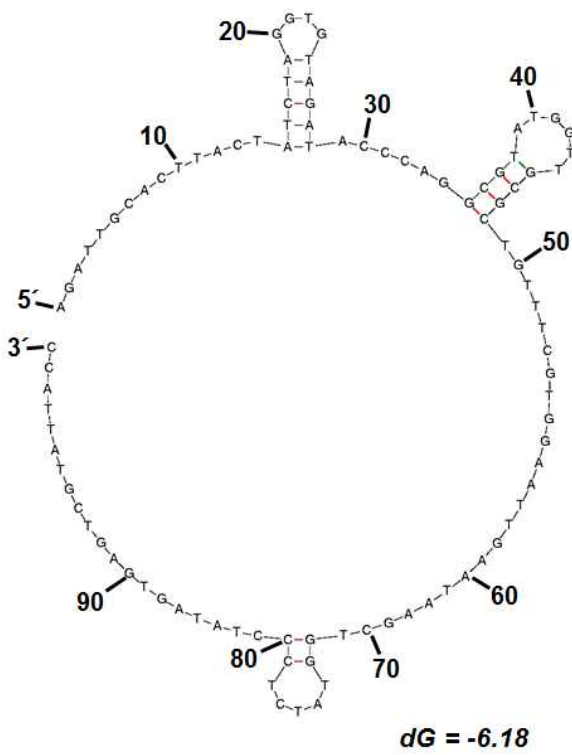
Dig-8



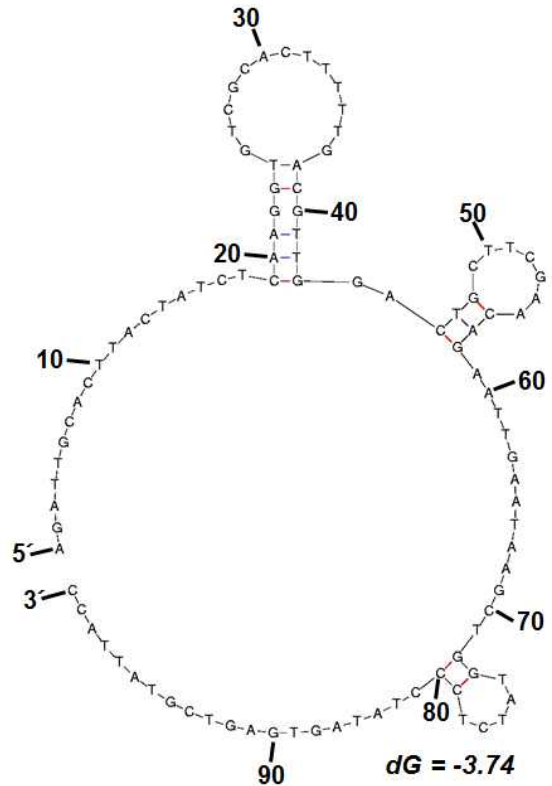
Dig-9



Dig-10



Dig-11



Dig-12

그림 5-99. Dig 특이결합 앵타머 후보군 12종의 2차원 예측 구조

(다) Digoxigenin 결합 DNA 앵타머와 GST-1 앵타머를 활용한 anti-GST 항체와의 비교 실험

- ① 112종의 앵타머 중 가장 친화력이 좋은 앵타머를 선별하기 위하여 SPR을 수행하였으며 12종의 앵타머 중 Dig-1 앵타머가 해리상수 $7 \pm 0.003\text{nM}$ 로 Dig과의 결합력이 가장 높은 것을 확인할 수 있었음. 이와 같은 SPR 분석 결과는 작은 크기의 Dig과 같은 화학물질과 결합하는 DNA 앵타머의 해리상수로는 매우 높은 값을 확인함.
- ② HRP로 변형된 Dig 결합 DNA 앵타머의 2차 항체로의 활용 가능성을 확인하기 위하여 친화력이 가장 좋았던 GST와 특이적으로 결합하는 GST-2 앵타머와 Dig 결합 앵타머 Dig-1을 순차적으로 활용하고자 하였음. 뿐만 아니라, 이와 같은 과정이 기존에 GST 단백질을 탐지하기 위하여 활용되었던 1차 GST-항체 및 2차 항체를 활용 탐지와 어떻게 차이를 보이는지 확인함.
- ③ 기 확보된 GST 활성형 단백질과 정제된 GST 단백질은 SDS-PAGE (12%)에 3개의 경우로 나뉘어 loading 한 후, Mini Trans Blot Cell을 이용하여 methanol로 활성화된 PVDF membrane으로 옮겼음. 2장의 membrane 중 하나의 membrane은 anti-GST 항체 (1차 항체)와 anti-mouse IgG peroxidase conjugated 항체 (2차 항체)를 이용한 기존 WB (Western blotting) 기법을 활용하여 GST 단백질을 탐지하였으며, 다른 한 장은 앵타머와 기존 항체 기법을 결합한 SWB (southwestern blotting) 기법을 이용하여 GST 단백질을 탐지하였음. 이는 dig으로 변형된 GST 단백질 결합 GST-2 앵타머와 anti-Dig-Alkaline phosphatase conjugated (2차 항체)를 이용하여 탐지하였음. 마지막으로 Dig으로 변형된 GST 단백질 결합 GST-2 앵타머와 Dig 결합 Dig-1 앵타머를 이용한 새로운 형태의 AB (aptamer blotting) 기법을 이용하여 GST 단백질을 탐지하였음. 이를 위하여 먼저 단백질이 완전히 고정된 세 장의 membrane을 1X PBS (pH 7.2) buffer를 이용하여 2번에 걸쳐 washing하였으며, 샘플이 고정된 membrane은 blocking buffer (5% nonfat dry milk, 1X PBS (pH 7.2), tween 20 (0.1% v/v)를 이용하여 비특이적인 단백질과의 반응을 차단하였음.
- ④ 이후, WB의 경우 blocking buffer에 1 : 1,000로 희석한 anti-GST 항체 (Sigma, USA) 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰으며, SWB과 aptamer blotting의 경우 blocking buffer에 1 µg/ml로 dig으로 변형된 GST-2 앵타머를 희석 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰음. 1차 GST-항체 및 GST-2 앵타머 반응을 마친 membrane들은 시각화를 위하여 WB의 경우 blocking buffer에 1:10,000로 희석한 anti-mouse IgG peroxidase conjugated (Sigma, USA) 항체 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰으며, SWB의 경우 blocking buffer에 1:5,000로 희석한 anti-Dig-Alkaline phosphatase conjugated (Roche, Germany) 용액과 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰음.
- ⑤ Aptamer blotting의 경우 blocking buffer에 1 µg/ml로 희석한 HRP로 한쪽 말단을 변형시킨 Dig 결합 Dig-1 앵타머와 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰음. WB, SWB, aptamer blotting 기법 모두 반응과 반응 사이는 washing buffer (PBS (pH 7.2), 0.5% tween 20)를 이용하여 15 분씩 3회 반복 washing을 실시하였으며, 이후 각

반응에 대한 시그널을 확인하기 위하여 WB과 aptamer blotting 기법은 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare, Sweden)을 사용하였으며, SWB은 NBT/BCIP과 ECL kit (GE Healthcare, Sweden)을 시스템을 활용하였음.

- ⑥ 이와 같은 실험을 통하여 anti-GST 항체 및 2차 항체를 이용한 WB 기법, dig으로 변형된 GST 단백질 결합 앵타머와 Dig을 탐지할 수 있는 2차 항체를 이용하는 SWB 기법, GST 단백질 결합 DNA 앵타머 및 Dig과 특이적으로 결합하는 Dig 결합 DNA 앵타머를 이용한 aptamer blotting 기법을 활용하였을 때 모두 GST 활성형 단백질과 정제된 GST 단백질 샘플 모두에서 약 26 kDa에서 GST 단백질에 특이적인 signal을 확인할 수 있었음(그림 5-100 a-c).
- ⑦ 하지만 이 실험을 통하여 GST 탐지시 동일한 실험 시간을 투자할 때, anti-GST 항체를 기반으로 하는 WB보다 앵타머를 기반으로 하는 AB 시스템 하에서 표적하는 단백질을 더 깨끗한 signal을 확인할 수 있었다 (그림 61 a, c). 뿐만 아니라, GST 탐지시 GST 앵타머 와 Dig 결합 2차 항체를 활용하는 기법인 SWB 기법의 이용이 가능함을 확인할 수 있었으며, WB 기법 보다는 앵타머와 2차 항체를 동시에 이용하는 SWB 기법을 이용하였을 때 보다 깨끗한 signal을 확인할 수 있었음 (그림 61 a-b). SWB 기법을 활용한 확인을 통하여 ECL을 이용한 탐지뿐만 아니라, NBT/BCIP 탐지 기법을 이용하여 signal을 확보할 수 있음을 확인할 수 있었음 (그림 5-100 a-c).

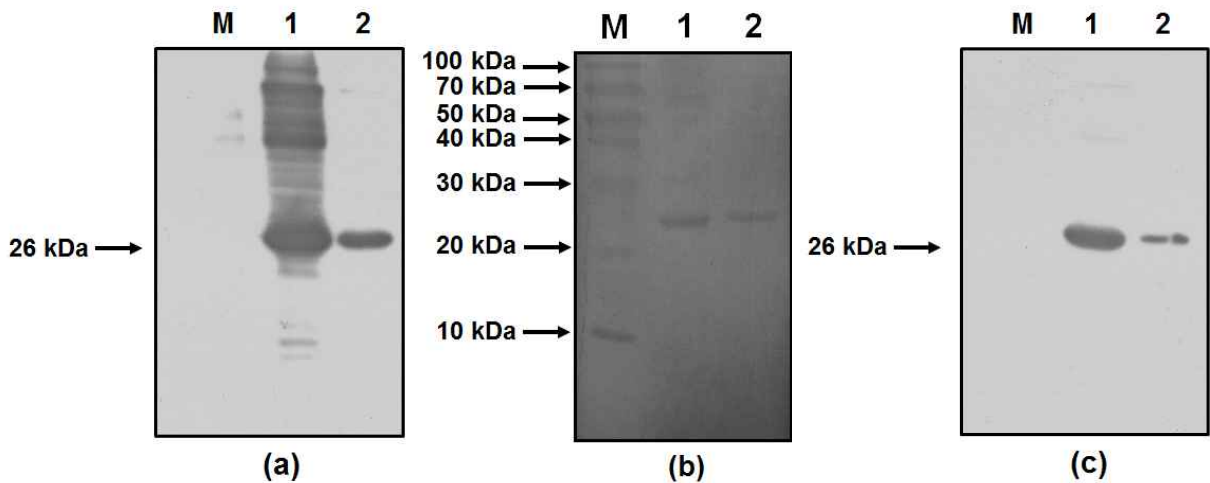


그림 5-100. HRP 변형 Dig 결합 DNA 앵타머와 2차 항체와의 비교실험

(3) Apta blotting 기술을 이용한 GST 융합 재조합 단백질 PNBE의 탐지 실험

(가) GST 융합 PNBE 단백질의 제작

- ① 실제 GST 재조합 단백질 탐지에 있어서도 GST 단백질 결합 DNA 앵타머와 Dig 결합 DNA 앵타머를 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여 실험을 진행함. fusion protein인 GST 단백질을 표적 단백질에 융합시켜 GST-tagging 된 단백질을 제작한 후 이를 GST-2 앵타머와 Dig-1 앵타머를 사용하여 탐지가 가능한지 여부를 실험해보고자 함.

② *Bacillus subtilis* 유래의 지질분해효소인 PNBE 유전자를 pGEX4T-1 벡터에 클로닝 하였음. 이를 위하여 일차적으로 *B. subtilis* 유래의 지질분해효소 PNBE 유전자를 포함하는 DNA 프라이머 한쌍을 주문 제작함. 제한 효소 자리를 참가하여 제작한 프라이머를 이용한 PCR 방법을 이용하여 *B. subtilis* 유래의 PNBE 유전자를 증폭하였음. 증폭된 유전자와 벡터를 동일한 제한 효소 (pGEX 4T-1: BamH I/Not I)로 자른 후 발현 벡터에 클로닝 하여 콜로니를 선별하였음. 이렇게 선별된 pGEX4T-1 발현 벡터에 *B. subtilis* 유래의 PNBE 유전자를 클로닝된 재조합 균주는 plasmid mini-prep kit (Geneall, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였으며, 획득한 재조합 plasmid DNA는 BamH I/Not I 제한 효소를 이용하여 재조합 plasmid를 잘라(Digestion) 약 1.5 kb의 PNBE 유전자가 클로닝 되어 있음을 확인하였음 (그림 5-101).

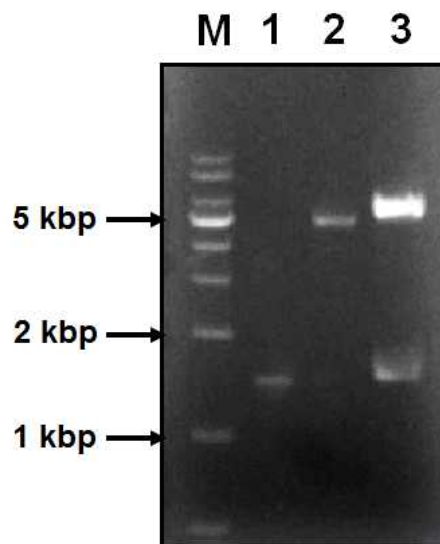


그림 5-101. Digestion을 통한 PNBE 유전자의 클로닝 확인

(나) GST 융합 PNBE 단백질의 Aptablotting을 활용한 탐지

① GST 단백질 결합 DNA 앵타머 및 HRP 변형 Dig 결합 앵타머를 이용한 GST 융합 PNBE 단백질 탐지 확인 실험을 진행하기 위하여 먼저, PNBE 유전자를 pGEX4T-1 발현 벡터에 클로닝하여 재조합 균주를 확보하였으며, IPTG를 이용한 재조합 단백질 유도 기법을 이용하여 재조합 균주의 전체 활성형 단백질을 확보할 수 있었음. 뿐만 아니라, glutathione agarose를 이용하여 순수 분리 정제한 GST 단백질 융합 PNBE 단백질(GST-tagging PNBE 단백질)을 확보할 수 있었음 (그림 5-102 a, 라인 3-4).

② GST 단백질 결합 앵타머(GST-2)와 HRP로 변형된 Dig 결합 DNA 앵타머 (HRP-modified Dig-1)를 기반으로 GST 단백질 및 GST 융합 PNBE 단백질 탐지를 확인하기 위하여 aptamer blotting을 수행하였음. GST 단백질 및 GST 융합 PNBE 단백질 탐지능을 확인 실험을 위하여 전체 pGEX 4T-1 세포 활성형 단백질, GST 순수 분리 정제 단백질, GST 융합 PNBE 단백질, 순수 분리 정제된 GST 융합 PNBE 단백질(GST-tagging PNBE protein)을 활용하였음. 각 단백질은 SDS-PAGE (12%)를 통하여 확인하였으며, SDS-PAGE를 통하여 확인된 단백질

은 Bio rad (USA)의 Mini Trans Blot Cell을 이용하여 methanol로 활성화된 PVDF membrane으로 옮김.

- ③ 단백질이 고정된 membrane은 1X PBS (pH 7.2) buffer를 이용하여 3번에 걸쳐 washing한 후, 샘플이 고정된 membrane은 blocking buffer (5% nonfat dry milk, 1X PBS (pH 7.2), tween 20 (0.1% v/v)을 이용하여 비특이적인 단백질과의 반응을 차단하였음.
- ④ 이후 GST 단백질 및 GST 융합 PNBE 단백질을 탐지하기 위하여 dig으로 변형된 GST-2 앵타머를 1 ug/ml로 blocking buffer에 희석하여 4°C에서 1시간 동안 반응시켰으며, 이를 시각화하기 위하여 2차로 HRP로 변형된 Dig 결합 DNA 앵타머 1 ug/ml를 blocking buffer에 희석하여 4°C에서 1시간 동안 반응 시킴. 모두 반응과 반응 사이는 washing buffer (PBS (pH 7.2), 0.5% tween 20)를 이용하여 15 분씩 3회 반복 washing을 실시하였음. 이후 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare, Sweden)을 사용하여 시각화함. 앵타머를 기반으로 하는 aptamer blotting 기법을 이용하여 약 26 kDa에서 GST 단백질 signal 및 약 75 kDa에서 GST 융합 PNBE 단백질 signal을 확인 할 수 있었음 (그림 5-102 b). 이와 같은 실험을 통하여, 기존 WB 기법을 aptamer blotting 기법이 완벽하게 대체할 수 있음을 최종 확인함.

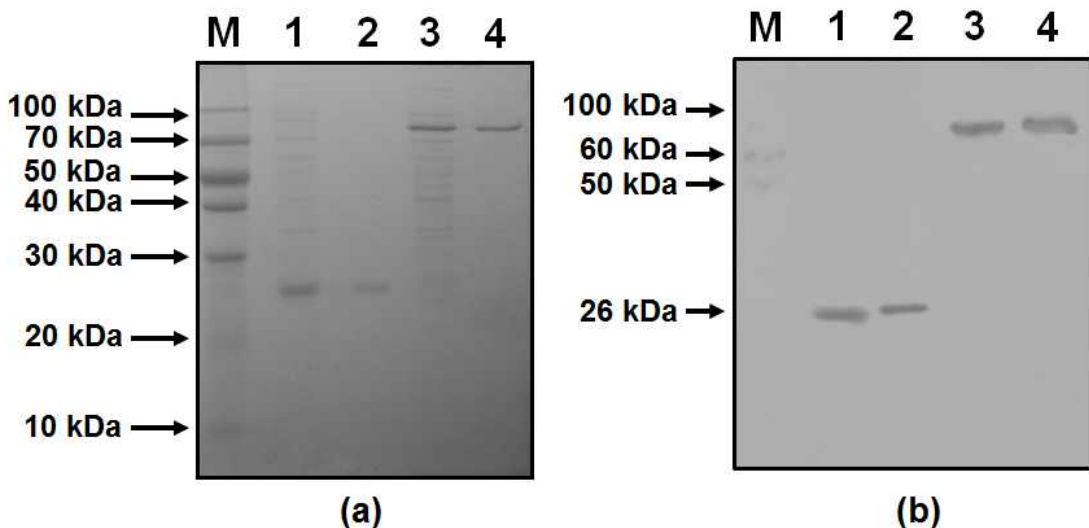


그림 5-102. Aptamer blotting 기법을 이용한 PNBE 단백질 검출 실험

마. 항균 펩타이드 특이결합 앵타머 개발

(1) 항균펩타이드(PMAP36, PR26, PG1) 특이결합 앵타머 소재 개발

(가) 항균펩타이드 PMAP36에 특이적인 앵타머 개발을 위한 SELEX

- ① 항균펩타이드 PMAP36에 특이적인 앵타머 소재를 개발하기 위하여 DNA 앵타머 library를 준비하고자 하였음. DNA 앵타머를 제작하기 위해 40개의 랜덤 서열을 dA : dG : dC : dT = 1.5 : 1.15 : 1.25 : 1 비율로 포함하고 있는 100 bp의 주형 DNA (5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT-N40-AGATAGTAAGTGCAATCT-3';와 이를 100 bp로 증폭할 수 있는 프라이

머를 바이오니어로부터 주문하여 제작하였음(F primer:5'-ATACCAGCTTATTCAATT-3'] , R primer: 5'-AGATTGCACT-TACTATCT-3', 비오티닐화된 (biotinylated) R primer: 5'-Biotin-AGATTGCACTTACTATCT-3']. 임의의 DNA library는 PCR 기법을 이용하여 증폭하였으며, 100 bp DNA 라이브러리의 증폭을 위한 PCR 반응 조성은 주형 DNA 1 ul, 10X PCR 완충용액 5 ul, 각 2.5 mM dNTP 혼합물 4 ul, 25 μM 정방향 프라이머 2 ul, 25 μM 비오티닐화된 역방향 프라이머 2 ul, Ex Taq 중합효소 (Takara, Japan) 0.3 ul (1 unit/ul)와 35.7 ul의 증류수로 수행함. PCR 반응 조건은 우선 95°C에서 5분간 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초간 반응을 25주기 반복한 후, 72°C에서 5분간 추가로 신장시키는 반응을 이용하였음. PCR 반응 후 4 ul를 취하여, 2% 아가로스 겔 전기영동을 통하여 100bp에서 밴드가 나타나는지 증폭 산물을 확인하였음. PCR을 통하여 확보된 DNA 라이브러리는 PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 이용하여 정제한 후 증류수 50 ul를 이용하여 회수하였음 (그림 5-103 a).

- ② PCR 기법과 PCR 정제 키트를 이용하여 회수한 DNA 라이브러리 50 ul에 증류수 50 ul를 첨가하여 부피를 100 ul로 조정한 후, 가열-냉각 (heating-cooling) 기법을 이용하여 dsDNA를 ssDNA로 변성 (Denaturation)하였음. 실험 방법을 구체적으로 표현하자면 PCR 기법과 PCR 정제 키트를 이용하여 획득한 dsDNA를 85°C에서 5분 동안 반응하여 dsDNA를 ssDNA로 변성시킨 후, 반응 종료 후 즉시 반응액을 4°C로 냉각 시켜 ssDNA를 확보함.
- ③ 가열-냉각 기법을 이용하여 확보된 ssDNA 산물 중 비오티 (Biotin)이 결합되어 있는 ssDNA와 primer를 제거하고 정방향의 ssDNA만을 순수하게 확보하기 위하여, 상기 실험에서 획득한 100 μl의 반응액에 스트렙트아비딘 아가로스 레진 (streptavidin agarose resin, Thermo scientific, USA) 50 ul를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰음. 반응액은 4°C, 13,000 rpm의 원심분리기를 이용하여 15분간 원심분리한 후, 상층액만을 회수하여 동일 부피의 PCI (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) 용액을 처리한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액만을 회수하였음. 상층액에 1/100 부피의 tRNA (sigma aldrich, USA), 1/10 부피의 3 M 소듐 아세테이트 (sodium acetate, pH 4.5)와 3 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에서 1시간 이상 반응시켰음. 반응 후에는 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 ssDNA만을 회수하였음. 회수한 ssDNA는 65°C에서 건조시킨 후, 50 ul의 증류수에 녹임. 회수한 ssDNA를 2% 아가로스 겔을 이용하여 dsDNA와 비교하여 정확한 크기의 밴드가 나타나는지 확인하였음 (그림5-103, a-c).

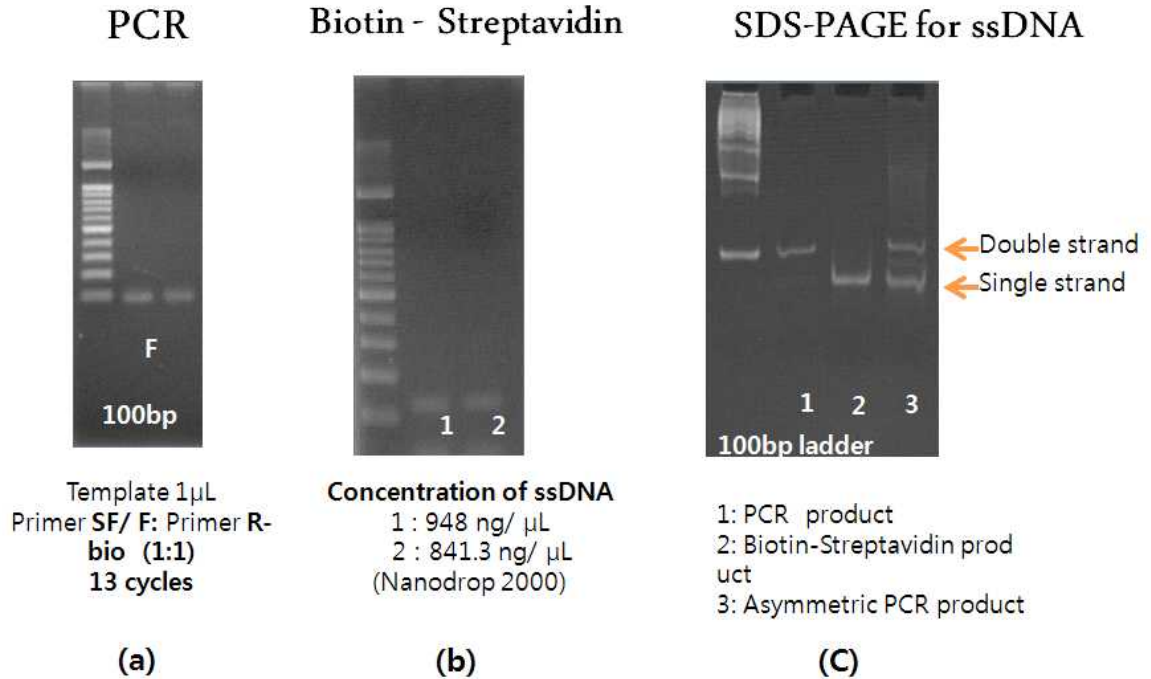


그림 5-103. 항균펩타이드 특이적으로 결합하는 ssDNA 앵타머 library 확인

- ④ 상기 실험을 통해 확보한 ssDNA library는 1X PBS buffer 내에서 85°C, 5분 동안 변성시킨 뒤, 상온에서 2시간 동안 서서히 냉각시켜 ssDNA 앵타머의 안정한 구조를 형성하였음. PMAP36은 히스티딘(Histidine)이 표지된 펩타이드로서 앵타머 library와 반응시키기 앞서 Ni-NTA agarose 200 μ l에 1 X binding buffer 200 μ l을 넣고 4°C에서 30분 동안 교반하며 반응시키고 4°C에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하여 Ni-NTA agarose resin을 활성화 시켰음. 히스티딘 표지된 PMAP36 펩타이드(1.09mg/ μ l)와 구조화한 ssDNA 앵타머 라이브러리를 1시간동안 반응시킨 반응액을 활성화된 Ni-NTA agarose와 4°C에서 1시간 동안 반응시킴. 이후, 원심분리하여 상층액을 제거한 후, washing buffer (500mM NaCl, 60mM imidazole, 20mM Tris-HCl) 1ml을 넣어 5회 세척과정을 반복하고 히스티딘 융합 PMAP36펩타이드와 결합하지 못한 앵타머를 제거함.
- ⑤ Ni-NTA agarose로부터 히스티딘 융합 PMAP 36 펩타이드와 이에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 확보하기 위하여 DNA 앵타머 elution buffer (300mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 250mM imidazole) 200 μ l를 넣어 4°C에서 1시간동안 교반하며 반응시켰으며, 이후, 원심분리하여 상층액을 회수함. PMAP36 펩타이드와 이물질들을 제거하기 위하여 PCI 처리와 에탄올 침전법을 시행하여 PMAP36에 특이적으로 친화력을 갖는 순수한 ssDNA 앵타머를 확보함 (그림 5-104).

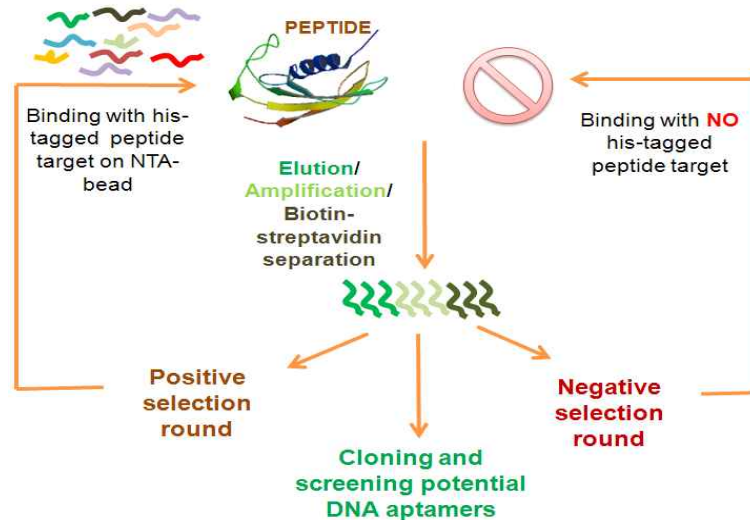


그림 5-104. 항균펩타이드 특이적으로 결합하는 ssDNA 앵타머 SELEX

⑥ SELEX는 총 13 round 까지 수행하였으며 4 round 와 9 round 때 Negative SELEX를 진행함. PMAP36 펩타이드가 아닌 Ni-NTA resin에 결합하는 DNA 앵타머를 제거하기위하여 PMAP36 펩타이드 없이 Ni-NTA resin과 직접 DNA 앵타머 라이브러리를 결합시켜 Ni-NTA resin과 결합력을 갖는 DNA 앵타머들을 제거 하였음.

(나) 항균펩타이드 PMAP36에 특이적인 앵타머의 최적 SELEX round 선별

- ① PMAP36 펩타이드에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 개발하기 위하여 SELEX를 Negative SELEX 포함 13 round 까지 진행하였으며 SELEX 계속 진행 여부 및 각 round 에서 용리된 ssDNA 앵타머의 친화성을 정량적으로 확인하기 위하여 각 round 에서 용리된 ssDNA의 농도를 나노 드롭 스펙트로포토미터 (Nano drop (Micro spectrophotometer))장비를 이용하여 측정함.
- ② 나노 드롭을 활용하여 각 라운드에서 용리된 ssDNA 앵타머 농도를 측정한 결과, 2 차 Negative SELEX (9 round) 선별 이후에 12 round의 농도가 663.3 ng/μl로 가장 높았으며, 13 round의 농도는 각각 359.7 ng/μl로 12 round의 결과 보다 농도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 네가티브 선별 이후, 히스티딘 용합 PMAP36 펩타이드와 가장 특이적으로 결합하는 최적 앵타머 라이브러리는 12 round가 가장 친화력 높은 DNA 앵타머들이 존재하는 round 임을 확인할 수 있었음 (그림 5-105).

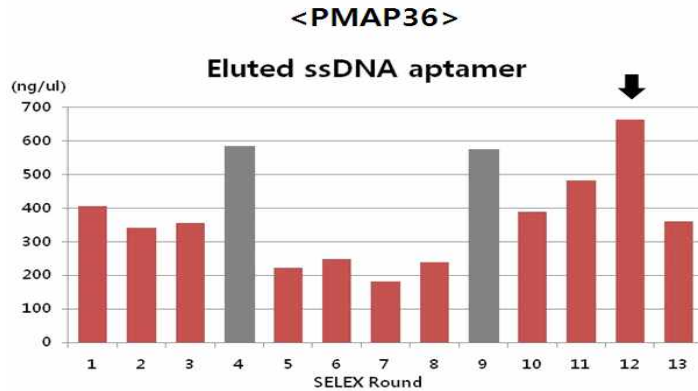


그림 5-105. 항균펩타이드 PMAP36 특이적으로 결합하는 앵타머 ELEX

(다) 항균펩타이드 PR26에 특이적인 앵타머의 최적 SELEX round 선별

- ① PR26 펩타이드에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 개발하기 위하여 SELEX 및 round 진행은 상기 제시된 PMAP36 펩타이드의 SELEX round 진행과 동일하며 PR26 펩타이드의 농도는 0.64mg/ul로 측정되었음. Negative SELEX (4 round) 포함 8 round를 진행하였으며 Nano drop spectrophotometer를 사용하여 각 round 별 회수되었던 DNA를 측정 한 결과, 7round (568.0 ng/ul)에서 가장 높은 농도로 회수 되었음을 확인하여 최적 DNA 앵타머 선별 SELEX는 7round로 선별되었음(그림 5-106).

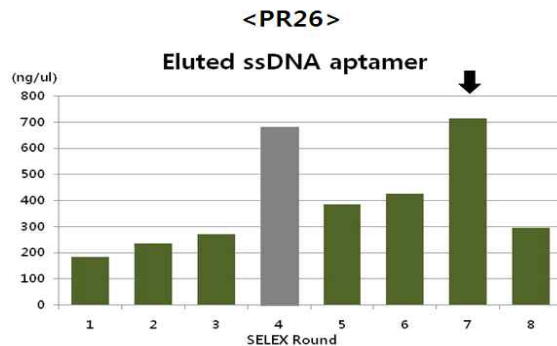


그림 5-106. 항균펩타이드 PMAP36 특이적으로 결합하는 앵타머 ELEX

(라) 항균펩타이드 PG1에 특이적인 앵타머의 최적 SELEX round 선별

- ① PG1 펩타이드에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 개발하기 위하여 SELEX 및 round 진행은 상기 제시된 PMAP36 펩타이드의 SELEX round 진행방법과 동일하게 진행하였으며 진행 시 PG1 펩타이드의 농도는 Brandford assay로 측정결과 1.04mg/ul로 측정되었음. Negative SELEX (4 round) 포함 전체 8 round를 진행하였으며 Nano drop spectrophotometer를 사용하여 각 round 별 회수되었던 DNA를 측정하였음. Negative SELEX round 인 4round 이후에서 가장 높은 농도로 회수된 round는 7 round(715.6 ng/ul) 였으며 PG1 펩타이드에 결합하는 앵타머가 고농도로 회수된 7round를 친화력 앵타머 후보군이 많은 최적 SELEX round 로 선별하였음

(그림 5-107).

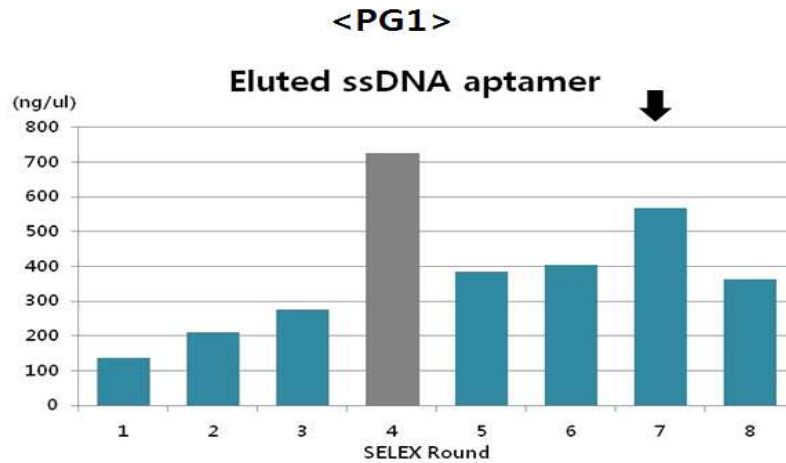


그림 5-107. 항균펩타이드 PG1 특이적으로 결합하는 앵타머 SELEX

- ② 항균펩타이드 PMAP36, PR26, PG1 각각의 SELEX round별 회수되었던 DNA 앵타머들의 Nano drop spectrophotometer 측정 결과 농도는 약 200 - 700 ng/ul 수준으로 회수됨을 알 수 있었음(그림 5-108).

Elution (ng/μL)	Round 1	Round 2	Round 3	Round 4 NG	Round 5	Round 6	Round 7	Round 8	Round 9 NG	Round 10	Round 11	Round 12	Round 13
PMAP36	331.3	341.1	292.6	584.4	222.6	249.4	180.6	239.5	575	389	483	663.3	359.7
PG1	292.6	209.2	275.2	726	385	402.6	568	362.4	x	x	x	x	X
PR26	248.3	236.5	271.7	683	386	425.6	715.6	295.1	x	x	x	x	x

그림 5-108. 항균펩타이드 PMAP36 특이적으로 결합하는 앵타머 SELEX

- ③ 항균펩타이드 PMAP36은 12 round에서 PR26과 PG1은 7 round에서 가장 높은 농도의 DNA 앵타머들이 회수됨을 확인할 수 있었으며, 각 round에서 클로닝을 진행하여 앵타머 서열을 확보하였음. 항균펩타이드에 높은 결합력을 갖는 앵타머들을 SPR 이나 EMSA 등의 기법을 이용하여 선정된 최적의 항균펩타이드 결합 앵타머는 가축 전염병 치료 소재로서 이용될 수 있을 것으로 사료되며 항균펩타이드의 정제 및 회수에도 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

6. 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화 (제4협동)

가. 개발신소재를 이용한 면역복합제제 축산농가 임상시험 및 효능 평가

- 개발신소재를 이용하여 면역항체 성분이 포함된 면역복합제제 시제품을 생산하고, 제1세부과제 연구팀과 공동으로 목적동물에 대한 축산농가 임상시험을 실시하였음.

(1) 송아지용 면역복합제제(아이지켈프 F산 실험 결과 보고서)

(가) 시험배경

- 한우산업은 일본 와규를 따라 고품질의 한우육 생산을 위해 노력해 왔으나 어린 송아지 설사, 로타나 코로나 BVD 같은 바이러스성 설사는 송아지 폐사의 주원인으로 한우산업에 막대한 경제적 피해를 야기해 왔음.
- 이에 따라 (주)삼양애니팜에서는 송아지 바이러스성 설사 질병 및 세균성 설사병을 예방 및 치료하기 위해 난황항체와 초유항체를 이용한 제품을 개발해 왔으며, 본 과제를 통하여 개발한 아이지켈프 F산은 기본 페이스트제제보다 안정성이 뛰어나고 항체역가가 오랫동안 보존되는 장점을 지녔음. 또한 2종의 Probiotics와 비타민, 타우린이 첨가되어 생리활성을 증가시키는 효능이 기대됨.
- 본 실험은 신생 송아지에 대한 아이지켈프 F산의 초유섭취시간 단축 및 설사 치료 효과를 알아보기 위해 실시하였음.

(나) 실험재료 및 방법

① 시험장소: 경기도 전곡일대 한우사육장

② 시험일자: 2015. 09. 10 - 09. 30

③ 시험재료 : 아이지켈프 F산

- 송아지 설사의 주원인이 되는 바이러스성 질병(Rotavirus, Coronavirus, BVD)과 세균성 질병(대장균증)에 대한 난황항체와 초유항체를 함유하고 있으며, 비타민C와 타우린, 2종의 Probiotics를 함유하여 생리활성을 돕도록 개발된 제형임.

④ 시험방법

- ㉠ 투여방법. 전곡 지역의 송아지 설사가 문제되는 농장을 대상으로 농장주의 동의하에 시험제제를 투여함. 신생송아지의 경우, 이지켈프를 분만후 바로 1회 경구투여하고 예전과 초유 섭취시간 및 활력을 비교하였음.
- ㉡ 임상증상 관찰. 먼저 설사하는 송아지의 병원체를 확인하기 위해 분변샘플을 임프로AH에 검사 의뢰하였다. 의뢰후 설사 송아지에 대해 아이지켈프를 투여하였으며 설사 정도에 따라 후속적으로 투여횟수를 결정하였다. 설사 정도를 체크하고 탈수 정도를 검사하였음.

(다) 시험 결과

- 총 8두의 설사병 이환 송아지에 대한 제제 투여 결과, 3두(3일령 1두, 30일령 2두)는 1회 투여 후 완치되었고 3두(20일 30일 및 50일령)는 2회 투여로 완치되었음. 나머지 2두 중 1두는 2회 투여 후 설사증상이 완화되었으며, 다른 1두는 2회 투여 후 예후가 양호해졌음.
- 설사병 이환 송아지의 설사분변에서 대장균, 로타바이러스 및 바이러스성설사병바이러스가 검출되었으며, 단독감염인 경우에는 1회 투여만으로도 치료효과가 아주 좋았으며, 복합감염인 경우에는 2회 투여후 증상이 완화되었음(표 5-50).

표 5-50. 송아지 설사병 발생 원인체별용 아이지켈프 F산 투여 후 치료 경과

설사병원인체	치료효과 판정			
	효과없음	좋음	아주 좋음	완치
대장균				2
BVD			1	2
BVD+대장균		1		1
로타바이러스				1

(라) 고찰

- 시험에서 송아지에 설사를 일으킨 질병은 대장균, BVD, 로타바이러스성 설사였으며 아이지켈프 F산 투여 결과 1회~2회 투여만으로도 이들 설사병을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였음.
- 이번 시험을 통해 아이지켈프 F산내의 항체가 송아지 장내의 병원체와 결합하여 체외로 배출함으로써 설사증을 효과적으로 완화 내지 완치할 수 있음을 확인하였음.

(2) 다이스톱 피그F산(이유자돈용) 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 우리나라 양돈업은 점차 규모화되고 시설도 현대화되었지만 사육밀도가 높아지고 면역력이 떨어지면서 질병에 시달리는 농장이 증가하고 있음. 포유자돈과 이유자돈은 Rotavirus, PEDvirus, TGEvirus, E.coli, Salmonella등 많은 바이러스 및 세균에 의한 소화기질병에 노출되어 있음. 세균성 질환은 농장에서 항생제와 Probiotics를 이용해 컨트롤이 가능하지만 바이러스성 질환은 한번 발생하면 쉽게 컨트롤하기 어려움. 따라서 바이러스 질환은 백신과 함께 자돈의 면역력을 강화시켜주는 면역치료가 필요한 실정임.
- 다이스톱 피그F산은 자돈에 문제를 일으키는 소화기질병(세균 및 바이러스)에 대한 초유항체를 함유하고 있어 직접적으로 소화기질병을 감소시킬 수 있으며, 또한 펩타이드 아연과 Probiotics가 복합적으로 함유되어 있어 자돈의 소화기질병 예방에 큰 도움이 될 것으로 기대됨.

(나) 시험방법

- ① 실험농장 : 고은농장(경기도 포천시 연천군 이동리 소재, 모돈 120두 일관사육농장)
- ② 시험기간 : 2016. 02. 18 - 04. 02 (45일간)
- ③ 시험제제 생산 및 시제품 제작
 - ㉠ 초유면역제제. 초유면역항체 생산을 위한 젖소 접종용 항원은 그림 5-109와 같이 설사병 3종 바이러스(TGEV, PEDV, RotaV)를 적합 세포주에서 배양하여 농축후 불활화하였으며, E. coli, S. typhimurium, M. hyopneumoniae, H. parasuis, P. mutocida, S. suis 등의 세균은 배양후 불활화하여 원심 농축하였음. 바이러스 배양이 힘든 PCV2의 경우 그 주요 면역 단백질(capsid 단백질)을 배큐로바이러스 발현 시스템을 이용하여 발현후 그 배양액과 세포를 파쇄한후 불활화하여 사용하였음 이러한 항원들은 적정 농도로 혼합 및 희석하고 부형제인 수산화알루미늄 겔

과 면역증강제(oil adjuvant, ISA25)를 섞어 유제화하여 임신 젖소에 분만 2개월전 부터 3주 간격으로 3회 접종하여 고도면역시켰음. 면역된 젖소로부터 분만 30시간 이내의 초유를 수거하고, 분말건조화한 후 부형제와 혼합하여 최종 초유면역항체 제제를 제조하였으며, 각 병원체별 정제 항원을 이용한 효소면역측정법(ELISA)과 응집반응으로 초유에 함유되어 있는 면역항체의 역가를 측정하였음.

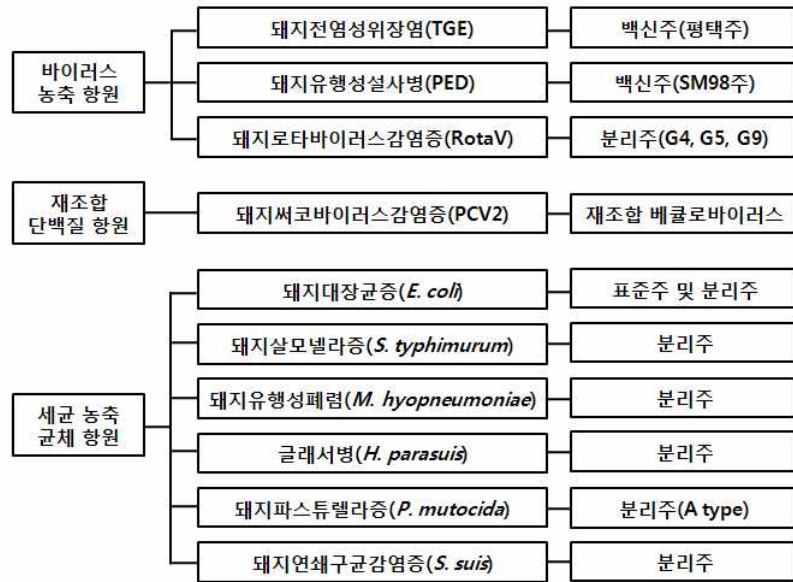


그림 5-109. 면역 초유제제 생산을 위한 면역항원 확보

- ㉠ 난황항체. 산란기에 돼지용 항원((TGEV, PEDV, RotaV, *E. coli*, *S. typhimurium*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *P. mutocida*, *S. suis*)을 3회 주사하여 얻은 난황을 건조하여 난황분말을 생산하였음.
 - ㉡ Probiotics. *Lactobacillus acidophilus* 및 *Clostridium butyricum* 두 종류의 Probiotics를 이용하여 설사 예방 및 증체율 향상에 도움이 되도록 조성에 포함.
 - ㉢ 기타. 성장촉진용으로 비타민 A, D3, E, C 및 타우린을 첨가함.
- ② 시험방법
- 25일령 이유자돈 82두에 대해 70일령까지 폐사율 및 증체율을 측정하였음. 이유자돈은 3개의 권장량군, 2배권장량군, 무투여군의 3개 돈군으로 구분하여 각각 별개의 돈방에 격리사육하면서 권장량군은 다이스톱을 사료톤당 1kg 비율로 45일간 투여하였고, 2배권장량군은 다이스톱을 사료톤당 2kg 비율로 45일간 투여하였음. 무투여군은 다이스톱을 첨가하지 않은 사료만 급이하였음. 사료는 도드람사료를 사용하였음.
 - 실험 시작전 모든 자돈군의 체중을 이동식체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제하였음. 실험 중 투여되는 사료의 양은 정확히 기록하였으며, 자돈군에서 설사병 발생 시에는 설사변을 채취하여 임프로AH 실험실에 의뢰하였음. 또한 매일 일정시간에 설사, 발열, 기침 등 임상증상을 체크하여 기록하였음. 실험 종료시 모든 자돈의 종료체중을 측정하였으며, 그 때까지 섭취한 사료량을 정확히 기록하였음.

(라) 시험결과

① 설사발생두수 및 폐사율

- 3개군의 설사 발생두수는 권장량군과 2배권장량군이 각각 4두, 3두로 유사하였으나 무투여군은 8일로 현저한 차이가 있었음. 평균 설사 기간도 권장량군이 4일, 2배권장량군이 3일로 무투여군 6일에 비해 짧아 다이스톱 피그F산이 이유자돈 설사에 효과가 있음을 확인하였음. 폐사율은 권장량군과 2배권장량군이 각각 3.6%, 3.4%였으며, 무투여군은 7.2%로 큰 차이를 보였음(표 5-51).

② 생산성

- 두당일일사료섭취량은 권장량군이 689g, 2배권장량군이 634g, 무투여군이 674g으로 권장량군과 무투여군이 2배권장량군보다 높았음. 두당일일증체량은 권장량군이 539g, 2배권장량군은 559g, 무투여군은 501g으로 2배권장량군이 가장 좋았고 무투여군은 권장량군과 2배권장량군에 비해 낮았음. 사료요구율은 2배권장량군이 0.96으로 권장량군 1.01, 무투여군 1.07에 비해 좋게 나타났음(표 5-52).

표 5-51. 3개 실험군간 설사발생두수 및 폐사율 비교

구 분	시험두수	설사발생두수	평균 설사기간(일)	폐사율(%)
권장량군	28	4	4	3.6
2배권장량군	26	3	3	3.4
무투여군	28	8	6	7.2

표 5-52. 시험 자돈군간 생산성 평가

구 분	두 수	총사료섭취량(kg)	두당일일사료섭취량(g/day/두)	개시평균체중(kg)	종료평균체중(kg)	두당일일증체량(g)	사료요구율
권장량군	28	689	547	5.9	30.2	539	1.01
2배권장량군	26	634	542	6.1	31.3	559	0.96
무투여군	28	674	535	6.2	28.7	501	1.07

(마) 고찰

- 다이스톱 피그F산은 이유자돈용 면연복합제제로써 돼지 설사병에 대한 항체가 포함된 초유항체 및 난황항체와 함께 Probiotics, 비타민, 미네랄 등이 혼합된 기능성 제품으로 이유자돈의 설사 기간 단축 및 사료효율 증진에 우수한 효과가 있음을 이번 실험을 통해 확인할 수 있었음.

(3) 다이스톱 피그 F2산(육성돈용) 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 이번 실험은 난황항체와 초유항체를 주성분으로 한 분말타입의 제제인 다이스톱 피그F2산(기허가제품)을 이용하여 육성돈에서의 생산성 향상 효과를 확인하기 위한

실험임. 이 제품의 주성분인 젖소 초유항체 이용방법은 기 특허 출원된 것으로 현재 시중에서 시판되고 있는 난황항체만 함유한 제품과 효능에서 월등한 차이를 나타낼 것으로 기대됨.

(나) 재료 및 방법

① 실험농장: 보원농장(경기도 파주시 파주읍 소재, 모돈 120두의 일관사육농장)

② 시험기간: 2016. 04. 07 - 07. 15 (99일간)

③ 실험재료 : 다이스톱 피그F2산(난황항체 /초유항체 혼합 복합면역제제)

- 초유면역항체 생산을 위한 젖소 접종용 항원의 구성을 보면 설사병 3종 바이러스(TGEV, PEDV, RotaV)는 대표 백신주나 야외주 바이러스는 적합 세포주에서 배양하여 농축후 불활화하였으며, E. coli, S. Typhimurium, M. hyopneumoniae, H. parasuis, P. mutocida, S. suis 등의 세균은 배양후 불활화하여 원심 농축하였음. 바이러스 배양이 힘든 PCV2의 경우 그 주요 면역 단백질(capsid 단백질을 배큐로 바이러스 발현 시스템을 이용하여 발현후 그 배양액과 세포를 파쇄한후 불활화하여 사용하였음. 이러한 항원들은 적정 농도로 혼합 및 희석하고 부형제인 수산화알루미늄 겔과 면역증강제(oil adjuvant, ISA25)를 섞어 유제화하여 임신 젖소에 분만 2개월전부터 3주간격으로 3회 접종하여 고도면역시켰음. 면역된 젖소로부터 분만 30시간이내의 초유를 수거하고, 분말건조화한 후 부형제와 혼합하여 최종 초유면역항체제제를 제조하였으며, 각 병원체별 정제 항원을 이용한 효소면역측정법(ELISA)과 응집반응으로 초유에 함유되어 있는 면역항체의 역가를 측정하였음. 여기에 2종의 Probiotics(L.acidophilus, C.butyricum) 및 펩타이드 아연, 비타민이 혼합되어 생산성 향상을 위한 최적의 배합비로 개발되었음.

③ 방법

㉠ 공시동물 : 68일령 50두(권장량 투여군 20두, 권장2배 투여군 10두, 대조군 20두)

㉡ 사료: 기존 농장에서 사용하고 있는 양주축협사료를 사용하였다. 사료에는 다른 사료첨가제가 전혀 첨가하지 않았음.

㉢ 다이스톱 피그F2(이하 피그3산)산 제제 투여시기 및 방법: 피그F2산 분말은 권장량군과 2배권장량군에 투여하고 대조군에는 투여하지 않았음. 권장량군에는 사료톤당 1.5kg의 비율로 사료에 혼합하여 투여하였으며, 피그F2산 제제 외에 어떠한 다른 첨가제도 혼합하지 않았음. 2배권장량군에는 사료톤당 3kg의 피그F2산 분말을 사료에 혼합하여 투여하였음. 실험시작부터 출하 1주일전까지 권장량군과 2배권장량군에 피그F2산을 투여하였으며, 대조군에는 피그F2산은 물론 다른 어떠한 첨가제도 투여하지 않았음다.

㉣ 사육환경: 유창돈사로 개폐식 원치커튼돈사로서 각 실험돈군별 각 돈방에 별도 사육관리하였음.

㉤ 조사항목: 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율, 분변내 미생물 검사

(다) 실험결과

① 육성돈 증체량 결과 (표 5-53 및 그림 5-110)

- 피그F2산 권장량 투여군과 대조군은 20두씩, 2배권장량군은 10두의 육성돈으로 실험을 실시하였으며, 각 실험군의 개시체중은 권장량 첨가군이 평균 26.6kg, 2배권장량군이 27.2kg, 대조군이 27.4kg으로서 2배권장량 투여군과 대조군이 유사하고 권

장량군이 다소 낮았음. 이는 권장량군 개체중 개체체중이 25kg이하인 개체의 비율이 2배권장량군과 대조군에 비해 높았기 때문으로 증체량을 비교하는 본 실험에서는 각 돈군을 비교하기에 큰 문제가 되지 않을 것으로 사료됨.

- 개시일령은 모든 돈군이 68일령으로 동일하였으며, 종료일령은 권장량군 및 나머지 돈군이 167일령으로 출하시기와 동일하였음. 종료(출하)평균체중이 권장량군이 112.1kg, 2배권장량군이 109.7kg, 대조군이 105.9kg이었음.
- 총증체량은 권장량군이 85.5kg, 2배권장량군이 82.5kg, 대조군이 78.5kg이었고 일당증체량은 권장량군이 863g, 2배권장량군이 833g, 대조군이 792g으로서 총증체량과 일당증체량에서 권장량군이 다른 두 군에 비해 높았으며, 특히 일당증체량은 대조군에 비해 월등히 높았음. 2배권장량군도 일당증체량이 대조군에 비해 높아 피그F2 산 분말이 증체량에서 경제성이 있을 것으로 사료됨. 다만 권장량군이 2배권장량군보다 총증체량과 일당증체량이 높게 나온 것은 질병이 없는 상황에서 난황항체와 초유항체의 일정수준 이상은 큰 의미가 없음을 보여줌.

표 5-53. 시험 육성돈군의 증체량 측정 결과

구분	실험 두수	개시체중 평균(kg)	종료평균 체중(kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량군	20	26.6	112.1	85.5	863
2 배권장량군	10	27.2	109.7	82.5	833
대조군	20	27.4	105.9	78.5	792

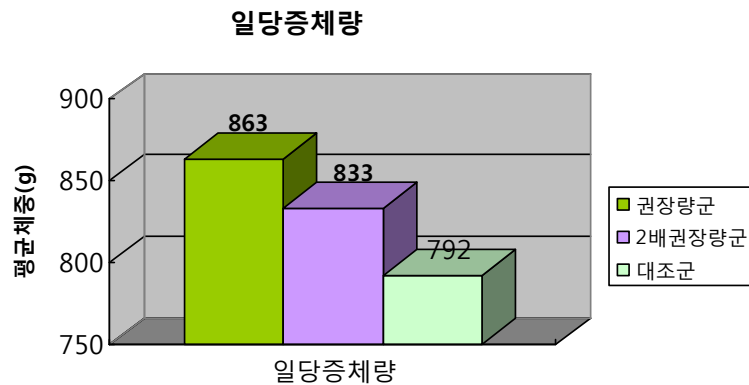


그림 5-110. 시험 육성돈군간 일당증체량 비교

② 시험 육성돈군의 사료섭취량 및 사료요구율 측정결과(표 5-54)

- 피그2산의 효율성을 알아보기 위해서는 증체량 외에 사료섭취량을 조사하여 사료요구율을 계산하였음. 본 실험에서 권장량군의 두당총사료섭취량은 191.5kg, 2배권장량군은 187.6kg으로서 대조군 179.1kg보다 많았음.
- 두당일일사료섭취량도 권장량군과 2배권장량군이 1.934kg와 1.894kg으로 대조군의 1.809kg보다 많았음.

- 사료요구율은 권장량군이 2.23, 2배권장량군이 2.27로서 대조군 2.28보다 좋았음. 사료요구율에서 권장량군은 대조군보다 우수하였으나 2배권장량군은 대조군과 차이가 없어 사료효율에서 2배권장량군과 대조군이 큰 차이가 없는 것으로 나타났음.

표 5-54. 시험 육성돈군간 사료섭취량 및 사료요구율 비교

구분	두당총사료섭취량 (kg/두)	두당일일사료섭취량 (g/day/두)	사료요구율
권장량군	191.5	1,934	2.23
2 배권장량군	187.6	1,894	2.27
대조군	179.1	1,809	2.28

③ 분변중 살모넬라균수 검사 결과

- 육성돈의 설사는 바이러스, 세균, 기생충 등이 단독으로 감염 증식해서 설사를 일으키는 경우도 있으나, 대부분은 혼합감염하여 설사증상을 일으키고 있음. 특히 항생제 장기 사용 후 혹은 PED 감염 이후의 살모넬라균 혼합감염은 현장에서 흔히 발생하는 상황임.
- 시험 육성돈군의 분변 시료에 대한 살모넬라균 검사결과(그림 5-111), 피그F2산을 권장량과 2배권장량으로 투여한 돈군은 살모넬라균수가 현저히 감소되었으며, 2배권장량군이 권장량군보다 더 우수한 살모넬라 억제능력을 나타내었음. 따라서 면역성분(항체)이 많이 포함될수록 살모넬라에 대한 억제능력이 높아짐을 알 수 있었음.

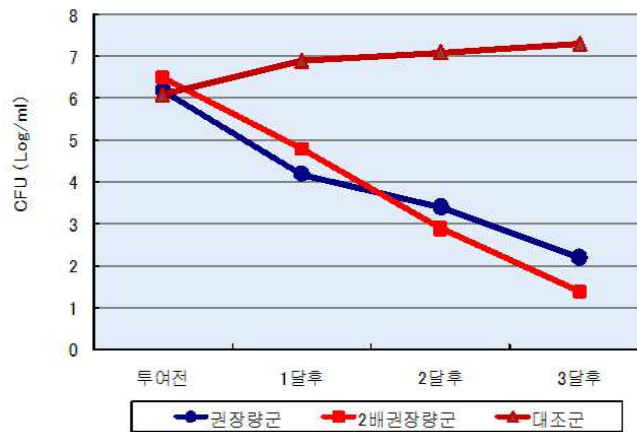


그림 5-111. 시험 육성돈군간 분변시료내 살모넬라 감출을 비교

(라) 고찰

- 피그F2산 제제 투여는 육성돈의 증체율과 사료요구율에 우수한 효과를 나타내었음.
- 분변내 살모넬라균 검사결과, 피그F2산 제제는 3달 후 대조군과 현저한 균수 차이를 나타내어 육성돈의 살모넬라증에 우수한 효과가 있을 것으로 사료됨.
- 실험 결과에 따라 피그F2산 제제가 육성돈의 경제성 및 살모넬라증 등의 세균성 질병의 감소에 우수한 효과가 기대됨.

(4) 다이스톱 피그 F3산(비육돈용) 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 본 실험은 단계별로 최적화된 면역복합제(다이스트롭 피그F3산) 중 육성돈에 최적화된 조성으로 제조된 다이스트롭 피그 F3산 제제 투여에 따른 비육돈에서의 생산성 향상 여부를 확인하기 위해 실험하였음.

(나) 재료 및 방법

- ① 시험장소 및 기간. 본 실험은 경기도 충남 서산시 운산면 원평리에 위치한 농장에서 실시하였으며 실험돈군은 권장량 투여군(권장량군), 권장량 2배 투여군(2배권장량군), 무투여 대조군(무투여군) 각각 20두씩 별개의 돈방에 나누어 실시하였음. 본 실험은 2015년 8월 20일부터 10월 30일까지 71일간 실시하였음.
- ② 시험제제. 본 실험에 사용된 제품은 다이스트롭 피그F3산((주)삼양애니팜)으로서 비육돈용으로 개발된 사료첨가제로 돼지질병에 항생제대체제로서 효과를 가진 면역성분(IgY)과 2종의 Probiotics 및 Prebiotic으로서 프락토올리고당이 첨가되었고, 추가적으로 비타민C와 타우린이 첨가되어 효율적으로 생산성을 향상시킬 수 있도록 배합되었음.
- ③ 시험방법. 시험 돼지를 3개의 돈군으로 나누고 권장량군, 2배권장량군, 무투여군 각각 20두로 실험을 시작하였으며, 실험제품 이외에 사료나 음수 등 다른 요인은 동일하게 적용하였음.
 - 실험돈은 112일령의 육성돈을 3개 돈군 각 20두씩 나누어 권장량군은 F3를 사료톤당 0.5kg 비율로 71일간 투여하였고, 2배권장량군은 F3를 사료톤당 1kg 비율로 투여하였으며, 무투여군은 F3를 첨가하지 않은 사료만 급여하였음. 사료는 대한제분 곰표사료를 사용하였음.
 - 실험 시작전 모든 돈군의 체중을 체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제하였음. 실험 중 투여되는 사료의 양은 정확히 기록하였으며, 실험기간중 설사 및 호흡기증상 발생 시 임상증상을 자세히 기록하였다. 종료체중은 출하 시 체중으로 측정하였음.

(다) 시험결과

① 임상증상 (표 5-55)

- 3개 돈군 모두에서 호흡기증상이 관찰되었고, 무투여군에서 호흡기증상 외에 소화기증상도 나타났으며, 실험실 진단결과 살모넬라 감염으로 확인되었음. 무투여군의 폐사한 2두 모두 마이코플라즈마페렴과 홍막페렴의 혼합감염으로 확인되었음.
- 2배권장량군은 132일령까지 임상증상이 발생하지 않다가 145일령에 갑작스런 기침과 사료섭취량 감소를 동반한 호흡기증상이 3두에서 나타나 이후 총 6두에서 기침을 동반한 호흡기증상이 나타났음. 이 중 1두는 증상 발현 후 5일째에 폐사하여 부검한 결과 홍막페렴 소견이 확인되었고, 세균배양 결과 *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 분리되었음.
- 권장량군은 138일령에 2두에서 호흡기증상을 나타내어 이후 총 출하시까지 5두에서 호흡기증상을 나타내었으나 폐사는 없었음.

표 5-55. 실험돈군에서의 임상증상 발현 및 폐사수 비교

구 분	두수	임상증상 발현두수	폐사수	비 고
권장량군	20	5	0	
2배권장량군	20	6	1	급성홍막폐렴
무투여군	20	8	2	PRDC(2두)

② 생산성 비교

- 3개 돈군에 대한 생산성을 비교하기 위해 개시체중과 종료체중을 측정하고 실험기간 동안 총사료섭취량을 측정하였음.
- 표 5-56과 같이 개시체중은 권장량군이 60.37kg, 2배권장량군이 59.41kg, 무투여군이 60.85kg으로 전체적으로 비슷하였음. 개시일령은 112일령으로 3개 돈군이 동일하였으며 종료일령도 권장량군과 2배권장량군 그리고 무투여군이 183일령으로 동일하였음. 일일증체량은 2배권장량군이 696g으로 권장량군 675g, 무투여군 643g 보다 높았음.
- 두당일일사료섭취량은 무투여군이 2.89kg/day로 가장 높았는데 이는 2두 폐사에 기인한다. 두당일일사료섭취량은 2배권장량군이 권장량군보다 조금 높았음. 사료요구율은 권장량군과 2배권장량군이 4.08과 4.05로 거의 비슷했으며, 무투여군은 4.49로 다른 2군에 비해 유의적으로 높았음(표 5-57).

표 5-56. 시험돈군간 생산성 비교

구분	실험 두수	개시 일령	종료 일령	개시평균 체중(kg)	종료평균 체중(kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량군	20	112	183	60.37	108.32	959	675
2배권장량군	19	112	183	59.41	108.86	939	696
무투여군	18	112	183	60.85	106.57	822	643

표 5-57. 시험돈군간 사료섭취량 비교

구분	실험두수	총사료섭취량 (kg)	두당일일사료섭취량 (kg/day)	사료요구율
권장량군	20	3920	2.76	4.08
2배권장량군	19	3804	2.82	4.05
무투여군	18	3693	2.89	4.49

(라) 고찰

- 비육돈군에 대한 다이스톱 피그 F3산 제제의 주된 기대효과는 사료효율 증진과 증

체량 증가인 바, 실제 실험결과에서도 권장량군과 2배권장량군이 무투여군에 비해 일당증체량과 사료요구율에서 우수한 결과를 나타내었음.

- 또한 임상증상 발현율과 폐사수에서도 무투여군에 비해 권장량군과 2배권장량군이 개선된 결과를 나타내어 비육돈에 대한 F3의 사용이 경제성이 있음을 실험을 통해 확인할 수 있었음.

(5) 다이스톱 폴츄리 F산(산란계용) 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 산란계 산업은 경제성 평가와 함께 질병 방제가 중요하며, 한국 산란계 농가들은 살모넬라증과 각종 산란저하 질병으로 애로를 겪고 있음. 특히 살모넬라증(가금티푸스)은 여전히 한국의 많은 산란계 농가에서 만성화되어 있는 세균성 질병으로 농장에 심각한 경제적 피해를 야기하고 있음.
- 본 과제를 통하여 개발된 다이스톱 폴츄리F산 제제는 살모넬라에 대한 항체를 함유한 난황분말과 초유분말을 주성분으로 하여 각종 비타민과 미네랄 그리고 2종의 Probiotics를 함유하여 질병 예방뿐만 아니라 산란율 향상 등의 생산성 향상에 기여할 것으로 기대됨.

(나) 재료 및 방법

① 시험장소 및 기간

- 경기도 포천시 창수면 소재 산란계농장에서 실험을 실시하였으며, 실험군은 권장량군, 2배권장량군, 무투여군의 3개 계군으로 나누어 동일조건에서 실시하였음.
- 실험기간은 2016년 3월 2일부터 4월 26일까지 약 8주간 실시하였음. 계사는 유창계사 농장이었으며, 실험계군은 32주령의 이사브라운 갈색 산란계이었음.

② 시험제제

- 실험제품은 (주)삼양애니팜에서 제조한 다이스톱 폴츄리F산 제품을 사용하였으며, 실험군은 권장량군(3,300), 2배권장량군(2,700수), 무투여군(3,100수) 등 3개 계군으로 구분하여 권장량군은 사료톤당 1kg을 첨가하였으며, 2배권장량군은 사료톤당 2kg을 첨가하였고 무투여군은 사료만 투여하였음. 실험제품 외에 사료(대한 사료)는 동일한 제품을 사용하였으며 음수는 넵플시스템으로 급수하였음. 그 외에 다른 영양제나 생균제는 첨가하지 않았음.
- 제제 투여 후 주간별로 산란율을 측정하여 주간 평균값을 기록하였으며, 난중(egg weight)을 측정하였음.

(다) 시험결과

① 산란율

- 8주간(32-39주령)의 시험기간 동안 무투여군은 실험 개시 시점 92.11%에서 종료 시점 82.22%로 떨어진 반면, 권장량군은 92.07%에서 85.09%로, 2배권장량군은 91.05%에서 86.71%로 권장량군과 2배권장량군이 무투여군에 비해 39주령에 높은 산란율을 나타내었음(표 5-58) .
- 투여기간별로 보면 다이스톱 투여 4주 동안은 산란율에서 권장량군 및 2배권장군과 무투여군이 차이가 크지 않았으나 4주 이후부터 다이스톱 투여군의 산란율이 꾸준히 증가한 반면 무투여군은 정체되어 8주 이후 다이스톱 투여군과 무투여군의 산란

율의 차이가 크게 나타났음(그림 5-112).

② 난중(egg weight)

- 난중dms 권장량군이 50.59g에서 54.95g까지 증가하였고, 2배권장량군도 50.27g에서 56.02g까지 증가하여 다이스톱이 난중 향상에 특히 효과적인 것으로 나타났음(표 5-58). 이에 반해 무투여군은 52.11g에서 50.14g까지 감소하여 다이스톱 투여가 난중에 미치는 영향이 큼을 알 수 있었음.
- 투여기간별로 보면 난중 측정 결과에서도 실험 3주까지는 다이스톱 투여군과 무투여군 사이에 큰 차이가 없었으나, 이후 차이가 점점 벌어져 8주 이후에는 무투여군과 투여군 사이에 현저한 난중 차이가 발생하였음(그림 5-113).
- 권장량군과 2배권장량군 간에는 산란율과 난중에서 별다른 차이를 나타내지 않음.

표 5-58. 시험계군별 주간 산란율 및 난중 비교

실험기간	산란율(%)			난중(g/hen/day)		
	권장량군	2배권장량군	무투여군	권장량군	2배권장량군	무투여군
32주령	92.07	91.05	92.11	53.31	51.39	51.25
33주령	91.58	89.46	91.42	51.73	50.27	52.11
34주령	90.13	89.88	88.78	50.59	51.19	51.09
35주령	88.97	90.09	86.42	52.06	52.37	50.46
36주령	87.66	88.57	85.19	52.84	52.84	53.79
37주령	86.5	89.63	85.01	53.70	52.78	52.39
38주령	86.98	87.18	83.17	54.95	53.19	53.81
39주령	85.09	86.71	82.22	54.69	54.05	54.97

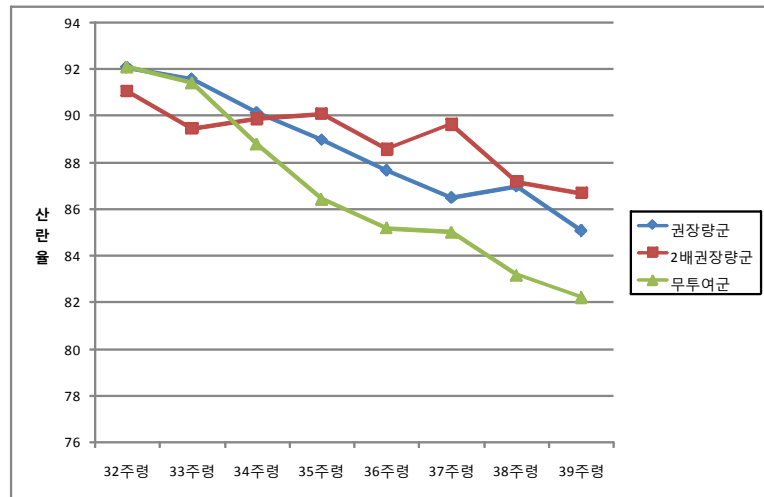


그림 5-112. 시험군간 주간별 산란 곡선 비교

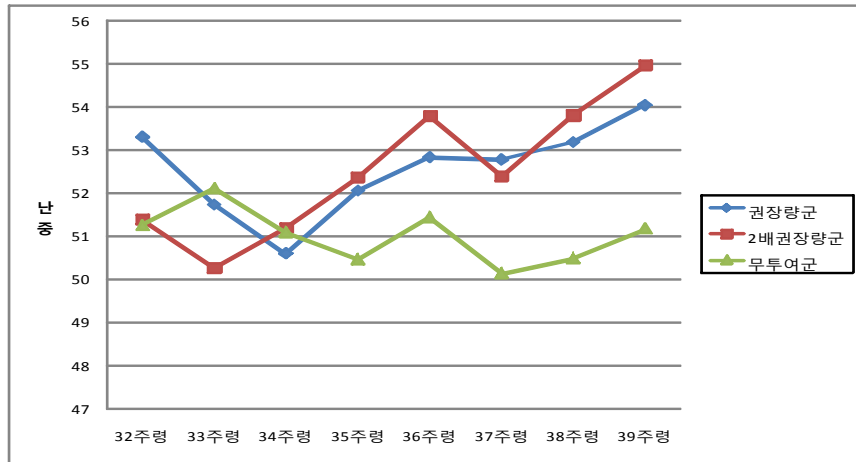


그림 5-113. 시험군간 난중 곡선 비교

③ 폐사율 및 살모넬라 검출율 (표 5-59)

- 실험기간동안 권장량군과 2배권장량군의 폐사율은 각각 2.3%와 2.1%로서 5.6%의 폐사율을 나타낸 무투여군과 차이를 나타내었음.
- 폐사계중 살모넬라균 검출율은 권장량군이 5.9%, 2배권장량군이 4.6%인데 반해, 무투여군은 38.8%로서 살모넬라균의 검출율이 현저히 높았음.

표 5-59. 시험계군별 폐사율 및 살모넬라 검출율 비교

구분	실험수수	폐사율	폐사계중 살모넬라 검출율
권장량군	3,300	2.3%	5.9%
2배권장량군	2,700	2.1%	4.6%
무투여군	3,100	5.6%	38.8%

(라) 고 찰

- 다이스톱 폴츠티F산 제제의 투여는 산란율 향상에 효과가 있으며, 난중도 무투여군에 비해 높은 증가율을 나타내었음.
- 산란계 폐사율 감소에 효과가 있으며 특히 살모넬라증으로 인한 피해를 현저히 감소시키는 것을 확인하였음.
- 따라서 본 제제의 투여는 산란율 향상 및 살모넬라증 예방에 효과가 있으며, 생산성 향상에 도움이 될 것으로 기대됨.

(6) 다이스톱 폴츠티 F2산(육계용) 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 2011년 7월부터 배합사료 내 성장촉진용 항생제의 첨가가 금지된 이후 이들을 대체할 새로운 성장촉진제의 필요성이 대두됨. 이를 위해 유기산, 생균제, 광물질제제 등 다양한 물질들이 항생제대체제로 사용되고 있음. 그러나 아직까지 성장촉진용 항생제 만큼 효과적인 대체제는 찾지 못하고 있음.

- 이에 생균제가 가지는 장점에 미네랄을 함유한 천연물질이 가지는 항균 및 항바이러스 능력을 나타내는 다이스트롭을 육계에 실제로 적용함으로써 그 효과를 알아보고자 농장적용 시험을 실시함.

(나) 시험제제의 조성

- 육계에 문제를 일으키는 가금티푸스 및 대장균 항체를 함유한 IgY와 초유항체를 함유하고 있으며, 육계성장에 필요한 비타민 A, D3, E, C가 함유되었음. 또한 소화 흡수율 촉진을 위해 2종류의 Probiotics를 추가하여 생산성을 높일 수 있도록 설계함.

(다) 시험방법

① 실험장소 및 기간

- 실험은 경기도 가평군에 위치한 7만수 규모의 육계농장에서 실시하였으며, 실험기간은 실험군은 2015년 11월 5일부터 12월 4일까지 31일간 실시하였음.

② 시험군 및 처리

- 권장량군은 다이스트롭 폴츄리 2산(육계용, (주)삼양애니팜)을 7일령부터 28일령까지 사료톤당 1kg씩 사료에 첨가하였으며, 2배권장량군은 사료톤당 2kg의 다이스트롭을 첨가하였음. 대조군은 어떤 첨가제도 투여하지 않았음. 나머지 조건은 실험군과 대조군 동일하게 하였음.
- 실험군을 3개 계군으로 분류하고 권장량군과 2배권장량군은 전기사료가 들어가는 7일령부터 다이스트롭을 사료톤당 1kg, 2kg씩을 첨가하여 출하 시까지 투여하였음. 대조군은 어떤 첨가제도 투여하지 않았음. 다른 일반 약제들은 실험군과 대조군 모두 동일하게 적용하였으며, 사료는 중앙사료를 사용하였고, 31일령에 출하하였음.

(라) 시험결과

① 육성율 비교

- 3개 계군 모두 31일령에 출하되었으며 육성율은 권장량군이 96.1%, 2배권장량군이 96.2%였으며 대조군은 94.3%로 폐사율이 높았음(표 5-60). 이는 사육기간 중 대조군에서 가금티푸스로 인한 폐사가 증가하였고 호흡기질병(Mycoplasmosis)과 함께 병발한 대장균증으로 인한 폐사율도 권장량군과 2배권장량군에 비해 높았기 때문으로 분석됨.

② 생산성적 비교

- 사료요구율은 대조군이 1.68로서 권장량군 1.47, 2배권장량군 1.45에 비해 높아 권장량군과 2배권장량군에 비해 증체를 위해 더 많은 사료가 소요되었음. 생산지수는 2배권장량군이 336으로 가장 좋았고 권장량군이 320, 대조군이 257로서 무투여군은 2배권장량군은 물론 권장량군 보다는 현저히 낮은 생산지수를 나타내어 생산성에서 다이스트롭을 투여한 권장량과 2배권장량군이 우수함을 확인할 수 있었음(표 5-61, 그림 5-114).

(마) 고찰

- 육계농장에 다이스트롭 폴츄리2산 제제를 투여한 결과, 육성율은 대조군 94.3%에 비해 권장량군과 2배권장량군이 각각 96.1%와 96.2%로 나와 육계의 폐사율을 감소시키는 것으로 나타났음.
- 사료요구율에서도 대조군이 1.68인데 반해, 권장량군은 1.47, 2배권장량군은 1.45로 나와 다이스트롭이 우수한 사료효율을 가진 것으로 사료됨. 전체적인 생산지수를 보면

대조군 257에 비해 권장량군 320, 2배권장량군 336으로 다이스톱 풀츄리 2산이 육계 생산성 향상에 우수한 효과가 있음을 확인하였음.

표 5-60. 시험 육계군의 육성을 비교

구분	입추수	출하일령	폐사수	육성율(%)
권장량군	33,500	31	1,327	96.1
2배권장량군	27,800	31	1,053	96.2
대조군	32,000	31	1,833	94.3

표 5-61. 시험육계군의 생산성적 비교

구분	사료섭취량(톤)	평균출하체중(kg)	사료요구율	생산지수
권장량군	72	1.52	1.47	320
2배권장량군	61	1.57	1.45	336
대조군	72	1.42	1.68	257

※ 생산지수 : $\{(평균중량 \times 육성율) \div (출하일령 \times 사료요구율)\} \times 100$

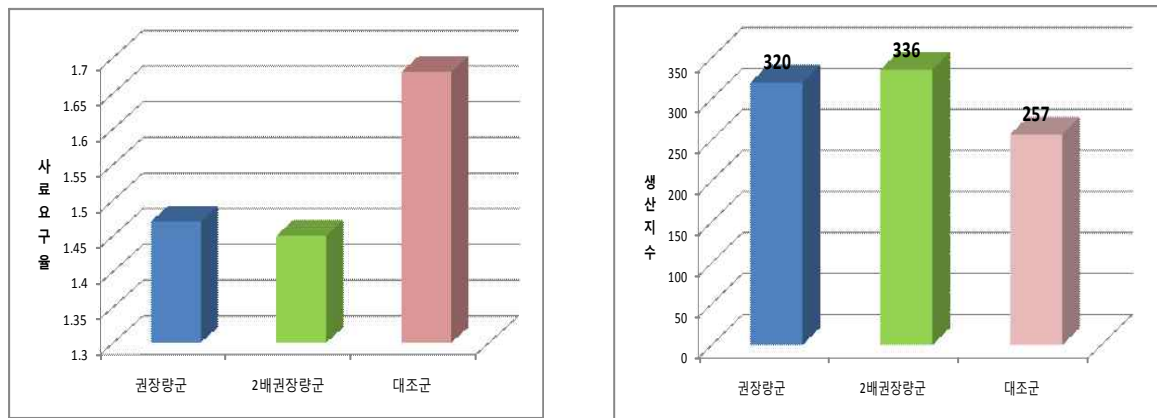


그림 5-114. 시험 육계군의 사료요구율 및 생산지수 비교

(7) 아이지신 캄프산(송아지용) 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 산란기에 특정 항원을 접종시 혈중으로도 특정 항원에 대한 항체가 형성되지만 난황으로도 특정 항원에 대한 항체가 혈중과 동일하게 형성되는데 난황에 형성되는 이러한 항체를 난황항체(IgY Antibody)라고 함. 이와 유사하게 젖소에 특정 항원을 주사하여 초유에서 얻은 항원을 초유항체(Colostrum antibody)라고 함.
- 난황항체 제제는 현재 수의학 뿐만 아니라 인의, 건강식품 등에 광범위하게 개발 및 사용되고 있으며 앞으로도 더 많이 상용화 될 전망이며, 항생제대체제로서도 각광받

고 있으며 특히 바이러스성 질병 치료에 뛰어난 효과를 인정받아 로타바이러스 및 BVD등의 바이러스성 설사병 치료에 이용되고 있음.

- 이에 본 과제에서 제2 세부과제팀과 공동 생산한 난황항체 및 초유항체 복합제제인 아이지신 켈프산(송아지용) 제제에 대한 농장 적용 시험을 실시하여 그 효과를 확인하고자 함.

(나) 실험재료 및 방법

① 시험장소 및 일시

- 시험장소: 경기도 포천시 소재 한우사육장
- 시험일시: 2016년 1월 8일 - 3월 2일 (2개월간)

② 시험재료

- 아이지신 켈프산은 송아지에 질병을 일으키는 10가지 특정 항원을 산란계에 주사하여 난황항체를 얻고, 동일 항원을 젖소에 주사하여 초유항체를 생산하였고, 이 면역 성분(난황항체와 초유항체 분말)에 비타민C와 타우린 2종의 Probiotics(*Bacillus mesentericus*, *Clostridium butyricum*)를 혼합하여 기능을 강화하였음(표 5-62).

표 5-62. 아이지신 켈프산 제제내 면역항체 성분

구 분	항체 생산에 사용된 항원의 종류
바이러스성 항체	Rotavirus
	Coronavirus
	BVDvirus
세균성 항체	E.Coli(K99, F41)
	Salmonella typhimurium
	Salmonella enteritis
	Mannheimia haemolytica
	Pasteurella multocida A

③ 시험 방법

- 시험농장은 한우 번식과 비육을 함께하는 일관사육 농장으로 번식우 150마리를 보유하고 있으며, 매년 겨울 BVD(소 바이러스성 설사병)로 많은 피해를 보고 있으며, 주로 2개월에서 3개월령 사이에 다발하였음.
- 본 실험은 설사 발생 자우에 대해 아이지신 켈프산 두당 20g을 물에 희석하여 1일 2회 (아침, 저녁) 2회 경구투여 하였음.
- 실험 기간동안 총 36두의 설사 자우에 아이지신을 경구투여 하였으며 아이지신 외에 다른 치료제는 사용하지 않았음. 설사증상 자우의 분변 시료는 임프로 AH (또는 경북대)로 보내어 원인체 동정을 실시함.

(다) 시험 결과(표 5-63)

- 설사를 일으킨 36두의 자우에 대한 아이지신 투여 결과 BVD 단독 원인체의 경우 총 10두가 발병하여 6두는 완치되었고, 2두는 거의 완치 1두는 호전되었으며 1두는 치료반응이 없었음. 반응을 나타내지 않은 1두는 4개월의 자우로서 반추위가 발달하여 아이지신에 반응하지 않은 것으로 보임.

- BVD와 대장균이 혼합감염된 15두의 자우에 아이지신을 투여한 결과 7두는 완치되었고, 5두는 아주 효과가 좋았으며 3두는 호전되었으며, 반응을 나타내지 않은 개체는 없었음.
- 코로나바이러스 감염개체는 2두로서 1두는 완치, 1두는 아주 호전되었음.
- 대장균 감염된 5두의 자우에 아이지신을 투여한 결과, 5두 모두 완치되었음.
- 로타와 대장균이 혼합감염된 4두는 아이지신 2회 투여후 모두 완치되었음.
- 이상의 시험결과를 보아 아이지신 켈프산이 BVD나 코로나바이러스 등의 단독감염 뿐만 아니라 BVD와 대장균, 로타바이러스와 대장균의 혼합감염에도 효과적임이 확인되었음.

표 5-63. 시험농장 설사병 발생 자우의 감염 질병별 아이지신 켈프산의 투여효과

설사질병	아이지신 투여횟수	반응 없음	호전		
			+	++	+++
BVD	2회	1	1	2	6
BVD+대장균	2회		3	5	7
코로나바이러스	2회			1	1
대장균	2회				5
로타바이러스+대장균	2회				4

(라) 고찰

- 아이지신 켈프산은 BVD, 로타, 코로나 등의 바이러스성 설사병은 물론 대장균성 설사에 우수한 치료 효과를 나타내었음.
- 아이지신은 단독감염 뿐만 아니라 BVD와 대장균, 로타와 대장균의 혼합감염시에도 우수한 효과를 나타내어 농장에서 주로 발생하는 혼합감염에 우수한 치료효과가 기대됨.
- 다만 아이지신은 반추위가 발달한 4개월령 이상의 자우에는 효과가 떨어지는 것으로 나타나 3개월령 이하의 자우 설사에 사용 시 충분한 효과를 기대할 수 있는 것으로 판단됨.

(8) 아이지신 피그1(이유자돈용)산 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 현재 한국의 양돈장은 종돈수입에 따른 각종 질병이 해외로부터 유입되어 생산성 저하를 일으키고 있다. 특히 PED, Rotavirus 등은 포유자돈과 이유자돈에 발생시 폭발적인 폐사를 일으킴으로써 막대한 경제적 피해를 야기해왔음.
- PED 등의 바이러스 질병들은 백신과 방역외에 발병농장에서 할 수 있는 수단이 없었다. 이에 따라 PED 바이러스와 결합하여 원인체를 배출시킴으로써 PED를 예방은 물론 치료까지 할 수 있는 난황항체와 초유항체에 대한 관심이 커지고 있음.
- IgY는 이미 가축치료와 건강식품 및 인의에서도 지대한 관심을 갖고 각 종의 제품이 개발되고 있는 중이다. 양돈업에서는 바이러스성 질병(PED, TGE, ROTA)과 독

소산생 대장균증에 IgY 기술이 이용되고 있음.

- 본 과제에서 개발한 아이지신 피그 1산은 자돈에 문제를 일으키는 소화기질병(세균 및 바이러스)에 대한 IgY와 초유항체를 함유하고 있어 직접적으로 소화기질병을 완화시킬 수 있으며, 또한 펩타이드 아연과 Probiotics가 복합적으로 함유되어 있어 자돈의 소화기질병 예방에 큰 도움이 될 것으로 기대되며, 이에 농장 적용시험을 실시하여 그 효과를 확인함.

(나) 실험방법

① 시험장소 및 기간

- 실험농장 : 고온농장(경기도 포천시 연천군 이동리)
- 생산규모 : 모돈 120두(일관사육)
- 시험기간 : 2015년 9월 18일 - 11월 1일(45일간)

② 시험방법

- 26일령 자돈을 각각 권장량군, 2배권장량군, 무투여군의 3개 실험군으로 나누고 각각 25두, 25두, 20두로 나누어 별개의 돈방에 격리하여 실험을 실시하였음. 시험 개시일령은 26일령이었으며 종료일령은 70일령으로 44일간 실험을 실시하였음.
- 권장량군은 아이지신 피그1산을 사료톤당 1kg을 실험기간동안 투여하였고, 2배권장량군은 두당 2kg을 투여하였으며, 제반 실험조건은 동일하게 하였음.
- 시험기간동안 각 돈군의 설사발생을 체크하여 기간과 설사정도를 기록하였으며, 시험군별로 폐사율을 기록하였음.
- 실험 시작전 모든 자돈군의 체중을 이동식체중계(카스 CTI-1110)를 이용하여 측정하였으며, 육안적으로 허약하거나 유병소견이 있어 보이는 개체는 실험에서 배제하였음. 실험 중 투여되는 사료의 양은 정확히 기록하였으며, 자돈군에서 설사가 발생 시에는 설사변을 채취하여 실험함(임프로 AH 또는 경북대)에 의뢰하였음.
- 또한 매일 일정시간에 설사, 발열, 기침 등 임상증상을 체크하여 기록하였으며, 실험 종료 시 모든 자돈의 종료체중을 측정하였으며, 그 때까지 섭취한 사료량을 정확히 기록하였음.

(다) 시험결과

① 설사발생두수 및 폐사율(표 5-64 및 그림 5-115)

- 3개군의 설사 발생두수는 권장량군과 2배권장량군이 각각 5두, 3두로 유사하였으나 무투여군은 9두로 현저한 차이가 있었음. 평균 설사 기간도 권장량군이 4.3일, 2배권장량군이 2.7일로 무투여군 8.9일에 비해 유의있게 짧아 아이지신 피그1산이 이유자돈 설사에 효과가 있음을 확인하였음.
- 폐사율은 권장량군과 2배권장량군이 각각 3.5%, 2.4%였으며, 무투여군은 5.5%로 다소 높게 나타났음.

② 생산성 분석 결과(표 5-65 및 그림 5-116)

- 두당일일사료섭취량은 권장량군이 547g, 2배권장량군이 542g, 무투여군이 543g으로 3개 돈군이 비슷하였음.
- 두당일일증체량은 권장량군이 539g, 2배권장량군은 559g, 무투여군은 501g으로 2배권장량군이 가장 좋았고 무투여군은 권장량군과 2배권장량군에 비해 낮았으며, 사료요구율은 2배권장량군이 0.97으로 권장량군 1.02, 무투여군 1.08에 비해 좋게 나타

낮음.

표 5-64. 3개 시험군간 설사발생두수 및 폐사율 비교

구 분	두 수	설사 발생 두수	평균 설사 기간 (day)	폐사율 (%)
권장량군	25	5	4.3	3.5
2배권장량군	25	3	2.7	2.4
무투여군	20	9	8.9	5.5

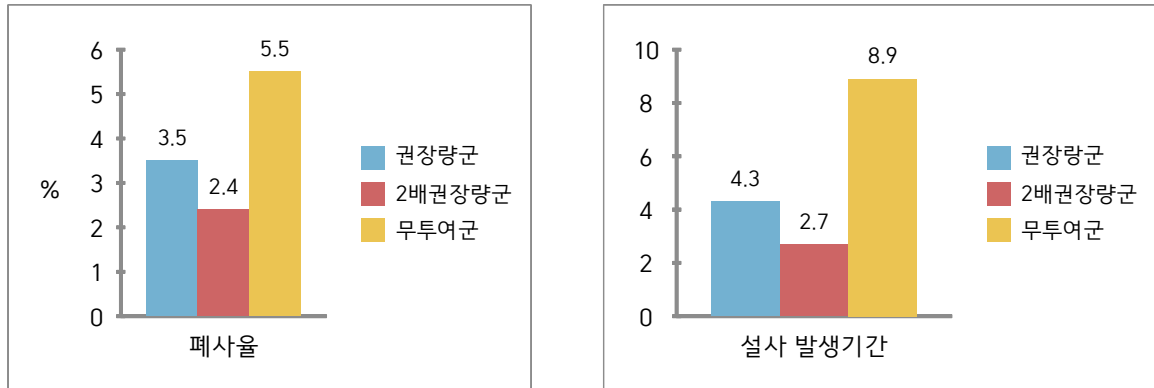


그림 5-115. 시험 돈군간 폐사율 및 설사 발생기간 비교

표 5-65. 시험 자돈군간 생산성 비교

구 분	두수	총사료 섭취량(kg)	두당일일 사료섭취량 (g/day/두)	개시평균 체중(kg)	종료평균 체중(kg)	두당일일 증체량 (g)	사료 요구율
권장량군	25	602	547	5.9	30.2	539	1.02
2배권장량군	25	596	542	6.1	31.3	559	0.97
무투여군	20	477	543	6.2	28.7	501	1.08

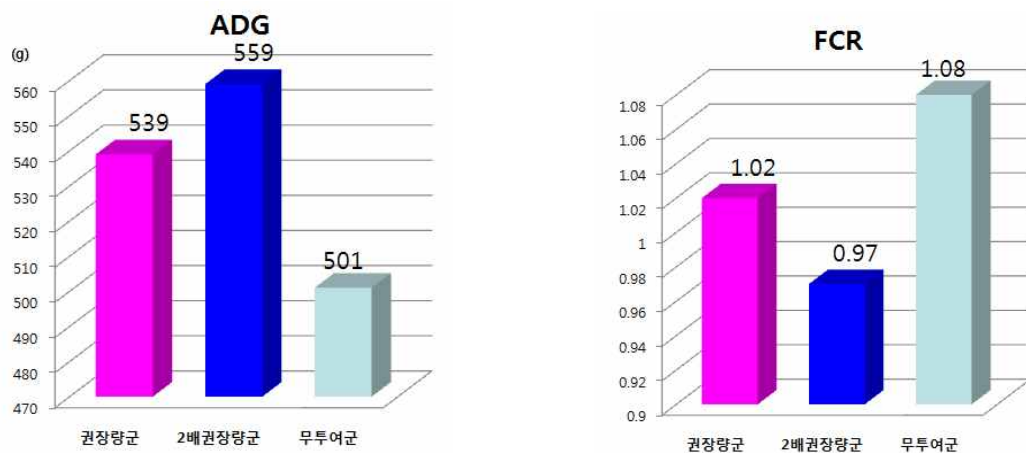


그림 5-116. 시험 돈군간 일일증체량(좌) 및 사료요구율(우) 비교

(라) 고찰

- 평균설사기간은 무투여군이 8.9일로서 권장량군과 2배권장량군 4.3일, 2.7일보다 길었고 폐사율도 무투여군이 5.5%로 다른 2개 시험군보다 높았음.
- 두당일일증체량은 2배권장량군이 559g으로 권장량군 539g, 무투여군 501g 보다 높았으며 사료요구율도 0.97으로 권장량군 1.02, 무투여군 1.08보다 좋았음.
- 아이지신 피그1 제제는 이유자돈 구간용 초유항체 및 난황항체 혼합제품으로 Probiotics, 비타민, 미네랄 등이 혼합된 기능성 제품으로 설사 기간 단축 및 사료효율 증진에 우수한 효과가 있음을 이번 실험을 통해 확인할 수 있었음.

(9) 아이지신 피그2(육성돈용)산 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 금번 실험에서는 비육돈용 면역복합제제 조성으로 개발된 아이지신 피그2산 제제의 농장 적용 효과를 확인하기 위하여 실시하였음. 본 제제는 주요 돼지 질병에 대한 항체를 함유한 난황과 초유 뿐만 아니라 비타민, 타우린, 2종 Probiotics를 함유하여 증체율 향상 및 폐사율 감소에 우수한 효과가 있을 것으로 기대됨.

(나) 시험방법 및 결과

- 실험농장: 청송농장(경기도 파주시소재, 모든 100두규모)으로 시험 당시 유행성설사병 등 설사병 발생으로 인한 피해가 심각한 농장이었음.
- 실험기간: 2015년 11월 4일 - 2016년 1월 4일
- 시험군 및 제제 투여: 72일령 육성돈을 30두씩 3개 시험군(총 90두) 즉, 권장량군, 2배권장량군, 무투여군으로 분류하였으며, 표 5-66과 같이 사료 혼합량을 달리하여 투여하였으며, 무투여군은 해당 농장의 육성돈용 사료만 급여하였음.
- 실험은 72일령부터 실험을 개시하여 60일간 실시하였음.

표 5-66. 효능 검증을 위한 시험군 설정 및 제제 투여방법

그룹	실험두수	평균개시체중(kg)	투여 방법
2배권장량군	30두	27.3	사료톤당 2kg 혼합하여 첨가
권장량군	30두	28.1	사료톤당 1kg 혼합하여 첨가
무투여군	30두	28.3	사료만 급여

(다) 시험결과

① 설사 발생율 및 폐사율(표 5-67)

- 60일 동안 권장량군과 2배권장량군 및 무투여군의 설사발생율과 폐사율을 비교한 결과, 2배권장량군과 권장량군의 설사발생율은 최소 13%, 최대 26.7%인 반면, 무투여군의 설사발생율은 43.8%와 64.3%로서 큰 차이를 나타내었음.
- 폐사율도 2배권장량군과 권장량군이 6.7-13.3%인 반면 무투여군은 37.5%로 나타나 면역제제 투여군과 큰 차이를 나타내었음. 2배권장량군과 권장량군 사이에는 설사 발생율에서 2배권장량군이 권장량군 보다 효과가 좋았으나 폐사율에서는 큰 차이가 없었음.

② 증체율 비교

- 일당증체율은 2배권장량군과 권장량군이 무투여군에 비해 유의있게 높았으며, 2배 권장량군이 권장량군보다 일당증체율이 높게 나타났음(표 5-68).

표 5-67. 시험농장 면역제제 급여 및 비급여군의 설사발생율 및 폐사율

시험군	실험두수	복당최대설사발생율		설사발생 기간(일)	폐사율	
		두수	%		두수	%
2배권장량군	15	2	13.3	3	1	6.7
	15	3	20.0	4	1	6.7
권장량군	15	3	20.0	4	2	13.3
	15	4	26.7	3	1	6.7
무투여군	16	7	43.8	10	6	37.5
	14	9	64.3	8	4	28.6

* 복당 최대 설사발생율은 시험기간 중 매일 임상관찰하여 설사 발생두수를 기록한 다음, 가장 많은 두 수가 설사증상을 나타낸 일자의 두수를 기준으로 복당 최대 설사 발생율을 산정하였으며, 설사발생기간은 복단위로 관찰하여 설사 개시 후 종식될 때까지의 일자를 기록하였음.

표 5-68. 시험농장의 3개 실험군간 증체율 비교

시험군	실험 두수	평균개시체중 (A)	평균종료체중 (B)	실험기간 (C)	일당증체율(g) [(B-A)/C]
2배권장량군	30	27.3	75.1	60	797
권장량군	30	28.1	74.8	60	778
무투여군	30	28.3	72.9	60	743

(다) 고찰

- 설사병 발생이 문제되는 농장에 대하여 아이지신 피그2(육성돈용)산 제제를 적용한 결과, 설사발생율과 설사발생기간이 감소하였으며, 돼지의 성장 개선 효과가 ○ 쓰음이 확인되었음.
- 또한 면역제제 권장량투여군에 비해 2배권장량투여군에서 설사발생율 감소 및 일당 증체량 개선효과가 높아 설사병 발생농장인 경우 2배 권장량 적용이 추천됨.

(10) 아이지신 피그3(비육돈용)산 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 국내 양돈장의 생산성에 영향을 끼치는 요인중 하나는 비육구간에서의 폐사율이며, 이를 반영하듯 생산성 상위농장은 비육돈 폐사율이 낮은 반면, 하위농장은 폐사율이 높은 실정임.
- 아이지신 피그3산 제제는 비육돈에 문제가 되는 질병에 대한 항체와 면역력을 높여

주는 비타민과 생균제가 복합적으로 혼합된 제제로서 폐사율 감소와 증체율을 높여 주어 농장 생산성 향상에 도움을 줄 것으로 기대됨.

(나) 시험방법

① 실험농장 및 시험기간

- 실험농장: 청송농장(경기도 파주시 파주읍 소재, 모돈 100두 규모의 일관사육 농장)
- 시험기간 : 2015년 7월 12일 - 10월 23일 (104일간)
- 해당농장은 유창돈사 농장으로. 실험은 비육사내 격리된 돈방에서 권장량군, 2배권장량군, 대조군으로 구분하여 실험을 실시하였음. 각 돈방의 사료급여기 및 음수급여기는 동일하며 환기나 온도에 영향을 주는 요인을 최소화하였음.

② 실험재료 : 아이지신 피그3(비육돈용)산

③ 실험방법

㉠ 공시동물; 73일령 50두(권장량 투여군 20두, 권장2배 투여군 10두, 대조군 20두)

㉡ 사료: 기존 농장에서 사용하고 있는 퓨리나사료를 사용하였으며, 사료에는 다른 사료첨가제가 전혀 첨가되지 않았음.

㉢ 아이지신 피그3산(이하 피그3) 투여시기 및 방법

- 아이지신 피그3는 권장량군과 2배권장량군에 투여하고 대조군에는 투여하지 않았음. 권장량군에는 사료톤당 0.5kg의 비율로 사료에 혼합하여 투여하였으며, 2배권장량군에는 사료톤당 1kg의 피그3를 사료투여시 혼합하였다. 실험시작부터 출하 1주일전까지 권장량군과 2배권장량군에 피그3를 투여하였으며, 대조군에는 피그3는 물론 다른 어떠한 첨가제도 투여하지 않았음.

㉣ 조사항목: 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율, 분변내 미생물 검사

(다) 실험결과

① 비육돈 증체량 결과(표 5-69)

- 실험결과 종료체중은 2배권장량군이 114.7kg으로 가장 높았고 권장량군이 비슷한 113.2kg이었음. 대조군은 109.0kg으로 2배권장량군과 권장량군에 비해 종료체중이 낮았음. 총증체량도 2배권장량군과 권장량군이 각각 85kg과 83kg으로 대조군 78kg에 비해 높게 나타났음.
- 일당증체량은 2배권장량군이 817g으로 현저히 높았으며, 권장량군이 798g으로 다음으로 좋았으며 대조군은 751g으로 낮았음.
- 이상의 실험결과로 볼 때 피그3를 투여한 권장량군과 2배권장량군은 대조군에 비해 증체효과가 월등히 좋았으며, 2배를 투여한 돈군이 증체효과가 가장 좋아 투여량에 비례하여 증체를 나타냄을 확인할 수 있었음.

② 비육돈 사료요구율 결과(표 5-70)

- 아이지신 피그3를 투여한 권장량군과 2배권장량군의 두당일일사료섭취량이 각각 2,029g, 2,055g으로서 대조군의 1,982g보다 다소 높았으나 큰 차이는 나지 않았음.
- 반면, 사료요구율은 권장량군과 2배권장량군이 각각 2.54와 2.51로서 2.63인 대조군에 비해 크게 차이가 있어 아이지신 피그3 투여가 사료효율 향상에 우수한 효과가 있음이 확인되었음.

표 5-69. 시험농장 시험 비육돈군의 증체량 비교

구분	실험 두수	개시체중 평균(kg)	종료평균체중 (kg)	총증체량 (kg)	일당증체량 (g/day)
권장량군	20	30.2	113.2	83.0	798
2배권장량군	10	29.7	114.7	85.0	817
대조군	20	30.9	109.0	78.1	751

표 5-70. 시험농장 시험 비육돈군의 사료섭취량 및 사료요구율 비교

구분	두당총사료섭취량 (kg/두)	두당일일사료섭취량 (g/day/두)	사료요구율
권장량군	211.0	2,029	2.54
2배권장량군	213.8	2,055	2.51
대조군	206.1	1,982	2.63

② 설사발생율(그림 5-117)

- 그림 5-116에서 보는 바와 같이 피그3를 사용함으로써 농장의 설사발생율이 획기적으로 감소하였다. 분변검사 결과 70%이상의 설사가 살모넬라균이 원인으로 확인되었으며, 이로 볼 때 피그3가 비육돈의 살모넬라성 설사에 우수한 효과가 있음이 확인되었음.

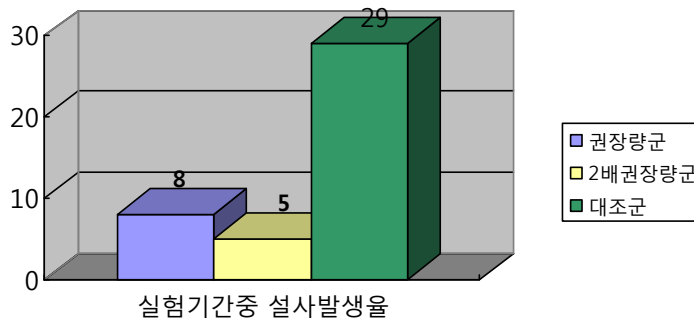


그림 5-117. 시험기간 중 시험군간 설사 발생을 비교. 실험기간중 설사발생 개체의 수를 총합하여 계산.

(라) 고찰

- 아이지신 피그3가 비육돈의 증체율과 사료요구율에 우수한 효과를 나타내었다. 특히 아이지신 피그3를 2배 투여한 돈군이 더 우수한 증체율과 사료요구율을 나타내었음.
- 농장에 문제되던 살모넬라균 감염에 의한 설사병 감소에도 효과가 있음이 확인되었음. 따라서 아이지신 피그3가 비육돈의 경제성 및 살모넬라증 등의 세균성 질병의 감소에 우수한 효과가 기대됨.

(11) 아이지신 폴츄리 1(산란계용)산 실험 결과 보고서

(가) 시험배경

- 국내 산란계 농가의 가장 문제가 되는 질병중의 하나는 가금티푸스이며, 산란중인 가금에서 발생한 가금티푸스는 쉽게 컨트롤하기 어렵고 경제적으로 큰 피해를 야기함. 산란이전 티푸스백신을 투여하여 예방하지만 그것만으로 충분하지 않으며, 산란중인 가금에서 티푸스가 발생하면 항생제를 사용할 수 없어 피해가 커지게 됨. 이에 따라 산란중인 가금에서 발생한 티푸스를 치료할 수 있는 항생제대체제로서 티푸스에 대한 항체가 함유된 제품을 개발하게 되었음.
- 본 과제에서 개발한 아이지신 폴츄리1산 제제는 티푸스 및 대장균에 대한 IgY와 초유항체가 함유되어 있으며, 기타 2종의 Probiotics와 미네랄 및 비타민이 함유되어 있어 생산성 향상에도 효과적일 것으로 기대됨.

(나) 시험방법

① 실험장소 및 기간

- 경기도 포천시 창수면 소재 산란계농장(무창계사이며, 사육품종은갈색 하이라인)
- 실험기간: 2016년 5월 2일 - 6월 26일 (8주간)

② 실험재료 및 방법

- 실험제품은 (주)삼양애니팜에서 제조한 아이지신 폴츄리1산 제품을 사용
- 실험군은 권장량군(5,100), 2배권장량군(4,800수), 무투여군(5,200수) 등 3개 계군으로 구분하였으며, 권장량군은 사료톤당 1kg을 사료에 첨가하였으며, 2배권장량군은 사료톤당 2kg을 사료에 첨가하였고 무투여군은 사료만 투여하였음.
- 낱플 급수시스템을 사용하고, 사료는 자동급이기로 급이되었으며, 환기와 기타 환경은 동일한 시스템으로 작동되었으며, 사료는 안양축협사료를 사용하였음.
- 산란율을 매주 측정하여 평균값을 기록하였으며, 매일 폐사계의 수를 기록하고, 폐사계에 대해서는 부검하여 원인체를 확인하였음.

(다) 시험결과

① 산란율

- 37주령부터는 산란계의 산란율이 다소 감소하는 시기로 무투여군의 경우 40주령까지 산란율이 83%까지 유지하다가 그 이후 79%까지 하락한 반면, 권장량군과 2배권장량군은 40주령까지 오히려 산란율이 소폭 증가하였다가 44주령에 권장량군은 83.1%, 2배권장량군은 82.6%로 감소하였음. 권장량군과 2배권장량군 사이에는 유의차가 발생하지 않았으나 무투여군과 권장량군 및 2배권장량군 사이에는 실험 4주 이후 3%정도의 산란율 차이를 나타내어 아이지신이 산란율에 긍정적인 효과를 나타냄을 확인하였음(표 5-71 및 그림 5-118).

② 폐사율 및 폐사계의 살모넬라 검출율(표 5-72)

- 실험기간동안 권장량군과 2배권장량군의 폐사율은 각각 2.2%와 1.8%로서 4.9%의 폐사율을 나타낸 무투여군과 차이를 나타내었음.
- 폐사계에서의 살모넬라 검출율은 권장량군이 3.2%, 2배권장량군이 2.5%인데 반해, 무투여군은 29.8%로서 살모넬라증으로 인한 폐사율이 높게 나타났음.

(라) 고찰

- 37-44주령 구간의 산란계군에 아이지신 폴츄리1산을 투여한 결과 8주간 무투여군에

비해 3%정도의 산란율 향상 효과를 나타내었음.

- 시험기간 동안 살모넬라증으로 인한 폐사율이 무투여군이 29.8%인데 반해 권장량군과 2배권장량군이 각각 3.2%, 2.5%로서 현저한 차이를 나타내어 아이지신 폴츄리1산이 살모넬라증을 효과적으로 컨트롤할 수 있음을 확인하였음.
- 이와 같은 결과로 볼 때 아이지신 폴츄리1산은 살모넬라증을 효과적으로 컨트롤 할 수 있는 것 외에 산란율 향상 등 생산성 향상 효과도 나타내어 산란계장의 경제성 증대에 기여할 것으로 기대됨.

표 5-71. 시험기간 중 시험계군간 산란율 비교

시험기간	산란율(%)		
	권장량군	2배권장량군	무투여군
37주령	84.3	83.6	83.9
38주령	84.8	84.3	82.9
39주령	85.1	84.8	83.1
40주령	85.5	85.9	82.8
41주령	84.1	85.2	81.3
42주령	83.7	83.9	81.2
43주령	82.9	83.2	80.4
44주령	83.1	82.6	79.5

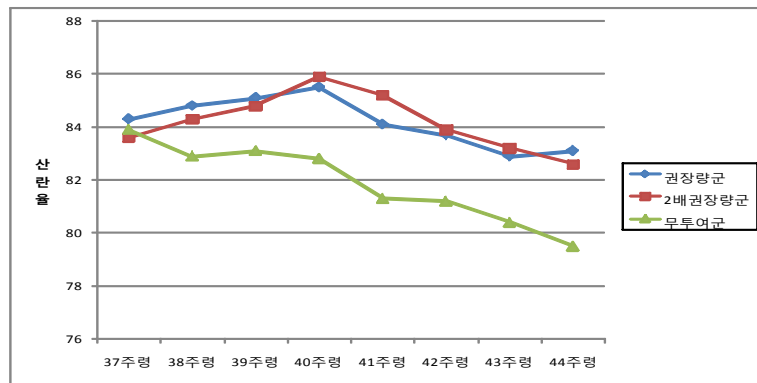


그림 5-118. 시험기간 중 시험계군간 산란곡선 비교

표 5-72. 시험기간중 계군별 폐사율 및 살모넬라 검출율

구분	시험수수	폐사율(%)	폐사계 살모넬라 검출율(%)
권장량군	5,100	2.2	3.2
2배권장량군	4,800	1.8	2.5
무투여군	5,200	4.9	29.8

제 6절. 5년간 연구수행 내용 요약 및 평가

1. 신소재 산업화를 위한 현장적용 및 효능평가 연구(제1세부)

가. 5년간 연구수행 내용 요약

- (1) 제1세부과제에서는 소재개발팀, 효능평가팀 및 산업화팀의 과제 전반을 총괄, 조정하며, 개발된 신소재를 이용한 가축용 면역복합제제의 개발, 시제품 제작, 농장 적용시험 및 제품화를 주관하였음.
- (2) 개발된 양계용, 양돈용 및 축우용 면역복합제제의 실험실 및 효능평가를 제1협동과제의 효능평가팀 및 제4협동과제의 산업화팀과 긴밀히 협조하여 수행함으로써 최종 19종의 가축용 면역복합제제의 제품화에 성공하였음.

나. 대표적 연구성과

- (1) 개발 면역복합제제는 주요 가축 질병 원인체에 대한 고면역 항체성분(난황항체 및 젓소 초유항체)을 포함하고 있어 다양한 가축 질병에 대한 예방 및 치료제로 활용이 가능한 것으로 평가됨.
- (2) 개발 면역복합제제를 신생가축에 초유 개념으로 적용할 경우, 해당 가축에 높은 초기 면역을 형성시켜 줄 수 있으므로 포유기 가축의 질병 발생 예방 및 치료에 효과적임을 확인하였음.
- (3) 양돈용 면역복합제제인 경우, 최근 전국적으로 문제되는 돼지유행성설사병의 피해를 방지하는데 효과적임이 확인되었으며, 전국 양돈장에 일반적으로 감염되고 있는 돼지 로타바이러스 및 대장균증의 예방 및 치료에도 우수한 효과가 있는 것으로 확인되어 국내 양돈장의 어린 돼지 설사병 피해 저감에 기여할 것으로 판단됨.
- (4) 양계용 면역복합제제인 경우, 괴사성 장염과 살모넬라에 효과적이며, 산란계의 산란율 개선과 육계의 생산성 향상에도 효과가 있는 것으로 확인되었음.
- (5) 축우용 면역복합제제인 경우, 송아지의 바이러스 및 세균성 설사병에 대하여 예방 및 치료 효과가 확인되어 양돈용과 동일하게 송아지 설사병 방지용으로 활용이 가능할 것으로 평가됨.
- (6) 상시 연구성과를 논문(SCI 3, 비SCI 5) 등으로 활용하고, 제품 인허가자료로 활용함.

다. 종합평가 및 향후 발전방안

- (1) 본 과제에서 목표로 한 가축용 면역복합제제 19종의 제품화를 달성하여 세부과제의 목표는 충분히 달성하였다고 평가됨.
- (2) 단, 면역제제와 생균제 등 제품화에 성공한 개발 소재 이외 식물소재, 앵타머소재, 리소좀 소재, 항미생물펩타이드 제제 등은 우수한 연구성과에도 불구하고, 대량생산 및 생산원가 문제가 해결되지 않거나 비교적 단가가 저렴한 축산용 사료첨가제로는 개발에 한계가 있었음. 따라서 향후 이들 개발 소재에 대한 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 판단됨.

2. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발(제2세부)

가. 고면역 면역난황항체를 이용한 사료첨가제 개발

(1) 5년간 연구수행 내용 요약

- (가) 복합난황항체 소재를 이용한 사료첨가제를 개발하기 위하여 닭 유래 면역보강분자 선발 수행한 결과 닭 IgY Fc(cFc) 분자 유전자를 구축하였음.
- (나) 닭 유래 면역보강 인자 발현 세포주 개발을 수행한 결과 cFc 분자를 지속적으로 막발현(membrane expression)하는 바이러스 감수성 고면역 유도 세포주를 개발하고 cFc 분자를 발현하는 세포주에 외피 바이러스(돼지; PEDV, PRRSV, 소; BVDV)를 감염시켜 조립 후 budding시 cFc 분자가 바이러스 외피에 장착된 고면역 유도용 고역가 cFc-harboring 바이러스 항원 생산 및 시스템을 구축하였음
- (다) 또한 외피가 없는 바이러스 및 spike 단백질을 보유한 바이러스인 경우(돼지; PEDV spike, PCV2b capsid, 소; BCV spike) 바이러스 단백질 유전자에 cFc 분자가 tagging된 cFc-tagged 재조합 바이러스 단백질을 클로닝하여 이 재조합 단백질을 지속적으로 발현하는 세포주들을 개발을 수행한 결과 이 세포주들로부터 고면역 cFc-tagged 바이러스 재조합 단백질 항원 생산 시스템을 구축하였음
- (라) 구축된 고면역 바이러스 항원 및 바이러스 재조합 단백질 항원 시스템을 이용하여 산란계용 다가 면역항원을 제작하였으며 이를 이용하여 고면역 복합난황항체 생산 시스템을 구축하였음
- (마) 개발된 고면역 복합난황항체 제제는 목적동물을 이용한 실험을 통해 안전성, 안정성 및 효능을 입증하였으며 상품화를 진행하였음

(2) 대표적 연구성과

- (가) 축종별 바이러스 고역가 배양용 cFc 분자 발현 고면역 유도용 최적화 세포주 개발
- (나) cFc 분자가 포함된 바이러스 유래 재조합 구조단백질 발현 최적화 세포주 개발
- (다) 고역가 고면역 바이러스 항원 및 재조합 바이러스 단백질-면역보강인자 항원 생산 시스템 구축
- (라) 산란계용 고면역 다가 혼합백신 제조 시스템 구축
- (마) 고면역 복합난황항체 대량 생산 시스템 구축
- (바) 상기 연구성과를 특허(1건) 및 논문(SCI 6, 비SCI 2) 등으로 활용함.

(3) 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) 산란계 접종용 cFc-harboring 바이러스 항원 및 cFc-tagged 재조합 바이러스 단백질 항원 생산 시스템을 이용하여 불활성화 다가 면역항원을 제작하였고 닭에 면역시킨 결과 cFc 수용체를 포함하는 다양한 탐식세포들로 구성된 항원제시세포의 활성화를 촉진시켜 세포면역과 체액면역을 증가시킴으로써 항체생산의 유도가 증가되어 기존보다 효과적이고 고역가의 복합난황항체를 생산할 수 있을 것으로 판단됨. 고역가 복합난황항체 대량 생산 기반 시스템을 최적화하고 목적 동물에서 안전성 및 유효성 평가를 수행한 결과 생산된 고면역 난황항체가 충분한 안전성 및 효능을 나타낸다고 판단되었으며 시제품 생산 및 산업화 기반이

마련됨.

- (나) 향후 구축된 시스템을 통하여 돼지 만성 소모성 질병뿐만 아니라 급성 장염을 유발하는 PED 제어를 위해 사료첨가제로써 활용이 가능함. 본 연구과제에서 개발된 시스템을 활용하여 국가 재난형 질병 또는 신종·변종 바이러스성 장염을 예방할 수 있는 신소재 개발 또는 응용할 수 있을 것으로 판단됨.

나. 항바이러스 면역 단백질 생산법 구축 및 면역단백질 발현균주의 개발

(1) 5년간 연구수행 내용 요약

- (가) Auto-cloning system과 위치 특이적 재조합 기술을 이용한 항바이러스 면역 단백질 시스템을 구축하고 안정적인 면역 단백질 발현 및 검출을 위한 tagging system 구축하였음
- (나) *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모를 이용한 항바이러스 면역 단백질 발현 시스템 구축을 하였으며 면역 단백질 발현에 사용되는 다양한 발현 host cell line을 구축
- (다) 일반적으로 안전하다고 알려진 *Bacillus* 균주를 이용한 면역 단백질 발현, 효모에서 발현된 면역 단백질의 초고속 스크리닝법 구축하였고 *Pichia*와 *Bacillus*에서 발현된 면역 단백질은 앞에서 구축한 발현된 단백질의 초고속 스크리닝법으로 발현을 확인하였으며 동정을 실시함. 또한 면역 단백질 발현 재조합 균주의 제제화 및 생존률을 확인
- (라) 가축 면역 증진을 위한 축산 사료 첨가용 *Lactobacillus acidophilus* KNU-02의 분리 및 활용 가능성 확인을 확인
- (마) 가축 정장 작용을 가지고 있는 축산 사료 첨가용 *Clostridium butyricum* KNU-L09의 분리 및 활용 가능성 확인
- (바) 가축 정장 작용을 가지고 있는 축산 사료 첨가용 *C. butyricum* KNU-L09의 전장 유전체 분석을 통한 가축 사료 첨가용으로써의 안전성 평가 실시 및 확인
- (사) 제제화된 미생물 소재의 효능평가 시험 및 시제품 원료 제공
- (아) Bench-top fermenter scale, large scale fermenter 운용을 통해 제제화를 위한 최적 배양 조건 확립

(2) 대표적 연구성과

- (가) PCV, PEDV, PRRSV에 대한 항바이러스 면역단백질 발현 재조합 균주 제조 방법 개발
- (나) 항바이러스 면역 단백질 생산법 구축
- (다) 가축 사료 첨가용 생균제 균주 2종 확보
- (라) 가축 사료 첨가용 생균제 균주를 대상으로 하는 안전성 평가법 구축
- (마) 가축 사료 첨가용 생균제 균주 2종을 대상으로 하는 제제화 방법 구축
- (바) 상기 연구성과를 특허(출원4, 등록3) 및 논문(SCI 6, 비SCI 2) 등으로 활용

(3) 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) Auto-cloning system, 단백질 발현 확인을 위한 tagging system을 이용하여 항바이러스 면역 단백질 시스템 구축 및 생산과 이를 확인하기 위한 초고속 스크리닝법의 적용은 국내에서 최초로 시도된 것으로 사료되며 일반적으로 안전하다고 알려진 *Bacillus*와 효모인 *P. pastoris*, *S. cerevisiae*에서 발현되었다는 것에서 강점을 둘 수 있음.
- (나) 향후 구축된 시스템을 통하여 돼지 만성 소모성 질병뿐만 아니라 기타 가축의 질병 제어를 위해 사료첨가제로써 면역 단백질 균주의 개발에 활용이 가능함. 본 연구과제에서 개발된 시스템을 활용하여 국가 재난형 질병 또는 신종·변종 바이러스성 장염을 예방할 수 있는 신소재 개발 또는 응용할 수 있을 것으로 판단됨.
- (다) 본 연구를 통해 얻어진 가축 사료 첨가용 생균제 *L. acidophilus* KNU-02는 농촌진흥청에서 제시한 ‘비료 및 사료로 사용 가능한 미생물 목록’에 해당하고 *C. butyricum* KNU-L09는 진장유전체 분석을 통해 안정성이 확보되었음. 현재 가축 사료에 포함되는 미생물 제제에 사용되는 미생물은 해당 균주 정보 및 활성에 대한 부분에 대해 언급이 미비하며 그 정보를 확인하기 어렵고 안정성 부분에 대해 확실한 정보가 없음. 이로써 본 연구를 통해 확보된 가축 사료 첨가용 미생물 생균제 2종은 해당 시장에서 선점할 수 있으며 가축 사료 첨가용 제제로 가능성이 충분함.

3. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립(제1협동) 가. 기능성 리소솜제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 5년간 연구수행 내용 요약

- (가) 기능성 세포소기관 리소솜 소재를 이용한 가축 면역증강 및 질병예방을 위한 사료첨가제 개발을 위하여 리소솜 확보와 기능향상 기술 개발을 수행한 결과, 리소솜 분리 기술 확보와 동물모델에 적용하기 위한 리소솜 스크리닝 및 리소솜과 퍼옥시솜 분리기술을 개발하였고, 진핵세포에 외부적인 스트레스를 주어 세포 내 리소솜을 활성화 시켜 리소솜 내 유용 효소들의 나노집적화를 위한 고정화 기술을 개발함. 또한, 유전자 재설계를 통해 활성이 강화된 리소솜을 분리 및 효능을 검증하였고, 피부조직상에서 리소솜의 독성 검증 및 *in vivo*상에서의 리소솜 항균활성을 검증하였으며, 리소솜의 안정성 및 활용 가능성을 평가함. 리소솜의 항균 지속력 분석 및 산업화를 위한 *in vivo*분성을 통해 리소솜의 안정성 및 안전성을 검증하였으며, 산업화를 위해 리소솜의 정량화 방법을 제시하고 세포 내 염증 관련 효과 검증 및 대량 생산을 위한 리소솜 분리 공정화 단순화를 통해 리소솜의 대량생산 공정화 방법을 구축함.

(2) 대표적 연구성과

- (가) 진핵 생물 내에 존재하는 순수한 리소솜 분리기술 개발
- (나) 리소솜과 퍼옥시솜 기능분리 기술 개발
- (다) 진핵 세포에 외부적인 스트레스를 주어 세포내 리소솜 활성화 기술 개발

- (라) 리소좀 내 유용 효소들의 나노입자에 고정화 기술 개발
- (마) 유전자 재설계를 통해 활성이 강화된 리소좀 분리 및 효능 검증
- (바) 항균활성이 강화된 리소좀의 항균활성 및 안정성 검증
- (사) 리소좀의 정량화 방법 제시
- (아) 세포 내 염증 관련 효과 검증
- (자) 대량생산을 위한 리소좀 분리공정 단순화
- (아) 상기 연구성과를 특허(출원2) 등으로 활용

(3) 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) 기능성 세포소기관 리소좀을 이용하여 항균성 신소재를 개발하기 위하여, 리소좀 분리기술 및 유해세균 처리 능력 확인뿐만 아니라 리소좀 내 유용 효소들의 나노 집적화를 위한 고정화기술개발 및 항균활성이 강화된 리소좀 분리, 효능 검증 및 안정성 평가하고, 리소좀 대량생산 공정화 방법을 구축하였음.
- (나) 이는 향후 항생물질의 사료 내 첨가의 제한으로 천연 항균 및 천연 기능성 물질 개발을 초점화 하고 있는 시점에서 유용한 기술개발로 판단됨.
- (다) 단, 본 과제에서 목표로 하는 가축용 사료첨가제인 경우, 생산단가를 더 낮추어야 하는 문제점으로 당장에 제품화하기는 곤란하나 이후 단가 및 제형 문제가 해결되면 개발된 리소좀을 가축 사료 첨가제뿐만 아니라, 가축 질병 치료제제로의 응용 방향으로 발전될 것으로 기대됨.

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 5년간 연구수행 내용 요약

- (가) 항바이러스성 사료첨가제를 개발하기 위하여 수급이 용이한 농산물 14점, 자생식물 추출물 3,200점, 산업부산물인 균류배양액, 자생균류자원 300점 등을 확보하여 추출물을 제조하고, 이를 대상으로 neuraminidase 억제활성을 검정하였음.
- (나) 균류 배양액을 대상으로 neuraminidase 저해물질의 탐색 결과 목질진흠버섯 및 장수진흠버섯 배양액이 강력한 활성을 나타내어 목질진흠버섯 산업부산물을 포함하여 2종의 균주배양액으로부터 수종의 활성성분을 분리, 정제하고 hispidin, hypholomine B, inotilone, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one 등으로 화학구조를 규명하였음.
- (다) 스크리닝에 의하여 최종적으로 선정된 장수진흠버섯으로부터 다양한 column chromatography를 수행하여 5종 활성성분을 정제하고, mass 및 NMR 분광분석에 의하여 화학구조를 각각 hispidin, hypholomine B, inoscavin A, davallialactone, phelligridin D로 규명하고 저해활성 및 활성기전을 밝혔음.
- (라) 말뚝진흠버섯 유래 neuraminidase 저해물질 PIE-1, PIE-2, PIE-3을 정제하고 NMR 분석을 통하여 말뚝진흠버섯 유래 neuraminidase 저해물질 PIE-1, PIE-2, PIE-3의 화학구조를 각각 phelligridin D, phelligridin E, phelligridin G로 동정하고 저해활성을 검정하였음.
- (마) In vivo 효능평가를 위하여 장수진흠버섯 활성 조추출물을 다량으로 제조하여 협동연구기관에 제공하고, 지표성분으로 유효 활성성분인 hispidin을 선정하여 직선성,

검출한계, 정량한계, 정밀성 등 시험법 밸리데이션을 확립하였음.

(2) 대표적 연구성과

- (가) 본 연구는 항생제 사용의 제한에 따른 대안으로 항바이러스 천연물소재를 개발하여 가축사료첨가제로의 활용을 모색한 것임.
- (나) 항바이러스 소재 특히 인플루엔자에 유효한 천연물소재를 국내산 농산물, 약용작물, 자생 및 약용균류 등을 대상으로 폭넓게 스크리닝을 수행한 후 활성이 강한 소재를 선별하여 이로부터 유효성분의 분리, 정제 및 화학구조를 규명하였음.
- (다) 또한 분리한 활성 화합물의 항인플루엔자 효능과 기전을 규명하여 천연 항바이러스소재로의 활용가능성을 모색하였음. 특히 사료첨가제의 특성상 원료의 가격경쟁력을 확보하는데 어려움이 있어 산업부산물 등의 활용을 모색함.
- (라) 상기 연구성과를 특허(출원 1, 등록 2) 및 논문(SCI 4)으로 발표함.

(3) 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) 본 연구는 항생제 사용의 제한에 따른 대안으로 항바이러스 천연물소재를 개발하여 가축사료첨가제로의 활용을 모색한 것임. 항바이러스 소재 특히 인플루엔자에 유효한 천연물소재를 국내산 농산물, 약용작물, 자생 및 약용균류 등을 대상으로 폭넓게 스크리닝을 수행한 후 활성이 강한 소재를 선별하여 이로부터 유효성분의 분리, 정제 및 화학구조를 규명하였음. 또한 분리한 활성 화합물의 항인플루엔자 효능과 기전을 규명하여 천연 항바이러스소재로의 활용가능성을 모색하였음. 특히 사료첨가제의 특성상 원료의 가격경쟁력을 확보하는데 어려움이 있어 산업부산물 등의 활용을 모색하기도 하였음. 그러나 이같은 노력에도 불구하고 사료첨가제 등 축산용 대체 항생제의 개발은 가격경쟁력의 측면에서 제품화에 한계가 있었음.
- (나) 본 연구에서는 보다 저렴한 항인플루엔자 천연물 소재를 개발하고자 국내산 농산물, 자생 및 약용작물, 자생 및 약용균류 자원 등을 대상으로 폭넓게 스크리닝을 수행하였음. 스크리닝 과정 중 자생식물 및 약용식물 추출물에서 활성이 우수한 소재를 발견하였으나 소재의 수급성과 가격적인 측면에서 축산용으로의 사용이 어려워 추가적인 연구를 진행하지 못하였음. 그러나 이들 소재는 향후 고부가 의약용료의 개발은 가능할 것으로 판단되어 의약용 및 동물용 항인플루엔자 개발에 유용한 소재로 활용할 수 있을 것임.
- (다) 본 연구를 통하여 장수진흙버섯이 항인플루엔자 효능이 뛰어난을 밝혔음. 장수진흙버섯은 시중에 판매되는 상황버섯의 80%를 차지하고 있음. 상황버섯은 고가의 약용버섯으로 인식되고 있으나 과잉생산에 의하여 가격이 하락되어 생산농가가 어려움을 겪고 있는 상황임. 향후 추가적인 연구를 수행하여 독감의 치료에 장수진흙버섯을 활용한다면 농가소득은 물론 국민건강증진에도 크게 기여할 것임.
- (라) 본 연구에서 도출한 항인플루엔자 소재들에 대하여 향후 고부가 기능성 식품 및 천연물 신약으로의 추가적인 연구를 진행한다면 국내 바이오소재 산업의 활성화 및 경제적 이익 창출에 기여할 것이며, 우리나라 자생 식물 및 미생물자원의 체계적 활용에 기여할 것임.

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) 5년간 연구수행 내용 요약

- (가) 식물발현시스템을 이용한 백신가능 소재를 이용한 사료첨가제를 개발하기 위하여 조직배양 최적화 및 유용유전자 발현 시스템에 관한 연구를 수행한 결과, 국내품종을 위한 조직배양(재분화) 최적화 조건을 확립하였고, 유용 유전자가 고발현할 수 있도록 gene silencing suppressors가 도입된 형질전환 담배를 개발하였으며, 유용 유전자와 GFP를 융합 발현되었음을 확인하였고 조류질병 방제에 사용될 HA를 식물체에 발현하도록 식물체 발현 벡터를 제작하였음. 이 연구를 통하여 얻은 생물정보는 NCBI에 기탁하였음.
- (나) 유용제제로 PMAP:GFP, BSV-S1:GFP, H1N1-HA:RFP의 3가지가 개발되었음.

(2) 대표적 연구성과

- (가) 국내품종을 위한 조직배양(재분화) 최적화 조건을 확립
- (나) gene silencing suppressors가 도입된 형질전환 담배를 개발
- (다) 유용유전자 식물발현용 바이러스 탐색 및 바이러스 벡터 작성
- (라) 동물질병 방제용 3가지 유용유전자 발현 벡터 작성과 발현 확인
- (마) 생물정보 기탁
- (바) 상기 연구성과를 특허(출원 1), 논문(1) 등으로 활용하였음.

(3) 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) 유용유전자 발현 산물이 단백질임을 감안 할 때 콩은 단백질 함량이 다른 작물에 비하여 상대적으로 높기 때문에 산업화 측면에서 콩이 다른 작물보다 유용한 시스템으로 생각되며, 각각의 품종마다 발현정도 및 조직배양 정도가 다르므로 품종마다 형질전환 정도를 확인하여야 최적의 품종을 선정할 필요성이 있음.
- (나) 본 연구에서 발현한 유용유전자의 발현정도가 낮아 산업화가 어려운 상태이나, 발현정도에 영향을 미치는 다양한 요인 분석이 필요한 상황임. 향후 유용유전자 고발현 형질전환체에 관한 연구가 더 진행 되어야 하며, 프로모터 선택을 통하여 발현량을 증진 시키거나, 바이러스벡터조작, 발현된 유용 단백질의 분해 억제, 세포내 유용단백질 발현 장소 등에 관한 추후 연구가 더 진행되어진다면 산업화가 가능한 소재로서 활용도가 클 것으로 생각됨.

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

(1) 5년간 연구수행 내용 요약

- (가) 난황항체제재(IgY)와 식물추출물인 장수진흙버섯추출물(PBE)을 이용한 사료첨가제를 개발하기 위하여 양계질병모델인 조류인플루엔자 바이러스와 괴사성 장염, 가금티푸스, 병원성대장균증을 대상으로 효능평가를 실시하여 방어효능을 확인하였음.
- (나) 장수진흙버섯추출물인 PBE 물질과 청국장 추출물 3종에 대해 H1N1 마우스유발모델 대상으로 효능평가한 결과, 물질투여에 따른 개체군들의 임상증상이나 체중 등에서 큰 변화가 나타나지 않았으나, PBE 투여군과 청국장 추출물중 A8 추출물은 항바이러스 효능과 질병수준에서도 방어효과가 있는 것으로 확인되었음.

- (다) 난황항체제제(IgY)를 괴사성 장염 유발모델 대상으로 효능평가한 결과, 42.8%의 방어효과가 관찰되었으나, 외부개발물질인 스테비아 EM제제와 규산염 광물질제제는 각각 71.4%와 57.1%로 방어효과가 매우 우수하였음.
- (라) 난황항체제제(IgY)를 가금티푸스 유발모델 대상으로 IgY 음수제제와 스테비아 EM제제를 사료첨가로 급이하였을 때, 02% IgY 음수제제에서 55.5%의 높은 방어율이 관찰되었고, 0.2% 스테비아 EM제제에서도 38.8% 방어율을 확인한 바, 이 물질들이 단일제제뿐 아니라 혼합 급여할 경우에 질병방어에 대한 높은 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 판단하였음.
- (마) 난황항체제제(IgY)에 대한 효능평가 및 농장 적용시험 결과, 난계대 질병들이 예상되는 초생추(1일령)부터 3~5일간 음수로 급여하고 이후 사료첨가로 급여했을 때 질병예방 및 방어를 위한 백신보조제와 치료제로서의 역할을 기대할 수 있었음.
- (바) 본 과제에서 개발한 물질과 동물질병모델(조류인플루엔자 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 괴사성 장염, 가금티푸스, 병원성대장균증)을 대상으로 농장 맞춤형 적용 프로그램을 개발하였음.
- (사) 청국장 추출물질인 PGA는 선천성 면역반응의 증가, 증체율 개선, PRRS 등의 바이러스 질병에 대한 저항성 증가 및 모돈의 난산을 개선 등의 효능과 반복된 동물실험과 농장적용 실험을 통해 안전성이 증명되었으며, 모돈의 난산 및 유산 관련 문제 해결을 위해 사용이 권장되며 포유 및 이유자돈의 질병 저항성을 높이는 목적으로 사용될 수 있을 것으로 판단됨.
- (아) 초유 유래 물질인 IC-F1는 PED를 포함한 다양한 포유자돈 설사 병원체들의 항체가 포함된 제제로 PED에 대한 방어효과와 농장적용을 통한 포유자돈의 설사증 개선 효과가 증명되었으며, 포유자돈의 초기 설사병 예방을 위해 사용될 수 있을 것으로 판단됨.
- (자) β -glucan은 선천성 면역반응의 증가 및 장내 유익균을 증가시키는 효과 등이 관찰, 이유자돈을 이용한 살모넬라 공격접종 실험을 통해 살모넬라 감염증에 대한 저항성을 높이고 증체율을 개선하는 효과가 증명되었으며, 이유기 및 비육기 사료에 첨가하여 다양한 소화기성 질병의 예방에 사용될 수 있을 것임.
- (차) Antimicrobial peptide(AMP)는 돼지의 천연 펩타이드로 다양한 병원성 세균에 대한 항균효과가 증명되었으며, 분무제, 사료 첨가제 또는 음수첨가제 등으로 이유기에서 비육기까지의 세균성 감염을 예방하는 목적으로 사용될 수 있을 것임.

(2) 대표적 연구성과

- (가) 본 과제에서 개발된 다양한 신소재 물질에 대한 실험실평가와 목적동물 효능평가 및 농장 적용시험을 차질없이 수행하여 소재 개발 및 제품 출시에 기여하였음.
- (나) 상기 연구성과를 논문(9편) 학술발표(14건) 및 홍보(3건) 등에 활용하였음.

(3) 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) 본 연구과제에서 개발된 물질인 난황항체와 유용미생물(생균제)이 혼합된 난황항체제제(IgY)가 양계분야 질병유발모델에서 효능이 우수한 것으로 확인되었음. 본 제제는 양계에서 발생하는 질병 8종 항원에 대한 항체를 보유하고 있고, 대부분 고병원

- 성 야외주로 면역을 시켜 현장 질병방어에서 우수한 효과를 나타낼 것으로 기대됨.
- (나) 외부개발물질 중에서도 규산염제제 또는 스테비아 EM제제 등도 사육기간 동안 혼합하여 급여 시 질병방어효과 및 생산성에 기여할 것으로 판단됨.
- (다) 본 연구과제에서 개발한 물질과 외부개발물질의 전사육기간 투여 용법, 용량 등을 고려한 질병별 맞춤형 적용 프로그램은 가금사육 농가의 질병 발생 저감 및 생산성 증대에 기여할 것으로 기대됨.
- (5) 5차년도 소재개발팀에서 개발한 소재 중 효능평가가 추가 필요한 항목에 대해서는 과제 완료 이후에도 지속적으로 효능평가지험을 추진하여 결과를 도출할 계획임.

4. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발(제2협동)

가. 5년간 연구수행 내용 요약

- (1) 가축 전염병 제어용 항미생물 펩타이드 선정하고, 선정된 최적 펩타이드의 대량 발현 시스템 개발하여 병원성 미생물 억제제로써의 효과를 분석하고 평가를 수행한 결과, 펩타이드 발현을 위한 cDNA 8종에 클론을 확보하였고, 기존의 발현 시스템을 비교 분석한 결과를 기반으로 bactericidal effect와 숙주 세포 내 단백질 효소에 의한 분해 현상을 극복함으로써 발현을 극대화시킬 수 있는 시스템을 세계 최초로 개발함.
- (2) 또한 각종 크로마토그래피 기법을 도입한 정제 시스템을 최적화시키고 disulfide bond installation 과정을 도입하여 안정성 및 효능을 증대시켰음.
- (3) 항미생물 펩타이드의 항균 작용기전, 세포 독성 실험, 형질전환 동물 및 preproPG1과 관련된 연구들을 진행하였고, 생산된 펩타이드를 제공함으로써 항미생물 펩타이드 검정을 위한 미생물 패널을 구축 및 분석 기술을 개발하였음.

나. 대표적 연구성과

- (1) 돼지 항미생물 펩타이드 20종의 cDNA 확보
- (2) 현존하는 발현 시스템 분석을 통해 기존의 문제점을 극복한 최적 발현시스템 구축
- (3) 미생물 테스트 패널을 통한 최적 항미생물 펩타이드 평가 및 선발
- (4) 최적 항미생물 펩타이드로 선정된 유전자들에 대한 대량 발현 시스템 최적화 및 정제 기술 개발을 통한 대량 생산 시스템의 개발
- (5) 항미생물 펩타이드 활성화 증대를 위한 기술 도입
- (6) 전자 현미경을 통한 항미생물 펩타이드의 항균 작용 기전 분석
- (7) 가축전염성 질병 유발 미생물에 대한 항미생물 억제제로써의 효능 검정 및 기능성 첨가제로써의 효과 검정
- (8) 타세부과제와 협력을 통한 항미생물 펩타이드 검정 기법 및 분석 기술 개발
- (9) 상기 연구성과를 특허(출원2, 등록 1), 논문(SCI 3) 및 홍보 등에 활용함.

다. 종합평가 및 향후 발전방안

- (1) 본 과제를 통하여 가축 전염병 유해미생물 제어용 신소재를 발굴하고 미생물 테스트 패널의 구축 및 항미생물 펩타이드의 항균력을 측정함으로써 최적 항미생물 펩타이드를 선정하였음.
- (2) 기존의 발현 시스템이 가지는 치명적인 문제점을 극복한 대량 발현 및 정제 시스템

을 세계 최초로 개발하였음. 이를 통해 생산된 펩타이드를 이용하여 항균 작용 기전 분석, 기능성 첨가제로써의 효과 검증, 세포 독성 연구를 수행하였으며, 펩타이드를 제형함으로써 분석 기술 개발에 일조함은 물론 관련 과제를 제공하였음.

- (3) 이는 가축 전염병 유해 미생물 제어를 위한 신규 소재들을 도출하고, 확보된 대량 생산 시스템을 통해 항생제 대체물질 개발 및 숙주 독성 단백질 생산 분야의 기술 발전시킬 것으로 판단되며, 항미생물 펩타이드 분석 기술뿐만 아니라 효능 검증 기술 발전에 기여할 것으로 기대됨.
- (4) 또한 식물 내인성 항미생물 펩타이드를 통해 사료 산업, 농업에서의 질병저항성 향상에 활용될 수 있는 기술의 개발 및 형질전환 동물을 통한 항미생물 펩타이드의 *in vivo* 기능을 연구하는 데 도움을 줄 것으로 사료됨.
- (5) 단, 현재 수준의 생산 기술로는 비교적 원가가 저렴한 가축용 사료첨가제 등 동물용 의약품으로 본 항미생물펩타이드 소재를 이용하기에는 한계가 있으므로 단기적으로는 비교적 부가가치가 높은 인체 의약품 등으로 활용방향을 설정할 필요가 있으며, 장기적으로 대량생산기술 개발을 통하여 생산단가를 획기적으로 낮추어야 동물용 의약품으로 제품화가 가능할 것으로 판단됨.

5. 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 및 상용화 기반 구축 (제3협동)

가. 5년간 연구수행 내용 요약

- (1) 가축전염병 유발 세균 및 바이러스와 유발인자들에 각각 특이적으로 결합하는 최적 앵타머 기반의 소재 개발을 위하여 Cloning을 통해 소재를 확보하고, SELEX 및 SPR 기술로 친화력을 평가한 결과, 총 19종의 앵타머 소재를 확보하였음.
- (2) 가축전염병 치료용 앵타머의 상용화를 위하여 *in vitro*에서의 활성 및 안정성 평가를 위하여 SPR 및 ELISA 기반의 효능 평가를 수행한 결과, 각각의 선별된 앵타머는 표적 물질에 대해서 특이적으로 결합하고 높은 친화력을 갖는 것을 확인함.
- (3) 앵타머 소재의 세균 생육 저해 등의 항균 능력을 평가하기 위하여 *Shigella sp.*와 *Vibrio sp.* 의 앵타머를 이용하여 억제 실험을 수행한 결과, 앵타머를 첨가하여 균주를 배양하였을 시 생육 성장 속도에 저해가 생기는 것을 확인하였음.
- (4) 치료용 앵타머 기반의 검출 및 진단 제제로서의 시스템을 개발하기 위하여 GST와 Digoxigenin에 특이적으로 결합하는 각각의 DNA 앵타머를 이용하여 Sandwich 구조의 검출시스템을 개발한 결과, 항체기반의 검출법과 비교하여 노이즈가 적고 Westren blotting 방법을 대체할 수 있는 방법임을 확인하였음.
- (5) 항균펩타이드 PMAP36, PR26, PG1에 특이 결합하는 최적 앵타머 2종씩 확보함.

나. 대표적 연구성과

- (1) PRRS virus 치료 및 진단용 앵타머 소재 3종 확보
- (2) *Shigella sonnei* 검출용 앵타머 소재 3종 확보
- (3) *Vibrio parahaemolyticus* 검출용 앵타머 소재 2종 확보
- (4) *Listeria monocytogenes* 검출용 앵타머 소재 2종 확보
- (5) *Salmonella typhimurium* 검출용 앵타머 소재 2종 확보
- (6) *Listeria monocytogenes* PrfA 진단용 앵타머 소재 3종 확보

- (7) *Shigella sonnei* IpaH 진단용 앵타머 소재 4종 확보
- (8) Aptamer-based sandwich assay (ABSA)를 이용한 PRRSV 검출 시스템 개발
- (9) 상기 연구성과를 특허 2건(출원1, 등록1), 논문 2건(SCI 1, 비SCI 1) 등으로 활용

다. 종합평가 및 향후 발전방안

- (1) 고위험성 가축전염성질환을 대처하기 위하여 표적 세균 및 바이러스, 질환 유발 물질들을 진단하고 치료용으로서 적용할 수 있는 앵타머 소재를 개발하고자 하였으며 앵타머를 적용한 상용화 시스템을 구축하고자 하였음. 표적 바이러스 1종, 세균 4종, 가축질병 유발 인자 단백질 2종에 대하여 특이적으로 결합력을 갖는 앵타머 소재를 각각 개발하여 총 19종의 소재를 확보할 수 있었으며 가축질환 유발 요인별 수량은 계획(6종류)보다 많은 7종류에 대하여 앵타머 소재를 확보함.
- (2) 본 연구를 통해 리스테리아의 prfA 단백질을 검출할 수 있는 앵타머의 확보는 리스테리아 감염을 진단할 수 기술의 지적재산권을 확보할 수 있었으며 Western blot을 대체할 수 있는 앵타머 기반의 Apta-blotting 기술의 특허출원은 앵타머를 기반으로 하는 검출 시스템의 수준을 높여줬음.
- (3) 향후 가축전염성질환 요인들에 대하여 확보한 앵타머들의 지적재산권과 논문 투고를 통해 앵타머 소재들을 기술이전 물질로서 확보하고자 함. 세균 중 salmonella typhimurium에 대한 앵타머 2종의 특이적 결합력과 친화력을 토대로 논문 및 특허를 진행 중에 있으며 나머지 앵타머 소재들에 대하여 논문 및 특허를 통해 본 연구 기술로서 확보하고자 함.
- (4) 앵타머제제는 현 단계에서 제품 원가가 저렴한 축산용 사료첨가제 등으로는 제품화 자체가 곤란함. 따라서 PRRSV 진단키트 등 부가가치가 높은 방향으로 산업화 방향을 설정하여 추가 연구를 진행할 계획임.

6. 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화(제4협동)

가. 5년간 연구수행 내용 요약

- (1) 신소재 개발팀으로부터 개발된 신소재와 본사가 보유하고 있는 기존의 유효물질 성분들을 결합한 면역복합제제 조성을 개발하였고, 시제품을 제조하여 장기보존시험을 실시하여 시제품의 안정성을 확보하였음.
- (2) 제1협동과제 효능평가팀과 공동으로 개발된 시제품에 대한 목적동물 투여시험을 실시하여 안전성 및 효능을 확인하고, 제1 세부과제팀과 공동으로 축종별 농장 적용시험을 통하여 확보된 자료를 이용하여 동물용의약품으로 인허가를 획득함.
- (3) 본 연구로 개발되어 동물용의약품으로 허가를 득한 제제는 총 19종으로 당초 목표했던 18종을 초과 달성하였음.

나. 대표적 연구성과

- (1) 본 연구로 개발되어 동물용의약품으로 허가를 득한 제제는 총 19종으로 아래와 같음.
- (2) 면역복합제제 인허가 품목(19종)
 - (가) 축우용(3종): 아이지 켈프산(송아지용), 아이지 켈프 F산(송아지용), 아이지신 켈프산(송아지용)

- (나) 양돈용(9종): 다이스톱 피그 1(이유자돈용)산, 다이스톱 피그 2(육성돈용)산, 다이스톱 피그 3(비육돈용)산, 다이스톱 피그 F(이유자돈용)산, 다이스톱 피그 F2(육성돈용)산, 다이스톱 피그 F3(비육돈용)산, 아이지신 피그 1(이유자돈용)산, 아이지신 피그 2(육성돈용)산, 아이지신 피그 3(비육돈용)
- (다) 양계용(7종): 다이스톱 폴츄리 1(산란계용)산, 다이스톱 폴츄리 2(육계용)산, 다이스톱 폴츄리 F(산란계용)산, 다이스톱 폴츄리 F2(육계용)산, 아이지신 폴츄리 1(산란계용)산, 아이지신 폴츄리 2(육계용)산, 아이지 스타트(입추병아리용)산

다. 종합평가 및 향후 발전방안

- (1) 본 연구에서 개발된 신소재 중 난황향체, 초유향체, 생균제 등은 비교적 생산원가가 저렴하여 축산용 면역복합체제로 제품화하여 당초 목표한 18종을 초과한 19종의 제품의 인허가를 완료하여 소기 목적을 달성한 것으로 평가됨.
- (2) 나머지 소재(리소좀, 천연물, 향미생물펩타이드, 앱타머)는 생산원가 때문에 가축용 제품으로 활용이 곤란하였으며 향후 소재개발팀의 추가연구를 통하여 원가 절감형 대량생산기술이 확보된다면 가축용 제품으로 제형 개발이 가능할 것임.

라. 개발 신소재의 동물용의약품 제품화 가능성 분석 및 기술 극복방안

(1) 동물용의약품의 제형별 제조원가

- (가) 경구용첨가제 제형인 경우, 일반적으로 사료 1톤당 1kg (약 300두분)을 혼합하여 사용하며, 제조원가는 약 판매가는 2-3만원에 책정됨. 따라서 제품의 제조원가는 판매가의 1/5 수준인 4,000-6,000원이 적정함
- (나) 주사제 제형인 경우 일반적으로 두당 주사비용이 1,000-5,000원이므로 20두 접종 용량의 제품을 제조할 때 판매가는 20,000-100,000원이며, 제조원가는 판매가의 1/5 수준인 4,000-20,000원 수준이 적정함.

(2) 현 생산 기술수준에서의 신소재 제품 제조원가 및 기존 제품가격 비교

- (가) 신소재의 종류에 관계없이 동물용 첨가제 또는 주사제로 사용할 경우 아래 표와 같이 기존 시중 판매 첨가제 또는 주사제 가격으로 판매하기 위해서는 생산원가를 현 수준의 1/2~1/10 수준으로 낮추어야 함.

개발가능 제품유형	기존제품의 원가 분석			신소재별 현 생산원가		생산원가 차액(B-A)
	관련제품 평균판매가	유효성분 함유량	유효성분 생산원가(A)	신소재	현 생산 원가(B)	
첨가제 (300두분, 1Kg용량)	20,000원	50g (5%, w/w)	4,000원 (50g)	천연물	30,000원	25,000원
				리소좀	15,000원	9,000원
				앱타머	20,000원	16,000원
				AMP	15,000원	9,000원
주사제 (20두분, 20 mL용량)	30,000원	10g (50%, w/v)	2,000원 (10g)	천연물	6,000원	4,000원
				리소좀	3,000원	1,000원
				앱타머	4,000원	2,000원
				AMP	3,000원	1,000원

(나) 신소재 유형별로는 제품화에 필요한 양을 생산하는데 소요되는 비용이 천연물제제가 가장 높으며, 앵타머 및 AMP의 중등도 수준 그리고 리소좀제제가 가장 낮게 분석되어 당장은 리소좀 제제의 제품화가 비교적 수월 할 것으로 판단되며, 동물용의약품의 제형별로는 주사제 제형으로 개발하는 것이 부가가치가 높을 것으로 판단됨.

(3) 제품화를 위하여 필요한 생산 기술 개선 및 제품화 방안

(가) 현재 신소재 유효물질의 생산 및 추출 정제방법은 HPLC 방법에 의존하기 때문에 생산단가가 높고, 대량생산이 곤란한 상황임.

(나) 따라서 HPLC 방법이 아닌 원심분리 또는 필터 정제 방법 등 추출 정제 비용이 절감되는 정제 방법을 개발하여 적용하여야 할 것으로 생각됨.

(다) 또한 정제 신소재 유효성분의 효능효과가 현 수준보다 높게 개량이 된다면 추출 신소재 유효성분을 회석하여 제품에 사용할 수 있어 제품 생산 단가의 절감 효과를 기대할 수 있으므로 유효성분의 효능을 높이는 방향으로 추가 연구 개발이 필요할 것으로 판단됨.

제 7절. 사업화 성과 및 매출실적

1. 사업화성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	10억원
		관련제품	개발후 현재까지	2억원
			향후 3년간 매출	5억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 3%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 3%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		3위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		2위

2. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1년		
	소요예산(백만원)		200		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			2	15	25
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1	7.5	12.5
		국외	0	3	5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		현재 개발된 제품들을 기본 모델로 하여 추가적으로 축종별, 연령별로 맞춤형 제품들을 개발한 계획임.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	3	5	
	수 출	0	3	5	

제 4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

제 1절. 연구개발 목표 달성도

1. 연구개발목표

다양한 신소재를 이용하여 가축전염병의 발생을 사전에 차단할 수 있는 백신 및 치료제 기능의 면역복합체제(18종) 개발

2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1 차 년 도	2011	1 세 부 ○ 현장적용 농장 선정 및 질병 발생 위험도 분석	- 축종별 현장적용 대상농장 선정(축종별 3농장) - 대상농장에 대한 현지조사 및 질병모니터링을 통한 질병발생 위험도 분석 - 축종별, 사육단계별 질병발생 위험지도 작성
		2 세 부 ○ 고면역 항원생산 세포주 및 면역단백질 auto-cloning 시스템 구축	- 고역가 고면역 바이러스 항원 생산에 필요한 면역보강분자 Fc 분자 발현 세포주 및 바이러스 재조합 단백질 발현 세포주 개발 - 유전자 auto-cloning 시스템의 설계 및 구축
		1 협 동 ○ 가축전염병 제어용 백신 기능 면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 확립	- 항생제 대체 물질 및 첨가제의 실험실 수준의 효능평가기법 확립 - 외래단백질이 효율적으로 발현되는 식물바이러스 탐색, 선발, 감염성 식물바이러스 클론 제작 - 리소솜 분리 기술 확보와 동물모델에 적용하기 위한 리소솜 스크리닝 - 항바이러스 활성 천연물소재의 탐색 및 정제
		2 협 동 ○ 가축전염병 제어용 항미생물 펩타이드 발현 시스템의 개발 및 확보	- 기 분석된 돼지의 항미생물 펩타이드 20종을 활용한 발현용 cDNA클로닝 - In vitro 발현시스템을 활용한 돼지 항미생물 펩타이드 최적 발현시스템의 구축
		3 협 동 ○ 미생물 증식 저해 관련 표적 단백질 선별 및 확보	- 세균 및 바이러스의 침투, 세포내 증식 등에 관여하는 핵심 유전자 발굴 - 핵심 유전자의 cloning을 통한 핵심단백질 확보
		4 협 동 ○ 개발 신소재를 이용한 복합체제 제형 생산	- 경구투여제(분말제 또는 펠렛형)로 제조법 완성 - 시제품 생산 및 안정성시험 실시

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
2 차 년 도	2012	1 세 부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 축종별 현장적용 효능 및 안전성 평가 프로그램 구축(3종) 	<ul style="list-style-type: none"> - 양돈장의 현장 효능 및 안정성 평가 프로그램구축 및 시제품 적용 - 양계장의 현장 효능 및 안정성 평가 프로그램구축 및 시제품 적용 - 축우장의 현장 효능 및 안정성 평가 프로그램구축 및 시제품 적용
		2 세 부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고면역 항원생산 체계 및 면역단백질 효모용 auto-cloning 시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 고면역 바이러스 항원 및 재조합 바이러스 단백질 항원 생산 최적화 - 효모용 auto-cloning/expression 시스템 설계 및 구축
		1 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신소재 정제 및 단일 제제의 목적동물 및 마우스에 대한 효능평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 단일제제의 목적동물 및 마우스에 대한 효능평가 - 식물바이러스에 동물에서 항체를 유도하는 epitope을 도입 연구 - 유용 효소들의 나노 집적화를 위한 고정화 기술 개발 - 항바이러스 활성화합물의 화학구조 규명
		2 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가축전염병 제어용 최적 항미생물 펩타이드 스크리닝 및 대량 발현시스템의 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 테스트 패널에 대한 평가를 통한 최적 항미생물 펩타이드의 평가 및 선발 - 최적 항미생물 펩타이드 대량 발현시스템의 최적화 - 항미생물 펩타이드 대량발현시스템의 발현량 최대화를 위한 배양조건의 확립
		3 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 표적단백질에 특이결합하는 RNA 앵타머 제작 및 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 가축전염병질환 치료용 RNA 앵타머의 발굴 및 확보 - 특이성 확인을 통한 최적 가축전염병질환 치료용 RNA 앵타머 제작
4 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발 신소재를 이용한 복합제제 안정성, 안전성 평가/면역복합제제 제형 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 신소재를 이용한 복합제제 안정성 및 안전성(현장적용시험) 평가 - 개발 신소재를 이용한 면역복합제제 경구투여제(분말제 또는 펠렛형) 제조법 완성 및 시제품 생산 및 안정성시험 실시 		

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3 차 년 도	2013	1 세 부	○ 단일·복합제제 시제품에 대한 농장적용 및 효과 분석 - 양돈장에 대한 단일·복합제제 시제품에 대한 농장 적용 및 효과 분석 - 양계장에 대한 단일·복합제제 시제품에 대한 농장 적용 및 효과 분석 - 축우장에 대한 단일·복합제제 시제품에 대한 농장 적용 및 효과 분석
		2 세 부	○ 다가 백신 제조 및 고면역 복합난황항체 생산 및 면역단백질 효모 발현시스템 구축 및 적용 - 산란계 접종용 축종별 다가 백신 제조 및 고면역 복합난황항체 생산 - 효모용 expression 시스템 구축 및 시험 적용
		1 협 동	○ 신소재 구조구멍 및 단일·복합제제의 목적동물에 대한 효능평가 - 단일제제 및 복합제제의 목적동물에 대한 효능 평가 - 식물바이러스 고감염성 식물의 개발 - 리소좀 내에 유해세균 처리 단백질 발굴 및 in vivo에서 독성 확인 - 항바이러스 활성물질의 정보 검색
		2 협 동	○ 향미생물 펩타이드의 안정성 및 효능 증대기술의 확보 - 향미생물 펩타이드 생산량 증대를 위한 기술의 개발 - 향미생물 펩타이드의 활성증대기술 개발 - 전자현미경을 활용한 향미생물 펩타이드의 박테리아 세포벽 파괴기전 분석 - 향미생물 펩타이드 정제기술 개발 1단계
		3 협 동	○ 기 선별된 가축전염병 치료용 RNA 앵타머 효능 최적화 - 제작된 RNA 앵타머의 체내 안정성 및 효율성의 증가를 위한 구조 최적화를 통한 안정성 평가 - in vitro에서의 최적화된 가축전염병 치료용 RNA 앵타머의 효능성 평가
4 협 동	○ 개발 신소재를 이용한 복합제제 인허가, 상품화/면역복합제제 안정성, 안전성 평가 - 개발 신소재를 이용한 복합제제 인허가 및 상품화(포장재, 디자인 등) 추진 - 개발 신소재를 이용한 면역복합제제 안정성 및 안전성(현장적용시험) 평가		

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
4 차 년 도	2014	1 세 부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 축종별 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성(3종) 	<ul style="list-style-type: none"> - 양돈장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성 - 양계장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성 - 축우장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성
		2 세 부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고면역 복합난황항체 및 면역단백질 대량생산 체계 구축 및 시제품 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 고면역 복합난황항체의 안전성 및 효능평가 & 시제품 생산 및 상품화 - 후보 면역단백질의 high-throughput expression screening
		1 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신소재 대량생산 및 복합제제 최적 조합조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 복합제제 효능평가 및 최적 조합조건 확립 - 약제가 포함된 작물재배 및 생산과 약제의 활성 시험 - In vivo에서 신소재에 대한 병원균의 내성 생성 여부 확인 - 활성소재의 대량생산 및 in vivo 효능, 독성 안전성 검증
		2 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정제된 항미생물 펩타이드의 병원성 미생물 억제제로써의 효과 분석 및 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 가축전염성 질병유발 미생물에 대한 항미생물 억제제로써의 효과평가 : 세균성 호흡기질병과 설사병 원인체를 대상으로 유효성 검증을 타세부과제와 협력하여 실시(대장균, 살모넬라, 클로스트리듐, 홍막폐렴 등) - 돼지 디펜신 복합제제를 이용한 항균성 범위 및 효능의 분석 - 항생제내성균에 대한 항미생물 효과 검증 - 비정제 방법을 통한 항미생물 펩타이드의 생산 및 적용법 개발 - 항미생물 펩타이드 정제기술개발 2단계
		3 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가축전염병 치료용 RNA 앵타머 안정성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 앵타머 기반의 가축전염병의 체내에 미치는 영향 평가를 임상시험을 통해 안정성 평가
		4 협 동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발 신소재를 이용한 복합제제 대량생산체계 수립/면역복합제제 인허가 및 상품화 (포장재, 디자인 등) 수립 	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 신소재를 이용한 복합제제 생산 및 대량생산 체계 수립과 시판 - 개발 신소재를 이용한 면역복합제제 인허가 및 상품화(포장재, 디자인 등) 추진

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
5 차 년 도	2015	1 세 부	○ 개발제품의 확대적용 및 농장유형별 현장적용 프로그램의 다각적 활용방안 제시 - 양돈장의 유형별 다양한 확대적용 프로그램 개발 - 양계장의 유형별 다양한 확대적용 프로그램 개발 - 축우장의 유형별 다양한 확대적용 프로그램 개발
		2 세 부	○ 고면역 복합난황항체의 상품화 및 면역단백질의 고부가 안정 생산 - 고면역 난황항체의 안정성 및 효능평가 & 시제품 생산 및 상품화 - 발현 및 생산 가능한 면역단백질의 고부가 안정 생산
		1 협 동	○ 신소재 산업화 및 최적 적용매뉴얼 확립 - 산업화를 위한 최적 적용매뉴얼 확립 - Epitope 유전자가 도입된 바이러스의 포장생성 - 가축 종별 리소솜의 향균력 지속력 분석과 문제점 보완을 통한 시스템 최적화 - 항바이러스 활성소재의 산업화 연구
		2 협 동	○ 항미생물 펩타이드의 유효성 평가 - 항미생물 펩타이드의 임상적 및 기능성 첨가제로서의 효과 검증 - 돼지 디펜신 복합제제를 이용한 광범위 항균물질의 임상효과 검증을 타세부과제와 협력하여 실시 - 선정된 항미생물 펩타이드의 주사제 및 경구투여제로서의 효능분석을 타세부과제와 협력하여 실시
		3 협 동	○ 가축전염병 치료용 RNA 앵타머의 scale-up을 통한 상용화 기반 구축 - 최적 가축전염병질환 치료용 RNA 앵타머의 scale-up을 통한 생산 및 상용화
4 협 동	○ 면역복합제제 대량생산체계 수립 - 개발 신소재를 이용한 면역복합제제 생산 및 대량생산 체계 수립과 시판		

3. 계획대비 달성도

가. 주요 연구성과 목표 대비 달성도

구분	주요 연구개발의 목표	가중치 (%)	달성도	
			실적	%
1	○ 가축질병 제어용 바이오신소재 개발 - 지식재산권 20건 (출원 12, 등록 8)	40	25건 (출원13,등록12)	50
2	○ 개발 신소재에 대한 효능평가 실시 - 축종별 효능평가기법 확립 및 평가 실시 완료 여부	20	평가 완료	20
3	○ 개발 시제품에 대한 현장적용 평가 및 산업화 - 축산용 제품 18종 인허가 등록	20	19건	21
4	○ 연구성과에 대한 학술성과 도출 - 학술논문 44편 (SCI 32, 비SCI 12)	20	43편 (SCI 31, 비SCI 12)	19.6
계		100		110.6

나. 세부/협동과제별 목표 대비 달성도

(1) 제1세부과제: 신소재 산업화를 위한 현장적용 및 효능평가

년도	세부 연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ 현장적용 농장 선정 및 질병발생 위험도분석	- 축종별 현장적용 대상농장 선정(축종별 3농장) - 대상농장에 대한 현지조사 및 질병모니터링을 통한 질병발생 위험도 분석 작성 - 축종별, 사육단계별 질병발생 위험지도 작성 및 제시	100
2차 년도	○ 축종별 현장적용 효능 및 안전성 평가 프로그램 구축 (3종)	- 양돈장의 현장 효능 및 안정성 평가 프로그램구축 및 시제품 적용 완료 - 양계장의 현장 효능 및 안정성 평가 프로그램구축 및 시제품 적용 완료 - 축우장의 현장 효능 및 안정성 평가 프로그램구축 및 시제품 적용 완료	100
3차 년도	○ 단일·복합제제 시제품에 대한 농장적용 및 효과 분석	- 양돈장에 대한 단일·복합제제 시제품에 대한 농장 적용 및 효과 분석 완료 - 양계장에 대한 단일·복합제제 시제품에 대한 농장 적용 및 효과 분석 완료 - 축우장에 대한 단일·복합제제 시제품에 대한 농장 적용 및 효과 분석 완료	100
4차 년도	○ 축종별 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성(3종)	- 양돈장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성 완료 - 양계장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성 완료 - 축우장의 농장맞춤형 제품 적용 최적 프로그램 개발 및 매뉴얼 작성 완료	100
5차 년도	○ 개발제품의 확대적용 및 농장유형별 현장적용 프로그램의 다각적 활용 방안 제시	- 양돈장의 유형별 다양한 확대적용 프로그램 개발 - 양계장의 유형별 다양한 확대적용 프로그램 개발 - 축우장의 유형별 다양한 확대적용 프로그램 개발	100

(2) 제2세부과제: 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발

년도	세부연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ 고면역 항원생산 세포주 개발	- 닭 유래 면역보강분자 유전자 클로닝, 발현 분석 - 바이러스 고역가 증식능 및 닭 Fc 분자 발현 세포주 개발 - 고면역 축종별 유래 바이러스 단백질 항원 발현 세포주 개발	100
	○ 고면역 항원생산 세포주 및 면역단백질 auto-cloning 시스템 구축	- Site specific recombinase를 이용한 auto-cloning 시스템 확립 - 면역단백질의 효과적 발현을 위한 호모발현균주 조사 및 확보	100
2차 년도	○ 고면역 항원생산 체계 최적화	- 고역가 고면역 유도용 바이러스 항원 생산 최적화 - 고면역 유도용 재조합 cFc- tagged 바이러스 단백질 항원 생산 최적화 - 산란계 항원 접종 후 면역반응 유도능 in vitro 평가 시스템 구축	100
	○ 호모용 auto-cloning / expression 시스템의 설계 및 구축	- Plasmid copy number가 다른 origin을 가진 벡터의 제작과 적용 - Expression level의 차이에 따른 벡터 제작과 적용 - Solublizing, chaperon, secretion을 위한 각종 tagging system을 가진 벡터의 제작과 적용	100
3차 년도	○ 산란계 접종용 축종별 다가 백신 제조 및 고면역 복합난황항체 생산	- 고면역 유도 바이러스 항원 및 바이러스 단백질 항원을 이용한 불활화 다가 면역항원 제조 - 다가 면역항원 접종에 따른 산란계의 in vitro 면역반응 평가 - 고면역 복합난황항체 생산 시스템 구축	100
	○ 호모용 expression 시스템 구축 및 시험 적용	- 제작된 expression system 중복성 검토 및 체계화 - 호모에서 면역단백질 발현의 초고속 스크리닝 시도 - <i>Pichia</i> 용 auto-cloning 시스템 적용 및 expression 시도	100
4차 년도	○ 고면역 난황항체의 안전성 및 효능평가 & 대량 생산	- 고면역 난황항체의 안전성 및 효능 평가 - 불활화 고면역 백신 제조 계속 및 시스템 최적화 - 고면역 난황항체 대량생산 계속 및 시스템 최적화	100
	○ 후보 면역단백질의 high-throughput expression screening 및 제제화	- 후보 면역단백질 발현체 균주의 다수 확보를 통한 목적 단백질의 안정적 생산 연구 - 면역단백질 발현체 미생물 균주로부터 생산되는 후보 면역단백질의 동정 확인 - 면역단백질 발현 재조합 균주 및 면역 증강용 <i>Lactobacillus</i> 균주에 대한 제제화	100
5차 년도	○ 고면역 복합난황항체의 안전성 및 효능평가 & 시제품 생산 및 상품화	- 불활화 고면역 백신 제조 계속 및 시스템 최적화 - 고면역 복합난황항체 대량생산 및 시스템 최적화 - 고면역 복합난황항체의 안전성 및 효능 평가 - 고면역 복합난황항체 시제품 생산 및 상품화	100
	○ 축산 사료 첨가용 면역증강 생균제 균주의 확보, 활용 가능성 확인 및 제제화를 통한 시제품 생산	- 축산 사료 첨가용 면역증강 생균제 균주의 확보 및 분리, 동정 - 축산 사료첨가용 면역증강 생균제 균주의 활용 가능성 확인 - 축산 사료 첨가용 면역증강 생균제 균주의 제제화 및 시제품 상품화	100

(3) 제1 협동과제 : 가축전염병 제어용 백신 기능 면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기
법 확립

년도	세부연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ 기 개발 물질 이용 및 효능범위(항균성, 항바이러스성, 면역증강제)에 따른 실험실적 평가기법 확립	- 소 유래의 살모넬라, 대장균, BVDV, 로타바이러스, 코로나바이러스에 대한 실험실적 효능평가기법 확립 - 리소솜에 대한 효능평가	100%
		- 돼지 유래의 살모넬라, 대장균, PRRSV, 인플루엔자 바이러스에 대한 실험실적 효능평가기법 확립 - 생약 및 식물 추출물 25종에 대한 평가 수행 - 베타글루칸의 면역증강능과 돼지에서 살모넬라 감염증에 대한 효능평가	100%
		- 닭 장내질환 원인균 효능평가기법 확립(in vitro) - 닭 면역증진 효능평가기법 확립(in vitro)	100%
	○ 식물바이러스 및 형질전환용 벡터 제작	- 외래단백질이 효율적으로 발현되는 식물바이러스 탐색, 선발, 감염성 식물바이러스 클론 제작 - 식물바이러스 고감염성 식물 개발(유전자 침묵억제제 클론 및 식물 재분화 최적화)	
	○ 유용 기능성 세포 소기관인 리소솜 분리기술 확보	- 진핵생물 내에 존재하는 순수한 리소솜 분리 기술 개발 - 리소솜의 유해세균 처리 기능 검증 - 리소솜과 퍼옥시솜 분리기술 개발	100%
○ Neuraminidase 억제 활성을 나타내는 항바이러스성 천연물 소재의 탐색	- 수급이 용이한 농산물 14점, 자생식물 추출물 3,200점, 산업부산물인 균류배양액, 자생균류자원 300점 등을 확보하여 추출물을 제조하고, 이를 대상으로 neuraminidase 억제활성을 검정함 - 산업부산물인 목질진흠버섯 배양액이 강력한 neuraminidase 억제활성을 나타내어 이로부터 2종의 활성성분을 분리 정제함 - 목질진흠버섯 배양액으로부터 분리한 2종의 화합물을 HPLC를 이용하여 표준시료와 비교한 결과 hispidin과 hypholomine B로 동정함	100%	
2차 년도	○ 1차년도에 개발된 물질의 효능 및 안전성에 대한 실험실적 평가 ○ 단일제제의 목적동물 및 마우스에 대한 효능평가	- 리소솜의 축우 항미생물 효능평가 - 항미생물 펩타이드(AMP)의 축우 항미생물에 대한 항균효능평가 - 천연물 20종의 축우 항미생물 효능평가	100%
		- 청국장 추출물질의 효능 및 안전성 평가 - 천연물 20종의 항미생물 효능평가 - 항미생물 펩타이드(AMP)의 항균효능평가	100%
		- Spot test 방법에 의한 물질의 최소억제농도 평가 - 제2협동과제에서 개발된 항미생물 펩타이드 물질(PG-1)의 실험실적 항균효능평가 - 닭 세균성 질병제어를 위한 괴사성장염모델 확립	100%
	○ 콩 조직배양 ○ 동물질병억제 기능성 물질 발현용 재조합	- 식물 재분화 최적화 방법 구현 및 유전자 침묵억제제 발현 식물체 제작 - 타 협동연구에서 제공받은 유전자가 발현되는	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물질병억제 기능성 물질의 식물체내 발현 	<p>재조합 식물바이러스 제작 (Recombinant PVX 외)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 타 협동연구에서 제공받은 유전자의 발현[일시적 발현 후 추출, 형질전환 식물(영구적 발현) 제작] 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유해세균을 처리하는 리소솜의 기능 검증 및 리소솜 내 유용효소들의 나노집적화 기술개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 외부적인 스트레스를 주어 진핵세포내의 리소솜 활성변화 비교분석 및 유용효소의 나노입자 고정화 기술의 개발 - 후보군 효소를 선정하여 과발현 시켜 활성이 증가된 리소솜 개발 - 세균을 인식할 수 있는 리소솜 막단백질의 기능 검증 및 인공 리포솜 내 효소를 넣어 항균제 개발 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항바이러스 활성물질 스크리닝, 활성성분 분리 정제 및 화학구조 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 스크리닝에 의하여 선발된 모과로부터 다양한 column chromatography를 수행하여 3종의 neuraminidase 억제제를 정제하고, NMR 분석을 통하여 화학구조를 catechin, epicatechin, quercitrin으로 규명함 - 균류를 대상으로 neuraminidase 저해제의 탐색 결과 장수진흙버섯이 우수한 활성을 나타냄. 활성물질을 정제하고 NMR 분석을 통하여 활성성분을 hispidin과 hypholomine B로 동정함 - 자생식물 및 약용식물 추출물로부터 neuraminidase 저해물질을 탐색하여 7종의 우수한 활성소재를 선발하고, 이들에 대한 재현성을 확인함 	100%
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 송아지에서 개발된 물질들의 효능 및 안전성 평가 ○ 차년도 개발 물질의 송아지에서 효능 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 기능 강화 리소솜의 항균력 평가 - 알지네이트 올리고당 리소솜의 마우스에서의 항균효과 시험 - 송아지에서 난황항체제제의 장염 병원체에 대한 예방 효과 검증 시험 - 유효 개발 물질들을 이용한 송아지 질병 관리 프로그램 개발 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지를 이용한 개발 물질의 효능 및 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 청국장 추출물질의 임신모돈 및 포유자돈에서의 효능 및 안전성 평가와 농장 적용 - 초유 유래물질의 포유자돈 설사병 및 PED 감염에 대한 예방 효능 평가 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1, 2차 년도 개발 신소재 물질의 돼지를 이용한 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 유효 개발물질들을 이용한 양돈장 질병 관리 프로그램 개발 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 단일제제 및 복합제제의 목적동물에 대한 효능평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 목적동물병원체들에 대한 AMP 3종 항균효능평가 - 육계장염동물모델에서 시제품 및 외부개발물질 효능평가 - 식물추출물 30종 항균효능평가 및 항생제 감수성 검사 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Epitope의 고발현을 위한 식물바이러스의 조작 및 식물바이러스 고감염성 식물의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - Epitope의 고발현을 위한 식물바이러스의 조작 - 식물바이러스 고감염성 식물의 개발 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물 재분화 최적화 방법 구현 및 유전자 침묵억제제 발현 식물체 제작 ○ 동물질병억제 기능성 물질 발현용 재조합 식물바이러스 및 	<ul style="list-style-type: none"> - 콩 조직배양 - 타 협동연구자에서 제공 받은 유전자가 발현되는 재조합 식물바이러스 제작 (Recombinant PVX외) - 타 협동연구자에서 제공 받은 유전자의 발현[일시적 발현 후 추출, 형질전환 식물(영구적 발현) 제작] 	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환용 벡터 제작 ○ 동물질병억제 기능성 물질의 식물체내 발현 		
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유해세균을 처리하는 리소솜 내 단백질과 활성화 조건에서 항균능력이 향상된 단백질 후보군 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 리소솜내의 단백질 동정을 통한 재조합 균주의 개발 및 향상된 항균능력 평가 - 피부 조직상에서 리소솜의 독성 검증 및 <i>in vivo</i> 상에서의 리소솜의 항균활성 검증 - 리소솜의 안정성 및 활용가능성 평가 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항바이러스 활성물질의 분 정제, 정제한 활성물질의 화학구조 규명 및 항바이러스 활성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 스크리닝에 의하여 최종적으로 선정된 장수진흙버섯으로부터 다양한 column chromatography를 수행하여 5종 활성성분을 정제하고, mass 및 NMR 분광분석에 의하여 화학구조를 각각 hispidin, hypholomine B, inoscavin A, davallialactone, phelligridin D로 규명함 - 장수진흙버섯으로부터 분리한 5종 화합물의 neuraminidase 저해 활성은 IC₅₀ 값이 각각 50.9, 22.9, 20.0, 14.2, 8.8 μM이었으며, 억제기전은 noncompetitive type이었음 - 세포를 이용한 항바이러스 활성검정 결과 5종 화합물 모두 항인플루엔자 의약품인 oseltamivir 보다 활성이 우수하고 TI 값이 높게 나타나 독성은 낮은 것으로 판명됨 - 한국농수산대학으로부터 분양받은 목질진흙버섯 균주를 배양하여 배양액으로부터 다양한 column chromatography를 수행 2종의 활성성분을 정제함 - 이들 2종 화합물의 화학구조를 mass 및 NMR 분광분석에 의하여 각각 inotilone과 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one으로 규명함 - 2종 화합물의 neuraminidase 저해 활성은 각각 IC₅₀ 값이 29.1과 125.6 μM이었으며, 세포를 이용한 항바이러스 활성검정 결과 모두 항인플루엔자 의약품인 oseltamivir 보다 활성이 우수하고, 독성은 낮은 것으로 판명됨 	100%
4차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효과가 입증된 물질에 대해 최적 조합조건 확립 및 축우장 질병 관리 프로그램의 평가 및 개선 	<ul style="list-style-type: none"> - 3차년도에 개발된 향미생물질 및 면역증강물질의 축우질병에 대한 효능 및 안전성에 대한 실험실적 평가 - 축우장 질병 관리 프로그램의 농장 적용을 통한 평가와 개선 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효성이 증명된 물질에 대해 최적 조합조건 확립 및 양돈장 질병 관리 프로그램의 평가와 개선 	<ul style="list-style-type: none"> - 3차년도에 개발된 향미생물질 및 면역증강물질의 양돈질병에 대한 효능 및 안전성에 대한 실험실적 평가 - 양돈장 질병 관리 프로그램의 농장 적용을 통한 평가와 개선 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복합제제 효능평가 및 최적 조합조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - AMP 항균효능 및 안전성 평가 - 버섯추출물 대상 항바이러스 활성 - 양계분야 질병모델(가금티프스)대상 물질(IgY) 효능평가 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물바이러스유래 유용물질 고발현 	<ul style="list-style-type: none"> - ER과 mitochondria에서 형광단백질 발현 담배 제작 - 타 협동연구자에서 제공 받은 유전자가 발현되는 재조합 식물바이러스 제작 (Recombinant PVX외) - 타 협동연구자에서 제공 받은 유전자의 	

		발현[일시적 발현 후 추출, 형질전환 식물(영구적 발현) 제작]	
	○ 리소좀의 항균 지속력과 <i>in vivo</i> 분석 및 산업화를 위한 리소좀 항균제의 상품화	- 항균활성이 강화된 리소좀의 <i>in vivo</i> 실험을 위한 항균지속력 검증 - 알지네이트-올리고당의 제조방법에 따른 고정화된 리소좀의 항균활성 검증	100%
	○ 항바이러스 활성물질의 분리 및 정제, 항바이러스 활성소재의 산업화 가능성 타진	- 다양한 크로마토그래픽법을 이용하여 말뚝진흙버섯 유래 neuraminidase 저해물질 PIE-1, PIE-2, PIE-3을 정제하고 NMR 분석을 통하여 말뚝진흙버섯 유래 neuraminidase 저해물질 PIE-1, PIE-2, PIE-3의 화학구조를 각각 phelligridin D, phelligridin E, phelligridin G로 동정함 - 화합물 PIE-1, PIE-2, PIE-3의 neuraminidase 저해활성을 검증 - 장수진흙버섯의 산업화 가능성을 타진하기 위하여 ethyl acetate 분획물을 제조한 후 세포독성을 평가함. 그 결과 독성을 나타내지 않음 - 장수진흙버섯 ethyl acetate 분획물이 인플루엔자 바이러스에 대하여 강력한 세포내 증식저해 효과를 나타냄을 밝힘 - 가격경쟁력으로 미루어 볼 때 사료첨가제로의 활용은 어려우나 동물의약품 등으로의 활용가능성이 제시됨	100%
5차 년도	○ 돼지를 이용한 개발물질의 효능 및 안정성 평가	- 청국장 추출물질 PGA의 효능 및 안정성 확인, 모든 난산 및 유산 관련 문제 해결을 위한 사용 권장 - 초유 유래 물질인 C-F의 효능 및 안정성 확인, 포유자돈의 초기 설사병 예방 및 증체율 개선을 위한 사용 권장 - β -glucan 효능 및 안정성 확인, 이유기부터 비육기까지 사료에 첨가하여 소화기성 질병 예방을 위한 사용 권장	100%
	○ 신소재 구조구명 및 단일·복합제제의 목적동물에 대한 효능평가	- 가금티프스 질병모델 구축 - 양계용 신규 IgY 제품 효능평가를 통해 방어효능 확인	100%
	○ 제형별 리소좀의 산업화를 위한 대량생산 공정방법 제시	- 리소좀 막의 콜레스테롤 분석을 통한 리소좀의 정량화 방법 제시 - 알지네이트-올리고당의 세포내 염증관련 효과 검증 - 대량 생산을 위한 분리공정 단순화 및 공정 단순화에 따른 리소좀의 항균활성 검증	100%
	○ 수진흙버섯 활성 분획물의 <i>in vivo</i> 항바이러스 효능평가를 위한 대량 제조 및 지표성분 설정 및 시험법 밸리데이션 확립	- <i>In vivo</i> 효능평가를 위하여 장수진흙버섯 활성 조추출물을 다량으로 제조하여 협동연구기관에 제공함 - 지표성분으로 유효 활성성분인 hispidin을 선정하고 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성 등 시험법 밸리데이션을 확립함. 지표성분인 hispidin은 7.16 ppm 범위의 검출한계를, 21.70 ppm의 정량한계를 나타내었고, 장수진흙버섯 추출물에 함유된 hispidin의 함량은 $0.0978 \pm 0.0014\%$ 이었음	100%

(4) 제2 협동과제: 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발

년도	세부연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○ 가축전염병 제어용 항미생물 펩타이드 발현시스템의 개발 및 확보	돼지 항미생물 펩타이드를 활용한 가축전염병 유해미생물 제어용 신소재 발굴(beta defensin 및 PMAP1, pr26, PG1 등 유전자 소재 클로닝 20건)	100
		항미생물 펩타이드 <i>in vitro</i> 대량생산 기술 개발 : insoluble GFP를 활용한 숙주세포유해물질 발현시스템 개발	100
2차 년도	○ 미생물 테스트 패널에 대한 평가를 통한 최적 항미생물 펩타이드의 평가 및 선발	항미생물 펩타이드의 효과 검정을 위한 항미생물 테스트 패널의 구축 및 항미생물펩타이드 항균력 측정	100
		최적 항미생물 펩타이드의 선정 및 대량 발현	100
		항미생물 펩타이드 대량발현시스템의 발현량 최대화를 위한 배양조건의 확립	100
	○ 항미생물 펩타이드 대량 발현시스템의 최적화	돼지유래 이외의 주요 항미생물 펩타이드의 확보 및 효력평가	100
		항미생물 펩타이드의 분석을 위한 오피타머 또는 항체의 개발	100
3차 년도	○ 최적 항미생물 펩타이드의 생산량 증대를 위한 기술 개발 및 활성증대기술 개발	PG1의 정제단계 최적화 및 생산효율 극대화	100
		항미생물 PMAP36, PR26의 클로닝 확보 및 안정적인 발현, 정제시스템 최적화	100
	○ 항미생물 펩타이드의 박테리아 세포벽 파괴기전 분석 및 비교	PR26의 박테리아 세포벽에 대한 작용 기전에 대한 분석 및 비교	100
		Cyclic AMP의 클로닝 확보 및 발현	100
4차 년도	○ 정제된 항미생물 펩타이드의 병원성미생물 억제제로써의 효과 분석 및 평가	가축전염성 유해미생물 패널에 대한 항미생물 억제제로써의 효과평가를 통한 가축전염병 제어용 신소재로써의 효과의 검정	100
		전자현미경을 활용한 항미생물 펩타이드의 박테리아 세포벽 파괴기전 분석 및 비교	100
		항미생물 펩타이드 정제기술개발 2단계	100
		임상실험을 위한 항미생물 펩타이드의 생산	100
5차 년도	○ 항미생물 펩타이드의 유효성 평가	항미생물 펩타이드의 임상적 및 기능성 첨가제로써의 효과 검정	100
		전자 현미경을 활용한 항미생물 펩타이드의 항균작용 기전 연구	100
		Cyclic 항미생물 펩타이드의 대량 발현 시스템 구축 및 효력 평가	70
		항미생물펩타이드의 생산 및 관련과제 제공	50

(5) 제3 협동과제: 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 및 상용화 기반 구축

년도	세부연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	○가축전염병 질환을 유발하는 바이러스 및 세균의 증식 저해 관련 표적 단백질의 선별 및 확보	- 가축전염병질환 관련 문헌 및 서열 조사를 통한 세균 및 바이러스의 세포내 증식 등에 관여하는 핵심 인자 발굴	100
2차 년도	○ 가축전염병 유발 관련 세균 및 바이러스의 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머의 제작, 선별 및 확보	- 가축 전염병 유발 관련 표적 단백질인 prfA와 IpaH에 특이적으로 결합하는 앵타머 선정 - 가축 전염병 유발 세균 Shigella spp.와 Vibrio spp.의 생균에 특이적으로 결합하는 앵타머 선별	100
3차 년도	○ 가축전염병 치료용 앵타머의 상용화를 위한 in Vitro에서의 앵타머의 활성 평가	- 선별된 가축전염병 관련 단백질에 특이적인 앵타머의 결합 최적화를 위한 in vitro에서의 결합력 및 특이성 등의 효능 평가 - 가축전염병 관련 병원성 인자에 대한 앵타머 개발 및 이를 통한 세균 생육 저해 등의 항균 능력 평가	100
4차 년도	○ 병원성 인자에 특이적인 앵타머 소재의 상용화를 위한 안정성 평가	- <i>Salmonella spp.</i> 특이 결합용 DNA 앵타머 소재 개발 - 가축 전염성 인자인 PRRSV에 특이적인 앵타머 개발 - 항균펩타이드에 특이적인 앵타머 개발 및 효능 평가 - 가축 전염병 관련 병원성 인자에 특이적인 앵타머의 항균활성 평가 및 안정성 평가	100
5차 년도	○ 표적 치료용 앵타머 소재의 상용화 기반 구축 및 대량생산 시스템 개발	- 가축 전염병 관련 병원성 미생물에 특이적인 앵타머의 안정성 평가를 통한 상용화 기반 구축 - 병원성 바이러스에 특이적인 앵타머의 친화력 평가 및 안정성 평가 - 치료용 앵타머의 대량확보를 위한 앵타머 생산 Scale-up 생산 기술 개발 - 가축 전염병 치료용 앵타머의 상용화를 목표로 안정적인 소재 공급을 위한 대량 시스템 구축	100

(6) 제3 협동과제: 개발된 가축전염병 제어용 신소재를 이용한 제형 개발 및 산업화

년도	세부연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	개발 신소재를 이용한 복합제제 제형 생산	- 육계용, 산란계용 복합제제 제조법 완성 및 시제품 생산 완료 - 관련 제제 안정성시험 착수	100
2차 년도	○ 복합제제의 안정성, 안전성 평가 및 면역복합제제 생산과 적용방안 도출 ○ 신소재 개발팀과 신소재에 대한 기준 및 시험방법 연구	- 복합제제 경구투여제(분말) 안정성시험 및 축산농가에서의 안전성시험 실시 - 복합제제 경구투여제(분말) 제조법을 완성하고 시제품 생산 및 안정성시험 실시 - 신소재 개발팀과 신소재에 대한 기준 및 시험방법 설정	100
3차 년도	○ 개발신소재를 이용 면역 복합제제 포뮬라, 제조법, 안정성, 안전성 평가 ○ 효능평가팀에 시제품 제공 ○ 신소재 개발팀과 기준 및 시험방법 연구 ○ 해외 수출 방안 연구	- 개발신소재를 이용한 면역복합제제의 포뮬라와 제조법을 완성하고 안정성 및 축산농가에서의 안전성 평가 - 개발신소재를 이용한 면역복합제제의 시제품을 생산하여 효능평가팀에 제공 - 신소재 개발팀과 협의하여 최적의 기준 및 시험방법 연구 - 기존의 사내 수출팀을 활용하여 수출방안 모색	100
4차 년도	○ 개발신소재 이용 복합제제 기준 및 시험방법 연구 ○ 효능평가팀에 시제품 제공 ○ 개발신소재 이용 복합제제 대량생산 체계 수립 ○ 개발신소재 이용 복합제제 인허가, 상품화 체계 수립 ○ 해외 수출 방안 연구	- 개발신소재를 이용한 면역복합제제의 기준 및 시험방법을 확립하고 장기보존시험을 실시하여 안정성 평가 - 개발신소재를 이용한 면역복합제제의 시제품을 생산하여 효능평가팀에 제공 - 신소재 개발팀과 협의하여 대량 생산 체계 연구 - 기존 사내 인허가, 홍보팀과 허가 및 상품화 협의 - 기존의 사내 수출팀을 활용하여 수출방안을 모색	100
5차 년도	○ 개발신소재 이용 복합제제 기준 및 시험방법 연구 ○ 효능평가팀에 시제품 제공 ○ 개발신소재 이용 복합제제 대량생산 체계 수립 ○ 개발신소재 이용 복합제제 인허가, 상품화 체계 수립 ○ 해외 수출 방안 연구	- 개발신소재를 이용한 면역복합제제의 기준 및 시험방법을 확립하고 장기보존시험을 실시하여 안정성 평가 - 개발신소재를 이용한 면역복합제제의 시제품을 생산하여 효능평가팀에 제공 - 신소재 개발팀과 협의하여 대량 생산 체계 연구 - 면역복합제제 허가 완료 및 상품화 추진 - 기존의 사내 수출팀을 활용하여 수출방안을 모색	100

제 2절. 관련분야 기여도

1. 가축전염병 제어용 면역단백질 이용 첨가제 개발 분야

- 가. 현행 사료 첨가제 시장에서 항생제 및 백신의 사용량이 줄어들고 있는 시점에서 면역 단백질 발현 균주의 개발은 현 시점에서 적절한 개발이므로 가치가 있음. 또한 면역 단백질 발현 균주로는 GRAS 균주인 효모와 바실러스를 이용하여 발현을 시도하였다는 점에서 큰 의미를 가지고 있고 안전하다고 알려져 있으므로 항생제 및 백신의 사용량을 줄이는 목적으로 사료 첨가제로써의 활용 가능성이 높음.
- 나. 현행 사료 첨가제 시장에서 사료 첨가제 성분으로 사용되는 생균제의 경우 해당 균주의 유전적 정보를 통한 pathogenic gene island의 확인은 아직까지 없어진 것으로 알려져 있음. NGS기법을 이용한 pathogenic gene island 탐색은 사료 첨가제 성분으로 사용되는 생균제의 품질 보증으로써의 역할을 수행할 수 있다는 점에서 다른 것들에 비해 경쟁력을 확보하고 있음. 또한 이러한 기술을 이용하여 안전이 검증된 생균제의 사용은 사료 첨가제 시장을 선점할 가능성이 있음.
- 다. 사료 첨가제 성분 중 생균제의 경우 외국으로부터 수입을 받아 사용하는 경우가 대부분인 것으로 알려져 있고 생균제를 수입하는데 많은 비용이 소요되는 것으로 알려져 있음. 또한 수입한 생균제는 유용 활성의 확인이 어렵고 제시된 균체 수만큼 존재하지 않는 것으로 확인 됨. 따라서 본 연구에서 분리, 동정, 활성 확인 및 유전적 정보가 확인된 생균제 *L. acidophilus* KNU-02와 *C. butyricum* KNU-L09는 생균제 수입에 발생하는 비용을 절감할 수 있고 사료 첨가제 성분으로써의 품질 보증이 되었으므로 가치가 있음. 이 두 균주의 경우 제제화 한 후에도 10⁹ 이상의 균체수를 가지고 있는 것으로 확인되어 사료 첨가제 성분으로써의 활용 가능성이 높음.
- 라. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부 과제명	세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
제2세 부 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발	고면역 복합난황 항체 시제품 생산 및 상품화	○ 국내 난황항체 기술 개발은 단일 병원체에 대한 난황항체 생산이 대부분이며 난황항체 역가에 대한 문제점이 제기되고 있음 ○ 국외인 경우 일본 EW Nutrition 기업에서 난황항체 관련 제품들이 시판되고 있으며 국내에도 수입되어 판매되고 있으나 역기 난황항체 역가로 인한 효능이 검증되지 않음	- 난황항체 생산을 위해 효과적으로 닭을 면역시키기 위해 닭 유래 면역보강분자(cFc)가 harboring 된 바이러스 항원 또는 tagging된 바이러스 유래 단백질 항원 생산 시스템 개발 - 고역가 복합난황항체 생산을 통해 난황항체의 효능이 기존보다 개선됨	- 향후 고면역 복합난황항체의 상품화를 통해 국내 양돈장의 급성 감염병에 대한 질병 제어 개선에 기여 - 다양한 복합난황항체 개발을 위한 기초자료 제공 및 응용연구에 기여 - 독자적인 국내 기술 개발로 로열티 및 일본으로부터 난황항체 수입 비용 감소에 기여
	면역 단백질	○ 국내에서 시판중인 미생물 사료에 사용되는 미생물제제에 대한 확	- 축산 사료 첨가용 미생물 생균체인 <i>L. acidophilus</i>	- 향후 가축용 미생물 사료시장에서 품질이 확인된 미생물

<p>발 현 재 조 합 균 주 및 생 균 제 용 분 리 확 보 된 미 생 물 균 주 의 제 제 화</p>	<p>실한 정보 및 그 활성화에 대한 정보 역시 미비한 것으로 확인됨</p>	<p>○ 현재 국내에서 <i>C. butyricum</i>이 포함된 미생물 사료의 경우 해당 균주에 대해서는 전량 일본에서 수입한 균주를 사용하고 있음. 일본에서 수입될 때 균주에 대한 품질 관리가 미비하며 유해성 검사는 진행되지 않는 것으로 알려짐</p>	<p>KNU-02와 <i>C. butyricum</i> KNU-L09의 경우 이들에 대한 동정이 완료되었으며 활용 가능성을 확인한 결과 바이러스 완화 및 인축 공통 병원성 미생물에 대해 항균활성이 있는 것으로 확인</p> <p>- 본 연구에서의 <i>C. butyricum</i> KNU-09 균주를 이용하여 일본으로부터 수입되는 균주를 대체할 수 있어 비용 절감 및 토착 미생물을 사용하는 것에 대한 신뢰성 증가 효과를 기대</p>	<p>사료를 공급할 수 있어 해당 시장에 대한 선점 가능성이 높음</p> <p>- 미생물 분리, 동정 및 활용 가능성 조사에 대한 기술을 확보하여 가축용 미생물 관련 연구에 대한 기초자료를 제시</p> <p>- 일본으로부터의 균주 수입 비용 감소에 기여</p>
--	--	---	--	---

2. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 기법 분야

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

- (1) 기존의 동물성 백신은 사백신 또는 약독화 백신으로 다른 세균 혹은 바이러스성 질환에 오염되거나 mutation 발생 시 예상치 못한 독성을 초래할 수 있음. 또한 낮은 항체 형성으로 인하여 지속적인 투여로 인한 농가의 경제적 부담을 향상시키는 등의 문제를 지니고 있을 뿐만 아니라 항생제 사용의 규제에 따른 이를 대체할 수 있는 새로운 가축질환 예방용 백신 개발이 필요한 실정임. 따라서 본 기술은 기능성 세포소기관인 리소좀을 이용하여 항균 신소재 개발을 하는 것으로 앞서 언급한 문제점들을 보완할 수 있는 신소재이며, 가축의 예방백신 및 치료제 외 인체용 백신 및 치료제 등으로 개발되기 위한 핵심기술임.
- (2) 친환경적인 세포소기관인 리소좀을 이용한 가축 치료제를 개발함에 있어 기존의 화학적으로 개발된 항균제, 생균제 등의 물질들의 새로운 질병이 유발될 수 있는 가능성을 완전 차단함으로써 기존 치료제제와는 완전 다른 치료제제로서 사용이 가능하며 질병 치료제로서 새로운 개발은 국제 경쟁력의 적극적인 확보 면에서 큰 기여를 할 수 있으리라 사료됨.
- (3) 개발 리소좀 제제는 기존 항생제를 대체 가능한 천연 신규항균물질로 사용함으로써 사회적으로 가축 질병확산에 따른 걱정을 없애 현대인의 생활 영위와 질 높은 경제 생활을 가능하게 할 것임.

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

- (1) 항생제 사용의 제한에 따라 대체항생제를 개발하려는 연구가 다방면으로 진행되고 있음. 특히 보다 안전하고 환경친화적인 것으로 알려진 천연물 유래 대체항생제를 개

발하고자 많은 노력을 기울이고 있음. 그럼에도 불구하고 사료첨가제 등 축산용 대체 항생제의 개발은 가격경쟁력의 측면에서 개발에 많은 어려움이 있음.

- (2) 본 연구에서는 보다 저렴한 항인플루엔자 천연물 소재를 개발하고자 국내산 농산물, 자생 및 약용작물, 자생 및 약용균류 자원 등을 대상으로 폭넓게 스크리닝을 수행하였음. 스크리닝 과정 중 자생식물 및 약용식물 추출물에서 활성이 우수한 소재를 발견하였으나 소재의 수급성과 가격적인 측면에서 축산용으로의 사용이 어려워 추가적인 연구를 진행하지 못하였음. 그러나 이들 소재는 향후 고부가 의약용으로의 개발 가능할 것으로 판단되어 의약용 및 동물용 항인플루엔자 개발에 유용한 소재로 활용될 수 있을 것임.
- (3) 본 연구를 통하여 장수진흠버섯이 항인플루엔자 효능이 뛰어난 것을 밝혔음. 장수진흠버섯은 목질진흠버섯과 함께 상황버섯으로 불리며 시중에서 시판되는 상황버섯의 80%를 차지하고 있음. 상황버섯은 고가의 약용버섯으로 인식되고 있으나 과일생산에 의하여 가격이 하락되어 생산농가가 어려움을 겪고 있는 상황임. 반면 최근 플루를 비롯한 신종 독감이 출현하고 있어 이의 치료에 장수진흠버섯을 활용한다면 농가소득은 물론 국민건강증진에도 크게 기여할 것임.
- (4) 본 연구에서 도출한 항인플루엔자 소재들이 추가적인 연구에 의하여 개발된다면 외국으로부터의 사료첨가제 수입을 대체하고 수출을 통한 국내 바이오소재 산업의 활성화 및 경제적 이익 창출에 기여할 것임. 또한 항인플루엔자 소재 개발을 통한 국가 생물산업 경쟁력 제고 및 우리나라 자생 식물 및 미생물자원의 체계적 활용에 기여할 것이며, 본 연구를 통하여 도출한 지적재산권, 논문 투고 및 원천기술 개발은 국가 과학기술 경쟁력 제고에 크게 기여할 것임.

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

- (1) 가축질병을 예방·치유 할 수 있는 약제들이 개발 되어 시판 중에 있으나, 현재 동물 질병 예방을 위해 사용되는 백신의 생산단가가 높아서 농민들에게는 경제적으로 부담스러운 상황임.
- (2) 최근 식물체에서 생산된 항체 (Plant body라고도 부름)에 대한 연구가 미국과 유럽의 선진국에서 주로 연구를 수행하고 있으나, 국내의 경우 몇몇 학자들이 연구를 진행하고 있으나 여전히 인프라가 부족으로 어려움을 겪고 있음. 때문에 정부차원에서 기술 개발에 대한 집중적인 투자로 선진국에 근접하는 기술수준으로 끌어 올려야 함. 선진국 제품이 국내 시장을 완전히 잠식하기 전에 상용화가 시키고 더 멀리는 제품을 수출할 수 있도록 연구개발에 대한 투자가 절실히 요구됨. 따라서 본 연구는 앞서 언급한 문제점을 해결할 수 있는 소재로서 직접발현 또는 식물바이러스를 이용한 간접발현을 통하여 유용단백질을 식물에서 발현시키는 시스템 개발을 목적으로 하고 있음.
- (3) 가격경쟁력과 제조과정에서 오염되지 않도록 고단백 사료작물인 콩에 발현 시키고자 형질전환 식물체를 만들기 위한 선결 조건이 될 수 있는 재분화 능력을 테스트한 결과 국내품종을 이용한 형질전환체 작성이 가능할 것으로 보이며, 형질전환체 작성이 용이한 담배를 이용하여 유용단백질 고발현용 식물체를 만들어 본 결과, 국내 콩 품종을 이용하여 유용단백질용 고발현용 식물체 개발이 가능 할 것으로 기대됨.
- (4) 본 연구기간동안 다양한 유용유전자 발현 벡터를 제작하고자 하였으나 PMAP:GFP, BSV-S1:GFP, HINI-HA:RFP의 조합이 발현되었는데, 추후 연구를 더 진행하여 이

유용유전자들을 바이러스벡터에 도입 하면 보다 노동력이 적게 투입되어 가격경쟁력이 있는 유용단백질을 식물에서 생산이 가능할 것으로 기대됨.

- (5) 위에 기술한 것 외에도 동물 바이러스병 사전 방제법에 관한 우수연구 논문출판과 바이러스성 질병방제에 대한 대한민국의 학문적 위상이 높아질 것으로 기대되며, 식물바이러스와 동물바이러스를 연구 할 수 있는 전문가 육성과 식물형질전환 전문가 육성이 기대됨. 경제적, 산업적 측면에서도 살펴보면, 약제 개발 시간이 혁신적으로 단축되므로 병발생시 신속한 대응이 가능하여 수확조원에 이르는 경제적 피해를 사전에 예방 할 수 있는 효과를 기대됨.

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가

- (1) 항병성과 관련된 실험실평가에서 항바이러스와 면역원성실험 등은 대부분 국내외에서 사용하는 기법들과 큰 차이가 없음. 그러나 항균효능평가에서 흔히 사용되는 paper disc 방법은 disc 주변의 억제능(inhibitory effect)만을 확인할 수 있기 때문에 실제 물질에 대한 항균능의 존재를 정확하게 파악할 수 없음.
- (2) 번 과제에서 도입한 변형된 spot-on lawn assay는 배지 상에 균액이 골고루 퍼진 상태에서 물질을 적하했을 때 균의 억제능 여부를 육안으로 쉽게 확인할 수 있는 장점이 있음. 이 방법은 원래 bacteriophage의 용원성 시험에서 사용하던 방법으로 알려져 있으나 최근에는 이를 세균에 적용시켜 물질의 항균효과를 확인하는 방법이 보고되어 있음. 결국 spot-on lawn assay는 억제능이 확인되었을 때 물질의 농도나 또는 시간별로 항균효능을 최종적으로 확인하는 time kill assay의 전단계로서 물질의 세균 억제능(microbial inhibitory effect)을 1차적으로 평가하는데 보다 정확한 평가기법이라고 할 수 있음. 본 과제에서는 주로 식물추출물, 항미생물펩타이드(AMP), 광물(silicate) 등을 이 방법으로 억제능을 평가하고 항균효능이 우수한 물질들을 최종 확인하여 질병유발모델 대상 효능평가에서도 우수한 방어효과가 있는 것을 확인할 수 있었음.
- (3) 양계질병유발모델 대상 물질 효능평가기법은 질병유발모델이 구축되지 않으면 물질에 대한 효능평가나 면역원성 평가 등을 수행할 수 없기 때문에 현장(농장) 수준에서 발생하는 임상증상, 실질장기 육안병변, 폐사율 등을 감안한 질병모델을 만드는 것은 무엇보다 중요함. 본 과제에서는 5종의 양계질병 유발모델을 마우스와 실용계(육계)를 통해 평가항목들을 가지고 효능과 방어율을 확인할 수 있는 평가체계를 확립하였다는데 큰 의미가 있다고 판단됨. 이러한 질병유발모델 및 효능평가기법은 향후 본 과제가 끝난 이후에도 이들 질병모델들에서 면역원성 및 생리활성, 안정성 등에 관한 다양한 연구를 시도할 수 있는 중요한 기초자료가 될 수 있음. 또한 질병모델에서의 평가항목들도 질병에 따라 개체들의 임상증상이나 실질장기 병변에 대해 약간씩 다르게 구분되었기 때문에 기본적인 평가지침에 꼭 필요하다고 생각되며 향후 면역원성, 생리활성, 안정성 등의 연구들을 확대하여 평가항목들을 개발해 나간다면 개발물질 급여를 통한 가축들과 소비자들의 안전성을 담보하는데 기여할 수 있을 것임.
- (4) 개발물질의 양돈에서의 효능평가 및 안전성을 위하여 기존 농장 수준의 평가와 마우스를 이용한 평가 방법을 넘어서 실제 목적동물인 돼지를 이용한 효능 평가 방법이 정립되었음. PRRSV, PEDV, Salmonella, 병원성 E. coli 등에 적합한 질병모델을 구축하였고 공격접종에 따른 병원체 억제, 면역형성 (항체 및 싸이토카인 유도)와 세포

활성 평가), 병원성 평가 등에 따른 효능 검사법을 확립하였음. 또한 평가 물질의 안전성 평가를 위하여 기존의 생화학적 또는 임상관찰에 의존한 평가방법 뿐만 아니라 장내 세균총 분석을 통한 정상 세균총의 파괴 등의 위험성을 평가하는 더욱 발전된 안전성 평가 분석 방법을 구축하였음.

마. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부 과제명	세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
	기능성 리소좀 제제를 이용한 항병성 신소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내의 경우 리소좀이 아닌 리소좀 내의 효소인 라이소자임이라는 효소를 이용한 항균제 개발이 대부분이며 세포소기관 자체를 이용한 개발은 이루어지고 있지 않음. ○ 국외의 경우 항균 펩타이드를 이용한 항균제 개발이 활발히 이루어지고 있으나 천연물질이 아닌 합성물질로 거부감과 부작용이 발생하고 있음 	<ul style="list-style-type: none"> - 단일 효소가 아닌 세포소기관 자체 리소좀을 직접적으로 사용함으로 인해 안전성이 뛰어나고, 효소와 같이 무조건적 반응이 아닌 세균인식 기작을 이용한 반응으로 세균 특이적이며 그로 인한 부작용이 없음 - 합성물질이 아닌 천연물질로서 부작용이 없고, 그에 따른 부정적 인식이 적음 	<ul style="list-style-type: none"> - 가축 질병의 예방 및 면역증강으로 인해 향후 사육농가의 경제적 이익증대 및 축산 산업발전에 기여 - 세포소기관을 이용한 최초의 기술개발로 다른 세포소기관을 이용한 연구에 대한 기초자료를 제시 - 독자적인 국내 기술개발로 항균물질의 로열티 감소에 기여
	천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내의 경우 항생제 사용의 제한에 따라 사료 첨가용 대체 항바이러스제를 개발하려는 연구가 한국생명공학연구원 등을 중심으로 수행되고 있음 ○ 외국의 경우 신종 바이러스의 출현으로 다국적 제약사를 중심으로 항인플루엔자 신약을 개발하고 있음 	<ul style="list-style-type: none"> - 본 연구는 우리나라 자생 바이오자원을 활용한 폭넓은 항인플루엔자 소재의 스크리닝을 수행함 - 자생 균류소재가 강력한 항인플루엔자 활성을 지녔음을 처음으로 밝힘 - 추출물 수준의 연구가 아닌 활성성분의 규명과 지표성분의 밸리데이션 등 산업화 기반을 구축함 	<ul style="list-style-type: none"> - 가격 측면에서 축산용으로의 사용은 어렵지만 추가적인 연구를 통하여 고부가 천연물신약 및 동물 의약품, 기능성 식품소재로의 활용가능성이 높음 - 항인플루엔자 소재 개발을 통한 국가 생물산업 경쟁력 제고 및 우리나라 자생 바이오자원의 체계적 활용에 기여
	식물발현 시스템을 이용한 백신가신소재	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현재까지 국내에는 고부가 가치 유용물질 생산을 위한 상업화된 형질전환체는 존재하지 않으나 지속적인 연구를 통하여 국내에서도 	<ul style="list-style-type: none"> - 안정적인 형질전환 식물체를 만드는데 최소 2-3년이 소요되는 반면에 바이러스를 이용하는 경우 수개월에서 짧게는 	<ul style="list-style-type: none"> - 향후 추가 연구가 진행되어 효율적인 식물바이러스 벡터가 개발된다면, 유용단백질을 가축 감염성 질병을 효과

	<p>머지않아 유용 단백질을 생산할 수 있는 GM 작물이 탄생할 수 있을 것이나, 국내에서는 GM 작물을 재배하지 못하는 문제점을 내포하고 있다.</p> <p>○ 미국 콜로라도에 있는 Ventria Bioscience사는 1993년에 설립한 회사로 GM 벼를 만들어 유아용 식품첨가제를 판매하고 있으며 사업 영역을 확장 시켜가고 있다.</p>	<p>수 주만에 유용물질 생산이 가능한 우수성을 가지고 있다.</p>	<p>적으로 제어하는데 크게 기여 할 것으로 봄</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 유용물질 발현을 위한 기초자료 제공 및 응용연구에 기여 - 식물바이러스를 이용한 가축 감염성 질병 제어 기술에 의한 지적 재산권 확보가 가능하고 시장 선점 효과가 기대됨
<p>축 종 별 효능평가 기법 확 립 및 개 발 신소 재 효능 평가</p>	<p>○ 고면역 복합난황항체 개발 및 효능평가 기술</p>	<p>- 양계질병 맞춤형 난황항체 및 효능평가 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 양계에서 발생하는 주요 질병에 대한 맞춤형 난황항체제 적용 프로그램 개발로 국내 양계산업의 생산성 향상에 기여

3. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발분야

가. 가축 전염병 유해 미생물 제어를 위한 신규소재의 개발

- (1) 돼지 유래의 항미생물 펩타이드 유전자 발굴을 통하여 확보된 항미생물 펩타이드 유전자들은 돼지 유전체를 활용한 질병 저항성 향상 기술 개발에 기여하였음.
- (2) 이는 돼지 이외의 종에서도 다양한 항미생물 펩타이드가 존재하므로 돼지뿐 만 아니라 다른 종의 가축에도 적용이 가능하다는 점에서 다른 가축의 질병 저항성 향상 기술 개발에 가능성을 제시하였으며, 새로운 항생제 대체제로써의 활용 가능성을 가지는 신규 소재들을 도출하였음.

나. 항생제 대체 물질 개발 분야의 기술 발전에 기여

- (1) 항생제 내성균의 출현이 동물 산업은 물론 국민 보건을 위협하는 중대한 문제로 대두됨에 따라 항미생물 펩타이드를 활용한 방법이 세계적으로 검토되고 있으며 본 연구의 대장균을 이용한 대량 발현 및 정제 시스템은 최초로 개발된 세계적인 기술로 항생제대체제의 개발 연구 및 산업적 생산에 기술적 진전을 이루었음.

다. 숙주 독성 단백질 생산을 통한 생물학적 연구 발전에 기여

- (1) 본 연구에서 구축한 대량 생산 시스템은 항미생물 펩타이드 뿐 만 아니라 숙주세포에 독성을 가지는 다른 단백질 생산에 대한 적용이 가능성이 제시됨에 따라 보다 단백질 구조 분석등 단백질과 관련된 다양한 분야의 연구를 촉진시킬 수 있을 것임.

라. 항미생물 펩타이드 분석 및 효능검증 기술의 발전

- (1) 항미생물 펩타이드의 경우 그 분자량이 매우 작아 전기영동을 통한 확인에 어려움이 있

었으나, 본 연구의 고용량 펩타이드 생산 및 협업을 통해 앵타머 발굴과 같은 분석 기술 개발에 일조하였음.

(2) 이는 비단 항미생물 펩타이드 뿐 아니라 다른 펩타이드들에 대한 적용이 가능할 것으로 전망된다. 또한 병원성 미생물 패널을 구축함으로써 이 후 다양한 항미생물 펩타이드들의 효능 검증에도 유용하게 사용될 것임.

마. 사료산업, 농업에서의 질병저항성 증진을 위한 기술 개발 제시

(1) 식물의 경우 다양한 종류의 내인성 항미생물 펩타이드를 가지고 있으며, 특히 pH, 온도, protease로부터 보다 안정성을 가지는 것으로 알려진 cyclic 항미생물 펩타이드를 많이 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로 식물의 질병 저항성 향상 개발에 활용될 수 있는 신규 소재들을 도출하였음.

바. 돼지 항미생물 펩타이드 transgenic mouse을 통한 항미생물펩타이드 in vivo 기능 이해의 촉진

(1) 건국대 호흡기 질병 문제로 인한 대체 실험의 일환으로 본 연구에서 추가한 항미생물 펩타이드 과발현 transgenic mouse를 이용한 연구들은 동물 모델 및 항미생물펩타이드 작용기전에 대한 구체적인 이해를 위해 유용하게 사용될 수 있을 것이며, 항미생물펩타이드가 항균작용 이외에도 다른 기능을 할 것으로 생각됨에 따라 이에 대한 추가적인 연구에도 이용이 가능할 것임.

사. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부 과제명	세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
가축의 유해 미생물 제어 위한 항미생물 펩타이드 개발	가축 전염병 유해 미생물 제어를 위한 신규소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지 유전체 분석이 이루어짐에 따라 이를 활용한 질병 저항성과 관련된 연구가 진행 중 ○ 항미생물 펩타이드는 내재성면역을 통해 생체방어에 중요한 역할을 하는 천연 항생물질로 전세계적으로 의학 및 식품분야에서 주목받고 있는 소재 	<ul style="list-style-type: none"> - 기 분석된 돼지의 항미생물 펩타이드 20종을 활용한 cDNA클로닝을 확보하고 발현을 위한 최적의 유전자들을 평가 및 선발 	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 유래의 항미생물 펩타이드 유전자 발굴을 통하여 확보된 항미생물 펩타이드 유전자들은 돼지 유전체를 활용한 질병 저항성 향상 기술 개발 - 돼지 이외의 다른 종의 가축 질병 저항성 향상 기술 개발에 가능성을 제시 - 새로운 항생제 대체제로써의 활용 가능성을 가지는 신규 소재들을 도출
	항생제 대체 물질 및 숙주 독성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항생제 내성균의 출현이 증대한 문제로 대두됨에 따라 항생제 내성균 문제의 해결책 중 하나로 항미생물 펩타이드를 활용한 방법 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대장균을 이용한 항미생물 펩타이드 및 박테리아 독소 단백질 대량 생산 시스템 세계 최초 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 항생제대체제의 개발 연구 및 산업적 생산에 기술적 진전 - 숙주세포에 독성을 가지는 다른 단백질

단백질 생산 시스템 개발	전세계적으로 검토되는 중 ○ 항미생물 펩타이드 및 박테리아 독소 단백질 생산 시스템의 부재로 인해 다양한 분야에서 연구에 제약이 따름	<ul style="list-style-type: none"> - 대량 발현 시스템의 발현량 최대화를 위한 배양조건의 확립 - 생산량 증대를 위한 정제 기술의 개발 - 항미생물 펩타이드의 활성증대기술 개발 	<p>생산에 대한 적용이 가능성이 제시됨에 따라 보다 단백질과 관련된 다양한 분야의 연구를 촉진</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고용량 펩타이드 생산을 통해 항균작용 기전 연구, 앵타머 개발, 항미생물 펩타이드 검정 시스템 확립을 포함한 다양한 관련 과제를 제공
---------------	---	---	--

4. 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 분야

가. 국내·외 2009년부터 2015년까지 앵타머 치료제 관련 지식재산권 수 분석결과, 현 기준 110건이 등록되어 있으며 2,925건이 공개되어 있음(KIPRIS, 2016.06). 앵타머 기반의 치료제 기술에 대한 지식재산권 점진적으로 늘어나고 있는 추세이며 치료제 관련 기술 확보가 중요성이 높아지고 있는 것을 나타냄. 특히 앵타머 소재를 기반으로 하는 가축전염병 치료용으로 개발된 사례는 전무하여 본 연구의 가축질병치료제로서의 앵타머 소재 및 응용 기술은 국가 기술력 확보와 경제력 구축에 기여할 것임.

나. 앵타머 기반의 치료제 기술 연구도 2016년 현재 앵타머를 소재로 동식물과 사람에 관여하는 질병을 진단 및 검출하는 논문은 3,969건으로 다수가 등재되어 있지만 치료하는 소재로서 연구된 논문은 224건으로 전체의 2.1%에 불과하여(SCOPUS, 2016.06) 본 연구에서 수행한 가축을 대상으로 하는 치료용 앵타머 연구는 절실한 실정임. 가축전염병 관련 바이러스 및 세균의 증식을 저해하고 질병 치료용으로서의 앵타머 소재 개발은 가축 전염병 치료제의 상용화를 위한 기반 구축에 발판이 될 것이며 생체내에서 안정적인 핵산으로 이뤄진 앵타머는 안정적이고 잔존우려가 없어 가축 내 치료용 물질로서 용이할 것임.

다. 앵타머를 기반으로 하는 본 연구에서 개발한 Apta-blotting는 기존 항체를 사용하는 western blot기술을 대체할 수 있는 기술로서 노이즈도 적고 DNA로 이뤄진 앵타머의 특성상 항체보다 경제성이 높고 안정적인 특징으로 진단 및 검출 시스템에 적용이 쉽고 다양한 분야에 응용 가능할 것으로 생각되어 지식재산권 확보는 가치가 높을 것으로 사료됨. Western blot을 응용한 앵타머 기반의 검출 시스템은 다른 표적 물질에 응용이 가능할 것으로 생각되어 활용 가능성이 높음.

라. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부 과제명	세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
제3협동 고위험성	가축 전염병 관련 병원성	○ 국내·외 앵타머 기반의 치료제 특허는 점진적으로 늘고 있으나 가축에 대한 연구는 미	- 가축전염병 유발 바이러스 1종, 세균 4종, 유발인자 2종에 특이성을 갖는 앵타머	- 앵타머 소재가 적용된 질병 진단 및 치료용 상용화 제품을 통해 국내 양돈장의 급성

가축 전염성질 환 표적용 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 및 상용화 기반 구축	균주에 특이적인 앵타머 개발	비합 ○ 사람 질병과 관련된 연구는 활발히 이뤄지고 있으나 동물 질병 치료와 관련한 앵타머 소재 연구는 미약함	소재 19종 확보 - 동물 질병 관련 표적물질을 특이적으로 검출하고 생장을 억제하여 치료할 수 있는 소재로서 개발됨	감염병에 대한 질병 제어 개선에 기여 - 핵산을 이용하여 안정적이고 대량생산이 가능하여 경제력 이점
	목적 단백질 탐지하는 앵타머 플랫폼 (Aptamer blotting) 시스템 개발	○ 기존의 표적물질 진단 기술은 항체 기반 또는 PCR 장비를 사용한 검출이 다수임. ○ 항체 확보에 동물 실험 등 고비용이 소요되며 PCR 장비를 통한 진단의 경우는 장비의 전문적인 지식이 요구되어 사용에 제약이 따름	- 안정적인 핵산 기반의 소재를 사용하여 변형이 쉽고 대량생산이 용이함 - ELISA kit와 유사한 방법의 검출기법으로서 기존의 항체기반의 검출기법을 대체할 수 있어 비용 절감과 사용이 쉬워 상용화에 어려움이 없을 것으로 기대됨	- 향후 가축 진단 및 치료용 제품 시장에서 대량생산이 가능한 경제성 있는 핵산기반 소재의 응용 빈도가 높아질 것으로 전망됨. - 항체 생산을 위한 동물 실험이 필요없는 고효율의 핵산 기반의 진단 시스템으로서 바이러스 및 세균 진단 시스템 연구의 초석이 됨

5. 면역복합제제 현장적용 및 산업화 분야

가. 개발된 신소재 및 기존에 사용하던 성분들을 이용하여 포물라를 완성하고 시제품을 생산하여 안정성시험(장기보존시험 등)을 실시하여 제품의 안정성을 확보하였으며, 농장 적용 임상시험을 실시하여 효능을 확인하였음.

나. 당초 산업화 부분에서 동물용의약품으로 총 18종의 축산용 면역복합제품 등록을 목표로 하였으나 1개 품목을 더 추가하여 총 19개 품목을 동물용의약품으로 등록하여 목표를 초과 달성하였으며 향후 국내 축산업분야에서 폐사감소, 성장촉진 등으로 축산농가의 소득증대를 기대할 수 있으며, 기존의 수출부서를 활용하여 수출증대에도 효과를 볼 것으로 기대됨.

다. 내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성 및 기여도 평가

세부 과제명	세부연구 항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
개발된 가축 전염병 제어용 신소재를 이용한 가축 전염병 제어용 신소재 개발 및 산업화	가축 전염병 제어용 신소재를 이용한 제형개발	○ 국내·외 난항 및 초유항체 제제는 단순히 부형제만을 첨가한 제품만이 생산, 판매되고 있음.	- 난항, 초유항체 제제에 기능성이 우수한 생균제, 비타민, 기타 부형제 등이 혼합된 제형 개발	- 다양한 난항, 초유항체 제제 개발을 위한 기초자료 제공 및 응용연구에 기여 - 독자적인 국내 기술 개발로 수입 비용 감소에 기여
	가축 전염병 제어용 신소재를 이용한 산업화	○ 국내·외 난항 및 초유항체 제제는 일부 축종에 한하여 산업화가 이루어 졌으나, 사양단계별로 산업화를 이루지는 못하고 있음.	- 본 연구에서는 난항, 초유항체 제제에 기능성이 우수한 생균제, 비타민, 기타 부형제 등이 혼합된 축종별, 사양단계별 제형 19종을 산업화하였음.	- 향후 항생제 대체제로서 품질이 확인된 사료 첨가제를 공급할 수 있어 해당 시장에 대한 선정 가능성 높음 - 독자적인 국내 기술 개발로 수입 비용 감소에 기여

5장. 연구결과의 활용계획

1. 가축전염병 제어용 면역단백질 고속, 대량발현 체계 구축 및 첨가제 개발분야

가. 추가연구의 필요성

- (1) 본 연구에서 효모를 단백질 발현 세포로 하여 PCV에 대해 면역 단백질 발현을 실시하였고 발현이 되었고 PCV가 발현된 효모를 제제화하여 활성 평가까지 실시하였음.
- (2) 그러나 발현된 PCV의 면역 단백질에 대해서 정제된 면역 단백질을 이용한 활성 평가에 대해서는 실시되지 않은 것으로 확인 됨. 따라서 PCV 면역 단백질을 정제하고 이를 이용한 활성 평가에 대한 추가 연구가 필요함.

나. 타 연구의 응용 및 활용방안

- (1) 본 연구에서 효모를 단백질 발현 세포로 하는 auto-cloning system과 expression system을 이용하여 PCV, PEDV, PRRSV 이외의 바이러스에 의한 가축 질병에 대해 면역 단백질을 만들 수 있음. 또한 본 연구에서 개발된 기술을 가축에 대한 면역 단백질의 발현에만 적용할 뿐만 아니라 반려동물에 대한 면역 단백질의 발현에도 적용 가능할 것으로 사료 됨. 식용을 목적으로 하는 가축 이외에 반려동물에 대한 인식과 수요가 변화하고 있는 추세이므로 반려동물에 대한 면역 단백질의 발현 및 생산은 반려 동물 시장에서 선점할 기회를 제공하며 경제적 이득을 가질 수 있을 것으로 사료됨.
- (2) 본 연구에서 진행된 NGS 기법은 사료에 첨가되어 있는 생균제의 안전 검증을 할 수 있는 큰 수단이 됨. 시판되고 있는 생균제 사료 중 효과 및 생균수에 대한 정보는 있지만 유전 정보를 바탕으로 한 생균 자체의 독성 유전자 진단은 아직까지 이뤄지지 않는 상태임. NGS 기법을 이용하여 사료 첨가제로 사용되는 생균제의 독성 유전자 진단을 실시하고 안전하다고 확인 된 생균제를 사료 첨가제로 사용한다면 품질 보증이 되므로 생균제 사료 시장을 선점할 수 있을 것으로 사료됨.

다. 기업화 추진방안

- (1) 본 연구를 통해 확보 된 면역 단백질 발현 재조합 바실러스와 효모 균주는 활성 평가가 진행 되었으며 생균제 목적으로 분리되어 활성 및 안정성이 보증 된 *L. acidophilus* KNU-02와 *C. butyricum* KNU-L09 균주를 이용한 제제화까지 실시가 되었으며 이를 이용한 활성 평가 역시 진행된 것으로 확인됨
- (2) 생균제 균주 2종 이외에 다른 균주 역시 제제화를 진행하여 사료 첨가제로써의 활용 가능성을 확인하고 이를 이용하여 제품 생산 시도를 할 수 있음.

2. 가축전염병 제어용 백신기능면역복합 신소재 개발 및 효능평가 분야

가. 기능성 리소좀제제를 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 추가연구의 필요성

- (가) 본 연구는 기능성 세포소기관을 이용하여 항균성 신소재를 개발한 것으로, 이것은 항 후 항생물질의 사료 내 첨가의 제한으로 천연 항균 및 천연 기능성 물질 개발을 초점화 하고 있는 시점에서 유용한 기술 개발로 판단된다.
- (나) 이들 소재의 추가적인 연구를 진행한다면 가축의 면역증강, 성장촉진 및 질병의 예방효과 등의 사료 내 첨가의 유용한 소재로 활용할 수 있을 것이다.

(2) 타 연구의 응용 및 활용방안

- (가) 향후 항생물질의 사료 내 첨가의 제한으로 천연항균 및 천연 기능성 물질개발 기술 향상 도모와 생산품 활용 시 가축의 면역증강, 성장촉진, 질병의 예방효과를 거두어 가축 사육 농가의 경제적 이익이 증진하고 축산 산업 발전에 기여할 것으로 판단된다.
- (나) 전염병 예방 효과에 맞춘 깨끗한 축산물을 생산하기 위한 천연물질을 이용한 시장 전환이 예상되며, 독자적인 기술로 개발되어 로알티 및 기타 제반 비용을 감소시켜 기업의 이윤 창출이 기대된다. 또한 산업화를 통한 국내 사육농가에 시제품 판매 및 수출 품목으로 개발할 수 있을 것이며, 생산 관련 기술 축적 향후 다른 질병 분야에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

(3) 기업화 추진방안

- (가) 본 연구에서 개발한 항균성 신소재는 추후 산업화를 위하여 제형별 리소좀의 활성 검증, 리소좀 대량생산을 위한 분리공정 단순화 및 공정 단순화에 따른 리소좀의 항균활성 검증 등을 실시하였다.
- (나) 따라서 본 소재의 실질적인 활용을 위해 추후 가축 사료회사 및 식품기업과의 세부적인 산업화 전략을 통하여 리소좀의 기능이 향상시켜 화학적 항균제에 비하여 안전성이 높으면서도 효율이 높은 친환경 항균제 및 항생제로 대체할 수 있는 물질로 이용할 수 있는 방안을 모색할 예정이다.

나. 천연물질을 이용한 항병성 신소재 개발

(1) 추가연구의 필요성

- (가) 본 연구는 항생제 사용의 제한에 따라 사료첨가용 대체항생제를 개발하려는 연구로 국내산 농산물, 자생 및 약용식물, 자생 및 약용균류 자원 등을 대상으로 폭넓게 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝 과정 중 자생식물 및 약용식물 추출물에서 활성이 우수한 소재를 발견하였으나 소재의 수급성과 가격적인 측면에서 축산용으로서의 사용이 어려워 추가적인 연구를 진행하지 못하였다.
- (나) 그러나 이들 소재는 향후 추가적인 연구를 진행한다면 고부가 의약품으로 개발 가능할 것으로 판단되며 앞으로 의약품 및 동물용 항인플루엔자 신약 개발에 유용한 소재로 활용할 수 있을 것이다.
- (다) 또한 본 연구에서 개발한 장수진흙버섯은 강력한 항인플루엔자 효능뿐만 아니라 항암, 고질혈증, 동맥경화억제, 항염증, 항산화, 관절염억제 등의 약리효과를 나타내는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 추가적인 연구를 통하여 항인플루엔자를 위한 천연물 신약 혹은 건강기능식품으로의 개발이 필요하며, 이는 가격 하락으로 어려움을 겪고 있는 생산농가의 경제적 이익창출에도 크게 기여할 것이다.

(2) 타 연구의 응용 및 활용방안

- (가) 본 연구에서 개발한 장수진흙버섯은 항인플루엔자 효능뿐만 아니라 항암, 고질혈증, 동맥경화억제, 항염증, 항산화, 관절염억제 등의 약리효과를 나타내는 것으로 밝혀진 약용버섯이다. 특히 상황버섯으로 불리며 고가의 약용농산자원으로 인식되어 있다. 추가적인 연구를 진행한다면 항인플루엔자를 위한 천연물 신약 혹은 건강기능식품으로의 개발이 가능할 것으로 사료된다. 특히 이미 면역력 향상을 위한 항

암보조제로 균사체로부터 분리한 다당체가 개발되어 시판되고 있고, 면역력 개선을 위한 건강기능식품으로 등록된 바 있어 독성, 안전성 등의 문제는 해소된 소재이다. 따라서 보건의료부분의 항인플루엔자 천연물신약개발에 응용의 가능성이 높고 또한 식약처 개별 인정형을 통한 기능성식품 소재로의 개발 가능성도 매우 높다.

(나) 본 연구에서 개발한 소재들은 추후 추가 연구를 통하여 천연물 신약 혹은 건강기능식품으로의 개발이 필요하다. 이는 궁극적으로 우리나라 농산 자원인 진흙버섯을 이용한 기능성 건강식품 혹은 천연물 신약 개발로 국민의 건강 증진 및 농가소득 증대에도 크게 기여할 것으로 판단된다.

(3) 기업화 추진방안

(가) 본 연구에서 개발한 진흙버섯 항인플루엔자 활성성분은 기능성식품소재 혹은 천연물신약 소재로의 개발가능성이 높다. 비록 본 연구에서 목표로 하는 사료첨가제로의 개발은 원료의 가격적인 측면에서 어려움이 예상되지만 고부가 의약소재 혹은 식품소재로의 개발은 가능할 것이다.

(나) 따라서 본 연구에서는 산업화를 대비하여 지표성분설정 및 시험법 밸리데이션 연구를 수행하였다. 추후 본 소재와 관련이 있는 제약회사 및 식품회사에 개발기술을 설명하고 관심있는 기업과의 공조로 세부적인 산업화 전략을 수립하여 실질적인 활용을 위한 방법을 모색할 예정이다

다. 식물발현시스템을 이용한 백신가능 신소재 개발

(1) 추가연구의 필요성

식물바이러스를 이용하여 식물에서 유용단백질을 생산하는 시스템을 개발하고자 연구를 실시하였다. 유용단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있는 다양한 식물바이러스 벡터의 개발에 대한 연구가 필요하며, 유용단백질 고발현 담배는 개발하였으나 산업화 목적으로 사용될 콩을 대상으로 하는 유용단백질 고발현 형질전환체를 만드는 추가적인 연구가 필요하다. 아울러 본 연구에서 개발된 3가지 유용단백질 (PMAP:GFP, BSV-S1:GFP, HINI-HA:RFP)을 식물바이러스벡터에서 발현시킨 후 이를 이용한 활성 평가가 추가 연구에 해당 되는 것으로 사료된다.

(2) 타 연구의 응용 및 활용방안

본 연구에서 완성한 국내 콩품종의 조직배양 최적화는 국내 콩을 이용한 형질전환체를 만드는데 있어서 활용이 가능 하며, 또한 본 연구에서 개발된 3가지 유용단백질 (PMAP:GFP, BSV-S1:GFP, HINI-HA:RFP) 식물발현 벡터를 이용하여 형질전환 식물체를 만들어 이용할 수 있다.

(3) 기업화 추진방안

기업화 해당사항 없음

라. 축종별 효능평가 기법 확립 및 개발 신소재 효능평가 (닭, 돼지, 소 순으로 기술)

(1) 추가연구의 필요성

(가) 추가적으로 연구기간 동안 각 세부별로 개발된 물질들을 이용하여 양계질병모델에서 물질을 급여하였을 때 항병성 효과보다는 다른 방어기전인 면역원성, 생리활성

등을 조사하는 것도 개체들의 안전성에 있어서 중요한 평가지표가 될 수 있을 것으로 판단된다.

(나) 또한, 질병수준에서 발현되는 면역기전을 연구하고 이를 방어효능에 대한 정성적인 평가항목들과 비교분석하여 정량적인 지표로 평가될 수 있는 후속연구들도 필요하다고 사료된다.

(2) 타 연구의 응용 및 활용방안

(가) 본 연구과제에서 개발한 물질 중에서 양계분야 질병유발모델에서 효능이 우수한 제품은 난황항체와 유용미생물(생균제)이 혼합된 난황항체제제(IgY)로서 이 제제는 양계 대표적인 질병 8종 항원에 대한 항체들을 가지고 있고 대부분 고병원성 야외주요 면역을 시켰기 때문에 현장에서 질병방어에도 우수한 효과를 예상하고 있다.

(나) 무항생제농장인 동물복지농장에서 현장평가를 통해서도 확인되었지만 사육기간 동안 농장에서 빈번하게 발생하는 장염, 대장균증을 방어하는데 뛰어난 효과가 있음을 확인하였다. 또한 외부개발물질들 중에서 규산염제제나 스테비아 EM제제 등도 사육 기간 동안 혼합하여 급여할 경우, 질병방어효과 및 생산성에도 기여할 것이다.

(다) 이렇듯 본 과제에서 내부개발물질과 외부개발물질에 대한 평가를 통해 각 질병별로 방어효과를 나타내는 물질(제제)들을 질병발생시점과 전 사육기간 투여하는 용법, 용량 등을 고려한 질병 맞춤형 적용 프로그램은 현장의 가금사육 농가들에게 질병 맞춤형 제품에 대한 유용한 정보를 제공해 줄 뿐만 아니라 생산성 증대와 질병 발생을 저감시킴으로서 경제적인 소득을 증가시켜줄 수 있을 것으로 판단된다.

(3) 기업화 추진방안

(가) 본 연구에서 가금질병 동물모델에서 질병방어 효과가 우수한 것으로 평가된 버섯추출물 등의 식물추출물의 경우 생체내 안전성이 보증되고 대량생산이 용이하기 때문에 동물용의약품 및 기능성 사료첨가제로의 개발이 용이하며, 특히 기존의 유효한 제제 성분들과의 시너지효과를 발휘 할 수 있는 복합제제로 다양한 형태의 산업화가 가능함

(나) 또한 난황항체제제(IgY)의 경우 특정 질병을 직접적으로 타겟팅 하여 백신기능과 유사한 예방효과를 기대 할 수 있기 때문에 산업화시 성공 가능성이 큼. 타겟하는 질병(항원)에 따라 맞춤형 항체제제를 생산하는 기술이 고도화 될 경우 기존 백신으로는 방어하기 어려웠던 질병 뿐 아니라 향후 신규로 발생 할 수 있는 질병에 대해서도 광범위하게 적용 가능할 것으로 기대할 수 있으므로 질병별 항체제제 생산 산업화, 고면역 항체 제조기술 산업화, 면역 증강제 등 복합제제 생산 산업화 등이 가능함

(다) 초유 및 난황 유래 PRRSV, PEDV, 살모넬라와 대장균 항원과 유산균의 복합제제가 시제품으로 개발되었고 PRRSV, PEDV, 살모넬라와 대장균 감염증에 대한 경감 효과가 증명되었다. 따라서 국내에서 발병하는 PRRSV, PEDV의 유전형을 고려하여 항원을 준비하고 보다 고도면역 초유 및 난황을 생산할 수 있는 기술개발만 더욱 발전이 된다면 양돈현장에서 특히 이유자돈에서 비육돈까지의 PRRSV, PEDV, 살모넬라 및 병원성 대장균에 의한 피해를 경감하는 최종 제품을 생산할 수 있을

것으로 생각되며 질병에 의한 양돈산업 피해를 경감시키는 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 과제에서 활용된 돼지를 이용한 물질의 효능 및 안전성 평가 방법은 향후 축산관련 물질의 평가 및 기업화에 유용하게 활용 될 것으로 기대가 된다.

3. 가축의 유해미생물 제어를 위한 항미생물 펩타이드 개발분야

가. 추가연구의 필요성

- (1) 본 연구과제의 수행을 통하여 도출된 성과들 중 가장 괄목할 만한 성과는 대장균을 이용한 항미생물 펩타이드 대량 시스템의 개발이며 이와 관련된 논문이 네이처 자매지인 사이언티픽 리포트에 게재, 이와 관련된 홍보 성과를 거두었다.
- (2) 향후 이 고용량 펩타이드 생산 기술을 이용하여 새로이 발굴된 항미생물 펩타이드들에 대한 단백질 구조 분석, 항균 작용 분석, 세포 독성 실험 등 다양한 생물학적으로 의미 있는 자료들을 도출 가능할 것으로 예상된다.
- (3) 생산된 펩타이드를 타 협동에 제공함으로써 앵타머 발굴과 같은 분석 기술 개발에 일조하여 항미생물 펩타이드 분석 기술의 정밀도 향상 및 정제 기술 발전에 기여할 수 있을 것이다. 또한 구축한 병원성 미생물 패널을 이용하여 항미생물 펩타이드들이 항생제 대체제 혹은 병원성 미생물 제어 신소재로서의 가능성을 검정할 수 있을 것이다.

나. 타 연구의 응용 및 활용방안

- (1) 확보된 항미생물 펩타이드 대량 생산 기법을 통한 산업화 가능성 모색
- (2) 확보된 항미생물 펩타이드 분석 및 검증 기술을 활용한 후속 연구에의 활용
- (3) 생산된 항미생물 펩타이드를 이용한 항생제 대체 물질로서의 효능 및 안정성 검정이 필요하므로 이에 대한 연구 수행 필요
- (4) 본 연구의 결과는 양돈 및 양계 산업에서 병원성 미생물의 감염으로 인한 생산성 감소를 극복하여 생산성 향상을 통해 산업 경쟁력 향상을 위해 활용이 가능
- (5) 확보된 transgenic mouse와 항미생물펩타이드를 활용한 모델동물 활용 및 동물산업에 대한 활용법의 지속적 연구 추진 필요

다. 기업화 추진방안

- (1) 산업적 연구 성과 면에서는 국제특허 (PCT)를 포함한 총 4건이 출원, 등록되었으며, 비록 펩타이드 생산 단가의 한계로 백신 스트레스 완화용 투여제의 보조 첨가제로써의 상품화까지 도달하지 못하였으나 인간을 대상으로한 의약품으로써 개발 가능성이 매우 크기 때문에 이들 특허 및 본 연구를 통하여 구축한 대량 생산 시스템을 활용한 산업화 시도가 지속적으로 이루어질 예정이다.

4. 차세대 앵타머 기반 치료제 개발 분야

가. 추가연구의 필요성

- (1) 항균펩타이드 PMAP36, PR26, PG1에 대하여 특이적으로 결합하는 앵타머를 SELEX 기법으로 스크리닝하여 친화력을 갖는 앵타머 후보군 각각 물질에 대하여 30종을 확보함.
- (2) 그러나 확보한 앵타머 후보군에서 각각의 항균펩타이드에 친화력과 특이성이 가장 높은 최적 앵타머를 선별하지 못함. 따라서 후보군 30종에서 소량으로 최적 앵타머를

구분하기 위한 추가 연구가 필요하다고 생각됨.

나. 타 연구의 응용 및 활용방안

- (1) 가축 전염성 질환을 유발하는 병원성 미생물 및 병원성 인자에 결합할 수 있는 핵산으로 이뤄진 앵타머 소재의 개발은 단백질로 이뤄진 항체보다 온도나 pH에 안정적이기 때문에 현장 적용이 쉬울 뿐 아니라 앵타머 말단에 구조 변화가 쉬워 고정화하거나 gel내에 가두기 쉬워 가축 치료제로서 경구 삼입용은 물론 체내 고정하는 등 다양한 방법으로 활용이 가능할 것으로 기대됨.
- (2) 특히 체내에서 분해가 쉬워 가축 치료제로서 적용 후 동물 체내에서의 거부반응이나 오염 문제가 적은 장점이 있어 항체를 대체할 수 있는 유용한 소재로서 이용될 것으로 사료됨.
- (3) 항균 펩타이드에 특이적인 앵타머 개발은 항균펩타이드의 항균력 증진에 기여할 수 있을 것이며 물질 고정화 및 회수에 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

다. 기업화 추진방안

- (1) 본 연구를 통해 개발된 리스테리아 prfA 단백질 특이적으로 결합하는 앵타머 소재 LMPA7, LMPA9, LMPA12는 특허 등록 소재로서 대량생산이 가능하여 기술이전을 통해 사업화 할 수 있을 것으로 기대됨. 또한 본 연구를 통해 특허 출원한 APTA-blotting 기술은 Western blotting 기법을 대체할 수 있는 기술로서 가축질병 표적물질 뿐만 아니라 항체가 기반이 아닌 화학적 물질을 검출할 수 기술로서도 적용 가능할 것으로 사료되어 지속적으로 기술이전에 노력을 기울일 예정임.

5. 연구성과 종합 활용방안

가. 본 연구과제에서 개발된 신소재들에 관련된 특허 기술 및 물질은 참여기업에 기술이전하여 제품화될 수 있도록 조치하였음.

나. 또한 본 과제 개발 기술과 물질에 대한 핵심 정보는 특허 출원 및 등록으로 공개하였으며, 신소재를 활용하여 상용화하고자하는 기업체가 있을 경우 추가적으로 적극 기술이전 및 노하우 전수를 추진하여 상용화를 추진할 계획임.

제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Gateway cloning system

Gateway cloning system은 특정 유전자의 삽입, 유전체 수준에서 일어나는 교차, 박테리아 DNA가 유전체로 삽입되는 기작 등에서 발생하는 homologous recombination 기작과 이를 매개하는 recombinase에서 착안을 얻은 기술임 (Craig, Nancy. L. et al. 1984).

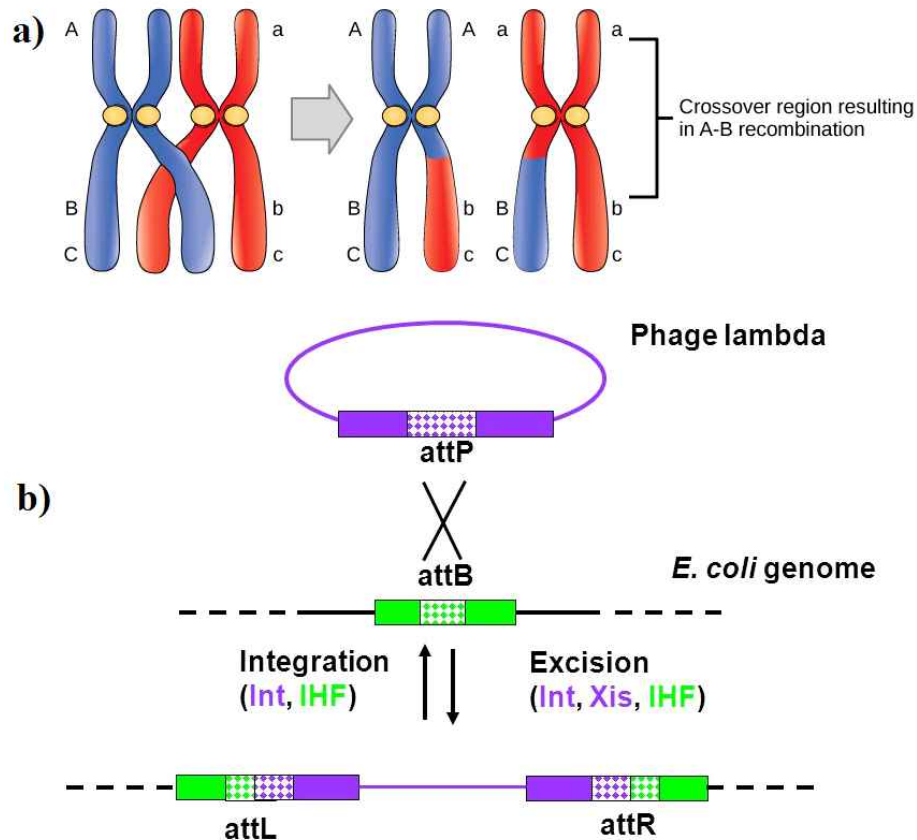


그림 6-1. Homologous recombination의 예

Homologous recombination은 att site라는 특정 유전자에 recombinase가 binding 하게 되고 target DNA를 원하는 영역에 삽입 함. (Dorman, CHARLES J. et al. 1987). 이러한 기작을 이용하여 개발된 cloning system은 현재 Invitrogen사에서 판매되고 있는 Gateway cloning system이 있음. Gateway cloning system의 첫 번째로 BP reaction이 있는데 BP reaction은 증폭하고자 하는 DNA의 양 말단에 att site를 붙여서 amplicon을 만들고 이를 이용하여 pDONR 벡터와 BP clonase를 이용하여 entry clone을 만드는 과정임. Amplicon의 att site와 pDONR 벡터의 att site가 binding 하게 되고 BP clonase에 의해 target DNA가 pDONR 벡터 내로 삽입되어 entry clone을 만들게 되고 pDONR 벡터 내에 있는 ccdB gene은 by product가 됨.

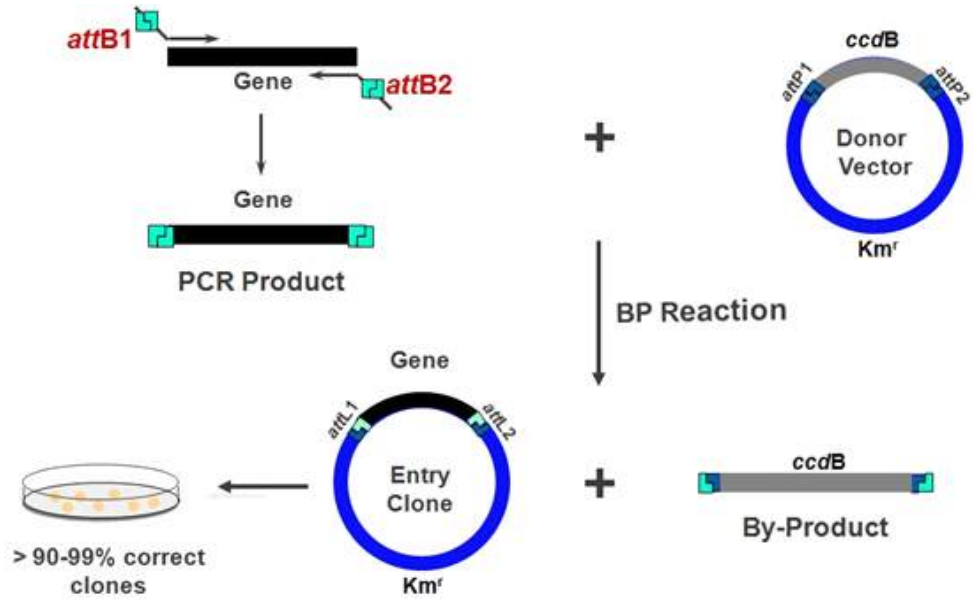


그림 6-2. Gateway cloning의 BP reaction

다음으로 LR reaction이 있는데 BP reaction에서 만들어진 entry clone과 pDEST 벡터의 att site가 binding 한 다음 LR clonase를 이용하여 expression clone을 만드는 과정임. LR reaction 과정 중 target DNA는 LR clonase에 의해 pDEST 벡터로 삽입되며 by product가 만들어지게 됨.

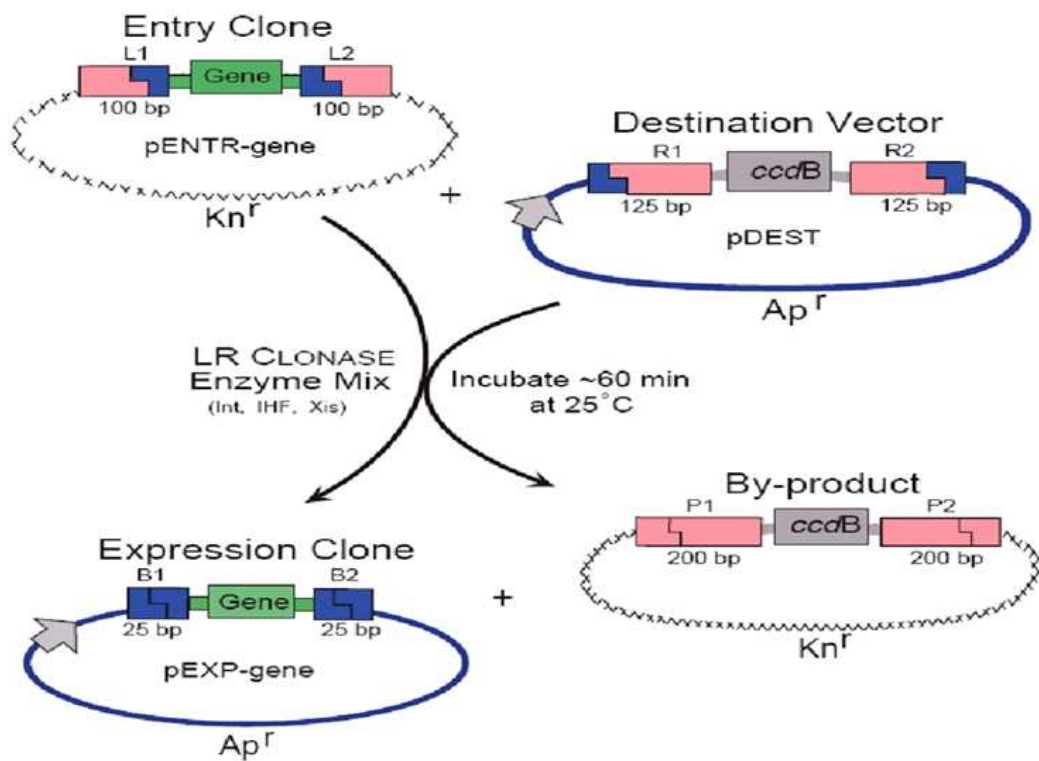


그림 6-3. Gateway cloning의 LR reaction

Gateway cloning system의 장점은 하나의 entry clone만 있으면 목적에 따라 원하는 pDEST 벡터로 cloning이 쉽게 가능하다는 점이며 이러한 이유로 auto-cloning system이라고 불림. 또한 삽입하고자 하는 DNA가 여러개일 경우 하나의 vector에 삽입할 때 한 번의 reaction으로 가능하다는 점 역시 장점으로 꼽힘. 실 예로 4개의 target DNA을 이용하여 각각 entry clone을 만들고 이를 pDEST 벡터에 한번에 삽입하는 기술에 대한 논문이 존재하는 것을 확인 (Sasaki, 2004).

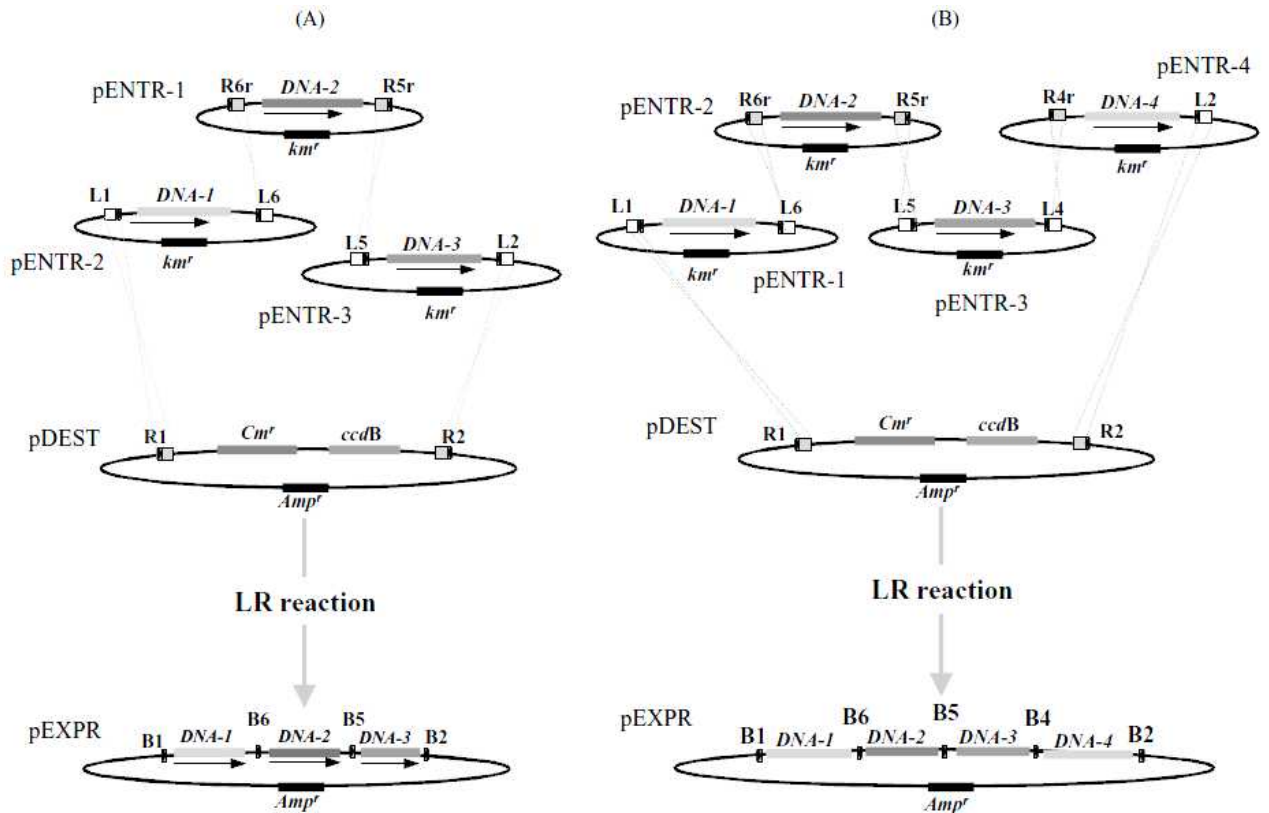


그림 6-4. Gateway cloning system을 이용한 multiple cloning system

2. Fluorescent protein tag

Fluorescent protein tag는 생체 내에서 일어나는 반응에 대해 확인을 하는 방법 중 간편하면서도 대표적인 방법으로 알려져 있음. Mammalian cell, plant, yeast, insect 및 bacteria에 이르기까지 다양한 생물체에 적용이 가능하며 생체 내에서 일어나는 특정 물질의 활성을 탐색할 때 fluorescent protein tag가 부착된 antibody를 이용하여 항원-항체 반응을 통해 활성을 확인함. 단백질 발현의 경우 특정 단백질을 암호화하는 유전자 서열 말단에 fluorescent protein tag를 암호화 하는 유전자 서열을 붙여서 같이 발현함. 정상적인 발현이 일어나게 되면 fluorescent protein tag 역시 정상적으로 발현이 되어 특정 단백질의 발현 유무 및 발현 양 등을 신속히 확인할 수 있음. 대표적인 fluorescent protein tag의 종류로는 ECFP, EGFP, EYFP, MsRed 등이 있음.

미생물의 경우 미생물 내에서 발현된 단백질의 확인에 fluorescent protein tag가 사용될 수 있지만 미생물 존재 유무를 확인할 경우 fluorescent protein tag가 사용 가능함. GRAS 균주로 알려져 있는 *Lactobacillus plantarum*을 처리하였을 때 장내 서식 및 유

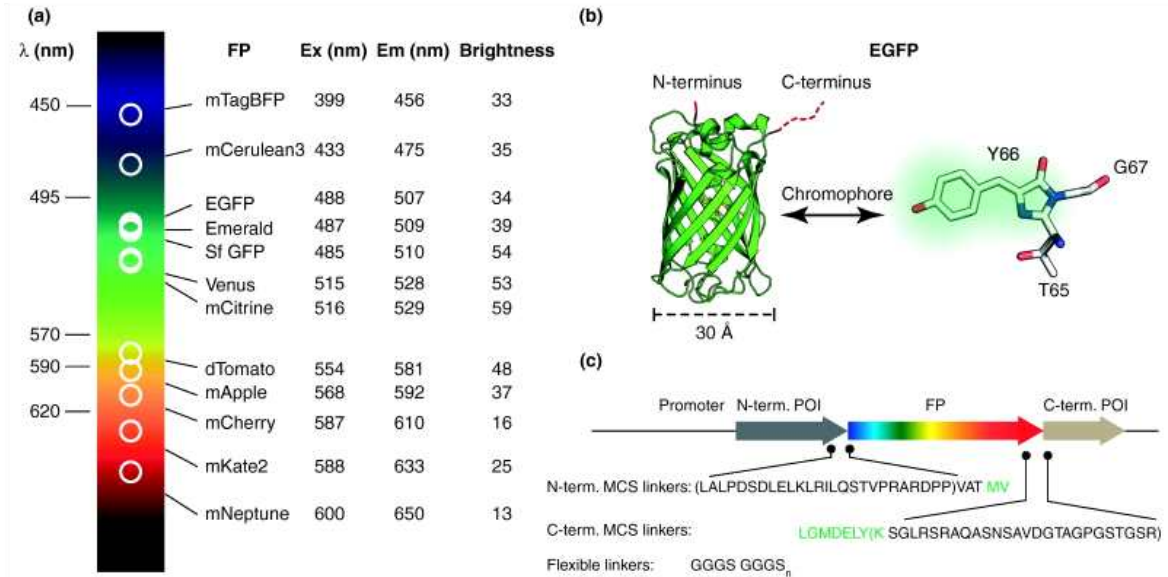


그림 6-5. Fluorescent protein tag의 파장대 및 사용 예시

een fluorescent protein을 암호화하는 유전자가 삽입된 벡터를 형질전환하고 형질 전환된 *L. plantarum* 균주를 처리하여 연구에 활용한 사례가 있음 (Geoffroy, 2000). 그 결과 장 내에 형질전환된 *L. plantarum* 균주가 서식하고 유지되는 것을 확인할 수 있었음.

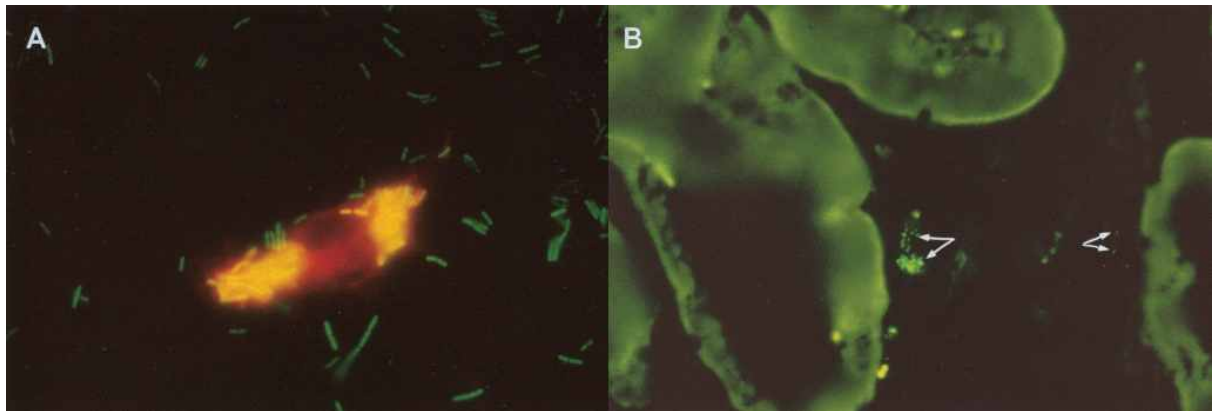


그림 6-6. GFP를 이용한 *L. plantarum* 재조합 균주의 장내 서식 유무 확인

3. Next generation sequencing (NGS)

생명공학을 하기 위해 DNA를 분석하는 일은 매우 중요함. 예전부터 생명공학 분야에서는 sanger sequencing이라는 기술로 DNA를 분석하고 이 정보를 이용하여 생명공학 분야 내 실험에 적용하였음. 기초 연구에서 응용 연구로 갈수록 생명공학 분야에서는 더 많은 유전 정보를 원함에 따라 NGS기술이 발전하게 됨. 차세대 염기서열 분석 (NGS) 은 이러한 시대적 배경에 의해 sanger sequencing 이후 개발되었으며 NGS의 platform으로는 Illumina, Ion Torrent, 454 FLX가 존재하며 최근 3세대 NGS 기술인 Pacbio RSII single molecule realtime (SMRT) sequencing이 개발되었다. 이들의 공통

적인 원리는 유전체를 특정 길이로 자른 fragment들을 증폭하고 해당 platform의 machine 내에서 염기서열을 분석함 (Reis-Filho et al. 2009). 분석의 원리는 상보되는 염기서열이 신장될 때 형광물질이 발광하거나 pH 변화를 이용하여 염기서열을 확인함.



그림 6-7. 다양한 NGS 기술의 platform

본 연구에서 사용된 Pacbio RSII SMRT sequencing 기술은 2세대 NGS platform에서 만들어지는 library 길이에 비해 훨씬 긴 것으로 알려져 있으며 그 길이가 최대 20 kb까지인 것으로 확인 됨. 또한 이 기술에 사용되는 polymerase는 $\phi 29$ DNA polymerase이며 높은 processivity와 proofreading 기능을 가지고 있음. 이 polymerase는 10 kb 이상의 긴 DNA fragment를 증폭하는데 용이하며 PCR보다 더 많은 DNA를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있음. Sequencing은 chip 내에 zero-mode waveguide (ZMW)라는 많은 well이 존재 하며 각 well 안에 DNA fragment, polymerase 및 dNTP를 비롯한 chemistry가 들어가게 되어 증폭이 일어나는 것으로 알려져 있음. Well 내에서 DNA가 증폭될 때 dNTP에 표지된 형광물질이 반응하여 빛을 내는 것을 detector가 탐지하여 색상으로 염기서열을 확인할 수 있음. 이 기술의 장점으로서는 다른 2세대 NGS platform에 비해 정확도가 더 높으며 2세대 NGS에서 확인할 수 없는 DNA modification을 확인할 수 있음 (Flusberg, Benjamin A et al.2010).

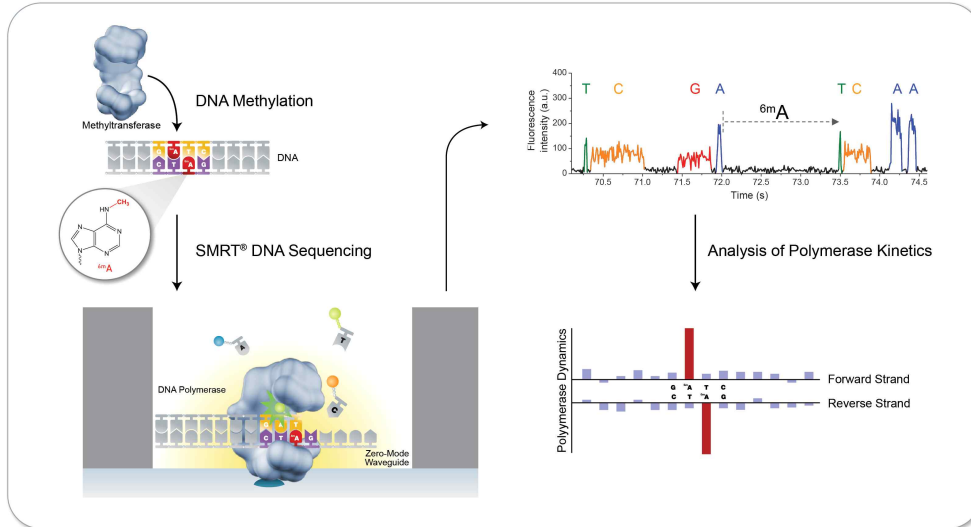


그림 6-8. SMRT sequencing의 원리

NGS에 의해 생성된 sequencing data를 다양한 처리과정을 통해 원하는 유전 정보를 획득할 수 있음. Sequencing에 사용된 시료에 따라 미생물 전장 유전체 염기서열 분석 및 유전 정보 확인, 특정 환경 내 미생물 군집 및 다양성 확인 등 목적하는 결과를 얻을 수 있음. 따라서 2세대 NGS는 미생물 전장 유전체 분석, 특정 미생물이 가지는 독성 유전자의 확인, 미생물에 의한 동·식물 질병의 진단 등 다양한 분야에 걸쳐 사용되고 있음.

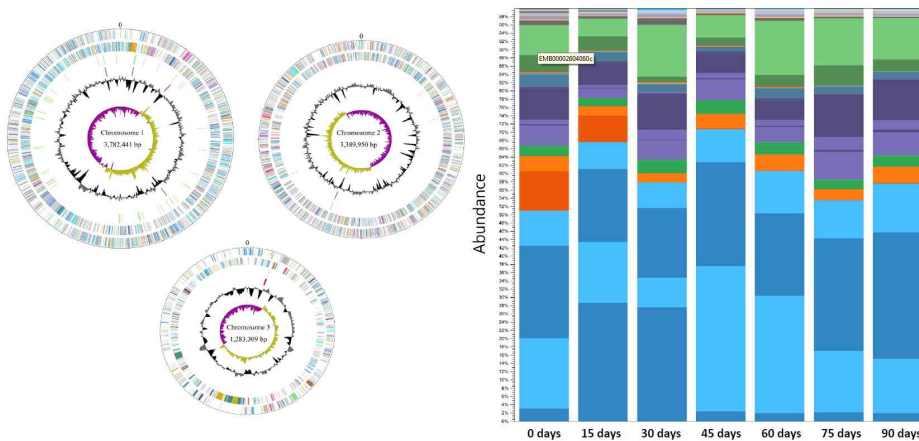


그림 6-9. NGS 기법을 이용한 유전정보의 예시

4. Pathogenic gene island in microbial genome

NGS 시대가 도입되고 비용이 점차 줄어들면서 NGS의 사용 빈도 및 그 중요성은 더욱 커지고 있음. 최근 병원성 미생물을 판단하는 기준은 유전적 수준에서 독성 유전자 탐색이 이에 해당하는데 전장 유전체 내 독성 유전자의 판단을 실시함으로써 해당 미생물이 병원성인지 아닌지를 판단하고 있음. 또한 질병 유발 유전자를 지니지 않는 미생물 역시 다양한 방법을 통해 독성 유전자를 가지게 되고 그 대표적인 예는 horizontal

gene transfer가 있음. Horizontal gene transfer는 환경 내에서 미생물에 의한 유전자 획득으로 미생물이 가지는 pili에 의해 특정 유전자를 가지지 않은 미생물에게로 유전자를 전달하는 것을 의미하며 horizontal gene transfer에 의해 가지게 되는 유전자는 항생제 내성 유전자, 독성 유전자 등이 있음. 최근 NGS를 통해 얻어진 유전정보를 이용하여 미생물 내 독성 유전자 존재 유무를 판단하는 database가 구축 되고 있는 중이며 여러 tool들이 개발되고 있는 중임. ClanTox는 미생물 유전체 중 독성 유전자의 유무를 확인 해 주는 인터넷 기반 tool이며 접근 및 운용 방식이 편리하여 많은 곳에서 활용되고 있음 (Naamati et al. 2009). 독성 유전자 유무 분석을 원하는 미생물의 전장 유전체를 이 tool에 업로드 하면 toxin like gene, possibly toxin like gene, probably toxin like gene 및 probably not toxin like gene 등 과 같이 분석을 할 수 있으며 어떠한 toxin을 암호화 하고 있는지 확인할 수 있어 특정 미생물의 독성 유전자 유무 탐색과 더불어 어떠한 독성을 가지고 있는지 확인 가능함.

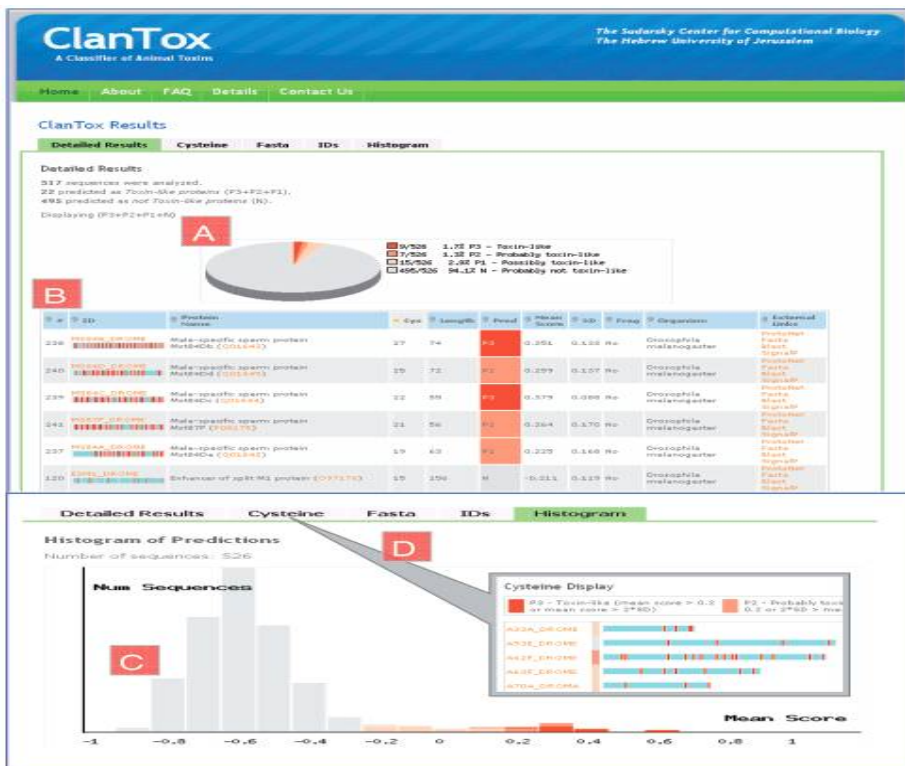


그림 6-10. ClanTox를 이용한 미생물 유전체 내 독성 유전자 유무 탐색

제7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당 없음	

제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

- 해당없음

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>1. 연구실 안전조치 이행계획</p> <p>가. 기술적 위험요소 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 일상적인 동물 검체 분석업무이므로 특별한 위험요소는 없으며, 일상적인 실험실 안전조치로 위험요소 관리 가능함 <p>나. 안전관리대책</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구사업 수행시 필요한 연구실 안전 확보를 위해 다음과 같은 안전점검 계획을 수립 <p>1) 일상점검</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구개발 활동에 사용되는 기계·기구·전기·가스 등의 실험기자재와약품·병원체 등 실험재료의 이상 유무와 보호장비의 관리실태 등을 점검하고 그 결과를 기록·유지하도록 함 - 일상점검을 실시하는 자는 사고 및 위험 가능성이 있는 사항을 발견할 경우 즉시 당해 연구책임자에게 보고하고 안전에 관한 지시를 받아 필요한 조치를 취하도록 함 <p>2) 특별안전점검</p> <ul style="list-style-type: none"> - 폭발, 화재 등 연구활동 종사자에게 치명적인 위험을 야기할 사고발생 가능성이 있을 것으로 예상되는 장비, 시설의 사용을 위해 정기적으로 월 1회, 특별 안전점검을 실시 <p>3) 특별교육훈련 및 건강검진 참여</p> <ul style="list-style-type: none"> - 매년 정기적으로 연구관련 안전교육 훈련 및 전문가 교육과정에 해당 연구원의 참여를 독려하여 교육하도록 함 - 매년 정기적으로 전염병 위해관리 건강검진 및 예방접종에 참여함 <p>4) 농림수산검역검사본부 실험실안전관리지침 (농림수산검역검사본부 훈령 제57호, 2012.3.26) 에 의거하여 연구개발 사업 수행 시 필요한 연구실 안전관리를 실시하고 있음</p> <p>2.. LMO 연구시설 및 수입신고 현황</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 해당사항 없음 		

제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

1. 지식재산권 출원 및 등록 성과

- 본 연구과제를 통하여 개발된 신소재 등에 대하여 총 27건의 특허를 출원(19건) 및 등록(8건)하여 당초 목표(출원 12건, 등록 8건)를 초과 달성하였으며, 이중 대표성과 5건은 아래와 같음.

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허 출원	가축 면역 증강제로 사용 가능한 락토바실러스 에시도필러스 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) KNU-02와 이를 이용한 경구용 동결건조분말 제조	경북대 학교 산학협 력단	발명 자	대한민국	-		중복사사	2016-0047 -KR
2	특허 출원	DNA 앵타머를 활용한 새로운 단백질 탐지 시스템 및 이의 용도	충북대 학교 산학협 력단	발명 자	대한민국	-	2015.11.13	중복사사	특허출원
3	특허 등록	항균 활성 및 항암 활성이 강화된 리소좀의 제조방법	전북 대학교	발명 자	대한민국	-	2014.07.15	단독사사	10-142153 4
4	특허 등록	장수진흙버섯 자실체로부터 분리된 폴리페놀 성분을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 치료용 조성물	전북 대학교	발명 자	대한민국	-	2014.02.21	중복사사	10-2014-0 020793
5	특허 등록	항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용	건국대 학교	발명 자	대한민국	-	2012.06.26	단독사사	10-116183 0~3(3건)

2. 학술논문 성과

- 본 연구과제를 통하여 총 46편의 논문을 게재 완료하여 당초 성과목표(44편)을 초과달성하였음.
- 최종 보고서에 성과로 제시한 논문 총 46편 중 44편 (95%)은 본 과제에서 제어 대상

으로 하는 가축질병, 대상 신소재 및 신소재의 효능 평가 등에 대한 내용으로 연구 내용과 직접적인 연관성이 있으며, 2편은 간접적인 연관성이 있어 연구내용의 논문 게재 활용 성과가 우수한 것으로 판단됨.

○ 이중 대표성과 4편은 아래와 같음.

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody against recombinant S1 domain of the PED virus spike protein in piglet	경북대학교	교신 저자	Archives of Virology	2.390	2015.09.01	단독사사	SCI
2	논문	Neuraminidase inhibitory activities of polyphenols derived from the mushroom <i>Phellinus baumii</i>	전북대학교	교신 저자	Bioorg. Med. Chem. Lett.	2.420	2015.07.05	중복사사	SCI
3	논문	Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β -defensin genes	건국대학교	교신 저자	BioMed Central genetics	2.8	2012.11.15	중복사사	SCIE
4	논문	Green fluorescent protein as a scaffold for high efficiency production of functional bacteriotoxic proteins in <i>Escherichia coli</i>	건국대학교	교신 저자	Scientific Report	5.6	2016.02.11	중복사사	SCIE

3. 산업화 성과

○ 본과제에서 개발된 신소재를 활용하여 19종의 면역복합체제를 동물용의약품으로 인허가를 획득하여 제품화하였으며, 당초 목표(18종)를 초과달성하였으며, 해당 19종 제품의 품목허가증은 다음과 같음.

[별지 제8호 서식]

제 010-A0032 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 아이지 켈프산(송아지용)
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0032
최 초 신 고 연 월 일 : 2015년 08월 05일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2015년 08월 05일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0033 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 다이스톱 피그 1(이유자돈용) 산
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0033
최 초 신 고 연 월 일 : 2015년 08월 05일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2015년 08월 05일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0034 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 다이스톱 피그 2(육성돈용) 산
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0034
최 초 신 고 연 월 일 : 2015년 08월 05일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2015년 08월 05일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0035 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 다이스톱 피그 3(비육돈용) 산
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0035
최 초 신 고 연 월 일 : 2015년 08월 05일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2015년 08월 05일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0036 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 다이스름 풀슈리 1(산란계용) 산
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0036
최 초 신 고 연 월 일 : 2015년 08월 05일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2015 년 08 월 05 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0037 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 다이스름 풀슈리 2(육계용) 산
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0037
최 초 신 고 연 월 일 : 2015년 08월 05일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2015 년 08 월 05 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0041 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 아이지 캠프 F산(송아지용)
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0041
최 초 신 고 연 월 일 : 2016년 08월 08일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)

[별지 제8호 서식]

제 010-A0042 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에니팜
업 종 : 제조업
제 품 명 : 아이지신 캠프산(송아지용)
구 분 : 동물용의약품
허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
신 고 번 호 : 010-A0042
최 초 신 고 연 월 일 : 2016년 08월 08일
부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0043 호


동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 아이지신 피그 1(이유자돈용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0043
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0044 호


동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 다이스름 피그 F(이유자돈용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0044
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0045 호


동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 아이지신 피그 2(육성돈용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0045
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0046 호


동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 다이스름 피그 F2(육성돈용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0046
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/m²)


[별지 제8호 서식]


제 010-A0046 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양애니팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 다이스름 피그 F2(육상돈용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0046
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.

 2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]


제 010-A0048 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양애니팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 다이스름 피그 F3(비육돈용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0048
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.

 2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]


제 010-A0049 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양애니팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 아이지신 풀슈리 1(산란계용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0049
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.

 2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]


제 010-A0050 호

동물용의약품 등 제조 품목 신고증
 수입

업 체 명 : (주)삼양애니팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 다이스름 풀슈리 F(산란계용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0050
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.

 2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국 동물 약 품 협 회 장 

210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0051 호

동물용의약품 등 **제조** **품목 신고증**
 수입


업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 아이지신 플슈리 2(육계용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0051
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0052 호

동물용의약품 등 **제조** **품목 신고증**
 수입


업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 다이스름 플슈리 F2(육계용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0052
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)


[별지 제8호 서식]

제 010-A0053 호

동물용의약품 등 **제조** **품목 신고증**
 수입


업 체 명 : (주)삼양에너팜
 업 종 : 제조업
 제 품 명 : 아이지 스타트(입추병아리용)산
 구 분 : 동물용의약품
 허 가 조 건 : 동물용의약품 제조업
 신 고 번 호 : 010-A0053
 최초 신고 연월일 : 2016년 08월 08일
 부 표 : 별첨

「동물용 의약품등 취급규칙」 제 11조 및 제 16조제4항에 따라 위와 같이 신고 수리 합니다.



2016 년 08 월 08 일

사단법인 한국동물약품협회장



210mm x 297mm (보존용지(1종) 180g/㎡)

제 11장. 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당 없음	

제 12장 . 참고문헌

- Zorko, M., Japelj, B., Hafner-Bratkovič, I., and Jerala, R. "Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788.2 (2009): 314-323.
- Achmüller, C., Kaar, W., Ahrer, K., Wechner, P., Hahn, R., Werther, F., ... and Bayer, K. "Npro fusion technology to produce proteins with authentic N termini in *E. coli*." *Nature methods*, 4.12 (2007): 1037-1043.
- Alberti, Simon, Aaron D. Gitler, and Susan Lindquist. "A suite of Gateway® cloning vectors for high throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 24.10 (2007): 913-919.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. and Piddock, L. J. "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." *Nat. Rev. Microbiol.*, 13 (2015): 42 - 51.
- Bray, B. L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2 (2003): 587 - 593.
- Cai, Huawei, et al. "High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*." *Applied microbiology and biotechnology* 82.1 (2009): 41-48.
- Chen CY, Nace GW, Irwin PL. 2003. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*. 55(2):475-479.
- Craig, Nancy L., and Howard A. Nash. "*E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA." *Cell* 39.3 (1984): 707-716.
- Craik, David J. "Discovery and applications of the plant cyclotides." *Toxicon* 56.7 (2010): 1092-1102.
- Deboosere N, Horm SV, Pinon A, Gachet J, Coldefy C, Buchy P, Vialette M. 2011. Development and validation of a concentration method for the detection of influenza A viruses from large volumes of surface water. *Appl Environ Microbiol*. 77(11):3802-3808.
- Dorman, CHARLES J., and CHRISTOPHER F. Higgins. "Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases." *Journal of bacteriology* 169.8 (1987): 3840-3843.
- ENGLAND, NEW. "IMPACT™-TWIN."
- Fernandez, Ana I., et al. "Flexible tools for gene expression and silencing in tomato." *Plant Physiology* 151.4 (2009): 1729-1740.
- Flusberg, Benjamin A et al. (2010) Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods*.
- Geoffroy, Marie-Claude, et al. "Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors." *Applied and environment*

- al microbiology 66.1 (2000): 383-391.APA
- Gould, A., Li, Y., Majumder, S., Garcia, A. E., Carlsson, P., Shekhtman, A., and Camarero, J. A. "Recombinant production of rhesus Θ -defensin-1 (RTD-1) using a bacterial expression system". *Molecular BioSystems*, 8.4 (2012): 1359-1365.
 - Hara, S. and Yamakawa, M. "Production in *Escherichia coli* of moricin, a novel type antibacterial peptide from the Silkworm, *Bombyx mori*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220 (1996): 664 - 669.
 - Jihee Yoon, Jea-Min Park, Ki-Ju Kim, Yang-Hoon Kim and Jiho Min. 2009. Antimicrobial activity of the cell organelles, lysosomes isolated from egg white. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11:1364-1368
 - Jihee Yoon, Jea-Min Park, Seung-Ki Jung, Keun-Young Kim, Yang-Hoon Kim and Jiho Min. 2009. Characterization of antimicrobial activity of the lysosomes isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 59:48-52
 - Jihee Yoon, Ki-Ju Kim, Young-Woo Choi, Hwa Sung Shin, Yang-Hoon Kim and Jiho Min. 2010. The dependence of enhanced lysosomal activity on the cellular aging of bovine aortic endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 340:175-178.
 - Jihee Yoon, Seung Hyuck Bang, Yang-Hoon Kim and Jiho Min. 2011. "Increased In Vitro Lysosomal Function in Oxidative Stress-induced Cell Lines." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168:1002-1011
 - Jihee Yoon, Suk-Tai Chang, Yong-Woo Choi, Yang-Hoon Kim and Jiho Min. 2010. Functional characterization of starvation-induced lysosomal activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88(1):283-289
 - Kahlenberg, J. Michelle, and Mariana J. Kaplan. "Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease." *The Journal of Immunology* 191.10 (2013): 4895-4901.
 - Keyburn AL, Yan XX, Bannam TL, Van Immerseel F, Rood JI, Moore RJ. 2010. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res.* 41(2):21.
 - Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B. and Zlotnik, T. "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." *Nature*, 449.7162 (2007): 564-569.
 - Lee, J. H., Kim, J. H., Hwang, S. W., Lee, W. J., Yoon, H. K., Lee, H. S., and Hong, S. S. "High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies." *Biochemical and biophysical research communications*, 277.3 (2000): 575-580.
 - Li, Dong, et al. "Expression and analysis of the recombinant human interleukin-21 (rhIL-21) in *Pichia pastoris*." *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology* 25.11 (2009): 1711-1717.
 - Lima ET, Andreatti Filho RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Can J Vet Res.* 71(2):103-107.

- Naamati, Guy, Manor Askenazi, and Michal Linial. "ClanTox: a classifier of short animal toxins." *Nucleic acids research* 37.suppl 2 (2009): W363–W368.
- Nakagawa, Tsuyoshi, et al. "Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation." *Journal of bioscience and bioengineering* 104.1 (2007): 34–41.
- Oren, Ziv, and Yechiel Shai. "Mode of action of linear amphipathic α helical antimicrobial peptides." *Peptide Science* 47.6 (1998): 451–463.
- Park, C. B., Kim, H. S. and Kim, S. C. "Mechanism of action of the antimicrobial peptide Buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1998): 253 - 257.
- Park, T.-J., Kim, J.-S., Choi, S.-S. and Kim, Y. "Cloning, expression, isotope labeling, purification, and characterization of bovine antimicrobial peptide, lactophorin in *Escherichia coli*." *Protein Expres. Purif.* 65 (2009): 23 - 29.
- Piers, K. L., Brown, M. H. and Hancock, R. E. W. "Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria." *Gene.* 134 (1993): 7 - 13.
- Piers, Kevin L., Melissa H. Brown, and Robert EW Hancock. "Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria." *Gene* 134.1 (1993): 7–13.
- Reinaldo Ramos, João Pedro Silva, Ana Cristina Rodrigues, Raquel Costa, Luísa Guardão, Fernando Schmitt, Raquel Soares, Manuel Vilanova, Lucília Domingues, and Miguel Gam. "Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37." *Peptide* 32.7 (2011): 1469 - 1476.
- Reis-Filho, Jorge S. "Next-generation sequencing." *Breast Cancer Research* 11.3 (2009): 1.
- Sasaki, Yukari, et al. "Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system." *Journal of biotechnology* 107.3 (2004): 233–243.
- Schebelle, Laura, et al. "Efficient conditional and promoter-specific in vivo expression of cDNAs of choice by taking advantage of recombinase-mediated cassette exchange using FLEX gene traps." *Nucleic acids research* 38.9 (2010): e106–e106.
- Seung Hyuck Bang, Am Jang, Jihee Yoon, Pil Kim, Jong Soo Kim, Yang-Hoon Kim and Jiho Min. 2011. Evaluation of whole lysosomal enzymes directly immobilized on Titanium (IV) oxide used in the development antimicrobial agents. *Enzyme. Microb. Technol.* 49:260–265
- Shi, J., Ross, C. R., Chengappa, M. M., Sylte, M. J., McVey, D. S., and Blecha, F. "Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide." *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40.1 (1996): 115–121.
- Shojadoost B, Vince AR, Prescott JF. 2012. The successful experimental induction of

- necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Vet Res.* 26(43):74.
- Soundrarajan, N., Sokalingam, S., Raghunathan, G., Budisa, N., Paik, H. J., Yoo, T. H., and Lee, S. G. "Conjugation of proteins by installing BIO-orthogonally reactive groups at their N-termini." *PloS one*, 7.10 (2012) e46741.
 - Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii. C. A., Kung, A. H. C., Ho, J. F., Cheng, F. C., Loury, D. J. and Fiddes, J. C. "Protegrin-1: a broadspectrum, rapidly microbicidal peptide with In Vivo activity." *Antimicrob. Agents. Ch.* 8 (1997): 1738 - 1742.
 - Teixeira, V., Feio, M. J. and Bastos, M. "Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes." *Prog. Lipid Res*, 51 (2012): 149 - 177.
 - Thorpe, Helena M., and Margaret CM Smith. "In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.10 (1998): 5505-5510.
 - Vidovic, V., Prongidi Fix, L., Bechinger, B., and Werten, S. "Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high yield insoluble expression and fast purification." *Journal of Peptide Science*, 15.4. (2009): 278-284.
 - Wang, Guangshun, Xia Li, and Zhe Wang. "APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education." *Nucleic acids research* 44.D1 (2016): D1087-D1093.
 - Xia, L., Zhang, F., Liu, Z., Ma, J. I. and Yang, J. "Expression and characterization of cecropinXJ, a bioactive antimicrobial peptide from *Bombyx mori* (Bombycidae, Lepidoptera) in *Escherichia coli*". *Exp. Ther. Med.* 5 (2013): 1745 - 1751.
 - Xie, Y. G., Luan, C., Zhang, H. W., Han, F. F., Feng, J., Choi, Y. J., ... and Wang, Y. Z. "Effects of Thioredoxin: SUMO and Intein on soluble fusion expression of an antimicrobial peptide OG2 in *Escherichia coli*". *Protein. Pept. Lett.* 20 (2013): 54 - 60.
 - Yeaman, Michael R., and Nannette Y. Yount. "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." *Pharmacological reviews* 55.1 (2003): 27-55.
 - Zanetti, M., Storici, P., Tossi, A., Scocchi, M. and Gennaro, R. "Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells." *J. Biol. Chem.* 269 (1994): 7855 - 7858.
 - Zhang L, Cheng YX, Liu AL, Wang HD, Wang YL, Du GH. 2010. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-influenza properties of components from *Chaenomeles speciosa*. *Molecules*. 15(11):8507-8517.
 - Zheng, M. J., et al. "Secreted expression of signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* in *Pichia pastoris* system with primary evaluation on its antigenicity." *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases* 25.1 (2007): 12-16.
 - Zu M, Yang F, Zhou W, Liu A, Du G, Zheng L. 2012. In vitro anti-influenza virus and anti-inflammatory activities of theaflavin derivatives. *Antiviral Res.* 94(3):217-224.