

116104-3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개()발간등록번호(O)

발간등록번호

11-1543000-002919-01

조류인플루엔자 제어를 위한 가리우 유산균 기능성 사료첨가제 및 오일 면역증강제/유산균 면역보조제 개발 최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

조류인플루엔자 제어를 위한 가금용 유산균 기능성 사료첨가제 및 오일 면역증강제/유산균 면역보조제 개발

최종보고서

2019. 09 04.

주관연구기관 / 주식회사 카브
협동연구기관 / (주)대성미생물연구소

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “조류인플루엔자 제어를 위한 가금용 유산균 기능성 사료첨가제 및 오일
면역증강제/유산균 면역보조제 개발”(개발기간 : 2016. 09. ~ 2019. 09.)과제의 최종보
고서로 제출합니다.

2019. 10. 18.

주관연구기관명 : 주식회사 카브

(대표자)



협동연구기관명 : (주)대성미생물연구소

(대표자)



참여기관명 : 바이오엔텍(주)

(대표자)



전국대학교 산학협력단

(대표자)



주관연구책임자 : 송 창 선

협동연구책임자 : 이 명 형

참여기관책임자 : 김 재 훈

참여기관책임자 : 박 승 용

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116104-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018. 09 - 2019. 09	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	조류인플루엔자 제어를 위한 가금용 유산균 기능성 사료첨가제 및 오일 면역증강제/유산균 면역보조제 개발			
연구책임자	송 창 선	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:350,000천원 민간:116,700천원 계:466,700천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,100천원 계:1,200,100천원
연구기관명 및 소속부서명	주식회사 카브 (주)대성미생물연구소			참여기업명 주식회사 카브 (주)대성미생물연구소	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 바이오엔텍(주) 건국대학교 산학협력단			연구책임자: 김재훈 박승용	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

- 가금용 유산균 기능성 사료첨가제 개발
 - 동물 및 식물 유래 유산균의 동정
 - 생체 내 환경 저항성 유산균의 시험관내 평가 및 선발
 - 마우스에서 인플루엔자 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 선발
 - 가금류에서 살모넬라 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 선발 및 사업화

- 가금용 오일 면역증강제의 자체생산 체계 확립 및 제조공정 개발
 - 자체 개발 오일 면역증강제의 원료 발굴 및 제조공정 개발
 - 자체 개발 오일 면역증강제의 다국적기업 제품과 실험실 내 안전성, 안정성, 효능 비교
 - 신규 개발 오일 면역증강제의 야외 적용 시험

- 가금용 신규 면역보조제의 개발
 - 유산균 라이브러리를 이용한 가금용 면역보조제 선발 및 면역원성 시험
 - 유산균의 오일 백신 적용 제조 공정 개발
 - 신규 개발 면역보조제의 효능 시험

76

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 조류인플루엔자 제어를 위한 가금용 유산균 기능성 사료첨가제 및 오일 면역증강제/유산균 면역보조제 개발</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 가금용 유산균 기능성 사료첨가제 개발 - 동물 및 식물 유래 유산균의 동정 - 생체 내 환경 저항성 유산균의 시험관내 평가 및 선발 - 마우스에서 인플루엔자 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 선발 - 가금류에서 살모넬라 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 선발 및 사업화</p> <p>○ 가금용 오일 면역증강제의 자체생산 체계 확립 및 제조공정 개발 - 자체 개발 오일 면역증강제의 원료 발굴 및 제조공정 개발 - 자체 개발 오일 면역증강제의 다국적기업 제품과 실험실 내 안전성, 안정성, 효능 비교 - 신규 개발 오일 면역증강제의 야외 적용 시험</p> <p>○ 가금용 신규 면역보조제의 개발 - 유산균 라이브러리를 이용한 가금용 면역보조제 선발 및 면역원성 시험 - 유산균의 오일 백신 적용 제조 공정 개발 - 신규 개발 면역보조제의 효능 시험</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 유산균을 이용한 면역능 향상으로 조류인플루엔자 외 기타 질병에 대한 저항성 향상 ○ 기능성 사료첨가제 및 면역증강제/면역보조제의 동남아 시장 개척 ○ 불활화 오일 면역증강제의 국산화 ○ 기존 가금 핵심질병 백신의 면역반응 증대</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>유산균</p>	<p>기능성 사료첨가제</p>	<p>면역증강제</p>	<p>면역보조제</p>	<p>가금 질병</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Lactic Acid Bacteria</p>	<p>Functional Feed Additives</p>	<p>Adjuvant</p>	<p>Immunesuppl ement</p>	<p>Poultry Diseases</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	14
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	70
4. 연구결과의 활용 계획 등	74
붙임. 참고 문헌	76

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

세부과제명 및 목표		연구개발의 목적
총괄 1세부	○ 조류인플루엔자 감염 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 및 식물 유래 유산균의 분리 및 동정 - 생체 내 환경 저항성 유산균의 시험관 내 평가 및 선발 - 마우스에서 인플루엔자 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 선발 - 가금류에서 인플루엔자 저항성 유산균 기능성 사료첨가제 선발 - 선발 유산균의 대량 생산 및 야외 적용 시험 - 가금류에서 유산균의 면역조절 기전 규명 및 장내 미생물총 변화 연구
1협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가금용 오일 면역증강제의 자체생산 체계 확립 및 산업화 ○ 가금용 신규 면역보조제의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 자체 개발 오일 면역증강제의 원료 발굴 및 제조공정 개발 - 자체 개발 오일 면역증강제의 다국적기업 제품과의 실험실 내 안전성, 안정성, 효능 비교 - 자체 개발 오일 면역증강제의 야외 적용 시험 - 유산균 라이브러리를 이용한 가금용 면역보조제 선발 및 면역원성 시험 - 유산균의 오일 백신 적용 제조공정 개발

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 사회적 중요성

- 가. 현재 국내에서 저병원성 조류인플루엔자에 대한 백신은 실시하고 있는 반면, 고병원성 조류인플루엔자는 발생 시 감염 농장의 살처분 정책만을 실시하고 백신을 사용하지 않고 있음. 따라서 가금류에 인플루엔자 감염시 HPAI에 대한 면역능을 전혀 보유하지 않아 빠르게 감염되어 전파되는 것을 볼 수 있음. 유산균으로 인한 면역력 증가와 인플루엔자 저항성 증대는 인플루엔자의 질병의 전파 속도를 낮추어 방역에 도움을 줄 것으로 예상되며, 살모넬라와 같은 기타 가금 질병에 대한 저항성도 높여 건강한 닭의 생산에 기여 할 것으로 예상됨.
- 나. 국내 백신시장에서 해외 기업의 점유율이 약 70%인 것을 감안 할 때, 국내 생산 가금용 백신의 효능 불신과 외산 백신에 대한 선호가 있음을 간접적으로 알 수 있음. 따라서 국내 백신의 품질에 대한 선입견을 타파하고 소비자의 인식을 개선하기 위해 본 연구의 사회적 홍보 및 국가 지원이 요구됨.

2. 경제적 중요성

- 가. 유산균은 유익균으로 알려져 가금류뿐만 아니라 타 축종에서 사료첨가제 등으로 사용되고 있음. 이를 이용하여 개발 유산균을 생산시 추가적인 생산투자 설비 없이 질병의 감염에 효력을 지닌 유산균을 대량생산 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 나. 국내 백신제조 회사들은 그동안 동물약품시장의 성장과 함께 양적 성장을 이루어왔으나 질적 성장(새로운 기술 개발 및 투자)에 대해 미흡한 것으로 파악됨. 본 연구는 기존 사용 오일백신의 국산화, 가금용 백신의 품질개선, 신규 면역증강제 개발로 국내시장 및 해외 시장에서 국내 백신제조 회사의 이익 증대와 전염성질병의 전파를 억제해 통해 국내 산업 동물의 생산성 향상에 의의를 지님.
- 다. 현재 국내 가금용 오일 면역증강제 제품의 대부분에 쓰이고 있는 SEPPIC社의 본 연구개발을 통해 국내 제품으로 대체 할 경우 기존 SEPPIC 제품 사용 대비 40%의 원가절감 효과를 볼 수 있을 것으로 기대됨. 제품의 가격 절감으로 소비자는 양질의 백신을 저렴한 가격에 구입 할 수 있으며, 국내 백신제조사는 자체 품질 개선 및 연구개발을 도모 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 라. 백신 면역증강제 발굴 및 효능 연구는 다수의 기관에서 괄목할 연구 성과를 보였으나, 인체의약품 대비 낮은 가격 형성으로 실제 동물용의약품 적용이 어려웠음. 본 연구에서는 신규 면역증강제의 효능 검증과 동시에 경제성을 고려하여 적용하고자함.

3. 기술적 중요성

- 가. 국내에 다양한 기능성 유산균들이 개발되어있으나 가금류에서 인플루엔자 감염에 적용 할 수 있는 유산균은 아직 개발되지 않아 시험이 필요하며, 가금류의 장에서 살아 남을 수

있는 유산균의 개발이 요구됨

나. 다양한 가금 전염성질병이 발생함에 따라 세계적으로 이에 맞는 다양한 백신 면역증강제가 개발되고 있음. 국내 백신 제조사의 신규 면역증강제 개발 연구 및 적용은 이에 비해 미흡한 것으로 나타나 본 연구에서 개발되는 기술은 기업의 기술적 경쟁력을 뒷받침 할 수 있으며 불활화 백신의 안전성, 효율성을 다국적 백신회사 수준 또는 그 이상으로 향상시키는 역할로서 중요성을 지님

제 3 절. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
동물(철새 및 가금류)의 장내 유산균 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 장내 미생물총의 큰 부분을 차지하는 유산균은 무해하고 동물의 면역능 자극에서 유익한 영향을 가짐. - 동물의 소화기관은 부위별로 pH, 호기 및 혐기성 등 조건이 다르므로 각 부위를 대표하는 샘플링 부위를 정하고, 유산균을 분리하기 위한 배양조건을 알맞게 설정하여 분리동정을 실시함. 	<ul style="list-style-type: none"> - 포획 야생오리 4종(청둥오리, 고방오리, 쇠오리, 홍머리오리) 및 산란계의 소화기관 및 분변에서 장내 유산균 분리 및 동정을 실시함. - 분리 장소를 상부 소화기(산성 환경 및 담즙산, 소화액 존재)와 하부 소화기(혐기성 환경)를 대표하는 crop, proventriculus 및 cecum과 분변의 4종으로 선정함. - 유산균의 선택 배지인 MRS agar 및 broth를 이용하여 분리를 진행함. 유산균 배양 조건은 소화기관 내 환경에 맞추어 호기 및 혐기의 두 가지로 설정함. - 16s rRNA sequencing을 통해 유산균의 유전정보를 동정함.
식물(발효식품 등)의 유산균 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 발효식품 유래 유산균은 발효식품이 만들어지는 척박한 환경을 견딜 수 있고 천연의 항균물질 및 다양한 생리활성물질들을 생산하며 다양한 미생물 환경 속에서 경쟁적으로 우점종을 이뤄 생존력이 뛰어난 것으로 알려져 있음. - 식물성 발효식품인 김치, 된장을 비롯해 요거트, 치즈 	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 유산균의 확보를 위해 김치, 된장, 마유주, 낫또, 치즈, 요거트 등 다수의 발효식품을 수집함. - 유산균의 선택 배지인 MRS agar 및 broth를 이용하여 분리를 진행함. 유산균 배양 조건은 소화기관 내 환경에 맞추어 호기 및 혐기의 두 가지로 설정함. - 16s rRNA sequencing을 통해 유산균의 유전정보를 동정함.

	<p>등 다수의 발효식품을 수집하여 유산균의 분리동정을 실시함.</p>	<p>- 16s rRNA sequencing으로 서로 구분되지 않는 Lactobacillus plantarum group의 유산균은 recA 유전자 대상의 multiplex PCR을 이용해 동정함.</p>
<p>유산균의 항산성, 항담즙 시험</p>	<p>- 사료첨가제로서 기능하는 유산균을 선발하기 위해 소화기관 내 환경을 재현한 시험관내 조건에서 환경 저항성을 테스트함.</p>	<p>- 소화효소인 pepsin과 소화액의 구성 성분인 bile salt를 이용하여 인공 위액과 인공 담즙산을 제조함.</p> <p>- 유산균을 일정한 농도로 희석하고 인공 위액과 인공 담즙산에 첨가하여 일정 시간 반응시키고, MRS agar를 이용한 colony counting 방법으로 생존 균수를 측정함.</p>
<p>유산균의 가끔 면역세포 자극/분화 및 선발</p>	<p>- 유산균 집락화 능력 시험 프로토콜 설계: 유산균의 면역 조절 기전 중에는 장관내 집락을 이루어 물리적으로 병원균의 부착 및 증식을 억제하는 것도 포함됨. 이를 시험관내에서 평가하기 위하여 닭 장 상피세포를 이용한 유산균 집락화 능력 시험을 실시함.</p> <p>- 사이토카인 수준 측정 시험 프로토콜 설계: 경구 섭취한 유산균은 장 상피세포에 자극을 유발함. 장 상피세포에서 이러한 자극에 반응하여 분비하는 사이토카인은 이후의 면역 반응을 시작하는 방아쇠로 작용하게 됨. 이에 따라 유산균의 면역 조절 능력을 평가하기 위하여 세포 자극 후 분비되는 사이토카인 양을 확인함.</p>	<p>- 라이브러리 내 유산균의 닭 장 상피세포에 대한 세포 부착 능력을 평가하기 위한 목적임.</p> <p>- 세포에 정해진 농도의 유산균을 함께 배양한 후 세포에 부착한 유산균의 수를 MRS agar를 이용한 titration 방식으로 측정함.</p> <p>- 라이브러리 내 유산균의 면역 자극 정도를 유산균이 세포 자극으로 유도하는 사이토카인 발현량을 확인하기 위한 목적임.</p> <p>- 사이토카인 발현량 측정은 mRNA expression level Real-time RT-PCR을 사용함.</p> <p>- 각각 Th1 (IL-2), anti-inflammation (IL-10), pro-inflammation (IL-8) 기능을 대표하는 사이토카인을 측정함.</p>
<p>시험관내 선발 유산균의 마우스 투여 및 인플루엔자 감염시험</p>	<p>- 4주령 BALB/c 마우스에 species, strain, origin 등이 서로 다른 다양한 유산균을 비강, 경구 등의 경로로 투여하고 인플루엔자를 감염시켜</p>	<p>- 선발한 유산균을 이용하여 투여 방식별 방어 효능 비교 시험을 진행하고 비강 경로로 투여할 때 방어 효능이 가장 높은 것을 확인함</p>

	그 방어 효능을 시험함.	- 비강 경로로 유산균을 투여하여 인플루엔자 바이러스 증식 억제 효능 시험을 진행하고, 같은 종의 유산균이라도 strain에 따라 방어 효능에 큰 차이를 보이는 것을 확인함
시험관내 선발 유산균의 가금(닭) 및 인플루엔자 감염 시험	- 시험관내 시험법 및 마우스 시험에서 우수한 방어 효능을 보인 유산균을 선발하여 SPF 닭에 투여 후 인플루엔자 방어 효능을 확인함	- 닭에서 유산균 비강 투여 후 인플루엔자 공격접종 시험 진행 결과, 인플루엔자 공기 전파 억제 효능을 확인할 수 있었음. - 닭에서 유산균 경구 투여 후 인플루엔자 공격접종 시험 진행 결과, 인플루엔자 직접 감염, 접촉 감염, 공기 전파 감염 모두에서 항인플루엔자 효능을 확인할 수 없었음.
마우스 및 가금류에서 유산균 기능성 사료첨가제 선발	- 시험관 내 시험법을 통하여 우수한 장관 내 부착력 및 항살모넬라능을 보인 유산균을 선발하여 1일령 육계에서 <i>Salmonella enteritidis</i> 에 대한 방어 효능을 확인함	- 선발한 유산균을 경구 투여한 결과 계육을 통하여 사람에서도 식중독 등의 증상을 유발할 수 있는 <i>Salmonella enteritidis</i> 의 배출량이 유의적으로 감소하는 것을 관찰함.
mineral oil 원료 발굴 및 선정	- 오일의 선정기준 1) 순도(Pure paraffinic oil without aromatic oil) 2) Carbon number (15~21; ideal point-19; changeable) 3) Viscosity 4) 안전성/유효성 규정 (농림축산검역본부고시 또는 Committee for Veterinary Medical Products (CVMP) 기준 통과 물질)	- 시중에 판매되고 있는 해외 및 국내 석유화학업체의 다양한 오일 제품을 구매함. - 해외 4개사, 7개 제품. 국내 5개사 9개 제품 구입 완료. - 점도측정기를 이용하여 각 미네랄 오일의 점도 측정. - 현장 적용 가능한 점도(<35mPa·s)가 확인되는 8개 제품 선정 완료.

<p>Surfactant 원료 발굴 및 선정</p>	<p>- (주)대성미생물연구소에서 현재 사용하고 있는 surfactant 조성 1) Span80 : 3% , HLB=4.3 2) Tween80 : 0.3% , HLB=15 3) 조합 HLB : $(4.3 \times 10 + 15 \times 1)/11 = 5.273$</p>	<p>- 기존 surfactant 조성을 바탕으로 해외 및 국내 오일 제품을 이용하여 이멀전 제조 - 국내 1개 제품에서 이멀전 제조 안정성 확인 - 향후 제품에 대해서도 HLB 조정 (4~8) 실험을 통하여 안정성 확보 예정</p>
<p>항원-면역증강제 최적 배합비율 도출</p>	<p>- 주요 가금질병별 항원 제조 시스템 확보 1) AI, ND, IB 항원 제조 : Allantoic fluid 2) FAdV 항원 제조 : Chicken Embryo Liver cell, Chorioallantoic membrane, LMH cell 3) AMPV : Vero cell - 생산방식 별로 차이가 발생하는 pH, Salinity 조절 및 수당 용량 최소화를 위한 water phase 비율 조절</p>	<p>- 항원 제형별 백신-면역증강제 최적 배합비율 결정 - 항원 제형별 최적 pH 결정</p>
<p>이멀전 공법의 정립</p>	<p>- 제조 용량별 두 가지 Mixing System에 대한 제조 공법 확립</p>	<p>- 대량생산용 Mixer (대성미생물 보유) : IKA DISPAX-REACTOR® DR 2000/05 : 교반 조건 및 시간 / 세부 작업과정 제시 - 소량생산용 Mixer (건국대학교 보유) : T.K Robomics Homo Mixer MarK II model 2.5 : 교반 조건 및 시간 / 세부 작업과정 제시</p>
<p>유산균 라이브러리를 이용한 가금용 면역보조제 선발 및 면역원성 시험</p>	<p>- 기 보유 유산균주 중 면역 자극 능력이 우수한 균주를 선발하여 사독 오일백신에 면역보조제로 첨가하여 면역원성을 확인</p>	<p>- (주)카브 분리 유산균 라이브러리에서 마우스 대상 항인플루엔자 능이 확인된 2개 균주를 선발하여 저병원성 AI 사독백신에 면역보조제로 첨가함. - 유산균 비첨가 백신 대비 우수한 항체 형성능을 확인</p>

<p>오일 이멀전 제조 검증시험</p>	<p>- 오일 면역증강제를 활용한 오일 이멀전 백신 제조 후 Drop test 시험을 통한 안정성 확인</p>	<p>- 1차년도 연구개발을 통해 선정된 국산 오일을 활용하여 다양한 조건(HLB 수치 조절, Surfactant의 비율 조절 등)의 이멀전을 제조하였고, Drop test를 통하여 상대적으로 이멀전의 안정성이 높은 조건(Span80 = 7%이하)을 확립.</p>
<p>오일 이멀전 입자 크기 및 분포 비교 시험</p>	<p>- 오일 면역증강제를 활용한 오일 이멀전 백신 제조 후 입자 분포 확인, 점도 측정 수행</p>	<p>- 제조한 다양한 조건의 이멀전을 대상으로 Microscopic observation, Viscosity test를 통하여 상대적으로 이멀전의 안정성이 높은 조건(HLB = 5.263이상)을 확립</p>
<p>안정성 시험</p>	<p>- 온도별 안정성 확인을 위한 장기 보관 시험 수행</p>	<p>- 4도, 25도, 37도, 55도 등 다양한 조건의 장기 보관 안전성을 확인한 결과, HLB=5.477 이상 조건에서 가장 안정함을 확인함.</p>
<p>안전성 시험</p>	<p>- 오일 면역증강제의 안전성을 확인하기 위하여 백신 접종 후 임상증상, 증체율, 접종부위 조직 소견 등 관찰</p>	<p>- 자체 개발 오일 면역증강제를 이용한 백신의 경우, 해외 제품에 비해 접종 부위 조직병리학적 검사 점수가 일부 높게 확인되었으나, 임상증상, 증체율 등 다른 안전성 관련 수치에서는 해외 제품과 유의적인 차이가 확인되지 않았음.</p>
<p>유산균 면역보조제 첨가 오일백신의 안전성, 안정성 시험</p>	<p>- 유산균 면역보조제의 안전성을 확인하기 위하여 백신 접종 후 임상증상, 증체율, 접종부위 조직 소견 등 관찰</p>	<p>- 선발 유산균을 활용한 오일 백신의 경우, 유산균 미첨가 백신에 비해 접종 부위 조직병리학적 검사 점수가 높게 확인되었으나, 임상증상, 증체율 등 다른 안전성 관련 수치에서는 해외 제품과 유의적인 차이가 확인되지 않았음.</p>
<p>자체 개발 오일 면역증강제의 다국적기업 제품과 실험실 내 효능 비교</p>	<p>- 낮은 량의 항원을 이용한 Dose-Sparing 효과를 관찰함 - 온도 가혹조건 보관 후 면역원성 비교 - 자체 개발 오일 면역증강제의 시제품 제작 및 야외 적용시험</p>	<p>- 항원별 시험 결과, 일부 항원은 자체 개발 오일 면역증강제가 기존 상업화된 해외 면역증강제에 비해 Dose-Sparing 효과를 보이는 것으로 확인됨. - 온도 가혹 조건 시 항체가 감소 정도는 해외 제품 대비 비슷한 수준임. - 자체 개발 오일 면역증강제의 야외 적용</p>

		시험 결과, 생산성 및 효능 면에서 기존 상업화 해외 제품과 동일한 수준임을 확인함.
가금융 신규 면역보조제의 개발	- 선발 유산균 첨가 오일 백신의 효능 시험 및 야외적용 시험	<p>- 다양한 항원을 이용한 유산균 면역보조제 첨가 시험 결과, 항원의 종류에 관계없이 유산균 면역보조제 첨가군이 비첨가군에 비해 높은 항체 역가를 나타내었으며, 공격접종 시험을 통한 실제 방어 효능 역시 높은 것으로 확인되었음.</p> <p>- 이러한 결과를 바탕으로 현재 야외 적용 시험을 준비 중에 있음.</p>

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연차별 연구수행 내용 및 결과

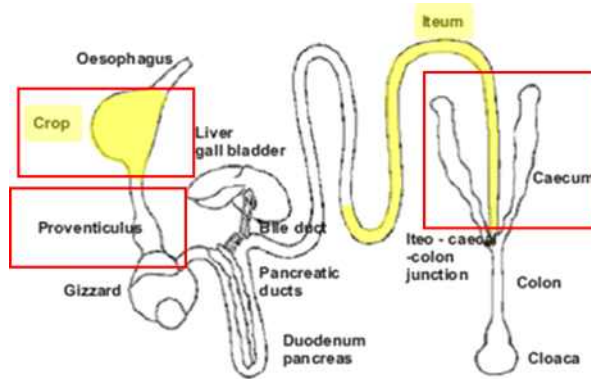
1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 제 1 세부 연구기관 : (주)카브

○ 동물(가금류) 및 식물(발효식품) 유래 유산균 분리 및 동정

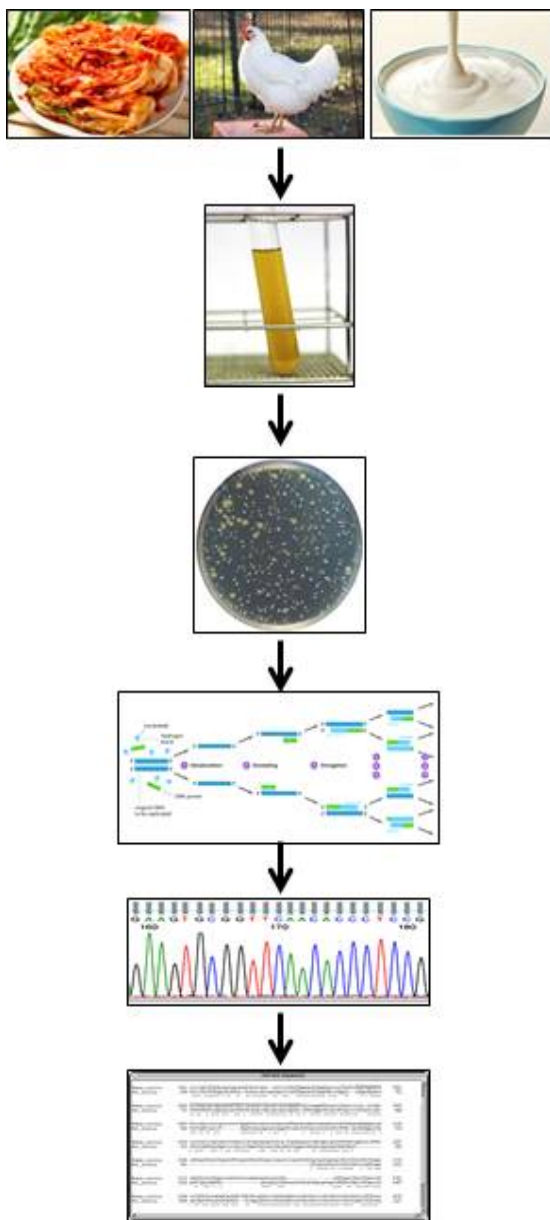
(1) 동물(가금류) 유래 유산균 확보

- 본 연구진은 4종의 야생오리(청둥오리, 고방오리, 홍머리오리, 쇠오리) 및 가금류(산란계, 육계 및 SPF 닭)로부터 장내 유산균을 분리·동정 하였음.
- 다양한 유산균을 분리하기 위해 대상 동물 중 또한 다양하게 설정함. 먹이·생활 환경이 가금류에 비해 가혹하고, 다양한 먹이 섭취원이 존재하는 야생오리류로부터 면역능 자극성이 높은 다수의 유산균 분리를 기대할 수 있을 것으로 판단하였음. 가금류 소화기관에서 분리되는 유산균은 분리 부위에 보다 잘 정착할 수 있기 때문에 과제 의 최종 목표인 사료첨가제로서의 적합도가 높음.
- 동물의 위장관은 상부 소화기(강한 산성 환경, 단백질 분해 효소 존재, 담즙산의 항생 작용) 및 하부 소화기(혐기성 환경)의 특성이 확연히 구분되고, 각 부위에 존재하는 장내 미생물총 구성 또한 다름이 알려져 있음. 따라서 특징적 조건을 갖는 소화기관 중의 부위를 선정하여 최대한 다양한 유산균을 분리하고자 함.
- 유산균 분리를 진행할 총 4종의 부분(crop, proventriculus, cecum, 분변)을 선정함. 먼저 소화기관에 존재하는 다양한 유산균을 분리하기 위해 소화기관을 장내 환경을 고려해 세 부분(crop, proventriculus, cecum)으로 분류함.
- ① Crop(모이주머니)은 조류에 특이적으로 존재하는 부위로 소화기관 중 미생물 정착이 가장 먼저 일어나는 부위 중 하나임.
- ② Proventriculus(선위)는 상부소화기의 대표적 부분으로 사람의 위에 해당하며 소화액이 분비되고 소화가 일어나는 부위임.
- ③ Cecum(맹장)은 하부소화기의 대표적 부분으로 산소가 부족한 혐기 환경이며 발효 과정을 이용하여 상부 소화기관에서 소화되지 않은 음식물의 소화가 일어남. 분변은 모든 소화기관 중 유산균이 배출되므로 위 세 부위 이외의 소화기관 중 유산균이 검출될 수 있고 장기에 비해 샘플링이 매우 쉬움.
- 산소 존재 정도에 따른 호기 및 혐기 조건은 미생물 배양에 큰 영향을 가짐. 예를 들어 혐기성 미생물은 호기 조건에서 그 성장이 크게 저해됨. 호기 및 혐기 조건에서 성장하는 다양한 유산균을 분리하기 위해 각 origin의 분리물을 호기와 혐기 조건에서 각각 배양하여 유산균 분리 동정을 진행함.



<그림 1. 조류의 소화기관 구조 및 샘플링 부위>

※ 실험방법 - 유산균 분리



- 동물을 무균적 방법으로 부검하여 소화기관 중 3종의 부위(crop, proventriculus, cecum) 및 분변을 샘플링함.
- 4종의 조직 및 분변 샘플을 PBS에 10% (w/v) 희석함.
- 희석액 중 1ml을 취하여 MRS broth (LAB094, LAB 또는 69966, Sigma-Aldrich) 30ml에 접종하고 37°C shaking incubator(200rpm)에서 24시간 배양함.
- 배양액의 경우 탁도가 증가하는데, 탁도 변화가 관찰되지 않을 경우 추가로 12~24 시간 동안 배양함.
- 배양액을 Rogosa agar(MB-R1176, MB cell, 기산바이오)에 loop을 이용해 dilution streaking 하고, 호기/혐기 조건별로 37°C, 24시간 배양함.
- 성상이 다른 colony를 loop을 이용해 dilution streaking 하고, 호기/혐기 조건별로 37°C, 24시간 배양함. 이 과정은 각 plate가 single colony로 구성된 것이 육안으로 확인될 때까지 반복하여 계대함.
- Single colony가 확인되면 16s rRNA 유전자 염기서열을 분석(MacroGen사에 의뢰)하고, NCBI Genebank의 데이터베이스와 비교하여 유산균을 동정하고 분류를 진행함.
- 동정된 유산균은 기존의 library에 지속적으로 업데이트함.

<그림 2. 유산균의 분리 및 동정 과정 모식도>

※ 실험결과

- 4종의 야생오리 및 SPF chicken 1종을 대상으로 소화기관 및 분변 내 유산균 분리동정을 진행한 결과, 총 40종의 유산균이 확보됨.
- 종 분포는 Lactobacillus spp. 27종, Enterococcus spp. 8종, Weissella spp. 3종, Pediococcus spp. 1종 및 Streptococcus spp. 1종으로 나타남.
- 40종 중 호기 조건에서 19종, 혐기 조건에서 21종이 분리되어 절반 이상이 혐기 조건에서 분리됨. 배양 조건을 다양하게 설정하면 분리 가능한 유산균이 더욱 늘어날 것으로 생각됨.
- Proventriculus, crop, cecum은 호기와 혐기 조건에서 분리된 유산균 종의 개수가 비슷했지만(각각 5:3, 7:7, 2:1 씩), 분변의 경우 혐기 분리가 10종, 호기 분리가 5종으로 혐기 조건에서 2배 더 많은 유산균을 분리할 수 있었음.
- 각 부위별 분리 종수는 분변과 crop이 각각 15종 및 14종으로 가장 많았고, proventriculus가 8종, cecum이 3종으로 확인됨. Cecum에서 가장 적은 수의 유산균이 분리된 것은 cecum 샘플링 시 내부의 분변을 제거하는 과정 때문일 것으로 사료됨.
- 산란계 및 육계 2종에서 총 67종의 유산균이 분리되었음.

No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA
1	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	21	분변	Lactobacillus antri	41	Crop	16s rRNA identifying
2	Crop	Lactobacillus vaginalis	22	분변	Lactobacillus dextrinicus	42	Crop	
3	Crop	Lactobacillus vaginalis	23	Crop	Lactobacillus johnsonii	43	Crop	
4	분변	Enterococcus hirae	24	Cecum	Lactobacillus plantarum	44	Crop	
5	분변	Weissella paramesenteroides	25	Crop	Enterococcus faecalis	45	Crop	
6	분변	Weissella cibaria	26	Crop	Lactobacillus crispatus	46	Crop	
7	분변	Lactobacillus plantarum	27	Crop	Lactobacillus johnsonii	47	Crop	
8	Proventriculus	Lactobacillus crispatus	28	Crop	Lactobacillus murinus	48	Crop	
9	Crop	Weissella cibaria	29	Crop	Lactobacillus vaginalis	49	Crop	
10	Crop	Enterococcus faecalis	30	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	50	Crop	
11	분변	Lactobacillus dextrinicus	31	Proventriculus	Lactobacillus murinus	51	Crop	
12	분변	Lactobacillus brevis	32	Cecum	Lactobacillus salivarius	52	Crop	
13	분변	Enterococcus hirae	33	Crop	Enterococcus faecium	53	Crop	
14	분변	Lactobacillus kimchii	34	Proventriculus	Enterococcus faecalis	54	Crop	
15	분변	Lactobacillus paralimentarius	35	Crop	Lactobacillus vaginalis	55	Proventriculus	
16	분변	Enterococcus faecalis	36	Proventriculus	Lactobacillus salivarius	56	Proventriculus	
17	분변	Pediococcus pentosaceus	37	Proventriculus	Streptococcus alactolyticus	57	Proventriculus	
18	분변	Lactobacillus reuteri	38	Cecum	Lactobacillus johnsonii	58	Proventriculus	
19	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	39	Crop	Lactobacillus vaginalis	59	Proventriculus	
20	분변	Enterococcus hirae	40	Crop	Lactobacillus reuteri	60	Proventriculus	

No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA
61	Proventriculus	16s rRNA identifying	81	분변	16s rRNA identifying	101	분변	16s rRNA identifying
62	Proventriculus		82	분변		102	분변	
63	Proventriculus		83	분변		103	분변	
64	Proventriculus		84	분변		104	분변	
65	Proventriculus		85	분변		105	분변	
66	Proventriculus		86	분변		106	분변	
67	Proventriculus		87	분변		107	분변	
68	Proventriculus		88	분변				
69	Proventriculus		89	분변				
70	Cecum		90	분변				
71	Cecum	91	분변					
72	Cecum	92	분변					
73	Cecum	93	분변					
74	Cecum	94	분변					
75	Cecum	95	분변					
76	Cecum	96	분변					
77	Cecum	97	분변					
78	Cecum	98	분변					
79	Cecum	99	분변					
80	Cecum	100	분변					

<그림 3. 철새 및 가금류 장내 유산균 동정 결과>

(2) 발효식품 유래 유산균 확보

- 전통발효식품은 오랫동안 유산균의 섭취원이 되어 왔고 다양한 발효식품에서 각각의 특징적 유산균이 분포하는 것으로 알려져 있음.
- 한국의 전통발효식품인 김치와 된장을 비롯해 몽골 전통 발효식품인 마유주, 일본 전통 발효식품인 낫또, 이 밖에 치즈와 요거트 등의 다수 발효식품 샘플링을 통해 다양한 유산균을 분리하고자 함.

※ 실험방법 - 유산균 분리

- 발효식품 1g (액상인 경우 1ml)을 broth (LAB094, LAB 또는 69966, Sigma-Aldrich) 30ml에 접종하고 37°C shaking incubator(200rpm)에서 24시간 배양함.
- 배양액의 경우 탁도가 증가하는데, 탁도 변화가 관찰되지 않을 경우 추가로 12~24시간 동안 배양함.
- 배양액을 Rogosa agar(MB-R1176, MB cell, 기산바이오)에 loop을 이용해 dilution streaking 하고, 호기/혐기 조건별로 37°C, 24시간 배양함.
- 성상이 다른 colony를 loop을 이용해 dilution streaking 하고, 호기 조건에서 37°C, 24시간 배양함. 이 과정은 각 plate가 single colony로 구성된 것이 육안으로 확인될 때까지 반복하여 계대함.
- Single colony가 확인되면 16s rRNA 유전자 염기서열을 분석(MacroGen사에 의뢰)하고, NCBI Genbank의 데이터베이스와 비교하여 유산균을 동정하고 분류를 진행함.
- 동정된 유산균은 기존의 library에 지속적으로 업데이트함.

※ 실험방법 - Lactobacillus plantarum/pentosus/paraplantarum 종 구분

- Lactobacillus plantarum group에 속하는 L. plantarum, L. pentosus, L. paraplantarum은 유전적 특성과 표현형이 유사함. 특히 L. plantarum과 L. pentosus 종은 16s rRNA 유전자에서 99% 이상의 상동성을 보여 세균 종 동정에 가장 많이 이용되는 16s rRNA sequencing을 이용한 종 구분이 불가능함. 3종의 유산균 동정을 위해 recA 유전자를 목적으로 하는 multiplex PCR을 적용함.
- Primers : paraF(5' -GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'), planF(5' -CG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'), penF(5' -CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'), pREV(5' -TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3')
- PCR 조성은 다음과 같음; 1.5mM MgCl₂, 0.25uM 썬의 paraF, pentF, pREV primers, 0.12uM planF primer, 12uM dNTP, 0.025U/ul Taq polymerase, 5ng/ul DNA
- PCR thermocycle program은 다음과 같음; 94°C, 3분 - (94°C, 30초 - 56°C, 10초 - 72°C, 30초) x 30cycles - 72°C, 5분
- PCR 이후 2% agarose gel에서 PCR product size를 확인함. L. plantarum은 318bp, L. pentosus는 218bp, L. paraplantarum은 107bp의 PCR product size를 나타냄.

※ 실험결과

- 30종의 발효식품(김치 19종, 된장 10종, 마유주 1종)을 수집하여 유산균 분리동정을

진행한 결과, 총 57종의 유산균을 확보함.

- 분리된 유산균 종 개수는 김치 유래 19종, 된장 유래 10종, 마유주 유래 1종으로 확인됨.
- 종 분포는 *Lactobacillus* spp. 38종, *Pediococcus* spp. 7종, *Sporolactobacillus* spp. 3종, *Leuconostoc* spp. 1종, *Enterococcus* spp. 1종 및 *Clostridium* spp. 1종, *Bacillus* spp. 6종으로 나타남.
- 발효식품 종류에 따라 주로 분리되는 유산균 종이 특징적으로 다르게 나타남. 김치에서는 대부분 *Lactobacillus* 종이 분리됨. 마유주에서는 김치와 된장에서 분리되지 않은 *Lactobacillus fermentum* 종이 분리되었고, 된장에서는 다른 발효식품에서 확인되지 않았던 *Bacillus* 종이 다수 분리됨.
- 치즈, 요거트, 낫또 등의 추가 수집된 발효식품 20종에서 50종의 유산균이 분리되었고, 현재 16s rRNA sequencing 과정이 진행중에 있음.

No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA
1	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	21	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	41	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	22	마유주	<i>Lactobacillus fermentum</i>	42	김치	<i>Lactobacillus alimentarius</i>
3	꽃송이버섯	<i>Pediococcus acidilactici</i>	23	마유주	<i>Lactobacillus fermentum</i>	43	된장	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
4	김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	24	마유주	<i>Lactobacillus fermentum</i>	44	된장	<i>Pediococcus lolii</i>
5	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	25	마유주	<i>Lactobacillus fermentum</i>	45	된장	<i>Bacillus lincheniformis</i>
6	된장	<i>Lactobacillus brevis</i>	26	마유주	<i>Lactobacillus fermentum</i>	46	된장	<i>Clostridium tyrobutyrium</i>
7	된장	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	27	김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	47	된장	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>
8	된장	<i>Pediococcus acidilactici</i>	28	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	48	된장	<i>Bacillus lincheniformis</i>
9	된장	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	29	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	49	김치	<i>Lactobacillus brevis</i>
10	김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	30	김치	<i>Lactobacillus sakei</i>	50	된장	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>
11	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	31	김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	51	김치	<i>Lactobacillus sakei</i>
12	김치	<i>Lactobacillus sakei</i>	32	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	52	김치	<i>Lactobacillus curvatus</i>
13	깍두기	<i>Lactobacillus brevis</i>	33	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	53	된장	<i>Bacillus coagulans</i>
14	깍두기	<i>Lactobacillus brevis</i>	34	된장	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>	54	김치	<i>Lactobacillus curvatus</i>
15	깍두기	<i>Lactobacillus curvatus</i>	35	된장	<i>Bacillus coagulans</i>	55	김치	<i>Lactobacillus sakei</i>
16	물김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	36	김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	56	된장	<i>Bacillus coagulans</i>
17	물김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	37	된장	<i>Bacillus coagulans</i>	57	김치	<i>Pediococcus acidilactici</i>
18	물김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	38	김치	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	58	요거트	16s rRNA identifying
19	물김치	<i>Lactobacillus brevis</i>	39	된장	<i>Enterococcus faecium</i>	59	요거트	
20	물김치	<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	김치	<i>Lactobacillus curvatus</i>	60	요거트	

No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA	No.	Origin	16s rRNA
61	요거트	16s rRNA identifying	81	김치	16s rRNA identifying	101	된장	16s rRNA identifying
62	요거트		82	김치		102	된장	
63	요거트		83	낫또		103	된장	
64	요거트		84	낫또		104	된장	
65	요거트		85	낫또		105	된장	
66	김치		86	낫또		106	된장	
67	김치		87	치즈		107	된장	
68	김치		88	치즈				
69	김치		89	치즈				
70	김치		90	치즈				
71	김치	91	치즈					
72	김치	92	치즈					
73	김치	93	치즈					
74	김치	94	치즈					
75	김치	95	치즈					
76	김치	96	된장					
77	김치	97	된장					
78	김치	98	된장					
79	김치	99	된장					
80	김치	100	된장					

<그림 4. 발효식품 유래 유산균 동정 결과>

- Multiplex PCR을 이용한 *Lactobacillus plantarum/pentosus* 종 구분 실험 결과, PCR을 진행한 4종의 유산균 모두 약 300bp의 band size를 나타내어 *L. plantarum* 종으로 확인됨.



<그림 5. *L. plantarum/pentosus/paraplantarum* 종 구분을 위한 multiplex PCR의 전기영동 결과>

○ 신규 동정 유산균의 환경저항성 및 면역세포 활성화 시험관내 시험

1) 신규 동정 유산균 대상 항산성 및 항담즙성 시험

※ 실험방법 - 항산성 시험

- 인공 위산 제조 : PBS를 HCl을 이용해 pH 2.5로 조정된 후 pepsin (Pepsin from porcine gastric mucosa, P7000, Sigma-Aldrich)을 3mg/ml 농도로 첨가함.
- 유산균 준비 : MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척함. PBS로 희석하여 10⁷CFU/ml 농도로 준비함.
- 유산균을 인공 위산에 1% (v/v) 첨가하고 상온에서 2시간 반응시킴.
- 2시간 경과 후 균 현탁액을 PBS에 십진 희석하고, MRS agar를 이용한 colony counting method를 이용해 생존 균수를 측정함.
- 처리 후 0시간 및 2시간의 균수를 비교하여 저항성 여부를 판단함.

※ 실험방법 - 항담즙성 시험

- 인공 담즙산 제조 : MRS broth에 0.3% (w/v) bile salt (B8756, Sigma-Aldrich)를 첨가함.
- 유산균 준비 : MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척함. PBS로 희석하여 10⁷CFU/ml 농도로 준비함.
- 유산균을 인공 담즙산에 1% (v/v) 첨가하고 37°C에서 24시간 동안 반응시킴.
- 24시간 경과 후 균 현탁액을 PBS에 십진 희석하고, MRS agar를 이용한 colony counting method를 이용해 생존 균수를 측정함.
- 처리 후 0시간 및 24시간의 균수를 비교하여 저항성 여부를 판단함.

※ 실험결과

- 신규 분리 유산균 대상 항산성 실험 결과 89종 중 13종(14.6%)에서 50% 이상의 생존율이 확인됨. 이 13종 중 12종은 발효식품 유래(57종 중 12종, 21.1%)였고, 1종만이 동물 소화기관 유래(40종 중 1종, 2.5%)로 확인됨.
- 된장 유래 유산균 중 항산성이 뛰어난 균주가 많은 것으로 확인됨. 총 17종의 된장 유래 유산균 중 10종이 소화기관 내와 비슷한 시험관내 산성 환경에서 50% 이상 생존율을 가짐. 이것은 된장이 발효되는 과정 중에 형성되는 낮은 pH 환경을 이겨낸 균주만이 살아남기 때문인 것으로 생각됨.
- 항담즙성 실험 결과 89종 중 41종(46.1%)에서 50% 이상의 생존율이 확인됨. 이 41종 중 20종은 발효식품 유래(57종 중 20종, 35.1%)였고, 21종은 동물 소화기관 유래(40종 중 21종, 52.5%)로 확인됨.
- 항담즙성 또한 김치 유래(35종 중 7종, 20%)와 비교해 된장 유래 유산균의 보유 비율이 높은 것으로 확인됨(17종 중 13종, 76.5%). 동물 소화기관 유래 유산균주도 항담즙성을 갖는 비율이 높았고(40종 중 21종, 52.5%), 된장 유래 유산균에 비해 생존율도 높게 나타남. 소화기관의 정착 미생물에 필요한 장내 환경에 대한 저항성을 갖는 것으로 생각됨.
- 항산성과 항담즙성을 동시에 가지는 균주는 14종으로 확인됨. 된장 유래 유산균이 10종으로 가장 많았고, 김치 및 동물 유래는 각각 3종, 1종으로 확인됨. 항산성과 항담즙성 실험이 소화기관 내 환경을 인공적으로 재현했으므로 두 실험에서 높은 능력을 나타낸 균주는 사료첨가제로 개발될 수 있는 가능성이 높을 것으로 사료됨.

No.	Origin	16s rRNA	항산성 (생존율)	항담즙성 (생존율)	No.	Origin	16s rRNA	항산성 (생존율)	항담즙성 (생존율)
1	김치	Lactobacillus plantarum	N	26.33	26	마유주	Lactobacillus fermentum	N	N
2	김치	Lactobacillus brevis	0.02	N	27	김치	Lactobacillus brevis	N	3.08
3	꽃송이버섯	Pediococcus acidilactici	0.45	123.33	28	김치	Lactobacillus plantarum	N	43.25
4	김치	Lactobacillus brevis	0.05	24.17	29	김치	Lactobacillus brevis	N	N
5	김치	Lactobacillus plantarum	N	9.08	30	김치	Lactobacillus pentosus or plantarum	2.88	13.42
6	된장	Lactobacillus brevis	0.07	58.83	31	김치	Lactobacillus plantarum	N	N
7	된장	Pediococcus pentosaceus	N	49.17	32	된장	Sporolactobacillus nakayamae	3.52	29.17
8	된장	Pediococcus acidilactici	0.79	148.33	33	된장	Bacillus coagulans	106.5934066	122.1153846
9	된장	Pediococcus pentosaceus	N	55.83	34	김치	Lactobacillus pentosus or plantarum	88.88888889	124.691358
10	김치	Lactobacillus brevis	1.68	34.33	35	된장	Bacillus coagulans	105.7534247	118.4931507
11	김치	Lactobacillus plantarum	N	26.33	36	김치	Leuconostoc mesenteroides	111.3043478	135.3043478
12	김치	Lactobacillus sakei	0.55	162.5	37	된장	Enterococcus faecium	77.23577236	130.0813008
13	각두기	Lactobacillus brevis	0.02	44.5	38	김치	Lactobacillus pentosus or plantarum	N	N
14	각두기	Lactobacillus brevis	0.35	160.83	39	김치	Lactobacillus alimentarius	97.98657718	122.8187919
15	각두기	Lactobacillus curvatus	0.15	170	40	된장	Pediococcus pentosaceus	76.10146862	89.45260347
16	물김치	Lactobacillus plantarum	N	38.58	41	된장	Pediococcus acidilactici or lolii	104.5714286	124.5714286
17	물김치	Lactobacillus plantarum	N	11.92	42	된장	Bacillus lincheniformis or sonorensis	72.45179063	78.51239669
18	물김치	Lactobacillus brevis	1	0.17	43	된장	Sporolactobacillus nakayamae	124.2718447	140.776699
19	물김치	Lactobacillus brevis	N	2.42	44	된장	Bacillus lincheniformis or sonorensis	105.0964187	125.4820937
20	물김치	Lactobacillus plantarum	0.03	98.33	45	김치	Lactobacillus brevis	3.77	28.33
21	김치	Lactobacillus plantarum	N	N	46	된장	Sporolactobacillus nakayamae	104.8746518	122.005571
22	마유주	Lactobacillus fermentum	N	N	47	김치	Lactobacillus sakei	N	0.5
23	마유주	Lactobacillus fermentum	N	N	48	김치	Lactobacillus curvatus	N	N
24	마유주	Lactobacillus fermentum	N	N	49	된장	Bacillus coagulans	0.82	3
25	마유주	Lactobacillus fermentum	N	N	50	김치	Lactobacillus curvatus	0.73	0.08

No.	Origin	16s rRNA	항산성 (생존율)	항담즙성 (생존율)	No.	Origin	16s rRNA	항산성 (생존율)	항담즙성 (생존율)
51	김치	Lactobacillus sakei	N	N	76	Cecum	Lactobacillus plantarum	N	86.17021277
52	된장	Bacillus coagulans	103.4340659	117.9945055	77	Crop	Enterococcus faecalis	0.27	1.17
53	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	N	58095.2381	78	Crop	Lactobacillus murinus	N	N
54	Crop	Lactobacillus vaginalis	N	180555.5556	79	Crop	Lactobacillus vaginalis	N	N
55	Crop	Lactobacillus vaginalis	N	1040000	80	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	N	N
56	분변	Enterococcus hirae	N	26.78571429	81	Proventriculus	Lactobacillus murinus	N	N
57	분변	Weissella paramesenteroides	N	770	82	Cecum	Lactobacillus salivarius	N	N
58	분변	Weissella cibana	N	12608.69565	83	Crop	Enterococcus faecium	N	51.77993528
59	분변	Lactobacillus plantarum	33.87096774	41935.48387	84	Proventriculus	Enterococcus faecalis	N	126.8292683
60	Proventriculus	Lactobacillus crispatus	N	N	85	Proventriculus	Lactobacillus salivarius	N	108.6261981
61	Crop	Weissella cibana	N	10952.38095	86	Proventriculus	Streptococcus alactolyticus	N	56.33802817
62	Crop	Enterococcus faecalis	N	1833333.333	87	Cecum	Lactobacillus johnsonii	N	116.1616162
63	분변	Lactobacillus dextrinicus	N	N	88	Crop	Lactobacillus vaginalis	0.909516381	0.209048362
64	분변	Lactobacillus brevis	81481.48148	8888888.889	89	Crop	Lactobacillus reuteri	0.664359862	0.260416667
65	분변	Enterococcus hirae	N	420					
66	분변	Lactobacillus kimchii	N	0.242990654					
67	분변	Lactobacillus paralimentarius	N	N					
68	분변	Enterococcus faecalis	N	2111.111111					
69	분변	Pediococcus pentosaceus	N	23728.81356					
70	분변	Lactobacillus reuteri	12.25806452	64.51612903					
71	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	N	6571.428571					
72	분변	Enterococcus hirae	1.055408971	272.7272727					
73	분변	Lactobacillus antri	N	N					
74	분변	Lactobacillus dextrinicus	1.18	0.17					
75	Crop	Lactobacillus johnsonii	N	N					

<그림 6. 신규 동정 유산균 대상 항산성 및 항담즙성 시험 결과>

2) 신규 동정 유산균 대상 면역세포 활성화 시험

※ 세포주 선정

- 활성화 평가를 진행할 면역세포를 가금 면역세포(splenocyte 및 PBMC)에서 닭 장상피세포(Chicken gastrointestinal epithelial cell)로 변경함.
- 장상피세포는 유산균 사료첨가제의 경구 적용 시 최초로 접촉하는 세포임. 또한 immuno-effector cells이므로 유산균 적용 후 면역 사이토카인 측정 시험이 가능하고, 동물 소화기관 내 정착 가능성 또한 시험관내 시험으로 평가가 가능할 것으로 예상되었음. 본 과제의 목표 중 하나인 면역 자극능이 높고 적용 후 장내에 장시간 정착 가능한 기능성 유산균 선발을 위한 최적의 세포주로 사료됨.
- 반면, 기존 계획의 가금 splenocyte는 primary cell로서 계대가 어려워 매번 실험동물의 안락사 후 부검이 필요함. 장상피세포를 이용한 실험은 실험동물을 대신할 수 있어 동물실험윤리적으로 적절하며 기능성 유산균의 대규모 스크리닝에 알맞을 것으로 판단됨.
- 이러한 판단을 바탕으로 다수의 계대가 가능한 Line cell로 개발된 닭 장상피세포 2종의 수입을 독일의 개발회사로부터 진행함. 세포의 내역은 다음과 같음.
 - 세포주명: 8E11, 2G4
 - 유래: 흰색 레그혼 계태아 소장 (Ileum of White Leghorn embryo)
 - 제조회사: 독일 MicroMole사

※ 세포주 배양 및 최적화

- 배양 배지 조성 : DMEM/HAM F-12에 10% FBS를 첨가, 항생제 첨가하지 않음.
- 배양 조건 : 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 5~7일 배양. 플라스크 면적의 80% 이상 세포가 자라면 계대 진행.



2G4



8E11

<그림 7. 닭 장 상피세포 배양 사진(100X)>

- 선정된 세포주는 heterogeneous origin으로 구성됨. 개발회사에서 cell marker western blot과 immunofluorescence 시험으로 닭 장 유래세포임을 확인하였으며, 사이토카인 발현능력에 대하여 확인이 이루어진 세포임.

cell clone	Characterization by expression			Characterization by function	
	Villin	E-cadherin	Cyto-keratin	LPS stimulation	<i>Campylobacter</i> infection
8E11	X	X	X	Induction of IL6 + IL8 (K60)	Invasive
9E6	X	X	X	Induction of IL6 + IL8 (K60)	Highly invasive
2G4	X	X	X	Induction of IL6 + IL8 (K60)	Invasive
10F6	X	X	X	Induction of IL6 + IL8 (K60)	Invasive

<그림 8. 세포주 종류에 따른 특성>

- 신규 분리 동정한 유산균 중 동물에서 인플루엔자 방어에 도움을 줄 것으로 예상되는 유산균을 선발하기 위하여 닭장상피세포 유래 세포주를 이용한 면역 활성 평가 시험을 진행함.

※ 유산균 집락화 능력 시험

- 세포 준비: 24 well plate에 cell을 2×10^5 cells/well의 농도로 약 7일 배양, well 안에 90% 이상 세포가 차도록 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10^7 CFU/ml 농도로 준비함.
- 배지를 털어내고, well당 유산균 500ul를 담아 4시간 동안 37°C incubator에서 반응시킴.
- 반응이 끝난 뒤, 유산균 상층액을 털어내고 남은 세포를 PBS로 워싱하여 세포에 부착하지 않고 남아있는 유산균을 제거함.
- 세포를 트립신 처리로 회수함.
- 세포에 붙어있는 유산균의 균체수를 MRS 배지를 이용하여 타이트리이션함.
- 세포와 반응시킨 유산균의 수와 장세포를 회수하여 측정된 세포에 붙은 유산균의 수를 비교하여 집락화 능력을 측정함.

※ 예비시험결과

- 닭 장상피세포 유래 세포주를 이용하여 진행한 예비시험에서 임의로 선발한 5종의 유산균이 장 세포와 거의 반응하지 못 하는 것을 관찰함. 이에 추가적인 해외 문헌 조사를 통하여 유산균 집락화 시험에서 널리 사용되는 Caco-2(사람 대장 유래 세포주)를 이용하여 추가 시험을 진행하였음.

16s rRNA	Origin	닭장상피세포		Caco-2 집락화 시험 결과
		2G4	8E11	
L.plantarum	김치	0.14 ^A	0.08	7
L.sakei	김치	0.01	0.01	-
L.brevis	김치	0.09	0.53	15.5
P.acidilactici	된장	0.53	0.093	1.5
P.pentosus	된장	0.01	0.01	22.3

^A 유산균 집락화율 : 회수 후 확인한 집락수/접종한 집락수

<표 1. 유산균 집락화 능력 시험 예비시험 결과>

※ 본시험결과

- 신규 분리 유산균 대상 Caco-2를 이용한 집락화 능력 시험 결과 85종 중 5종(5.88%)에서 처리한 유산균의 50% 이상이 세포에 부착하는 것을 확인함. 이들 5종 유산균 중 4종은 김치 유래 유산균이고 1종은 된장 유래 유산균임.
- 반응시킨 전체 유산균 중 10% 이상이 세포에 부착한 유산균은 14종(16.47%)으로 확인됨. 이 14종 중 13종은 발효식품 유래이고, 1종만 가금 소화기관 유래로 확인됨.
- Caco-2를 이용한 집락화 능력 시험 결과 예상과 달리 가금류 유래 유산균보다 발효식품 유래 유산균이 장상피세포 유래 세포에 더 잘 달라붙는 것으로 관찰됨.
- 이에 실제 장관에서도 발효식품 유래 유산균이 집락화할 가능성이 더 높아 보임.

No.	Origin	16s rRNA	장상피세포부착능	No.	Origin	16s rRNA	장상피세포부착능
1	김치	Lactobacillus plantarum	N	44	김치	Lactobacillus curvatus	0.376
2	김치	Lactobacillus brevis	N	45	된장	Bacillus coagulans	N
3	꽃송이버섯	Pediococcus acidilactici	N	46	김치	Lactobacillus curvatus	30.2
4	김치	Lactobacillus brevis	N	47	김치	Lactobacillus sakei	N
5	김치	Lactobacillus plantarum	22.5	48	된장	Bacillus coagulans	0.504
6	된장	Lactobacillus brevis	165	49	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	1.5
7	된장	Pediococcus pentosaceus	29.1	50	Crop	Lactobacillus vaginalis	1.46
8	된장	Pediococcus acidilactici	23.3	51	Crop	Lactobacillus vaginalis	1.58
9	된장	Pediococcus pentosaceus	22.3	52	분변	Enterococcus hirae	N
10	김치	Lactobacillus brevis	15.5	53	분변	Weissella paramesenteroides	N
11	김치	Lactobacillus plantarum	7	54	분변	Weissella cibaria	0.088
12	김치	Lactobacillus sakei	24.5	55	분변	Lactobacillus plantarum	0.112
13	각두기	Lactobacillus brevis	20.2	56	Proventriculus	Lactobacillus crispatus	N
14	각두기	Lactobacillus brevis	25.3	57	Crop	Weissella cibaria	0.54
15	각두기	Lactobacillus curvatus	19.3	58	Crop	Enterococcus faecalis	0.04
16	들김치	Lactobacillus plantarum	22.2	59	분변	Lactobacillus dextrinicus	N
17	들김치	Lactobacillus plantarum	0.38	60	분변	Lactobacillus brevis	0.02
18	들김치	Lactobacillus brevis	56.9	61	분변	Enterococcus hirae	N
19	들김치	Lactobacillus brevis	93	62	분변	Lactobacillus kimchii	N
20	들김치	Lactobacillus plantarum	16.3	63	분변	Lactobacillus paralimentarius	N
21	김치	Lactobacillus plantarum	N	64	분변	Enterococcus faecalis	5.28
22	김치	Lactobacillus brevis	181	65	분변	Pediococcus pentosaceus	0.008
23	김치	Lactobacillus plantarum	375	66	분변	Lactobacillus reuteri	0.004
24	김치	Lactobacillus brevis	1.74	67	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	11.6
25	김치	Lactobacillus pentosus or plantarum	16.7	68	분변	Enterococcus hirae	2.09
26	김치	Lactobacillus plantarum	37.6	69	분변	Lactobacillus antri	N
27	된장	Sporolactobacillus nakayamae	12.1	70	분변	Lactobacillus dextrinicus	N
28	된장	Bacillus coagulans	0.888	71	Crop	Lactobacillus johnsonii	N
29	김치	Lactobacillus pentosus or plantarum	1.28	72	Cecum	Lactobacillus plantarum	1.4
30	된장	Bacillus coagulans	0.428	73	Crop	Enterococcus faecalis	N
31	김치	Leuconostoc mesenteroides	0.56	74	Crop	Lactobacillus murinus	N
32	된장	Enterococcus faecium	2.22	75	Crop	Lactobacillus vaginalis	N
33	김치	Lactobacillus curvatus	7.66	76	Proventriculus	Lactobacillus reuteri	0.016
34	김치	Lactobacillus pentosus or plantarum	0.952	77	Proventriculus	Lactobacillus murinus	N
35	김치	Lactobacillus alimentarius	0.156	78	Cecum	Lactobacillus salivarius	N
36	된장	Pediococcus pentosaceus	0.868	79	Crop	Enterococcus faecium	N
37	된장	Pediococcus acidilactici or lolii	1.5	80	Proventriculus	Enterococcus faecalis	N
38	된장	Bacillus licheniformis or sonorensis	1.56	81	Proventriculus	Lactobacillus salivarius	N
39	된장	Sporolactobacillus nakayamae	0.428	82	Proventriculus	Streptococcus alactolyticus	N
40	된장	Bacillus licheniformis or sonorensis	0.004	83	Cecum	Lactobacillus johnsonii	N
41	김치	Lactobacillus brevis	11.3	84	Crop	Lactobacillus vaginalis	N
42	된장	Sporolactobacillus nakayamae	0.264	85	Crop	Lactobacillus reuteri	N
43	김치	Lactobacillus sakei	N				

<그림 9. 신규 동정 유산균 대상 Caco-2에서 집락화 능력 시험 결과>

나. 제 1 협동 연구기관 : (주)대성미생물연구소

○ Mineral Oil 원료 발굴 및 선정

- 현재 국내 다수(5개 동물용 백신회사 중 4개)의 동물용 백신회사에서는 사독 오일 백신 제조시 SEPPIC사의 오일면역증강제를 수입하여 백신을 제조하고 있음.
- 반면, (주)대성미생물연구소에서는 현재 Exxon Mobile 사의 Marcol 52 mineral oil을 구매하여 자체 확립한 프로토콜에 의해 사독 백신을 생산하고 있음.
- SEPPIC사의 주력 오일 면역증강제인 ISA 70 VG의 가격은 원화로 대략 12,000원/kg이며, 대성에서 사용하고 있는 Marcol 52의 가격은 5,730원/kg임.
- 시중에 판매되는 오일 사독 백신 가격은 주로 Oil phase의 가격에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있음. (오일면역증강제 대비 항원 가격은 미미한 수준)
- 따라서, 현재 생산되고 있는 사독오일백신의 Oil phase를 저가의 국산 오일로 대체할 수 있을 때 얻게 되는 경제적 효과는 크다고 할 수 있음.
- 본 연구에서는 국내외 여러 석유화학업체로부터 동물용 백신 면역증강제로 사용되기 적합할 것으로 보이는 각종 Oil들을 추천받아 신규한 오일 면역증강제로의 사용 가능성을 타진하기로함.

회사	Cat.No.	용량	제품명	성상			가격	Cas.No.
				SD	Fp (C)	그외		
삼전케미칼	M1319	1L	Mineral oil	0.87	>170	Cl < 10ppm SO4 < 10ppm Acid < 20ppm Alkali < 10ppm	11,000	
덕산약품공업주식회사	2270	1L	Paraffin liquid	0.86	230		9,400	8012-95-1
대명케미칼	?	150Kg	유동파라핀	0.845	154		?	8012-95-1
가나케미칼	1515.30.0000	약 0.5kg	CASTOR OIL CP 500G(OCI)	0.959	229	녹는점 -12 중기밀도 9.96 끓는점 313	7,300	8001-79-4
	151221	약 0.5kg	COTTON SEED OIL CP 500G(JUNSEI)	?	?		13,300	8001-29-4
	151912	약 0.5kg	OLIVE OIL CP 500ML(JUNSEI)	0.891	189	녹는점 13.4 끓는점 286 중기밀도 9.56	18,000	112-80-1
	151912	약 0.5kg	OLIVE OIL CP 500ML(OCI)	0.891	189	녹는점 13.4 끓는점 286 중기밀도 9.56	9,000	112-80-1
신원 무역 상사	?	15Kg,176Kg	파라핀 오일 Paraffin oil(Carnation)	0.829~0.859		Visc,Kin.@40C,mm2/s 10.8~13.6cst Breakdown time >45		8012-95-1
		15Kg, 182Kg	(Kaydol)	0.869~0.885		Visc,saybolt @100F:340~360, Pour point : -28C		
서진화학	KF-70		화이트 미네랄 오일 (White Mineral Oil) 유동파라핀 (Liquid Paraffin)	0.935	202			8042-47-5
강남 화공 약품상사	?	1.5L	유동파라핀	0.828-0.905	>576F,302C			8012-95-1
우리동네	템1		다목적유(General Purpose Oil ; white mineral oil)				템1	?
	템2		유동파라핀(Liquid paraffin series)				템2	?

<그림 10. 국내 Mineral Oil 원료 수집처 조사 결과>

- 위 회사들을 중심으로 Oil 원료 수집을 진행하여 다음과 같이 총 16종의 Oil을 수집하였음.
 - ① 국외 : 4개 회사, 7개 제품
 - ② 국내 : 5개 회사, 9개 제품

회사	Cat.No.	용량	제품명	성상			가격	Cas.No.
				SD(g/ml)	Fp	그외		
Pharmachem		?	White mineral oil	N/A	>175C	Bp>350C	?	8012-95-1
Paraffin oils			Light Liquid Paraffin	0.82@16C/16Cmin	300F(150C)/PM,min	vapor pressure 0.05@68CF Bp 536-662F		90622-46-1
Sigma-Aldrich	232-384-2(EC No.) 181512	1L	Paraffin oil(puriss., meets analytical specification of Ph. Eur., BP, viscous liquid)	?	419F	dynamic viscosity 110-230mPa.s	112000	8012-95-1
	76235	500ml	Paraffin oil(for IR spectroscopy)	?	419F	viscosity 100-145mPa.s(20C)	45000	8012-95-1
Recochem	?	?	Paraffin liquid	0.85	210C			8012-95-1
Chemsupply	PL041-500M	500ml	Paraffin liquid light	0.830-0.860	>120C		\$54.00	8042-47-5
	PL043-500M	500ml	Paraffin liquid heavy	0.875-0.905	>170C	Bp 360.05C	\$41.00	8012-95-1
Fisher scientific	O1211	1L	Mineral Oil,Light(NF/FCC)	0.83@15.6C	>160C	Bp 260-427C	\$176.86	8042-47-5
Vet-way	LP001	500ml x 20	Liquid paraffin	?	>165C	Bp>300C	?	8012-95-1
Hampton Research	HR3-411	250ml	Paraffin oil	0.86	419F	viscosity 110-125Pas	\$47.00	8012-95-1
PanReac AppliChem	A4043	500ml	Paraffin Oil heavy White oil	approx.0.88	Not applicable	dynamic viscosity 110-230mPa.s(20C)		8042-47-5
Jmloveridge	RM183(102-4421)	500ml	Light Liquid Paraffin	0.845	>180C	Vapot pressure <0.01mmHg vapour density>1		
Exxon	Marcol 82		Medicinal grade White oil	?	182C	density@15C(kg /m3) 845-858 Pour point -6C		8042-47-5
Shell	Shell Ondina 100		Medicinal White oil	0.874	260C			8042-47-5

<그림 11. 국외 Mineral Oil 원료 수급처 조사 결과>

- 상기 16개 제품을 대상으로 Brookfield사의 DV2T Viscometer를 이용하여 각 Oil의 점도를 측정함.

	번호	제품명	회사
국외	F-1	Marcol82	Exxonmobile
	F-2	Paraffin oil	Sigma-aldrich
	F-3	Paraffin oil	Riedel-de Haen
	F-4	Liquid paraffin	Junsei
	F-5	Castor oil	Junsei
	F-6	Cotton seed oil	Junsei
	F-7	Olive oil	Junsei
국내	K-1	KF-40	서진화학
	K-2	KF-50	
	K-3	KF-60	
	K-4	KF-70	
	K-5	KF-350	
	K-6	HS-080	우리동네
	K-7	Paraffin oil	삼진화학
	K-8	Paraffin oil	덕산약품공업
	K-9	Olive oil	대정

<표 2. 연구팀 수집하여 시험에 사용한 Mineral Oil 원료 정리>

※ 측정 조건

- ① Temperature : 20°C
- ② Spindle : LV-2 (62) - Range 50~100K mPa*s
- ③ Volume : 100ml Beaker에 120ml씩 분주 후 측정 - 측정용 Spindle의 높이 고려
- ④ 측정 interval : 15초마다 1회씩 총 3회 측정, 평균값을 해당 Oil의 viscosity로 결정

※ 측정 결과

			Oil			
			1차	2차	3차	평균
F-1	Marcol82	Exxonmobile	34.8	35	34.8	34.9
F-2	Paraffin oil	Sigma-aldrich	131.8	131.6	131.4	131.6
F-3	Paraffin oil	Riedel-de Haen	100.6	100.4	100.2	100.4
F-4	Liquid paraffin	Junsei	151.4	150.8	150.8	151.0
F-5	Castor oil	Junsei	728	728	724	726.7
F-6	Cotton seed oil	Junsei	60.2	60.4	60.2	60.3
F-7	Olive oil	Junsei	68.6	68.6	68.6	68.6
K-1	KF-40	서진화학	12.8	13	12.8	12.9
K-2	KF-50		17.8	17.8	17.8	17.8
K-3	KF-60		22.2	22.2	22.2	22.2
K-4	KF-70		27	27	27	27.0
K-5	KF-350		133.8	133.4	133.2	133.5
K-6	HS-080	우리동네	22.4	22.4	22.4	22.4
K-7	Paraffin oil	삼진화학	27.6	27.8	27.6	27.7
K-8	Paraffin oil	덕산약품공업	27.2	27.2	27.2	27.2
K-9	Olive oil	대정	73.6	73.4	73.4	73.5

<표 3. 점도 측정 결과>

- 측정 결과, 국외 7개 제품 중 3개 제품(Exxon Mobile-Marcol82, Junsei-Cotton Seed Oil, Olive Oil) 및 국내 8개 제품(서진화학 KF-40, KF-50, KF-60, KF-70, 우리동네-HS-080, 삼진화학-Paraffin Oil, 덕산약품공업-Paraffin Oil, 대정-Olive Oil) 의 점도가 100mPa*s 이하로 측정됨.
- 대부분의 사독오일백신은 연속주사기를 사용하여 점종하게되는데, 이때 오일 백신의 점도가 높을 경우 연속주사기의 재충전이 어려워짐. 이는 곧 정량 투여의 실패를 초래하기 때문에 오일백신의 개발에 있어서 백신의 점도는 주요 고려사항 중 하나임.
- 따라서, 수집한 오일 중 비교적 낮은 점도를 보인 상기 11개 오일을 대상으로 추가 실험을 진행하기로 결정함.

○ Surfactant 원료 발굴 및 선정

- 사독 오일 백신 제조 시 Oil phase(면역증강제)와 Water phase(항원)를 유화시키기 위한 유화제(Surfactant)가 필수적으로 요구됨.
- Surfactant는 친수성(Hydrophilic)과 친유성(Lipophilic)을 동시에 가지고 있는 물질로서 그 두 성질의 상대적인 차이가 곧 해당 계면활성제의 성능 및 용도에 크게 영향을 미치게 됨.
- 계면활성제의 친수성과 친유성의 정도를 수치로 나타낸 것을 HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)라고 하며, HLB는 친유성이 가장 큰 것부터 1로 시작하여 친수성이 가장 큰 것이 40에 이르게 됨.
- 널리 쓰이고 있는 계면활성제는 HLB가 대체로 1~20사이에 존재하며, 계면활성제의 HLB에 따라 물에 잘 녹기도 하고 유기용매에 잘 녹기도 하며 일반적으로 HLB가 커질수록 물에 대한 용해도는 증가하는 것으로 알려짐.

HLB	용도
1-3	소포제
3-4	드라이클리닝용 세제
4-8	유화제(기름 속에 물 분산)
8-13	유화제(물 속에 기름 분산)
13-15	세탁용 세제
15-18	가용화(물 속에 기름 분산)

<표 4. 계면활성제의 HLB와 그 용도>

- (주)대성미생물연구소 오일 백신 제품의 기본 조성은 다음과 같음.

※ 오일 백신 기본 조성

- ① Water part(25%)
- ② Oil part(75%)
 - a. Marcol 52 oil - 71.7%
 - b. Span 80 - 3.0%
 - c. Tween 80 - 0.3%

- Span80의 HLB=4.3, Tween80의 HLB=15 이므로 두 물질을 10:1로 조합한 계면활성제의 HLB는 계산 공식에 의해 $(4.3 \times 10 + 15 \times 1)/11 = 5.273$ 임.

$$\frac{AX}{100} + \frac{BY}{100} + \frac{CZ}{100} = H.L.B \quad \left[\begin{array}{l} A, B, C - \text{성분 각각의 HLB} \\ X, Y, Z - \text{성분 각각의 함량} \end{array} \right]$$

<그림 12. HLB 계산 공식>

- 본 연구에서는 우선 HLB=5.273 조건 하에서 선행 시험에 의해 선발된 Oil 11종을 사용하여 항원과 Oil의 유화를 시도하였음.

※ 유화 조건

① Water phase(25%=27.5ml)

- LPAIV(H9N2/01310) 10배 희석액 사용

- 원액 농도 : 10^9 .375 EID₅₀/ml

② Oil phase(75%=82.5ml)

- Mineral Oil : 71.7%=78.9ml

- Span80 : 3%=3.3ml

- Tween80 : 0.3%=0.33ml

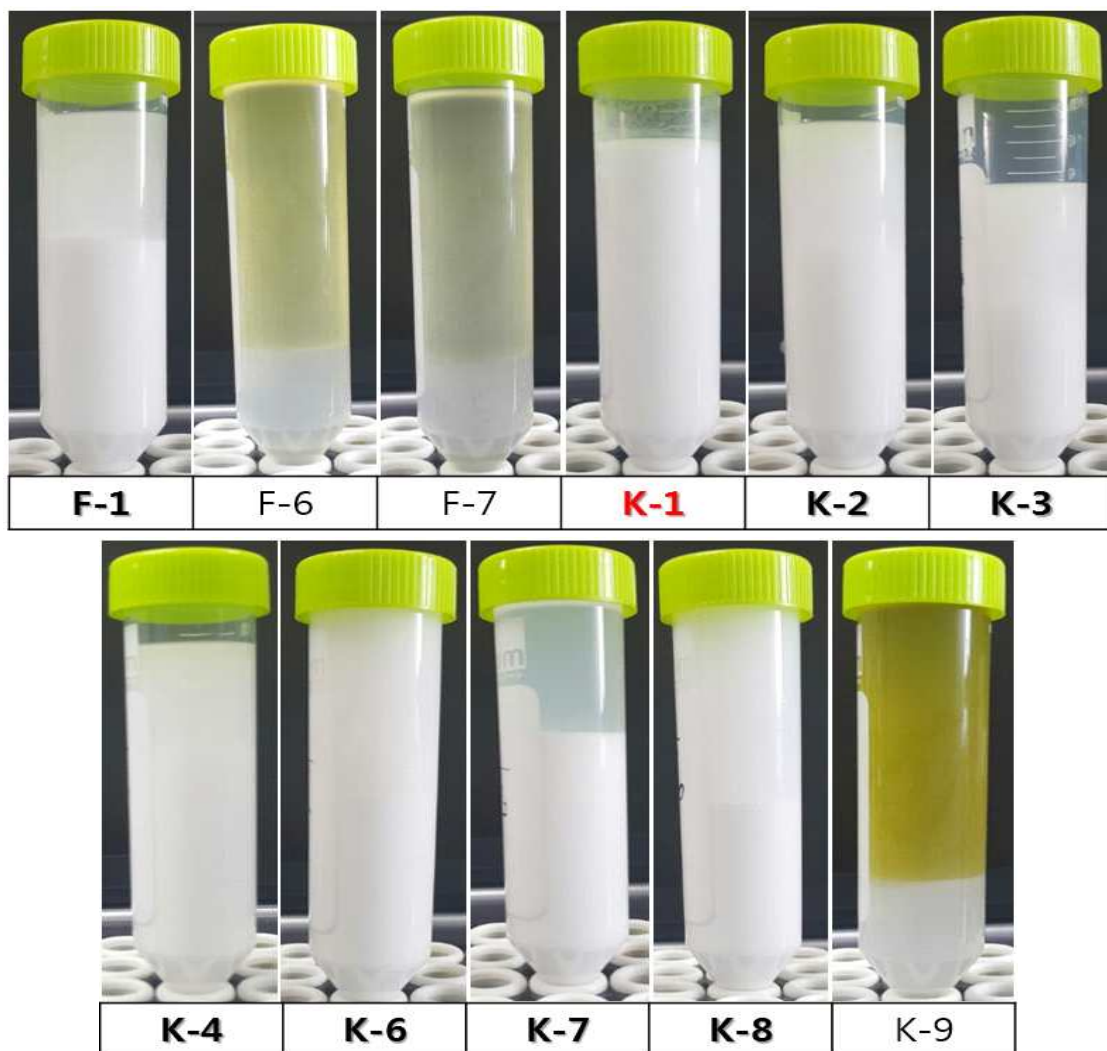
③ Condition

- Oil phase 교반 : 1400rpm, 1min

- Water phase 투입 중 : 1400rpm

- Water phase 투입 후 : 6000rpm, 3min

④ 유화 확인 시험 : Drop-test



<그림 13. Emulsion 제조 후 24시간 상온 보관 후 사진>

※ 실험 결과

- 유화 실험 결과, 11종의 Oil 중 K-1 1종만이 해당 조건의 Surfactant(HLB : 5.273, Content % : 3.3)로 완벽히 유화되는 것으로 나타남.
- 나머지 10종의 Oil은 시험 직후에는 우유상의 Emulsion 형성이 확인되었으나, 제조 24시간 후 확인 결과 상 분리가 일어난 것이 관찰됨.
- 특히, 11종의 선발 Oil 중 점도가 비교적 높았던(>60mPa*s) F-6, F-7, K-9의 경우 전혀 유화가 일어나지 않는 것으로 확인되었으며, 이는 높은 점도와 더불어 세 Oil이 Mineral Oil이 아닌 plant-derived Oil인 점이 영향을 주었을 것으로 생각됨.

○ 항원-면역증강제 최적 배합비율 도출

- 사독백신용 항원은 병원체에 따라 다양한 제조 시스템을 채택하고 있으며, 주요 가금 질병의 경우 다음과 같은 항원제조 시스템을 지님.
- ① Avian Influenza virus, Newcastle Disease Virus, Infectious Bronchitis Virus
: 계란의 Allantoic Fluid(AF)
- ② Fowl Adeno Virus
: Chicken Embryo Liver Cell(CEL), Chorioallantoic membrane(CAM), LMH cell 등
- ③ Avian Metapneumovirus
: Vero cell 등
- 백신 항원 제원별 항원-면역증강제 최적 배합 비율 및 조건을 확립하기 위해서 우선 주요 가금질병 별 항원 제조 시스템을 확립하였음.

※ AI 항원 제조 시스템

- ① 종란배양
 - 사용종란(10일령)
 - 부화기 조건(37°C, 50~60% RH)
- ② 바이러스 접종 및 배양
 - 접종 seed 역가 ($10^2 \sim 3$ EID₅₀/0.1ml)
 - 배양시간 (72h)
- ③ 접종방식
 - 요막강
- ④ 바이러스 채득 및 불활화
 - 원심분리 조건(3000rpm(3400g), 15min)
 - 불활화 (0.2% 포르말린, 24h at RT, 교반 필수)
- ⑤ 채득 후 보관 조건
 - -20°C
- ⑥ 용해조건
 - 4°C

※ FAdV 항원 제조 시스템

- T175 System

- ① T175 flask에 LMH cell 80%~90% monolayer 상태에서 FAdV type 4 LMH 계대주 P10 한 병 ($10^{8.5}$ TCID₅₀/병)을 100배 희석
- ② T175 flask의 growth media 제거 후 희석한 계대주 3ml 접종 ($3 \times 10^6.5$ /flask)
- ③ 접종 후 40분 incubation
- ④ 유지배지 27ml 첨가
- ⑤ 37도 incubator에서 3일간 배양
- ⑥ 3일 후 -70도 freezing
- ⑦ freezing thawing 3회
- ⑧ FAdV type 4 LMH P11 완성

- Multi flask System

Flask	백신희석	접종량	유지배지	freezing	freezing thawing
T175	100배	3ml	27ml	-70도	3회
Multi flask	100배	15ml	135ml	-20도	1회

<표 5. T175 system 과 Multiflask system protocol 간의 차이점 정리>

- 역가 측정 시에는 CEL 사용 : 리딩은 접종 후 6일까지 확인하여 최종 역가 판정

※ AMPV 항원 제조 시스템

① Vero Cell

- 세포 배양
- 배양배지 조성 (D-MEM, antibiotic-antimycotic 1%, FBS 8%)
- 10% glucose 제조 후 세포배양배지에 1% 첨가

② 바이러스 접종 및 배양

- 접종 seed 역가($10^{7.2-7.4}$ TCID₅₀/ml)
- 감각시간 : 40min
- 배양시간 : 4~5일
- 채독시기 : CPE 80~90%

③ 채독

- 원심분리 조건 : 2000rpm, 10min

④ 불활화

- 8L 유리 용기에 6L 불활화 조건일 경우
- 포르말린 0.2%, 37°C, 24hr
- 용량이 적을 경우 변경 가능

⑤ 보관조건

- 채독 후 장기 보관시 : -70°C 이하
- 채독 후 단기 보관시 : -25°C (3개월 이내 사용)

⑥ 용해조건

- 실온조건에서 유지 후 흐르는 물에 녹임
- 상기 시스템에 의해 제조된 AI 항원(A/chicken/Korea/01310/2001)을 이용하여 최적 배합 조건 확립

※ 항원 최적 pH 조절

- 3N NaOH or 1N HCl 사용하여 pH 7.0으로 조절함

※ 항원-오일 면역증강제 비율 결정

- Water phase와 Oil phase를 surfactant를 사용하여 유화시킬 때 일반적으로 Water phase의 비율이 높을수록 에멀전의 점도는 높아지는 것으로 알려짐.
- 즉, 생성된 Emulsion의 점도는 항원-오일 면역증강제 비율에 의해 결정되며 백신의 점도는 곧 사용성과 직결되므로 그 중요성이 크다 할 수 있음.
- 따라서, 선행실험 시 사용된 Oil을 사용하여 선행실험 조건과 동일하게 제조한 뒤 각 백신의 점도를 측정함. (Water phase = 25%, Oil phase = 75%)

			Vaccine			
			1차	2차	3차	평균
F-0	ISA70 VG	SEPPIC	33.8	33.8	33.8	33.8
F-1	Marcol82	Exxonmobile	186	182.4	181	183.1333
F-6	Cotton seed oil	Junsei	69.6	67.6	66.4	67.86667
F-7	Olive oil	Junsei	63.4	61.4	60.2	61.66667
K-1	KF-40	서진화학	29	28.8	28.6	28.8
K-2	KF-50		52	51.6	51.2	51.6
K-3	KF-60		76.8	75.8	75.2	75.93333
K-4	KF-70		114.6	113.2	111.8	113.2
K-6	HS-080	우리동네	69	68.2	68.2	68.46667
K-7	Paraffin oil	삼전화학	146.2	144.2	142.4	144.2667
K-8	Paraffin oil	덕산약품공업	91.6	90.2	89.2	90.33333
K-9	Olive oil	대정	86.8	83.4	81.4	83.86667

<표 6. 백신 제조 후 Viscosity 측정 결과>

- 실험 결과, F-0 (ISA 70 VG : 현재 시중에서 가장 일반적으로 쓰이고 있는 오일면역증강제) 비교하였을 때, K-1을 사용한 오일 백신이 유일하게 더 낮은 점도를 보임.
- 즉, 이 결과에 따르면 K-1을 제외한 다른 오일의 경우 ISA 70 VG와 동등한 수준의 점도를 확보하기 위해 더 낮은 항원 비율(더 높은 Oil 비율)을 적용해야 할 것으로 보이며, 이는 곧 Dose 당 항원량의 감소를 가져올 것으로 예상됨.

○ 이멀전 공법의 정립

- Water-in-Oil 이멀전 공법은 High shear Mixer를 이용하며, 기본적으로는 회전하는 Rotor와 고정되어 있는 Stator 사이의 간극을 통과하는 물과 기름이 Surfactant에 의해 합쳐지는 방법임.
- 크게 Homo mixer와 In-line mixer로 나뉘어지며 각각의 방식의 장단점이 존재함.
- Homo mixer의 경우, 한 탱크나 한 통 단위로 작업하는 Batch type에 편리하게 이용 가능하며, 원료를 빨아올리며 분산하는 원리임.
- In-line Mixer의 경우, 펌핑과 순환에 의한 교반 타입으로 수 톤에 달하는 큰 용량의 경우에도 Drain만 장착시키면 설치가 가능하기 때문에 상대적으로 설치와 유지보수가 용이한 면이 있어서 산업계에서 쓰이는 초대형 반응기에 주로 사용됨.



<그림 14. Homo mixer 및 In-line Mixer>

① Homo mixer

- 건국대학교에서 보유하고 있는 Homomixer는 Primix 사의 T.K.ROBOMICS 이며, Mixing section은 T.K.Homo Mixer MarK II Model 2.5를 사용함.

※ 제조 공법 예시

STEP	작업과정	세부사항
1*	pH 조절	pH : 6.5~7.2, (NaOH or HCl)
2	ISA70 VG 교반	1400rpm, 5min
3	항원 투입조건	투입중 : 1400rpm
		투입후 : 6000rpm, 5min
4	유화확인시험	Drop-test, Viscosity test
5	분병	(X)

* 다가백신 제조 시 pH 조절 과정은 서로 다른 항원을 교반하기 전 실시함.

<표 7. Homomixer 제조 공법>

② In-line Mixer

- 대성미생물연구소 보유 In-line Mixer는 IKA 사의 DISPAX-REACTOR® DR 2000/05 임.
- ※ 제조 공법 예시

STEP	작업과정	세부사항
1*	pH 조절	pH : 6.5~7.2, (NaOH or HCl)
2	ISA70 VG (Stirrer 사용)	140rpm, 30min
3	항원 투입(Stirrer 사용)	투입중 : 180~300rpm
		투입후 : 180~300rpm, 20~30min
4	1차 Mixing (Homogenizer 사용)	7000~8000rpm, 30min (높은 rpm으로 인한 온도상승 막기 위해 용기 주변 ICING)
5	기포 제거	20~30분 정치
6	2차 Mixing (Homogenizer 사용)	7000~8000rpm, 20min
7	유화확인시험	Drop-test, Viscosity test(시험방법)
8	분병	(O)

* 다가백신 제조 시 pH 조절 과정은 서로 다른 항원을 교반하기 전 실시함.

<표 8. In-line mixer 제조 공법>

- 상기와 같이 두 가지 Emulsifier에 대한 오일 백신 제조 공법을 확립함.

○ 유산균 라이브러리를 이용한 가금용 면역보조제 선발 및 면역원성 시험

- 본 연구진은 기 보유 유산균 라이브러리 중 일부를 대상으로 Mouse에 유산균 투여 후 Influenza A 및 B에 대한 방어 효능을 테스트함.

※ 실험 1

① 공시재료

- 시험동물 : 6주령 SPF(specific pathogen free) BALB/c mouse
- 시험물질 : 유산균 12종
- 시험바이러스 : Influenza virus type A, A/NWS/33 (H1N1)

Group	Strain	Origin
G1	<i>L.plantarum</i>	김치(꺼먹촌)
G2	<i>L.brevis</i>	김치(꺼먹촌)
G3	<i>P.acidilactici</i>	꽃송이버섯
G4	<i>L.brevis</i>	김치
G5	<i>L.plantarum</i>	김치
G6	<i>L.brevis</i>	된장
G7	<i>P.pentosaceus</i>	된장
G8	<i>P.acidilactici</i>	된장
G9	<i>P.pentosaceus</i>	된장
G10	<i>L.brevis</i>	김치(과주옥-1)
G11	<i>L.plantarum</i>	김치(과주옥-2)
G12	<i>L.sakei</i>	김치(씨푸드락)

<표 9. 시험 그룹 정리>

② 시험내용

- 6주령의 SPF BALB/c mice 140수를 그룹당 10수씩 총 14개의 그룹(유산균 비강투여

시험군 12개, 공격접종 양성대조군 1개, 공격접종 음성대조군 1개)으로 나눈다.

- 유산균 비강투여 그룹(90ul/마리/day)은 인플루엔자 바이러스 ($10^{4.5}/90\mu\text{l}/\text{dose}$) 공격접종 전 6회 비강투여 하여 예방한다.
- 공격접종 양성대조군 및 음성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여 한다.
- 공격접종 후 3주간 임상증상 발현 및 폐사율 감소 효과를 관찰하여 유산균 비강 투여에 의한 인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가한다.

③ 시험결과

- 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 임상증상 발현억제 효능시험 및 폐사율 시험 결과

그룹	농도 (c.f. u/마 리) ^A	접 종 수	체중(g) (mean ± SD)		공격접종 결과			PI ₂₁ ^F	
			접종전	접종후	임상증상 Sick ^B	폐사 MTO (day) ^C Dead ^D	MDT (day) ^E		
G1	<i>L.plantarum</i>	10	18.5±0.7	16.9±0.6	9/9	3	4/9	10.0	1.4
G2	<i>L.brevis</i>	10	18.4±0.5	18.3±0.6	9/9	3	7/9	9.8	1.8
G3	<i>P.acidilactici</i>	10	18.0±0.8	16.1±2.3	10/10	3	5/10	8.8	1.5
G4	<i>L.brevis</i>	10	17.5±0.8	17.4±0.0	10/10	3	9/10	10.5	1.9
G5	<i>L.plantarum</i>	10	18.1±1.0	17.1±2.0	10/10	3	2/10	10.3	1.2
G6	<i>L.brevis</i>	10	18.1±1.0	16.4±2.1	9/9	3	4/9	10.3	1.4
G7	<i>P.pentosaceus</i>	10 ^{8.0}	17.7±1.0	17.2±1.9	8/8	3	2/8	11.0	1.3
G8	<i>P.acidilactici</i>	10	18.2±1.0	15.5±2.9	10/10	3	3/10	11.0	1.3
G9	<i>P.pentosaceus</i>	10	17.4±1.2	17.6±1.1	10/10	3	3/10	10.0	1.3
G10	<i>L.brevis</i>	10	17.8±1.0	16.2±2.7	10/10	3	6/10	9.5	1.6
G11	<i>L.plantarum</i>	10	17.5±1.2	16.0±2.0	9/9	3	4/9	10.4	1.4
G12	<i>L.sakei</i>	10	18.1±0.9	18.2±1.3	9/9	3	2/9	8.5	1.2
G13	양성대조군	10	18.4±0.4	0.0±0.0	10/10	3	10/10	6.8	2.0
G14	음성대조군	10	17.5±0.9	19.9±1.0	0/10	-	0/10	-	-

^A 투여량 : 1회 90ul/두, 투여기간 : 공격접종 전 6회 예방

^B 임상증상발현수수/접종수수

^C Mean time of onset of clinical signs

^D 폐사수수/접종수수

^E Mean death time

^F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

<표 10. 시험 결과>

※ 실험 2

① 공시재료

- 시험동물 : 6주령 SPF(specific pathogen free) BALB/c mouse
- 시험물질 : 유산균 10종 비강투여
- 시험바이러스 : Influenza virus type B, B/Yamagata/16/88

그룹	유산균	역가
G1	18 <i>B.coagulans</i>	(2x10 ⁹ cfu/ml)
G2	37 <i>S.nakayamae</i>	(2x10 ⁹ cfu/ml)
G3	17 <i>S.nakayamae</i>	(2x10 ⁹ cfu/ml)
G4	46 <i>B.coagulans</i>	(2x10 ⁹ cfu/ml)
G5	21 <i>B.coagulans</i>	(2x10 ⁹ cfu/ml)
G6	35 <i>B.linchenformis</i>	(1x10 ⁹ cfu/ml)
G7	30 <i>P.acidilactici</i> or <i>P.lolii</i>	(3x10 ⁸ cfu/ml)
G8	28 <i>L.alimentarius</i>	(5x10 ⁸ cfu/ml)
G9	23 <i>E.faecium</i>	(5x10 ⁸ cfu/ml)
G10	22 <i>L.mesenteroides</i>	(2x10 ⁸ cfu/ml)
G11	공격접종 양성대조군	-
G12	공격접종 음성대조군	-

<표 11. 시험 그룹 정리>

② 실험내용

- 6주령의 SPF BALB/c mice 120수를 그룹 당 10수씩 총 12개의 그룹(유산균 비강투여 시험군 10개, 공격접종 양성대조군 1개, 공격접종 음성대조군 1개)으로 나눈다.
- 유산균 비강투여 그룹(90ul/마리/day)은 인플루엔자 바이러스 (10^{4.5}/90μl/dose) 공격접종 전 6회 비강투여 하여 예방한다.
- 공격접종 양성대조군 및 음성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여 한다.
- 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 3주간 임상증상 발현 및 폐사율 감소 효과를 관찰 하여 유산균 투여경로별 인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가한다.

③ 시험결과

- 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 임상증상 발현억제 효능시험 및 폐사율 시험

그룹	농도 (c.f.u/ 마리) ^A	접 종 수 수	체중(g) (mean ± SD)		공격접종 결과			PI ₂₁ F	
			접종전	접종후	임상증상 Sick ^B	폐사 Dead ^D	MDT (day) E		
G1	18 <i>B.coagulans</i>	10	19.2±0.9	17.8±2.2	10/10	3	5/10	8.8	1.5
G2	37 <i>S.nakayamae</i>	10	19.2±0.9	17.4±1.9	10/10	3	8/10	8.3	1.8
G3	17 <i>S.nakayamae</i>	10 ^{8.0} 9	19.8±0.8	17.5±3.5	9/9	3	4/9	9.3	1.4
G4	46 <i>B.coagulans</i>	10	19.3±0.8	15.9±3.4	10/10	3	6/10	8.0	1.6
G5	21 <i>B.coagulans</i>	10	19.5±0.8	18.5±1.4	10/10	3	4/10	6.3	1.4
G6	35 <i>B.linchenformis</i>	10	19.3±1.0	18.5±1.0	10/10	3	2/10	11.5	1.2

G7	30	<i>P.acidilactici</i> or <i>P.lolii</i>		11	18.8±1.2	18.8±1.0	11/11	3	1/11	9.0	1.1
G8	28	<i>L.alimentarius</i>		8	18.8±1.1	17.0±1.8	8/8	3	6/8	9.8	1.8
G9	23	<i>E.faecium</i>		10	19.1±0.8	18.0±2.3	10/10	3	1/10	8.0	1.1
G10	22	<i>L.mesenteroides</i>		9	18.9±1.2	19.4±0.6	9/9	3	2/9	9.5	1.2
G11		공격접종	PBS	10	19.7±1.3	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.1	2.0
G12		양성대조군									
G13		공격접종	PBS	10	20.0±0.9	20.5±0.7	0/10	-	0/10	-	-
G14		음성대조군									

A 투여량 : 1회 90ul/두, 투여기간 : 공격접종 전 6회 예방

B 임상증상발현수수/접종수수

C Mean time of onset of clinical signs

D 폐사수수/접종수수

E Mean death time

F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

<표 12. 시험 결과>

- 상기 실험 1, 2를 통해 선발한 2종의 유산균 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus lolli*의 면역보조제로의 가능성을 타진하기 위해 AI 사독 백신에 첨가하는 실험을 디자인함.

※ 실험 3

① 공시재료

- 시험동물 : 4주령 SPF chicken
- 시험물질 : Oil adjuvant - ISA 71 VG, SEPPIC
유산균 - *L.plantarum*, *P.lolli*

② 시험방법

- 유산균 사균화 : Heat-killed at 100°C for 20min
- 백신 제조
 - Water phase (30%, weight 기준)
 - Antigen : A/Chicken/Korea/K040110/2010(H9N2)-10배씩 희석하여 Dose별 시험 구성
 - 유산균 첨가 혹은 비첨가군 구성
 - Oil phase
 - ISA 71 VG (70%, weight 기준)
- Primix社 T.K. Robomix 이용하여 Emulsification

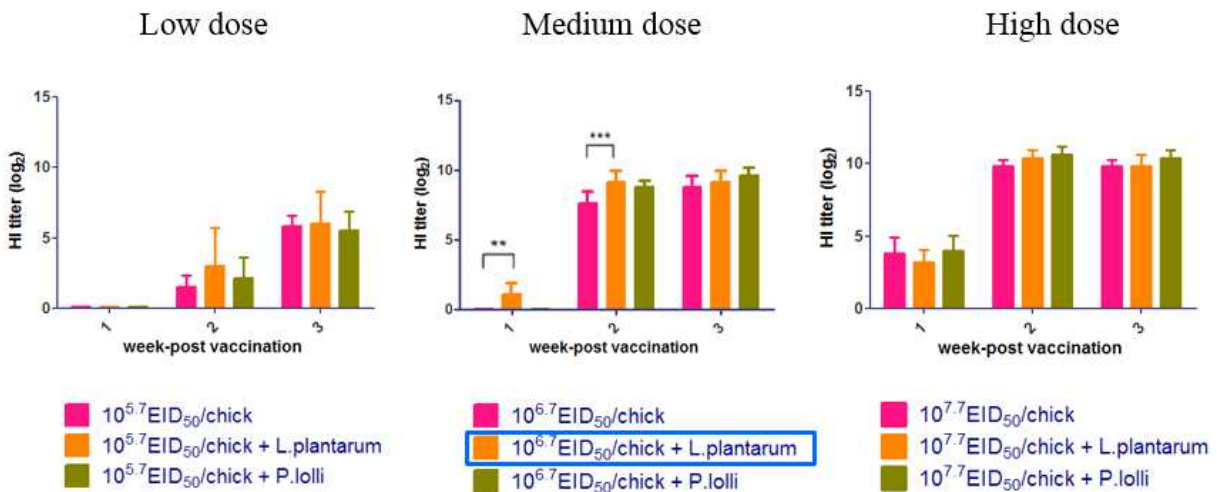
③ 다음과 같이 그룹을 나눈 후 각각 해당 백신을 접종한다.

Group	H9N2 Virus dose	BASE1	BASE2	Chicken no.	
Low	1	$10^{5.7}EID_{50}$	Oil	-	6
	2	$10^{5.7}EID_{50}$	Oil	<i>L.plantarum</i> ($10^{8.3}$ CFU)	6
	3	$10^{5.7}EID_{50}$	Oil	<i>P.lolli</i> ($10^{8.3}$ CFU)	6
Med	4	$10^{6.7}EID_{50}$	Oil	-	6
	5	$10^{6.7}EID_{50}$	Oil	<i>L.plantarum</i> ($10^{8.3}$ CFU)	6
	6	$10^{6.7}EID_{50}$	Oil	<i>P.lolli</i> ($10^{8.3}$ CFU)	6
High	7	$10^{7.7}EID_{50}$	Oil	-	5
	8	$10^{7.7}EID_{50}$	Oil	<i>L.plantarum</i> ($10^{8.3}$ CFU)	5
	9	$10^{7.7}EID_{50}$	Oil	<i>P.lolli</i> ($10^{8.3}$ CFU)	5

<그림 15. 시험군 분류>

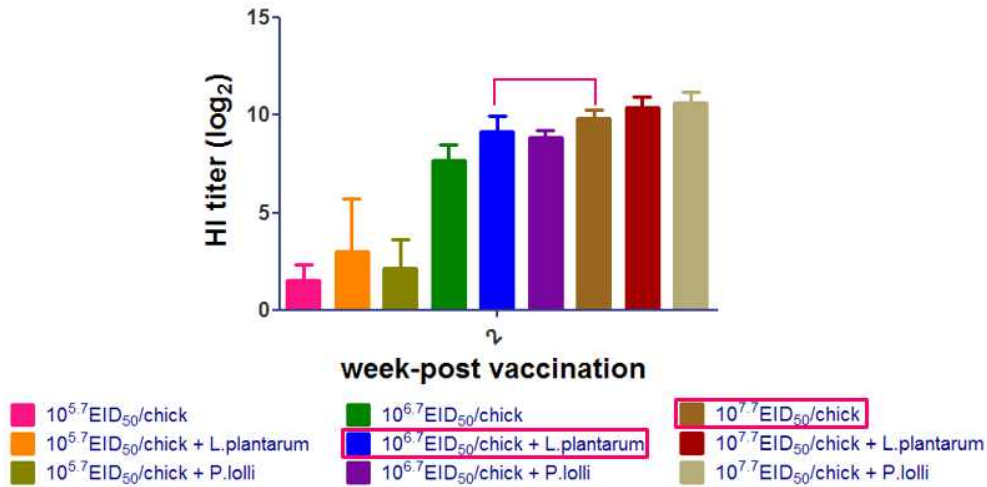
④ 백신 접종 후 매주 채혈 및 혈청분리를 통하여 그룹별 항체 역가를 Hemagglutination Inhibition Test를 통해 측정한다.

⑤ 시험 결과



<그림 16. 항원 Dose별 유산균 첨가 시 항체 형성능 비교>

- 시험 결과, 중간 역가의 항원을 이용하여 제조한 백신 그룹에서 유산균(*L.plantarum*) 첨가 시 유의적인 항체가의 상승을 보임.
- 백신 2주차에는 중간 역가의 항원에 유산균을 첨가한 그룹이 고역가 항원에 유산균 비첨가군과 통계학적으로 유의하지 않은 차이를 보임으로써 유산균(*L.plantarum*)의 Dose-sparing effect를 확인.
- 특히 중간 역가의 항원에 유산균을 첨가한 그룹은 1주령부터 신속한 항체 유도능을 보이는 양상을 확인할 수 있었으며 이는 유산균 면역보조제가 항체가의 신속한 상승이 요구되는 HPAI 긴급백신 등에 활용될 가능성을 시사함.



<그림 17. 백신 후 2주차 유산균 첨가 시 Dose-sparing effect 관찰>

2. 2차년도 연구 수행 내용 및 결과

가. 제 1 세부 연구기관 : (주)카브

○ 시험관내 선발 유산균의 마우스 투여 및 인플루엔자 감염 시험

1) 투여 방식별(비강투여, 경구투여, 텍스트린 혼합 경구투여) 방어 효능 비교 시험

① 유산균 경구투여 및 텍스트린 혼합 경구투여시 인플루엔자 방어 효능 시험

- 동물 준비: SPF BALB/c 6주령 암컷 마우스로 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10⁷CFU/ml 농도로 준비함. 텍스트린 혼합 투여 유산균은 유산균 배양액을 PBS로 2회 워싱 후 10% 텍스트린 용액으로 10⁷CFU/ml 농도로 준비함. 실험에 사용한 유산균은 된장(B.linchenfor- mis, P.acidilatici, E.facium) 및 김치 (L.brevis, L.sakei, L.plantarum)유래 신규 분리 유산균임. 시험관내 시험법에서 우수한 효능을 보인 균주를 위주로 선발하여 준비함.
- 바이러스: Influenza virus type A, A/NWS/33 (H1N1), 마리당 10^{4.5}/90μl/dose로 공격 접종함.
- 실험군과 대조군 모두 한 그룹은 마우스 10마리임. 바이러스 공격접종 후 체중변화를 추적하기 위하여 모든 그룹의 실험 시작 전 평균 체중이 일정하게 구성함.
- 유산균 경구투여 그룹은 공격접종 3주 전부터 공격접종 후 2주까지 유산균을 경구 투여(300ul/마리/day)함.
- 유산균과 텍스트린 혼합 경구투여 그룹도 유산균 단독 경구투여 그룹과 같은 방법으로 투여함.
- 공격 접종 양성대조군 및 음성대조군은 PBS를 실험군과 동일한 방법으로 투여함.

- 바이러스 공격접종 후 3주간 임상증상 발현 및 폐사율 감소 효과를 관찰하여 유산균 투여 방식별 인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가함.

※실험결과

그룹	농도 (c.f.u/ 마리) A	접 종 수 수	체중(g) (m ± SD)		공격접종 결과				PI ₂₁ ^F	
			접종전	접종후	임상증상 Sick ^B	MTO (day) ^C	폐사 Dead ^D	MDT (day) ^E		
G1	B.linchenformis	10 ^{8.0}	10	19.6±0.3	0.0±0.0	10/10	3	10/10	9.3	2.0
G2	P.acidilactici		10	20.3±0.6	18.9±1.5	10/10	3	6/10	8.3	1.6
G3	E.faecium		10	19.8±0.9	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.8	2.0
G4	L.brevis		10	20.3±1.0	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.3	2.0
G5	L.sakei		10	20.4±0.4	11.9±0.0	10/10	3	9/10	9.3	1.4
G6	L.palntarum		10	20.6±0.5	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.1	2.0
G7	B.linchenformis + 텍스트린		10	20.1±0.5	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.6	2.0
G8	P.acidilactici + 텍스트린		10	20.3±1.0	15.2±0.0	10/10	3	9/10	8.6	1.9
G9	E.faecium + 텍스트린		10	20.1±0.9	19.8±0.0	10/10	3	9/10	8.3	1.9
G10	L.brevis + 텍스트린		10	21.0±0.7	0.0±0.0	10/10	3	10/10	7.6	2.0
G11	L.sakei + 텍스트린		10	21.09±0.3	0.0±0.0	10/10	3	10/10	7.4	2.0
G12	L.palntarum + 텍스트린		10	20.8±0.4	0.0±0.0	10/10	3	10/10	7.3	2.0
G13	텍스트린		10	19.7±1.2	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.0	2.0
G14	양성대조군	-	10	19.6±1.1	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.6	2.0
G15	음성대조군	-	10	19.6±0.6	21.0±0.6	0/10	-	0/10	-	-

^A 투여량 : 경구투여그룹(300ul/day)

투여기간 : 공격접종 전 3주 예방 및 공격접종 후 2주 치료

^B 임상증상발현수수/접종수수

^C Mean time of onset of clinical signs

^D 폐사수수/접종수수

^E Mean death time

^F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

<표 13. 시험 결과>

- 텍스트린은 대표적인 prebiotics로 본 실험에서는 경구투여시 유산균의 효능을 향상시킬 목적으로 첨가함. 실험 결과 유산균 단독 실험군과 비교하여 텍스트린을 prebiotics로 첨가하더라도 크게 개선된 방어 효율을 가지지 못 하는 것을 확인함.

② 인플루엔자 방어 효능이 있는 선발 유산균의 비강, 경구, 텍스트린 혼합 투여시 효능시험 결과

- 동물 준비: SPF BALB/c 6주령 암컷 마우스로 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10⁷CFU/ml 농도로 준비함. 텍스트린 혼합 투여 유산균은 유산균 배양액을 PBS로 2회 워싱 후 10% 텍스트린 용액으로 10⁷CFU/ml 농도로 준비함. 실험에 사용한 유산균은 된장(B.linchenformis, P.acidilatici, E.facium) 및 김치(L.brevis, L.sakei, L.plantarum) 유래 신규 분리 유산균임. 실험 1에서 우수한 효능을 보인 균주를 위주로 선발하여 준비함.
- 바이러스: Influenza virus type A, A/NWS/33 (H1N1), 마리당 10^{4.5}/90μl/dose로 공격 접종함.
- 실험군과 대조군 모두 한 그룹은 마우스 10마리임. 바이러스 공격접종 후 체중변화를 추적하기 위하여 모든 그룹의 실험 시작 전 평균 체중이 일정하게 구성함.
- 유산균 비강투여 그룹은 바이러스 공격접종 전 3주 동안 유산균을 8회 비강투여(90ul/마리/day)함.
- 유산균 경구투여 그룹은 공격접종 3주 전부터 공격접종 후 2주까지 유산균을 경구투여(300ul/마리/day)함.
- 유산균과 텍스트린 혼합 경구투여 그룹도 유산균 단독 경구투여 그룹과 같은 방법으로 투여함.
- 바이러스 공격접종 후 3주간 임상증상 발현 및 폐사율 감소 효과를 관찰하여 유산균 투여 방식별 인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가함.

※ 실험결과

그룹	농도 (c.f.u/ 마리) ^A	접 종 수 수	체중(g)		공격접종 결과				PI ^F
			(mean ± SD)		임상증상		폐사		
			접종전	접종후	SickB	MTO (day) ^C	Dead ^D	MDT (day) ^E	
G1	L.brevis (비강투여)	10	17.7±0.6	17.7±2.5	10/10	3	2/10	9.5	1.2
G2	L.sakei (비강투여)	10	17.1±0.8	18.2±2.4	10/10	3	2/10	9.5	1.2
G3	L.brevis (경구투여)	10	18.8±1.1	0.0±0.0	10/10	3	10/10	8.8	2.0
G4	L.sakei (경구투여)	10 ⁸	18.2±1.1	15.7±0.2	10/10	3	8/10	6.8	1.8
G5	L.brevis + 텍스트린 (경구투여)	10	19.5±1.1	14.5±3.0	10/10	3	6/9	9.3	1.7
G6	L.sakei +텍스트린 (경구투여)	10	19.5±0.5	16.7±2.3	10/10	3	4/10	11.3	1.4
G7	양성대조군	PBS	20.0±0.8	19.3±0.0	10/10	3	7/8	8.6	1.9
G8	음성대조군	PBS	18.3±0.8	20.1±1.0	0/10	-	0/10	-	-

- A 투여량 : 비강투여그룹 (90ul/day), 경구투여그룹(300ul/day)
- 투여기간 : 비강투여그룹 (공격접종 전 8회 예방), 경구투여그룹 (공격접종 전 3주 예방 및 공격접종 후 2주 치료)
- B 임상증상발현수수/접종수수
- C Mean time of onset of clinical signs
- D 폐사수수/접종수수
- E Mean death time
- F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

〈표 14. 시험 결과〉

- 경구 투여에서 약간의 방어 효능을 보인 유산균을 대상으로 비강 투여를 실시한 결과 인플루엔자 방어 효능이 훨씬 개선되는 것을 확인함. 이후 마우스를 이용한 유산균 in vivo 선발 시험은 비강 투여 경로로 유산균을 투여하기로 결정함.

2) 마우스에서 선발 유산균 비강 투여를 통한 인플루엔자 방어 효능 시험

- ① 서로 다른 유래에서 분리한 유산균을 투여한 뒤 인플루엔자 방어 효능 시험 결과
 - 동물 준비: SPF BALB/c 6주령 암컷 마우스로 준비함.
 - 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10^7 CFU/ml 농도로 준비함. 시험관내 시험법에서 우수한 효능을 보인 균주를 위주로 선발하여 준비함.
 - 바이러스: Influenza virus type A, A/NWS/33 (H1N1), 마리당 $10^{4.5}/90\mu\text{l}/\text{dose}$ 로 공격 접종함.
 - 실험군과 대조군 모두 한 그룹은 마우스 10마리임. 바이러스 공격접종 후 체중 변화를 추적하기 위하여 모든 그룹의 실험 시작 전 평균 체중이 일정하게 구성함.
 - 유산균 비강 투여 그룹은 바이러스 공격접종 전 3주 동안 유산균을 8회 비강 투여 (90ul/마리/day)함.
 - 공격 접종 양성대조군 및 음성대조군은 PBS를 실험군과 동일한 방법으로 투여함.
 - 바이러스 공격접종 후 3주간 임상 증상 발현 및 폐사율 감소 효과를 관찰하여 유산균별 인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가함.

그룹	농도 (mg/kg) ^A	접종 수	분리 원	체중(g)		공격접종 결과				PI ₂₁ ^F
				(mean ± SD)		임상증상		폐사		
				접종전	접종후	Sick ^B	MTO (day) ^C	Dead ^D	MDT (day) ^E	
G1	L. brevis	10	김치	19.3±0.9	19.1±1.0	10/10	3	4/10	9.3	1.4
G2	L. pentosus or plantarum	10	김치	18.8±1.0	18.7±1.4	10/10	3	3/10	8.0	1.3
G3	P. pentosaceus	9	된장	18.6±0.8	18.8±1.7	9/9	3	2/9	8.0	1.2
G4	B. lincheniformis	10	된장	19.2±1.0	19.8±0.8	10/10	3	4/10	7.8	1.4
G5	L. curvatus	9	김치	18.6±1.0	19.4±1.0	9/9	3	2/9	8.5	1.2
G6	L. reuteri	10	선위	18.7±1.1	19.6±1.3	10/10	3	1/10	9.0	1.1
G7	L. vaginalis	10 ^{8.0}	crop	18.7±0.8	19.6±0.9	9/9	3	2/9	9.0	1.2
G8	L. vaginalis	10	crop	19.1±0.8	19.4±1.1	10/10	3	0/10	-	-
G9	W. cibaria	8	분변	18.8±1.2	19.3±0.9	8/8	3	2/8	11.5	1.3
G10	P. pentosaceus	9	분변	18.5±1.1	18.5±1.4	9/9	3	1/9	8.0	1.1
G11	L. plantarum	8	맹장	19.4±0.9	19.5±0.9	8/8	3	2/8	8.0	1.3
G12	L. vaginalis	10	crop	19.3±0.9	19.5±1.0	10/10	3	6/10	8.5	1.6
G13	L. reuteri	10	선위	18.8±0.9	18.7±1.1	10/10	3	5/10	10.2	1.5
G14	양성대조군	PBS	10	18.7±0.6	0.0±0.0	10/10	3	10/10	7.3	2.0
G15	음성대조군	PBS	10	18.3±0.9	20.0±1.0	0/10	-	0/10	-	-

^A 투여량 : 경구투여그룹(200ul/마리/day)

투여기간 : 경구투여그룹 (공격접종 전 21일 예방 및 공격접종 후 14일 치료)

^B 임상증상발현수수/접종수수

^C Mean time of onset of clinical signs

^D 폐사수수/접종수수

^E Mean death time

^F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

<표 15. 시험 결과>

- 시험관 내 시험에서 우수한 효능을 보인 유산균이어도 실제 동물에서는(마우스 모델) 인플루엔자 방어 효능이 매우 다양한 수준으로 나타나는 것을 관찰함.

② 같은 종 내 다른 strain을 투여하고 인플루엔자 방어 효능 시험 결과

- 동물 준비: SPF BALB/c 6주령 암컷 마우스로 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10⁷CFU/ml 농도로 준비함. 그룹 1~그룹 9에 투여하는 유산균은 모두 김치 유래 유산균이고 그룹 10~그룹 14에 투여하는 유산균은 된장 유래 유산균임.
- 바이러스: Influenza virus type B, A/NWS/33 (H1N1), 마리당 10^{4.5}/90µl/dose로 공격접종함.
- 실험군과 대조군 모두 한 그룹은 마우스 10마리임. 바이러스 공격접종 후 체중변화를 추적하기 위하여 모든 그룹의 실험 시작 전 평균 체중이 일정하게 구성함.
- 유산균 비강투여 그룹은 바이러스 공격접종 전 3주 동안 유산균을 8회 비강투여 (90ul/마리/day)함.

- 공격 접종 양성대조군 및 음성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여함.
- 바이러스 공격접종 후 3주간 임상증상 발현 및 폐사율 감소 효과를 관찰하여 유산균 별 인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가함.

※ 실험결과

그룹	농도 (10^6 CFU/ml) ^A	접종 수/총 수	공격접종 결과			PI ₂₁ ^F		
			임상증상		폐사			
			Sick ^B	MTO (day) ^C	Dead ^D		MDT (day) ^E	
G1	L. plantarum-1	10	10/10	3	6/10	10.0	1.4	
G2	L. plantarum-2	10	10/10	3	9/10***	10.3	1.2	
G3	L. plantarum-3	10	10/10	3	6/10	10.4	1.4	
G4	L. plantarum-4	10	10/10	3	7/10	10	1.4	
G5	L. brevis-1	10	10/10	3	3/10	9.8	1.8	
G6	L. brevis-2	10	10/10	3	1/10	10.5	1.9	
G7	L. brevis-3	10	10/10	3	6/10	10.3	1.4	
G8	L. brevis-4	10 ¹⁰⁰	10	10/10	3	5/10	9.5	1.6
G9	L. brevis-5	10	10/10	3	9/10***	8.0	1.1	
G10	L. brevis-6	10	10/10	3	8/10***	9.0	1.2	
G11	P. acidilactici-1	10	10/10	3	5/10	8.8	1.5	
G12	P. acidilactici-2	10	10/10	3	8/10***	11.0	1.3	
G13	P. pentosaceus-1	10	10/10	3	9/10***	11.0	1.3	
G14	P. pentosaceus-2	10	10/10	3	8/10***	10.0	1.3	
G15	양성대조군	PBS	10	10/10	3	10/10	7.3	2.0
G16	음성대조군	PBS	10	0/10	-	0/10	-	-

A 투여량 : 200ul/마리/day

투여기간 : 공격접종 전 21일 예방 및 공격접종 후 14일 치료

B 임상증상발현수수/접종수수

C Mean time of onset of clinical signs

D 폐사수수/접종수수

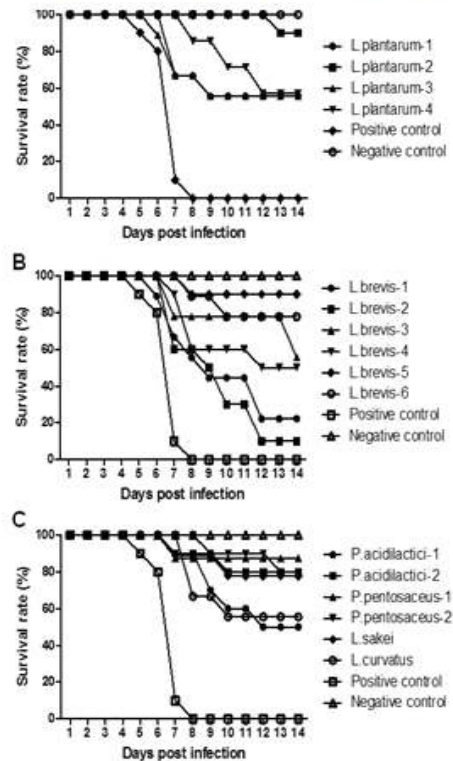
E Mean death time

F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

<그림 18. 시험 결과>

- 서로 다른 분리원에서 분리 동정한 유산균 중 1차년도에 실시한 in vitro 시험에서 우수한 효능을 가진 것으로 확인된 유산균을 모음. 해당 유산균 중 같은 species에 속하는 유산균은 동물에서 같은 수준의 방어 효능을 가지는지 확인하기 위하여 본 시험을 실시함. 실험 결과 strain이 다르면 같은 species라도 생존율 및 MDT 등의 방어 효능이 다르다는 것을 확인함.

[그림. 유산균 투여 후 인플루엔자 공격접종시 체중 변화]



○ 시험관내 선발 유산균의 가금 투여 및 인플루엔자 감염 시험

1) 유산균 비강 투여에 따른 인플루엔자 방어 효율 시험

① 유산균 비강 투여에 따른 인플루엔자 방어 효율 평가 모델 설정 시험

- 동물 준비: 1일령 SPF 닭으로 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10⁹CFU/ml 농도로 준비함. 시험관내 시험법과 소규모 예비 시험에서 우수한 효능을 보인 균주 *L.fermentum*(발효식품 유래)을 준비함.
- 바이러스: A/ Korean native chicken/ Korea/ K040110/ 2010 (nCK/K040110/10; H9N2), 마리당 10^{4.0}EID₅₀/100μl/dose로 공격접종함.
- 유산균 투여 실험군과 바이러스 양성 대조군으로 구성함.
- 유산균 투여 그룹은 3주 동안 매일 1.5X10⁹CFU 농도의 유산균을 비강 투여 (100~250ul/마리/day)함. 병아리가 성장하는 것에 따라 유산균 농도가 같도록 조절하여 투여량을 늘임.
- 공격 접종 양성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여.
- 바이러스 공격 접종 후 2주간 임상증상 발현 및 폐사율을 관찰함. 공격 접종 후 11일까지 매 홀수일마다 인후두강 및 총배설강 스왑으로 바이러스가 재분리되는지 확인함. 또한 모든 개체에서 채혈하여 실제 감염이 일어났는지 sero-conversion을 확인함.

※ 실험결과

	수 수	혈청	폐사율	일자별 qPCR 결과					
				1dpc	3dpc	5dpc	7dpc	9dpc	11dpc
유산균 투여군									
인후두강	10	10/10	0/10	24.66±1.69 ^A	22.40±2.67	22.34±1.57	26.61±2.09	30.69±1.60	32.12±1.76
총배설강				37.42±0.76	28.33±7.50	22.90±7.40	25.92±7.01	32.44±2.88	34.25±1.55
대조군									
인후두강	10	10/10	0/10	25.68±3.77	23.92±3.68	23.65±2.46	25.88±2.29	30.57±2.49	31.07±0.71
총배설강				36.30±1.71	30.63±2.98	24.86±6.97	24.87±5.28	33.48±1.68	34.40±1.53

^A Average and standard deviation of individual qPCR ct value in the group

<표 16. 시험 결과>

- 마우스에서는 유산균을 비강으로 투여할 경우, 직접 공격접종 동물에서도 바이러스 방어 효율이 뛰어났는데, 닭에서는 그렇지 못 한 것을 확인함. 유산균을 투여하더라도 직접 바이러스에 감염된 동물의 바이러스 배출량이 대조군과 비교하여 크게 줄어들지 않는 점을 감안하여 이후 실험에서는 직접 감염 동물의 분비물을 통하여 감염되는 간접 감염 동물에 유산균 투여를 통한 바이러스 감염 방어 효율을 확인하기로 함.

② 유산균 비강 투여에 따른 인플루엔자 방어 효율 시험

- 동물 준비: 3주령 SPF 닭으로 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을

PBS로 2회 세척하고 10^9 CFU/ml 농도로 준비함. 시험관내 시험법과 소규모 예비 시험에서 우수한 효능을 보인 균주 L.fermentum(발효식품 유래)을 준비함.

- 바이러스: A/ Korean native chicken/ Korea/ K040110/ 2010 (nCK/K040110/10; H9N2), 마리당 $10^{6.0}$ EID₅₀/100µl/dose로 공격접종함.
- 유산균 투여 실험군과 바이러스 양성 대조군으로 구성함. 각 그룹은 직접 바이러스를 투여하는 10마리, 접촉전과 10마리, 공기전과 10마리씩 총 30마리로 구성함.
- 유산균 투여 그룹은 총 3주간(바이러스 공격접종 전 1주와 공격접종 후 2주)동안 매일 1.5×10^9 CFU농도의 유산균을 비강투여(500ul/마리/day)함.
- 공격 접종 양성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여.
- 바이러스 공격접종 후 2주간 임상증상 발현 및 폐사율을 관찰함. 공격접종 후 11일까지 매 홀수일마다 인후두강 및 총배설강 스왑으로 바이러스가 재분리되는지 확인함. 또한 모든 개체에서 채혈하여 실제 감염이 일어났는지 항체가 반응을 확인함.

※ 실험결과

	수 수	혈 청	폐 사 율	바이러스 재분리							
				3dpc		5dpc		7dpc		9dpc	
				OP	CL	OP	CL	OP	CL	OP	CL
유산균 투여군											
공격	10	10	7	10/10	4/10	9/10	7/10	7/10	8/10	8/10	6/10
접종		/10	/10	(4.2±0.2 ^A)	(2.3±0.9)	(4.0±0.5)	(4.0±1.0)	(2.2±0.5)	(2.7±1.0)	(2.1±0.5)	(1.6±0.7)
접촉	10	10	6	9/10	2/10	10/10	6/10	10/10	9/10	10/10	9/10
전과		/10	/10	(4.9±0.7)	(1.2±0.8)	(5.9±0.2)	(2.4±0.8)	(5.8±0.2)	(4.9±0.8)	(4.0±0.3)	(5.1±0.7)
공기	10	5	0	0/10	0/10	5/10	0/10	3/10	0/10	3/10	0/10
전과		/10	/10			(1.6±0.6)		(0.9±0.5)		(1.1±0.6)	
대조군											
공격	10	10	7	8/10	7/10	6/10	7/10	10/10	10/10	8/10	9/10
접종		/10	/10	(3.4±0.6)	(2.3±0.6)	(2.3±0.7)	(2.5±0.7)	(3.5±0.2)	(4.3±0.5)	(2.9±0.5)	(3.4±0.6)
접촉	10	10	7	9/10	3/10	10/10	4/10	9/10	5/10	10/10	9/10
전과		/10	/10	(4.0±0.6)	(0.9±0.4)	(5.9±0.2)	(1.7±0.8)	(5.7±0.6)	(2.5±0.9)	(5.6±0.3)	(6.2±0.8)
공기	10	8	3	0/10	0/10	3/10	2/10	5/10	8/10	5/10	0/10
전과		/10	/10			(1.1±0.6)	(0.6±0.4)	(1.5±0.5)	(4.3±0.9)	(2.6±0.9)	

^A Average and standard deviation of individual viral titer(log EID₅₀/mL) in the group

<표 17. 시험 결과>

- 먼저 진행한 마우스 실험에서 경구 투여보다 비강 투여일 때 인플루엔자 방어 효능이 뛰어난 것을 관찰할 수 있어서, 닭에서도 비강으로 유산균을 투여한 뒤 조류인플루엔자 방어 효능을 관찰함. 계사 내 환경을 모사하여 직접 바이러스에 감염되어 주변 동물로 바이러스를 전파할 수 있는 동물, 직접 감염된 동물로부터 배출되는 분변이나 호흡기 삼출물에 접촉하여 간접적으로 질병에 감염될 수 있는 동물, 앞의 두 가지 동물유형에서 기침 등으로 분비하는 공기 중 바이러스로 감염되는 동물로 동물 실험 모델을 구성함.
- 닭에서 비강으로 유산균을 투여할 경우 대조군에 비하여 인플루엔자에 저항하는 능력이 뛰어난 것으로 확인됨. 특히 유산균 투여시 인플루엔자에 걸린 동물로부터 기침, 분변 등으로 분비되는 바이러스로 인해 2차적으로 감염되는 것을 막는데 매우 효과적인 것으로 확인됨.

2) 유산균 경구 투여에 따른 인플루엔자 방어 시험

- 마우스를 이용한 동물시험에서 유산균을 경구로 투여할 경우 비강으로 투여하는 것보다 인플루엔자 방어 효율이 낮은 것을 확인함. 그러나 유산균 비강 투여 제제는 산업화하여 가금 산업에서 보여지는 대규모 동물군에 투여하기 어려운 형태임.
- 따라서 경구로 투여하되 비강 투여와 유사한 수준의 방어 효율을 가지는 제품의 개발이 필요함. 이에 시험관내 시험에서 우수한 효능을 보이고 개별로 마우스에 투여했을 때 인플루엔자 방어 효능이 있는 유산균을 모아서 합제로 구성하여 음수로 투여하는 방식을 고안함.

① 합제 유산균 경구 투여에 따른 인플루엔자 방어 시험

- 동물 준비: 1일령 SPF 닭으로 준비함.
- 유산균 준비: 시험관내 시험법과 마우스 시험, 닭 소규모 예비시험에서 우수한 효능을 보인 균주 *L.brevis*, *L.sakei*, *P.acidilatici*, *B.lichenformis*(모두 발효식품 유래)를 MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양함. 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 동량으로 혼합하여 총균수가 4×10^7 CFU/ml 농도가 되도록 준비함.
- 바이러스: A/ Korean native chicken/ Korea/ K040110/ 2010 (nCK/K040110/10; H9N2), 마리당 $10^{6.0}$ EID₅₀/100 μl/dose로 공격접종함.
- 유산균 투여 실험군과 유산균 투여 대조군, 바이러스 양성 대조군으로 구성함. 각 그룹은 직접 바이러스를 공격접종하는 개체 5마리, 접촉전과 10마리, 공기전과 10마리씩 총 30마리로 구성함.
- 유산균 투여 그룹은 총 3주간(바이러스 공격접종 전 3주)동안 매일 4×10^7 CFU농도의 유산균을 경구투여(100~250ul/마리/day)함.
- 유산균 투여 대조군과 공격 접종 양성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여함.
- 바이러스 공격접종 후 2주간 임상증상 발현 및 폐사율을 관찰함. 공격접종 후 11일까지 매 홀수일마다 인후두강 및 총배설강 스왑으로 바이러스 채딩을 확인함. 또한 모든 개체에서 채혈하여 실제 감염이 일어났는지 sero-conversion을 확인함.

※ 실험결과

	경로	수수	혈청	폐사율	일자별 qPCR 결과					
					1dpc	3dpc	5dpc	7dpc	9dpc	11dpc
유산균 투여군										
공격접종	OP ^A	5	5/5	0/5	30.09±0.99 ^c (5/5)	28.75±1.63(5/5)	27.08±1.67(5/5)	31.47±1.89(5/5)	34.99±0.52(5/5)	33.70±1.76(5/5)
	CL ^B				- (0/5)	34.58±6.08(3/5)	23.99±2.67(5/5)	26.20±2.60(5/5)	35.12±1.83(5/5)	31.96±4.42(5/5)
직접접촉	OP	10	10/10	0/10	- (0/10)	30.81±3.30(10/10)	27.40±1.93(10/10)	26.41±1.31(10/10)	31.00±2.94(10/10)	35.49±0.70(7/10)
	CL				- (0/10)	37.08(1/10)	32.19±4.53(9/10)	22.30±1.86(9/10)	30.68±4.53(10/10)	31.98±3.93(10/10)
공기전파	OP	10	10/10	0/10	- (0/10)	37.38±0.77(2/10)	36.73±1.36(2/10)	- (0/10)	30.60±4.43(10/10)	29.68±2.50(10/10)
	CL				- (0/10)	- (0/10)	- (0/10)	29.81±8.79(2/10)	31.26±5.81(7/10)	28.34±5.00(4/10)
대조 유산균 투여군										
공격접종	OP	5	5/5	0/5	29.39±1.39(5/5)	25.95±1.52(5/5)	25.88±7.43(5/5)	31.58±3.98(5/5)	34.20±2.09(5/5)	33.28±1.01(5/5)
	CL				- (0/5)	27.61±0.65(5/5)	26.19±3.33(5/5)	28.20±3.42(5/5)	32.04±0.86(4/5)	33.15±3.15(4/5)
직접접촉	OP	10	10/10	0/10	- (0/10)	33.29±5.11(3/10)	27.11±2.24(9/10)	27.54±2.28(10/10)	31.83±1.82(10/10)	32.49±3.27(10/10)
	CL				- (0/10)	- (0/10)	32.30±5.18(9/10)	24.98±5.64(10/10)	28.17±3.69(10/10)	27.71±3.78(9/10)
공기전파	OP	10	10/10	0/10	- (0/10)	- (0/10)	35.28±2.63(3/10)	37.14±1.36(2/10)	30.1±4.85(10/10)	29.26±2.10(10/10)
	CL				- (0/10)	- (0/10)	- (0/10)	31.17±4.12(4/10)	33.09±5.03(9/10)	27.10±4.17(10/10)
바이러스 양성 대조군										
공격접종	OP	5	5/5	1/5	29.15±1.24(5/5)	23.02±1.72(5/5)	26.53±1.58(5/5)	33.41±1.76(4/5)	34.39±0.65(4/5)	32.78±0.68(4/4)
	CL				- (0/5)	32.80±6.49(4/5)	30.64±7.58(4/5)	27.46±0.93(4/5)	31.89±3.22(5/5)	32.08±3.42(4/4)
직접접촉	OP	10	10/10	0/10	- (0/10)	33.13±5.94(3/10)	30.16±4.83(10/10)	26.82±1.29(10/10)	30.73±1.30(10/10)	29.17±2.37(10/10)
	CL				- (0/10)	39.66(1/10)	30.48±7.37(2/10)	28.12±6.31(10/10)	27.71±5.08(10/10)	24.66±4.20(10/10)
공기전파	OP	10	10/10	0/10	- (0/10)	- (0/10)	37.39±1.99(5/10)	32.68±3.54(3/10)	25.66±1.48(10/10)	30.08±1.43(10/10)
	CL				- (0/10)	- (0/10)	- (0/10)	34.84±1.48(4/10)	24.52±7.22(10/10)	25.65±2.82(10/10)

^A oropharyngeal swab

^B cloacal swab

^C Average and standard deviation of individual qPCR ct value in the group

<표 18. 시험 결과>

- 닭에서 유산균을 비강 투여했을 때 인플루엔자 방어 효능을 관찰할 수 있었던 바이러스 간접 접촉과 공기 전파로 감염되는 동물을 포함하도록 실험군을 설계하여 유산균을 경구 투여한 결과, 유산균 투여군과 미투여군 사이에 바이러스 배출량에서 유의미한 차이를 발견하지 못 함.

나. 제 2 협동 연구기관 : 대성미생물연구소

○ 오일 이멀전 제조 검증시험

- 유중수 이멀전의 경우, 이멀전의 안정성을 평가하기 위한 다양한 정량적/정성적 시험법이 확립되어 있음.
- Drop test는 이멀전 제조 후 가장 간단히 수행해볼 수 있는 안정성 시험법 중 하나임.
- Slide glass에 D.W를 점적한 후, 그 위에 동량의 Emulsion을 점적하게 되면 Oil phase가 바깥에 존재하는 Water-in-Oil Emulsion의 특성 상 물과 이멀전이 섞이지 않고 분리되는 것을 확인할 수 있음.
- 이후 pipet tip 등을 활용해 점적 부위를 섞어줬을 때, 안정한 이멀전의 경우 분리가 유지되나 불안정한 이멀전의 경우 두 층이 섞이면서 Slide glass 상에 붙어나는 현상이 발생.
- 본 연구진은 1차년도 연구개발 결과 선발된 국내산 Mineral Oil (서진화학, KF-40)을 이용하여 다양한 조건의 Surfactant와 섞어 총 18종의 Oil adjuvant를 제조하여 최적의 조합을 찾고자 하였음.

Group	HLB	Span80 (%)	Tween80 (%)	Total Sufactant (%)
1	5.049 (Span:Tween = 93:7)	3	0.226	3.226
		4	0.301	4.301
		5	0.376	5.376
		6	0.452	6.452
		7	0.527	7.527
		8	0.602	8.602
2	5.263 (Span:Tween = 91:9)	3	0.297	3.297
		4	0.396	4.396
		5	0.495	5.495
		6	0.593	6.593
		7	0.692	7.692
		8	0.791	8.791
3	5.477 (Span:Tween = 89:11)	3	0.371	3.371
		4	0.494	4.494
		5	0.618	5.618
		6	0.742	6.742
		7	0.865	7.865
		8	0.989	8.989

[그림 19. 이멀전 안정성 시험을 위해 제조한 오일 어쥬번트 시험군]

※ Oil adjuvant 제조방법

- ① 매스실린더를 이용하여 Mineral Oil을 먼저 500ml Beaker에 투입.
- ② Span80 설정량을 투입. (Surfactant의 경우, 점도가 높아 정확한 Volume을 투입하기 어렵기 때문에, Weight로 환산하여 투입한다.)
- ③ 교반기를 이용하여 1500rpm에 20분간 교반.
- ④ Tween80 설정량을 투입.
- ⑤ 교반기를 이용하여 1500rpm에 20분간 교반.

- 그림 19와 같이 제조한 18종의 Adjuvant와 항원을 혼합하여 Oil emulsion vaccine을 제조함.

※ Oil vaccine 제조방법

- ① 70% Oil phase(Adjuvant) 투입 후 1400rpm에서 1분간 교반
- ② 30% Water phase(Antigen : Allantoic fluid containing inactivated H9N2 virus) 투입 후 8000rpm에서 5분간 교반 - 이 때, beaker 주변으로 열이 발생하기 때문에 Ice에 위치시킨 후 교반
- ③ 5분 휴식
- ④ 다시 8000rpm에서 5분간 교반

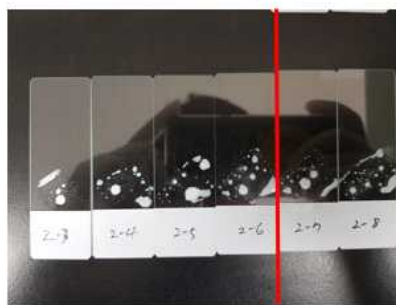
- 제조한 백신은 각각 G 1-3~8, G 2-3~8, G 3-3~8로 라벨링함.

- Drop test를 실시.

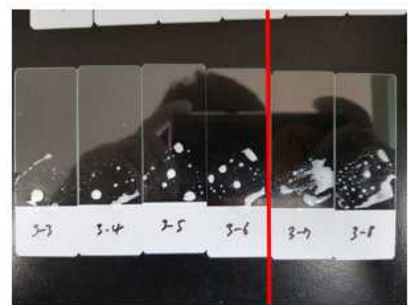
G1 - HLB : 5.049



G2 - HLB : 5.263



G3 - HLB : 5.477



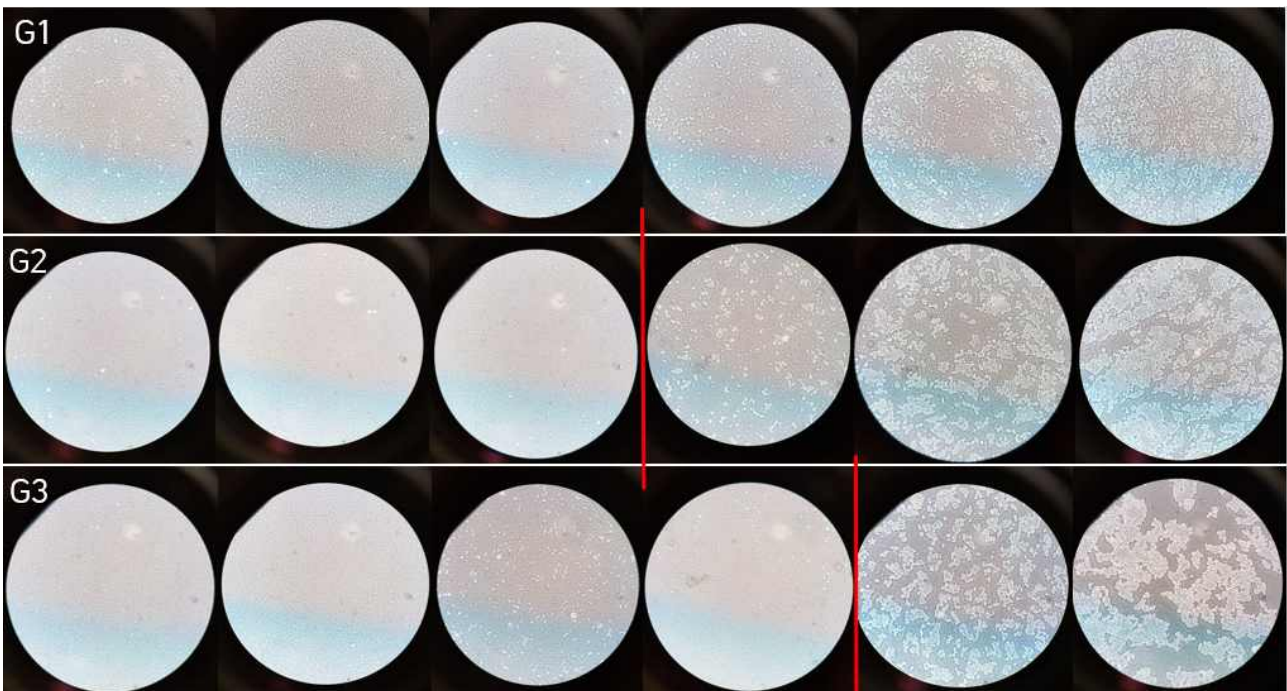
[그림20. Dropt test 결과]

- 시험 결과, Surfactant의 비율이 7% 이상이 되는 조건에서는 Drop test 상 Glass 위에서 Emulsion이 퍼지는 성상이 관찰됨.
- 본 시험 결과를 바탕으로, KF-40을 활용한 사독 오일 백신 제조시 최적 Surfactant의 비율은 7% 이하가 될 것으로 판단.

○ 오일 이멀전 입자 크기 및 분포 비교 시험

1) Microscopic Observation test

- 표2의 Adjuvant를 이용하여 제조한 사독 오일 백신을 Slide glass에 점적한 후, Cover glass를 덮어서 광학현미경(x400)으로 관찰함.
- G1(HLB=5.049)의 경우, Surfactant의 비율에 관계없이 이멀전 입자 크기가 불균일한 것을 확인할 수 있었음.
- G2, G3의 경우, Span80의 비율이 5~6% 이하일 때 비교적 균질한 이멀전 입자 크기 분포를 확인할 수 있었음.
- 본 시험 결과를 바탕으로, KF-40을 활용한 사독 오일 백신 제조시 최적 HLB는 5.263 혹은 5.477로 판단함.



[그림21. 현미경 관찰 결과]

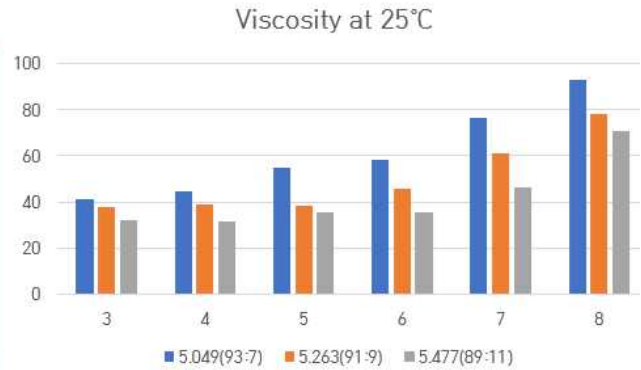
2) Viscosity test

- 역시 상기 18개 사독 오일 백신을 대상으로 Brookfield사의 DV2T Viscometer를 이용하여 각 백신의 점도를 측정함.

※ 측정 조건

- ① Temperature : 25℃
- ② Spindle : LV-2 (62) - Range 50~100K mPa*s
- ③ Volume : 250ml Beaker에 200ml씩 분주 후 측정
- ④ 측정 interval : 15초마다 1회씩 3회 측정, 평균값을 해당 Vaccine의 viscosity로 결정

Viscosity at 25°C		HLB		
		5.049(93:7)	5.263(91:9)	5.477(89:11)
Span80(%)	3	41.1	37.9	31.95
	4	44.5	39.2	31.8
	5	54.6	38.45	35.35
	6	58.2	45.6	35.4
	7	76.35	61.4	46.2
	8	92.75	78.3	70.6



[그림22. Viscosity test 결과]

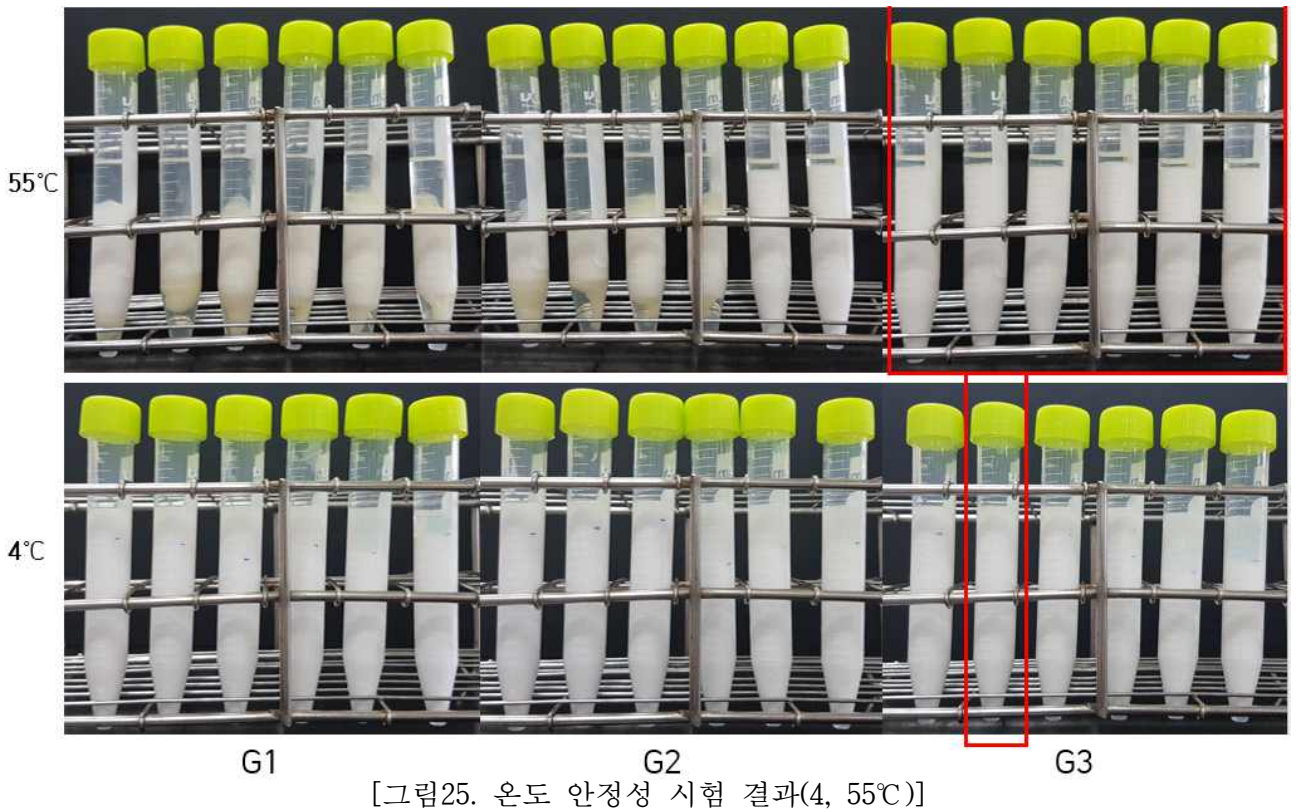
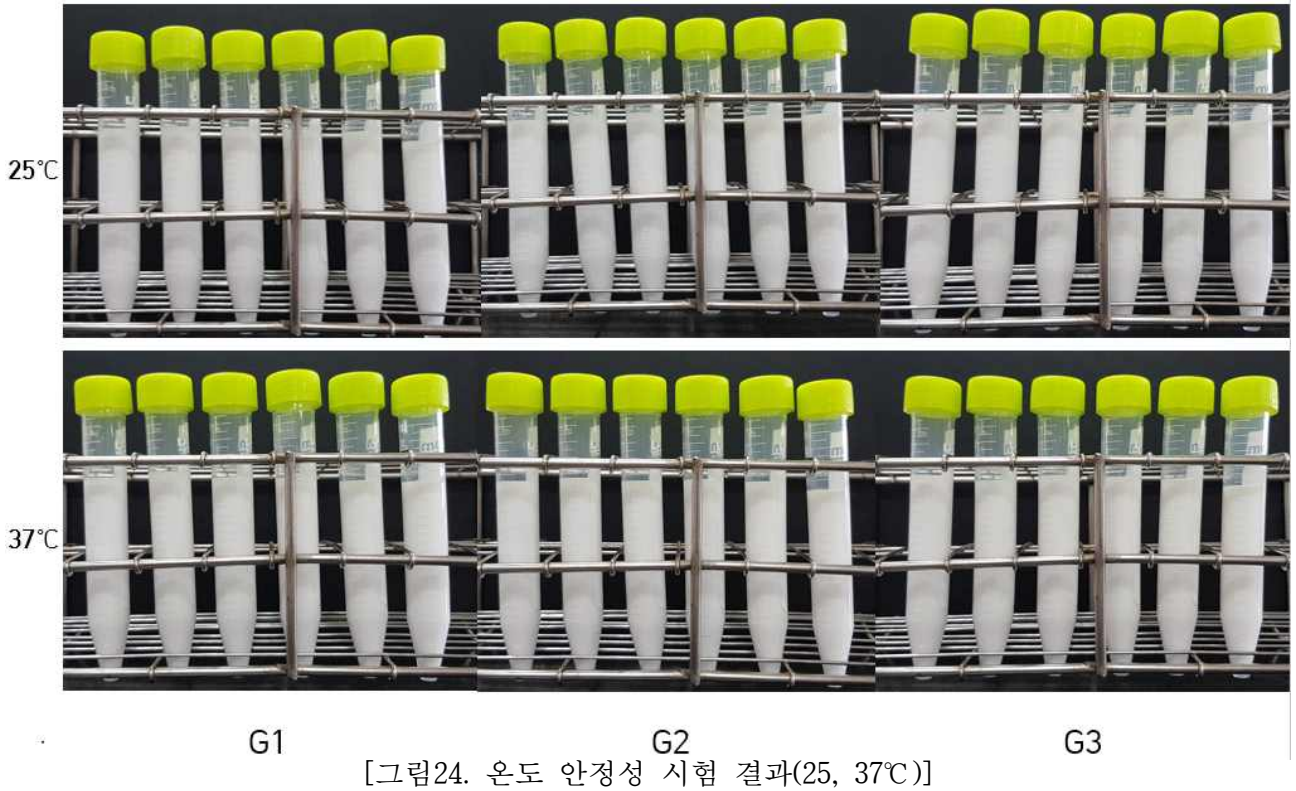
- 측정 결과, 1) Adjuvant의 HLB가 높아질수록 Vaccine의 Viscosity는 감소하는 것을 확인함. 2) 동일한 HLB 상에서는 Surfactant의 비율이 높아질수록 Emulsion의 Viscosity가 증가함.
- 양계 백신의 경우, 대량 접종 시 연속주사기를 사용하는 과정에서 일반적으로 낮은 점도가 선호됨.(50mPa.s 이하)
- 점도 측정 결과, G3(HLB=5.477)이 타 그룹에 비해 낮은 점도를 보였음.

○ 안정성 시험

- 제조한 18종의 사독 오일 백신을 각각 15ml Cornical tube에 10ml씩 소분한 뒤, 다양한 온도별 조건하에서 보관함. (4, 25, 37, 55°C)
- 보관 1달 후, 발생하는 결함을 기록하여 판단함. 판단 기준은 아래와 같음.

Name of defaults	Non critical defaults			Critical defaults		
Release External phase = Oil release	0% → 30%	2% Oil release Emulsion	30%	30% → 100%	50% Oil release Emulsion	100%
Dephasing = Creaming or Sedimentation	0% → 30%	60% Creaming 40% Sedimentation	30%	Critical defaults		
Release Internal phase = Water release	0 → drops	Emulsion Drops	drops	Very small breakage	small breakage	breakage + %

[그림23. 온도 안정성 시험 기준]

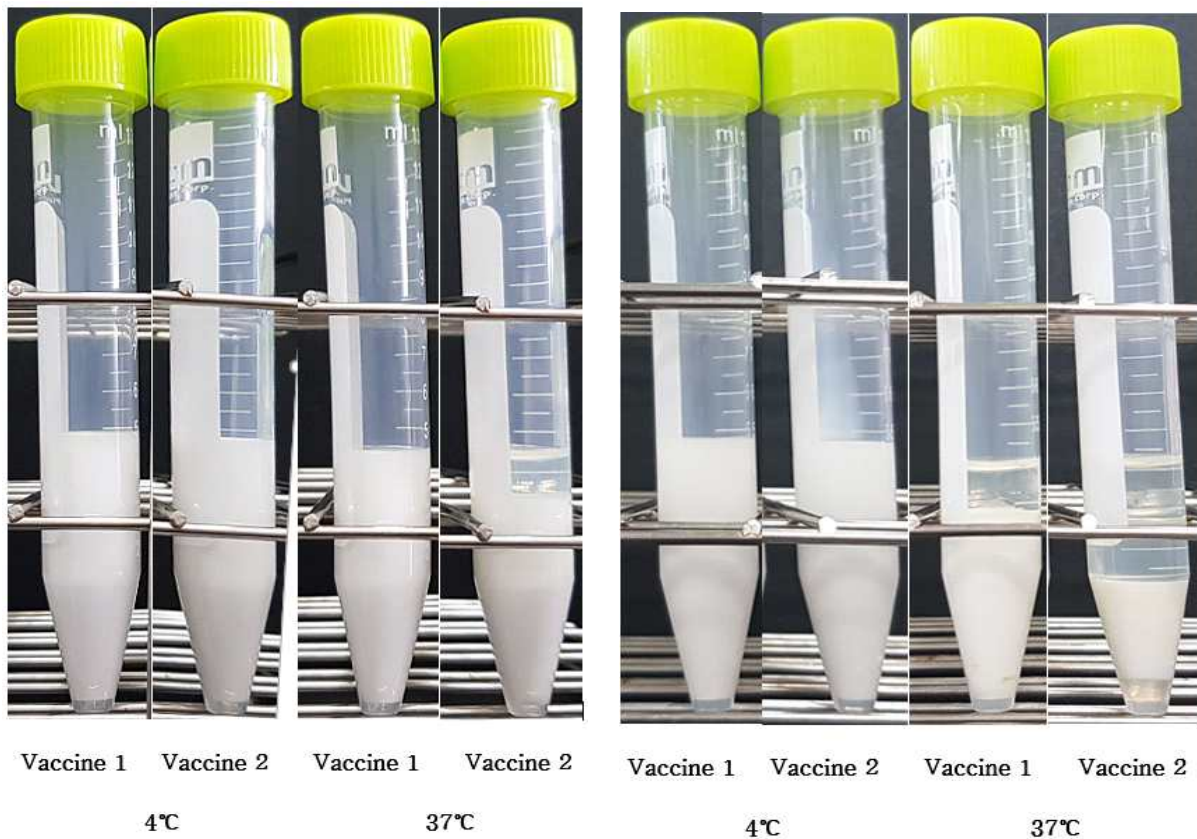


- 실험 결과, 25도와 37도 보관 시에는 보관 1달 후까지 별다른 결함이 발생하지 않았음.

- 반면, 55°C 보관 시 층의 분리 정도가 확연히 차이가 났으며, G3 (HLB-5.477)가 높은 온도에서도 비교적 안정한 것으로 확인되었음.
- 4°C 보관의 경우, 55°C 보관에서의 결합(Oil release)와는 다르게 Sedimentation 현상이 확인되었으며, 이 때, Cornical tube를 기울여 흰색 분리선을 확인함으로써 상대적 안정성의 차이를 확인하였음.
- 4°C 보관 조건하에서 가장 안정한 Emulsion은 G3-4인 것으로 확인되었음.
- 이상의 다양한 이멀전 안정성 시험 결과, 국산 Mineral Oil(KF-40)을 활용한 오일 어쥬번트 제조 시 최적의 HLB는 5.477, Oil과 Surfactant, Antigen의 비율은 KF-40 = 65.506%, Span80 =4%, Tween80 = 0.494%, Antigen = 30% 로 선정하였음.

○ 장기 보관 안정성 시험

- 개발한 KF-40 어쥬번트를 이용하여 제조한 사독 오일 백신의 온도별 장기 보관 조건에 따른 안정성을 확인하기 위해 다음 시험을 실시함.
- 시험항원(Reverse genetics-derived H5N9 virus, rgH5N9)과 시험어쥬번트(KF-40 및 ISA70VG)를 3:7(v/v) 비율로 유화한 사독 오일 백신을 제조함.
- 백신 제조 후 소분하여 각각 4°C 냉장고, 37°C 인큐베이터에 보관함.
- 제조 1개월 및 5개월 후, 보관 중인 백신을 관찰하여 층분리 양상 및 정도를 관찰함.



[그림 26. 장기 보관 안정성 시험 결과 (좌측 : 제조 1달 후, 우측 : 제조 5달 후)]

- 제조 1달 후, ISA70VG를 이용하여 제조한 Vaccine 2는 37°C 보관 조건 하에서 층분리가 일어나는 것이 확인되었음.
- 제조 5달 후, ISA70VG를 이용하여 제조한 Vaccine 2는 37°C 보관 조건 하에서 층분리 정도가 제조 1달 후에 비해 증가하였으며, KF-40을 이용하여 제조한 Vaccine 1 역시 층분리가 나타났으나 그 정도는 Vaccine 2에 비해 감소된 양상을 보임.
- 시험 결과, KF-40을 이용하여 제조한 사독 오일 백신이 ISA70VG를 이용하여 제조한 사독 오일 백신에 비해 높은 안정성(층분리 정도 비교)을 보임을 확인함.
- 향후 지속적인 관찰을 통해 제조 후 1년 이상의 장기 안정성 및 효능 데이터를 확보해나갈 계획임.

○ 안전성 시험

- 상기 시험을 통해 확립된 비율을 이용하여 Newcastle disease virus 사독 오일 백신을 제조하였고, 3주령 닭을 이용하여 안전성 시험을 수행하였음.

① 공시재료

- 시험동물: 3주령 SPF 닭 20수
- 시험백신: KF-40 이용 뉴캐슬병 바이러스 (K148/08) 불활화 오일 백신 1종
ISA 70 VG이용 뉴캐슬병 바이러스 (K148/08) 불활화 오일 백신 1종
- 백신접종 경로: 근육접종
- 백신접종 농도 : $10^{9.0}$ EID₅₀/수

② 시험 내용

- 3주령 SPF 닭 20수를 표 1 과 같이 구분하여 격리사육한다.

구분	시험구분	공시수수	적용백신	백신 수분	백신방법	백신농도
Group 1	효능	10	불활화백신 KF-40	1수분	근육	$10^{9.0}$ /수
Group 2	효능	10	불활화백신 ISA 70 VG	1수분	근육	$10^{9.0}$ /수

<표19. 시험군의 구분>

- 시험 백신의 안전성을 확인하기 위하여 3주령의 SPF 닭에 표1과 같이 시험백신을 수당 0.5ml 근육접종한다.
- 다국적 회사 제품인 SEPPIC사의 ISA 70 VG를 대조 어쥬번트로 사용하여 안전성을 평가한다.
- 시험군 및 대조군은 백신 후 6주간 폐사를 포함한 임상증상 및 체중을 관찰한다.
- 시험 백신 접종 후 6주차에는 시험군 및 대조군 전수를 안락사하여 접종 부위 근육 조직을 채취한 뒤 중성포르말린에 고정을 실시한다. 이후 건국대학교 수의과대학 병리학 실험실에 의뢰하여 접종 부위의 조직병리학적 평가를 진행한다.

③ 시험 결과

- 3주령 SPF 닭에 대한 KF-40 이용 뉴캐슬병 바이러스 불활화 백신 안전성 평가 시험

구분	공시 수수	적용 백신	평균 체중 (Mean±S.D)					임상증상 ^A	
			백신 전	백신 후 1주	백신 후 2주	백신 후 3주	백신 후 4주		백신 후 5주
Group 1	10	불활화백신 KF-40	197 ±18.3	277 ±40.1	403 ±59.2	490 ±78.7	611 ±97.3	738 ±120	0/10
Group 2	10	불활화백신 ISA 70 VG	185 ±23.2	296 ±29.2	411 ±41.2	524 ±51	635 ±70.6	761 ±93.1	0/10

^A 백신 실시 후 5주 동안 임상증상 발현 수수/ 총 시험 수수

<표20. 3주령 SPF 닭에서 시험백신 접종 후 체중 측정 결과>

구분	공시 수수	적용 백신	조직병리학적 검사 ^A
			(MeanS.D) 백신 후 6주
Group 1	10	불활화백신 KF-40	1.5±0.83
Group 2	10	불활화백신 ISA 70 VG	1.16±0.4

^A 시험백신 접종 6주 뒤 채취한 근육의 조직학적 병변 지수 (1: mild한 국소적 침윤 2: 비교적 multi-focal한 염증세포 침윤 3: mild granulomatous inflammation 4: moderate granulomatous inflammation 5: Intense Granulomatous inflammation)

<표21. 3주령 SPF 닭에서 시험백신 접종 6주 후 접종 부위 조직 안전성 확인 결과>

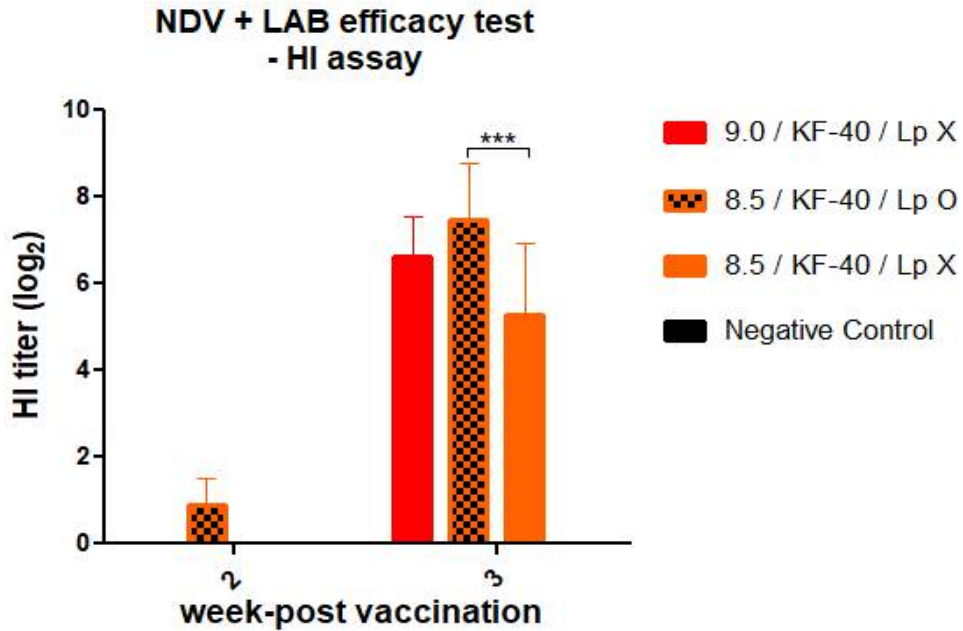
- 시험결과, 백신 접종 6주 후 KF-40 어쥬번트로 제조된 사독백신과 시중에 판매되고 있는 ISA 70 VG 어쥬번트로 제조된 사독백신은 거의 동등한 수준의 조직 안전성을 나타내었으며, 5주간의 체중 측정 결과에서도 두 사독백신간 유의성이 없을 정도의 근소한 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있었음.

○ 1차년도 선발 유산균의 오일백신의 안전성, 안정성 시험(위탁시험)

- Newcastle disease virus 사독 오일 백신에 1차년도 연구개발결과 선발된 유산균 면역보조제를 첨가한 백신을 제조하였고, 6주령 닭을 이용하여 안전성 시험을 수행하였음.

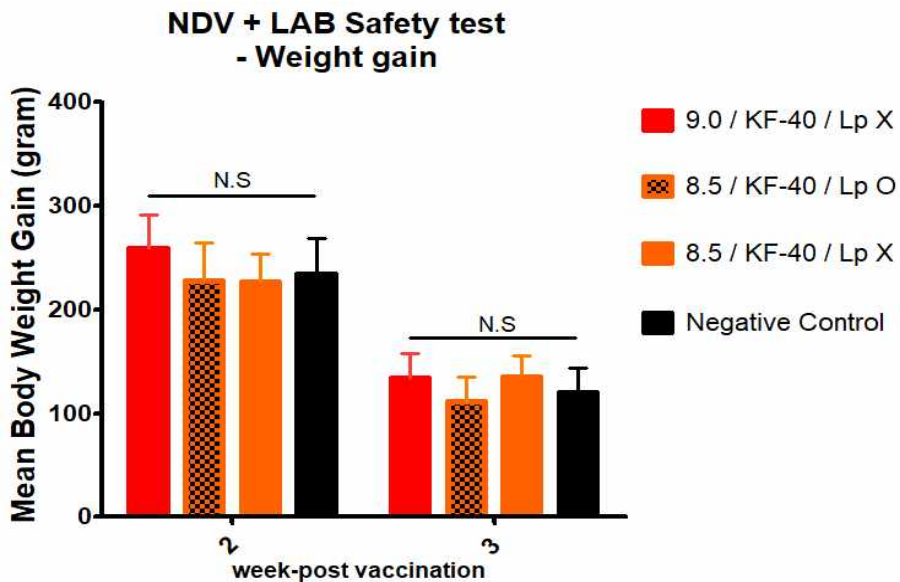
	균주명	계대수	백신 1 dose
Antigen	K148/08	CE7	10 ^{^9.0} EID50 / 0.5ml
LAB	<i>L.plantarum</i>	P4	10 ^{^7.5} CFU / 0.5ml
Group	Oil	<i>Lp</i>	Dose
1	KF-40	X	10 ^{^9.0} EID50 / 0.5ml
2	KF-40	O	10 ^{^8.5} EID50 / 0.5ml
3	KF-40	X	
4	Control	X	—

<그림 26. 유산균 면역보조제의 안전성 시험 개요>

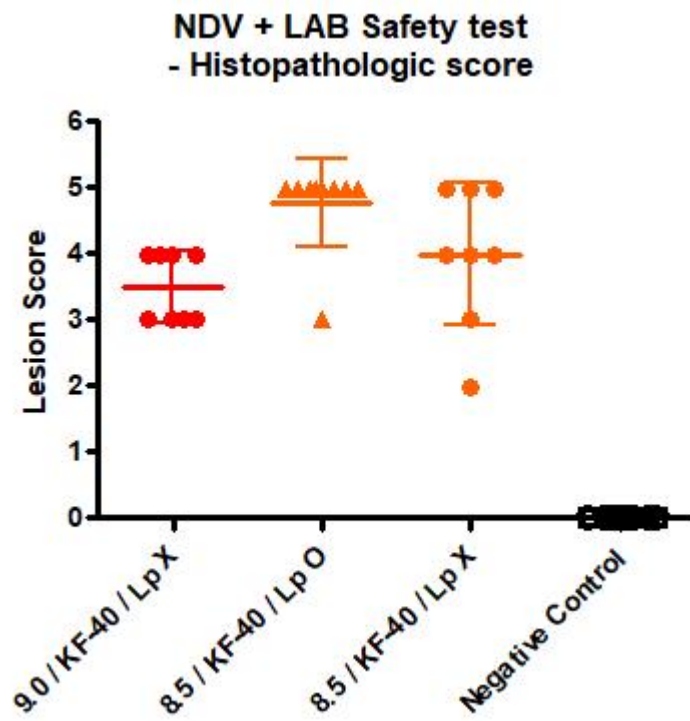


<그림27. 유산균 면역보조제의 효능 시험 결과>

- 효능 평가 결과, 유산균을 첨가한 그룹이 비첨가 그룹에 비해 2주차부터 항체가의 빠른 반전이 확인되었으며, 3주차 결과에서도 비첨가 그룹에 비해 유의적으로 높은 항체가가 확인되었음. 또한 유산균 첨가 그룹은 수당 $10^{0.5}$ EID₅₀ 높은 고역가 백신에 비해서도 높은 항체가를 보여서 Dose-sparing effect도 있음을 확인하였음.
- 안전성 시험 결과, 유산균 면역보조제 첨가 그룹은 비첨가 그룹에 비해 증체량과 조직 소견상에서 유의미한 차이를 보이지 않았음.
- 향후, 야외 임상 시험을 통해 산란율, 난중 등 사업화를 위한 안전성 시험을 수행할 예정이다.



<그림 28. 유산균 면역보조제의 안전성 시험 결과 - 증체량>



<그림 29. 유산균 면역보조제의 안전성 시험 결과 - 접종 부위 조직 소견>

3. 3차년도 연구 수행 내용 및 결과

가. 제 1 세부 연구기관 : (주)카브

○ 최종 선발 유산균의 대량 생산 및 야외 시험

- 3차년도에서는 2차년도에 개발한 항인플루엔자 효능을 보이는 유산균 사료첨가제를 야외 농장에 투여하고, 같은 농장에서 무작위로 20마리를 선발한 뒤, 실험실에서 인플루엔자 공격접종 시험을 수행하여 직접적인 방어 효능을 관찰하는 시험을 수행할 계획이었음. 그러나 2차년도에 수행한 다양한 실험실 내 시험에도 불구하고, 본 연구진은 닭에서 경구 투여 시 항인플루엔자 효능을 보이는 유산균 사료첨가제 후보균을 발굴하지 못하였음.

1) 유산균 경구 투여에 따른 살모넬라 방어 시험

- 본 연구진은 당초 이 과제의 목표였던 가금용 기능성 유산균 사료첨가제의 성공적 개발을 위하여 2차년도까지 수집하고 다양한 시험관내 시험을 거쳐 특성을 파악한 유산균 라이브러리를 항인플루엔자가 아닌 다른 방법으로 활용할 수 있을지 조사함.
- 현재 양계 농가에서는 자주 문제가 되는 질병으로 조류인플루엔자말고도 전염성 기관지염 바이러스감염증, 살모넬라 감염증, 대장균 감염증 등이 주로 보고되고 있으며, 본 과제를 통해 개발되어야 할 유산균제제는 사료첨가제로 경구로 투여하여 소화관에 직접 닿는다는 점과 가금 주요 질병의 발생 장기를 고려하여 현재까지 발굴된 유산균제제를 이용하여 소화관 관련 질병인 살모넬라 감염증을 예방하는 사료첨가제에 대한 개발 시도를 하게 됨.
- 유산균 경구 투여에 따른 살모넬라 방어 시험에 쓰일 살모넬라 공격균주로는 닭에서 뿐만 아니라 계육을 통하여 사람에게까지 살모넬라 감염증을 일으킬 수 있는 *Salmonella enteritidis*를 사용하기로 함. 살모넬라 감염증이 발생하는 농장에서 분리하여 실험실 내 보관하던 균주 중 시험관내 시험을 통하여 특정 항생제에 내성을 가지는 균주를 선발함. 이러한 항생제 내성 특성은 공격접종 시험 시 타 세균을 효과적으로 배제할 수 있음.

	내성 항생제	역가
F-CJch.	CX, MY, B, C	3*10 ⁸
F17-229	S, CX, T, AMP, MY, TE, B	2*10 ⁸
F17-306	S, CX, T, AMP, MY, TE, B, FFC, K, C	5*10 ⁸
F17-362	S, CX, T, AMP, MY, TE, B	2*10 ⁸
F17-502	S, CX, T, AMP, MY, TE, B	4*10 ⁸
F17-534	S, CX, T, AMP, MY, TE, B	3*10 ⁸

S:streptomycin, CX:cloxacillin, T:oxytetracyclin, AMP:ampicilin, TE:tetracyclin, B:bacitracin, FFC:florfenicol, K:kanamycin, C:chloramphenicol

<표 22. 내성 살모넬라 선발 시험 결과>

① 유산균 경구 투여에 따른 살모넬라 방어 시험

- 동물 준비: 1일령 육계로 준비함.
- 유산균 준비: 개별 유산균 배양액의 상층액을 이용한 한천 평판 내 살모넬라 증식 억제 시험에서 우수한 효능을 보인 균주 *L.brevis*, *L.sakei*, *L.pentosus*, *P.acidilatici*, *B.lichenformis*(모두 발효식품 유래)를 MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양함. 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하여 10⁸CFU/ml 농도가 되도록 준비함.
- 시험계에 각각 *Salmonella Enteritidis* 균 250μl(1.5x10⁸cfu/ml)을 구강을 통해 공격 접종함.
- 공격 접종 1시간 뒤, 급수와 급이를 차단하고 마리당 10⁷cfu/200ul를 경구 투여함.
- 유산균 투여 24시간 뒤 부검을 통해 맹장변을 채취하여 분리되는 *Salmonella Enteritidis* 균의 정량 분석을 진행함.

※ 실험결과

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
	<i>L.brevis</i>	<i>L.sakei</i>	<i>L.pentosus</i>	<i>P.acidilatici</i>	<i>B.lichenformis</i>	양성대조군	음성대조군
평균 SE 회수량 (Mean log cfu/ml)	7.24	5.54	7.08	5.78	5.99	6.92	0

<표 23. 시험 결과>

- 살모넬라만 투여한 양성대조군에 비하여 *L.sakei*, *P.acidilatici*, *B.lichenformis*를 투여한 동물에서 살모넬라 배출량이 현저히 적은 것을 관찰함. 시험관내 시험법에서 모두 강한 항살모넬라 효능을 보이는 균주였으나 실제 동물에 투여해보았을 때는 그 효력에 차이가 있는 것을 확인함. 동물 실험에서 우수한 효능을 보인 균주를 모아서 합제 형태로 만들기로 결정함.

② 유산균 합제 상품화를 위한 대량 생산 및 부형제 선발시험

- 동물 준비: 1일령 육계로 준비함.
- 유산균 준비: 시험관내 시험법과 닭 유산균 선발 시험에서 우수한 효능을 보인 균주 *L.sakei*, *P.acidilatici*, *B.lichenformis*(모두 발효식품 유래)를 대용량으로 배양하여 건조시켜 가루로 제작함.
- 부형제 첨가: 유산균 가루에 부형제로 사용할 덱스트린, 프락토 올리고당 등을 동량 혼합하여 잘 흔들어서 균일한 유산균혼합제제로 제조함. 이후 제조한 유산균 시제품은 고압멸균한 3차 증류수에 녹여서 동물에 투여함.
- 공격균주 : 클로람페니콜, 플로로페니콜 등에 내성을 가지는 *Salmonella enteritidis*
- 부형제 종류에 따라 서로 다른 유산균제제 투여 실험군과 유산균 투여 대조군, 바이러스 양성 대조군으로 구성함. 각 그룹은 10마리로 구성함.
- 유산균 투여 그룹은 동물이 실험실에 도착하는 즉시 마리당 10⁷cfu/200ul의 유산균을 경구로 투여함.
- 유산균 투여 대조군은 시판 중인 다른 회사의 유산균을 투여하고, 공격 접종 양성대

조균은 PBS를 시험균과 동일한 방법으로 투여함.

- 유산균 투여 24시간 후 살모넬라를 공격접종함. 공격접종 이후 24시간 뒤 동물을 부검하여 맹장과 맹장변을 수집함. 수집한 분변과 장기는 PBS에 부유한 뒤, 희석하여 클로람페니콜이 첨가된 XLD 배지에 접종함.

※ 실험결과

부형제 종류	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	FO ^A	FO+DX ^B	DX	대조유산균	양성대조균	음성대조균
평균 SE 회수량	1.4 * 10 ⁶	6 * 10 ⁷	1.5 * 10 ⁸	6.9 * 10 ⁷	7.1 * 10 ⁸	3.5 * 10 ⁶

^A fructo oligosaccharide

^B dextrin

<표 24. 시험 결과>

- 부형제로서 올리고당을 단독으로 사용한 실험군에서 살모넬라만 접종한 양성대조군에 비하여 살모넬라 배출량이 가장 큰 폭으로 감소하는 것을 관찰함. 올리고당과 텍스트린을 혼합한 유산균제제도 대조군에 비하여 살모넬라 배출량이 감소하였고 대조로 사용한 시판 중인 타 회사 유산균과도 비슷한 효능을 보이는 것을 확인함. 올리고당은 효력이 있더라도 원재료의 가격이 비싸 양계 현장에서 사용하는 여타 유산균제제들과 비교하였을 때 경쟁력을 갖추지 못 할 것으로 생각되어 제품화할 때 올리고당과 텍스트린을 혼합하여 부형제로 사용하기로 함.

③ 유산균 시제품 경구 투여에 따른 살모넬라 방어 시험

- 동물 준비: 1일령 육계로 준비함.
- 유산균 준비: 시제품을 고압멸균하여 식힌 3차 증류수에 녹여서 준비함.
- 공격균주 : 클로람페니콜, 플로로페니콜 등에 내성을 가지는 Salmonella enteritidis
- 유산균 투여 그룹은 마리당 10⁷cfu/200ul의 유산균을 경구로 투여함.
- 유산균 투여 대조군은 시판 중인 다른 회사의 유산균을 투여하고, 공격 접종 양성대조군은 PBS를 시험균과 동일한 방법으로 투여함.
- 유산균 투여 24시간 후 살모넬라를 공격 접종함. 공격접종 이후 48시간, 96시간, 168시간 뒤 동물을 부검하여 맹장과 맹장변을 수집함. 수집한 분변과 장기는 PBS에 부유한 뒤, 희석하여 클로람페니콜이 첨가된 XLD 배지에 접종함.

※ 실험결과

	Average mean log cfu/ml			
	48hr	96hr	168hr	average
시제품투여군	0.00	0.00	0.00	0.00
대조유산균투여군	0.00	0.00	4.40	1.47
유산균미투여군	4.86	5.31	6.71	5.63

<표 25. 시험 결과>

- 제작한 유산균 시제품을 투여한 결과 계육을 통하여 사람에서도 식중독 등의 증상을 유발할 수 있는 Salmonella enteritidis의 배출량이 확연히 줄어드는 것을 관찰함.

특히 대조유산균으로 사용한 시판 중인 다른 회사의 제품보다도 더 오랜 시간 동안 살모넬라 증식을 억제하는 것으로 확인되었음.

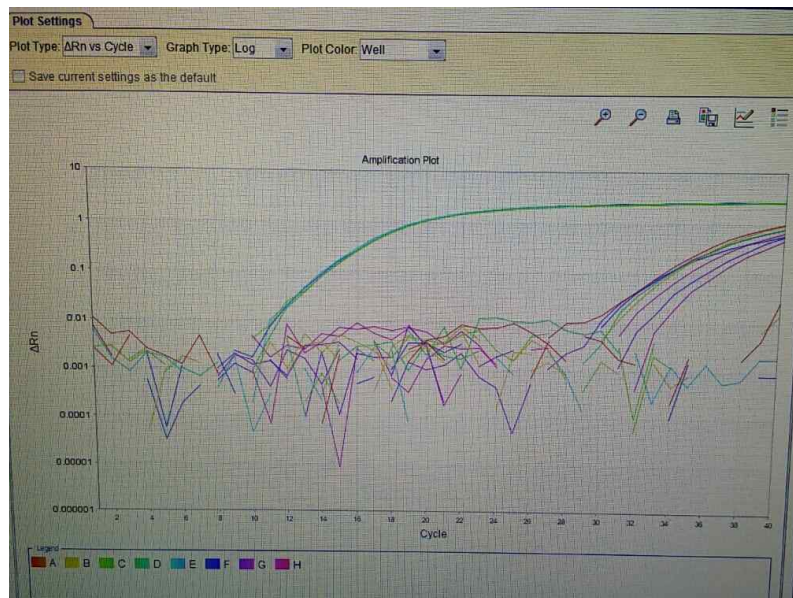
- 향후 최종 시제품을 이용하여 제품 등록과 시판을 위한 살모넬라 방어 시험을 진행하려 함. 현재 동물의 일령 및 어린 동물에서 성체로 자라면서 사료가 바뀌는 일정을 고려하여 적절한 유산균 투여 프로그램을 결정하기 위한 시험과 시제품을 이용한 농장시험을 계획 중에 있음.

○ 유산균 투여의 면역 사이토카인 조절 및 장내 미생물총 변화 연구

1) 유산균 자극 후 면역 사이토카인 발현 수준 측정 시험

- 세포 준비: 6 well plate에 Caco-2 Cell을 2×10^5 cells/well의 농도로 약 10일 배양, well 안에 90% 이상 세포가 차도록 준비함.
- 유산균 준비: MRS broth에 37°C, 24시간 조건에서 배양한 신선한 유산균 배양액을 PBS로 2회 세척하고 10^7 CFU/ml 농도로 준비함.
- 배지를 털어내고, well당 유산균 1ml을 담은 뒤 0hr, 1hr, 3hr, 6hr, 12hr동안 37°C 인큐베이터에서 반응시킴.
- 정해진 반응 시간마다 유산균 상층액을 털어내고, 세포를 PBS로 워싱 후 lysis 처리하여 회수함.
- mRNA를 추출하여 GAPDH, IL-1b, IL-6, IL-10, INF-g에 대하여 SYBR을 이용하여 quantitative PCR을 진행함.

※ 실험결과



<그림 30. L.plantarum(김치 유래) 처리 1시간 후 q-PCR 결과>

- 본 과제에서 개발하려는 사료첨가제의 형태가 생균인 점을 감안하여 이번 시험은 유산균 생균을 이용하여 진행함.

- 시험 결과, 유산균이 만들어내는 부산물이 pH 변화 등을 유도하여 세포 사멸 정도가 심각한 것을 관찰할 수 있었음. 생균으로 세포와 반응시키는 경우, 목표한 반응 시간 동안 세포 손상을 유발하지 않고 관찰할 수 있도록 시험 조건을 결정하는데 어려움이 있을 것으로 판단됨.
- 유산균 자극 후 측정된 qPCR 값은 세포 내 housekeeping gene인 GAPDH를 기준으로 모든 시료의 사이토카인 측정값을 일정하게 재조정함.
- 면역 사이토카인 분석 결과, 반응 초기에는 IL-1b가 비교적 높게 나타났고, INF-g는 유산균 자극 후 전체 반응 시간 동안 낮게 발현되는 것을 확인함.

나. 제 1 협동 연구기관 : 대성미생물연구소

○ Dose-sparing 효과 비교 시험

1) 가금아데노바이러스 type 4 항원을 이용한 KF-40 Adjuvant의 Dose-Sparing 효과 시험

① 공시재료

- 시험동물: 3주령 SPF 닭 50수
- 시험백신: KF-40 이용 FAdV-4 (K4) 불활화 오일 백신 1종
ISA 70 VG 이용 FAdV-4 (K4) 불활화 오일 백신 1종
- 백신접종 경로: 근육접종
- 백신접종 농도 : $10^{7.0}$ TCID₅₀/수 , $10^{6.0}$ TCID₅₀/수

② 시험 내용

- 시험 백신의 낮은 량의 항원 농도에서의 면역원성을 비교 확인하기 위하여 3주령의 SPF 닭에 표1과 같이 시험백신을 수당 0.5ml 근육접종한다.
- 다국적 회사 제품인 SEPPIC사의 ISA 70 VG를 대조 어쥬번트로 사용하여 평가한다.
- 시험군 및 대조군은 백신 후 3주간 ELISA로 평가한 항체 역가를 관찰한다.

③ 시험 결과

구분	공시 수수	적용 백신	평균 항체 역가 (Mean±S.D)			백신 농도
			백신 후 1주	백신 후 2주	백신 후 3주	
Group 1	10	불활화백신 KF-40	3541±2147	8471±5804	12040±3484	$10^{7.0}$ /수
Group 2	10	불활화백신 KF-40	2144±2415	6655±4135	8042±3214	$10^{6.0}$ /수
Group 3	10	불활화백신 ISA 70 VG	1541±1322	6511±4792	7841±2235	$10^{7.0}$ /수
Group 4	10	불활화백신 ISA 70 VG	2221±1124	2536±1442	5633±1458	$10^{6.0}$ /수
Group 5	10	대조군	-	-	-	-

<표26. 3주령 SPF 닭에서 시험백신 접종 후 항체가 측정 결과>

- 시험 결과, KF-40으로 제조한 저농도 사독 오일 백신($10^{6.0}$)과 ISA70VG로 제조한 고농도 사독 오일 백신($10^{7.0}$)에서 백신 후 2주와 3주차에 거의 동등한 수준의 항체가 확인됨.

- 따라서, KF-40 이용 사독 오일 백신은 FAdV-4 항원에 대하여 ISA70VG 이용 사독 오일 백신에 비해 10배 정도의 항원량 저감효과를 확인할 수 있었음.

○ 온도 가혹조건 보관 후 효능비교

- 온도 가혹조건 보관 후 효능 비교 시험은 백신이 상용화 되어 제조 후 농장에 배송이 될 때까지 Cold chain을 벗어났을 때의 고온의 환경에서도 백신이 효능을 유지할 수 있는지를 확인하기 위함.
- 조류인플루엔자 백신을 이용한 온도 가혹조건 효과 시험 : KF-40을 이용한 자체 개발 오일 면역 증강제에 불활화 된 (포르말린 0.1% 처리) 조류 인플루엔자 바이러스 (rgH9N2)을 혼합하여 백신을 제조함.
- ISA70VG도 위와 같이 동일한 방법으로 항원을 혼합하여 백신을 제조함.
- 제조된 두 백신을 4℃와 36℃ 환경에 24시간 보관한 후 6주령 SPF 닭에 0.5ml씩 접종을 하였음.
- 접종 후 3주차에 채혈을 하여서 조류인플루엔자 바이러스(H9N2)에 대한 항체 역가 수준을 HI assay로 비교 평가하였음.

구분	공시 수수	적용 백신	평균 항체 역가 (Mean±S.D)	보관 온도
			백신 후 3주차	
Group 1	10	불활화백신 KF-40	7.71±0.48	4℃
Group 2	10	불활화백신 KF-40	5.21±1.21	36℃
Group 3	10	불활화백신 ISA 70 VG	7.14±0.37	4℃
Group 4	10	불활화백신 ISA 70 VG	4.89±2.21	36℃
Group 5	10	대조군	-	-

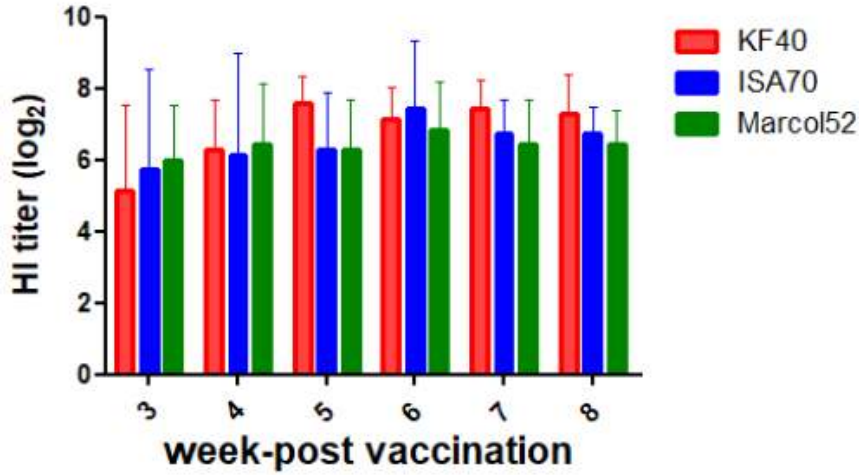
<표 27. 온도 가혹 조건 후 백신 시 항체가 비교>

- 시험 결과, 두 어쥬먼트 이용 백신 모두 4℃ 보관 조건에 비해 36℃ 보관 조건 하에서 항체가가 약간 감소하는 경향을 보였으며, 동일 보관 온도 내에서 어쥬먼트별 그룹 간의 항체가 차이는 유의적이지 않았음.

○ 면역지속성 비교 시험

- 건국대학교에서 역유전자 플랫폼으로 제작한 rgH5N9/14 항원과 KF-40, ISA70VG, Marcol52 (ExxonMobil) 3종의 어쥬먼트를 유화하여 총 3종의 사독 오일 백신을 제조함.
- 10주령 SPF 닭을 세그룹으로 나눈 후, 시험군별 백신을 가슴근육에 각각 0.5ml씩 접종하였으며, 백신 접종 3주 후부터 8주 후까지 매주 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤, HI test를 이용해 항체 역가를 측정하였음.
- 시험 결과, KF-40을 이용하여 제조한 백신을 접종한 그룹의 항체 역가는 상용화된 어쥬먼트를 사용한 그룹과 비교하여 동등하거나 우수한 면역지속능을 보였음.

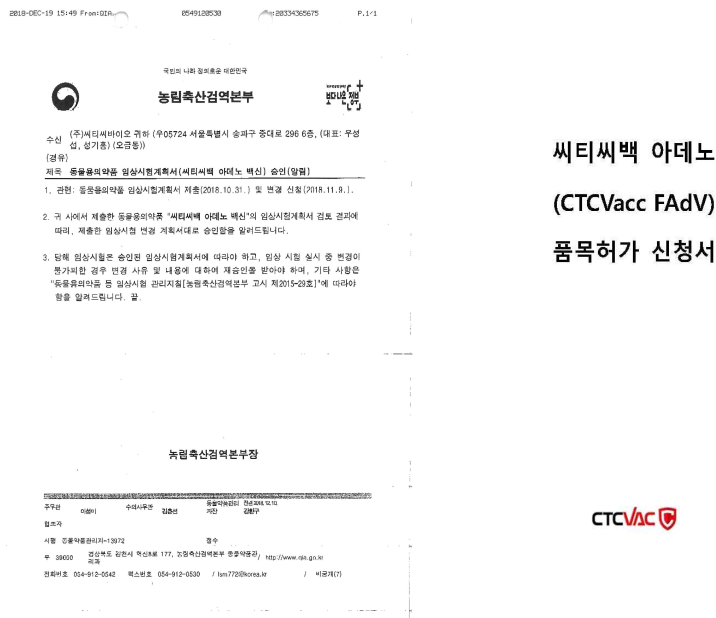
HPAI adjuvant comparison test - SPF



<그림 31. 백신 접종 3주 후부터 8주차 까지 면역 지속능 평가 결과>

○ 자체 개발 오일 면역증강제의 시제품 제작 및 야외적용 시험

- 본 과제를 통해 개발된 KF40 Adjuvant는 현재 (주)씨티씨백에서 가금용 오일 어쥬번트 개발에 활용 중임.
- (주)씨티씨백에서는 우선적으로 FAdV-4 사독 오일 백신에 KF-40을 적용하여 시제품 제작 및 야외적용 시험 수행을 완료하였으며 현재 검역본부에 품목허가 진행 중에 있음.
- CTCVacc FAdV-4 야외 임상 시험은 총 3개 농가(산란계 1농가, 종계 2농가)를 선정하여 계사별로 시험군(CTCVacc FAdV : KF40 이용) 및 대조군(상용 FAdV 백신 : ISA70VG 이용)을 설정함.



<그림 31. 야외 임상시험 계획서 승인 공문 및 품목 허가 신청서>

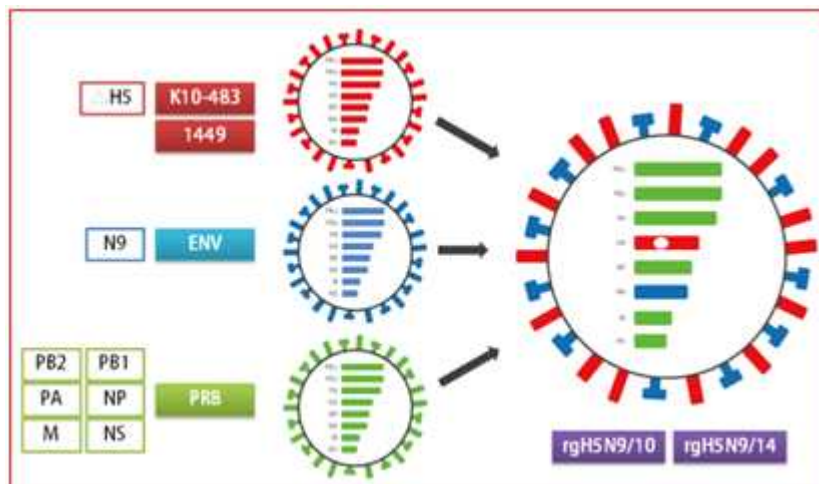
- 시험 성적을 요약하면 다음과 같음.

- 1) KF40 이용 백신의 농장 내 근육 접종 시 항체형성능을 확인하기 위하여 선정된 3곳의 시험 농가에 입식된 산란계 혹은 종계에서 모두 백신 접종 후 4주 간격으로 혈청 검사 시 아데노바이러스의 방어에 적합한 항체가 형성되는 것을 확인함.
- 2) 대조 백신군과 KF40 이용 백신군 간의 농장 내 산란율, 표준산란율, 누적폐사율을 근거로 생산지수를 비교 평가한 결과, 대조백신군과 비교 시 KF40 이용 백신군의 생산지수에 유의적 차이가 없는 것을 확인하였음.
- 3) KF40 이용 백신의 농장 내 접종 시 후대 병아리의 모체이행항체에 의한 방어율을 확인하기 위하여 종계 농가 2곳에서 26주령 및 34주령에 산란한 후대병아리 중 시험군과 대조군 각 10수와 공격접종 대조군 10수를 실험실로 이동하여 공격접종 시험을 수행한 결과, KF40 이용 시험군에선 공격접종 후 14일간 높은 방어율을 확인할 수 있었으나, 대조군에서는 공격접종 5일 이내에 전수 폐사하여 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였음.
- 4) 이상의 시험결과, KF40으로 제조한 CTCVacc FAdV 백신은 근육 접종 시 높은 수준의 항체 역가를 형성하며, 생산지수에서도 높은 안전성을 나타내는 것으로 확인되었음. 또한, 모체이행항체를 통해 후대병아리에 우수한 방어능을 나타내는 것으로 확인되었음.

○ 유산균 첨가 오일 백신의 효능 시험 및 야외적용 시험

- 1) SPF 닭에서 고병원성 인플루엔자 백신에 대한 백신 초기 유산균 면역보조제의 방어능 증강 효과 확인 시험

- 건국대학교에서 역유전학 플랫폼을 이용하여 제작한 rgH5N9/14 균주를 이용하여 ISA70VG 어쥬번트에 유산균 면역보조제를 첨가/미첨가한 백신을 제조함.



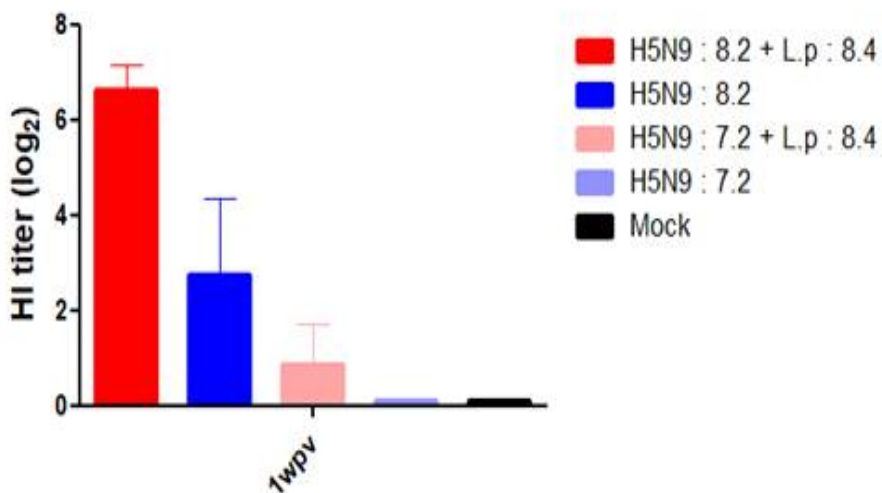
<그림 32. 역유전학 플랫폼을 이용해 제작한 rgH5N9 모식도>

- 시험군은 다음과 같음. 우선 항원의 역가를 10배씩 2단계로 나누었고, 각각의 항원 역가 당 유산균 첨가군과 비첨가군을 두었음.

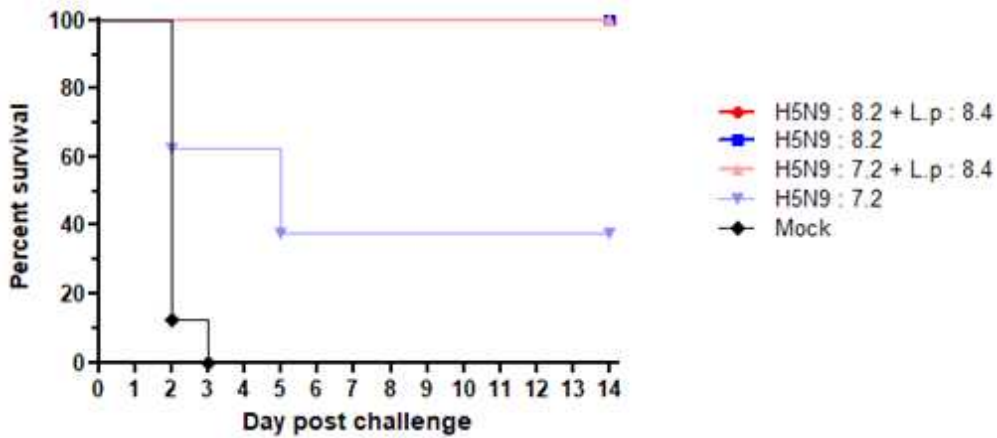
Group	Virus dose	BASE1	BASE2	Chicken no.	
High	1	$10^{8.2}EID_{50}$	ISA70	<i>L.plantarum</i> ($10^{8.4}CFU$)	8
	2	$10^{8.2}EID_{50}$	ISA70	-	8
Low	3	$10^{7.2}EID_{50}$	ISA70	<i>L.plantarum</i> ($10^{8.4}CFU$)	8
	4	$10^{7.2}EID_{50}$	ISA70	-	8
Mock	5	-	-	-	8

<그림 33. 시험군>

- 8주령 SPF 닭 40수를 그룹별로 나눈 후, 시험군별 백신을 가슴근육에 0.5ml씩 접종하였으며, 백신 접종 1주 후 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤, HI test를 이용해 항체 역가를 측정하였음.
- 이 후, 건국대학교 의생명과학동 내에 BL3로 이동하여 비강 경로로 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 공격접종 하였으며, 이 후 14일간 매일 폐사여부 및 임상증상을 기록하였음.
- 바이러스 배출 검사는 공격접종 바이러스 주입 후 2, 3, 5, 7일에 구강 및 총배설장에서 배출되는 샘플을 면봉을 이용하여 수거하였고, 수거된 샘플에서 바이러스를 검출하기 위해 RNA를 추출함. 추출한 RNA는 Real-Time RT-PCR을 이용하여 바이러스 유전자의 유무 및 양을 판단하였음.
- 시험 결과, 유산균 첨가군의 경우 백신 후 1주차 방어능 평가에서 비첨가군에 비해 높은 항체 역가를 보였으며, 공격접종 시험에서는 낮은 폐사율과 낮은 바이러스 배출율을 보였음.



<그림 34. 백신 후 1주차 항체가 검사 결과>



<그림 35. 공격접종 후 생존율 결과>

그룹	바이러스 배출 개체 수/전체수 (평균 바이러스 배출량 Log ₁₀ (EID ₅₀ /ml))									
	10 ^{8.2} + L.p		10 ^{8.2}		10 ^{7.2} + L.p		10 ^{7.2}		Mock	
샘플링 위치	구강	총배 설강	구강	총배 설강	구강	총배 설강	구강	총배 설강	구강	총배 설강
공격접종 2일 후	0/8	0/8	1/8	0/8	0/8	0/8	8/8	3/8	8/8	7/8
공격접종 3일 후	(0)	(0)	(0.3)	(0)	(0)	(0)	(3.6)	(1.9)	(4.2)	(4.3)
공격접종 5일 후	0/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	5/8	1/8	-	-
공격접종 3일 후	(0)	(0)	(0.7)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0.3)	-	-
공격접종 5일 후	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	4/8	2/5	2/5	-	-
공격접종 5일 후	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1.7)	(1.2)	(1.2)	-	-
공격접종 5일 후	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/3	0/3	-	-
공격접종 5일 후	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	-

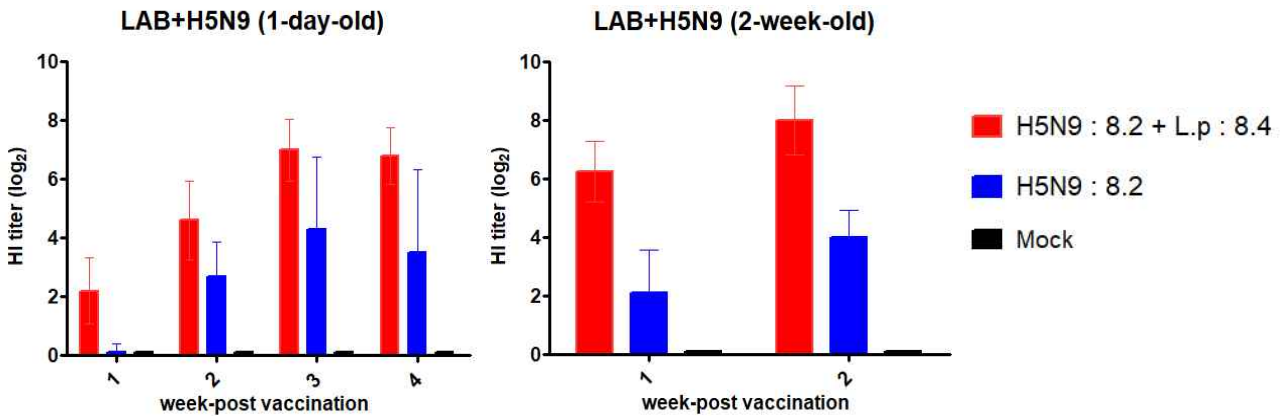
<표 28. 공격접종 후 바이러스 배출 결과>

- 2) 오리에서 고병원성 인플루엔자 백신에 대한 유산균 면역보조제의 면역원성 증강 효능 시험
- 건국대학교에서 역유전자 플랫폼을 이용하여 제작한 rgH5N9/14 균주를 이용하여 ISA70VG 어쥬번트에 유산균 면역보조제를 첨가/미첨가한 백신을 제조함.
 - 시험군은 다음과 같음. 먼저 모란식품에서 제공받은 육용 오리를 주령별로 구분한 뒤, 각 주령별로 유산균 면역보조제 첨가 백신과 비첨가 백신 그리고 대조군으로 구분함.

Group	Virus dose	BASE1	BASE2	Chicken no.	
1 day old	1	10 ^{8.2} EID ₅₀	ISA70	<i>L.plantarum</i> (10 ^{8.4} CFU)	10
	2	10 ^{8.2} EID ₅₀	ISA70	-	10
	3	Mock	-	-	10
2 week old	4	10 ^{8.2} EID ₅₀	ISA70	<i>L.plantarum</i> (10 ^{8.4} CFU)	8
	5	10 ^{8.2} EID ₅₀	ISA70	-	8
	6	Mock	-	-	8

<그림 36. 시험군>

- 1일령과 2주령 육용 오리 54수를 그룹별로 나누는 후, 시험군별 백신을 1일령의 경우 목 뒤 피하에, 2주령의 경우 가슴근육에 각각 0.5ml씩 접종하였으며, 백신 접종 1주 후부터 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤, HI test를 이용해 항체 역가를 측정하였음.



<그림 37. 백신 후 항체가 검사 결과>

- 시험 결과, 유산균 면역보조제 첨가군은 비첨가군에 비해 1일령과 2주령 모두에서 유의적으로 높은 항체 역가를 보이는 것을 확인할 수 있었음.

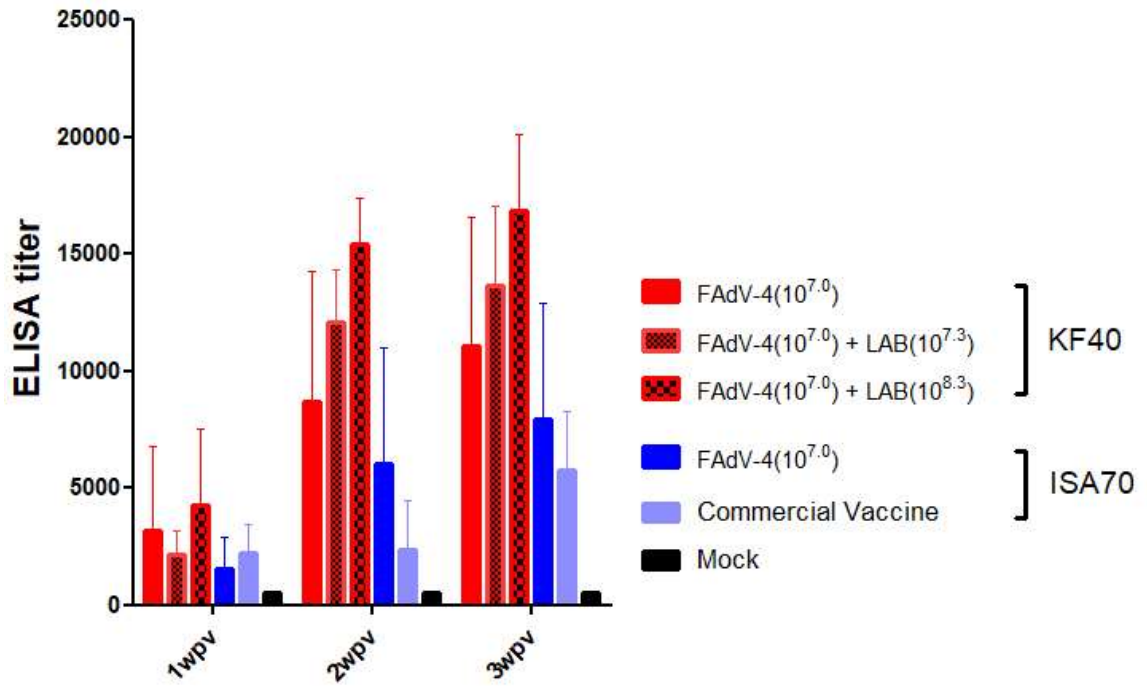
3) 산란계에서 가금 아데노바이러스 4형 백신에 대한 유산균 면역보조제의 Dose별 면역원성 증강 효능 시험

- 건국대학교에서 백신 항원용으로 제작한 K4 (FAdV-4) 균주를 이용하여 KF40 어쥬번트에 유산균 면역보조제를 첨가/미첨가한 백신을 제조함.
- 시험군은 다음과 같음. 먼저 한국양계에서 제공받은 산란계 60마리를 다섯 그룹으로 나누는 후 백신 전 채혈을 통해 FAdV에 대한 항체가 없음을 확인하였음. 오일 어쥬번트는 자체 제작한 KF40 이용 어쥬번트와 ISA70VG를 모두 사용하였으며, 백신 그리고 대조군으로 구분함.

	Virus dose	BASE1	BASE2	Chicken no.
1	$10^{7.0}EID_{50}$	KF40	-	10
2	$10^{7.0}EID_{50}$	KF40	<i>L.plantarum</i> ($10^{7.3}$ CFU)	10
3	$10^{7.0}EID_{50}$	KF40	<i>L.plantarum</i> ($10^{8.3}$ CFU)	10
4	$10^{7.0}EID_{50}$	ISA70	-	10
5	Commercial Vaccine	ISA70	-	10
6	Mock	-	-	10

<그림 38. 시험군>

- 8주령 산란계 60수를 그룹별로 나누는 후, 시험군별 백신을 가슴근육에 0.5ml씩 접종하였으며, 백신 접종 1주 후부터 경정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤, Biocheck社 Fowl Adenovirus Group 1 antibody ELISA test를 이용해 항체 역가를 측정하였음.



<그림 39. 백신 후 ELISA 검사 결과>

- 시험 결과, KF40의 유산균 면역보조제 첨가군은 비첨가군에 비해 Dose-dependent한 양상으로 항체가가 상승하는 경향을 보였으며, ISA70VG는 KF40 비첨가군에 비해서 낮은 항체가를 보임을 확인할 수 있었음.

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 목표

1. 1차년도

구분	성과목표	성과지표	가중치	달성도
주관 (카브)	유산균의 동정 및 시험관 내 평가/선발	동물(철새 및 가금류)의 장내 유산균 동정	25%	100%
		식물(발효식품 등)의 유산균 동정	25%	100%
		유산균의 항산성, 항담즙 시험	25%	100%
		유산균의 가금 면역세포 자극/분화 시험 및 선발	25%	100%
협동1 (대성)	가금용 오일 면역증강제의 원료 발굴 및 제조공정 개발	Mineral Oil 원료 발굴 및 선정	20%	100%
		Surfactant 원료 발굴 및 선정	20%	100%
		항원-면역증강제 최적의 배합비율 도출	20%	100%
		이멸전 공법의 정립	20%	100%
		유산균 라이브러리를 이용한 가금용 면역보조제 선발 및 면역원성 시험	20%	100%

2. 2차년도

구분	성과목표	성과지표	가중치	달성도
주관 (카브)	마우스 및 가금류에서 인플루엔자 저항 유산균 기능성 사료 첨가제 선발	시험관내 선발 유산균의 마우스 투여 및 인플루엔자 감염시험	50%	100%
		시험관내 선발 유산균의 가금(닭) 투여 및 인플루엔자 감염시험	50%	80%
협동1 (대성)	자체 개발 오일 면역증강제의 다국적기업 제품과 실험실 내 비교시험	오일 이멸전 제조 검증시험	20%	100%
		오일 이멸전 입자 크기 및 분포 시험	20%	100%
		안정성 시험	20%	100%
		안전성 시험	20%	100%
		1차년도 선발 유산균의 오일백신의 안전성, 안정성 시험	20%	100%

3. 3차년도

구분	성과목표	성과지표	가중치	달성도
주관 (카브)	마우스 및 가금류에서 인플루엔자 저항 유산균 기능성 사료 첨가제 선발	최종 선발 유산균의 대량 생산 및 야외시험	50%	80%
		유산균 투여의 면역 사이토카인 조절 및 장	50%	50%

		내 미생물총 변화 연구		
협동1 (대상)	가금용 오일 면역증 강제의 자체생산 체 계 확립 및 산업화	Dose-sparing 효과 비교 시험	25%	100%
		온도 가혹조건 보관 후 효능 비교	25%	100%
		자체 개발 오일 면역증강제의 시제품 제 작 및 야외적용 시험	25%	100%
		유산균 첨가 오일 백신의 효능 시험 및 야외 적용 시험	25%	90%

제 2 절. 목표 달성여부

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	15		15		15							20	10	10					
최종목표	4	4		3		2						5	3		3	2	5			
1 차 연 도	목 표											2			1		1			
	실 적											1	1		1		1			
2 차 연 도	목 표	1										2	2		1	1	2			
	실 적	1													1	1	2			
3 차 연 도	목 표	3	4		3		2					1	1		1	1	2			
	실 적	4			3		2								2	1	3			
소 계	목 표	4	4		3		2					5	3		3	2	5			
	실 적	5			3		2					1	1		4	2	6			
종료 1차연도																				
종료 2차연도																				

종료 3차연도																			
종료 4차연도																			
종료 5차연도																			
소 계																			
합 계																			

제 3 절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 1) 조류인플루엔자 저항성 유산균 사료첨가제 개발 미달성
 - 본 연구진은 다양한 실험적 접근 방법을 통하여 본 과제의 주제에 합치하는 조류인플루엔자 저항성 유산균을 선발코자 했으나, 개발 마지막 단계인 가금류 대상 경구 투여 시험에서 긍정적인 결과를 얻지 못한 바 있음.
 - 하지만 이에 그치지 않고 본 연구 과제의 본질이었던 유산균 사료첨가제의 의의를 살리고자, 기타 질병에 대한 방어 효능을 다각도로 모색하여 최근 공중보건학적으로 관심이 집중되고 있는 가금 살모넬라증에 대한 효능을 확인할 수 있었음.
 - 이러한 결과를 바탕으로 하여, 본 연구진은 해당 연구 성과를 특허 출원하였고 시제품 제작 및 사업화의 발판을 마련한 바 있음.
 - 본 과제 종료 이후에도 가금류에 적용 가능한 조류인플루엔자 저항성 유산균 사료첨가제 개발을 지속할 계획이며, 향후 개발이 완료될 시 본 과제의 성과로 등록할 것임.

- 2) 유산균 면역보조제 야외 임상 시험 수행 미달성
 - 현재 본 연구진의 연구 결과에 따르면 유산균 면역보조제는 다양한 항원에 적용 가능하며 대부분의 경우 항체가를 큰 폭으로 상승시키는 것으로 확인됨.
 - 유산균 면역보조제를 첨가한 백신을 접종한 동물의 경우, 외관상 및 증체율에서는 비첨가 백신 접종군과 비교하여 별 차이가 없으나, 조직 검사를 통한 안전성 평가에서는 비첨가 대조군 대비 높은 육아종 및 염증 소견을 보이는 것이 사실임.
 - 현재 유산균 면역보조제의 제형을 변경하는 등 우수한 효능을 유지하면서 안전성도 확보할 수 있는 기술을 확보하기 위해 노력하고 있으며, 동물 실험을 통해 일부 성과를 확인함. 우선 실험실적 조건에서 보다 나은 안전성의 확보 이후 야외 임상 시험을 진행해야 할 것으로 생각됨.
 - 본 연구진은 향후 지속적인 연구개발을 통해 유산균 면역보조제의 사업화를 위해 노력할 것이며, 개발 완료 시 본 과제의 연구 성과로 등록할 것임.

- 3) 특허 등록 미달성

- 본 연구진은 지난 3년간의 연구개발결과를 토대로 총 5건의 국내 특허를 출원하였으나, 아직 등록이 이루어지지 않는 못하였음.
- 향후 지속적으로 특허 진행 대응을 통해 4건의 등록 성과 역시 종료 후 2년 이내에 완료할 수 있도록 노력하겠음.

4) 논문 성과 미달성

- 본 과제는 SCI 5건, 비SCI 3건 등 총 8건의 논문 성과가 잡혀있었으나, 주요 연구 개발 성과가 3년차 말에 발생되면서 과제 종료일까지 논문 성과의 달성(SCI 1건, 비SCI 1건 달성)에 실패한 바 있음.
- 현재 국내 비 SCI 저널(한국가금학회지, 대한수의학회지)에 2건이 투고되어 있으며, 해외 SCI 저널(Poultry Science, Emerging Microbes & Infections)에 2건이 투고 완료되었음.
- 유산균 면역보조제의 다양한 항원에 대한 면역증강 효과를 기본 전략으로 가능한 종료 1년차 이내에 미달성 논문 성과를 달성할 수 있도록 할 것임

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 기대 성과 및 기대 효과

1. 기술적 측면

- 가금 살모넬라증에 대해서 실제적 효력이 있는 유산균을 선발하여 사업화하였음.
- 가금용 오일 면역어주번트 자체 개발에 대한 연구는 기존에 실행된 사례가 없어, 해외 제품에 의존했던 기술을 자체 보유함에 의의를 지님
- 신규 면역증강제로 인한 높은 면역원성은 기존 야외 질병의 항원 변이에 대한 방어 효율도 증가시켜 제조사의 새로운 항원 개발의 부담을 줄일 수 있음
- 신규 면역증강제의 개발은 본 연구과제에서 집중하는 가금용 불활화 백신 뿐 아니라 사회·경제적으로 영향을 미치는 여타 산업동물(돼지, 소, 말) 또는 반려동물(개, 고양이)에 적용 가능함
- 국내 동물용 백신 연구투자는 질병의 야외 균주 예찰 후 이에 맞는 백신 항원 균주 개발에 초점이 맞춰져 있음
- 본 연구는 기존 오일 면역증강제 플랫폼(이멀전)에 대한 개량과 신규 면역증강제 개발 연구로서 동물백신 분야에 있어서 면역증강제 전문가를 양성에 기여함

2. 경제적·산업적 측면

- 국내 동물용 백신 제조사의 오일 면역 어주번트 자체 생산 기술은 해외 오일 면역어주번트에 대한 의존도를 줄이고 가격경쟁력을 확보 할 수 있을 뿐만 아니라 관련 산업의 내수시장 활성화에 기여
- 백신의 높은 면역원성은 기존 유행 질병 주(strain)에 대한 방어 효율 증대와 함께 빠르게 변이하는 새로운 균주에 대한 교차 방어 효율 향상도 기대 할 수 있어 동물 질병 방제에 드는 직접적 비용을 줄일 것으로 기대됨
- 효율적인 불활화 백신은 산업동물의 생산성 향상으로 나타나 축산식품의 안정적인 공급과 연관됨

3. 사회적 측면

- 현재 국내 저병원성 조류인플루엔자 백신주는 구강 및 총배설장의 바이러스 배출을 막을 수 없어 바이러스의 전파에 영향을 줄 수 있음. 유산균의 적용으로 바이러스의 배출을 줄일 수 있다면 질병 예방에 도움을 줄 것으로 기대함
- 국가차원의 올바른 동물용 백신 기술 투자는 가깝게 위치한 거대 동물용의약품 시장 중국에 국내 제조사 제품 수출 가능성을 향상시킴
- 현재 산업동물의 다양한 질병을 국가차원에서 방제하기 위해 관납 백신을 공급하고 있으나 공급된 백신의 품질에 대한 사용자의 feedback이 적절히 이루어지지 못했음

- 본 연구는 사용자에게 대한 국내 백신 제조사의 feedback 차원으로서, 경제성과 효율성을 동시에 추구하여 관납 백신의 신뢰 상승을 기대함

제 2 절. 개발 결과의 활용 방안

1. 기술 이전

- 국내 기업(유한회사 나루)에 본 과제를 통하여 개발된 항살모넬라능 유산균 사료첨가제 제조 공법, 오일 면역증강제 제조 공법, 유산균 면역보조제 제조 공법을 기술 이전 하였음.
- 향후 (주)CTCVacc, (주)고려비엔피 등 국내 백신회사와 연계하여 항원별로 최적화된 오일 면역증강제 개발 기술 등을 지속적으로 기술이전 해나갈 계획임.

2. 제품화

- 현재 유산균 사료첨가제와 자체 개발 오일면역증강제의 시제품은 완성되어 있으며, 야외 시험 등을 완료하여 검역본부 허가 절차를 밟고 있는 단계임.
- 면역증강제의 국산화를 통한 경제성 있는 백신 생산으로 효율적인 가금 핵심질병 방제에 기여하여 가금 산업 전반의 생산성 향상에 기여할 것임.
- 국내 동물용백신 제조사의 자체 오일 면역증강제 생산으로 해외 제품 의존도를 줄이고, 역 수출의 발판 기회
- 유산균을 이용한 면역증강제의 생산 및 제품화 실시

3. 후속연구

- 본 과제에서 도출된 유산균 면역증강제의 안전성을 보완하여 가금용 백신 이외에 양돈 또는 반려동물의 불활화 백신에 확대 적용시도
- 인플루엔자와 살모넬라 외에 유산균 사료첨가제를 적용할 수 있는 주요 동물 질병 탐색 및 발굴
- 향후 사업화를 위해 필수적인 시제품 대상 안전성, 효능, 안정성 테스트 및 야외 임상 시험 수행 (종료 후 1년 내 수행 예정)
- 사업화 진행 시 제품의 지속적인 성능 유지를 담보할 수 있는 Quality Control 시스템을 구축

붙임. 참고문헌

1. Influenza other respi viruses, 2009
2. Fourth Report on the Global Programme for the Prevention and Control of HPAI
3. Eggert D, Swayne DE. Single vaccination provides limited protection to ducks and geese against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.* 2010 Dec;54(4):1224-9.
4. CDC, MMWR, 2009
5. Swayne et al., Avian influenza
6. Juliette Ben Arous et al., Montanide™ ISA 71 VG: A robust and flexible adjuvant formulation for potent and stable poultry vaccines Egg-Broiler. 2013
7. J. Ben Arous et al., Reduction of Newcastle disease vaccine dose using a novel adjuvant for cellular immune response in poultry, *Procedia in Vaccinology* 7 (2013) 28 – 33
8. Gabr F. El-Bagoury et al., Comparative evaluation of different inactivated Rift valley fever virus vaccine adjuvanted with montanide oil ISA 61 VG, montanide oil ISA 201 VG, and aluminum hydroxide gel *BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNAL*, VOL. 29, NO. 1:224-228
9. Ehab El-Sayed Ibrahim et al., Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine *Veterinary World* 8(10): 1189-1198
10. A. Klimka et al., Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in immunization Against *S. aureus* Infection of Mice, *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015, 81, 291-297
11. Sébastien Deville et al., Montanide™ adjuvants for stimulation of cellular immune response in FMD vaccines, SEPPIC
12. Jeong-Hwa Shin et al., Assessment of the safety and efficacy of low pathogenic avian influenza (H9N2) virus in inactivated oil emulsion vaccine in laying hens. *J Vet Sci* 2016, 17(1), 27-34
13. R. Droual et al., Investigation of Problems Associated with Intramuscular Breast Injection of Oil-Adjuvanted Killed Vaccines in Chicken. *Avian Diseases*, Vol. 34, No. 2
14. Gabriela Perdigón et al., Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* (2001) 2(1): 27-42.
15. Eun-Soo Sohn et al., A Current Research Insight into Function and Development of Adjuvants, Immune network

주 의

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