

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농식품기술융복합 창의인재 양성사업2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004209-01

미생물의 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술 개발

2022.11.14.

주관연구기관 / (주)비알디코리아

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물의 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술 개발”(개발기간 : 2020. 1. ~ 2022. 1.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 11. 14.

주관연구기관명 : 김 학 관 (대표자) (인)
BRD Corp.
Antonio Kim / CEO

주관연구책임자 : 김 학 관

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급			
										일반[■], 보안[]			
중앙행정기관명			농림식품기술기획평가원			사업명		사업명		농식품기술융복합 창의인재 양성사업			
전문기관명 (해당 시 작성)						내역사업명 (해당 시 작성)							
공고번호						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
						연구개발과제번호				IPET120003-2			
기술분류	국가과학기술 표준분류		1순위 소분류 코드명	50 %	2순위 소분류 코드명	30 %	3순위 소분류 코드명	20 %					
	농림식품과학기술분류		1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)			국문				영문						
연구개발과제명			국문		미생물의 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술 개발		영문		Application of competitive microbial stress on swine respiratory disease control				
			영문										
주관연구개발기관			기관명		㈜비알디코리아		사업자등록번호		621-86-15681				
			주소		화성시 동탄대로 21길 10 더퍼스트타워 1406호		법인등록번호		131111-0432870				
연구책임자			성명		김학관		직위		대표이사				
			연락처		직장전화		휴대전화						
					전자우편		국가연구자번호		12525314				
연구개발기간			전체		2020. 01. 29 - 2022. 01. 28(2년)								
			1차년도		2020. 01. 29 - 2021. 01. 28(1년)								
			2차년도		2021. 01. 29 - 2022. 01. 28(1년)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발비 외			
		연구개발비		연구개발비		지방자치단체 기타()				지원금			
		현금		현금		현물		현금		현물		합계	
총계		150,000		5,000		50,000							
1차년도		75,000		2,500		22,500							
2차년도		75,000		2,500		22,500							
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)			기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		
공동연구개발기관											비고		
위탁연구개발기관											역할		
연구개발기관 외 기관											기관유형		
연구개발담당자 실무담당자			성명		이나라		직위		선임연구원				
			연락처		직장전화		070-7601-3074		휴대전화				
		전자우편			rnd@brdc.biz		국가연구자번호		11435492				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 01월 28일

연구책임자: 김학관 (인)

주관연구개발기관의 장: 김학관 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

BRD Corp.

Antonio Kim / CEO
BRD Corp.

Antonio Kim / CEO

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		농식품기술융복합 창의인재 양성 사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		IPET120003-2	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		미생물의 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술 개발					
전체 연구개발기간		2020.01.29.~2022.01.28					
총 연구개발비		총 200,000천원 (정부지원연구개발비: 150,000천원, 기관부담연구개발비 : 50,000천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[■] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		돼지 호흡기 내 정주하고 있는 세균(병원균 및 이를 저해할 수 있는 균주)이 생존 경쟁을 위하여 병원성 세균을 저해하는 균주를 탐색하고 이를 활용하기 위한 연구 방안 모색				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> - 미생물들이 같은 공간에서 영역권 확장(생존)을 위하여 대사산물을 발현하는 균주 확보를 위하여 기초적인 연구가 필요 - 이를 위하여 돼지 호흡기 내 존재하는 미생물을 분리하고 활용하기 위한 연구가 목표 - 백신에 의한 예방법 등이 사용되고 있지만 60-80%정도의 항체 생성율이 나타남에 따라 질병 억제가 완벽하지 않고, 또한 농장 환경에 따른 변수에 대한 질병은 예방이 어려움 - 기존 백신의 방어력 한계와 항생제의 내성 문제가 발생 - 미생물의 경쟁 스트레스를 활용하여 이상의 문제점들을 해결하고 내성 문제가 없는 원료를 개발하고자 함 - 질병이 발병하는 부위에서 세균에 의해 발병되는 질병의 병원체를 타겟으로 특이적 선택적으로 질병을 억제하는 기술 (<i>Actinobacillus</i> spp. 목표) - 호흡기계에 상주하고 있는 균을 선별하여 질병을 발현하는 균주를 억제하는 방법과 이를 활용하기 위한 방법에 대한 연구 - 호흡기 내 같은 공간에서 존재하는 모든 미생물은 경쟁하면서 생존 - 질병을 유발하는 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 존재하는 미생물자원 활용 				
	1차년도	목표	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 호흡기 내 균주를 확보하고, 분리된 균주 중 질병 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 상재균 선별 - 목표 질병 관련 균주 효능 확인 				
	내용	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 3개 농장에서 확보한 폐에서 균주 분리 완료 - 균주 선별 및 특성조사 - 분리 균주의 동정(분석의뢰) 완료 					

2차년도	목표	<ul style="list-style-type: none"> - 호흡기 질병을 target 으로 하는 균주 확보 - 효능 확인법 확립 - 1차년도에 대한 연속적인 연구 진행 - 세균성 호흡기 질병에 효능이 있는 균주의 대사산물 확보 및 정량법 확립 - 직접 효능 확인 및 보존 기간별 효능 확인 - 제품화 가능성에 대한 확인
	내용	<ul style="list-style-type: none"> - 1차년도에 확보한 균주에 대한 대사산물 확보 - 균주가 분비하는 대사산물에 대한 정량법 확인 - 목표 병원성 미생물의 최소 저해농도 확인 - in -vivo 실험을 통한 안전성 및 효능 확인(분석의뢰) - 보관안정성 확인 - 활용 가능성 및 방법에 대한 검토

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 호흡기 내 균주 확보 : 3개 농장에서 확보한 폐에서 균주 screening(43종 분리) : 목표질병 균주 선정완료(2종) : 목표질병 균주를 저해 할 수 있는 상재균(유용미생물) 선별(2종) - 균주 특성조사 및 동정(43종 sequencing 완료) - 목표 질병 관련 균주 효능 확인 - 유용미생물 대사산물의 정량법 확인 - 목표 질병 미생물 저해 농도 확인 - 동물실험을 통한 효능 및 안전성 확인(in-vivo test 진행) - 대사산물의 보관안정성 확보
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> - 과제 종료 이후 추가 실험을 통해 세균성 흉막폐렴균에 문제가 되고 있는 다른 타입의 목적균주(현재는 농장에서 분리한 APP 2, 5형에 대해 과제 운영)에 대한 효능을 확인하여 활용도의 스펙트럼을 넓히고자 함 - 당 연구에 대해 천연 치료제의 형태로 손쉽게 사용할 수 있는 시제품의 형태로 개발하여 사용된다면 돼지의 호흡기 질병에 도움이 되어 생산성 향상에 큰 기여를 할 것으로 예상됨 - 위와 같은 추가 활용을 위한 연구가 수반 된다면 웰빙 트렌드에 적합한 축산물 생산을 통한 소비자 만족을 예상함
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
		2							30			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	돼지 호흡기 질병		경쟁미생물		대사산물		박테리오신					
영문핵심어 (5개 이내)	swine-respiratory disease		competitive microbial		Metabolite		Bacteriocin					

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 개요

- 돼지 호흡기 내 정주하고 있는 세균(병원균 및 이를 저해할 수 있는 균주)이 생존 경쟁을 위하여 병원성 세균을 저해하는 균주를 탐색하고 이를 활용하기 위한 연구 방안 모색
- 미생물들이 같은 공간에서 영역권 확장(생존)을 위하여 대사산물을 발현하는 균주 확보를 위하여 기초적인 연구가 필요
- 이를 위하여 돼지 호흡기 내 존재하는 미생물을 분리하고 활용하기 위한 연구가 목표
- 백신에 의한 예방법 등이 사용되고 있지만 60-80%정도의 항체 생성율이 나타남에 따라 질병 억제에 완벽하지 않고, 또한 농장 환경에 따른 변수에 대한 질병은 예방이 어려움
- 기존 백신의 방어력 한계와 항생제의 내성 문제가 발생
- 미생물의 경쟁 스트레스를 활용하여 이상의 문제점들을 해결하고 내성 문제가 없는 원료를 개발하고자 함
- 질병이 발병하는 부위에서 세균에 의해 발병되는 질병의 병원체를 타겟으로 특이적 선택적으로 질병을 억제하는 기술 (*Actinobacillus* spp. 목표)
- 호흡기계에 상주하고 있는 균을 선별하여 질병을 발현하는 균주를 억제하는 방법과 이를 활용하기 위한 방법에 대한 연구
- 호흡기 내 같은 공간에서 존재하는 모든 미생물은 경쟁하면서 생존
- 질병을 유발하는 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 존재하는 미생물자원 활용

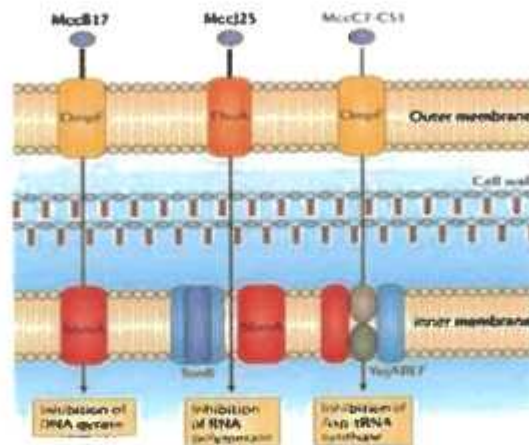
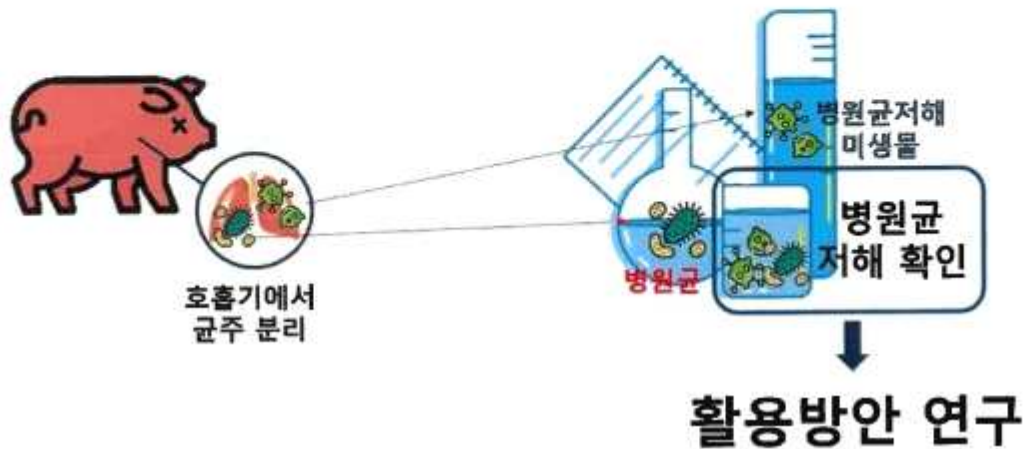


그림 1. 질병을 발현하는 균주를 억제하는 균주 대사산물의 작용기작 예시

2) 연구개발과제의 목표

- 농장에서 확보한 돼지 호흡기에서 균주를 선별하고 활용하기 위한 균주 동정 및 특성 조사 진행

- 동정이 완료된 분리 균주 중 목표질병 (돼지홍막폐렴)을 유발하는 균주 선정
- 돼지 호흡기 내에서 분리한 병원체를 저해할 수 있는 상재균 선별
- 목표 질병 균주를 저해 할 수 있는 상재균의 효능 확인
- 상재균의 대사산물에 대한 정량법 확립
- 목표 질병 균주의 저해 농도 확인
- 상재균의 대사산물을 실험동물을 활용하여 효능 및 안전성을 검증
- 시제품 제작을 통한 사업화 가능성 확인

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2.1. 연구개발과제 수행

○ 돼지 호흡기 내 균주 screening

- 4개 농장에서 폐사된 돼지의 폐를 확보 (용인, 당진, 아산, 홍성 농장에서 분리)
- 확보된 폐의 여러 부분의 검체를 채취하여 saline을 혼합하여 분쇄
- 폐의 특성상 산소의 유입에 노출된 조건으로 호기성 균주에 대하여 분리 진행(통성혐기성 유산균 포함)
- TSA(Tryptoc spy agar), MRS(Lactobacilli MRS), NA(Nutrient Agar) 배지를 이용하여 각 검체들을 희석 후 도말
- 다양한 균주가 확인된 배지에서 각기 다른 colony 개체를 순수배양 진행함



그림 2. 균주 분리에 사용한 폐 사진

○균주 특성 조사

- Screening 과정에서 분리한 균주를 대상으로 선행연구되어 있는 자료 검색을 통한 특징 조사
- 목표균주를 저해할 수 있는 상재균의 효소활성을 API zym kit를 활용하여 확인

○ 돼지 호흡기 내 균주 관련 균주 동정(sequencing)

- 16S rRNA Universal Primer 27F-1492R을 사용하여 해당 유전자를 증폭시킨 뒤, Sequencing을 진행
- 해당 Rawdata를 획득하여 Sequence를 Alignment하여 그 Sequence를 NCBI Blast를 통해, 폐에서 분리한 균주들을 identification함.

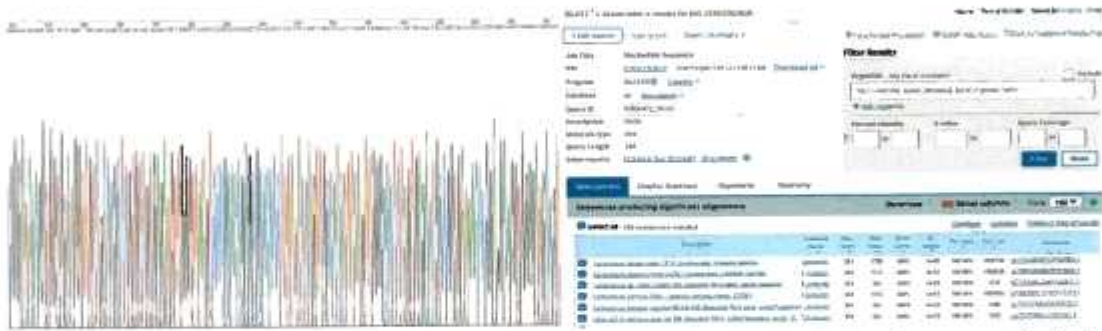


그림 3. 돼지 폐에서 분리한 균주들의 Sequence Alignment 과정 및 Blast 결과(예시)

○ 질병 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 상재균 선별

- 선행 연구되어 있는 결과를 참고하여 돼지의 폐에 상재 하고 있는 흉막폐렴을 발현하는 병원성 미생물을 추가 농장으로부터 야외균주 확보
 - 기 확보된 야외분리균주 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP)를 목표 균주 설정
 - 각 폐에서 분리 된 균주를 Sequencing 의뢰를 통해 결과를 확인
 - 목표균주를 저해 할 수 있는 균주를 선정
- : 폐(서식지)를 공유하여 상호경쟁 관계에 있을 것이라 추정되는 균주들을 폐에서 분리하여, 그 중 Pyocin을 생산한다고 알려진 *Pseudomonas aeruginosa* (PA)를 유용미생물로 선정

○ 목표 질병 관련 균주 효능 확인

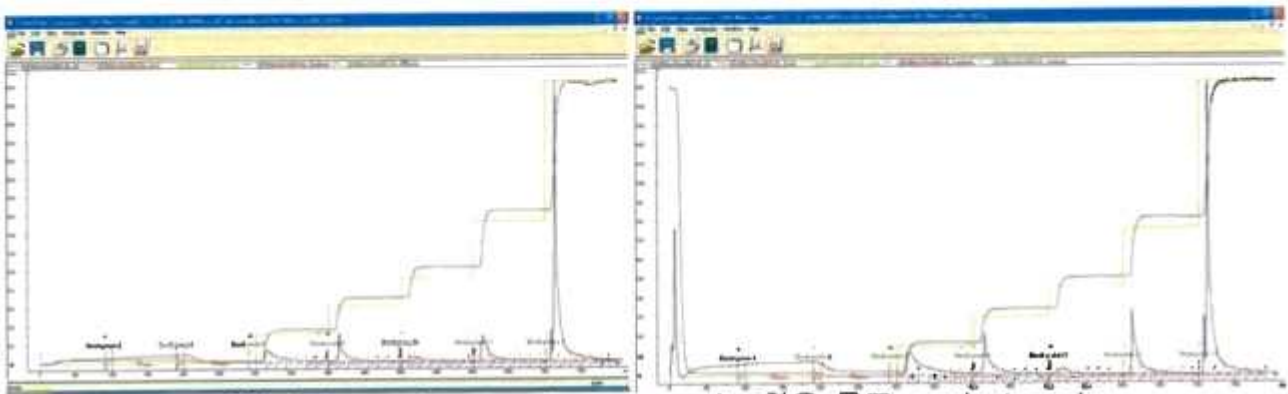


그림 4. Ion-exchange chromatography 활용 목표 product peak

- 균주배양액에 대한 호흡기 질병 유발 균주(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 용균 효능 확인을 위해 FPLC를 활용하여 유효물질이 있는 fraction 회수
- 농축 과정을 통해 시료를 준비 하고 효능의 유무를 실험
- *Pseudomonas aeruginosa* 가 생산하는 대사산물(Pyocin)의 효능을 확인하기 위하여 항균 활성 조사를 진행함
- 항균활성 조사

1. 실험 대상 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) glycerol cell stock을 10 ml의 TSBY (TSB broth, 0.6% yeast extract, 10 µg/mL NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)) 배지에 1:1000 비율로 접종한 후 overnight incubation (37°C, 5% CO²).
2. Clean bench에서 1 ml의 O/N bacterial culture를 준비된 BHI-NAD plate (Brain-Heart infusion broth, 10 µg/mL NAD) 에 도말하여 건조될 때까지 방치
3. 37°C, 5% CO² incubator에서 4~7시간 배양
4. BHI-NAD plate에 APP 균이 자란 것을 확인한 후, pyocin 시료 5~10 µl spotting 실시 (대조군으로

TN50 buffer를 사용)

5. Clean bench에서 약 10분간 건조 후, 37°C, 5% CO2 incubator에 1시간 배양 후 clear zone 형성 유무 확인

○ 대사산물 정량법 확인

- 아래에 첨부한 참고 문헌을 활용하여 정량법 진행

1) Kageyama, et. al. 1964. Studies of a Pyocin. III. Biological Properties of the Pyocin. J. Biochem. 55:59-64

2) D. Scholl, et. al. 2008. Antibacterial Effect of R-type Pyocins towards Pseudomonas aeruginosa in a Murine Peritonitis Model. Antimicrob. Agents Chemother. 52(5):1647-1652

- 목표균주를 이용한 항균 활성 시험 방법으로 진행함

1) 예비시험

1. 시험 대상 Pseudomonas aeruginosa (PA) 균주 (INT-PA05-03, intron bio 분양) glycerol cell stock을 10 ml의 TSB에 1:1000 비율로 접종한 후 overnight incubation (37°C).
2. Clean bench에서 100 µl의 O/N bacterial culture를 10 ml의 새로운 TSB에 접종하여 incubation (37°C).
3. A600 값이 대략 0.5~1.0 정도 되었을 때, 5 ml 가량을 cell harvest (7,000 rpm, 5 min)
4. 1 ml의 TN50 buffer로 pellet suspension 후, cell harvest (wash step).
5. 4의 과정을 반복 (총 2회 wash).
6. 1 ml의 TN50 buffer로 pellet suspension 후 A600 값 측정.
7. A600 값을 기준으로 하여 PA 균주가 각각 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 CFU/100 µl가 되게끔 희석하여 두 세트(대조군 1, 시험군 1)로 1.5 ml tube에 준비
8. 단계 7에서 준비한 시료 중 한 세트에는 pyocin 원액을 100 µl씩 (test), 또 다른 세트에는 TN50 buffer를 100 µl씩 첨가 (control)하여 vortexing 후 37°C incubator에서 40분 incubation.
9. 단계 8의 시료를 각각 serial dilution하여 TSA plate에 2장씩 spreading 후, CFU 계산. 10. Control 대비 test 처리 시료의 colony가 적절히 차이 (약 100~1,000개의 CFU)가 나는 PA 균주의 희석 배수 결정 후 본 시험 진행.

2) 본시험

1. '예비시험'의 단계 1에서 단계 6까지의 과정을 통해 test 균주를 준비한 후, A600 값 측정.
2. A600 값을 기준으로 하여 PA 균주가 '예비시험'에서 결정한 CFU (/100 µl) 가 되게끔 희석하여 적절한 개수의 시료 (단계 8 참조)를 준비.
3. Pyocin 원액 시료 및 pyocin 희석 시료 [$1/5$ (또는 $1/10$)씩 serial dilution한 시료]를 준비.
* Serial dilution의 단계수는 pyocin 양에 따라 경험적으로 준비해야 할 필요가 있으며, 처음 시도시에는 약 4~5 단계 정도의 serial dilution 시료를 준비 (약 $\sim 1/3,125$)
4. 단계 7에서 준비한 PA 균주의 시료에, 단계 8에서 준비한 pyocin 시료들 및 control로 TN50 buffer를 100 µl씩 각각 첨가하여 vortexing 후 37°C incubator에서 40분 incubation.
5. 단계 9의 시료를 각각 serial dilution하여 TSA plate에 2장씩 spreading 후, CFU 계산.
6. 하기 계산식에 따라, active한 pyocin 분자수 계산. * 정확성을 더하기 위해 pyocin 원액 처리 시료와 pyocin 희석액 처리 시료의 active한 pyocin 분자수를 각각 계산하여 비교하는 것이 좋음.

* Pyocin 원액 처리 시료의 CFU/ml: P, TN50 buffer 처리 시료의 CFU/ml: C

① $(P/C) = \text{survivors fraction } (S)$

② $m = -\ln(S)$, (m은 bacteria cell 하나당 붙은 pyocin의 수)

③ $m \times C$ 시료의 CFU (/ml) = active pyocin particles의 수 (/ml)

→ Active pyocin particles의 수 (/ml) = C 시료의 CFU $\times -\ln$ (P 시료의 CFU/C 시료의 CFU)

Ex) Pyocin 원액 처리 시료의 CFU/ml 수 (P): 5×10^7

, TN50 buffer 처리 시료의 CFU/ml 수 (C): 1×10^8 ① $P/C = 0.5$

② $-\ln(S) = 0.693$

③ $0.693 \times (1 \times 10^8) (C) = 6.93 \times 10^7/\text{ml}$ 의 active pyocin 분자가 존재

* 상기 계산식은 기존 문헌 보고1에서 참고한 것으로 여러 논문들이 해당 계산식을 참고하여 pyocin의 분자수를 계산하고 있음.

○ 보관안정성

- 생산된 Pyocin 중 초기 생산값이 확인 된 냉장보관시료를 대사산물 정량법 확인 방법을 활용하여 보관안정성을 수치화 함
- 냉장보관 된 Pyocin 의 3, 6, 9개월 시료를 선택하여 초기 값대비 보관안정성률을 환산함

○ 마우스 in-vivo 실험을 활용하여 효능 검증

- 별첨 항목에 첨부

○ 시제품 제작

- 파우더 형태

1. 동결건조 과정

1.1. 목표 질병 관련 균주 효능 확인 과정에서 회수한 유효 Fraction 회수액을 사용함

1.2. 회수액의 pH를 6.5 수준으로 조정

1.3. 회수액에 Skim milk를 20% 혼합하여 완전히 용해

1.4. 동결건조 조건

: -40°C 에서 30시간 수행 후 10°C 까지 20시간에 걸쳐 변경 후 동결 완료 까지 유지

1.5. 동결건조 완료 후 0.2mm sieve를 사용하여 분쇄

1.6. 분쇄 되 시료는 냉장 보관

2. 시제품 제작

2.1. 제품의 함량 규격에 맞게 혼합(150g 기준)

성분명	파이오신(Pyocin) 분말	Vitamin A	Vitamin E	포도당
성분량	10^6 (적량)	0.1%	0.1%	90% 이상

- 액상 형태

1. 액상 원료

- 1.1. 파이오신 배양액을 원심분리하여 균주 제거
- 1.2. PEG를 사용하여 Pyocin을 침전
- 1.3. 침전 된 시료를 용해하여 파이오신 함량 확인
- 1.4. 적정량이 되도록 파이오신을 정제수로 희석
- 1.5. pH가 6.5 가 되도록 조절
- 1.6. 준비된 파이오신 원료는 냉장보관

2. 시제품 제작

2.1. 제품의 함량 규격에 맞게 혼합(150ml 기준)

성분명	파이오신(Pyocin) 액상	Vitamin A	Vitamin E	수분(정제수)
성분량	10 ⁶ (적량)	0.1%	0.1%	90% 이상

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 산업연구인력 양성 목표 및 결과

(1) 산업연구인력 양성 목표

- ▲ 인력양성 목표 : 수의학 석사 및 산업관련 인재 양성 (4년 이내)
 - 당사가 연구할 과제에 관련하여 산업동물의 질병 진단과 치료에 대해 수의적으로 판단하고 예측할 전문적인 인력 필요
 - 연구원의 전문적 능력 계발 및 향상으로 당사 개발과제의 실현 구체화
 - 관련 대학과의 연계를 통한 석사 이상의 학위 인력을 확보하고 신규인력 교육기회를 제공함으로써 개발기술의 합리적, 기술적 시장접근
- ▲ 목표인원 : 2 명
- ▲ 인력양성 계획 :
 - 관련 학회 및 강의 참가
 - : 미생물관련 학회 참가(한국미생물생명공학회, 세포생물학회 등)
 - : 교육기관이나 학회에서 제공하는 관련 기술 및 교육프로그램 참여
 - : 연구개발 동향을 검토하여 개발기술의 독립성 확보
 - 과제의 연계성과 효율을 위하여 1차년도부터 과제 참여연구원의 석박사 과정지원
 - 학위취득 연구원의 전문지식 산업기술에 활용
 - 업계 전문가 초빙(교육멘토링)을 통해 연구인력의 동물 산업업계 동향과 연구방향, 산업화에 대한 강연 개최
 - 전문가를 활용하여 현재 연구개발 방향과 연구개발의 활용에 대한 기술의 완성도 유도
 - 신규 관련 전공자 채용을 통한 기술개발 인력 확대



그림 5. 인력양성 계획

(2) 산업연구인력 양성 결과

▲ 양성인원 : 2 명

▲ 양성과정

- 전문 인력 양성

No	양성인력	학교	학과	양성 학기
1	김산	건국대학교	수의학과 수의병리학	4
2	이나래	단국대학교	생명자원과학과 동물자원학	3

개인별 누적성적 현황

소속: 생명자원과학과 동물자원학(1기)
학년: 2021학년도 2학년 01128 학번: 3

학기	과목	점수	평점	비고
2021 1	생물학	85	B+	
	동물생리학	85	B+	
	동물생화학	85	B+	
2021 2	동물생리학	85	B+	
	동물생화학	85	B+	
	동물생리학	85	B+	
학기평균 점수: 85.00				
학기총평점: 4.50				
학기총평점: 4.50				

학번	성명	성별	생년월일	학부	학과	학년	학기	과목	점수	평점	비고
202101128	김산	남	2000.01.12	생명자원과학과	동물자원학	2	1	생물학	85	B+	
202101128	김산	남	2000.01.12	생명자원과학과	동물자원학	2	2	동물생리학	85	B+	
202101128	김산	남	2000.01.12	생명자원과학과	동물자원학	2	2	동물생화학	85	B+	
202101128	이나래	여	2000.01.12	생명자원과학과	동물자원학	3	1	동물생리학	85	B+	
202101128	이나래	여	2000.01.12	생명자원과학과	동물자원학	3	2	동물생화학	85	B+	
202101128	이나래	여	2000.01.12	생명자원과학과	동물자원학	3	3	동물생리학	85	B+	

▲ 수행연구과제와의 양성인력의 역량 강화 연계성

- 병리학에 대한 기초 및 심화 지식을 습득함으로써 유용 미생물을 활용한 기능성 물질의 분리 이후 실제 *in vivo* 실험시에 발생하는 다양한 병리, 해부학적 변화에 대한 분석 가능
- 동물 자원학에 대한 기초 및 심화 지식 습득을 통한 목적 동물의 생리적인 특성에 대한 이해와 함께 이를 기반으로한 상재균총에 대한 이해 심화
- 다양한 분야의 심화 지식을 습득함으로써 향후 실험을 통해 도출되는 결과에 대한 다양한 견해를 가진 해석이 가능

▲ 소속기업 종사자로 연구역량 제고 성과

- 문헌 자료 조사를 통한 관련 데이터 확보에 대한 체계적인 접근이 가능
- *in vitro* 실험이 아닌 실험 동물을 활용한 *in vivo* 실험 방법 도입
- 본 연구과제 수행 시 일반적인 미생물 관련 실험 이외에 차세대 염기 서열 분석법 (next generation sequencing, NGS)과 같은 최신 연구 기법의 습득을 통하여 실험 결과의 해석에 단순한 병원체에 대한 분석이 아닌 마우스의 폐에 존재하는 metagenomic에 대한 분석을 실시 가능하게 되었음

▲ 기대 효과 및 향후 인력활용 계획

- 수의 병리학 학위 과정 중 습득하게 되는 실제 목적 동물인 돼지의 폐의 정상적인 구조와 목적 질병인 돼지 흉막 폐렴균의 감염 시 나타나는 병리학적인 변화에 대한 고찰을 통하여 추후 Pyocin의 실제 사용 시 흉막폐렴균에 대한 치료 효과를 병리학적으로 판단 할 수 있으며 Pyocin의 실제 체내에서 작용되는 기전에 대한 과학적인 해석을 할 수 있을 것으로 기대

2) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○돼지 호흡기 내 균주 screening

- TSA(Tryptoc spy agar), MRS(Lactobacilli MRS), NA(Nutrient Agar) 배지를 활용하여 배양한 다양한 균주를 확인하고 각 배지에서 각기 다른 colony 개체를 순수배양 진행함
- 이를 통해 3개 농장에서 총 45개의 개체를 분리 함

○균주 특성 조사

- 돼지 호흡기에서 분리한 총 45개의 균주의 특성조사 결과 아래와 같음
- 총 45종 32종의 균주를 확인 함

번호	균주명	특징
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gram(-), 포도당 발효 가스 생성, Oxydase, 인돌 생성, 젤라틴 및 헤모글로빈 용해가능, 어류 및 양서류에서 심각하게 발생
2	<i>Bacillus cereus</i>	Gram(+), 토양, 물 등 환경에 널리 분포, penicillin에 대한 내성, Lecithinase 양성, mannitol 비분해, Voges-Prausker 양성
3	<i>Chryseobacterium montanum</i>	Gram(-), 노란색 colony, 대부분의 항생제에 내성 가짐, 토양, 식물뿌리, 오염된 토양 등에서 분리, 균혈, 폐렴, 복막염등을 일으킬 수 있음
4	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	Gram(+), 자연적으로 널리 분포, 대부분 무해, 황백색
5	<i>Enterococcus avium</i>	유산균
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	유산균, 포유류의 위에 서식, Gram(+), 포도당 발효, 극한의 알칼리에서 생존 가능 담즙산, 세제, 중금속, 에탄올, 건조에 견딤
7	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	유산균
8	<i>Escherichia fergusonii</i>	Gram(-), 암피실린, 겐타마이신 등의 항생제 내성이 높음
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram(-), 폐포파괴, 토양에서 자연적으로 발생, 농업에서 작물수확량을 증가시킴
10	<i>Kurthia gibsonii</i>	Gram(+), 바이오가스에서 분리, 병원성의 증거 없음, 육류, 우유, 토양에서 발견
11	<i>Kurthia populi</i>	Gram(+)
12	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	유산균
13	<i>Lactobacillus agilis</i>	유산균
14	<i>Lactobacillus farciminis</i>	유산균
15	<i>Lactobacillus reuteri</i>	eutericin 및 reutericyclin 을 생산, 구강건강
16	<i>Lactobacillus ruminis</i>	유산균
17	<i>Lysinibacillus sp.</i>	Gram(+), 농업토양 및 공장폐수를 포함한 여러 환경에서 분리, 병원성 증거 없음
18	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Gram(+), 식물 성장촉진 박테리아
19	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Gram(+), 원유 분해 세균
20	<i>Pediococcus stilesii</i>	Gram(+), Lactobacillus 와 유사하게 당을 젖산으로 발효, 프로바이오틱으로 사용(소시지, 치즈 및 요쿠르트 생산)
21	<i>Shewanella xiamenensis</i>	Gram(-), 샤먼지역에서 발견, 통성혐기성, 중금속 분해(생물학적 정화)
22	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Gram(+), 염료 분해능 가짐

23	<i>Staphylococcus cohnii</i>	일반적으로 인간의 피부에 존재, 항생제내성가짐, 수막염 일으키지 않음
24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	바이오필름 형성, 비용혈성, 피부 항상성을 돕고 피부 염증을 유발하는 TLR2 단백질 생성을 감소시켜 <i>P. acnes</i> 병원성 염증을 감소
25	<i>Staphylococcus equorum</i>	소시지에서 분리, 건강한 말의 피부에서 분리
26	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	반추동물에서 자발성 세균성 복막염과 관련 있음, 대장과 관련이 있음, 젖산균
27	<i>Streptococcus suis</i>	돼지에서 중요한 병원체, 수막염, 패혈증, 치명적인 질병균은 아님, 질병 발병률이 5% 미만
28	<i>Shigella sonnei</i>	세균성 이질, 오염된 물이나 음식 섭취시 감염,
29	<i>Rothia nasimurium</i>	Gram(+), 장에 존재, 위위축과 장의 화생 유발, 방선균
30	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i>	Gram(+), 화합물 분해, 생리활성 스테로이드, 아키릴산을 생산, 유해한 환경오염물질 대사(생물학적 정화)
31	<i>Wautersiella falsenii</i>	Gram(-), 혈액, 호흡기샘플 상처, 흉막액에서 분리됨, 감염은 극히 드뭄 노란색 Colony
32	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	녹농균으로 폐에 상주하며 세균성질병에대한 저항이 약해졌을 때 발병, 돼지의 폐에서 발견
33	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	돼지에서 흉막폐렴을 일으키는 전염성이 높은 병원성 미생물, 전염시 대량으로 감염

- 본 과제에 목표균주를 저해하는 균주로 사용 하는 *Pseudomonas aeruginosa*(PA1, PA2 로 표기) 균주의 효소활성도 확인

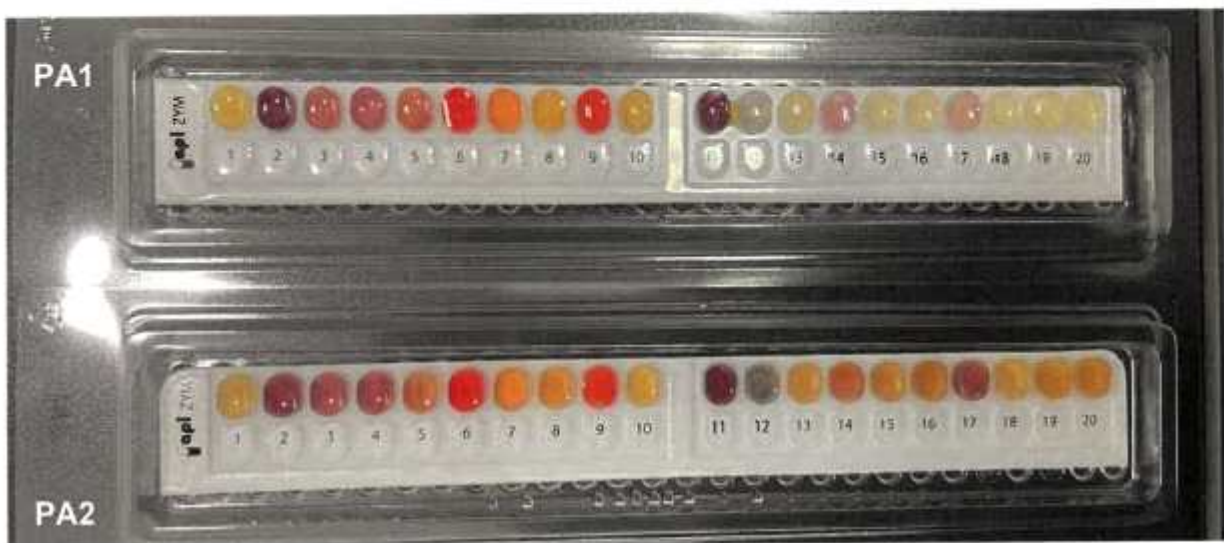


그림 6. API zym을 사용한 *Pseudomonas aeruginosa* 의 효소활성 확인

No	Enzyme Assayed For	Positive color	PA1	PA2
1	Control	Colorless	-	-
2	Alkaline phosphate	Violet	+	+
3	Esterase(C4)	Violet	+	+
4	Estrase Lipase(C8)	Violet	+	+
5	Lipase(C14)	Violet	+	+
6	Leucine arylamidase	Orange	+	+
7	Valine arylamidase	Orange	+	-
8	Crystine arylamidase	Orange	-	-
9	Trypsin	Orange	+	+
10	α -chymotrypsin	Orange	-	-
11	Acid phosphate	Violet	+	+
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Blue	+	+

13	α -galactosidase	Violet	-	-
14	β -glucuronidase	Violet	+	+
15	β -glucosidase	Blue	-	-
16	α -glucosidase	Violet	-	-
17	β -glucosidase	Violet	+	+
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	Brown	-	-
19	α -mannosidase	Violet	-	-
20	α -fucosidase	Violet	-	-

○ 돼지 호흡기 내 균주 관련 균주 동정(sequencing)

- 목표균주 확보(야외분리균주)

NO.	농장	name	sequence result
1	전북 비육돈	A-2	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
2		A-5	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>

- 4개 농장에서 확보한 폐에서 분리한 균주

NO.	농장	name	sequence result
1	용인 비육돈	P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2		P2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	당진 자돈	Dangjin_N-1	<i>Shigella sonnei</i>
4		Dangjin_N-3	<i>Enterococcus faecalis</i>
5		Dangjin_N-4	<i>Shigella sonnei</i>
6		Dangjin_N-7	<i>Escherichia fergusonii</i>
7		Dangjin_M-2	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
8		Dangjin_M-4	<i>Lactobacillus reuteri</i>
9		Dangjin_N-6-1	<i>Kurthia gibsonii</i>
10		Dangjin_M-3-	<i>Lactobacillus agilis</i>
11	홍성 비육돈	HM-1	<i>Lactobacillus farciminis</i>
12		HM-2	<i>Pediococcus stilesii</i>
13		HM-3	<i>Pediococcus stilesii</i>
14		HM-4	<i>Pediococcus stilesii</i>
15		HM-5	<i>Pediococcus stilesii</i>
16		HM-6	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
17		HN-1	<i>Shewanella xiamenensis</i>
18		HN-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
19		HN-3	<i>Kurthia gibsonii</i>
20		HN-4	<i>Enterococcus avium</i>
21		HN-5	<i>Wautersiella falsenii</i>
22		HN-6	<i>Aeromonas hydrophila</i>
23		HN-7	<i>Streptococcus suis</i>
24		아산 비육돈	AN-1
25	AN-2		<i>Kurthia populi</i>
26	AN-3		<i>Staphylococcus cohnii</i>
27	AN-4		<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
28	AN-5		<i>Bacillus cereus</i>
29	AN-6		<i>Staphylococcus arlettae</i>
30	AT-1		<i>Microbacterium paraoxydans</i>
31	AT-2		<i>Escherichia fergusonii</i>
32	AT-3		<i>Aeromonas hydrophila</i>
33	AT-4		<i>Corynebacterium aurimucosum</i>
34	AT-5		<i>Staphylococcus equorum</i>
35	AM-1	<i>Lactobacillus ruminis</i>	

36		AM-2	<i>Lactobacillus reuteri</i>
37		AM-3	<i>Lactobacillus ruminis</i>
38		AM-4	<i>Lactobacillus reuteri</i>
39		AM-5	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
40		AN-7	<i>Rothia nasimurium</i>
41		AN-8	<i>Microbacterium oleivorans</i>
42		AT-6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
43		AT-7	<i>Lysinibacillus sp.</i>
44		AT-8	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i>
45		AT-9	<i>Chryseobacterium montanum</i>

○ 질병 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 상재균 선별

- 질병 목표 균주는 전북 비육돈 농장에서 확보한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2형, 5형 야외균주 사용
- 4개 농장에서 분리한 균주 중 호흡기 내 상재균으로 사용할 균주는 위 균주 동정을 통해 목표 질병 균주를 저해 할 수 있는 *Pseudomonas aeruginosa* 로 균주를 선정 (당사의 기존 보유하고 있던 선행 연구를 통해 *Pseudomonas aeruginosa* 가 생산하는 Pyocin 이 목표 질병 균주에 효능(용균)이 작용한다는 결과 활용)

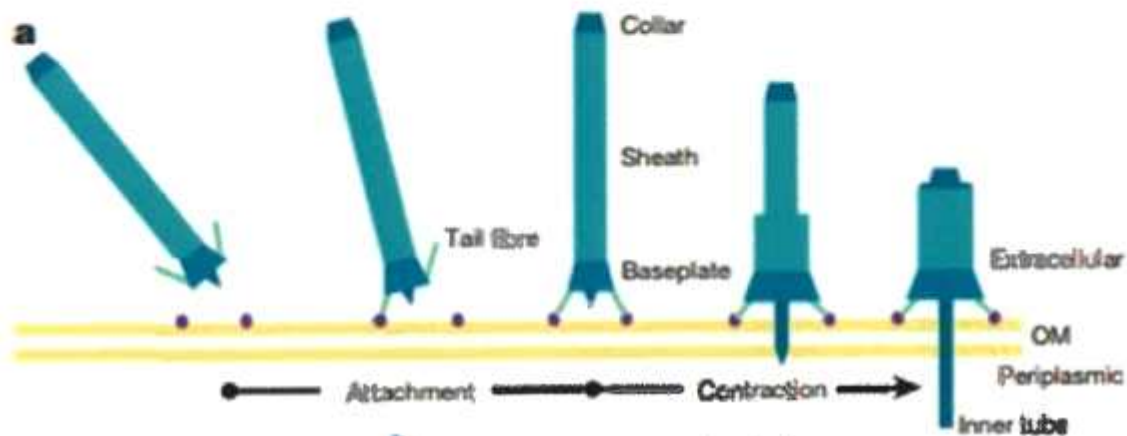


그림 7. Pyocin 의 작용방법

○ 목표 질병 관련 균주 효능 확인

- 호흡기 질병을 target으로 하는 균주 효능을 확인 선별균주가 생산하는 Product를 확보하기 위하여 Ion-exchange chromatography를 활용하여 추출
- 그림 6. 와 같이 질병유발균주에 대한 용균능이 있는 것을 확인함
- 이후 이 균주(용인 비육돈 농장에서 분리한 균주)를 선택하여 실험을 진행하는 것을 결정함



그림 8. 호흡기 질병 유발균주에 대한 저해능(용균) 확인

- 선택한 균주로 질병 목표균주에 대한 효능을 확인하였으며, 이를 산업적으로 활용하기 용이하도록 농축방법을 변경하여 예비실험을 진행하였음
- 그림 8. 와 같이 다양한 결과를 확인하였고 이 결과를 2차년도에 연속적으로 실험하여 활용하는 것으로 방법을 확정하였음

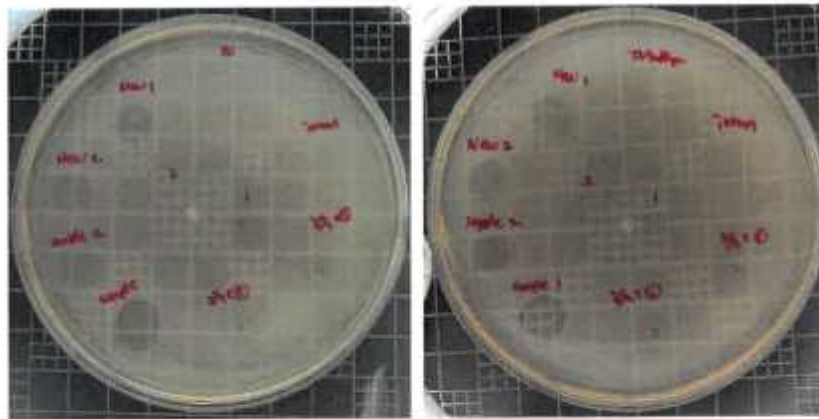


그림 9. 농축 방법에 따른 호흡기 질병 유발균주에 대한 저해(용균) 확인

○ 대사산물 정량법 확인

- 목표균주를 이용한 항균 활성 시험 방법으로 진행하였으며, 방법 내 첨부 된 식에 대입하여 값을 계산
- : 아래 값은 실제로 항균활성 시험방법을 활용하여 직접 분석한 결과를 첨부 한 것임
- : Control 생균수 값은 10^8 군에서 4.5×10^8 CFU/ml, 10^6 군에서 3.7×10^6 CFU/ml 로 확인되었으며, 아래 결과는 Control 값을 대비하여 계산함

Sample	생균수(CFU/ml)	P/C	$-\ln(s)$	Pyocin(Pyocin/ml)
1	4.5×10^5	0.15	1.8	1.8×10^6
2	3.5×10^5	0.11	2.2	2.2×10^6
3	3.5×10^7	0.08	2.5	2.5×10^8
4	2.5×10^5	0.08	2.5	2.5×10^6
5	5.0×10^5	0.16	1.8	1.8×10^6

- Pyocin 은 복합단백질로 알려져 있으며, 당사에서 개발한 Pyocin의 크기를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과 FPLC 정제에서 균주별 집중 분리되는 구간 분자량이 있는 것을 확인(정확한 분자량은 확인이 어려움)

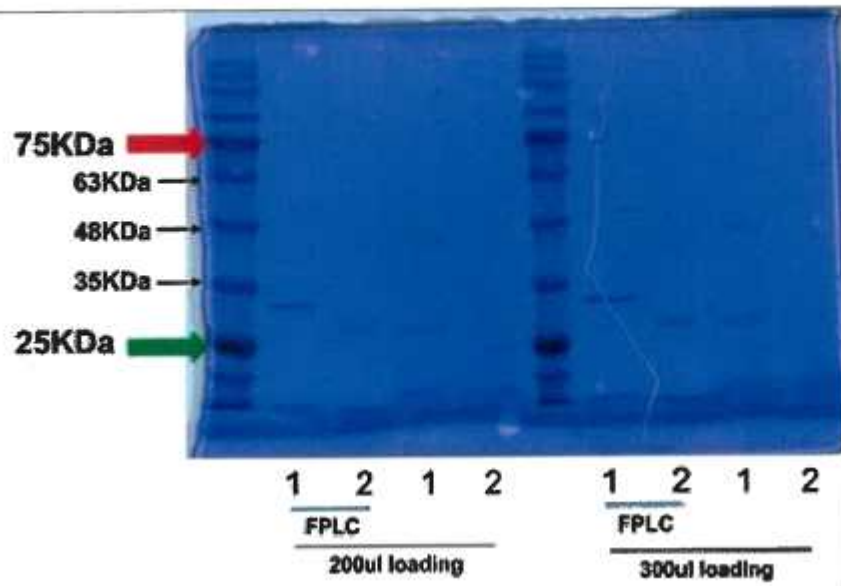


그림 10. Pyocin SDS-PAGE 실험결과

- 보관안정성
- 냉장 보관 (4℃)

	초기 Pyocin	3개월 경과 Pyocin 값	보관안정성(%)
Pyocin sample 1	5.9×10^9 Pyocin/ml	5.6×10^9 Pyocin/ml	94.9
	초기 Pyocin	6개월 경과 Pyocin 값	보관안정성(%)
Pyocin sample 2	2.5×10^8 Pyocin/ml	2.3×10^8 Pyocin/ml	92
	초기 Pyocin	9개월 경과 Pyocin 값	보관안정성(%)
Pyocin sample 3	5.8×10^9 Pyocin/ml	2.1×10^9 Pyocin/ml	36.2

: 제조 된 일자 별 초기값대비 Pyocin 의 냉장 보관 시 유지되는 정도를 대사산물 정량법을 활용하여 보관안정성을 확인 한 결과임

: 위 결과를 통해 냉장보관 시 6개월까지는 Pyocin 이 안정한 것으로 보이며, 9개월 경과시 수치상으로 많은 양이 감소 한 것으로 보이나 높은 titer(역가) 를 유지하고 있기 때문에 냉장보관시 안정하다고 판단 됨

- 시제품 제작
- 파우더 형태



파이오프로-P (PYOPRO-P)

APP 유발 홍막패렴 개선제

양돈용
바자류 미생물 유래 박테리옌
APP유발 홍막패렴 개선제
사료첨가용

1x10⁶ Pyocin/Bottle(150g)

BRD

1. 제품의 명칭 : 사료 혼합 첨가제
2. 제품의 형태 : 파우더
3. 등록성분량(1병 150g 기준)

성분명	파이오신	Vit A	Vit E	포도당
성분량	10 ⁶	0.1% 이상	0.1% 이상	90% 이상

4. 사용한 원료의 명칭 : 파이오신, 비타민A, 비타민 E, 포도당
5. 제품의 용도 : APP 유발 홍막패렴의 치료
6. 주의사항 : 냉장보관
7. 실제중량 : 150g
8. 사용방법 : 사료 100kg 에 본제품 1병(150g) 혼합
9. 유통기한 : 제조일로 부터 냉장보관 10개월 까지
10. 판매업자 : ㈜비알디코리아 경기도 화성시 동탄대로 21길 10, 더퍼스트타워 1406호
11. 동물용 의약품 첨가내역 : 해당 없음

BRD

그림 11. 시제품 (파우더 제형)

- 액상 형태



그림 12. 시제품(액상제형)

파이오프로-L (PYOPRO-L)



APP 유발 홍막페렴 개선제

양돈용
비잔류 미생물 유래 박테리옌
APP유발 홍막페렴 개선제
음수루어

1x10⁶ Pyocin/Bottle(150ml)



1. 제품의 명칭 : 음수 혼합 첨가제
2. 제품의 형태 : 액상
3. 동특성분량(1병 150ml 기준)

성분명	파이오신	Vit A	Vit E	수분
성분량	10 ⁶	0.1% 이상	0.1% 이상	99% 이상

4. 사용한 원료의 명칭 : 파이오신, 비타민A, 비타민 E, 정제수
5. 제품의 용도 : APP 유발 홍막페렴의 치료
6. 주의사항 : 냉장보관
7. 실재증량 : 150ml

8. 사용방법: 음수 100L 에 본제품 1 병(150ml) 혼합
9. 유통기한: 제조일로 부터 냉장보관 10개월 까지
10. 판매업자 : ㈜비알디코리아
경기도 화성시 동탄대로 21길 10, 더퍼스트타워 1406호
11. 동물용 의약품 첨가내역 : 해당 없음



(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	연도		계	가중치 (%)	
		1차년도 (2020-2021)	2차년도 (2021-2022)			
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허	목표(단계별)	2	2	40	
		실적(누적)	2	2	40	
	생명자원	목표(단계별)	15	15	30	5
		실적(누적)	15	15	30	5
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)	1	1	10	
		실적(누적)	1	1	10	
	제품화	목표(단계별)	2	2	2	10
		실적(누적)	2	2	2	10
	고용창출	목표(단계별)	2	1	3	10
		실적(누적)	2	1	3	10
	인력양성	목표(단계별)	1	1	2	25
		실적(누적)	2	2	2	25
	계		18	22	40	100
			19	23	40	100

- 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(무자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY-YYYY)	n단계 (YYYY-YYYY)	
1								
2								

- 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
- 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Lactobacillus amylovorus</i> BRD-D	KCCM 43387	한국미생물보존센터	2020
2	<i>Kurthia gibsonii</i> BD	KCCM 43388	한국미생물보존센터	2020
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BRD	KCCM 43389	한국미생물보존센터	2020
4	<i>Kurthia gibsonii</i> BRD	KCCM 43390	한국미생물보존센터	2020
5	<i>Aeromonas hydrophila</i> BRD-H	KCCM 43391	한국미생물보존센터	2020
6	<i>Lactobacillus amylovorus</i> BRD-A	KCCM 43392	한국미생물보존센터	2020
7	<i>Staphylococcus cohnii</i> BRD	KCCM 43393	한국미생물보존센터	2020
8	<i>Staphylococcus arlettae</i> BRD	KCCM 43394	한국미생물보존센터	2020
9	<i>Microbacterium paraoxydans</i> BRD	KCCM 43395	한국미생물보존센터	2020
10	<i>Aeromonas hydrophila</i> BRD-A	KCCM 43396	한국미생물보존센터	2020
11	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> BRD	KCCM 43397	한국미생물보존센터	2020
12	<i>Staphylococcus equorum</i> BRD	KCCM 43398	한국미생물보존센터	2020
13	<i>Microbacterium oleivorans</i> BRD	KCCM 43399	한국미생물보존센터	2020
14	<i>Staphylococcus epidermis</i> BRD	KCCM 43400	한국미생물보존센터	2020
15	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i> BRD	KCCM 43401	한국미생물보존센터	2020
16	<i>Shigella sonnei</i> BIL-01	KCCM 43421	한국미생물보존센터	2021
17	<i>Lactobacillus reuteri</i> BIL-02	KCCM 43422	한국미생물보존센터	2021
18	<i>Lactobacillus agilis</i> BIL-03	KCCM 43423	한국미생물보존센터	2021
19	<i>Lactobacillus farciminis</i> BIL-04	KCCM 43424	한국미생물보존센터	2021
20	<i>Pediococcus stilesii</i> BIL-05	KCCM 43425	한국미생물보존센터	2021
21	<i>Streptococcus gallolyticus</i> BIL-06	KCCM 43426	한국미생물보존센터	2021
22	<i>Enterococcus avium</i> BIL-07	KCCM 43427	한국미생물보존센터	2021
23	<i>Wautersiella falsenii</i> BIL-08	KCCM 43428	한국미생물보존센터	2021
24	<i>Kurthia populi</i> BIL-09	KCCM 43429	한국미생물보존센터	2021
25	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> BIL-10	KCCM 43430	한국미생물보존센터	2021
26	<i>Escherichia fergusonii</i> BIL-11	KCCM 43431	한국미생물보존센터	2021
27	<i>Lactobacillus ruminis</i> BIL-12	KCCM 43432	한국미생물보존센터	2021
28	<i>Lactobacillus reuteri</i> BIL-13	KCCM 43433	한국미생물보존센터	2021
29	<i>Rothia nasimurium</i> BIL-14	KCCM 43434	한국미생물보존센터	2021
30	<i>Chryseobacterium montanum</i> BIL-15	KCCM 43435	한국미생물보존센터	2021

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	티트리 추출물을 포함하는 돼지 흥막폐렴 예방 또는 치료용 조성물	국내	㈜비알디 코리아	2021.11 .02	10-2021- 014905 5				100%	미활용	
2	겨우살이 추출물을 포함하는 돼지 흥막폐렴 예방 또는 치료용 조성물	국내	㈜비알디 코리아	2021.11 .02	10-2021- 014905 4				100%	미활용	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√		√							√
2	√		√							√

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	파이오프로-L	2021.12	㈜비알디코리아			2020.01 -2022.01		
2	파이오프로-P	2021.12	㈜비알디코리아			2020.01 -2022.01		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	과제를 통해 얻어진 노하우를 직접 활용한 연속 연구 혹은 제품화 연구	㈜비알디코리아	2021.12.01	2,100,000원	2,100,000원

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	제품 개발	APP 유발 흥락폐렴 개선제	㈜비알디코리아			2025년 예상	10년 이상

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		과제와 연계하여 APP 유발 흥락폐렴 개선제 개발			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(천원)	500,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		-	15,000	70,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			-	1	5
-			-	-	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		현재는 사료첨가제 수준으로 연구하고 있으나, 향후 전문 동물약품으로 관련 기술의 수준을 업그레이드 할 예정에 있음			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			1차년도	2차년도	
1	농식품기술융복합 창업인재 양성사업	쥬비알디코리아	2	1	3
합계			2	1	3

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	-
		생산인력	-
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	-

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도						3	
기대 목표						3	

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2022	2				1	1	1	1			

3) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 미생물들이 같은 공간에서 영역권 확장(생존)을 위하여 대사산물을 발현하는 균주 확보를 위한 기초적인 연구 진행	○ 돼지 호흡기 내 균주 분리	○ 100
	○ 목표 질병 균주 선정 및 분리	○ 100
○ 돼지 호흡기 내 존재하는 미생물을 분리하고 활용하기 위한 연구가 목표	○ 질병 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 상재균 선별	○ 100
	○ 관련 균주 동정	○ 100
	○ 균주 특성 조사	○ 100
	○ 목표 질병 관련 균주 효능 확인	○ 100
	○ 대사산물 정량법 확립	○ 100
	○ 목표 병원성 미생물 저해농도 확인	○ 100
	○ 마우스에서의 효능 검증(효능 및 안전성)	○ 100
	○ 보관안정성 확인	○ 100
	○ 시제품 제작	○ 100

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 호흡기에 정주하고 있는 균을 활용하여 돼지 호흡기 질병을 예방 또는 개선할 수 있는 기술 개발이 목표
- 호흡기 질병을 유발하는 원인에 대해 직접적, 특이적으로 작용하여 항생제 내성이 없는 기술을 개발
- 당 연구를 통해 가축의 질병 예방 및 개선제로 개발하여 친환경축산물을 생산에 기여
- 잔류항생제의 위험과 항생제 과다 사용으로 발생하는 내성균주 문제를 동시에 해결하여 국민건강 이바지와 더불어 축산농가의 생산성 향상에 기여
- 당 연구에 대해 천연 흥막페럼 개선제로 개발하여 사용된다면 돼지의 호흡기 질병에 도움이 되어 생산성 향상에 큰 기여를 할 것으로 예상됨
- 웰빙 트렌드에 적합한 축산물 생산을 통한 소비자 만족을 도출 할 수 있을 것

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○과제 완료 후 연구계획

- 농장규모 사양실험
 - : 관련 대학과의 연계를 통한 Challenge study
 - : 개발 제품의 등록
 - : 효능 실증시험 (시장 및 국가별 별도 추진 예정)
 - : 시장 확대를 위한 대량생산체계 확립

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사	2	
	계	2	
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발	2	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치
국외논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	
	국외	
	계	
특허등록	국내	
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	상품출시	
	기술이전	
	공장개발	
제품개발	시제품개발	
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서 3) 파이오신을 돼지 흉막폐렴균 치료시험 보고서
2.	1) 2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림식품기술기획평가원부에서 시행한 농식품기술융복합 창의인재 양성사업 - 산업기반연구지원 과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림식품기술기획평가원부에서 시행한 창의인재 양성사업 - 산업기반연구지원 개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

[별첨 1]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		IPET120003-2	
사업구분	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	산업기반연구지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	미생물의 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술 개발			과제유형	개발
연구개발기관	㈜비알디코리아			연구책임자	김학관
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.01.29.- 2021.01.28	75,000	25,000	100,000
	2차년도	2021.01.29.- 2022.01.28	75,000	25,000	100,000
	계	2020.01.29.- 2022.01.28	150,000	50,000	200,000
참여기업	㈜비알디코리아				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.1.28

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
㈜비알디코리아	대표이사	김학관

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

BRD Corp.

확약	 Antonio Kim / CEO
----	--

[별첨 1]

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

- 백신 또는 항생제 위주의 기존시장 변화
: 호흡기 질병은 주로 백신을 사용하나 완전하지 못하여 추가적인 항생제 치료를 필요로 함
- 호흡기 질병을 유발하는 원인에 대해 직접적, 특이적으로 작용하여 항생제 내성이 없는 치료제 개발

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

- 2011년 하반기부터 전면 금지된 사료첨가용 항생제의 대체시장 선점
- 기존의 생균제, 효소제, 유기산제, 미네랄 및 비타민 혼합제 등의 단미사료 제품군과는 기술적 차별화
- 본 과제를 통해 사료첨가제나 동물용 의약품형태로 사용편이성 증대
- 돼지의 호흡기 질병 제어를 통한 생산성 향상
- 웰빙 트렌드에 적합한 축산물 생산을 통한 소비자 만족도 개선

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 돼지 농장의 3대 상재성 질병으로 시장에서의 요구가 매우 높아 개발과 함께 상용화가 가능할 것으로 기대

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

- 초기 과제 운영시 전문인력부족으로 인력양성 및 추가인원 영입으로 인해 연구방향에 대한 전문성이 높아졌다고 판단 됨
- 과제의 전문성과 수행도를 높이기 위하여 학계 전문가를 초빙하여 교육멘토링을 지속적으로 주최함으로써 과제의 운영의 적극적인 수행을 할 수 있었음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 보통

- 연구개발과제 당초 목표대로 지적재산권(특허출원 2건)에 대한 성과 완료
- 그 중 1건에 대해서는 출원을 완료하고 등록으로 진행하기 위하여 추가적인 심사 중

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
돼지 호흡기 내 균주 분리	10	100	호흡기 질병에 감염된 돼지 폐에서 다양한 미생물 분리 완료
목표 질병 균주 선정 및 분리	10	100	돼지 호흡기 질병(생산성에 영향을 미치는)에 치명적이라고 알려진 균주 선정
질병 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 상재균 선별	10	100	폐에서 분리한 균주 중 파이오신을 생산한다고 알려진 균주 선정함
관련균주 동정	10	100	분석 의뢰를 통하여 정확한 분리 균주의 Identity를 확인
균주 특성 조사	5	100	분리균주들의 일반적인 특성들을 문헌으로 조사하고, 파이오신을 생산하는 균주의 특성 조사
목표질병 관련 균주 효능 확인	10	100	파이오신 생산 균주의 돼지 호흡기 질병균주의 용균능 확인
대사산물 정량법 확립	10	100	용균능은 확인된 바 있으나 정확한 파이오신의 함량 분석을 확립하기 위하여 생균수 법으로 정량법을 설정함
목표 병원성 미생물 저해농도 확인	5	100	대사산물 정량법을 통해서 균주가 1:1로 작용한다는 것을 확인
마우스에서의 효능 검증	15	100	사료첨가제로 개발하기 위하여 실험동물에서 효능을 나타내는지 실험을 진행하였으며, 결과적으로 효능이 있는 것으로 확인 됨
보관안정성	10	100	파이오신이 냉장에서 6개월간 안정하다고 알려져 있으며, 직접 실험 결과 9개월 이상 안정한(효능이 있는 것) 것으로 확인 됨
시제품 제작	5	100	시제품 생산을 통하여 신제품의 가능성을 가시화 함
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 협약 초기부터 국내외 동시다발적으로 발생되고있는 COVID-19로 과제의 진행이 지연되었으나 과제 종료까지 다양한 방향으로 보완하여 완료되었음

- 연구
 - : COVID-19 및 농장 등에서 발생하는 질병 등으로 인해 농장에서 확보되어야 하는 시료들의 입고 지연으로 실험이 전반적으로 늦춰짐
 - : COVID-19 로 인한 시약의 해외입고 지연 등으로 실험의 진행이 지체되었지만 현재는 전반적인 이해와 여러 업체를 유동적으로 섭외하여 실험에 진행에 차질이 발생하지 않도록 대처하였음
- 인력양성 일정
 - : 당초 계획했던 목표에 대한 일정에 대한 조정이 불가피하게 필요한 상황이었으며, 최근 더욱 더 심해진 상황으로 인해 1차년도 계획을 2차년도로 이월해서 진행하였고, 이에 관련하여 과제 진행의 모든 일정 계획을 조정 하였음
 - : 전문인력 양성 부분에서는 학교측의 COVID-19 대처방안으로 온라인 수업을 진행하여 전반적인 인력양성에 차질이 없도록 진행하였음
 - : 교육멘토링 과정을 주최하여 연구인력들을 대상으로 경제동물의 전문지식 습득에 기여하였음
 - : 1차년도에는 학회등의 일정이 COVID-19 대부분 취소 되었으나, 2차년도에는 대부분 학회들이 온라인을 병행함으로 인해 1차년도에 비해 현재의 산업동물과 미생물 활용 동향들에 대해 충분히 습득 가능하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 과제 종료시점인 현재까지 세계적으로 유행하고 있는 바이러스 질병인 COVID-19 로 인해 연구개발에 사용되는 주요 시약 및 균주(호흡기 질병 유발균 및 저해 균주)를 얻을 재료에 대한 입고 지연으로 인해 실험의 일정이 전체적으로 지체되었음

○ 이를 해결하기 위하여 재고확보 등의 노력을 통해 과제 종료시점의 연구성과를 도출해 냄

○ 인력양성의 항목에서도 COVID-19 의 영향을 받아 1차년도에는 일정의 취소등으로 일정 진행의 어려움이 있었지만, 현재는 해당기관들의 유동적인 대처로 원만히 목표를 달성하였음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 당 연구를 통해 가축의 질병 예방 및 개선을 목적하며, 사료첨가제로 형태로 개발하여 친환경 축산물 생산에 기여

○ 잔류항생제의 위험과 항생과 작다 사용으로 발생하는 내성균주 문제에 도움이 되어 국민건강 이바지와 더불어 축산농가의 생산성 향상에 기여하는 것이 목표

○ 과제 종료 후 추가적인 실험이 필요하다고 판단 시 목적동물수준에서의 실험을 염두하고 있음

○ 현재의 생산방법을 산업적인 수준으로 증대시키기 위한 추가적인 연속 연구가 필요할 것으로 생각 됨

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	미생물의 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술 개발			
주관연구개발기관	(주)비알디코리아		주관연구책임자	김학관
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	150,000,000	50,000,000		200,000,000
연구개발기간	2020.01.29.~2022.01.28			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체실시) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1. 돼지 호흡기 내 균주 분리	4개 농장에서 돼지 폐를 확보하여 분리 완료
2. 목표 질병 균주 선정 및 분리	돼지 흉막폐렴균을 유발하는 균주를 확보
3. 질병 균주를 저해할 수 있는 호흡기 내 상재균 선별	돼지 폐에서 분리 한 균주 중 파이오신을 생산한다고 알려져 있는 균주를 선정완료
4. 관련균주 동정	분석의뢰를 통하여 동정완료
5. 균주 특성 조사	기초조사 및 API kit 로 균주의 특성 확인
6. 목표질병 관련 균주 효능 확인	파이오신 생산균주의 용균능 확인 완료
7. 대사산물 정량법 확립	대사산물 정량법 설정 완료
8. 목표 병원성 미생물 저해농도 확인	정량법을 통해 직접적 확인
9. 마우스에서의 효능 검증	동물실험을 통해 체내 주입시 직접작용함을 확인
10. 보관안정성	약 9개월간 냉장보관시 안정한 것을 확인
11. 시제품 제작	제품화의 가시화 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용액) (백만원)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T 기 단 위	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문	S C I			비 S C I	학 술 발 표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건		
가중치	40				10		10			10					25			5	
최종	2				1		2			3					2			30	

목표															
당해 년도	목표	2			1	2		3					2		30
	실적	2			1	2		3					2		30
달성률 (%)		100			100	100		100					100		100

4. 핵심기술

구분	핵심기술명														
①	돼지 호흡기 내 흉막폐렴을 유발하는 균주와 공존하여 존재하는 균주중 파이오신을 생산하는 미생물을 활용														

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과														
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> ○ 질병이 발병하는 부위에서 세균에 의해 발병되는 질병의 병원체를 타겟으로 특이적 선택적으로 질병을 억제하는 기술을 활용하여 제품화 개발 예정 ○ 잔류항생제의 위험과 항생제 과다 사용으로 발생하는 내성균주 문제를 동시에 해결 ○ 당 연구에 대해 천연 흉막폐렴 개선제로 개발하여 사용된다면 돼지의 호흡기 질병에 도움이 되어 생산성 향상에 큰 기여를 할 것으로 예상됨 														

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표									연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화			기술인종	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구활용등) (명)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T 평가기준	건수	기술료	제품화	매출액	수출액		고용 창출	투자유치	논문 S C I			비 S C I	초판권 I F	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건
가중치	40				10		10			10						25		5
최종목표	2				1		2			3						2		30
연구기간	2				1		2			3						2		30

다성실적																			
연구종료후																			
성과장출	1			1		2			3										
계획																			

[별첨 3]

파이오신 돼지 흥막폐렴균 치료시험

농식품기술융복합 창의인재 양성사업
미생물 경쟁 스트레스를 활용한 돼지 호흡기 질병 제어기술개발

의뢰자 : (주)비알디코리아

주소: 경기도 화성시 동탄대로 21길 10, 더퍼스트타워 1406호

연구책임자 : 세명대학교 동물바이오헬스학과 교수 문형준

시험기관 : 세명대학교 동물임상연구센터

주소 : 충북 제천시 세명로 65 세명대학교

시험시작일 : 2021. 10. 20

시험종료일 : 2021. 12. 15

제출문

(주) 비알디코리아에서 세명대학교학교에 의뢰한 “파이오신 돼지 흥막폐렴균 치료시험”의 보고서를 이와 같이 제출합니다.

연구책임자: 세명대학교 동물바이오헬스학과 교수 문 형 준



목차

1. 목적	1
2. 재료 및 방법	1
2.1. 시험대상 물질	1
2.2. 공시균주	1
2.3. 실험동물 및 실험군 구성	1
2.4. 시험방법	2
3. 결과	3
3.1. 호중구 수치	3
3.2. Cytokine 수치	4
3.3. 조직병리 검사 결과	8
4. 결론	9

1. 목적

마우스 모델을 이용한 파이오신 경구 및 비강 투여를 통한 돼지 흉막폐렴균 치료 유효성 평가

2. 재료 및 방법

2.1. 시험대상 물질

#	물질명 (농도)
1	파이오신 $10^{7.0}/100\mu\text{l}$

2.2. 공시균주:

Actinobacillus pleuropneumoniae type 2 : 10 LD₅₀($2 \times 10^{7.0}$ CFU/100 μl)

Actinobacillus pleuropneumoniae type 5 : 10 LD₅₀($2 \times 10^{8.0}$ CFU/100 μl)

2.2.1. 실험동물: 마우스 (C57BL/6)

2.2.2. 시험군 구성

	Post infection							total
	0	6	12	18	24	48	72	
Negative	5	5	5	5	5	5	5	35
Pyocin I.N	5	5	5	5	5	5	5	35
Pyocin P.O	5	5	5	5	5	5	5	35
APP 2 형 + 무처리	5	5	5	5	5	5	5	35
APP 2 형 + Pyocin I.N	5	5	5	5	5	5	5	35
APP 2 형 + Pyocin P.O	5	5	5	5	5	5	5	35
APP 5 형 + 무처리	5	5	5	5	5	5	5	35
APP 5 형 + Pyocin I.N	5	5	5	5	5	5	5	35
APP 5 형 + Pyocin P.O	5	5	5	5	5	5	5	35
total	45	45	45	45	45	45	45	315

PO: per Oral / IN: intra Nasal

2.3. 시험방법

2.3.1. 공격접종 및 시험물질의 투여

Ether를 이용하여 마우스를 마취 시킨후 돼지 흉막폐렴균을 마우스 비강으로 접종 후 10분후 파이오신을 마우스 비강 및 경구로 투여한다.

파이오신의 투여 농도는 $10^{7.0}/100\mu\text{l}$ 농도로 진행.

파이오신 투여 후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 48시간 간격으로 각 시험군을 CO₂ 가스를 이용하여 안락사 시킨 후 폐를 채취한다. 폐를 채취하여 조직내 Cytokine농도 측정

2.3.2. Cytokine 측정

폐에서의 염증관련 인자를 판단하기 위하여 BALF를 채취하여 배양 후 염증성 사이토카인인 TNF-a, IL-6와 염증억제성 사이토카인인 IL-10 농도를 ELISA 방법으로 측정한다.

2.3.2.1. 병리조직검사

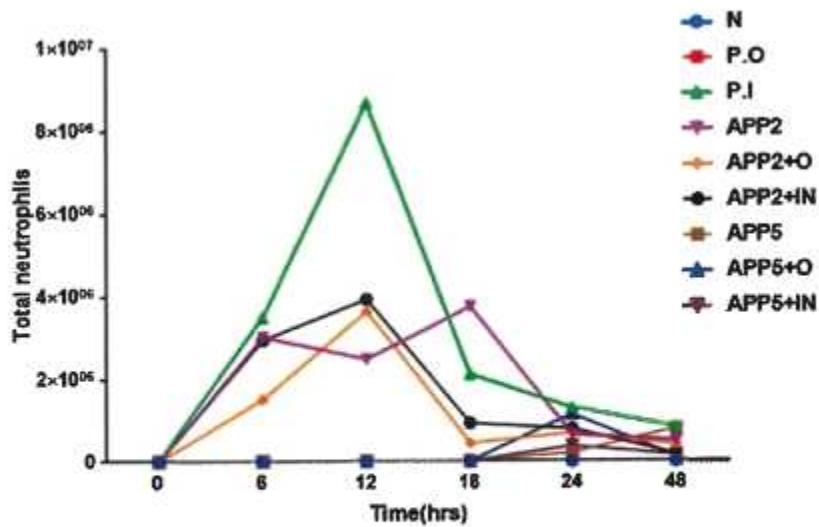
채취한 폐를 10% 중성포르말린으로 고정후 H&E 염색을 통하여 병리조직학적 검사를 진행하였으며 폐병변지수를 수치화 하였다.

3. 결과

3.1. 호중구 수치

3.1.1.1.1.1.1.1. BALF에서 호중구 수치를 확인한 결과 음성대조군 (N), APP5 공격접종군 (APP5, APP5+O, APP5+IN), 파이오신 경구 투여군 (PO)에서는 낮은 수준의 호중구 수치가 관찰되었으나, 나머지 시험군에서는 6시간에서 18시간 사이에 호중구 수치의 상승이 관찰되었다.

3.1.1.1.1.1.1.2. 특히 파이오신 비강 투여군 (P.I.)에서는 세균을 공격접종하지 않았음에도 불구하고 12시간째에 전체 시험군 가운데 가장 높은 호중구 수치를 보이는 것이 확인되었다 (그림1).



3.1.1.1.1.1.1.3.

그림1 각 시험군의 BALF에서의 호중구 수치 변화

3.1.1.1.1.1.1.1.4. APP2형과 APP5형에 대한 치료효과를 비교한 결과 그림2와같이 APP2형 공격접종군에서 BALF내 호중구 수치가 증가하는 것 (>2x10⁶)을 확인할 수 있었다. APP5형공격접종군에서는 호중구 수치가 <1x10⁶으로 상대적으로 낮게 확인되었다.

3.1.1.1.1.1.1.1.5. 유의적인 수준의 호중구 수치변화를 보인 APP2형 접종군에서 18시간째에 파이오신을 투여한 그룹에서 호중구 수치 감소가 확인되었다. 24시간이후에는 치료하지 않은 그룹에서도 호중구 수치의 감소가 확인되었다.

3.1.1.1.1.1.1.1.6. 파이오신 단독 비강 접종시 BALF의 호중구 수치를 변화시키는 요인이 되는 것으로 판단된다.

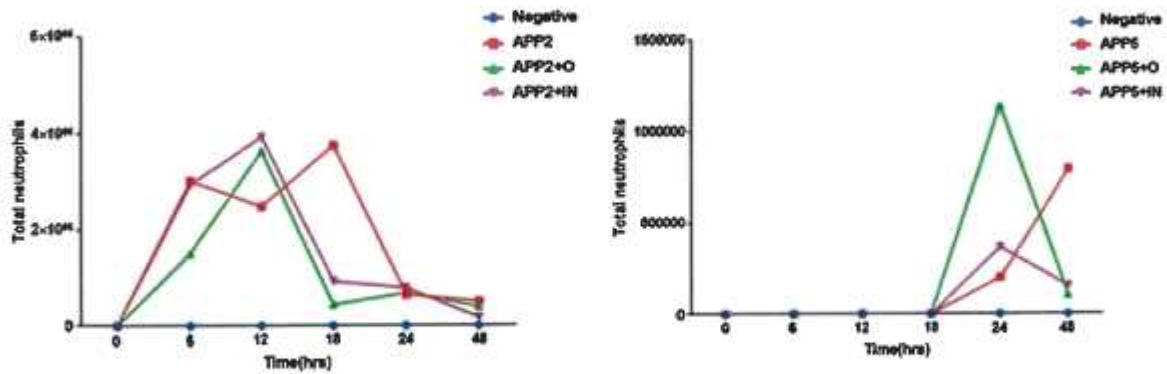
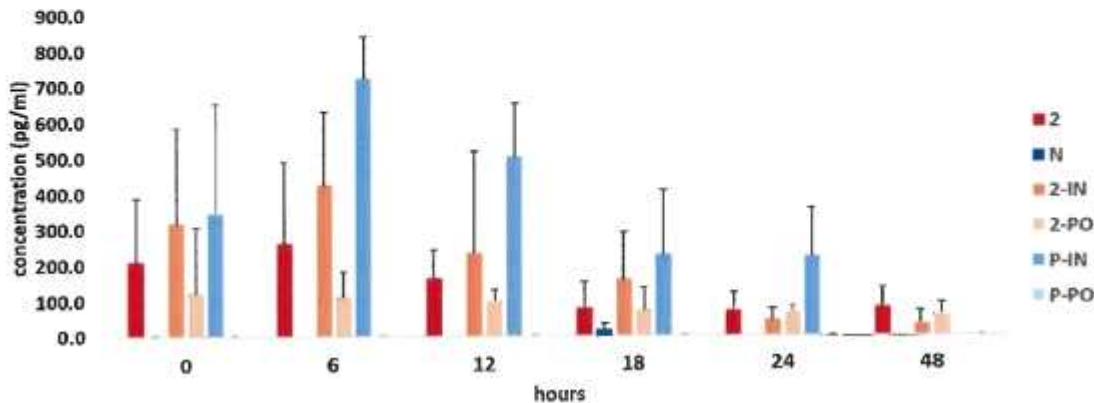


그림2 흉막 폐렴균 공격접종후 BALF에서 호중구 수치 변화. 왼쪽: APP2형 공격접종후 파이오신 투여, 오른쪽: App5형 공격접종후 파이오신 치료.

3.2. Cytokine 수치

3.2.1.1.1.1.1. BALF에서의 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, 염증 억제성 사이토카인인 IL-10을 측정하여 파이오신 투여와 염증간의 관계를 확인하였다.

3.2.1.1.1.1.1.2. TNF- α 의 양을 확인한 결과 호중구 수치에서의 결과와 마찬가지로 파이오신만 비강으로 공격접종한 그룹에서도 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.



3.2.1.1.1.1.1.3.

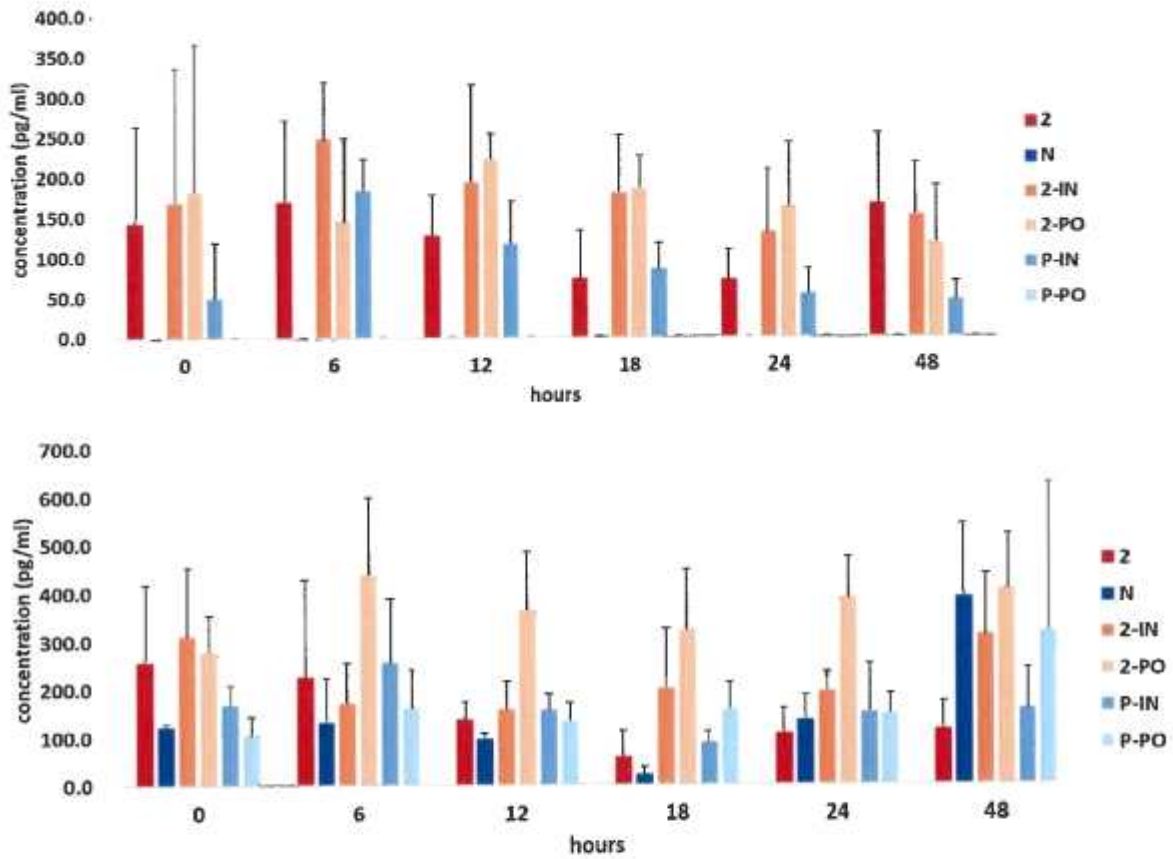
그림 3 공격접종 및 치료 후 BALF에서 측정한 TNF- α 의 시간대별 농도 변화. 2: APP2 공격접종, 2-IN: APP2 공격접종+파이오신 비내접종, 2-PO: APP2 공격접종+파이오신 경구접종, N: 무접종 대조군, P-IN: 파이오신 비내접종, P-PO: 파이오신 경구접종

3.2.1.1.1.1.1.4. 또다른 염증성 사이토카인인 IL-6의 농도를 측정한 결과 TNF- α 와 유사한 양상을 보였다. 6시간째에 최고농도에 이르고 이후 감소하는 양상을 보였다. 그러나 APP2 단독 접종, APP2공격접종 + 파이오신 비강투여 (2-IN)그룹에서는 48시간째에 IL-6의 농도가 증가하는 것이 확인되었다.

3.2.1.1.1.1.1.5.

그림 4 공격접종 및 치료 후 BALF에서 측정한 IL-6의 시간대별 농도 변화. 2: APP2 공격접종, 2-IN: APP2 공격접종+파이오신 비내접종, 2-PO: APP2 공격접종+파이오신 경구접종, N: 무접종 대조군, P-IN: 파이오신 비내접종, P-PO: 파이오신 경구접종

3.2.1.1.1.1.1.6. IL-10은 염증 억제성 사이토카인의 일종이다. 본 시험에서 마우스의 BALF에서 IL-10의 농도를 측정한 결과 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6와는 다른 양상을 보였다. APP2형 공격접종군에서의 IL-10농도는 지속적으로 낮게 확인되었다.



3.2.1.1.1.1.7.

그림 5 공격접종 및 치료 후 BALF에서 측정된 IL-10의 시간대별 농도 변화. 2: APP2 공격접종, 2-IN: APP2 공격접종+파이오신 비내접종, 2-PO: APP2 공격접종+파이오신 경구접종, N: 무접종 대조군, P-IN: 파이오신 비내접종, P-PO: 파이오신 경구접종

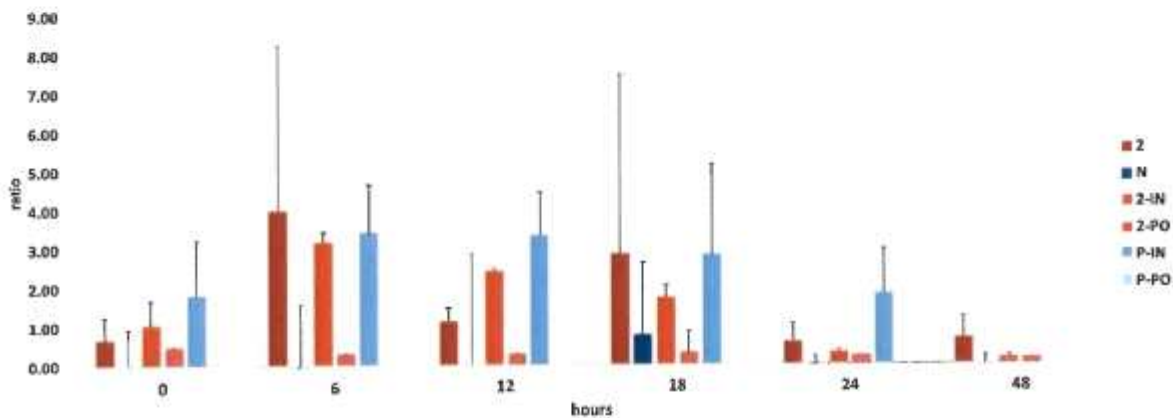
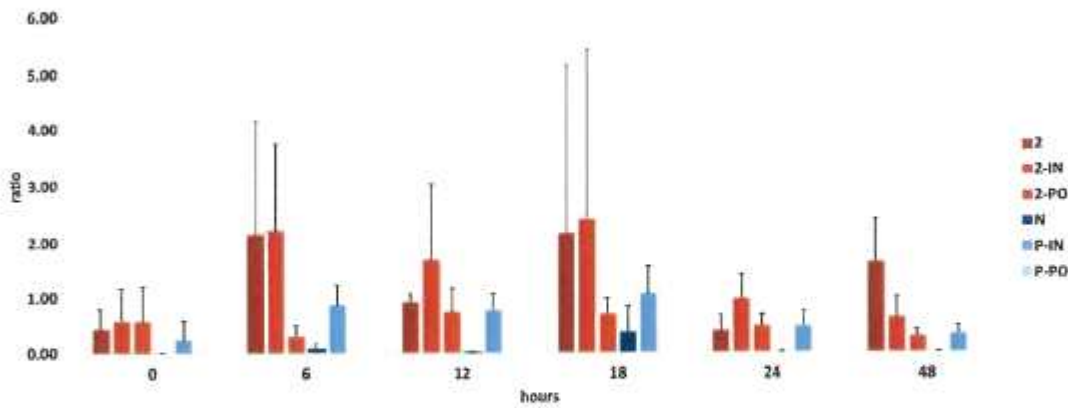


그림6 공격접종 및 치료 후 BALF에서 측정된 TNF- α:IL-10 비율의 시간대별 변화. 2: APP2 공격접종, 2-IN: APP2 공격접종+파이오신 비내접종, 2-PO: APP2 공격접종+파이오신 경구접종, N: 무접종 대조군, P-IN: 파이오신 비내접종, P-PO: 파이오신 경구접종

3.2.1.1.1.1.8.

그림7 공격접종 및 치료 후 BALF에서 측정된 IL-6:IL-10 비율의 시간대별 변화. 2: APP2 공격접종, 2-IN: APP2 공격접종+파이오신 비내접종, 2-PO: APP2 공격접종+파이오신 경구접종, N: 무접종 대조군, P-IN: 파이오신 비내접종, P-PO: 파이오신 경구접종

3.2.1.1.1.1.9. 염증성 사이토카인과 염증 억제성 사이토카인의 농도 비교를 통해 그 비율이 1 이상인 경우 염증과 좀더 밀접한 관련이 있음을 판단하였다. 그림6에서는TNF- α와 비교를 하였고 그림7에서는 IL-6와 비교를 하였

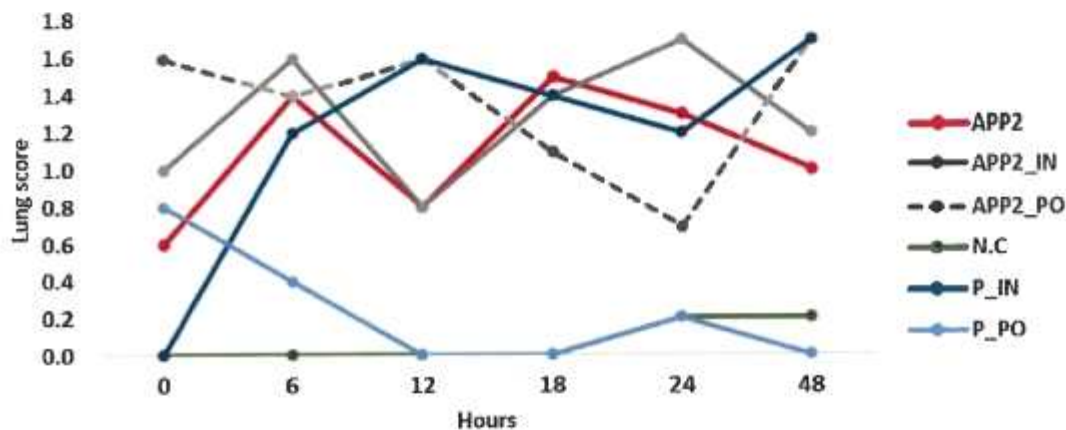


다. TNF- α :IL-10의 비율을 보면 파이오신만 비내접종했을 경우 염증 반응과 관련이 있음을 확인할 수 있다. IL-6:IL-10의 경우 파이오신 비내접종에서 상대적으로 염증과 관련된 반응이 낮은 것을 확인할 수 있었다. TNF- α :IL-10과 IL-6:IL-10의 경우 APP2형 단독 접종 및 APP2형 +파이오신 비내접종의 경우를 제외하고 6시간 이후 1이하의 비율을 보였다. 염증성 사이토카인과 염증억제성 사이토카인의 비율로 판단할 때 APP2형 공격접종후 파이오신 경구접종의 경우 염증반응을 낮추는 것으로 추측할 수 있다.

3.2.1.1.1.1.1.10.

3.3. 조직병리 검사 결과

3.3.1.1.1.1.1.1.1. 시험에 공시한 마우스들을 안락화 한 후 폐를 채취하여 병리조직학적 검사를 실시하였다. 폐 조직의 염증의 정도에 따라 0 (normal)부터 5(severe) 점수를 부여하여 수치화 하였다. 그 결과 전반적으로 mild-moderate의 약한 염증을 보였다. 호중구 수치 및 염증성 사이토카인 결과와 마찬가지로 파이오신 비내접종군에서 APP2형 공격접종군과 유사한 양상의 폐병변을 보였다. 폐병변에서는 APP2형을 공격접종한 모든 군에서 1이상의 염증수치를 보였으나 중등도 미만 수준의 염증을 보인 것으로 판단된다.



3.3.1.1.1.1.1.2.

그림 8 부검후 폐의 폐병변 수치. APP5접종군의 수치는 제외.

3.3.1.1.1.1.1.3.

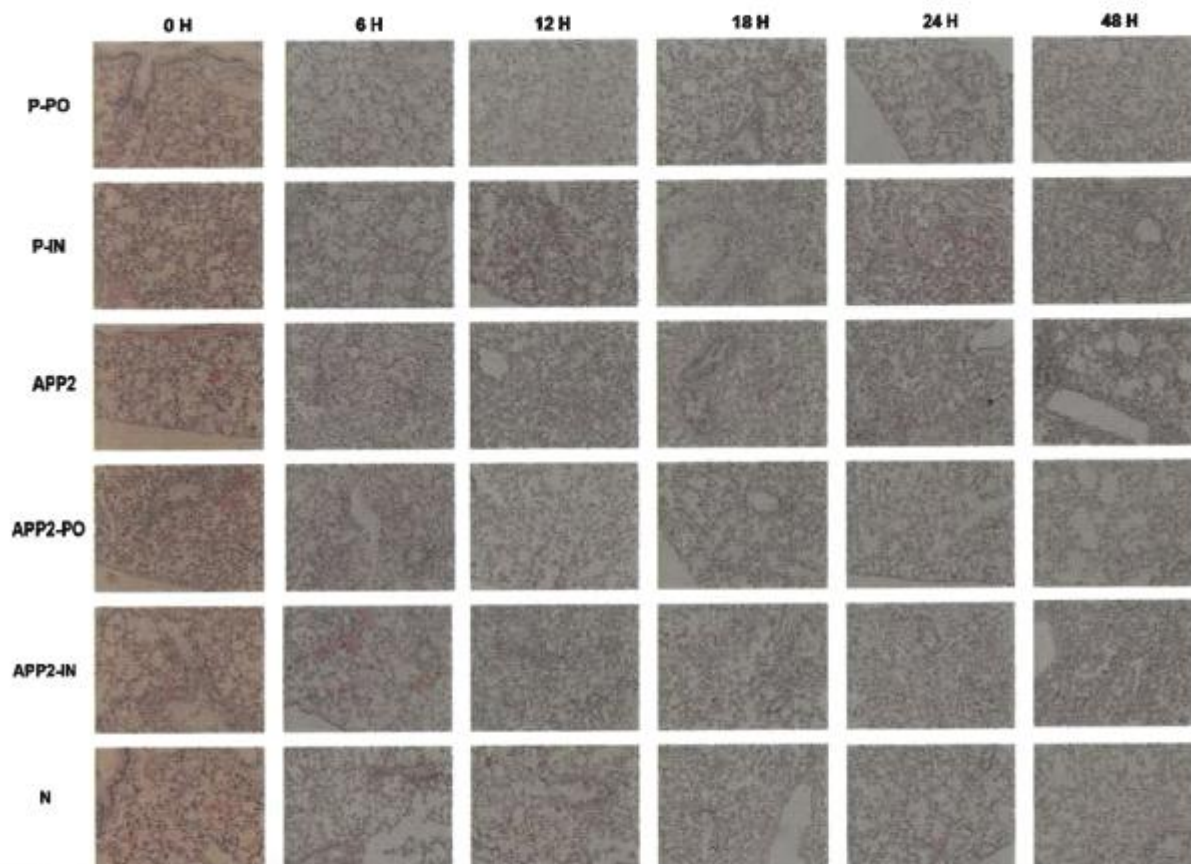


그림 9 부검후 폐의 현미경사진. APP5접종군 제외.

4. 결론

파이오신의 돼지 흉막폐렴 치료효과 확인을 위하여 실험동물인 마우스에 흉막폐렴균을 비강으로 공격접종한 후 파이오신을 비강, 경구로 1회 투여하여 투여 경로에 따른 치료효과를 확인하였다.

파이오신 자체만으로도 비강으로 투여했을 때 BALF에서 염증성 사이토카인과 호중구 수치의 증가가 확인되었다. 경구로 투여했을 경우에는 비강 투여시와 같은 염증관련 인자가 확인되지 않았다.

돼지 흉막폐렴균을 공격접종한 마우스에 파이오신을 비강, 경구로 투여했을 때, 경구로 투여한 군에서 염증성 사이토카인과 호중구 수치가 공격접종군, 공격접종후 파이오신 비강 투여군에 비하여 상대적으로 낮게 관찰되는 것이 확인되었다.

시험군의 폐 병변을 수치화하여 평가한 결과 돼지 흉막폐렴균을 접종한 모든군 (파이오신 무처리군, 처치군)에서 1점도의 폐병변 지수가 관찰되었다. 각 그룹간 유의적인 차이는 없었으나 전체적으로 낮은 수준의 염증소견이 관찰되었다고 판단된다.

파이오신을 이용한 마우스 효능 평가 결과 돼지 흉막폐렴균 공격접종후 파이오신 경구 투여시 무처리군, 비강 투여군 대비 염증성 사이토카인과 호중구 수치를 상대적으로 감소시키는 결과를 확인할 수 있었다.

파이오신의 경구투여후 체내 동태에 대한 연구를 추가적으로 진행시 경구투여 첨가제로서의 적용을 고려해 볼 수 있을 것으로 판단된다.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술융복합 창의인재 양성사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술융복합 창의인재 양성사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.