

314019-3

안
전
한
축
산
물
생
산
을
위
한
살
모
넬
라
저
감
제
개
발
및
현
장
적
용
매
뉴
얼
작
성
최
종
보
고
서

2018

농
림
축
산
식
품
부
농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(√) / 공개(), 비공개(√)
농림축산식품연구개발사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002081-01

안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성 최종보고서

2018. 01.30.

주관연구기관 / (주)에스티알바이오텍
협동연구기관 / 강원대학교산학협력단
아주대학교산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성”(개발기간 : 2014.07.29. ~ 2017.10.28.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01. 30.

주관연구기관명 : (주)에스티알바이오텍 (대표자) 이상중 (인)

협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 정재연 직인생략

협동연구기관명 : 아주대학교 산학협력단 (대표자) 최경희 직인생략

주관연구책임자 : 이상중

협동연구책임자 : 윤장원

협동연구책임자 : 남석현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	314019-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.07.29.~ 2017.10.28	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	2014년도 농림축산식품연구개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성			
	세부 과제명	제1세부 : 안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성 제1협동 : 목적동물 대상 살모넬라 저감제의 감염면역학적 효능 분석 제2협동 : 살모넬라 저감제의 Mouse모델에서의 효능 평가			
연구책임자	이상중	해당단계 참 여 연구원 수	총: 19명 내부: 19명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)에스티알바이오텍 강원대학교 산학협력단 아주대학교 산학협력단			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
육제품의 안전성 확보를 위해 닭, 오리, 돼지 농장에 적용 가능한 살모넬라 제어모델을 개발함에 있어서 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 저감제’와 ‘장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 저감제’를 2종 이상 개발하고 고도화하며, 최종적으로 살모넬라 저감제에 대한 현장실증실험을 통해 농가 보급모델 개발과 함께 현장적용매뉴얼을 개발하고, 개발된 기술의 현장 보급 및 확산을 위한 정책안을 제시함.				보고서 면수	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>연구의 목적</p> <p>육제품의 안전성 확보를 위해 닭, 오리, 돼지 농장에 적용 가능한 살모넬라 제어 모델을 개발함에 있어서 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 저감제’와 ‘장관 상피세포막 통과 이후 살모넬라 대응이 가능한 저감제’를 2종 이상 개발하고 고도화하며, 최종적으로 살모넬라 저감제에 대한 현장실증실험을 통해 농가보급모델 개발과 함께 현장적용매뉴얼을 개발하고, 개발된 기술의 현장 보급 및 확산을 위한 정책안을 제시함.</p> <p>연구의 내용</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 살모넬라 저감제 소재별 시제품을 생산하고 고도화함. ② Mouse동물모델에서 효능을 평가하고 이론적인 검증을 통해 최적 배합 및 투여량을 설정함. ③ 목적동물을 대상으로 공격접종시험을 실시하고, 효능과 함께 대상동물에서 항살모넬라 기전을 연구함. ④ Mouse동물모델에서의 효능 평가 및 목적동물에서의 공격접종실험을 통한 효능 평가를 바탕으로 닭, 돼지의 2개 축종에 대하여 각 5개 농가에서 현장실증실험을 수행함. ⑤ 현장실증 테스트 결과를 바탕으로 효능을 평가하고, 최종적인 현장적용매뉴얼을 개발하며, 농식품부 정책부서와 정책자문회의를 통해 개발된 기술의 현장보급 정책안을 제시함 		
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> 1. 면역반응 활성화를 통해 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 면역조절소재 개발 : ‘장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 소재’ 개발 2. 살모넬라에 직접 작용하여 살모넬라를 제거할 수 있는 항균소재 개발 : ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재’ 3. 면역조절소재 및 항균소재의 작용기전 연구 4. 시너지 효과를 낼 수 있는 면역조절소재 및 항균소재의 조합 도출을 위한 in vitro 효능 비교 평가 5. 마우스 실험동물모델에서 고도화 면역조절소재 및 바실러스소재의 유효성 평가 및 이를 통한 고도화된 소재조합 도출 6. Field test를 위한 배합제품 제조 <ol style="list-style-type: none"> 1. 양계에서의 Field test를 위한 배합제품의 시제품 생산 2. 양돈계에서의 Field test를 위한 배합제품의 시제품 생산 7. 경제동물에서의 공격접종 test 		

	<p>8. 농장에서의 현장실증실험 수행</p> <p>9. 현장적용매뉴얼 개발</p> <p>10. 농림식품부 정책부서에 정책안 제안</p>
--	--

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>활용계획</p> <p>1) 안전한 축산물의 생산 안전한 축산물 생산을 위한 매뉴얼로 활용할 계획하여, HACCP의 확산에 큰 도움이 될 것이라고 판단한다.</p> <p>2) 제품의 해외 수출 가축의 살모넬라에 대한 저감 효과를 해외에서 인정받을 수 있도록, 앞으로 논문 발표 등을 통해 해외에 적극 알림으로써 해외 진출이 가능할 것으로 예상된다.</p> <p>3) 항생제 adjuvant로 사용 현재 항생제 다제내성균은 증가하지만 항생제의 개발은 늦어지고 있으므로, 그 사이에 항생제의 기능을 향상시킬 수 있는 항생제 adjuvant의 개발이 중요한 이슈가 되고 있다. 본 과제로 개발된 제품은 Class II 항생제 adjuvant에 속하는 물질이며, host의 면역력을 개선해서 항생제의 효과를 향상시킬 수 있는 물질이다. 특히 Class II 물질은 병원균의 항생제 내성 기전을 방해하는 Class I 물질과 병용할 수 있고, 항생제를 사용한 이후 몸 안의 항생제 내성균을 완전히 제거하는데 도움이 되어, 앞으로 항생제 저감 대책에도 핵심소재가 될 것으로 판단된다.</p> <p>기대효과</p> <p>기존 대부분의 살모넬라 저감제(백신 제외)의 공통적인 특징은 모두 장관 내강에서만 작용하기 때문에 장관 내강의 살모넬라만 저감할 수 있어, 실질적인 문제가 되는 몸 안에서 면역세포인 대식세포 등에 숨어 오랫동안 생존하고 만성적인 감염을 일으키는 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 방법이 없었다. 그러나, 본 과제를 통해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 M세포 및 상피세포를 통해서 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대한 대응 가능한 소재로 가축의 생체안에서 작용하여 이미 전신성 감염을 일으키거나, 가축의 몸 안에서 집락화된 살모넬라에 대해서 저감 기능이 있는 경쟁력 있는 소재가 될 것이며, 앞으로 면역력을 강화시켜서 질병을 예방하는 새로운 패러다임이 형성될 것으로 판단된다.</p>				
	중심어 (5개 이내)	인수공통 살모넬라	살모넬라 저감제	가축	현장실증실험

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>Purpose In developing a <i>Salmonella</i> control model applicable to chicken, duck and pig farms to secure the safety of meat products, we developed two or more products which can 'reduce <i>Salmonella</i> in intestine lumen' and reduce <i>Salmonella</i> in internal organs. In addition, we will develop Field Control Model for farm, and suggest the policy plan for dissemination of the developed technology.</p> <p>Contents</p> <ul style="list-style-type: none"> ① Produce and upgrade the prototype for <i>Salmonella</i> Reducing Agents. ② Evaluate efficacy in mouse animal model and set the optimum formulation and dosage by experimental verification. ③ Conduct Challenge test on target animals and evaluate the efficacy and studied the defense mechanism of <i>Salmonella</i> in animals. ④ Based on the evaluation of efficacy in mouse animal model and the evaluation of efficacy through Challenge test in target animal, field test was conducted on chicken, and pig in each 5 farms. ⑤ Evaluate the efficacy based on the field test results, develop the final field manual, and propose a policy of <i>Salmonella</i> control to Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> 1. Development of immunoregulatory material that can remove intracellular <i>Salmonella</i> in internal organs through activation of immune response : development of the material which can control the <i>Salmonella</i> in the internal organs. 2. Development of antimicrobial material that can remove <i>Salmonella</i> by directly acting on <i>Salmonella</i> : development of the material which can control the <i>Salmonella</i> in the lumen of intestine. 3. Study the mode of action of immunomodulating materials and antibacterial materials. 4. Evaluation of in vitro efficacy for combination of immune modulating material and antimicrobial material for synergy 5. Evaluation of efficacy of advanced immune modulating material and Bacillus material in mouse experimental animal model and elucidation of advanced material combination by this. 6. Manufacture of formulated products for field testing <ul style="list-style-type: none"> 1. Prototype production of formulation for field test in laying hens 2. Prototype production of formulation for field test in pigs 7. Challenge test for domestic animals. 8. Field test on the farms 9. Field manual preparation 10. Suggest policy to Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 		

<p>Expected Contribution</p>	<p>Plan for usage</p> <p>1) Production of safe animal products We plan to utilize it as a manual for the production of safe livestock products, and it will be a great help to spread HACCP.</p> <p>2) Export of products to overseas Once the <i>Salmonella</i> reducing agents have demonstrated the effect of reducing the <i>Salmonella</i> in livestock, it is expected that it will be able to advance overseas by publishing papers.</p> <p>3) Using as an antibiotic adjuvant There is a growing gap between the clinical need for new antibiotics and new drug discovery and development. It is increasingly challenging to find new antibiotics and to bring them to market. A complimentary strategy to protect our existing drugs is through the use of antibiotic adjuvants, compounds that enhance the activity of current drugs and can minimize, and even directly block, resistance. The product developed in this project is a substance belonging to class II antibiotic adjuvant and can improve the immunity of host to improve the effect of antibiotic. Particularly, Class II adjuvants can be used in combination with Class I substances that interfere with antibiotic resistance mechanism of pathogens, and it is helpful to completely eliminate antibiotic resistant bacteria in the body after using antibiotics, so it will be a key material in future antibiotic reduction measures .</p> <p>Expected Benefit</p> <p>Since all of <i>Salmonella</i> abrogators (except vaccines) that have been developed so far work only on intestinal lumen, there is no way to eliminate intracellular infectious <i>Salmonella</i> that is hidden in the internal organs' macrophage, which is a real problem. However, the <i>Salmonella</i> reducing agents that work in intracellular developed through this project will be a competitive material that can function in the internal organs of the livestock and it is expected that it will be a new paradigm to prevent disease by strengthening immunity.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>zoonotic <i>Salmonella</i></p>	<p>anti-<i>Salmonella</i> agent</p>	<p>livestock</p>	<p>field test</p>	<p>field manual</p>

6. Contents

1. Develop immune substances which can control *Salmonella* by acting indirectly through immune response activation
2. Developed antimicrobial material that can control *Salmonella* directly by acting on *Salmonella*.
3. Studies on the mechanism of action of immune modulating materials and antibacterial materials
4. Evaluation of in vitro efficacy to elicit a combination of immunomodulatory and antimicrobial materials that can produce synergistic effects.
5. Evaluation of efficacy of advanced immune modulating material and Bacillus material in mouse animal model for optimized products.
6. Manufacture of formulated products.
7. Challenge test in economic animals.
8. Field test on the farm.
9. Field manual development
- 10 Suggest policy to Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	
2. 국내외 기술개발 현황	
3. 연구수행 내용 및 결과	
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	
5. 연구결과의 활용계획	
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	
7. 연구개발결과의 보안등급	
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	
11. 기타사항	
12. 참고문헌	

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

8. 뒷면지

주 의

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

1장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1절. 연구개발 목적

본 과제의 목표는 축산물 제품의 안전성 확보를 위해 닭, 오리, 돼지 농장에 적용 가능한 살모넬라 제어모형을 개발함에 있어서 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 저감제’와 ‘장관 막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 저감제’를 개발하고 고도화하며, 최종적으로 살모넬라 저감제에 대한 현장실증실험을 통해 농가보급모델 개발과 함께 현장적용매뉴얼을 개발하고, 개발된 기술의 현장 보급 및 확산을 위한 정책안을 제시함에 있다.

특히 본과제가 추구하는 것은 특정 혈청형의 살모넬라에 감염되는 개체만을 대상으로 하는 것이 아니라, 무증상 혹은 미약한 증상의 만성 감염의 살모넬라를 저감하는 것을 포함하고 있으며, 이로 인하여 항생제, 혹은 일부 특정 살모넬라에 대한 치료제와는 그 개발 목적이 다르다고 할 수 있다.

살모넬라균은 살아있는 닭, 오리, 돼지 및 도체를 통해 도축장 및 가공 처리장으로 유입되어, 작업 라인을 따라 시설을 오염시켜 최종 생산된 축산식품의 미생물적인 품질을 위태롭게 한다. 실제 국내 환경에서도 *S. Enteritidis*를 비롯한 다양한 인수공통 살모넬라가 분리되고 있으며, 종계장 유래의 살모넬라가 부화장, 육계 사육농장을 거쳐 도축장까지 전달된다는 연구 내용(Kim et al., 2007)을 고려할 때, 도축장, 농장을 비롯한 생산단계별 통제가 아닌 종계 사육부터 가공장에 이르기까지 모든 단계의 체계적인 통제기술이 필요하다.

식중독은 종특이성이 있는 숙주 적응 살모넬라 혈청형을 제외한 대부분의 인수공통 살모넬라에 의해 일어날 수 있으며, 지역별 시기별로 유행하는 혈청형의 분포도 다양하게 나타나고 있다. 따라서 지역 별로 유행하는 혈청형의 파악이 선행되어야 적절한 통제 대책이 수립될 수 있다. 미국과 유럽의 경우, 분리 빈도가 가장 높은 *S. Enteritidis*를 대표적인 식중독 원인균으로 분류하여 대규모의 국가방역프로그램을 농장 사육단계 뿐만 아니라 계란 및 계육 유통시장에까지 확대 적용하여 체계적으로 관리하고 있다. WHO의 Global Foodborne Infections Network(GFN) 내에 ‘WHO Global Salm-Surv’ 네트워크가 구성되어 전세계 살모넬라 역학 조사, 혈청형 분석, 항생제 내성 시험 등의 결과를 수집하고 분석하는 등 살모넬라 식중독 통제에 관한 노력이 전세계적으로 이루어지고 있다(WHO, 2005).

1938년부터 실시된 미농무성 NPIP(National Poultry Improvement Plan)에서는 가금의 살모넬라 감염증인 추백리(Pullorum disease)와 가금티푸스(Fowl typhoid) 뿐만 아니라, 사람에게 식중독을 유발하는 살모넬라를 관리대상으로 포함시켰다. 이는 가금에는 직접적인 피해가 없어 간과했던 *S. Enteritidis*가 대표적인 식중독 유발균으로 부각되고 계란과 계육이 이들 식중독균의 주요 매개체로 밝혀지면서 이들에 대한 관리가 중요하다고 판단되었기 때문이다. 살모넬라균은 난계대 전파가 가능한 점을 고려하여 종계장과 부화장까지 관리하도록 규정하고 있다. 산란전 *S. Enteritidis*는 감염된 난소 또는 난관 조직에서 계란으로 감염될 수 있다.

또한 암탉의 내장에 착생하면 내부기관에 살포될 수 있고 산란기간 동안 생존할 수 있다. 따라서 조리되지 않은 날계란이나 감염된 난제품의 소비에 의해 인체감염이 발생할 수 있으며 인체감염은 주로 5세 미만의 어린이, 노약자, 그리고 손상된 면역시스템을 가진 사람들에서 일어날 수 있다. 유럽연합, 일본, 캐나다 등에서도 Hazard Analysis Critical Control Point(HACCP)에 의한 축산식품 위생관리가 제도적으로 마련되어 있고, 스웨덴의 경우 2003년 이래 살모넬라 감염증이 근절된 상태이며, 스웨덴에서 가장 큰 가금회사인 Kronfagel은 모든 상품에 대해 살모넬라 부재를 선언하였다.

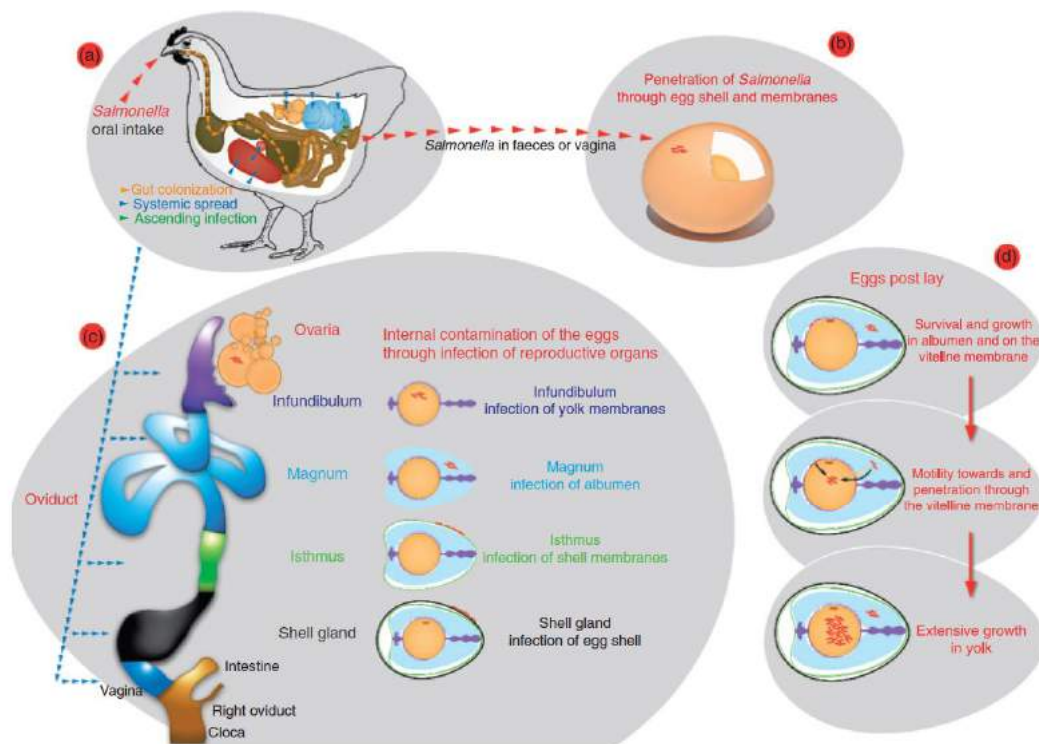


Fig. 1. Pathogenesis of egg contamination by *Salmonella*. (a) *Salmonella* is orally taken up by the hen and enters the intestinal tract. Bacteria colonizing the intestinal lumen are able to invade the intestinal epithelial cells (gut colonization). As a consequence, immune cells, more specifically macrophages, are attracted to the site of invasion and enclose the *Salmonella* bacteria. This allows the bacteria to survive and multiply in the intracellular environment of the macrophage. These infected macrophages migrate to the internal organs such as the reproductive organs (systemic spread). In addition to systemic spread, bacteria can also access the oviduct through ascending infection from the cloaca. (b) One possible route of egg contamination is by *Salmonella* penetration through the eggshell and shell membranes after outer shell contamination. Surface contamination may be the result of either infection of the vagina or faecal contamination. (c) The second possible route is by direct contamination of the yolk, yolk membranes, albumen, shell membranes and egg shell originating from infection of the ovary, infundibulum, magnum, isthmus and shell gland, respectively. (d) *Salmonella* bacteria deposited in the albumen and on the vitelline membrane are able to survive and grow in the antibacterial environment. They are also capable of migrating to and penetrating the vitelline membrane in order to reach the yolk. After reaching this rich environment, they can grow extensively.

출처: FEMS Microbiol Rev 33 (2009) 718 - 738.

국내에서도 축산물 안전성 확보를 위하여 HACCP 프로그램을 도입하였고, 2003년 7월 1일부터 모든 닭 도축장에 의무적용하고 있으며, 최근 닭 사육농가에 대해서도 HACCP 신청 농장에 한하여 확대 적용 중에 있다. 2010년 현재 국내에서 HACCP 인증 받은 양계농장은 250곳으로 전 농장의 7%를 차지하고 있고, 식육 가공장은 전체의 22.4%를 차지하고 있으며, 도계장은 2003년부터 HACCP 의무적용에 의해 모두 인증을 받은 상황이다.

그러나, HACCP 인증 후 위생상태의 개선 여부를 검증하는 제도는 마련되어 있지 않고, 현재 HACCP 인증 시 도축장을 제외하고는 작업장 내 위해요소 지정이 자율적으로 운영 중에 있다. 또한, 식중독 유발균으로서의 살모넬라에 대한 인식이 부족하여 종특이성이 있는 *S. Pullorum* 및 *S. Gallinarum*은 규제 대상에 포함되어 있으나, 이외의 종특이성이 낮은 인수공통의 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium* 살모넬라는 규제 대상에 포함되지 않아 가끔 유래 식중독 발생을 적극적으로 통제하지 못하고 있는 실정이다.

실제 국내 종계장, 부화장, 육계 사육농장, 도축장의 살모넬라 검사 결과 *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*를 비롯하여 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 외에도 *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Blockley*, *S. Virchow* 등의 살모넬라가 분리되고 있으며, 특히 종계장 유래의 살모넬라가 부화장, 육계 사육농장을 거쳐 도축장까지 전달되는 것으로 나타났다(Kim et al., 2007). 이러한 점을 고려할 때, 도축장, 농장을 비롯한 시설별 통제가 아닌 종계사육부터 가공장에 이르기까지 전 단계의 체계적인 통제기술이 필요하다.

살모넬라는 주변환경 모든 곳에 존재하고 다양한 경로를 통해 감염될 수 있으며, 수평 전파 및 수직 전파가 가능하다. 특히, 살모넬라는 닭에 감염 시 불규칙하고 지속적인 체외 배출을 일으켜 환경 내 잔류가 가능하며, *S. Pullorum*와 *S. Gallinarum*를 제외한 혈청형의 경우 성계에서 뚜렷한 임상증상의 발현이 관찰되지 않아 꾸준히 모니터링을 실시하지 않는 경우 발견이 어렵다. 따라서 외부로부터의 “유입” 자체를 차단하고, 비오염 개체로의 “전파”를 차단하는 것이 위생관리의 핵심이다. 이를 위하여 철저한 차단 방역과 소독이 필수적이며 정기적인 모니터링을 통해 농장 내 살모넬라 감염 개체의 존재 유무를 정확히 파악하는 것이 필요하고, 살모넬라 오염 시 감염체의 제거 외에 체외로 배출된 살모넬라의 환경잔류 농도와 기간을 최소화 하는 것을 고려하여야 한다. 그러나 종특이 살모넬라와 달리 인수공통 살모넬라 감염의 경우 뚜렷한 임상증상의 발현이 관찰되지 않아 발견이 어려워 감염동물의 제거가 매우 어려운 것이 현실이다. 또한, 2011년 하반기부터 축종에 관계없이 성장촉진용 항생제를 사료에 첨가하는 것이 전면 금지됨에 따라 살모넬라를 비롯한 세균성 질병의 발생 증가가 예상되어, 2010년 3월 농식품부가 발표한 ‘계란제품 위생관리 종합대책’에 의하면 *S. Enteritidis*를 선진국과 마찬가지로 가축전염병 수준으로 관리하고, 종계장, 부화장 및 농장에 대해 방역의무를 부과하는 방안이 추진 예정으로, 향후 구체적이고 실천 가능한 살모넬라 관리 가이드라인의 확립이 절실한 상황이다.

따라서 식품 안전에 대한 요구가 증가되고 있는 현실에서 철저한 차단 방역과 소독이 필수적이며, 이를 현장에 쉽게 적용할 수 있는 수준의 가이드라인이 개발되고 실질적으로 준수되어야 함은 물론이고, 추가적으로 본 과제에서 추구하고자 하는 살모넬라 저감 동물(닭, 오리, 돼지) 생산기법과 함께 안전한 계란 등 축산물 생산기법의 개발이 이루어지게 되면, 농가 소득 증대의 경제적 가치 외에도, 안전한 먹거리 생산기반 마련의 공중보건학적 가치가 매우 높다고 할 수 있다.

2절. 연구개발의 필요성

축산물은 사람의 주요 식품원으로서 중요하지만, 식중독균의 주요 매개체이기도 하다. 살모넬라 감염증은 미국과 유럽에서는 수인성 식품매개질환 중 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, 2008년도 국내 조사결과에서는 두 번째로 높은 비율을 차지할 정도로 공중보건학적으로 많은 문제를 야기하고 있다. 그러므로 살모넬라는 전 세계적으로 식품의 안전성 관리를 위한 주요 연구대상으로 주목받고 있다.

살모넬라속 균은 장내세균과(Enterobacteriaceae)에 속하는 그람음성의 통성 혐기성 간균으로 *S. enterica* 및 *S. bongori*로 나뉜다. 이 2개의 종(species)중 사람과 동물에서 병원성을 발현하는 종은 *S. enterica*이며, 이 종은 다시 6개의 아종(subspecies; subsp.)인 *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizoanae*, *houtenae* 및 *indica*로 구분된다. 이 중에 가장 문제시 되는 아종은 *S. enterica* subsp. *enterica*이며, 이 균체들은 혈청형, 생물형 및 과지형에 따라 좀 더 세분된다[Koneman 등, 1997; Popoff 등, 2004]. 살모넬라 균체의 표면항원은 균체항원(O-antigen), 편모항원(H-antigen) 및 표면캡슐항원(Vi-antigen)이 있으며, Kauffman-White serological scheme에 의해 균체의 혈청형이 구분되고 있다 [Edwards와 Ewing, 1986]. 현재까지 알려진 혈청형은 약 2,500여 종에 달하며 그 중 200여종이 비교적 높은 발생을 보이고 있으며 [Baggesen 등, 2000; Chiu 등, 2005], 자연계에 널리 분포되어 있다.

살모넬라균은 숙주에 대한 적응력이 뛰어나 종특이성이 있는 균체와 그렇지 않은 균체로 뚜렷하게 구분된다. 종특이성이 있는 균체 혈청형 중 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhi(*S. Typhi*) 및 *S. Paratyphi*는 사람에, *S. Pullorum* 및 *S. Gallinarum*은 닭에, *S. Choleraesuis*는 돼지에, *S. Dublin*은 소에, 그리고, *S. Abortusovis*는 양에 감염된다. 종특이성이 낮은 혈청형에는 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*이 대표적이며, 이 균체들은 사람을 포함한 거의 모든 동물에 감염되며 특히, 사람에게는 장염 및 패혈증을 유발시키는 인수공통 병원체 이다[Baggesen 등, 2000; Rabsch 등, 2002].

살모넬라성 식중독의 오염원은 다양하지만, 그 중 계란 및 계육을 포함하는 가금 생산물은 대표적인 오염원으로 여겨지고 있으며, 이외에도 털 익힌 육류 등 동물들의 가공품이나 부산물로 오염된 식품류에 의해서도 발생한다(Foley et al., 2008). 가금은 밀집 다두사육이 용이해 다른 축종보다 병원성미생물 오염기회가 높고 질병 발생 시 제어하기가 어렵다(Penha Filho et al., 2009). 오리는 닭과 달리 기본적으로 살모넬라에 저항성이 있어 주로 불현성 감염으로 나타나나, 살모넬라 감염의 매개체로 작용할 수 있다(Buchholz and Fairbrother, 1992; Henry, 2000). 오리는 무증상 감염과 위생적으로 열악한 환경에서의 사양관리로 인해 사람에게 살모넬라 감염의 매개체로 작용할 가능성이 닭보다 점차 커지고 있다. 최근 오리고기가 웰빙식품으로 각광받으며 국내 오리산업이 지속적으로 성장하고 있어(FAO, 2012), 오리고기의 소비 증가로 인한 사람의 살모넬라 감염도 증가할 것으로 예상하고 있다.

FAO/WHO(2002) 보고에 따르면 유럽에서 발생하는 식중독의 약 26%가 계란 및 계육을 포함한 가금 유래이며, 식중독 발생의 77.1%가 살모넬라 균이 원인으로 나타났다. 주요 살모넬라 원인균은 *S. Enteritidis*로, 1/3 이상을 차지하는 것으로 나타났으며, 미국에서는 다른 식중독 유발 세균에 비해 치사율이 높은 원인균으로 파악되고 있다(Olsen et al., 2000). 국내에서도 닭도체로부터 살모넬라 분석 결과, 분리한 24종 중 *S. Enteritidis*가 17종(70.8%)으로 가장 높게 나타났다(Lee et al., 2007).

살모넬라는 가금류 뿐만 아니라, 육류를 통해서도 문제를 일으키고 있는데 2008년 유럽의 보고서에 의하면 살모넬라증 사례는 원인 별로는 대략 가금류에 의한 살모넬라 오염이 50~70%를 차지하고 있으며, 그 뒤를 돼지고기와 소고기가 각각 10~20%씩 같은 비율을 차지하고 있다. EU 보고에 의하면 섭취하는 육류 종류에 따른 살모넬라 발병률과 위험도 비교하여 가금육:돈육:우육:양에서 82:11:6:2의 비율로 가금육의 비율이 월등이 높아 살모넬라의 전파에 가장 큰 역할을 하고 있으며, 돼지는 유럽에서 닭, 칠면조를 이어서 3번째로 많은 살모넬라 식중독을 일으키는 것으로 간주되고 있다.

양돈장에서 살모넬라속 균의 감염은, 돼지에게 종특이성이 있는 살모넬라로 급성 패혈증을 일으켜서 높은 폐사율을 발생시키는 *S. Choleraesuis*와, 인수공통 살모넬라로 결장염을 일으켜서 설사를 유발하는 *S. Typhimurium* 및 *S. Enteritidis* 등에 의해서 주로 일어난다. 특히, 인수공통원인균에 의한 감염은 사람에게는 돈육 오염에 의한 식중독의 원인이 될 수 있어 식육위생 면에서도 중요한 질병이다. *S. Choleraesuis*는 전세계적으로 임상증상을 보이는 돼지에서 가장 많이 분리되는 살모넬라 임에도 불구하고 국내의 경우 이 균에 의한 질병 발생은 그 빈도가 매우 낮은 것으로 파악되고 있다.

돼지에서 주로 만성소화기계질환을 일으키는 *S. Typhimurium*의 경우는 매우 다양한 오염원이 존재하는데, 오염된 사료나 물 또는 농장 주변의 야생동물(새, 설치류 등)이나 별 증상 없이 균을 보유하고 있는 성돈이 중요한 전염원이 될 수 있다. 특히 건강 보균돈의 감별 진단이 어려울 뿐만 아니라 이균의 숙주가 무한히 많고 저항성이 강하다 보니 도처에 생재할 가능성이 높다.

세계적으로 세균성 식중독의 발생이 증가하고 있으며, 통계에 따르면 2009년 미국에서 17,468건의 세균성 식중독이 발생하였으며, 살모넬라 식중독은 전체 식중독 발생 건수 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다. 또한, 살모넬라 혈청형 분석 결과 6,371개(90.5%) 시료 중 *Enteritidis* 1,226(19.2%), *Typhimurium* 1,024(16.1%), *Newport* 772(12.1%), *Javiana* 544(8.5%), *Heidelberg* 230(3.6%), *Montevideo* 206(3.2%), *I 4,[5],12:i-* 197(3.1%), *Muenchen* 170(2.7%), *Saintpaul* 157(2.5%), *Oranienburg* 132(2.1%)로 나타나, *S. Enteritidis* 와 *S. Typhimurium*이 살모넬라에 의한 식중독 발생의 35.2%를 차지하는 것으로 나타났다(CDC, 2010).

3절. 연구개발 범위

살모넬라는 숙주 내에서 생존하기 위해서 동물 면역체계에 잘 적응되어 있는 병원체이다. 음식을 통해 구강으로 들어온 살모넬라는 강산성의 위액에서 생존할 수 있으며, 위를 통과한 살모넬라는 2단계에 걸쳐 감염을 일으킬 수 있는데, 1단계로 장관에서 장관 감염을 일으키고, 2단계로 동물의 장관막을 뚫고 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 전신감염을 일으킬 수 있다.

따라서 본 과제에서는 항살모넬라 효능이 우수한 살모넬라 저감제 개발을 위하여 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재’와 ‘장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응이 가능한 소재’의 배합을 통해 살모넬라 저감 효능을 획기적으로 향상시킨 제품을 개발하고자 하였다.

본 과제에서 개발하고자 하는 제품은 코네티켓 대학의 Michael Darre 박사가 새로운 대안으로 제시한 Natural 하고, 안전하며, 경제적이고, 실제 적용이 용이한 물질이어야 한다는 기준에 입각하여 아래의 표에 제시한 바와 같이 제품의 개발 방향을 설정하였다.

표 1. 본 과제에서 개발하고자 하는 제품의 개발 방향

	회피사항	권장사항
효과 범위	Specific한 살모넬라 저감	광범위한 살모넬라 저감 가능 (Serotype non-specific)
소재의 작용점	장관 내강에서만 작용	장관 내강 및 몸 안에서 모두 작용
안전성	염증 유발	안전 (less inflammation)
투여방법	주사제	사료/음수
기존 프로토콜과의 조화 (HACCP)	기존 프로토콜 변경 필요	기존 프로토콜 변경없이 추가
기타 부수효과	생산성 저하	생산성 향상

또한 안전한 축산물 생산을 위해 사육동물에 적용할 살모넬라 저감제에 있어서 중요하게 고려해야 할 사항은 사람에게 감염될 수 있는 인수공통 살모넬라를 대상으로 하는데 있어서 감염빈도가 높은 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 외에도 혈청분석 결과 *S. Newport*, *S. Javiana*, *S. Heidelberg*, *S. Montevideo*, *S. Muenchen*, *S. Saintpaul*, *S. Oranienburg*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Altona*, *S. Johannesburg* 등 다양한 살모넬라 균주가 존재하고 있다는 점이다. 최근 미국에서는 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 외에도 *S. Heidelberg*를 비롯하여 일부 살모넬라 균주가 Outbreak를 일으키는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 과제에서 개발해야 할 살모넬라 저감제는 다양한 인수공통 살모넬라균에 대응할 수 있어야 하며, 동시에 살모넬라균은 언제 어디서든 사육동물을 감염시킬 수 있으므로 사육 전주기에 걸쳐 살모넬라균에 대응할 수 있도록 개발되어야 한다는 점이다. 특히, 사육 전주기에 걸쳐 사용할 경우 살모넬라 저감 효과 이외에도 실제 사용 농가에 비용 대비 경제적 이득을 제공할 수 있어야 축산농가에서 사용할 수 있다는 점을 충분히 고려해야 한다고 판단된다.

1. 내강(lumen)에서 살모넬라 대응이 가능한 소재

가. 천연항균소재

제2협동과제의 남석현교수팀에서는 탄화초액(목초액)이 강한 살균력 등으로 항균 및 보존성 향상, 가금의 육질 개선 등 일부 식품첨가제로 시판되고 있고 특히, 토양 살균, 축산 분뇨화 및 퇴비 발효 촉진, 식물의 생장 촉진 등 농업환경정화분야에 활용되고 있음에 착안하여 탄화초액(목재 등을 탄화시키는 과정에서 발생하는 연기를 냉각하여 얻은 응축액으로 경질유인 상층액과 하층의 타르를 제거한 중간 수용액층)에 대한 심도있는 연구 결과, 벼 도정부산물인 왕겨를 탄화재료로 사용한 특정 왕겨초액이 *S. Typhimurium*을 지시균으로 한 Paper disc agar diffusion assay 방법을 통해 탁월한 항균활성을 나타냄을 확인하고, 치사량 수준의 살모넬라(1×10^5 cfu)를 복강내에 감염시킨 Mouse동물모델 실험에서 살모넬라 감염에 대한 탁월한 사망률 개선 효과와 함께 Vancomycine (10mg/kg)과 함께 사용시 시너지 효과를 나타냄을 확인하였으며, 그 결과를 해외논문(*J. Food Sci.* 2012, 71, 80-85)에 발표한 바 있다. 이에 본 과제에서는 남석현교수팀이 제안한 특정 왕겨초액을 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 천연항균소재’로써 평가 후 활용하고자 하였다.

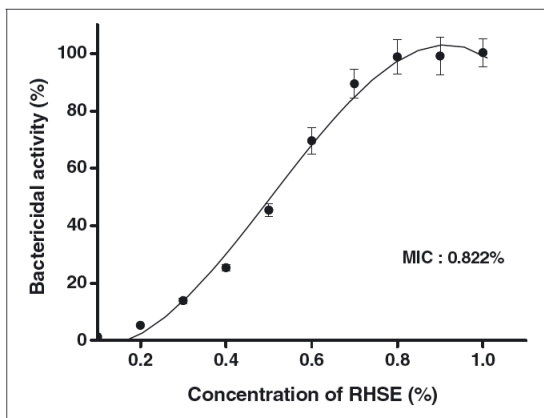


Figure 2—Minimum inhibitory concentrations (MIC, %) value of RHSE against *Salmonella Typhimurium* determined from a dilution series. Each diluted RHSE sample in NBGP was mixed with bacteria (5×10^5 CFU) in a 96-well microplate reader. After incubation at 37 °C for 24 h, bacterial growth was determined by measuring the change of color in the wells at 595 nm. Plotted values are means \pm SD ($n = 3$).

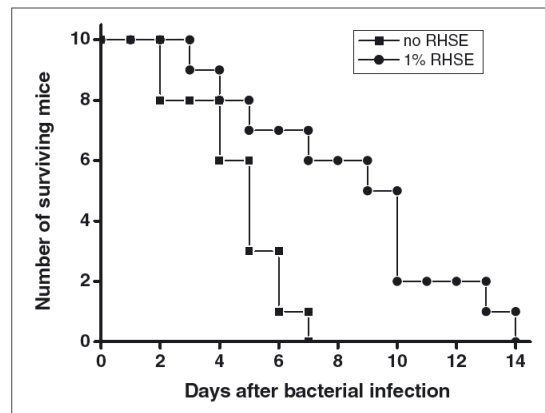


Figure 6—Effects of the dietary administration of RHSE on *Salmonella Typhimurium* infection induced lethality. Balb/c mice (10 mice per group) were fed for 2 wk a standard mouse diet supplemented with RHSE (1.0%, v/w), followed by infection with a lethal dose of *Salmonella* (1×10^5 CFU) administered intraperitoneally. PBS was used as the vehicle in the control group. Plotted values are means of triplicate determinations.

STR바이오텍에서 기 개발하여 확보하고 있는 천연항균소재도 필요시 함께 활용하고자 한다. STR바이오텍에서는 논문 및 한방 관련 검색을 통해 병원균에 의한 감염질환에 대해 효능이 있다고 알려진 천연물자원을 대상으로, *S. Typhimurium*을 지시균으로 한 Paper disc agar diffusion assay 방법에 의한 clear zone 확인을 통해 screening한 결과 약용식물인 산초, 정향, 곽향, 황금 등에서 우수한 항균활성을 보이고 있음을 확인하고, 이를 토대로 항살모넬라 효능의 다양한 천연항균소재를 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 천연항균소재’로써 평가 후 활용하고자 하였다.

나. 프로바이오틱스소재

또한 다양한 경로를 통해 확보한 프로바이오틱스에 대한 배양상등액을 가지고 S. Typhimurium을 지시균으로 한 Paper disc agar diffusion assay 방법을 통해 탁월한 항균활성을 나타내는 프로바이오틱스를 기 확보하고 있다. 다양한 고초균의 배양상등액은 살모넬라에 대한 항균활성이 우수한 반면, 유산균을 배양하여 얻은 배양상등액에서는 살모넬라보다는 E.coli에서 우수한 항균활성을 나타내는 결과를 얻었으며 특히, 효모배양액의 경우에는 살모넬라와 동시에 E.coli에서도 탁월한 항균활성을 나타내는 결과를 토대로 항살모넬라 효능의 다양한 프로바이오틱스를 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 프로바이오틱스 소재’로써 평가 후 활용하고자 하였다.

2. 장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 소재

가. 안전하고 효과적인 면역조절소재의 선발 과정

본 과제에서는 면역조절 효능이 검증된 천연물에 대한 생물학적 전환(bioconversion)을 통해 면역조절 효능을 획기적으로 향상시킨 면역조절소재에 있어서, 선행연구를 통해 기 창출하여 이미 논문에 발표한 면역조절소재와 함께 최근에 새롭게 창출된 면역조절소재에 대한 증거-기반의 효능 분석을 통해 인간에 식중독을 유발하는 인수공통 살모넬라의 가축 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 면역조절소재를 선발하고자 하였다. 또한 선발된 소재는 살모넬라를 공격접종한 마우스동물모델 실험 및 대상동물에서의 공격접종 실험을 통해 최종 선발하고 농장에서의 현장실증시험을 통해 사업화하고자 하였다.

본 과제에서 제시하는 항살모넬라 효능의 면역조절소재는 면역조절 효능이 검증된 천연물자원을 원재료로 하여 면역조절 효능이 밝혀진 약용버섯의 균사를 사용한 발효 및 효소처리의 생물전환공정을 통해 생산된 천연물발효(생물전환)소재[이하, 발효소재]이며, 또한 5단계의 선발기준에 따른 선발과정을 거쳐 항살모넬라 효능이 우수한 면역조절소재로 선발될 것이다. 최근 병원균 감염질환에 대해 효능이 검증된 천연물자원을 원재료로 하여 생산된 발효소재에 대해서도 5단계의 선발기준에 따른 선발과정에 따라 수행될 예정이다.

1차 선발과정에서는 선천성 면역반응을 획기적으로 활성화 시킬 수 있는 소재 선별을 위하여 대식세포에서 NO(nitric oxide, 일산화질소) 생성 능력을 평가하여 EC₅₀이 1 µg/ml 이하인 대식세포 활성화 능력이 우수한 발효소재가 1차 선발 기준이다. 특히, 논문상으로 이미 알려진 어떠한 β-glucan 보다도 더 낮은 농도에서 면역활성을 나타냈다. NO는 대식세포 등이 생성하는 물질로 항균, 항바이러스 효과가 있으며 Th1 세포의 분화를 촉진하는 역할을

하는 것으로 보고되고 있다.

2차 선발과정에서는 감염성질환에 효과적으로 대처할 수 있는 소재 선별을 위하여 대식세포에서 사이토카인 생성에 미치는 영향을 평가하여 IL-1 β 는 분비하지 않으면서 TNF- α , IL-6와 함께 Type I Interferon(IFN- α 또는 IFN- β)의 생성 능력이 우수한 발효소재가 2차 선발 기준이다. Type I Interferon 역시 항균, 항바이러스 효과가 있으며, Th1세포의 분화에 기여하는 것으로 보고되고 있다. IL-1 β 는 발열성 사이토카인으로 강력한 염증을 유발한다. 본 발효소재는 일부 면역조절소재가 IL-1 β 을 분비하는 것과는 달리 이를 분비하지 않아서 안전성이 더욱 높다고 할 수 있다.

3차 선발과정에서는 살모넬라는 세포내 감염이 이루어지는 세포내 기생세균(intracellular pathogen)으로 대식세포 내에서 살아남아 증식과 체내 전파가 이루어지는 특성이 있으므로, 대식세포의 살모넬라에 대한 항병력을 강화시킬 수 있는 소재 선별을 위하여 대식세포의 살모넬라 포식을 유도하는 in vitro 실험을 통해 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능을 강화시켜 살모넬라를 효과적으로 제어할 수 있는 발효소재가 3차 선발 기준이다.

4차 선발과정에서는 1차, 2차 및 3차 선발과정을 통해 선발된 발효소재는 면역활성이 획기적으로 향상된 소재로, 심각한 염증반응의 발생 우려에 대한 불식과 함께 LPS에 의해 유발되는 패혈증에 대한 억제 효과를 확인하기 위하여 살모넬라 유래 LPS로 패혈증을 유도한 Mouse 실험동물모델에서 LPS로 유도된 패혈증에 대한 사망률 개선 효과와 함께 전신염증 반응 및 장기손상 억제 효과를 나타내는 발효소재가 4차 선발 기준이다.

5차 선발과정에서는 병원성 박테리아인 살모넬라균에 대한 항균 항병력을 강화시킬 수 있는 소재 선별을 위하여 살모넬라를 감염시킨 Mouse 실험동물모델에서, ① 치사량 수준의 살모넬라(1×10^5 cfu)를 복강내에 감염시킨 mice에서 살모넬라 감염에 대한 획기적인 사망률 개선 효과와 함께, ② sublethal dose의 살모넬라(1×10^4 cfu)를 복강내에 감염시킨 mice에서 감염 2일 후 비장조직에서의 면역활성 지표를 관찰하여 Th1 면역반응과 관련된 cytokine의 생성량을 향상시키면서 반면에, Th2 면역반응과 관련된 cytokine의 생성량에는 변화가 거의 없는 발효소재를 선발함으로써 살모넬라를 효과적으로 제어할 수 있는 면역조절소재(발효소재)가 최종 선발 기준이다.

나. 본 과제에서 추구하는 면역조절소재의 개발현황

5차 선발과정을 거쳐 예비 선발된 면역조절소재는 논문상으로 이미 알려진 어떠한 베타글루칸 보다도 더 낮은 농도 (EC₅₀ 이 1 μ g/ml 이하)에서 대식세포 활성화능(Nitric oxide 생성)을 나타내며, 치사량의 살모넬라를 공격접종한 마우스동물모델 실험에서도 10mg/Kg의 투여량에서 사망률이 획기적으로 개선된 효과를 나타냈으며, 또한 살모넬라 LPS로 패혈증을 유도한 마우스동물모델 실험에서 예상과는 달리, 염증을 유발하지 않고 오히려 생존률을 높여주

었으며 특히, 1mg/Kg 투여량에서도 사망률 개선 효과가 나타났으며, 투여량이 증가할수록 즉 10mg/Kg 및 100mg/Kg의 투여량에서 보다 더 사망률이 개선된 효과를 나타내, 본 과제에서 제시하는 면역조절소재는 염증을 유발하지 않으면서 살모넬라 감염에 매우 효과적으로 대처할 수 있는 면역조절물질임이 확인되었다.

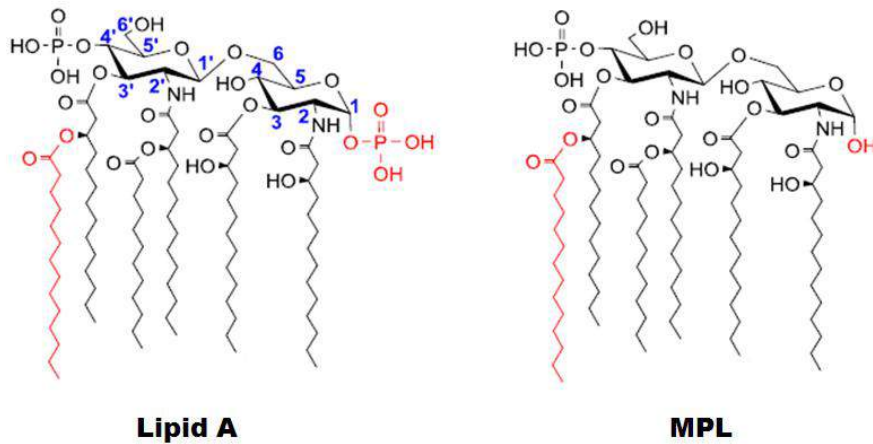
다. 본 과제에서 추구하는 면역조절소재의 장점

일반적으로 사료첨가제로는 매우 저가의 제품만이 사용될 수 있기 때문에 대부분은 아주 간단한 과정을 거쳐서 대량으로 생산된 제품만이 주로 사용되고 있다. 하지만 본 소재는 5차 선발과정을 통해서 무엇보다도 고효성의 소재군이 발굴되었고, 개발된 고효성 소재는 생물학적 전환(bioconversion)을 통해 개발된 Natural한 물질로, 안전성이 확보되었으며, 저렴한 비용(economic)으로 충분한 효과를 발휘할 수 있으며, 경구투여로도 충분한 효능을 발휘할 수 있기 때문에 굳이 주사제로 개발할 필요도 없다. 따라서 지금까지 면역조절 기능이 있으나, 사용량이 충분하지 못해서 실질적인 효능이 나타나지 못했던 기존 면역조절소재가 갖고 있던 문제점을 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

또한 본 면역조절소재의 가장 큰 장점은 살모넬라 감염에 대한 획기적인 사망률 개선 효과와 동시에 LPS에 의해 유도된 패혈증에 대한 사망률 개선 효과도 함께 있다는 점으로, 일반적으로 알려진 면역조절소재와 비교하였을 때 ①포화지방산의 경우 살모넬라 감염에 대한 사망률 개선 효과는 있으나, LPS로 유도된 패혈증에 의한 사망은 오히려 촉진되며, ②불포화지방산의 경우 LPS에 의해 유도된 패혈증에 대한 사망률 개선 효과는 있으나, 살모넬라 감염에 의한 사망은 오히려 촉진되며, ③건강에 유익한 것으로 알려져 있는 강황(카레)의 주 성분인 curcumin 성분의 경우 LPS에 의해 유도된 패혈증에 대한 사망률 개선 효과는 있으나, 오히려 살모넬라 감염에 의한 사망률을 높여 카레를 많이 섭취하는 지역에 있어서 살모넬라에 감염될 경우 카레 섭취를 중단할 것을 강력히 권고하고 있는 실정이다.

라. 천연물 생리활성물질의 구조적 변화를 통해 성공한 대표적 사례

천연물의 생리활성을 증대시켜 기능성소재로서의 가능성을 높이기 위한 가공방법 중 기능성 원료 성분의 화학적/생물학적 수식을 통한 기존 생리활성 성분의 기능성 강화에 대한 연구역시 다양한 연구기관에서 진행되고 있다.



천연물 생리활성물질의 구조적 변화를 통해 성공한 대표적 사례로 MPL(Monophosphoryl lipid A)이 있다. MPL은 대표적 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)를 화학적 변환을 통해 독성을 약화시킨 탈독성(detoxified) 유도체이다. LPS는 그람음성 박테리아의 외부세포막의 주요 구성물질로 외부표면에 존재하며, 대표적 면역활성물질인 동시에 독성이 매우 강하여 패혈증을 일으키는 물질이기도 하다. LPS에서 lipid A는 면역세포 표면에 있는 TLR4(toll-like receptor 4)에 의해 인식되는 영역으로 독성과 함께 면역활성을 나타내는 부분이다. MPL은 lipid A에서 TLR4와의 결합 구조에 변화를 일으켜 탈독성화 시키고 동시에 TLR4와의 결합을 유지시킴으로써 면역활성이 유지되도록 lipid A를 화학적으로 변화시킨 물질로, 독성이 LPS의 1/10,000 수준으로 낮아졌다. MPL은 FDA에서 두 번째로 허가한 adjuvant 물질이 되었으며, 인간백신에 처음으로 허가된 유일한 TLR ligand 이기도 하다. GSK(GlaxoSmithKline)社は 2005년 3억 달러의 권리금을 개발社인 Corixa(Seattle WA, USA)에 주고 MPL을 사용하고 있으며, 지속적으로 MPL을 adjuvant로 사용한 백신을 출시하고 있다. 최근 MPL은 유전공학적 방법으로도 생산되고 있다.

마. 살모넬라의 숙주 내에서 면역회피기전에 근거한 새로운 항살모넬라 대응전략 및 이에 기초한 살모넬라 저감제로의 면역조절소재 개발 방향

살모넬라는 숙주 내에서 생존하기 위해서 동물 면역체계에 잘 적응되어 있는 병원체이다. 음식을 통해 구강으로 들어온 살모넬라는 위장으로 이동하게 되는데 대부분의 병원체가 강한 pH에 의해서 사멸하는 것에 반하여, 살모넬라는 약산(pH 5~6) 유도 조절체계인 산 적응 반응을 통해서 강산성의 위액에서 생존할 수 있다. 위를 통과한 살모넬라는 2단계에 걸쳐 감염을 일으킬 수 있는데, 1단계로 장내에서 장관 감염을 일으키고, 2단계로 동물의 장관 상피 세포막을 뚫고 체내로 들어가 전신감염을 일으킬 수 있다.

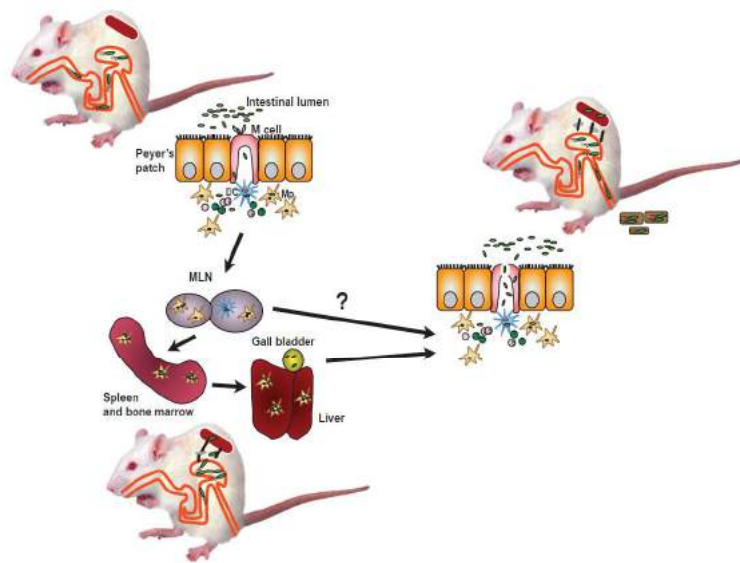


Fig. 1. Persistent *Salmonella* infection. Schematic representation of persistent infection with *S. enterica* serovar Typhi in humans. Bacteria enter the Peyer's patches of the intestinal tract mucosal surface by invading M cells. This is followed by inflammation and phagocytosis of bacteria by neutrophils and macrophages and recruitment of T and B cells. In systemic salmonellosis, such as typhoid fever, *Salmonella* may target specific types of host cells, such as DC and/or macrophages (Mp) that favor dissemination through the lymphatics and blood stream to the MLNs and to deeper tissues. This then leads to transport to the spleen, bone marrow, liver, and gall bladder. Bacteria can persist in the MLNs, bone marrow, and gall bladder for life, and periodic reseeded of the mucosal surface via the bile ducts and/or the MLNs of the small intestine occur, and shedding can take place from the mucosal surface.

출처: FEMS Microbiol Rev 36 (2012) 600 - 615.

살모넬라는 크게 2가지 방법으로 전신감염을 일으킬 수 있다(Ricke, Steven C., and Richard K. Gast, eds. *Producing Safe Eggs: Microbial Ecology of Salmonella*. Academic Press, 2016.). 한 가지는 림프계를 이용해서 전신감염을 일으키는 것이며, 다른 하나는 대식세포를 통해서 전신감염을 일으키는 것이다. 이 두 가지가 모두 중요하기는 하지만, 양계에 있어서는 림프계가 없기 때문에 특히 대식세포를 이용한 감염이 매우 중요하다.

살모넬라는 주로 M세포를 통해 장관막을 통과하여 Peyer's patch로 이동하거나, 혹은 일단 장관 내에서 장관 상피세포에 부착한 다음, 여러 가지 기전을 통해서 상피세포 내부로 들어가게 되고(Chappell, L., et al., 2009. *The immunobiology of avian systemic salmonellosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 53 - 59.), 상피세포 내부로 들어간 살모넬라는 상피세포 내에서 증식하게 되며, 상피세포 내에서 증식된 살모넬라는 상피세포에서 나와 몸 안으로 들어가게 된다. 이 과정에서 세포는 염증유발물질을 분비하게 되고, 이때 혈관에 있는 대식세포가 혈관을 벗어나, 장관벽면으로 이동하게 되며, 이동한 대식세포는 탐식작용을 통해서 세균을 탐식한다. 그러나 일반적인 세균들은 대식세포 내에서 활성산소나, 라이소좀에 의해서 죽게 되지만 살모넬라는 이러한 과정을 회피해서 대식세포 내에서 살아남을 수 있는 독특한 기전을 가지고 있으며, 살아남은 살모넬라는 대식세포 내에서 증식하게 된다. 살모넬라에 감염되어 있는 대식세포는 다시 혈액으로 복귀할 수 있으며, 이렇게 되면 대식세포의 이동을 통해서 살모넬라를 전신으로 퍼뜨리게 되는데, 특히 간, 비장, 난관(가금류) 등의 내부 장기에 퍼지게 되며 실제로 이들 장기에서는 살모넬라 세균이 다량 검출된다. 이 상태를 전신성 감염상태 라고 한다.

그러므로 살모넬라를 억제하기 위해서는 ①장관 내의 감염도 조절해야 하지만, ②M세포 및 상피세포를 통해서 몸 안으로 들어온 살모넬라가 대식세포로 전달되고 이어지는 전신성 감염을 억제할 수 있는 즉, 본 과제에서와 같이 면역반응에 의해 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 방법을 개발해야 한다.

살모넬라가 대식세포 안에 존재할 때 SCV(*Salmonella*-containing vacuole)라는 vacuole 안에 존재하는데, 이 안에서 살모넬라는 SCV가 성숙하지 못하도록 유도하는 SPI-2 라는 물질을 분비하여 생존할 수 있게 된다. 그러나 이러한 살모넬라는 항상 대식세포 안에서 무한정 생존할 수 있는 것만은 아니다. 결국 심한 감염이 아니라면 살모넬라는 면역계에 의해서 제거되게 된다. 그러나 살모넬라가 사람이나 가축의 몸속에서 1년 이상 살아남을 수 있어 사육기간이 짧은 가축의 경우 일단 감염되면 도축될 때까지 감염이 지속될 수 있다. 일반적으로 살모넬라는 대식세포 안에서 아래와 같은 4가지의 운명을 맞게 된다.

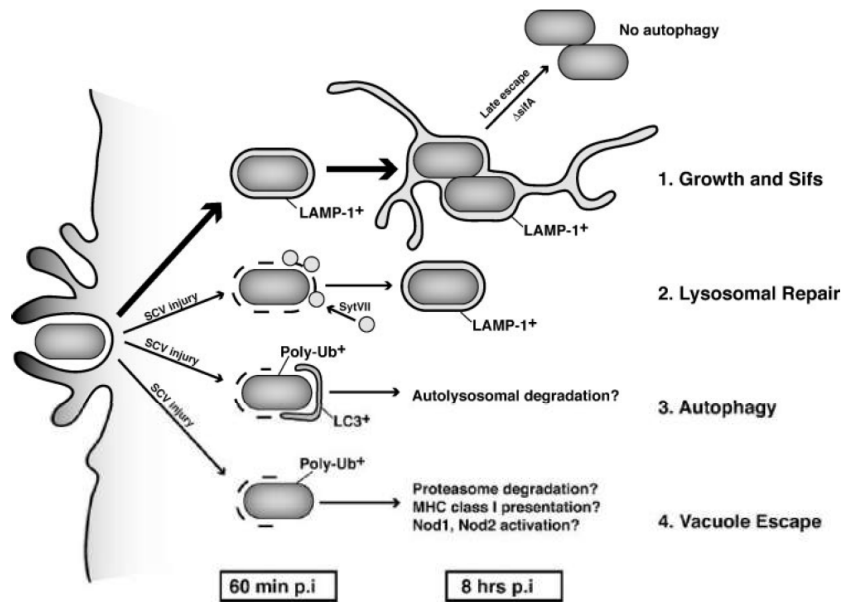


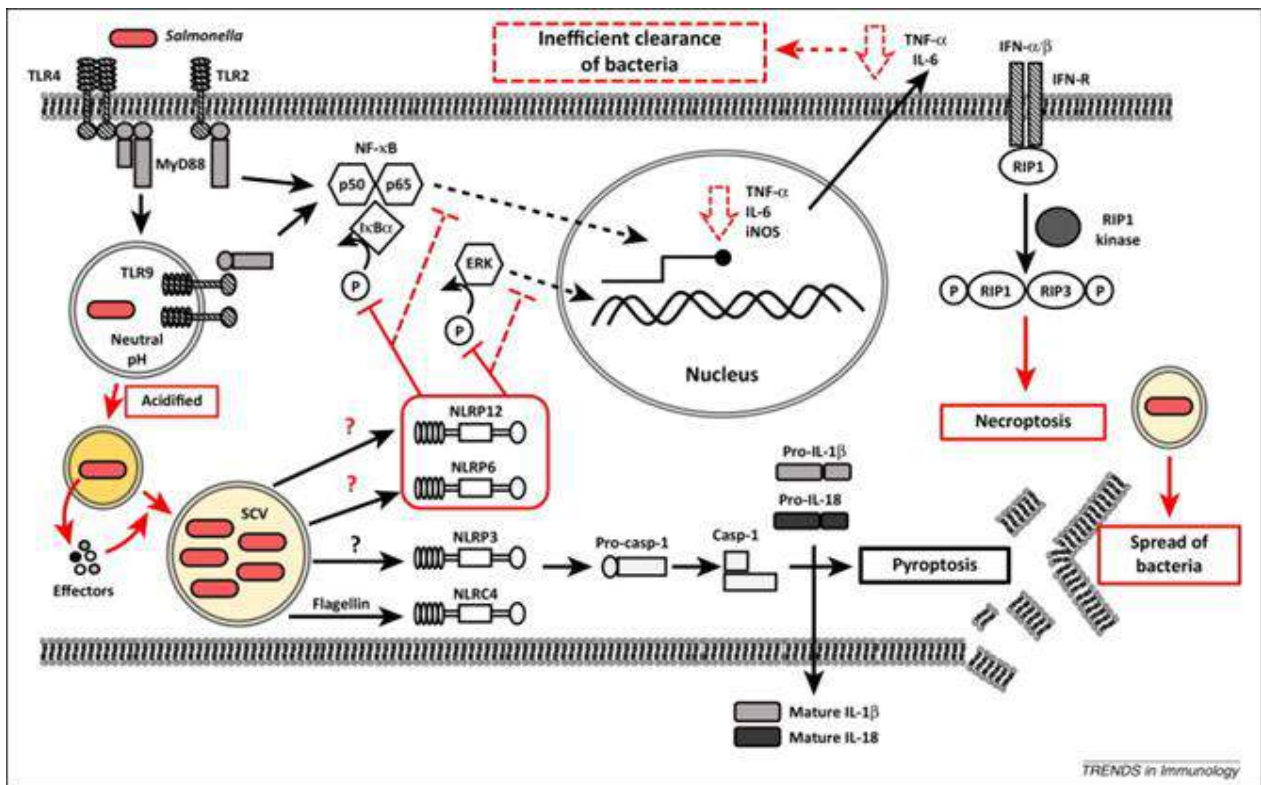
FIGURE 9. Model of intracellular *S. Typhimurium* populations during *in vitro* infection. After invasion, at least four different intracellular populations of *S. Typhimurium* are observed. *Population 1*, majority of *S. Typhimurium* reside within SCVs that acquire LAMP-1. These bacteria direct SCV maturation to allow establishment of a niche permissive for growth. Sif formation is typically observed at 8 h postinfection and is associated with these bacteria. *Population 2*, *S. Typhimurium* can injure the SCV early after invasion via the SPI-1 TTSS. This allows release of calcium into the cytosol and triggers the recruitment of LAMP-1⁺ lysosomes via the calcium sensor SytVII. The lysosomes fuse with the SCV and release their contents into the vacuole, possibly degrading the bacteria (30). These bacteria are maintained in vacuoles but would not be predicted to grow. *Population 3*, here we show that damage to the SCV gives rise to a population of bacteria targeted by the autophagy system. The consequences of this event are still unknown, though interaction with the endocytic pathway and degradation of the bacteria within autolysosomes is a possible outcome. *Population 4*, damaged SCVs that are not repaired by lysosome fusion or targeted by the autophagy system eventually release *S. Typhimurium* into the cytosol of the host cell. These bacteria become heavily decorated with ubiquitinated proteins (Poly-Ub⁺) (this study and Ref. 31). The fate of these bacteria is cell type-dependent: *S. Typhimurium* can grow in the cytosol of epithelial cells (23, 25) and fibroblasts (this study) but are killed by factors present in the cytosol of macrophages (24, 25).

출처: J. Biol. Chem. 2006, 281:11374-11383.

살모넬라는 ①대식세포 안에서 증식할 수도 있지만, 반대로 대식세포에 의해 제거될 수도 있다. 살모넬라의 제거과정은 위의 그림 SCV injury의 경우처럼 살모넬라는 대식세포 안으로 침입한 직후 SCV에 손상을 입힐 수 있으며, SCV가 손상을 입게 되면 곧 이어서 ②lysosome 수리가 일어나게 되는데 이 과정에서 살모넬라가 손상을 입어 비록 SCV 안에 존재하더라도 증식이 어려워질 수 있으며, ③자가포식이 일어나면 자가포식포로 살모넬라를 싸고 lysosome과 결합하여 살모넬라가 제거되고, ④SCV가 손상을 입어, 살모넬라가 세포질 안으로 나오게 되면 세포질 내의 패턴인식수용체의 활성화 등에 의해서 제거되게 된다.

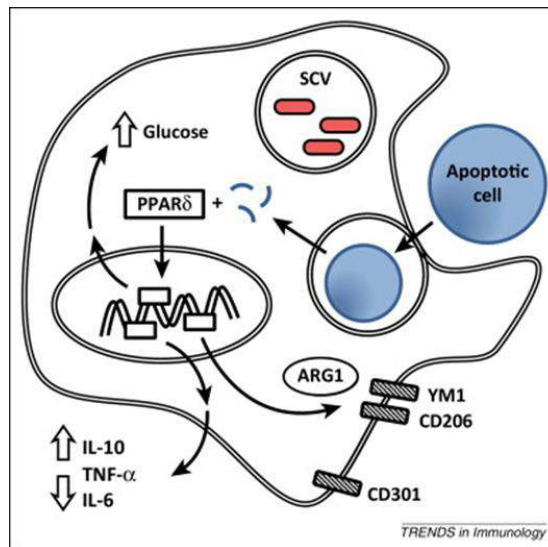
즉, 살모넬라는 세포의 종류에 따라 상피세포나 섬유아세포(fibroblast)의 세포질에서는 성장이 이루어지는 반면, 대식세포에서는 오랜 기간 생존할 수 있으나 무한정 생존할 수 있는 것은 아니며 궁극적으로 세포질에 존재하는 인자들에 의해 제거될 수 있다.

일반적으로, 대식세포는 탐식능과 함께 산성화를 포함하는 작용기전, 항균 펩타이드 및 toxic free radical 생성, pyroptosis에 의한 세포 사멸, 그리고 염증성 cytokine을 분비하여 다른 매개체의 유인 등을 통해 박테리아를 살해할 수 있는 살해능을 충분히 보유하고 있으나, 살모넬라균은 성공적으로 대식세포 등 phagocytes를 잘 조정하고 조절하여 자신의 생존과 숙주에의 감염을 촉진시키는 능력을 갖고 있다.



Salmonella takes advantage of innate immune responses inside the macrophage. PAMPs from *Salmonella* are recognized by TLRs, signaling from which induces an array of responses, including acidification of the phagosome. This drop in pH triggers *Salmonella* to secrete effectors, which in turn modify the phagosome to generate a replicative compartment known as the *Salmonella*-containing vacuole (SCV). *Salmonella* can also activate NLRs, including NLRC4 (activated by flagellin) and NLRP3 (unknown ligand). Activation of NLRC4 and NLRP3 leads to processing of pro-caspase-1 (pro-casp-1) into its active form, followed by cleavage of pro-IL-1 β and pro-IL-18 into their active forms and by the induction of pyroptosis. In addition to NLRC4 and NLRP3, NLRP6 and NLRP12 are also activated by *Salmonella*, albeit through unknown ligands. These latter NLRs inhibit phosphorylation (P) of I κ B α and ERK, thus preventing nuclear translocation of NF- κ B and ERK, respectively. This subsequently diminishes the production of proinflammatory mediators, resulting in the inefficient clearance of phagocytized bacteria. During *Salmonella* infection, type I IFN signaling is activated through the binding of type I IFNs, leading to an association between IFNAR and RIP1. This in turn induces the formation of the RIP1-RIP3 complex, resulting in necroptosis of macrophages. The reduction in proinflammatory mediators and induction of macrophage death by necroptosis diminishes the ability of the immune system to control the replication and spread of *Salmonella* within the host. Activities promoting the growth or survival of *Salmonella* are depicted by red lines and boxes. Abbreviations: ERK, extracellular signal-regulated kinase; IFN, interferon; IFN-R, IFN receptor; I κ B, inhibitor of κ B; IL, interleukin; NF- κ B, nuclear factor κ B; NLR, Nod-like receptor; NOS, NO synthase; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; RIP1/3, receptor-interacting protein 1,3; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

살모넬라는 대식세포 안에서 선천성 면역반응을 최대한 자신에 유리하게 이용한다. 살모넬라 유래 PAMPs는 숙주의 TLR들에 인식되어, phagosome의 산성화(acidification)을 포함하는 일련의 반응을 유도하게 된다. Phagosome에서의 pH 강하는 살모넬라가 effectors를 분비하도록 자극하여 phagosome을, SCV(salmonella-containing vacuole)로 명명되어진 살모넬라가 복제 가능한 구역으로 변형시킨다. 살모넬라는 NLR들을 활성화시킬 수 있는데 NLRC4는 flagellin에 의해 활성화되고, NLRP3 또한 알려지지 않은 ligand에 의해 활성화된다. NLRC4 및 NLRP3의 활성화는 pro-caspase 1의 process를 유도하여 활성형 caspase 1으로 전환시키며, 활성형 caspase 1에 의해 pro-IL-1 β 및 pro-IL-18의 cleavage가 일어나 활성형 IL-1 β 및 IL-18으로 전환되어 pyroptosis가 유도된다. NLRC4 및 NLRP3 이외에도 NLRP6 및 NLRP12가 살모넬라에 의해 활성화되어, I κ B α 및 ERK의 인산화를 억제함으로써 NF- κ B 및 ERK의 핵으로 이동을 막아, 결국 염증성 매개물질의 생성을 줄여 세포 내로 탐식된 살모넬라의 제거가 제대로 이루어지지 않게 된다. 또한 살모넬라에 감염된 동안 type I IFN이 발현되어 type I IFN의 신호전달이 활성화 되고, IFNAR와 RIP1의 complex 형성을 유도하여 대식세포에서 necroptosis가 일어나게 된다. 염증성 매개물질의 감소 및 necroptosis에 의한 대식세포의 사멸 유도는 숙주 내에서의 살모넬라 복제 및 살모넬라 확산을 억제하는 면역시스템의 능력을 감소시키게 된다.



Salmonella uses M2 macrophages to establish a chronic infection. PPAR δ is upregulated in CD301⁺ macrophages during *Salmonella* infection. Following activation by fatty acids present in engulfed apoptotic cells, PPAR receptors translocate to the nucleus where they induce the M2 macrophage phenotype (ARG1⁺, YM1⁺, CD206⁺). M2 macrophages produce high levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, and low levels of proinflammatory cytokines such as TNF α and IL-6. In addition, activation of PPAR δ increases intracellular glucose availability and enhances *Salmonella* replication in macrophages and in mice, whereas this pathogen fails to persist in *Ppard*-null mice. The anti-inflammatory environment and metabolic state present in M2 macrophages allow *Salmonella* to establish a chronic infection. Abbreviations: ARG1, arginase 1; IL, interleukin; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SCV, *Salmonella*-containing vacuole; TNF, tumor necrosis factor; YM1, chitinase-like 3 (CHIL3). (출처 Trends in Immunology 36(2), (2015) 112-120.

살모넬라는 대식세포에서의 pyroptosis 및 necroptosis를 조절함으로써 숙주에서 자신을 복제하고, 퍼뜨릴 수 있는 데, 모든 대식세포에서 일어나는 것이 아니라 특정 대식세포에서만

pyroptosis 및 necroptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 살모넬라를 집어삼킨 모든 대식세포가 세포내 살모넬라 감염의 결과로 죽는 것은 아니며, 만성감염 상태에서 살모넬라가 지속적으로 살 수 있는 장소(niche)를 구성하고 있는 세포는 죽지 않고 살아남게 된다. 즉, 살모넬라가 대식세포 안에서 생존하는데 있어서 모든 대식세포에서 생존하는 것이 아니라, 특히 항염증성(antiinflammatory) M2 phenotype 대식세포 안에서 생존하는 것으로 알려져 있다. 이들 대식세포는 hemophagocytic macrophage로 알려져 있으며, 염증성 cytokine을 매우 낮은 수준으로 분비하기 때문에 살모넬라의 복제를 제한할 수 있는 기능이 결여되어 있는 대식세포이다. 따라서 이들 hemophagocytic macrophages에서의 살모넬라 생존은 만성감염 기간 동안 살아남고 또한 숙주의 면역시스템에 의한 살모넬라 제거를 피할 수 있는 기전의 하나로, 이는 개체의 전체적인 면역력이 살모넬라 감염에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

일반적인 대식세포(특히 M1 대식세포)에 의해 이루어지는 살모넬라의 제거에 있어서 가장 주목을 받고 있는 것은 바로 M1 대식세포에서의 자가포식에 의한 살모넬라의 제거이다. 이는 대식세포 안으로 침투한 살모넬라가 대식세포의 자가포식능을 억제하여 대식세포 안에서 장기간 생존할 수 있기 때문이다. 본 과제에서 개발소재 처리시 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 탐식 후 살해능을 획기적으로 향상시키는 것을 관찰할 수 있는데, 이 때 관찰되는 탐식 후 살해능이 자가포식에 해당하며 본 과제를 통해 자가포식이 일어나는 과정을 입증할 수 있었다.

따라서 대식세포 안의 살모넬라를 제거하기 위해서는 자가포식을 더욱 활성화시켜 SCV를 자가포식포로 싸서 이것을 lysosome으로 전달하는 것이 새로운 대안으로 판단되어 진다. 자가포식을 일으키는 많은 방법이 있지만, 이 중에서 현장에서 적용이 가능한 방법은 PAMP(pathogen associated material patterns)를 이용해서 자가포식을 일으키는 방법이다. 특히 여러 종류의 혈청형의 살모넬라를 제어하는데 있어서 PAMP에 의한 자가포식 기능의 활성화가 최적의 방법이라고 할 수 있다. 하지만 많은 PAMP는 염증을 유발하는 물질이기도 하므로, 매우 안전하고도 동시에 동물의 체내로 쉽게 흡수 될 수 있는 PAMP를 사용하는 것이 가장 최선의 선택이다. 그러나 이러한 물질이 현재까지는 많이 알려져 있지 않다. 이에 본 과제에서는 염증을 유발하지 않으면서 안전하고도 동시에 동물의 몸 안으로 쉽게 흡수될 수 있는 안전하고 효과적인 면역조절소재의 개발을 통해 살모넬라 저감제를 개발하고자 하였다.

본 과제에서의 Bioconversion이란 미생물발효 및 효소처리 등의 생물학적 방법을 통해 천연물 생리활성물질의 구조적 변화를 유도하여 유효성분의 함량 증가, 흡수율 개선 및 새로운 기능성분의 생성을 유도하는 작업으로, 본 과제에서는 Bioconversion product를 효과적으로 생성할 수 있는 Bioconversion공정의 도입을 통해 항살모넬라 효능을 획기적으로 향상시킨 차별적 효능 우위의 천연물발효(생물전환)소재의 개발 및 이에 대한 효능 평가를 통해 안전한 축산물 생산을 위한 면역조절소재를 개발하고, 개발된 면역조절소재를 현장에 적용하기 위한 현장적용 매뉴얼을 개발하고자 하였다.

2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

국내외의 연구자 및 관계자들은 살모넬라의 제어에 있어서 일반적으로 방역과 소독만으로는 위생관리가 충분하지 않다고 생각되기 때문에, 아래와 같은 추가적인 살모넬라의 제어가 필요하다고 판단하고 있다.

- 맹장(ceca)에서의 살모넬라 균락화 감소
- 분변으로 나오는 살모넬라 감소
- 수평적 전염 감소
- 고기와 계란의 감염 감소

이러한 것을 이루기 위해서 현재까지 아래와 같은 방법이 국내외에서 사용되어 왔다.

- 백신
- 경쟁적 배제제 (Competitive exclusion bacteria)
- 프로바이오틱스
- Bacteriocins
- 프리바이오틱스 (MOS 포함)
- 유기산 (단쇄지방산)
- 중쇄지방산
- Bacteriophages
- Essential oil
- 베타글루칸
- 항생제 등

①사육단계에서의 살모넬라 저해 방안

○사육단계에서의 살모넬라 저해 방안에 대해서 다양한 연구들이 수행되어 왔다. 살모넬라에 대한 사료 첨가 형태의 경쟁적 배제제, 유산균을 비롯한 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 유기산, 중쇄지방산, essential oil, 베타글루칸 적용 및 살모넬라에 대한 백신과의 “combination therapy” 등에 관한 연구들이 수행되어 왔으며(Dunkley et al., 2008; Kajikawa et al., 2007; Methner et al., 1999; Park et al., 2005), 최근에는 특정 병원성균에 특이적으로 작용하여 사멸시키는 박테리오파아지의 특성을 이용한 살모넬라 억제 박테리오파아지에 대한 연구들도 진행되고 있다(Andreatti Filho et al., 2007; Huff et al., 2006).

②백신 접종

○닭에서의 S. Enteritidis 배출의 감소는 계란과 계육의 S. Enteritidis에 의한 오염 감소로 이어지며, 이는 바로 오염된 계란과 계육을 섭취한 사람에서의 식중독 발생의 감소로 이어진다. 따라서 닭에서 S. Enteritidis 예방을 위해서 불활화백신과 생균백신이 일부 상용

화되고 있다. 일반적으로 *S. Enteritidis*를 비롯한 살모넬라균은 세포 내 기생세균이기 때문에 생균백신이 불활화백신보다 방어 효과가 우수하다고 알려져 있다.

○ 백신 접종이 닭의 몸 안에서 주로 작용함에도 불구하고 살모넬라를 저감시키는데 매우 중요한 방법으로 인정받고 있으며, 이는 살모넬라의 제어에 있어서 닭의 몸 안으로 침투한 살모넬라의 억제가 매우 중요하다는 것을 의미한다.

③ 경쟁적 배제제

○ 경쟁적 배제제는 성계의 정상적인 장내의 미생물 균총을 초생추에게 제공하여 살모넬라가 집락화를 이루거나, 조직에 침투하는 것을 방지하는 물질이다. 살모넬라에 접촉하기 이전에 제공해야만 효과가 크기 때문에 닭의 경우 경쟁적 배제제는 대략 태어난 후 며칠 이내에만 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 정상적인 장내 균총이 형성된 이후에는 경쟁적 배제제는 거의 예방 효과가 없다고 알려져 있다. 또한 미확인 경쟁적 배제제 제품을 사용하는 것에 대한 우려의 시각도 있다.

④ 유산균의 효과와 문제

○ 실험실이나 소규모의 실험에서는 매우 우수한 결과를 보이고 있음이 사실이나, 유산균은 특히 대상 가축에서 분리한 것이 효과적이라는 점과, 여러 가지 혼합 유산균을 사용해야 한다는 점에서 실제 대규모 필드테스트 결과는 부족한 편이다. 특히 유산균을 언제 어떠한 방식으로 투여해야 하는가라는 문제와, 생육단계 중 어떤 단계에서 투여해야 최종 도축장에서 살모넬라 오염을 방지하는가에 대해서도 추가적인 연구가 필요하다. 실험실 내에서는 유산균만을 직접 투여하는 것이 가능하지만 현장에서는 사료나 물에 타서 급이해야만 하며, 이는 사료 제조과정 뿐만 아니라, 국내 여름철의 고온 다습한 환경에서 생존이 가능함은 물론 보관과정 중에도 안정한 한국형의 환경에 적합한 균주를 사용해야 한다는 것을 의미한다.

⑤ MOS

○ 만난올리고당도 살모넬라 제어에 사용되기도 한다. Alltech社에 의해 개발된 만난올리고당(MOS)은 1993년 출시되었으며, 초기에는 살모넬라, 대장균 같은 병원균의 장내 집락화를 차단하는데 중심이 맞추어져 있었으나, 이후 지속된 연구를 통해 장내 면역시스템을 발달시키고 장내 점액층의 발달을 돕는 것으로 밝혀지면서 MOS가 단지 장내 건강을 도모하는 것뿐만 아니라 사육 성적에 영향을 미치고 있다고 알려지면서 주로, 육계, 종계, 칠면조, 및 오리 등 가금류와 양돈에서 사용되고 있다.

⑥ 유기산(단쇄지방산)의 효과와 문제점

○ 닭을 포함한 육류의 미생물 오염 억제 목적으로 가장 널리 사용하는 화학물질은 유기산 용액이며(Belk, 2001), 특히 유산(lactic acid)이 가장 보편적으로 적용되고 있다(Huffman, 2002). 그러나 유산과 아세트산이 산성조건에 저항성이 생긴 살모넬라와 대장균과 같은 병원성균의 처리에 효과적이지 않다는 연구 결과들도 보고되어 있다(Conner & Kotrola, 1995; Kanellos & Burriel, 2005). 또한 유기산에 노출되면 살모넬라 세균은 장관의 세포

내부로 도피하는 것이 증가하는 것으로 확인되었다.

⑦ 박테리오파아지

○ 박테리오파아지는 미생물 표면의 특정성분을 인지하고 부착하기 때문에 특정 미생물에 한해서만 살균 능력을 발휘하며, 장관 내 서식하는 유익균에는 영향을 주지 않고 목표로 하는 특정 유해균만을 억제할 수 있는 장점을 가지고 있다. 특히, 박테리오파아지의 경우 항생제 내성균에 대해서도 효과적으로 적용된다고 알려져 있어 사료첨가제로의 사용 뿐만 아니라, 염소 소독제와 식품 방부제에 의해서도 *S. Enteritidis*의 항생제 내성이 증가한다는 연구내용 (Potenski et al., 2003)을 토대로 볼 때 소독제 및 육가공품에도 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 기대하고 있다.

⑧ 항생제 내성의 문제

○ 항균제는 세균성 질병의 치료나 예방을 위해 널리 사용되고 있으나, 이들 약제의 무분별한 사용으로 인한 살모넬라균과 다른 식중독균에 대한 항균제 내성 증가는 사회적인 관심과 그 중요성이 크며, 동물용의약품 및 항균제 사용은 약제내성균을 증가시켜 세균성 감염증의 치료 및 예방에 많은 문제점을 일으키고 있다. 세계 보건기구(WHO)는 항균제에 강한 비장티푸스 살모넬라 변종의 증가를 보고하고 있다(McEwen, 2012).

○ 살모넬라의 항생제 내성과 관련하여 국내에서도 닭도체로부터 분리한 24종 중 살모넬라 분석 결과 *S. Enteritidis*가 17종(70.8%)으로 가장 높게 나타났는데, 분리 균주에 대한 항생제 내성 분석 결과, 분리 24종 중 23종(95.8%)이 한 가지 이상의 항생제에 내성이 있었으며, 분리 24종 중 13종이 2 가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 특히, *S. Enteritidis* 17종 중에서 16종이 내성을 가지고 있는 것으로 나타났다(Lee et al., 2007). 또한, 국내 가금에서 분리된 *S. Enteritidis*의 64.7%가 2가지 이상의 항생물질에 내성을 보인다고 보고된 바 있다(Chung et al., 2004). 브라질 육계에서 분리된 살모넬라균에 대한 내성 연구에서 88%의 균주가 1가지 이상의 항생제에 내성을 보였으며(Ribeiro et al., 2007), 포르투갈에서 가금 생산물에서 분리된 살모넬라 60종 중 75%가 1개 이상의 항생제에 내성을 나타내었다(Antunes et al., 2003). 이와 같이 전 세계적으로 국가와 지역별로 사용하는 약제 종류에 따라 항생제별 내성율의 차이는 나타나나, 항생제 내성을 가진 살모넬라균이 많이 출현하는 추세로서 과학적인 살모넬라 부재 계란 및 계육 생산을 위해서는 사육단계부터 가공 공정까지 항생제 내성균을 고려한 접근이 필요하다. 돼지의 경우에 있어서도 닭 등의 가금류와 비슷하게 항생제 내성의 문제가 대두되고 있다. 이러한 시각에서 코네티컷 대학의 Michael Darre의 박사는 새로운 대안은 Natural 하고, 안전하며, 경제적이고, 실제 적용이 용이한 물질이어야 한다고 기준을 제시한 바가 있다.

⑨ 항생제 사용 금지 조치와 면역조절(증강)제 필요성

○ 국내에서도 사료첨가용 항생제 사용 금지 조치가 이루어지면서 항생제를 대체할 만한 물질을 찾기 위해서 많은 노력을 해왔고, 그 결과 여러 가지가 이미 개발되어 사용되고 있다. 또한 살모넬라의 문제도 사실은 항생제 대체물질의 연장선에 있다고 볼 수 있다.

현재까지 개발된 항생제 대체물질 중 가장 효율적인 물질을 검증해서 살모넬라에 효과적으로 대처할 수 있는 제품을 개발하는 것이 가장 좋은 대안이라 할 수 있다.

○ 특히 살모넬라의 균수를 저감시키는 방법 즉, 경쟁적 배제제, 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 유기산, 중쇄지방산, 박테리오파아지 등에 의해 장내에서의 살모넬라 농도를 저감하는 방법이 중요한 것으로 생각되지만, 많은 시도에도 불구하고 살모넬라에 의한 식중독이 줄어 들고 있다는 보고는 아직까지 발표되고 있지 않다. 그러나 최근 국내 돼지농가에서 살모넬라 감염의 보고가 감소하고 있는데, 이러한 보고가 감소하게 된 가장 큰 이유 중의 하나가 써코바이러스의 백신이 개발되면서 써코바이러스가 통제되고 이로 인하여 질병의 보고 건수가 줄어든 것에 기인한다(피그엔포크 2013.2월호 참조).

○ 돼지에서 살모넬라증은 이유자돈, 육성돈 및 비육돈에서 장염과 패혈증을 유발한다. 국내에서 각 돼지에서 감염된 질병을 원인체 별로 조사하였을 때 살모넬라 감염은 주로 이유자돈에서 발생하며, 살모넬라 단독 감염은 25% 정도에 불과하고 나머지 75%는 다른 병원체와 혼합 감염되어 있다. 특히, PRRSV와 PCV2와의 혼합 감염이 90% 이상을 차지하여 이유 후 스트레스 요인이 증가된 상태에서 만성소모성질병의 대표적인 원인체인 PRRSV와 PCV2와 같은 바이러스에 먼저 감염되고 이차적으로 살모넬라의 혼합 감염이 증가하는 것으로 추정하고 있다. 그러나 아직도 국내에서는 돼지의 경우 면역력을 억제하는 1차적 병원체인 PRRS 바이러스 등이 상존하고 있으므로 이들을 같이 조절할 수 있는 물질인 본 과제에서와 같은 면역조절(증강)제의 개발이 살모넬라의 억제에도 가장 이상적이라고 할 수 있다.

그러나 위에 언급한 조치(measure)가 현재 널리 사용됨에도 불구하고 아직도 살모넬라에 의한 식중독이 줄지 않고 있으므로 이에 대한 새로운 대안이 요구되고 있다. 또한 지금까지 사용된 방법이 살모넬라의 맹장(cecal)에서의 살모넬라 군락화 감소, 및 분변으로 나오는 살모넬라 감소를 목표로 효능이 뛰어난 제품을 수 십년간 연구했음에도 이미 살모넬라들이 이러한 조치에 적응했음을 고려한다면, 추가적인 새로운 방법의 제시가 필요할 것으로 판단된다.

집락화 억제와 선천성면역 훈련(training innate immunity)에 근거한 새로운 시도

모든 종류의 가축 사육 중 어느 생산 단계에서도 살모넬라 감염이 발생할 수 있지만, 육계와 산란계의 경우 종계장의 지속적 감염이나 부화기의 오염으로 인해 부화 직후 조기에 살모넬라 세균에 감염되는 것으로 추정된다. 높은 역가의 특정 모계이행항체의 방어 효과는 몇 주 이내에 소멸되며, 비록 부화 후 조기에 임상증상에 대한 방어 효과는 일부 나타낼 수 있다고 하더라도 감염되는 외부 혈청형 세균이 장관 내에 집락화(colonization)하는 것을 예방할 수 있는 효과는 거의 없다. 따라서 매우 어린 시기의 병아리가 조기에 감염되면 결과적으로 매우 높은 수준의 오염이 주변 환경에 야기하게 되고 병원체의 전염이 자리짓 오염을 통해 매우 빠르게 일어날 수 있다.

이러한 이유 때문에 부화 직후 곧 바로 저항성을 유도해 준 다음, 성계 및 노계까지 장기간 면역력을 지속시킬 수 있는 방법이 필요하다.

최근에 제시된 면역훈련(trained immunity)이라는 새로운 가설에 의하면, 감염 등에 의해 일단 선천성 면역반응이 유도되면 일정 시간 동안 유도된 면역반응이 유지되어, 처음 감염된 병원체가 아닌 새로운 병원체에 대한 항병력의 증강을 이끌어 내 2차 감염에 대한 대항력이 강해질 수 있다. 이것은 가축에서 이미 보고되었던 집락화(colonization) 억제 과정에서 보여주는 현상과 유사하다고 할 수 있다. 유럽의 연구진들은 가축의 면역체계 미성숙과 함께 방어를 위한 장내 미생물 세균총이 미발달한 상태에서(가금류의 경우 부화 후), 살모넬라 백신을 경구투여 하는 집락화 억제라는 과정을 실시한 결과 아직 정상적인 면역체계가 형성되기 이전의 감수성 기간임에도 불구하고 병원성 살모넬라에 대한 방어효과가 형성될 수 있음을 입증하였다. 즉, 병원성이 없는 살아있는 균주(백신)를 미리 경구로 투여하게 되면 후에 접종한 공격접종용 병원성 균주가 장관 내에 집락화 하는 것을 감소시키거나, 예방할 수 있다는 것이다. 이러한 집락화 억제 현상은 광범위한 적용 범위를 가지게 되는데, 이와 유사한 집락화 억제 작용이 *Campylobacter jejuni* 세균 사이에서도 발생하며 또한 돼지, 송아지, 어린 유아에서도 발생하는 것이 확인되었기 때문이다.

집락화 억제 작용은 매우 유사한 상관관계를 지니는 개체들 사이에서 나타나는데, 이러한 세균 균주 사이의 작용 외에도 숙주와 세균 사이의 작용 역시 방어작용에 관여할 수 있으며 이는 먼저 유입된 균주가 가축의 면역체계를 자극함으로써 일어난다고 보고되고 있다. 즉, 장관벽에 면역세포들이 축적되게 됨으로써 내부 장기에 퍼지는 것을 감소시키는 것이 확인된 것이다.

이러한 면역학적 학설에 의하여 개념을 확장하여 실험한 결과 면역훈련(trained immunity)이라는 새로운 가설이 제안된 것으로, BCG 접종이 면역훈련(trained immunity) 과정을 통해 관련성이 없는 병원체에 대해 상당히 오랫동안 비특이적 방어효과를 나타냄을 확인하였으며, 또한 *C. albicans*와 베타글루칸을 가지고 실시한 실험에서도 유사한 결과를 나타내었다.

집락화(colonization) 억제나 면역훈련(trained immunity) 가설에 근거한 살모넬라 대응에 있어서 현장에서 적용 가능한 방법은 PAMP 즉, 베타글루칸 등 병원체 유래의 안전한 PAMP를 이용하는 것으로 판단되어 진다.

3장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

세부연구수행결과

< 목 차 >

1절. 면역반응 활성화를 통해 간접적으로 작용하여 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 면역조절소재 개발

: '장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 소재' 개발

1. 고도화 면역조절소재 선발을 위한 5종 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 *in vitro* 효능 평가

가. 면역조절소재의 생산공정

(1) 발효미생물 증균배양공정

(2) 천연물(생물전환)산물 생산공정

(가) 전처리공정

① 이물 및 곰팡이 세척공정

② 천연물자원의 배양배지화를 위한 가수분해효소에 의한 효소처리공정

(나) 발효 및 효소처리 생물전환공정

(다) 후처리공정

나. 면역조절소재의 면역활성 및 항살모넬라 효능 평가를 위한 대식세포 기반의 Bioassay 실험법

(1) 대식세포(마크로파지)의 배양

(2) 대식세포의 NO 생성능 측정

(3) 대식세포의 살모넬라 탐식능 확인

(4) 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능(자가포식) 확인

다. 5종 천연물 유래 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 면역활성 평가

(1) 흑미강(생물전환)산물

(2) 미강(생물전환)산물

(3) 강황(생물전환)산물

(4) 산초(생물전환)산물

(5) 수수(생물전환)산물

라. 5종 천연물 유래 면역조절소재의 대식세포 기반의 항살모넬라 효능 평가

(1) 흑미강(생물전환)산물

(2) 미강(생물전환)산물

(3) 강황(생물전환)산물

(4) 산초(생물전환)산물

(5) 수수(생물전환)산물

2. 5종 면역조절소재의 *in vivo* 효능 평가를 통한 고도화 면역조절소재의 주소재 및 후보소재 선발

가. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서 5종 면역조절소재의 패혈증 억제 효과 평가

나. Lethal dose의 살모넬라 복강 내 감염 마우스모델에서 5종 면역조절소재의 치사율 지연 효과 평가

다. Sub-lethal dose의 살모넬라 복강 내 감염 마우스모델에서 5종 면역조절소재의 면역반응 평가

(1) 복강 내 생존 살모넬라 수 측정

(2) 비장 림프구 활성화 효과 평가

(3) cytokine profiling을 통한 면역반응의 분석

3. 선발된 **고도화** 면역조절소재의 대식세포 기반의 *in vitro* 효능 평가

가. 주소재인, 강황(생물전환)산물의 원재료 평가를 위한 국내산 및 인도산 강황 유래의 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 효능 평가

- (1) 원산지별 강황(생물전환)산물의 생산 및 대식세포 기반의 면역활성 평가
- (2) 원산지별 강황(생물전환)산물의 대식세포 기반의 항살모넬라 효능 평가
 - (가) 살모넬라 탐식능 평가
 - (나) 살모넬라 살해능 평가

나. **고도화** 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 효능 평가

- (1) **고도화** 면역조절소재의 대식세포 기반의 면역활성 평가
 - (가) 미강(생물전환)산물
 - (나) 강황(생물전환)산물
- (2) **고도화** 면역조절소재의 대식세포 기반의 항살모넬라 효능 평가
 - (가) 미강(생물전환)산물
 - (나) 강황(생물전환)산물

4. 선발된 **고도화** 면역조절소재의 *in vivo* 효능 평가

: **종 특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 복강 내 감염 마우스모델에서의 평가**

가. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서 패혈증 억제 효능 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

나. Lethal dose의 살모넬라(ATCC14028) 복강 내 감염 마우스 모델에서의 치사율 지연 효과 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

다. Sub-lethal dose의 살모넬라(ATCC14028) 복강 내 감염 마우스에서의 면역반응 평가

- (1) 복강 내 생존 살모넬라 수 측정
 - (가) 미강(생물전환)산물
 - (나) 강황(생물전환)산물
- (2) 비장 림프구 활성화 효과 평가
 - (가) 미강(생물전환)산물
 - (나) 강황(생물전환)산물
- (3) cytokine profiling을 통한 면역반응의 분석
 - (가) 미강(생물전환)산물
 - (나) 강황(생물전환)산물
- (4) 조직의 손상 억제 효능 확인
 - (가) 미강(생물전환)산물
 - (나) 강황(생물전환)산물

5. 선발된 **고도화** 면역조절소재의 Scale-up 및 표준화

가. **고도화** 면역조절소재의 생산공정 scale-up 및 표준화

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

나. **고도화** 면역조절소재, 강황(생물전환)산물의 생산공정 validation 및 표준화

- (1) 50L 발효조 규모에서의 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

- (2) 500L 발효조 규모에서의 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증
- (3) 5000L 발효조 규모에서의 시험생산

다. 면역조절소재의 유통기한 설정 및 안정성 확립

- (1) 면역조절소재의 유통기한 설정 실험 디자인 및 결과 도출
 - (가) 실험방법
 - (나) 실험결과
 - (다) 결론
- (2) 면역조절소재의 안정성 확립

**2절. 살모넬라에 직접 작용하여 살모넬라를 제거할 수 있는 항균소재 개발
: ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재’**

1. 바실러스소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가

다. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

- (1) 실험방법
- (2) MIC 산출 결과

라. 살모넬라균과의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 접종량 및 배양시간에 따른 항살모넬라 효능 비교
- (3) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 세포상태(growth or spore)에 따른 항살모넬라 효능 비교
- (4) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 세포상태(growth or spore)와 혼합배양 후 바실러스 추가접종에 의한 항살모넬라 효능 비교
- (5) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 다양한 접종량과 혼합배양 후 바실러스 추가접종에 의한 항살모넬라 효능 비교
- (6) 고농도 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 접종량 감소와 혼합배양 후 추가접종에 의한 항살모넬라 효능 비교

2. 유산균소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가

다. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

라. 살모넬라균과의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 살모넬라와의 유산균 혼합배양에서 접종량 및 배양시간에 따른 항살모넬라 효능 비교
- (3) 살모넬라와의 유산균 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 세포상태(growth or spore)에 따른

항살모넬라 효능 비교

(4) 살모넬라와의 유산균 혼합배양에서 유산균의 접종량 및 배양환경에 따른 항살모넬라 효능 비교

3. 바실러스소재 및 유산균소재 복합제제의 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 살모넬라와의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 살모넬라와의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가
- (3) 살모넬라와의 바실러스 및 유산균 혼합배양에서 접종량에 따른 항살모넬라 효능 비교

4. 정향소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가
- (3) 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

5. 산초소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

- (1) 실험방법
- (2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가
- (3) 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

6. 왕겨초액의 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

나. 인수공통감염균주를 포함하는 5가지 살모넬라 균주에 대한 MIC 산출

3절. 면역조절소재 및 항균소재의 작용기전 연구

1. **고도화** 면역조절소재의 특성 조사

가. 면역조절소재의 물리화학적 및 생물학적 특성 조사 실험법

- (1) 물리화학적 특성
- (2) 생물학적 특성

나. 미강(생물전환)산물의 물리화학적 및 생물학적 특성

다. 강황(생물전환)산물의 물리화학적 및 생물학적 특성

2. **고도화** 면역조절소재, 강황(생물전환)산물의 면역활성 유효성분 확인 및 생물학적 특성 평가

가. 강황(생물전환)산물의 면역활성 유효성분인 다당체분획물 제조

- (1) 분리정제공정
- (2) HPLC 분석
- (3) 대식세포 NO 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

나. 강황(생물전환)산물의 및 다당체분획물의 면역활성 특성 평가

- (1) 대식세포에서의 Cytokine 분비 패턴 비교
- (2) 특이수용체(Receptor) 확인
- (3) LPS 및 MPLA와의 면역활성 특성 비교

3. 고도화 면역조절소재의 *in vitro* 실험계에서 살모넬라 감염 억제 기전 확인

가. 고도화 면역조절소재의 농도별 대식세포 탐식능 활성화 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

나. 고도화 면역조절소재의 농도별 대식세포 NO 생성 및 iNOS 활성화 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

다. 고도화 면역조절소재의 세포내 살모넬라 증식 억제에 기여하는 autophagy 관련 단백질 활성화 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

라. 고도화 면역조절소재의 interferon 반응 활성화 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

마. 고도화 면역조절소재의 *in vitro* 실험계에서 살모넬라 감염 억제 기전에 대한 실험적 의의

4. 왕겨초액의 살모넬라 성장 억제 기전 확인

가. Disc assay를 이용한 왕겨초액의 항균활성 검증

나. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

다. genomic DNA 및 세포 내 단백질에 미치는 효과 확인

라. Scanning Electron Microscopy를 이용한 살모넬라 형태 변화 확인

마. 왕겨초액의 살모넬라 성장 억제 기전에 대한 실험적 의의

4절. 시너지 효과를 낼 수 있는 면역조절소재 및 항균소재의 조합 도출을 위한 *in vitro* 효능 비교 평가

1. 선발된 소재의 *in vitro* 효능에 대한 개별소재별 *in vitro* 1차 평가

가. Caco-2 세포주에서 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입 억제에 미치는 개발소재의 효능 비교 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물
- (3) 왕겨초액
- (4) 프로바이오틱스

나. 대식세포의 살모넬라 탐식능 향상에 미치는 면역조절소재의 효능 비교 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

다. 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 향상에 미치는 면역조절소재의 효능 비교 평가

- (1) 미강(생물전환)산물
- (2) 강황(생물전환)산물

라. 면역조절소재 및 항균소재의 *in vitro* 1차 평가에 대한 실험적 의의

2. 고도화 면역조절소재, 강황(생물전환)산물의 농도에 따른 효능 비교 *in vitro* 2차 평가

- 가. 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입 억제에 미치는 강황(생물전환)산물의 농도별 효능 비교 평가
- 나. 대식세포의 살모넬라 탐식능 향상에 미치는 강황(생물전환)산물의 농도별 효능 비교 평가
- 다. 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 향상에 미치는 강황(생물전환)산물의 농도별 효능 비교 평가
- 라. 강황(생물전환)산물의 농도에 따른 효능비교 *in vitro* 2차 평가에 대한 실험적 의의

3. 선발된 소재의 *in vitro* 효능에 있어서 면역조절소재 및 항균소재의 복합제제에서의 시너지 효과 평가

- 가. 복합제제의 장관 점착 및 침입 억제 효과 비교
 - (1) 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제
 - (2) 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합제제
- 나. 복합제제가 대식세포의 살모넬라 탐식능 향상에 미치는 효과 비교
 - (1) 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제
 - (2) 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합제제
- 다. 복합제제가 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 향상에 미치는 효과 비교
 - (1) 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제
 - (2) 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합제제
- 라. 복합제제의 살모넬라 항균 효과 비교
 - (1) NBGP 방법을 이용한 복합제제의 항살모넬라 항균 효과 평가
- 마. 면역조절소재 및 항균소재의 복합제제에서의 시너지 효과 평가의 실험적 의의

5절. 마우스 실험동물모델에서 고도화 면역조절소재 및 바실러스소재의 유효성 평가 및 이를 통한 고도화된 소재조합 도출

1. 살모넬라 저감제의 유효성 평가를 위한 *in vivo* 투여기준 설정

- 가. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 면역조절소재의 복강 및 경구 투여량에 따른 치사율 억제 평가
- 나. 살모넬라 ATCC14028 균주 복강내 감염 마우스 모델에서의 면역조절소재의 경구 투여량에 따른 치사율 억제 평가
- 다. 면역조절소재의 *in vivo* 경구 투여량 설정
- 라. 프로바이오틱스소재의 *in vivo* 경구 투여량 설정
- 마. 왕겨초액의 *in vivo* 경구 투여량 설정
- 바. 살모넬라 저감제의 유효성 평가를 위한 *in vivo* 투여기준 설정의 실험적 의의

2. 인수공통 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 *in vivo* 유효성 평가

- 가. 살모넬라 저감제의 살모넬라 감염 저해 효능에 대한 *in vivo* 1차 평가
 - (1) 인수공통 살모넬라 경구 감염 마우스모델의 제작
 - : 인수공통 살모넬라(*S. Enteritidis* SE38) 경구 감염 식중독 마우스 모델의 제작
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
 - (2) 살모넬라 저감제 시제품의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 살모넬라의 감소 여부 확인
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

- ① 맹장 및 장관막림프절
- ② 비장 및 간

(3) 복합제제의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 미생물의 감소 여부 확인

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

- ① 맹장 및 장관막림프절
- ② 비장 및 간

나. **고도화** 면역조절소재, **강황(생물전환)산물 함유 살모넬라 저감제**의 살모넬라 감염 예방 및 치료 효능에 대한 **농도에 따른 in vivo** 2차 평가

(1) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(2) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(3) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(4) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(5) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 활성 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(6) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 투여량에 따른 시너지 효과 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(7) 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 효과 평가

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

(8) 왕겨초액의 분변 살균제로서의 효능 평가

(가) 왕겨초액의 처리시간에 따른 분변 내 살모넬라의 생존률 확인

(나) 강황(생물전환)산물을 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

(다) 바실러스소재를 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

(라) 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

다. **인수공통 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스 모델에서의 in vivo** 유효성 평가에 대한 실험적 의의

3. **종특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 in vivo** 유효성 평가

가. 살모넬라 저감제의 살모넬라 감염 저해 효능에 대한 1차 평가

- (1) 종특이 살모넬라 경구 감염 마우스모델의 제작
 - : 종특이 살모넬라(SL1344) 경구 감염 식중독 마우스 모델의 제작
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (2) 살모넬라 저감제 시제품의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 살모넬라의 감소 여부 확인
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
 - ① 맹장 및 장관막림프절
 - ② 비장 및 간
- (3) 복합제제의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 미생물의 감소 여부 확인
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
 - ① 맹장 및 장관막림프절
 - ② 비장 및 간

나. **고도화** 면역조절소재, **강황(생물전환)산물 함유 살모넬라 저감제**의 살모넬라 감염 예방 및 치료 효능에 대한 **농도에 따른 in vivo** 2차 평가

- (1) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (2) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (3) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (4) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (5) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 활성 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (6) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 투여량에 따른 시너지 효과 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (7) 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 효과 평가
 - (가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인
 - (나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인
- (8) 왕겨초액의 분변 살균제로서의 효능 평가
 - (가) 왕겨초액의 처리시간에 따른 분변 내 살모넬라의 생존률 확인
 - (나) 강황(생물전환)산물을 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가
 - (다) 바실러스소재를 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가
 - (라) 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

다. 종특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스 모델에서의 *in vivo* 유효성 평가에 대한 실험적 의의

4. 항생제 다제내성 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구·감염 마우스모델에서 *in vivo* 유효성 평가

가. 항생제 다제내성 균주를 이용한 살모넬라 감염 마우스모델 확립

나. 면역조절소재의 감염 억제 효능 평가

(1) 미강(생물전환)산물의 효능 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

(2) 강황(생물전환)산물의 효능 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

(3) 프로바이오틱스소재의 감염 억제 효능 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

(4) 왕겨초액의 감염 억제 효능 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

(5) 면역조절소재와 바실러스소재의 감염 억제 시너지 효과 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

다. 항생제 다제내성 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 *in vivo* 유효성 평가에 대한 실험적 의의

6절. 배합제품 제조

1. 산란계에서의 공격접종 Field test를 위한 배합제제의 시제품 생산

가. 배합제품의 시제품 Formulation

나. 산란계에서의 인수공통 살모넬라균의 공격접종 Field test를 위한 배합제품 제조

다. 산란계에서의 종 특이적 살모넬라균의 공격접종 Field test를 위한 배합제품 제조

라. 산란계에서의 면역조절소재의 1일섭취량 산출

마. 산란계에서의 배합제품의 시제품 시험성적서

2. 양돈계에서의 공격접종 Field test를 위한 배합제제의 시제품 생산

가. 배합제품의 시제품 Formulation

나. 양돈계에서의 Field test를 위한 배합제품 제조

다. 양돈계에서의 배합제품의 시제품 시험성적서

7절. 경제동물에서의 공격접종 test

1. 닭에서의 공격접종 test

: 닭 대상 살모넬라 저감제의 감염면역학 및 임상병리학적 효능 분석

가. 살모넬라 저감 후보물질의 선별(제1세부과제와 연계)

나. 공격 접종균주 선발 및 접종균주 감별 표지유전자 바이오마커 도입

- (1) 가금 특이 병원성 및 인수공통 살모넬라균주의 확보
- (2) GFP를 이용한 살모넬라 균의 tagging
- (3) 항생제 저항성을 이용한 *S. Enteritidis*의 선택적 배양(정성 및 정량분석법 구축)

다. 실험균주 준비 및 정성/정량적 분석법 확립

라. 선발 후보물질이 살모넬라균의 성장곡선에 미치는 영향

- (1) 실험방법
- (2) 결과 및 분석

마. 선발 후보물질이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과

- (1) 실험방법
- (2) 결과 및 분석

바. 선발 후보물질이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과

- (1) 실험방법
- (2) 결과 및 분석

사. 선발 후보물질이 닭 유래 대식세포주의 탐식 및 포식작용에 미치는 효과 분석

- (1) 실험방법
- (2) 결과 및 분석

아. 선발 후보물질이 닭 유래 대식세포 HD11의 cytokine 발현에 미치는 영향

- (1) 실험방법
- (2) 결과 및 분석

자. 공격균주 선발 및 1일령 초생추에 대한 감염프로토콜 확립

- (1) SG 사료첨가제 시험
- (2) SE 사료첨가제 시험

차. 닭에 대한 강황(생물전환)산물의 생체 효능 분석

- (1) 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 생체반응 분석
 - (가) 생체지표의 변화 분석
 - (나) 감염면역지표의 변화 분석
 - (다) 임상병리학적지표의 변화 분석

카. 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 공격접종에 대한 방어효능 분석

- (1) 가금 특이 살모넬라균 SG의 공격접종에 대한 방어 효능

- (가) 증체율 변화 및 폐사율 분석
- (나) 감염면역지표의 변화 분석
- (다) 임상병리학적지표의 변화 분석

(2) 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 인수공통 살모넬라균 SE의 공격접종에 대한 방어 효능

- (가) 증체율 변화 및 폐사율 분석
- (나) 감염면역지표의 변화 분석
- (다) 임상병리학적지표의 변화 분석

2. 돼지에서 **의 공격접종 test**

: 돼지 대상살모넬라 저감제의 효능 분석

가. 살모넬라 저감 후보물질의 선별 및 이유자돈 적응농도 최적화

(1) *In vitro* 결과를 토대로 살모넬라 저감 후보물질의 선별(제1세부과제와 연계)

(2) 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물의 생체 안전성 및 급여 효능 분석

- (가) 강황(생물전환)산물의 급여
- (나) 강황(생물전환)산물의 급여에 따른 장내 미생물총(microbiota)변화 분석
- (다) 강황(생물전환)산물에 의한 이유자돈의 성장지표, 혈액 및 주요 장기에 대한 임상병리학적 분석
 - ① 전체 혈구 계산 지표 분석
 - ② 혈청화학검사 지표 분석
- (라) 주요 장기에 대한 조직병리학적 지표 분석

나. 강황(생물전환)산물이 *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* 살모넬라균에 미치는 효과

(1) 강황(생물전환)산물이 살모넬라의 성장에 미치는 효과 분석

- (가) 실험방법
 - ① 균주, 배지 및 배양조건
 - ② 강황(생물전환)산물 추출물 준비
 - ③ 성장곡선 측정
- (나) 결과분석
 - ① 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 성장에 미치는 효과

(2) 강황(생물전환)산물이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과 분석

- (가) 실험방법
 - ① 균주, 배지 및 배양조건
 - ② 강황(생물전환)산물 추출물 준비
 - ③ 운동성(swimming motility) 측정
- (나) 결과분석
 - ① 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과

(3) 강황(생물전환)산물이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과 분석

(가) 실험방법

- ① 균주, 배지 및 배양조건
- ② 강황(생물전환)산물 추출물 준비
- ③ Total proteins 분석
- ④ Secreted proteins 분석

(나) 결과분석

- ① 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과

다. 돼지에 대한 *S. Enteritidis* 공격접종균주 선발 및 접종균주 감별 표지유전자 바이오마커 도입

- (1) 자연감염균주와의 감별을 위한 접종균주 내 표지유전자 바이오마커 도입
- (2) 접종균주의 정성 및 정량 분석을 위한 표준검출법 확립

라. 살모넬라 저감 후보물질의 이유자돈 유래 대식세포 반응 분석

- (1) 혈액으로부터 돼지 유래 대식세포주의 확보 및 배양

- (가) 세포배양법 확립
- (나) 살모넬라균 배양
- (다) 강황(생물전환)산물 준비

- (2) 저감 후보물질 처치 후, 대식세포 활성화 비교 : 대식세포 증식능 분석

- (가) 실험방법
- (나) 결과분석

- (3) 저감 후보물질 처치 후, 대식세포 활성화 비교 : 살모넬라균 탐식능 및 포식능 비교 분석

- (가) 실험방법
 - ① 살모넬라균 탐식능 분석(Phagocytosis assay)
 - ② 살모넬라균 포식능 분석(*Salmonella* killing assay)
- (나) 결과분석
 - ① 돼지 대식세포의 탐식능력 비교 분석
 - ② 돼지 대식세포의 포식능력 비교 분석

- (4) 강황(생물전환)산물이 돼지 유래 대식세포주 3D4/31의 cytokine 발현에 미치는 영향 분석

- (가) 실험방법
- (나) 결과분석

마. *S. Enteritidis* 공격균주 선발 및 21일령 이유자돈에 대한 감염프로토콜 확립

- (1) 문헌검색을 통해 감염성이 잘 확립된 인수공통살모넬라균 공격접종 균주 선발
- (2) 21일령 이유자돈에 대한 공격접종 농도 선정 및 감염 kinetic 결정

바. S. Enteritidis 살모넬라균 공격접종에 대한 방어효과 검증 및 임상 및 병리학적 지표 분석

- (1) 공격접종 실험군 및 시료채취 일정 설계
 - (가) 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물 급여 및 살모넬라균 공격접종
 - ① 실험방법
 - (나) 성장지표 분석
 - ① 소비된 사료의 양, 체중 및 체온 측정
 - (다) 혈액 및 주요장기에 대한 임상병리학적 지표 분석(일반 혈액지표, 간/근육/신장 손상지표, 대사지표)
 - ① 전체 혈구 계산 지표 분석
 - ② 혈청화학검사 지표 분석

사. 목적동물에 대한 S. Enteritidis 살모넬라균 감염면역학적 효능 검증

- (1) 공격균주 준비 및 접종

- (2) 면역지표 변화 분석 : 혈액 중 면역세포 아형 분석, 친염증성 사이토카인 발현양상 분석
 - (가) 강황(생물전환)산물이 돼지의 살모넬라균 감염 시 혈액 중 면역세포 아형 변화에 미치는 영향 분석
 - ① 실험방법
 - ② 결과분석
 - (나) Cecal 집락화, 분변 내 균수 변화, 주요 장기에 세균분포에 대한 정량 및 정성분석
 - ① 실험방법
 - ② 결과분석

아. S. Typhimurium 살모넬라균 공격접종에 대한 방어효과 검증

- (1) **접종농도 결정 실험 (외부의뢰실험과 연계)**

- (2) **살모넬라 저감제의 효능평가 실험 (외부의뢰실험과 연계)**

8절. 농장에서의 현장실증 실험

1. 현장실증 실험의 시험농장 선정 기준 설정 및 적용실험 Design

가. 시험농장의 선정 기준 설정

- (1) 현장실증 실험대상농장 선택에 관한 견해
- (2) 인수공통 살모넬라 양성의 양돈 실험대상농장의 탐색

나. 현장실증 적용시험 Design

- (1) 마우스, 양계 및 양돈에서의 challenge 실험 결과를 기반으로 현장실증실험 설계 준비
- (2) 인수공통 살모넬라 음성인 농장에서의 현장실증실험 설계

다. 현장실증시험 수행에 있어서의 조사 항목 검토 및 결정

2. 양계농장에서의 현장실증 실험

가. 닭에서의 공격 접종 테스트 실험

- (1) 산란계에서의 인수공통 살모넬라균의 공격접종 Field test [외부의뢰]
- (2) 산란계에서의 증특이 살모넬라균의 공격접종 Field test [외부의뢰]

나. 5개 양계농장에서 살모넬라 저감제 섭취군 및 미섭취군 2군에 대해 적용

- (1) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 임상병리학적 지표 평가
- (2) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 분자미생물학 평가

3. 양돈농장에서의 현장실증 실험

가. 돼지에서의 공격접종 테스트 실험

- (1) 1차 야외공격접종실험
- (2) 2차 야외공격접종실험
- (3) 3차 야외공격접종실험
- (4) 4차 야외공격접종실험
- (5) 5차 야외공격접종실험

나. 6개 양돈농장에서 살모넬라 저감제 섭취군 및 미섭취군 2군에 대해 적용

- (1) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 임상병리학적 지표 평가
- (2) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 분자미생물학 평가

다. 현장실증실험을 수행할 농장에서의 살모넬라 저감제에 대한 의견

- (1) 농가의 살모넬라 저감제에 대한 의견
- (2) 1개 농장의 성적서
- (3) 요약

라. 농장 살모넬라 혈청을 이용한 살모넬라 항체가 검사 및 PCR 검사

- (1) 실험방법
- (2) 결과
- (3) 시험 담당 수의사의 의견
- (4) 고찰

9절. 현장적용매뉴얼 개발

- 1. 목적
- 2. 범위
- 3. 배경
- 4. 참고 문헌

5. 용어 정의
6. 개요 및 배경
7. 농장적용 살모넬라 저감제 선택 및 사용 매뉴얼
8. 향후 살모넬라 저감대책 방안 제안

10절. 농림식품부 정책부서에 정책자문안 제시

1. 정책안 제안배경 요약

2. 세포내 감염 살모넬라 저감제의 필요성

- 가. 살모넬라 식중독 현황
- 나. 현재 살모넬라 저감 조치의 단점 및 문제점
 - (1) 살모넬라 저감제의 문제점
 - (가) 백신 및 항생제의 제한사항
 - ① 백신의 장단점
 - ② 항생제의 문제점
 - (2) 기존 살모넬라 저감제들의 문제점
 - (가) 유기산
 - (나) Prebiotics
 - (다) 프로바이오틱스 및 CE 제품
 - (라) 박테리오파지
 - 다. 살모넬라 저감제의 개선 방안
 - (1) 새로운 기전의 살모넬라 저감제 개발의 필요성
 - (2) 본 과제에서 개발한 살모넬라 저감제에 대한 개요
 - : 살모넬라의 면역회피 기능과 이의 극복 방안
 - (3) 탐식작용/자가포식 유도 TLR4 agonist

3. 정책안 제안의 근거

- 가. 몸 안에서 세포내 감염 살모넬라에 작용하는 살모넬라 저감제가 필요한 이유
- 나. 국가에서 가이드라인 작성 및 중장기적 로드맵 작성이 필요한 이유
- 다. 기타 산업계에서 세포내 감염 살모넬라 저감제가 권장되는 이유
- 라. 항생제 다제내성 살모넬라에 대응하기 위한 세포내 감염 살모넬라 저감제의 중요성

4. (주)에스티알바이오텍의 정책안 제안

1절. 면역반응 활성화를 통해 간접적으로 작용하여 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 면역조절소재 개발

: '장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 소재' 개발

1. 고도화 면역조절소재 선발을 위한 5종 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 *in vitro* 효능 평가

가. 면역조절소재의 생산공정

(1) 발효미생물 종균배양공정

발효미생물(표고버섯균사, 이하 표고균사)의 종균배양공정은 주관기관에서 기 확립한 버섯균사 종균배양공정 체계를 기반으로 수행하였다. 당사에서는 표고버섯 균사체 추출물을 기 확립된 배양공정을 통해 생산하고 있으며, 본 과제의 발효미생물(표고균사)의 종균배양공정은 기 확립된 생산공정에 준하여 수행하였다. 표고균사 seed 배양공정은 5L 발효조에서 컴퓨터 모니터링 on-line system을 통해 발효조의 다양한 배양변수가 자동으로 컴퓨터 모니터를 통해 실시간 모니터링 되며 또한 데이터 자동 저장을 통해 발효공정 확립을 통한 자동제어가 가능하도록 기 구축된 flask, 5L, 50L, 500L 발효조 시스템에서 수행하였다. 발효조에서의 표고균사 seed 배양조건은 온도 28°C, 교반속도 120~180rpm, 공기유입량 1 vvm 조건에서 96시간 배양하여 종균으로 사용하였다.

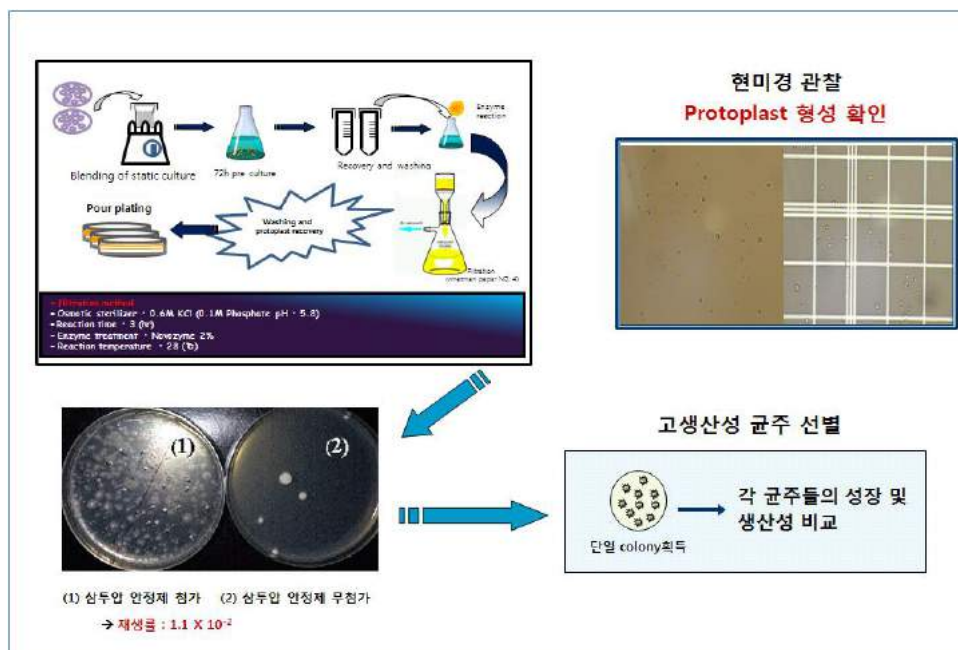


Figure 3. 버섯균사로부터 원형질체 분리 및 재생을 통한 단일콜로니 획득 체계

주관기관에서는 버섯균사배양 최적화를 위해 버섯균사의 단일콜로니 획득 및 고생산성 균주 선별을 위한 스크리닝 시스템이 기 구축되어 있으며, 선정된 버섯균사체의 세포 생산성 향상을 위하여 통계학적 프로그램을 기반으로 한 배양배지 최적화 및 배양변수 최적화를 통해 표고균사 배양을 위한 배양공정 최적화 체계도 기 확립되어 있다. 또한 lab-scale의 flask 배양공정의 scale-up 생산공정 최적화를 위하여 5L 발효기를 기반으로 자동화모니터링 시스템을 구축하고 있으며, 가스분석시스템의 구축을 통한 배양변수의 실시간 분석 및 자동화배양공정 시스템을 통해 500L 및 5톤의 scale-up 생산공정에서도 안정화된 버섯균사 배양공정을 확립하고 있다.

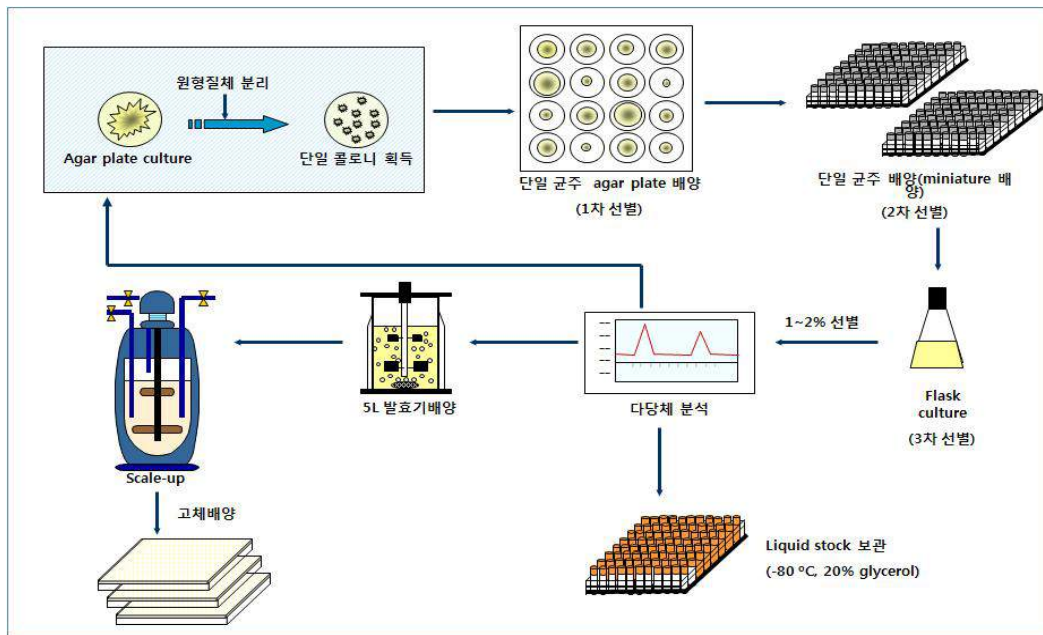


Figure 2. 버섯균사로부터 단일콜로니 획득을 통한 균주개발 및 Scale-up system 체계

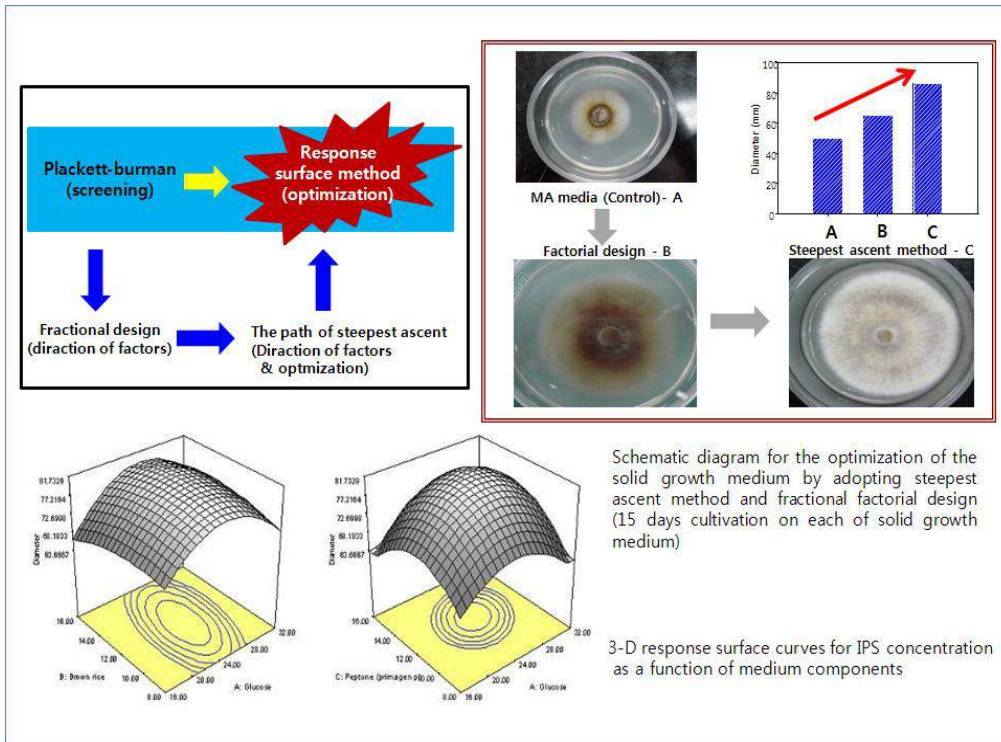


Figure 3. 고생산성 균주의 신속선별을 위한 고체성장배지 최적화 체계

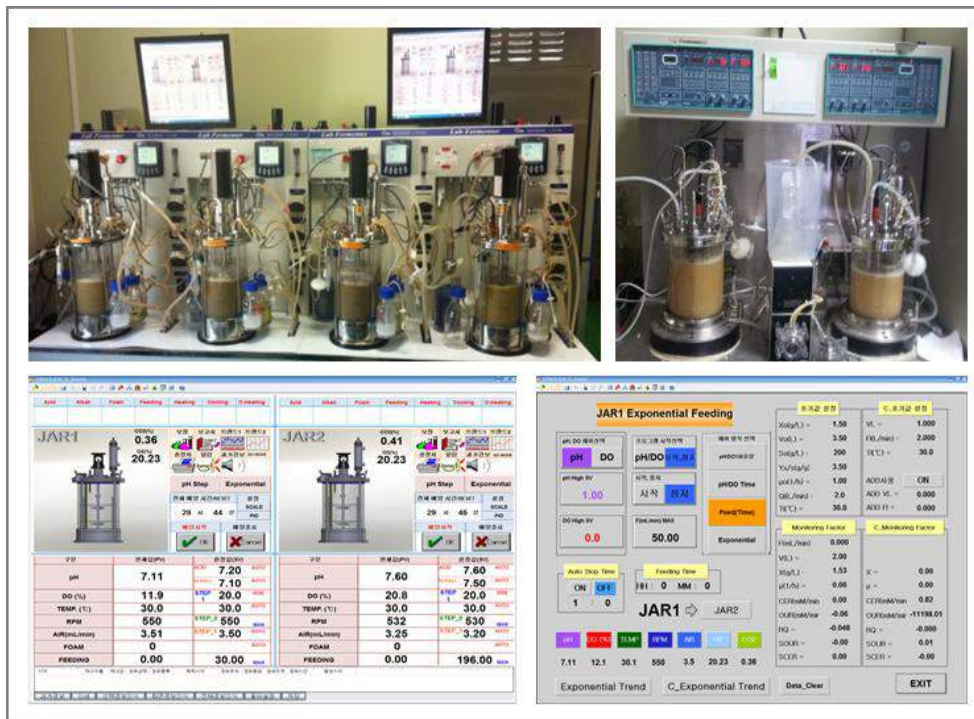


Figure 4. 컴퓨터 모니터링 및 자동제어 시스템

(2) 천연물(생물전환)산물 생산공정

천연물(생물전환)산물의 발효 및 효소처리 생물전환산물의 제조공정은 아래 Figure 5의 공정도에 따라 제조하였다.

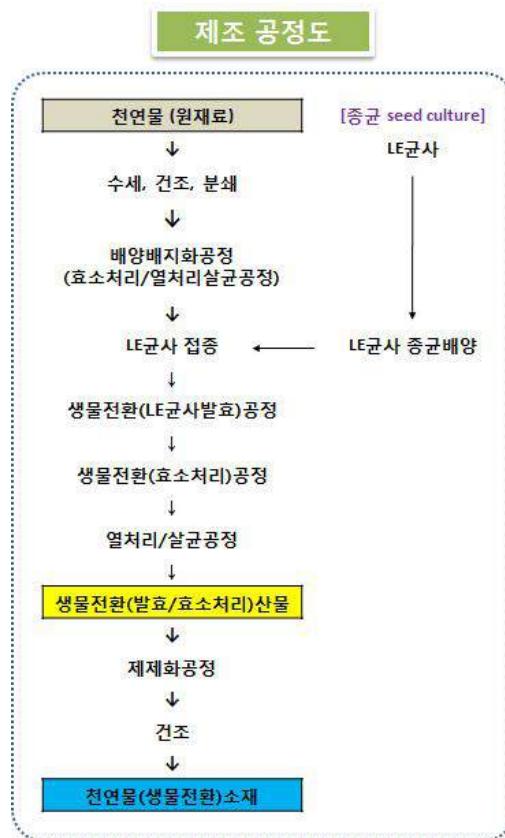


Figure 5. 천연물(생물전환)산물의 제조공정도

(가) 전처리공정

① 이물 및 곰팡이 세척공정

면역조절소재를 생산하기 위한 천연물자원인 흑미강, 강황, 미강, 산초, 수수는 이물 및 곰팡이 등의 오염물질을 제거하기 위하여 세척공정을 수행하였다.

이물 및 곰팡이 제거 작업은 각각의 천연물자원을 ① 1차로 고압의 air gun으로 걸면에 붙어 있을 이물 및 먼지 등을 제거하였다. ② 2차로 체를 쳐서 그 외 존재할 수 있는 이물을 제거하였다. ③ 3차로 물 또는 필요시 에탄올을 처리하여 곰팡이 포자 등의 오염물질을 제거하는 공정을 거쳤다. 세척공정을 거친 천연물자원을 자체규격의 미생물검사를 통해 미생물오염 검사를 수행하여 원재료로 사용하였다.

Table 1. 수수의 원물에서 세척공정 조건에 따른 곰팡이 검출 측정 결과

No.	천연물	멸균처리 조건	곰팡이 관찰 정도
1		-	++
2		-	++
3	수수	-	+/-
4		air washing	+/-
5		air washing /	-
6		70% EtOH	-

② 천연물자원의 배양배지화를 위한 가수분해효소에 의한 효소처리공정

이물 및 곰팡이 오염을 제거한 천연물자원은 다양한 가수분해효소를 사용하여 효소처리 공정을 수행하였다. 가수분해효소는 각 천연물자원에 최적화한 조합의 complex 효소를 사용하였으며, 천연물자원의 전분 및 셀룰로오스 등을 분해할 수 있는 amylase 계열의 효소와 cellulase 계열의 효소를 사용하여 실험을 수행하였다. 각각의 효소는 0.1~0.5%(w/v)으로 처리하고, 최적 활성을 나타내는 온도에서 1시간 동안 반응시키고 멸균과정을 거쳐 천연물 배양배지를 제조하였다.

(나) 발효 및 효소처리 생물전환공정

천연물자원을 배양배지화한 액상천연물배지에 표고균사를 접종하여 28°C ~ 30°C에서 배양하였다. 잔류 탄소원의 농도가 일정농도 이하로 고갈되는 시점에서 농축된 액상천연물배지를 첨가하는 유가식 공정으로 7~10일간 배양하였다. 발효배양공정에 의해 생산된 표고균사발효 천연물발효물에 대하여 2차 생물전환공정의 효소처리공정을 수행하였다. 원재료 즉, 배양기질인 천연물과 발효배양산물인 배양균사체로부터 세포벽 유래의 면역활성 기능성물질을 효과적으로 생산하기 위해서는 세포벽을 구성하고 있는 성분 중 특정성분의 구조 변화를 통해 면역활성 기능성물질로 전환시킴과 함께 효율적으로 추출할 수 있는 효과적인 추출방법을 고려하여야 한다. 이러한 방법으로써 cellulase, hemi-cellulase, pectinase, β-glucanase, β-glucosidase, lysozyme 등 다양한 세포벽 분해효소를 이용한 연구가 보고되어 있다. 본 과제에서는 주관기관에서 기 보유하고 있는 cell wall lytic enzyme complex(세포벽을 분해할 수 있는 세포벽 가수분해효소인 cellulase, hemi-cellulase 및 pectinase 등의 효소 외에 베타글루칸 분해효소인 β-glucanase의 효소복합제)를 사용하여 50~60°C 조건에서 시간별로 shaking(250rpm)하여 효소/기질반응을 최적화 하였다. 2차 생물전환공정에 있어서 표고균사 배양을 통해 생산된 효소와 함께 섬유소분해효소 즉, 셀룰라아제(cellulase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase), 펙티나아제(pectinase), 글루카나제(glucanase) 등의 다양한 효소제를 각각의 천연물 마다 최적화된 최적량을 첨가하여 실시하였다. 효소로는 상업적으로 판매되고 있는 효소제 즉, 섬유소분해효소인 비스코자임(Viscozyme:Aspergillus 유래 복합물), 셀룰라아제(Cellulase: Aspergillus niger 유래), 펙틴분해효소인 필트라제(Filtrase:Tricoderma reesei 유래 복합물), 라피다제(Rapidase:Aspergillus

niger 유래 복합물) 및 스미자임(Sumizyme:Aspergillus niger 유래 펙티나아제를 함유한 복합물)을 사용하였다.

2차 생물전환공정인 효소처리 생물전환공정에 있어서, 효소처리공정에 사용되는 섬유소 분해효소를 생산할 수 있는 미생물을 사용한 발효공정을 최적화함으로써 효소처리 생물전환공정을 대체할 수 있다. 2차 생물전환 발효공정을 통해 천연물(생물전환)산물을 생산할 경우 2차 발효배양과정 중에 증식되는 발효미생물이 배합제제에 있어서 첨가되는 생균제를 대신할 수 있어 보다 경쟁력 있는 소재를 생산할 수 있다.

(다) 후처리공정

생물전환공정에 의해 생산된 천연물자원의 생물전환(발효/효소처리)산물은 90℃, 1시간 효소 불활성화 과정 및 살균과정을 거친 후 동결건조하여 분말화 하였다.



Figure 6. 천연물(생물전환)산물의 후처리 및 회수작업 공정도

나. 면역조절소재의 면역활성 및 항살모넬라 효능 평가를 위한 대식세포 기반의 Bioassay 실험 방법

(1) 대식세포(마크로파지)의 배양

면역조절소재의 면역활성을 평가하기 위하여 5% DMEM media를 사용하여 마크로파지(대식세포)의 배양 및 assay를 수행하였다. 면역활성 측정에 사용한 마크로파지(대식세포)는 RAW 264.7 세포주로, 계대배양은 24well plate의 각 well에 1×10^5 cell/ml의 농도로 0.5ml 씩 세포를 계대배양하였다. 24시간 배양 후 현미경으로 cell growth 상태를 확인한 뒤, 배지를 완전히 제거한 다음 혈청이 첨가되지 않은 배지로 2~3회 washing 하여준다. 각 well에 시료가 첨가된 5% FBS DMEM 배지를 0.5ml 씩 채워준다. 시료의 농도는 1,024 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 시작으로 1/4 serial dilution을 하거나, 8 또는 16 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 시작으로 1/2 serial dilution하여 희석하였다. 또한, positive(+) control로 최종 농도 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하였다(200 $\mu\text{g/ml}$ stock). 시료가 처리된 24well을 8~24시간 배양 후 각 well의 배양액을 400 μl 씩 취하고, 400 μl 씩 취한 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 assay에 사용하였다.

(2) 대식세포의 NO 생성능 측정

96well plate에 각각의 시료와 serial dilution 된 standard를 100 μl 분주하고, Griess reagent (① N-(1-naphtyl) ethlene diamine dihydrochloride : 0.5g/500ml ② Sulfanilamide : 5g / 85% H₃PO₄ 29.5ml/470.5ml)를 100 μl 분한 후 1분간 반응시킨다. ELISA leader를 이용하여 540nm(또는 550nm)에서 흡광값을 측정하여 다양한 시료의 면역활성 역가를 측정하였다.

(3) 대식세포의 살모넬라 탐식능 확인

- ① 1×10^4 cell/ml의 RAW264.7 cell line에 시료를 4시간 처리했다.
- ② 배지로 1회 washing 한 후
- ③ *Salmonella* Typhimurium을 1×10^6 cfu/ml로 맞추어 10ul 처리하였다. (final 1×10^4 cfu)
- ④ 30분, 60분간 반응시킨 후, 배지로 washing 하였다.
- ⑤ 30ug/ml의 gentamycin 을 30분간 처리하여 배지 내 남아있는 *Salmonella*를 제거하였다.
- ⑥ PBS로 washing 후 trypsin 을 처리하여 세포를 얻은 후, 증류수 1ml (또는 0.1% triton X-100 in PBS 1ml)에 현탁하고 실온에서 30분간 rotation하여 세포를 용해시켰다.
- ⑦ nutrient agar에 serial dilution으로 spreading하여 16시간 배양하고 colony 수를 측정하였다.

(4) 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능(자가포식) 확인

- ① 1×10^4 cell/ml의 RAW264.7 cell line에 시료를 4시간 처리했다.
- ② 배지로 1회 washing 한 후
- ③ *Salmonella* Typhimurium을 1×10^6 cfu/ml로 맞추어 10ul 처리하였다. (final 1×10^4 cfu)
- ④ 1시간 반응시킨 후, 배지로 washing 하였다.
- ⑤ 30ug/ml의 gentamycin 을 2,4,8시간 동안 처리하였다.
- ⑥ PBS로 washing 후 trypsin 을 처리하여 세포를 얻은 후, 증류수 1ml (또는 0.1% triton X-100 in PBS 1ml)에 현탁하고 실온에서 30분간 rotation하여 세포를 용해시켰다.
- ⑦ nutrient agar에 serial dilution으로 spreading하여 16시간 배양하고 colony 수를 측정 하였다.

다. 5종 천연물 유래 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 면역활성 평가

앞서 설명한 천연물(생물전환)산물 생산공정에 따라 5종의 천연물(생물전환)산물 시제품을 생산하였다. 각 천연물의 엄선된 원재료에 대해 전처리공정을 거친 후 자체 개발하여 최적화 시킨 표고균사 발효공정과 함께 자체 개발한 cell wall lytic enzyme 효소복합체 처리공정을 수행하여 각 천연물에 대한 생물전환(발효/효소처리)산물의 면역활성 역가를 측정하였다. 면역활성 역가 측정은 대식세포 활성화 실험을 통해 수행하였다. 대식세포 활성화는 대식세포 세포주(RAW 264.7 cell line)의 NO 생성량을 측정하여 평가하였다.

실험결과, 전처리공정을 거친 추출물의 면역활성은 전처리공정을 거치지 않은 추출물에 비해 크게 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 원재료의 전처리공정 후 실온추출 및 열추출 즉, 온도에 따른 추출물의 면역활성 역가에서는 큰 차이가 나타나지 않았으나, 생물전환공정에 의해 생산된 생물전환산물의 면역활성 역가를 조사한 결과, 원물은 물론 전처리공정만을 거친 후의 면역활성 역가에 비해 생물전환(발효)공정을 거친 생물전환(발효)산물의 면역활성 역가가 획기적으로 높아진 것을 확인할 수 있었으며, 생물전환(효소처리)공정까지 거친 최종 생물전환(발효/효소처리)산물에서 면역활성 역가가 매우 향상되어 가장 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

(1) 흑미강(생물전환)산물

국내산 흑미를 구입하여 흑미를 도정하고 흑미강을 수득하여, 이로부터 흑미강(생물전환)산물을 생산하였다. 흑미강(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2~1μg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

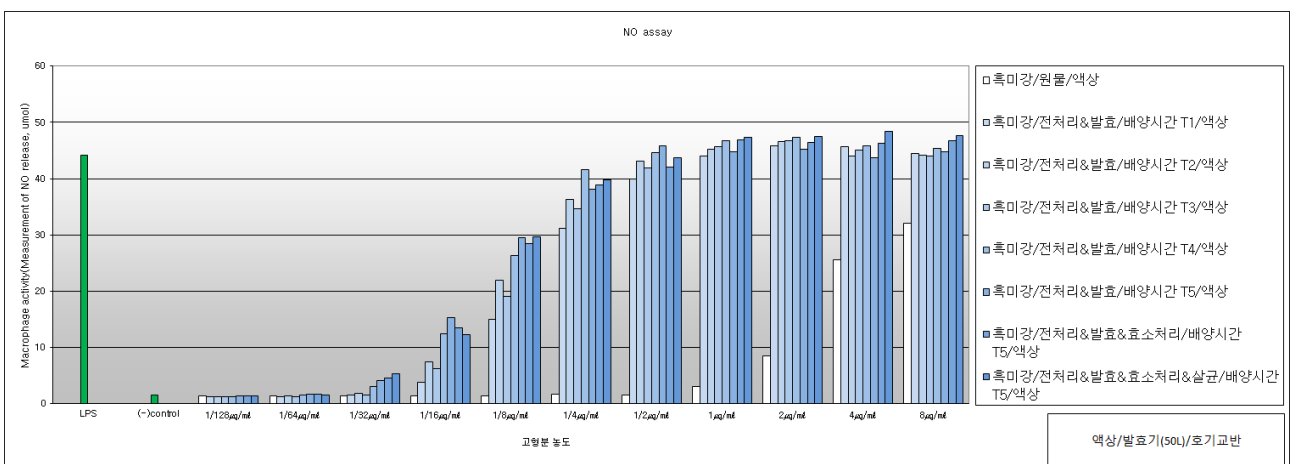


Figure 7. 흑미강(생물전환)산물의 면역활성 역가

(2) 미강(생물전환)산물

국내산 탈지미강을 구입하여 이로부터 탈지미강(생물전환)산물을 생산하였다. 탈지미강(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2~1μg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

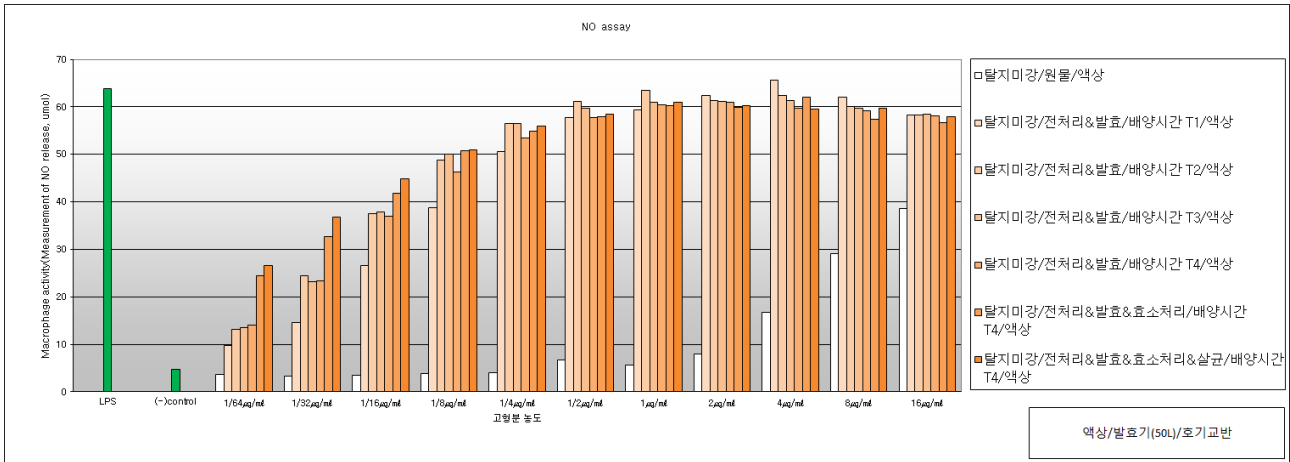


Figure 8. 탈지미강(생물전환)산물의 면역활성 역가

(3) 강황(생물전환)산물

인도산 강황을 구입하여 이로부터 강황(생물전환)산물을 생산하였다. 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 4μg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

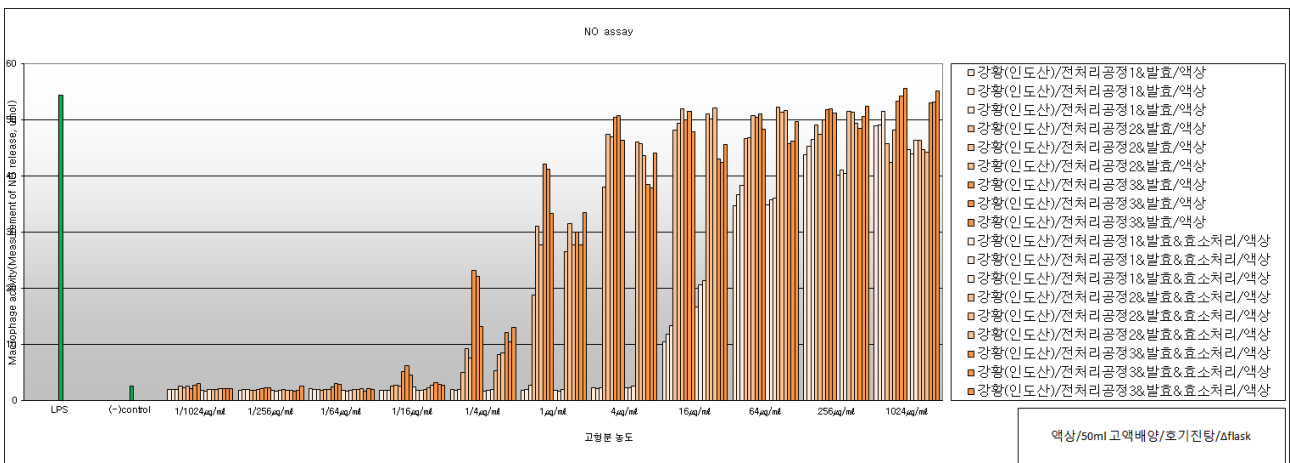


Figure 9. 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

(4) 산초(생물전환)산물

국내산(충청북도 괴산) 산초를 구입하여 이로부터 산초(생물전환)산물을 생산하였다. 산초(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1μg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

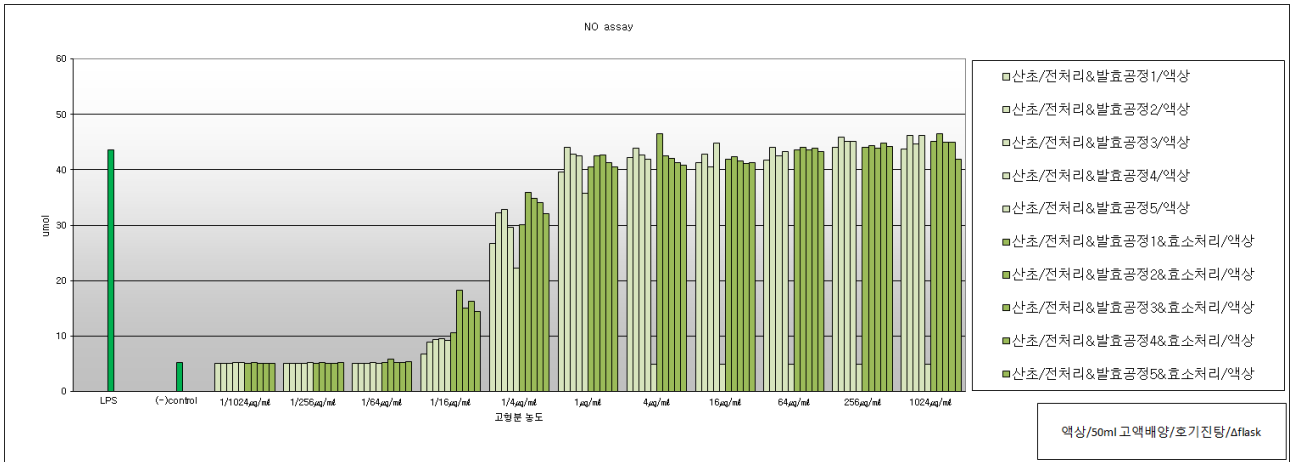


Figure 10. 산초(생물전환)산물의 면역활성 역가

(5) 수수(생물전환)산물

국내산(경상북도 예천) 수수를 구입하여 이로부터 수수(생물전환)산물을 생산하였다. 수수(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1μg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

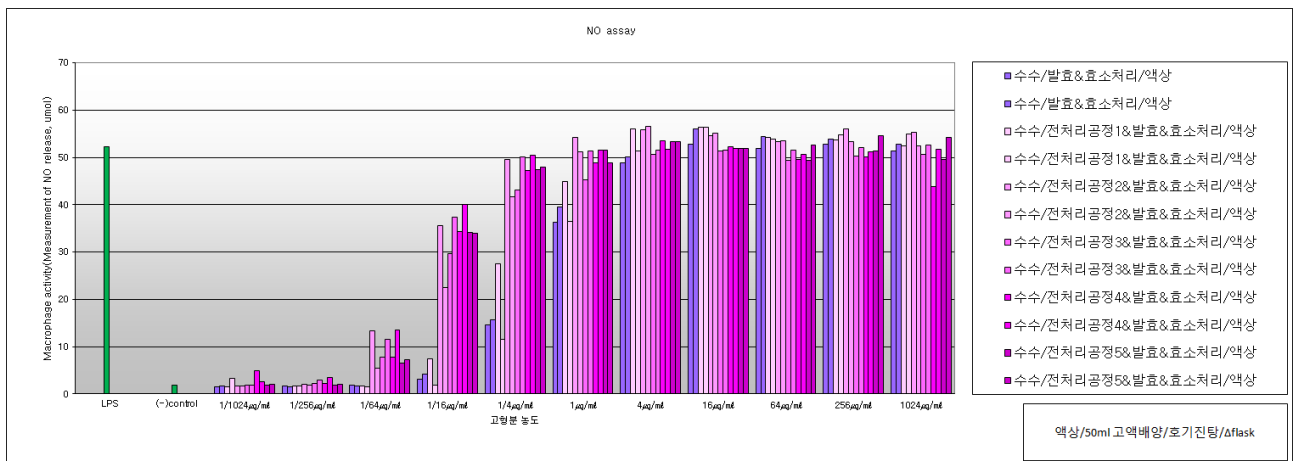


Figure 11. 수수(생물전환)산물의 면역활성 역가

라. 5종 천연물 유래 면역조절소재의 대식세포 기반의 항살모넬라 효능 평가

5종 천연물로부터 생산된 생물전환산물이 대식세포의 항살모넬라 효능 향상에 미치는 효과를 확인하기 위하여 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능을 평가하였다. 살모넬라는 세포내 감염이 이루어지는 세포내 기생세균(intracellular pathogen)으로 대식세포 내에서 살아남아 증식과 체내 전파가 이루어지는 특성이 있으므로 살모넬라에 대한 대식세포의 항병력을 강화시킬 수 있는 소재 선발을 위하여 대식세포의 살모넬라 섭식 및 증식억제를 유도하는 in vitro 실험을 통해 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능(대식세포내로 섭식된 살모넬라의 증식억제 활성)을 확인하였다.

(1) 흑미강(생물전환)산물

대식세포에 흑미강(생물전환)산물을 처리한 후 대식세포에 살모넬라를 동량으로 혼합하여 대식세포의 살모넬라 섭식을 유도하고 섭식 유도 후, 시간대 별로 대식세포내에 존재하는 살모넬라의 수를 측정하여 탐식능 및 살해능을 측정한 결과, 대식세포의 탐식능을 확인한 실험에서는 흑미강(생물전환)산물 처리에 의해 활성화된 대식세포가 30분에서 60분으로 배양시간이 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 탐식능이 크게 증가하여, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과 후 탐식능은 53%로 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 3.68배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

대식세포내로 섭식된 살모넬라에 대한 살해능은 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 흑미강(생물전환)산물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 흑미강(생물전환)산물을 처리하지 않은 조건과 비교해 볼 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 흑미강(생물전환)산물을 처리한 결과, 흑미강(생물전환)산물로 활성화된 대식세포가 살모넬라를 빨리 잡아먹고, 빨리 죽이는 것을 확인할 수 있었다.

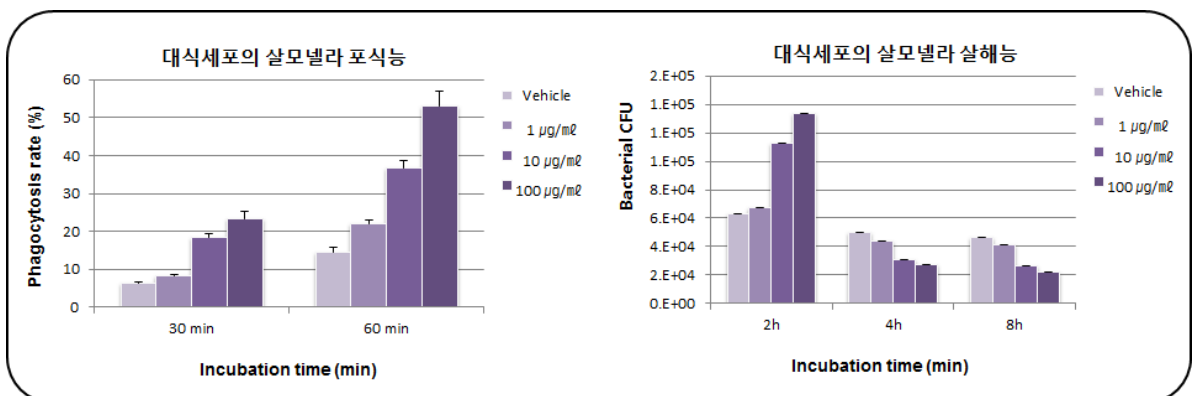


Figure 12. 흑미강(생물전환)산물에 의한 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능 향상

(2) 미강(생물전환)산물

탈지미강(생물전환)산물의 대식세포 탐식능을 확인한 실험에서, 미강(생물전환)산물 처리에 의해 활성화된 대식세포가 30분에서 60분으로 배양시간이 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 탐식능이 크게 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과후, 탐식능은 47%로 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 3.24배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 살해능은 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 탈지미강(생물전환)산물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 탈지미강(생물전환)산물을 처리하지 않은 조건과 비교해 볼 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 탈지미강(생물전환)산물을 처리한 결과, 탈지미강(생물전환)산물로 활성화된 대식세포가 살모넬라를 빨리 잡아먹고, 빨리 죽이는 것을 확인할 수 있었다.

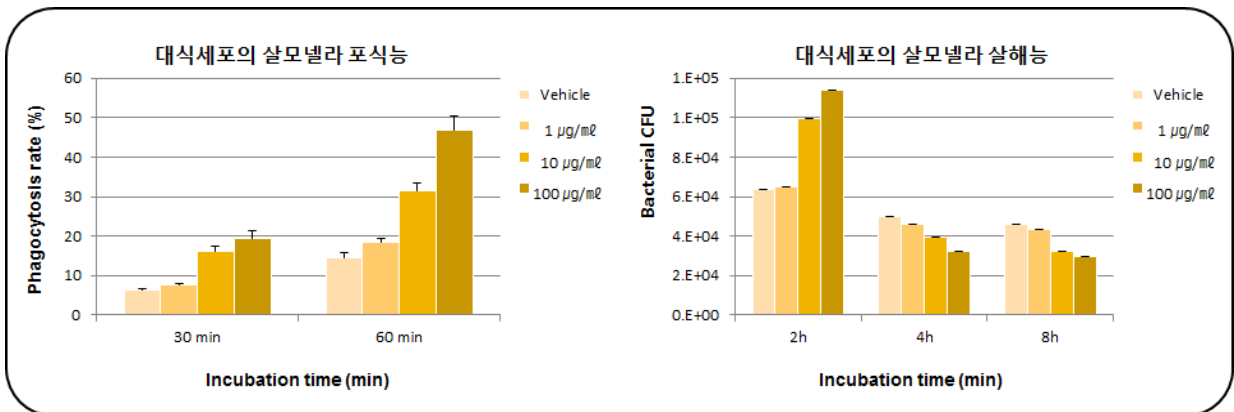


Figure 13. 탈지미강(생물전환)산물에 의한 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능 평가

(3) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물의 대식세포 탐식능을 확인한 실험에서, 강황(생물전환)산물 처리에 의해 활성화된 대식세포가 30분에서 60분으로 배양시간이 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 탐식능이 크게 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과 후, 탐식능은 51%로 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 3.54배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 살해능은 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 강황(생물전환)산물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 강황(생물전환)산물을 처리하지 않은 조건과 비교해 볼 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 강황(생물전환)산물을 처리한 결과, 강황(생물전환)산물로 활성화된 대식세포가 살모넬라를 빨리 잡아먹고, 빨리 죽이는 것을 확인할 수 있었다.

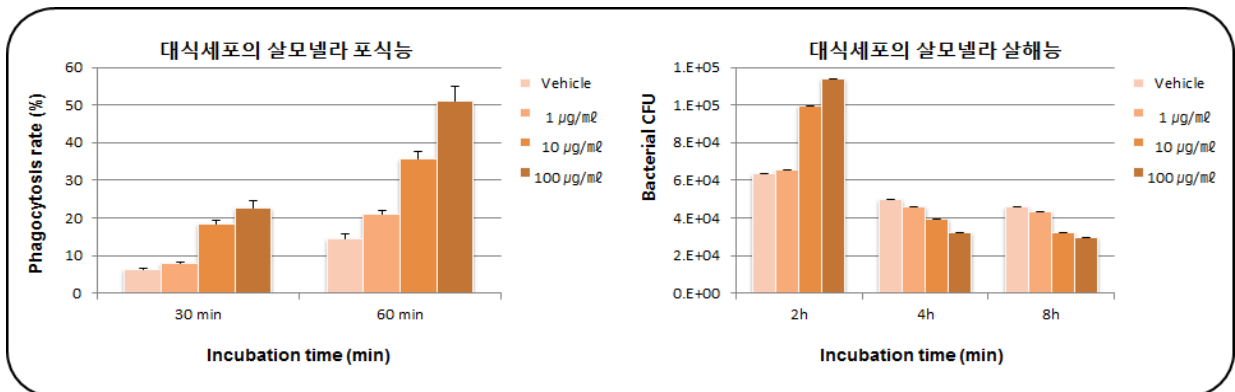


Figure 14. 강황(생물전환)산물에 의한 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능 향상

(4) 산초(생물전환)산물

산초(생물전환)산물의 대식세포 탐식능을 확인한 실험에서, 산초(생물전환)산물 처리에 의해 활성화된 대식세포가 30분에서 60분으로 배양시간이 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 탐식능이 크게 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과 후, 탐식능은 50%로 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 3.46배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 살해능은 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 산초(생물전환)산물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 산초(생물전환)산물을 처리하지 않은 조건과 비교해 볼 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 산초(생물전환)산물을 처리한 결과, 산초(생물전환)산물로 활성화된 대식세포가

살모넬라를 빨리 잡아먹고, 빨리 죽이는 것을 확인할 수 있었다.

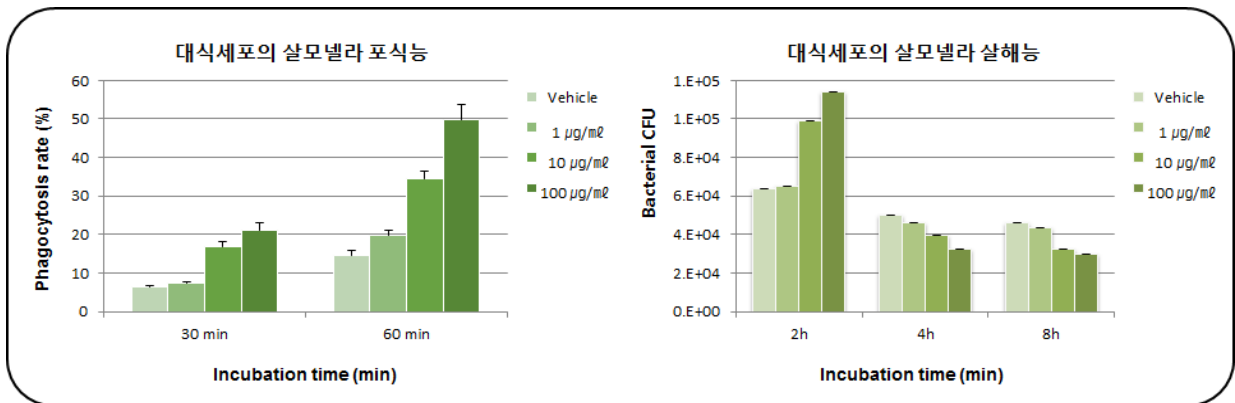


Figure 15. 산초(생물전환)산물의 대식세포에 대한 살모넬라 탐식 및 증식억제능 평가

(5) 수수(생물전환)산물

수수(생물전환)산물의 대식세포 탐식능을 확인한 실험에서, 수수(생물전환)산물 처리에 의해 활성화된 대식세포가 30분에서 60분으로 배양시간이 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 탐식능이 크게 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과 후, 탐식능은 49%로 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 3.34배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 살해능은 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 수수(생물전환)산물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 수수(생물전환)산물을 처리하지 않은 조건과 비교해 볼 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 수수(생물전환)산물을 처리한 결과, 수수(생물전환)산물로 활성화된 대식세포가 살모넬라를 빨리 잡아먹고, 빨리 죽이는 것을 확인할 수 있었다.

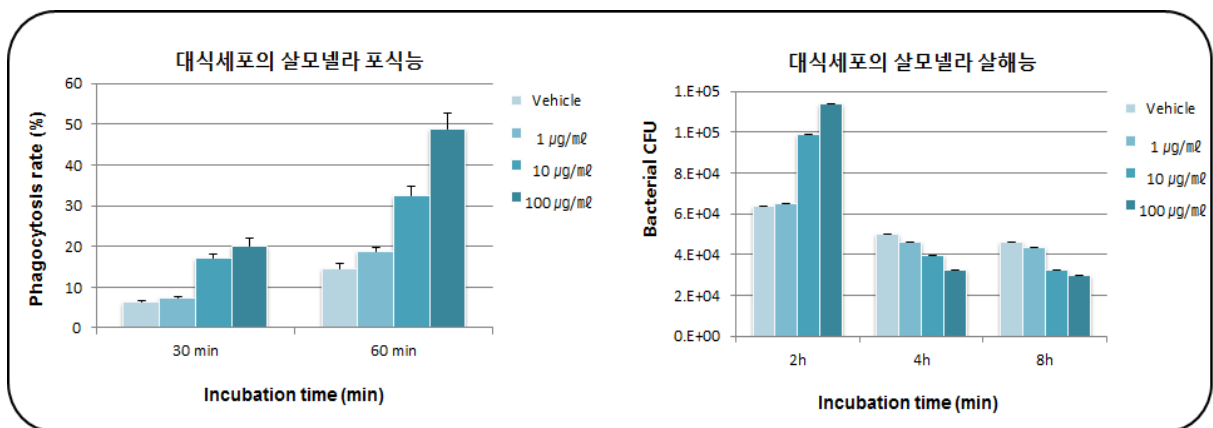


Figure 16. 수수(생물전환)산물에 의한 대식세포의 살모넬라 탐식능 및 살해능 향상

2. 5종 면역조절소재의 in vivo 효능 평가를 통한 고도화 면역조절소재의 주소재 및 후보소재 선발

가. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서 5종 면역조절소재의 패혈증 억제 효과 평가

면역조절소재 선정을 위하여 흑미강(생물전환)산물, 강황(생물전환)산물, 미강(생물전환)산물, 산초(생물전환)산물, 수수(생물전환)산물의 5가지 생물전환산물이 갖는 LPS 유도 패혈증 억제 효과를 확인하였다. 마우스 몸무게 1kg 당 1, 10, 100mg/kg의 투여량으로 생물전환산물을 2주간 복강투여 및 식이투여한 뒤, lethal dose인 20 μ g/kg LPS와 700mg/kg의 galactosamine을 복강주사하여 패혈증을 유도하였다.

패혈증 유도 뒤 60시간까지 관찰하여 마우스의 생존률을 측정한 결과 10mg/kg 복강투여시 흑미강(생물전환)산물 투여 그룹에서 5마리, 강황(생물전환)산물 투여 그룹에서 5마리, 미강(생물전환)산물 투여 그룹에서 4마리, 산초(생물전환)산물 투여 그룹에서 3마리, 수수(생물전환)산물 투여 그룹에서 2마리가 생존함을 확인하였으며, 10mg/kg 경구투여시 흑미강(생물전환)산물 투여 그룹에서 3마리, 강황(생물전환)산물 투여 그룹에서 3마리, 미강(생물전환)산물 투여 그룹에서 2마리, 산초(생물전환)산물 투여 그룹에서 2마리, 수수(생물전환)산물 투여 그룹에서 1마리가 생존함을 확인하였다. 10mg/kg 복강투여시와 100mg/kg 복강투여시 큰 차이가 없는 것으로 보아 생물전환산물의 패혈증 억제 효과는 10mg/kg 투여량에서 포화되는 것으로 보이며, 복강투여가 경구투여보다 약간 더 높은 활성을 보이는 것으로 확인되었다.

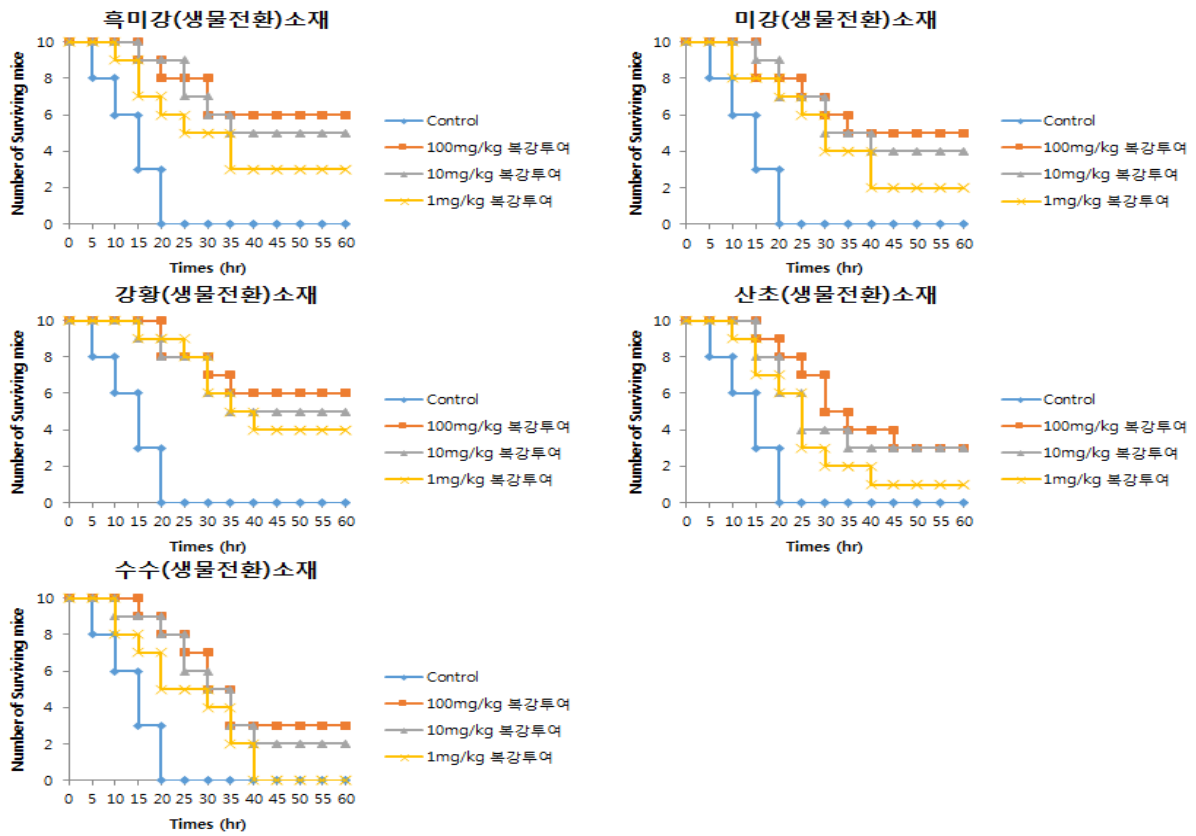


Figure 17. 5종 생물전환산물의 소재에 따른 패혈증 억제 효과

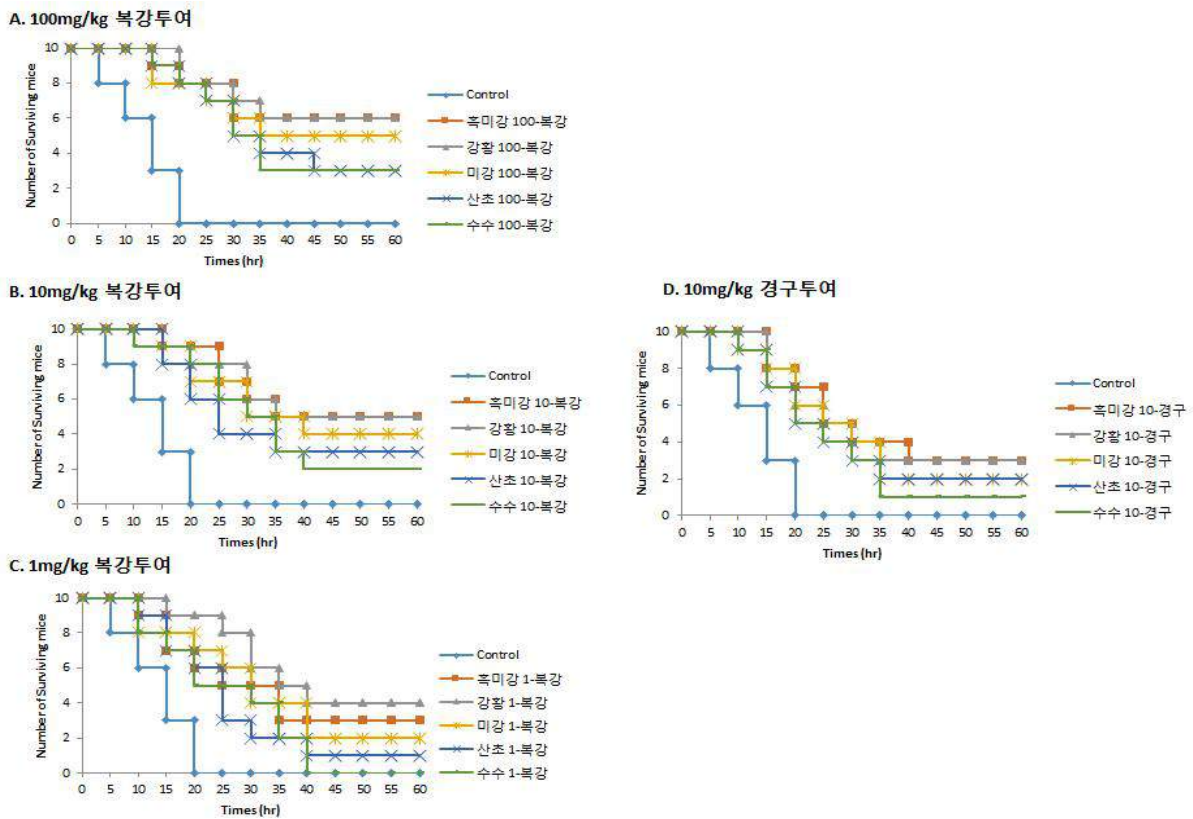


Figure 18. 5종 생물전환산물의 동일농도에서의 패혈증 억제 효과 비교

나. Lethal dose의 살모넬라 복강 내 감염 마우스모델에서 5종 면역조절소재의 치사율 지연 효과 평가

살모넬라 저감제 후보물질 선정을 위하여 5가지 생물전환산물의 살모넬라 감염 억제효과를 확인하였다. 패혈증 억제 효과와 마찬가지로 5종류의 생물전환산물을 10mg/kg의 투여량으로 2주간 복강투여 및 경구투여 하였으며 살모넬라 ATCC14028 균주를 lethal dose 인 1×10^5 cfu/mouse로 복강주사하여 복강 내 살모넬라의 증식 및 감염으로 인한 마우스의 사망을 유도하였다. 그 결과, 복강투여와 경구투여시 대조군의 마우스가 모두 사망하는 7일째를 기준으로 흑미강(생물전환)산물 투여 그룹에서는 각각 10마리와 9마리, 강황(생물전환)산물 투여 그룹에서는 9마리와 8마리, 미강(생물전환)산물 투여 그룹에서는 9마리와 8마리, 산초(생물전환)산물 투여 그룹에서는 8마리와 8마리, 수수(생물전환)산물 투여 그룹에서는 9마리와 7마리가 생존하였으며, 최대 생존 일자는 흑미강(생물전환)산물 투여 그룹에서 28일과 22일, 강황(생물전환)산물 투여 그룹은 26일과 21일, 미강(생물전환)산물 투여 그룹은 23일과 18일, 산초(생물전환)산물 투여 그룹은 21일과 18일, 수수(생물전환)산물 투여 그룹은 22일과 17일까지 생존하는 결과를 확인하였다 <Figure 19>. 이와 같은 결과를 <Figure 17, 18>의 패혈증 억제효과와 종합하여, 미강(생물전환)산물을 살모넬라 저감제 후보물질로, 강황(생물전환)산물을 고도화된 살모넬라 저감제 후보물질로 선정하였다.

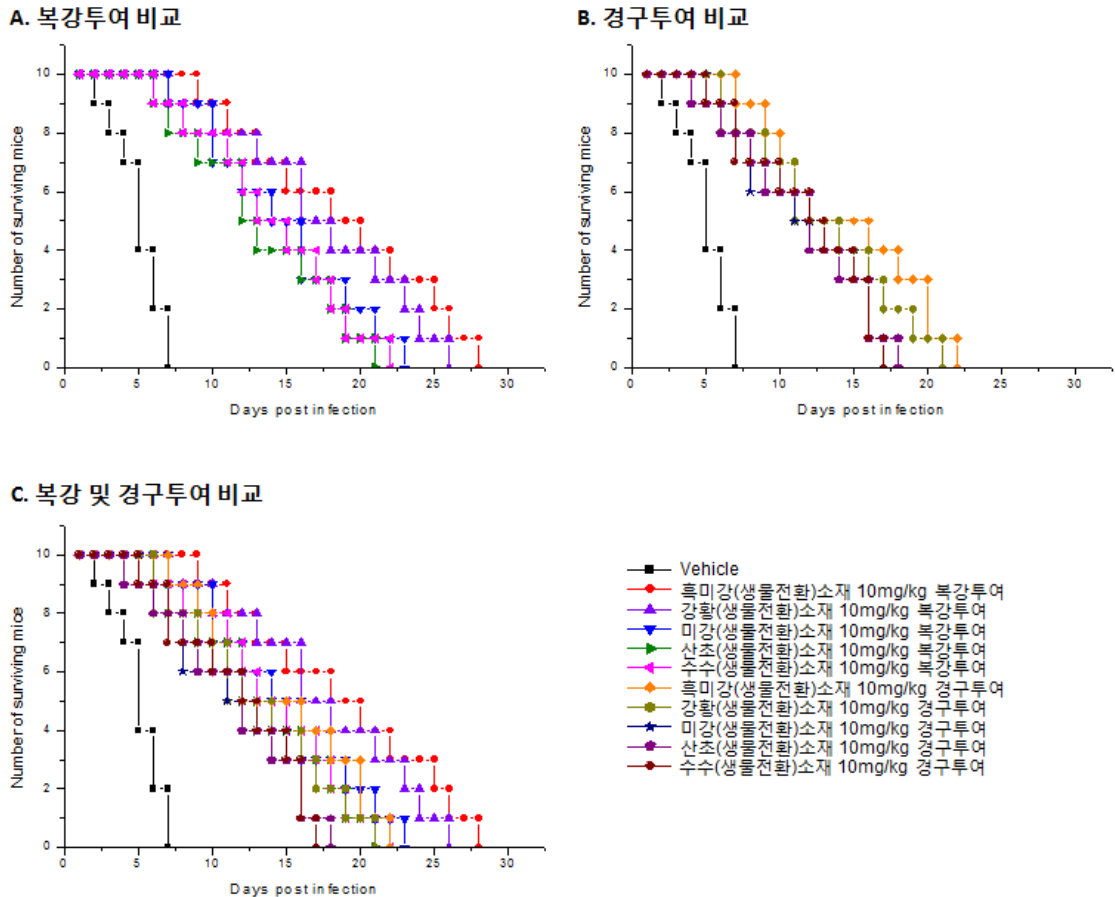


Figure 21. 복강 및 경구투여 살모넬라 감염에 의한 5종 생물전환산물의 치사율 지연 효과

다. Sub-lethal dose의 살모넬라 복강 내 감염 마우스모델에서 5종 면역조절소재의 면역반응 평가

(1) 복강 내 생존 살모넬라 수 측정

마우스를 희생한 뒤 복강을 PBS로 세척하고, 회수한 PBS를 LB plate에 spreading 하여 복강 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 측정 결과, 흑미강, 강황, 미강, 산초 및 수수의 생물전환산물 처리 그룹에서 대조군(생물전환산물이 처리되지 않은 그룹)에 비하여 월등히 감소된 살모넬라 집락수 결과가 확인되었다. 생물전환산물 투여방법에 따른 비교에서는 흑미강, 강황, 미강, 산초 및 수수의 생물전환산물 처리 그룹에서 복강투여한 경우 경구투여의 경우보다 살모넬라 집락수가 더 많이 감소하는 것으로 나타났다 <Figure 20>.

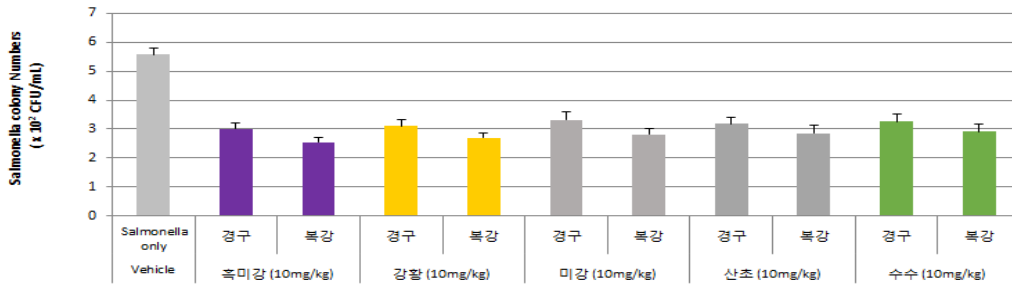


Figure 22. 생물전환산물의 복강 내 살모넬라 억제 효과

(2) 비장 림프구 활성화 효과 평가

희생한 마우스의 비장을 적출한 후 비장 내 림프구를 분리하였다. 분리한 림프구를 T세포 증식 유도물질인 concanavalin A 와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 세포의 증식이 얼마나 유도되는지 확인하였다. 그 결과, 대조군(생물전환산물을 투여하지 않은 그룹 중 적출한 비장 림프구를 con A와 LPS로 자극한 그룹)의 비장 림프구가 건강한 마우스의 비장 림프구(con A와 LPS로 자극하지 않은 그룹)에 비하여 약 1.5배 증가한 것에 비하여, 흑미강, 강황, 미강, 산초 및 수수의 생물전환산물 처리 그룹의 마우스에서 적출한 비장 림프구를 con A와 LPS로 자극한 그룹이 건강한 마우스의 비장 림프구에 비하여 약 2배 증가한 것을 확인하였다. 특히 생물전환산물을 복강투여한 경우에는 경구투여한 경우보다 마우스의 비장 림프구가 더 많이 증가하였다 <Figure 21>.

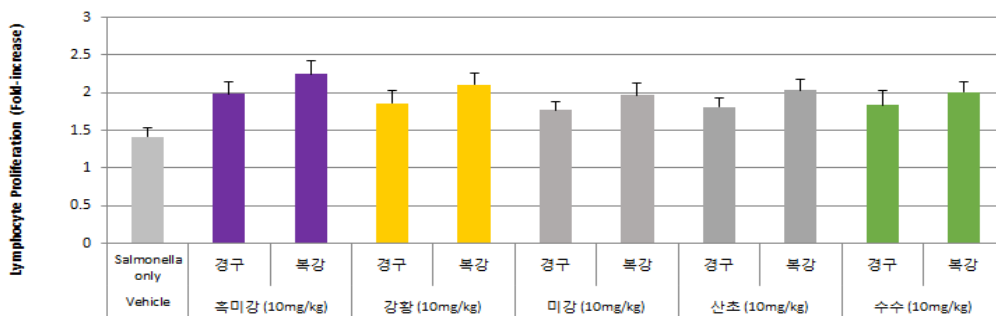


Figure 23. 생물전환산물의 림프구 활성화 효과

(3) cytokine profiling을 통한 면역반응의 분석

미강(생물전환)산물의 투여 시 생산되는 cytokine을 측정하여 면역반응의 활성화 패턴을 분석하였다. 실험 결과, 흑미강, 강황, 미강, 산초 및 수수의 생물전환산물 처리 그룹에서 대조군(생물전환산물을 처리하지 않은 그룹)에 비하여 사이토카인 수치가 증가한 것을 확인하였다. 또한 전반적으로, 생물전환산물을 복강투여한 경우에 경구투여한 경우보다 사이토카인 수치가 더 많이 증가하였다.

흑미강, 강황, 미강, 산초 및 수수의 생물전환산물 처리 그룹에서 염증반응과 관련이 있는 사이토카인인 IL-1 β 와 함께 Th1 면역반응과 관련된 사이토카인인 IFN- γ , IL-2의 발현량은 모든 생물전환산물의 복강 또는 경구로 투여된 그룹에서 대조군에 비하여 증가되었으나, Th2 면역반응과 관련된 사이토카인인 IL-5은 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 즉, 살모넬라 감염 후 일어난 면역반응에 있어서 생물전환산물을 투여한 경우 Th2 면역반응과 관련된 사이토카인의 생성량은 변화가 거의 없는 반면, Th1 면역반응과 관련된 사이토카인의 생성량은 증가시킴을 확인한 바, 이는 Th1 면역반응이 바이러스와 세포내 감염 미생물(박테리아, 원생동물)의 방어와 관련된 세포성 면역에 중요하고 또한 살모넬라가 대식세포내에 감염을 일으키는 세포내 감염 미생물임을 고려할 때 상기 흑미강, 강황, 미강, 산초 및 수수의 모든 생물전환산물은 면역학적 근거에 기초해 효과적으로 대처할 수 있을 것으로 기대된다 <Figure 22>.

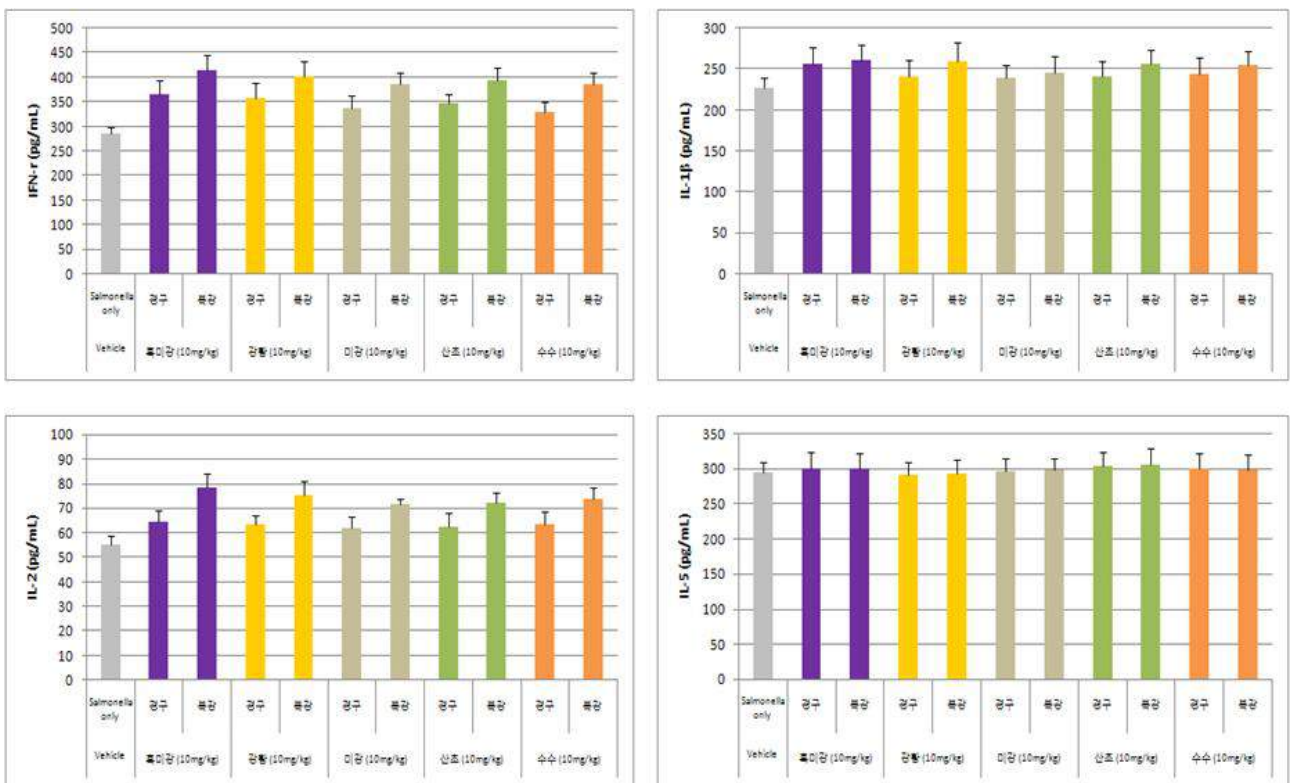


Figure 24. 생물전환산물 투여에 의한 cytokine 발현 분석

3. 선발된 **고도화** 면역조절소재의 대식세포 기반의 *in vitro* 효능 평가

가. 주소재인, 강황(생물전환)산물의 원재료 평가를 위한 국내산 및 인도산 강황 유래의 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 효능 평가

항살모넬라 효능이 우수한 강황(생물전환)산물의 개발에 있어서 강황의 기능성분으로 알려진 curcumin 함량에 따른 효능 비교를 위하여 국내(진도)산과 인도산 원물을 구입하여 원산지별 강황(생물전환)산물의 시제품을 생산하고 *in vitro* 효능을 비교하는 실험을 수행하였다. 또한 제2협동기관인 아주대학교에서 살모넬라 저감제의 mouse모델에서의 효능 평가 실험을 수행하기 위한 시료로 전달하였다.

국내(진도)산은 진도의 농협에서 직접 원물을 구입하여 사용하였으며, 인도산은 인도의 강황농장에서 강황을 수입하여 실험에 사용하였다. 국내(진도)산 강황의 경우에는 땅에서 채취한 후 절편을 내어 건조작업을 거친 뒤 수거하여 분말화하여 사용하였다. 인도산 강황의 경우에는 인도의 기후 및 토양 특성상 모래에서 자라기 때문에 강황자체의 수분함량이 매우 적어 절편을 내어 건조하지 않고, 채취한 그대로 건조한 상태로 수입하여 분말화과정을 거쳐 사용하였다.



Figure 25. 국내 진도산 강황 및 수입 인도산 강황의 원물 비교 사진

(1) 원산지별 강황(생물전환)산물의 생산 및 대식세포 기반의 면역활성 평가

(가) 진도산 강황의 생물전환산물

전라남도 진도의 농협에서 절편으로 건조된 강황을 구입하여 이로부터 강황(생물전환)산물을 생산하였다. 진도산 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1µg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

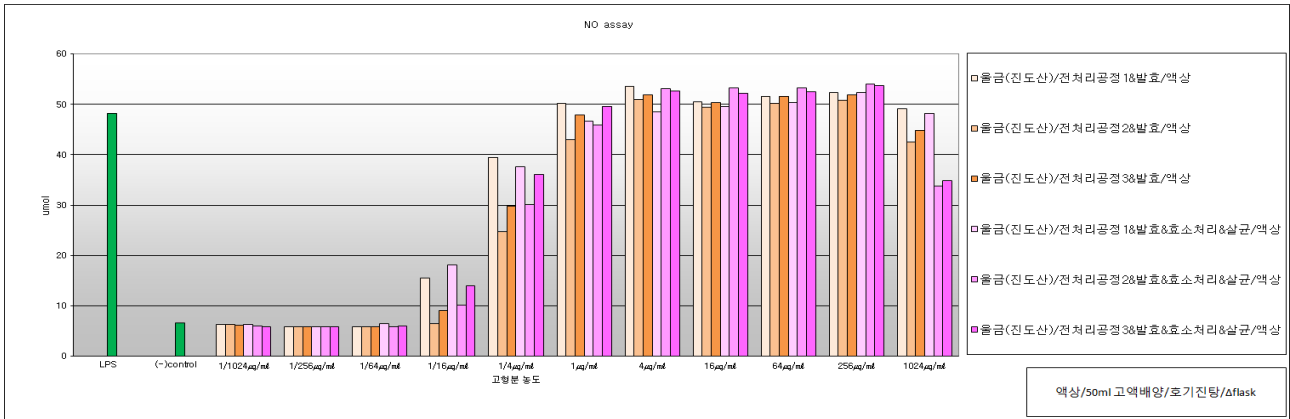


Figure 26. 국내(진도산) 강황으로 생산한 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

(나) 인도산 강황의 생물전환산물

인도산 강황을 수입하여 이로부터 강황(생물전환)산물을 생산하였다. 인도산 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1µg/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

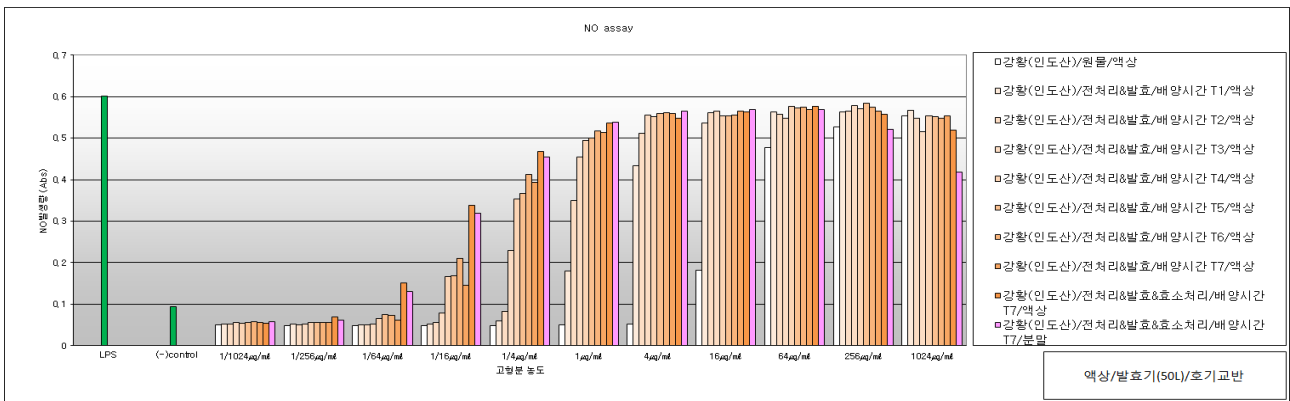


Figure 27. 인도산 강황으로 생산한 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

강황의 기능성분으로 알려진 curcumin의 함량에 있어서 국내(진도)산 강황의 함량은 대략 2~3mg/g이며, 인도산 강황의 함량은 대략 30~40mg/g 로, 국내산 강황과 인도산 강황의 curcumin 함량에는 많은 차이가 있으나 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가에 있어서는 거의 동일한 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

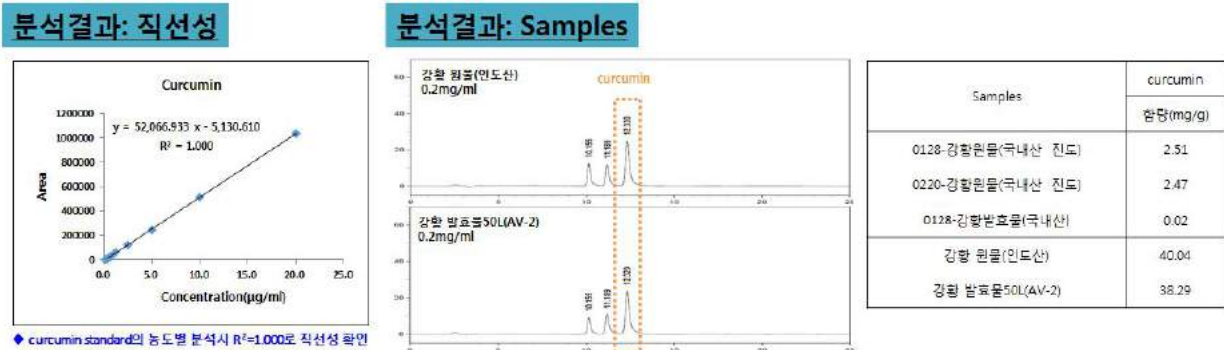


Figure 28. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물의 커큐민 함량 분석

최근의 연구에 따르면, curcumin은 TLR4의 dimerization을 방해함으로써 TLR4의 activation을 억제하는 것으로 보고되고 있으며 또한 NOD2의 dimerization을 방해함으로써 NOD2의 activation도 저해하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 국내(진도)산 강황의 생물전환산물은 물론 curcumin을 다량 함유하고 있는 인도산 강황의 생물전환산물에서도 높은 면역활성 역가를 나타내고 있어, 강황 (생물전환)산물에 있어서 curcumin에 의한 면역활성 저하 효과는 나타나지 않는 것으로 판단된다.

(2) 원산지별 강황(생물전환)산물의 대식세포 기반의 항살모넬라 효능 평가

국내산 및 인도산 강황으로부터 생산된 강황(생물전환)산물이 대식세포의 항살모넬라 효능 향상에 미치는 효과를 확인하기 위하여 대식세포의 살모넬라 포식능 및 살해능(대식세포내로 섭취된 살모넬라의 증식억제 활성)을 평가하였다.

대식세포에 진도산 강황의 원물 및 생물전환산물과 인도산 강황의 원물 및 생물전환산물을 각각 처리한 후 대식세포에 살모넬라를 동량으로 혼합하여 대식세포의 살모넬라 섭취를 유도하고 섭취 유도 후, 시간대 별로 대식세포내에 존재하는 살모넬라의 수를 측정하여 탐식능 및 살해능을 측정하였다.

(가) 살모넬라 탐식능 평가

대식세포의 살모넬라 포식능을 확인한 실험에서 진도산 원물의 경우 대식세포의 배양시간이 30분에서 60분으로 경과할수록, 매우 미약하나마 농도 의존적으로 살모넬라에 대한

포식능이 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과 후 포식능이 22%로 시료를 처리하지 않은 대조군의 16%와 비교해 보았을 때 1.38배 증가하였으며, 진도산 강황(생물전환)산물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 포식능이 크게 증가하여, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대식세포 배양 60분 조건에서 살모넬라에 대한 포식능이 51%로 시료를 처리하지 않은 대조군의 16%와 비교해 보았을 때 3.1배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

인도산 강황의 경우도 마찬가지로 대식세포의 배양시간이 30분에서 60분으로 경과할수록, 매우 미약하나마 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 포식능이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 인도산 원물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60분 경과 후 살모넬라에 대한 포식능이 25%로 시료를 처리하지 않은 대조군의 16%와 비교해 보았을 때 1.55배 증가하였으며, 인도산 강황(생물전환)산물을 처리한 실험군에서는 국내산 경우와 같이 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 포식능이 크게 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대식세포 배양 60분 조건에서 살모넬라에 대한 포식능이 56%로 시료를 처리하지 않은 대조군의 16%와 비교해 보았을 때 3.38배 향상된 것을 확인할 수 있었다.

(나) 살모넬라 살해능 평가

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 증식억제능을 평가한 실험결과, 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 진도산 강황의 원물 및 생물전환산물과 인도산 강황의 원물 및 생물전환산물을 처리하였을 때 대식세포내에 존재하는 살모넬라의 수가 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

진도산 강황 원물을 처리한 조건에서 시간대 별로 대식세포내에 존재하는 살모넬라의 수를 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 대식세포의 배양시간이 2시간에서 8시간으로 경과함에 따른 살모넬라 수의 감소 폭이 농도 의존적으로 증가하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 살모넬라의 수가 9.7×10^4 cfu에서 3.6×10^4 cfu로 크게 감소하는데 비해 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 살모넬라 수가 시료를 처리하지 않은 대조군과 비슷한 정도로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

진도산 강황(생물전환)산물을 처리한 조건에서 시간대 별로 대식세포내에 존재하는 살모넬라의 수를 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 대식세포의 배양시간이 2시간에서 8시간으로 경과할수록 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 살해능이 크게 증가하여 살모넬라의 수가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 1.43×10^5 cfu에서 1.4×10^4 cfu로, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 1.05×10^5 cfu에서 2.4×10^4 cfu로 크게 감소하는데 비해 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 시료를 처리하지 않은 대조군과 같은 정도의 수치를 나타냄을 확인할 수 있었다.

인도산 강황 원물을 처리한 조건에서 시간대별로 대식세포내에 존재하는 살모넬라의 수를 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 진도산 강황 원물의 경우와 같은 정도의 수치를 나타냈으며, 인도산 강황(생물전환)산물을 처리한 조건에 있어서도 진도산 강황(생물전환)산물과 같은 정도의 수치와 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

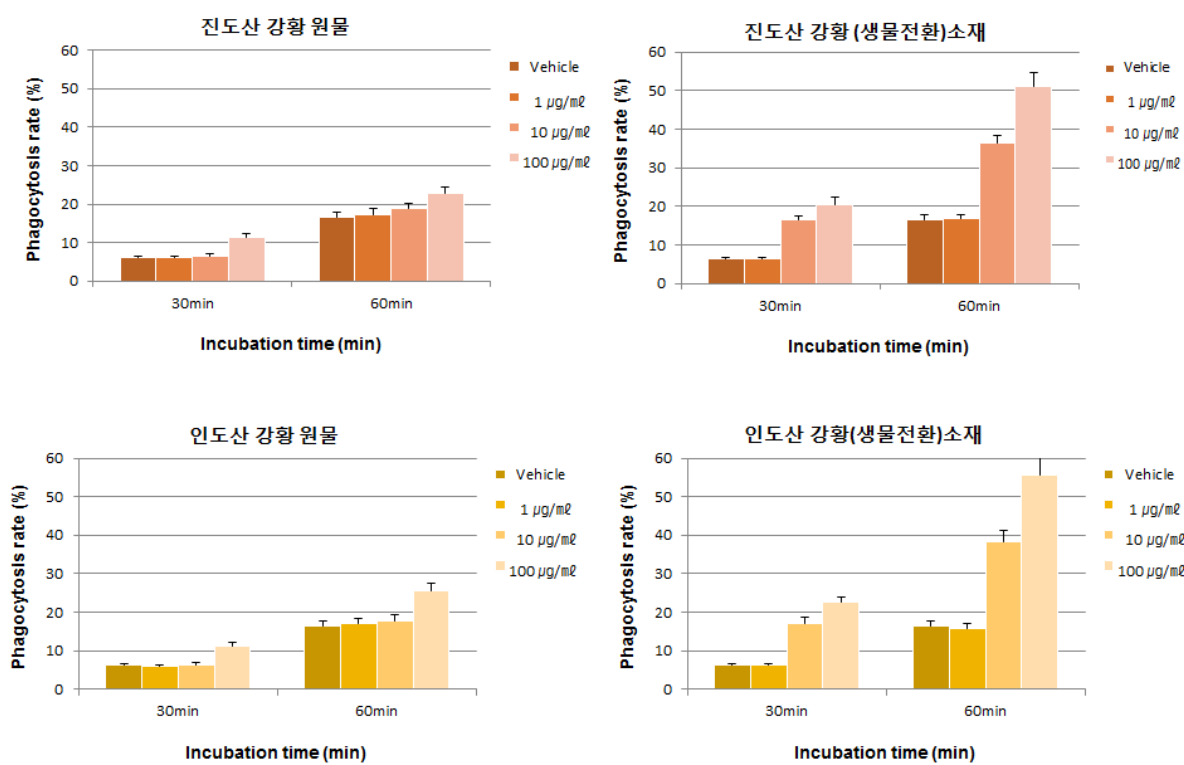


Figure 29. 국내(진도)산 및 인도산 강황의 원물 및 생물전환산물에 의한 대식세포의 살모넬라 포식능 향상

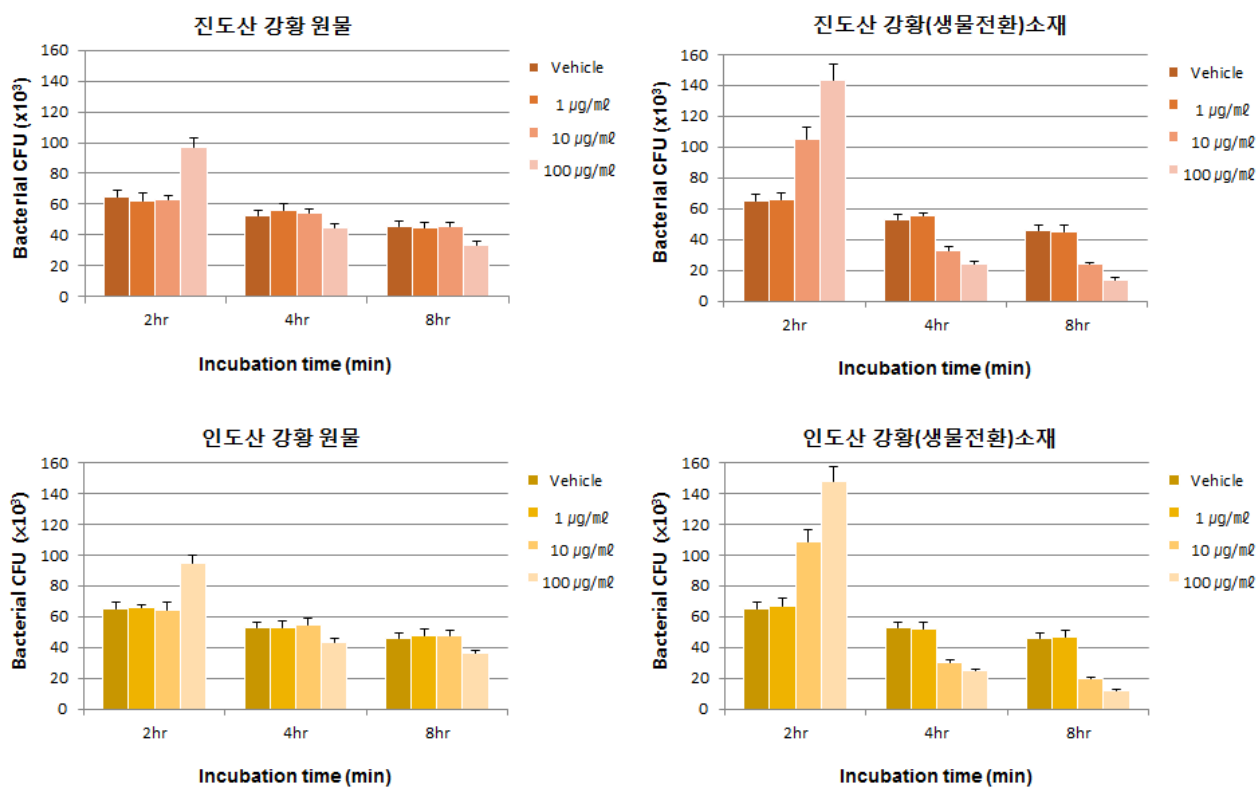


Figure 30. 국내(진도)산 및 인도산 강황의 원물 및 생물전환산물에 의한 대식세포의 살모넬라 살해능 향상

나. 고도화 면역조절소재 생산 및 대식세포 기반의 효능 평가

제2협동기관인 아주대학교에서 mouse모델에서의 살모넬라 저감제의 효능 평가와 함께 제1협동기관인 강원대학교에서 목적동물을 대상으로 한 살모넬라 저감제의 임상병리학적 효능과 감염면역학적 효능을 조사하기 위한 시료를 제공하기 위하여 3차 면역조절소재 시제품을 생산하였다. Field test용 시제품으로 탈지미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물을 선정하여 5,000리터 및 50리터 발효조에서 시제품을 생산하였으며, 대식세포의 살모넬라 포식능 및 살해능(섭식 후 증식억제능) 검사를 통해 항살모넬라 효능을 평가한 후, 제1협동기관과 제2협동기관에 각각의 시료를 전달하였다.

(1) 고도화 면역조절소재의 대식세포 기반의 면역활성 평가

(가) 미강(생물전환)산물

탈지미강(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2~1 μ g/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

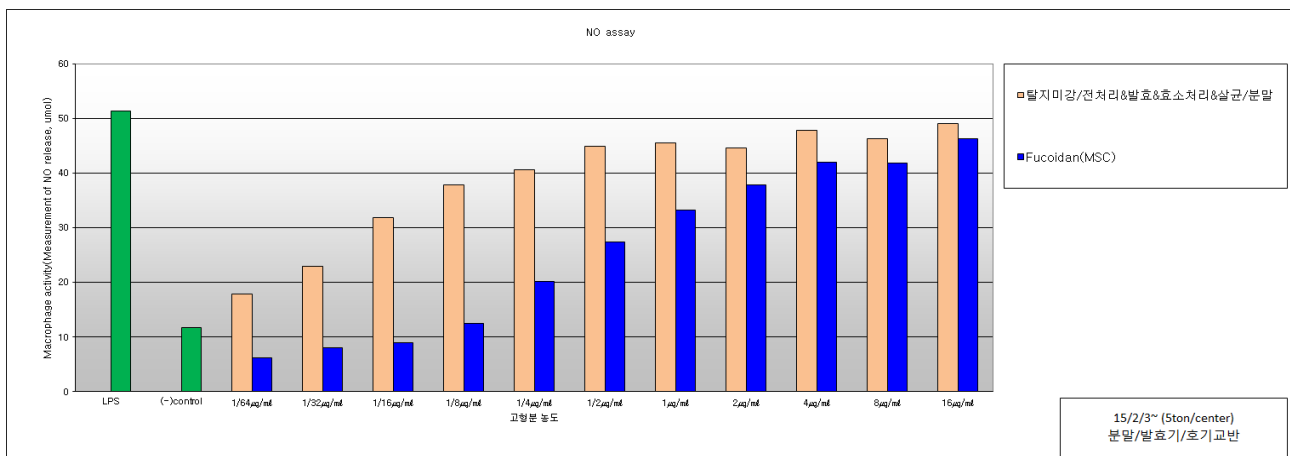


Figure 31. 탈지미강(생물전환)산물의 면역활성 역가

(나) 강황(생물전환)산물

인도산 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1 μ g/ml이며, 순수하게 정제된 면역소재인 후코이단보다 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

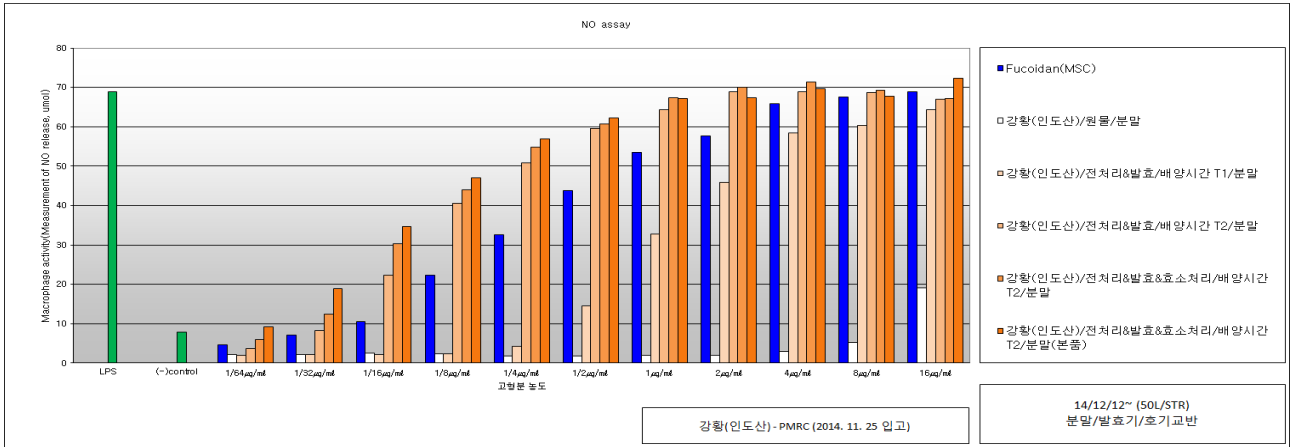


Figure 32. 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

(2) **고도화** 면역조절소재의 대식세포 기반의 항살모넬라 효능 평가

Field test용 생물전환산물이 대식세포의 항살모넬라 효능 향상에 미치는 효과를 확인하기 위하여 대식세포의 포식능 및 살해능(대식세포내로 섭취된 살모넬라의 증식 억제 활성)을 확인하였다.

(가) 미강(생물전환)산물

탈지미강(생물전환)산물을 처리한 후 대식세포의 살모넬라 포식능을 확인한 실험에서, 시료를 처리한 군에서 대식세포의 배양시간이 30분에서 60분으로 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 포식능이 크게 향상되는 결과를 확인할 수 있었다. 탈지미강(생물전환)산물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서 60분 경과 후 살모넬라 포식능은 46%로 시료를 처리하지 않은 대조군의 14%와 비교해 보았을 때 3.13배 증가하는 결과를 확인하였다.

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 살해능을 평가한 실험결과에서는 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 탈지미강(생물전환)산물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료를 처리한 실험군에서 각각 9.6 $\times 10^3$ cfu에서 2.8 $\times 10^3$ cfu로, 1.2 $\times 10^4$ cfu에서 2.4 $\times 10^3$ cfu로 살모넬라 수가 감소하여 시료를 처리하지 않은 대조군의 6.2 $\times 10^3$ cfu에서 4.7 $\times 10^3$ cfu로 감소한 것과 비교해 보았을 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료를 처리한 실험군에서는 시료를 처리하지 않은 대조군과 비슷한 정도의 수치와 양상을 나타내었다.

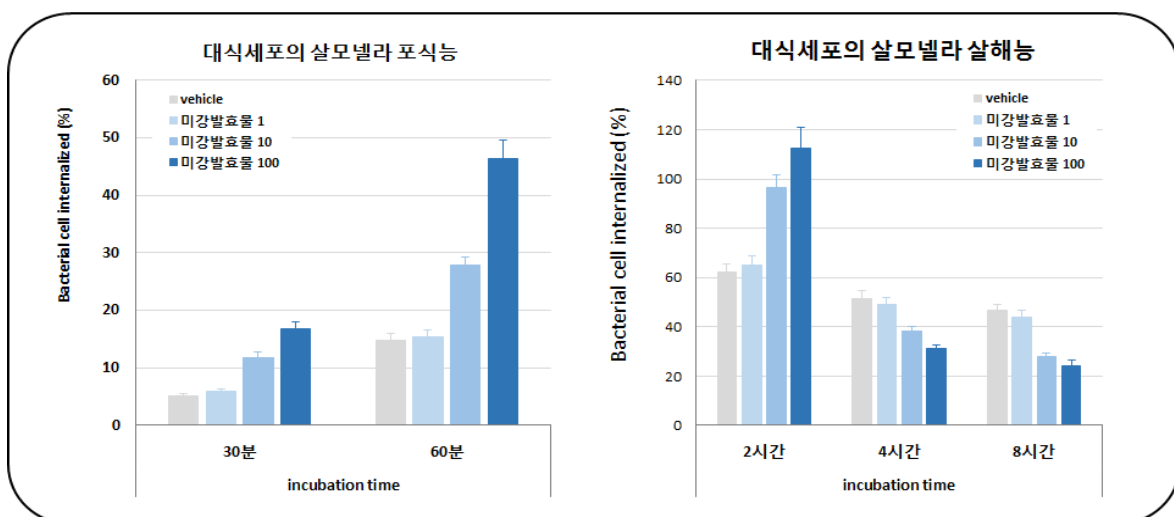


Figure 33. 탈지미강(생물전환)산물에 의한 대식세포의 살모넬라 섭취능 및 살해능 평가

(나) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물을 처리한 후 대식세포의 살모넬라 포식능을 확인한 실험에서, 시료를 처리한 군에서 대식세포의 배양시간이 30분에서 60분으로 경과할수록, 농도 의존적으로 살모넬라에 대한 포식능이 크게 향상되는 결과를 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서 60분 경과 후 살모넬라 포식능은 50%로 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보았을 때 3.39배 증가하는 결과를 확인하였다.

대식세포내로 섭취된 살모넬라에 대한 살해능을 평가한 실험결과에서는 대식세포를 2시간, 4시간, 8시간 배양함에 따라 강황(생물전환)산물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 대식세포내에서의 살모넬라의 수가 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 시료를 처리한 실험군에서 각각 1.04 $\times 10^4$ cfu에서 2.2 $\times 10^3$ cfu로, 1.22 $\times 10^4$ cfu에서 2.0 $\times 10^4$ cfu로 살모넬라 수가 감소하여 시료를 처리하지 않은 대조군의 6.2 $\times 10^3$ cfu에서 4.7 $\times 10^3$ cfu로 감소한 것과 비교해 보았을 때 살모넬라의 수가 크게 감소하는 결과를 확인할 수 있었다.

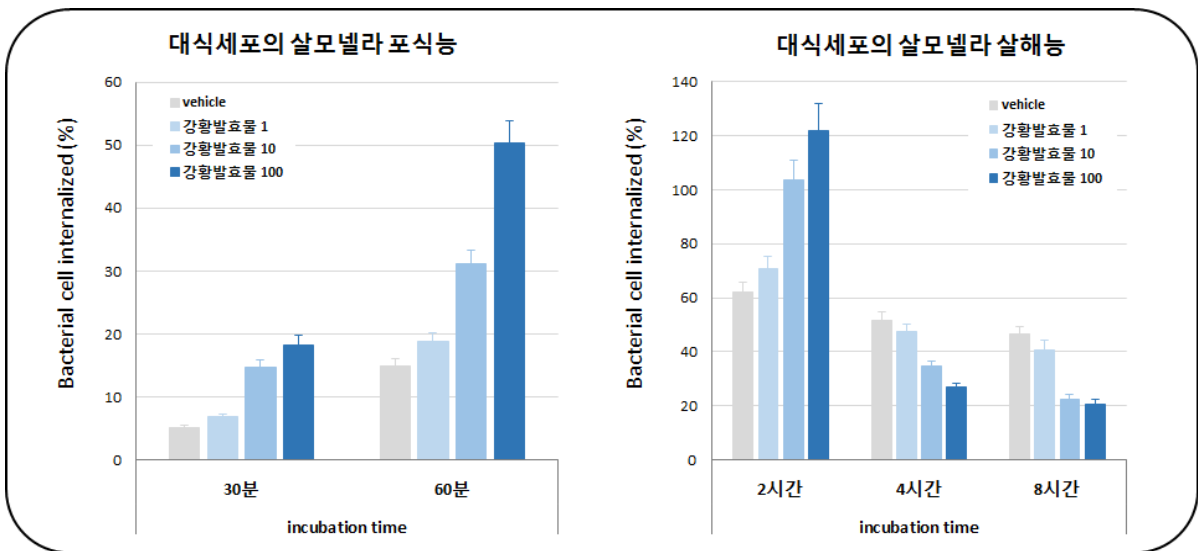


Figure 34. 강황(생물전환)산물의 살모넬라 섭취능 및 섭취후 증식 억제능 평가

4. 선발된 **고도화** 면역조절소재의 **in vivo** 효능 평가

: **중 특이 살모넬라 균주를 이용한** 살모넬라 복강 내 감염 마우스모델에서의 평가

앞서의 5종 생물전환산물에 대한 효능 평가를 통하여 2종의 소재를 선정하고 재평가를 실시하였다. 선정된 2종의 면역조절소재가 갖는 살모넬라 감염 억제 효능 평가를 위해 살모넬라 ATCC14028 균주를 이용한 복강 내 감염 마우스모델을 이용하였다. 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물을 10mg/kg의 투여량으로 복강투여 또는 경구투여 방식으로 2주간 투여한 후, ATCC14028 균주를 1×10^4 cfu/mouse로 복강 주사하여 복강 내에서 살모넬라의 증식 및 감염이 유도되게 하였다. 살모넬라 감염 48시간 후, 마우스를 희생하여 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물이 살모넬라 감염을 억제하는 효능을 확인하였다.

가. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서 패혈증 억제 효능 평가

(1) 미강(생물전환)산물

미강(생물전환)산물의 LPS 유도 패혈증 억제 효과를 확인하였다. 1, 10, 100mg/kg의 투여량으로 생물전환산물을 2주간 복강투여한 뒤, lethal dose인 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ LPS와 700mg/kg의 galactosamine을 복강주사하여 패혈증을 유도하였다. 패혈증 유도 뒤 60시간까지 관찰하여 마우스의 생존률을 측정한 결과, 복강투여의 경우 미강(생물전환)산물 1mg/kg의 복강투여 그룹에서 2마리, 10mg/kg의 복강투여 그룹에서 4마리, 100mg/kg의 복강투여 그룹에서 5마리가 생존하였으며, 경구투여의 경우 미강(생물전환)산물 10mg/kg 경구투여 그룹에서 2마리 생존함을 확인하였다 <Figure 33>.

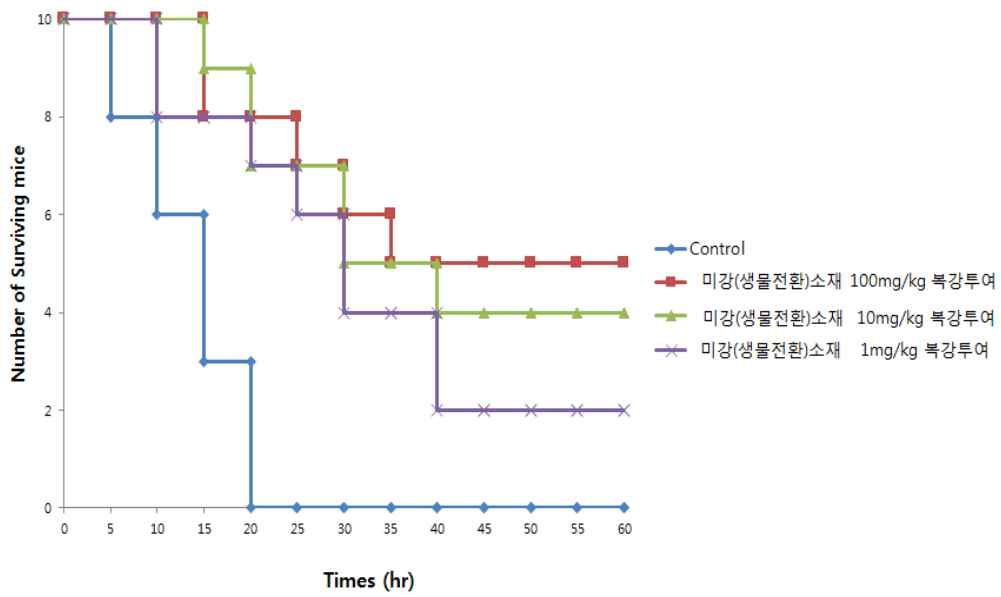
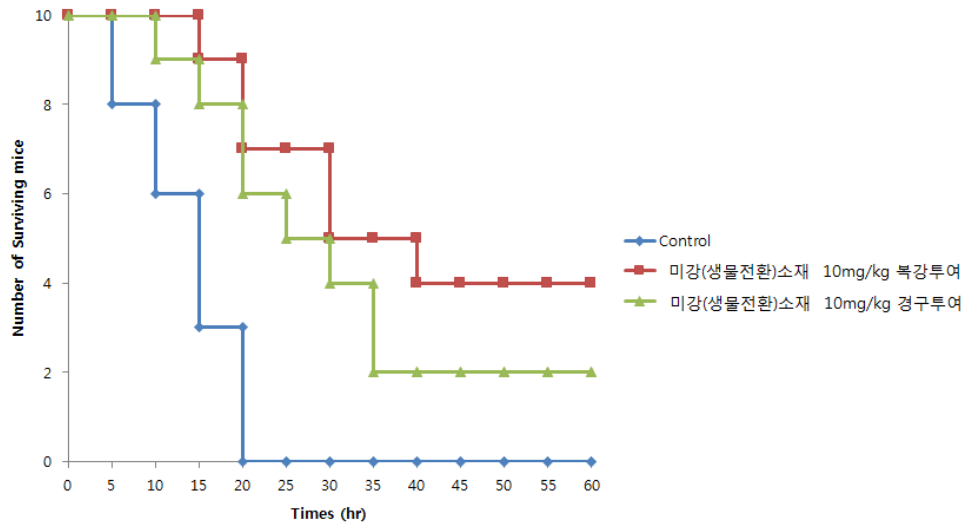


Figure 35. 미강(생물전환)산물의 복강 및 경구투여 시 소재의 농도에 따른 패혈증 억제 효과

(2) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물의 LPS 유도 패혈증 억제 효과를 확인하였다. 1, 10, 100mg/kg의 투여량으로 생물전환산물을 2주간 복강투여한 뒤, lethal dose인 20 μ g/kg LPS와 700mg/kg의 galactosamine을 복강주사하여 패혈증을 유도하였다. 패혈증 유도 뒤 60시간까지 관찰하여 마우스의 생존률을 측정된 결과, 복강투여의 경우 강황(생물전환)산물 1mg/kg의 복강투여 그룹에서 4마리, 10mg/kg의 복강투여 그룹에서 5마리, 100mg/kg의 복강투여 그룹에서 6마리가 생존함을 확인하였으며, 경구투여의 경우 10mg/kg의 경구투여 그룹에서 3마리 생존함을 확인하였다.

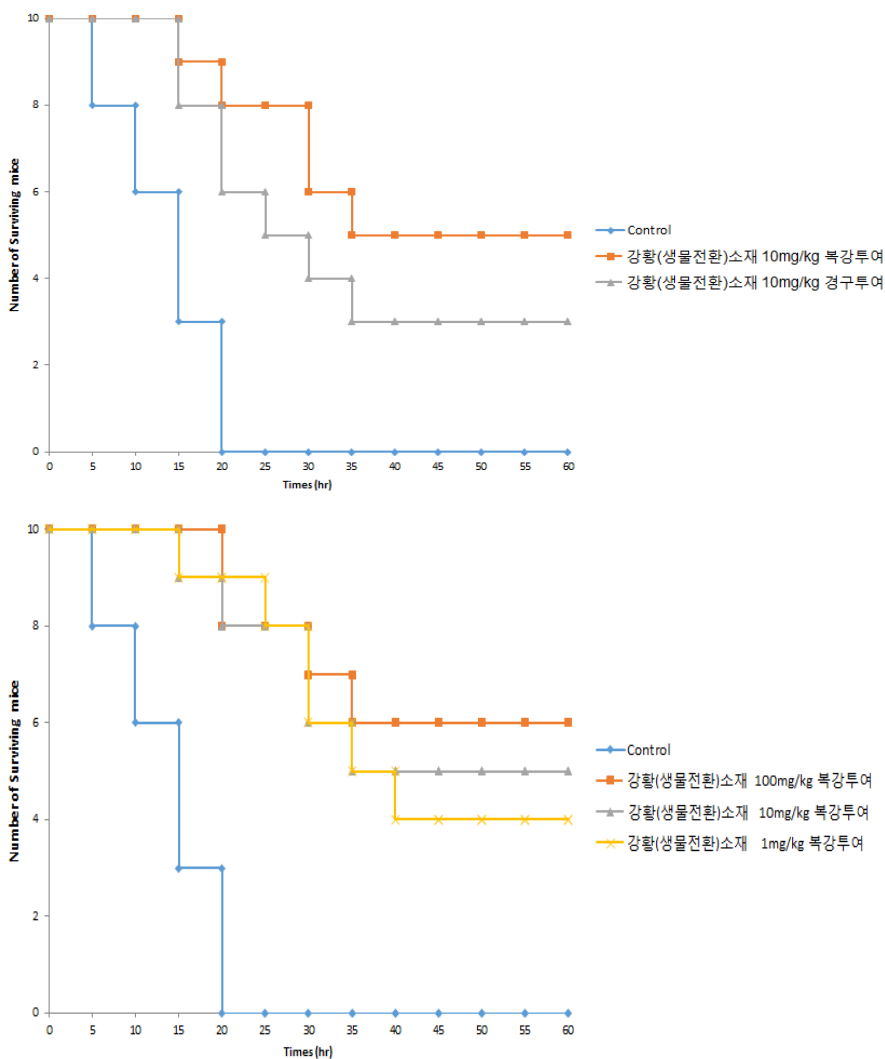


Figure 36. 강황(생물전환)산물의 복강 및 경구투여 시 소재의 농도에 따른 패혈증 억제 효과

나. Lethal dose의 살모넬라(ATCC14028) 복강 내 감염 마우스 모델에서의 치사율 지연 효과 평가

(1) 미강(생물전환)산물

(1) 미강(생물전환)산물

미강(생물전환)산물의 살모넬라 감염 억제 효과를 확인하였다. 미강(생물전환)산물을 10mg/kg의 투여량으로 2주간 복강 및 경구투여 하였으며 살모넬라 ATCC14028 균주를 lethal dose 인 1×10^5 cfu/mouse로 복강주사하여 복강 내 살모넬라의 증식 및 감염으로 인한 마우스의 사망을 유도하였다. 그 결과, 대조군의 마우스가 모두 사망하는 7일째를 기준으로 미강(생물전환)산물 경구투여 그룹에서는 8마리, 복강투여 그룹에서는 9마리 생존 하였으며, 미강(생물전환)산물 경구투여 그룹은 18일, 복강투여 그룹에서는 23일까지 생존 하는 결과를 확인하였다.

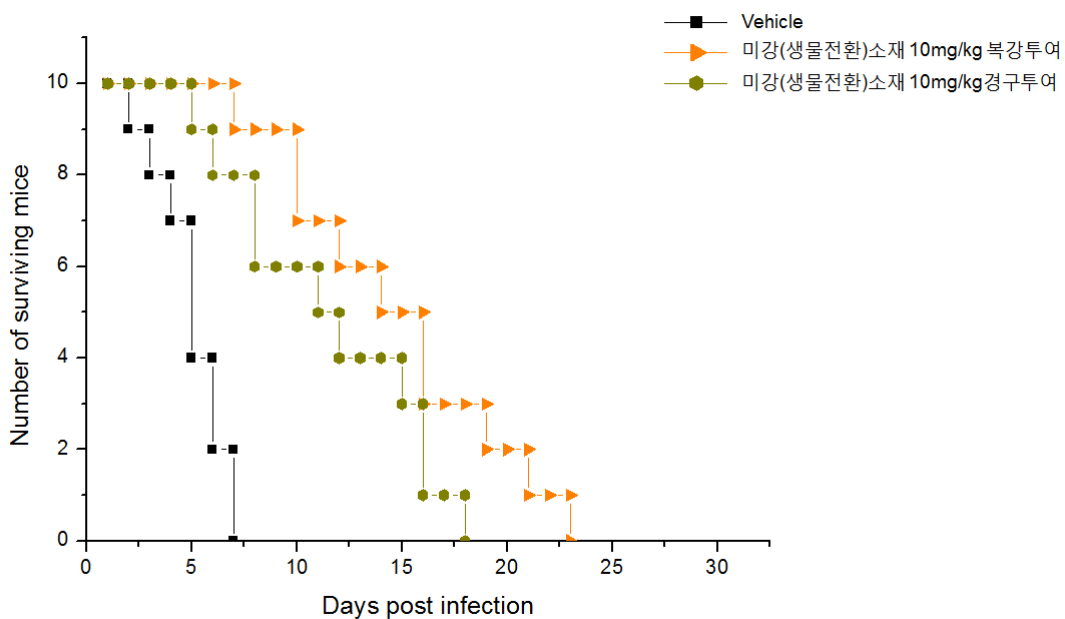


Figure 37. 미강(생물전환)산물의 복강 및 경구투여 살모넬라 감염에 의한 치사율 지연 효과

(2) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물의 살모넬라 감염 억제 효과를 확인하였다. 강황(생물전환)산물을 10mg/kg의 투여량으로 2주간 복강 및 경구투여 하였으며 살모넬라 ATCC14028 균주를 lethal dose 인 1×10^5 cfu/mouse로 복강주사하여 복강 내 살모넬라의 증식 및 감염으로 인한 마우스의 사망을 유도하였다. 그 결과, 대조군의 마우스가 모두 사망하는 7일째를 기준으로 강황(생물전환)산물 경구투여 그룹에서는 8마리, 복강투여 그룹에서는 9마리 생존 하였으며, 강황(생물전환)산물 경구투여 그룹은 21일, 복강투여 그룹에서는 26일까지 생존 하는 결과를 확인하였다.

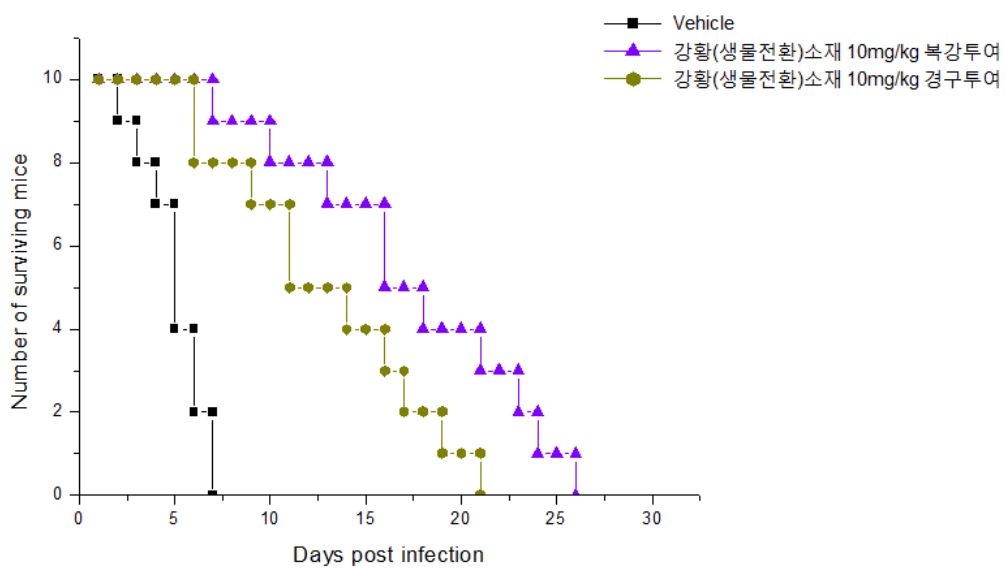


Figure 38. 강황(생물전환)산물의 복강 및 경구투여 살모넬라 감염에 의한 치사율 지연 효과

다. Sub-lethal dose의 살모넬라(ATCC14028) 복강 내 감염 마우스에서의 면역반응 평가

(1) 복강 내 생존 살모넬라 수 측정

(가) 미강(생물전환)산물

마우스를 희생한 뒤 복강을 PBS로 세척하고, 회수한 PBS를 LB plate에 spreading 하여 복강 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 측정 결과, 미강(생물전환)산물을 복강투여한 경우에는 생존 살모넬라의 수가 62.6%로 감소하였으며 미강(생물전환)산물을 경구투여한 경우에는 56.6%로 감소함을 확인하였다 <Figure 37>.

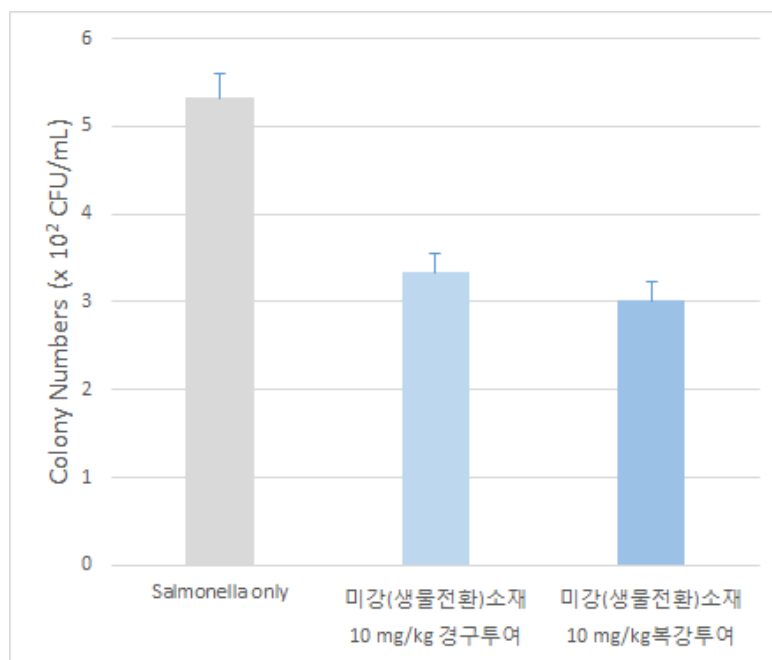


Figure 39. 미강(생물전환)산물의 복강 내 살모넬라 억제 효과

(나) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물 투여 후 살모넬라 ATCC14028 균주를 감염시킨 뒤 복강 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 강황(생물전환)산물 경구투여시 60.8%, 복강투여시 52.8%의 살모넬라가 생존하여 미강(생물전환)산물에 비해 약 2~4% 정도의 살모넬라가 더 사멸한 것을 확인할 수 있었다. <Figure 38>.

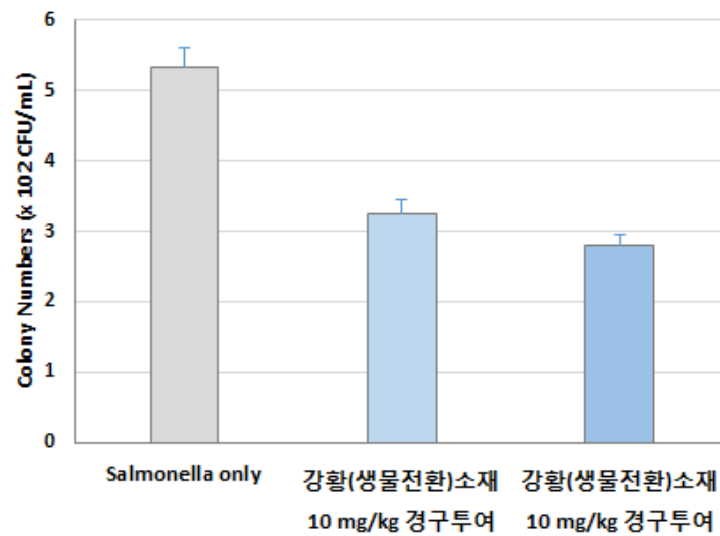


Figure 40. 강황(생물전환)산물의 복강 내 살모넬라 억제 효과

(2) 비장 림프구 활성화 효과 평가

(가) 미강(생물전환)산물

희생한 마우스의 비장을 적출한 후 비장 내 림프구를 분리하였다. 분리한 림프구를 T 세포 증식 유도물질인 concanavalin A 와 B 세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 세포의 증식이 얼마나 유도되는지 확인하였다. 그 결과, 살모넬라 감염 마우스는 정상 마우스에 비해 림프구의 증식이 1.41배 증가하는데 비해 미강(생물전환)산물 경구투여시에는 1.9배, 복강투여시에는 2.01배로 증가하여 미강(생물전환)산물의 투여로 인해 림프구의 활성화가 유도되는 것으로 확인되었다 <Figure 39>.

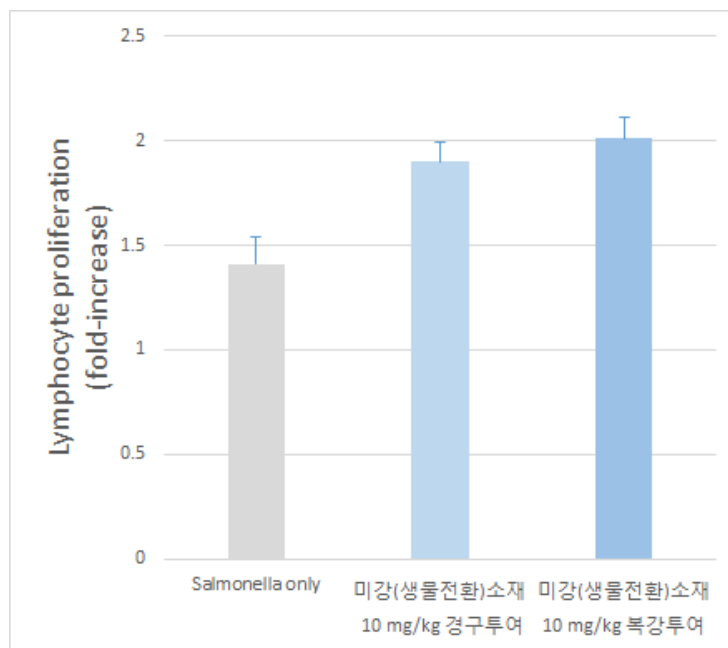


Figure 41. 미강(생물전환)산물의 림프구 활성화 효과

(나) 강황(생물전환)산물

분리한 비장 림프구의 증식을 유도하여 림프구 활성화 효과를 평가하였다. 그 결과, 살모넬라 감염 마우스는 정상 마우스에 비해 림프구의 증식이 1.41배, 강황(생물전환)산물 경구투여시에는 1.98배, 강황(생물전환)산물 복강투여시에는 2.07배로 증가하는 것으로 확인되어 강황(생물전환)산물의 비장 림프구 활성화 능력이 미강(생물전환)산물에 비해 약간 더 높은 것으로 확인되었다 <Figure 40>.

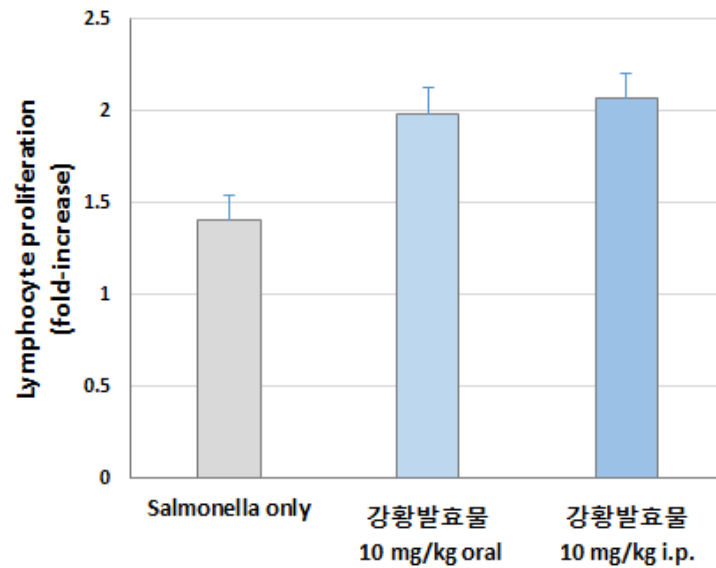


Figure 42. 강황(생물전환)산물의 림프구 활성화 효과

(3) cytokine profiling을 통한 면역반응의 분석

(가) 미강(생물전환)산물

미강(생물전환)산물의 투여 시 생산되는 cytokine을 측정하여 면역반응의 활성화 패턴을 분석하였다. 측정 결과, 염증반응의 활성화를 유도하는 IL-1 β 와 IL-6의 발현이 증가하였고, 감염 억제 및 Th1 면역반응 활성화를 유도하는 IFN- γ , IL-2, IL-12와 같은 Th1 cytokine이 증가하는 것을 확인하였다. 반면 IL-4, IL-5, IL-10과 같은 Th2 cytokine은 미강(생물전환)산물의 투여로 인해 발현량이 증가되지 않는 것을 확인하였다 <Figure 41>.

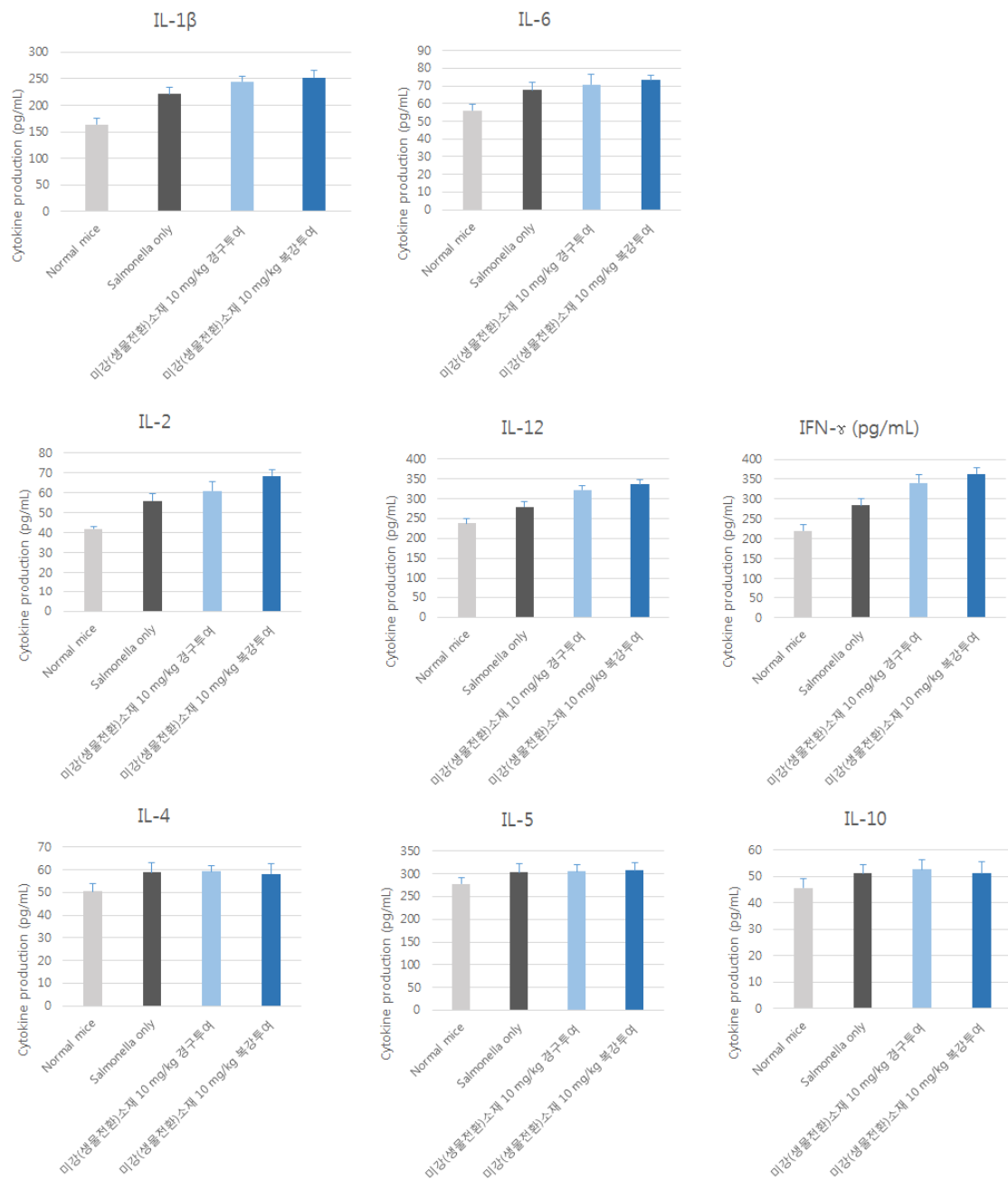


Figure 43. 미강(생물전환)산물의 투여에 의한 cytokine 발현 분석

(나) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물의 투여 시 생산되는 cytokine을 측정하여 면역반응의 활성화 패턴을 분석하였다. 측정 결과, 미강(생물전환)산물 투여 시와 동일하게 IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-12 및 IFN- γ 의 발현량이 증가하는 것을 확인하였으며, IL-4, IL-5, IL-10은 증가하지 않는 것을 확인하였다. Cytokine의 발현량 증가 효과 역시 강황(생물전환)산물이 미강(생물전환)산물에 비해 더 높은 것으로 확인되었다. <Figure 42>.

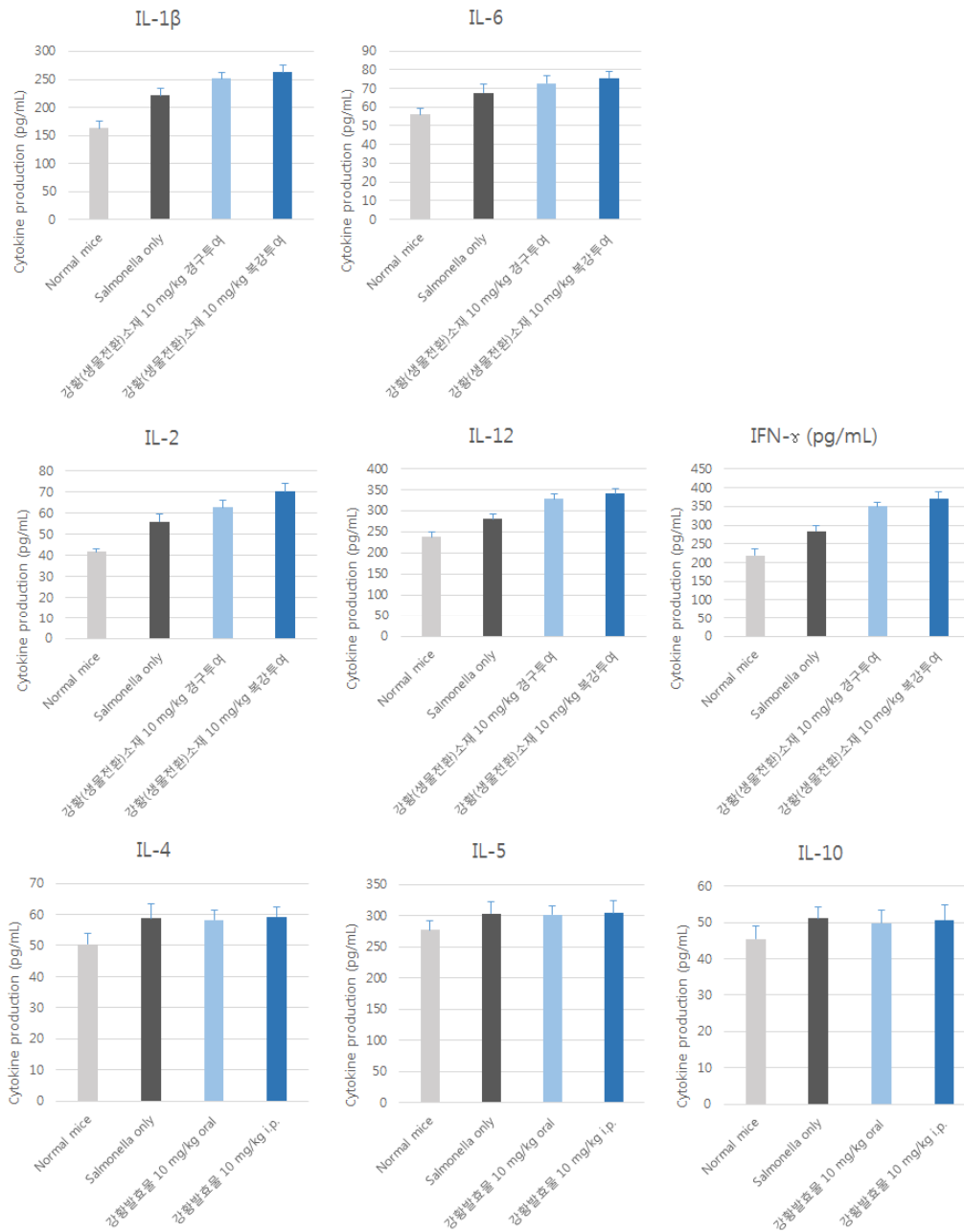


Figure 44. 강황(생물전환)산물의 투여에 의한 cytokine 발현 분석

(4) 조직의 손상 억제 효능 확인

살모넬라 감염으로 인해 발생하는 전신성 염증반응에 의한 조직의 손상을 면역조절소재의 투여에 의해 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 ATCC14028 살모넬라 균주를 복강 내로 주사한 살모넬라 감염 모델을 이용하였고, 면역조절소재의 투여 후 살모넬라 감염으로 인해 전신 염증반응이 유도된 마우스에서 간 조직을 분리하여 조직의 손상 여부를 확인하였다.

(가) 미강(생물전환)산물

10mg/kg의 미강(생물전환)산물을 2주간 식이를 통하여 투여하였고, 1×10^4 cfu의 ATCC14028 살모넬라 균주를 복강 내로 주사하여 감염을 유도하였다. 감염 2일 후 마우스를 희생하여 간 조직을 분리 후, 염색하여 관찰한 결과 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 대조군에 비해 간 조직의 손상이 억제된 것이 확인되었다 <Figure 43>.

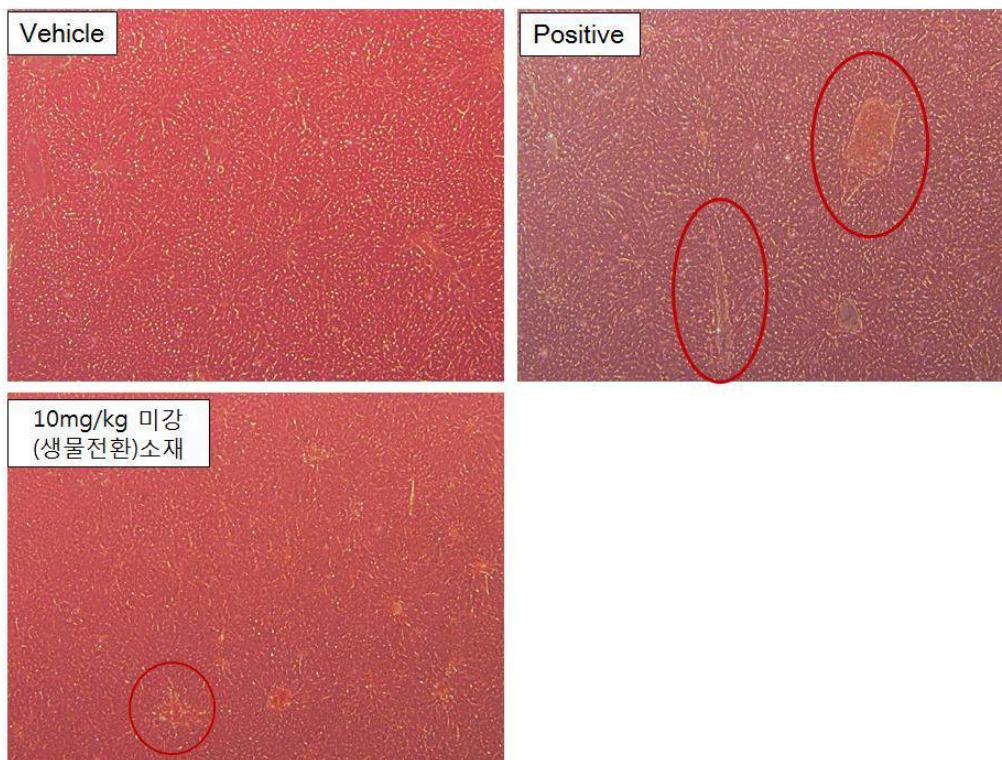


Figure 45. 살모넬라 감염으로 인해 유도되는 간 손상에서 미강(생물전환)산물의 처리로 인한 억제효과

(나) 강황(생물전환)산물

10mg/kg의 강황(생물전환)산물을 2주간 식이를 통하여 투여하였고, 1×10^4 cfu의 ATCC14028 살모넬라 균주를 복강 내로 주사하여 감염을 유도하였다. 감염 2일 후 마우스를 희생하여 간 조직을 분리 후, 염색하여 관찰한 결과 강황(생물전환)산물을 투여한 마우스에서는 대조군에 비해 간 조직의 손상이 억제된 것이 확인되었다 <Figure 44>.

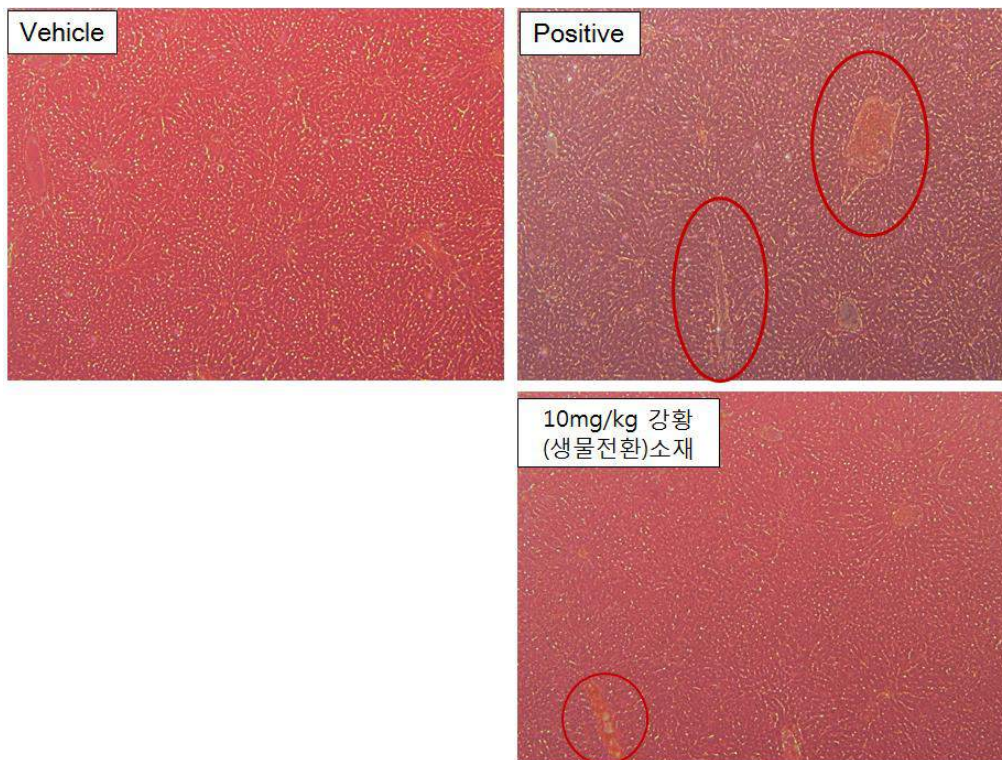


Figure 46. 살모넬라 감염으로 인해 유도되는 간 손상에서 강황(생물전환)산물의 처리로 인한 억제효과

5. 선발된 **고도화** 면역조절소재의 Scale-up 및 표준화

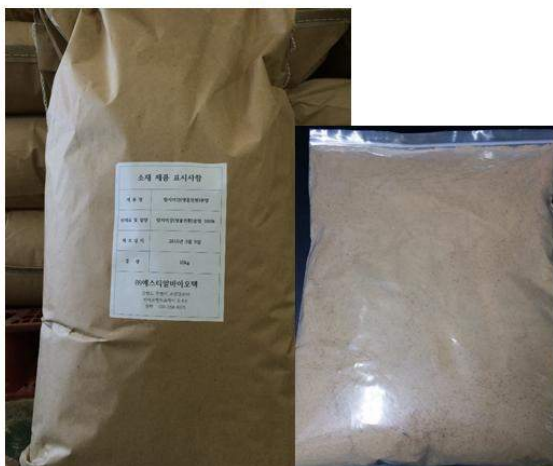
가. **고도화** 면역조절소재의 생산공정 scale-up 및 표준화

Scale-up 규모에서 생산된 면역조절소재(시제품)의 생산공정 표준화를 위하여 미강(생물 전환)산물은 5,000L pilot 규모의 발효조에서 3회 반복시험 생산을 통해 생산된 미강(생물 전환)산물의 면역활성역가를 평가하였으며, 강황(생물전환)산물은 50L 규모에서 3회 반복 시험 생산을 통해 생산된 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가를 평가함으로써 생산공정 표준화를 구축하고자 하였다. 각각 배양시간별 시료를 취하여 면역활성 역가를 측정하였으며, 최종 생물전환산물의 건조분말을 수득하여 시제품을 생산하였다.



Figure 47. 면역조절소재(시제품) 생산을 위한 Pilot-scale의 5,000리터 발효조 및 50리터 발효조 생산설비 사진

A. 탈지미강(생물전환)분말



B. 강황(생물전환)분말



Figure 48. 면역조절소재 시제품

(1) 미강(생물전환)산물

미강(생물전환)산물의 발효(배양)시간에 따른 5,000리터 3반복 시료에 대한 면역활성 역가를 측정된 결과,

1차 미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/4~1/2μg/ml,

2차 미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2μg/ml,

3차 미강(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2~1μg/ml 이었다.

3회 반복시험을 통해 생산성의 정확성을 검토해 본 결과, 5,000리터의 pilot 규모의 생산에서도 안정적으로 생물전환산물의 면역활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 미강(생물전환)산물의 생산공정의 표준화를 구축할 수 있었다.

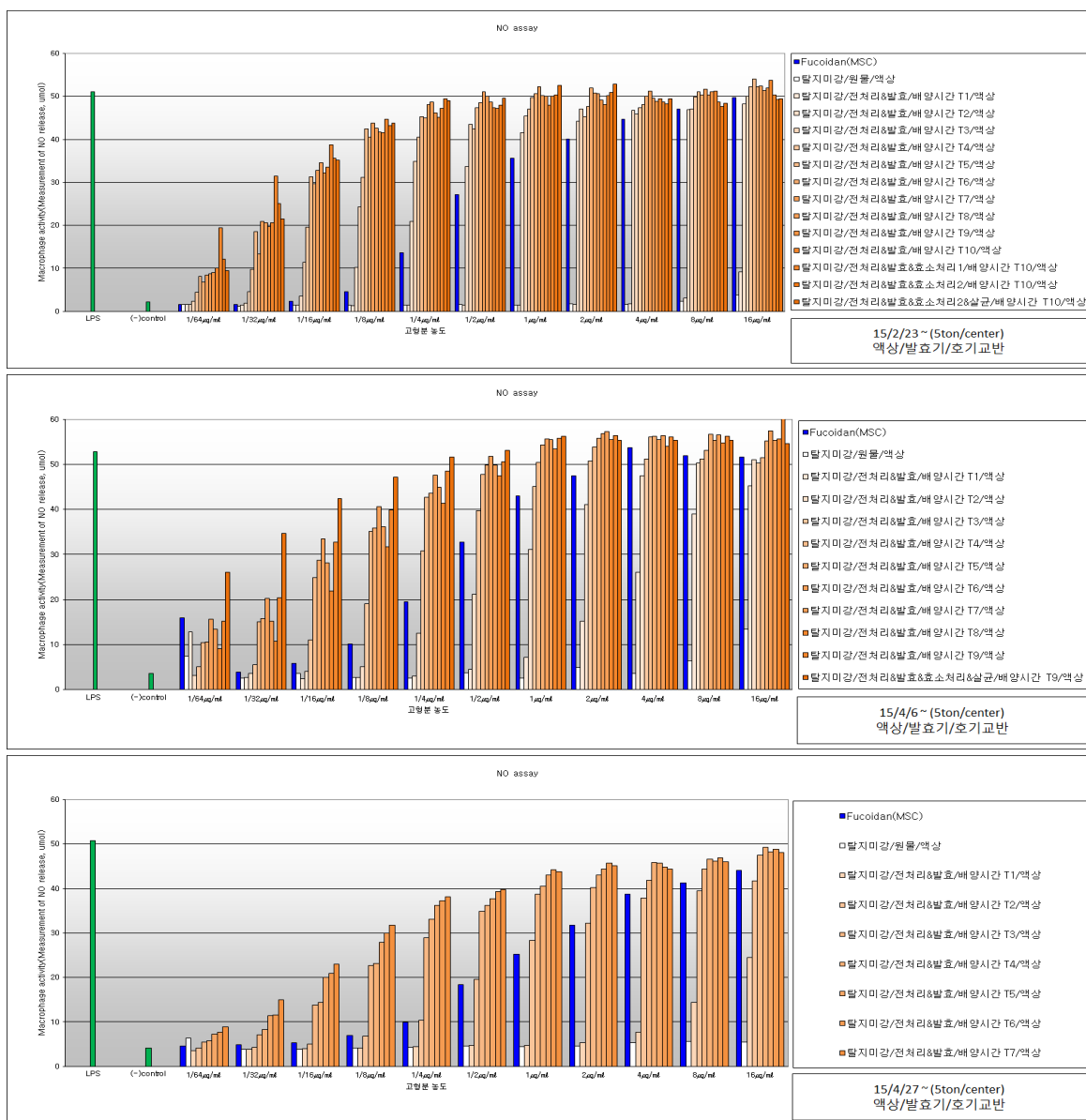


Figure 49. 5,000L pilot scale 발효조배양에서 생산된 3batch 미강(생물전환)산물의 면역활성 역가

(2) 강황(생물전환)산물

강황(생물전환)산물의 발효(배양)시간에 따른 50리터 3반복 시료에 대한 면역활성 역가를 측정된 결과,

1차 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1 μ g/ml,

2차 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2~1 μ g/ml,

3차 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/2 μ g/ml 이었다.

3회 반복시험을 통해 생산성의 정확성을 검토해 본 결과, 50리터 규모의 생산에서도 안정적으로 생물전환산물의 면역활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물의 생산공정의 표준화를 50리터 규모에서 구축할 수 있었다.

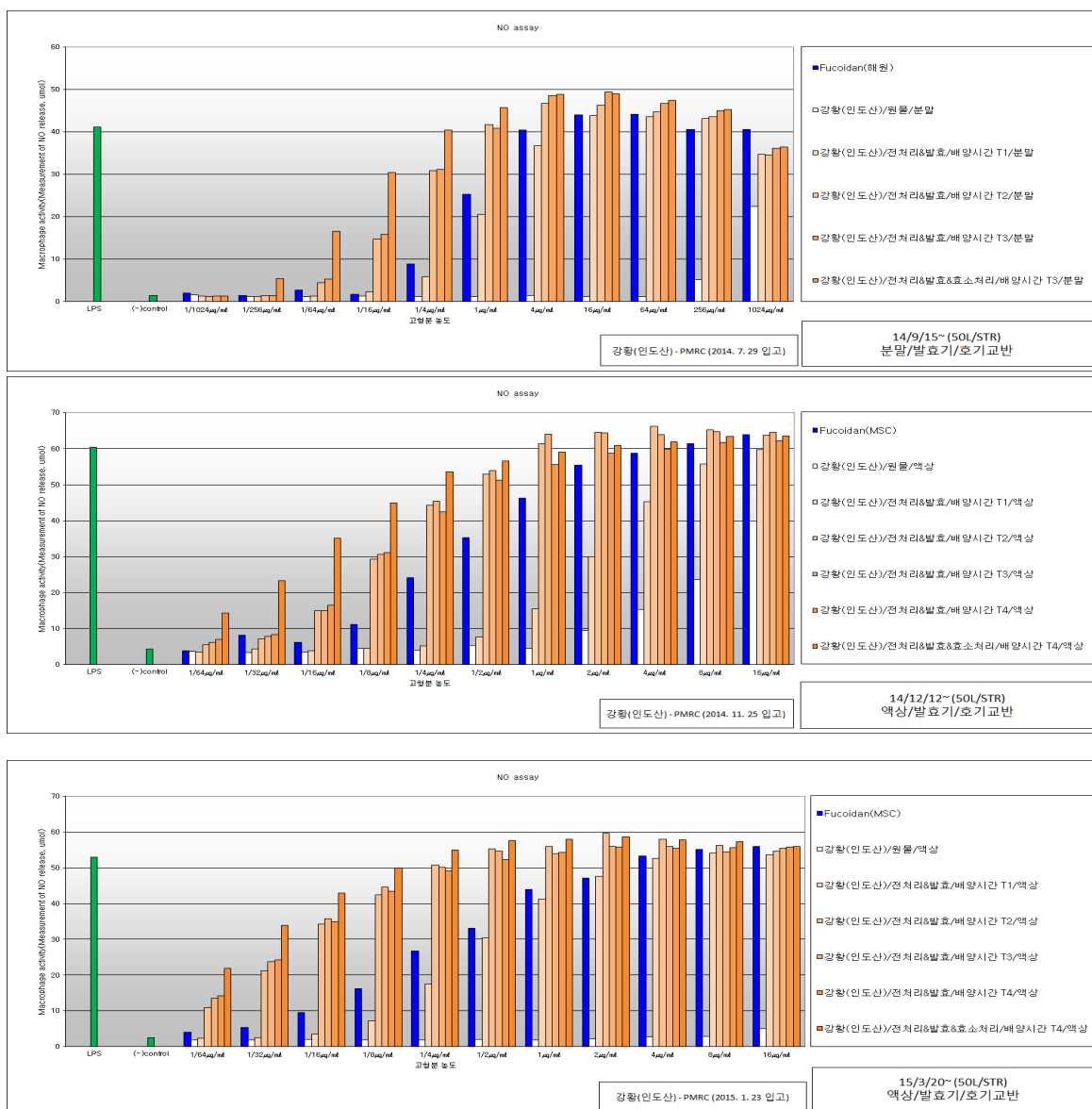


Figure 50. 50L scale 발효조배양에서 생산된 3batch 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

나. 고도화 면역조절소재, 강황(생물전환)산물의 생산공정 validation 및 표준화

(1) 50L 발효조 규모에서의 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

대식세포(macrophage)의 NO 생성능 측정에 있어서 대식세포의 배양상태를 보다 안정적으로 유지된 상태에서 NO 생성을 측정하는 Bioassay 방법이 확립됨에 따라 1차년도에 50L 규모에서 3반복 시험생산을 통해 생산된 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가를 재측정하여, 2차년도에 500L 및 5000L 규모에서 수행된 결과와 비교할 수 있도록 하였다.

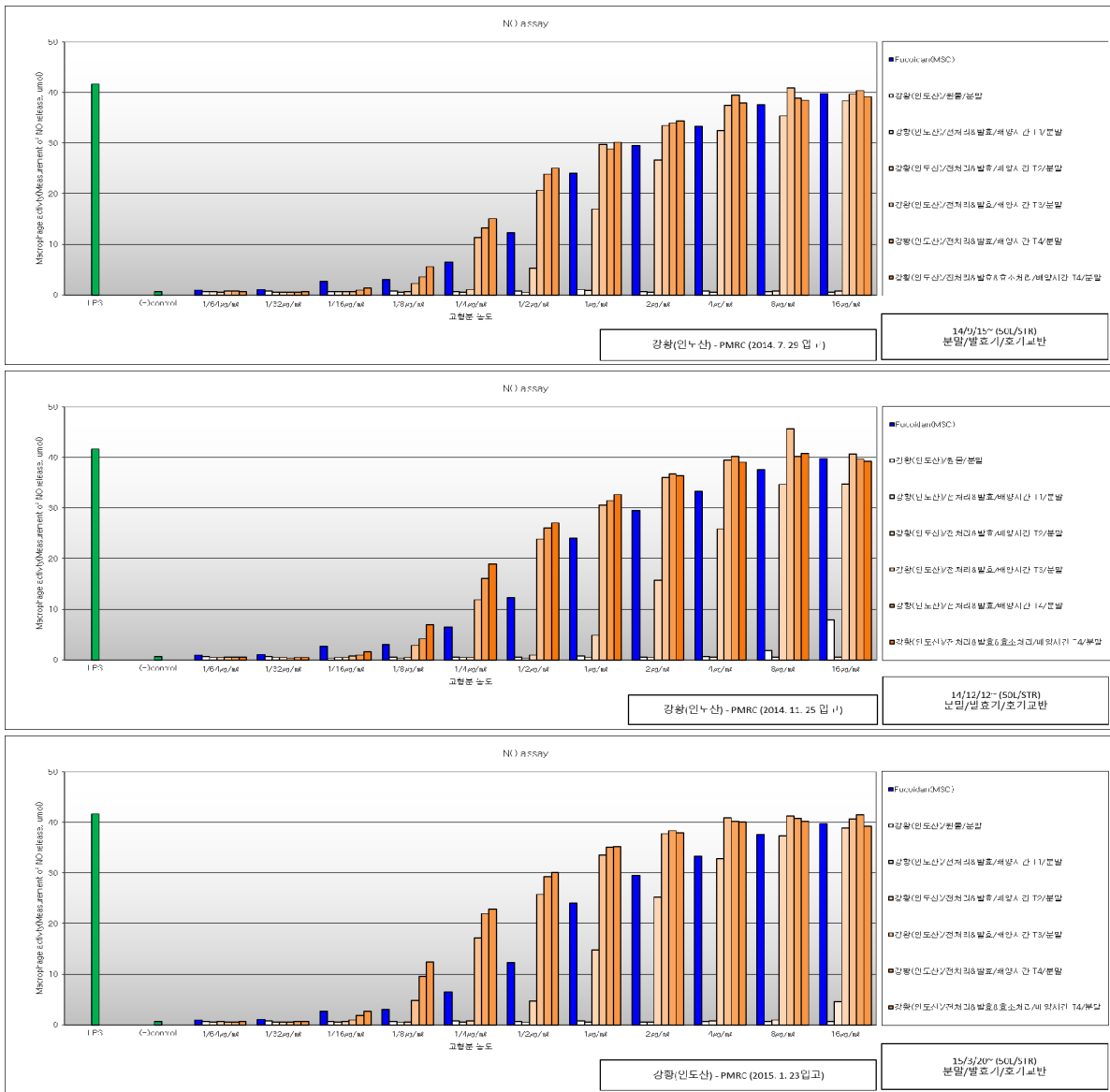


Figure 51. 50L pilot scale 발효조 배양에서 생산된 3batch 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

(2) 500L 발효조 규모에서의 3반복 시험생산을 통한 생산공정의 균일성 검증

고도화된 면역조절소재인 강황(생물전환)산물의 생산공정 validation을 위하여 500L 규모의 발효조에서 3반복 시험생산을 수행하였다.

강황(생물전환)산물의 발효(배양)시간에 따른 500L 3반복 시료에 대한 면역활성 역가를 측정하고, 결과,

1차 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC_{100} 은 대략 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,

2차 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC_{100} 은 대략 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,

3차 강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC_{100} 은 대략 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

3반복 시험생산을 통해 배양시간별 시료를 취하여 면역활성 역가를 측정하여 생산공정의 균일성을 검토해 본 결과, 500L 규모의 생산에서도 안정적으로 생물전환산물의 면역활성이 유지되는 것으로 나타나 생산공정의 균일성을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물의 생산공정 표준화를 500L 규모에서 구축할 수 있었다.

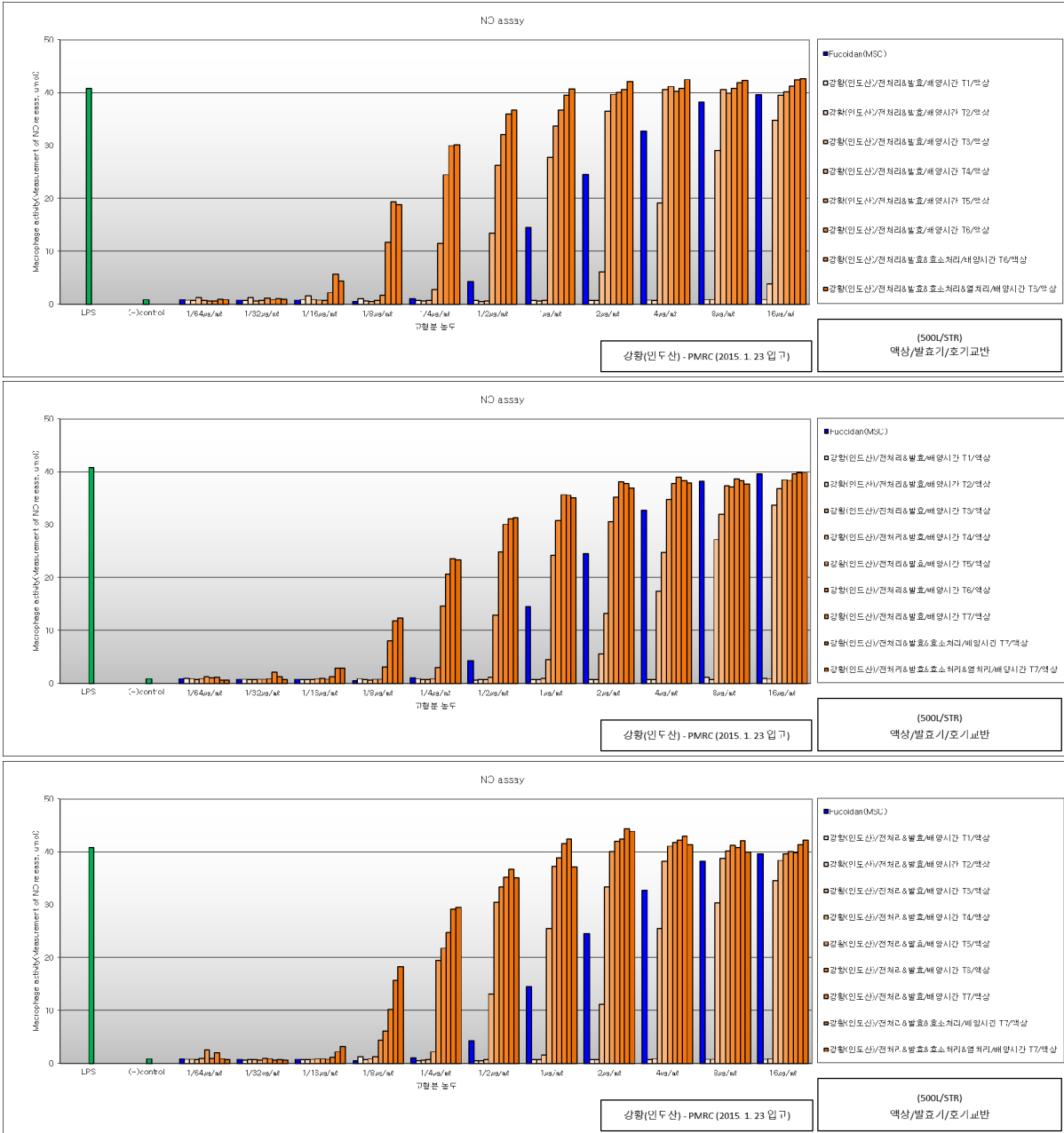


Figure 52. 500L pilot scale 발효조 배양에서 생산된 3batch 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

(3) 5000L 발효조 규모에서의 시험생산

강황(생물전환)산물의 생산공정 validation을 위하여 50L, 500L 규모에서 수행한 3반복 시험생산의 결과를 바탕으로 5000L 규모에서의 시험생산을 수행하였다.

강황(생물전환)산물의 발효(배양)시간에 따른 5000L 시료에 대한 면역활성 역가를 측정 한 결과,

강황(생물전환)산물에 대한 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1µg/ml 이었다.

배양시간별 시료를 취하여 면역활성 역가를 측정하여 생산공정의 균일성을 검토해 본 결과, 5000L 규모의 생산에서도 안정적으로 생물전환산물의 면역활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 5000L 규모에서의 강황(생물전환)산물 시제품을 생산하였다.

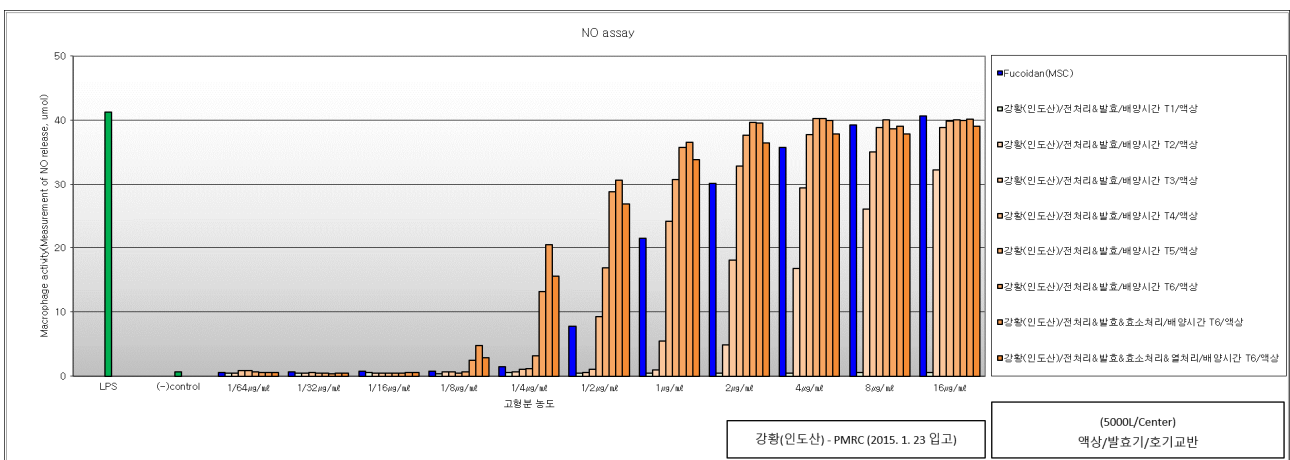


Figure 53. 5000L pilot scale 발효조 배양에서 생산된 강황(생물전환)산물의 면역활성 역가

다. 면역조절소재의 유통기한 설정 및 안정성 확립

살모넬라 저감용 사료첨가제로 사용하고자 하는 본 개발소재의 적용은 사료첨가제로써, 농장에서는 사료가 사료회사로 부터 농장에 들어올 때 첨가 및 혼합하여 사용하거나, 또한 사료회사에 납품되어 사료에 첨가 및 혼합된 후 농장으로 들어가는 경로로 적용되기 때문에 유통 및 사료에 적용되는 시간은 1개월 미만이며 최대 길어야 3개월 정도의 단기간으로 유통기한을 고려하고 있다. 또한 사료 및 사료첨가제는 축산물처럼 유통기한 설정에 관련한 기준 및 규격이 없기 때문에 본 과제에서는 개발된 시제품의 유통기한 설정을 식품 및 축산물의 유통기한 설정실험 가이드라인에 맞춰 실험을 수행하였다.

(1) 면역조절소재의 유통기한 설정 실험 디자인 및 결과 도출

(가) 실험방법

① 검체의 채취 및 취급방법

면역조절소재(시제품)의 품질유지기한 설정을 위하여 가속실험을 통해 시료의 성상, 수분, 미생물 및 면역활성 역가를 확인하는 실험을 수행하여, 개발 시제품의 품질유지기한을 예측하고자 하였다.

② 실험조건

Table 2와 같은 조건에서 약 3개월간 보관하면서 가속실험을 실시하였고, 4주 간격으로 샘플링 하여 분석을 수행하였다. 미강(생물전환)산물의 저장은 각 시료를 일정 중량으로 칭량하여 포장한 후 각 조건에 적합하도록 설정된 항온항습기내에서 보관하여 실험에 사용하였다.

Table 2. 유통기한 예측을 위한 가속시험 조건

구분	실험조건
저장 온도	25 °C(75 %R.H.), 35 °C(90 %R.H.), 60 °C(60 %R.H.)
저장 기간	4주간격, 총12주
실험 반복수	3반복

③ 품질지표 및 실험방법

미강(생물전환)산물의 유통기한 예측을 위한 품질지표 및 시험방법은 Table 3과 같이 설정하여 결과를 산출하였다.

Table 3. 시료의 유통기한 예측을 위한 품질지표 및 실험방법

품질지표		실험방법	품질한계
성상		식품공전 제II권 제10. 일반시험법 성상	
이화학	수분	식품공전 제II권 제10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.1 수분 1.1.1.1 건조감량법 가. 상압가열건조법	-
미생물	대장균	식품공전 제II권 제10. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.8 대장균	음성

(나) 실험결과

① 품질지표 성상 변화

미강(생물전환)산물의 성상 변화 관찰 결과, 시료 고유의 색변화는 거의 관찰되지 않았으며, 고유의 취를 유지하면서, 이미.이취(산패취)가 나지 않았다.

② 품질지표 수분함량 변화

미강(생물전환)산물의 저장기간 중 수분의 함량을 측정한 결과는 다음의 Table 4와 같이 나타났으며, 최초 $2.5 \pm 0.1\%$ 에서 저장기간 마지막인 12주차에서 3.0~3.2%로 0.5~0.7%가 증가하였으나, 유의적인 증감추세가 관찰되지 않아 품질변화의 제한요소로 작용하지 않는 것을 확인하였다.

Table 4. 가속조건에서 미강(생물전환)산물의 수분함량 변화

Moisture content (%)				
Temperature/ Humidity	Storage period(weeks)			
	0	4	8	12
25°C/75%RH	2.5±0.1	2.7±0.3	2.8±0.1	3.0±0.2
35°C/90%RH		2.9±0.1	2.9±0.2	3.1±0.2
60°C/60%RH		2.8±0.2	2.8±0.1	3.2±0.1

③ 품질지표 대장균 변화

미강(생물전환)산물의 저장기간 중 대장균 검출 유무를 관찰한 결과를 Table 5에 나타내었다. 저장기간동안 대장균 검출 유무 확인 결과, 모두 음성으로 관찰되어 품질변화의 제한요소로 작용하지 않는 것을 확인하였다.

Table 5. 가속조건에서 미강(생물전환)산물의 대장균 검출 유무

Microbiological test (cfu/g)				
온도/상대습도	Storage period(weeks)			
	0	4	8	12
25°C/75%	음성	음성	음성	음성
35°C/90%	음성	음성	음성	음성
60°C/60%	음성	음성	음성	음성

(다) 결론

미강(생물전환)산물의 저장기간에 따른 품질 변화의 제한요소에 변화를 통한 품질한계 설정기준에 의한 유통기한을 예측해 보았을 때, 저장 품질 안정성 실험 결과 예상되는 유통기한은 생산 후 품질유지의 안정권이 12개월~24개월 이상으로 예측된다.

※참고자료 : 1. 식품의약품안전처 : 식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준 (제2014-206호, 2014.12)
2. 식품의약품안전처 : 식품 및 축산물의 유통기한 설정실험 가이드라인 (2013.12)

(2) 면역조절소재의 안정성 확립

미강(생물전환)산물의 안정성 확립을 위하여 실온에서 시료를 보관하면서 2주 간격으로 제품의 면역활성 역가를 분석하였다. 본 실험은 시료를 계속적으로 실온에서 보관하면서 분석을 진행할 예정이다. 현재 미강(생물전환)산물을 12주까지 실온에서 보관하면서 면역활성 역가를 분석한 결과 면역활성 역가가 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

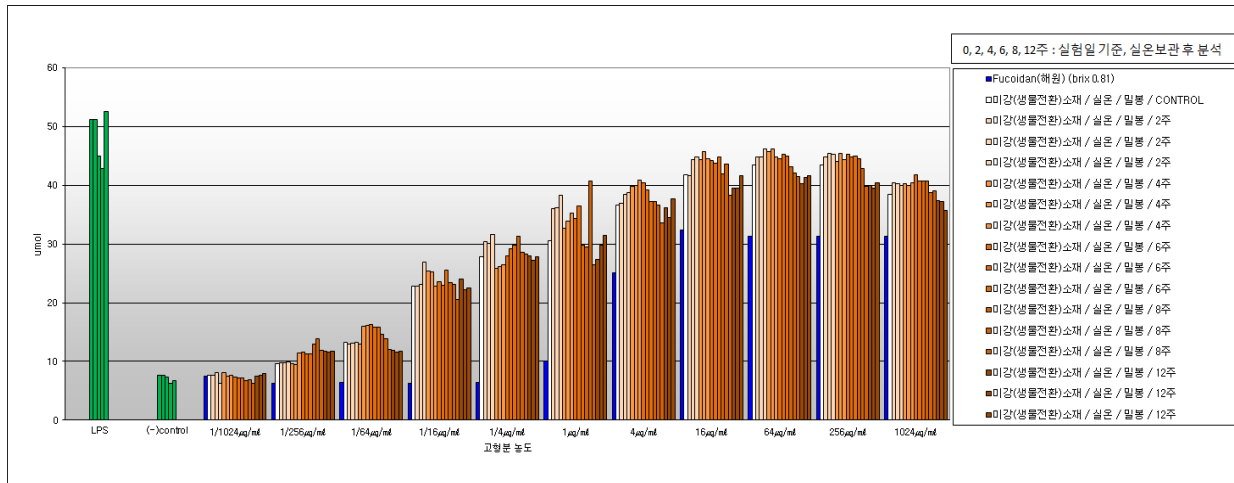


Figure 54. 미강(생물전환)산물의 실온 보관조건에서 장기 안정성 확립을 위한 면역활성 역가 측정 (~12주까지)

2절. 살모넬라에 직접 작용하여 살모넬라를 제거할 수 있는 항균소재 개발

: '장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재'

주관기관인 (주)STR바이오텍에서 기 개발하여 확보하고 있는 프로바이오틱스소재로 바실러스 및 유산균소재의 항살모넬라 효능을 평가하여 항살모넬라소재로 활용하고자 하였다. 다양한 경로를 통해 확보한 프로바이오틱스에 대한 배양상등액을 가지고 *S. Typhimurium*을 지시균으로 한 Paper disc agar diffusion assay 방법을 통해 탁월한 항균활성을 나타내는 프로바이오틱스를 기 확보하고 있으며, 다양한 고초균의 배양상등액은 살모넬라에 대한 항균활성이 우수한 반면, 유산균을 배양하여 얻은 배양상등액에서는 살모넬라보다는 *E.coli*에서 우수한 항균활성을 나타내는 결과를 얻었으며 특히, 효모배양액의 경우에는 살모넬라와 동시에 *E.coli*에서도 탁월한 항균활성을 나타내는 결과를 토대로 항살모넬라 효능의 다양한 프로바이오틱스를 '장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 프로바이오틱스 소재'로써 평가 후 활용하고자 하였다.

1. 바실러스소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

바실러스소재 생산을 위하여 당사에서 기 확보하고 있는 다양한 strain의 바실러스 균주 (BS-CAL, BS-WJ)를 발효조에서 배양하였다. 발효조 배양공정은 5 L bottom driven 배양기에서 조업부피(working volume) 3.5 L로 배양을 수행하였으며, 접종량 1%, 교반속도는 D.O. level이 10~20% 유지되도록 200rpm에서 500rpm으로 증가시키면서 용존산소를 공급해 주었다. 바실러스 생산성 향상을 위해 유가식배양공정을 수행하였으며 배양 pH가 낮아지기 시작하는 시점인 배양 9시간부터 initial feeding을 수행하여 24시간 배양하여 바실러스소재를 생산하였으며, 필요시 각각의 바실러스 배양액을 분말화하여 실험에 사용하였다.

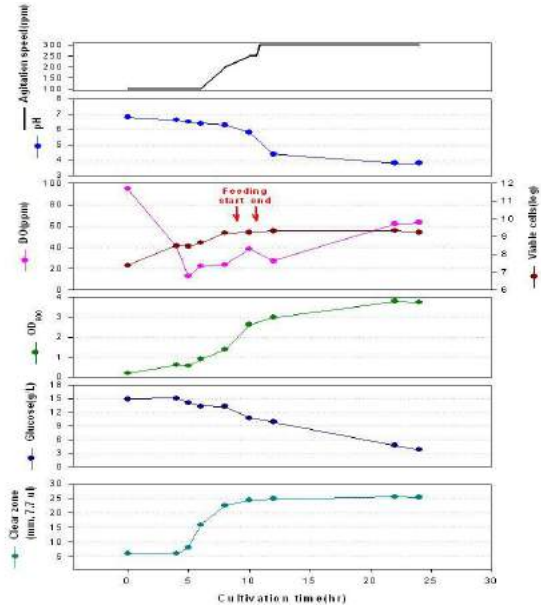


Figure 55. BS-STR-TWNS균주의 연속유가식 배양공정에서의 time profiles

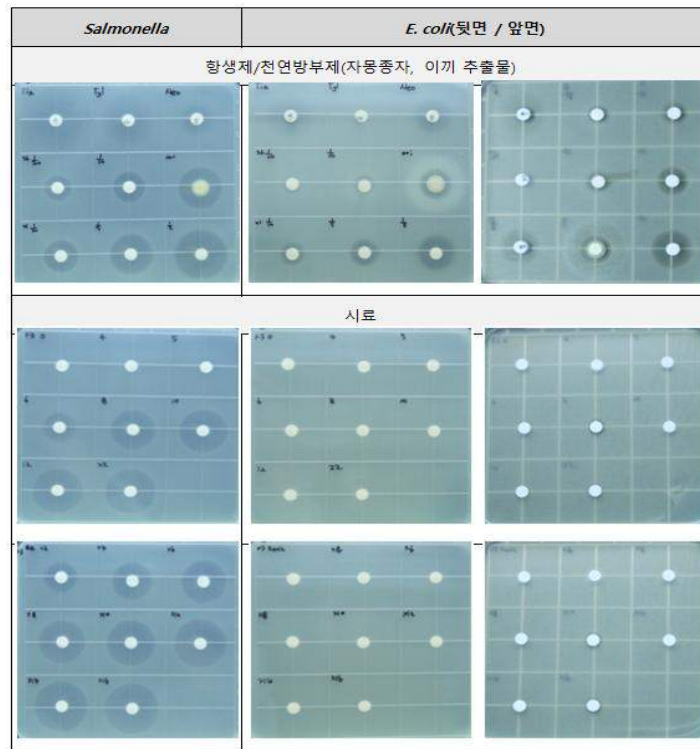


Figure 56. 바실러스소재(BS-STR-TWNS)의 항살모넬라활성 확인을 위한 항균활성 확인

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

상기의 바실러스소재 생산배양공정을 통해 생산된 바실러스 배양액에 대한 항살모넬라 항균활성을 원판확산법으로 평가하였다.

(1) 실험방법

바실러스 배양액의 항살모넬라 효능을 평가하기 위한 지시균인 살모넬라균주로 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*), SE38(*S. Enteritidis*), SG227(*S. Gallinarium*) 3종류의 strain을 사용하였다.

바실러스 배양액의 항균력검사는 살모넬라 공시균주를 혈액배지(Blood agar)에 배양하여 각각의 살모넬라 균주를 취해 10ml의 BHIB에 접종하고, 37°C에서 18~24시간 배양하여 접종균주로 사용하였다. 각각의 살모넬라 균주는 Mueller-Hinton 평판배지에 고르게 도말되도록 top agar를 사용하여 도말하였다. 바실러스 배양액은 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 0.45 μ m filter로 거른 후 8mm disc에 바실러스 배양원액으로 100 μ l를 loading 하였으며, 각 디스크는 디스크 중앙에서 중앙까지의 간격이 24mm이상 되도록 충분한 간격을 유지하였다. 항균력의 결과는 배양 16~18시간 후 판독하였으며, 디스크의 지름을 포함하여 억제대(clear zone)의 지름을 측정하였다. 억제대는 디스크 지름을 포함하여 전체 mm가 가장 가까운 것을 vernier calipers를 사용하여 측정하였다.

(2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가

원판확산법에서의 바실러스 배양액의 항균활성은 살모넬라 표준균주인 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*) 균주에서 항균활성이 가장 크게 측정되었으며, BS-CIK, BS-STR-TWNS 및 BS-CAL의 바실러스 균주에서 항균활성이 높게 관찰되었다. 본 실험에 사용한 살모넬라 표준균주인 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*) 균주는 대조균으로 사용한 항생제 disc 중에서 내성을 갖는 항생제는 없었으나, 가금류에 병원성을 가지는 인수공통 균인 SE38(*S. Enteritidis*)과, 종 특이성 균인 SG227(*S. Gallinarium*) 두 균주의 경우에는 바실러스 배양액을 100 μ l를 loading한 실험조건에서는 항균활성이 거의 나타나지 않았을 뿐만 아니라, 대조균으로 사용한 항생제 disc에서의 항균력 test에서도 민감도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, 타일로신(30 μ g)과 반코마이신(30 μ g)이 항균활성을 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 살모넬라 균주의 species 및 strain에 따라서 항균력에 대한 민감도가 각각 다른 경향을 가지는 것을 파악할 수 있었다. 바실러스 배양액의 loading 양을 증가시켜서 살모넬라에 대한 항균활성을 확인하는 실험을 수행하였다. 실험결과 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*) 균주에서만 가장 민감하여 억제대가 관찰되었다.

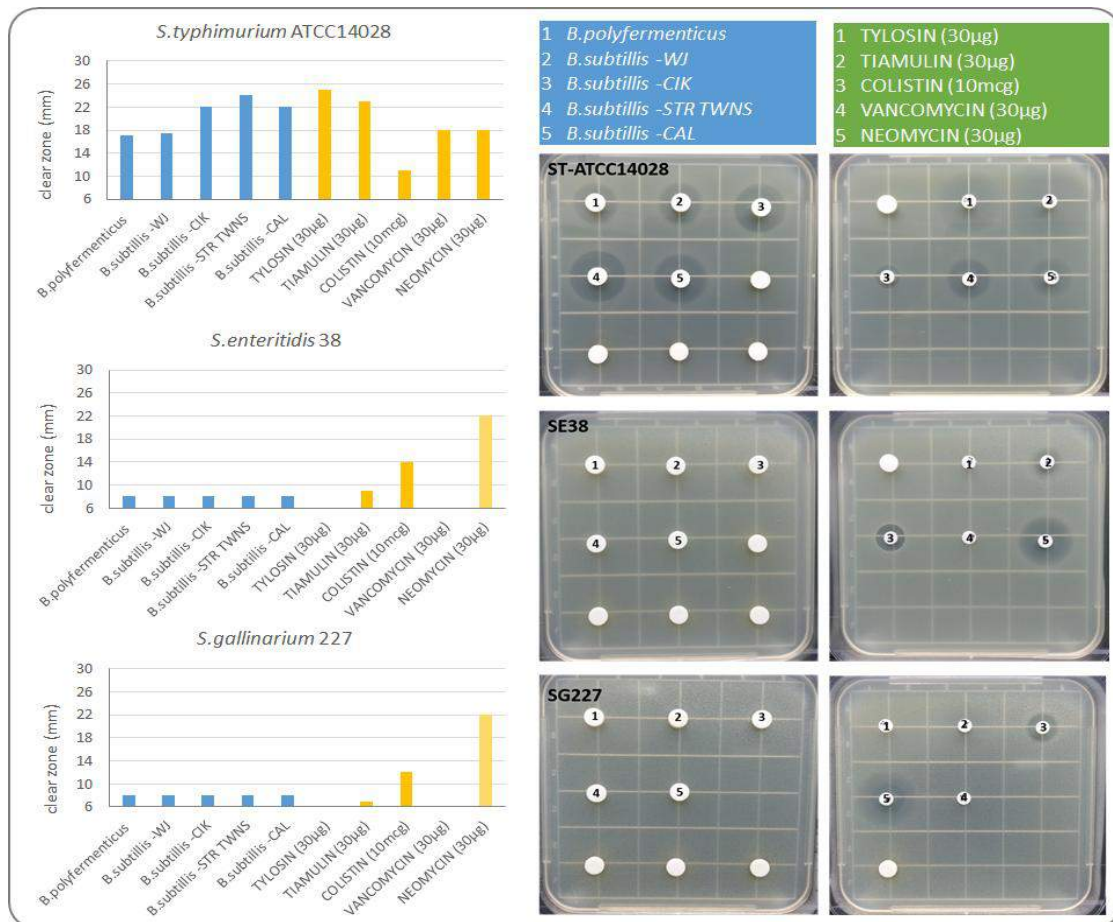


Figure 57. 다양한 바실러스 배양액의 각종 살모넬라 균주에 대한 항살모넬라 in vitro disc assay 결과

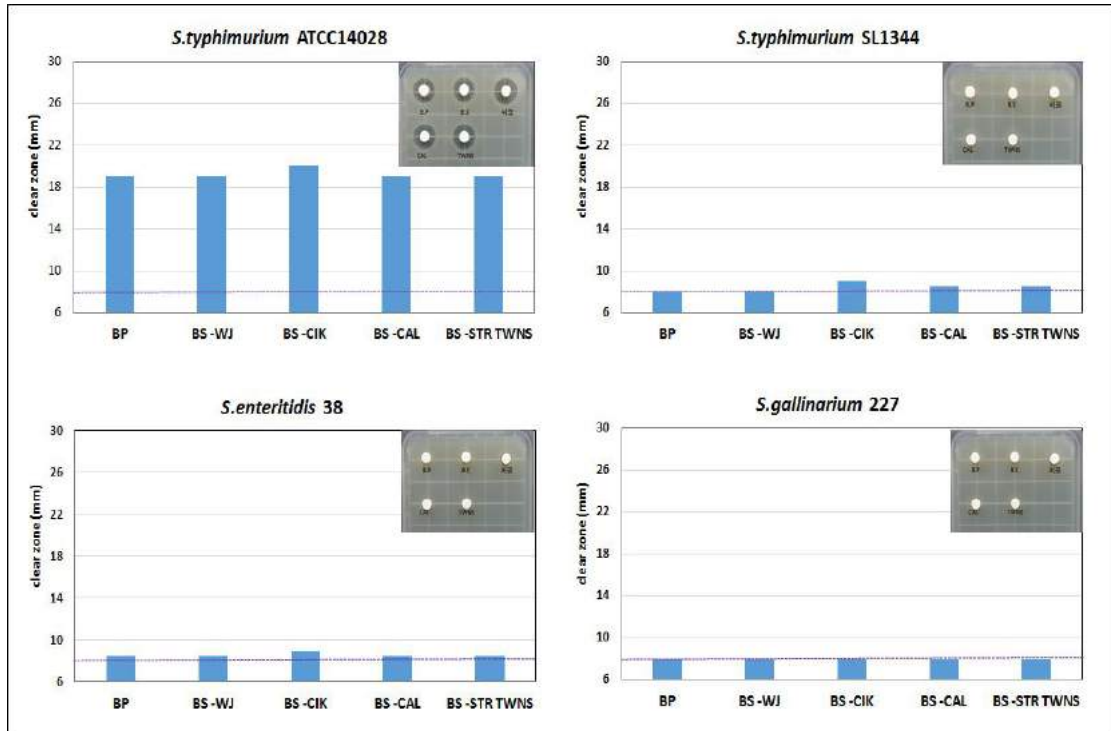


Figure 58. Loading 양을 증가시킨 바실러스 배양액의 각종 살모넬라 균주에 대한 항살모넬라 in vitro disc assay 결과

다. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

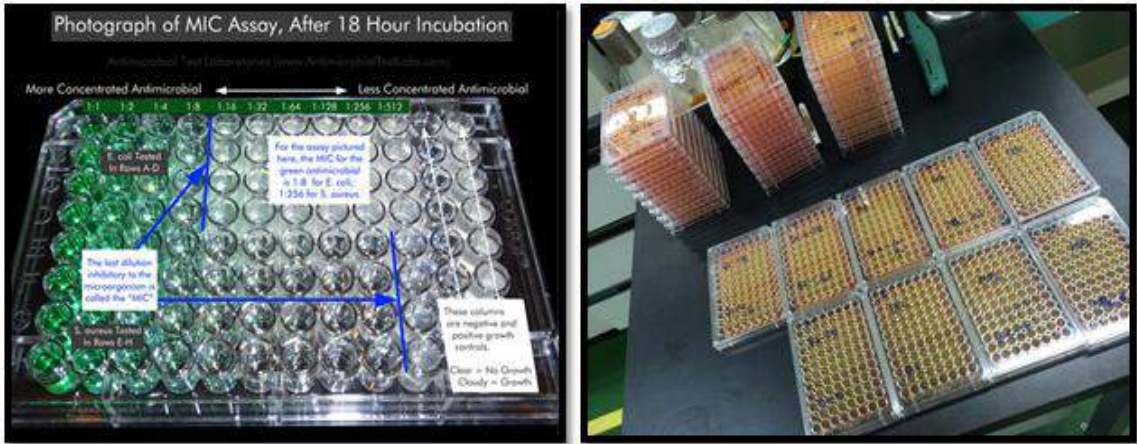
MIC는 항균력을 측정하는 기초적인 지표로 시험관내 세균 감수성 검사(in vitro sensitivity test)에서 미생물의 번식을 억제할 수 있는 항생제의 최저농도로 정의하고 있다 (Acar JF, Goldstein FW : Disc susceptibility test, In;Lorian V, ed. Antibiotics in laboratory medicine, 4th. p813-34, Baltimore, Williams & Wilkins, 1996). 생체내에서는 생체내 존재하는 다양한 단백질과 결합된 상태로 존재할 수 있어 항균력이 변화할 수 있으며, 미생물의 종류 및 양에 따라서도 그 미생물이 항생제에 대한 내성이나 돌연변이 등으로 인해 다양한 변수가 존재하여 항균물질에 대한 감수성이 다양하게 나타날 수 있기 때문에 시험관내에서 측정한 MIC는 생체내의 반응을 정확히 예측할 수는 없지만 항미생물제의 항균활성의 감도를 예측하기 위해 사용되고 있다(DG Lee et., pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics : general concepts and recent advances, Infection and Chemotherapy : Vol.40, No.3, p140-147, 2008). 최소성장억제농도는 미생물의 종, 균주, 측정조건에 따라 달라질 수 있다.

본 실험에서는 바실러스 배양상등액의 항균활성을 in vitro 조건에서 평가하기 위하여 최소억제농도(MIC)를 산출해 보았다.

(1) 실험방법

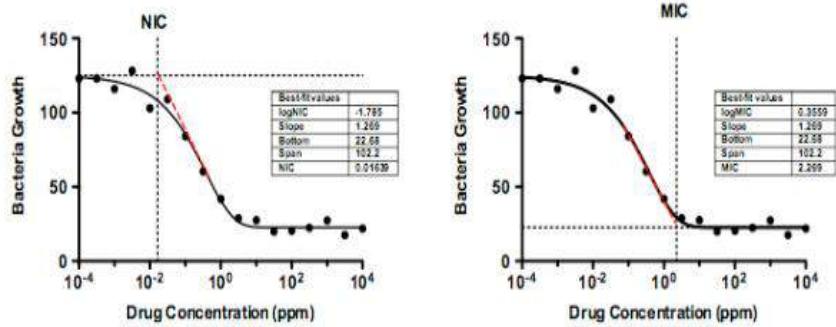
MIC 측정을 위해 사용되는 희석법은 한천배지 희석법과 액체배지 희석법이 있으며, 본 실험에서는 액체배지 희석법 중에서 미량액체배지 희석법(microdilution broth method)를 사용하여 실험하였다.

96well plate에 희석한 시료액을 $10\mu\text{l}$ 넣고, 접종균주액은 $90\mu\text{l}$ 에 5×10^5 cfu/ml이 되도록 접종하였다. 바실러스 배양액의 MIC산출을 위한 감수성균주인 살모넬라 균주는 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*), SE38 (*S. Enteritidis*), SG227 (*S. Gallinarium*), ST SL1344 (*S. Typhimurium*) 등 4종류의 strain을 사용하였다. 접종을 완료한 microplate는 35°C 에서 16~20시간 배양하였으며, 동일 온도조건을 유지하기 위하여 tray를 4개이상 쌓지 않는 조건에서 배양하였다. 실험결과의 분석은 96well plate에서 균이 완전히 자라지 않는 항균제의 농도를 MIC로 하였으며, 살모넬라균의 성장을 600nm에서 O.D. 값을 측정하여 산출하였다.



<참조> http://www.antimicrobialtestlaboratories.com/Minimum_Inhibitory_Concentration_Test_MIC.htm

Figure 59. 최소억제농도 산출을 위한 실험법

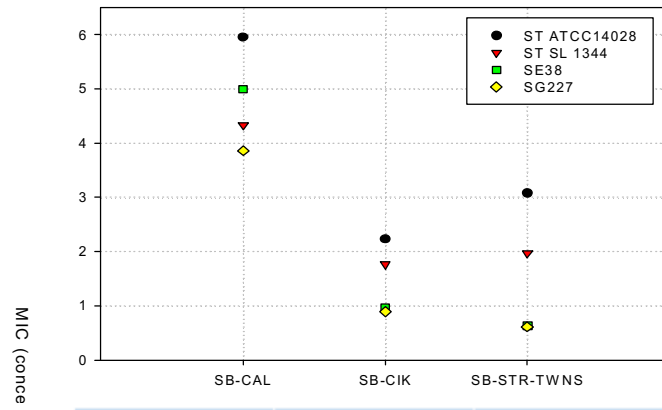


<참조> <http://www.graphpad.com/support/>

Figure 60. 최소억제농도 산출 그래프

(2) MIC 산출 결과

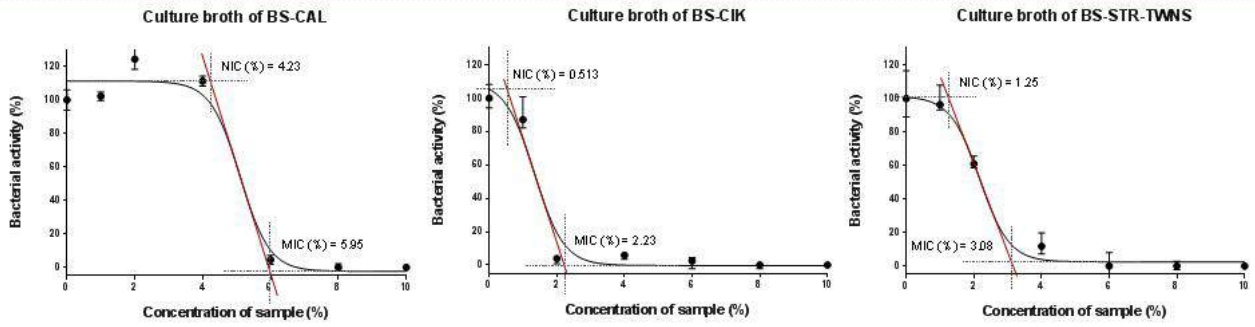
바실러스 배양액의 MIC 산출결과, 원판확산법의 실험결과와 조금 다른 경향성을 확인할 수 있었다. 원판확산법 실험결과에서는 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*) 균주가 sample에 가장 민감하여 clear zone을 보인 반면, MIC 실험결과에서는 ST ATCC14028 (*S. Typhimurium*) 균주보다 SE38(*S. Enteritidis*)와 SG227(*S. Gallinarium*) 균주에서 더 낮은 MIC의 농도를 나타내어 MIC 산출 실험에서는 SE38(*S. Enteritidis*)와 SG227(*S. Gallinarium*) 두 균주가 더 민감한 것을 확인할 수 있었다. 원판확산법에서는 SB-CAL, SB-CIK 및 SB-STR-TWNS 균주의 배양상등액 시료의 항균활성을 나타내는 clear zone의 크기가 거의 비슷한 반면, MIC 산출 실험에서는 SB-CIK의 MIC 농도가 대체적으로 낮은 경향성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 각각의 균주에 대한 바실러스 배양액의 종류에 따라 산출된 MIC 실험결과는 Figure 60에 나타내었다.



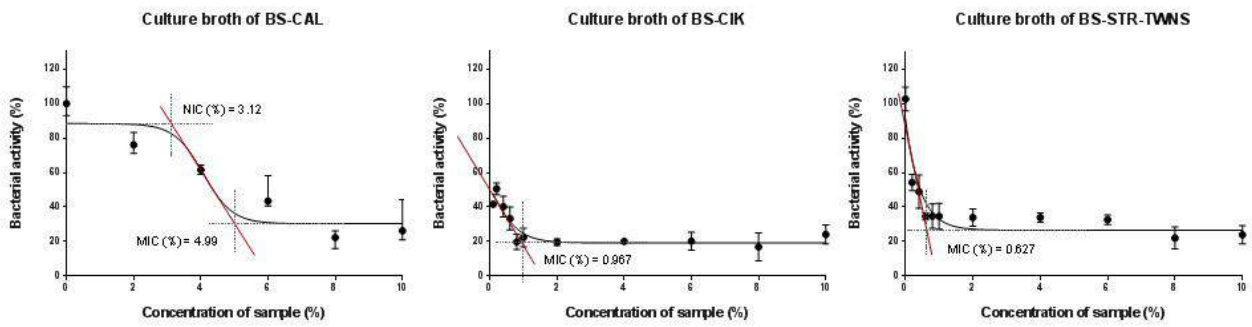
Strain	ST ATCC14028	ST SL1344	SE38	SG227
Name of sample	MIC (%)	MIC (%)	MIC (%)	MIC (%)
SB-CAL	5.95	4.33	4.99	3.86
SB-CIK	2.23	1.76	0.967	0.891
SB-STR-TWNS	3.08	1.97	0.627	0.608

Figure 61. 다양한 바실러스 배양액의 MIC 산출결과 및 분포도

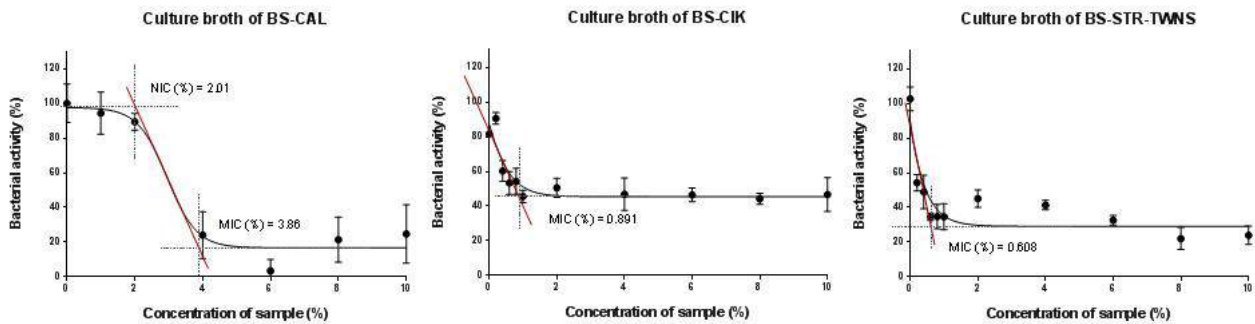
❖ ST ATCC14028 strain



❖ SE38 strain



❖ SG227 strain



❖ ST SL1344 strain

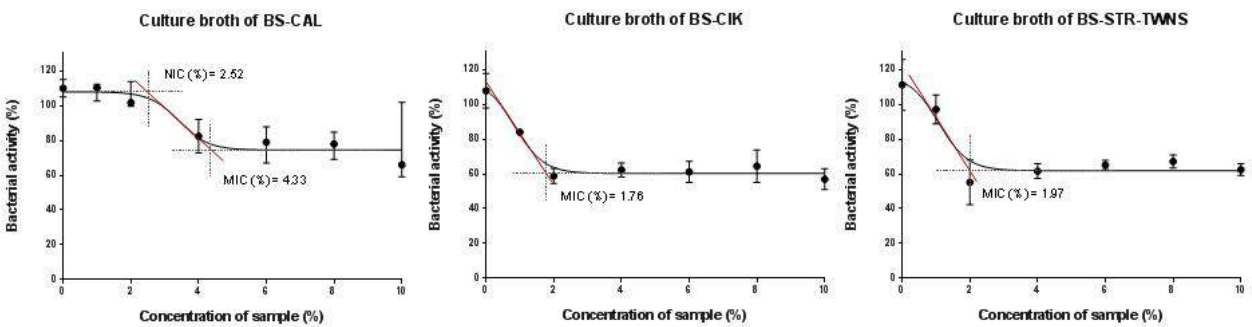


Figure 62. 각종 살모넬라 균주에 대한 다양한 바실러스 배양액의 MIC 산출 그래프

라. 살모넬라균과의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

살모넬라에 대한 생육억제 활성을 관찰하기 위하여 살모넬라와 바실러스를 혼합배양하고, 각각의 균주의 성장을 확인하는 실험을 통해 살모넬라 저감 효능을 평가하고자 하였다.

(1) 실험방법

살모넬라(ST14028, SE38, SG227) 균주는 24시간 성장배양 후 1×10^6 cfu/ml이 되도록 250ml 삼각플라스크 (working volume 50ml)에 접종하여 35°C에서 배양하였다. 바실러스(BS-CAL, BS-WJ) 균주는 상기 시제품 제작으로 만들어진 포자 분말을 준비하여 1×10^6 cfu/ml이 되도록 첨가해주었다. 각각의 균주 배양액은 1일, 2일, 3일의 시료를 취하여 배양액의 살모넬라 및 바실러스의 생균수를 계수하였다. 혼합배양 중 추가 접종하는 실험에서는 혼합배양 2일, 3일에 각각 바실러스 균수가 1×10^6 cfu/ml이 되도록 추가로 첨가하여 살모넬라 저감 효능을 확인하고자 하였다. 바실러스의 접종량을 평가하는 실험에서는 살모넬라 균수는 1×10^5 cfu/ml으로 일정하게 하고 바실러스 균수를 조정하면서 혼합배양한 후 배양 24시간째에 시료를 채취하여 살모넬라 및 바실러스 균수를 계수하였다. 고농도 살모넬라의 환경에서 바실러스의 항살모넬라 효능을 확인하기 위한 실험에서는 살모넬라를 고농도(1×10^9 cfu/ml)로 배양한 후 바실러스를 조건별로 접종하여 항살모넬라 효능을 확인하고자 하였다. 채취한 시료의 살모넬라 균수는 XLD(*Salmonella* growing on XLD agar ; xylose lysine deoxycholate agar, DIFCO 278850) media에서 검정 콜로니로 자라는 살모넬라 균수를 측정하였으며, 바실러스는 PCA 배지에서 자라는 콜로니 수를 측정하였다.

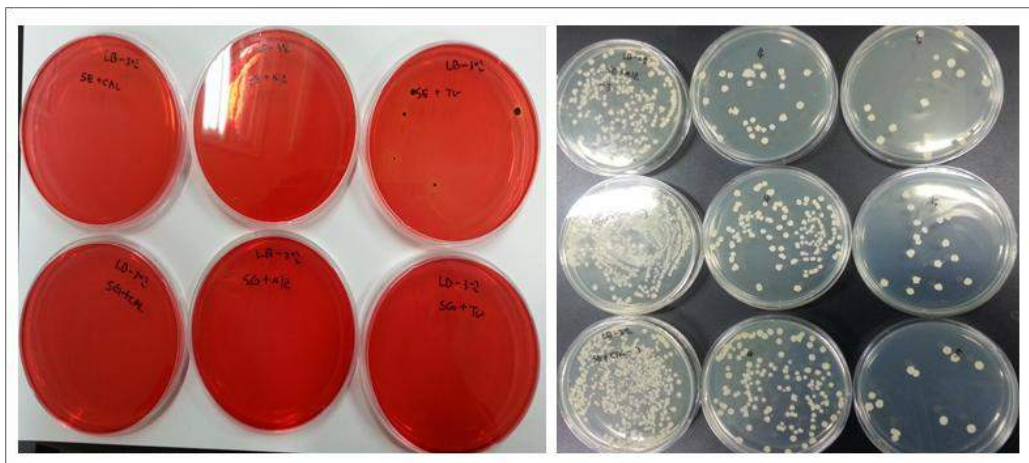


Figure 63. XLD plate에서의 살모넬라 및 MRS plate에서 바실러스 균주 배양 사진

(2) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 접종량 및 배양시간에 따른 항살모넬라 효능 비교
살모넬라를 하루 동안 키운 후 1×10^6 cfu/ml이 되도록 접종하고, 바실러스는 1×10^6

cfu/ml이 되도록 포자 분말을 첨가하여 배양하였다. 단독 및 혼합 배양 1일, 2일, 3일째에 배양시료를 채취하여 살모넬라와 바실러스 균수를 측정하였다. 실험결과 각각의 균을 단독 배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 1×10^{10} cfu/ml 까지 성장하였으며 이후 배양시간이 경과할수록 감소하여 3일째 1×10^9 cfu/ml로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 반면 바실러스는 1×10^6 cfu/ml으로 접종하였을 때 살모넬라 보다는 다소 균수가 낮게 성장하여 배양 1일에 5×10^6 cfu/ml, 배양 3일에 대략 1×10^8 cfu/ml 정도 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 살모넬라와 바실러스를 각각 1×10^6 cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 바실러스는 단독배양에서의 균수와 거의 비슷하게 1×10^8 cfu/ml 정도로 성장한 반면, 살모넬라는 배양 1일에 100~0 cfu/ml로 거의 성장하지 못하여 항살모넬라 결과를 확인할 수 있었다.

살모넬라(SE38)와 바실러스(BS-CAL, BS-WJ)의 혼합배양을 통한 항살모넬라 효능의 한계 범위를 확인하기 위하여 혼합배양 시간을 24시간으로 하고, 살모넬라 접종량은 1×10^6 cfu/ml으로 일정하게 하며, 바실러스의 접종량을 1×10^6 cfu/ml에서 1×10^3 cfu/ml 까지 감소시켜 접종하여 바실러스가 나타내는 항살모넬라 효능의 한계범위를 확인하는 실험을 수행하였다. 실험 결과, 바실러스 접종량이 1×10^6 cfu/ml 및 1×10^5 cfu/ml에서는 살아남은 살모넬라의 균수가 1×10^4 cfu/ml 이하로 10-2 정도 감소하는 살모넬라 증식 억제능을 확인할 수 있었으며, 바실러스를 1×10^4 cfu/ml 이하로 접종한 실험조건에서는 살모넬라의 증식속도는 감소시키나 균수는 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 항살모넬라 효능을 보이기 위한 바실러스의 접종량은 살모넬라의 균수 대비 1/10 배수 이상에서 살모넬라 증식 억제 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

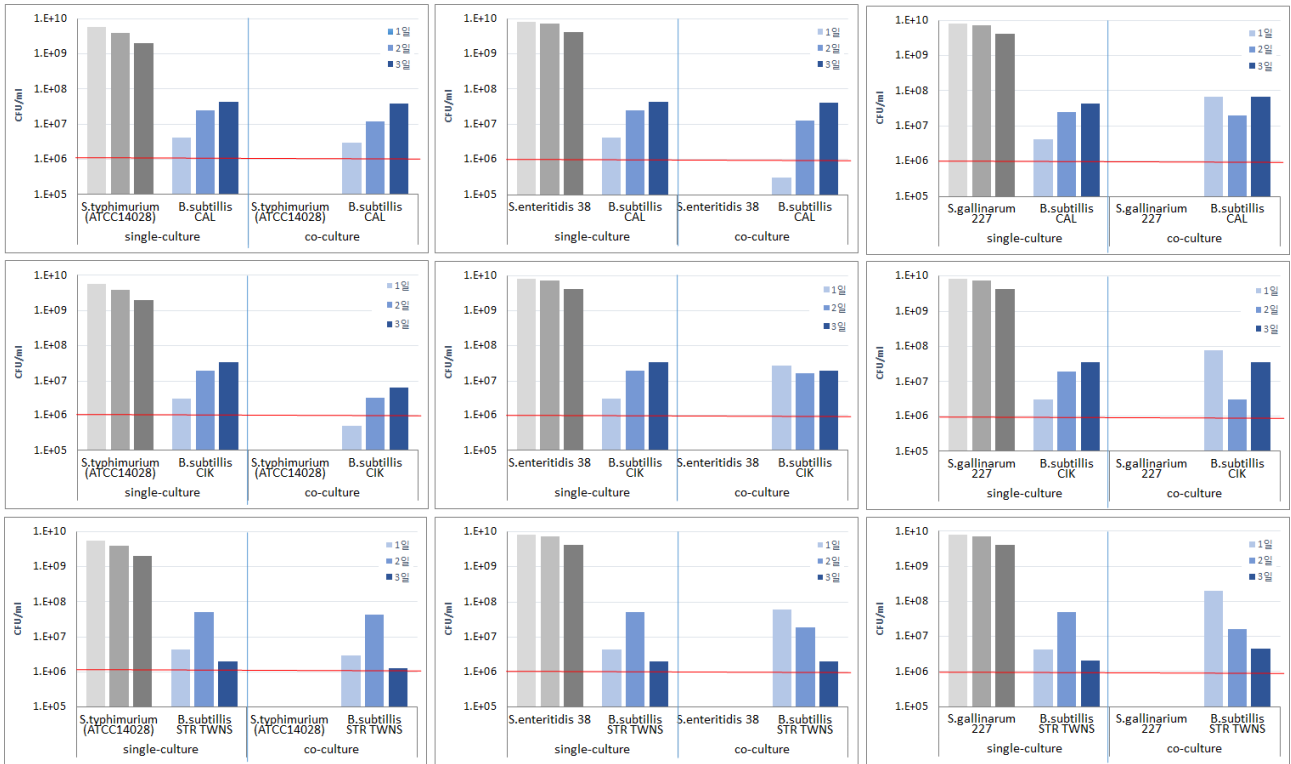


Figure 64. 다양한 살모넬라와 바실러스 균주의 1 : 1 (1×10^6 cfu/ml) 혼합배양에 의한 항살모넬라 효능 비교

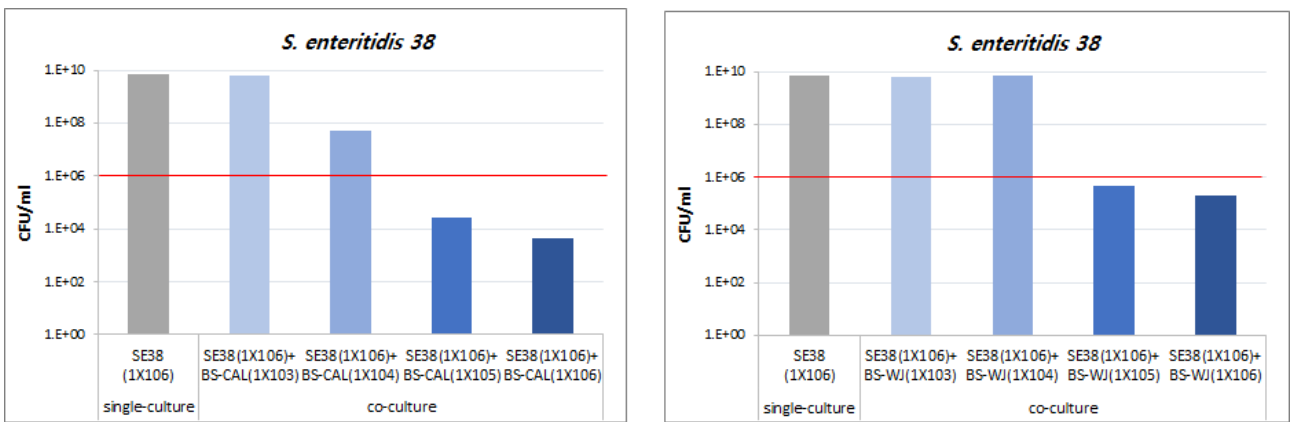


Figure 65. 살모넬라(SE38)와 바실러스(BS-CAL, BS-WJ)의 혼합배양에서 바실러스 접종량에 따른 항살모넬라 효능 비교

(3) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 세포상태(growth or spore)에 따른 항살모넬라 효능 비교

바실러스소재의 시제품은 바실러스를 발효조에서 배양한 후 후처리공정을 통해 생균을 포집하고, 건조분말화 하여 생산했다. 바실러스 배양생균은 분말 상태에서의 바실러스균 안정화 및 보관, 유통 시 바실러스균이 감소하는 것을 방지하기 위하여 건조하는 단계에서 생균을 포자로 전환시키는 공정을 도입하여 건조분말을 생산했다. 바실러스소재의 항살모넬라 효능 평가에 있어서 바실러스는 생균 및 포자 상태로 존재할 수 있으므로 생균(growth cell) 및 포자(spore) 상태의 균을 각각 살모넬라와 혼합배양하여 바실러스 세포 상태가 항살모넬라 효능에 미치는 효과를 비교했다.

바실러스 균주에 따라 포자로 전환이 잘되는 BS-CAL 균주는 포자전환 과정에서 99% 이상의 포자전환이 이루어져 분말 제조시 포자가 99% 이상 확인되는 시료이며, BS-WJ 균주는 포자전환율이 50% 정도로 분말 제조시 포자가 50% 정도 확인되는 시료이다. 각각의 분말 상태의 포자는 $1 \times 10^6 \sim 10^8$ cfu/ml로 접종하였으며, 액상 생균은 $1 \times 10^6 \sim 10^3$ cfu/ml로 접종하여, 접종량에 따른 살모넬라 억제 및 증식 감소효과를 비교했다. BS-CAL 및 BS-WJ 균주 모두 생균(growth cell)으로 살모넬라와 혼합배양한 실험조건에서 1 : 1의 비율인 1×10^6 cfu/ml 조건에서는 살모넬라 균수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 BS-CAL 균주를 분말 포자로 접종하여 혼합배양을 하였을 경우에는 바실러스 균수를 1×10^8 cfu/ml 까지 증가시켜 접종하더라도 살모넬라 균수가 감소하지 않는 경향을 확인할 수 있었으며, 혼합배양액을 현미경으로 관찰해 보았을 때 바실러스균이 50% 이상 포자 상태로 남아 있는 것을 확인할 수 있었다. BS-WJ 균주를 분말 포자로 접종하여 혼합배양을 하였을 경우에는 바실러스 균수가 증가함에 따라 살모넬라 균수가 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며, 혼합배양액을 현미경으로 관찰하였을 때 포자의 수가 20% 이하로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 바실러스가 포자에서 생균으로 전환되어 자란 후 항살모넬라 효능을 나타내는 것으로 사료된다. 향후 바실러스소재는 포자로 전환시키지 않고 생균 상태로 포집한 후 생균의 활성을 유지할 수 있도록 코팅 및 안정제를 처리하는 공정을 개발하여 바실러스분말을 생산할 필요성이 있다고 판단된다.

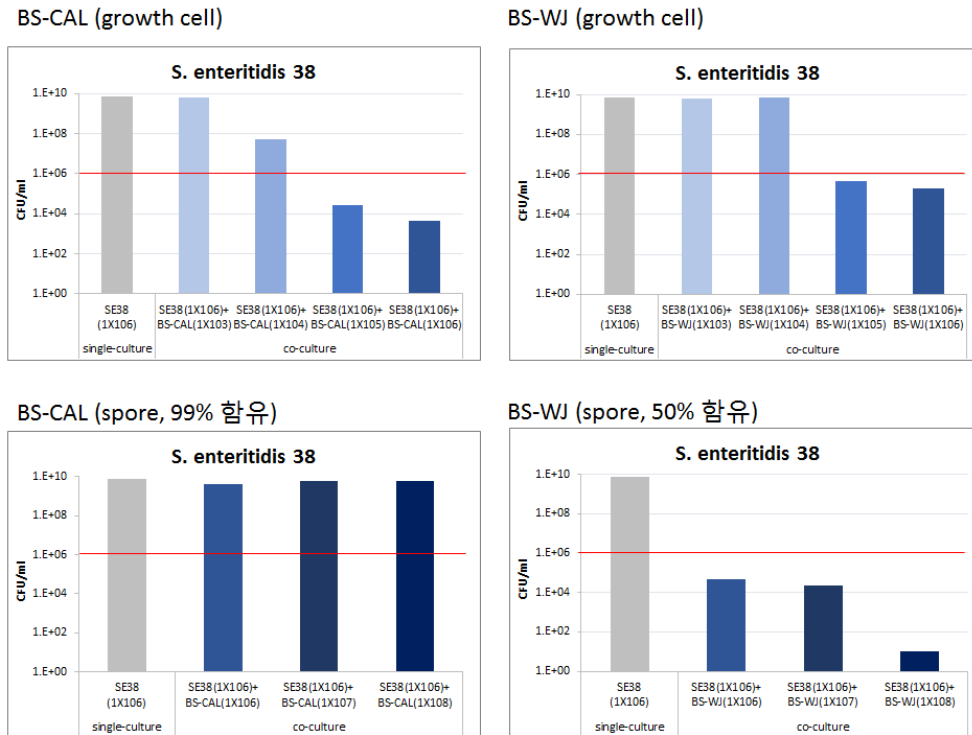


Figure 66. 살모넬라(SE38)와 바실러스(BS-CAL, BS-WJ)의 혼합배양에서 세포 상태에 따른 항살모넬라 효능 비교

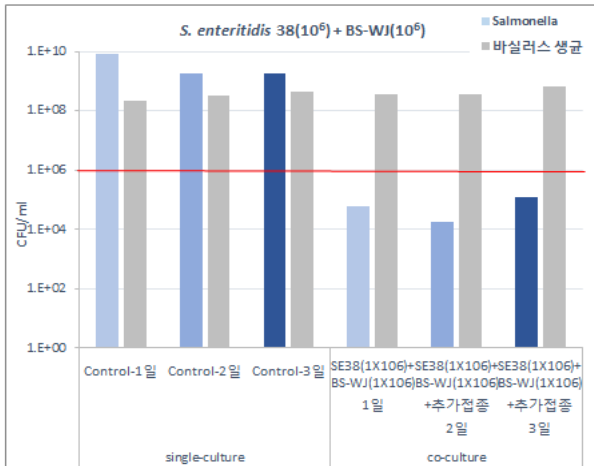
(4) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 세포상태(growth or spore)와 혼합배양 후 바실러스 추가접종에 의한 항살모넬라 효능 비교

혼합배양에서 배양 2일 및 3일에 추가로 바실러스 생균(growth cell) 및 포자(spore)를 각각 추가로 더 접종하였을 때 항살모넬라 효능에 미치는 효과를 비교했다.

바실러스 BS-WJ 균주는 포자전환율이 50% 정도로 분말 제조시 포자가 50% 정도 확인되는 소재이다. BS-WJ 균주의 분말 포자 및 액상 생균을 1×10^6 cfu/ml로 접종하고, 각각 배양일 2일 및 3일에 추가로 분말 포자 및 액상 생균을 1×10^6 cfu/ml로 추가 접종하여 배양일에 따른 살모넬라 증식 감소를 비교했다.

BS-WJ 균주를 살모넬라와 혼합배양한 실험조건에서 액상 생균(growth cell)과 분말 포자(spore)를 접종한 실험군 모두에서 배양 1일부터 살모넬라 균수가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 분말 포자(spore)를 접종한 후 혼합배양 2일 및 3일에 바실러스 분말 포자(spore)를 각각 추가로 접종하였을 때 살모넬라 균수가 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

BS-WJ (growth cell)



BS-WJ (spore, 50% 함유)

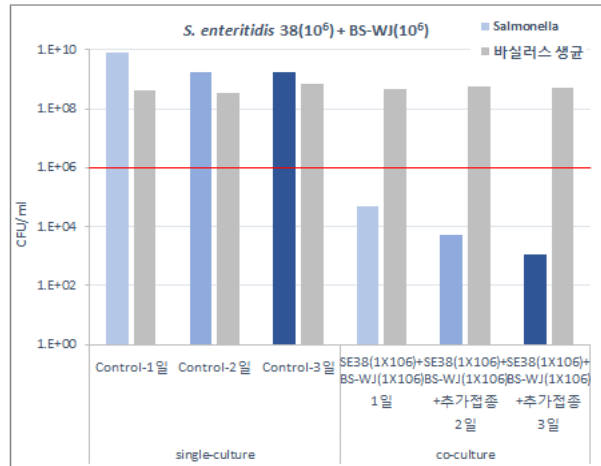


Figure 67. 살모넬라(SE38)와 바실러스(BS-WJ)의 혼합배양에서 세포 상태 및 혼합배양 후 추가접종에 따른 항살모넬라 효능 비교

(5) 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 다양한 접종량과 혼합배양 후 바실러스 추가접종에 의한 항살모넬라 효능 비교

상기 실험결과에서 항살모넬라 효능을 나타낸 BS-WJ(spore, 50% 함유) 균주를 $1 \times 10^6 \sim 10^4$ cfu/ml로 접종하여 살모넬라와 혼합배양 후 분말 포자를 추가로 접종하였을 때 접종량에 따른 살모넬라 증식 억제 효과를 비교했다. 혼합배양 후 추가 접종은 배양 2일 및 3일에 추가로 각 접종량으로 분말 포자(spore, 50% 함유)를 추가로 더 접종하였을 때 항살모넬라 효능에 미치는 효과를 비교했다.

바실러스 BS-WJ 균주는 포자전환율이 50% 정도로 분말 제조시 포자가 50% 정도 확인 되는 시료이다. BS-WJ 균주의 분말 포자를 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 cfu/ml로 접종하였고, 각각 배양일 2일 및 3일에 추가로 분말 포자를 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 cfu/ml로 추가 접종하여 배양일에 따른 살모넬라 증식 억제 및 감소 효과를 비교했다.

BS-WJ 균주를 살모넬라와 혼합배양한 실험조건에서는 10 배수의 비율인 1×10^6 cfu/ml 조건에서 혼합배양 1일부터 살모넬라 균수가 현저하게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 배양 2일 및 3일에 추가 접종한 실험결과에서도 계속적으로 살모넬라의 수가 감소하여 유지되는 경향을 확인할 수 있었다. BS-WJ 균주를 살모넬라와 혼합배양한 실험조건에서 1 : 1의 비율인 1×10^5 cfu/ml 조건에서는 혼합배양 1일 살모넬라 균수가 소폭 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 배양 2일에 추가 접종한 실험결과에서 현저하게 살모넬라 균수가 감소하여 배양 3일까지 계속적으로 살모넬라의 수가 감소하여 유지되는 경향을 확인할 수 있었다. BS-WJ 균주를 살모넬라와 혼합배양한 실험조건에서 1/10 배수의 비율인 1×10^4 cfu/ml 조건에서는 살모넬라의 균수가 감소하는 경향을 관찰하지 못하였으며, 배양 2일 및 3일에 추가 접종한 실험군에서도 살모넬라 균수가 매우 적은 양만 감소함을 확

인할 수 있었다. 따라서 살모넬라 저감 효능을 확인하기 위해서는 살모넬라와 1 : 1의 비율 이상의 조건에서 살모넬라 저감 효능을 확인할 수 있을 것으로 예상해 볼 수 있다.

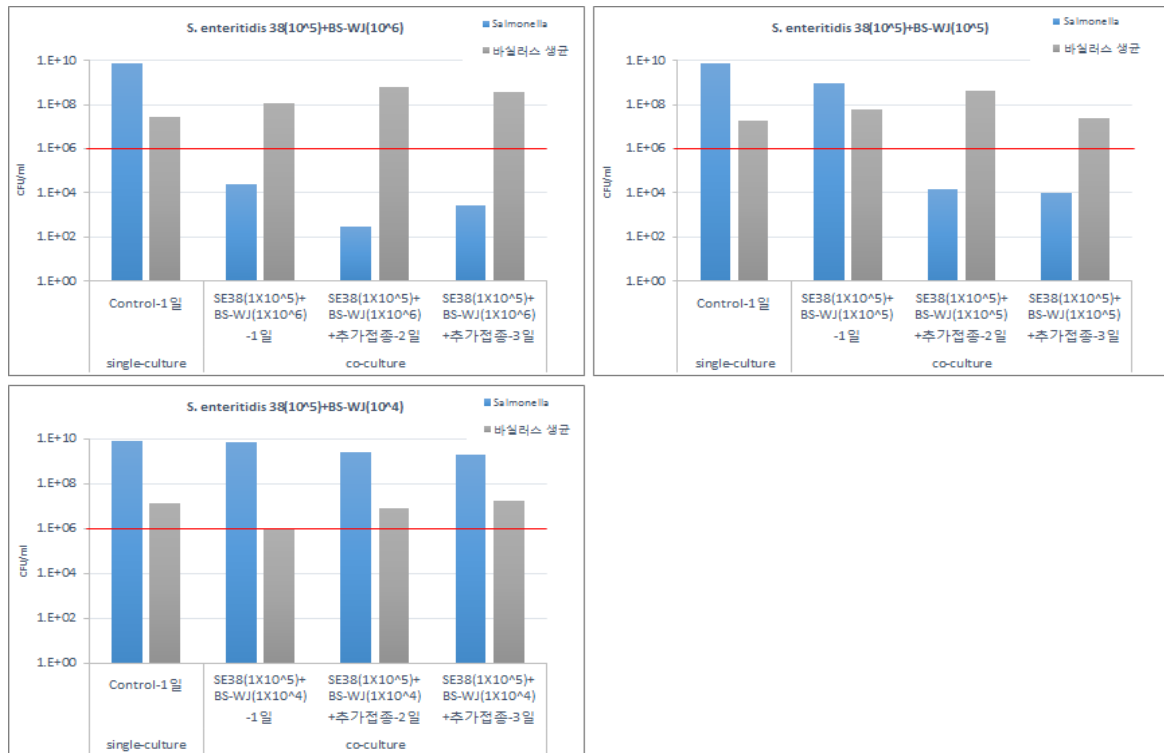


Figure 68. 살모넬라(SE38)와 바실러스(BS-WJ)의 혼합배양에서 바실러스 접종량 및 혼합배양 후 추가 접종에 따른 항살모넬라 효능 비교

(6) 고농도 살모넬라와의 바실러스 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 접종량 감소와 혼합 배양 후 추가접종에 의한 항살모넬라 효능 비교

실험실 배양조건에서 살모넬라와 바실러스의 혼합배양에서 바실러스에 의한 항살모넬라 효능은 10 배수 또는 1 : 1의 균수 조건에서 확인할 수 있었다. 질병이 발생한 상태에서 바실러스에 의한 항살모넬라 효능을 검토해 보기 위하여 살모넬라를 고농도로 배양한 후 바실러스 접종비가 감소된 상태에서 혼합배양한 조건에서 항살모넬라 효능을 관찰하고자 하였다. 살모넬라는 1×10⁹ cfu/ml의 고농도 배양 후 BS-CAL(spore, 99% 함유), BS-WJ(spore, 50% 함유) 분말 포자를 각각 1×10⁶~10⁴ cfu/ml로 감소하여 접종하여 접종량에 따른 고농도 살모넬라와의 혼합배양과 혼합배양 후 추가 접종하였을 때 살모넬라 증식 감소를 비교했다. 혼합배양 후 추가접종은 배양 2일 및 3일에 추가로 각 접종량으로 분말 포자를 추가로 더 접종하였을 때 항살모넬라 효능에 미치는 효과를 비교했다.

고농도 살모넬라(1×10⁹ cfu/ml)에 BS-CAL(spore, 99% 함유), BS-WJ(spore, 50% 함유) 분말 포자를 각각 1×10⁶~10⁴ cfu/ml로 접종하여 각 접종량에 따른 혼합배양 및 혼합배양 후 추가 접종하였을 때 살모넬라 증식 감소 효과가 크게 나타나지 않고 추가접종 2~3일

에 매우 적은량 감소된 결과를 확인할 수 있었다. 이는 고농도로 배양된 살모넬라 배양액에 바실러스를 접종하면서 추가 영양분의 공급 없이 접종하였기에 기존의 실험에서 계수되었던 바실러스 균수 만큼 충분히 자라지 못한 영향으로 볼 수 있으나, 바실러스를 접종하면서 영양분을 추가 공급할 경우에는 고농도의 살모넬라가 희석되는 문제를 고려하여 영양분을 추가 공급하지 않고 접종하였는 바, 추가 영양분을 농축하여 고농도의 살모넬라가 최소한 희석되도록 실험을 설계하여 살모넬라 질병 환경에서의 항살모넬라 효능 확인 실험을 진행 중에 있다.

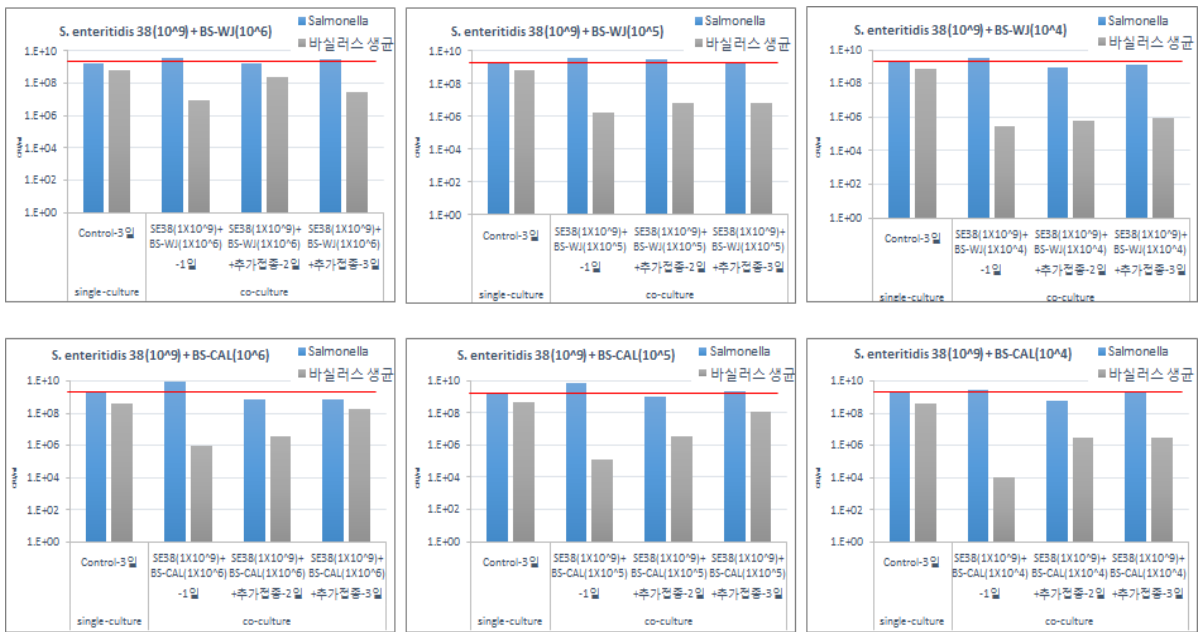


Figure 69. 고농도의 살모넬라(SE38)와의 바실러스(BS-CAL, BS-WJ)의 혼합배양에서 바실러스 접종비 감소 및 혼합배양 후 추가접종에 따른 항살모넬라 효능 비교

2. 유산균소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

유산균소재 생산을 위하여 당사에서 기 확보하고 있는 다양한 strain의 유산균 균주 (FE-AM, FE-CB, FE-STR-HM)를 발효조에서 배양하였다. 발효조 배양공정은 5 L bottom driven 배양기에서 조업부피(working volume) 3.5 L로 배양을 수행하였으며, 접종량 1%, 교반속도는 100rpm, pH6.5로 12시간 배양하여 유산균소재를 생산하였다.

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

(1) 실험방법

유산균 배양액의 항살모넬라 효능을 평가하기 위한 지시균인 살모넬라균주로 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*), SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 3종류의 strain을 사용하였다.

유산균 배양액의 항균력검사는 살모넬라 공시균주를 혈액배지(Blood agar)에 배양하여 각각의 살모넬라 균주를 취해 10ml의 BHIB에 접종하고, 37°C에서 18~24시간 배양하여 접종균주로 사용하였다. 각각의 살모넬라 균주는 Mueller-Hinton 평판배지에 고르게 도말되도록 top agar를 사용하여 도말하였다. 유산균 배양액은 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 0.45 μ m filter로 거른 후 8mm disc에 유산균 배양원액으로 100 μ l를 loading 하였으며, 각 디스크는 디스크 중앙에서 중앙까지의 간격이 24mm이상 되도록 충분한 간격을 유지하였다. 항균력의 결과는 배양 16~18시간 후 판독하였으며, 디스크의 지름을 포함하여 억제대(clear zone)의 지름을 측정하였다. 억제대는 디스크 지름을 포함하여 전체 mm가 가장 가까운 것을 vernier calipers를 사용하여 측정하였다.

(2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가

유산균소재의 항균활성을 확인한 결과, 원판확산법에서는 억제대가 관찰되지 않았다. 이는 유산균소재가 살모넬라를 직접 저감시키는 효능보다는 유산균과 함께 장내에서 존재할 경우에 배양환경을 변화시킴으로써 살모넬라를 저감시키는데 효능을 나타낼 수 있을 것으로 사료되어, 유산균소재와의 혼합배양 실험 등의 살모넬라 저감효과를 나타낼 수 있는 실험을 디자인하여 실시하였다.

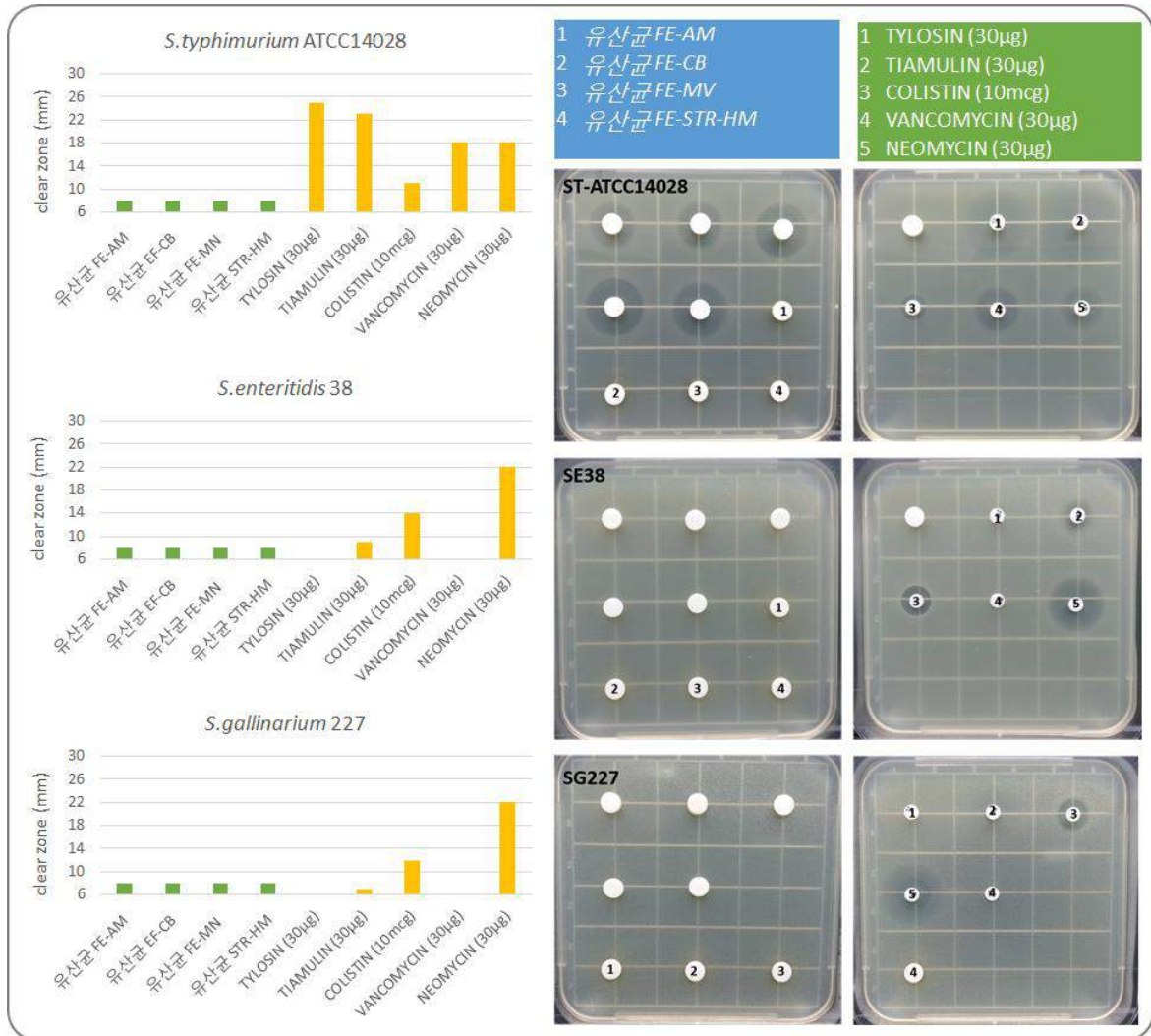


Figure 70. 다양한 유산균 배양액의 살모넬라군주에 따른 항살모넬라 in vitro disc assay 결과

다. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

유산균 배양액의 MIC 산출결과, 원판확산법의 실험결과에서는 살모넬라를 죽이는 직접적인 항균활성은 나타나지 않은 반면, MIC 산출 실험결과에서는 유산균 배양액에서 살모넬라 저감효과를 확인할 수 있었다. 살모넬라 균주에 따라서는 SE38(*S.Enteritidis*) 균주에서 가장 낮은 MIC의 농도를 나타내어 유산균 배양액을 처리한 조건에서는 SE38(*S.Enteritidis*) 균주가 가장 민감한 것을 확인할 수 있었다. 유산균 배양액 시료중에서는 FE-STR-HM의 MIC 농도가 대체적으로 낮은 경향성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 각각의 균주에 대한 유산균 배양액의 종류에 따라 산출된 MIC 실험결과는 Figure 70에 나타내었다.

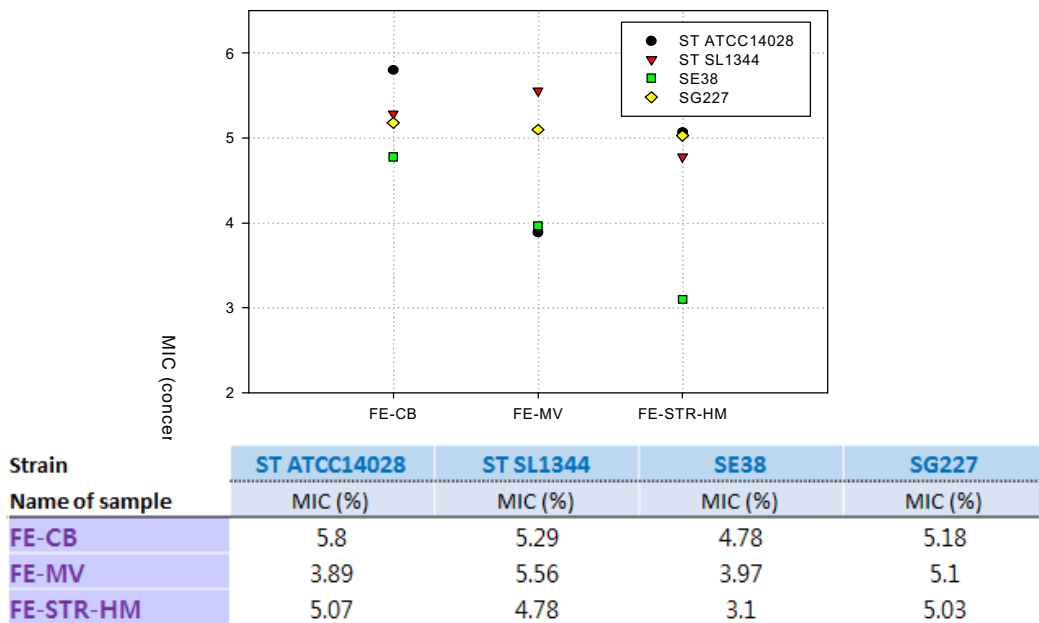
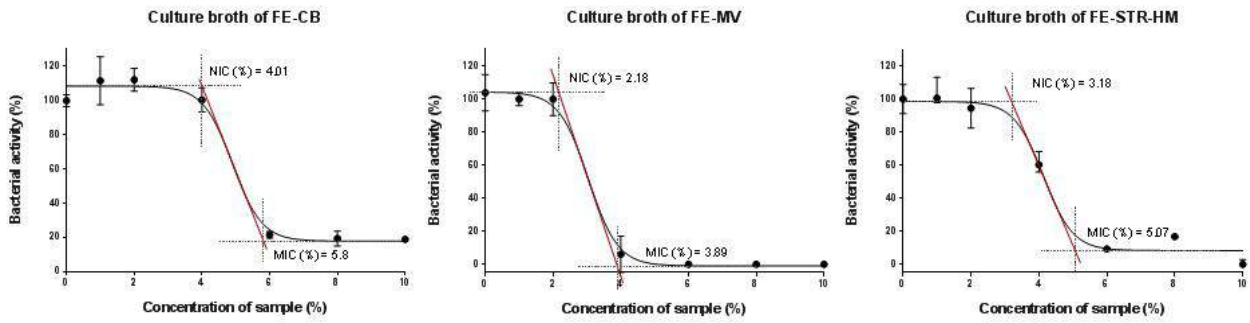
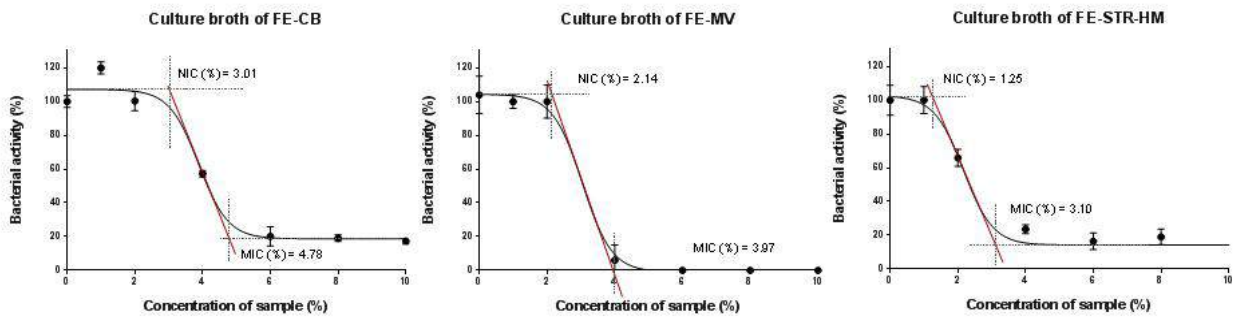


Figure 71. 다양한 유산균 배양액의 MIC 산출결과 및 분포도

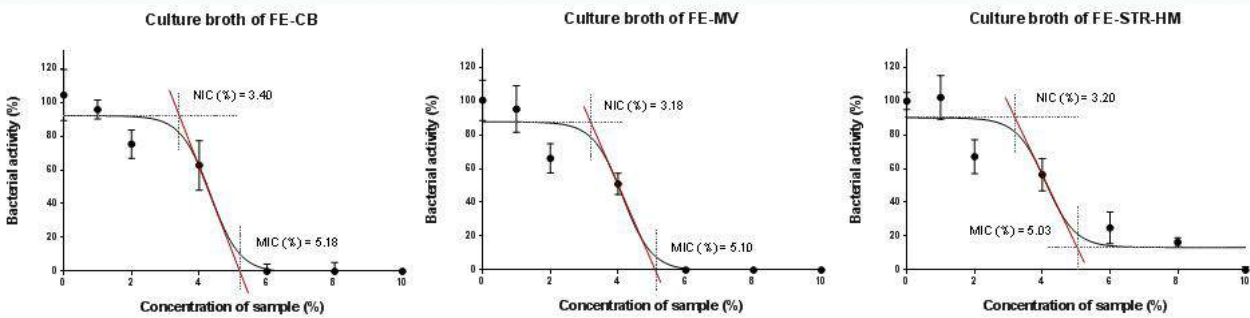
❖ ST ATCC14028 strain



❖ SE38 strain



❖ SG227 strain



❖ ST SL1344 strain

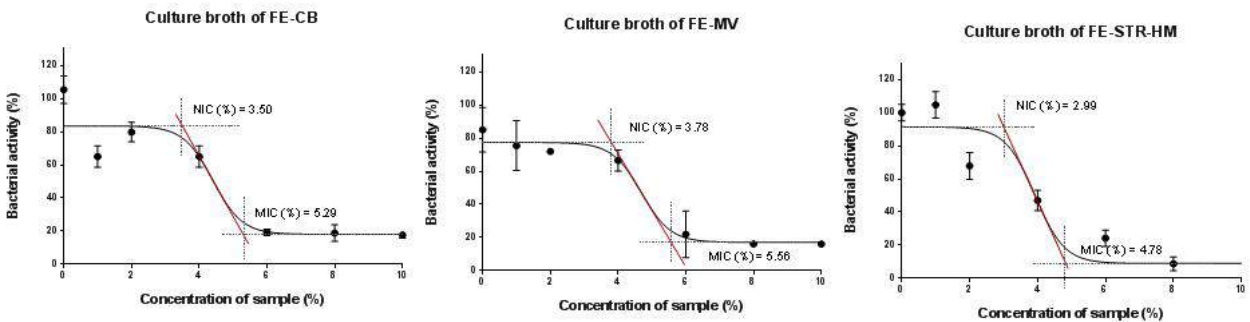


Figure 72. 살모넬라 균주에 대한 다양한 유산균 배양액의 MIC 산출 그래프

라. 살모넬라균과의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

살모넬라에 대한 생육억제 활성을 관찰하기 위하여 살모넬라와 유산균을 혼합배양하고, 각 균주의 생장을 확인하는 실험을 통해 살모넬라 저감 효능을 평가하고자 하였다.

(1) 실험방법

살모넬라(ST14028, SE38, SG227) 및 유산균(FE-STR-HM, STR-YE) 균주의 접종 seed를 준비하여, 각각의 균주를 1×10^6 cfu/ml이 되도록 250ml 삼각플라스크 (working volume 50ml)에 접종한 후 35°C에서 호기(shaking culture) 및 정지배양(stationary culture)을 하였다. 호기배양은 일반적으로 균이 잘 자랄 수 있는 환경을 제공해 주며, 정지배양은 통성혐기성미생물(facultative anaerobe)에게 실험실적으로 장내(腸內) 환경을 유사하게 제공함으로써 절대혐기성 미생물과는 달리 산소가 존재하는 조건에서 생육할 수 있는 살모넬라와 유산균을 장내 환경과 유사한 배양조건에서 항살모넬라 효능에 미치는 영향을 비교했다. 혼합배양 1일, 2일, 3일의 시료를 채취하여 각각의 혼합배양액의 살모넬라 및 유산균 수를 계수하였다. 시료의 살모넬라 수는 XLD media에서 검정 콜로니로 자라는 살모넬라 균수를 측정하였으며, 유산균은 MRS 배지에서 자라는 콜로니 수를 측정하였다.

(2) 살모넬라와의 유산균 혼합배양에서 접종량 및 배양시간에 따른 항살모넬라 효능 비교

살모넬라를 하루 동안 키운 후 각각 1×10^6 cfu/ml이 되도록 접종하고, 유산균 분말은 1×10^6 cfu/ml이 되도록 첨가하여 배양하였다. 단독 및 혼합 1일, 2일, 3일째에 배양시료를 채취하여 살모넬라와 유산균 균수를 측정하였다. 실험결과 각각의 균을 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 1×10^{10} cfu/ml 까지 성장하였으며 이후 배양시간이 3일로 경과할수록 1×10^9 cfu/ml로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 유산균은 1×10^6 cfu/ml로 접종하였을 때 살모넬라 균보다는 균수가 낮게 성장하여 배양 1일부터 3일까지 1×10^9 cfu/ml 정도 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 살모넬라와 유산균을 각각 1×10^6 cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 유산균은 혼합배양을 하였을 때에도 단독배양에서의 균수와 거의 비슷하게 1×10^9 cfu/ml 정도로 성장하였으며, 살모넬라 균주의 경우 ST14028 및 SE38 균주는 혼합배양을 하였을 때 살모넬라 증식 억제 효능이 거의 나타나지 않았으며 배양 3일째에 1×10^9 cfu/ml으로 다소 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 살모넬라 SG227 균주의 경우에는 배양일수가 경과함에 따라 균수가 감소하는 폭이 혼합배양에서 증가하는 것으로 보아 살모넬라 균주에 따라서 유산균 혼합배양시 항살모넬라 효능이 일부 있는 것을 확인할 수 있었다.

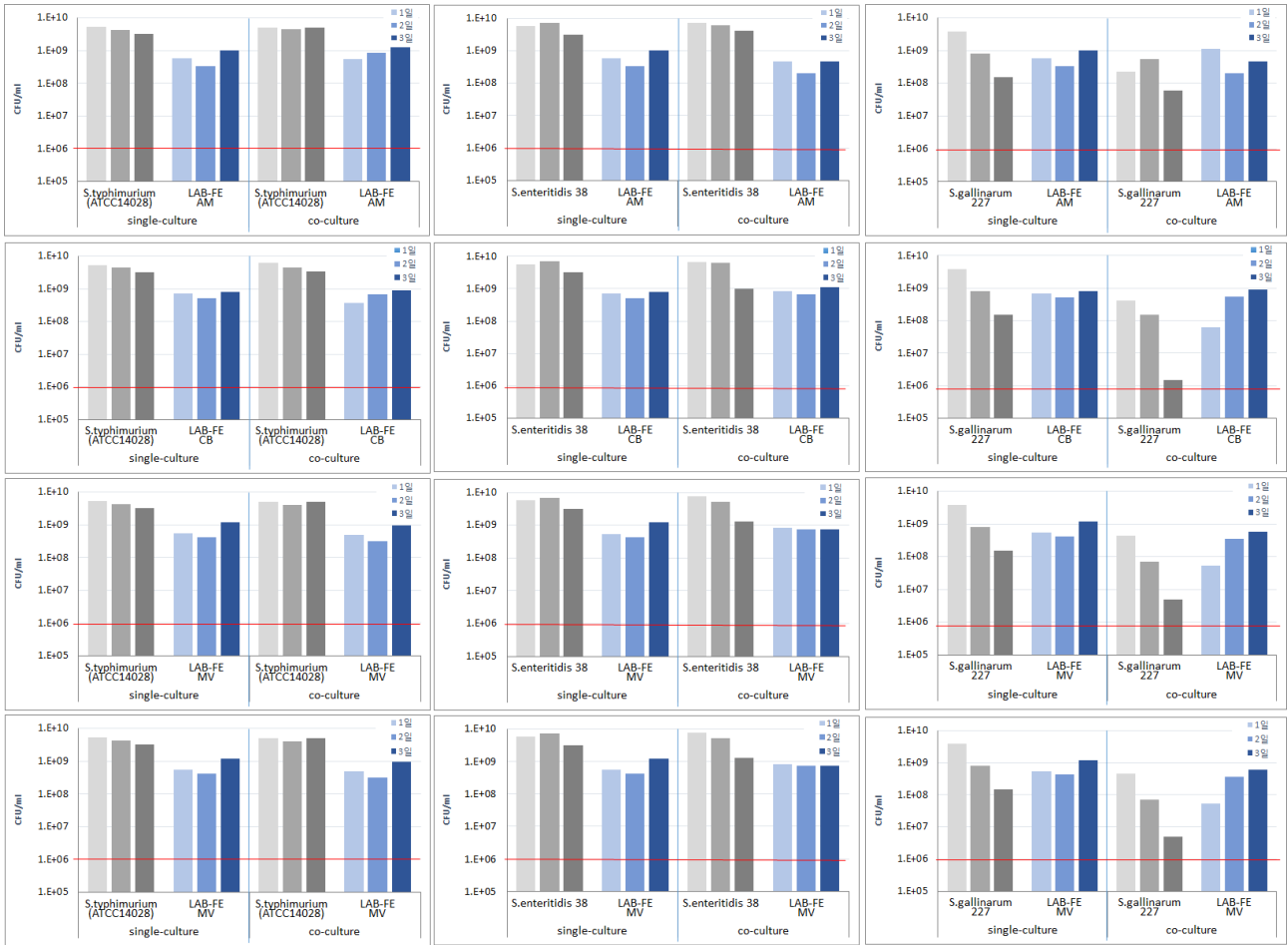


Figure 73. 다양한 살모넬라 및 유산균 균주의 1 : 1 (1×10^6 cfu/ml) 혼합배양에 의한 항살모넬라 효능 비교

(3) 살모넬라와의 유산균 혼합배양에서 혼합접종시 바실러스의 세포상태(growth or spore)에 따른 항살모넬라 효능 비교

살모넬라(SE38)를 하루 동안 키운 후 각각 1×10^6 cfu/ml이 되도록 접종하고, 유산균 (FE-STR-HM) 분말은 1×10^6 cfu/ml이 되도록 첨가하여 호기(shaking culture) 및 정치배양 (stationary culture) 하여 1일, 2일, 3일 배양시료를 채취하여 살모넬라와 유산균 균수를 측정하였다.

호기배양 조건의 실험결과 각각의 균주를 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 5×10^9 cfu/ml 까지 성장하였으며, 유산균은 1×10^6 cfu/ml으로 접종하였을 때 살모넬라 균보다 다소 낮은 1×10^9 cfu/ml 정도 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 살모넬라와 유산균을 각각 1×10^6 cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험 결과에서 유산균은 혼합배양을 하였을 때에도 단독배양에서의 균수와 거의 비슷한 1×10^9 cfu/ml 정도로 성장하였으며, 살모넬라균의 경우 배양 2~3일째에 단독배양보다 약간 낮은 균수를 측정할 수 있었다.

혐기배양 조건의 실험결과 각각의 균을 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 3×10^8 cfu/ml 까지 성장하였으며, 유산균은 1×10^6 cfu/ml로 접종하였을 때 살모넬라 균주보다 다소 높은 1×10^9 cfu/ml 정도 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 살모넬라와 유산균을 각각 1×10^6 cfu/ml로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 유산균은 혼합배양을 하였을 때에도 단독배양에서의 균수와 거의 비슷한 1×10^9 cfu/ml 정도로 성장하였으며, 살모넬라 균의 경우 배양 3일째에 1×10^6 cfu/ml로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 따라서 유산균 혼합배양시 장내환경과 유사한 혐기배양 조건에서 항살모넬라 효능이 일부 있는 것을 확인할 수 있었다.

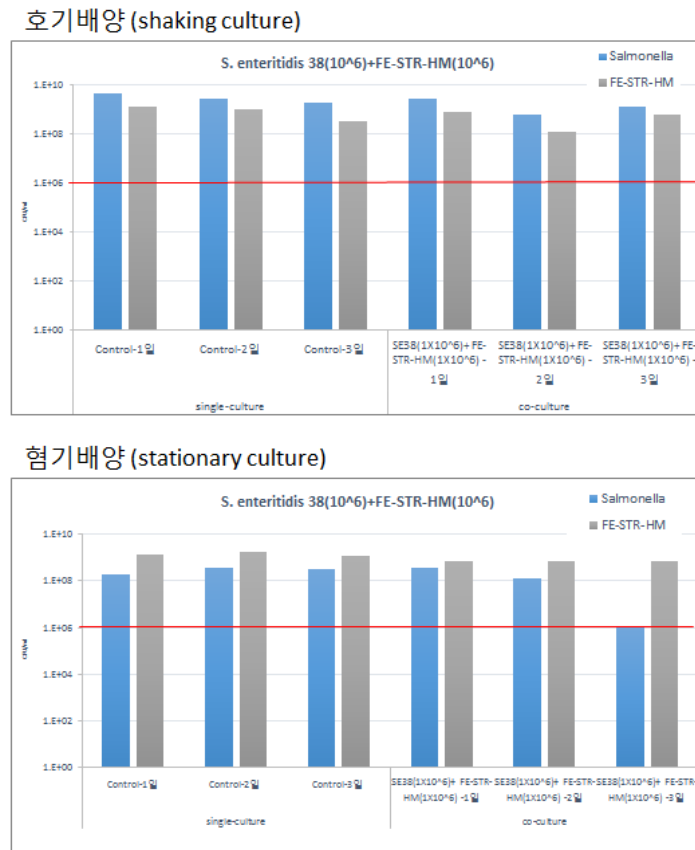


Figure 74. 살모넬라(SE38)와 유산균(FE-STR-HM)의 혼합배양에서 배양환경(호기 및 혐기배양)에 따른 항살모넬라 효능 비교

(4) 살모넬라와의 유산균 혼합배양에서 유산균의 접종량 및 배양환경에 따른 항살모넬라 효능 비교

살모넬라(SE38)를 하루 동안 키운 후 각각 1×10^6 cfu/ml이 되도록 접종하고, 유산균 (FE-STR-HM) 분말은 $1 \times 10^7 \sim 10^4$ cfu/ml이 되도록 첨가한 후, 호기 및 정치배양 하여 배양 1일, 2일, 3일 배양시료를 취하여 살모넬라와 유산균 균수를 측정하여 유산균의 접종량 및 배양환경에 따른 항살모넬라 효능을 비교하였다.

호기배양 조건의 실험결과 각각의 균을 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 7×10^9 cfu/ml 까지 성장하였다. 살모넬라 1×10^6 cfu/ml에 유산균을 $1 \times 10^7 \sim 10^4$ cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 유산균은 혼합배양을 하였을 때 단독배양에서의 균수와 거의 비슷하게 성장하였으며, 살모넬라의 경우 혼합배양 후 유산균을 1×10^7 cfu/ml 및 1×10^6 cfu/ml 추가 접종한 실험군에서 살모넬라의 균수가 배양 3일째에 단독배양보다 대략 10^2 정도 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 유산균 혼합배양시 항살모넬라 효능이 일부 있는 것을 확인할 수 있었다.

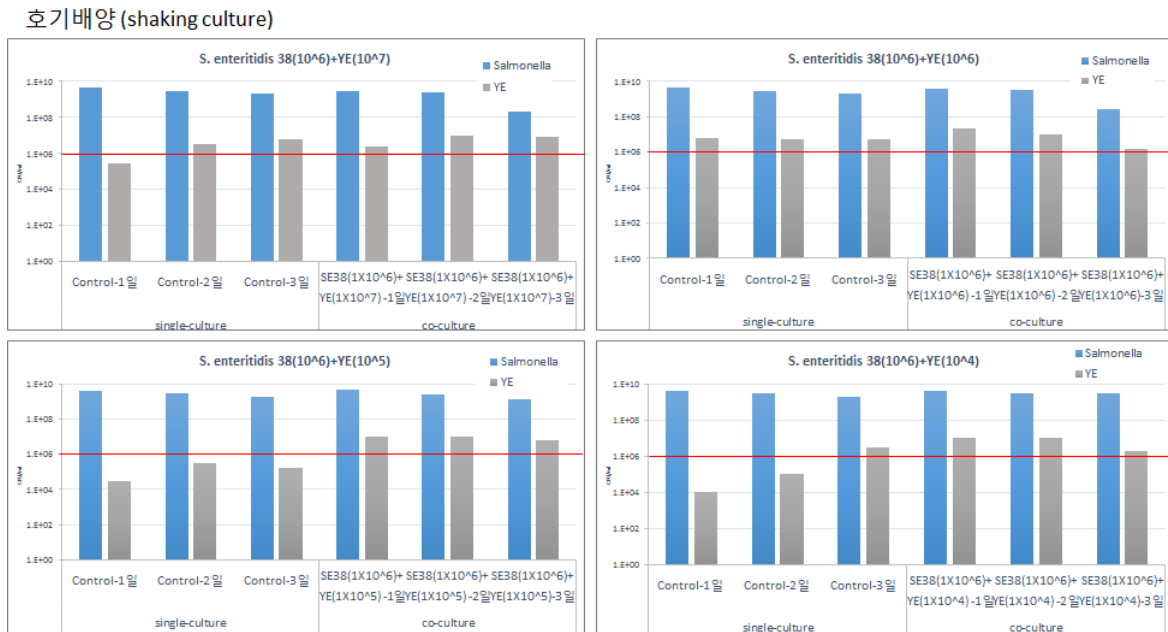


Figure 75. 호기배양 조건에서의 살모넬라(SE38)와 유산균(STR-YE)의 혼합배양에서 유산균의 접종량에 따른 항살모넬라 효능 비교

혐기배양 조건의 실험결과 각각의 균을 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 3×10^8 cfu/ml 까지 성장하였다. 살모넬라 1×10^6 cfu/ml에 유산균을 $1 \times 10^7 \sim 10^4$ cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 유산균은 혼합배양을 하였을 때 단독배양에서의 균수와 거의 비슷하게 성장하였으며, 살모넬라의 경우 혼합배양

후 유산균을 1×10^7 cfu/ml 및 1×10^6 cfu/ml 추가 접종한 실험군에서, 유산균 1×10^7 cfu/ml 접종 조건에서는 살모넬라의 군수가 배양 3일째에 단독배양보다 대략 10^4 정도 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 유산균 1×10^6 cfu/ml 접종 조건에서는 대략 10^2 정도 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 유산균 혼합배양시 장내환경과 유사한 혐기배양 조건에서 항살모넬라 효능이 일부 있는 것을 확인할 수 있었으며, 호기배양 조건에서 보다 혐기배양 조건에서 항살모넬라 효능이 더 뚜렷하게 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

혐기배양 (stationary culture)

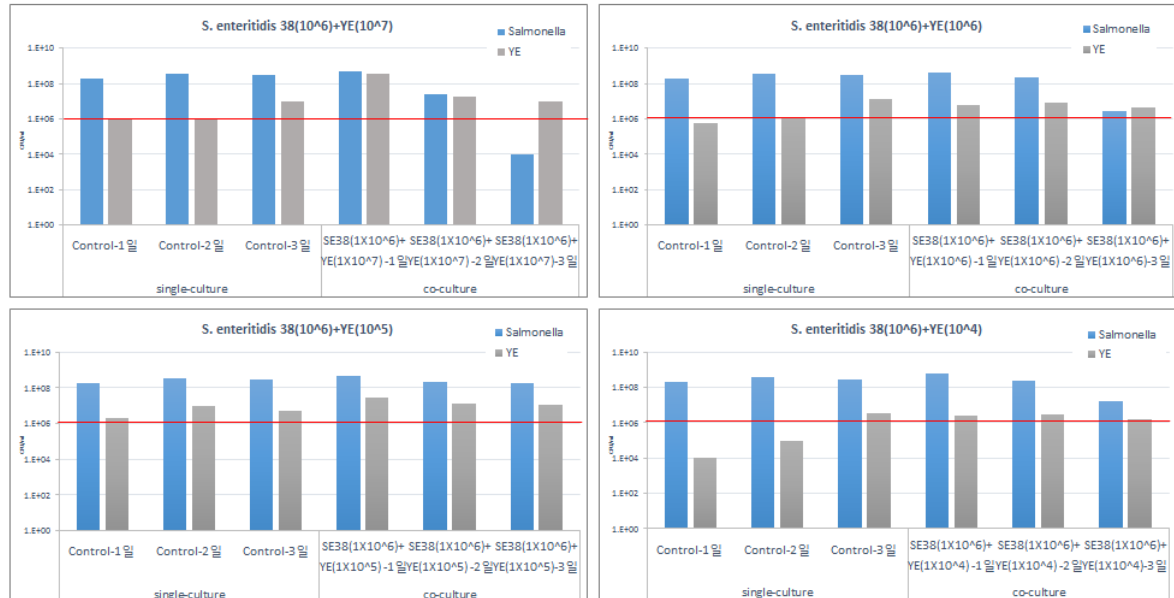


Figure 76. 혐기배양 조건에서의 살모넬라(SE38)와 유산균(STR-YE)의 혼합배양에서 유산균의 접종량에 따른 항살모넬라 효능 비교

3. 바실러스소재 및 유산균소재 복합제제의 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 살모넬라와의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

살모넬라에 대한 생육억제 활성을 관찰하기 위하여 살모넬라와 바실러스 및 유산균을 혼합배양하고, 각 균의 성장을 확인하는 실험을 통해 살모넬라 저감 효능을 평가하고자 하였다.

(1) 실험방법

살모넬라 종균 배양액과 바실러스(STR-CAL, STR-WJ) 및 유산균(FE-STR-HM, STR-YE) 분말을 1×10^6 , 1×10^5 cfu/ml이 되도록 접종하고 1 ~3 일 동안 배양한 후, 배양 시료를 취하여 각각의 균수를 측정하였으며, 추가접종의 실험은 1차 혼합접종 후 배양 2일 및 3일째에 바실러스(STR-CAL, STR-WJ) 및 유산균(FE-STR-HM, STR-YE) 분말을 1×10^6 , 1×10^5 cfu/ml이 되도록 추가 접종하여 실험을 수행하였다.

(2) 살모넬라와의 혼합배양(co-culture)을 통한 살모넬라 저감 효능 평가

살모넬라(SE38)를 하루 동안 키운 후 각각 1×10^6 cfu/ml이 되도록 접종하고, 바실러스 3종(BD-CAL, BS-TWNS, BS-CIK) 및 유산균 1종(FE-STR-HM) 분말은 1×10^6 cfu/ml이 되도록 첨가하여 배양하였다. 배양 24시간째에 배양 시료를 취하여 각각의 균수를 측정하였다. 실험결과 각각의 균을 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 4.6×10^9 cfu/ml로 성장하였으며, 바실러스는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 1×10^9 cfu/ml로 성장하였다. 유산균은 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 3.8×10^8 cfu/ml 정도 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 살모넬라와 바실러스 3종 및 유산균 1종을 각각 1×10^6 cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 바실러스 및 유산균은 혼합배양 조건에서 단독배양에서의 균수 보다 대략 $10^2 \sim 10^3$ 정도 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으나, 살모넬라의 경우에는 바실러스와 혼합배양한 결과 및 바실러스+유산균을 같이 혼합배양한 결과가 대략 비슷하게 측정되어 살모넬라 SE38과 함께 바실러스 BS-CAL을 혼합배양한 조건과 살모넬라 SE38과 함께 바실러스 BS-CAL 및 유산균을 혼합배양한 조건에서 살모넬라가 검출되지 않아 프로바이오틱스소재에 의한 살모넬라 증식 억제 효능이 매우 우수하게 관찰되었다. 그러나 살모넬라와 바실러스 혼합배양의 결과와 살모넬라와 바실러스+유산균 혼합배양 결과가 거의 유사하게 측정된 것으로 보아 살모넬라 억제 효능은 바실러스에 의해 더 크게 나타나는 것으로 사료된다. 바실러스 균주에 따른 평가에서는 BS-CAL 균주가 살모넬라 증식 억제능이 가장 우수했으며, BS-CIK 균주도 혼합배양 후 1×10^2 cfu/ml로 억제능이 우수했고, BS-STR-TWNS 균주도 1×10^4 cfu/ml 정도로 감소하여 혼합배양에 의한 살모넬라 증식 억제능을 확인할 수 있었다.

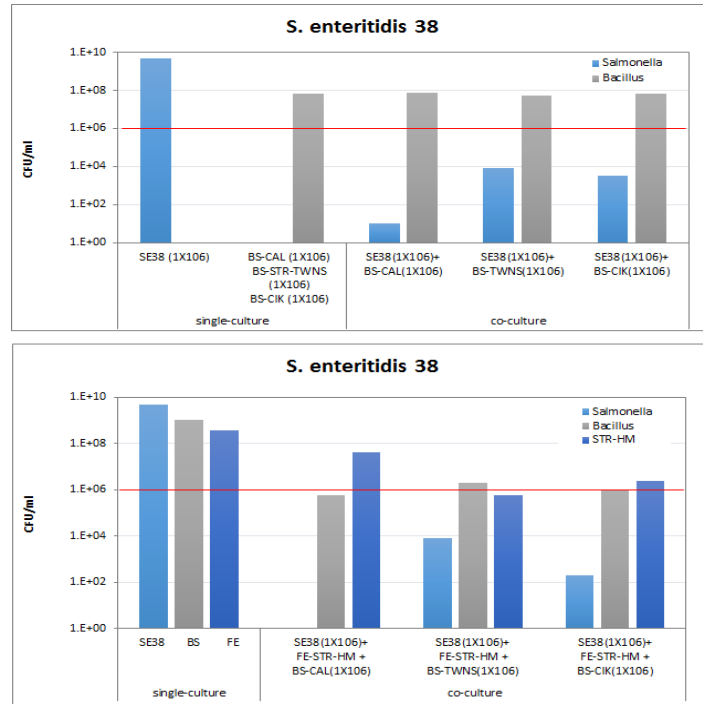


Figure 77. 살모넬라, 바실러스 및 유산균의 1 : 1 : 1 (1×10^6 cfu/ml) 혼합배양에 있어서 바실러스 균주에 따른 항살모넬라 효능 비교

(3) 살모넬라와의 바실러스 및 유산균 혼합배양에서 접종량에 따른 항살모넬라 효능 비교
 살모넬라(SE38)를 하루 동안 키운 후 각각 1×10^6 cfu/ml이 되도록 접종하고, 바실러스 (STR-CAL, STR-WJ) 및 유산균(FE-STR-HM) 분말은 각각 1×10^6 , 1×10^5 cfu/ml이 되도록 첨가하여 배양하였다. 배양 24시간째에 배양시료를 채취하여 각각의 균수를 측정하였다.

실험결과 각각의 균주를 단독배양한 실험에서 살모넬라는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 10^{10} cfu/ml로 성장하였으며, 바실러스(STR-CAL, STR-WJ)는 1×10^6 cfu/ml 접종 후 24시간째에 대략 10^8 cfu/ml로 성장하였다. 유산균(FE-STR-HM)은 1×10^6 cfu/ml로 접종하였을 때 10^8 cfu/ml 정도 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 살모넬라와 함께 바실러스 2종 및 유산균 1종을 각각 1×10^6 cfu/ml으로 접종하여 혼합배양한 실험결과에서 바실러스 STR-CAL은 단독배양에서의 균수 보다 대략 10^1 정도 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으며, 유산균 FE-STR-HM은 혼합배양 조건에서 단독배양에서의 균수 보다 대략 $10^1 \sim 10^3$ 정도 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 살모넬라 SE38균주와 함께 바실러스(STR-CAL, STR-WJ) 및 유산균(FE-STR-HM)을 각각 1종씩 같이 혼합배양한 결과에서 살모넬라의 균수가 $10^5 \sim 10^4$ cfu/ml로 감소하여 혼합배양에 의한 살모넬라 증식 억제능을 확인할 수 있었다.

살모넬라, 바실러스 및 유산균 균주의 접종량을 1×10^5 cfu/ml로 접종한 실험결과에서는 접종 후 24시간째의 균수는 1×10^6 cfu/ml로 접종한 실험 결과와 거의 유사한 균수를 나타

내었으며, 살모넬라 SE38균주와 함께 바실러스(STR-CAL, STR-WJ) 및 유산균(FE-STR-HM)과 같이 혼합배양한 결과에서 살모넬라의 균수가 10⁵ cfu/ml로 감소하여 혼합배양에 의한 살모넬라 증식 억제능을 확인할 수 있었다.

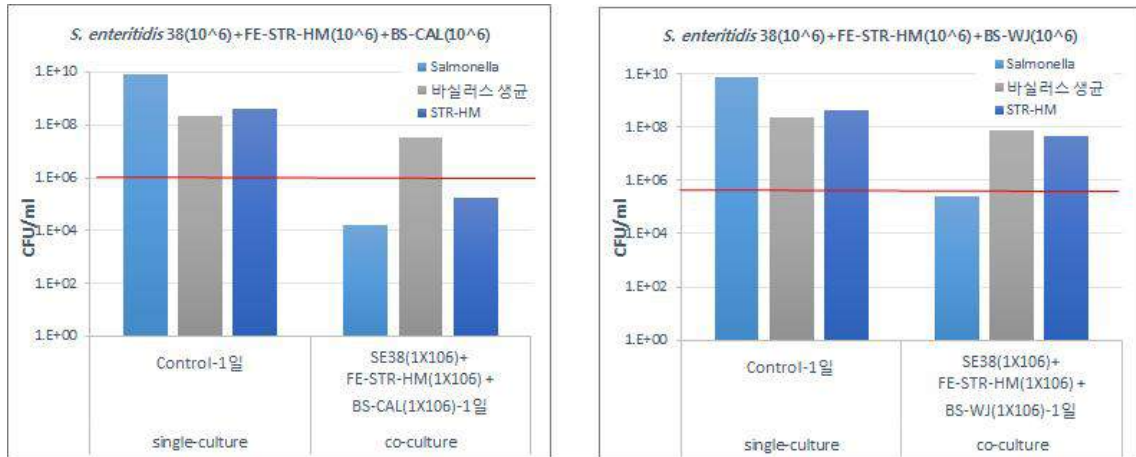


Figure 78. 살모넬라(SE38)와 바실러스(STR-CAL, STR-WJ) 포자(spore) 및 유산균(FE-STR-HM)의 혼합배양 시 접종량(1×10⁶ cfu/ml)에 따른 항살모넬라 효능 비교

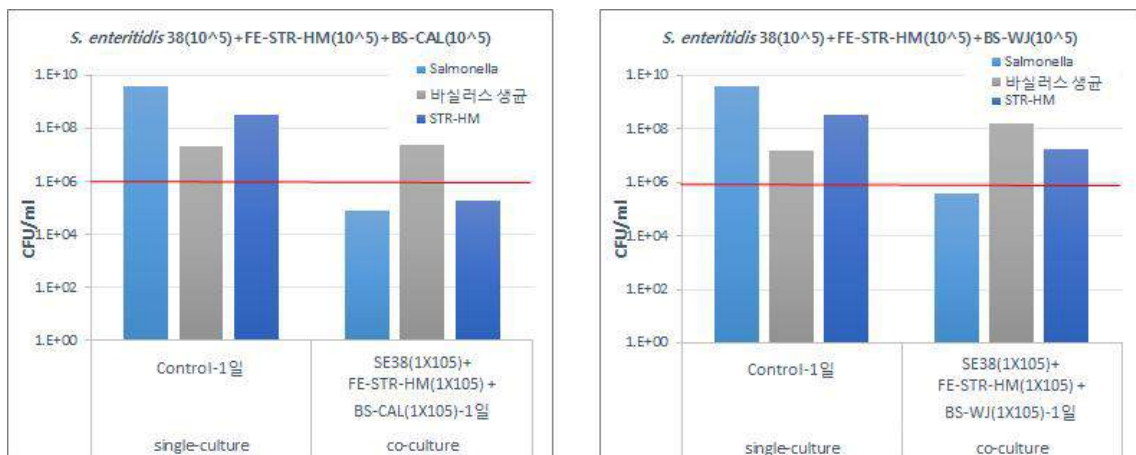


Figure 79. 살모넬라(SE38)와 함께 바실러스(STR-CAL, STR-WJ) 및 유산균(FE-STR-HM)의 혼합배양에서 접종량(1×10⁵ cfu/ml)에 따른 항살모넬라 효능 비교

4. 정향소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

주관기관인 STR바이오텍에서는 논문 및 한방 관련 검색을 통해 병원균에 의한 감염질환에 대해 효능이 있다고 알려진 천연물자원을 대상으로, *S. Typhimurium*을 지시균으로 한 Paper disc agar diffusion assay 방법에 의한 clear zone 확인을 통해 screening한 결과 약용식물인 산초, 정향, 곽향, 황금 등에서 항균활성을 보이고 있음을 확인하고, 이를 토대로 항살모넬라 효능의 다양한 천연항균소재를 '장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 천연항균소재'로서 평가 후 활용하고자 하였다. 선행연구 및 자료조사를 통해 항균·항산화활성을 가지는 다양한 천연물을 선정하여 항균·항산화력을 평가하여 정향 및 산초를 선정하였다. 정향과 산초 각각에 대하여 생물전환공정을 통해 항균력을 가지는 정향(생물전환)산물 및 산초(생물전환)산물을 생산하였으며, 정향과 산초를 물과 용매로 추출한 추출액과 함께 살모넬라에 미치는 효과를 평가해 보았다.



Figure 80. 정향 및 산초 원재료

가. 시제품 생산

정향은 마다가스카르산을 구입하여 생물전환공정을 통해 정향(생물전환)산물을 생산하여 실험에 사용하였으며, 정향 원물은 물과 메탄올을 사용하여 3시간동안, 220rpm으로 충분히 shaking 추출한 후, 고형분을 filter(Whatamn No.4)로 여과하여 제거한 추출물을 수득하여 실험에 사용하였다.

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

(1) 실험방법

정향(생물전환)산물, 물추출물 및 메탄올추출물의 항살모넬라 효능을 평가하기 위한 지시균인 살모넬라균주로 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*), SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 3종류의 strain을 사용하였다.

정향(생물전환)산물, 물추출물 및 메탄올추출물의 항균력검사는 살모넬라 공시균주를 혈액배지(Blood agar)에 배양하여 각각의 살모넬라 균주를 취해 10ml의 BHIB에 접종하고, 37°C에서 18~24시간 배양하여 접종균주로 사용하였다. 각각의 살모넬라 균주는 Mueller-Hinton 평판배지에 고르게 도말되도록 top agar를 사용하여 도말하였다. 정향(생물전환)산물, 물추출물 및 메탄올추출물은 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 0.45 μ m filter로 거른 후 8mm disc에 정향(생물전환)산물, 물추출물 및 메탄올추출물원액으로 100 μ l를 loading 하였으며, 각 디스크는 디스크 중앙에서 중앙까지의 간격이 24mm이상 되도록 충분한 간격을 유지하였다. 항균력의 결과는 배양 16~18시간 후 판독하였으며, 디스크의 지름을 포함하여 억제대(clear zone)의 지름을 측정하였다. 억제대는 디스크 지름을 포함하여 전체 mm가 가장 가까운 것을 vernier calipers를 사용하여 측정하였다.

(2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가

원판확산법에서 정향(생물전환)산물, 물추출물 및 메탄올추출물의 항균활성은 살모넬라 표준균주인 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*) 균주에서 항균활성이 가장 크게 측정되었으며, 정향(생물전환)산물 보다는 원물이 가지는 추출물에서 항균활성이 높게 관찰되었다. 가금류에 병원성을 가지는 SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 두 균주의 경우에는 정향(생물전환)산물 및 추출물에 대해 항균활성이 높게 나타나지 않았으며, in vitro 항균활성에 실험에서는 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*) 균주가 민감성을 나타내고 있으며, SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 두 균주는 덜 민감한 것으로 나타났다.

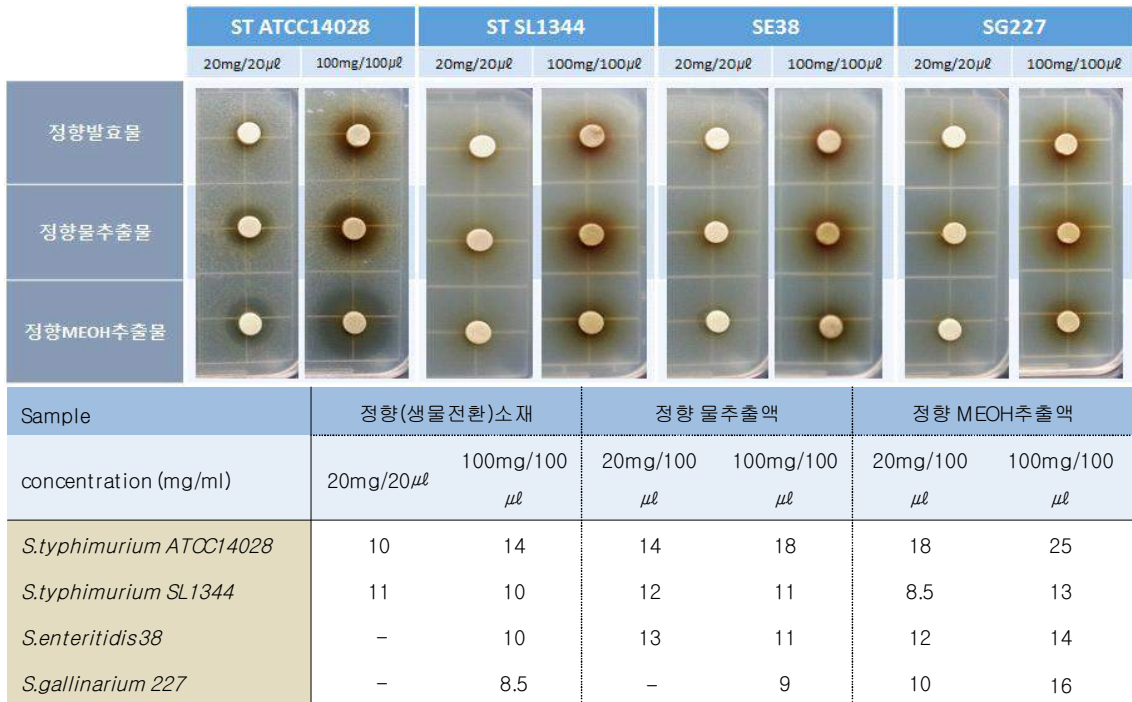


Figure 81. 정향(생물전환)산물, 물추출물 및 메탄올추출물의 항살모넬라 in vitro disc assay 결과

(3) 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

정향(생물전환)산물 및 물추출물에 대한 MIC 산출실험을 수행하였다. 정향의 메탄올추출물의 경우 실험배지에 시료를 처리하면 용매로 인해 배지가 바로 탁해지는 현상이 나타나서 실험을 수행하지 않았다. 살모넬라에 정향(생물전환)산물 및 물추출물을 10% 까지 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 살모넬라의 생육이 억제되는 것을 관찰 할 수 있었으나, 생육이 완전히 억제되는 단계는 10% 처리 이상으로 산출되었다.

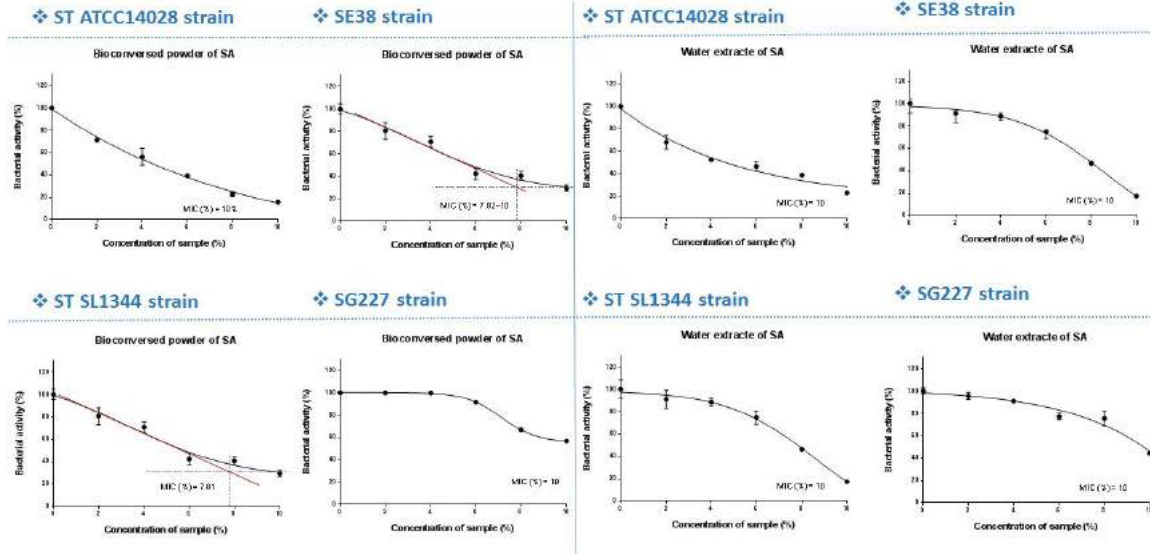


Figure 82. 살모넬라 균주에 대한 정향(생물전환)산물 및 물추출물의 MIC 산출 그래프

5. 산초소재 시제품 생산 및 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 시제품 생산

산초는 충청북도 괴산에서 구입하여 생물전환공정을 통해 산초(생물전환)산물을 생산하여 실험에 사용하였고, 산초는 에탄올과 메탄올을 사용하여 3시간 동안, 220rpm으로 충분히 shaking 추출하였고, 고형분을 filter(Whatamn No.4)로 여과하여 제거한 추출물을 수득하여 실험에 사용하였다.

나. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

(1) 실험방법

산초(생물전환)산물 및 추출물의 항살모넬라 효능을 평가하기 위한 지시균인 살모넬라 균주로 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*), SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 3종류의 strain을 사용하였다.

산초(생물전환)산물 및 추출물의 항균력검사는 살모넬라 공시균주를 혈액배지(Blood agar)에 배양하여 각각의 살모넬라 균주를 취해 10ml의 BHIB에 접종하고, 37°C에서 18~24시간 배양하여 접종균주로 사용하였다. 각각의 살모넬라 균주는 Mueller-Hinton 평판배지에 고르게 도말되도록 top agar를 사용하여 도말하였다. 산초(생물전환)산물 및 추출물은 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 0.45 μ m filter로 거른 후 8mm disc에 산초(생물전환)산물 및 추출물원액으로 100 μ l를 loading 하였으며, 각 디스크는 디스크 중앙에서 중앙까지의 간격이 24mm이상 되도록 충분한 간격을 유지하였다. 항균력의 결과는 배양 16~18시간 후 판독하였으며, 디스크의 지름을 포함하여 억제대(clear zone)의 지름을 측정하였다. 억제대는 디스크 지름을 포함하여 전체 mm가 가장 가까운 것을 vernier calipers를 사용하여 측정하였다.

(2) 항살모넬라 항균활성 효능 평가

원판확산법에서 산초(생물전환)산물 및 추출물의 항균활성은 살모넬라 표준균주인 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*) 균주에서 항균활성이 가장 크게 측정되었으며, 산초(생물전환)산물 보다는 원물이 가지는 용매추출물에서 항균활성이 높게 관찰되었다. 가금류에 병원성을 가지는 SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 두 균주의 경우에는 항균활성이 높게 나타나지 않았으며, *in vitro* 항균활성에 실험에서는 ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*) 균주가 민감성을 나타내었으며, SE38(*S.Enteritidis*), SG227(*S.Gallinarium*) 두 균주는 덜 민감한 것으로 나타났다.



Figure 83. 산초(생물전환)산물, 에탄올추출물 및 메탄올추출물에 대한 항살모넬라 *in vitro* disc assay 결과

(3) 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

살모넬라에 산초(생물전환)산물을 처리하였을 때, ST ATCC14028 (*S.Typhimurium*) 균주에서는 살모넬라의 생육억제 효능이 우수하게 나타나 MI 농도가 1.89%로 측정되었으며, ST SL1344 (*S.Typhimurium*) 및 SE38(*S.Enteritidis*)균주는 대략 6~7% 사이 농도에서 생육이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 SG227(*S.Gallinarium*) 균주는 10% 농도까지 처리하였을 때 농도 의존적으로 살모넬라의 생육이 억제되는 것을 관찰 할 수 있었으나, 생육이 완전히 억제되는 단계는 10% 처리 이상으로 산출되었다.

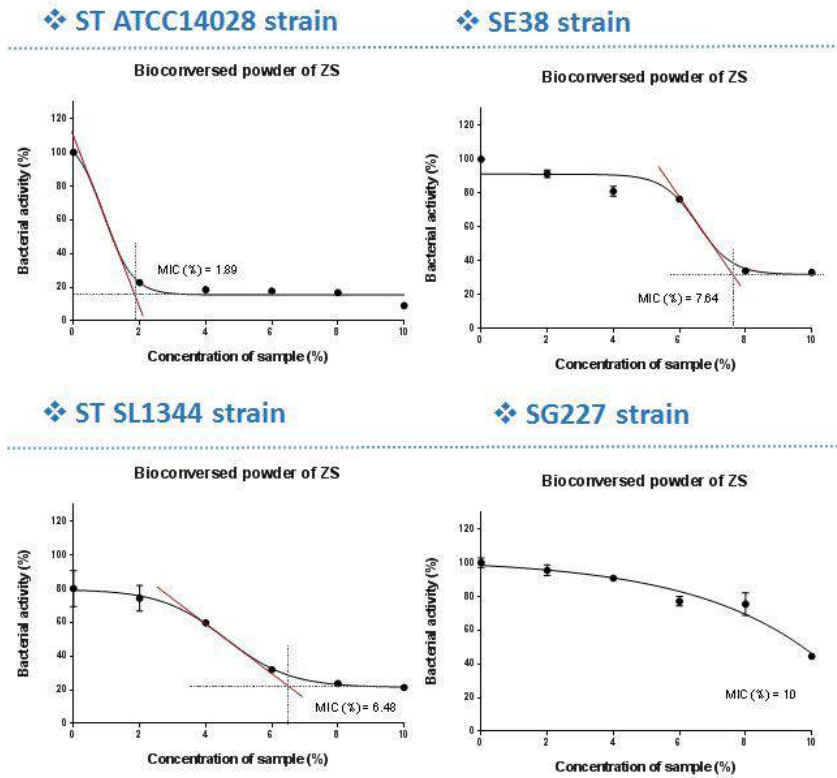


Figure 84. 살모넬라 균주에 대한 산초(생물전환)산물의 MIC 산출 그래프

6. 왕겨초액의 항살모넬라 항균활성 효능 평가

가. 원판확산법(Disc assay)를 통한 항살모넬라 항균활성 효능 평가

왕겨초액의 살모넬라 항균활성을 평가하기 위하여, 5가지 종류의 살모넬라 균주에 대한 disk assay를 통해 항균활성을 측정하였다 <Figure 83>. 왕겨초액은 종 특이적인 항균 효과는 보이지 않았으며, 1% 농도로 처리 시 검정에 사용한 5가지 균주에서 모두 20mm 이상의 clear zone이 나타나 강력한 항균활성이 있는 것으로 확인되었다.

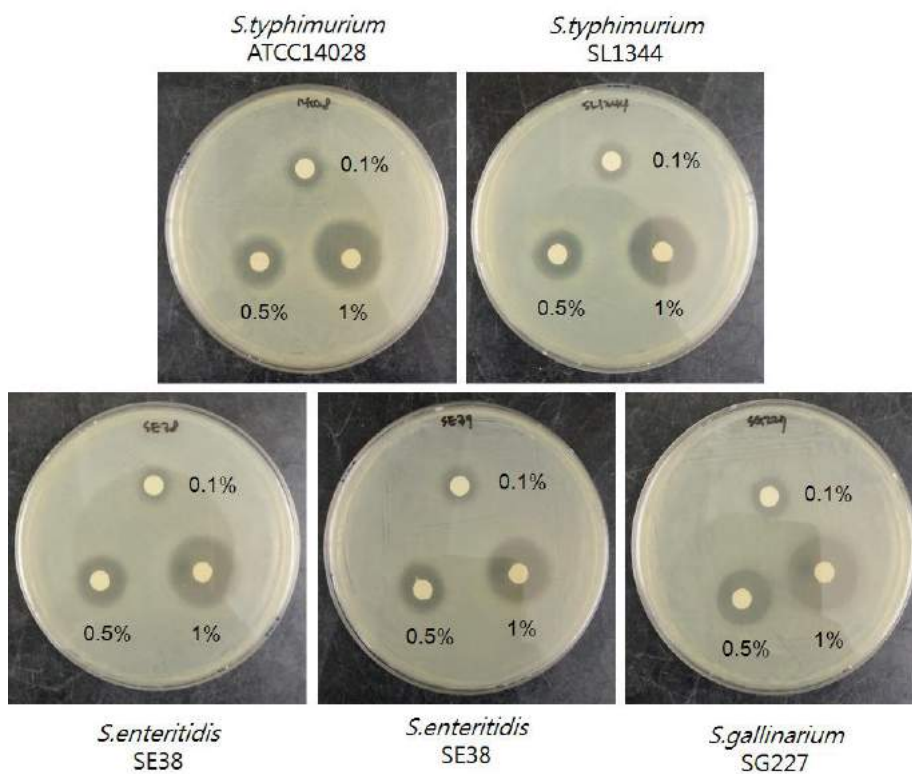


Figure 85. 5가지 살모넬라 균주에 대한 왕겨초액 disc assay

Table 6. 5가지 살모넬라 균주에 대한 왕겨초액 disc assay

		Clear Zone (mm)				
		S.Typhimurium ATCC14028	S.Typhimurium SL1344	S.Enteritidis SE38	S.Enteritidis SE39	S.Gallinarium SG227
왕겨초액	0.1%	11 ± 1.05	12 ± 1.08	9 ± 0.75	10 ± 0.83	13 ± 0.80
	0.5%	16 ± 1.02	16 ± 0.87	16 ± 1.02	15 ± 0.72	17 ± 1.21
	1%	22 ± 1.14	22 ± 1.03	21 ± 1.26	20 ± 1.06	23 ± 1.15

나. 인수공통감염균주를 포함하는 5가지 살모넬라 균주에 대한 MIC 산출

인수공통감염 살모넬라 균주인 *S. Enteritidis* SE38, SE39을 포함한 총 5가지 살모넬라 균주에서 왕겨초액의 MIC를 측정하였다. 지시약인 phenol red와 발효를 위한 glucose가 포함된 nutrient broth (NBGP)를 사용하여 살모넬라의 성장 및 당발효로 인한 색 변화를 측정하였으며, 흡광도 곡선의 추세선을 이용하여 MIC를 계산하였다. 그 결과, <Figure 84>에서 보듯이 ATCC14028 균주에서 0.89%, SL1344 균주에서 0.94%, SE38 균주에서 0.92%, SE39 균주에서 0.83%, SG227 균주에서 0.66%의 MIC를 나타냄을 확인하였다.

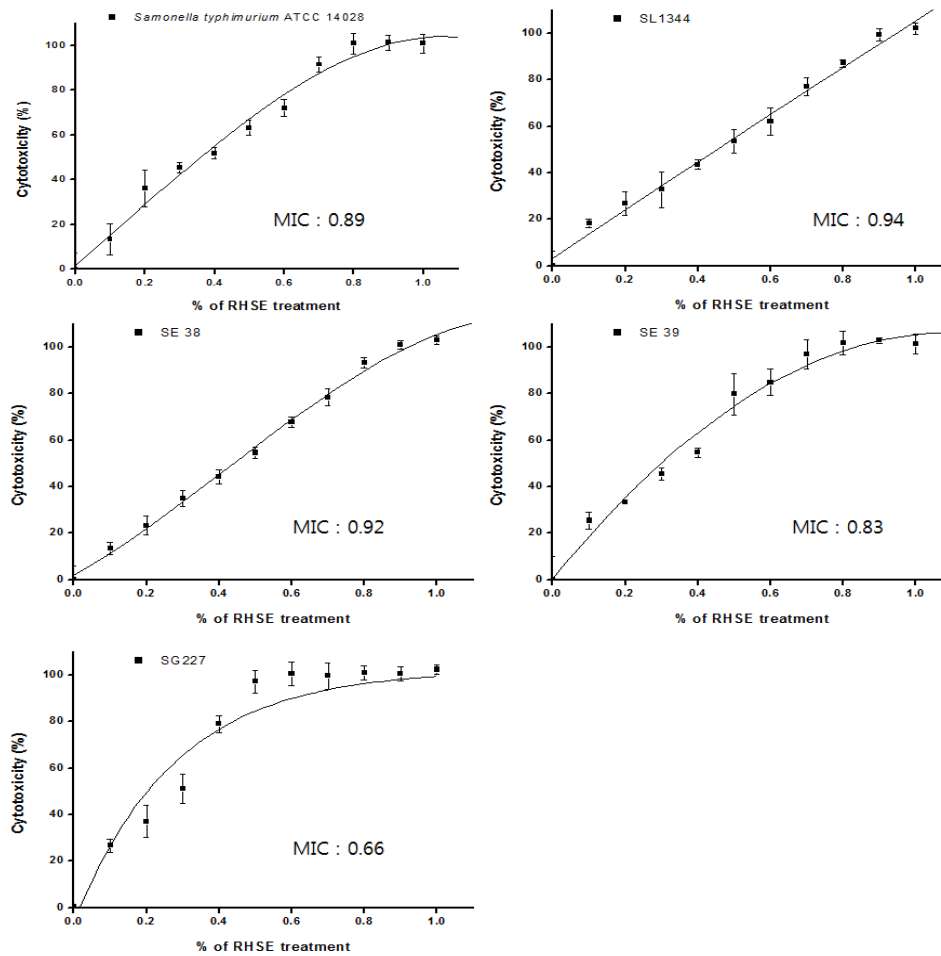


Figure 86. 5가지 살모넬라 균주에 대한 왕겨초액의 MIC 측정

3절. 면역조절소재 및 항균소재의 작용기전 연구

1. 고도화 면역조절소재의 특성 조사

가. 면역조절소재의 물리화학적 및 생물학적 특성 조사 실험법

(1) 물리화학적 특성

물리화학적 특성을 관찰하기 위하여 면역조절소재(시제품)의 색을 관찰하고, 체를 사용하여 각 분말의 입도를 체크하였다. 또한 수분측정기로 수분함량을 측정하여 나타내었다.

(2) 생물학적 특성

(가) 대식세포(macrophage) 배양

면역조절소재의 면역활성을 평가하기 위하여 5% DMEM media를 사용하여 마크로파지(대식세포)의 배양 및 assay를 수행하였다. 면역활성 측정에 사용한 마크로파지(대식세포)는 RAW 264.7 세포주로, 계대배양은 24well plate의 각 well에 1×10^5 cell/ml의 농도로 0.5ml 씩 세포를 계대배양하였다. 24시간 배양 후 현미경으로 cell growth 상태를 확인한 뒤, 배지를 완전히 제거한 다음 혈청이 첨가되지 않은 배지로 2~3회 washing 하여준다. 각 well에 시료가 첨가된 5% FBS DMEM 배지를 0.5ml 씩 채워준다. 시료의 농도는 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 시작으로 1/10 serial dilution을 하여 희석하여 1, 10, $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 하여 시료를 처리하였다. 또한, positive(+) control로 최종 농도 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 처리하였다($200 \mu\text{g}/\text{mL}$ stock). 시료가 처리된 24well을 8~24시간 배양 후 각 well의 배양액을 $400 \mu\text{L}$ 씩 취하고, $400 \mu\text{L}$ 씩 취한 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 assay에 사용하였다.

(나) Cytokine 분비량 측정

면역조절소재(시제품)의 선천성 면역반응 활성화 효능을 확인하기 위하여 관련된 cytokine 발현능을 조사하였다. 대조군 물질로는 LPS(Lipopolysaccharide)를 각각 $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였으며, 탈지미강 및 강황의 원물 및 생물전환산물을 1, 10, $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 실험을 수행하였다. 시료처리 후 12시간에 배양 상등액을 취하여 각각의 cytokine 분석을 위한 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay 시료로 사용하여 분석을 수행하였다.

○ TNF- α (R&D system, MTA00B) assay kit

- ① Standard concentration : 700, 350, 175, 87.5, 43.8, 21.9, 10.9 pg/mL
- ② Material & reagent : mouse TNF- α microplate , mouse TNF- α standard, mouse TNF- α conjugate, assay diluents RD1-63, calibrator diluent RD5K, calibrator diluent RD6-12, kit control, wash buffer concentrate, color reagent A, color reagent B, stop solution, plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였으며 pouch 안의 mouse TNF- α microplate 를 sample, standard (7 well)를 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50 μ L 의 Assay diluents RD1-63을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50 μ L의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응한다. ⑦ plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑧ 100 μ L의 mouse TNF- α conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑩ Substrate solution (color reagent A, color reagent B를 1:1 mix)을 100 μ L 넣고 30분 빛이 없는 상태에서 반응하였다.
- ⑪ 100 μ L stop solution을 넣고 혼합하였다.
- ⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 선형그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-1 β (R&D system, MLB00C) assay kit

- ① Standard :400pg/mL, 200pg/mL, 100pg/mL, 50pg/mL, 25pg/mL, 12.5pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-1 β microplate, Mouse IL-1 β standard, Mouse IL-1 β conjugate, Assay diluents RD1N, Calibrator Diluent RD5-16, kit control, Wash buffer, concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-1 β microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50ul의 Assay diluents RD1N 을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100ul의 Mouse IL-1 β conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.

- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하여, 450nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑫ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 선형그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-4 (R&D system, M4000B) assay kit

- ① Standard :250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.2pg/mL, 15.6pg/mL, 7.8pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-4 microplate, Mouse IL-4 standard, Mouse IL-4 conjugate, Assay diluents RD1-18, Calibrator Diluent RD5Y, kit control, Wash buffer, concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-4 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50ul의 Assay diluents RD1-18을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100ul의 Mouse IL-4 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.
- ⑫ 450nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL)그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-5 (R&D system, M5000)

- ① Standard : 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.2pg/mL, 15.6pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-5 microplate, Mouse IL-5 standard, Mouse IL-5 conjugate, Assay diluents RD1-38, Calibrator Diluent RD6-12, kit control, wash buffer, concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-5 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.

- ⑤ 50ul의 Assay diluents RD1-38 을 각 well에 넣었다
- ⑥ 50ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100ul의 Mouse IL-5 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하여, 450nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 직선그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-6 (R&D system, M6000B) assay kit

- ① Standard : 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 pg/mL
- ② Material & reagent : mouse IL-6 microplate , mouse IL-6 standard, mouse IL-6 conjugate, assay diluents RD1-14, calibrator diluent RD5T, kit control wash buffer concentrate, color reagent A, color reagent B, stop solution, plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 mouse IL-6 microplate를 sample, standard (8 well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50 μ L의 assay diluents RD1-14 을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50 μ L의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑧ 100 μ L의 mouse IL-6 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑩ Substrate solution (color reagent A, color reagent B를 1:1 mix)을 100 μ L 넣고 30분 빛이 없는 상태에서 반응하였다.
- ⑪ 100 μ L stop solution을 넣고 혼합 하였다.
- ⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 선형그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-10 (R&D system, M1000) assay kit

- ① Standard : 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 pg/mL

- ② Material & reagent : mouse IL-10 microplate, mouse IL-10 standard, mouse IL-10 conjugate, assay diluents RD1-14, calibrator diluent RD5T, kit control, wash buffer, concentrate, color reagent A, color reagent B, stop solution, plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 mouse IL-10 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50 μ L의 assay diluents RD1-14 을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50 μ L의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑧ 100 μ L의 mouse IL-10 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer를 넣고 5번 세척 하였다.
- ⑩ Substrate solution (color reagent A, color reagent B를 1:1 mix)을 100 μ L 넣고 30분 빛이 없는 상태에서 반응하였다.
- ⑪ 100 μ L stop solution을 넣고 가볍게 혼합 하였다.
- ⑫ 450 nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (log-log) 다항식그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IL-12p70 (R&D system, M1270) assay kit

- ① Standard :250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.2pg/mL, 15.6pg/mL, 7.8pg/mL
- ② Material & Reagent : Mouse IL-12p70 microplate, Mouse IL-12p70 standard, Mouse IL-12p70 conjugate, Assay diluents RD1-14, Calibrator Diluent RD5Y, kit control Wash buffer concentrate, Color reagent A, Color reagent B, stop solution, Plate sealers.
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch 안의 Mouse IL-12p70 microplate를 sample, standard(8well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 50ul의 Assay diluents RD1-14을 각 well에 넣었다.
- ⑥ 50ul의 control, sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.
- ⑧ 100ul의 Mouse IL-12p70 conjugate를 넣고 2시간 상온에서 반응하였다.
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer(data sheet에는 400uL이나, 넘치므로, 300ul)를 넣고 5번 wash하였다.

- ⑩ Substrate solution(Color reagent A, Color reagent B를 1:1 mix)을 100ul 넣고 30분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.
- ⑫ 450nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (log-log) 다항식그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IFN-β (PBL Assay Science, 42400) assay kit

- ① Standard :1000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.25pg/mL, 15.6pg/mL
- ② Material & Reagent : Pre-coated micro-titer plate(s), Plate sealers, wash solution Concentrate, Mouse Interferon-Beta Standard, Dilution buffer, Antibody Concentrate, HRP Conjugate Concentrate, Concentrate Diluent, TMB substrate, Stop Solution
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch안의 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 100ul의 sample, standard를 넣고 1분 정도 가볍게 교반 한 뒤, 1시간 상온에서 반응 하였다.
- ⑥ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300ul를 넣고 3번 wash하였다.
- ⑦ 100ul의 Mouse IFN-β antibody를 넣고 1시간 상온에서 반응하였다.
Antibody concetrates를 필요한 양만큼 Concentrate diluent에 희석하여 사용한다.
(예 40ul antibody concentrate : 2.0mL concentrate diluent)
- ⑧ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300ul를 넣고 3번 wash하였다.
- ⑨ 100ul의 HRP solution을 넣고 1시간 상온에서 반응하였다.
HRP concentrate를 필요한 양만큼 Concentrate diluent에 희석하여 사용한다.
(예 20ul HRP concentrate : 2.0mL concentrate diluent)
- ⑩ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300ul를 넣고 3번 wash하였다.
- ⑪ TMB substrate를 100ul 넣고 15분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑫ 100ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.
- ⑬ 450nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑭ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 그래프를 그려 농도를 계산하였다.

○ IFN-α (PBL Assay Science, 42120) assay kit

- ① Standard :400pg/mL, 200pg/mL, 100pg/mL, 50pg/mL, 25pg/mL, 12.5pg/mL, 6.25pg/mL

- ② Material & Reagent : Pre-coated micro-titer plate(s), Plate sealers, wash solution Concentrate, Mouse Interferon-alpha Standard, Sample buffer, Antibody Concentrate, HRP Conjugate Concentrate, Concentrate Diluent, Assay diluent, TMB substrate, Stop Solution
- ③ Reagents, sample, standard를 준비하였다.
- ④ Pouch안의 microplate를 sample, standard(7well) 계산하여 꺼낸 후 Plate sealers로 동봉하였다.
- ⑤ 100ul의 sample, standard를 넣고, 50ul의 Diluent antibody solution을 넣고 1시간 상온에서 450rpm으로 교반하여 반응하였다. antibody concentrate를 필요한 양만큼 Concentrate diluent에 희석하여 사용한다. (예 40ul antibody concentrate : 4.0mL concentrate diluent)
- ⑥ 20-24시간동안 4도씨에서 반응하였다. Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300ul를 넣고 3번 wash하였다.
- ⑦ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300ul를 넣고 4번 wash하였다.
- ⑧ 100ul의 HRP solution을 넣고 2시간 상온에서 반응하였다. HRP concentrate를 필요한 양만큼 Assay diluent에 희석하여 사용한다. (예 24ul HRP concentrate : 3.0mL concentrate diluent)
- ⑨ Plate의 내용물을 제거한 뒤 wash buffer 300ul를 넣고 4번 wash하였다.
- ⑩ TMB substrate를 100ul 넣고 15분 빛이 없는 상태(호일로 싸준 뒤)에서 반응하였다.
- ⑪ 100ul stop solution을 넣고 가볍게 mixing하였다.
- ⑫ 450nm 파장에서 파장을 읽었다.
- ⑬ Standard 값을 기준으로 (4-PL) 그래프를 그려 농도를 계산하였다.

나. 미강(생물전환)산물의 물리화학적 및 생물학적 특성

(1) 탈지미강(생물전환)산물의 물리화학적 특성

미강(생물전환)산물의 물리적 특성으로는 미강 특유의 밝은 베이지색의 색을 보유하고 있으며, 입도는 No.40(425 μ m)를 98% 통과하는 입자의 특성을 가지고 있다. 수분함량은 5% 이하로 대개 2~3%의 수분함량을 나타낸다.

(2) 탈지미강(생물전환)산물의 cytokine 분비량 분석 결과

(가) TNF- α 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물의 경우 10ug/ml의 처리농도에서부터 TNF- α 가 분비되기 시작하였고, 100ug/ml의 고농도에서는 분비량이 증가하는 것이 관찰되었다. 반면, 탈지미강(생물전환)산물의 경우, 1ug/ml 의 저농도에서부터 TNF- α 가 분비되기 시작하였고, 10ug/ml, 100ug/ml의 처리농도에서는 농도 의존적으로 높은 분비량을 나타내었다. 또한, 전체적인 분비량을 비교하였을 시 탈지미강(생물전환)산물이 미강 원물에 비하여 높은 TNF- α 분비능을 갖는 것으로 분석되었다.

(나) IL-1 β 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 β (Interlukine-1 β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물과 탈지미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물과 탈지미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물과 탈지미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물의 경우 1ug/ml의 처리농도에서부터 IL-6 가 분비되기 시작하였고, 농도가 증가함에 따라서 분비량이 소량으로 증가하는 양상이 관찰되었다. 반면, 탈지미강(생물전환)산물의 경우, 1ug/ml 의 저농도에서부터 IL-6 가 분비되기 시작하였고, 10ug/ml, 100ug/ml의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다. 또한 전체적인 분비량을 비교하였을 시 탈지미강(생물전환)산물이 탈지미강 원물에 비하여 현저히 높은 IL-6 분비능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

(바) IL-10 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물의 경우 1, 10, 100ug/ml의 처리농도 모두에서 IL-10이 분비되지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 탈지미강(생물전환)산물의 경우, 1ug/ml 의 저농도에서부터 IL-10 가 분비되기 시작하였고, 10ug/ml, 100ug/ml의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 증가하였다.

(사) IL-12p70 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물과 탈지미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(아) IFN-β 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IFN-β (Interferon-β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물의 경우 IFN-β를 분비하지만, 전체적으로 매우 낮은 분비량을 나타내었다. 반면, 탈지미강(생물전환)산물의 경우, 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하는 양상을 나타내었다. 전체적인 분비량을 비교하였을 시 탈지미강(생물전환)산물이 탈지미강 원물에 비하여 현저히 높은 IFN-β 분비능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

(자) IFN-α 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IFN-α (Interferon-α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 탈지미강 원물과 탈지미강(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

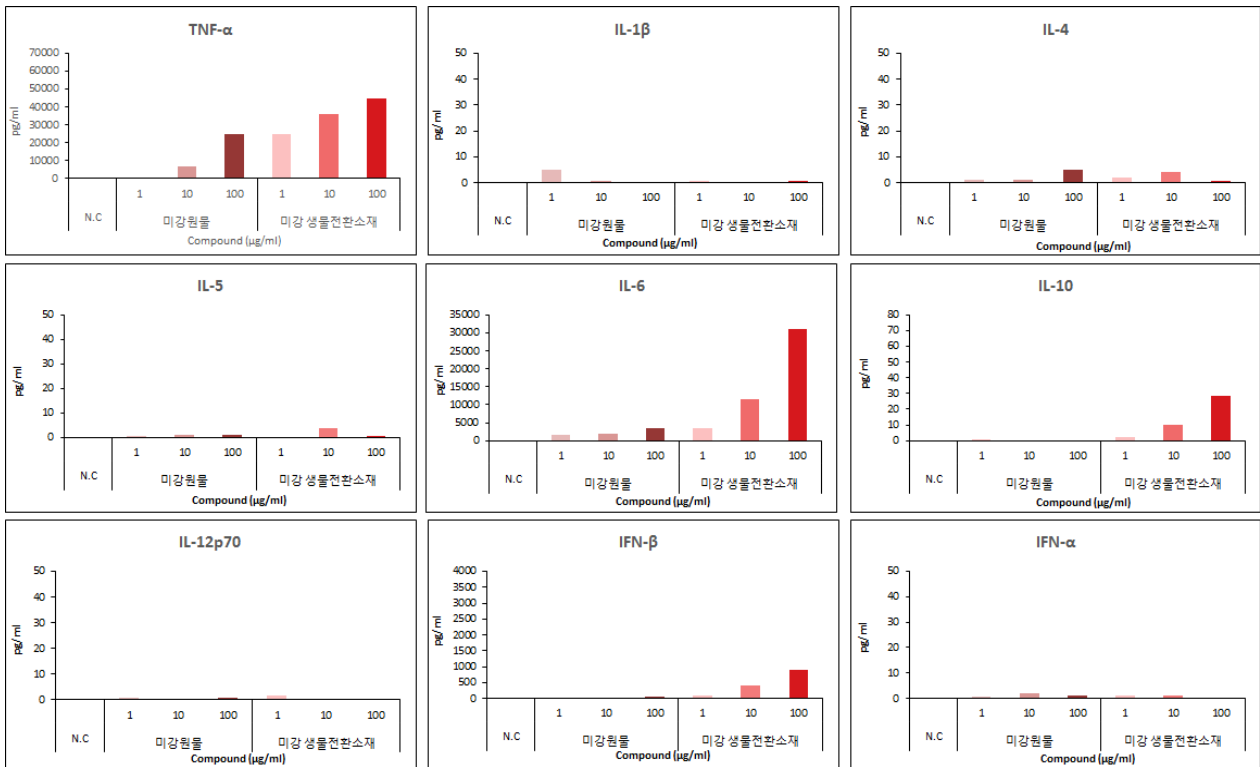


Figure 87. 대식세포(RAW 264.7)에서의 탈지미강(생물전환)산물의 사이토카인 발현능 평가

다. 강황(생물전환)산물의 물리화학적 및 생물학적 특성

(1) 강황(생물전환)산물의 물리화학적 특성

강황(생물전환)산물의 물리적 특성으로는 강황 특유의 진한 노란색을 보유하고 있으며, 입도는 No.40(425 μ m)를 98% 통과하는 입자의 특성을 가지고 있다. 수분함량은 5% 이하로 대개 2~3%의 수분함량을 나타낸다.

(2) 강황(생물전환)산물의 cytokine 분비량 분석 결과

(가) TNF- α 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 종양괴사인자인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay 로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001ug/ml의 처리농도에서부터 TNF- α 가 분비되기 시작하였고, 0.01~0.1ug/ml의 처리농도에서는 0.001ug/ml의 처리농도에 비하여 분비량이 소량 증가하는 양상을 나타내었다. 반면, 강황(생물전환)산물의 경우, 1ug/ml 의 저농도에서부터 TNF- α 가 분비되기 시작하였고, 10ug/ml, 100ug/ml의 처리농도에서는 농도 의존적으로 높은 분비량을 나타내었다.

(나) IL-1 β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-1 β (Interlukine-1 β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay 로 분석하였다.

분석 결과 LPS와 강황(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 측정 한계치 정도의 현저히 낮은 수치로 분비되었다.

(다) IL-4 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS와 강황(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 관찰되었다.

(라) IL-5 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS와 강황생물전환산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 관찰되었다.

(마) IL-6 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001ug/ml의 처리농도에서부터 IL-6 가 분비되기 시작하였고, 농도가 증가함에 따라서 분비량이 소량으로 증가하는 양상이 관찰되었다. 반면, 강황(생물전환)산물의 경우, 1ug/ml 의 저농도에서부터 IL-6 가 분비되기 시작하였고, 10ug/ml, 100ug/ml의 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하였다.

(바) IL-10 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001ug/ml의 처리농도에서 분비되기 시작하였고, 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것이 확인되었다. 강황(생물전환)산물의 경우, 1ug/ml 의 처리농도에서 분비되기 시작하였고, 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것이 확인되었다.

(사) IL-12p70 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS와 강황(생물전환)산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(아) IFN-β 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IFN-β (Interferon-β)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001~0.1ug/ml 처리농도에서 농도 의존적으로 IFN-β의 분비량이 증가하는 것이 확인되었다. 반면, 강황 생물전환산물의 경우, 1, 10ug/ml 처리농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 크게 증가하는 양상을 나타내었지만, 100ug/ml의 처리농도에서는 10ug/ml 처리농도에 비하여 분비량이 감소하는 것이 확인되었다.

(자) IFN-α 발현능 평가

시료처리 후 12시간에 배양상등액을 취하여 IFN- α (Interferon- α)를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay) assay로 분석하였다.

분석 결과 LPS와 강황생물전환산물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

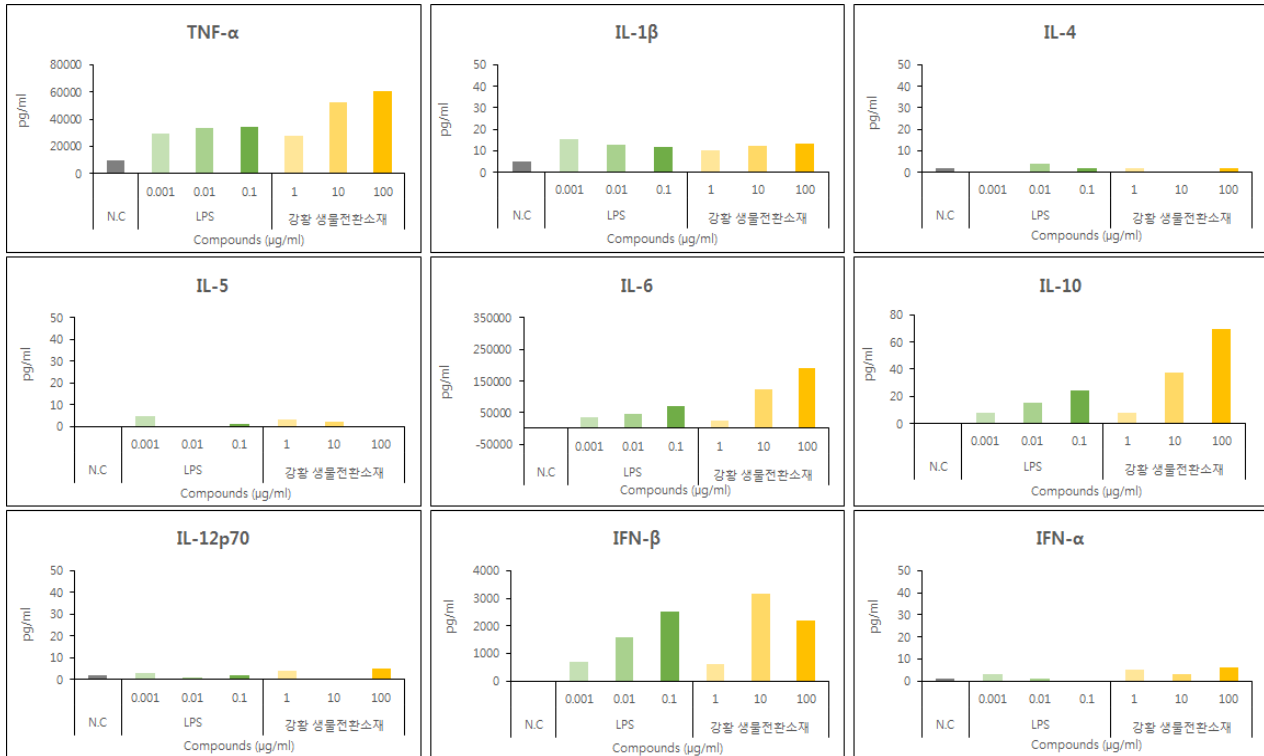


Figure 88. 대식세포(RAW 264.7)에서의 강황(생물전환)산물의 사이토카인 발현능 평가

탈지미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물의 면역활성 관련 cytokine을 분석한 결과, TNF- α , IL-6 및 IFN- β 와 함께 IL-10이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 이중 TNF- α , IL-6 및 IFN- β 는 매우 높게 발현되었다.

TNF- α 는 포식작용 시 대식세포와 단핵세포 등에서 분비되며 inducible nitric oxide(NO)와 함께 독감바이러스를 포함하는 RNA 바이러스에 대해 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 항원특이 면역반응, 염증반응, 급성반응에서의 주요 mediator, 그리고 인체(동물) 방어체계에서 핵심역할을 담당하는 대표적 cytokine이다.

IFN- β 는 IFN- α 와 함께 type 1 interferon으로, 항균, 항바이러스에 효과가 있으며, Th1세포의 분화에 기여하는 것으로 보고되고 있다.

인체 및 동물에 있어서 바이러스 및 박테리아에 대한 생체의 첫 번째 방어선에는 다양한 신호전달체계가 관여하며, 이들은 궁극적으로 면역조절에 관여하는 유전자 및 단백질의 발현을 활성화시켜 세포내 환경을 바이러스나 박테리아의 증식에 적합하지 못한 상태로 전환시키게 된다. Interferon은 병원체의 감염초기에 생성되어 세포로 하여금 병원체의 증

식을 억제하는 단백질을 발현하게 하는 cytokine으로서 interferon에 의해 유도된 항바이러스, 항균 활성은 한 종류의 병원체에 특이적인 것이 아니라 일단 활성화 된 시스템에서는 다른 종류의 병원체에 대해서도 방어력을 나타내는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 과제를 통해 개발된 탈지미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물은 강력한 IFN- β 유도물질임이 입증되어 다양한 소모성 바이러스질환 및 소모성 박테리아 질환에 대한 치료 및 예방에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

2. **고도화** 면역조절소재, 강황(생물전환)산물의 면역활성 유효성분 확인 및 생물학적 특성 평가

가. 강황(생물전환)산물의 면역활성 유효성분인 다당체분획물 제조

(1) 분리정제공정

다당체분획물의 제조공정도는 아래의 Figure 87과 같다. 분말화된 강황(생물전환)산물에 20배수 이상의 3차증류수를 첨가하여 추출한다. 추출 후 원심분리를 통해 잔사를 제거하고 추출상등액을 분리한다. 추출상등액에 상등액의 4배수에 해당하는 양의 EtOH을 첨가하여 잘 섞어준 후, 4°C에서 밤새 보관한다. 생성된 침전물을 원심분리를 통해 분리하고, 분리된 침전물에 3차증류수를 첨가해 완전 용해시킨 후, 여과 또는 원심분리를 통해 용해되지 않은 물질을 분리한다. 여과된 침전물용해액에 대해 투석용 튜브를 사용하여 투석을 진행한다. 2시간에 한 번씩 3차증류수를 교체하고, 이를 15번 반복한다. 투석완료 후 동결건조를 통해 분말화한다.



Figure 89. 다당체분획물 제조공정도 및 제조과정

(2) HPLC 분석

다당체분획물의 분석에 사용한 기기는 Shimadzu LC 010Avp (Shimadzu Co., Japan)로 분석조건은 Table 7과 같다.

Table 7. 다당체분획물 분석조건

Instrument	Conditions
Instrument	SHIMADZU_HPLC, SEDEX 75_ELSD
Column	UltrahydrogelTM 1000 (7.8x300mm) Waters, WAT011535
Column oven	45 °C
Flow rate	0.6 ml/min
Solvent	HPLC grade water
Elution	Isocratic, HPLC water 100%
Run time	40 min
Injection	20 µl
Sample extraction	시료 100mg을 HPLC water 10ml로 250rpm 1시간 shaking 추출 후, 원심분리 후 분석

50L 발효조에서 생산된 2배치의 강황(생물전환)산물을 사용하여 분리정제한 다당체분획물의 균일성을 확인하기 위해 반복실험을 진행하였다. 각 배치당 4번씩 다당체분획물을 제조하였다. 제1배치와 제2배치의 강황(생물전환)산물의 다당체분획물의 HPLC분석 결과 모두 저분자물질이 잘 제거되고 면역활성 다당체의 분획이 잘 이루어졌음을 크로마토그램의 피크를 통해 확인하였다.

각 배치에 사용한 강황 원물이 달라 1배치와 2배치의 다당체분획물 회수율이 각각 약 2.4%, 4.5%로 배치 간에 서로 차이를 보였지만, 이는 정제 순도와 함께 정제규모에 따른 손실의 과다여부에 의한 것으로 각 배치의 4반복 다당체분획물의 분리정제에 있어서 각각 0.004, 0.002로 편차가 거의 없음을 확인하였다.

이를 통해 배치에 따른 다당체분획 제조공정 적용의 차이가 없음을 확인하였고, 재현성이 우수한 다당체분획물 제조공정임을 확인하였다.

Table 8. 강황(생물전환)산물의 생산배치에 따른 4반복 다당체분획물의 회수율 비교

	다당체분획물 회수율 (%)	편차
강황(생물전환)산물 제1배치	2.395	0.004
강황(생물전환)산물 제2배치	4.535	0.002
		n=4

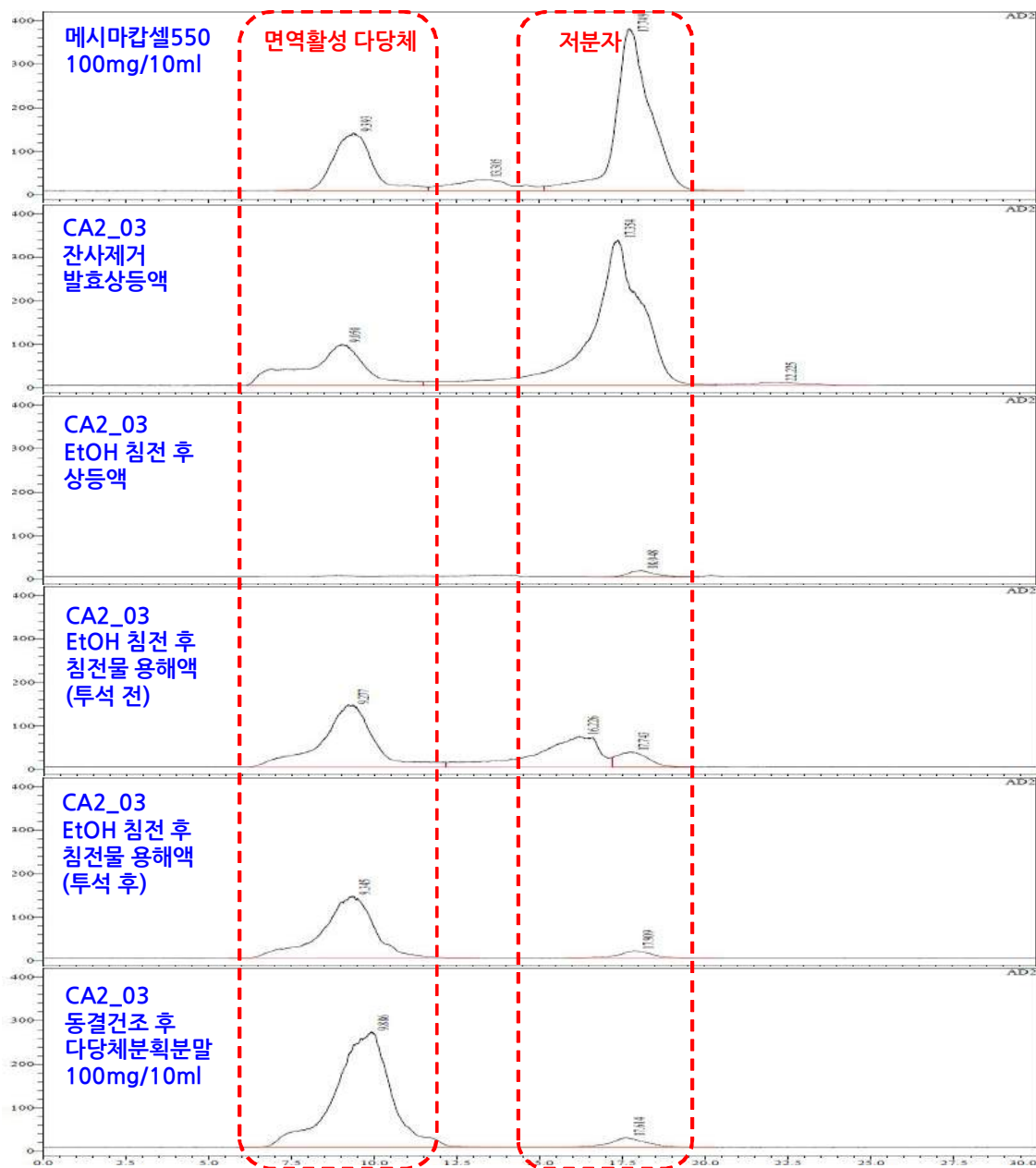


Figure 90. 강황(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별 HPLC분석 크로마토그램

강황(생물전환)산물의 다당체분획물 제조공정별로 샘플을 채취하여, 공정에 따른 크로마토그램 패턴 변화를 분석하였다. 비교물질로 상황버섯 균사체 유래의 면역활성 다당체로 항암치료에 사용되고 있는 전문의약품인 메시마캡셀550을 사용하였다. 분석결과 강황(생물전환)산물의 불용성물질을 제거한 상등액을 gel filtration HPLC를 통해 분석한 결과 17.5분대에서 저분자물질의 피크가 나타났으며, 7.5~10분대에서 고분자의 다당체분획 피크가 검출되었다. EtOH침전공정과 투석공정을 진행 후, 저분자물질이 제거되어 분석 시 저분자물질의 피크가 감소함을 확인하였고 동결건조 후에도 큰 변화가 없음을 확인하였다.

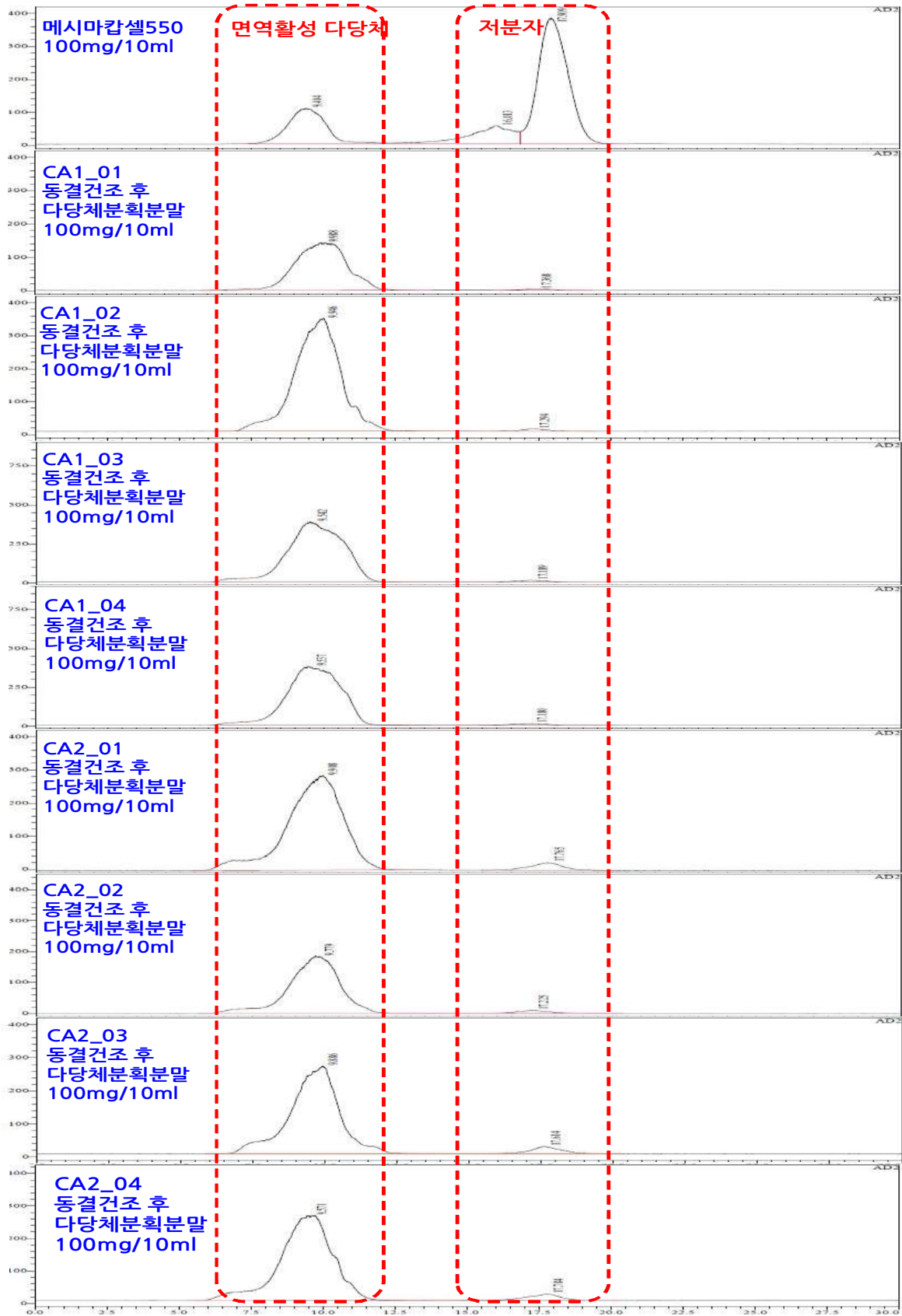


Figure 91. 강황(생물전환)산물의 다당체분획물들의 HPLC분석 크로마토그램

(3) 대식세포 NO 측정을 통한 대식세포 활성화능 평가

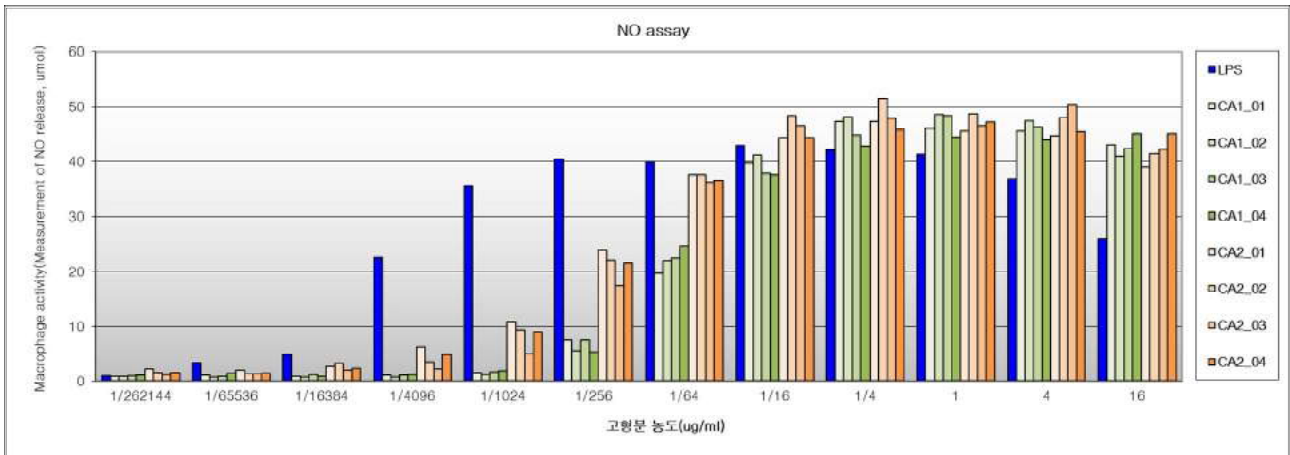


Figure 92. 강황(생물전환)산물 다당체분획물들의 대식세포 활성화능 평가

50L 발효조에서 생산된 두 배치의 강황(생물전환)산물을 사용하여, 다당체분획물 분리정제의 균일성을 확인하기 위해 반복실험을 진행하였다. 각 배치당 4번씩 다당체분획물을 제조하였고, 이들의 대식세포 NO 생성능을 측정하여 대식세포 활성화능을 평가하였다.

제1배치의 강황(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들(CA1-01, 02, 03, 04)와 제2배치의 강황(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들(CA2-01, 02, 03, 04)간의 NO생성능에서 차이를 보였다. 제1배치의 강황(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/4 ug/ml, 제2배치 강황(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들의 면역활성 역가 MEC₁₀₀은 대략 1/16 ug/ml으로 제2배치의 강황(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물들이 제1배치의 강황(생물전환)산물로부터 제조한 다당체분획물보다 약 4배 정도 더 높은 면역활성 역가를 나타내는 것을 확인하였다.

앞선 결과에서 제2배치의 강황(생물전환)산물의 다당체분획물 회수율이 4.5%로 1배치의 강황(생물전환)산물의 다당체분획물 회수율이 2.4%인 것에 비해 1.9배 더 높은 회수율을 확인하였고, NO 생성능을 비교하였을 때도 제2배치가 제1배치에 비해 더 높은 면역활성 역가를 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 생성된 강황(생물전환)산물의 면역활성이 높을수록 정제된 다당체분획물에 있어서도 면역활성 역가가 높게 나타남을 확인하였다.

나. 강황(생물전환)산물의 및 다당체분획물의 면역활성 특성 평가

최근 면역활성을 나타내는 다당체에 의한 macrophage 활성화, NK세포 자극활성 및 cytokine 생산 자극 등과 같은 여러 생리활성에 대한 연구결과들이 속속 발표되고 있다.

또한 면역활성을 나타내는 다당체의 특이적 구조가 대식세포 등 면역세포들이 세포표면에 발현하고 있는 특이수용체인 패턴인식수용체(pattern recognition receptor, PRR)에 인식되면서 신호전달을 매개한다고 밝혀지고 있다.

이러한 연구결과들에 근거하여, 앞에서 확립된 분리정제공정을 통해 제조된 강황(생물전환)산물의 다당체분획물 또한 면역세포의 특이수용체인 패턴인식수용체에 인식되어 신호전달이 매개되는지를 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비패턴 비교를 통해 특이수용체(specific receptor)를 추측하였고, 이를 확인하기 위하여 추측된 특이수용체에 대한 inhibitor를 처리하여 신호전달이 차단되는지 확인하는 실험도 함께 진행하였다. Inhibitor처리 실험을 통해 강황(생물전환)산물에 대한 특이수용체가 패턴인식수용체의 하나인 TLR4(Toll-like receptor4)임을 확인하고 TLR4의 ligand로 잘 알려진 LPS와 함께 TLR4 agonist로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 비교를 통해 강황(생물전환)산물의 면역활성 특성을 조사하였다.

(1) 대식세포에서의 Cytokine 분비 패턴 비교

강황(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성을 확인하기 위하여 대식세포에서의 cytokine 분비 패턴을 조사하였다. 대조군 물질로는 LPS(Lipopolysaccharide)를 각각 0.01 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL의 농도를 처리하였으며, 강황(생물전환)산물은 0.2 μ g/mL, 2 μ g/mL, 20 μ g/mL의 농도로 처리한 반면 강황(생물전환)산물 다당체분획물은 0.01 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL의 농도로 실험을 수행하였다. 강황(생물전환)산물의 처리농도 설정은 강황(생물전환)산물로부터 다당체분획물의 회수율이 약 5%로 나왔기 때문에 이를 근거로 하여 농도를 설정하였다.

(가) TNF- α 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 강황(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.2 μ g/mL에서부터 TNF- α 가 분비되는 것을 확인할 수 있었고 처리농도가 증가함에 따라 TNF- α 의 분비량도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01 μ g/mL의 처리농도에서부터 TNF- α 가 분비되기 시작해서 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL로 처리농도가 증가함에 따라 TNF- α 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 분비량 정도는 회수율을 근거로 설정한 농도에서의 강황(생물전환)산물의 TNF- α 분비량과 비슷한 수치를 나타내었다.

강황(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두에서 농도가 증가할수록

TNF- α 분비량이 유사하게 증가함을 보임을 확인하였다. 이를 통해 강황(생물전환)산물에 함유된 여러물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 TNF- α 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

강황(생물전환)산물 다당체분획물과 LPS의 TNF- α 분비량을 비교하였을 때, 0.01 μ g/mL에서는 LPS가 더 높은 분비량을 나타냈으나, 0.1 μ g/mL 및 1 μ g/mL에서는 서로 비슷한 정도의 TNF- α 분비량을 보였다.

(나) IL-1 β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 β (Interlukine-1 β)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 강황(생물전환)산물의 경우 처리농도 0.2 μ g/mL 및 2 μ g/mL의 농도에서 IL-6가 소량 분비되는데 비해 20 μ g/mL의 농도에서는 IL-6의 분비량이 대폭 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에서도 0.1 μ g/mL의 농도에서부터 IL-6가 소량 분비되는데 비해 1 μ g/mL에서는 분비량이 대폭 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

강황(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 IL-6 분비량이 농도가 증가할 수록 유사한 증가율을 보임을 확인하였다. 이를 통해 강황(생물전환)산물에 함유된 여러

물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IL-6를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IL-6 분비량을 비교하였을 때, 0.01 μ g/mL 및 0.1 μ g/mL의 농도에서는 IL-6의 분비량이 낮게 나타났으나, 1 μ g/mL의 농도에서는 분비량이 크게 증가하는 것으로 나타났으나, 강황(생물전환)산물 다당체분획물에 비해서는 낮은 수치를 보였다.

(바) IL-10 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(사) IL-12p70 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(아) IFN- β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- β (Interferon- β)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 강황(생물전환)산물의 경우 0.2 μ g/mL의 농도에서는 IFN- β 가 분비되지 않았으나, 2 μ g/mL 및 20 μ g/mL의 농도에서는 농도 의존적으로 IFN- β 의 분비량이 크게 증가하는 것이 관찰되었다. 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.01 μ g/mL의 저농도에서부터 IFN- β 가 소량 분비되기 시작하여, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL의 농도에서는 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

강황(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 IFN- β 분비량이 농도가 증가할수록 유사하게 증가함을 확인하였다. 이를 통해 강황(생물전환)산물에 함유된 여러물질들 중에서 다당체 성분이 대식세포의 특이수용체에 인식되어 신호전달을 매개하여 IFN- β 를 분비하게 만드는 유효성분임을 확인할 수 있었다.

LPS의 IFN- β 분비량을 비교하였을 때 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물 다당체분획물과 비교하여 0.01 μ g/mL의 농도에서는 LPS가 상대적으로 많이 높게 나타난 반면, 1 μ g/mL의 농도에서는 서로 비슷한 IFN- β 분비량을 나

타내고 있다.

(자) 결과 분석

강황(생물전환)산물의 면역활성 관련 cytokine을 분석한 결과, TNF- α , IL-6 및 IFN- β 가 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 강황(생물전환)산물의 상기 면역활성은 다당체분획물에 기인한 것임을 확인할 수 있었다. 비교물질인 LPS와 비교평가 시, LPS에서도 TNF- α , IL-6, IFN- β 의 cytokine 분비패턴 양상이 강황(생물전환)산물 다당체분획물과 유사함은 물론 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70도 함께 분비되지 않음을 확인할 수 있었다. LPS는 TLR4(Toll-loke receptor4)에 인식되는 물질로 잘 알려져 있는 바, 이를 통해 강황(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 인식되어 신호를 매개할 것이라 유추할 수 있었다.

TNF- α 는 포식작용 시 대식세포와 단핵세포 등에서 분비되며 inducible nitric oxide(NO)와 함께 독감바이러스 등의 다양한 바이러스에 대하여 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 항원 특이 면역반응, 염증반응, 급성반응에서의 주요 mediator이며 또한 생체내 방어체계에서 핵심역할을 담당하는 대표적 cytokine이다.

IFN- β 는 IFN- α 와 함께 type I interferon으로 항균, 항바이러스 효과가 있으며 특히, Th1 세포의 분화에 기여하여 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 cytokine으로 Th1 면역반응을 유도하는 반면, Th2 및 Th17 면역반응을 억제하는 면역조절 기능이 있는 cytokine이다.

결론적으로 활성화시킨 대식세포에서 Interferon- β 의 생성이 유도됨을 확인하여 Th1 면역반응을 특이적으로 활성화시킬 수 있는 소재로 판단되며, 이들의 면역활성은 모두 고분자 다당체에 의해 나타남을 확인하였다.

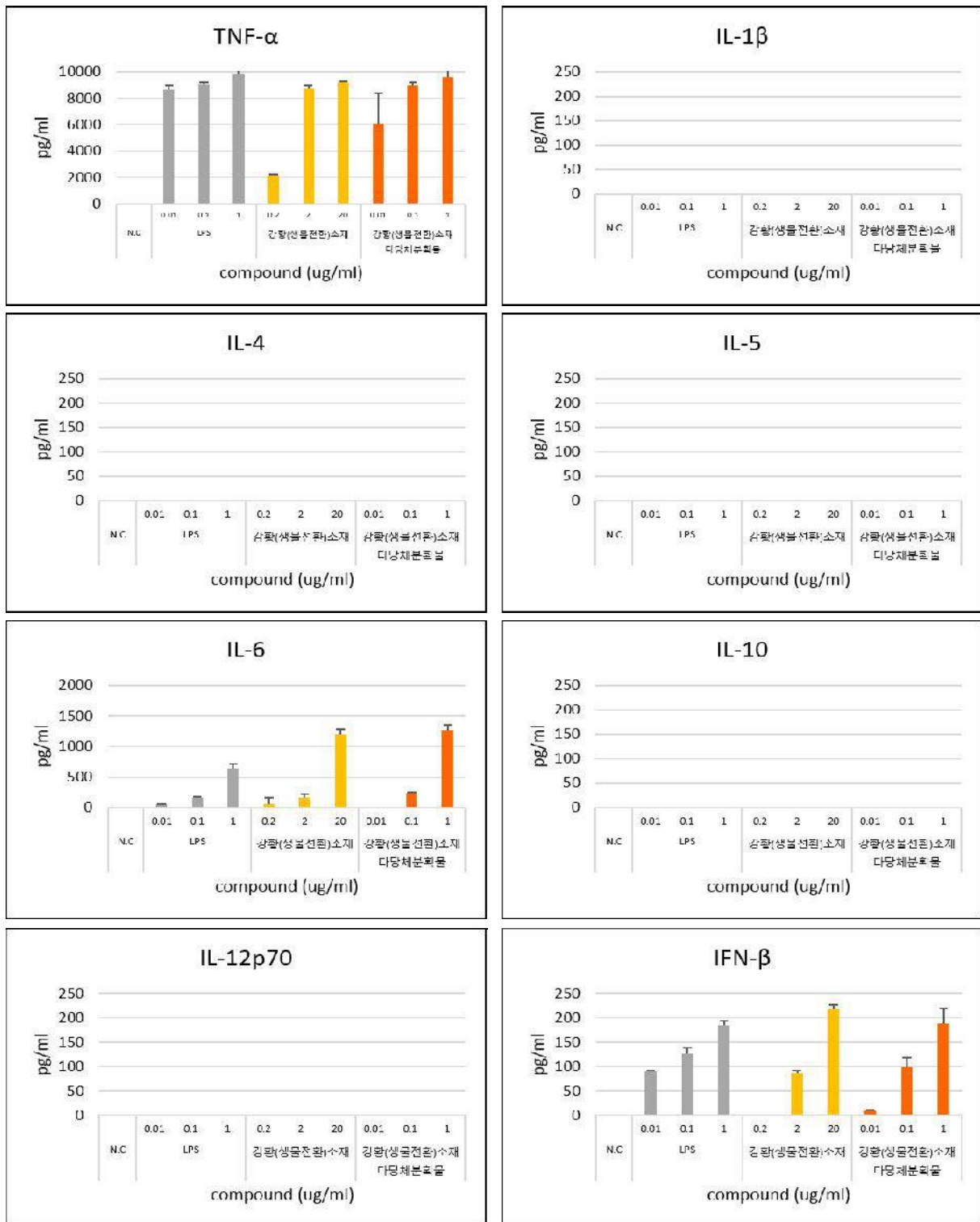


Figure 93. 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비량 평가

(2) 특이수용체(Receptor) 확인

현재까지 개발된 많은 면역소재의 경우 대부분 receptor가 확인되고 있지 않으며 일부 베타글루칸 제품만이 주로 dectin-1 이라는 수용체에 결합한다고 알려져 있으나, 베타글루칸 제품조차도 불용성소재의 경우 dectin에 결합하는 반면 수용성소재는 dectin-1에 결합하지 않는 것으로 알려져 있다. 수용체가 알려져 있으면 biomarker가 확정될 수 있으며 이를 바탕으로 의약품 및 동물용의약품 개발의 임상시험에 있어서도 biomarker의 설정에 활용이 가능하다는 장점이 있다.

앞선 실험결과들을 바탕으로 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 Receptor가 TLR4임을 유추한 바, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 특이적으로 인식되어 신호를 매개하는 것인지 확인하기 위하여 TLR Inhibitor인 TAK-242를 사용한 실험을 통하여 최종 확인하고자 하였다.

(가) TNF- α 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 TNF- α 의 분비량이 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물의 경우에서도 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때 TNF- α 의 분비량이 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 TNF- α 의 분비량이 매우 크게 대폭 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 TNF- α 의 분비가 매우 크게 대폭 감소되는 결과에 근거하여 강황(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 TNF- α 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

(나) IL-1 β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 β (Interlukine-1 β)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다. TAK-242를 처리했을 때도 마찬가지로 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다. TAK-242를 처리했을 때도 마찬가지로 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다. TAK-242를 처리했을 때도 마찬가지로 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물의 경우에도 TLR Inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IL-6의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IL-6의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IL-6의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 강황(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IL-6 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

(바) IL-10 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

TAK-242를 처리했을 때도 마찬가지로 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(사) IL-12p70 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다. TAK-242를 처리했을 때도 마찬가지로 LPS, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(아) IFN- β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- β (Interferon- β)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 TLR4 inhibitor인 TAK-242를 처리하였을 때 IFN- β 의 분비가 완전히 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물의 경우에도 TLR Inhibitor인 TAK-242를 처리했을 때, IFN- β 의 분비가 완전히 차단됨을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에 있어서도 TAK-242를 처리했을 때, 마찬가지로 IFN- β 의 분비량이 완전히 차단됨을 확인할 수 있었다.

TLR4 inhibitor인 TAK-242 처리시 IFN- β 의 분비가 완전히 차단되는 결과에 근거하여 강황(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물의 다당체가 LPS와 마찬가지로 TLR4에 특이적으로 결합, 인식되어 IFN- β 분비 신호가 매개됨을 확인하였다.

(자) 결과 분석

강황(생물전환)산물의 대식세포 면역활성은 다당체분획물에 의해 나타남을 확인하였으며, 대식세포 활성화에 의해 나타나는 반응들은 TLR4 저해제인 TAK242에 의해 모두 억제되어 TLR4가 수용체임을 확인함으로써, 본 과제에서 추구하는 생물전환공정에 의해 생산된 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물은 TLR4 agonist, Th1 adjuvant의 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

본 실험을 통해 강황(생물전환)산물의 면역활성 작용점 및 작용기전을 파악하였다는 것은 기대되는 효능·효과 및 부작용을 예측 가능하게 되었다는 점에서 특히 의미가 있다고 사료된다.

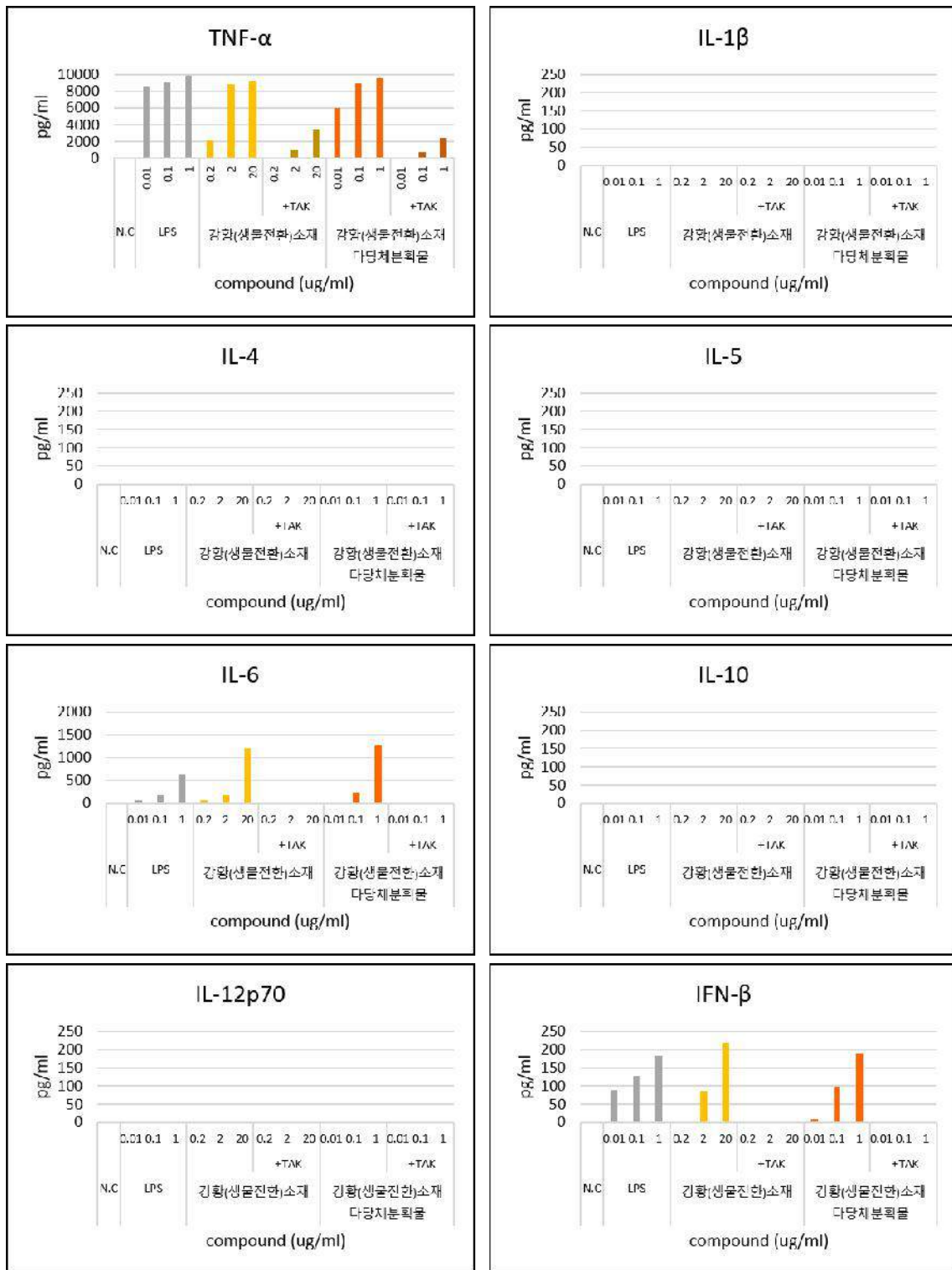


Figure 94. TLR4 inhibitor처리시, 강황(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 cytokine 분비량 억제 평가

(3) LPS 및 MPLA와의 면역활성 특성 비교

패턴인식수용체의 하나인 TLR4의 대표적 리간드로 대표적인 내독소인 LPS가 있다. 또한 논문 및 임상에서의 적용을 통해 TLR4 agonist, Th1 adjuvant로 입증된 유일한 면역조절 소재로 GSK社에서 출시하고 있는 MPLA가 이에 해당한다. MPLA는 대표적인 내독소인 LPS를 화학적 변환을 통해 독성을 약화시킨 탈독성(detoxified) 유도체이다. LPS에서 lipid A는 면역세포 표면에 있는 TLR4(toll-like receptor 4)에 의해 인식되는 영역으로 면역활성과 함께 독성을 나타내는 부분이다. MPLA는 화학적 변환을 통해 lipid A에서 phosphate group 하나를 제거하여 화학적으로 변환시킨 물질로, TLR4와의 결합 구조에 변화를 일으켜 탈독성화 시키고 동시에 TLR4와의 결합은 유지시킴으로써 면역활성이 유지되도록 개발된 물질이다.

앞선 실험을 통해 강황(생물전환)산물 다당체분획물이 TLR4에 의해 인식되어 신호전달을 매개하는 것으로 확인되어, TLR4의 잘 알려진 ligand인 LPS와 TLR4 agonist이자 Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소재인 MPLA와의 면역활성 특성을 비교하고자 실험을 수행하였다.

(가) TNF- α 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS의 경우 0.001 μ g/mL의 농도까지 TNF- α 의 높은 분비량을 유지하다가 0.0001 μ g/mL의 농도에서는 TNF- α 의 분비량이 급속히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우에는 LPS보다 10배 높은 농도인 0.01 μ g/mL의 농도까지 TNF- α 의 높은 분비량을 유지하다가 0.001 μ g/mL의 농도에서 TNF- α 의 분비량이 급속히 감소되고, 0.0001 μ g/mL의 농도에서는 TNF- α 가 분비되지 않음을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.01 μ g/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 분비량이 증가함을 확인할 수 있었으나, 1 μ g/mL 농도에서의 TNF- α 분비량이 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 0.01 μ g/mL 농도에서의 분비량과 비슷한 수준이며, LPS의 0.001 μ g/mL 농도에서의 분비량보다 낮은 수준임을 확인할 수 있었다.

(나) IL-1 β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-1 β (Interlukine-1 β)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(다) IL-4 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-4(Interlukine-4)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(라) IL-5 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-5(Interlukine-5)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(마) IL-6 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-6(Interlukine-6)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 0.1 μ g/mL의 농도에서부터 IL-6가 소량 분비되기 시작하여 1 μ g/mL에서 IL-6의 분비량이 크게 증가하는데 비해 LPS의 경우 0.01 μ g/mL의 농도에서부터 IL-6가 매우 소량 분비되기 시작하여 농도 의존적으로 분비가 증가하나 강황(생물전환)산물 다당체분획물에 비해 상당히 적은 양이 분비되며, MPLA의 경우 농도와 관계없이 IL-6의 분비가 나타나지 않았다.

(바) IL-10 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-10(Interlukine-10)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(사) IL-12p70 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IL-12p70(Interlukine-12p70)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

분석 결과 LPS, 강황(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA 모두 농도와 관계없이 현저히 낮은 수치로 나타나거나, 수치가 전혀 나오지 않는 양상을 나타내었다.

(아) IFN- β 발현능 평가

시료 처리 후 12시간에 대식세포 배양상등액을 취하여 IFN- β (Interferon- β)의 분비 여부 및 농도를 ELISA(Enzyme linked immuno solvent assay)로 분석하였다.

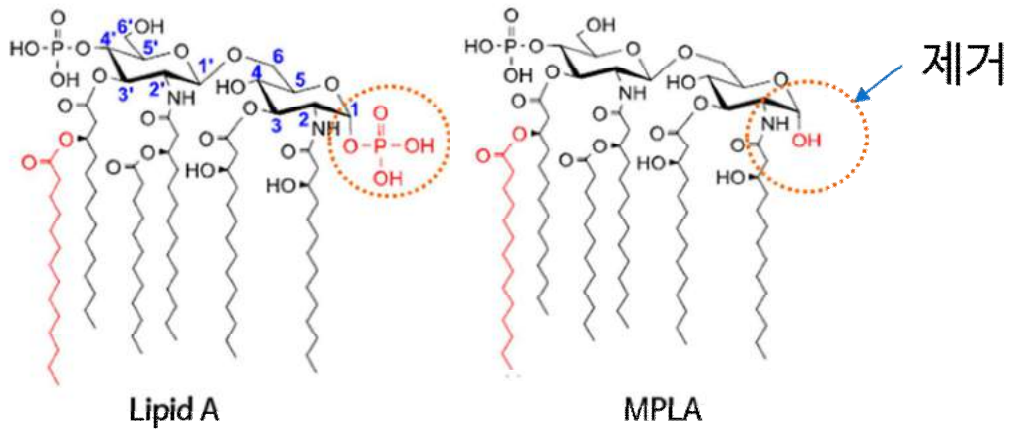
분석 결과 LPS의 경우 0.0001 μ g/mL의 농도에서부터 IFN- β 가 분비되기 시작하여 농도 의존적으로 IFN- β 의 분비량이 크게 증가함을 확인한 반면, 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 경우 LPS보다 100배 높은 농도인 0.01 μ g/mL의 농도에서부터 IFN- β 가 분비되기 시작하여 농도가 증가함에 따라 IFN- β 의 분비량이 급격히 증가하여 1 μ g/mL의 농도에서는 LPS와 비슷한 분비량의 IFN- β 를 분비하는 것을 확인할 수 있었다. MPLA의 경우 0.1 μ g/mL의 농도에서부터 IFN- β 가 분비되기 시작하여 1 μ g/mL에서 IFN- β 의 분비량이 매우 조금 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(자) 결과 분석

대표적인 면역활성물질인 LPS 및 MPLA와 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 특성을 비교한 결과 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 TNF- α , IL-6, IFN- β 의 분비패턴과 수치가 LPS의 수치와 매우 유사함을 확인한 바, 강황(생물전환)산물 다당체분획물은 매우 강력한 TLR4 agonist의 면역조절소재임을 입증할 수 있었다. 또한 현재 유일하게 TLR4 agonist이자, Th1 adjuvant로 입증된 면역조절소재인 MPLA에 비해 강황(생물전환)산물 다당체분획물의 면역활성 능력이 100배 이상 낮은 농도에서도 MPLA에 비해 더 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

강황(생물전환)산물 다당체분획물은 MPLA와 같이 10가지의 TLR중 TLR4에 특이적으로 결합하며 또한 LPS가 TLR4에 결합하는 것을 방해함으로써, TLR4 agonist로서의 기능 향상과 함께 LPS에 의해 나타나는 염증 부작용을 억제함을 보여주고 있다.

MPLA는 FDA에서 두번째로 허가한 백신 adjuvant물질로 인간 백신에 유일하게 허가된 TLR ligand이기도 하다. GSK社에서는 지속적으로 MPLA를 adjuvant로 사용한 백신을 출시하고 있다. MPLA를 사용한 B형간염백신의 항체생성률은 기존 백신이 60%인데 반해 100%에 가깝게 향상되었으며, 최근 개발한 대상포진 단백질백신에서는 기존 생백신의 방어율이 50% 정도인데 비해 97%의 방어율을 보였다.



백신은 생백신과 사백신으로 나눌 수 있다. 사백신의 경우, 생백신과는 달리 바이러스나 박테리아 유래의 세포벽 성분이나 DNA 혹은 RNA 등의 강력한 면역유발물질이 거의 없기 때문에 자체의 항원만으로는 충분한 항체나 CTL 반응을 유발하지 못하게 된다. 이를 극복하기 위해서 사용하는 물질이 adjuvant 이다. 이러한 물질은 특히, 선천성면역을 자극하여 적응면역이 더 쉽게 활성화 되도록 한다. 일반적으로 이와 같이 선천성 면역력을 올려주는 물질을 어쥬번트라고 부른다.

현재까지 다양한 어쥬번트들이 연구되고 있으며, 이들의 상당수가 TLR의 ligand들이다. 이들은 현재 동물용 백신에서 다양하게 사용되고 있고 또한 많은 연구가 진행되고 있으나, 현재까지 TLR4 agonist의 adjuvant는 사용되고 있지 않으며 관련 연구도 보고되고 있지 않다. 현재 가장 안전하다고 알려진 것은 앞서 설명한 인간백신에 처음으로 허가된 유일한 TLR ligand인 MPLA라는 물질로 TLR4 agonist 이다. 아직 이유는 정확하지 않지만 TLR4 agonist, MPLA가 특히 안전한 이유는 MyD88 신호 대신에 TRIF 신호를 주로 이용하여 더 안전하게 면역력을 올릴 수 있기 때문이라고 해석되고 있다.

그러므로 면역조절소재를 개발하기 위해서는 TLR4 agonist를 개발하는 것이 현재로서는 가장 안전한 방법이라고 생각된다.

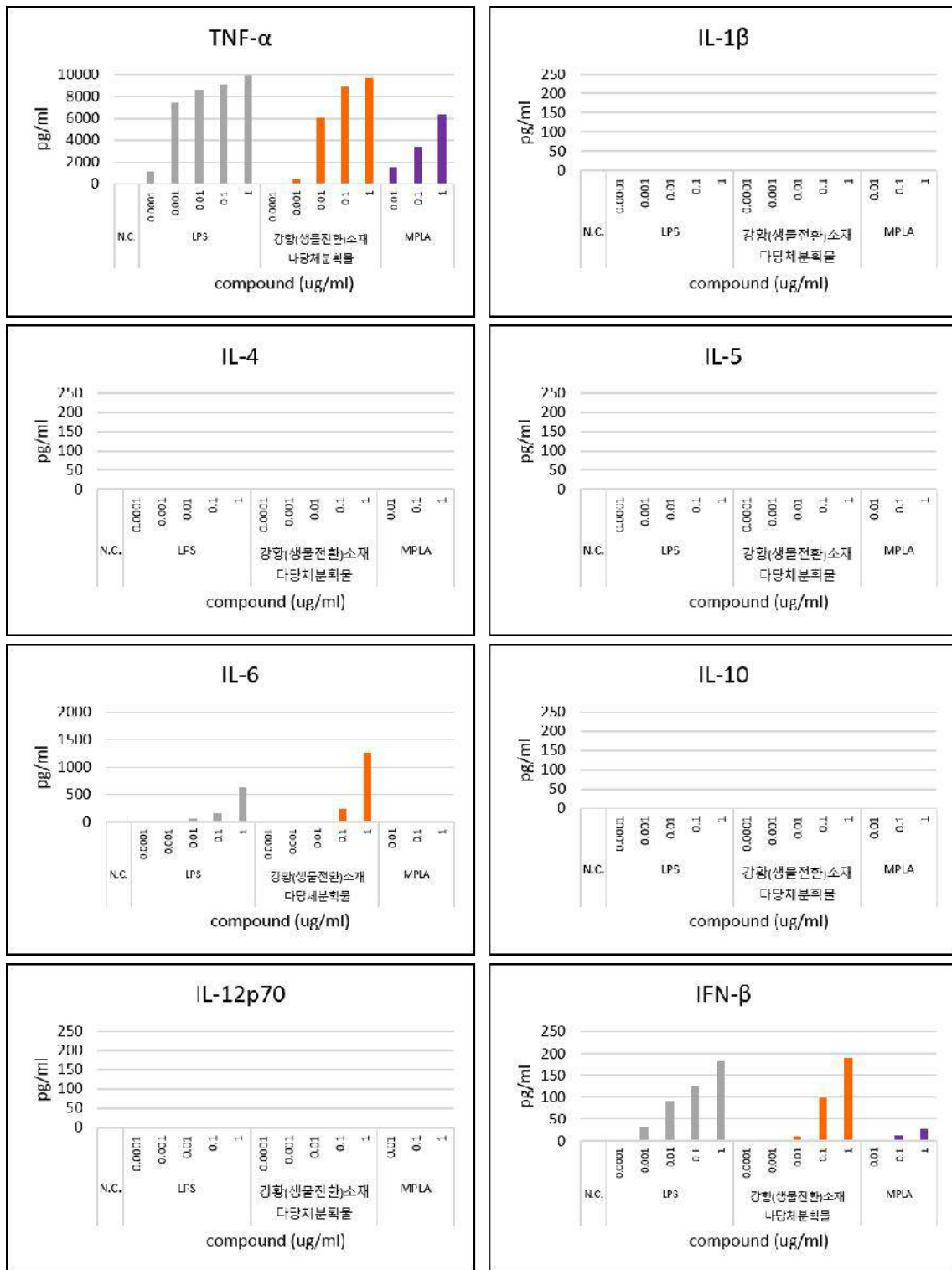


Figure 95. LPS, 강황(생물전환)산물 다당체분획물 및 MPLA의 cytokine 분비량 비교

3. 고도화 면역조절소재의 in vitro 실험계에서 살모넬라 감염 억제 기전 확인

고도화 면역조절소재로 선별된 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물의 살모넬라 감염 억제 기전을 확인하기 위하여, 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물이 갖는 대식세포 활성화 효과 및 미생물 감염 제어에 중요한 기능을 담당하는 autophagy 활성화 기전을 확인하였다. 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포주와 *Salmonella* Typhimurium SL1344 균주를 이용하여 대식세포의 살모넬라 감염을 유도하였으며, 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물을 농도별로 처리하여 대식세포의 활성화 및 autophagy 유도 효과를 측정하였다.

가. 고도화 면역조절소재의 농도별 대식세포 탐식능 활성화 평가

고도화 면역조절소재를 농도별로 처리하여 대식세포의 탐식능 활성화를 평가하였다. 24 well plate에서 1×10^5 cell의 대식세포에 면역조절소재의 원물과 생물전환산물을 농도별로 처리한 뒤, 1 MOI (1×10^5 cfu)의 SL1344를 1시간 처리하여 감염 및 탐식을 유도하였다. 탐식된 살모넬라의 수를 계수하여 원물과 생물전환산물이 갖는 탐식능을 측정하였다.

(1) 미강(생물전환)산물

미강 원물과 미강(생물전환)산물을 대식세포에 농도별로 처리하고 살모넬라 SL1344를 감염시킨 결과, 미강 원물을 처리한 대식세포는 탐식능 활성화를 보이지 않았으나 생물전환산물을 처리한 대식세포의 경우, 농도 의존적으로 탐식능이 증가하는 효과를 보였으며, 최대 농도로 처리한 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 대조군 대비 탐식능이 3.42배 증가하는 것으로 확인되었다.

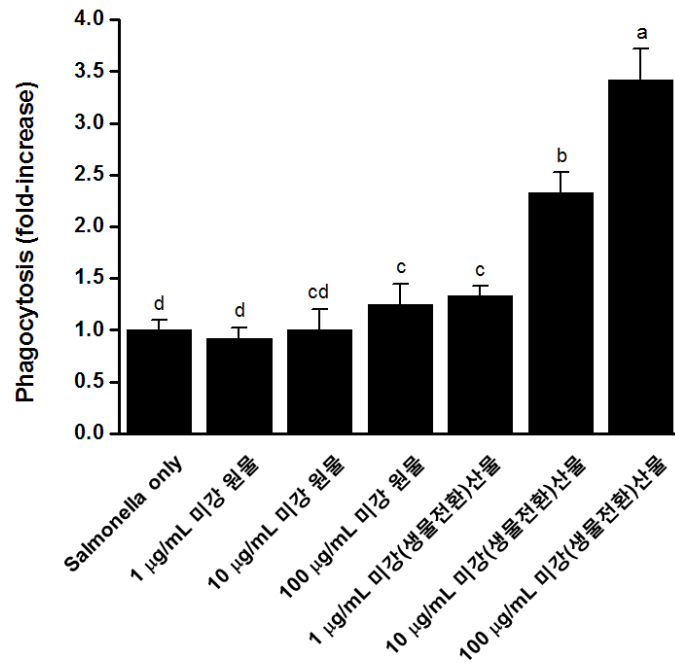


Figure 96. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 처리 시 대식세포의 탐식능 활성화 효과

(2) 강황(생물전환)산물

강황 원물과 강황(생물전환)산물을 농도별로 대식세포에 처리한 후 살모넬라 SL1344를 감염시켜 대식세포로의 탐식을 유도하였으며, 미강 소재와 마찬가지로 원물에서는 탐식능의 활성화 효과를 보이지 않았다. 강황(생물전환)산물을 처리한 경우 최대 농도인 100 μg /mL 농도에서 대조군 대비 3.69배의 탐식능 증가 활성을 보였으며 농도 의존적으로 탐식능의 증가가 유도되는 효과가 있음을 확인하였다.

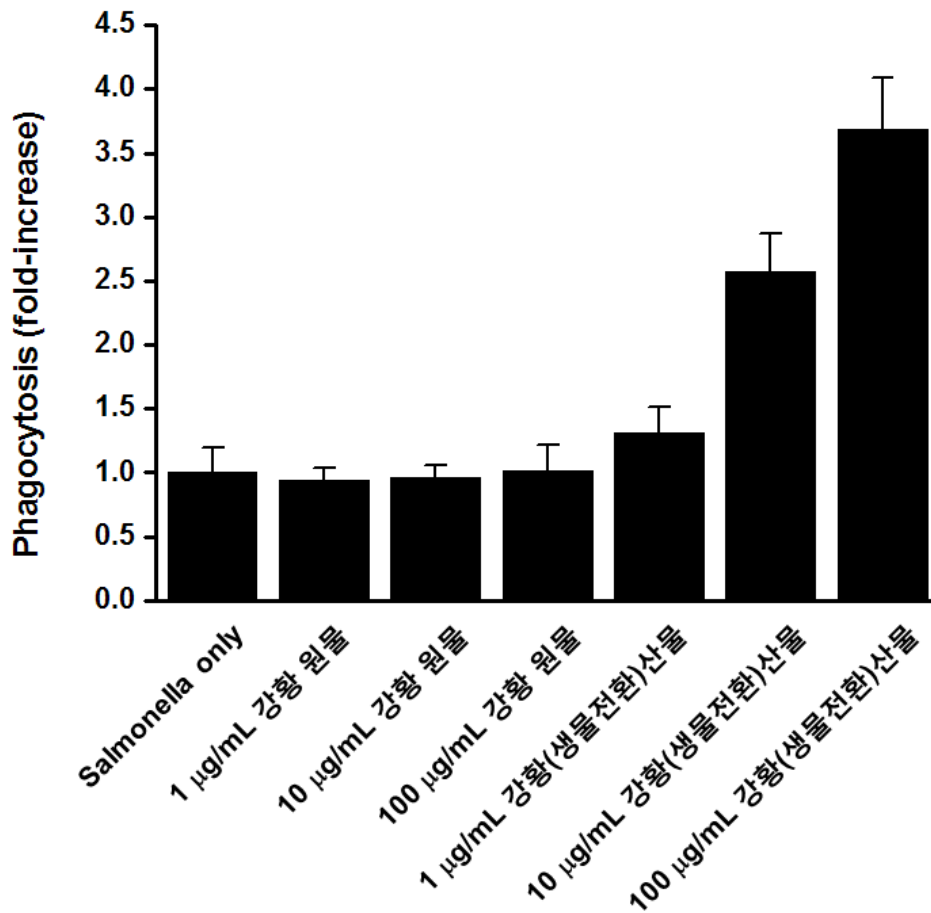


Figure 97. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물 처리 시 대식세포의 탐식능 활성화 효과

나. 고도화 면역조절소재의 농도별 대식세포 NO 생성 및 iNOS 활성화 평가

고도화 면역조절소재 처리 시 대식세포의 활성화 지표인 NO의 분비량 및 NO 생성을 유도하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 효과를 확인하였다. Griess 방법을 이용하여 NO의 분비량을 측정하였으며, 이 때 면역조절소재의 원물 및 생물전환산물이 세포 생존률에 미치는 효과를 MTT 방법을 이용하여 함께 평가하였다. 또한, RT-PCR 방법을 이용하여 iNOS mRNA 발현량을 확인하였으며, western blot을 통해 iNOS 단백질 발현량을 확인하였다.

(1) 미강(생물전환)산물

미강 원물 및 미강(생물전환)산물 처리 시 대식세포의 NO 생성 및 세포 생존률을 확인하였다. 1×10^5 cells/well의 농도로 96 well에 접종한 대식세포에 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 농도별로 처리하였고, 48시간 배양 후 NO의 생성과 세포 독성을 측정하였다. 원물과 생물전환산물 모두 모든 처리농도에서 세포독성을 보이지는 않았으며, 미강 원물의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 약간의 NO 분비가 유도되는 것으로 보이나 효과가 높지 않은 것으로 측정되었다. 반면, 생물전환산물의 경우 최저 농도인 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시에도 23.6 μM 의 높은 NO 분비량을 나타내었으며, 농도 의존적으로 NO 분비량이 증가하는 것으로 확인되었다. 1×10^6 cells의 대식세포에 1 MOI의 살모넬라와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 24시간 처리하여 iNOS의 mRNA와 단백질의 발현량을 확인한 결과, NO와 마찬가지로 원물 처리시에는 iNOS의 발현량 증가를 유도하지 못하였으나 생물전환산물 처리 시 iNOS의 발현이 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. 또한, 살모넬라 감염 시 더 많은 양의 iNOS가 발현되는 것으로 확인되어, 살모넬라 감염 시 대식세포 활성화를 더 강하게 유도하는 것으로 보인다.

Table 9. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 처리 시 대식세포의 NO 생성 및 세포 생존에 미치는 효과

Treatment		Nitrite (μM)	Cell Viability (%)
Vehicle		2.018 \pm 0.204	100.000 \pm 1.767
LPS		31.129 \pm 0.336	-
미강 원물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	1.796 \pm 0.204	102.317 \pm 2.810
	10	1.751 \pm 0.601	102.852 \pm 2.161
	100	6.907 \pm 0.667	102.674 \pm 2.884
미강 (생물전환)산물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	23.618 \pm 0.555	103.565 \pm 3.425
	10	34.373 \pm 1.155	102.460 \pm 1.721
	100	39.262 \pm 1.195	100.285 \pm 2.479

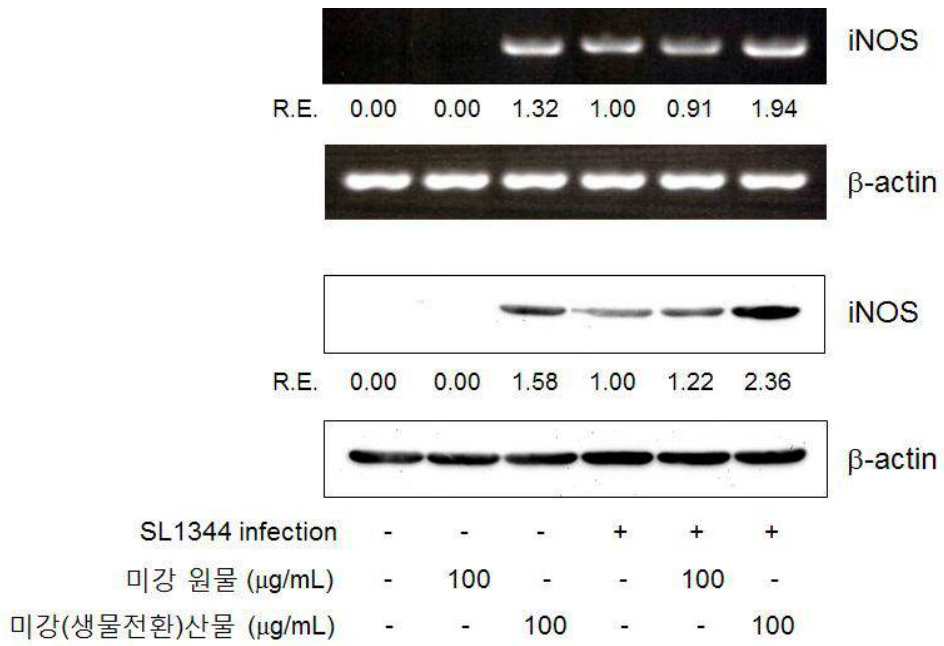


Figure 98. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 처리 시 iNOS mRNA 및 단백질 발현에 미치는 효과

(2) 강황(생물전환)산물

강황 원물 및 강황(생물전환)산물을 대식세포에 처리하여 NO 생성 및 세포 생존률을 확인하였다. 원물과 생물전환산물은 모두 대식세포의 생존률에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었으며, 생물전환산물의 경우 농도 의존적으로 NO 생성을 증가시키는 것으로 확인되었다. iNOS 단백질 발현량 역시 생물전환산물 처리 시 증가하는 것으로 확인되었고, 살모넬라 감염 시에는 더 많은 양의 iNOS 단백질이 발현되어 감염을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 10. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물 처리 시 대식세포의 NO 생성 및 세포 생존에 미치는 효과

Treatment		Nitrite (μM)	Cell Viability (%)
Vehicle		1.625 \pm 0.065	100.000 \pm 1.903
LPS		39.566 \pm 0.658	-
강황 원물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	2.787 \pm 0.045	100.000 \pm 5.832
	10	2.150 \pm 0.057	100.397 \pm 4.022
	100	4.578 \pm 0.184	98.823 \pm 5.278
강황 (생물전환)산물 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	22.884 \pm 1.468	97.669 \pm 3.221
	10	31.412 \pm 2.159	99.764 \pm 2.156
	100	42.648 \pm 2.382	100.231 \pm 6.346

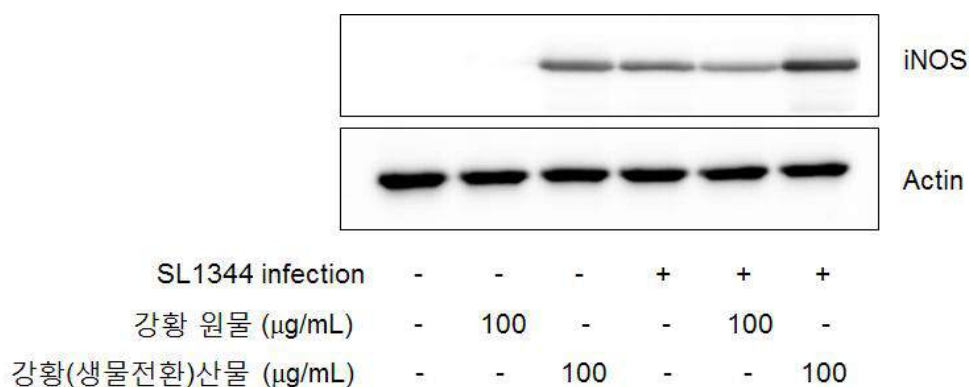


Figure 99. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물 처리 시 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과

다. 고도화 면역조절소재의 세포내 살모넬라 증식 억제에 기여하는 autophagy 관련 단백질 활성화 평가

고도화 면역조절소재가 세포 내 살모넬라 증식 억제에 기여하는 autophagy 관련 단백질 활성화에 미치는 효과를 확인하였다. 살모넬라 감염 시, 살모넬라에 의한 focal adhesion kinase (FAK)의 활성화는 세포 내 autophagy 반응을 억제하므로 autophagy 활성화의 회복 여부는 살모넬라 감염을 효과적으로 제어하는데 중요하다. 따라서, autophagosome 합성에 관여하는 단백질인 Atg 계열 단백질과 LC3, Beclin-1 단백질의 활성화를 western blot을 통해 확인하여 면역조절소재가 갖는 autophagy 유도 효과를 평가하였다.

(1) 미강(생물전환)산물

60mm cell culture dish에서 1×10^6 cells의 대식세포에 1 MOI의 살모넬라와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 미강 원물과 미강(생물전환)산물을 5시간 처리하여 대식세포의 autophagy 활성화 여부를 확인하였다. 그 결과, 살모넬라 감염 시 Atg 계열 단백질과 LC3, Beclin-1 모두 발현량이 감소하는 것으로 나타났으며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 생물전환산물 처리 시에는 autophagy 관련 단백질이 정상세포 수준, 혹은 그 이상으로 증가하는 것으로 확인되었다. 원물 처리 시에는 autophagy 관련 단백질의 활성화가 나타나지 않았다.

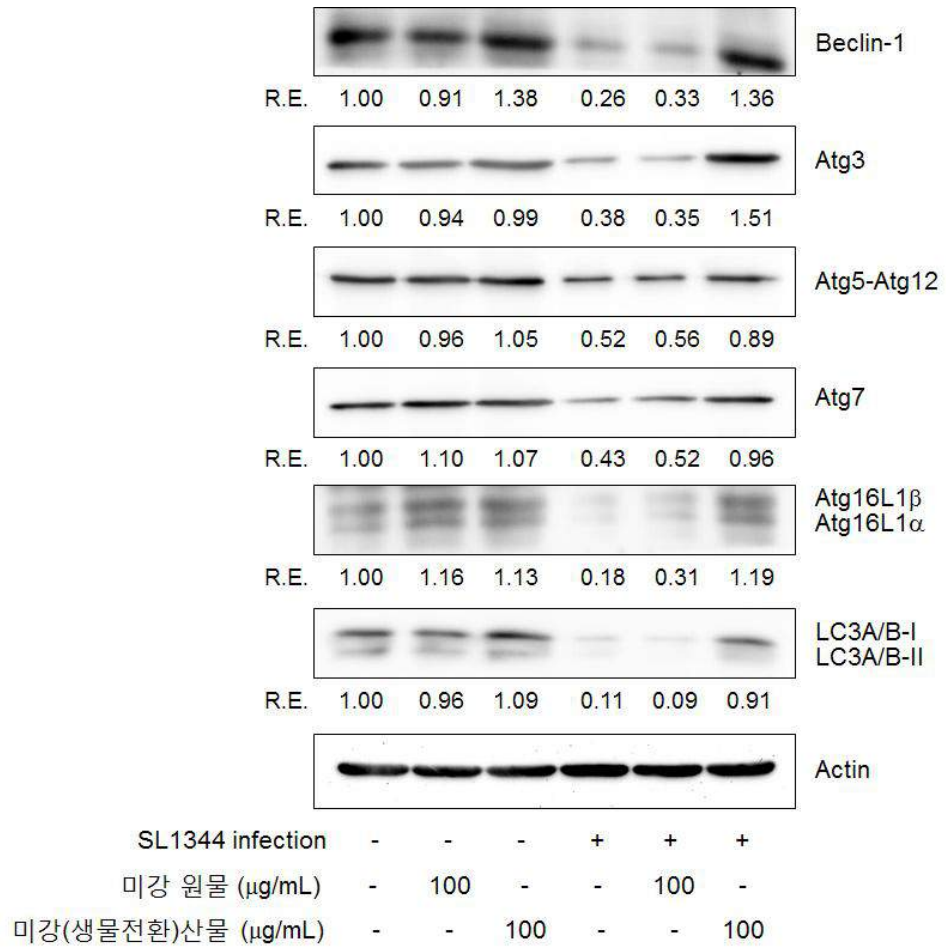


Figure 100. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물의 autophagy 관련 단백질 활성화 효과

(2) 강황(생물전환)산물

강황 원물과 강황(생물전환)산물 처리 시 autophagy 관련 단백질의 활성화를 확인하였다. 미강 소재의 경우와 마찬가지로 살모넬라 감염 시 autophagy 관련 단백질의 발현량이 급격히 감소하는 결과를 보였으며, 생물전환산물 처리 시에는 정상 수준으로 회복되는 것으로 확인되었다. 강황 소재 역시 원물에서는 효과를 보이지 않았다.

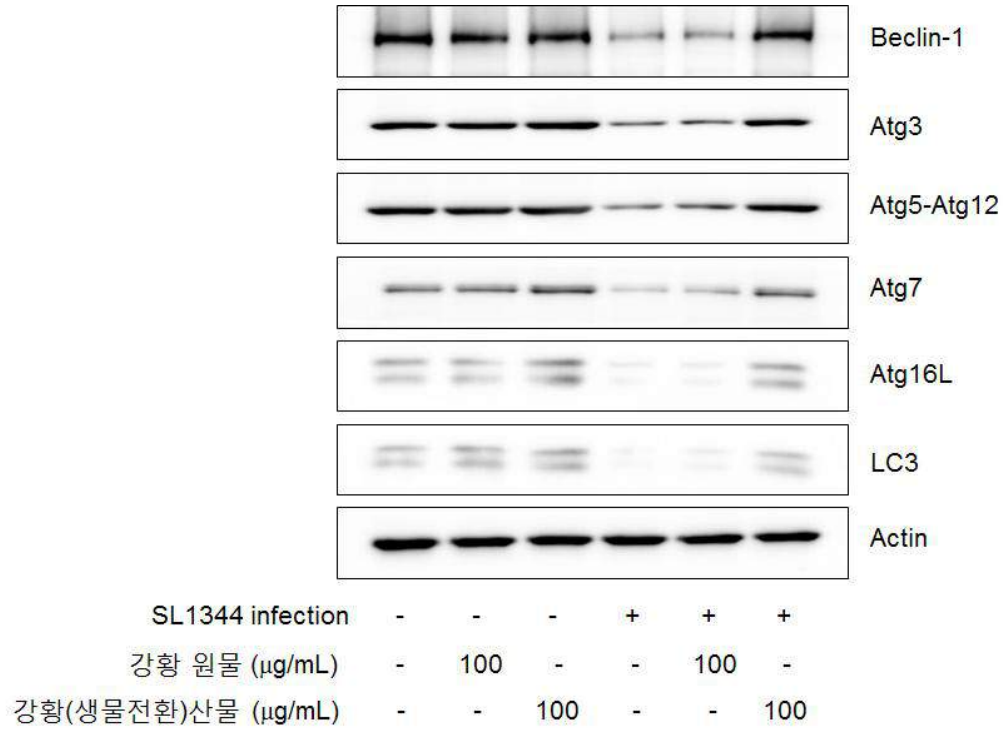


Figure 101. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물의 autophagy 관련 단백질 활성화 효과

라. 고도화 면역조절소재의 interferon 반응 활성화 평가

autophagosome의 활성화 및 autolysosome의 활성화 결과 일어나는 interferon 반응의 활성화 여부를 확인하였다. 살모넬라 감염은 autophagy의 억제를 유도하므로, 결국 TRIF 활성화에 의한 interferon 반응의 억제를 유발하게 된다. 위 결과에서, 생물전환산물의 처리가 autophagy 반응의 활성화를 유도함에 따라, 살모넬라 감염 시 IRF3의 활성화 여부를 western blot을 통해 확인하였으며 interferon- β 의 분비량을 ELISA방법을 통해 확인함으로써 면역조절소재가 갖는 interferon 반응 활성화 효과를 확인하였다.

(1) 미강(생물전환)산물

24 well plate에서 1×10^6 cells의 대식세포에 1 MOI의 살모넬라와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 미강 원물, 미강(생물전환)산물을 5시간 처리하여 미강 원물과 미강(생물전환)산물 처리 시 IRF3의 활성화 여부를 확인하였다. 그 결과, 살모넬라 감염 시 IRF3의 인산화가 정상수준보다 감소하는 것으로 확인되었으며, 미강(생물전환)산물 처리 시에는 살모넬라 감염 여부와 상관없이 IRF3의 인산화가 강하게 일어나는 것으로 확인되었다. 또한, 미강(생물전환)산물 처리 시 미감염 세포에서의 interferon- β 분비량이 급격히 증가하는 것으로 확인되었으며, 살모넬라 감염 세포에서 역시 interferon- β 가 비슷한 수준으로 분비되는 것으로 확인되었다.

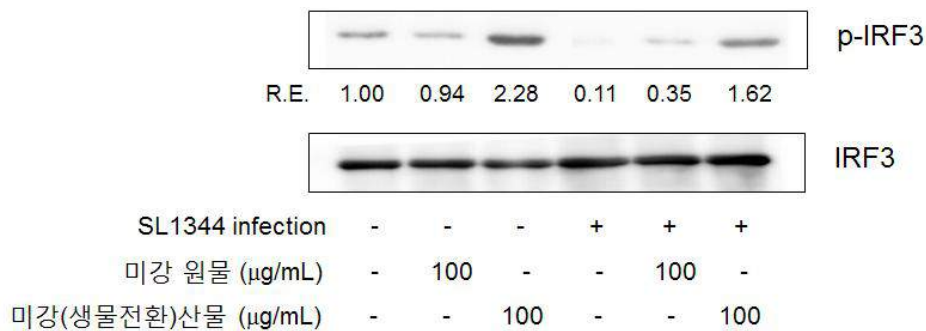


Figure 102. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 처리에 의한 IRF3 활성화 효과

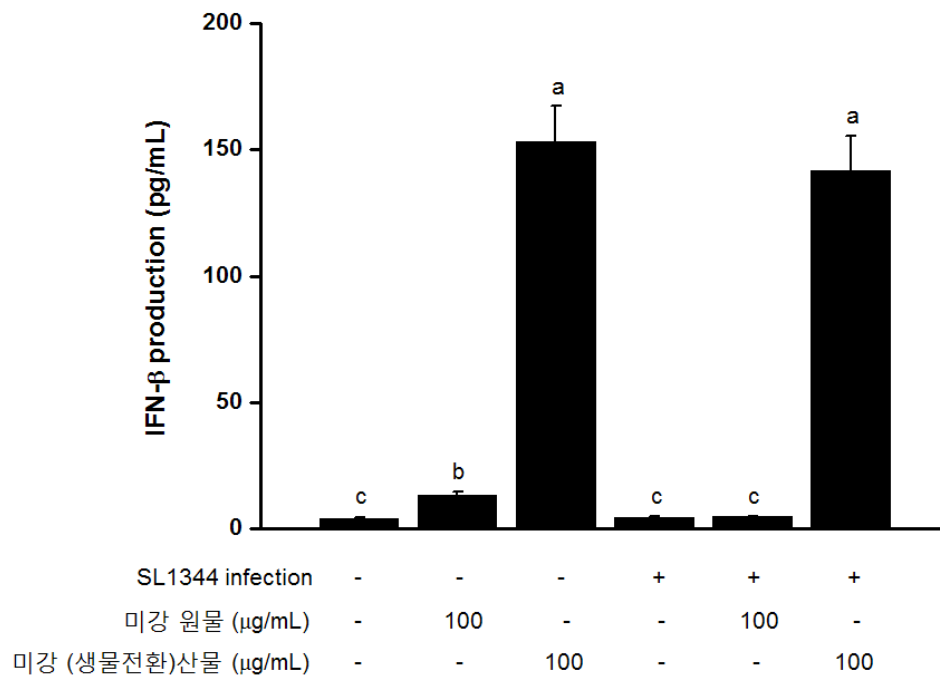


Figure 103. 미강 원물 및 미강(생물전환)산물 처리 시 interferon-β 생성 유도 효과

(2) 강황(생물전환)산물

강황 원물과 강황(생물전환)산물 처리 시 IRF3의 활성화 정도를 확인하였다. 강황(생물전환)산물 처리 시 살모넬라 감염에 의해 감소한 IRF3의 활성화가 회복되는 결과를 확인하였으며, 살모넬라가 감염되지 않은 상태에서도 강황(생물전환)산물의 처리에 의해 IRF3의 인산화가 강하게 유도되는 것으로 확인되었다. interferon- β 의 분비량을 측정한 결과 역시 강황(생물전환)산물 처리 시에는 살모넬라 감염 여부와 상관없이 interferon- β 의 생성을 강하게 유도하는 것으로 확인되었다.

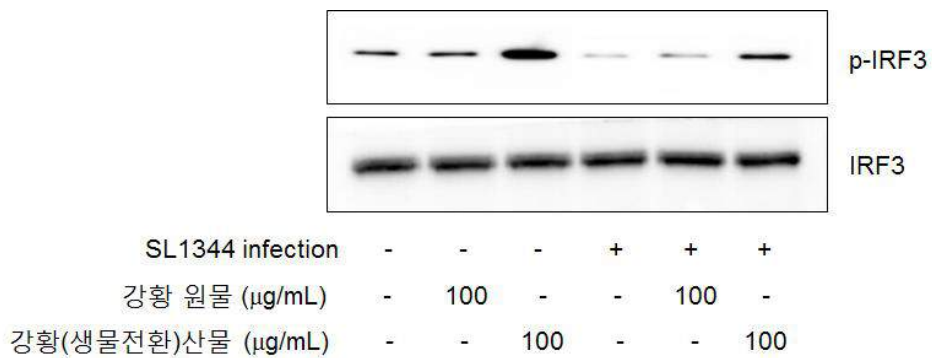


Figure 104. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물 처리에 의한 IRF3 활성화 효과

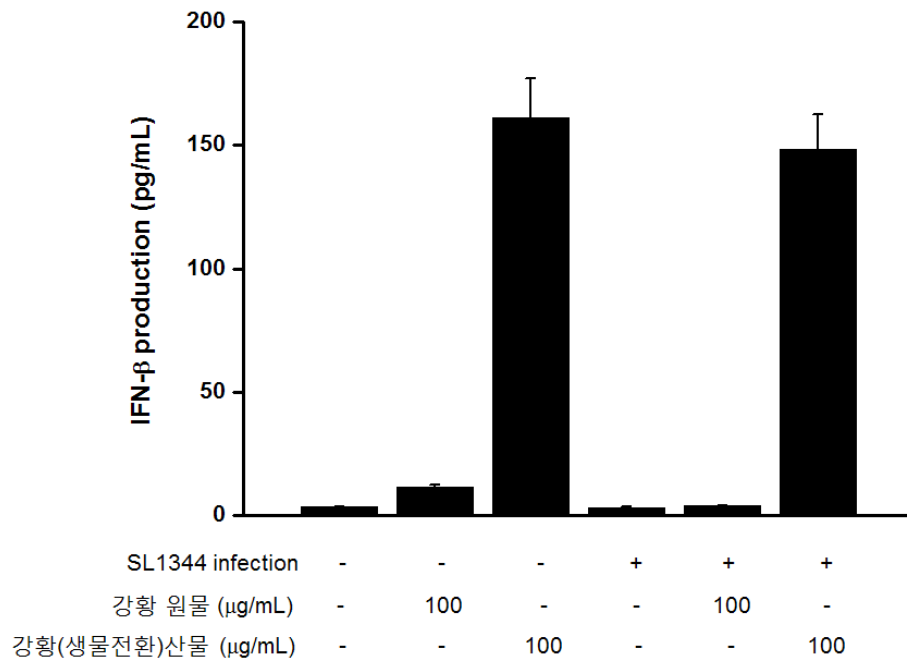


Figure 105. 강황 원물 및 강황(생물전환)산물 처리 시 interferon- β 생성 유도 효과

마. 고도화 면역조절소재의 in vitro 실험계에서 살모넬라 감염 억제 기전에 대한 실험적 의의

살모넬라는 세포 내 증식이 가능한 미생물으로써, 세포의 탐식작용에 의해 세포 내로 유입되거나 혹은 살모넬라가 갖는 자체적인 (T3SS 단백질과 같은 세포 내 침입 단백질을 이용한) 침투능에 의해 세포 내로 침입, 생존하게 된다. 따라서, 세포 외에 존재하는 살모넬라를 제어하는 것은 물론 세포 내 생존하는 살모넬라를 함께 제어하는 것이 필수적이다. 본 연구에 사용한 고도화 면역조절소재는 대식세포의 활성화를 유도하여 세포 내로의 살모넬라 탐식을 효과적으로 증가시키는 것으로 확인되었다. 또한 세포 내 살모넬라에 의해 억제된 autophagy 반응 및 interferon 반응을 효과적으로 회복시켜 세포 내 살모넬라의 생존 및 증식을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 이러한 반응은 다양한 세포 내 단백질과 살모넬라의 상호작용에 의한 것으로, 살모넬라 자체적으로 내성을 가질 수 없기에 살모넬라 감염에 대한 안전하고 효과적인 제어 방법이라 평가된다.

4. 왕겨초액의 살모넬라 성장 억제 기전 확인

직접적으로 강한 항균효과를 갖는 것으로 밝혀진 왕겨초액의 살모넬라 성장 억제 기전을 확인하였다. 특히, 왕겨초액은 살모넬라 균주 strain과 상관없이 넓은 스펙트럼의 항균효과를 보유함에 따라, 본 연구에서는 항생제 다제 내성 균주인 *Salmonella* Typhimurium CCARM8107 균주를 이용하여 다제 내성 살모넬라에 대한 항균활성과 성장 억제 기전을 함께 평가하였다.

가. Disc assay를 이용한 왕겨초액의 항균활성 검증

왕겨초액이 갖는 항균활성을 Disk assay를 통해 확인하였다. 1×10^8 cfu의 CCARM8107 균주를 MH plate에 spreading 한 후 왕겨초액이 0.1%, 0.5%, 1% 포함된 disk를 올리고 24시간 배양 후 clear zone을 관찰하였다. 그 결과, 왕겨초액은 농도 의존적으로 CCARM8107 균주에 대한 항균활성을 보였으며, 최대 농도인 1%에서 18mm의 clear zone을 보여, 우수한 항균력이 있는 것으로 평가되었다.

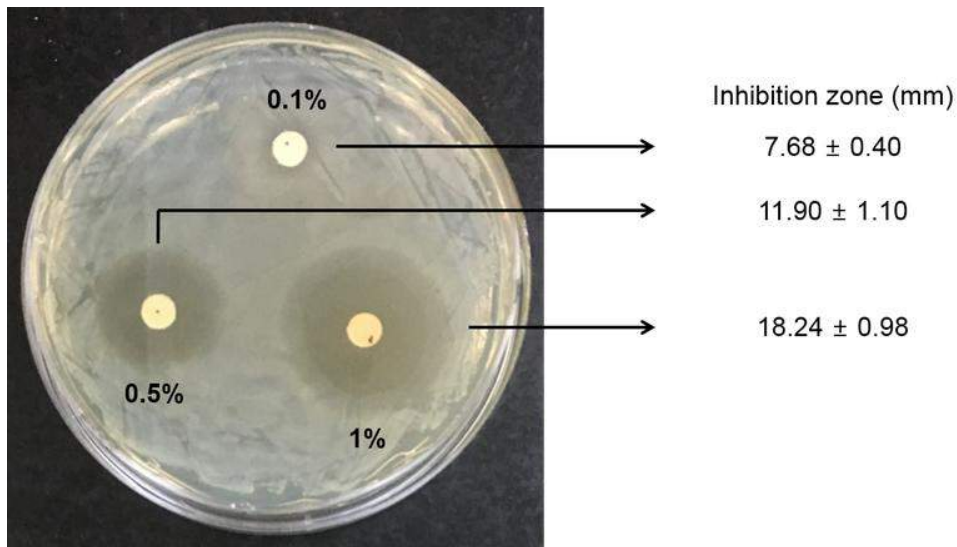


Figure 106. Disk assay를 이용한 왕겨초액의 항균활성 측정

나. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration ; MIC) 산출

CCARM8107 균주에 대한 왕겨초액의 MIC를 산출하였다. 15ml cornical tube에서 1×10^5 cfu의 CCARM8107 살모넬라 균주에 0.2%에서 1.6%까지의 왕겨초액을 처리하고 살모넬라의 생존률을 측정하여 계산한 결과, CCARM8107 균주에 대한 왕겨초액의 MIC는 1.29%로 계산되었다. 또한, 도출된 MIC를 이용하여 다양한 농도의 살모넬라에 대한 성장 억제능이 있는지 확인하였다. 10^4 cfu, 10^5 cfu, 10^6 cfu, 10^7 cfu의 살모넬라에 1%, 1.2%, 1.29%의 왕겨초액을 각각 처리한 뒤 살모넬라의 생존률을 확인한 결과, MIC 농도인 1.29%의 왕겨초액을 처리할 경우 살모넬라의 농도와 상관없이 모든 살모넬라가 사멸하는 것으로 확인되었다.

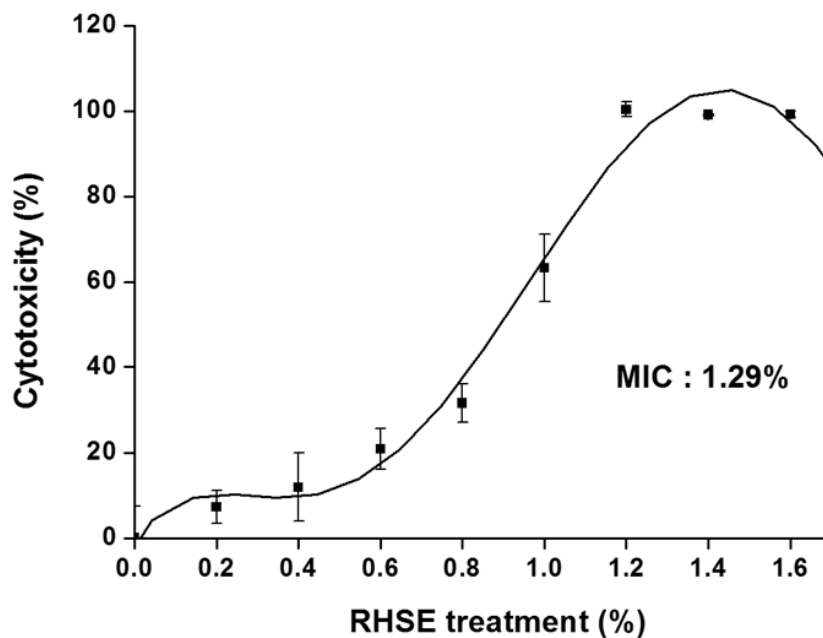


Figure 107. CCARM8107 균주에 대한 왕겨초액의 MIC 측정

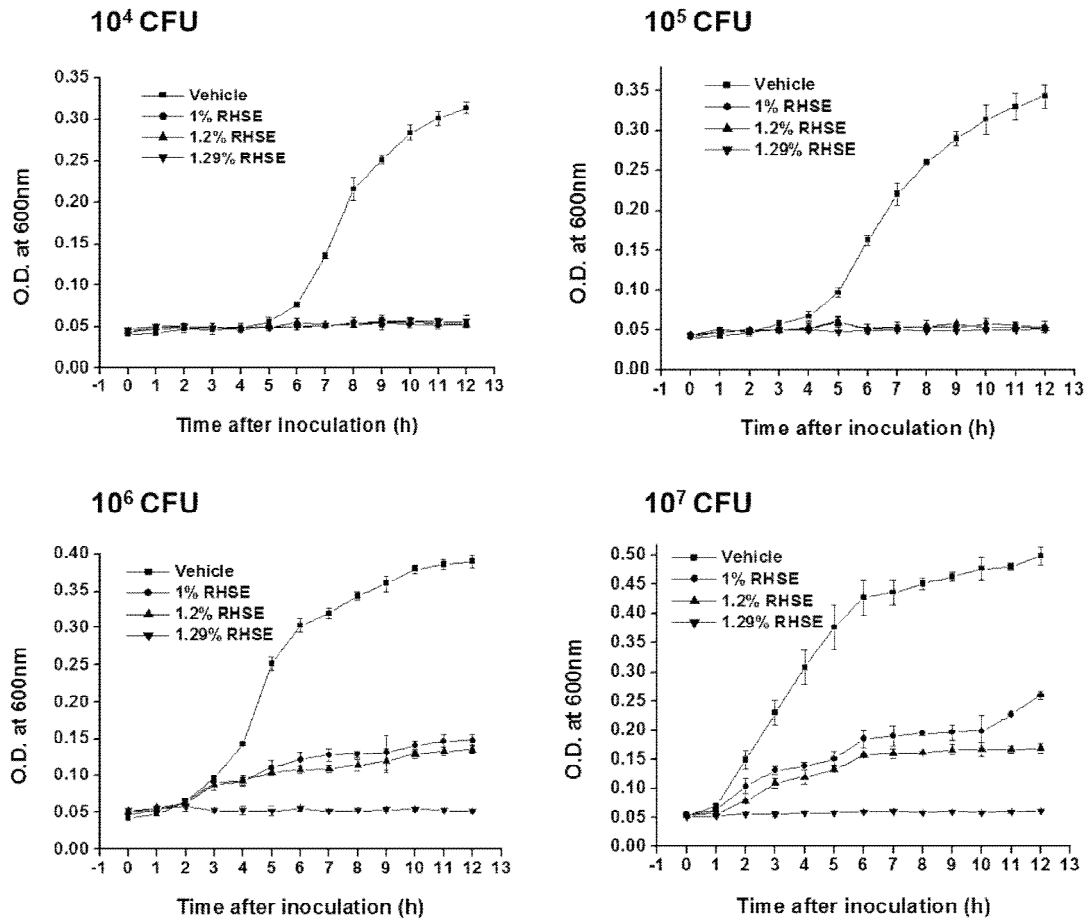


Figure 108. 농도별 살모넬라에 대한 왕겨초액의 MIC 검정

다. genomic DNA 및 세포 내 단백질에 미치는 효과 확인

살모넬라에 대한 왕겨초액의 항균활성 기전을 확인하기 위해, 15ml cornical tube에서 1×10^7 cfu의 CCARM8107 살모넬라 균주에 MIC 농도의 왕겨초액을 시간별로 처리하고 살모넬라의 genomic DNA와 단백질을 확인하였다. 그 결과, 최소 시간인 3시간 처리 시에도 살모넬라의 genomic DNA와 단백질이 검출되지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 왕겨초액 3시간 처리시에도 충분한 항균효과를 나타내어 세포의 사멸 및 세포막의 파괴가 일어나기 때문인 것으로 보인다.

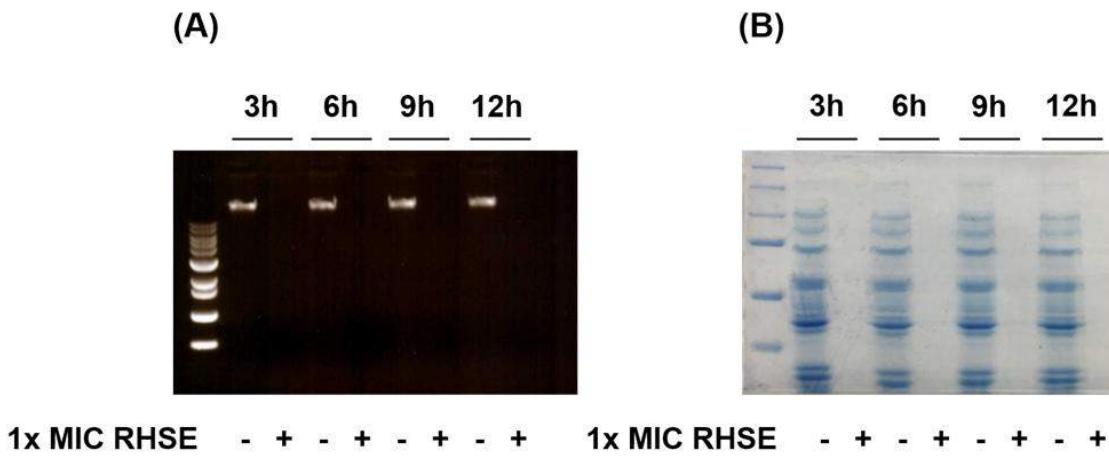


Figure 109. 왕겨초액 처리 시 살모넬라 내 DNA와 단백질 확인

라. Scanning Electron Microscopy를 이용한 살모넬라 형태 변화 확인

앞선 실험에서, 왕겨초액의 처리가 살모넬라 세포를 강하게 파괴함에 따라 15ml conical tube에서 1×10^7 cfu의 CCARM8107 살모넬라 균주에 왕겨초액을 처리한 후 살모넬라의 세포 표면을 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, 왕겨초액 처리 시 살모넬라의 세포막이 파괴되는 것으로 확인되었으며, 살모넬라 세포막 파괴에 대한 자세한 물리·화학적 기전은 이후 추가 연구를 통해 확인할 필요가 있다.

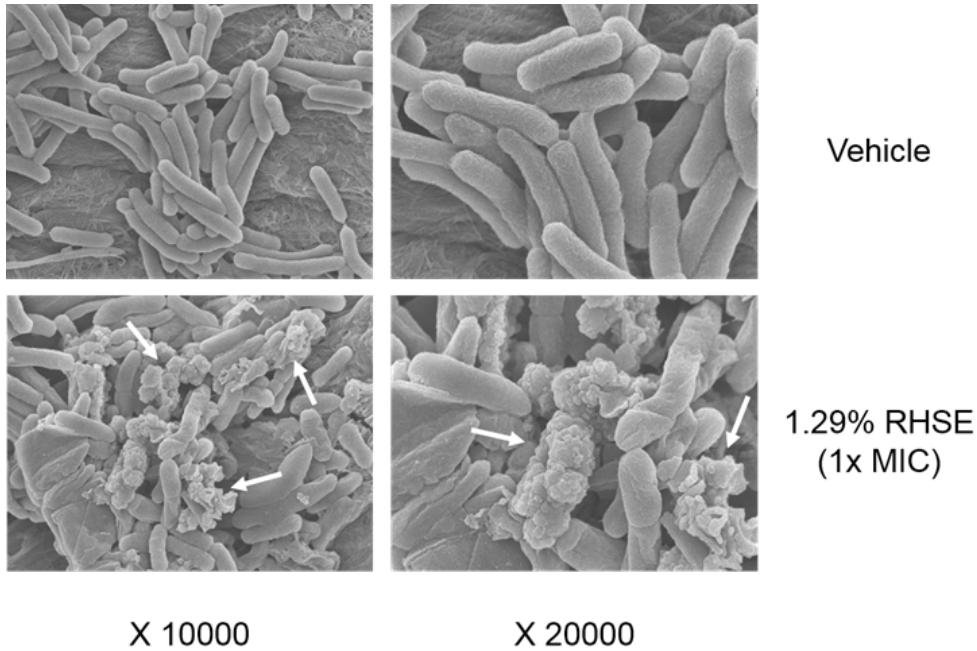


Figure 110. 왕겨초액 처리에 의한 살모넬라 세포 형태 변화 확인

마. 왕겨초액의 살모넬라 생장 억제 기전에 대한 실험적 의의

왕겨초액은 농산부산물인 왕겨를 탄화, 증류하여 얻어진 물질로서 항산화 및 항염증 활성이 뛰어남이 보고되어 있다. 또한, 본 연구를 통하여 다양한 살모넬라 strain에 대한 항균활성이 있음이 확인됨에 따라 살모넬라에 대한 생장 억제 기전을 확인하였다. 특히, 다양한 항생제에 대한 내성을 갖는 *Salmonella* Typhimurium CCARM8107 균주를 지시균주로 사용하여 왕겨초액의 항균활성을 확인함으로써 항생제 대체 물질로서 왕겨초액의 유효성을 평가하고자 하였다. 왕겨초액은 CCARM8107 균주에 대해 1.29%의 낮은 MIC 수치를 갖는 것으로 확인되었으며 MIC 농도에서 최대 10^7 cfu의 살모넬라 증식을 완벽히 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 살모넬라의 genomic DNA와 단백질을 확인한 결과, DNA와 단백질 모두 왕겨초액 처리군에서는 검출되지 않았고, 이는 살모넬라의 세포 파괴로 인해 DNA와 단백질이 회수되지 않은 것으로 보인다. 특정 DNA의 파괴 (exonuclease / endonuclease 활성) 나 특정 단백질의 활성화 또는 저해가 확인되지 않았기 때문에, 살모넬라 세포벽 형태변화를 전자현미경을 이용하여 확인하였고 왕겨초액 처리 시 세포벽의 파괴가 일어나는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 왕겨초액은 항생제 대체 물질 및 항균제, 또는 살균제로서의 충분한 유효성이 있을 것으로 판단된다. 다만, 왕겨초액이 넓은 스펙트럼의 항균활성 및 생리활성을 가지기 때문에 다른 유용 미생물 혹은 식물, 동물에 미치는 독성은 추가적으로 검증해야 할 필요가 있다.

4절. 시너지 효과를 낼 수 있는 면역조절소재 및 항균소재의 조합 도출을 위한 *in vitro* 효능 비교 평가

1. 선발된 소재의 *in vitro* 효능에 대한 개별소재별 *in vitro* 1차 평가

가. Caco-2 세포주에서 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입 억제에 미치는 개발소재의 효능 비교 평가

Caco-2 세포주를 이용하여 면역조절소재가 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입 억제효능을 *in vitro* 실험계에서 평가하기 위하여 사람 유래 대장암 세포주인 Caco-2 세포주를 사용하였다. 미강(생물전환)산물, 강황(생물전환)산물, 왕겨초액과 프로바이오틱스소재를 처리한 Caco-2 세포주에 경구투여 시 체내 감염을 일으키는 SL1344 살모넬라 균주를 감염시키고 Caco-2 세포내로 침투된 살모넬라의 양을 측정하였으며, 미강(생물전환)산물, 강황(생물전환)산물, 왕겨초액과 프로바이오틱스소재는 살모넬라 감염 전 처리 및 감염과 동시처리하여 효과를 비교하였다.

(1) 미강(생물전환)산물

100 μ g/mL 농도의 미강(생물전환)산물을 24 well plate에서 5x10⁵ cell의 Caco-2 세포주에 4시간 전처리 또는 100 MOI의 살모넬라와 동시처리한 후 세포 내로 침투한 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 4시간 전처리의 경우에 10.7%의 살모넬라 침투 억제능을 보였으며 동시처리의 경우 58.4%의 살모넬라 침투 억제능을 보였다. 미강(생물전환)산물의 경우 직접적인 항균활성이 없으므로 이러한 살모넬라 침투 억제 효과는 Caco-2 대장세포에 직접 작용하여 살모넬라의 침투를 억제하는 것으로 보인다. 살모넬라의 세포 내 침투를 억제하는 물질의 경우 다당류 또는 당단백류인 경우가 많아 본 효과 역시 미강(생물전환)산물에 존재하는 당질 또는 당단백질의 효과인 것으로 추측된다.

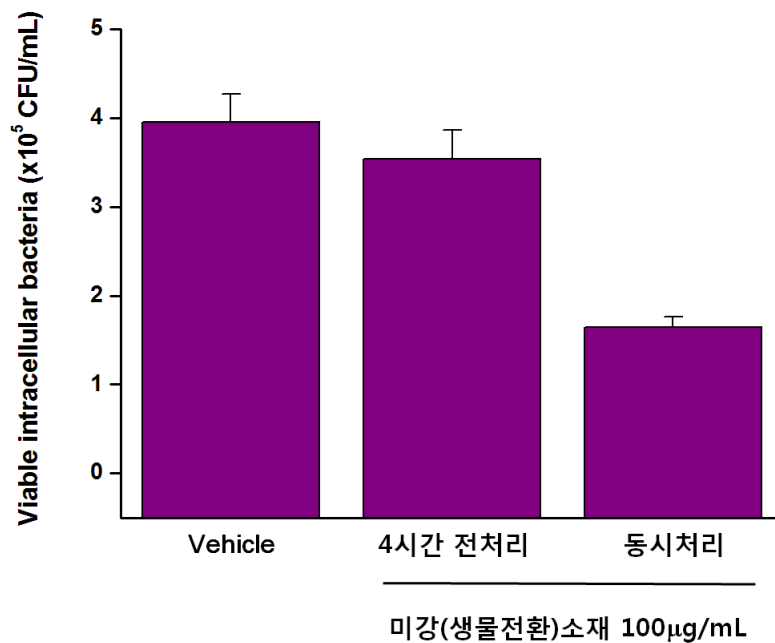


Figure 111. Caco-2 세포주를 이용한 미강(생물전환)산물의 장관세포 내 침투 억제 활성 측정

(2) 강황(생물전환)산물

100 μ g/mL 농도의 강황(생물전환)산물을 24 well plate에서 5×10^5 cell의 Caco-2 세포주에 4시간 전처리 또는 100 MOI의 살모넬라와 동시처리한 후 세포 내로 침투한 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 미강(생물전환)산물과 유사하게 4시간 전처리의 경우에 9.5%의 살모넬라 침투 억제능을 보였으며 동시처리의 경우 64.3%의 살모넬라 침투 억제능을 보였다. 강황(생물전환)산물 역시 직접적인 항균활성이 없으므로 이러한 살모넬라 침투 억제 효과는 Caco-2 대장세포에 직접 작용하여 살모넬라의 침투를 억제하는 것으로 보인다.

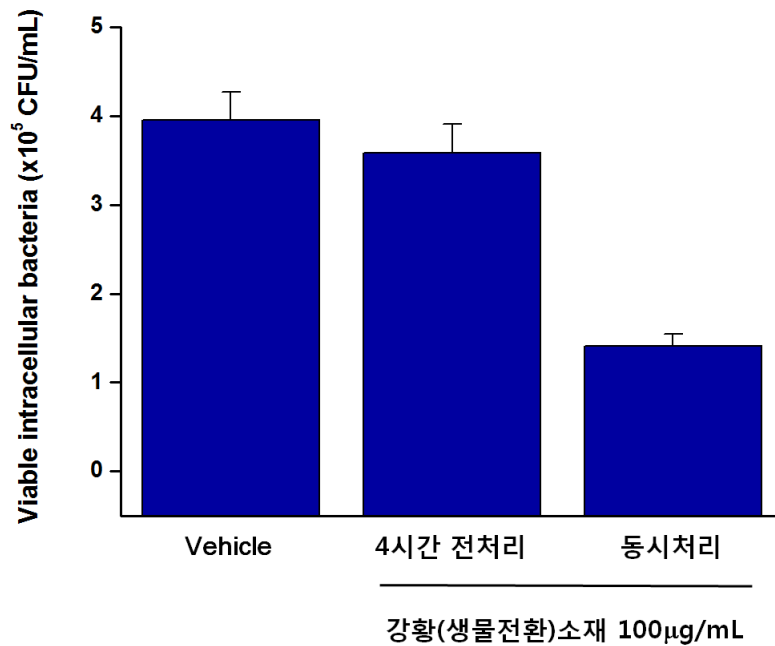


Figure 112. Caco-2 세포주를 이용한 강황(생물전환)산물의 장관 조직 내 침투 억제 활성 측정

(3) 왕겨초액

Caco-2 세포주에 0.5% 왕겨초액을 24 well plate에서 5×10^5 cell의 Caco-2 세포주에 4시간 전처리 또는 100 MOI의 SL1344 균주와 동시 처리하여 SL1344 살모넬라균의 Caco-2 세포 내 침투를 억제할 수 있는지 확인하였다. 살모넬라 감염 1시간 후 세포를 용해하여 세포 내 침투된 살모넬라의 수를 측정한 결과, 왕겨초액을 4시간 전처리 한 경우에는 세포 내 침투를 억제하지 못하는 것으로 확인되었다. 반면에 왕겨초액을 살모넬라와 동시 처리한 경우에는 세포 내로 침투되는 살모넬라의 양이 대부분 감소하는 것으로 나타났지만, 이는 왕겨초액이 갖는 항균활성 때문인 것으로 보이며 대장암 세포주에 작용하여 살모넬라의 침투를 억제하는 효과는 없는 것으로 확인되었다.

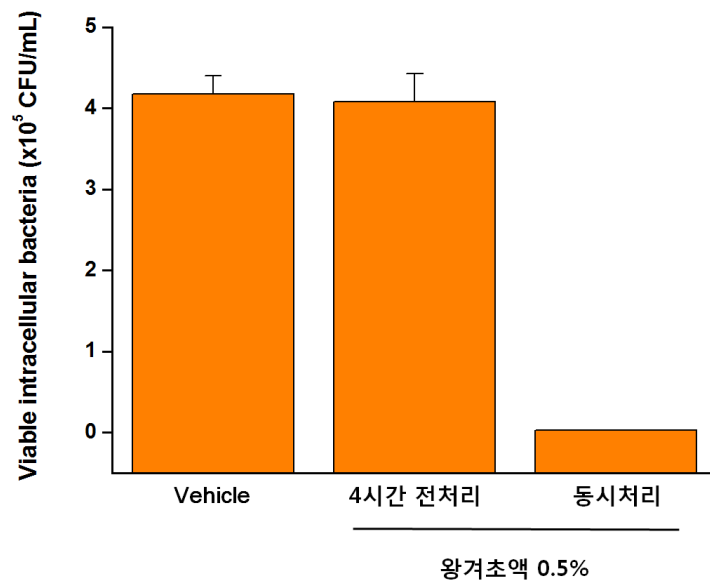


Figure 113. Caco-2 세포주를 이용한 왕겨초액의 장관 조직 내 침투 억제활성 측정

(4) 프로바이오틱스

24 well plate에서 5×10^5 cell의 Caco-2 세포주에 프로바이오틱스소재인 바실러스소재 와 유산균소재를 4시간 전처리 또는 100 MOI의 SL1344 균주와 동시 처리하여 살모넬라의 세포 내 침투 억제능을 확인하였으며, 프로바이오틱스소재의 처리는 살모넬라의 처리농도와 동일한 5×10^7 cfu 농도로 사용하였다. 그 결과, 바실러스소재와 유산균소재 모두 4시간 전처리 시에는 침투 억제 효과가 없는 것으로 확인되었으며, 동시 처리시에는 세포 내의 살모넬라가 급격히 줄어드는 것으로 보이지만 이러한 결과는 왕겨초액과 마찬가지로 세포 밖에 존재하는 바실러스 및 유산균의 살모넬라에 대한 항균활성 때문인 것으로 보인다.

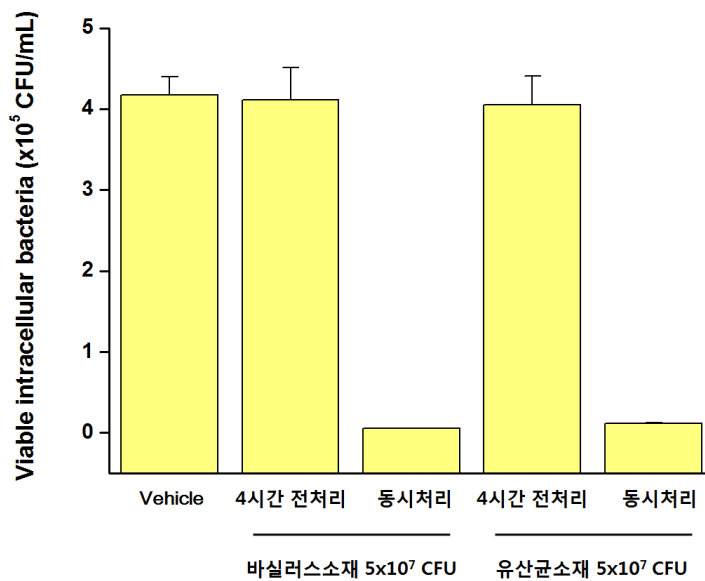


Figure 114. Caco-2 세포주를 이용한 프로바이오틱스소재의 장관 조직 내 침투 억제활성 측정

나. 대식세포의 살모넬라 탐식능 향상에 미치는 면역조절소재의 효능 비교 평가

살모넬라 감염에 대해 '장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 소재'로서 면역조절소재인 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물의 살모넬라 억제 효능을 평가하였다. 면역조절소재는 살모넬라에 대해 직접적인 항균활성은 없으나 면역반응의 활성화를 강하게 유도하는 물질로서, 면역반응의 활성화 및 장관세포로의 살모넬라 침투 억제를 통하여 감염미생물을 제거할 수 있는지 평가하였다.

(1) 미강(생물전환)산물

'장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 소재'로서의 미강(생물전환)산물의 효과를 확인하기 위하여 대식세포의 활성화를 통한 살모넬라 탐식능의 증가량을 확인하였다. 실험에 사용한 살모넬라 균주는 ATCC14028로 24 well plate에서 1×10^4 cells의 대식세포에 미강(생물전환)산물을 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리한 뒤 1 MOI의 살모넬라를 30분, 60분간 감염시킨 결과, 살모넬라 30분 감염시에 미강(생물전환)산물의 처리로 인한 탐식능의 증가가 최대 16.8% 까지 증가함을 확인하였고 살모넬라 60분 감염시에는 최대 46.4% 까지 증가함을 확인하였다.

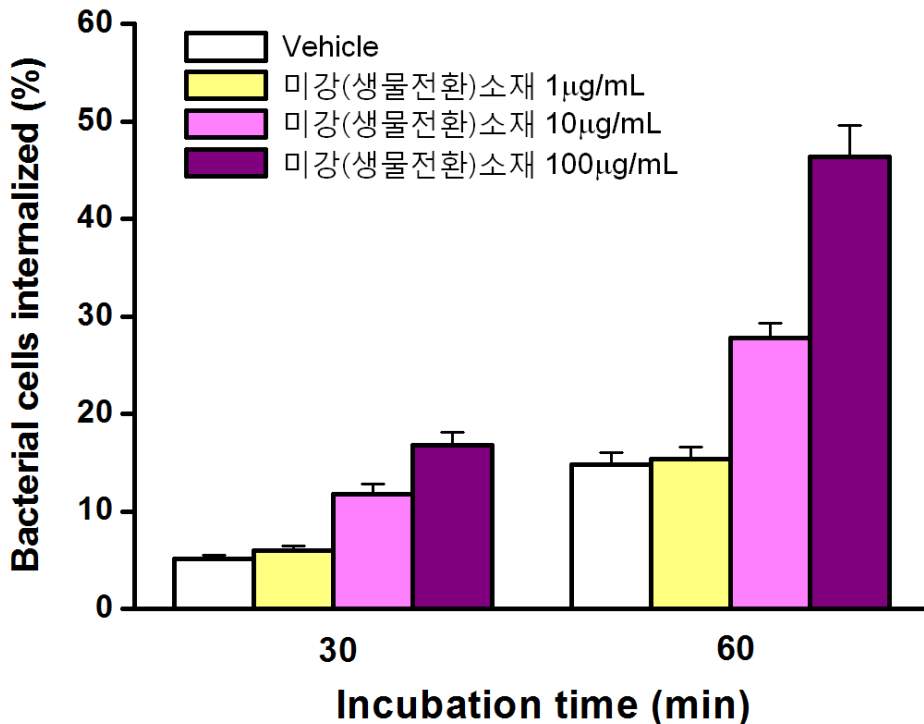


Figure 115. 농도별 미강(생물전환)산물이 대식세포의 살모넬라 탐식능에 미치는 효과

(2) 강황(생물전환)산물

'장관 상피세포막 통과 이후 단계에서 살모넬라 대응이 가능한 **고도화된 소재**' 로서의 강황(생물전환)산물의 효과를 확인하기 위하여 대식세포의 활성화를 통한 살모넬라 탐식능의 증가량을 확인하였다. 미강(생물전환)산물과 마찬가지로 **24 well plate**에서 1×10^4 cells의 대식세포에 강황(생물전환)산물을 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 4시간동안 처리하고 살모넬라 ATCC14028 균주를 1 MOI의 농도로 30분, 60분간 감염시킨 결과, 살모넬라 30분 감염시에 강황(생물전환)산물의 처리로 인한 탐식능의 증가가 최대 18.3% 까지 증가함을 확인하였고 살모넬라 60분 감염시에는 최대 50.3% 까지 증가함을 확인하였다.

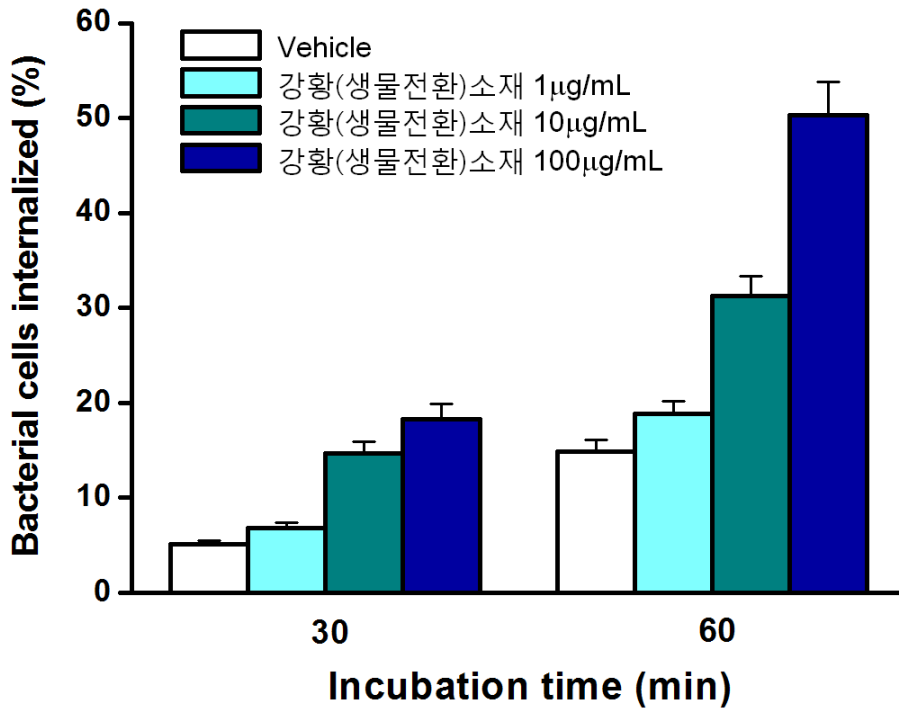


Figure 116. 농도별 강황(생물전환)산물이 대식세포의 살모넬라 탐식능에 미치는 효과

다. 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 향상에 미치는 면역조절소재의 효능 비교 평가

(1) 미강(생물전환)산물

대식세포의 포식작용에 의해 세포 내로 들어간 살모넬라는 세포 내 증식이 가능하기 때문에, 미강(생물전환)산물의 처리가 autophagy의 활성화를 통해 대식세포 내에 존재하는 살모넬라의 세포 내 증식을 억제할 수 있는지 확인하였다. 미강(생물전환)산물을 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 24 well plate에서 1×10^4 cell의 대식세포에 4시간 동안 처리하여 활성화 시킨 후, 살모넬라 ATCC14028 균주를 1 MOI의 농도로 2시간, 4시간, 8시간 동안 감염시켜 포식 및 세포 내 증식이 일어나게 하였다. 이후 세포 내에 생존하는 살모넬라의 수를 측정된 결과, 2시간 배양시에는 포식된 살모넬라의 양이 많아짐에 따라 대조군에 비해 세포 내 살모넬라가 많은 것으로 나타났으며, 시간이 지날수록 세포 내 존재하는 미생물의 수가 감소함을 확인하였으며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 미강(생물전환)산물을 처리하고 살모넬라 감염 후 최대 8시간 경과시 세포 내 존재하는 살모넬라는 대조군에 비하여 크게 억제됨을 확인하였다.

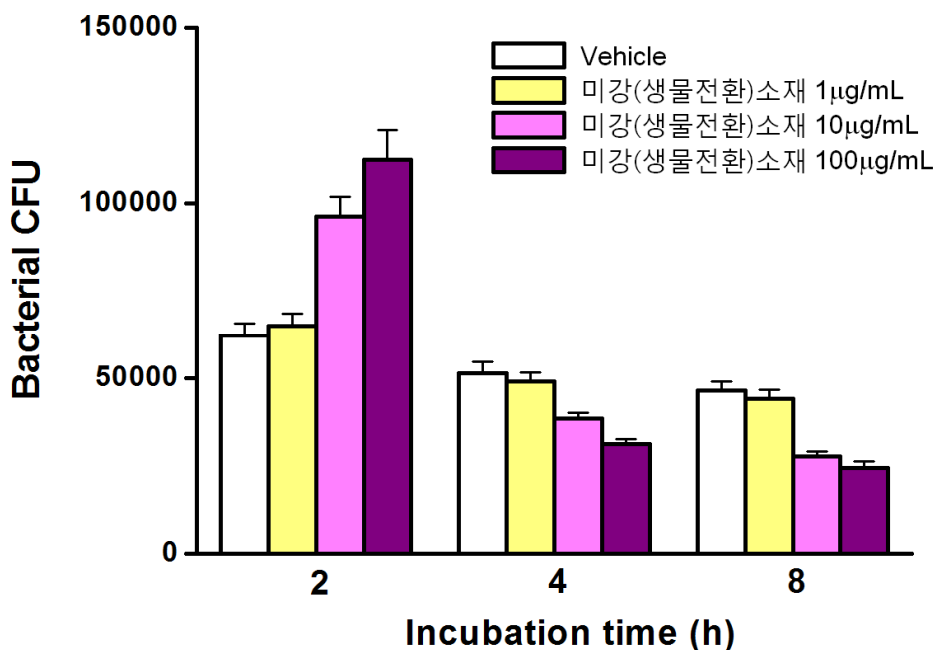


Figure 117. 농도별 미강(생물전환)산물이 대식세포의 살모넬라 세포 내 증식 억제에 미치는 효과

(2) 강황(생물전환)산물

미강(생물전환)산물과 마찬가지로 강황(생물전환)산물의 살모넬라 세포 내 증식 억제 효과를 확인하였다. 강황(생물전환)산물 역시 살모넬라 ATCC14028 균주 감염 후 2시간까지는 포식되는 살모넬라의 증가로 인해 세포 내 살모넬라가 증가하는 결과를 보였으며, 시간이 지날수록 세포 내 살모넬라의 양이 급격히 감소하는 결과를 나타냈다. 100 μ g/mL의 강황(생물전환)산물을 처리하고 살모넬라 감염 후 8시간 경과시에는 대조군에 비하여 매우 크게 살모넬라가 억제됨이 확인되어 포식작용의 활성화 및 세포 내 증식 억제에서도 강황(생물전환)산물이 미강(생물전환)산물보다 뛰어난이 확인되었다.

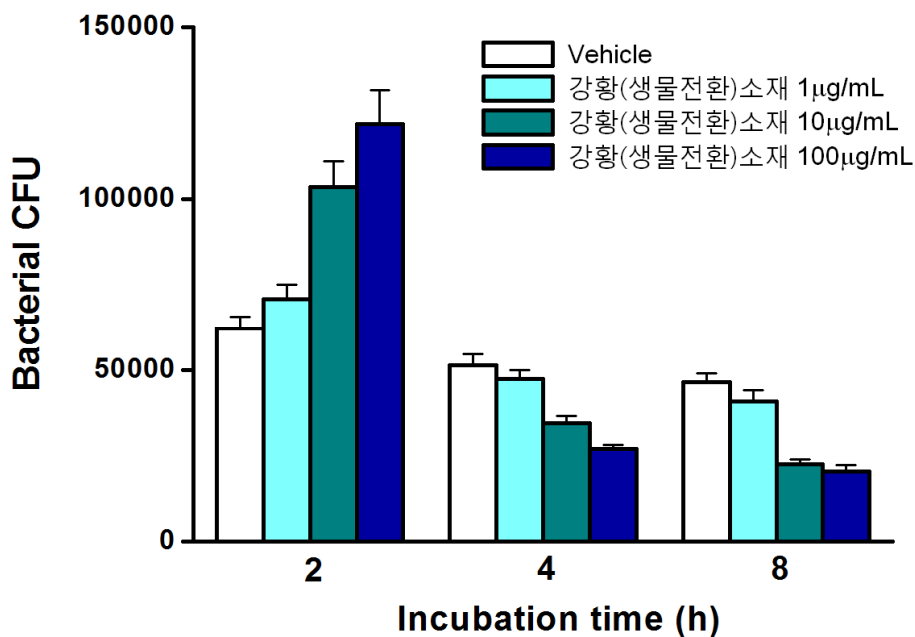


Figure 118. 농도별 강황(생물전환)산물이 대식세포의 살모넬라 세포 내 증식 억제에 미치는 효과

라. 면역조절소재 및 항균소재의 in vitro 1차 평가에 대한 실험적 의의

면역조절소재와 항균소재가 갖는 감염 억제 효과를 장관세포인 Caco-2 세포주와 RAW264.7 대식세포주를 이용하여 평가하였다. 면역조절소재의 경우, Caco-2 장관세포로의 살모넬라 침투를 억제하는 효과를 보였으며 살모넬라와의 동시처리에 비해 효과는 낮았지만 4시간 전처리의 경우에도 약간의 감염 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 효과는 면역조절소재의 성분 중 포함된 당질 또는 당단백질이 장관세포의 수용체에 결합하거나 혹은 세포질 내로 유입되어, 이후 감염되는 살모넬라에 대한 억제 효과를 갖기 때문인 것으로 생각되며, 면역조절소재의 지속적인 투여 시에는 살모넬라 감염에 대한 예방 효과를 가질 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 면역조절소재의 경우 대식세포의 강력한 활성화를 유도하여 살모넬라의 세포 내로의 침투 및 포식을 강하게 유도하는 것으로 확인되었고, autophagy의 활성화를 통해 포식된 살모넬라에 대한 효과적인 제거를 유도하는 것으로 확인되었다. 항균소재로 평가한 바실러스소재와 유산균소재, 왕겨초액의 경우 Caco-2 세포주에 대한 살모넬라 감염 억제 활성을 보였으나, 동시처리의 경우에만 감염 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 4시간 전처리 시에는 세 소재 모두 활성을 갖지 않는 것으로 보아, 세포의 수용체를 통한 신호전달이나 세포질 내에서의 활성은 없는 것으로 평가되며, 살모넬라와의 동시처리 시 각 소재가 갖는 직접적인 항균활성을 통해 세포 내로 침투되는 살모넬라의 수를 줄일 수 있는 것으로 판단된다. 따라서, 항균소재의 경우 예방효과는 없으나 살모넬라 감염 시 치료 효과를 기대할 수 있는 항생제 대체 물질로 개발 가능할 것이라 평가된다.

2. 고도화 면역조절소재, 강황(생물전환)산물의 농도에 따른 효능 비교 *in vitro* 2차 평가

앞선 연구 결과를 토대로 선발한 살모넬라 저감제의 *in vitro* 효능 평가를 수행하였다. 고도화된 면역소재로서 강황(생물전환)산물을 선발하였고, 25, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세 농도에서 살모넬라 억제에 대한 *in vitro* 효능을 평가하였다.

가. 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입 억제에 미치는 강황(생물전환)산물의 농도별 효능 비교 평가

Caco-2 대장암 세포주를 이용하여 살모넬라의 장관세포 점착 및 침입에 대한 강황(생물전환)산물의 억제 효능을 평가하였다. 마우스 특이적인 장관 내 감염을 일으키는 *Salmonella* Typhimurium SL1344 균주를 이용하였으며, 각 농도의 강황(생물전환)산물을 살모넬라의 감염과 동시에 처리하여 세포 내로 침투된 살모넬라의 생균수를 콜로니 계수법으로 측정하였다.

24 well plate에서 5×10^7 cfu의 살모넬라를 5×10^5 cells의 Caco-2 세포주에 감염시킴과 동시에 25, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 강황(생물전환)산물을 처리하여 살모넬라의 장관세포 내 침입을 억제할 수 있는지 확인하였다. 살모넬라 감염 후 세포를 용해하여 세포 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정한 결과, 농도가 높아질수록 세포 내 생존하는 살모넬라의 수가 감소하는 효과를 보였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도와 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 효과의 차이가 크지 않은 것으로 확인되었다. 1차년도 연구에서, 강황(생물전환)산물은 직접적인 항균활성이 없는 것으로 확인되었기 때문에, 이러한 살모넬라 억제 효과는 강황(생물전환)산물이 살모넬라의 세포 내 침투를 억제하기 때문인 것으로 생각된다.

		Viable intracellular bacteria ($\times 10^5$ cfu/g)
	Vehicle	4.018 \pm 0.351
강황(생물전환)산물	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3.031 \pm 0.248
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.483 \pm 0.120
	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.005 \pm 0.053

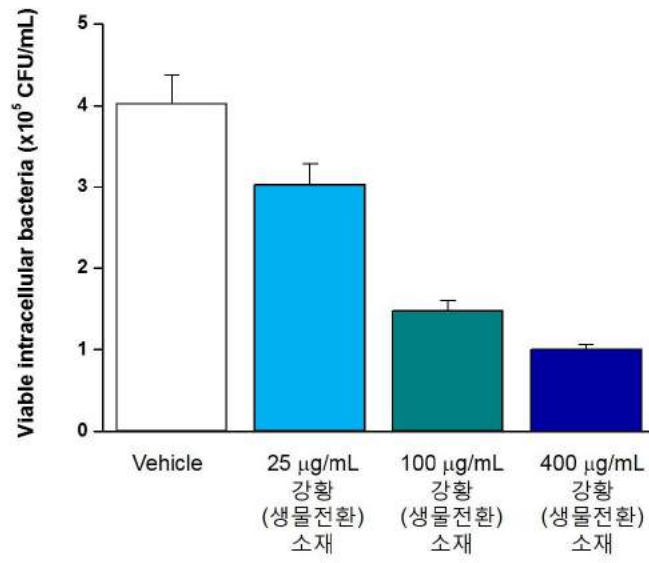


Figure 119. Caco-2 세포주를 이용한 강황(생물전환)산물의 장관 조직 내 침투 억제 활성 평가

나. 대식세포의 살모넬라 탐식능 향상에 미치는 강황(생물전환)산물의 농도별 효능 비교 평가

강황(생물전환)산물의 대식세포 활성화를 통한 살모넬라 탐식 유도 효과를 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포주를 이용해 확인하였다. 24 well plate에서 1×10^4 cells의 대식세포주에 강황(생물전환)산물을 농도별로 4시간 동안 처리하여 대식세포의 활성화를 유도한 후, 1 MOI의 살모넬라를 30분, 60분간 감염시키고 대식세포 내 포식된 살모넬라의 양을 측정하여 강황(생물전환)산물이 살모넬라의 탐식에 미치는 효과를 평가하였다.

강황(생물전환)산물을 25, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후, 살모넬라를 감염시켜 탐식능의 변화를 확인하였다. 30분 감염시에는 농도별 각각 3.2배, 4.2배 6.1배의 살모넬라 탐식 증가가 일어났으며 60분 감염시에는 각각 2.3배, 3.9배, 5.3배의 살모넬라 탐식 증가가 일어난 것으로 확인되었다. 강황(생물전환)산물 처리 시 최대 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지 농도의존적으로 탐식 활성의 증가를 일으키는 것으로 나타났으며, 활성화의 정도가 뛰어난 것으로 확인되었다. 또한, 60분 감염시에 나타나는 탐식능의 증가량에 비해 30분 감염시에는 보다 많은 탐식능의 증가량이 나타나는 것으로 확인되어 빠른 시간 내에 대식세포의 활성화를 강하게 유도할 수 있는 소재인 것으로 평가된다.

		Bacterial cells internalized (%)	
		30 min	60 min
강황(생물전환)산물	Vehicle	4.826 ± 0.389	14.209 ± 1.206
	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15.206 ± 1.428	32.209 ± 2.725
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20.306 ± 1.593	55.217 ± 4.206
	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$	29.214 ± 2.216	75.225 ± 5.651

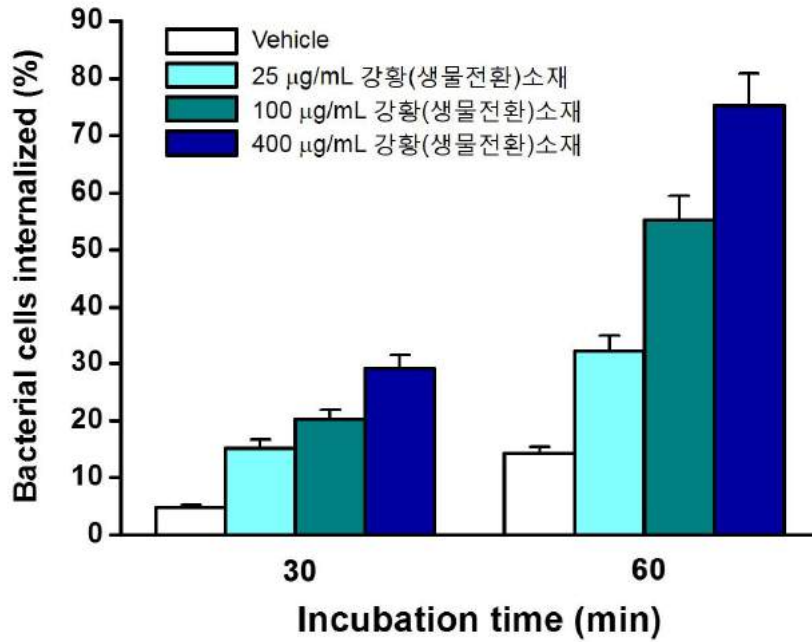


Figure 120. 농도별 강황(생물전환)산물이 대식세포의 살모넬라 탐식능에 미치는 효과

다. 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 향상에 미치는 강황(생물전환)산물의 농도별 효능 비교 평가

대식세포 내에서 증식이 가능한 살모넬라에 대하여 강황(생물전환)산물이 갖는 대식세포 내 증식 억제 활성화 효과를 평가하였다. 농도별 강황(생물전환)산물을 24 well plate에서 1×10^4 cells의 대식세포에 4시간 처리하여 활성화를 유도한 후, 1 MOI의 살모넬라 균주를 2, 4, 8시간 동안 감염시켜 탐식 및 세포 내 증식이 일어나게 하였다. 이후 대식세포 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하여 강황(생물전환)산물의 대식세포 내 증식 억제 효과 즉, 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 활성화를 확인하였다.

강황(생물전환)산물을 25, 100, 400 µg/mL 농도로 처리한 후, 살모넬라를 감염시켜 탐식 및 세포 내 증식을 유도하였다. 이후 세포를 용해하여 세포 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정한 결과, 2시간 감염시에는 농도가 높아짐에 따라 탐식되는 살모넬라의 수가 증가하여 세포 내 존재하는 살모넬라의 양이 많아지는 것으로 나타났으며, 4시간 이후로는 세포 내 증식 억제 작용에 의해 생존하는 살모넬라의 양이 급격히 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 이러한 효과는 탐식작용과 마찬가지로 농도 의존적으로 증가하여, 세포 내 증식을 억제할 수 있는 것으로 확인되었으며, 탐식작용 활성화, 세포 내 증식 억제 (탐식 후 살해능) 활성화와 같은 대식세포 활성화의 경우 400 µg/mL 농도까지도 효과의 포화 없이 증가하는 결과를 확인하였다.

	Bacterial cfu		
	2 h	4 h	8 h
Vehicle	60219 ± 3514	51693 ± 3208	44281 ± 2634
강황(생물전환)산물	25 µg/mL	88312 ± 5627	41282 ± 3371
	100 µg/mL	130524 ± 9925	32712 ± 1542
	400 µg/mL	151249 ± 10534	28424 ± 2014

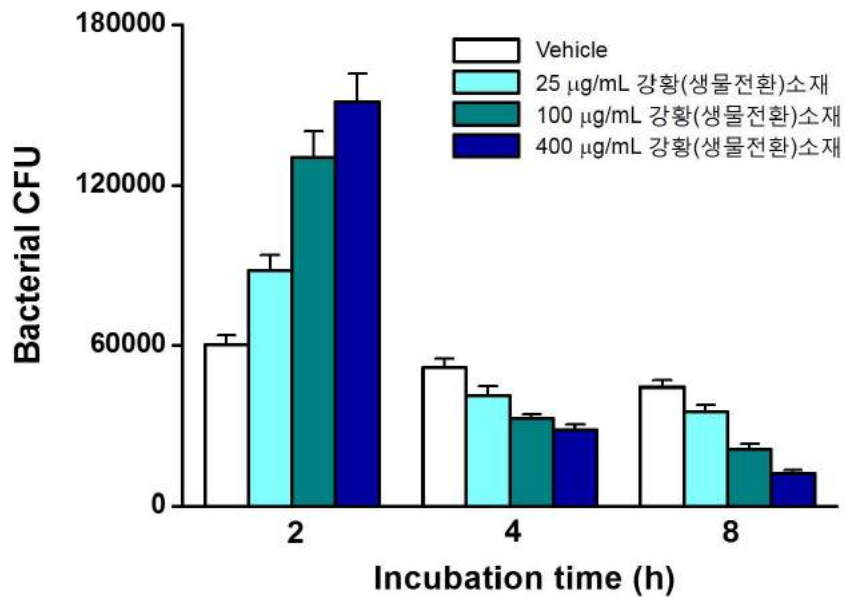


Figure 121. 농도별 강황(생물전환)산물이 대식세포의 살모넬라 세포 내 증식 억제에 미치는 효과

라. 강황(생물전환)산물의 농도에 따른 효능비교 in vitro 2차 평가에 대한 실험적 의의

면역조절소재의 *in vitro* 1차 평가 시 최대농도로 설정한 100 µg/mL 농도까지 살모넬라의 감염 억제 효능이 포화되지 않았기 때문에, 최대농도를 400 µg/mL로 설정하여 *in vitro* 2차 효능 평가를 수행하였다. Caco-2 장관세포주에 살모넬라 감염 시 강황(생물전환)산물을 농도별로 처리하여 장관세포 내 살모넬라의 침투 억제 효과를 확인하였고, 농도의존적으로 살모넬라의 감염을 억제하는 효과를 확인하였다. 다만, 100 µg/mL과 400 µg/mL 농도에서의 효과 차이는 크지 않은 것으로 확인되었다. 또한 대식세포주에서의 살모넬라 감염 억제 효과를 측정된 결과, 살모넬라에 대한 탐식 효과 및 세포 내 살해 효과 모두 농도의존적으로 효과가 증가하는 것이 확인되었으며 최대농도인 400 µg/mL 까지도 효과가 포화되지 않는 것으로 확인되었다. 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때, 살모넬라의 장관 침투 억제 효과는 100 µg/mL 농도에서 최대 효율을 가지며, 대식세포의 활성화는 400 µg/mL 이상까지도 활성의 증가가 계속 일어나고 있는 것을 확인할 수 있었다.

3. 선발된 소재의 in vitro 효능에 있어서 면역조절소재 및 항균소재의 복합제제에서의 시너지 효과 평가

가. 복합제제의 장관 점착 및 침입 억제 효과 비교

Caco-2 대장암 세포주를 이용하여 살모넬라의 장관 점착 및 침입 억제 효과를 비교하였으며, 앞선 실험 결과를 근거로 하여 살모넬라 감염과 동시 처리 후 결과를 비교하였다.

(1) 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제

24 well plate에서 100µg/mL의 면역조절소재와 0.5%의 왕겨초액을 함께 처리하여 Caco-2 세포주에서 살모넬라의 장관 점착 및 침입 억제 효과를 측정하였다. 그 결과, 왕겨초액의 단독 처리 시 항균효과에 의한 세포 내 생존 살모넬라의 양보다 더 적은 양의 살모넬라가 측정되었으며 이러한 결과는 1차적인 왕겨초액의 항균효과 이후 생존한 살모넬라의 세포 내 침입이 면역조절소재에 의하여 억제된 것으로 보인다. 따라서, 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제 사용은 장관 조직 침투 전 살모넬라에 대한 효과적인 항균작용과 함께 생존한 살모넬라의 장관조직 내 침투 억제를 효과적으로 할 수 있을 것으로 추측된다.

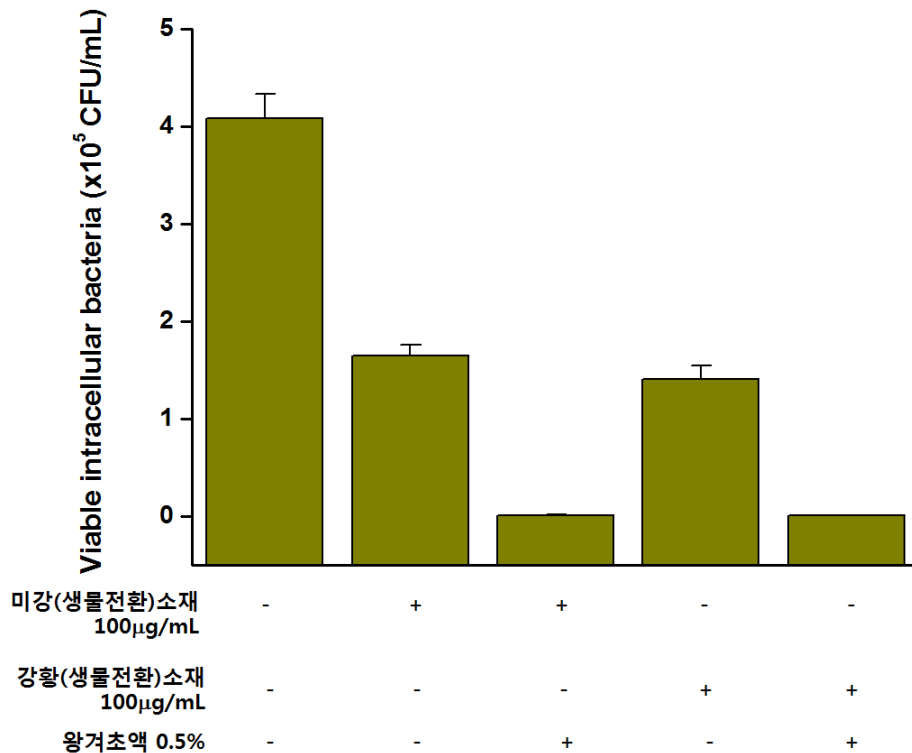


Figure 122. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제 처리시 살모넬라의 Caco-2 세포 내 침투에 미치는 효과

(2) 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합제제

24 well plate에서 100µg/mL의 면역조절소재와 5x10⁷ cfu 의 프로바이오틱스소재를 함께 처리하여 Caco-2 세포주에서 살모넬라의 장관 점착 및 침입 억제 효과를 측정하였다. 그 결과, 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제와 마찬가지로 단독 처리에 비하여 복합제제 처리의 경우 세포 내로 침투된 살모넬라의 양이 더 감소하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 앞선 결과와 같이 프로바이오틱스소재에 의한 1차적인 항균효과 이후 생존한 살모넬라의 세포 내 침입이 면역조절소재에 의하여 억제된 것으로 보인다. 따라서, 면역조절소재와 프로바이오틱스소재 복합제제 사용은 장관 조직 침투 전 살모넬라에 대한 효과적인 항균작용과 함께 생존한 살모넬라의 장관 조직 내 침투 억제를 효과적으로 할 수 있을 것으로 추측된다.

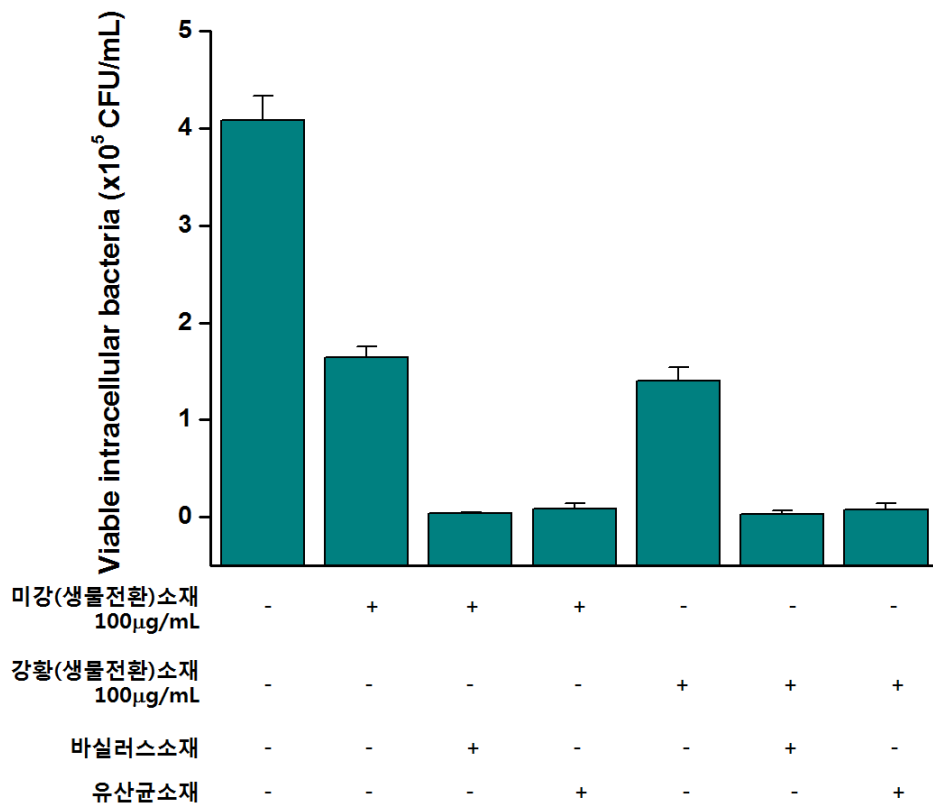


Figure 123. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 프로바이오틱스소재의 복합제제 처리시 살모넬라의 Caco-2 세포 내 침투에 미치는 효과

나. 복합제제가 대식세포의 살모넬라 탐식능 향상에 미치는 효과 비교

RAW264.7 대식세포주를 이용하여 살모넬라에 대한 탐식능 활성화 효과를 비교하였으며, 대식세포의 탐식작용이 포화되는 시점인 감염 후 1시간을 기준으로 효과를 비교하였다.

(1) 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제

24 well plate에서 100µg/mL의 면역조절소재와 0.5% 왕겨초액을 함께 처리하여 RAW264.7 대식세포주에서 살모넬라의 탐식능을 향상시킬 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 미강(생물전환)산물의 단독 처리 시 46.4% 였던 탐식능력이 29.5%로 감소하는 것으로 확인되었으며, 강황(생물전환)산물 역시 50.3%에서 31.7%로 감소하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 왕겨초액이 갖는 염증반응 억제 활성화에 의한 것으로 보이며, 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제의 경우 면역조절소재에 의해 유도된 면역반응 활성화를 왕겨초액이 감소시키는 것으로 생각된다.

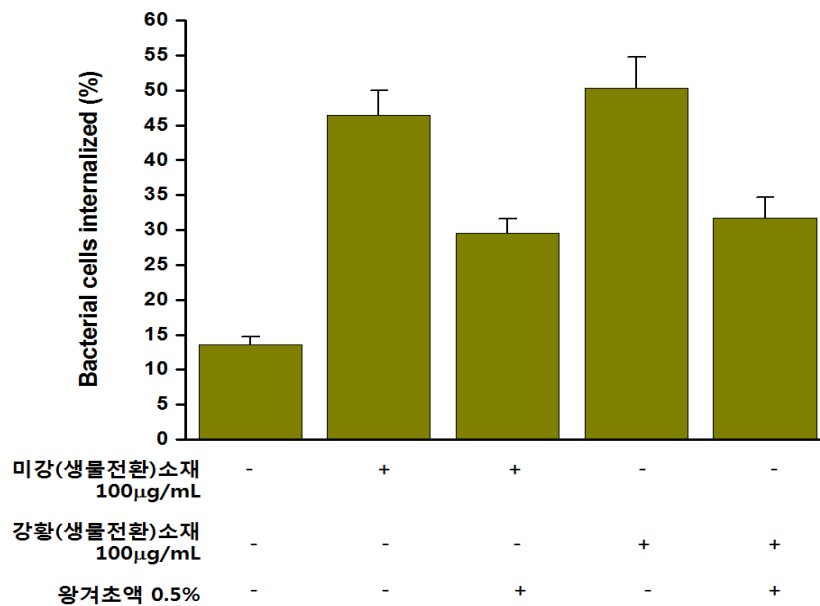


Figure 124. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제 처리시 대식세포의 살모넬라 탐식능에 미치는 효과

(2) 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합제제

24 well plate에서 100µg/mL의 면역조절소재와 10⁴ cfu의 프로바이오틱스소재를 함께 처리하여 RAW264.7 대식세포주에서 살모넬라의 탐식능을 향상시킬 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물의 탐식능력은 바실러스소재 또는 유산균소재과 함께 처리하는 경우에도 단독 처리와 큰 차이가 나지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 프로바이오틱스소재는 직접적으로 면역반응에는 관여하지 않으며, 면역조절소재에 의한 면역반응 활성화에도 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

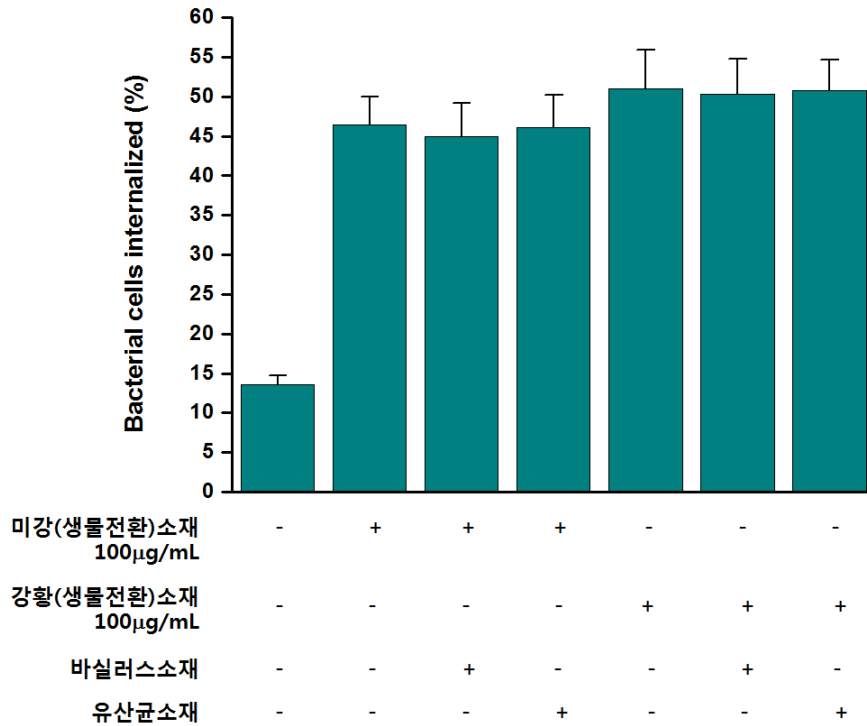


Figure 125. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 프로바이오틱스소재의 복합제제 처리시 대식세포의 살모넬라 탐식능에 미치는 효과

다. 복합제제가 대식세포의 살모넬라 탐식 후 살해능 향상에 미치는 효과 비교

RAW264.7 대식세포주를 이용하여 복합제제가 살모넬라에 대한 세포 내 증식 억제에 미치는 효과를 비교하였으며, 세포 내 증식 억제가 포화되는 시점인 감염 후 8시간을 기준으로 효과를 비교하였다.

(1) 면역조절소재와 왕겨초액의 복합제제

24 well plate에서 100 μ g/mL의 면역조절소재와 0.5% 왕겨초액을 함께 처리하여 RAW264.7 대식세포주에서 살모넬라의 세포 내 증식 억제 효과를 향상시킬 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 대식세포의 탐식능과 마찬가지로 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 모두 왕겨초액과의 복합 처리로 인하여 세포 내 증식 억제 효과가 감소하는 결과를 나타냈다. 이 또한 면역조절소재에 의해 대식세포 내 살모넬라의 증식에 있어서 억제가 이루어지는데, 억제된 살모넬라의 증식이 왕겨초액에 의해 해소되어 다시 대식세포 내 살모넬라의 증식이 일부 이루어지는 것으로 보인다.

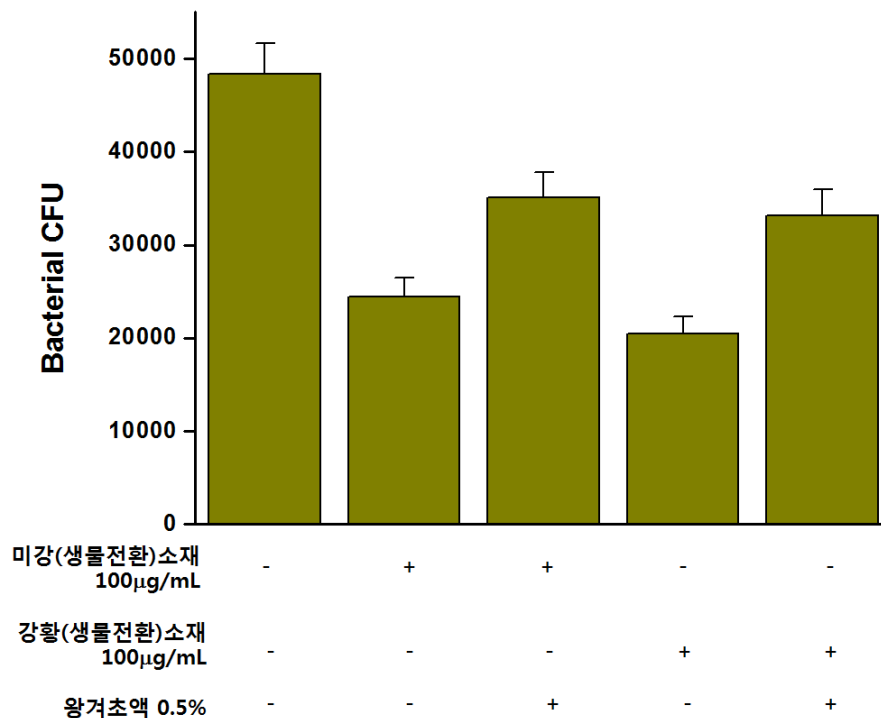


Figure 126. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제 처리시 대식세포의 살모넬라 세포 내 증식 억제에 미치는 효과

(2) 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합제제

24 well plate에서 100µg/mL의 면역조절소재와 10⁴ cfu의 프로바이오틱스소재를 함께 처리하여 RAW264.7 대식세포주에서 살모넬라의 세포 내 증식 억제 효과를 향상시킬 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 대식세포의 탐식능과 마찬가지로 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 모두 프로바이오틱스소재와의 복합 처리로 인하여 세포 내 증식 억제 효과가 증가하거나 감소하지 않는 결과를 확인하였다.

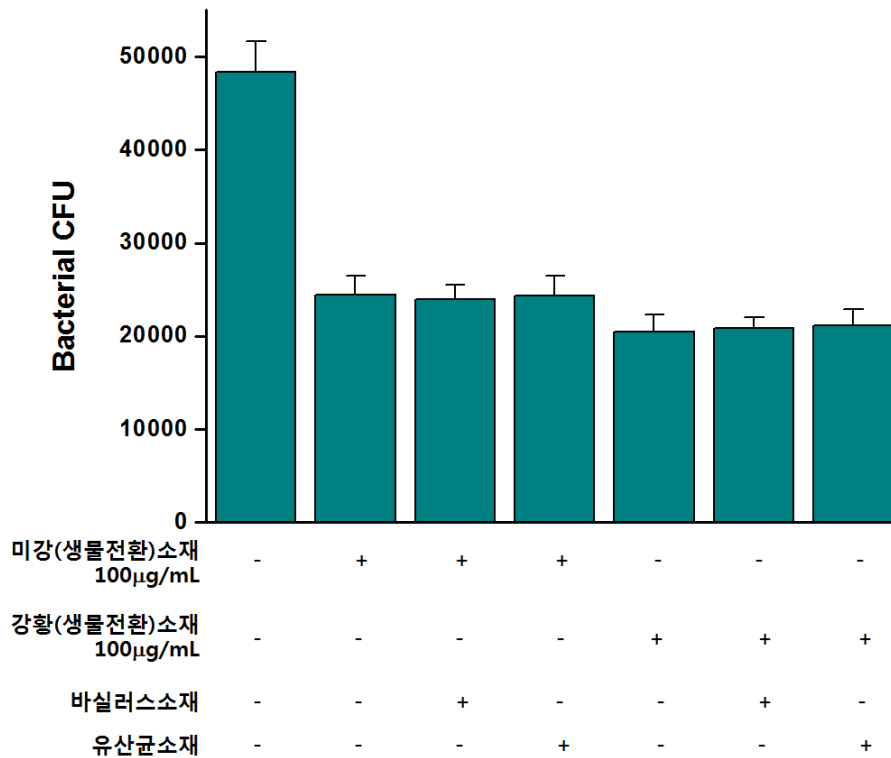


Figure 127. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 프로바이오틱스소재의 복합제제 처리시 대식세포의 살모넬라 세포 내 증식 억제에 미치는 효과

라. 복합제제의 살모넬라 항균 효과 비교

항균활성을 갖는 왕겨초액과 프로바이오틱스소재의 복합제제를 이용하여 살모넬라 SL1344 균주에 대한 항균효과를 비교하였으며, 앞서 기술한 연구에 사용하였던 NBGP 방법을 이용하여 살모넬라의 생존 억제율을 측정하였다.

(1) NBGP 방법을 이용한 복합제제의 항살모넬라 항균 효과 평가

강력한 항균활성을 갖는 왕겨초액과 프로바이오틱스소재의 시너지 효과를 평가하기 위하여 두 소재를 배합하여 살모넬라 SL1344 균주에 대한 항균활성을 확인하였다. 왕겨초액의 경우 SL1344 균주를 약 50% 억제하는 농도인 0.5%를 사용하였고, 프로바이오틱스소재 역시 살모넬라 접종량의 50%인 2.5×10^5 cfu를 사용하여 두 소재의 시너지 효과를 확인하였다. 그 결과, 왕겨초액의 단독 처리 시 보다 항균활성이 떨어지는 것으로 확인되었으며 이러한 결과는 중 특이적인 항균활성을 보이지 않는 왕겨초액이 생균제인 프로바이오틱스 역시 사멸시킨 결과인 것으로 보인다.

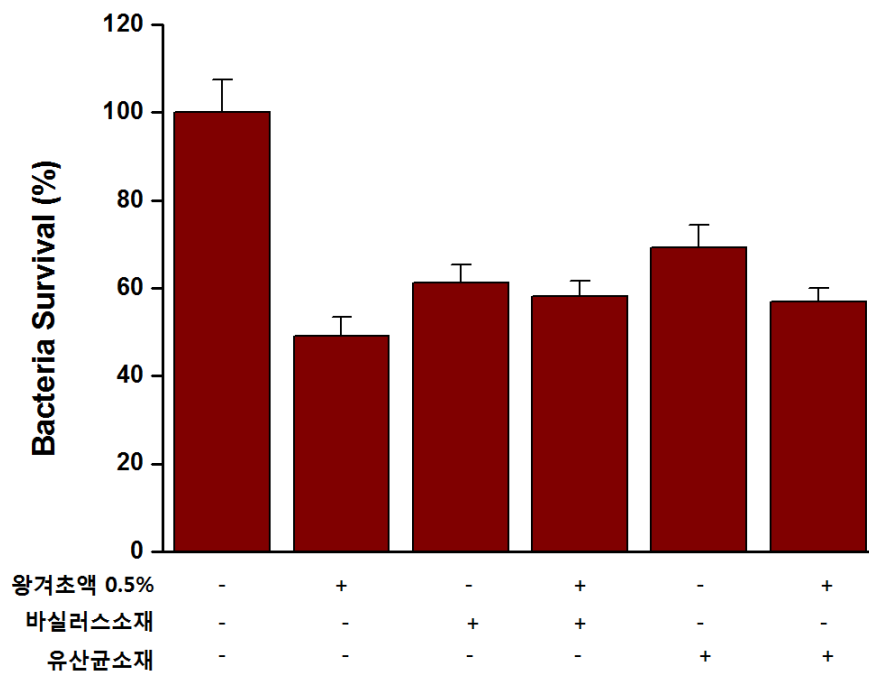


Figure 128. 왕겨초액과 프로바이오틱스소재 복합제제의 살모넬라 항균 효과

마. 면역조절소재 및 항균소재의 복합제제에서의 시너지 효과 평가의 실험적 의의

면역조절소재와 항균소재의 복합제제의 시너지 효과를 Caco-2 장관세포주와 RAW264.7 대식세포주에서 평가하였다. 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합처리 및 면역조절소재와 왕겨초액의 복합처리 시, Caco-2 장관세포주에서는 단독처리에 비해 살모넬라의 세포 내 침투가 더 많이 억제되는 것으로 확인되었다. 면역조절소재가 갖는 침투억제 기전과 왕겨초액 또는 프로바이오틱스소재가 갖는 항균효과 기전은 각자 서로 독립적인 반응에 의한 것이므로, 두 소재의 작용은 서로간의 억제작용을 하지 않는 것이라 생각할 수 있다. 반면, 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합처리 시 대식세포의 탐식작용과 세포 내 증식 억제 활성은 면역조절소재 단독 처리 시와 큰 차이가 없는 것으로 확인되었고, 이러한 결과는 프로바이오틱스소재가 대식세포의 활성화에 영향을 주지 않기 때문에 면역조절소재 단독 처리 시와 차이가 없는 것으로 생각된다. 또한 면역조절소재와 왕겨초액의 복합처리 시에는 면역조절소재의 대식세포 활성화 효과와 왕겨초액의 항염증 효과가 합해져 오히려 살모넬라 억제 효과가 감소하는 것으로 확인되었다. 프로바이오틱스소재와 왕겨초액의 복합처리 시에는 왕겨초액 단독처리 시보다 감소한 항균능력을 보였고, 특이적이지 않은 왕겨초액의 항균활성에 의해 프로바이오틱스소재 역시 사멸된 결과인 것으로 생각된다. 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때, 면역조절소재와 프로바이오틱스 소재의 경우 복합제제로 사용할 수 있는 가능성이 있으며, 왕겨초액의 경우 복합제제로 사용하기에 적합하지 않을 것이라 판단된다.

5절. 마우스 실험동물모델에서 고도화 면역조절소재 및 바실러스소재의 유효성 평가 및 이를 통한 고도화된 소재조합 도출

1. 살모넬라 저감제의 유효성 평가를 위한 *in vivo* 투여기준 설정

가. LPS 유도 패혈증 마우스모델에서의 면역조절소재의 복강 및 경구 투여량에 따른 치사율 억제 평가

미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물의 *in vitro* 실험을 기반으로 *in vivo* 투여량 및 투여 방법을 결정하였다. 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물의 *in vitro* 최대활성을 나타내는 농도인 100 μ g/mL을 기준으로 하여 마우스 투여량을 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 세가지 1일 투여량에서 비교하였고, 복강 주사를 통한 복강 내 투여와 식이를 통한 경구 투여를 비교하였다. 두 가지 면역조절소재를 1, 10, 100mg/kg 투여량으로 2주간 복강 주사를 통해 마우스에 투여하고 살모넬라 유래 LPS 20 μ g/kg과 Galactosamine 700mg/kg을 복강 내 주사하여 패혈증을 유도하고 생존율을 확인한 결과, 패혈증에 의한 마우스의 사망률을 감소시켜 생체 안전성이 있음을 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 Balb/c 마우스를 사용하였다. 미강(생물전환)산물의 경우 100mg/kg 투여량과 10mg/kg 투여량에서 모두 4마리가 생존한 결과를 보였고 강황(생물전환)산물의 경우 100mg/kg 투여량에서 6마리, 10mg/kg 투여량에서 5마리가 생존하여 두 농도 사이에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 10mg/kg의 투여량으로 경구 투여한 경우에도 미강(생물전환)산물의 경우 3마리가 생존하였고, 강황(생물전환)산물의 경우 4마리가 생존한 결과를 보임으로써 복강주사와 경구투여 사이에 큰 차이를 보이지 않음을 확인하였다.

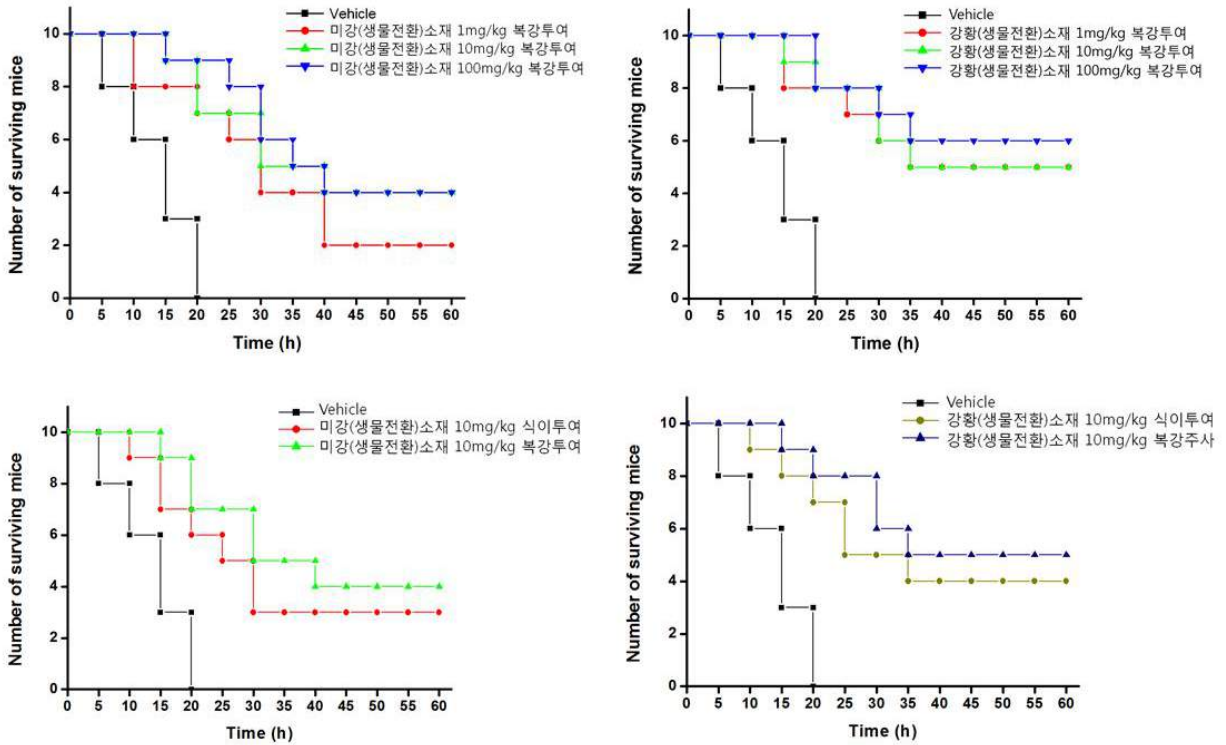


Figure 129. LPS에 의한 패혈증 유도 마우스에서 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물의 농도별/투여경로별 치사율 억제 효과

나. 살모넬라 ATCC14028 균주 복강내 감염 마우스 모델에서의 면역조절소재의 경구 투여량에 따른 치사율 억제 평가

면역조절소재의 복강 및 경구 투여에 의해 살모넬라에 의한 마우스의 사망률이 지연됨에 따라, 면역조절소재를 농도별로 식이투여 하여 마우스의 사망률을 지연시킬 수 있는지 확인하였다. 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물을 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg의 투여량으로 2주간 식이한 후, lethal dose (1×10^5 cfu/mouse)의 살모넬라를 복강 내 감염시켜 마우스의 사망을 유도한 뒤 면역조절소재의 사망률 지연 효과를 확인하였다. 실험군 당 10마리의 암컷 6주령 Balb/c 마우스를 사용하였다.

치사량의 살모넬라 감염으로 인해 대조군이 모두 사망하는 7일째에 1mg/kg의 미강(생물전환)산물을 투여한 그룹은 5마리, 10mg/kg 투여 그룹은 7마리, 100mg/kg 투여 그룹은 8마리가 생존하였으며 각각 최대 15일, 17일, 19일까지 생존함을 확인하였다. 또한 강황(생물전환)산물의 경우 7일째를 기준으로 1mg/kg 투여 그룹은 8마리, 10mg/kg 투여 그룹은 8마리, 100mg/kg 투여 그룹은 9마리가 생존하였고 각각 최대 17일, 21일, 23일까지 생존함이 확인되었다.

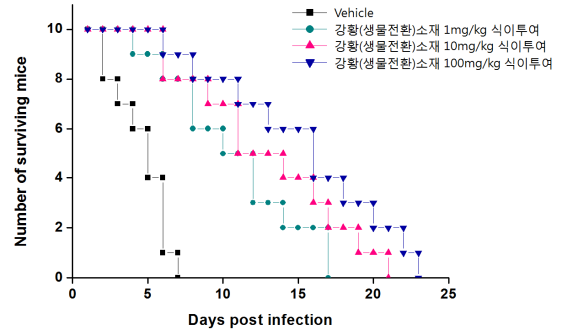
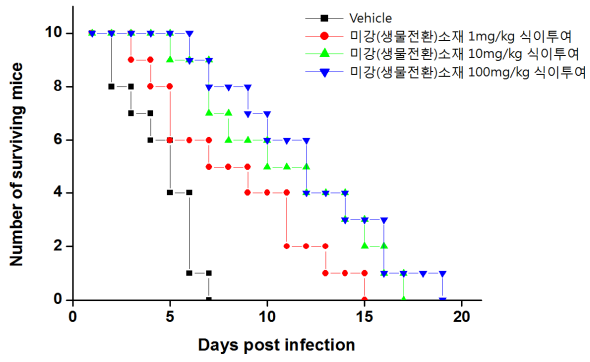


Figure 130. 복강 내 살모넬라 ATCC14028 균주 감염 마우스에서 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물의 투여 농도별 사망률 지연 효과

다. 면역조절소재의 *in vivo* 경구 투여량 설정

LPS 유도 패혈증 마우스모델에서, 미강(생물전환)산물의 경우 100mg/kg의 투여량과 10mg/kg의 투여량에서 모두 4마리가 생존을 보이는 등 비슷한 치사율 억제 효능을 보였으며, 강황(생물전환)산물의 경우에 있어서도 100mg/kg의 투여량에서 6마리, 10mg/kg의 투여량에서 5마리가 생존하는 등 두 투여량 사이에서 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 살모넬라 감염 마우스모델에서도 면역조절소재의 경구 투여량에 따른 치사율 억제 효능 평가에 있어서도 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물 모두 100mg/kg 및 10mg/kg의 두 투여량 사이에서도 큰 차이가 나타나지 않았다.

이에 상기의 LPS 유도 패혈증 마우스모델 및 살모넬라 감염 마우스모델에서의 실험결과를 바탕으로 면역조절소재의 투여량으로 1일 10mg/kg을 설정하였다

라. 프로바이오틱스소재의 *in vivo* 경구 투여량 설정

프로바이오틱스소재의 생체투여량은 *in vivo* 감염 시 사용하는 살모넬라와 동량을 사용하는 것으로 설정하였으며, 투여방법은 식이를 통한 투여로 설정하였다.

마. 왕겨초액의 in vivo 경구 투여량 설정

왕겨초액의 생체투여량은 기 수행한 식이를 통한 투여에서의 연구결과에 따라 1%로 설정하였다.

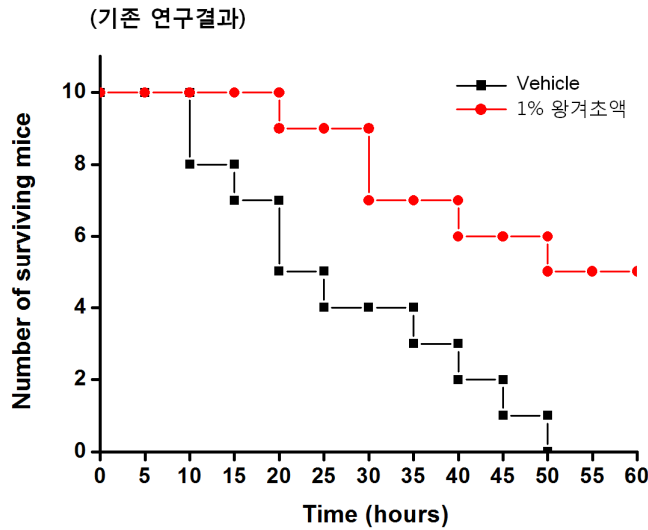


Figure 131. LPS에 의한 패혈증 유도 마우스에서 1% 왕겨초액 식이에 의한 치사율 억제 효과 (기존 연구결과)

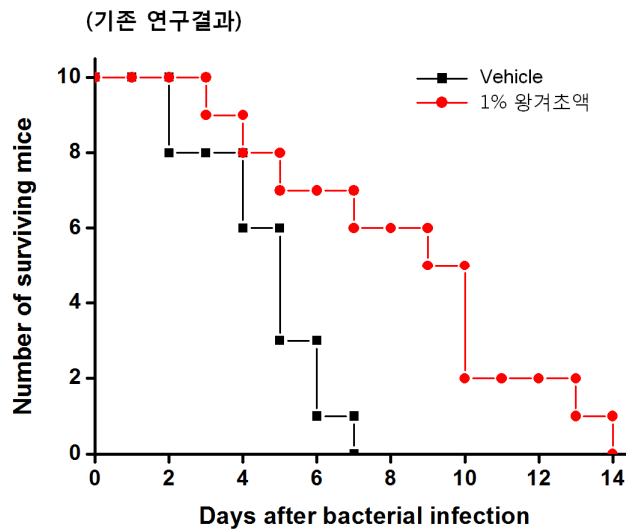


Figure 132. 복강 내 살모넬라 ATCC14028 균주 감염 마우스에서 1% 왕겨초액 식이에 의한 치사율 지연 효과 (기존 연구결과)

바. 살모넬라 저감제의 유효성 평가를 위한 *in vivo* 투여기준 설정의 실험적 의의

살모넬라 저감제의 *in vivo* 평가를 위해 패혈증 마우스 모델 및 살모넬라 복강 감염 마우스 모델에서의 치사율 억제 평가를 수행하였다. 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물을 1, 10, 100 mg/kg의 1일 투여량으로 2주간 복강주사로 투여한 마우스에 LPS와 galactosamine을 주사하여 패혈증을 유발하고 마우스의 치사율을 측정한 결과, 1mg/kg 농도보다 10mg/kg 농도에서 치사율이 억제되는 것으로 확인되었지만, 10mg/kg 농도와 100mg/kg 농도에서는 치사율에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 이후 10mg/kg 농도의 면역조절소재를 복강주사와 식이투여 방식으로 2주간 투여하고 패혈증을 유도, 치사율을 확인한 결과 복강주사 투여군에서 식이투여군 보다 약간 높은 치사율 억제 효과를 보였으나 차이가 크지 않은 것으로 확인되었다 (1마리). 또한, 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물을 1, 10, 100mg/kg의 농도로 2주간 식이투여 한 후, 치사 농도의 살모넬라를 복강주사 하여 마우스의 사망률을 확인한 결과, 농도 의존적으로 살모넬라의 사망률이 지연되는 것으로 확인되었으나 10mg/kg과 100mg/kg의 효과 차이가 크지는 않았다 (2일). 패혈증 모델과 살모넬라 감염 모델 모두에서 10mg/kg과 100mg/kg의 효과 차이가 크지 않았기 때문에, 투여 농도는 10mg/kg으로 설정하였으며, 투여 방법 역시 복강 투여와 식이투여의 효과 차이가 크지 않아 식이 투여 방법으로 설정하였다. 왕겨초액의 경우 기존 연구결과를 참고하여 1% (v/w) 농도로 식이에 첨가하여 급여하는 것으로 설정하였고, 프로바이오틱스소재의 경우 표적 미생물과 동량을 처리한 경우에 항균활성이 나타나기 때문에 살모넬라 감염 시 동일한 양으로 처리하는 것으로 설정하였다.

2. 인수공통 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 *in vivo* 유효성 평가

가. 살모넬라 저감제의 살모넬라 감염 저해 효능에 대한 *in vivo* 1차 평가

(1) 인수공통 살모넬라 경구 감염 마우스모델의 제작

: 인수공통 살모넬라(*S. Enteritidis* SE38) 경구 감염 식중독 마우스 모델의 제작

살모넬라의 일반적인 감염 경로는 경구를 통한 감염이기 때문에, 마우스에서 경구를 통한 살모넬라 식중독 모델을 확립하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 4시간 동안 금식, 금수 시킨 후 20mg의 streptomycin을 경구투여 하여 장관 내의 미생물을 사멸시켰다. 20시간 뒤에 다시 4시간 동안 금식, 금수 시킨 후 10^8 cfu의 SE38 균주를 경구투여하여 살모넬라의 감염을 유도하였다. 감염 후 24시간, 48시간에 분변을 채취하여 살모넬라의 개체 수를 측정하였고, 48시간 후 마우스를 희생하여 맹장, 장관막림프절, 비장, 간으로 침투한 살모넬라의 개체 수를 측정하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

장관 내강에서 조직 내로 침투되지 못하고 분변으로 빠져나온 살모넬라의 양을 측정하였다. 분변 0.1g 당 3mL의 PBS에 잘 현탁한 후, 50 μ g/mL의 streptomycin이 포함된 Macconkey agar에 spreading 하여 생균수를 측정하였다. 감염 24시간 후에 채취한 분변 내의 살모넬라의 양은 87.667×10^4 cfu/g, 48시간 후에 채취한 분변 내의 살모넬라의 양은 112×10^4 cfu/g 으로 측정되었다.

Table 11. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 분변 내 생존하는 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
SE38 10^8 cfu infection	87.667 \pm 4.933	112.000 \pm 2.646

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

장관 내강에서 조직 내로 침투되는 살모넬라의 양을 측정하였다. 맹장은 조직 0.1g 당 2mL, 장관막림프절과 비장은 조직 당 2mL, 간은 조직 당 3mL의 PBS를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 serial dilution 하여 50µg/mL의 streptomycin이 포함된 Macconkey agar에 spreading 하여 생균수를 측정하였다. 측정 결과 맹장에는 2.7×10^6 cfu/g의 살모넬라가 침투한 것으로 나타났으며, 장관막림프절에는 3.6×10^4 cfu/organ, 비장에는 1.24×10^4 cfu/organ, 간에는 6.4×10^3 cfu/organ 의 살모넬라가 침투된 것으로 확인되었다.

Table 12. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 조직 내 생존하는 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Tissue			
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	7.667 ± 8.082	0.000 ± 0.000
SE38 10^8 cfu infection	27.000 ± 3.464	36.000 ± 2.416	124.000 ± 8.718	64.333 ± 4.589

(2) 살모넬라 저감제 시제품의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 살모넬라의 감소 여부 확인

인수공통 균주인 SE38 균주를 이용한 살모넬라 식중독 모델을 확립함에 따라, 식중독 모델에서 저감제 시제품을 투여하여 장관 및 조직 내 감염된 살모넬라를 제어할 수 있는지 확인하였다. 면역조절소재는 10mg/몸무게 kg, 왕겨초액은 사료에 1% 첨가, 프로바이오틱스소재는 마우스 당 10⁸ cfu의 1일 투여량으로 3일간 식이를 통해 투여하였으며, 20mg의 streptomycin의 투여 및 10⁸ cfu의 살모넬라를 경구로 투여하여 감염을 유도하였다. 24시간과 48시간 후 분변을 채취하여 분변 내 미생물을 측정하였으며, 맹장과 장관막림프절, 비장, 간에서의 살모넬라의 수를 측정하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

살모넬라의 감염 후, 조직으로 침투되지 못하고 배출되어 분변 내에 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 면역조절소재인 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물은 살모넬라 감염 대조군에 비하여 분변에 검출되는 살모넬라의 양이 2배 정도로 증가하였다. 이러한 결과는 Caco-2 세포주를 이용한 실험의 결과와 같이 장관조직 내로의 침투를 억제하여 체내로 들어온 살모넬라를 분변을 통해 배출되게 하는 것으로 보인다. 또한 천연항균소재인 왕겨초액과 프로바이오틱스소재인 바실러스소재 및 유산균소재의 경우에는 장관 내로 들어온 살모넬라를 직접적으로 죽임으로써 분변 내에 존재하는 살아있는 살모넬라의 양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

Table 13. 인수공통 SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품의 투여가 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁴ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SE38 infection only		78.842 ± 3.716	93.814 ± 5.931
미강(생물전환)산물	10mg/kg	134.842 ± 9.816	195.637 ± 12.750
강황(생물전환)산물	10mg/kg	156.631 ± 11.527	226.210 ± 15.603
왕겨초액	사료에 1% 첨가	23.471 ± 1.509	31.542 ± 2.547
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse	31.596 ± 2.782	40.805 ± 2.669
유산균소재	10 ⁸ cfu/mouse	43.462 ± 3.719	56.627 ± 3.226

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

장관 내강에서 조직으로 침투한 살모넬라를 확인하기 위하여 마우스를 희생한 뒤 맹장과 장관막림프절, 비장, 간을 분리하여 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다.

① 맹장 및 장관막림프절

살모넬라의 감염 후 1차 침투 조직인 맹장과 그에 연결된 림프조직인 장관막림프절 내의 살모넬라를 측정하여 살모넬라 저감제 시제품의 조직 침투 억제 효과를 확인하였다. 면역조절소재인 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물은 모두 살모넬라의 맹장 내 침투를 억제하였으며 각각 51.3%와 64.6%의 살모넬라 맹장 내 침투를 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 미강(생물전환)산물은 66.9%, 강황(생물전환)산물은 76.1%의 장관막림프절 내 살모넬라를 억제하는 것으로 확인되었다. 맹장으로 침투하는 살모넬라의 억제율 보다 장관막림프절 내의 살모넬라 억제율이 더 큰 결과는 장관조직 내로 침투하여 림프절로 이동한 살모넬라를 림프절 내 존재하는 면역세포의 활성화로 인하여 제거하는 것으로 보인다. 천연항균소재인 왕겨초액과 프로바이오틱스소재인 바실러스소재 및 유산균소재는 Caco-2 세포주를 이용한 실험에서와 같이 장관조직으로의 침투를 억제하는 능력은 없는 것으로 보이며 장관 내에 존재하는 살모넬라의 수를 감소시켜 상대적으로 장관조직 내로 침투하는 살모넬라의 양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

Table 14. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품의 투여가 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SE38 infection only		32.287 ± 2.716	41.506 ± 3.532
미강(생물전환)산물	10mg/kg	15.715 ± 1.119	13.752 ± 1.164
강황(생물전환)산물	10mg/kg	11.428 ± 0.973	9.915 ± 0.563
왕겨초액	사료에 1% 첨가	11.173 ± 0.779	18.820 ± 1.265
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse	13.394 ± 1.217	20.020 ± 1.117
유산균소재	10 ⁸ cfu/mouse	16.254 ± 1.265	23.639 ± 1.787

② 비장 및 간

조직 내로의 침투 및 체액을 통한 이동이 가능한 비장과 간에서의 살모넬라의 양을 측정하였다. 미강(생물전환)산물을 투여한 경우 비장 내 살모넬라의 양을 84.0% 억제하였으며, 강황(생물전환)산물을 투여한 경우에는 87.7%의 억제 효과를 보였다. 또한 간에 존재하는 살모넬라에 대해 미강(생물전환)산물은 81.6%, 강황(생물전환)산물은 88.8%의 억제율을 보였다. 맹장 내 침투하는 살모넬라와 장관막림프절 내 살모넬라에 대한 억제율보다 비장 및 간 내에 존재하는 살모넬라에 대한 억제율이 더 큰 이유는 장관막림프절과 마찬가지로 비장 내 림프구를 포함한 다양한 면역세포에 대한 면역조절소재의 활성화 효과에 의한 것으로 보인다. 천연항균소재인 왕겨초액과 프로바이오틱스소재인 바실러스소재 및 유산균소재의 경우에는 비장과 간 내에 존재하는 살모넬라의 양 역시 큰 비율의 증감 없이 억제하는 것으로 확인되어 맹장 및 장관막림프절 내의 살모넬라 억제와 마찬가지로 초기에 장관 내강에 존재하는 살모넬라에 대한 항균활성을 통하여 비장 및 간 조직으로 이동되는 살모넬라의 양을 감소시키는 것으로 보인다.

Table 15. 인수공통 SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품의 투여가 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SE38 infection only		128.726 ± 7.529	69.103 ± 5.541
미강(생물전환)산물	10mg/kg	20.557 ± 1.416	12.714 ± 1.065
강황(생물전환)산물	10mg/kg	15.806 ± 1.121	7.720 ± 0.497
왕겨초액	사료에 1% 첨가	29.215 ± 2.224	14.117 ± 1.229
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse	34.406 ± 2.721	20.548 ± 1.320
유산균소재	10 ⁸ cfu/mouse	43.509 ± 3.594	29.453 ± 1.285

(3) 복합제제의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 미생물의 감소 여부 확인

면역조절소재의 경우 직접적인 항균활성은 없으나, 장관조직 내로의 살모넬라 침투를 억제하고 면역세포의 활성화로 인하여 체내 미생물을 제거하는 능력이 있으며, 천연항균소재와 프로바이오틱스소재의 경우 장관 내에서 직접적인 항균활성을 통해 살모넬라 감염을 억제하는 효과를 보임에 따라 두 종류의 소재를 배합한 복합제제를 이용하여 살모넬라 감염 억제 능력을 확인하였다. 복합제제의 제조는 면역조절소재와 천연항균소재, 면역조절소재와 프로바이오틱스소재를 배합하여 제조하였다. 천연항균소재는 왕겨초액을 사용하였으며, 면역조절소재와 프로바이오틱스소재는 각각 단독소재 투여 실험의 결과에서 더 강한 효과를 보인 강황(생물전환)산물과 바실러스소재를 선별하여 실험에 사용하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

복합제제를 3일간 투여한 후, SE38 균주를 감염시킨 뒤 조직 내로 침투되지 못하고 분변으로 배출되는 살모넬라의 양을 측정하였다. 그 결과, 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합제제 모두 단독 투여시 보다 더 강한 억제 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 강황(생물전환)산물의 활성화로 인하여 장관조직 내로 침투되지 못하고 장관 내강에 존재하는 살모넬라가 왕겨초액 또는 바실러스소재의 항균활성으로 인해 사멸되어 나타난 결과로 보인다.

Table 16. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 복합제제의 투여가 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
SE38 infection only		72.229 \pm 5.847	86.921 \pm 6.203
강황(생물전환)산물 +	10mg/kg	12.107 \pm 1.010	18.420 \pm 1.349
왕겨초액	1%		
강황(생물전환)산물 +	10mg/kg	19.510 \pm 1.332	26.410 \pm 2.049
바실러스소재	10^8 cfu/mouse		

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

① 맹장 및 장관막림프절

복합제제 3일간 투여 후, 살모넬라를 감염시키고 조직 내로 침투된 살모넬라의 양을 측정하였다. 분변에서의 살모넬라 측정 결과와 마찬가지로, 복합제제는 맹장 조직 내로 침투되는 살모넬라를 단독 처리시 보다 더 강하게 억제하는 것으로 확인되었다. 왕겨초액이나 바실러스소재의 경우 살모넬라의 조직 침투를 억제하는 효과는 없지만, 직접적인 항균활성으로 인해 장관 내강의 살모넬라 수를 감소시키고, 감소된 살모넬라의 장관조직 내 침투를 면역조절소재가 억제한 것으로 보인다. 하지만, 장관막림프절에서의 살모넬라 억제 효과에 있어서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합제제의 경우 단독소재 처리의 경우보다 향상된 것으로 나타났으나, 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제의 경우 단독소재 처리와 비슷하게 유지되는 것으로 확인되었는데, 이는 천연항균소재로 사용한 왕겨초액이 갖는 면역반응 활성화 억제 효과 때문에 면역조절소재로 사용한 강황(생물전환)산물에 의해 유도된 면역반응 활성화가 왕겨초액에 의해 억제된 결과인 것으로 보인다.

Table 17. 인수공통 SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 복합제제의 투여가 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SE38 infection only		36.410 ± 1.872	46.229 ± 2.873
강황(생물전환)산물 +	10mg/kg	5.233 ± 0.329	10.829 ± 0.847
왕겨초액	1%		
강황(생물전환)산물 +	10mg/kg	8.825 ± 0.762	7.448 ± 0.610
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse		

② 비장 및 간

조직으로의 침투 및 체액으로 이동 가능한 비장과 간에서의 살모넬라의 양을 측정하였다. 장관막림프절에서의 결과와 마찬가지로 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합제제는 단독 투여시 보다 뛰어난 억제활성을 보였지만, 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제는 단독 투여시와 비슷한 비율의 억제활성을 보였다. 이는 역시 왕겨초액이 갖는 면역반응 억제 활성 때문인 것으로 생각된다.

Table 18. 인수공통 SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 복합제제의 투여가 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SE38 infection only		121.238 ± 10.094	65.859 ± 4.216
강황(생물전환)산물	10mg/kg	15.129 ± 1.227	8.014 ± 0.526
+			
왕겨초액	1%		
강황(생물전환)산물	10mg/kg	10.414 ± 0.563	4.418 ± 0.379
+			
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse		

나. 고도화 면역조절소재, 강황(생물전환)산물 함유 살모넬라 저감제의 살모넬라 감염 예방 및 치료 효능에 대한 농도에 따른 in vivo 2차 평가

살모넬라 저감제 개별소재의 투여시기에 따른 복합투여 방법

	감염 전	감염 후
1	강황(생물전환)산물	강황(생물전환)산물
2		강황(생물전환)산물
3	바실러스	바실러스
4		바실러스
5		강황(생물전환)산물+바실러스
6	강황(생물전환)산물	바실러스
7	강황(생물전환)산물	강황(생물전환)산물+바실러스

(1) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가

이전 연구에서 확립한 살모넬라 경구 감염 마우스 모델에서, 강황(생물전환)산물을 농도 별로 투여하여 강황(생물전환)산물의 감염 억제 효능을 평가하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 감염 예방에 대한 강황(생물전환)산물의 효과를 분석하기 위해 2주간 강황(생물전환)산물을 투여용량별로 식이한 뒤, 인수공통 살모넬라균을 감염시켜 살모넬라에 대한 감염 억제 효능을 분석하였다.

강황(생물전환)산물의 살모넬라 감염 예방 효과를 평가하기 위해 마우스에서 감염 전 2주간 2.5, 10, 40 mg/kg의 1일 투여용량으로 강황(생물전환)산물을 식이한 뒤, 인수공통 전염균주인 *Salmonella* Typhimurium SE38을 10^8 cfu/mouse의 접종량으로 감염시켰다. 감염 후 강황(생물전환)산물의 식이를 지속시키면서 감염 1일 후와 2일 후 분변을 채취하여 분변 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정하였으며, 2일 후 마우스를 희생하여 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 계수하여 강황(생물전환)산물의 감염 예방 효능을 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 후 1일과 2일차의 분변 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 이전 연구와 동일한 조건인 10 mg/kg의 투여량으로 감염 전 2주간 식이한 마우스에서는 1일차에서 210%, 2일차에서 204%의 살모넬라 배출량이 증가하는 것으로 확인되어 유사한 결과를 보이는 것으로 확인되었다. 또한 2.5 mg/kg의 투여량으로 식이한 경우는 1일차와 2일차에 살모넬라 배출량이 각각 136%와 131% 증가하는 결과를 보였으며, 본 연구에서 사용한 최대 투여용량인 40 mg/kg 투여량에서는 1일차와 2일차에 각각 247%와 223%의 배출량 증가를 보임에 따라 강황(생물전환)산물 투여량 의존적으로 살모넬라 배출량을 증가시키는 것으로 확인되었다. 다만, 모든 투여량에서 1일차에 비해 2일차에 약간의 효율 감소가 일어나는 것으로 확인되었다.

Table 19. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 전/후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	8.23 \pm 0.51	12.19 \pm 1.05
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	11.21 \pm 1.05
	10 mg/kg	17.29 \pm 2.03
	40 mg/kg	20.34 \pm 1.56

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

감염 2일 후 마우스 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 분석하였다. 이전 연구와 마찬가지로 맹장, 장관막림프절, 비장, 간의 네 가지 조직에서 살모넬라의 양을 측정하였으며, 각각의 억제율을 비교하여 강황(생물전환)산물이 갖는 살모넬라 침투 억제 효과 및 면역반응 활성화로 인한 살모넬라 제어 효과를 비교, 분석하고자 하였다. 그 결과, 모든 조직에서 강황(생물전환)산물의 투여량이 높아짐에 따라 살모넬라의 개체수가 투여량 의존적으로 감소하는 효과를 보였으며, 맹장에서의 억제율보다 림프절, 비장 및 간에서의 억제율이 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 직접적인 장관 조직 내로의 살모넬라 침입을 억제한 뒤, 조직 내로 침투된 살모넬라는 면역반응의 활성화를 통해 2차적으로 제어할 수 있는 효과가 있는 것으로 평가된다.

Table 20. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 전/후 투여 시 맹장과 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	32.9 \pm 2.1	34.8 \pm 2.7
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	21.8 \pm 1.9
	10 mg/kg	10.7 \pm 1.3
	40 mg/kg	7.9 \pm 0.6

Table 21. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 전/후 투여 시 비장과 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	108.5 \pm 7.3	58.3 \pm 4.2
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	68.9 \pm 5.4
	10 mg/kg	13.4 \pm 1.3
	40 mg/kg	6.2 \pm 0.3

(2) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가

감염 전 투여용량별 강황(생물전환)산물의 투여가 투여량 의존적인 살모넬라 감염 예방 효과가 있는 것으로 확인됨에 따라, 살모넬라 감염 이후부터 강황(생물전환)산물을 투여하여 감염에 대한 치료 효과가 있는지 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며 살모넬라 감염 후 투여용량별로 강황(생물전환)산물을 투여하였고, 분변과 조직 내 살모넬라의 수를 측정하여 강황(생물전환)산물의 감염 치료 효과를 평가하였다.

강황(생물전환)산물이 갖는 감염 치료 효과 분석을 위해 감염 이후에 강황(생물전환)산물을 2.5 mg/kg, 10 mg/kg, 40 mg/kg의 1일 투여용량으로 투여하였다. 감염 1일 후와 2일 후 분변을 채취하여 분변 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정하였으며, 감염 2일 후 각 조직 내 생존하는 살모넬라의 양을 확인하여 강황(생물전환)산물의 감염 치료 효과를 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 1일 후와 2일 후의 분변을 채취하여 분변 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정한 결과, 강황(생물전환)산물을 2.5 mg/kg으로 투여한 마우스의 경우 분변으로의 살모넬라 배출량에 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다. 10 mg/kg 이상의 투여량에서는 살모넬라 배출량이 증가하는 것으로 나타났으며 2주간 사전투여 한 마우스에 비해 효과는 감소하는 것으로 확인되었다. 그러나 최대 농도인 40 mg/kg을 투여한 경우에 감염 2일 후 분변에서는 비슷한 수준의 살모넬라 배출 효율을 보이는 것으로 확인되었으며 이러한 결과는 감염 후 시간이 지날수록 강황(생물전환)산물의 효율이 높아질 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

Table 22. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		Salmonella in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		8.51 \pm 0.56	10.37 \pm 0.95
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	9.02 \pm 0.68	11.13 \pm 1.05
	10 mg/kg	11.62 \pm 1.09	14.73 \pm 1.63
	40 mg/kg	16.92 \pm 1.53	23.84 \pm 1.5

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

강황(생물전환)산물을 감염 후 투여한 마우스에서 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 분변에서의 결과와 마찬가지로 2.5 mg/kg 투여량의 투여는 살모넬라의 억제에 효과가 없는 것으로 확인되었고, 10 mg/kg 이상의 농도에서는 2주간 사전 투여한 경우와 비교하여 볼 때 약 5~10% 정도의 낮은 효율을 보이는 것으로 확인되었으나, 40 mg/kg의 투여량에서는 비슷한 수준의 효율을 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 조직 간 억제율을 비교하면 사전 투여시와 마찬가지로 감염 후 투여시에도 맹장에서의 억제율보다 장관막림프절, 비장 및 간에서의 억제율이 더 뛰어난 것으로 확인되어, 단기간의 투여를 통해서도 면역반응의 활성화를 효과적으로 유도할 수 있는 것으로 평가된다.

Table 23. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 후 투여시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	35.1 ± 3.6	44.7 ± 5.0
2.5 mg/kg	33.6 ± 4.1	42.9 ± 4.8
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	25.4 ± 2.3	35.2 ± 3.6
40 mg/kg	12.7 ± 1.4	10.8 ± 1.2

Table 24. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 후 투여시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	130.6 ± 14.2	67.2 ± 5.9
2.5 mg/kg	122.1 ± 11.8	62.0 ± 4.8
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	72.6 ± 6.9	41.2 ± 5.2
40 mg/kg	15.9 ± 1.4	8.3 ± 0.9

(3) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가

이전 연구 결과에서, 바실러스소재는 살모넬라에 대한 직접적인 항균활성을 통해 살모넬라의 감염을 제어할 수 있는 결과를 확인하였다. 본 실험에서는 이전 실험에서 사용한 10^8 cfu/mouse 투여량 외에 다른 투여용량의 바실러스소재를 추가하여 투여량에 따른 감염 억제 효과를 분석하고자 하였으며, 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였다.

10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/mouse의 1일 투여용량으로 바실러스소재를 투여하여 바실러스소재의 투여량에 따른 감염 억제 효과를 분석하였으며, 투여용량별로 바실러스소재를 감염 전 2주간 식이한 뒤, 살모넬라를 감염시키고 바실러스소재의 식이를 지속시키면서 바실러스소재의 살모넬라 감염 예방 효과를 평가하였다. 강황(생물전환)산물과 마찬가지로 분변 내 살모넬라의 양과 조직 내 살모넬라의 양을 확인하였으며 두 가지를 비교, 분석하여 바실러스소재가 갖는 활성을 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

바실러스소재를 감염 2주 전부터 식이시키면서, 살모넬라 감염 후 분변 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 그 결과, 10^6 cfu/mouse의 투여량에서는 살모넬라 억제 효과를 보이지 않았으며, 10^7 cfu/mouse의 투여량 이상에서 살모넬라 억제 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 또한, 바실러스소재의 농도와 상관없이 감염 2일차 까지 효과가 유지되는 것으로 확인되어 장관 내에서 안정적으로 활성을 나타낼 수 있는 것으로 판단된다.

Table 25. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 전/후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	8.23 \pm 0.51	12.19 \pm 1.05
바실러스소재	10^6 cfu/mouse	8.07 \pm 0.4
	10^7 cfu/mouse	6.38 \pm 0.52
	10^8 cfu/mouse	3.51 \pm 0.29

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

바실러스소재 투여로 인한 조직 내 살모넬라 억제 효과를 확인하였다. 네 가지 조직에서 생존하는 살모넬라의 양을 측정한 결과, 분변에서의 결과와 마찬가지로 10^7 cfu/mouse의 투여량 이상에서 살모넬라 억제 효과가 나타나는 것으로 확인되었으며, 조직 특이적인 억제율의 증가는 보이지 않았다. 또한, 모든 조직에서 분변 내 살모넬라 억제율과 유사한 억제율을 보이는 것으로 보아 바실러스소재에 의한 살모넬라의 감염 억제는 오직 살모넬라에 대한 직접적인 항균활성에 기인한 것으로 평가된다.

Table 26. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 전/후 투여 시 맹장과 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	32.9 \pm 2.1	34.8 \pm 2.7
바실러스소재	10^6 cfu/mouse	33.8 \pm 4.2
	10^7 cfu/mouse	26.7 \pm 1.9
	10^8 cfu/mouse	14.2 \pm 1.5

Table 27. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 전/후 투여 시 비장과 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	108.5 \pm 7.3	58.3 \pm 4.2
바실러스소재	10^6 cfu/mouse	105.9 \pm 10.4
	10^7 cfu/mouse	76.8 \pm 5.4
	10^8 cfu/mouse	32.2 \pm 3.5

(4) 바실러스소재의 투여량에 따른 다른 살모넬라 감염 치료 효과 평가

투여용량별 바실러스소재를 살모넬라 감염 후에 투여하여 살모넬라 감염에 대한 치료 효과를 평가하고자 하였다. 실험군당 10마리의 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 이용하였고, SE38 균주의 감염 후에 투여용량별로 바실러스소재를 식이하였으며, 분변과 조직에서 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다.

살모넬라 감염 후, 바실러스소재를 투여용량별로 투여하여 살모넬라 감염 치료 효과를 확인하였다. 예방이 아닌 감염에 대한 치료의 경우, 더 많은 양의 프로바이오틱스소재를 쓰는 것이 실제로 유용할 수 있기 때문에 효과가 나타나지 않은 10^6 cfu/mouse 투여량을 제외하고 10^9 cfu/mouse 투여량을 추가하여 10^7 , 10^8 , 10^9 cfu/mouse의 세가지 1일 투여 용량에서 살모넬라 감염에 대한 치료 효과를 확인하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

S38 균주 감염 후 바실러스소재를 투여용량별로 처리하고, 감염 1일 후와 2일 후의 분변을 채취하여 살모넬라 생균수를 측정하였다. 그 결과, 바실러스소재의 경우 감염 전 2주간 사전투여 시의 효과와 감염 후 투여 시의 효과가 동일한 것으로 확인되었으며 이는 바실러스소재가 장 내 균총을 변화시키지는 않으며 살모넬라에 대한 특이적 항균활성만 가지고 있음을 시사한다. 또한 치료 효과에 대한 평가를 위해 추가한 10^9 cfu/mouse 투여량의 바실러스소재는 1일차와 2일차에 각각 85%와 78%의 높은 살모넬라 억제율을 보이는 것으로 확인되어 살모넬라 감염시 항생제를 대체할 수 있는 저감제 물질로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 평가된다.

Table 28. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	8.51 \pm 0.56	10.37 \pm 0.95
바실러스소재	10^7 cfu/mouse	5.79 \pm 0.55
	10^8 cfu/mouse	3.57 \pm 0.25
	10^9 cfu/mouse	1.28 \pm 0.13

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

바실러스소재가 직접적인 항균활성 외의 활성을 갖는지 확인하기 위하여 조직 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 바실러스소재는 농도와는 상관없이 조직 특이적인 억제 효과는 보이지 않는 것으로 확인되었다.

Table 29. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 후 투여 시 대장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	35.1 ± 3.6	44.7 ± 5.0
바실러스소재	10 ⁷ cfu/mouse	25.3 ± 2.9
	10 ⁸ cfu/mouse	14.2 ± 1.5
	10 ⁹ cfu/mouse	9.8 ± 1.2

Table 30. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 후 투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	130.6 ± 14.2	67.2 ± 5.9
바실러스소재	10 ⁷ cfu/mouse	83.9 ± 8.5
	10 ⁸ cfu/mouse	36.6 ± 4.1
	10 ⁹ cfu/mouse	16.7 ± 1.8

(5) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 활성 평가 SE38 균주 감염 마우스 모델에서, 감염 전 2주간의 사전투여 없이 감염 이후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 살모넬라 감염을 억제할 수 있는지 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 살모넬라의 감염 후 강황(생물전환)산물을 2.5, 10, 40 mg/kg, 바실러스소재를 1×10^7 cfu/mouse와 1×10^8 cfu/mouse의 투여량으로 복합 투여하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 1일째와 2일째 분변 내 존재하는 살모넬라의 양을 확인한 결과, 강황(생물전환)산물의 투여량이 높을수록 살모넬라의 배출량이 증가하는 경향이 있으며, 바실러스소재의 투여량이 높을수록 살모넬라의 사멸이 증가하는 것으로 확인되었다. 하지만, 감염 전 2주간 강황(생물전환)산물을 사전투여 한 결과와 비교할 때, 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 하였을 경우 살모넬라의 배출이 더 효과적으로 유도되는 것으로 보인다.

Table 31. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 분변 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	86.7 \pm 6.3	95.4 \pm 7.6
20 mg Streptomycin	82.3 \pm 5.9	93.1 \pm 8.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	66.7 \pm 5.1	70.5 \pm 6.2
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	64.3 \pm 6.2	75.3 \pm 5.9
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	77.9 \pm 5.5	82.9 \pm 7.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	24.2 \pm 1.8	25.2 \pm 1.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	25.1 \pm 1.9	24.9 \pm 1.3
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	9.5 \pm 0.6	13.1 \pm 1.2

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

맹장과 장관막림프절, 비장과 간 조직 내 살모넬라의 수를 측정하였다. 강황(생물전환)산물과 바실러스소재 모두 투여량이 증가할수록 살모넬라의 감염이 억제되는 결과를 보였으며, 효과가 포화되지는 않는 것으로 확인되었다. 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 한 결과와 비교할 때, 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 한 경우 대부분 더 높은 억제 활성을 보이는 것으로 확인되어, 낮은 투여량이더라도 강황(생물전환)산물의 지속적인 투여가 살모넬라 감염을 더 효율적으로 제어할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 32. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	45.8 \pm 3.5	59.7 \pm 4.2
20 mg Streptomycin	41.7 \pm 4.0	55.6 \pm 5.4
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	20.8 \pm 1.3	28.3 \pm 1.9
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	16.7 \pm 1.0	21.1 \pm 1.8
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	7.8 \pm 0.5	9.3 \pm 0.5
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	12.1 \pm 1.1	15.9 \pm 1.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	9.5 \pm 0.6	10.7 \pm 0.9
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	6.2 \pm 0.3	5.1 \pm 0.3

Table 33. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 비장 및 간 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only	142.8 \pm 11.2	77.6 \pm 5.9
20 mg Streptomycin	135.3 \pm 12.9	71.8 \pm 6.3
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	79.8 \pm 6.2	51.6 \pm 4.2
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	63.7 \pm 5.1	45.3 \pm 3.8
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	13.8 \pm 1.2	14.9 \pm 1.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	55.6 \pm 4.3	33.7 \pm 2.9
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	44.2 \pm 3.7	30.8 \pm 2.4
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	9.9 \pm 0.5	8.7 \pm 0.5

(6) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 투여량에 따른 시너지 효과 평가

앞선 연구 결과에서, 강황(생물전환)산물은 예방에 보다 효율적인 소재인 것으로 확인되었고, 바실러스소재는 치료에 더 효율적인 것으로 나타남에 따라, 두 소재를 순차적으로 처리하여 두 소재 간의 시너지 효과를 평가하고자 하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였다. 감염 전 2주간 강황(생물전환)산물을 사전투여 하고, 감염 후에는 바실러스소재를 투여하여 살모넬라에 대한 억제 효율을 측정하였다.

강황(생물전환)산물은 2.5, 10, 40 mg/kg의 1일 투여용량으로 감염 전 2주간 사전투여 하였으며, 바실러스소재의 경우 효과가 없는 10^6 cfu/mouse의 1일 투여량을 제외하고 10^7 cfu/mouse과 10^8 cfu/mouse의 두가지 1일 투여용량으로 감염 후 투여하여 투여량에 따른 시너지 효과를 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

세 가지 농도의 강황(생물전환)산물을 각각 감염 전 2주간 사전투여 하고 살모넬라를 감염시킨 뒤, 두 가지 투여용량의 바실러스소재를 투여하여 살모넬라 감염 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 강황(생물전환)산물에 의해 장관으로 침투하지 못하고 분변으로 다량 배출되는 살모넬라를 바실러스소재가 효율적으로 제거할 수 있는 것으로 보인다. 다만, 분변으로 배출되는 것을 보다 효율적으로 억제하기 위하여 더 높은 농도의 바실러스소재를 투여하거나, 분변으로 배출된 살모넬라를 2차적으로 제어하기 위한 방법이 필요할 것으로 보인다.

Table 34. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 순차적 복합투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		8.06 \pm 0.57	9.12 \pm 0.83
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		5.81 \pm 0.42	6.83 \pm 0.59
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10^7 cfu/mouse	5.56 \pm 0.53	6.56 \pm 0.41
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		5.68 \pm 0.55	6.28 \pm 0.57
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		3.27 \pm 0.28	4.08 \pm 0.35
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10^8 cfu/mouse	3.59 \pm 0.36	3.82 \pm 0.36
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		3.36 \pm 0.35	3.79 \pm 0.4

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

조직 내의 살모넬라의 양을 확인하여 면역반응의 활성화 여부를 판별하였다. 그 결과, 감염 후 투여한 바실러스소재는 면역반응을 활성화 하지 못하지만 2주간 사전 투여한 강황(생물전환)산물의 투여로 인해 면역반응이 효과적으로 활성화 되어 있는 것으로 확인되었다. 따라서 감염 전 2주간의 면역소재 사전 투여와 감염 후 바실러스소재 투여는 장관 내 살모넬라에 대한 직접적인 제거 및 장관 내 침입 억제, 침입한 살모넬라에 대한 면역반응의 활성화 유도를 모두 만족하는 효율적인 순차적 복합투여 방법으로 평가된다. 조직 내 살모넬라 양의 억제에 있어서 기본적으로 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 효과가 더 크게 나타났으며, 바실러스소재의 경우 추가적인 효과를 나타내는 것으로 보인다. 그러나 살모넬라 감염 전 2주간의 강황(생물전환)산물 사전투여, 그리고 살모넬라 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합소재 투여가 보다 효과적인 방법임이 추가실험을 통해 확인되었다.

Table 35. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 순차적 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		41.5 \pm 4.3	51.9 \pm 3.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		20.9 \pm 1.8	27.5 \pm 1.9
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10^7 cfu/mouse	8.4 \pm 0.7	7.8 \pm 0.6
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		5.3 \pm 0.6	2.4 \pm 0.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		16.5 \pm 1.7	20.1 \pm 2.2
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10^8 cfu/mouse	6.7 \pm 0.3	5.6 \pm 0.6
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		3.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1

Table 36. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 순차적 복합투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		135.9 ± 12.7	71.2 ± 6.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		66.3 ± 5.7	42.3 ± 4.7
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse	12.7 ± 1.4	6.8 ± 0.4
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		5.1 ± 0.4	5.1 ± 0.3
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		51.2 ± 5.3	31.2 ± 2.8
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse	8.6 ± 0.9	4.2 ± 0.4
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.1

(7) 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 효과 평가

SE38 살모넬라 균주 감염 마우스 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 감염 억제 효과를 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 강황(생물전환)산물을 2.5 mg/kg과 10 mg/kg의 1일 투여용량으로 감염 전 2주간 투여한 뒤 살모넬라의 감염을 유도하였다. 살모넬라 감염 후 2일간 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합소재를 식이 투여 하였으며, 강황(생물전환)산물은 1.25 mg/kg부터 40 mg/kg 까지의 1일 투여용량으로, 바실러스소재는 5×10^6 cfu/mouse부터 1×10^8 cfu/mouse 까지의 1일 투여용량으로 투여하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 후 1일차와 2일차의 분변 내 살모넬라를 측정된 결과, 강황(생물전환)산물의 투여량이 높아질수록 분변 내 배출되는 살모넬라의 양은 증가하는 것으로 확인되었으며 바실러스소재의 투여량이 높아질수록 분변 내 살모넬라의 양은 감소하는 것으로 확인되었다. 앞선 결과와 마찬가지로, 강황(생물전환)산물에 의해 증가하는 살모넬라의 배출량이 바실러스소재의 복합투여로 인해 효과적으로 감소하는 것으로 보인다.

Table 37. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 분변 내 살모넬라의 측정-1

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		86.7 \pm 6.3	95.4 \pm 7.6
20 mg Streptomycin		82.3 \pm 5.9	93.1 \pm 8.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1×10^7 cfu/mouse	60.3 \pm 5.2	65.6 \pm 5.7
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1×10^7 cfu/mouse	69.8 \pm 4.3	75.6 \pm 4.3
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1×10^7 cfu/mouse	75.9 \pm 5.4	80.7 \pm 5.9
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1×10^8 cfu/mouse	21.0 \pm 1.5	20.3 \pm 1.2
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1×10^8 cfu/mouse	16.5 \pm 1.4	22.3 \pm 1.7
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1×10^8 cfu/mouse	8.3 \pm 0.4	10.9 \pm 0.8
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1×10^7 cfu/mouse	59.6 \pm 4.1
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1×10^7 cfu/mouse		68.2 \pm 3.6	69.7 \pm 4.3
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1×10^7 cfu/mouse		77.2 \pm 5.6	85.8 \pm 7.5
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1×10^8 cfu/mouse		16.9 \pm 1.3	23.2 \pm 1.6
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1×10^8 cfu/mouse		10.3 \pm 0.9	12.3 \pm 1.1
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1×10^8 cfu/mouse		6.8 \pm 0.3	9.2 \pm 0.5

Table 38. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 분변 내 살모넬라의 측정-2

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		86.7 \pm 6.3	95.4 \pm 7.6
20 mg Streptomycin		82.3 \pm 5.9	93.1 \pm 8.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	61.3 \pm 5.3	70.9 \pm 6.2
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	45.3 \pm 3.4	52.3 \pm 4.8
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	34.3 \pm 2.6	39.2 \pm 2.4
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	22.4 \pm 1.3	29.4 \pm 1.4
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	57.6 \pm 3.8	65.6 \pm 4.1
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	42.5 \pm 4.1	48.2 \pm 3.5
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	30.2 \pm 2.4	34.4 \pm 2.5
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	20.4 \pm 1.5	25.7 \pm 2.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg			

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여에서 맹장과 장관막림프절, 비장과 간에 존재하는 살모넬라를 측정된 결과, 모든 실험군에서 살모넬라의 조직 내 생존률이 감소하는 것으로 확인되었다. 특히, 감염 전 가장 높은 투여량으로 설정한 10 mg/kg 강황(생물전환)산물의 2주간 사전투여와 감염 후 40 mg/kg 강황(생물전환)산물 + 1×10^8 cfu/mouse 바실러스소재 복합투여에서 효과의 포화 없이 가장 높은 감염 억제 활성을 갖는 것으로 확인되었으며, 강황(생물전환)산물의 2주간 사전투여 및 감염 후 바실러스소재의 단독 투여 시 보다 더 높은 억제율을 갖는 것으로 확인되어, 감염 전·후 강황(생물전환)산물의 지속적인 투여가 살모넬라 감염 억제에 더 효과적일 것이라 판단된다.

Table 39. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 살모넬라의 측정-1

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		45.8 ± 3.5	59.7 ± 4.2
20 mg Streptomycin		41.7 ± 4.0	55.6 ± 5.4
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	17.6 ± 1.3	22.1 ± 2.0
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	8.7 ± 0.6	8.8 ± 0.5
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	5.8 ± 0.4	6.2 ± 0.3
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse	11.3 ± 1.0	12.5 ± 0.8
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	5.7 ± 0.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse		3.1 ± 0.1	5.1 ± 0.2
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse		1.5 ± 0.1	2.6 ± 0.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse		3.2 ± 0.2	6.6 ± 0.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse		2.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse		0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1

Table 40. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 살모넬라의 측정-2

		<i>Salmonella</i> in tissue			
		Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)		
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
SE38 infection only		45.8 ± 3.5	59.7 ± 4.2		
20 mg Streptomycin		41.7 ± 4.0	55.6 ± 5.4		
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	22.8 ± 1.9	30.9 ± 2.7	
		강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	8.3 ± 0.4	10.2 ± 0.8	
		강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	14.7 ± 1.3	21.3 ± 1.5	
		강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	6.2 ± 0.4	6.1 ± 0.5	
	10 mg/kg		강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	17.2 ± 1.3	8.3 ± 0.6
			강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	7.7 ± 0.5	7.2 ± 0.6
			강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	11.5 ± 1.0	6.1 ± 0.5
			강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	5.9 ± 0.4	4.8 ± 0.3

Table 41. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 비장 및 간 내 살모넬라의 측정-1

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		142.8 ± 11.2	77.6 ± 5.9
20 mg Streptomycin		135.3 ± 12.9	71.8 ± 6.3
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	60.3 ± 4.5	40.8 ± 3.4
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	12.2 ± 1.1	7.9 ± 0.5
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	7.1 ± 0.5	6.3 ± 0.4
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse	45.3 ± 4.1	24.7 ± 1.6
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse	7.6 ± 0.5	3.2 ± 0.2
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse	5.4 ± 0.3	1.9 ± 0.2
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse	11.3 ± 1.0
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse		6.2 ± 0.3	4.9 ± 0.3
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁷ cfu/mouse		4.2 ± 0.3	2.5 ± 0.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse		6.3 ± 0.5	4.0 ± 0.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse		5.0 ± 0.4	1.6 ± 0.1
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 1x10 ⁸ cfu/mouse		2.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1

Table 42. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 비장 및 간 내 살모넬라의 측정-2

		<i>Salmonella</i> in tissue		
		Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)	
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
SE38 infection only		142.8 ± 11.2	77.6 ± 5.9	
20 mg Streptomycin		135.3 ± 12.9	71.8 ± 6.3	
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	71.2 ± 5.6	45.9 ± 3.9
		강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	16.3 ± 1.2	7.2 ± 0.4
		강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	52.8 ± 4.7	33.2 ± 2.5
		강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	8.9 ± 0.7	4.3 ± 0.2
		강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	13.3 ± 1.2	5.6 ± 0.4
		강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁶ cfu/mouse	4.2 ± 0.3	2.8 ± 0.1
		강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	6.9 ± 0.4	3.3 ± 0.2
		강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5x10 ⁷ cfu/mouse	2.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1

(8) 왕겨초액의 분변 살균제로서의 효능 평가

분변으로 배출된 살모넬라는 2차감염을 일으킬 수 있기 때문에, 분변에 생존하는 살모넬라를 제거하기 위한 살균제로서 왕겨초액을 사용하고자 하였다. 이전 연구 결과에서, 왕겨초액은 강력한 항균활성을 갖지만 강황(생물전환)산물, 바실러스소재 모두와 시너지효과를 가질 수 없는 단점이 있다. 따라서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재를 생체 내 적용하는 저감제로 이용하고, 왕겨초액을 분변 내 살모넬라에 대한 살균제로 이용하여 세 가지 소재의 장점을 극대화 한 복합처리방법을 고안하고자 하였다. 실험군당 10마리의 암컷 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 강황(생물전환)산물은 6주령 마우스를 이용하여 2주간 사 전식이 하였고, 바실러스소재는 8주령 마우스를 이용하여 감염 후 식이하였다. 또한, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재를 순차적으로 투여시에는 6주령의 마우스를 이용하였다.

(가) 왕겨초액의 처리시간에 따른 분변 내 살모넬라의 생존률 확인

SE38 살모넬라 감염 마우스에서 감염 1일째와 2일째에 각각 분변을 포함한 깔짚 전체를 회수하였다. 왕겨초액은 동물실험에서 독성을 보이지 않았던 1%로 처리하였으며 원액을 증류수에 희석하여 1%로 제작하였다. 회수한 깔짚은 평균적으로 110~120g 내외이며 50ml의 왕겨초액을 분무하여 깔짚 전체에 왕겨초액이 닿도록 잘 섞어준 뒤 10분과 60분 상온에서 반응시키고 깔짚 내 분변을 회수하여 분변 내 존재하는 살모넬라의 생균수를 측정하였다. 그 결과, 1% 왕겨초액을 10분 처리시 90% 이상의 높은 살모넬라 사멸율을 보였으며, 60분 처리시 97% 이상의 살모넬라가 사멸하는 결과를 확인하였다.

Table 43. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 분변 내 살모넬라에 대한 왕겨초액의 살균활성

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁵ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice	-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	-	8.89 ± 0.51	9.67 ± 0.75
Normal mice	1% 왕겨초액	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	10 min	0.52 ± 0.04	0.79 ± 0.06
Normal mice	1% 왕겨초액	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only	60 min	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01

(나) 강황(생물전환)산물을 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

왕겨초액이 분변으로 빠져나온 살모넬라를 강력히 제거하는 효과가 있음에 따라 강황(생물전환)산물을 투여한 마우스 분변에 대한 왕겨초액의 효과를 평가하고자 하였다. 강황(생물전환)산물은 체내 살모넬라를 효과적으로 배출, 제거할 수 있지만 분변으로 빠져나온 살모넬라에 대한 제어 능력은 없기 때문에 강황(생물전환)산물의 투여에 의해 다량 배출된 살모넬라를 왕겨초액의 처리로 인해 효과적으로 제거할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 강황(생물전환)산물의 투여에 의해 다량으로 배출된 살모넬라 역시 1% 왕겨초액 처리로 인해 90% 이상 사멸시킬 수 있는 것으로 확인되었다. 이는 강황(생물전환)산물의 주기적인 섭취와 왕겨초액을 이용한 살균으로도 살모넬라에 대한 제어를 효과적으로 할 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

Table 44. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물을 감염 전/후 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		8.89 \pm 0.51	9.67 \pm 0.75
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	-	12.96 \pm 1.17	18.3 \pm 1.54
강황(생물전환)산물 10 mg/kg		18.24 \pm 1.57	22.84 \pm 2.51
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		23.25 \pm 1.26	29.46 \pm 3.05
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		0.52 \pm 0.04	0.79 \pm 0.06
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 10 min	0.92 \pm 0.08	1.37 \pm 0.14
강황(생물전환)산물 10 mg/kg		1.17 \pm 0.13	1.62 \pm 0.15
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		2.09 \pm 0.09	2.16 \pm 0.21
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 60 min	0.31 \pm 0.02	0.87 \pm 0.06
강황(생물전환)산물 10 mg/kg		0.58 \pm 0.02	0.96 \pm 0.07
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		1.28 \pm 0.13	1.59 \pm 0.13

(다) 바실러스소재를 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

바실러스소재를 투여한 마우스 분변에 대한 왕겨초액의 효과를 평가하였다. 바실러스소재를 투여한 살모넬라 감염 마우스에서 배출된 분변에 1% 왕겨초액을 처리한 결과 모두 98% 이상의 살모넬라가 사멸하는 것으로 확인되었다. 바실러스소재에 의해 제거되지 못하고 생존하여 분변으로 빠져나온 살모넬라에 대한 추가적인 제어가 가능하다는 장점이 있으며, 두 소재 모두 작용기전이 유사하지만 분변에서의 살모넬라 제거에 매우 효과적으로 사용할 수 있어 그 의미가 크다고 평가된다.

Table 45. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재를 전/후 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁵ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		8.89 ± 0.51	9.67 ± 0.75
바실러스소재 10 ⁶ cfu/mouse	-	8.13 ± 0.57	9.42 ± 0.89
바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse		7.31 ± 0.42	8.11 ± 0.79
바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse		3.8 ± 0.26	4.54 ± 0.31
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		0.52 ± 0.04	0.79 ± 0.06
바실러스소재 10 ⁶ cfu/mouse	1% 왕겨초액 10 min	0.53 ± 0.02	0.78 ± 0.02
바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse		0.49 ± 0.03	0.59 ± 0.06
바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse		0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01
바실러스소재 10 ⁶ cfu/mouse	1% 왕겨초액 60 min	0.12 ± 0.01	0.36 ± 0.02
바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse		0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01
바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse		0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01

(라) 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과를 평가하였다. 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여하고, 감염 후에는 바실러스소재를 투여하였으며, 분변에 존재하는 살모넬라는 왕겨초액을 처리하여 사멸시키고자 하였다. 그 결과 모든 경우에 분변 내 존재하는 살모넬라는 98% 이상 사멸하는 것으로 확인되었고, 세 소재의 장점을 모두 이용하여 가장 큰 시너지 효과를 내는 복합투여 방법인 것으로 평가된다. 그러나 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 후 살모넬라 감염, 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합소재를 투여하고 분변에는 왕겨초액을 처리하는 방법이 보다 시너지 효과를 나타내는 효과적인 방법임이 추가실험을 통해 확인되었다.

Table 46. SE38 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SE38 infection only		8.06 \pm 0.57	9.12 \pm 0.83
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		5.81 \pm 0.42	6.83 \pm 0.59
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^7 cfu/mouse	5.56 \pm 0.53	6.56 \pm 0.41
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		5.68 \pm 0.55	6.28 \pm 0.57
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		3.27 \pm 0.28	4.08 \pm 0.35
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^8 cfu/mouse	3.59 \pm 0.36	3.82 \pm 0.36
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		3.36 \pm 0.35	3.79 \pm 0.4
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		0.32 \pm 0.02	0.56 \pm 0.04
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^7 cfu/mouse	0.39 \pm 0.02	0.49 \pm 0.03
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		0.39 \pm 0.03	0.51 \pm 0.05
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 10 min	0.19 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^8 cfu/mouse	0.21 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		0.19 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁵ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SE38 infection only		8.06 ± 0.57	9.12 ± 0.83
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		0.08 ± 0.01	0.1 ± 0.01
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10 ⁷ cfu/mouse	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		0.07 ± 0.01	0.16 ± 0.01
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 60 min	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.01
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10 ⁸ cfu/mouse	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.00
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00

다. 인수공통 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스 모델에서의 in vivo 유효성 평가에 대한 실험적 의의

인수공통 살모넬라 균주인 SE38 균주를 이용하여 살모넬라 경구 감염 마우스모델을 제작하고, 면역조절소재, 프로바이오틱스소재 및 왕겨초액의 살모넬라 감염 억제 효과를 평가하였다.

면역조절소재의 경우, 유효성 1차 평가에서 투여기준 설정 평가에서 설정한 10mg/kg 농도를 사용하였고, 감염 전 2주간 사료에 첨가하여 식이투여한 후 살모넬라를 감염시킨 뒤 감염 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물 모두 분변으로 배출되는 살모넬라의 양이 크게 증가한 것으로 확인되었고, 맹장, 장관막림프절, 비장, 간 조직에서 모두 살모넬라의 생존률이 감소하는 것으로 확인되었다. 특히, 맹장에서의 억제율에 비해 장관막림프절, 비장, 간에서의 억제율이 높게 측정되어 면역조절소재가 갖는 면역반응 활성화를 통한 살모넬라 제어가 유의미하게 일어났다고 생각된다.

유효성 2차 평가에서는 두가지 면역조절소재 중, 더 높은 활성을 갖는 강황(생물전환)산물의 경우 2.5mg/kg, 10mg/kg, 40mg/kg의 세가지 1일 투여용량을 사용하여 농도별 감염 억제 효과를 평가하였다. 각 농도의 면역조절소재 포함 식이를 감염 전 2주간 식이하고 살모넬라를 감염시켜 감염 억제에 대한 예방 효과를 확인하였으며, 사전투여 없이 살모넬라 감염과 동시에 식이하여 살모넬라 감염에 대한 치료 효과를 확인할 수 있었다. 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 한 경우와 사전투여 없이 감염과 동시에 처리한 경우 모두 농도 의존적으로 살모넬라 감염이 억제되는 효과를 확인하였으나, 감염과 동시에 처리한 경우 보다 감염 전 2주간 사전투여 한 경우에 더 높은 활성이 있는 것으로 확인되었다. 10mg/kg의 농도로 감염 전 2주간 식이 후 감염시킨 경우와 사전투여 없이 감염과 동시에 40mg/kg의 면역조절소재를 처리한 경우의 감염 억제 효율이 유사하게 측정되는 것으로 보아, 감염 전 사전투여와 동일한 치료 효과를 보기 위해서는 약 4배 정도 높은 수준의 강황(생물전환)산물의 투여가 필요할 것이라 예상된다.

프로바이오틱스소재는 유효성 1차 평가에서 유산균소재와 바실러스소재를 사용하였으며, 살모넬라 감염량과 동일량인 10^8 cfu를 1일 섭취하는 사료에 첨가하여 2주간 식이 투여하였다. 프로바이오틱스소재는 직접적인 항균활성을 갖기 때문에, 분변으로의 살모넬라 배출과 조직 내 살모넬라 모두 감소하는 효과를 보였으며 유산균소재에 비해 바실러스소재에서 더 높은 항균활성이 있는 것으로 확인되었다. 또한, 각 조직 별 살모넬라 억제율에 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 항균활성 이외의 다른 생리활성은 없는 것이라 생각된다. 유효성 2차 평가에서는 두가지 프로바이오틱스소재 중, 더 높은 활성을 갖는 바실러스소재를 이용하여 10^6 cfu, 10^7 cfu, 10^8 cfu 세가지 1일 투여용량에서 감염 예방 효과와 감염

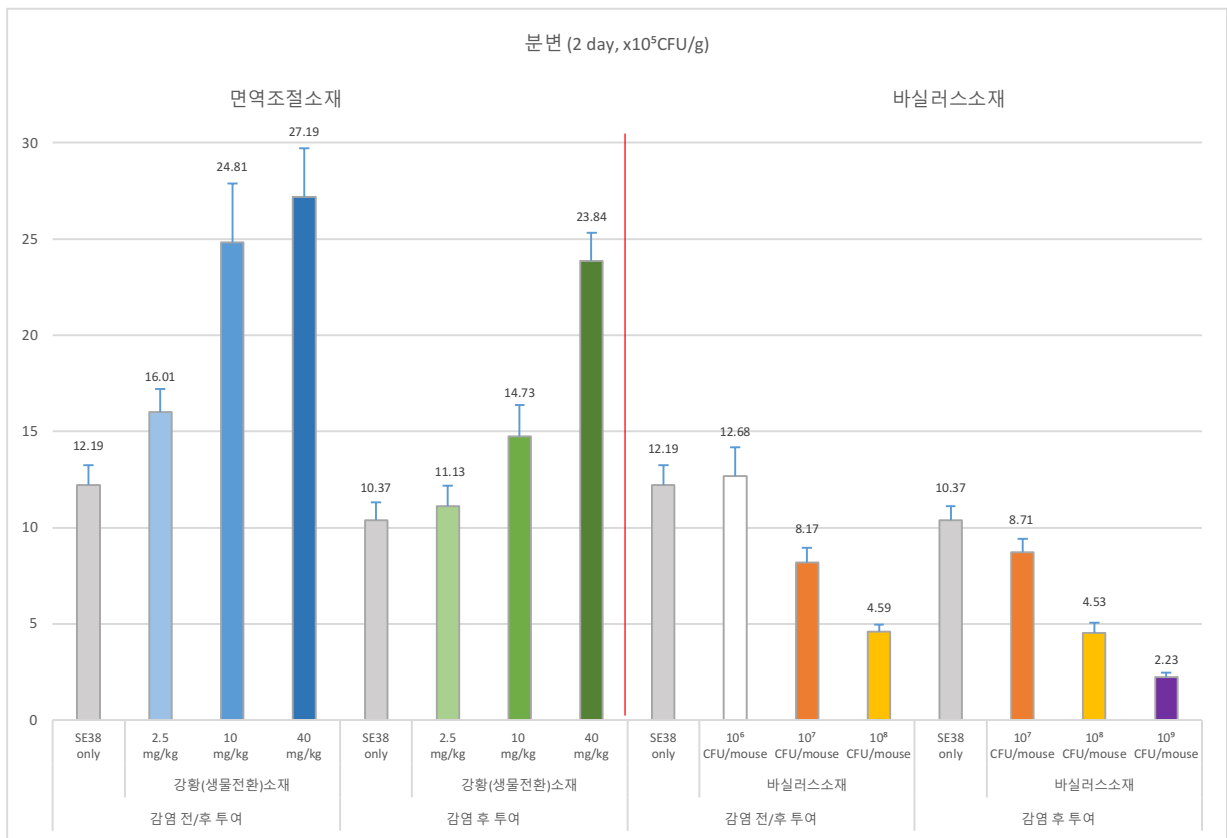
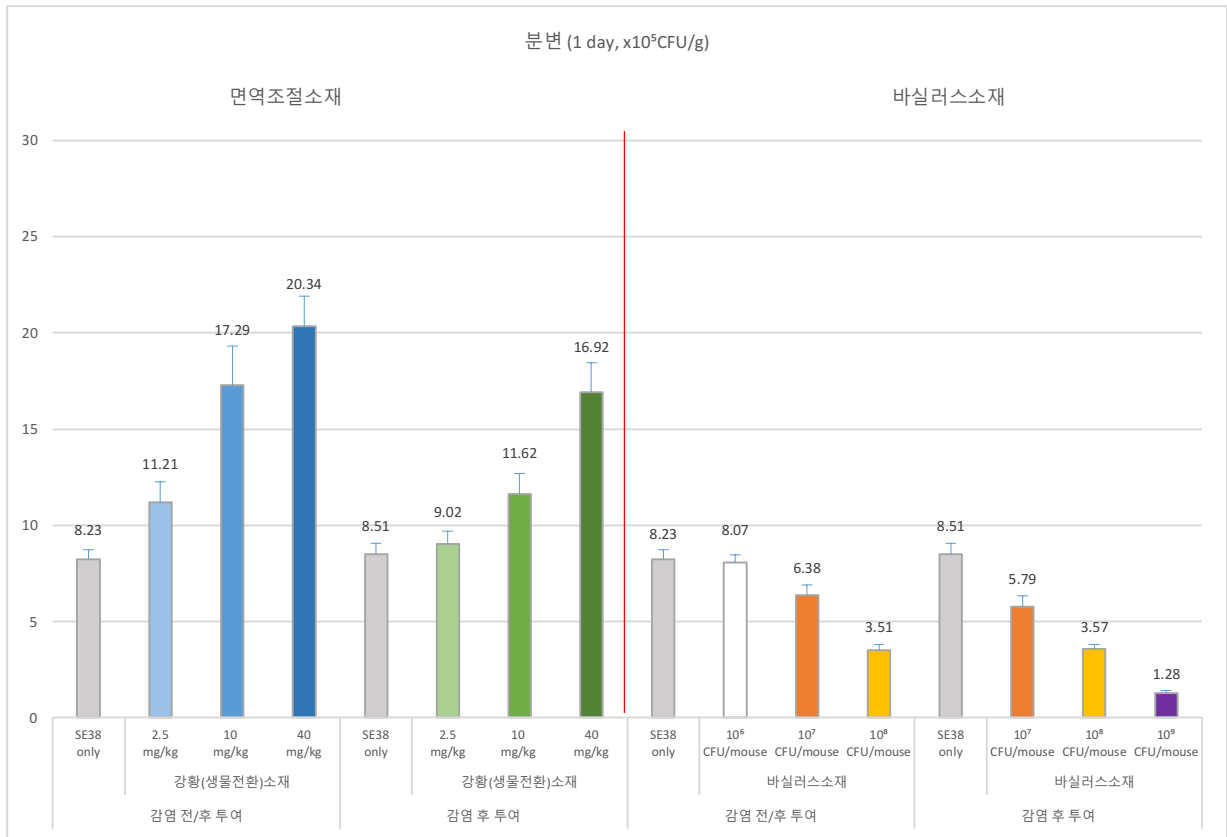
치료 효과를 확인하였다. 1일 투여량 10^6 cfu의 경우 항균활성을 보이지 않았으며 10^7 cfu 이상에서 항균효과가 나타나는 것으로 확인되었고, 10^8 cfu 처리 시 항균활성의 급격한 증가가 일어나는 것으로 확인되었다. 또한 감염 전 2주간 사전투여 시와 감염 후 투여 시 감염 억제 효율에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아, 바실러스소재는 사전투여에도 장 내에 잔존하지 않고 배출되며 투여 시 즉각적인 살모넬라 항균활성을 갖는 것이라 평가된다.

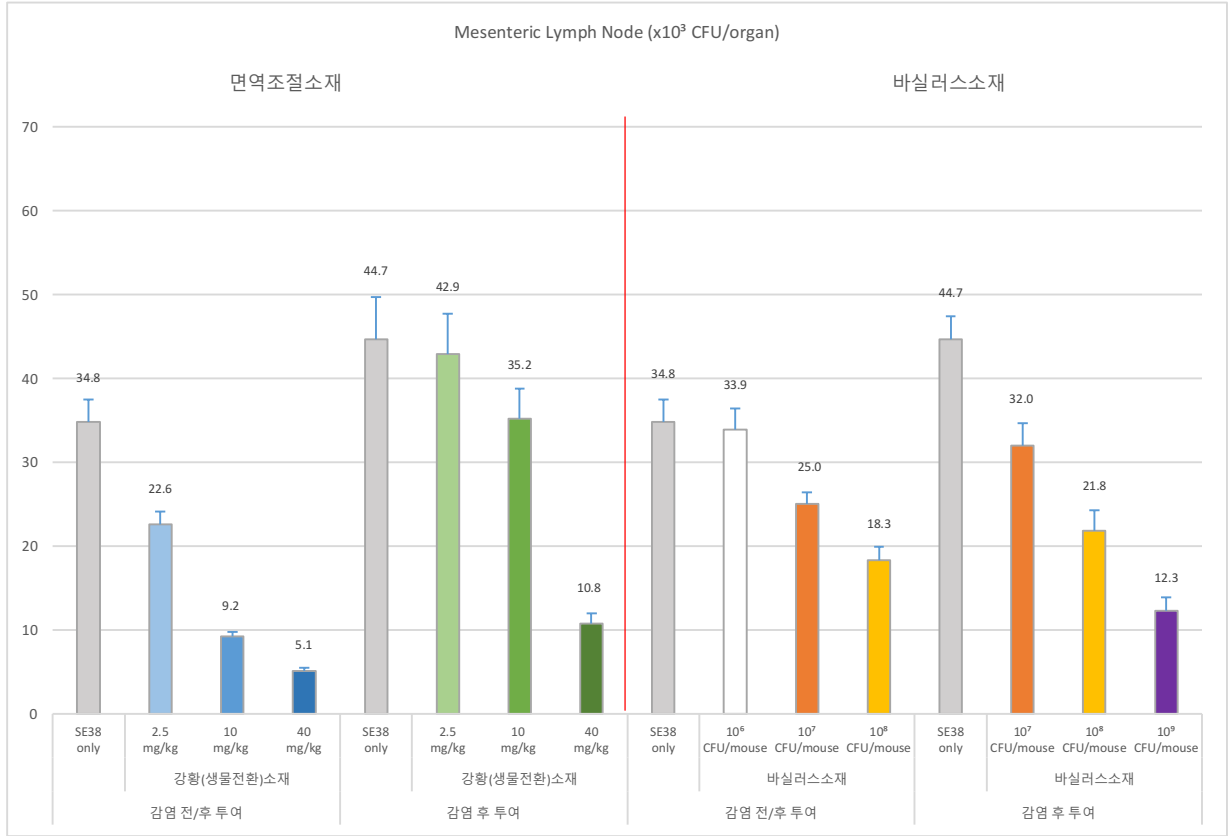
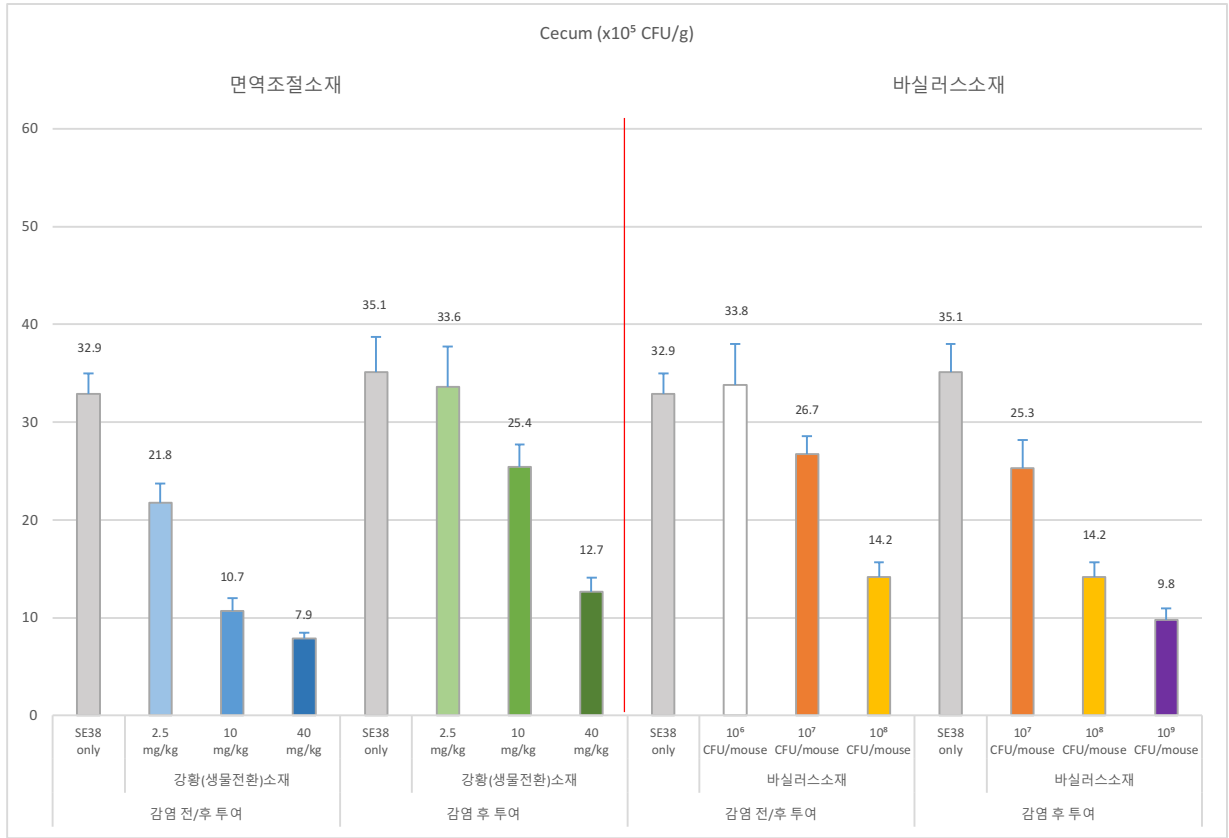
왕겨초액은 유효성 1차 평가에서 1%의 농도로 사료에 첨가하여 감염 전 2주간 식이 투여하였으며, 프로바이오틱스소재와 마찬가지로 직접적인 항균활성을 통해 분변으로 배출되는 살모넬라 및 조직 내 살모넬라를 제거할 수 있는 것으로 확인되었다. 왕겨초액 역시 조직 별 억제율에 큰 차이를 보이지 않아, 항균활성 이외의 다른 생리활성을 통한 억제 효과는 없는 것으로 평가된다.

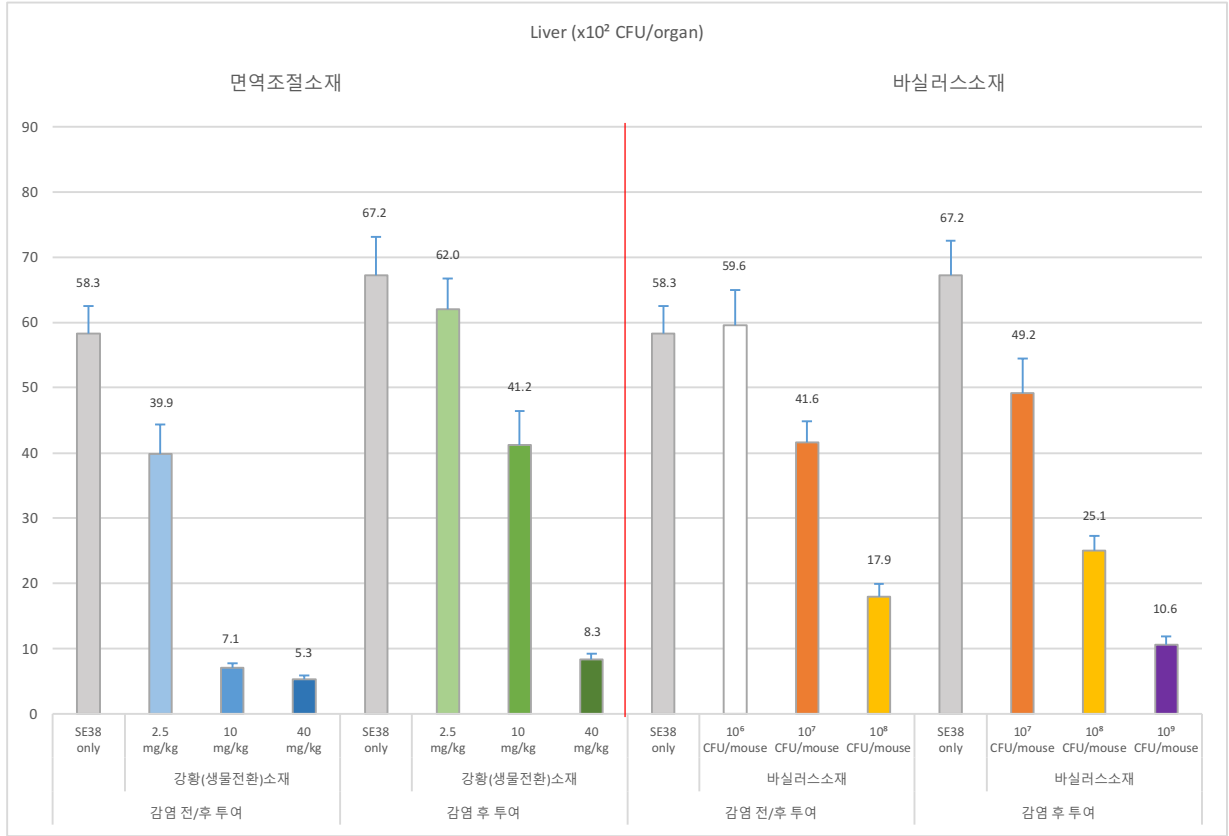
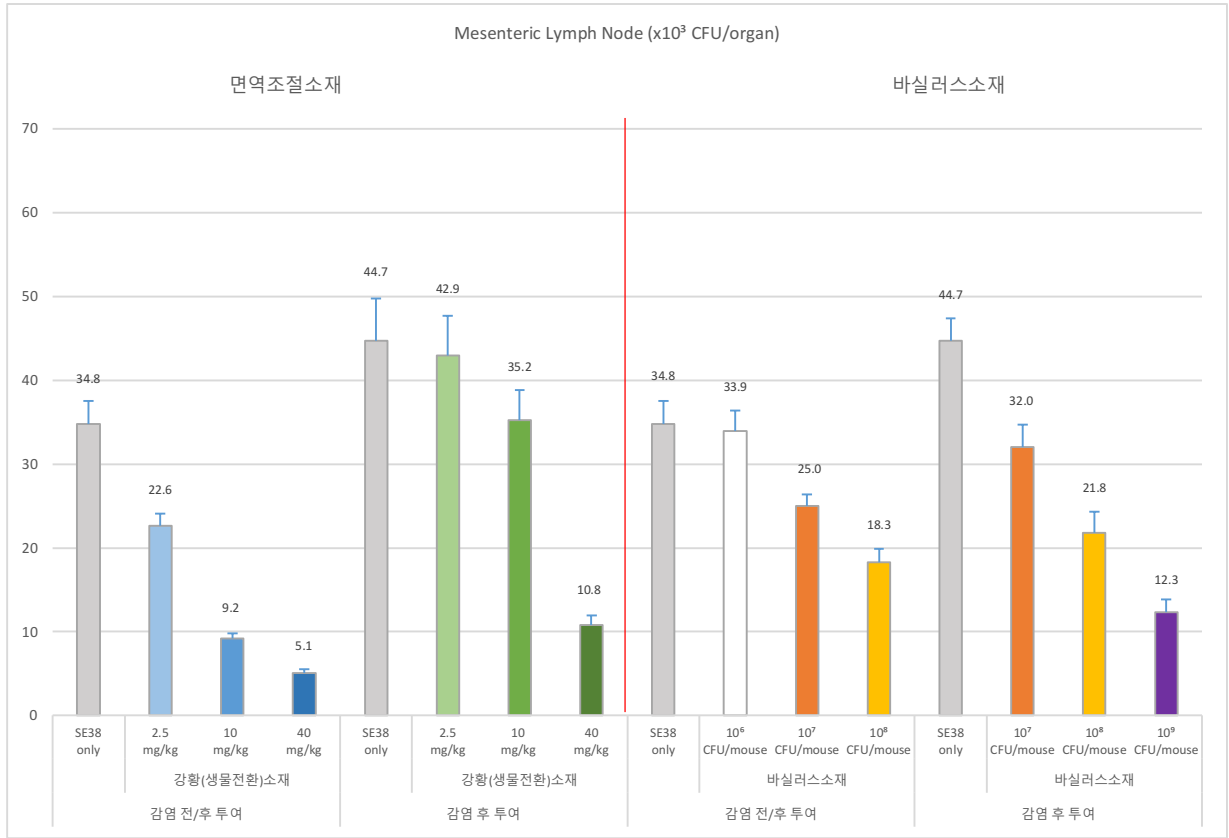
예방 효과가 뛰어난 강황(생물전환)산물과 치료 효과가 뛰어난 바실러스소재를 순차 투여했을 경우 두 소재의 시너지 효과를 확인하였고, 단독투여시 보다 살모넬라 감염 억제 효율이 증가하는 것으로 확인되었다. 특히, 강황(생물전환)산물에 의해 증가하는 분변 내 살모넬라 배출량을 바실러스소재가 효과적으로 제거하는 것으로 확인되었으며, 분변 내 배출되는 살모넬라의 제어는 강황(생물전환)산물의 농도와는 관계없이 주로 바실러스소재의 농도에 영향을 받는 것으로 확인되었다. 반면, 조직 내 살모넬라의 제어는 강황(생물전환)산물의 농도와 바실러스소재의 농도에 모두 의존적으로 반응하는 것으로 확인되었다.

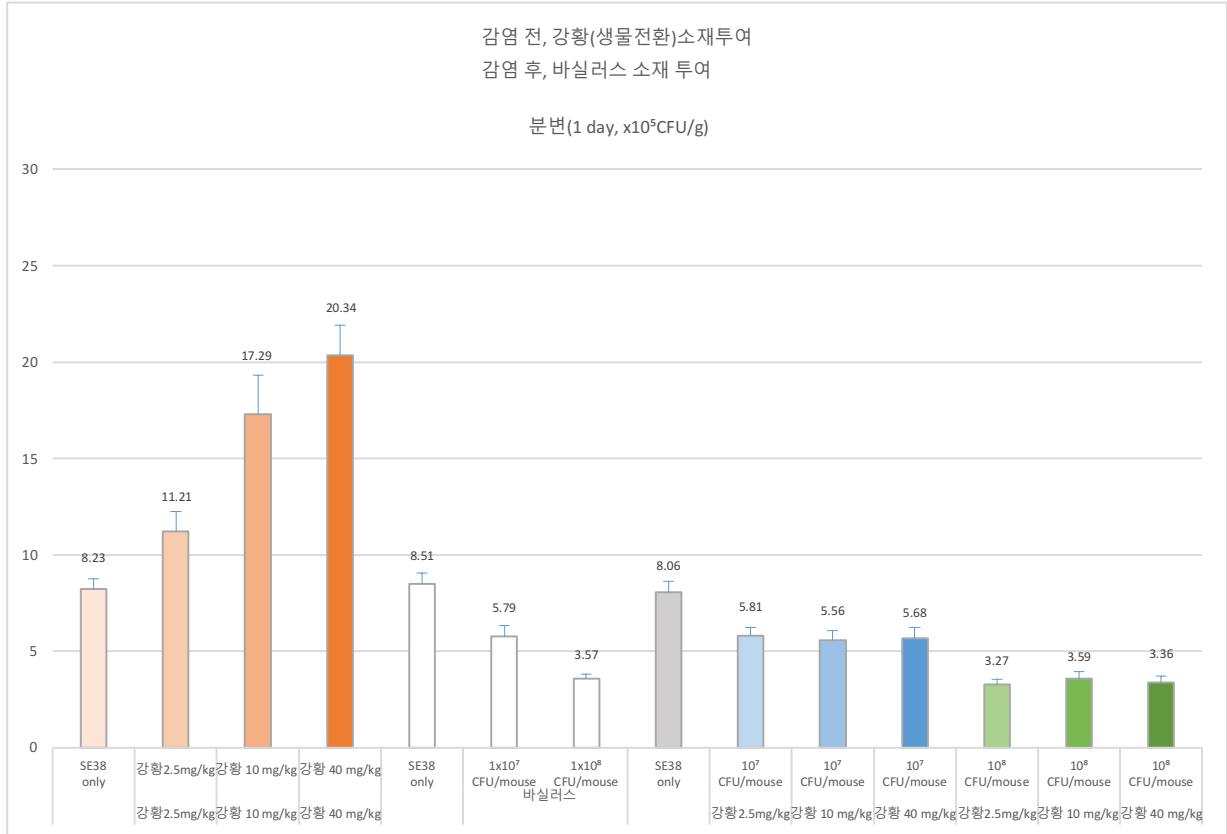
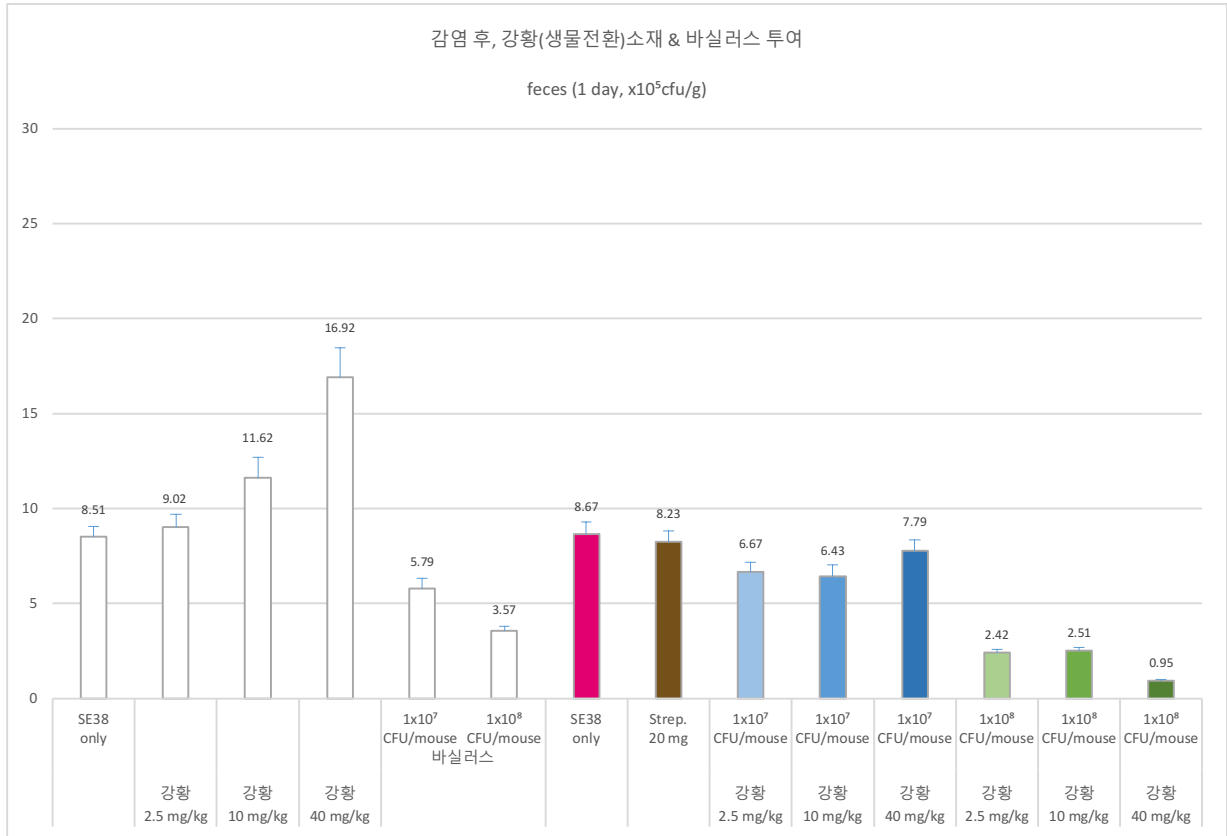
왕겨초액의 경우 면역조절소재 및 프로바이오틱스소재의 효능을 모두 억제하여 면역조절소재 및 프로바이오틱스소재 모두와 복합처리를 할 수 없기 때문에, 왕겨초액이 갖는 강력한 살균 효과를 이용하여 분변 내 생존하는 살모넬라에 대한 살균제로서의 가능성을 평가하였다. 분변을 포함한 깔짚에 1% 왕겨초액을 10분과 60분간 처리하여 살모넬라의 생존률을 측정하였고, 모든 실험조건에서 90% 이상의 살모넬라 억제율이 있는 것으로 확인되었다.

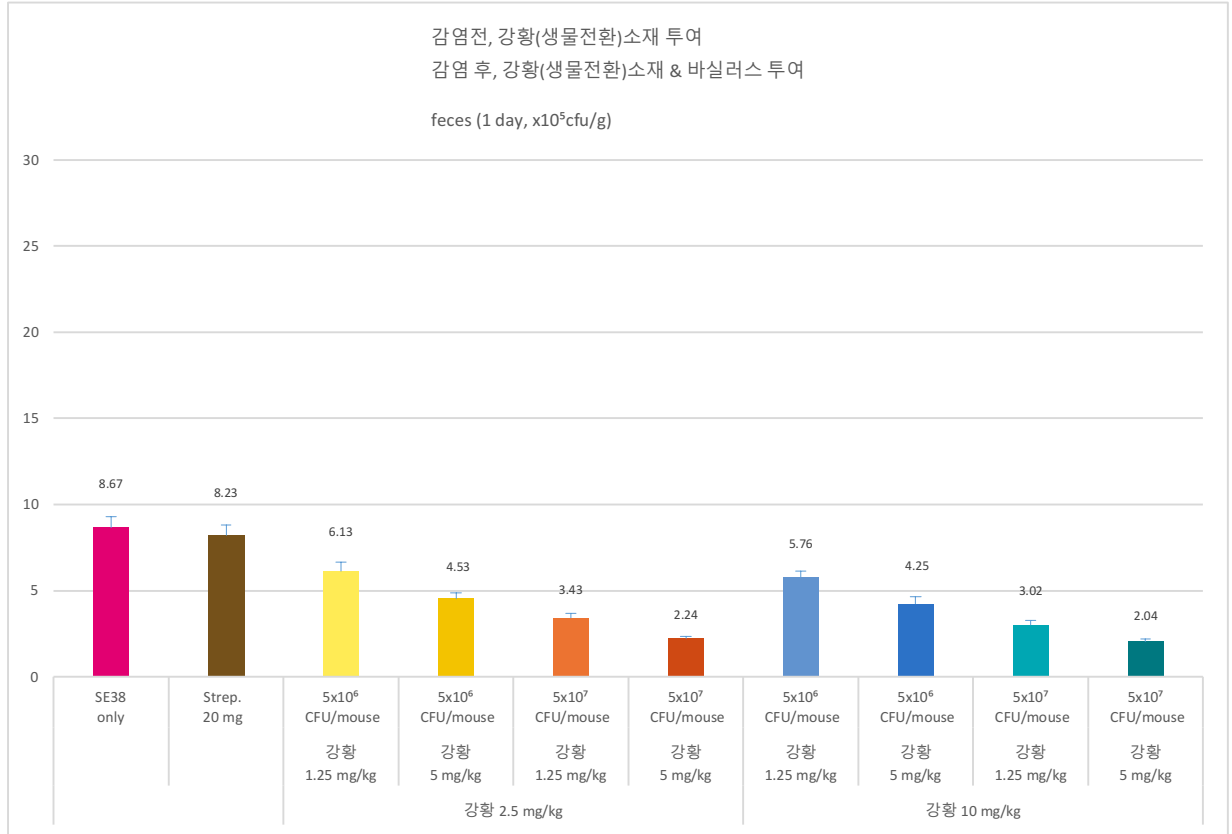
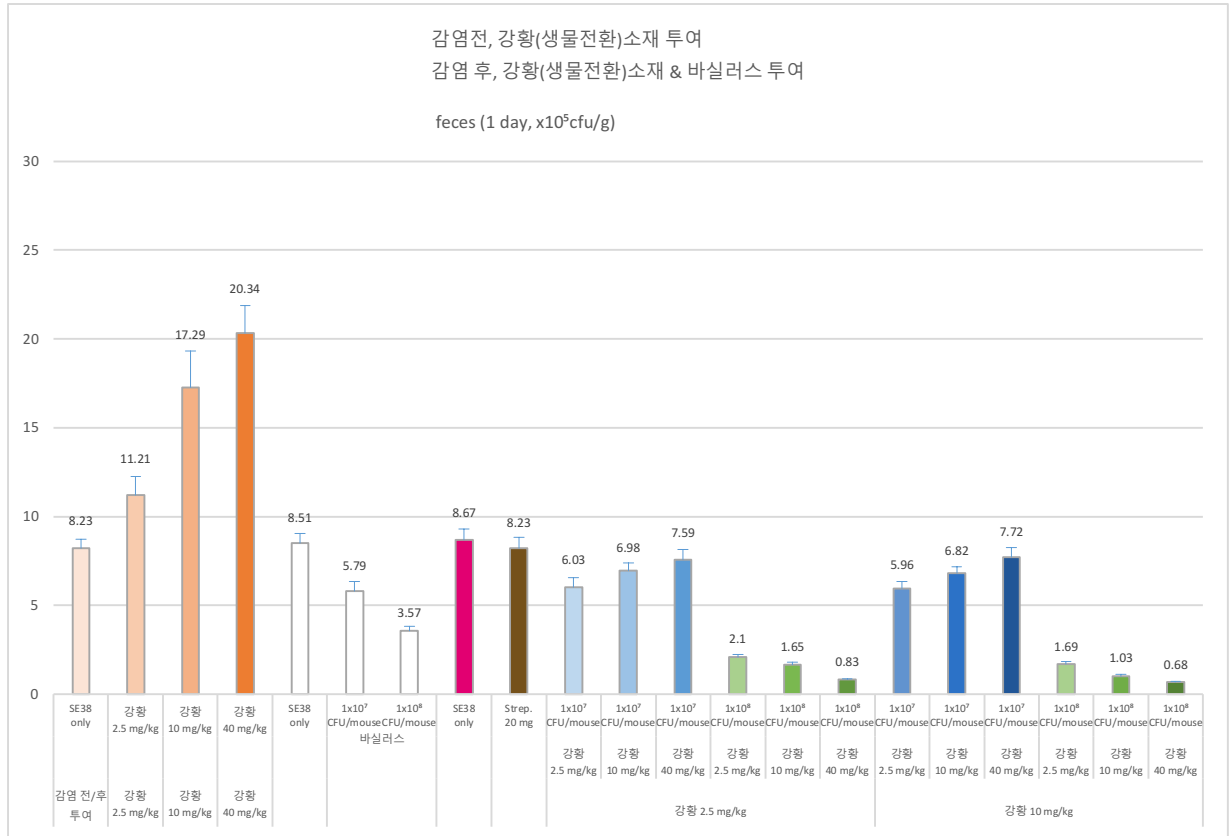
본 연구결과를 종합할 때, 면역조절소재는 감염 전 예방 및 감염 후 치료 목적으로 모두 사용이 가능하며, 프로바이오틱스소재와 왕겨초액의 경우 감염 후 치료 목적으로 사용이 적합할 것으로 생각된다. 또한, 세가지 소재의 복합처리를 고려하면, 감염 전 예방 목적으로의 면역조절소재의 사용과 감염 후 치료 목적으로의 면역조절소재와 프로바이오틱스소재의 복합처리, 이후 살균제로서의 왕겨초액의 사용이 가능할 것이라 판단된다.

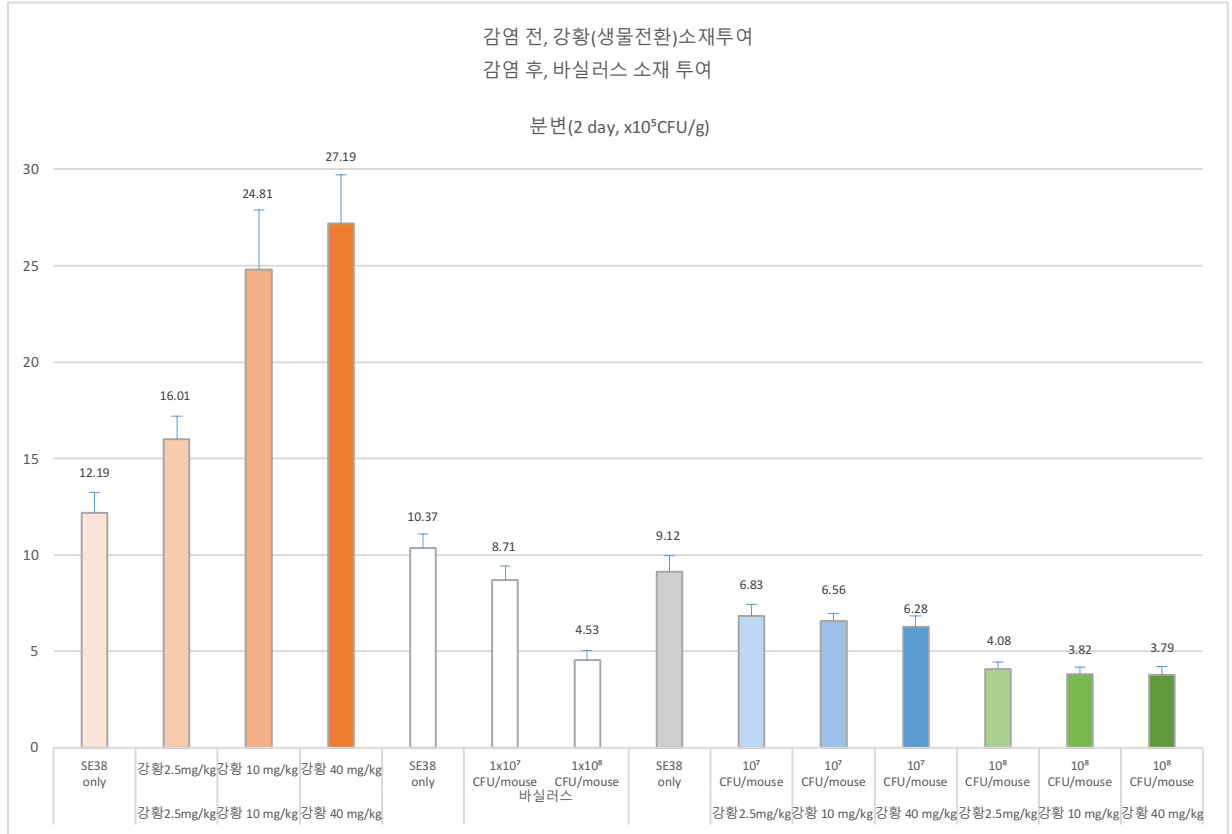
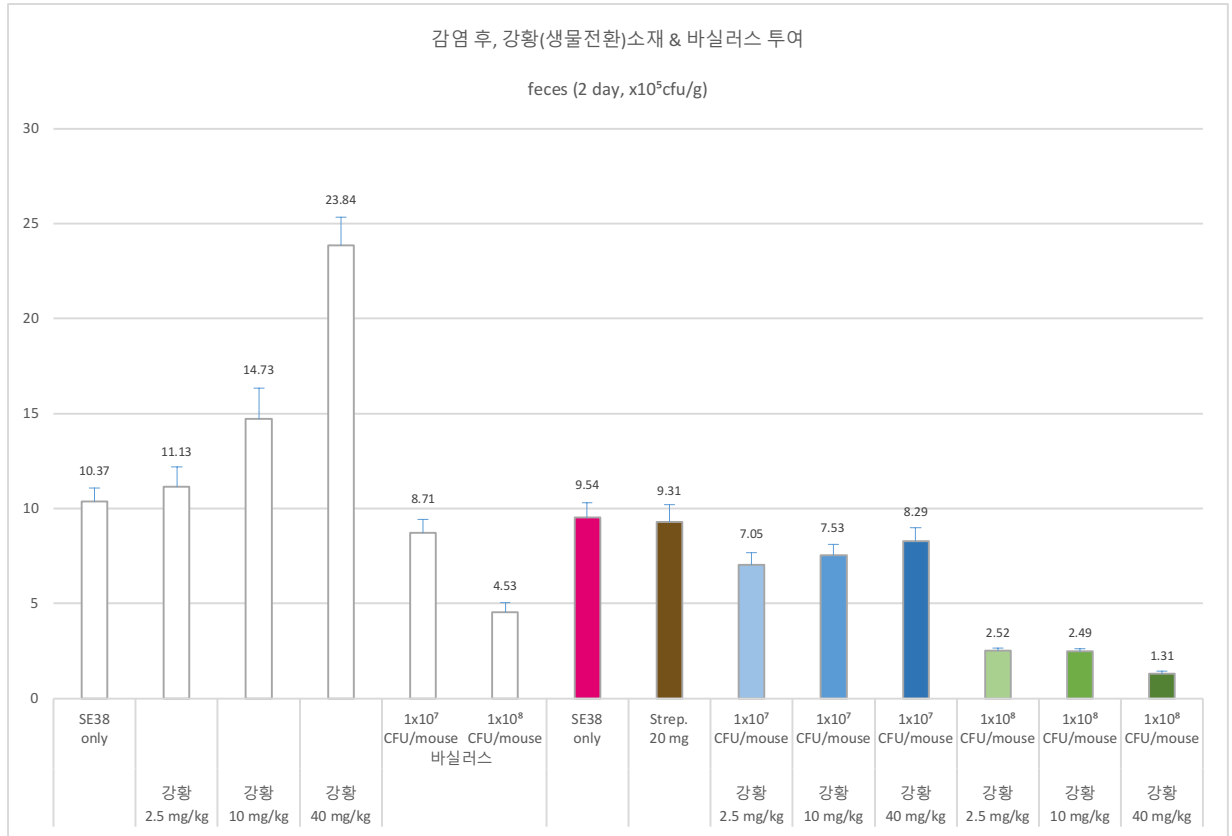


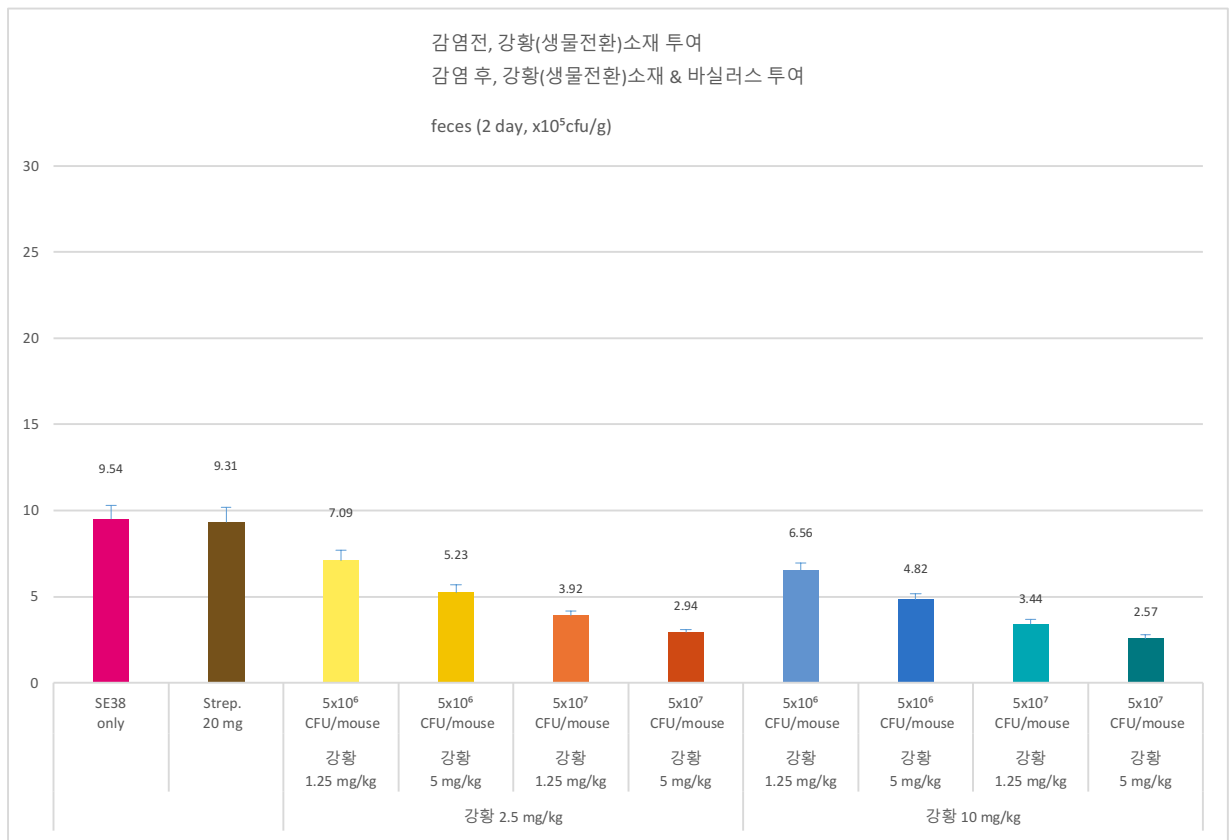
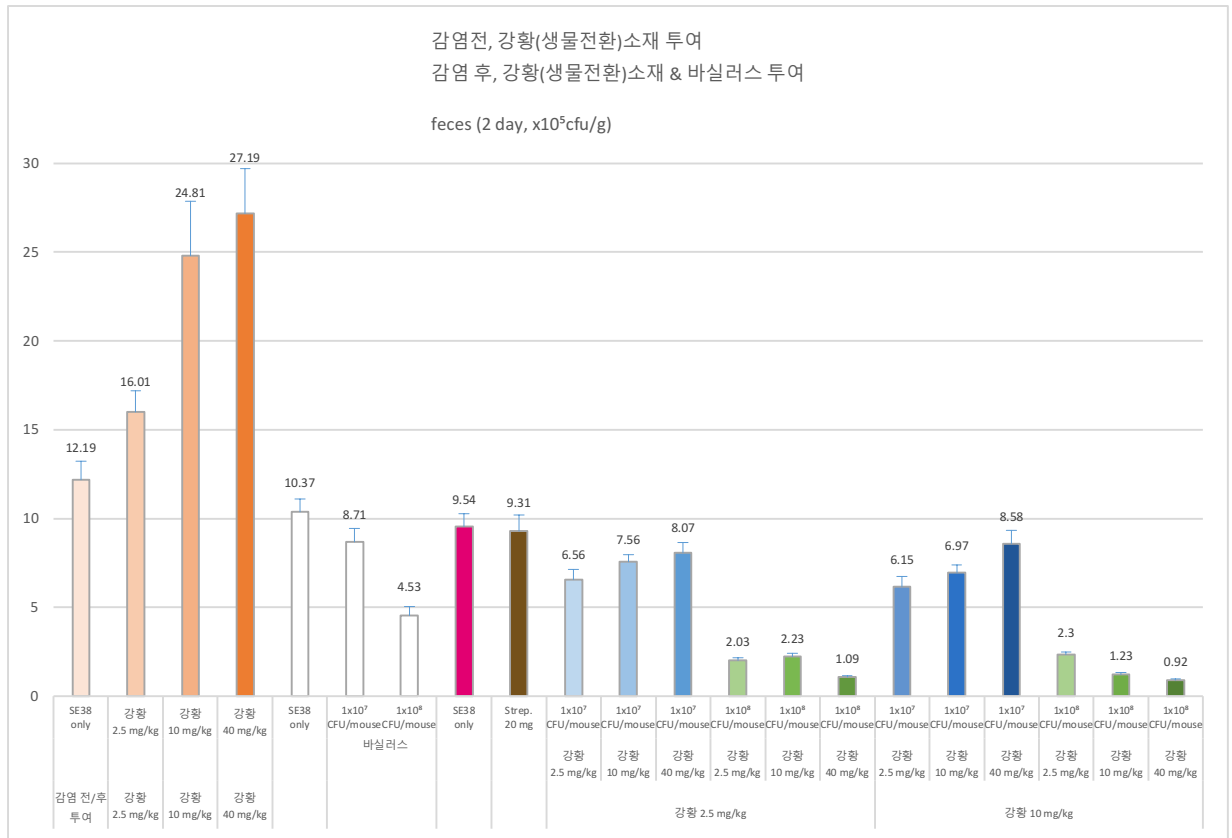


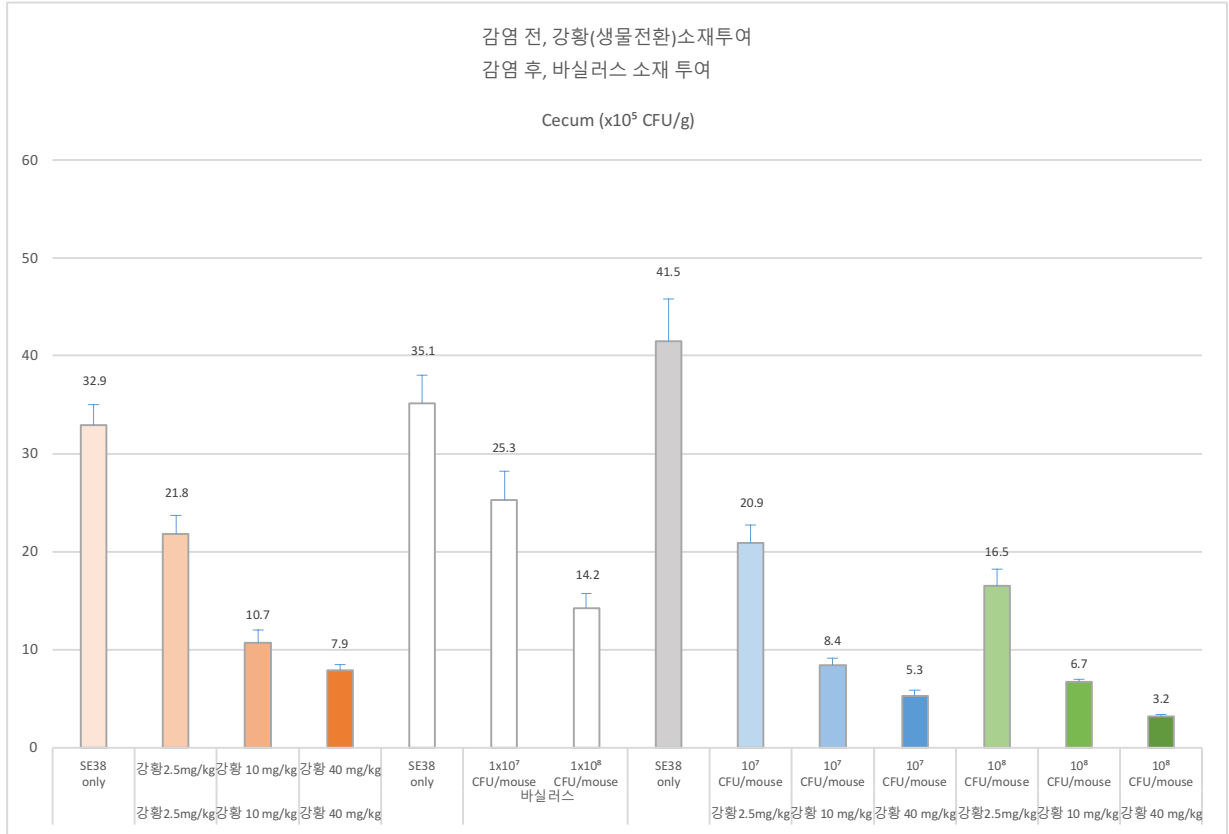
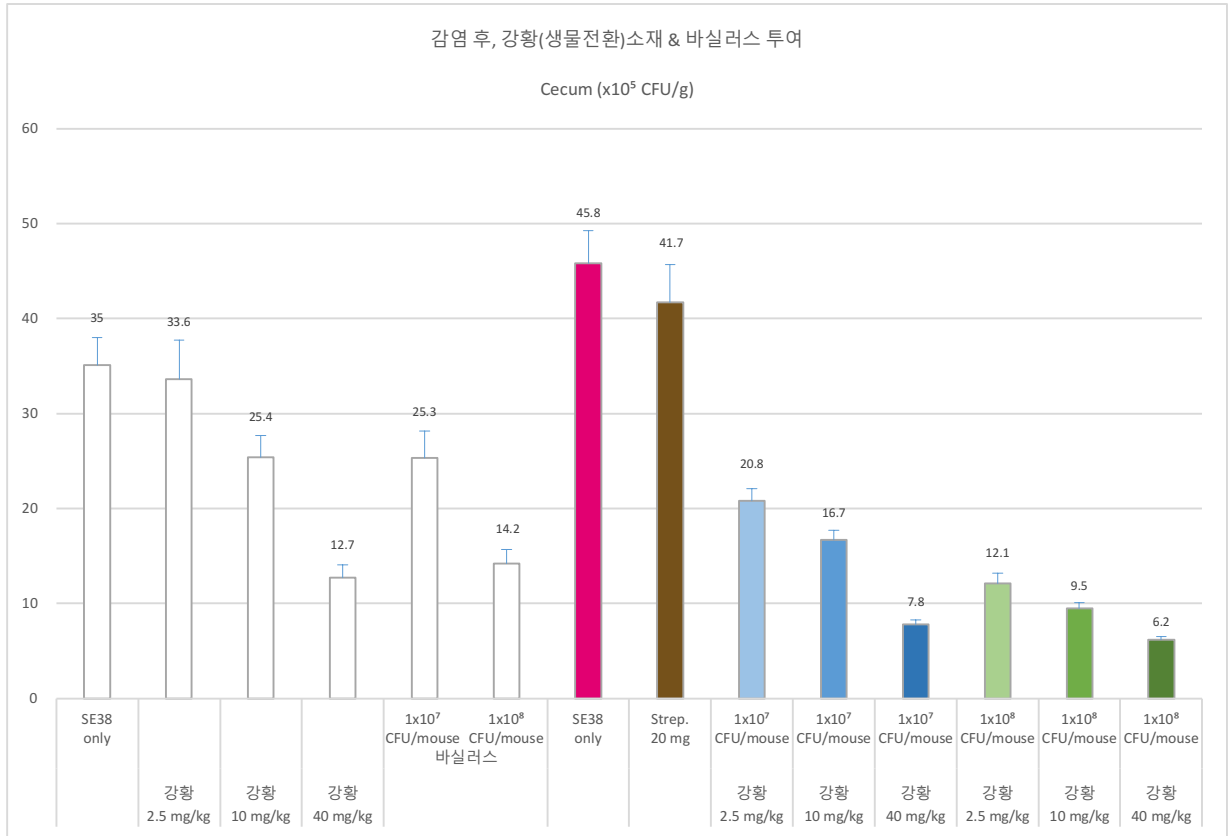


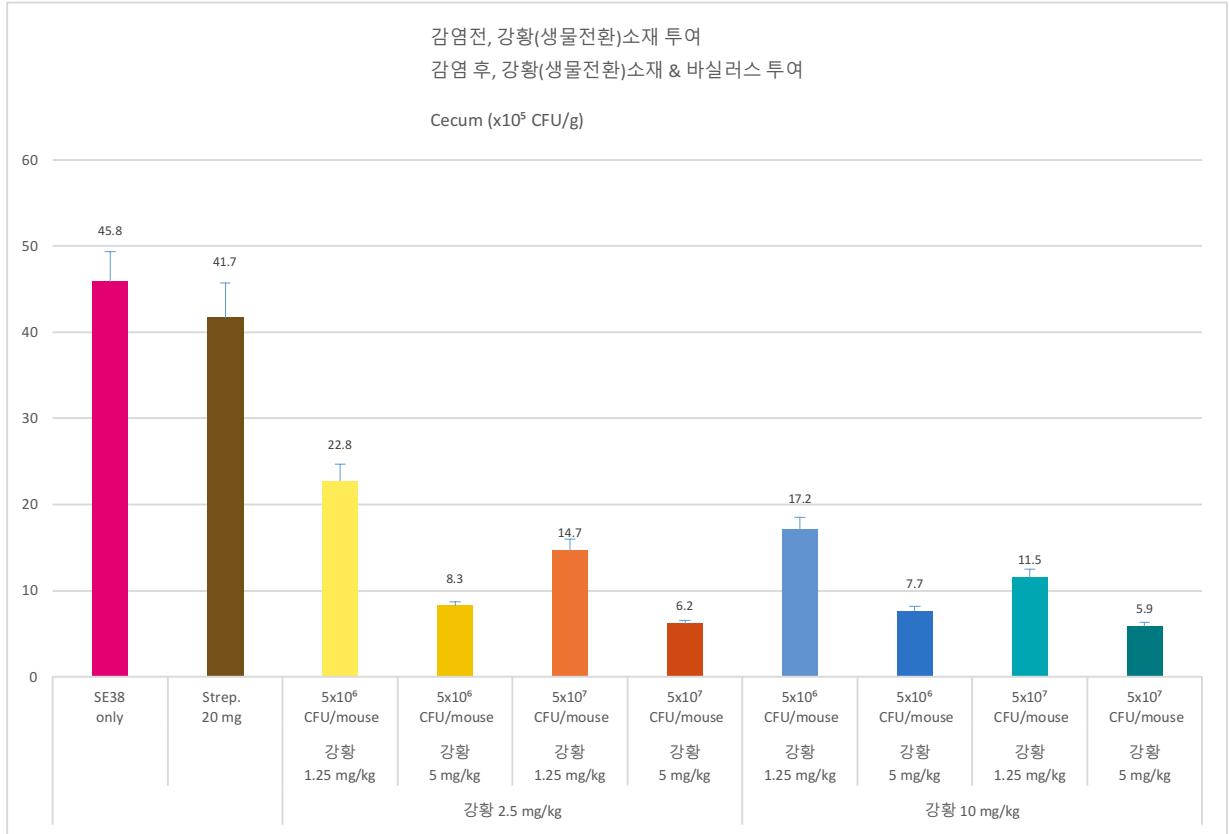
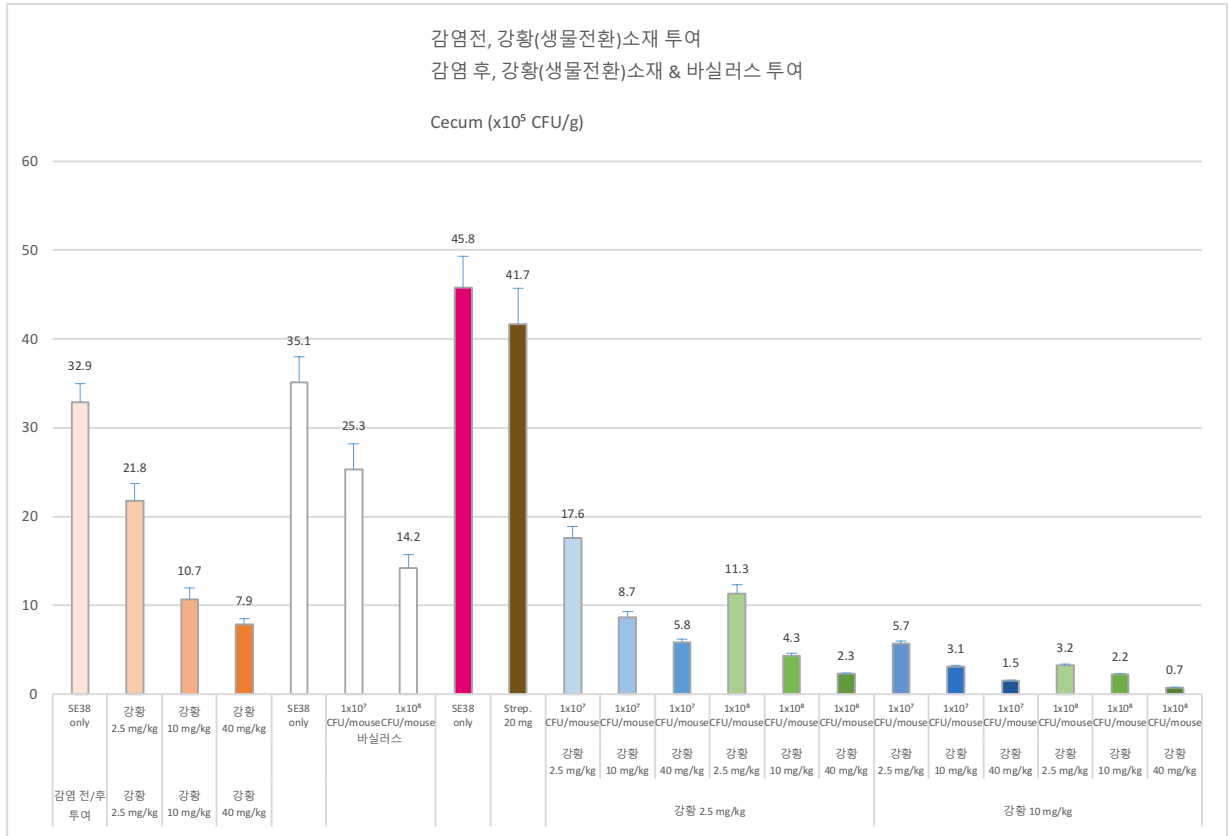


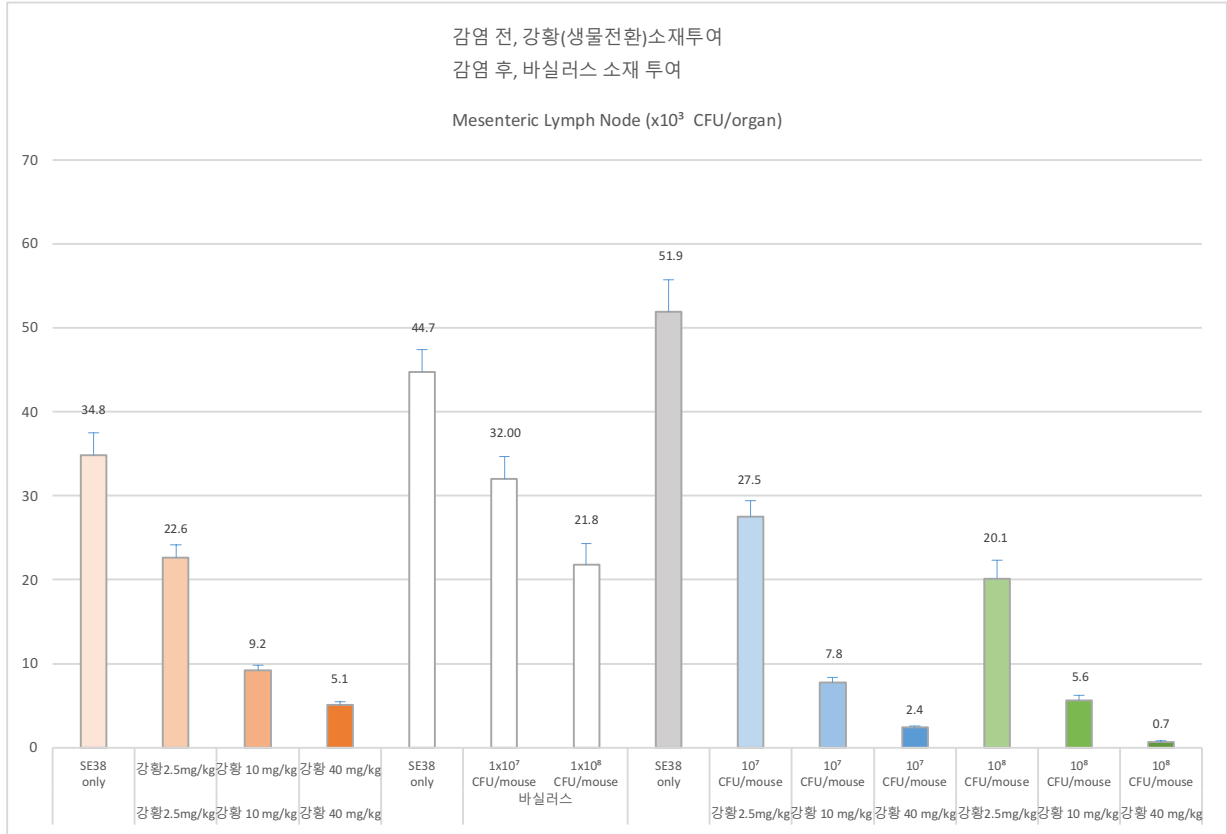
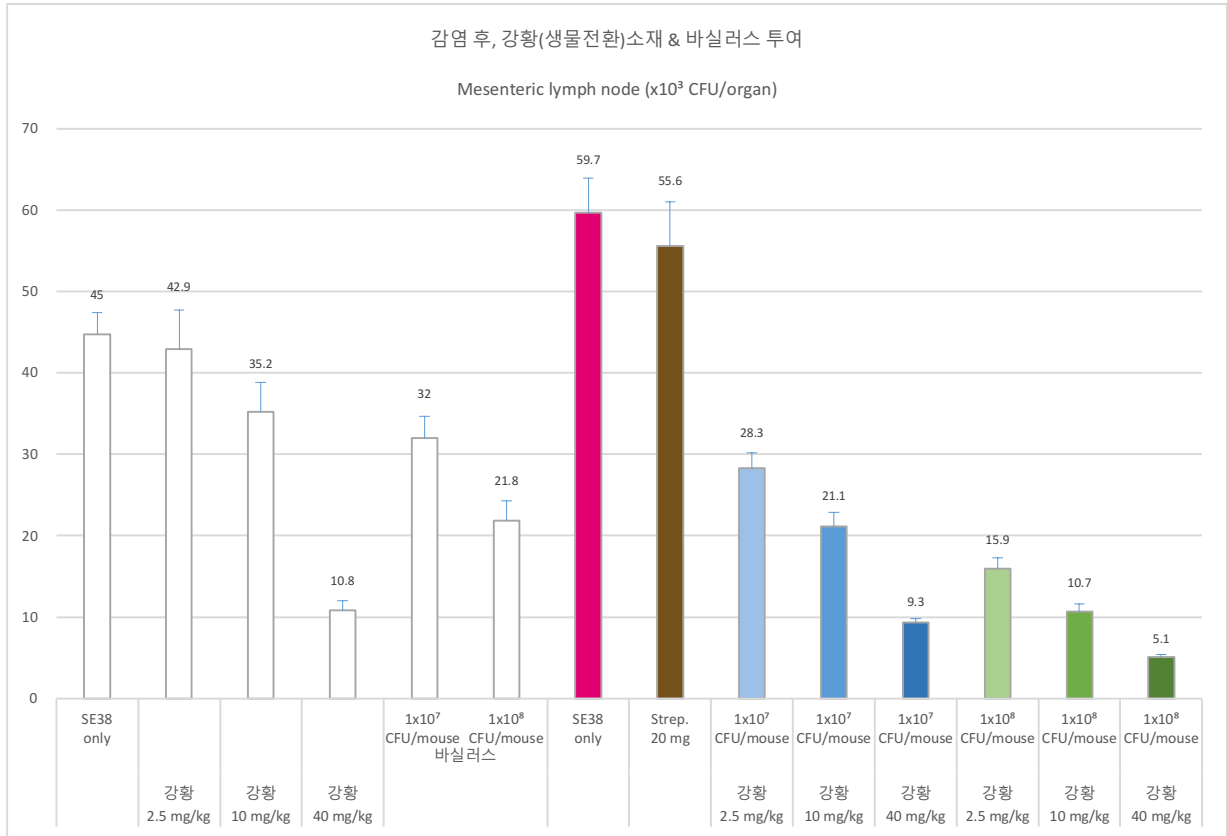


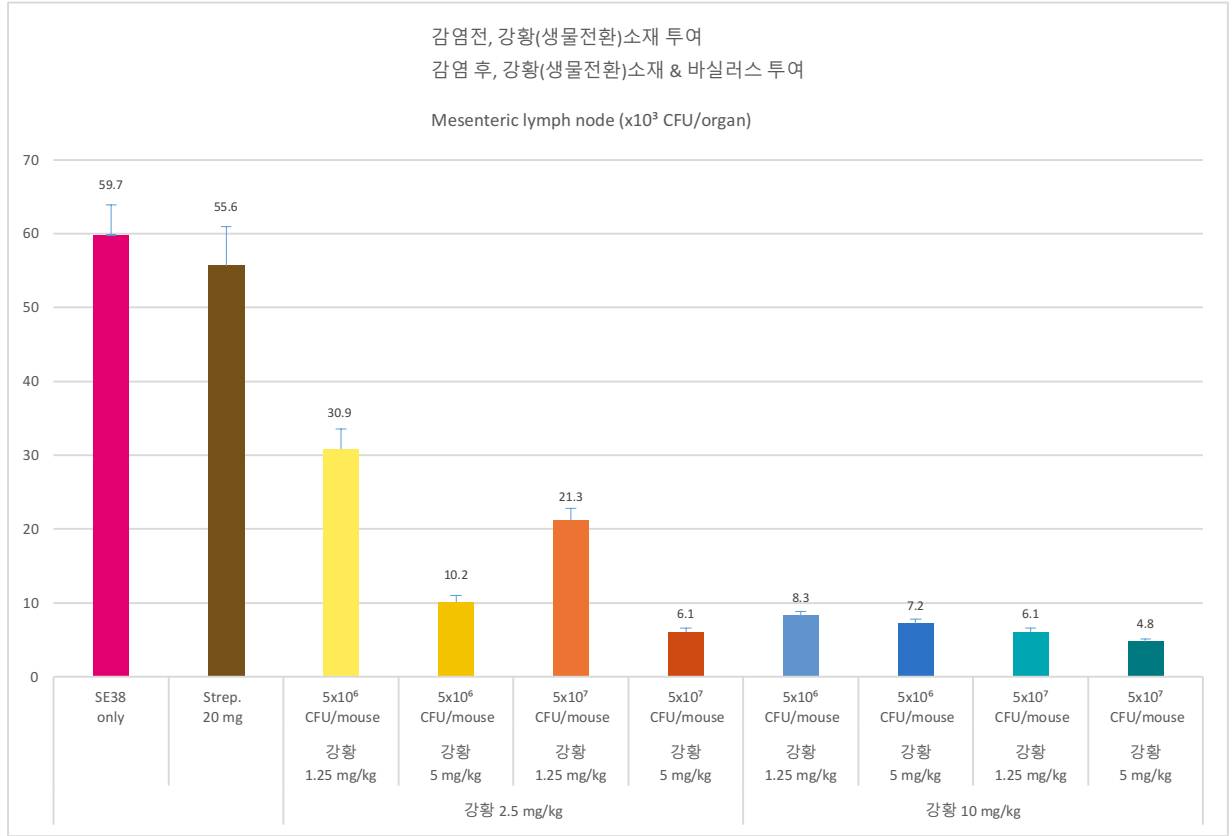
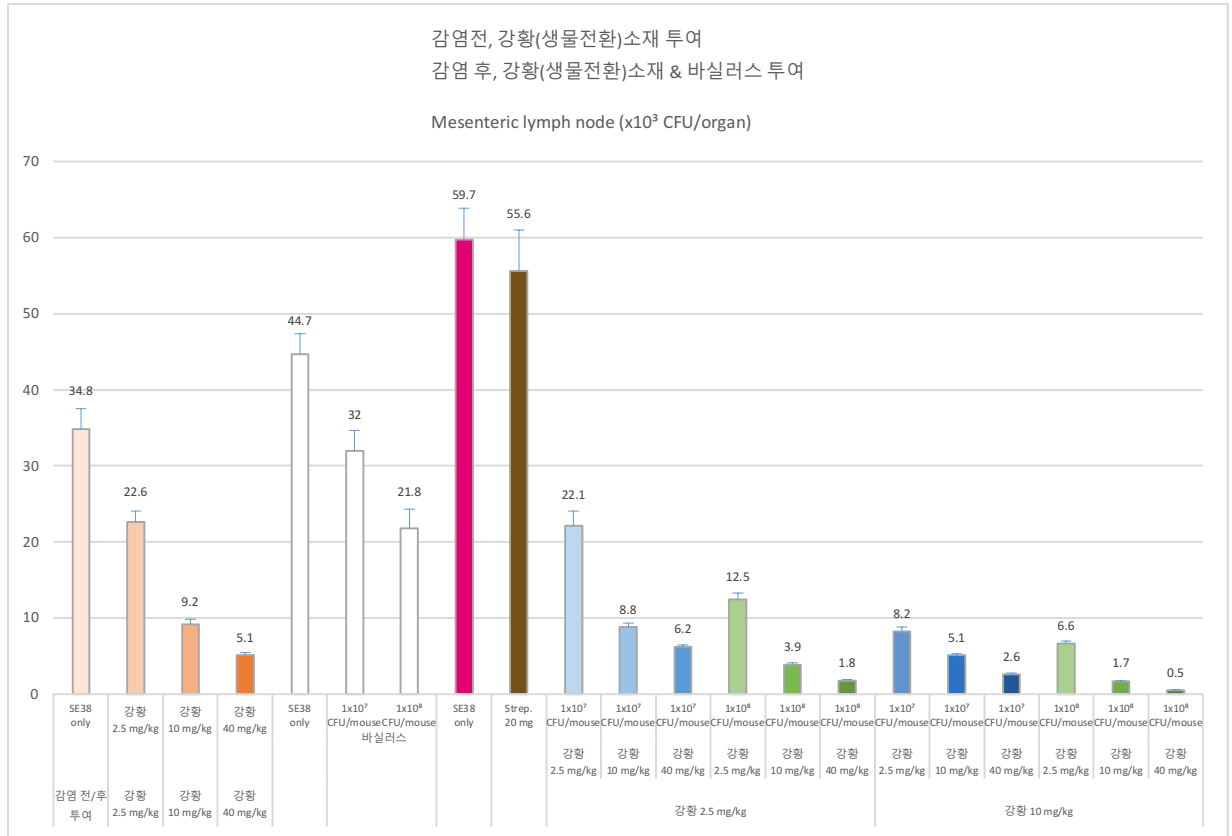


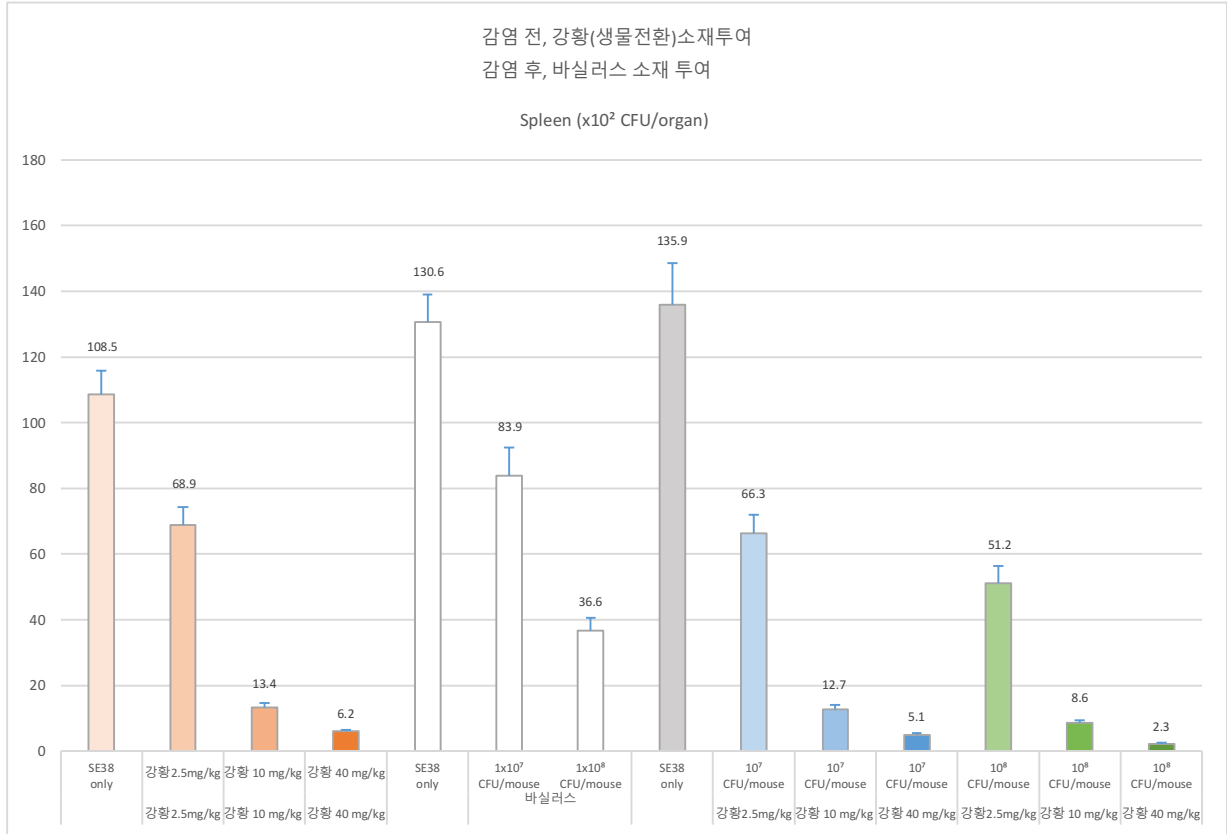
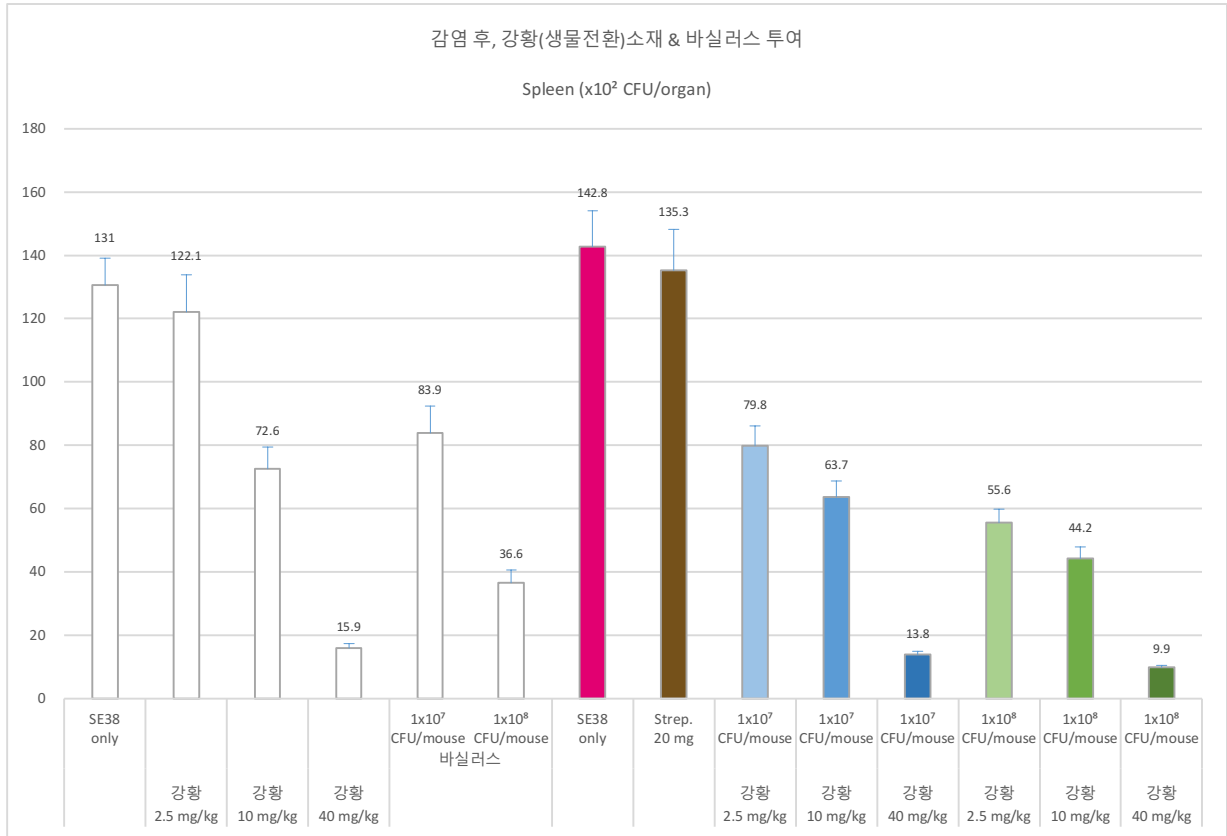


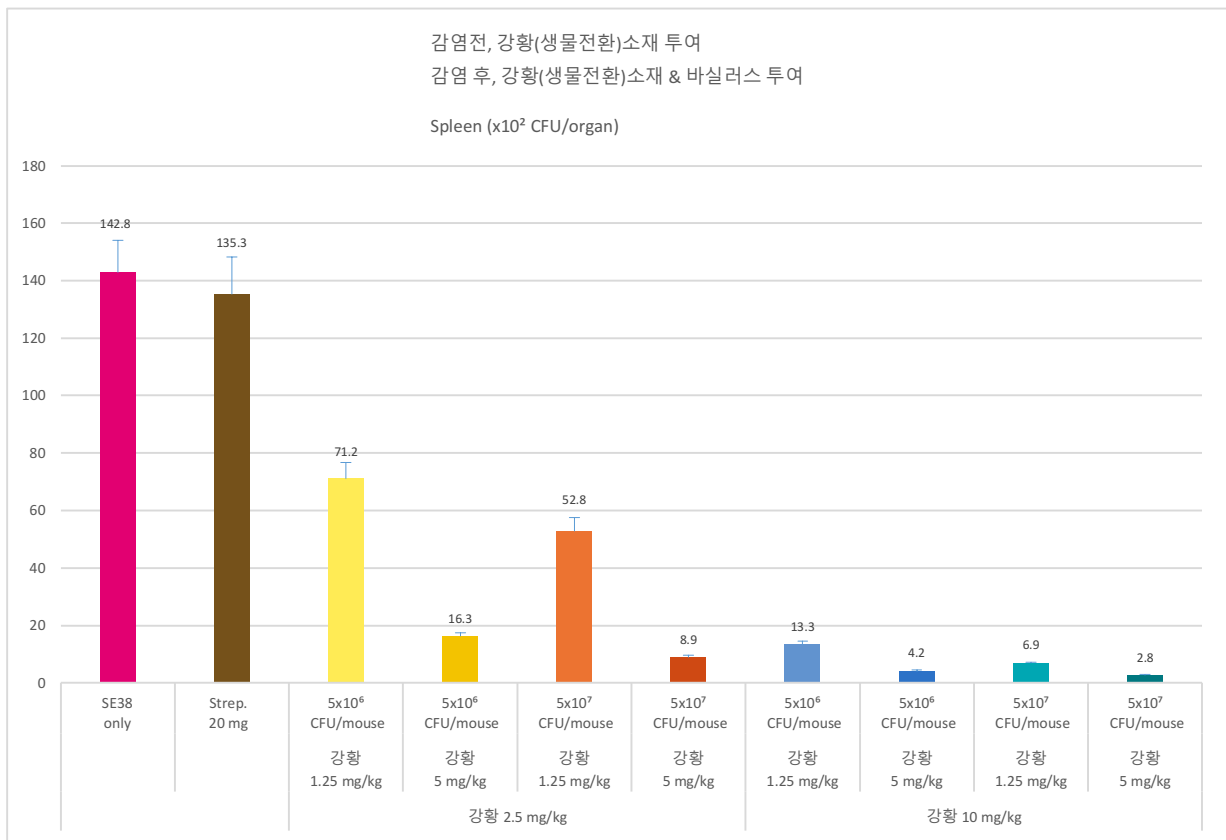
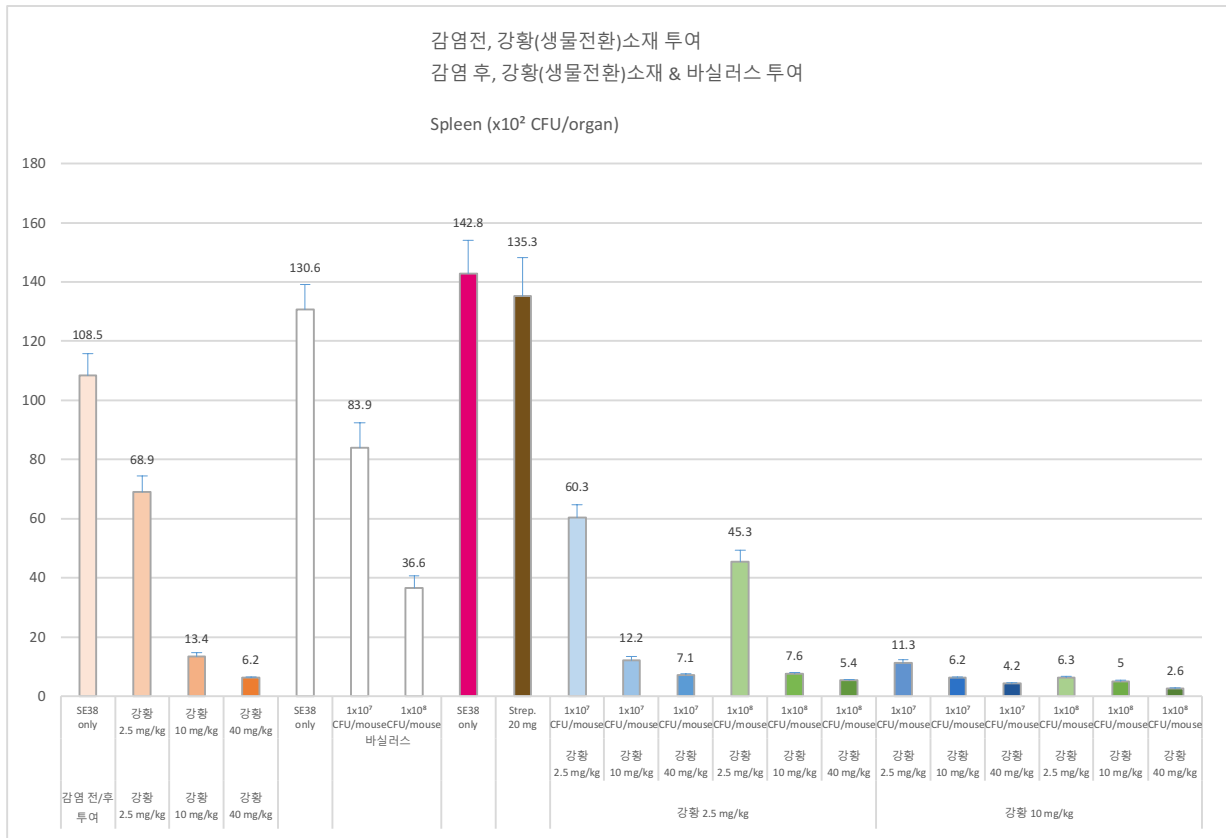


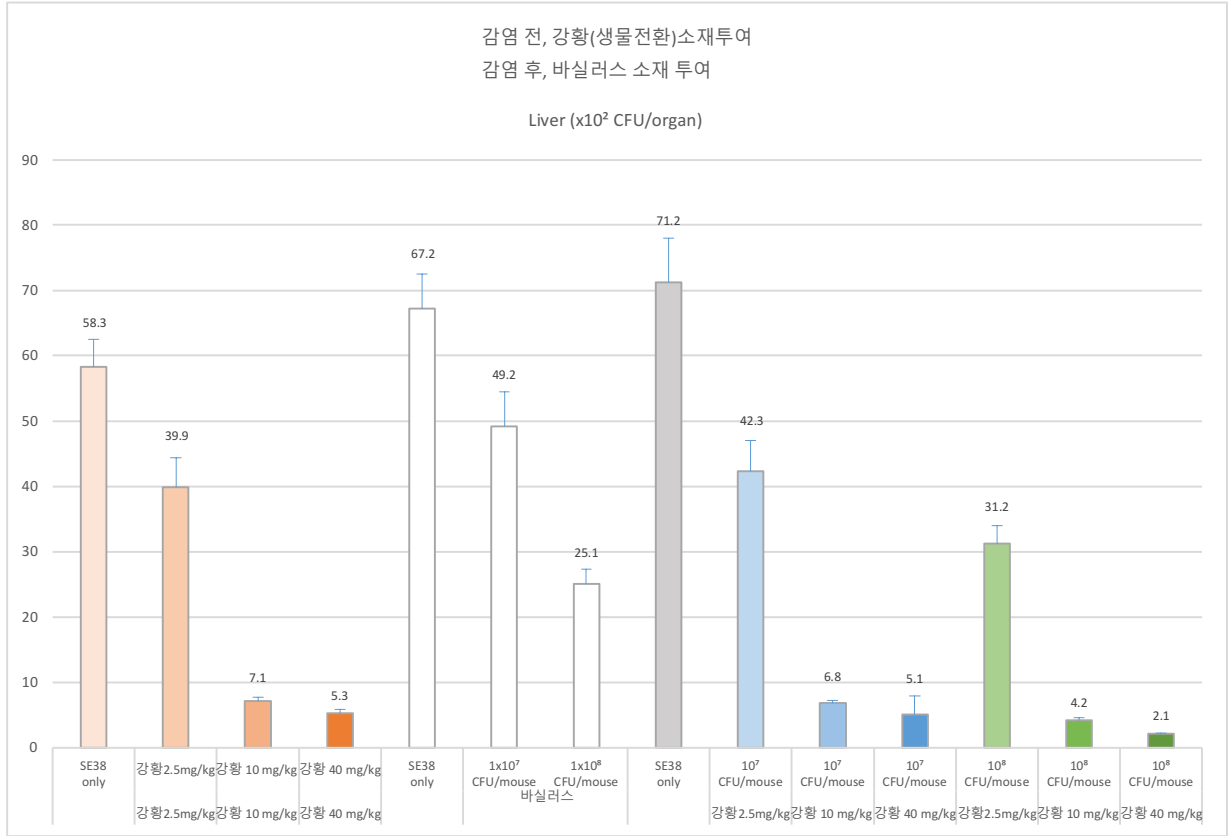
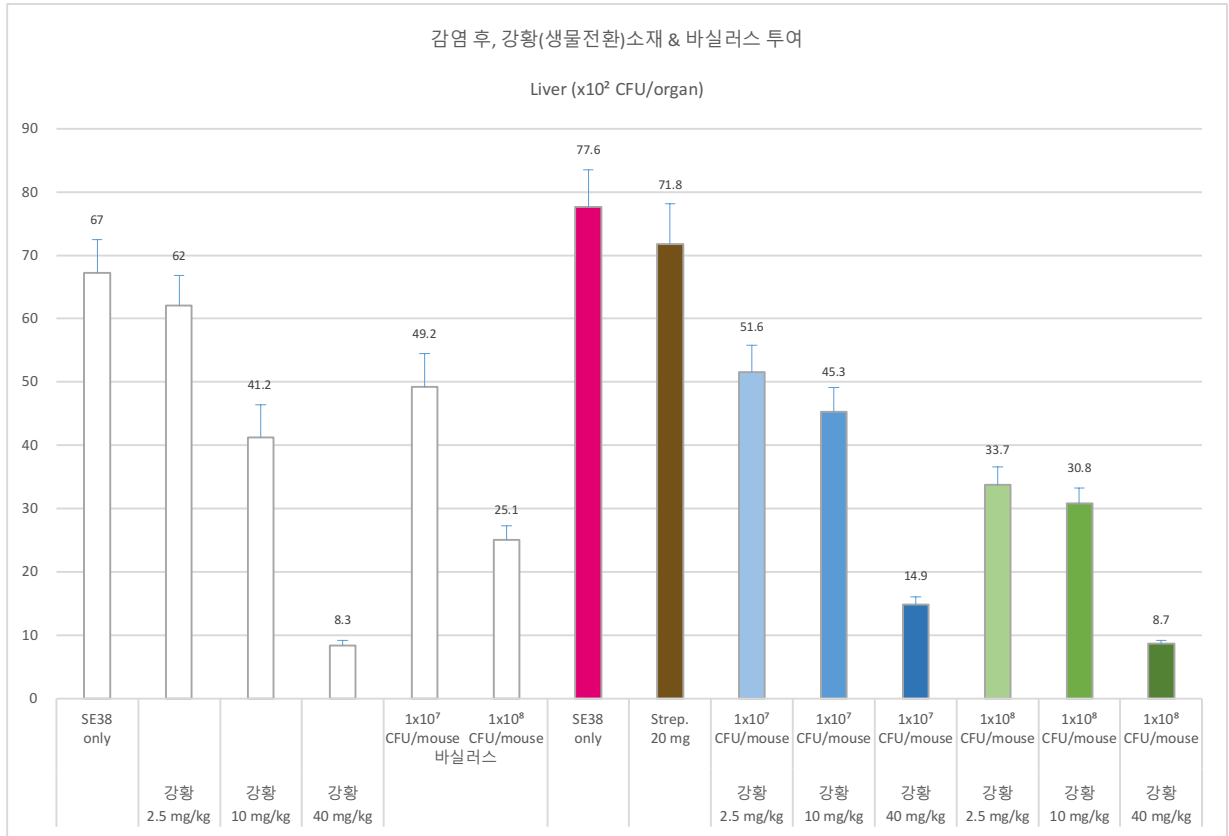


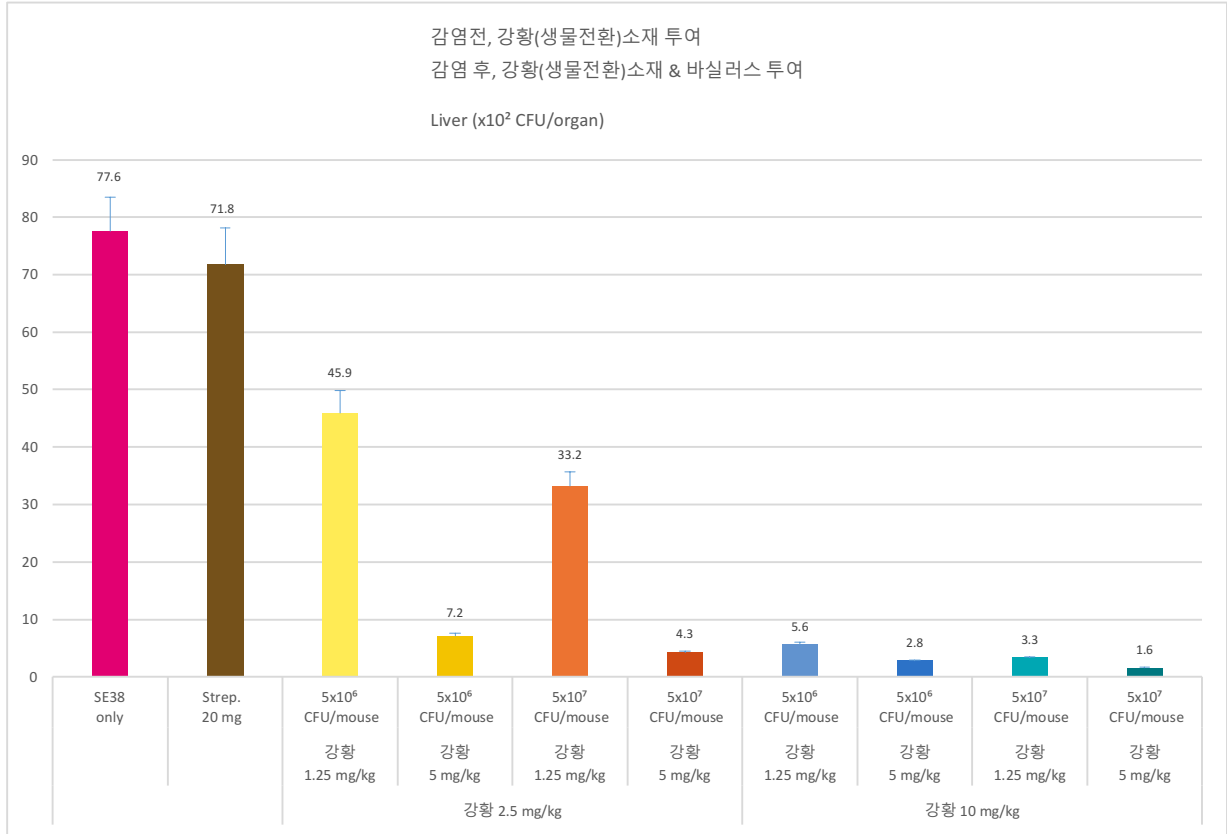
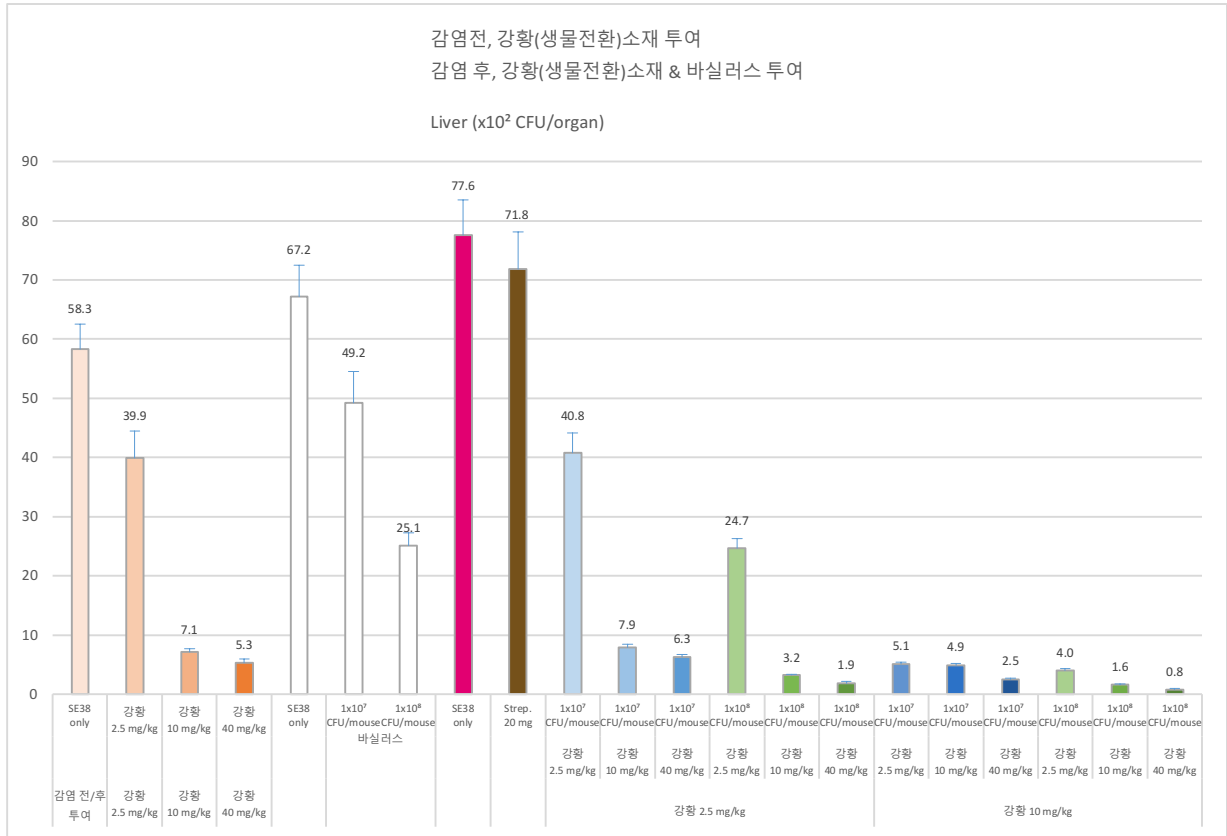


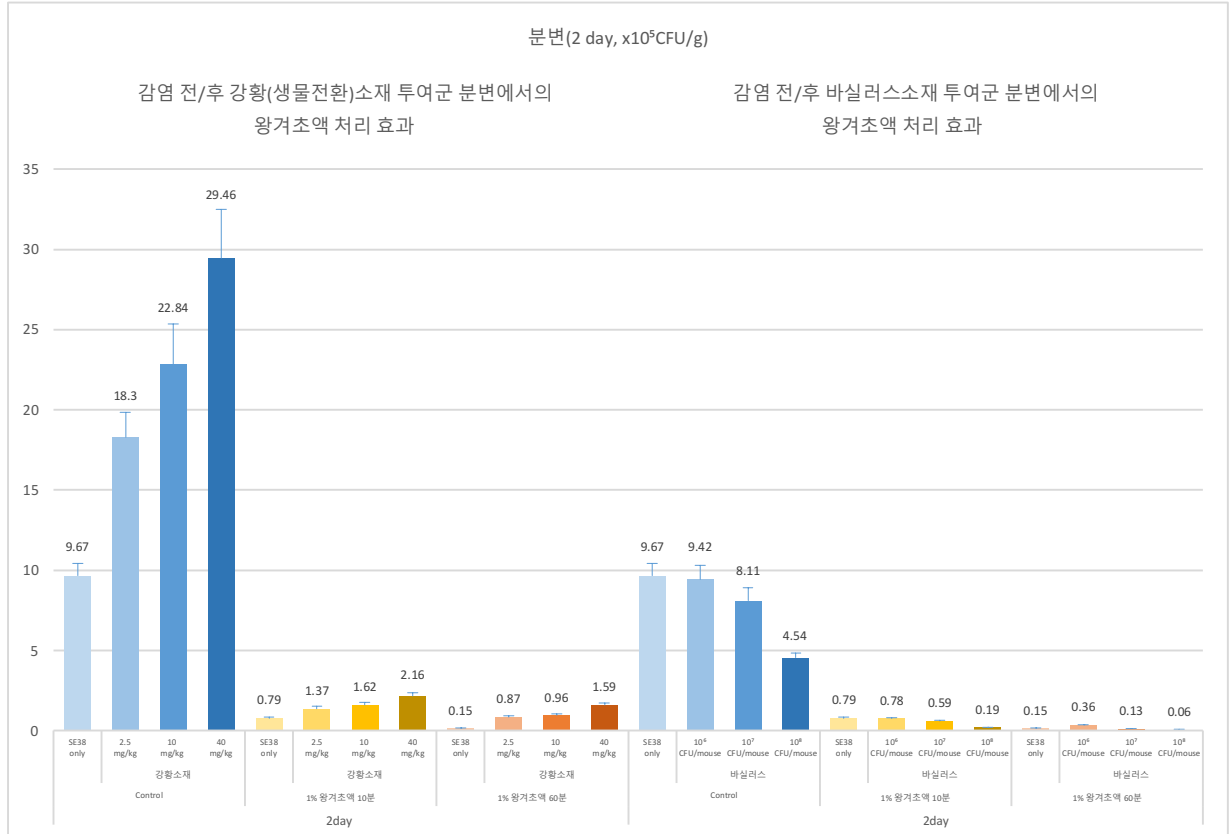
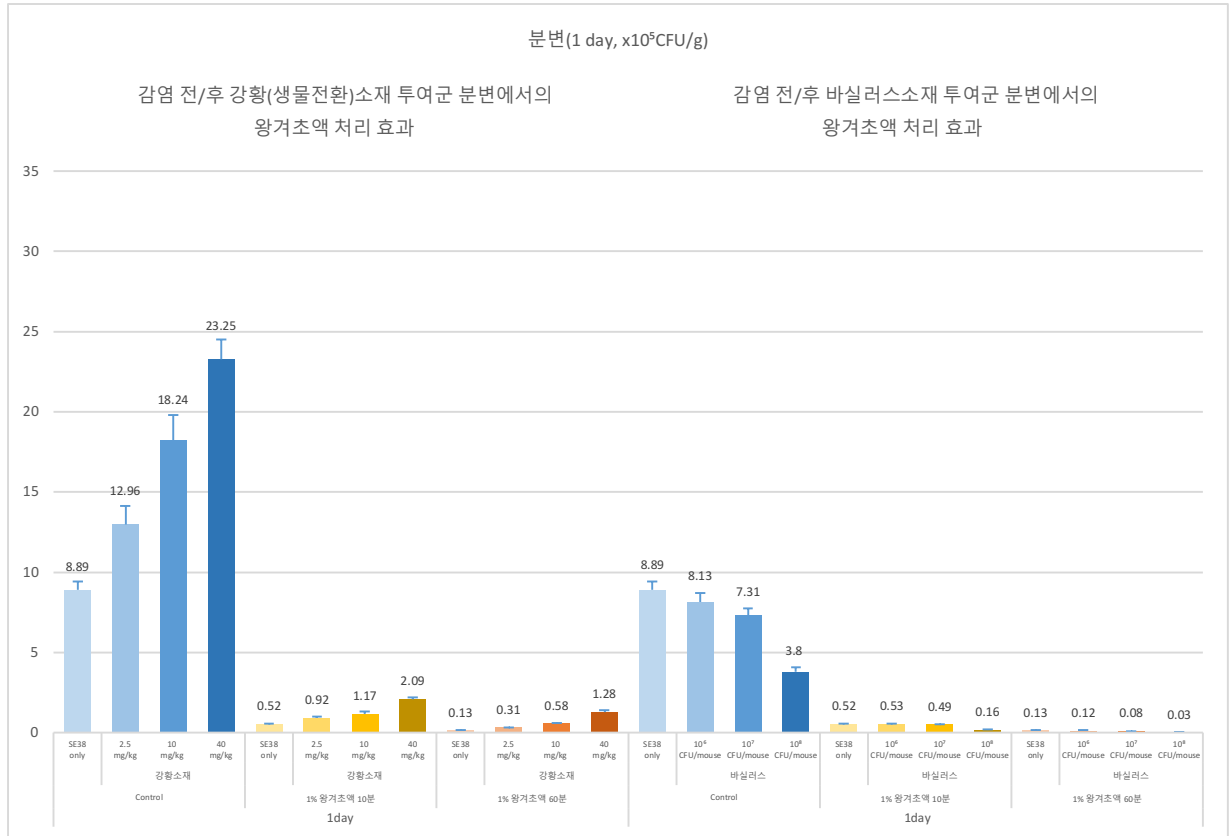


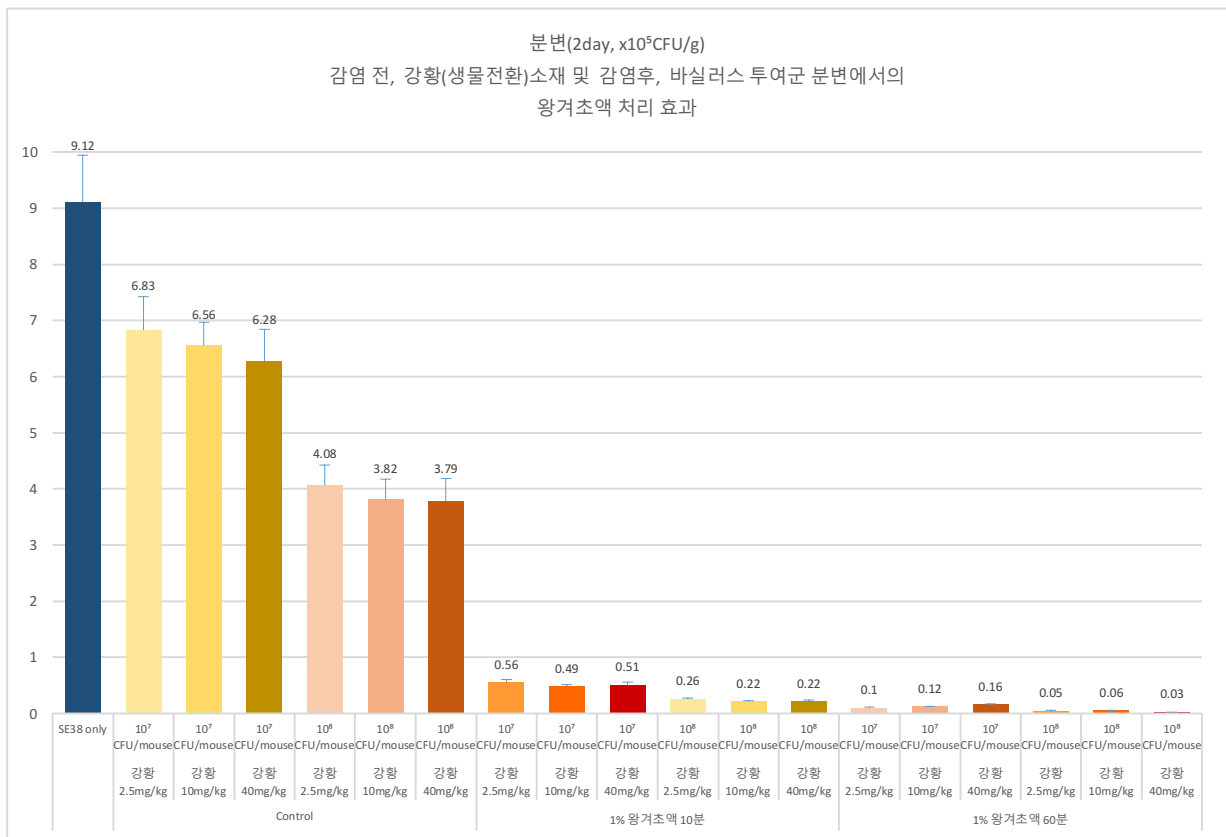
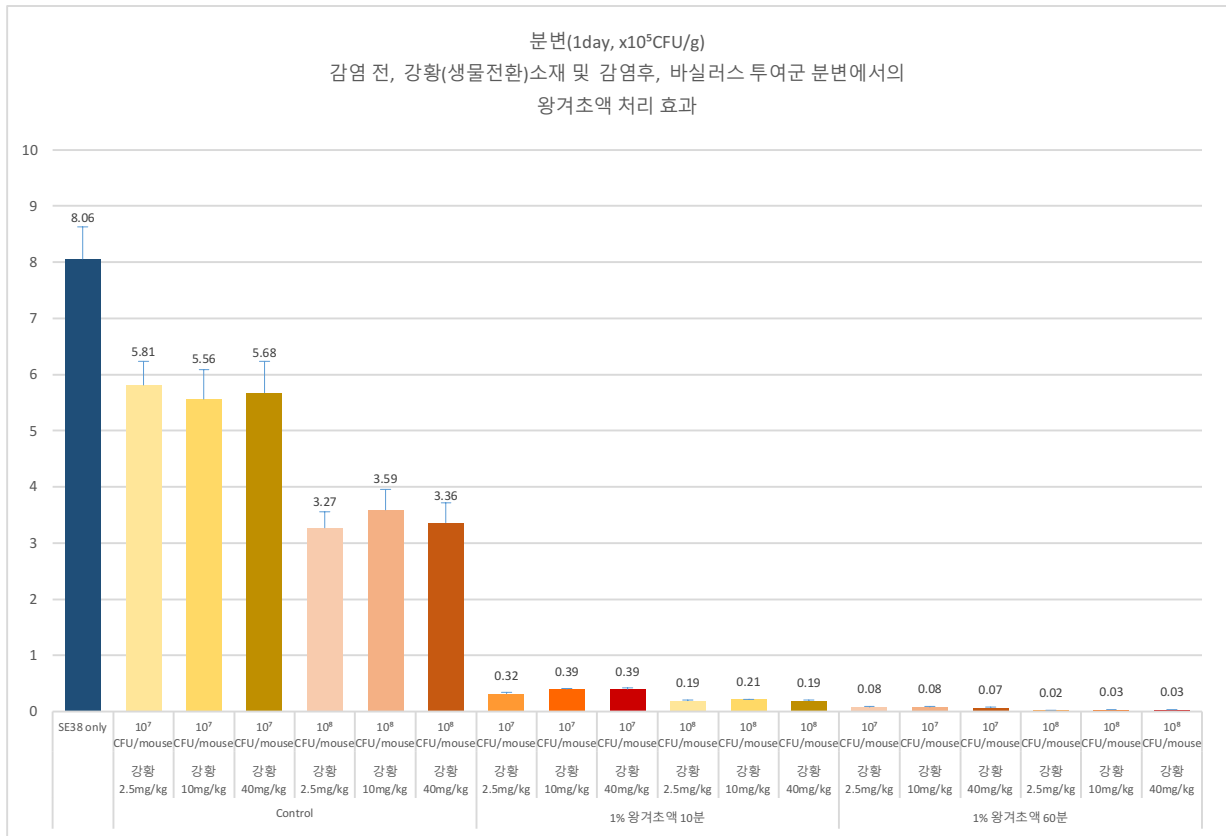












3. 종특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 in vivo 유효성 평가

가. 살모넬라 저감제의 살모넬라 감염 저해 효능에 대한 1차 평가

(1) 종특이 살모넬라 경구 감염 마우스모델의 제작

: 종특이 살모넬라(SL1344) 경구 감염 식중독 마우스 모델의 제작

인수공통 SE38을 이용한 살모넬라 식중독 모델과 같이, 마우스 특이적 SL1344 살모넬라 균주를 이용하여 살모넬라의 경구 감염 식중독 mouse model을 제작하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 4시간 동안 금식, 금수 시킨 후 20mg의 streptomycin을 경구투여 하여 장관 내의 미생물을 사멸시켰다. 20시간 뒤에 다시 4시간 동안 금식, 금수 시킨 후 10^8 cfu의 SL1344 균주를 경구투여하여 살모넬라의 감염을 유도하였다. 감염 후 24시간, 48시간에 분변을 채취하여 살모넬라의 개체 수를 측정하였고, 48시간 후 마우스를 희생하여 맹장, 장관막림프절, 비장, 간으로 침투한 살모넬라의 개체 수를 측정하였다. 인수공통 균주인 SE38과는 달리, SL1344 균주는 마우스 특이적으로 감염하는 균주로서 SE38 균주에 비하여 마우스에 대해 훨씬 더 강한 감염 능력을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

장관 내강에서 조직으로 침투되지 못하고 분변으로 빠져나온 살모넬라의 양을 측정하였다. 그 결과, 감염 24시간 후에 분변에 포함된 살모넬라의 양은 338.333×10^4 cfu/g, 48시간 후에 분변에 포함된 살모넬라의 양은 390.000×10^4 cfu/g 으로 확인되었다. SE38 균주에 비하여 3배 이상 많은 살모넬라가 검출되어, 조직 내로 침투되지 못한 살모넬라도 장관 내에서 생존이 가능함이 확인되었다.

Table 47. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 분변 내 생존하는 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
SL1344 10^8 cfu infection	338.333 \pm 7.371	390.000 \pm 1.732

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

장관 내강에서 조직 내로 침투되는 살모넬라의 양을 측정하였다. 맹장은 조직 0.1g 당 2mL, 장관막림프절과 비장은 조직 당 2mL, 간은 조직 당 3mL의 PBS를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 serial dilution 하여 50µg/mL의 streptomycin이 포함된 Macconkey agar에 spreading 하여 생균수를 측정하였다. 측정 결과, 맹장에는 502x10⁵ cfu/g의 살모넬라가 검출되어 SE38 균주에 비해 20배 가까운 많은 양의 살모넬라가 장관 상피세포 내로 침투한 것으로 확인되었다. 장관조직 내 미생물 침투와 밀접한 관련이 있는 장관막림프절 역시 3배 가까이 많은 112x10³ cfu/organ의 살모넬라가 검출되었다. 반면 체액을 통한 이동이 가능한 비장에서는 139.667x10² cfu/organ, 간에서는 82.667x10² cfu/organ의 살모넬라가 검출되어 SE38 균주와 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 48. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 조직 내 생존하는 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Tissue			
	Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)	Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SL1344 10 ⁸ cfu infection	502.000 ± 33.045	112.000 ± 9.715	139.667 ± 6.658	82.667 ± 3.812

(2) 살모넬라 저감제 시제품의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 살모넬라의 감소 여부 확인

마우스 특이적 살모넬라 균주인 SL1344 균주를 이용한 살모넬라 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품을 투여하여 장관 및 조직 내 감염된 살모넬라를 제어할 수 있는지 확인하였다. 인수공통 균주를 이용한 실험과 마찬가지로 면역조절소제는 10mg/kg 몸무게, 왕겨초액은 사료에 1% 첨가, 프로바이오틱스소제는 마우스 당 10⁸ cfu의 1일 투여량으로 3일간 식이를 통해 투여하였으며, 20mg의 streptomycin의 투여 및 10⁸ cfu의 살모넬라를 경구로 투여하여 감염을 유도하였다. 24시간과 48시간 후 분변을 채취하여 분변 내 미생물을 측정하였으며, 맹장과 장관막림프절, 비장, 간에서의 살모넬라를 측정하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

살모넬라의 감염 후, 조직으로 침투되지 못하고 배출되어 분변 내에 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 면역조절소재인 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물은 살모넬라 감염 대조군에 비하여 분변에 검출되는 살모넬라의 양이 2배 정도로 증가하였는데, 이러한 결과는 Caco-2 세포주를 이용한 실험 및 인수공통감염균주의 감염 모델의 결과와 같이 장관조직 내로의 침투를 억제하여 체내로 들어온 살모넬라를 분변을 통해 배출되게 하는 것으로 보인다. 천연항균소재인 왕겨초액과 프로바이오틱스소재인 바실러스소제 및 유산균소제 역시 동일하게 장관 내로 들어온 살모넬라를 직접적으로 죽임으로써 분변 내에 존재하는 살아있는 살모넬라의 양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

Table 49. 마우스 특이적 SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품의 투여가 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁴ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SL1344 infection only		351.461 ± 17.587	412.060 ± 22.973
미강(생물전환)산물	10mg/kg	682.519 ± 52.263	733.449 ± 41.416
강황(생물전환)산물	10mg/kg	746.983 ± 59.710	831.467 ± 68.402
왕겨초액	사료에 1% 첨가	77.523 ± 5.600	91.496 ± 5.631
바실러스소제	10 ⁸ cfu/mouse	96.815 ± 7.746	124.826 ± 10.759
유산균소제	10 ⁸ cfu/mouse	120.714 ± 9.972	156.886 ± 12.790

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

장관 내강에서 조직으로 침투한 살모넬라를 확인하기 위하여 마우스를 희생한 뒤 맹장과 장관막림프절, 비장, 간을 분리하여 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다.

① 맹장 및 장관막림프절

살모넬라의 감염 후 1차 침투 조직인 맹장과 그에 연결된 림프조직인 장관막림프절 내의 살모넬라를 측정하여 살모넬라 저감제 시제품의 조직 침투 억제 효과를 확인하였다. 면역조절소재인 미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물은 모두 살모넬라의 맹장 내 침투를 억제하였으며 미강(생물전환)산물은 56.9%, 강황(생물전환)산물은 64.5%의 맹장 내 침투를 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 미강(생물전환)산물은 73.1%, 강황(생물전환)산물은 81.2%의 장관막림프절 내 살모넬라를 억제하는 것으로 확인되었고, 인수공통 균주의 감염 시와 마찬가지로 면역세포의 활성화로 인하여 장관막림프절 내의 살모넬라 억제율이 더 큰 것으로 보인다. 천연항균소재인 왕겨초액과 프로바이오틱스소재인 바실러스소재 및 유산균소재는 Caco-2 세포주를 이용한 실험 및 인수공통감염균주의 감염 모델에서와 같이 장관조직으로의 침투를 억제하는 능력은 없는 것으로 보이며 장관 내강에 존재하는 살모넬라의 수를 감소시켜 상대적으로 장관조직 내로 침투하는 살모넬라의 양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

Table 50. 마우스 특이적 SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품의 투여가 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice		0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
SL1344 infection only		517.530 \pm 35.629	120.416 \pm 8.528
미강(생물전환)산물	10mg/kg	223.048 \pm 17.469	32.415 \pm 2.567
강황(생물전환)산물	10mg/kg	183.329 \pm 12.417	22.609 \pm 1.130
왕겨초액	사료에 1% 첨가	191.823 \pm 15.526	42.870 \pm 2.226
바실러스소재	10^8 cfu/mouse	238.172 \pm 14.227	72.415 \pm 5.361
유산균소재	10^8 cfu/mouse	268.102 \pm 16.899	63.203 \pm 5.288

② 비장 및 간

조직 내로의 침투 및 체액을 통한 이동이 가능한 비장과 간에서의 살모넬라의 양을 측정하였다. 미강(생물전환)산물을 투여한 경우 80.1%, 강황(생물전환)산물을 투여한 경우에는 85.2%의 비장 내 살모넬라를 억제하는 효과를 보였다. 또한 간에 존재하는 살모넬라에 대해 미강(생물전환)산물은 74.3%의 억제율을 보였으며 강황(생물전환)산물은 86.1%의 억제율을 보였다. 이러한 결과 또한 인수공통 균주의 감염 모델과 마찬가지로 다양한 면역세포의 활성화로 인한 것으로 생각된다. 천연항균소재인 왕겨초액과 프로바이오틱스소재인 바실러스소재 및 유산균소재의 경우에도 동일하게 초기에 장관 내강에 존재하는 살모넬라에 대한 항균활성을 통하여 비장 및 간 조직으로 이동되는 살모넬라의 양을 감소시키는 것으로 보인다.

Table 51. 마우스 특이적 SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 살모넬라 저감제 시제품의 투여가 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice		0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
SL1344 infection only		134.226 \pm 7.715	80.049 \pm 4.661
미강(생물전환)산물	10mg/kg	26.713 \pm 1.859	20.540 \pm 1.339
강황(생물전환)산물	10mg/kg	19.747 \pm 1.228	11.143 \pm 0.526
왕겨초액	사료에 1% 첨가	33.520 \pm 2.413	23.183 \pm 1.872
바실러스소재	10^8 cfu/mouse	41.125 \pm 3.547	35.316 \pm 2.408
유산균소재	10^8 cfu/mouse	56.529 \pm 4.205	47.729 \pm 3.236

(3) 복합제제의 투여에 의한 장관내강(분변) 및 조직 내 미생물의 감소 여부 확인

인수공통 균주의 살모넬라 감염 모델과 마찬가지로 마우스 특이적 균주의 살모넬라 감염 모델에서도 복합제제의 시너지 효과를 평가하였다. 복합제제는 인수공통 SE38 균주를 이용한 감염 모델에서와 동일하게 제조하여 사용하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

복합제제를 3일간 투여한 후, 마우스 특이적 SL1344 균주를 감염시킨 뒤 조직 내로 침투되지 못하고 분변으로 배출되는 살모넬라의 양을 측정하였다. 그 결과, 인수공통 SE38 균주 감염 모델과 동일하게 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합제제 모두 단독 투여시 보다 더 강한 억제 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

Table 52. 마우스 특이적 SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 복합제제의 투여가 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁴ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SL1344 infection only		384.106 ± 22.529	438.410 ± 38.454
강황(생물전환)산물 +	10mg/kg	37.212 ± 2.520	51.112 ± 4.870
왕겨초액	1%		
강황(생물전환)산물 +	10mg/kg	51.609 ± 3.227	63.472 ± 4.285
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse		

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

① 맹장 및 장관막림프절

복합제제 3일간 투여 후, 살모넬라를 감염시키고 조직 내로 침투된 살모넬라의 양을 측정하였다. 인수공통 SE38 균주를 이용한 감염 모델에서의 결과와 동일하게 복합제제는 맹장 조직 내로 침투되는 살모넬라를 단독 처리시 보다 더 강하게 억제할 수 있는 것으로 확인되었으며, 장관막림프절 내로 침투하는 살모넬라에 대한 억제효과는 단독소재 투여시와 비슷하거나 약간 향상되는 결과를 보였다.

Table 53. 마우스 특이적 SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 복합제제의 투여가 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice		0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SL1344 infection only		531.549 ± 27.160	134.085 ± 12.971
강황(생물전환)산물 + 왕겨초액	10mg/kg 1%	83.462 ± 5.410	25.252 ± 3.006
강황(생물전환)산물 + 바실러스소재	10mg/kg 10 ⁸ cfu/mouse	96.745 ± 6.557	19.064 ± 1.284

② 비장 및 간

조직으로의 침투 및 체액으로 이동 가능한 비장과 간에서의 살모넬라의 양을 측정하였다. 마찬가지로 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합제제는 단독 투여시 보다 더 뛰어난 억제활성을 보였지만, 강황(생물전환)산물과 왕겨초액의 복합제제는 단독 투여시와 비슷한 비율의 억제활성을 보였다.

Table 54. 마우스 특이적 SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 복합제제의 투여가 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice		0.000 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
SL1344 infection only		129.238 \pm 11.106	77.638 \pm 3.218
강황(생물전환)산물	10mg/kg	17.498 \pm 1.550	10.016 \pm 0.889
+ 왕겨초액	1%		
강황(생물전환)산물	10mg/kg	13.529 \pm 1.243	5.714 \pm 0.336
+ 바실러스소재	10^8 cfu/mouse		

나. 고도화 면역조절소재, 강황(생물전환)산물 함유 살모넬라 저감제의 살모넬라 감염 예방 및 치료 효능에 대한 농도에 따른 in vivo 2차 평가

살모넬라 저감제 개별소재의 투여시기에 따른 복합투여 방법

	감염 전	감염 후
1	강황(생물전환)산물	강황(생물전환)산물
2		강황(생물전환)산물
3	바실러스	바실러스
4		바실러스
5		강황(생물전환)산물+바실러스
6	강황(생물전환)산물	바실러스
7	강황(생물전환)산물	강황(생물전환)산물+바실러스

(1) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가

강황(생물전환)산물의 살모넬라 감염 예방 효과를 종특이적 살모넬라 균주인 *Salmonella* Typhimurium SL1344 균주를 이용하여 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, SE38 균주와 마찬가지로 세 가지 투여용량으로 강황(생물전환)산물을 투여하였으며, 예방 효과를 평가하기 위해 감염 2주 전부터 식이한 후 10^8 cfu의 SL1344 균주를 감염시켜 살모넬라 감염에 대한 억제 활성을 측정하였다.

강황(생물전환)산물의 살모넬라 감염 예방 효과를 평가하기 위해 마우스에서 감염 전 2주간 2.5, 10, 40 mg/kg의 1일 투여용량으로 강황(생물전환)산물을 식이한 뒤, SL1344 살모넬라 균주를 10^8 cfu/mouse의 접종량으로 감염시켰다. 감염 후 강황(생물전환)산물의 식이를 지속시키면서 감염 1일 후와 2일 후 분변을 채취하여 분변 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정하였으며, 2일 후 마우스를 희생하여 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 계수하여 강황(생물전환)산물의 감염 예방 효능을 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 1일 후와 2일 후 분변 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정한 결과, 강황(생물전환) 산물은 투여량 의존적으로 살모넬라의 배출량을 증가시키는 결과를 확인하였다. 또한, 모든 투여량에서 인수공통 감염균주인 SE38 감염시 보다 더 뛰어난 효과를 갖는 것으로 나타났다. 이는 마우스에 대한 두 균주의 감염능력 및 장관 내 생존능력 차이 때문인 것으로 추측된다. 다만, SE38 균주 감염시와는 달리 감염 2일 후의 살모넬라 배출 효율이 약간 감소하는 것으로 확인되었다.

Table 55. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 전/후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	33.94 \pm 2.18	45.38 \pm 4.09
2.5 mg/kg	41.5 \pm 3.52	52.63 \pm 4.52
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	73.92 \pm 5.68	86.8 \pm 7.79
40 mg/kg	82.36 \pm 7.92	92.08 \pm 9.06

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

강황(생물전환)산물 투여에 의한 조직 내 살모넬라 성장 억제 효과를 확인하고자 하였다. 강황(생물전환)산물 투여 후, 살모넬라를 감염시키고 조직 내로 침투한 살모넬라의 양을 측정하였다. 강황(생물전환)산물 투여 시 40 mg/kg 까지 투여량 의존적으로 살모넬라의 억제율이 증가하는 결과를 보였으며, SE38 균주 감염시와 마찬가지로 맹장에서의 살모넬라 억제 효율보다 장관막림프절, 비장 및 간에서의 억제 효율이 뛰어난 것을 확인하였다. 특히, 40 mg/kg의 투여량으로 감염 전 2주간 투여한 경우에 장관막림프절 내 살모넬라는 91.7%, 비장 내 살모넬라는 92.4%, 간 내 살모넬라는 90.3%를 억제할 수 있는 것으로 확인되어 뛰어난 면역반응 활성화 효율을 갖는 것으로 평가된다.

Table 56. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 전/후 투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	542.0 \pm 37.9	142.6 \pm 11.5
2.5 mg/kg	383.6 \pm 27.1	103.7 \pm 8.2
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	189.5 \pm 15.6	24.1 \pm 1.9
40 mg/kg	140.9 \pm 15.5	11.8 \pm 1.6

Table 57. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 전/후 투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	147.9 \pm 15.2	85.6 \pm 4.9
2.5 mg/kg	118.2 \pm 7.9	61.4 \pm 6.7
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	20.9 \pm 1.8	13.7 \pm 1.2
40 mg/kg	11.2 \pm 1.3	8.3 \pm 1.1

(2) 강황(생물전환)산물의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가

살모넬라 감염 이후 강황(생물전환)산물을 투여하여 SL1344 균주의 감염에 대한 치료 효과가 있는지 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 살모넬라 감염 후 투여용량별로 강황(생물전환)산물을 투여하였고, 분변과 조직 내 살모넬라의 수를 측정하여 강황(생물전환)산물의 감염 치료 효과를 평가하였다.

강황(생물전환)산물이 갖는 감염 치료 효과 분석을 위해 SL1344 감염 이후에 강황(생물전환)산물을 2.5 mg/kg, 10 mg/kg, 40 mg/kg의 1일 투여용량으로 투여하였다. 감염 1일 후와 2일 후 분변을 채취하여 분변 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정하였으며, 감염 2일 후 각 조직 내 생존하는 살모넬라의 양을 확인하여 강황(생물전환)산물의 감염 치료 효과를 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 1일 후와 2일 후의 분변을 채취하여 분변 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정한 결과, 강황(생물전환)산물을 2.5 mg/kg으로 투여한 마우스의 경우 SE38 감염 마우스와 마찬가지로 분변으로의 살모넬라 배출량에 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다. 10 mg/kg 이상의 투여량에서는 살모넬라 배출량이 증가하는 것으로 나타났으며 2주간 사전투여 한 마우스와 비교하였을 때 40 mg/kg 농도로 처리한 마우스의 감염 2일째 분변을 제외하고 모든 처리군에서 살모넬라의 배출량 증가에 있어서 낮은 효율을 보였다. 그러나 40 mg/kg 농도로 처리한 마우스의 감염 2일째 분변에서는 감염 전 사전투여 마우스의 경우와 비슷한 효과를 갖는 것으로 나타남에 따라, 추후 연구를 통하여 살모넬라의 침투 억제 활성을 위해 필요한 기간을 확립할 필요가 있다.

Table 58. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	Salmonella in Feces (x10 ⁵ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only	37.25 ± 2.89	43.94 ± 4.12
2.5 mg/kg	38.32 ± 2.45	44.74 ± 2.96
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	55.68 ± 4.12	68.3 ± 5.12
40 mg/kg	76.38 ± 5.62	85.12 ± 8.81

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

강황(생물전환)산물을 감염 후 투여한 마우스에서 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 2.5 mg/kg 투여량의 강황(생물전환)산물 투여는 조직 내 살모넬라의 억제에 효과가 없는 것으로 나타났으며, 10 mg/kg의 투여량에서는 조직 내 살모넬라의 생존율을 감소시키는 것으로 나타났지만 감염 전 2주간 사전투여 한 경우와 비교하여 약 10% 정도 낮은 효율을 보이는 것으로 확인되었으나, 40 mg/kg의 투여량에서는 감염 전 10 mg/kg의 투여량으로 2주간 사전투여 한 경우와 비슷한 수준의 효능을 보이는 것으로 확인되었다. 그러나 40 mg/kg 투여 시 장관막림프절, 비장 및 간에서의 억제율은 각각, 80.4%, 87.2%, 87.6%로 비교적 높은 편으로 측정되어 높은 살모넬라 제어 효과를 갖는 것으로 나타나, 투여시기와 상관없이 단기간의 투여를 통해서도 면역반응의 활성화를 효과적으로 유도할 수 있는 것으로 평가된다.

Table 59. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 후 투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	529.6 \pm 41.7	131.2 \pm 14.8
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	513.0 \pm 45.2
	10 mg/kg	383.9 \pm 26.0
	40 mg/kg	196.1 \pm 17.2

Table 60. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물의 감염 후 투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	131.2 \pm 11.9	85.6 \pm 7.2
강황(생물전환)산물	2.5 mg/kg	126.2 \pm 10.7
	10 mg/kg	85.2 \pm 7.6
	40 mg/kg	16.8 \pm 1.7

(3) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 예방 효과 평가

실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 바실러스소재를 투여용량별로 2주간 투여하여 종특이적 감염균주인 SL1344에 대한 감염 예방 효과를 평가하였다. 감염 예방 효과를 확인하기 위해 바실러스소재를 감염보다 먼저 2주간 식이하였으며, 10^8 cfu/mouse의 SL1344 균주를 감염시킨 뒤 바실러스소재의 살모넬라 증식 억제 효능을 확인하였다.

10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/mouse 의 세가지 1일 투여용량에서 바실러스소재의 감염 예방 효과를 확인하였다. 투여용량별로 바실러스소재를 감염 전 2주간 투여한 뒤, 살모넬라를 감염시키고 바실러스소재의 식이를 지속시키면서 분변 내 생존하는 살모넬라와 조직 내 존재하는 살모넬라의 양을 측정하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 1일 뒤와 2일 뒤의 분변을 채취하여 살아있는 살모넬라의 수를 측정하였다. SE38 균주 감염시와 마찬가지로 10^6 cfu/mouse 투여량의 바실러스소재는 살모넬라에 대한 억제능을 보이지 않았으며 10^7 cfu/mouse 투여량 이상에서 살모넬라의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다. 감염 1일째의 살모넬라 억제율과 감염 2일째의 살모넬라 억제율은 큰 변화를 보이지 않아, 바실러스소재가 마우스 장관 내에서 안정적으로 활성을 나타낼 수 있는 것으로 평가된다.

Table 61. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 전/후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	33.94 \pm 2.18	45.38 \pm 4.09
바실러스소재	10^6 cfu/mouse	32.82 \pm 3.09
	10^7 cfu/mouse	22.6 \pm 1.75
	10^8 cfu/mouse	9.12 \pm 0.67

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

살모넬라 감염 2일 뒤 마우스 조직 내 생존한 살모넬라의 수를 측정하였다. 분변과 마찬가지로 10^7 cfu/mouse 투여량 이상에서 살모넬라의 생장을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었으며 조직 별 살모넬라 억제율에는 큰 차이가 없는 것으로 보아 살모넬라에 대한 직접적인 항균활성만 작용한 것으로 보인다.

Table 62. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 전/후 투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	542.0 \pm 37.9	142.6 \pm 11.5
바실러스소재	10^6 cfu/mouse	551.2 \pm 14.3
	10^7 cfu/mouse	428.1 \pm 38.9
	10^8 cfu/mouse	250.9 \pm 17.8

Table 63. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 전/후 투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	147.9 \pm 15.2	85.6 \pm 4.9
바실러스소재	10^6 cfu/mouse	140.2 \pm 11.1
	10^7 cfu/mouse	103.2 \pm 7.6
	10^8 cfu/mouse	48.3 \pm 5.2

(4) 바실러스소재의 투여량에 따른 살모넬라 감염 치료 효과 평가

투여용량별 바실러스소재를 살모넬라 감염 후에 투여하여 살모넬라 감염에 대한 치료 효과를 평가하고자 하였다. 실험군당 10마리의 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며 1×10^8 cfu의 SL1344 균주를 감염시킨 후에 투여용량별로 바실러스소재를 투여하였고, 분변과 조직에서 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다.

SE38 균주 감염 시와 동일하게 10^6 cfu/mouse 농도를 제외하고 10^9 cfu/mouse 농도를 포함하여 실험에 사용하였다. SL1344 균주 감염 후, 10^7 , 10^8 , 10^9 cfu/mouse의 1일 투여용량의 바실러스소재를 투여하여 살모넬라 감염 치료 효과를 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

SL1344 균주 감염 후 바실러스소재를 투여용량별로 처리하고, 감염 1일 후와 2일 후의 분변을 채취하여 살모넬라 생균수를 측정하였다. 그 결과, SE38 감염시와 마찬가지로 감염 전 사전투여 시와 감염 후 투여시의 효과가 일정하게 유지되었고, 이는 바실러스소재가 갖는 살모넬라 특이적인 항균활성 때문인 것으로 추측된다. 10^8 cfu/mouse 농도의 바실러스소재는 70%의 살모넬라 억제율을 보였으며 10^9 cfu/mouse 농도의 바실러스소재는 80% 이상의 높은 억제율을 보임에 따라 살모넬라 감염에 대한 저감제 물질로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 평가된다.

Table 64. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 후 투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	37.25 \pm 2.89	43.94 \pm 4.12
바실러스소재	10^7 cfu/mouse	30.36 \pm 2.25
	10^8 cfu/mouse	10.93 \pm 0.75
	10^9 cfu/mouse	5.14 \pm 0.48

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

바실러스소재가 직접적인 항균활성 외의 다른 기전을 통해 살모넬라를 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 각 조직 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 바실러스 소재는 투여량과는 상관없이 조직 특이적인 억제 효과는 보이지 않는 것으로 확인되었고, 직접적인 항균활성 외의 다른 기전을 통한 살모넬라의 억제는 일어나지 않는 것으로 평가된다.

Table 65. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 후 투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only	529.6 ± 41.7	131.2 ± 14.8
	10 ⁷ cfu/mouse	451.6 ± 38.0
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse	252.1 ± 17.5
	10 ⁹ cfu/mouse	112.1 ± 10.9

Table 66. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재의 감염 후 투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only	131.2 ± 11.9	85.6 ± 7.2
	10 ⁷ cfu/mouse	100.8 ± 9.1
바실러스소재	10 ⁸ cfu/mouse	45.6 ± 3.9
	10 ⁹ cfu/mouse	22.1 ± 1.6

(5) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 활성 평가
 SL1344 균주 감염 마우스 모델에서, 감염 전 2주간의 사전투여 없이 감염 이후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 살모넬라 감염을 억제할 수 있는지 확인하였다. 인수공통감염 살모넬라 균주와 마찬가지로 실험군당 10마리의 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 살모넬라의 감염 후 강황(생물전환)산물을 2.5, 10, 40 mg/kg, 바실러스소재를 1×10^7 cfu/mouse와 1×10^8 cfu/mouse의 투여량으로 복합 투여하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 1일째와 2일째 분변 내 존재하는 살모넬라의 양을 확인한 결과, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재 모두 투여량이 높을수록 살모넬라 감염 억제 효율이 증가하는 것으로 확인되었다. 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 한 결과와 비교할 때, 2주간 사전투여 시 분변 내 살모넬라의 감소량이 더 높은 것으로 보아, 강황(생물전환)산물의 지속적인 투여가 살모넬라의 장관 내 침입을 더욱 효율적으로 억제하는 것으로 보인다.

Table 67. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 분변 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	426.8 \pm 35.7	483.8 \pm 42.5
20 mg Streptomycin	405.9 \pm 36.1	452.9 \pm 41.6
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	367.2 \pm 22.4	377.2 \pm 25.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	348.2 \pm 25.6	379.2 \pm 27.1
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	401.5 \pm 34.1	409.8 \pm 32.7
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	121.9 \pm 10.9	142.3 \pm 13.5
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	88.9 \pm 7.2	132.4 \pm 11.9
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	82.4 \pm 6.3	88.7 \pm 5.6

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

맹장과 장관막림프절, 비장 및 간 조직 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 투여량이 높을수록 조직 내 존재하는 살모넬라의 양이 감소하는 결과를 보였으나, 강황(생물전환)산물을 2주간 사전투여 한 결과에 비하면 낮은 억제 효율을 갖는 것으로 확인되었다. 감염 후 투여 시 최대 투여량으로 설정한 강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse의 경우, 감염 전 2주간 2.5 mg/kg의 강황(생물전환)산물을 사전투여하고, 감염 후 10 mg/kg의 강황(생물전환)산물과 1×10^8 cfu/mouse의 바실러스소재를 복합투여 한 경우보다 더 낮은 억제 효율을 보임에 따라, 살모넬라의 효율적인 억제를 위해서는 강황(생물전환)산물의 지속적인 투여가 중요할 것으로 생각된다.

Table 68. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	562.4 \pm 41.2	168.3 \pm 11.0
20 mg Streptomycin	542.8 \pm 32.9	143.8 \pm 10.5
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	283.1 \pm 22.1	81.3 \pm 7.9
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	142.9 \pm 10.8	58.6 \pm 2.8
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	112.6 \pm 8.2	19.9 \pm 0.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	172.5 \pm 15.4	52.9 \pm 4.1
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	89.4 \pm 7.6	18.4 \pm 1.6
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	89.7 \pm 8.4	13.2 \pm 1.0

Table 69. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 감염 후 복합투여 시 비장 및 간 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in tissue	
	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only	152.6 \pm 10.8	92.3 \pm 7.2
20 mg Streptomycin	143.2 \pm 9.6	88.7 \pm 6.3
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	112.4 \pm 10.5	62.9 \pm 5.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	29.4 \pm 1.2	15.4 \pm 0.9
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^7 cfu/mouse	18.3 \pm 1.3	10.4 \pm 0.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	63.8 \pm 4.9	22.6 \pm 1.2
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	15.6 \pm 0.8	11.8 \pm 0.4
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스소재 1×10^8 cfu/mouse	10.5 \pm 0.7	8.2 \pm 0.5

(6) 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 투여량에 따른 시너지 효과 평가

SE38 균주를 이용한 감염 실험에서, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재가 효율적인 시너지 효과를 보임에 따라, SL1344 감염 마우스에서도 두 소재의 순차적 복합투여에 의한 시너지 효과를 평가하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였고, 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 하고 SL1344를 감염시킨 뒤 바실러스소재를 투여하였으며 분변과 조직 내 살모넬라를 측정하였다.

강황(생물전환)산물은 2.5, 10, 40 mg/kg의 농도로 2주간 사전 투여 하였으며, 바실러스소재는 살모넬라를 감염시킨 뒤, 10^7 cfu/mouse과 10^8 cfu/mouse의 두가지 1일 투여용량으로 투여하여 투여량에 따른 시너지 효과를 평가하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

세 가지 농도의 강황(생물전환)산물을 각각 감염 전 2주간 사전투여 하고 살모넬라를 감염시킨 뒤, 두 가지 투여용량의 바실러스소재를 투여하여 살모넬라 감염 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, SE38 감염시와 마찬가지로 강황(생물전환)산물에 의해 장관으로 침투하지 못하고 분변으로 다량 배출되는 살모넬라를 바실러스소재가 효율적으로 제거할 수 있는 것으로 확인되었다. 다만, 분변으로 배출되는 것을 보다 효율적으로 억제하기 위하여 더 높은 농도의 바실러스소재를 투여하거나, 분변으로 배출된 살모넬라를 2차적으로 제어하기 위한 방법이 필요할 것으로 보인다.

Table 70. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 순차적 복합투여 시 분변 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁵ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only		39.24 ± 3.08	46.91 ± 3.56
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		33.12 ± 2.17	36.7 ± 2.83
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse	32.94 ± 2.84	37.21 ± 3.09
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		33.09 ± 2.12	36.22 ± 2.14
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		11.68 ± 0.97	15.22 ± 1.16
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse	11.02 ± 0.76	15.08 ± 1.63
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		11.85 ± 0.92	14.79 ± 1.58

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

조직 내의 살모넬라의 양을 확인하여 면역반응의 활성화 여부를 평가하였다. 그 결과, 감염 후 투여한 바실러스소재는 면역반응을 활성화 하지 못하지만 감염 전 2주간 사전투여 한 강황(생물전환)산물로 인해 면역반응이 효과적으로 활성화 되어 있는 것으로 확인되었으며, 감염 전 2주간의 면역소재 사전투여와 감염 후 바실러스소재 투여는 장관 내 살모넬라에 대한 직접적인 제거 및 장관 내 침입 억제, 침입한 살모넬라에 대한 면역반응의 활성화 유도를 모두 만족하여 효율적으로 살모넬라를 제어할 수 있는 순차적 복합투여 방법인 것으로 평가된다. 그러나 2주간의 강황(생물전환)산물 사전투여 후 살모넬라 감염, 그리고 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합소재 투여가 보다 효과적인 방법임이 추가실험을 통해 확인되었다.

Table 71. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 순차적 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum (x10 ⁵ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node (x10 ³ cfu/organ)
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only		527.7 ± 48.1	150.9 ± 12.4
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		309.2 ± 11.5	96.1 ± 6.2
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse	123.8 ± 11.9	18.4 ± 1.3
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		103.4 ± 7.8	7.2 ± 0.5
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		212.4 ± 14.9	55.4 ± 3.6
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse	82.0 ± 4.5	8.7 ± 0.6
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		56.7 ± 3.5	2.8 ± 0.3

Table 72. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 순차적 복합투여 시 비장 및 간 내 생존하는 살모넬라에 미치는 효과

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		140.4 \pm 11.3	88.7 \pm 9.6
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		112.6 \pm 9.2	54.2 \pm 4.7
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10^7 cfu/mouse	15.3 \pm 1.2	9.3 \pm 0.4
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		8.3 \pm 0.4	5.3 \pm 0.6
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg		78.2 \pm 5.6	28.6 \pm 1.9
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스소재 10^8 cfu/mouse	7.7 \pm 0.5	5.2 \pm 0.4
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		3.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2

(7) 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 살모넬라 감염 억제 효과 평가

SL1344 살모넬라 균주 감염 마우스 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 감염 억제 효과를 확인하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 강황(생물전환)산물을 2.5 mg/kg과 10 mg/kg의 1일 투여용량으로 감염 전 2주간 투여한 뒤 살모넬라의 감염을 유도하였다. 살모넬라 감염 후 2일간 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합소재를 식이투여 하였으며, 강황(생물전환)산물은 1.25 mg/kg부터 40 mg/kg 까지의 1일 투여량으로, 바실러스소재는 5×10^6 cfu/mouse부터 1×10^8 cfu/mouse 까지의 1일 투여용량으로 투여하였다.

(가) 분변으로 배출되는 살모넬라의 확인

감염 후 1일차와 2일차의 분변 내 살모넬라를 측정된 결과, 앞선 결과와 마찬가지로 강황(생물전환)산물의 투여량이 높을수록 살모넬라의 배출은 증가하며, 바실러스소재의 투여량이 높을수록 분변 내 생존하는 살모넬라의 양은 감소하는 것으로 확인되었다.

Table 73. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 분변 내 살모넬라의 측정-1

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		426.8 \pm 35.7	483.8 \pm 42.5
20 mg Streptomycin		405.9 \pm 36.1	452.9 \pm 41.6
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	358.3 \pm 12.9	372.4 \pm 26.4
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	351.3 \pm 27.3	383.1 \pm 29.4
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	383.1 \pm 26.3	411.3 \pm 38.9
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	101.3 \pm 7.5	121.6 \pm 10.2
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	95.6 \pm 8.2	116.7 \pm 10.5
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	71.2 \pm 5.7	83.5 \pm 4.1
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	346.3 \pm 28.1	388.9 \pm 25.6
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	332.6 \pm 15.4	370.6 \pm 20.9
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	403.7 \pm 30.9	456.9 \pm 22.6
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	96.7 \pm 7.5	130.4 \pm 10.9
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	88.3 \pm 5.5	93.6 \pm 7.4
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	56.3 \pm 4.1	71.4 \pm 5.4

Table 74. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 분변 내 살모넬라의 측정-2

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^4$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		426.8 \pm 35.7	483.8 \pm 42.5
20 mg Streptomycin		405.9 \pm 36.1	452.9 \pm 41.6
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^6$ cfu/mouse	335.2 \pm 29.2	352.0 \pm 31.2
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^6$ cfu/mouse	326.9 \pm 25.4	382.9 \pm 21.6
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^7$ cfu/mouse	105.9 \pm 8.6	132.8 \pm 11.2
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^7$ cfu/mouse	152.9 \pm 12.1	187.4 \pm 12.5
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^6$ cfu/mouse	329.7 \pm 24.9	356.9 \pm 22.7
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^6$ cfu/mouse	316.0 \pm 25.7	363.8 \pm 25.4
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^7$ cfu/mouse	99.5 \pm 6.8	124.1 \pm 10.6
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5 $\times 10^7$ cfu/mouse	95.7 \pm 8.6	112.1 \pm 10.5

(나) 조직 내로 침투한 살모넬라의 확인

감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여에서 맹장과 장관막림프절, 비장과 간에 존재하는 살모넬라를 측정된 결과, 모든 실험군에서 살모넬라의 조직 내 생존률이 감소하였으며, 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재의 투여량이 많을수록 감염 억제 효과가 높은 것으로 확인되었다. 또한, 인수공통감염 살모넬라 균주의 결과와 마찬가지로 효과의 포화 없이 투여량의 증가에 따른 억제율의 증가가 확인되었으며, 단독소재의 순차적 복합투여시 보다 더 높은 억제 활성을 보임에 따라, 강황(생물전환)산물의 지속적인 투여가 효과적인 감염 억제를 유도할 수 있을 것이라 판단된다.

Table 75. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 살모넬라의 측정-1

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		562.4 \pm 41.2	168.3 \pm 11.0
20 mg Streptomycin		542.8 \pm 32.9	143.8 \pm 10.5
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	256.9 \pm 11.5	75.1 \pm 5.4
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	127.1 \pm 10.0	22.6 \pm 1.5
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	98.3 \pm 7.5	14.2 \pm 1.1
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	162.7 \pm 14.3	41.2 \pm 3.0
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	75.4 \pm 5.9	12.7 \pm 1.1
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	71.2 \pm 3.9	7.2 \pm 0.6
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse	116.3 \pm 10.7
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse		71.2 \pm 6.3	5.8 \pm 0.3
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^7 cfu/mouse		56.3 \pm 4.2	3.1 \pm 0.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse		80.6 \pm 7.8	7.2 \pm 0.5
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse		51.3 \pm 4.6	3.1 \pm 0.2
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse		21.9 \pm 1.1	1.2 \pm 0.1

Table 76. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 맹장 및 장관막림프절 내 살모넬라의 측정-2

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		562.4 \pm 41.2	168.3 \pm 11.0
20 mg Streptomycin		542.8 \pm 32.9	143.8 \pm 10.5
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	312.2 \pm 15.6	94.3 \pm 5.9
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	152.7 \pm 10.5	32.1 \pm 2.7
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	203.9 \pm 15.7	52.8 \pm 3.1
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	99.6 \pm 7.2	15.6 \pm 1.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	120.9 \pm 15.6	16.7 \pm 1.4
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	89.7 \pm 6.3	8.5 \pm 0.6
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	91.5 \pm 5.7	7.9 \pm 0.5
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	55.3 \pm 0.4	5.2 \pm 0.4

Table 77. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 비장 및 간 내 살모넬라의 측정-1

	<i>Salmonella</i> in tissue		
	Spleen (x10 ² cfu/organ)	Liver (x10 ² cfu/organ)	
Normal mice	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
SL1344 infection only	152.6 ± 10.8	92.3 ± 7.2	
20 mg Streptomycin	143.2 ± 9.6	88.7 ± 6.3	
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10 ⁷ cfu/mouse	93.2 ± 4.6	47.2 ± 3.2
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁷ cfu/mouse	22.1 ± 1.5	10.6 ± 0.8
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10 ⁷ cfu/mouse	15.6 ± 1.3	7.2 ± 0.6
	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	56.3 ± 3.8	19.2 ± 1.3
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	10.5 ± 0.8	7.4 ± 0.5
	강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	6.8 ± 0.5	5.1 ± 0.4
	강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10 ⁷ cfu/mouse	14.9 ± 1.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁷ cfu/mouse		6.1 ± 0.5	3.8 ± 0.5
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10 ⁷ cfu/mouse		4.2 ± 0.3	1.7 ± 0.2
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse		7.2 ± 0.5	4.9 ± 0.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse		4.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2
강황(생물전환)산물 40 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse		1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1

Table 78. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 감염 전 강황(생물전환)산물의 사전투여 및 감염 후 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시 비장 및 간 내 살모넬라의 측정-2

		<i>Salmonella</i> in tissue	
		Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		152.6 \pm 10.8	92.3 \pm 7.2
20 mg Streptomycin		143.2 \pm 9.6	88.7 \pm 6.3
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	120.2 \pm 10.5	55.6 \pm 3.4
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	26.8 \pm 1.9	15.4 \pm 1.3
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	75.3 \pm 5.6	25.7 \pm 1.2
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	15.7 \pm 1.4	8.7 \pm 0.5
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	16.9 \pm 1.2	9.8 \pm 0.7
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^6 cfu/mouse	7.2 \pm 0.5	4.6 \pm 0.2
	강황(생물전환)산물 1.25 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	8.0 \pm 0.6	5.5 \pm 0.3
	강황(생물전환)산물 5 mg/kg + 바실러스 5×10^7 cfu/mouse	5.3 \pm 0.4	2.1 \pm 0.1

(8) 왕겨초액의 분변 살균제로서의 효능 평가

SE38 감염 모델에서 분변으로 배출된 살모넬라가 왕겨초액의 처리로 인해 효과적으로 제거되는 결과를 얻었기 때문에, SL1344 감염 모델에서도 분변에 왕겨초액을 처리하여 분변 내 잔존하는 살모넬라를 제어하고자 하였다. 실험군당 10마리의 암컷 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 강황(생물전환)산물은 6주령 마우스를 이용하여 2주간 사전식이 하였고, 바실러스소재는 8주령 마우스를 이용하여 감염 후 식이하였다. 또한, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재를 순차적으로 투여시에는 6주령의 마우스를 이용하였다. SL1344 감염 마우스의 분변에 왕겨초액을 10분, 60분간 처리한 뒤 생존하는 살모넬라의 개체수를 측정하였으며, 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재와 함께 왕겨초액의 처리에 따른 시너지 효과를 평가하였다.

(가) 왕겨초액의 처리시간에 따른 분변 내 살모넬라의 생존률 확인

SL1344 감염 마우스의 분변이 포함된 깔짚을 회수하여 1% 왕겨초액을 처리하였다. 처리 후 10분, 60분에 분변을 회수하고 생존한 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 감염 1일 후와 2일 후에 모두 90% 이상의 높은 살모넬라 제거 능력을 보였으며, 왕겨초액을 60분간 처리한 경우에는 97% 이상의 살모넬라를 제거하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Table 79. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 분변 내 살모넬라에 대한 왕겨초액의 살균활성

		<i>Salmonella</i> in Feces (x10 ⁵ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only		38.31 ± 2.92	44.92 ± 3.8
Normal mice	1% 왕겨초액	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only	10 min	1.59 ± 0.17	2.83 ± 0.16
Normal mice	1% 왕겨초액	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SL1344 infection only	60 min	0.86 ± 0.07	1.27 ± 0.1

(나) 강황(생물전환)산물을 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

강황(생물전환)산물의 투여로 인해 다량 배출된 살모넬라에 대한 왕겨초액의 항균활성을 측정하였다. 강황(생물전환)산물의 투여량과는 관계없이, 1% 왕겨초액을 10분간 처리한 경우 모두 90% 이상의 억제 활성을 보였으며 60분간 처리한 경우에는 모두 95% 이상의 높은 억제 활성을 보였다. SE38 균주와 마찬가지로 SL1344 균주에서도 동일한 항균활성이 나타남에 따라, 왕겨초액이 다양한 살모넬라에 대한 강력한 살균제로 사용될 수 있는 가능성이 있는 것으로 평가된다.

Table 80. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물을 감염 전/후 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		38.31 \pm 2.92	44.92 \pm 3.8
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	-	49.32 \pm 2.86	55.91 \pm 4.42
강황(생물전환)산물 10 mg/kg		77.83 \pm 5.60	86.91 \pm 7.25
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		85.69 \pm 7.28	95.83 \pm 8.24
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		1.59 \pm 0.17	2.83 \pm 0.16
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 10 min	2.30 \pm 0.17	3.89 \pm 0.34
강황(생물전환)산물 10 mg/kg		5.69 \pm 0.48	6.28 \pm 0.53
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		7.81 \pm 0.59	8.99 \pm 0.71
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		0.86 \pm 0.07	1.27 \pm 0.1
강황(생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 60 min	1.27 \pm 0.13	2.05 \pm 0.17
강황(생물전환)산물 10 mg/kg		2.67 \pm 0.15	3.06 \pm 0.25
강황(생물전환)산물 40 mg/kg		4.15 \pm 0.31	4.62 \pm 0.32

(다) 바실러스소재를 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

바실러스소재를 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과를 평가하였다. 바실러스소재의 항균활성에 의해 많은 양의 살모넬라가 장관 내에서 사멸하지만, 살아남아 분변으로 배출된 살모넬라는 왕겨초액의 처리에 의해 대부분 사멸되는 것으로 확인되었다. 바실러스소재에 의해 제거되지 못하고 생존하여 분변으로 빠져나온 살모넬라에 대한 추가적인 제거가 가능하다는 장점이 있으며, 두 소재 모두 작용기전이 유사하지만 분변에서의 살모넬라 제거에 매우 효과적으로 사용할 수 있어 그 의미가 크다고 평가된다.

Table 81. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 바실러스소재를 감염 후 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		38.31 \pm 2.92	44.92 \pm 3.8
바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse	-	31.28 \pm 2.65	36.51 \pm 3.24
바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse		12.67 \pm 1.15	18.3 \pm 1.72
바실러스소재 10 ⁹ cfu/mouse		7.2 \pm 0.68	9.07 \pm 0.84
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		1.59 \pm 0.17	2.83 \pm 0.16
바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse	1% 왕겨초액 10 min	2.16 \pm 0.13	2.38 \pm 0.12
바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse		1.08 \pm 0.11	1.29 \pm 0.09
바실러스소재 10 ⁹ cfu/mouse		0.56 \pm 0.04	0.67 \pm 0.04
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		0.86 \pm 0.07	1.27 \pm 0.1
바실러스소재 10 ⁷ cfu/mouse	1% 왕겨초액 60 min	1.1 \pm 0.12	1.14 \pm 0.13
바실러스소재 10 ⁸ cfu/mouse		0.47 \pm 0.03	0.58 \pm 0.05
바실러스소재 10 ⁹ cfu/mouse		0.19 \pm 0.01	0.31 \pm 0.03

(라) 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과 평가

강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과를 평가하였다. 2주간 강황(생물전환)산물을 감염 전 사전투여 한 마우스에 SL1344 균주를 감염시키고, 바실러스소재를 투여한 마우스 모델을 사용하였다. 분변에 1% 왕겨초액을 처리한 결과, 모든 처리군에서 95% 이상의 살모넬라가 사멸하는 것으로 확인되었고, 가장 큰 시너지 효과를 낼 수 있는 복합투여 방법인 것으로 평가된다. 그러나 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 후 살모넬라를 감염시키고, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합소재를 투여하고, 분변에는 왕겨초액을 처리하는 방법이 보다 시너지 효과를 나타내는 효과적인 방법임이 추가실험을 통해 확인되었다.

Table 82. SL1344 균주를 이용한 식중독 모델에서 강황(생물전환)산물 및 바실러스소재를 순차적으로 투여한 마우스의 분변에 대한 왕겨초액의 효과

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		39.24 \pm 3.08	46.91 \pm 3.56
강황 (생물전환)산물 2.5 mg/kg		33.12 \pm 2.17	36.7 \pm 2.83
강황 (생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^7 cfu/mouse	32.94 \pm 2.84	37.21 \pm 3.09
강황 (생물전환)산물 40 mg/kg		33.09 \pm 2.12	36.22 \pm 2.14
강황 (생물전환)산물 2.5 mg/kg		11.68 \pm 0.97	15.22 \pm 1.16
강황 (생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^8 cfu/mouse	11.02 \pm 0.76	15.08 \pm 1.63
강황 (생물전환)산물 40 mg/kg		11.85 \pm 0.92	14.79 \pm 1.58
강황 (생물전환)산물 2.5 mg/kg		2.26 \pm 0.15	2.57 \pm 0.24
강황 (생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^7 cfu/mouse	2.49 \pm 0.18	2.86 \pm 0.15
강황 (생물전환)산물 40 mg/kg		2.13 \pm 0.15	2.45 \pm 0.17
강황 (생물전환)산물 2.5 mg/kg		0.87 \pm 0.06	1.03 \pm 0.11
강황 (생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^8 cfu/mouse	0.84 \pm 0.07	1.06 \pm 0.12
강황 (생물전환)산물 40 mg/kg		0.86 \pm 0.07	1.07 \pm 0.12

		<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
		1 day	2 day
Normal mice		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
SL1344 infection only		39.24 \pm 3.08	46.91 \pm 3.56
강황 (생물전환)산물 2.5 mg/kg		1.02 \pm 0.11	1.09 \pm 0.1
강황 (생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^7 cfu/mouse	1.06 \pm 0.09	1.11 \pm 0.12
강황 (생물전환)산물 40 mg/kg		0.95 \pm 0.07	1.09 \pm 0.08
강황 (생물전환)산물 2.5 mg/kg	1% 왕겨초액 60 min	0.32 \pm 0.01	0.48 \pm 0.03
강황 (생물전환)산물 10 mg/kg	바실러스 소재 10^8 cfu/mouse	0.24 \pm 0.01	0.37 \pm 0.04
강황 (생물전환)산물 40 mg/kg		0.32 \pm 0.03	0.46 \pm 0.03

다. 종특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스 모델에서의 in vivo 유효성 평가에 대한 실험적 의의

종특이 살모넬라 균주인 SL1344 균주를 이용하여 살모넬라 경구 감염 마우스 모델을 제작하고, 면역조절소재와 프로바이오틱스소재, 왕겨초액이 갖는 살모넬라 감염 억제 효과를 평가하였다.

미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물은 유효성 1차 평가에서 10mg/kg의 1일 투여 용량으로 감염 전 2주간 사전 투여 시 분변으로 배출되는 살모넬라의 배출 증진 및 조직 내 살모넬라의 감소 효과를 보였으며, 인수공통 살모넬라 균주 감염 모델과 마찬가지로 맹장 보다는 장관막림프절과 비장, 간에서의 억제율이 더 높은 것으로 확인되었다.

유효성 2차 평가에서는 두 면역조절소재 중 활성이 더 높은 것으로 확인된 강황(생물전환)산물을 이용하여 추가적인 유효성 평가를 수행하였으며, 2.5mg/kg, 10mg/kg, 40mg/kg 의 세가지 1일 투여용량으로 감염 전 2주간 사전투여 또는 감염과 동시에 투여하여 농도 별 예방 및 치료 효과를 비교하였다. 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 한 경우 최대 40mg/kg 농도까지 효과의 포화없이 감염 억제 효과가 농도 의존적으로 증가되는 효과를 보였으며, 10mg/kg 농도를 감염 전 2주간 사전투여 했을 경우와 마찬가지로 면역 반응 활성화에 의해 장관막림프절, 비장, 간에서의 억제 효율이 더 높게 나타나는 것으로 확인되었다. 동일 농도에서 감염 전 사전투여 없이 감염과 동시에 투여하여 치료 효과를 확인한 실험에서는 사전투여와 비교하여 비교적 낮은 활성이 있는 것으로 확인되었으며, 인수공통 살모넬라 균주를 이용한 실험과 유사하게 4배 정도의 활성 차이가 있는 것으로 확인되었다.

프로바이오틱스소재로 사용한 유산균소재와 바실러스소재는 유효성 1차 평가에서 2주간 1일 투여용량으로 10^8 cfu 사전투여 시 분변으로 배출되는 살모넬라 및 조직 내 생존하는 살모넬라를 모두 효과적으로 제어할 수 있는 것으로 확인되었으며, 유산균소재에 비해 바실러스소재가 더 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

따라서, 유효성 2차 평가에서는 바실러스소재를 이용하여 10^6 cfu, 10^7 cfu, 10^8 cfu 세가지 1일 투여용량에서 감염 예방 효과와 감염 치료 효과를 확인하였다. 1일 투여용량 10^6 cfu를 투여한 마우스에서는 살모넬라의 감염 억제 효과가 나타나지 않았고, 1일 투여용량 10^7 cfu 이상의 바실러스소재 투여 시 살모넬라에 대한 항균활성이 있는 것으로 확인되었다. 또한, 인수공통 살모넬라의 실험 결과와 마찬가지로 감염 전 사전투여 시와 감염 후 투여 시 효과의 차이를 보이지 않았다.

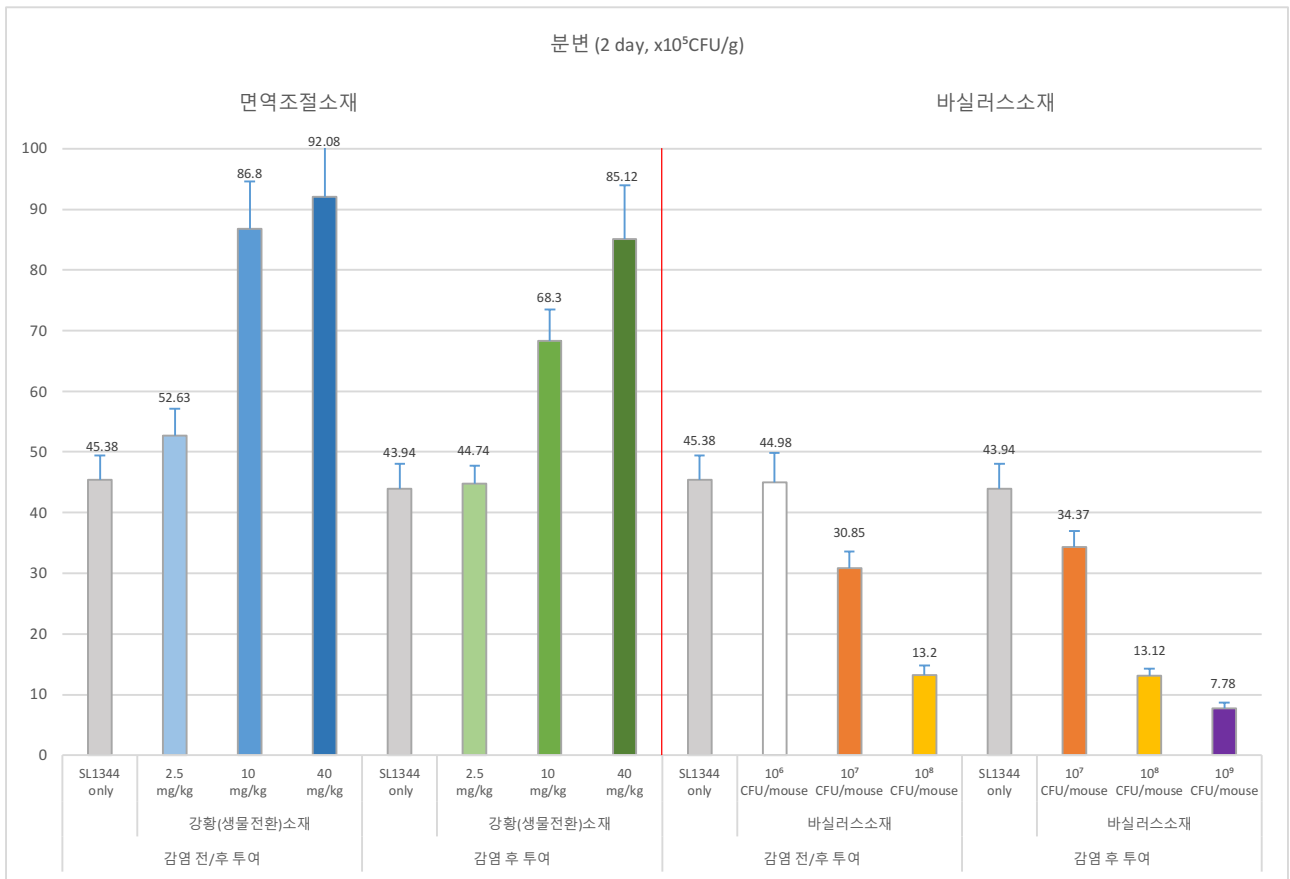
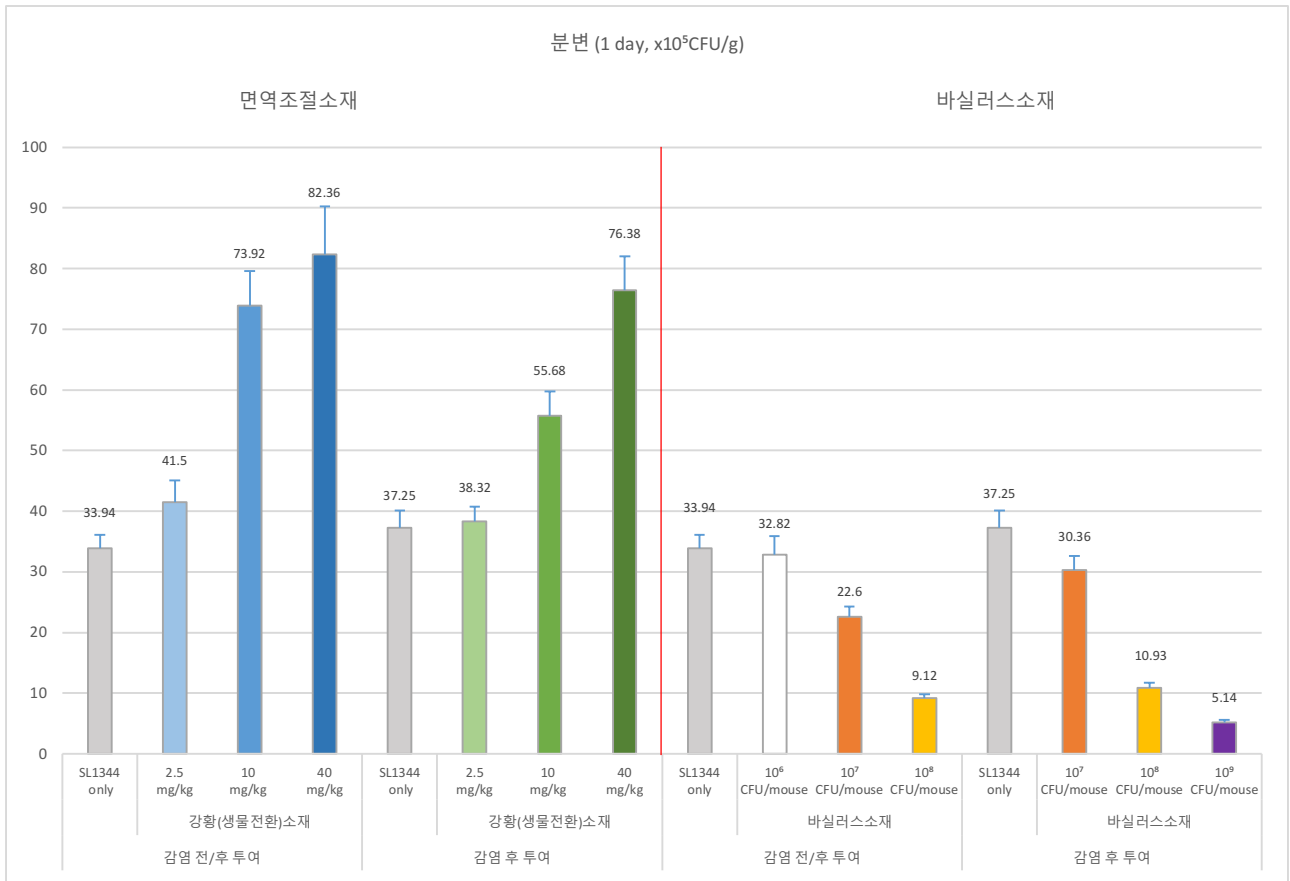
왕겨초액은 유효성 1차 평가에서 1% 농도로 감염 전 2주간 사전투여 시 강력한 항균활

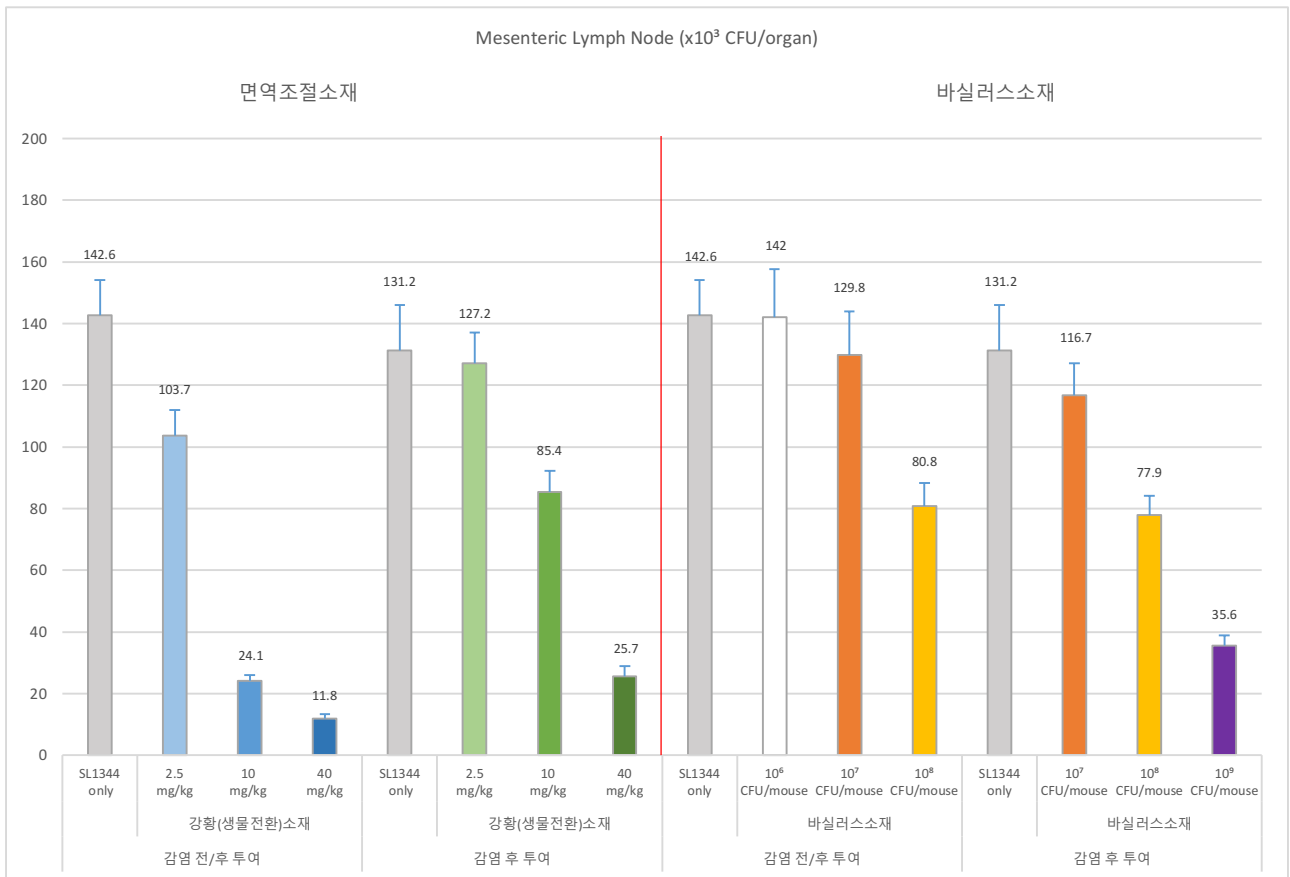
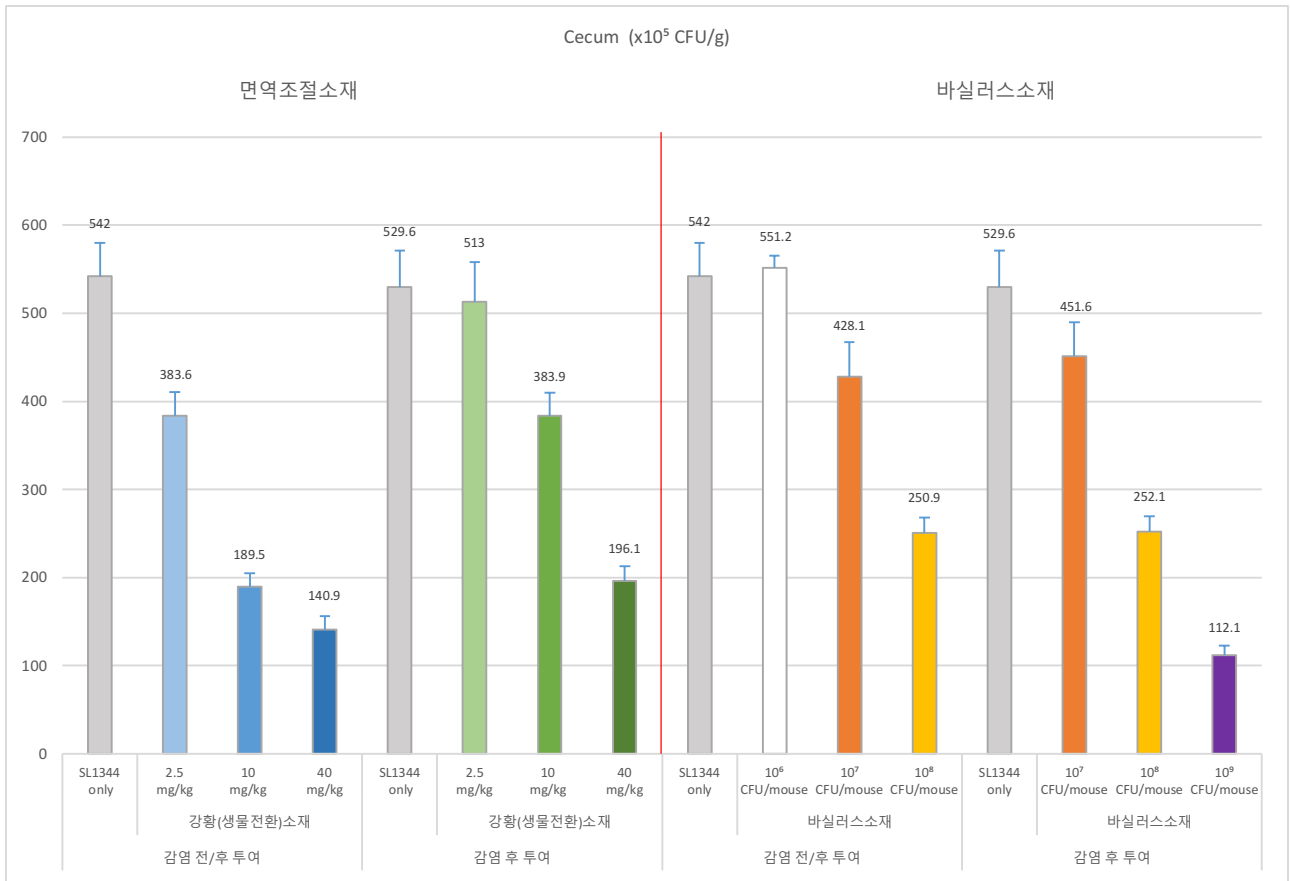
성에 의해 분변 내 살모넬라 및 조직 내 살모넬라를 사멸시키는 것으로 확인되었고 단독 처리 시에는 프로바이오틱스소재보다 더 뛰어난 항균활성을 갖는 것으로 확인되었다.

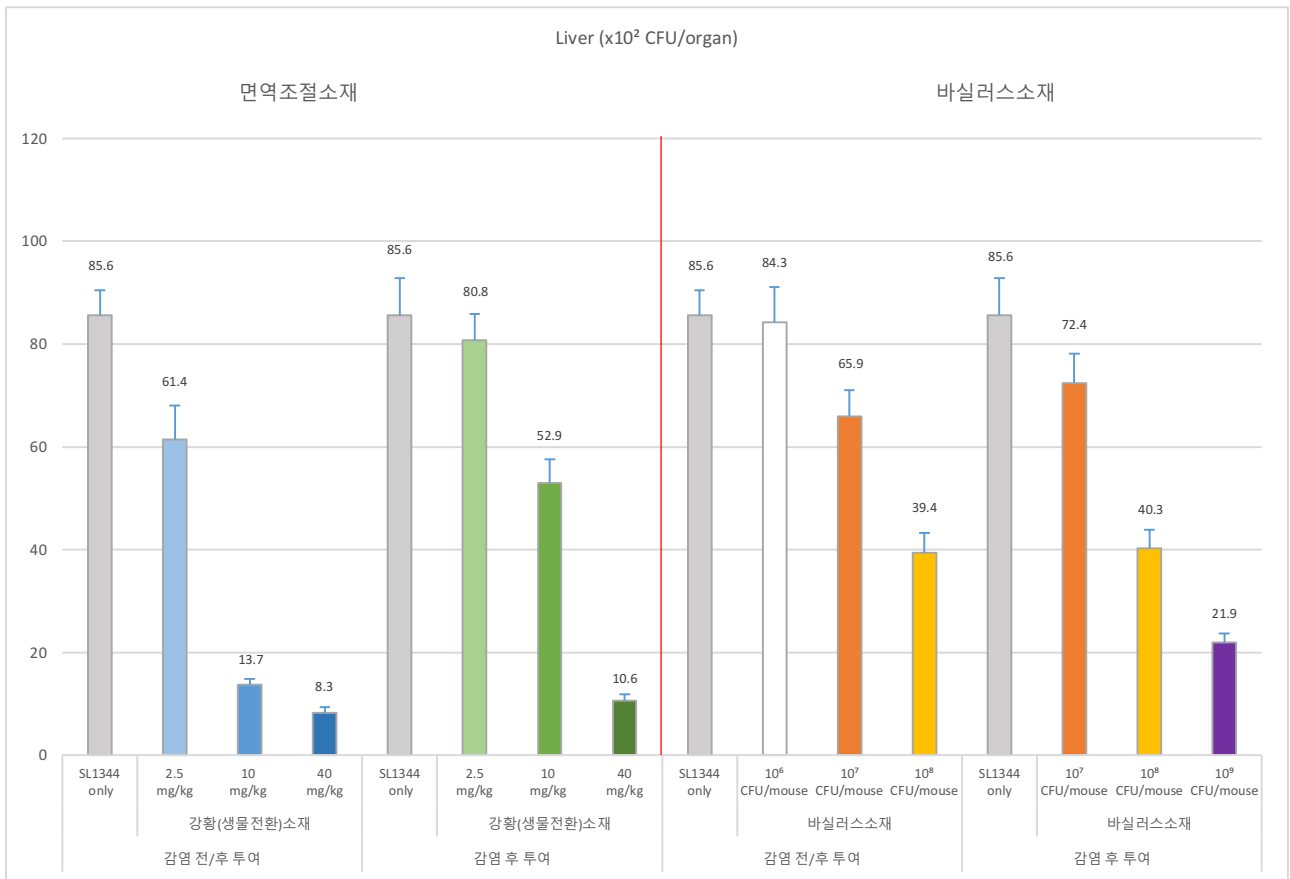
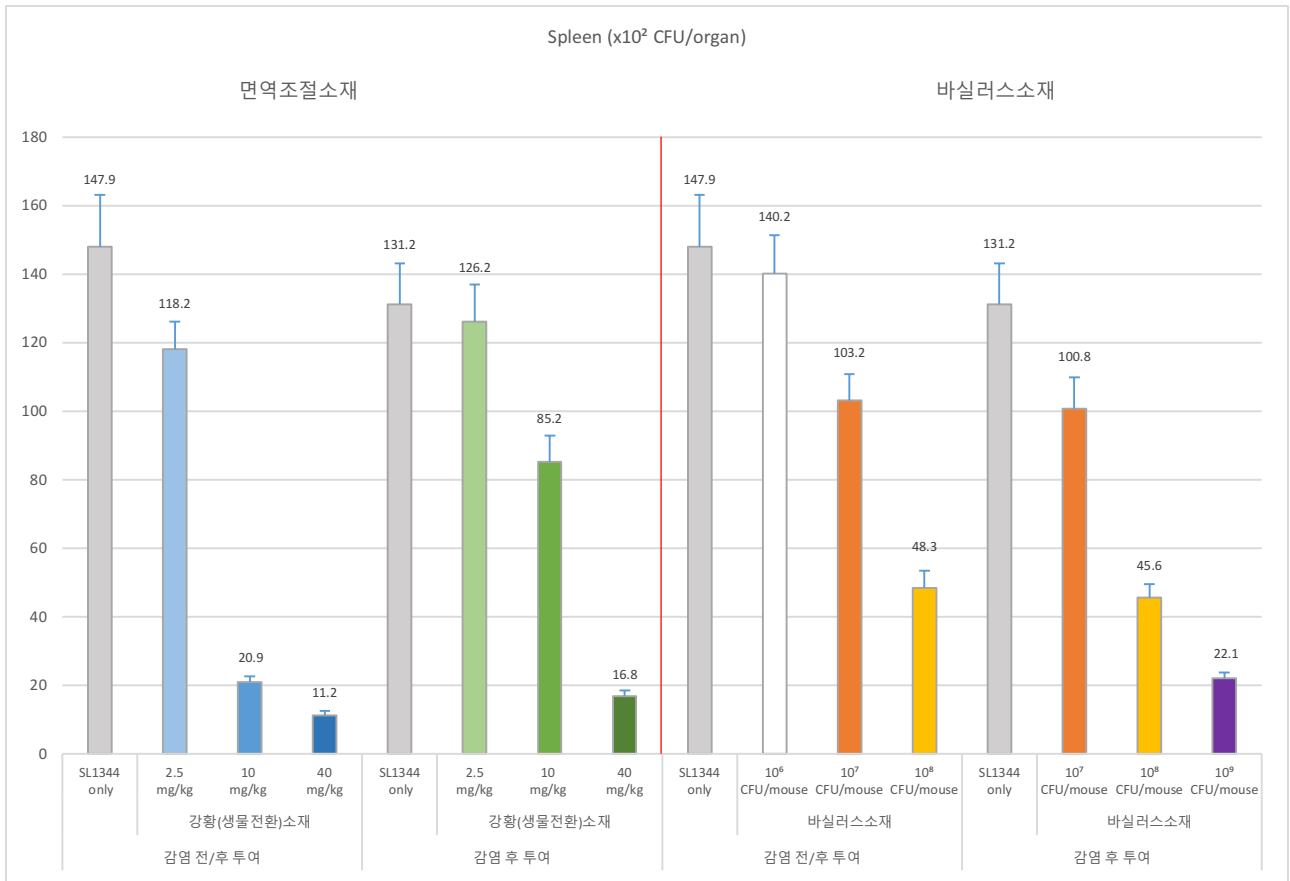
복합제제로 적합하지 않은 왕겨초액을 제외한 강황(생물전환)산물과 바실러스소재를 이용하여 복합투여에 의한 시너지 효과를 평가한 결과, 강황(생물전환)산물을 감염 전 2주간 사전투여 후 감염과 동시에 바실러스소재를 추가적으로 투여한 경우가 가장 뛰어난 살모넬라 감염 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 조직 내 살모넬라의 경우, 강황(생물전환)산물의 농도가 높을수록 높은 억제 활성을 보이며, 또한 바실러스소재의 농도가 높을수록 높은 억제 활성을 보이는 것으로 확인되었다. 따라서, 감염 억제를 위한 최소한의 강황(생물전환)산물을 예방 차원에서 투여하며, 감염 발생 시 강황(생물전환)산물의 투여 농도 증가 및 바실러스소재의 추가적인 투여를 이용하여 감염을 제어하는 것이 효과적인 살모넬라 제어 방법이라 판단된다.

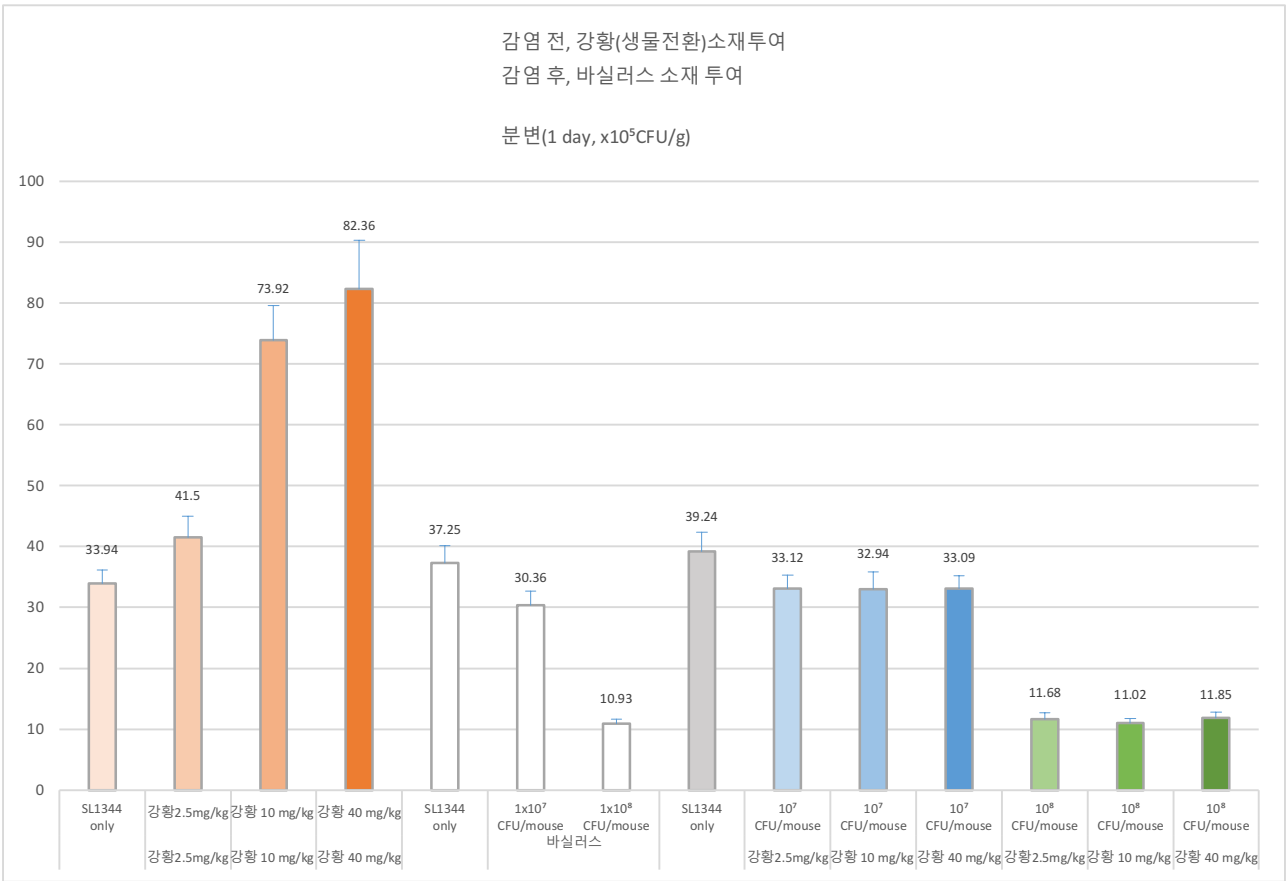
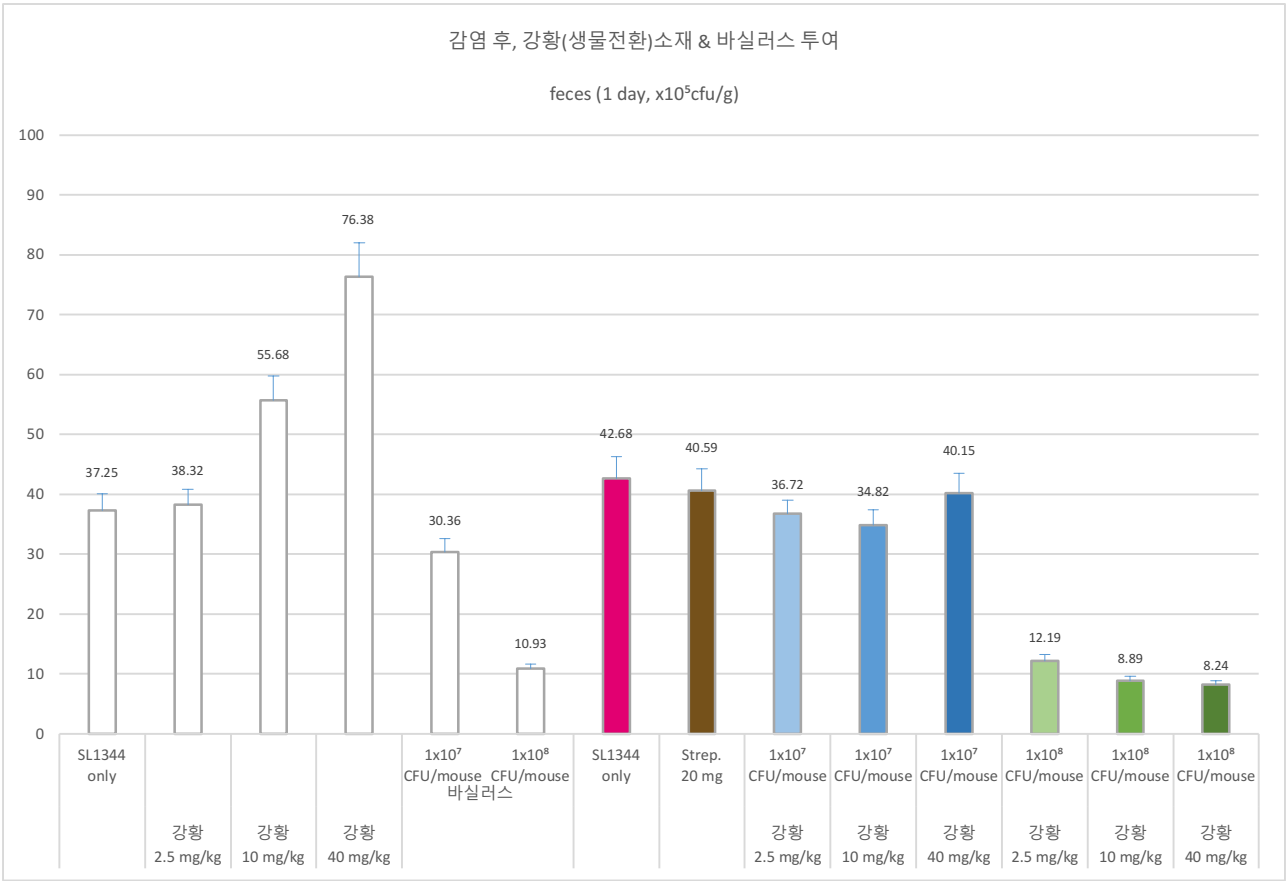
왕겨초액의 경우 인수공통 살모넬라 균주와 마찬가지로 분변 내 살모넬라에 대한 살균제로서의 가능성을 평가하였다. 분변이 포함된 깔짚에 1% 왕겨초액을 분무하여 10분과 60분간 처리한 경우, 어떠한 실험조건에서도 90% 이상의 살모넬라를 사멸시키는 것으로 확인되었다.

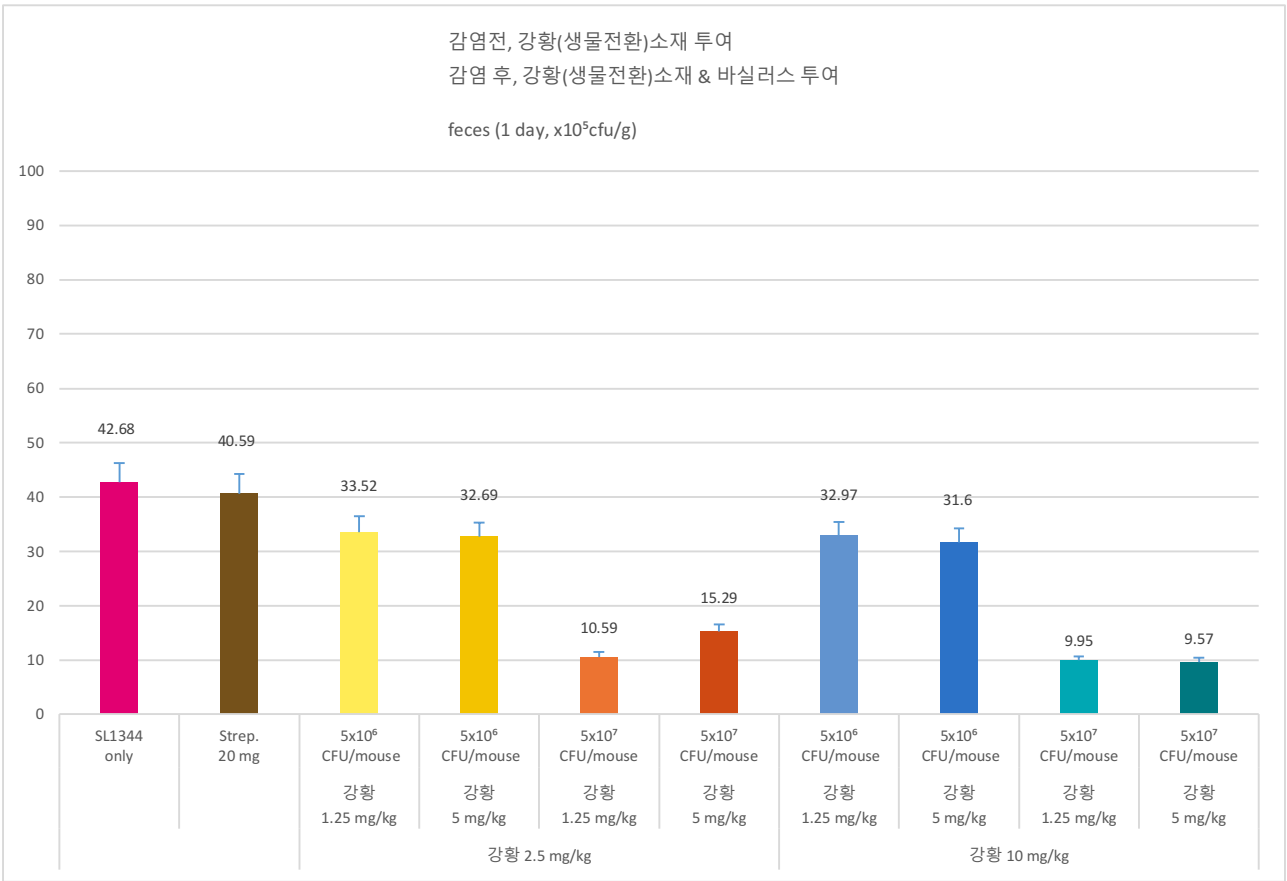
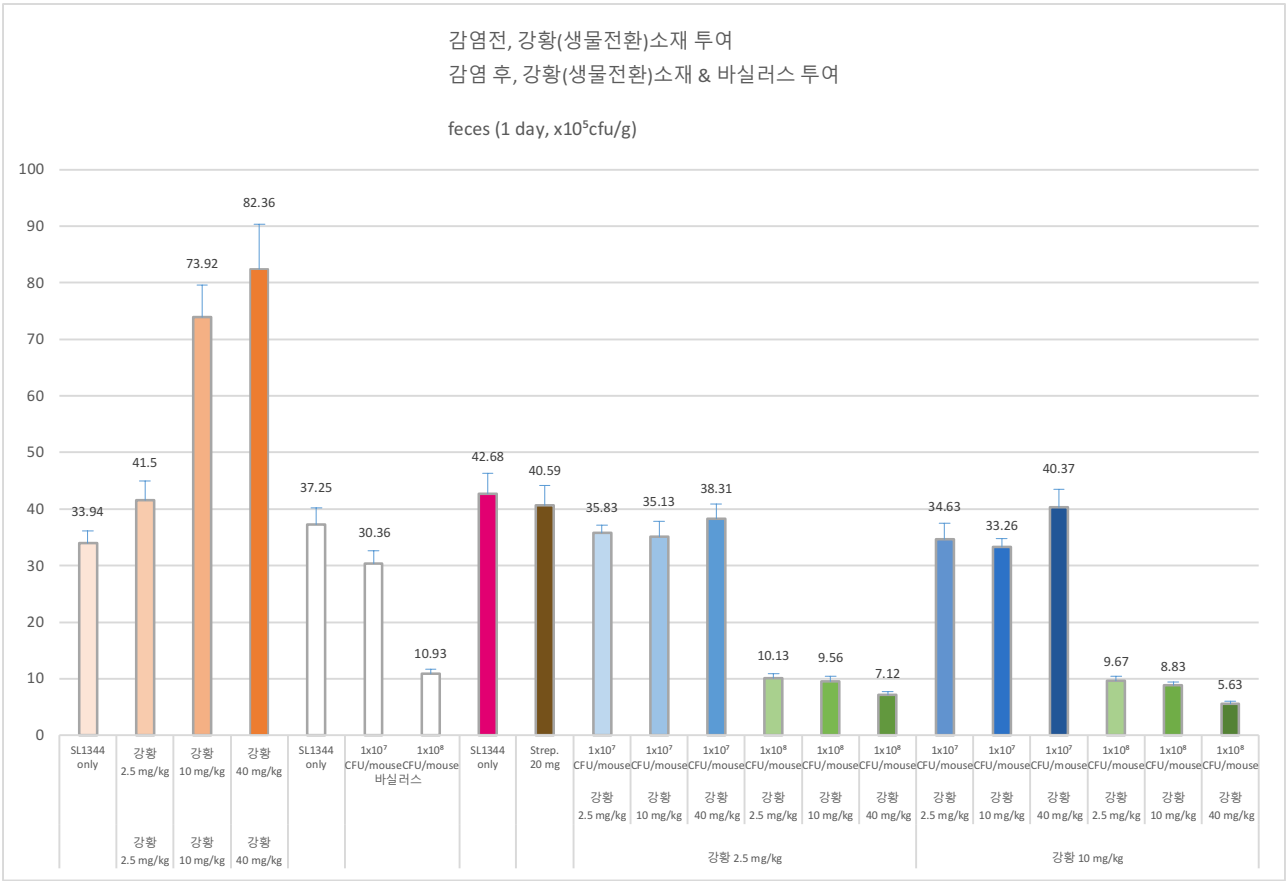
본 연구를 종합하여 볼 때, 체내 감염의 경우 강황(생물전환)산물의 감염 전 예방적 투여와 바실러스소재의 감염 후 치료적 투여에 의해 억제하며, 체외로 방출된 살모넬라의 경우 왕겨초액의 처리로 인해 사멸시키는 것이 가장 효과적인 제어 방법일 것이라 생각된다.

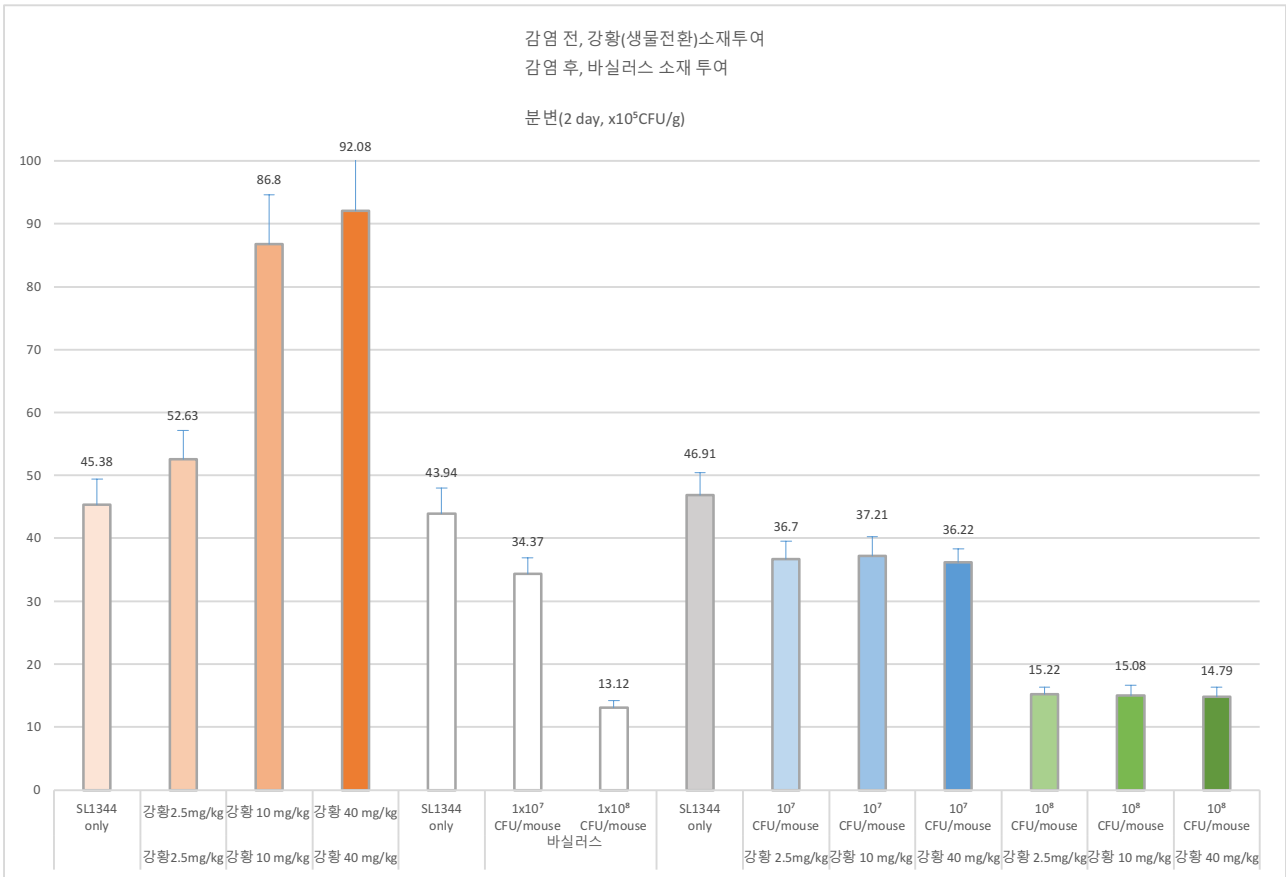
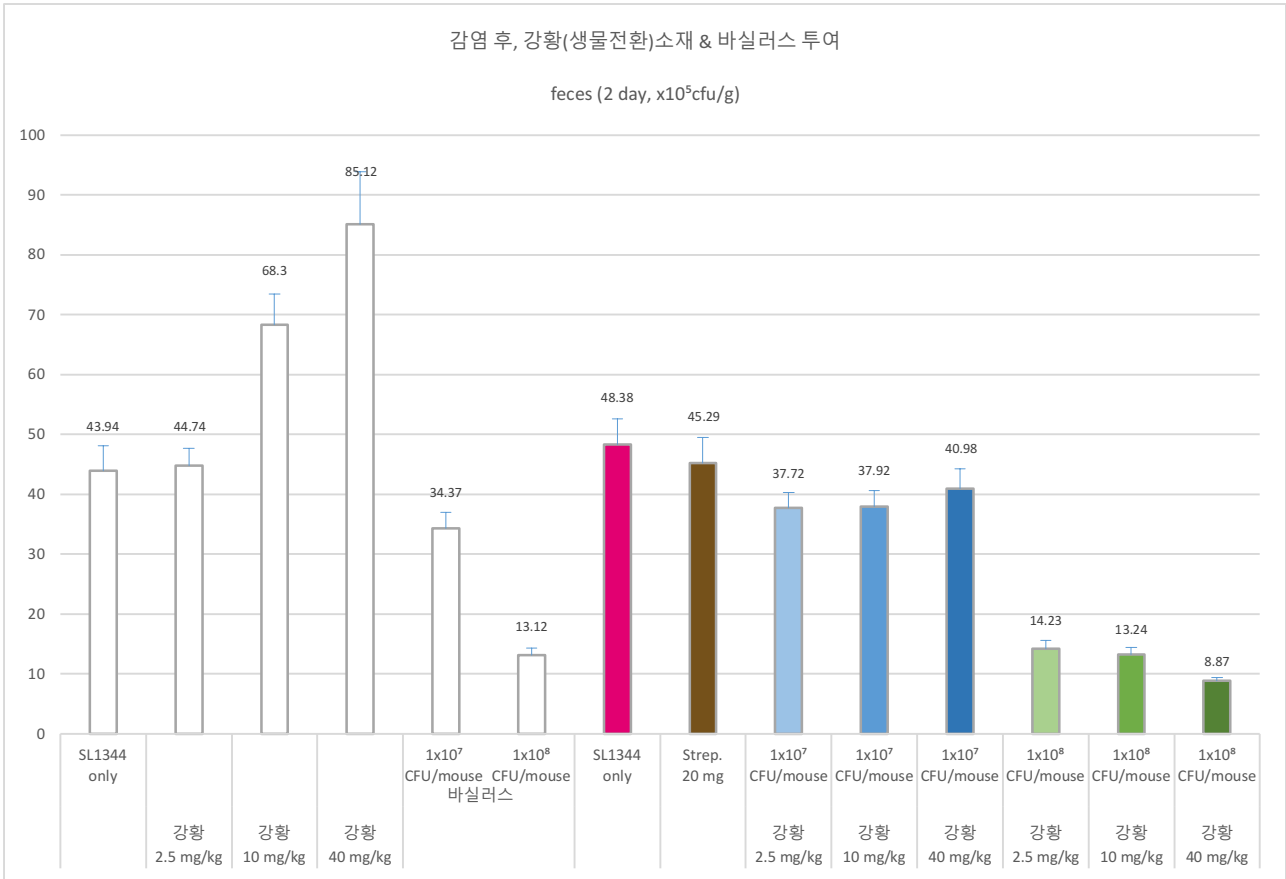


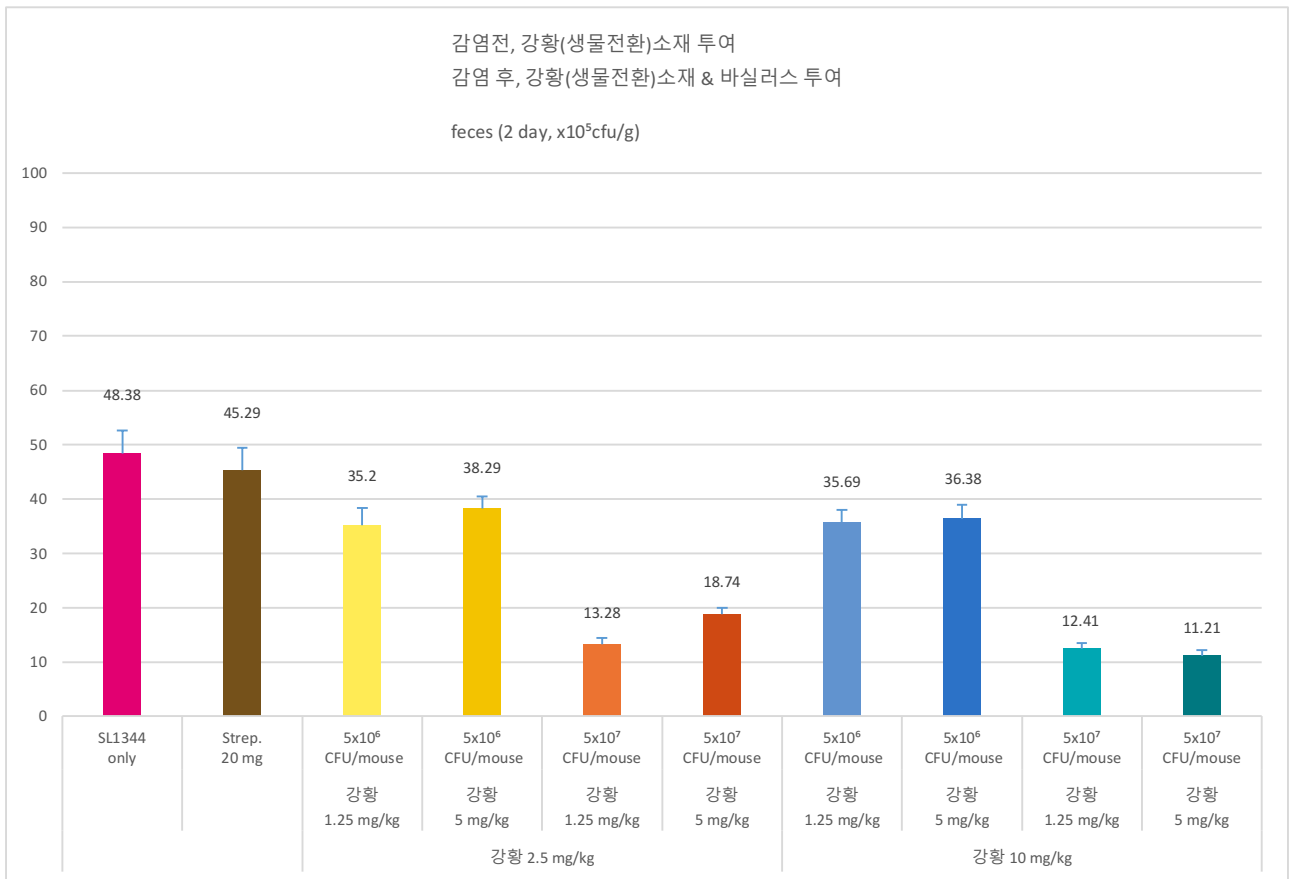
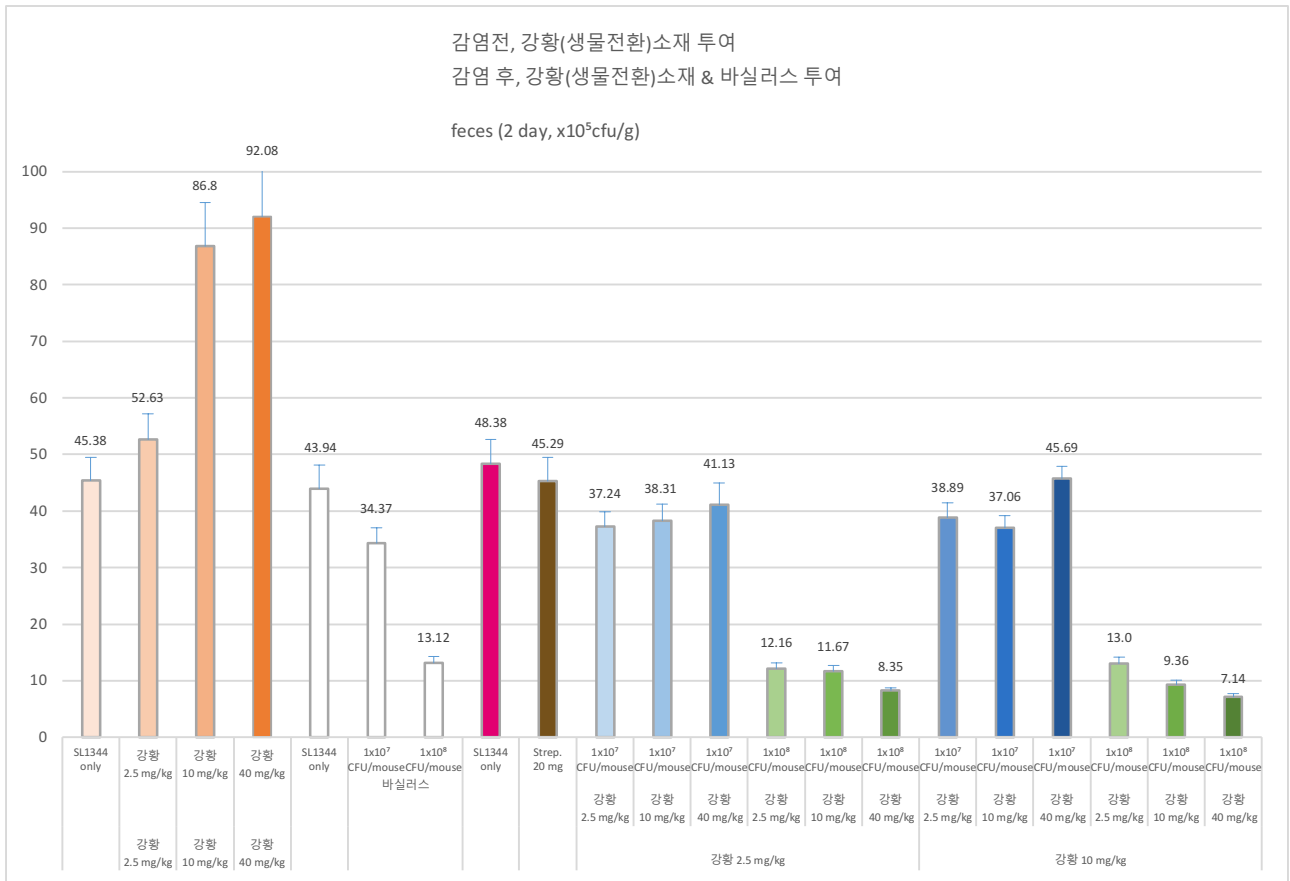


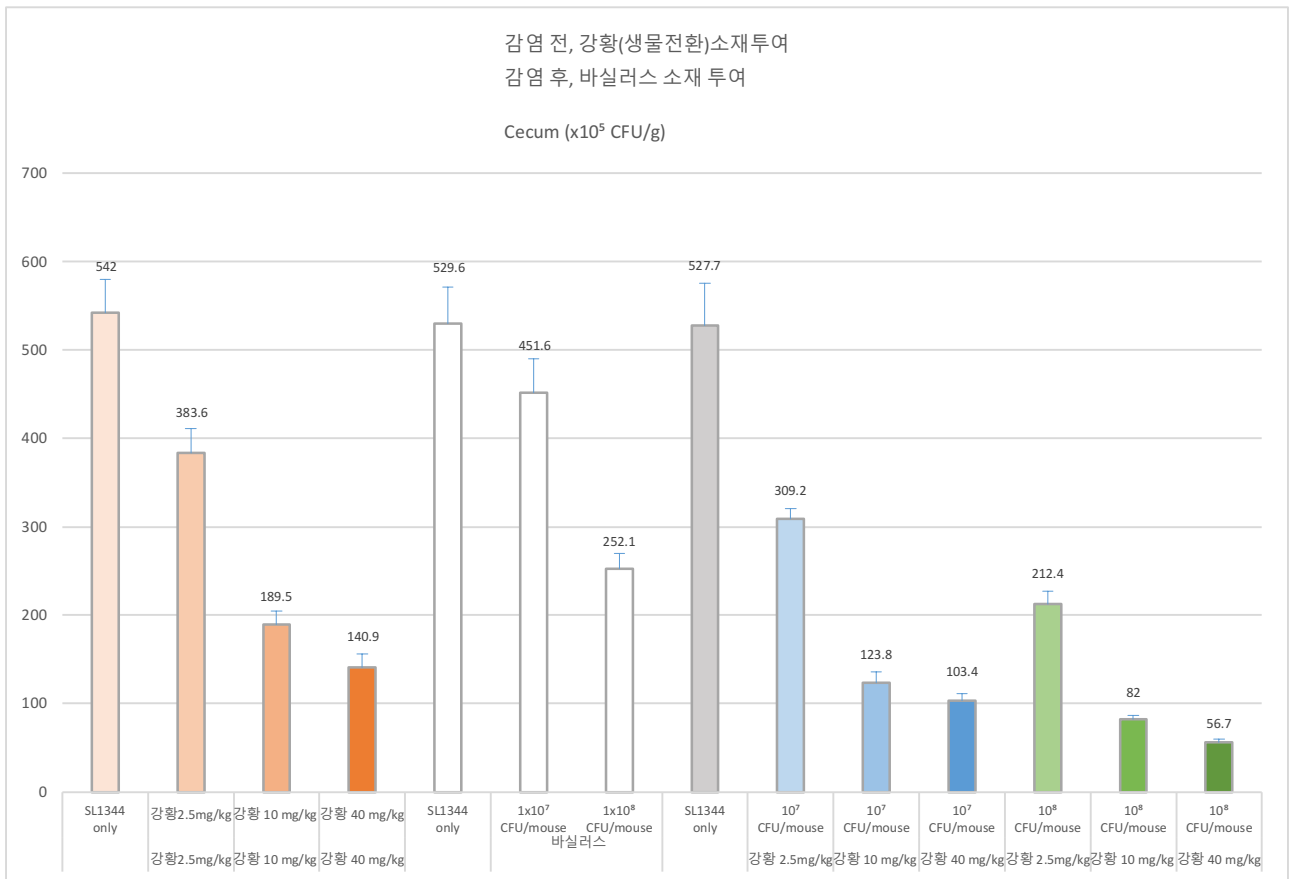
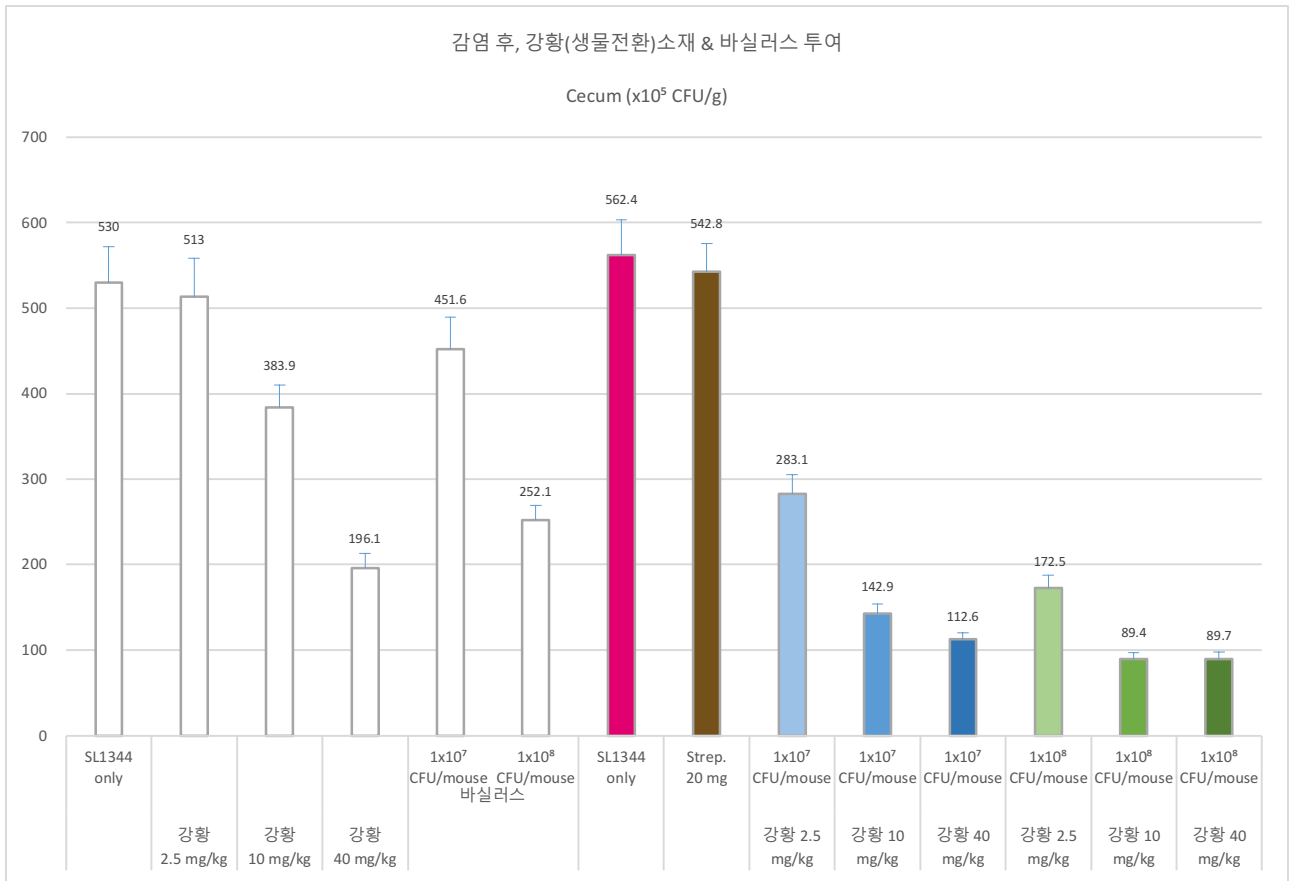


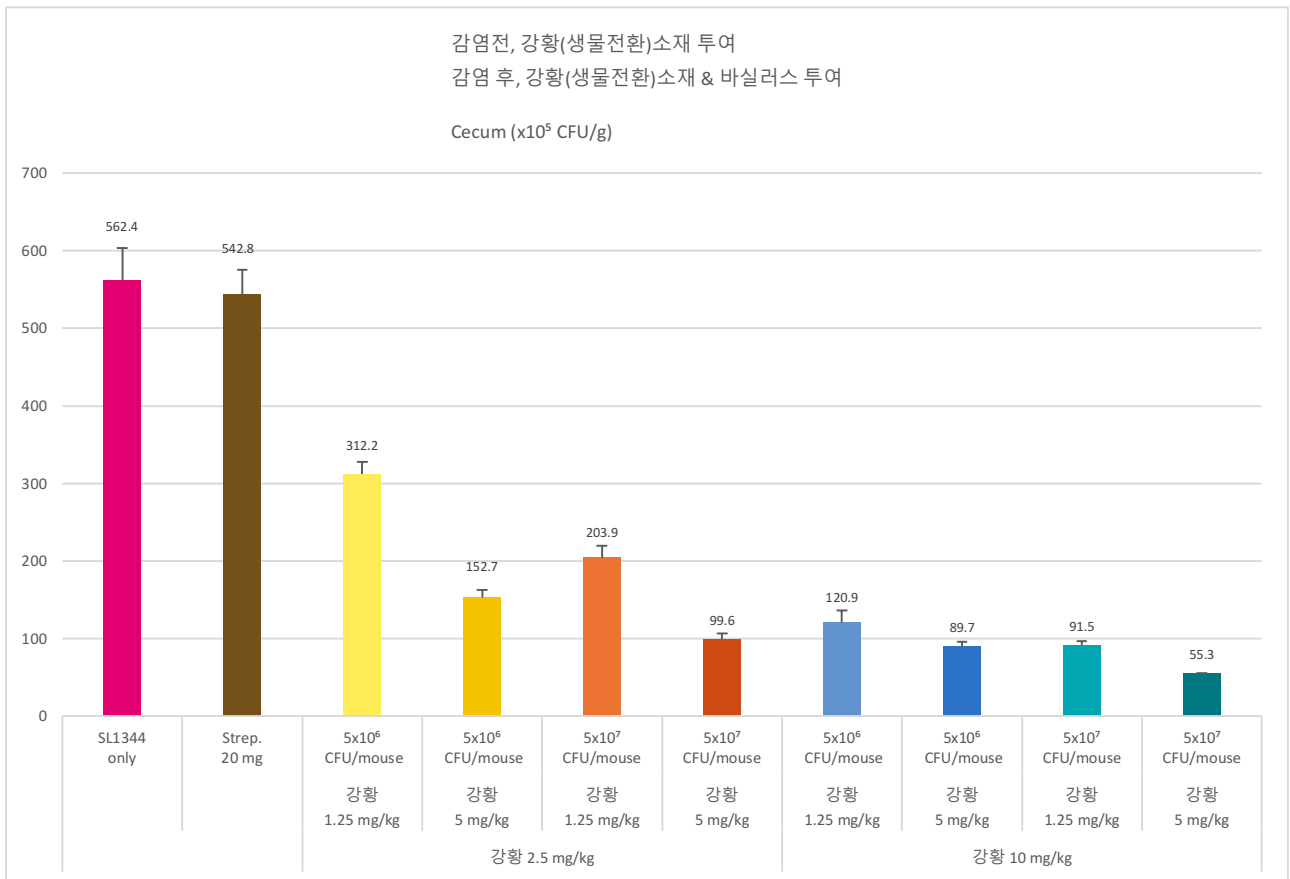
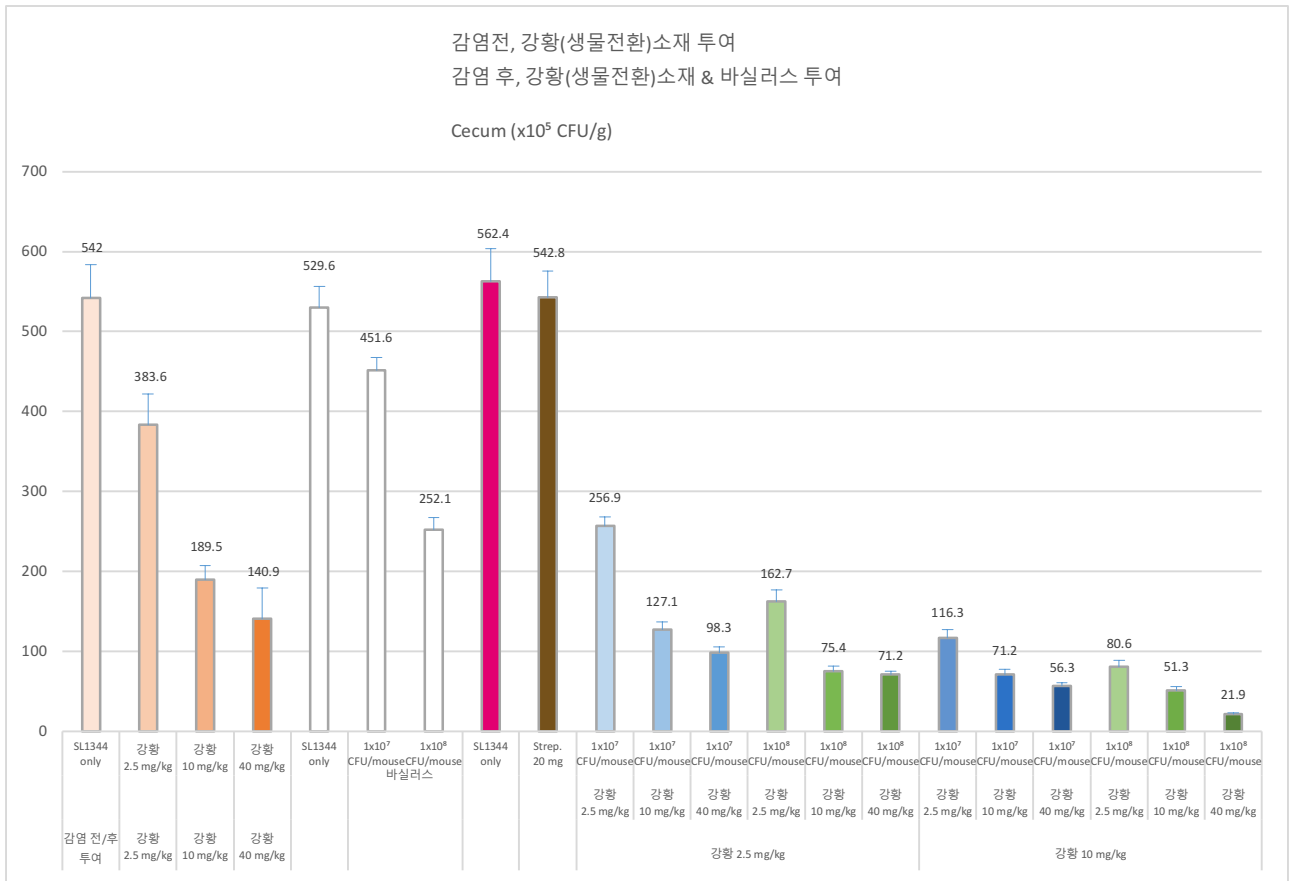


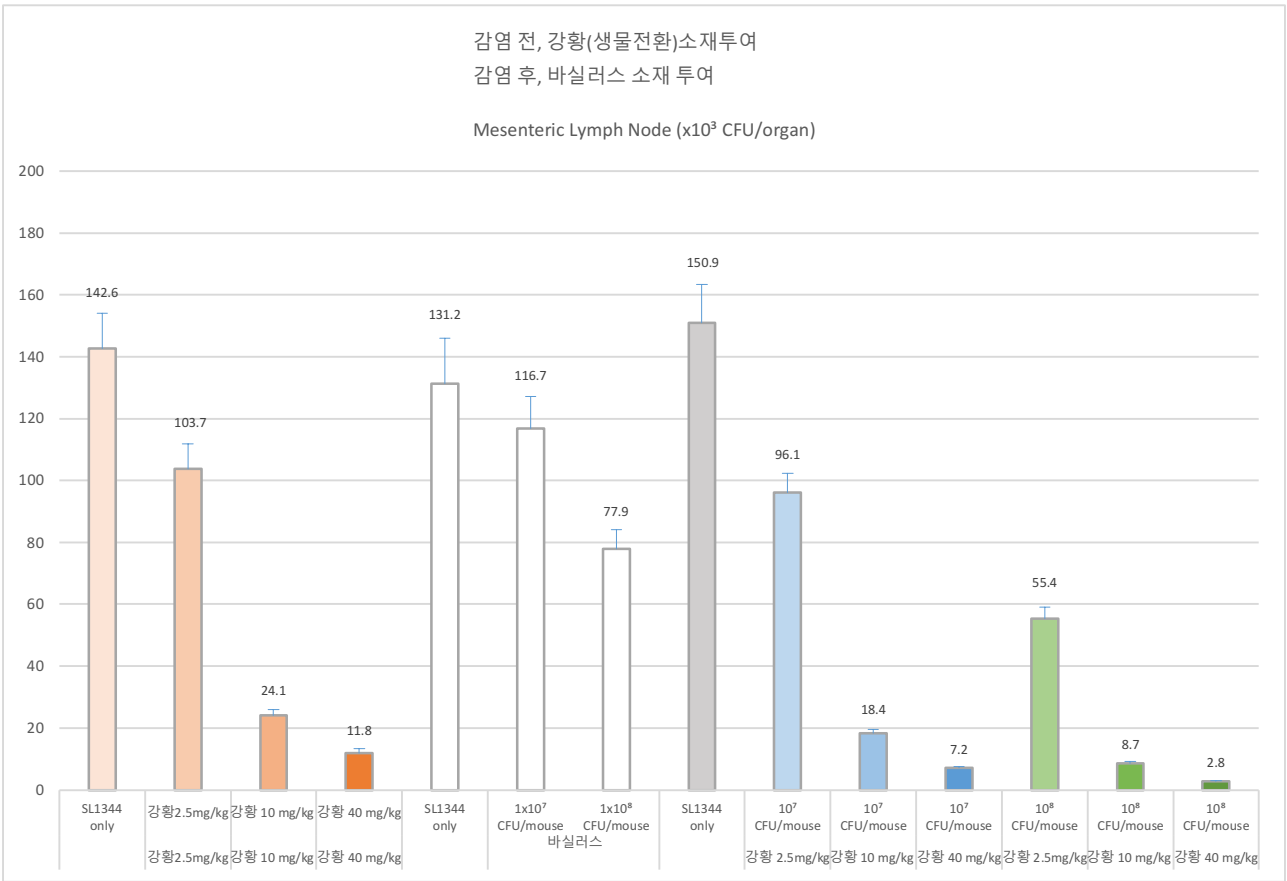
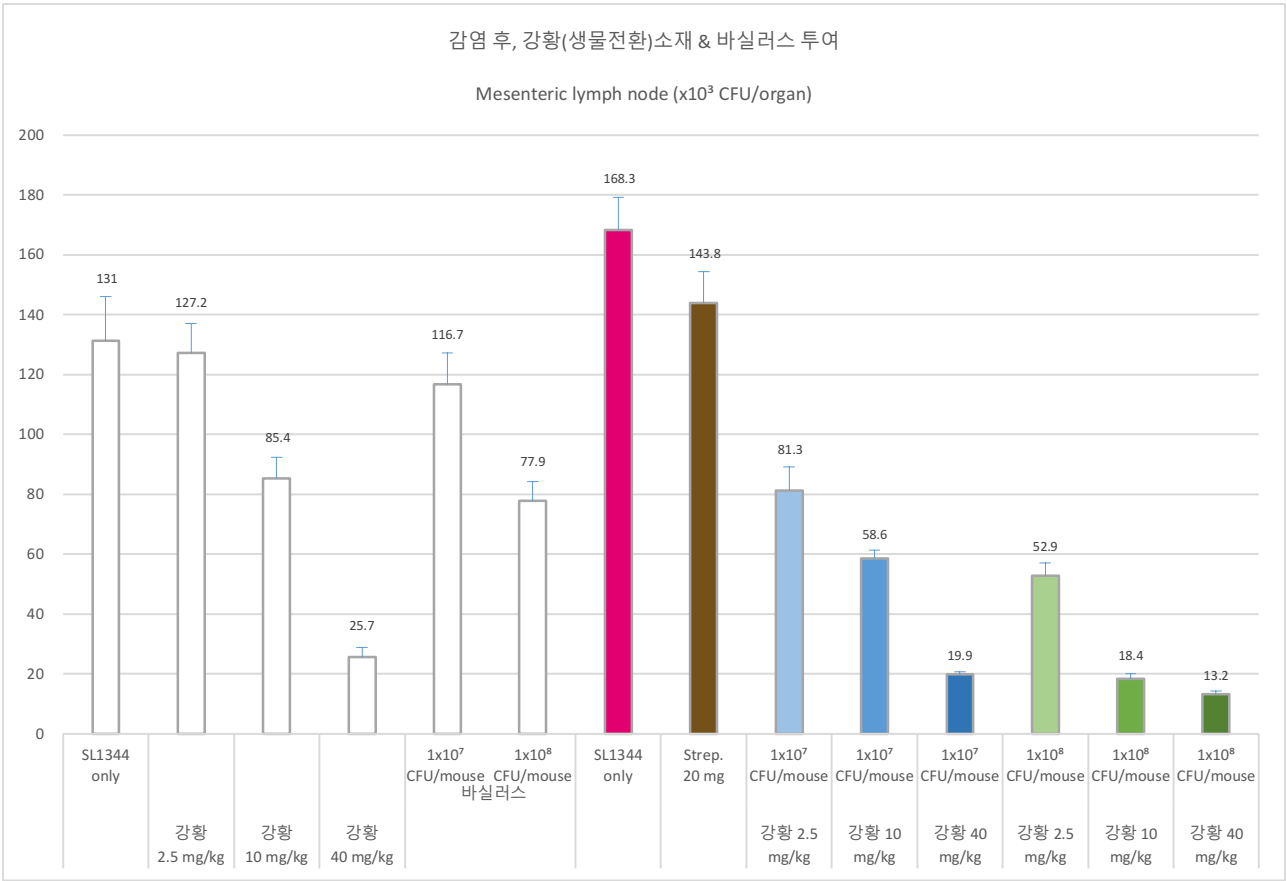


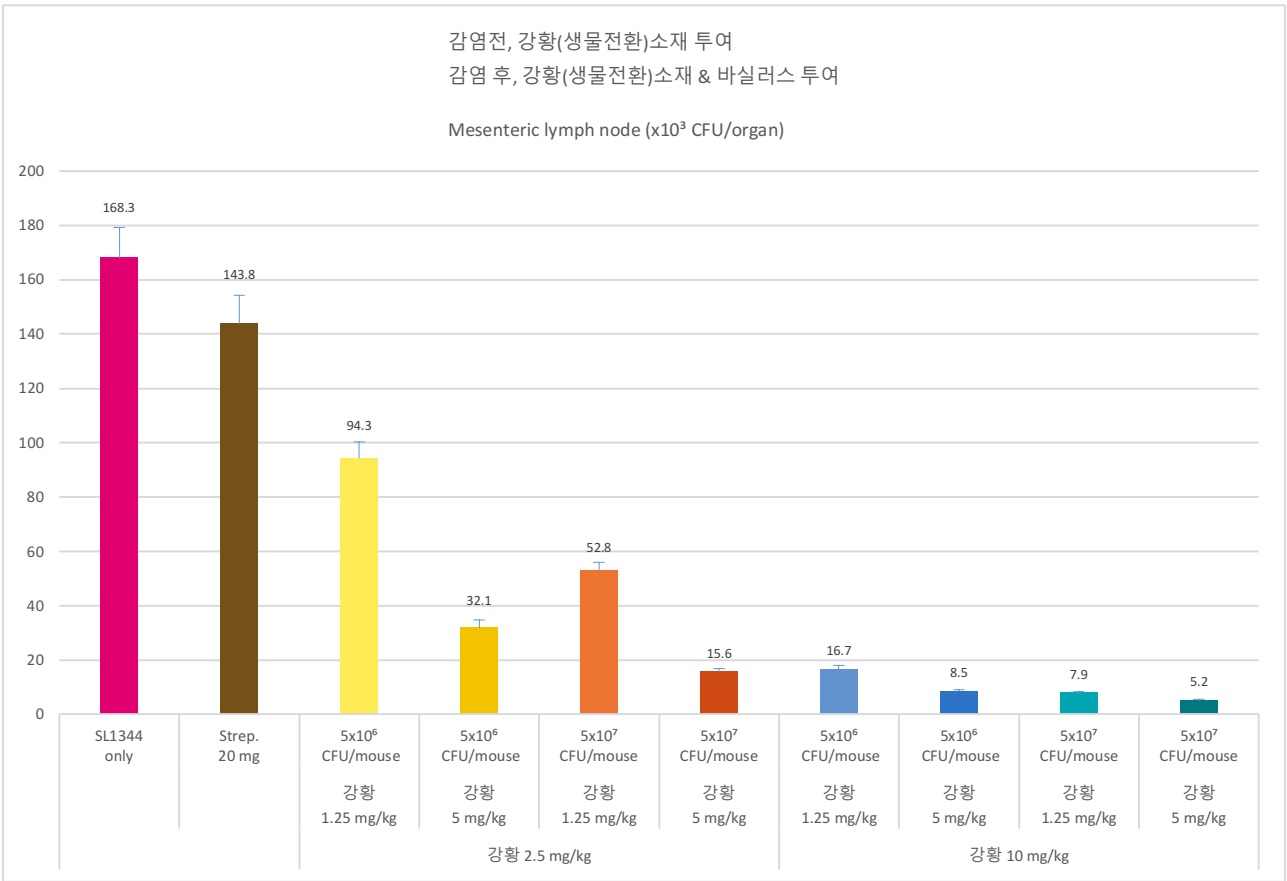
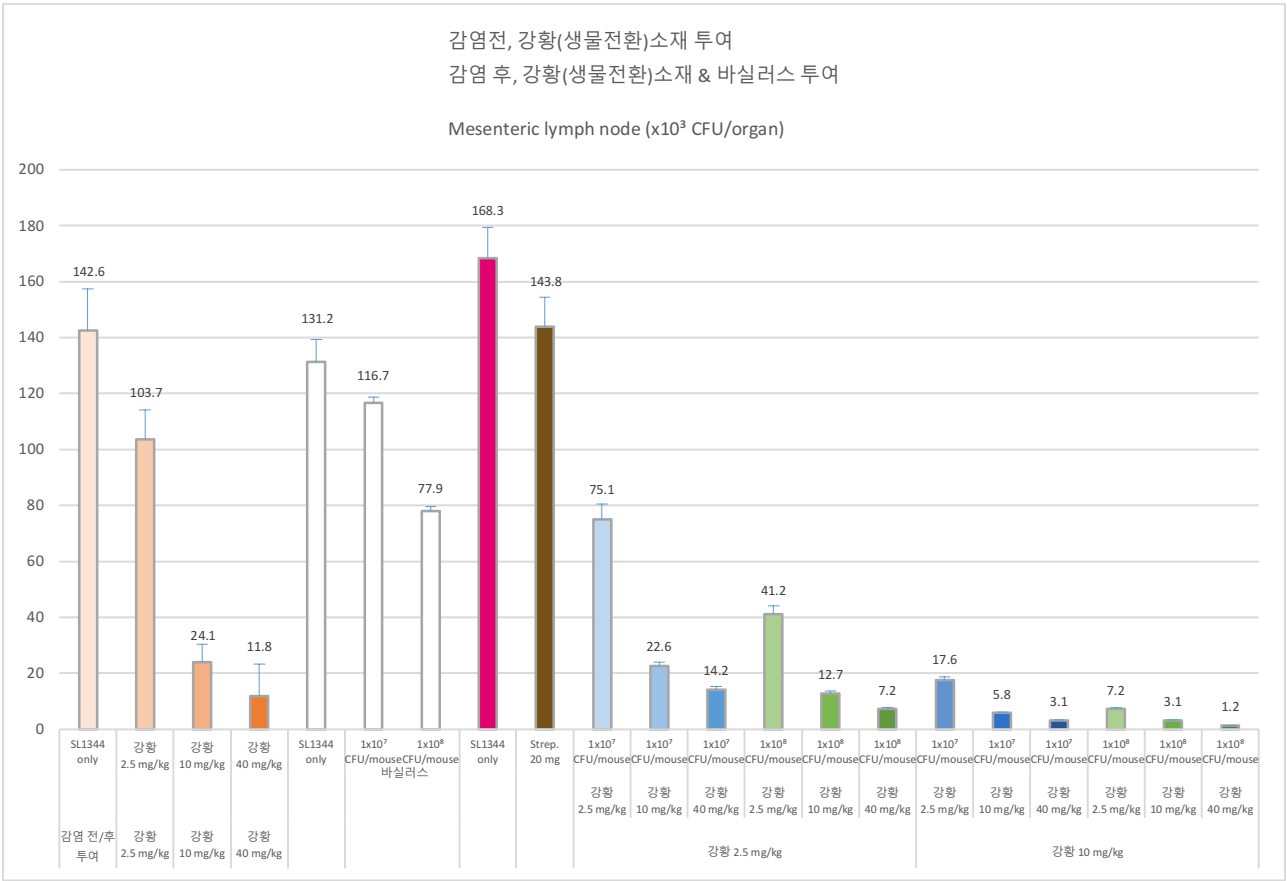


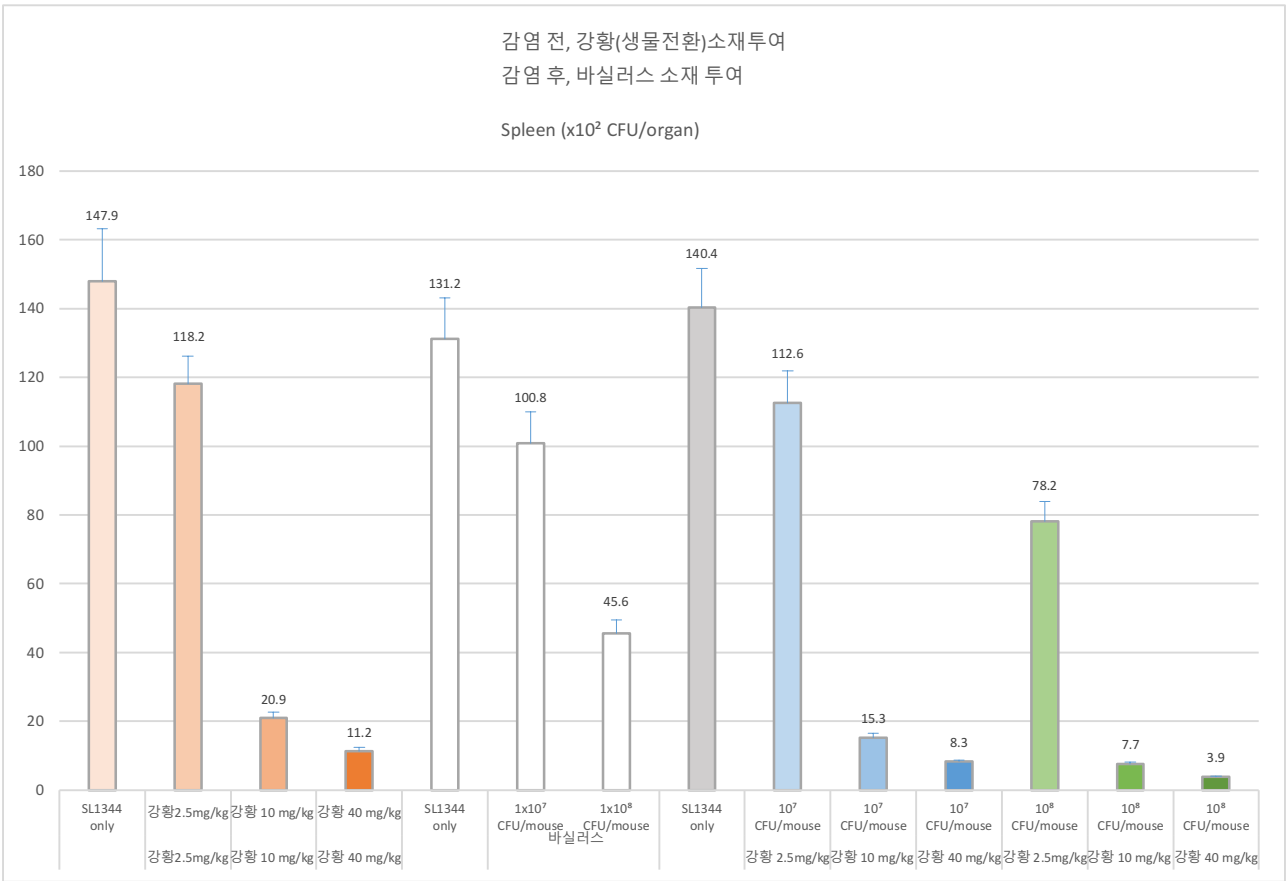
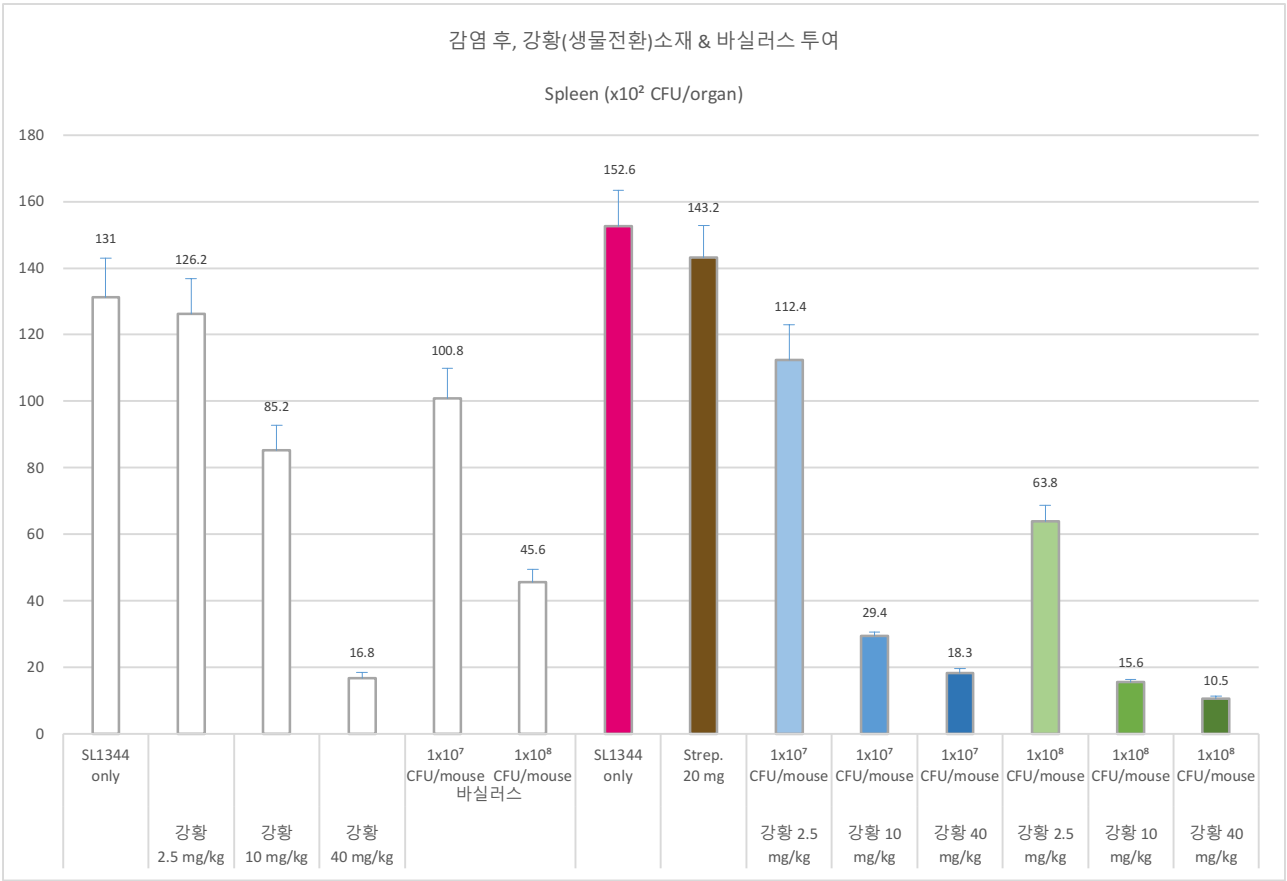


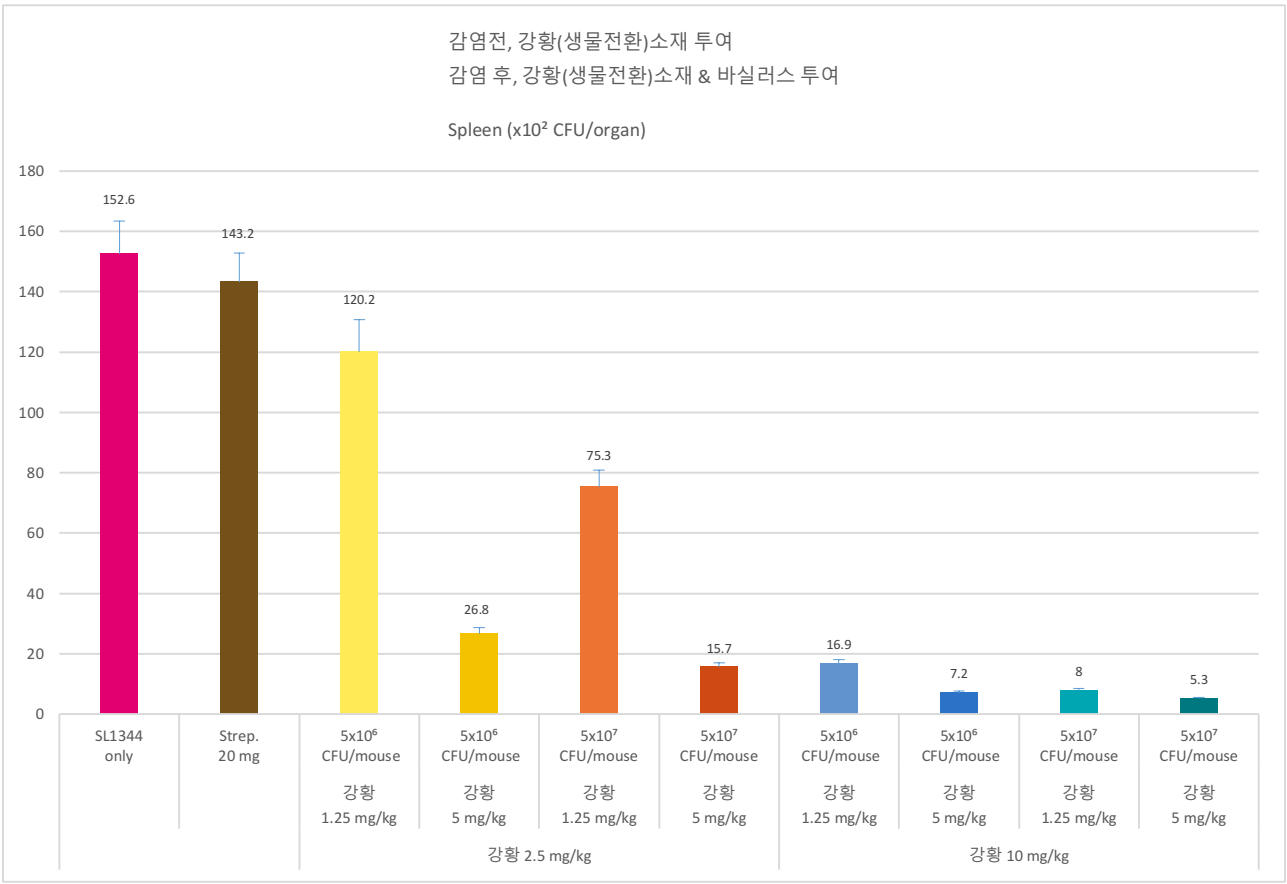
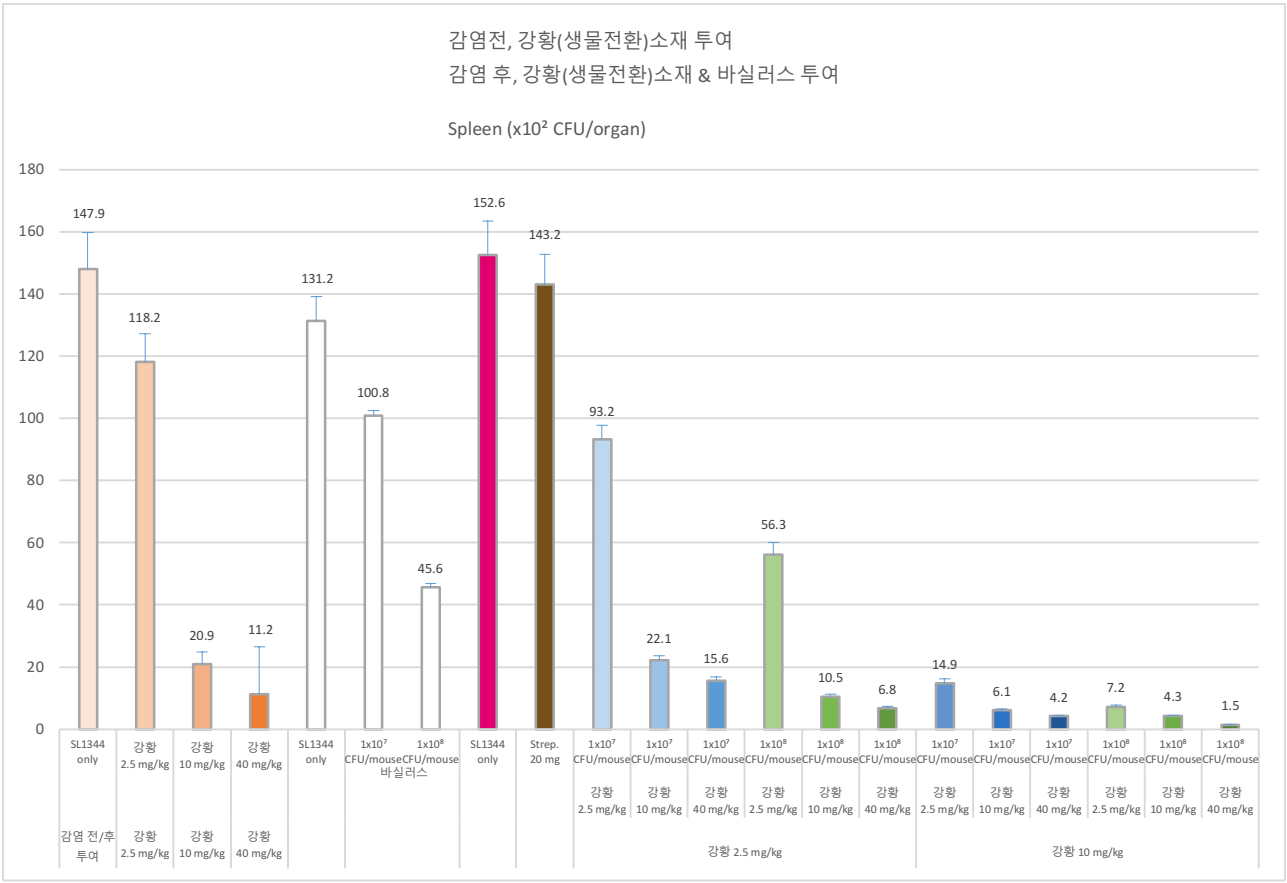


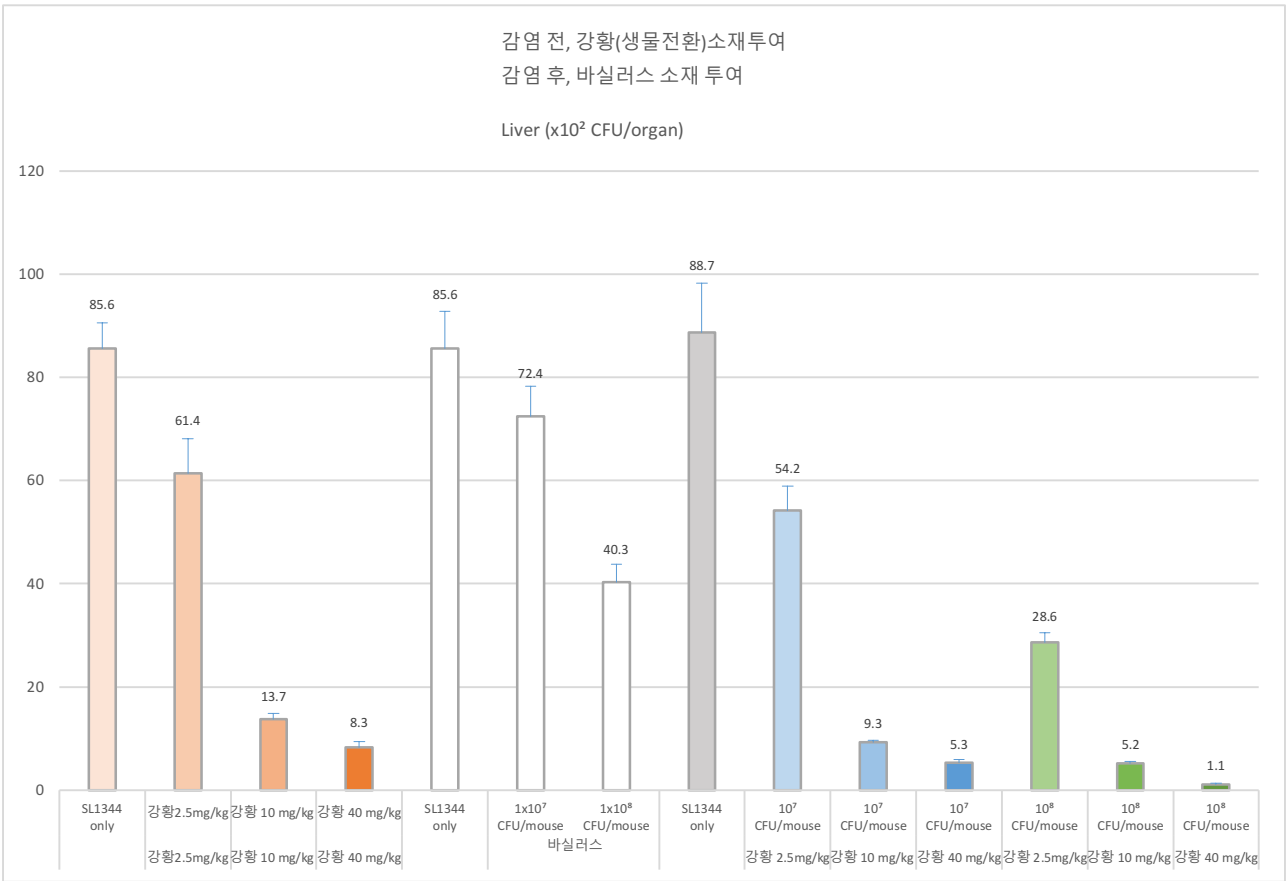
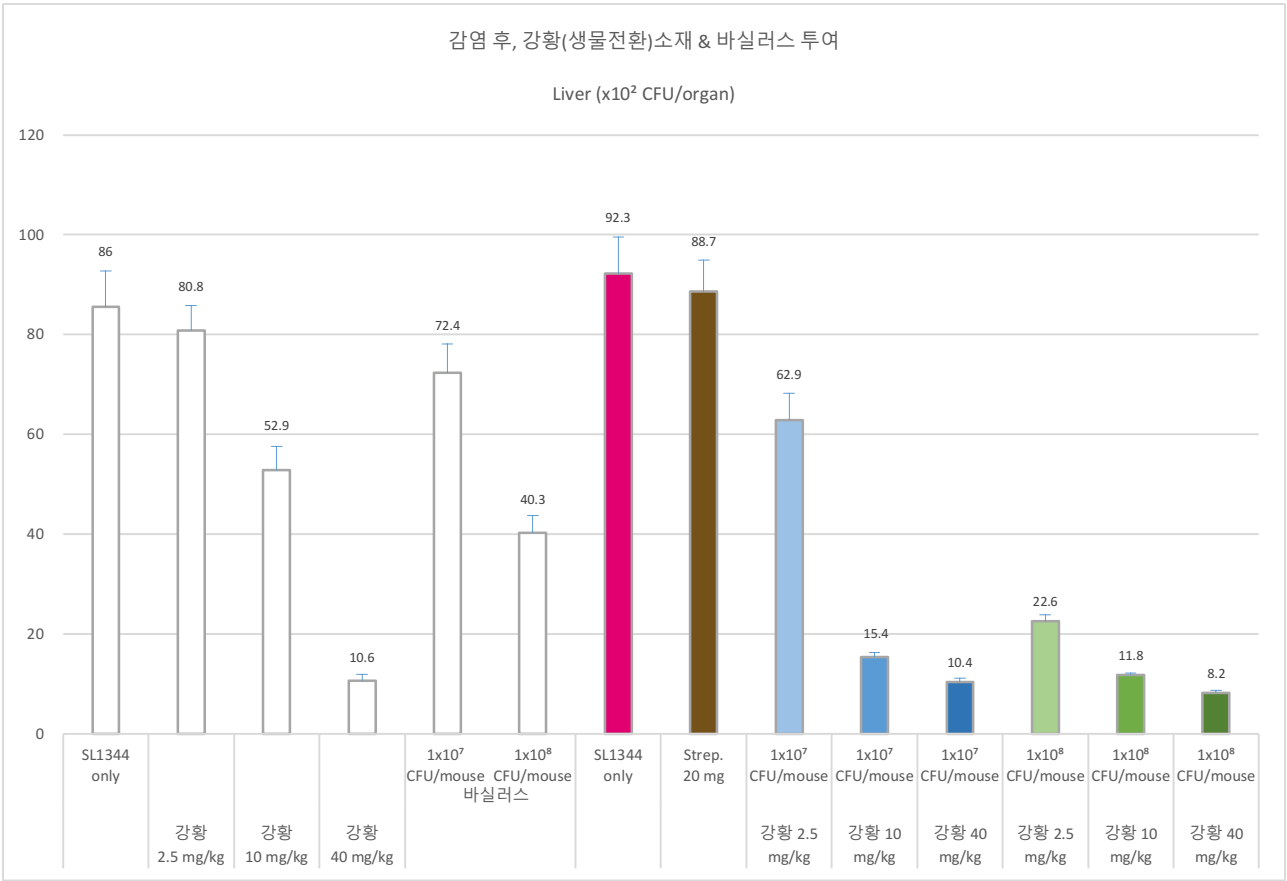


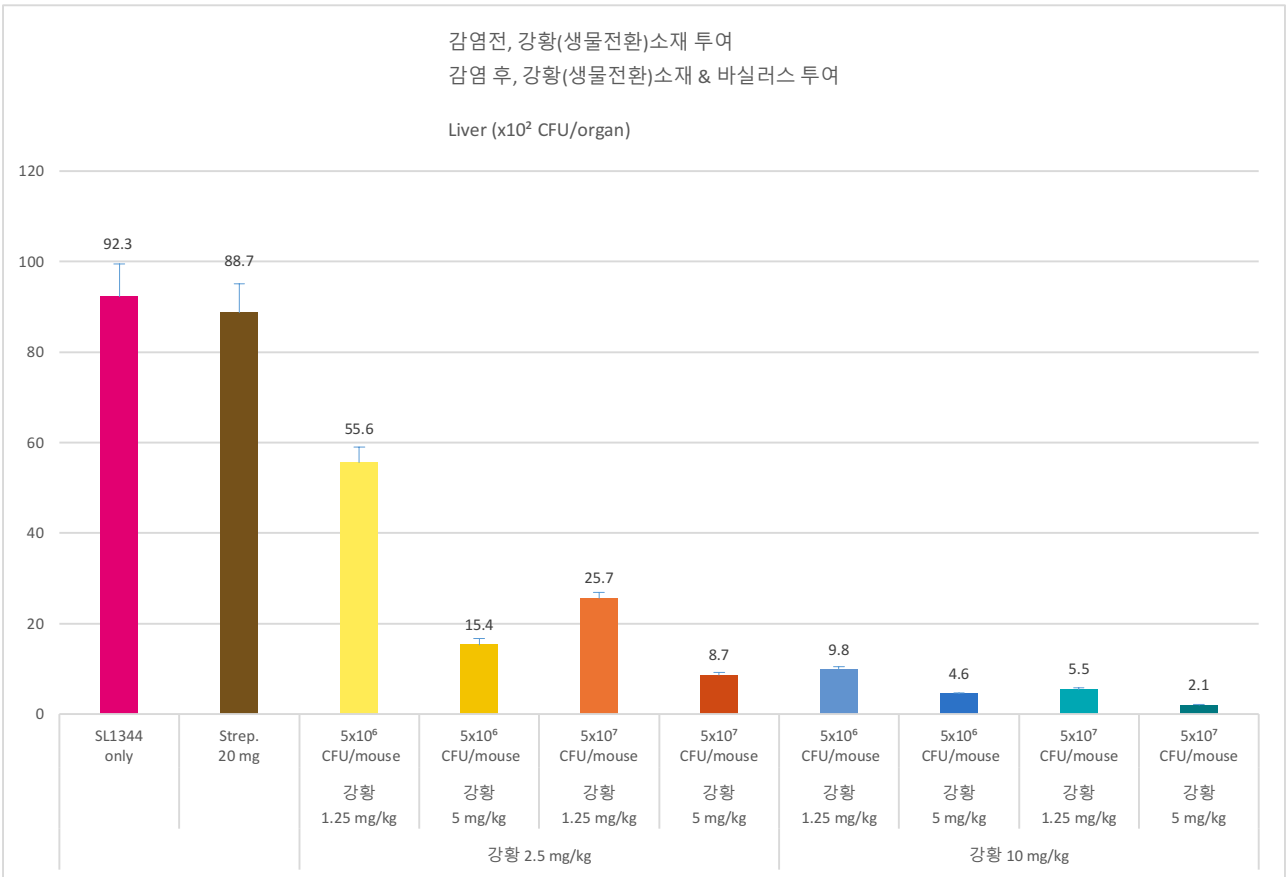
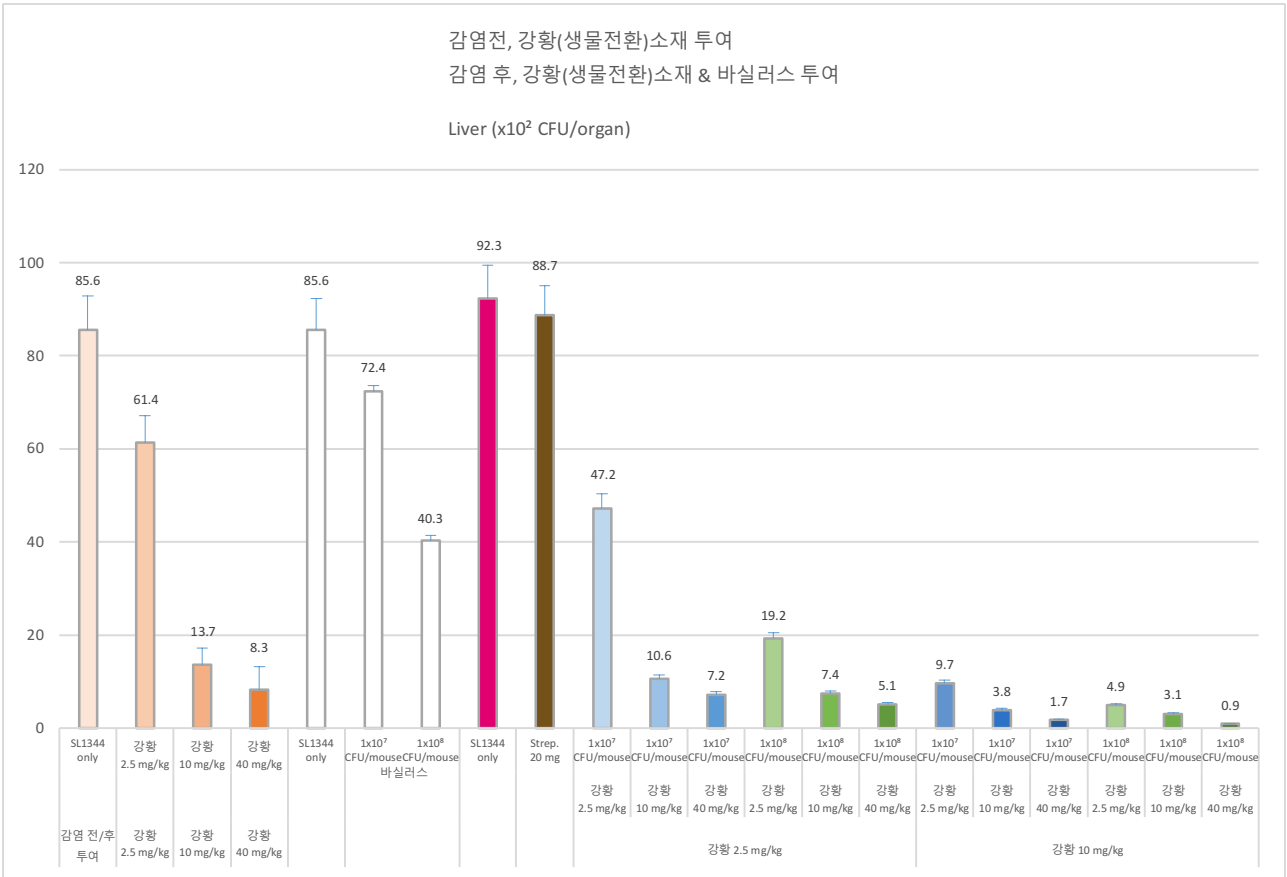


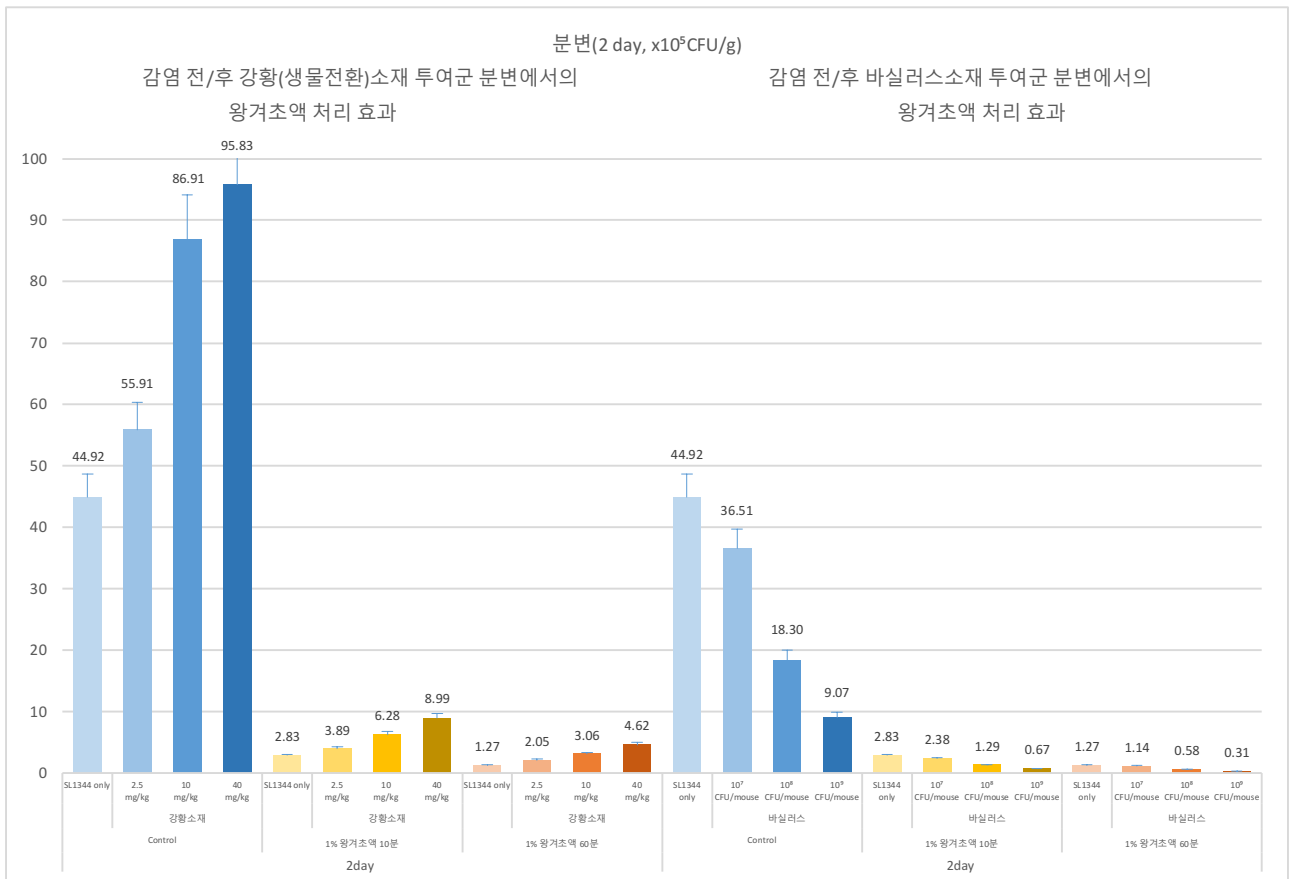
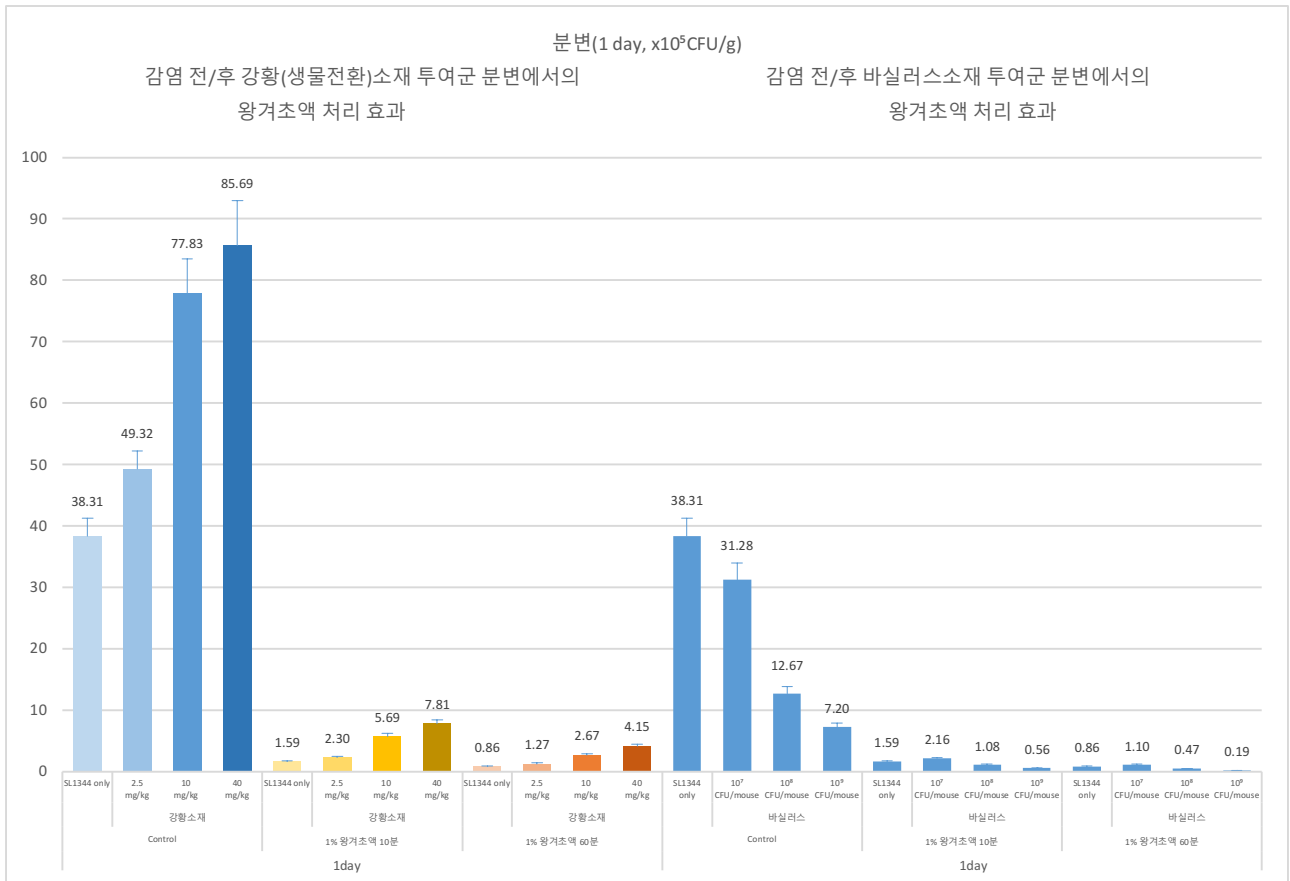


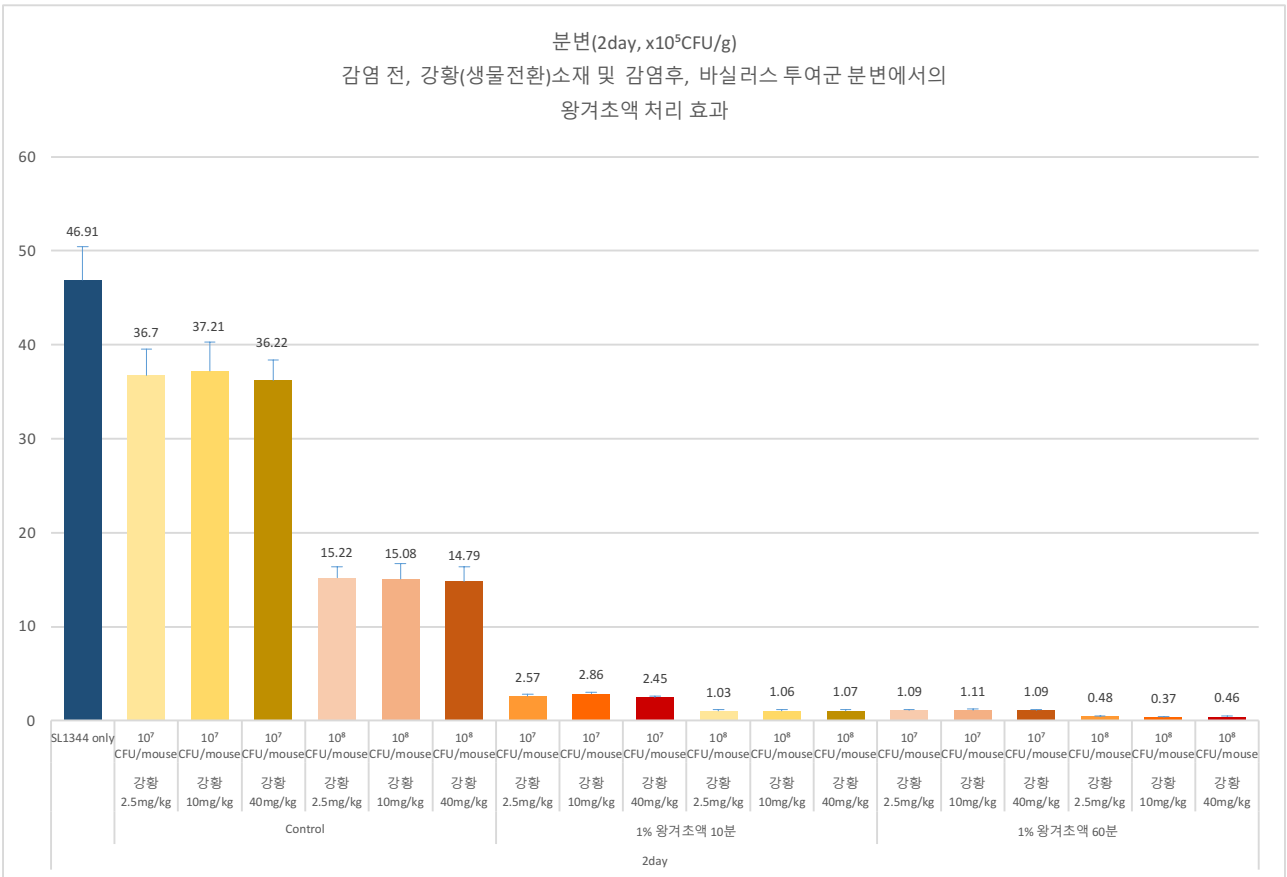
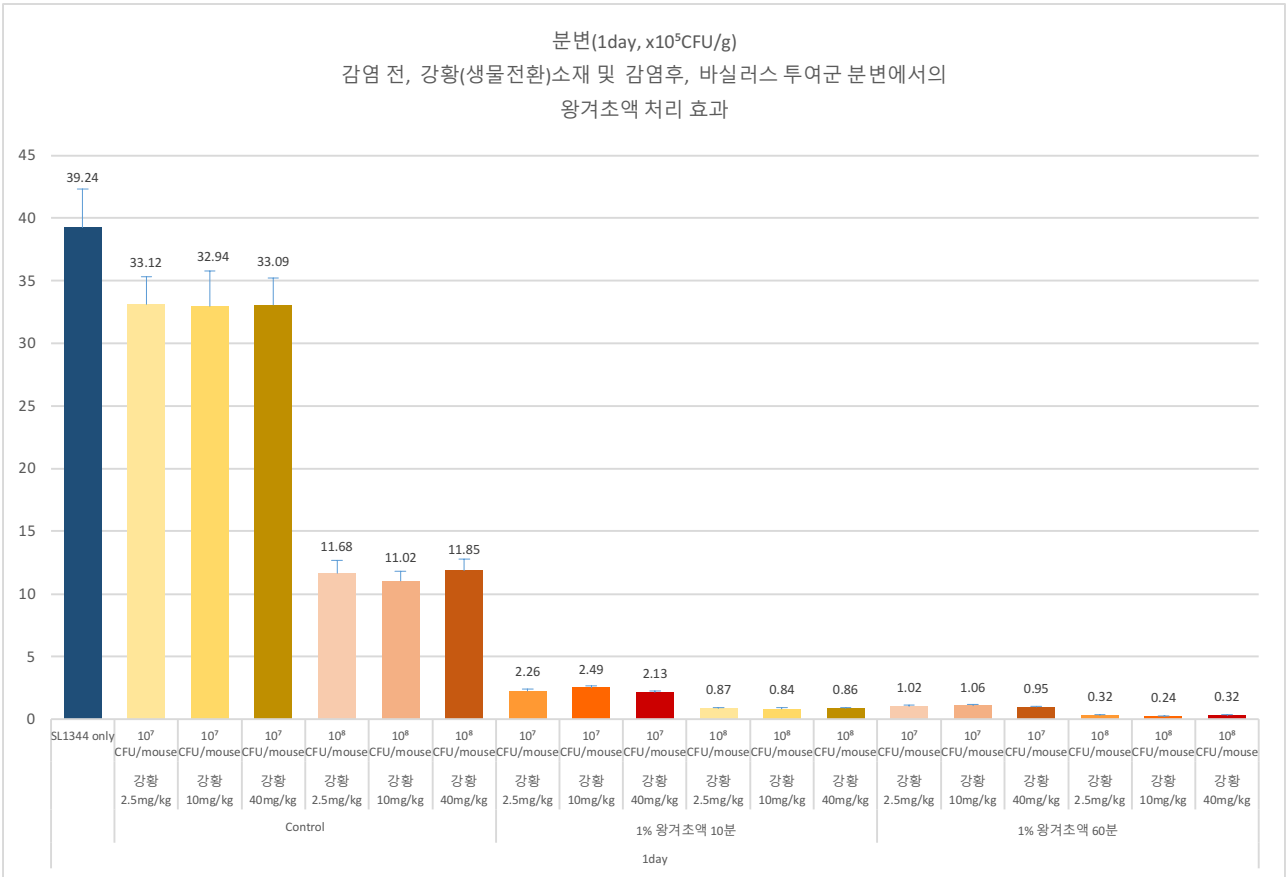












4. 항생제 다제내성 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구·감염 마우스모델에서 *in vivo* 유효성 평가

이전의 연구 결과에서, 고도화 면역조절소재와 바실러스소재, 왕겨초액 모두 특정 strain 에 국한되지 않고 감염 억제 활성을 보임에 따라, 다제내성 살모넬라 균주인 *Salmonella* Typhimurium CCARM8107에 대한 *in vivo* 감염 억제 효과를 확인하고자 하였다. CCARM8107 균주를 이용한 경구감염 식중독 모델을 확립한 뒤, 면역조절소재 및 바실러스소재, 왕겨초액의 항균활성을 평가하였고, 모든 소재는 사료에 배합하여 식이를 통해 투여하였다. 감염 1일과 2일 후 분변 내 살모넬라 배출량을 확인하였으며, 감염 2일 후 마우스 조직 내 살모넬라의 생존 여부를 확인하였다.

가. 항생제 다제내성 균주를 이용한 살모넬라 감염 마우스모델 확립

항생제 다제내성 균주인 CCARM8107 균주를 이용한 마우스모델을 확립하였다. 실험군 당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스에서 1×10^8 cfu의 살모넬라를 경구투여 하고 2일간 감염을 유도하였으며, 1일과 2일 째 분변을 회수하여 분변 내 살모넬라를 계수하였다. 또한, 감염 2일 후 마우스를 희생하여 맹장과 장관막림프절, 비장, 간 조직 내 살모넬라의 수를 측정하였다. 그 결과, 감염 1일 후와 2일 후 모두 분변 내 생존하는 살모넬라가 검출되었으며, 감염 2일 후에서 살모넬라의 배출량이 약 30% 증가하는 것으로 확인되었다. 마우스 조직 내 살모넬라를 측정한 결과, 맹장과 장관막림프절, 비장, 간 모두 살모넬라가 검출되었으며, 2차년도 연구에서 사용한 인수공통 감염 살모넬라 균주인 SE38과 유사한 정도의 살모넬라 감염이 유도되는 것으로 확인되었다.

Table 83. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 분변 내 살모넬라 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection	6.9 \pm 0.5	9.2 \pm 0.6

Table 84. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 조직 내 살모넬라 측정

	<i>Salmonella</i> in Tissue			
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection	30.3 \pm 2.8	34.2 \pm 2.1	152.6 \pm 7.3	75.8 \pm 6.2

나. 면역조절소재의 감염 억제 효능 평가

CCARM8107 다제내성 살모넬라의 감염 모델을 확립함에 따라, 면역조절소재의 감염 억제 효능을 평가하였다. 실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스에서 면역조절소재를 10 mg/kg의 1일 투여용량으로 2주간 식이투여 한 뒤, 1×10^8 cfu의 살모넬라를 경구투여하고 2일간 감염을 유도하였다. 감염 후 면역조절소재의 식이를 지속시키면서 감염 1일째와 2일째 분변을 회수하여 분변 내 잔존 살모넬라를 계수하였으며, 감염 2일 후 조직 내 살모넬라의 수를 측정하였다.

(1) 미강(생물전환)산물의 효능 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

미강 원물과 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서 살모넬라 감염 시 분변 내 배출되는 살모넬라의 양을 측정한 결과, 1일차와 2일차 모두에서 생물전환산물 투여 시 분변으로 배출되는 살모넬라의 양이 증가되는 것으로 확인되었다. 반면, 미강 원물을 투여한 마우스에서는 배출되는 살모넬라가 소폭 감소하였으나, 유의미한 결과는 아닌 것으로 판단된다.

Table 85. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 미강 원물과 미강(생물전환)산물 투여 시 분변 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	6.8 \pm 0.5	9.5 \pm 0.6
미강원물 10 mg/kg	6.4 \pm 0.4	9.1 \pm 0.8
미강(생물전환)산물 10 mg/kg	13.7 \pm 1.1	16.2 \pm 1.2

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

미강 원물과 미강(생물전환)산물을 투여한 마우스에서 조직 내 생존하는 살모넬라의 양을 측정하였다. 그 결과, 미강 원물 처리 시에는 조직 4군데 모두 살모넬라 감염 억제 효과가 낮거나 거의 없는 것으로 확인되었고, 미강(생물전환)산물 처리 시에는 맹장에서 56.4%, 장관막림프절에서 74.6%, 비장에서 93.9%, 간에서 88.1%의 높은 감염 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Table 86. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 미강 원물과 미강(생물전환)산물 투여 시 조직 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Tissue			
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	35.3 \pm 2.7	34.7 \pm 1.9	172.1 \pm 8.8	80.6 \pm 7.6
미강원물 10 mg/kg	30.6 \pm 1.5	31.4 \pm 2.7	165.3 \pm 11.2	75.4 \pm 2.9
미강(생물전환)산물 10 mg/kg	15.4 \pm 1.3	8.8 \pm 0.6	10.5 \pm 0.9	9.6 \pm 0.7

(2) 강황(생물전환)산물의 효능 평가

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

실험군당 10마리의 암컷 6주령 C57BL/6 마우스에서 강황 원물과 강황(생물전환)산물을 2주간 식이하고 1×10^8 cfu의 살모넬라를 감염시킨 마우스의 분변에서 잔존 살모넬라를 측정된 결과, 강황 원물을 식이한 마우스에서는 장관 내 살모넬라의 감소나 배출 증진 효과를 보이지 않았다. 반면, 강황(생물전환)산물을 식이한 마우스의 경우, 1일째 분변에서 2.2 배, 2일째 분변에서 2배의 살모넬라 배출 증진 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Table 87. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 강황 원물과 강황(생물전환)산물 투여 시 분변 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	6.8 \pm 0.5	9.5 \pm 0.6
강황원물 10 mg/kg	6.6 \pm 0.4	9.2 \pm 0.7
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	14.8 \pm 1.3	18.6 \pm 1.5

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

강황 원물과 강황(생물전환)산물을 식이한 마우스에서 조직 내 살모넬라의 수를 측정한 결과, 강황 원물을 식이한 마우스에서는 감염 억제 효과를 보이지 못하는 것으로 확인되었다. 강황(생물전환)산물을 식이한 마우스는 맹장에서 66.9%, 장관막림프절에서 81.8%, 비장에서 94.8%, 간에서 90.9%의 살모넬라가 감소한 것으로 확인되어, 항생제 다제내성 살모넬라 감염 시에도 뛰어난 감염 억제 효과가 있는 것으로 평가된다.

Table 88. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 강황 원물과 강황(생물전환)산물 투여 시 조직 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Tissue			
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	35.3 \pm 2.7	34.7 \pm 1.9	172.1 \pm 8.8	80.6 \pm 7.6
강황원물 10 mg/kg	32.8 \pm 1.9	33.2 \pm 1.5	166.7 \pm 12.1	77.2 \pm 5.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg	11.7 \pm 1.0	6.3 \pm 0.5	8.9 \pm 0.7	7.3 \pm 0.4

(3) 프로바이오틱스소재의 감염 억제 효능 평가

CCARM8107 다제내성 살모넬라 감염 모델에서, 프로바이오틱스소재의 감염 억제 효능을 평가하였다. 2차년도까지의 연구를 통해 선별된 바실러스소재를 이용하였으며, 감염 억제 활성을 보였던 10^7 cfu/mouse와 10^8 cfu/mouse의 두가지 1일 투여용량을 사용하였다. 바실러스소재는 사료에 혼합하여 감염 전 2주간 자유식이 하였으며, 1×10^8 cfu의 CCARM8107 감염 후, 바실러스소재의 식이를 지속시키면서 분변과 조직 내 살모넬라의 양을 측정하였다.

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

살모넬라 감염 후 분변 내 살모넬라의 양을 확인하였다. 1일째 분변에서는 1일 투여용량으로 10^7 cfu/mouse 식이군과 10^8 cfu/mouse 식이군에서 각각 19%와 52.4%의 살모넬라 감소 효과를 보였으며, 2일째 분변에서는 10^7 cfu/mouse 식이군과 10^8 cfu/mouse 식이군에서 각각 7.9%와 42.7%의 살모넬라 감소 효과를 보였다.

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	6.3 \pm 0.4	8.9 \pm 0.3
바실러스소재 10^7 cfu/mouse	5.1 \pm 0.3	8.2 \pm 0.4
바실러스소재 10^8 cfu/mouse	3.0 \pm 0.2	5.1 \pm 0.5

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

살모넬라 감염 2일 후, 조직 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 1일 투여용량으로 10^7 cfu/mouse 식이균에서는 맹장에서 20.6%, 장관막림프절에서 20.7%, 비장에서 22.8%, 간에서 15.7%의 억제 효과를 보였으며, 10^8 cfu/mouse 식이균에서는 맹장에서 49.6%, 장관막림프절에서 41.4%, 비장에서 50.1%, 간에서 32.6%의 살모넬라 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

<i>Salmonella</i> in Tissue				
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	27.2 \pm 1.3	31.9 \pm 2.6	145.8 \pm 8.9	72.1 \pm 5.4
바실러스소재 10^7 cfu/mouse	21.6 \pm 1.5	25.3 \pm 2.2	112.6 \pm 8.5	60.8 \pm 3.9
바실러스소재 10^8 cfu/mouse	13.7 \pm 1.2	18.7 \pm 1.3	72.7 \pm 5.7	48.6 \pm 3.2

(4) 왕겨초액의 감염 억제 효능 평가

CCARM8107 다제내성 살모넬라 감염 마우스 모델에서 왕겨초액의 감염 억제 효능을 평가하였다. 왕겨초액은 0.5%와 1% 두가지 농도를 사용하였으며, 사료에 배합하여 식이투여하였다. 감염 전 2주간 두가지 농도의 왕겨초액이 함유된 사료를 식이한 뒤, 1×10^8 cfu의 살모넬라를 2일간 감염시키고, 감염 후 왕겨초액의 식이를 지속시키면서 분변과 조직 내 살모넬라의 양을 계수하였다.

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

살모넬라 감염 1일째와 2일째의 분변에서 잔존 살모넬라를 측정하였다. 0.5%의 왕겨초액을 식이한 경우 1일째 분변에서 46%, 2일째 분변에서 46.1%의 살모넬라가 감소하는 결과를 보였으며 1%의 왕겨초액을 식이한 경우 1일째 87.3%, 2일째 80.9%의 살모넬라가 감소하는 것으로 확인되었다.

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	6.3 \pm 0.4	8.9 \pm 0.3
0.5% RHSE	3.4 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2
1% RHSE	0.8 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

왕겨초액을 식이한 마우스에서 조직 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 0.5% 왕겨초액을 식이한 마우스의 경우 맹장에서 60.7%, 장관막림프절에서 50.5%, 비장에서 74.3%, 간에서 58.9%의 억제 효과를 보이는 것으로 확인되었으며, 1% 왕겨초액을 식이한 마우스의 경우 맹장에서 80.5%, 장관막림프절에서 80.6%, 비장에서 93.1%, 간에서 88.5%의 살모넬라 감소가 나타나는 것으로 확인되었다.

<i>Salmonella</i> in Tissue				
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	27.2 \pm 1.3	31.9 \pm 2.6	145.8 \pm 8.9	72.1 \pm 5.4
0.5% RHSE	10.7 \pm 0.8	15.8 \pm 1.2	37.4 \pm 2.5	29.6 \pm 1.7
1% RHSE	5.3 \pm 0.4	6.2 \pm 0.6	10.1 \pm 0.6	8.3 \pm 0.5

(5) 면역조절소재와 바실러스소재의 감염 억제 시너지 효과 평가

대식세포 활성화를 통해 살모넬라 감염 억제 효과를 보이는 면역조절소재와 직접적인 항균활성을 보이는 바실러스소재를 복합처리 하여 마우스의 살모넬라 감염 억제 효과를 확인하고, 두 소재의 시너지 효과를 평가하였다. 1일 투여용량 10 mg/kg의 원물과 생물전환산물을 각각 감염 전 2주간 식이투여 하고, 1×10^8 cfu의 CCARM8107 다제내성 살모넬라 균주를 경구투여 하여 살모넬라 감염을 유도하였다. 감염 유도 후 2일간 1일 투여용량으로 10^8 cfu/mouse의 바실러스소재를 추가로 식이공급 하였으며, 면역조절소재도 함께 식이공급 하였다. 1일과 2일째 분변 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였으며, 감염 2일 뒤 마우스를 희생하여 조직 내 존재하는 살모넬라의 수를 측정하였다.

(가) 분변 내 살모넬라의 확인

살모넬라 감염 1일째와 2일째 분변 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 미강 원물과 강황 원물은 단독처리 시 살모넬라 감염 억제 효과가 크게 나타나지 않았으며, 바실러스소재와 복합처리 시에도 나타나는 감염 억제 효과는 대부분 바실러스소재 단독으로 나타나는 효과인 것으로 생각된다. 반면, 미강(생물전환)산물과 바실러스소재 복합처리 시에는 1일차에 55%, 2일차에 54%의 살모넬라 배출 억제 효과를 보였으며 강황(생물전환)산물과 바실러스소재 복합처리 시에는 각각 59%와 54%의 배출 억제 효과를 보였다. 면역조절소재 단독처리 시 살모넬라 배출이 증가하며, 바실러스소재 단독처리 시 장관 내 생존하여 배출되는 살모넬라의 양이 감소하는 결과로 볼 때, 면역조절소재에 의해 조직 내로 침투되지 못한 살모넬라가 바실러스소재에 의해 장관 내에서 효과적으로 제거될 수 있는 것으로 생각된다.

Table 89. CCARM8107 살모넬라 균주를 이용한 마우스 감염 모델에서 강황 원물과 강황(생물전환)산물 투여 시 분변 내 살모넬라의 측정

	<i>Salmonella</i> in Feces ($\times 10^5$ cfu/g)	
	1 day	2 day
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	7.4 \pm 0.7	11.2 \pm 1.0
미강 원물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	4.1 \pm 0.4	6.8 \pm 0.5
강황 원물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	4.3 \pm 0.3	6.5 \pm 0.4
미강(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	3.3 \pm 0.4	5.1 \pm 0.4
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10 ⁸ cfu/mouse	3.0 \pm 0.2	5.2 \pm 0.5

감염 전 : 면역조절소재

감염 후 : 면역조절소재+바실러스소재

(나) 조직 내 살모넬라의 확인

감염 2일 후 마우스 조직 내 생존하는 살모넬라의 수를 측정하였다. 분변의 결과와 마찬가지로, 원물과 바실러스소재의 복합투여는 바실러스소재 단독투여와 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 미강(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여는 맹장에서 77%, 장간막림프절에서 83%, 비장에서 96%, 간에서 94%의 살모넬라 감염을 억제하는 것으로 확인되었으며, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여는 네가지 조직에서 각각 79%, 84%, 96%, 94%의 살모넬라 감염을 억제하는 것으로 확인되었다. 복합투여 시 두 소재의 단독투여 보다 더 높은 감염 억제 효율을 갖는 것으로 보아, 두 소재가 갖는 서로 다른 감염 억제 기전을 이용하여 효과적으로 상호 보완적인 시너지 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

<i>Salmonella</i> in Tissue				
	Cecum ($\times 10^5$ cfu/g)	Mesenteric Lymph Node ($\times 10^3$ cfu/organ)	Spleen ($\times 10^2$ cfu/organ)	Liver ($\times 10^2$ cfu/organ)
Normal Mice	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CRM8107 infection only	30.9 \pm 2.8	35.7 \pm 3.3	156.9 \pm 11.2	80.5 \pm 0.7
미강 원물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	16.7 \pm 1.2	17.8 \pm 1.2	82.3 \pm 5.4	45.2 \pm 3.6
강황 원물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	17.2 \pm 1.5	18.1 \pm 1.6	80.9 \pm 7.1	44.1 \pm 3.8
미강(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	7.2 \pm 0.6	6.1 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	4.7 \pm 0.3
강황(생물전환)산물 10 mg/kg + 바실러스 10^8 cfu/mouse	6.6 \pm 0.4	5.7 \pm 0.3	6.4 \pm 0.2	4.9 \pm 0.4

감염 전 : 면역조절소재

감염 후 : 면역조절소재+바실러스소재

다. 항생제 다제내성 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 in vivo 유효성 평가에 대한 실험적 의의

인수공통 살모넬라 균주와 종특이 살모넬라 균주 모두에서 개발소재가 효과적인 감염 억제 효과를 보임에 따라, 항생제 다제내성 균주에서 동일한 감염 억제 효과를 갖는지 확인하였다. 항생제 다제내성 균주로는 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, tetracycline 등 다양한 항생제에 내성을 갖는 *Salmonella Typhimurium* CCARM8107 균주를 사용하였으며, 본 균주를 이용하여 경구 감염 마우스 식중독 모델을 확립하였다.

미강(생물전환)산물과 강황(생물전환)산물은 모두 10mg/kg 농도로 감염 전 2주간 사전 투여 시 분변으로 배출되는 살모넬라의 배출 증가, 조직 내 살모넬라의 사멸을 유도하였으며 면역반응 활성화를 통해 장관막림프절, 비장, 간에서의 효과적인 살모넬라 제거를 유도하는 것으로 확인되었다.

바실러스소재의 경우 1일 투여용량 10^7 cfu에서는 낮은 살모넬라 억제 효과를 보였으나 살모넬라 감염 투여량과 동일한 10^8 cfu에서는 효과적인 살모넬라 억제 효과를 나타냈으며, 분변으로의 배출이나 조직에서의 억제율에서 큰 차이를 보이지 않았다.

왕겨초액은 0.5%와 1% 농도에서 모두 효과적으로 살모넬라를 억제할 수 있는 것으로 확인되었으며, 특히 1% 왕겨초액 투여 시에는 분변과 조직에서 모두 80% 이상의 살모넬라 억제율이 있는 것으로 확인되었다.

미강(생물전환)산물과 바실러스소재, 강황(생물전환)산물과 바실러스소재의 복합투여 시에는 각 소재의 단독투여 시 보다 더 높은 효율의 살모넬라 감염 억제 효과가 있는 것으로 확인되어, 서로 다른 기전을 갖는 두 소재가 효과적인 시너지 효과를 갖는 것으로 생각된다.

본 연구결과를 종합하여 볼 때, 면역조절소재와 바실러스소재, 왕겨초액은 모두 살모넬라의 strain과는 관계없이 넓은 범위의 항균효과를 갖는 것으로 판단되며, 항생제에 대한 내성을 갖는 살모넬라 역시 효과적으로 제어할 수 있는 소재인 것으로 생각된다. 특히, 본 연구에 사용한 모든 소재의 경우 각각의 살모넬라 제어 기전이 기존의 항생제와는 다르기 때문에, 내성을 가진 살모넬라가 나타나게 될 확률이 낮을 것이라 생각된다. 또한, 각 소재가 갖는 살모넬라 감염 억제 기전을 충분히 활용하여, 소재별 투여량, 투여기간, 투여방법 및 복합투여를 효과적으로 사용할 경우 살모넬라 감염에 대응하기 위한 항생제의 사용을 충분히 대체할 수 있을 것이라 기대된다.

6절. 배합제품 제조

1. 산란계에서의 공격접종 Field test를 위한 배합제제의 시제품 생산

가. 배합제품의 시제품 Formulation

배합제제의 시제품 생산에 있어서 개별소재 투입량은 아래의 설정근거를 바탕으로 설정하였다.

1. 배합제품 제조에 있어서 실험동물 몸무게 1kg당 면역조절소재 10mg, 생균제 1×10^8 cfu가 투입될 수 있도록 기준 설계하였다.
2. 면역조절소재 : 면역조절소재 1%가 함유된 배합제품을 사료에 1% 첨가하여 효능 평가 실시

배합제품에 면역조절소재가 1% 함유되도록 제조하면 \Rightarrow 면역조절소재 10g/배합제품 kg
사료에 배합제품을 1% 첨가하면 \Rightarrow 면역조절소재 0.1g/배합제품 10g/사료 kg

병아리의 경우, 1일사료섭취량이 몸무게 대비 약 10% 정도이므로

면역조절소재 10mg/배합제품 1g/사료 100g/몸무게 kg 되도록 설정하였다.

3. 생균제소재 : 생균제 1×10^{11} cfu/kg이 함유된 배합제품을 사료에 1% 첨가하여 효능 평가 실시

사료에 배합제품을 1% 첨가하면 $\Rightarrow 1 \times 10^9$ cfu/배합제품 10g/사료 kg

병아리의 경우, 1일사료섭취량이 몸무게 대비 약 10% 정도이므로 생균제 1×10^8 cfu/배합제품 1g/사료 100g/몸무게 kg 되도록 설정하였다.

생균제소재 투입량의 설정에 있어서 아래와 같은 근거로 투입량을 설정하였다.

1. 유산균 건강기능식품
 100×10^8 cfu/성인 (50kg)
 2×10^8 cfu/몸무게 kg
2. VSL유산균 건강기능식품
 3500×10^8 cfu/성인 (50kg)
 70×10^8 cfu/몸무게 kg
 7×10^9 cfu/몸무게 kg
3. 사료첨가제 Bon vital (EU)
원료 : 1×10^{10} cfu/g
EU : 5×10^8 cfu/원료 50mg/ 사료 kg
국내 : 1×10^9 cfu/원료 100mg/ 사료 kg
1일사료섭취량이 몸무게 대비 10%의 경우,
1일 투여량 : EU : 5×10^7 cfu/원료 5mg/ 사료 100g/몸무게 kg
 국내 : 1×10^8 cfu/원료 10mg/ 사료 100g/몸무게 kg (건기식 50%)
4. 사료첨가제 닥터이문 (STR)
원료 : 1×10^{11} cfu/g
닥터이문 : 1×10^{11} cfu/원료 1g/ 닥터이문 kg
사료內 : 1×10^8 cfu/원료 1mg/ 닥터이문 1g/사료 kg
1일사료섭취량이 몸무게 대비 10%의 경우,
1일 투여량 : 1×10^7 cfu/원료 0.1mg/ 닥터이문 100mg/사료 100g/몸무게 kg (건기식 50%)
5. 본 과제의 배합제품에서의 생균제소재 투여량 설정
 1×10^8 cfu/사료 100g/몸무게 kg

나. 산란계에서의 인수공통 살모넬라균의 공격접종 Field test를 위한 배합제품 제조

산란계에서의 Field test를 실시할 배합제품의 구성성분 선정에 있어서 앞에서 기술한 살모넬라 저감제 소재별 항살모넬라 효능 평가 결과를 바탕으로, 면역조절소재로는 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물을 선정하였으며, 선정된 구성성분의 조합을 통해 8균의 실험균을 구성하였다.

배합제품 제조에 있어서 면역조절소재의 1일투여량은 제2협동기관인 아주대학교 남석현 교수팀의 in vivo 연구 결과를 바탕으로 실험동물(또는 목적동물)의 몸무게 1kg당 1일 면역조절소재가 1mg, 10mg, 40mg이 투여될 수 있도록 설계하였다.

배합제품 Kg당 구성성분 조성은 Table에서 제시한 함유량으로 시제품 균을 제작하였다.

Table 90. 산란계에서의 Field test용 배합제품균의 기능성분 함량

무첨가 (無감염)	무첨가 (감염)	
미강-F1 (감염) 미강(생물전환)산물 1g/Kg	미강-F2 (감염) 미강(생물전환)산물 10g/Kg	미강-F3 (감염) 미강(생물전환)산물 40g/Kg
강황-F1 (감염) 강황(생물전환)산물 1g/Kg	강황-F2 (감염) 강황(생물전환)산물 10g/Kg	강황-F3 (감염) 강황(생물전환)산물 40g/Kg

다. 산란계에서의 종 특이적 살모넬라균의 공격접종 Field test를 위한 배합제품 제조

산란계에서의 Field test를 실시할 배합제품의 구성성분 선정에 있어서 앞에서 기술한 살모넬라 저감제 소재별 항살모넬라 효능 평가 결과를 바탕으로, 면역조절소재로는 미강(생물전환)산물 및 강황(생물전환)산물과 함께 도라지(생물전환)산물을 선정하였으며, 또한 생균제(프로바이오틱스)소재로는 바실러스 균주인 BS-CAL 균주와 함께 유산균 균주인 FE-STR-HM균주를 선정하였으며, 선정된 구성성분의 조합을 통해 10균의 실험균을 구성하였다.

배합제품 제조에 있어서 면역조절소재의 1일투여량은 제2협동기관인 아주대학교 남석현 교수팀의 in vivo 연구 결과를 바탕으로 실험동물(또는 목적동물)의 몸무게 1kg당 1일 면역조절소재가 10mg 투여될 수 있도록 설계하였으며, 생균제의 경우 살모넬라균 접종량(1×10^8 cfu/마리)의 1/10이 투여될 수 있도록 실험동물(또는 목적동물)의 1마리의 몸무게인 100g당 1일 생균제소재가 1×10^7 cfu 투여될 수 있도록 설계하였다. 또한 고농도 생균제의 경우 살모넬라균 접종량(1×10^8 cfu/마리)과 동량으로 투여될 수 있도록 설계하였다.

배합제품 Kg당 구성성분 조성은 Table에서 제시한 함유량으로 시제품 균을 제작하였다.

Table 91. 산란계에서의 Field test용 배합제품균의 기능성분 함량

미강-F(감염) 미강(생물전환)산물 10g/Kg	강황-F(감염) 강황(생물전환)산물 10g/Kg	도라지-F(감염) 도라지(생물전환)산물 10g/Kg
미강-F + 생균제(감염) 미강(생물전환)산물 10g/Kg 유산균 1×10^{11} cfu/Kg 바실러스 1×10^{11} cfu/Kg	강황-F + 생균제(감염) 강황(생물전환)산물 10g/Kg 유산균 1×10^{11} cfu/Kg 바실러스 1×10^{11} cfu/Kg	도라지-F + 생균제(감염) 도라지(생물전환)산물 10g/Kg 유산균 1×10^{11} cfu/Kg 바실러스 1×10^{11} cfu/Kg
무첨가(無감염)	무첨가(감염)	생균제(감염) 유산균 1×10^{11} cfu/Kg 바실러스 1×10^{11} cfu/Kg
		High dosage 생균제(감염) 1×10^8 cfu/몸무게100g/마리, 1회 (1×10^8 cfu/몸무게 Kg) 감염시 1회 동시 투여

라. 산란계에서의 면역조절소재의 1일섭취량 산출

산란계에서의 Field test용 배합제품들은 3종의 면역조절소재중 1종만 단독으로 0.1%, 1%, 및 4% 함유되도록 제조되었으며, Field test에 있어서 사료에 배합제품을 1% 첨가하여 사용하도록 Field test를 설계하였다. 산란계 병아리를 대상으로 한 Field test에 있어서 주령별 사료섭취량을 근거로 산란계 병아리의 1일 사료섭취량에 따른 면역조절소재 1일섭취량을 산출한 결과 Field test 기간에 해당하는 2주령~5주령(또는 7주령) 병아리에 있어서 면역조절소재가 Field test용 배합제품에 1% 함유되도록 제조한 경우, 면역조절소재 1일섭취량은 최소 8.9mg에서 최대 10.3mg으로 산출되었다.

Table 92. Field test에 있어서 면역조절소재의 1일섭취량 산출

산란계 1일섭취량계산: 면역조절소재 0.1g / 사료Kg 기준

주령	체중(g/수)	사료 섭취량 (g/일,수)	사료 대비 사료첨가제 함유비율 (%)	사료첨가제 섭취량 (g/일/수)	사료첨가제 섭취량 (g/일/체중Kg)	사료첨가제 대비 면역조절소재 함유비율 (%)	체중 kg 당 면역조절소재 섭취량 (mg/일/체중Kg)	비고
1	69	13.3	1	0.133	1.928	1	19.3	
2	125	12	1	0.120	0.960	1	9.6	
3	190	17	1	0.170	0.895	1	8.9	
4	263	26	1	0.260	0.990	1	9.9	
5	360	37	1	0.370	1.028	1	10.3	
6	460	44	1	0.440	0.957	1	9.6	
7	553	53	1	0.530	0.959	1	9.6	
8	670	54	1	0.540	0.806	1	8.1	
9	778	58	1	0.580	0.746	1	7.5	
10	888	72	1	0.720	0.811	1	8.1	
11	990	54	1	0.540	0.545	1	5.5	
12	1,080	73	1	0.730	0.676	1	6.8	
13	1,160	77	1	0.770	0.664	1	6.6	
14	1,225	82	1	0.820	0.669	1	6.7	
20	1,675	90	1	0.900	0.537	1	5.4	
25주 이상	1,900	110	1	1.100	0.579	1	5.8	

사료첨가제에 면역소재 1%혼합 / 사료에 사료첨가제 1% 혼합 / 사료 1Kg당 면역소재 0.1g 함유

*해당 체중은 퓨리나 산란계사료 정보로 정리

마. 산란계에서의 배합제품의 시제품 시험성적서

상기 Field test용 배합제품 시제품 7종에 대해 주관기관의 내부 규정에 따라 제조 기록과 함께 시험성적서를 작성하였으며, 외부시험용 제품의 내부 규정에 따라 시험성적서를 보관 관리하고 있다.

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
생강-1 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test01

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
말미잘-1 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test02

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
광물-1 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test03

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
도라지-1 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test04

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
과일-F4 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test05

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
과일-F4 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test06

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

(주)에스티알바이오텍

경기도 수원시 소양로2길 36
에스티알바이오텍 3층-505
Tel. 031-258-8325 Fax. 031-258-8333

시험성적서

제품 : 모조사료 테스트용 시료

분명	제조 일자	Batch No.
도라지-1 배합제품	2015. 4. 27.	Dr-SJ-Test04

No.	검사항목	기준 및 단위	검사결과	비고(과거품질규격)
1	수분	20.0의 범위 및 0.1%를 초과하지 않아야 함	19.9%	비 고
2	단백질	20.0% 이상	20.0%	
3	칼슘	0.10% 이상	0.10%	
4	인	0.08% 이상	0.08%	

(주)에스티알바이오텍

Figure 167. 산란계에서의 Field test 용 배합제품의 시험성적서

2. 양돈계에서의 공격접종 Field test를 위한 배합제제의 시제품 생산

가. 배합제제의 시제품 Formulation

배합제제의 시제품 생산에 있어서 개별소재 투여량은 아래의 설정근거를 바탕으로 설정하였다.

1. 배합제제 제조에 있어서 실험동물 몸무게 1kg당 면역조절소재 2.5mg, 10mg, 40mg이 투여 될 수 있도록 설계하였다.

2. 면역조절소재 : 면역조절소재 0.625%, 2.5%, 10%가 함유된 배합제제를 사료에 1% 첨가하여 효능 평가 실시

① 배합제제에 면역조절소재가 0.625% 함유되도록 제조하면

⇒ 면역조절소재 6.25g/배합제제 kg

사료에 배합제제를 1% 첨가하면

⇒ 면역조절소재 0.0625g/배합제제 10g/사료 kg

② 배합제제에 면역조절소재가 2.5% 함유되도록 제조하면

⇒ 면역조절소재 25g/배합제제 kg

사료에 배합제제를 1% 첨가하면

⇒ 면역조절소재 0.25g/배합제제 10g/사료 kg

③ 배합제제에 면역조절소재가 10% 함유되도록 제조하면

⇒ 면역조절소재 100g/배합제제 kg

사료에 배합제제를 1% 첨가하면

⇒ 면역조절소재 1g/배합제제 10g/사료 kg

돼지의 경우, 1일사료섭취량이 몸무게 대비 약 4% 정도이므로
면역조절소재 0.0625g/배합제제 10g/사료 1kg/몸무게 25kg
면역조절소재 0.25g/배합제제 10g/사료 1kg/몸무게 25kg
면역조절소재 1g/배합제제 10g/사료 1kg/몸무게 25kg
되도록 설정하였다.

나. 양돈계에서의 Field test를 위한 배합제품 제조

양돈계에서의 Field test를 실시할 배합제품의 구성성분 선정에 있어서 살모넬라 저감제 소재별 항살모넬라 효능 평가 결과를 바탕으로, 면역조절소재로는 강황(생물전환)산물을 선정하였으며, 선정된 구성성분의 조합을 통해 4군의 실험군을 구성하였다.

배합제품 제조에 있어서 면역조절소재의 1일투여량은 제2협동기관인 아주대학교 남석현 교수팀의 in vivo 연구 결과를 바탕으로 실험동물(또는 목적동물)의 몸무게 1kg당 1일 면역조절소재가 2.5mg, 10mg, 40mg이 투여될 수 있도록 설계하였다.

배합제품 Kg당 구성성분 조성은 Table에서 제시한 투여용량으로 시제품 군을 제작하였다.

Table 93. 양돈계에서의 Field test용 배합제품군의 기능성분 함량

	1차 시제품	2차 시제품
1군	무첨가	
2군	돼지 강황소재 제품 1 강황(생물전환)산물 2.5mg/kg	돼지 강황소재 제품 3 강황(생물전환)산물 40mg/kg
3군	돼지 강황소재 제품 2 강황(생물전환)산물 10mg/kg	
4군	돼지 강황소재 제품 3 강황(생물전환)산물 40mg/kg	

강황(생물전환)산물이 2.5mg/kg, 10mg/kg, 40mg/kg의 투여용량으로 설계된 3종의 배합제품을 각 1kg씩 제1협동기관인 강원대에 1차 제공되었고, 추가로 강황(생물전환)산물이 40mg/kg의 투여용량으로 설계된 배합제품 8kg을 제1협동기관인 강원대에 2차 제공되었다.

다. 양돈계에서의 배합제품의 시제품 시험성적서

상기 Field test용 배합제품 시제품 3종에 대해 주관기관의 내부 규정에 따라 제조 기록과 함께 시험성적서를 작성하였으며, 외부시험용 제품의 내부 규정에 따라 시험성적서를 보관 관리하고 있다.



경기도 수원시 소양광로 58
에스티알바이오택
Tel. 031-258-6323 Fax. 031-258-6333



경기도 수원시 소양광로 58
에스티알바이오택
Tel. 031-258-6323 Fax. 031-258-6333



경기도 수원시 소양광로 58
에스티알바이오택
Tel. 031-258-6323 Fax. 031-258-6333

시험성적서				
No.	발행	검인	승인	비고
1	[Signature]	[Signature]	[Signature]	

목적 : 양돈사육 개선용 시료

품명	제조일	Batch No.
강황-F 배합제품	2016. 3. 14.	CL-F1

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고(과량불량구분)
1	성분	2016. 3. 14. 00:00 ~ 2016. 3. 14. 23:59	적합	
2	대량	강황(F) 1000g	합격	
3	중량(중량불량)검사	강황(F) 1000g ± 10g	합격(중량불량) 1000g	
4	중량(중량불량)검사	강황(F) 1000g ± 10g	합격(중량불량) 1000g	

(주)에스티알바이오택

시험성적서				
No.	발행	검인	승인	비고
1	[Signature]	[Signature]	[Signature]	

목적 : 양돈사육 개선용 시료

품명	제조일	Batch No.
강황-F 배합제품	2016. 3. 14.	CL-F2

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고(과량불량구분)
1	성분	2016. 3. 14. 00:00 ~ 2016. 3. 14. 23:59	적합	
2	대량	강황(F) 1000g	합격	
3	중량(중량불량)검사	강황(F) 1000g ± 10g	합격(중량불량) 1000g	
4	중량(중량불량)검사	강황(F) 1000g ± 10g	합격(중량불량) 1000g	

(주)에스티알바이오택

시험성적서				
No.	발행	검인	승인	비고
1	[Signature]	[Signature]	[Signature]	

목적 : 양돈사육 개선용 시료

품명	제조일	Batch No.
강황-F 배합제품	2016. 3. 14.	CL-F3

No.	검사항목	기준 및 규격	검사결과	비고(과량불량구분)
1	성분	2016. 3. 14. 00:00 ~ 2016. 3. 14. 23:59	적합	
2	대량	강황(F) 1000g	합격	
3	중량(중량불량)검사	강황(F) 1000g ± 10g	합격(중량불량) 1000g	
4	중량(중량불량)검사	강황(F) 1000g ± 10g	합격(중량불량) 1000g	

(주)에스티알바이오택

Figure 168. 양돈계에서의 Field test 용 배합제품의 시험성적서

7절. 경제동물에서의 공격접종 test

1. 닭에서의 공격접종 test

: 닭 대상 살모넬라 저감제의 감염면역학 및 임상병리학적 효능 분석

가. 살모넬라 저감 후보물질의 선별(제1세부과제와 연계)

본 과제에서 개발할 살모넬라 저감후보물질인 미강 및 강황(생물전환)산물은 제1 세부과제에서 in vitro 및 in vivo 마우스 실험 등을 통하여 유효물질로 선별하여 분말형태로 제공받아 사용하였으며, 실험에 사용하기 위하여, 사료첨가제 혹은 물 추출액 형태로 지시된 농도에서 사용하였음.

나. 공격 접종균주 선별 및 접종균주 감별 표지유전자 바이오마커 도입

(1) 가금 특이 병원성 및 인수공통 살모넬라균주의 확보

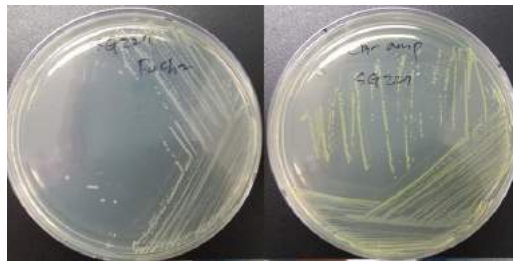
Table 94. 본 실험에서 사용한 살모넬라균 병원성 혈청형

Strain/plasmid	Description	Source/reference
<i>S. Gallinarum</i> 227	실험에 사용한 가금티푸스 병원성 균주	바이오포아
<i>S. Gallinarum</i> 227G	<i>S. Gallinarum</i> carrying the pKEN-GFP mut3 plasmid	This study
SR2-N6	비병원성 가금티푸스 백신주	바이오포아
SR2-N6G	SR2-N6 carrying the pKEN-GFP mut3 plasmid	This study
<i>S. Enteritidis</i> 38	장내 점착성이 우수한 균주	바이오포아
<i>S. Enteritidis</i> 39	장내 점착성이 우수한 균주	바이오포아
<i>S. Enteritidis</i> 43	장내 점착성이 우수한 균주	바이오포아
<i>S. Enteritidis</i> 43G	<i>S. Enteritidis</i> carrying the pKEN-GFP mut3 plasmid	This study
<i>S. Typhimurium</i>	LT2	ATCC 700720
pGFPmut3	IPTG 발현유도 가능한 녹생형광단백질 및 암피실린 내성유전자 보유 plasmid	실험실 stock

(2) GFP를 이용한 살모넬라 균의 tagging

실험방법 및 결과: GFP를 유전자를 가지고 있는 pKEN-GFP mut3 plasmid를 살모넬라에 삽입하여 GFP를 발현할 수 있는 균주를 제작한다. Electroporation 방법으로 plasmid를 삽입하기 위하여 먼저 plasmid를 잘 받아드릴 수 있도록 한 competent cell을 제작한다. 그 후 micro pulser (Bio-Rad, 165-2100)과 0.1 cm gene pulser cuvette (Bio-Rad, 165-2089)을 이용하여 매뉴얼에 따라 transformation을 진행한다. 확보한 GFP를 가지고 있는 plasmid는 selection의 편의를 위하여 ampicillin 저항 유전자를 함께 가지고 있지만 target 살모넬라 균주들이 이미 ampicillin에 대한 저항성을 가지고 있기 때문에 사용하지 못하였다. 하지만 GFP의 발현이 됨에 따라 콜로니의 색이 흰색에서 진한 노란색을 띠기에 노란색을 띠는 단일 콜로니만을 선별해 내어서 transformation된 균주를 얻어 낼 수가 있었다.

S. Gallinarum



SR2-N6



S. Enteritidis

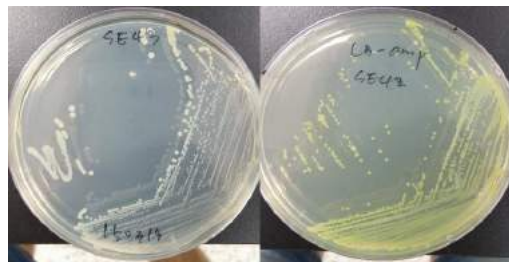


Figure 169. 본 실험에서 구축한 형광단백질로 표지된 살모넬라균

(3) 항생제 저항성을 이용한 *S. Enteritidis*의 선택적 배양(정성 및 정량분석법 구축)

실험방법 및 결과: 실험에 사용한 *S. Enteritidis* 38 strain의 경우 ampicillin, erythromycin, penicillin, streptomycin, tetracycline, kanamycin (intermediate) 그리고 neomycin 등 다양한 항생제에 대한 내성을 가지고 있었다. 이를 이용하여 penicillin과 streptomycin을 포함한 XLT4 또는 XLD agar 배지를 이용하여 분변 시료에서 *S. Enteritidis*를 선별해 낼 수가 있었다. 먼저 분변 시료에 *S. Enteritidis*가 없는 경우에는 항생제의 효과 때문에 아무런 균도 자라지 않는 것을 확인하였다. 분변 시료에 *S. Enteritidis*가 포함된 경우 XLT4 agar 배지에서 검은색 콜로니를 형성하며 자라는 것을 확인할 수가 있었다. 하지만 분변에 존재하는 균 중에 두가지 항생제에 모두 저항성을 가지고 자라는 균이 존재하긴 하였지만 검은색 콜로니를 형성하는 *S. Enteritidis*와는 다르게 흰색 콜로니를 형성하였기 때문에 *S. Enteritidis*를 구별해 낼 수가 있었다. 균이 자라는 긴 하였으나 *S. Enteritidis*는 존재하지 않고 분변에 존재하는 다른 균만 자라는 경우도 있었다. 균이 완전히 자라지 않거나 *S. Enteritidis*가 자라지 않았을 경우에는 RV broth에 증균 배양하여 배양한 것을 다시 XLT4 agar 배지에 도말하여 *S. Enteritidis*의 존재를 확인하였다.

(A)

균주	항생제	Ampicillin(AM)	Erythromycin(E)	Penicillin(P)	Streptomycin(S)	Tetracycline(TE)	Kanamycin(K)	Neomycin(N)
GE36		R	R	R	R	R	I(14)	R(12)
SE39		R	R	R	R	R	I(14)	R(12)
SE41		R(12)	R	R	R	R	R(12)	R(12)
SE43		R(12)	R	R	R	R	R(12)	R(10)
SE49		R(12)	R	R	R	R	I(14)	R(12)
SE50		R	R	R	R	R	I(14)	R(12)
SE64		R(10)	R	R	R(10)	R(12)	R(10)	R(10)
SE55		R(12)	R	R	R(10)	R(12)	R(10)	R(10)

(B)

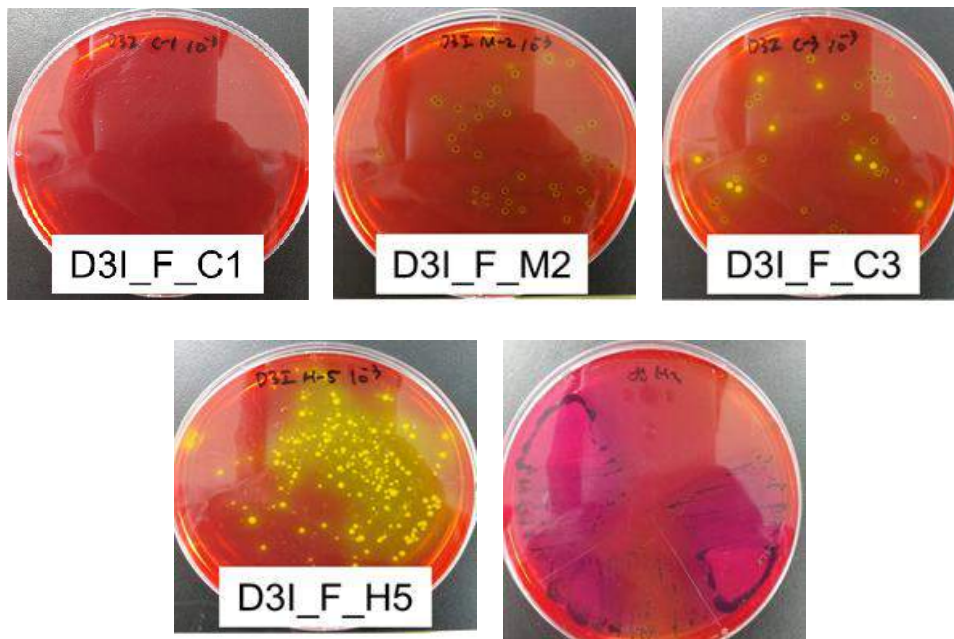


Figure 170. *S. Enteritidis*의 정성 및 정량적 분석법 확립을 위한 항생제 내성양상 분석(A) 및 선택적 배양결과(B)

다. 실험균주 준비 및 정성/정량적 분석법 확립

닭으로부터 맹장분변을 채취한 뒤, 살모넬라균을 인공접종하여, 위에서 선별한 선택배지를 활용하여 분변 중의 살모넬라균의 정성 및 정량적 분석을 시도하였다.

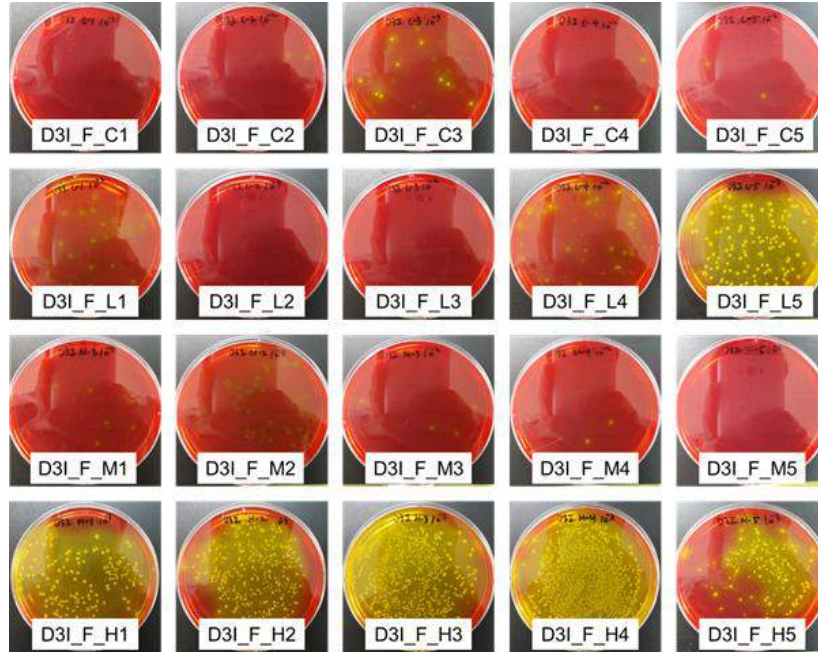


Figure 171. 닭 맹장분변으로부터 살모넬라균의 정성 및 정량적 분석법 확립

라. 선발 후보물질이 살모넬라균의 성장곡선에 미치는 영향

(1) 실험방법

- (가) 균주배양 : 살모넬라 균주들은 Luria-Bertani(LB) 액체배지에서 37°C, 230rpm으로 진탕배양하였다.
- (나) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물 준비 : 멸균된 LB 액체배지에 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물이 1% (w/v)가 되게 섞고 37°C에서 1시간동안 진탕기에서 반응시킨다. 반응된 추출액은 12,000g에서 10분동안 원심분리 한 다음에 상층액을 Syringe filter (0.45um)를 이용하여 여과하였다.
- (다) 성장곡선 측정 : 살모넬라 균주들을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간동안 진탕배양 한 후에 미강(생물전환)산물(1%, 10%) 또는 강황(생물전환)산물(1%, 10%) 추출물이 포함된 50ml의 LB 액체배지에 OD600이 0.02가 되도록 접종하였다. 살모넬라 균주들의 성장곡선은 OD600과 direct plating에 의한 cfu (colony forming units) 방법으로 측정하였다.

(2) 결과 및 분석

(가) 미강(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균 성장에 미치는 효과: 미강(생물전환)산물의 농도별 성장억제 효과를 조사한 결과, 조사한 농도에서 살모넬라균의 성장억제를 확인하지 못하였다.

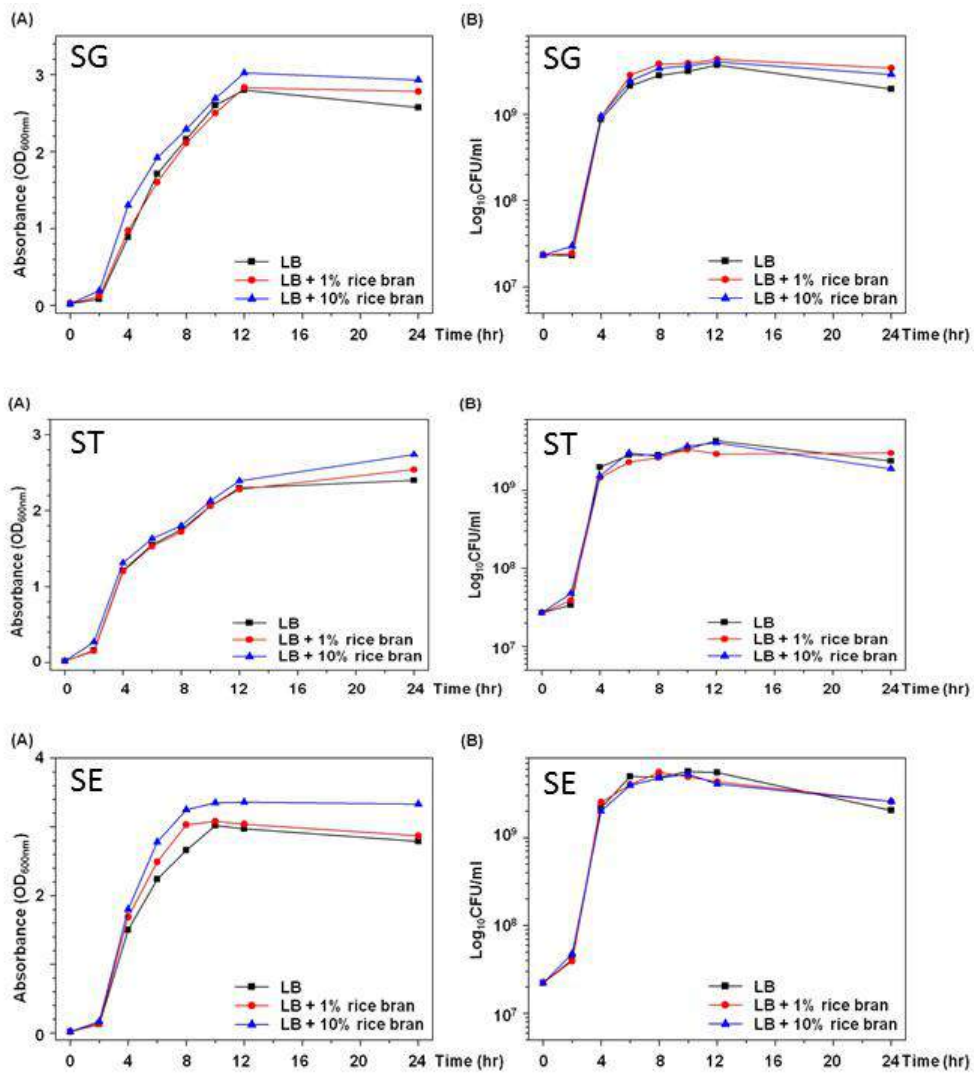


Figure 172. 미강(생물전환)산물의 살모넬라균 성장에 미치는 효과.
(좌측패널) optical density at 600nm. (우측패널) colony forming units

(나) 강황(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균 성장에 미치는 효과: 강황(생물전환)산물의 농도별 성장억제 효과를 조사한 결과, 조사한 농도에서 살모넬라균의 성장억제를 확인하지 못하였다.

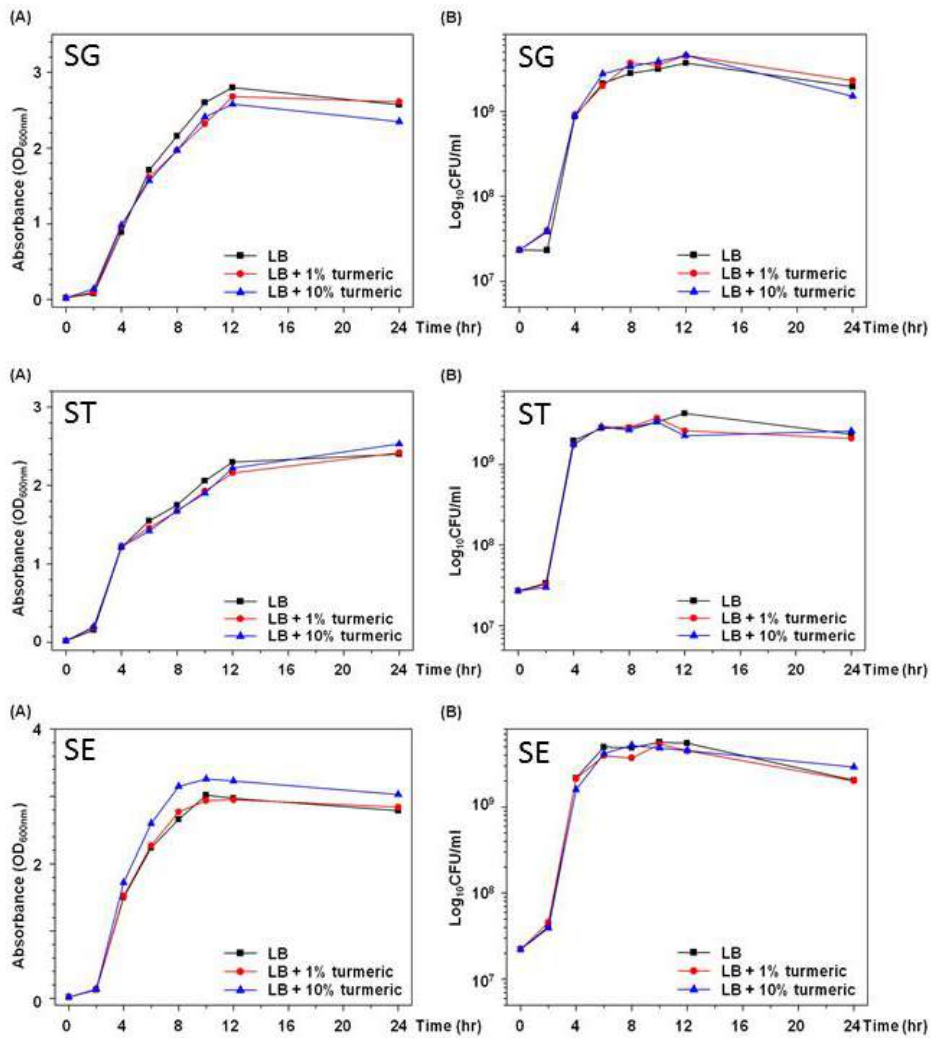


Figure 173. 강황(생물전환)산물의 살모넬라균 성장에 미치는 효과.
(좌측패널) optical density at 600nm. (우측패널) colony forming units

마. 선발 후보물질이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과

(1) 실험방법

- (가) 균주배양 : 살모넬라 균주들(SG, ST, SE)은 LB 액체배지에서 37°C, 230rpm 으로 진탕배양하였다.
- (나) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물 준비: 멸균된 LB 액체배지에 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물이 1% (w/v)가 되게 섞고 37°C에서 1시간동안 진탕기에서 반응시킨다. 반응된 추출액은 12,000g에서 10분동안 원심분리 한 다음에 상층액을 Syringe filter (0.45um)를 이용하여 여과하였다.
- (다) Swimming motility 분석: 살모넬라 균주의 운동성은 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물 (1%, 10%)이 첨가된 운동성 배지 (1 % tryptone, 0.5 % NaCl, 0.3 % agar)를 이용하여 분석하였다. 살모넬라 균주들을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간 진탕배양 한 후에, 멸균된 이쑤시개를 이용하여 운동성 배지에 접종한 다음 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. Motility halo의 지름은 3, 6시간에 측정하였다. 실험 결과에 대한 유의성을 확인하기 위해 paired t-test를 이용하여 통계분석을 하였다.

(2) 결과 및 분석

- (가) 미강(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균 운동성에 미치는 효과: 미강(생물전환)산물 추출물이 살모넬라 균주들의 운동성에 영향을 주는지 확인하기 위해 추출물(1%, 10%)이 포함된 운동성 배지에 접종 후 6시간 동안 배양한 후에 control group과 비교하였다. 운동성 분석 결과를 통해서 S. Gallinarum는 모든 운동성 배지에서 운동성이 없는 것을 확인하였다. S. Typhimurium, S. Enteritidis는 저농도(1%)의 미강(생물전환)산물 추출물이 포함된 운동성 배지에서는 control group에 비해 감소하는 것을 확인하였다. 하지만, S. Typhimurium는 고농도(10%)의 추출물이 포함된 운동성 배지에서는 control group에 비해 증가하는 것을 확인하였다

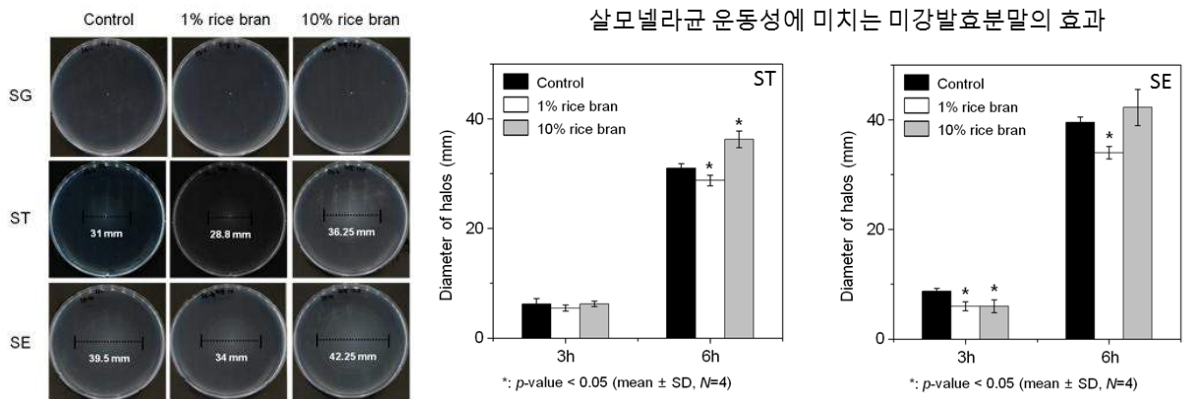


Figure 174. 미강(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균 운동성에 미치는 효과

(나) 강황(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균 운동성에 미치는 효과: 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라 균주들의 운동성에 영향을 주는지 확인하기 위해 추출물(1%, 10%)이 포함된 운동성 배지에 접종 후 6시간 동안 배양한 후에 control group과 비교하였다. 운동성 분석 결과를 통해서 *S. Gallinarum*는 모든 운동성 배지에서 운동성이 없는 것을 확인하였다. *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*의 운동성 분석 결과는 미강(생물전환)산물 추출물의 결과와 유사하게 저농도(1%)의 강황(생물전환)산물 추출물이 포함된 운동성 배지에서는 control group에 비해 감소하는 것을 확인하였지만, 고농도(10%)의 추출물이 포함된 운동성 배지에서는 control group에 비해 증가하는 것을 확인하였다.

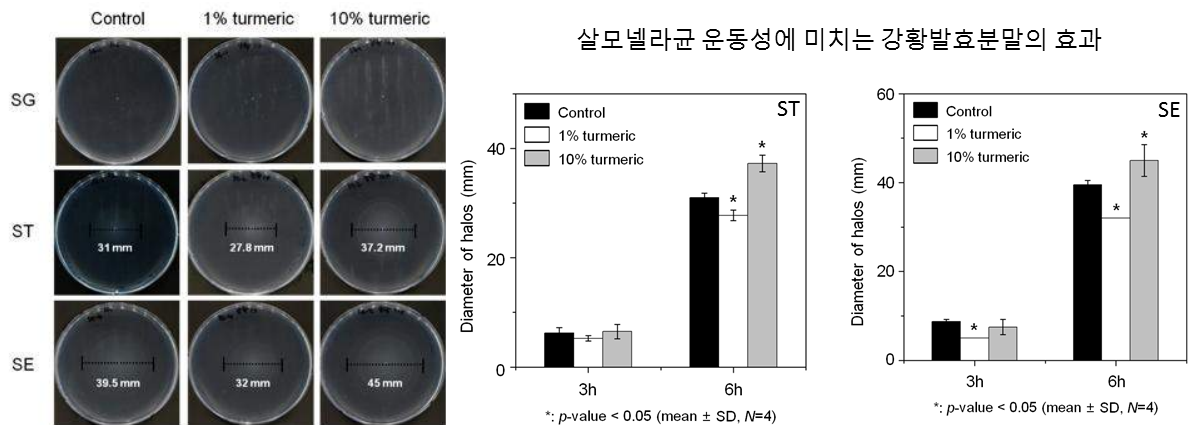


Figure 175. 강황(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균 운동성에 미치는 효과

바. 선발 후보물질이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과

(1) 실험방법

(가) 균주배양 : 살모넬라균(표1)은 Luria-Bertani(LB; BD Difco™) 액체배지에 접종하여 37°C, 230rpm으로 진탕기(Vision Scientific)에서 배양하였다.

(나) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액 준비 : 멸균된 LB 액체배지에 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물 (STR바이오텍)이 1% (w/v)가 되게 섞고 37°C에서 1시간동안 230 rpm으로 진탕기 (Vision Scientific)에서 반응시켰다. 반응된 추출액은 거름종이 (Whatman, Filter paper grade 1)로 여과한 후에 50ml 주사기 (한국백신)와 syringe filter (Sartorius, Minisart® high flow syringe filters 0.45um)를 이용하여 여과하였다.

(다) Total protein 분석 : 살모넬라 균주들을 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물(1%, 10%)이 포함된 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간동안 진탕기 (Vision Scientific)에서 배양하였다. 배양된 균주들은 ice에서 5분간 방치한 후에 13,500 rpm (LaboGene) 에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 Laemmli sample buffer를 넣은 다음 95°C에서 15분간 끓여주었다. 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후에 Coomassie brilliant blue 염색방법으로 염색하였다.

(라) Secreted protein 분석 : 살모넬라 균주들을 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물이 포함된 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간동안 진탕기 (Vision Scientific)에서 배양하였다. 배양된 균주들은 ice에서 5분간 방치한 후에 13,500 rpm (LaboGene) 에서 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 상층액에 포함된 단백질은 Vivaspin-500 (MWCO 10 kDa; Sartorius stedim biotech)으로 13,500 rpm, 4°C에서 20 min동안 원심 분리 (LaboGene)하여 농축하였다. 농축된 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)를 이용하여 정량하였으며, 동량의 단백질을 Laemmli sample 용액을 넣고 95°C에서 15분간 끓여주었다. 8%, 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후에 silver 염색방법으로 염색하였다.

(2) 결과 및 분석

(가) 미강(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과

미강(생물전환)산물 추출물이 살모넬라 균주들의 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 total proteins과 secreted proteins의 발현 양상을 비교했다. 모든 살모넬라 균주들의 total proteins은 미강 추출물에 의해서 큰 변화를 보이지 않았다. 하지만, *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*의 secreted proteins에서는 여러 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 미강 및 강황(생물전환)산물과 관련된 선행 연구결과에서, Kumar et al. 그룹은 미강을 섭취한 mice model에서 *S. Typhimurium*의 colonization이 감소한다는 것을 보고하였다. 선행 연구결과와 이번 실험 결과를 토대로, 미강은 살모넬라 균주의 secreted proteins의 발현 억제와 숙주로의 colonization에 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다. 하지만, 미강에 의한 살모넬라의 secreted proteins과 병원성 사이의 직접적인 연관성에 대한 연구는 아직까지 보고된 것이 없기 때문에 추후에 연구할 필요성이 있다.

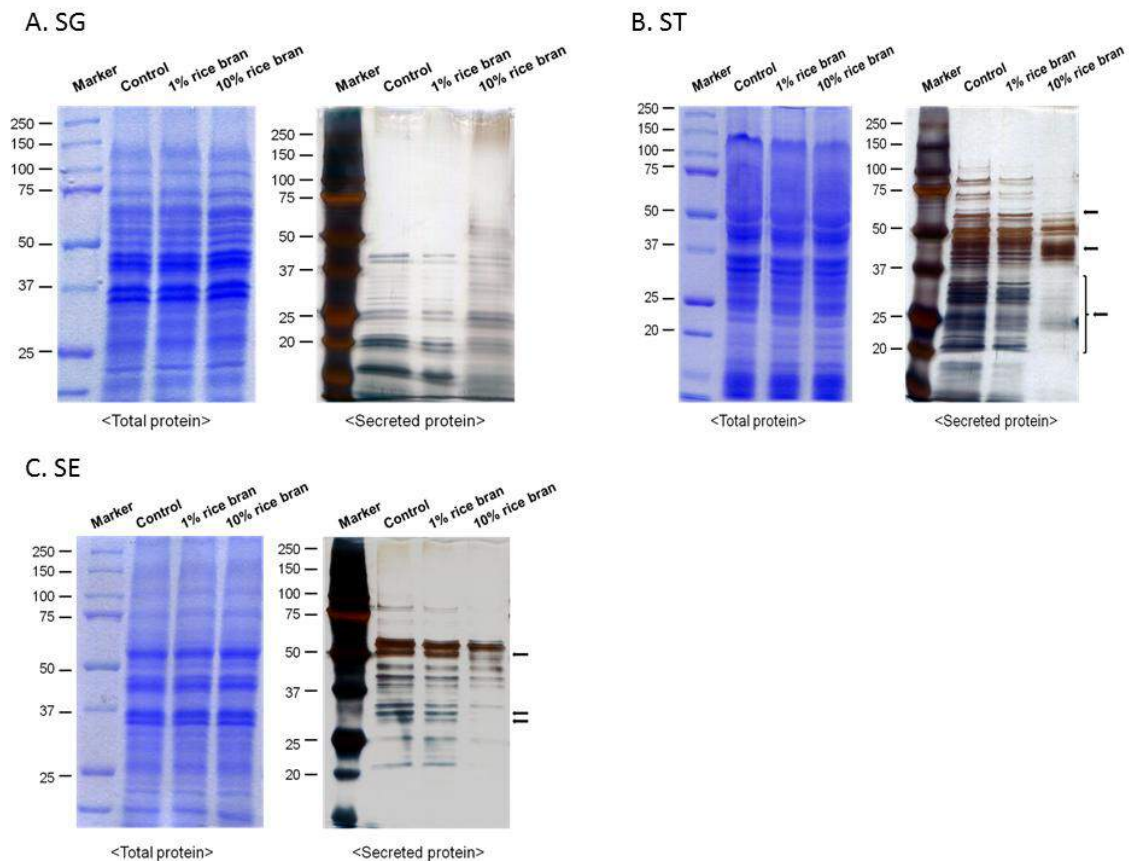


Figure 176. 미강(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과.
(화살표) 발현양상에 변화를 보인 단백질.

(나) 강황(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과

강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라 균주들의 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 total proteins과 secreted proteins의 발현 양상을 비교했다. 미강과 마찬가지로, 살모넬라의 단백질 발현 양상과 연관된 연구는 아직까지 많은 연구가 진행되지 않았다. 강황(생물전환)산물과 관련하여 Marathe et al. 그룹에서 curcumin(강황에 포함되어 있는 노란 색소 물질)이 antimicrobial peptides, reactive oxygen, nitrogen species에 대한 *S. Typhimurium*의 저항성이 증가하는 것을 통해 pathogenicity를 증가하는데 영향을 준다는 것을 보고하였다. 우리의 결과에서는 *S. Typhimurium*의 secreted proteins의 발현이 오히려 감소하는 것을 확인하였다. 또한, *S. Typhimurium*와는 다르게 *S. Gallinarum*에서는 여러 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이번 연구 결과를 토대로, 강황이 살모넬라 균주에 따라 단백질의 발현에 다른 영향을 준다는 것을 확인하였다. 추후의 연구에서는, 발현이 변화하는 단백질들을 동정하여 강황(생물전환)산물에 의한 영향에 대해서 알아보는 것이 필요하다. 또한, 황(생물전환)산물이 *S. Typhimurium*의 pathogenicity와 밀접한 연관성이 있는 것으로 보여지기 때문에 secreted proteins과 관련하여 추후에 연구할 필요성이 있다.

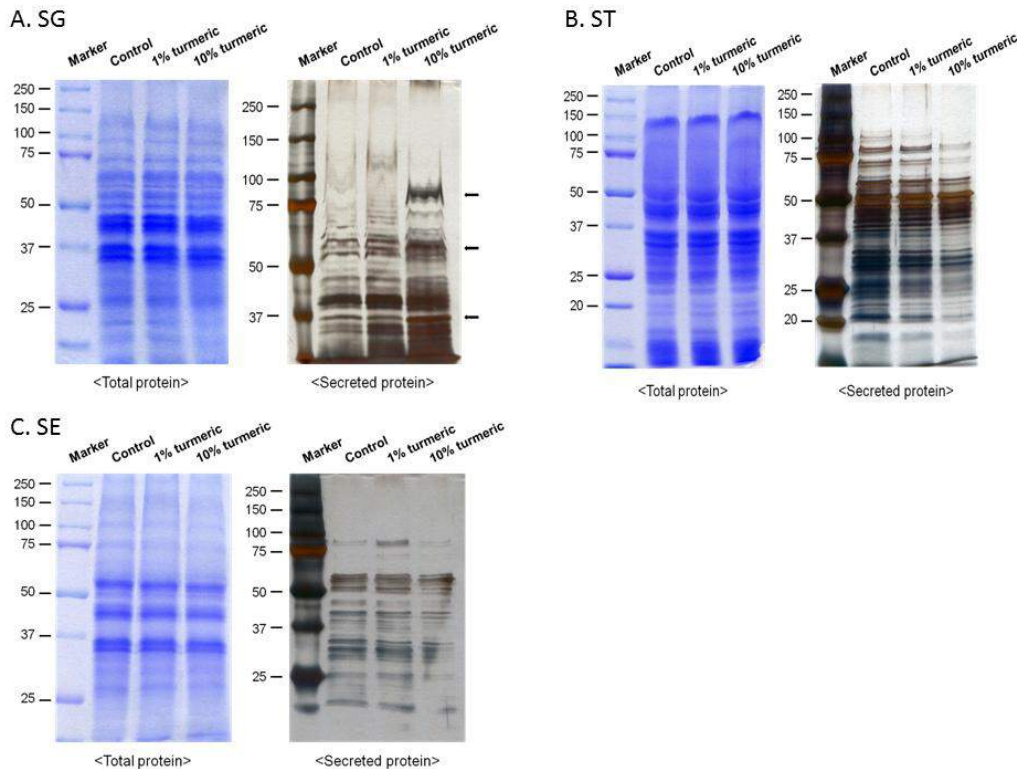


Figure 177. 강황(생물전환)산물 추출액이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과. (화살표) 발현양상에 변화를 보인 단백질.

사. 선발 후보물질이 닭 유래 대식세포주의 탐식 및 포식작용에 미치는 효과 분석

(1) 실험방법

(가) HD11 세포의 배양

HD11 (chicken macrophage cell line)의 배양은 RPMI 1640 (GIBCO, 11875) 배지를 기본으로 하여 8% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, 26140), 1% penicillin-streptomycin (PS) (GIBCO, 15140)를 첨가한 것을 사용하며, 37°C, 5% CO₂가 있는 환경에서 배양한다. 세포는 주로 10 cm culture dish (Corning, 430167)에서 배양하며, 초기에 10% 정도 (약 5×10⁵개) 되도록 seeding 하며, 90% 정도가 되면 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, 25200)를 이용하여 떼어내 준다. 필요에 따라서 6 well (SPL, 30006), 24 well (SPL, 30024) 또는 96 well plate (Greiner bio-one, 655180)에 seeding 하여 사용한다.

(나) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액 준비

미강 및 강황(생물전환)산물을 1% (w/v)가 되게 RPMI 1640 배지에 녹인 후 37°C, 200rpm 에서 1시간 동안 진탕배양 한다. 12,000×g 로 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 0.22 um syringe filter로 걸러서 사용하고, 4°C 에 보관한다. 이렇게 준비된 추출액의 농도를 10 mg/ml 이라고 하였다.

(다) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 증식에 미치는 영향 분석

HD11 세포를 96 well plate에 대략 3×10³개를 seeding 하고, 하루정도 안정화 시킨 후에 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액을 10 mg/ml의 1/5배 농도부터 2진 희석하여 1/320배까지 배지와 희석하여 넣어준 후 16, 24, 48, 72시간 동안 배양한다. 각각 시간동안 배양 후 배지를 모두 제거하고, fresh 한 배지를 넣어준 후에 배지의 1/10 부피의 WST-1 (TAKARA, MK400) 시약을 넣어준다. 2시간동안 추가 배양 한 후에 440 (450) nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 한번의 실험에서 3개의 동일한 well을 만들어서 그 값의 평균치를 사용하였으며 총 3번의 실험을 독립적으로 수행하여 결과를 도출하였다.

(라) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 Salmonella 탐식(phagocytosis)능력에 미치는 영향 분석

HD11 세포를 24 well plate에 대략 5×10^5 /well개가 되도록 seeding 한 후에 하루정도 안정화 시킨다. 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액을 1% 또는 10%를 넣고 16시간 동안 배양한다. 16시간 후에 배지를 제거하고, PBS로 1회 washing 한 후에 항생제가 들어있지 않은 배지를 넣어준다. 대략 1×10^6 /well개의 *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* 또는 *S. Typhimurium* 를 넣어준 후 1 또는 3시간 동안 배양한다. 1 시간 후 배지를 모두 제거하고, PBS로 1회 washing 한다. 20 ug/ml 농도의 gentamicin을 포함한 fresh한 배지를 넣고 1시간 동안 배양한다. 1시간 후 배지를 모두 제거하고, PBS로 1회 washing 한다. 1% triton / 0.9 % NaCl 용액 100 ul를 넣고 상온에서 5분간 두어 세포를 녹인다. Well에 들어있는 용액을 전부 agar 배지에 도말하여 콜로니 수를 측정한다.

(마) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 Salmonella 탐식(killing)능력에 미치는 영향 분석

HD11 세포를 24 well plate에 대략 5×10^5 /well개가 되도록 seeding 한 후에 하루정도 안정화 시킨다. 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액을 1% 또는 10%를 넣고 16시간 동안 배양한다. 16시간 후에 배지를 제거하고, PBS로 1회 washing 한 후에 항생제가 들어있지 않은 배지를 넣어준다. 대략 1×10^6 /well개의 *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* 또는 *S. Typhimurium* 를 넣어준 후 2시간 동안 배양한다. 2시간 후 배지를 모두 제거하고, PBS로 1회 washing 한다. 20 ug/ml 농도의 gentamicin을 포함한 fresh한 배지를 넣고 각각 1, 3, 5시간 동안 배양한다. Gentamicin 처리후 배지를 모두 제거하고, PBS로 1회 washing 한다. 1% triton / 0.9 % NaCl 용액 100 ul를 넣고 상온에서 5분간 두어 세포를 녹인다. Well에 들어있는 용액을 전부 agar 배지에 도말하여 콜로니 수를 측정한다. 각 시간 별로 측정된 콜로니 수를 비교하여 줄어든 양을 알아낸다.

(2) 결과 및 분석

(가) 미강(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 증식에 미치는 영향 분석

미강(생물전환)산물 추출액에 대한 HD11 세포의 증식은 16시간에서는 차이를 보이지 않았으나 24 시간에서 1/5배 농도에서 약간 감소하는 것을 관찰하였다. 48 시간에서는 1/80 배의 농도에서 증가하였으며, 72시간에서는 1/320 농도부터 시작하여 1/40배까지 증식 능력이 증가하여 1/20배부터 조금씩 감소하였다.

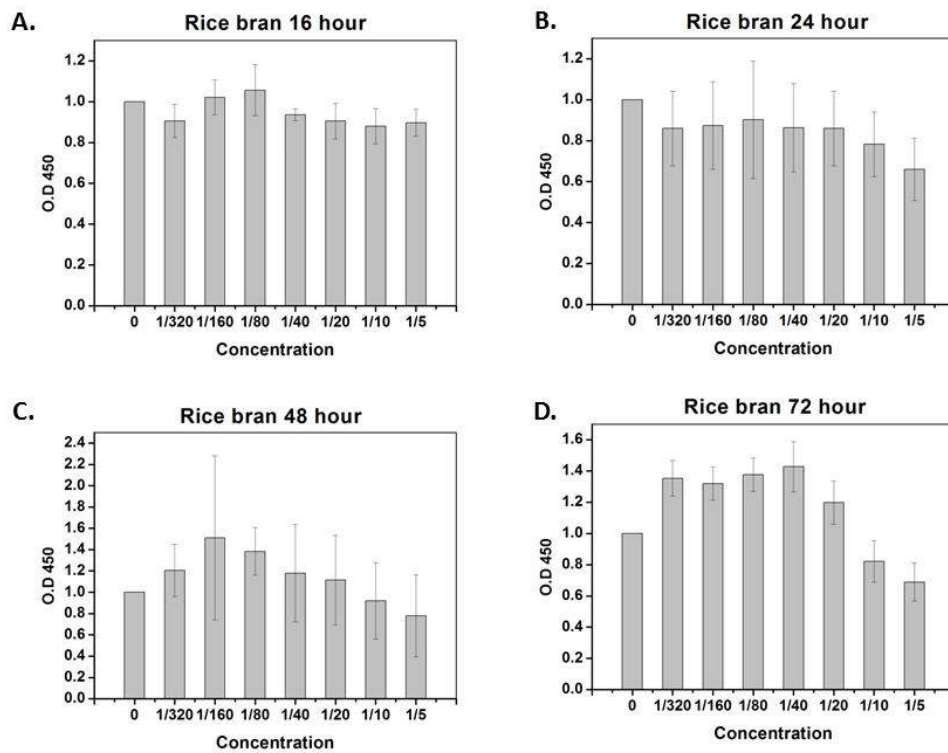


Figure 178. 미강(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 증식에 미치는 영향 분석

(나) 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 증식에 미치는 영향

미강 및 강황(생물전환)산물 추출액에 대한 HD11 세포의 증식은 16시간, 24시간에서는 차이를 보이지 않았지만 48시간 에서는 1/160, 1/80배 농도에서 최대치로 증가하여 농도에 따라서 조금씩 감소하는 모양을 보였다. 72시간 에서는 1/320배 농도부터 증가하기 시작하여 마찬가지로 1/160, 1/80배 농도에서 최대치로 증가한 후 농도에 따라서 조금씩 감소하는 모습을 보였다. 하지만 높은 농도 1/5배 에서는 근소하지만 감소하는 것으로 나타났기 때문에 이후의 실험에 사용한 농도는 최대치 구간인 1/100배와 생존이 유의하게 증가하는 마지막 농도인 1/10배를 사용하여 진행하였다.

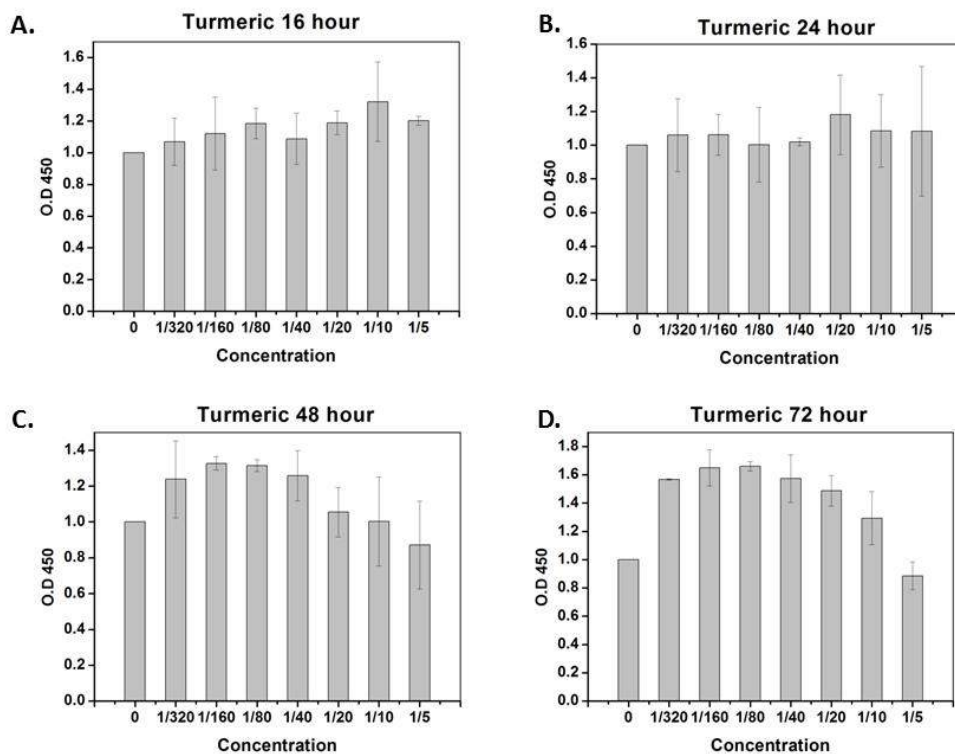


Figure 179. 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 증식에 미치는 영향

(다) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 Salmonella 탐식(phagocytosis)능력에 미치는 영향

- ① 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 탐식 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포를 *S. Gallinarum*에 감염 전 16시간동안 추출액을 처리 한 후에 washing 하여 균에는 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 영향을 받지 않도록 하여 실험을 진행

하였다. 예비실험으로 1% 농도와 10% 농도에서 진행하였는데 농도별로 차이를 보이지는 않아서 추후 실험은 10%로 진행하였다. 감염 1시간 후에 10개 정도의 균이 세포내에 존재하였고, 강황 추출액을 처리한 균 에서는 크게 차이가 나타나지 않았다. 하지만 미강 추출액을 처리한 균에서는 30개 정도의 균이 세포 내에 존재하는 것으로 보아서 탐식능력이 향상되었음을 알 수가 있었다.

② 감염 3시간 후에는 400개 정도의 균이 세포내에 존재하였으며 강황(생물전환)산물 추출액을 처리한 균에서는 약간 감소한 반면, 미강(생물전환)산물 추출액을 처리한 균에서는 여전히 증가함을 보였다. 위 실험은 독립적으로 3번 반복 수행한 결과의 평균값으로 나타내었으며 오차는 standard deviation 값을 사용하였다. 미강 및 강황(생물전환)산물 추출물에 대한 HD11 세포의 탐식 능력은 감염 1시간 후에 600여개의 균이 세포 내에 존재 하였고, 3시간 후에는 17000여개의 균이 세포내에 존재하였다. 강황(생물전환)산물 추출물을 처리한 균에서는 크게 변화가 없었지만, 미강(생물전환)산물 추출물을 처리한 균 에서는 *S. Enteritidis*에 대한 탐식 능력이 크게 증가함을 관찰할 수가 있었다. HD11 세포 의 *S. Typhimurium*에 대한 탐식 능력은 감염 1시간 후에 400여 개의 균이 세포 내에 존재하였으나 감염 3시간 후에는 4000여개의 균이 세포내에 존재하였다. 강황(생물전환)산 물을 처리한 균에서는 탐식 능력이 감소하였으나 미강을 처리한 균에서는 증가하였다.

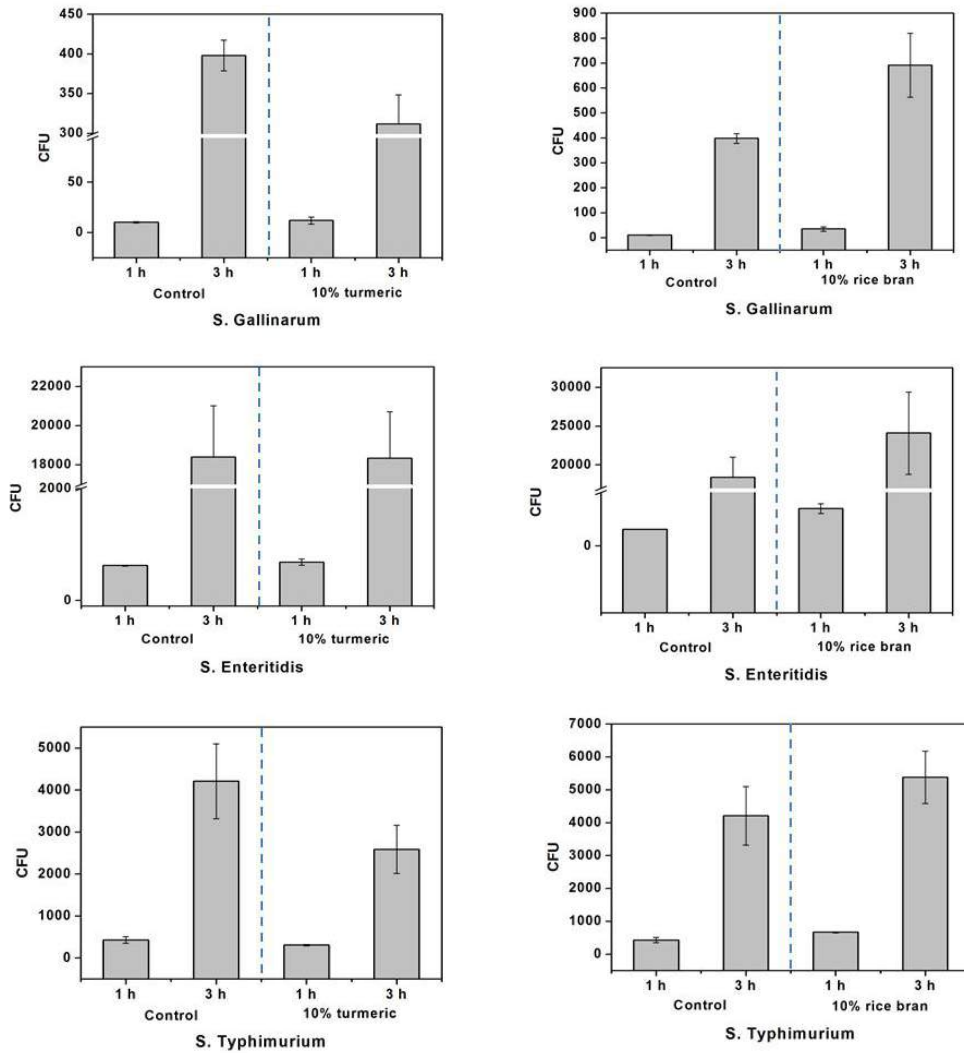


Figure 180. 미강 및 강황(생물전환)산물이 닭 대식세포 HD11의 *Salmonella* 탐식(phagocytosis)능력에 미치는 영향

(라) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 HD11 세포의 *Salmonella* 포식(killing)능력에 미치는 영향

강황 및 미강 추출액이 HD11 세포의 포식 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동일 조건으로 각각 3종류의 *Salmonella* (*S. Typhimurim*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*)를 감염시킨 후 gentamicin을 이용하여 남은 균들을 모두 제거 한 후에 변화하는 균수를 확인하였다. 하지만 예상 결과와는 다르게 *S. Typhimurim*와 *S. Enteritidis*에서는 killing 효과를 관찰할 수가 없었지만 *S. Gallinarum*에 대해서는 killing 효과를 보였다. *S. Gallinarum*을 감염한 세포 중, 강황(생물전환)산물을 처리 한 군(60%)에서는 초기 3시간 동안에는 대조군(40%) 보다 약간 효과가 떨어졌지만 5시간 후에는 대조군과 유사한 수준 (24%)으로 균을 죽인 것이 관찰되었다. 미강(생물전환)산물을 처리한 군에서는 시간이 지남에 따라 균을

죽인 것은 관찰이 되었으나 5시간 동안에 속도나 효율은 대조군에 비해서 약간 떨어졌다. 본 실험은 독립적으로 3번 반복 수행한 결과의 평균값을 사용해 나타내었으며, 오차 막대는 표준편차 값으로 하였다.

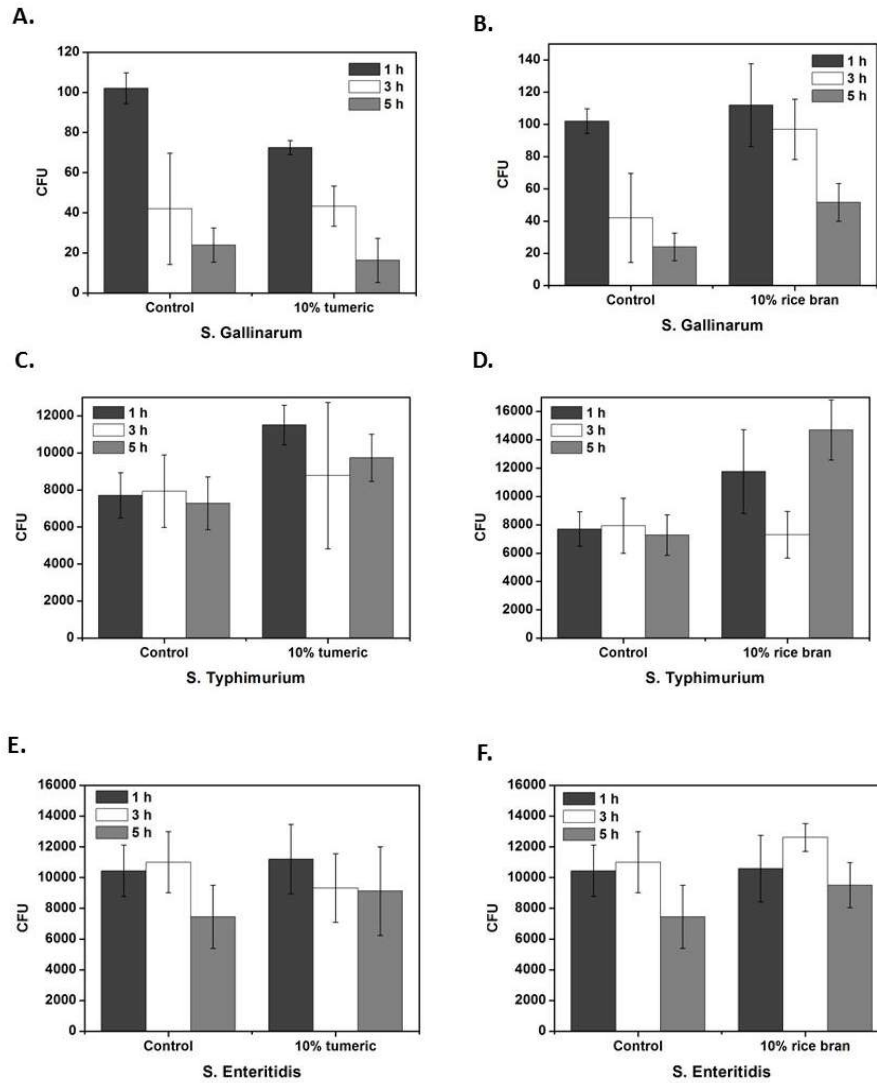


Figure 181. 미강 및 강황(생물전환)산물이 닭 대식세포 HD11의 *Salmonella* 포식(killing)능력에 미치는 영향

아. 선발 후보물질이 닭 유래 대식세포 HD11의 cytokine 발현에 미치는 영향

(1) 실험방법

RT-qPCR 분석 : HD11 세포를 6 well plate에 대략 5×10^5 /well이 되도록 seeding 한다. 하루정도 안정화 시킨 후에 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액을 1% 또는 10%를 넣고 16시간 동안 배양한다. 16시간 후에 배지를 제거하고, PBS로 1회 washing 한 후에 500 ul의 trizol을 넣고 세포를 수확한다. 이후 RNA 추출 및 real-time PCR 방법은 조직에서와 같다.

(2) 결과 및 분석

(가) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액에 의한 cytokine 발현 효과

미강 및 강황(생물전환)산물 추출액을 16시간 동안 처리 했을 때 IL-1 β , iNOS 그리고 IL-10의 발현이 크게 증가하였으며, TNF- α 의 발현 또한 증가하였다.

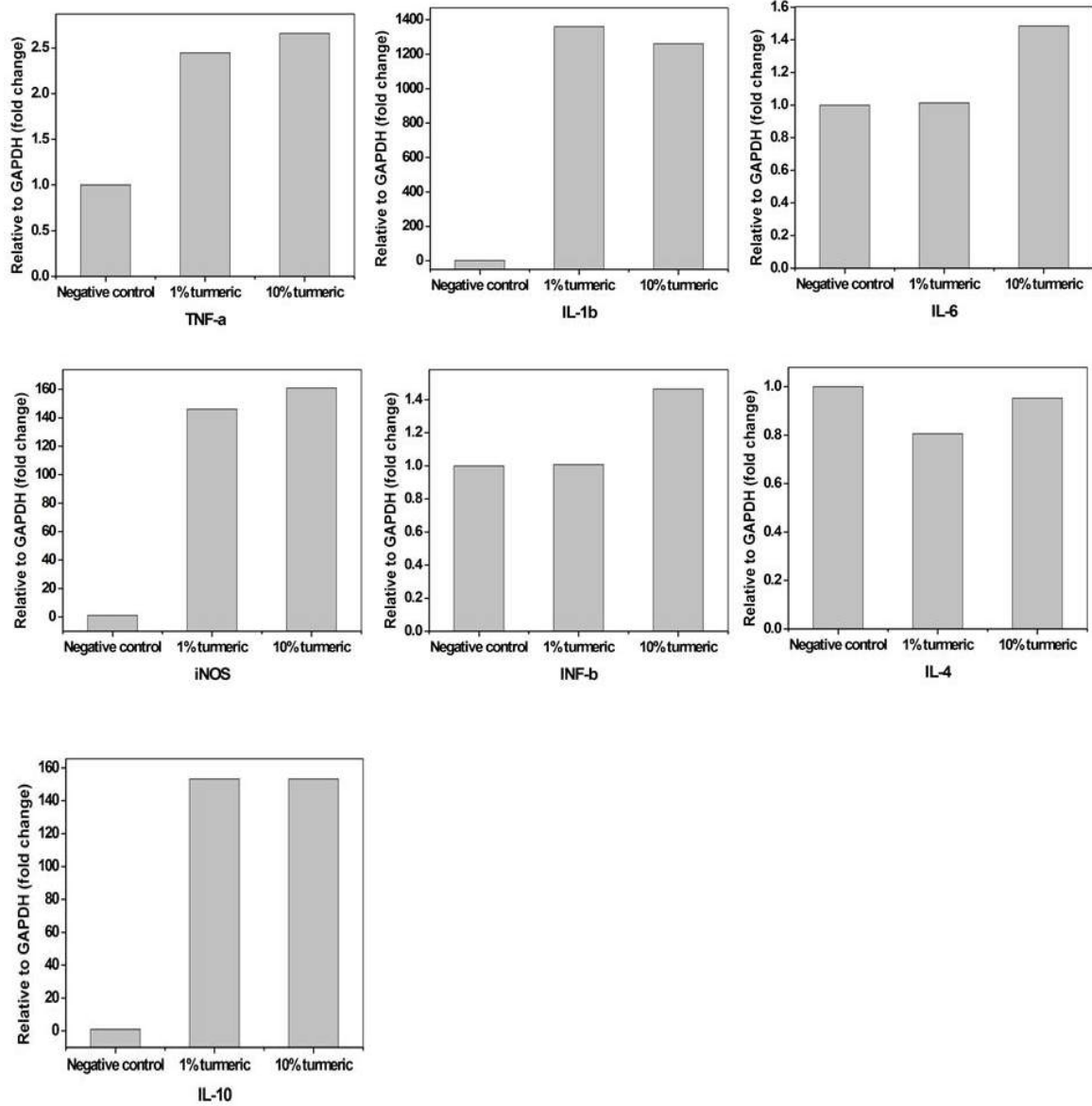


Figure 182. 강황(생물전환)산물 추출액에 의한 cytokine 발현 효과

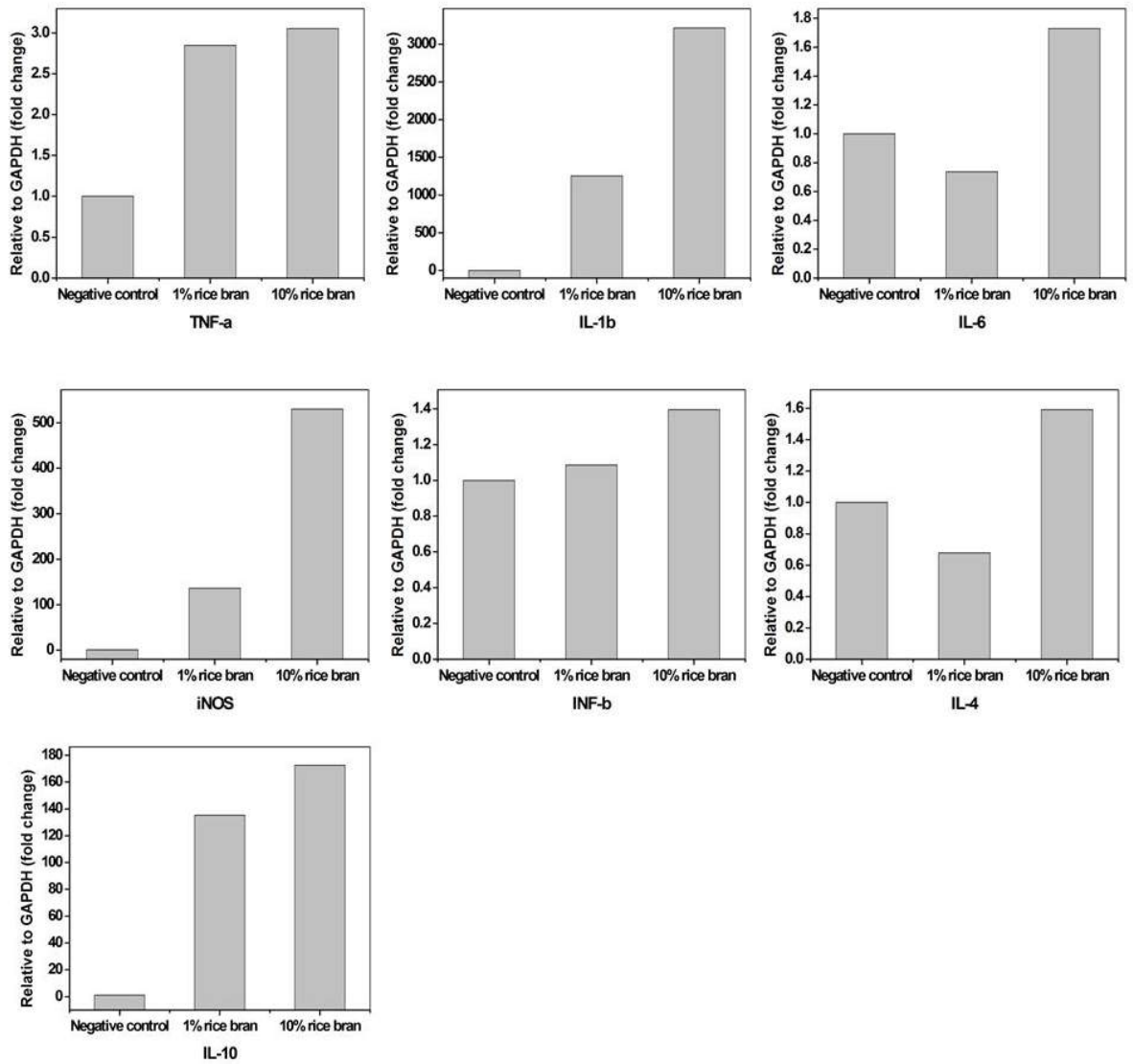


Figure 183. 미강(생물전환)산물 추출액에 의한 cytokine 발현 효과

(나) 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이 *S. Gallinarum* 감염에 따른 HD11 세포의 cytokine 발현에 미치는 영향

결과에서 negative control (NC)은 미강 및 강황(생물전환)산물 추출액이나 균을 아무것도 처리하지 않은 것이고, positive control (PC)은 추출액은 처리하지 않고 균만 감염시킨 것으로 정의하였다. 그 외에는 각각의 추출액 1%, 10%를 16시간 처리 후 균을 감염시킨 것이다. TNF- α 의 발현은 PC에서 약간 감소하였으나 추출액을 처리한 균에서는 증가하였다. IL-1 β 는 PC에서 발현양이 크게 증가하였으나 추출액을 처리한 균에서는 증가폭이 감소하였으며 그 효과는 10% 강황(생물전환)산물 추출액을 처리한곳에서 가장 크게 나타났다. IL-6의 발현 또한 PC에서 크게 증가하였으나 추출액을 처리한 균에서는 소폭 증가하였다. INF- β 는 PC에서의 발현은 감소하였으나 추출액 처리균에서는 발현양에 변화가 없거나 약간 증가하였다. iNOS의 발현은 PC에서는 거의 없었으나 추출액 처리균에서는 크게 증가하였다. IL-4의 발현은 미강(생물전환)산물 추출액 10% 에서 약간의 증가만 있었다. IL-10의 발현은 PC에서 크게 증가하였으며, 추출액을 처리한 균에서의 발현은 더욱 크게 증가하였다.

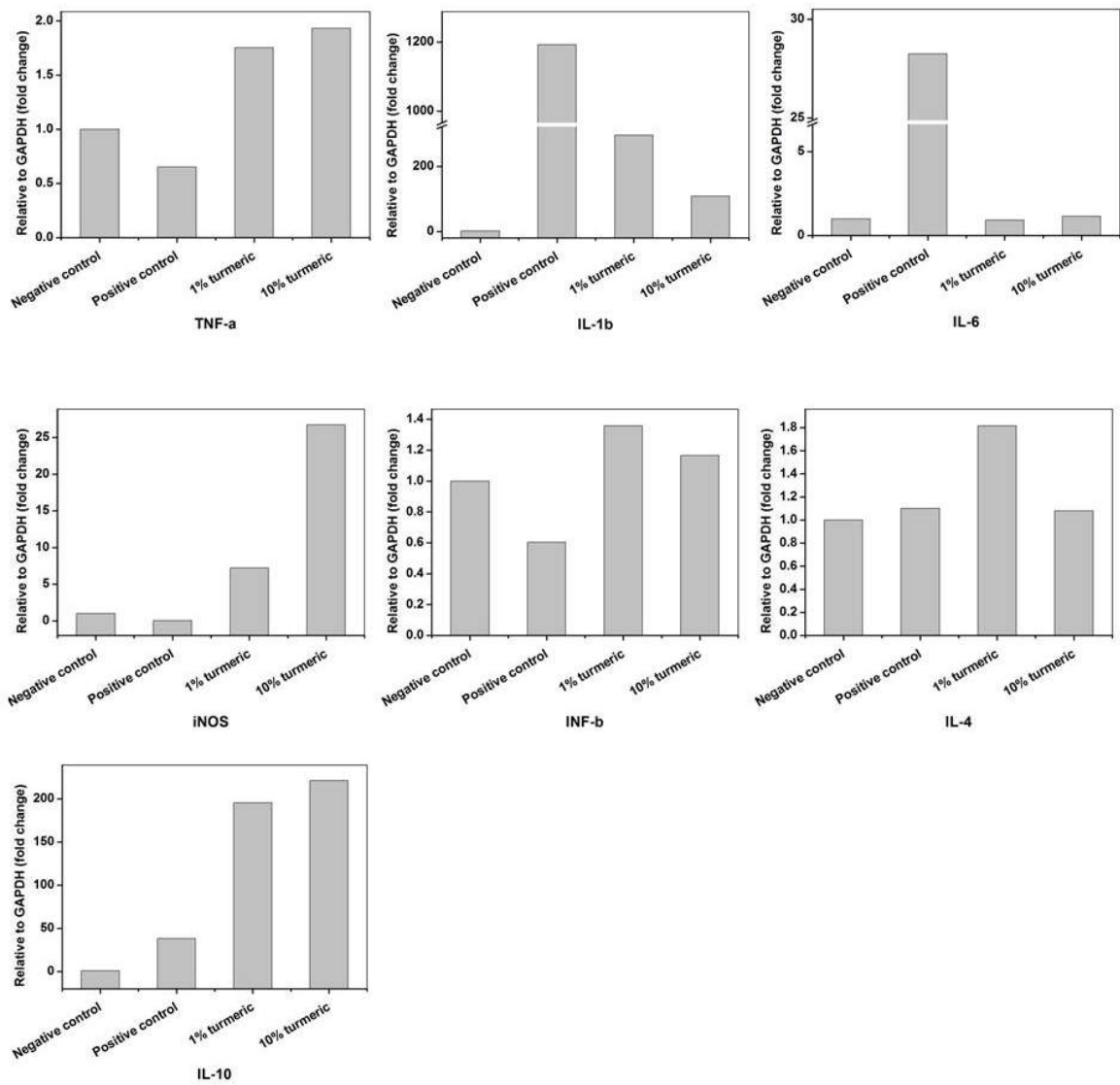


Figure 184. 강황(생물전환)산물 추출액이 *S. Gallinarum* 감염에 따른 HD11 세포의 cytokine 발현에 미치는 영향

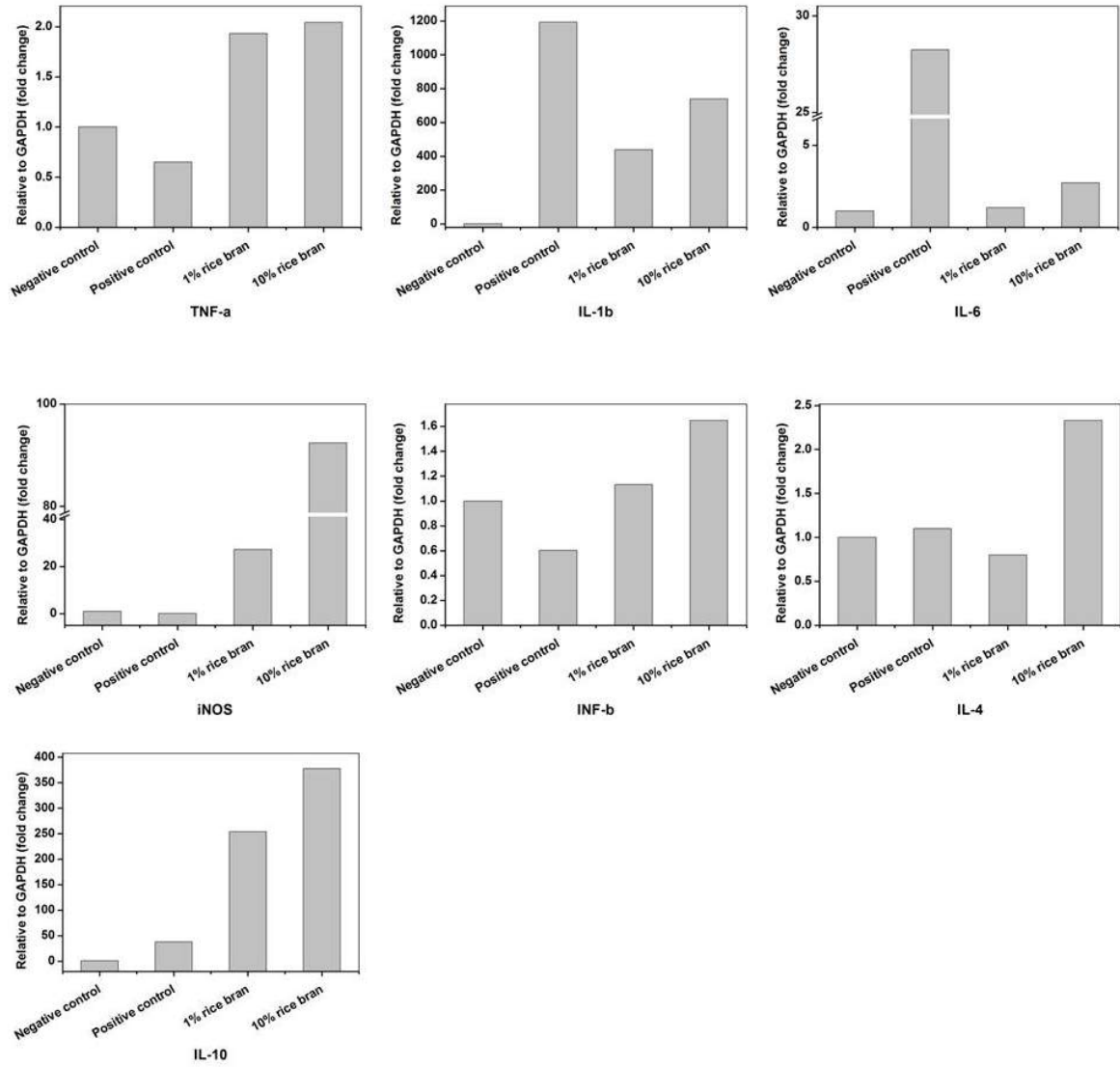


Figure 185. 미강(생물전환)산물 추출액이 *S. Gallinarum* 감염에 따른 HD11 세포의 cytokine 발현에 미치는 영향

자. 공격균주 선발 및 1일령 초생추에 대한 감염프로토콜 확립

(1) SG 사료첨가제 시험

- (가) 시험계 : 시험계는 '추백리·가금티푸스 방역실시요령'에 따른 검사에서 살모넬라 음성종 계군으로 확인된 종계 유래 1일령 실용 갈색 산란계 병아리를 130수를 입수하였다.
- (나) 공격접종균 : 국내 가금에서 분리된 병원성 *S. Gallinarum* 균주 (BP-SG104).
- (다) 시험물질 : 강황(생물전환)산물 함유 사료
- (라) 사육환경 : 외기가 차단된 각 사육상자 내 13수씩 나누어 사육
- (마) 사육상자 : Hepa-filter가 장착된 양압식 공기주입 스테인레스 차단 상자
120cm(L)*80cm(W)*80cm(H)
- (바) 사료 및 물 : 사료는 축협사료-산란어린병아리 사료, 물은 상수도 이용
- (사) 검역 및 순화 : 입수한 병아리를 격리사육장치에서 시험개시까지 7일간 사육하며, 시험개시 직전에 사육수수의 10수 이상에 대하여 추백리진단액 및 *Salmonella* group D1 ELISA kit를 이용하여 살모넬라 감염여부를 확인 후 시험에 사용함

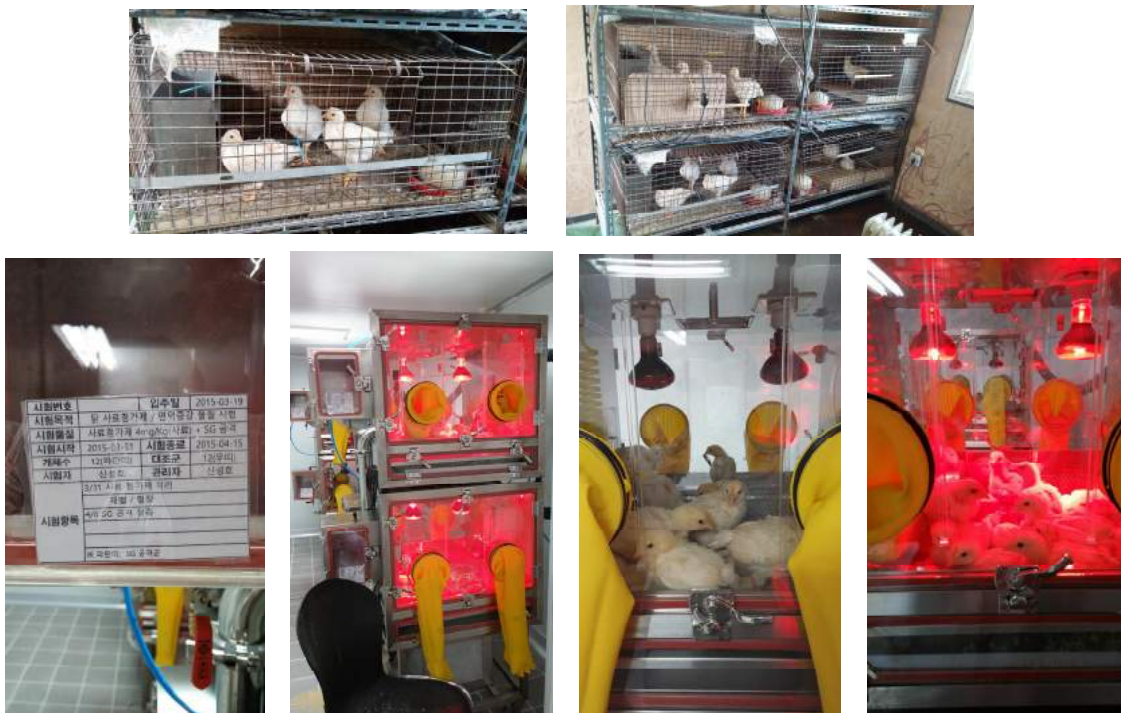


Figure 186. 초생추 실험을 위한 차폐시설 및 실험과정

Table 95. SG 공격성 회복 / LD50 결정 시험 결과

공격 doses/수 (cfu)	수	누적 폐사수							
		1DPI	2DPI	3DPI	4DPI	5DPI	6DPI	7DPI	8DPI
1.0E+07	10	0	0	0	0	0	9	10	10
1.0E+06	10	0	0	0	0	0	3	6	8
1.0E+05	10	0	0	0	0	0	3	4	5

(2) SE 사료첨가제 시험

(가) 시험계 : 시험계는 '추백리·가금티푸스 방역실시요령'에 따른 검사에서 살모넬라 음성종 계군으로 확인된 종계 유래 1일령 실용 갈색 산란계 병아리를 130수를 입수하였다.

(나) 공격접종균 : 국내 가금에서 분리된 S. Enteritidis 균주(BP-SE38).

(다) 시험물질 : 강황(생물전환)산물 함유 사료

(라) 사육환경 : 외기가 차단된 각 사육상자 내 13수씩 나누어 사육

(마) 사육상자 : HEPA-filter가 장착된 양압식 공기주입 스테인레스 차단 상자

120cm(L) * 80cm(W) * 80cm(H)

(바) 사료 및 물 : 사료는 축협사료-산란어린병아리 사료, 물은 상수도 이용.

(사) 검역 및 순화 : 입수한 병아리를 격리사육장치에서 시험개시까지 7일간 사육하며, 시험개시 직전에 사육수수의 10수 이상에 대하여 추백리진단액 및 Salmonella group D1 ELISA kit를 이용하여 살모넬라 감염여부를 확인 후 시험에 사용함.

(아) 사전 공격시험 및 접종량 결정 : 12일령

Table 96. SE 사전 공격시험 및 접종량 결정

구분	마리 수	음수 접종량(200ul)	피하 접종량(100ul)
1	3	1x10 ⁸ cfu/수	-
2	3	1x10 ⁸ cfu/수	1x10 ⁷ cfu/수
3	3	1x10 ⁹ cfu/수	-
4	3	1x10 ⁹ cfu/수	1x10 ⁷ cfu/수

- 6DPI 후 희생

- Body weight 측정, 희생 개체 비장 weight 측정

차. 닭에 대한 강황(생물전환)산물의 생체 효능 분석

(1) 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생주에서 생체반응 분석

(가) 생체지표의 변화 분석

증체율 변화 : 본 연구에서 3단계 서로 다른 농도의 강황(생물전환)산물을 급여한 닭에서 유의적인 증체율의 변화를 확인하지 못하였으나, 강황(생물전환)산물을 급여한 닭에서 증체율 평균값의 증가 경향을 보여주었다.

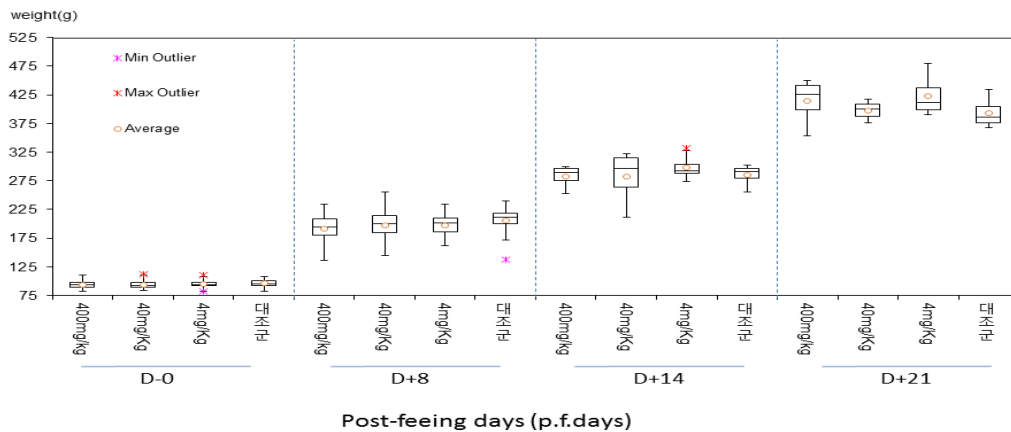


Figure 187. 강황(생물전환)산물을 급여한 닭에서 증체율 변화

(나) 감염면역지표의 변화 분석

① 실험방법

② 시료 채취

태어난 지 2일 이내의 초생주 100마리를 사육장 입고 후 10일 정도의 적응 기간을 준 후에 25마리씩 4개의 그룹으로 나누어 사료첨가제인 강황(생물전환)산물을 사료에 섞어서 먹였다. 사료첨가제를 첨가한 양에 따라서 0, 4, 40, 400 mg/kg 을 첨가해 먹인 그룹을 각각 control, low, medium 그리고 high 그룹이라고 한다. 접종 전 각 그룹별로 3마리씩 12마리를 희생 시켜서 얻은 샘플 (Day 0 control), 7일째 희생시킨 초생주 15마리 (Day 7 control), 그리고 14일째 희생시킨 비접종군 초생주 15마리 (Day 14 control)에서 각각 비장, 간, 혈액을 채취하여 분석에 사용하였다.

Table 97. 강황(생물전환)산물을 급여한 닭에서 생체 효능 분석을 위한 시료채취 일정

	Day 0	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 14	
비접종군	control	3	-	3	-	-	4
	low	3	-	4	-	-	4
	medium	3	-	4	-	-	3
	high	3	-	4	-	-	4

③ 간과 비장에서의 균수 측정

앞에서 채취한 간과 비장 샘플을 2 ml eppendorf safe lock tube에 조직의 무게를 재어서 넣고, 조직이 10% (w/v)가 되게 0.9% NaCl 용액을 넣었다. 그 다음 조직을 잘게 파쇄해야 하는데 서로 다른 두가지의 방법을 사용하였다. 첫번째는 7 mm stainless bead 1개를 넣고 Qiagen Tissue Lyser을 이용하여 25-30/s frequency로 6분간 파쇄하는 방법이고, 두번째는 0.5 mm zirconium oxide bead (Nextadvanced, ZROB05)를 약 300 ul를 넣고 Nextadvanced bullet blender를 이용하여 SPEED 8, TIME 3으로 파쇄했다. 조직이 완전히 파쇄가 되면 0.9% NaCl 용액을 이용하여 4-5번 10진 희석하여 적절한 균수를 맞추었다. 희석된 용액 중 100 ul를 취하여 XLD 또는 XLT4 agar 배지에 도말한 후 37°C에서 하루 밤 배양하여 자라나는 콜로니 수를 계수했다. 만약 균이 자라지 않았을 경우에는 원액 (조직 10% 용액)을 Rappaport-Vassiliadis(RV) enrichment broth (Oxoid, CM0669)에 1/100이 되게 접종하여 37°C, 220 rpm 에서 하루 밤 진탕 배양하여 자라는 균이 있는지를 확인했다. Agar 배지에서 생성된 콜로니 수를 희석 배수와 조직 무게를 이용하여 단위 조직 무게당 균수를 계산했다.

④ 간과 비장 조직에서의 RNA 추출 방법

RNA를 추출해야 할 간 또는 비장을 2 ml eppendorf safe lock tube에 담아 RNAlater 또는 Trizol(Life technology, 15596018)을 넣어서 보관했다. 만약 RNAlater에 조직이 담겨 있다면 RNAlater를 전부 제거하고 1 ml 정도의 trizol을 넣었다. 앞에서 조직에서의 균수를 측정할 때와 마찬가지로 방법으로 조직을 파쇄한 후, 100 ul의 조직-trizol 용액을 취하여 fresh한 trizol 900ul와 섞어서 10%가 되게 희석했다. 이렇게 준비된 파쇄된 조직은 RNA 추출 매뉴얼에 따라서 RNA를 추출했다. 위에서 준비된 파쇄된 조직이 들어있는 1 ml trizol에 chloroform 200 ul를 넣고 손으로 10회 정도 부드럽게 섞었다. 상온에 1분 정도 놓아 둔 후에 12000 g, 15 min, 4°C로 원심분리 했다. 원심 분리 후에 3개의 층으로 나뉘는데 가장 위쪽에 맑은 수층에 RNA가 존재한다. 이 RNA층은 대략 전체 부피의 절반정도

가 되기 때문에 600 ul 정도를 취했다(이때 다른 층에 있는 것을 건들지 않도록 조심한다). RNA가 포함된 수층을 새 tube에 담고 600 ul isopropanol을 넣어준 후 상온에 15분간 두었다(이때 보이는 침전물이 RNA이다). 그 다음 12000 g, 10 min, 4°C로 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고 75% EtOH 1 ml로 washing 한다. 7500 g, 5 min, 4°C로 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고 상온에서 10분정도 말려서 남아있는 EtOH를 제거했다. 30-100 ul 의 DEPC를 넣고 조심스럽게 섞어 주고 55°C 에서 10분간 가열한다. 다시한번 조심스럽게 섞어 준 후에 정량하여 3 ug의 total RNA를 cDNA를 만드는데 사용하고, 남은 RNA는 -70°C에 보관했다.

⑤ Total RNA에서 cDNA 만드는 방법과 Real-time PCR

50 pmol oligo(dT) 15 primer 1ul, each 10mM dNTP mixture 1ul, RNA 3ug을 넣고 D.W를 채워 10 ul로 만들었다. 65°C에서 5분간 가열한 후, 즉시 4°C에 넣는다. RNA mixture 10 ul에 5X reaction buffer 4 ul, RNase inhibitor 0.5 ul, Reverse transcriptase 0.5 ul를 넣고 D.W를 채워 20 ul로 만들었다. 42°C에서 30분, 70°C에서 15분간 반응한 후 4°C에 보관한다. D.W를 30 ul 첨가하여 총 부피가 50 ul가 되게 하여 보관했다. 이렇게 만들어진 cDNA를 가지고 Real-time PCR을 수행하여 유전자 발현 변화를 확인했다. 2X SYBR premix 10 ul, cDNA 0.5 ul, 1 pmol/ul gene specific primer 4 ul, D.W 5.5 ul를 넣어서 총 부피가 20 ul가 되게 했다. Triplicate로 sample을 넣어서 그 평균값을 가지고 분석한다. 분석방법은 Livak and Schmittgen (2001, Methods) 의 방법에 따랐다.

⑥ 초생추 간에서의 주요 cytokine 유전자 발현양 조사

Real-time PCR 기법을 이용하여 유전자 발현양의 변화를 알아보기 위하여 우선 선택된 유전자 들이 실험에 적합한 양을 발현하는지를 알아보았다. 선택된 유전자는 reference gene으로 house keeping 유전자중 하나인 GAPDH를 사용하였으며, TNF- α , iNOS, INF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4 그리고 INF- γ 를 선정하였다. 접종균과 비접종균에서 무작위로 간 샘플을 하나씩 골라서 유전자의 발현을 조사해 본 결과 선정된 유전자는 대부분 발현양이 양호하여 Real-time PCR 기법으로 발현양을 분석하는데 문제가 없었지만 INF- γ 는 발현양이 너무 적어서 이 방법으로 분석하기 힘들기 때문에 제외하였다.

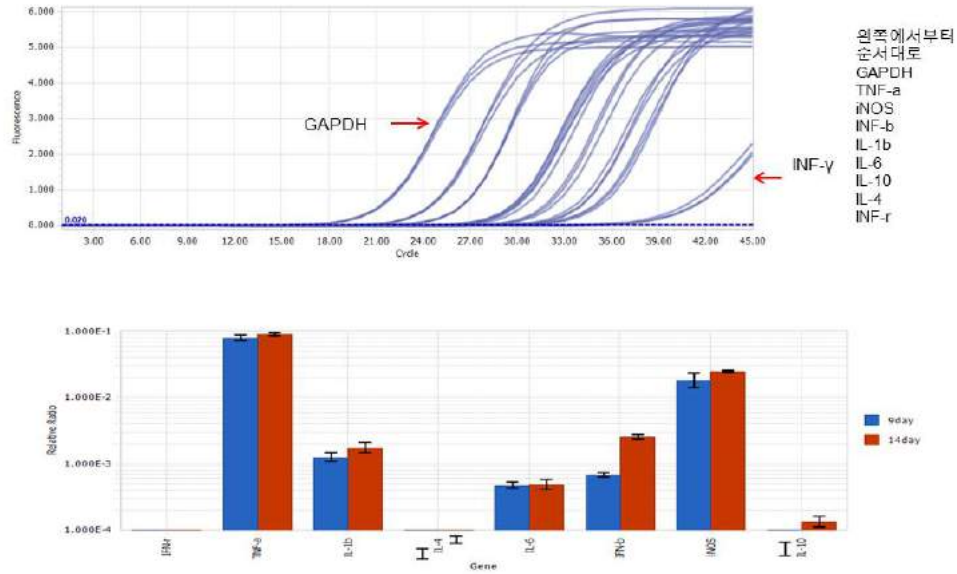


Figure 188. 초생추 간에서의 주요 cytokine 유전자 발현양 조사를 위한 RT-qPCR 조건 확립

⑦ 결과 및 분석

0, 7, 14 일째 비접종군에서의 강황(생물전환)산물 함유 사료 첨가제의 양에 따른 주요 cytokine 유전자의 발현양을 비교하였으나 개체간의 차이가 심하고, 날짜 간에도 일정한 발현 변화의 패턴을 확인 할 수가 없었다.

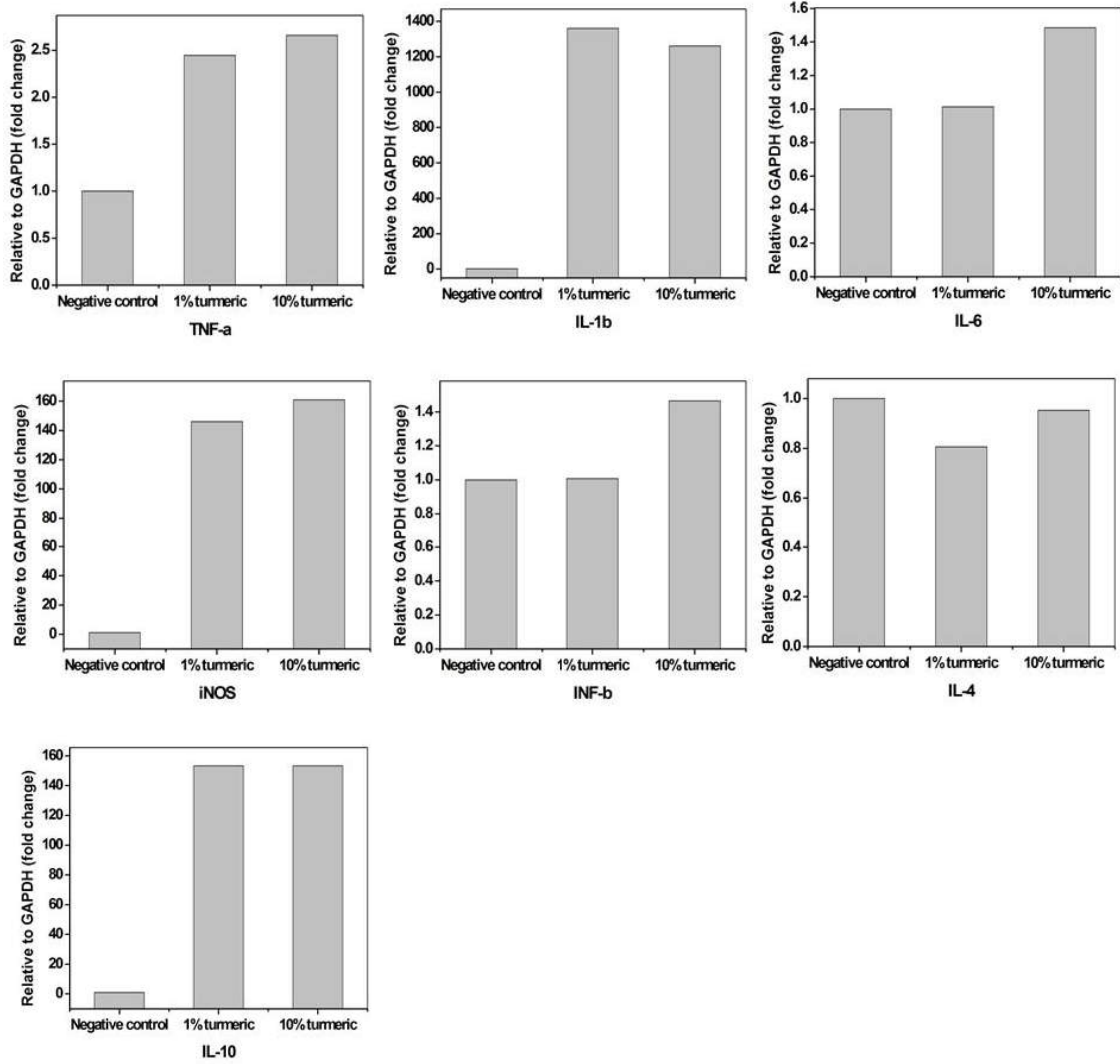


Figure 189. 강황(생물전환)산물 추출액이 초생추 cytokine 발현에 미치는 영향

(다) 임상병리학지표의 변화 분석

① 혈액학적 지표 분석

② 방법

- 채혈: 알코올 솜으로 소독한 이후, 3 cc 시린지를 이용하여 닭의 정맥에서 채혈하였다.
- 전혈구 검사: 전혈구 검사를 통한 분석을 위해서, EDTA tube에 혈액을 수집한다. 이 때 용혈을 방지하기 위해서 주사기 바늘을 통하지 않도록 한다. 정확한 결과 분석을 위해서 적절한 혈액량을 수집하는 것이 중요하며, 본 실험의 경우 해당 EDTA tube에 맞도록 최소 0.25 ml에서 최대 0.5 ml 정도의 혈액을 수집하였다.

- 혈액 도말 제작 및 평가 방법: 닭의 혈구는 쉽게 파열될 수 있기 때문에 커버 슬립을 이용한 방법(Cover-slip and slide method)이 가장 추천된다. 혈액 한 방울을 슬라이드 글래스에 위치시킨 뒤에, 커버 슬립을 혈액 위에 올린다. 이 때 손으로 압력을 주지 않도록 주의해야 한다. 커버 슬립의 무게로 인해서 혈액이 퍼지게 되며, 커버슬립을 슬라이드 글래스의 장축을 따라서 이동시킨다. 어떠한 사이즈의 커버슬립도 사용이 가능하나, 긴 커버슬립을 이용하는 것이 편리하고 섬세한 조작이 가능하기에, 본 실험의 경우 긴 커버슬립을 사용하였다. 혈액도말은 염색을 통한 시각화를 통해 이후에 관찰되었으며, 염색을 수행하기에 앞서서 혈액도말 표본은 충분히 건조된 이후에, 메탄올을 이용하여 충분한 시간 고정하였다. 본 실험의 경우 조류 혈액도말 염색에 루틴하게 사용되는 "rapid stain"의 하나인 Diff Quik을 이용하여 염색하였다. 해당 염색법은 핵산과 호염구의 세포질 내의 과립에서는 호염성의 색을 나타내게 하고, 적혈구의 헤모글로빈을 포함하는 세포질, 이호성백혈구(heterophil)와 호산구의 세포질내 과립에서는 호산성의 색을 나타내게 한다. 염색 용액은 각각 Coplin jar에 담아 이용하였으며, Solution I에 15회 정도 염색한 이후에, Solution II에 15~17회 정도 염색하였다. 염색 이후에 혈액 도말을 건조 하여, 침습기름(immersion oil)을 점적한 뒤, 커버슬립을 덮어 광학 현미경으로 관찰하였다.

- mPCV 측정 방법: PCV는 전혈에서 적혈구가 차지하는 용적의 비율을 의미한다. EDTA tube에 수집한 혈액 일부를 미세관(microcapillary tube)에 옮긴 뒤, 표지된 하단 부위를 점토에 찍어서 막는다. 막힌 하단 부위가 바깥쪽으로 위치하도록 PCV용 원심분리기에 위치시킨다. 1000G에서 5분동안 원심분리 한 뒤, reader를 이용하여 mPCV를 측정했다.

- 전혈구 검사 기계 및 이용 방법: 전혈구 검사에 앞서, EDTA에 담긴 혈액을 충분히 흔들어 섞도록 한다. 이후에 기계가 혈액을 흡인할 수 있도록, 흡인부에 혈액을 위치 시킨 뒤에, 검사 시작 버튼을 눌러 검사를 진행했다.

③ 혈청 화학 검사

④ 시료 샘플링 방법

혈청 화학 검사를 통한 분석을 위해서, SST tube에 혈액을 수집하였다. 이 때 용혈을 방지하기 위해서 주사기 바늘을 통하지 않도록 하였다. 이후에 2~3분 정도 원심 분리한다. 혈청을 피펫을 이용하여, 플레인 튜브에 따로 담아 측정된 뒤에 냉동 보관하였다.

⑤ 혈청 화학 검사 수행 방법

기계를 이용하여, 총 13가지 항목에 대한 검사를 수행하였다. 검사를 진행한 항목은 ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Creatinine, Ca, Phosphorous, Glucose, Total Protein, Albumin, Total cholesterol, Triglyceride 와 같다.

⑥ 전해질 검사

- 시료 샘플링 방법: 전해질 검사를 통한 분석을 위해서, SST tube에 혈액을 수집하였다. 이 때 용혈을 방지하기 위해서 주사기 바늘을 통하지 않도록 하였다. 이후에 2~3분 정도 원심 분리한다. 혈청을 피펫을 이용하여, 플레인 튜브에 따로 담아 측정된 뒤에 냉동 보관하였다.

- 전해질 검사 수행 방법: 기계를 이용하여, 전해질 검사를 수행하였다.

⑦ 결과 및 분석

⑧ 전혈구 검사 분석

- mPCV 측정치의 분석: 적혈구에 대한 평가를 위해서 PCV에 대한 측정치는 중요한 의미를 갖는다. 특히 조류에서는 PCV의 측정치가 적혈구의 상태에 대한 평가에 가장 중요한 지표로 활용된다. 일반적으로 가금류에서의 PCV의 참고범위는 35~55 %로, 35% 이하의 측정치는 빈혈을, 55% 이상의 측정치는 탈수 소견과의 연관성이 고려된다. 다만 본 실험군의 경우, D+0의 총 평균이 25.9(%)임을 고려할 때, 실험 개체군의 기준치(baseline)이 참고 범위 이하에 존재하는 것으로 사료되므로, 빈혈을 지시할 가능성은 낮을 것으로 고려된다. 기준치와 기존의 참고 범위를 종합하여 고려할 때, 임상적으로 유의한 소견은 확인되지 않는 것으로 사료된다.

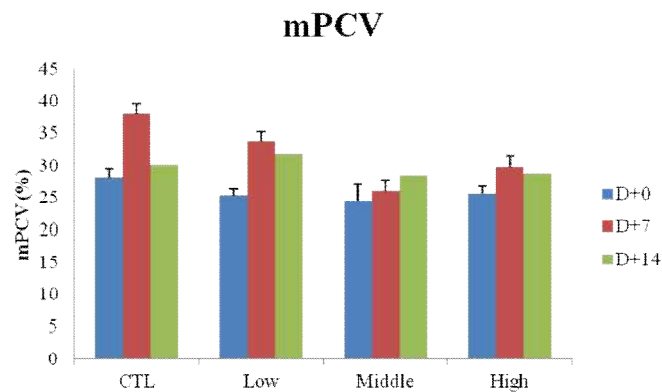
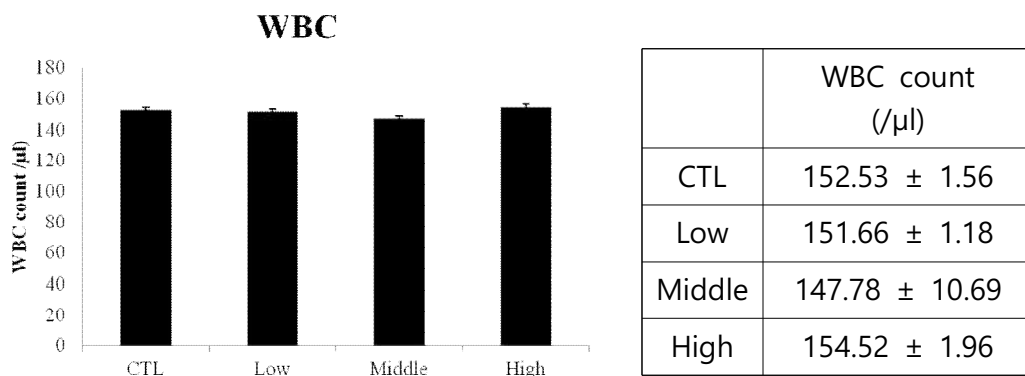


Figure 190. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생주에서 mPCV 측정치의 분석 결과

- WBC 수치 및 감별 계수 결과의 분석 : WBC 측정은 D+14 실험군에 대해서 이루어졌다. CTL, Low, Middle, High 집단 간 비교에 있어서, 평균 및 분산을 고려할 때 유의적인 차이는 확인되지 않았다. 도말 표본을 통한 WBC 감별계수 결과를 측정된 WBC 수치 값과 함께 비교한 결과이다. 문헌상의 참고범위를 기준으로 해석한 결과, 모든 실험군에서 Heterophilia 및 Lymphopenia가 확인되었다. 이는 일반적으로 염증 내지는 스트레스에 대한 반응성 증가 등의 생리적 반응으로 인해서 확인될 수 있는 소견이다. 다만 도말 표본의 세포학적 검사상 염증과 관련된 소견은 확인되지 않았으며, 모든 실험군에서 동일 소견이 확인되는 점을 고려할 때 임상적 의의는 낮을 것으로 사료된다.



	Heterophil (/μl)	Lymphocyte (/μl)	Monocyte (/μl)	Eosinophil (/μl)
Reference interval	30 - 60	70 - 175	1.5 - 20	0 - 10
CTL	94.39 ± 9.43	50.38 ± 9.38	5.16 ± 1.73	0.30 ± 0.68
Low	103.50 ± 9.32	42.49 ± 6.87	5.16 ± 1.73	0.61 ± 0.83
Middle	108.96 ± 4.60	37.94 ± 4.80	4.55 ± 1.52	0.30 ± 0.68
High	100.92 ± 4.60	45.91 ± 4.29	4.55 ± 1.07	0.38 ± 0.68

Figure 191. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 WBC 수치 및 감별 계수 결과

⑨ 혈청화학 검사 분석

- 간 효소 수치의 분석: SAS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 실시하였다. Day를 하나의 변수로, Treat(강황 농도에 따른 CTL, Low, Middle, High)을 또 하나의 변수로 놓고 동일한 피실험체에 실험을 했다고 가정했다. Treat만을 유일한 처리라 했을 때, D+7에서 유의적인 GGT 변화가 관찰되었다. 이는 분산분석 모형이 타당성을 띄고 있을 때 평균의 차이가 드러난 것으로 처분별 효과가 유의미하다고 볼 수 있었다. 다만 임상병리학적 소견을 고려했을 때, GGT는 간 효소 수치로, 몇 배 이상으로 fold change가 일어나지 않는 경우, 임상적 의의를 갖는다고 보기 어렵다. 따라서 통계적 및 임상병리학적 분석 결과 해당 Treat이 주는 간 효소 수치상의 임상적인 영향은 확인되지 않는 것으로 판단된다.

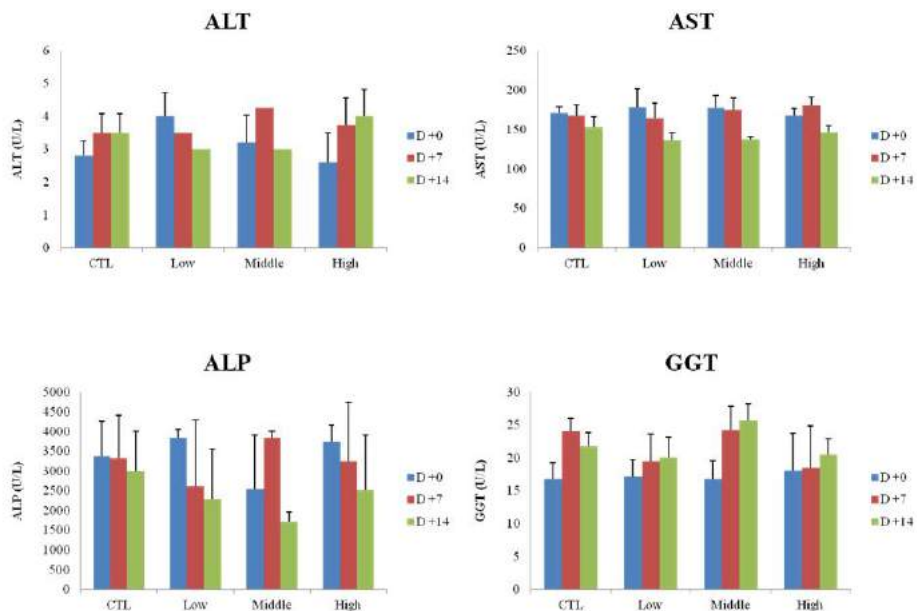


Figure 192. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 간 효소 수치의 분석

- 신장 관련 측정치의 분석: SAS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 실시하였다. Day를 하나의 변수로, Treat(강황 농도에 따른 CTL, Low, Middle, High)을 또 하나의 변수로 놓고 동일한 피실험체에 실험을 했다고 가정했다. Treat만을 유일한 처리라 했을 때, 유의적인 변화는 확인되지 않았다. 따라서 Treat가 주는 신장 관련 측정치에 대한 임상적인 영향은 확인되지 않는 것으로 판단된다.

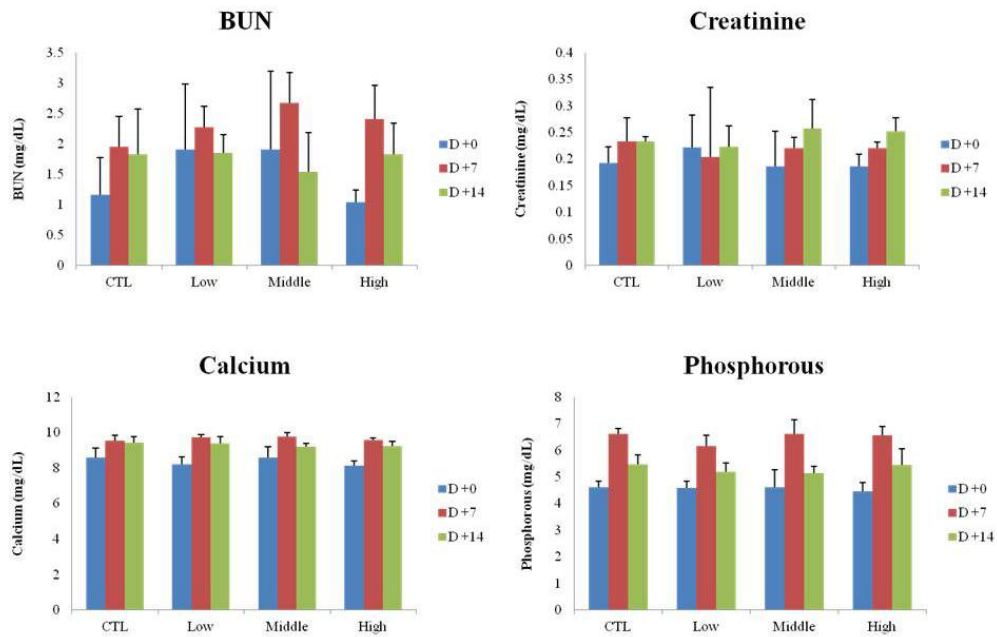


Figure 193. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 신장 관련 측정치의 분석

- 단백질 농도 측정치의 분석: SAS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 실시하였다. Day를 하나의 변수로, Treat(강황 농도에 따른 CTL, Low, Middle, High)을 또 하나의 변수로 놓고 동일한 피실험체에 실험을 했다고 가정했다. Treat만을 유일한 처리라 했을 때, D+7에서 TREAT (CTL/LOW/MIDDLE/HIGH)에 따른 Total Protein F값의 확률이 0.0481로 작으므로 유의수준 0.05보다 작으므로 TREAT 별 평균치의 차이가 있다는 것을 알 수 있다. Middle에서 Total Protein에 대해서 분산분석 상에서 유의적인 감소가 있는 것으로 판단되었다. D+7 그룹 내에서 유의적인 차이를 보이지만, 다른 그룹을 종합적으로 고려할 때, 임상적으로 유의적인 수치적 변화는 아닌 것으로 사료된다.

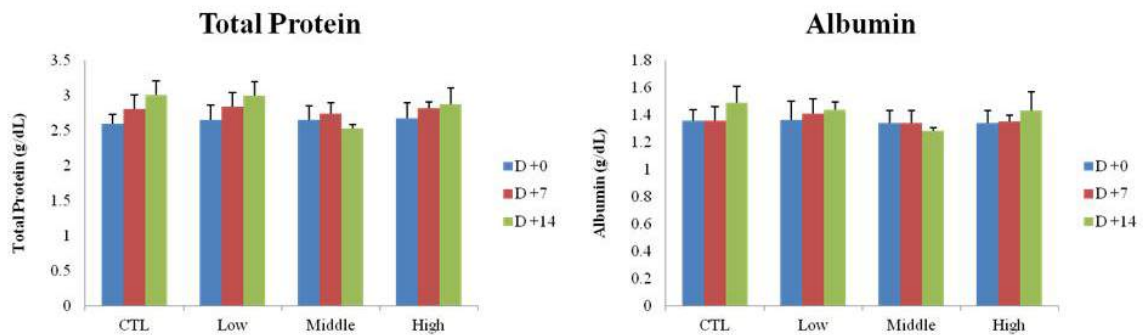


Figure 194. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 단백질 농도 측정치의 분석

- 대사 및 소화기계 관련 측정치의 분석: SAS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 실시하였다. Day를 하나의 변수로, Treat(강황 농도에 따른 CTL, Low, Middle, High)을 또 하나의 변수로 놓고 동일한 피실험체에 실험을 했다고 가정했다. Treat만을 유일한 처리라 했을 때, D+0 TREAT (CTL/LOW/MIDDLE/HIGH)에 따른 TG F값의 확률이 0.0002로 작으므로 유의수준 0.05보다 작으므로 TREAT 별 평균치의 차이가 있다는 것을 알 수 있다. 다만 Triglyceride 수치는 변동이 심한 편이며 또한 D+0에 측정한 측정치로, 측정치 자체에서 발생할 수 있는 범위 내의 변동으로 생각되어, TREAT의 임상적인 영향과는 무관한 것으로 평가된다.

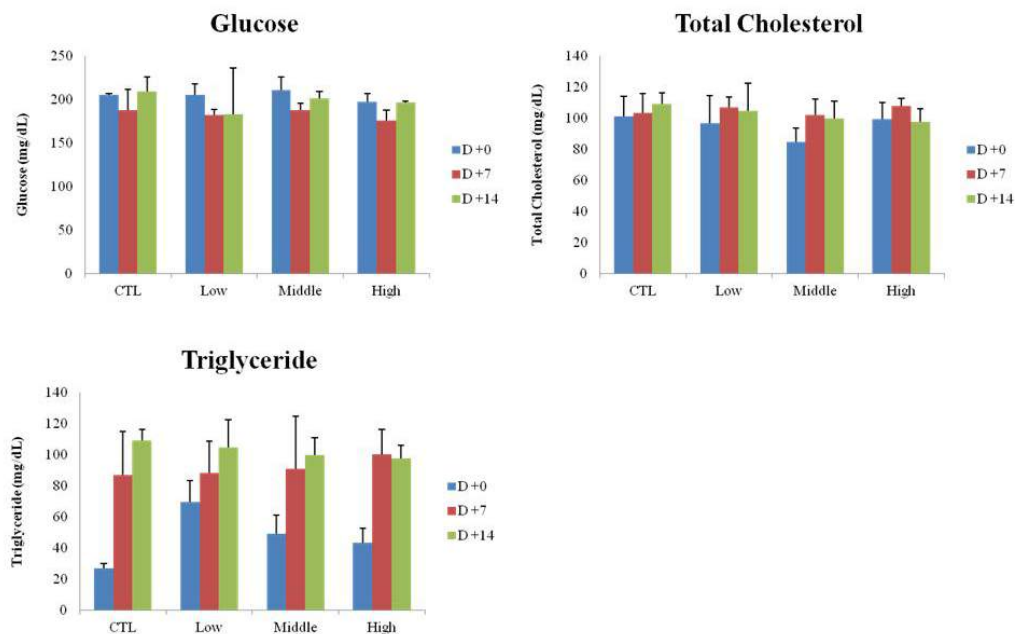


Figure 195. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 대사 및 소화기계 관련 측정치의 분석

- 전해질 검사 분석: SAS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 실시하였다. Day를 하나의 변수로, Treat(강황 농도에 따른 CTL, Low, Middle, High)을 또 하나의 변수로 놓고 동일한 피실험체에 실험을 했다고 가정했다. Treat만을 유일한 처리라 했을 때, D+0에서 TREAT (CTL/LOW/MIDDLE/HIGH)에 따른 K F값의 확률이 0.0170로 작으므로 유의수준 0.05보다 작으므로 TREAT 별 평균치의 차이가 있다는 것을 알 수 있다. 다만 D+0에 측정된 측정치로, TREAT의 임상적인 영향과는 무관한 artifact로 평가된다.

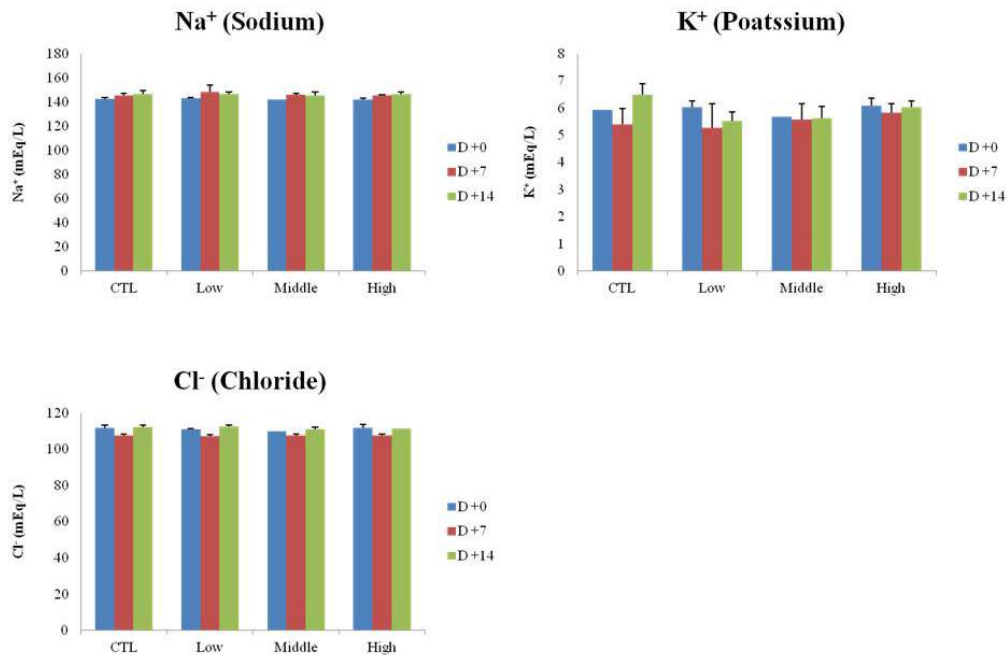


Figure 196. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 전해질 검사 분석

⑩ 조직병리학적 지표 분석

⑪ 방법

D+0, D+7, D+14에 각 개체를 희생하여, 간 비장을 부검하여, 일반적인 방법으로 조직병리 검사를 수행하였다.

⑫ 조직병리학적 지표 분석 결과

조직사진의 분석 결과를 아래 표로 요약하였다. 다음은 비접종군의 간, 비장에서의 조직병리학 소견이다(조직 사진 결과는 별첨1에 제시). 전체적으로, 강황(생물전환)산물의 급여가 조직병리학적 변화를 유도하지 않았다.

Table 98. 비접종 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생주의 간, 비장에서의 조직병리학 소견 요약

			Liver	Spleen
CTL	3	D+0	Normal with minimal EMH	Normal
		D+0	Normal	Normal
		D+0	Normal	Normal
Low	3	D+0	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+0	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+0	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
Middle	3	D+0	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+0	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+0	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
High	3	D+0	EMH	Normal
		D+0	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+0	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
CTL	4	D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis EMH Hepatic lipidosis	Normal
		D+7	Normal	Normal
			Multifocallymphocytichepatitis EMH	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
Low	4	D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
Middle	4	D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	Minimal multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
High	4	D+7	Normal	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis Heterophilic infiltration	Normal
		D+7	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+7	EMH	Normal
CTL	4	D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+14	Multifocallymphocytichepatitis EMH	Normal
		D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
Low	4	D+14	EMH	Normal
		D+14	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
Middle	3	D+14	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+14	Normal	Normal
		D+14	EMH	Normal
High	4	D+14	Multifocal lymphocytic hepatitis	Normal
		D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal
		D+14	Normal	Normal
		D+14	Multi-focal lymphocytic hepatitis EMH	Normal

카. 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 공격접종에 대한 방어효능 분석

(1) 가금 특이 살모넬라균 SG의 공격접종에 대한 방어 효능

(가) 증체율 변화 및 폐사율 분석

① 실험방법

② 시험군의 구성

Table 99. 가금 특이 살모넬라균 SG의 공격접종에 대한 방어효능 분석을 위한 개체수

구분		개체 수		비고
		공격접종	비 공격접종	
사료첨가제 투여	고농도 (400mg/Kg)	13	11	
	중간농도 (40mg/Kg)	13	11(10)	4/7 1수 폐사
	저농도 (4mg/Kg)	13	11	
사료첨가제 비투여		13	11	

③ 시험물질 투여 및 공격 접종 방법 및 시기

④ 시험물질 및 투여시기 : 시험물질은 사료에 설정된 용량으로 각각의 시험물질을 혼합하여 시험기간 내내 투여하였다. 공격접종은 시험물질 투여 1주일 후 인 2주령에 음수로 공격접종하고 2주간 관찰하였다.

⑤ 공격접종 : 모든 동물에 대해서 시험물질을 사료에 첨가하여 투여한지 6 일 후(2주령)에 경구로 1×10^6 cfu를 공격 접종 한다. 단 공격 접종 시 닭의 위산에서 SG가 불활화 되는 것을 막기 위해 OIE에서 제시된 방법대로 공격 접종액 1ml당 300mg의 칼 테일 파우더(40% calcium carbonate, 43% kaolin, 17% magnesium trisilicate)와 SG 1×10^6 cfu가 혼합된 배양액을 제조하여 사용하였으나, 공격접종 후 공격 균주의 cfu 측정 결과 닭 1수당 2×10^6 cfu씩 접종된 것으로 확인되었다.

⑥ 결과 및 분석

누적 폐사율 : 강황(생물전환)산물 급여군과 비급여군 간에 폐사율에서 의미있는 차이가 없었으나, 소재 급여군의 경우, 공격접종 후 7일째 다수가 사망한 반면, 대조군의 경우 6일째 사망함을 관찰하였다. 이는 급여한 소재에 의한 병원성의 delay로 판단된다.

Table 100. 가금 특이 살모넬라균 SG의 공격접종 후 누적 폐사율

사료 첨가제 투여	개체수	누적 폐사 수									
		6DPI	7DPI	8DPI	9DPI	10DPI	11DPI	12DPI	13DPI	14DPI	
Control	13	6	7	9	11			13	13	13	
Low (4 mg/kg)	13	2	6	10	11			13	13	13	
Medium (40 mg/kg)	13	2	5	11	13			13	13	13	
High (400 mg/kg)	13	3	5	11	12			12	12	12	

(나) 감염면역지표의 변화 분석

① 실험방법

② 시료 채취 : 태어난 지 2일 이내의 초생추 100마리를 사육장 입고 후 10일 정도의 적응 기간을 준 후에 25마리씩 4개의 그룹으로 나누어 사료첨가제인 강황(생물전환)산물을 사료에 섞어서 먹인다. 사료첨가제를 첨가한 양에 따라서 0, 4, 40, 400 mg/kg 을 첨가해 먹인 그룹을 각각 control, low, medium 그리고 high 그룹이라고 한다. 각기 다른 양의 사료 첨가제를 7일간 먹인 후, SG227 (가금티푸스 강독균주) 10×10^6 개를 경구 투여하여 공격 접종한다. 접종 전 각 그룹별로 3마리 씩 12마리를 희생 시켜서 얻은 샘플 (Day 0 control), 공격 접종 후 6일째 죽은 초생추 11마리 (Day 6 infection), 7일째 죽은 초생추 10마리 (Day 7 infection), 7일째 희생시킨 비접종군 초생추 15마리 (Day 7 control), 8일째 죽은 초생추 4마리 (Day 8 infection), 9일째 죽은 초생추 3마리 (Day 9 infection), 그리고 14일째 희생시킨 비접종군 초생추 15마리 (Day 14 control) 에서 각각 비장, 간, 혈액을 채취하여 분석에 사용하였다.

③ 간과 비장에서의 균수 측정 : 앞에서 채취한 간과 비장 샘플을 2 ml eppendorf safe lock tube에 조직의 무게를 재어서 넣고, 조직이 10% (w/v)가 되게 0.9% NaCl 용액을

넣는다. 그 다음 조직을 잘게 파쇄해야 하는데 서로 다른 두가지의 방법을 사용하였다. 첫번째는 7 mm stainless bead 1개를 넣고 Qiagen Tissue Lyser을 이용하여 25-30/s frequency로 6분간 파쇄하는 방법이고, 두번째는 0.5 mm zirconium oxide bead (Nextadvanced, ZROB05)를 약 300 ul를 넣고 Nextadvanced bullet blender를 이용하여 SPEED 8, TIME 3으로 파쇄하는 것이다. 조직이 완전히 파쇄가 되면 0.9% NaCl 용액을 이용하여 4-5번 10진 희석하여 적절한 균수를 맞추어 준다. 희석된 용액 중 100 ul를 취하여 XLD 또는 XLT4 agar 배지에 도말한 후 37°C에서 하루 밤 배양하여 자라나는 콜로니 수를 세어본다. 만약 균이 자라지 않았을 경우에는 원액 (조직 10% 용액)을 RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) ENRICHMENT BROTH (Oxoid, CM0669)에 1/100이 되게 접종하여 37°C, 220 rpm 에서 하루 밤 진탕 배양하여 자라는 균이 있는지를 확인한다. Agar 배지에서 생성된 콜로니 수를 희석 배수와 조직 무게를 이용하여 단위 조직 무게당 균수를 계산했다.

④ 간과 비장 조직에서의 RNA 추출 방법: RNA를 추출해야 할 간 또는 비장을 2 ml eppendorf safe lock tube에 담아 RNAlater 또는 Trizol(Life technology, 15596018)을 넣어서 보관한다. 만약 RNAlater에 조직이 담겨 있다면 RNAlater를 전부 제거하고 1 ml 정도의 trizol을 넣는다. 앞에서 조직에서의 균수를 측정할때와 마찬가지로의 방법으로 조직을 파쇄한 후, 100 ul의 조직-trizol 용액을 취하여 fresh한 trizol 900ul와 섞어서 10%가 되게 희석한다. 이렇게 준비된 파쇄된 조직은 RNA 추출 매뉴얼에 따라서 RNA를 추출한다. 위에서 준비된 파쇄된 조직이 들어있는 1 ml trizol에 chloroform 200 ul를 넣고 손으로 10회 정도 부드럽게 섞어 준다. 상온에 1분 정도 놓아 둔 후에 12000 g, 15 min, 4°C로 원심분리 한다. 원심 분리 후에 3개의 층으로 나뉘는데 가장 위쪽에 맑은 수층에 RNA가 존재한다. 이 RNA층은 대략 전체 부피의 절반정도가 되기 때문에 600 ul 정도를 취한다 (이때 다른 층에 있는 것을 건들지 않도록 조심한다). RNA가 포함된 수층을 새 tube에 담고 600 ul isopropanol을 넣어준 후 상온에 15분간 둔다 (이때 보이는 침전물이 RNA이다). 그 다음 12000 g, 10 min, 4°C로 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고 75% EtOH 1 ml로 washing 한다. 7500 g, 5 min, 4°C로 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고 상온에서 10분정도 말려서 남아있는 EtOH를 제거한다. 30-100 ul 의 DEPC를 넣고 조심스럽게 섞어 주고 55°C 에서 10분간 가열한다. 다시한번 조심스럽게 섞어 준 후에 정량하여 3 ug의 total RNA를 cDNA를 만드는데 사용하고, 남은 RNA는 -70°C에 보관한다.

⑤ Total RNA에서 cDNA 만드는 방법과 Real-time PCR: 50 pmol oligo(dT) 15 primer 1ul, each 10mM dNTP mixture 1ul, RNA 3ug을 넣고 D.W를 채워 10 ul로 만든다. 6

5°C에서 5분간 가열한 후, 즉시 4°C에 넣는다. RNA mixture 10 ul에 5X reaction buffer 4 ul, RNase inhibitor 0.5 ul, Reverse transcriptase 0.5 ul를 넣고 D.W를 채워 20 ul로 만든다. 42°C에서 30분, 70°C에서 15분간 반응한 후 4°C에 보관한다. D.W를 30 ul 첨가하여 총 부피가 50 ul가 되게 하여 보관한다. 이렇게 만들어진 cDNA를 가지고 Real-time PCR을 수행하여 유전자 발현 변화를 알아본다. 2X SYBR premix 10 ul, cDNA 0.5 ul, 1 pmol/ul gene specific primer 4 ul, D.W 5.5 ul를 넣어서 총 부피가 20 ul가 되게 한다. Triplicate로 sample을 넣어서 그 평균값을 가지고 분석한다. 분석방법은 Livak and Schmittgen (2001, Methods) 의 방법에 따른다.

⑥ 초생추 간에서의 주요 cytokine 유전자 발현양 조사: Real-time PCR 기법을 이용하여 유전자 발현양의 변화를 알아보기 위하여 우선 선택된 유전자 들이 실험에 적합한 양을 발현하는지를 알아보았다. 선택된 유전자는 reference gene으로 house keeping 유전자중 하나인 GAPDH를 사용하였으며, TNF- α , iNOS, INF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4 그리고 INF- γ 를 선정하였다.

⑦ 결과 및 분석 : 공격군에서는 6, 7일째에 폐사가 많이 일어나 모든 샘플을 확보하지를 못하였다. 그래서 그룹들 간에 개체수의 차이가 있으며, 유전자의 발현 또한 개체들 간의 차이도 심하여, 비교하기가 힘들었고, 특이한 패턴을 관찰하지 못하였다.

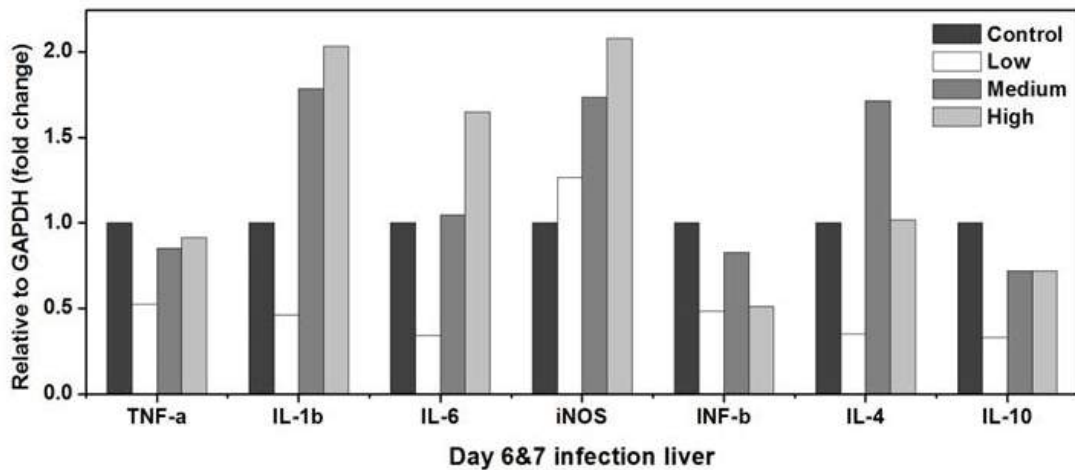


Figure 197. 강황(생물전환)산물 급여한 닭에서 SG 공격접종 후 면역지표의 발현 변화

(다) 임상병리학지표의 변화 분석

- ① 혈액학적 지표 분석 : 공격접종군의 혈액이 D+14 샘플 밖에 없고, 세균이 확인되지 않은 것으로 유의미하지 않다고 사료되어, 분석을 생략하였다.
- ② 조직병리학적 지표 분석 : 강황(생물전환)산물 급여군과 대조군 모두 유사한 치사율을 보였으며, 치사개체 상호간 별 다른 조직병리학 차이를 확인할 수 없었다(조직 결과는 별첨 1에 제시).

(2) 강황(생물전환)산물 함유 사료 급여 초생추에서 인수공통 살모넬라균 SE의 공격접종에 대한 방어 효능

(가) 증체율 변화 및 폐사율 분석

① 실험방법

② 시험군의 구성

Table 101. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 인수공통 살모넬라균 SE의 공격접종에 대한 방어효능 분석을 위한 개체수 요약

구분		개체 수	SE 공격 doses
사료첨가제 투여	저농도 (4mg/Kg)	30	1.0x10 ⁹ cfu/수 (음수접종)
	중간농도 (40mg/Kg)	30	
	고농도 (400mg/Kg)	30	
사료첨가제 비투여		30	

③ 시험물질 투여 및 공격 접종 방법 및 시기

- 시험물질 및 투여시기 : 시험물질은 사료에 설정된 용량으로 각각의 시험물질을 혼합하여 시험기간 내내 투여하였다. 공격접종은 시험물질 투여 10일 후 인 2주 3일령에 음수로 공격접종하고 3주간 관찰하였다.

- 공격접종 : 모든 동물에 대해서 시험물질을 사료에 첨가하여 투여한지 10 일 후(2주 3일령)에 경구로 1 × 10⁹cfu를 공격 접종 한다. 단 공격 접종 시 닭의 위산에서 SG가 불활화 되는 것을 막기 위해 OIE에서 제시된 방법대로 공격 접종액 1ml당 300mg의 칼테일 파우더(40% calcium carbonate, 43% kaolin, 17% magnesium trisilicate)와 SE 1 × 10⁹ cfu가 혼합된 배양액을 제조하여 사용하였으나, 공격접종 후 공격 균주의 cfu 측정 결과 닭 1수당 1 × 10⁹ cfu씩 접종된 것으로 확인되었다.

④ 시료 채취

Table 102. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 인수공통 살모넬라균 SE의 공격접종에 대한 방어효능 분석을 위한 시료채취 일정

날짜	시료	
	희생	혈액/혈청
0 DPI	5수	5수
3 DPI	5수	5수
7 DPI	5수	5수
14 DPI	5수	5수
21 DPI	5수	5수
28 DPI	5수	5수

⑤ 결과 및 분석

강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 인수공통 살모넬라균 SE의 공격접종 후, 대조군과 비교하여 유의성있는 증체율 변화를 확인하지 못하였으나, 증체율 평균에서 다소 증가하는 경향을 소재 급여군에서 관찰하였다.

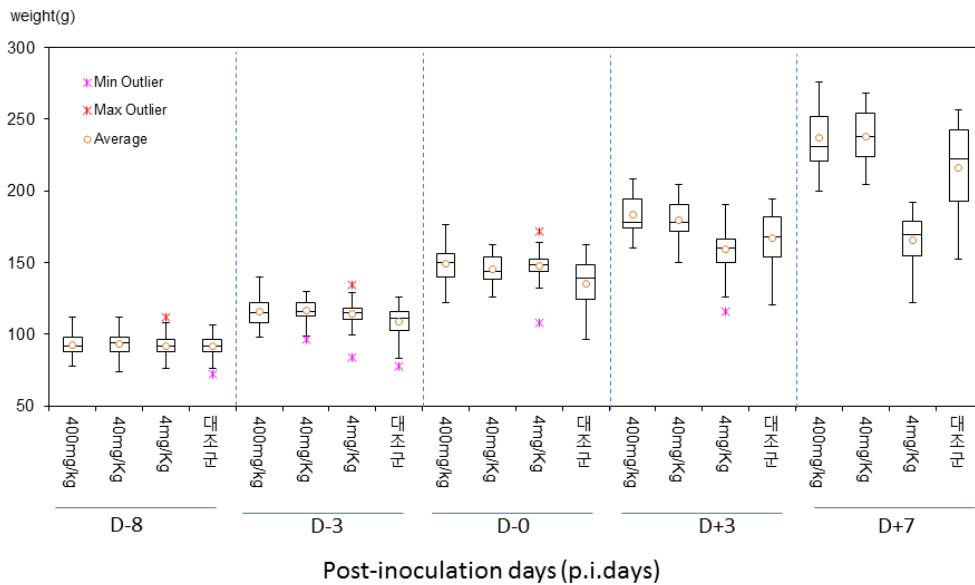


Figure 198. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 인수공통 살모넬라균 SE의 공격접종 후 증체율 변화

(나) 감염면역지표의 변화 분석

① 실험방법

- 시료 채취 : 태어난 지 2일 이내의 초생추 120마리를 사육장에 입고하여 10일정도 사육환경에 적응하도록 한 뒤에 30마리씩 4개의 군으로 나누고 강황(생물전환)산물을 3가지 농도 (0, 4, 40, 400 mg/kg) 로 사료와 섞어 7주일간 먹인 후 *S. Enteritidis* 1×10^9 개를 경구 투여하여 접종한다. 균을 접종하지 않고 사료만 7일간 먹인군을 0일차라고 정의하고, 100마리에 대하여 균을 접종한다. 각각 3개의 실험군별로 5 마리씩 총 15마리, 대조군 5마리로 20마리를 0일차 시료로 하고, 추후 같은 방법으로 20마리씩 시간의 경과에 따라서 초생추를 희생시켜 혈액, 간, 비장, 그리고 맹장변을 채취한다. 초생추의 무게와 비장의 무게를 비교하여 감염에 따른 비장 증대를 관찰하고, 간과 맹장변에서의 균수를 조사한다. 또한 간과 비장에서의 주요 cytokine 유전자 발현양을 조사하고, 혈액에서의 면역 지표를 조사하였다.

- 간 조직에서의 균수 관찰 : 간 조직을 조금 잘라 채취하여 무게를 재어 담은 후, 조직이 10% (w/v)가 되게 0.9% NaCl 용액을 넣고 조직을 잘게 부수어 준다. 조직에 균이 많지 않을 것으로 예상되기 때문에 1회만 10진 희석하여 희석된 용액중 100 ul를 취하여 XLT-4 agar 배지에 도말 하여 자라난 균 수를 관찰한다. 또한 실험 방법상 적은수의 균이 존재할 경우 탐지해 내지 못할 가능성이 있기에 10% 조직을 1/100로 RV broth에 접종하여 자라나는 균이 있는지를 살표본다.

- 맹장분변에서의 균수 관찰 : 초생추의 맹장을 잘라내어 그 속에 있는 분변을 채취한다. 분변의 무게를 재어서 그 무게의 9배에 해당하는 0.9% NaCl 용액을 넣어 10% (w/v)가 되게 만든다. 그 후 1회 10진 희석하여 그 중 100 ul를 취하여 XLT-4 agar 배지에 penicillin-streptomycin이 첨가된 배지에 도말하여 자라나는 콜로니를 관찰한다. 콜로니가 생성되지 않는 시료에 대해서는 RV broth에 penicillin-streptomycin을 첨가하여 10% 분변을 1/100로 접종하여 자라는 균을 관찰한다.

② 결과 및 분석

- 간에서 SE 양성 개체수 및 보유 균수: 0일차 간 시료에서는 어떠한 곳에서도 균이 자라는 것을 확인하지 못하였고, RV broth에서 증균배양을 하였을 경우에도 마찬가지로 자라나는 균이 없었다. 3일차 간 시료의 경우, cfu를 실시하였을 때 어떠한 곳에서도 콜로니가 생성되는 것을 관찰할 수가 없었다. 하지만 RV broth에 접종하여 증균 배양한 결과 강황(생물전환)산물을 고농도로 처리한 균을 제외한 나머지 3개의 군에서 *S. Enteritidis*가 포

함되어 있음을 확인하였다. 7일차 공격균 시료의 경우, cfu를 실시한 결과 3일차에 비해 많은 개체의 간에서 *S. Enteritidis*가 발견되었다. 대조군과 저농도 군에서 4마리씩, 중간과 고농도 군에서 각 2마리에서 발견되었으며 그 수는 단위 무게당 100개에서 1000개 정도였다.

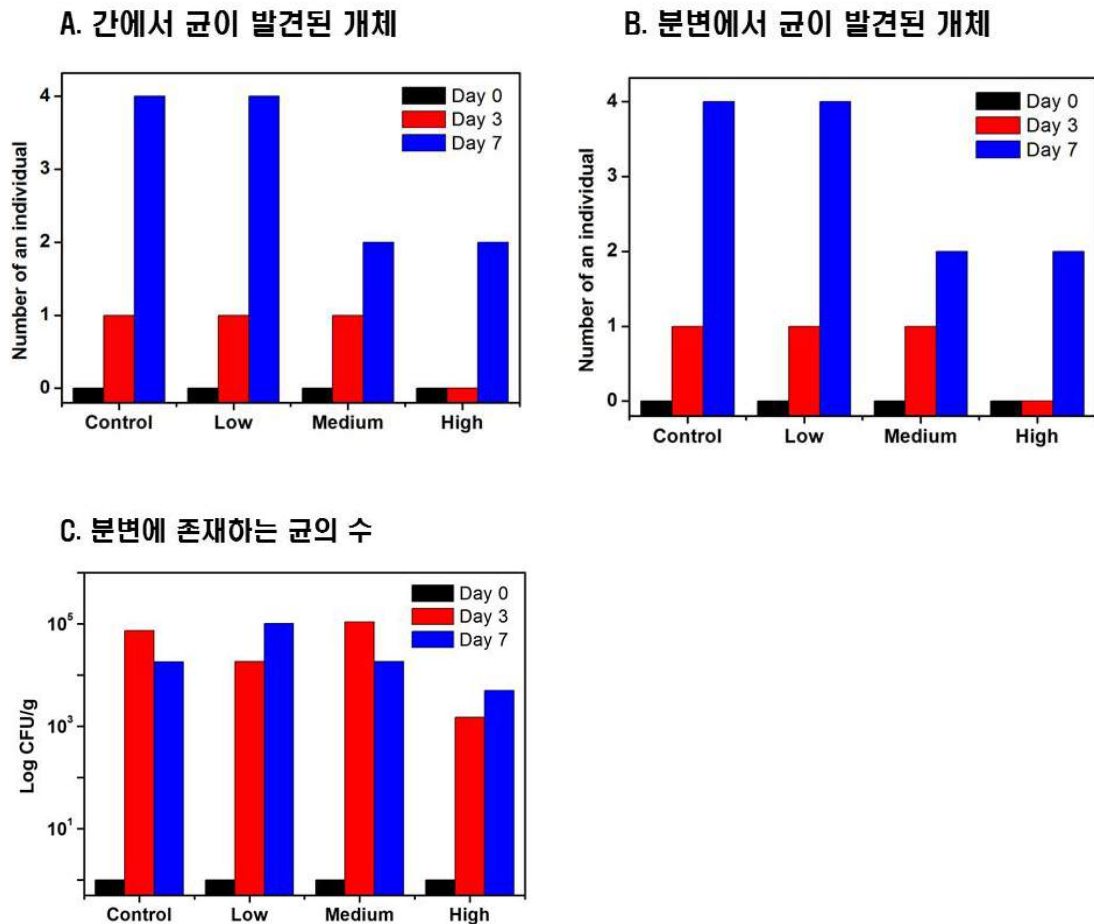


Figure 199. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염에 대한 양성 개체수 및 분변 균수

- 맹장분변에서 SE 양성 개체수 및 보유 균수 : 실험에 사용한 *S. Enteritidis*는 penicillin 과 streptomycin에 대한 저항성이 있기 때문에 장내에 있는 다른 균들이 검출되는 것을 막기 위하여 두 가지 항생제를 첨가한 배지를 사용하였다. 이 배지에서 원하는 균만 정확히 선택 배양할 수 있는지를 알아보기 위하여 실험에 사용한 *S. Enteritidis*를 도말하여 콜로니를 관찰하고, 0일차 에서 얻은 맹장변 시료를 도말하여 관찰한 결과 *S. Enteritidis* 집락은 검은색으로 자라서 쉽게 구분이 가능하였으며, 대부분의 균들의 성장이 저해됨을 관찰하였다. 하지만 몇몇 균이 자라기도 하였는데 색은 흰색 또는 옅은 노란색을 띠기 때문에 *S. Enteritidis*와 확연히 구별되어 원하는 균을 검출하는데 적합함을 확인하였다. 3일차 맹장분변에서는 모든 시료에서 *S. Enteritidis*가 존재함이 관찰 되었는데 cfu 수행 결과 분변 단위 무게당 1×10^3 개에서 4.3×10^5 개 까지의 균이 존재함을 확인하였다. 하지만 cfu 결

과에서 검출되지 못한 시료가 5개 있었는데 RV broth에서 증균한 결과 *S. Enteritidis*가 존재함을 확인하였다. 이때 고농도의 추출액을 먹인 군에서 평균 균수가 가장 적었으며, 중간농도에서 가장 많이 발견되었다. 7일차 맹장분변의 경우, cfu를 수행한 결과 분변 단위 무게당 2×10^3 개에서 2.1×10^5 개까지의 균이 존재함을 확인하였다. 하지만 저농도와 중간농도 군에서 각 1마리씩에서 *S. Enteritidis*가 발견되지 않았고, 저농도 그룹에서의 균수가 크게 증가함이 관찰되었다. 고농도 그룹에서의 균수는 여전히 가장 적었다.

(다) 임상병리학적지표의 변화 분석

① 혈액학적 지표 분석

*Salmonella Gallinarum*에 대한 실험과 동일한 방법으로 분석을 진행하였다.

② 결과 및 분석

- WBC 결과 분석 : WBC 측정치와 기계의 참고 범위를 고려할 때, WBC 측정치는 참고 범위 내에 존재하므로, 임상적 의의는 낮을 것으로 사료된다. 앞서 언급하였듯 일반적으로 가금류에서의 PCV의 참고범위는 35~55 %로, 35% 이하의 측정치는 빈혈을, 55% 이상의 측정치는 탈수 소견과의 연관성이 고려된다. 다만 앞서 제시한 다른 실험군의 측정치와, 본 실험군의 측정치를 종합할 때, 실험 개체군의 기준치(baseline)이 참고 범위 이하에 존재하는 것으로 사료되므로, 빈혈을 지시할 가능성은 낮을 것으로 고려된다. 따라서 기준치와 기존의 참고 범위를 종합하여 고려할 때, 임상적으로 유의한 소견은 확인되지 않는 것으로 사료된다.

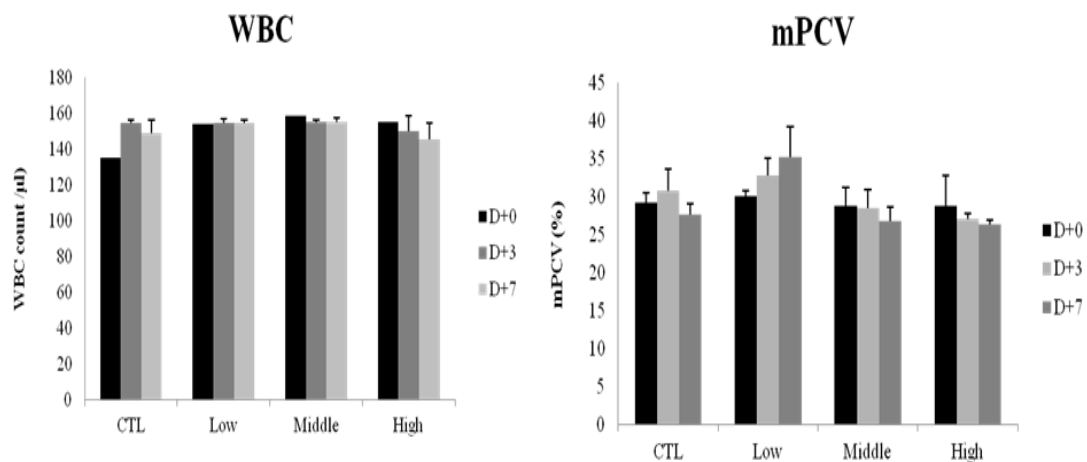


Figure 200. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염 후 WBC 변화 분석

- 간 효소 수치의 분석 : ALT의 수치상의 변화가 다소 확인되었으나, ALT는 간 효소 수치로 일반적으로 최소 3배 이상의 측정치 차이를 유의하다고 평가하는 점을 고려할 때, 임상적 의의는 낮을 것으로 사료된다. AST 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 유의적 변화는 확인되지 않는 것으로 사료된다. ALP 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 유의적 변화는 확인되지 않는 것으로 사료된다. GGT는 간 효소 수치로, 몇 배 이상으로 fold change가 일어나지 않는 경우, 임상적 의의를 갖는다고 보기 어렵다. 따라서 임상병리학적 분석 결과 해당 Treat 및 Day가 주는 간 효소 상의 임상적인 영향은 낮을 것으로 판단된다.

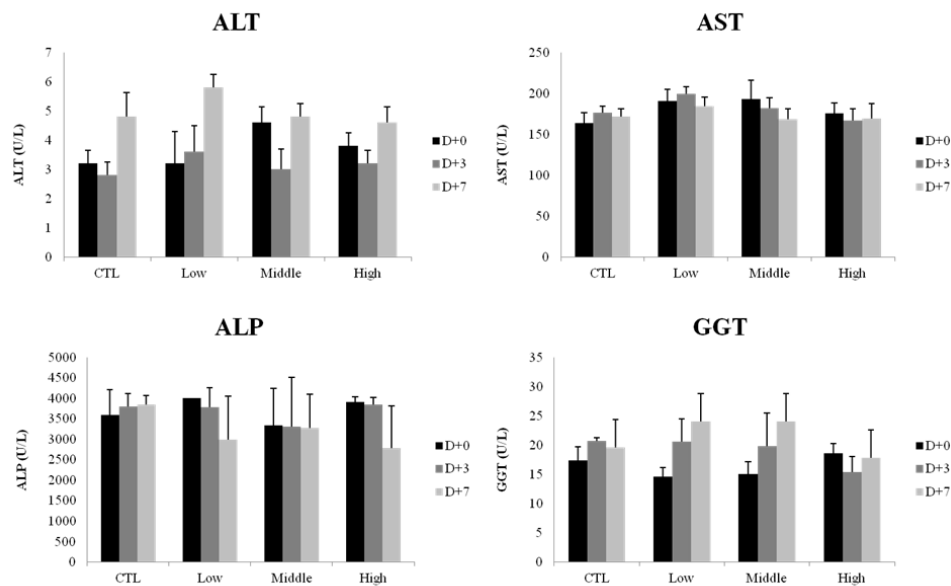


Figure 201. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염 후 간 효소 수치의 분석

- 신장 관련 측정치의 분석 : SAS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 실시하였다. Day를 하나의 변수로, Treat(강황 농도에 따른 CTL, Low, Middle, High)을 또 하나의 변수로 놓고 동일한 피실험체에 실험을 했다고 가정했다. Treat만을 유일한 처리라 했을 때, 유의적인 변화는 확인되지 않았다. 따라서 Treat가 주는 신장 관련 측정치에 대한 임상적인 영향은 확인되지 않는 것으로 판단된다. BUN의 측정치가 Day에 따라서 다소 낮아지는 경향성이 확인되나, BUN 측정치의 감소가 갖는 임상적인 중요도는 낮으며, 신장 관련된 질병을 지시할 가능성은 낮은 것으로 사료된다. Creatinine 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 실험군 간의 측정치에 임상병리학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다. 따라서 실험군 조건에 따른 신장 손상은 유발되지 않았을 가능성이 높을 것으로 사료된다. Ca 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 실험군 간의 측정치에 임상병리학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다. 인(P) 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 실험군 간의 측정치에 임상병리학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다.

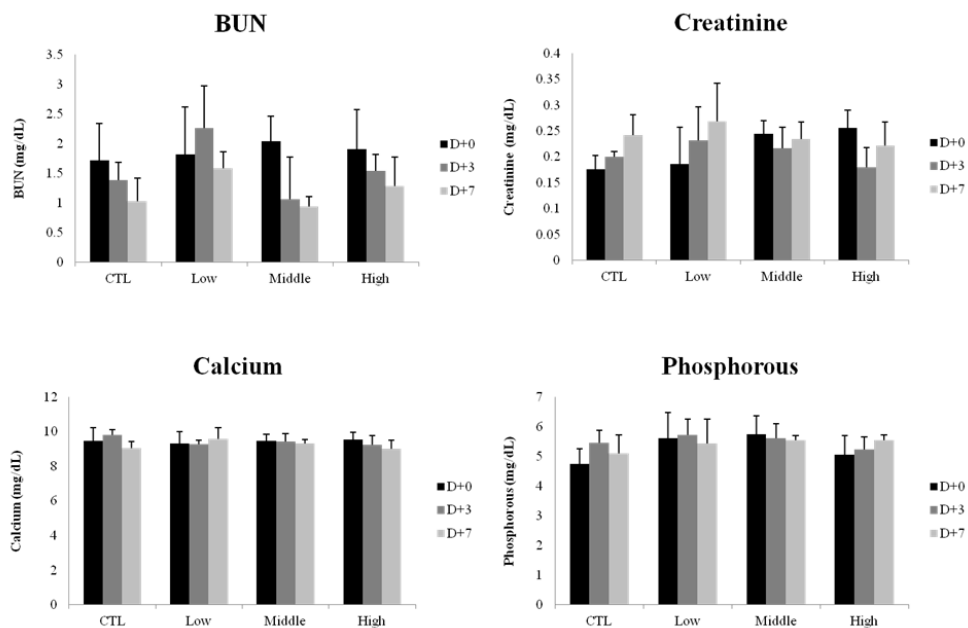


Figure 202. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염 후 신장 관련 측정치의 분석

- 단백질 농도 측정치의 분석 : 총 단백질 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 실험군 간의 측정치에 임상병리학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다. 다만 경미하게 확인되는 Day에 따른 총단백질 측정치의 증가 경향은 경미한 탈수 증상을 지시하는 소견일 가능성이 낮지만 고려될 수 있다. 알부민 측정치의 평균과 분산을 고려할 때, 실험군 간의 측정치에 임상병리학적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다. 다만 일부 실험군에서 경미하게 확인되는 Day에 따른 총단백질 측정치의 증가 경향은 경미한 탈수 증상을 지시하는 소견일 가능성이 낮지만 고려될 수 있다.

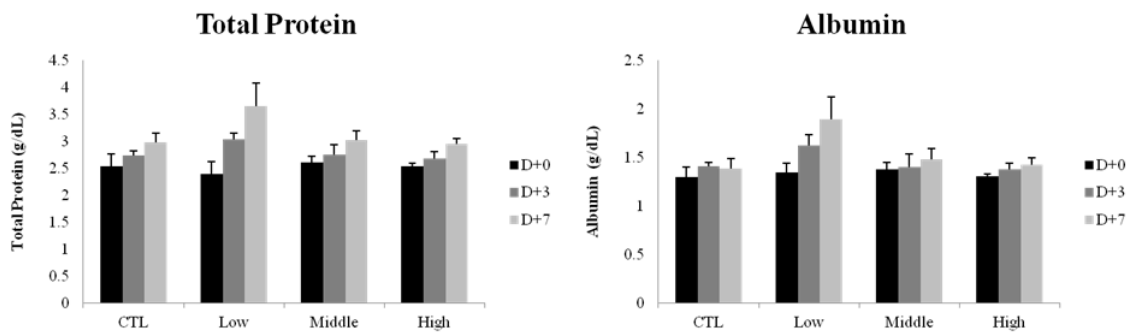


Figure 203. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염 후 단백질 농도 측정치의 분석

- 대사 및 소화기계 관련 측정치의 분석: Glucose의 평균과 분산 및 임상병리학적 수치상의 특성을 고려할 때, 유의적인 변화는 확인되지 않는 것으로 사료된다. Total Cholesterol의 평균과 분산 및 임상병리학적 수치상의 특성을 고려할 때, 유의적인 변화는 확인되지 않는 것으로 사료된다. Day 3+에서 전반적으로 Triglyceride 측정치의 감소된 경향이 확인되었으나, Triglyceride의 평균과 분산 및 임상병리학적 수치상의 특성을 고려할 때, 질병 및 대사 문제와 관련된 유의적인 변화는 확인되지 않는 것으로 사료된다.

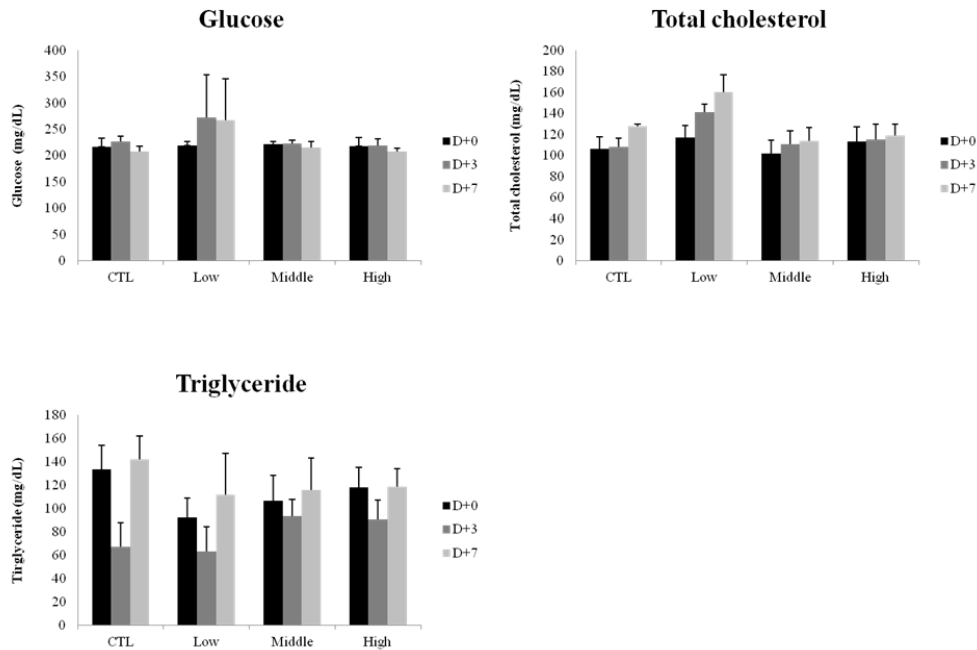


Figure 204. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염 후 대사 및 소화기계 관련 측정치의 분석

- 전해질 검사 분석 : 전해질 검사 결과, 임상적 의의를 갖는 수치상의 변화는 확인되지 않았다.

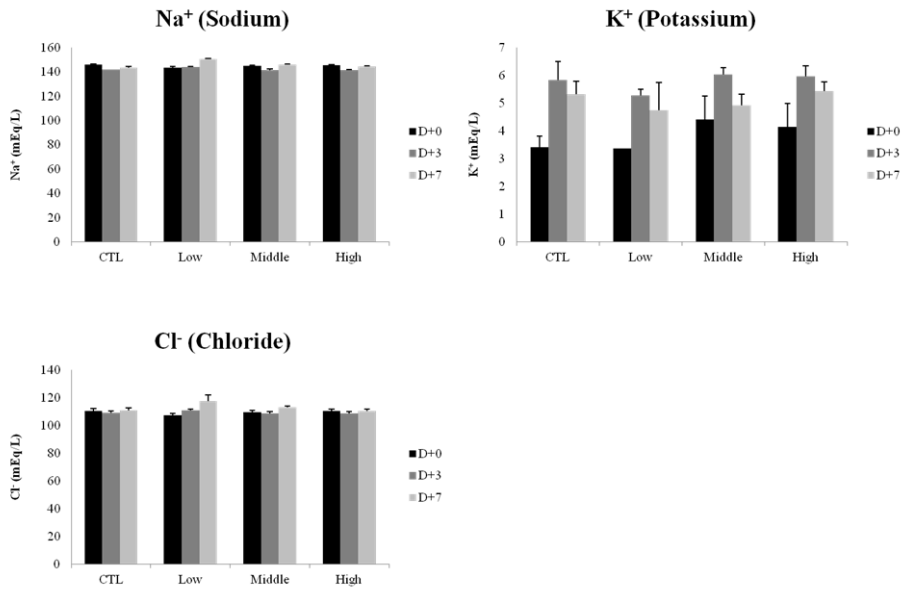


Figure 205. 강황(생물전환)산물 급여 초생추에서 SE감염 후 전해질 검사 분석

2. 돼지에서의 공격접종 test

: 돼지 대상살모넬라 저감제의 효능 분석

가. 살모넬라 저감 후보물질의 선별 및 이유자돈 적응농도 최적화

(1) In vitro 결과를 토대로 살모넬라 저감 후보물질의 선별(제1세부과제와 연계)

당해연도(2차년도) 본 과제에서 개발할 살모넬라 저감후보물질인 강황(생물전환)산물은 제1세부과제로부터의 *in vitro* 및 *in vivo* 마우스 실험결과와 1차년도 초생추 감염실험을 통하여 유효물질로 선별되었으며, 목적동물인 이유자돈 실험에 사용하기 위하여 분말형태의 사료첨가제 혹은 수용성 Stock 용액의 형태로 제공받아, Figure와 Table에 표시된 농도로 실험에 사용하였음.

(2) 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물의 생체 안전성 및 급이 효능 분석

(가) 강황(생물전환)산물의 급이

본 과제의 대상목적동물인 돼지실험을 위하여, 강원대학교 동물실험윤리위원회의 실험동물윤리 기준 및 가이드라인에 따라 연구 승인을 취득하였음(승인번호: KW-160329-1)

총 20두의 생후 1주령 이유자돈을 선별된 강황(생물전환)산물의 사료 혼합농도를 기준으로, (i) 대조군, (ii) 저농도급여군(2.5 mg/kg), (iii) 중농도급여군(10 mg/kg), (iv) 고농도급여군(40 mg/kg)으로 나누어, 각 5마리씩 구획된 돈사에 격리 사육하였음.



Figure 206. 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물의 생체 안전성 및 급이 효능 분석

모든 이유자돈은 입식 후 11일 동안 순화시키며, 본 실험 개시 전 일괄적으로 항생제를 처치하였고, 분변 시료를 채취하여 살모넬라균의 감염 여부를 세균 배양법을 토대로 음성임을 확인하였음. 사료와 물은 자유급여 하였으며, 각 실험군별로 소비된 사료의 양, 체중 및 체온을 주기적으로 측정 및 기록하였음(Table 참조).

Table 103. 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물 생체 안전성 검정 및 급이 효능 분석을 위한 실험설계

그룹	2/4일(D-11)	2/15일(D+0)	2/22일(D+7)	2/29일(D+14)	3/07일(D+21)	3/08일(D+22)
사료 대비 1% 강황(생물전환)산물의 혼합 급이 (10 g/사료 kg)	-20두 입식 -순화 -항생제처리 -채혈(혈청) ^a -사진	-채혈 ^a -채변	-채혈 ^a -채변	-채혈 ^a -채변	-채혈 ^a -채변	-안락사 -채혈(최대) -조직 ^b -Colon내용물
대조군	5두	5두	5두	5두	5두	5두
저농도급여군 (2.5 mg/kg)	5두	5두	5두	5두	5두	5두
중농도급여군 (10 mg/kg)	5두	5두	5두	5두	5두	5두
고농도급여군 (40 mg/kg)	5두	5두	5두	5두	5두	5두

^a 채혈샘플

- EDTA 처리 혈액(EDTA tube 이용)
- 혈청(SST™ II Advance tube를 이용)

^b조직샘플: 포르말린 용액 고정 간, 신장, 비장, 소장, 장간막 림프절 각각 0.5 cm × 1 cm 이상 크기.

강황(생물전환)산물 급이에 따른 이유자돈 체중 및 체온 변화 분석: 상기 일정에 맞추어, 개별 이유자돈의 체온(Figure 참조) 및 체중 변화(Table 참조)를 기록하여 강황(생물전환)산물의 급이가 이들 인자에 미치는 영향을 조사하였음. 그 결과, 별 다른 특이점을 관찰하지 못하였음.

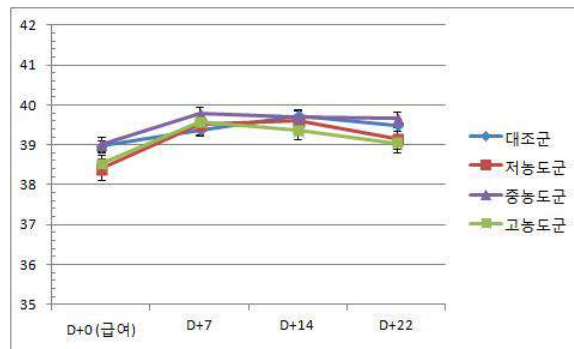


Figure 207. 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물의 급이에 따른 체온 변화

Table 104. 강황(생물전환)산물 급여가 이유자돈의 체중 및 체온에 미치는 영향 분석

구분	이표번호	체중(kg)				
		D-6	D+0 급여개시	D+7	D+14	D+22
대조군	1	9.5	11	17.9	23.7	28.5
	2	10.2	12.7	18.8	22.7	28.6
	3	9.1	11.8	17.7	22.9	29.3
	4	8.1	10.1	14.1	18	23
	5	8.6	11.9	17.3	22.2	26.7
	평균	9.1	11.5	17.16	21.9	27.22
	편차	0.81	0.99	1.80	2.25	2.55
저농도 급여군 (2.5mg/kg)	1	10.1	11.5	17.4	23.4	28
	2	8.9	11.4	17.1	22.5	27
	3	8.1	9.7	14.6	18.9	23.2
	4	10.5	12.1	17.9	23.1	28
	5	9.9	9.6	17.3	22.6	26.6
	평균	9.5	10.86	16.86	22.1	26.56
	편차	0.98	1.14	1.30	1.83	1.98
중농도 급여군 (10mg/kg)	1	9	12.2	17.1	22.7	27.3
	2	9.2	12.1	16.7	21.6	26.3
	3	8.2	11	15.2	20.1	25.7
	4	8.1	10.6	15.3	20.8	26.5
	5	9.2	11.5	12.5	17.8	23.3
	평균	8.74	11.48	15.36	20.6	25.82
	편차	0.55	0.69	1.80	1.84	1.52
고농도 급여군 (40mg/kg)	1	10.8	11.9	17.2	22.2	27.6
	2	7.9	9.6	13.7	18.1	24.9
	3	9	11.9	16.5	21.4	25.6
	4	11.1	13.9	16.7	21.5	26.1
	5	9.2	12.3	17.4	24.5	27.6
	평균	9.6	11.92	16.3	21.54	26.36
	편차	1.33	1.54	1.50	2.29	1.21

(나) 강황(생물전환)산물의 급여에 따른 장내 미생물총(microbiota)변화 분석

① 실험방법

혼합사료 급여 후 D+22일째 모든 이유자돈을 안락사 시켜 부검하였고, colon으로부터의 내용물 0.2 g 으로부터, QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 genomic DNA(30-50 ng/μl)를 추출하였음. 16s rRNA gene 서열분석을 통해, 분변 내 세균을 동정하기 위해서 종(species) 특이성이 높은 다양성의 염기서열부분을 포함하는 universal 16S rRNA gene sequence primers(F: 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3' & R: 5'-ATC GGY TAC CTT GTT ACG ACT TC-3')를 이용해 DNA를 증폭하였음. PCR은 AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity kit(Invitrogen)를 이용해 Denaturation(94°C, 30 sec), Annealing(58°C, 30 sec), Extension(68°C, 1 min)을 30 cycles 반복 수행하여 약 1,000-bp size의 증폭된 DNA를 얻었고, 이 후 DNA를 T&A vector(Real Biotech Corporation)에

cloning하여 DH5α competent cell에 transformation 후, 선별된 colony를 확보하였음. 하나의 돼지 분변에서 얻어낸 약 100개의 clone 중 무작위로 10개를 선발하여 plasmid를 추출하였고, M13 Forward primer(5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3')를 이용해 sequencing하여 얻어낸 16s rRNA gene의 염기서열을 미국 국립생물정보센터 NCBI Blast program에 입력하여, 계통분석을 수행하였다.

② 결과분석

대조군과 고농도급여군(40 mg/kg) 이유자돈 각 5마리에 대한 colon 내용물로부터 분변 DNA를 추출하여 획득한 16S rRNA TA cloning products 중 10개의 colony를 무작위 선발하여, 군별 총 50개의 colony의 16S rRNA gene 염기서열을 분석한 결과, Firmicutes 문(Phylum)에 속하는 Clostridiales 세균이 대조군과 고농도급여군(40 mg/kg) 이유자돈의 colon에 가장 많이 존재하는 것으로 확인되었음(대조군 N=31 vs. 고농도급여군 N=32; Figure 참조). 그 다음으로, 역시 Firmicutes 문에 속하는 Negativicutes 강(대조군 N=9 vs. 고농도급여군 N=7; Figure 참조), Lactobacillales 목(대조군 N=4 vs. 고농도급여군 N=7; Figure 참조) 세균들과 일부 Proteobacteria, Spirochaetae, Bacteroidetes 문에 속하는 세균들(N=4 이하)이 동정되었다. 흥미로운 점은 고농도(40 mg/kg)의 강황(생물전환)산물 급여군의 경우, 대조군에 비해 Negativicutes 강 세균의 비율이 감소한 반면, 장관 내 유익균으로 알려져 있는 Lactobacillales 목의 세균들의 비율은 증가한 것을 확인할 수 있었다(Figure 참조).

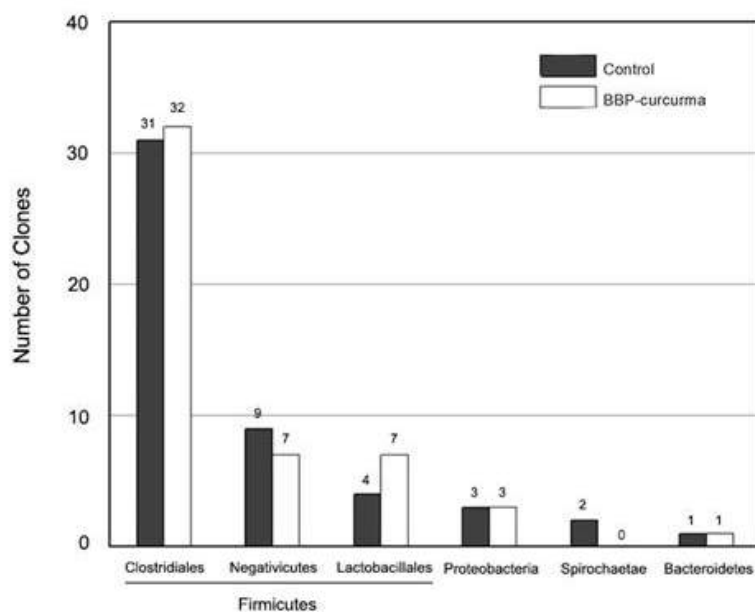


Figure 208. 주요 분류학적 범주(Phylum: Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetae, Bacteroidetes)에 따른 장관세균총의 변화

(다) 강황(생물전환)산물에 의한 이유자돈의 성장지표, 혈액 및 주요 장기에 대한 임상병리학적 분석

① 전체 혈구 계산 지표 분석

② 실험방법

- 채혈 및 시료 준비

알코올 솜으로 소독한 이후, 3 cc 주사기를 이용하여 자돈의 정맥에서 채혈을 시도하였고, EDTA tube에 혈액을 수집하였다. 이 때 용혈을 방지하기 위해서, 주사기 바늘을 통하지 않도록 주의하였다. 정확한 결과 분석을 위해 적절한 혈액량을 수집 하는 것이 중요한데, 본 실험의 경우 해당 EDTA tube에 맞도록 최소 0.25 ml에서 최대 0.5 ml의 혈액을 수집하였다. 실험군은 (i) 대조군(C; Control), (ii) 저농도급여군(L; 2.5 mg/kg), (iii) 중농도급여군(M; 10 mg/kg), (iv) 고농도급여군(H; 40 mg/kg)으로, 그룹(군)별 이유자돈 5마리에 대한 혈액을 채취하였다.

- 전체혈구계산

EDTA tube에 담긴 혈액은 충분히 섞은 뒤, Advia 2120을 이용하여 분석하였다.

③ 결과분석

- RBC 측정치의 분석

적혈구 장애는 크게 빈혈과 적혈구증가증으로 나뉘며, 이에 대한 평가를 위해서 적혈구용적율(Hematocrit), RBC, 헤모글로빈에 대한 측정치는 중요한 의미를 갖고 있음. 해당 수치가 참고 범위보다 증가할 경우 적혈구 증가증으로 고려되며, 참고 범위 보다 감소할 경우 빈혈로 판단함. 분석결과, 적혈구용적율의 실험군별 평균은 각각 C군 33.06%, L군 34.02%, M군 31.82%, H군 33.48%로 측정되었다. RBC의 실험군별 평균은 C군 $637 \times 10^4/\text{ul}$, L군 $653 \times 10^4/\text{ul}$, M군 $601 \times 10^4/\text{ul}$, H군 $635 \times 10^4/\text{ul}$ 로 측정되었다. 한편, 헤모글로빈의 실험군별 평균은 C군 10.33 g/dl, L군 10.74 g/dl, M군 10.00 g/dl, H군 10.69 g/dl로 측정되었다(Figure 참조). 적혈구용적률, RBC, 헤모글로빈에 대한 측정치가 참고범위 내에서 확인되었던 바, 빈혈 또는 적혈구증가증의 가능성은 낮을 것으로 평가되었다. 또한 SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, 적혈구용적률, RBC, 헤모글로빈 모두 실험군간 유의적인 차이는 확인되지 않았음($p < 0.05$). 혈청화학검사 지표

분석

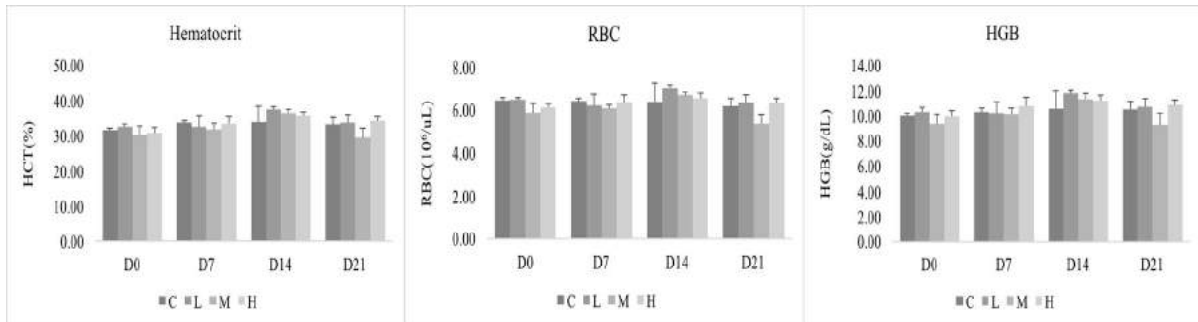


Figure 209. 적혈구용적률(Hematocrit), RBC, 헤모글로빈에 대한 측정치

MCV(Mean corpuscular volume), RDW(Red cell distribution width), MCH(Mean corpuscular hemoglobin), MCHC(Mean corpuscular hemoglobin concentration) 측정치는 빈혈 환자에서 유용한 임상 정보를 제공한다. 앞선 실험군의 혈액검사 결과 빈혈 소견은 확인되지 않았던 바, MCV, RDW, MCH, MCHC의 임상적인 중요도는 낮을 것으로 사료됨. MCV의 실험군별 평균은 C군 51.92 fL, L군 52.04 fL, M군 52.92 fL, H군 52.67 fL으로 측정되었다. RDW의 실험군별 평균은 C군 21.02%, L군 19.95%, M군 20.69%, H군 19.49%로 측정되었다. MCH의 실험군별 평균은 C군 16.22 pg, L군 16.66 pg, M군 16.51 pg, H군 16.87 pg으로 측정되었다. 한편, MCHC의 실험군별 평균은 C군 31.41 g/dl, L군 31.39 g/dl, M군 31.67 g/dl, H군 31.86 g/dl 으로 측정되었다(Figure 208.참조).

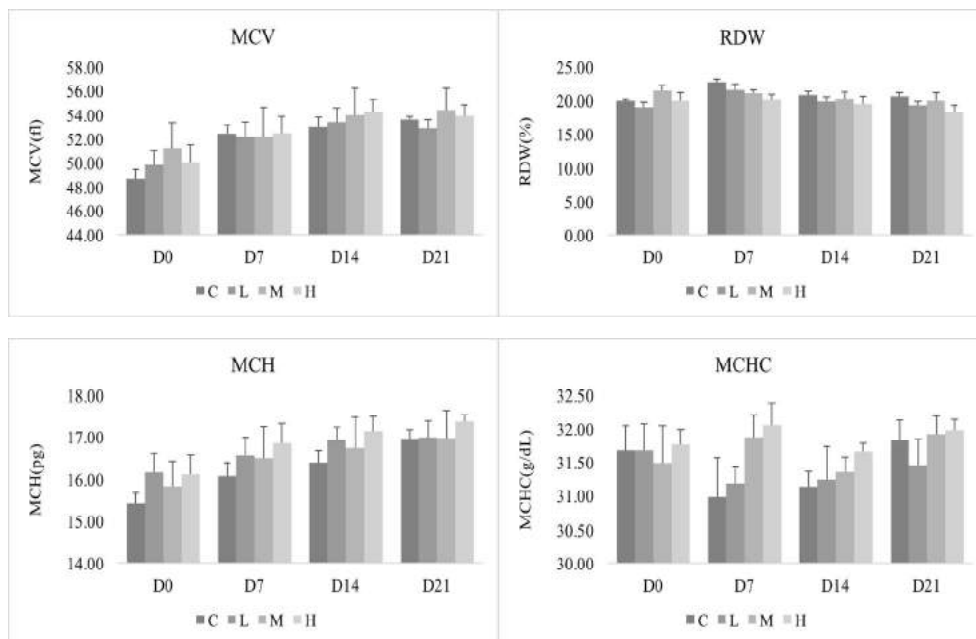


Figure 210. 적혈구에 대한 평가: MCV, RDW, MCH, MCHC 측정치

- WBC 측정치의 분석

백혈구는 신체 방어, 염증, 및 면역 시작과 조절의 핵심으로, 총 백혈구 수치를 통해 생체의 생리적 반응이나 염증 반응에 대해 평가할 수 있다. 본 실험에서 총 백혈구 수치의 평균은 C군 18,160 /ul, L군 16,910 /ul, M군 20,910 /ul, H군 20,540 /ul 으로, 참고범위 내에서 측정되었다(Figure 209. 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석 결과, 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았다($p < 0.05$).

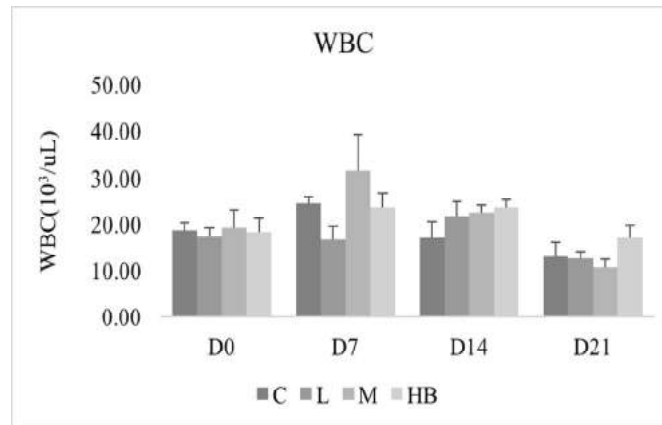


Figure 211. 백혈구(WBC) 측정치

- 혈소판 측정치의 분석

혈소판 숫자는 지혈 장애와 관련된 임상 증상을 보이는 환자에서 필수적인 검사임. 본 실험에서 혈소판 숫자(PLT)의 평균은 C군 526,450 /ul, L군 408,800 /ul, M군 376,100 /ul, H군 536,500 /ul 으로, 모두 참고 범위 내에서 측정되었다(Figure 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았음($p < 0.05$). 혈소판 숫자 및 관련 장애에 이상이 확인되지 않는 바, MPV(Mean platelet volume)의 임상적인 의의는 낮을 것으로 사료된다. MPV 측정치의 평균은 C군 7.66 fl, L군 7.61 fl, M군 8.24 fl, H군 7.77 fl 으로, 모두 참고범위 내에서 측정되었다(Figure 210. 참조).

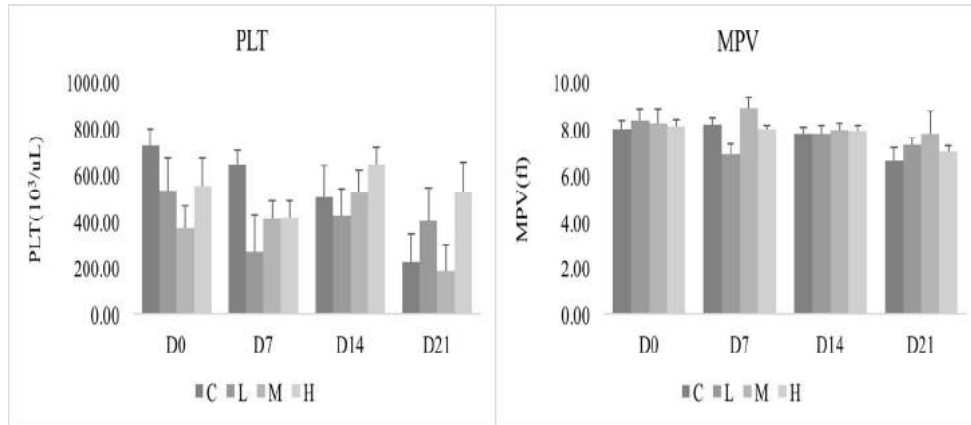


Figure 212. 혈소판 측정치

④ 혈청화학검사 지표 분석

⑤ 실험방법

- 채혈 및 시료 준비

혈청 화학 검사를 통한 분석을 위해서, SST tube에 혈액을 수집하였음. 이 때 용혈을 방지하기 위해서 주사기 바늘을 통하지 않도록 하였고, 이후 3분 정도 원심 분리한 뒤, 혈청을 피펫을 이용하여 플레인 튜브에 따로 담아 측정한 뒤에 냉동보관 하였다.

- 혈청화학 검사

검사를 진행한 항목은 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase), ALP(alanine aminotransferase), GGT(gamma-glutamyl transferase), BUN(Blood urea nitrogen), Creatinine, Ca, Inorganic phosphorous, Total Protein, Albumin, Total cholesterol, Triglyceride에 대한 혈액 중 정량적 측정치였음.

- 전해질 검사

검사를 진행한 항목은 Na, K Cl에 대한 혈액 중 정량적 측정하였다.

⑥ 결과분석

- 혈청화학 검사

간 효소 수치의 분석: 혈청 중, 간(liver) 특이 효소의 증가는 간 손상을 반영하는 간질병의 표지로, 간질병에 대한 기본적인 평가를 위해 이에 대한 검사를 수행하였다. ALT 측정치의 평균은 C군 62.70 U/L, L군 74.90 U/L, M군 68.25 U/L, H군 78.20 U/L 으로, 참고 범위 내에서 측정되었다(Figure 211. 참조). AST 측정치의 평균은 C군 68.65 U/L, L군 62.60 U/L, M군 68.95 U/L, H군 54.95 U/L로, ALP 측정치의 평균은 C군 303.25 U/L, L군 291.35 U/L, M군 270.25 U/L, H군 269.25 U/L로서, 모두 참고 범위 내에서 측정되었다. GGT 측정치의 평균은 C군 32.15 U/L, L군 27.55 U/L, M군 25.60 U/L, H군 20.85 U/L로, 참고 범위 내에서 측정되었으나, SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석 수행 결과, ALT, AST, ALP, GGT 모두에서 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았음($p < 0.05$). 따라서 간 손상을 지시하는 유의적인 측정치의 변화는 확인되지 않은 것으로 평가됨.

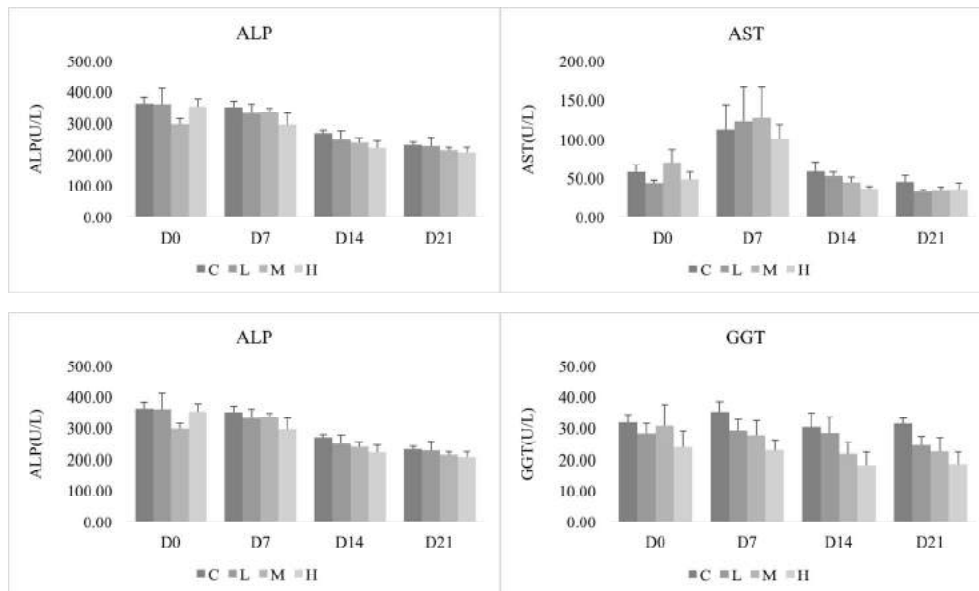


Figure 213. 간 효소 측정치

신장 관련 측정치의 분석: 신장 손상으로 인한 배출 기능의 감소 시, 혈 중 질소 노폐물의 증가가 확인될 수 있다. 따라서 신장에 대한 기본적인 평가를 위해서 BUN, 크레아티닌, 칼슘, 인에 대한 검사를 수행하였다. BUN 측정치의 평균은 C군 6.61 mg/dl, L군 6.47 mg/dl, M군 5.13 mg/dl, H군 4.47 mg/dl로, 참고 범위 내에서 측정되었다(Figure 212. 참조). 크레아티닌 측정치의 평균은 C군 0.71 mg/dl, L군 0.63 mg/dl, M군 0.65 mg/dl, H는 0.65 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었다(Figure 참조). 칼슘 측정치의 평균은 C군 9.77 mg/dl, L군 9.91 mg/dl, M군 9.98 mg/dl, H군 9.93 mg/dl로, 역시 참고범위 내에서 측정 가능하였다(Figure 212. 참조). 인 측정치의 평균은 C군 7.36 mg/dl, L군 7.91 mg/dl,

M군 7.54 mg/dl, H군 7.76 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 212. 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, BUN 수치와 크레아티닌 수치에서 일부 유의적인 차이는 확인되었다($p < 0.05$). 추가 분석을 진행한 결과, BUN의 경우 D+7일째 L군의 BUN 수치가 M군과 H군보다 증가되어 관찰되었으나, D+14일과 D+21일의 경우 전반적으로 C군의 BUN 수치가 H군보다 증가된 것으로 분석되었다(Figure 참조). 크레아티닌 수치의 경우, D+21일째 C군의 수치가 L군보다 높은 것으로 분석되었다. 종합하여, 강황(생물전환)산물을 투여한 군에서 BUN, 크레아티닌 수치가 대조군에 비하여 통계적으로 유의성있게 감소됨을 확인하였으며, 이는 질소혈증의 감소에 효능이 있을 가능성이 있다.

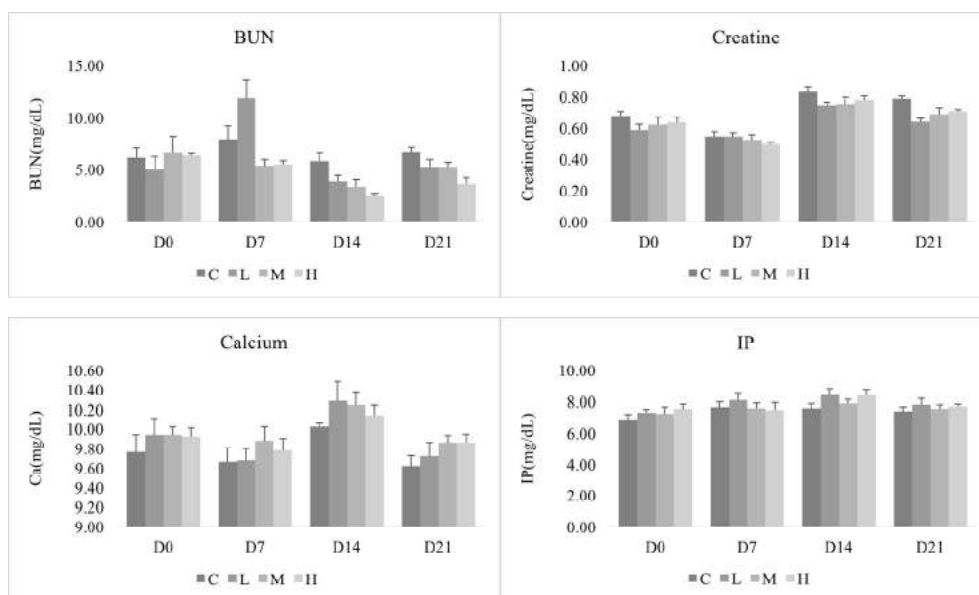


Figure 214. 신장 관련 측정치

단백질 농도 측정치의 분석: 혈장단백질의 이상은 다양한 질병과 관련이 있는 중요한 생화학적 검사이다. 이와 관련하여 총 단백질 농도, 알부민(ALB) 수치를 비교 분석하였다. 결과로서, 총 단백질 농도의 평균은 C군 4.35 g/dl, L군 4.38 g/dl, M군 4.31 g/dl, H군 4.32 g/dl이므로, 참고범위 내에서 측정되었으며, 알부민 측정치의 경우, 평균이 C군 2.75 mg/dl, L군 2.65 mg/dl, M군 2.68 mg/dl, H군 2.73 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었다(Figure 213. 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, 총 단백질 농도, 알부민에서는 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았다($p < 0.05$).

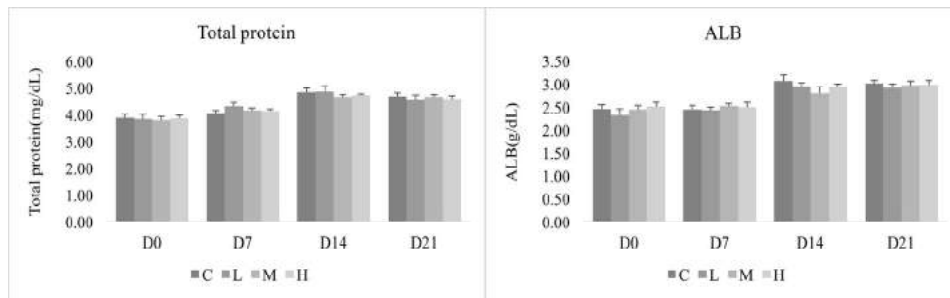


Figure 215. 혈액 중 단백질 농도 측정치

대사 및 소화기계 관련 측정치의 분석: 대사 및 소화기계에 대한 기본적인 평가를 위해서 총콜레스테롤, 트리글리세리드 수치를 분석하였다. 총 콜레스테롤의 평균은 C군 59.20 g/dl, L군 64.25 g/dl, M군 68.15 g/dl, H군 60.70 g/dl로, 참고범위 내에서 측정되었으며, 트리글리세리드 측정치의 평균은 C군 40.50 mg/dl, L군 54.35 mg/dl, M군 46.80 mg/dl, H군 43.05 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었다(Figure 214. 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, 트리글리세리드에서 L군에서 H군보다 유의적으로 높게 측정되었으나, 변동의 폭이 큰 트리글리세리드 수치의 특성을 고려할 때, 임상적인 의의는 낮을 것으로 사료된다. 그 밖에 총콜레스테롤, 트리글리세리드에서는 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았다($p < 0.05$).

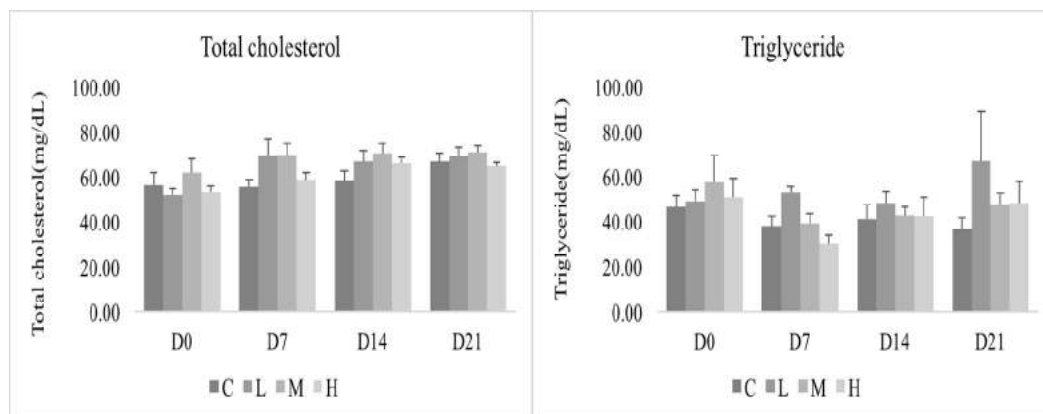


Figure 216. 혈액 중 대사 및 소화기계 관련 측정치

- 전해질검사 분석

Na⁺, K⁺, Cl⁻ 측정치: 전해질에 대한 기본적인 평가를 위해서 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 수치를 분석하였다. Na⁺ 측정치의 평균은 C군 140.35 mEq/L, L군 140.00 mEq/L, M군 140.34 mEq/L, H군 140.92 mEq/L로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). K⁺ 측정치의 평균은 C군 5.32 mEq/L, L군 5.22 mEq/L, M군 5.27 mEq/L, H군 5.22 mEq/L로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 215. 참조). Cl⁻ 측정치의 경우, 평균이 C군 104.17 mEq/L, L군

103.98 mEq/L, M군 104.77 mEq/L, H군 104.73 mEq/L로, 참고범위 내에서 측정되었음 (Figure 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석 수행 결과, Na⁺, K⁺, Cl⁻ 측정치에서 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았음(p<0.05).

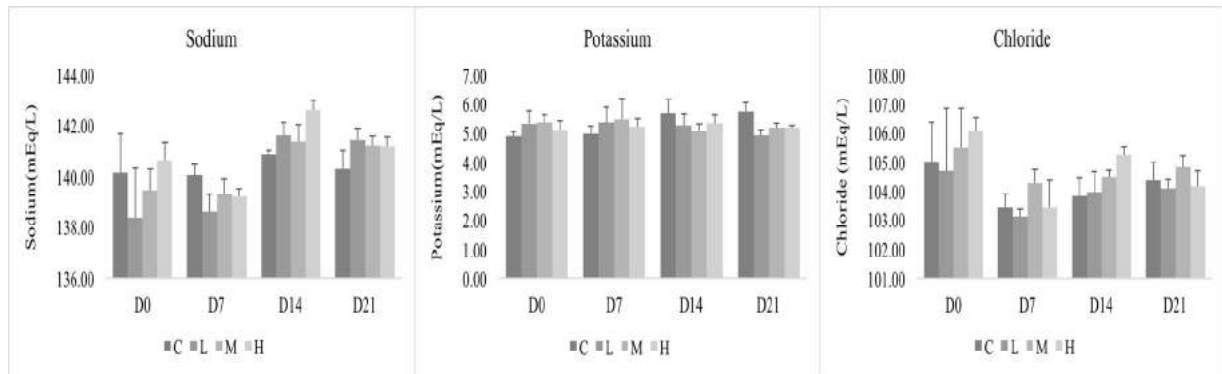


Figure 217. 혈액 중 전해질 측정치

(라) 주요 장기에 대한 조직병리학적 지표 분석

① 실험방법

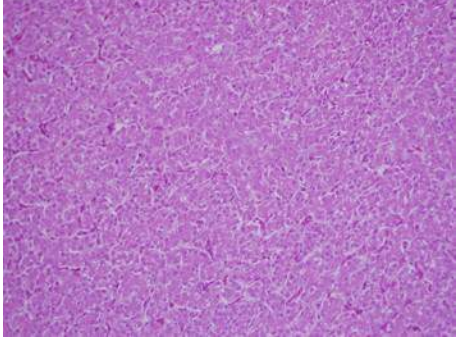
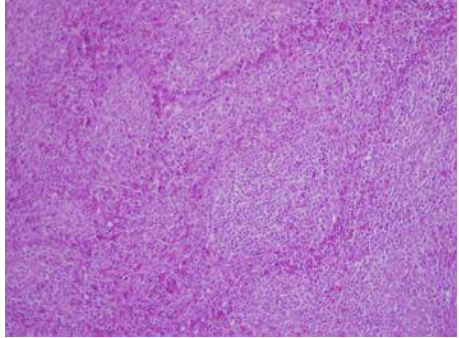
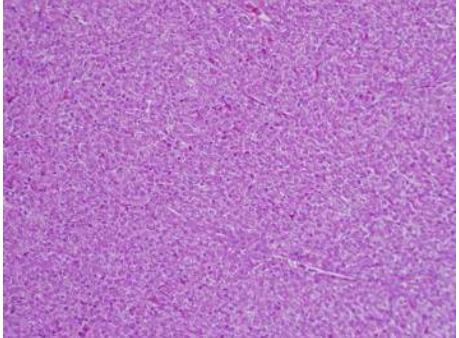
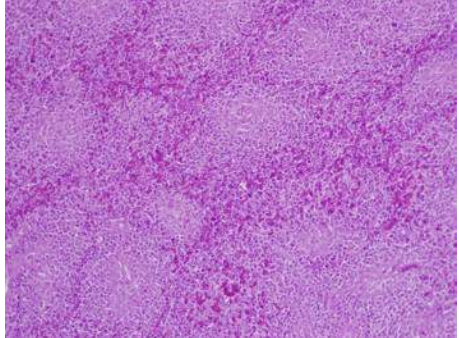
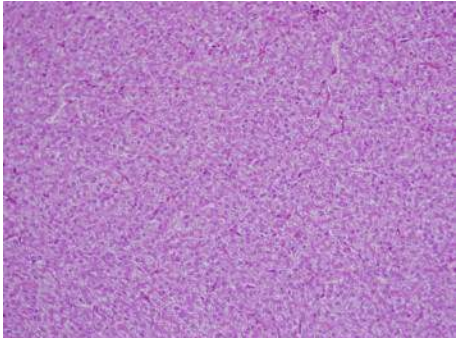
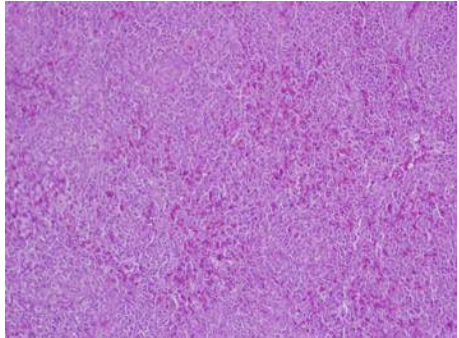
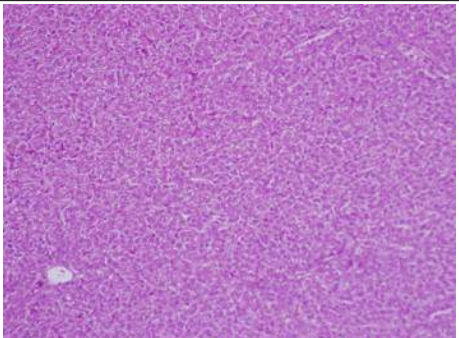
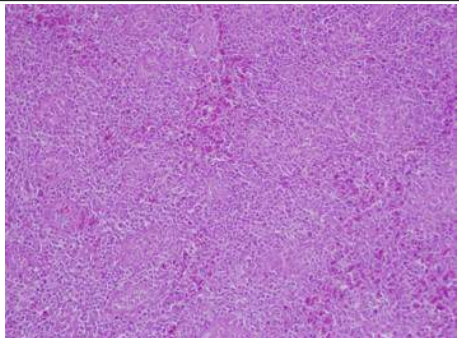
D+0, D+3, D+7, D+14, D+21에 각 개체를 희생하여, 간 비장을 부검하여, 루틴한 방법으로 조직병리 검사를 수행하였음.

② 결과분석

조직 사진의 분석 결과를 아래 표로 요약하였고, 다음은 간, 비장에서 조직병리학 소견임.

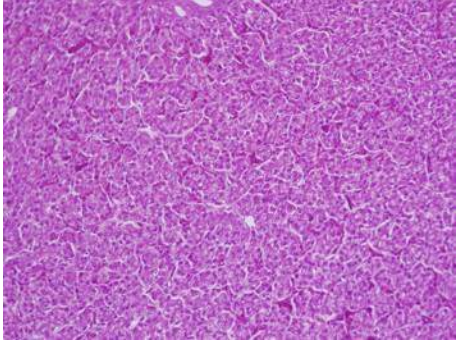
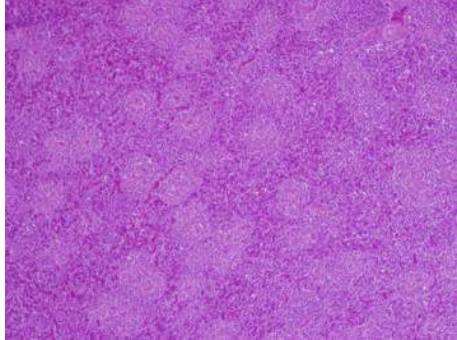
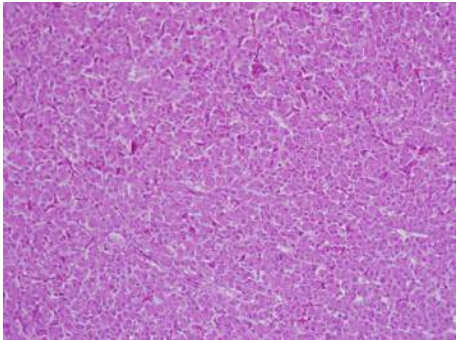
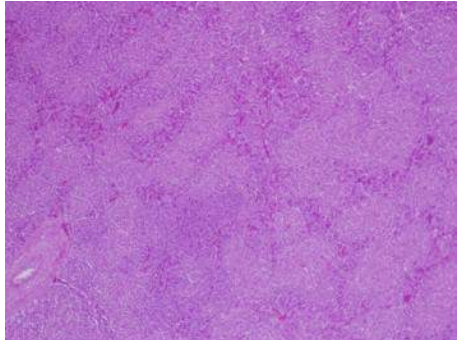
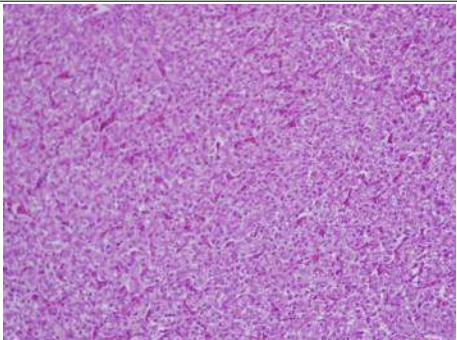
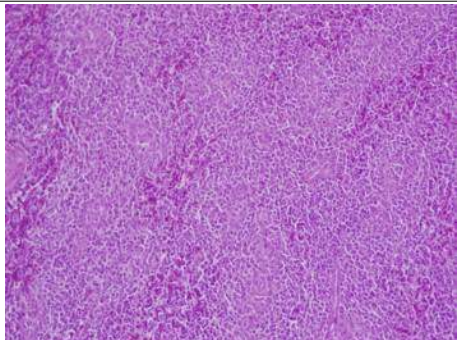
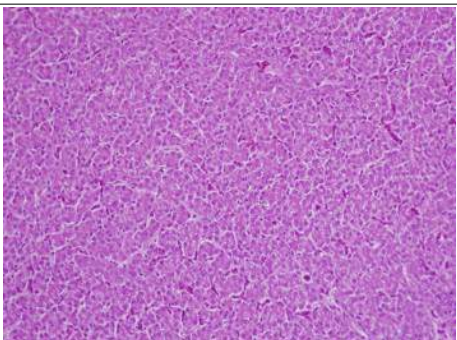
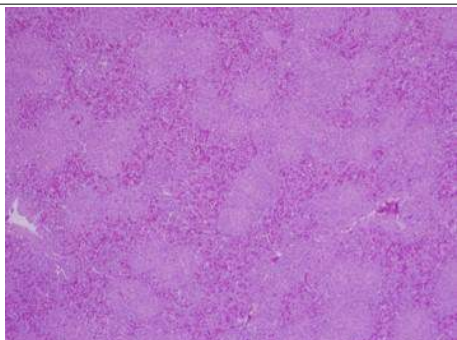
- D+0

Day	Treatment	Liver	Spleen
D+0	CTL	Within normal limits, EMH	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Low	Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
	Middle	Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	High	Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits

Treatment	Liver	Spleen
CTL		
Low		
Middle		
High		

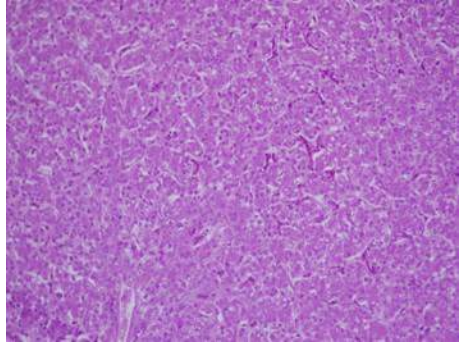
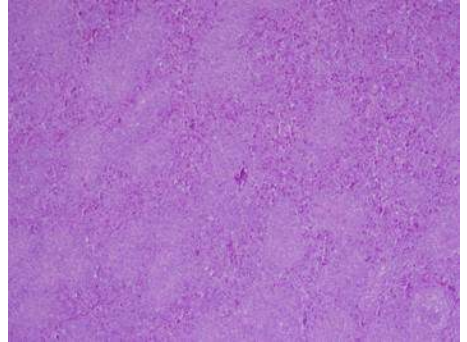
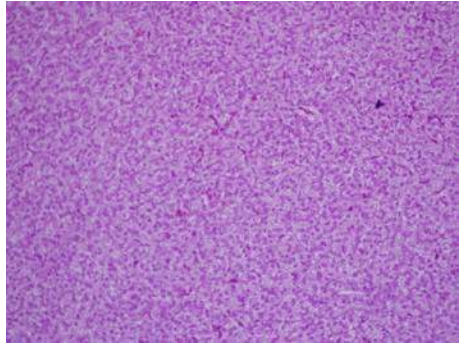
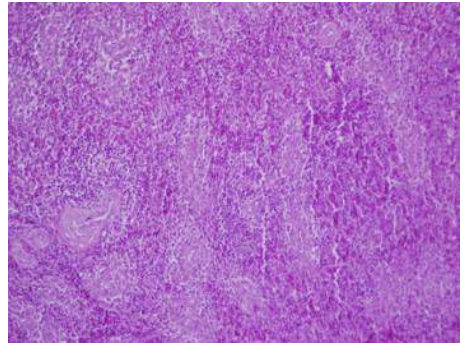
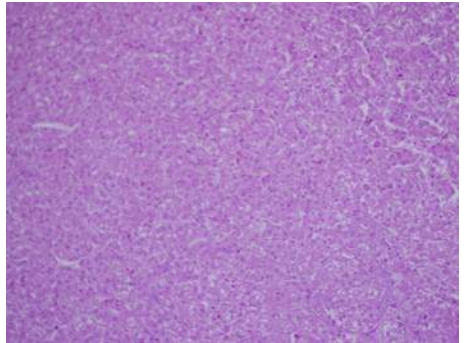
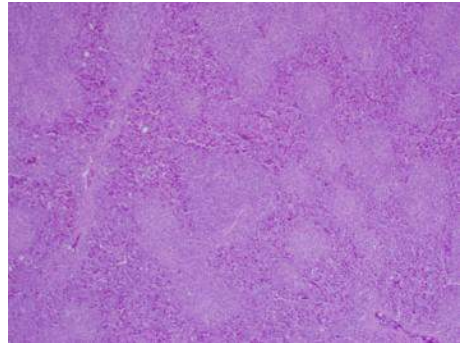
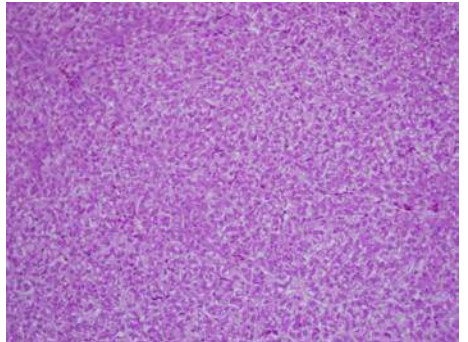
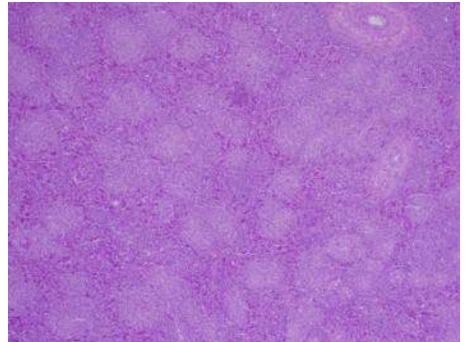
- D+3

Day	Treatment	Liver	Spleen
D+3	CTL	Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Low	Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Middle	Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	High	Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits

Treatment	Liver	Spleen
CTL		
Low		
Middle		
High		

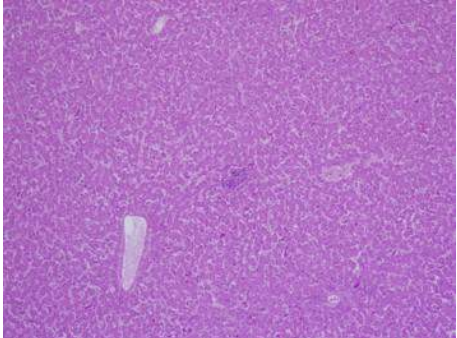
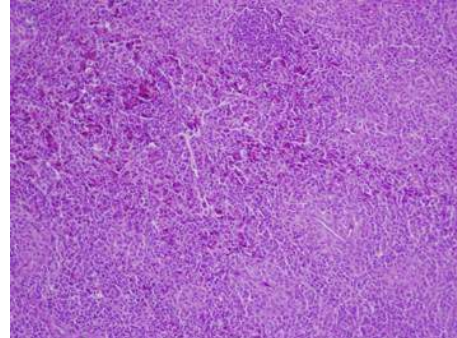
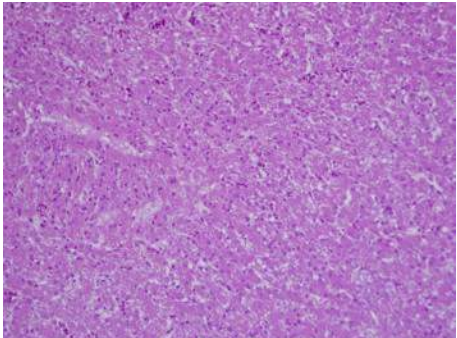
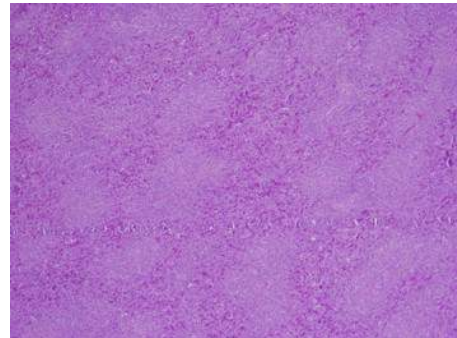
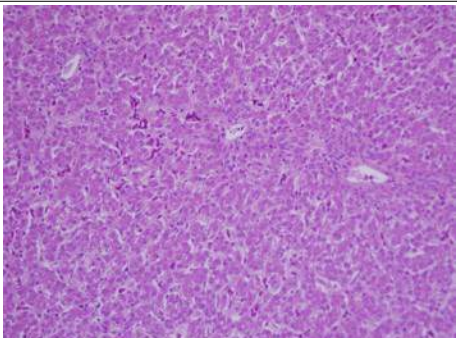
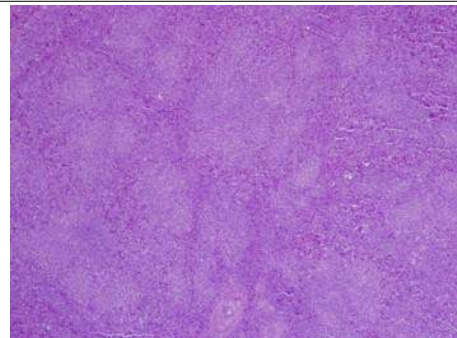
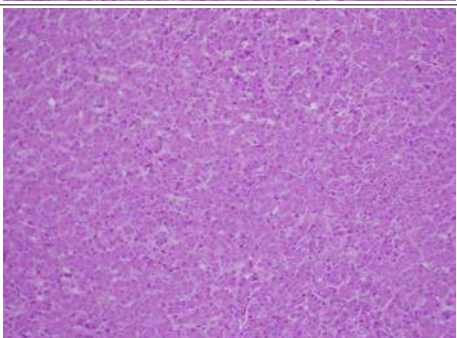
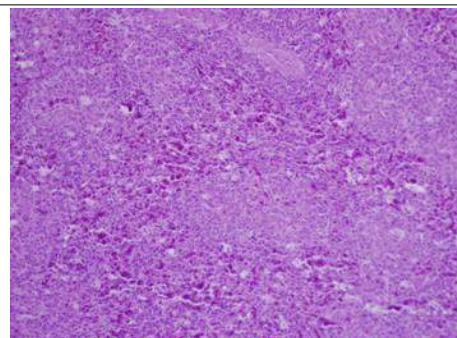
- D+7

Day	Treatment	Liver	Spleen
D+7	CTL	Minimal pericholangitis	EMH
		Multifocal lymphoid infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Low	Multifocal lymphoid infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	
		Multifocal lymphoid infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Middle	Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	High	Multifocal lymphocytic infiltration EMH	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration Pericholangitis	Within normal limits

Treatment	Liver	Spleen
CTL		
Low		
Middle		
High		

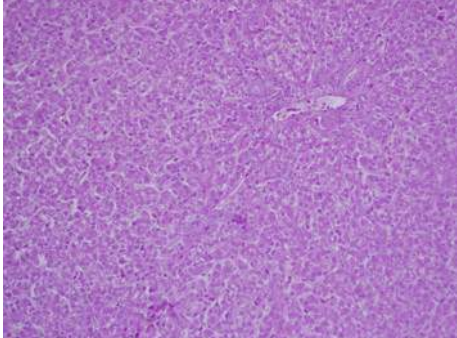
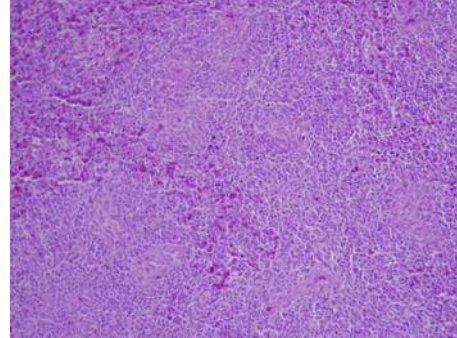
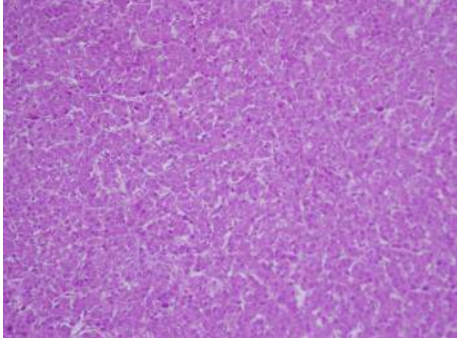
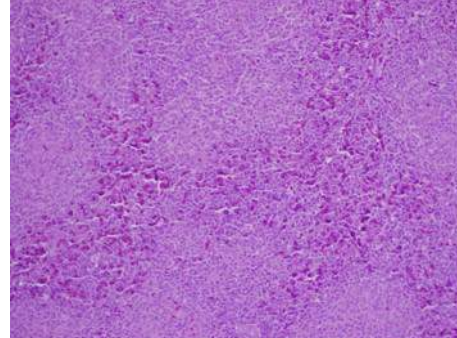
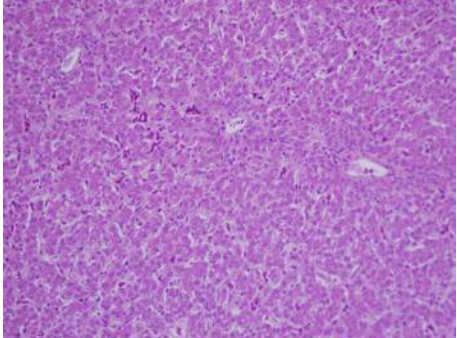
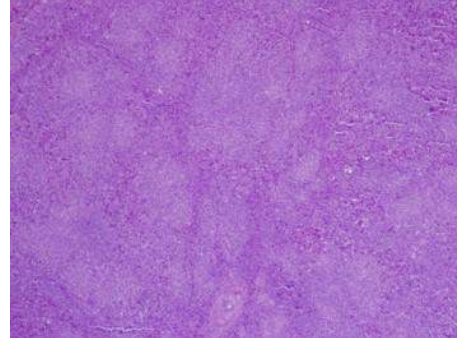
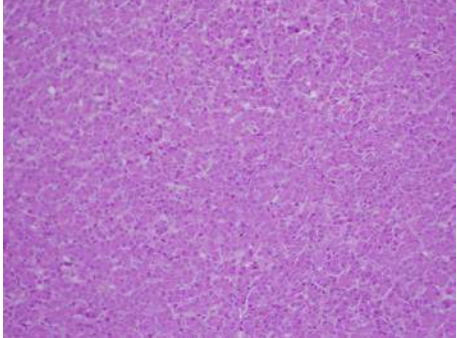
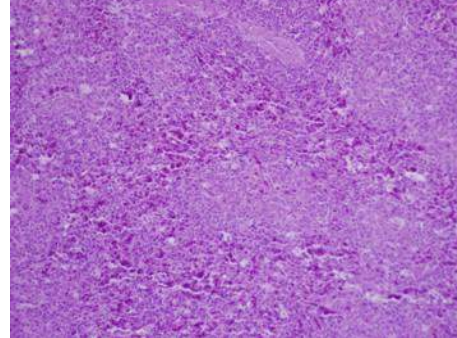
- D+14

Day	Treatment	Liver	Spleen
D+14	CTL	Minimal pericholangitis	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Low	Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
	Middle	Multifocal lymphocytic infiltration Pericholangitis	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
	High	Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits

Treatment	Liver	Spleen
CTL		
Low		
Middle		
High		

- D+21

Day	Treatment	Liver	Spleen
D+21	CTL	Minimal pericholangitis	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
	Low	Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
	Middle	Multifocal lymphocytic infiltration Pericholangitis	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
	High	Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Within normal limits	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits
		Multifocal lymphocytic infiltration	Within normal limits

Treatment	Liver	Spleen
CTL		
Low		
Middle		
High		

나. 강황(생물전환)산물이 *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* 살모넬라균에 미치는 효과

(1) 강황(생물전환)산물이 살모넬라의 성장에 미치는 효과 분석

(가) 실험방법

① 균주, 배지 및 배양조건

살모넬라 균주들은 Luria-Bertani(LB; BD Difco™) 액체배지에서 37°C, 230 rpm으로 진탕배양하였다(Table 참조).

Table 105. 본 실험에서 사용한 돼지 살모넬라균주

<i>Salmonella</i> serovar	Description	Source
<i>S. Enteritidis</i>	숙주 비특이적인 인수공통 살모넬라균 혈청형	^a ATCC 13076
<i>S. Choleraesuis</i>	돼지에 특이적으로 질병을 일으키는 숙주감응성 병원균주	ATCC 13312

^aAmerican Type Culture Collection

② 강황(생물전환)산물 추출물 준비

멸균된 LB 액체배지에 강황(생물전환)산물을 0.1% (w/v)가 되게 섞고, 37°C에서 1시간동안 진탕배양기(Vision Scientific)에서 반응시켰다. 반응 추출액은 12,000 ×g에서 10분 동안 원심분리 후, 상층액을 Syringe filter(Sartorius, Minisart® high flow syringe filters 0.22µm)를 이용하여 여과하였다.

③ 성장곡선 측정

살모넬라균을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간동안 진탕배양 후, 0.5와 5% 강황(생물전환)산물 추출물이 포함된 50 ml의 LB 액체배지에 OD600=0.02가 되도록 접종하였다. 살모넬라균들의 성장곡선은 OD600과 direct plating에 의한 cfu(colony forming units) 계수법으로 측정하였다.

(나) 결과분석

① 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 성장에 미치는 효과

강황(생물전환)산물 추출물이 *S. Enteritidis* 및 *S. Choleraesuis*의 성장에 미치는 효과를 확인하기 위해서 강황(생물전환)산물을 농도별로 배양배지에 첨가한 후 성장 억제 효과를 조사한 결과, 2종의 살모넬라균 모두에서 성장억제를 확인하지 못하였음(Figure 216. 참조). 이러한 결과는, 선발된 강황(생물전환)소재가 살모넬라균에 대한 항균능력이 없거나 미약하다는 것을 암시함.

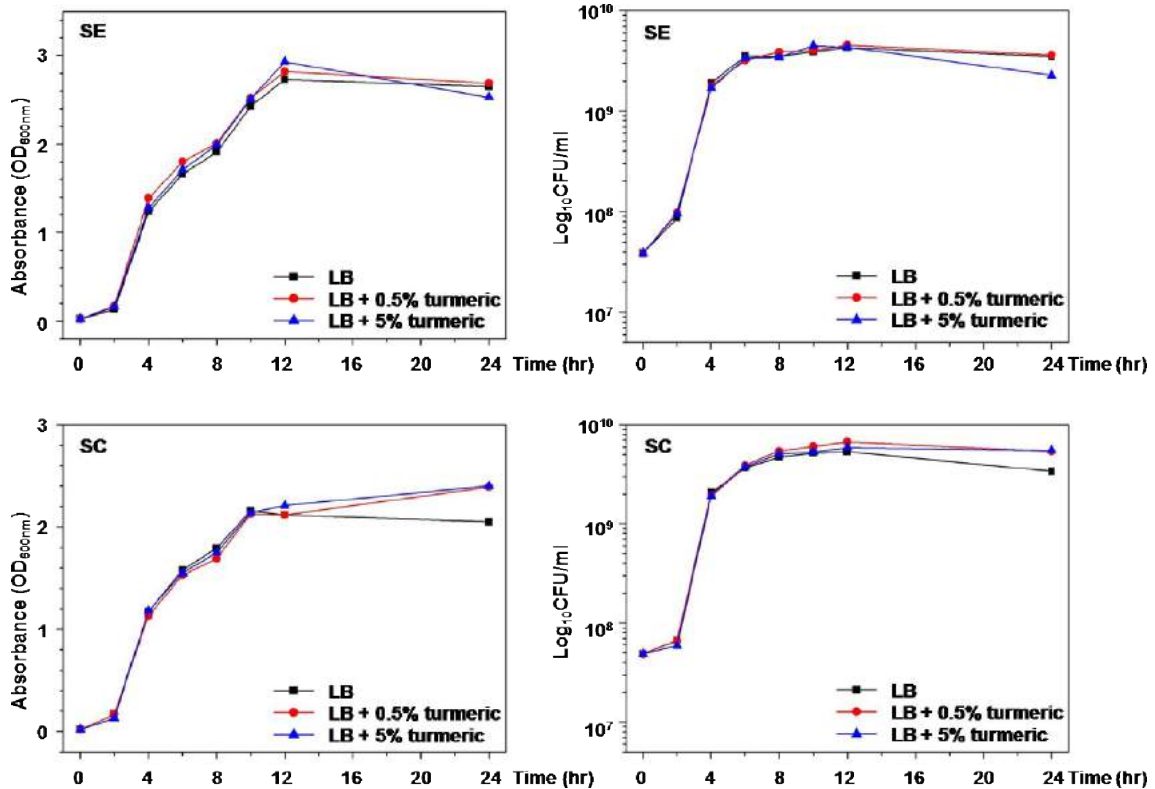


Figure 218. 강황(생물전환)산물이 *S. Enteritidis*(SE)와 *S. Choleraesuis*(SC)의 성장에 미치는 효과.
좌측패널: Optical density at 600nm. 우측패널: Colony forming units

(2) 강황(생물전환)산물이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과 분석

(가) 실험방법

① 균주, 배지 및 배양조건

상기 기술한 내용과 같음.

② 강황(생물전환)산물 추출물 준비

상기 기술한 내용과 같음.

③ 운동성(swimming motility) 측정

살모넬라 균주의 운동성은 강황(생물전환)산물 (0.5%, 5%) 추출물이 첨가된 운동성 배지 (1 % tryptone, 0.5 % NaCl, 0.3 % agar)를 이용하여 분석하였다. 살모넬라균을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간 진탕배양 한 후, 멸균된 이수시개를 이용하여 운동성 배지에 접종한 다음 37°C에서 8시간 동안 배양하였고, Motility halo의 지름(mm)을 배양 4시간 및 8시간에 측정하였다.

(나) 결과분석

① 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과

강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 운동성에 미치는 효과를 확인하기 위해서 강황(생물전환)산물 추출물 (0.5 %, 5 %)이 포함된 운동성 배지에 접종하여 관찰한 결과, *S. Choleraesuis*는 모든 운동성 배지에서 운동성이 없는 것을 확인하였다. *S. Enteritidis*의 경우, 강황(생물전환)산물 추출물(0.5 %, 5 %)이 포함된 운동성 배지에서 대조군과 비교하여 유의미한 운동성 차이를 보이지 않았다(Figure 참조).

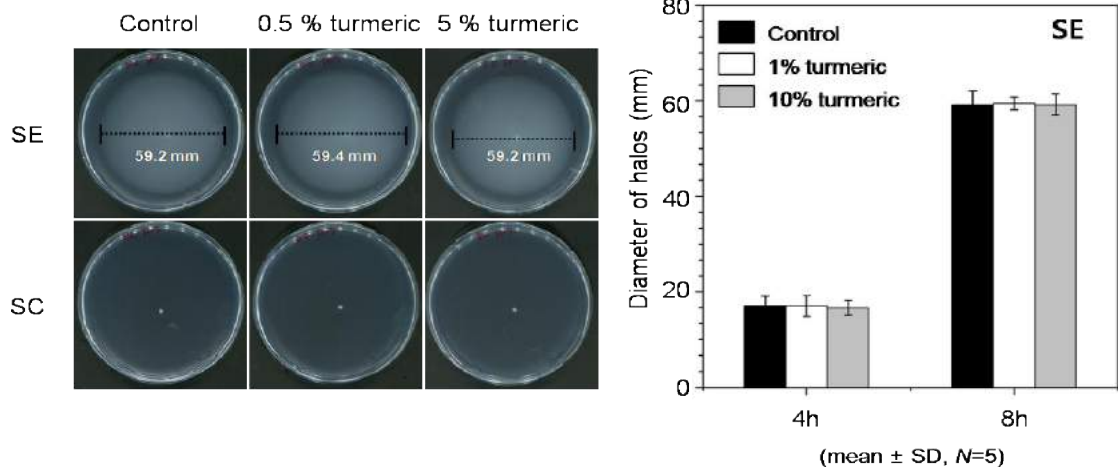


Figure 219. 강황(생물전환)산물이 *S. Enteritidis*(SE)와 *S. Choleraesuis*(SC)의 운동성에 미치는 효과.
 좌측패널: Optical density at 600nm. 우측패널: Colony forming units

(3) 강황(생물전환)산물이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과 분석

(가) 실험방법

① 균주, 배지 및 배양조건

상기 기술한 내용과 같음.

② 강황(생물전환)산물 추출물 준비

상기 기술한 내용과 같음.

③ Total proteins 분석

살모넬라균을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 19시간동안 진탕배양 한 후, 강황(생물 전환)산물(0.5%, 5%) 추출물이 포함된 4 ml의 LB 액체배지에 1/100 (v/v)로 접종하였다. OD600=1.0이 되도록 배양한 후, ice에 10분간 방치한 다음, 13,500 rpm에서 5분간 원심 분리(LaboGene)하여 상층액을 제거하였다. 100 ul의 Laemmli sample buffer를 넣고 95°C에서 15분간 끓인 다음 10 ul의 단백질 샘플을 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후에 Coomassie brilliant blue 염색방법을 적용하였다.

④ Secreted proteins 분석

기술한 바와 같이 준비한 배양액으로부터, Secreted proteins이 포함된 상층액을 Syringe filter(0.22um)를 이용하여 여과한 후, 100 % trichloroacetic acid 용액이 전체 volume에 10 %가 되도록 첨가한 후, ice에서 15 분간 방치하였다. 반응이 끝난 용액을 14,000 ×g, 4°C에서 원심분리하여 단백질을 침전시킨 후, ice-cold acetone을 넣고 washing한 다음 50 ul의 Laemmli sample 용액을 넣고 95°C에서 15분간 끓여주었다. 20 ul의 단백질 샘플을 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후에 silver 염색방법으로 염색하였다.

(나) 결과분석

① 강황(생물전환)산물 추출물이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과

2종의 살모넬라균에 대한 total proteins은 강황(생물전환)산물에 의해서 큰 변화를 보이지 않았음(Figure 참조). 대조적으로, secreted proteins은 추출물의 농도 증가에 따라 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히, 두 균주 모두에서 5% 농도에서만 특이적으로 증가하는 단백질들의 존재를 확인하였음(Figure 참조, *S. Enteritidis*: 37, 75 120 kDa 단백질 & *S. Choleraesuis*: 100 kDa 단백질). 이러한 결과를 토대로, 강황(생물전환)산물이 전반적으로 살모넬라균의 protein secretion system(s)을 활성화 시키는 것으로 추정하였다. 보통 병원성 세균의 secreted proteins은 숙주세포-병원균 상호작용에 밀접한 관련이 있기 때문에, 추후의 연구에서는 분비가 증가된 단백질들을 동정하여 강황(생물전환)산물에 대한 살모넬라균-숙주반응 mechanism을 규명하고, 그와 관련된 기능 분석을 통해서 강황(생물전환)산물과 살모넬라균, 숙주 사이에 직접적인 연관성이 있는지에 대해서 알아볼 필요가 있음.

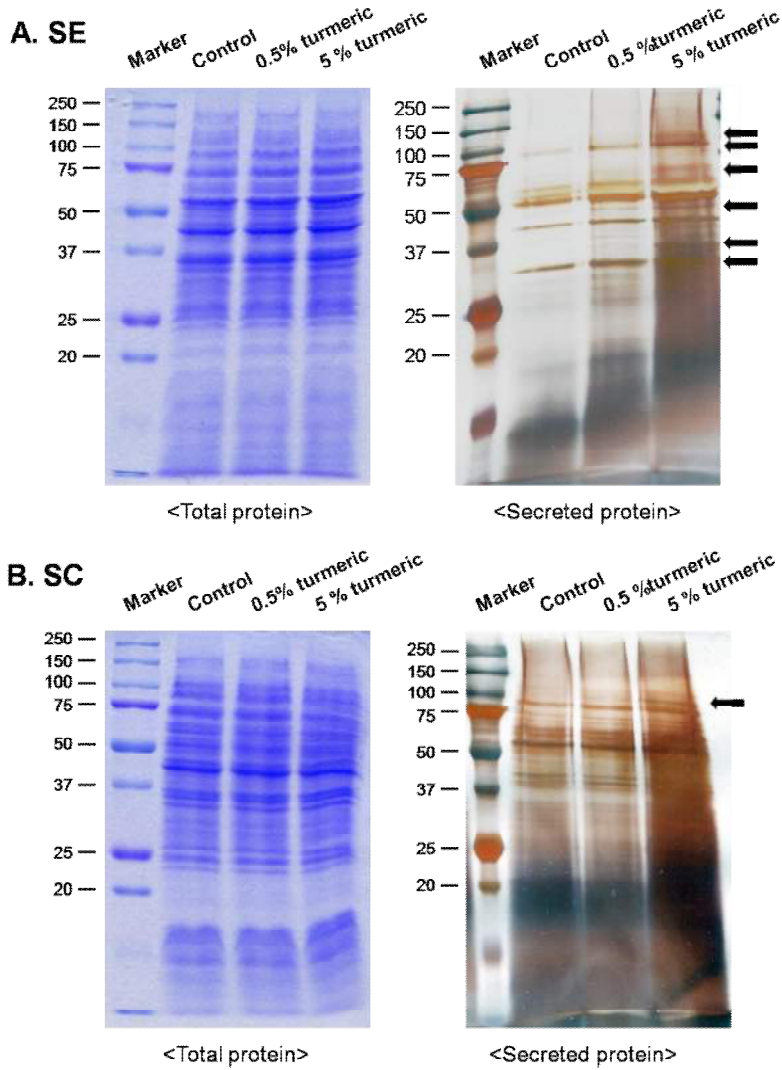


Figure 220. 강황(생물전환)산물이 살모넬라균의 단백질 발현에 미치는 효과.
 (SE: *S. Enteritidis*, SC: *S. Choleraesuis*. 화살표는 발현양상에 변화를 보인 단백질을 암시)

다. 돼지에 대한 *S. Enteritidis* 공격접종균주 선발 및 접종균주 감별 표지유전자 바이오마커 도입

(1) 자연감염균주와의 감별을 위한 접종균주 내 표지유전자 바이오마커 도입

실험과정 중 살모넬라균 자연감염의 가능성을 배제하기 위하여, 공격접종실험을 위해 사용하는 살모넬라균주에 대하여 spontaneous 항생제 내성 변이주를 개발함으로써, 감별 표지유전자를 도입하였음(Table 참조).

실험방법 및 결과: *S. Enteritidis* strain ATCC 13076의 single colony를 LB broth에 접종하여 19시간 동안 37°C, 230 rpm shaking incubator에서 진탕배양 하였다. 배양한 균 1

ml을 1.5 ml tube에 옮긴 후, 원심분리(13,500 rpm, 1 min at RT)하여 상층액을 제거하고, 100 μ l의 LB broth를 이용하여 pellet을 풀어주었고, 재부유된 100 μ l의 균부유액을 Streptomycin(50 μ g/ml), Nalidixic acid(50 μ g/ml) 항생제가 포함되어 있는 LB agar plate에 도말, 19시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 19시간 배양 후, plate에서 single colony로 자란 균이 있는지 확인한 뒤, 3-5개의 single colony를 선별하여 항생제가 포함되어 있는 LB agar plate에 도말하여, 19시간 동안 37°C incubator에서 계대하였다. 배양한 후, 성장 및 세균 형태를 관찰하고, 항생제가 포함되어 있는 LB agar plate에 연속 계대하여, 최종 변이주를 선별하였고, PZLM1이라 명명하였음(Table 참조).

Table 106. 본 실험에서 사용한 돼지 특이적인 병원성 및 인수공통 살모넬라균주의 확보

<i>Salmonella</i> serovar	Description	Source
<i>S. Enteritidis</i>	숙주 비특이적인 인수공통 살모넬라균 혈청형	^a ATCC 13076
PZLM1	공격접종실험을 위해 구축한 <i>S. Enteritidis</i> 항생제 내성 변이주 (Spontaneous SmR NalR mutant strain of <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076)	This study
<i>S. Choleraesuis</i>	돼지에 특이적으로 질병을 일으키는 숙주감응성 병원균주	ATCC 13312
<i>S. Typhimurium</i>	숙주 비특이적인 인수공통 살모넬라균 혈청형	ATCC 700720
<i>S. Typhimurium</i>	숙주 비특이적인 인수공통 살모넬라균 혈청형	ATCC 14028

^aAmerican Type Culture Collection

(2) 접종균주의 정성 및 정량 분석을 위한 표준검출법 확립

본 실험을 들어가기에 앞서, 공격접종 후 분변으로 나오는 살모넬라균의 정성 및 정량적 분석법을 확립하기 위해 공격접종 6일 전(D-6), 이유자돈 분변을 채취한 뒤, 상기에서 표지된 살모넬라균을 인공접종하여 다양한 농도의 항생제(0-50 μ g/ml)를 단독 혹은 혼합 첨가한 살모넬라 선택배지에 도말하였다. 본 실험에서 구축한 살모넬라균 항생제내성 변이주는 고농도의 streptomycin, nalidixic acid(각각 50 μ g/ml)이 첨가된 Xylose Lysine Deoxycholate(XLD) agar에서 기타 분변세균총의 배양을 최소화 하였고, XLD agar배지에서 살모넬라균에 특징적인 검은색 colony를 형성하며 자라는 것을 확인할 수 가 있었음(Figure 참조). 분변에 존재하는 기타 장관세균총 중, 두 항생제에 모두 저항성을 가지고 자라는 균이 존재 하였으나, 검은색 colony를 형성하는 *S. Enteritidis*와는 다르게 노란색 colony를 형성하였기 때문에 *S. Enteritidis*와 감별할 수 있었다. 따라서 선별된 배지를 본 실험에 정성 분석을 위한 배지로 활용하였다.

확립된 검출배지를 활용하여, 분변 중 살모넬라균의 검출한계를 조사하였을 때, 분변 그람 당 2.0×10^3 cfu/g feces까지 증균배양(Ebrichment) 없이 균수 측정이 가능하였다. 따라

서, 분변 내 균수가 이러한 detection limit 이하로 존재할 경우 증균없이 direct plating에 의해 XLD agar에서 colony를 확인할 수 없음. 이런 경우, 분변 시료의 일부를 항생제가 첨가된 RV broth에 19시간 동안 증균배양 하였고, XLD agar에 도말해 *S. Enteritidis*가 증식했는지를 확인함으로써, 살모넬라균의 존재 유무를 정량 및 정성적으로 확인하였다.

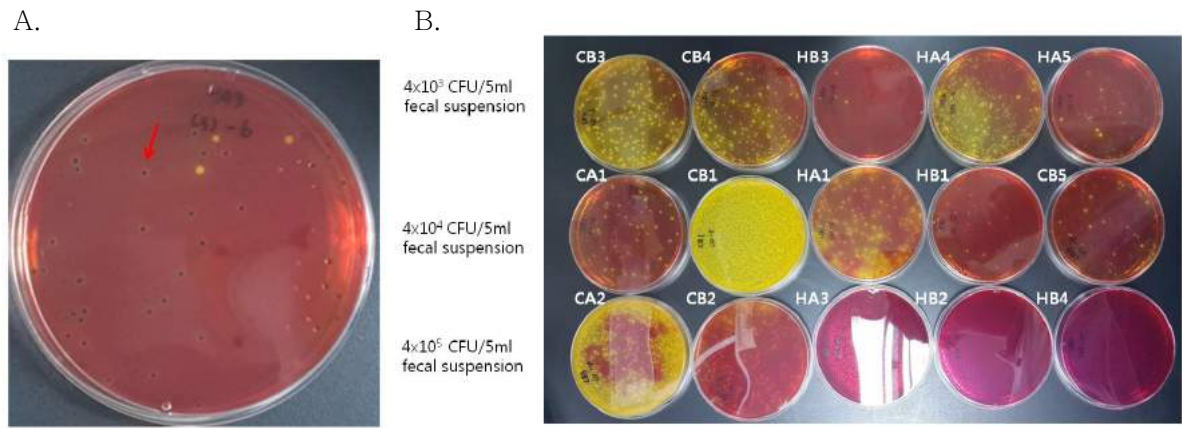


Figure 221. 돼지 분변으로부터 살모넬라균의 정성 및 정량적 분석법 확립

(A) Streptomycin & nalidixic acid(50 µg/ml)이 첨가된 Xylose Lysine Deoxycholate(XLD) agar에서 기타 분변세균총의 배양 최소화(화살표: 살모넬라균). (B) 15두의 돼지 분변에 다양한 농도의 살모넬라균을 인공접종한 뒤, 확립된 분석법을 통하여, 정성 및 검출한계에 대한 정량적 분석 실시.

라. 살모넬라 저감 후보물질의 이유자돈 유래 대식세포 반응 분석

(1) 혈액으로부터 돼지 유래 대식세포주의 확보 및 배양

(가) 세포배양법 확립

본 실험에서 사용한 돼지 대식 세포주인 3D4/31(ATCC CRL-2844)는 modified RPMI-1640 (Gibco; A10491)에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin(PS), 그리고 1% non-essential amino acid(NEAA)를 첨가한 배지를 10φ 배양접시에 넣어 37°C, 5% CO2가 있는 습한 환경에서 배양하였으며 0.25% trypsin을 이용하여 1주일에 한번 계대 배양하여 유지하였다.

(나) 살모넬라균 배양

실험에 사용한 두 종의 *Salmonella*는 각각 *S. Enteritidis*(ATCC 13076), *S. Choleraesuis*(ATCC 13312)로서 40% glycerol stock 냉동 보관된 것을 꺼내어, LB agar plate에 도말, 37°C에서 배양하여 single colony를 얻은 후 그 중 하나를 취하여 LB broth

에 접종하여 37°C, 220 rpm 에서 19시간 동안 배양하였다. 이렇게 준비된 배양액의 경우, 반복적으로 3.0×10^9 cfu/ml의 살모넬라균액을 얻을 수 있었고, 멸균된 0.9% NaCl 용액에 희석하여 사용하였다.

(다) 강황(생물전환)산물 준비

최종 정제된 분획물 0.025g을 25ml의 RPMI 1640 배지에 녹인 후(0.1%, w/v), 1시간 동안 진탕배양(37°C, 230 rpm shaking incubator) 하였다. 이후 원심분리(12,000xg, 10 min) 하여 얻어낸 상층액을 0.22 μ m syringe filter를 이용해 stock을 만들어 4°C에 보관하였고, stock 용액(1 mg/ml)으로 사용하였다.

(2) 저감 후보물질 처리 후, 대식세포 활성화 비교 : 대식세포 증식능 분석

(가) 실험방법

3D4/31 세포를 96 well cell culture plate에 대략 1×10^3 개를 seeding하여 24시간 안정화 시킨 후, 강황(생물전환)산물 Stock 1 mg/ml을 준비하였고, 1/10배 농도부터 2진 희석을 진행하여 1/640배까지 첨가하였다. 배지와 희석하여 넣어준 후, 16, 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 배양하는 동안 1일 1회 강황(생물전환)산물이 포함된 신선한 배지로 갈아주었으며, 배양 후 cell proliferation을 측정하기 위하여 남아있는 배지를 모두 제거하고, fresh 배지를 넣어준 후, 배지의 1/10 부피에 해당하는 WST-1(TAKARA, MK400) 시약을 첨가하였다. 2시간 동안 추가 배양 후, 최대 흡광도인 440 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 1회 실험에서 3개의 동일한 well을 만들어서 그 값의 평균치를 사용하였으며, 총 3번의 실험을 독립적으로 수행하여 결과를 도출하였다.

(나) 결과분석

강황(생물전환)산물이 돼지의 대식세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 강황(생물전환)산물을, Figure에서 제시된 다양한 농도로 세포에 전 처리한 후, 3일 동안 세포의 증식률을 관찰하였다. 그 결과, 강황(생물전환)산물이 조사한 농도 전반에 걸쳐 돼지의 대식세포 증식에 유의미한 영향을 주지 못하였음(Figure 참조). 하지만, 가장 높은 농도인 1/10 희석군(10%에 해당)에서 72시간 동안 배양하였을 때, 성장이 유의하게 저해됨이 관찰하였음($p < 0.05$). 따라서 세포의 성장에 영향을 주지 않는 최대 농도인 1/20 희석액(5%에 해당)이 강황(생물전환)산물에 대한 돼지의 대식 세포의 영향을 관찰하기에 가장 적절한 농도로 결정하였고, 이후 실험의 경우 1/20(5%)과 1/200(0.5%) 농도를 사용하였다.

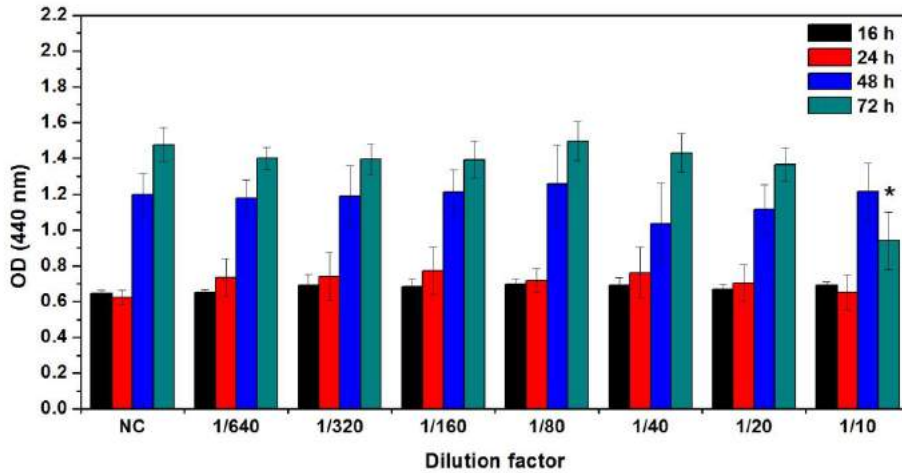


Figure 222. 강황(생물전환)산물의 대식세포 증식능 분석

(3) 저감 후보물질 처치 후, 대식세포 활성화 비교 : 살모넬라균 탐식능 및 포식능 비교 분석

(가) 실험방법

① 살모넬라균 탐식능 분석(Phagocytosis assay)

돼지 대식세포주 3D4/31 세포를 배양 접시에서 80-90%가 되게 키운 후 0.25% trypsin 을 이용하여 떼어 낸 후 세포 수를 세어서 24 well cell culture plate에 각 well 당 1×10^5 개가 되도록 넣어주었다. 세포가 잘 부착하도록 1일 배양한 후, 강황(생물전환)산물을 넣어 16시간동안 배양하였고, 배지를 전부 제거한 후 강황(생물전환)산물이 남아 있지 않도록 PBS를 이용해 1회 washing, 항생제가 들어있지 않은 신선한 배지를 첨가하였다. Phagocytosis assay를 위하여, 각 well당 1×10^5 개의 bacteria를 넣어 준 후 1-3 시간 동안 반응하였다. 반응 후, bacteria가 포함된 배지를 전부 제거한 후 PBS로 1회 washing 하였 고, 20 ug/ml 농도의 gentamicin이 들어있는 신선 배지를 넣고 1시간 동안 배양하여 세포 밖에 남아있는 bacteria를 전부 제거하였다. 배양 후, 다시 배지를 제거하고 PBS로 1회 washing 한 뒤, 1% triton / 0.9% NaCl 용액을 넣고 상온에서 5분간 반응하여 세포를 용 해하였고, well 안에 있는 모든 세포를 취하여 남아있는 균수를 측정하였다.

② 살모넬라균 포식능 분석(Salmonella killing assay)

각 well당 1×10^5 개의 bacteria를 넣어 준 후 2 시간 동안 반응하였다. 반응 후 bacteria가 포함된 배지를 전부 제거한 후 PBS로 1회 washing 하였고, 20 ug/ml 농도의 gentamicin이 들어있는 신선한 배지를 넣고 1-5시간 동안 배양하여 세포 밖에 남아있는 bacteria를 전부 제거하였다. 배양 후, 다시 배지를 제거하고 PBS로 1회 washing 한 뒤, 1% triton / 0.9% NaCl 용액을 넣고 상온에서 5분간 반응하여 세포를 용해하였고, well 안에 있는 모든 세포를 취하여 남아있는 균수를 측정하였다.

(나) 결과분석

강황(생물전환)산물의 유효농도가 돼지의 대식세포의 *Salmonella*에 대한 탐식과 포식능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 돼지의 대식세포에 *Salmonella*를 감염시키기 전 16 시간 동안 강황(생물전환)산물의 유효농도에서 반응시킨 후, 강황 추출물을 전부 제거하였다. 그 이유는 강황(생물전환)산물 자체가 *Salmonella* 균에 영향을 주어, 세포에 대한 반응이 아닌 세균의 능동적 세포 유입의 가능성을 배제하기 때문임. *Salmonella*는 intracellular pathogen으로서 종류에 따라 숙주동물종에 특이적인 것과 광범위 숙주종에 감염이 가능한 숙주-비특이적 종이 있다고 알려져 있음. 따라서 감염숙주의 종 특이성을 배제하기 위하여, 본 실험에서는 돼지숙주에 특이적인 *S. Choleraesuis*와 인수공통숙주에 감염하는 것으로 알려진 *S. Enteritidis*를 모두 사용하였다.

Table 107. *Salmonella*에 대한 돼지 대식세포의 탐식능(phagocytic activity) 및 포식능(killing) 분석

Bacterial strain	Incubation time		BPP concentrations		
	Bacteria	Gentamicin	Control	0.5%	5%
<u>S. Enteritidis :</u>					
탐식능비교	1 hr	1 hr	293 ± 38	365 ± 21	202 ± 15
	2 hr		13,600 ± 833	12,867 ± 2,074	18,933 ± 4,255
	3 hr		362,267 ± 28,328	314,533 ± 45,723	269,200 ± 26,975
포식능비교	2 hr	1 hr	13,600 ± 833	12,867 ± 2,074	18,933 ± 4,255
		3 hr	20,467 ± 5,581	23,733 ± 4,596	30,133 ± 5,565
		5 hr	143,833 ± 42,352	56,433 ± 22,036	66,700 ± 2,226
<u>S. Choleraesuis :</u>					
탐식능비교	1 hr	1 hr	2.6 ± 0.8	2.6 ± 1.2	1 ± 0.0
	2 hr		88 ± 15	61 ± 8	57 ± 10
	3 hr		1,540 ± 103	2,316 ± 387	2,186 ± 522
포식능비교	2 h	1 hr	88 ± 15	61 ± 8	57 ± 10
		3 hr	205 ± 30	126 ± 30	133 ± 32
		5 hr	286 ± 77	124 ± 46	99 ± 15

① 돼지 대식세포의 탐식능력 비교 분석

- 돼지유래 대식세포주인 3D4/31 세포 1×10^5 개에 10배의 *S. Choleraesuis*를 감염시킨 후, 1시간 동안 5개미만의 매우 적은 양을 탐식하였기 때문에 phagocytosis가 거의 일어나지 않았던 것으로 추정됨. 2시간 후, 대조군과 0.5%, 5% 강황(생물전환)산물 처리군에서 각각 88(±15), 61(±8), 57(±10)개를 탐식하여 별 다른 유의적인 차이를 보여주지 못하였음 ($p < 0.05$). 반면, 3시간 후, 각각 1,540(±103), 2,316(±387), 2,186(±522)개의 *S. Choleraesuis*를 탐식하여 강황(생물전환)산물 처리군에서 탐식능력이 약간 더 증가하였음(Table 참조).

- 이에 반하여 *S. Enteritidis*는 감염 1시간 후 대조군과 0.5%, 5% 강황(생물전환)산물 처리군에서 각각 293(±38), 365(±21), 202(±15)개가 탐식되었고, 2시간 후 각각 13,600(±833), 12,867(±2,074), 18,933(±4,255)개가 탐식되었으며. 3시간 후 362,267(±28,328), 314,533(±45,723), 269,200(±26,975)개가 탐식 되었음(Table 참조).

- 종합적으로, 강황(생물전환)산물의 처리가 돼지 유래 대식세포주의 *Salmonella* 균 탐식 능력에 있어, 통계적으로 유의미한 차이를 보이지는 않았음($p < 0.05$). 반면, 목적동물인 돼지숙주 특이적인 *S. Choleraesuis*보다 *S. Enteritidis*의 탐식능력이 더 높았던 것은, 부분적으로 *S. Choleraesuis*가 non-motile이기 때문에(운동성 실험결과 참조) 대식세포와 접촉하

는 기회가 적어서, 같은 시간에 상대적으로 적은 양이 탐식 되었을 것이라 추정함. 하지만 전체적으로 강황(생물전환)산물이 살모넬라균 혈청형과 무관하게 돼지 유래 대식세포의 탐식 능력에 영향을 주지 않음을 알 수가 있었음(Figure 참조).

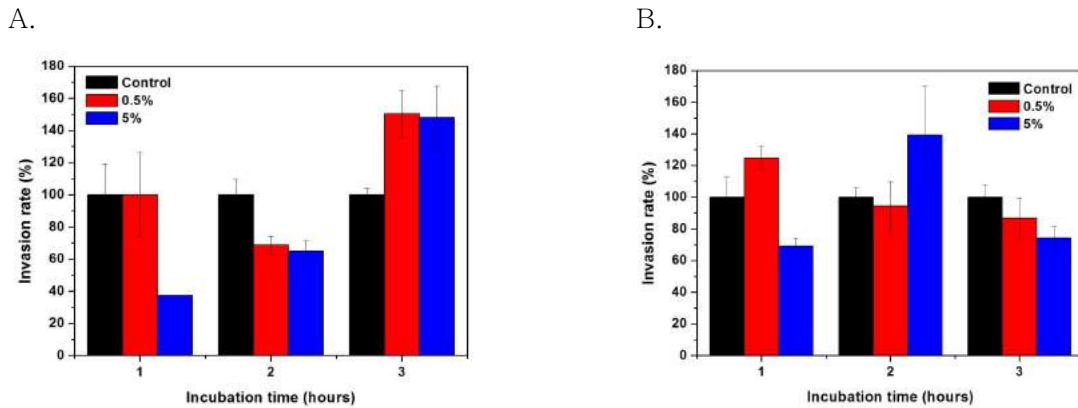


Figure 223. 돼지 대식세포의 *Salmonella* 탐식능력에 대한 강황(생물전환)산물의 효과
(A) *S. Choleraesuis*에 대한 탐식능. (B) *S. Enteritidis*에 대한 탐식능.

② 돼지 대식세포의 포식능력 비교 분석

- 유사한 방법으로 2시간 동안 infection 시킨 후, 더 이상의 세포 내 *Salmonella*의 유입을 막기 위하여 gentamicin이 포함된 신선 배지를 첨가함으로써 배지에 남아있는 *Salmonella*를 모두 제거하였다. 대식세포 내 *Salmonella*균의 killing 효율을 1, 3, 5시간 후 측정하여 그 변화를 조사하였다.

- 그 결과, *S. Choleraesuis*의 경우, 돼지 대식세포에 2시간 infection 후 gentamicin 배지에 추가로 1시간 배양하였을 때, 대조군과 0.5%, 5% 강황(생물전환)산물 처리군에서 각각 88(±15), 61(±8), 57(±10)개의 생존균수가 존재하였던 반면, 3시간 후에는 각각 205(±30), 126(±30), 133(±32), 그리고 5시간 후에는 각각 286(± 77), 124(±46), 99(±15)개의 균수를 측정하였음(Table 참조). 이러한 결과는, *S. Choleraesuis*는 돼지의 대식세포 안에서 증식 가능함을 암시하였으며, 대조군에 비해 강황(생물전환)산물 처리군에서 유의성 있게 포식능이 증가함을 보여주었음(Table 참조, $p < 0.05$).

- 마찬가지로 *S. Enteritidis*에 대한 포식능력은 2시간 infection 후, gentamicin 배지에 1시간 처리하였을 때, 대조군과 0.5%, 5% 강황(생물소재) 처리군에서 각각 13,600(±833), 12,867(±2,074), 18,933(±4,255)개의 생존균수를 보여주었으며, 3시간 배양 후에는 20,467(±5,581), 23,733(±4,596), 30,133(±5,565)의 생존균수를, 그리고 5시간 배양 후에는 각각 143,833(±42,352), 56,433(±22,036), 66,700(±2,226)개의 생존균수를 나타내었음(Table 참조). 이러한 결과는, *S. Enteritidis*의 경우, 강황(생물전환)소재 처리군에서 포식능력이 대조군에 비해 유의하게 증가시킬 수 있음을 암시함(Figure 참조).

- 종합적으로, 강황(생물전환)소재의 처리가 2종의 살모넬라균(*S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*)에 대한 돼지 대식세포의 포식능력을 향상시킬 수 있음을 확인하였음(Figure 참조).

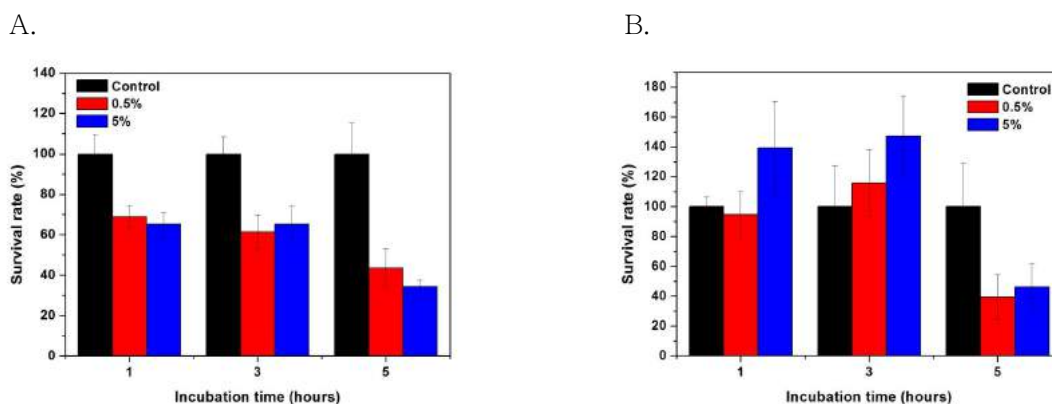


Figure 224. 돼지 대식세포의 *Salmonella* 포식능력에 대한 강황(생물전환)산물의 효과
(A) *S. Choleraesuis*에 대한 포식능. (B) *S. Enteritidis*에 대한 포식능.

(4) 강황(생물전환)산물이 돼지 유래 대식세포주 3D4/31의 cytokine 발현에 미치는 영향 분석

(가) 실험방법

6 well plate에 3D4/31 cell을 약 2.0×10^6 /well개가 되도록 seeding하고 안정화시키며, 전체 면적의 약 80%까지 키운 후, 강황(생물전환)산물 stock을 0.5% 또는 5%를 넣고 16시간 동안 배양하였다. 16시간 후, 배지를 제거하고, PBS로 2회 washing 한 뒤, 항생제가 들어있지 않은 배지를 첨가하였다. 대략 2.0×10^7 /well의 *S. Enteritidis* 또는 *S. Choleraesuis*를 넣어준 후 1시간 동안 배양하였다. 배지를 모두 제거하고 PBS로 2회 washing하였고, 하나의 well에 500 μ l의 Trizol(Life technology)을 넣어 cell이 다 녹은 것을 확인한 후, DEPC water를 처리한 1 ml microtube에 옮겼음. Tube에 Chloroform 100 μ l를 넣고, 손으로 10회 정도 부드럽게 섞어주었으며, 상온에 1분 정도 놓아둔 후, 12,000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 원심분리 하였다. 원심분리 후, RNA가 존재하는 가장 위층의 상층액 300 μ l만을 취하여 Isopropanol 300 μ l(1:1)을 넣어둔 새로운 tube에 옮겨, 흰색침전물의 RNA를 확인한 후, 손으로 부드럽게 혼합하였고, 상온 10분 동안 반응하였다. 15,000 \times g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 원심분리한 뒤, 상층액을 버리고, 75% Ethanol(in DEPC water) 1 ml를 넣고 tube 바닥에 붙은 RNA를 쳐서 떨어뜨린 후 vortexing하였고, 7,500 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 tube 뚜껑을 열어 공기 중에서 말려 남아있는 Ethanol을 제거한 뒤, 50 μ l의 DEPC water를 넣고 조심스럽게 섞어주고 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 다음 얼음에 보관하였다. RNA양을 정량하여 3 μ g의 total RNA를 cDNA를 만드는

데 사용하였고, 남은 RNA는 -20°C에 보관하였다. cDNA를 합성하는 방법과 Real-time PCR방법은 다음과 같음: 50 pmol oligo(dT) 15 primer 1 µl, each 10mM dNTP mixture 1 µl, RNA 3 µg을 넣고 D.W를 채워 10 µl로 만든 후, 65°C에서 5분간 가열하였다. 즉시 4°C에 넣고, RNA mixture 10 µl에 5X reaction buffer 4 µl, RNase inhibitor 0.5 µl, Reverse transcriptase 0.5 µl를 넣고 D.W를 채워 최종 20 µl로 조성하였다. 42°C 30분, 70°C 15분간 반응한 후, 4°C에 보관하였으며, 이 때 D.W를 30 µl 첨가하여 총 부피가 50 µl가 되게 하여 보관함. 이렇게 만들어진 cDNA를 가지고 Real-time PCR을 수행하여 유전자 발현 변화를 알아보았으며, 2× SYBR premix 10 µl, cDNA 0.5 µl, 1 pmol/µl gene specific primers 4 µl(Table 참조), D.W 5.5 µl를 넣어서 총 부피가 20 µl가 되게 조성하였고, 분석방법은 Livak and Schmittgen (2001, Methods)의 방법을 적용하였다.

Table 108. 본 실험에 사용된 primer oligonucleotide sequences

Primer ID	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Reference
GADPH_F	CAT TGA CCT CCA CTA CAT	Suming Zhou et al., 2014
GADPH_R	CCT TTC CAT TGA TGA CAA	
IL-1β_F	CCA AAG AGG GAC ATG GAG AA	In this study
IL-1β_R	GGG CTT TTG TTC TGC TTG AG	
IL-6_F	AAT GCT CTT CAC CTC TCC	Suming Zhou et al., 2014
IL-6_R	TCA CAC TTC TCA TAC TTC TCA	
IL-8_F	TTC TGC AGC TCT CTG TGA GGC	J. Volf et al., 2007
IL-8_R	GGT GGA AAG GTG TGG AAT GC	
IL-12_F	CCA CCT GGA CCA TCT CAG TT	In this study
IL-12_R	CAG CAG ATT TTG GGA GTG GT	
IL-18_F	ATG CCT GAT TCT GAC TGT TC	J. Volf et al., 2012
IL-18_R	CTG CAC AGA GAT GGT TAC TGC	
INOS_F	GTG ATG GCC GAC CTG ATG TT	J. Volf et al., 2012
INOS_R	GGC CCA GGA AAT GTT CGA G	
TNF-α_F	CCC CCA GAA GGA AGA GTT TC	J. Volf et al., 2007
TNF-β_R	CGG GCT TAT CTG AGG TTT GA	

(나) 결과분석

- 강황(생물전환)산물을 16시간 처리하였을 때, 세포의 cytokine의 발현은 전체적으로 큰 변화가 없었음(Figure 참조, $p < 0.05$).

- 반면, *S. Enteritidis* 감염실험의 경우, 강황(생물전환)산물을 처리하지 않은 대조감염군에서 발현이 증가했던 IL-6, IL-8, TNF- α 의 발현이 0.5%와 5% 강황(생물전환)산물 처리군에서 유의성있게 비감염군 수준으로 발현이 감소되었음(Figure 참조, $p < 0.05$).

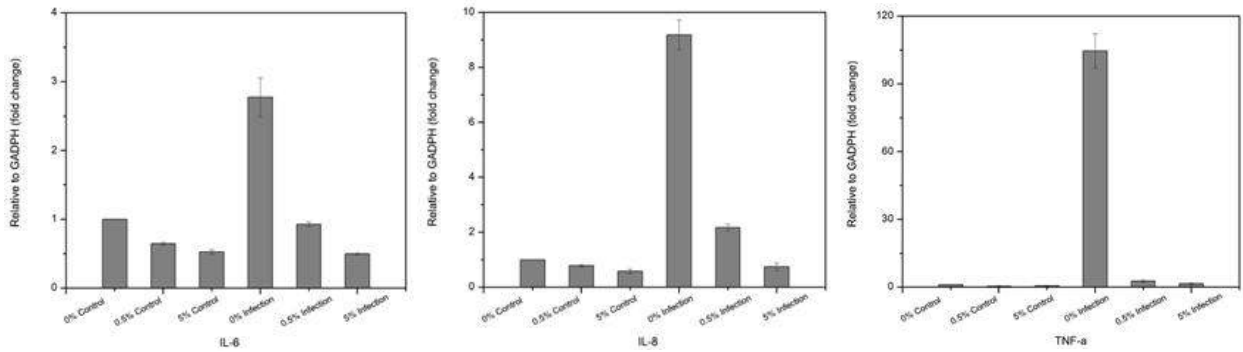


Figure 225. 강황(생물전환)산물이 *S. Enteritidis* 감염에 따른 돼지 유래 대식세포(3D4/31) cytokine 발현에 미치는 영향. (좌: IL-6, 중: IL-8, 우: TNF- α).

- 마찬가지로 감염 시 증가했던 iNOS의 발현은 강황(생물전환)산물 처리 농도에 비례하여, 점차 감소되는 것을 확인하였음(Figure 참조, $p < 0.05$). IL-1 β 의 경우, 감염 후에도 0%, 0.5%군에서는 유전자발현의 변화가 없었으나, 5% 처리군에서 발현이 유의성있게 증가하였음(Figure 참조, $p < 0.05$). IL-12와 IL-18은 0.5%군에서 약간 증가하다가 5%군에서 약간 감소하는 서로 유사한 패턴을 나타내었음(Figure 참조).

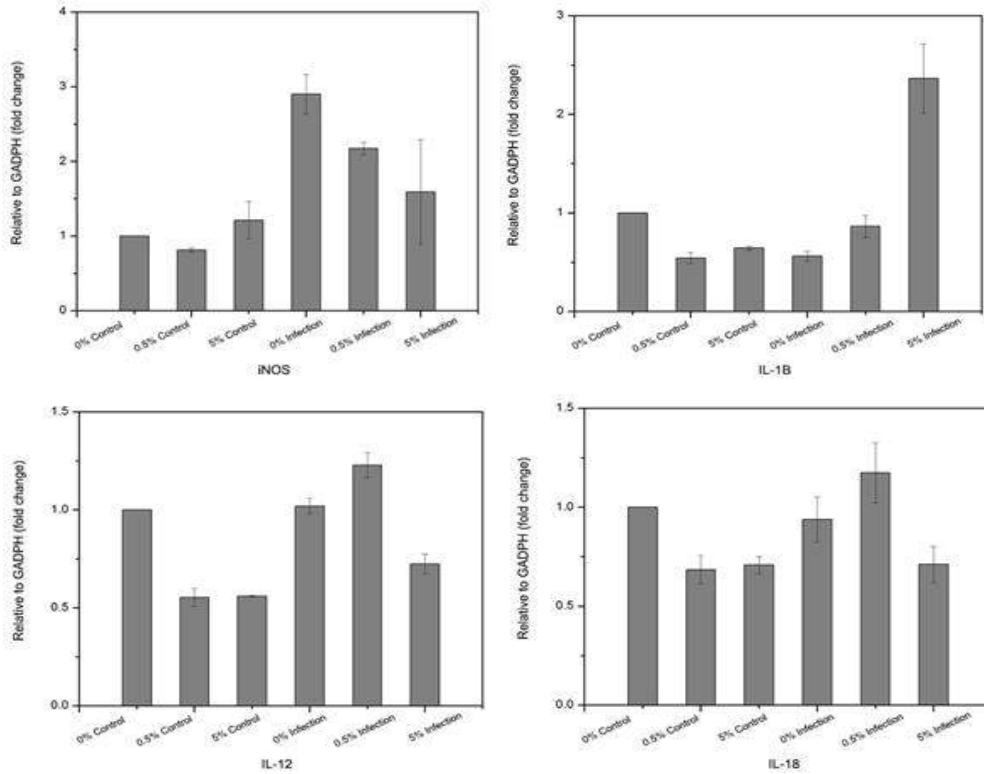


Figure 226. 강황(생물전환)산물이 *S. Enteritidis* 감염에 따른 돼지 유래 대식세포(3D4/31) cytokine 발현에 미치는 영향. (좌상: iNOS, 우상: IL-1B, 좌하: IL-12, 우하: IL-18).

- 한편, *S. Choleraesuis*의 경우, 감염 후 발현 증가하는 IL-6, IL-8, TNF- α 의 발현이 강황(생물전환)산물 처리 농도에 비례하여 유의하게 점차 감소되었음(Figure 참조, $p < 0.05$). 반면, iNOS, IL-1 β , IL-12, IL-18의 발현은 모두 0.5%군에서 약간 증가하다가 5%군에서는 감소하는 유사한 패턴을 보여주었음(Figure 참조, $p < 0.05$).

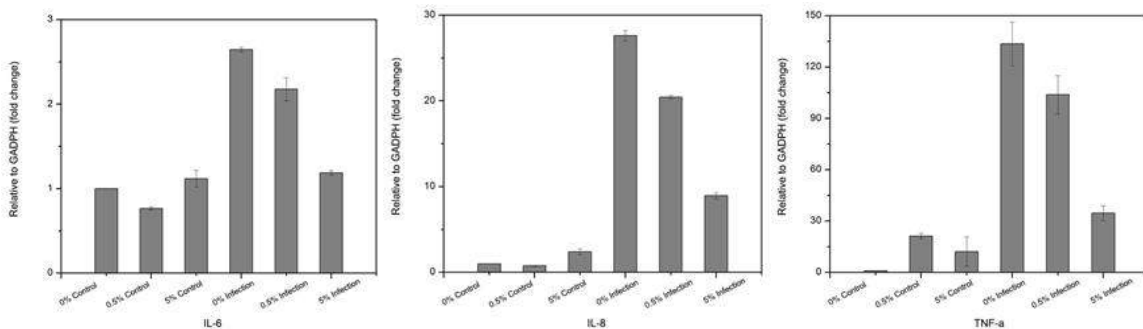


Figure 227. 강황(생물전환)산물이 *S. Choleraesuis* 감염에 따른 돼지 유래 대식세포(3D4/31) cytokine 발현에 미치는 영향. (좌: IL-6, 중: IL-8, 우: TNF-a).

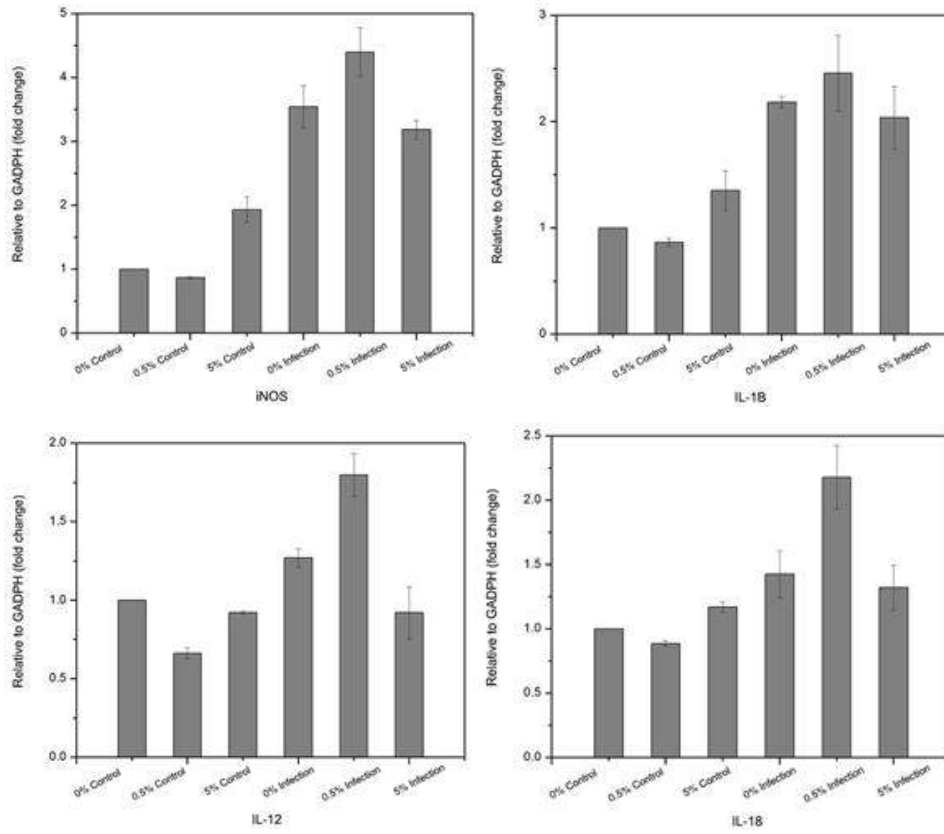


Figure 228. 강황(생물전환)산물이 *S. Choleraesuis* 감염에 따른 돼지 대식세포(3D4/31) cytokine 발현에 미치는 영향. (좌상: iNOS, 우상: IL-1B, 좌하: IL-12, 우하: IL-18).

마. S. Enteritidis 공격균주 선발 및 21일령 이유자돈에 대한 감염프로토콜 확립

(1) 문헌검색을 통해 감염성이 잘 확립된 인수공통살모넬라균 공격접종 균주 선발

접종균주 선발은 기존 문헌검색을 통하여, 초기 연구과제에서 제안한 바와 같이 인수공통살모넬라균 혈청형인 S. Enteritidis 중에서, 돼지 구강 공격접종 후, 약 10-14일간 지속적으로 분변을 통해 균을 배출하는 것으로 알려진 ATCC 13076 균주를 확보하여, 실험에 사용하였음(Table 참조)

Table 109. 이유자돈에 대한 공격접종을 위한 균주 선발 및 바이오마커 표지 현황

Salmonella serovar	Description	Source
S. Enteritidis	숙주 비특이적인 인수공통 살모넬라균 혈청형	^a ATCC 13076
PZLM1	공격접종실험을 위해 구축한 S. Enteritidis 항생제 내성 변이주 (Spontaneous SmR NalR mutant strain of S. Enteritidis ATCC 13076)	This study

(2) 21일령 이유자돈에 대한 공격접종 농도 선정 및 감염 kinetic 결정

목적동물 공격접종 실험을 위하여, 문헌에서 보고되었던 선발균주에 대한 감염 kinetic의 재현성을 검증하고, 접종경로 및 감염용량을 결정하고자 실험을 진행하였다. 그 결과, 예상했던 바와 달리, 고농도(1.0×10^{10} cfu을 함유한 균액 3 ml) 균부유액을 구강경로로 1회 접종하였을 때, 감염 3일 후(D+3일째)부터 살모넬라균이 빠르게 장관으로부터 제거됨을 확인하였음(Table 참조).

Table 110. 이유자돈에 대한 공격접종 농도 선정 및 감염 kinetic 분석-1

접종균수/경로/횟수		접종후 일수			
		D+0	D+1	D+3	D+7
1.0×10^{10} cfu/ 구강 3ml/ 1회	분변양성두수/총두수	공격접종	5 / 5	2 / 5	1 / 5
	분변양성률(%)		100	40	20

공격접종 이후 분변으로부터 균 배출이 너무 빨리 이루어졌기 때문에, 2차적으로 공격접종 횟수를 추가하여, 고농도(1.0×10^{10} cfu을 함유한 균액 3 ml) 균부유액을 구강경로로 이틀에 걸쳐 연속 2회접종 하였을 때, 분변 살모넬라균의 배출 양상을 조사해 보았음. 그 결과, 1회 단일 접종과 비교할 때, 60%의 감염 이유자돈이 D+7일째까지 분변으로 균을 배출함을 확인하였음(Table 참조). 이러한 결과를 토대로, 이유자돈 공격접종 실험에서 1차접종 후, 7일간 분변 균수를 모니터링하고, 장관으로부터 제거되는 7일 후 이틀 연속 공격접종

을 실시하여 10일간 균 배출 양상을 조사하기로 결정하였음(Table 참조).

Table 111. 이유자돈에 대한 공격접종 농도 선정 및 감염 kinetic 분석-2

접종균수/경로/횟수		접종후 일수				
		D+0	D+1	D+2	D+7	D+10
- 1.0×10 ¹⁰ cfu	분변양성두수/총두수	1차	2차	5 / 5	3 / 5	0 / 5
- 구강 3ml		공격	공격			
- 2일연속 2회접종	분변양성률(%)	접종	접종	100	60	0

바. S. Enteritidis 살모넬라균 공격접종에 대한 방어효과 검증 및 임상 및 병리학적 지표 분석

(1) 공격접종 실험군 및 시료채취 일정 설계

(가) 이유자돈에 대한 강황(생물전환)산물 급여 및 살모넬라균 공격접종

① 실험방법

상기에 기술한 바와 같이, 결정된 공격접종 일정대로 실험을 진행하였다. 총 20마리의 생후 21일령 이유자돈을 비접종군(대조군 & 고농도생물전환산물투여군(40 mg/kg), 각 군별 5두)과 공격접종군(대조군 & 고농도생물전환산물투여군(40 mg/kg), 각 군별 5두) 총 4개군으로 나누어 구획된 돈사를 이용하여 사육하였음(Table 참조). 입식 후, 7일 동안 순화시키며 본 실험 개시 전에 일괄적으로 항생제를 처치하였고, 사료와 물은 자유급여 하였으며, 각 실험군별로 소비된 사료의 양, 체중 및 체온을 주기적으로 측정 및 기록하였음(Table 참조). 이 후, 강황(생물전환)산물을 혼합급여하기 시작하였으며(D-14일), 14일 급여 후(D+0일)에 공격접종군 10마리에 대하여 살모넬라균 항생제내성 표지 변이주 PZLM1 균주를 이유자돈 두당 약 1.0 x 10¹⁰ cfu를 포함하는 3 ml 균부유액을 경구투여 하였다. 공격접종 이후, 공격접종군은 비접종군과 돈사를 분리시켰으며, 1차 접종 후 살모넬라균의 분변 배출량을 모니터링하였고, 1차 공격접종 후 7, 8일이 지나는 날(D+7 & D+8일) 동일한 수의 균을 이를 연속으로 재투여 하였고, 이후 감염 양상을 분석하였음(Table 참조).

Table 112. 이유자돈에 대한 생물전환산물 살모넬라균 감염효능 분석을 위한 실험설계

감염군	3/15일	3/22일 (D-14)	3/29일 (D-7)	4/05일 (D+0)	4/06일 (D+1)	4/08일 (D+3)
	20두 입식 순화 항생제처치	고농도 (40 mg/kg) 급여개시 채혈/채변 ^a	채혈/채변	채혈/채변 공격접종: - 균주 PZLM1 - 1.0×10 ¹⁰ cfu - 구강 3ml - 1회	채변	채변
대조군+비감염(CB)	5두	5두	5두	5두	5두	5두
대조군+감염군(CA)	5두	5두	5두	5두	5두	5두
고농도처치군+비감염(HB)	5두	5두	5두	5두	5두	5두
고농도처치군+감염군(HA)	5두	5두	5두	5두	5두	5두

감염군	4/12일 (D+7)	4/13일 (D+8)	4/14일 (D+9)	4/19일 (D+14)	4/26일 (D+21)
	채혈/채변 공격접종: - 균주 PZLM1 - 1.0×10 ¹⁰ cfu - 구강 3ml - 1회	공격접종: -균주 PZLM1 - 1.0×10 ¹⁰ cfu - 구강 3ml - 1회	채변	채혈/채변	채변 안락사 -채혈(최대) -조직 ^b -Colon내용물
대조군+비감염(CB)	5두	5두	5두	5두	5두
대조군+감염군(CA)	5두	5두	5두	5두	5두
고농도처치군+비감염(HB)	5두	5두	5두	5두	5두
고농도처치군+감염군(HA)	5두	5두	5두	5두	5두

^a 채혈샘플

- EDTA 처리 혈액(EDTA tube 이용)

- 혈청(SST™ II Advance tube를 이용)

^b조직샘플: 포르말린 용액 고정 간, 신장, 비장, 소장, 장간막 림프절 각각 0.5 cm × 1 cm 이상 크기.

(나) 성장지표 분석

① 소비된 사료의 양, 체중 및 체온 측정

상기 일정에 맞추어, 개별 이유자돈의 체중 및 사료섭취량(Table 참조), 체온변화(그리 참조)를 기록하여 강황(생물전환)산물의 급이가 이들 인자에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 별 다른 특이점을 관찰하지 못하였다.

Table 113. 공격접종 이유자돈에서 체중 및 사료섭취량 변화 추이

그룹	이표 번호	체중(kg)						사료섭취량, kg		비고
		D-14 (급여)	D-7	D+0 공격접종	D+7	D+14	D+21	총 섭취량	1일 섭취량	
CA	1	7.9	11.8	16.1	19	24.5	26.8	36	1.028	
	2	9.9	14	16.7	18.7	22.4	24.8			
	3	9.5	11.6	14.9	20	22.7	25.6			
	4	9.5	11.6	14.6	18.5	23.6	26.9			
	5	7.3	11.3	14.9	19.1	23.6	24.3			
	평균	8.82	12.06	15.44	19.06	23.36	25.68			
	편차	1.15	1.10	0.91	0.58	0.83	1.16			
HA	1	12.3	16.9	22.3	26.4	31.7	31.8	43	1.228	4/19일 직장탈수술
	2	9.3	13.2	18.1	22.2	26.2	26.7			4/19일 직장탈수술
	3	9.5	13.6	17.7	22	27.1	26.6			
	4	9.8	13.8	18.7	23.4	28.7	28.7			
	5	10.3	14.8	19.5	23.6	26.7	31.4			
	평균	10.24	14.46	19.26	23.52	28.08	29.04			
	편차	1.21	1.49	1.83	1.76	2.23	2.49			
CB	1	7.7	10.6	14	17.3	21.2	24	41	1.171	
	2	8.3	10.6	13.3	17.7	22.6	25.2			
	3	7.4	11	15.5	19.3	26.1	29.5			
	4	6.9	10.1	13.5	19.3	23.5	26.9			
	5	8.5	12.5	16.2	22.4	26.7	29.3			
	평균	7.76	10.96	14.5	19.2	24.02	26.98			
	편차	0.65	0.92	1.28	2.01	2.33	2.44			
HB	1	7.3	10.5	13.6	16	15.1	16.2	38	1.085	성장이상
	2	7.6	10.3	14	17.8	24.8	25.5			
	3	7.6	10.4	17	21.3	26.5	30.4			
	4	6.5	9.3	13.6	17.4	25.8	26.2			
	5	8.1	12	17.5	21.5	26.6	31.3			
	평균	7.45	10.5	15.525	19.5	25.925	28.35			
	편차	0.68	1.12	2.01	2.20	0.83	2.92			

(Note) 그룹: 고농도처치군+감염군(HA), 대조군+감염군(CA), 고농도처치군+비감염(HB), 대조군+비감염(CB).

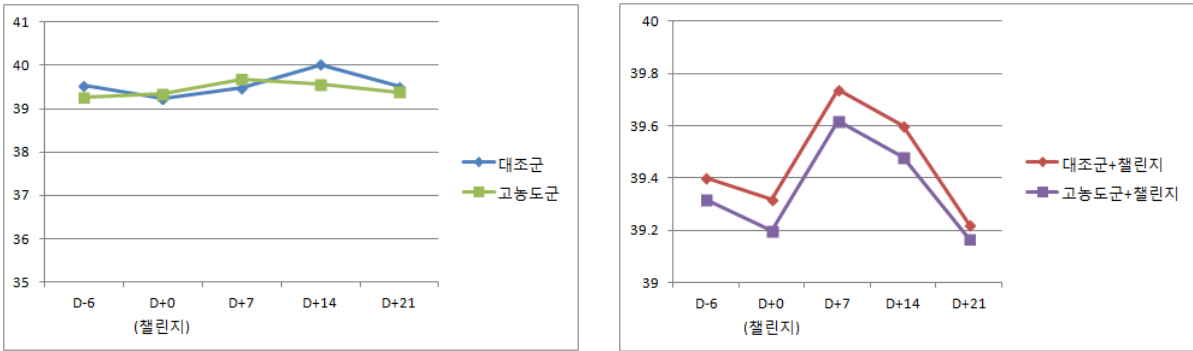


Figure 229. 공격접종 이유자돈에서 체온 변화 추이

(다) 혈액 및 주요장기에 대한 임상병리학적 지표 분석(일반 혈액지표, 간/근육/신장 손상지표, 대사지표)

① 전체 혈구 계산 지표 분석

② 실험방법

위와 동일한 방법으로 수행하였다.

③ 결과분석

- RBC 측정치의 분석

적혈구 장애는 크게 빈혈과 적혈구증가증으로 나뉘며, 이에 대한 평가를 위해서 적혈구 용적율(Hematocrit), RBC, 헤모글로빈에 대한 측정치는 중요한 의미를 갖고 있음. 해당 수치가 참고 범위보다 증가할 경우 적혈구 증가증으로 고려되며, 참고 범위 보다 감소할 경우 빈혈로 판단함. 분석결과, 적혈구용적율의 실험군별 평균은 각각 CA군 32.39%, CB군 32.27%, HA군 34.73%, HB군 35.0%로 측정되었다. RBC의 실험군별 평균은 CA군 $658 \times 10^4/\text{ul}$, CB군 $639 \times 10^4/\text{ul}$, HA군 $647 \times 10^4/\text{ul}$, HB군 $663 \times 10^4/\text{ul}$ 로 측정되었다. 한편, 헤모글로빈의 실험군별 평균은 CA군 9.91 g/dl, CB군 10.01 g/dl, HA군 10.96 g/dl, HB군 11.31 g/dl로 측정되었음(Figure 참조). 적혈구용적률, RBC, 헤모글로빈에 대한 측정치가 참고범위 내에서 확인되었던 바, 빈혈 또는 적혈구증가증의 가능성은 낮을 것으로 평가됨. 또한 SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, D+7일째 헤모글로빈 측정치의 유의적인 변화가 확인되었음(Figure 참조, $p < 0.05$). 하지만 적혈구용적율, RBC, 헤모글로빈 모두 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않는 바, 임상적인 의의를 갖는 변화는 유발되지 않는 것으로 생각됨.

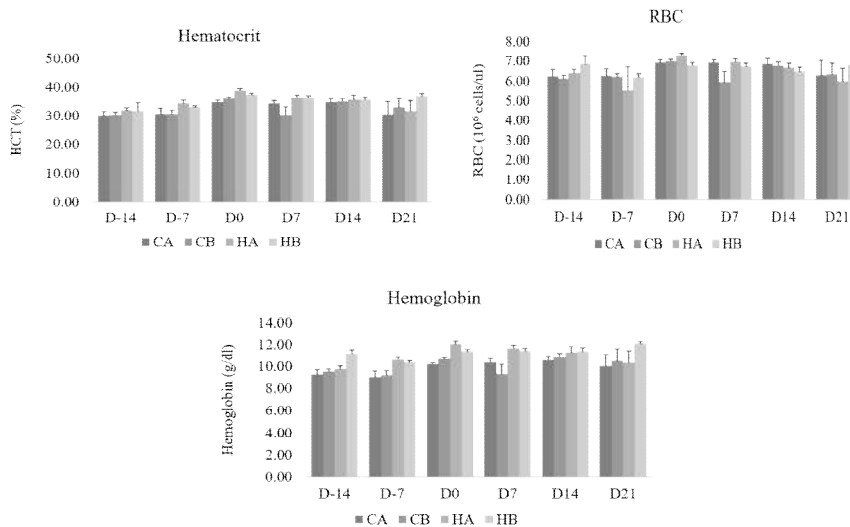


Figure 230. 공격접종 이유자돈에서 적혈구용적율(Hematocrit), RBC, 헤모글로빈에 대한 측정치

MCV(Mean corpuscular volume), RDW(Red cell distribution width), MCH(Mean corpuscular hemoglobin), MCHC(Mean corpuscular hemoglobin concentration) 측정치는 빈혈 환자에서 유용한 임상 정보를 제공함. 실험군의 혈액검사 결과 빈혈 소견은 확인되지 않는 바, MCV, RDW, MCH, MCHC의 임상적인 중요도는 낮을 것으로 사료됨. MCV의 실험군별 평균은 CA군 49.51 fL, CB군 48.90 fL, HA군 52.04 fL, HB군 54.07 fL으로 측정되었다. RDW의 실험군별 평균은 CA군 20.46%, CB군 19.67%, HA군 19.61%, HB군 19.43%로

측정되었다. MCH의 실험군별 평균은 CA군 15.09 pg, CB군 15.64 pg, HA군 16.43 pg, HB군 17.16 pg으로 측정되었다. 한편, MCHC의 실험군별 평균은 CA군 30.48 g/dl, CB군 30.94 g/dl, HA군 31.58 g/dl, HB군 31.67 g/dl로 측정되었음(Figure 참조).

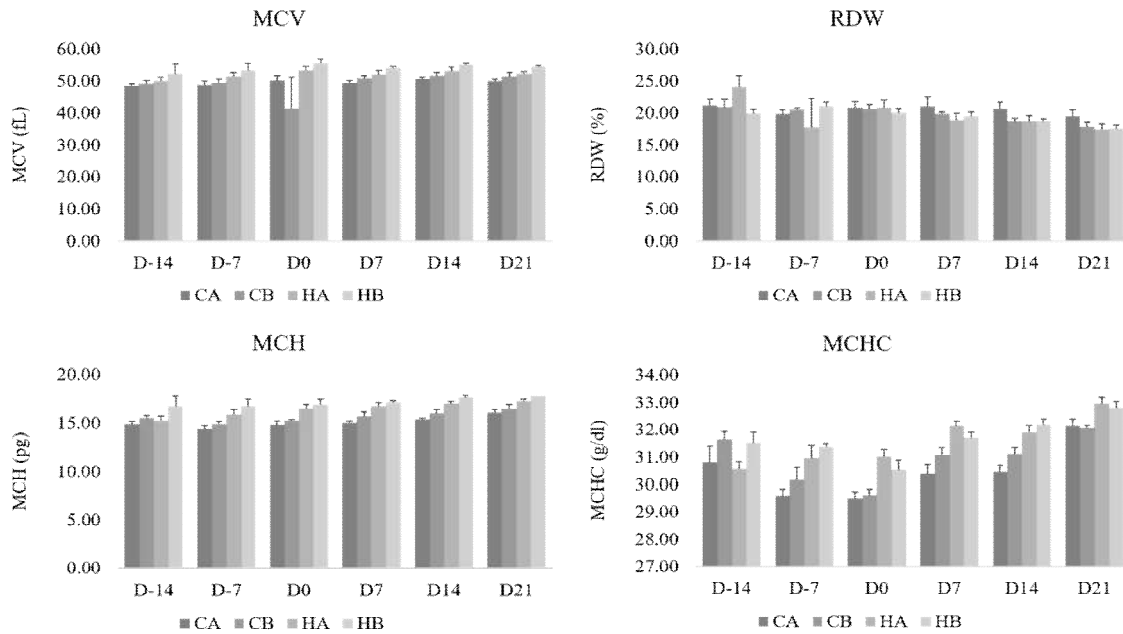


Figure 231. 공격접종 이유자돈에서 적혈구에 대한 평가: MCV, RDW, MCH, MCHC 측정치

- WBC 측정치의 분석

백혈구는 신체 방어, 염증, 및 면역 시작과 조절의 핵심으로, 총 백혈구 수치를 통해 생체의 생리적 반응이나 염증 반응에 대해 평가할 수 있음. 본 실험에서 총 백혈구 수치의 평균은 CA군 18,560 /ul, CB군 19,300 /ul, HA군 21,501 /ul, HB군 16,660 /ul로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, D+7일째 총 백혈구 수치에서 유의적인 변화가 확인되었으며, 분석결과, HA군에서 CB군 및 HB군보다 총 백혈구 수치가 유의적으로 높은 것으로 나타났음($p < 0.05$). 이것은 강황(생물전환)산물이 임상적으로 염증유발을 감소시키는데 효과가 있을 가능성보다는 HA군에서 살모넬라균의 감염에 따른 현상으로 판단됨.

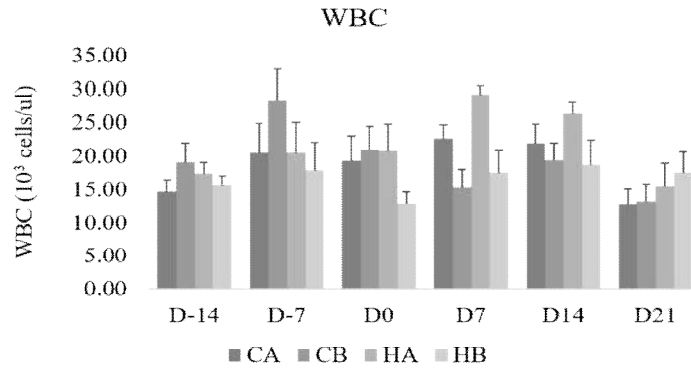


Figure 232. 공격접종 이유자돈에서 백혈구(WBC) 측정치

- 혈소판 측정치의 분석

혈소판 숫자는 지혈 장애와 관련된 임상 증상을 보이는 환자에서 필수적인 검사임. 본 실험에서 혈소판 숫자(PLT)의 평균은 CA군 463,630 /ul, CB군 500,600 /ul, HA군 534,060 /ul, HB군 485,570 /ul로, 모두 참고 범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, 실험군간 유의적인 차이는 확인되지 않았음(p<0.05). 혈소판 숫자 및 관련 장애에 이상이 확인되지 않는 바, MPV(Mean platelet volume)의 임상적인 의의는 낮을 것으로 사료됨. MPV 측정치의 평균은 CA군 7.66 fl, CB군 8.23 fl, HA군 7.74 fl, HB군 8.68 fl로, 모두 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조).

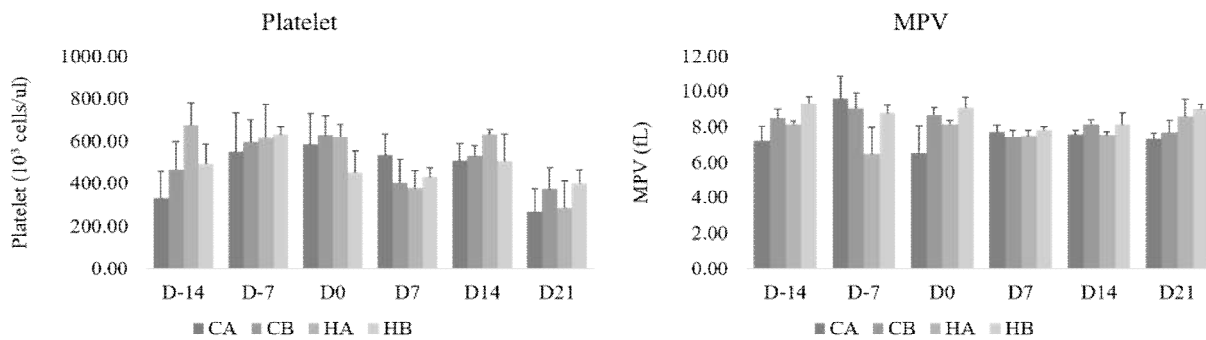


Figure 233. 공격접종 이유자돈에서 혈소판 측정치

④ 혈청화학검사 지표 분석

⑤ 실험방법

상기에서와 동일하게 진행하였다.

⑥ 결과분석

- 혈청화학검사

간 효소 수치의 분석: 혈청 중, 간(liver) 특이 효소의 증가는 간 손상을 반영하는 간질병의 표지로, 간질병에 대한 기본적인 평가를 위해 이에 대한 검사를 수행하였다. ALT(alanine aminotransferase) 측정치의 평균은 CA군 49.70 U/L, CB군 49.10 U/L, HA군 57.90 U/L, HB군 61.53 U/L로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). AST(aspartate aminotransferase) 측정치의 평균은 CA군 48.70 U/L, CB군 42.47 U/L, HA군 45.63 U/L, HB군 41.87 U/L로, ALP(alanine aminotransferase) 측정치의 평균은 CA군 226.93 U/L, CB군 221.47 U/L, HA군 266.73 U/L, HB군 289.20 U/L로서, 각각 참고 범위 내에서 측정되었다. GGT(gamma-glutamyl transferase) 측정치의 평균은 CA군 7.17 U/L, CB군 8.52 U/L, HA군 6.14 U/L, HB군 7.99 U/L로, 참고 범위 내에서 측정되었으나, SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석 수행 결과, ALT, AST, ALP, GGT 모두에서 실험군간 유의적인 차이는 확인되지 않았음($p < 0.05$). 따라서 간 손상을 지시하는 유의적인 측정치의 변화는 확인되지 않은 것으로 평가됨.

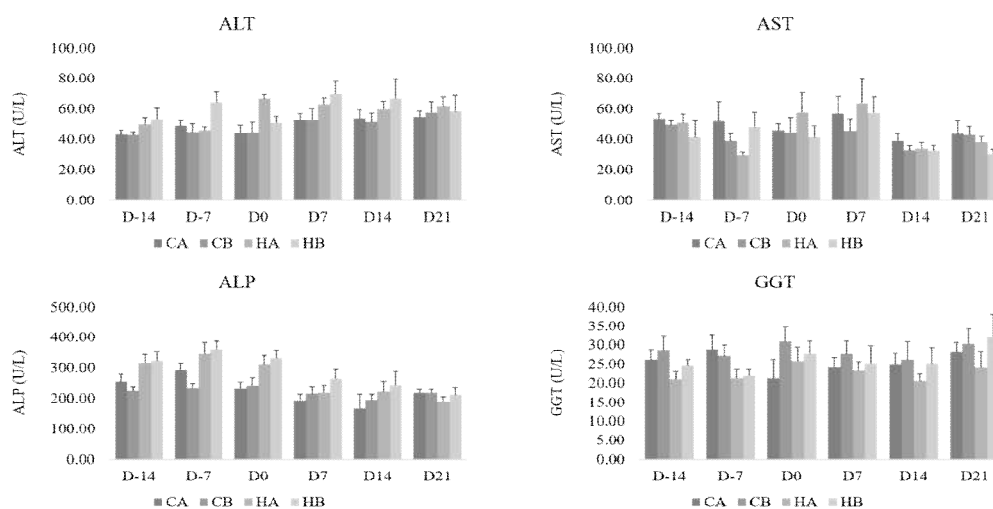


Figure 234. 공격접종 이유자돈에서 간 효소 측정치

신장 관련 측정치의 분석: 신장 손상으로 인한 배출 기능의 감소 시, 혈 중 질소 노폐물의 증가가 확인될 수 있음. 따라서 신장에 대한 기본적인 평가를 위해서 BUN, 크레아티닌, 칼슘, 인에 대한 검사를 수행하였다. BUN(Blood urea nitrogen) 측정치의 평균은 CA군 4.79 mg/dl, CB군 6.06 mg/dl, HA군 5.71 mg/dl, HB는 6.24 mg/dl로, 참고 범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). 크레아티닌 측정치의 평균은 CA군 0.69 mg/dl, CB군 0.67 mg/dl, HA군 0.67 mg/dl, HB군 0.69 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). 칼슘 측정치의 평균은 CA군 9.62 mg/dl, CB군 9.74 mg/dl, HA군 9.95 mg/dl, HB군 9.80 mg/dl로, 역시 참고범위 내에서 측정 가능하였음(Figure 참조). 인 측정치의 평균은 CA군 7.73 mg/dl, CB군 7.56 mg/dl, HA군 7.81 mg/dl, HB군 7.71 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). BUN의 경우, 실험군간 유의적인 차이를 보이는 것으로 평가되었음($p < 0.05$). Tukey 방법을 이용한 추가 분석 결과, CB 실험군이 나머지 실험군에 비해 유의적으로 높은 것으로 분석되었으나, 수치가 참고범위 내에서 관찰되는 점을 고려할 때, 임상적인 의의는 낮을 것으로 사료됨.

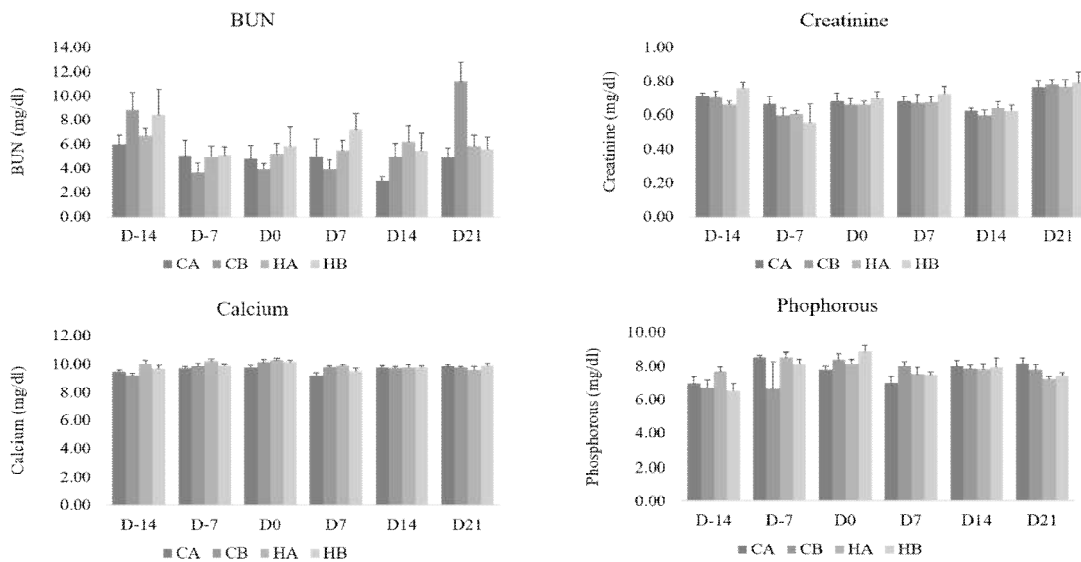


Figure 235. 공격접종 이유자돈에서 신장 관련 측정치

단백질 농도 측정치의 분석: 혈장단백질의 이상은 다양한 질병과 관련이 있는 중요한 생화학적 검사임. 이와 관련하여 총 단백질 농도, 알부민(ALB) 수치를 비교 분석하였다. 결과로서, 총 단백질 농도의 평균은 CA군 4.46 g/dl, CB군 4.46 g/dl, HA군 4.64 g/dl, HB군 4.35 g/dl로, 참고범위 내에서 측정되었으며, 알부민 측정치의 경우, 평균이 CA군 2.58 mg/dl, CB군 2.66 mg/dl, HA군 2.73 mg/dl, HB군 2.67 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석을 측정치에 대해 수행한 결과, 총 단백질 농도, 알부민에서는 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았음($p < 0.05$).

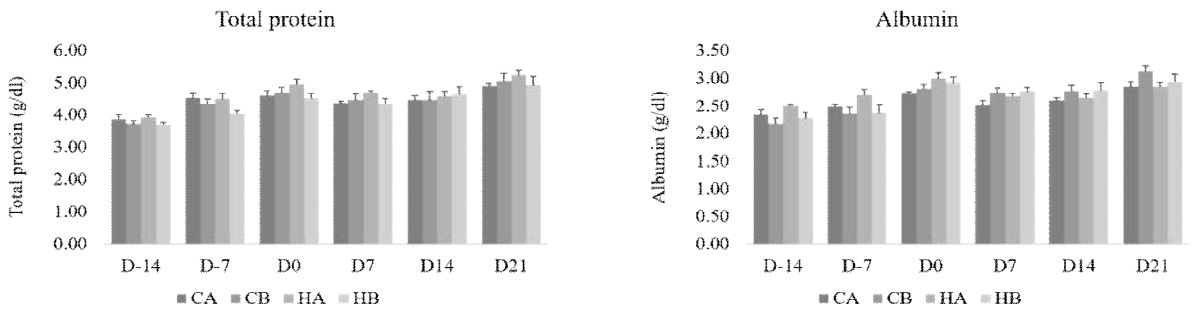


Figure 236. 공격접종 이유자돈에서 혈액 중 단백질 농도 측정치

대사 및 소화기계 관련 측정치의 분석: 대사 및 소화계에 대한 기본적인 평가를 위해서 총콜레스테롤, 트리글리세리드 수치를 분석하였다. 총 콜레스테롤의 평균은 CA군 75.67 g/dl, CB군 71.10 g/dl, HA군 73.00 g/dl, HB군 71.03 g/dl로, 참고범위 내에서 측정되었으며, 트리글리세리드 측정치의 평균은 CA군 52.00 mg/dl, CB군 46.83 mg/dl, HA군 52.50 mg/dl, HB군 44.03 mg/dl로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). D+7일째 총 콜레스테롤 수치에서 유의적인 변화가 확인되었으며, 추가 분석 결과 HA군에서 HB군보다 유의적인 증가가 확인되었음($p < 0.05$). 하지만, 변동이 큰 총콜레스테롤 수치의 특성과 참고범위 내에서 수치가 측정된 점을 고려할 때, 임상적인 의의는 낮을 것으로 사료됨. 또한 트리글리세리드에서는 실험군간 유의적인 차이는 확인되지 않았음($p < 0.05$).

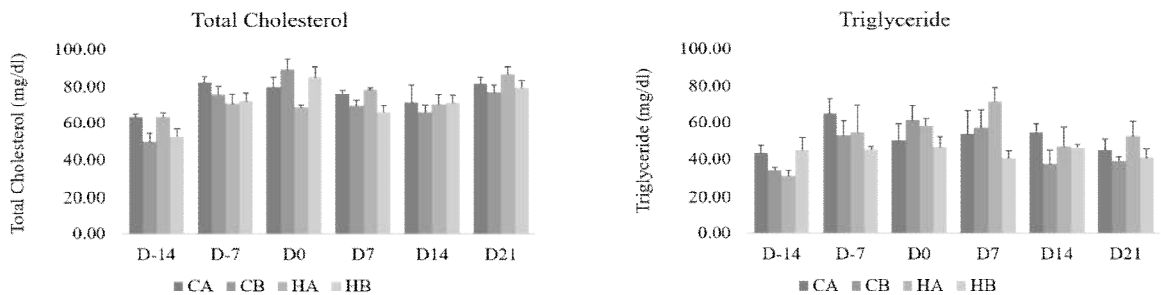


Figure 237. 공격접종 이유자돈 혈액 중 대사 및 소화기계 관련 측정치

- 전해질검사 분석

Na⁺, K⁺, Cl⁻ 측정치: 전해질에 대한 기본적인 평가를 위해서 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 수치를 분석하였다. Na⁺ 측정치의 평균은 CA군 141.87 mEq/L, CB군 141.10 mEq/L, HA군 141.13 mEq/L, HB군 142.14 mEq/L로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). K⁺ 측정치의 평균은 CA군 5.58 mEq/L, CB군 5.54 mEq/L, HA군 5.62 mEq/L, HB군 5.46 mEq/L로, 참고범

위 내에서 측정되었음(Figure 참조). Cl⁻ 측정치의 경우, 평균이 CA군 104.47 mEq/L, CB군 104.64 mEq/L, HA군 104.13 mEq/L, HB군 104.49 mEq/L로, 참고범위 내에서 측정되었음(Figure 참조). SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA 분석 수행 결과, Na⁺, K⁺, Cl⁻ 측정치에서 실험군 간 유의적인 차이는 확인되지 않았음(p<0.05).

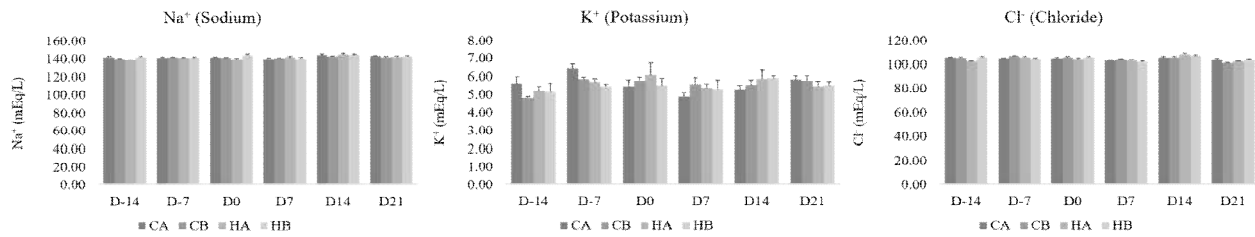


Figure 238. 공격접종 이유자돈 혈액 중 전해질 측정치

사. 목적동물에 대한 S. Enteritidis 살모넬라균 감염면역학적 효능 검정

(1) 공격균주 준비 및 접종

상기에서 기술한 바와 동일하게 수행하였다.

(2) 면역지표 변화 분석 : 혈액 중 면역세포 아형 분석, 친염증성 사이토카인 발현양상 분석

(가) 강황(생물전환)산물이 돼지의 살모넬라균 감염 시 혈액 중 면역세포 아형 변화에 미치는 영향 분석

① 실험방법

이유자돈을 안락사한 후, 경동맥으로부터 혈액 30 ml을 바로 Acid-citrate-dextrose(ACD) buffer가 담긴 50 ml tube에 수집하였다. 이 후 1,800 rpm, 20 min, no break 조건으로 원심분리해 상층액인 혈장을 제거하고 buffy coat를 분리해 새로운 15 ml tube에 옮기고, 20% ACD buffer 4 ml를 채웠음. 여기에 pasteur's pipette을 이용해 2 ml ficoll 용액 (Accu-Paque™ Lymphocytes, ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC, CO.)을 바닥에서부터 천천히 채워준 뒤 1,800 rpm, 20 min, no break 조건으로 원심분리 하였다. 여러 개로 나뉘어진 층들 중 Peripheral blood mononuclear cell(PBMC) 층만 조심스럽게 따서 새로운 15 ml tube에 옮기고 20% ACD buffer를 채워 1,000 rpm, 8 min 조건으로 원심분리한 뒤, 상층액을 제거하고 vortexing하여 cell pellet를 풀어주어 96-well plate에 동량을 분주 하였다. 이어서 1st wash buffer(10% ACID + 0.2% NaN₃ + 10mM EDTA + 2% Horse Serum in PBS)에 1:100비율로 희석한 50 µl의 1st antibody를 150µl의 1st wash buffer와 혼합하여 1 well에 50 µl씩(15 µg/ml) 분주하고 얼음 위에 20분간 반응시켰음. 반응이 끝나면 1st wash buffer로 2회 washing하고 1st wash buffer에 1:100비율로 희석한 100 µl의 2nd antibody를 분주하고 얼음 위에 20분간 반응시켰음. 반응이 끝나면 2nd wash buffer (1st wash buffer containing no horse serum)로 2회 washing 하고 2% formalin 용액 200 µl을 넣고 은박지로 96-well plate를 감싼 후 flow cytometry를 이용해 분석하기 전까지 냉장보관 하였다.

Table 114. 면역세포 아형 분석을 위한 백혈구 특이 단클론항체 목록

1	2	3	4
1st antibody	PIG45A2	PGCAM36	PT90A+PT36A
2nd antibody	G2b	G1	G2a + G1
Target cell	B cell	Monocytes	CD4 + CD8 T cell

② 결과분석

- 대조군+비감염군(CB), 대조군+감염군(CA), 고농도처치군+비감염군(HB), 고농도처치군+감염군(HA) 각 5마리 이유자돈 혈액 면역세포 중, B cell, CD4 T cell, CD8 T cell, Monocytes의 세포아형 빈도를 분석하였음(Table 참조)

- B cell의 경우, 비감염그룹과 감염그룹 모두에서 대조군에 비해, 고농도처치군의 B cell 발현이 유의적으로 감소하였음($p < 0.05$).

- CD4 T cell의 경우, 비감염그룹에서 대조군에 비해 고농도처치군의 CD4 T cell 빈도가 유의적으로 감소하였던 반면($p < 0.05$), 감염그룹에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았음 ($P=0.84812$).

- CD8 T cell의 경우, 비감염그룹에서 대조군에 비해 고농도처치군의 CD4 T cell 발현이 유의적으로 증가한 반면($p < 0.05$), 감염그룹에서 유의적인 차이가 나타나지 않았음 ($p=0.70579$).

- CD4+CD8 T cell의 경우, 4개의 군에서 모두 유의적인 차이를 관찰하지 못하였으며, Monocyte에서도 별 다른 유의적 차이가 나타나지 않았음(Figure 참조).

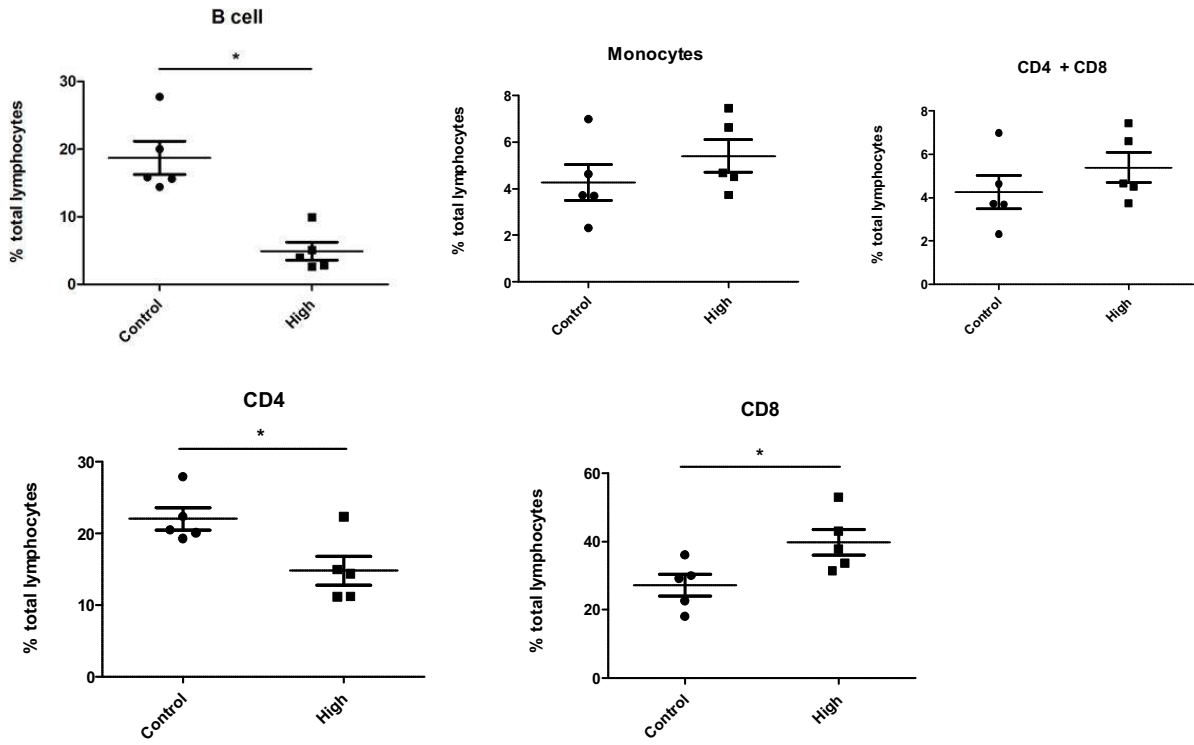


Figure 239. 강황(생물전환)산물 급여에 따른 혈액 중 면역세포 아형 발현변화 분석
(비감염군: CB, Control. HB, High)

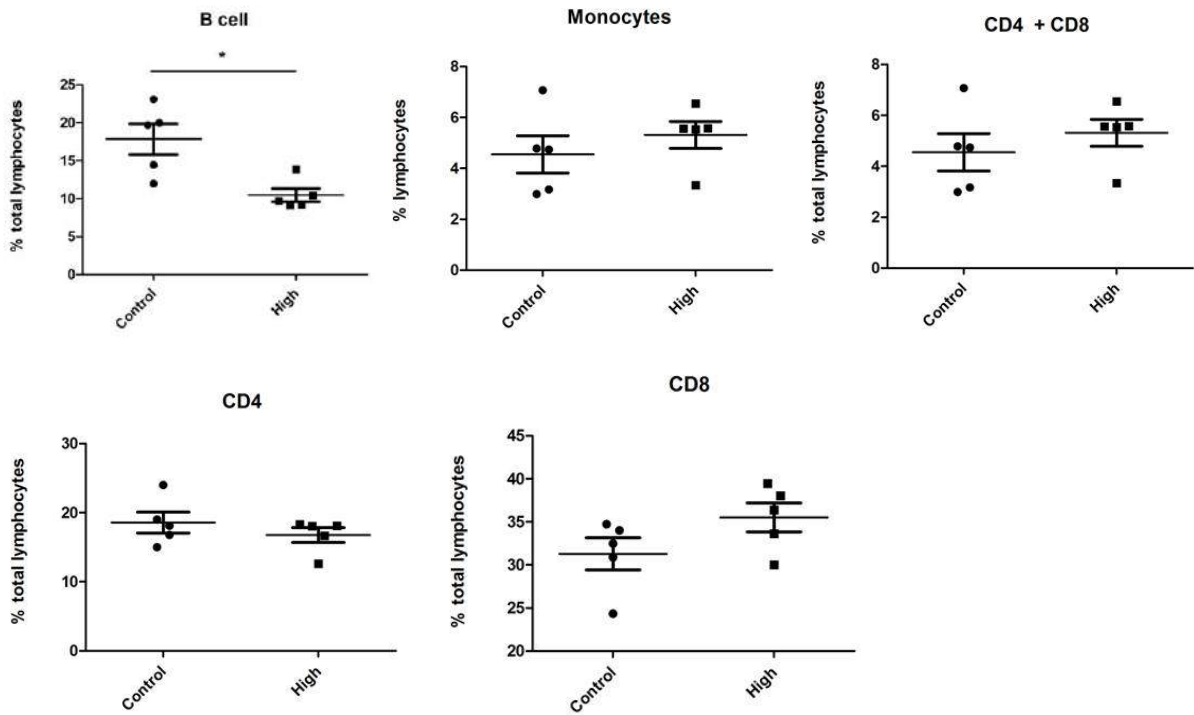


Figure 240. 강황(생물전환)산물 급여에 따른 혈액 중 면역세포 아형 발현변화 분석
(감염군: CA, Control. HA, High)

(나) Cecal 집락화, 분변 내 균수 변화, 주요 장기에 세균분포에 대한 정량 및 정성분석

① 실험방법

- 공격접종을 위한 실험설계에 의거하여, 이유자돈의 직장에서부터 채취한 분변을 멸균 tube에 넣고, ice box에 보관 후 5시간 내에 실험실로 이동하여 분석하였다. 분변무게는 0.5-5g범위 내로 동일하게 맞추고, tube에 Rappaport-Vassiliadis(RV) broth with Streptomycin(50 μ g/ml) & Nalidixic acid(50 μ g/ml) 배지를 넣고 희석해(detection limit <500 cfu) 분변을 균질화 시켰음. 원액을 PBS용액에 십진희석 후에 Xylose Lysine Deoxycholate(XLD) Agar with Streptomycin(50 μ g/ml) & Nalidixic acid(50 μ g/ml)배지에 도말한 뒤, 다음 날 colony수를 세어 cfu/g으로 계수하였다. 균을 검출하지 못하였을 경우, 남은 RV배지는 37°C, 230 rpm shaking incubator에서 19시간 동안 진탕배양 하였고, 살모넬라균의 존재여부를 증균배양액을 통해 확인하였다.

- 조직에서의 살모넬라균을 검출하기 위해, 안락사 직후 0.1-0.5g 무게의 간, 비장, 신장, 장간막림프절을 0.5 mm zirconium oxide bead (Nextadvanced, ZROB05)을 담은 2 ml eppendorf tube에 담아 가지고 와서 바로 RV with Streptomycin(50 μ g/ml) & Nalidixic acid(50 μ g/ml) 배지를 넣고 Next advanced bullet blender를 이용하여 균질화 하였다. 이후 원액을 그대로 XLD with Streptomycin(50 μ g/ml) & Nalidixic acid(50 μ g/ml) 배지에 도말하여 다음 날 colony를 세어 cfu/g으로 계수하였다. 균을 확인하지 못한 경우, 남은 RV 배지는 37°C 230 rpm shaking incubator에서 19시간 동안 진탕배양하였고, 살모넬라균의 존재여부를 증균배양액으로부터 확인하였다.

② 결과분석

- 공격접종 후 분변에서 검출되는 살모넬라균수 분석: 선택배지에서 검출된 살모넬라균의 cfu를 log₁₀cfu/g값으로 환산하고, 5마리 돼지에서의 평균과 표준편차를 계산했을 때, 1차 접종 후 D+1일에 각 감염군(대조군 vs 고농도처치군)에서 3.58 \pm 1.45 vs. 4.81 \pm 1.06의 균수를 확인하였다. D+3일 경과 후, 두 그룹에서 비슷한 수의 균수가 확인된 반면 (1.40 \pm 1.95 vs. 1.38 \pm 1.90), D+7일째 대조군보다 고농도처치군에서 더 많은 균수를 보여주었음(0.60 \pm 1.34 vs. 2.04 \pm 1.87).

- 2차 및 3차 접종 후, D+9일째 5.22 \pm 1.19 vs. 6.32 \pm 0.44의 균수를 보여주었음(Figure 참조). D+14일째 두 군에서 비슷한 수의 균이 확인된 반면(1.50 \pm 1.41 vs 1.38 \pm 1.28), D+18일째 대조군에서 균이 검출되지 않았고 고농도처치군에서 균이 검출되었음(0 vs. 1.93 \pm 1.30).

- 종합적으로, 이러한 결과는 살모넬라균 공격접종 후 이유자돈의 분변으로부터 균배출

속도가 매우 빠르며, 따라서 강황(생물전환)산물의 살모넬라균 장관 집락화에 미치는 효과는 미약하다고 판단됨.

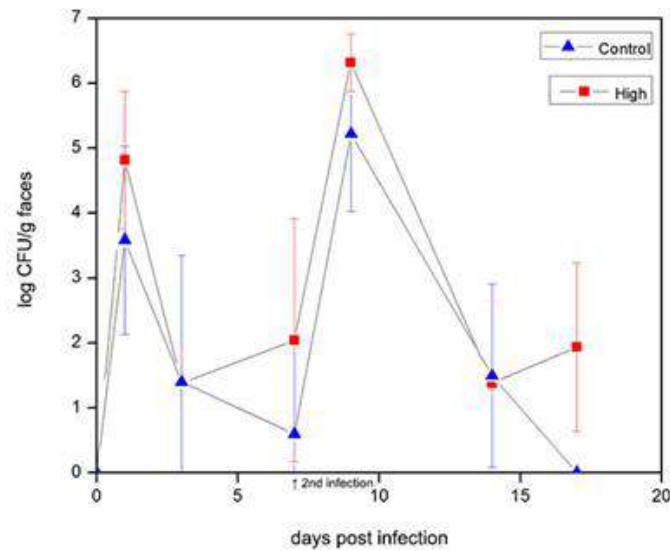


Figure 241. 공격접종 이유자돈에서 살모넬라균의 분변 배출 양상 (High: 고농도사료첨가제 급여군. Control: 대조군)

- 조직에서 살모넬라균의 존재를 확인한 결과, 간, 비장, 신장조직에서는 모든 군에서 살모넬라균이 검출되지 않았음(Table 참조). 장간막림프절의 경우, 대조군에서는 균이 검출되지 않은 반면, 고농도처치군 2마리에서 살모넬라균이 검출되었으나, 아마도 부검 시 분변 혹은 바닥으로부터 살모넬라균이 오염된 결과로 추정됨.

아. S. Typhimurium 살모넬라균 공격접종에 대한 방어효과 검증

(1) 접종농도 결정실험 [외부의뢰실험과 연계]

(가) 목적

- 돼지의 살모넬라 경구투여 투여량에 따른 임상 및 병리적인 변화의 확인을 통해 경구 감염 확인 및 적정 투여량 설정을 위한 pilot 실험.
- 살모넬라 저감제의 효능을 검증하기 위한 조건을 확립하기 위하여, 살모넬라를 경구투여 한 후 병리적인 변화를 관찰하여, 살모넬라 저감제의 효능을 확인할 수 있는 살모넬라 경구감염 조건을 확립하고자 하였다.

(나) 연구(실험) 요약

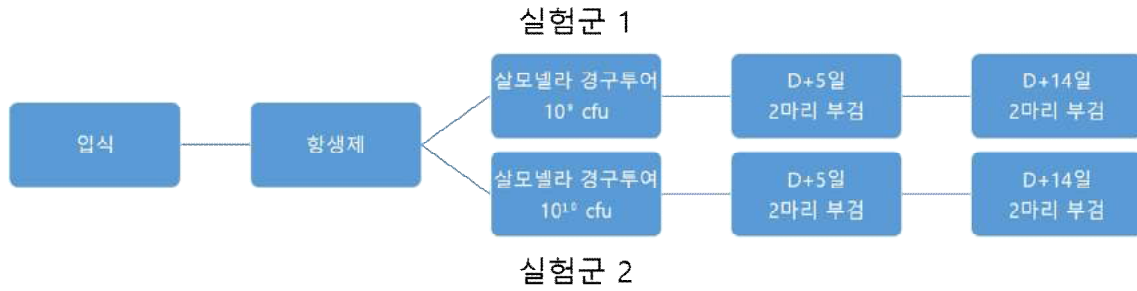
- 20kg 돼지 8마리를 입식하여, 4마리씩 2군의 실험군으로 나눈 후, 2주간 순치 후 3일간 연속으로 돼지에게 각각 10^9 cfu/Pig 및 10^{10} cfu/Pig를 경구투여 한 후, 시간 경과에 따른 살모넬라 감염 증상을 확인한 결과 장관의 괴사와 함께 총혈 소견을 보였으며, 고농도 살모넬라 투여군에서 증상이 더 심하게 나타났다.

(다) 재료 (Materials)

- 돼지 (3원 교잡종, 송산농장): 경기도 화성의 송산농장에서 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 8두 선발하여 시험에 사용하였다. 각 돼지는 입식후 2주간의 순치기간을 거쳐서 실험을 실시하였다.
- 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)
- 실험용 살모넬라 : *Salmonella* Typhimurium. 우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella* Typhimurium)를 선발하였으며, 선발된 균주를 본 실험에 사용하였다.
- 항생제 : 아미카신주사약(유한양행)으로 2일간 주사하였다.
- 살모넬라 검출 시약 : 사니타균 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

(라) 실험 방법 및 전략

- 실험 개요: 살모넬라의 경구투여시 돼지의 임상적인 피해 증상을 확인하기 위한 것으로, 돼지를 2군으로 나누어서 각각 살모넬라를 10^9 cfu/Pig 및 10^{10} cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구접종 하였으며, 접종 개시일로부터 5일 및 14일 뒤에 부검하여 살모넬라에 의한 증상을 확인하였다. 실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.



■ 실험방법

- ① 돼지 8마리를 입식하였으며, 4마리씩 2개의 군으로 배치하였다.
- ② 입식한 돼지를 2주간 순치하였다.
- ③ 순치과정 중에 항생제를 처리하여, 장내의 균총을 일정하게 하였다.
- ④ 순치 후에 살모넬라를 실험군 1에서는 10⁹ cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여 하였으며, 실험군 2에서는 10¹⁰ cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여 하였다.
- ⑤ 경구투여 시작후 5일 되는 날 (D+5일) 각 군에서 2마리를 sacrifice 한 후, 부검을 실시하였다.
- ⑥ 경구투여 시작후 14일 되는 날 (D+14일) 각 군에 남아있는 2마리씩을 모두 sacrifice 한 후, 부검을 실시하였다. 부검시 간, 비장, 소장, 맹장, 림프절에서 Salmonella Typhimurium 균의 균수를 측정하고 전체적인 병변을 확인하였다.
- ⑦ 자세한 실험 schedule은 다음 표와 같다.

Table 115. 실험 스케줄

실험그룹		D-14	D-7	D-4	D-3	살모넬라 경구투여접종 (3회 연속)			D+3	D+5	D+8	D+11	D+14
						D	D+1	D+2					
실험군 1 (살모넬라 10 ⁹ cfu 경구투여군)	처리	입식 / 순치	항생제	항생제		10 ⁹ cfu 접종	10 ⁹ cfu 접종	10 ⁹ cfu 접종					
	분변검사	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
	안락사									✓ (2마리)			✓ (2마리)
실험군 2 (살모넬라)	처리	입식 / 순치	항생제	항생제		10 ¹⁰ cfu	10 ¹⁰ cfu	10 ¹⁰ cfu					

10 ¹⁰ cfu 경 구 투 여 균)	분변검사	✓	✓		✓	접종	접종	접종	✓		✓	✓	
	안락사									✓ (2마 리)			✓ (2마 리)

(마) 실험결과

① 실험군 1 부검결과(10⁹ cfu/Pig의 살모넬라 경구감염군)

② 실험군 1-1 (3일간 총 3회의 10⁹ cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+5일 1차 부검)

장관의 울혈 및 충혈 소견, 간장의 충혈 소견, 폐렴 소견도 있었다.



그림 1a. 폐렴 소견 및 간의 충혈 소견이 있음.



그림 1b. 맹장의 충.출혈 소견이 있음.



그림 2a. 간의 충혈 소견과 비교적 정상적인 장의 소견 그러나, 맹장에는 흰색 괴사소가 있음

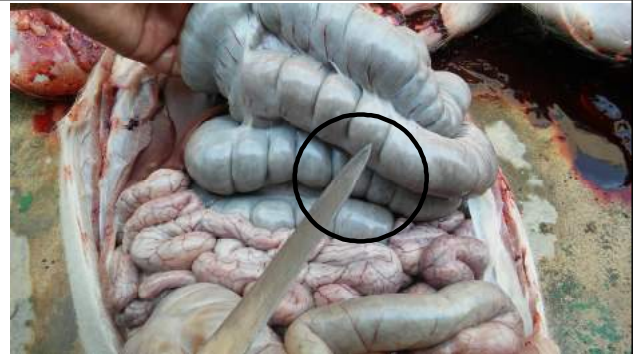


그림 2b. 맹장의 흰색 괴사소의 소견

③ 실험군 1-2 (3일간 총 3회의 10⁹ cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+14일 2차 부검)

10⁹ cfu/Pig의 투여량으로 접종한 군에서는 2주가 지난 후에는 비교적 정상적인 소견을 보였다.



그림 3. 비교적 정상적이다.



그림 4. 비교적 정상적이다.

④ 실험군 2 (1010 cfu/Pig의 살모넬라 경구감염군)

⑤ 실험군 2-1 (3일간 총 3회의 10^{10} cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+5일 1차 부검)

장관의 괴사와 울혈, 충혈 소견이 심하였다. 폐렴도 관찰되며 *Salmonella Typhimurium*균을 고농도로 3일간 연속 경구투여한 결과로 보여진다.



그림 5. 흰색 괴사소 및 충출혈

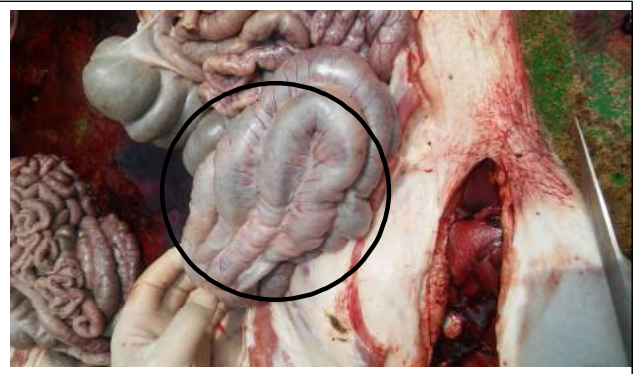


그림 6. 흰색 괴사소 및 충출혈



그림 7. 간의 충혈 소견과 일부 장염도 관찰되고 있다.

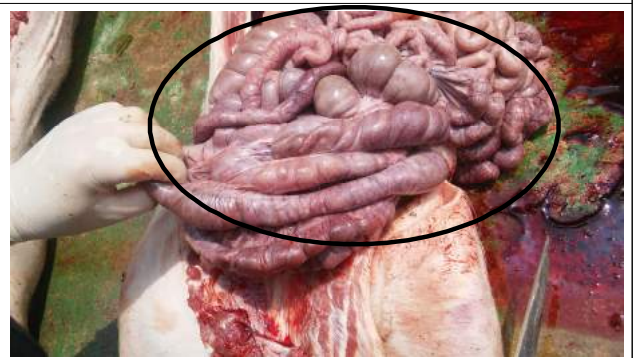


그림 8. 심한 소장 및 대장의 충출혈

⑥ 실험군 2-2 (3일간 총 3회의 10^{10} cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+14일 2차 부검)

10^{10} cfu/Pig의 투여량으로 접종한 군에서는 2주가 지난 후에도 아직까지 장염소견이 관찰되었다.



그림 9. 소장의 장염 소견이 보인다.



그림 10. 맹장의 괴사소가 보인다.

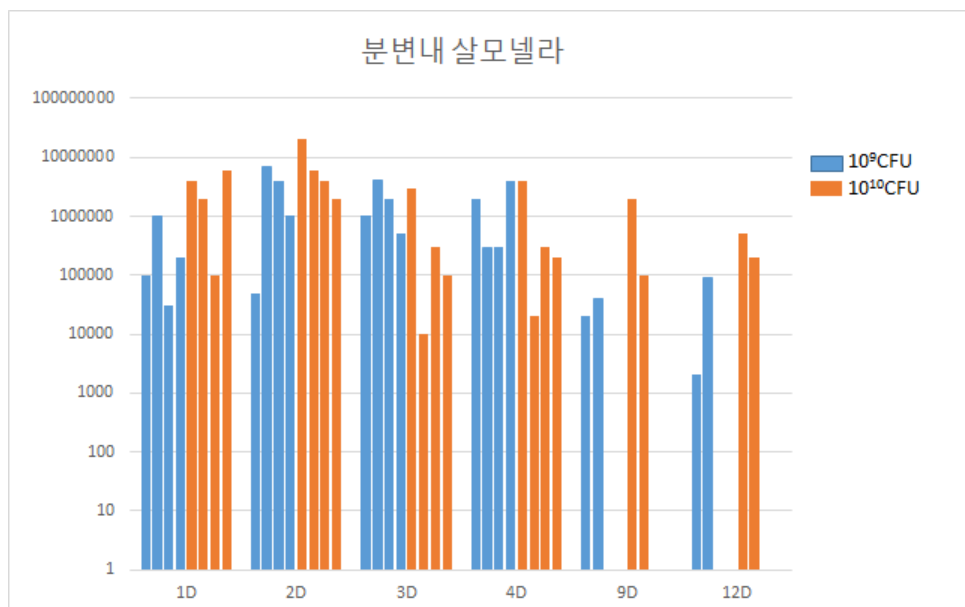
⑦ 실험군의 세균학적 비교

⑧ 분변 내 세균 변화

Table 120. 분변내 균수 변화

구분	입식 1일	7일	11일	PCR 검사	접종 1일	D+1 2일	D+2 3일	D+3 4일	D+56 일	D+8 9일	D+11 12일	D+145 일
1번	0	0	0	음성	1x10 ⁵	5x10 ⁴	1x10 ⁶	2x10 ⁶	부검 2두	-		부검 2두
2번	0	0	0	음성	1x10 ⁶	7x10 ⁶	4x10 ⁶	3x10 ⁵		2x10 ⁴	2x10 ³	
3번	0	0	0	음성	3x10 ⁴	4x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁵		4x10 ⁴	9x10 ⁴	
4번	0	0	0	음성	2x10 ⁵	1x10 ⁶	5x10 ⁵	4x10 ⁶		-		
평균	0	0	0		1.6x10 ⁵	1.1x10 ⁶	1.4x10 ⁶	9.2x10 ⁵		2.8x10 ⁴	1.3x10 ⁴	
5번	0	0	0	음성	4x10 ⁶	2x10 ⁷	3x10 ⁶	4x10 ⁶	부검 2두	-		부검 2두
6번	0	0	0	음성	2x10 ⁶	6x10 ⁶	1x10 ⁴	2x10 ⁴		2x10 ⁶	5x10 ⁵	
7번	0	0	0	음성	1x10 ⁵	4x10 ⁶	3x10 ⁵	3x10 ⁵		-		
8번	0	0	0	음성	6x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁵	2x10 ⁵		1x10 ⁵	2x10 ⁵	
평균	0	0	0		3.0x10 ⁶	5.6x10 ⁶	1.7x10 ⁵	2.6x10 ⁵		4.5x10 ⁵	3.2x10 ⁵	

- 입식 후 관찰된 균들은 PCR 결과 대장균으로 판명되었으며, *Salmonella* Typhimurium 균을 경구투여 한 결과, 경구투여균에 있어서 10¹⁰ cfu/Pig의 투여량으로 투여한 균에서 증상이 더 심했다.



- 분변 내 살모넬라의 균수에 있어서 개체간의 차이가 크기 때문에 값의 차이에 대해서 일관성 있는 자료를 얻기 어려웠다. 하지만, 분변에서 검출된 살모넬라의 균수의 변화는

일반적으로 높아졌다가 접종 3일 후부터 감소하는 패턴을 보이고 있으며, 또한 투여량이 많을수록 더 많은 살모넬라가 검출되었으며 특히, 10^9 cfu/Pig 감염군에서는 시간이 경과함에 따라 보다 큰 폭으로 감소하고 있음을 보여주고 있다.

⑨ 부검 시 장기의 균수 측정

- 부검한 결과, 살모넬라를 경구투여 한 이후, 몸 안의 장기에서 살모넬라가 검출되기는 하지만, 검출되는 균수는 차이가 크기 때문에 살모넬라가 특정한 병소에 모여 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 살모넬라의 저감 효과를 확인하는 방법으로 살모넬라 갯수를 측정하는 것 보다는 부검을 통해 임상적인 차이를 확인하는 것이 보다 현실적이라 판단된다.

Table 121. 부검시 각 장기의 균수 변화

구분	1차 부검 시(5.16)					2차 부검 시(5.25)				
	간장	비장	소장	맹장	임파절	간장	비장	소장	맹장	임파절
1	0*	0	5×10^5	4×10^6	3×10^5					
2						0	0	1×10^5	5×10^8	0
3						0	0	2×10^8	5×10^8	0
4	1×10^3	1×10^3	2×10^5	2×10^5	3×10^5					
5	0	1×10^3	3×10^5	3×10^4	2×10^1					
6						4×10^4	1×10^4	5×10^5	5×10^6	1×10^4
7	0	3×10^1	4×10^7	4×10^8	4×10^2					
8						0	0	1×10^6	1×10^5	1×10^4

(바) 결론

- 부검 후 육안적 검사 결과, 고농도 살모넬라 투여군(실험군 2)에서 높은 장관의 괴사와 충혈 소견을 보였다.
- 세균 검사 결과에서도 고농도 살모넬라 투여군에서 더 높은 세균수를 보였다.
- 증상에 있어서도 *Salmonella* Typhimurium을 각각 10^9 cfu/Pig, 10^{10} cfu/Pig의 투여량으로 한 것 중에서 10^{10} cfu/Pig 군에서 더 증상이 심하였다.
- 모든 실험군에서 실험과정 중에 폐사 및 살모넬라와 관련이 없는 질병이 발생하지 않았다.
- 경구투여군에서도 충분히 증상이 나타나므로 본 연구가 야외 상황을 전제로 한 것임을 감안하여 경구투여 하는 것이 바람직하다고 생각된다.
- 경구투여군에 있어서 고용량 투여군에서는 심한 증상이 나타나고 있는 바, 향후 살모넬라 저감제의 효능 테스트 실험시에는 고용량 경구투여군이 적합하다고 생각된다.

(사) 고찰

- 살모넬라를 경구감염 시킨 실험에 있어서, 살모넬라의 감염 투여량으로 10^9 cfu/Pig 및 10^{10} cfu/Pig를 투여했지만, 외관상으로는 임상적인 변화가 뚜렷하게 나타나지는 않았다. 하지만 부검 결과, 살모넬라에 의한 충혈이나, 출혈 소견이 나타났으며, 장기에서도 살모넬라가 확인되어 살모넬라가 장내에서만 존재하는 것이 아니라, 비장이나 임파절로 이동할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 살모넬라가 항생제에 의해서 저감 효과를 나타내지만 시간이 지나면서 다시 재발하는 경우가 많은 이유를 설명해 주는 것이다. 또한 임파절이나, 비장에서 발견된 살모넬라는 유기산의 투여로는 효과를 볼 수 없으므로, 이는 체내에서 작용하는 살모넬라 저감제가 필요한 이유이기도 하다.
- 살모넬라 경구감염 실험에서 10^9 cfu/Pig 투여 보다는 10^{10} cfu/Pig 투여가 훨씬 일정한 결과를 보여주고 있으므로 앞으로의 실험은 10^{10} cfu/Pig 경구투여가 적절하다고 생각되며, 부검을 실시하는 시기는 3일 연속 경구투여한 이후 5일째(D+5일)에 실시하는 것이 바람직하다고 생각된다.

(2) 살모넬라 저감제 효능 평가 실험 [외부의뢰실험과 연계]

(가) 목적

- 살모넬라의 **경구투여**에 의한 돼지의 임상증상 및 병리적인 변화에 미치는 **살모넬라 저감제, 강황(생물전환)산물의 효과**에 대한 Pilot 실험.
- 살모넬라를 경구투여 한 돼지를 실험동물로, 살모넬라 저감제로서 ①강황(생물전환)산물 및 ②강황(생물전환)산물+바실러스 혼합물의 효과를 확인함에 목적이 있다.

(나) 연구(실험) 요약

- 25kg 돼지 15마리를 입식하여 5마리씩 실험군을 나눈 후, 2주간 순치후 3일간 연속으로 돼지에게 10^{10} cfu/Pig를 경구투여 한 후, 살모넬라 저감제의 효과를 확인하기 위하여 부검을 실시하였으며, 부검 결과 살모넬라 저감제를 사용한 실험군에서 살모넬라에 의한 병리적인 현상이 현저하게 적게 나타났다.

(다) 재료 (Materials)

- 돼지 (3원 교잡종, 송산농장): 경기도 화성의 송산농장에서 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 15두 선발하여 시험에 사용하였다. 각 돼지는 입식후 2주간의 순치기간을 거쳐서 실험을 실시하였다.
- 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)
- 살모넬라 저감제 : 저감제A [강황(생물전환)산물], 저감제B [강황(생물전환)산물+바실러스]
- 실험용 살모넬라 : *Salmonella* Typhimurium. 우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella* Typhimurium)를 선발하여 사용하였다.
- 항생제 : 아미카신주사약(유한양행)으로 2일간 주사하였다.
- 살모넬라 검출 시약 : 사니타균 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

(라) 실험방법 및 전략

▪ 실험 계획

살모넬라의 경구투여시 임상적인 피해 증상 및 살모넬라 저감제에 의한 증상 완화를 확인하기 위한 것으로, 돼지를 살모넬라 저감제를 투여한 실험군 A군 및 B군과, 살모넬라 저감제를 투여하지 않은 대조군 C군으로 나누어서 살모넬라를 10^{10} cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여로 접종하였으며, 접종 개시일로부터 9일 뒤에 전 두수 부검하여 살모넬라에 의한 증상을 확인하였다.

실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.

구분	사료	접종전 사료	접종후 사료
실험군 A군	A (강황 첨가)	A (강황 첨가)	A (강황 첨가)
실험군 B군	B (강황+바실러스 첨가)	B1 (강황 첨가)	B2 (강황+바실러스 첨가)
대조군 C군	C (저감제 무첨가)	C (저감제 무첨가)	C (저감제 무첨가)

▪ 실험방법

- ① 돼지 15마리를 입식하였으며, 5마리씩 3개의 군으로 배치하였다.
- ② 입식한 돼지를 접종전 2주간 순치하였다.
- ③ 입식한 후부터 바로 대조군은 일반사료를, 실험군은 살모넬라 저감제가 첨가된 사료를 섭취하도록 하였다.
- ④ 순치 후에 살모넬라를 대조군과 실험군 모두 1010 cfu/Pig를 3일간 연속 경구투여로 강제접종 하였다.
- ⑤ 살모넬라 투여 시작 후 13일 되는 날 (D+13일) 각 군을 모두 (15마리) 도살한 후, 부검을 실시하였다.
- ⑥ 실험 시작 후, 2마리의 돼지가 살모넬라에 감염되어 있다고 강원대에서 연락을 받고, 현장에서 즉시 격리 후 분리 사육하였다. 번호는 실험군 A에 속하는 1,2번이었다.
- ⑦ 자세한 실험 계획은 다음 표1과 같다. 실험군 A는 일반사료에 살모넬라 저감제로 강황(생물전환)산물을 먹였으며, 실험군 B에는 일반사료에 강황(생물전환)산물+바실러스 혼합물을 먹였으며 대조군은 일반사료만을 전 기간에 걸쳐서 섭취토록 하였다.
- ⑧ 살모넬라 경구투여에 의한 병리현상 확인

실험 스케줄

날짜	9/22일(금)	9/25일(월)	10/7(토), 8(일), 9일(월)	10/10 (화) ~ 10/17(화)(8일간)	10/18 (수)
소재 급여	D-14		D+0, +1, +2	D+3 ~ D+12	D+13
실험 군 A	-입식&순치 -생물전환소재급여 -분변검사	분변(살모넬라 감염여부 확인)	-균접종 3회 -분변(10/6일 접종 전 D-1)	매일 분변 채취 후 결과 확인	분변 안락사(조직샘플)
실험 군 B	-입식&순치 -생물전환소재급여 -분변검사	분변(살모넬라 감염여부 확인)	-균접종 3회 -분변(10/6일접종 전 D-1)	매일 분변 채취 후 결과 확인	분변 안락사(조직샘플)
대조 군 C	-입식&순치 -일반사료급여 -분변검사	분변(살모넬라 감염여부 확인)	-살모넬라접종 3회 -분변(10/6일접종 전 D-1)	매일 분변 채취 후 결과 확인	분변 안락사(조직샘플)

(마) 실험결과

① 대조군 C군에서의 부검소견

- 대조군에서는 전형적인 살모넬라성 장염이 유발되었다. 소장의 충혈 및 출혈 소견과 대장의 회색 괴사소가 대장의 전면에 산재되어 나타났다.



그림1. C-1: 소장의 심한 충혈 및 출혈 소견



그림2. C-1:대장에 다수의 회색 괴사소 산재



그림3. C-2: 소장의 충혈 소견



그림4. C-2: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재



그림5. C-3: 소장의 충혈 소견



그림6. C-3: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재 및 설사 소견



그림7. C-4: 소장외 충혈 및 출혈 소견



그림8. C-4: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재



그림9. C-5: 소장외 충혈 소견



그림10. C-5: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재

② 실험군 A군 [강황(생물전환)산물 투여군]에서의 부검소견

- 실험 시작과 동시에 강원대로부터 2마리가 살모넬라균에 감염되었다고 통보받아 격리 사육한 후 일반 실험과 동일하게 한 후, 마지막(D+13)에 부검하였다. 생각 보다는 심하지 않고 양호하게 나타났다.
- 검사 결과 간장의 병변 및 소장 of 출혈이 일부 보이지만, 대장의 소견이 아주 양호해 보여 아주 우수한 살모넬라 저감 효과를 보였다.



그림11. A-1: 소장의 소견이 아주 양호해 보임.

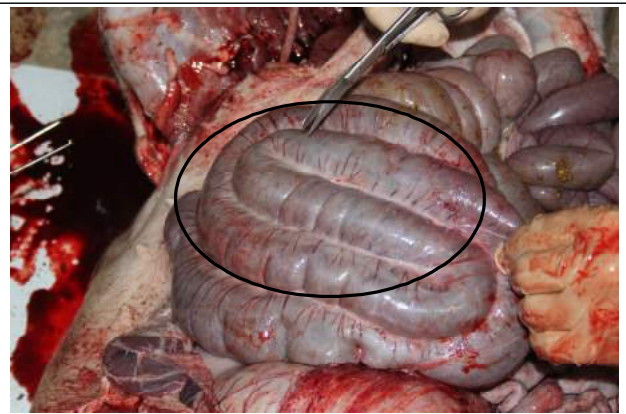


그림12. A-1: 대장의 소견이 일부 증상이 약하게 보임



그림13. A-2: 소장의 소견이 아주 양호해 보임.



그림4. A-2: 대장의 소견이 아주 양호해 보임.

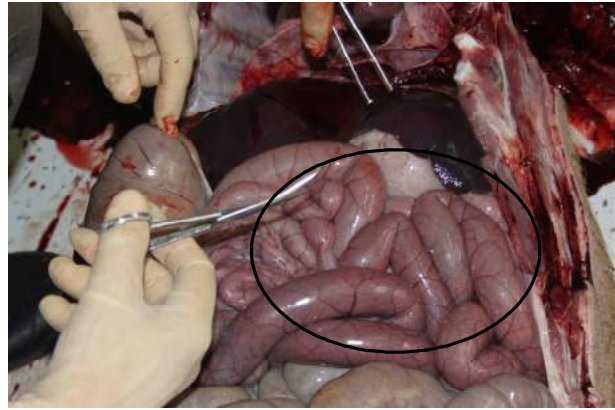


그림15. A-3: 소장의 출혈이 보인다



그림16. A-3: 대장은 비교적 정상적이다

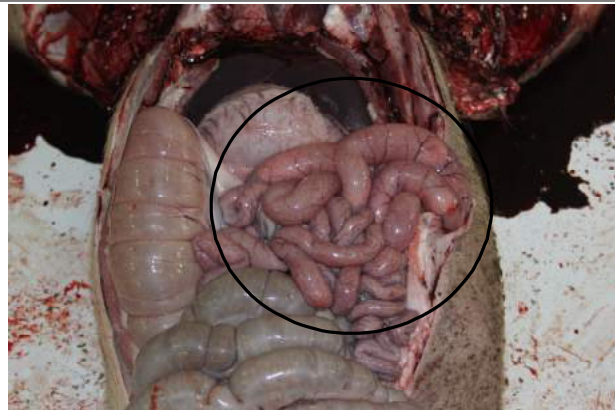


그림17. A-4: 소장의 출혈이 보인다



그림18. A-4: 대장은 비교적 정상적이다



그림19. A-5: 소장은 비교적 정상적이다



그림20. A-5: 대장은 비교적 정상적이다.

③ 실험군 B군 [강황(생물전환)산물+바실러스 투여군]에서의 부검소견

- 소장의 충혈 및 출혈을 제외하고 대장은 비교적 정상이었다. 그러나 5마리중 2마리에서 대장에서 회색 괴사소가 관찰되었다. 그러나, 생균제(바실러스)를 먹어서인지 분변의 상태가 좋았다.



그림21. B-1: 소장의 충혈 소견이 보임



그림22. B-1: 대장의 회색 괴사소의 산재

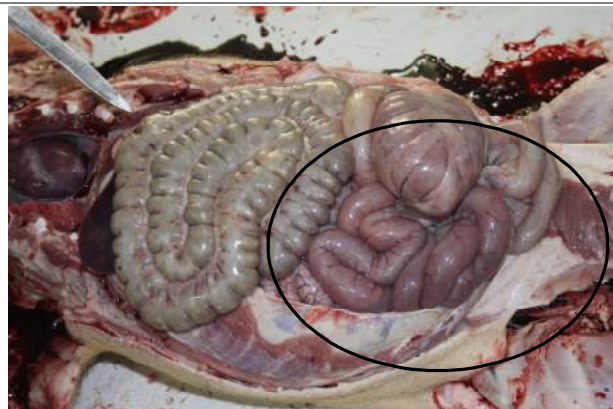


그림23. B-2: 소장의 충혈 소견이 보임



그림24. B-2: 대장은 비교적 정상적임





그림25. B-3: 소장은 비교적 정상적임



그림26. B-3 대장은 비교적 정상적임



그림27. B-4: 소장은 충혈 소견을 보임



그림28. B-4: 대장은 비교적 정상적임

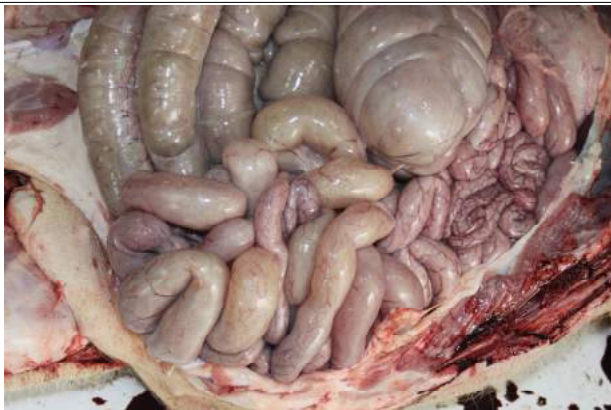


그림29. B-5: 소장은 비교적 정상적임



그림30. B-5: 대장의 회색 괴사소 산재

④ 분변중 살모넬라 검출 결과

- 각 대조군 및 실험군에서의 분변 중 살모넬라 검출 결과는 아래표와 같다.

분변 중 살모넬라 검출 결과

구분		1차(10/11)	2차(10/12)	3차(10/13)	4차(10/14)	5차(10/15)	6차(10/16)	7차(10/17)
대 조 군 C	11	6×10^8	4×10^7	3×10^6	2×10^6	8×10^5	2×10^5	2×10^6
	12	2×10^7	8×10^7	3×10^7	7×10^6	2×10^6	1×10^5	2×10^3
	13	1×10^7	4×10^7	2×10^6	2×10^6	1×10^5	2×10^3	4×10^4
	14	3×10^7	5×10^7	3×10^7	5×10^6	1×10^5	5×10^3	6×10^3
	15	1×10^7	7×10^6	1×10^6	1×10^6	2×10^5	7×10^3	8×10^3
	평균	3.2×10^7	3.4×10^7	5.6×10^6	3.4×10^6	2.7×10^6	1.7×10^4	2.4×10^4
실 험 군 A	1	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^4	4×10^4	2×10^3	2×10^3
	2	2×10^6	3×10^5	3×10^4	1×10^3	2×10^3	1×10^3	2×10^3
	3	4×10^6	3×10^5	1×10^5	1×10^5	4×10^3	4×10^2	1×10^2
	4	3×10^5	2×10^5	2×10^5	4×10^5	3×10^3	5×10^2	2×10^2
	5	2×10^6	7×10^5	5×10^5	5×10^3	5×10^2	3×10^2	2×10^2
	평균	1.4×10^6	2.6×10^5	7.9×10^4	2.4×10^4	3.4×10^3	6.5×10^2	4.4×10^2
실 험 군 B	6	3×10^6	4×10^5	4×10^5	5×10^3	4×10^3	2×10^2	1×10^2
	7	2×10^6	8×10^5	5×10^4	5×10^3	2×10^3	3×10^2	2×10^2
	8	3×10^6	2×10^5	1×10^5	4×10^3	3×10^3	2×10^2	1×10^2
	9	5×10^6	6×10^5	1×10^5	5×10^4	1×10^3	5×10^3	3×10^3
	10	7×10^6	6×10^4	5×10^4	2×10^4	1×10^3	4×10^3	2×10^3
	평균	3.6×10^6	3.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^4	1.9×10^3	7.5×10^2	4.1×10^2

- 실험군 A군 및 실험군 B군 간의 분변에서의 살모넬라 검출율은 상호 유의성이 없었으나, 대조군 C군과는 확연한 차이를 보일 정도로 대조군 C군에서 검출율이 높았다.

⑤ 부검시 각 장기의 살모넬라 검출 결과(10/18)

- 부검시 실험군 A군에 비하여 실험군 B군에서 분변 상태가 양호하여 분변 및 각 장기에서의 세균학적 조사를 해 보았으나 유의성이 없었다. 그러나 실험군 A군 및 실험군 B군 모두 분변 및 각 장기에서의 살모넬라 검출에 있어서 대조군 C군에 비하여는 월등히 좋은 성적을 나타냈다.

구분		간	비장	신장	임파절	결장	분변
대 조 군 C	11	ND	ND	ND	ND	1x10 ⁵	8x10 ³
	12	ND	6x10 ⁴	ND	ND	3x10 ⁴	6x10 ³
	13	ND	ND	ND	4x10 ⁴	2x10 ⁷	4x10 ⁴
	14	4x10 ⁵	3x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	2x10 ⁷	2x10 ⁶
	15	5x10 ⁵	6x10 ³	1x10 ⁴	4x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ³
실 험 군 A	1	ND	ND	ND	ND	2x10 ⁴	2x10 ³
	2	ND	ND	ND	ND	3x10 ⁴	2x10 ³
	3	ND	ND	ND	2x10 ³	2x10 ²	1x10 ²
	4	1x10 ⁴	ND	ND	ND	4x10 ³	2x10 ³
	5	7x10 ²	ND	ND	1x10 ⁵	4x10 ⁵	2x10 ⁴
실 험 군 B	6	ND	ND	ND	ND	ND	1x10 ³
	7	ND	ND	ND	ND	3x10 ³	2x10 ³
	8	ND	ND	ND	1x10 ³	4x10 ³	3x10 ³
	9	ND	ND	ND	7x10 ³	4x10 ³	2x10 ²
	10	5x10 ³	3x10 ³	2x10 ³	6x10 ³	3x10 ⁵	1x10 ⁵

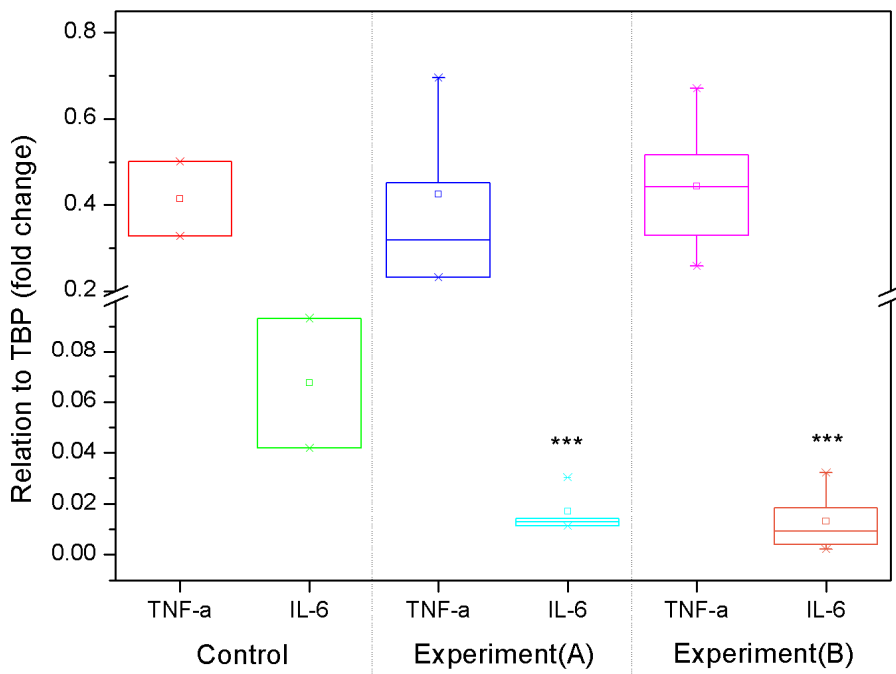
(ND: Not Detected (검출안됨))

⑥ 조직에서의 사이토카인 유전자 발현양 차이 분석

- 대조군, 실험군(A), 실험군(B)에 대한 각각 이유자돈의 간, 신장, 비장, 장간막림프절, 결장 조직 중, TNF-a, IL-6의 유전자 발현양을 총 4회의 실험에 걸쳐 분석하였다.
- 장기에서 TNF-a, IL-6 유전자의 발현양 분석 결과는 아래와 같다.

돼지 간에서의 군별 TNF-a, IL-6 유전자 발현양의 평균 및 표준편차

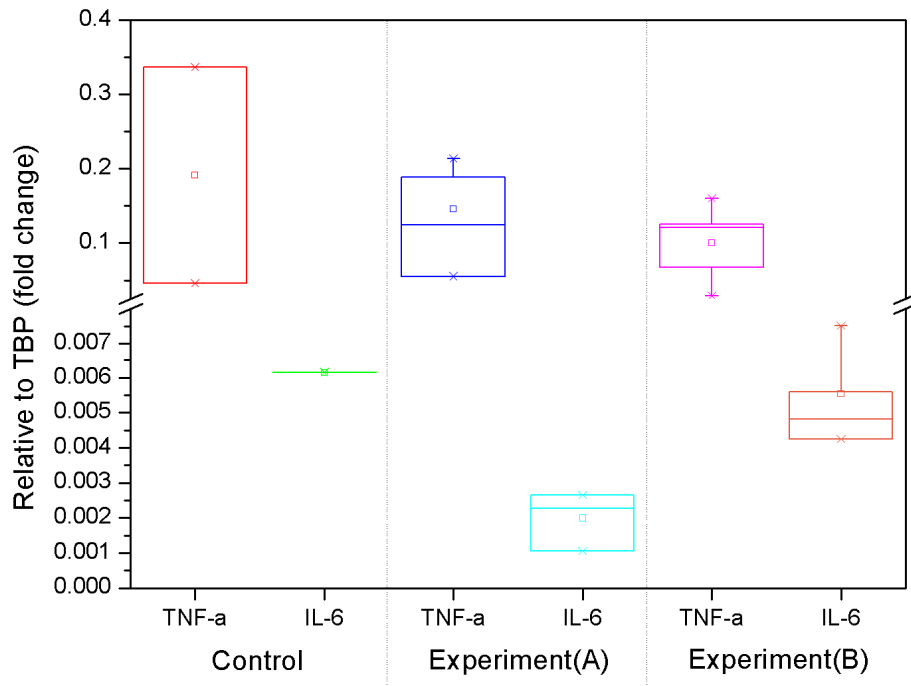
	TNF-a gene expression (relative to TBP)	IL-6 gene expression (relative to TBP)
대조군(1,2)	0.14	0.068
실험군(1,2,4,5)	0.42±0.2	0.017±0.0089
실험군(6~10)	0.44±0.16	0.13±0.12



돼지 간에서의 TNF-a, IL-6 유전자 발현 차이
(대조군과의 유의성; *** = $P < 0.05$)

돼지 신장에서의 군별 TNF-a, IL-6 유전자 발현량의 평균 및 표준편차

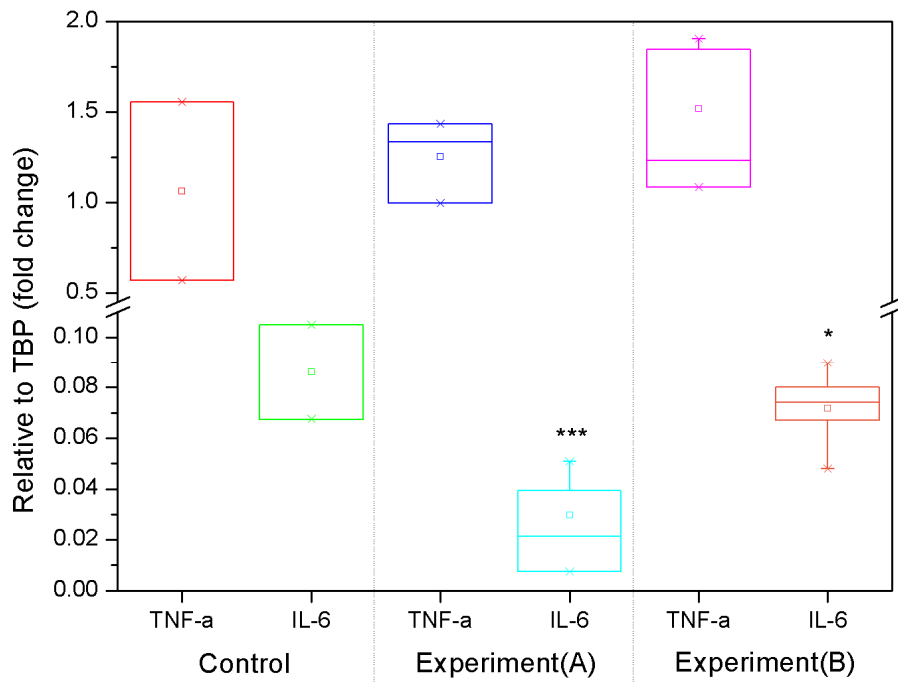
	TNF-a gene expression (relative to TBP)	IL-6 gene expression (relative to TBP)
대조군(1,2)	0.19	0.0062
실험군(1,2,4,5)	0.15±0.07	0.0053±0.0066
실험군(6~10)	0.1±0.05	0.0075±0.0045



돼지 신장에서의 TNF-a, IL-6 유전자 발현 차이

돼지 비장에서의 군별 TNF-a, IL-6 유전자 발현량의 평균 및 표준편차

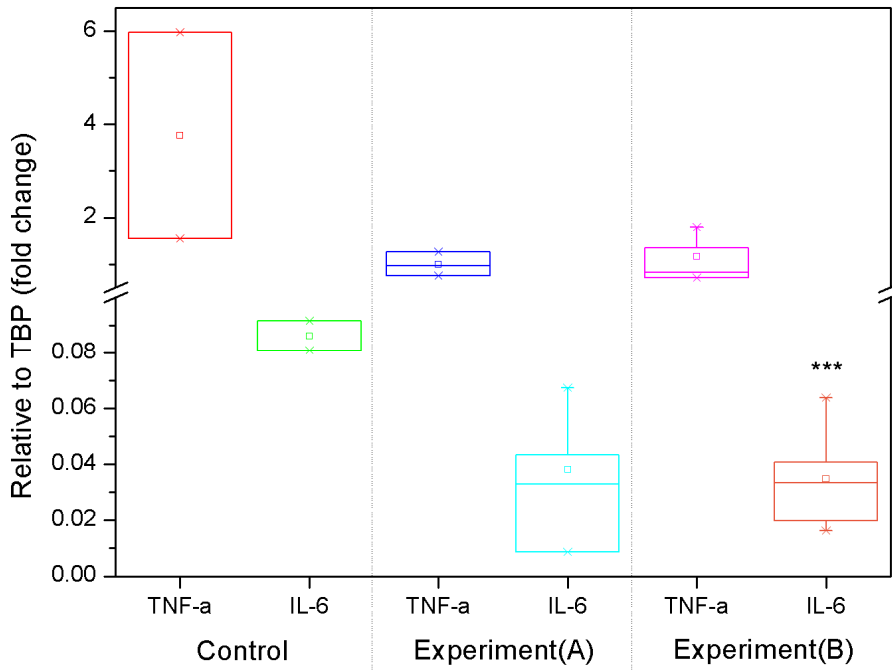
	TNF-a gene expression (relative to TBP)	IL-6 gene expression (relative to TBP)
대조군(1,2)	1.063	0.086
실험군(1,2,4,5)	1.46±0.46	0.03±0.019
실험군(6~10)	1.87±0.88	0.072±0.016



돼지 비장에서의 TNF-a, IL-6 유전자 발현 차이
(대조군과의 유의성; *** = $P < 0.05$, 실험군A와의 유의성 ; * = $P < 0.05$)

돼지 장간막림프절에서의 군별 TNF-a, IL-6 유전자 발현양의 평균 및 표준편차

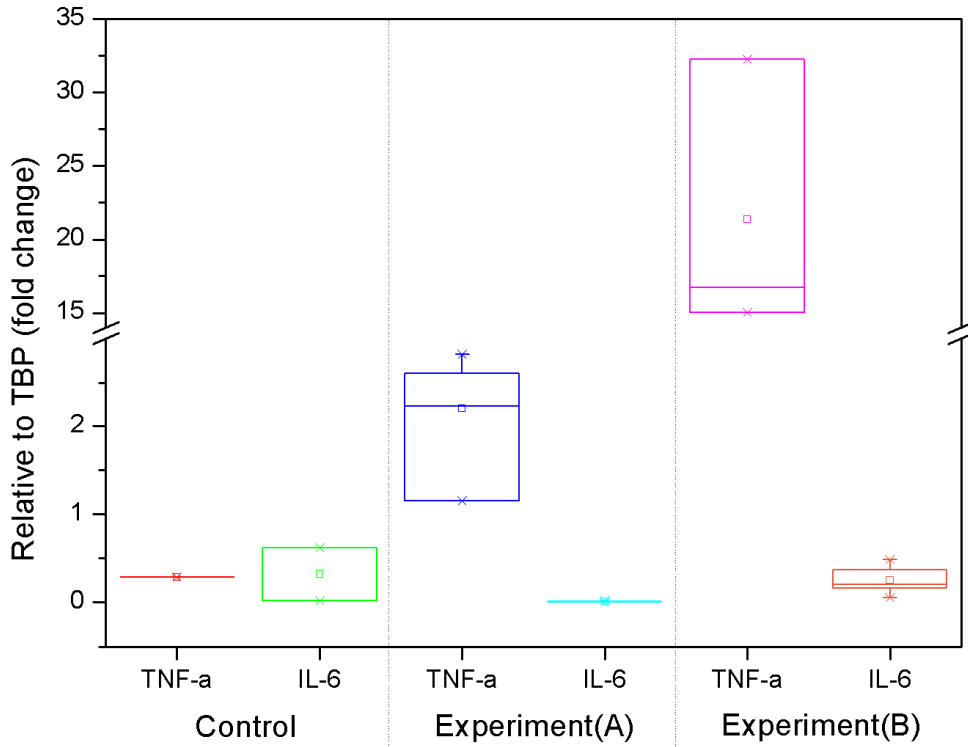
	TNF-a gene expression (relative to TBP)	IL-6 gene expression (relative to TBP)
대조군(1,2)	3.75	0.086
실험군(1,2,4,5)	1.46±0.95	0.038±0.024
실험군(6~10)	1.55±0.95	0.035±0.019



돼지 장간막림프절에서의 TNF-a, IL-6 유전자 발현 차이
(대조군과의 유의성; *** = P<0.05)

돼지 결장에서의 군별 TNF-a, IL-6 유전자 발현양의 평균 및 표준편차

	TNF-a gene expression (relative to TBP)	IL-6 gene expression (relative to TBP)
대조군(1,2)	3.75	0.086
실험군(1,2,4,5)	2.2±0.74	0.013±0.011
실험군(6~10)	21.54±15.4	0.25±0.17



돼지 결장에서의 TNF-a, IL-6 유전자 발현 차이

- 실험 결과, 실험군 A의 간, 비장 조직에서 IL-6가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 실험군 B그룹의 장간막림프절에서 IL-6가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 다른 조직 및 사이토카인에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

(바) 결론

- 실험군 A군의 검사 결과, 간장의 병변 및 소장외 출혈이 일부 보이지만 대장의 소견이 아주 양호해 보여 아주 우수한 살모넬라 저감 효과를 보였다.
- 실험군 B군의 검사 결과, 소장외 출혈 및 출혈을 제외하고 대장은 비교적 정상이었다. 그러나 5마리중 2마리에서 대장에서 회색 괴사소가 관찰되었다. 단 생균제(바실러스)를 먹어서인지 분변의 상태가 좋았다.
- 대조군 C군의 경우 전형적인 살모넬라성 장염이 유발되었다. 소장외 출혈 및 출혈 소견과 대장의 회색 괴사소가 대장의 전면에 산재되어 나타났다.
- 실험군 A군 및 실험군 B군 간의 분변중 살모넬라 검출율은 상호 유의성이 없고, 대조군 C군과는 확연한 차이를 보일 정도로 대조군 C군에서 검출율이 높았다.
- 부검시 실험군 A군에 비하여 실험군 B군에서 분변 상태가 양호하여 분변 및 각 장기에서의 세균학적 조사를 해 보았으나 상호 유의성이 없었다. 그러나 실험군 A군 및 실험군 B군 모두 분변 및 각 장기에서의 살모넬라 검출에 있어서 대조군 C에 비하여는 월등히 좋은 성적을 나타냈다.
- 실험군 A의 간, 비장 조직에서 IL-6가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 실험군 B그룹의 장간막림프절에서 IL-6가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$).

(사) Discussion

- 부검 결과 살모넬라에 의한 출혈이나, 출혈 소견이 살모넬라균만 투여한 대조군에서 더욱 심하게 나타났으며, 장기에서도 살모넬라 균수의 차이가 심하게 나타났다. 특히 소장 외 맹장의 경우, 매우 높은 수치를 보임으로 내장에 있는 살모넬라균이 쉽게 소장 외 대장으로 침투할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- 본 실험에서 살모넬라 저감제는 체내에 감염된 살모넬라를 쉽게 억제할 수 있으며, 앞으로 정확한 실험을 위해서는 더 많은 개체수를 대상으로 실험할 필요가 있으나, 아마도 체내 살모넬라균을 2 log 정도 감소시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 이는 농가가 대개 살모넬라균에 감염되면 항생제와 유기산 등을 사용해도 일정한 시간이 지나면 지속적으로 검출되거나 임상증상을 보이고 PRRS와 같은 바이러스 질병을 악화시킨다는 점에서, 살모넬라균을 반드시 통제해야 하고, 또한 이러한 통제를 위해서는 체내에서 작용할 수 있는 저감제가 필요하다는 것을 잘 보여준다고 할 수 있다.
- 살모넬라 감염 시, 간과 비장 조직에서 IL-6가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고 ($P < 0.05$), 이것은 본 과제의 생물전환 산물이 이들 조직에서 감염에 의한 염증반응을 조절함으로써 활성을 발휘함을 암시한다.

8절. 농장에서의 현장실증 실험

1. 현장실증 실험의 실험농장 선정 기준 설정 및 적용실험 Design

가. 실험농장의 선정 기준 설정

(1) 현장실증 실험대상농장 선택에 관한 견해

국내의 식중독 발생에 대한 식약처 자료에 의하면 2015년 식중독 발생건수 330건, 환자수 5981명 중 살모넬라에 의한 발생건수 13건, 환자수 202명으로, 발생건수로는 노로바이러스, 병원성 대장균, 캄필로박터제주니, 클로스트리디움퍼프린젠스, 원충에 이어 6위이며, 환자수로는 병원성 대장균, 노로바이러스, 캄필로박터제주니, 클로스트리디움퍼프린젠스에 이어 5위를 차지하는 등 최근 발생빈도가 많이 낮아진 것이 현실이다.

최근 발생빈도가 많이 낮아진 이유는 양계에서의 백신 접종과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 양계의 경우 인수공통 살모넬라에 의한 식중독 발생 피해가 많이 일어나고 있었으나, 종특이적 살모넬라인 *Salmonella Gallinarum*에 의한 피해를 막기 위해 최근 시행되고 있는 백신 접종이 *Salmonella Gallinarum* 뿐만 아니라 다른 살모넬라에 대해서도 교차반응을 보여 인수공통 살모넬라에 대해서도 효능이 나타나, 달걀 등에도 거의 살모넬라가 검출되지 않고 있으며, 특히 우리나라는 계란을 이용한 마요네즈를 집에서 제조하지 않으며 또한 닭고기와 달걀을 익혀 먹기 때문에 닭에 기인한 식중독이 급감하면서 나타난 결과로 해석된다.

양돈의 경우 종특이 살모넬라가 농장에 문제를 일으키면 전염성이 강하고 폐사에 이를 수 있기 때문에 항생제 등을 처리하여 빨리 해결하고 있으며, 또한 인수공통 살모넬라가 만성적으로 나타나는 농장은 거의 없다고 컨설팅 받았다. 돼지에 폐사를 일으키는 살모넬라는 급성 패혈증을 일으켜서 높은 폐사율을 발생시키는 종특이 살모넬라인 *Salmonella Choleraesuis*나, 인수공통 살모넬라로 결장염을 일으켜서 설사를 유발하는 *Salmonella Typhimurium*도 폐사를 일으킬 수 있다. *S.Typhimurium*을 제외한 인수공통 살모넬라의 감염은 PRRS 등 바이러스에 감염되어 면역력이 약해진 돼지에서 주로 나타나고 있으며, 단독으로 인수공통 살모넬라에 감염되는 경우는 흔치 않은 것으로 알려져 있다. 본 과제에서도 돼지의 분변에 존재하는 1g당 인수공통 살모넬라 수(1×10^6 cfu/g)의 만배에 해당하는 1×10^{10} cfu의 *Salmonella Typhimurium*균을 건강한 자돈에 공격접종 했을 때 잘 방어해 감염이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 3차년도에 수행할 현장실증 Field test에 있어서는 인수공통 살모넬라가 양성인 농장과 음성인 농장의 구별없이 살모넬라에 대한 모니터링과 함께, 새롭게 발생할 수 있는 감염을 방어할 수 있는지 항병력 향상에 대해서도 검토하는 것이 필요할 것으로 판단하였

다.

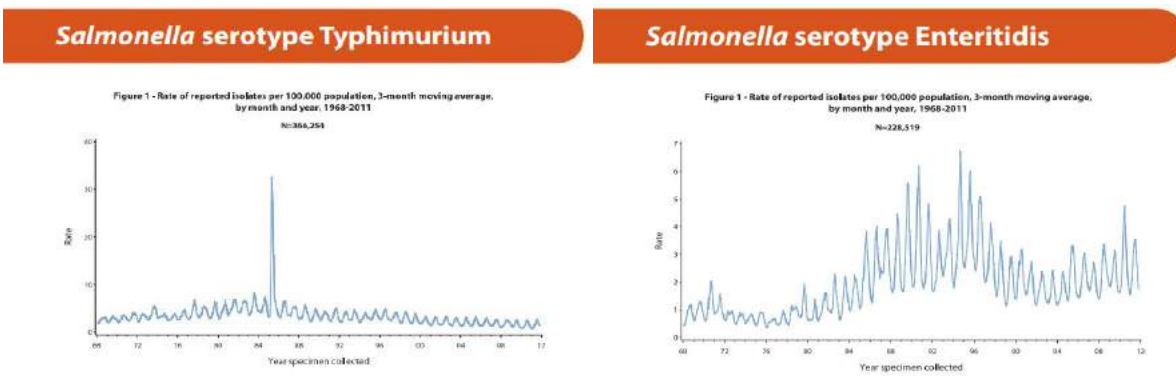
(2) 인수공통 살모넬라 양성의 양돈 실험대상농장의 탐색 및 선정 기준 설정

현재 인수공통 살모넬라 양성 양돈농장의 경우 국내 HACCP 관련된 컨설팅을 진행하고 있는 (주)한별팜텍과 (주)돼지와건강수의그룹 등의 HACCP 컨설팅업체 및 기타 개별적인 활동을 하는 수의사의 컨설팅을 통해서 살모넬라 양성인 농장을 탐색하여 실험이 가능한 농장을 선택할 계획을 수립하였다. (주)한별팜텍과의 컨설팅 회의에서 현재 국내에서 인수공통 살모넬라가 발병하고 있는 농장은 매우 적으며, 인수공통 감염을 일으키는 대표적 살모넬라는 Enteritidis와 Typhimurium이나 인수공통 살모넬라가 발병한 농장에서 발견되는 살모넬라는 외국에서는 주로 Enteritidis인 반면, 국내의 경우 Enteritidis가 아니라 주로 Typhimurium이며, Enteritidis는 발견되는 경우가 매우 드물기 때문에 실질적으로 *Enteritidis* 양성 농장을 찾는 것이 현실적으로 불가능하다는 의견을 받았다. 과제의 내용이 살모넬라의 저감제이고 가능하면 공중보건에 더 중요성이 높은 *Enteritidis*를 선택하는 것이 바람직하지만, Typhimurium 역시 인체에 감염되어 살모넬라 식중독을 일으키는 인수공통 살모넬라균의 하나로, 식중독을 일으킨 사례¹⁾가 보고되고 있으므로 Enteritidis 양성 농장이 확인되지 않으면 Typhimurium 양성 농장을 선택해서 실험대상농장으로 선택할 계획을 수립하였다.

A total of 356 persons infected with the outbreak strain of *Salmonella* Typhimurium were reported from 39 states.

- Among 240 ill persons for whom information was available, 62 (26%) were hospitalized.
- 57% of ill persons were children 10 years of age or younger.
- 76% percent of ill people reported contact with live poultry in the week before their illness began. (2013년 11월 CDC 자료)

Salmonella Enteritidis 및 Typhimurium이 미국내 1999년부터 2005년 사이에 살모넬라 식중독을 일으키는 빈도수는 아래와 같음.

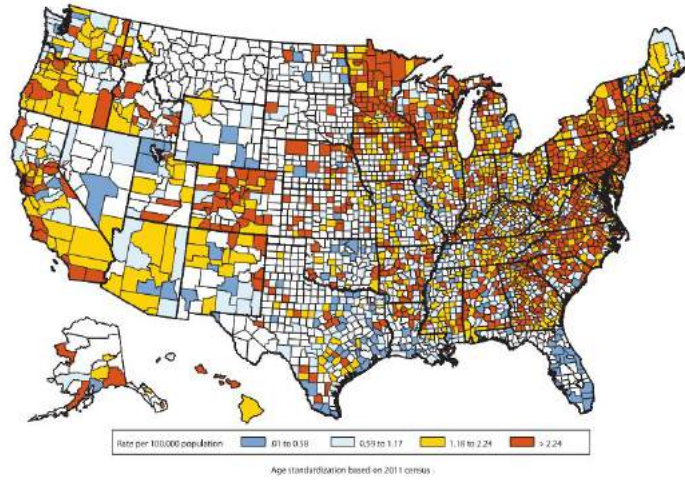


또한 2011년까지의 자료는 아래와 같다.

1) <http://www.cdc.gov/Salmonella/Typhimurium-live-poultry-04-13/index.html>

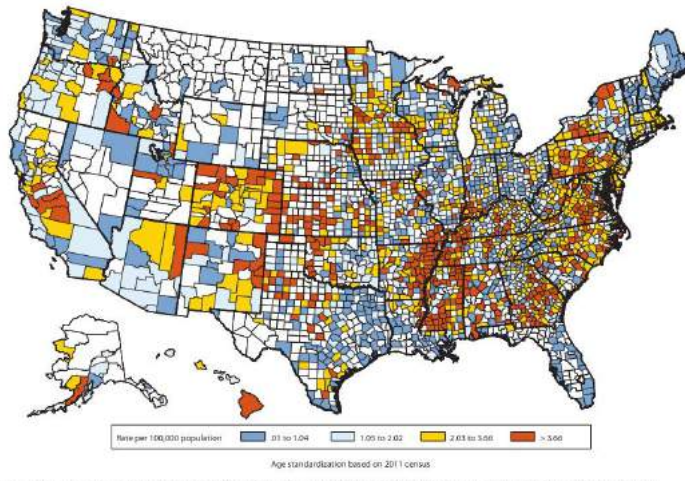
Salmonella serotype Enteritidis

Figure 14 - Age-standardized rate per 100,000 population, by county, 2006 to 2011



Salmonella serotype Typhimurium

Figure 14 - Age-standardized rate per 100,000 population, by county, 2006 to 2011



위의 자료를 살펴보면 *S. Enteritidis* 에 의한 식중독 발생 빈도가 *S. Typhimurium* 보다 더 높기 때문에 *S. Enteritidis* 에 의한 식중독이 *S. Typhimurium* 보다 더 많은 것을 알 수 있다.

나. 현장실증 적용시험 Design

(1) 마우스, 양계 및 양돈에서의 challenge 실험 결과를 기반으로 현장실증실험 설계 준비

일반적으로 양돈농가 중에서 살모넬라가 문제되는 농장의 경우 대개 환경이 열악한 농장으로 이들 농장은 축사를 2동 가지고 있는 경우가 많지 않으며, 따라서 환경이 열악한 일반농가에서 대조구가 있는 실험은 사실상 불가능하다는 의견이 주를 이루고 있으며, 일반적으로 2가지를 제안하고 있다.

1. 일반적으로 살모넬라가 문제가 되는 농장에서 1달간 자료를 축적하여 baseline을 확립한 후, 1달간 살모넬라 저감제를 사용하여 그 차이를 비교함.
2. 면역소재를 사용하고 있는 농장과 유사한 수준의 다른 농장의 분변을 비교하여 살모넬라의 검출 빈도를 비교함.

일반적으로 1번 방법이 더욱 바람직하다고 생각되지만, 살모넬라의 출현빈도가 항상 일정한 농장이 거의 없다고 컨설팅을 받았고, 이를 바탕으로 2번 방법으로 진행할 가능성이 훨씬 높다고 판단되었다. 다만 최종적으로 농장을 선정하는 과정에서 다시 한번 이에 대하여 충분한 논의를 진행할 계획을 수립하였다.

(2) 인수공통 살모넬라 음성인 농장에서의 현장실증실험 설계

살모넬라 음성 농장에서의 현장실증실험은 주기적으로 모니터링을 할 수 있도록 허락한 농장에서 살모넬라 저감소재를 투여한 군과 투여하지 않는 군의 분변에서 살모넬라 균을 검사하는 것을 검토하고자 하였다.

특히 여름철에 살모넬라가 증가하는 경향이 있어 가능하면 여름철에 현장실증실험을 실시하는 것이 바람직하다고 판단된다. 환경이 열악한 일반적인 양돈장의 상황이라면 대부분의 모돈들이 살모넬라에 감염되어 있기 때문에 이에 대한 항체를 자돈에게 물려주는 것이 일반적이며, 따라서 대개 초유를 정상적으로 먹은 포유자돈들에게서는 여간해서 살모넬라증이 발생하지 않는다. 그러나 그 이후로는 시기를 가리지 않고 살모넬라증이 나타날 수 있으며 특히, 3~4개월령에 이르면 살모넬라증이 발생한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 PRRS가 만연한 농장에서는 돼지의 일령을 가리지 않고 살모넬라증이 나타나는 것으로 알려져 있다.

그러므로 정기적인 분변검사에서도 살모넬라가 검출되지 않아도, 부정기적으로 살모넬라가 검출될 수 있으며 특히, PRRS가 만연한 농장을 중심으로 이에 대한 모니터를 할 필요성이 있다고 판단된다. 다만 PRRS의 검사는 혈청검사를 진행해야 하므로, 이미 PRRS가 확인된 농장을 선택하는 것이 바람직하다는 컨설팅을 받았다.

다. 현장실증시험 수행에 있어서의 조사 항목 검토 및 결정

현장실증시험 수행에 있어서 조사항목은 아래와 같다.

농장에서 살모넬라에 대하여 모니터가 가능한 것은 분변에서의 살모넬라 검사와 혈청 검사가 있다. 분변은 직접 살모넬라를 검출하는 것이고, 살모넬라 혈청 검사는 과거에 살모넬라에 감염된 경험이 있는가를 확인할 수 있는 방법이다.

항체 형성은 살모넬라 감염의 결과이므로 항체가 검출되지 않은 경우는 살모넬라가 감염되지 않았다는 증거로 일반적으로 받아들여지기는 하지만, 항체 자체는 살모넬라에 대한 저항력을 나타내는 것으로 면역력이나 항병력의 지표이기도 하기 때문에 살모넬라의 저감 효과의 biomarker로는 적합하지 않다고 컨설팅 받았다. 또한 동물실험을 통해서도 혈액내 여러가지 사이토카인이 살모넬라 저감제에 의하여 크게 변화하지 않을 것으로 판단되어 각종 사이토카인도 biomarker로 사용하기에는 부적합하다고 판단된다.

또한 농가에서의 혈청 조사와 관련하여 컨설팅 회사의 의견은 매우 어렵다는 의견이었다. 이는 혈청을 뽑을 때 돼지가 스트레스를 받아 피해보상을 요구할 것인데, 피해가 어느 정도이고 그 피해가 혈청 조사에 따른 것인지 검증할 수 없어 농가와 피해보상 합의가 어려울 수 있어 실제 진행이 상당히 어려울 수 있을 것이라는 컨설팅을 받았다.

그러므로 농장에서의 실험은 분변 및 환경에서의 살모넬라 검출로 정하고자 하며, 이는 현재 HACCP에서도 살모넬라를 직접 검출하는 분변 검사 방법을 주로 사용한다는 점에서 이러한 분석법이 타당하다고 판단된다.

또한 분변 채취에 있어서 대학원생들이나 외부 일반인은 할 수 없으며 수의사를 통해 하는 것이 현실적인 해결책이라는 의견도 컨설팅 받았다. 특히, 현장실증시험 때문이 아닐지라도 어떠한 문제든 농장에서 문제가 발생할 때에는 피해보상을 요구하기 때문에 이를 감안하면 수의사를 통해 농장을 관리하는 것이 유일한 해결책이 될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 양계농장에서의 현장실증 실험

가. 5개 양계농장에서 살모넬라 저감제 섭취군 및 미섭취군 2군에 대해 적용

- 멸균된 fecal swab으로 매 주마다 5개 농장에서 40마리씩, 총 200마리의 직장 내 분변 확보하였으며 각 샘플을 아래와 같이 표시 하였다.

[농장번호 / 그룹 / 주차 - 샘플번호] ex)1번 농장 A그룹 3주차 10번 샘플 = 1A3-10	
농장번호	1.점터농장, 2.대성농장, 3.세현농장, 4. 영곡농장, 5. 울애농장
그룹	A.대조군, B.실험군
주차	: 매주 5개 농장씩 샘플링
샘플 번호	: 한 농장 당 총 40개 샘플 -A.대조군 그룹 : 01~20 (20개) -B.실험군 그룹 : 01~20 (20개)

(1) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 임상병리학적 지표 평가

- 강황(생물전환)산물을 급여한 계군과 비급여 계군 모두에서 살모넬라 감염증상을 발현 하는 계군을 전혀 확인하지 못하였다.
- 임상병리학적 지표 분석: 채혈 후, 전혈구 검사, 혈청화학검사(ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Creatinine, Ca, Phosphorous, Glucose, Total Protein, Albumin, Total cholesterol, Triglyceride), 전해질 검사 지표에서 급여 계군과 비급여 계군 사이의 유의미한 변화를 관찰하지 못하였다.

(2) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 분자미생물학 평가

- 살모넬라균의 정량 및 정성적 분석(증균 전): 분변 샘플들은 농장에서 실험실로 이동한 당일에 라파포트-바실리아디스(Rappaport-Vassiliadis, RV) 선택 증균 배지 (4 mL, pH5.4)에 접종한 뒤, 상층액을 500 μ L 씩 멸균된 1.5mL Eppendorf tube에 분주하였다. 단계적인 십진 희석 후, 자일로오스 리신 디옥시콜레이트 (Xylose-Lysine-Desoxycholate, XLD) 살모넬라 선택배지에, 희석액 100 μ L 씩을 무균적으로 접종 도말하였고, 37°C 19시간 배양 후 살모넬라 균 의심 집락에 대해 계수하고, 2차적으로 살모넬라균 여부를 PCR 검증하였다.
- 선택 증균 배양: 분변 샘플들은 농장에서 실험실로 이동한 당일에 RAPPAPORT-VASSILIADIS(RV) enrichment broth medium에 접종한 뒤 37°C, 230rpm 조건으로 배양하였고, 19시간 뒤 배지의 색깔을 관찰하여 증균 여부를 판단하였다. 이후 증균

배양된 샘플 배지를 각각 1ml 씩 멸균된 1.5ml Eppendorf tube에 분주하여 sample box에 담아 4°C에 보관하였다.

○ 살모넬라균의 정량 및 정성적 분석(증균 후): 미증균 배지 중 남은 RV broth 배지 3.5ml 는 37°C, 230 rpm 조건으로 19시간 동안 진탕 배양하였고, 증균 후 단계 십진희석액 100 µl 씩을 XLD 배지에 무균적으로 접종 도말하였고, 37°C 19시간 배양 후 살모넬라균 의심 집락에 대해 계수하였다. 모든 의심집락에 대해 2차적으로 살모넬라균 여부를 PCR 검증하였다.

○ 살모넬라 검출 primer의 민감도 평가:

▶ 3개의 살모넬라 균주를 LB broth 배지에 19시간 동안 37°C, 200 rpm 조건에서 증균배양한 뒤 HiYield Genomic DNA mini kit (Real Biotech Corporation)를 이용하여 세균의 gDNA를 추출하였다. Spectrophotometer로 DNA의 농도를 측정 후 원액을 희석 ($2^0 \sim 2^{-23}$) 하였다. 각 희석농도에 대한 PCR은 다음과 같이 진행하였다.

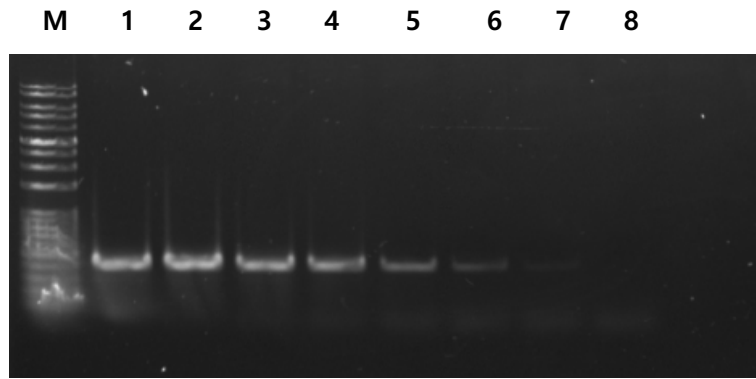
사용한 균주		
S. Typhimurium ATCC 14028	S. Typhimurium 돼지 분리주 (1차 실험 공격접종 균)	2종 (Streptomycin, Spectinomycin) 항생제 내성 S. Typhimurium 돼지 분리주 (2,3,4차 실험 공격접종 균)
각 샘플 (20 µl) 내 PCR 조성		
2x Taq DNA polymerase pre-mix (Solgent) 10 µl + Primer (1 pmol/µl) 4 µl + auto D.W 5 µl + gDNA 1 µl		

▶ 온도와 시간 조건은 참고 논문에 근거하여 First denaturation at 94°C for 2min. / Denaturation at 94°C for 30 s, Annealing at 60°C for 30s, Extension at 72°C for 30s (30 cycles). / Final extension at 72°C for 5 min으로 하였다. PCR 증폭여부는 증폭된 샘플을 1% 아가로스 젤에서 전기영동하여, 브롬화 에티듐 (Ethidium bromide)에 염색한 후 UV transilluminator에서 확인하였다.

▶ 실험결과:

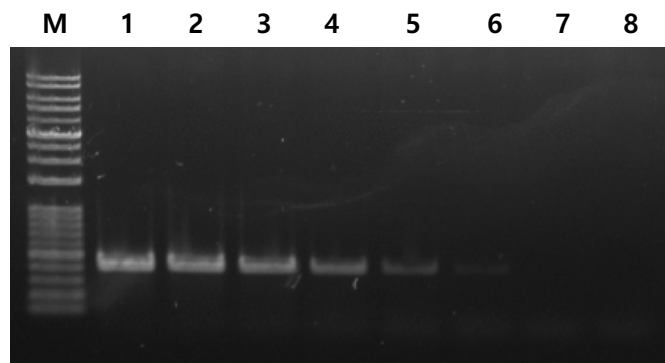
① S. Typhimurium ATCC 14028

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8
gDNA (pg)	890.625 (2^{-9})	222.6563 (2^{-11})	55.66406 (2^{-13})	13.91602 (2^{-15})	3.479004 (2^{-17})	0.869751 (2^{-19})	0.217438 (2^{-21})	0.054359 (2^{-23})
증폭여부	+	+	+	+	+	+	+	-



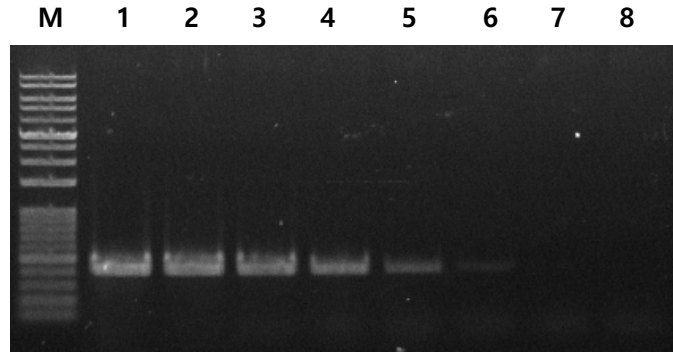
②. *S. Typhimurium* 농장 분리주

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8
gDNA (pg)	498.4375 (2 ⁻⁹)	124.6094 (2 ⁻¹¹)	31.15234 (2 ⁻¹³)	7.788086 (2 ⁻¹⁵)	1.947021 (2 ⁻¹⁷)	0.486755 (2 ⁻¹⁹)	0.121689 (2 ⁻²¹)	0.030422 (2 ⁻²³)
증폭여부	+	+	+	+	+	+	-	-



③ 2종 (Streptomycin, Spectinomycin) 항생제 내성 *S. Typhimurium* 농장 분리주

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8
gDNA (pg)	1067.188 (2 ⁻⁹)	266.7969 (2 ⁻¹¹)	66.69922 (2 ⁻¹³)	16.6748 (2 ⁻¹⁵)	4.168701 (2 ⁻¹⁷)	1.042175 (2 ⁻¹⁹)	0.260544 (2 ⁻²¹)	0.065136 (2 ⁻²³)
증폭여부	+	+	+	+	+	+	-	-



④ 본 실험의 PCR 검출한계

<i>Salmonella Typhimurium</i> strains	PCR로 검출할 수 있는 최소 gDNA 농도 (pg)
ATCC14028	0.06~0.21
농장분리주	0.12~0.48
항생제내성유전자 표지 농장분리주	0.26~1.04

○ PCR 분석: 1주 ~ 2주차까지의 분변 샘플은 분변 내 살모넬라균 검출 확인을 위해 *Salmonella* genus에 속하는 광범위한 strain들을 모두 검출할 수 있는 primer를 선정하였다²⁾. 또한 control gene으로 사용할 strain을 아래와 같이 선정하였다. 선정된 PCR 분석법의 검출한도를 조사하였던 바, 사용된 유전자검출기법의 검출한도는 fg으로 확인하였다.

Target	Primer	Sequence(5' to 3')	Size(bp)	Target gene
<i>Salmonella</i> genus	SG	F : TTTGG CGGCG CAGGC GATTC R : GCCTC CGCCT CATCA ATCCG	423	STM3098

Bacterial control strains used in this study	
Positive control	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 <i>S. Choleraesuis</i> ATCC 13312
Negative control	<i>E. coli</i> ATCC 25922

○ 증균 배양 후 4°C에 보관하였던 배지 1mL를 원심분리 하여 상층액을 제거한 뒤 가라 앉은 pellet을 auto D.W 100μL에 resuspension하여 농축된 균부유액을 만든다. Total 50 μL volume reaction을 위해 아래와 같이 mix 용액을 제조하였다.

Total 50μL volume
2x Taq DNA polymerase pre-mix(Solgent사) 25μL + Primer(1pmol/1μL) 10μL + auto D.W 10μL + 5개 샘플 균부유액 5μL(각각 1μL)

2) 참고문헌 : S.H. Park and S.C Ricke. 2014. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Salm.* Enteritidis, *Salm.* Heidelberg and *Salm.* Typhimurium. J. Appl. Microbiol. 118, 152-160

- 온도와 시간 조건은 참고 논문에 근거하여 First denaturation at 94°C for 2min. / Denaturation at 94°C for 30 s, Annealing at 60°C for 30s, Extension at 72°C for 30s (30 cycles). / Final extension at 72°C for 5 min으로 하였다. PCR amplicons은 1% agarose gel에서 separated 시키고 Ethidium bromide에 염색한 후 UV transilluminator에서 결과를 관찰하였다. Target size의 밴드가 관찰되었을 경우, 해당 lane에 속하는 5개의 샘플들을 각각 하나씩 다시 PCR 하였다.
- 실험결과: 1-2주차 총 220건의 분변시료 PCR 분석 결과는 모두 음성으로 나왔으며, *Salmonella* ATCC strain과 2주차까지의 분변샘플들의 증균 배양 및 PCR 결과는 첨부한 excel file에 정리되어있다.



- 2주차 PCR 결과 -

(1번 lane : negative control, 20번 lane : 일반 sample + positive control, 21번 lane : positive control)

1차 3개 농장 실험 결과

주차	그룹	샘플명	샘플수(수, head)		강황(생물전환)산물
			살모넬라균 음성	살모넬라균 양성	
17.05.11 (1주차)	대조군	1A1-01~10	10	0	비급여
		2A1-01~20	20	0	
		3A1-01~20	20	0	
		소계	50	0	
	실험군	1B1-01~10	10	0	급여
		2B1-01~20	20	0	
		3B1-01~20	20	0	
17.05.18 (2주차)	대조군	1A2-01~20	20	0	비급여
		2A2-01~20	20	0	
		3A2-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	1B2-01~20	20	0	급여
		2B2-01~20	20	0	
		3B2-01~20	20	0	
		소계	60	0	

2차 2개 농장 실험결과 (총 5개농장)

주차	그룹	샘플명	샘플수(수, head)		강황(생물전환)산물
			살모넬라균 음성	살모넬라균 양성	
17.06.19 (1주차)	대조군	4A1-01~20	20	0	비급여
		5A1-01~20	20	0	
		소계	40	0	
	실험군	4B1-01~10	20	0	급여
		5B1-01~20	20	0	
		소계	40	0	
17.06.28 (2주차)	대조군	4A1-01~20	20	0	비급여
		5A1-01~20	20	0	
		소계	40	0	
	실험군	4B1-01~10	20	0	급여
		5B1-01~20	20	0	
		소계	40	0	

Egg Production Systems and *Salmonella* in Korea

3

Soo-Kyoung Lee^{1,2}, Kun-Ho Seo¹

¹Konkuk University, Seoul, South Korea; ²Animal and Plant Quarantine Agency,
Gimcheon, South Korea

5. EGGS AND *Salmonella*

Among salmonellosis outbreaks reported to Korea Centers for Disease Control and Prevention (KCDC), those caused by *S. Enteritidis* have been especially frequent, and foods associated with outbreaks of *S. Enteritidis* infection have often included eggs or egg products (Hong et al., 2015). Salmonellosis caused by contaminated eggs has been consistently reported. Between 2008 and 2012, 23 outbreaks of disease caused by *Salmonella* spp. that were traceable to contaminated livestock or livestock products were reported. Among these outbreaks, food-borne outbreaks by *S. Enteritidis* were most frequent (15 outbreaks/cases) and egg-related products were identified as the major causative agents. Eggs have been considered as one of the most important food sources because of their high nutritional value and reasonable price. Egg and egg products, however, have been implicated in the outbreak of human salmonellosis. The risk of developing *Salmonella* poisoning can be especially higher in consumers with the consumption habits of eating raw eggs. Traditionally, consumers in Korea habitually eating raw or lightly cooked egg should especially be aware of the risks via raw eggs, which represents a possible route of acquiring foodborne infections.

Cases of *S. Enteritidis* isolation have been reported in countries other than Korea, including the United States (Baker, 1980; Humphrey et al., 1989); however, in Korea, no such cases were reported from eggs or egg products between 2000 and 2011 (Chun and Hong, 2009; Lee et al., 2002; Woo, 2005). The study of Cho and Shin (1985) showed that *Salmonella* Mississippi

was isolated from 1 of 260 eggs (0.38%) collected between November and December 1983 at three poultry farms in Gyeonggi-do. Kwon and Ko (1997) reported that *Salmonella* serogroup E was isolated from only one eggshell (0.26%) of 390 eggs sampled from a wholesaler in Cheon-an. Strikingly, the isolated strain was found in all parts of the same egg including eggshell, albumen, and yolk materials indicating internalization of *Salmonella* in egg. In the study conducted in 1998 by Chang (2000), none of the egg yolks were found to contain *Salmonella* among 135 packs of one dozen shell eggs purchased from supermarkets in Seoul and Gyeonggi-do areas in Korea. In the study of Lee et al. (2002), *S. Enteritidis* and antibodies directed against *S. Enteritidis* were not detected in the yolks of eggs available in the market. The study was evaluated on the egg pools composed of 171 eggs of 57 commercial brands (3 eggs per brand) collected from food stores in a department store located in the Incheon metropolitan city. Lee et al. (2004) carried out an investigation to analyze biological hazards, microbial contamination of egg (normal, dirty, and cracked), water, feed, manure, and equipment associated with laying farms, where one isolate of *S. Enteritidis* originated from the manure of egg-laying hens (n = 32 samples) among a total of 196 environmental samples and one isolate of *Salmonella* Bardo was detected from dirty egg shells (n = 34) among a total of 192 egg samples. In the study by Chun and Hong (2009), *Salmonella* was not identified in four different brands of eggs collected from hypermarkets in the northern Gyeonggi area. In the study by Woo (2005), a single isolate of *Salmonella* Gallinarum was isolated only on the eggshell part of one egg among 446 eggs (0.2%) collected from conventional markets and department stores located in Seoul and Gyeonggi regions in 1996. However, *S. Enteritidis* had rarely been isolated from eggs in Korea until the first isolation and identification in the surveys conducted by Kim et al. (2013), in which *S. Enteritidis* was first isolated from eggshells and the contents of eggs distributed at the grocery stores in Korea. Two strains of *S. Enteritidis* from the eggshells and one strain from egg contents collected from the Eumseong city region were first identified in the fall of 2011.

As the results of previous studies indicated, *Salmonella* was not prevalent among shell eggs in South Korea. However, this low frequency of detection, compared with those reported in previous studies in other countries, might partly have resulted from the use of a detection method that did not adopt the pooling criterion based on the US Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual, which has been proved to be the most effective detection method for *Salmonella* in egg contents (US Food and Drug Administration, 2012). Furthermore, most of the previous studies in Korea tested for *Salmonella* in a narrow geographic region, and the bulk pooling method was not applied. In most of these studies, either the sample size for the assessment of *Salmonella* was small (one to five eggs per farm) or the survey was conducted only once without consecutive testing. When the number of eggs for *Salmonella* test is increased and a nationwide study conducted in Korea, the prevalence of *Salmonella* from eggs might be increased. As neither the method of pooling the contents of 20 shell egg samples nor that of sampling by bulk pooling had been used, no *Salmonella* seemed to be detected in the contents of shell egg samples. Since previous reports have estimated that only 1 in 20,000 eggs is positive for *Salmonella*, more than 20,000 eggs should be tested to estimate the prevalence of *Salmonella* in eggs in any given region.

In Korea, the method used for the isolation of *Salmonella* from shell eggs was revised by the government in 2013 (QIA Notice, 2012-162). In a survey by Kim et al. (2015) conducted in bulk, no eggs were positive for *Salmonella* among a total of 2400 shell eggs (120 pooled samples consisting of 20 eggs per pool) between March 2011 and December 2012. Meanwhile in the same microbiological survey conducted at the egg-processing plants (i.e., plants that produce pasteurized and unpasteurized liquid egg), four *Salmonella*-positive samples from 120 unpasteurized liquid egg samples (3.3%) and five positive samples from 75 pasteurized liquid egg samples (6.7%) were identified at eight egg-breaking plants, which appears to prove that the pasteurization processes conducted in egg processing plants failed to adequately eliminate *Salmonella* in liquid egg products. Hygiene and sanitation standards in liquid egg products in South Korea need to be improved. Also, in the study by Lee et al. (2013), conducted according to the FDA method to evaluate the extent and species of *Salmonella* contamination in shell eggs in South Korea, a total of 26 *S. Gallinarum* isolates were obtained from the contents of 7000 shell eggs, but *S. Enteritidis* was not detected. In this study, *S. Gallinarum* was found to be more common in eggs from organic farms: 20.0% from organic and 5.3% from conventional farms.

Although cases of *S. Enteritidis* isolation from eggs have been reported in other countries, such cases have rarely been reported in Korea. This may be attributed to the hypothesis by Baumler et al. (2000) who suggested that *S. Enteritidis* filled the ecologic niche vacated by the eradication of *S. Gallinarum* from poultry, leading to an epidemic increase in human infections. This hypothesis was also supported by the study by Rabsch et al. (2000).

Even though *S. Gallinarum* has adapted to its avian host and rarely induces food poisoning in humans, it causes a significant poultry disease, fowl typhoid (FT), which has been responsible for considerable economic losses to the poultry industry. In Australia, North America, and most European countries, FT has almost disappeared as a result of improved surveillance and slaughter practices (Silva et al., 1981; Barrow, 1990; Kim et al., 1991; Wigley et al., 2005; Basnet et al., 2008). However, as the results show, FT has become one of the most serious bacterial diseases of poultry in Korea since the first case was reported in the field in 1992 (Kim et al., 2007). After experiencing severe damage from the disease since the massive outbreak in 1992, the Korean authorities decided to introduce a nationwide vaccination program with a live attenuated strain (SG 9R) for commercial layer chickens in 2001 instead of an eradication policy. Despite the introduction of live *S. Gallinarum* vaccines, a total of 928 national FT outbreaks were identified between 2000 and 2008 in Korea, and the annual number of outbreaks reached a peak (206 farms affected) in 2002 (Kwon et al., 2010).

나. 닭에서의 공격 접종 테스트 실험

(1) 산란계에서의 인수공통 살모넬라균의 공격접종 Field test [외부의뢰]

S. Enteritidis균 공격접종

: 살모넬라 엔테리티디스균 조절에 관한 소재 개발

국내 양계산업에서 *Salmonella* 속균은 패혈증, 설사 등을 유발하는 장내세균으로서 동물에서의 감염증은 경제적인 피해를 미칠 뿐만 아니라 식육 및 환경오염을 통한 사람의 질병발생에도 관련하기 때문에 공중위생 상으로도 중요시 여기고 있다.

*Salmonella*속 균은 그람음성의 통성 혐기성 세포내 기생세균으로서 사람과 동물을 비롯하여 자연계에 널리 분포하고 있다. 이들 균에 감염되면 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등의 전신성 증상을 일으키며, 특이성이 있는 몇몇 균종을 제외한 대부분의 균 속이 인수공통전염병의 원인 세균으로 알려져 있다.

*Salmonella enterica*는 수십 년 동안 사람에서 식중독의 주요 병원체로 인식되어 왔으며, 주로 동물 유래균으로 오염된 음식물 섭취를 통하여 감염된 것으로 알려져 있다. 살모넬라감염증은 사람에서 가장 흔한 식품매개 질병으로서 미국에서 발생하는 식중독의 약 30%를 차지하며, 국내에서도 식중독 원인세균 중 가장 높은 분포를 나타내고 있다.

Salmonella enterica serotype Enteritidis(이하 S. Enteritidis 라함)는 1980년대 중반 이후 사람에서 식품매개를 통한 질병으로서 매년 증가되고 있다. 이 균은 사람과 동물에 감염하여 주로 급성장염을 일으키며, 오염된 계란이나 식품을 통하여 폭발적인 식중독 발생을 일으키고 있다. 특히 NSC(National *Salmonella* Center)는 이 균을 1997년 이후부터 살모넬라균 감염증에서 가장 많이 분리되는 serotype(50%)으로 보고하고 있다.

살모넬라균 중 특히 S. Enteritidis는 사람에게 있어 식품유래 살모넬라증의 주된 원인균으로 어린 동물은 주로 설사를 동반한 전신증상으로 폐사하는 등 이환율과 치사율이 높은 반면, 성숙한 동물은 대부분이 불현성 감염으로 보균하게 되고, 사람에게는 구토, 발열, 수양성 설사, 복통, 장염 등을 일으키는 식중독의 원인균으로 국내에서 S. Enteritidis는 최근 5년간 가장 많이 분리된 혈청형으로 매년 증가추세에 있으며 항생제가 함유된 가축사료의 이용으로 항생제에 대한 내성균의 출현이 문제가 되고 있다. 또한 살모넬라균에 대한 다제 내성이 전 세계적으로 크게 증가하였다고 보고한 바 있다.

특히 항생제 내성문제는 국민의 생명과 직결되며, 항생제의 과다 사용으로 항생제 내성률이 높아져서 문제가 되고 있으며, 나아가 2가지 이상에 대한 다제내성균이 증가되어 병원균의 분리 및 동정을 어렵게 하고, 치료약제의 선택과 질병의 예방과 치료를 어렵게 하고 있다.

그래서 항생제 사용을 줄임으로써 내성을 감소시키는 일은 우리나라의 항생제 내성관리를 위해 우선적으로 항생제 사용량을 줄여야 할 것이며 이를 위해서는 지속적인 항생제 관리가 매우 필요하다고 생각되고 있으며, 사료네 첨가제를 통하여 확실한 저감 대책이 요구되어진다.

본 연구에서는 살모넬라균을 저감 시키는 강황과 미강의 8개 균를 만들어 *S. Enteritidis*를 투여 후 증체율, 부검 후 살모넬라균 재분리율, 조직학적 소견 등을 알아보려 하였다.

(가) 재료 및 방법

① 시험 동물

시판 산란계 하이라인 브라운® 품종(한양 부화장) 1일령을 200수를 구입하였다.

② 시험 설계

③ 각 구와 첨가제 첨가 현황

각 구를 25수로 하여 8구로 나누었다. 첨가제 제조에 있어서 실험동물 몸무게 1kg당 면역소재가 1mg, 10mg, 40mg이 투여될 수 있도록 설계하였다. 구별 내용과 첨가제 현황은 다음과 같다.

각 첨가제는 면역소재 CL-F 또는 RB-F를 각각 0.1%, 1%, 4% 함유하고 있으며, 사료에 각 첨가제를 1% 첨가하였다.

Table 134. 각 균의 성격과 첨가제 농도

구분	각 균	첨가제 농도
1	Negative Control(무첨가, 감염 X)	
2	Normal inoculation (무첨가, 감염 O)	무 첨가제, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종
3	CL-F1*	0.1%, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종
4	CL-F2	1%, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종
5	CL-F3	4%, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종
6	RB-F1**	0.1%, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종
7	RB-F2	1%, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종
8	RB-F3	4%, 1×10^8 <i>S. Enteritidis</i> 로 공격접종

* CL : 강황, ** RB : 미강

④ 공격 접종균

강원대 윤장원교수팀에서 제공한 병원성 *S. Enteritidis*를 가지고 1×10^8 cfu로 공격하였다. 이 균은 분자생물학적 방법으로 확인 후 접종하였다.

⑤ 사료 및 물

국내에서 분리된 병원성 *S. Enteritidis*를 가지고 1×10^8 cfu로 공격하였다. 이 균은 분자생물학적 방법으로 확인 후 접종하였다.

⑥ 조사항목 및 분석방법

⑦ 증체량 측정

입주 후부터 2주령까지 각 구의 증체량을 1주 간격으로 측정하였다. 초기의 실험구는 25수 모두를 측정하여 각 구를 일정하게 1,000g이 되도록 하였다. 그 후 3주령이 시작되는 시점부터 5일 간격으로 체중 측정과 부검을 실시하였다.

⑧ 부검 소견

- 닭들의 행동양상을 관찰한다.
- 설사 유무, 분변양상을 확인한다.
- 장내 이상 소견을 관찰한다.

⑨ 콕시듐 검사

부검 시 맹장의 분을 채취하여 1g을 만들고, 생리적 식염수 100ml를 부어 1시간을 정치해 둔 후 부유법으로 커버 그라스를 이용하여 채취 후 현미경으로 관찰하였다.

⑩ 분자생물학적 검사

Soumet 등의 실험에서 보았을 때 *sefA*는 *S. Enteritidis* 312bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. 그래서 이 프라이머를 사용하여 조사 하였다.

각 장기 즉 간과 비장, 맹장에서 채취한 샘플을 DNA를 추출하여(Takara DNA prep kit) 프라이머 작성 후 중합효소연쇄반응(PCR)방법으로 확인하였다.

Table 135. *Salmonella* sefA gene 증폭을 위한 PCR 프라이머.

Target gene	Primer	Sequencr(5'-3')	Size(bp)	Tm(°C)	Reference
sefA	sef167	AGG TTC AGG CAG CGG TTA CT	312	56	Soumet et al. (1999)
	sef478	GGG ACA TTT AGC GTT TCT TG			

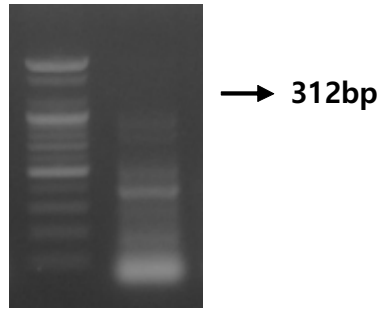


Figure 247. 증폭 된 PCR 사진(*Salmonella* sefA gene).

⑪ 간과 비장, 맹장의 분변 중 *S. Enteritidis* 재분리 성적

조금씩 떼서 한군데에 모아 1g이 되게 하고, 증류수로 10진 희석한 후 가장 마지막 단계에서 세균수를 측정하였다. 사용한 시험지는 3M회사에서 나온 Petrifilm™ 살모넬라 시험지를 사용하였다.

(나) 결과 및 고찰

① 증체 성적 결과

전체적으로 비교하여 볼 때 미강-F 급여군(RB-F2)에서 가장 우수하였다. 좀 더 구체적으로 살펴보면, 강황-F 급여군에서는 대동소이 하였지만, 미강-F 급여군에서는 RB-F2 급여군이 가장 우수하였다.

개체별 증체량 및 일령 증가에 따른 개체별 단기 기간별 증체량에서도 미강-F 급여군(RB-F2)에서 가장 우수하였다.

Table 136. 총 증체량 비

그룹 구분		체중(g)											
		7/13	7/20	7/27 (공 격)	7/31		8/5		8/10		8/15		8/20
					25수	20수	20수	15수	15수	10수	10수	5수	5수
		0일	7일	14일	18일	18일	23일	23일	28일	28일	33일	33일	38일
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	1,000	1730	2930	4450	3530	4660	3520	4480	3010	3720	1860	2250
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	1,000	1710	2880	3780	3050	3990	3020	3930	2650	3350	1680	2050
3	CL-F1*	1,000	1730	2990	3960	3180	4220	3170	4190	2810	3590	1790	2200
4	CL-F2	1,000	1780	3010	4070	3290	4320	3230	4250	2860	3680	1840	2250
5	CL-F3	1,000	1750	3070	4210	3300	4410	3300	4350	2910	3790	1890	2290
6	RB-F1**	1,000	1760	2960	3900	3130	4180	3140	4210	2790	3580	1800	2210
7	RB-F2	1,000	1750	3060	4180	3330	4480	3330	4560	3010	3900	1940	2420
8	RB-F3	1,000	1780	3050	4140	3280	4310	3220	4360	2910	3790	1890	2300

* CL : 강황, ** RB : 미강

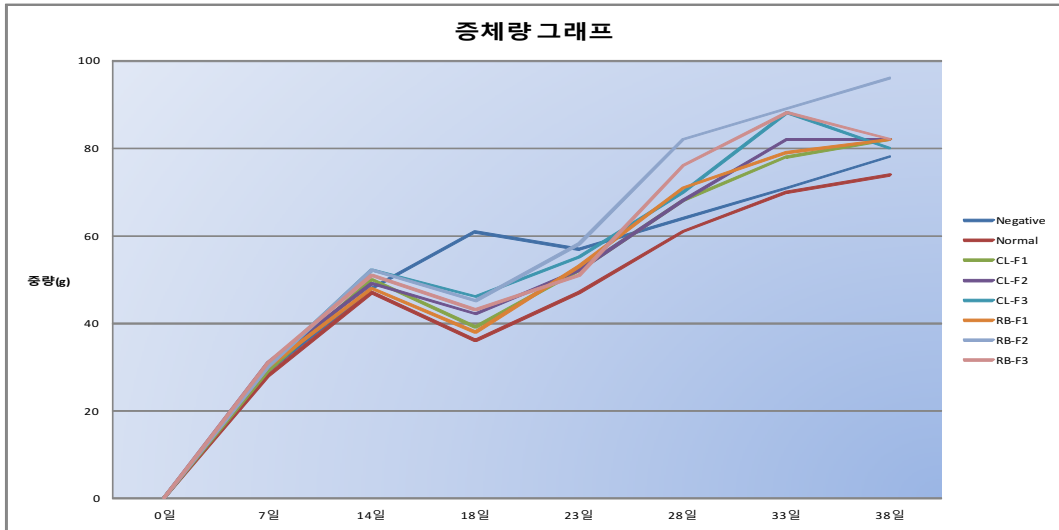


Figure 248. 총 증체량 비교표

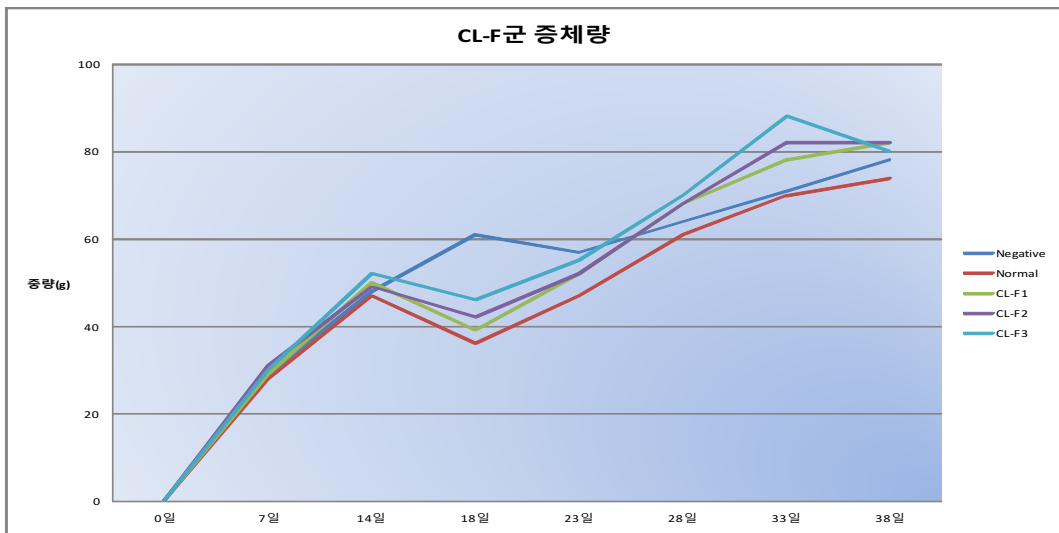


Figure 249. 강황 급여 군에서의 증체량

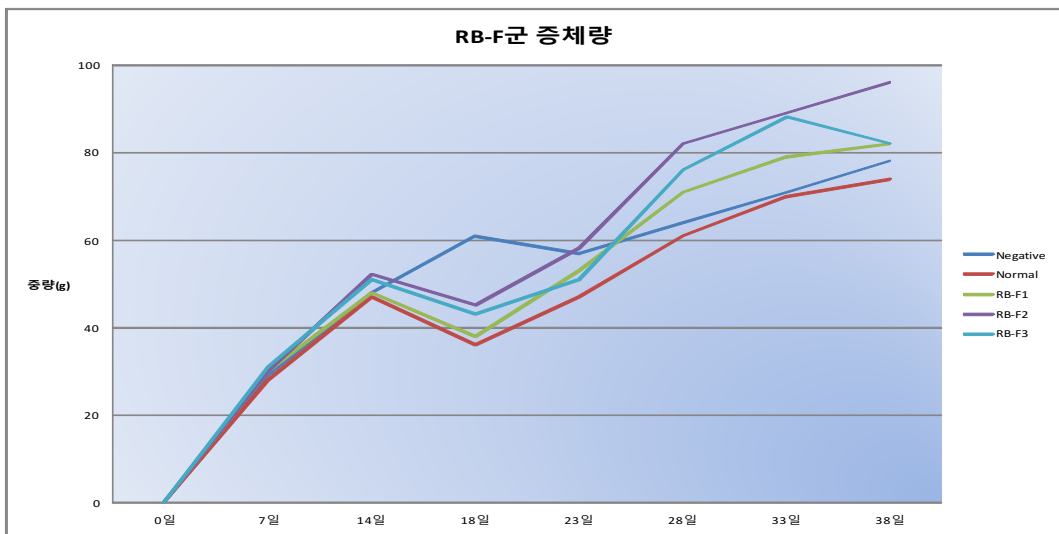


Figure 250. 미강 급여 군에서의 증체량

Table 137. 개체별 증체량

그룹 구분		체중(g)											
		7/13	7/20	7/27 (공격)	7/31		8/5		8/10		8/15		8/20
					25수	20수	20수	15수	15수	10수	10수	5수	
		0일	7일	14일	18일	18일	23일	23일	28일	28일	33일	33일	38일
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	40	69	117	178	176	233	234	298	301	372	372	450
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	40	68	115	151	152	199	201	262	265	335	336	410
3	CL-F1*	40	69	119	158	159	211	211	279	281	359	358	440
4	CL-F2	40	71	120	162	164	216	215	283	286	368	368	450
5	CL-F3	40	70	122	168	165	220	220	290	291	379	378	458
6	RB-F1**	40	70	118	156	156	209	209	280	279	358	360	442
7	RB-F2	40	70	122	167	166	224	222	304	301	390	388	484
8	RB-F3	40	71	122	165	164	215	214	290	291	379	378	460

* CL : 강황, ** RB : 미강

Table 138. 일령 증가에 따른 개체별 단기 기간별 증체량

그룹구분		체중(g)							
		7/13	7/20	7/27 (공격)	7/31	8/5	8/10	8/15	8/20
					25수	20수	15수	10수	5수
		0일	7일	14일	18일	23일	28일	33일	38일
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	0	29	48	61	57	64	71	78
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	0	28	47	36	47	61	70	74
3	CL-F1*	0	29	50	39	52	68	78	82
4	CL-F2	0	31	49	42	52	68	82	82
5	CL-F3	0	30	52	46	55	70	88	80
6	RB-F1**	0	30	48	38	53	71	79	82
7	RB-F2	0	30	52	45	58	82	89	96
8	RB-F3	0	31	51	43	51	76	88	82

* CL : 강황, ** RB : 미강

② 부검 소견

접종 초기에는 졸고 있는 개체가 각 군에서 2~3수 보였고, 설사하는 개체는 Normal Inoculation 군에서만 보이고, 나머지 접종 군에서는 모두 양호한 증상을 보였다.

Table 139. 1차 5수 부검 소견(7/31)





구분		분변 소견 및 부검 소견	사진
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	분변 및 소견은 정상적임	
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	설사 증상이 보임 간의 이상 소견	
3	CL-F1	간의 충혈 비장의 충혈	
4	CL-F2	간의 충혈 비장의 충혈	
5	CL-F3	간의 충혈 비장의 충혈	
6	RB-F1	간의 충혈 비장의 충혈	
7	RB-F2	간의 충혈 비장의 충혈	
8	RB-F3	간의 충혈 비장의 충혈	

Table 140. 2차 5수 부검소견(8/5)

구분		분변 소견 및 부검 소견	사진
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	분변 및 소견은 정상적임	
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	2~3수 설사 증상	
3	CL-F1	간의 충혈 비장의 충혈	
4	CL-F2	간의 충혈 비장의 충혈	
5	CL-F3	간의 충혈 비장의 충혈	
6	RB-F1	간의 충혈 비장의 충혈	
7	RB-F2	간의 충혈 비장의 충혈	
8	RB-F3	간의 충혈 비장의 충혈	

Table 141. 3차 5수 부검소견(8/10)







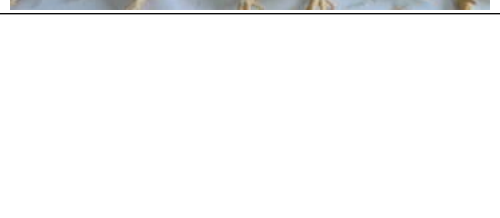








구분		분변 소견 및 부검 소견	사진
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	분변 및 소견은 정상적임	
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	2~3 수 설사 증상	
3	CL-F1	간의 충혈 비장의 충혈	
4	CL-F2	간의 충혈 비장의 충혈	
5	CL-F3	회복 증상	
6	RB-F1	간의 충혈 비장의 충혈	
7	RB-F2	회복 증상	
8	RB-F3	회복증상	

Table 142. 4차 5수 부검소견(8/15)

구분		분변 소견 및 부검 소견	사진
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	분변 및 소견은 정상적임	
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	간의 증혈 비장의 증혈 초기 콕시듐 소견	
3	CL-F1	회복 증상 콕시듐 소견	
4	CL-F2	회복 증상 콕시듐 소견	
5	CL-F3	회복 증상 콕시듐 소견	
6	RB-F1	회복 증상	
7	RB-F2	회복 증상	
8	RB-F3	회복 증상	

Table 143. 5차 5수 부검소견(8/20)

구분		분변 소견 및 부검 소견	사진
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	분변 및 소견은 정상적임	
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	콕시듐 소견(경증)	
3	CL-F1	콕시듐 소견(경증)	
4	CL-F2	콕시듐 소견(경증)	
5	CL-F3	콕시듐 소견(경증)	
6	RB-F1	회복 소견	
7	RB-F2	회복 소견	
8	RB-F3	회복 소견	

③ 콕시듐 검사 결과

부검 시 육안적인 맹장부위의 콕시듐 증상이 보여 콕시듐 검사를 실시한 결과 경미한 콕시듐증이 미강-F 투여군을 제외한 모든 군에서 보였다.

Table 144. 콕시듐 검사

구 분		4차(8/15)		5차(8/20)	
		한 시야당 숫자	평가	한 시야당 숫자	평가
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	7개	+	10개	+
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	5개	+	7개	+
3	CL-F1*	5	+	7개	+
4	CL-F2	5	+	7개	+
5	CL-F3	5	+	7개	+
6	RB-F1**	0	음성	0	음성
7	RB-F2	0	음성	0	음성
8	RB-F3	0	음성	0	음성

* CL : 강황, ** RB : 미강

음성 : 없음, + : 한시야당 10개 이하, ++: 100개 전후, +++: 셀수 없음

④ 분자생물학적 검사 결과

S. Enteritidis가 모두 검출 되었으나 균 분리 성적과 마찬가지로 비장에서만 4, 5차에 불검출 되었다.

⑤ 간과 비장, 맹장의 분변 중 S. Enteritidis 재분리 결과

본 균의 재분리 결과 중 간에서 Normal Inoculation군(S. Enteritidis를 투여한 군)에 비하여 현저히 균이 저하하고 있으며, CL-F3는 비장에서 4, 5차에서는 S. Enteritidis균이 분리되지 않을 정도로 저감 효과가 우수하였다. 맹장의 변에서는 비교적 저감효과가 보였다.

Table 145. *S. Enteritidis* 재분리 성적

구 분		1차(7/31)			2차(8/5)			3차(8/10)6		
		간	비장	맹장변	간	비장	맹장변	간	비장	맹장변
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	5X10 ⁵	1X10 ⁵	1.3X10 ⁶	3X10 ⁵	4X10 ⁵	2X10 ⁶	6X10 ⁴	4X10 ⁴	6X10 ⁶
3	CL-F1*	6X10 ⁴	1X10 ⁴	4.2X10 ⁶	4X10 ⁴	4X10 ³	1X10 ⁵	5X10 ³	2X10 ³	3X10 ⁶
4	CL-F2	1.1X10 ⁵	8X10 ³	4X10 ⁴	2X10 ⁴	6X10 ³	4X10 ⁵	4X10 ³	1X10 ³	1.2X10 ⁶
5	CL-F3	1.2X10 ⁵	6X10 ³	7.2X10 ⁶	4X10 ³	3X10 ³	1.7X10 ⁶	4X10 ³	1X10 ³	1.3X10 ⁶
6	RB-F1**	7X10 ⁴	3X10 ⁴	4X10 ⁵	2X10 ⁴	8X10 ³	2X10 ⁶	2.2X10 ³	2X10 ³	1X10 ⁶
7	RB-F2	1.6X10 ⁴	3.4X10 ³	2.9X10 ⁶	4X10 ⁴	8X10 ³	3X10 ⁵	7X10 ³	8X10 ³	4.5X10 ⁶
8	RB-F3	7X10 ⁴	1.2X10 ³	2X10 ⁶	1X10 ⁵	3X10 ³	5X10 ⁵	2X10 ³	1X10 ³	8X10 ⁵

구 분		4차(8/15)			5차(8/20)		
		간	비장	맹장변	간	비장	맹장변
1	Negative Control (무첨가, 감염X)	0	0	0	0	0	0
2	Normal Inoculation (무첨가, 감염O)	5X10 ⁴	2.8X10 ⁴	3X10 ⁶	6X10 ³	5X10 ³	4X10 ⁷
3	CL-F1*	6X10 ³	5X10 ³	3X10 ⁶	2X10 ³	7X10 ³	2X10 ⁵
4	CL-F2	2X10 ³	3X10 ²	1X10 ⁶	8X10 ³	7X10 ²	2X10 ⁵
5	CL-F3	1X10 ²	0	3X10 ⁵	6X10 ³	0	1X10 ⁵
6	RB-F1**	7X10 ³	1X10 ²	3X10 ⁵	4X10 ³	1X10 ²	2X10 ⁵
7	RB-F2	3X10 ³	3X10 ²	3X10 ⁵	1X10 ³	1X10 ²	2X10 ⁵
8	RB-F3	1X10 ³	6X10 ²	3X10 ⁵	4X10 ²	3X10 ²	2X10 ⁵

* CL : 강황, ** RB : 미강

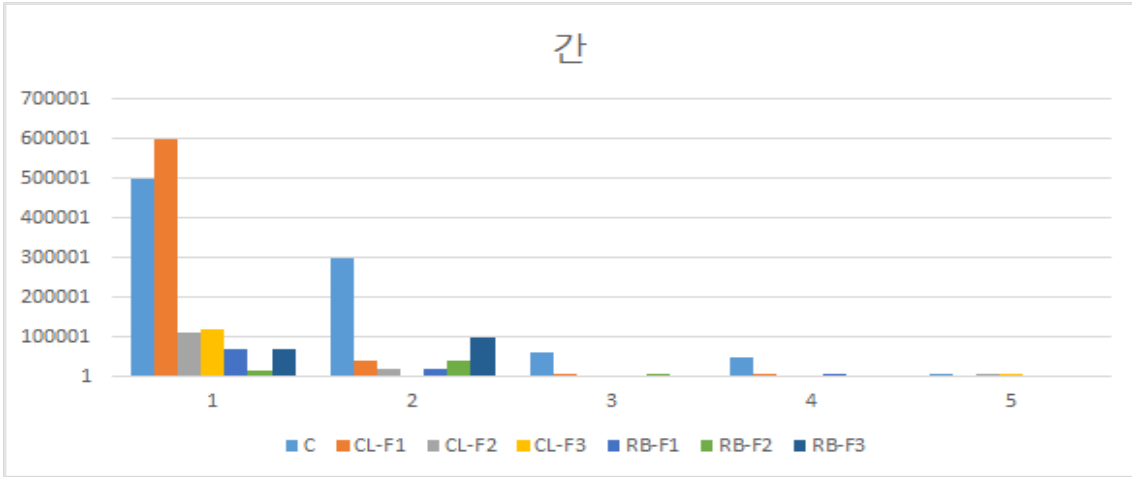


Figure 251. 간의 *S. Enteritidis* 재분리 성적 그래프

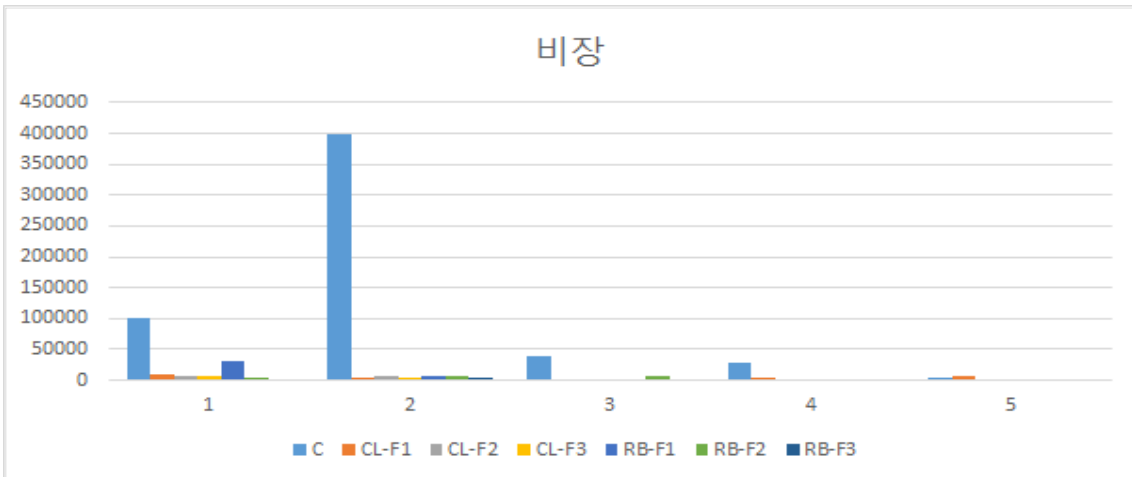


Figure 252. 비장의 *S. Enteritidis* 재분리 성적 그래프

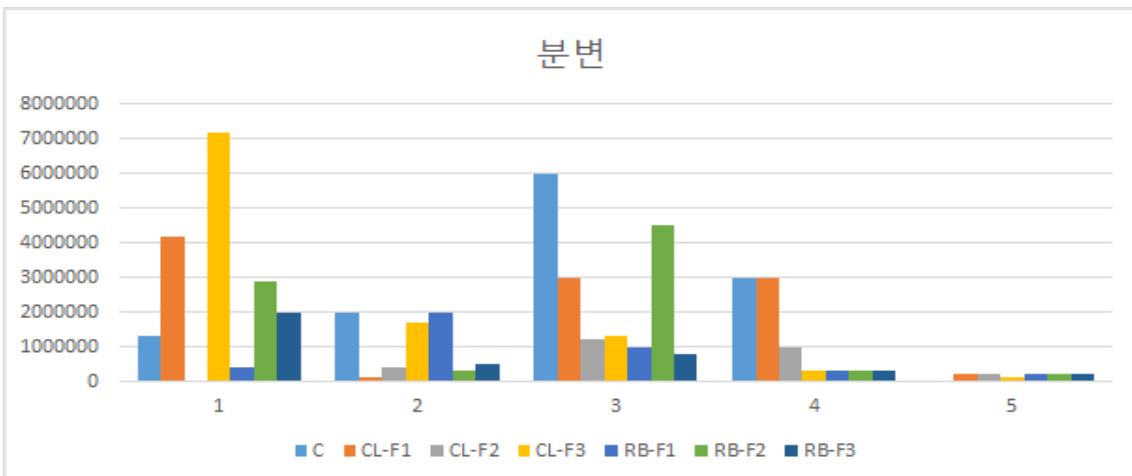


Figure 253. 맹장의 변의 *S. Enteritidis* 재분리 성적 그래프

⑥ 고찰

세계적으로 항생제 내성문제는 내성균에 감염된 사람이나 동물의 치료를 불가능하게 하며 또한 2가지 이상의 약제에 내성을 가지는 다제 내성균의 출현이 병원균의 분리 및 동정을 어렵게 만들기 때문에 감염병 예방과 치료약제의 선택을 어렵게 하여 공중보건상 중요한 문제로 대두되고 있는 실정이다.

항생제는 세균이 다른 미생물의 생장, 번식을 억제하거나 파괴하기 위하여 생산하는 물질로 동물질환의 치료와 발육촉진을 위해 사료에 첨가하기도 하고, 각종 생활용품에서 사용하는 등 산업적으로 다양하게 이용하고 있는 실정이다. 유럽 국가의 경우 항생제의 연간 소비량은 약 50% 이상을, 미국의 경우 80% 이상을 동물의 치료에 사용하고 있으며, 우리나라 경우 항생제 사용량은 2006년 이후 항생제 사용량이 줄고 있지만 OECD 가입국들과 비교하면 항생제의 남용과 부적절한 항생제로 인한 항생제 내성률도 세계 최고라는 보고가 있어 이로 인해 지역사회에 내성 세균의 발현이 증가되고 있으며, 동물로부터 사람에게 내성세균과 내성유전자가 직간접적으로 전파되어 심각한 사회문제가 되고 있다고 한다. 세계적으로 항생제 내성문제는 내성균에 감염된 사람이나 동물의 치료를 불가능하게 하며 또한 2가지 이상의 약제에 내성을 가지는 다제 내성균의 출현이 병원균의 분리 및 동정을 어렵게 만들기 때문에 감염병 예방과 치료약제의 선택을 어렵게 하여 공중보건상 중요한 문제로 대두되고 있는 실정이다.

그러므로 항생제를 쓰지 않는 축산업이 대두되고 있으며 이러한 일환으로 본 연구가 시작되었다.

그런데 결과 중에서 본 제제를 투여한 군에서 증체가 확실하게 일어나 오히려 면역성뿐만이 아니라 증체 측면에서도 우수하여 상당히 고무적 이었다. 전체적으로 비교하여 볼 때 미강-F 급여군(RB-F2)에서 가장 우수하였다. 좀 더 구체적으로 살펴보면, 강황-F 급여군에서는 대동소이 하였지만, 미강-F 급여군에서는 RB-F2 급여군이 가장 우수하였다.

부검 소견 상 접종 초기에는 즐고 있는 개체가 각 군에서 2~3수 보였고, 설사하는 개체는 Normal Inoculation 군에서만 보이고, 나머지 접종 군에서는 모두 양호한 증상을 보였다. 즉 닭에서는 심각한 증상을 보이지 않으나 이게 사람에게 들어갔을 때는 식중독이라는 대형 사건을 일으킨다. 그러므로 관심을 가지고 보아야 할 것이다.

부검 시 육안적인 맹장부위의 콕시듐 증상이 보여 콕시듐 검사를 실시한 결과 경미한 콕시듐증이 보였다. 외부와 차단되고 완벽히 차단된 계군에서 콕시듐증이 보여 상당히 당혹스럽게 만들었다. 이미 사료에는 "마두라마이신"이라는 항콕시듐제가 들어가고 있는데 콕시듐이 발병하고 있었다. 그런데 미강-F를 투여한 군에서는 콕시듐이 발견되지 않아 혹시 콕시듐에도 효과가 있지 않나 생각되어지며 향후 계속적으로 검토해 볼 사항 같다.

분자생물학적 검사 결과에서는 *S. Enteritidis*가 모두 검출되었으나 균 분리 성적과 마찬가지로 비장에서만 4, 5차에 불검출 되었다.

간과 비장, 맹장의 분변의 *S. Enteritidis* 재분리 결과 간에서 *S. Enteritidis*를 투여한 군에 비하여 현저히 균이 저하하고 있으며, CL-F3는 비장에서 4, 5차에서 *S. Enteritidis*균이 분리되지 않을 정도로 저감 효과가 우수하였다. 맹장의 변에서도 비교적 저감효과가 보였다.

결론적으로 본 제제가 개발된다면 본 연구과제에 의해서 획득된 지식 및 기술을 농장 현장으로 직접 보급할 수 있으며 본 기술을 바탕으로 지속적인 기술개발을 통한 다양한 제품들의 국내생산 유도하고, 전문기술 인력의 확보와 이러한 기법의 산업적 적용이 가능하게 되어 새로운 생물산업군의 활성화가 가능하게 되리라 생각한다.

(2) 산란계에서의 증특이 살모넬라균의 공격접종 Field test [외부의뢰]

S. Gallinarum균 공격접종

: 살모넬라 갈리나리움균 억제 및 치료에 관한 소재 개발에 대한 스크리닝 검사

국내 양계산업에서 *Salmonella* 속균은 패혈증, 설사 등을 유발하는 장내세균으로서 동물에서의 감염증은 경제적인 피해를 미칠 뿐만 아니라 식육 및 환경오염을 통한 사람의 질병 발생에도 관련하기 때문에 공중위생 상으로도 중요시 여기고 있다.

조류에서 살모넬라 감염증은 *Salmonella Gallinarum*에 의한 가금티푸스, *S. Pullorum*에 의한 추백리, 그리고 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 등 기타 *Salmonella sp.*에 의해 발생하는 가금파라티푸스로 구분이 되고 있다.

가금티푸스는 닭 및 칠면조 등의 조류에서 발생하는 급·만성의 전염병으로 연령에 관계없이 발병하며 높은 폐사율을 나타내는 질병으로 병아리는 물론 중추 및 성계에서도 심한 장염과 황색 또는 푸른 설사 그리고 패혈증을 주 증상으로 하고 있다. 또한, 난계대 전염을 일으킨다는 중요성 때문에 전 세계적으로 문제시 되고 있는 질병이다. 국내에서의 발생은 김기석 등에 의해 1992년 처음으로 보고되었으며, 1994년 이후로는 전국적으로 확산되어 높은 폐사율과 부화율 및 산란율 감소 등으로 인하여 양계산업에 막대한 경제적 손실을 끼치고 있는 실정이다.

Salmonella group A, B, D의 O 항원을 구성하는 당은 4개로 이중 3개는 mannosyl, rhamnosyl, galactose로 공통적인 구성당이며, 마지막 당은 dideoxyhexose로 혈청형에 따라 serotype A는 paratose, serotype B와 C2는 abequose, serotype D는 tyvelose 등으로 구분이 되어 진다.

이 최종단계의 dideoxyhexose를 합성하는 enzyme의 encoding 유전자를 혈청형에 따라 분석한 결과 serotype B와 C2의 경우 rfbJ에 의하여 합성이 되는 반면, serotype A와 D의 경우는 rfbS gene에 의해 합성됨이 밝혀졌다.

*S. Gallinarum*의 경우, *Salmonella serotype D*군에만 존재하는 rfbS 유전자의 염기서열상, 598과 237번째 위치에서 *S. Gallinarum*만의 특징적인 두 개의 유전자 구조 형태가 존재함이 확인되었다. 본 연구에서는 이러한 *S. Gallinarum* rfbS 유전자의 특징적인 유전자 구조를 바탕으로 하여 *S. Gallinarum*만을 선택적으로 검출할 수 있는 대립형질 특이유전자 중합효소연쇄반응 (allele-specific PCR)법을 사용하였다.

이런 rfb gene과 serogroup과의 관계 때문에 중합효소연쇄반응을 통해 serotype을 구분하려는 연구가 진행되어 오늘에 이르렀다.

이 방법은 *S. Pullorum*이나 serotype D군에 속하는 다른 살모넬라 형으로부터 선택배지에서 배양된 세균 집락에서는 3시간 이내에, 야외 가검물로부터는 24시간 내에 *S. Gallinarum*을 선

택적으로 검출할 수 있다. 또한, 이 PCR법에 사용한 특이 primer는 genomic DNA만 있어도 *S. Gallinarum*만을 선택적으로 검출할 정도로 그 민감성과 특이성이 매우 높았다고 보고되어 본 실험에 사용하였다.

본 연구에서는 10개 구를 만들어 *S. Gallinarum*을 접종한 후 증체율, 폐사율, 부검 후 균 재 분리 등을 알아보려 하였다.

(가) 재료 및 방법

① 시험 동물

시판 산란계 하이라인 브라운® 품종(한양 부화장) 1일령을 200수를 구입하였다.

② 시험 설계

③ 각 구와 첨가제 첨가 현황

각 구를 20수로 하여 10구로 나누었다. 첨가제 제조에 있어서 실험동물 몸무게 1kg당 면역소재가 10mg 투여될 수 있도록 설계하였다. 구별 내용과 첨가제 현황은 다음과 같다.

각 첨가제는 해당 면역소재 한가지를 1% 함유하고 있으며, 사료에 각 첨가제를 1% 첨가하였다.

Table 146. Contents of experimental group.

Group	contents
1	Negative Control(무첨가, 감염 X)
2	Normal inoculation(무첨가, 감염 O)
3	Enterococcus faecium, Bacillus subtilis 생균제 (첨가량 : 1 X 10 ⁷ cfu/마리)
4	고용량 Bacillus subtilis 생균제(1 X 10 ⁸ cfu/마리) : ***** 살모넬라균과 동량을 감염 시 당일 및 전후 3일간 투여
5	PGJ-F***
6	PGJ-F+생균제(첨가제)
7	CL-F**
8	CL-F+생균제(첨가제)
9	RB-F*
10	RB-F +생균제(첨가제)*****

* RB-F = 미강, ** CL-F = 강황, *** PGJ-F = 도라지, ***** 생균제는 1번구와 같음,

***** = 가금 티푸스를 억제할 수 있는 생균제

④ 공격 접종군

국내에서 분리된 병원성 *S. Gallinarum*을 가지고 1×10^8 cfu로 공격접종 하였다. 이 균은 분자생물학적 방법으로 확인 후 접종하였다.

⑤ 사료 및 물

사료는 흥성사료(주)에서 생산하고 있는 산란계용 어린 병아리 가루사료를 사용했으며, 물은 수질 검사를 득한 양호한 지하수를 그대로 사용하였다.

⑥ 조사항목 및 분석방법

⑦ 증체량 측정

입추 후부터 4주령까지 각 구의 증체량을 1주 간격으로 측정하였다. 초기에 실험구는 20수 모두를 측정하여 각 구를 일정하게 810g이 되도록 하였다. 이에 반하여 Negative Control은 790g으로 측정하여 실험을 시작하게 되었다.

⑧ *S. Gallinarum*의 접종

*S. Gallinarum*은 다음 표와 같은 프라이머를 사용하여 확인 후 접종하였다. 접종시점은 5주령이 시작 되는 시점에서 시작하였다.

Table 147. Oligonucleotide primers for PCR amplification of *Salmonella* rfnS gene.

primer	Length(mer)	Nucleotide sequence(5'to3')	position	Tm(°C)	Product size
SG 1	18	5'-TCA CGA CTT ACA TCC TAC-3'	40-57	52	720
SG 2	18	5'-CTG CTA TAT CAG CAC AAC-3'	763-743	52	

⑨ 부검 소견

- 닭들의 행동양상을 관찰한다.
- 설사 유무, 분변양상을 확인한다.
- 고개를 떨구거나 폐사체를 확인한다.

⑩ 간과 장의 *S. Gallinarum* 재분리 성적

- 간의 종창 유무 및 청동색 간을 확인한다.

- 세균검사는 부검 닭의 장 및 분변에서 검체를 채취하여 SS(살모넬라-쉬겔라)배지에서 37°C, 12시간 동안 배양하여 Mucap test를 점적한 후 UV하에서 확인 하여 형광을 띠는 살모넬라의 특성을 확인하여 재분리를 하였고. 재분리된 검체는 다시 그람염색법으로 염색 결과 그람음성 간균을 확인한다.

- 분자생물학검사방법은 부검 닭의 장 및 분변에서 검체를 채취하여 DNA를 추출하여 (Takara DNA prep kit) Primer작성 후 중합효소연쇄반응(PCR)방법으로 확인한다.

(나) 결과 및 고찰

① 증체 성적

- RB-F 군이 가장 잘 크고 꾸준히 크는 것 같다. CL-F는 4주령에 갑자기 크기 시작하였으며 추후 상황을 지켜보아야 했으나 실험 여건상 중단하였다.

- 들어가는 생균제가 분명히 증체에는 별 영향이 없는 것 같다. 다만 후기 성장은 시험을 안 해 보았으므로 어떻게 변할지 모르겠다.

Table 148. Gain of body weight

그룹	내용	중량(그룹합계,단위:g)				
		입추	5/7(1)	5/14(2)	5/21(3)	5/28(4)
1	Negative Control(무첨가, 감염 X)	790	1400	2380	4000	5610
2	Normal inoculation(무첨가, 감염 O)	810	1410	2340	3990	5640
3	생균제 (첨가량 : 1 X 10 ⁷ cfu/마리)	810	1410	2420	3900	5500
4	고용량 생균제(1 X 10 ⁸ cfu/마리)	810	1410	2370	3970	5610
5	PGJ-F	810	1410	2420	4120	5630
6	PGJ-F+생균제	810	1410	2490	4100	5580
7	CL-F	810	1410	2420	4130	5980
8	CL-F+생균제	810	1410	2390	4080	5380
9	RB-F	810	1410	2450	4290	5860
10	RB-F +생균제	810	1410	2430	4050	5630
하이라인 브라운 표준체중(20수기준)		800	1400	2380	3800	5600

Table 149. Comparative data according to gain of body weight.

그룹	내용	증량비교 (%)				
		입추	5/7(1)	5/14(2)	5/21(3)	5/28(4)
1	Negative Control(무첨가, 감염 X)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	Normal inoculation(무첨가, 감염 O)	102.5	100.7	98.3	99.8	100.5
3	생균제 (첨가량 : 1×10^7 cfu/마리)	102.5	100.7	101.7	97.5	98.0
4	고용량 생균제(1×10^8 cfu/마리)	102.5	100.7	99.6	99.3	100.0
5	PGJ-F	102.5	100.7	101.7	103.0	100.4
6	PGJ-F+생균제	102.5	100.7	104.6	102.5	99.5
7	CL-F	102.5	100.7	101.7	103.3	106.6
8	CL-F+생균제	102.5	100.7	100.4	102.0	95.9
9	RB-F	102.5	100.7	102.9	107.3	104.5
10	RB-F +생균제	102.5	100.7	102.1	106.3	100.4

② 부검 소견

- 부검 소견은 상당히 많은 수가 초기에는 즐고 있었으며, 접종 3일 쯤부터 많은 수가 설사를 하기 시작하였다.

- 폐사는 접종 3일째부터 시작하여 감염 9일째 까지 계속적으로 나왔으며 10일 이후에는 폐사가 멈추고, 설사도 중지되었다. *S. Gallinarum*를 접종한 컨트롤 구는 90% 폐사가 나왔다.

- 증체율 측면에서는 "RB-F"구가 가장 양호하였고 폐사율 측면에는 "CL-F"구를 단독 또는 생균제와 함께 투여한 구도 괜찮은 성적을 보였다.

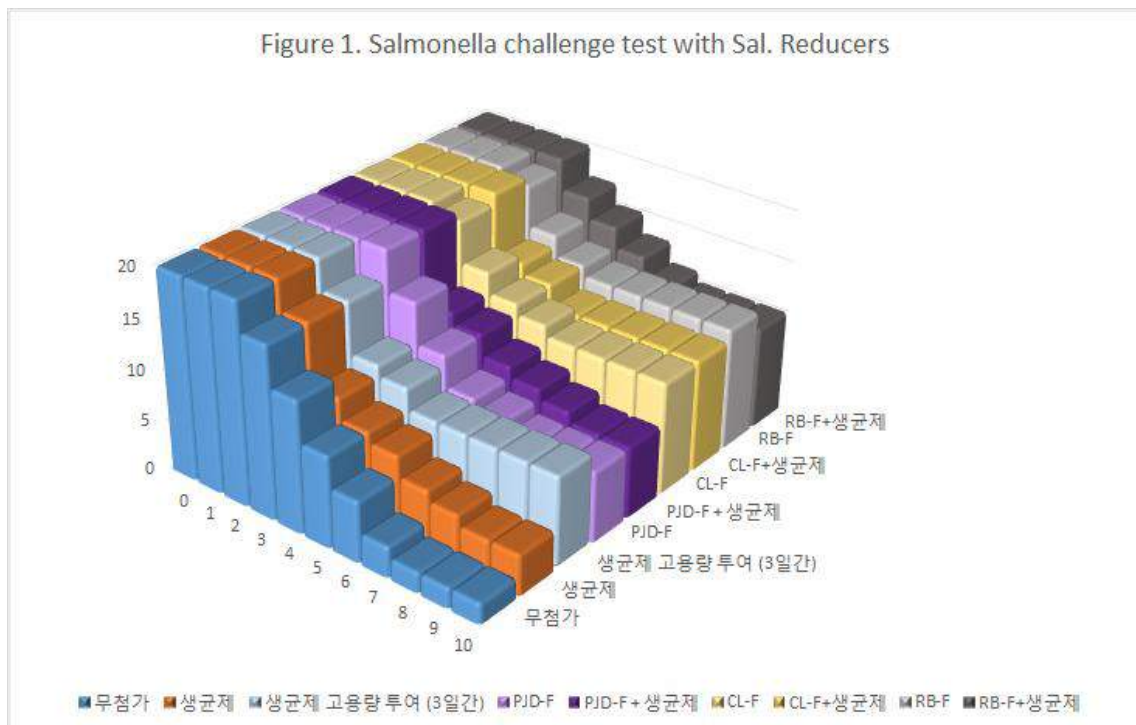
Table 150. Death according to days

그룹	내용	폐사율(day)										
		1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일	계
1	Negative Control (무첨가, 감염 X)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Normal inoculation (무첨가, 감염 O)	0	0	3	4	4	3	3	1	0	0	18
3	생균제 (1 X 10 ⁷ cfu/마리)	0	0	3	6	2	1	2	1	1	0	16
4	고용량 생균제 (1 X 10 ⁸ cfu/마리)*	0	0	3	5	1	2	0	0	0	0	11
5	PGJ-F	0	0	0	4	4	3	1	1	0	0	13
6	PGJ-F+생균제	0	0	0	7	1	2	1	1	1	0	13
7	CL-F	0	0	1	4	2	1	1	0	0	0	9
8	CL-F+생균제	0	0	0	6	1	2	0	0	0	0	9
9	RB-F	0	0	1	4	2	1	0	0	0	0	8
10	RB-F +생균제	0	0	0	3	2	2	2	1	0	0	10

* 생균제를 1X 10⁸cfu/마리로 접종, 단 이 구간은 접종 하루 전과 그 다음날에 생균제만을 주고, 당일 날 생균제와 공격 접종균을 혼합해서 공급하였다.

Table 151. Mortality rate

그룹	내용	생존율(%)		
		폐사수	생존수	%
1	Negative Control (무첨가, 감염 X)	0	20	100
2	Normal inoculation (무첨가, 감염 O)	18	2	10
3	생균제 (첨가량 : 1×10^7 cfu/마리)	16	4	20
4	고용량 생균제 (1×10^8 cfu/마리)	11	9	45
5	PGJ-F	13	7	35
6	PGJ-F+생균제	13	7	35
7	CL-F	9	11	55
8	CL-F+생균제	9	11	55
9	RB-F	8	12	60
10	RB-F +생균제	10	10	50



③ 간과 장의 *S. Gallinarum* 재분리 성적

- 접종 3일째에 폐사한 닭의 간과 장(분변)에서 0.1g씩 채취하여 십진 희석후 균을 분리한 결과 모두 *S. Gallinarum* 이 $10^7 \sim 10^8$ 개가 분리되었다. 이로써 모든 구간이 *S. Gallinarum*이 문제가 되고 있었다.

- 접종 14일 후에 살아 있는 닭의 항문에서 swab 하여 PCR로 *S. Gallinarum*을 조사한 결과 RB-F 및 CL-F를 단독 또는 생균제와 함께 첨가한 것에서는 양호한 것으로 평가되었다.

Table 152. Detection of PCR amplification of *S. Gallinarum*

그룹	내용	검출율
1	Negative Control (무첨가, 감염 X)	no
2	Normal inoculation (무첨가, 감염 O)	yes
3	생균제 (첨가량 : 1×10^7 cfu/마리)	yes
4	고용량 생균제 (1×10^8 cfu/마리)	yes
5	PGJ-F	yes
6	PGJ-F+생균제	yes
7	CL-F	no
8	CL-F+생균제	no
9	RB-F	no
10	RB-F +생균제	no

④ 고찰

생균, 효소, 효모제들이 개발되고 있으나, 면역증강제의 개발에 따라 그 가치는 최고치에 이르고 있다. 또한 미생물 코팅방법 개발되고 있어 향후에는 더욱 더 경쟁이 치열해질 것이며 어떠한 것이 선점할 것인가는 보다 더 깊은 연구에 달려 있다.

또한 Competitive Exclusion(CE) 제제 투여 등이 검토되고 있다. 양계 선진국들은 추백리와 가금티푸스가 이미 근절되었으며, 이들 국가에서는 숙주 특이성의 살모넬라가 근절된 상태에서 사람에서의 식중독 문제가 사회적으로 큰 문제를 야기 시킨 결과, 가금파라티푸스의 혈청형인 *S. Enteritidis* 등을 비롯한 숙주비특이 살모넬라의 효과적인 방제가 가장 문제가 되었던 것이다.

당 첨가제는 *S. Enteritidis*균을 비롯한 숙주비특이 살모넬라균의 방제에 큰 효과가 있어서 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

생균제 첨가는 항생제 남용으로 인한 항생제 내성문제 등으로 생균제의 사용이 권장되고 있으나, 대부분(약 90% 추정)의 프로바이오틱스가 외국에서 수입된 종균 원말을 가공하여 제제화 하고 있다.

현재 국내에서 유통되고 있는 생균제는 크게 나누어 소화기 계통 질병의 예방과 치료용으로 사용되는 세균제 제품(고초균, 낙산균, 유산균 등)과 생산성 향상에 도움을 주는 효소(SC), 곰팡이(AO) 등이며, 일부 제품은 면역력 증가와 병원미생물에 대한 길항작용을 특화하여 제품으로 판매하고 있는 실정이다.

이렇게 수입되고 있는 생균제의 수입 대체로 효과를 극대화 시키고, 가격경쟁력의 우위를 선점하기 위해서는 국내에서의 생균제 균주의 자체 개발과 생산기술의 축적이 시급한 실정이다.

결론적으로 본 제제가 개발된다면 본 연구과제에 의해서 획득된 지식 및 기술을 농장 현장으로 직접 보급할 수 있으며 본 기술을 바탕으로 지속적인 기술개발을 통한 다양한 제품들의 국내생산을 유도하고, 전문기술 인력의 확보와 이러한 기법의 산업적 적용이 가능하게 되어 새로운 생물 산업군의 활성화가 가능하게 되리라 생각한다.

3. 양돈농장에서의 현장실증 실험

가. 6개 양돈농장에서 살모넬라 저감제 섭취군 및 미섭취군 2군에 대해 적용

- 총 6개의 농장을 선발. 각 농장마다 돼지 40마리(대조군 20마리, 실험군 20마리)로 실험을 실시하였다.
- 멸균된 fecal swab으로 매 주마다 3개 농장에서 40마리씩, 총 120마리의 직장 내 분변을 확보하였으며 각 샘플을 아래와 같이 표시 하였다.

[농장번호 / 그룹 / 주차 - 샘플번호] ex)1번 농장 A그룹 3주차 10번 샘플 = 1A3-10	
농장번호	1.애니피그, 2.부강농장, 3.큰사람농장, 4.구미농장, 5.대화농장, 6.국민농장
그룹	A.대조군, B.실험군
주차	: 매주 3개 농장씩 샘플링 -홀수주 : 1, 2, 3농장 -짝수주 : 4, 5, 6농장
샘플 번호	: 한 농장 당 총 40개 샘플 -A.대조군 그룹 : 01~20 (20개) -B.실험군 그룹 : 01~20 (20개)

(1) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라군 저감효과의 임상병리학적 지표 평가

- 강황(생물전환)산물을 급여한 계군과 비급여 계군 모두에서 살모넬라 감염증상을 발현하는 계군을 전혀 확인하지 못하였다.
- 임상병리학적 지표 분석: 채혈 후, 전혈구 검사, 혈청화학검사(ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Creatinine, Ca, Phosphorous, Glucose, Total Protein, Albumin, Total cholesterol, Triglyceride), 전해질 검사 지표에서 급여 계군과 비급여 계군 사이의 유의미한 변화를 관찰하지 못하였다.

(2) 현장실증시험 대상 농장 및 목적동물에 대한 살모넬라균 저감효과의 분자미생물학 평가
 ○ 살모넬라균의 정량 및 정성적 분석(증균 전): 분변 샘플들은 농장에서 실험실로 이동한 당일에 라파포트-바실리아디스(Rappaport-Vassiliadis, RV) 선택 증균 배지 (4 mL, pH5.4)에 접종한 뒤, 상층액을 500 μ l 씩 멸균된 1.5mL Eppendorf tube에 분주하였다. 단계적인 십진 희석 후, 자일로오스 리신 디옥시콜레이트 (Xylose-Lysine-Desoxycholate, XLD) 살모넬라 선택배지에, 희석액 100 μ l 씩을 무균적으로 접종 도말하였고, 37°C 19시간 배양 후 살모넬라균 의심 집락에 대해 계수하고, 2차적으로 살모넬라균 여부를 PCR 검증하였다.

○ 선택 증균 배양: 분변 샘플들은 농장에서 실험실로 이동한 당일에 RAPPAPORT-VASSILIADIS(RV) enrichment broth medium에 접종한 뒤 37°C, 230rpm 조건으로 배양하였고, 19시간 뒤 배지의 색깔을 관찰하여 증균 여부를 판단하였다. 이후 증균 배양된 샘플 배지를 각각 1mL 씩 멸균된 1.5mL Eppendorf tube에 분주하여 sample box에 담아 4°C에 보관하였다.

○ 살모넬라균의 정량 및 정성적 분석(증균 후): 미증균 배지 중 남은 RV broth 배지 3.5mL 는 37°C, 230 rpm 조건으로 19시간 동안 진탕 배양하였고, 증균 후 단계 십진희석액 100 μ l 씩을 XLD 배지에 무균적으로 접종 도말하였고, 37°C 19시간 배양 후 살모넬라균 의심 집락에 대해 계수하였다. 모든 의심집락에 대해 2차적으로 살모넬라균 여부를 PCR 검증하였다.

○ PCR 분석:

- 1주 ~ 18주차까지의 분변 샘플은 분변 내 살모넬라균 검출 확인을 위해 *Salmonella* genus에 속하는 광범위한 strain들을 모두 detection 할 수 있는 primer를 선정하였다.

Target	Primer	Sequence(5' to 3')	Size(bp)	Target gene
<i>Salmonella</i> genus	SG	F : TTTGG CGGCG CAGGC GATTC R : GCCTC CGCCT CATCA ATCCG	423	STM3098

▶ 또한 control gene으로 사용할 strain을 아래와 같이 선정하였다.

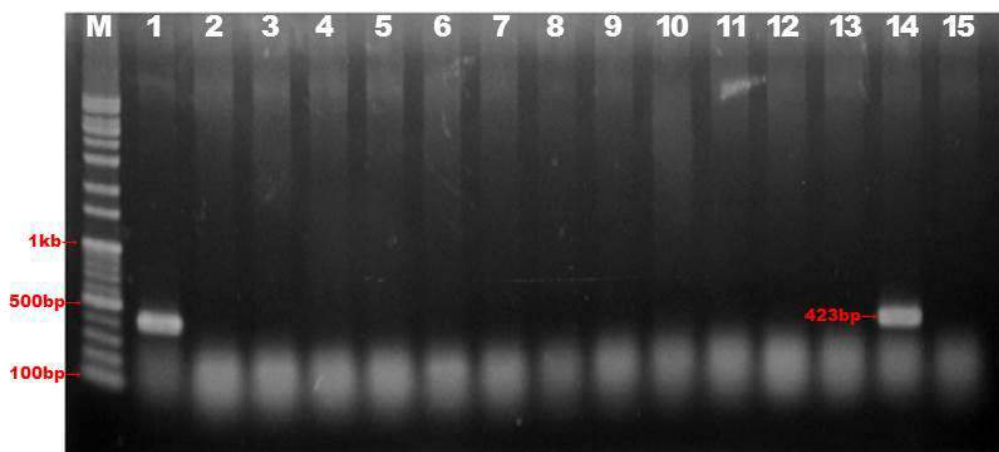
Bacterial control strains used in this study	
Positive control	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076
	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 13312
Negative control	<i>E. coli</i> ATCC 25922

▶ 증균 배양 후 4°C에 보관하였던 배지 1mL를 원심분리 하여 상층액을 제거한 뒤 가라앉은 pellet을 auto D.W 100 μ l에 resuspension하여 농축된 균부유액을 만든다. Total 50 μ l volume reaction을 위해 아래와 같이 mix 용액을 제조하였다.

Total 50 μ l volume
2x Taq DNA polymerase pre-mix(Solgent사) 25 μ l + Primer(1pmol/1 μ l) 10 μ l + auto D.W 10 μ l + 5개 샘플 균부유액 5 μ l(각각 1 μ l)

▶ 온도와 시간 조건은 참고 논문에 근거하여 First denaturation at 94°C for 2min. / Denaturation at 94°C for 30 s, Annealing at 60°C for 30s, Extension at 72°C for 30s (30 cycles). / Final extension at 72°C for 5 min으로 하였다. PCR amplicons은 1% agarose gel 에서 separated 시키고 Ethidium bromide에 염색한 후 UV transilluminator에서 결과를 관찰 하였다. Target size의 밴드가 관찰되었을 경우, 해당 lane에 속하는 5개의 샘플들을 각각 하나씩 다시 PCR 하였다.

○ 실험결과: 18주차 총 1,734개 분변시료 PCR 분석 결과는 모두 음성으로 나왔으며, *Salmonella* ATCC strain과 18주차까지의 분변샘플들의 증균 배양 및 PCR 결과는 첨부한 excel file에 정리되어있다.



- 11주차 PCR 결과 -

(1번 lane : positive control, 14번 lane : 일반 sample + positive control, 15번 lane : negative control)

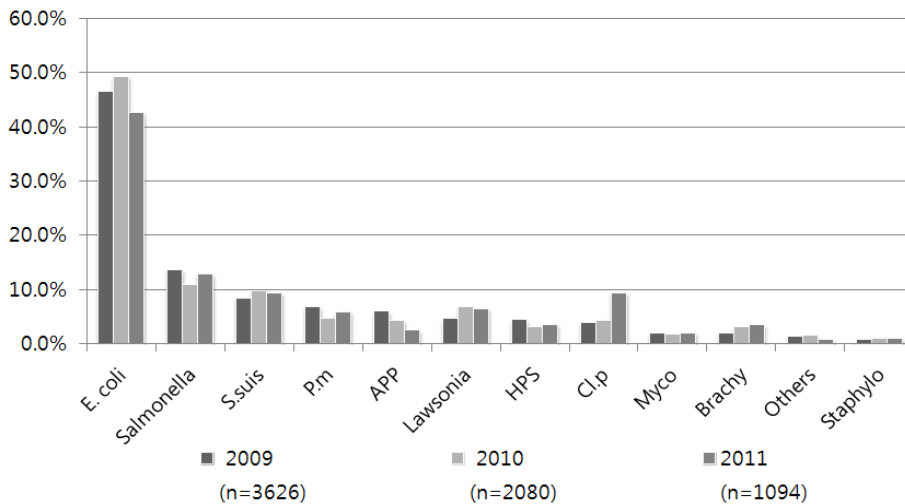
주차	그룹	샘플명	샘플수(수, head)		강황(생물전환)산물
			살모넬라균 음성	살모넬라균 양성	
17.01.04 (1주차)	대조군	1A1-01~10	10	0	비급여
		2A1-01~20	20	0	
		3A1-01~20	20	0	
		소계	50	0	
	실험군	1B1-01~10	10	0	급여
		2B1-01~20	20	0	
		3B1-01~20	20	0	
	소계	50	0		
17.01.11 (2주차)	대조군	4A2-01~20	20	0	비급여
		5A2-01~20	20	0	
		6A2-01~20	20	0	
		소계	60	0	

	실험군	4B2-01~20	20	0	급여
		5B2-01~20	20	0	
		6B2-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.01.16 (3주차)	대조군	1A3-01~20	20	0	비급여
		2A3-01~20	20	0	
		3A3-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	1B3-01~20	20	0	급여
		2B3-01~20	20	0	
		3B3-01~16	16	0	
		소계	56	0	
17.01.24 (4주차)	대조군	4A4-01~20	20	0	비급여
		5A4-01~20	20	0	
		6A4-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	4B4-01~20	20	0	급여
		5B4-01~20	20	0	
		6B4-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.02.02 (5주차)	대조군	1A5-01~20	20	0	비급여
		3A5-01~20	20	0	
		소계	40	0	
	실험군	1B5-01~20	20	0	급여
		3B5-01~20	20	0	
		소계	40	0	
17.02.07 (6주차)	대조군	4A6-01~20	20	0	비급여
		5A6-01~20	20	0	
		6A6-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	4B6-01~20	20	0	급여
		5B6-01~20	20	0	
		6B6-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.02.18 (7주차)	대조군	1A7-01~20	20	0	비급여
		2A7-01~20	20	0	
		3A7-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	1B7-01~20	20	0	급여
		2B7-01~20	20	0	
		3B7-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.02.28 (8주차)	대조군	4A8-01~20	20	0	비급여
		5A8-01~20	20	0	
		6A8-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	4B8-01~20	20	0	급여
		5B8-01~20	20	0	
		6B8-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.03.03 (9주차)	대조군	1A9-01~18	18	0	비급여
		3A9-01~20	20	0	
		소계	38	0	
	실험군	1B9-01~20	20	0	급여
		3B9-01~20	20	0	
		소계	40	0	
17.03.15	대조군	4A10-01~20	20	0	비급여

(10주차)		5A10-01~20	20	0	급여
		6A10-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	4B10-01~20	20	0	
		5B10-01~20	20	0	
		6B10-01~20	20	0	
소계	60	0			
17.03.22 (11주차)	대조군	1A11-01~20	20	0	비급여
		2A11-01~20	20	0	
		3A11-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	1B11-01~20	20	0	급여
		2B11-01~20	20	0	
		3B11-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.03.29 (12주차)	대조군	4A12-01~20	20	0	비급여
		5A12-01~20	20	0	
		6A12-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	4B12-01~20	20	0	급여
		5B12-01~20	20	0	
		6B12-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.04.06 (13주차)	대조군	1A13-01~20	20	0	비급여
		2A13-01~20	20	0	
		소계	40	0	
	실험군	1B13-01~20	20	0	급여
		2B13-01~20	20	0	
		소계	40	0	
17.04.14 (14주차)	대조군	4A14-01~20	20	0	비급여
		5A14-01~20	20	0	
		6A14-01~20	20	0	
		소계	60	0	
	실험군	4B14-01~20	20	0	급여
		5B14-01~20	20	0	
		6B14-01~20	20	0	
		소계	60	0	
17.04.18 (15주차)	대조군	1A15-01~20	20	0	비급여
		소계	20	0	
	실험군	1B15-01~20	20	0	급여
		소계	20	0	
17.04.28 (16주차)	대조군	4A16-01~20	20	0	비급여
		5A16-01~20	20	0	
		소계	40	0	
	실험군	4B16-01~20	20	0	급여
		5B16-01~20	20	0	
		소계	40	0	
17.05.11 (18주차)	대조군	4A18-01~20	20	0	비급여
		5A18-01~20	20	0	
		소계	40	0	
	실험군	4B18-01~20	20	0	급여
		5B18-01~20	20	0	
		소계	40	0	

○ 국내 양돈장에서 살모넬라균 저감효능 분석 결과에 대한 고찰

- 국내 병성감정 돼지의 살모넬라 감염을 문헌 조사: 농림축산검역본부의 문헌 보고를 조사한 결과, 국내의 경우 2009년도에서 2011년도 9월까지 질병진단과 및 국내 병성감정 기관에 의뢰된 질병 검사는 세균성 질병의 경우 6800여건이었으며, 질병진단 결과 대장균증이 42.6%로 가장 많았다. 그 뒤로 살모넬라감염증 12.9%, 스트렙토코코스 감염증 9.4%, 클로스트리디움 감염증 9.4%, 로소니아 감염증 6.5% 파스튜렐라 감염증 5.9% 등이 었다(아래 그림).



Prevalence rates of porcine enteric and respiratory bacterial disease (2009-2011, Epidimiology Division from QIA). *S.suis*: Streptococcus suis, *P.m*: Pasteurella multocida, *APP*: Actinobacillus pleuropneumoniae, *HPS*: Haemophilus parasuis, *Cl.p*: Clostridium perfringens, *Myco*: Mycoplasma spp. *Brachy*: Brachyspira hyodysenteriae, *Staphylo*: Staphylococcus spp.

- 본 과제의 결과로부터, 2017-18년 국내 양계 및 양돈장의 살모넬라 감염율은 매우 낮은 것으로 나타났다. 이것은 최근 5년 동안 조류인플루엔자 및 구제역의 발생으로 인한 이동제한, 매물, 광범위한 소독에 따른 농장 내 살모넬라균의 저감화에 기인한 것으로 추정할 수 있다. 이러한 이유로 연구소재인 강황(생물전환)산물의 살모넬라 저감화 효과를 농장 수준에서 확인하기 어려웠지만, 감염동물 실험으로부터 목적동물에서의 항감염 효능을 확인할 수 있었다.

나. 현장실증실험을 수행한 농장에서의 살모넬라 저감제에 대한 의견

(1) 농가의 살모넬라 저감제에 대한 의견

실험종료 후, 강황(생물전환)산물의 사용에 대한 서면 의견은 아래와 같다.

(농장이름 생략)

- 본 농장은 실험구, 대조구 각 400두씩 2개군 편성 약 6개월간 급여하였다. 정확한 계측은 하지 않았으나 실험구쪽의 성장도가 훨씬 양호한 것으로 판단되었다. 제품의 우수성은 인정되나, 공급단가 등의 문제로 선뜻 급여 결정을 할 수 없다. 약 5일 정도의 사육기간이 단축되었다.
- 실험구 대조구 2개군으로 편성하여 약 6개월 급여하였다. 당 농장은 양군의 큰 차이점을 발견할 수 없었다.
- 사용 도중 위축 및 폐사의 발생이 확실히 차이가 있으며, 재 사양시험을 하여 결과에 따라서 제품을 사용할 계획이다. (2개 농장의 동일한 의견)
- 좋은 개체를 선발하고, 잔여 개체로 실험을 하였다. 무탈하게 출하까지 하였다. 시간을 가지고 연구 검토할 예정이다.

(2) 1개 농장의 성적서

- 특히 1개 농장에서는 자세한 성적 및 사양가 의견을 보내왔다. 그 결과는 아래와 같다.

	대조구	실험구
시작두수	400	355
개시일령	90	93
평균체중	41.2	43.2
폐사	27	16
출하두수	373	339
출하체중	114	116.2
출하일령	193	187
사료요구율	3.39	3.16

사양가 의견

1. 전체적으로 본 농장의 시설 미흡과 동절기 호흡기 질병이 발생하여 폐사 및 위축된 발생이 많아 기대치의 실험결과에 미흡하였다.
2. 대조구에 비해서 체중이 고른 편이었고, 호흡기 회복력은 약간의 차이를 보였다. 또한 면역 증강제 급여시 병행급여 물질(예:항산화제 및 미네랄)의 필요성을 느꼈다.
3. 대조구 실험구 모두 설사나 연변 등은 확인되지 않았다.

(3) 요약

농장에서의 사양가의 의견에 따르면 본 제품이 살모넬라 저감제임에도 불구하고 생산성을 향상시켰다. 이는 강황(생물전환)산물이 살모넬라와 같은 병원성 균을 저감시키기 때문에 섭취한 영양소가 효율적으로 사용되는 것으로 판단된다. 모든 농장이 고루 효과가 있는 것이 아니라 1개 농장은 차이를 확인하지 못했다고 의견을 보내 왔으며, 주로 시설이 우수한 농장 보다는 시설이 미흡한 농장에서 강황(생물전환)산물의 생산성 향상 효과가 우수하였다.

살모넬라의 경우 일반적으로 농가에서는 저감 노력을 우선적으로 하지 않는 이유는 농가의 피해를 일으키는 PRRS, PVC, 홍막폐렴 등이 훨씬 시급한 문제라고 인식하기 때문이다. 이러한 상황에서 추가 비용부담을 하면서 살모넬라 저감제를 자발적으로 사용할 가능성은 매우 낮다. 하지만 농장실험에 사용한 강황(생물전환)산물은 살모넬라 저감제의 효과도 있지만, 그 자체가 생산성을 올려줄 수 있기 때문에 비용 부담이 상대적으로 적을 것으로 예상되며, 이것은 다른 살모넬라 저감제가 갖지 못한 장점이라고 생각된다.

다. 농장 살모넬라 혈청을 이용한 살모넬라 항체가 검사 및 PCR 검사

6개 농장에서 채취한 분변샘플에서 살모넬라가 검출되지 않았지만, 농장을 담당하는 수의사의 육안소견으로 살모넬라에 감염된 개체가 있다고 의심되는 농장 1개를 선택해서 살모넬라 항체가 검사를 통해 농장의 살모넬라 항체양성율을 검사하였다. 항체 양성은 비록 언제 살모넬라에 감염되었는지는 파악할 수 없지만, 개체가 살모넬라에 감염된 적이 있다는 것을 파악할 수는 있다. 혈청 채취는 농장실험 종료시점에 진행했다.

(아래의 실험방법과 고찰은 시험관련 수의사의 결과보고서에서 인용함)

(1) 실험방법

(가) 실험군 조성

총 60마리의 자돈(30일령)을 실험군과 대조군으로 각 30마리씩 두 그룹으로 나누어 진행하였다. 30일령 실험 시작 시점에 항체가 확인을 위한 혈액 채취 및 항원 검출을 위한 분변 채취를 하였으며, 60일령에 항원 검출을 위한 분변 채취를 시행하였다. 임상증상 확인과 체중 측정도 동시에 진행되었다.

(나) 혈청학적 분석

30일령에서 채취한 혈액샘플을 통해 실험 대상 돼지의 건강상태를 확인하였다. 실험실적 진단은 (주)옵티팜에서 진행하였으며 *Mycoplasma hyopneumoniae*(MH), *Salmonella*, PRRS의 항체를 확인하였다. MH는 indirect ELISA 검사를 하였으며, OPTIPHAM house kit로 진행하였다. *Salmonella*는 indirect ELISA 검사를 하였으며, IDEXX kit를 이용하였다. (S/P ratio 0.25 이상이 양성) PRRS는 indirect ELISA 검사를 하였으며, IDEXX kit를 이용하였다. (S/P ratio 0.4 이상이 양성)

(다) PCR을 통한 항원 검출

30일령에서 채취한 분변 샘플을 PCR을 통해 확인하였다. (주)옵티팜에서 실험실적 진단을 진행했으며, 60일령에서 채취한 분변 샘플은 (주)옵티팜, 서울대학교 수의과대학 수의전염병학 교실에서 PCR검사를 진행하였다.

(라) 임상증상 확인

OO농장에서 체중, 임상증상을 분석 진행하였다.

(2) 결과

(가) 혈청학적 검사

실험 대상 돈군의 질병적 상태는 MH의 경우 투여군이 titer 기준 평균 729, 대조군이 513으로 유의적 차이를 보이지 않았다. *Salmonella*의 경우 투여군이 100% 항체 양성율을 보였으며, 대조군이 97% 양성율을 보였다. PRRS의 경우 투여군에서 40% 항체가 양성율을 보였으며, 대조군에서는 23% 양성율을 보였다(첨부자료 확인). 결과적으로 두 그룹 모두 비슷한 면역상태를 보이고 있었다.

(나) PCR 검사

PCR은 총 3회에 걸쳐 진행되었으나 모두 항원 음성으로 확인되었다. 60일령에 채취한 분변의 경우 결과의 신빙성을 확보하기 위하여 ㈜옵티팜과 서울대학교 수의미생물 연구실에 각각 샘플을 보내 확인하였으나, 항원이 검출되지 않았다. 특히 서울대학교 수의전염병학 교실에서는 증균 배양, 증균 후 유전자 추출, 그리고 PCR을 진행하였으나 모두 음성으로 확인되었다.

(다) 임상증상

증체율에 큰 차이를 보이지 않았지만, 투여군에서 설사 및 연변이 덜 관찰되었다. 또한 돈군의 체중 편차가 줄어들었다.

(3) 실험 담당 수의사의 의견

PRRS, MH 그리고 *Salmonella*에 대한 실험 초기의 면역상태는 두 그룹간 비슷한 경향을 보였다. 이후 진행된 투여 실험에서 제품에 대한 기호성이나 부작용 등의 문제는 발견되지 않았으며, 증체율 또한 유의적인 차이를 보이지 않았다. 다만 연변이 줄었다는 점, 돈군의 체중 편차가 줄었다는 점은 감염이 진행된 후 돼지의 임상증상을 억제하는 효과가 있다 것으로 판단된다.

살모넬라의 경우 실험실적 진단을 통해 항원을 검출하는 것이 쉽지 않다. 총 세 번에 걸친 PCR 검사를 통해 살모넬라 항원 검사를 하여 강황(생물전환)산물의 돼지에서 살모넬라에 대한 영향을 확인하려고 하였지만 모두 미검출로 인해 결과를 비교할 수는 없었다. 60마리 돼지의 혈액에서 혈청검사를 통한 감염 여부는 확인하였지만, 분변에서 항원이 검출되지 않아 강황(생물전환)산물의 직접적인 항균 효과에 대한 결과를 도출하는데 어려움이 있었다.

하지만 돼지를 직접 사육하는 농장관리자의 임상증상 관찰은 매우 유의적으로 보인다. 강황(생물전환)산물을 투여한 돼지의 경우 설사를 포함한 연변이 눈에 띄게 줄었음을 확인하였으며, 돈군 전체의 체중편차(증아리)가 상대적으로 대조군에 비해 적었

으며, 비교적 골고루 성장하는 것으로 판단된다. 실험을 진행하고 관찰하는 입장에서 볼 때 실험실적으로 살모넬라가 검출되지는 않았지만 강황(생물전환)산물의 투여가 임상적으로 효과가 있다고 판단된다. 또한 장기적으로 추적하였다면 증체율도 유의적인 변화를 보였을 것으로 예상된다.

추가적으로 실험 전 돈군의 혈청 항체가(titer) 검사를 통해 *Salmonella*의 항체 양성 전환이 이루어지기 전 시점을 확인하여, 비감염 상태의 돈군에 투여를 시작하는 실험을 진행해 볼 필요가 있다. 강황(생물전환)산물이 *Salmonella* 감염 돈군에서의 임상증상 억제 효과는 이미 확인 되었으므로, 향후 비감염 상태의 돈군의 감염 억제 능력에 대한 평가를 할 필요성이 있다.

(4) 고찰

수의사의 육안 관찰시 살모넬라의 감염이 의심되는 돼지가 있다고 판단되는 농장에서 살모넬라 항체가 검사를 한 결과, 60개의 샘플 중 59개가 양성으로 확인되었다. 하지만 후속 실험에서 살모넬라를 검출하려는 시도에서는 모두 음성으로 확인되었다.

이는 살모넬라가 감염된 것이 분명한 농장임에도 불구하고 가장 민감한 살모넬라 검사법인 증균 후 PCR에서도 검출되지 않을 수 있음을 보여준다.

돼지의 경우 어린 자돈은 모체에서 이행된 모체이행항체로 인하여 살모넬라로부터 일부 보호를 받지만, 모체이행항체가 사라지면서 바로 감염되어 매우 빠르게 살모넬라 항체가 형성되었을 것이며, 그 이후로는 살모넬라가 일부 억제되어 분변에서는 살모넬라의 검출이 어려울 수 있다.

임상수의사들은 살모넬라에 감염된 것이 거의 확실해 보이고, 살모넬라 감염에 대한 치료를 하면 증상이 개선되는 돈군에서 죽은 개체를 부검해서 장을 분리하여 의뢰기관에 검사를 맡겨도 살모넬라가 검출되지 않는 경우가 많으므로, 살모넬라의 검사법이 현재로서는 민감도가 낮다고 판단하고 있다.

이 실험(농장 실증실험 기간 포함)에서는 투여군은 연변과 체중 증가에 효과가 있음을 육안으로는 확인할 수 있었으며, 체중을 측정하지는 않았으나, 돼지의 활력이 증가되어 있다고 판단했다. 그럼에도 불구하고 강황(생물전환)산물이 실험군에서 PRRS바이러스의 항체양성률이 40%로 높게 나왔고, 대조군에서는 이보다 낮은 23%를 보인 것은 항체양성률이 단순히 감염된 개체의 비율이 아니라, 오히려 항체가 잘 형성되도록 도움을 주었기 때문이라고 판단된다. 즉 강황(생물전환)산물은 대식세포의 탐식작용 및 자가포식을 증가시키며, 이는 세포안의 바이러스 유래 물질에 대한 소화를 증가시키고 MHC II를 통한 항원 제시 능력이 증가하기 때문이라고 판단된다. 비

록 PRRS는 항체가 형성되어도 중화항체가 아닌 경우가 많아 항체 자체가 큰 의미를 가지는 것은 아니지만, PRRS바이러스가 대식세포 안에서 자가포식작용을 통해서 효과적으로 분해될 수 있음을 암시한다고 할 수 있다. 또한 이러한 점은 이 농장에서 PRRS와 살모넬라가 동시에 존재할 경우 피해가 증폭된다는 과학적 사실을 바탕으로 생산성이 낮은 원인의 하나라고 할 수 있을 것이며, 이러한 농장은 살모넬라 저감이 단순히 안전한 축산물의 생산 뿐 아니라, 농장의 생산성을 증가시킬 수 있음을 보여주는 사례라 판단된다.

라. 돼지에서의 공격접종 테스트 실험

양돈에서는 현장실증실험에서 살모넬라가 검출되지 않았으며, 후속적인 연구를 통해서 살모넬라 증상이 완화되었다는 것은 확인하였으나, 살모넬라에 대한 직접적인 저감효과를 확인하기 위하여 공격접종 실험을 추가로 진행하였다.

실험은 모두 5회 진행하였으며, 초기 1, 2차 실험은 몸 안에 감염된 살모넬라의 감염 모델에 충실하기 위하여 살모넬라를 근육접종을 실시하였으며, 3, 4, 5차 실험은 경구감염시의 저감효과를 확인하기 위하여 살모넬라를 경구투여하였다.

- (1) 1차 야외공격접종실험
- (2) 2차 야외공격접종실험
- (3) 3차 야외공격접종실험
- (4) 4차 야외공격접종실험
- (5) 5차 야외공격접종실험

(1) 1차 야외공격접종실험

1차 야외공격접종실험

돼지의 *Salmonella* Typhimurium균 근육투여에
의한 감염 확인 및 투여횟수 설정

의뢰자 : STR바이오텍(주) 이 상 종

실험자 : 우리생명과학(주) 김 홍 집



(가) 실험의 제목 (Title of Experiment)

'살모넬라 근육투여에 의한 돼지의 임상증상 및 병리적인 변화의 확인을 통해 감염 확인 및 적정 투여방식 설정을 위한 Pilot 실험.

(나) 연구(실험)의 목적 (Purpose of Experiment)

살모넬라를 근육투여 한 돼지를 실험동물로, 향후 살모넬라 저감제의 효능 평가 실험에 적합한 살모넬라 감염조건을 확인함에 목적이 있다.

(다) 연구(실험) 요약 (Summary)

20kg 돼지 12마리를 입식하여 4마리씩 3군으로 나눈 후, 2주간 순치 후 1일, 또는 2일간, 또는 3일간 연속으로 돼지에게 살모넬라균 10^9 cfu/Pig를 근육주사 한 후, 살모넬라 감염 여부 및 정도를 확인하기 위하여 부검을 실시하였으며, 부검 결과 살모넬라 감염 횟수가 증가할수록 살모넬라에 의한 병리적인 현상이 점점 심하게 나타났다.

(라) 실험의 배경

살모넬라는 양돈 및 양계산업에서 많은 피해를 입히는 병원체이며, 또한 사람에게도 식중독을 일으키는 대표적인 인수공통 병원균의 하나이다. 특히 외국에서는 살모넬라에 의한 식중독이 심각한 보건위생의 문제이다.

돼지에 전염병을 일으키는 살모넬라균은 패혈증과 장염을 특징으로 하며, 돼지에서는 *Salmonella choleraesuis* 와 *Salmonella* Typhimurium이 주로 문제를 일으키는데 최근에는 다양한 종들이 분리되고 있다.

전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 어린자돈으로부터 성돈에 이르기까지 다양한 연령층에서 발생하나 흔히 어린자돈에서 발생한다. 계절적으로는 여름철에 많이 발생한다.

또한 *Salmonella* Typhimurium균은 인수공통 병원균이므로 본 세균을 근절시키는 것이 대단히 중요하게 인식되고 있는 바, 본 실험을 통하여 질병의 병리적인 양상과 살모넬라 저감제의 효과를 확인하고자 하였다. 특히 살모넬라는 장내 감염 후 체내로 이동할 수 있으며, 체내로 이동한 살모넬라균은 대식세포 내에서 생존이 가능하며 장기적으로 질환을 일으킬 수 있다. 따라서 본 실험은 경구투여가 아닌 근육투여로 감염시킴으로써 장내의 살

모넬라가 아닌 몸 안에 들어온 살모넬라의 감염 후 이동경로 및 질병의 양상을 확인하고자 하였다.

(마) 재료 (Materials)

① 실험 돼지 (3원 교잡종, 송산농장)

- 인근 농장에서 직접 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 12두 선발하여 시험에 사용하였다.
- 돼지는 4두를 기본으로 하여 3군으로 나누었다.

② 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)

③ 실험용 살모넬라 : *Salmonella Typhimurium*

우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella Typhimurium*)를 선발하여 사용하였다.

④ 살모넬라 검출 시약 : 사니타군 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

(바) 실험방법

① 실험 설계(design)

② 실험군 1군 (4두)

- *Salmonella* Typhimurium균을 하루 오후 3시에 근육접종 하여 1회 강제접종을 실시하였다.
- 균의 접종투여량은 10^9 cfu/Pig로 근육접종 하였다.

③ 실험군 2군 (4두)

- 본 균을 3일간 매일 오후 3시에 근육접종 하여 3회 강제접종을 실시하였다.
- 균의 접종투여량은 10^9 cfu/Pig로 근육접종 하였다.

④ 실험군 3군 (4두)

- 본 균을 2일간 매일 오후 3시에 근육접종 하여 2회 강제접종을 실시하였다.
- 균의 접종투여량은 10^9 cfu/Pig로 근육접종 하였다.

실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.



⑤ 실험방법

⑥ 입식 후 16일간 순화시켰다.

⑦ 실험진행

- 실험군 1군은 접종 후 2일째에 4두 모두를 부검하여 간, 비장, 림프절, 맹장, 분변에서의 살모넬라 균수를 측정했다.
- 실험군 2군은 3일간 연속 접종하고, 접종완료 후 3일째에 4두 모두를 부검하여 간, 비장, 림프절, 맹장, 분변에에서의 살모넬라 균수를 측정하였다.
- 실험군 3군은 접종 완료 후 3일째에 먼저 2두를 부검하고, 5일째에 나머지 2두를 부검하여 간, 비장, 림프절, 맹장, 분변에에서의 살모넬라 균수를 측정하였다.
- 모든 실험에서 실험기간 중 폐사는 나타나지 않았다.

⑧ 자세한 실험 schedule은 다음 표와 같다.

실험 스케줄

그룹	1-16일	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
실험군 1군	순치 (항생제 처치 안함)	접종		부검										
실험군 2군	순치 (항생제 처치 안함)	접종	접종	접종			부검							
실험군 3군	순치 (항생제 처치 안함)							접종	접종			부검		부검

(사) 실험결과

① 실험군 1군

장관의 울혈 및 충혈 소견, 간장의 충혈 소견. 폐렴 소견도 있었다.

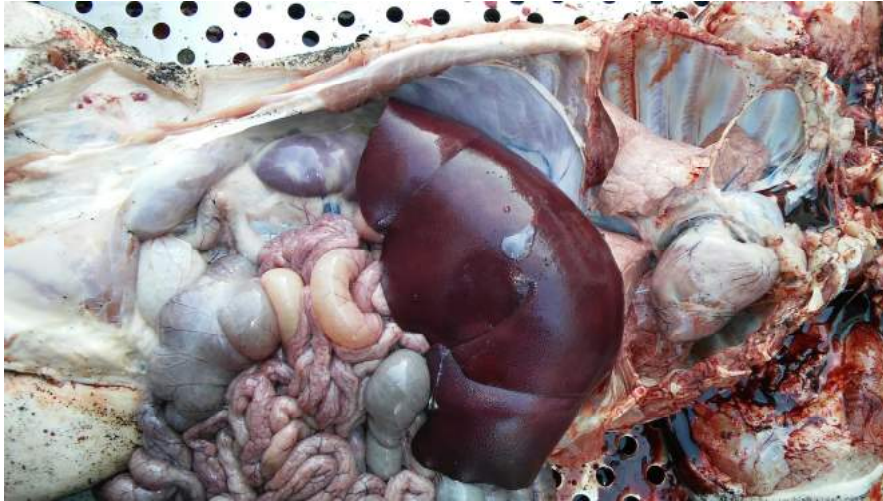


그림 1. 간의 충혈 및 폐렴 소견



그림 2. 간의 충혈, 장의 충혈 소견 및 폐렴 소견

② 실험군 2군

3회 접종하고 접종 후 3일째에 부검을 실시한 결과로, 1회 접종한 실험군 1군의 경우와 비교하여 장관의 괴사편과 울혈, 충혈 소견이 심하였다. 폐렴도 관찰되는데, 이는 *Salmonella Typhimurium*균을 3일간 연속 접종한 결과로 보여진다.



그림 3. 흰색 괴사소 및 충출혈



그림 4. 흰색 괴사소 및 충출혈



그림 5. 간장의 충혈 소견과 폐렴 소견

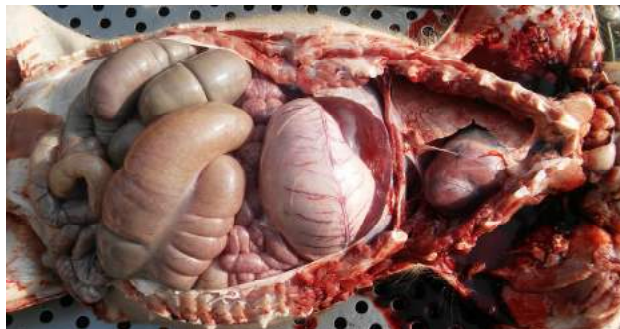


그림 6. 간장의 충혈 소견과 폐렴 소견

③ 실험군 3군

2회 접종하고 접종 후 3일째에 2마리를 부검하고, 5일째에 부검을 실시한 결과이다. 3회 접종한 실험군 2군의 경우와 비교하여 증상이 약하게 나타나고 있다.



그림 7. 3회 접종한 실험군 2군에 비하여 장염 및 폐렴이 약한 편이다.



그림 8. 장염이 3회 접종한 실험군 2군 보다 약한 편이다.

2번 접종하고 5일째 부검한 결과이다.



그림 9. 장관의 염증이 덜 심하다.

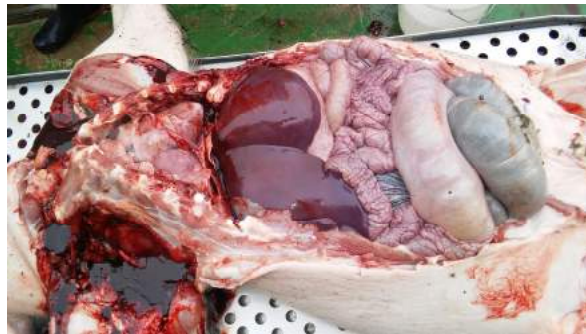


그림 10. 장관의 염증이 덜 심하다.

④ 실험군 1,2,3군에서의 세균학적 비교

실험군 2군에서 가장 높은 균수를 보였다.

구분		소장	맹장	림프절	간	비장	분변
1 그룹	1	2.3×10^4	1.1×10^7	1.2×10^2	1.4×10^3	2.3×10^3	3.1×10^6
	2	6.6×10^6	1.2×10^7	-	-	1.3×10^6	7.6×10^6
	3	1.2×10^5	2.6×10^7	2.0×10^2	-	1.8×10^3	9.5×10^5
	4	1.2×10^4	1.1×10^6	-	3.0×10^2	8.5×10^2	2.9×10^6
2 그룹	1	4.0×10^5	4.1×10^6	2.3×10^5	1.1×10^3	1.6×10^4	3.3×10^6
	2	4.8×10^8	3.2×10^8	-	7.0×10^2	4.1×10^7	2.5×10^7
	3	5.9×10^6	8.0×10^6	2.0×10^2	-	8.2×10^3	7.0×10^4
	4	5.9×10^6	7.3×10^6	6.1×10^5	-	1.1×10^2	1.7×10^5
3 그룹	1	1.3×10^5	1.9×10^7	2.8×10^6	6.0×10^2	5.0×10^2	8.0×10^5
	2	2.0×10^4	2.3×10^7	-	1.7×10^2	5.0×10^2	1.8×10^6
	3	3.6×10^6	2.6×10^5	1.1×10^5	9.0×10^1	1.3×10^3	2.7×10^6
	4	6.0×10^4	7.4×10^7	2.0×10^5	2.2×10^2	6.3×10^4	9.0×10^5

* 접종투여량 : 10^9 cfu/1회/1일/Pig

* 실험군 1 : 1회 투여, 2일 후 부검

* 실험군 2 : 1일 간격 3회 투여, 3일 후 부검

* 실험군 3-1,2 : 1일 간격 2회 투여, 3일 후 부검

* 실험군 3-3,4 : 1일 간격 2회 투여, 5일 후 부검

* - : 세균검출량이 10^1 미만인 경우

(아) 결 론

Salmonella Typhimurium을 가지고 예비실험을 실시한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

- 육안적 검사 결과 실험군 2군에서 가장 높은 장관의 괴사와 충혈 소견을 보였다.
- 세균검사 결과에서도 실험군 2군에서 가장 높은 균수를 보였다.
- 실험한 3군 모두에서 육안적 소견이 보였으나, 실험군 2에서 가장 높게 나타났다.
따라서 향후 살모넬라 저감제의 효능 평가 실험에서는 접종 반응이 가장 심한 실험군 2군의 강제접종 방식으로 진행하는 것이 바람직하다고 사료된다.
- 근육접종을 실시한 개체에서 소장 및 맹장 뿐 아니라 실제 분변에서도 많은 양의 살모넬라균이 검출되어 몸 안에 있는 살모넬라균이 장관막을 통해 몸 밖으로 배출될 수 있음을 입증할 수 있었다.

(2) 2차 야외공격접종실험

2차 야외공격접종실험

돼지의 *Salmonella* Typhimurium균 근육투여에
의한 임상증상 및 병리학적 변화에 미치는
살모넬라 저감제의 효과

의뢰자 : STR바이오텍(주) 이 상 중

실험자 : 우리생명과학(주) 김 홍 집



(가) 실험의 제목 (Title of Experiment)

‘살모넬라 근육투여에 의한 돼지의 임상증상 및 병리적인 변화에 미치는 **살모넬라 저감제의 효과**’에 대한 pilot 실험.

(나) 연구(실험)의 목적 (Purpose of Experiment)

살모넬라를 근육투여 한 돼지를 실험동물로, 살모넬라 저감제로서 미강(생물전환)산물 및 유익균(바실러스)의 혼합물(이하 살모넬라 저감제 표기함)이 나타내는 효과를 확인함에 목적이 있다.

(다) 연구(실험) 요약 (Summary)

20kg 돼지 8마리를 입식하여 4마리씩 대조군 및 실험군으로 나눈 후, 2주간 순치 후 3일간 연속으로 돼지에게 10^9 cfu를 근육주사 한 후, 살모넬라 저감제의 효과를 확인하기 위하여 부검을 실시하였으며, 부검 결과 살모넬라 저감제를 사용한 실험군에서 살모넬라에 의한 병리적인 현상이 현저하게 적게 나타났다.

(라) 실험의 배경

살모넬라는 양돈 및 양계산업에서 많은 피해를 입히는 병원체이며, 또한 사람에게도 식중독을 일으키는 대표적인 인수공통 병원균의 하나이다. 특히 외국에서는 살모넬라에 의한 식중독이 심각한 보건위생의 문제이다.

돼지에 전염병을 일으키는 살모넬라균은 패혈증과 장염을 특징으로 하며, 돼지에서는 *Salmonella choleraesuis* 와 *Salmonella* Typhimurium이 주로 문제를 일으키는데 최근에는 다양한 종들이 분리되고 있다.

전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 어린자돈으로부터 성돈에 이르기까지 다양한 연령층에서 발생하나 흔히 어린자돈에서 발생한다. 계절적으로는 여름철에 많이 발생한다.

또한 *Salmonella* Typhimurium균은 인수공통 병원균이므로 본 세균을 근절시키는 것이 대단히 중요하게 인식되고 있는 바, 본 실험을 통하여 질병의 병리적인 양상과 살모넬라 저감제의 효과를 확인하고자 하였다. 특히 살모넬라는 장내 감염 후 체내로 이동할 수 있으며 체내로 이동한 살모넬라균은 대식세포 내에서 생존이 가능하며 장기적으로 질환을

일으킬 수 있다. 따라서 본 실험은 경구투여가 아닌 근육투여로 감염시킴으로써 장내의 살모넬라가 아닌 몸 안에 들어온 살모넬라에 대한 저감 효과를 확인하고자 하였다.

(마) 재료 (Materials)

① 돼지 (3원 교잡종, 송산농장)

경기도 화성의 송산농장에서 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 8두 선발하여 시험에 사용하였다. 각 돼지는 입식후 2주간의 순치기간을 거쳐서 실험을 실시하였다.

② 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)

③ 살모넬라 저감제 : 미강(생물전환)산물+바실러스 혼합물

④ 실험용 살모넬라 : *Salmonella Typhimurium*

우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella Typhimurium*)를 선발하여 사용하였다.

⑤ 항생제 : 아미카신주사약(유한양행)으로 2일간 주사하였다.

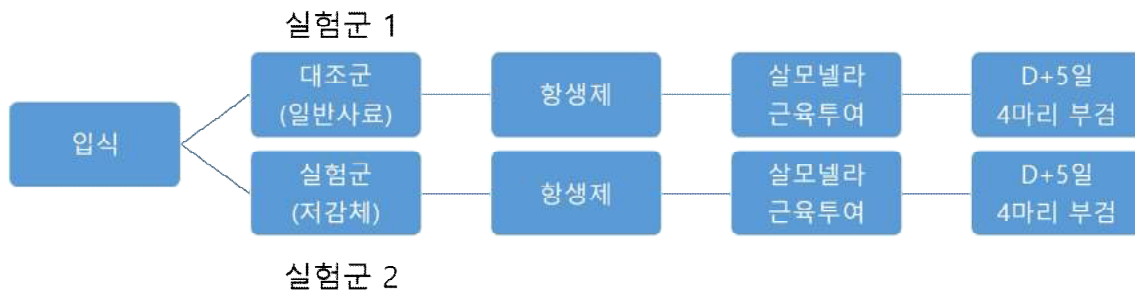
⑥ 살모넬라 검출 시약 : 사니타균 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

(바) 실험방법

① 실험 개요

살모넬라의 근육투여시 돼지의 임상적인 피해 증상 및 살모넬라 저감제에 의한 증상 완화를 확인하기 위한 것으로, 살모넬라 저감제를 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군 2군으로 나누어서 살모넬라를 10^9 cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 접종하였으며, 접종 개시일로부터 5일뒤에 부검하여 살모넬라에 의한 증상을 확인하였다.

실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.



② 실험방법

- ③ 돼지 8마리를 입식하였으며, 4마리씩 2개의 군으로 배치하였다.
- ④ 입식한 돼지를 접종전 2주간 순치하였다.
- ⑤ 입식한 후부터 바로 대조군은 일반사료를, 실험군은 살모넬라 저감제가 포함된 사료를 섭취하도록 하였다.
- ⑥ 순치 후에 대조군과 실험군 모두 살모넬라를 10^9 cfu/Pig로 3일간 연속 근육투여로 강제접종 하였다.
- ⑦ 살모넬라 근육투여 시작 후 5일 되는 날 (D+5일) 각 군을 모두 (4마리) sacrifice 한 후, 부검을 실시하였다.
- ⑧ 자세한 실험 schedule은 다음 표와 같다.

실험 스케줄

실험그룹		D-14	D-7	D-4	D-3	접종 (10 ⁹ cfu x3회 연속)			D+3	D+5
						D	D+1	D+2		
대조군: 근육 10 ⁹ cfu	처리	입식/순치				접종	접종	접종		
	분변검사	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
	안락사									✓ (4마리)
실험군: 근육 10 ⁹ cfu + 살모넬라 저감제	처리	입식/순치 /저감제 사료섭취 시작				접종	접종	접종		
	분변검사	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
	안락사									✓ (4마리)

대조군은 일반사료를 전 기간에 걸쳐서 섭취하였으며, 실험군은 일반사료에 살모넬라 저감제를 포함한 사료를 전 기간에 걸쳐서 섭취하도록 하였다.

(사) 실험결과

① 대조군 : 살모넬라 근육접종군

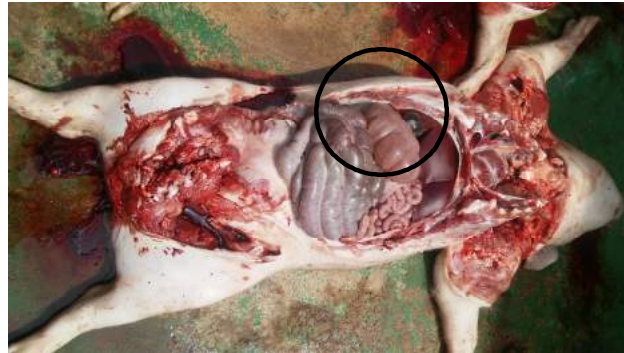


그림 1. 간의 충혈 및 출혈과 장염 소견이 보인다.

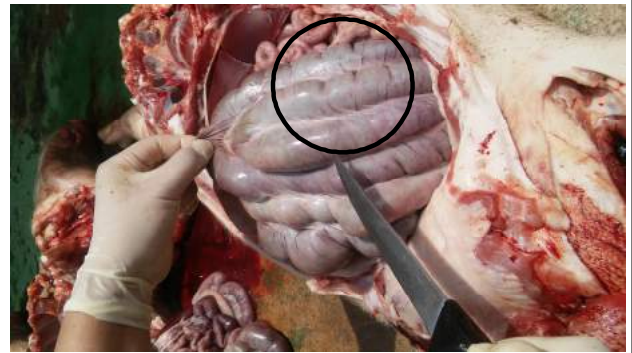


그림 2. 다양한 병변(소장 출혈, 맹장 흰색 괴사소 등)이 보인다

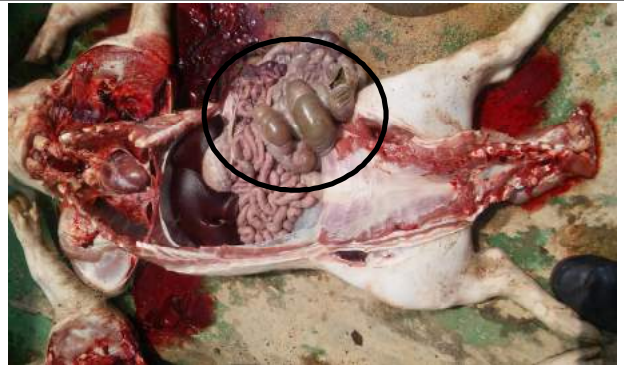


그림 3. 대장의 충혈 및 출혈 소견이 보인다.



그림 4. 소장 및 대장의 충혈 및 출혈 소견이 보인다.

② 실험군 : 살모넬라 근육투여 + 살모넬라 저감제 투여군



그림 5. 간의 총혈을 제외하고 비교적 정상적이다.



그림 6. 약간의 장염 소견이 보인다.



그림 7. 장관의 염증이 보이지 않는다.



그림 8. 장관의 염증이 보이지 않는다.

③ 실험군의 세균학적 비교

④ 분변내 세균 변화

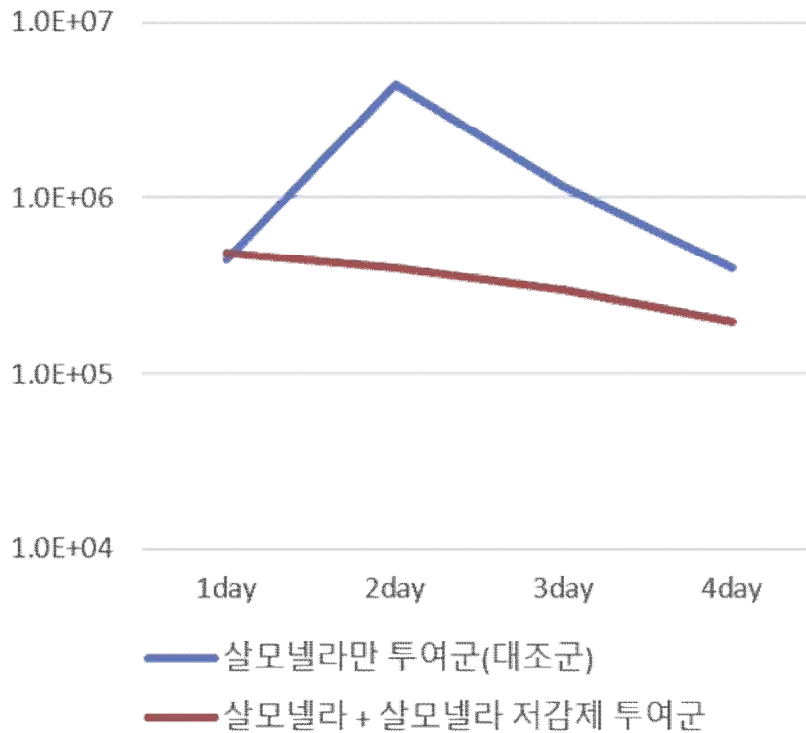
구분		입식 1일	7일	11일	PCR 검사	접종 1일	2일	3일	4일	6일
대 조 군	1	0	0	0	음성	2×10^5	1×10^6	2×10^5	1×10^5	4두 부검
	2	0	0	0	음성	3×10^5	2×10^7	1×10^6	2×10^5	
	3	0	0	0	음성	8×10^5	1×10^7	3×10^6	4×10^5	
	4	0	0	0	음성	8×10^5	2×10^6	3×10^6	3×10^6	
	평균	0	0	0		4.4×10^5	4.5×10^6	1.2×10^6	3.9×10^5	
실 험 군	5	0	0	0	음성	3×10^5	5×10^5	2×10^5	3×10^5	4두 부검
	6	0	0	0	음성	3×10^6	5×10^6	4×10^5	3×10^5	
	7	0	0	0	음성	1×10^5	1×10^5	1×10^5	4×10^5	
	8	0	0	0	음성	6×10^5	1×10^5	1×10^6	4×10^4	
	평균	0	0	0		4.83×10^5	4.0×10^5	3.0×10^5	1.95×10^5	

입식 후 관찰된 균들은 PCR 결과 대장균으로 판명되었다.

분변내 살모넬라의 균수에 있어서 개체간의 차이가 크기 때문에 값의 차이에 대해서 일관성 있는 자료를 얻기 어려웠다. 하지만 접종 후 분변내의 살모넬라의 숫자는 대조군에서 더 많은 살모넬라균이 검출되었다.

살모넬라균을 근육접종 한 개체이기 때문에 분변에서 검출된 살모넬라는 경구감염을 통해 감염된 것이 아니라, 몸의 근육으로부터 장기(간, 비장, 소장, 맹장, 임파절)를 통해 이전한 것이 장관 내강으로 분비된 것으로 판단되며, 살모넬라 저감제를 투여한 실험군에서 균수가 낮게 나타났다.

분변내 살모넬라 (cfu)

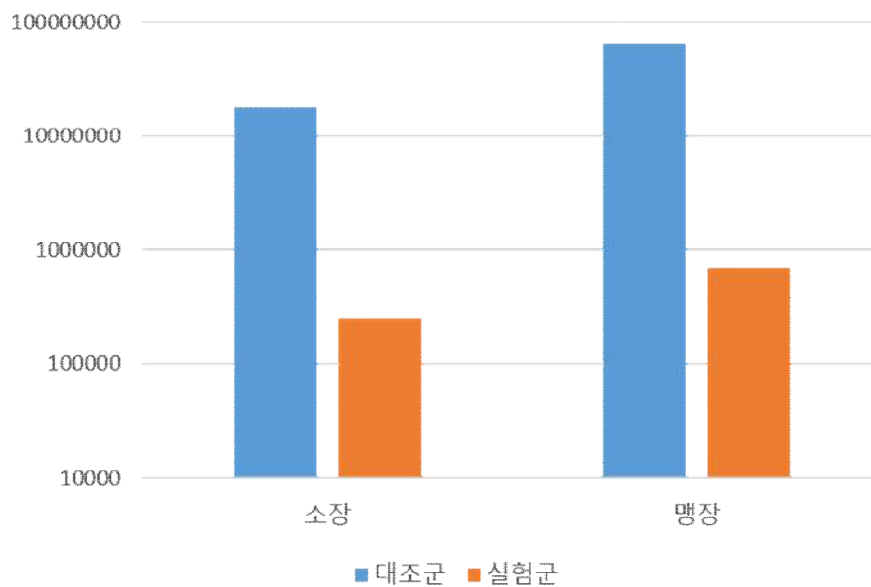


분변에서 검출된 살모넬라의 균수의 변화는 일반적으로 대조군에서는 높아졌다가 감소하는 패턴을 보인 반면에, 살모넬라 저감제를 투여한 실험군에서는 지속적으로 감소하는 패턴을 보이고 있다.

⑤ 부검시 각 장기의 균수 변화

구분		1차 부검 시(5.16)				
		간장	비장	소장	맹장	임파절
대조군	1	0	0	2×10^5	2×10^8	7×10^4
	2	2×10^5	0	9×10^7	3×10^7	1×10^3
	3	3×10^6	0	3×10^8	1×10^8	0
	4	1×10^3	4×10^4	2×10^7	3×10^7	0
실험군	1	0	0	2×10^4	3×10^7	0
	2	0	0	5×10^4	2×10^5	1×10^3
	3	0	0	7×10^4	2×10^4	4×10^4
	4	1×10^4	0	6×10^7	2×10^6	0

소장 및 맹장에서의 살모넬라 균수 (cfu)



살모넬라균을 근육접종 한 공격접종실험에 있어서 부검한 결과, 간에서 발견되는 살모넬라균은 살모넬라균만 투여한 대조군에서는 4개 개체중 3개의 개체에서 검출되었고, 살모

넬라 저감제를 투여한 실험군에서는 4개 개체중 1개의 개체에서만 검출되었다(표 3). 비장에서는 살모넬라균만 투여한 대조군에서는 4마리 중에서 한 마리에서 검출되었고, 살모넬라 저감제를 투여한 실험군에서는 4마리 모두에서 검출되지 않았다. 소장 및 맹장에서는 살모넬라균만 투여한 대조군에서 높게 검출되었고, 임파절에서는 사실상 큰 차이를 보이지는 않았다.

살모넬라균을 근육접종 한 개체이기 때문에 소장과 맹장에 전파된 살모넬라는 경구감염을 통해 감염된 것이 아니라 몸의 장기에서 이전한 것으로 판단되며, 대조군 및 투여군의 4마리 모두 검출된 소장과 맹장의 자료를 비교하면 살모넬라 저감제를 투여한 실험군에서 현저하게 균수가 낮았다.

(아) 결론

*Salmonella Typhimurium*을 가지고 근육접종 실험을 실시한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

- ① 부검 후 육안적 검사 결과, 살모넬라균만을 투여한 대조군에서 높은 장관의 괴사와 충혈 소견을 보였다.
- ② 세균 검사 결과에서도 살모넬라균만 투여한 대조군에서 높은 세균수를 보였다.
- ③ 모든 대조군 및 실험군에서 실험과정 중 폐사 및 살모넬라균과 관련이 없는 질병이 발생하지 않았다.
- ④ 근육접종을 실시한 개체에서 모두 소장과 맹장에서 살모넬라균이 검출되었다. 이는 몸안의 살모넬라가 언제든지 분변을 통해서 야외로 배출될 수 있음을 의미하며, 실제 분변에서도 많은 양의 살모넬라균이 검출되어 몸 안에 있는 살모넬라균이 장관막을 통해 몸 밖으로 배출될 수 있음을 입증할 수 있었다.
- ⑤ 살모넬라 저감제를 사용하지 않은 대조군에 비해 살모넬라 저감제를 사용한 실험군에서는 소장에서 발견된 균수가 약 $\frac{1}{70}$, 맹장에서는 약 $\frac{1}{90}$ 감소를 보였다.

(자) Discussion

살모넬라를 근육감염 시킨 실험에서 살모넬라의 감염농도로 10^9 cfu/Pig를 투여했으며, 임상적인 변화에 차이가 있었으나 수치화하기는 어려웠다. 하지만 부검 결과, 살모넬라에 의한 충혈이나, 출혈 소견이 살모넬라만 투여한 대조군에서 더욱 심하게 나타났으며, 장기에서도 살모넬라에 균수의 차이가 심하게 나타났다. 특히 소장과 맹장의 경우, 매우 높은 수치를 보임으로 장기에 있는 살모넬라균이 쉽게 소장과 맹장으로 이동할 수 있음은 물론 실제 분변에서도 많은 양이 검출되어 장관막을 통해 몸 밖으로 배출될 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 실험을 통해 살모넬라 저감제는 체내에 감염된 살모넬라를 쉽게 억제할 수 있으며, 앞으로 정확한 실험을 위해서는 더 많은 개체수를 대상으로 실험할 필요가 있으나, 대략 체내 살모넬라균을 2 log 정도 감소시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 이는 농가가 대개 살모넬라균에 감염되면 항생제와 유기산 등을 사용해도 일정한 시간이 지나면 지속적으로 검출되거나 임상증상을 보이고 PRRS와 같은 바이러스질환을 악화시킨다는 점에서, 살모넬라균을 반드시 통제해야 하고, 또한 이러한 통제를 위해서는 체내에서 작용할 수 있는 살모넬라 저감제가 필요하다는 것을 잘 보여준다고 할 수 있다.

(3) 3차 야외공격접종실험

3차 야외공격접종실험

돼지의 *Salmonella* Typhimurium균 경구감염 확인
및 경구감염에서의 *Salmonella* 투여량 설정을 위한
연구

의뢰자 : STR바이오텍(주) 이 상 중

실험자 : 우리생명과학(주) 김 홍 집



(가) 실험의 제목 (Title of Experiment)

돼지의 살모넬라 경구투여 투여량에 따른 임상 및 병리적인 변화의 확인을 통해 경구감염 확인 및 적정 투여량 설정을 위한 pilot 실험.

(나) 연구(실험)의 목적 (Purpose of Experiment)

살모넬라 저감제의 효능을 검증하기 위한 조건을 확립하기 위하여, 살모넬라를 경구투여한 후 병리적인 변화를 관찰하여, 살모넬라 저감제의 효능을 확인할 수 있는 살모넬라 경구감염 조건을 확립하고자 하였다.

(다) 연구(실험) 요약 (Summary)

20kg 돼지 8마리를 입식하여, 4마리씩 2군의 실험군으로 나눈 후, 2주간 순치 후 3일간 연속으로 돼지에게 각각 10^9 cfu/Pig 및 10^{10} cfu/Pig를 경구투여 한 후, 시간 경과에 따른 살모넬라 감염 증상을 확인한 결과 장관의 괴사와 함께 총혈 소견을 보였으며, 고농도 살모넬라 투여군에서 증상이 더 심하게 나타났다.

(라) 실험의 배경

살모넬라는 양돈 및 양계산업에서 많은 피해를 입히는 병원체이며, 또한 사람에게도 식중독을 일으키는 대표적인 인수공통 병원균의 하나이다. 특히 외국에서는 살모넬라에 의한 식중독이 심각한 보건위생의 문제이다.

돼지에 전염병을 일으키는 살모넬라균은 패혈증과 장염을 특징으로 하며, 돼지에서는 *Salmonella choleraesuis*와 *Salmonella* Typhimurium이 주로 문제를 일으키는데 최근에는 다양한 종들이 분리되고 있다.

전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 어린자돈으로부터 성돈에 이르기까지 다양한 연령층에서 발생하나 흔히 어린자돈에서 발생한다. 계절적으로는 여름철에 많이 발생한다.

Salmonella Typhimurium균은 인수공통 병원균이므로 본 세균을 근절시키는 것이 대단히 중요하게 인식되고 있는 바, 경구감염 예비실험을 통하여 질병의 양상을 파악하고자 하였다.

(마) 재료 (Materials)

① 돼지 (3원 교잡종, 송산농장)

경기도 화성의 송산농장에서 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 8두 선발하여 시험에 사용하였다. 각 돼지는 입식후 2주간의 순치기간을 거쳐서 실험을 실시하였다.

② 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)

③ 실험용 살모넬라 : *Salmonella* Typhimurium

우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella* Typhimurium)를 선발하였으며, 선발된 균주를 본 실험에 사용하였다.

④ 항생제 : 아미카신주사약(유한양행)으로 2일간 주사하였다.

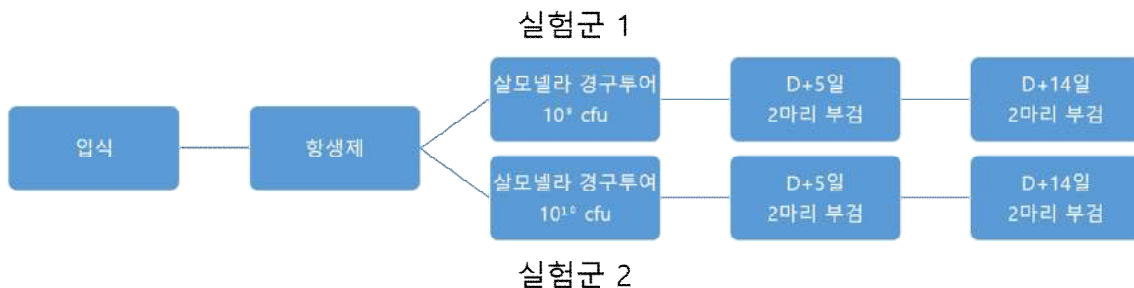
⑤ 살모넬라 검출 시약 : 사니타균 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

(바) 실험 방법

① 실험 개요

살모넬라의 경구투여시 돼지의 임상적인 피해 증상을 확인하기 위한 것으로, 돼지를 2군으로 나누어서 각각 살모넬라를 10^9 cfu/Pig 및 10^{10} cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구접종 하였으며, 접종 개시일로부터 5일 및 14일 뒤에 부검하여 살모넬라에 의한 증상을 확인하였다.

실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.



② 실험방법

- ③ 돼지 8마리를 입식하였으며, 4마리씩 2개의 군으로 배치하였다.
- ④ 입식한 돼지를 2주간 순치하였다.
- ⑤ 순치과정 중에 항생제를 처리하여, 장내의 균총을 일정하게 하였다.
- ⑥ 순치 후에 살모넬라를 실험군 1에서는 10^9 cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여 하였으며, 실험군 2에서는 10^{10} cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여 하였다.
- ⑦ 경구투여 시작후 5일 되는 날 (D+5일) 각 군에서 2마리를 sacrifice 한 후, 부검을 실시하였다.
- ⑧ 경구투여 시작후 14일 되는 날 (D+14일) 각 군에 남아있는 2마리씩을 모두 sacrifice 한 후, 부검을 실시하였다. 부검시 간, 비장, 소장, 맹장, 림프절에서 *Salmonella* Typhimurium균의 균수를 측정하고 전체적인 병변을 확인하였다.
- ⑨ 자세한 실험 schedule은 다음 표와 같다.

실험 스케줄

실험그룹		D-14	D-7	D-4	D-3	살모넬라 경구투여접종 (3회 연속)			D+3	D+5	D+8	D+11	D+14
						D	D+1	D+2					
						10 ⁹ cfu 접종	10 ⁹ cfu 접종	10 ⁹ cfu 접종					
실험군 1 (살모넬라 10 ⁹ cfu 경구투여 군)	처리	입 식 / 순치	항생 제	항생 제		10 ⁹ cfu 접종	10 ⁹ cfu 접종	10 ⁹ cfu 접종					
	분 변 검 사	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
	안락사									✓ (2마 리)			✓ (2마 리)
실험군 2 (살모넬라 10 ¹⁰ cfu 경구투여 군)	처리	입 식 / 순치	항생 제	항생 제		10 ¹⁰ cfu 접종	10 ¹⁰ cfu 접종	10 ¹⁰ cfu 접종					
	분 변 검 사	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
	안락사									✓ (2마 리)			✓ (2마 리)

(사) 실험결과

① 부검 결과

② 실험군 1 (10^9 cfu/Pig의 살모넬라 경구감염군)

③ 실험군 1-1 (3일간 총 3회의 10^9 cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+5일 1차 부검)

장관의 울혈 및 충혈 소견, 간장의 충혈 소견, 폐렴 소견도 있었다.

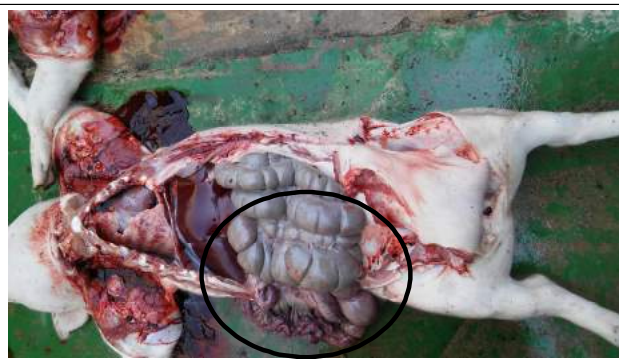


그림 1a. 폐렴 소견 및 간의 충혈 소견이 있음.



그림 1b. 맹장의 충.출혈 소견이 있음.



그림 2a. 간의 충혈 소견과 비교적 정상적인 장의 소견 그러나, 맹장에는 흰색 괴사소가 있음

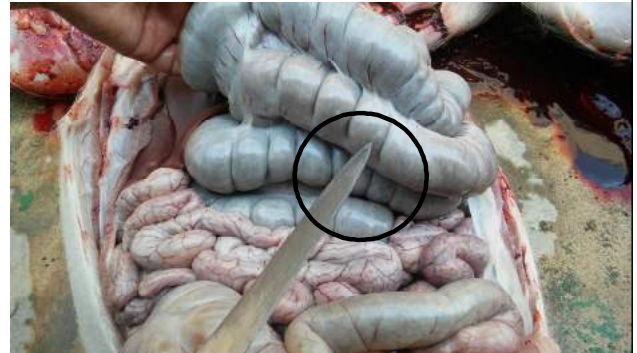


그림 2b. 맹장의 흰색 괴사소의 소견

④ 실험군 1-2 (3일간 총 3회의 10^9 cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+14일 2차 부검)

10^9 cfu/Pig의 투여량으로 접종한 군에서는 2주가 지난 후에는 비교적 정상적인 소견을 보였다.



그림 3. 비교적 정상적이다.



그림 4. 비교적 정상적이다.

⑤ 실험군 2 (1010 cfu/Pig의 살모넬라 경구감염군)

⑥ 실험군 2-1 (3일간 총 3회의 1010 cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+5일 1차 부검)

장관의 괴사와 울혈, 충혈 소견이 심하였다. 폐렴도 관찰되며 *Salmonella Typhimurium* 균을 고농도로 3일간 연속 경구투여한 결과로 보여진다.

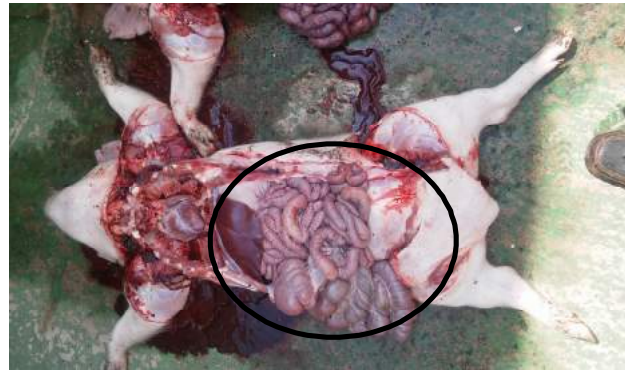


그림 5. 흰색 괴사소 및 충출혈

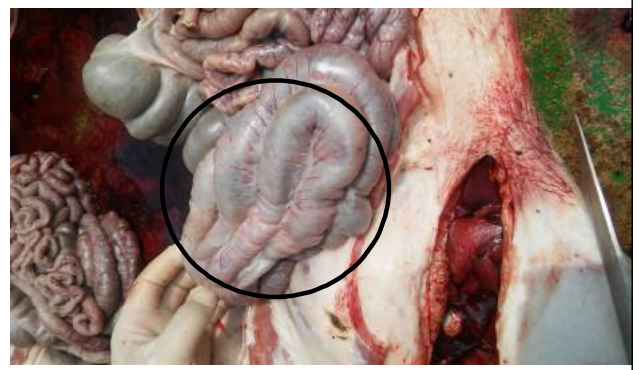


그림 6. 흰색 괴사소 및 충출혈



그림 7. 간의 충혈 소견과 일부 장염도 관찰되고 있다.

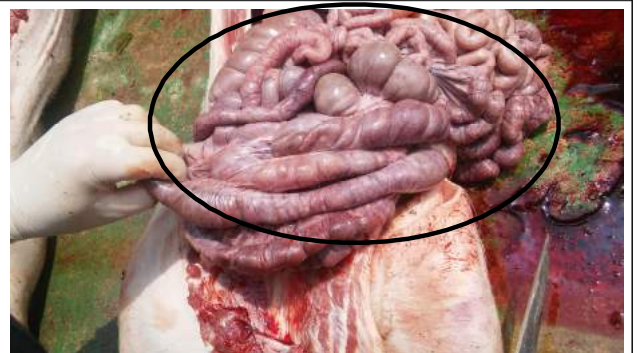


그림 8. 심한 소장 및 대장의 충출혈

⑦ 실험군 2-2 (3일간 총 3회의 1010 cfu/Pig의 살모넬라 경구투여 후, D+14일 2차 부검)



그림 9. 소장염의 장염 소견이 보인다.

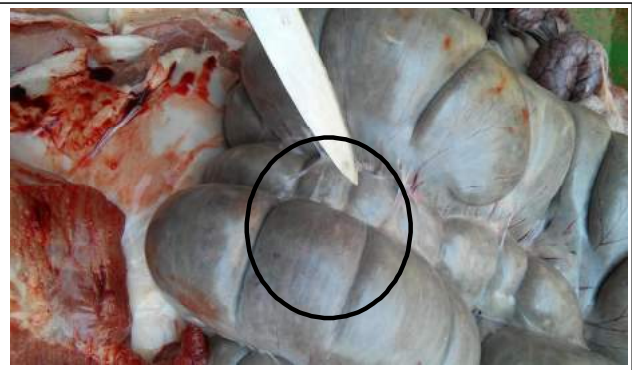


그림 10. 맹장의 괴사소가 보인다.

10¹⁰ cfu/Pig의 투여량으로 접종한 군에서는 2주가 지난 후에도 아직까지 장염소견이 관찰되었다.

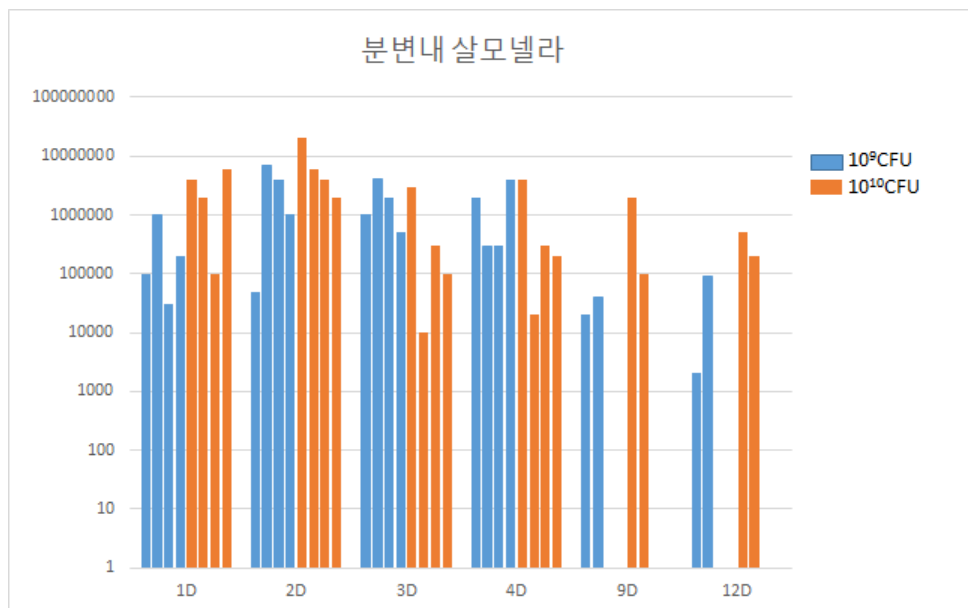
⑧ 실험군의 세균학적 비교

⑨ 분변 내 세균 변화

분변내 균수 변화

구분	입식 1일	7일	11일	PCR 검사	접종 1일	D+1 2일	D+2 3일	D+3 4일	D+5 6일	D+8 9일	D+11 12일	D+14 5일
1번	0	0	0	음성	1×10^5	5×10^4	1×10^6	2×10^6	부검 2두	-		부검 2두
2번	0	0	0	음성	1×10^6	7×10^6	4×10^6	3×10^5		2×10^4	2×10^3	
3번	0	0	0	음성	3×10^4	4×10^6	2×10^6	3×10^5		4×10^4	9×10^4	
4번	0	0	0	음성	2×10^5	1×10^6	5×10^5	4×10^6		-		
평균	0	0	0		1.6×10^5	1.13×10^6	1.4×10^6	9.2×10^5		2.8×10^4	1.3×10^4	
5번	0	0	0	음성	4×10^6	2×10^7	3×10^6	4×10^6	부검 2두	-		부검 2두
6번	0	0	0	음성	2×10^6	6×10^6	1×10^4	2×10^4		2×10^6	5×10^5	
7번	0	0	0	음성	1×10^5	4×10^6	3×10^5	3×10^5		-		
8번	0	0	0	음성	6×10^6	2×10^6	1×10^5	2×10^5		1×10^5	2×10^5	
평균	0	0	0		1.5×10^6	5.6×10^6	2×10^5	2.1×10^5		4.5×10^5	3.2×10^5	

입식 후 관찰된 균들은 PCR 결과 대장균으로 판명되었으며, *Salmonella* Typhimurium균을 경구투여 한 결과, 경구투여균에 있어서 10^{10} cfu/Pig의 투여량으로 투여한 군에서 증상이 더 심했다,



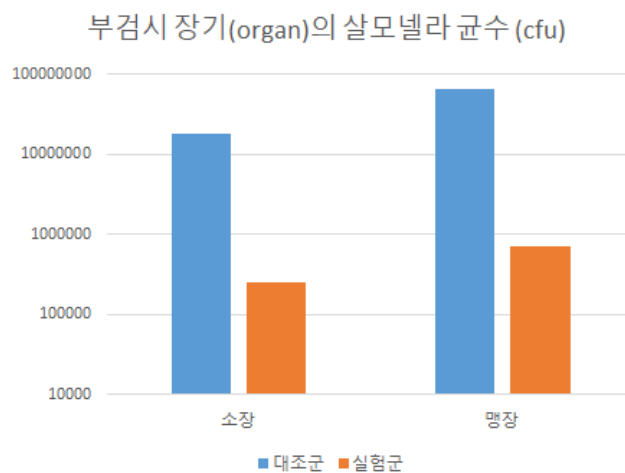
분변내 살모넬라의 균수에 있어서 개체간의 차이가 크기 때문에 값의 차이에 대해서 일관성 있는 자료를 얻기 어려웠다. 하지만, 분변에서 검출된 살모넬라의 균수의 변화는 일반적으로 높아졌다가 접종 3일 후부터 감소하는 패턴을 보이고 있으며, 또한 투여량이 많을수록 더 많은 살모넬라가 검출되었으며 특히, 10^9 cfu/Pig 감염군에서는 시간이 경과함에 따라 보다 큰 폭으로 감소하고 있음을 보여주고 있다.

⑩ 부검시 장기의 균수 측정

부검시 각 장기의 균수 변화

구분	1차 부검 시(5.16)					2차 부검 시(5.25)				
	간장	비장	소장	맹장	임파절	간장	비장	소장	맹장	임파절
1	0*	0	5x10 ⁵	4x10 ⁶	3x10 ⁵					
2						0	0	1x10 ⁵	5x10 ⁸	0
3						0	0	2x10 ⁸	5x10 ⁸	0
4	1x10 ³	1x10 ³	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵					
5	0	1x10 ³	3x10 ⁵	3x10 ⁴	2x10 ¹					
6						4x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ⁵	5x10 ⁶	1x10 ⁴
7	0	3x10 ¹	4x10 ⁷	4x10 ⁸	4x10 ²					
8						0	0	1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴

부검한 결과, 살모넬라를 경구투여 한 이후, 몸 안의 장기에서 살모넬라가 검출되기는 하지만, 검출되는 균수는 차이가 크기 때문에 살모넬라가 특정한 병소에 모여 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 살모넬라의 저감 효과를 확인하는 방법으로 살모넬라 갯수를 측정하는 것 보다는 부검을 통해 임상적인 차이를 확인하는 것이 보다 현실적이라 판단된다.



(아) 결론

Salmonella Typhimurium을 가지고 경구감염 예비실험을 실시한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

- ① 부검 후 육안적 검사 결과, 고농도 살모넬라 투여군(실험군 2)에서 높은 장관의 괴사와 충혈 소견을 보였다.
- ② 세균 검사 결과에서도 고농도 살모넬라 투여군에서 더 높은 세균수를 보였다.
- ③ 증상에 있어서도 *Salmonella* Typhimurium을 각각 10^9 cfu/Pig, 10^{10} cfu/Pig의 투여량으로 한 것 중에서 10^{10} cfu/Pig 군에서 더 증상이 심하였다.
- ④ 모든 실험군에서 실험과정 중에 폐사 및 살모넬라와 관련이 없는 질병이 발생하지 않았다.
- ⑤ 경구투여군에서도 충분히 증상이 나타나므로 본 연구가 야외 상황을 전제로 한 것임을 감안하여 경구투여 하는 것이 바람직하다고 생각된다.
- ⑥ 경구투여군에 있어서 고용량 투여군에서는 심한 증상이 나타나고 있는 바, 향후 살모넬라 저감제의 효능 테스트 실험시에는 고용량 경구투여군이 적합하다고 생각된다.

(자) Discussion

살모넬라를 경구감염 시킨 실험에 있어서, 살모넬라의 감염 투여량으로 10^9 cfu/Pig 및 10^{10} cfu/Pig를 투여했지만, 외관상으로는 임상적인 변화가 뚜렷하게 나타나지는 않았다. 하지만 부검 결과, 살모넬라에 의한 충혈이나, 출혈 소견이 나타났으며, 장기에서도 살모넬라가 확인되어 살모넬라가 장내에서만 존재하는 것이 아니라, 비장이나 임파절로 이동할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 살모넬라가 항생제에 의해서 저감 효과를 나타내지만 시간이 지나면서 다시 재발하는 경우가 많은 이유를 설명해 주는 것이다. 또한 임파절이나, 비장에서 발견된 살모넬라는 유기산의 투여로는 효과를 볼 수 없으므로, 이는 체내에서 작용하는 살모넬라 저감제가 필요한 이유이기도 하다.

살모넬라 경구감염 실험에서 10^9 cfu/Pig 투여 보다는 10^{10} cfu/Pig 투여가 훨씬 일정한 결과를 보여주고 있으므로 앞으로의 실험은 10^{10} cfu/Pig 경구투여가 적절하다고 생각되며, 부검을 실시하는 시기는 3일 연속 경구투여한 이후 5일째(D+5일)에 실시하는 것이 바람직하다고 생각된다.

(4) 4차 야외공격접종실험

4차 야외공격접종실험

돼지의 *Salmonella Typhimurum*균 경구감염에 의한
임상증상 및 병리학적 변화에 미치는 살모넬라
저감제, 미강(생물전환)산물의 효과

의뢰자 : STR바이오텍(주) 이 상 종

실험자 : 우리생명과학(주) 김 홍 집



(가) 실험의 제목 (Title of Experiment)

살모넬라의 경구투여에 의한 돼지의 임상증상 및 병리적인 변화에 미치는 **살모넬라 저감제, 미강(생물전환)산물의 효과**에 대한 Pilot 실험.

(나) 연구(실험)의 목적 (Purpose of Experiment)

살모넬라를 경구투여 한 돼지를 실험동물로, 살모넬라 저감제로서 미강(생물전환)산물+생균제(바실러스) 혼합물의 효과를 확인함에 목적이 있다.

(다) 연구(실험) 요약 (Summary)

20kg 돼지 15마리를 입식하여 5마리씩 실험군을 나눈 후, 2주간 순치후 3일간 연속으로 돼지에게 10^{10} cfu/Pig를 경구투여 한 후, 살모넬라 저감제의 효과를 확인하기 위하여 부검을 실시하였으며, 부검 결과 살모넬라 저감제를 사용한 실험군에서 살모넬라에 의한 병리적인 현상이 현저하게 적게 나타났다.

(라) 실험의 배경

살모넬라는 양돈 및 양계산업에서 많은 피해를 입히는 병원체이며, 또한 인수공통 병원균으로 식중독을 일으키는 대표적인 병원균의 하나이다. 특히 외국에서는 살모넬라에 의한 식중독이 심각한 보건위생의 문제이다.

돼지에 전염병을 일으키는 살모넬라균은 패혈증과 장염을 특징으로 하며, 돼지에서는 *Salmonella choleraesuis* 와 *Salmonella Typhimurium*이 주로 문제를 일으키는데 최근에는 다양한 종들이 분리되고 있다.

전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 어린자돈으로부터 성돈에 이르기까지 다양한 연령층에서 발생하나 흔히 어린자돈에서 발생한다. 계절적으로는 여름철에 많이 발생한다.

또한 *Salmonella Typhimurium*균은 인수공통 병원균으로 본 세균을 근절시키는 것이 대단히 중요하게 인식되고 있는 바, 본 실험을 통하여 질병의 병리적인 양상과 살모넬라 저감제의 효과를 확인하고자 하였다. 특히 살모넬라는 장내 감염 후 체내로 이동할 수 있으며, 체내로 이동한 살모넬라균은 대식세포 내에서 생존이 가능하여 장기적으로 질환을 일으킬 수 있다. 살모넬라균이 체내로 이동한 상태에서도 항생제를 사용할 경우 장관에서는

효과가 나타나 설사 등의 증상은 억제되는 것으로 나타나나, 세포 내에서 생존하고 있는 살모넬라는 항생제의 세포 내 침투에 한계가 있어서, 항생제를 사용한 경우에도 세포 내 살모넬라는 생존이 가능하다. 따라서 본 실험은 경구투여로 장내로 들어온 살모넬라뿐 아니라, 장내에서 몸 안에 들어간 살모넬라에 대한 저감 효과를 확인하고자 하였다.

(마) 재료 (Materials)

① 돼지 (3원 교잡종, 송산농장)

경기도 화성의 송산농장에서 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 15두 선발하여 시험에 사용하였다. 각 돼지는 입식후 2주간의 순치기간을 거쳐서 실험을 실시하였다.

② 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)

③ 살모넬라 저감제 : 미강(생물전환)산물+생균제(바실러스)

미강(생물전환)산물+생균제(바실러스)+면역왕(생균제,우리생명과학 제품)

④ 실험용 살모넬라 : Salmonella Typhimurium

우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella Typhimurium*)를 선발하여 사용하였다.

⑤ 항생제 : 아미카신주사약(유한양행)으로 2일간 주사하였다.

⑥ 살모넬라 검출 시약 : 사니타균 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

(바) 실험방법

① 실험 계획

살모넬라의 경구투여시 임상적인 피해 증상 및 살모넬라 저감제에 의한 증상 완화를 확인하기 위한 것으로, 돼지를 살모넬라 저감제를 투여한 실험군 A군 및 B군과, 살모넬라 저감제를 투여하지 않은 대조군 C군으로 나누어서 살모넬라를 10^{10} cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여로 접종하였으며, 접종 개시일로부터 11일 뒤에 전 두 수 부검하여 살모넬라에 의한 증상을 확인하였다.

구분	실험군	항생제 처치	살모넬라 경구투여	D +11일	D +28일
입식	대조군 C군	2일간	10^{10} cfu/Pig 3일간	검사 안함	부검 실시(4두)
	실험군 A군 (저감제)	2일간	10^{10} cfu/Pig 3일간	부검 실시(5두)	
	실험군 B군 (저감제+면역왕)	2일간	10^{10} cfu/Pig 3일간	부검 실시(5두)	

실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.

② 실험방법

- ③ 돼지 15마리를 입식하였으며, 5마리씩 3개의 군으로 배치하였다.
- ④ 입식한 돼지를 접종전 2주간 순치하였다.
- ⑤ 입식한 후부터 바로 대조군인 C군은 일반사료를, 실험군인 A군 및 B군은 살모넬라 저감제가 첨가된 사료를 섭취하도록 하였다.
- ⑥ 순치 후에 살모넬라를 실험군 A군 및 B군에 10^{10} cfu/Pig를 3일간 연속 경구투여로 강제접종 하였다.
- ⑦ 살모넬라 투여 시작 후 11일 되는 날 (D+11일) 실험군 A군 및 B군의 돼지 모두 (10마리)를 도살 한 후, 부검을 실시하였다.
- ⑧ 실험 시작 후, 2마리의 돼지가 살모넬라에 감염되어 있다고 강원대에서 연락을 받고, 현장에서 즉시 도살하였다. 그에 속한 군은 비급여군(대조군)과 급여군(실험군) 중 A군으로 각각 1마리씩 나왔다.
- ⑨ 자세한 실험 계획은 다음 표와 같다.

실험 스케줄

날짜	8/16일(수)	8/23(수), 25(금)	9/4(월), 5(화), 6일(수)	9/7일(목)	9/9일(토)	9/11일(월)	9/13일(수)	9/15일(금)
소재급여	D-14	D-7 & D-4	D+0, +1, +2	D+3	D+5	D+7	D+9	D+11
비급여군(대조군)	-입식&순치 -일반사료급여 -분변검사	-항생제투약 -투약 전 분변(D-7)	-식염수접종 3회 -분변(9/3일 접종 전 D-1)	생리적 시험수를 투여 함. 똑같이 살모넬라균을 투여하기로 하여 실험을 연장하기로 함				
실험군(A)	-입식&순치 -생물전환소재급여 -분변검사	-항생제투약 -투약 전 분변(D-7)	-균접종 3회 -분변(9/6일 접종 전 D-1)	분변	분변	분변	분변	분변 안락사(조직 샘플)
실험군(B)	-입식&순치 -면역왕+생균제 -분변검사	-항생제투약 -투약 전 분변(D-7)	-균접종 3회 -분변(9/6일 접종 전 D-1)	분변	분변	분변	분변	분변 안락사(조직 샘플)

대조군은 일반사료를 전 기간에 걸쳐서 섭취하였으며, 실험군은 일반사료에 살모넬라 저감제를 첨가한 사료를 전 기간에 걸쳐서 섭취하도록 하였다.

또한 연장하여 먹인 군도 위와 같이 먹였다.

연장실험 스케줄

날짜	9/21(목), 22(금), 23(토)	구분	9/25~9/29	10/10(화)
비급여군(대조군)	-균 접종 3일/3회 -매일 분변을 채취하기로 함	- 4마리를 2군으로 나누어 한군은 대조군, 한군은 살모넬라 저감제-미강(생물전환)산물을 먹임	-매일 채취함	-안락사 -분변, 채혈, 조직 샘플

(사) 실험결과

① 살모넬라 저감제 급여군인 실험군 A군 [미강(생물전환)산물 투여군]



그림1. A군-1: 소장. 대장의 소견이 아주 양호해 보임.



그림2. A군-2: 소장. 대장의 소견이 아주 양호해 보임.



그림3. A군-3: 소장의 충.출혈 소견이 보임.



그림4. A군-4: 대장의 소견이 아주 양호해 보임.



그림5. A군-1: 소장의 소견이 아주 양호해 보임.



그림6. A군-2: 대장의 소견이 아주 양호해 보임.



그림7. A군-3: 소장의 충출혈 소견이 보임.



그림8. A군-4: 대장의 소견이 양호해 보임.

검사 결과 간장의 병변과 소장 및 대장의 소견이 아주 양호해 보여, 아주 우수한 살모넬라 저감 효과를 보였다.

면역왕+생균제를 먹인 실험군 B군은 다소 효과는 인정되나 실험군 A군을 능가하지는 못했다(자료 생략).

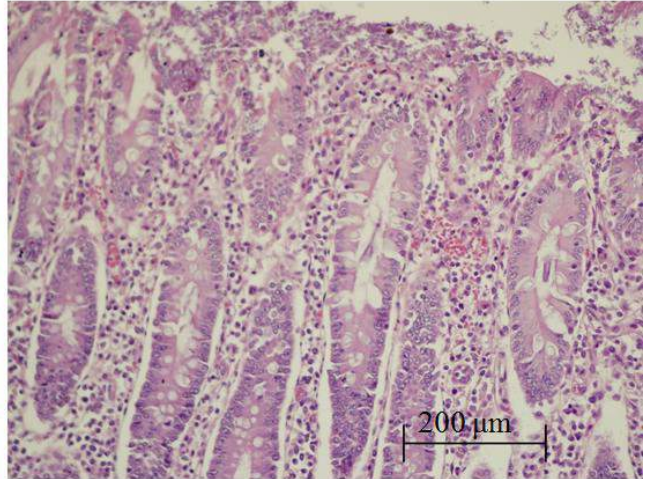
② 살모넬라 저감제 급여군인 실험군A 및 실험군B의 조직 병변 검사

실험군A

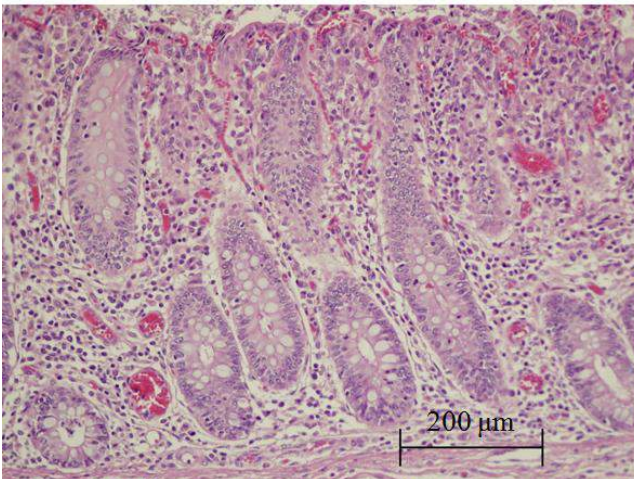


9월 15일
4차 야외공격접종 실험

실험군B

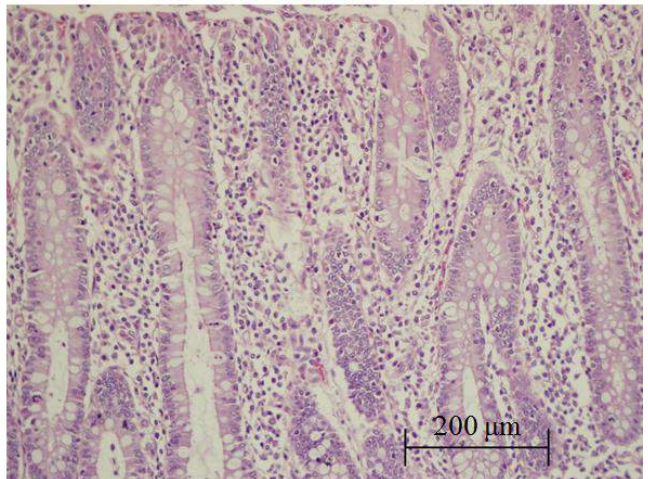


대조군C



10월 10일
4차 야외공격접종 연장실험

실험군_미강



③ 체중 측정 결과

측정 군		체중
실험군 A군	1	38.30
	2	38.38
	3	43.42
	4	35.78
	평균	38.97
실험군 B군	6	36.22
	7	37.24
	8	39.0
	9	39.90
	10	36.30
	평균	37.74

실험군 A군 및 B군의 체중 측정 결과에서도 실험군 A군이 실험군 B군 보다 평균체중이 1,23kg이나 더 증가했다.

④ 연장실험 : 대조군(2두)와 시험군(2두, 살모넬라 저감제 투여군)



그림18. 연장 C-1: 대장에 회색 괴사소가 산재



그림19. 연장 C-1: 대장에 회색 괴사소가 산재



그림20. 연장 C-2: 대장에 회색 괴사소가 산재

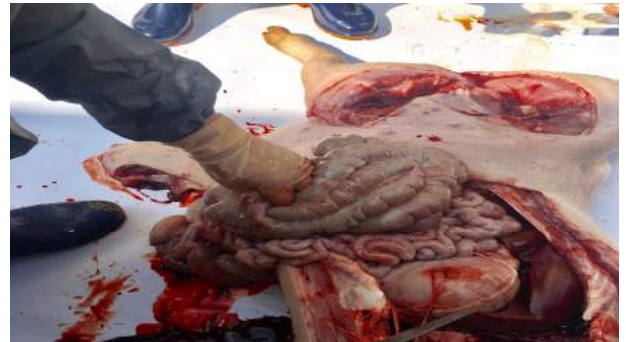


그림21. 연장 C-2: 대장에 회색 괴사소가 산재



그림22. 연장 A-1: 이상이 없이 깨끗함.



그림23. 연장 A-1: 이상이 없이 깨끗함.



그림24. 2차 A-2: 이상이 없이 깨끗함.



그림25. 2차 A-2: 이상이 없이 깨끗함.

연장실험에서도 살모넬라를 똑같이 접종 후 17일이 지난 후 비교하여, 살모넬라 저감제를 급여한 실험군과 살모넬라 저감제를 비급여한 대조군을 비교해 보았을 때, 살모넬라 저감제를 섭취시킨 실험군에서는 아무런 이상을 발견하지 못하였다.

(아) 결론

*Salmonella Typhimurium*을 가지고 경구투여 강제접종 실험을 실시한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

- 실험군 A군에서의 살모넬라 저감제 검사 결과, 간장의 병변과 소장 및 대장의 소견이 아주 양호해 보여 아주 우수한 살모넬라 저감 효과를 보였다.
- 체중 측정 결과에서도 유의성 있게 실험군 A군이 실험군 B군보다 평균체중이 1,23kg이나 더 증가하였다.
- 연장실험에서도 살모넬라를 똑같이 접종한 후 17일이 지난 후 비교하여, 살모넬라 저감제를 급여한 대조군과 비급여한 실험군을 비교해 보았을 때, 살모넬라 저감제를 섭취한 실험군에서는 아무런 이상 증상을 발견하지 못하였다.

(자) Discussion

부검 결과, 살모넬라에 의한 충혈이나, 출혈 소견이 살모넬라균만 투여한 대조군에서 더욱 심하게 나타났다.

본 실험에서 살모넬라 저감제는 체내에 감염된 살모넬라를 쉽게 억제할 수 있으며, 앞으로 정확한 실험을 위해서는 더 많은 개체수를 대상으로 실험할 필요가 있으나, 아마도 체내 살모넬라균을 2 log 정도 감소시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 이는 농가가 대개 살모넬라균에 감염되면 항생제와 유기산 등을 사용해도 일정한 시간이 지나면 지속적으로 검출되거나 임상증상을 보이고 PRRS와 같은 바이러스 질병을 악화시킨다는 점에서, 살모넬라균을 반드시 통제해야 하고, 또한 이러한 통제를 위해서는 체내에서 작용할 수 있는 저감제가 필요하다는 것을 잘 보여준다고 할 수 있다.

(5) 5차 야외공격접종실험

5차 야외공격접종실험

돼지의 *Salmonella* Typhimurium균 경구감염에 의한
임상증상 및 병리학적 변화에 미치는 살모넬라 저감제,
강황(생물전환)산물의 효과

의뢰자 : STR바이오텍(주) 이 상 중

실험자 : 우리생명과학(주) 김 홍 집



① 실험의 제목 (Title of Experiment)

살모넬라의 경구투여에 의한 돼지의 임상증상 및 병리적인 변화에 미치는 **살모넬라 저감제, 강황(생물전환)산물의 효과**에 대한 Pilot 실험.

② 연구(실험)의 목적 (Purpose of Experiment)

살모넬라를 경구투여 한 돼지를 실험동물로, 살모넬라 저감제로서 ①강황(생물전환)산물 및 ②강황(생물전환)산물+바실러스 혼합물의 효과를 확인함에 목적이 있다.

③ 연구(실험) 요약 (Summary)

25kg 돼지 15마리를 입식하여 5마리씩 실험군을 나눈 후, 2주간 순치후 3일간 연속으로 돼지에게 10^{10} cfu/Pig를 경구투여 한 후, 살모넬라 저감제의 효과를 확인하기 위하여 부검을 실시하였으며, 부검 결과 살모넬라 저감제를 사용한 실험군에서 살모넬라에 의한 병리적인 현상이 현저하게 적게 나타났다.

④ 실험의 배경

살모넬라는 양돈 및 양계산업에서 많은 피해를 입히는 병원체이며, 또한 인수공통 병원균으로 식중독을 일으키는 대표적인 병원균의 하나이다. 특히 외국에서는 살모넬라에 의한 식중독이 심각한 보건위생의 문제이다.

돼지에 전염병을 일으키는 살모넬라균은 패혈증과 장염을 특징으로 하며, 돼지에서는 *Salmonella choleraesuis* 와 *Salmonella* Typhimurium이 주로 문제를 일으키는데 최근에는 다양한 종들이 분리되고 있다.

전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 어린자돈으로부터 성돈에 이르기까지 다양한 연령층에서 발생하나 흔히 어린자돈에서 발생한다. 계절적으로는 여름철에 많이 발생한다.

또한 *Salmonella* Typhimurium균은 인수공통 병원균으로 본 세균을 근절시키는 것이 대단히 중요하게 인식되고 있는 바, 본 실험을 통하여 질병의 병리적인 양상과 살모넬라 저감제의 효과를 확인하고자 하였다. 특히 살모넬라는 장내 감염 후 체내로 이동할 수 있으며, 체내로 이동한 살모넬라균은 대식세포 내에서 생존이 가능하며 장기적으로 질환을 일으킬 수 있다. 살모넬라균이 체내로 이동한 상태에서도 항생제를 사용할 경우 장관에서는

효과가 나타나 설사 등의 증상은 억제되는 것으로 나타나나, 세포 내에서 생존하고 있는 살모넬라는 항생제의 세포 내 침투에 한계가 있어서, 항생제를 사용한 경우에도 세포 내 살모넬라는 생존이 가능하다. 따라서 본 실험은 경구투여로 장내로 들어온 살모넬라뿐 아니라, 장내에서 몸 안에 들어간 살모넬라에 대한 저감 효과를 확인하고자 하였다.

⑤ 재료 (Materials)

㉓ 돼지 (3원 교잡종, 송산농장)

경기도 화성의 송산농장에서 사육하고 있는 삼원교잡종의 20kg 돼지를 15두 선발하여 시험에 사용하였다. 각 돼지는 입식후 2주간의 순치기간을 거쳐서 실험을 실시하였다.

㉔ 사료 : 퓨리나 린텍 플러스 (카길 애그리 퓨리나)

㉕ 살모넬라 저감제 : 저감제A [강황(생물전환)산물], 저감제B [강황(생물전환)산물+바실러스]

㉖ 실험용 살모넬라 : *Salmonella Typhimurium*

우리생명과학(주)에서 전국적으로 병성감정을 실시하여 다수의 약제에 대하여 내성을 가진 균주(*Salmonella Typhimurium*)를 선발하여 사용하였다.

㉗ 항생제 : 아미카신주사약(유한양행)으로 2일간 주사하였다.

㉘ 살모넬라 검출 시약 : 사니타균 살모넬라 검출시약(일본 JNC(주))으로 조사하였다.

⑥ 실험방법

㉠ 실험 계획

살모넬라의 경구투여시 임상적인 피해 증상 및 살모넬라 저감제에 의한 증상 완화를 확인하기 위한 것으로, 돼지를 살모넬라 저감제를 투여한 실험군 A군 및 B군과, 살모넬라 저감제를 투여하지 않은 대조군 C군으로 나누어서 살모넬라를 10¹⁰ cfu/Pig의 양으로 3일간 연속 경구투여로 접종하였으며, 접종 개시일로부터 9일 뒤에 전 두수 부검하여 살모넬라에 의한 증상을 확인하였다.

구분	사료	접종전 사료	접종후 사료
실험군 A군	A (강황 첨가)	A (강황 첨가)	A (강황 첨가)
실험군 B군	B (강황+바실러스 첨가)	B1 (강황 첨가)	B2 (강황+바실러스 첨가)
대조군 C군	C (저감제 무첨가)	C (저감제 무첨가)	C (저감제 무첨가)

실험과정은 아래와 같이 요약할 수 있다.

㉡ 실험방법

- ㉢ 돼지 15마리를 입식하였으며, 5마리씩 3개의 군으로 배치하였다.
- ㉣ 입식한 돼지를 접종전 2주간 순치하였다.
- ㉤ 입식한 후부터 바로 대조군은 일반사료를, 실험군은 살모넬라 저감제가 첨가된 사료를 섭취하도록 하였다.
- ㉥ 순치 후에 살모넬라를 대조군과 실험군 모두 1010 cfu/Pig를 3일간 연속 경구투여로 강제접종 하였다.
- ㉦ 살모넬라 투여 시작 후 13일 되는 날 (D+13일) 각 군을 모두 (15마리) 도살한 후, 부검을 실시하였다.
- ㉧ 실험 시작 후, 2마리의 돼지가 살모넬라에 감염되어 있다고 강원대에서 연락을 받고, 현장에서 즉시 격리 후 분리 사육하였다. 번호는 실험군 A에 속하는 1,2번이었다.
- ㉨ 자세한 실험 계획은 다음 표1과 같다.

실험 스케줄

날짜	9/22일(금)	9/25일(월)	10/7(토), 8(일), 9일(월)	10/10 (화) ~ 10/17(화)(8일간)	10/18 (수)
소재 급여	D-14		D+0, +1, +2	D+3 ~ D+12	D+13
실험 군 A	-입식&순치 -생물전환소재급 여 -분변검사	분변(살모넬라 감염여부 확인)	-균접종 3회 -분변(10/6일 접종 전 D-1)	매일 분변 채취 후 결과 확인	분변 안락사(조직샘플)
실험 군 B	-입식&순치 -생물전환소재급 여 -분변검사	분변(살모넬라 감염여부 확인)	-균접종 3회 -분변(10/6일접종 전 D-1)	매일 분변 채취 후 결과 확인	분변 안락사(조직샘플)
대조 군 C	-입식&순치 -일반사료급여 -분변검사	분변(살모넬라 감염여부 확인)	-살모넬라접종 3회 -분변(10/6일접종 전 D-1)	매일 분변 채취 후 결과 확인	분변 안락사(조직샘플)

실험군 A는 일반사료에 살모넬라 저감제로 강황(생물전환)산물을 먹였으며, 실험군 B에는 일반사료에 강황(생물전환)산물+바실러스 혼합물을 먹였으며 대조군은 일반사료만을 전 기간에 걸쳐서 섭취토록 하였다.

⑦ 실험결과

㉞ 대조군 C군에서의 부검소견



그림1. C-1: 소장외 심한 충혈 및 출혈 소견

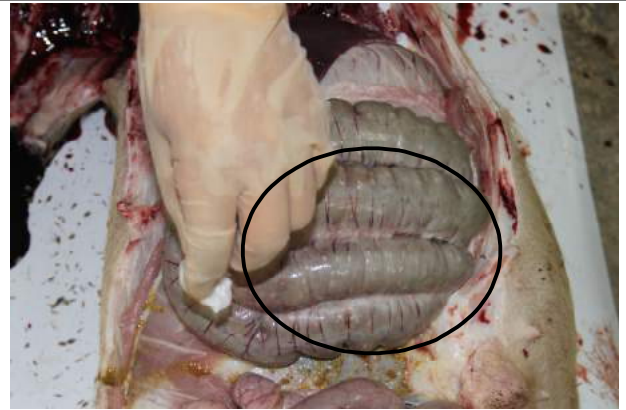


그림2. C-1:대장에 다수의 회색 괴사소 산재



그림3. C-2: 소장외 충혈 소견



그림4. C-2: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재



그림5. C-3: 소장외 충혈 소견

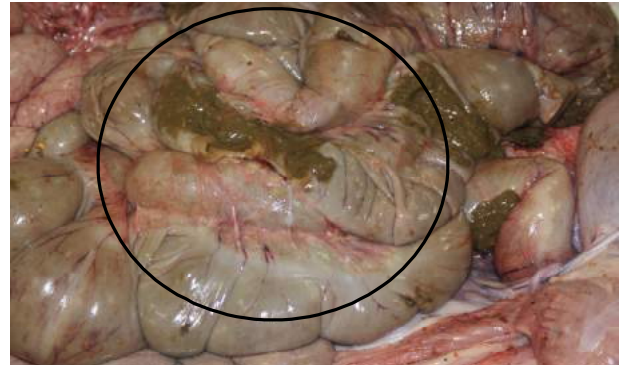


그림6. C-3: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재 및 설사 소견



그림7. C-4: 소장외 충혈 및 출혈 소견



그림8. C-4: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재



그림9. C-5: 소장외 충혈 소견



그림10. C-5: 대장에 다수의 회색 괴사소 산재

대조군에서는 전형적인 살모넬라성 장염이 유발되었다. 소장외 충혈 및 출혈 소견과 대장의 회색 괴사소가 대장의 전면에 산재되어 나타났다.

㉔ 실험군 A군 [강황(생물전환)산물 투여군]에서의 부검소견

실험 시작과 동시에 강원대로부터 2마리가 살모넬라균에 감염되었다고 통보받아 격리 사육한 후 일반 실험과 동일하게 한 후, 마지막(D+13)에 부검하였다. 생각 보다는 심하지 않고 양호하게 나타났다.



그림11. A-1: 소장 소견이 아주 양호해 보임.

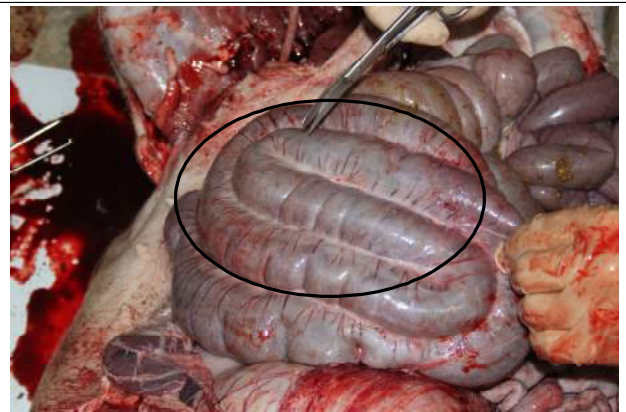


그림12. A-1: 대장 소견이 일부 증상이 약하게 보임



그림13. A-2: 소장 소견이 아주 양호해 보임.



그림14. A-2: 대장 소견이 아주 양호해 보임.

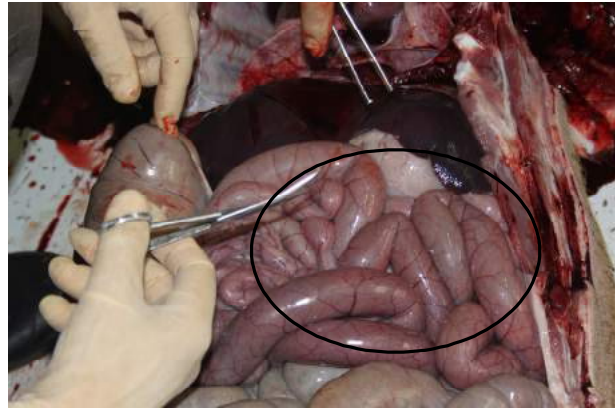


그림15. A-3: 소장외 출혈이 보인다



그림16. A-3: 대장은 비교적 정상적이다

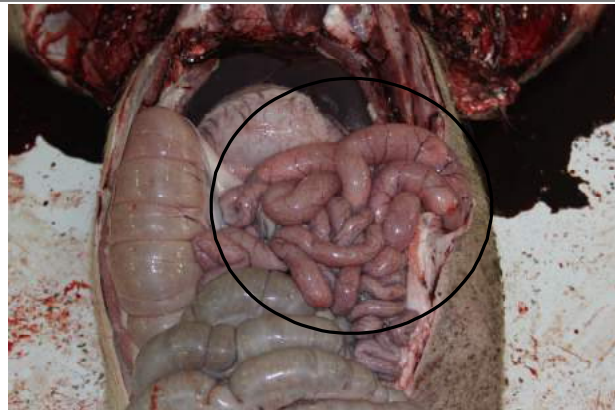


그림17. A-4: 소장외 출혈이 보인다



그림18. A-4: 대장은 비교적 정상적이다



그림19. A-5: 소장은 비교적 정상적이다



그림20. A-5: 대장은 비교적 정상적이다.

검사 결과 간장의 병변 및 소장외 출혈이 일부 보이지만, 대장의 소견이 아주 양호해 보여 아주 우수한 살모넬라 저감 효과를 보였다.

㉔ 실험군 B군 [강황(생물전환)산물+바실러스 투여군]에서의 부검소견

소장의 충혈 및 출혈을 제외하고 대장은 비교적 정상이었다. 그러나 5마리중 2마리에서 대장에서 회색 괴사소가 관찰되었다. 그러나, 생균제(바실러스)를 먹어서인지 분변의 상태가 좋았다.



그림21. B-1: 소장의 충혈 소견이 보임



그림22. B-1: 대장의 회색 괴사소의 산재

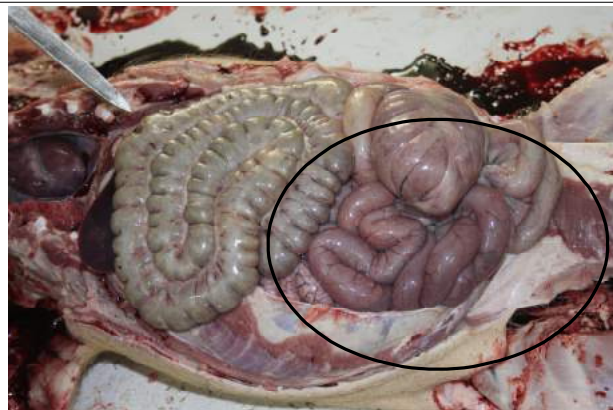


그림23. B-2: 소장의 충혈 소견이 보임



그림24. B-2: 대장은 비교적 정상적임



그림25. B-3: 소장은 비교적 정상적임



그림26. B-3 대장은 비교적 정상적임



그림27. B-4: 소장은 충혈 소견을 보임

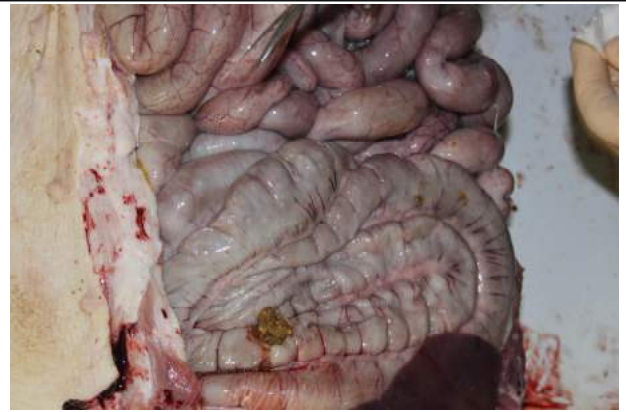


그림28. B-4: 대장은 비교적 정상적임



그림29. B-5: 소장은 비교적 정상적임



그림30. B-5: 대장의 회색 괴사소 산재

대조군



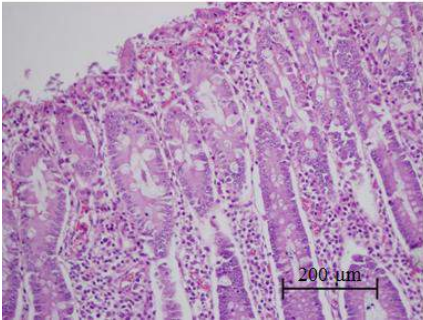
강황(생물전환)소재 투여군



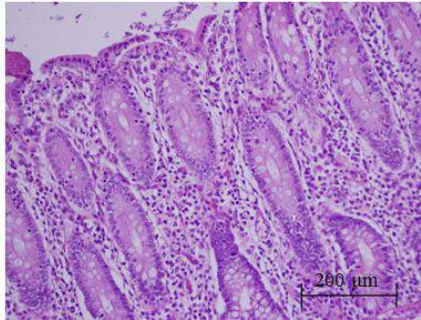
그림 31. 대조군과 강황(생물전환)소재 투여군의 괴사소 확대 사진

㉔ 조직 병변 검사 결과

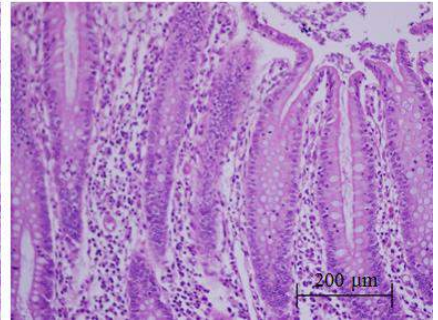
대조군



실험군A



실험군B



10월 18일

5차야외공격접종실험

대조군과 처치군 모든 돼지에서 장 용모가 잘 보존되어 있고 미약한 정도의 백혈구가 점막고유층에 침윤되어 있어 유의적인 차이를 보이지 않음. 살모넬라 감염과 생약 추출물에 의한 형태학적 변화에 유의미한 차이가 없음.

㉔ 분변중 살모넬라 검출 결과

각 대조군 및 실험군에서의 분변 중 살모넬라 검출 결과는 아래표와 같다.

분변 중 살모넬라 검출 결과

구분	1차(10/11)	2차(10/12)	3차(10/13)	4차(10/14)	5차(10/15)	6차(10/16)	7차(10/17)	
대 조 군 C	11	6×10^8	4×10^7	3×10^6	2×10^6	8×10^5	2×10^5	2×10^6
	12	2×10^7	8×10^7	3×10^7	7×10^6	2×10^6	1×10^5	2×10^3
	13	1×10^7	4×10^7	2×10^6	2×10^6	1×10^5	2×10^3	4×10^4
	14	3×10^7	5×10^7	3×10^7	5×10^6	1×10^5	5×10^3	6×10^3
	15	1×10^7	7×10^6	1×10^6	1×10^6	2×10^5	7×10^3	8×10^3
	평균	1.34×10^8	4.34×10^7	1.32×10^7	3.4×10^6	6.40×10^5	6.28×10^4	4.11×10^5
실 험 군 A	1	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^4	4×10^4	2×10^3	2×10^3
	2	2×10^6	3×10^5	3×10^4	1×10^3	2×10^3	1×10^3	2×10^3
	3	4×10^6	3×10^5	1×10^5	1×10^5	4×10^3	4×10^2	1×10^2
	4	3×10^5	2×10^5	2×10^5	4×10^5	3×10^3	5×10^2	2×10^2
	5	2×10^6	7×10^5	5×10^5	5×10^3	5×10^2	3×10^2	2×10^2
	평균	1.86×10^6	3.2×10^5	1.68×10^5	1.03×10^5	9.9×10^3	8.4×10^2	9×10^2
실 험 군 B	6	3×10^6	4×10^5	4×10^5	5×10^3	4×10^3	2×10^2	1×10^2
	7	2×10^6	8×10^5	5×10^4	5×10^3	2×10^3	3×10^2	2×10^2
	8	3×10^6	2×10^5	1×10^5	4×10^3	3×10^3	2×10^2	1×10^2
	9	5×10^6	6×10^5	1×10^5	5×10^4	1×10^3	5×10^3	3×10^3
	10	7×10^6	6×10^4	5×10^4	2×10^4	1×10^3	4×10^3	2×10^3
	평균	4×10^6	4.12×10^5	1.4×10^5	1.68×10^4	2.2×10^3	1.94×10^3	1.8×10^3

실험군 A군 및 실험군 B군 간의 분변에서의 살모넬라 검출율은 상호 유의성이 없었으나, 대조군 C군과는 확연한 차이를 보일 정도로 대조군 C군에서 검출율이 높았다.

분변에서의 살모넬라 검출율

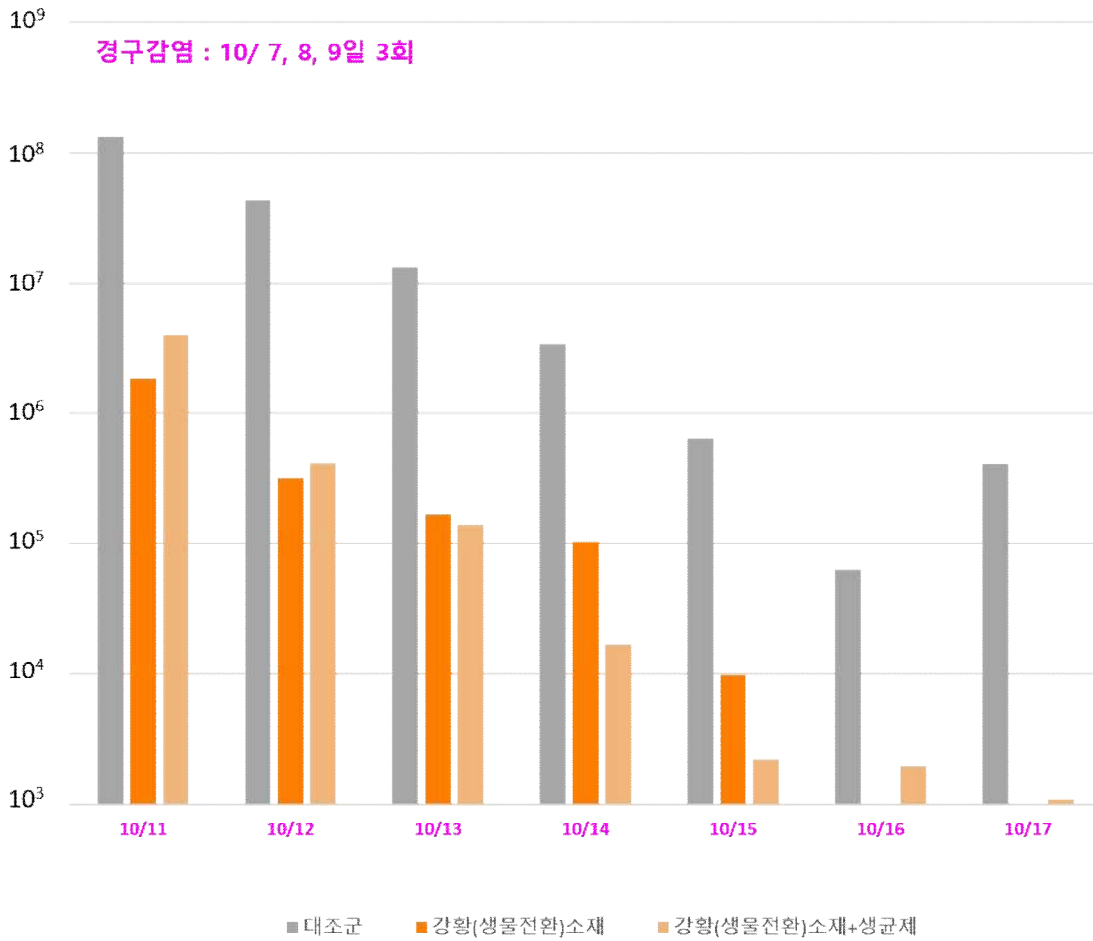


그림 32. 분변에서의 살모넬라 검출율. 대조군, 강황(생물전환)산물 투여군, 강황(생물전환)산물+생균제 투여군에서 분변에서의 살모넬라 검출율

부검시 각 장기의 살모넬라 검출 결과(10/18)

구분	간	비장	신장	임파절	결장	분변	
대 조 군 C	11	ND	ND	ND	ND	1x10 ⁵	8x10 ³
	12	ND	6x10 ⁴	ND	ND	3x10 ⁴	6x10 ³
	13	ND	ND	ND	4x10 ⁴	2x10 ⁷	4x10 ⁴
	14	4x10 ⁵	3x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	2x10 ⁷	2x10 ⁶
	15	5x10 ⁵	6x10 ³	1x10 ⁴	4x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ³
실 험 군 A	1	ND	ND	ND	ND	2x10 ⁴	2x10 ³
	2	ND	ND	ND	ND	3x10 ⁴	2x10 ³
	3	ND	ND	ND	2x10 ³	2x10 ²	1x10 ²
	4	1x10 ⁴	ND	ND	ND	4x10 ³	2x10 ³
	5	7x10 ²	ND	ND	1x10 ⁵	4x10 ⁵	2x10 ⁴
실 험 군 B	6	ND	ND	ND	ND	ND	1x10 ³
	7	ND	ND	ND	ND	3x10 ³	2x10 ³
	8	ND	ND	ND	1x10 ³	4x10 ³	3x10 ³
	9	ND	ND	ND	7x10 ³	4x10 ³	2x10 ²
	10	5x10 ³	3x10 ³	2x10 ³	6x10 ³	3x10 ⁵	1x10 ⁵

(ND: Not Detected (검출안됨))

부검시 실험군 A군에 비하여 실험군 B군에서 분변 상태가 양호하여 분변 및 각 장기에
서의 세균학적 조사를 해 보았으나 유의성이 없었다. 그러나 실험군 A군 및 실험군 B군
모두 분변 및 각 장기에서의 살모넬라 검출에 있어서 대조군 C군에 비하여는 월등히 좋은
성적을 나타냈다.

⑧ 결론

Salmonella Typhimurium을 가지고 경구투여 강제접종 실험을 실시한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

- 실험군 A군의 검사 결과, 간장의 병변 및 소장 출혈이 일부 보이지만 대장의 소견이 아주 양호해 보여 아주 우수한 살모넬라 저감 효과를 보였다.
- 실험군 B군의 검사 결과, 소장의 충혈 및 출혈을 제외하고 대장은 비교적 정상이었다. 그러나 5마리중 2마리에서 대장에서 회색 괴사소가 관찰되었다. 단 생균제(바실러스)를 먹어서인지 분변의 상태가 좋았다.
- 대조군 C군의 경우 전형적인 살모넬라성 장염이 유발되었다. 소장의 충혈 및 출혈 소견과 대장의 회색 괴사소가 대장의 전면에 산재되어 나타났다.
- 실험군 A군 및 실험군 B군 간의 분변중 살모넬라 검출율은 상호 유의성이 없고, 대조군 C군과는 확연한 차이를 보일 정도로 대조군 C군에서 검출율이 높았다.
- 부검시 실험군 A군에 비하여 실험군 B군에서 분변 상태가 양호하여 분변 및 각 장기에서의 세균학적 조사를 해 보았으나 상호 유의성이 없었다. 그러나 실험군 A군 및 실험군 B군 모두 분변 및 각 장기에서의 살모넬라 검출에 있어서 대조군 C에 비하여는 월등히 좋은 성적을 나타냈다.

⑨ Discussion

부검 결과 살모넬라에 의한 충혈이나, 출혈 소견이 살모넬라균만 투여한 대조군에서 더욱 심하게 나타났으며, 장기에서도 살모넬라 균수의 차이가 심하게 나타났다. 특히 소장과 맹장의 경우, 매우 높은 수치를 보임으로 내장에 있는 살모넬라균이 쉽게 소장과 대장으로 침투할 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 살모넬라 저감제는 체내에 감염된 살모넬라를 쉽게 억제할 수 있으며, 앞으로 정확한 실험을 위해서는 더 많은 개체수를 대상으로 실험할 필요가 있으나, 아마도 체내 살모넬라균을 2 log 정도 감소시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 이는 농가가 대개 살모넬라균에 감염되면 항생제와 유기산 등을 사용해도 일정한 시간이 지나면 지속적으로 검출되거나 임상증상을 보이고 PRRS와 같은 바이러스 질병을 악화시킨다는 점에서, 살모넬라균을 반드시 통제해야 하고, 또한 이러한 통제를 위해서는 체내에서 작용할 수 있는 저감제가 필요하다는 것을 잘 보여준다고 할 수 있다.

9절. 현장적용 매뉴얼 개발

농장내 살모넬라 저감을
위한
현장적용매뉴얼

2017. 12.

(주)STR바이오텍

현장적용매뉴얼

제목 : 안전한 축산물을 생산하기 위한 농장단계에서의 살모넬라 저감제 사용

1. 목 적

가. 안전한 축산물 생산을 위한 농장 단계에서의 살모넬라 제어 모델 개발 과제의 산출물이며, 새로운 저감제를 통해서 안전한 축산물을 생산하는 것을 목적으로 한다.

나. 살모넬라의 가장 대표적인 특징은 '살모넬라는 세포내 감염 병원균으로, 대식세포에서 생존 및 증식이 가능하여 우리 몸 (사람 및 동물)의 면역체계를 약화시키고 전신감염이 이루어진다' 는 점이다.

살모넬라는 숙주 내에서 생존하기 위해서 동물 면역체계에 잘 적응되어 있는 병원체로, 음식물을 통해 구강으로 들어온 살모넬라는 강산성의 위액에서 생존할 수 있으며, 위를 통과한 살모넬라는 2단계에 걸쳐 감염을 일으킬 수 있는데, 1단계로 장관 내강에서 장관 감염을 일으키고, 2단계로 동물의 장관막을 뚫고 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 전신감염을 일으킬 수 있다. 그러므로 살모넬라의 감염을 통제하기 억제하기 위해서는 ①장관 내강에서의 살모넬라 감염도 조절해야 하지만, ②M세포 및 상피세포를 통해서 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어온 살모넬라가 대식세포로 전달되고 이어지는 전신성 감염을 억제할 수 있도록 몸 안의 세포내 감염 살모넬라도 함께 제거하여야 한다.

그러나 기존 대부분의 살모넬라 저감제(백신 제외)의 공통적인 특징은 모두 장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재로, 장관 내강의 살모넬라만 제거할 수 있다는 것이다. 실질적인 문제가 되는 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 직접 저감시키는 제품은 없으며, 단순히 장관 내강의 살모넬라를 저감시켜서 결과적으로 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 억제하는 수준에 그치고 있다.

따라서 안전한 축산물 생산을 위한 농장 단계에서의 살모넬라 제어를 위해서는 '장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재'와 '장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 소재'의 배합을 통해 살모넬라 저감 효능을 획기적으로 향상시킬 필요가 있다.

2. 범 위

- 가. 본 매뉴얼은 축산물 특히, 계육, 계란, 돈육의 생산과정중 농장단계에서 살모넬라 감염을 줄이기 위한 것이다.
- 나. 본 매뉴얼은 살모넬라중 인수공통 감염균으로, 가금류에 주로 감염되는 *Salmonella Enteritidis* 그리고 돼지에 주로 감염되는 *Salmonella Typhimurium*을 대상으로 한다.
- 다. 본 매뉴얼은 예방적 차원으로 사용할 수 있는 저감제를 다루었으며, 백신과 항생제에 대해서는 고려하지 않는다.
- 라. 본 매뉴얼은 기존의 살모넬라 저감제에 대한 평가를 하지 않았으며, 기존의 살모넬라 저감제(예를 들어 유기산) 등의 사용 프로토콜을 대체하는 것이 아니라, 기존의 살모넬라 저감제에 추가하여 세포내 감염 살모넬라 저감제를 보강하는 것이다.
- 마. 지금까지 개발된 살모넬라 저감제가 모두 장관 내강의 살모넬라만 저감할 수 있는 저감제를 사용한 것에 반하여, 보다 원칙적으로는 장관 내강에서 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포 등에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 살모넬라 저감제로, 살모넬라의 혈청형과 관계 없이 작용하는 비특이적 살모넬라 저감제의 사용 매뉴얼 이다.
- 바. 본 매뉴얼은 위생관리 시스템 (특히 살균제)에 대해서는 다루지 않는다. 이는 이미 2013년에 발표된 “살모넬라 부재 계육 생산을 위한 위생관리 시스템 개발에 관한 연구”에서 살균제에 대해서 충분한 연구가 진행된 바가 있다.

3. 배경

- 가. 살모넬라는 전세계적으로 약 2,500종의 혈청형이 발견되고 있으나, 이중 사람에게서 식중독을 일으키는 것은 수십종에 불과한 것으로 알려져 있다. 그러므로 매우 특이적인 살모넬라가 종간의 장벽을 넘어서 사람에게 감염될 수 있는 것으로 판단된다.
- 나. 이러한 인수공통 전염병(식중독)을 일으킬 수 있는 살모넬라는 계란에서는 현재 *Salmonella Enteritidis*가 가장 대표적이며, 돼지에서는 주로 *Salmonella Typhimurium*이 원인균으로 지목되고 있다.
- 다. 현재 개발되고 있는 살모넬라 저감제는 유기산을 제외하고는 생균제, 박테리오파지 등은 혈청형에 특이적으로 작용하며, 특히 박테리오파지는 사용 후 바로 저항성을 가지는 살모넬라가 출현하는 것으로 알려져 있어, 장기적인 대안이 될 수 없다.

라. 또한 지금까지의 많은 살모넬라 저감제는 모두 장내(장관 내강)의 살모넬라에만 작용하는 것으로, 실질적인 문제가 되는 몸 안의 대식세포에 감염되어 있는 세포내 감염 살모넬라를 직접 저감시키는 제품은 없으며, 단순히 장관 내강의 살모넬라를 저감시켜서 결과적으로 체내의 살모넬라를 억제하는 수준이다.

마. 이에 보다 안전한 축산물을 생산하기 위하여, 새로운 저감제의 개발이 필수적이다.

4. 참고 문헌

DRAFT FSIS Compliance Guideline For Controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in Raw Poultry (2015, FSIS).

Food and Drug Administration, 2009. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production, storage, and transportation. Final rule. Federal Register 74, 33029–33101. (Available at : <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2009-07-09/pdf/E9-16119.pdf>. (Accessed" 4th December 2017)

Controlling *Salmonella* in Poultry Production and Processing. CRC Press (2016). Available at: <https://www.crcpress.com/Controlling-Salmonella-in-Poultry-Production-and-Processing/PhD/p/book/9781138199163>. (Accessed: 4th December 2017)

Producing Safe Eggs Microbial Ecology of *Salmonella*.

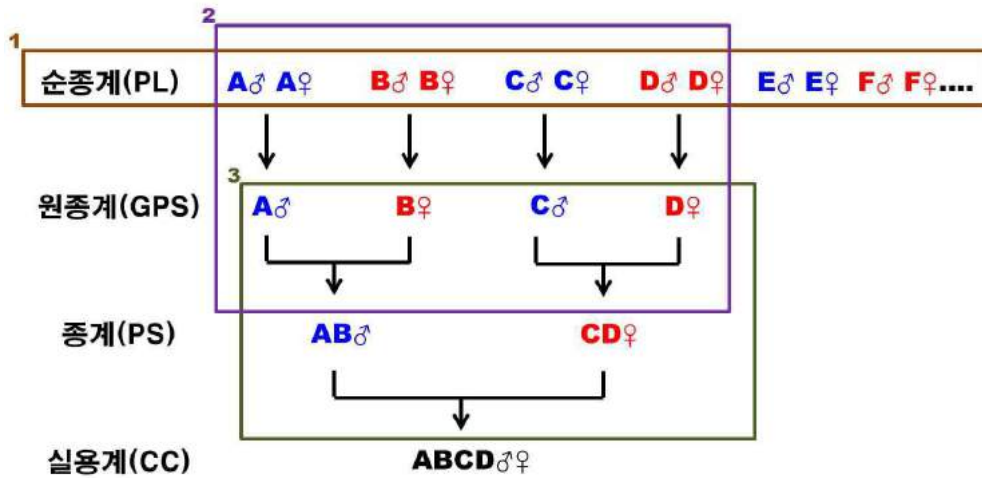
Gast, R. K. & Jones, D. R. Chapter 48 - *Salmonella* and Impact on Egg Production. in Egg Innovations and Strategies for Improvements (ed. Hester, P. Y.) 515–521 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-800879-9.00048-2

Producing Safe Eggs (Academic Press, 2017). Available at:

<https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128025826> (Accessed" 4th December 2017)

5. 용어 정의

가. 순종계, 원종계, 종계, 실용계 : 아래 그림 참조.



육계의 경우라면 실용계가 육계이며, 육계를 낳는 닭을 종계라고 하며, 종계를 낳는 닭을 원종계라고 하고 원종계를 낳는 닭을 순종계라고 한다.

산란계라면, 알을 낳는 산란계가 실용계이며, 산란계를 낳는 닭을 종계라고 하며, 종계를 낳는 닭을 원종계라고 한다.

나. 초생추 : 부화한지 얼마 안 되는 병아리

다. 육계 : 브로일로(broiler), 병아리를 비육시켜 육용으로 사용하는 닭

라. 산란계 : 산란용 목적의 닭

마. FSIS : 미국 농무부 산하 기관으로 정식 명칭은 USDA Food Safety and Inspection Service 이다. 식품의 안전과 검사를 담당한다. 흔히 식품안전검사청이라고 불린다. 2016년 12월 가금류의 살모넬라 제어에 대한 가이드라인을 발표했다.

바. 살모넬라 저감 면역조절제 : 살모넬라 저감제로 개발된 면역조절제를 의미하며, 본 매뉴얼에서는 구체적으로는 “안전한 축산물 생산을 위한 농장 단계의 살모넬라 제어모델 개발”과 제에서 개발된 『강황(생물전환)산물』 또는 『미강(생물전환)산물』을 의미한다.

6. 개요 및 배경

살모넬라에 의한 식중독을 줄이기 위해 전세계적으로 살모넬라 저감 대책에 대한 가이드라인이 제시되고 있다. 특히 미국에서는 농무부 산하 FSIS에서 2015년 12월에 “가금류의 살모넬라와 캄필로박터 제어를 위한 준법 가이드라인 초안(DRAFT FSIS Compliance Guideline For Controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in Raw Poultry)”이라는 가이드라인을 발표했다. 이 가이드라인은 살모넬라를 저감하기 위한 도축전, 도축장, 도축후의 조치에 대해서 자세히 언급하고 있다.

이 가이드라인에서 살모넬라의 저감에 대하여 주로 방역과 소독을 중점적으로 다루고 있으나, 농장내 살모넬라 저감제에 대해서도 정보를 제공하고 있다. 하지만 자료를 살펴보면 현재까지 개발된 살모넬라 저감제중에서 세포내 감염 살모넬라를 효과적으로 조절할 수 없다는 것을 알 수 있다.

FSIS에서 제안한 살모넬라 저감제의 종류 및 특성

정의	사용시 주의점
<p>백신: 살모넬라에 대한 면역을 증가시킴. 생백신은 사백신 혹은 subunit 백신에 비하여 다양한 면역반응을 일으킬 수 있음. 이외에도 박테리오 파지나, 자가백신을 사용할 수도 있다.</p>	<p>미국내에서는 중추에 대해서는 오직 약독화생백신만이 사용이 가능하다. 사백신이나, subunit 백신은 일회 접종으로는 어렵고 여러번의 부스팅이 필요하기 때문에 짧은 기간 사육하는 육계에서는 효과가 없는 것은 아니지만, 효과가 제한되는 것은 사실이다. 자가백신을 여러 flock에 이용하기 위해서는 APHIS에서 허가를 받아야 한다.</p> <p>일부 백신은 살모넬라의 prevalence가 약 9% (1~2 log)로 줄어들었으며, 백신 후에 살모넬라 공격접종에서 살모넬라를 2~3 log 감소시키는 것으로 확인되었다.</p>
<p>경쟁적 배제제 & 프로바이오틱스</p>	<p>일부 제품은 초생추에게 사용하여 건강한 장내 균총을 확립하는데 도움을 줄 수 있다. 일부 제품은 물이나 사료에 첨가하여 종계나 중추 모두에게 사용할 수 있으며, 일생동안 사용하여 병원균에 대한 생균제의 경쟁력을 증가시킬 수 있다. 유익균의 효과를 위해서는 항생제의 사용을 제한해야 한다.</p> <p>한 연구에 따르면 경쟁적 배제제는 살모넬라 공격접종시 살모넬라를 92% 감소시킬 수 있었다.</p>
<p>프리바이오틱스</p>	<p>종계와 중추에 모두 사용할 수 있으며, 가장 일반적인 성분은 효모 유래 베타글루칸이나, MOS(만난올리고당)이다.</p> <p>한 연구에 의하면 프리바이오틱스에 의하여 살모넬라 공격접종시 살모넬라를 34% 감소시킬 수 있었다.</p>
<p>유기산: 장의 활성을 증가시키며, 살모넬라나 캄필로박터를 죽일 수 있다. 박테리아 종마다 유기산에 대한 민감도가 다르기 때문에 병원균에 대해 경쟁하는 유익균의 활성을 증가시킨다.</p>	<p>사료나 음수에 타서 섭취시킬 수 있으며, 종계와 중추 모두 사용이 가능하다. 특히, 사료를 제한하는 경우 가금류들은 깔짚을 쪼고 병원체를 섭취할 수 있으므로, 음수에 유기산을 타서 주는 것이 매우 중요하다. 유기산을 물에 타서 주면 곡물의 pH가 낮아져서 병원체가 집락화를 이루고 성장하는 것을 방해한다.</p> <p>한 종설논문(review article)에서 대부분의 유기산이 약 1 log에 이르는 살모넬라 감소 효과를 보여주었다.</p>

미국의 FSIS 가이드라인은 위의 제품을 각 농장의 상황에 맞게 선택해서 사용하는 것을 권장한다.

7. 농장적용 살모넬라 저감제 선택 및 사용 매뉴얼

본 매뉴얼은 FSIS의 가이드라인을 참고하고, “안전한 축산물 생산을 위한 농장단계에서의 살모넬라 제어 모델 개발” 과제에서 도출된 살모넬라 저감제를 포함하도록 작성되었다.

가. 살모넬라 저감제 선택 기준

(1) 살모넬라 감염이 확인되지 않는 단계.

	사용가능한 제품	주의사항
살모넬라 저감 면역조절제	○	살모넬라 1 log 정도 감소, 타 제품(바실러스)과 동시 사용할 경우, cumulative 효과 나타냄.
유기산	○	장내 살모넬라 1 log 정도 감소. 예방적 차원으로 섭취시 섭취량이 줄어들기 때문에 효과에 대한 판단이 어려움
경쟁적 배제제	○	효과는 있으나, <1 log 미만으로 판단됨. 많은 양을 섭취시켜야 함. 일반적으로 경쟁적 배제제 및 프로바이오틱스는 장내 살모넬라 균의 감소에는 도움이 되지만, 감염이후 몸 안의 살모넬라 감소에는 예방효과가 없음.
프리바이오틱스	○	MOS를 사료에 첨가할 경우 살모넬라 저감 효과가 있다고 알려짐. 효과는 크지 않음.
에센셜 오일	○	FSIS 가이드라인에 포함되어 있지 않음. 효과가 미약하다고 판단됨. 일반적으로 혈청형에 따라서 효과가 다르게 나타남.
백신	○	현재 가금류의 SG의 백신이 SE의 교차방어 효과가 있다고 판단됨.
박테리오파지	X	예방적 차원으로는 사용하기 어렵고 장기적 사용할 경우, 내성이 있는 변이형이 나타날 가능성이 높음
항생제	X	항생제는 내성균 문제로 사용하기 어려움.

(2) 살모넬라 감염이 의심되는 단계

	사용가능한 제품	주의사항
살모넬라 저감 면역조절제	○	살모넬라 1 log 정도 감소, 타 제품과 동시 사용할 경우, cumulative 효과 나타냄.
유기산	○	장내 살모넬라 1 log 정도 감소.
경쟁적 배제제	○	효과는 있으나, <1 log 미만으로 판단됨. 많은 양을 섭취시켜야 함.
프리바이오틱스	○	MOS를 사료에 첨가할 경우 살모넬라 저감 효과가 있다고 알려짐. 효과는 크지 않음.
에센셜 오일	○	FSIS 가이드라인에 포함되어 있지 않음. 효과가 미약하다고 판단됨. 일반적으로 혈청형에 따라서 효과가 다르게 나타남.
백신	○	현재 가금류의 <i>S. Gallinarum</i> 의 백신이 <i>S. Enteritidis</i> 의 교차방어 효과가 있다고 판단됨.
박테리오파지	○	질병의 치료 목적으로 단기적으로 사용가능함.
항생제	○	항생제 사용가능하지만 신중한 사용이 요구됨. 수의사의 처방이 필요함.

(3) 살모넬라 감염후 예방단계

살모넬라 감염이후 예방단계에서

	사용가능한 제품	주의사항
살모넬라 저감 면역조절제	○	살모넬라 1 log 정도 감소, 타 제품(바실러스)과 동시 사용할 경우, cumulative 효과 나타냄. 감염이후 몸 안에 살모넬라가 숨어있을 가능성이 높으므로 반드시 사용 하기를 권장함.
유기산	○	예방적 차원으로 섭취시 섭취량이 줄어들기 때문에 효과에 대한 판단이 어려움
경쟁적 배제제	○	효과는 있으나, <1 log 미만으로 판단됨. 많은 양을 섭취시켜야 함.
프리바이오틱스	○	MOS를 사료에 첨가할 경우 살모넬라 저감 효과가 있다고 알려짐. 효과는 크지 않음.
에센셜 오일	○	FSIS 가이드라인에 포함되어 있지 않음. 효과가 미약하다고 판단됨. 일반적으로 혈청형에 따라서 효과가 다르게 나타남.
백신	○	현재 가금류의 <i>S. Gallinarum</i> 의 백신이 <i>S. Enteritidis</i> 의 교차방어 효과가 있다고 판단됨.
박테리오파지	X	예방적 차원으로는 사용하기 어렵고 장기적 사용할 경우, 내성이 있는 변이형이 나타날 가능성이 높음
항생제	X	항생제는 내성균 문제로 사용하기 어려움.

나. 개발된 살모넬라 저감 면역조절제의 적정 사용량

(1) 살모넬라 감염 확인 혹은 증상이 없을때

섭취량 : 2.5mg/kg

2.5mg/kg의 섭취량은 현재 동물실험으로 확인된 바에 의하면 2.5mg/kg 수준으로 계속 섭취시킬 경우, 살모넬라의 감염에 대한 효과도 나타날 뿐만 아니라 살모넬라 감염시 10mg/kg 수준으로 사용할 경우 살모넬라 저감 효과가 뛰어났다. 하지만 감염전에 사용하지 않은 경우에는 40mg/kg 수준으로 높은 함량의 제품에서만 우수한 효과가 나타났다. 40mg/Kg은 단기간이 아니라면 경제성이 맞지 않으므로 2.5mg/Kg의 섭취량으로 사용하는 것이 타당하다고 하겠다.

뿐만 아니라, 이 섭취량은 현재 판매되고 있는 제품의 권장섭취량과 같으며, 이 섭취량에서 농가의 생산성이 증가하여, 양돈농가에서는 ROI가 3~5 이상이라고 판단되고, 양계농가에서는 비록 ROI가 이 보다는 낮은 편이지만, 살모넬라 이외의 다른 질병에 대한 면역력도 증가되므로 충분히 사용할 만한 경제성을 갖추고 있다고 판단된다.

(2) 살모넬라 감염 증상이 나타날 때

섭취량 : 10mg/Kg 혹은 40mg/Kg

이미 2.5mg/kg로 섭취를 해왔다면 10mg/Kg의 섭취량으로도 어느 정도 방어가 된다고 판단된다. 살모넬라가 감염되면 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'로는 빠르게 살모넬라의 shedding을 억제하기 어렵기 때문에 수의사의 처방에 의해 장관 내강의 살모넬라에 대응할 수 있도록 다량의 유기산 제품이나, 항생제를 투여할 수 있다. 항생제를 투여할 경우, 면역조절제는 일반적으로 antibiotics adjuvant로도 기능을 하며, 균을 빠르게 탐식작용으로 제거할 수 있으므로 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'를 같이 섭취시키는 것이 바람직하다.

(3) 치료이후

섭취량 : 2.5mg/kg

살모넬라의 감염이 치료된 이후에는 살모넬라가, 분변으로는 검출되지 않지만, 몸 안의 장기에는 장기간 남아있을 수가 있고, 치료가 끝나고 항생제나 유기산의 효과가 사라지면, 살모넬라가 재발할 가능성이 높다. 이를 위해서는 지속적으로 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'를 섭취시킬 필요가 있다.

다. 개발된 살모넬라 저감 면역조절제의 사용방법

(1) 살모넬라 저감 면역조절제의 혼합

- ① 살모넬라 저감 면역조절제를 최종제품은 1kg을 사료 1 ton과 혼합해서 사용하는 제품과, 제품 1 kg을 사료 10 ton에 희석하는 제품으로 나뉜다.
- ② 1kg을 1톤으로 희석하는 것은 농가에서 직접 혼합기를 통해서 희석이 가능하지만, 1kg을 10톤 사료로 희석하는 것은 사료회사에서 미리 혼합하지 않으면 농가에서 혼합하기는 어렵다.
- ③ 1kg을 10톤으로 혼합하는 경우, 1차로 제품 1kg을 사료 9kg과 혼합 (10배 희석)후, 혼합된 10kg을 다시 10톤에 혼합하는 것이 바람직하다.

(2) 혼합시 주의사항

- ① 가루사료로 혼합해야 하며, 펠릿 사료를 이용해서 혼합하면 안 된다.
- ② 음수에는 혼합할 수 없다.
- ③ 유익균이 포함되어 있으므로 높은 온도에서 장시간 방치되면 안 된다. (80도 이상에서 보관되면 안 되므로, 여름철 사료빈의 온도 확인 필요)

라. 개발된 살모넬라 저감 면역조절제를 우선적으로 고려할 수 있는 상황

- (1) 항생제 내성을 가진 살모넬라에 감염되었을 때
- (2) 장기간 살모넬라에 반복적으로 감염될 때
- (3) 양돈농장의 경우 PRRS등의 만성소모성질환에 감염되어 가축의 면역력이 매우 낮아졌을 때
- (4) 박테리오파지를 사용한 이후에 살모넬라증이 재발했을 때

마. 개발된 살모넬라 저감 면역조절제의 장점

- (1) 몸 안의 살모넬라를 직접 제거할 수 있는 유일한 제품이다.
- (2) 항생제 내성균(살모넬라)에서도 효과가 나타난다.
- (3) 기존의 다른 제품들과 효과가 누적된다.
- (4) 가축의 만성소모성질환의 피해를 경감시켜 준다.
- (5) 장기간 사용해도 생산성의 감소가 없고, 오히려 가축의 면역력 개선으로 생산성이 증가한다.

8. 향후 살모넬라 저감대책 방향 제안

본 살모넬라 저감제 매뉴얼은 “안전한 축산물 생산을 위한 농장단계에서의 살모넬라 제어 모델 개발” 과제를 통해서 도출된 살모넬라 저감제의 효능과 경제성을 바탕으로 설정된 것으로, 돼지 및 닭을 이용한 현장실험과 마우스를 이용한 동물실험결과를 종합하면, 대략 1~2 log 정도 살모넬라를 저감할 수 있다고 판단된다. 이는 기존에 알려진 유기산 보다 우수한 효과이며, 어떤 의미에서는 거의 백신의 효과와 유사한 수준이다. 특히 몸 안의 면역세포(특히 대식세포) 안에 숨어있는 살모넬라를 제거하는데 있어서 혈청형과 관계없이 효과를 보인다는 점에서 상황에 따라서는 백신보다 우수한 효과를 보일 수 있다. 이에 앞으로 효능에 대한 더욱 철저한 검증이 필요하며, 살모넬라를 저감시키기 위한 노력을 하는 일부 농가가 살모넬라 저감제의 사용에 따른 경비 지출로 경제적으로는 불이익이 될 수 있다는 점에서 국가가 적극 다양한 방면으로 지원할 필요성도 있다고 판단된다.

유럽연합, 일본, 캐나다 등에서도 HACCP에 의한 축산식품위생관리가 제도적으로 마련되어 있고, 스웨덴의 경우 1953년 대규모 살모넬라 집단 감염 이후에 1961년 매우 적극적이고 체계적인 조치를 통해서 살모넬라를 거의 완전히 제거했다고 할 수 있다. 그 이후 스웨덴은 1990년 매우 공격적인 프로그램으로 모든 산란계에서 살모넬라를 제거하는 조치를 취했다. 약 90% layer flock에 대해서 도축전, 자발적으로 pooled fecal sample 에 대해서 살모넬라 검사를 실시하고, 만약 *Salmonella* Enteritidis가 검출되면 살모넬라가 검출된 breeder flock을 살처분했으며, 이 조치는 확대되어 산란장과 중추에 대해서 검사가 진행되었으며, *Salmonella* Enteritidis 뿐만 아니라 모든 살모넬라에 대해서 수행되었다. 뿐만 아니라 해외에서 수입되는 원종계(grandparent chicken)에 대해서도 살모넬라 검사를 실시했다.

뿐만 아니라, 스웨덴은 산란계에서 계란으로 살모넬라가 전파되는 것을 막기 위하여 다양한 조치를 취했다. 산란계를 키우는 동안 사용하는 사료는 모두 열처리를 해야만 했으며, 현재 스웨덴에서 열처리한 사료는 점차 일반화되고 있다. Wierup에 따르면 이러한 조치들로 인하여 스웨덴은 1972년 이후 지금까지 살모넬라가 육계에서 검출되지 않았다.

살모넬라를 저감하고 효과적으로 관리하기 위해서는 백신과 항생제를 사용은 권장되지 않는다. 백신을 하면, 항체검사를 통해서 살모넬라의 감염을 확인할 수 없으며, 일부 개체가 감염되었을 경우 확인하기가 더욱 어려워진다. 항생제는 비록 살모넬라가 저감되는 효과가 있지만, 몸 안의 면역세포에 감염되어 있는 살모넬라를 통제하기 어렵고, 항생제 내성균이 발생할 가능성이 있는 등 단점이 많아서 일차적인 조치로는 권장하지 않는다. 유럽에서는 Zoonosis Directive 라는 조치를 통해서 육계와 산란계에서 살모넬라를 통제하려고 시도했었다. 하지만 대부분의

EU 국가에서는 백신 혹은 항생제 혹은 두 가지를 모두 기본적인 살모넬라 저감 방법으로 허용하지 않는 Directive를 받아들이지 않은 상태이지만, 앞으로는 아마도 점차 스웨덴, 덴마크, 네덜란드와 같은 방향으로 나아갈 것으로 예상된다.

살모넬라 양성 계군의 살처분 비용을 비롯하여 살모넬라의 억제를 위해서 드는 비용은 약 1420만 달러(한화 약 160억원)으로 추산되었다. 이 비용은 오로지 생산자와 판매자가 부담하는 것이며, 최종적으로는 소비자가 부담하게 되지만, 농장간의 가격경쟁력에는 불리하게 작용할 수 있으므로 이를 위해서는 국가단위의 결정이 필요할 것으로 생각된다.

우리나라도 결국 축산선진국이 되기 위해서는 살모넬라 Free 단계에 이르는 것을 목표로 해야 하며, 이러한 단계에 이르기 위해서는 사실상 북유럽의 국가들처럼 살모넬라가 발견되면 그 집단을 모두 살처분하는 등의 전략도 고민해야 한다. 하지만 이러한 조치를 취한다고 해도, 아주 낮은 수준의 살모넬라는 감염될 수 있기 때문에 살모넬라가 문제를 일으키는 수준에 이르기 전에 모니터링을 통해서 제거할 수 있어야 하며, 또한 일단 감염된 살모넬라는 가금류나 돼지의 몸 안에 오랫동안 살아있을 수가 있기 때문에, 몸안의 살모넬라를 제거할 수 있는 살모넬라 저감제가 필수적으로 사용되어야 한다.

새로 연구개발된 “세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제”는 낮은 농도의 살모넬라 감염에도 효과적으로 대처할 수 있을 것으로 판단되며, 유기산이나 생균제 등과 같이 사용할 경우, 전혀 작용기전이 달라 그 효과가 누적(cumulative) 효과로 나타나는 것으로 판단된다.

이러한 저감제의 효과는 앞으로 살모넬라 저감 대책에 있어서 획기적인 전환이 될 수 있다고 생각된다. 장관 내강에 존재하는 살모넬라에 사용할 수 있는 살모넬라 저감제와 몸 안의 세포내 감염 살모넬라에 작용할 수 있는 살모넬라 저감제를 동시에 사용할 경우, 살모넬라가 면역세포 안에서 숨어서 생존할 가능성은 완전히 제거할 수는 없지만, 살모넬라를 현저하게 줄여줄 수 있으며 무엇보다, 다른 제품과는 달리, 낮은 cfu로 숨어있는 살모넬라를 제거하는데도 효과적이기 때문이다.

앞으로 전국적인 단위로 살모넬라의 저감 대책을 마련하기 위해서는 특히 계란에서의 살모넬라의 감염의 억제를 위한 추가적인 연구 등이 절실하다고 판단된다.

10절. 농림식품부 정책부서에 정책안 제안

1. 정책안 제안배경 요약

살모넬라는 국내 식중독 원인균의 하나로 2014년 한 해만 24건의 살모넬라 식중독을 일으켰으며, 1416명의 환자가 발생했다. 하지만 살모넬라로 확진되는 경우는 미국 내에서도 매우 드물며, 통상적으로 발생된 식중독 건수 중 1~5%만 보고하는 것으로 판단되므로 그 위험성을 무시할 수 없다.

살모넬라 식중독을 억제하기 위해서는 도축전, 도축과정, 도축후로 나누어서 관리해야 하며, 이 중 도축전 가축의 살모넬라 감염이 가장 중요한 위험인자이며, 이를 통제할 스웨덴은 1991년 이후 살모넬라 식중독 사고가 발생하지 않았다.

살모넬라 감염을 통제하기 위해서는 무엇보다 방역과 위생관리가 중요하지만, 살모넬라가 상대적으로 만연하고 있는 국내의 사정상 일단 살모넬라에 노출되어 있다고 판단되는 가축에 대한 살모넬라 저감제의 개발과 이에 기초한 매뉴얼의 보급은 매우 시급하고 중요한 문제이다.

기존의 살모넬라 저감제는 크게 가축의 몸 안의 세포내 감염 살모넬라에 작용할 수 있는 백신과 같은 제품들과 가축의 장관 내강에서 살모넬라에 작용하는 유기산, 경쟁적 배제제, 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 등이 있다. 특히 항생제의 경우 가축의 장관 내강 및 몸 안의 살모넬라를 제어하는 데 사용할 수 있으나, 몸 안의 살모넬라는 세포내에 존재하고 있어 항생제는 효과 면에서 크게 떨어진다.

가축의 몸 안에서 세포내 감염 살모넬라에 작용할 수 있는 항생제는 예방적 차원에서 사용하기에 각각 문제점과 한계점이 있으므로 실질적으로는 세포내 감염 살모넬라에 대처할 수 있는 것은 백신이 유일하나, 모든(광범위한) 인수공통 살모넬라에 대응할 수 있는 백신은 아직 개발되어 있지 않아, 몸 안으로 들어와 세포내에서 생존 및 증식하고 있는 살모넬라에 대해 모든(광범위한) strain에 작용할 수 있는 살모넬라 저감제는 전무한 상황이다.

이에 (주)에스티알바이오텍은 농림축산식품연구개발사업 지정공모과제인 “안전한 축산물 생산을 위한 농장단계에서의 살모넬라 제어 모델 개발”의 연구결과를 바탕으로 세포내 감염 살모넬라의 저감에 효과가 탁월한 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’를 개발하였으며, 이에 대한 활용 방안을 정부에 제안하고자 한다.

2. 세포내 감염 살모넬라 저감제의 필요성

가. 살모넬라 식중독 현황

year	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
살모넬라 식중독 (총 환자수)	42 (1497)	22 (387)	17 (477)	27 (677)	24 (1065)	9 (147)	13 (690)	24 (1416)	11 (197)

한국에서는 대략 매년 200~300건의 식중독사고가 발생한다. 이전 연구에서 1993~1996년 사이에서는 가장 많은 식중독 사고를 일으킨 원인균으로 원인이 밝혀진 경우의 55.1%가 살모넬라에 의한 것이었다. 최근에는 살모넬라에 의한 식중독은 점차 감소하고 있는 추세이며, 식중독 사고의 0.03%만이 살모넬라에 의한 것으로 노로바이러스, pathogenic E coli, 캄필로박터에 미치지 못한다.

Table 3.5 Food-Borne Pathogens and Vehicles Related to Food-Borne *Salmonella* Outbreak due to Livestock or Livestock Products Between 2007 and 2012 in Korea

Pathogen	Number of Outbreaks	Vehicle	Outbreak Place
<i>Salmonella</i> Enteritidis	15	Meatball, Minister's head, Jajang-myeon (meat), egg, stir-fried glass noodles and vegetables (meat, egg), Gimbap (egg), rolled omelet, Gimbap, potato salad (egg), steamed egg, broiled quail eggs	Gyeonggi, Gyeongbuk, Seoul, Jeonnam, Chungnam, Chungbuk, Jeju
<i>Salmonella</i> Thompson	2	Gimbap (egg)	Gyeonggi
<i>Salmonella</i> Typhimurium	2	Meatball (egg), Gimbap (egg)	Seoul, Chungnam
<i>Salmonella</i> D group	2	Pork	Jeonnam
<i>Salmonella</i> B group	1	Egg	Gangwon
<i>Salmonella</i> Schleissheim	1	Rolled omelet	Chungnam
<i>Salmonella</i> Montevideo	1	Sweet and sour pork	Seoul
<i>Salmonella</i> Newport	1	Sliced raw beef bibimbap	Jeonnam
Total	23		

Data from KCDC (Korea Centers for Disease Control and Prevention), 2015.

나. 현재 살모넬라 저감 조치의 단점 및 문제점

미국 농무성(USDA) 산하 FSIS(Food Safety and Inspection Service, FSIS)는 식육, 가금육 및 계란의 안전성과 적절한 표시를 확보하기 위한 검사, 가공공장의 안전성 기준 설정, 위해 평가, 식육(食育) 등을 실시하는 조직으로 “미국 식품안전검사국”이라고 부른다. FSIS는 2015년 12월 Controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in Raw Poultry라는 제목의 가이드라인 초안을 발표했다³⁾. 이 가이드라인은 가금류 농장에서 HACCP와 관련하여 살모넬라의 저감방법에 대한 방법을 제공하고 있다. 비록 가금류 농장의 살모넬라 통제에 관련된 자료이지만, 대부분의 가축에 대해서도 이 가이드라인을 참고할 필요가 있다고 판단된다. 가이드라인의 대부분의 내용은 예방조치에 대한 것이며, 일부는 intervention use에 대한 내용이 포함되어 있다. 이에 따르면, 저감조치에 사용되는 많은 물질들중 우수한 효과를 나타내는 것은 없으며 가장 우수하다고 알려진 유기산 조차도 1 log를 줄이는 정도에 불과함을 알 수 있으며, 이에 이 가이드라인은 여러가지 물질(방법)을 조합해서 살모넬라를 저감시켜야 한다고 제안하고 있으나 1 log 이상을 줄이지 못하고 있는 실정이다.

가이드라인의 살모넬라 저감제에 대한 평가 부분을 요약하면 아래와 같다.

정의	평가
백신	일부 백신은 살모넬라의 prevalence가 약 9% (1~2 log)로 줄어들었으며, 백신 후에 살모넬라 공격접종에서 살모넬라를 2~3 log 감소키는 것으로 확인되었다.
경쟁적 배제제 & 프로바이오틱스	유익균의 효과를 위해서는 항생제의 사용을 제한해야 한다. 한 연구에 따르면 경쟁적 배제제는 살모넬라 공격접종시 살모넬라를 92% 감소시킬 수 있었다.
프리바이오틱스	한 연구에 의하면 프리바이오틱스에 의하여 살모넬라 공격접종시 살모넬라를 34% 감소시킬 수 있었다.
유기산	한 종설논문(review article)에서 대부분의 유기산이 약 1 log에 이르는 살모넬라 감소 효과를 보여주었다.

3) <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/regulatory-compliance/compliance-guides-index>

(1) 살모넬라 저감제의 문제점

① 백신 및 항생제의 제한사항

㉠ 백신의 장단점

살모넬라를 억제하기 위해서는 크게 백신, 항생제, 살모넬라 저감제의 3가지를 생각할 수 있다. 이중 백신과 항생제는 문제를 오히려 복잡하게 할 수 있다는 점에서 신중하게 접근해야 한다.

백신은 유럽에서의 허가사항만 봐도, 일부 국가는 가금류에 필수적으로 사용해야 하며 (오스트리아, 벨기에, 체코공화국, 독일 및 헝가리), 일부 국가는 권장(불가리아, 시프러스, 에스토니아, 프랑스, 그리스, 이탈리아, 라트비아, 리투아니아, 네덜란드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 슬로바키아, 슬로베니아, 스페인 및 영국)하며, 일부 국가는 사용이 금지(덴마크, 핀란드, 스웨덴 및 아일랜드)되어 있다⁴⁾. 이는 백신을 사용할 경우 같은 혈청형이 아니라면 부분적인 방어 밖에 되지 않고, 만성적인 감염상태에서 오히려 관리가 안 될 가능성이 있기 때문이다. 병아리에서 백신은 혈청형 간에 교차방어가 잘 되지 않지만, *S. Enteritidis* 와 *S. Typhimurium* 사이에서는 교차방어가 어느 정도 잘 일어난다고 알려져 있다⁵⁾. 일반적으로 살모넬라가 만연되어 있다고 생각되면 백신은 좋은 선택이 될 수 있다. 그러나 반대로, 살모넬라의 위험이 낮은 국가에서는 오히려 살모넬라의 백신을 금지시킨다. 이는 백신을 접종하면 계군내에서 살모넬라가 감염되어도 파악하기 어렵고 항체 등을 통한 예찰도 불가능해지기 때문이다. 살모넬라 백신은 살모넬라가 세포내 감염되는 미생물이기 때문에 효과적으로 방어하기 위해서는 항체 면역이 아니라, 세포성 면역을 유도해야 한다. 백신은 생백신과 사백신으로 나눌 수가 있으며 일반적으로 생백신이 효과가 더 우수하지만, 오랜 기간 동안 약독화시켜야 하므로 새로운 혈청형에 대해서는 대응하기 어렵다는 단점이 있다. 앞으로 사백신과 어쥬번트의 연구가 지속되어야 할 분야이기도 하다.

4) Galis, A., Marcq, C., Marlier, D., Portetelle, D., Van, I., Beckers, Y., Thewis, A., 2013. Control of *Salmonella* contamination of shell eggs - preharvest and postharvest methods: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 155-182.

5) EFSA, 2004. The use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *EFSA J.* 114, 1-74.

㉔ 항생제의 문제점

살모넬라에 대해서는 분변에서의 살모넬라를 억제하기 위해서 항생제가 널리 사용되었다. 일반적으로는 소와 비교해서는 닭에서의 살모넬라 저항성은 큰 문제가 되지 않았지만, 최근 들어서 페니실린계나, 플루오로퀴놀론계열의 항생제에 대한 다재내성균 살모넬라가 발견되고 있어 문제가 심각해지고 있다. 특히 우리나라에서도 육계에서는 사육의 초기에 항생제를 예방적 차원으로 사용하기도 한다. 이러한 관행이 위험한 것은 이 과정에서 사용하는 테트라사이클린, 암피실린, 클로람페니콜은 살모넬라의 저감에 큰 효과가 없을 뿐만 아니라, 항생제를 중단할 경우, 장내의 미생물이 일시에 성장하면서 오히려 살모넬라가 증가되는 부작용이 있을 수가 있다⁶⁾.

1980년대 이후로 퀴놀론계 항생제가 많이 사용되었고 그 이후로 항생제 저항성이 증가하고 있다. 특히 E. coli의 플라스미드에 있는 내성유전자가 살모넬라에 전달될 수 있으며, 결국 nalidixic acid에 대한 저항성이 증가하고 있다⁷⁾. 이러한 문제로 인하여 영국내에서는 항생제 사용이 금지되어 있다. 살모넬라는 증상이 없어도 감염되어 있는 경우가 있으며, 이 경우 다른 질병을 치료하기 위해서 항생제를 사용하면 항생제 내성이 생길 수가 있으므로 항생제는 매우 신중하게 사용해야 한다.

국내에서도 예전에는 가축의 성장을 촉진할 목적으로 사용하는 사료첨가용 항생제인 타일로신이나, nitrovin이 사용되었으나, 현재는 금지되어 있으므로 더 이상 문제가 되지는 않지만, 아직도 일부 농가에서는 사료첨가용 항생제를 음성적으로 사용하는 것으로 알려져 있다. 사료첨가용 항생제는 일반적으로 오히려 분변내 살모넬라 배출을 증가시키는데, 이는 항생제가 장내 균총의 성장을 억제하기 때문에 비록 살모넬라의 성장도 억제되지만, 다른 균들도 성장이 억제되어 오히려 살모넬라에게는 상대적으로 좋은 조건이 형성되기 때문이다⁸⁾.

결론적으로 항생제는 살모넬라 억제에 있어서 최후의 수단이 되어야 하며, 가능하면 사용하지 않는 것이 바람직하다.

6) Smith, H.W., Tucker, J.F., 1975. The effect of antibiotic therapy on the faecal excretion of *Salmonella* Typhimurium by experimentally infected chickens. J. Hyg. 75 (2), 275-292.

7) Piddock, L.J., Wray, C., McClaren, I., Wise, R., 1990. Quinolone resistance in *Salmonella* spp: veterinary pointers. Lancet 336 (8707), 125.

8) Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, F., 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. Emerg. Infect Dis. 5 (3), 329-335 Review.

(2) 기존 살모넬라 저감제들의 문제점

현재까지 사용되는 살모넬라 저감제(항생제는 제외)의 공통적인 특징은 모두 장관 내강의 살모넬라만 저감할 수 있다는 것이다.

계란의 살모넬라 감염은 달걀껍질에서부터 계란의 안쪽으로 침입하는 경우도 있지만, 난소와 난관이 살모넬라에 의해서 감염되어 계란의 내부가 감염되었을 가능성이 더 크다. 현재까지는 장관 내강에서의 살모넬라의 집락화(colonization)을 억제해서 몸 안의 생식기관으로 이동하는 살모넬라를 줄이는 전략을 사용하고 있다.

① 유기산

유기산은 사료나 음수의 살모넬라 오염을 제거하여, 가축의 살모넬라 감염을 저해하기 위해 사료나 음수에 혼합하여 사용한다. 또한, 이미 장관에서 집락화를 이루고 있는 살모넬라에 대해서도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 유기산은 살모넬라의 세포막을 통과하여 세포질에서 해리되게 되고 그 결과 세포안에서 음이온이 축적되면서 세포독성을 나타낸다. 부틸산(butylate)는 10mmol/L의 낮은 농도에서도 SPI-1의 주요한 조절유전자인 *hilA*의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다.

하지만 유기산의 경우 물에 녹아야 효과가 있고 온도에 따라서 효과가 다르다고 알려져 있기 때문에 건조하게 보관되는 사료에서는 오히려 큰 효과를 볼 수가 없어서 주로 음수에 타서 섭취시키는 것이 좋다. 하지만 섭취된 유기산은 장관에서 흡수되기 때문에 맹장으로 잘 전달되지 않는다. 특히, 맹장은 장관에서 살모넬라가 상피세포를 통해서 몸 안으로 침입하는 주요 경로이기 때문에 유기산으로 몸안의 살모넬라를 제거하는 데는 무리가 있다. 이 문제를 해결하기 위해서는 새로운 formulation 연구를 통해서 바로 장관에서 흡수되지 않고 맹장까지 유기산을 전달할 수 있는 방법을 찾아야 한다. 일 예로, 코팅된 부틸산은 분변내의 살모넬라 shedding이 저감되고, 맹장에서의 살모넬라 집락화가 줄어들지만 코팅되지 않은 일반 부틸산은 그러한 효과가 전혀 없었다. 개발되는 방법에 따라서 유기산의 효과에 많은 차이가 나기 때문에 이에 대한 연구는 가능성을 보여준 단계라고 할 수 있다⁹⁾. 음수에 유기산을 혼합하는 경우, 부틸산은 강한 냄새 때문에 사용할 수 없다. 다른 해결책으로 장내미생물에 의해서 부틸산으로 분해될 수 있는 유기산이나, 혹은 유기산을 생산할 수 있는 박테리아를 사용하는 것이다.

9) Van Immerseel, F., Atterbury, R.J., 2013. Other approaches to infection control. In: Barrow, P.A., Methner, U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*, vol. 2. CAB International, Oxfordshire, pp. 518-535.

② Prebiotics

Prebiotics는 소화되지는 않지만, 숙주의 장관내에 존재하는 미생물중 선택적인 특정한 미생물의 성장이나 활동성을 자극할 수 있는 사료성분이다. 일반적으로 프리바이오틱스는, 올리고당, 혹은 다당체로, 락토즈, 락툴로즈, 프럭토올리고당, 갈락토올리고당, 및 아라비노 자일로당과 같은 것이 대표적이다. 자일로올리고당은 장내에서 부틸산을 생산하는 박테리아(Clostridial cluster XIVa bacteria)를 자극해서 육계의 살모넬라 집락화를 줄일 수 있다.

③ 프로바이오틱스 및 CE 제품

일반적으로 축산에서 프로바이오틱스로 널리 사용되는 균은 Lactobacillus, Enterococcus, Pediococcus 및 바실러스 속(genera)이며, 이외에 효모(Saccharomyces)도 사용된다. 초생 추 병아리들은 장내 유산균의 종류도 단순하고 숫자도 적지만 시간이 지나면서 다양해진다. 이 과정에서 특히 살모넬라에 취약하기 때문에 CE를 사용하여 미리 좋은 유익균이 장내에 정착하도록 도와준다.

CE는 크게 nondefined와 defined 제품으로 구분할 수 있으며, non-defined 제품은 효과가 좋으나, 생산 배치별 차이가 심하기 때문에 앞으로는 defined CE가 주로 개발될 것으로 예상된다.

④ 박테리오파지

박테리오파지는 박테리아를 잡아먹을 수 있는 자연의 포식자라고 할 수 있다. 하지만 박테리오파지에 대한 가능성 자체는 항생제가 개발되기 전부터 기대되었으나, 아직도 그다지 우수한 제품이 나오고 있지 않으며, 스트레인에 특이적이기 때문에 예방적인 차원에서 사용하기에는 무리가 있다. 뿐만 아니라, 박테리오파지는 형질전환을 통해서 살모넬라에서 다른 살모넬라간의 DNA를 전달할 수 있어 오히려 병원성이 강한 미생물을 만들어낼 수 있는 잠재적인 위험을 가지고 있다. 뿐만 아니라 박테리오파지가 비록 살모넬라를 줄일 수는 있지만, 박멸할 수는 없다는 점에서 문제가 있다¹⁰⁾.

10) Van Immerseel, F., Atterbury, R.J., 2013. Other approaches to infection control. In: Barrow, P.A., Methner, U. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*, vol. 2. CAB International, Oxfordshire, pp. 518-535.

다. 살모넬라 저감제의 개선 방안

(1) 새로운 기전의 살모넬라 저감제 개발의 필요성

살모넬라의 가장 대표적인 특징은 '살모넬라는 세포내 감염 병원균으로, 대식세포에서 생존 및 증식이 가능하여 우리 몸 (사람 및 동물)의 면역체계를 약화시키고 전신감염이 이루어진다'는 점이다. 살모넬라는 숙주 내에서 생존하기 위해서 동물 면역체계에 잘 적응되어 있는 병원체로, 음식을 통해 구강으로 들어온 살모넬라는 강산성의 위액에서 생존할 수 있으며, 위를 통과한 살모넬라는 2단계에 걸쳐 감염을 일으킬 수 있는데, 1단계로 장관 내강에서 장관감염을 일으키고, 2단계로 동물의 장관막을 뚫고 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 전신감염을 일으킬 수 있다. 그러므로 살모넬라의 감염을 통제하기 위해서는 ①장관 내강에서의 감염도 조절해야 하지만, ②M세포 및 상피세포를 통해서 몸 안으로 들어온 살모넬라가 대식세포로 전달되고 이어지는 전신성 감염을 억제할 수 있는 즉, 면역반응에 의해 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 방법을 개발해야 한다.

따라서 항살모넬라 효능이 우수한 살모넬라 저감제 개발을 위하여 ①'장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재'와 ②'장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 소재'의 배합을 통해 살모넬라 저감 효능을 획기적으로 향상시킨 제품이 필요하다.

현재까지 개발된 살모넬라 저감제는 모두 장내에서만 작용하기 때문에 몸 안에서 면역세포인 대식세포 등에 숨어 오랫동안 생존하고 만성적인 감염을 일으키는 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 방법은 없었다. 하지만 살모넬라는 무증상인 상태로 몸 안에 오랫동안 존재할 수 있으며, 이 경우, 부검을 하기 전까지는 확인할 수 있는 방법도 거의 없다는 점에서 인간의 보건 위생에 있어서 매우 중요한 위협이 되고 있다. 현재까지 우리나라에서 *Salmonella* Enteritidis에 의한 피해가 크지는 않지만, 이는 *Salmonella* Gallinarum에 의한 감염이 해결된 이후에는 오히려 증가할 가능성이 높다는 점에서 위험성이 앞으로 증가될 것으로 생각된다.

뿐만 아니라, 현재 시도되고 있는 방법 중 CE, 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 에센셜 오일 등은 살모넬라 뿐만 아니라 캄필로박터, 출혈성 대장균 등 다양한 질병과 관련된 모델에서도 연구되고 때문에 살모넬라만을 통제하기 위한 방법으로 장기적으로 사용하는 것은 최선책은 아니다. 그러므로 현재는 새로운 entity의 살모넬라 저감제가 필요한 상황이며, 특히 몸 안의 생식기관에도 작용할 수 있는 살모넬라 저감제가 절실한 상황이다.

살모넬라에 대해서 항생제 사용은 내성균을 유발할 수 있다는 점에서 매우 신중해야 한다. 결국 항생제와 백신을 제외한다면, 가축의 몸 안의 특히 대식세포안에 있는 살모넬라를 제거할 수 있는 방법은 전무하다고 할 수 있다.

몸 안에 있는 살모넬라를 제거하기 위한 노력이 진행되지 않은 이유는 현재까지 이와 유사한 질병이라고 할 수 있는 PRRS, 결핵, 브루셀라와 같은 질병이 모두 세포내 감염을 일으키는 난치성 질병이라는 점에서 드러나듯이 새로운 저감제의 패러다임이 제시되지 못하고 있으며, 특히 몸 안에서 면역세포인 대식세포 등에 숨어 오랫동안 생존하고 만성적인 감염을 일으키는 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 방법이 제안되지 못했기 때문이다.

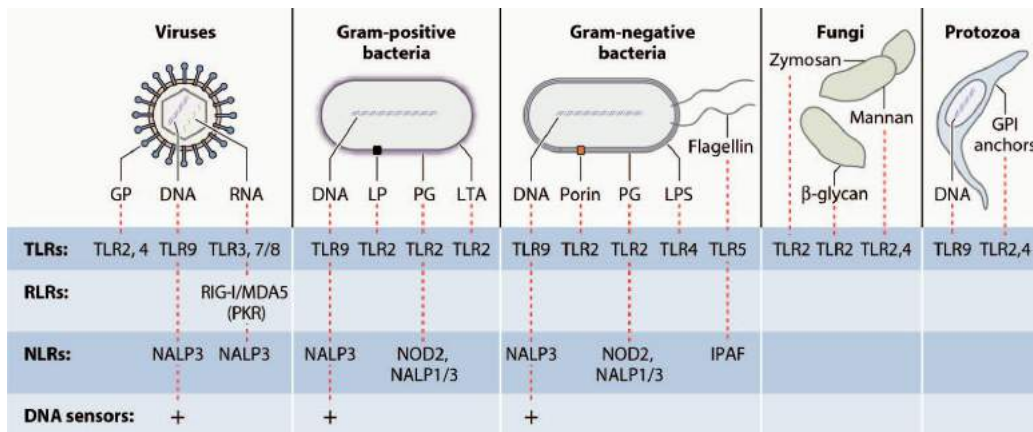
	작용부위	특징	예방적 사용
백신	체내 (세포성 면역)	Strain 특이적	가능
유기산	체외 (장관)	맹장에 도달하기 위한 특별한 제형연구 필요	가능
CE	체외 (장관)	효과 미약	가능
프로바이오틱스	체외 (장관)	효과 미약	가능
프리바이오틱스	체외 (장관)	효과 미약	가능
essential oil	체외 (장관)	효과 특이적, 타목적으로도 사용됨	가능
박테리오파지	체외 (장관)	살모넬라 strain에 특이적임	불가능
항생제	체내/체외	항생제 내성균 발생	불가능

(2) 본 과제에서 개발한 살모넬라 저감제에 대한 개요
 : 살모넬라의 면역회피 기능과 이의 극복 방안

살모넬라의 가장 큰 특징은 대식세포와 같은 면역세포내에서도 생존이 가능하다는 것이지만 모든 대식세포에서 면역회피가 동일하게 나타나는 것이 아니라, 주로 M2 대식세포 안에서 더 쉽게 생존하게 되고 M2 대식세포를 살모넬라의 새로운 niche로 삼아 살아가게 된다.

그러므로 이를 극복하기 위해서는 대식세포를 다시 M1 형태로 전환시켜야 하며, 세포내에 존재하는 살모넬라를 제거하기 위해서는 세포성 면역을 증가시켜야 하며, 이를 직접적으로 증가시킬 방법이 없다면 Th1 면역반응을 유도하여 세포성 면역을 강화시켜야 한다.

병원균은 단 하나의 PAMP(pathogen associated molecular pattern)만 가지고 있는 것이 아니기 때문에 단 하나의 PRR(pattern recognition receptor, 패턴인식수용체)에 의해서만 인식되는 것이 아니므로 면역반응은 일종의 패턴으로 나타나게 된다.

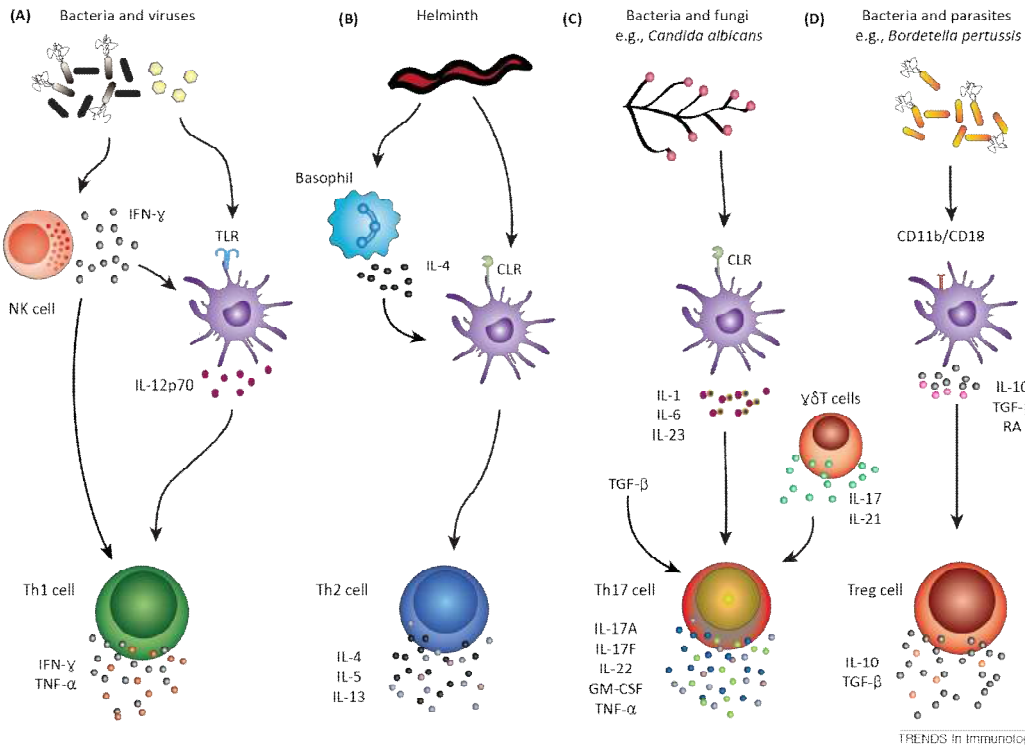


서로 다른 Class의 PAMP의 인식과 신호전달 (lipoproteins (LP), membrane components (peptidoglycans [PG], lipoteichoic acid [LTA], LPS, and GPI anchors). These PAMPs are recognized by different families of PRRs. 출처: Mogensen, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. Clin Microbiol Rev 22, 240–273 (2009).

병원체 자체가 복잡한 면역반응을 유도하기 때문에, 면역계로서는 이 중 몇 가지만 제대로 작용해도 그람음성균인 살모넬라는 억제될 수 있다. 이러한 면역반응 중에서 가장 살모넬라를 억제하는데 효과적이고, 가장 부작용이 없는 반응을 선택해야 한다.

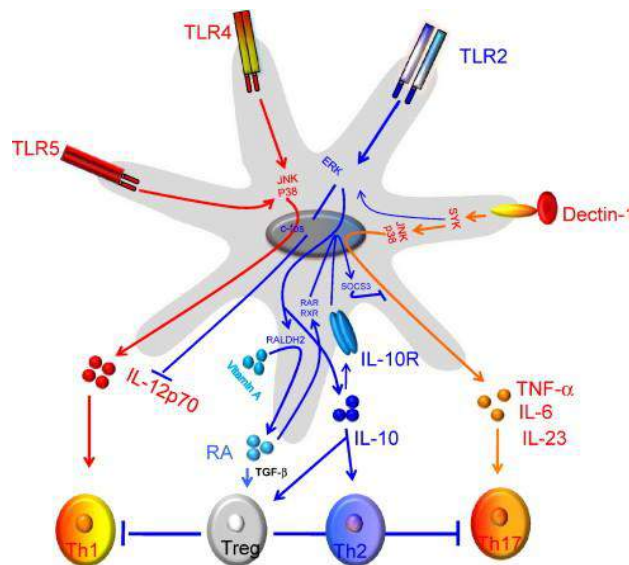
선천성 면역계의 면역반응은 비록 위와 같이 다양한 PRR에 의한 면역반응이 유도될 수 있으며, 적응면역계의 Th 세포는 크게 Th1, Th2, Th17, Treg 등의 세포로 분화되면서 면역반응을 조절하며, 이 조절과정은 외부항원이 무엇인가에 따라서 달라진다¹¹⁾, 일반적으로 살모넬라를 제거하기 위한 면역반응은 Th1 면역반응이다.

11) Walsh, K. P. & Mills, K. H. G. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. Trends in Immunology 34, 521–530 (2013).



출처 : Walsh, K. P. & Mills, K. H. G. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. Trends in Immunology 34, 521-530 (2013).

Th1 면역을 유도하기 위해서는 Th1 면역반응을 유도할 수 있는 패턴인식수용체를 자극하는 방법이 있다. 아래와 같은 그림 처럼 TLR4는 Th1 면역을 유도하고 TLR2는 Th2 면역을 유도할 수 있으며, Dectin-1은 Th17 면역반응을 유도할 수 있다고 알려져 있다. Dectin-1은 입자형 효모베타글루칸의 수용체이기 때문에 일반적인 면역증강제라고 해도, 베타글루칸으로는 살모넬라를 억제하기 어렵다고 생각된다. 그러므로 결론적으로는 살모넬라를 억제하기 위해서는 Th1 면역반응을 유도하는 TLR4의 리간드를 사용하는 것이 타당하다고 하겠다.



출처 : Manicassamy, S. & Pulendran, B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. Seminars in Immunology 21, 185-193 (2009).

(3) 탐식작용/자가포식 유도 TLR4 agonist

TLR4의 리간드가 Th1 면역반응을 유도할 수 있지만, TLR4의 리간드중 대표적인 LPS는 심한 염증을 유도할 수 있는 물질이며, 모든 TLR4 리간드가 면역증강제로 안전하게 사용될 수 있는 것은 아니다.

본 과제에서는 안전하게 사용할 수 있는 TLR4의 리간드를 이용하여, 살모넬라의 저감제로서의 효능을 평가하였다. 특히, 살모넬라는 대식세포의 면역반응에 대한 다양한 회피기전을 가지고 있으며, 탐식작용과 자가포식작용에 대한 회피 기능을 하는 물질들을 분비한다. 하지만 이러한 면역회피성 물질은 면역반응과 균형관계에 있는 것이므로 면역반응을 유도하면 대식세포내의 살모넬라는 자가포식 반응을 통해서 제거될 수 있다.

본 과제에서는 당사에서 개발한 면역소재가 TLR4 agonist, LPS antagonist의 Th1 adjuvant 면역조절소재임을 밝히고, 매우 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였으며, 무엇보다 살모넬라에 대한 저감제로서 작용할 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라 효과가 나타나는 기전을 연구한 결과 예상대로 살모넬라에 대하여 탐식작용은 물론 자가포식을 증가시켜 살모넬라를 제거할 수 있음을 확인하였다.

3. 정책안 제안의 근거

가. 몸 안에서 세포내 감염 살모넬라에 작용하는 살모넬라 저감제가 필요한 이유

현재 국내는 살모넬라 식중독이 축산선진국에 비해서 오히려 발생빈도가 적은 것으로 알려져 있다. 이러한 상황은 국내의 다른 질병의 만연과 비교할 때, 특이한 현상이라고 할 수 있다.

특히 계란에서 발생하는 살모넬라 식중독의 빈도가 낮은 편이며, 이러한 상황에서 유기산, 경쟁적 배제제 등 장관 내강에서 작용하는 살모넬라 저감제가 큰 효과를 나타낼 가능성 보다는 오히려 몸 안에서 세포내 감염 살모넬라에 작용하는 살모넬라 저감제를 사용하여, 계란의 내부에 감염될 수 있는 살모넬라를 저감시키는 것이 살모넬라 식중독을 억제하는 데 효과적일 것이다.

나. 국가에서 가이드라인 작성 및 중장기적 로드맵 작성이 필요한 이유

- 살모넬라 부재 축산물을 생산해야 하는 농가를 위하여 FSIS 수준의 가이드라인을 작성하여, 농장 단계에서의 살모넬라 저감 계획을 수립하도록 권장한다.
- 살모넬라 저감 대책의 하나로, '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 사용이 포함된 "살모넬라 저감제 사용 매뉴얼(온라인 포함)"을 제공한다.
- 살모넬라 부재 축산물을 생산해야 하는 농가에 살모넬라 저감 대책으로, "세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제"가 포함된 "살모넬라 저감제 사용 매뉴얼(온라인 포함)"을 제공하고 사용을 권장한다.
- 살모넬라의 잦은 감염이 의심되는 농장에 "세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제"가 포함된 "살모넬라 저감제 사용 매뉴얼(온라인 포함)"을 제공하고, '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 사용을 권장한다.

1970년대 이후 가금티푸스의 박멸을 목적으로, 120일 이후의 닭은 가금티푸스 질병 감염 여부를 확인하기 위하여, 혈청 agglutination 검사를 통해서 살모넬라 항원을 검출하고, 양성결과가 나온 flock에서 생산된 계란은 산란장에서 사용을 금지시켰다. 지난 15년간의 기록을 살펴보면 이러한 조치는 충분하지 못하다고 생각되며 새로 국가단위의 정책을 필요로 하고 있다.

미국에서는 2009년 계란의 생산, 저장, 운송 중 *S. Enteritidis* 감염 예방에 관한 법안 (Prevention of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs During Production, Storage, and Transportation, 74 Federal Register 33030) 에 따라서 규제가 확립되었으며, 현재 관련 가이드라인이 발표된 상태이다. 이 프로그램은 농가에 대해서 살모넬라를 저감시키는 농가의 실천방법과 살모넬라 검사프로그램을 강제화 시켰다. 첫번째 조치로 모든 상업적인 계란 생산자들은 문서로 *Salmonella* Enteritidis 예방 계획을 수립해야 한다. 그들은 모든 breeder flock을 National Poultry Improvement Plan (U.S. Department of Agriculture, 2014)에서 감염되지 않았다고 인증된 부화장에서만 구입해야 한다. 하지만 다양한 조치에도 불구하고 미국내에서 살모넬라 감염율은 매우 높은 수준을 유지하고 있어, 21세기에 들어서 살모넬라 감염율은 큰 변화가 없고 오히려 *Salmonella* Enteritidis가 44% 증가하였으며 사회, 산업, 정부의 비용부담은 물론 시장 축소, 농산품의 가치 감소, 위험절감 노력, 그리고 규제 프로그램 등으로 110억불의 비용을 초래하고 있다. 미국의 Federal Egg

Safety regulation은 미국내 *Salmonella* Enteritidis의 규제에 8,100만불을 소요되지만, 14억 불의 보건 비용을 줄여줄 수 있다고 추산했다.

이토록 상당히 많은 비용이 소요됨에도 불구하고 미국내 규제의 대부분은 방역에 치중해 왔으나, 2015년 12월 발표된 가이드라인에서 농장에서 사용 가능한 살모넬라 저감제를 소개하고 있어, 방역 뿐만 아니라, 감염된 개체의 살모넬라 shedding을 최소화 할 수 있는 방법에 대해서도 고민하고 있다.

국내에서도 미국과 유사한 수준의 방역 대책은 막대한 비용이 초래될 수 있지만, 중장기적인 관점에서는 살모넬라 저감 대책이 필요한 상황이며, 특히 면역 기반의 살모넬라 저감제를 적극적으로 활용하는 종합적인 가이드라인이 필요하다.

다. 기타 산업계에서 특히 살모넬라 저감제가 권장되는 이유

- 마요네즈 등 계란을 사용하여 생산하는 제품의 제조사는 살모넬라 부재 계획을 확립하고 실행중인 농장의 계란만 사용하도록 권장한다.
- 항생제를 사용하여 살모넬라를 억제한 농장은 감염이 치료된 이후에도 “세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제”의 사용을 권장하여 살모넬라 내성균의 발생을 억제하도록 한다.
- 국내 양돈농가중 생산성이 낮고 PRRS 등의 만성소모성질환이 발생하고 있는 농장에서는 살모넬라의 감염을 낮추고 PRRSV의 피해를 감소시킬 수 있는 “세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제”의 사용을 권장한다.

라. 항생제 다제내성 살모넬라에 대응하기 위한 세포내 감염 살모넬라 저감제의 중요성

우리나라는 비록 살모넬라 식중독이 외국에 비해서 매우 적게 발생하기는 하지만, 이는 우리나라가 *Salmonella Gallinarum* 백신을 사용하고 있기 때문에 나타나는 현상일 가능성이 크며, 가금티프스가 박멸되면서 백신 사용을 중단할 경우 오히려 *Salmonella Enteritidis*가 증가할 가능성이 높다. 이러한 상황에서 liquid egg에서는 살모넬라 균이 검출될 뿐만 아니라, 기존의 살균 방법이 그다지 효과적이지 않다는 보고를 고려할 경우, liquid egg를 사용하는 식품 제조시설에 사용되는 계란을 생산하는 농가에서는 특히, 몸 안의 세포내 감염 살모넬라에 작용하는 살모넬라 저감제의 사용을 권장하는 것이 바람직하다고 판단된다.

뿐만 아니라 우리나라는 2016년 CODEX (국제식품규격위원회)에서 '항생제 내성 특별위원회' 의장국으로 선출되어 '17년부터 '20년까지 4년 간 전세계 국가들이 항생제를 줄이거나 방지할 수 있는 최종지침을 마련하는 것에 주도적인 역할을 하게 되어 있다. 식약처는 '17년 하반기를 시작으로 항생제 내성 특별위원회 회의를 우리나라에서 개최하여 항생제 내성 저감화 및 방지를 위한 실행규범을 개정하고 항생제 내성 통합감시를 위한 가이드라인 개발을 논의하여 그 결과를 총회에 보고할 예정이며 '20년에 최종 지침을 마련·채택하는 것을 목표로 한다고 밝혔다. 2017년은 11월 27일부터 12월 1일 제주국제컨벤션센터에서 회의가 개최되었으며, CODEX 188개 회원국과 WHO, FAO, OIE 등 국제기구 총 250여 명이 참석할 예정이었으며, 이번 회의 주요 내용은 ▲항생제 내성 최소화 및 확산방지 실행규범 ▲항생제 내성 통합감시 가이드스 ▲항생제 내성에 관한 전문가 세미나 등 이었다.

우리나라의 경우 OECD 국가평균 보다 50% 이상 많은 항생제가 처방되고 있고, 내성균 발생률도 최근 7년간 최대 3배 이상 증가한 것으로 나타났다. 우리나라 정부는 현재 슈퍼박테리아 6종(반코마이신 내성 황색포도알균, 반코마이신 내성 장알균, 메티실린 내성 황색포도알균, 다제내성 녹농균, 다제내성 아시네토박터 바우마니균, 및 카바페넴 내성 장내세균속 균종)을 법정 감염병으로 지정하였다. 2016년에는 항생제 내성 문제들을 해결하기 위한 '국가 항생제 내성 관리 대책 협의체'를 출범시켰으며, '2017-2021년 국가 항생제 내성 관리대책'을 마련 중이다.

현재 학계를 중심으로 항생제 adjuvant라는 개념이 발표되고 있으며, "세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제"는 Gerald Wright의 분류에 따르면, LL-37 peptide 등이 속한 Class II antibiotics adjuvant에 해당한다. Class II 항생제 어쥬번트는 주로 숙주의 방어면역을 향상시켜서 항생제의 활성을 증가시킨다. 그러므로 앞으로 항생제 내성균을 관리함에 있어서 "세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제"는 매우 중요한 도구가 될 것이라고 판단된다.

4. (주)에스티알바이오텍의 정책안 제안

국내의 축산제품의 안전성을 높이고, 수출경쟁력을 확보하기 위해서는 살모넬라 부재 축산물을 생산하는 방법은 절대적으로 확보해야 하는 기술이다. 이를 위해서는 이미 기존에 사용되고 있는 살모넬라 저감제에 추가하여 다음과 같은 상황에 새로이 개발된 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 선택을 추가할 것을 제안하고자 한다.

- 국가 경쟁력을 위하여, 살모넬라 부재 축산물을 생산해야 하는 모든 축산농가에 제공할 살모넬라 저감 관련 정부의 중장기적 로드맵을 작성한다.
- 살모넬라 부재 축산물을 생산해야 하는 농가를 위하여 FSIS 수준의 가이드라인을 작성하여, 농장 단계에서의 살모넬라 저감 계획을 수립하도록 권장한다.
- 살모넬라 저감 대책의 하나로, '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 사용이 포함된 "살모넬라 저감제 사용 매뉴얼(온라인 포함)"을 제공한다.
- 살모넬라 부재 축산물을 생산해야 하는 농가에 살모넬라 저감 대책으로, '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'가 포함된 "살모넬라 저감제 사용 매뉴얼(온라인 포함)"을 제공하고 사용을 권장한다.
- 살모넬라의 잦은 감염이 의심되는 농장은 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'가 포함된 "살모넬라 저감제 사용 매뉴얼(온라인 포함)"을 제공하고, '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 사용을 권장한다.
- 항생제를 사용하여 살모넬라를 억제한 농장에서도 감염이 치료된 이후에도 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 사용을 권장하여 항생제 다제내성 살모넬라 내성균의 발생을 억제하도록 한다.
- 국내 양돈농가중 생산성이 낮고 PRRS 등의 만성소모성 질환이 발생하고 있는 농장에서는 살모넬라의 감염을 낮추고 PRRSV의 피해를 감소시킬 수 있는 '세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제'의 사용을 권장한다.
- 마요네즈 등 계란을 사용하는 제품을 생산하는 제조사는 살모넬라 부재 계획을 확립하고 실행중인 농장의 제품만 사용하도록 권장한다.

4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
4-1절. 목표달성도				
구분	세부연구개발항목	가중치 (%)	달성도 (%)	평가의 방법
1차년도 (2014)	살모넬라 저감 효능의 면역조절소재, 천연항균소재, 프로바이오틱스 및 배합제제 시제품 생산	15	100	시제품 확인 (Field Test에 적용)
	살모넬라 저감제 시제품의 표준화	15	100	시제품 자체 시험성적서
	살모넬라 저감제의 in vitro 효능 평가 및 혼합제제의 synergic 효과 평가	10	100	in vitro 항살모넬라 활성 및 시너지 효과 확인
	살모넬라 저감제의 in vivo 효능 평가	10	100	in vivo 항살모넬라 효능 검증
	초생추에 대한 저감 후보물질의 안전성 검정	15	100	안전성 관련 결과보고서 (LPS 유도 패혈증 억제)
	살모넬라균 공격집중에 대한 초생추 방어효과 검증 및 임상병리학적 지표 분석	15	100	지표분석 결과보고서
	초생추에 대한 감염면역학적 효능 검정	10	100	효능검정 결과보고서
	살모넬라 저감 후보물질의 닭 유래 대식세포 반응 분석	10	100	반응분석 결과보고서
	합계	100		
2차년도 (2015)	살모넬라 저감 효능이 고도화된 면역조절소재, 천연항균소재, 프로바이오틱스 및 혼합제제 시제품 생산	15	100	시제품 확인 (Field Test에 적용)
	면역조절소재, 천연항균소재, 프로바이오틱스 각 소재의 배합에 따른 in vitro 항살모넬라 효능의 synergic효과 확인	15	100	in vitro 항살모넬라 활성 확인
	살모넬라 저감 효능에 따른 최적 혼합비율 도출 및 synergic 효과 평가	10	100	혼합제제의 최적 혼합비율 제시
	면역반응 분석	10	100	면역학적 효능 특성 규명
	이유자돈에 대한 살모넬라 저감 후보물질의 안전성 검정	15	100	안전성 관련 결과보고서 (LPS 유도 패혈증 억제)
	살모넬라균 공격집중에 대한 이유자돈 방어효과 검증 및 임상병리학적 지표 분석 여부	15	100	지표분석 결과보고서
	이유자돈에 대한 감염면역학적 효능 검정	10	100	효능검정 결과보고서
	살모넬라 저감 후보물질의 이유자돈 유래 대식세포 반응 분석	10	100	반응분석 결과보고서
	합계	100		
3차년도 (2016)	현장실증실험 수행 및 총괄	30	100	축종별 5개 농장에서 현장실증실험 수행 결과보고서
	현장실증실험 대상농장 선발 및 농장 적용 프로토콜 설정	15	100	축종별 농장적용 프로토콜 작성 확인
	현장실증실험 대상 목적동물에 대한 임상병리학적 지표 비교 분석	15	100	지표분석 결과보고서
	현장실증실험 대상농장에서 살모넬라 오염과 관련된 위해요소 분석	10	100	분석 결과보고서
	현장실증실험 대상농장 및 목적동물에서 살모넬라 저감화의 정성 및 정량적 평가	10	100	평가 결과보고서
	in vitro 및 in vivo 효능 검정에 대한 보완 연구	10	100	in vitro 및 in vivo 항살모넬라 효능 검증
	면역조절소재의 추가적인 기전 확인 연구	10	100	면역학적 효능 특성 및 분자적 기전 규명
	합계	100		

4-2절. 관련분야 기여도

1) 기술적 측면

기존 대부분의 살모넬라 저감제(백신 제외)의 공통적인 특징은 모두 장관 내강에서만 작용하기 때문에 장관 내강의 살모넬라만 저감할 수 있어, 실질적인 문제가 되는 몸 안에서 면역세포인 대식세포 등에 숨어 오랫동안 생존하고 만성적인 감염을 일으키는 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 방법이 없었다. 그러나, 본 과제를 통해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 M세포 및 상피세포를 통해서 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대한 대응 가능한 소재로 가축의 생체안에서 작용하여 이미 전신성 감염을 일으키거나, 가축의 몸 안에서 집락화된 살모넬라에 대해서 저감 기능이 있는 경쟁력 있는 소재가 될 것이며, 앞으로 면역력을 강화시켜서 질병을 예방하는 새로운 패러다임이 형성될 것으로 판단된다.

본 과제를 통해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 면역세포인 대식세포에 존재하는 살모넬라를 획기적으로 줄여줄 수 있는 경쟁력 있는 소재로, 이와 유사한 다른 질병에도 적용해 볼 만한 충분한 가치가 있을 것으로 판단된다. 본 면역조절소재는 TLR4 agonist, LPS antagonist의 Th1 adjuvant 면역조절소재로, 선천성면역 활성화 및 Th1 면역 반응 활성화에 의해 효과를 나타낼 수 있는 돼지 PRRS 등 소모성바이러스질환에도 효과가 있을 것으로 기대된다. 예를 들어, 이미 현장에서 어느 정도 효과가 확인되고 있는 돼지의 PRRS 등에 대해서도 향후 현장실증실험을 통해 적용할 수 있을 것이며 특히, 소의 폐에 감염되는 소결핵 등에 대해서도 적용될 것으로 예상되며, 이로 인하여 국내의 많은 만성소모성 질환을 일으키는 질병을 퇴치하는데 큰 도움이 될 가능성이 높다고 본다.

2) 경제적 측면

매년 미국에서는 약 120만건이 살모넬라 식중독이 발생하며, 이중 23,000명이 병원에 입원하고 450명이 사망하는 것으로 알려져 있다(미국 CDC). 1989년 미국에서 사람의 살모넬라 감염증에 의한 경제적 손실은 연간 40억 달러로 추정되었으며, 1999년 조사에서는 20억 달러의 비용이 발생하는 것으로 추정하였다. 우리나라의 경우는 최근 국내의 식중독에 의한 사회 비용은 약 1조 3천억원에서 1조 6천억원으로 예측되었다¹²⁾. 다만 이 보고서는 식중독 전체를 계산한 것이므로 살모넬라에 의한 식중독의 비용은 따로 계산하지는 않았다. 하지만 국내 식중독사고는 원인을 밝히지 못하는 부분이 많고 식중독의 주원인의 하나가 살모넬라라는 것을 감안하면, 상당한 경제적인 비용이 살모넬라의 식중독 감염으로 지출되는 것은 분명해 보인다.

3) 산업적 측면

살모넬라에 의한 식중독은 전세계적으로 매우 심각한 문제이며, 본 과제를 통해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 이미 사용되고 있는 단순 유기산, 프로바이오틱스 등의 제품과는 확실히 차별화할 수 있는 제품이므로, 향후 추가적인 연구를 통해 충분한 자료를 바탕으로 유럽과 미국에 수출할 수 있을 것으로 보인다.

특히 본 제품은 살모넬라 뿐만 아니라, 다양한 감염성질병에 대한 방어력도 같이 증가시킬 것으로 예상되므로 다양한 질병 예방의 새로운 패러다임으로 자리 잡을 수 있을 것으로 판단된다.

뿐만 아니라, 만약 본 면역조절제가 성공적으로 적용될 수 있다면 국내의 농가에 빠르게 HACCP를 확산시키는데 도움이 될 것이며, FTA에 맞서서 농가의 경쟁력에 큰 도움이 될 것이라고 본다.

4) 수출에 의한 경제적 효과

계육은 수출시 살모넬라, 추백리, 뉴캐슬 등의 감염 여부가 언제든지 수출을 중단시킬 근거가 될 수 있다. 따라서 국가별 상이한 검역기준을 통과하기 위해서는 최선의 육제품을 생산해야 하며, 본 면역조절제 사용을 통해 안전한 육제품을 생산하게 된다면 이에 대한 경제적 파급효과는 매우 클 것으로 예상된다.

5장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

1) 안전한 축산물의 생산

안전한 축산물 생산을 위한 매뉴얼로 활용할 계획이다. 살모넬라 식중독이 전세계적인 문제가 되고 있는 현실에서 살모넬라의 감염을 통제하기 위해서는 몸 안의 세포내 감염 살모넬라에 작용할 수 있는 살모넬라 저감제가 필수적이며, 본 과제를 통해 이를 세계 최초로 개발하였다. 특히 육류에서의 살모넬라 감소는 물론, 전세계적으로 계란에 의한 식중독이 매우 심각한 상황에서 계란 껍질의 안쪽의 감염을 감소시킬 수 있는 방법을 개발하였다는 점에 있어서 의미가 크며, 뿐만 아니라 양돈에서는 우리나라의 대부분의 양돈농가가 PRRS 등으로 인하여 만성적인 소모성질병을 앓고 있는 상황에서 PRRS의 피해를 악화시키는 원인으로 지목된 살모넬라를 억제하는 것은 양돈농장의 생산성 향상에 큰 도움이 될 것으로 기대되는 바, HACCP의 확산에 큰 도움이 될 것이라고 판단된다. 특히 본 과제에 의해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 국내에서 이미 사업화 되었으며, 향후 해외에서 제품화가 이루어진다면, 국내 보다 살모넬라에 의한 식중독 발생률이 높은 해외에서 식중독 발생률 감소에 크게 기여할 것으로 예상된다.

2) 제품의 해외 수출

가축의 살모넬라에 대한 저감 효과를 해외에서 입증받을 수 있도록, 앞으로 논문 발표 등을 통해 해외에 적극 알림으로써 해외 진출이 가능할 것으로 예상된다.

3) 항생제 adjuvant로서의 활용

현재 항생제 다제내성균은 증가하지만 항생제의 개발은 늦어지고 있으므로, 그 사이에 항생제의 기능을 향상시킬 수 있는 항생제 adjuvant의 개발이 중요한 이슈가 되고 있다. 본 과제로 개발된 제품은 Class II 항생제 adjuvant에 속하는 물질이며, host의 면역력을 개선해서 항생제의 효과를 향상시킬 수 있는 물질이다. 특히 Class II 물질은 병원균의 항생제 내성 기전을 방해하는 Class I 물질과 병용할 수 있고, 항생제를 사용한 이후 몸 안의 항생제 내성균을 완전히 제거하는데 도움이 되어, 앞으로 항생제 저감 대책에도 핵심소재가 될 것으로 판단된다.

4) 가축의 다른 질병 조절에 대하여 새로운 패러다임을 제시

현재 많은 질병들을 선천성면역을 통해 조절하려는 시도가 있으나, 아직까지 뚜렷한 성과를 보이는 제품이 없는 현실에서 본 과제를 통해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 그 대안이 될 것으로 기대된다.

예를 들어 PRRS는 양돈업계에 연간 2000억원 이상의 피해를 입히는 대표적인 만성소모성질병이며, 면역조절로 PRRS를 조절할 수는 있지만 지속적으로 안전하게 사용할 수 있는 제품이 없는 현실에서 본 과제를 통해 개발된 면역조절제는 TLR4 agonist, LPS antagonist의 Th1 adjuvant 면역조절소재로 PRRS에 효과를 보이고 있으며, 이 외에도 국내의 많은 가축 전염병질병에 대해서도 적용될 것으로 예상되며, 이들 질병을 퇴치하는데 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

5) 기타 측면

가축에 대한 연구는 가축 뿐만 아니라 사람을 대상으로 하는 연구에 기여하는 바가 크므로, 본 연구를 바탕으로 특히 결핵, 신종플루와 같은 질병에 적용을 고려할 가치가 충분하다고 사료된다(실제로 면역학의 많은 부분이 실험동물 뿐만 아니라 가축을 통해서 이루어졌음).

6) 사업진행 계획

제품개발 계획 : 현재 양돈농가에는 강황(생물전환)산물이 더 우수한 것으로 나타났으나, 경제성을 고려해서 강황(생물전환)산물 제품이 아닌 강황(생물전환)산물+미강(생물전환)산물 제품으로 판매를 계획하고 있으며 현재는 미강(생물전환)산물 제품으로 판매가 이루어지고 있다. 양계농가에는 미강(생물전환)산물이 더 우수한 결과를 보였으므로 미강(생물전환)산물 제품으로 판매가 이루어지고 있다.

영업 마케팅 계획 : 현재 사업화되어 있는 이 제품을 소개하기 위해서는 국내 양돈컨설팅을 담당하시는 분들을 위주로 제품을 소개하고, 살모넬라의 피해가 더욱 큰 농장(예를 들어 이미 만성소모성질환이 만연한 농장)을 중심으로 살모넬라 저감제의 효과에 대한 실증 실험을 거쳐서 보급하도록 노력할 계획이며, 특히 살모넬라 저감제의 수요가 미국보다는 유럽이 더 높을 뿐만 아니라, 유럽의 가금류(특히 계란)의 생산비가 더 높기 때문에 유럽의 전시회 등을 통해서 살모넬라 저감제의 효능을 광고할 계획이다.

6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ 현재 외국에서는 살모넬라를 억제하기 위하여 유기산을 분비하는 장내세균에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히 장내세균이 맹장으로 이동하기 위해서는 장내세균에 대한 코팅 기술도 같이 연구되고 있다. (참고문헌 : Beaumont, C., Lecerf, F., Protais, J., Calenge, F., Prevost, K., Lalmanach, A.C., Chapuis, H., Pitel, F., Burlot, T., Sellier, N., Fravallo, P., Vignal, A., Velge, P., 2008. An integrated approach of genetic resistance to <i>Salmonella</i> carrier state in fowls: from genetics to genomics and modelling. Dev. Biol. (Basel) 132, 353 - 357.) ○ 캐나다 정부는 가금산업에 사용하는 항생제를 대체할 목적으로 2015년 약 30만 달러의 연구비를 지원했다. 이는 가금류의 생산에 항생제를 전혀 사용하지 않을 목적으로 개발되는 것이며, 아마도 선천성 면역조절제를 in ovo injection을 통해서 면역력을 높이는 연구를 진행하는 것으로 생각된다. (출처 : https://www.wattagnet.com/articles/23191-canada-funds-research-for-poultry-antibiotic-alternative) ○ in ovo vaccination 방법(닭이 아니라 계란 상태에서 백신을 접종하는 방법)이 최근 가금류 백신 접종의 새로운 방법으로 제시되고 있으며, in ovo injection용 백신의 개발에 있어서 면역조절제가 사용될 수 있다. 이 방법은 가금티푸스 백신 접종에 있어서도 혁명적인 방법이 될 수 있을 것으로 보인다. (출처 : https://www.egginject.com/In-ovo-vaccination) ○ 패턴인식수용체에 결합하는 리간드를 이용한 많은 의약품이 개발되고 있다. (참고문헌: Tartey, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. International Reviews of Immunology 36, 57 - 73 (2017)). ○ Red Seaweeds, <i>Chondrus crispus</i> 및 <i>Sarcodiotheca gaudichaudii</i> 등이 사료에 첨가될 경우 산란계의 <i>Salmonella</i> Enteritidis를 저감시킨다는 보고가 있다. (참고문헌: Kulshreshtha, G. et al. Feed Supplementation with Red Seaweeds, <i>Chondrus crispus</i> and <i>Sarcodiotheca gaudichaudii</i>, Reduce <i>Salmonella</i> Enteritidis in Laying Hens. Front. Microbiol. 8, (2017)). ○ 유기산 제제를 사용할 경우 encapsulation 기술과 유용한 유기산 끼리의 혼합 기술이 개발되고 있다. (참고문헌 : Natsir, M. H., Hartutik, Sjoftjan, O., Widodo, E. & Widyastuti, E. S. Use of acidifiers and herb-acidifier combinations with encapsulated and non-encapsulated intestinal microflora, intestinal histological and serum characteristics in broiler. in 020012 (2017). doi:10.1063/1.4983423) 	

- Kemin사에서는 유기산과 계면활성제를 포함시킨 제품을 판매하고 있다. 이는 섭취뿐만 아니라 환경내에서의 살모넬라를 억제하기 위한 제품이다.

<https://www.kemin.com/en/india/products/sal-curb/Salmonella-in-poultry>

- “Osteoimmunology,”이론에 따르면, 동물의 뼈의 성장에 있어서 장내 미생물의 영향이 매우 중요하다. 그러므로 현재 장내미생물에 대한 연구를 통해서 동물의 골격 형성에 도움이 될 수 있다. 이는 사람에게도 적용될 수 있을 것이다. (출처 : Charles, J.F., Ermann, J., Aliprantis, A.O., 2015. The intestinal microbiome and skeletal fitness: connecting bugs and bones. Clin. Immunol. 159, 163 - 169.)

7장. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 특허 출원시 까지 비공개 요청함		

8장. 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
관련사항 없음								

9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

[(주)에스티알바이오텍 연구실 안전조치 이행 계획]

본 연구개발 과정에서 주관기관인 (주)에스티알바이오텍은 ‘대한민국 연구실 안전환경 조성에 관한 법률’ 및 ‘산업안전보건법’ 등에 명기된 연구실의 안전조치 지침을 준수하며, 정기적인 연구실 안전 점검 및 정밀안전진단 검수를 통해 위험 요소를 사전에 제거하고, 참여연구원들이 규정된 안전교육을 의무적으로 이수하도록 하는 등 연구실 안전조치를 이행하였습니다.

[강원대 연구실 안전조치 이행 계획]

가. 연구실 안전점검

1) 실험실 안전 점검 체계

◎ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리함

◎ 관리위험등급 : A등급

- 1단계 (실험실, 책임교수 및 담당자 관리): 매일 1회. 실험실 출입문 바깥에 비상 연락망 기재

- 2단계 (소속기관): 분기별 1회 실시단계

- 3단계 (전담부서): 분기별 1회 실시

2) 실험실 정밀안전진단 실시

◎ 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

◎ 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

나. 교육 훈련

1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

2) 교육대상 : 실험실에 출입하는 모든 사람, 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생을 대상으로 의무 실시하며 교육을 받지 않은 자는 실험실 출입이 금지됨

3) 단계별 교육 이수과정 :

◎ 1단계 : 공통이수과목(등록실험실전체)

4) 교육구분

◎ 정기교육 : 방학기간 중 2회 출석 수업 후 평가 실시

다. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
재산종합보험 (종합패키지 보험)	재산종합위험담보 :2조 5천 6백억원 (신체배상책임보험 특별약관포함)	피보험자	설비안전팀
	대인대물일괄 : 20억원-사고당	전체	“
	제3자 치료비 보상:1천만원/인당, 8천만원/사고당	제3자 보상	“
	학생교내외치료비:1천5백만원/인당, 8천만원/사고당	학생	“
학생단체 상해보험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상해사망, 후유장해 : 2억원 ○ 의사상자 상해위험 : 1억원 ○ 상해, 후유정도에 따른 보상 : 약관보상 ○ 연구활동중사자보험 포함(특별약관) 	학부생, 대학원생	학생복지처
교직원 단체안심보험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사망, 후유장해, 질병사망 : 1억원/인 ○ 의료비지원 <ul style="list-style-type: none"> - 암치료비 : 1천만원/인당 - 입원의료비지원 : 3천만원/인당 - 상해의료실비 : 2백만원/인당 	교직원	인사팀

10장. 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	Turmeric Bioprocessed with Mycelia from the Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom <i>Lentinus edodes</i> (Agaricomycetes) Protects Mice Against Salmonellosis	아주 대학교, (주)STR 바이오텍	제1저자, 교신저 자	<i>Internationa l Journal of Medicinal Mushrooms</i>	1.272	2017.04	중복사사	SCI
2	논문	Mechanism of Antibacterial Activities of a Rice Hull Smoke Extract (RHSE) against Multidrug-Resistant <i>Salmonella</i> Typhimurium in vitro and in Mice	아주 대학교, (주)STR 바이오텍	제1저자, 교신저 자	<i>Journal of Food Science</i>	1.815	in press	중복사사	SCI
3	논문	A Bioprocessed Polysaccharide from <i>Lentinus edodes</i> Mycelia Cultures with Turmeric Protects Chicks from a Lethal Challenge of <i>Salmonella</i> <i>Gallinarum</i>	강원 대학교	제1저자	<i>Journal of Food Protection</i>	1.609	2017.01.20	단독사사	SCI
4	논문	Bioprocessed polysaccharide from <i>Lentinus edodes</i> mycelia cultures with turmeric represses the proinflammatory cytokine expression of the porcine macrophage infected by <i>Salmonella</i> <i>Choleraesuis</i>	강원 대학교	제1저자	<i>Journal of Preventive Veterinary Medicine</i>	1.987	2017.12.31. (게재예정)	단독사사	KCI

5	논문	Inhibitory effects of bioprocessed rice bran on <i>Salmonella</i> infection through macrophage activation and autophagic response recovery	아주대학교, (주)STR 바이오텍	제1저자, 교신저자	작성중		작성중		
6	특허	미생물(담자균류균사) 발효 및 효소처리 생물전환공정을 통해 생물전환된 미강생물전환산물	(주)STR 바이오텍		대한민국		2017.08.29	단독사사	등록
7	특허	미생물(담자균류균사) 발효 및 효소처리 생물전환공정을 통해 생물전환된 미강생물전환산물	(주)STR 바이오텍		대한민국		2016.05.26	단독사사	출원
8	특허	미생물(담자균류균사) 발효 및 효소처리 생물전환공정을 통해 생물전환된 강황생물전환산물	(주)STR 바이오텍		대한민국		2016.05.26	단독사사	출원
9	특허	미생물(담자균류균사) 발효 및 효소처리 생물전환공정을 통해 생물전환된 산초생물전환산물	(주)STR 바이오텍		대한민국		2016.05.26	단독사사	출원

11장. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12장. 참고문헌

	코드번호	D-14
○ 도서		
Ricke, Steven C., and Richard K. Gast, eds. <i>Producing Safe Eggs: Microbial Ecology of Salmonella</i> . Academic Press, 2016.		
Schatten, Heide, and Abraham Eisenstark, eds. <i>Salmonella: methods and protocols</i> 2 nd Edition. Springer Science & Business Media, 2016.		
Barrow, Paul A., and Ulrich Methner, eds. <i>Salmonella</i> in domestic animals. CABI, 2013.		
Russell, Scott M. <i>Controlling Salmonella</i> in poultry production and processing. CRC Press, 2012.		
World Health Organization. Risk assessments of <i>Salmonella</i> in eggs and broiler chickens. Vol. 2. Food & Agriculture Org., 2002.		
○ 논문		
1. Wroblewska, J. A. et al. Cutting Edge: Lymphotoxin Signaling Is Essential for Clearance of <i>Salmonella</i> from the Gut Lumen and Generation of Anti- <i>Salmonella</i> Protective Immunity. <i>The Journal of Immunology</i> 198, 55 - 60 (2017).		
2. Wales, A. D. & Davies, R. H. <i>Salmonella</i> Vaccination in Pigs: A Review. <i>Zoonoses Public Health</i> 64, 1 - 13 (2017).		
3. Soares, M. P., Teixeira, L. & Moita, L. F. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. <i>Nature Reviews Immunology</i> 17, nri.2016.136 (2017).		
4. Rehman, Z. U. et al. Dendritic cell harmonised immunity to poultry pathogens; a review. <i>World's Poultry Science Journal</i> 73, 581 - 590 (2017).		
5. Pavlov, V. A. & Tracey, K. J. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. <i>Nature Neuroscience</i> 20, nn.4477 (2017).		
6. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. <i>Nature Reviews Immunology</i> nri.2017.105 (2017). doi:10.1038/nri.2017.105		
7. Mitchell, G. & Isberg, R. R. Innate Immunity to Intracellular Pathogens: Balancing Microbial Elimination and Inflammation. <i>Cell Host & Microbe</i> 22, 166 - 175 (2017).		
8. Kurtz, J. R., Goggins, J. A. & McLachlan, J. B. <i>Salmonella</i> infection: Interplay between the bacteria and host immune system. <i>Immunology Letters</i> 190, 42 - 50 (2017).		
9. Jennings, E., Thurston, T. L. M. & Holden, D. W. <i>Salmonella</i> SPI-2 Type III		

Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. *Cell Host & Microbe* 22, 217 - 231 (2017).

10. Ingram, J. P., Brodsky, I. E. & Balachandran, S. Interferon- γ in *Salmonella* pathogenesis: New tricks for an old dog. *Cytokine* 98, 27 - 32 (2017).
11. Howrylak, J. A. & Nakahira, K. Inflammasomes: Key Mediators of Lung Immunity. *Annual Review of Physiology* 79, 471 - 494 (2017).
12. Han, D. et al. A Bioprocessed Polysaccharide from *Lentinus edodes* Mycelia Cultures with Turmeric Protects Chicks from a Lethal Challenge of *Salmonella* Gallinarum. *Journal of Food Protection* 80, 245 - 250 (2017).
13. Diard, M. et al. Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella* spp. *Science* 355, 1211 - 1215 (2017).
14. Dar, M. A. et al. *Salmonella* Typhimurium in poultry: a review. *World's Poultry Science Journal* 73, 345 - 354 (2017).
15. Chen, K., Liu, J. & Cao, X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* 83, 1 - 11 (2017).
16. Buck, M. D., Sowell, R. T., Kaech, S. M. & Pearce, E. L. Metabolic Instruction of Immunity. *Cell* 169, 570 - 586 (2017).
17. Bierschenk, D., Boucher, D. & Schroder, K. *Salmonella*-induced inflammasome activation in humans. *Molecular Immunology* 86, 38 - 43 (2017).
18. Wright, G. D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology* 24, 862 - 871 (2016).
19. Tran, T. H. T., Everaert, N. & Bindelle, J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *J Anim Physiol Anim Nutr* n/a-n/a (2016). doi:10.1111/jpn.12666
20. Dougnon, T. V. & Bankole, H. S. Review on the Problematic of Salmonellosis and Interests of Traditional Herbs in the Treatment. *Clinical Microbiology: Open Access* 5, (2016).
21. Dolowschiak, T. et al. IFN- γ Hinders Recovery from Mucosal Inflammation during Antibiotic Therapy for *Salmonella* Gut Infection. *Cell Host & Microbe* 20, 238 - 249 (2016).
22. Tennant, S. M. & Levine, M. M. Live attenuated vaccines for invasive *Salmonella* infections. *Vaccine* 33, C36 - C41 (2015).
23. Tang, T. et al. Development and evaluation of live attenuated *Salmonella* vaccines in newly hatched ducklings. *Vaccine* 33, 5564 - 5571 (2015).
24. Stecher, B. The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiology Spectrum* 3, (2015).
25. LaRock, D. L., Chaudhary, A. & Miller, S. I. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology* 13, 191 - 205 (2015).
26. Kuda, T. et al. Effect of sodium-alginate and laminaran on *Salmonella* Typhimurium

- infection in human enterocyte-like HT-29-Luc cells and BALB/c mice. *Carbohydrate Polymers* 125, 113 - 119 (2015).
27. Chirullo, B. et al. *Salmonella* Typhimurium exploits inflammation to its own advantage in piglets. *Frontiers in Microbiology* 6, (2015).
28. Wigley, P. *Salmonella* enterica in the Chicken: How it has Helped Our Understanding of Immunology in a Non-Biomedical Model Species. *Frontiers in Immunology* 5, (2014).
29. Diard, M. et al. Antibiotic Treatment Selects for Cooperative Virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Current Biology* 24, 2000 - 2005 (2014).
30. College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea & Park, Y.-M. *Salmonella* contamination of poultry slaughter houses. *Journal of Preventive Veterinary Medicine* 37, 125 - 131 (2013).
31. Ruby, T., McLaughlin, L., Gopinath, S. & Monack, D. *Salmonella's* long-term relationship with its host. *FEMS Microbiol Rev* 36, 600 - 615 (2012).
32. Kim, S. P., Kang, M. Y., Park, J. C., Nam, S. H. & Friedman, M. Rice Hull Smoke Extract Inactivates *Salmonella* Typhimurium in Laboratory Media and Protects Infected Mice against Mortality. *Journal of Food Science* 77, M80 - M85 (2012).
33. Ghosh, J. Role of Nitric Oxide in *Salmonella* Infection. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 27, 306 - 308 (2012).
34. Broz, P., Ohlson, M. B. & Monack, D. M. Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes* 3, 62 - 70 (2012).
35. Revollo, L., Ferreira, C. S. A. & Ferreira, A. J. P. Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. *Poultry Science* 88, 734 - 743 (2009).
36. Perron, G. G., Bell, G. & Quessy, S. Parallel evolution of multidrug-resistance in *Salmonella* enterica isolated from swine: Parallel evolution of resistance in *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters* 281, 17 - 22 (2008).
37. Lupp, C. et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host & Microbe* 2, 119 - 129 (2007).
38. Beal, R. K., Powers, C., Davison, T. F., Barrow, P. A. & Smith, A. L. Clearance of Enteric *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium in Chickens Is Independent of B-Cell Function. *Infection and Immunity* 74, 1442 - 1444 (2006).
39. Kubena, L. F., Byrd, J. A., Moore, R. W., Ricke, S. C. & Nisbet, D. J. Effects of drinking water treatment on susceptibility of laying hens to *Salmonella* Enteritidis during forced molt. *Poultry Science* 84, 204 - 211 (2005).
40. Burkey, T. E., Dritz, S. S., Nietfeld, J. C., Johnson, B. J. & Minton, J. E. Effect of dietary mannanoligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with

Salmonella enterica serotype Typhimurium. J. Anim. Sci. 82, 397 - 404 (2004).

41.Mastroeni, P. Development of acquired immunity to *Salmonella*. Journal of Medical Microbiology 52, 453 - 459 (2003).

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성				
	(영문) Development of control measures for <i>Salmonella</i> at farm level to produce safe animal products				
주 관 연구 기관	(주)에스티알바이오텍		주 관 연 구	(소속) (주)에스티알바이오텍	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 이상중	
총 연구개발비 (1,200,000천원)	계	1,200,000	총 연 구 기 간	2014. 7. 29 ~ 2017. 10. 28 (3년 3월)	
	정부출연 연구개발비	900,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	26명
	기업부담금	300,000		내부인원	26명
	연구기관부담금			외부인원	

○ 연구개발 목표 및 성과

본 과제에서는 육제품의 안전성 확보를 위해 가금류 및 돼지 농장에 적용 가능한 살모넬라 제어모델을 개발함에 있어서 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 저감제’와 ‘장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 저감제’를 2중 이상 개발하고 고도화하며, 최종적으로 살모넬라 저감제에 대한 현장실증실험을 통해 농가보급모델 개발과 함께 현장적용매뉴얼을 개발하고, 개발된 기술의 현장 보급 및 확산을 위한 정책안을 제시함.

○ 연구내용 및 결과

- ① 살모넬라 저감제 소재별 시제품을 생산하고 고도화 완료
- ② Mouse동물모델에서 효능을 평가하고 이론적인 검증을 통해 최적 배합 및 투여량을 설정 완료
- ③ 목적동물을 대상으로 공격접종실험을 실시하고, 효능과 함께 대상동물에서 항살모넬라 기전을 연구.
- ④ Mouse동물모델에서의 효능 평가 및 목적동물에서의 공격접종실험을 통한 효능 평가를 바탕으로 닭, 돼지의 2개 축종에 대하여 각 5개 농가에서 현장실증실험을 수행함.
- ⑤ 현장실증 test 결과를 바탕으로 효능을 평가하고, 최종적인 현장적용매뉴얼을 개발하며, 농식품부 정책부서와 정책자문회의를 통해 개발된 기술의 현장보급 정책안을 제시함.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1) 안전한 축산물의 생산

안전한 축산물 생산을 위한 매뉴얼로 활용할 계획하여, HACCP의 확산에 큰 도움이 될 것이라고 판단된다. 특히 본 과제에 의해 개발된 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’는 국내에서 이미 사업화 되었으며, 향후 해외에서 제품화가 이루어진다면 국내 보다 살모넬라에 의한 식중독 발생률이 높은 해외에서 식중독 발생률 감소에 크게 기여할 것으로 예상된다.

2) 제품의 해외 수출

가축의 살모넬라에 대한 저감 효과를 입증받을 수 있도록, 앞으로 논문 발표 등을 통해 해외에 적극 알림으로써 해외 진출이 가능할 것으로 예상된다.

3) 항생제 adjuvant로서의 활용

현재 항생제 다제내성균은 증가하지만 항생제의 개발은 늦어지고 있으므로, 그 사이에 항생제의 기능을 향상시킬 수 있는 항생제 adjuvant의 개발이 중요한 이슈가 되고 있다. 본 과제로 개발된 제품은 Class II 항생제 adjuvant에 속하는 물질이며, host의 면역력을 개선해서 항생제의 효과를 향상시킬 수 있는 물질이다. 특히 Class II 물질은 병원균의 항생제 내성 기전을 방해하는 Class I 물질과 병용할 수 있고, 항생제를 사용한 이후 몸 안의 항생제 내성균을 완전히 제거하는데 도움이 되어, 앞으로 항생제 저감 대책에도 핵심소재가 될 것으로 판단된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	314019-3	
사업구분	농림축산식품연구개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	농림축산식품연구개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성		과제유형	(응용)	
연구기관	(주)에스티알바이오텍/강원대학교/아주대학교		연구책임자	이상중/윤장원/남석현	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.07.29.~ 2015.07.28	300,000	100,000	400,000
	2차년도	2015.07.29.~ 2016.07.28	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2016.07.28.~ 2017.10.28	300,000	100,000	400,000
	계		900,000	300,000	1,200,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)에스티알바이오텍	대표이사/연구소장	이상중

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 아주우수

○ 실적 : 세계 최초로 몸 안의 장기 내로 침투한 살모넬라에 대한 저감이 가능한 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’의 개발을 완료함.

살모넬라는 숙주 내에서 생존하기 위하여 동물 면역체계에 잘 적응되어 있는 병원체로, 음식물을 통해 구강으로 들어온 살모넬라는 1단계로 장관 내강에서 장관감염을 일으키고, 2단계로 동물의 장관막을 뚫고 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 전신감염을 일으킬 수 있음. 그러므로 살모넬라의 감염을 통제하기 위해서는 ①장관 내강에서의 살모넬라 감염도 조절해야 하지만, ②M세포 및 상피세포를 통해서 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어온 살모넬라가 대식세포로 전달되고 이어지는 전신성 감염을 억제할 수 있도록 몸 안의 ‘세포내 감염 살모넬라’도 함께 제거해야 함.

그러나 기존 대부분의 살모넬라 저감제(백신 제외)는 모두 장관 내강의 살모넬라에만 작용하는 것으로, 실질적으로 문제가 되는 몸 안의 대식세포에 감염되어 있는 ‘세포내 감염 살모넬라’를 직접 저감시키는 제품은 없었으나, 본 과제를 통해 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 ‘세포내 감염 살모넬라’에 작용할 수 있는 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’를 세계 최초로 개발하였다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수

○ 요약 : 살모넬라 식중독이 전세계적인 문제가 되고 있는 현실에서 살모넬라의 감염을 통제하기 위해서는 세포내 감염 살모넬라에 작용할 수 있는 살모넬라 저감제가 필수적이며, 이를 세계 최초로 개발하였다. 특히 육류에서의 살모넬라 감소는 물론, 전세계적으로 계란에 의한 식중독이 매우 심각한 상황에서 계란 껍질의 안쪽의 감염을 감소시킬 수 있는 방법을 개발하였다는 점에서 의미가 크며, 뿐만 아니라 양돈에서는 우리나라의 대부분의 양돈농가가 PRRS 등으로 인하여 만성적인 소모성질병을 앓고 있는 상황에서 PRRS의 피해를 악화시키는 원인으로 지목된 살모넬라를 억제하는 것은 양돈농장의 생산성 향상에 큰 도움이 될 것으로 기대됨.

살모넬라 저감의 새로운 패러다임 제시

기존 대부분의 소재가 살모넬라 제어 및 저감 목적으로 주로 장관 내에서만 작용하는데 반해 본 과제를 통해 개발된 살모넬라 저감제는 장관 내강에서 뿐만 아니라, 장내에서 장관막을 통과하여 몸안으로 들어온 세포내 감염 살모넬라에 대해서 저감 기능이 있는 경쟁력 있는 소재임. 따라서 살모넬라를 제어/저감하는 새로운 패러다임이 형성될 것으로 판단됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 등급 : 우수
- 실적 : 살모넬라 저감제로서 특히, 장기내의 살모넬라 저감효과가 우수하며, 안전한 축산물을 생산하는데 큰 도움이 될 것임. 특히 현재 가금류의 생식기관에 감염된 살모넬라를 억제할 가능성이 있는 유일한 저감제 일 뿐만 아니라, 양돈 및 양계 분야에서 살모넬라 저감 이외에도 생산성을 향상시킬 수 있다는 점에서 제품 사용시에 경제적인 부담이 거의 없기 때문에 활용가능성이 매우 높을 것으로 기대됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 등급 : 아주우수
- 실적 : · 살모넬라 저감제의 작용부위 및 작용기전 확인
TLR4 agonist, LPS antagonist의 Th1 adjuvant 면역조절제로, 살모넬라에 대한 탐식작용 및 자가포식작용 활성화를 통해 대식세포내 감염 살모넬라를 제거하는 기전을 확인함.
· 최소한 1,000 마리가 훨씬 넘는 마우스를 사용하여 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절 소재’의 효능 평가, synergic 효과를 나타내는 소재 조합 및 적정 투여량을 설정하였다.
· 100 마리가 넘는 이유자돈을 사용하여 공격접종실험을 수행하였음.
· 돼지 6개 농장/가금류 5개 농장실증시험 완료.
· 농장실험 결과를 바탕으로, 추가적인 농장실험 수행하였음.
· 세계 최초로 대식세포내 살모넬라의 저감 효과를 보이는 물질을 개발하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 등급 : 우수
- 실적 : SCI 논문 4건 발표
살모넬라 저감제 특허 3건 출원, 등록 1건
학술발표 11건

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
① 살모넬라 저감제 시제품 생산 및 고도화	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 면역반응 활성화를 통해 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 면역조절소재 개발 - 살모넬라에 직접 작용하여 장관 내강의 살모넬라를 제거할 수 있는 항균소재 개발 - 선발된 고도화 면역조절소재의 scale-up 및 표준화
② <i>in vitro</i> 실험계에서 면역조절소재 및 항균소재의 작용기전 연구	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 고도화된 면역조절소재의 면역활성 유효성분 확인 및 생물학적 특성 평가 : 작용부위 및 작용기전 확인 - 살모넬라 감염 억제 기전 확인 : 자가포식 활성화 확인 - 살모넬라 성장 억제 기전 확인
③ Mouse 동물모델에서 효능을 평가하고 이론적인 검증을 통해 최적 배합 및 투여량을 설정	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 인수공통 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 <i>in vivo</i> 유효성 평가 - 종특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 <i>in vivo</i> 유효성 평가 - 항생제 다제내성 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 <i>in vivo</i> 유효성 평가 - 살모넬라 저감제의 최적 배합 및 투여량 설정
④ 목적동물을 대상으로 공격접종시험을 실시하고, 효능과 함께 대상동물에서 항살모넬라 기전을 연구.	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 닭에서의 공격접종 test 실시 : 감염면역학 및 임상병리학적 효능 분석 - 돼지에서의 공격접종 test 실시 : 감염면역학 및 임상병리학적 효능 분석
⑤ 목적동물에서 공격접종시험을 통한 효능 평가 및 Mouse 동물모델에서 효능 평가를 바탕으로 닭, 돼지 농가에서 현장실증 시험을 수행	10	100	<ul style="list-style-type: none"> - 5개 양계농장에서의 현장실증실험 실시 - 6개 양돈농장에서의 현장실증실험 실시
⑥ 현장실증실험 결과를 바탕으로 효능을 평가하고, 최종적인 현장적용 매뉴얼을 개발하며, 농식품부 정책부서와 정책자문회의를 통해 개발된 기술의 현장보급 정책안을 제시	10	100	<ul style="list-style-type: none"> - 안전한 축산물 생산을 위한 농장단계에서의 살모넬라 저감 방향에 대한 자문회의 - 농장내 살모넬라 저감을 위한 ‘현장적용매뉴얼’작성 - 농림식품부 정책부서에 제안할 정책안 제안서 작성
합계	100		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

살모넬라의 가장 대표적인 특징은 ‘살모넬라는 세포내 감염 병원균으로, 대식세포에서 생존 및 증식이 가능하여 우리 몸 (사람 및 동물)의 면역체계를 약화시키고 전신감염이 이루어진다’ 는 점임.

살모넬라는 숙주 내에서 생존하기 위해서 동물 면역체계에 잘 적응되어 있는 병원체로, 음식을 통해 구강으로 들어온 살모넬라는 강산성의 위액에서 생존할 수 있으며, 위를 통과한 살모넬라는 2단계에 걸쳐 감염을 일으킬 수 있는데, 1단계로 장관 내강에서 장관감염을 일으키고, 2단계로 동물의 장관막을 뚫고 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 전신감염을 일으킬 수 있음. 그러므로 살모넬라의 감염을 통제하기 위해서는 ①장관 내강에서의 살모넬라 감염도 조절해야 하지만, ②M세포 및 상피세포를 통해서 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어온 살모넬라가 대식세포로 전달되고 이어지는 전신성 감염을 억제할 수 있도록 몸 안의 세포내 감염 살모넬라도 함께 제거하여야 함.

그러나 기존 대부분의 살모넬라 저감제(백신 및 항생제 제외)의 공통적인 특징은 모두 장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재로, 장관 내강의 살모넬라만 제거할 수 있다는 점임. 실질적인 문제가 되는 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 직접 저감시키는 제품은 없으며, 단순히 장관 내강의 살모넬라를 저감시켜서 결과적으로 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 억제하는 수준에 그치고 있음.

따라서 안전한 축산물 생산을 위한 농장 단계에서의 살모넬라 제어를 위해서는 ‘장관 내강에서 살모넬라 대응이 가능한 소재’와 ‘몸 안의 세포내 감염 살모넬라에 대응 가능한 소재’의 배합을 통해 살모넬라 저감 효능을 획기적으로 향상시킬 필요가 있음.

이에 본 과제를 통해 장관막을 통과하여 몸 안으로 들어가 대식세포에 침투하여 생존하고 있는 세포내 감염 살모넬라에 작용할 수 있는 ‘세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제’를 세계 최초로 개발하였으며, 장관 내강의 살모넬라에 작용하는 기존의 살모넬라 저감제인 바실러스소재와 병용 투여 시 세포내 감염 살모넬라의 저감 효능에 있어서 synergic 효과를 나타내 살모넬라 감염을 획기적으로 저감시킬 수 있음을 확인할 수 있었음.

현재 미국을 비롯한 선진국은 SE 혹은 ST로 인한 살모넬라 식중독이 보건위생에 매우 중요한 문제로 부각되고 있음. 본 과제로 개발된 살모넬라 저감제는 현재 돼지와 가금류에 모두 효과가 있지만, 돼지에서는 장기내의 면역세포에 기생하는 살모넬라에 대해서 면역세포의 자가포식을 유도하여 살모넬라를 저감/제거할 수 있는 전세계에서 유일한 제품으로 판단되며 특히, 가금류에서는 생식기관에 감염된 살모넬라를 저감시켜, 계란 내부의 살모넬라의 감염을 줄여, 살모넬라 식중독을 줄일 수 있을 것으로 기대됨.

이는 앞으로 살모넬라의 저감을 위한 대책에 중요한 저감방안을 추가했다는 것 뿐만 아니라, 살모넬라가 가축의 몸 안의 대식세포내에서 감염된 상태로 유지되어 항생제나, 유기산 등의 사용이 중단되면 다시 재발하는 문제에 대해서 근본적인 해결을 제시했다는 점에서 매우 중요한 의의가 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 과제를 통해 개발된 살모넬라 저감제는 이미 시제품 단계를 넘어, 시중에 판매가 되고 있는 제품임.
- 본 과제에서 개발된 살모넬라 저감제는 전세계에서 유일하게 면역세포인 대식세포에 감염된 살모넬라를 억제할 수 있는 제품으로, 수출 전망이 아주 기대되는 제품임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 과제 연구결과를 바탕으로, 살모넬라 저감제 및 안전한 축산물 생산을 위한 사료첨가제로 판매하고자 함.
- 살모넬라에 의한 식중독 발생률이 높은 해외에 진출할 수 있도록 필요시 추가 연구 및 논문 발표 등을 통해 해외에서 적극적으로 홍보하고자 함.
- 가축의 다른 질병 조절에 대하여 새로운 패러다임을 제시.
- 축산산업의 수출에 기여할 수 있는 방안 모색을 통해 판로를 확보하고자 함.
- 항생제 다제내성균의 억제에 항생제 adjuvant (Class II)로의 판매를 목적으로 추가 연구가 필요함.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 특히 출원시 까지 비공개 요청함

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 특히 출원시 까지 비공개 요청함

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성			
주관연구기관	(주)에스티알바이오텍	주관연구책임자	이상중	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000천원	300,000천원		1,200,000천원
연구개발기간				
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 살모넬라 저감제 시제품 생산 및 고도화	- 면역반응 활성화를 통해 몸 안의 세포내 감염 살모넬라를 제거할 수 있는 면역조절소재 개발 - 살모넬라에 직접 작용하여 장관 내강의 살모넬라를 제거할 수 있는 항균소재 개발 - 선발된 고도화 면역조절소재의 scale-up 및 표준화
② in vitro 실험계에서 면역조절소재 및 항균소재의 작용기전 연구	- 고도화된 면역조절소재의 면역활성 유효성분 확인 및 생물학적 특성 평가: 작용부위 및 작용기전 확인 - 살모넬라 감염 억제 기전 확인: 자가포식 활성화 확인 - 살모넬라 성장 억제 기전 확인
③ Mouse 동물모델에서 효능을 평가하고 이론적인 검증을 통해 최적 배합 및 투여량을 설정	- 인수공통 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 in vivo 유효성 평가 - 종특이 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 in vivo 유효성 평가 - 항생제 다제내성 살모넬라 균주를 이용한 살모넬라 경구 감염 마우스모델에서의 in vivo 유효성 평가 - 살모넬라 저감제의 최적 배합 및 투여량 설정
④ 목적동물을 대상으로 공격접종시험을 실시하고, 효능과 함께 대상동물에서 항살모넬라 기전을 연구.	- 닭에서의 공격접종 test 실시 : 감염면역학 및 임상병리학적 효능 분석 - 돼지에서의 공격접종 test 실시 : 감염면역학 및 임상병리학적 효능 분석
⑤ 목적동물에서의 공격접종시험을 통한 효능 평가 및 Mouse 동물모델에서의 효능 평가를 바탕으로 닭, 돼지 농가에서 현장실증실험을 수행	- 5개 양계농장에서의 현장실증실험 실시 - 6개 양돈농장에서의 현장실증실험 실시
⑥ 현장실증실험 결과를 바탕으로 효능을 평가하고, 최종적인 현장적용매뉴얼을 개발하며, 농식품부 정책부서에 개발된 기술의 현장보급 정책안 제안	- 안전한 축산물 생산을 위한 농장단계에서의 살모넬라 저감 방향에 대한 자문회의 개최 - 농장내 살모넬라 저감을 위한 '현장적용매뉴얼' 작성 - 농림식품부 정책부서에 제안할 정책안 제안서 제안

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	3			1		2					5			3	3					
연구기간 내 달성실적	3	1		1		2	909		8	1999	3			11	3		2			
달성율 (%)	100	-		100		100	-				60			100	100		-			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	몸 안의 세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	✓					✓				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표											1						1	3	
연구기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획																			

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	세포내 감염 살모넬라 저감 면역조절제		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (직접실시)		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

- (1) 지식재산권
 ① 특허출원
 특허출원 3

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2016.05.26
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(DPB150063k03)
 출원번호 10-2016-0065084 (접수번호 1-1-2016-0509329-10)
 출원인명칭 (주)에스티알바이오택(1-2001-003772-4)
 대리인성명 특허법인 정안(9-2012-100022-4)
 발명자성명 이상중 박선옥 허인영 박선주 김진만 남석현 김성필
 발명의명칭 미생물(담자균류균사) 발효 및 효소처리 생물전환공정을 통해 생물전환된 산초생물전환산물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교한허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

- (1) 지식재산권
- ② 특허등록
- 특허등록 1



(2) 기술실시(이전)

직접실시

- (3) 사업화
- ① 제품화
- 제품화 1

[별지 제8호서식]

등록번호 제 881770001 호

사 료 성 분 등 록 증

대표자 : 이상중 생년월일 : 1955년 10월 15일

업체명 : (주)에스티알바이오텍 제조(수입)업등록번호 6420000-502-2015-0026

소재지 : 강원도 춘천시 소양강로 56, 바이오4동 3층 8호 (후평동)

사료의 종류 : 보조사료/미생물제-합제 사료의 명칭 : 유익균 합제 1

사료의 형태 : 가루 사료의 용도 : 사료원료용, 양축농가용

제조국가 : 국내산

제품명(영문명) : 닥터이윤SJ Core100, 닥터이윤SJ Core100-F

사료의 성분량

성분명	엔테로코커스 스웨이엄	바실러스 서브틸리스							
성분량	5.0×10^8 cfu/g 이상	5.0×10^8 cfu/g 이상							

『사료관리법』 제12조제2항 및 같은 법 시행규칙 제 12조제3항에 따라
위와 같이 사료의 성분등록을 하였음을 증명합니다.

2015 년 09 월 10 일

강 원 도 지 사



210mm x 297mm(민쇄용지(1종) 120g/㎡)

닥터이문SJ Core100-F

성분등록사항

- ▶ 성분등록번호 : 제 881770001호
- ▶ 사료의 명칭, 형태 및 용도 : 보조사료 유익균합제(가루)/실수요자용
- ▶ 생균제 (생존을 강화 및 장내 도달을 향상)
 - Enterococcus faecium (다중코팅) 5×10^8 cfu/g
 - Bacillus subtilis (포자) 5×10^8 cfu/g
- ▶ 사용한 원료
 - 미강(표고균사)발효/효소처리분말 적량
 - 살균처리 콘플러스 적량

주요기능

- ▶ 장내 미생물균총 개선
- ▶ 유해미생물 생육 억제
- ▶ 축분내 암모니아 발생 감소

주의사항

- ▶ 기능성보조사료로 도움을 줄수 없을 수도 있습니다.
- ▶ 서늘하고 건조한 장소에 보관 하십시오
- ▶ 권장사용량 : 100g/ton이며 용도에 따라 증량 가능합니다.
- ▶ 유전자 변형된 옥수수 포함 가능성이 있음.



제조원 : (주)에스티알바이오텍
판매원 : (주)에스티알바이오텍
강원도 춘천시 소양강로 56
033-258-8325

- ❖ 포장 단위 : 20Kg
- ❖ 제조년월일 : 2015. 10. 15
- ❖ 유통기한 : 제조일로부터 12개월
- ❖ Batch No. : SJ-Core100F-15005

닥터이문 GF2

성분등록사항

- ▶ 성분등록번호 : 제 881770002호
- ▶ 명칭 및 형태 : 유익균합제 4 (가루)
- ▶ 용도 : 사료원료용, 양축농가용 / 미생물제(합제)

▶ 등록성분 및 함량

- Enterococcus faecium (다중코팅)1×10⁸cfu/g
- Bacillus subtilis (포자).....1×10⁸cfu/g

▶ 사용한 원료

- 강황 (표고균사)발효/효소처리분말.....적량
- 콘플러스.....적량

주요기능

- ▶ 장내 미생물균총 개선 ▶ 축분내 암모니아 발생 감소
- ▶ 유해미생물 생육 억제

주의사항

- ▶ 기능성보조사료로 도움을 줄수 없을 수도 있습니다.
- ▶ 서늘하고 건조한 장소에 보관 하십시오
- ▶ 권장사용량 : 500g/ton이며 용도에 따라 증량 가능합니다.
- ▶ 유전자변형된 옥수수 포함 가능성이 있음.

제조원 : (주)에스티알바이오텍
판매원 : (주)에스티알바이오텍
강원도 춘천시 소양강로 56
033-258-6325

♣포장단위 : 20Kg
♣제조년월일 : 2017. 07 . 18
♣유통기한 : 제조일로부터 12개월
♣Batch No. :Dr-PL-17001

(3) 사업화
 ② 매출액

(2017.12.05. 현재)

제품명	연도별	매출액(원)	비고
닥터이문SJ core 100-F	2015 (2015.10~2015.12)	103,200,000	
	2016 (2016.01~2016.12)	391,200,000	
	2017 (2017.01~2017.11 현재)	415,200,000	
합계		909,600,000	

Turmeric Bioprocessed with Mycelia from the Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) Protects Mice Against Salmonellosis

Sung Phil Kim,^{1,2} Sang Jong Lee,² Seok Hyun Nam,^{3,*} & Mendel Friedman^{4,*}

¹Research Institute of Basic Sciences, Ajou University, Suwon, South Korea; ²STR Biotech. Co., Ltd., Chuncheon, South Korea; ³Department of Biological Science, Ajou University, Suwon, South Korea; ⁴Western Regional Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Albany, CA, USA

*Address all correspondence to: Seok-Hyun Nam, Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea; shnam@ajou.ac.kr; or Mendel Friedman, Western Regional Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 800 Buchanan St, Albany, CA 94710, USA; mendel.friedman@ars.usda.gov

ABSTRACT: This study investigated the suppressive mechanisms of an extract from bioprocessed *Lentinus edodes* mycelial liquid culture supplemented with turmeric (bioprocessed *Curcuma longa* extract [BPCLE]) against murine salmonellosis. The BPCLE extract from the bioprocessed mycelia of the *Salmonella* Typhimurium into murine RAW 264.7 macrophage cells, elimination of intracellular bacteria, and elevation of inducible nitric oxide synthase expression. Dietary administration of BPCLE activated leukocytes from the mice infected with *Salmonella* through the intraperitoneal route. The enzyme-linked immunosorbent assay of the cytokines produced by splenocytes from infected mice showed significant increases in the levels of T_H1 cytokines, including interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, and IL-12. Histology showed that dietary administration of BPCLE protected against necrosis of the liver resulting from a sublethal dose of *Salmonella*. In addition, the treatment (1) extended the lifespan of lethally infected mice, (2) suppressed the invasion of *Salmonella* into human Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells, (3) increased excretion of the bacterium in the feces, (4) suppressed the translocation of the *Salmonella* to internal organs, and (5) increased total immunoglobulin A in both serum and intestinal fluids. BPCLE protected the mice against salmonellosis via cooperative effects that include the upregulation of the T_H1 immune reaction, prevention of translocation of bacteria across the intestinal epithelial cells, and increased immunoglobulin A production in serum and intestinal fluids.

KEY WORDS: antibacterial effect, bioprocessing, composition, *Curcuma longa*, immunostimulation, *Lentinus edodes* mycelia, mechanism, mice, *Salmonella* Typhimurium, salmonellosis prevention, turmeric, spice

ABBREVIATIONS: BPCLE, bioprocessed *Curcuma longa* extract; CFU, colony-forming unit; Con A, concanavalin A; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; IFN, interferon; IgA, immunoglobulin A; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; NA, nutrient agar medium; NPCLE, non-bioprocessed *Curcuma longa* extract; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PDA, potato dextrose agar; T_H, T-helper

I. INTRODUCTION

The rhizomatous turmeric plant is mainly cultivated in tropical Asia and is widely used as a culinary spice and in traditional medicines.¹ Submerged culture mycelia from mushrooms are a rich source of bioactive compounds.^{2,3} Exoenzymes produced by mushrooms can biotransform various substrates into potentially bioactive compounds.^{4,5} We previously

reported that a bioprocessed formulation from the shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (= *Lentinula edodes*, Marasmiaceae, Agaricomycetes), protected mice against allergic asthma⁶ via immunostimulation by mechanisms similar to those described by Fang et al.⁷ Susceptibility to bacterial infections is often attributed to stimulation (upregulation) of immune factors including T-helper (T_H) cells and their cytokines (interleukin [IL]-2, -6,

- (4) 학술성과
 ① 논문
 논문 2

Journal of Food Science



Mechanism of Antibacterial Activities of a Rice Hull Smoke Extract (RHSE) against Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium in vitro and in Mice

Journal:	Journal of Food Science
Manuscript ID:	JFDS-2017-1572.R1
Manuscript Type:	Food Microbiology and Safety
Date Submitted by the Author:	13-Nov-2017
Complete List of Authors:	Kim, Sung Phil, Ajou University, Research Institute of Basic Sciences Lee, Sang Jong, STR biotech, Central laboratory Nam, Seok, Ajou University, Department of Biological Science Friedman, Mendel, USDA Western Regional Research Center, Produce Safety and Microbiology
Keywords:	Rice hull liquid smoke, multidrug resistant <i>S. salmonella</i> <i>S. typhimurium</i>, inactivation, mechanism, functional food additive

SCHOLARONE
Manuscripts

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

Page 1 of 30

Journal of Food Science

1

1 Mechanism of Antibacterial Activities of a Rice Hull
 2 Smoke Extract (RHSE) against Multidrug-Resistant
 3 *Salmonella* Typhimurium in vitro and in Mice

4 Sung Phil Kim,^{1,2} Sang Jong Lee,³ Seok Hyun Nam,^{4,2} and Mendel

5 Friedman^{6,*}

6 ¹Research Institute of Basic Sciences, Ajou University, Suwon, 164499, Republic of
 7 Korea,

8 ³STR Biotech Ltd., Chuncheon 24232, Republic of Korea,

9 ⁴Department of Biological Science, Ajou University, Suwon, 16499, Republic of Korea,

10 ⁶Western Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of
 11 Agriculture, Albany, CA 94710, USA

12 *Correspondence: Dr. Seok Hyun Nam, Department of Biological Science, Ajou
 13 University, Suwon, 443-749, Republic of Korea, Tel: 82-31-219-2619; Fax: 82-31-219-

14 1615; E-mail: shnam@ajou.ac.kr; Dr. Mendel Friedman, WRRCA/ARS-USDA 800


15 Buchanan St., Albany, CA, USA, Tel: 01-510-559-5615; Fax 01-510-559-6162; E-mail:

16 mendel.friedman@ars.usda.gov.

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

ScholarOne Manuscripts™

Sung Phil Kim ▾ Instructions & Forms Help Log Out



Home Author

Author Dashboard

Author Dashboard

2 Manuscripts I Have Co-Authored >

Start New Submission >

Legacy Instructions >

5 Most Recent E-mails >

English Language Editing Service >

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EOS: Ferguson, Amanda	JFDS-2017-1572.R1	Mechanism of Antibacterial Activities of a Rice Hull Smoke Extract (RHSE) against Multidrug-Resistant <i>Salmonella</i> Typhimurium in vitro and in Mice View Submission Submitting Author: Friedman, Mendel	09-Nov-2017	13-Nov-2017
<ul style="list-style-type: none"> Accept (27-Nov-2017) Awaiting Production Checklist 				
EOS: Ferguson, Amanda EOS: MacKenzie, Brian	JFDS-2017-1572	Mechanism of Antibacterial Activities of a Rice Hull Smoke Extract (RHSE) against Multidrug-Resistant <i>Salmonella</i> Typhimurium in vitro and in Mice View Submission Submitting Author: Friedman, Mendel	21-Sep-2017	21-Sep-2017
<ul style="list-style-type: none"> Major Revision (01-Nov-2017) a revision has been submitted 				

Research Note

A Bioprocessed Polysaccharide from *Lentinus edodes* Mycelia Cultures with Turmeric Protects Chicks from a Lethal Challenge of *Salmonella Gallinarum*

DALMURIHAN,¹ HYUNG TAE LEE,¹ JUNE BONG LEE,¹ YONGBAEK KIM,² SANG JONG LEE,³ AND JANG WON YOON^{1*}

¹College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Republic of Korea; ²Laboratory of Clinical Pathology, Research Institute for Veterinary Science, and Brain Korea 21 Plus Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea; and ³STR Biotech, Ltd., 56, Soyonggang-ro, Chuncheon, Gangwon 24232, Republic of Korea

MS 16-306: Received 27 July 2016/Accepted 12 October 2016/Published Online 20 January 2017

ABSTRACT

Our previous studies demonstrated that a bioprocessed polysaccharide (BPP) isolated from *Lentinus edodes* mushroom mycelia cultures supplemented with black rice bran can protect mice against *Salmonella* lipopolysaccharide-induced endotoxemia and reduce the mortality from *Salmonella* Typhimurium infection through upregulated T-helper 1 immunity. Here, we report that a BPP from *L. edodes* mushroom mycelia liquid cultures supplemented with turmeric (referred to as BPP-turmeric) alters chicken macrophage responses against avian-adapted *Salmonella Gallinarum* and protects chicks against a lethal challenge from *Salmonella Gallinarum*. In vitro analyses revealed that the water extract of BPP-turmeric (i) changed the protein expression or secretion profile of *Salmonella Gallinarum*, although it was not bactericidal, (ii) reduced the phagocytic activity of the chicken-derived macrophage cell line HD-11 when infected with *Salmonella Gallinarum*, and (iii) significantly activated the transcription expression of interleukin (IL)-1 β , IL-10, tumor necrosis factor α , and inducible nitric oxide synthase in response to various *Salmonella* infections, whereas it repressed that of IL-4, IL-6, interferon- β , and interferon- γ . We also found that BPP-turmeric (0.1 g/kg of feed) as a feed additive provided significant protection to 1-day-old chicks infected with a lethal dose of *Salmonella Gallinarum*. Collectively, these results imply that BPP-turmeric contains biologically active component(s) that protect chicks against *Salmonella Gallinarum* infection, possibly by regulating macrophage immune responses. Further studies are needed to evaluate the potential efficacy of BPP-turmeric as a livestock feed additive for the preharvest control of fowl typhoid or foodborne salmonellosis.

Key words: Bioprocessed polysaccharide; Chicken macrophage responses; *Lentinus edodes*; *Salmonella Gallinarum*; Turmeric

Fowl typhoid is a severe systemic disease caused by avian-adapted *Salmonella Gallinarum* that has caused substantial economic losses to the commercial poultry and egg-laying industries (7, 9). Because the microorganism is found frequently in many poultry products and transmitted easily to other individuals (7, 9), preharvest control at the farm level is critical for prevention of infection.

Recently, we demonstrated that a bioprocessed polysaccharide (BPP) isolated from cultures of *Lentinus edodes* mushroom mycelia supplemented with black rice bran (referred to as BPP-bran) could protect mice against *Salmonella* lipopolysaccharide-induced endotoxemia and reduced mouse mortality from *Salmonella* Typhimurium through upregulation of T-helper 1 (Th1) immunity (12, 13). Although the molecular mechanisms behind these protective effects are unclear, we speculated that certain compounds from the mycelia cell wall or black rice bran might be converted to a biologically active polysaccharide by

enzymatic catalysis during the bioconversion process (12, 13). Indeed, our previous biochemical characterization of BPP-bran revealed that it is a pure compound with a molecular weight of >10 kDa, containing neutral sugars (glucose, galactose, rhamnose, fucose, mannose, and xylose) and basic amino sugars (glucosamine and galactosamine), and is likely β -glucan structured (12).

Similar to black rice bran (8, 16), turmeric (an Indian spice derived from the rhizomes of *Curcuma longa*) is also known to possess strong antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities (6, 10, 15). In this study, a BPP from *L. edodes* mushroom mycelia liquid cultures supplemented with turmeric (referred to as BPP-turmeric) was prepared by the bioconversion process previously established for BPP-bran (12). Its direct effects on avian-adapted *Salmonella Gallinarum* 277 and on the response of the chicken-derived macrophage cell line, HD-11 (22), against *Salmonella Gallinarum* 277 or foodborne *Salmonella* were investigated. The in vivo protective efficacy was evaluated by using a 1-day-old chick infection model exposed to a lethal dose of *Salmonella Gallinarum* (3).

* Author for correspondence. Tel: +82-33-250-8791; Fax: +82-33-259-5625; E-mail: jwy706@kangwon.ac.kr.

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 2

* 학회명 : 42회 한국미생물생명공학회 국제학술대회 (I-50)

* 발표일시 : 2015. 06. 24 ~ 06. 26. / 경주

* 발표자 : 한달무리, 이형태, 이준봉, 김나연, 김향아, 김용백, 윤장원



I-47

Anti-inflammatory Effects of CecropinA(1-8)-Magainin(1-12) Hybrid Peptide Analog P5 against *Propionibacterium acnes* Infection in Mice.

Hyeon HAN^{1,2} and Youkyung PARK^{1,2*}
¹Research Center for Proteinous Materials (RCPM), Chonnam University, Gwangju, Republic of Korea, ²Department of Biotechnology and BK21-Plus Research Team for Innovative Control Technology, Chonnam University, Gwangju, Republic of Korea.
*Corresponding author: y_k_park@chonnam.ac.kr

The cutaneous inflammation associated with acne vulgaris is caused by the anaerobic bacterium *Propionibacterium acnes* through activation of the innate immune system in the skin. Current standard treatments for acne have limitations that include adverse effects and poor efficacy in many patients, making development of a more effective therapy highly desirable. In the present study, we demonstrate the protective effects of a novel customized c-bacterial cationic peptide, P5, against *P. acnes*-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. Application of P5 significantly reduced expression of two inflammatory cytokines IL-8 and TNF α in *P. acnes*-treated primary human keratinocytes, whereas P5 appeared to act in part by binding to bacterial LTA, thereby suppressing TLR2-to-NF- κ B signaling. In addition, in a mouse model of acne vulgaris, P5 exerted both anti-inflammatory and antimicrobial effects against *P. acnes*, but exerted no cytotoxic effects against skin cells. These results demonstrate that P5, and perhaps other cationic antimicrobial peptides, offer the unique ability to reduce numbers *P. acnes* cells in the skin and to inhibit the inflammation they trigger. This suggests these peptides could potentially be used to effectively treat acne without adversely affecting the skin.
Keywords:

I-48

Mechanism of DNA Adsorption and Desorption on Graphene Oxide

Nam-In GOO, Joon Soo PARK and Dong-Eun KIM^{1*}
¹Dept. of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
*Corresponding author: kimde@konkuk.ac.kr

Graphene oxide adsorbing thymidine-labeled single-stranded DNA serves as a sensor system, because subsequent desorption of the adsorbed probe DNA from GO in the presence of complementary target DNA enhances the fluorescence. In this study, we investigated the interaction of single- and double-stranded DNAs with GO by using a fluorescently labeled DNA probe. In addition, the status of ssDNA or dsDNA previously adsorbed on the GO surface was investigated by adding complementary or non-complementary DNA to the adsorption complex. We observed that hybridization occurred between the cDNA and the probe DNA on the GO surface. Based on the kinetics driven by the incoming DNA, we propose a desorption mechanism of the adsorbed probe DNA from the GO surface: the desorption of the GO-adsorbed DNA was facilitated following its hybridization with cDNA on the GO surface; when the GO surface was almost saturated with the adsorbed DNA, nonspecific desorption dominated the process through a simple displacement of the GO-adsorbed DNA by the incoming DNA because of the low of mass action. Our results can be applied to design appropriate DNA probes and to choose proper GO concentrations for experimental setup to improve specific signaling in many biosensor systems based on the GO platform.
Keywords: Graphene oxide, Fluorescent DNA, Base complementarity

I-50

Bioprocessed Polysaccharide Powders from the Liquid Culture of *Leitmus edodes* Fungal Mycelia with *Carrusma longa* (Turmeric) Alter the Chicken Macrophage Responses to *Salmonella enterica* species

Jung Woo YOON^{1*}, Dalmeun HAN¹, Hyung Tae LEE¹, Joon Bong LEE¹, Chang-Ho HONG¹, Na-Yon KIM¹, Haeng-A KIM¹ and Youngho KIM²
¹College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Republic of Korea, ²Laboratory of Clinical Pathology, Research Institute for Veterinary Science, & BK 21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, The Republic of Korea.
*Corresponding author: jwyo06@kangwon.ac.kr

Various pharmacological activities of *Carrusma longa* (Turmeric) have reported such as anti-inflammatory and antioxidant effects. In this study, bioprocessed polysaccharide powders (BPP) from the liquid culture of *Leitmus edodes* fungal mycelia containing *Carrusma longa* (referred to as BPP-Curcuma) were extracted in water at 37°C and examined their biological effects on the strain-specific or non-specific *Salmonella enterica* species as well as their responses to the chicken-derived macrophage cells, HD-11, during the *Salmonella* infection. Our experimental analyses revealed that the water extracts of BPP-Curcuma (i) did not affect the growth kinetics of *Salmonella* spp. evaluated, (ii) induced the elevation of the bacterial succinate dehydrogenase compared to the untreated control groups, (iii) showed increased phagocytic activities in the HD-11 cells when infected by *Salmonella* spp., but did not affect their bacterial killing activities, and (iv) greatly upregulated the transcription expression of TNF- α , IL-1 β , iNOS, and IL-10. Interestingly, such cytokine expression appeared to be modulated when the HD-11 cells were pre-exposed with *Salmonella* spp. Taken together, these results imply the biological activity of BPP-Curcuma on both *Salmonella* spp. and macrophages during an acute infection.
Keywords: *Carrusma longa*, Avian *Salmonella* infection, Chicken macrophage response

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 3

* 학회명 : 2015년 한국예방수의학회 추계학술대회

* 발표일시 : 2015. 10. 07. / 대전 충남대학교

* 발표자 : 한달무리

www.jpvm.or.kr ISSN 2287-7991

한국예방수의학회

2015년 추계학술대회 2015 KSPVM Symposium

제39권 제3호 부록, 2015년 10월

국민보건 향상을 위한 국가 재난형 질병 대응 전략

- 일시 : 2015. 10. 7(수) 18:00 ~ 2015. 10. 8(목) 18:00
- 장소 : 대전광역시 충남대학교 수의과대학
- 주최 : 한국예방수의학회
- 주관 : CNU 충남대학교 수의과대학
- 후원 : 식품의약품안전처, 농림축산검역본부, 대한수의학회



한국예방수의학회
The Korea Society of Preventive Veterinary Medicine

P - 2

Immunomodulation of Bioprocessed Polysaccharide Powders from the Liquid Culture of *Leptinus edodes* Fungal Mycelia with Rice Bran in a Chicken Macrophage during *Salmonella* Infection

Dalmei Han¹, Hyung Tae Lee¹, June Bong Lee¹, Chong-Hae Hong¹, Na-Yon Kim², Hang-A Kim², Yongbaek Kim², and Jang Won Yoon^{1*}

¹College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Republic of Korea
²Laboratory of Clinical Pathology, Research Institute for Veterinary Science, & BK 21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea (jwy706@kangwon.ac.kr)

Various beneficial effects of rice bran extracts have been reported such as anti-tumor, anti-oxidation, and anti-inflammation activities. Previously, it was demonstrated that bioprocessed polysaccharide powders (BPPs) from the liquid culture of *Leptinus edodes* fungal mycelia containing rice bran (referred to as BPP-R) can stimulate the immune responses in mice during *Salmonella* infection. In this study, the water extracts of BPP-R at 37°C were examined their biological effects on three pathogenic *Salmonella* serovars as well as their responses to the chicken-derived macrophage cells, HD-11, when infected with the avian-adapted *Salmonella enterica* Gallinarum 227 strain. Although the BPP-R extracts did not affect the growth of *S. Gallinarum* as well as bacterial protein expression profile, they slightly increased swimming motility of *Salmonella* species. BPP-R extracts increased the viability of HD-11 cells at the concentrations ranging from 30-250 µg/ml after the exposure for 72 hrs and enhanced the phagocytic activities of HD-11 cells, but not the bacterial killing activities, when pre-treated with 1 mg/ml BPP-R extracts for 16 hrs. The cytokine transcription profiling revealed that BPP-R extracts were able to up-regulate the expression of IL-1β, iNOS, and IL-10, while down-regulate IL-4 and IL-6. Interestingly, the differential gene expression patterns were observed in the *S. Gallinarum*-infected HD-11 cells that were pre-exposed with BPP-R extracts. Taken together, our results imply the biological activity of BPP-R extracts during the *Salmonella* infection *in vivo*, especially on chicken macrophages, through the modulation of cytokine expression.

Acknowledgment : This study was supported by Bio-Industry Technology Development Program (No. 314019-3), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

40 한국예방수의학회 2015년 추계학술대회

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 5

- * 학회명 : Infectious diseases world summit
- * 발표일시 : 2015. 7. 8 ~ 2016. 7. 10 / 보스턴
- * 발표자 : 김나연 외

The poster features a dark red background with a microscopic view of a cell. At the top left is the GTC logo (Global Technology Community). The main title 'INFECTIOUS DISEASES WORLD SUMMIT' is centered in large white letters. Below the title, it lists three co-located conferences: 13th Vaccines Research & Development, 4th Influenza Research & Development, and 12th Anti-Infectives Partnering & Deal-Making. A section titled 'Keynote and Plenary Speakers' lists names and affiliations such as Risky Balou (Vice President and Head, Critical Research and Translational Science, Vaccine Discovery and Development, GSK Vaccines), Helen Boucher (Director, Infectious Diseases Fellowship Program, Tufts Medical Center), Leonard Freed (Vice President, Director Scientific Affairs and Public Health, Ventron, North America, DanComBio), Mark Parrington (Senior Director, Sanofi Pasteur), Nancy Sullivan (Chief, Biodefense Research Section, National Institutes of Health), Stephen H. Zinner (Charles S. Coakley Distinguished Professor of Medicine, Harvard Medical School, Mount Auburn Hospital), and Carol Plautz.

A row of logos for Gold Sponsors (Viracor-IBT, SR Bioscience, antibodies, Technology Networks, BENTHAM SCIENCE) and Silver Sponsor (utmb Health). Other logos include The New York Academy of Sciences, BIOSCREENING.COM, pharmanext, and BioPharma DIVZ. A note at the bottom says 'Visit www.gtcbio.com for more information!'.

A Preliminary Toxicity Study of an Immunostimulator, Curcuma Longa Extract, in Chicken

Na-Yon Kim^{1,2}, Myung-Chul Kim^{1,2}, Hang-A Kim, Uree Seo¹, Hyung Tae Lee⁴, Dalmuri Han⁴, June Bong Lee⁴, Jang Won Yoon⁴ and Yongbaek Kim^{1,3}

¹Laboratory of Clinical Pathology; ²Research Institute for Veterinary Science; ³BK 21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, The Republic of Korea 151-742; ⁴College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Republic of Korea

Presenting Author: Yongbaek Kim
Phone: 82-2-880-1273
Email: yongbaek@snu.ac.kr
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu
Seoul 151-742
Korea

Natural Curcuma extract has been widely used as a component of oriental medicine and is proven to possess various biological characteristics including antimicrobial, antioxidative, and anti-inflammation activities. Ethanol extract of the natural Curcuma extract retains a biologically active component. This study was performed to screen potential toxicity of the natural Curcuma extract prepared to control *Salmonella* spp. in chicken. Materials and Methods: Ethanol fraction of the natural Curcuma extract was diluted in 1%-water solution, and fed to one week old chicken for two weeks. Various parameters of toxicity including mortality, weight gain, complete blood cell counts, clinical chemistry, and histopathology of the liver and spleen were investigated. Results: All of the animals were survived

throughout the experiment. Treatment with Curcuma extract induced no differences in weight gain, manual PCV, WBC count, clinical chemistry results including ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Creatinine, Calcium, Phosphorus, Total protein, Albumin, Glucose, Total Cholesterol, triglyceride, and electrolytes such as sodium, potassium and chloride. Conclusion and acknowledgement: The results indicated that ethanol extract from *Curcuma longa* is not toxic to chicken and may be a valuable candidate of salmonella control measure, helping to reduce the use of antibiotics in chicken industry. This research investigation was funded by a project grant no. 314019-03-1-HDD40 from Bio-Industry Technology Development Program of IPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea. Materials and Methods: Ethanol fraction of the natural Curcuma extract was diluted in 1%-water solution, and fed to one week old chicken for two weeks. Various parameters of toxicity including mortality, weight gain, complete blood cell counts, clinical chemistry, and histopathology of the liver and spleen were investigated. Results: All of the animals were survived throughout the experiment. Treatment with Curcuma extract induced no differences in weight gain, manual PCV, WBC count, clinical chemistry results including ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Creatinine, Calcium, Phosphorus, Total protein, Albumin, Glucose, Total Cholesterol, triglyceride, and electrolytes such as sodium, potassium and chloride. Conclusion: The results indicated that ethanol extract from *Curcuma longa* is not toxic to chicken and may be a valuable candidate of salmonella control measure, helping to reduce the use of antibiotics in chicken industry.

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 6

- * 학회명 : 2016년 한국예방수의학회 추계학술대회
- * 발표일시 : 2016. 5. 26 ~ 2016. 5. 28 / 제주대학교
- * 발표자 : 이준봉

www.jpvm.or.kr ISSN 2287-7991

한국예방수의학회

2016년 춘계학술대회
2016 KSPVM Symposium

제40권 제1호 부록, 2016년 5월

예방수의학 분야에서
최신의 연구 동향

- 일시: 2016. 5. 26(목) ~ 2016. 5. 28(토)
- 장소: 제주대학교 수의과대학 대강당
- 주최: 한국예방수의학회
- 주관: 제주대학교 수의과대학
- 후원: 수의공중보건학 교수협의회, RDA 농촌진흥청

한국 예방수의학회
The Korea Society of Preventive Veterinary Medicine

P - 1

Altered porcine macrophage responses to *Salmonella* infections by bioprocessed polysaccharide from the turmeric-containing fungal mycelia liquid culture of *Lentinus edodes*

June Bong Lee, Dalmuri Han, Hyung Tae Lee, Chong Hae Hong, Jang Won Yoon

College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Republic of Korea (jby706@kangwon.ac.kr)

Turmeric is known to enhance the host immunity against pathogens via the anti-inflammatory and antioxidant effects. *Salmonella enterica* species contain a large number of pathogenic serovars which can infect a broad range of vertebrate hosts. Our previous study has reported that bioprocessed polysaccharide from the liquid culture *Lentinus edodes* fungal mycelia containing turmeric (referred to as BP-Turmeric) can alter the chicken macrophage responses during *Salmonella enterica* infections. In the present study, we examined if BP-Turmeric could alter the immune responses of the porcine macrophage cell line, 3D4/31, during *Salmonella* infections. Our experimental analyses demonstrated that BP-Turmeric was able to increase the phagocytic activity of 3D4/31 cells, but reduce the transcription expression of IL-6, IL-8 and TNF- α in the 3D4/31 cells when infected by *S. enterica* species. Indeed, the cytokine expression levels were not increased in the BP-Turmeric treated groups pre-exposed with *S. enterica* spp., compared to those of the control groups. These results imply that BP-Turmeric can modulate the porcine macrophage responses infected by *S. enterica* spp., which is possibly protective against *Salmonella* infections in pigs.

Acknowledgement : This study was supported by a grant (No. 314019-3) from Bio-industry Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

포스터 발표 61

(4) 학술성과

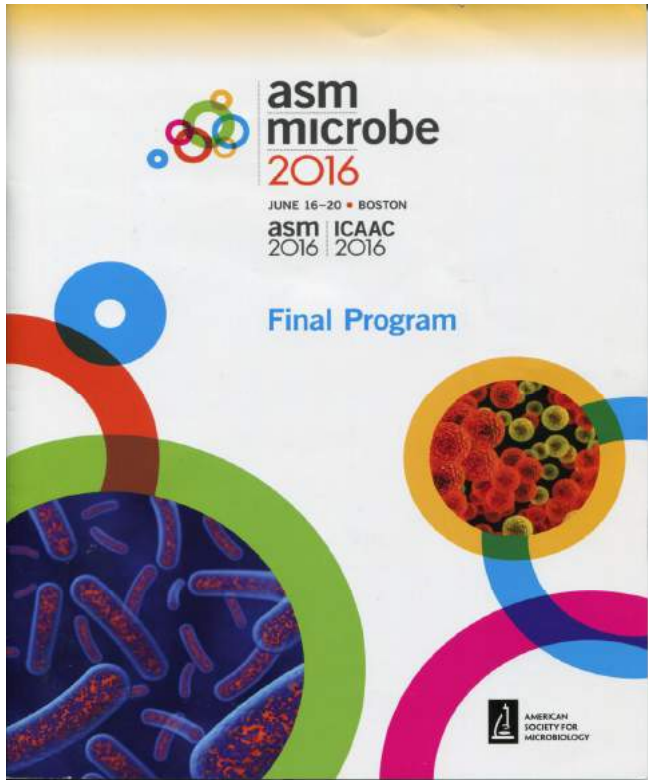
② 학술발표

(포스터) 7

* 학회명 : Asm Microbe 2016

* 발표일시 : 2016. 6. 16 ~ 2016. 6. 20 / 보스턴

* 발표자 : 한달무리



Poster Board Number:

FRIDAY-085

Publishing Title:

Bioprocessed Polysaccharide Powders from the Liquid Culture of *Lentinus Edodes* Fungal Mycelia with *Curcuma Longa* (Turmeric) After the Chicken Macrophage Responses to *Salmonella* Enteric Species

Author Block:

D. Han¹, H. T. Lee¹, J. B. Lee¹, N. Y. Kim², Y. B. Kim², J. W. Yoon¹; ¹Coll. of Vet. Med. & Inst. of Vet. Sci., Kangwon Natl. Univ., Chuncheon, Korea, Republic of, ²Res. Inst. for Vet. Sci. & BK21 PLUS Program for Creative Vet. Sci., Coll. of Vet. Med., Seoul Natl. Univ., Seoul, Korea, Republic of

Abstract Body:

Various pharmacological activities of *Curcuma longa* (turmeric) have been reported, including anti-inflammatory and antioxidant effects. In this study, bioprocessed polysaccharide powders (BPPs) from the liquid culture of *Lentinus edodes* fungal mycelia containing *Curcuma longa* (referred to as BPP-Curcuma) were extracted in water at 37°C and examined their biological effects on the avian-specific or zoonotic *Salmonella enterica* species as well as their responses to the chicken-derived macrophage cells, HD-11, during the salmonella infection. Our experimental analyses revealed that the water extracts of BPP-Curcuma (i) did not affect the growth kinetics of *Salmonella* spp. evaluated, (ii) induced the alteration of the bacterial secretome profiles compared to the untreated control groups, (iii) showed increased phagocytic activities in the HD-11 cells when infected by *Salmonella* spp., but did not affect their bacterial killing activities, and (iv) greatly up-regulated the transcription expression of TNF- α , IL-1 β , iNOS, and IL-10. Interestingly, such cytokine expression appeared to be modulated when the HD-11 cells were pre-exposed with *Salmonella* spp. Taken together, these results imply the biological activity of BPP-Curcuma on both *Salmonella* spp. and macrophages during an avian infection.

Author Disclosure Block:

D. Han: None. H.T. Lee: None. J.B. Lee: None. N.Y. Kim: None. Y.B. Kim: None. J.W. Yoon: None.

(4) 학술성과

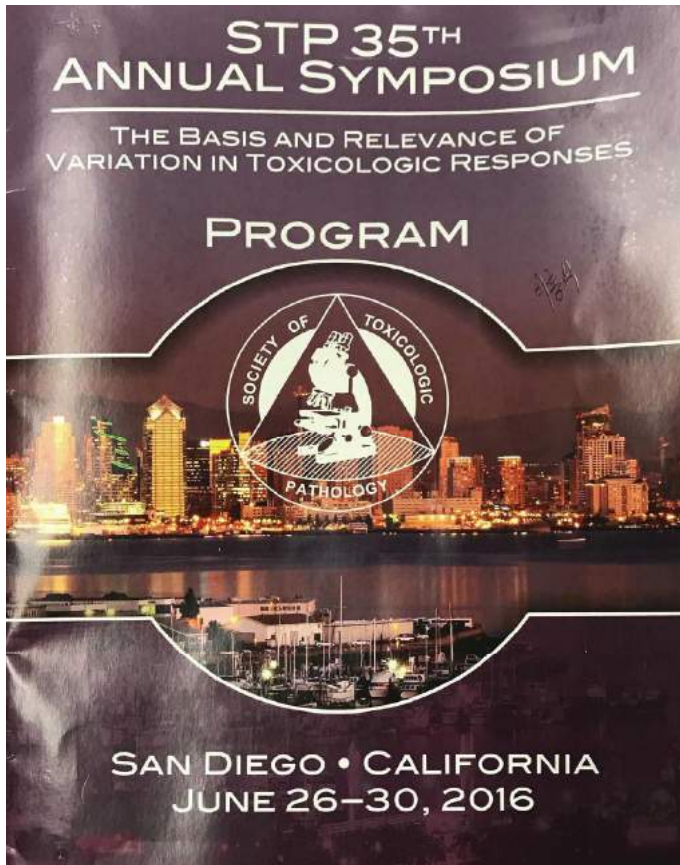
② 학술발표

(포스터) 8

* 학회명 : STP 35th Annual Symposium

* 발표일시 : 2016. 6. 26 ~ 2016. 6. 30 / 샌디에고

* 발표자 : 이홍석



THE BASIS AND RELEVANCE OF VARIATION IN TOXICOLOGIC RESPONSES

Poster Presentation Index

Annual Meeting materials can only be downloaded at www.toxpath.org/am2016/materials.asp. STP members can access with their normal member login. Nonmember attendees should use the login sent via email.

Poster Categories:
Young Investigator Candidates 1-18
Fellowships 19-22
General Pathology/Toxicology/Pathology 23-40
New Technologies 41-50
Oncology/Carcinogenesis 51-57
Systems/Organ-Specific Toxicologic Pathology 58-78

- 1. Usefulness of Optical Coherence Tomography to Detect Central Serous Chorioretinopathy in Monkeys**
Hyeon-Jeong Kim¹, Woon-Jin Choi², Hyun-Ji Choi², Bongtae Kim¹, Gihyeon Lee¹, Jongsu Lee¹, Suk-Young Choi¹, Cheung-Soo Kim¹, Sun-Kyung Choi¹, Jung-In Haeng¹, Joo-Yong Lee¹, Young-Hye Yoon¹, Woo-Chon Son¹, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Republic of Korea, ¹Asan Medical Center, Seoul, Republic of Korea, ²CHAMCOMED Co., LTD, Seongnam, Republic of Korea, ³FAO, Nan-Tai, Co., LTD, Shanghai, China
- 2. Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in C57BL/6J Mice by Using MRI and Histopathologic Analyses**
Jae-Sun Ryu¹, Woo-il Ju¹, Hyun-Ji Choi¹, Sung-wong Jang¹, Hui-Ju Lee¹, Dong-Chul Woo¹, Jaeng-Kan Kim¹, Kyung-Wan Kim¹, Eun-Sil Yi¹, Ji-Hye Ahn¹, Woo-Chon Son¹, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Republic of Korea
- 3. Circulating Biomarkers Indicate Severe Mitochondrial Dysfunction During Drug-Induced Ischemic Hepatitis**
Jianjun Wang¹, Benjamin L. Washburne¹, Michael R. McGill¹, Jason C. Camp¹, Daniel J. Aronow¹, Harriet Weisber¹, Department of Medical Toxicology, Banner Good Samaritan Medical Center, Department of Medicine, University of Arizona College of Medicine, Phoenix, AZ, US, ²MRC Centre for Drug Safety Science, Department of Molecular and Clinical Pharmacology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool, UK
- 4. Characterized Dysplasia in Sprague-Dawley Rats: Ophthalmologic and Histopathologic Characterization**
Leah Sapp¹, Faith Nelson¹, Joshua Benson¹, Betsy Oudings¹, Michigan State University, East Lansing, MI, US, ²RFI Research, Johnson, AB, US
- 5. Morphine Treatment Potentiates *Citrobacter rodentium* Virulence, Systemic Dissemination and Exacerbates Gut Dysbiosis in Mice**
Eupann Zhang¹, Jingjing Meng¹, Sohee Ro¹, University of Minnesota, College of Veterinary Medicine, St. Paul, MN, US, ²University of Minnesota, Medical School, Department of Surgery, Minneapolis, MN, US, ³University of Minnesota, Medical School, Department of Pharmacology, Minneapolis, MN, US
- 6. A Preliminary Toxicity Study of Carceme (age Extract for the Control of Salmonella Spp. in Pigs**
Hong-Soo Lee¹, No-Yon Kim¹, Myung-Chul Kim¹, Yu-Ri Seol¹, Hyoung-Tae Lee¹, Dae-Il Han¹, Juno-Bong Lee¹, Jang-Wan Yoon¹, Yongsuok Kim¹, Laboratory of Clinical Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ²SK-PLS Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ³Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shingyeon, Rapido, of Korea
- 7. Observation and Characterization of a Novel Mouse Model of Primary Biliary Cirrhosis**
Suzuki, Satoru¹, Perry Bleckshar¹, NIDDK, Research Triangle Park, NC, US
- 8. Immunopathologic Effects of Prednisolone and Cyclosporine A on FIV Replication and Persistence**
Cory Miller¹, Esther Alameddine¹, Jordan Powers¹, Ryan Madole¹, Susan Vonnahme¹, Colorado State University, Fort Collins, CO, US
- 9. In Vivo Loss of TGF-beta Receptors Type-1 and -2 in Col3-Unsupp Cells Alters Acute Polymeric Graft Remodeling**
Elizabeth Davis¹, Nathan Mahler¹, Sa-Yi George Tellez¹, Christopher Brues¹, The Ohio State University, Columbus, OH, US, ²McKusick Children's Hospital, Columbus, OH, US, ³Yale University, New Haven, CT, US
- 10. Establishment of a Novel Chronic Hyperplastic Gastritis Model with Carcinoma in Type 1 Dicholic Mice**
Yu-Tatsung¹, Shiro Yoshida¹, Takashi Matsuda¹, Eiyoku Otsuka¹, Jishun University, Hwasun, Choson, Japan
- 11. The Effect of HDAC (AB-42) on Canine Prostate Cancer Metastasis**
Sridharan, Nickol Khatami¹, Lucas Alshab¹, Whissel Dissanayake¹, Thomas Ross¹, Ohio State University, Columbus, OH, US
- 12. Evaluation of Helicobacter Mutations in *ldh2*, *ldh3*, *brd*, and *egfr* Genes in Rat Glioblastoma**
Woo-il Ju¹, Hui-Hye Hong¹, Bamesh Kwon¹, Kyungho Choi¹, Jongsu Lee¹, Susan Bekker¹, Paul Foster¹, John Bucher¹, Robert Sills¹, Arun Pandey¹, Division of National Toxicology Program (DNTP), NIEHS, Research Triangle Park, NC, US, ²Experimental Pathology Laboratories Inc., Research Triangle Park, NC, US, ³Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, NC, US

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 9

* 학회명 : (사)대한수의학회 2016년도 추계국제학술대회

* 발표일시 : 2016. 10. 27 ~ 2016. 10. 28 / 진주

* 발표자 : 김나연

Laboratory, Animal and Plant Quarantine Agency for CWD testing on February 4, 2016. The samples (Obs, RPLN, tonsil) were analyzed by using a commercial ELISA test (rapid test) for detection of PrP^{Sc} (HerChok® HSE-scrapie Ag Test, IDDX) according to the manufacturer's instructions. After an initial positive result, the presence of PrP^{Sc} was demonstrated by a commercially available Western blot test (TeSeE™ Western blot, Bio-Rad), and immunohistochemical method using the polyclonal antibody S1 (made in QIA, ROK) at a dilution of 1:3000 for confirmation. These tissues were stained with hematoxylin-eosin (HE) to see spongiosis and gliosis.

Results: The sud deer was found to be positive for the abnormal prion protein in the obs, RPLN and tonsil by the rapid test (OD values 1.6–3.7). Furthermore, all samples of the red deer demonstrated proteinase K(PK)-resistant three bands pattern (mono-, di-, un-glycosylated band) between 17 and 29 kDa. The microscopic lesion identified was spongiform encephalopathy in the obs. Diffuse patterns of PrP^{Sc} immunolabelling was presented in the obs region, especially, in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNV) and solitary tract, and in the germinal center of lymphoid follicles in RPLN and tonsil.

Conclusions: The suspect case of CWD in a captive red deer was confirmed to be a new outbreak of CWD in 2016. The disease was detected through the routine CWD testing (passive surveillance) of cervids showing suspect clinical signs at the QIA. The western blot and immunohistochemical staining patterns and intensity demonstrated in the present case were similar to the previous cases of CWD infection in red deer, elk and Sika deer in Korea, and those shown by CWD isolates from American elk. Although epidemiological investigations are ongoing, it may be possible that all CWD infected deer that had been sold from the infected farm were traced during the previous outbreaks due to lack of records and these infected deer may have caused the new outbreaks in 2016. Therefore, a traceability system for deer will be needed in the future as well as an ongoing CWD surveillance to control and eradicate CWD in Korea. Further study is required to characterize and compare the CWD prion with the previous strain.

- References:**
- [1] Beenaed SL, et al. Vet Res. 2016; 47, 86-95.
 - [2] Kim TY, et al. J Vet MedSci. 2005; 67, 753-759.
 - [3] Lee YH, et al. J Vet MedSci. 2013; 75, 95-98.
 - [4] Shon HJ, et al. J Vet MedSci. 2002; 64, 855-858.

P-108

A preventative effect of *Curcuma longa* extract for the control of *Salmonella* spp. in pigs

Na-Yun Kim^{1,2}, Myung-Chul Kim^{1,2}, Hong-Seok Lee^{1,2}, Sung-Hyun Hwang^{1,2}, Yongcheek Kim^{1,4}

¹Laboratory of Clinical Pathology, ²BK 21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, ³Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, The Republic of Korea 08826.

282 P Korean Journal of Veterinary Science

Introduction: Natural *Curcuma* extract has been widely used as a component of oriental medicine and is proven to possess various biological characteristics including antimicrobial, antioxidative, and anti-inflammatory activities. This study was performed to evaluate preventive effect of the natural *Curcuma* extract to control *Salmonella* spp. in pigs.

Materials and Methods: Study population was divided into 4 groups: HA, HB, CA, and CB. H groups, including HA and HB, were treated with *Curcuma* extract, while C groups, including CA and CB, were not. *Salmonella enteritidis* was administered orally to B groups, including HB and CB. A groups, including HA, and CA, served as control group of *Salmonella* administration. Blood samples were collected for six times with one-week interval. Various parameters of toxicity, including complete blood cell counts, clinical chemistry were investigated. CBC included PCV, RBC, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, platelet, MPV, and WBC. Serum chemistry analysis included ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Creatinin, Calcium, Phosphorus, Total protein, Albumin, Glucose, Total Cholesterol, triglyceride, and electrolytes involving sodium, potassium and chloride were observed and subjected to statistical analysis by ANOVA (P = 0.05) using R program (GNU,MA, USA). Tukey's method was adopted as multi comparison post-test method.

Results: All of the animals were survived throughout the experiment. Treatment with *Curcuma* extract induced no differences in PCV, RBC, hemoglobin, MCV, MCH, and platelet count. All the serum chemistry results, except BUN, did not show significant alteration. WBC and BUN had statistically significant difference (P < .05). Post-test revealed that CB population had elevated WBC on 7 days after *Salmonella* administration. Also increased BUN was observed in CB population on 21 days after *Salmonella* administration. There were no remarkable findings on histopathologic examination.

Conclusions: Considering the increased WBC and BUN level of CB, this *in vivo* analysis revealed the anti-inflammatory and protective effect of *Curcuma* extract after *Salmonella enteritidis* injection. In conclusion, *Curcuma longa* is not toxic to pigs and may be a valuable candidate of *Salmonella* control measure.

- References:**
- [1] BS Ramsewak, DL DeWitt, MG Nair. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Curcuma* Hill from *Curcuma longa*. Phytomedicine. 2000; pp 303-308.

P-109

Detection of Novel Oxazolidinone and Phenicol resistance gene *opx4A* in Enterococcal isolates from Food Animals and Animal Carcasses

Hyeon Eunjung¹, Dong Chan Moon¹, So-Ran Kim¹, Hee Young Kang¹, Kichan Lee¹, Hyang-Mi Nam¹, Geum-Chan Jang¹, Hee-Soo Lee¹, Suk-Chan Jung¹, Suk-Kyung Lim¹

¹Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, The Republic of Korea 08826.

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 10

* 학회명 : 한국예방수의학회 2016년 추계학술대회

* 발표일시 : 2016. 11. 17 ~ 2016. 11. 18 / 김천

* 발표자 : 한달무리

www.jpvm.or.kr ISSN 2287-7991

한국예방수의학회

2016년 추계학술대회 2016 KSPVM Symposium

제40권 제3호 부록, 2016년 11월

인수공통전염병에 대한 예방수의학적 관리 및 대응 방안

- 일시 : 2016. 11. 17(목) - 2016. 11. 18(금)
- 장소 : 농림축산검역본부 강당 (경북 김천)
- 주최 : 한국예방수의학회
- 후원 : 농림축산검역본부



한국 예방수의학회
The Korea Society of Preventive Veterinary Medicine

P - 2

A Bioprocessed polysaccharide from *Lentinus edodes* fungal mycelia cultures with rice bran regulate immune-response in chicken macrophage during *Salmonella* Infection

Dalmeun Han¹, Hyung Tae Lee¹, June Bong Lee¹, Chong-Hae Hong¹, Yongbaek Kim², Sang Jong Lee³, Jang Won Yoon⁴

¹College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Republic of Korea

²Laboratory of Clinical Pathology, Research Institute for Veterinary Science, & BK 21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

³STR Biotech, Ltd., Chuncheon, Gangwon 24252, Republic of Korea

Various beneficial effects of rice bran extracts have been reported such as anti-tumor, anti-oxidation, and anti-inflammation activities. Previously, it was demonstrated that bioprocessed polysaccharide powders (BPPs) from the liquid culture of *Lentinus edodes* fungal mycelia containing rice bran (referred to as BPP-R) can stimulate the immune responses in mice during *Salmonella* infection. In this study, the water extracts of BPP-R at 37°C were examined their biological effects on three pathogenic *Salmonella* serovars as well as their responses to the chicken-derived macrophage cells, HD-11, when infected with the avian-adapted *Salmonella enterica* Gallinarum 227 strain. Although the BPP-R extracts did not affect the growth of *S. Gallinarum* as well as bacterial protein expression profile. Nonetheless, they slightly increased swimming motility of *Salmonella* species. In addition, BPP-R extracts increased the viability of HD-11 cells at the concentrations ranging from 30-250 µg/ml after the exposure for 72 hrs and enhanced the phagocytic activities of HD-11 cells, but not the bacterial killing activities, when pre-treated with 1 mg/ml BPP-R extracts for 16 hrs. The cytokine transcription profiling revealed that BPP-R extracts were able to up-regulate the expression of IL-1β, iNOS, and IL-10, while down-regulate IL-4 and IL-6. Interestingly, the differential gene expression patterns were observed in the *S. Gallinarum*-infected HD-11 cells that were pre-exposed with BPP-R extracts. Taken together, our results imply the biological activity of BPP-R extracts during the *Salmonella* infection *in vivo*, especially on chicken macrophages, through the modulation of cytokine expression.

Acknowledgment: This study was supported by the Bio-Industry Technology Development Program (No. 314019-3), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

36 한국예방수의학회 2016년 추계학술대회

(4) 학술성과

② 학술발표

(포스터) 11

* 학회명 : International Meeting of the Microbiological Society of Korea MSK2017

* 발표일시 : 2017. 4. 26 ~ 2017. 4. 28 / 부산

* 발표자 : June Bong Lee



(5) 교육지도

	교육지도 사진
1	
2	
3	

<별지>

최종보고서 공개유보(또는 비공개) 요청서

1. 연구과제 개요

연구과제 수행내역	연구과제명	안전한 축산물 생산을 위한 살모넬라 저감제 개발 및 현장적용 매뉴얼 작성				
	연구기관	(주)에스티알바이오텍	기관유형	<input type="checkbox"/> 대학 <input checked="" type="checkbox"/> 기업 <input type="checkbox"/> 출연(연) <input type="checkbox"/> 기타		
	연구책임자	이상중	연구기간	2014년 7월~2017년 10월(3년3개월)		
	연구개발비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	기타	계	
		900,000	300,000		1,200,000	
	참여기업	기업명:				
기업유형: <input type="checkbox"/> 대기업 <input type="checkbox"/> 중소기업 <input type="checkbox"/> 농업인단체 <input type="checkbox"/> 기타()						

2. 요청 구분 및 요청 기간 (해당 항목 표기, 중복표기 가능)

구분	해당여부	공개유보 또는 비공개 요청기간 ¹⁾	관련증빙자료 ²⁾
① 보완과제 ³⁾	<input type="checkbox"/>	개월	
② 주관연구기관의 장이 지식재산권의 취득을 위하여 요청하는 경우	<input checked="" type="checkbox"/>	18개월	비공개 요청 사유서 (별첨)
③ 참여기업의 대표가 영업비밀 보호 등의 정당한 사유로 요청하는 경우	<input type="checkbox"/>	개월	

¹⁾ 1년 6개월 이내의 범위에서 농림수산물기술기획평가원장이 승인. 단, 비공개기간 연장이 필요한 특별한 사유가 있는 경우, 기간 만료일부터 3개월 이전에 평가원장의 승인을 받아 최대 3년의 범위에서 연장 가능

²⁾ 공개유보(또는 비공개) 요청 및 기간의 근거자료(자료 별첨할 것)

³⁾ 농림수산물기술기획평가원장이 보안등급을 검토한 결과, 보안과제로 분류된 경우

주관연구기관: (주)에스티알바이오텍 (인)

주관연구책임자: 이상중 (인)

비공개 요청 사유서

주관연구기관인 (주)에스티알바이오텍에서는 본 과제의 1차년도 연구결과에 대해 2016년 5월 26일 3건의 특허를 출원한 바 있습니다. 그러나 3건 모두 특허청으로부터 거절 의견으로 ‘의견제출통지서(거절이유 등 통지)’를 받았습니다.

3건의 특허 중 미강(생물전환)산물의 경우 2016년 5월 26일 출원하여, 2017년 2월 13일 거절 의견의 ‘의견제출통지서’를 통지받아 이에 대한 대응으로 2017년 4월 13일 거절이유 등 통지에 따른 ‘의견(답변, 소명)서’를 제출하여 2017년 8월 16일 특허등록을 통지 받았습니다.

강황(생물전환)산물의 경우 2016년 5월 26일 출원하였으나, 2017년 6월 28일 거절 의견의 ‘의견제출통지서’를 통지받아 이에 대한 대응으로 2017년 10월 12일 거절이유 등 통지에 따른 ‘의견(답변, 소명)서’를 제출하고 특허 등록 여부에 대한 통지를 기다리고 있는 중입니다.

산초(생물전환)산물의 경우도 2016년 5월 26일 출원하여, 2017년 6월 28일 거절 의견의 ‘의견제출통지서’를 통지받아 이에 대한 대응으로 2017년 10월 24일 거절이유 등 통지에 따른 ‘의견(답변, 소명)서’를 제출하고 특허 등록 여부에 대한 통지를 기다리고 있는 중입니다.

2016년 5월 26일 특허출원 한 3건 중 1건(미강생물전환산물)은 특허 결정을 받아 특허등록 되었으나, 나머지 2건인 강황(생물전환)산물 및 산초(생물전환)산물에 대한 특허는 아직 특허 결정(또는 거절)을 통보받지 못한 상태입니다.

만일 나머지 2건에 대해 특허 결정이 나면, 이들 3건의 특허를 기반으로 우선권 주장을 통해 먼저 2차년도의 연구결과에 대해서도 특허 출원이 이루어질 것이며, 2차년도의 연구결과에 대해 출원한 특허가 등록되면 다시 3차년도의 연구결과에 대해서도 특허출원 할 예정입니다.

2016년 5월 26일 3건의 특허를 출원하고, 첫 번째 특허등록은 2017년 8월 16일 통지를 받아 특허출원 후 15개월 만에 이루어졌으며, 나머지 2건은 특허출원 후 18개월이 지났으나 아직도 특허가 등록 될지 거절 될지 통보받지 못한 상태입니다. 따라서 기 출원한 나머지 2건에 대한 통보를 받고, 2차년도 연구결과의 특허출원 후, 다시 3차년도 연구결과를 출원하기 까지는 18개월 보다 더 많은 시간이 소요될 것으로 예상되어, 공개유보(또는 비공개)요청 기간을 18개월로 신청하게 되었습니다.

본 과제의 2차년도 및 3차년도의 연구결과에 대한 특허출원 전에 본 보고서가 공개되면 이미 공개된 발명이 되어 특허출원을 한다고 하여도 모두 거절되어 특허등록이 될 수 없습니다. 따라서 본 과제의 2차년도 및 3차년도의 연구결과에 대한 특허출원이 이루어질 때까지는 본 연구과제 보고서의 비공개를 요청드리는 바입니다.

주관연구기관 : (주)에스티알바이오텍

주관연구책임자 : 이상중 (인)