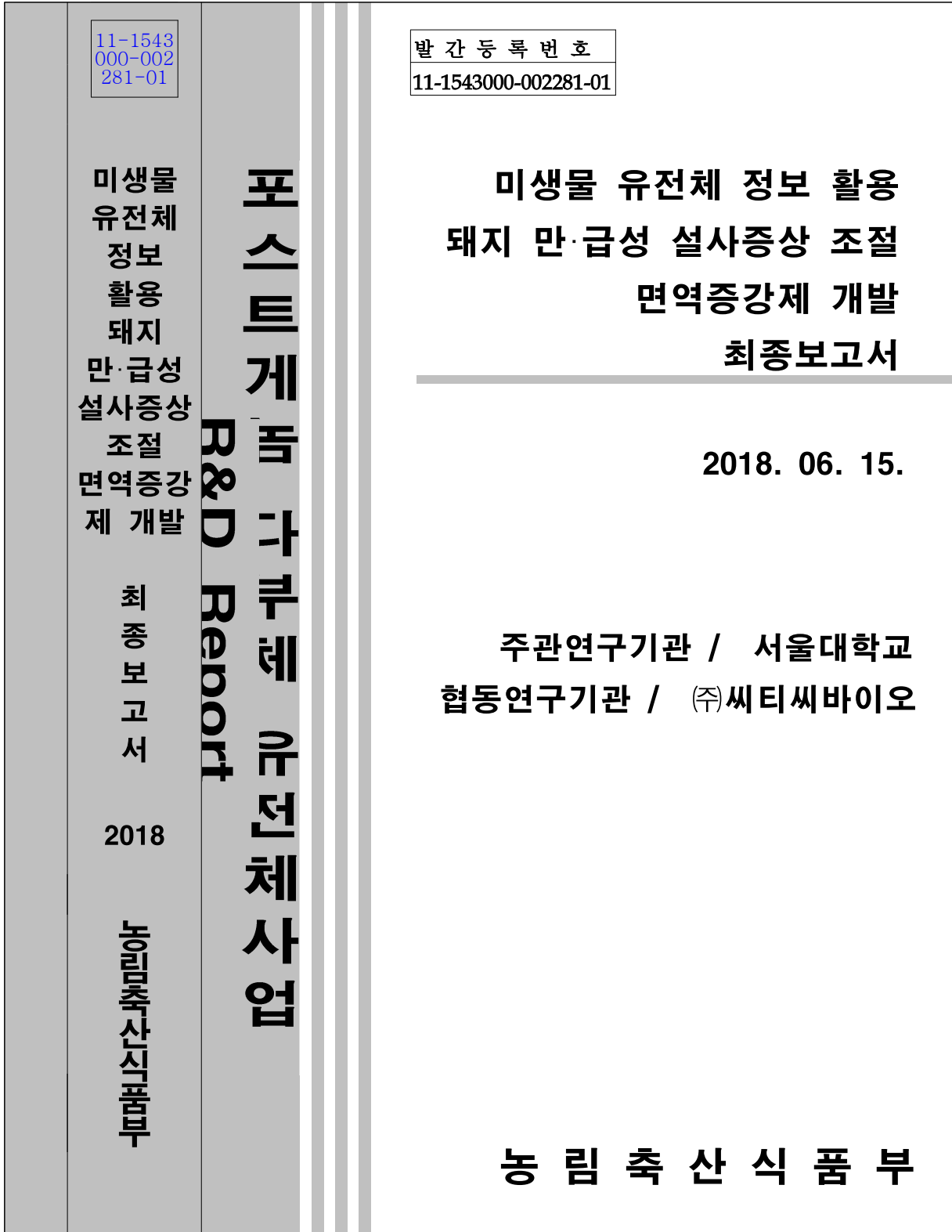


1. 표지



## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지농장의 만·급성 설사증상 조절 면역증강제 개발과 제품화” (개발기간 : 2016.02.29. ~ 2018.2.28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.02.23.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (인)  
협동연구기관명 : (주)씨티씨바이오 (인)  
참여기관명 : (인)

주관연구책임자 : 박 병 철  
협동연구책임자 : 최 대 건  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	916004-2	해당단계 연구기간	2016.2.29. ~ 2018.2.28.	단계구분	1/2
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	포스트게놈 다부처 유전체 사업			
연구과제명	대과제명	미생물 유전체 정보 활용 돼지 만·급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
	세부과제명				
연구책임자	박병철	해당단계 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:320,000천원 민간:106,800천원 계:426,800천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	총연구개발비	정부:320,000천원 민간:106,800천원 계:426,800천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교			참여기업명 (주)씨티씨바이오	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 52	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 연구 목적: 만성스트레스가 상재하고 있는 돼지농장의 현실과 성장시기별로 다르게 나타나는 돼지의 설사증세를 종합적으로 고려하지 않는 기존의 접근방법을 탈피하여 만성 및 급성 설사증상의 발병기전을 타깃하는 맞춤형 면역증강제 개발 및 제품화</li> <li>■ 연구 내용:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 질병대응 전략개발: 만·급성 설사증상의 발병기전을 기존의 통합 해석 방식에서 탈피한 맞춤형 전략 개발</li> <li>- 대책: 만성 및 급성 설사증상을 나누어서 접근하는 방식 채택 - 만성 설사증에는 항균·항바이러스 효능을 가진 생균제로, 급성 설사증에는 박테리오파지로 접근</li> <li>- 돼지농장의 만·급성 설사증상 조절 면역증강제 제품화: 본 연구과제는 제품화를 전제로 하며 연구가 종료된 후에도 산업화로 연결시키는 것을 최종목표로 함.</li> </ul> </li> </ul>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 연구성과 측면: SCI급 논문 4편, 특허등록 1건, 특허출원 2건, 학술발표 20건.</li> <li>■ 산업적 측면:               <ul style="list-style-type: none"> <li>전략 미생물 유전체 해독 5건, NABIC 등록 5건, KCTC 기탁5건</li> <li>유용 유전자원 확보 4건</li> <li>맞춤형 혼합 첨가제를 통한 양돈 생산성 향상; 시제품화 1건</li> </ul> </li> <li>■ 과학적 측면: 장관스트레스와 장관 항상성 간 상호관계 규명; 과학 인력양성 3건</li> </ul>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p><b>가. 활용방안</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 본 연구를 통해, 돼지 설사증 원인 기전별 맞춤형 생균제제로 개발하여 축산분야에서 사료첨가용 가축 생산성 증진소재로 활용 가능</li> <li>■ 기존에 항생제가 사용되면서 가축 생산성이 증진되었으나, 다양한 안전성의 문제점으로 인하여 항생제 사용이 금지되면서 대체소재 개발이 절실하였음. 본 연구의 성과물은 이러한 사료첨가용 가축 생산성 증진 대체 소재로 활용할 예정</li> <li>■ 또한 관련된 기술들은 식품, 사료 산업 및 생균제 산업에 기초적인 기술로 활용이 가능</li> </ul> <p><b>나. 기대성과</b></p> <p><u>기술적 측면</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 면역조절 기전이 규명된 미생물 사료첨가제 특허 출원 및 시제품 출시</li> <li>■ 향후 사료공정규격서에 생균제 분야로 등록</li> <li>■ 설사증 방어 및 완화를 위한 혼합 사료첨가제 특허 출원 및 시제품 출시</li> </ul> <p><u>경제·산업적 측면</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 자체사업화로 국내를 포함 동남아시아 지역 중심으로 사업화</li> <li>■ 기존 제품 개선을 통한 시장 확대 및 후속 신제품 출시 가속화</li> <li>■ 양돈, 양계, 축우, 양어 등 광범위한 축산업 분야에 활용</li> <li>■ FTA 대응 축산물 경쟁력 확보 가능</li> <li>■ 항생제를 대체할 수 있는 획기적인 미생물 제제를 상품화</li> <li>■ 축산 식품에 대한 안전한 먹거리 제공 - 소비자들의 신뢰회복</li> </ul>					
중심어 (5개 이내)	돼지	설사증	면역증강제	생균제	박테리오파지	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose & Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>Purpose:</b> Identify the mechanism of the chronic &amp; acute diarrhea symptoms for developing an advanced immune-modulator, and for making a customized pilot feed additive for pigs under stresses.</li> <li>■ <b>Contents:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Development of a new concept and strategy: To avoid the current confused interpreting method of chronic and acute diarrhea symptoms</li> <li>- Countermeasures: use antimicrobial and anti-viral probiotics against chronic diarrhea, and bacteriophage against acute diarrhea</li> <li>- This project is based on commercialization, so the final goal is to make a pilot feed additive as a commercialized product.</li> </ul> </li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Research results: 4 SCI papers, 1 patent registration, 2 patent submission, and 20 oral and poster presentations at the national and international conferences</li> <li>■ Industrial aspects:           <ul style="list-style-type: none"> <li>5 Strategy Microbial Genome Decoding</li> <li>5 NABIC Registration cases</li> <li>5 KCTC Deposition cases</li> <li>4 Useful genetic resources Secured</li> <li>1 a pilot product made</li> </ul> </li> <li>■ Scientific aspects: Identify the correlation between intestinal stress and homeostasis; also, train 3 junior scientist in the area of developing immune modulators in domestic animals.</li> </ul>				
Expected Contribution	<p><b>A. Utilization plan</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Developed as a customized probiotic agent based on the mechanism study on feed additive against porcine acute and chronic diarrhea.</li> <li>- The results can be used as a substitute for antibiotics in animal feed</li> <li>- The concept of the study can be used as basic technologies for the food, feed and probiotic industries</li> </ul> <p><b>B. Expected Performance</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Technical aspects           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Patent application; launching the microbiological feed additives</li> <li>- Register as probiotic feed additives</li> <li>- launch the pilot multi-blended feed additive against porcine diarrhea</li> </ul> </li> <li>■ Economic and industrial aspects           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Expansion and acceleration of feed additive market</li> <li>- Securing competitiveness of livestock products to counteract FTA</li> <li>- Commercialization of innovative microbial agents to replace antibiotic growth promoter (AGP)</li> <li>- Supplying safe animal origin foods - Restoring consumers' confidence</li> </ul> </li> </ul>				
Keywords	Pig	Diarrhea	Immuno-modulator	Probiotics	Bacteriophage

## 6. 영문목차

### < 목 차 >

	Page
1. Research project synopsis .....	1
2. Current situation of technique .....	5
3. Research content and result .....	7
4. Achievement and expected Contribution .....	48
5. Application plan .....	49
6. Information on Overseas Science Technology .....	49
7. Security Level of R&D Performance .....	49
8. Research facilities and equipment registered in the NTIS .....	49
9. Performance of safety measures implementation .....	50
10. Research Performance of R&D Projects .....	51
11. Other informations .....	52
12. Reference .....	52

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

	페이지
1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	5
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	7
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	46
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	49
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	49
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	49
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	49
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	50
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	51
11. 기타사항 .....	52
12. 참고문헌 .....	52

<별첨> 자체평가의견서

## 8. 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.



# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## ○ 연구개발의 배경 및 목적

### 1. 돼지 만·급성 설사병의 위험성

- 대장균 설사증은 병원성 대장균 감염에 의해 일어나며, 장독소 분비형 대장균이 소장 을 침범하여 장벽에 부착함으로써 병을 일으킴. 대장균의 부착인자에는 K88, K99, 987P, F41등의 4가지가 가장 흔함. 대장균이 장상피세포 및 장관 기저부에 일단 부착 하게 되면 빠르게 증식하여 장독소를 생산하여 장상피세포에 손상을 주고 체액에 손실 을 가져오며, 영양분의 흡수를 방해함으로써 설사를 일으키게 됨.
- 돼지의 설사병은 주요 양돈국의 생산성 향상에 큰 걸림돌이 되는 질병 중 하나로, 우 리나라에서도 양돈이 산업화되기 시작하면서 설사병으로 인한 자돈의 폐사를 줄이기 위하여 여러 가지 방법, 즉 예방약의 개발, 치료약제의 선정, 환경과 위생의 문제 등을 중요시하여 왔으나 현대화 된 양돈 산업에서는 큰 효과를 거두지 못하고 있음.
- 이유 전후 어린 자돈의 폐사는 낮은 양돈 생산성의 주요 원인임. 자돈 폐사는 주로 설 사증에 의해서 초래되며, 자돈 설사증은 농장 내 만성 스트레스가 큰 이유임. 병원성 급성 설사증상을 예방하는 백신과 함께 만성 스트레스를 해결할 수 있는 면역 증강제 사용을 구분하여 치료할 필요가 있음.

### 2. 질병 원인별 맞춤형 생균제 개발의 부재

- 만성 및 급성 설사증세는 기본적으로 비병원성과 병원성(박테리아, 바이러스)에 대해 원인별로 대책을 수립하여 해결책을 찾지 않고 급성과 만성의 시기 및 차이, 스트레스 성과 질병성 원인들에 대한 접근방법이 혼재 되어 있음. 특정시기에 특정 질병에 대해 서는 동물 백신으로 예방하지만 이는 잘 알려진 특정 주요 질병에 대한 매우 제한적인 해결책이 될 수밖에 없음. 따라서 백신과 더불어 만성 및 급성 설사증에 대한 접근방 법을 구분하여 발병 기전에 따라서 맞춤형으로 접근하여야 함. 따라서 병원성 질병을 예방하는 백신과 함께 만성 스트레스를 해결할 수 있는 면역증강제 사용을 구분하여 맞춤형으로 접근하여야 함.(그림 1)



그림 1 자돈설사증 발병원인 및 대응책

### 3. 면역증강제로의 생균제와 항생제 대체제인 박테리오파지

- 생균제는 오래전부터 장내의 이상 발효, 설사, 소화불량, 변비 감소 등에 효과가 인정되어 인체용으로 사용되어 왔는데 최근에 와서는 동물의 장내 환경 개선, 생산성 개선, 설사발생 감소 등의 목적으로 사료에 많이 사용되고 있음. 적절한 생균제를 사료에 첨가하면 대장균 수를 줄여 독성물질의 생산을 억제하고, 이로운 박테리아의 수가 증가하며, 젖산생성을 촉진시킴으로서 장내 pH의 변화를 유도할 수 있음.
- 돼지사료에 사용되는 생균제의 종류로는 효모, 유산균, 국균 등이 있는데, 이중 가장 대표적인 것으로 유산균을 들 수 있으며, 이 **유산균은 살모넬라와 대장균에 의한 설사를 방지하고 동물의 생산성을 향상시킬 수 있는 것으로** 실험동물과 동물의 경우 그 사용효과가 뚜렷하다고 보고되었음.(농림수산식품교육문화정보원, 사료 첨가제 특허분석 보고서 참고)
- '배합사료내 항생제 사용 전면금지'에 대응하여 차세대 동물용 항생제 대체제로 각광받고 있는 박테리오파지는 특정 병원성 세균만을 선택적으로 사멸시키고 다른 균에는 전혀 영향을 미치지 않는다는 천연 항세균제체이고, 직접적으로 박테리아를 사멸시킴. (주)씨티씨바이오는 앞으로도 꾸준히 수개월내 수종의 박테리오파지를 개발하여 축종별 다양한 세균성질병에 대항할 수 있는 제품들을 계획하고 있어, 본 과제에서 활용할 박테리오파지 제제를 제공하고, 관련 안정성 및 생산성을 검증하여 제품화 과정에 큰 기여를 할 수 있음. 2013년 10월 16일에 살모넬라 엔테라이티디스 박테리오파지와 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지가 사료공정서에 추가 등재됨으로써 현재 4종의 박테리오파지가 사료공정서에 등재.(축산경제, 2014.03.07.)

○ 연구개발의 필요성

- 국내 연구개발의 필요성 : 국내에 보급된 생균제 제품중에 일본과 중국 및 유럽에서 수입된 제품들이 많이 판매되고 있어, 여전히 국내 자급율을 높일 필요가 있음. 특히 외국의 대형 미생물 기업에 의한 국내 잠식에 대비하기 위해서는 국내의 연구가 지속적으로 이루어져야 함.
- 본 사업을 통해서, 돼지농장의 만·급성 설사증상 조절 면역증강제 개발하고자 함. *In vitro*와 *in vivo* 수준에서의 실험을 통해 생균제+ 대장균 박테리오파지 혼합 첨가제의 효능을 면역학적으로 검증하고, 기업을 통해 체계적인 제품화 과정을 거쳐 최종적으로 만성 및 급성 발병기전에 입각한 맞춤형 사료첨가제 개발을 목표로 함.

○ 연구개발의 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
돼지 장상피세포를 활용한 장벽기능 및 활성 분석	- <i>E. coli</i> 유래 LPS 및 박테리오파지 등 감염에 따른 돼지 장상피세포의 표현형 변화 관찰	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 돼지 장상피세포주인 IPEC-J2를 배양한 후, <i>E. coli</i> 유래 LPS 및 <i>E. coli</i> K88, K99를 처리한 뒤, 세포 간 결합력을 나타낼 수 있는 결합력을 측정.</li> <li>- 장관 면역세포 유도에 영향을 줄 수 있는 케모카인 생산량을 realtime-PCR로 분석.</li> <li>- 또한 박테리아가 장상피세포에 부착하는 능력을 확인하기 위해 adherence assay를 수행.</li> </ul>
생균제/대장균 박테리오파지 혼합 급이에 의한 이유자돈 생산·면역지표 분석	- 이유자돈을 사용하여 생균제+대장균 박테리오파지 혼합 사료첨가제를 특정 비율로 배합하여 급이 후 성장성적 측정 및 설사지수 점검, 면역학적 지표 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 농장에서 21일령 이유자돈 총 28두를 약 2주간 생균제+대장균 박테리오파지 혼합 사료첨가제를 특정비율로 배합하여 급이 후 성장성적(증체량, 사료섭취량, 폐사율 조사) 및 설사지수를 조사(분변 검사).</li> <li>- 또한 면역 지표 분석(PBMC를 분리해 혈액 내 단핵구 및 림프구 분포)을 위해 혈액 내 면역세포를 분리하여 flow cytometry로 세포표면단백질 발현을 분석.</li> <li>- 백신 특이적 반응성을 확인하기 위해 백신에 따른 혈액 내 면역세포의 증식 정도를 CFSE 염색기법을 활용하여 flow cytometry로 분석.</li> </ul>

<p>생산성 및 안정성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 사료첨가제 안정성, 균주 생산성 확인 실시 및 기존 균주 적용 시 최종 생산 수율 평가를 통한 추후 개선방향 설정</li> <li>- 균주 배양성 평가과정을 통해 고농도 배양 조건을 최적화하고 규모 확장 및 대량생산공정 수율을 최종적으로 평가</li> <li>- 신규 사료첨가제 생균제 분리 및 특성 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CFU, OD 평가법을 활용하여 공시적 균주 배양성을 확인하고, 배지내 당 소모도 분석하여 배양성에 대한 평가를 실시함. 또한, 기존균주 적용 시 최종 생산수율을 평가하여 추후 개선방향을 설정함. 균주 기본 특성 파악을 위해 내산성, 내담즙성, 내열성 평가.</li> <li>- 균주 배양성 평가과정을 통해서, pH, agitation, 당 농도 등의 분석으로 상업적으로 사용 가능한 배양 조건을 최적화하고, 규모를 5L에서 50L-1.5 KL로 Scale-Up test를 완료하였거나 진행하고 있음. 농축, 동결 각 공정의 회수율을 비교하고, 생존율 우수 동결보호제 선발을 통해 대량 상업 생산공정을 구축.</li> <li>- 기존 사료 첨가제 생균제 외, 신규 분리 사료첨가제로 사용가능한 생균제에 대한 내산성, 내담즙성, 항균활성 평가를 통해 새로운 생균제 적용 미생물 탐색.</li> </ul>
---------------------	---	---

## 2. 국내외 기술개발 현황

		코드번호	D-04
연구 및 기술개발 현황		출처	
국내	<p>● 2010년 최초로 사료공정서에 살모넬라 갈리나룸 박테리오파지, 살모넬라 티피뮤리움 박테리오파지가 사료첨가제로 사용할 수 있게 등재됐으며, (주)씨티씨바이오가 2013년부터 박테리오파지를 사료첨가제로 개발, 생산을 시작하여 현재 연간 40억 매출을 바라보는 품목으로 성장함. 이후 2013년 10월 16일에 살모넬라 엔테라이티디스 박테리오파지와 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지가 사료공정서에 추가 등재됨으로써 현재 4종의 박테리오파지가 사료공정서에 등재됨.</p>	축산경제 (2014.03.07)	
	<p>● 장관 스트레스에 대한 장상피세포 및 면역세포 활성 변화 연구</p> <p>- porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) 감염 실험을 통해 돼지 장상피세포에서의 감염 방어 기전에 대한 연구가 수행되었음. 또한 돼지 장관계에 감염되는 병원균에 대한 장상피세포 내 활성 변화를 분석할 수 있는 기술이 보유되어 있음.</p> <p>- 사람 및 동물의 장관 면역 환경을 <i>in vitro</i> 수준에서 구현하기 위해, transwell을 활용하여 장상피세포와 면역세포를 공동배양. 본 공동배양 시스템을 활용하여 곰팡이독소에 의해 손상된 장상피세포가 면역세포에 미치는 영향을 확인됨. 그 결과, 곰팡이독소인 디옥시니발레놀에 의해서 T 세포 및 단핵구의 분포, 세포사멸, 증식에 변화를 유도되었고, 본 연구를 통하여 곰팡이독소가 오염된 사료의 섭취는 장상피세포 뿐 아니라 장관 내 면역세포에도 영향을 미칠 수 있는 가능성이 확인되었음.</p>	Antiviral Res. 2017;146:86-95	
	<p>● 미생물 활용 면역기전 연구</p> <p>- 마우스, 사람, 경제동물 모델을 활용하여 미생물에 의한 면역활성 조절 기전연구를 꾸준히 수행되어 왔음. 대표적으로 돼지 장관스트레스 조절을 위해 미생물 유래 물질을 활용하여 이에 대한 연구실적이 최근까지도 나온 바 있으며, 돼지 면역세포에 대한 분석 기술도 존재함.</p> <p>- 황색포도상구균 유래 LTA와 LPS를 활용하여 숙주세포 간의 상호작용 병인기전 연구가 수행되어있음. 황색포도상구균 LTA가 TGF-beta 생성 증가를 통하여 CD4 T cell의 활성을 억제할 수 있음을 밝혀, 미생물 유래 물질과 면역세포간의 작</p>	Vet Res. 2016;47:25  Asian-Australas. J. Anim. Sci. 2014; 27(4): 580-586	

<p>국내</p>	<p>용기전에 대한 연구를 수행됨.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 유래 입자를 항원보조제로의 가능성도 규명되어 있음. 또한 바실러스 서브틸리스 유래 물질을 활용하여, 교차항원제시 능력을 유도함을 밝혀, 면역활성 기전 규명을 통한 면역증강제 및 항원보조제로의 연구가 수행되고 있음.</li> <li>- 조류에서의 장내 미생물 조절 모델을 구축하여, 장관계 면역활성에서 미생물의 역할에 대한 연구를 수행되고 있음. 본 연구를 통하여 장 내 존재하는 미생물은 장관 면역항상성을 유지하는 데에 중요한 역할을 한다는 가능성을 제시함.</li> </ul>	
<p>국외</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 박테리오파지는 1910년대 세균을 잡아먹는 생명체로 인체 분야에서 인정을 받은 후 각종 질병 치료제로 인기를 끌었지만 1940년대 페니실린 등 항생제 개발로 인해 연구 및 치료가 줄어들어 동유럽에서만 사용되어 왔음. 하지만 항생제 오남용에 따른 슈퍼박테리아 출현과 내성문제 때문에 박테리오파지가 다시 주목 받게 되었고 여기에 바이오테크놀로지(BT) 기술발전과 함께 투자가 활발해졌고, 미국 FDA, USDA에서는 식품, 육가공 등에 인증되어 사용되고 있음.</li> <li>● 동물 사료첨가제의 국외시장은 새로운 기술과 제품의 혁신을 통해 효율적인 가축 생산품의 증가에 초점을 두어 급격히 발달하고 있음. 선도적인 회사들은 지역을 넘어선 사업 확대와 새로운 시설을 도입한 제품 생산라인의 효율적인 공급에 초점을 두고 있음. 주로 유럽의 회사들이 증가하는 아시아인의 축산물 수요를 맞추기 위해 아시아태평양 지역에 많은 투자를 함으로써 새로운 제품을 개발하려 노력하고 있음.</li> <li>● 북미 시장에서는 생균제시장의 규모가 꾸준히 증가하고 있으며 2018년에는 49억 달러 규모로 증가할 것으로 예상됨. 또한 전 세계적으로 건강에 대한 관심의 증가와 항생제 첨가에 대한 규제 및 거부감으로 인해 앞으로도 생균제 시장의 규모가 계속적으로 증가할 것으로 예상됨.</li> </ul>	<p>World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30(8): 2153-2170</p>

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

○ 이론적, 실험적 접근방법:

1) 돼지 장상피세포를 활용한 장벽기능 및 활성 분석

생체 내 장관에서 일어나는 현상(음식물을 포함하는 항원-장상피세포-면역세포의 상관관계)을 가장 가깝게 *in vitro*에서 구현할 수 있는 Transwell 시스템을 활용. 돼지 장상피세포주인 IPEC-J2를 DMEM/F-12 배지와 함께 12-well culture plate 7-10일 배양하여 장상피세포의 상부(apical side)와 하부(basolateral side)를 극성상태로 분화시킨 후 실험을 진행함. *E. coli* K99와 박테리오파지(*E. coli* K99)를 배지에 혼합 처리한 뒤 transepithelial electrical resistance (TEER) 값을 epithelial volttohmmeter로 측정하여 permeability를 분석함. 또한 Annexin V/PI staining을 통해 세포사멸을 분석하고 상층액 내에 존재하는 케모카인 생산량을 ELISA로 분석함.

2) 돼지 장상피세포+면역세포 공동배양 시스템을 통한 장관면역모델 구축

장관 면역환경을 *in vitro* 수준에서 구현하여 메커니즘 연구를 수행하기 위해 돼지 장상피세포주인 IPEC-J2를 DMEM/F-12 배지와 함께 12-well transwell plate에 7-10일 배양한 뒤, 대식세포주인 3D4/31을 well의 하부에 배양하여, 장상피세포/면역세포 공동배양 모델을 구축함. *E. coli* 감염 및 대장균 박테리오파지 처리에 따른 선천성 면역세포 활성화분자 및 염증성 사이토카인의 발현을 mRNA 수준에서 분석하고 면역세포에 의해 생산되는 사이토카인(IL-8등)을 ELISA로 분석함.

○ 연구내용 및 결과:

<주관 연구>

대장균 성장곡선 확인

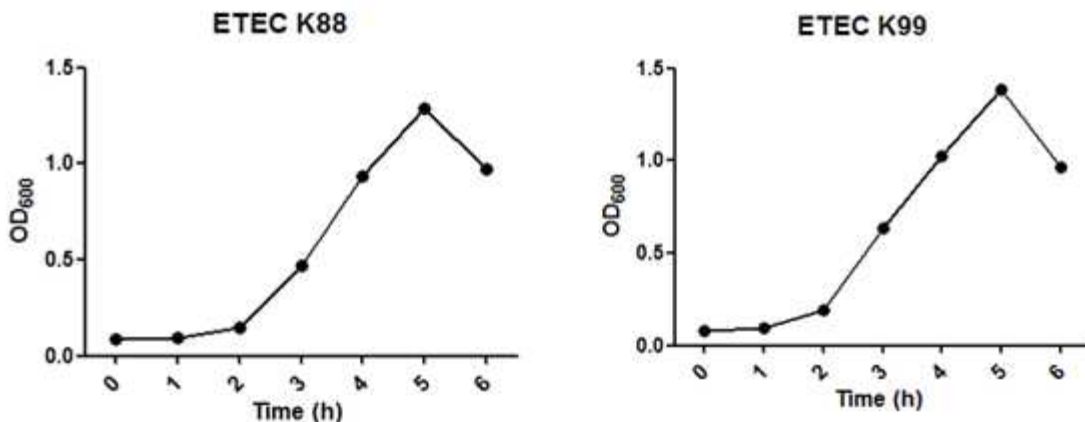


그림 2 대장균 K88과 대장균 K99의 성장곡선

파장 600nm에서 시간별 O.D.를 측정하여 본 연구실 내에서의 대장균 성장곡선을 확인함. 배양 4시간 후에 두 균주 모두 Mid to late log phase에 도달함을 확인함. (그림 2) 또한 OD에 따른 CFU를 확인하기 위해 선형함수 근사를 이용하여 CFU를 확인해 보았음. (그림 3) 본 결과를 통하여 대장균 K99의 CFU는 “ $Y(\text{CFU}) = 4 \times 10^9 \times (\text{OD}_{600})$ ” 이와 같은 공식을 활용하여 추후 실험에 활용함.

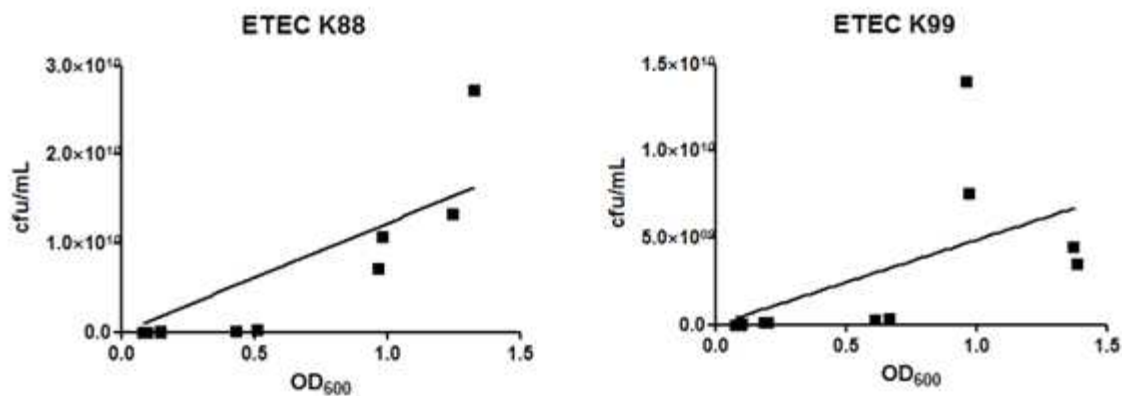


그림 3 대장균 K88, K99의 OD에 대한 CFU 변화와 선형함수 근사

**대장균 K99 특이적 박테리오파지에 의한 효능 확인**



그림 4 K99 특이적 박테리오파지를 활용한 Plaque assay

K99 특이적 박테리오파지의 농도를 측정하기 위해 Plaque assay를 수행함. 다양한 농도의 박테리오파지를 대장균 K99와 혼합하여 Top agay assay를 시행한 결과, 5x10<sup>8</sup> pfu/ml의 농도임을 확인.(그림 4)



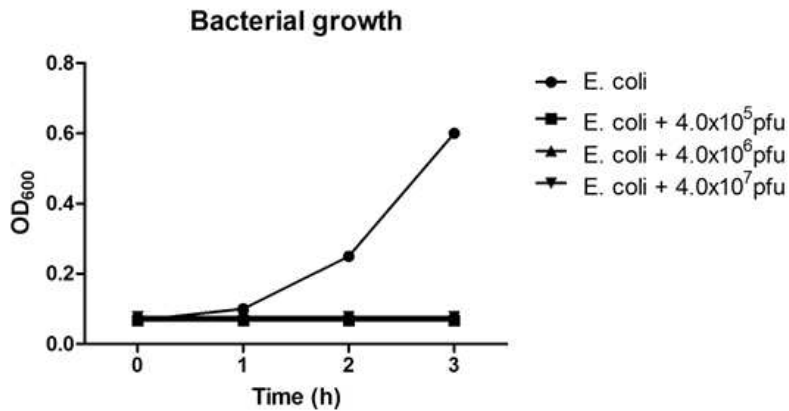
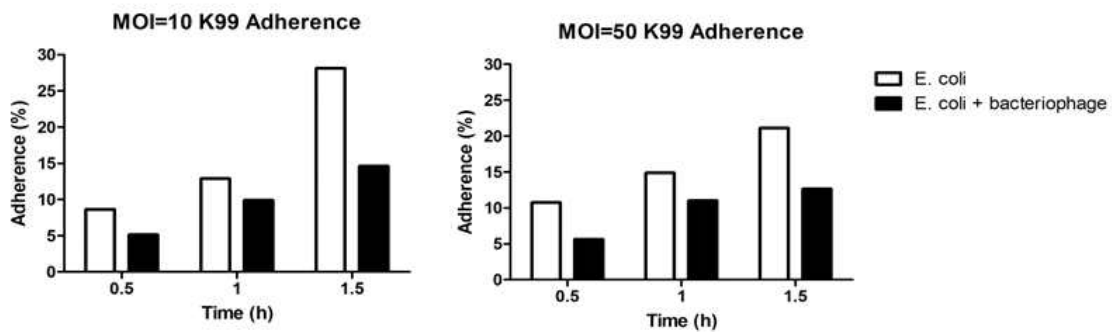


그림 5 박테리오파지에 의한 대장균 성장 저해

K99 특이적 박테리오파지를 대장균 수에 대비하여 10, 100, 1000배 희석하여 대장균 K99과 혼합하여 배양하였을 시, 박테리오파지에 의해 대장균이 정상적으로 성장하지 못하는 것을 확인.(그림 5)



\* Adhesion %: (bacterial CFU in the lysate) / (total treated bacterial CFU per well)

그림 6 박테리오파지에 의한 대장균 adherence의 변화

장상피세포를 배양하여 장상피세포 수에 대비해 10, 50배의 대장균을 접종하였을 시 대장균이 장상피세포에 부착되는 정도를 adherence assay로 확인. 그 결과 2시간도 채 되기 전에 부착된 비율이 100%를 초과하는 결과를 확인하였음.(Data not shown) 이때 앞서 수행하였던 박테리오파지를 혼합 배양하였을 때에, 박테리오파지에 의해서 세포에 부착하는 정도가 감소하는 것을 확인.(그림 6)

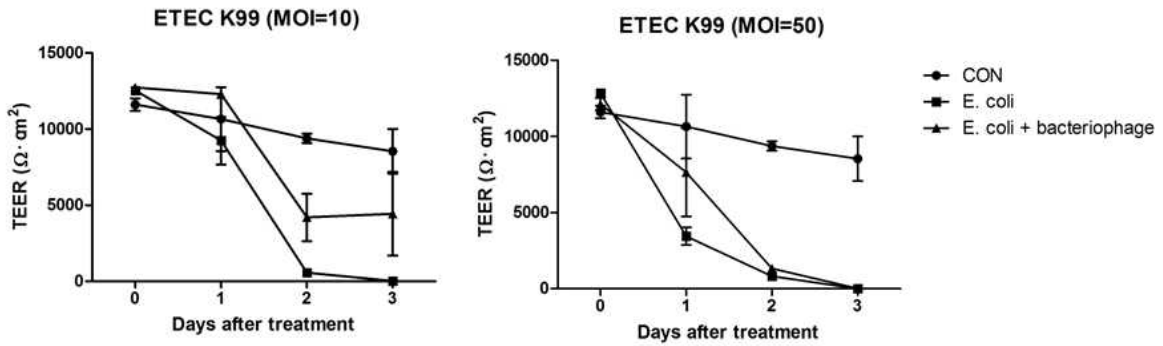


그림 7 박테리오파지에 의한 대장균 감염 장상피세포의 장투과성 보호

장상피세포의 장벽기능 중 하나인 투과성은 Transepithelial electrical resistance (TEER) 측정을 통해 확인할 수 있음. 돼지 장상피세포를 Transwell plate의 insert에서 7일 이상을 키워 분화된 장상피세포로 배양함. 그 후 *E. coli* 유래 LPS를 0-7일간 처리하여 장상피세포 간 결집력의 변화를 TEER 값의 변이로 확인하였으나 LPS 처리에 따라서는 장상피세포 결집력의 변화가 유도되지 않음을 확인함. (Data not shown) *E. coli* K88과 *E. coli* K99에 의한 장상피세포의 감염을 유도하기 위해 우선 두 박테리아를 액체 배지에 배양하여 OD값과 CFU 측정을 통해 대장균 성장곡선을 확인함. 그 후 OD=1의 대장균를 사용하여 미리 분화시킨 장상피세포에 대장균을 감염시킨 후 대장균 감염에 따른 장결집력을 확인한 결과 LPS와는 달리 감염에 따른 TEER의 감소를 확인하여 대장균 감염이 장상피세포의 투과성 증가를 유도함을 확인함. (Data not shown) 대장균 감염에 의해 시간에 따른 TEER 감소 양상을 보였던 장상피세포가 박테리오파지와 혼합 배양 되었을 시에는 TEER 감소를 줄여줌을 확인.(그림 7) 본 결과를 통해 박테리오파지에 의한 대장균 감염의 감소로 장결집력을 보호할 수 있음을 확인함.

뿐만 아니라 장상피세포는 감염에 대응하여 장상피세포 하부의 기저막에 면역세포를 유인하는 케모카인을 분비할 수 있음. 장상피세포에 의한 장관면역 조절 기능을 확인하기 위해 대장균 감염 장상피세포에서의 케모카인 발현을 확인하였음. 그 결과 대장균 감염에 의해 증가되었던 IL-8 및 MCP-1의 발현이 박테리오파지 처리에 따라 그 발현이 감소됨을 확인.(그림 8) 본 결과는 차년도 면역세포/장상피세포 공동배양 모델에서 장관면역활성 조절능 연구에 대한 기초 데이터로 충분히 활용될 수 있어 가치있는 결과라고 볼 수 있음.

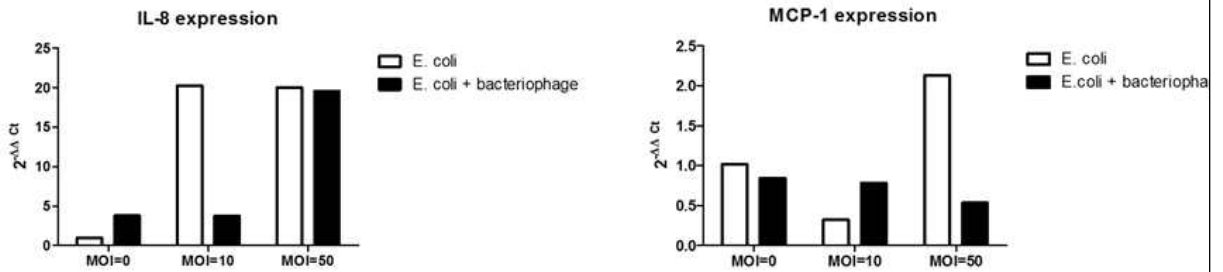


그림 8 대장균 감염 장상피세포에서의 케모카인 발현 양상

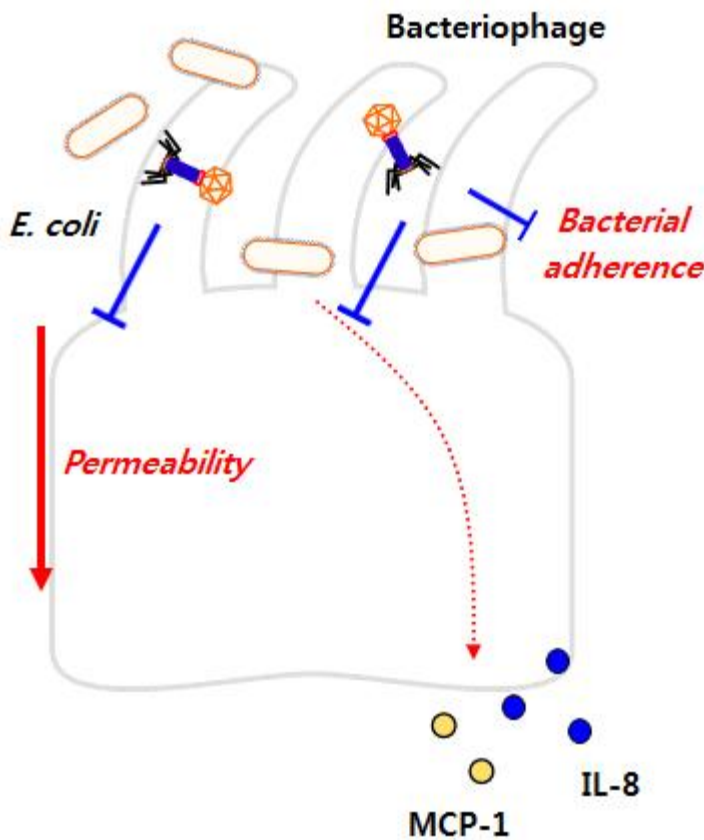


그림 9 박테리오파지에 의한 장상피세포에서의 면역활성 조절

최종적으로 1차년도 연구 수행 결과 돼지 장상피세포를 활용하여 대장균의 감염이 장상피세포에 부착 및 침투하여 장투과성을 증가시키고, 케모카인의 발현을 유도함을 확인함. 박테리오파지를 혼합처리하여 대장균의 성장을 억제하게 되면, 대장균에 의해 증가되었던 부착정도 및 투과성이 감소됨을 확인하였고 케모카인의 발현도 줄일 수 있음을 확인.(그림 9) 이를 통하여 박테리오파지가 대장균 감염을 감소시킴으로써 1차적 장벽인 장상피세포에서의 기능 손상을 조절함을 확인하였고 차년도 연구를 통해 장관면역활성이 어떻게 조절되는 지를 면역세포와의 공동배양을 통하여 기전규명.

## 돼지 장상피세포를 활용한 장벽기능 및 활성 분석

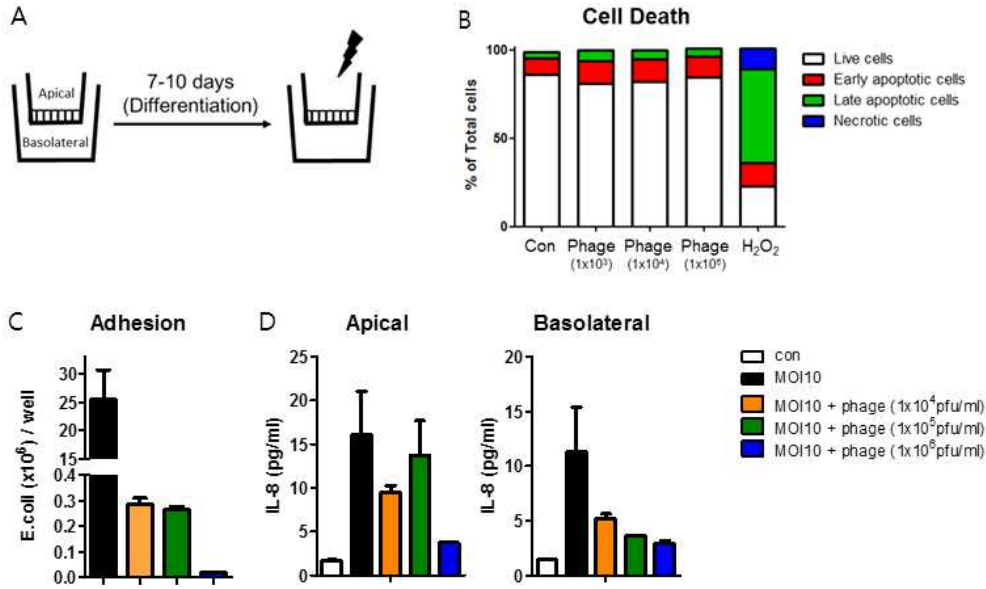


그림 10 분화된 장상피세포에 박테리오파지 처리에 의한 ETEC 감염 억제

Phage 단독 처리는 분화된 장상피세포에 대해 세포 사멸을 유도하지 않는 것을 확인하였으며(그림 10B), Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99(이하 ETEC) 단독으로 혹은, *E. coli* K99 박테리오파지(이하 Phage)를 배지에 혼합하여 처리한 후 *E. coli* adhesion assay를 진행하였을 때 phage 농도 dependent하게 장상피세포 표면의 ETEC adhesion이 감소하는 것을 볼 수 있었음(그림 10C). 또한 apical side와, basolateral side에서 염증성 사이토카인의 한 종류인 IL-8 생산량을 ELISA로 분석하였을 때, IL-8의 발현 역시 phage농도 dependent하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었음 (그림 10D). 이를 통해 박테리오파지의 처리는 분화된 장상피세포의 세포사멸에는 영향을 미치지 않으며 효과적으로 ETEC의 장상피세포 감염을 억제시킴을 증명함.

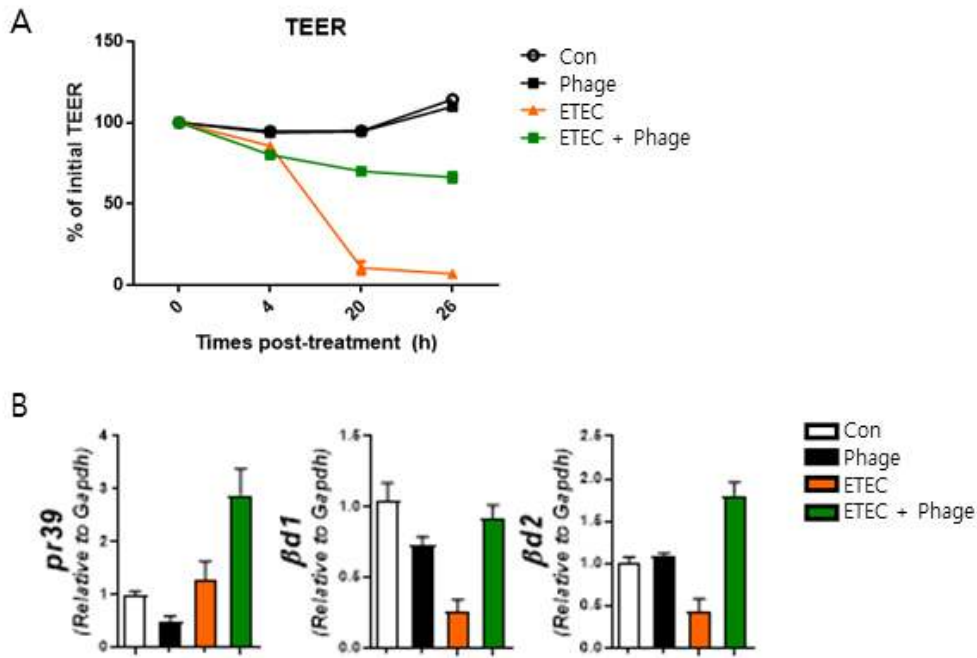


그림 11 분화된 장상피세포에 박테리오파지 처리에 의한 장벽기능 활성

본 연구팀의 선행 연구에 따르면, 돼지 장상피세포주인 IPEC-J2를 DMEM/F-12 배지와 함께 12-well culture plate 7-10일 배양하여 극성상태를 유도하게 되면 타이트정선 단백질 발현의 증가와 함께 TEER가  $10\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$  이상을 유지하게 됨. 분화된 장상피세포주에 ETEC( $1\times 10^7$  cfu/ml) 단독으로 혹은, Phage( $1\times 10^6$  pfu/ml)를 배지에 섞어 처리하였을 때 ETEC 단독으로 처리한 그룹에서는 20시간 이후 TEER가 급격히 떨어지며 permeability가 증가하는 것을 확인할 수 있는 반면, Phage와 동시에 처리해준 그룹에서는 TEER의 감소가 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있음(그림 11A). 또한 처리 24시간 이후 분화된 장상피세포에서 Antimicrobial peptides(이하 AMPs)인 PR39, pBD1, pBD2의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였을 때 ETEC와 Phage를 함께 처리한 그룹에서 세 종류의 AMPs가 모두 ETEC단독처리에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었음(그림 11B). 이러한 결과는 박테리오파지를 포함한 사료 첨가제가 돼지 장내 감염되는 ETEC의 증식 및 부착을 억제할 뿐만 아니라 장상피세포의 permeability 증가를 억제하며, AMPs의 생산을 촉진시켜 더욱 효과적으로 ETEC 감염을 방어함을 시사.

**돼지 장상피세포+면역세포 공동배양 시스템을 통한 기전연구**

본 연구팀은 장관 면역 환경을 *in vitro* 수준에서 구현하여 메커니즘 연구를 수행하기 위해 돼지 대식세포주인 3D4/31를 분화시켜 이를 Transwell에 7-10일 배양해 극성상태를 유도한 돼지 장상피세포주 하부에 처리하여 장상피세포/면역세포 공동배양 모델을 구축함.

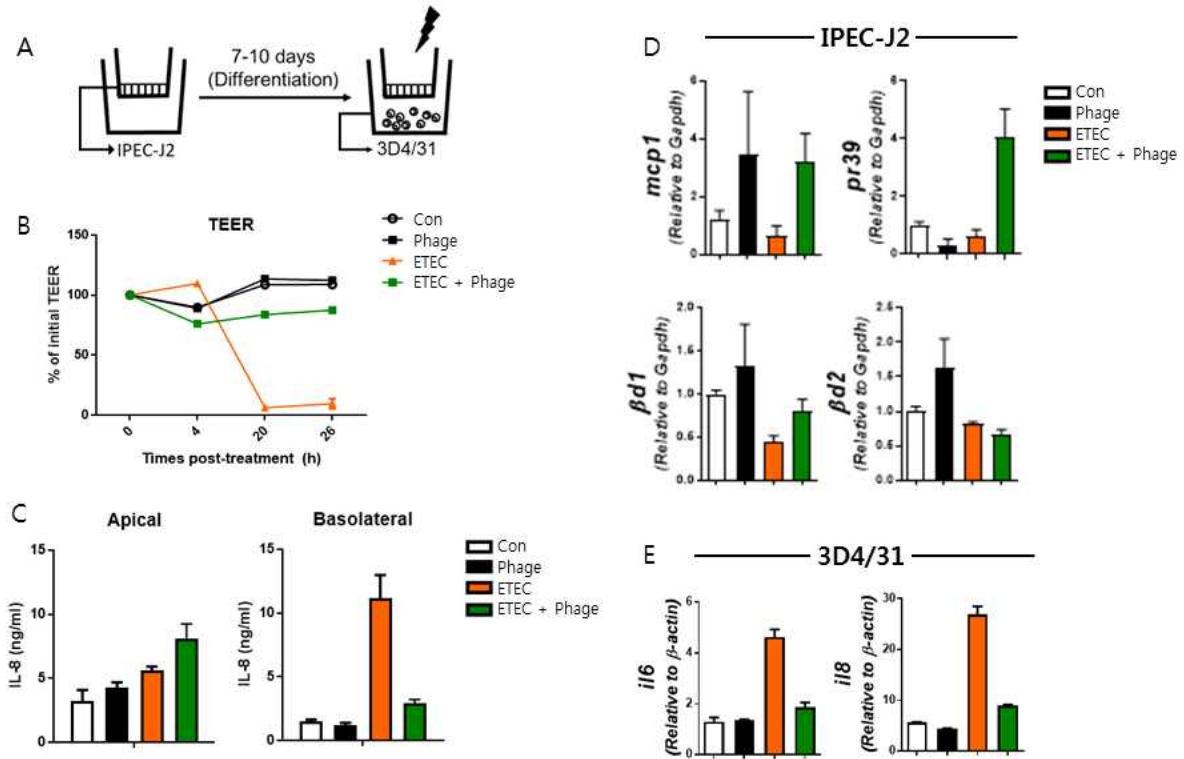


그림 12 장상피세포/면역세포 공동배양 모델에서 박테리오파지 처리에 의한 ETEC 감염 억제

7-10일 배양하여 분화시킨 돼지 장상피세포주 하부에 돼지 대식세포주를 처리하여 구축한 공동배양 모델 (그림 12A)에 ETEC ( $1 \times 10^7$  cfu/ml) 단독으로 혹은, Phage ( $1 \times 10^6$  pfu/ml)를 배지에 섞어 처리하였을 때 앞선 장상피세포 단독 배양 모델에서와 같이 ETEC 감염에 의해 감소한 TEER값이 Phage 처리에 의해 회복되는 것을 확인 할 수 있었음 (그림 12B). 또한 apical side와 basolateral side의 배지에서 염증성 사이토카인인 IL-8의 발현을 ELISA로 측정하였을 때 basolateral side에서 ETEC감염에 의해 증가한 IL-8의 발현이 Phage 처리에 의해 현저히 감소함을 확인할 수 있었음 (그림 12C). 처리 24시간 이후 장상피세포주인 IPEC-J2에서 염증이 일어난 부위로 선천성 면역세포의 이동을 촉진하는 케모카인의 한 종류인 MCP-1과 AMPs인 PR39, pBD1, pBD2의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였을 때 MCP-1, PR39, pBD1의 발현이 ETEC 단독 처리에 비해 ETEC+Phage처리 그룹에서 증가함을 확인할 수 있었음 (그림 12D). 또한 하부 대식세포에서 역시 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8의 mRNA 발현이 ETEC+Phage처리 그룹에서 control과 가까운 수준으로 감소함을 확인할 수 있었음 (그림 12E). 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ , IL-12p35, IL-12p40의 발현은 그룹 간 유의미한 차이가 없음을 확인함 (data not shown). 장관 면역 환경을 in vitro 수준에서 in vivo 와 유사하게 구현한 장상피세포/면역세포 공동배양 모델을 통해 박테리오파지의 처리가 장상피세포내 장벽기능을 향상시킬 뿐만 아니라 케모카인의 생성으로 인한 염증 부위로 하부 면역세포의 이동을 촉진시킬 수 있으며, 통증 유발의 주원인인 염증성 사이토카인의 생성을 완화시켜 돼지 만.급성 설사증으로 인한 가축의 스트레스를 예방할 수 있음을 확인.



이유자돈에서의 생균제+ 박테리오파지 급이를 통한 생산 및 면역지표 확인

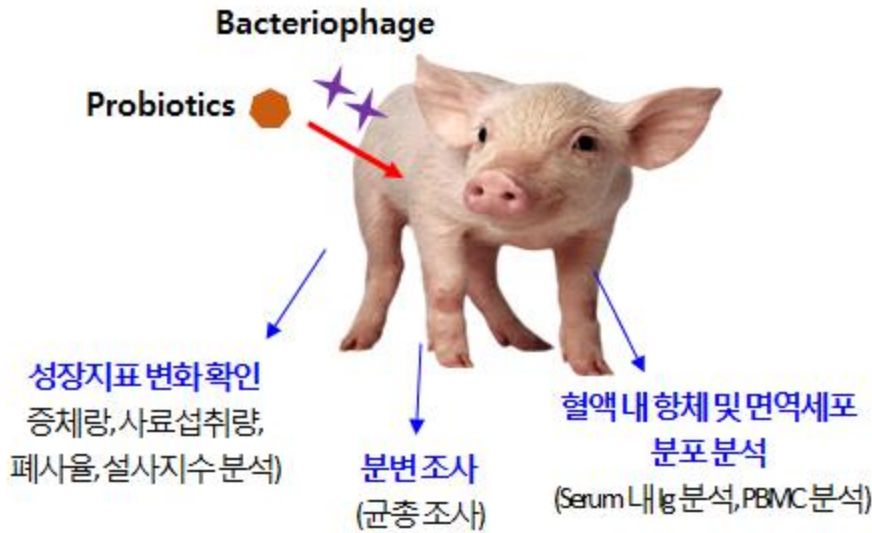


그림 13 이유자돈을 활용한 생균제+ 박테리오파지의 급이 실험

대장균 감염 실험에 앞서 기존 사료 첨가제에 들어가는 생균제와 박테리오파지를 2주간 혼합 급이 하였을 때 이유자돈에서의 성장지표와 면역지표의 변화를 확인하고 분변 조사를 수행.(그림 13) 구체적으로 1차년도 사양시험에서는 이유자돈 총 28두를 처리당 7두씩 2주간 사양시험 실시함. 4개 처리구 즉, 대조구 (negative 및 positive control) 각 ZnO 100, 2,500ppm 및  $1 \times 10^{10}$ cfu *Enterococcus facium* (EF) +  $1 \times 10^6$  cfu/kg K88, K99, F18 *E. coli*-specific bacteriophage (ED) or  $1 \times 10^8$ cfu *Salmonella typhimurium*-specific bacteriophage (T) 등을 포함함. 그 결과 성장지표 내 증체량, 폐사율, 설사지수에서는 그룹 간 큰 변화를 보이지 않았으나 사료섭취량에서 생균제+ 박테리오파지 그룹에서 증가하는 경향을 확인.(그림 16 왼쪽) 또한 2차년도 사양시험 계획은 본래 초기 육성돈으로 진행할 계획이었으나 육성돈보다는 면역능력이 완전히 확보되지 않은 이유자돈에서 사양시험을 실시하는 것이 본 연구과제에 적합하다는 판단을 하였음. 구체적으로 이유자돈 총 128두를 처리당 32두씩 (8 piglets  $\times$  4 replicate) 2주간 사양시험 실시함. 4개 처리구 즉, 무첨가[negative control (CON)], ZnO로 2,500 ppm Zn 첨가(ZnO),  $1 \times 10^{10}$ cfu *Enterococcus facium* (EF)에  $1 \times 10^8$ cfu *Salmonella typhimurium*-specific bacteriophage 첨가(T) 및 EF에  $1 \times 10^6$  cfu/kg K88, K99, F18 *E. coli*-specific bacteriophage (ED) 첨가구 등을 포함함. 그 결과 성장지표 내 2주차 증체량에서 T처리구 및 ED처리구가 ZnO처리구와 유의차가 없었고 세 처리구 모두 CON처리구보다 증가를 보임. 또한 사료섭취량 전구간에서 T처리구 및 ED처리구는 ZnO처리구와 유의차가 없었고 세 처리구는 모두 CON대조구보다 증가하는 경향을 보임. 설사지수에서는 T처리구가 1주차, 2주차에 가장 낮은 경향을 보였고 전 기간에서는 T처리구와 ZnO처리구가 가장 낮은 수치를 나타냈고 T, ZnO, ED처리구는 CON대조구보다 감소하는 경향을 확립함.(그림 16 오른쪽) 뿐만 아니라 혈액 내 면역세포를 분석하기 위해 농도구배방식을 이용하여 혈액에서 Peripheral blood

mononuclear cell (PBMC)를 분리하였고, 혈액 내 선천성 면역세포 및 획득성 면역세포의 비율과 면역 활성을 분석한 결과 그룹 간 큰 변화가 없음을 확인하여 혈액 내 면역 활성에는 큰 변화를 유도하지 않음을 확인함. (Data not shown) 기존 사료 첨가제에 들어가는 생균제와 박테리오파지를 2주 간 혼합 급여 한 뒤 이유 자돈의 백신 특이적 반응을 확인함.(그림 14) 이유자돈에게 투여되는 Mycoplasma, Circovirus, PRRSV, Haemophilus parasuis 등에 대한 백신에 대한 특이적 T 세포 반응성을 CFSE staining을 통해 확인하였으나, 대장균 타겟 박테리오파지를 처리한 그룹에서 대조군과 비교하였을 시 기존 백신에 대한 특이적 반응이 유도되지 않음을 확인하여 백신 반응에 있어서 면역활성을 증진시키지는 못하는 것으로 판단됨 (Data not shown).

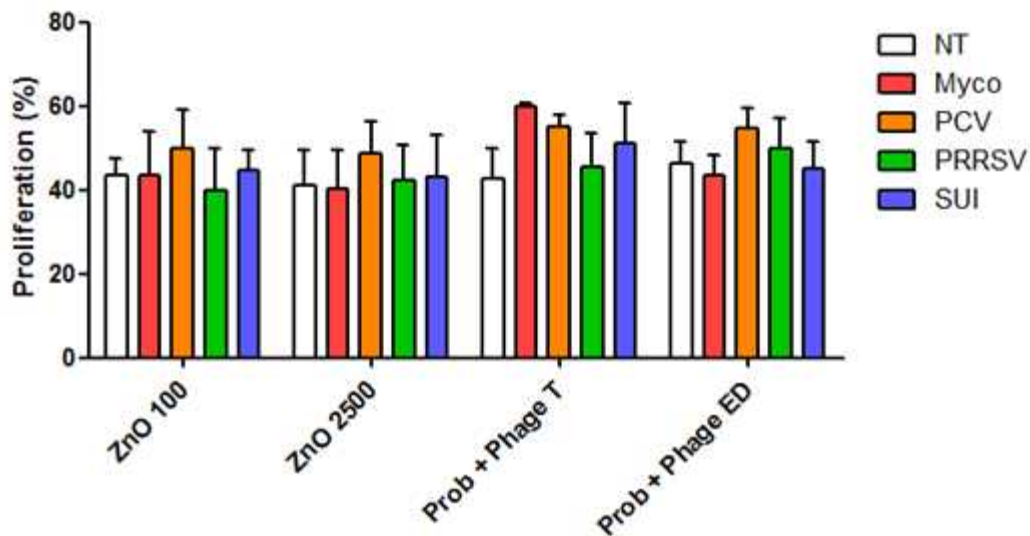


그림 14 백신 특이적 T세포 증식 변화

또한 장내 정상 세균총 교란 시험을 위해 박테리오파지의 경구투여가 장내 정상 세균총의 분포에 미치는 영향을 검사하여 박테리오파지 투여의 부작용 여부를 평가함. 이유자돈의 분변을 채취하여 next generation sequencing(NGS)을 이용한 metagenomics 기술을 활용하여 대조군과 비교한 장내 세균총의 변화를 관찰한 결과 생균제 처리(Before vs EF+ T or EF+ ED)에 의해 Proteobacteria인 Betaproteobacteria가 증가하였으나 대장균 박테리오파지(EF+ T vs EF+ ED)에 의한 특이적인 변화는 보이지 않았음.(그림 15)



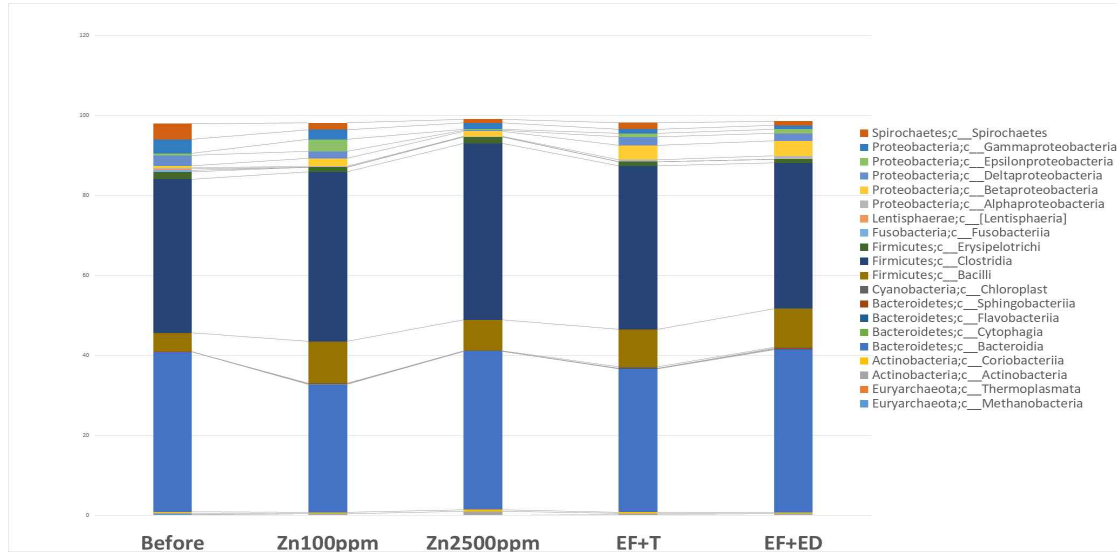


그림 15 이유자돈 분변 내 미생물 균총 분석

Item	CON <sup>(1)</sup>	ZnO <sup>(1)</sup>	Probiotics EF		SEM	Contrast		
			+T <sup>(2)</sup>	+ED <sup>(3)</sup>		CON <sup>(2)</sup>	ZnO <sup>(3)</sup>	T vs. ED <sup>(4)</sup>
<b>Body weight (kg)</b>								
Day 0	5.23	5.78	5.54	5.52	0.274	0.38	0.47	0.96
Day 7	6.41	7.33	6.69	6.73	0.363	0.52	0.18	0.94
Day 14	8.83	9.60	8.93	9.12	0.418	0.69	0.28	0.75
<b>ADG (g)</b>								
Days 0-7	169	221	164	172	27.0	0.97	0.12	0.84
Days 7-14	344	325	321	343	21.6	0.64	0.80	0.47
Days 0-14	257	273	242	258	19.6	0.78	0.34	0.59
<b>ADFI (g)</b>								
Days 0-7	252 <sup>a,b</sup>	295 <sup>a</sup>	219 <sup>a</sup>	244 <sup>a,b</sup>	23.2	0.48	0.04	0.45
Days 7-14	606 <sup>a,b</sup>	685 <sup>a</sup>	573 <sup>a</sup>	574 <sup>a</sup>	36.8	0.49	0.02	0.98
Days 0-14	429 <sup>a,b</sup>	490 <sup>a</sup>	396 <sup>a</sup>	409 <sup>a</sup>	27.5	0.44	0.02	0.74
<b>Gain:feed</b>								
Days 0-7	0.664	0.750	0.730	0.702	0.0695	0.55	0.70	0.78
Days 7-14	0.573 <sup>a,b</sup>	0.484 <sup>b</sup>	0.561 <sup>a,b</sup>	0.605 <sup>a</sup>	0.0364	0.82	0.04	0.41
Days 0-14	0.602	0.566	0.611	0.633	0.0365	0.66	0.23	0.67
<b>Fecal consistency score<sup>(5)</sup></b>								
Day 0	1.14	1.14	1.00 <sup>a</sup>	1.57	0.249 <sup>(6)</sup>	Not applicable		
Day 7	1.29	1.43	1.71 <sup>a</sup>	1.86				
Day 14	1.29	1.14	1.00 <sup>a</sup>	1.57				
Overall <sup>(7)</sup>	1.24	1.24	1.24	1.67	0.110	0.23	0.23	0.04

<sup>(1)</sup>Weanling pigs were fed a nursery diet supplemented with 100 mg ZnO (CON), 2,500 mg Zn/kg as ZnO (ZnO),  $1 \times 10^{10}$  cfu of *Enterococcus faecium* (EF) with  $1 \times 10^8$  cfu *Salmonella typhimurium*-T) or  $1 \times 10^8$  cfu *E.coli* K88, K99, F18-specific bacteriophage (ED) per kg diet, respectively, for 14 days. Data are means of 7 animals.  
<sup>(2),(3),(4)</sup>P values for Probiotics vs. CON, probiotics vs. ZnO, and ED vs. EP within probiotics, respectively.  
<sup>(5)</sup>Fecal consistency was scored subjectively: 1, normal firm feces; 2, soft feces; 3, diarrhea.  
<sup>(6)</sup>Applies to all day  $\times$  treatment combinations.  
<sup>(7)</sup>Effects of the day and day  $\times$  treatment were 0.09 and 0.87, respectively.  
<sup>(a),(b)</sup>Means with no common superscript within a row differ (P < 0.05).  
<sup>(1),(2)</sup>Means with no common superscript within a column differ (P < 0.05).

Item	CON	ZnO	Probiotic		SEM	Contrast		
			+T	+ED		CON <sup>(2)</sup>	ZnO <sup>(3)</sup>	T vs. ED <sup>(4)</sup>
<b>Body weight (kg)</b>								
Day 0	7.02	6.94	7.04	6.73	0.238	0.64	0.85	0.37
Day 7	7.56	7.70	7.78	7.23	0.289	0.89	0.60	0.20
Day 14	9.40	9.89	9.90	9.48	0.364	0.53	0.66	0.43
<b>ADG (g)</b>								
Days 0-7	77	108	101	75	20.1	0.65	0.42	0.38
Days 7-14	253 <sup>a</sup>	313 <sup>a</sup>	303 <sup>a,b</sup>	321 <sup>a</sup>	19.5	0.02	0.95	0.52
Days 0-14	167	211	202	198	16.0	0.10	0.59	0.87
<b>ADFI (g)</b>								
Days 0-7	168	173	168	161	11.5	0.85	0.55	0.68
Days 7-14	302	329	374	370	24.3	0.04	0.17	0.90
Days 0-14	234 <sup>a</sup>	251 <sup>a,b</sup>	269 <sup>a</sup>	260 <sup>a,b</sup>	10.6	0.04	0.33	0.57
<b>Gain:feed</b>								
Days 0-7	0.443	0.538	0.498	0.437	0.0962	0.84	0.56	0.66
Days 7-14	0.933	1.004	0.820	0.865	0.0945	0.45	0.19	0.74
Days 0-14	0.749	0.841	0.747	0.764	0.0544	0.92	0.22	0.83
<b>Fecal consistency score<sup>(5)</sup></b>								
Day 0	1.06 <sup>a</sup>	1.03 <sup>b</sup>	1.06 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	0.150 <sup>(6)</sup>	Not applicable		
Day 7	1.94 <sup>a,b</sup>	1.69 <sup>a,b</sup>	1.53 <sup>a,b</sup>	1.81 <sup>a,b</sup>				
Day 14	1.52 <sup>a,b</sup>	1.28 <sup>a,b</sup>	1.19 <sup>a,b</sup>	1.26 <sup>a,b</sup>				
Overall <sup>(7)</sup>	1.51 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.41 <sup>a</sup>	0.061	0.02	0.96	0.09

<sup>(1)</sup>Weanling pigs were fed a diet containing 125 mg ZnO (100 mg Zn/kg supplemented with none (CON), 3,000 mg ZnO/kg (ZnO), or  $1 \times 10^{10}$  cfu of *Enterococcus faecium* (probiotic) plus  $1 \times 10^8$  pfu of *Salmonella typhimurium*-specific bacteriophages (T) or three strains of bacteriophages specific to *Escherichia coli*/K88, K99, and F18 (ED), respectively, with  $1 \times 10^8$  cfu per strain, per kg diet. Data are least squares means of 4 pens, with 8 piglets per pen.  
<sup>(2),(3),(4)</sup>P values for probiotic vs. CON, probiotic vs. ZnO, and T vs. ED, respectively.  
<sup>(5)</sup>Fecal consistency was scored subjectively: 1, normal firm feces; 2, soft feces; 3, diarrhea.  
<sup>(6)</sup>Applies to all day  $\times$  treatment combinations.  
<sup>(7)</sup>Effects of the day and day  $\times$  treatment were <0.01 and 0.51, respectively.  
<sup>(a),(b)</sup>Means with no common superscript within a row differ (P < 0.05).  
<sup>(1),(2)</sup>Means with no common superscript within a column differ (P < 0.05).

그림 16 이유자돈에서의 성장지표 변화

<제1협동 연구>

유용 미생물 특성 분석 실험

- E.coli K88,K99 박테리오파지 및 숙주, DNA 정보 서울대학교 제공
- 기존 사료 첨가제 생균제 대체를 위한 미생물 분리 및 기 보유 균주에 대한 16S rRNA 분석

No.	Sample Name	16s rRNA 분석 결과	비고
1	RC, Pig8	<i>Lactobacillus casei</i>	
2	InD-1,BC2015	<i>Bacillus coagulans</i>	
3	PSB-CTC	<i>Rhodobacter sp.</i>	
4	CSO-1	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	
5	CSO-2	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
6	LR3,LR4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
7	LS-CK-01	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
8	Lac23,CLP0611,Lac113,Lac74	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
9	S1	<i>Pediococcus acidilactic</i>	
10	Lac116,Lb116,Pig43,Pig45,Pig82,Pig106,Pig107,Pig46,pig80	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
11	Pig 52	<i>Enterococcus faecalis</i>	
12	Pig 87	<i>Enterococcus faecium</i>	
13	Leu511	<i>Lactobacillus sakei subsp.</i>	
14	Lac238,Lac57	<i>Lactobacillus brevis</i>	
15	Lac251,Leu38,Lac103,Lac107,Leu44	<i>Weissella sp.</i>	
16	Leu51,Str26,Str30	<i>Leuconostoc sp.</i>	
17	LR4, ELF	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
18	다수	<i>Bacillus sp.</i>	

이외 추가 균주 분리 및 유용 미생물 스크리닝을 지속적으로 진행하고 있음.

- 기 보유 균주 또는 신규 분리 균주를 대상으로 각 미생물의 내산성, 내열성, 내담즙성 등 1 차 특성 파악을 위한 실험 진행하였음.
- *Lactobacillus* - *baginalis*, *johnsonii*, *reuteri*, *salivarius*, *plantarum*에 대한 내산성 실험을 진행하였음.
- *Bacillus coagulans* 내산성 내열성 내담즙성 실험 완료 하였으며, 장기 안정성 평가를 진행하였음.
- 선별 균주 대상 내산성, 내열성 등을 진행하여 유용미생물로 사용가능성을 판단하고자 함.

▶ *Bacillus coagulans*(BC2015) 내열성, 내산성, 장기 안정성

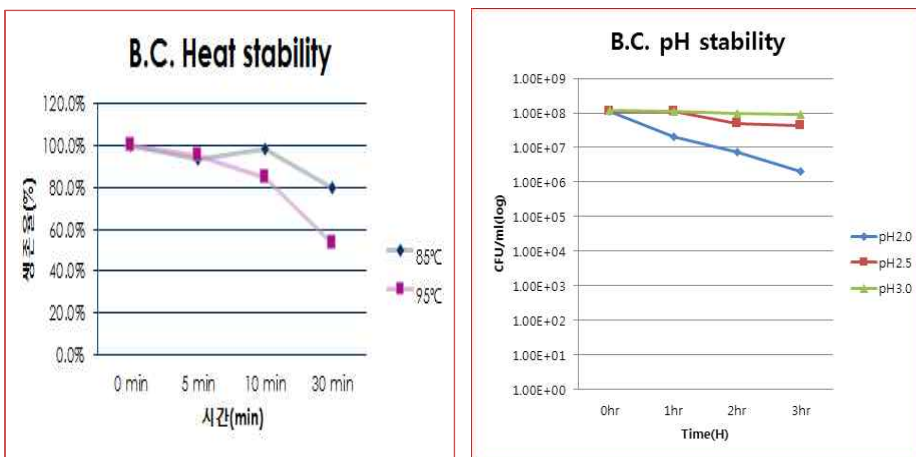


그림 17 BC열안정성 및 pH안정성

## BC 장기 안정성 평가

	0일차	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
25도	3.68E+08	3.73E+08	3.50E+08	3.10E+08	3.00E+08	2.80E+08	2.70E+08
45도	3.68E+08	3.94E+08	3.80E+08	3.30E+08	3.10E+08	2.50E+08	1.50E+08
생존율(%)25	100.0%	101.4%	95.1%	84.2%	81.5%	76.1%	73.4%
생존율(%)45	100.0%	107.1%	103.3%	89.7%	84.2%	67.9%	40.8%



그림 18 BC 장기 안정성

- *Bacillus coagulans*는 내산성에서 pH2.5이상에서 3시간동안 50%이상으로 매우 안정적이었으며, 내열성 또한 80℃에서 30분간 80%를 유지하였다. 장기안정성의 경우 25℃, 45℃에서 비교하였으며, 9개월간 관찰한 결과 다른 유산균에 비해 비교적 안정적으로 생존수를 유지하고 있었다.

하지만, *Bacillus coagulans*를 scale-up 과정에서 포자 형성율이 80% 선을 유지하였으며, 대량배양에 있어 배지 최적화 및 생존수 증가가 미비하여 추가 연구가 필요함.

### ▶ *L. reuteri* (LR4) 내열성, 내산성 실험

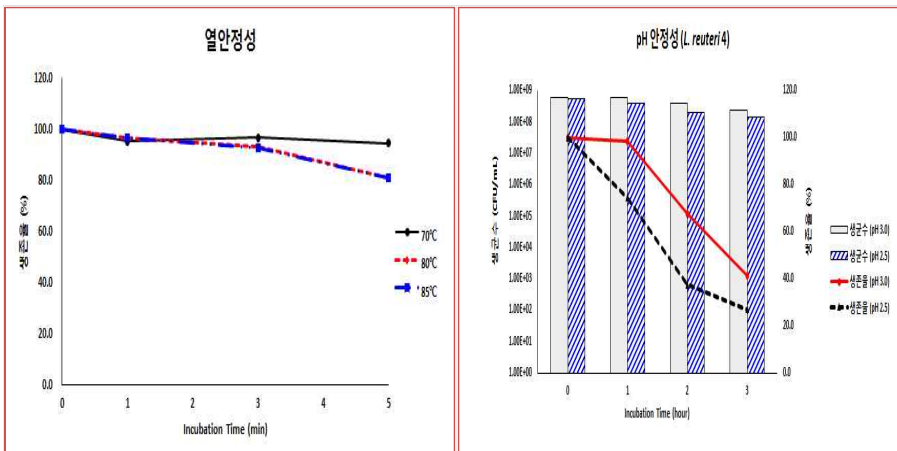


그림 19 *L. reuteri* (LR4) 내열성, 내산성

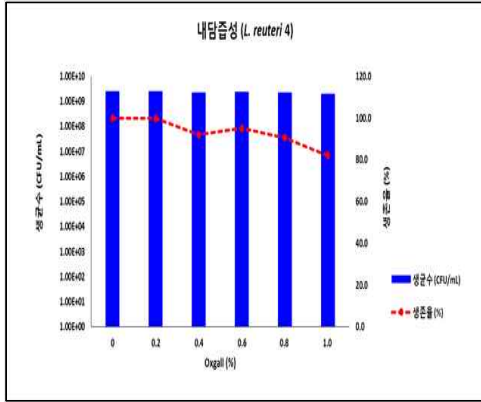


그림 20 *L. reuteri* 내담증성

▶ *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus vaginalis* 내산성 실험

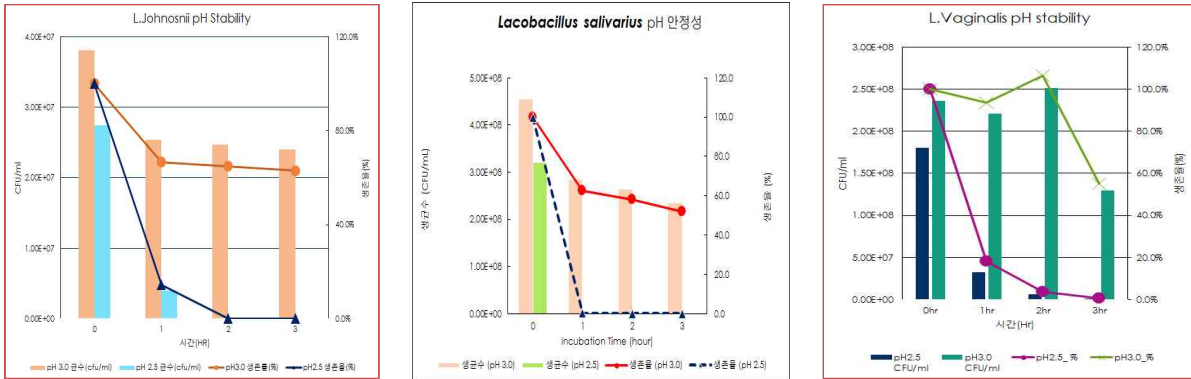


그림 21 *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus vaginalis* 내산성

유산균 항균활성		<i>L. salivarius</i> CK-01	
No.	병원성 균주	Cell	
1	Salmonella	Typhimurium	++
2		Gallinarum	+++
3		Dublin	++
4		Choleraesuis	+
5		Enteritidis	++
6	Staphylococcus	aureus	++
7		F41	+
8	E. coli	K88	+
9		K99	+
10		F18 (태원)	+
11	Pasteurella	multosida	+
12	Bodetella	Bronchiseptica	?
13	Streptococcus	Suis	+
14		Pararuberis	+
15	Edwardsiella	Iniae	+
16		Tarda	+
17	Vibrio	Parahaemolyticus (VET)	?
18		sp. (제주)	?

유산균 항균활성		<i>L. vaginalis</i> CK-04	
No.	병원성 균주	Cell	Inhibition size (mm)
1	Salmonella	Typhimurium	+
2		Gallinarum	+
3		Dublin	+++
4		Choleraesuis	+
5		Enteritidis	++
6	Staphylococcus	aureus	++
7		F41	+
8	E. coli	K88	+++
9		K99	+
10		F18 (태원)	+
11	Pasteurella	multosida	++
12	Bodetella	Bronchiseptica	++
13	Streptococcus	Suis	+
14		Pararuberis	+++
15	Edwardsiella	Iniae	+++
16		Tarda	+
17	Vibrio	Parahaemolyticus (VET)	+++
18		sp. (제주)	++

유산균 항균활성		<i>L. bulgaricus</i> J2-1	
No.	병원성 균주	Cell	Inhibition size (mm)
1	Samonella	Typhimurium	+
2		Gallinarum	++
3		Dublin	++
4		Choleraesuis	++
5		Enteritidis	++
6	Staphylococcus	aureus	++
7		F41	+
8	E. coli	K88	++
9		K99	+
10		F18 (태원)	+
11	Pasteurella	multosida	++
12	Bodetella	Bronchiseptica	++
13	Streptococcus	Suis	+
14		Pararuberis	++
15	Edwardsiella	Iniae	+++
16		Tarda	++
17	Vibrio	Parahaemolyticus (VET)	++
18		sp. (제주)	++

유산균 항균활성		<i>L. lactis</i> YF 5-1	
No.	병원성 균주	Cell	Inhibition size (mm)
1	Samonella	Typhimurium	+
2		Gallinarum	+
3		Dublin	+
4		Choleraesuis	+
5		Enteritidis	+
6	Staphylococcus	aureus	+
7		F41	+
8	E. coli	K88	+
9		K99	+
10		F18 (태원)	+
11	Pasteurella	multosida	+
12	Bodetella	Bronchiseptica	+
13	Streptococcus	Suis	+
14		Pararuberis	+
15	Edwardsiella	Iniae	+
16		Tarda	+
17	Vibrio	Parahaemolyticus (VET)	+++
18		sp. (제주)	+

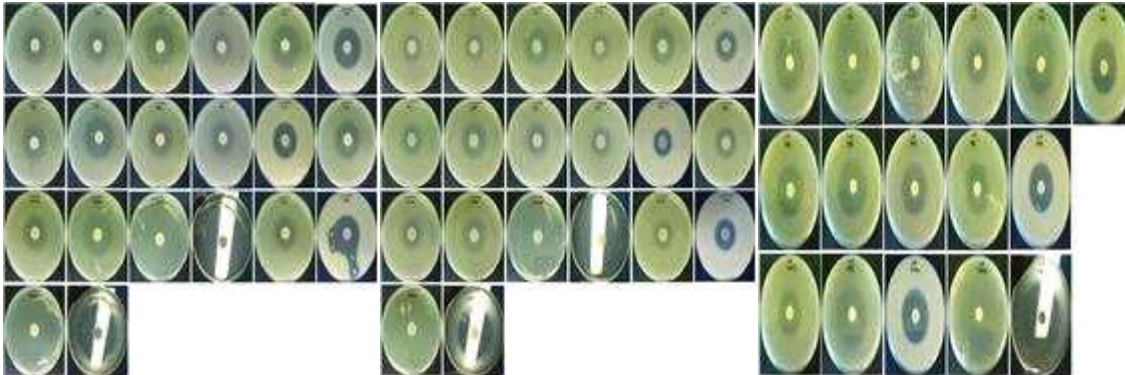


그림 22 *L. reuteri* / *L. vaginalis* / *L. plantarum* 항균력 시험

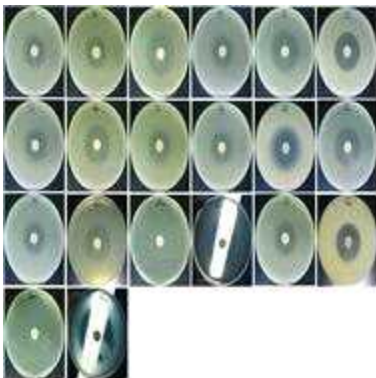


그림 23 *L. bulgaricus* 항균력 시험

- 본 과제를 통해 스크리닝한 여러 균주에 대한 특성을 파악하였으며, pH3.0이상에서 50%이상 비교적 안정적으로 생존수를 유지 하는 미생물들을 선별하였다.

- *E. coli* / *Salmonella* sp. / *Staphylococcus aureus* / *Pasteurella multocida* / *Bodetella bronchiseptica* / *Streptococcus iniae* / *Edwardsiella tarda* / *Vibio* sp. 등 다양한 종류의 축산, 수산에서 질병을 유발하는 미생물에 대한 항균력 실험을 진행하였으며, 광범위하게 항균력을 나타내고 있다.

○ *Bacillus subtilis*

- 2종에 대한 배양성 및 포자화 배지 선별
- 자사 보유 중 *Bacillus subtilis*에 대한 배양성 평가((Flask scale)
- 자사 보유 *Bacillus* sp. 에 대한 특성 파악
- 신규 분리 *Bacillus lichemiformics* 특성 분석

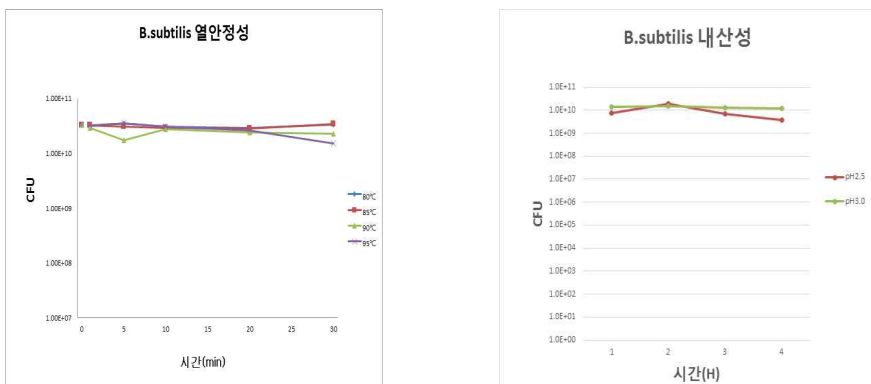


그림 24 *Bacillus subtilis* 열안정성 내산성

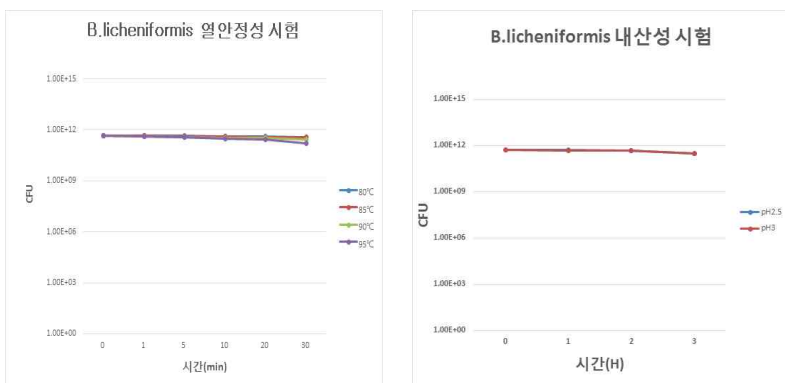


그림 25 *Bacillus lichemiformics* 열안정성 내산성

- *Bacillus* sp.의 경우 포자 형성을 유도하여 내열성 내산성을 평가하였다.

포자 형성으로 인해 내열성과 내산성은 타 유산균에 비해 월등히 높았으나, 항균력에서 유산균에 비해 낮은 항균력을 보였으며, 추후 사료 첨가제로 유산균과 혼합하여 정장작용



에 용이한 균으로 사용할 수 있을 것으로 보임.

○ E.faecium 기 보유 유산균 장기 안정성 평가

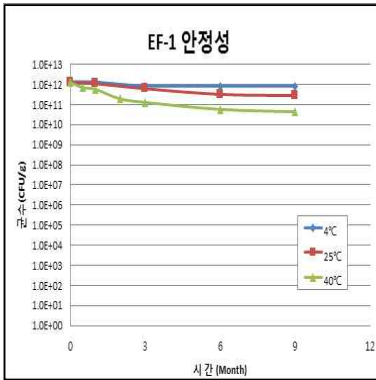


그림 26 EF 장기 안정성 평가

- 기 보유 *Enterococcus faecium*에 대한 장기 안정성을 평가하였으며, 타 유산균에 비해 비교적 안정성이 높은 것으로 판단되어 시제품에 1차 적용하는 미생물로 선별하였음.
- EF는 냉장보관에서는 6개월간 62.0%이상 유지하였으며, 상온(25°C)에서는 25.7%를 유지함.
- 다소 온도가 높은 가속시험 구간인 40°C에서는 4.3%로 나타남. 상온에서 6개월간 25%수준으로 기존 자사에서 보유한 *Lactobacillus* sp.보다는 다소 높은 안정성을 나타냄.

**사료첨가제 사용 후보 미생물 배양성 실험**

○ *L. reuteri* 배양성 평가

- 배지 최적화(락토즈, 포도당, yeast extract, soy peptone 등의 최적 농도 평가)
- 온도, pH 최적화 실험
- 상업 배지를 이용한 배양 scale-up 및 기존 *L. reuteri* 와 비교

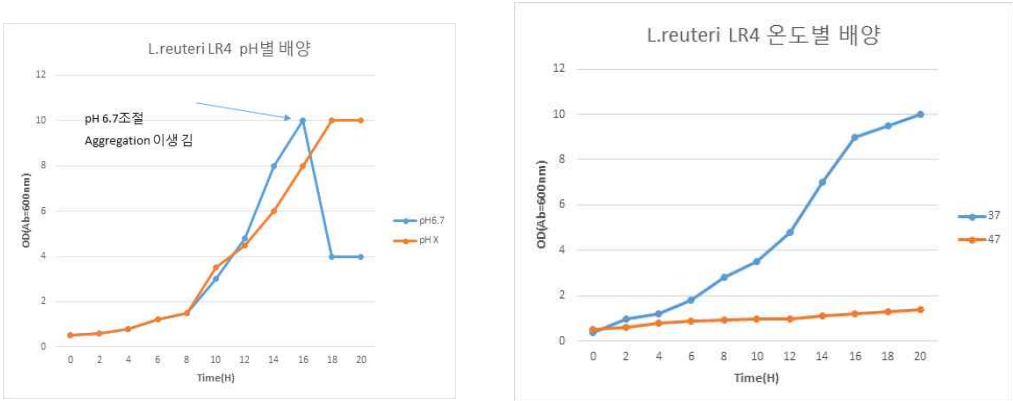


그림 27 *L. reuteri* LR4 50L Scale-up (온도 및 pH)

- 생육 최적 온도를 높여 장기 안정성 향상을 위해 실험하였으나, growth에 문제가 있어 추가 온도 변화를 주어 실험 중에 있음
- pH를 회수 4시간 전 6.7로 조정하여 배양 했을 시 안정성 향상에 도움을 준다는 자료를 토대로 하여 배양을 진행하였으며, pH 상승으로 유산균이 뭉치는 현상이 나타났으며, 최종 titer 는 2.0E+9 cfu/ml로 생산 균주와 큰 차이는 없었으며, 뭉치는 현상에 대한 원인을 찾기 위해 배양 조건을 변화 시켰으며, cell cake를 회수하여 동결건조를 진행하였음.

○ *Enterococcus faecium* 배양성

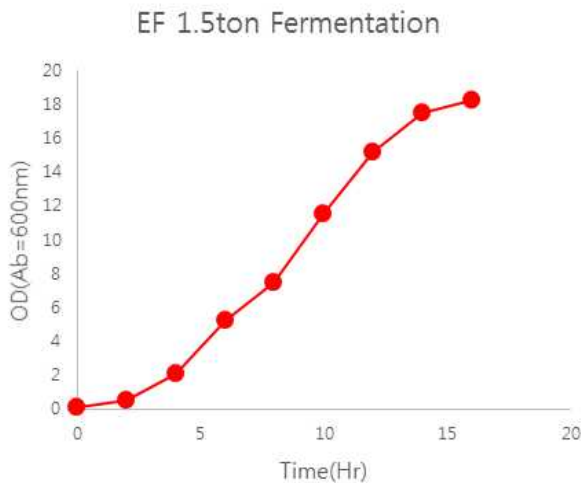


그림 28 EF - 1.5 KL 배양성 평가

기존 사료 첨가제로 사용하고 있는 EF / LP에 대한 16s rRNA을 진행하였으며, 1.5KL 상업용 배양을 통해 사료 첨가제로 생산함. EF의 경우 배양시간은 15~20 시간 정도이며, OD 15~20에서 회수하는 것이 가장 적절한 생산성을 보임. EF의 경우 최종 4.0E+9 cfu/ml 수준을 보였으며, 회수량 및 공정별 과정은 하단에 표기함.

○ *Enterococcus faecium* 안정성 평가 자료

자사에서 사용하고 있는 사료 첨가용 생균제중 *Enterococcus faecium*(이하 EF)의 장기 안정성 평가를 진행함. EF는 유아의 분변, 된장 등에서 분리 되며, 유산균의 일종으로 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 가지며, 내산성, 내담즙성 및 면역 증강 효과가 우수한 것으로 알려져 있음. 이러한 EF는 의약품, 건강식품, 유산균제제, 사료첨가제 등으로 사용하고 있으며, 본 과제를 통해 사료 첨가제로서의 재평가를 실시함. 대표적인 사료 첨가제 유산균으로 다양한 용도로 사용되고 있음. 본 과제에서 사용한 사료 첨가제용 EF는 높은 생산성 및 배양의 용이성이 있어 우선적으로 사료 첨가제용으로 개발 하고자 한다. EF를 동결건조하여 장기 안정성 평가를 다음과 같이 진행함. 동결건조 후 분말을 사용하여 최소 6개월간 저온, 상온, 고온에서 장기 안정성을 평가하였음.



○ *Enterococcus faecium* 공정별 수율

EF의 1.5KL 생산용 퍼멘터를 이용하여 배양, 회수, 동결건조를 진행하였으며, 각 공정의 회수율을 상단의 표와 같다. 전체적으로 회수율이 높게 나왔으며, 이는 실험자의 오차로 생각되며 최종적으로는 80%이상의 회수율을 보임 (표 3). 이는 다른 자사에서 배양한 *Lactobacillus* sp.의 공정 수율 보다 약간 상회하는 수치임. 본 과제에서 사용할 시료를 만들기 위한 배양을 진행하여 최종 1.0E+11 cfu/g 이상의 샘플을 제작함.

공정별 수율

공정	생산량(g)	g당 균수	총균수	회수율(%)	공정간회수율(%)
Main	1,000,000	6.25E+09	6.25E+15	100.0%	
Cell cake	8,520	7.65E+11	6.52E+15	104.28%	104.28%
FD 전	12,800	6.30E+11	8.06E+15	129.02%	123.72%
FD 후	3,420	2.69E+12	9.20E+15	147.20%	114.08%
분쇄 후	3,300	3.48E+12	1.15E+16	183.74%	124.83%

○ *Lactobacillus plantarum* 1.5KL 배양성 평가

본 연구를 위해 자사에서 사용하는 *Lactobacillus* 계열의 사료 첨가제인 *Lactobacillus plantarum*의 1.5KL 배양을 실시하였으며, 본 배양을 통한 최종 생산물을 가지고 6개월 장기 안정성 평가를 진행함. 저온에서는 35%, 25℃에서는 9%, 40℃에서는 0.1%대의 안정성을 보였으며, 앞서 언급한 EF 보다는 다소 낮은 안정성을 보였다. *Lactobacillus* 계열의 유산균은 안정성은 다소 낮지만, 항균력이 높아 사료 첨가제로 다양하게 사용되고 있음. 추가적인 연구를 통해 안정성을 높일 수 있는 부형제 변경, 코팅 등의 방법을 고려해야 할 것으로 보임

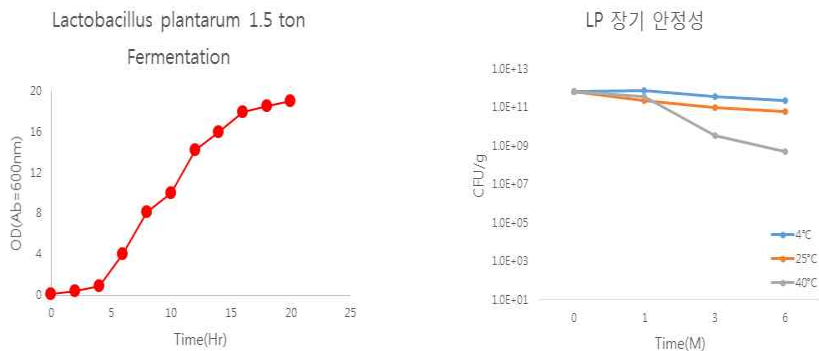


그림 29 *Lactobacillus plantarum* fermentation & 장기 안정성

○ *Lactobacillus plantarum* 공정 수율

*Lactobacillus plantarum*의 공정별 회수율을 보면 EF 와 마찬가지로 다소 높게 평가 되었으며, 보편적인 회수율은 70%이상을 나타냄. 하지만, EF와의 비교에서도 마찬가지로 사료 첨가제로 제조하기 위한 원료의 안정성은 EF가 다소 높은 것으로 판단되며, 추후 신규 유용 미생물을 분리하여 장기 안정성이 높은 미생물을 찾아 박테리오파지와 함께 사용한

다양한 균주를 분리 동정 할 예정임.

공정별 수율

공정	생산량(g)	g당 균수	총균수	공정총균수	회수율(%)
Main	1000000	1.27E+09	1.27E+15	1.27E+15	100.0%
Cell cake	6020	1.61E+11	9.69E+14	9.69E+14	76.3%
FD 전	8600	2.01E+11	1.73E+15	1.73E+15	136.1%
FD 후	2870	6.10E+11	1.75E+15	1.75E+15	101.3%

○ EF / LP 배지 최적화 평가

현재 사료첨가제로 사용하고 있는 EF/LP의 배지 최적화를 Glucose / Yeast extract 에 관하여 실시하였으며, 기존에 사용하는 상업용 배지를 기초로 하여 당농도와 Yeast 농도를 재설정함. 기타 미네랄 성분은 상업용 배지의 성분표를 참고로 하여 농도 변경과 함께 당 농도 및 Yeast 농도를 변경하여 Flask 실험을 한 뒤 1.5KL 에 적용함.

○ EF / LP 동결 보호제 평가

각 균주의 동결건조는 현재 사용하고 있는 기본 동결건조 보호제를 기초로 사용하였으며, Skim milk를 기반으로 하는 성분 조성을 사용함. 이는 상업용으로 사용하는 배지이기에 성분표는 미작성 하였음을 밝힘.

○ *Bacillus coagulans* 배양성 평가

- *Bacillus coagulans*는 5L jar 배양을 통해 얻은 cell을 동결건조(동결보호제 사용안함)를 PBS buffer나 멸균수를 이용하여 순수한 균체만을 동결건조 하였으며, 장기안정성 평가를 위해 옥분, 탄칼 등의 부형제와 혼합하여 상온과 고온에서 안정성 평가를 진행함. *Bacillus coagulans*는 배양온도가 45℃도로 다른 미생물에 비해 고온이며, 포자를 형성하여 7개월간의 보관안정성에서 70% 이상을 유지하는 안정성을 보임.

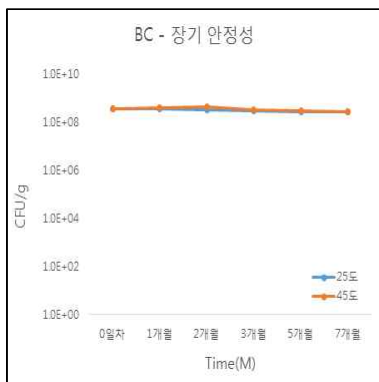
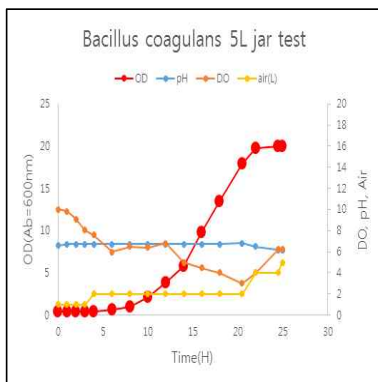


그림 30 *Bacillus coagulans* jar-fermentation & 장기 안정성

*Bacillus coagulans*를 포자 형성을 위해 starch기본 배지를 이용하여 배양을 진행하였다. *Bacillus coagulans*를 최종 회수율은 73% 수준을 보였으며, 포자 형성율은 80% 이상을 나타내었음. 이를 500L Fermenter를 이용하여 Scale-up을 실시하였으나, 포자 형성율이

저조하여 추가 연구를 진행하고 있음. Scale-up에 성공한다며, 안정성이 매우 뛰어난 사료첨가제용 생균제를 대량 생산할 수 있을 것으로 보임.

***E. coli* K88, K99 박테리오파지**

- *E. coli* K88, K99 대응 박테리오파지 및 숙주, DNA 정보

▷ 박테리오파지 DNA 정보

*E. coli* K88 박테리오파지 서열분석(일부표기)

GCAAAAATTG CAGCAAAGAT AAATTTTTTC ATGATAATCT CCTCAGTAGT  
TTATGTTTAT AGTATCTCAA TTTTCAACAA AAGTAAACAC TAGTAGAAGC  
AAACAGACAA ATTACAATAA TTGGTGATTT CAGTTTCATT CTTCTCCTCC  
ATGTTGATGA ACATATTCTT TTTCAAGTCT AGAGCACAAAG TTTTCATATT  
CAACTAATAA AAATGAATCA AGTGCGTTAT TTCTATGCTG ACACCGTTCT  
TGTAAGAAT CCATCTCTGA ACGTTGTTCT TGTGTTAATA ATTGATAACC  
TGATACTTTA GACATTTTAT TCTCCATTTA CTCGTTTGTG TTGATAGGTC  
TATAATAACA TGTTTAAAAC AAAAGTAAAC TATTTTATTT CCTCAAGTTC  
GTTAATCAAT AAAAGTTCTC TGACGCTAAA AACAAAGAAA  
AATGTGTTCC.....

*E. coli* K99P-1 박테리오파지 서열 분석(일부표기)

TATAATCCCACTTAGATGGCAGGGCCGTCTCCTATGTTGCCGATGGTCGGCGCATATG  
CACAAAAGGGCTTATATCATGGCAGAAATTAAGTTAAAGGCCGTCGAGCTAAACT  
GGACGGACGAGTAGCAGTTACCCCGCGCCGTAAACCAGGCGAGCAAACCGAGCATA  
CCAATCTCGGACCTGAAATCGAGTACGAAAGCGCCGTAAAGGCGGCAAATGTGGA  
CGCCCTACTGACTACCGATCCGTTTACTGCGACCAGCTTCGCCGCTATTTTGCCGA  
CGCCGACGCCTGGCAGGTCAACTACTCCGATAAAGGCGCTGCGCAAGTAATCCCCCG  
CAACAAAATGCCAACCTTCGGCAGATTTGCCGCGGAAATAGGTGTGGGCGTTGCCT  
GCCTGTACCGCTGGGCGCGGCACATGAGGAGTTCGCCGAGGCTATGGCGGACGCT  
ATGGAATTGCAGAAAATTTCTGATGGAAGCTGGCGGCGTGACTATCGCGGCAGG  
CTTCGCGACCTTCCTGCTCAAAGCCAACCACGGCGTACGCGACGATATCCCACTGGA  
TGACGACGAAGATGATAACGGCGACGTCGTTGTCGAACCTACCGGCAAAGGCCAGG  
GCGAATAATGCGTAACTATGCTGCAGAACACCGCGCACTGGAACGCGCGATCGCGA  
AGCGCAACCGACCACCGCGCCCGACACGCGTTGCGCAGGCGGTGCGGCTTTACCAGC  
CTGATTGCCTACCGCACCAGGTGCAACTACTGCGGGACACGAAGACTAAAATCCTC  
GGCCTGTGTTCCGGCTTCGGCGGCGGCAAGTCATGGGTGCGCAGCCC.....

- 본과제에서 진행하여 1차년도에 추가 파지 선별을 통한 시제품 생산을 위해 Salmonella sp.에 대한 박테리오파지를 추가 할 것을 검토 하여 파지 분리 및 기 파지 사용 여부를 결정할 것임.

**박테리오파지 분리 및 감수성 평가**

□ 박테리오파지 분리 및 감수성 평가

- 대장균 박테리오파지 및 살모넬라 박테리오파지의 감수성 평가를 진행하여 클리어한 플라크를 확인하였고, 자사 QC를 통해 Titer를 확인 하였다.
- 각각의 박테리오파지에 대한 숙주균의 감수성 평가를 진행하여 실험실상에서 숙주균의 감소를 확인 할 수 있었다.

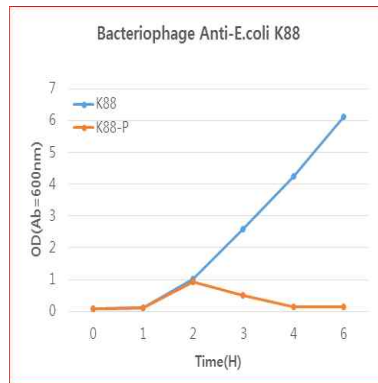
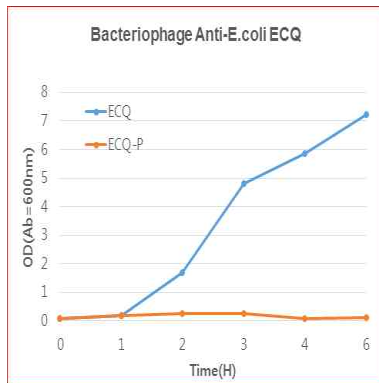
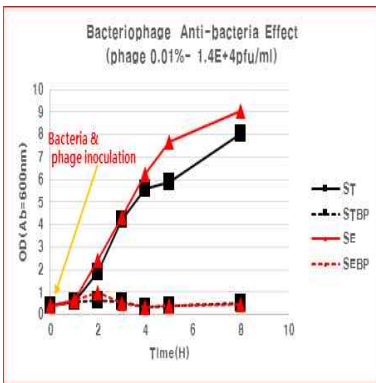


그림 31 살모넬라 & 대장균 박테리오파지 감수성 시험

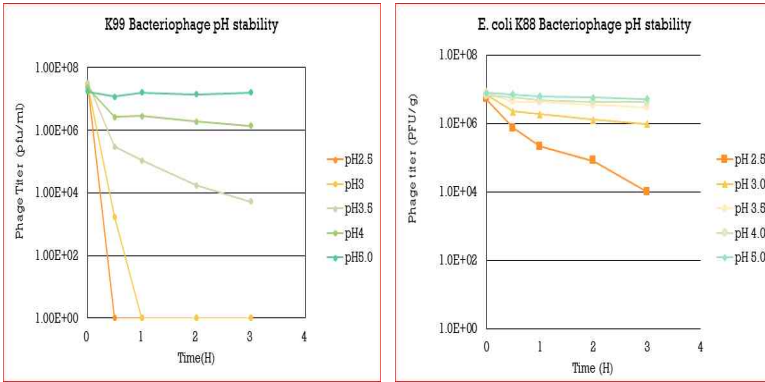


그림 32 대장균 박테리오파지 pH 안정성 평가

- 기 보유 및 신규 파지에 대한 숙주 감수성 실험 결과 위 그래프에서 보듯이 일정시간 이후 대조군에 비해 OD의 급격한 감소를 확인 할 수 있었으며, 플라크 확인 결과도 상단의 그림과 같이 명확하게 클리어한 플라크가 형성됨을 확인할 수 있었음.
- 대장균 박테리오파지의 pH안정성은 pH 3.0이상에서 일부는 안정하나 일부는 pH4.0이상으로 안정함을 보였다. pH 안정성 증진을 위해 동결건조 보호제 및 제형 변경을 통한 안정성 증진 연구중에 있음.

**혼합생균제와 박테리오파지의 QC 범 정립**

○ 사료 Top Agar Assay (*E. coli* specific bacteriophage)

<1일차: Bacterial Seed Culture>

- [1] 50 ml conical tube에 TSB 배지 20 ml을 첨가 (오후 5시 전후에 시작)
- [2] 1항에서 준비한 것에 bacterial glycerol stock(*E.coli*) 20  $\mu$ l를 첨가 (bacterial glycerol stock은 충분한 개수를 준비해 두고 사용하며, 되도록이면 3회까지만 freezing/thawing사용)
- [3] 37 $^{\circ}$ C에서 200 rpm으로 O/N shaking culture

<2일차: Plaque Assay>

[박테리오파지 시료 희석액 준비]

- [1] Titer를 조사할 고휘 시료에 대하여 다음의 처리를 하여 박테리오파지 액을 준비한다.
  - ① 박테리오파지 액 (이를 “top agar assay 시료”라 한다.) 0.1 ml을 사용하여 serial dilution을 다음과 같이 실시한다.

- (1) SMT buffer 사용;
- (2) Tip은 매 희석 단계마다 교체;
- (3)  $10^8$  pfu/ml 이상의 titer가 예상되는 시료의 경우는 "top agar assay 시료"의  $10^6$  dilution까지는 "10-2dilution" 방식으로 dilution을 실시하고 그 이후는 "10-1dilution" 방식으로 dilution을 실시;
- (4)  $10^6$  pfu/ml 미만의 titer가 예상되는 시료의 경우는 "top agar assay 시료"를 "10<sup>1</sup>dilution" 방식으로 dilution을 실시;
- (5) 10초 vortexing 하고 10초 방치하는 방식으로 실시

<10-2dilution 방식>

"Top agar assay 시료" 또는 앞 단계 희석액 0.1 ml을 9.9 ml의 SMT buffer에 첨가하는 방식으로 실시하는 희석 (15 ml conical tube 사용)

<10-1dilution 방식>

"Top agar assay 시료" 또는 앞 단계 희석액 1 ml을 9 ml의 SMT buffer에 첨가하는 방식으로 실시하는 희석 (15 ml conical tube 사용)

[Optional 고형시료; 불용성의 사료첨가제]

- ① 고형 시료 1 g에 9 ml의 SMT buffer를 첨가한다.
- ② 2분 동안 vortexing 한다.
- ③ 상온에서 5분 방치한 다음에 다시 2분 동안 vortexing 한다.
- ④ 4,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 한다.
- ⑤ 상등액을 회수한 후 0.45  $\mu$ m filter를 이용하여 filtration을 실시한다.

② 박테리오파지 희석액은 냉장 보관하며 당일 top agar assay에 사용한다.

[박테리아 배양]

- [1] 50 ml conical tube에 TSB 배지 30 ml 첨가한다.
- [2] 1항에서 준비한 것에 O/N 박테리아 culture 3 ml을 첨가한다.
- [3] 37°C shaking incubator에서 OD600=0.5가 될 때까지 진탕배양한다. (최소 0.5 이상은 되어야 하며 0.5에 가까울수록 좋음. OD600=0.5-0.8)

[Plaque assay]

- [1] 1.5 ml microcentrifuge tube에 200  $\mu$ l의 bacterial culture와 200  $\mu$ l의 박테리오파지 희석액을 첨가한 다음에 10초간 vortexing하여 섞어준다 (균 배양액과 희석 buffer에서의 박테리오파지 오염 여부를 확인하기 위해 200  $\mu$ l의 bacterial culture와 200  $\mu$ l의 희석에 사용하는 SMT buffer를 혼합한 용액을 control로 준비).
- [2] Drying oven에 보관 중인 top agar stock을 사용하여 top agar를 50 ml conical tube에 필요한 양만큼을 덜어 하기 작업에 사용한다.
- [3] 2항의 top agar를 15 ml conical tube에 3 ml씩 분주한 다음에 즉시 1항에서 준비한 혼합액 중 200  $\mu$ l를 취하여 첨가한다 (Control도 함께 실시).
- [4] 손으로 흔들어서 잘 혼합해 준 다음에 모두를 agar plate에 부어준다.
- [5] 부은 후에 바로 plate 뚜껑을 닫고 이를 상온에 방치하여 top agar가 완전히 굳게 한다.
- [6] Top agar가 완전히 굳은 것을 확인한 다음 incubator에 넣은 후 O/N incubation한다.
- [7] O/N incubation 후에 plaque counting을 실시한다 (Control에서는 plaque이 없어야 유

효하며, 희석배수와 유의한 결과가 도출되었을 경우 plaque이 10~99개 사이에 형성된 plate를 기준으로 최종 titer를 확인).

▷ Plaque counting 계산식

$$\text{Counting 된 plaque 수} \times \text{Dilution factor} \times 10 \times 10 = \text{고형 시료 1 g에서의 박테리오파지 titer (pfu/g)}$$

**신규 파지 분리 및 신규 미생물 분리**

- 야외 샘플을 활용한 신규 파지 분리
  - 만성 대장균 설사증이 있는 농장 또는 주위 오염물을 채취하여 E.coli 특이 파지 분리
  - 1종의 대장균 박테리오파지 와 2종의 살모넬라 박테리오파지 분리
  - 각 파지의 특성은 추가 실험을 통해 확인 할 예정이며, 기존 파지와의 동일성에 대한 부분은 추가 유전체분석을 통해 확인 되어야 함.

**생균제 + 대장균 박테리오파지 혼합 첨가제 영향성 평가**

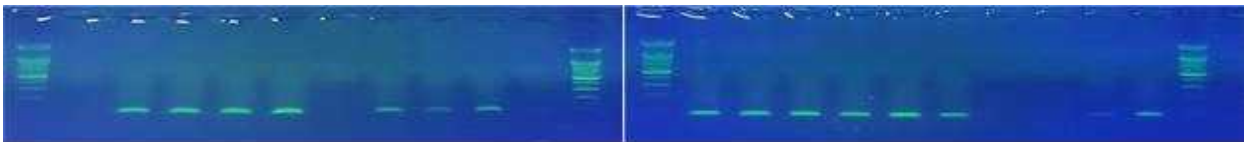
- 유산균을 혐기 조건 하에서 배양하여 영향 평가
  - 유산균 배양 조건인 혐기 조건하에서 적당한 농조의 박테리오파지와 함께 배양하여 플라크 형성 유무를 확인
  - *Lactobacillus reuteri* 외 주요 유산균과 박테리오파지 처리를 통한 플라크 형성 유무 확인

\* ○; 플라크 형성, x;플라크 형성안됨

	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>E.coli (K88/K99)</i>
균 배양	x	x	x	x	x
파지혼합	x	x	x	x	○

**야외 농장 분리 E.coli F18 PCR 확인**

- 90bp 프라이머 확인

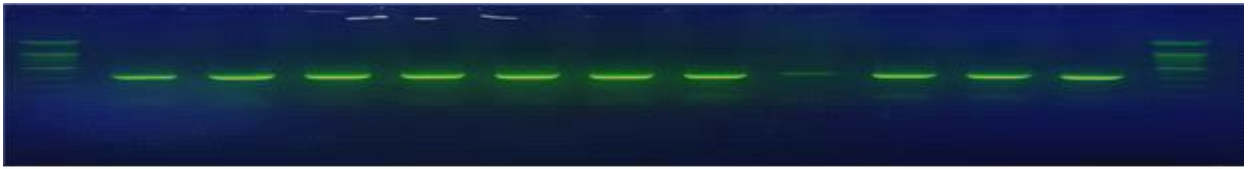


- 510bp 프라이머 확인

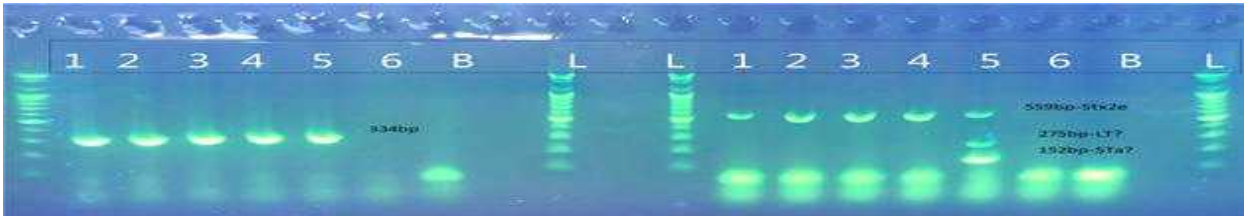




- 334bp 프라이머 확인



- 최종 F18 유전자 및 Toxin 유전자 확인



sample	Stx2e	Sta	STb	LT	비고
P-1	○	△	X	X	F18
D-2-2-5	○	△	X	X	F18
D-2-2-1	○	x	X	X	F18
T-6-3	○	X	X	X	F18
D-1-12	○	○	x	○	F18
E-1	X	x	X	X	E.coli

○ - 명확 , x - 없음.

○ 전국 A~F 농장에서 분리한 4~5개의 E.coli를 대상으로 F18 유무 확인

- F18을 확인하기 위해 문헌 조사를 통해 F18 확인 primer를 3종 이상을 제작하여 교차 실험을 진행하였으며, Toxin primer도 문헌을 통해 수개의 primer를 제작하여 최적 primer로 PCR을 진행하였음.

- 설사유발 대장균인 K88/K99와 함께 부종병을 유발하는 대장균 F18에 대한 제어도 함께 이루어져야 하기에 전국 야외 농장에서 채취한 분변내 F18을 분리 하였으며, 분리한 F18에 존재하는 Toxin을 확인하여 Stx2e 유전자를 확인하였음.

- 약 5종의 각기 다른 F18을 분리하여 보유한 toxin 유전자수가 다른 것을 확인하였으며, 이를 토대로 각 지역에서 발생하는 F18에 대한 유전체적 정보를 얻기 위해 whole genome sequence를 진행하여 다양한 비교를 해보는 것이 좋을듯함.

- 같은 농장에서 분리한 일반 E. coli와 F18 대장균에 유전체 서열을 비교 연구가 필요할 것으로 보임.

### 생균제 + 박테리오파지 안정성 평가 추가 진행

○ 유산균 + 박테리오파지 혼합제품 박테리오파지 안정성 6개월 평가



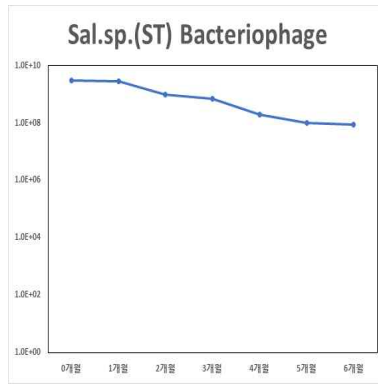
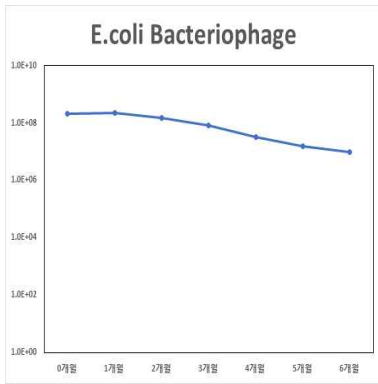


그림 33 박테리오파지 안정성 시험

○ 유산균 + 박테리오파지 혼합제품 유산균 안정성 평가 6개월

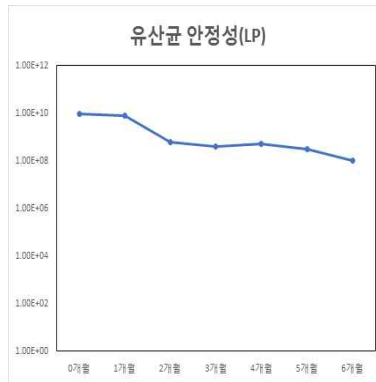
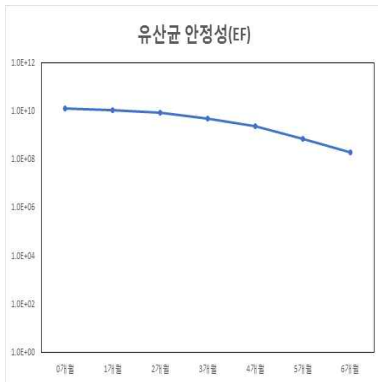


그림 34 유산균 안정성 평가

- *Lactobacillus reuteri* R4는 동결건조수율 향상 및 안정성 향상을 위한 보호제 탐색이 완료된 후 사료 첨가제용으로 사용가능성을 판단해야 할 것으로 보이며, 현 시점에서는 사용할 수 없을 것으로 보임.
- *Lacobacillus plantarum*도 *Enterococcus faecium*에 비해 안정성이 낮아 우선 *Enterococcus faecium*를 시제품에 사용하는 것이 좋을 듯함.
- 다수의 신규 분리 유산균에 대한 평가를 지속적으로 진행하여 사료첨가제용 생균제 사용가능성을 평가하고 기존에 사용하는 유산균과 차별화된 균종을 사용하여 제품 개발에 사용할 것임.

## 부형제 적합성 평가

○ 혼합제품에 사용할 부형제 선별

- 부형제 선정 : 옥수수분말(F5), 말토덱스트린, 탈지분유, 말분, DDGS, 등외 등 사료첨가 가능 부형제 6종 평가

- 1차 원료 혼합 평가 - 최종 원료를 1차 희석할 때 사용하는 부형제

- 2차 최종 부형제 혼합 평가 - 최종 제품 생산시 사용하는 부형제

- 1차 원료 혼합은 부형제의 섞임성이 좋고, 물에 잘 녹을 수 있는 부형제를 선별하여 최종 말토덱스트린으로 선정 하였으며, 2차 최종 제품을 희석 및 제품에 사용할 부형제로 섞임성과 경제성을 고려하여 옥수수분말 및 등외를 선정하였다.

하기 결과는 각 부형제 원료 혼합용, 제품 혼합용 부형제에 따라 적합성을 3반복하여 평균을 구한 것이며, 경제성, 섞임성을 고려하여 각 단계의 부형제를 선별하였다. 부형제선별은 혼합시 박테리오파지 QC에 문제점을 확인하기 위한 것이며, 이론치 대비 분석치를 수율로 정하였다. 부형제선별에 있어 경제성 및 혼합도, 입자크기, 핸들링의 편의성을 고려하여 선별 하였다. 하기 결과는 살모넬라 박테리오파지 원료를 가지고 진행하였다. 제조는 원료는 1kg 내외, 제품은 10kg 내외로 제조하였다.

### 원료 혼합용 부형제

이론치	부형제의 종류	혼합 후 역가 (pfu/g) (원료:부형제=1:9)	수율 (%)
1.20E+ 11	말토덱스트린	1.30E+ 11	108.3%
	탈지분유	1.10E+ 11	91.7%
	말분	8.00E+ 10	66.7%
	등외	9.00E+ 10	75.0%
	DDGS	7.33E+ 10	61.1%
	옥분 (F5)	1.15E+ 11	95.8%

### 제품 혼합용 부형제

이론치	부형제의 종류	혼합 후 역가 (pfu/g) (원료:부형제=1:99)	수율 (%)
1.20E+09	말토덱스트린	1.23E+ 09	102.8%
	탈지분유	1.08E+ 09	90.3%
	말분	7.37E+ 08	61.4%
	등외	1.02E+ 09	84.7%
	DDGS	5.00E+ 08	41.7%
	옥분 (F5)	1.15E+ 09	95.8%

- 말토덱스트린과 탈지분유도 수율이 높았으나, 옥분이나 등외에 비해 단가가 높기 때문에 제품 형태의 부형제로는 부적합하여 등외 와 옥분을 선택하였음.

- 원료를 희석하는 부형제의 경우 향후 수용성 원료로 사용가능한 부형제를 사용하기위해 말토덱스트린을 선택하였음.

## 시제품 제작

- 본 과제를 통한 박테리오파지와 생균제 혼합제품의 시제품을 제작 하였음 (대장균 파지가 아직 사료원료 성분에 등재가 되지 않아 주요 첨가제인 파지에 대한 표기를 할 수가 없는 문제점이 있음).
- 또한, 아직 대장균 파지에 대한 분석을 하는 공인기관이 없기에 공인기관에 대장균파지 분석을 의뢰할 수 없었음.
- 이러한 문제점이 있지만, 당사는 박테리오파지와 생균제 혼합이 질병유발 미생물제어와 유산균 혼합작용에 따른 시너지 효과를 본 과제를 통하여 검증 하였으므로 가칭 ‘락토파지’라는 제품명으로 시제품을 제작하였음 (내부적으로 향후 제품계획에 대해서 마케팅부서와 논의를 진행하고 있음).

### ○ 가칭 ‘락토 파지’시제품 시안



그림 35 ‘락토 파지’시제품 시안

- 옥수수분말과 등위를 부형제로 사용하여 박테리오파지  $10^6 \sim 10^7$  pfu/g 과 *Enterococcus faecium*  $10^8$  cfu/g 농도로 시제품을 제작함.
- 본 시제품을 토대로 박테리오파지와 유산균의 시너지 효과가 현장평가에서 확인 되면 박테리오파지 생산원가 및 유산균 생산원가를 고려해 이에 대한 첨가량을 선정하여 추가 현장 적용사례를 만들 필요가 있음.

### NABIC 등록 유전체 정보

- 유용 미생물 및 경제동물 미생물을 NABIC에 유전체 정보를 등록하였음.
- 유용 미생물 *Enterococcus faecium* R 과 *Enterococcus faecalis* CEC0511/CEC0511-2(CEC0835) 2종의 whole genome sequence를 등록하였음.
- NN-4950 / 4952 (*Enterococcus faecalis*), NN-4949 / 4951 (*Enterococcus faecium*)
  - 추가로 유용 미생물 *Lactobacillus reuteri* LR4 를 whole genome sequence를 분석하였으며, 추가로 NABIC에 등록완료(NG-0966)하여 총 5건을 등록하였음.
  - E.coli 중에서 야외 농장에서 분리한 Stx2e Toxin 유전자가 확인된 2종을 추가로 whole genome sequence를 분석하여 NABIC에 등록할 예정임. 야외 E. coli 유전자 분석을 통해 국내 퍼져 있는 부중병 유발 E. coli에 대한 연구 자료로 활용 할 수 있을 것으로 사료됨.

### 박테리오파지 투여 후 파지의 체내 분포 분석

가. 총 40마리의 마우스(Balb/c)에 박테리오파지 액상시료( $10^8$  pfu/마우스)를 경구투여(단회투여) 한 후 3일(8마리), 6일(8마리), 9일(8마리), 12일(8마리), 15일(8마리)에 마우스를 희생하여 부검을 실시함

- (1) 부검시 채취한 시료로는 분변(feces), 혈액(blood), 오줌(urine) 및 8종의 장기(간장, 비장, 신장, 소장, 대장, 뇌, 폐장, 심장)
- (2) 박테리오파지의 경구 투여에 의해 어떠한 비정상적인 임상증상 및 행동을 보이지 않았고 몸무게의 변화도 없었음
- (3) 박테리오파지의 경구 투여 후 모든 일차에서 혈액, 오줌, 뇌에서 박테리오파지가 검출되지 않음(Data not shown)
- (4) 박테리오파지의 경구 투여 후 분변에서는 3일 및 6일경까지 박테리오파지가 검출이 되었으며 9일부터는 박테리오파지가 검출되지 않음(그림 36)

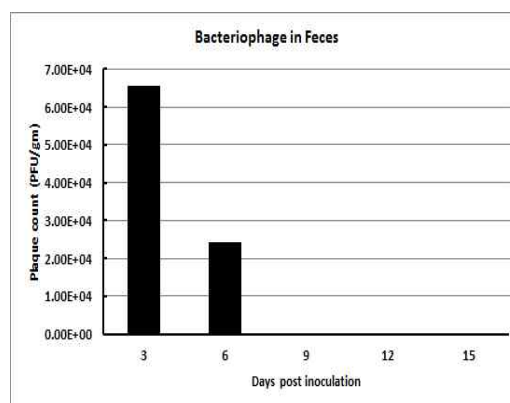


그림 36 분변에서의 박테리오파지 검출

- (5) 박테리오파지의 경구 투여 후 소장시료에서는 6일차까지 박테리오파지가 검출되었으

며 이후에는 매우 적은 수의 박테리오파지가 검출됨 (그림 37)

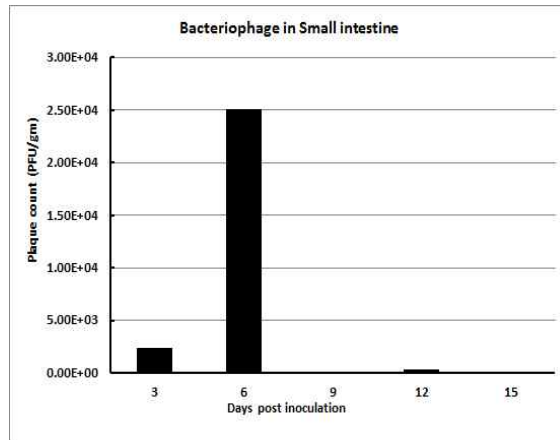


그림 37 소장에서의 박테리오파지 검출

(6) 대장의 경우 박테리오파지의 경구 투여 후 3일경까지 다수의 박테리오파지가 검출되었으며 그 이후에는 매우 적은 수의 박테리오파지가 검출됨 (그림 38)

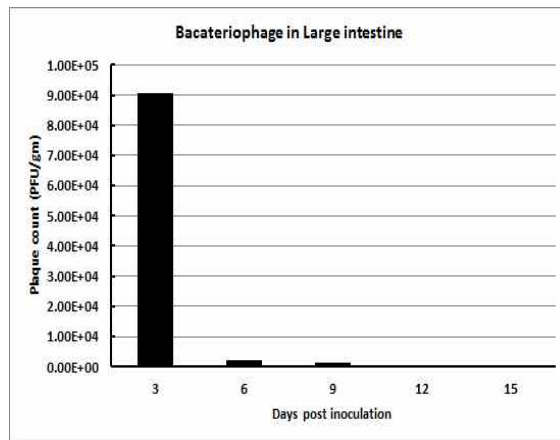


그림 38 대장에서의 박테리오파지 검출

(7) 간장의 경우 박테리오파지의 경구 투여 후 3일경에 소수의 박테리오파지가 검출되었으며 그 이후 점차 감소되어 거의 검출되지 않음 (그림 39)

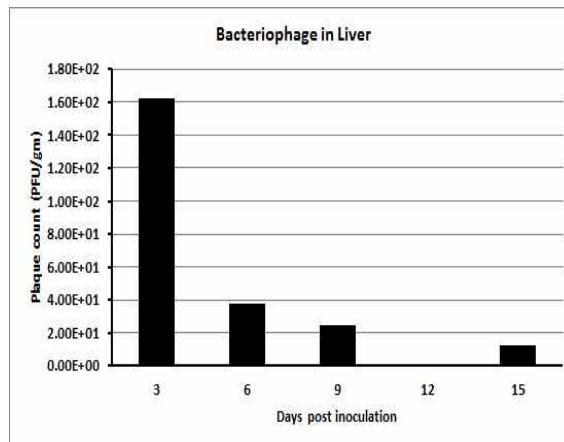


그림 39 간장에서의 박테리오파지 검출

(8) 폐장의 경우 박테리오파지의 경구 투여 후 9일경까지는 검출되지 않다가 12일경에 다수의 박테리오파지가 검출되었으며 15일경에는 다시 급격히 감소하는 패턴이 보임 (그림 40)

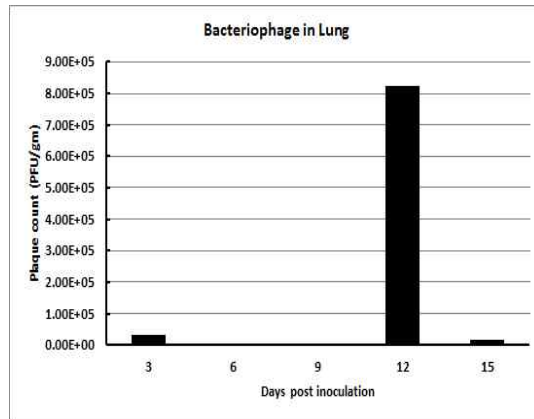


그림 40 폐장에서의 박테리오파지 검출

(9) 비장의 경우 하단의 표 6의 내용과 같이 각 마우스의 모든 기간 동안 약 25%정도만 박테리오파지가 미약하게 검출되었으며 일차간의 특별한 차이도 없는 것으로 보임

표 6. 각 마우스 개체의 비장에서 시간별 박테리오파지 역가 측정

개체	박테리오파지 titer (pfu/g)				
	3 일차 시료	6 일차 시료	9 일차 시료	12 일차 시료	15 일차 시료
1	No detection	No detection	No detection	No detection	No detection
2	$8.3 \times 10^2$	$4.2 \times 10^2$	$4.2 \times 10^2$	No detection	No detection
3	No detection	$1.3 \times 10^2$	No detection	No detection	No detection
4	No detection	No detection	$4.2 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$	$8.3 \times 10^2$
5	No detection	No detection	No detection	No detection	No detection
6	$4.2 \times 10^2$	No detection	No detection	No detection	No detection
7	No detection	No detection	No detection	$4.2 \times 10^2$	No detection
8	No detection	No detection	No detection	$1.7 \times 10^3$	No detection

기존의 보고에 따르면 박테리오파지는 대부분 nucleic acid와 protein으로 구성되어 toxic한 성질을 가지고 있지는 않음 (Bacteriophage. 2011 Mar-Apr; 1(2): 111 - 114). 그럼에도 불구하고, 다른 국책과제를 통해 조사된 바에 따르면, 마우스 내 다양한 파지(살모넬라 박테리오파지, 대장균 박테리오파지 등)의 기간별 영향 등을 살펴본 결과 분변 및 장기에서 1달이내 파지가 사멸하였으며, 결론적으로 파지가 환경에 미치는 영향은 미미 할 것으로 보임.

사업구분	포스트게놈다부처유 전체사업	사업단	농림축산식품 미생물 유전체 전력연구사업단	과제번호	916004-2
주관연구과제명	국문	미생물 유전체 정보 활용 돼지 만, 급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
	영문	Development of Immuno-modulating Mixture to Control the Incidence of Chronic and Acute Diarrhea of Pig through Utilizing Microbial Genome Information			
주관연구책임자	소속 및 부서명	서울대학교 서울대학교	직 위	부교수	
	성 명	(한글) 박명철	(영문) Park Byung-Chul		
등 록 자 인적사항	소속 및 부서명	CTCBIO	직 위	차장	
	성 명	(한글) 유승일 (영문) Seung Il Yoo			
	연락처	(전화) (E-mail)			
	세부/협동 연구과제명	(세부) 미생물 유전체 정보 활용 돼지 만, 급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
ATIS 연계정보	생명정보명	<i>Enterococcus faecium</i>			
	생명정보 대분류명	Genome sequencing	생명정보 소분류명	de novo	
등 록 내용	등록필증번호	생명정보형태	등록내용	건수	용량
	NN-4949-000001 NN-4949-000001	~ NGS SRA	엔테로코쿠스 페시움 2	1	265.23 MB 338.69 Mbp
	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~
	~	~	~	~	~
계				1	265.23 MB 338.69 Mbp
<p>“생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률” 제10조2항(2010.3)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(NABIC)에 등록되었음을 확인합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 02월 20일</p> <p style="text-align: center;">국립농업과학원장 (직인)</p>					

사업구분	포스트게놈다부처유 전체사업	사업단	농림축산식품 미생물 유전체 전력연구사업단	과제번호	916004-2
주관연구과제명	국문	미생물 유전체 정보 활용 돼지 만, 급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
	영문	Development of Immuno-modulating Mixture to Control the Incidence of Chronic and Acute Diarrhea of Pig through Utilizing Microbial Genome Information			
주관연구책임자	소속 및 부서명	서울대학교 서울대학교	직 위	부교수	
	성 명	(한글) 박병철	(영문) Park Byung-Chul		
등 록 자 인적사항	소속 및 부서명	CTCBIO	직 위	차장	
	성 명	(한글) 유승일	(영문) Seung Il Yoo		
	연락처	(전화)	(E-mail)		
	세부/협동 연구과제명	(세부) 미생물 유전체 정보 활용 돼지 만, 급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
ATIS 연계정보	생명정보명	<i>Enterococcus faecalis</i>			
	생명정보 대분류명	Genome sequencing	생명정보 소분류명	de novo	
등 록 내 용	등록필증번호	생명정보형태	등록내용	건수	용량
	NN-4950-000001 NN-4950-000001	~ NGS SRA	엔테로코커스 페칼리스 CEC0511	1	291.26 MB 371.58 Mbp
		~			
		~			
		~			
	계			1	291.26 MB 371.58 Mbp
<p>“생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률” 제10조2항(2010.3)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(NABIC)에 등록되었음을 확인합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 02월 20일</p> <p style="text-align: center;">국립농업과학원장 (직인)</p>					



사업구분	포스트게놈다부처유 전체사업	사업단	농림축산식품 미생물 유전체 전력연구사업단	과제번호	916004-2
주관연구과제명	국문	미생물 유전체 정보 활용 돼지 만, 급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
	영문	Development of Immuno-modulating Mixture to Control the Incidence of Chronic and Acute Diarrhea of Pig through Utilizing Microbial Genome Information			
주관연구책임자	소속 및 부서명	서울대학교 서울대학교	직 위	부교수	
	성 명	(한글) 박병철	(영문) Park Byung-Chul		
등 록 자 인적사항	소속 및 부서명	CTCBIO	직 위	차장	
	성 명	(한글) 유승일	(영문) Seung Il Yoo		
	연락처	(전화)	(E-mail)		
	세부/협동 연구과제명	(세부) 미생물 유전체 정보 활용 돼지 만, 급성 설사증상 조절 면역증강제 개발			
ATIS 연계정보	생명정보명	<i>Enterococcus faecalis</i>			
	생명정보 대분류명	Genome sequencing	생명정보 소분류명	de novo	
등 록 내용	등록필증번호	생명정보형태	등록내용	건수	용량
	NN-4952-000001 NN-4952-000001	~ NGS SRA	엔테로코커스 페칼리스 CEC0511-2	1	296.78 MB 376.74 Mbp
		~			
		~			
		~			
	계			1	296.78 MB 376.74 Mbp

“생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률” 제10조2항(2010.3)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(NABIC)에 등록되었음을 확인합니다.

2018년 02월 20일

국립농업과학원장 (직인)

기탁증 사본(*Lactobacillus reuteri* ELF)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT  
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM


RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: CTCBIO, Inc.

CTCBIO, Inc.

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Lactobacillus reuteri</i> ELF	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 13154BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>November 22, 2016</b> .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: <b>Korean Collection for Type Cultures</b>  Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)  Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):    KIM, Cha Young, Director Date: <b>December 13, 2016</b>

Form BF/4 (KCTC Form 17)

sole page

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	5 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	0 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - 국외 : -	
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : -	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - 국외 : -	
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 1%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			비교대상 없음
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			비교대상 없음

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2.5년			
	소요예산(백만원)	100백만원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		없음	5억	15억	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	5%	8%
국외		-	-	-	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	-	-	

○ 연구개발 성과

- 논문게재 성과

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재연도	등록번호
1	Stress, Nutrition, and Intestinal Immune Responses in Pigs	Asian Australas. J. Anim. Sci.	이인규	29	한국	AJAS	SCI	2016	
2	H9N2-specific IgG and CD4+ CD25+ T cells in broilers fed a diet supplemented with organic acids	Poultry Science	이인규	47	미국	미국가금학회	SCI	2017	
3	Rapamycin-induced autophagy restricts porcine epidemic diarrhea virus infectivity in porcine intestinal epithelial cells	Antiviral Research	고성렬	146	미국	MEDLINE	SCI	2017	
4	Distinct pattern of immune tolerance in dendritic cells treated with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid	Molecular Immunology	윤효신	91	네덜란드	Elsevier	SCI	2017	

- 특허성과

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	바실러스 서브틸리스를 이용한 가축의 장관벽 보호 방법	한국				윤철희 박성무 구민정 한승현	2017.02 .13	10-170792 0	25%
2	한국 유아 분변 유래의 베타-갈락토시데이즈 활성이 우수한 신규 균주 비피도박테리움 애니멀리스	한국	홍도선 김인선 박병철 허철성	2017.10 .26	10-2017- 0121648				20%
3	핑클루비 (Sedeveria Pink Ruby) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 향암 또는 항산화용 조성물	한국	김성조 전현식 허태희 송기덕 박병철 윤철희 황은미	2017.09 .21	10-2017- 0121648				50%

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

##### 4-1. 목표달성도

구분	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 ·실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보완성
계획	유전체 1건	4	시제품 1건				1건		
달성	5건	4건	시제품 1건				5건		
달성도(%)	500%	100%	100				500%		

구분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
계획	2	1	2	1	2			시제품1					
달성	2	1	4		20			1		3			
달성도(%)	100	100	100		100			100					

- 본 과제에서 유전체 분석을 통한 유전자원 해독과 관련하여 *Enterococcus faecium* , *Enterococcus faecalis* 등에 대한 유전체 분석을 진행하였으며, NABIC에 등록하였음. 등록 번호 NN-4950 / 4952(*Enterococcus faecalis*), NN-4949 / 4951(*Enterococcus faecium*) 또한, 위 2종의 유산균 외, *Lactobacillus reuteri*에 대한 유전체를 분석하였고, 부종병 유발 원인균이면서 Stx2e / STa / STb /LT 등의 toxin 유전자를 가진 E.coli F18(*Escherichia fergusonii*) 2종에 대한 유전체 분석을 진행하고 있음. 현재까지 본 과제를 통해 유전체 분석은 5건을 진행하였으며, 5건이 NABIC에 등록되었음.
- 현재 *Lactobacillus reuteri* ELF는 KCTC에 기탁되어 있으며, 기탁 번호 KCTC13154BP임. 추가로 유용 유전자원으로는 *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* , *Bifidobacterium animalis* 등의 6종 이상을 기탁하여 향후 유용 자원으로 활용 할 계획임. 전체적으로, 유용 유전자원은 본 과제를 통해 다양한 유산균 스크리닝을 통해 향후 사료 첨가제로 사용 가능성이 있는 5종을 KCTC에 기탁하였음.
- 또한 *Lactobacillus reuteri* LR4를 특허 기탁 완료하였음.
- *Lactobacillus reuteri*는 70℃의 열처리에서 다른 유산균에 비해 우수한 안정성을 보였으며, 이를 통해 *Lactobacillus reuteri*에 대한 특허출원을 특허법인 (주)필앤온지를 통해 완료 하였음.
- 본 과제를 통한 시제품 생산과 관련하여 대장균 박테리오파지가 사료 첨가제로 등록이 안되어 있는 관계로 본사의 마케팅과 제품계획에 대해 협의 중에 있으며, 시제품 제작된 ‘락토파지’를 제품화할 예정임
- 시제품은 대장균 박테리오파지 함량은 1.0E+6 pfu/g , 엔테로코커스 페시움 함량은 1.0E+8 cfu/g으로 시제품을 제작 하였음.

구분	연도	연구목표	달성도 (%)	자체평가
1차년도	2016	<i>E. coli</i> 감염에 따른 돼지 장상피세포의 장벽기능 및 활성 변화 분석	100	본 연구팀은 7일 이상 배양하여 분화된 장상피세포를 사용하여 대장균을 장 상피세포에 감염시켰으며 TEER를 측정하여 대장균 감염이 장벽기능을 감소시킴을 확인함.
		대장균 박테리오파지 처리에 따른 장상피세포 보호 효과 확인	100	박테리오파지를 처리 후 장상피세포에 bacterial adherence assay와 TEER를 측정한 결과 대장균 단독 감염보다 박테리오파지를 같이 넣어줄 시 장상피세포의 감염과 장벽기능 손상 완화 현상을 확인함.
		생균제/대장균 박테리오파지 혼합 급이를 통한 이유자돈의 생산지표 확인	100	증체량과 폐사율은 전체 시험군에서 차이가 없었으며 사료섭취량은 positive control구에서 가장 높았음. 2주차 성장시험구간에서 생균제+박테리오파지 (K88, K99, F18-specific) 처리구에서 대조군에 비해 사료전변효율이 높음을 확인함.
		균주보관안정성 재평가 및 균주 생산성 확인등	100	기존 사료 첨가제로 사용하던 EF, LP, BC의 보관 안정성을 재평가한 결과 안정성이 비교적 우수한 EF를 1차 선별함. 장기 및 열 안정성에서 뛰어난 BC는 배지, 포자 조건 및 배양 조건의 추가적 실험을 통해 포자 형성 유산균으로 사용가능성 판단함.
2차년도	2017	장상피세포/면역세포 공동배양을 통한 대장균 박테리오파지의 장관면역조절 확인	100	장상피세포와 면역세포의 공동배양 모델을 이용/구축 함. 박테리오파지의 처리가 장상피세포 내 장벽기능 향상, 염증성 사이토카인의 생성을 완화, 케모카인 생성 및 분비를 유도 염증부위에 면역세포의 소집 촉진함을 확인함.
		<i>E. coli</i> 감염 공동배양 모델에서 대장균 박테리오파지의 효능 확인	100	돼지 장상피세포주 하부에 돼지 대식세포주를 처리하는 공동배양 모델에 ETEC단독으로 혹은, Phage를 배지에 섞어 처리하였을 시 ETEC 감염에 의해 감소한 TEER값이 Phage 처리에 의해 회복되는 것을 확인함. 염증성 사이토카인인 IL-8의 발현을 ELISA로 측정 하였을 시 ETEC감염에 의해 증가한 IL-8의 발현이 Phage 처리에 의해 현저히 감소함을 확인, 케모카인의 mRNA 수준 발현에서도 ETEC 단독 처리보다 ETEC+Phage처리 그룹에서 증가함을 확인함.

#### 4-2. 관련분야 기여도

- 돼지 설사병은 주요 양돈국의 생산성 향상에 큰 걸림돌이 되는 질병 중 하나로 심각한 경우 어린 자돈의 폐사로 극심한 경제적 손실을 야기하게됨. 자돈 폐사는 주로 설사증에 의해서 초래되며, 자돈 설사증은 농장 내 만성 스트레스가 큰 이유가 됨. 이러한 문제를 해결하기 위해 병원성 급성 설사증상을 예방하는 백신과 함께 만성 스트레스를 해결할 수 있는 면역증강제 사용이 요구됨. 본 연구를 통해 병원성 급성 설사증을 유발하는 ETEC의 감염에 박테리오파지가 효과적으로 대응할 수 있음을 장상피세포/면역세포 공동배양 모델 구축을 통해 확인하였으며, 만성 스트레스를 타겟하기 위한 생균제를 포함한 생균제/대장균 박테리오파지 혼합 급이를 통해 생산지표 및 안정성을 입증함. 이러한 연구는 항생제 사용이 금지된 양돈 산업 분야에서 보다 효과적인 돼지 만성급성 설사병 조절 면역 증강제 개발을 용이하게 하였으며, 학술적 측면에서도 돼지 장관 면역 연구에 있어 큰 바탕이 되어줄 수 있음. 이러한 연구는 앞으로도 다양한 사료 첨가제 개발 기술의 향상에 이바지할 뿐 아니라, 그 응용분야를 더욱 넓히는 것은 물론 고부가 가치 산업으로 연결시킬 수 있을 핵심 연구가 될 것으로 기대됨.

### 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<input type="radio"/> 장상피세포/면역세포 공동배양 모델 구축을 통한 동물 응용면역학의 학술적 기반 마련. <input type="radio"/> 기존 사료첨가제제들과 혼합하여 효능 개선과 새로운 사료첨가제를 구상하는데 활용함. <input type="radio"/> 사료첨가제 형태로의 기술개발을 통해 설사병 완화를 위한 사양 시스템 구축에 활용함. <input type="radio"/> 돼지 설사병 뿐 아니라 양돈관련 백신제제와의 효능 연구를 통해 양돈 생산성 향상 연구에 활용함. <input type="radio"/> 추후 응용분야로의 연구계획을 추진 시, 산업화를 위한 전임상시험 결과를 바탕으로 하여, 과제 종료 후 필드테스트 및 기업 연계 과제 수행을 통한 상용화 전략 구축 <input type="radio"/> 본 기술을 가축 사료첨가제 산업체에 기술 이전하여 제품화를 모색가능 함.		

### 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<input type="radio"/> 해당사항 없음		

### 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<input type="radio"/> 본 과제는 일반과제로 분류		

### 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호



## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

### 가. 연구실 안전 점검 체계

#### 1) 안전 점검 체계

본 연구진은 서울대학교 실험실환경 안전점검 기준 상 모두 A등급(실험실 점검기준 매일 1회, 대학별 점검기준 매분기 1회, 전담부서 기준 매분기 1회)에 속함.

종류	기간	실시자	내용
일상점검	년중	연구활동종사자	전 연구개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검
정기점검	매년6-8월	서울대학교환경안전원	실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검
특별안전 점검	년중 필요시	총장의 지시에 의거 환경안전원 실시 또는 외부기관에 의뢰	폭발사고, 화재사고 등 연구활동종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 총장의 지시에 의해 실시
정밀안전 진단	매년 9-10월	외부전문 진단기관	정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

#### 2) 실험 폐기물 처리

In vitro 실험에서 사용하는 폐기물은 모두 autoclave를 이용하여 멸균한 후 생물폐기물 처리위탁 업체 (두만 위생 산업)에 폐기물 처리하였음. 또한, in vivo 실험에서 나오는 동물의 사체 폐기물은 플라스틱 biohazard bag에 넣은 후 시건 장치가 달린 Deep freezer에 보관, 2주에 한 번씩 두만 위생 산업에 동물 사체로 폐기물 처리하였음.

### 나. 교육훈련

본 연구진의 연구 참여자들은 서울대 생물안전 교육 이수하였음.

종류	기간	실시자	내용
정기교육	매년 2월, 8월	이공계 대학원생 및 연구원	환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)
온라인 교육	매년 3월, 9월	정기교육을 수강하지 못한 연구활동종사자	환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)
수시 교육	수시	이공계 대학원생 및 연구원	기관에 요청에 따라 상이함

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Stress, Nutrition, and Intestinal Immune Responses in Pigs	서울대학교	공동	Asian Australas. J. Anim. Sci.	0.971	2016.08	중복사사	
2	논문	H9N2-specific IgG and CD4+ CD25+ T cells in broilers fed a diet supplemented with organic acids.	서울대학교	공동	Poultry Science	1.908	2016.08.20	중복사사	
3	논문	Rapamycin-induced autophagy restricts porcine epidemic diarrhea virus infectivity in porcine intestinal epithelial cells.	서울대학교	공동	Antiviral Research	4.271	2017.08.24	중복사사	
4	논문	Distinct pattern of immune tolerance in dendritic cells treated with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid.	서울대학교	공동	Molecular Immunology	3.236	2017.08.23	중복사사	
5	특허	바실러스 서브틸리스를 이용한 가축의 장관벽 보호 방법	서울대학교	공동	대한민국		2017.02.13	중복사사	
6	특허	한국 유아 분변 유래의 베타-갈락토시데이즈 활성이 우수한 신규 균주 비피도박테리움 애니멀리스	서울대학교	공동	대한민국		2017.10.26	중복사사	
7	특허	핑크루비 (Sedeveria Pink Ruby) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 향암 또는 항산화용 조성물	서울대학교	공동	대한민국		2017.09.21	중복사사	

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
○ Min geong Gu, Sun Kwang Song, Sung Moo Park, In kye Lee, and Cheol-Heui Yun. <i>Bacillus subtilis</i> Protects Porcine Intestinal Barrier from Deoxynivalenol via Improved Zonula Occludens-1 Expression. Asian Australas. J. Anim. Sci. April 2014. Vol. 27, No. 4 : 580-586 April 2014		
○ Min Jeong Gu, Sun Kwang Song, In Kyu Lee, Seongyeol Ko, Seung Eun Han, Suhan Bae, Sang Yun Ji, Byung-Chul Park, Ki-Duk Song, Hak-Kyo Lee, Seung Hyun Han and Cheol-Heui Yun. Barrier protection via Toll-like receptor2 signaling in porcine intestinal epithelial cells damaged by deoxynivalnol. Vet Res. 2016. 47:25 DOI 10.1186/s13567-016-0309-1		
○ Seongyeol Ko, Min Jeong Gu, Cheol Gyun Kim, Yoon Chul Kye, Younggap Lim, Ji Eun Lee, Byung-Chul Park, Hyuk Chu, Seung Hyun Han, Cheol-Heui Yun. Rapamycin-induced autophagy restricts porcine epidemic diarrhea virus infectivity in porcine intestinal epithelial cells. Antiviral Research.2017. 146 86-95		
○ W. Si, J. Gong, R. Tsao, T. Zhou, H. Yu, C. Poppe, R. Johnson, Z. Du. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. 2005. 10.1111/j.1365-2672.2005.02789.		
○ Kluess JW, Kahlert S, Kröber A, Diesing AK, Rothkötter H, Wimmers K, Dänicke S. Deoxynivalenol, but not E. coli lipopolysaccharide, changes the response pattern of intestinal porcine epithelial cells (IPEC-J2) according to its route of application. Toxicol Lett. 2015 Dec 15;239(3):161-71. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.09.019. Epub 2015 Sep 28.		
○ Karimi S, Jonsson H, Lundh T, Roos S. Lactobacillus reuteri strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic Escherichia coli. Physiol Rep. 2018 Jan;6(2). doi: 10.14814/phy2.13514.		
○ Kim KW, Kang SS, Woo SJ, Park OJ, Ahn KB, Song KD, Lee HK, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic Acid of Probiotic Lactobacillus plantarum Attenuates Poly I:C-Induced IL-8 Production in Porcine Intestinal Epithelial Cells. Front Microbiol. 2017 Sep 21;8:1827. doi: 10.3389/fmicb.2017.01827.		
○ Hyo Shin Yoon, Girak Kim, Young Jun Ju, In SuCheon, Sun WoongHong, Dong Wook Kim,, Byung-Chul Park, Seung Hyun Han, Cheol-Heui Yun. Distinct pattern of		

immune tolerance in dendritic cells treated with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid. *Mol Immunol*. 2017 Nov;91:57-64. doi: 10.1016/j.molimm.2017.08.023.

- Yang JW, Tian G, Chen DW, Yao Y, He J, Zheng P, Mao XB, Yu J, Huang ZQ, Yu B. Involvement of PKA signalling in anti-inflammatory effects of chitosan oligosaccharides in IPEC-J2 porcine epithelial cells. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018 Feb;102(1):252-259.
- Catherine LC, Stephen TA. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011 Mar-Apr; 1(2): 111-114.