

## 완결과제 최종보고서

일반과제(○)

(과제번호 : PJ010201)

닭에서 항-바이러스 단백질 이용한 사료 첨가제 개발

Development of feed additives using antiviral protein in chicken

국립축산과학원

연구수행기간

2014. 2 ~ 2016. 12

농촌진흥청

## 제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “닭에서 항-바이러스 단백질 이용한 사료 첨가제 개발에 관한 연구”(개발기간 : 2014. 2. ~ 2016. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 닭에서 항-바이러스 단백질을 발현하는 사료 첨가제 특성 구명

제1협동연구과제 : 항-바이러스 단백질을 발현하는 장내 세균의 개발과 이를 이용한 사료 첨가제 개발

제2협동연구과제 : 항-조류인플루엔자 단백질 개량체 개발 및 이를 분비하는 Lactobacillus 및 클로렐라에 의한 면역력 증강 효과 검증

제3협동연구과제 : 형질전환 미세조류를 이용한 항-바이러스 단백질의 대량 생산과 이를 응용한 기능성 사료 첨가제 개발

2016. 2. 28.

제1세부연구기관명 : 국립축산과학원

참여연구원 : 김경운, 김점순, 이풍연, 최훈성, 오건봉

제1협동연구책임자 : 성균관대학교

참여연구원 : 길의준, 조문주, 조승찬

제2협동연구기관명 : 아주대학교

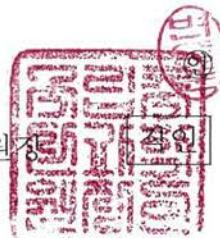
참여연구원 : 서영실, 이정민, 김민재, 박현준, 이연진

제3협동연구책임자 : 대상(주)

참여연구원 : 전진영, 김보라, 강순태, 권지수, 박창병, 임동빈, 송창선, 권정훈, 정솔, 정제현, 서윤영, 김유진

주관연구책임자 : 변승준

주관연구기관장 : 국립축산과학원



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서  
열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제번호	PJ010201		연구기간	2014-2016		
연구사업명	단위사업명	농업공동연구				
	세부사업명	친환경 안전농축산물생산기술개발				
	내역사업명	가축질병 예방기술 개발				
연구과제명	주관과제명	닭에서 항-바이러스 단백질 이용한 사료 첨가제 개발				
	세부(협동) 과제명	(1세부) 닭에서 항-바이러스 단백질을 발현하는 사료 첨가제 특성 구명				
		(1협동) 항-바이러스 단백질을 발현하는 장내 세균의 개발과 이를 이용한 사료첨가제 개발				
		(2협동) 항-조류인플루엔자 단백질 개량체 개발 및 이를 분비하는 <i>Lactobacillus</i> 및 클로렐라에 의한 면역력 증강 효과 검증				
		(3협동) 형질전환 미세조류를 이용한 항-바이러스 단백질의 대량 생산과 이를 응용한 기능성 사료 첨가제 개발				
연구책임자	구분	연구기관	소속	성명		
	1세부	국립축산과학원	동물바이오공학과	변승준		
	1협동	성균관대학교	유전공학과	이석찬		
	2협동	아주대학교	미생물학교실	권명희		
	3협동	대상(주)	건강연구실	한재갑		
총 연구기간	총: 29 명	총 연구개발비	정부: 1,500,000천 원			
참여	내부: 6 명		민간: 600,000천 원			
연구원 수	외부: 23 명		계: 2,100,000천 원			
위탁연구기관명 및 연구책임자	송창선	참여기업명	대상(주)			
국제공동연구	상대국명:	상대국 연구기관명:				
<b>&lt;요약&gt;</b>						
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-바이러스 단백질(3D8 scFv)을 발현하는 사료 첨가제(미세조류) 섭취 시 시험군의 계분에서 암모니아 발생 감소 확인</li> <li>○ 닭에서 발현한다고 알려진 항균 펩타이드인 cathalacidin family 의 발현 분석 결과 골수세포에서 강력하게 발현됨을 확인</li> <li>○ 항-바이러스 단백질을 발현하는 형질전환 미생물의 동물 장 관계에서 생존 능 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 섭취한 미생물은 24시간 내에 체내에서 완전히 배출되며, 미생물을 섭취한 시험동물은 특이 현상을 보이지 않음</li> </ul> </li> <li>○ 항-바이러스 단백질을 발현하는 형질전환 락토바실러스 개발</li> <li>○ 대장균에서 대량 생산된 항-바이러스 활성이 있는 재조합 항체의 다양한 물리/화학적 조건에서의 기능적 안정성 분석</li> <li>○ 클로렐라 형질전환 기술의 개발</li> <li>○ 항-바이러스 재조합 단백질에 대한 단회투여 독성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3D8 scFv 재조합 단백질을 ICR 마우스에 단회 경구 투여하였을 때 사망이 관찰되지 않음, 개량의 치사량 (Approximate Lethal Dose: ALD)은 암수 모두 2g/kg을 상회하는 것으로 예상됨</li> </ul> </li> <li>○ 항-바이러스 재조합 단백질 산업적 생산을 위한 Scale-up</li> </ul>						
보고서 면수: 169쪽						

## 〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 닭에서 사료 첨가제(항-바이러스 단백질) 섭취가 닭의 생리에 미치는 영향 구명</li> <li>○ 항-조류인플루엔자 재조합 항체의 체내 장기로의 투과능 및 지속 능 확인</li> <li>○ 항-바이러스 단백질의 물리적 안전성 조사</li> <li>○ 가금류 바이러스 질병의 예방을 위한 항-바이러스 기능성 사료 첨가제 개발</li> </ul>
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-바이러스 단백질(3D8 scFv)을 발현하는 사료 첨가제(미세조류)를 섭취한 시험군의 계분에서 암모니아 발생 감소 확인</li> <li>○ 항-바이러스 단백질 발현하는 형질전환 미생물의 동물 장에서 생존 능 조사 결과: 특이사항 없음</li> <li>○ 항-바이러스 단백질을 발현하는 형질전환 락토바실러스 개발</li> <li>○ 대장균에서 대량 생산된 항-바이러스 활성이 있는 재조합 항체의 다양한 물리/화학적 조건에서의 기능적 안정성 분석</li> <li>○ 클로렐라 형질전환 기술 개발</li> <li>○ 항-바이러스 재조합 단백질에 대한 단회투여 독성 평가</li> <li>○ 산업적 생산을 위한 Scale-up</li> </ul>
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재조합 미니항체 단백질을 이용하여 닭의 사료 첨가제로서 활용 가능성 검증</li> <li>○ 긍정적인 연구결과 도출시 외부공동연구팀과 협의하여 사업화 혹은 현장적용 연구 등의 후속 연구 사업을 추진할 계획</li> <li>○ 본 연구는 생명공학기술을 이용한 사료 첨가제 개발의 첫 사례로 새로운 산업 창출이 기대됨</li> </ul>
중심어 (5개 이내)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <span>닭</span> <span>사료 첨가제</span> <span>항-바이러스</span> <span></span> <span></span> </div>

## 〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Effects of feed additive (Anti-Viral Protein) in chicken on physiology of chicken</li> <li>○ Investigation of permeability and persistence of anti-avian influenza recombinant antibodies to organs of body</li> <li>○ Investigation of the physical safety of antiviral proteins</li> <li>○ Development of antiviral functional feed additives to prevent poultry virus diseases</li> </ul>
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Reduced ammonia production in the flocks of the test group ingesting the feed additive (chlorella) expressing the anti-viral protein (3D8 scFv)</li> <li>○ Survivability of the transformed microorganism expressing the antiviral protein in the field of animals: No specific information</li> <li>○ Development of transgenic Lactobacillus expressing antiviral protein</li> <li>○ Functional stability analysis of massive produced recombinant antibodies having anti-viral activity in E. coli under various physico-chemical conditions</li> <li>○ Development of chlorella transformation technology</li> <li>○ Single-dose toxicity assessment of antiviral recombinant proteins</li> <li>○ Scale-up for industrial production</li> </ul>
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Verification of recombinant mini-antibody protein utilization possibility as a feed additive by using a chicken</li> <li>○ Positive research result produced, we plan to carry out follow-up research projects such as commercialization or field applied research in consultation with the joint research team</li> <li>○ This research is expected to create new industry as the first case of feed additive development using biotechnology</li> </ul>
Keywords	chicken      feed additives      anti-viral

## 〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	8
제 3 장 연구수행 내용 및 결과 .....	11
제 4 장 목표달성을 및 관련 분야 기여도 .....	150
제 5 장 연구결과의 활용계획 등 .....	155
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	158
제 7 장 연구개발성과의 보안등급 .....	159
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설 · 장비현황 .....	160
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	161
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	162
제 11장 기타사항 .....	163
제 12장 참고문헌 .....	167

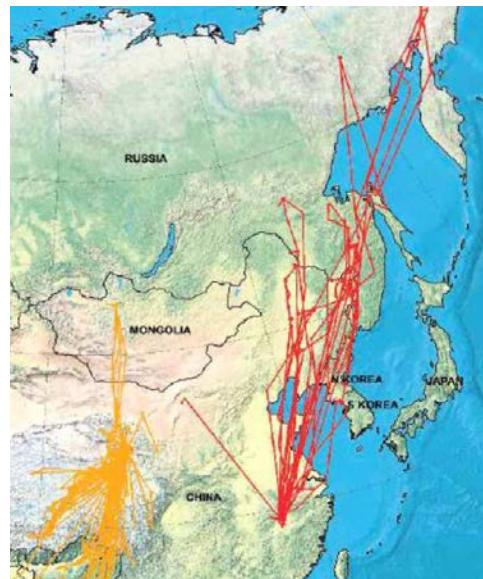
# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

## 제1절 연구 개발 목적

- 국내외 모두에서 유산균(프로바이오틱스)을 이용하여 가축의 면역력을 높이려는 연구들이 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구는 기존의 연구들에서 한 걸음 더 나아가 대장균에서 발현된 항-바이러스 단백질 및 기능이 검증된 사료첨가제들(락토바실러스, 미세조류)에 항-바이러스 단백질을 발현하는 형질전환 사료첨가제(락토바실러스, 미세조류)들을 개발하고 닭에서 이들의 기능을 검증하고자 한다.

## 제2절 연구 개발의 필요성

- 최근 중국에서 발생한 H7N9형 조류 인플루엔자는 닭에서부터 사람에게 감염되어 현재까지 136명의 감염자 및 44명의 사망자가 발생하였고, 2013년 8월 이후 감염자가 없었으나, 최근 2013년 10월 8일 두 달 만에 감염자가 다시 발생하면서 올 겨울 재창궐 위험성이 제기됨(WHO - Global Alert and Response), 이 바이러스는 생조류 유통시장(Live bird market, LBM)에서 오리, 닭, 철새의 바이러스가 조합되어 발생한 것으로 밝혀져, 공중보건학적으로 가금류의 인플루엔자 질병 제어 기술의 발전이 시급한 실정이다.
- 우리나라에는 고병원성 인플루엔자 상시 발생 지역인 중국 및 동남아를 지나는 철새의 이동경로에 위치하여 H7N9 및 HPAI H5N1 바이러스의 유입 가능성이 높아 가금류에서 이를 예방 및 치료하기 위한 새로운 형태의 예방/치료제 개발이 필요하다.



[중국 유래 철새의 이동경로]

(출처: J.Y. Takekawa, Avian Disease; 2010), (1)

- 가금류에서 인플루엔자 백신의 적용은 새로운 변이주의 출현을 야기함으로 그 사용이 제약되고 있으며, 국내에서는 2007년부터 H9N2에 대한 백신만을 허가하여 사용하고 있으며, 인플루엔자 바이러스는 다양한 혈청형이 존재하고 재조합되어 H7N9과 같은 새로

운 바이러스가 생성되므로 백신만으로 질병제어가 어려운 실정이며, 가금류에서 인플루엔자에 대한 새로운 예방/치료제의 도입이 필요하다.

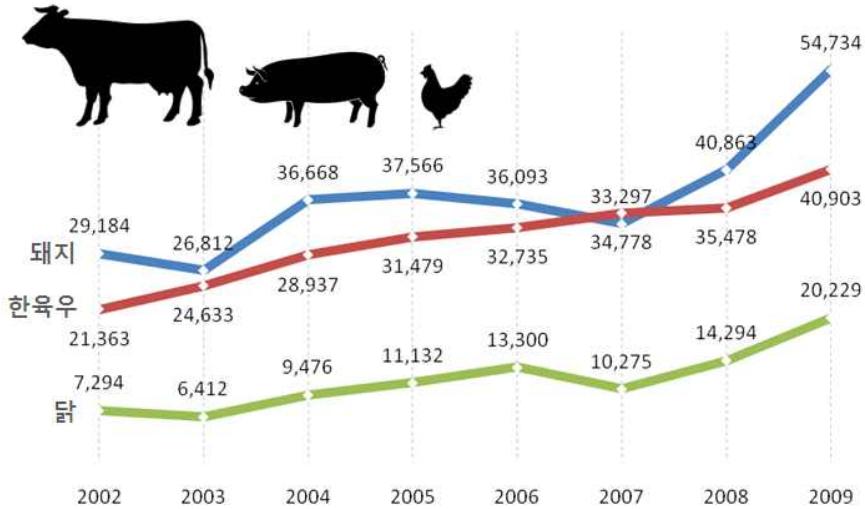
- 현 국내 양계 농장에는 인플루엔자 뿐 아니라 전염성 기관지염(IB), 뉴캣슬병(ND), 조류 아데노바이러스 감염증, 조류 레오바이러스, 전염성 F낭병 바이러스 감염증 등 다양한 바이러스성 질병에 의한 피해가 상당하여 다양한 바이러스 질병 예방에 효과적인 항-바이러스 제제의 개발은 양계 시장의 품질 향상에 큰 영향을 줄 것으로 기대된다.
- 가축 및 가금류의 바이러스성 질병에 대한 피해를 최소화하기 위해서 많은 항-바이러스 제제들이 개발되고 있지만 그 효과는 미흡하다.
- 다른 항-바이러스 제제들과 달리 본 연구 그룹에서 개발한 3D8 scFv는 바이러스 유전체의 종류에 비특이적으로 반응하여 바이러스 유전체를 분해하는 능력을 가지고 있어서, 다양한 바이러스에 대해 탁월한 항-바이러스 능을 가진다.
- 기존에 개발된 항-바이러스 제제는 직접 항-바이러스 제제를 동물에 주사해야 하는 어려움이 있어 대형 계사를 운영하는 경우 인건비 상승과 고가의 약제비 지출로 효율적인 항-바이러스 조치를 취하지 못하기 때문에 핵산가수분해 항체를 생산하는 유산균을 이용할 경우 신기능성 종균 개발이 가능하다.
- 3D8 scFv가 가지는 핵산가수분해 능과 더불어 유산균 종균을 이용한 투여 방법을 통해서 숙주 자체가 가지는 면역체계의 활성을 야기해 보다 효과적이고 빠른 항-바이러스 효능을 기대할 수 있다.
- 천연제제 동물약품 시장은 전반적으로 향후 지속적인 성장가능성이 큰 것으로 나타났으며, 항생제 사용금지 및 항균제와 관련된 정부정책 등 환경요인으로 인하여 천연제제를 바탕으로 한 동물약품 및 기능성 사료의 성장세가 주를 이룰 것으로 예측된다.
- 배합사료용 항생제의 사용 금지로 인해 면역 증강제에 대한 시장의 요구에 부응하여 허브나 한방약재로 사용되는 식물체 혹은 식물유래 성분들을 활용하는 프리바이오틱스나 항균물질을 만들어 생균제로 활용 가능한 균주에 대한 연구들이 진행되고 있다.
- 특히 동향으로는, 생균제 분야에 대한 연구개발이 가장 활발한 것으로 나타났으며 기술별로는 효소제와 유기산 분야에서 특허출원이 최근 활발해지고 있다.
- 육류의 소비가 증가하면서 생산 증대를 위하여 좁은 공간에서 생산량을 극대화하는 대량 밀식사육 방식을 취하게 됨에 따라, 이러한 환경은 결국 항생제를 첨가한 사료를 먹이고 질병방제를 위하여 화학제제를 사용하게 만들고 있다.
- 그러나 시간이 지남에 따라 무분별한 항생제의 사용이 축산물에서의 잔류를 초래하게 되고 항생제에 대한 내성인자의 전이와 내성균의 발생 등의 문제를 일으켜 세계 각국에서는 사료 내 항생제의 사용을 엄격하게 규제 또는 일부 금지하고 있다.
- 이에 항생제를 부분적으로 또는 완전하게 대체 할 수 있는 사료 첨가제에 대한 개발 요구가 증가하고 있다.
- 국내에서 살모넬라 감염에 의한 식중독이 증가하는 추세에 있으며, 미국의 경우 살모넬라로 인한 식중독이 전체 식중독 발생 건수 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다(19,089건 중 8,256건, CDC, MMWR, 2011),(2). 살모넬라 감염증의 주원인 식품은 축산물로, 특히 가금유래 식품에 의한 살모넬라 감염 발병율이 가장 높은 것으로 알려져 있어 이를 차단하기 위해 축산시장의 항생제 대체제의 개발이 시급하다.



[2002-2012년도 연도/원인별 식중독 발생 현황]

(출처: 식약처 - 식중독 통계 시스템)

- 천연항생제 시장은 동물의약품 시장 및 사료첨가제 시장에 해당되는데 천연제제 동물약품 시장을 둘러싸고 있는 전반적인 환경을 살펴봤을 때, 현재 성장기에 있는 천연제제 동물약품 시장은 향후 지속적으로 성장할 가능성이 크다고 볼 수 있다.
- 양계(계란 포함) 산업은 생산액 기준으로 전체 농림업에서 차지하는 비중은 대략 8.7%이며, 축산업에서는 양돈(10.5%) 보다는 작지만 한우(6.6%) 보다는 큰 산업이다(2011년 기준),(3)
- 국민들의 생활수준 향상은 일인당 육류 소비량 급증으로 이어졌고, 특히 닭고기는 7.5배 ( $1.4\text{kg}/1970 \rightarrow 10.7\text{kg}/2010$ ), 계란은 3배( $77\text{개}/1970 \rightarrow 236\text{개}/2010$ ) 증가하고 있다(농림수산식품 주요통계, 2011),(4).
- 특히, 국내 1인당 육류소비량이 선진국에 비해 낮은 수준으로 육류소비의 성장잠재력은 충분하며 소, 돼지, 닭 등 가축 두수 역시 2000년대 초반부터 시작된 가축질병에도 불구하고 꾸준히 증가하고 있는 실정이다.



[연도별 가축 생산액 (단위 억원, 농림수산식품부, 발췌 편집)]

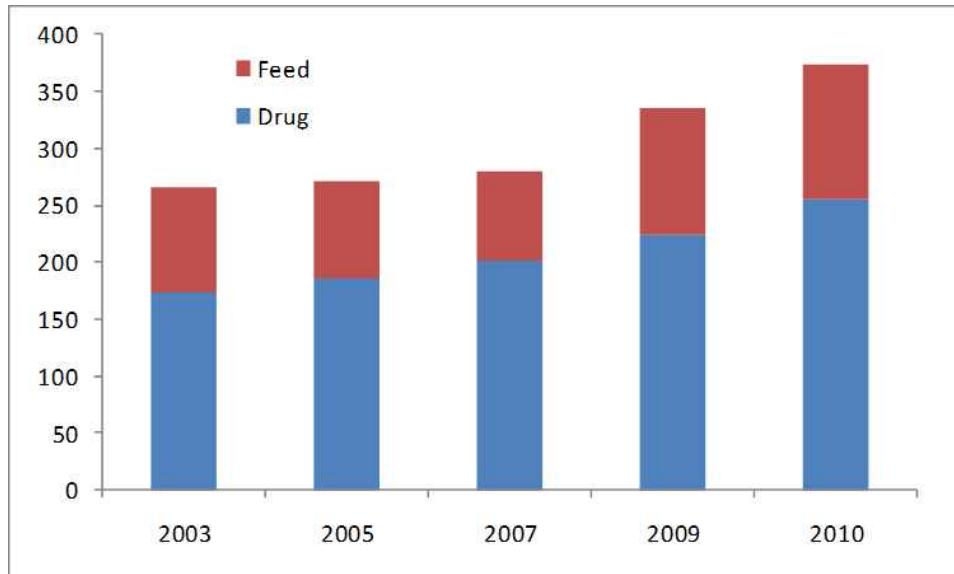


[국내 동물 백신 시장 규모 및 증가율]  
(한국동물약품협회, 발췌 편집)

- 이러한 이유로 사료 및 동물약품 시장 역시 성장 잠재력이 있다고 판단되며, 그 중 금지 항생제 및 항균제 등의 정부정책과 같은 환경요인으로 천연제제를 바탕으로 하는 동물약품 및 기능성사료의 성장세가 주를 이룰 것이라 기대된다.
- 항생제 오/남용에 따른 부작용은 가축체내 항생제 잔류 문제와 다양한 항생제에 내성을 가지는 일명 “슈퍼 박테리아” 등장이라는 새로운 문제점이 대두됨에 따라, 농림축산식품부에서는 2005년부터 안전축산물에 대한 소비자 요구와 “국가 항생제내성 안전관리사업” 추진에 따라 가축의 배합사료 제조용 항생제 감축 정책을 수립하여 추진하고 있다.
- 농림축산식품부는 항생제 사용에 따른 문제점을 줄이고자 2011년 7월 1일부터 항-콕시듐 제 8종과 구충제 1종을 제외한 합성항생제를 배합사료에 첨가 할 수 없도록 하였고, 더불어 천연물질을 활용한 사료첨가용 대체물질 개발과 보급 등의 다양한 정책을 추진하고

있다.

- 2009년 농림축산검역본부의 “가축 및 축산물 내 주요 항생제내성 실태조사 및 평가” 사업보고에 의하면 2011년 법적으로 사료 내 항생제 사용이 불가함에 따라 점차적으로 사용량이 감소하는 모습을 보임, 구체적으로 2009년 전체 축산용 항생제 사용량은 998톤으로 2008년 약 1,211톤 대비 18% 감소하였으며, 2001년 1,595톤 대비 약 37% 감소한 것으로 나타나고 있다(국립수의과학검역원, 2009),(5).
- 항생제의 가축사료 내 첨가가 금지됨에 따른 가축질병 증가에 따른 축산농가의 질병 예방 및 치료에 대한 부담을 덜고 나아가 지속가능한 축산업을 유지하기 위해서는 천연항생제 발굴과 개발이 필수적이다.
- 인구요인, 정책요인, 과거 성장추세 등을 고려했을 때, 천연제제 동물약품의 향후 시장규모는 2019년 약 4,216억 원의 시장규모를 형성할 것으로 예측된다.
- 현재 배합사료용 항생제의 사용이 금지되면서 면역 증강제에 대한 요구가 증가하고 있는데 많이 사용되는 면역 증강제는 생균제, 허브, 한방 식물, 혹은 식물유래 성분들을 활용하는 프로바이오틱스이다.
- 천연항생제의 시장 상황을 바탕으로 천연항생제로 사용 가능한 물질 혹은 면역증가 물질에 대한 연구가 수행되고 있는데 주로 식물을 활용하거나 식물의 조추출물 혹은 식물유래 성분 그리고 생균제로 사용이 가능한 균들과 그리고 이 균들에서 생성되는 항균 펩타이드인 박테리오신에 대한 연구가 주로 수행되고 있다.
- 우리나라의 경우 성분보다 주로 식물체 자체를 사용하는 경우가 많은데 복합 식물체 혹은 복합 한약재가 많이 활용되는 편이며 광물성 재료까지 폭넓게 활용하는 편이며, 생균제 관련 연구는 특정 균이 생균제로 사용할 때 조건에 맞는지 확인하는 경우가 해당된다.
- 우리나라의 항생제 대체제 관련 연구는 주로 닭을 비롯한 가금류를 대상으로 하고 있으며 육류의 질과 생산성 증진에 중점을 두고 연구하고 있다.
- 유산균은 장에서의 다른 균에 대한 경쟁적 배제 뿐 아니라 IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  등의 cytokine 발현을 조절함으로써 *Salmonella* 등의 세균의 증식 및 침입을 막는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다(Poultry Science, 2012, 91: 2139 - 2147),(6). 또한 닭에서의 증체율 향상에도 효과가 있는 것으로 밝혀져 있어(Br Poultry Science, 2007, 48: 732),(7). 면역 증강제 및 항생제 대체제로서 높은 효과가 기대된다.



[동물사료 천연물 첨가제 시장현황]

(한국동물약품협회, 발췌 편집)

- 항생제 대체재에 대한 연구는 미국, 캐나다, 중국이 주도하는 편이고 우리나라도 최근 중국과 함께 계속적으로 연구가 증가하고 있다.
- 항생제 대체재와 관련되어 다른 나라의 경우도 생균제와 면역증강 물질에 대한 연구가 중점을 이루고 있으며, 우리나라와 다른 점은 생균제로의 조건 부합 여부뿐만 아니라 생성되는 박테리오신의 특성 규명뿐만 아니라 생균제로 사용할 수 있는 균주와 박테리오신의 항생제에 대한 감수성 여부를 확인하고 장내 세균으로의 전이 여부를 확인하고 있다. 이는 생균제를 산업화하기 위해서 필요한 안전성 검사에 해당된다.
- 프로바이오틱스의 활용의 경우 우리나라가 식물체 자체를 활용하는 반면에 미국이나 캐나다와 같은 다른 나라의 경우는 성분에 중점을 두는 경향을 보이고 있으며 주로 에센셜 오일과 구성성분에 대한 연구가 많이 진행되는 편이다.
- 생균제나 면역 증가물질을 산업화하기 위해서는 해결해야 할 점이 많지만 가장 기본적인 것은 정확한 효능 검증으로 우리나라를 비롯한 여러 나라에서 효능 검증에 대한 연구가 양적으로 증가해야하는 상황이라 판단된다.
- 사료첨가제 관련 기술이 처음 출원된 시기인 1974년 이후부터 현재까지 특허출원 건수가 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 1990년대 후반 이후 특허출원 건수의 증가가 뚜렷한데 이는 최근 항생제를 부분적으로 또는 완전하게 대체 할 수 있는 사료첨가제 개발에 대한 사회적 또는 시장의 요구에 따라 이와 관련한 특허 출원이 증가한 것으로 사료된다.
- 전반적인 기술 흐름은 전체적으로 발전기 동향을 보이고 있으며 특히, 한국과 중국, 일본의 특허동향은 기술혁신의 주체인 출원인수와 기술혁신의 결과인 특허건수가 동시에 증가함에 따라, 포트폴리오 기본 모델에서 발전기에 해당하는 것으로 나타났다.
- 각 국가별 주요 연구주체는 특허출원 건수로 비교하면 대한민국(농촌진흥청장), DEGUSSA社, KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD社 및 BASF社, ZHEJIANG UNIV. 가 다수의 특허를 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 기관별 특허출원 동향을 살펴보면 미국과 일본, 유럽의 경우 기업이 특허출원의 상위를 차지하고 있으며, 한국의 경우 대한

민국(농촌진흥청장), 한국생명공학연구원 등 국가 기관이 출원인의 상위를 차지하고 있다,(8).

- 전 세계의 기술 분야별로 살펴본 출원 동향에서는 생균제 분야가 전체의 58%, 효소제 분야가 17%, 식물추출물 분야가 15%, 유기산 분야가 10% 순으로 나타나고 있어 생균제 분야의 연구 개발이 가장 활발한 것으로 나타났다.
- 유기산 분야와 효소제 분야에서는 다른 기술 분야에 비해 연구개발 활동이 미비한 것으로 나타났으나, 이는 생균제 분야와 식물 추출물 분야에 상대적으로 낮은 수치이나 실질적으로는 특허출원이 꾸준히 이루어지고 있어 이에 관한 연구 활동이 활발하지는 않지만 지속적으로 이루어지고 있다고 판단된다.
- 전 세계적인 기술별 발전 위치를 살펴보면, 효소제 분야, 유기산 분야는 최근 특히 활동이 활발한 기술 분야라고 할 수 있으며, 생균제 분야는 지속적으로 특히 활동이 활발한 것으로 나타났다.

### 제3절 연구 개발 범위

- 유산균 및 미세조류(클로렐라)를 통한 선천면역 활성화로 항-바이러스 효능이 있음이 많은 연구를 통하여 입증되었으나, 선천면역만으로는 100%의 효과를 이루어내기 어려운 실정이며, 본 연구과제 수행을 통하여 이러한 유용 미생물 및 대장균에 항-바이러스 단백질 발현을 통하여 1)항-바이러스 물질의 대량생산을 가능케 하고, 2)장내 병원성 미생물 억제 능과 항-바이러스 효능을 동시에 나타내는 2중 효과가 기대되며, 3)항-바이러스 물질의 전달을 용이하게 해주며, 4)투여가 용이하여 인플루엔자, 살모넬라를 포함한 가금류의 질병을 효과적으로 제어가능하고 품질 좋은 축산물 생산을 가능케 하는 경제적인 생균체를 개발하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 연구 현황

- Lactobacillus를 이용한 항원의 발현을 통해서(HPV 16의 E7) 숙주 쥐의 immune response를 boosting하여 anti-tumor effect를 관찰한 연구가 수행되었다(Haryong Poo, et al. 2006),(9).
- 다양한 유전자의 발현, 다양한 유산균의 종류를 통해서 면역체계증강과 다양한 질병에 대한 효과를 관찰하려는 연구들이 많이 진행되고 있다.
- 농림축산식품부는 가축과 양식 어류의 배합사료 내 항생제 첨가를 2011년 7월부터 전면 금지하고 있다.
- 국내에서 기능성 사료첨가제에 대한 연구는 정책 동향에 따라 많은 기관 및 업체에서 항생제 대체용으로 연구되어 왔으나, 현재 시장에서 유의성을 확보한 제품은 제한적이며, 또한 바이러스 질병을 방지하기 위한 접근은 시도된 바 없다.
- 국내 기능성 사료 첨가제 산업은 참여기업이 약 130여개로 경쟁회사가 다수인 완전경쟁 시장으로 제품 경쟁력이 중요한 변수로 작용하고 있다.
- 동물과 인체 및 환경에 유해하지 않은 기능성 사료 첨가제 개발이 중요시 되는 기술의 존형 산업이나, 국내 기업은 원료를 개발할 기술력이 없어 외국에서 원재료를 수입하여 합성하는 실정이다.
- 천연제제의 대량 생산이 가능하다면 기능성첨가제 산업에서 새롭게 큰 성장이 가능할 것으로 예상된다.
- 국민들의 성장과 소득증가 뿐 아니라 전 세계적으로도 개발도상국들의 생활수준 향상으로 육류 소비가 증가하고 있어 이에 따른 축산물 소비량과 가축용 사료의 수요는 지속적인 상승세에 있다.
- 국내 천연항생제 관련 연구는 대부분 기존 항균 능력이 알려진 한약 약용 식물을 이용하는 경우가 대부분이며, 이외에도 게르마늄과 일라이트 같은 광물질부터 목초 액까지 가능성 있는 모든 물질들을 다양하게 활용하고 있는 상황이다[육계의 성장 촉진을 위한 사료 첨가제로서의 희토(稀土), (함숙경 등, 한국가금학회지, 2006),(10); 목초액 함유 활성탄의 첨가가 육계 생산성 및 계란 내 항생제 잔류에 미치는 영향(성은일 등, 한국가금학회지, 2006),(11); 허브 및 식물 추출물의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향(김찬호 등, 한국가금학회지, 2008),(12)].
- 현재 국내의 생균제에 대한 연구는 주로 락토바실러스(Lactobacillus spp)에 집중되어 있는 편이며, 주로 생균제로 사용 시 조건 부합 여부를 조사가 주된 연구 내용이 되고 있다 [TMR 제조 시 수분 함량 및 발효제(Lactobacillus plantarum) 첨가 유무가 사료가치에 미치는 영향(기광석 등, 한국초지학회지, 2007),(13); 육계에 대한 유산균의 장내 생존성 및 적정 급여방법에 대한 연구(김동욱 등, 한국동물자원과학회지, 2008),(14); 바실러스 세틸리스 BC1212와 설팩틴의 병용투여가 이유돈의 성장에 미치는 영향(김명석 등, 한국임상수의학회지, 2009),(15)].



[천연항생제 국내특허동향]

&lt;천연항생제 관련 동향 보고서, 농업기술실용화재단, 2011&gt;

- 박테리오신과 박테리오파아지에 대한 연구는 상대적으로 다른 분야에 비하여 적은 상태이나, 최근 일부 연구가 진행되고 있다.

## 제2절 국외 연구 현황

- Lactococcus sp., Lactobacillus sp. 등으로 대표되는 유산균을 이용해 이들의 장내 세균으로서의 정장작용의 역할 외에도 혈압 저하작용, 콜레스테롤 면역 조절작용, 알레르기 개선 작용 등 다양한 보건 건강 증진효과를 나타내는 프로바이오틱(Probiotics)으로서의 작용이 많이 연구가 되고 있다(Beatriz del Rio, et al. 2008., Berg, R. D. 1998),(16,17).
- Lactobacillus를 이용하여 scFv (Single Chain Variable Fragment)를 발현시켜서 Rotavirus에 의한 diarrhea를 protection하는 연구가 이루어졌다(Neha Pant, et al. 2006),(18).
- Lactobacillus를 이용하여 live vaccine의 delivery의 vector의 역할로 이용하려는 연구들이 지속적으로 수행되어지고 있다(Jos F.M.L Seegers, 2002),(19).
- 클로렐라를 이용한 면역증진 실험은 1990년대부터 꾸준히 진행되어 다양한 실험적 증명은 존재한다. 하지만, 클로렐라 자체가 가지고 있는 기능성에 대한 입증일 뿐, 형질전환을 통한 새로운 기능성을 부여하고 이 기능성에 대한 검증을 시도한 예는 없다.
- 클로렐라는 인체의 PBMC에서 cytokine 분비의 자극제 역할을 할 수 있는 잠재적 물질이며, 특히 Th1(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) 계열의 cytokine 분비를 촉진하여 면역반응의 조절에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다(Ewart et al., 2007),(20).
- MAIDS에 경구 투여한 클로렐라 추출물에 의해 Listeria 균에 대한 저항성을 띠는 면역반응이 증가한 것으로 나타났으며, 이는 바이러스에 의해 유도된 면역결핍에 있어서 클로렐라의 면역증진 효과를 확인한 것으로 판단된다(Hasegawa et al., 1995),(21).
- 클로렐라 추출물은 L. monocytogenes에 감염된 생쥐에서 이에 대한 저항성의 증가를 보였으며 bone marrow의 CFU-GM을 증가시켜 면역 반응을 향상시킨다(Dantas et al.,

1999),(22).

- 생쥐에서 외부의 pathogen 침입 시 클로렐라 추출물을 투여할 경우, INF- $\gamma$ , IL-2의 증가로 인해 NK cell 활성화 및 세포중재 면역반응을 증가시키고, 이것은 클로렐라 추출물이 cytokine의 생성량 증가 및 활성화와 관련, 면역기능 향상에 직/간접적인 영향을 미친다 (Queiroz et al., 2002),(23).
- 클로렐라가 육체적 stamina 향상 및 피로에 대한 생화학적 수칙들을 감소시키는 경향을 확인하였으며, 이를 통해 클로렐라는 직/간접적으로 면역 기능의 향상에 도움을 준다는 사실을 확인하였다(An et al., 2006),(24).
- 현재 전 세계적으로 천연항생제관련 연구 분야 가운데 아래와 같이 생균제 분야의 연구 개발 활동이 가장 활발한 것으로 나타났다[Identification of the Most Abundant Lactobacillus Species in the Crop of 1- and 5-Week-Old Broiler Chickens (Abbas Hilmi et al., 2007),(25); Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with Megasphaera elsdenii NCIMB 41125 in early lactation (Aikman et al., 2011),(26); Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocino-genic Enterococcus faecium KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions (Bhardwaj et al., 2010),(27); Fate and efficacy of lacticin 3147-producing Lactococcus lactis in the mammalian gastrointestinal tract (Dobson et al., 2011),(28); Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical Lactobacillus strains in relation to safety aspects of probiotics (Klein G. 2011),(29)].



[천연항생제 국외특허동향]

<천연항생제 관련 동향 보고서, 농업기술실용화재단, 2011>

### 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

- 표지단백질(GFP 등) 발현하는 재조합 Lactobacillus 이용 닭의 장내에서 Lactobacillus의 장내 지속성 규명
- 항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 식이에 따른 닭의 생리적 변화(증체 및 설사 등) 조사
- 닭 혈액 내 면역관련 cytokine들의 변화 조사
  - 위의 연구내용들(3가지)을 국립축산과학원 동물바이오공학과 계사 현장 연구실에서 직접 닭을 이용하여 수행하고자 하였으나, 2014년 1월에 발생한 고병원성 조류인플루엔자(HPAI)로 인해 국립축산과학원 동물바이오공학과 계사 현장 연구시설이 1월부터 8월 말 까지 사용이 제한되어 연구수행이 불가능한 상황이었다.
- 닭을 이용한 핵산가수분해 항체의 기능 검증 시험
  - 항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 식이에 따른 닭의 생리적 변화(증체 및 설사 등) 조사의 연구내용인 핵산가수분해 항체가 발현되는 유산균을 생균상태로 닭에 강제투여 후, 조류인플루엔자 바이러스의 전파 억제 효능을 확인 실험을 외부 용역연구 형태로 추진하였고, 본 연구는 조류인플루엔자 바이러스의 전파 억제 효능을 확인하는 시험으로서 우리원에서는 유산균 투여군 간의 상호 오염을 방지 할 수 있는 BSL-2 시설 및 닭 전용 격리사육 시설이 없어 외부용역을 추진하였다.
  - 시험목적은 핵산가수분해 항체를 발현하는 유산균 투여 시 닭에서 인플루엔자 바이러스의 전파 억제 효능을 확인하고자 한다.
  - 공시재료는 시험동물(3주령 SPF 닭, 40수), 시험바이러스 [A/Korean native chicken/k040110/2010(H9N2)], 그리고 혈구응집 억제반응용 불활화 항원 [A/Korean native chicken/k040110/2010(H9N2)]이다.
  - 3주령의 닭 40수를 총 4개의 그룹(형질전환 유산균 2종 투여군 각각 10수, 비형질 전환 유산균 투여군 10수, 양성 대조군 10수)으로 나눈다.
  - 각 유산균들을 3주령부터 매일 3주간 경구로  $10^9$ CFU/dose로 투여한다.
  - 투여 3주후, 6주령 SPF에 각 그룹별로 3수씩 인플루엔자 바이러스를 공격 접종한다.
  - 그룹별로 공격접종 3, 5, 7, 9, 그리고 11일 후 공격접종군 및 접촉전파군의 구강 및 총배설강에서의 인플루엔자 바이러스의 shedding 정도를 real time RT-PCR을 이용하여 측정한다.
  - 공격접종 17일 후 그룹별로 채혈하여 공시된 혈구응집억제반응 불활화 항원을 이용한 혈구응집억제반응시험을 통해 혈청학적 반전을 평가한다.

닭을 이용한 핵산가수분해 항체의 기능 검증 시험 결과

<표1>. 공격접종 3일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	0/6	-	-	-	-
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	2/6	29.90	4.10	2.64	1.32
G3	L. casei	7	0/7	-	-	-	-
G4	양성대조군	7	1/7	27.00	-	3.57	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수

<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차

<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

<표2>. 공격접종 3일 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		Log EID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	21.67	1.33	5.29	0.43
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	21.23	0.30	5.43	0.10
G3	L. casei	3	3/3	21.64	0.58	5.29	0.19
G4	양성대조군	3	3/3	19.46	1.56	5.99	0.50

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수

<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차

<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

<표3>. 공격접종 3일 후 접촉전파군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		Log EID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	0/6	-	-	-	-
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	0/6	-	-	-	-
G3	L. casei	7	0/7	-	-	-	-
G4	양성대조군	7	0/7	-	-	-	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수

<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차

<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표4&gt;. 공격접종 3일 후 공격접종군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		Log EID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	0/3	-	-	-	-
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	2/3	32.11	1.65	1.93	0.53
G3	L. casei	3	1/3	26.73	-	3.66	-
G4	양성대조군	3	0/3	-	-	-	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표5&gt;. 공격접종 5일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	5/6	31.70	3.09	2.06	0.99
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	5/6	32.34	5.05	1.86	1.62
G3	L. casei	7	5/7	29.82	3.11	2.67	1.00
G4	양성대조군	7	2/7	22.14	1.35	5.14	0.43

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표6&gt;. 공격접종 5일 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	22.22	1.30	5.11	0.42
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	22.06	0.69	5.16	0.22
G3	L. casei	3	3/3	22.58	1.59	4.99	0.51
G4	양성대조군	3	3/3	23.06	2.07	4.84	0.67

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표7&gt;. 공격접종 5일 후 접촉전파군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	0/6	-	-	-	-
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	0/6	-	-	-	-
G3	L. casei	7	0/7	-	-	-	-
G4	양성대조군	7	0/7	-	-	-	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표8&gt;. 공격접종 5일 후 공격접종군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	1/3	21.58	-	5.31	-
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	22.27	3.61	5.09	1.16
G3	L. casei	3	1/3	18.38	-	6.34	-
G4	양성대조군	3	1/3	33.25	-	1.57	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표9&gt;. 공격접종 7일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	6/6	25.85	4.77	3.94	1.53
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	6/6	30.36	5.54	2.49	1.78
G3	L. casei	7	6/7	24.16	2.44	4.49	0.79
G4	양성대조군	7	7/7	24.99	5.86	4.22	1.88

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표10&gt;. 공격접종 7일 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	30.59	2.27	2.42	0.73
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	28.29	1.80	3.16	0.58
G3	L. casei	3	3/3	28.96	2.39	2.94	0.77
G4	양성대조군	3	3/3	32.07	1.56	1.94	0.50

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표11&gt;. 공격접종 7일 후 접촉전파군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	3/6	33.14	1.78	1.60	0.57
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	4/6	30.79	5.51	2.35	1.77
G3	L. casei	7	2/7	33.50	0.14	1.49	0.05
G4	양성대조군	7	3/7	24.61	7.78	4.34	2.50

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표12&gt;. 공격접종 7일 후 공격접종군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	2/3	21.36	4.93	5.39	1.58
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	21.73	6.24	5.26	2.00
G3	L. casei	3	1/3	19.34	-	6.03	-
G4	양성대조군	3	1/3	20.87	-	5.54	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표13&gt;. 공격접종 9일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	6/6	21.95	1.22	5.19	0.39
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	4/6	28.84	5.33	2.98	1.71
G3	L. casei	7	7/7	24.24	3.56	4.46	1.15
G4	양성대조군	7	7/7	21.94	2.06	5.20	0.66

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표14&gt;. 공격접종 9일 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	30.68	0.70	2.39	0.23
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	33.48	0.44	1.49	0.14
G3	L. casei	3	3/3	31.83	0.98	2.02	0.31
G4	양성대조군	3	2/3	29.53	2.51	2.76	0.81

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표15&gt;. 공격접종 9일 후 접촉전파군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	5/6	26.39	6.91	3.77	2.22
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	2/6	24.23	10.40	4.46	3.34
G3	L. casei	7	5/7	25.85	3.91	3.94	1.25
G4	양성대조군	7	6/7	22.95	5.98	4.87	1.92

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표16&gt;. 공격접종 9일 후 공격접종군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID <sub>50</sub> <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	2/3	32.77	0.68	1.72	0.22
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	1/3	27.86	-	3.30	-
G3	L. casei	3	1/3	31.02	-	2.28	-
G4	양성대조군	3	2/3	31.34	2.87	2.18	0.92

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표17&gt;. 공격접종 11일 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID50 <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	6/6	28.55	4.42	3.07	1.42
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	6/6	26.77	3.73	3.65	1.20
G3	L. casei	7	7/7	26.54	2.91	3.72	0.93
G4	양성대조군	6	6/6	25.95	4.58	3.91	1.47

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표18&gt;. 공격접종 11일 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID50 <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	32.25	0.96	1.89	0.31
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	31.69	0.81	2.07	0.26
G3	L. casei	3	3/3	29.79	4.09	2.68	1.31
G4	양성대조군	3	3/3	31.31	0.71	2.19	0.23

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표19&gt;. 공격접종 11일 후 접촉전파군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID50 <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	5/6	18.47	3.86	6.31	1.24
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	4/6	24.23	2.38	4.46	0.76
G3	L. casei	7	5/7	27.61	2.73	3.38	0.88
G4	양성대조군	6	5/6	25.27	5.93	4.13	1.90

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표20&gt;. 공격접종 11일 후 공격접종군의 총배설강 내 AIV 배출량 확인

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rate <sup>A</sup>	Ct value <sup>B</sup>		LogEID50 <sup>C</sup>	
				Mean	SD	Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	34.04	1.04	1.31	0.33
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	2/3	31.09	2.80	2.26	0.90
G3	L. casei	3	0/3	-	-	-	-
G4	양성대조군	3	1/3	33.98	-	1.33	-

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수<sup>B</sup> Real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value의 평균 및 표준 편차<sup>C</sup> Influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 EID50 평균 및 표준 편차

&lt;표21&gt;. 공격접종 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 변화 확인

Group	Treatment	Virus replication <sup>A</sup>				
		3dPC	5dPC	7dPC	9dPC	11dPC
G1	3D8 L. casei (secrete)	0/6 (2.06±0.99)	5/6 (3.94±1.53)	6/6 (5.19±0.39)	6/6 (3.07±1.42)	6/6
G2	3D8 L. casei (anchor)	2/6 (2.64±1.32)	5/6 (1.86±1.62)	6/6 (2.49±1.78)	4/6 (2.98±1.71)	6/6 (3.65±1.2)
G3	L. casei	0/7 (2.67±1.00)	5/7 (4.49±0.79)	6/7 (4.46±1.15)	7/7 (3.72±0.93)	7/7
G4	양성대조군	1/7 (3.57)	2/7 (5.14±0.43)	7/7 (4.22±1.88)	7/7 (5.20±0.66)	6/6 (3.91±1.47)

<sup>A</sup> 양성수수/시험수수. 괄호 안의 값은 real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value를 influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 LogEID50 평균 및 표준 편차임.

&lt;표22&gt;. 공격접종 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 변화 확인

Group	Treatment	Virus replicationA				
		3dPC	5dPC	7dPC	9dPC	11dPC
G1	3D8 L. casei (secrete)	3/3 (5.29±0.43)	3/3 (5.11±0.42)	3/3 (2.42±0.73)	3/3 (2.39±0.23)	3/3 (1.89±0.31)
G2	3D8 L. casei (anchor)	3/3 (5.43±0.10)	3/3 (5.16±0.22)	3/3 (3.16±0.58)	3/3 (1.49±0.14)	3/3 (2.07±0.26)
G3	L. casei	3/3 (5.29±0.19)	3/3 (4.99±0.51)	3/3 (2.94±0.77)	3/3 (2.02±0.31)	3/3 (2.68±1.31)
G4	양성대조군	3/3 (5.99±0.50)	3/3 (4.84±0.67)	3/3 (1.94±0.50)	2/3 (2.76±0.81)	3/3 (2.19±0.23)

A 양성수수/시험수수. 팔호 안의 값은 real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value를 influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 LogEID50 평균 및 표준 편차임.

&lt;표23&gt;. 공격접종 후 접촉전파군의 총배설장 내 AIV 배출량 변화 확인

Group	Treatment	Virus replicationA				
		3dPC	5dPC	7dPC	9dPC	11dPC
G1	3D8 L. casei (secrete)	0/6	0/6	3/6 (1.60±0.57)	5/6 (3.77±2.22)	5/6 (6.31±1.24)
G2	3D8 L. casei (anchor)	0/6	0/6	4/6 (2.35±1.77)	2/6 (4.46±3.34)	4/6 (4.46±0.76)
G3	L. casei	0/7	0/7	2/7 (1.49±0.05)	5/7 (3.94±1.25)	5/7 (3.38±0.88)
G4	양성대조군	0/7	0/7	3/7 (4.34±2.50)	6/7 (4.87±1.92)	5/7 (4.13±1.90)

A 양성수수/시험수수. 팔호 안의 값은 real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value를 influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 LogEID50 평균 및 표준 편차임.

## &lt;표24&gt;. 공격접종 후 공격접종군의 총배설장 내 AIV 배출량 변화 확인

Group	Treatment	Virus replicationA				
		3dPC	5dPC	7dPC	9dPC	11dPC
G1	3D8 L. casei (secrete)	0/3	1/3 (5.31)	2/3 (5.39±1.58)	2/3 (1.72±0.22)	3/3 (1.31±0.33)
G2	3D8 L. casei (anchor)	2/3 (1.93±0.53)	3/3 (5.09±1.16)	3/3 (5.26±2.00)	1/3 (3.30)	2/3 (2.26±0.90)
G3	L. casei	1/3 (3.66)	1/3 (6.34)	1/3 (6.03)	1/3 (2.28)	0/3
G4	양성대조군	0/3	1/3 (1.57)	1/3 (5.54)	2/3 (2.18±0.92)	1/3 (1.33)

A 양성수수/시험수수. 팔호 안의 값은 real time RT-PCR을 통하여 양성으로 확인된 oropharyngeal swab 샘플의 cycle threshold (Ct) value를 influenza virus의 standard curve와의 비교를 통해 산출한 LogEID50 평균 및 표준 편차임.

## &lt;표25&gt;. 공격접종 17일 후 접촉전파군의 혈구응집억제반응시험 결과

Group	Treatment	No. of chicks	Positive rateA	HI titerB	
				Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	6	6/6	5.67	1.21
G2	3D8 L. casei (anchor)	6	5/6	3.67	2.58
G3	L. casei	7	7/7	4.71	0.95
G4	양성대조군	6	7/7	5.83	0.75

A 양성수수/시험수수

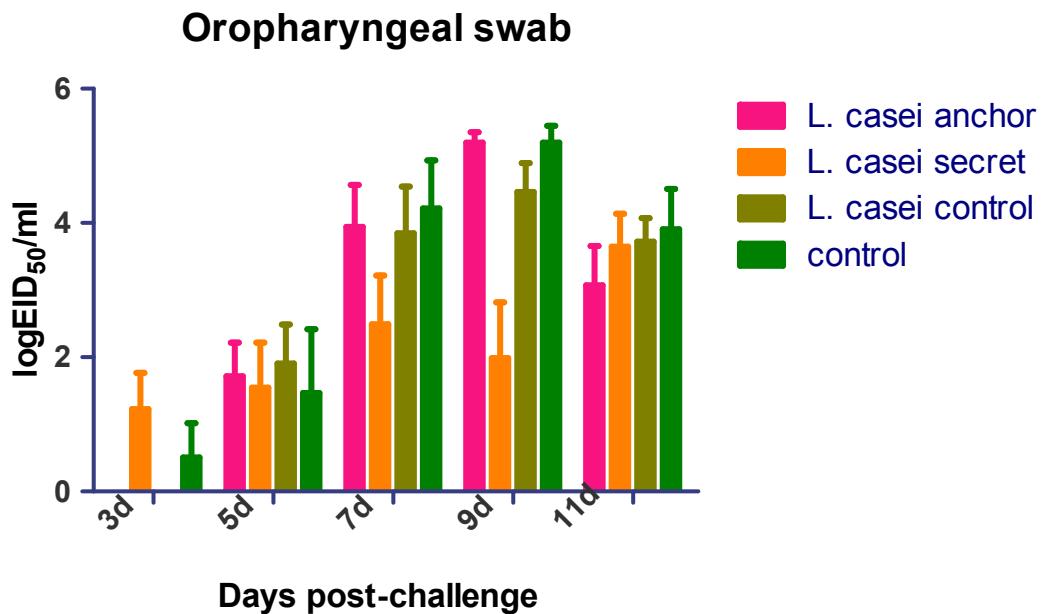
B 공격접종 17일 후 채혈한 뒤 그룹별로 공시된 혈구응집억제시험 불활화 항원을 이용하여 HI 항체가를 측정하여 평균값 (Mean)과 표준편차 (SD)를 산출함 (Log2)

## &lt;표26&gt;. 공격접종 17일 후 공격접종군의 혈구응집억제반응시험 결과

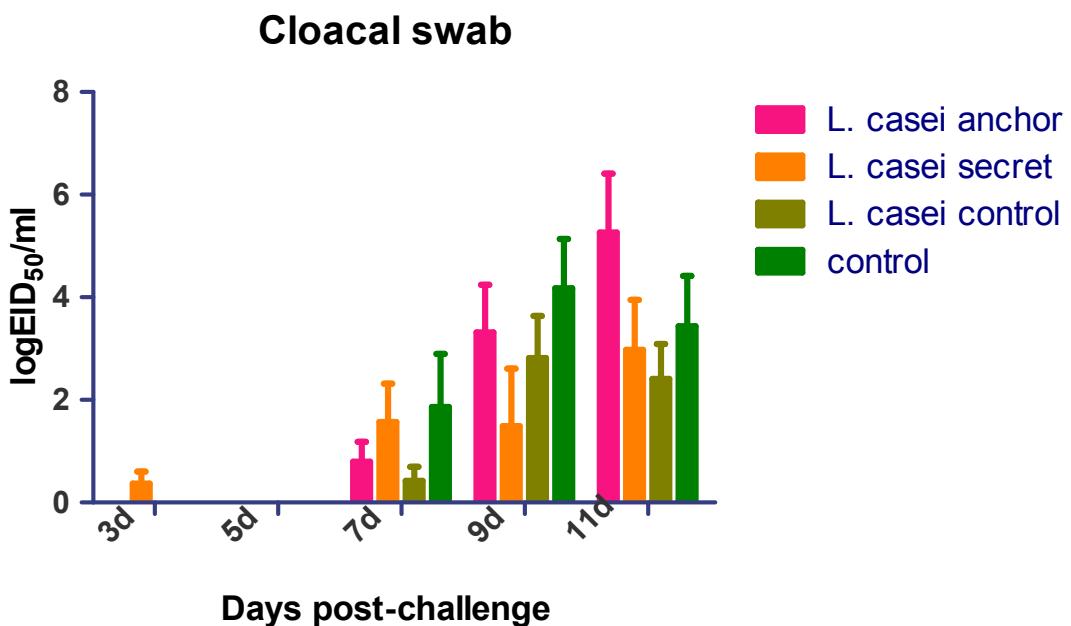
Group	Treatment	No. of chicks	Positive rateA	HI titerB	
				Mean	SD
G1	3D8 L. casei (secrete)	3	3/3	5.67	0.58
G2	3D8 L. casei (anchor)	3	3/3	5.67	1.53
G3	L. casei	3	3/3	4.33	2.08
G4	양성대조군	3	3/3	6.00	0.00

A 양성수수/시험수수

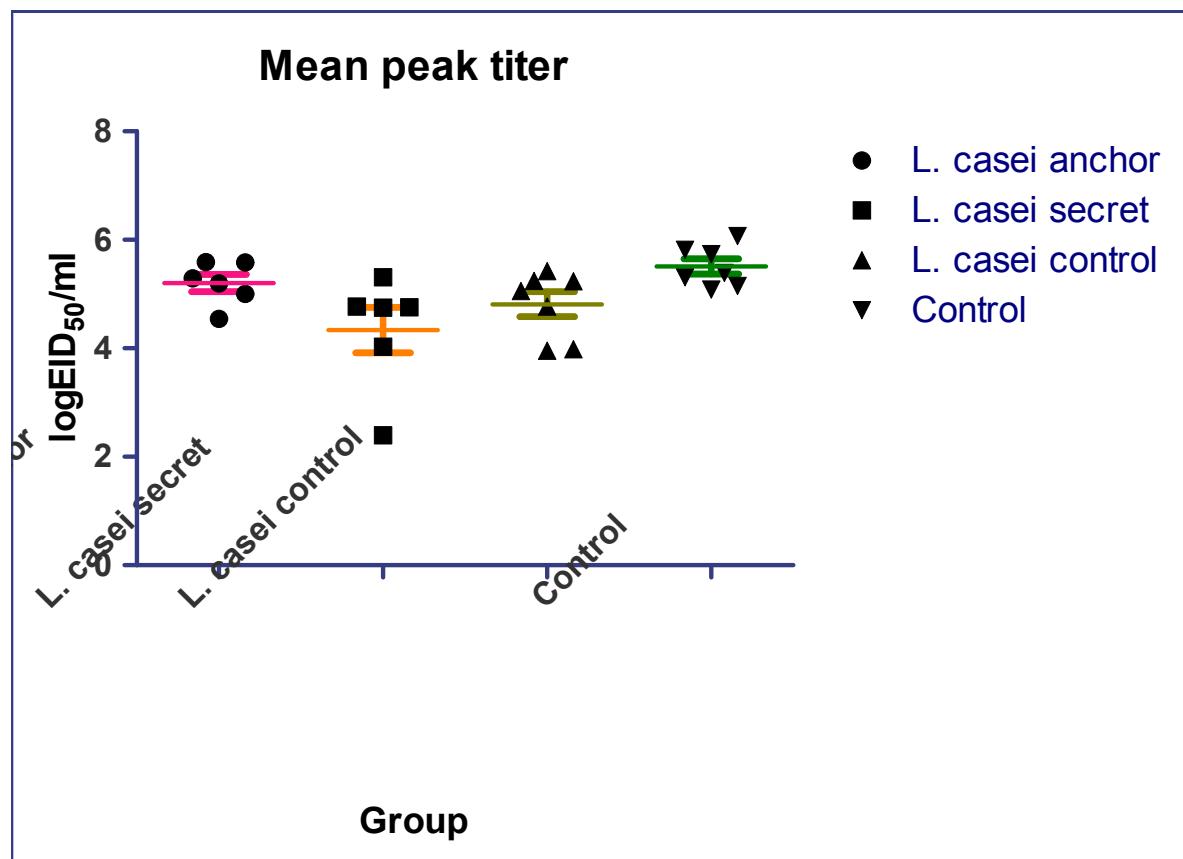
B 공격접종 17일 후 채혈한 뒤 그룹별로 공시된 혈구응집억제시험 불활화 항원을 이용하여 HI 항체가를 측정하여 평균값 (Mean)과 표준편차 (SD)를 산출함 (Log2)



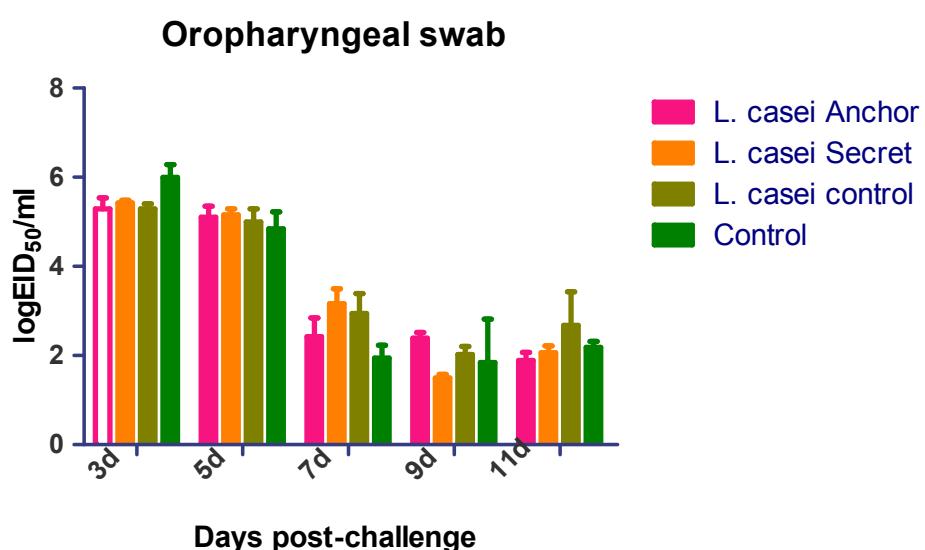
<그림1>. 공격접종 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량 변화 확인



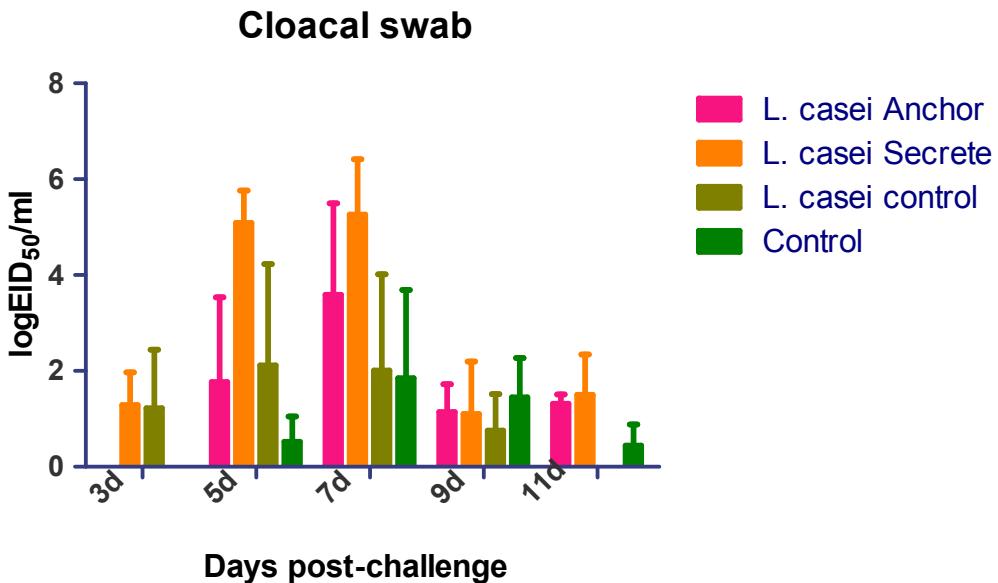
<그림2>. 공격접종 후 접촉전파군의 총배설장 내 AIV 배출량 변화 확인



<그림3>. 공격접종 후 접촉전파군의 구강 내 AIV 배출량의 peak 값



<그림4>. 공격접종 후 공격접종군의 구강 내 AIV 배출량 변화 확인



<그림5>. 공격접종 후 접촉전파군의 총배설장 내 AIV 배출량 변화 확인

- 실험분석 결과를 종합하여 보면 시험군과 대조군사이의 바이러스 배출량은 유의적인 차이는 없었으나, 시험군[3D8 L. casei (secrete), 3D8 L. casei (anchor)]의 접촉전파군의 구강에서 바이러스 배출량은 대조군에 비해 낮은 것처럼 보이나 유의적인 의미를 가지지는 못하는 것으로 나타났다.

- 항-바이러스 단백질을 발현하는 사료첨가제(미세조류) 식이에 따른 닭의 생리·면역학적 특성 변화 조사
  - 본 시험은 1 일령 ROSS 308(♂, ♀) 375수 공시하였고, 시험 개시 체중은  $45 \pm 0.39g$ 으로 사양시험은 5주간 실시하였다. 시험은 1) NC, 1.0% E.coli Fermented liquor; 2) PC1, 0.2% E.coli Fermented liquor + Chlorella; 3) PC2, 1.0% E.coli Fermented liquor + Chlorella; 4) T1, 0.2% E.coli (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); 및 5) T2, 1.0% E.coli (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral)으로 5처리하여 처리당 5반복, 반복당 15수씩 무작위 배치하였다.
  - 육계 사료 내 채조합 미세조류 첨가가 생산성, 육질특성, 혈액 특성, 분내 미생물 조성, 분내 가스 조성 및 영양소 소화율에 미치는 영향 조사 결과를 조사하였다.

## 1) 생산성

<표 27>. Effect of *E.coli* liquor and Chlorella supplementation of sea plant on growth performance in broilers<sup>1</sup>

Items	NC	PC1	PC2	T1	T2	SEM <sup>2</sup>	P-Value					
							NC VS PC2	NC VS T2	PC1 VS PC2	T1 VS T2	PC1 VS T1	PC2 VS T2
<b>d 1-21</b>												
BWG, g	720	728	745	734	741	14	0.2252	0.3141	0.4091	0.7660	0.7509	0.8271
FI, g	1040	1045	1020	1032	1034	8	0.1179	0.6465	0.0533	0.8954	0.3161	0.2532
FCR	1.444	1.435	1.369	1.405	1.396	0.033	0.1280	0.3148	0.1838	0.6505	0.7235	0.5782
<b>d 21-35</b>												
BWG, g	999 <sup>b</sup>	1011 <sup>ab</sup>	1026 <sup>a</sup>	1016 <sup>ab</sup>	1023 <sup>ab</sup>	8	0.0286	0.0528	0.1929	0.5848	0.6322	0.7578
FI, g	1506	1502	1490	1495	1495	21	0.6199	0.7320	0.7119	0.9839	0.8140	0.8771
FCR	1.508	1.486	1.452	1.471	1.462	0.022	0.0908	0.1569	0.2907	0.7429	0.6623	0.7575
<b>Overall</b>												
BWG, g	1719 <sup>c</sup>	1739 <sup>bc</sup>	1771 <sup>a</sup>	1751 <sup>ab</sup>	1763 <sup>ab</sup>	9	0.0010	0.0032	0.0248	0.3469	0.3620	0.5771
FI, g	2545	2546	2510	2527	2529	20	0.2269	0.5736	0.2097	0.9380	0.4917	0.5049
FCR	1.481 <sup>a</sup>	1.464 <sup>ab</sup>	1.417 <sup>c</sup>	1.443 <sup>abc</sup>	1.434 <sup>bc</sup>	0.013	0.0032	0.0218	0.0208	0.6078	0.2824	0.3677

<sup>1</sup>Abbreviation: NC, 1.0% *E.coli* Fermented liquor; PC1, 0.2% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; PC2, 1.0% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; T1, 0.2% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); T2, 1.0% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral).

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b,c</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

- 육계 사료 내 재조합 미세조류 첨가가 생산성에 미치는 영향은 표27에 나타내었다. 21-35일차 증체량에 있어 PC2 처리구가 NC 처리구 보다 유의적으로 높게 나타났다 (P<0.05, P=0.0286). 전체 시험기간 증체량에 있어 PC2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 (P<0.05, P=0.0010), T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났으며 (P=0.0032), PC2 처리구가 PC1 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다 (P=0.0248). 사료 요구율에 있어 PC2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났고 (P<0.05, P=0.0032), T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났으며 (P=0.0218), PC2 처리구가 PC1 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났다(P=0.0208).

## 2) 육질 특성

<표 28>. Effect of E.coli liquor and Chlorella supplementation of sea plant on growth performance in broilers<sup>1</sup>

Items	NC	PC1	PC2	T1	T2	SEM <sup>2</sup>	P-Value					
							NC VS PC2	NC VS T2	PC1 VS PC2	T1 VS T2	PC1 VS T1	PC2 VS T2
pH value	5.47	5.45	5.42	5.37	5.41	0.04	0.3869	0.2632	0.6441	0.4721	0.1547	0.7957
Breast muscle color												
Lightness (L*)	52.78	52.76	52.46	52.91	52.77	0.68	0.7367	0.9901	0.7547	0.8819	0.8729	0.7460
Redness (a*)	10.52	10.69	10.46	10.28	10.34	0.18	0.8195	0.5044	0.3923	0.7930	0.1241	0.6594
Yellowness (b*)	8.55	8.51	8.43	8.58	8.27	0.21	0.6913	0.3525	0.7715	0.2919	0.8152	0.5915
WHC, %	56.87	56.82	56.64	56.91	56.83	0.67	0.8113	0.9733	0.8480	0.9399	0.9290	0.8373
Drip loss, %												
d 1	5.53	5.56	5.51	5.47	5.48	0.40	0.9735	0.9316	0.9275	0.9832	0.8693	0.9581
d 3	9.04	8.93	8.71	8.81	8.82	0.14	0.1157	0.3029	0.2853	0.9259	0.5448	0.5743
d 5	11.32	11.16	11.20	11.16	11.05	0.14	0.5415	0.1854	0.8536	0.5871	1.0000	0.4678
d 7	13.23 <sup>a</sup>	13.08 <sup>ab</sup>	13.03 <sup>ab</sup>	13.00 <sup>ab</sup>	12.93 <sup>b</sup>	0.09	0.1531	0.0304	0.7215	0.5881	0.5481	0.4327
Relative organ weight, %												
Breast muscle	19.13 <sup>b</sup>	19.50 <sup>ab</sup>	20.07 <sup>a</sup>	19.69 <sup>ab</sup>	19.72 <sup>ab</sup>	0.68	0.0052	0.0666	0.0813	0.9095	0.5558	0.2855
Liver	3.02	3.04	2.94	2.97	3.02	0.11	0.6135	0.9896	0.5219	0.7361	0.6456	0.6045
Bursa of Fabricius	0.15	0.14	0.15	0.14	0.13	0.01	0.5484	0.1976	0.4245	0.4245	0.7637	0.0630
Abdominal fat	1.74	1.70	1.71	1.68	1.72	0.12	0.8569	0.8758	0.9186	0.8381	0.9377	0.9808
Spleen	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12	0.01	0.3300	0.2739	0.5410	0.7133	0.7133	0.9024
Gizzard	1.24	1.20	1.27	1.22	1.25	0.04	0.4978	0.8542	0.1574	0.5821	0.6998	0.6203

<sup>1</sup>Abbreviation: NC, 1.0% *E.coli* Fermented liquor; PC1, 0.2% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; PC2, 1.0% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; T1, 0.2% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); T2, 1.0% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral).

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

- 육계 사료 내 재조합 미세조류 첨가가 육질특성에 미치는 영향은 표28에 나타내었다. 가슴육 저장감량 7일차에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났다(P<0.05, P=0.0304). 장기무게 중 가슴육에 있어 PC2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05, P=0.0052). pH, 육색 및 보수력에 있어 처리구간 유의적인 차이는 나타나지 않았다(P>0.05).

## 3) 혈액 특성

<표 29>. Effect of dietary supplementation of sea plant on blood profiles in broilers<sup>1</sup>

Items	NC	PC1	PC2	T1	T2	SEM <sup>2</sup>	P-Value					
							NC VS		PC1 VS PC2	T1 VS T2	PC1 VS T1	
							PC2	T2				
WBC, 10 <sup>3</sup> /μl	22.9	23.1	23.9	24.0	24.5	1.4	0.6117	0.4386	0.7050	0.8303	0.6648	0.7878
RBC, 10 <sup>6</sup> /μl	2.81	2.91	2.94	3.10	3.22	0.2	0.6027	0.1134	0.8978	0.6299	0.4637	0.2798
Lymphocyte, %	61.8	63.3	64.1	65.8	65.9	2.8	0.5468	0.2904	0.8265	0.9695	0.5218	0.6450
Heterophil, %	31.3	31.9	32.4	33.1	33.8	1.30	0.5738	0.1862	0.8126	0.7008	0.5318	0.4405
Basophil, %	2.87	2.93	2.98	3.04	3.10	0.22	0.7060	0.4558	0.8630	0.8656	0.7084	0.7108
Platelet, 10 <sup>9</sup> /ℓ	21.78	21.97	22.02	22.08	22.14	0.54	0.7597	0.6424	0.9522	0.9419	0.8840	0.8738
Total Cholesterol, mg/dL	111 <sup>b</sup>	115 <sup>b</sup>	120 <sup>ab</sup>	121 <sup>ab</sup>	126 <sup>a</sup>	4	0.0910	0.0056	0.3079	0.3551	0.1993	0.2342
HDL/C, mg/dL	82	83	87	90	95	6	0.5256	0.1299	0.6522	0.5638	0.4400	0.3694
LDL/C, mg/dL	26.9 <sup>a</sup>	24.7 <sup>ab</sup>	22.7 <sup>ab</sup>	22.2 <sup>ab</sup>	21.8 <sup>b</sup>	2	0.0681	0.0284	0.3764	0.8588	0.2703	0.6893
Triglyceride, mg/dL	69	67	66	66	66	7	0.7560	0.7170	0.9506	0.9669	0.9422	0.9587
AST, U/L	187.2	183.7	183.0	181.7	180.1	5.6	0.5950	0.3722	0.9271	0.8382	0.8012	0.7156
ALT, U/L	14.2 <sup>a</sup>	12.8 <sup>ab</sup>	12.3 <sup>ab</sup>	11.5 <sup>b</sup>	10.9 <sup>b</sup>	0.6	0.0406	0.0008	0.5949	0.5573	0.1488	0.1344
BUN, mg/dL	3.2 <sup>b</sup>	3.6 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>ab</sup>	4.0 <sup>a</sup>	4.1 <sup>a</sup>	0.2	0.1584	0.0024	0.8166	0.6710	0.1108	0.0756
Creatinine, mg/dL	0.26 <sup>b</sup>	0.28 <sup>ab</sup>	0.29 <sup>ab</sup>	0.31 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.01	0.1542	0.0079	0.5322	0.8097	0.0892	0.1828
Total Protein, g/dL	2.7	3.1	3.2	3.1	3.3	0.2	0.0890	0.0533	0.8873	0.5480	0.8317	0.8042
Albumin, g/dL	1.2	1.3	1.4	1.4	1.3	0.1	0.2426	0.7933	0.3616	0.3616	0.3616	0.3616
Globulin, g/dL	1.5	1.9	1.8	1.7	2.0	0.2	0.2955	0.0834	0.7340	0.2955	0.4978	0.4767
IgG, g/dL	234	239	239	244	248	13	0.7865	0.4538	1.0000	0.8079	0.8121	0.6310
IgM, g/dL	154	155	158	164	163	4	0.4958	0.1236	0.5971	0.8376	0.1146	0.3862
IgA, g/dL	37 <sup>b</sup>	40 <sup>ab</sup>	44 <sup>ab</sup>	45 <sup>ab</sup>	48 <sup>a</sup>	3	0.0771	0.0097	0.3688	0.5531	0.2299	0.3688

<sup>1</sup>Abbreviation: NC, 1.0% *E.coli* Fermented liquor; PC1, 0.2% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; PC2, 1.0% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; T1, 0.2% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); T2, 1.0% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral).

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

- 육계 사료 내 재조합 미세조류 첨가가 혈액 특성에 미치는 영향은 표29에 나타내었다. 혈액 내 Total Cholesterol 함량에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ,  $P=0.0056$ ). LDL 함량에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ,  $P=0.0284$ ). ALT 함량에 있어 T1 및 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났고 ( $P<0.05$ ,  $T2=0.0008$ ), PC2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P=0.0406$ ). BUN 함량에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ,  $P=0.0024$ ). Creatinine 함량에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ,  $P=0.0079$ ). IgA 함량에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다( $P<0.05$ ,  $P=0.0097$ ).

#### 4) 분내 미생물 조성

<표 30>. Effect of *E.coli* liquor and Chlorella supplementation of sea plant on growth performance in broilers<sup>1</sup>

Items, $\log_{10}\text{cfu/g}$	NC	PC1	PC2	T1	T2	SEM <sup>2</sup>	P-Value					
							NC VS PC2	NC VS T2	PC1 VS PC2	PC1 VS T2	T1 VS T2	T1 VS T1
<i>Lactobacillus</i>	7.57	7.64	7.61	7.61	7.63	0.03	0.3973	0.1964	0.5213	0.6485	0.5213	0.6485
<i>E.coli</i>	6.49	6.45	6.41	6.39	6.40	0.07	0.4144	0.3747	0.6484	0.9009	0.5144	0.9421

<sup>1</sup>Abbreviation: NC, 1.0% *E.coli* Fermented liquor; PC1, 0.2% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; PC2, 1.0% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; T1, 0.2% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); T2, 1.0% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral).

<sup>2</sup>Standard error of means.

- 육계 사료 내 재조합 미세조류 첨가가 분내 미생물 조성에 미치는 영향은 표30에 나타내었다. 분내 미생물 조성에 있어 처리구간 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $P>0.05$ ).

## 5) 분내 가스 조성

<표 31>. Effect of *E.coli* liquor and Chlorella supplementation of sea plant on growth performance in broilers<sup>1</sup>

Items, ppm	NC	PC1	PC2	T1	T2	SEM <sup>2</sup>	P-Value					
							NC VS		PC1 VS		T1 VS	
							PC2	T2	PC2	T2	T1	T2
NH <sub>3</sub>	31.10 <sup>a</sup>	30.78 <sup>ab</sup>	30.56 <sup>ab</sup>	29.35 <sup>bc</sup>	28.89 <sup>c</sup>	0.55	0.4920	0.0074	0.7789	0.5580	0.0743	0.0386
H <sub>2</sub> S	2.37	2.36	2.31	2.11	2.27	0.22	0.8449	0.7444	0.8705	0.6024	0.4169	0.8962
R.SH	1.47	1.32	1.45	1.52	1.25	0.12	0.9072	0.2050	0.4506	0.1219	0.2483	0.2483

<sup>1</sup>Abbreviation: NC, 1.0% *E.coli* Fermented liquor; PC1, 0.2% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; PC2, 1.0% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; T1, 0.2% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); T2, 1.0% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral).

<sup>a,b,c</sup>Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

- 육계 사료 내 재조합 미세조류 첨가가 분내 가스 조성에 미치는 영향은 표31에 나타내었다. 분내 암모니아 발생에 있어 T2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났고 (P<0.05, P=0.0074), T2 처리구가 PC2 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났다(P=0.0386).

## 6) 영양소 소화율

<표 32>. Effect of dietary supplementation of sea plant on nutrient digestibility in broilers<sup>1</sup>

Items, %	NC	PC1	PC2	T1	T2	SEM <sup>2</sup>	P-Value					
							NC VS		PC1 VS		T1 VS	
							PC2	T2	PC2	T2	T1	T2
Dry matter	69.74	69.90	70.21	69.98	70.11	0.21	0.1194	0.2176	0.3035	0.6702	0.7871	0.7325
Nitrogen	66.06	66.42	66.71	66.32	66.57	1.16	0.6983	0.7591	0.8633	0.8787	0.9508	0.9353
Energy	72.85 <sup>b</sup>	73.00 <sup>ab</sup>	73.60 <sup>a</sup>	73.20 <sup>ab</sup>	73.35 <sup>ab</sup>	0.23	0.0270	0.1296	0.0712	0.6304	0.5429	0.4460

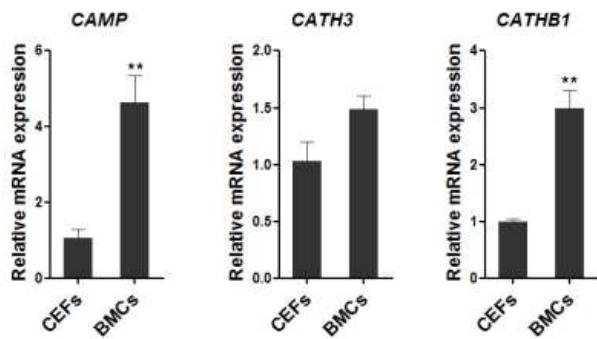
<sup>1</sup>Abbreviation: NC, 1.0% *E.coli* Fermented liquor; PC1, 0.2% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; PC2, 1.0% *E.coli* Fermented liquor + Chlorella; T1, 0.2% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral); T2, 1.0% *E.coli* (Anti-viral) + Chlorella (Anti-viral).

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscripts differ ( $P<0.05$ ).

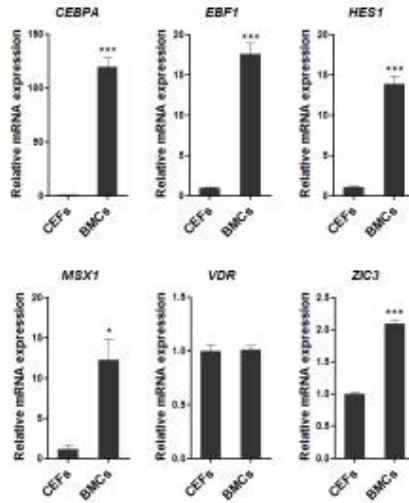
- 육계 사료 내 재조합 미세조류 첨가가 영양소 소화율에 미치는 영향은 표32에 나타내었다. 에너지 소화율에 있어 PC2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ( $P<0.05$ ), PC2 처리구가 NC 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다 ( $P=0.0270$ ). 건물 소화율 및 질소 소화율에서는 처리구간 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $P>0.05$ ).

- 외부공동연구팀의 닭을 이용한 연구부분 협력연구 수행
  - 당해년도 외부 협동연구팀에서 협력 연구 요청이 없었다.
  
- 닭에서 발현한다고 알려진 항균 웨타이드인 cathalacidin family의 발현 분석
  - 닭에서 발현한다고 알려진 항균 웨타이드인 Cathalacidin family의 발현을 분석하기 위하여 닭의 일반 체세포(CEF), 면역세포(Bone Marrow)에서 발현양상을 분석한다. Cathalacidin family 유전자의 전사과정을 조절해주는 전사인자를 조사하기 위하여 PRPOMO database를 이용하여 전사인자를 선발하고, 면역세포에서 발현 양상을 검증 한다. 발현 양상을 바탕으로 후보 전사인자를 선발하고, 선발된 전사인자의 기능분석을 위하여 siRNA를 통한 발현 억제 연구를 진행한다. 발현 억제시 Cathalacidin family의 발현 양상을 검증한다. Cathalacidin family중 하나인 CAMP promoter에 전사인자의 binding site를 mutation하여 발현 양상을 검증한다.



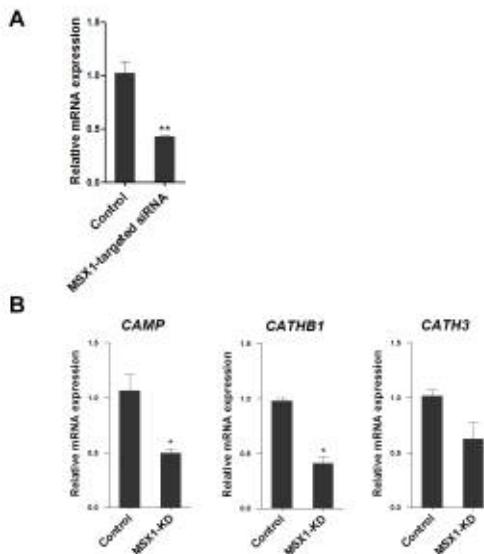
<그림6>. Expression analysis of cathelicidin genes in chicken BMCs and CEFs

- Cathelicidin 유전자들(CAMP, CATH3, and CATHB1)을 닭 골수세포와 섬유아세포에서 발현 분석결과 골수세포에서 강력하게 발현됨을 확인하였다(그림6).



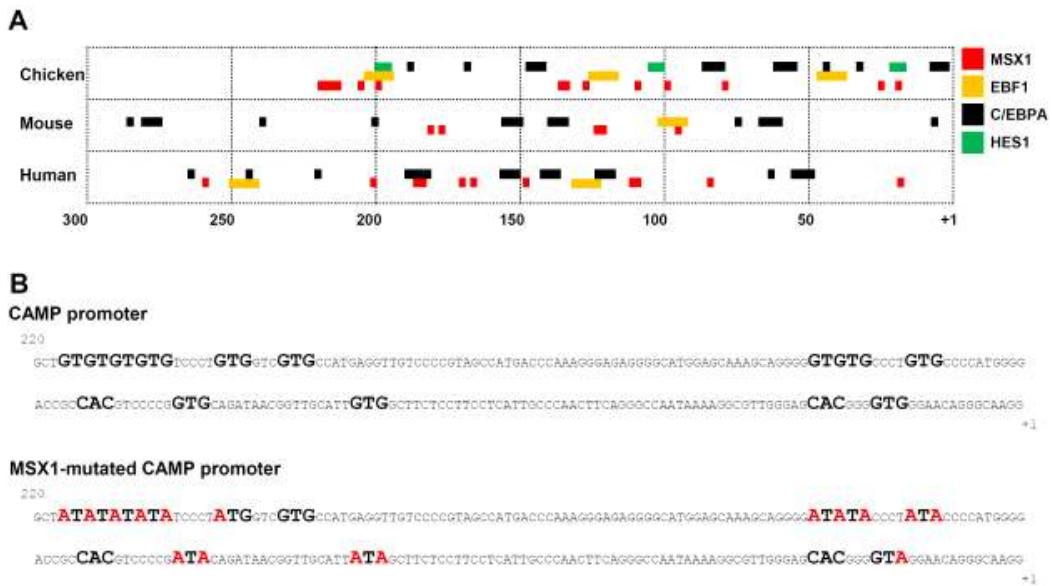
<그림7>. Expression analysis of the putative binding factors of cathelicidin gene promoters in chicken BMCs and CEFs

- Cathelicidin 유전자들의 프로모터 영역에 결합할 것으로 예측되는 전사인자들의 발현양상을 분석한 결과 전사인자들(CEBPA, EBF1, HES1, MSX1, and ZIC3)의 발현이 섬유아세포보다 골수세포에서 높게 발현됨을 확인하였다(그림7).



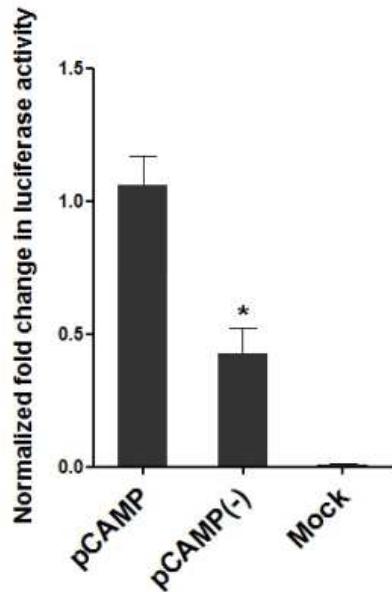
<그림8>. Expression of MSX1 in bone marrow cells after target-specific siRNA expression

- 앞서 말한 전사인자들(CEBPA, EBF1, HES1, MSX1, and ZIC3) 가운데 MSX1 전사인자의 siRNA 합성하고 골수세포에서 유전자발현 저하 능을 조사하였다(A). 골수세포에 합성한 MSX1 전사인자의 siRNA를 transfection하고 cathelicidin 유전자들(CAMP, CATH3, and CATHB1)의 발현 양상을 조사한 결과 대조군에 비하여 유전자발현이 낮아짐을 확인하였다(그림8).



<그림9>. Prediction of TF binding sites and mutation of the CAMP promoter

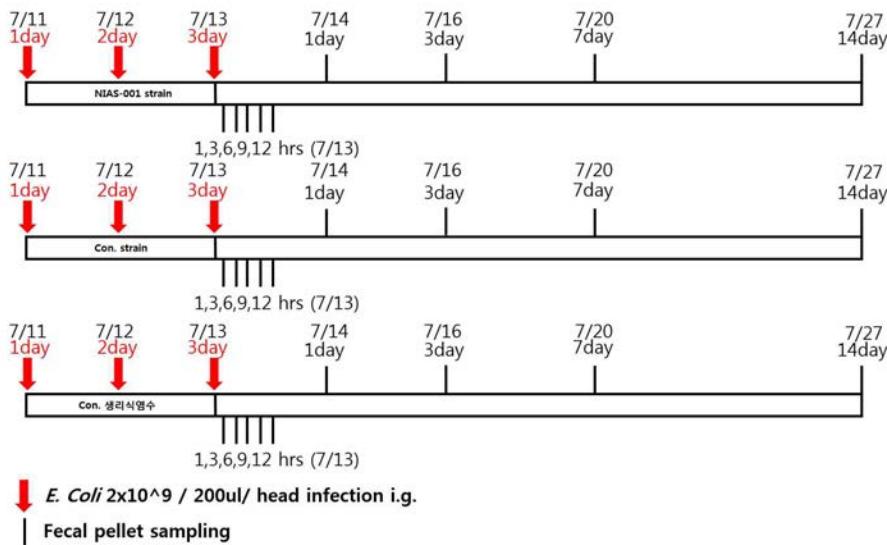
- 사람, 생쥐, 그리고 닭의 CAMP 유전자들의 프로모터 영역에 MSX1, EBF1, C/EBPα, 그리고 HES1 전사인자 결합 예상부위를 조사한 결과(그림9A)이고, CAMP 유전자 프로모터 영역에 전사인자 MSX1 예상 결합부위 염기서열을 일부 mutation시킨 결과이다(그림9B).



<그림10>. Analysis of promoter activity for the 5'-flanking region of CAMP

- 정상적인 닭의 CAMP 유전자 프로모터와 MSX1 예상 결합부위 염기서열을 일부 mutation시킨 프로모터 가지는 각각 벡터를 닭 골수세포에 transfection하고 각각의 프로모터 활성을 조사한 결과 정상의 프로모터가 높은 활성을 보였다. 이는 골수세포에서 MSX1 전사인자가 CAMP 유전자의 발현을 높이는 기능을 가짐을 알 수 있다(그림10).

- 장내 생존 능 시험 : 항-바이러스 단백질 발현 재조합 발현하는 미생물이 동물의 장 관계에서 생존 능 및 유전자 검출 조사
- 분석 시료는 국립축산과학원으로부터 전달받은 *E. coli* wild type을 LB 액상배지에 37°C에서 6시간 배양하여 준비하였으며, NIAS-001는 동일한 배지 및 배양 조건 하에서 Kanamycin (50ug/ml)을 첨가하여 배양 한 후 대조군(wild type)과 동일한 양을 준비하였다.
  - 모든 실험동물들은 한국생명공학연구원 동물실험윤리위원회의 지침에 따라 사용 되었다. 실험동물은 대한바이오링크로부터 구입하였으며 SPF SD 수컷 랫트 25마리(실험군: 10마리, W.T 대조군: 10마리, 생리식염수 대조군: 5마리)를 사용하였다. 한우리 당 2마리로 사육하였고 실내온도는 22±1°C를 유지 하였으며, 12시간 간격으로 낮과 밤의 주기를 두었다. 물과 먹이는 자유롭게 접근하도록 하였으며 실험에 사용한 케이지, 물과 우리에 넣어주는 깔 짚은 모두 121°C에서 30분 이상 멸균된 것을 사용하였다.
  - 세균의 감염은 국립축산과학원으로부터 전달 받은 NIAS-001과 대조군 *E. coli* 2x10<sup>10</sup> 개 cell/ml로 생리식염수를 이용해 희석한 후 랫트 존대를 이용하여 마리당 400 μl (2x10<sup>9</sup> 개) 씩 구강 투여하였으며 이를 1일(24시간) 1 회씩 총 3회 실시하였다. 한편 non-treatment 대조군의 경우 동량의 생리식염수를 동일 횟수로 투여하였다(그림11).



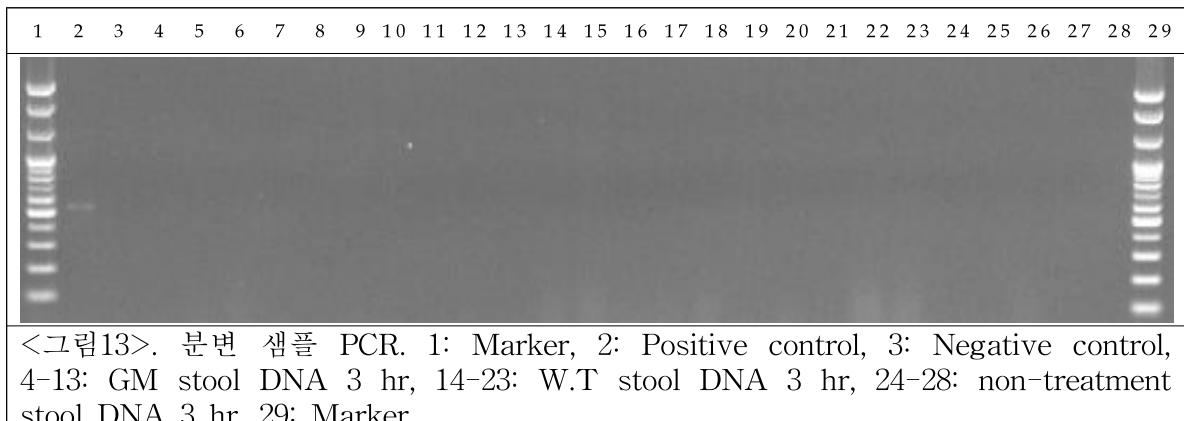
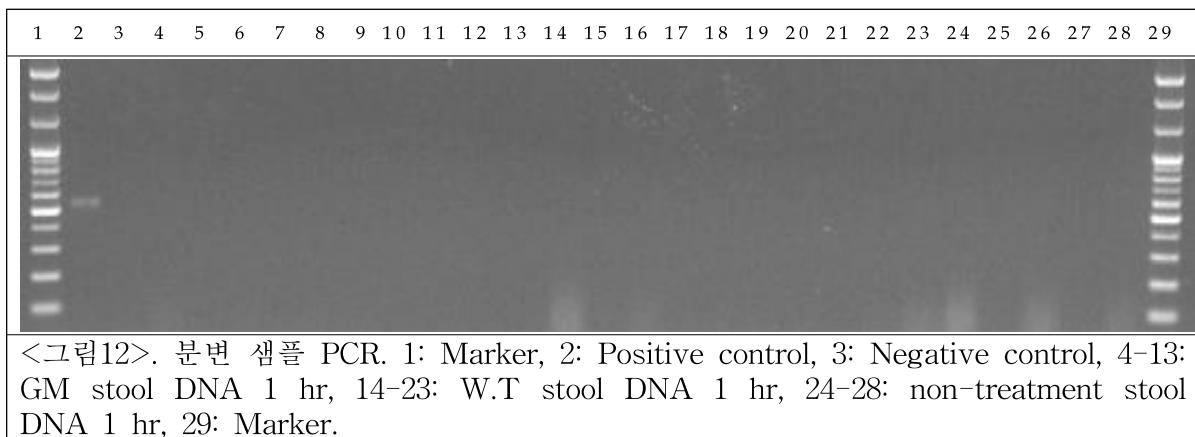
<그림11>. 전체 실험 일정(적색 화살표: 투여, 검정색 막대: 시료채취)

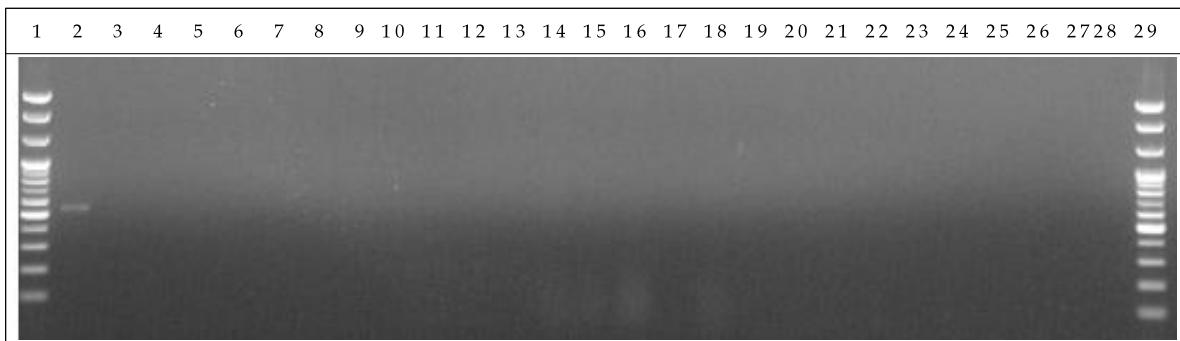
- 분변 total DNA의 추출은 실험군 및 대조군들의 분변을 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일에 채취하여 Accuprep® Stool Genomic DNA Extraction Kit (bioneer)의 Stool lysis buufer와 proteinase K로 균질화 하여 60 °C 중탕기에서 10분 처리 후에 상온에서 12000 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 상층액 400 μl을 채취하여 Kit로 분변의 total DNA를 분리하였고, 이를 NIAS-001에 특이적인 프라이머(primer)를 이용하여 PCR을 실시하였다.
- 세균 접락으로부터 total DNA 추출은 실험군 및 대조군들의 분변을 1시간, 3시간, 6시

간, 9시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일에 채취하여 1 ml 생리식염수에 균질화 한 후, 상층액 100  $\mu\text{l}$ 를 배양 배지에 접종하였다. 이 후 37°C 배양기에서 1일간 배양하여 증식된 세균 집락을 관찰하였다. 배양된 세균 집락을 백금이로 모두 채취하여 100  $\mu\text{l}$  생리식염수에 균질화한 후 1  $\mu\text{l}$ 를 취하여, NIAS-001에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다.

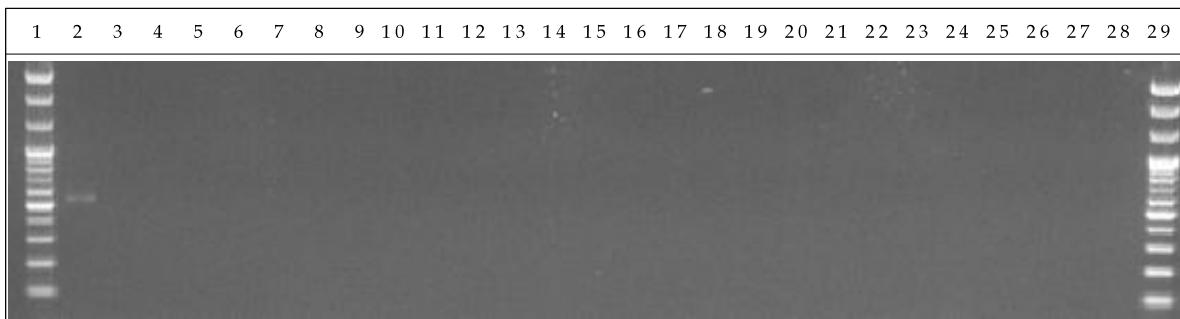
- NIAS-001 검출 PCR 반응은 상기 실험에서 추출한 분변 DNA와 세균 집락에서 추출한 DNA를 주형으로 NIAS-001에 특이적인 primer set (CGGGTATGCGATGGACTATT, CGCGTTCTGCTGTTCTTTATT)을 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. 반응은 95°C에서 최초 3분, 이후 95°C 30초, 65°C 30초, 72°C 30초간 20회를 반복 실행하였고, 마지막으로 72°C에서 1분간 반응시킨 후 4°C에 안정화 시켰다. PCR 반응 산물은 EtBr을 첨가한 1.5 % agarose gel을 이용하여 전기영동 후 자외선을 이용하여 확인하였다.
- 장내 생존 능 시험은 항-바이러스 단백질 발현 재조합 발현하는 미생물이 동물의 장 관계에서 생존 능 및 유전자 검출 조사 결과는 아래와 같다.

### 1) 분변 total DNA PCR

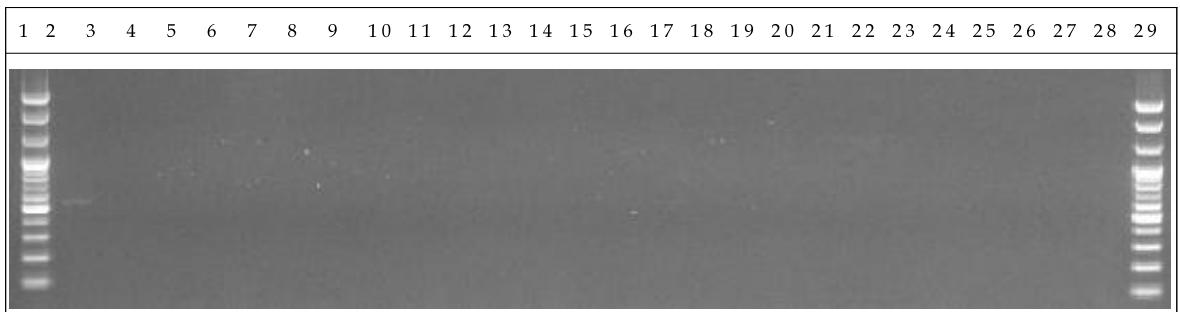




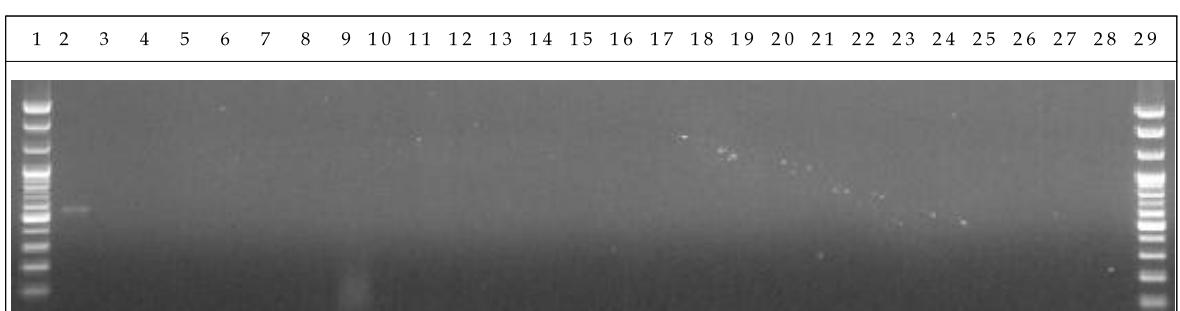
<그림14>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 6 hr, 14-23: W.T stool DNA 6 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 6 hr, 29: Marker.



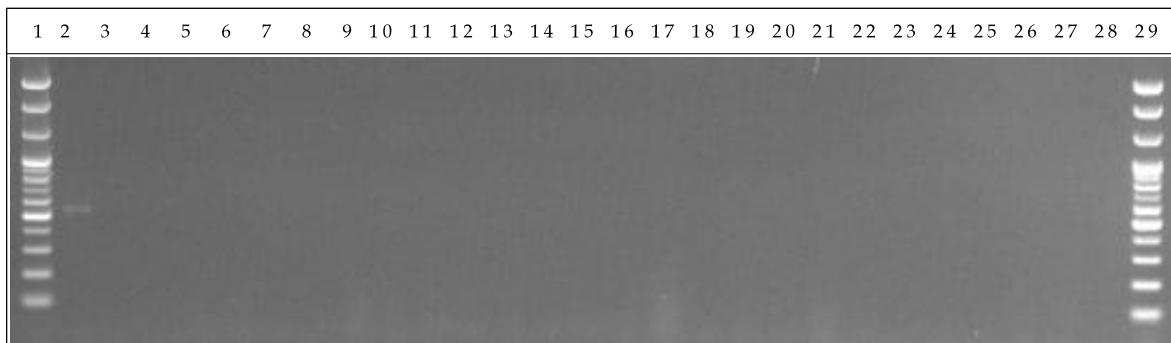
<그림15>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 9 hr, 14-23: W.T stool DNA 9 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 9 hr, 29: Marker.



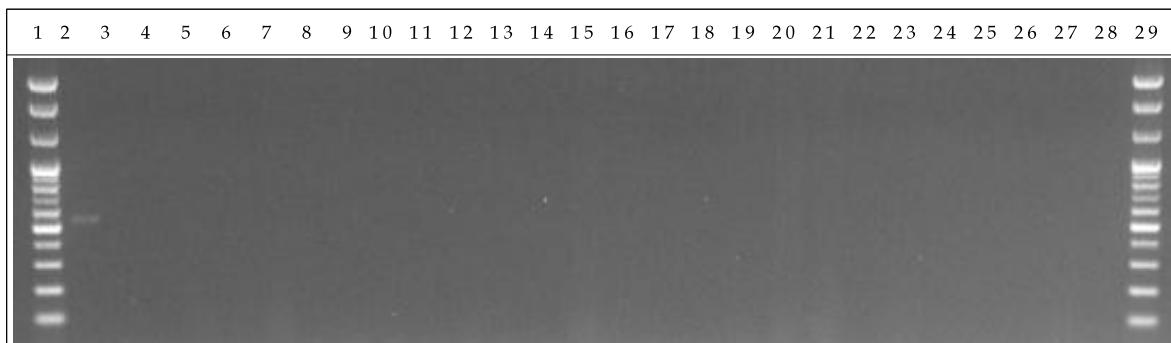
<그림16>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 12 hr, 14-23: W.T stool DNA 12 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 12 hr, 29: Marker.



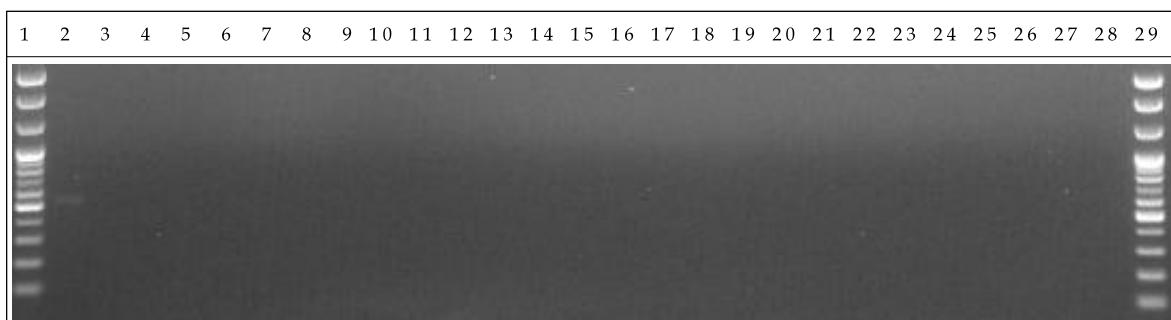
<그림17>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 1 Day, 14-23: W.T stool DNA 1 Day, 24-28: non-treatment stool DNA 1 Day, 29: Marker.



<그림18>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 3 Day, 14-23: W.T stool DNA 3 Day, 24-28: non-treatment stool DNA 3 Day, 29: Marker.



<그림19>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 7 Day, 14-23: W.T stool DNA 7 Day, 24-28: non-treatment stool DNA 7 Day, 29: Marker.



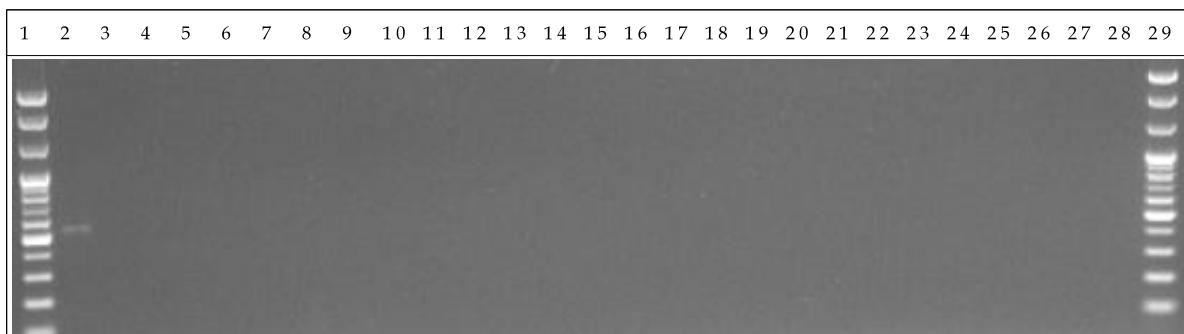
<그림20>. 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 14 Day, 14-23: W.T stool DNA 14 Day, 24-28: non-treatment stool DNA 14 Day, 29: Marker.

&lt;표33&gt;. 분변 total DNA에 대한 NIAS-001 특이적 PCR 결과

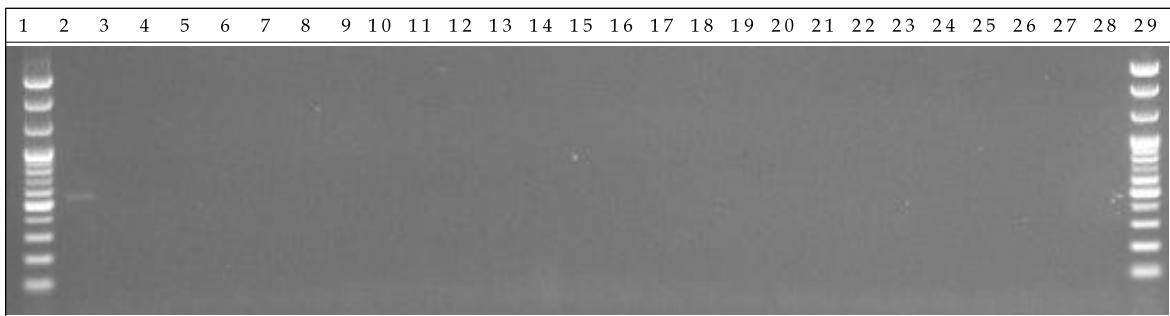
Day after treatment	Group (Animal No.)		
	non-treatment Control (5)	Control (10)	Treatment (10)
1 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
3 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
6 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
9 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
12 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
1 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
3 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
7 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
14 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)

- NIAS-001을  $2 \times 10^9$  개 씩 3일에 걸쳐 3회 경구 투여방식을 이용하여 감염한 후 1시간, 3시간, 5시간, 9시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일의 신선변 (fresh fecal pellet)을 채취하여 분변 total DNA에 대한 NIAS-001 특이적 PCR을 실시한 결과 해당 세균에 대한 검출 유무를 측정할 수 없었다(표33, 그림12-20).

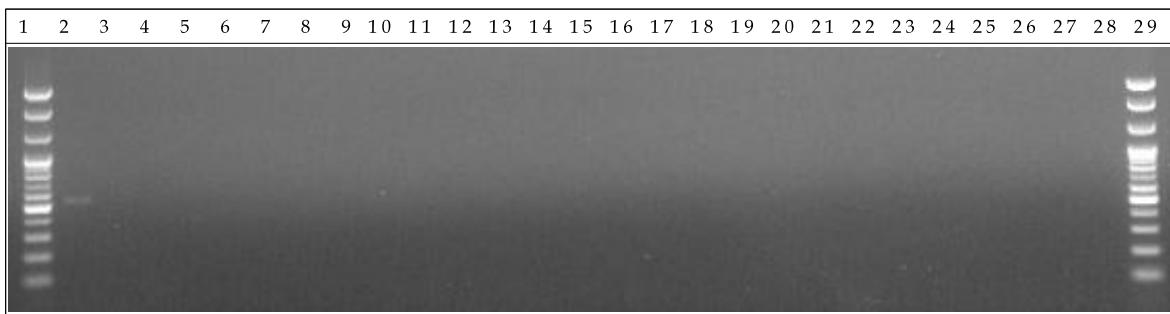
## 2) 세균 배양 plate에 대한 PCR



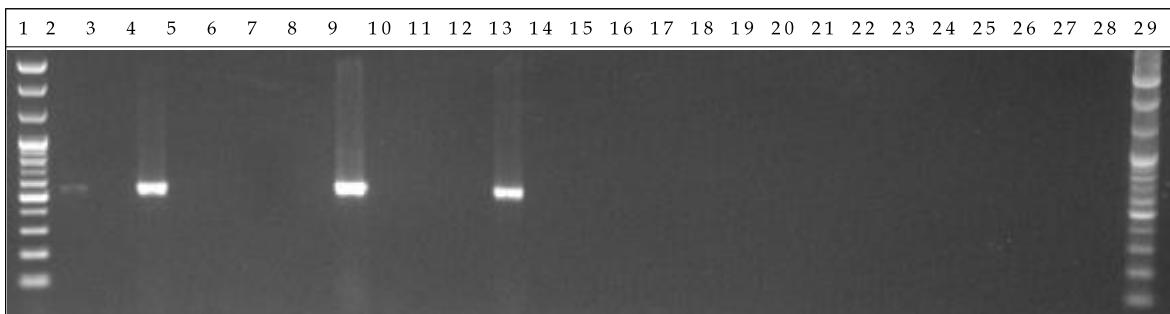
&lt;그림21&gt;. 배양 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 1 hr, 14-23: W.T stool DNA 1 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 1 hr, 29: Marker.



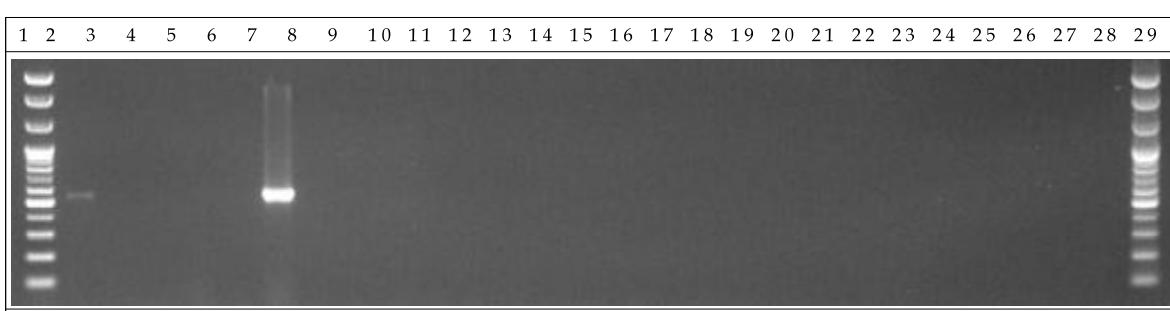
<그림22>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 3 hr, 14-23: W.T. stool DNA 3 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 3 hr, 29: Marker.



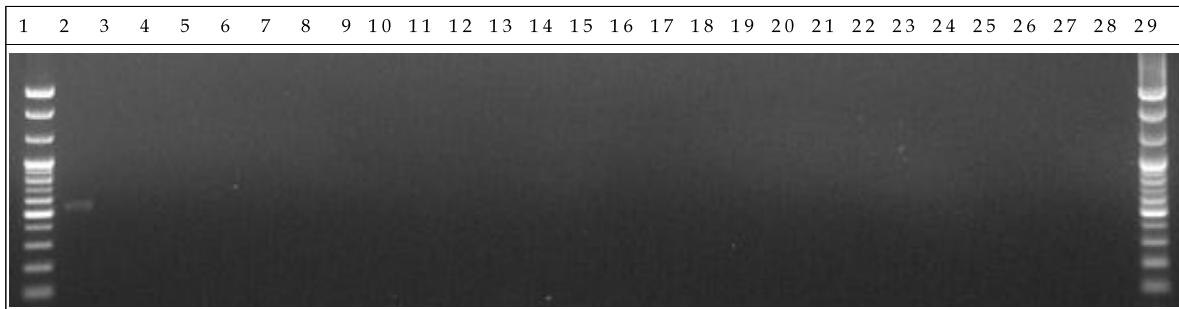
<그림23>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 6 hr, 14-23: W.T. stool DNA 6 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 6 hr, 29: Marker.



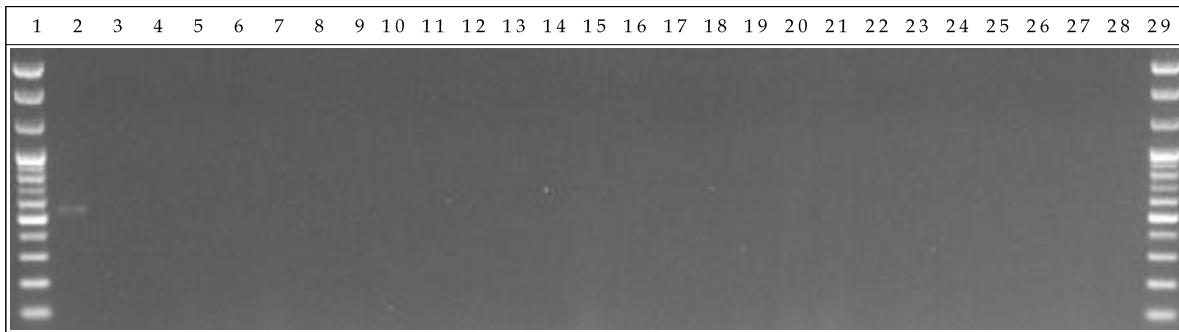
<그림24>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 9 hr, 14-23: W.T. stool DNA 9 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 9 hr, 29: Marker.



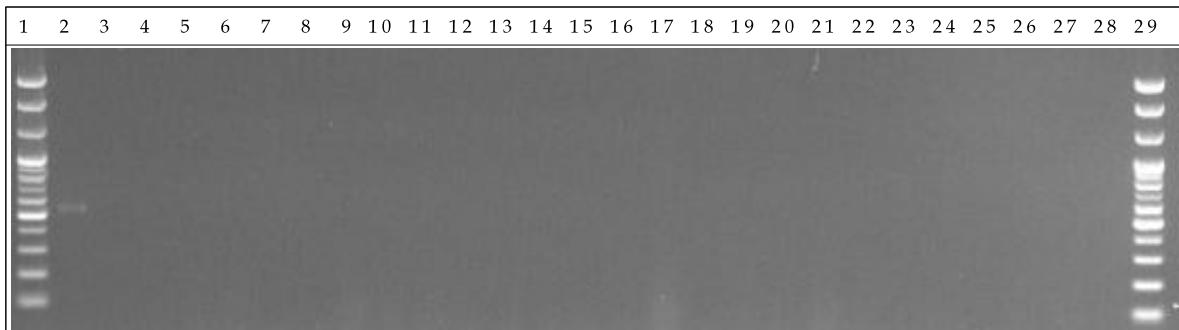
<그림25>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 12 hr, 14-23: W.T. stool DNA 12 hr, 24-28: non-treatment stool DNA 12 hr, 29: Marker.



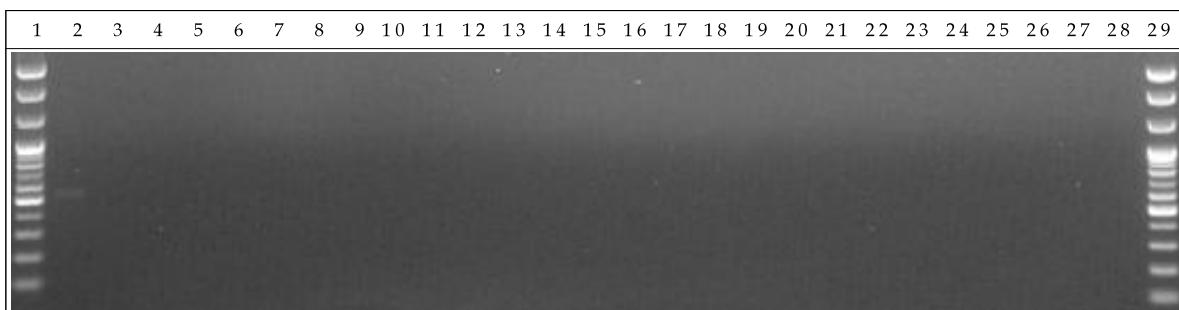
<그림26>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 1 day, 14-23: W.T stool DNA 1 day, 24-28: non-treatment stool DNA 1 day, 29: Marker.



<그림27>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 3 day, 14-23: W.T stool DNA 3 day, 24-28: non-treatment stool DNA 3 day, 29: Marker.



<그림28>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 7 day, 14-23: W.T stool DNA 7 day, 24-28: non-treatment stool DNA 7 day, 29: Marker.



<그림29>. 배양 분변 샘플 PCR. 1: Marker, 2: Positive control, 3: Negative control, 4-13: GM stool DNA 14 day, 14-23: W.T stool DNA 14 day, 24-28: non-treatment stool DNA 14 day, 29: Marker.

&lt;표34&gt;. 배양세균 집락에 대한 NIAS-001 특이적 PCR 결과

Day after treatment	Group (Animal No.)		
	non-treatment Control (5)	Control (5)	Treatment (10)
1 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
3 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
6 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
9 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	3/10 (Positive/Test anim. NO.)
12 hr	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	1/10 (Positive/Test anim. NO.)
1 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
3 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
7 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)
14 Day	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/5 (Positive/Test anim. NO.)	0/10 (Positive/Test anim. NO.)

- NIAS-001을  $2 \times 10^9$ 개 씩 3일에 걸쳐 3회 경구 투여방식을 이용하여 감염한 후 1시간, 3시간, 5시간, 9시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일의 신선변 (fresh fecal pellet)을 채취하여 50 ug/ml Kanamycin 배지에서 배양 후 증식된 세균 콜로니들에 대한 NIAS-001 특이적 PCR을 실시한 결과 해당 세균에 대한 특이적인 반응이 9시간 (NIAS-001 투여군 10마리 중 3마리)과 12시간 (NIAS-001 투여군 10마리 중 1마리) 세균배양 군을 제외한 모든 시료에서 NIAS-001이 검출되지 않았다(표34, 그림21-29).

### 3) 기타

- 실험 중 이번 실험에 사용된 모든 랫트 군에서 동물의 폐사, 이상행동 및 질병 등을 발견 할 수 없었다.

### 4) 결론 및 고찰

- NIAS-001을 대상으로 동물의 장관내 생존 및 정착으로 기인한 NIAS-001의 위해성 여부를 검정하기 위하여 SD 랫트 장관내 생존 및 생착 능력 분석을 실시하였다. NIAS-001을  $2 \times 10^9$  개씩 3일에 걸쳐 24 시간 간격으로 3회 경구 투여 한 후 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일의 신선변(fresh fecal pellet)을 채취하여 분변 total DNA와 50 ug/ml Kanamycin이 들어있는 LB 배지에서 배양 후 증식된 세균 콜로니들에 대한 NIAS-001 특이적 PCR을 각각 실시하였다. 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일의 신선변(fresh fecal pellet)을 채취하여 분변 total DNA를 분리 후 NIAS-001에 대한 분석을 수행한 결과 해당 세균에 대한 검출 유무를 측정 할 수 없었다. 50 ug/ml Kanamycin이 들어있는 LB배지에서 배양 후 증식된 세균 콜로

니들에 대한 NIAS-001 특이적 PCR을 수행한 결과 9시간 (NIAS-001 투여군 10 마리 중 3 마리), 12시간 (NIAS-001 투여군 10 마리 중 1 마리), 내에 NIAS-001이 검출 되었고, 1일 (NIAS-001 투여군 10 마리 중 0 마리)부터 14일 (NIAS-001 투여군 10 마리 중 0 마리)까지 모든 시료에서 NIAS-001가 검출되지 않았다. 통상적으로 랫트의 장내 음식물의 체류시간은 약 7.4에서 12.6시간이 소요되며 (이형자 외, 1997), 정상적인 사람의 장내 음식물의 체류시간은 표준 음식을 이용할 경우 위 4시간, 소장 2.5시간 그리고 최종적으로 대장 이 후까지 약 30시간이 소요 된다 (Iwanaga et. al., 1998). 본 시험에 사용한 NIAS-001을 투여한 랫트 군의 배양액의 경우 처음 9시간에서 검체에서 확인 되었으며, 12시간 검체 이 후에서는 확인되지 않는 것으로 보아, 24시간(1일) 내에 체내에서 완전히 배출된 것으로 판단된다. 또한 감염된 랫트 군은 감염시험 시작과 종료까지 모든 랫트의 폐사, 이상행동 및 질병 등을 보이지 않았다.

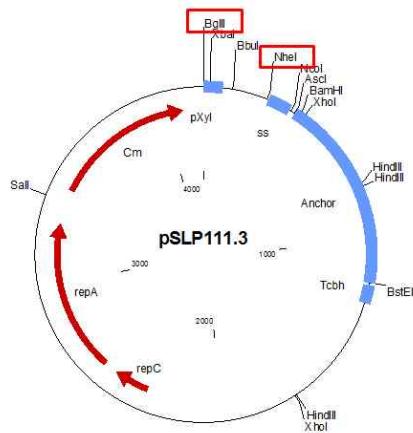
□ 재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사

- 본 연구내용은 2016년 11월 국립축산과학원 동물바이오공학과 계사 현장 연구실에서 수행하고자 하였으나, 2016년 11월 국내 고병원성 조류인플루엔자(HPAI)가 발생함에 따라 연구수행이 불가능한 상황이었다.
- 본 연구에 사용될 3D8 scFv 단백질 사료첨가제는 GMO인 관계로 LMO법에 의거 법적으로 승인된 시설에서만 수행 가능한 관계로 허가되지 않은 학교 및 농가에서는 수행이 불가능하다.
- 본 연구과제에서 수행하지 못한 연구내용은 2017년 경상과제(형질전환 닭 호모 계통 조성 및 보존 기술 개발)에 포함하여 연구를 추진할 계획이다.

□ 외부공동연구팀의 닭을 이용한 연구부분 협력연구

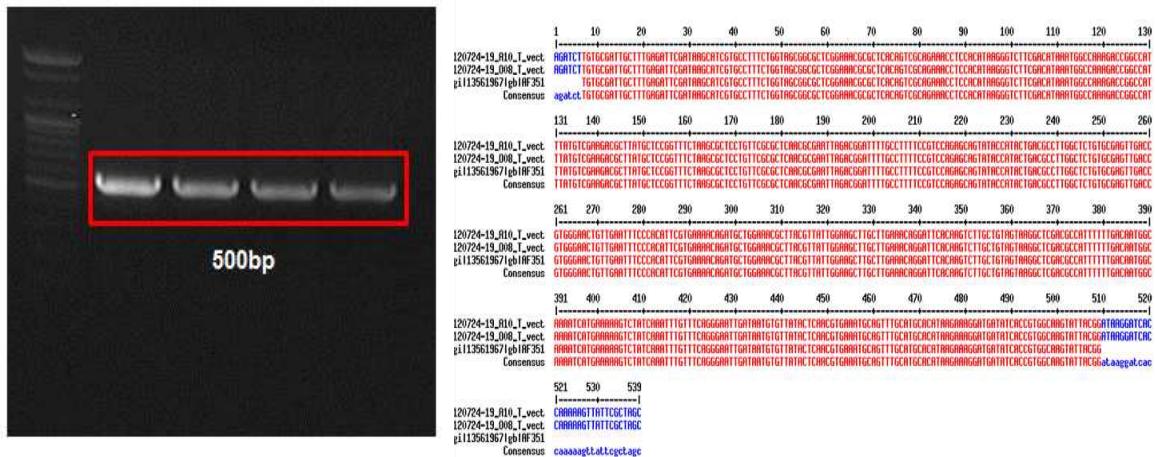
- “재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사” 연구 수행이 불가능함에 따라 공동연구팀에 시료 제공 등의 협력 연구 수행은 불가능하였다.

- 표지단백질 발현과 항-바이러스 단백질 발현을 위한 형질전환용 벡터의 제작
- 장내 *Lactobacillus*에 표지단백질 발현과 항-바이러스 단백질 발현을 위한 벡터를 제작하였고 형질전환용 벡터는 pSLP111.3를 사용하였다(그림30).



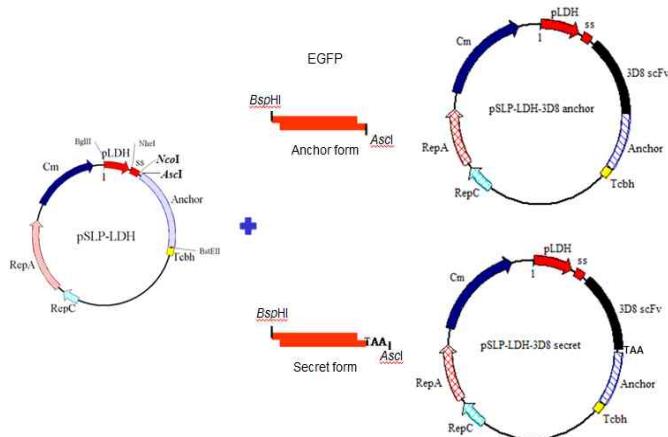
<그림30>. 형질전환용 발현벡터인 pSLP111.3 의 모식도

- 장내 *Lactobacillus*에 적용시키기 위해서는 pSLP111.3 벡터에 있는 Xylose-inducible promoter를 Lactate-dehydrogenase promoter로 교체를 해야 하므로 프로모터를 교체하는 실험을 진행하였다. Lactate-dehydrogenase(LDH) promoter는 *Lactobacillus casei* 유래이므로 이것으로부터 Genomic DNA를 prep 하고 BglIII와 NheI 제한효소 부위를 삽입한 프라이머를 이용하여 LDH PCR을 진행하였다(그림31). 전기영동을 통하여 500bp 위치에 증폭된 유전자 단편을 확인하였고 이것을 추출하여 pGEM T-easy vector에 삽입하고 DH5α에 형질전환 후 염기서열 분석을 통하여 LDH promoter가 클로닝 됨을 확인하였다(그림31). 클로닝이 확인된 도입유전자를 제한효소 BglIII와 NheI으로 절단하여 동일한 제한효소들로 절단한 pSLP111.3 벡터와 16°C에서 16시간 이상 ligation 반응하였으며 이후 DH5α에 형질전환 시킨 후 도입유전자가 벡터로 들어감을 확인하였다.



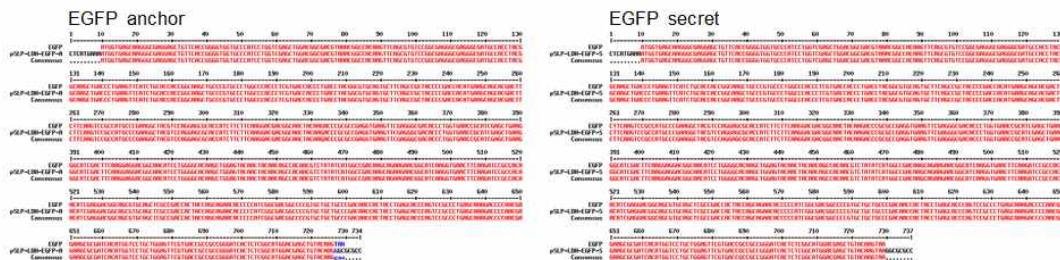
<그림31>. Lactate-dehydrogenase(LDH) promoter를 PCR 하고 pSLP111.3 벡터에 클로닝하여 염기서열을 확인한 결과

- 표지단백질 중 하나인 EGFP를 형질전환 시킨 Lactobacillus를 만들기 위해 EGFP 유전자를 anchor form, secret form으로 나누어 LDH promoter를 삽입한 pSLP111.3에 클로닝 하였다(그림32).



<그림32>. 형질전환용 벡터에 EGFP anchor form 및 secret form 유전자 클로닝 모식도

- EGFP anchor, secret form을 PCR을 통하여 증폭시켰고 LDH 유전자를 클로닝하는 것과 같은 과정으로 실험을 진행하였다(그림33). pSLP111.3 벡터에는 NcoI과 AscI 제한효소를 처리하고 증폭된 EGFP 유전자는 BspHI과 AscI 제한효소를 처리하여 ligation을 진행하고 DH5α에 형질전환 후 도입유전자가 벡터로 들어감을 확인하였다.



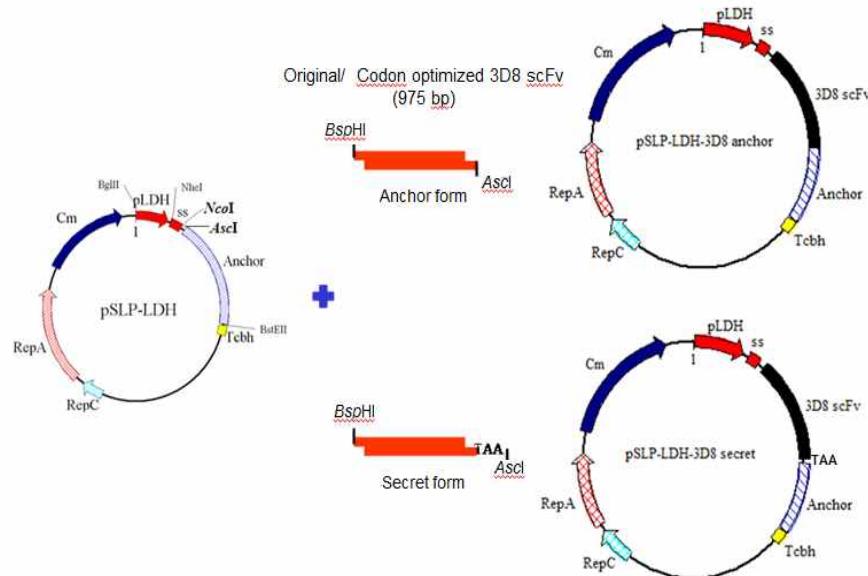
<그림33>. 형질전환용 벡터에 EGFP anchor form 및 secret form 유전자를 클로닝하여 염기서열 확인한 결과

- 항-바이러스 단백질인 3D8 scFv를 형질전환 시킨 Lactobacillus를 만들기 위해 3D8 scFv 유전자를 anchor, secret form으로 나누어 클로닝을 진행하였고 다양한 construct를 구축하기 위해 치즈 유래인 Lactobacillus casei에 코돈 최적화 시킨 3D8 scFv 유전자 또한 클로닝 하였다(그림34,35).

Original	GAG GTC CAG CTC CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA AGG OCT GGG CCT TCA GTO AAG ATG TOC TCG AAG CCT TGT TGA TAC ACA
Codon optimized	GAA GTA CAA TTA CAG CAG TCA CCT CCT GAA TTA GTC AAA GCA GGT GCA TCA GTC AAG ATG ATG TCG AAG CCT TCA GGT TAT ACT
Translated	E V Q L D Q S G P E L V K F G A S V K M S C K A S G Y T
Original	TTC ACT ACG TAT GTT ATG CAC TGG GTC AAG CAG CCT CGG CAG GGC CCT TGG TGG ATT GGA TAT ATT AAT CCT TAG ATG GAT
Codon optimized	TTC ACA ACT TAT GTC ATG CAT TGG GTT AAG CAA AAA CCA GGT CAA GGT TTA GKG TGG ATT GGT TAG ATT AAT CCT TAG ATG GAC
Translated	F T S Y V M H W V K Q K P G Q G L E W I Z G Y I N P Y N D
Original	GGT ACT AAG TAC AAT GAG AAG TTC AAA GGC AAG GCG AGA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC ACC AGA GGC TAC ATG GAG GTC AGC
Codon optimized	GUT ACT AAA TAC TAT GAA AAG TTC AAG GGA AAG CCT ACT TTA ACT TCT GAT AAA TCT TCT TCA ACT GCT TAC ATG GAA TTG AGC
Translated	G T K Y H E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M E L S
Original	AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GGG GTC TAT TAC TGT GCA AGA GGG CCT TAT AAA AGG GGA TAT CCT GCT ATG GAC TAC TGG GOT CAA
Codon optimized	TCA TTG ACT AGC GAG GAT AGC GCA GTT TAT TAC TGT GCA AGA GGT CAA TAC AAA CCT GGC TAC GCA ATG GAT TAC TGG GOT CAA
Translated	S L T S D E S A V Y Y C A R G A Y K R G Y A M D I W G Q
Original	GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCT TGT AGA GGT GGG GGT TCG GGT GGC GGG CCT CGG GGT GGC TCA GAT CCT TTG ATG
Codon optimized	GCG ACT TCA GTC ACC GTC TCT TGT AGA GGT GGT GGT GGC GGT GGC GGG CCT CGG TCA GAT CCT TTG ATG
Translated	G T S V T V S S R G G G G G G G G G G G S D L V M
Original	TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTG GGT GTC TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACT ATG AGC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT
Codon optimized	TCA CAA TCA CCA AGT TCT TTG GCA GTC TCT CCT GAG AAA CCT GCA AAG TCT TTA ATC TAC TGG CCT AGT ACA COT
Translated	S Q S P S S L A V S A G E R V T M S C K S S Q S L F N S
Original	AGA ACC CGA AAG AAC TAC TTG GCT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TGT CCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GGT TCC ACT AGG
Codon optimized	CGA ACC CGT AAA AAT TAT TTG GCT TGG TAT CAA CAG AAA CCT GGA CAA TCA GCA AAG CCT TTA ATC TAC TGG CCT AGT ACA COT
Translated	R T R K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R
Original	GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TGT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT GTG CAA CCT GAA GAC
Codon optimized	GAG TCA GGA GTT CCA GAT CGT TTT ACT GGT AGT GGT TCA GGC ACT GAT TTT ACC TTG ACC ATT ATG AGC GTC CAA GGC GAA GAT
Translated	E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D
Original	CTG GCA GTT TAT TAC TGG AAC CAA TCT TAT TAC ATG TAT AGC TTC GGA TGG GGT ACT AGC CTG GAA ATA AAA
Codon optimized	TTC GCT GTC TAT TAT TGT AAA CAA TCA TAT TAT CAT ATG TAC ACT TTC GGT TCA GGA ACA AAA CCT GAA ATC AAA
Translated	L A V Y Y C K Q S Y Y H M Y T F G S G T K L E I K

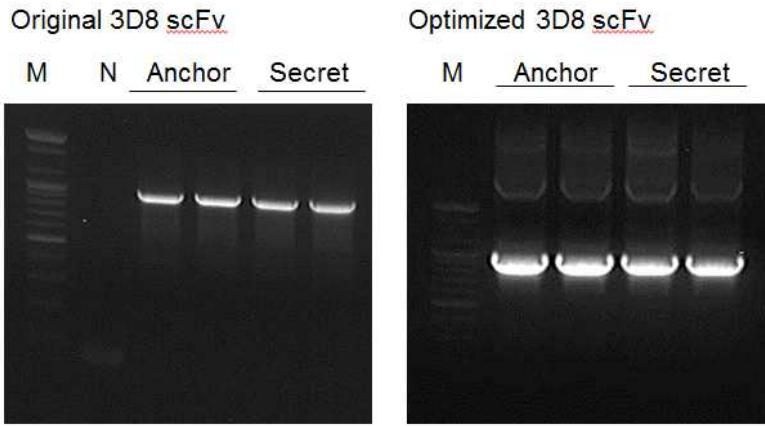
■ Same codons  
□ Different codons

<그림34>. Original 3D8 scFv와 코돈 최적화된 3D8 scFv 간의 유전자 염기서열 비교



<그림35>. 형질전환용 벡터에 Original/Optimized 3D8 scFv 유전자 클로닝 모식도

- Original/Optimized 3D8 scFv 유전자를 PCR을 통해 증폭하였고 증폭된 단편을 확인하였다(그림36).



<그림36>. Original/Optimized 3D8 scFv 유전자를 PCR을 통해 증폭한 결과

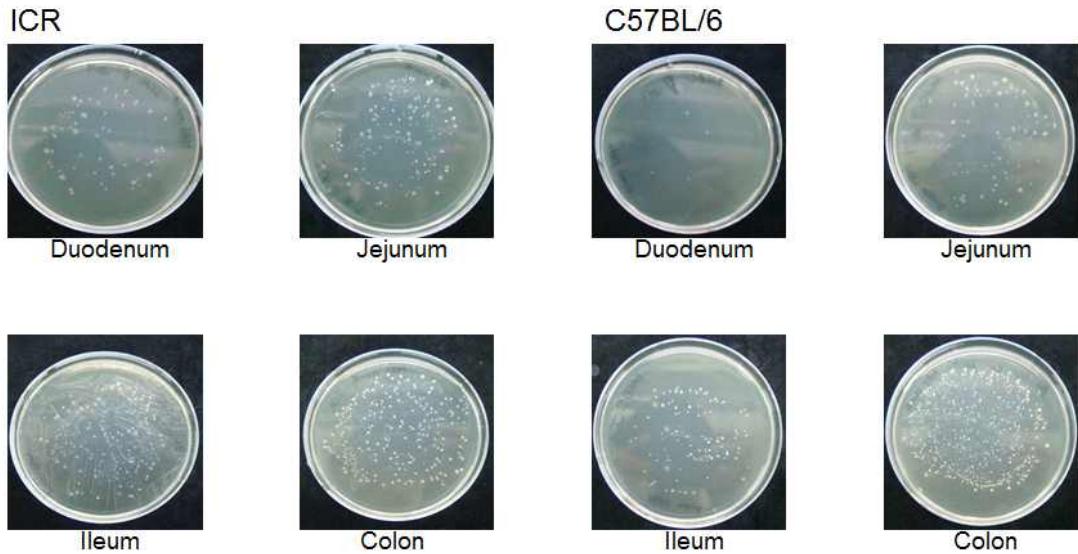
- pSLP111.3 벡터에는 NcoI과 AscI 을 처리하고 증폭한 유전자에는 BspHII과 Ascl 제한효소를 처리하여 ligation 후 DH5α에 형질전환 시켜 도입유전자가 삽입된 것을 염기서열 분석으로 확인하였고(그림37). 3D8 scFv 유전자 안에는 NcoI 제한효소 부위가 있기 때문에 NcoI을 처리하였을 때 3D8 scFv 유전자가 잘려나가므로 NcoI 대신 BspHII 제한효소를 처리하였다.



<그림37>. Original/Optimized 3D8 scFv 유전자를 클로닝하여 염기서열을 확인한 결과

- 표지단백질인 EGFP와 항-바이러스 단백질인 3D8 scFv 유전자가 최종 삽입된 벡터를 이용하여 장내 세균에 electroporation 방법으로 형질전환을 하였다.

- 쥐 장내 Lactobacillus와 Gram negative bacteria 분리 동정
  - 제작한 형질전환용 벡터를 삽입하여 목적 단백질을 발현하도록 하고자 Gram positive bacteria인 Lactobacillus와 Gram negative bacteria를 생쥐의 장내에서 분리하였다(그림38).

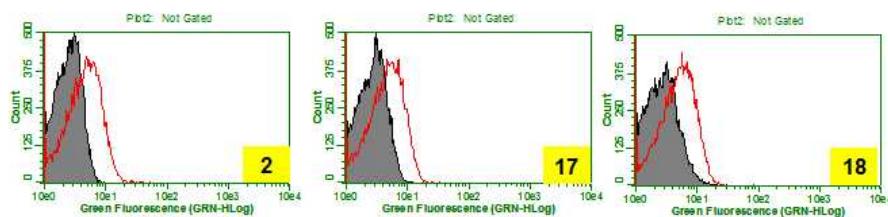


<그림38>. ICR mouse와 C57BL/6 생쥐 장내에서 분리한 Lactobacillus들의 colony 확인

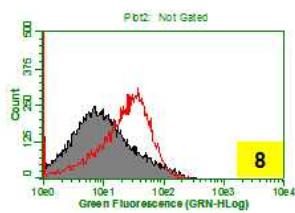
- 생쥐 장내에서 Lactobacillus와 Gram negative bacteria 분리 동정 과정은 아래와 같다.
  - ICR mouse와 C57BL/6 6주령 암컷들에게서 소장을 이루고 있는 부분인 Duodenum, Jejunum, Ileum과 Colon(대장)을 적출하였다. 순수한 장내 Lactobacillus를 분리하기 위해 적출한 장기들 내에 있는 대변을 제거하였고 각 장기들을 절단하여 PBS로 washing 하였다. PBS에 각 장기들을 넣고 Homogenization 과정을 진행하였고 장기별로 원액부터 1/1000 까지 희석한 것을 Lactobacillus를 배양할 수 있는 MRS plate와 Gram negative bacteria를 배양할 수 있는 LB plate에 spreading을 하였다. 하나의 콜로니를 picking 하기에 적합한 plate들을 선별하여 각 장기별로 20개의 colony를 picking하여 candidate를 제작하였다.

- 표지단백질을 이용하여 장내 세균에서의 발현 유도
  - 항-바이러스 단백질 발현을 유도하기 이전에 쉽게 확인이 가능한 표지단백질인 EGFP를 이용하여 장내 Lactobacillus와 Gram negative bacteria 들이 표지단백질과 같은 재조합 단백질 발현 효율이 높은 Lactobacillus를 선발하는 실험을 진행하였다(그림39).
  - C57BL/6 mouse와 ICR mouse유래 Lactobacillus를 이용하여 표지단백질을 발현시켜 보았을 때 발현이 되는 candidate들을 Flow cytometry 분석으로 확인하였다(그림40).

## C57BL/6-Duodenum



## C57BL/6-Ileum

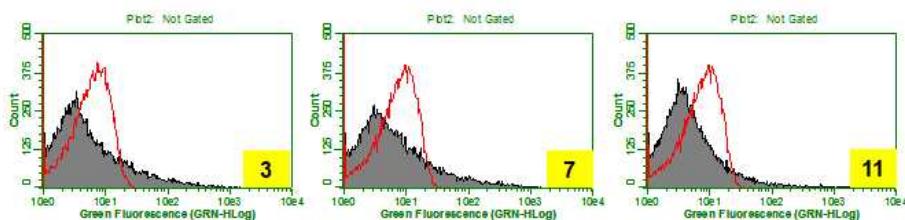


&lt;그림39&gt;. C57BL/6 생쥐 장내에서 분리한 Lactobacillus 표지단백질 발현 확인

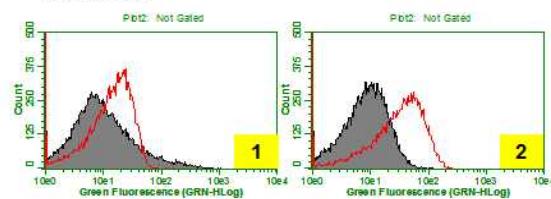
&lt;표35&gt;. 표지 단백질을 발현하였던 장내 세균 candidates (C57BL/6)

Origin	EGFP(FACS)
Duodenum	3/20 picked colonies with FACS positive result
Ileum	1/20 picked colonies with FACS positive result

## ICR-Duodenum



## ICR-Ileum

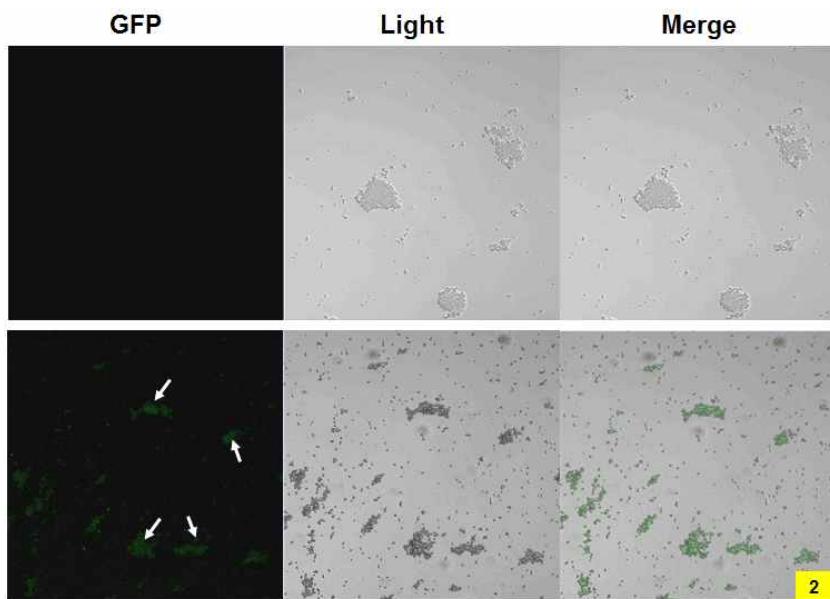


&lt;그림40&gt;. ICR 생쥐 장내에서 분리한 Lactobacillus 표지단백질 발현 확인

<표36>. 표지 단백질을 발현하였던 장내 세균 candidates (ICR)

Origin	EGFP(FACS)
Duodenum	3/20 picked colonies with FACS positive result
Ileum	2/20 picked colonies with FACS positive result

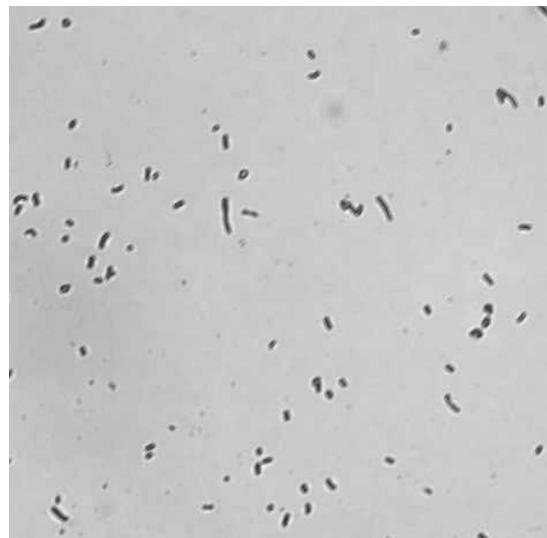
- Flow cytometry로 분석하였을 때 상대적으로 녹색형광발현이 좋은 C57BL/6 생쥐의 duodenum으로부터 유래한 candidate 2번을 형광현미경으로 관찰하였을 때 형광이 관찰됨을 확인하였다(그림41).



<그림41>. C57BL/6 생쥐의 duodenum으로부터 유래한 candidate가 표지단백질을 발현하는 것을 형광현미경으로 관찰한 결과

- C57BL/6 생쥐 소장에서 유래한 Lactobacillus를 다음과 같은 과정으로 16s rRNA 서열 분석을 수행하여 Lactobacillus reuteri임을 확인하였다.
  - Lactobacillus 균주의 Genomic DNA를 추출 및 정제하였다. Universal primer인 16s rRNA primer를 이용하여 PCR을 수행하고, PCR 조건은 annealing 온도를 55°C로 세팅하고 extension time을 1분 30초로 설정하였다. 전기영동을 수행하여 target size의 밴드를 확인하고 gel elution을 수행하여 pGEM-T Easy vector에 16°C로 16시간 ligation 시켰다. 대장균(DH5α)에 형질전환시켜 colony를 암페실린이 포함된 LB 배지에 배양하였다. Plasmid를 추출하여 EcoRI 제한효소를 이용하여 enzyme cutting을 진행하였다. Enzyme cutting을 전기영동으로 확인 후, 염기서열을 EZ Taxon database를 이용하여 database에서 보관하고 있는 미생물 서열과의 유사성을 이용하여 균주를 밝혔다.

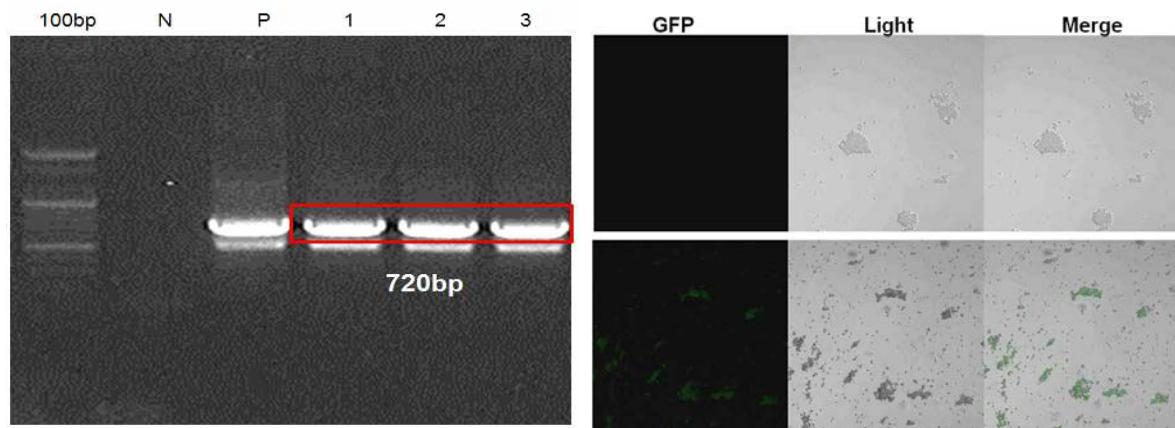
- 이 균주의 콜로니 모양을 확인하여 Gram staining을 통해서 더 자세히 균주를 분석한 결과 crystal violet 으로 staining 하였을 때 보라색 빛을 띠는 것을 확인하였고 Gram positive bacteria 인 것을 확인하였다(그림42).



<그림42>. *Lactobacillus reuteri*의 Gram staining 결과

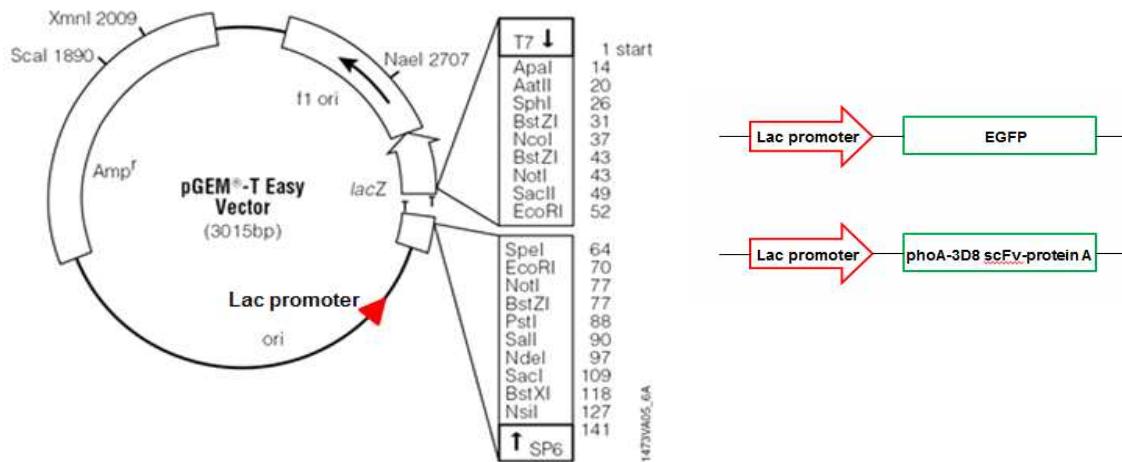
- *Lactobacillus reuteri* 또한 표지단백질이 포함된 벡터를 electroporation 방법으로 형질전환 하였을 때 PCR을 통하여 벡터가 들어감을 확인하였다(그림43).

#### *L. reuteri*/ pSLP-LDH-EGFP anchor



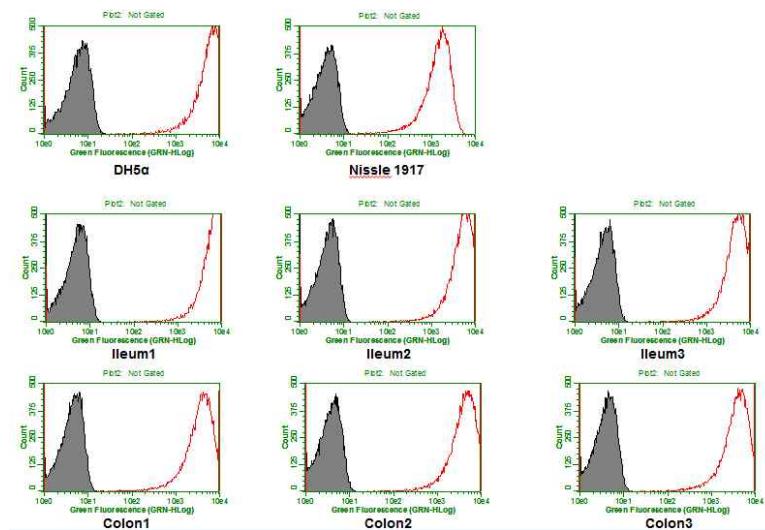
<그림43>. *Lactobacillus reuteri*에 형질전환용 벡터가 들어감을 PCR로 확인하고 표지단백질 발현을 형광현미경으로 관찰한 결과

- 표지단백질을 발현하는지 형광현미경으로 관찰하였을 때도 형광 발현이 관찰됨을 형광 현미경으로 확인하였다(그림43).
- 장내 Lactobacillus뿐 아니라 장내 Gram negative bacteria에서도 표지단백질이 발현되는지 확인하기 위하여 목적단백질이 포함된 발현 벡터인 pGEM-T Easy vector를 E.coli와 같은 heat shock 방법으로 Gram negative bacteria에 형질전환 시켰다(그림44).



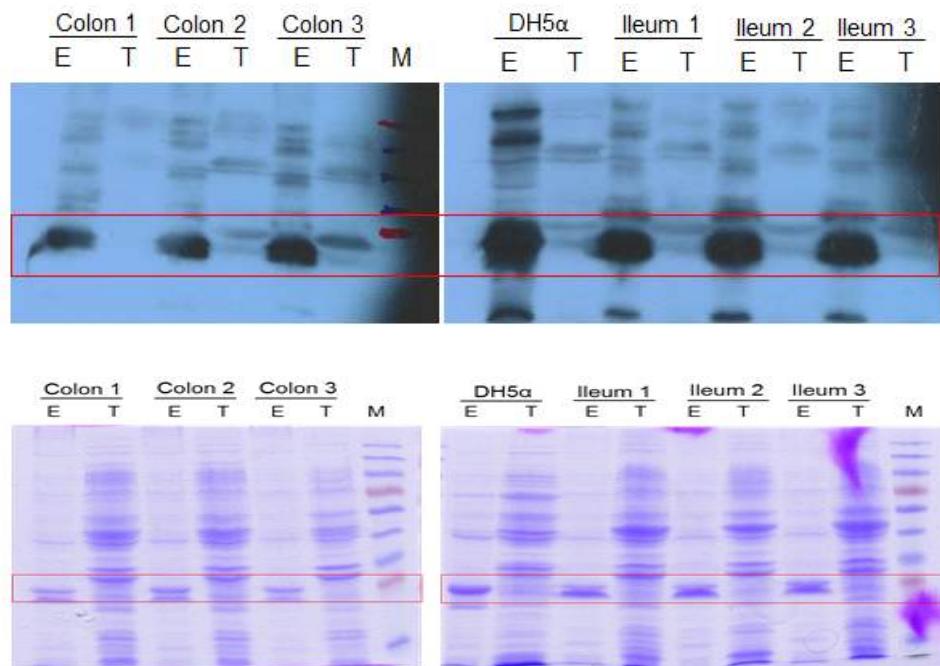
<그림44>. Gram negative bacteria에 목적단백질을 발현하기 위한 발현 벡터와 construct들

- DH5α와 Nissle1917을 포함하여 Mouse ileum과 colon 유래 Gram negative bacteria를 형질전환 시킨 후, 표지단백질의 발현 정도를 Flow cytometry 분석으로 확인해보았을 때 발현 정도가 상당히 높음을 확인하였다(그림45).



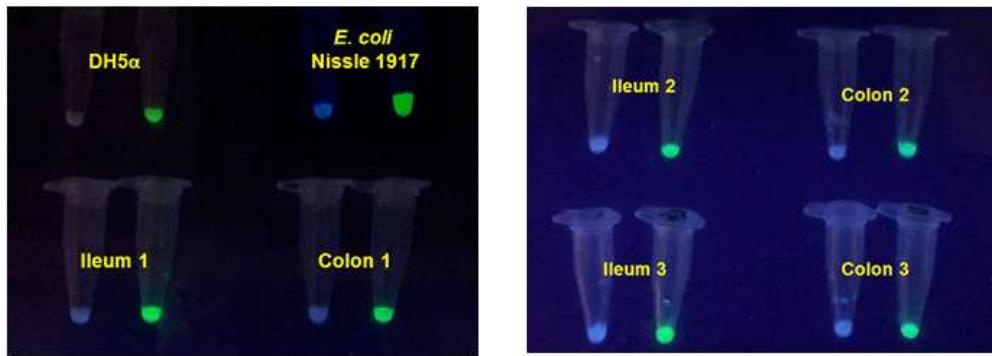
<그림45>. Gram negative bacteria의 표지단백질을 발현정도를 Flow cytometry 분석 결과

- 앞서 발현이 확인된 균주에서 표지단백질인 EGFP를 발현을 하기 위해 Western blot과 Coomassie blue staining을 진행하였다.
- T-vector에 EGFP 유전자가 삽입된 형질전환체와 T-vector만 삽입된 형질전환체를 freeze-thaw 방법으로 단백질을 추출하였다. Western blot의 경우 1차 항체로 anti-GFP antibody를 사용하였고, 2차 항체로 anti-rabbit antibody를 사용하였다(그림46). Coomassie blue staining의 경우 SDS-PAGE 이후 Coomassie blue staining buffer로 한 시간 동안 staining 시킨 후, destaining buffer를 이용하여 16시간 동안 반응시킨 이후 확인하였다(그림46).



<그림46>. Gram negative bacteria에 표지단백질을 형질전환 시킨 후, 발현정도를 Western blot과 Coomassie blue staining으로 분석한 결과

- EGFP가 삽입된 형질전환체와 T-vector만 삽입된 형질전환체를 암피실린이 포함된 LB 배지에서 배양하여 13,000rpm으로 1분간 원심분리 후, pellet을 얻어 UV 조사를 해주었을 때에도 육안으로 확실히 볼 수 있을 정도로 형광이 발현됨을 확인하였다(그림47).



<그림47>. 표지단백질을 형질전환 시킨 Gram negative bacteria를 배양하여 pellet을 얻은 후, UV 조사를 하여 형광 발현정도를 확인한 결과

- 표지단백질을 발현하는 생쥐유래 Gram negative bacteria들을 16s rRNA 서열분석을 통하여 균주를 알아내었다.
- EZ Taxon database에서 16s rRNA 서열을 입력하여 database에서 보존하고 있는 미생물 서열과의 유사성을 바탕으로 균주를 분석하였다(그림48).

Origin	Identified strain	EGFP	Similarity	Completeness
Ileum	<i>Shigella flexneri</i> x 2	■	99.46	100%
Ileum	<i>Escherichia coli</i> KCTC2441	■	98.56	58.41%
Ileum	<i>Shigella boydii</i>	■	95.76	86.27%
Ileum	<i>Escherichia coli</i> O157	■	95.16	79.17%
Ileum	<i>Salmonella enterica</i>	■	90.37	79.04%
Colon	<i>Shigella flexneri</i>	■	99.46	100%
Colon	<i>E.coli fergusonii</i>	■	88.97	89.34%

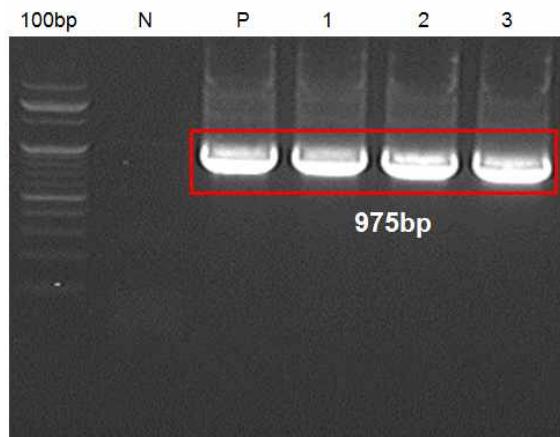
<그림48>. 표지단백질을 발현하는 생쥐유래 Gram negative bacteria의 균주를 분석한 결과

- 항-바이러스 단백질을 이용하여 장내 세균에서의 발현 유도
  - 표지단백질 발현이 잘 되는 균주를 선정하고, 이 균주를 이용하여 항-바이러스 단백질을 발현하는 실험을 진행하였다.
  - 표지단백질이 발현된 균주인 *Lactobacillus reuteri*를 이용하여 항-바이러스 단백질이 포함된 벡터를 아래와 같은 electroporation을 통하여 형질전환 하였다.
    - *Lactobacillus*를 배양할 수 있는 MRS 배지 3ml에 *Lactobacillus reuteri*를 30ul를 넣고 37°C 배양기에 16시간동안 배양하였다. 신선한 MRS 배지에 배양하였던 균주를 1/10로 희석하여 37°C 배양기에서 OD600가 0.2-0.3이 나올 때까지 약 2시간 정도 배양하였다. OD600가 나오면 4°C 10분간 보관 후, 3000rpm으로 20분간 원심분리를 진행하였다. 상층액을 버린 후, 10mM MgCl<sub>2</sub>가 포함되어 있는 Washing buffer 10ml을 넣고 pellet을 resuspension해 주었다. 3000rpm으로 10분간 원심분리를 진행 후, washing과 원심분리

과정을 한 번 더 반복하였다. 상층액을 버린 후, 10% glycerol과 0.5M sucrose가 포함되어 있는 electroporation buffer를 10ml 넣고 resuspension 했다. 3000rpm으로 10분간 원심분리 후, 상층액을 버리고 electroporation buffer 2ml을 넣고 resuspension 했다. 플라스미드 농도(700ng/ul) 5ul와 cell 50ul을 잘 섞어주고 미리 차갑게 해 놓은 2mm electroporation cuvette에 넣고, 여기서 사용한 플라스미드는 pSLP\_LDH-Optimized 3D8 scFv anchor이다. Electroporation은 2000V, 25uF, 그리고 400Ω으로 조건을 맞추고 GenePulser X cell을 사용하였다. 신선한 MRS 1ml을 cuvette에 넣고, 다시 E-tube에 옮긴 후, 37°C 배양기에서 3시간동안 배양하였다. 항생제(클로람페니콜, 3ug/ml)이 포함된 MRS plate에 spreading하여 37°C 배양기에서 2-3일 동안 배양하였다.

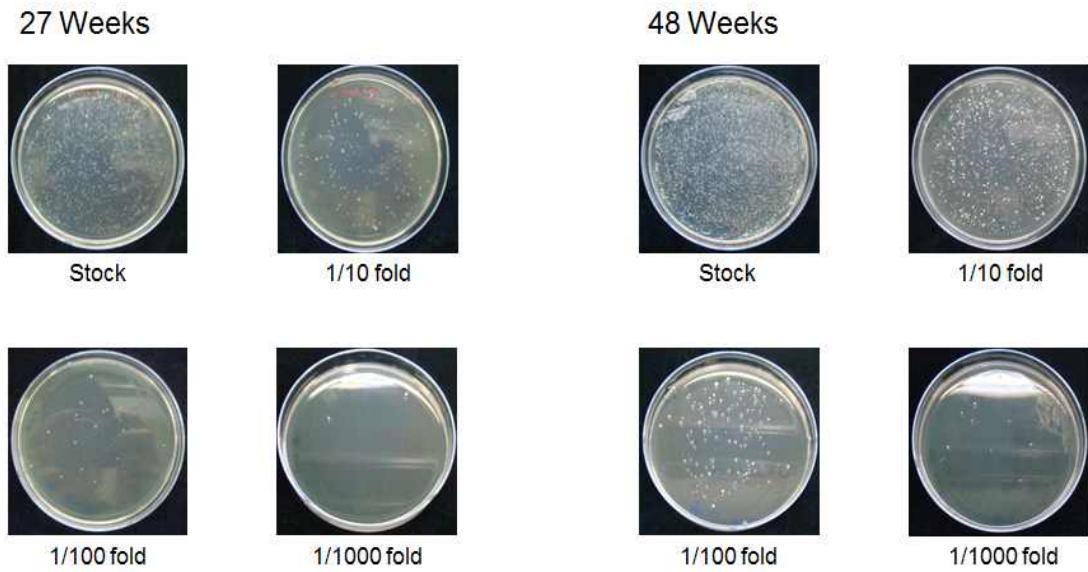
- 형질전환용 벡터 중 pSLP\_LDH-Optimized 3D8 scFv anchor를 *Lactobacillus reuteri*에 형질전환 시킨 후 벡터가 들어감을 PCR로 확인하였다(그림49).

*L. reuteri*/ pSLP-LDH-Optimized 3D8 scFv anchor



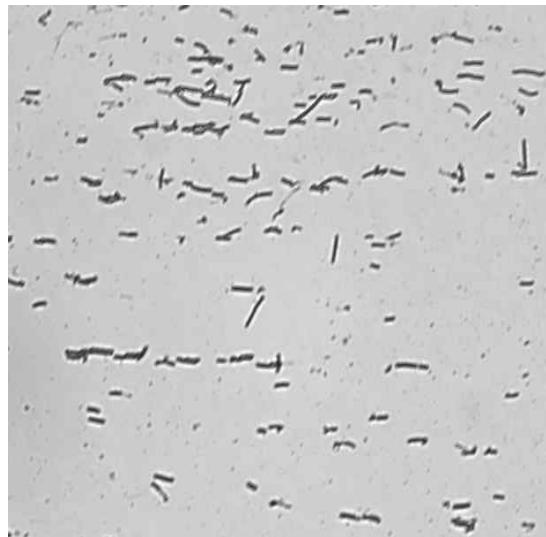
<그림49>. Optimized 3D8 scFv anchor를 *Lactobacillus reuteri*에 형질전환 시킨 후, PCR로 확인

- 닭 장내 *Lactobacillus*와 Gram negative bacteria 동정
  - 항-바이러스 단백질을 발현하는 *Lactobacillus*와 Gram negative bacteria를 닭 장내에서 도 스크리닝하기 위하여 27주와 48주령의 닭을 사용하였다.
  - 닭의 장내에서 다음과 같은 과정을 통해 장내 미생물을 분리 동정하였다.
    - 닭을 마취 및 희생시킨 후, 닭의 소장을 적출하고 절개하였다. 순수한 장내 *Lactobacillus*만을 얻기 위하여 닭의 소장 내 있는 대변을 제거 후 PBS로 washing 하였다. 조직을 homogenization하고 PBS를 이용하여 원액부터 1/1000까지 serial dilution을 하여 각각 *Lactobacillus*와 Gram negative bacteria를 배양할 수 있는 MRS plate와 LB plate에 spreading 하였다. *Lactobacillus*는 2-3일간 37°C 배양기에서 배양하고 Gram negative bacteria는 하루 동안 37°C 배양기에서 배양하여 나오는 colony를 가지고 candidate를 제작하였다(그림50).



<그림50>. 27주령과 48주령 닭 장내에서 분리한 Lactobacillus들의 colony 모양 확인

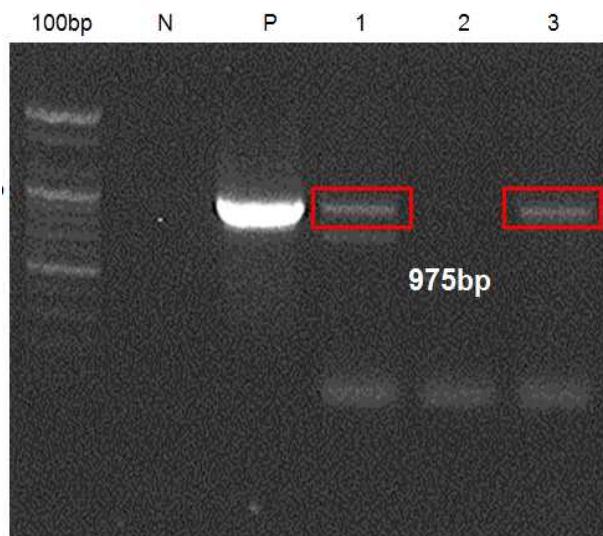
- 닭 소장유래 Lactobacillus에 항-바이러스 단백질이 포함된 벡터를 다음과 같은 과정을 통하여 형질전환 했을 때도 쥐 소장유래 Lactobacillus와 마찬가지로 형질전환이 되었다.
  - Lactobacillus를 37°C 배양기에서 약 16시간 동안 배양하였다. 신선한 MRS를 24.5ml에 배양한 Lactobacillus를 250ul 넣고, 총 용량의 1퍼센트가 되는 glycine(250ul)을 넣어 주었다. 37°C 배양기에서 O,D가 0.2-0.3이 나올 때까지 약 2시간 정도 배양하였다. OD600 가 나오면 4°C에 10분간 보관하였다. 3000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 sodium phosphate와 MgCl<sub>2</sub>가 포함된 washing buffer 1.4ml을 넣고 pellet을 resuspension 하였고, 동일과정을 2회 반복하였다. 다시 5,000rpm으로 1분간 원심분리 후, 상층액을 버리고 MgCl<sub>2</sub>와 sucrose, sodium phosphate가 포함된 electroporation buffer를 500ul를 플라스미드 1ul와 잘 석어주고, 여기서 사용한 플라스미드는 pSLP\_LDH-Optimized 3D8 scFv anchor이다. 미리 차갑게 해 둔 2mm electroporation cuvette에 mixture를 넣고, 2000V, 25uF, 100Ω 조건에서 ectroporation을 진행하였다. Cuvette에 fresh한 MRS를 넣고, 이를 다시 E-tube로 옮기고, 이를 37°C 배양기에서 3 시간 동안 배양하였다. 항생제(클로람페니콜)가 포함 된 MRS plate에 spreading하고 37°C 배양기에서 2-3일간 배양 후 콜로니를 관찰하였다.
- 16s rRNA 분석을 통하여 Lactobacillus kitasatonis라는 균주라는 것을 확인하였다.
- 균주를 좀 더 자세히 분석하기 위하여 Gram staining을 실시하였고, 그 결과 Gram positive bacteria라는 것을 확인하였다(그림51).



<그림51>. *Lactobacillus kitasatonis*의 Gram staining 결과

- *Lactobacillus kitasatonis*에 항-바이러스 단백질(Optimized 3D8 scFv anchor)이 포함된 벡터가 형질전환 되었는지를 PCR을 통하여 확인하였다(그림52).

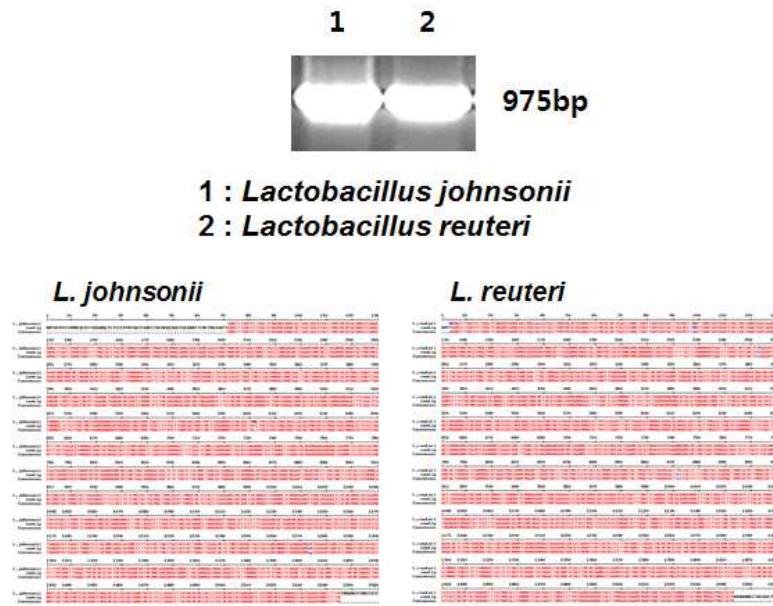
#### *L. kitasatonis/pSLP-LDH-Optimized 3D8 scFv anchor*



<그림52>. 항-바이러스 단백질이 포함된 벡터가 *Lactobacillus kitasatonis*에 형질전환 되었는지를 확인하기 위해 PCR을 진행한 결과

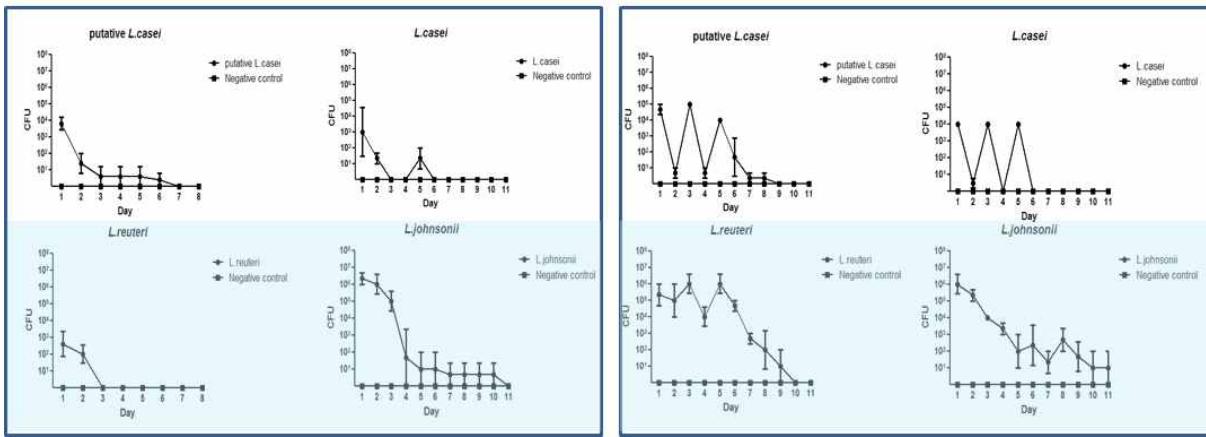
- 항-바이러스 단백질을 발현하는 생쥐 유래 *Lactobacillus* 스크리닝
  - 쥐의 소장 내에서 분리한 총 240개의 서로 다른 colony를 이용해 항-바이러스 단백질을 발현하는 *Lactobacillus*를 screening 하고자 하였다.
  - 항-바이러스 유전자가 포함된 형질전환용 벡터를 electroporation 과정을 통하여 형질전환 하였다.
  - 형질전환용 벡터가 삽입된 두 가지 *Lactobacillus*에서 벡터가 들어감을 PCR을 통해 확

인하였고, 그 strain을 16S rRNA 서열 분석을 통해 알아보았을 때 각각 *Lactobacillus johnsonii*와 *Lactobacillus reuteri*인 것을 확인하였다(그림53).



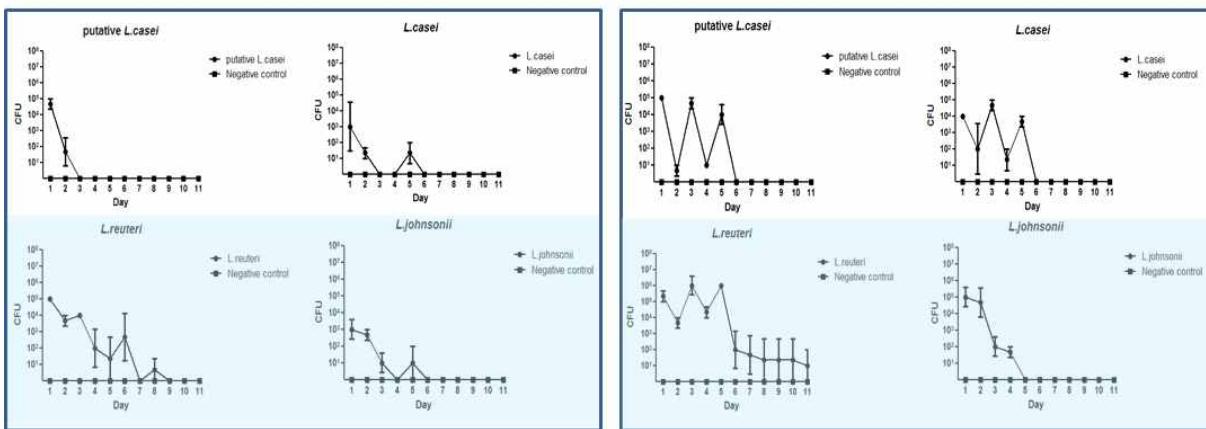
<그림53>. 형질전환용 백터가 삽입됨을 PCR로 확인한 후, 형질전환 균주의 strain 분석을 진행

- 형질전환 *Lactobacillus*의 생쥐 소장 내 retention time 분석
  - 생쥐 소장 내에서 형질전환 *Lactobacillus*의 retention time을 측정하기 위해 실험군을 항생제 처리의 유무와 투여 횟수의 차이로 나누어 총 4가지의 실험군으로 진행하였다.
  - 다음과 같은 방법으로 항생제를 처리한 이후, 투여 횟수를 각각 1회와 3회로 진행하여 retention time을 측정하였다.
    - *Lactobacillus*를 16시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 투여하기 하루 전날 starvation시키고 클로람페니콜(3ug/ml)이 포함된 물을 먹여 장내 공생 균을 제거하여 투여한 *Lactobacillus*의 colonization을 용이하게 하였다. 10<sup>8</sup> CFU의 *Lactobacillus*를 쥐의 구강을 통하여 투여하였고, 투여 횟수를 3회로 진행한 것은 이를 간격으로 3번 투여하였다. 매일 1g의 쥐의 대변을 모아 PBS를 이용하여 homogenization 후, stock부터 1/1000까지 serial dilution한 것을 클로람페니콜(3ug/ml)이 포함된 MRS plate에 spreading 하였다. 37°C 배양기에서 이를 간 배양 후, 나오는 colony 들을 counting하여 CFU를 계산함으로써 retention time을 측정하였다(그림54).

**1 time feeding**

&lt;그림54&gt;. 항생제 선 처리 후, 형질전환 Lactobacillus의 retention time 분석

- 사료 첨가제로서의 개발을 고려하였을 때 항생제를 처리하지 않은 실험군에서도 형질전환 균주가 장 내에서 오래 살아남는지 보기 위해 다음과 같이 실험을 진행하였다.
  - Lactobacillus를 16시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 항생제를 처리하지 않음으로써 투여한 형질전환 균주들이 장내 공생 균과의 경쟁을 이겨내고 colonization 할 수 있는지 보기 위해 starvation 과정은 생략하였다.  $10^8$  CFU의 Lactobacillus를 쥐의 구강을 통해 투여하였고, 투여 횟수를 3회로 진행한 것은 이를 간격으로 3번 투여하였다. 매일 1g의 쥐의 대변을 모아 PBS를 이용하여 homogenization한 후, stock부터 1/1000까지 serial dilution한 것을 클로람페니콜(3ug/ml)이 포함된 MRS plate에 spreading 하였다. 37°C 배양기에서 이를 간 배양 후, 나오는 colony들을 counting하여 CFU를 계산함으로써 retention time을 측정하였다(그림55).

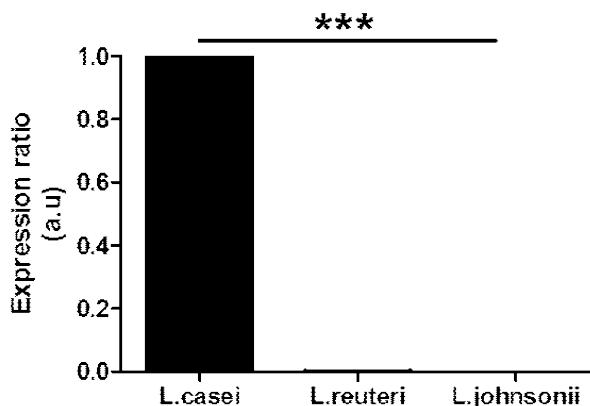
**1 time feeding****3 times feeding**

&lt;그림55&gt;. 항생제 무 처리 후, 형질전환 Lactobacillus의 retention time 분석

- 항생제를 처리한 것과 처리하지 않은 그룹에서 모두 공통적으로 control로 사용한 Lactobacillus casei와 추가적으로 구축한 형질전환체인 putative Lactobacillus casei에 비해서 Lactobacillus reuteri와 Lactobacillus johnsonii가 상대적으로 장 내에서 오랜 시

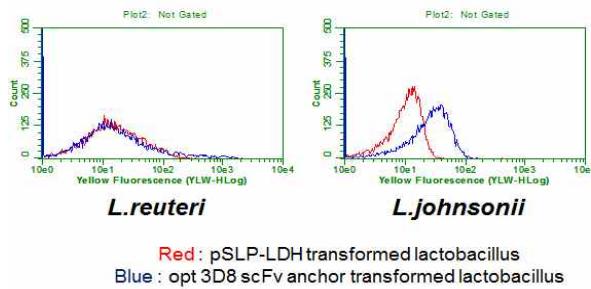
간 잔류할 수 있음을 확인하였다.

- 또한 이 두 가지 형질전환 *Lactobacillus*들은 긴 기간 동안 일정 수준으로 장 내에 잔류함으로써 이후 바이러스를 감염시켰을 때 상대적으로 다른 균주들에 비해 항-바이러스 효과가 더 뛰어날 것이라고 예상되었다.
  
- 쥐로부터 구축한 형질전환 *Lactobacillus* 의 항-바이러스 단백질 발현 여부 확인
  - 앞서 장 내에서 오랜 기간 살아남았던 두 가지 형질전환 균주인 *Lactobacillus reuteri*와 *Lactobacillus johnsonii*에서 항-바이러스 단백질 발현율을 확인하고자 transcript level에서 확인하였다.
  - 형질전환 *Lactobacillus*에서 total RNA를 분리하여 DNase를 처리한 이후, cDNA를 만들어 quantitative realtime PCR을 하는 순서로 진행하였다.
  - Housekeeping gene인 16S rRNA를 이용하여 normalization하여 이를 토대로 형질전환 *Lactobacillus*간의 항-바이러스 단백질 발현 효율을 측정하였다(그림56).



<그림56>. 형질전환 *Lactobacillus*의 항-바이러스 단백질 발현정도를 transcript level에서 확인

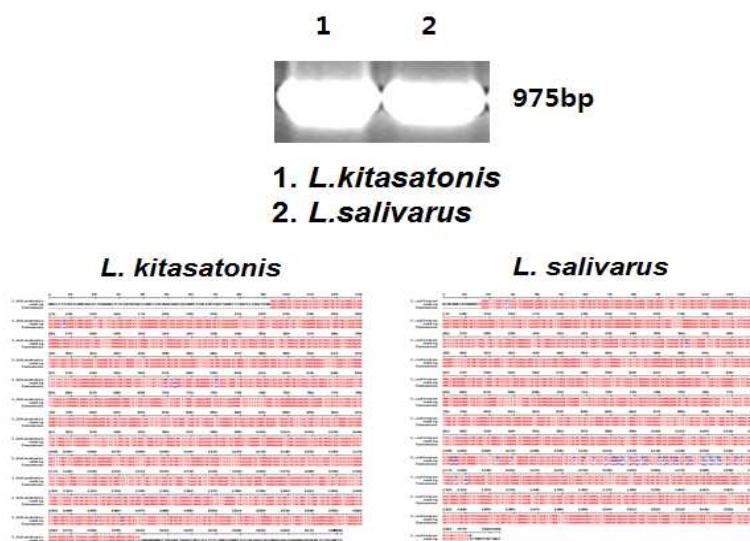
- 기존에 항-바이러스 단백질 발현이 확인된 치즈 유래의 *Lactobacillus casei*에 비해서 앞서 선별된 두 가지 형질전환균주인 *Lactobacillus reuteri*와 *Lactobacillus johnsonii*에서는 발현정도가 매우 낮음을 확인하였다.
- 추가적으로 protein level에서 항-바이러스 단백질 발현정도를 확인하기 위해 FACS (Fluorescent activated cell sorting) 분석을 하였고 다음과 같은 방법으로 진행하였다.
  - *Lactobacillus*를 37°C에서 하루 동안 배양하였다. 원심분리기를 통해 pellet만 남겨 PBS로 3번 washing 하였다. 5% BSA 1ml 넣고 1시간동안 incubation 하였다. PBST로 1번 washing 후, anti-3D8 scFv antibody를 1:1000의 비율로 처리하여 1시간동안 incubation 하였다. PBST로 3번 washing 후, TRITC-conjugated anti-rabbit antibody를 1:1000의 비율로 처리한 후 1시간동안 incubation하였다. PBST로 3번 washing 후, FACS 분석을 통해 항-바이러스 단백질 발현율을 확인하였다(그림57).



<그림57>. 형질전환 Lactobacillus의 항-바이러스 단백질 발현정도를 protein level에서 확인

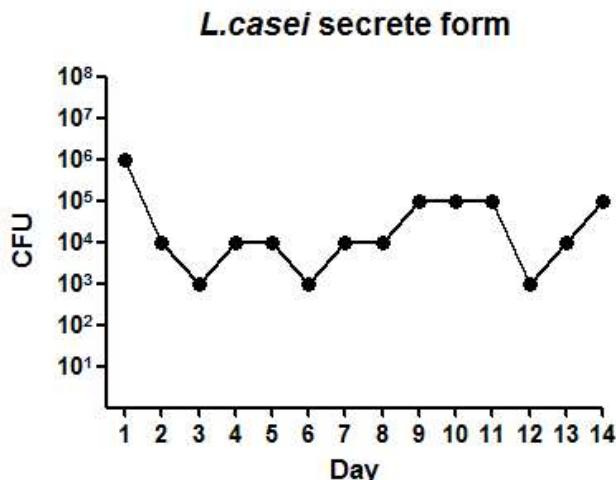
- Protein level에서도 또한 transcript level에서와 마찬가지로 항-바이러스 단백질 발현정도가 매우 낮음을 확인하였다.
- Transcript level과 protein level 모두에 있어서 형질전환 Lactobacillus내에서 항-바이러스 단백질 발현효율이 매우 낮은 수준으로 이루어지고 있으므로 이전보다는 발현효율을 끌어올리는 대책이 필요하다고 판단하였다.

- 항-바이러스 단백질을 발현하는 닭유래 Lactobacillus 스크리닝
- 닭의 장 내에서 분리한 총 180개의 서로 다른 colony를 이용해 항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus를 screening 하고자 하였다.
  - 항-바이러스 단백질이 포함된 형질전환용 벡터를 electroporation 과정을 통해 형질전환하였다.
  - 형질전환용 벡터가 들어감을 PCR로 확인하였고, 16S rRNA 서열 분석을 통해 strain을 분석한 결과 Lactobacillus kitasatonis와 Lactobacillus salivarus임을 확인하였다(그림 58).



<그림58>. 형질전환용 벡터가 삽입됨을 PCR로 확인한 후, 형질전환 균주의 strain 분석을 진행

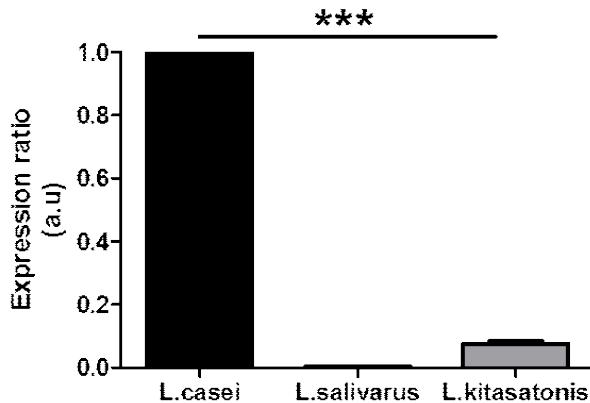
- 형질전환 Lactobacillus의 닭 장내 retention time 분석
  - 항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus casei의 장 내 retention time을 분석하기 위해 1일령 병아리를 대상으로 실험을 진행하였다.
  - 1일령 병아리는 장 내 공생 균이 거의 없는 상태기 때문에 항생제를 선 처리 하지 않고 2주간 매일  $10^9$  CFU 의 Lactobacillus를 구강 투여하였을 때 어느 정도의 수준으로 장 내에서 잔류하는지를 보기 위해 retention time 분석을 진행하였다(그림59).



<그림59>. 형질전환 Lactobacillus casei의 닭 장내에서의 retention time 측정

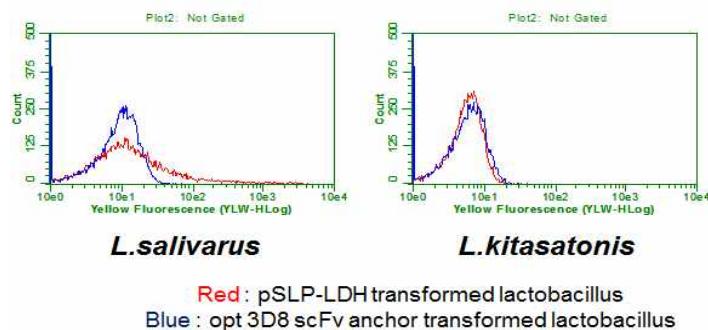
- 평균적으로  $10^4$  CFU 정도의 Lactobacillus casei가 장 내에 잔류할 수 있음을 보였고, 투여 기간 내내 어느 정도의 수로 계속 유지되는 것으로 보아 바이러스 감염 시 항-바이러스 효과를 보일 것으로 예상되었다.
- 이후 닭 장내에서 형질전환체로 구축 된 Lactobacillus kitasatonis와 Lactobacillus salivarius의 retention time을 측정했을 때 control로 사용한 Lactobacillus casei에 비해 더 오랜 기간 동안 높은 수준으로 그 수가 유지 된다면 보다 뛰어난 항-바이러스 효과를 기대할 수 있을 것이다.

- 닭으로부터 구축한 형질전환 Lactobacillus의 항-바이러스 단백질 발현 여부 확인
  - 닭에서 선발한 두 가지 형질전환 균주인 Lactobacillus kitasatonis와 Lactobacillus salivarius에서 항-바이러스 단백질 발현율을 확인하고자 transcript level에서 확인하였다.
  - Quantitative real-time PCR을 통해 housekeeping gene인 16S rRNA를 이용하여 normalization한 후, 이를 토대로 형질전환 Lactobacillus간의 항-바이러스 단백질 발현율을 측정하였다(그림60).



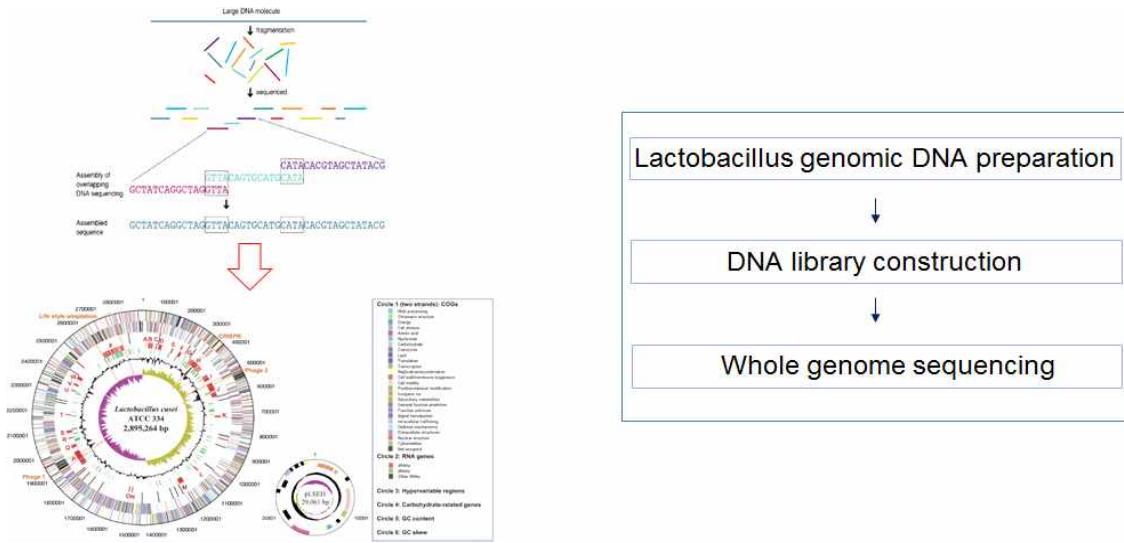
<그림60>. 형질전환 *Lactobacillus*의 항-바이러스 단백질 발현정도를 transcript level에서 확인

- 추가적으로 protein level에서 항-바이러스 단백질 발현 정도를 확인하기 위해 FACS (Fluorescent activated cell sorting) 분석을 하였다(그림61).



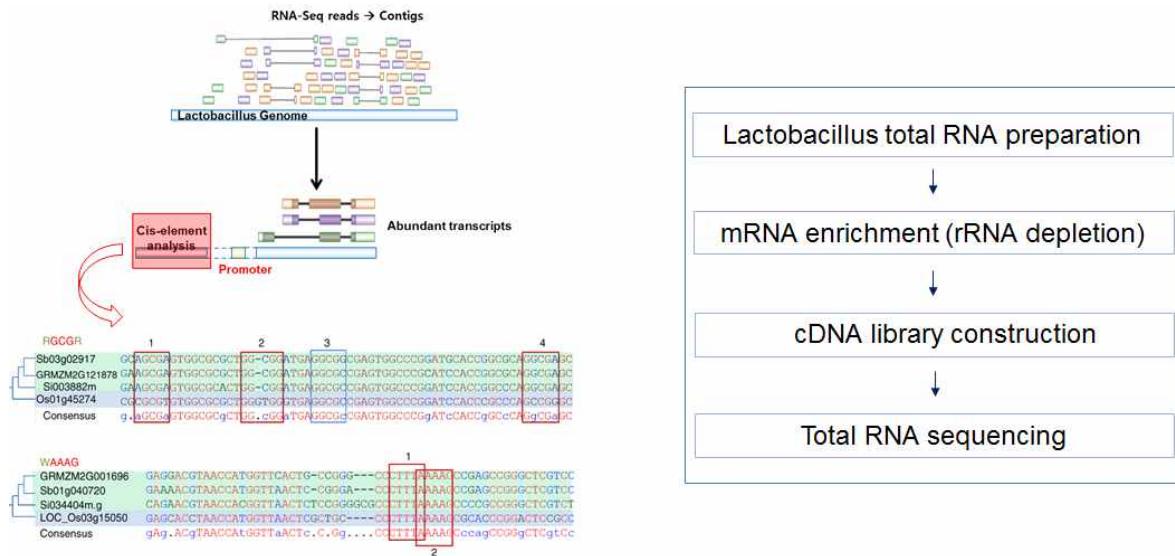
<그림61>. 형질전환 *Lactobacillus*의 항-바이러스 단백질 발현정도를 protein level에서 확인

- 생쥐에서 선발한 두 가지 형질전환 균주와 마찬가지로 닭에서 선발한 균주들 또한 transcript과 protein level에서 상당히 낮은 수준의 발현 양상을 보였다.
- 항-바이러스 단백질의 발현율을 높이기 위해 *Lactobacillus*에 최적화한 promoter 개발을 위한 transcriptome 분석
- 현재 생쥐와 닭에서 선발한 총 4가지 형질전환 균주에서 항-바이러스 단백질 발현이 낮은 수준으로 이루어지고 있기 때문에 발현효율을 향상시키고자 새로운 promoter 개발을 위한 실험을 진행하고 있다.
- 우선 총 4가지 종의 *Lactobacillus*로부터 유전체를 확보하고자 genomic DNA를 분리하여 DNA library를 구축한 후, whole genome sequencing을 통해 유전체를 확보하였다(그림62).



<그림62>. Promoter isolation을 위한 *Lactobacillus*의 유전체 확보 모식도

- 발현 효율이 높은 유전자를 확보하고 그와 관련된 프로모터를 분석하기 위해 일반 배양 조건과 장내 환경에 맞춰 배양한 총 4종의 *Lactobacillus*로부터 total RNA를 분리하여 mRNA enrichment 단계를 거쳐 cDNA library를 구축하여 RNA sequencing을 진행하였다(그림63 ,64).



<그림63>. Promoter engineering을 위한 *Lactobacillus*의 전사체 확보 모식도

### Total RNA preparation

Yield & Purity (A260/A280)		<i>L. reuteri</i>		<i>L. johnsonii</i>	
RNA	pH 5.7	728.5ng/μl	1.90	979.7ng/μl	1.98
	pH 4.8	430.4ng/μl	1.85	1191.8ng/μl	2.00
↓ DNase I treatment					
Yield & Purity (A260/A280)		<i>L. reuteri</i> (after DNase I)		<i>L. johnsonii</i> (after DNase I)	
RNA	pH 5.7	547.8ng/μl	1.74	1166ng/μl	1.84
	pH 4.8	272.6ng/μl	1.68	1170.3ng/μl	1.85

### mRNA enrichment (rRNA depletion)

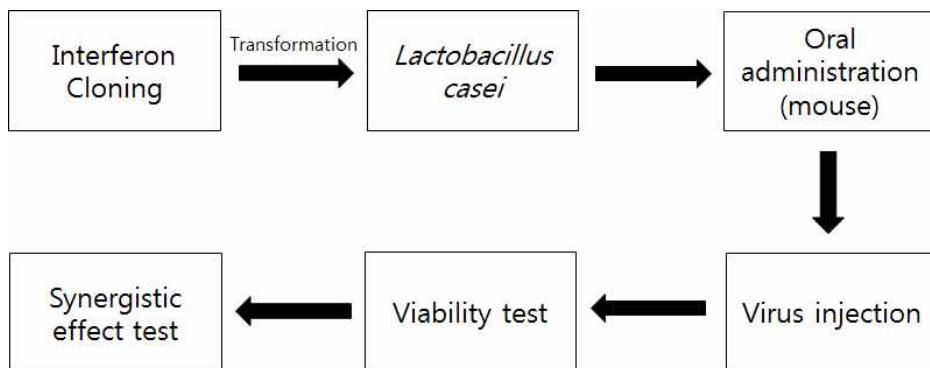
Table 1 The pH values of the mouse and rat gastrointestinal tract

Gastrointestinal section	pH mean (s.d.)			
	Mice		Rats	
	Fed	Fasted	Fed	Fasted
Stomach	2.98 (0.3)	4.04 (0.2)	3.20 (1.0)	3.90 (1.0)
Duodenum	4.87 (0.3)	4.74 (0.3)	5.00 (0.3)	5.89 (0.3)
Jejunum	4.82 (0.2)	5.01 (0.3)	5.10 (0.3)	6.13 (0.3)
Ileum	4.81 (0.3)	5.24 (0.2)	5.94 (0.4)	5.93 (0.4)
Cecum	4.44 (0.2)	4.63 (0.4)	5.90 (0.4)	6.58 (0.4)
Proximal colon	4.69 (0.3)	5.02 (0.3)	5.51 (0.5)	6.23 (0.4)
Distal colon	4.44 (0.3)	4.72 (0.2)	5.77 (0.5)	5.88 (0.5)

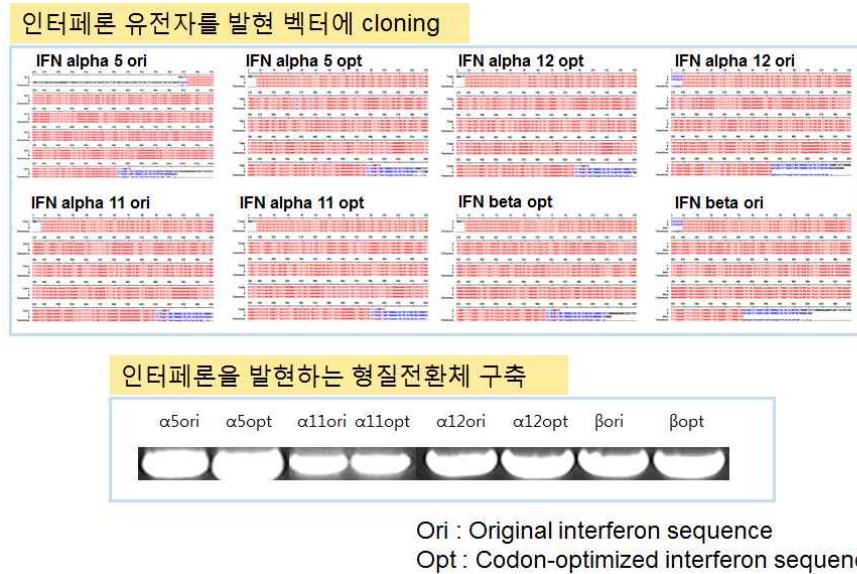


<그림64>. Transcriptome 분석을 위해 total RNA sequencing을 진행하기 위한 단계

- 이후 RNA sequencing을 통해 확보한 전사체 정보와 앞서 확보한 유전체 정보를 비교하여 발현 효율이 높은 프로모터를 선발하고 프로모터들 간의 cis-element 분석을 통해 promoter engineering에 들어갈 예정에 있다.
- Promoter engineering으로 새롭게 구축한 프로모터를 기준의 발현 벡터에 활용할 때 이전보다 향상된 항-바이러스 단백질 발현효율을 보일 것으로 예상된다.
- 인터페론을 발현하는 *Lactobacillus* 구축과 이를 이용한 항-바이러스 효과 검증
- *Lactobacillus*에 의한 간접적인 면역 증강 효과가 아닌 *Lactobacillus*내에서 인터페론 발현을 유도하면 더 향상된 항-바이러스 효과를 기대할 수 있을 것이라는 가설 하에 실험을 진행하였다(그림65).
- 여러 종류의 인터페론 중에서 항-바이러스 효과가 가장 뛰어난 인터페론인 IFN-beta, IFN-alpha 5, IFN-alpha 11, 그리고 IFN-alpha 12를 선정하였다.
- 생쥐 유래 인터페론 유전자(위의 4가지)를 분리하였고, *Lactobacillus*내에서 인터페론 발현을 증가시키기 위해 codon usage optimization하였고, 발현 벡터인 pSLP111.3 vector에 ligation하였고 형질전환체를 구축하였다(그림66).

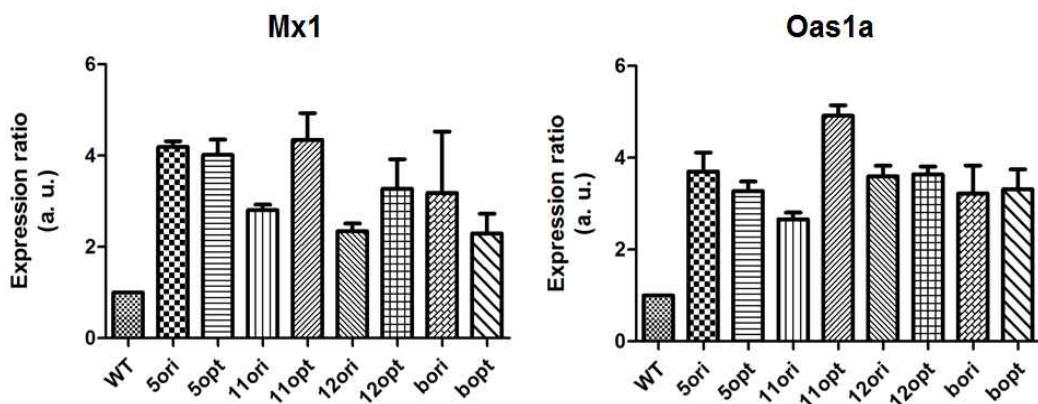


<그림65>. 인터페론으로 인한 향상된 항-바이러스 능을 분석하기 위한 실험 모식도



<그림66>. 인터페론 발현 벡터와 인터페론을 발현하는 형질전환체 *Lactobacillus* 구축 결과

- 8종류의 인터페론 발현 유산균을 2주 동안 매일  $10^8$ CFU의 dosage로 투여한 이후, 생쥐의장을 적출하여 IFN-alpha, IFN-beta 발현량 증가를 확인하고자 quantitative realtime PCR을 진행하였다(그림67).
- 형질전환 되지 않은 유산균에 의한 간접적인 면역 증강 효과가 아닌 *Lactobacillus*가 직접 인터페론을 발현함에 따라 개체 내에서 더 뛰어난 부스팅 효과를 기대하였다.



<그림67>. 인터페론을 발현하는 *Lactobacillus* 투여 이후, 향상된 면역 증강 효과에 대한 분석

- *Lactobacillus*에 의해 발현되는 인터페론이 직접 host내의 type I interferon pathway에 작용함으로써 antiviral-stimulated gene인 Mx1과 Oas1a의 발현이 증가되는지를 확인하였고, 그 결과 INF-5 opt와 IFN-11 opt, IFN-12 opt에 의해 이 두 가지 유전자의 mRNA level이 유의미한 수준으로 상승됨을 확인하였다.
- 따라서 8종류의 형질전환 유산균 중 위의 결과에서 확인된 3종류의 형질전환 유산균이 상대적으로 wild type 유산균에 비하여 더 높은 면역 부스팅 효과를 가짐으로써 향상된 항-바이러스 효과를 가질 수 있을 것이라 예상되었다.

- 현재 이 3종류의 형질전환 유산균을 투여한 이후 소화기 계통에 감염되는 murine norovirus CR6 (persistent strain)에 대한 항-바이러스 효과를 확인하는 실험을 진행 중에 있다.

□ 항-바이러스 단백질의 체내 지속능과 투과능력 분석

- 항-바이러스 단백질인 3D8 scFv를 다양한 투여 경로를 통해 주입하여도 이들의 체내 지속능과 투과능이 있음을 확인하기 위하여 우선적으로 복강 내 투여를 통하여 이 단백질의 체내 지속능과 흡수 여부를 확인 하였고, 다음과 같은 실험 방법으로 진행하였다.
- 항-바이러스 단백질 Wild type 3D8 scFv 200 $\mu$ g을 12시간 간격으로 3일 동안 총 6번의 횟수로 복강 내 투여를 실시하였다. 투여한 단백질이 혈액을 통하여 다른 장기로 흡수됨을 확인하기 위하여 혈액을 포함한 간, 폐, 장, 뇌, 그리고 비장을 적출하여 Western blot hybridization으로 확인하였다(그림68).

### Negative control



### 3D8 scFv 복강 투여



<그림68>. 항-바이러스 단백질을 복강 내 투여하였을 때 여러 장기로 침투 확인

- 추가적으로 항-바이러스 단백질인 3D8 scFv가 그 자체로 직접적으로 여러 장기로 흡수되는 것인지, 혈액 내 존재하는 단백질로 인하여 장기로 흡수되는 것처럼 보이는지에 대한 것을 명확하게 확인하기 위하여 생쥐의 혈액을 모두 배출하는 perfusion 과정을 진행한 후, 장기를 적출하여 western blot hybridization 으로 확인하였다(그림69).

## Negative control



## 3D8 scFv 복강 투여 (Perfusion)

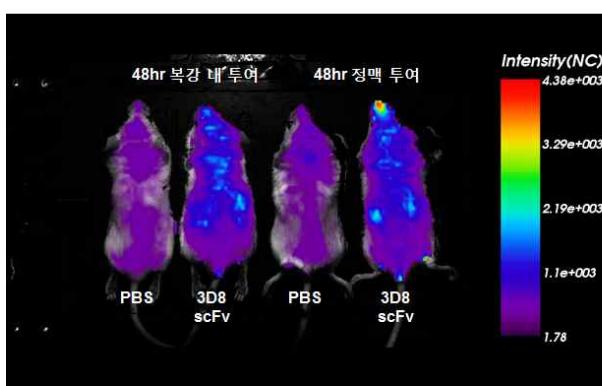


<그림69>. Perfusion을 후, 항-바이러스 단백질이 장기로 침투 확인

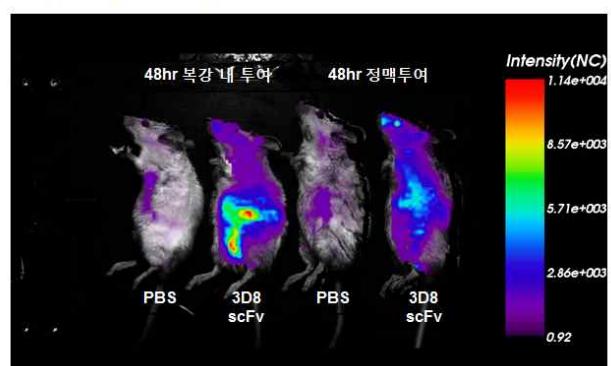
- 복강 내 투여 뿐 아니라 정맥 내 투여를 통해서도 항-바이러스 단백질의 투과능과 체내 지속성이 있는지를 가시적으로 확인하기 위하여 live imaging을 실시하였고 그 방법은 다음과 같다.
  - 항-바이러스 단백질에 labeling을 이후 free dye를 모두 제거하는 과정을 실시하였고, 200 $\mu$ g의 단백질을 각각 쥐의 복강과 정맥에 투여하고, 48시간 경과 후 live imaging을 진행하여 장기로 투과됨과 동시에 체내 지속성을 확인하였다(그림70).

Protein labeling 한 WT 3D8 200 $\mu$ g  $\Rightarrow$  쥐의 복강 내 투여와 정맥 투여  $\Rightarrow$  48시간 후 live imaging

Frontal plane (관상면)



Sagittal plane (시상면)



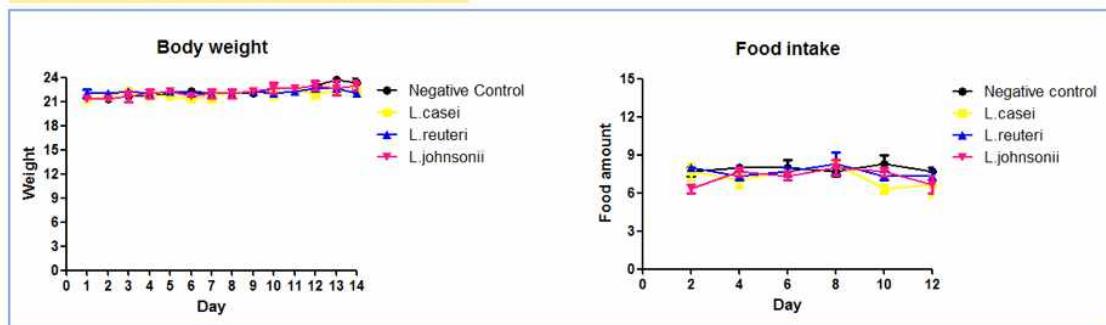
<그림70>. Live imaging을 통한 항-바이러스 단백질의 체내 지속능과 투과능 확인

- 복강 내 투여 뿐 아니라 정맥 내 투여를 통해서도 항-바이러스 단백질의 체내 흡수와 지속성이 있다는 것을 확인하였고, antiviral drug로서의 가능성이 충분하다고 사료된다.

□ 선발된 Lactobacillus 2종의 안전성과 면역 증강 효과에 대한 분석

- 앞에서 2종의 Lactobacillus가 장 내에서 어느 정도 지속됨을 확인하였고 추가적으로 probiotics로서 갖춰야 할 특징인 안전성과 면역 증강 효과에 대한 실험을 진행하였다.
- Lactobacillus를 2주간 매일  $10^8$ CFU의 dosage로 쥐에게 투여하였을 때 유산균의 안전성을 몸무게의 변화, 음식 섭취량의 변화, 장기 무게의 변화, bacterial translocation, serum내 ALT/AST level을 측정하는 방법으로 평가하였다.
- Probiotics라고 잘 알려진 Lactobacillus casei를 control로 사용하였고, control과 비교하였을 때에도 선발된 2종의 균주를 투여하였을 때 체중과 음식 섭취량에 있어서 큰 차이가 없음을 확인하였다(그림71).

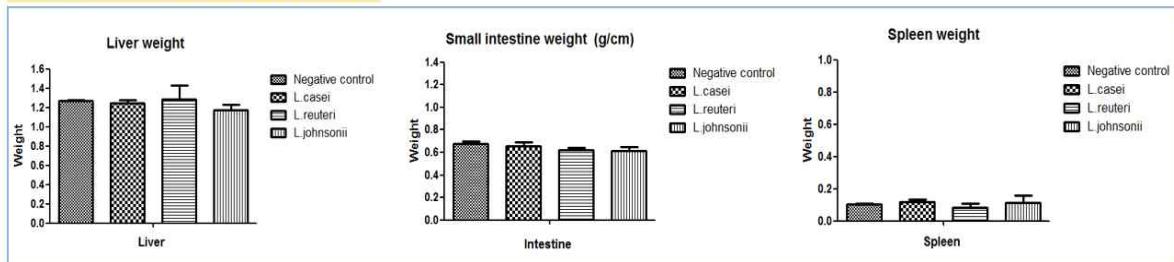
**체중 변화와 음식 섭취량 변화**



<그림71>. 유산균 투여 기간 중 체중의 변화와 음식 섭취량 변화 측정

- 안전성 평가 시 장기 무게의 변화를 보게 되는 데 있어서 기준이 되는 장기인 간과 소장 비장을 선정하여 무게 차이를 관찰하였고, 그 결과 모든 실험군에서 유의미한 차이가 없음을 확인하였다(그림72).

**장기별 무게 측정 (간, 소장, 비장)**



<그림72>. 유산균 투여 기간 중 장기(간, 소장, 비장) 무게의 변화 측정

- Bacterial translocation은 유해한 균이 장에 정착했을 때 이들에 의해 장 내 미생물총의 변화가 좋지 않은 방향으로 변화하게 되고 epithelial barrier가 무너짐에 따라 균들이 장으로부터 다른 여러 장기로 이동하게 되는 현상인데 선발된 Lactobacillus가 이러한 현상을 일으키는지에 대한 여부를 확인하였다.
- 쥐의 혈액과 간 그리고 신장을 적출하여 혈액은 Lactobacillus를 선별할 수 있는 MRS plate에 직접 떨어뜨려 spreading을 진행하였고, 간과 신장은 PBS를 넣고 균질화하여

MRS plate에 spreading 하여 이를 간 배양 후 나타나는 colony를 관찰하였고 그 결과 colony가 거의 나타나지 않음을 확인하였다.

- 또한 bacterial translocation이 일어나게 되면 간이 손상되어 ALT/AST level이 상승하게 되는데 측정 결과 모든 실험군에서 ALT/AST level이 normal range 안에 포함되는 것을 확인하였다(그림73).

### Bacterial translocation

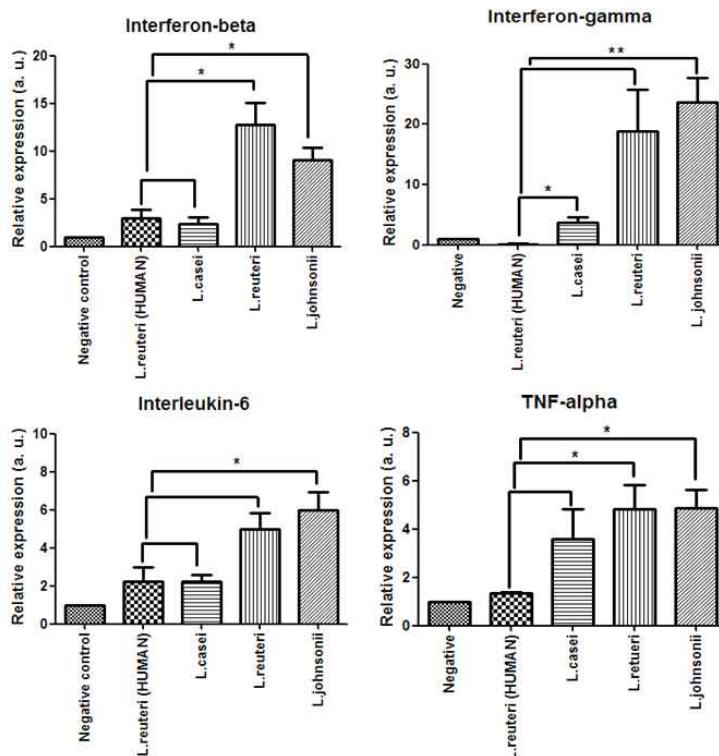
	Negative Control	<i>L.casei</i>	<i>L.reuteri</i>	<i>L.johnsonii</i>
Blood	0/3	0/3	0/3	0/3
Liver	0/3	1/3	0/3	0/3
Kidney	0/3	0/3	0/3	0/3

### Serum analysis

NAME	AST	ALT
Negative control	109	38
<i>L.casei</i>	105	44
<i>L.reuteri</i>	102	52
<i>L.johnsonii</i>	81	30
단위	U/L	U/L

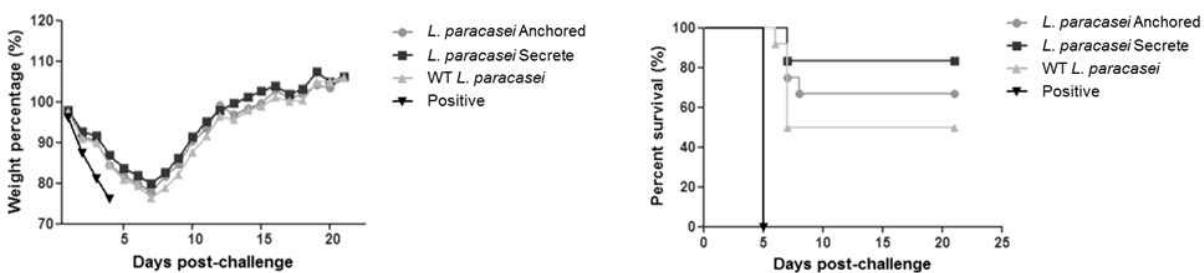
<그림73>. Bacterial translocation 관찰과 serum내 ALT/AST level의 측정

- 추가적으로 이런 Lactobacillus들이 host내에서 면역 증강 효과를 일으킬 수 있는지 확인하기 위하여 2주간 매일  $10^8$ CFU의 dosage로 유산균을 투여한 이후 장을 적출하였다.
- Antiviral defense에 관여하는 대표적인 cytokine 이라고 할 수 있는 interferon-beta, interferon-gamma, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha를 선정하여 유산균 투여 이후 이들의 mRNA level 증가 여부를 quantitative realtime PCR로 확인하였다(그림74).



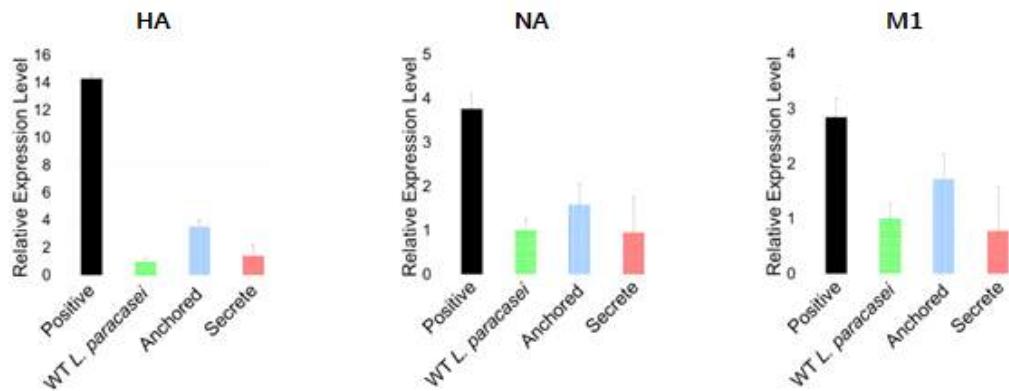
<그림74>. 유산균 투여 이후에 나타나는 면역 증강 효과에 대한 분석

- Control로 사용한 *Lactobacillus casei*와 사람유래 *Lactobacillus reuteri*와 비교해 보았을 때 선발된 2종의 *Lactobacillus* 투여 이후 cytokine의 level이 증가됨을 확인함으로써 충분한 면역 증강 효과가 있음을 확인하였다.
  - 이로써 생쥐의 소장으로부터 분리한 *Lactobacillus reuteri*와 *Lactobacillus johnsonii*는 사료첨가제 개발에 필요한 source인 probiotics로서의 특징을 모두 갖고 있음을 장내 군집형성, 안전성, 면역 증강 효과라는 지표로써 확인하였다.
  - 생쥐에서 직접 분리한 유산균들을 다시 쥐에게 투여해 주었을 때 host에 이로운 효과를 주었음을 확인하였기 때문에 닭에서도 마찬가지로 분리한 유산균을 다시 닭에게 투여해 주었을 때에도 동일한 효과를 가질 것이라 예상된다.
- 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균을 비강 투여하였을 때 인플루엔자에 대한 방어 효능 검증
- 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균을 membrane-anchored form과 secretion form이라는 두 가지 형태로 형질전환 균주를 구축하였다.
  - 두 가지 형질전환체 중 secretion form의 성격을 지닌 유산균이 상대적으로 더 뛰어난 항-바이러스 효과를 가질 것이라는 예상 하에 실험을 진행하였다.
  - Wild type, membrane-anchored form, secretion from 세 종류의 유산균을 비강으로 투여한 이후 H1N1(A/NWS/33)을 감염시켰을 때 몸무게의 변화와 생존율을 우선적으로 비교분석 하였다(그림75).



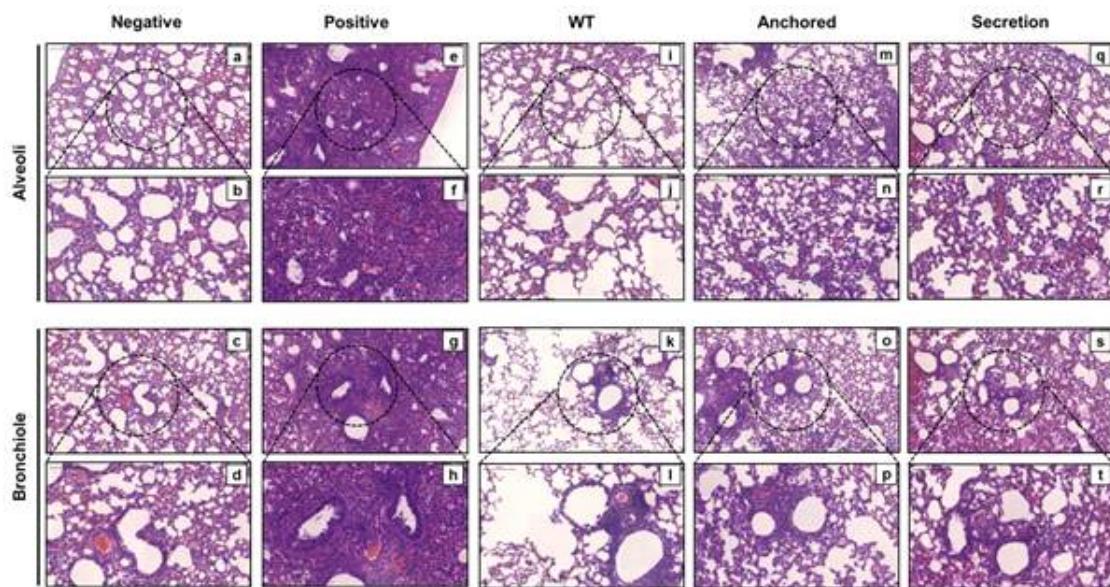
<그림75>. 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균 투여 이후 인플루엔자 바이러스를 감염시켰을 때 나타나는 몸무게의 변화(왼쪽)과 생존율(오른쪽)의 비교 분석

- 인플루엔자 바이러스만을 감염시킨 실험군과 비교하였을 때 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균을 투여한 실험군에서 몸무게의 회복이 정상적으로 이루어짐을 확인하였으며 약 80% 정도의 높은 생존율을 보이는 것을 확인하였다.
- 생쥐의 폐를 적출한 이후, 인플루엔자 바이러스의 main 유전자인 HA, NA, M1의 감소 여부를 확인하였다(그림76).



<그림76>. 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균에 의한 인플루엔자 바이러스의 유전자 발현 감소

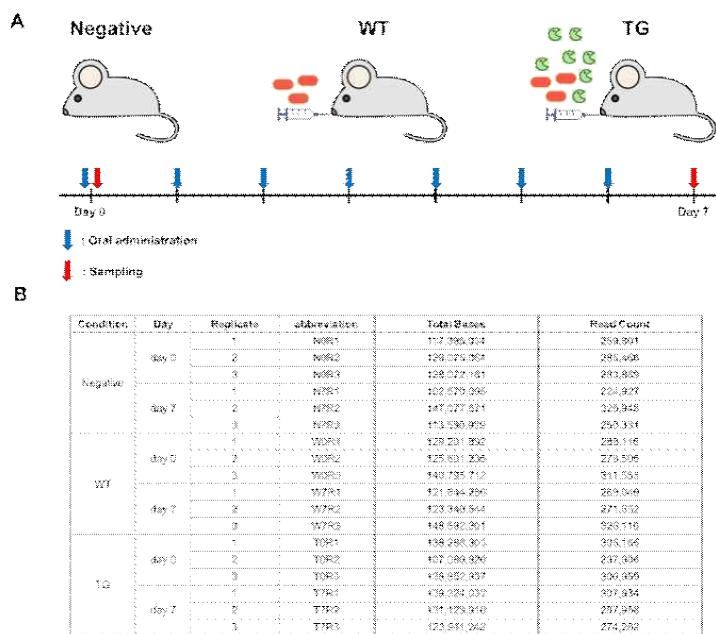
- 형질전환체 유산균 중 secretion form의 성격을 지닌 유산균이 비약적으로 인플루엔자 바이러스의 유전자를 감소시키는 것을 확인하였음
- 또한 H&E staining을 통하여 폐 조직에서의 병리학적 현상을 관찰하였음(그림77)



<그림77>. 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균에 의한 폐 조직 내의 병리학적 현상 완화 관찰

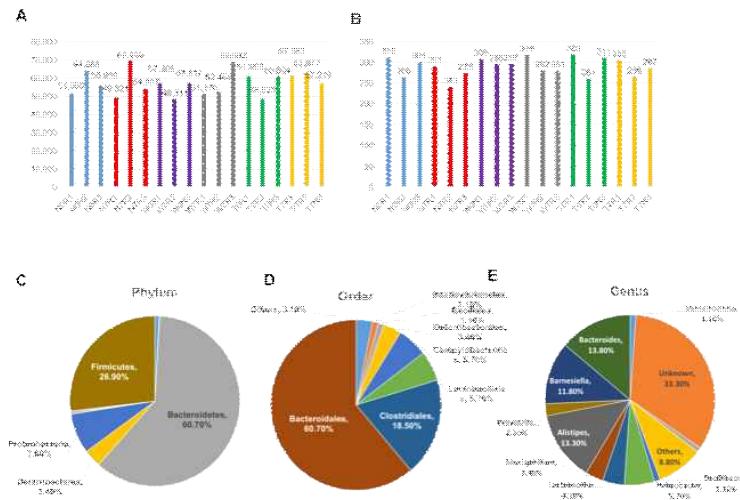
- 바이러스만 감염시킨 실험군에서는 폐 조직에서 면역세포의 recruiting과 염증반응이 명확하게 보이는 데 반해 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균을 처리한 실험군에서는 이러한 병리학적 특성이 확실히 감소하는 경향을 보였다.
- 이러한 결과들로 보았을 때 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균의 비강 투여로 인하여 인플루엔자 바이러스를 충분히 예방할 수 있다는 결론을 내렸다.

- 항-바이러스 단백질인 3D8 scFv를 발현하는 유산균을 먹인 쥐의 장내에서 나타나는 장내미생물의 변화 관찰
- 7일 동안 쥐의 경구를 통해 WT *L.paracasei* 혹은 TG *L.paracasei*를 먹인 후 쥐의 분변을 받아 0, 7일째에 장내 미생물총의 변화가 나타나는지 관찰하였다.
- 항-바이러스 단백질을 발현하는 형질전환 *L.paracasei*의 안전성에 대한 사항을 검증하기 위하여 다음의 실험을 진행하였다.
- 16S rDNA를 이용한 NGS 분석법을 사용하기 위하여 분변으로부터 DNA library를 제작하였고 이를 이용하여 sequencing을 진행하였을 때 분석에 유의미한 결과를 얻을 수 있는 충분한 read count를 얻은 것을 확인하였다(그림78).



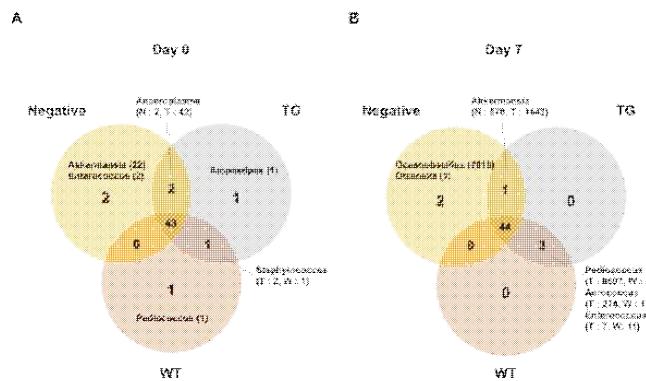
<그림78>. 3D8 scFv를 발현하는 TG *L. paracasei*를 먹였을 때 나타나는 쥐의 장내 미생물총의 변화를 관찰하기 위한 16s rDNA를 이용한 NGS 분석

- 분류에 따른 장내미생물총의 구성분포 확인
  - 조건에 따른 각각의 sample(총 18개) 에서의 NGS 분석에 따른 Read count와 OTU를 확인하였고 전체 분석된 sequence의 read 가운데에서 어떤 균주들이 쥐의 장내에 다수 분포하는지 확인하기 위하여 Phylum, Order, Genus의 분류에 따른 박테리아의 구성을 다음과 같이 확인하였다(그림79).



<그림79>. 3D8 scFv를 발현하는 TG L. paracasei를 먹였을 때 나타나는 쥐의 장내 미생물총의 변화를 관찰하기 위한 16s rDNA를 이용한 NGS 분석

- L.paracasei를 경구 투여한 뒤 장 내에서 나타나는 미생물총의 변화를 관찰
  - WT L. paracasei와 TG L. paracasei를 각각 7일 동안 경구 투여한 뒤 장내미생물총이 어떻게 변화하였는지 확인하기 위해서, 각각의 그룹별로 비교를 하여 새롭게 늘어나거나 증가된 균들이 존재하는지 비교 분석함. 대부분의 균들이 공통으로 존재하는 것을 확인 할 수 있으나 특별히 L. paracasei를 먹인 그룹에서 Pediococcus, Aerococcus, Enterococcus들이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이를 보다 자세하게 확인하기 위하여 시간별, 그룹별로 장내 미생물의 변화를 Species level에서 비교분석함. 0일차 (W0, T0)에 비해서 7일차 (W7, T7)에 L. paracasei가 많이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히 T0에 비해서 T7에 P. acidilactici가 급격하게 증가한 것을 볼 수가 있었다. P. acidilactici는 probiotics로 잘 알려진 균주로써, 3D8 scFv를 발현하는 L. paracasei를 경구 투여하였을 때, 쥐의 장내에서 probiotics 역할을 하는 균주들이 상대적으로 증가하는 것을 보여주고 있다(그림80,81).



<그림80>. 각각 0, 7일차에서 그룹별 장내미생물총의 차이를 비교, 분석한 결과

	All	N0	N7	W0	W7	T0	T7
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5743 (0.6%)	0	0	0	4790 (2.8%)	0	953 (0.5%)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	6120 (0.6%)	1068 (0.6%)	163 (0.1%)	733 (0.4%)	2518 (1.5%)	1295 (0.8%)	343 (0.2%)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	9702 (0.9%)	0	0	1	4	0	9697 (5.3%)
Uncultured bacterium	922984 (89.4%)	153395 (89.3%)	158000 (91.3%)	141368 (86.7%)	158205 (91.6%)	152017 (89.2%)	159999 (88.1%)
Uncultured <i>Bifidobacterium</i> sp.	360	82	0	53	0	225 (0.1%)	0
Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	275	14	52	65	53	84	7
Uncultured <i>Helicobacter</i> sp.	58145 (5.6%)	14060 (8.2%)	9849 (5.7%)	16001 (9.8%)	1213 (0.7)	13879 (8.1%)	3143 (1.7%)
Uncultured organism	2469 (0.2%)	594 (0.3%)	236 (0.1%)	307 (0.2%)	260 (0.2%)	274 (0.2%)	798 (0.4%)
Uncultured <i>Shigella</i> sp.	2669 (0.3%)	41	39	168 (0.1%)	1843 (1.1%)	40	538 (0.3%)
Unknown	24294 (2.4%)	2473 (1.4%)	4628 (2.7%)	4437 (2.7%)	3852 (2.2%)	2703 (1.6%)	6201 (3.4%)
	103261	171727	172967	163133	172738	170517	181679

<그림81>. 각 조건별 장내미생물의 변화를 species level에서 비교 및 분석한 결과

- 위의 결과들로 보았을 때 WT *L.paracasei*를 경구 투여 하였을 때 probiotics인 *L.paracasei*가 급격하게 증가하였을 뿐 아니라 TG *L.paracasei*를 투여하였을 때에도 *P. acidilactici*라는 probiotics가 급격하게 증가한 것으로 미루어 보아 형질전환 균주의 안전성은 물론 host의 장 내에서 probiotics의 양을 늘림으로써 오히려 이로운 효과를 주는 것으로 확인되었다.

□ 세포내 침투성과 안정성이 향상된 항-바이러스 단백질 제재 개발

- 1) 항-바이러스 단백질의 세포내 침투효율 분석 시스템 개발 및 이를 이용한 항체의 세포내 침투효율 정량분석
  - 베타-갈락토시다아제를 이용한 세포내 침투성 항체 선별 시스템 개발: 항-바이러스 단백질의 세포내 침투효율을 보다 더 쉽게 확인할 수 있는 시스템을 개발하기 위해 베타-갈락토시다아제의 활성을 이용하였다. 베타-갈락토시다아제의 N-말단 부위에 항체 면역글로불린 G의 Fc에 결합하는 Protein A 또는 카파-가변부위에 결합하는 Protein L을 삽입하여, 항체가 세포내로 침투하여 베타-갈락토시다아제와 결합하였을 때 그 활성을 저해시킬 것이라고 기대하였다.
  - 실험과정은 다음과 같다. HeLa 세포를 24-well plate에 5 x 10<sup>4</sup> cells/500 µl로 37°C CO<sub>2</sub>배양기에서 18시간 배양함. 18시간 후 배지를 제거하고 PBS로 1번, Opti-MEM으로 1번 세척 한 후, Opti-MEM에 Lipofectamine 2000 (invitrogen)을 이용해 KV10 lacZ, KV10 pA-lacZ, 및 KV10 pL-lacZ를 transfection하고 37°C CO<sub>2</sub>배양기에서 6시간 동안 배양함. 세포를 PBS로 1번, DMEM으로 1번 세척한 후, DMEM을 넣고 37°C CO<sub>2</sub>배양기에서 18시간 동안 배양함. 세포 용해물을 얻은 후, 베타-갈락토시다아제 검출 키트 (Pierce)와 함께 96-well plate의 각 well에 넣음. 37°C에서 30분간 보관 후, 405 nm에서 흡광도를 측정한다.
  - 알칼리성 인산분해효소를 이용한 세포내 침투성 항체 선별 시스템 개발: 항-바이러스 단백질의 세포내 침투효율을 보다 더 쉽게 확인하기 위한 제2의 시스템을 개발하였다. 이는 알칼리성 인산분해효소 (Alkaline phosphatase)의 활성과 ELISA 원리를 이용한 것이다. HeLa 세포를 96-well plate에 1 x 10<sup>4</sup> cells/100 µl로 37°C CO<sub>2</sub>배양기에서 18시간 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 1번, TOM (transfection optimized medium)로 1번 세

척 한 후, TOM에 Ch3D8 IgG, Polyclonal Human IgG를 각각 0.5, 2  $\mu$ M 처리하고 37°C에서 6시간 배양함. 세포를 PBS로 3번 세척 한 후, 고정완충용액 (4% paraformaldehyde/PBS)으로 상온에서 10분 처리하고, 다시 PBS로 3번 세척 후, 세포 투과성 완충용액 (1% BSA/0.1% saponin/0.1% sodium azide/PBS)으로 상온에서 10분 동안 처리한다. PBS로 3번 세척 후, 알칼리성 인산분해효소가 결합된 항-사람 Fc 면역글로불린 G (alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human Fc IgG)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBS로 3번 세척 후, p-나트로페닐 인산염 (0.1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate/0.1 M glycine/0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>/0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 10.4)을 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

## 2) 항-바이러스 단백질 생산 및 항체의 활성단위 (unit) 결정방법 확립

- ELISA 및 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 원리를 이용한 핵산결합, 핵산 분해활성 분석법을 통해, 정제한 항-바이러스 단백질의 사료 제형화에 필요한 scFv의 생화학적 특성을 확인하고 항체의 활성단위 (unit)를 결정한다.
- 온도에 따른 3D8 scFv의 DNA 결합 및 분해 활성을 확인하기 위해, 단백질을 PBS에 희석하여 각 2, 6시간 동안 각각의 온도에서 보관하고, 단백질 변성이 일어나는 온도 및 pH 조건에서 변성되었던 단백질이, 생리적 조건에서 그 활성 (DNA 결합능 및 분해능)을 회복할 수 있는지를 ELISA 및 FRET-base DNA hydrolysis 분석으로 확인한다. FRET-base DNA hydrolysis 분석은 다음과 같이 수행한다. 96-well black plate (Nunc)에 전처리해둔 각 단백질 (0.5  $\mu$ M)과 이중가닥 oligonucleotides (5'-FAM-CGA TGA GTG CCA TGG ATA TAC- BHQ-3') 0.5  $\mu$ M을 Mg<sup>2+</sup>가 포함된 완충용액 (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)에 넣어주고 15분 간격으로 6시간 동안 fluorescence analyzer (Molecular Devices)를 통해 분석한다. 양성 대조군으로 DNase I, 음성 대조군으로 항-DR5 항체인 HW6 scFv를 사용한다.

## 3) 항-바이러스 단백질 개량체 HD1 scFv 개발

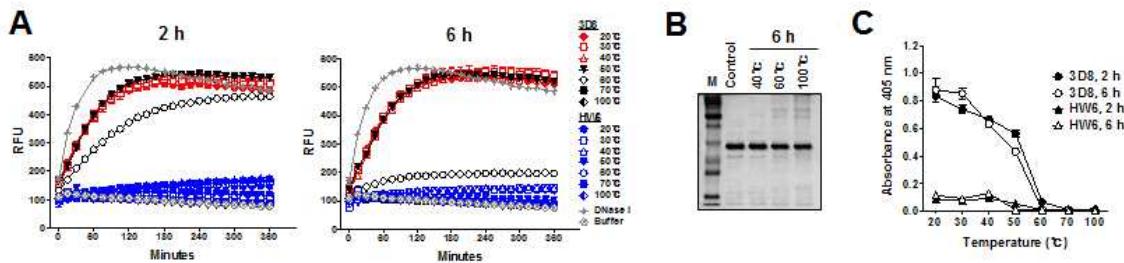
- 3D8 scFv 세포침투 및 핵산 가수분해 활성에 LCDR1 (KSSQSLFNSRTRKNYLA) 부분이 중요했기 때문에, 이 부분을 HW6 scFv (항-DR5 항체)의 LCDR1과 치환하였을 때의 결과를 확인해 보았다. 그 결과, 정제 수율이 기존의 항-조류인플루엔자 항체인 3D8 scFv보다 10 배 정도 증가하였고, DNA 결합력 및 세포내 침투성 면에서도 개선이 되었지만, DNA 가수분해 활성이 절반으로 낮아져서 이 부분의 개선이 요구되었고, 이 항체를 HD1 scFv라 명명하였다.

### 대장균에서 대량 생산된 항-바이러스 활성이 있는 재조합 항체(3D8 scFv)의 다양한 물리/화학적 조건에서의 기능적 안정성 분석

#### 1) 다양한 온도 조건에서 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

- 여러 가지 온도 (20°C~100°C)조건에서 항-바이러스 단백질 (3D9 scFv)을 2 h, 또는 6 h 동안 보관한 후, FRET assay를 이용하여 DNA 가수분해 능력을 확인하였고, ELISA를 이용하여 DNA 결합능력을 확인하였다. 그 결과 3D8 scFv는 50°C (pH 7.2 조건)에서 6 h 동안 DNA 가수분해활성을 유지하는 것을 확인하였고, DNA 결합능력도 가수분해능력과 동일하게 50°C 까지 활성이 유지되고 있음을 확인하였다. 또한 SDS-PAGE 결과를 통하여 온도가 올라감에 따라 활성이 없어지는 것은 항체 단백질이 분해되기 때문이

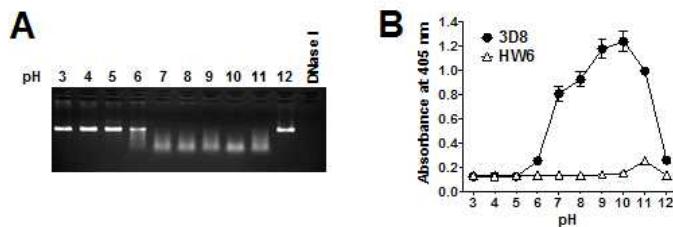
아니라 3차구조의 변화 때문인 것을 알 수 있었다(그림82).



<그림82>. 다양한 온도 조건에서 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

### 2) 3D8 항체가 DNA 분해 활성을 나타내는 최적의 pH 확인

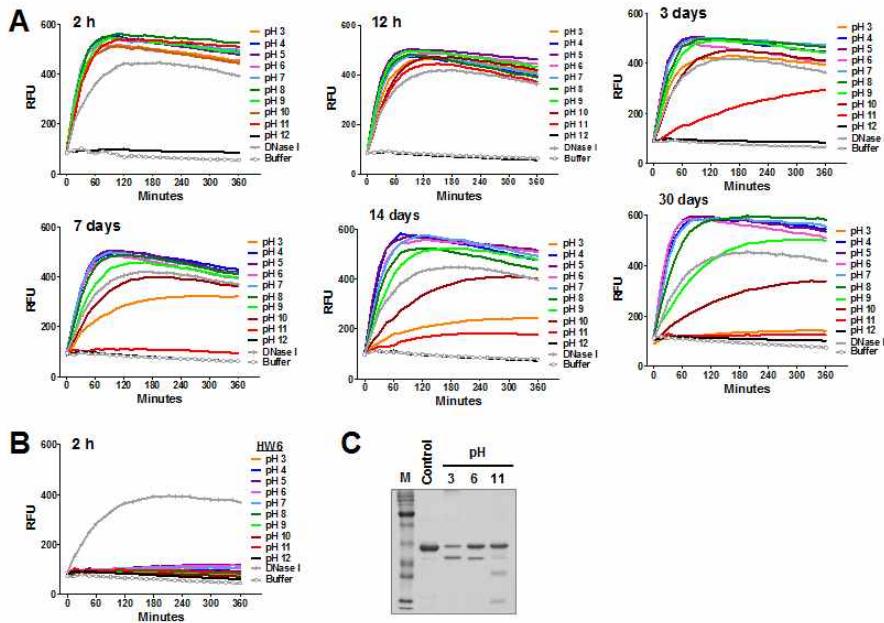
- 다양한 pH (pH 3-12) 조건에서 3D8 scFv를 2h, 또는 6h 동안 보관한 후, agarose gel electrophoresis를 이용하여 DNA 가수분해 능력을 확인하였고, ELISA를 이용하여 DNA 결합능력을 확인하였다. FRET assay에 사용되는 DNA는 형광이 달려있기 때문에 pH에 대해 상당히 민감하므로 이 방법으로는 확인할 수 없었다. 그 결과 DNA 가수분해 능력은 pH 7-11에서 활성이 나타났으며, DNA 결합능력 또한 가수분해 능력과 동일하게 pH 7-11에서 활성이 나타난 것으로 확인되었다(그림83).



<그림83>. 3D8 항체가 DNA 분해 활성을 나타내는 최적의 pH 확인

### 3) 다양한 pH (pH 3-12) 조건에서 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

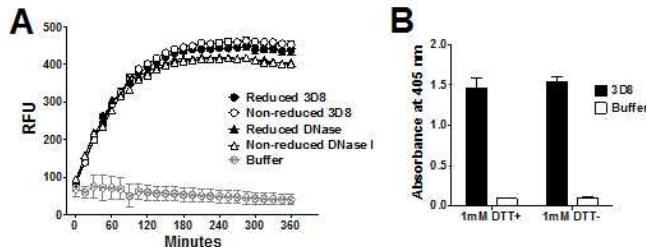
- 3D8 scFv를 다양한 pH 조건에서 최대 1달간 보관한 후, DNA 가수분해 활성을 알아보기 위하여 FRET assay를 진행하였다. 활성을 측정하기 위하여 여러 pH 조건 (pH 3~12)의 베퍼에 3D8 scFv를 희석하여 37°C에서 2시간, 3일, 7일, 14일, 30일 동안 보관한 후, microdialysis plate를 이용하여 생체 내 조건인 pH 7로 바꾸어주었다. 그 후 FRET assay를 이용하여 DNA 가수분해 활성을 측정한 결과, pH 3 - 10 (37°C 조건)에서 3일 동안, pH 4 - 8 (37°C 조건)에서 30일간 활성을 유지하는 것을 확인하였다. 또한 SDS-PAGE 결과를 볼 때, control 단백질에 비하여 pH 3, 6, 11에 보관되었던 단백질에서 분해가 일어난 것으로 보였다. 이를 통하여 3D8 scFv의 분해가 일어나도 활성에는 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다(그림84).



<그림84>. 다양한 pH (pH 3~12) 조건에서 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

#### 4) DTT가 첨가된 환원적 환경에서 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

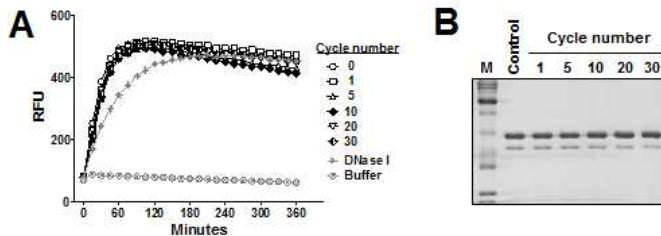
- 3D8 scFv는 이황화결합에 의해 구조가 유지되기 때문에 이황화결합을 환원시켜주어도 활성이 유지되는지를 보기 위하여 FRET assay와 ELISA를 이용하였다. 3D8 scFv를 환원시키기 위하여 DTT를 사용하였다. 그 결과 DNA 가수분해 능력이 완전히 유지되고 있었고, DNA 결합 활성도 유지되는 것으로 확인되었다. 따라서 3D8 scFv에 존재하는 이황화결합이 환원되어도 활성에는 전혀 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(그림85).



<그림85> DTT가 첨가된 환원적 환경에서 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

#### 5) 반복적 freezing-thawing에 의한 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

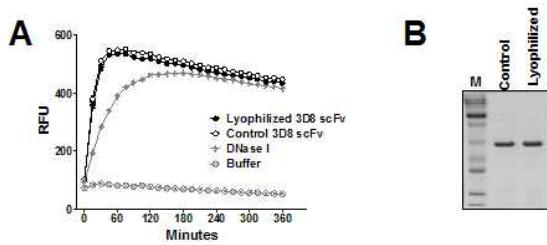
- 3D8 scFv가 제품화되어 사용될 때 동결용해 과정이 반복되어 활성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 -75°C와 상온에서 얼리고 녹이는 과정을 최대 30번 반복하여 DNA 가수분해 활성의 변화를 확인하였다. 그 결과 30번까지 동결용해 과정을 반복하여도 활성에 영향을 미치지 않았고, SDS-PAGE를 통해 단백질의 분해가 일어나지 않음을 확인하였다. 이 결과를 토대로 동결용해 과정을 30번 이상 반복하여도 활성이 유지될 것이라고 판단되었다(그림86).



<그림86>. 반복적 freezing-thawing에 의한 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

#### 6) 동결건조에 의한 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

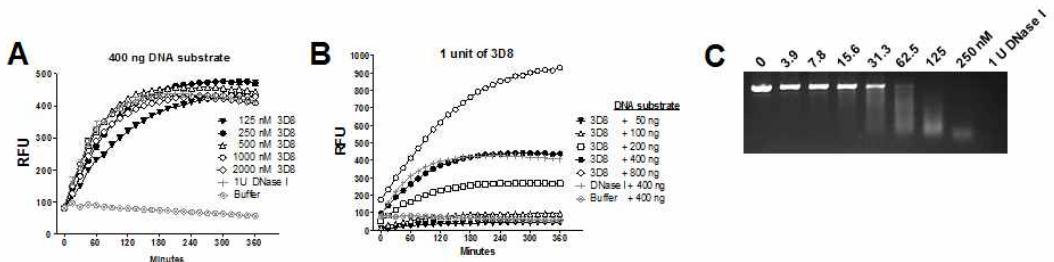
- 3D8 scFv이 제형화 될 때 동결건조 되는 과정에서 활성이 변화될 수 있으므로 PBS에 보관된 3D8 scFv를 동결건조 시킨 후, 다시 증류수에 녹여 DNA 가수분해 활성을 확인하였다. 그 결과 동결건조 과정이 활성에 영향을 주지 않음을 알 수 있고, 단백질 분해 또한 일어나지 않는 것으로 확인되었다. 이를 통하여 3D8 scFv가 동결건조 과정을 통해 파우더로 제형화 되어도 활성에는 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다(그림87)



<그림87>. 동결건조에 의한 3D8 scFv의 기능적 안정성 분석

#### 7) 3D8 scFv의 DNA 가수분해활성 unit의 결정

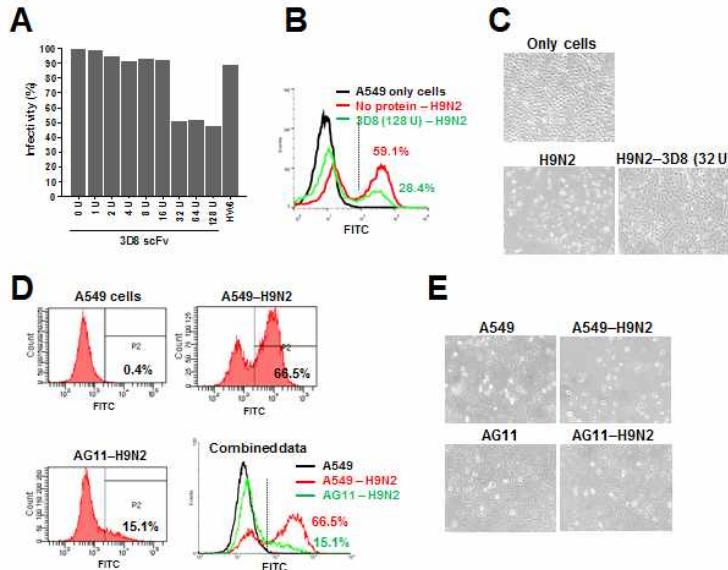
- 3D8 scFv를 적용하기 위해 기준이 되는 양을 정하기 위하여 활성단위를 결정하기로 하였다. 활성단위를 결정하기 위해 FRET assay를 이용하였고, DNA의 양을 400 ng으로 고정하고 3D8 scFv의 양을 2배씩 늘려주어 3D8 scFv의 양에 따른 DNA 가수분해활성을 비교하였다. 그 결과, 3시간 동안 250 nM 이상의 양에서는 모두 포화상태가 되는 것으로 나타남. 이 결과를 재확인하기 위하여 agarose gel electrophoresis를 통하여 3D8 scFv의 농도별로 활성을 확인한 결과 역시 250 nM에서 DNA가 완전히 분해되는 것으로 나타났다. 따라서 3D8 scFv의 1 unit은 250 nM로 정하였고, 이렇게 정한 활성단위를 다시 한 번 확인해보기 위해서 3D8 scFv의 양을 1 unit (250 nM)으로 고정하고 DNA 양을 변화시켜서 활성을 측정하였고, 그 결과 DNA의 양이 2배로 증가할수록 활성도 2배씩 증가하였고, DNA의 양이 400 ng일 때 앞에서 정한 3D8 scFv 1 unit과 결과가 동일하게 나온 것으로 확인되었다. 따라서 3D8 scFv의 1 unit은 250 nM임을 확정하였고 3D8 scFv의 250 nM은 2 ug으로 환산되었다. 이 모든 결과를 토대로 3D8 scFv의 활성 단위는 3시간 동안 37°C에서 400 ng의 DNA를 완전히 자르는 3D8 scFv의 양'이라 정의 하였고, 3D8 scFv의 1 unit은 2 ug이었다(그림88).



<그림88>. 3D8 scFv의 DNA 가수분해활성unit 결정

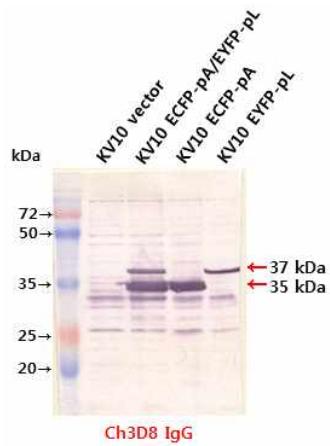
#### 8) 3D8 scFv unit에 따른 항-인플루엔자 활성 확인

- 위에서 정한 3D8 scFv의 활성단위에 따라 바이러스를 억제하는 능력을 확인해보기 위하여 사람의 호흡기세포 중 하나인 A549 세포를 이용하여 항-인플루엔자 활성을 확인하였다. A549 세포에 3D8 scFv를 침투시킨 후 24시간동안 배양하고 3D8 scFv가 침투된 세포에 H9N2형 인플루엔자 바이러스를 MOI 1로 감염시킨 후 18시간동안 배양하였다. 인플루엔자 바이러스의 감염정도를 확인해보기 위해서 핵단백질을 검출하는 항체를 이용하여 유세포 분석기로 인플루엔자 바이러스의 핵단백질의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 16 unit까지는 항-바이러스 활성을 나타내지 않았으나 32 unit부터는 대략 50% 정도까지 바이러스 감염을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 3D8 scFv를 32 unit 이상으로 처리해도 바이러스 감염이 더 억제되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이를 다시 확인해 보기 위해서 3D8 scFv를 발현하는 AG11 (stable cell line)을 제작하여 항-바이러스 활성을 분석한 결과, AG11에서도 효과적으로 바이러스가 억제되는 것을 확인하였다. 바이러스가 억제되는 것을 직접 관찰하기 위하여 광학현미경을 통해 확인한 결과, 3D8 scFv를 침투시킨 A549와 3D8 scFv를 발현하는 AG11가 바이러스를 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 보았을 때 형태가 비슷하게 유지되고 있는 것으로 보였다. 이를 통하여 3D8 scFv의 활성단위에 따른 바이러스 억제 능력을 확인하였고, 이는 항-바이러스 실험을 하거나 3D8 scFv를 생체에 적용하고자 할 때 기초적인 정보가 될 것이라고 생각되었다(그림89).



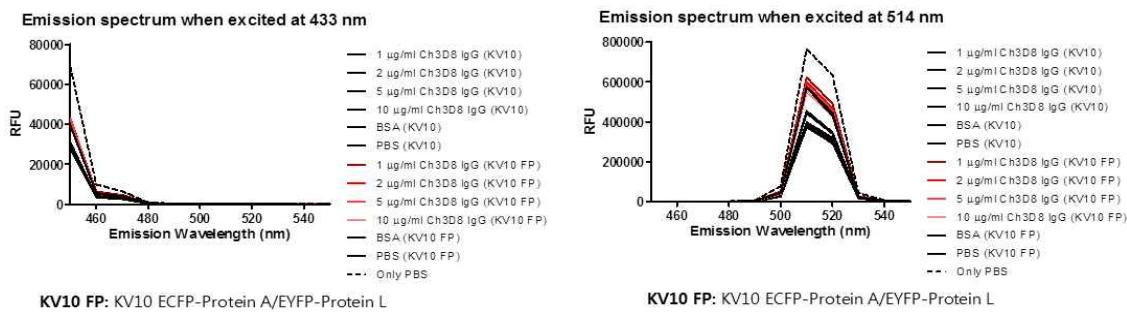
<그림89>. 3D8 scFv unit에 따른 항-인플루엔자 활성 확인

- 재조합 클로렐라 배양액에서 항-바이러스 재조합 항체 3D8 scFv의 발현수준 분석법 및 핵산분해활성 분석법 확립
  - (주) 대상으로 받은 클로렐라 배양액에서 DNA에 결합능을 분석하는 ELISA를 수행하여 DNA분해활성 unit를 결정하는 방법을 확립하였다. 이는 정제된 3D8 scFv의 DNA 결합력과 DNA 분해능과의 상관관계를 표준으로 하여, 클로렐라 배양액의 발현양과 핵산분해활성을 정량화하는 방법이다.
- 항-바이러스 단백질의 세포내 침투효율 분석 시스템 개발 및 이를 이용한 항체의 세포내 침투효율 정량분석 (1차년도부터 수행하고 있으며, 개발의 어려움으로 인해 현재까지도 진행 중인 연구내용임)
  - 1) ECFP-EYFP의 FRET assay에 기초한 세포내 침투성 항체 검출 시스템 디자인
    - 항-바이러스 단백질의 세포내 침투효율을 보다 더 쉽게 확인할 수 있는 시스템을 개발하기 위해 FRET assay 방법을 이용하였다. ECFP의 C-말단 부위에 IgG의 Fc에 결합하는 Protein A를, EYFP의 C-말단 부위에 항체 면역글로불린 G의 카파-가변부위에 결합하는 Protein L을 삽입하여 세포내에서 각각 발현시키고, 항체가 세포내로 침투하여 Protein A와 Protein L과 결합하게 되면 형광공명에너지전이 현상이 일어날 것이라 기대하였다.
  - 2) Western blot을 이용한 ECFP-Protein A, EYFP-Protein L의 발현 확인
    - 세포내로 침투 가능한 항체를 특이적으로 선별하기 위해서 HeLa cell에 FRET assay 모델인 ECFP-Protein A, EYFP-Protein L를 transfection 시킨 후에 western blot을 통해 발현을 확인하였다. Protein A와 Protein L에 대한 결합 부위를 모두 가지고 있는 Ch3D8 IgG를 1차 항체로 이용하였고, 그 결과, ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L의 발현을 확인하였으나, 비교적 EYFP-Protein L이 낮게 발현되는 것을 확인하였다(그림90). EYFP-Protein L이 ECFP-Protein A에 비해 비교적 낮게 발현이 되긴 하나, 일정수준의 발현이 확인되기 때문에 형광 분석기를 통해 에너지전이 양을 확인해보기로 하였다.



<그림90>. ECFP-Protein A, EYFP-Protein L의 발현 확인

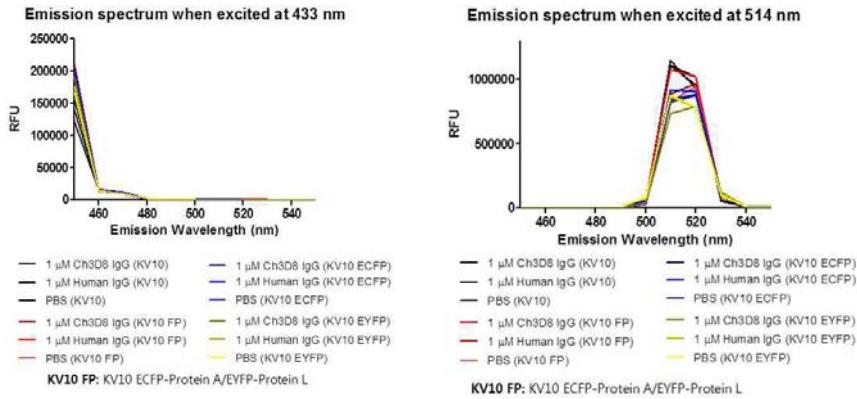
- 3) 형광 분석기를 이용한 Cell lysate 유래의 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L 사이의 emission spectrum 확인
- ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L을 transfection한 HeLa cell lysate를 이용해 실제로 형광공명에너지전이가 일어나는지 형광 분석기로 확인하였다. Ch3D8 IgG를 코팅한 플레이트에 HeLa cell lysate를 처리해준 뒤, ECFP의 excitation 파장인 433 nm와 EYFP의 excitation 파장인 514 nm에서 각각 emission spectrum을 관찰하였고, 그 결과, 433 nm에서 excitation 시켰을 때는 처리해준 형광 단백질이 포함된 cell lysate의 양에 관계없이 비슷한 emission spectrum을 그렸으며, 음성대조군인 PBS, BSA에서의 spectrum 값과 동일한 것을 확인하였다. 514 nm에서 excitation 시켰을 때에도 모든 sample에서 비슷한 emission spectrum을 보였다(그림91). 세포 파쇄액을 이용한 실험에서는 결과가 분명하지 않았기 때문에 live cell에 단백질을 처리 후, 직접 형광을 관찰하였을 경우에는 어떤 결과가 나오는지 확인해보기로 하였다.



<그림91>. Cell lysate에서 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L 사이의 emission spectrum 확인

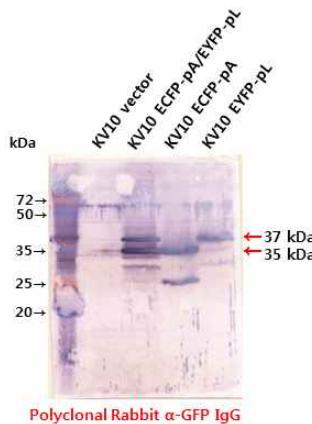
- 4) 형광 분석기를 이용한 세포내에서의 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L 사이의 emission spectrum 확인
- Live cell에서 직접 형광을 관찰하기 위해, ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L을 transfection한 HeLa cell에 Ch3D8 IgG를 처리한 후에 형광공명에너지전이가 일어나는

지 형광 분석기로 확인함. ECFP의 excitation 파장인 433 nm와 EYFP의 excitation 파장인 514 nm에서 각각 emission spectrum을 관찰하였다. 그 결과, 433 nm, 514 nm에서 excitation 시켰을 때 모두 비슷한 emission spectrum을 그렸으며, 음성대조군인 PBS, BSA에서의 spectrum 값과 동일한 것을 확인하였다(그림92). 문제점을 해결하기 위해, ECFP-Protein A, EYFP-Protein L에 항체가 실제로 결합하는지, transfection efficiency는 높은지를 확인해보기로 하였다.



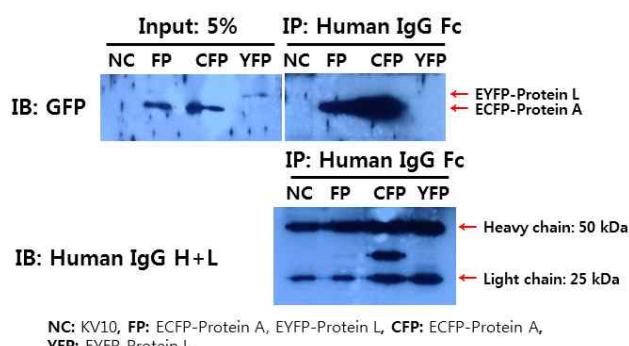
<그림92>. Live cell에서 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L 사이의 Emission spectrum 확인

- 5) ECFP-Protein A, EYFP-Protein L의 발현 확인을 위한 1차 항체로써 Anti-GFP 의 사용 가능 여부를 확인하기 위한 Western blot
  - ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L에 대한 항체의 결합유무를 확인하기 위해, 형광단백질 ECFP, EYFP를 직접 detection 할 수 있는 antibody로 anti-GFP antibody를 사용할 수 있는지를 확인하기로 하였고, GFP와 ECFP, EYFP의 sequence 차이가 5개 내외였기 때문에 polyclonal anti-GFP antibody로는 ECFP, EYFP를 detection 할 수 있다고 예상하였다. 실제로 western blot 결과에서 polyclonal rabbit anti-GFP IgG를 이용해 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L를 모두 확인할 수 있었다(그림93). 그래서 앞으로 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L에 대한 항체의 결합을 알아보기 위한 ELISA나 Co-IP western blot과 같은 실험에서 anti-GFP antibody를 사용할 수 있겠다고 예상하였다.



<그림93>. ECFP-Protein A, EYFP-Protein L의 발현 확인을 위한 1차 항체로써 Anti-GFP의 사용가능 여부를 확인하기 위한 Western blot

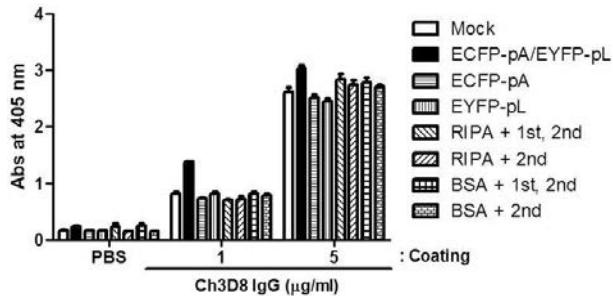
- 6) Co-immunoprecipitation western blot을 이용한 세포내에서의 ECFP-Protein A, EYFP-Protein L의 항체 결합 유무 확인
- HeLa cell내에서 발현된 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L이 세포 밖에서 처리해준 자발적 세포내 침투 항체인 Ch3D8 IgG와 세포내에서 만나, 실제로 결합을 유지하고 있는지를 Goat anti-Human IgG Fc를 이용한 Co-IP Western blot을 통해 알아보았다. 그 결과, ECFP-Protein A의 항체결합은 관찰되지만 EYFP-Protein L은 항체결합을 확인할 수 없었고, 또한 애초에 발현된 양이 ECFP-Protein A에 비해 현저하게 적은 것을 확인하였다(그림94). 따라서 Protein L이 항체에 결합할 수 있는지를 추후에 정제된 EYFP-Protein L 단백질이나 stable cell line을 이용해 확인해볼 예정이다.



<그림94>. Co-immunoprecipitation western blot을 이용한 세포내에서의 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L의 항체 결합 확인

- 7) ELISA를 이용한 세포내에서의 ECFP-Protein A, EYFP-Protein L 항체 결합 유무 확인
- 퓨전형광단백질과 항체의 결합을 확인하기 위해, ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L이 발현된 HeLa cell lysate를 이용해 96-well plate에서 Ch3D8 IgG와의 결합을 관찰하였다. ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L을 따로 또는 같이 농도별로 처리해준 결과, 음성대조군으로 넣어준 RIPA, BSA buffer 조건에서도 각각의 sample과 비슷한 값을 나타내었다

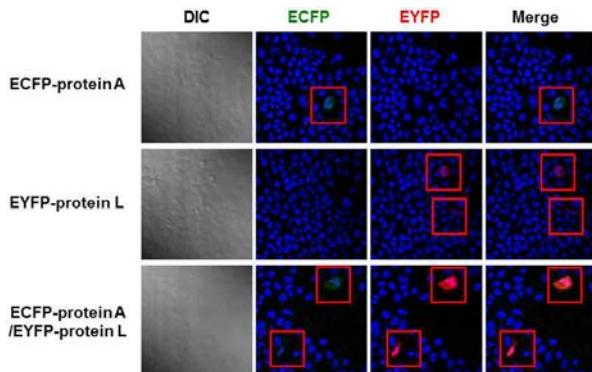
(그림95). 시료 및 일차항체의 유무에 상관없이 모두 비슷한 흡광도를 나타내는 걸로 봐서 plate에 코팅한 Ch3D8 IgG와 primary, secondary antibody 조합에 있어서 뭔가 맞지 않는 것이 있다고 예상되었다. 추후 실험에서는 Protein A나 Protein L에 결합하지 못하는 antibody (예를 들어 chicken antibody)를 이용해 결합을 알아봐야 할 것 같다.



<그림95>. ELISA 이용 세포내 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L의 항체 결합 유무 확인

#### 8) Confocal microscopy를 이용한 KV10 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L의 transfection efficiency 확인

- HeLa cell에 transfection 시킨 plasmid KV10 ECFP-Protein A/EYFP-Protein L, KV10 ECFP-Protein A, KV10 EYFP-Protein L의 transfection efficiency를 확인하기 위해, confocal microscopy을 수행하였다. 이미지로 확인해본 결과, 현저하게 낮은 수준의 transfection efficiency를 확인하였다(그림96). 따라서 추후에는 transient transfection 아니라 stable cell line을 제작하여 실험을 진행할 계획이다.



<그림96>. Confocal microscopy를 이용한 KV10 ECFP-Protein A와 EYFP-Protein L의 transfection efficiency 확인

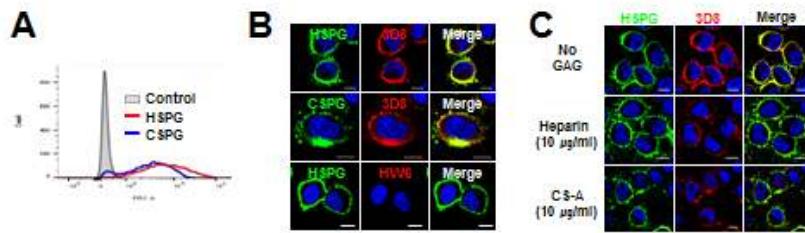
#### 3D8 scFv의 세포내 유입에 관여하는 세포 수용체 규명

- HSPGs (heparan sulfate proteoglycans)와 CSPGs (chondroitin sulfate proteoglycans)는 거의 모든 동물세포가 발현하는 분자들의 집단으로, 대부분의 분자는 세포표면에 발현된다. 분자에 따라 세포막을 통과(transmembrane) 하여 세포표면에 발현되거나, GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor를 통해 세포막의 바깥층에 결합되어 세포표면에

발현된다. 이 분자들은 다양한 형태 및 길이의 당사슬을 가지고 있으며, (-)전하를 띠고 있다. 본 연구에서는 (+)전하를 띠는 3D8 scFv가 이들 HSPGs 및 CSPGs에 결합하여 세포내로 유입되는지를 증명하였다. 본 연구는 항-바이러스 활성이 있는 3D8 scFv가 광범위한 동물세포에 유입될 수 있음을 보여주는 연구이다.

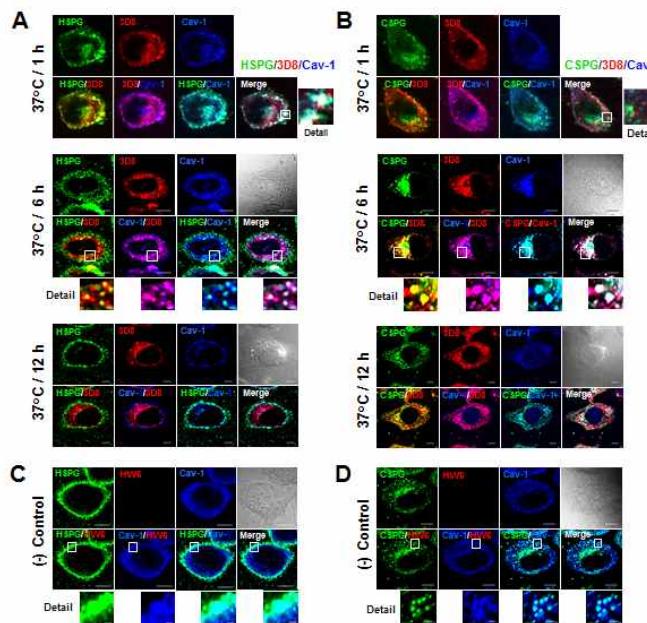
- 본 연구내용은 현재 ‘The Journal of Biological Chemistry’에 투고한 상태이다.

- 1) 대장균 배양으로부터 정제한 3D8 scFv 단백질을 HeLa 세포에 처리했을 때, 세포표면에 발현되어 있는 HSPGs 및 CSPGs에 결합함을 확인하였다(그림97).



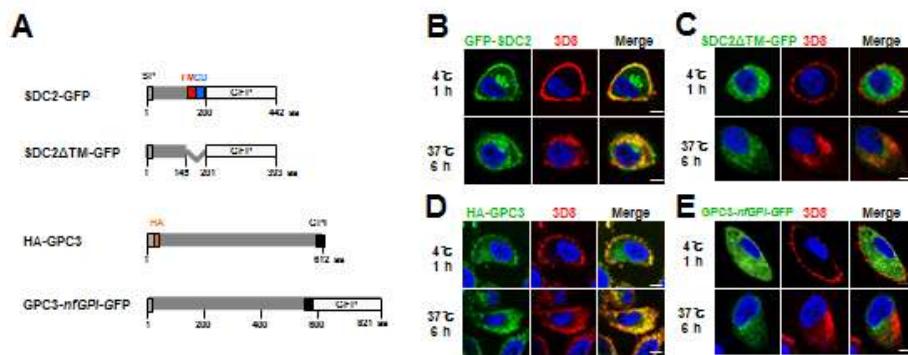
<그림97>. HeLa 세포표면 HSPGs 및 CSPGs의 발현확인 및 3D8 scFv와의 결합을 보여주는 confocal microscopy

- 2) 3D8 scFv 단백질을 HeLa 세포에 처리했을 때, HSPGs와 CSPGs와 세포내에서 co-localization 됨을 확인하였고, 이와 동시에 3D8 scFv가 세포내 유입경로에 관여하는 분자 중 하나인 caveolin-1과도 co-localization됨을 확인하였다(그림98).



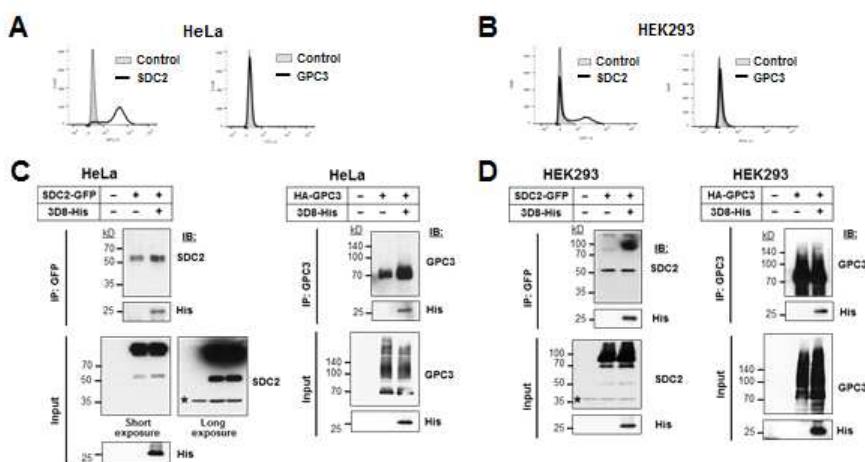
<그림98>. 3D8 scFv 단백질이 HSPGs와 CSPGs를 통해 caveolae-매개 경로를 통해 세포내로 유입되어 들어간다는 것을 보여주는 confocal microscopy

3) 3D8 scFv 단백질이 세포표면에 발현되어 있는 HSPGs를 통해서 세포내로 유입됨을 확인하였다. Transmembrane 형태로 세포표면에 발현되어 있는 대표적인 HSPGs 중 하나인 syndecan-2 (SDC2)와 GPI anchor를 통해 발현되어 있는 HSPGs 중 하나인 glypcan 3 (GPC3)를 세포표면에 발현 시켰을 때는 3D8 scFv와 co-localization되어 있지만, 세포표면에 발현될 수 없도록 한 돌연변이 형태는 3D8 scFv와 co-localization 되지 않음을 관찰함으로써 HSPGs가 transmembrane 형태로 세포포면에 발현되거나 GPI anchor 형태로서 세포표면에 발현되거나 상관없이 모두 3D8 scFv의 세포내 유입에 관여하는 수용체로 역할을 한다는 것을 확인하였다(그림99).



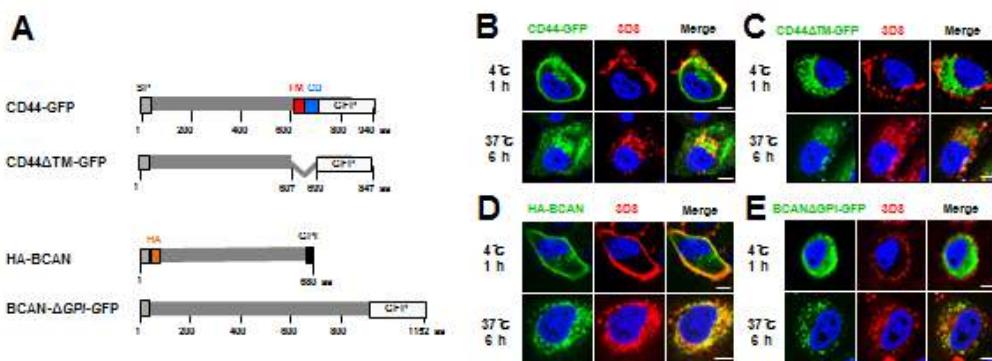
<그림99>. Transmembrane 형태 또는 GPI anchor를 통해 세포표면에 발현된 SDC2 또는 GPC3만이 3D8 scFv와 co-localization되고 세포질에 발현시킨 SDC2와 GPC는 3D8 scFv와 co-localization되지 않음을 보여주는 confocal microscopy

- 또한 면역침강법 (immunoprecipitation)을 세포에 처리한 3D8 scFv가 SDC2와 GPC3에 직접적으로 결합함을 HeLa 세포 및 HEK293 세포에서 확인하였다(그림100).



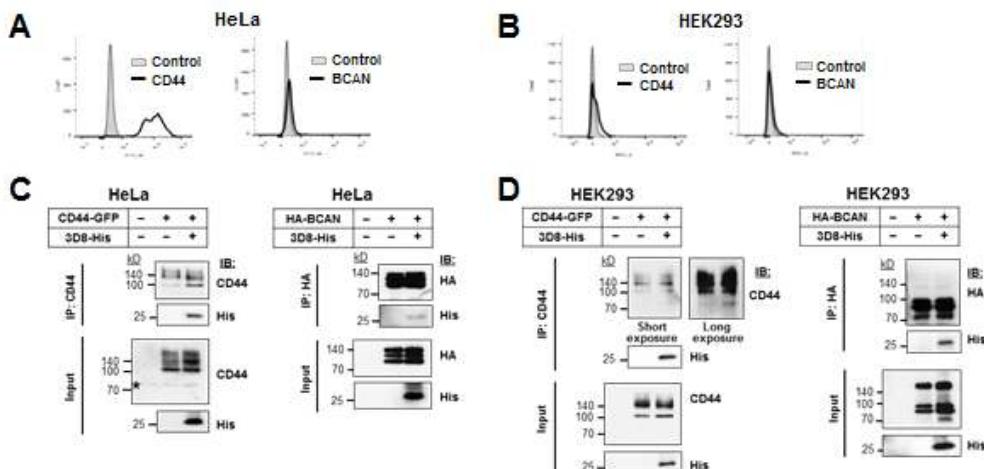
<그림100>. 3D8 scFv가 HSPGs인 SDC2와 GPC3에 직접적인 결합한다는 것을 보여주는 HeLa 및 HEK293 세포에서의 면역침강 결과

4) 3D8 scFv 단백질이 세포표면에 발현되어 있는 CSPGs를 통해서 세포내로 유입됨을 확인하였다. Transmembrane 형태로 세포표면에 발현되어 있는 대표적인 CSPGs 중 하나인 CD44와 GPI anchor를 통해 발현되어 있는 CSPGs 중 하나인 brevican (BCAN)을 세포 표면에 발현 시켰을 때는 3D8 scFv와 co-localization되어 있지만, 세포표면에 발현될 수 없도록 한 돌연변이 형태는 3D8 scFv와 co-localization되지 않음을 관찰함으로써 CSPGs가 transmembrane 형태로 세포표면에 발현되거나 GPI anchor 형태로서 세포표면에 발현되거나 상관없이 모두 3D8 scFv의 세포내 유입에 관여하는 수용체로 역할을 한다는 것을 확인하였다(그림101).



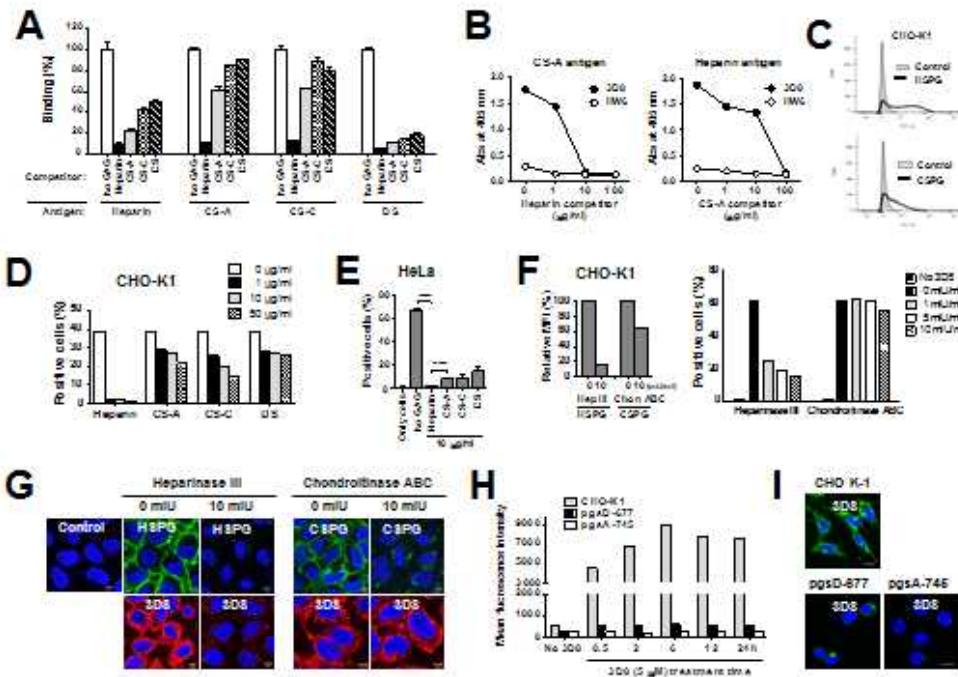
<그림101>. Transmembrane 형태 또는 GPI anchor를 통해 세포표면에 발현된 SDC2 또는 GPC3만이 3D8 scFv와 co-localization되고 세포질에 발현시킨 SDC2와 GPC는 3D8 scFv와 co-localization되지 않음을 보여주는 confocal microscopy

- 또한 면역침강법 (immunoprecipitation)을 세포에 처리한 3D8 scFv가 CD44와 BCAN에 직접적으로 결합함을 HeLa 세포 및 HEK293 세포에서 확인하였다(그림102).



<그림102>. 3D8 scFv가 CSPGs인 CD44와 BCAN에 직접적인 결합한다는 것을 보여주는 HeLa 및 HEK293 세포에서의 면역침강 결과

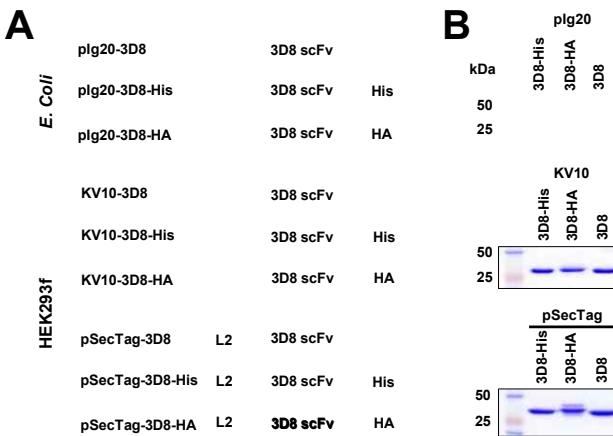
5) 3D8 scFv 단백질이 세포내로 유입될 때 수용체로서 역할을 하는 HSPGs와 CSPGs에 있어서, 어느 것이 더 선호적으로 작용하는지 알아보고자 HS (heparan sulfate) 당사슬 및 CS (chondroitin sulfate) 당사슬에 대한 3D8 scFv의 친화를 조사하였고, HSPGs를 발현하지 않는 CHO 세포에서의 3D8 scFv 유입량 변화, HSGPs 또는 CSPGs의 당사슬-분해 효소를 처리한 HeLa세포에서의 3D8 scFv 유입량 변화를 관찰함으로써, HeLa 세포 및 CHO 세포에서 HSPGs가 3D8 scFv의 세포내 유입에 있어 더 선호적으로 작용함을 확인하였다(그림103).



<그림103>. 3D8 scFv가 CSPGs보다 HSPGs에 친화도가 높으며, CSPGs보다 HSPGs를 통해 세포 내로 유입된다는 것을 보여주는 ELISA, confocal microscopy, flow cytometry 결과

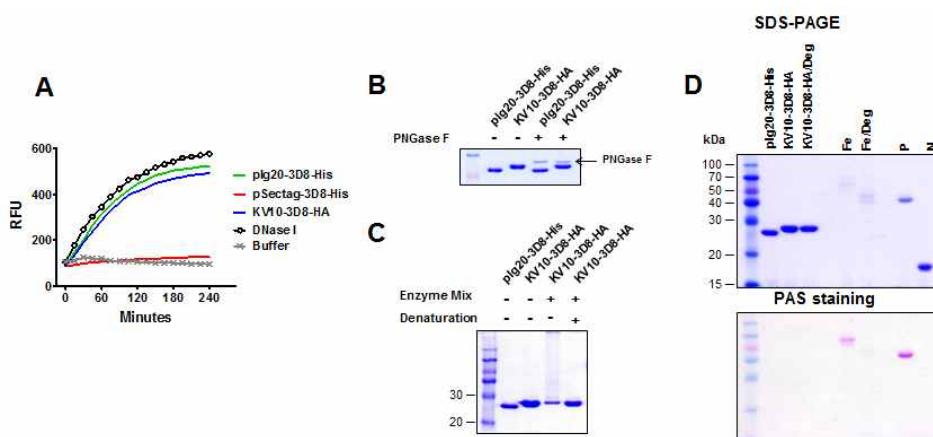
- 3D8 scFv의 발현숙주, N-말단, 및 C-말단 형태에 따른 핵산가수분해 활성 차이 규명
- 3D8 scFv는 핵산가수분해 활성이 있는 항체로서, 항-바이러스 활성을 나타내기 위해서는 핵산가수분해 활성을 유지하는 것이 중요하다. 현재까지 pIg20 발현벡터를 이용하여 대장균에서 발현하고, 정제하여 본 연구에 사용하였으나, 3D8 scFv의 핵산가수분해 활성이 발현숙주 및 N-말단, C-말단의 변화에도 유지가 되는지 변화하는지 알아보고자 하였다. 본 연구는 3D8 scFv의 발현 시스템 개량 및 다른 분자와의 융합단백질의 제조에 필요한 기초자료를 제공하는 연구이며, 연구내용은 아래와 같다.

- 1) 발현벡터 구축: *E. coli*와 사람세포주인 HEK293 세포에서 다양한 형태의 3D8 scFv (다른 N-말단 아미노산을 남기는 다른 leader sequence, 다른 C-말단의 tag을 가지는)를 발현시키기 위해 아래 그림과 같은 발현벡터를 구축하였다. *E. coli*에서 발현시키기 위해서는 pIg20 벡터를, HEK293 세포에서 발현시키기 위해서는 KV10 및 pSecTag 벡터를 사용하였다. KV10과 pSecTag 벡터는 서로 다른 leader sequence를 가지고 있다(그림104).



<그림104>. 3D8 scFv 발현. (A) *E. coli*와 사람세포주인 HEK293 세포에서 3D8 scFv 발현시키기 위해 사용한 벡터 및 3D8 scFv 형태를 나타내고 있음. (B) Protein L 컬럼을 이용하여 정제한 3D8 scFv 단백질

2) 3D8 scFv 생산 및 DNA-가수분해 활성 및 glycosylation 여부 분석: 위에서 구축한 벡터를 각각 *E. coli*와 HEK293 세포에 transformation (또는 transfection)한 후, 배양하고 배양액으로부터 Protein L 컬럼을 통하여 3D8 scFv 단백질을 정제하였다. 우선 pIg20 벡터에서 발현된 3D8-His, pSecTag 벡터에서 발현된 3D8-His, KV10 벡터에서 발현된 3D8-HA 단백질의 DNA 가수분해 활성을 분석 (FRET-based analysis)한 결과, 예상과 달리, pSecTag 벡터에서 발현된 3D8-His는 활성이 없었다. 그 이유가 glycosylation 차이에 기인하는지 알아보고자 KV10 벡터에서 발현된 3D8-HA 단백질에 당-분해 효소를 처리하여 PAS 염색을 수행하였다. 이때 pIg20 벡터에서 발현된 3D8-His를 음성대조로 사용하였다. 그 결과 HEK293 세포에서 발현된 3D8 단백질은 glycosylation되어 있지 않음이 확인되었다(그림105). 아미노산 염기서열 분석에서도 glycosylation되는 site가 발견되지 않았음. 이는 활성의 차이가 glycosylation이 아닌 다른 원인에 기인함을 의미하였다.



<그림105>. DNA 가수분해 활성 및 당-분해 효소 처리 후, PAS 염색을 통한 glycosylation 여부 분석 결과

3) N-말단 아미노산 서열 분석: pIg20 벡터에서 발현된 3D8-His과 pSecTag 벡터에서 발현된 3D8-His의 DNA 가수분해활성의 차이가 N-말단의 차이에 때문에 나타나는지 알아보기 위하여, Edman degradation 화학반응을 통해 N-말단의 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과, pSecTag 벡터에서 발현된 3D8-His는 N-말단에 추가적으로 6개의 아미노산 (DAAQPA)이 존재함을 확인하였다(표37). 이는 leader sequence로부터 유래된 것이고, pIg20 벡터에서 발현된 3D8-His과 KV10 벡터에서 발현된 3D8-HA는 N-말단에 추가적인 아미노산이 없이 leader sequence가 완전히 제거되었음이 확인되었다. 따라서 3D8 scFv는 N-말단에 아미노산이 추가되면 활성이 상실된다는 것을 확인하였다.

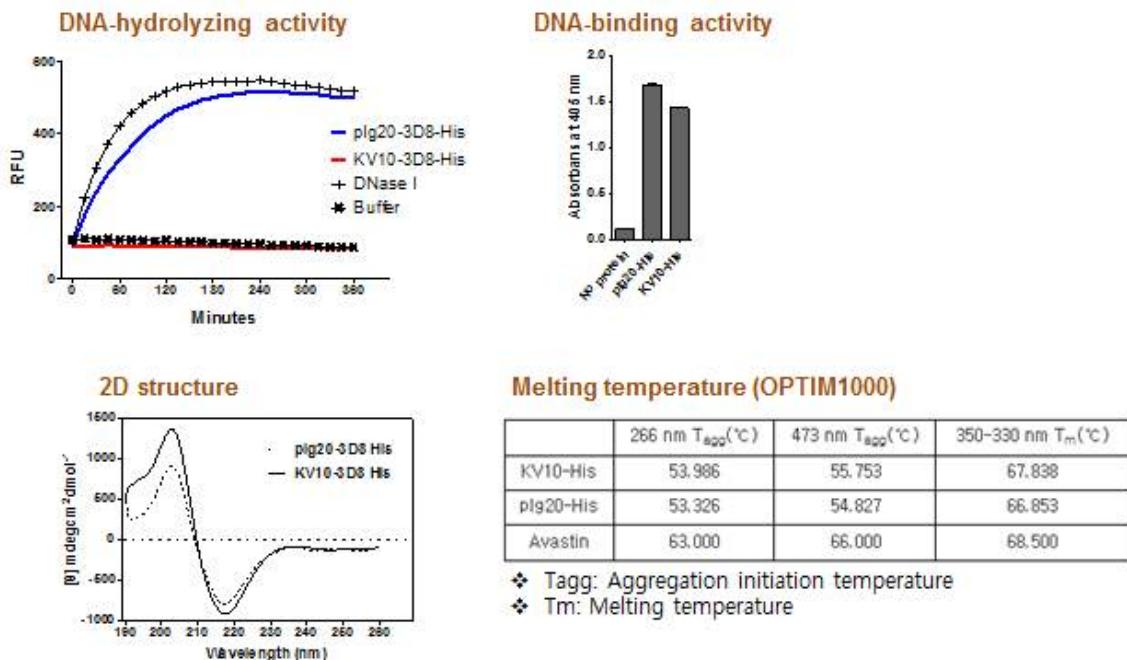
<표37>. The signal peptide cleavage sites, N- and C-terminal amino acids of 3D8 scFv that are expressed from different vectors

Host	Expression vector	Protein		Molecular weight*
		Signal sequence	3D8 scFv	
<i>E. coli</i>	pIg20-3D8-His5	MKQSTIALALLPLLLFTPVTKAR↓	EVQLQ.....EIK	27,734 Da
HEK 293F	KV10-3D8-HA	MGWSLILLFLVAVATRVQS↓	EVQLQ.....EIK	27,976 Da
	pSecTag-3D8-His5	METDTLLLWVLLLWVPGSTG↓DAAQPA	EVQLQ.....EIK	27,994 Da

↓ : The proposed cleavage site when proteins translocate to secretion pathways

\* : Molecular weight calculated based on the amino acid sequences

4) pIg20 벡터에서 발현된 3D8-His과 KV10 벡터에서 발현된 3D8-His 단백질 비교: pIg20 벡터에서 발현된 3D8-His과 KV10 벡터에서 발현된 3D8-His의 DNA-가수분해 활성을 FRET-based 분석법으로 조사했을 때, 예상과 달리 KV10 벡터에서 발현된 3D8-His는 DNA 가수분해활성이 없었다(그림106). 두 단백질의 DNA 결합 활성을 ELISA로, 2차 구조를 circular dichroism 분석법으로, 열에 대한 안정성을 OPIM1000 기기를 이용한 분석법으로 조사한 결과, 두 단백질 간에 DNA 결합 활성, 2차 구조, 및 열안정성에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이에 대한 연구는 더 진행해야 할 것으로 판단되었다.



<그림106>. 대장균에서 발현된 3D8-His와 HEK293 세포에서 발현된 3D8-His의 DNA 가수분해활성, DNA 결합 활성, 2차 구조 및 열에 대한 안정성 분석결과

- 지금까지의 연구의 종합결과는 표38에 나타내었으며, 현재 진행 중에 있다.

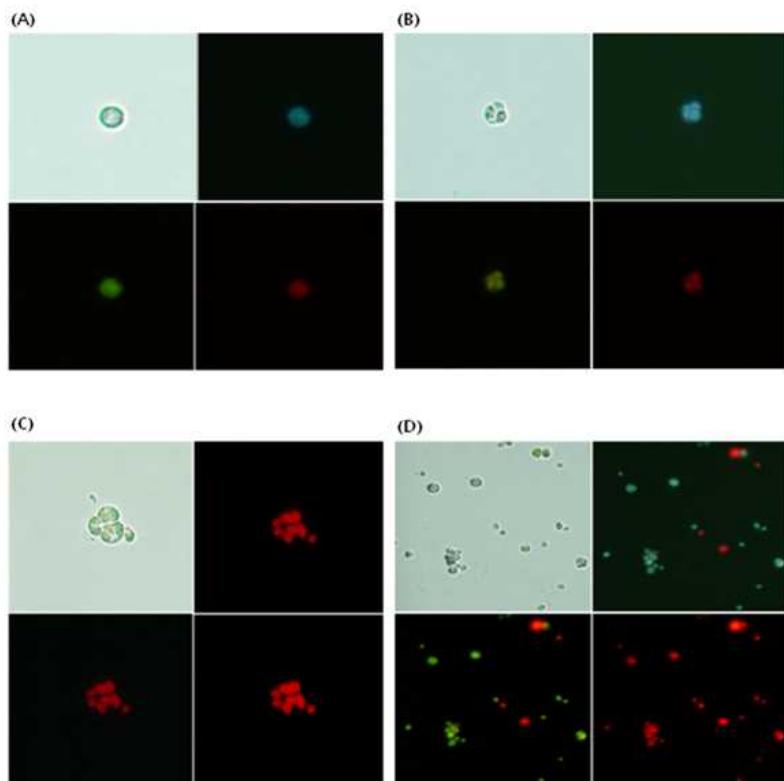
<표38>. The activities of 3D8 scFvs with different N-and C-terminus that are expressed in E. coli and mammalian cells

Host	Expression vector	Expressed protein	Yield (mg/L)	Relative DNA-hydrolyzing activity*		
				% DNA-hydrolyzing	% DNA-binding	% Cellular internalization
<i>E. coli</i>	pIg20	3D8	0.3	100	?	
		3D8-His	2	100	100	100
		3D8-HA	0.3	100	?	
HEK 293F	KV10	3D8	3	0	?	
		3D8-His	5	0	50	
		3D8-HA	0.3	100	50	
	pSecTag	DAAQPA-3D8	?	?	?	?
		DAAQPA-3D8-His	10	0	20	
		DAAQPA-3D8-HA	?	?	?	?

\* : Presented as the mean to 3D8-His expressed in *E.coli* ± s.e.m.; n = 3

□ 클로렐라 형질전환 기술의 개발

- Agrobacterium mediated transformation으로 gfp::gusA가 형질전환된 클로렐라를 형광 현미경을 통해 GFP의 발현을 확인하였다(그림107). 형질전환 클로렐라는 380 nm의 UV 하에서 녹색의 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 일반광원(좌상), 혼합광원(우상), 혼합광원 + Green filter(좌하), 혼합광원 + Red filter를 나타내며 비 형질전환체(그림 107C)의 혼합광원에서의 클로렐라가 클로로필에 의하여 붉은색의 auto-fluorescence를 보이는 것과는 달리 GFP 형질전환체는 청녹색을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(그림 107A, B, D). 형광의 발현은 분열중인 세포에서도 관찰되었다(그림107B). 이러한 결과는 형질전환된 GFP 유전자가 다음 세대로 안정하게 전이될 수 있다는 것을 반증한다.



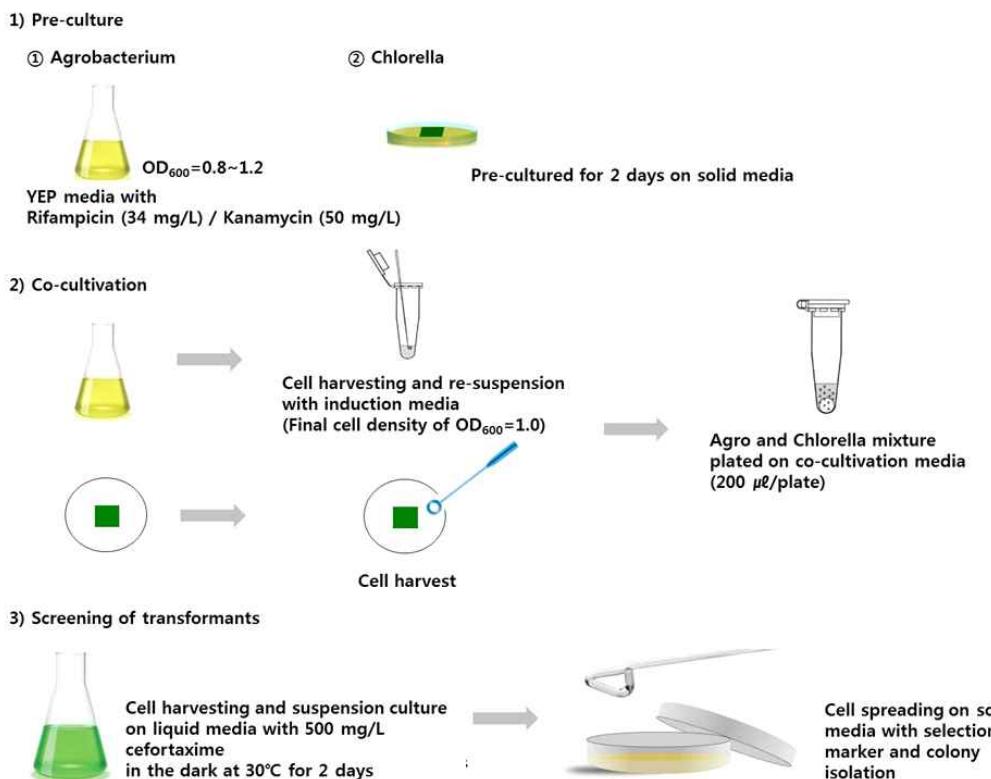
<그림107>. GFP 형질전환 클로렐라의 형광현미경 사진. (A) 형질전환 단일 클로렐라 세포, (B) 분열중인 형질전환 클로렐라 세포, (C) 비형질전환 클로렐라 세포, (D) 형질전환 클로렐라와 비형질전환 클로렐라가 섞여 있는 저배율 현미경 사진

- 유전자 수준에서 형질전환체의 분석을 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 클로렐라로부터 total RNA의 추출은 Trizol reagent (Invitrogen, USA)을 사용하여 정해진 매뉴얼대로 진행하였다. 추출된 RNA를 정량한 뒤, Random 6mer primer RT-premix kit(Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성한 뒤, Forward primer, 5'-TAA TGT TCT GCG ACG CTC AC-3'와 Reverse primer, 5'-CGG CGA AAT TCC ATA CCT-3'를 사용하여 PCR을 수행하였고 얻어진 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 형질전환된 유전자의 발현 여부를 확인하였다(그림108).



<그림108>. GFP 형질전환 클로렐라로부터 RT-PCR을 통한 GFP 유전자의 발현 확인. M: DNA size marker, P: positive control(pCAMBIA 1304 vector), N: negative control (wild type 클로렐라), L: 형질전환 클로렐라(using LBA4404 agro strain), G: 형질전환 클로렐라(using GV3103 agro strain)

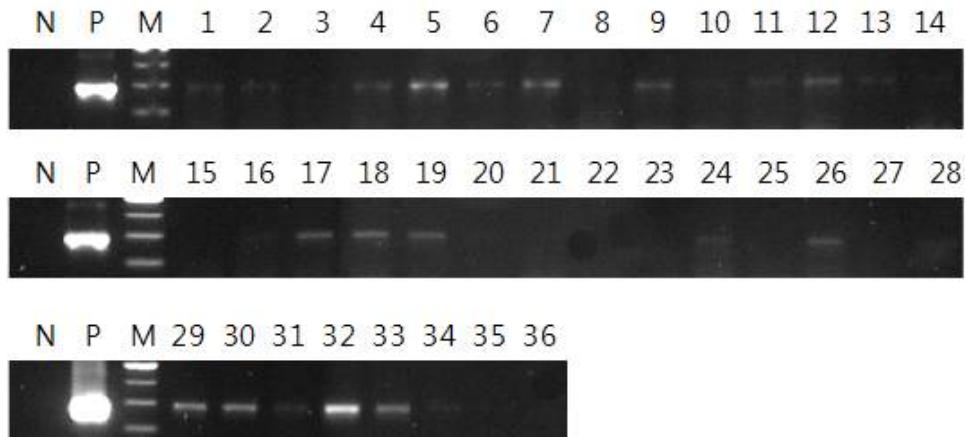
- 리포터 유전자를 이용한 형질전환 시스템의 구축은 그림109로 나타내었다. 이후 3D8 scFv 유전자의 형질전환도 동일한 과정을 통하여 진행하였다.



<그림109>. 클로렐라의 형질전환법 모식도

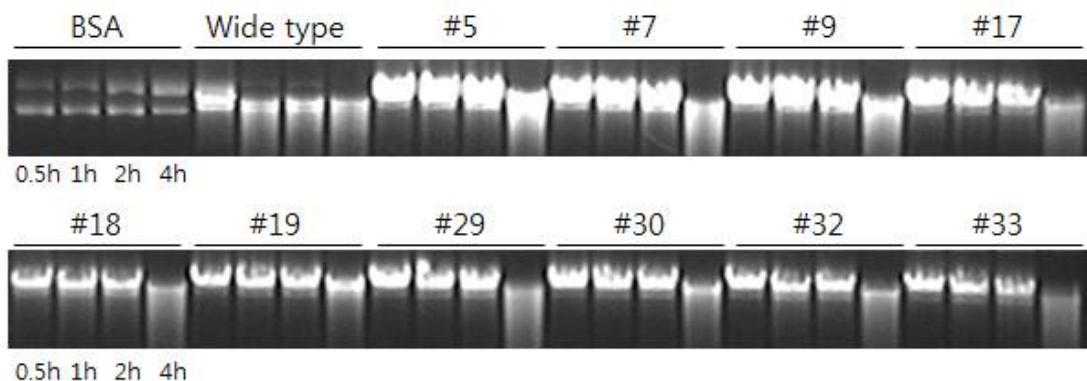
#### □ 클로렐라에 항-바이러스 단백질(3D8 scFv) 형질전환

- LBA4404, GV3101 두 세포주를 이용하여 클로렐라에 3D8 scFv유전자를 형질전환 후, 36개의 단일 colony를 얻었다. 양성 대조군으로는 재조합 발현벡터를 사용하였고, 음성 대조군으로는 wild type 클로렐라의 cDNA를 사용하였다. PCR 분석 결과, 36개 중 21개의 세포주에서 300bp 정도의 위치에 밴드가 증폭되었고, 반면 음성 대조군으로 사용했던 형질전환하지 않은 세포에서는 밴드가 관찰되지 않았다(그림110).



<그림110>. 3D8 scFv 형질전환 선발 개체 RT-PCR 결과. N: negative control, P: positive control, M: DNA size marker

- 형질전환 클로렐라에서 3D8 scFv의 abzyme activity를 확인하기 위하여 total protein을 추출하고, dsDNA를 기질로 하여 in vitro abzyme test를 진행하였다. 예상과 달리 PCR을 통해 확인된 형질전환체에서 추출한 crude protein을 사용하였으나 기대하였던 높은 abzyme 활성을 확인하지 못하였다(그림111).
- Nuclease 활성을 BSA 처리군에서는 전혀 나타나지 않았으며, wide type 클로렐라의 crude protein 처리 군에서는 시간이 지남에 따라 target dsDNA band의 감소 현상이 확인되지 않았다. 반면 3D8 scFv 형질전환체에서 추출한 crude protein extract를 이용한 실험군(ST5-ST33)에서는 4시간 경과한 sample에서 target dsDNA band의 감소 현상을 확인할 수 있었다(#17, #18, #32, #33). 그러나 3D8 scFv에 의한 nuclease 활성이란 단정할 수 없는 낮은 활성을 보여주었다. 이러한 낮은 활성을 차후 사료첨가제 제형 개발 과정에서 기대 효과를 얻을 수 없다고 판단하고 이후 높은 발현을 획득하는 방법을 적용하였다.



<그림111>. 형질전환 클로렐라로부터 추출한 crude protein을 이용한 in vitro abzyme test 결과

가

가 .  
Ala (A) 49834

Arg (R) 24450

Asn (N) 10311

ASP (D) 20228

Cys (C) 5597

Glu (E) 23996

Gln (Q) 17938

Gly (G) 30422

His (H) 8743

Ile (I) 13165

Leu (L) 37416

Lys (K) 15654

Met (M) 8615

Phe (F) 11686

Pro (P) 23339

Ser (S) 28307

Thr (T) 18457

Trp (W) 5151

Tyr (Y) 8183

Val (V) 24476

Ter (\*) 827

Ala (A) 49834

Arg (R) 24450

Asn (N) 10311

ASP (D) 20228

Cys (C) 5597

Glu (E) 23996

Gln (Q) 17938

Gly (G) 30422

His (H) 8743

Ile (I) 13165

Leu (L) 37416

Lys (K) 15654

Met (M) 8615

Phe (F) 11686

Pro (P) 23339

Ser (S) 28307

Thr (T) 18457

Trp (W) 5151

Tyr (Y) 8183

Val (V) 24476

Ter (\*) 827

그림112> 흑자바이러스 단백질의 안정적 발현을 위한 codon optimization 정보

Ala (A) 49834

Arg (R) 24450

Asn (N) 10311

ASP (D) 20228

Cys (C) 5597

Glu (E) 23996

Gln (Q) 17938

Gly (G) 30422

His (H) 8743

Ile (I) 13165

Leu (L) 37416

Lys (K) 15654

Met (M) 8615

Phe (F) 11686

Pro (P) 23339

Ser (S) 28307

Thr (T) 18457

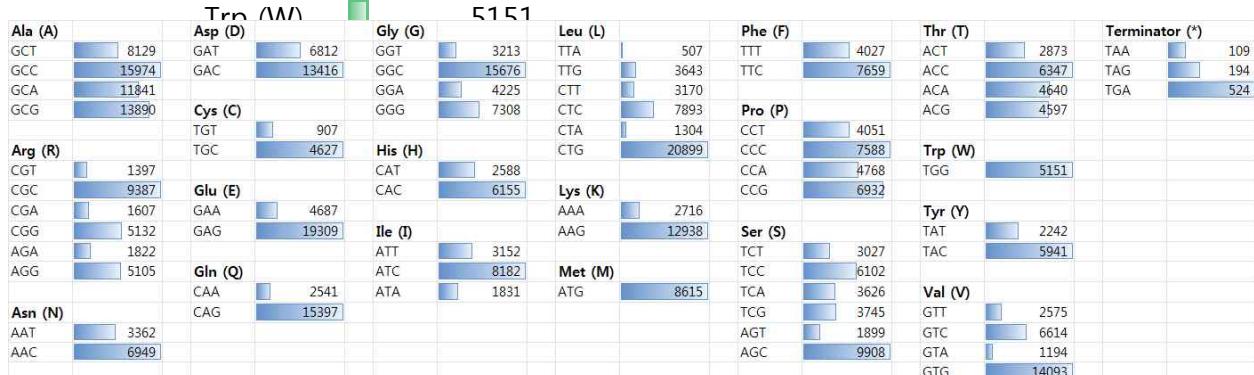
Trp (W) 5151

Tyr (Y) 8183

Val (V) 24476

Ter (\*) 827

- 항-바이러스 단백질의 안정적 발현을 위한 codon optimization 정보
- C. vulgaris C-168의 38만여 개 codon을 분석하여 아래의 도표에 나타내었다. 그럼 112은 카운팅된 전체 codon의 수를 상대적으로 비교한 것이다. 그림113은 각 codon에 따른 codon usage profile이다.



&lt;그림113&gt; 클로렐라 codon usage profile

#### □ 3D8 scFv 유전자의 클로렐라 codon optimization

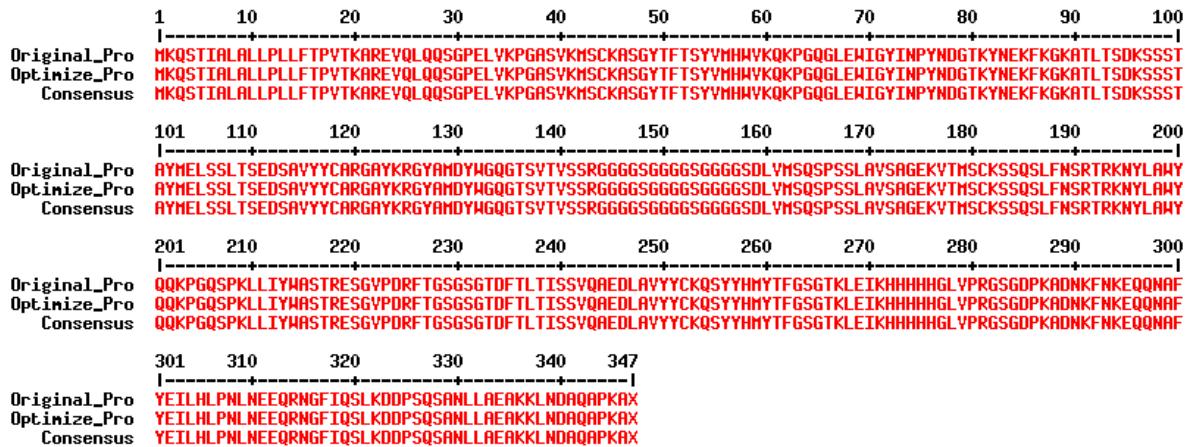
- 작성된 codon usage profile을 기준으로 3D8 scFv 유전자를 re-building 하였다. Re-building 유전자는 original sequence와 4번 이상의 연속적인 변이가 있는 부분이 12회 나타났다(그림114). 특히 10번째 염기서열 부분은 유전자 서열의 초기에 나타났으며, 420번째 염기서열 부분의 10개 nucleotide 연속 변이는 클로렐라로 삽입된 외래 단백질의 mRNA로의 transcription이 저해될 수 있는 부분으로 사료된다.

(A)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Original_Sequence	TG	A	G	A	C	T	G	A	C	T	G
Optimized_Sequence	TG	A	G	A	C	T	G	A	C	T	G
Consensus	TG	A	G	A	C	T	G	A	C	T	G
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Original_Sequence	T	A	R	G	C	T	G	C	T	G	C
Optimized_Sequence	T	A	R	G	C	T	G	C	T	G	C
Consensus	T	A	R	G	C	T	G	C	T	G	C
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Original_Sequence	T	G	A	T	T	A	T	A	T	A	T
Optimized_Sequence	T	G	A	T	T	A	T	A	T	A	T
Consensus	T	G	A	T	T	A	T	A	T	A	T
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Original_Sequence	G	C	T	A	T	G	G	A	T	G	G
Optimized_Sequence	G	C	T	A	T	G	G	A	T	G	G
Consensus	G	C	T	A	T	G	G	A	T	G	G
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Original_Sequence	A	G	G	A	C	T	G	C	T	G	G
Optimized_Sequence	A	G	G	A	C	T	G	C	T	G	G
Consensus	A	G	G	A	C	T	G	C	T	G	G
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
Original_Sequence	C	T	C	C	T	C	T	C	T	C	T
Optimized_Sequence	C	T	C	C	T	C	T	C	T	C	T
Consensus	C	T	C	C	T	C	T	C	T	C	T
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Original_Sequence	C	A	G	A	T	G	A	T	G	A	T
Optimized_Sequence	C	A	G	A	T	G	A	T	G	A	T
Consensus	C	A	G	A	T	G	A	T	G	A	T
	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Original_Sequence	A	T	T	A	C	T	C	A	T	C	T
Optimized_Sequence	A	T	T	A	C	T	C	A	T	C	T
Consensus	A	T	T	A	C	T	C	A	T	C	T
	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
Original_Sequence	G	T	G	A	A	T	C	A	A	G	T
Optimized_Sequence	G	T	G	A	A	T	C	A	A	G	T
Consensus	G	T	G	A	A	T	C	A	A	G	T
	901	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
Original_Sequence	T	A	T	T	A	C	T	A	T	G	A
Optimized_Sequence	T	A	T	T	A	C	T	A	T	G	A
Consensus	T	A	T	T	A	C	T	A	T	G	A
	1001	1010	1020	1030	1040						
Original_Sequence	A	A	G	T	A						
Optimized_Sequence	A	A	G	T	A						
Consensus	A	A	G	T	A						

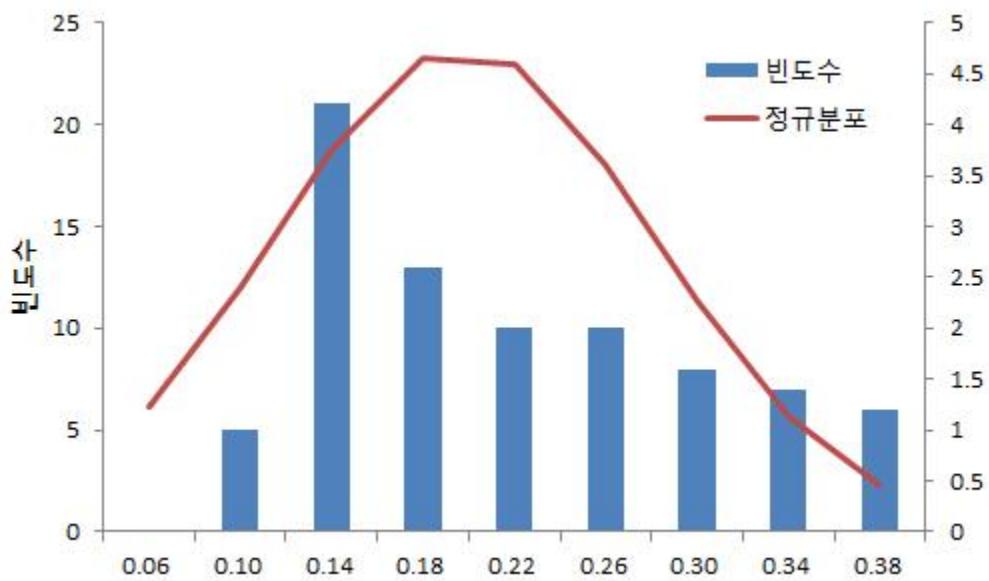
(그림114. 계속)

(B)



<그림114>. 3D8 scFv의 original sequence와 클로렐라의 codon usage에 맞추어 optimized sequence간의 multialign 데이터. (A) Multialign graph using nucleotide sequence, and (B) multialign graph using translated protein sequences

- 클로렐라의 codon usage에 최적화된 C\_scFv 유전자를 이용하여 기존에 제작한 pDSBAR 벡터에 삽입하여 과제를 통해 설정한 형질전환 방법에 의거, 클로렐라를 형질 전환 하였다. 일련의 형질전환 과정을 통해 총 96개의 isolated colony를 선발할 수 있었다. 선발된 형질전환 개체는 qRT-PCR을 통해 삽입된 C\_scFv의 발현양을 확인함과 동시에 배양실험을 같이 진행하였다.
- Flask를 이용한 배양 실험에서 형질전환 클로렐라의 성장속도는 개체별로 차이를 보였다. 특히 본 연구진에서 배양에 사용하는 heterotrophic culture 방법에 의한 클로렐라의 배양에서 각 개체군에 따라 배지내 glucose를 소비하는 속도가 다르게 측정되었다. 30°C shaking incubator에서 93시간 배양 후 OD600에서 세포량을 측정하고 이를 정규분포곡선으로 표현하였다(그림115). 그림에서 보이는 것처럼 높은 빈도에서 OD600=0.2 이하로 측정되었으며, 원쪽으로 치우쳐진 정규분포곡선을 나타냄을 확인 할 수 있었다. Negative control로 사용한 wild type 클로렐라의 OD600은 0.268로 측정되었으며 이는 형질전환체의 평균값인 0.198에 상위하는 성장속도를 보여주었다. 이러한 정규분포곡선으로 미루어 형질전환된 클로렐라의 성장속도가 일반적인 경우보다 낮다는 것을 짐작할 수 있었다.



<그림115>. 형질전환 클로렐라 96개 strain의 96시간 배양 후 OD값에 따른 정규분포곡선

- qRT-PCR을 통하여 96개 isolate중에 1차 18개를 선발하였고, 선발된 18개로 2차 qRT-PCR을 진행하였다(표39). Delta delta CT method를 이용한 상대정량 측정을 통하여 #9-2 형질전환체가 가장 높은 C\_scFv 발현을 보이는 것으로 측정되었다. 이 결과를 바탕으로 5개의 발현양 우수 균주를 선발하여 5L-jar fermentor 배양 실험을 진행하였다.

<표39>. 형질전환 클로렐라의 qRT-PCR 분석 결과(Delta delta CT method)

Name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.
4-4	40.70	10.64	30.06	0.00	1.000
5-4	39.84	9.76	30.08	0.01	0.990
6-3	39.96	7.20	30.71	0.64	0.640
6-5	47.48	9.27	38.22	8.15	0.004
9-2	37.69	10.28	27.41	-2.66	6.302
9-4	43.42	10.44	32.98	2.92	0.132
11-2	39.66	10.28	29.38	-0.68	1.603
11-4	49.67	10.21	39.46	9.40	0.001
14-1	44.83	10.25	34.59	4.53	0.043
15-4	39.85	10.19	29.66	-0.04	1.321
17-1	42.49	10.36	32.14	2.07	0.238

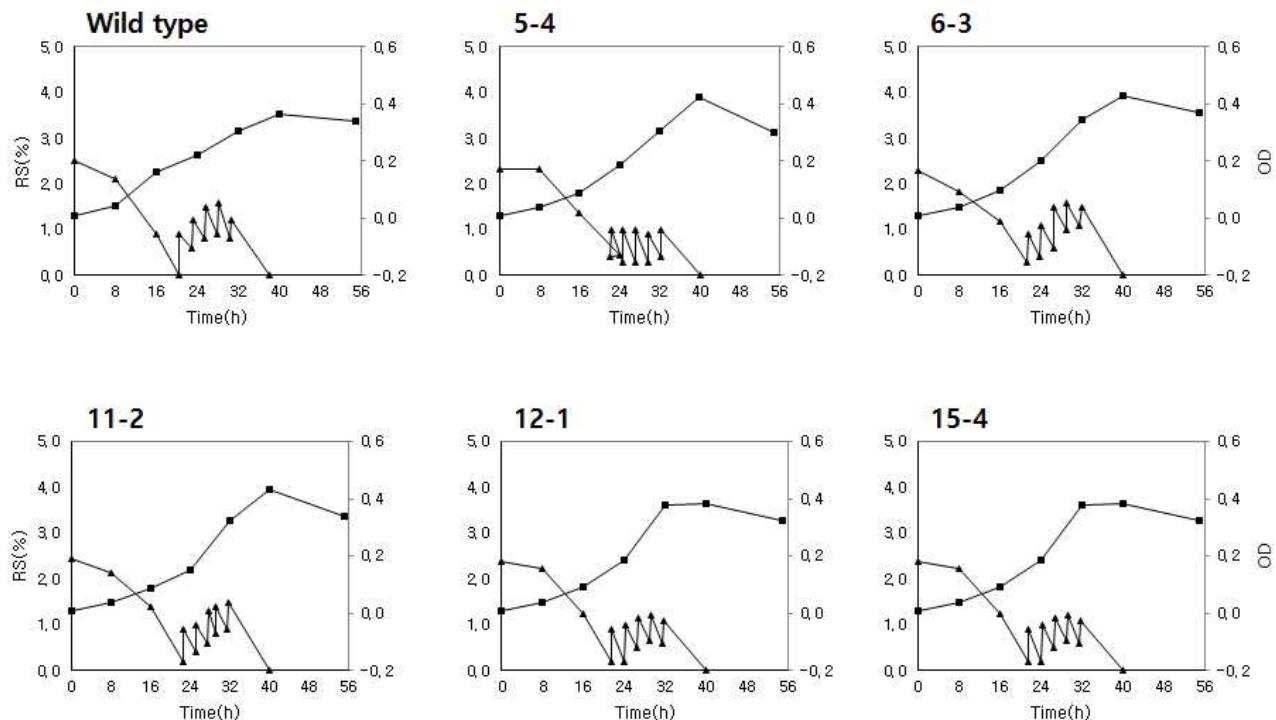
□ 선발된 균주의 5L scale 배양 실험

- qRT-PCR의 결과로 선정된 5종의 형질전환 클로렐라를(5-4, 6-3, 11-2, 12-1, 15-4) 이용하여 5L jar fermentor로 scale-up하여 배양실험을 진행하였다. 배양 시간은 총 56시간으로 고정하였으며, fed-batch culture 방법으로 배양하였다. 표40은 1차, 2차 seed 배양 조건과 배양 후 RS(%)를 나타낸다. Wild type 클로렐라와 비교하여 6-3 균주가 seed 배양에서는 성장 속도가 좋은 것으로 확인되었다.

<표40>. 선발된 균주의 seed culture 조건 및 성적

Strain	1차 seed			2차 seed		
	Seed OD (x100)	배양 시간	잔 당 (RS%)	Seed OD (x100)	배양 시간	잔 당 (RS%)
Wild-type	0.0166	48	0.68	0.0897	43	0.00
5-4	0.0346	48	0.00	0.1919	43	0.10
6-3	0.0303	48	0.00	0.1321	43	0.00
11-2	0.0229	48	0.20	0.1090	43	0.18
12-1	0.0211	48	0.26	0.1383	43	0.12
15-4	0.0233	48	0.19	0.1124	43	0.16

- 5L scale 배양에서 그림116과 같은 growth curve를 보이며 배양되었다.

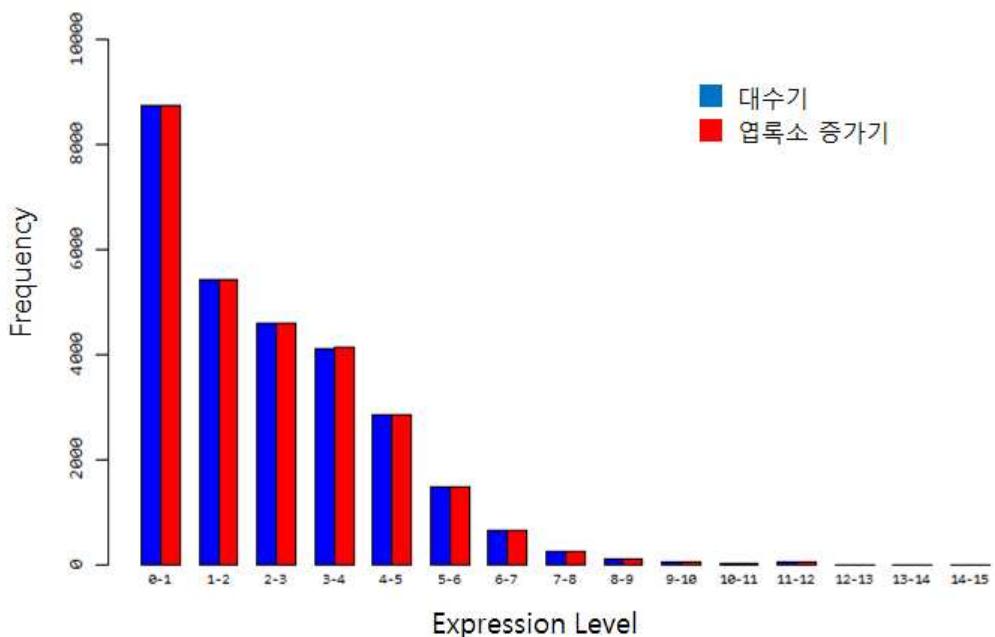


<그림116>. 선발된 형질전환 클로렐라의 5L scale fed-batch 배양 그래프

- Wild type과 유사하게 선발된 모든 형질전환체에서 최종 배양 농도가 OD=0.4 내외로 측정되었으며, 40시간 배양 후 배지내에 glucose는 모두 소진된 것으로 측정되었다. Heterotrophic culture 조건에서 glucose의 소모는 세포의 성장과 비례 관계가 성립하므로, 형질전환 클로렐라의 성장에는 삽입된 3D8 scFv에 의한 저해 작용이 낮은 것으로 평가할 수 있다. 이후 배양 조건에 따른 3D8 scFv 발현양에 대한 실험을 계속 진행 중에 있다.

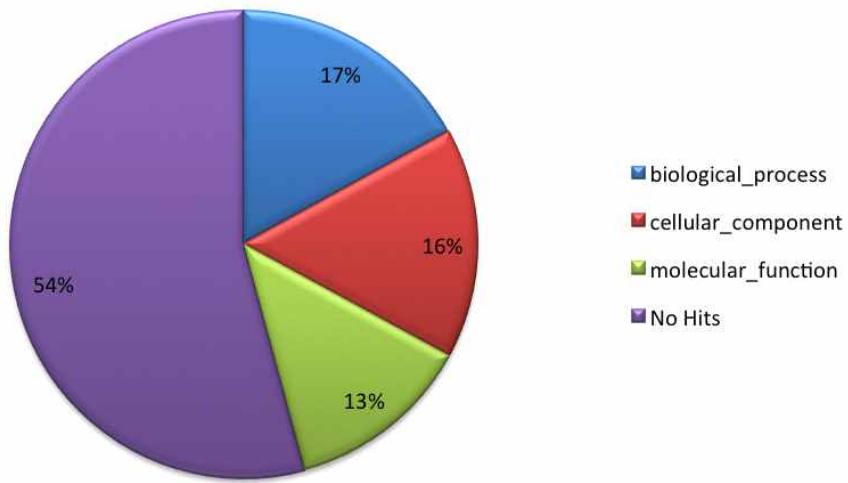
#### □ Glucose 소모에 따른 클로렐라 성장 관련 NGS 결과

- Glucose 소모 단계에 따른 클로렐라로부터 추출된 transcriptom sequencing을 통하여 유도발현 프로모터를 선발하기 위하여 DEG (differential expressed genes) 분석을 진행하였다. NGS 결과, 많은 경우의 유전자가 대수 증가기나 엽록소 증가기에 관계없이 낮은 expression level로 분류되었고(그림117), 그림118에서 나타난 것처럼 대부분 유전자의 발현 level은 상대값 10이하로 측정되었으며, 발현양의 유의적 차이를 보이지 않는 절대값 2 이하의 변화에 집중되어 있었다.



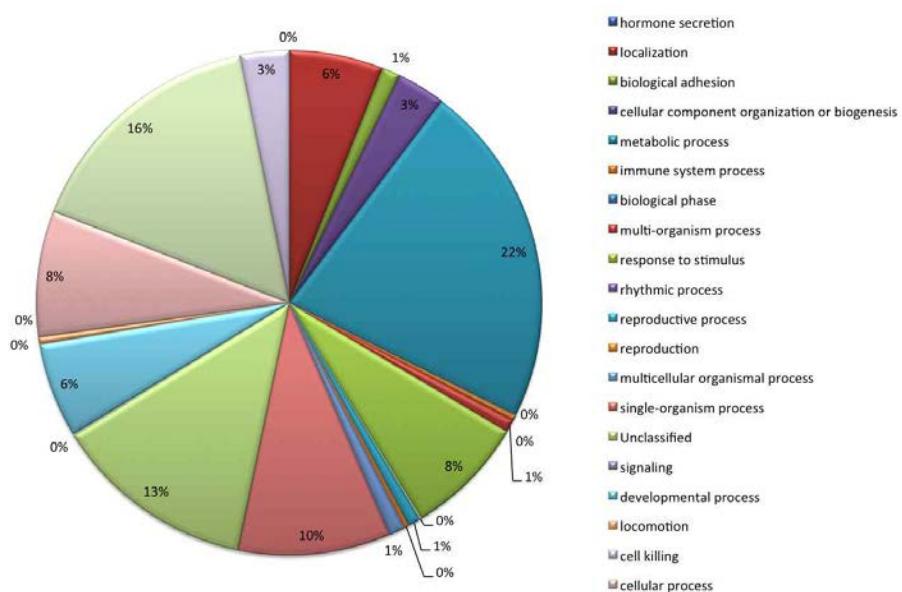
<그림117>. Distribution of Expression level

- NGS 결과를 바탕으로 GO 분석을 진행하였고, sequencing된 유전자의 54%의 유전자가 No Hits로 분류되고, 17%는 biological process, 16%는 cellular component, 13%는 molecular function과 관련 있는 유전자군으로 분류되었다(그림118).

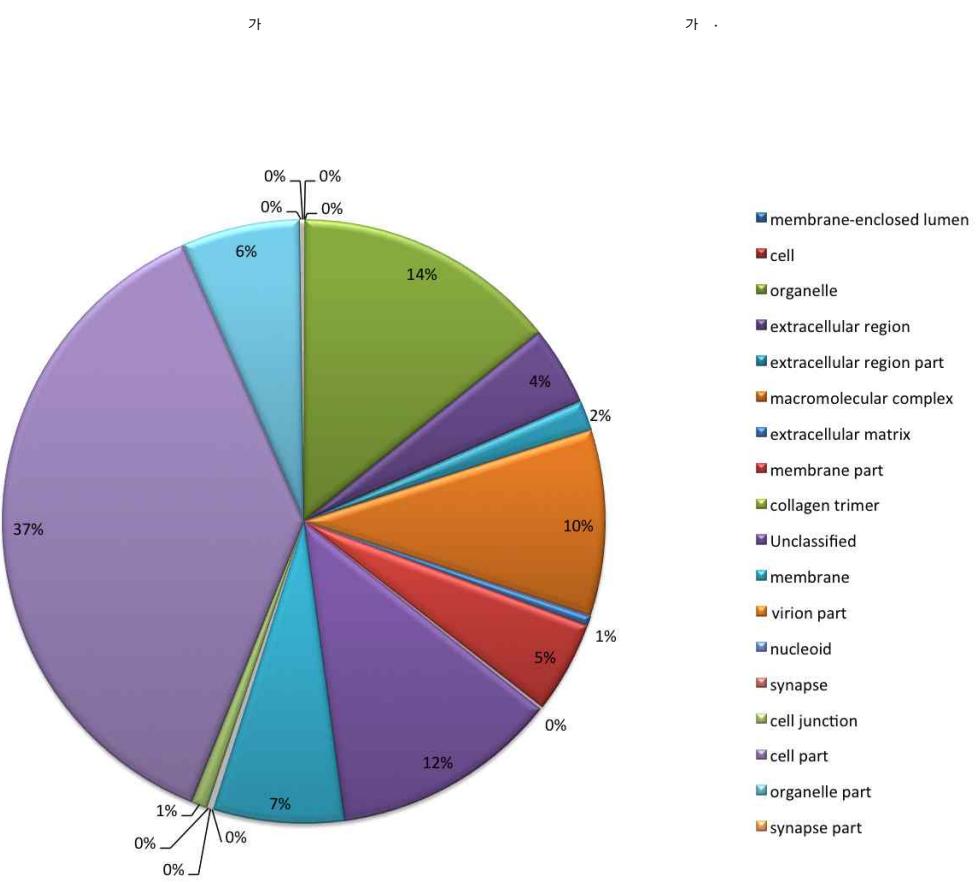


<그림118>. NGS 결과의 GO analysis 분류

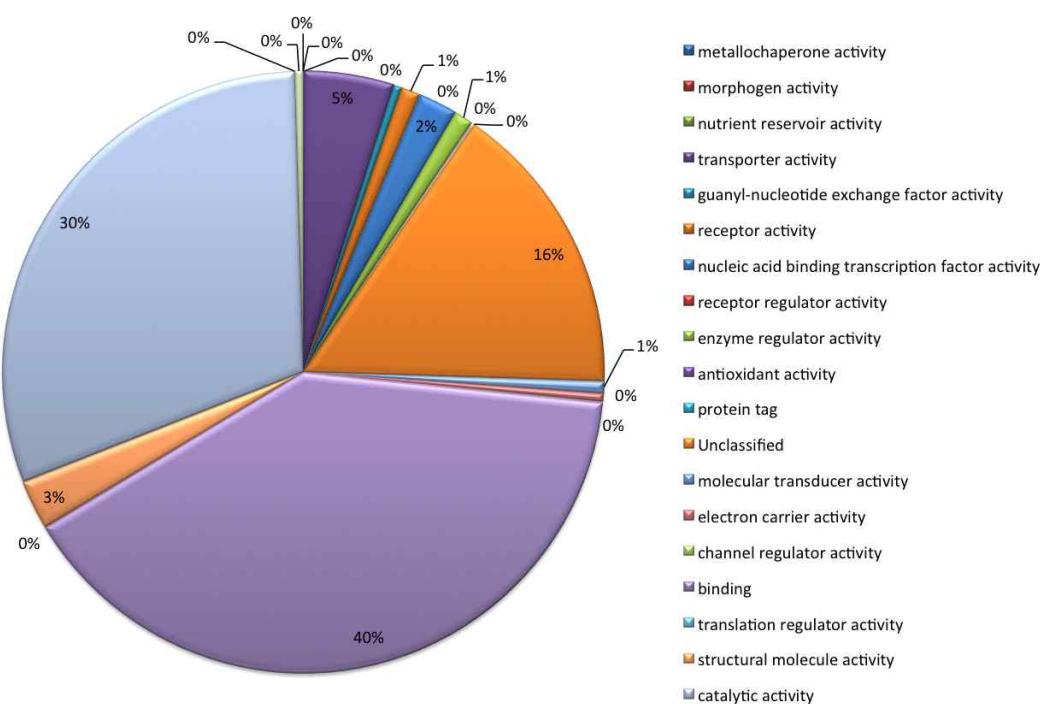
- 각 GO category에 따른 유전자 항목을 분류한 것은 그림119-121에 나타내었다. 각 category에서 metabolic process (22%, Biological process), cell part (37%, cellular component), binding (40%, molecular function)이 가장 높은 비중을 차지하였다.



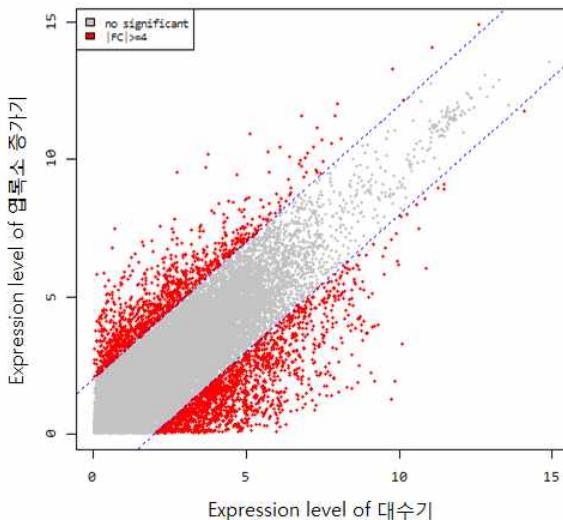
<그림119>. 클로렐라 NGS 결과에 따른 biological process 관련 유전자 분포도



<그림120>. 클로렐라 NGS 결과에 따른 cellular component 관련 유전자 분포도

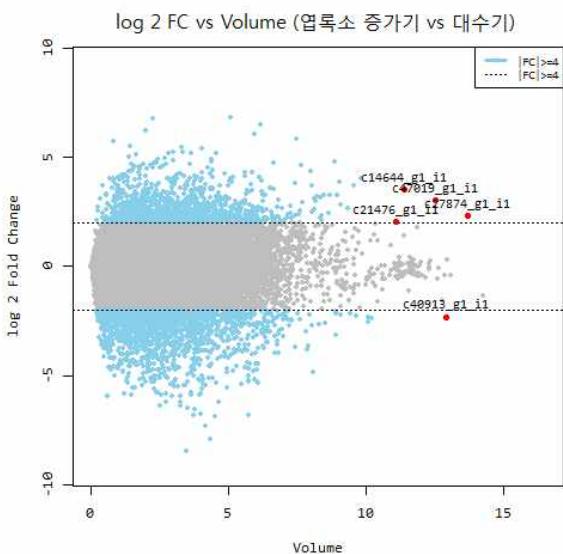


<그림121>. 클로렐라 NGS 결과에 따른 molecular function 관련 유전자 분포도



<그림122>. 대수기 vs 엽록소 증가기의 유전자 발현 level 분석 그래프

- Glucose 소모 단계에 따라 발현양의 유의적 차이를 보인 유전자는 up-fold 4,605개와 down-fold 4,431개로 스크리닝 되었으며, 이중 많은 경우의 유전자는 Genebank에서 no-hit 되거나 uncharacterized protein로 분류되는 유전자였다(그림122,123). Characterization된 유전자중 최대 up-fold를 나타낸 것은 starvation 이후 108배 증가한 AT1G15520로 environmental stress에 response되는 signal peptide로 분석되었다. 특히 29.8배 증가한 chlorophyll biosynthetic process 관련 enzyme에 대한 분석을 진행하고 있다. 현재 분석된 DEGs 정보를 이용하여 inducible promoter로 사용할 수 있는 후보군에 대한 실험을 진행 중이며, 이와 관련된 내용으로 특히 출원을 진행하였다(출원번호 10-2014-0149808).



<그림123>. 대수기 vs 엽록소 증가기의 유전자 발현 volum 차이 분석 그래프

□ 대장균 형질전환용 벡터 시스템 개발

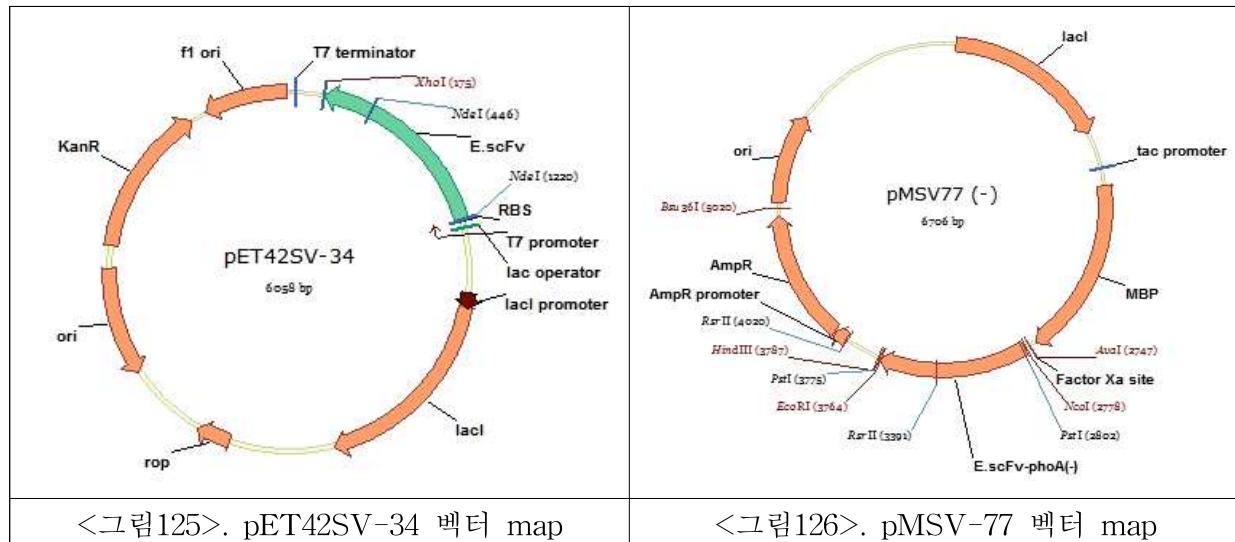
- 본 연구진은 항-바이러스 기능성을 유지 및 증진시킬 수 있는 사료 첨가제 제형 개발을 위해 클로렐라 균주 외에 항-바이러스 단백질 제재로서 3D8 scFv 단백질이 발현되어 세포 밖으로 단백질을 용출시킬 수 있는 대장균 균주를 선별하고 발현을 최적화할 수 있는 시스템을 개발하였다.
- 대장균에서 항-바이러스 단백질 3D8 scFv의 발현 최적화를 위한 코돈 최적화 작업 및 발현균주 확보
  - 대장균에서 3D8 scFv의 발현을 최적화하기 위해 기존 3D8 scFv 유전자의 코돈을 대장균에 맞게 최적화하였다. 1년차 형질전환 클로렐라 개발시 개발한 3D8 유전자임(그림 124).



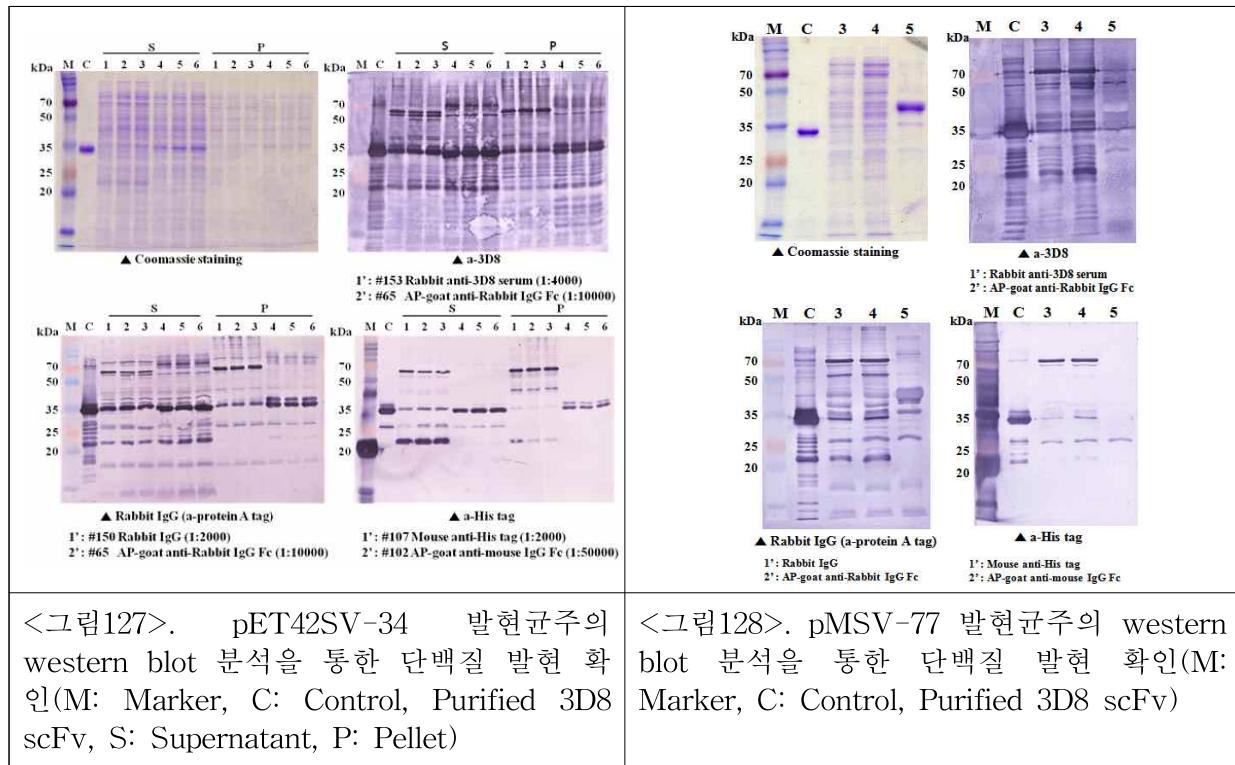
- 최적화된 유전자를 발현벡터인 pET42a(+)와 pMAL-p5x벡터에 클로닝하였다.

pET42a(+) 벡터는 GST taq이 결합된 peptide sequence가 높은 수준으로 발현되도록 디자인된 벡터로 원핵세포에서 T7 promoter에 의해 원하는 유전자의 발현 및 선별을 위한 kanamycin 저항성 유전자가 발현된다. 벡터 내 GST taq을 빼어내고 대장균의 codon usage profile에 맞춰 re-building 완료된 3D8 scFv 유전자 (E.scFv명명)만을 pET42a(+)에 삽입하기 위해 Nde I과 Xho I 제한효소 인식부위로 하여 primer를 제작하고 PCR을 수행하였다. 그 후 PCR 산물과 pET42a(+) 벡터를 Nde I과 Xho I 제한효소로 37°C에서 반응시킨 후 E.scFv 유전자의 약 1kb 크기와 pET42a(+)의 약 5.9kb 크기를 젤 전기영동으로 분리하여 준비하였다. 이 때 E.scFv 내 Nde I 제한효소 인식부위가 존재하여 serial digestion 방법으로 진행하였으며, 각각 같은 Nde I과 Xho I 제한효소 인식부위로 준비된 E.scFv 유전자, pET42a(+) 벡터, T4 DNA ligase (Promega, USA)를 혼합하여 4°C에서 24시간동안 반응시켰다. 이 반응 혼합물을 E.coli DH5α에 열 충격 (heat shock)으로 형질전환 시킨 후 kanamycin 15μg/mL의 농도로 함유되어 있는 LB 평판배지에 배양하였다. 자란 단일 colony를 kanamycin 15μg/mL의 농도로 함유되어 있는 LB 액체배지에서 배양한 후 DNA miniprep kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 plasmid DNA를 순수 분리하였다. 이를 다시 EcoRI과 Xho I의 제한효소로 37°C에서 반응시킨 후 잘린 가닥의 크기를 관찰함으로써 E.scFv 유전자가 pET42a(+)벡터에 삽입되었는지 여부를 확인하였고, 염기서열 분석으로 재확인하였다. 분석 결과 E.scFv 유전자가 변이되지 않고 pET42a(+) 벡터에 정확히 삽입되었는지 최종적으로 확인하고 pET42SV-34(6058bp)라 명명하였다(그림125).

3D8 scFv 단백질의 발현 최적화를 위해 발현 단백질을 maltose binding protein (MBP)과 같이 용해도가 높은 단백질과 결합시켜 목표단백질의 가용성을 증가시킬 수 있는 pMAL 벡터를 NEB (NEW England Biolabs, UK)로부터 구입하여 발현 시스템을 구축하였다. MBP와 같은 용해도가 높은 단백질을 결합시켜 발현하는 방법은 단백질의 종류에 관계없이 범용적으로 사용될 수 있는 장점이 있다. pMAL-p5x 벡터는 원핵세포에서 Ptac promoter에 의해 외부 유래 유전자가 발현되며, 선별을 위한 Ampicillin 저항성 유전자가 발현된다. 3D8 scFv 단백질은 phoA leader peptide와의 결합단백질로 되어있으며, 발현되는 즉시 대장균 세포막 밖으로 용출이 유도되는 특징이 있다. 3D8 scFv 내의 phoA leader peptide와 pMAL-p5x 내의 MBP가 목표 단백질의 세포막 용출을 유도한다는 공통된 기능성에 의해 상충된 결과 발생을 우려해 phoA sequence가 없는 scFv를 디자인하여 벡터 시스템을 구축하였다. E.scFv를 pMAL-p5x의 Nco I과 EcoRI 제한효소 인식부위에 상기 서술한 방법과 동일하게 삽입하였다. 이 후 염기서열 분석을 통해 유전자가 벡터 내 올바르게 삽입되었음을 확인하였고 pMSV-77(6706bp)로 명명하였다(그림 126).



- pET42SV-34와 pMSV-77 발현벡터는 대장균 strain 중 expression cell line인 BL21(DE3)에 각각 형질전환하였고, 이렇게 획득된 세포주는 80%(v/v) glycerol을 첨가하여 -70°C에서 보관하고 있다.
- 확보된 대장균 균주 2종에서 3D8 scFv 단백질의 발현 유무를 확인하기 위해 western blot 분석을 실시하였다. 배양액을 lysis buffer 200μL에 용해시키고 14,000rpm, 4°C에서 30분간 원심 분리하였다. 단백질을 포함한 상층액을 새 튜브로 옮기고, Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 Bradford법으로 단백질의 농도를 측정하였다. 단백질 20μg을 SDS polyacrylamide 겔에 전개시킨 후, PVDF membrane으로 옮기고, 5% skim milk로 blocking 하였다. 1차 anti-body로 Rabbit anti-3D8 serum (1:4000), Rabbit IgG (1:2000), Mouse anti-His tag (1:2000)을 사용하였고, 2차 anti-body로는 AP goat anti-Rabbit IgG Fc (1:10000)를 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 AP-conjugated development Biorad (CA, USA)로 발색하였다.
- 이와 같이 western blot 분석을 진행한 결과 pET42SV-34 발현균주에서는 3D8 scFv 단백질 34kDa이 pMSV-77 발현균주에서는 MBP 단백질과 3D8 scFv 단백질이 결합된 형태인 77kDa에서 밴드가 확인되어 발현균주 모두 3D8 scFv 단백질이 발현되는 것으로 확인되었다(그림127,128).



- Jar fermentor를 이용한 항-바이러스 단백질 발현 최적화

- 대장균에서의 3D8 scFv 단백질 발현을 최대화하기 위해 5L-jar fermenter (JF)에서 glucose, glycerol, lactose를 배지에 첨가하여 auto-induction을 통한 발현을 유도하였다.
- pET42SV-34 및 pMSV-77 발현 균주는 아래 표41의 조성물을 포함한 200mL 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 18시간 종균배양 한 후, 5L-JF에 접종하여 발현 유도 실험을 수행하였다.

**<표41>. 종균 배양 배지 조성**

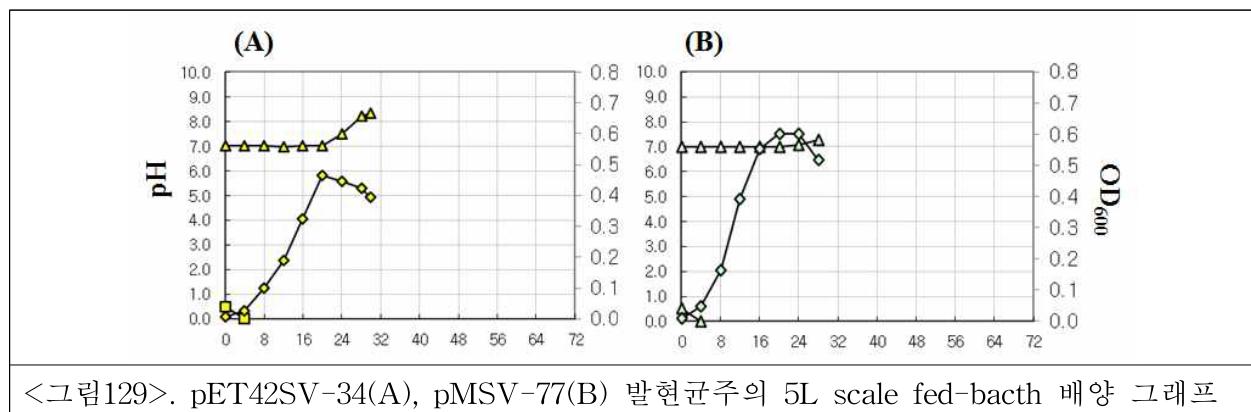
구분	내용	비고
배지조성	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5%; NaCl, 0.5%; YPA, 2%; Polypeptone, 3%	w/v
pH	7.2	
온도	37°C	

- 종균 배양한 후 아래 표42와 같은 5L-JF의 배양 조건에서 단백질 발현을 최적화하기 위해 glucose, glycerol, lactose의 다양한 농도를 적용하여 발현량을 확인하고 glucose 3%, glycerol 3%, lactose 1%로 배지조성을 확정하였다(data not shown). 각 균주의 성장은 UV-spectrophotometer를 사용하여 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 배지 내 glucose 농도는 YSI 당분석기를 이용하여 측정하였다. 배지 내 glucose, glycerol이 다 소진되는 시점인 최대 성장기(stationary phase)부터 8시간 induction하는 것을 기본으로 하였으며, 배양 완료 후 상등액과 세포를 따로 분리하여 SDS-PAGE로 발현 정도를 확인하였다.

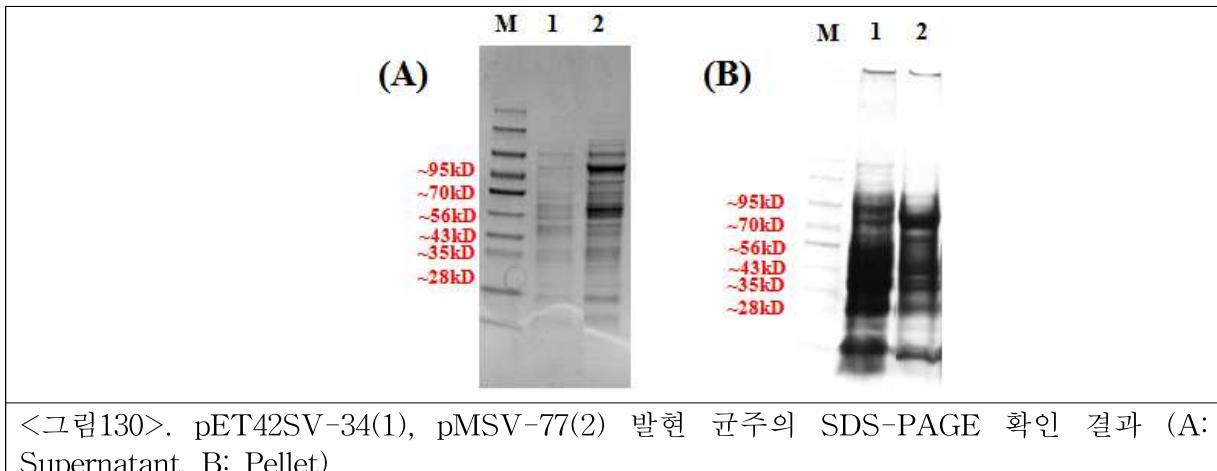
## &lt;표42&gt;. 5L-JF 배양 배지 조성

구분	내용	비고
배지조성	Yeast extract, 4g; YPA, 8g; (NH4)2SO4, 12g; KH2PO4, 40g; MgSO4, 2g; MnSO4, 20mg; FeSO4, 20mg, ZnSO4, 20mg	2L
pH	7.0	
온도	○ pET42SV-34 발현 균주: 26°C ○ pMSV-77 발현 균주: 30°C	
RPM	700	

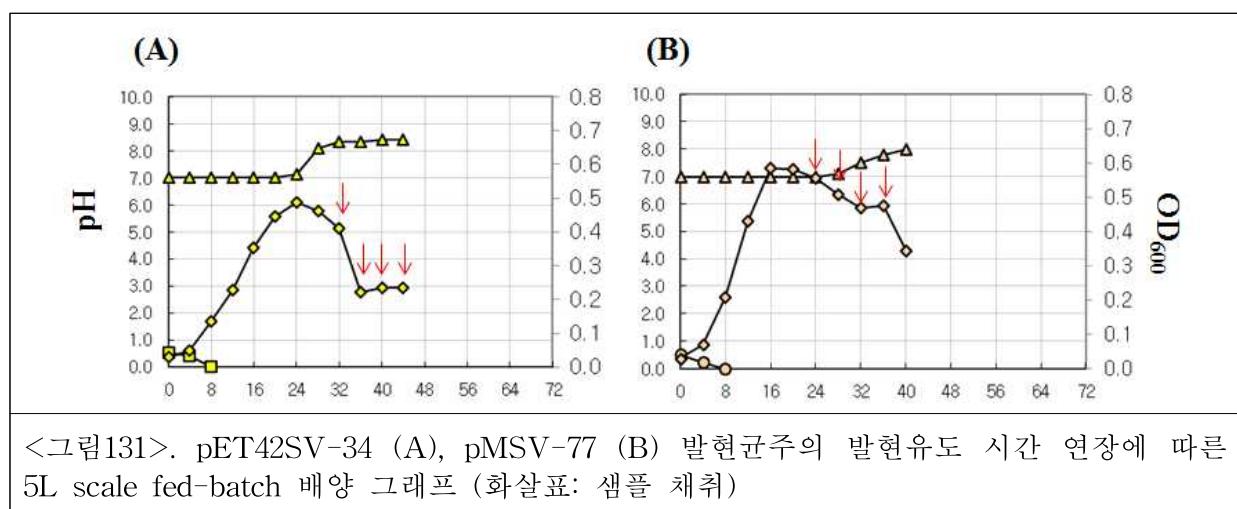
- 각 발현균주는 위의 발현 조건에서 약 28시간 배양되며 최대 세포 성장 시 OD600값은 pET42SV-34 발현균주는 약 45, pMSV-77 발현균주는 약 60으로 확인되었다(그림129). 배양액 중 총단백질 농도는 Bradford법을 이용하여 측정하였으며 pET42SV-34 발현균주의 경우 평균 1.95 mg/mL, pMSV-77 발현균주는 2.5mg/mL으로 확인되었다.

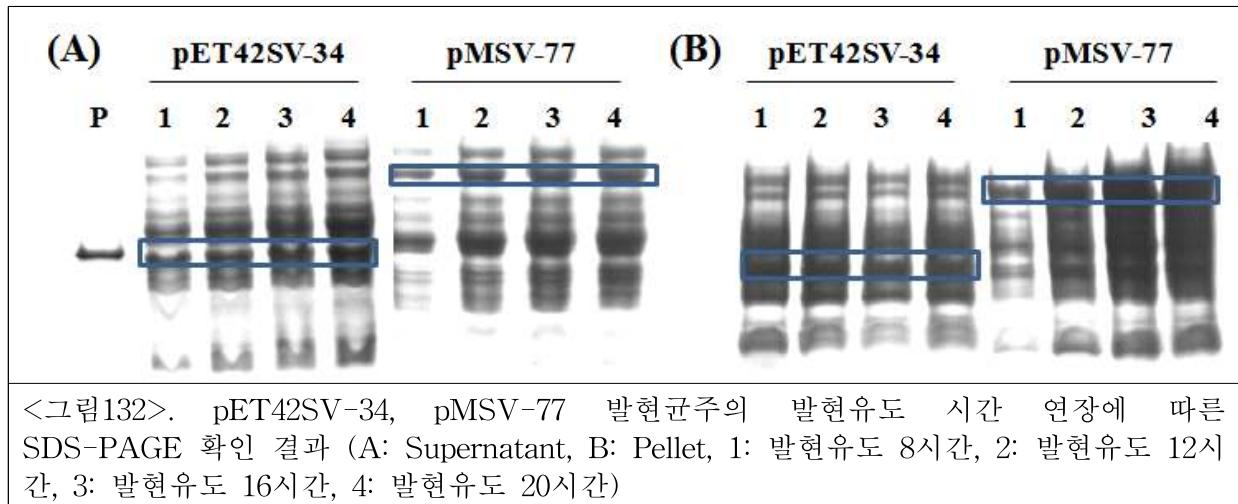


- pET42SV-34, pMSV-77 발현균주 모두 배양 상등액에서는 3D8 scFv 단백질의 발현량이 낮았으나, 세포 내부에는 3D8 scFv 단백질이 많은 양으로 발현된 것을 확인할 수 있었는데(그림130), 이는 단백질 과발현으로 단백질 뭉침 현상이 일어나 세포 내 inclusion body가 형성되었거나, 다른 요인으로 인해 세포 밖으로 효율적인 용출이 되지 않아 일어난 현상이라고 판단되었다.



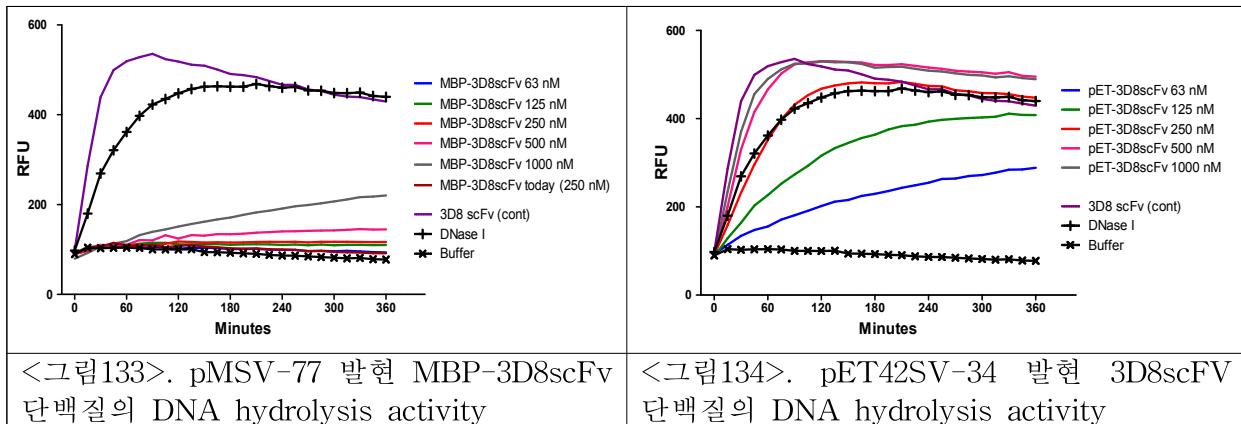
- 세포 내 3D8 scFv 단백질의 용출을 유도하기 위해 발현유도 시간을 연장하여 시간 연장에 따른 발현 단백질의 축적 및 용출 효과를 확인해 보았다. 발현유도 8시간부터 20시간까지 4시간 간격으로 배양액을 채취하여(그림131), 상등액 및 세포 내 발현된 3D8 scFv 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.
- pET42SV-34, pMSV-77 발현균주 모두 발현 시간이 지남에 따라 세포 내에 축적하는 3D8 scFv 단백질이 점차적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며(그림132), 발현 시간이 길어짐에 따라 배양 상등액으로 단백질 용출 정도가 증가하는 것을 확인하였다.





- 대장균 발현 3D8 scFv 단백질의 핵산 가수분해 활성 및 정량 분석

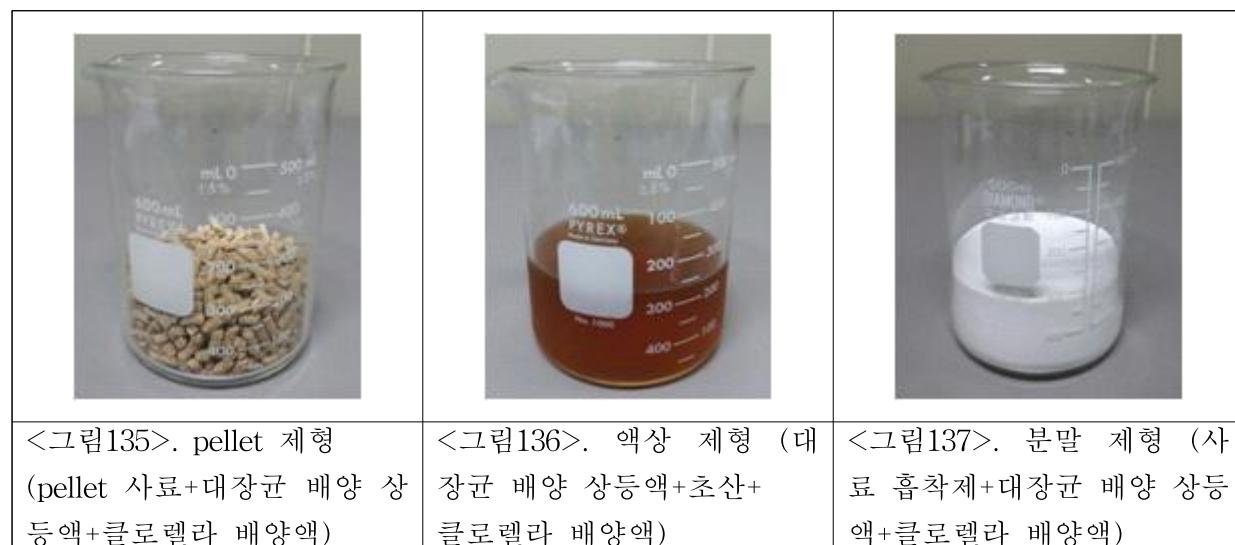
- 확립된 pET42SV-34와 pMSV-77 발현 세포주 내에서 발현하는 3D8 scFv 단백질의 항-바이러스 활성을 확인하기 위해 정제한 단백질을 ELISA 및 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 원리를 이용하여 핵산결합, 핵산 분해활성을 분석하였다. 5' 말단에 형광 (FAM)이, 3'말단에는 blackhole quencher (BHQ)가 표지된 21bp 길이의 DNA 기질을 사용하였으며, FRET의 원리에 의하면 3D8 scFv 단백질이 발현되지 않는 세포주에서는 DNA 기질이 분해되지 않아 quencher에 의해 형광이 억제되는 반면, 발현 세포주에서는 3D8 scFv 단백질에 의해 DNA 기질이 분해되면 quencher가 FAM과 분리되어 형광을 나타내게 된다. 96 well black plate (Nunc)에 pET42SV-34 및 pMSV-77 세포주에서 발현, 정제한 단백질을 농도별 (63, 125, 250, 500, 1000nM)로 처리하여 이중 가닥 oligonucleotides (5'-FAM-CGA TGA GTG CCA TGG ATA TAC-BHQ-3') 0.5 $\mu$ M을 Mg<sup>2+</sup>가 포함된 완충용액 (10mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.4)에 넣어주고 15분 간격으로 6시간 동안 fluorometric imaging plate reader (Molecular Devices)를 통해 RFU (relative fluorescence unit) 값으로 산출하였다. 양성대조군으로 DNaseI, 음성대조군으로 완충용액을 사용하였다.
- 단백질 정제 결과 pET42SV-34 발현 3D8 scFv 단백질은 81mg/L, pMSV-77 발현 MBP-3D8 scFv 단백질은 154mg/L의 농도로 분석되었다.
- FRET 기반 DNA-hydrolysis assay를 수행한 결과 pMSV-77발현 MBP와 결합된 형태의 3D8 scFv 단백질은 핵산가수분해 활성이 없는 것으로 확인되었으며(그림133), pET42SV-34 발현 3D8 scFv 단백질은 핵산가수분해 활성이 확인되었다(그림134). 특히 pET42SV-34 발현 3D8 scFv 단백질은 250nM의 농도에서 3시간 후에 모두 분해되어 형광 값이 포화되는 것을 확인하였으며, 1unit에 대한 정의를 37°C에서 3시간 동안 400ng의 DNA를 완전히 자르는데 필요한 3D8 scFv의 양으로 결정했을 때 1unit은 250nM( $\approx$ 2 $\mu$ g)으로 확인되었다.



- 단백질의 과발현 시 일어날 수 있는 단백질의 불용성화를 방지하고 가용성으로 목표 단백질을 발현하기 위한 일반적인 방법으로 용해도가 높은 MBP와 3D8 scFv 단백질을 결합시켜 발현시켰으나, FRET 분석 결과, DNA hydrolysis activity가 없는 것으로 확인되었다. 이는 3D8 scFv 단백질이 MBP와 결합되어 구조적인 변형이 야기되어 활성이 억제되었거나, 3D8 scFv 단백질보다 크기가 큰 MBP (40kDa)에 의해 3D8 scFv의 DNA binging site가 masking되었을 가능성을 생각해 볼 수 있으나 이에 대해서는 추가적인 개선이 요구되었다.

□ 항-바이러스 기능성 유지 사료 첨가제 제형 개발

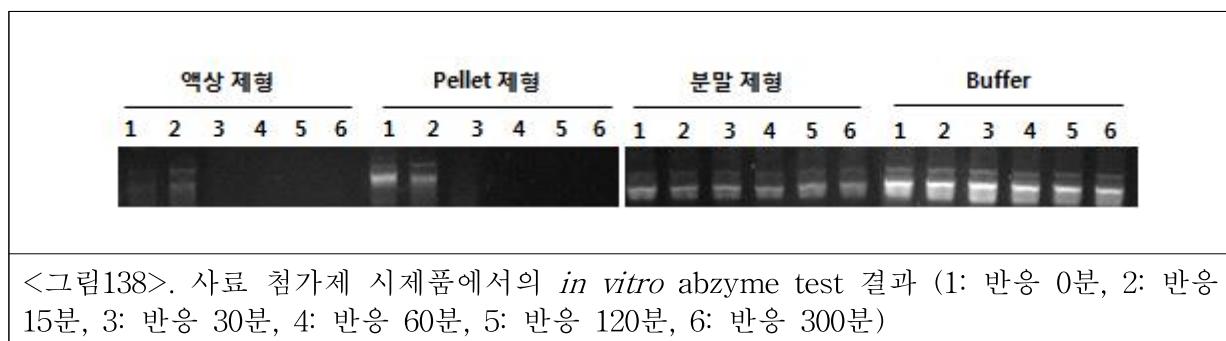
- 3D8 scFv 단백질 발현 대장균 배양 상등액 및 클로렐라 배양액을 이용한 사료 첨가제 시제품 제작 및 단백질 활성 확인
- 핵산가수분해 활성이 확인된 pET42SV-34 발현 배양 상등액과 형질전환 클로렐라 배양액을 이용하여 3가지 형태의 사료 첨가제 시제품을 제작하였다(그림135,136,137).



- pellet 제형의 사료 첨가제는 pellet 형태의 사료에 대장균 배양 상등액과 클로렐라 배양액을 분무하여 코팅하는 형태로 제작하였고, 액상 제형은 대장균 배양 상등액과 클로렐

라 배양액을 적정 비율로 섞고 초산을 첨가하는 형태로 제작하였다. 분말 제형은 사료 흡착제에 대장균 배양 상등액과 클로렐라 배양액을 섞는 형태로 제작하였다.

- 3가지 형태의 사료 첨가제 시제품에서 3D8 scFv 단백질의 핵산가수분해 활성이 유지되는지 확인하기 위해 dsDNA를 기질로 하여 *in vitro* abzyme test를 진행하였다. 확인 결과 액상 제형과 pellet 제형에서 시간이 경과함에 따라 target ds DNA band가 감소되어 높은 nuclease 활성을 확인하였으나, 분말 제형에서는 nuclease 활성이 확인되지 않았다 (그림138). 이는 차후 사료첨가제 제형 개발 과정에서 분말 제형 보다는 액상이나 pellet 형태의 제형으로 개발하는 것이 항-바이러스 활성을 유지할 수 있을 것으로 기대된다.



- 현재 3D8 scFv 단백질 발현 대장균 배양 상등액과 클로렐라 배양액은 액상 제형의 시제품 형태로 위탁기관인 건국대학교와 연계하여 경구 투여 시 마우스에서 인플루엔자 방어 효능 평가를 수행하였다.

#### □ 클로렐라 Native Inducible Promoter 발굴 및 발현벡터 개발

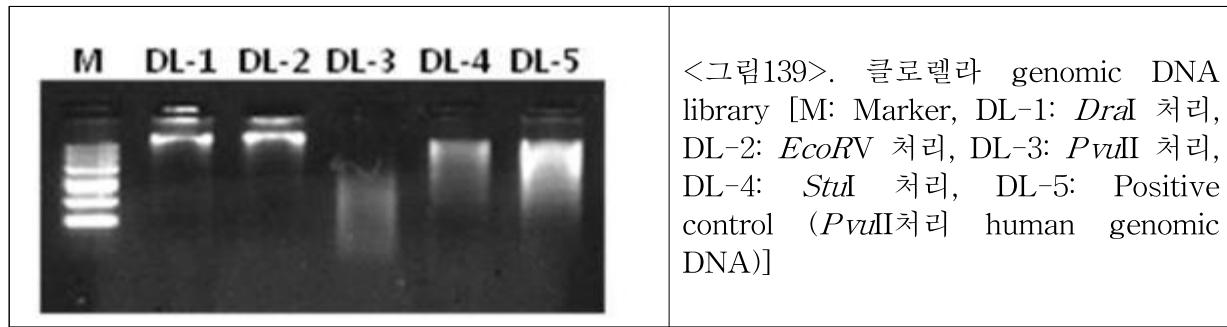
##### ○ 클로렐라 inducible promoter 발굴을 위한 유전자 선정

- 본 연구에 앞서 CaMV35S promoter에 의한 3D8 scFv 유전자가 발현되는 클로렐라 균주를 분리하였으나 결과적으로 3D8 scFv 단백질의 발현이 낮게 평가되었다. 이는 3D8 scFv가 상시 발현할 경우 기질 특이성 없이 핵산을 가수분해는 촉매활성으로 숙주세포 핵산이 손상되어 발현량이 낮은 세포주만 선별되었을 거라는 예상에 따라 상업적으로 이용 가능한 클로렐라 형질전환용 벡터 및 promoter를 개발하기 위해 CaMV35 promoter를 대체할 수 있는 강도와 유도발현이 가능한 promoter 개발이 필요하였다.

당사에서 클로렐라 배양에 사용하는 fed-batch culture 방법은 클로렐라의 생육에 필요한 에너지원(탄소원)을 일반적인 광합성 미세조류에서 광합성을 통하여 glucose를 얻는 방법을 대신하여 직접 배양 배지에 glucose를 제공하여 클로렐라의 빠른 성장을 유도하고 있다. 성장이 빠르다는 장점에 반하여 광합성에 필요한 물질인 엽록소의 함량이 광배양 대비 낮아질 수 있으나, 배지 내 glucose를 제한하는 ‘숙성’이라는 과정을 통해 엽록소의 함량을 증량 시키는 방법을 사용하고 있다. 즉 단시간 내에 세포량을 증량하기 위해 glucose를 공급하여 세포량을 증가시킨 후 당 공급을 제한하여 엽록소를 높이는 방법이다. 본 연구팀에서는 이 배양 특징을 이용하여 glucose를 공급해 세포량을 증가시키고, glucose를 제한하는 ‘숙성’이라는 과정 동안 엽록소와 함께 3D8 scFv가 발현되도록 하기 위해 glucose에 의해 조절되는 inducible promoter를 분리하여 균주를 개발하고자 하였

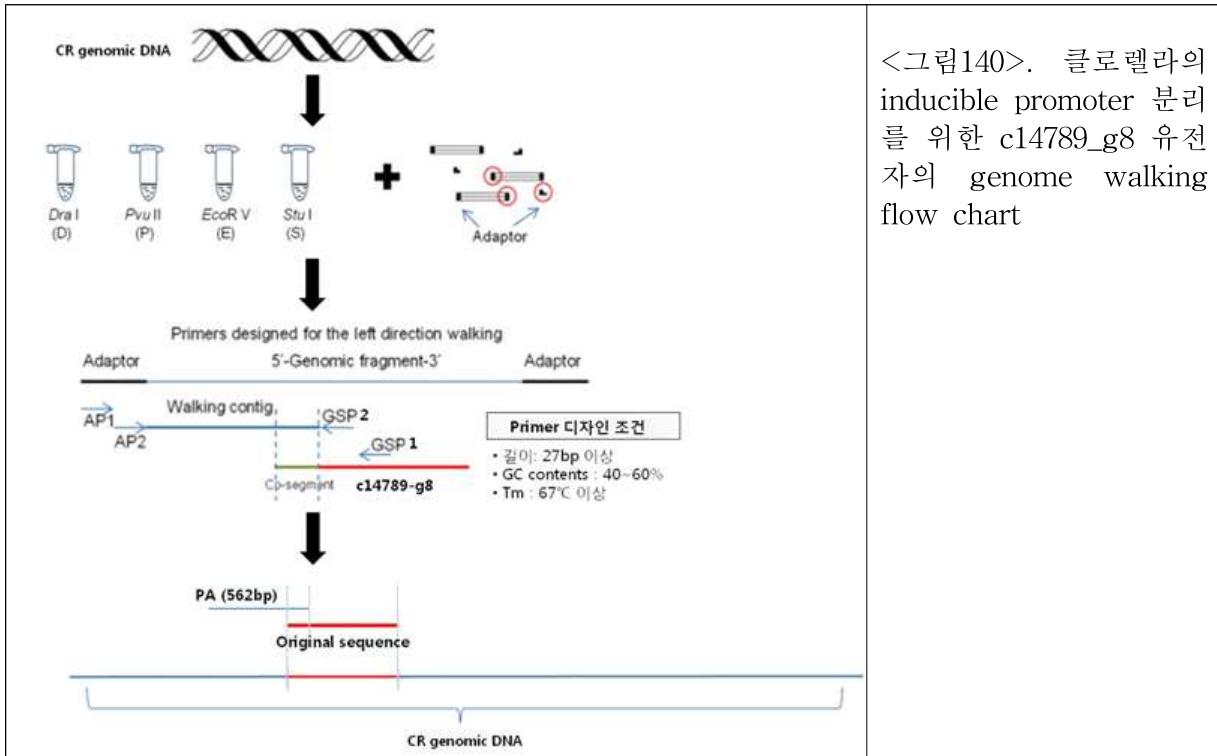
다. 이에 glucose 소모에 따른 유전자 profile의 변화를 확인하기 위하여 wild type 클로렐라를 5L jar fermentor에서 heterotrophic culture하는 과정에서 대수증식기의 샘플과 당 공급 제한 이후 엽록소 함량이 증가하는 시점의 샘플을 각각 취하여 NGS (Next Generation Sequencing) 기법을 이용한 total RNA를 분석하였다. 숙성 전(당 공급/ 세포 성장)과 숙성 후 (당 제한/엽록소 증가)의 클로렐라 샘플을 채취하여 total RNA를 분리하고 염기서열을 분석한 뒤 분석된 염기서열의 Data base를 비교하여 숙성 전과 후의 유전자 발현량 차이를 보이는 DEG (Differential Expressed Genes)을 선발하였다. DEG 중 증감에 따른 절대값  $|2|$  이상의 유전자를 sorting하여 4605개의 up-fold된 유전자와 4431개의 down-fold된 유전자를 확인하였고 가장 높게 up-fold된 유전자 중 starvation 이후 108배 증가한 c14789\_g8에 대한 promoter를 분리하기 위해 genome walking이라는 방법을 통해 upstream sequence를 확보하여 발현벡터를 디자인하고자 하였다.

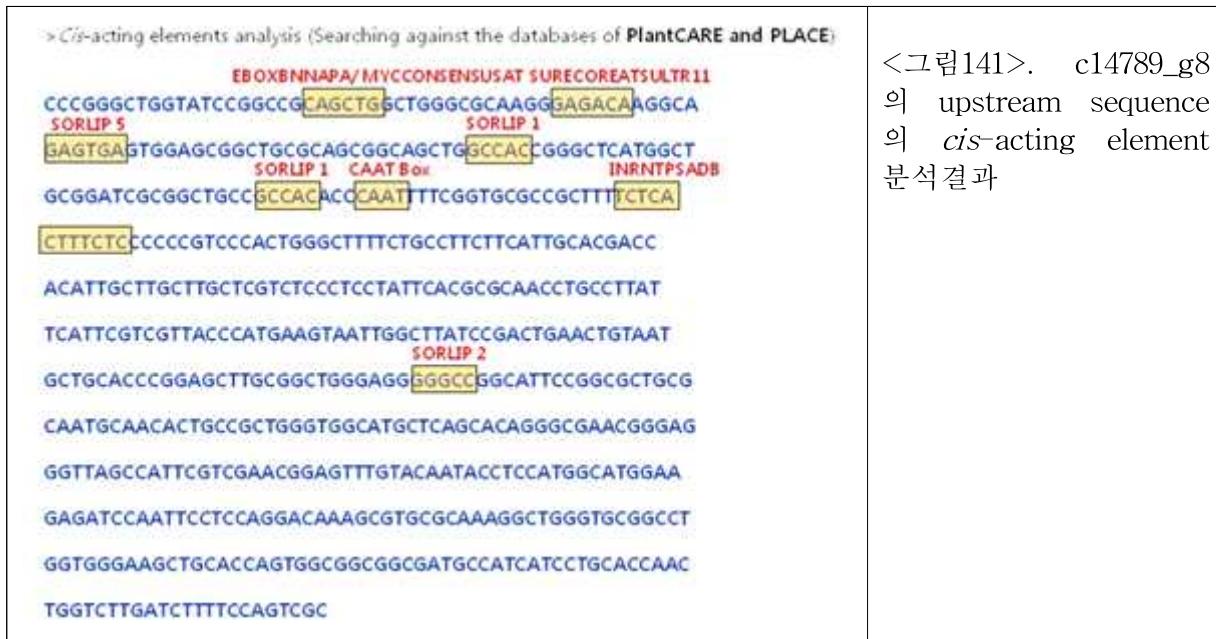
- 클로렐라 genomic DNA 분리 및 5'-upstream region 확인을 위한 genome walking PCR 수행
  - 클로렐라의 genomic DNA를 추출하기 위해 세포에서 배지를 제거하고 액체질소를 넣어 세포를 얼린 상태로 막자로 곱게 간 후, DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)의 protocol에 따라 추출하였다. 이후  $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 genomic DNA를 10unit의 DraI, EcoRV, PvuII, StuI을 이용하여 blunt 말단이 생기도록  $37^\circ\text{C}$ 에서 16시간 이상 처리하였고, NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Clontech, USA)를 이용하여 정제하였다. 이 중  $4.8\mu\text{L}$ 를 genome walker Adaptor fragment (Clontech, USA)와 ligation하였으며, Adaptor Primer 1 (AP1)와 Gene Specific Primer 1(GSP1)로 1차 PCR을 수행하였으며, 1차 PCR 반응조건은  $94^\circ\text{C}$ 에서 25초;  $72^\circ\text{C}$ 에서 3분 조건으로 7 cycles 수행 후,  $94^\circ\text{C}$ , 25초;  $67^\circ\text{C}$ , 3분 조건으로 32 cycles 수행하였으며, 추가적으로  $67^\circ\text{C}$ , 7분 1회 수행한 후,  $4^\circ\text{C}$ 로 저하시켜 반응을 종결시켰다. 1차 PCR 산물을 1/50 회석하여 AP2와 GSP2로 nested 2차 PCR을 수행하였으며, 반응 조성은 1차 PCR 반응 조성과 같이 수행하였으며, nested 2차 PCR의 반응은  $94^\circ\text{C}$ 에서 25초;  $72^\circ\text{C}$ 에서 3분 조건으로 5 cycles 수행 후,  $94^\circ\text{C}$ , 25초;  $67^\circ\text{C}$ , 3분 조건으로 25 cycles 수행하였으며, 추가적으로  $67^\circ\text{C}$ , 7분 1회 수행한 후,  $4^\circ\text{C}$ 로 저하시켜 반응을 종결시켰다. PCR 결과를 확인하고자 1.5% Agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.
  - 1차와 2차 PCR 반응에서 모두 확인된 밴드는 agarose gel에서 잘라 NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Clontech, USA)를 이용하여 정제하였다. 회수한 DNA를 pGEM/T-easy (Promega, USA)에 cloning 한 후 sequence 분석을 의뢰하여 sequence를 확보하였다.
  - 확보된 sequence 내 cis-acting-regulatory elements를 분석하기 위해 Plant CARE and PLACE Databases 시스템을 통해 sequence를 분석하였다.



- 클로렐라의 glucose에 의해 조절되는 inducible promoter를 찾아내기 위해 클로렐라 genomic DNA를 추출한 후, blunt 말단이 생성될 수 있도록 각각의 *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Stu*I 제한 효소를 이용하여 자른 후, genome walker adaptor를 ligation하여 클로렐라 genomic DNA library를 제작하였다(그림139). 속성 전 대비 108배 증가한 contig 14789\_g8을 target으로 AP1과 AP2, GSP1과 GSP2 primer를 이용하여 genome walking을 수행한 결과 *Pvu*II 제한 효소로 만든 클로렐라 genomic DNA library에서 약 0.6kb의 DNA 밴드를 확인하였다.

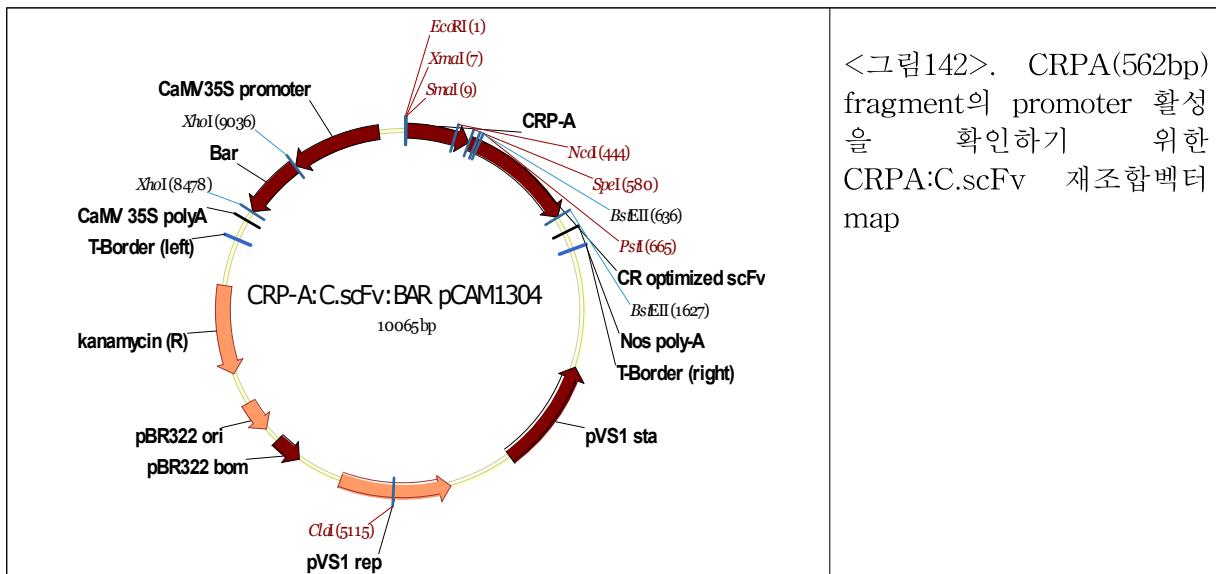
이를 pGEM T-easy 벡터(Promega, USA)에 클로닝한 후 염기서열을 확인한 결과, contig 14789\_g8의 5' upstream sequence 562bp 얻었고(그림140), 이를 CRPA라 명명하였다. PlantCARE와 PLACE database를 이용하여 searching한 결과 위와 같은 결과를 얻었다(그림141).





<그림141>. c14789\_g8의 upstream sequence의 *cis*-acting element 분석 결과

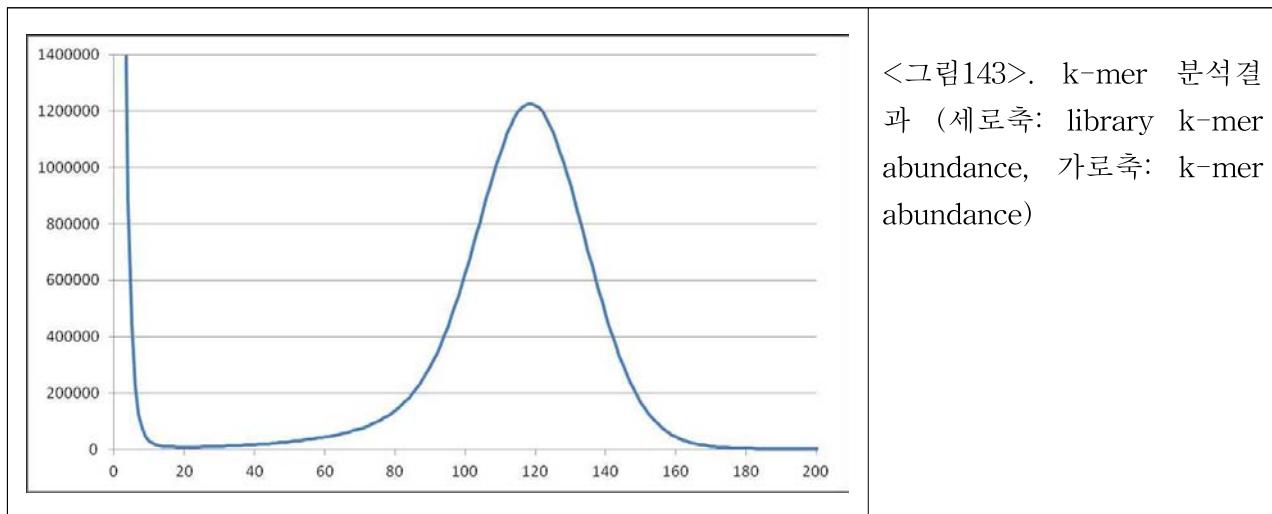
- Genome walking을 통해 확보한 CRPA(562bp) fragment의 promoter 활성을 확인하기 위해 binary vector인 pCAMBIA1304 (<http://www.cambia.org>) 발현 벡터 내 CaMV35s promoter 대신 CRPA fragment를 각각 EcoRI과 SpeI 제한효소 인식부위에 삽입하여 제작하였다. 이 때 각각의 fragment에 의해 발현 조절되는 유전자로 codon optimized scFv (C.scFv) 유전자를 삽입하여 CRPA:C.scFv로 명명한 발현 벡터를 제작하였다(그림 142). 재조합된 발현 벡터는 Agrobacterium tumefaciens LBA4404와 GV3101에 형질전환 후, 현재 클로렐라에 형질전환을 시도하고 있다.



<그림142>. CRPA(562bp) fragment의 promoter 활성을 확인하기 위한 CRPA:C.scFv 재조합 벡터 map

- 현재 지속적인 형질전환 시도 후 균주 선별을 진행 중에 있으며, 보다 정확한 유전 정보를 통한 클로렐라의 inducible promoter 확보를 위해 클로렐라 균주의 genomic DNA full sequencing이 진행하였다.

- NGS 기법을 활용한 클로렐라의 genomic DNA sequence 확보
  - 클로렐라 균주의 genomic DNA 추출 및 library를 제작 후, 5Gb (150bpX2) 방식으로 sequencing을 진행하였으며 총 13Gb가 생산되었다. 이를 jellyfish라는 프로그램을 이용하여 k-mer 분석을 진행하였다. k-mer 분석을 통해 genome size 예측, coverage, 샘플의 오염유무 및 heterozygosity 등을 확인할 수 있다(그림143).



- k-mer 분석을 통해 예측된 클로렐라의 genome size는 50,626,656bp로 약 50.6 Mb로 확인되었으며, coverage는 118X로 예측된 genome sequence의 신뢰도가 적합하게 확인되었다.
- SOAPdenovo2를 사용하여 Denovo assemble한 결과 contig 33,300개와 scaffold 1,139개가 확보되었고, gap-filling을 위한 추가적인 실험을 진행하였다.

□ 항-바이러스 재조합 단백질에 대한 안전성 평가

- 항-바이러스 재조합 단백질에 대한 단회투여 독성 평가

1) 연구개요

항-바이러스 재조합 단백질 3D8 scFv에 대한 독성 여부 파악을 위해 동물시험 전문업체인 (주)켐온에 의뢰하여 단회투여 독성시험을 진행하였다. 시험군은 3D8 scFv 재조합 단백질을 500, 1000, 그리고 2000 mg/kg으로 투여하는 시험물질 투여군 및 멀균주 사용 수만을 투여하는 부형제대조군으로 구성하였으며, 군당 암수 각 5마리에 단회 경구 투여하였다. 시험물질 투여군에서 사망률, 일반증상, 체중변화 및 유판적 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.

## 2) 연구재료 및 방법

### ① 시험군 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)
G1	M/F	5/5	1~5/21~25	10	0
G2	M/F	5/5	6~10/26~30	10	500
G3	M/F	5/5	11~15/31~35	10	1000
G4	M/F	5/5	16~20/36~40	10	2000

G1:부형제대조군(멸균주 사용수)

### ② 투여량의 설정

본 시험물질을 300 및 1000mg/kg의 용량으로 ICR 마우스에 예비 경구 투여한 결과, 사망 및 시험물질에 의한 이상증상은 관찰되지 않았다. 상기 결과를 바탕으로, 가용한 시험물질의 양을 고려하여 2000mg/kg을 고용량군으로 설정하고, 아래로 공비 2로 두 군을 두었으며, 멸균주 사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

### ③ 군 분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여 ‘시험군 구성’ 표와 같이 무작위 분배하였다.

### ④ 투여

투여경로 및 선택이유	경구 투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	단회 투여하였으며, 투여는 13:59 이전에 실시하였다.
투여액량 산출	투여 당일에 측정한 절식 체중을 기준으로 산출하였다.
투여방법	투여 전에 약 3~4시간 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경배부 피부를 고정하고 경구 투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다. 시험물질을 투여하고 약 2시간 경과 후에 사료를 재급여 하였다.

### ⑤ 관찰 및 검사

- 일반증상 : 모든 동물에 대하여 일반증상의 종류, 발현일, 정도를 1일 1회 이상 관찰하였고, 개체 별로 기록하였다. 단, 투여당일에는 투여 후 1시간까지는 지속적으로 그 후부터는 1시간 간격으로 5시간 동안 관찰하였다(합계 6시간). 투여 일을 Day 1으로 설정하였고, 일반증상 관찰은 Day 15까지 실시하였다.
- 체중 : 모든 동물에 대하여 Day 1(투여 전), 2, 4, 8, 그리고 15에 측정하였다.
- 부검 : Day 15에 모든 동물을 CO2를 이용하여 흡입 마취시킨 후, 개복하여 후대정백 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시킨 후, 육안으로 모든 장기를 검사하였다.

### ⑥ 통계 분석

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS Statistics 22 for Medical Science를 이용하였으며 유의수준은  $P<0.05$ 로 설정하였다. 체중에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였고, 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였다. ANOVA 결과가 유의하면 등분산인 경우

Duncan으로 사후 검정을 실시하여 부형제대조군과 유의한 차이를 나타내는 군을 확인하였다. 본 보고서에서 P-value와 함께 기재된 ‘유의한’은 부형제대조군과 비교하였을 때 통계학적인 유의성을 나타낸다는 의미이다.

### 3) 연구결과

① 사망 : 사망동물은 관찰되지 않았다(표43).

<표43>. 시험물질 투여 후 사망여부

Groups (mg/kg)	No.dead/ No.dosed	Mortalities									ALD Value	
		Days after Dose										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-15		
G1 (0)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Male	
G2 (500)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>2000mg/kg	
G3 (1000)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (2000)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Female												
G1 (0)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>2000mg/kg	
G2 (500)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (1000)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (2000)	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

ALD: Approximate Lethal Dose

② 일반증상 : 이상 증상은 관찰되지 않았다(표44).

<표44>. 일반증상 측정 결과

Days	Signs	Clinical signs				Groups (mg/kg)	
		Groups (mg/kg)		Groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)		
Male							
1-14	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5		
15	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5		
	Terminal sacrifice	5/5	5/5	5/5	5/5		
Female							
1-14	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5		
15	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5		
	Terminal sacrifice	5/5	5/5	5/5	5/5		

The day of administration was designated Day 1.

Number of animals with the sign/Number of animals examined.

③ 체중 : 3D8 scFv 재조합 단백질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 그 외, 500mg/kg 투여군 수컷에서 증체량이 유의하게( $P<0.05$ ) 높았고, Day2에 500, 1000, 그리고 2000mg/kg 투여군 암컷에서, Day 4에 500 및 2000mg/kg 투여군 암컷에서 체중이 유의하게( $P<0.05$ ) 높았으나, 이들은 용량-반응 상관성이 없었고, (주)켐온의 Historical reference data의 정

상법위 내의 변화로 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단한다(표45).

<표45>. 체중변화 측정 결과

Days	Body weight (g)			
	Groups (mg/kg)			
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)
Male				
1	31.28±1.17	31.88±1.10	31.81±1.19	31.88±1.27
2	33.02±0.74	33.53±1.34	32.87±1.30	32.66±0.89
4	33.14±0.86	33.45±1.61	32.90±1.01	33.17±1.26
8	33.34±0.53	34.12±1.64	33.01±1.17	33.65±1.03
15	35.09±1.07	37.15±1.16	35.18±1.61	35.93±0.87
Gain	3.81±1.20	5.27±0.13*	3.37±1.22	4.05±0.94
N	5	5	5	5
Female				
1	24.78±0.92	25.60±0.48	25.10±0.99	25.46±1.25
2	25.34±0.77	26.37±0.51*	26.72±0.72*	26.61±0.86*
4	25.03±1.04	26.85±0.79*	25.62±1.21	26.57±0.85*
8	26.08±0.95	26.98±1.47	26.45±1.14	27.61±1.06
15	28.38±1.34	28.87±2.50	29.49±1.69	29.31±1.49
Gain	3.60±0.77	3.27±2.05	4.39±1.05	3.86±0.63
N	5	5	5	5

The day of administration was designated Day 1.

Data are expressed as mean ±S.D.

Gain is body weight on Day 15-body weight on Day 1.

\* Significant difference at P<0.05 levels compared with the Vehicle control.

④ 부검소견 : 육안적 이상소견을 관찰되지 않았다(표46).

<표46>. 부검 후 육안적 이상 확인 결과

Organs	Findings	Necropsy findings			
		Groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (2000)
Male					
No gross findings		5	5	5	5
N		5	5	5	5
Female					
No gross findings		5	5	5	5
N		5	5	5	5

이상의 결과로 보아, 시험물질 3D8 scFv 재조합 단백질을 ICR 마우스에 단회 경구 투여하였을 때 사망이 관찰되지 않았으므로 본 시험조건 하에서 개략의 치사량 (Approximate Lethal Dose:ALD)은 암수 모두 2000mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

## ○ 항-바이러스 재조합 단백질 3D8 scFv의 물리화학적 안정성 시험

### 1) 연구개요

유전자 재조합생물체 (GMO)를 식품으로 사용하기 위해서는 2003년 코덱스국제식품규격 위원회 (Codex Alimentarius Commission)의 규정 및 가이드라인에 따라 인체 건강 위해에 대한 안전성을 검증받도록 하고 있다. 안전성 평가에는 삽입된 유전자에 의한 직접적인 영향과 새로운 유전자를 도입한 결과로 생길 수 있는 의도하지 않은 영향 모두를 포함하고 있으며, 특히 알레르기 유발성은 코덱스의 평가방법에서도 별도의 항목을 둘 정도로 중요하게 여기고 있다.

알레르기 유발성 평가는 1993년 OECD에서 발표하여 2003년 국제식품규격위원회의 ‘안전성평가지침’에도 도입되어 있는 ‘실질적 동등성’ 개념에 입각하여 유전자재조합생물체와 기존 생물체간의 차이가 나는 부분에 대해서 독성 및 알레르기성 등의 잠재적 영향을 평가하는 것으로 권고 사항은 다음과 같다. 신규도입단백질의 특성을 평가하기 위하여 이미 알려져 있는 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성 및 그 구조의 유사성을 분석하고 조리, 가공에서의 열에 대한 안전성 및 소화과정에서의 효소나 산에 대한 안정성 등을 검토하여 아미노산의 구조 유사성이 확인된 알레르겐은 환자의 혈청으로 알레르기 반응 검사를 하여 알레르기 유발성을 평가한다.

국내에서도 2004년부터 이 원칙을 근간으로 한 ‘유전자재조합식품 등의 안전성 평가 심사 등에 관한 규정’을 제정하여 시행하고 있으며, 이에 따라 상기의 방법으로 유전자변형생물체의 알레르기 유발성을 평가하도록 권고하고 있다. 이번 시험은 알레르기 유발성 평가 사항 중 도입 단백질의 열에 대한 안정성 및 소화과정에서의 안정성을 인공위액, 인공장액, 열처리 등의 물리화학적 처리를 통하여 평가하고자 하였다.

### 2) 연구재료 및 방법

#### ① 인공위액 소화시험 (SGF: Simulated Gastric Fluid assay)

재조합 단백질 3D8 scFv의 소화효소 분해능을 조사하기 위하여 인공위액 (SGF) 소화시험을 수행하였다. 인공위액은 pepsin (SIGMA)을 0.03M NaCl (pH1.2)용액에 3.2mg/ml로 제조하였으며, 제조한 인공위액은 1.5mL tube에 200ul 씩을 넣어 37°C 항온수조에서 예열하였다. 각 인공위액이 들어 있는 tube에 시험 단백질(5mg/mL in PBS) 10ul를 혼합(pepsin: protein=13(w): 1(w))하여 37°C 항온수조에서 0, 5초, 10초, 30초, 1분, 5분, 10분, 30분, 60분 간격으로 반응시켰고, 반응시간 후 바로 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75ul를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응시간 0인 시료는 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 pepsin을 불활성화 시킨 후 실험을 수행하였다. 다음으로 5x SDS sample buffer 70ul를 첨가하여 95°C에서 10분간 가열한 후 SDS PAGE를 실시하여 coomassie brilliant blue 염색법으로 단백질 분해여부를 관찰하였다. 정확한 결과를 확인하기 위하여 동일한 조건에서 SDS-PAGE를 실시한 후 PVDF membrane에 단백질을 transfer해주고 3D8 scFv에 특이적으로 결합하는 anti-scFv 다항체를 사용하여 Western blot 분석을 실시하였다.

#### ② 인공장액 소화시험 (SIF: Simulated Intestinal Fluid assay)

재조합 단백질 3D8 scFv의 소화효소 분해능을 조사하기 위하여 인공장액 (SIF) 소화시험을 수행하였다. 인공장액은 pancreatin(SIGMA)을 0.05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.5)용액에 10mg/ml로 제조하였으며, 제조한 인공장액은 1.5mL tube에 64ul 씩을 넣어 37°C 항온수조에서 10분간 예열하였다. 각 인공장액이 들어 있는 tube에 시험 단백질(5mg/mL in

PBS) 10ul를 혼합(pepsin: protein=13(w): 1(w))하여 37°C 항온수조에서 0, 5초, 10초, 30초, 1분, 5분, 10분, 30분, 그리고 60분 간격으로 반응시켰고, 반응시간 후 바로 5X SDS sample buffer를 넣고 95°C에서 10분간 처리하여 반응을 정지시켰다. 반응시간 0인 시료는 95°C에서 10분간 가열하여 pancreatin을 불활성화 시킨 후 실험을 수행하였다. 인공장액 소화시험이 끝난 시료들은 SDS-PAGE를 실시하여 Coomassie brilliant blue 염색법으로 단백질 분해여부를 관찰하였다. 정확한 결과를 확인하기 위하여 동일한 조건에서 SDS-PAGE를 실시한 후 PVDF membrane에 단백질을 transfer해주고 3D8 scFv에 특이적으로 결합하는 anti-scFv 다항체를 사용하여 Western blot 분석을 실시하였다.

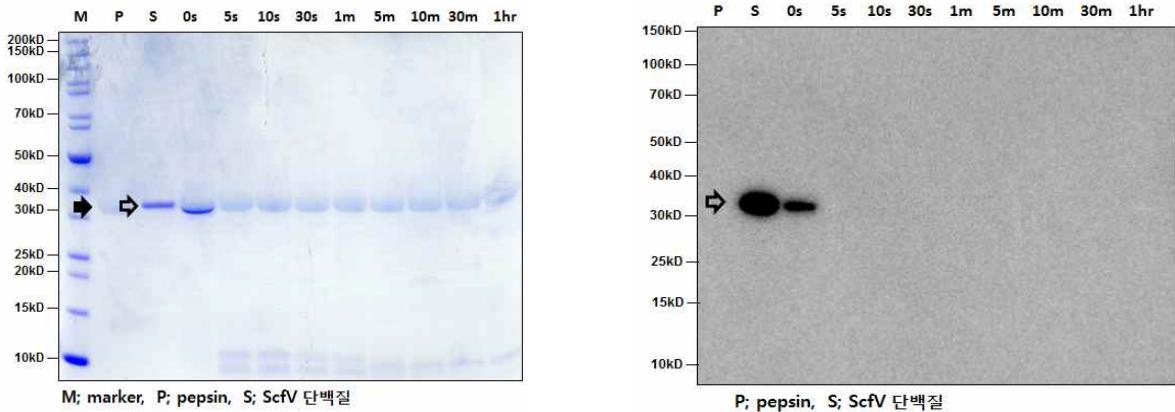
### ③ 열 안정성 시험

재조합 단백질 3D8 scFv의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 열 안정성 시험을 수행하였다. 1.5ml tube에 시험 단백질 (1mg/ml in PBS) 40ul 씩을 준비한 후 100°C에서 0분, 10분, 20분, 30분, 60분, 90분, 120분, 그리고 150분의 순서대로 가열해주었다. 반응 시간 후 즉시 tube를 ice로 급랭시켜 반응을 정지시킨 후 5X SDS sample buffer를 첨가하여 95°C에서 10분간 가열하였다. 열 안정성 시험이 끝난 시료들은 SDS-PAGE를 실시하여 Coomassie brilliant blue 염색법으로 단백질 분해여부를 관찰하였다. 정확한 결과를 확인하기 위하여 동일한 조건에서 SDS-PAGE를 실시한 후 PVDF membrane에 단백질을 transfer해주고 3D8 scFv에 특이적으로 결합하는 anti-scFv 다항체를 사용하여 Western blot 분석을 실시하였다.

## 3) 연구결과

### ① 인공위액(SGF) 소화 시험

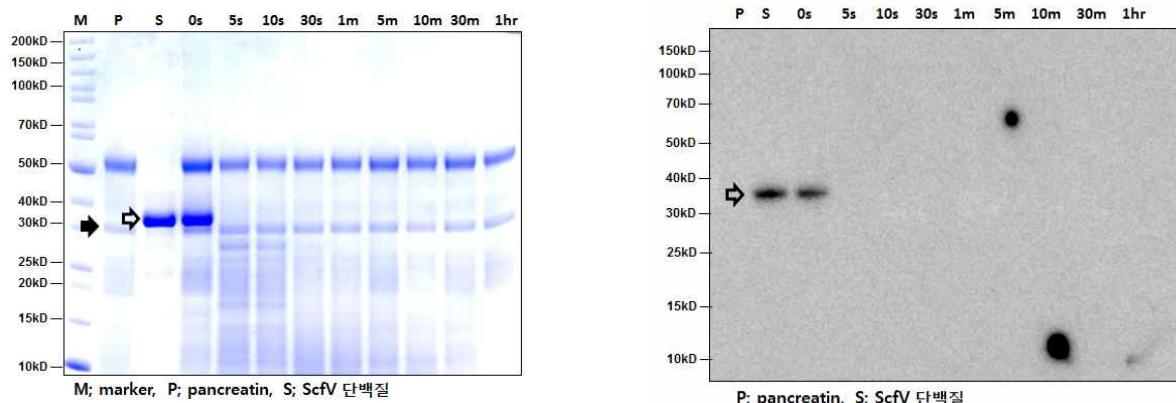
3D8 scFv 단백질의 인공위액(SGF)에서의 소화성 시험은 0분부터 60분까지 9개의 시간별로 처리한 시료를 SDS-PAGE 후, Coomassie 염색과 Western blot 분석을 실시하였다. 그 결과 약 38 kDa의 ScfV 단백질은 5초 이내에 완전히 분해되어 SDS-PAGE 상에서 뿐만 아니라 Western blot 분석에서도 관찰되지 않았다(그림144). 이러한 결과는 3D8 scFv 단백질이 위액에서 쉽게 분해되어 위장계통에 노출이 적을 뿐 아니라 흡수가 일어나는 장관벽에 도달할 가능성이 적다는 것을 의미하며, 이는 곧 scFv 단백질을 식품이나 사료첨가제로 이용할 시 알레르기 유발인자로 작용할 가능성은 희박한 것으로 분석된다.



<그림144>. 인공장액 소화시험에서 3D8 scFv 단백질의 SDS-PAGE (좌) 및 Western blot detection (우) P와 검정화살표: pepsin, S와 투명화살표: 3D8 scFv

### ② 인공장액(SIF) 소화 시험

3D8 scFv 단백질의 인공장액(SIF)에서의 소화성 시험은 0분부터 60분까지 9개의 시간별로 처리한 시료를 SDS-PAGE 후, Coomassie 염색과 Western blot 분석을 실시하였다. 그 결과 약 38 kDa의 3D8 scFv 단백질은 5초 이내에 완전히 분해되어 SDS-PAGE 상에서 관찰되지 않았다[그림145(좌)]. 더 정확한 결과를 도출하기 위해 실시한 western blot 분석에서도 위 결과와 마찬가지로 인공장액 처리 시 3D8 scFv 단백질이 5초 이내에 완전히 분해되는 것을 알 수 있었다[그림145(우)]. 이러한 결과는 3D8 scFv 단백질이 장액에서 쉽게 분해되어 위장계통에 노출이 적다는 것을 의미하며, 이는 곧 3D8 scFv 단백질이 식품 혹은 사료첨가제로 이용 시 알레르기 유발인자로 작용할 가능성은 희박한 것으로 분석된다.

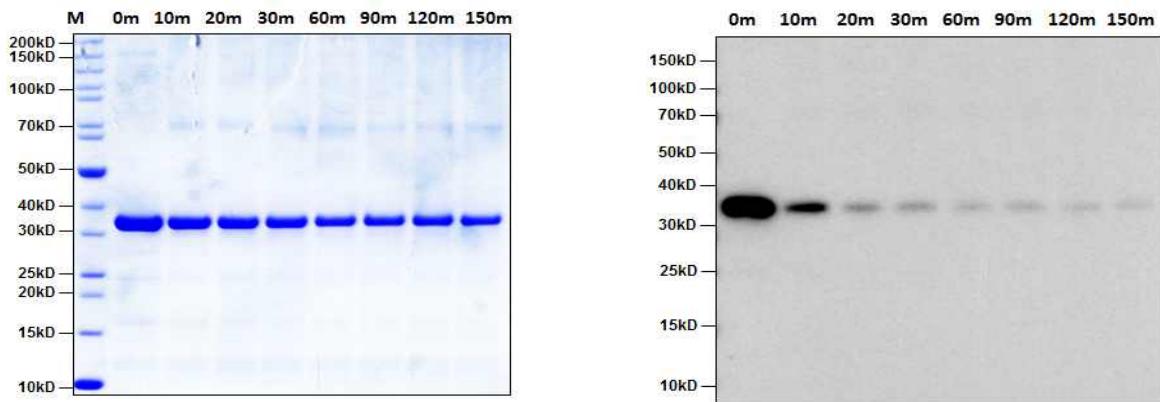


<그림145>. 인공장액 소화시험에서 ScfV 단백질의 SDS-PAGE (좌) 및 Western blot detection (우) P와 검정화살표: pancreatin, S와 투명화살표: 3D8 scFv

### ③ 열 안정성 시험

일반적으로 식품에 열을 가할 경우 식품 내 단백질의 구조변형, 변성 또는 응집 등의 반

응이 일어나 알레르겐의 반응성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나, 몇몇의 주요 식품 알레르겐의 경우 열에 매우 안정하여 열처리 후에도 단백질의 구조가 변형되지 않으며, 항원성 또한 유지하여 특이 IgE와 결합하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 잠재적인 식품 알레르겐으로써 3D8 scFv 단백질이 열처리 과정에 의해 구조의 변형 또는 변성을 초래하는지 알아보기 위해 100°C에서 8개의 시간 별로 처리하여 열안정성 시험을 수행하였으며, 그 결과 SDS-PAGE 상에서 150분까지 3D8 scFv 단백질의 주요 band가 관찰되었으며[그림146(좌)], Western blot에서도 열처리 시간이 길어질수록 3D8 scFv 단백질이 분해되는 양상을 보였으나 150분 처리 시까지 주요 band가 관찰되어 도입단백질인 3D8 scFv가 열에 의해 쉽게 분해되지 않는 것을 알 수 있었다[그림146(우)]. 이러한 결과는 형질전환생물체의 주요 선발마커로 사용하고 있는 비 알레르기성 단백질인 PAT 단백질과 유사한 결과로 3D8 scFv 단백질이 알레르기 유발한 가능성은 없는 것으로 판단된다.



<그림146>. 열 안정성 시험에서의 SDS-PAGE (좌) 및 Western Blot detection (우)

산업적 생산을 위한 Scale-up 테스트

최적수율 도출을 위한 공정 최적화

1) 연구개요

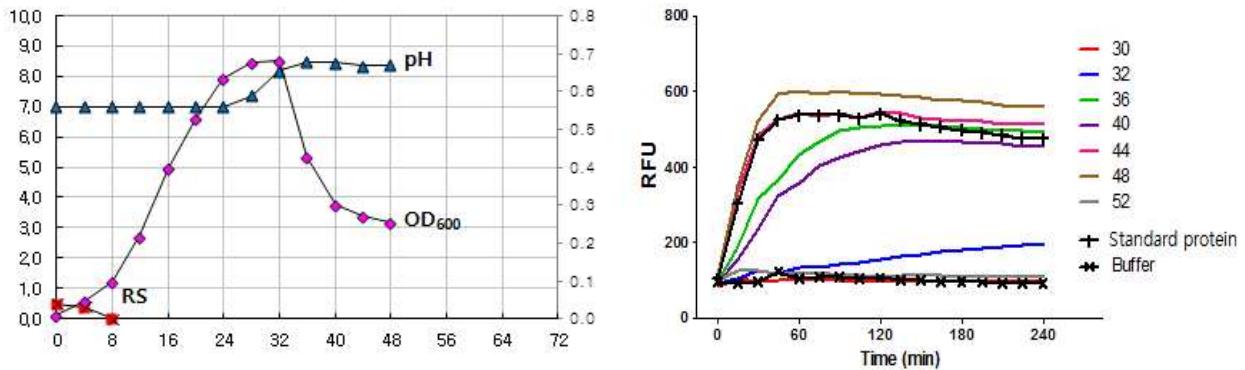
3D8 scFv 재조합 단백질을 이용한 사료첨가제로서의 산업적 생산을 위해서는 단백질 수율을 증가시키는 것뿐만 아니라, 단백질 자체의 핵산가수분해 능을 유지 혹은 향상시키는 것도 중요하다. 본 파트에서는 최적수율 도출 및 단백질 활성을 유지시키기 위해 배양과정 중 단백질 활성에 영향을 미칠 수 있는 요인을 알아보고자 하였다.

① 자가유도 (Auto induction)발현 시간에 따른 단백질 발현 및 활성변화 확인

*E. coli* 내 자가 유도 프로토콜은 T7 promoter 기반 발현 시스템으로 구축되었으며, 이는 이단계 생장 (diauxic growth)의 조건 하에서 glucose, glycerol 및 lactose의 혼합물에서 lac operon 조절 인자들의 기능에 기반한다. 초기 생장 기간 동안, glucose가 우선적으로 탄소원으로 이용되고 대체적 탄소이용 경로의 억제 및 lacI와 lac operator 사이의 상호작용에 의해 단백질 발현이 낮다. glucose가 고갈되면, 대사산물 억제작용이 풀려 세포대사가 lactose 및 glycerol의 유입 및 소비 쪽으로 변화가 일어난다. lactose는  $\beta$ -galactosidase에 의해 allolactose로 변환되며, 이는 lac operon의 유도 기능을 한다.

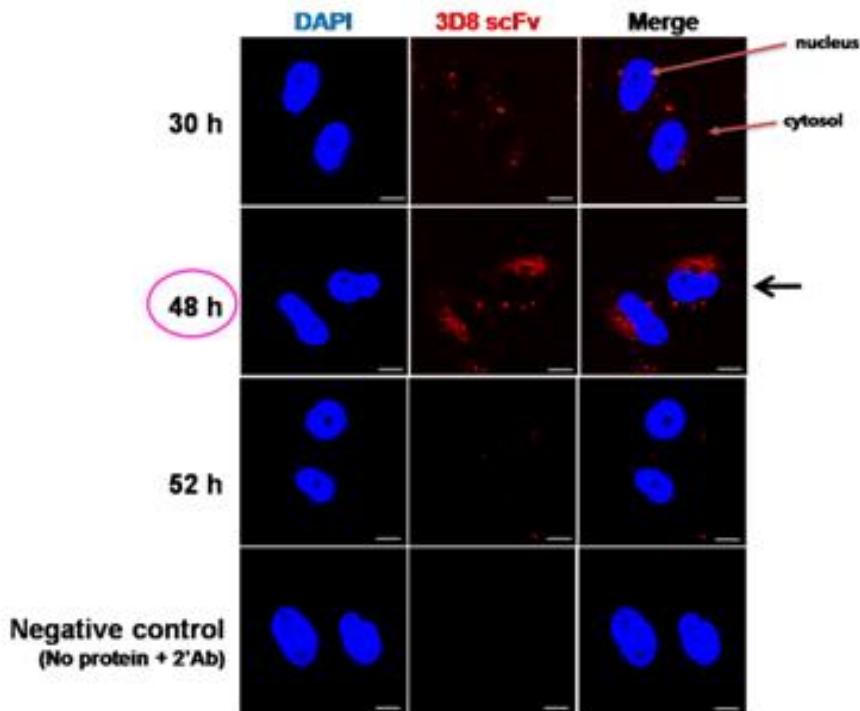
본 연구과제의 2차년도 연구성과로 3D8 scFv 재조합 단백질을 발현 양상을 증가시키기 위해 *E.coli* BL21 (DE3) 균주를 숙주 세포로 자가유도 발현 시스템을 구축하였으며, 발현량은 40mg/L 이상으로 생산할 수 있었다.

본 연구에서는 세포 내 3D8 scFv 단백질의 용출을 유도하기 위해 발현유도 시간을 연장하여 시간 연장에 따른 단백질의 발현량 및 활성변화를 확인하고자 하였다. 발현유도 시작부터 20시간까지 4시간 간격으로 배양액을 채취하여 상등액 내 발현된 3D8 scFv 단백질의 활성을 FRET assay를 통해 확인하였다. 실험 결과 자가 발현 시작 (배양시간 32hrs) 후 16시간 (배양시간 48hrs)까지 활성이 최대로 유지되는 것을 확인하였으나, 그 이후 활성이 저하되었고(그림147), 이는 균주의 death phase 내 세포가 깨지면서 cytoplasm 내 활성이 없는 unfolding 형태의 단백질이 용출되었을 가능성을 유추해볼 수 있었다.



<그림147>. 3D8 scFv 재조합 단백질 발현 미생물의 배양 차트(좌) 및 배양시간에 따른 3D8 scFv 정제 단백질의 활성변화

또한 3D8 scFv 단백질의 핵산가수분해 활성과 세포 내 침투 능을 확인한 결과, 활성이 최대인 자가발현 유도 후 16시간(배양시간 48hrs) 때의 정제단백질이 세포 내 침투능이 높은 것을 확인하였으며, 활성이 저하된 정제 단백질 (배양시간 30, 52hrs)은 세포 내 침투능이 낮은 것으로(그림148) 단백질의 활성과 세포 내 침투 능의 상관관계를 확인할 수 있었다. 이는 생산 공정 확립 시 단백질 활성 유지를 위한 요인으로 배양시간을 고려해야 함을 본 실험을 통해 확인할 수 있었다.

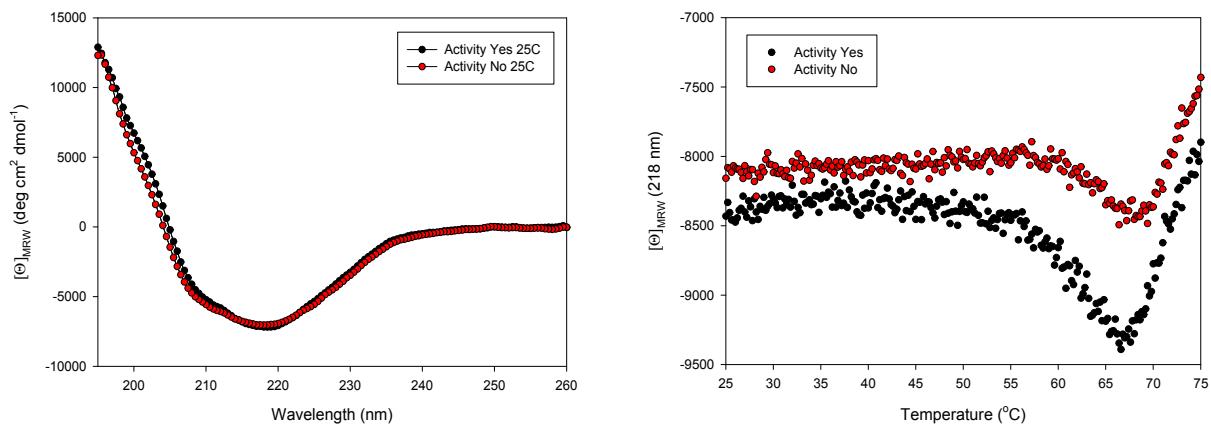


<그림148>. 배양시간에 따른 3D8 scFv 정제 단백질(배양시간 30, 48, 52h)의 세포 내 침투 능

## ② 3D8 scFv 재조합 단백질의 활성 유무에 따른 이차구조 및 열안정성 분석

3D8 scFv 재조합 단백질의 활성 유무에 따라 단백질의 구조적 차이가 있는 확인하기 위해 circular dichroism 분석을 통해 단백질의 이차구조 및 열안정성을 분석하였다. 활성이 있는 단백질 (Activity Yes)과 없는 단백질 (Activity No)의 spectrum은 대체적으로 일치하여, 전체적인 이차구조는 유사하지만 210nm 이하의 CD signal 차이가 보여[그림 149(좌)] 미세한 구조적인 차이가 있는 것으로 사료되었다.

Cuvette 온도를 25-75°C까지 향상시키면서 218nm의 CD signal을 monitoring 한 결과 두 단백질 모두 유사한 thermal unfolding profile을 보였다. 두 단백질 모두 55°C에서 218nm의 CD signal이 감소되기 시작하여 67°C 부근에서 최소를 보였고, 이후 급격히 상승하였으므로 열에 의한 변성이 시작되기 전  $\beta$ -sheet의 content가 증가되는 단백질로 판단되었다. 단, CD signal의 차이는 단백질 농도의 차이에 의한 것으로 보였고 두 단백질의 대략적인 Tm은 약 60°C로 비교적 열 안정성이 높고 열안정성이 유사하므로 구조 및 folding status의 차이는 크지 않다고 판단되었다[그림149(우)].



<그림149>. 3D8 scFv 재조합 단백질의 활성 유무에 따른 이차구조(좌) 및 열안정성(우) 분석

- 50L Jar fermenter를 이용한 scale-up 생산 시험

### 1) 연구개요

대장균에서의 3D8 scFv 단백질 발현을 최대화하기 위해 기존 5L JF에서 50L JF로 scale-up하여 자가 유도를 통해 단백질 발현을 유도하였다.

### 2) 50L JF를 이용한 배양 및 발현 단백질의 활성 확인

pET42SV-34 발현균주는 아래 표47의 조성물이 포함된 200mL 배지에 접종하여 진탕 배양기에서 18시간 1차 종균배양 한 후, 5L JF에 접종하여 4시간 동안 2차 종균 배양하였다.

<표47>. 종균 배양 배지 조성

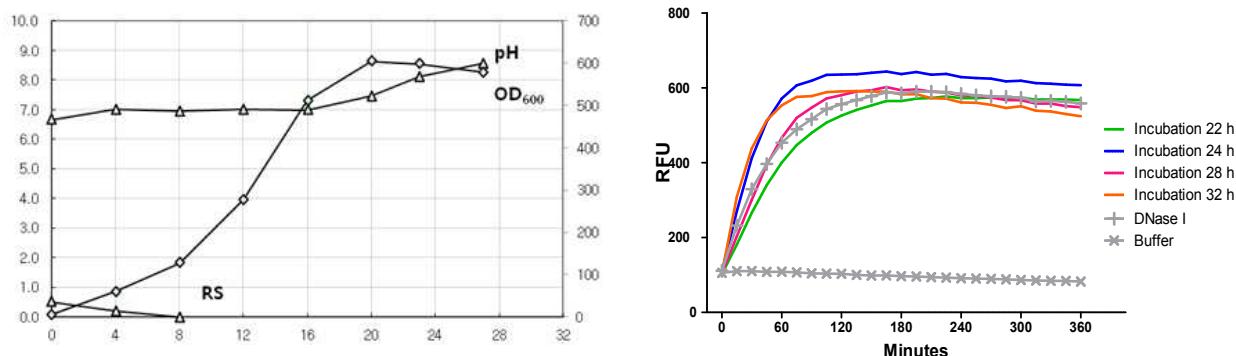
구분	내용	비고
배지조성	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5%; NaCl, 0.5%; YPA, 2%; Polypeptone, 3%	w/v
pH	7.2	
배양온도	37°C	

종균 배양 후, 아래 표48와 같은 50L JF 배양 배지 조성에서 glucose 0.5%, glycerol 5%, lactose 1% 첨가하여 3D8 scFv 재조합 단백질을 자가유도 발현하였다. 균주의 성장은 UV spectrometer를 사용하여 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 배지 내 glucose 농도는 YSI 당분석기를 이용하여 측정하였다. 배지 내 glucose, glycerol이 다소진되는 시점인 최대 성장기 (stationary phase)부터 induction이 시작되는 것을 기본으로 하였으며, 4시간마다 샘플링하여 3D8 scFv 단백질을 정제하여 FRET assay를 통해 활성 유무를 확인하였다.

## &lt;표48&gt;. 50L JF 배양 배지 조성

구분	내용	비고
배지조성	Yeast extract, 40g; YPA, 80g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 120g; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 400g; $\text{MgSO}_4$ , 20g; $\text{MnSO}_4$ 200mg; $\text{FeSO}_4$ , 200mg, $\text{ZnSO}_4$ , 200mg	20L
pH	7.0	
배양온도	26°C	
RPM	300	

50L JF 배양 시 총 배양시간은 27시간이며, 최대 세포 성장 시, OD600값은 604로 확인되었다[그림150(좌)]. 자가 유도발현이 시작된 후, 4시간마다 샘플링하여 단백질 정제 후, FRET assay를 통해 활성을 확인한 결과 유도발현 시작 후, 12시간(배양시간 32h)까지 활성이 유지되는 것을 확인하였다[그림150(우)].



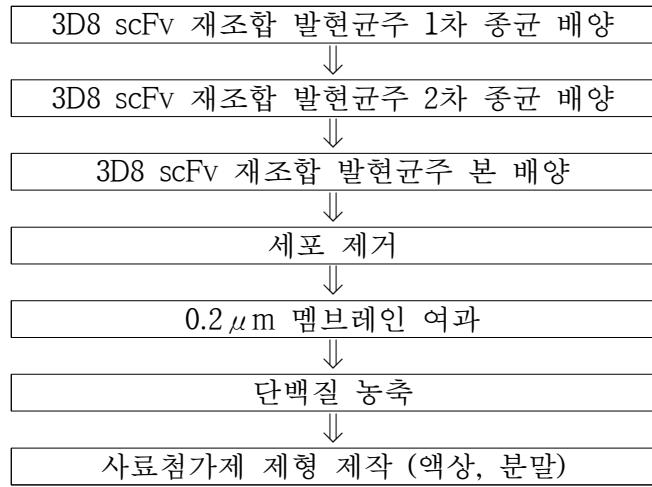
<그림150>. 50L scale fed-batch 배양 그래프 (좌) 및 배양시간 별 3D8 scFv 정제단백질의 활성유무 확인

## 3) 생산 공정별 3D8 scFv 재조합 단백질의 활성 확인

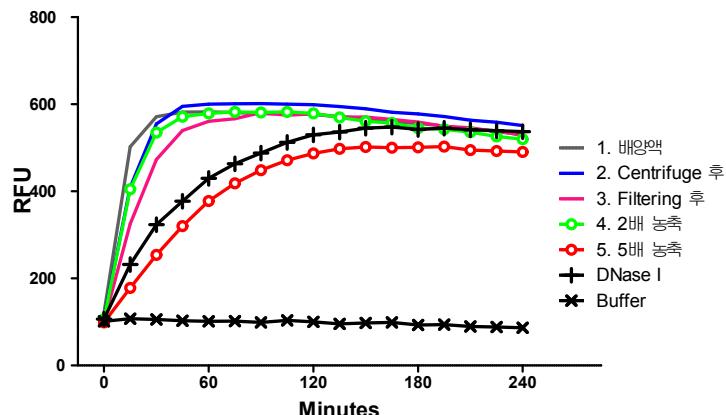
50L JF에서 성공적으로 생산된 3D8 scFv 재조합 발현균주의 배양액은 다음과 같은 사전 처리 단계를 거쳐 사료 첨가제 제형으로 제작된다(그림151). 사료 첨가제 제품화 시 최종 제품 생산까지의 단백질 활성유지는 중요하므로 각 단계별 처리 후, 샘플을 취하여 단백질 정제 후 FRET assay를 통해 활성유무를 확인하였다.

① 배양, ② 세포 제거, ③ 멤브레인 여과 단계까지는 단백질의 활성이 유지되었으나 단백질을 농축하는 과정에서 활성이 저하되는 것이 관찰되었다(그림152). 이 중 2배 농축 까지는 활성이 유지되었으나 5배 농축 시 활성이 저하되었다. 이는 멤브레인을 이용한 농축 단계에서 펌프로 인한 지속적인 압력이 3D8 scFv 재조합 단백질에 영향을 주어 활성이 저하되는 것으로 추측이 되나 활성 저하의 원인에 대해서는 추후 추가 연구를 통해 밝혀내야 할 것이며, 생산 공정상에는 활성이 계속 유지될 수 있도록 공정을 수정하여야 할 것으로 판단된다.

활성이 확인된 2배 농축 배양 상등액 중 일부는 단백질 정제를 통해 위탁기관인 건국대에서 진행된 조류인플루엔자 방어효능 평가에 시험 물질로 제공되었으며, 일부는 아래 그림과 같이 사료첨가제 샘플로 제작하였다(그림153).



<그림151>. 3D8 scFv 재조합 단백질을 이용한 사료 첨가제 제형 예상 생산 공정 단계



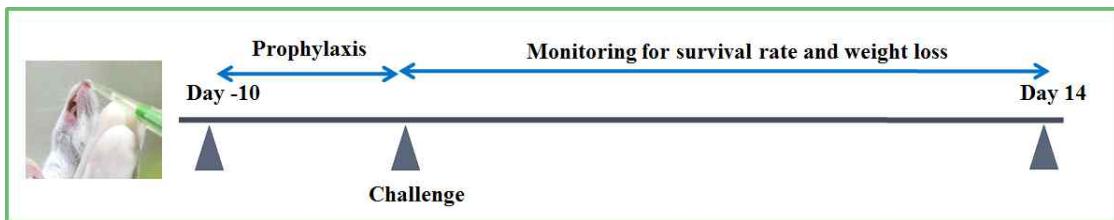
<그림152>. 생산 공정 단계별 3D8 scFv 정제단백질의 활성 유무 확인



<그림153>. 액상제형(좌) 및 분말제형(우)

□ 유산균의 항-인플루엔자 효능 검증

- 시험 동물은 체중 18-20g의 SPF 마우스 이용하였고, 시험 균주는 김치 및 된장에서 12종의 *Lactobacillus* spp와 3종의 *pediococcus* spp을 사용하였다. 시험 바이러스는 Influenza 바이러스 A/NWS/33 (H1N1) 균주를 공격접종에 이용하였다. Influenza 바이러스는 11일령 SPF 종란에서 증폭 후 -70°C 냉동보관 하였고, 바이러스 역가는 SPF 종란을 이용하여 50% egg infective dose (EID50)를 통하여 측정하였다.
- 시험 개요
  - 유산균 분리 일정 및 실험 규모에 의해 2회로 나뉘어져 실험을 수행하였고, 1차 실험에서는 11종의 유산균을, 2차 실험에서는 4종의 유산균을 마우스에 투여하여 각각 양성대조군 대비 생존율 및 음성대조군 대비 체중 변화를 통하여 효능을 측정하였다. 10일간 6회 각각 유산균을 비강접종 후, 치사량의 Influenza 바이러스(104.5EID50/mouse)를 공격접종 하였으며, 공격접종 후 2주간 폐사율 및 체중변화를 관찰하였다(그림154).



<그림154>. 유산균의 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

○ 연구결과

- 김치 및 된장에서 분리된 유산균 15종에 대한 시험 결과는 위의 같다(표49,50 및 그림 155,156). 1차 시험에서 11종의 유산균을 대상으로 치사량의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어효능 시험을 실시한 결과, 유산균 종류 별 다양한 방어효능을 나타내었으며 80%의 생존률을 나타낸 2종의 유산균을 선별하였다(표49, 그림155). 2차 시험에서 같은 효능 시험 결과, 마찬가지로 종류 별 다양한 방어효능을 나타내었으며 80% 이상 생존률을 나타낸 2종의 유산균을 선별하였다(표50, 그림156). 유산균 투여 시 생존률에서는 효능을 나타냈으나 인플루엔자 감염에 의한 체중 변화에는 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다(그림155,156).

&lt;표49&gt;. 항인플루엔자 유산균 선별 1차 시험 결과

그룹	농도 (c.f.u/ 마리) <sup>A</sup>	접 종 수	체중(g) (mean ± SD)		공격접종 결과				PI <sub>21</sub> <sup>F</sup>
			접종전	접종후	임상증상		폐사		
G1	L.plantarum	10	18.5±0.7	16.9±0.6	9/9	3	4/9	10.0	1.4
G2	L.brevis	10	18.4±0.5	18.3±0.6	9/9	3	7/9	9.8	1.8
G3	L.brevis	10	17.5±0.8	17.4±0.0	10/10	3	9/10	10.5	1.9
G4	L.plantarum	10	18.1±1.0	17.1±2.0	10/10	3	2/10	10.3	1.2
G5	L.brevis	10	18.1±1.0	16.4±2.1	9/9	3	4/9	10.3	1.4
G6	P.pentosaceus	10 <sup>8.0</sup>	17.7±1.0	17.2±1.9	8/8	3	2/8	11.0	1.3
G7	P.acidilactici	10	18.2±1.0	15.5±2.9	10/10	3	3/10	11.0	1.3
G8	P.pentosaceus	10	17.4±1.2	17.6±1.1	10/10	3	3/10	10.0	1.3
G9	L.brevis	10	17.8±1.0	16.2±2.7	10/10	3	6/10	9.5	1.6
G10	L.plantarum	10	17.5±1.2	16.0±2.0	9/9	3	4/9	10.4	1.4
G11	L.sakei	10	18.1±0.9	18.2±1.3	9/9	3	2/9	8.5	1.2
G12	양성대조군	10	18.4±0.4	0.0±0.0	10/10	3	10/10	6.8	2.0
G13	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

&lt;표50&gt;. 항인플루엔자 유산균 선별 2차 시험 결과

그룹	농도 (c.f.u/ 마리) <sup>A</sup>	접 종 수	체중(g) (mean ± SD)		공격접종 결과				PI <sub>21</sub> <sup>F</sup>
			접종전	접종후	임상증상		폐사		
G1	L.brevis	10	18.8±0.9	20.4±1.5	10/10	3	1/10	8.0	1.1
G2	L.brevis	10 <sup>8.0</sup>	18.1±0.9	20.1±0.6	9/9	3	2/9	9.0	1.2
G3	L.curvatus	10	18.9±0.9	20.4±0.9	9/9	3	4/9	8.5	1.4
G4	L.plantarum	10	18.7±1.5	20.6±0.5	7/7	3	3/7	10	1.4
G5	양성대조군	10	19.0±0.9	0.0±0.0	10/10	3	10/10	7.4	2.0
G6	음성대조군	10	18.3±0.8	20.1±1.0	0/10	-	0/10	-	-

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

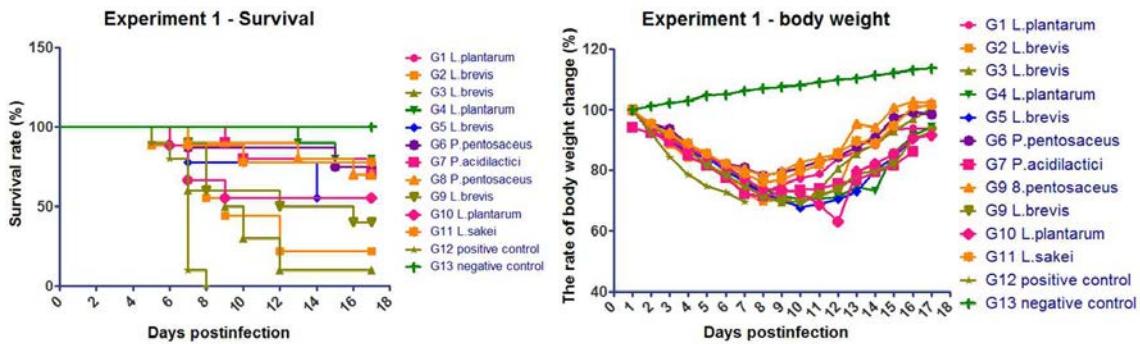
B 임상증상발현수수/접종수수

C Mean time of onset of clinical signs

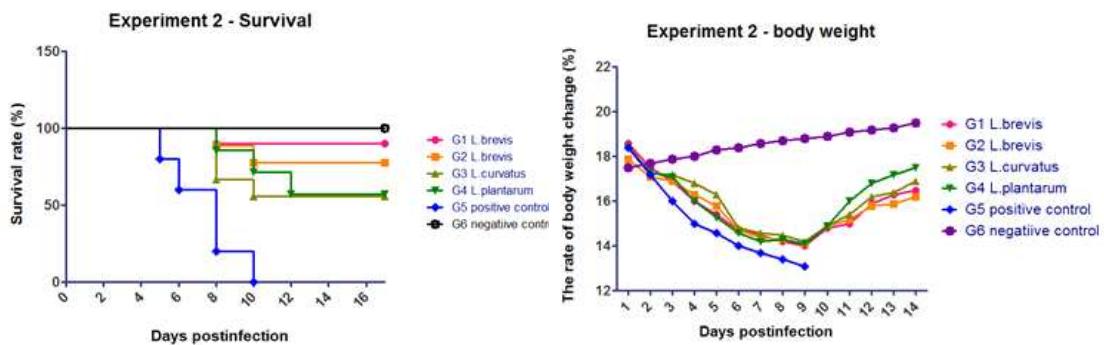
D 폐사수수/접종수수

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



<그림155>. 1차 유산균 선별 시험의 생존률 및 체중변화 그래프



<그림156>. 2차 유산균 선별 시험의 생존률 및 체중변화 그래프

- 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균의 마우스에서의 인플루엔자 방어 효능평가
- 시험 동물은 체중 18-20g의 SPF 마우스 이용하였고, 시험 균주는 1협동 성균관대학교에서 제작한 3D8 핵산가수분해 항체를 발현하는 유산균 L. casei 2종(Secret type 1종, Anchor type 1종) 및 재조합하지 않은 대조 유산균 L. casei 1종을 이용하였다. 시험 바이러스는 Influenza 바이러스 A/NWS/33 (H1N1) 균주를 공격접종에 이용하였고, 바이러스의 역가는 SPF 종란 이용하여 50% egg infective dose (EID50)를 통하여 측정하였다.
- 시험 개요 : 김치 및 된장에서 분리된 유산균과 동일한 방법으로 실시하였다.
- 연구결과
  - 1협동 성균관대학교에서 제작한 3D8 핵산가수분해 항체를 발현하는 유산균 L. casei를 2종(Secret type 1종, Anchor type 1종) 및 재조합하지 않은 대조 유산균 L. casei 1종의 항-인플루엔자 효능 평가 시험 결과는 표51과 같다. 3D8 Secret type 발현 유산균 투여군의 치사량 인플루엔자 바이러스에 대한 생존률은 70%, 3D8 Anchor type 발현 유산균 투여군은 100%, 대조 유산균 투여군은 50%로 나타났다. 바이러스 감염에 의한 체중감소는 양성대조군 대비 유의적인 차이를 보이지 않았다. 바이러스 감염에 의한 임상증상은 막지 못한 것으로 확인되었다. 2종의 3D8 항체 발현 유산균 모두 대조 유산균 대비 높은 효능 향상을 보였으며, 3D8 Anchor type 발현 유산균이 3D8 Secret type 발현 유산균보다 높은 효능 향상을 나타내었다. 3D8 항체 발현 유산균의 항인플루엔자 효능을 확

인 하였으며, 이후 닭에서의 항인플루엔자 검증 및 살모넬라균 방어 효능 시험을 통해 사료첨가제 개발을 진행하고자 한다.

<표51>. 3D8 핵산가수 분해 발현 유산균의 항인플루엔자 효능 평가 시험 결과.

그룹	농도 (c.f.u/ 마리) <sup>A</sup>	접 종 수	체중(g) (mean ± SD)		공격접종 결과				PI <sub>21</sub> <sup>F</sup>
			접종전	접종후	임상증상	Sick <sup>B</sup>	MTO (day) <sup>C</sup>	Dead <sup>D</sup>	
G1	3D8 secret type	10	18.8±0.9	18.5±1.7	10/10	3	3/10	6.7	1.3
G2	3D8 Anchor type	10 <sup>8.0</sup>	18.2±0.7	18.4±1.6	8/8	3	0/8	-	1.0
G3	대조 L.casei	10	18.0±0.6	18.0±1.7	10/10	3	5/10	7.4	1.5
G5	양성대조군	10	19.1±0.4	18.5±0.0	9/9	3	8/9	8.2	1.9
G6	음성대조군	10	18.5±0.8	20.1±1.0	0/10	-	0/10	-	

□ 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균과 항생제 경구 투여 시 닭에서의 인플루엔자 방어 효능 평가

- 시험 동물은 3주령 SPF 닭이며, 시험 균주는 1협동 성균관대학교에서 제작한 3D8 핵산가수분해 항체를 발현하는 유산균 *L. casei*를 2종(Secret type 1종, Anchor type 1종) 및 재조합하지 않은 대조 유산균 *L. casei* 1종을 이용하였다. 시험 항생제는 Streptomycin이며, Streptomycin은 그람 양성 및 음성 세균 모두에 항균력을 가지는 광범위 항생제이다. 그러나 유산균은 streptomycin을 비롯한 아미노글리코사이드 계열 항생제에 내재적으로 저항성을 가지는 것으로 알려져 있다. 닭에 유산균 투여 전에 항생제를 이용해 장내에 이미 정착해 있는 경쟁적 정상 미생물총을 줄임으로써 본 실험에서 검증하고자 하는 유산균이 최대로 정착할 수 있도록 하였다. 시험 바이러스는 A/Korean native chicken/k040110/2010(H9N2)를 사용하였다.

○ 시험 개요

- 항생제 투여 후, 유산균 투여 그룹은 3주령부터 5일간 매일 streptomycin (66mg/kg)을 경구로 투여한다. 항생제 비투여 후, 유산균 투여 그룹과 양성 대조군은 같은 부피의 PBS를 투여한다. 유산균 투여 그룹은 항생제 투여 종료 후 10일 동안, 공격접종 후 10일 동안 매일 경구로 유산균(10<sup>9</sup>cfu/ml)을 투여하고, 양성 대조군은 같은 방법으로 PBS를 투여한다. *L. casei* secrete form 유산균 투여 그룹(항생제 투여 및 항생제 비투여 2 그룹)은 유산균 투여 시작 전과 투여 10일 째에 총배설강을 swab한다. 이를 각각 nutrient 배지 및 chloramphenicol(형질전환 유산균의 벡터가 포함된 내성 항생제)이 첨가된 MRS 배지에 적용하여 생균수 및 형질전환 유산균수 변화를 측정한다. 각 그룹을 공격접종군 3수와 접촉전파군 7수로 나누고 공격접종 직전에 다른 케이지에 사육한다. 공격접종군 3수에 공격접종을 하고 1일 후 같은 그룹의 접촉전파군 7수를 공격접종군 3수와 같은 케이지에 사육한다. Influenza 바이러스 공격접종 후 3, 5, 7, 9, 11일째에 구강

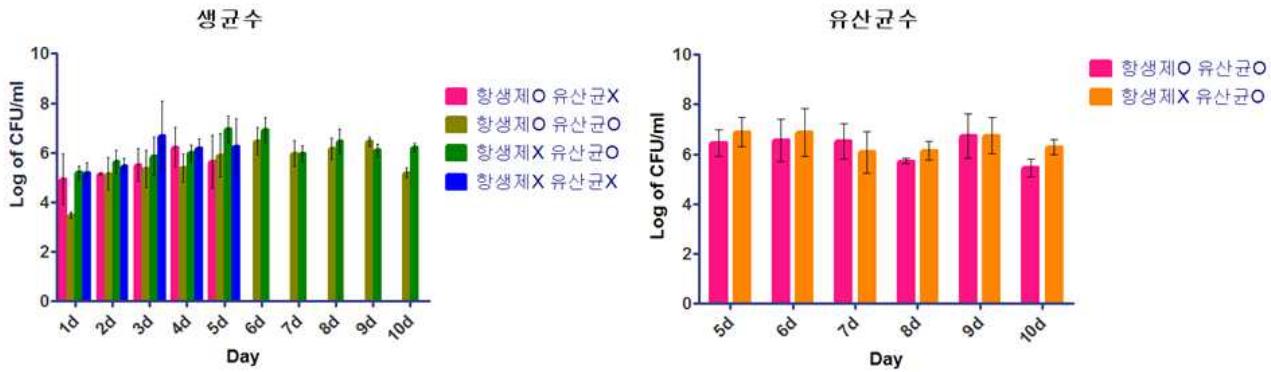
및 총배설강 swab 후 바이러스 농도를 측정한다(그림157).



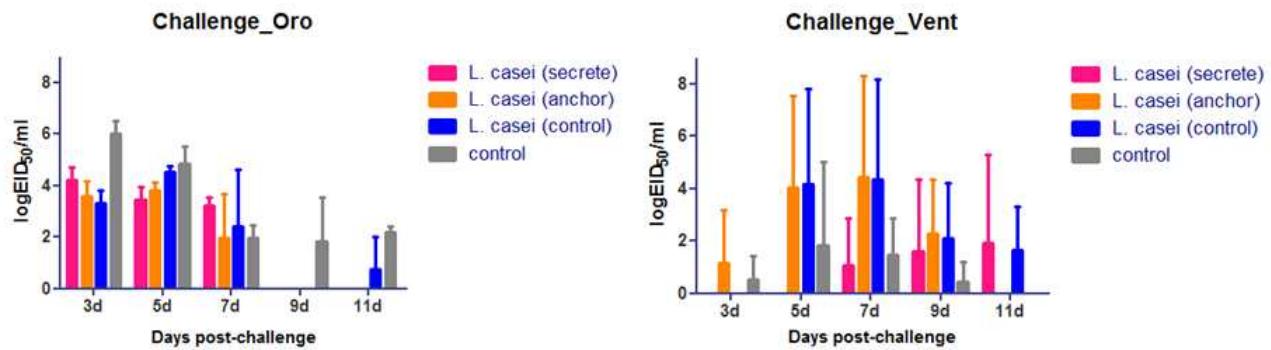
<그림157>. 닭에 형질전환 유산균과 항생제 경구 투여 시 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

### ○ 연구결과

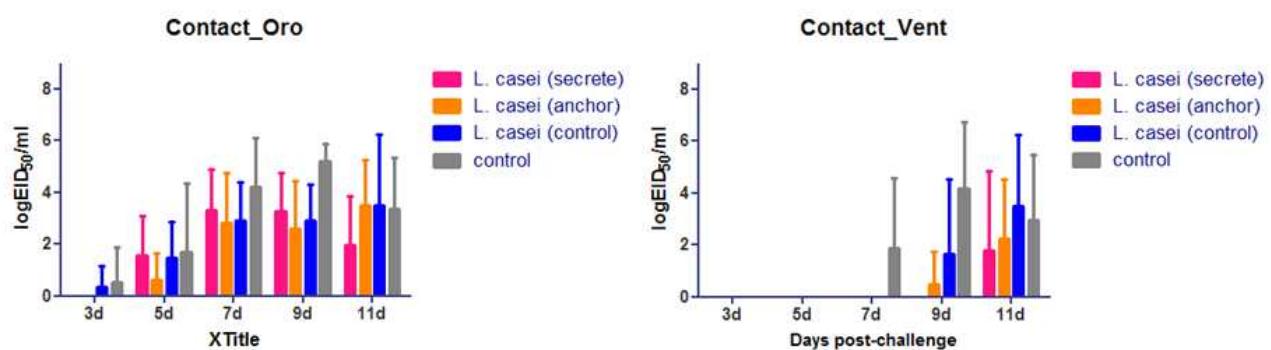
- 그림158에서 항생제 투여 시 총 생균수 및 유산균수 관찰결과 항생제 투여 시 초기 (1-2일 후)에는 총 생균수가 줄어드는 것이 확인되었으나 3일 이후 다시 회복되는 양상을 나타내었다. 항생제 투여 시 내성균이 다시 증식하여 생균수의 변화가 없어지는 것으로 판단되었다. 항생제 투여 후 유산균 투여 결과 항생제 투여군과 항생제 비투여군 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 시험 결과 streptomycin 경구 투여는 항생제 투여로 인한 유산균의 장 정착 상승효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 본 실험에서는 총 유산균수를 측정하여 직접적인 투여 유산균의 정착여부는 확인하지 못하였다. 실질적인 투여 유산균의 효능향상 여부를 확인하기 위하여 유산균-항생제 병용 투여 시 인플루엔자 방어효능 향상 여부 확인 시험을 실시하였으며 그 결과는(그림159-161)와 같다. 그림159과 160의 바이러스 배출 양상 확인 결과, 공격접종군의 경우 대조군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다. 접촉전파군의 경우 통계학적 유의성은 없으나 공격접종 7일 이후에 구강 및 총배설강에서의 바이러스 배출양이 감소하는 양상을 나타내었다. 하지만 wild type의 L. casei 투여 그룹과 형질전환 L. casei 투여그룹간의 배출량 차이는 나타나지 않았다. 그림161은 바이러스 배출량 최대치 확인 결과 항생제-유산균 병용 투여군의 접촉전파군이 대조군에 비해 배출량 최대치가 낮은 것으로 확인되었다. wild type의 L. casei 투여 그룹과 형질전환 L. casei 투여그룹간의 배출량 차이는 나타나지 않았다. 본 실험결과와 1세부에서 시행한 유산균 단독 투여 실험과의 결과 비교 결과 항생제 병용 투여 시 유산균의 인플루엔자 방어효능 향상 효과가 나타난 것으로 확인되었다. 하지만 형질전환 유산균의 wild type 유산균 대비 인플루엔자 방어효능 향상이 확인되지 않았다.



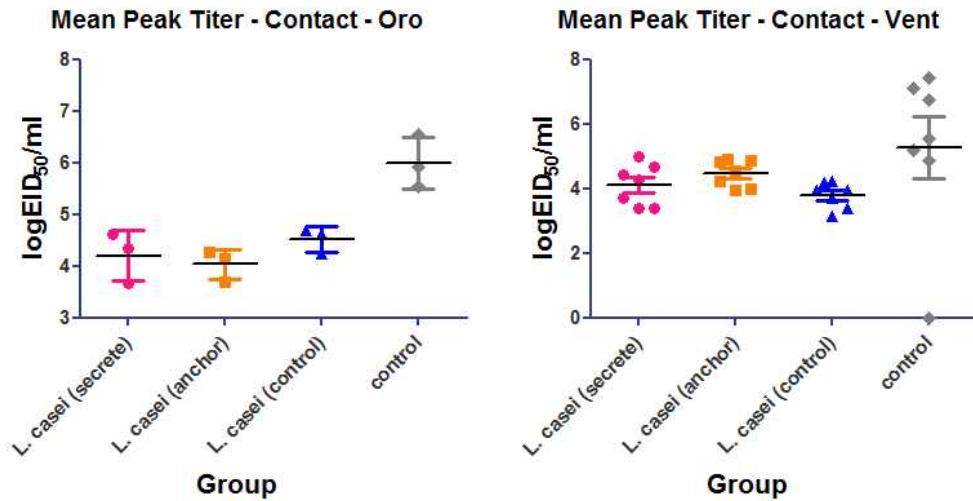
<그림158>. 항생제 및 유산균 투여 기간 중 총배설강 swab 샘플에서 분석한 생균수 및 유산균수



<그림159>. 공격접종군의 구강 및 총배설강 배출 바이러스 농도 변화



<그림160>. 접촉전파군의 구강 및 총배설강 배출 바이러스 농도 변화



<그림161>. 각 그룹 접촉전파군 총배설강 swab에서 관찰 기간 동안 최대 바이러스 농도

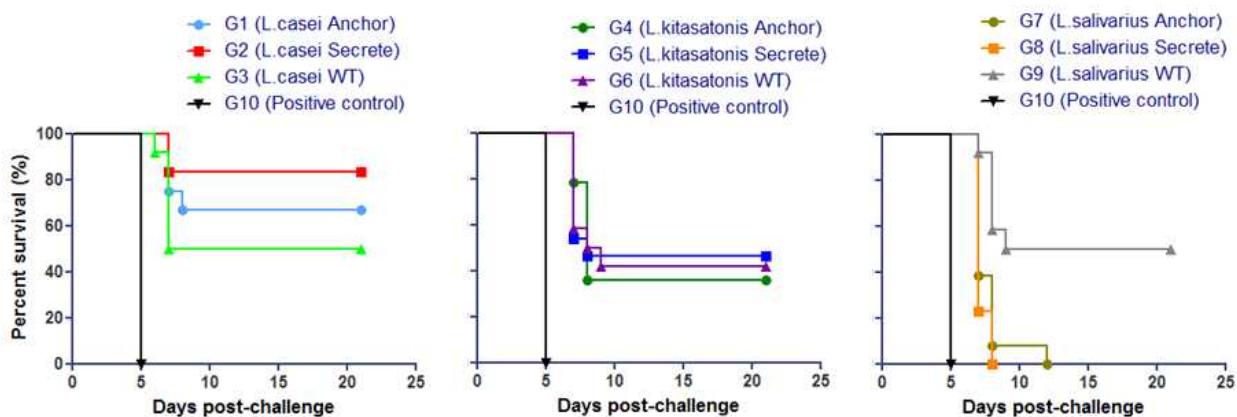
- 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균의 마우스에서의 인플루엔자 방어 효능 평가
- 시험 동물은 6주령 SPF mouse (BALB/C)이고, 시험 균주는 Lactobacillus casei(Wild type), L. casei(Secrete form), L. casei(Anchor form), L. kitasatonis(Wild type), L. kitasatonis(Secrete form), L. kitasatonis(Anchor form), L. salivarius(Wild type), L. salivarius(Secrete form), L. salivarius(Anchor form)이다. 1협동 성균관대학교에서 제작한 3D8 혼란가수분해 항체를 발현하는 유산균으로 L. casei 2종 (Secret type 1종, Anchor type 1종), L. kitasatonis 2종 (Secret type 1종, Anchor type 1종), L. salivarius를 2종 (Secret type 1종, Anchor type 1종) 및 재조합하지 않은 대조 유산균 L .casei, L. kitasatonis, L. salivarius 3종을 사용하였고, L. casei는 3D8 혼란가수분해 항체 발현 시 마우스 비강 모델의 항-인플루엔자 효능을 1차년도 과제에서 확인하였고, 양성 대조 균주로서 사용하였다. 시험 바이러스는 A/NWS/33 (H1N1)를 사용하였다.
- 시험 개요
  - 유산균을 10일간 6회, 108cfu/90ul 농도로 비강 투여한다. Influenza 바이러스 (104.5EID<sub>50</sub>/mouse) 공격접종 후 2주 동안 체중 변화 및 생존율을 관찰한다(그림162).



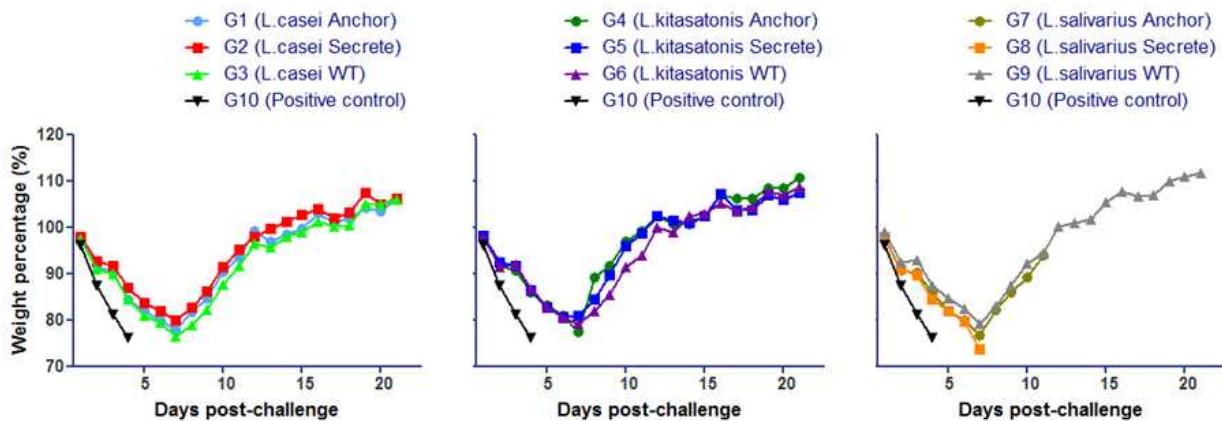
<그림162>. 형질전환 유산균의 마우스 비강 투여 시 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

- 연구결과
  - 가금류의 사료 첨가제를 개발하는 본 과제의 최종 목표 달성을 위해서 목표 기관인 가금류 소화기에 정착이 용이하며 높은 항-바이러스 능을 가지는 유산균 제작이 중요하다.

따라서 1차년도에 검정한 마우스 유래 유산균인 *L. casei* 이외에도 닭 소화기 유래 유산균인 *L. kitasatonis*와 *L. salivarius*에 3D8 핵산가수분해 항체를 발현시키고, 그 항-인플루엔자능을 마우스에서 검정하였다. 마우스 및 닭 유래의 3D8 핵산가수분해 항체를 발현하는 유산균(형질전환 6종 및 wild type 3종) 총 9종에 대한 항-인플루엔자능 시험 결과는 (그림163,164)와 같다. *L. casei* secrete form 유산균 투여 그룹의 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 생존율은 83%, anchor form 유산균 투여 그룹은 66%, 대조 wild type 유산균 그룹은 50%로 나타났다. *L. kitasatonis* secrete form 유산균 투여 그룹의 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 생존율은 36%, anchor form 유산균 투여 그룹은 46%, 대조 wild type 유산균 그룹은 42%로 나타났다. *L. salivarius* secrete form 유산균 투여 그룹의 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 생존율은 0%, anchor form 유산균 투여 그룹은 0%, 대조 wild type 유산균 그룹은 50%로 나타났다. *L. kitasatonis*는 3D8 핵산가수분해 항체 발현 유산균과 대조 wild type 간의 생존율 차이가 *L. casei*보다 적었지만, 생존율과 체중 변화에서 *L. casei*와 비슷한 양상을 나타내었다. 또한 wild type 유산균이 항-인플루엔자 효과를 나타내었으므로 발현량 조절 등 개량을 통해 닭의 사료 첨가제로 이용될 가능성이 있다고 생각된다. *L. salivarius*의 경우 3D8 핵산가수분해 항체 발현 유산균이 wild type 대조 유산균에 비해 나은 항-바이러스 능을 보이지 못했다.



<그림163>. 공격접종 후 생존율 그래프



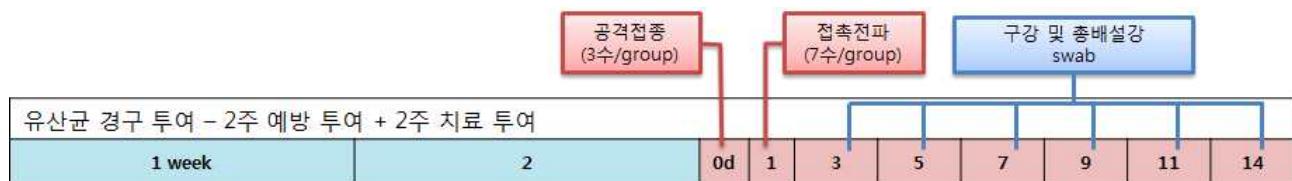
<그림164>. 공격접종 후 체중 백분율 변화 그래프

□ 항-바이러스 단백질을 발현하는 유산균의 닭에서의 인플루엔자 방어 효능 평가

○ 시험 동물은 1일령 SPF 닭이고, 시험 균주는 *Lactobacillus casei*(Secretive form), *L. casei*(Wild type), *L. fermentum* CJL-112 이다. 시험 균주 중 *L. casei* secretive form과 wild type은 성균관대학교(제1협동기관)에서 배양한 것을 제공받아 실험하였다. *L. fermentum* CJL-112는 본 실험실에서 닭 비강 투여 시 유의적으로 항-인플루엔자 효능을 가지는 것을 검증한 유산균으로 이번 실험에 대조군으로 이용되었다(Youn et al., Poultry Sci, 2012),(30). 시험 바이러스는 A/Korean native chicken/k040110/2010(H9N2)를 사용하였다.

○ 시험 개요

- 유산균 투여 그룹은 1일령부터 2주 동안, 공격접종 후, 2주 동안 매일 경구로 유산균 (109cfu/ml)을 투여하고, 양성 대조군은 같은 방법으로 PBS를 투여한다. 각 그룹을 공격 접종군 3수와 접촉전파군 7수로 나누고 공격접종 직전에 다른 케이지에 사육한다. 공격 접종군 3수에 공격접종을 하고 1일 후 같은 그룹의 접촉전파군 7수를 공격접종군 3수와 같은 케이지에 사육한다. Influenza 바이러스 공격접종 후 3, 5, 7, 9, 11, 14일째에 구강 및 총배설강 swab 후, 바이러스 농도를 측정한다(그림165).

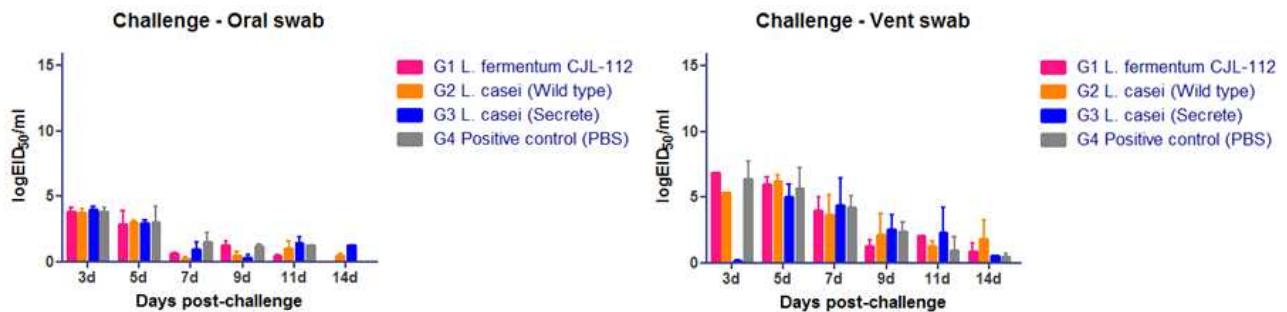


<그림165>. 형질전환 유산균의 닭 경구 투여 시 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

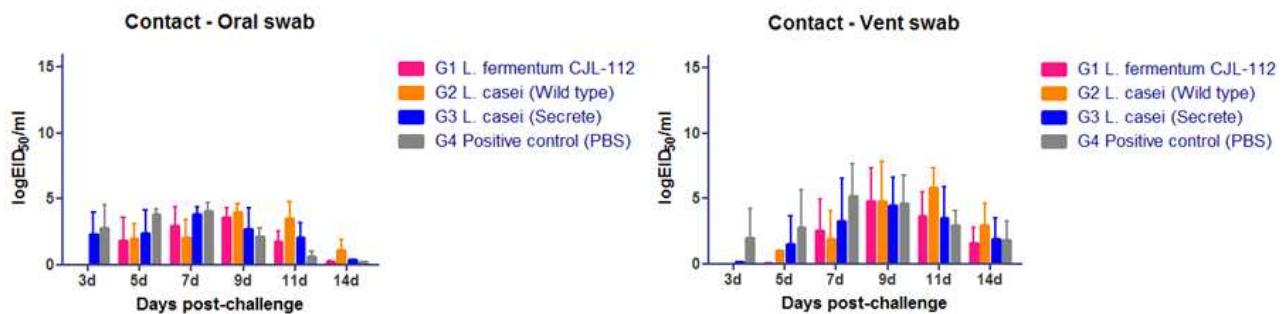
○ 연구결과

- 닭은 부화 직후 장내 미생물총을 가지고 있지 않아 사료와 주위 환경의 세균을 섭취해 장내 미생물총을 형성하고, 이로 인해 같은 무리의 닭들은 비슷한 장내 미생물총 구성을

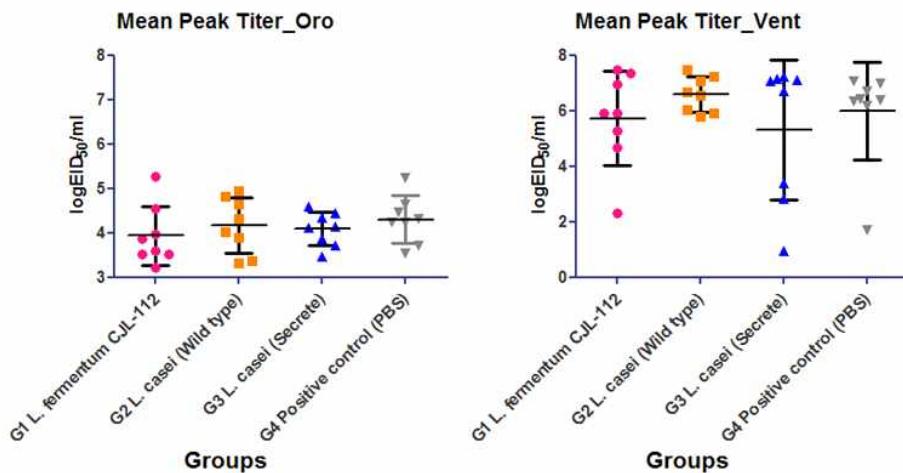
가진다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 의도한 유산균을 닭의 장내에 다량으로 효과적으로 정착시키기 위해 1일령 병아리부터 유산균 경구 투여를 진행하였다. 3D8 핵산 가수분해 항체를 발현하는 유산균(1종 및 wild type 1종) 및 대조 유산균, 총 3종에 대한 항-인플루엔자능 시험 결과는 그림166과 167 같다. 3D8 핵산가수분해 항체를 발현하는 *L. casei* secrete form 투여그룹 중 접촉전파군에서 구강과 총배설강으로부터 최대 바이러스 배출량이 유의적 차이를 보이진 않았지만, 양성대조군 및 비형질전환 유산균 *L. casei* wild type 투여그룹과 대비해 낮아진 것을 알 수 있었다. 그림167에서 *L. casei* scerete form 유산균 투여 접촉전파군은 양성대조군에 비해 바이러스 농도가 최대로 되는 지점이 늦춰진 것을 알 수 있었다. 이는 대조 유산균 *L. fermentum* CJL-112도 같은 양상을 나타냈다. 공격접종 3일 후에는 거의 바이러스 배출이 관찰되지 않았다. 즉, 전파된 바이러스가 닭에서 증폭하는 과정을 대조군에 비해 늦췄다고 할 수 있다. 그림168에서 3D8 핵산가수분해 항체 발현 *L. casei* secrete form 투여 그룹이 양성대조군 및 비형질전환 *L. casei* wild type 투여그룹에 비해 접촉전파군 최대 바이러스 배출량이 낮았다. 3D8 핵산가수분해 항체 발현 유산균 *L. casei*는 항-바이러스 단백질의 발현량 조절 및 유산균 투여량 조절 등의 개선을 통해 경구 투여 시 항-인플루엔자 효능을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.



<그림166>. 공격접종군의 구강 및 총배설강 바이러스 농도 변화



<그림167>. 접촉전파군의 구강 및 총배설강 바이러스 농도 변화



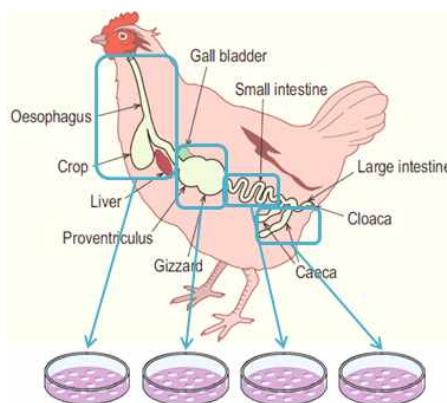
<그림168>. 접촉전파군 구강 및 총배설강의 최대 바이러스 배출량

□ 닭의 소화 장기에서 유산균 분리 및 동정

○ 시험 동물은 6주령 SPF 닭이다.

○ 시험 개요

- 투여 유산균이 효과적으로 정착할 수 있는 조건을 규명하는 것은 3D8 핵산가수분해 단백질의 항-바이러스 능을 최대로 발휘하는 데 중요하다. 이미 닭의 소화기 내에 정착해 있는 유산균은 다른 동식물 유래 유산균과 비교해 닭의 소화기와 유익한 상호작용을 할 수 있을 것으로 예상하고, 이를 분리 및 동정 후 앞으로 항-바이러스 단백질을 발현해 실험으로 검정하도록 계획하였다. 6주령 SPF 닭의 소화기 중 모이주머니(crop), 선위, 소장, 맹장의 네 부위를 채취한다. MRS 액체 배지에서 증균(37°C, 24시간) 후 MRS 고체 배지에 적용(37°C, 24시간, 호기배양)해 유산균을 분리했다(그림169). 단일 집락으로 확인되면 염기서열 분석을 통해 동정한다.



<그림169>. 닭 소화 장기에서 유산균 분리 과정 개요

○ 연구결과

- 분리 및 동정 결과, 총 3가지의 유산균을 얻을 수 있었다(표52).

<표52>. 닭의 소화기에서 분리된 유산균

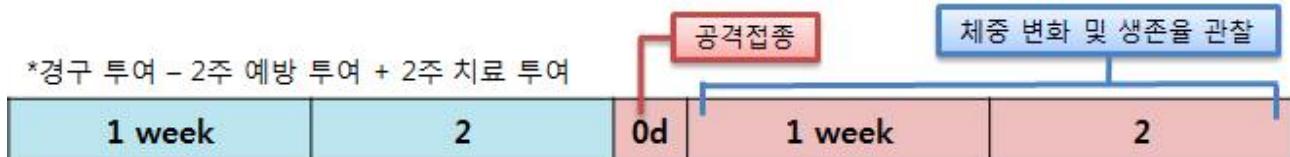
분리 장소	분리 유산균
모이주머니(Crop)	Lactobacillus salivarius
	L. saerimneri
소장	L. salivarius
	L. saerimneri
맹장	L. salivarius

□ 항-바이러스 단백질 발현 클로렐라의 마우스 경구 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 확인(2015년 연말에 수행하여 2차년도 연차보고서에 진행 내용으로 보고하지 못한 연구 내용임)

○ 시험 동물은 6주령 SPF 생쥐(BALB/c)이고, 시험물질은 클로렐라(Wild-type), 형질전환 클로렐라(Anchor form), 대장균(E. coli)-pET42V 상층액, 대장균(E. coli)-pMSV77 상층액, Wild type 대장균(E. coli) 상층액이다. 시험 물질은 대상(제3협동기관)에서 배양한 것을 제공받아 실험을 진행하였다. 바이러스는 A/NWS/33 (H1N1)를 사용하였다. 바이러스의 역가는 SPF 종란을 이용한 50% egg infective dose (EID50)를 통하여 측정하였다.

○ 시험 개요

- 6주령 SPF 마우스(BALB/c) 64수를 표5와 같이 총 7개 그룹으로 나누고, 클로렐라(2종) 및 대장균 상층액(3종)을 6주령부터 2주 동안, 공격접종 후, 2주 동안 매일 경구 투여하였다. 양성대조군은 동량의 PBS를 같은 방법으로 투여하였다. 음성대조군을 제외하고 인플루엔자 바이러스(104.5EID50/mouse) 공격접종 후, 2주 동안 체중 변화, 생존율 및 임상 증상을 관찰하였다(그림170).



<그림170>. 클로렐라 및 대장균 상층액의 마우스 경구 투여 시 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

○ 연구결과

- 항-바이러스 3D8 scFv 핵산가수분해 항체 단백질을 세포표면에 발현하도록 형질전환된 클로렐라와 wild type 클로렐라까지 총 2종을 이용해 항인플루엔자 효능을 평가하였다.

클로렐라는 광합성이 가능한 미세조류로서 유산균처럼 사료첨가제로 사용될 가능성이 있다. 대장균은 발현벡터의 종류에 따라 2종을 선발하고 wild type 대장균까지 총 3종을 이용하여 그 상충액에 포함된 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 단백질의 발현 및 in vivo 효능을 비교함. 형질전환 대장균은 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 단백질을 발현해 세포 밖으로 분비하도록 이루어져 정제 단백질을 사료첨가제로써 생산하기 위한 발현 시스템으로 만들어졌다. 클로렐라 2종 및 대장균 상충액 3종의 마우스의 경구 투여 시 항인플루엔자 효능 시험 결과는 표53와 그림171-173과 같다. 그림171에서 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 5일째까지의 생존율은 형질전환 클로렐라 투여군이 78%, wild type 클로렐라 투여군은 56%, 양성대조군은 22%로 형질전환 클로렐라 투여군의 폐사율이 가장 적은 것으로 나타났다. 그러나 인플루엔자 바이러스 공격접종 후, 6일째 형질전환 클로렐라 투여군, wild type 클로렐라 투여군 및 양성대조군의 모든 개체가 폐사하여 차이가 나타나지 않았다. 인플루엔자 바이러스 공격접종 후, 생존율은 형질전환 및 wild type 대장균 상충액 투여군과 양성대조군에서 차이가 나타나지 않았다. 그림173에서 양성대조군의 MDT는 5.22로 가장 작게 나타났고, 형질전환 클로렐라 투여군 및 형질전환 대장균 pET42SV 상충액 투여군과 wild type 대장균 상충액 투여군의 MDT가 모두 5.78로 가장 크게 나타나 생존율에서 관찰된 양상과 같게 나타났다. 그림172의 왼쪽 그래프에서 인플루엔자 바이러스 공격접종 전까지 wild type 클로렐라 투여군, 대장균 상충액 투여군의 체중 증가율이 음성대조군에 비해 높게 나타났다. 그림172의 오른쪽 그래프에서 인플루엔자 바이러스 공격접종 후, 양성대조군에 비해 대장균 상충액 pET42SV 투여군의 체중 감소가 가장 더디게 나타났지만 통계적 유의성은 관찰되지 않다.

<표53>. 형질전환 클로렐라 및 대장균 상충액의 항인플루엔자 효능 시험 결과

그룹	접종 수수	체중(g) (mean $\pm$ SD)		공격접종 결과			
		접종전	접종후	임상증상 Sick <sup>B</sup>	MTO (day) <sup>C</sup>	Dead <sup>D</sup>	MDT (day) <sup>E</sup>
G1	3D8 클로렐라	9	20.1 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 1.2	9/9	3	9/9
G2	Wild type 클로렐라	9	20.7 $\pm$ 1.0	14.6 $\pm$ 0.4	9/9	3	9/9
G3	E. coli pMSV77 상충액	9	20.3 $\pm$ 0.6	14.8	9/9	3	9/9
G4	E. coli pET42SV 상충액	9	19.8 $\pm$ 1.1	14.4	9/9	3	9/9
G5	Wild type E. coli 상충액	9	20.0 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.3	9/9	3	9/9
G6	양성대조군	9	19.5 $\pm$ 1.0	12.8 $\pm$ 0.5	9/9	3	9/9
G7	음성대조군	10	18.3 $\pm$ 0.8	20.1 $\pm$ 1.0	0/10	-	0/10

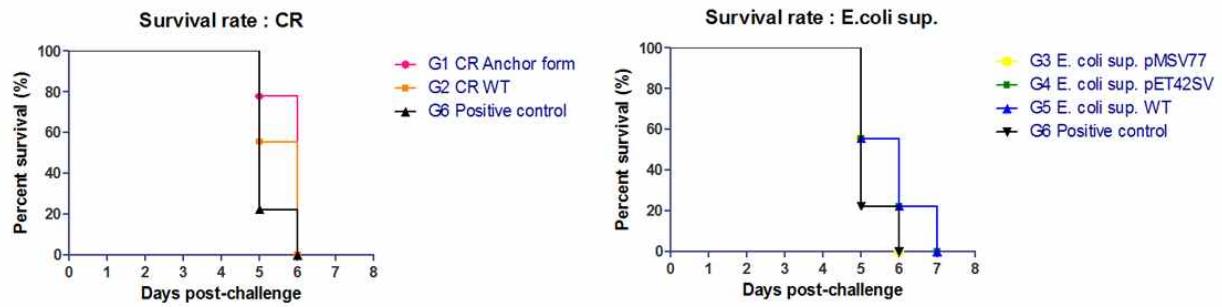
A 투여량 : 1회 450ul/두, 투여기간 : 공격접종 전 6회 예방

B 임상증상발현수수/접종수수

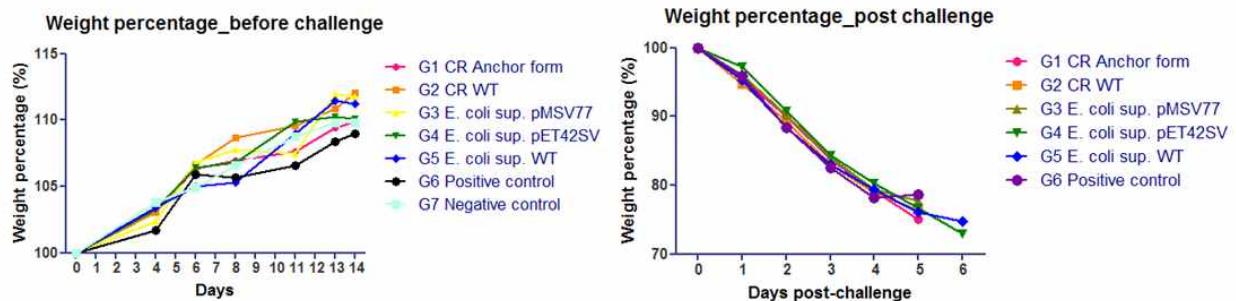
C Mean time of onset of clinical signs

D 폐사수수/접종수수

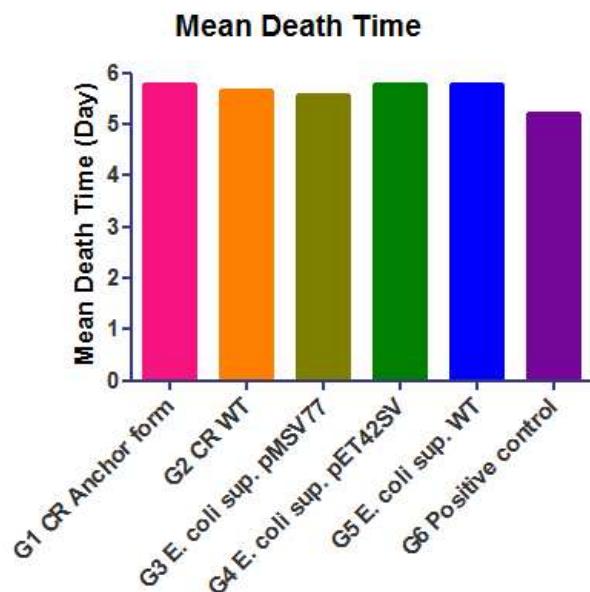
E Mean death time



<그림171>. 형질전환 클로렐라(왼쪽) 및 대장균 상충액(오른쪽) 투여 시 공격접종 후, 생존율  
그래프



<그림172>. 형질전환 클로렐라(왼쪽) 및 대장균 상충액(오른쪽) 투여 시 공격접종 후,  
체중변화율 그래프



<그림173>. 형질전환 클로렐라 및 대장균 상충액 투여 시 공격접종 후, MDT (Mean Death Time) 그래프

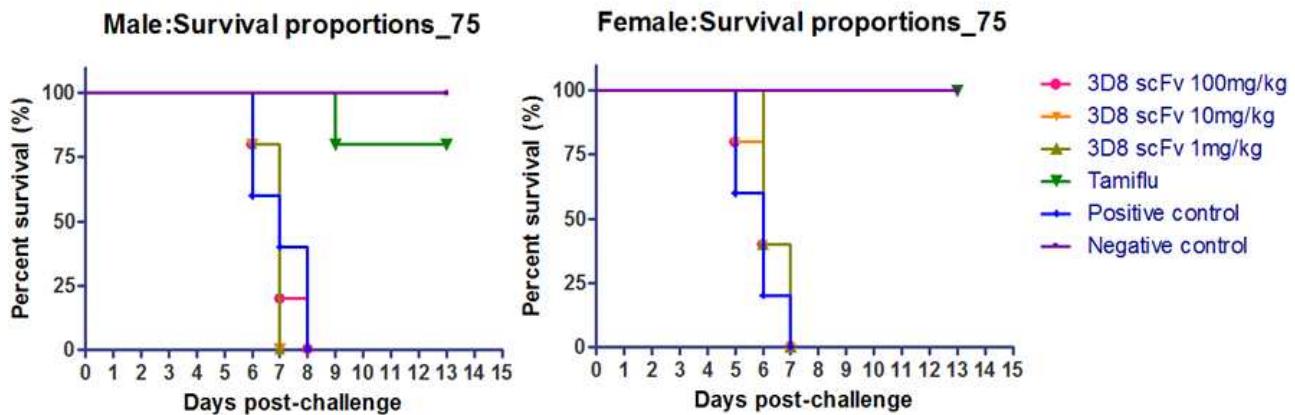
- 항-바이러스 정제 단백질 마우스 구강 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 평가
- 시험 동물은 6주령 SPF 생쥐(BALB/C) 암수 각 42수(총 84수)였고, 시험 물질은 항-바이러스 3D8 scFv 정제 단백질과 Tamiflu® (성분명 Oseltamivir, 제조사 Roche)를 사용하였다. 항-바이러스 3D8 scFv 핵산가수분해 항체 정제 단백질은 (주)대상(제3협동기관)에서 정제 및 농축한 것을 제공 받았다. Tamiflu® (성분명 Oseltamivir, 제조사 Roche)는 동물 및 사람에서의 항인플루엔자 효능이 확인된 항-바이러스 물질로서, 이 실험에서 항-바이러스 3D8 scFv 핵산가수분해 항체 단백질의 항-바이러스 효능을 확인하기 위한 양성대조물질로써 사용하였다. 시험 바이러스는 A/NWS/33 (H1N1)이었다. 바이러스의 역가는 SPF 종란을 이용 50% egg infective dose (EID50)를 통하여 측정하였다.
  - 시험 개요
    - 6주령 SPF 마우스(BALB/c) 암수 각 42수, 총 84수를 총 6개 그룹(3D8 scFv 농도별 투여군 3개 그룹, Tamiflu 투여군, 양성대조군, 음성대조군)에 암수 각 7수씩 나누고, 항-바이러스 3D8 scFv 핵산가수분해 항체 정제 단백질의 세 가지 농도(100mg/kg, 10mg/kg, 1mg/kg)를 6주령 마우스에 2주 동안, 공격접종 후, 2주 동안 매일 경구 투여 함. 양성대조군은 동량의 PBS를 같은 방법으로 투여한다. Tamiflu(100mg/kg)는 6주령 마우스에 제조사 투여 지침에 따라 공격접종 6시간 전에 1회, 공격접종 후 5일 동안 하루 2회 경구 투여한다. 음성대조군을 제외하고 인플루엔자 바이러스(104.5EID50/mouse) 공격접종 후, 2주 동안 체중 변화 및 생존율 및 임상 증상을 관찰한다(그림174).



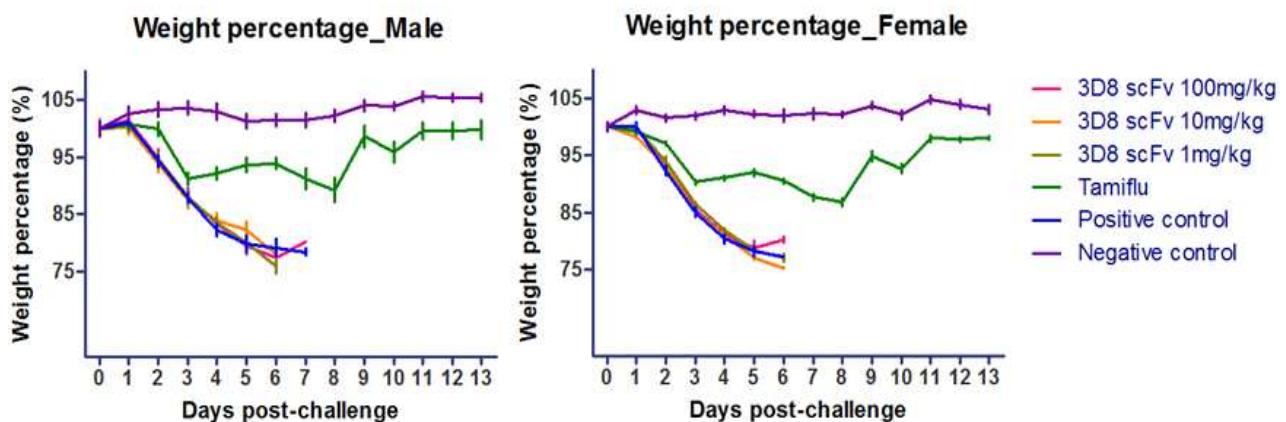
<그림174>. 항-바이러스 3D8 scFv 정제 단백질 및 Tamiflu 마우스 경구 투여 시 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

- 연구결과
  - 항-바이러스 3D8 scFv 정제 단백질 및 Tamiflu의 항인플루엔자 효능 시험 결과는 그림 175-177과 같다. 그림176에서 Tamiflu 투여군은 공격접종 후 투여기간인 5일 동안 체중이 감소하다 이후 회복되는 경향을 보였고, 투여 종료 후 체중백분율은 암수 모두 80% 후반에서 최소값을 형성했고, 이후 꾸준히 증가하여 인플루엔자 바이러스 감염에서 회복되는 것으로 나타났다. 즉 항-바이러스 효능을 가진 양성대조물질로써 참고할 수 있다. 항-바이러스 3D8 scFv 핵산가수분해 항체 정제 단백질 투여군은 공격접종 이후 체중이 계속적으로 감소했고 양성대조군과 차이를 보이지 않았다. 그림175에서 항-바이러스

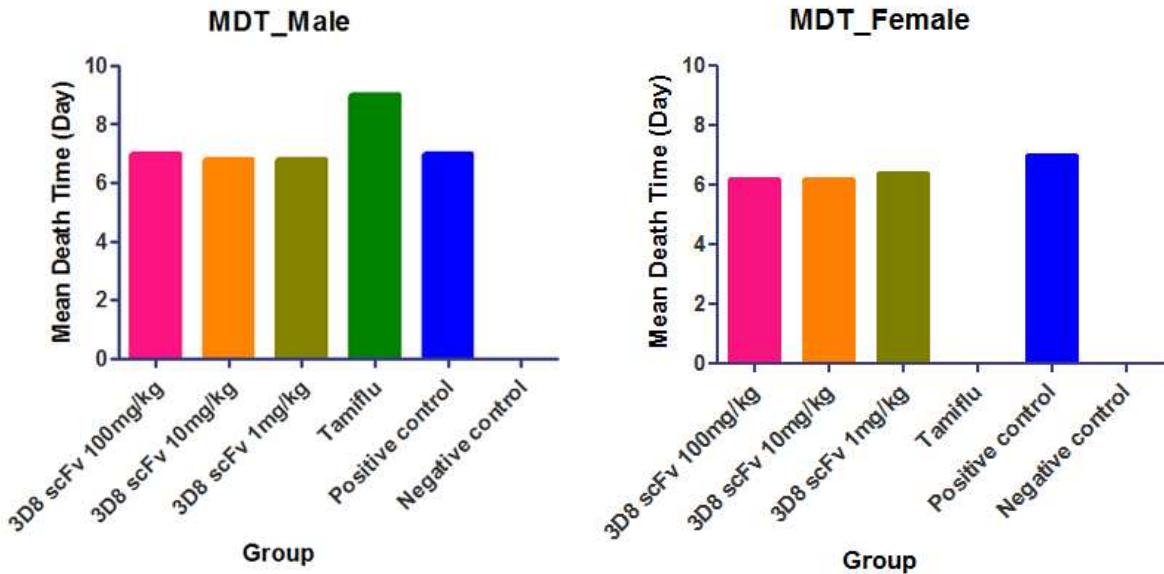
3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 100mg/kg 투여군 중 수컷은 공격접종 후 8일, 암컷은 7일 째 모든 실험개체가 폐사했고 양성대조군은 수컷은 공격접종 후 7일, 암컷은 8일 째 모든 실험개체가 폐사하여 두 그룹 사이에 큰 차이가 관찰되지 않았다. 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 10mg/kg과 1mg/kg 투여군 중 암컷과 수컷 모두 100mg/kg 투여군과 같은 날 또는 1일 전에 모든 실험개체가 폐사하였다. Tamiflu 투여군은 수컷에서 한 마리가 공격접종 8일 후 폐사한 것을 제외하면, 폐사 개체가 관찰되지 않았다.



<그림175>. 항-바이러스 3D8 scFv 정제 단백질 및 Tamiflu 투여 시 수컷(왼쪽)과 암컷(오른쪽)의 공격접종 후 생존율 그래프



<그림176>. 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 및 Tamiflu 투여 시 수컷(왼쪽)과 암컷(오른쪽)의 공격접종 후 체중변화율 그래프

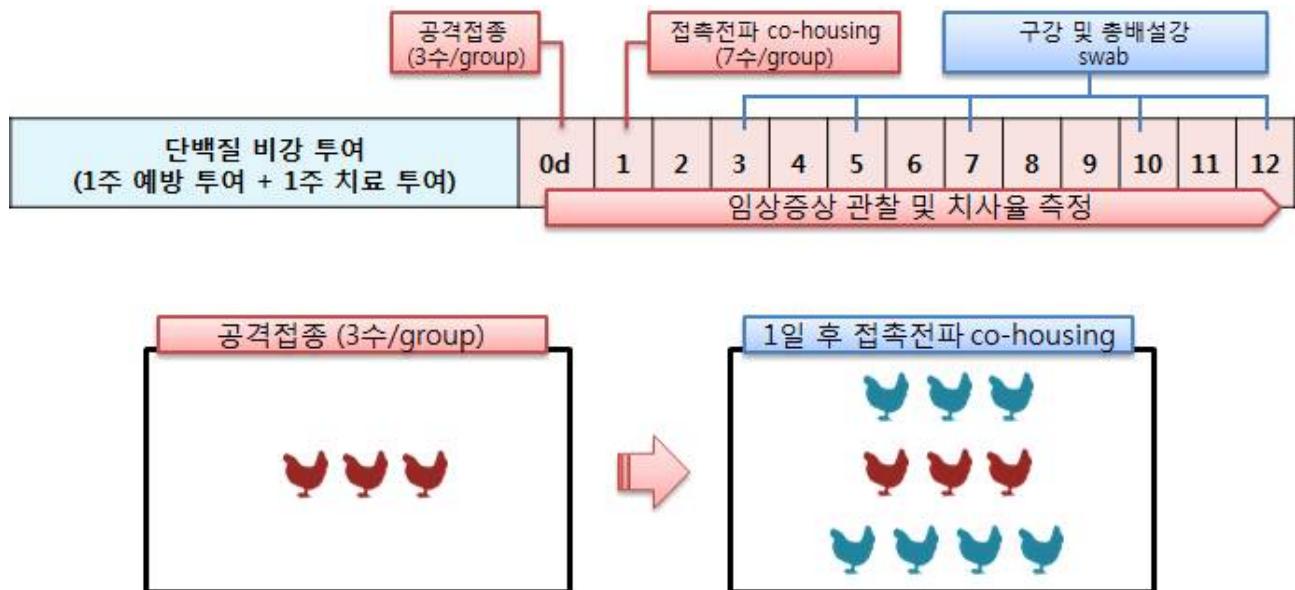


<그림177>. 항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질 및 Tamiflu 투여 시 수컷(왼쪽)과 암컷(오른쪽)의 공격접종 후 MDT (Mean Death Time) 그래프

- 그림177에서 MDT의 경우 항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질 투여군과 양성대조군에서 차이가 관찰되지 않았고, Tamiflu 투여군은 암컷의 경우 폐사 개체가 없어 MDT 측정이 불가능했고, 수컷의 경우 양성대조군보다 MDT가 크게 나타나 생존율이 늘어났다고 판단할 수 있었다. 항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질의 경우 기존 비강 투여 시 효능이 확인되었으나 구강 투여 시에는 바이러스 억제 효과가 없는 것으로 확인되었다.

- 항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질의 닭 비강 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 평가
  - 시험 동물은 3주령 SPF 닭 30수를 사용하고, 시험 물질은 항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질과 대조 항-바이러스 단백질을 사용한다. 시험 물질 중 항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질과 대조 항-바이러스 단백질은 대상(제3협동기관)에서 정제 및 농축한 것을 제공받아 실험한다. 시험 바이러스 : A/Korean native chicken/k040110/2010(H9N2)이며, 바이러스의 역가는 SPF 종란을 이용 50% egg infective dose (EID50)를 통하여 측정한다.
  - 시험 개요
    - 3주령 SPF 닭 30수를 총 3개 그룹(항-바이러스 3D8 scFv 혼합가수분해 항체 정제 단백질 투여군, 대조 항-바이러스 단백질 투여군, 양성대조군)에 각 10수씩 나누고, 두 가지 시험 단백질을 3주령부터 매일 1주 동안 비강으로 투여함. 투여 농도는 모두 100mg/ml로 함. 양성대조군은 동량의 PBS를 같은 방법으로 투여한다. 각 그룹을 공격접종개체 3수와 접촉전파개체 7수로 나누고 공격접종 직전에 다른 케이지에 사육한다. 음성대조군을 제외하고 인플루엔자 바이러스(104.5EID50/mouse)를 각 그룹의 공격접종개체 3수에

공격접종하고 1일 후 같은 그룹의 접촉전파개체 7수를 공격접종개체 3수와 같은 케이지에 사육한다. 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 3, 5, 7, 10, 그리고 12일째에 공격접종개체 및 접촉전파개체 구강 및 총배설강을 swab 후 바이러스 shedding을 real-time RT-PCR을 이용해 측정한다(그림178).



<그림178>. 항-바이러스 3D8 scFv 핵산가수분해 항체 정제 단백질 및 대조 항-바이러스 단백질의 닭 비강 투여 시 항-인플루엔자 효능 확인 시험 개요

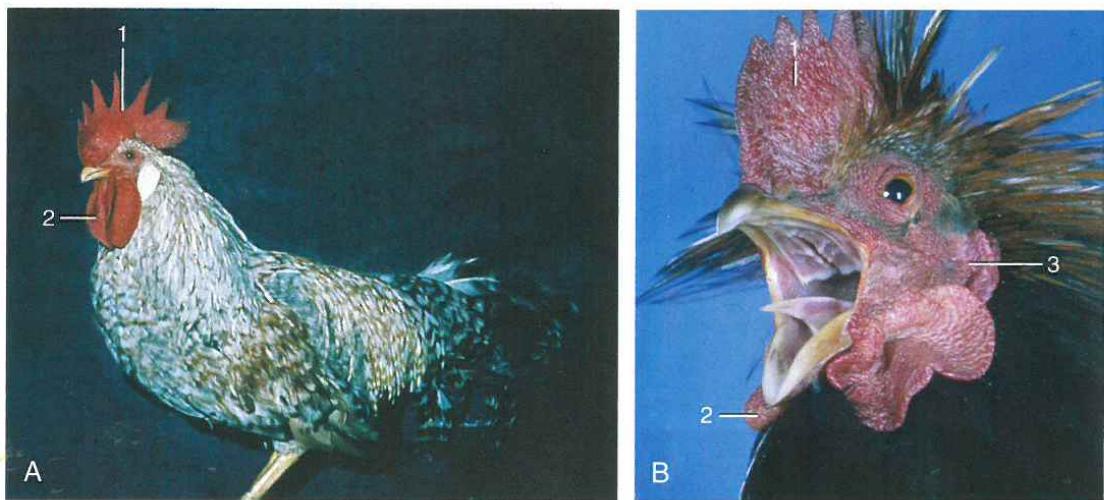


Figure 37-2 A, B, Two chickens with ornaments. 1, Comb; 2, wattles; 3, ear lobe.

<그림179>. 닭의 구강 구조 (Textbook of Veterinary Anatomy, 4th edition, Saunders)

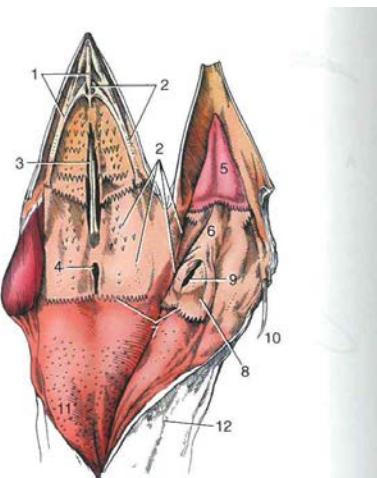


Figure 37-14 Oropharynx opened by the reflection of the lower jaw. 1, Median and lateral palatine ridges; 2, openings of salivary glands; 3, choana; 4, infundibular cleft; 5, body of tongue; 6, root of tongue; 7, "mechanical" papillae; 8, laryngeal mound; 9, glottis; 10, branchial cornu of hyobranchial apparatus; 11, esophagus; 12, position of trachea.

<그림180>. 닭의 구강 구조 (Textbook of Veterinary Anatomy, 4th edition, Saunders)

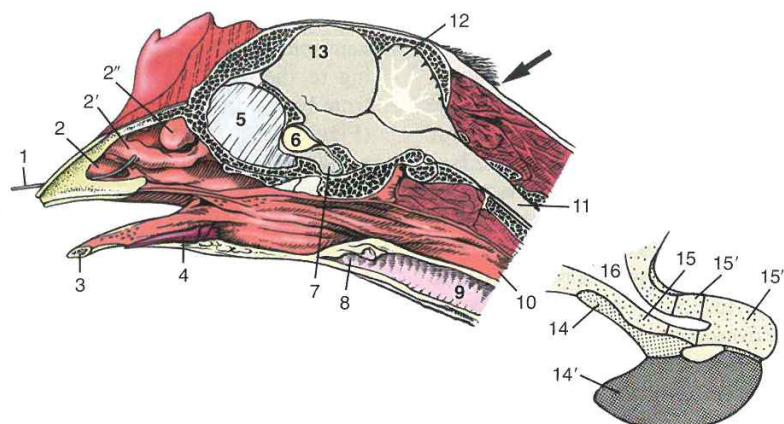


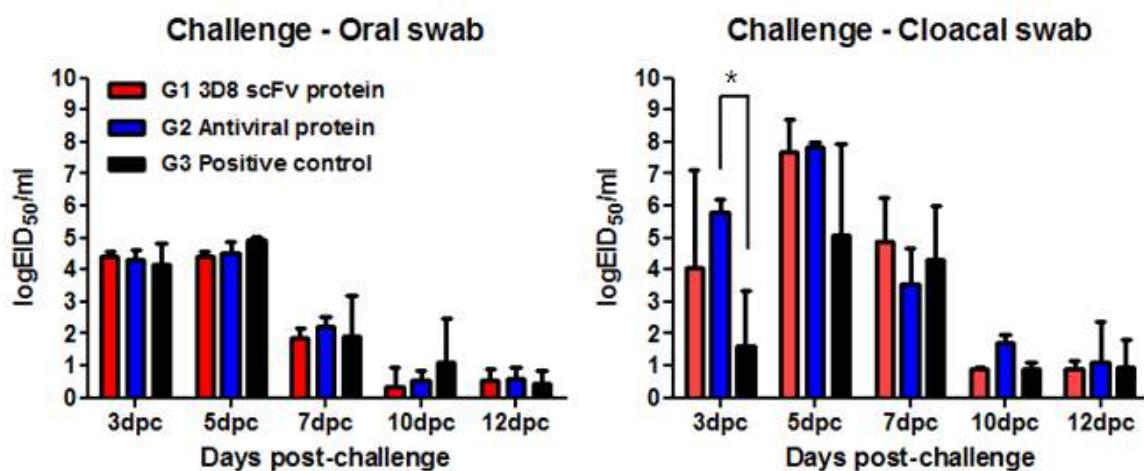
Figure 37-38 Median section of the head with an enlargement of the hypophysis (inset). The arrow indicates the approach to the foramen magnum through which euthanasia may be performed by injection into the brain. 1, Wire in nostril; 2, 2', 2'', rostral, middle, and caudal nasal conchae; 3, mandible; 4, tongue; 5, interorbital septum; 6, optic chiasm; 7, hypophysis (see also inset); 8, larynx; 9, trachea; 10, esophagus; 11, spinal cord; 12, cerebellum; 13, cerebrum; 14, 14', pars tuberalis and pars distalis of the adenohypophysis; 15, 15', 15'', median eminence, infundibulum, and neural lobe of the neurohypophysis; 16, third ventricle.

<그림181>. 닭의 비강 및 구강 구조 (Textbook of Veterinary Anatomy, 4th edition, Saunders), (31)

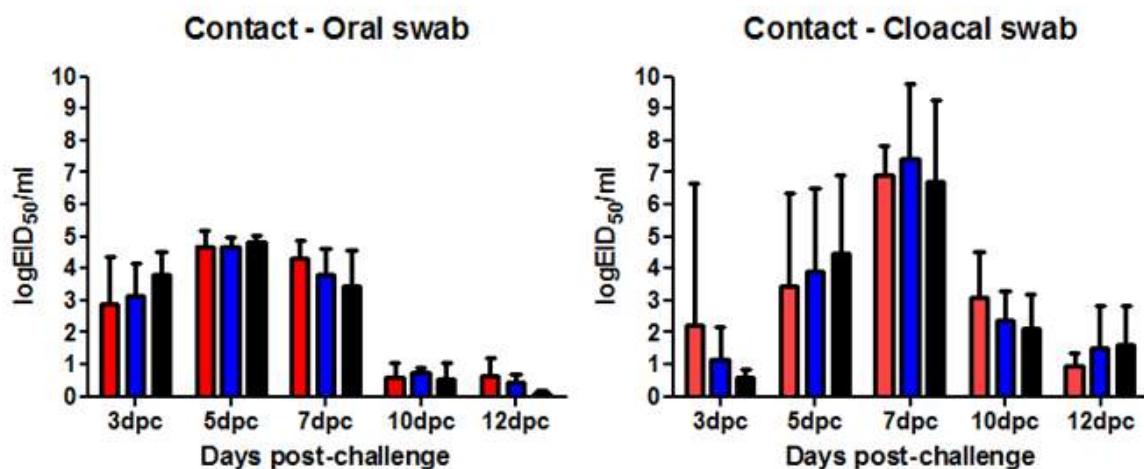
### ○ 연구결과

- 본 과제의 목표인 항인플루엔자 사료첨가제 개발을 위해선 항-바이러스 단백질의 경구 투여 경로에서의 항인플루엔자 효능을 검정해야 할 필요가 있으나, 경구로 물질을 투여 할 경우 소화효소, bile acid, 낮은 pH, 음식물에 의한 시험 물질의 희석 효과, 소화 장기의 지속적 연동 운동 등 소화기 내의 여러 가지 환경이 가지는 변수가 많아 항인플루엔자 물질의 개발 초기 단계에서 경구 투여를 통한 *in vivo* 실험은 변수 통제가 매우 어려

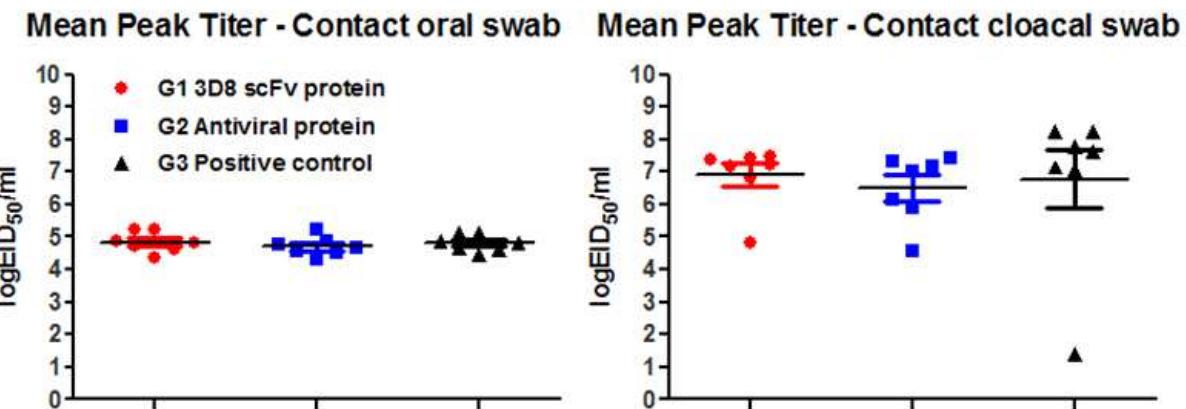
운데 반해 비강 투여의 경우 소화 효소가 존재하지 않고 pH가 중성에 가까운 등 소화기에 비해 실험 물질의 효능을 방해할 요소가 적다. 따라서 항-바이러스 3D8 scFv 혼란가 수분해 항체 정제 단백질의 닦에서의 항인플루엔자 효능 유무를 먼저 판단하기 위해 통제가 어려운 경구 시험에 앞서 비강 투여를 통한 항인플루엔자 시험을 우선 실시하였다. 항-바이러스 3D8 scFv 혼란가 수분해 항체 정제 단백질 및 대조 항-바이러스 단백질의 항인플루엔자 효능 실험 결과는 그림182-185와 같다. 그림182와 183은 바이러스 배출량 변화 양상 확인 결과, 공격접종개체와 접촉전파개체 모두에서 양성대조군과 비교해 유의적 바이러스 배출량 감소는 확인되지 않았다.. 공격접종개체의 총배설강 바이러스 배출량 확인 결과에서 공격접종 후, 3일째 대조 항-바이러스 단백질 투여군이 양성대조군에 비해 유의적으로 큰 바이러스 배출량을 보였다.



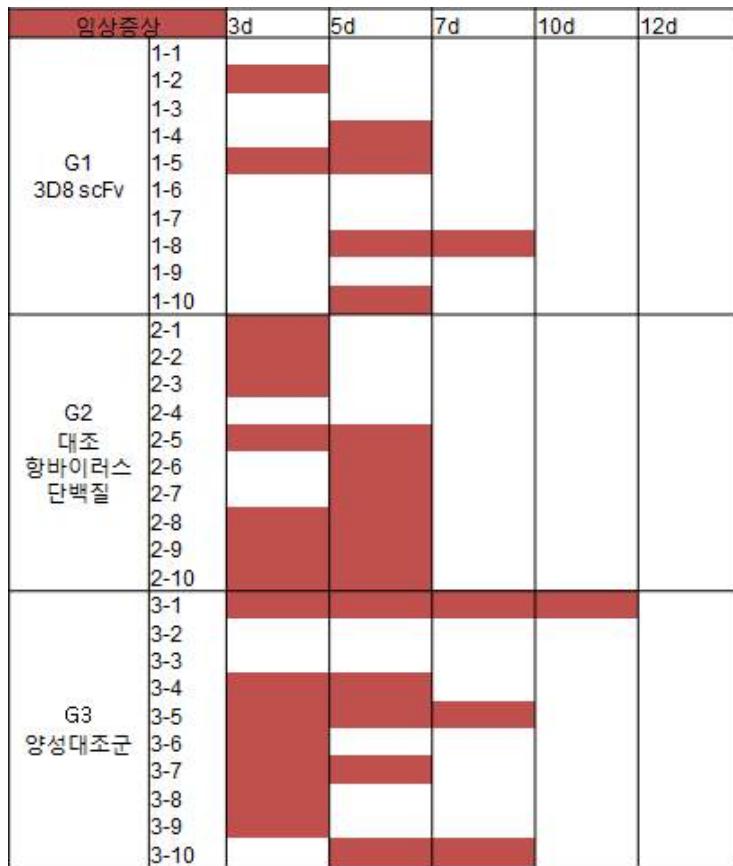
<그림182>. 공격접종개체의 구강 및 총배설강 바이러스 배출량 변화



<그림183>. 접촉전파개체의 구강 및 총배설강 바이러스 배출량 변화



<그림184>. 접촉 전파개체의 구강 및 총배설강 최대 바이러스 배출량



<그림185>. 각 그룹 개체별 임상증상 발현 여부

- 그림185는 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 관찰기간 동안 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염 시 나타날 수 있는 임상증상(안와부종, 비말 및 비루 등의 호흡기 증상, 침울 등)을 보인 실험 개체들을 표시한 것이다. 대조 항-바이러스 단백질 투여군 중 공격접종 개체는 공격접종 후 3일째만 3수 모두에서 임상증상이 관찰되었다. 양성대조군

중 공격접종 개체는 3수 중 1수가 공격접종 후 3일째에서 9일째까지 긴 기간 동안 임상증상을 보였으며, 반면 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 투여군 중 공격접종 개체는 3수 중 1수만이 공격접종 후, 3일째 하루만 임상증상을 보여 인플루엔자 바이러스 감염 후, 나타날 수 있는 임상증상 경감 효과를 보였다. 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질이 마우스 실험 결과 생체 내에서 잔류하는 것으로 나타났고, 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 투여 경로와 인플루엔자 바이러스 공격접종 경로가 비강으로 동일하였기 때문에 항인플루엔자 효능이 관찰된 것으로 분석되었다. 대조 항-바이러스 단백질 투여군 또한 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 투여군보다 적지만 임상증상 경감 효과를 보였다. 접촉전파개체에서 대조 항-바이러스 단백질 투여군은 공격접종 후 관찰기간 중 7수 중 6수가 임상증상을 나타냈고 하루에서 이틀간 증상이 유지되었다. 양성대조군은 공격접종 후, 관찰기간 중 7수 중 모두에서 임상증상이 나타났고 하루에서 3일까지 지속되었다. 반면 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 투여군은 7수 중 4수만이 임상증상을 나타냈고 하루에서 이틀간 증상이 유지되어 공격접종 개체와 마찬가지로 인플루엔자 임상증상 경감 효과를 보였다. 그림179-181에서 닦은 입천장에 choana가 존재하여 포유류 동물과 달리 비강과 구강이 연결된 구조를 가진다. 인플루엔자 바이러스가 개체에서 개체로 접촉 전파되는 경로는 fecal-oral route인데 비강으로 투여된 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질이 비강 및 구강에 잔류하여 임상증상 경감 효과를 나타낸 것으로 분석되었다. 항-바이러스 3D8 scFv 혼산가수분해 항체 정제 단백질 투여군이 양성대조군에 비해 임상증상이 확연히 경감되는 양상을 보였지만, 구강 및 총배설장 바이러스 배출량을 분석한 결과에서는 양성대조군과 유의적 차이가 관찰되지 않았다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

### 제1절 목표대비 달성도

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 식이에 따른 닭의 생리·면역학적 특성 변화 및 장내 지속성 구명	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 표지단백질(GFP 등) 발현하는 재조합 Lactobacillus 이용 닭의 장내에서 Lactobacillus의 장내 지속성 규명</li> <li>- 항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 식이에 따른 닭의 생리적 변화(증체 및 설사 등) 조사</li> <li>- 닭 혈액 내 면역관련 cytokine들의 변화 조사</li> </ul>	60
항-바이러스 단백질을 발현하는 장내 Lactobacillus 개발	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 쥐, 닭의 소장을 분리하여 기존의 장내미생물을 분리, 선별과정 후 16s rRNA 분석을 통한 미생물 동정</li> <li>- Lactobacillus에서 발현 가능한 pSLP111.3에 표지단백질(GFP)를 클로닝</li> <li>- Electroporation을 이용한 형질전환을 통해 GFP를 발현하는 lactobacillus 선발</li> <li>- 재조합항체 유전자를 electroporation을 통해 형질전환시킴</li> <li>- Immunocytochemistry, Flow cytometry, western blot을 통한 재조합 항체를 발현하는 군주 선발</li> <li>- 쥐와 닭의 장내에 존재하는 gram negative균을 16s rRNA 분석을 통해 동정</li> <li>- 재조합 항체를 발현하는 군주 선발 및 발현시스템 구축</li> </ul>	100
세포내 침투성과 안정성이 향상된 항-바이러스 단백질 제재 개발	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항-바이러스 단백질을 생산하였음</li> <li>- 항인플루엔자 항체의 활성 단위 결정과 더불어 단백질 사료 제형화에 필요한 생화학적 특성을 확인함</li> <li>- 항-바이러스 효과 확인</li> <li>- 침투성과 안정성이 향상된 새로운 항체를 개발하였으나, DNA 가수분해 활성을 좀 더 개선할 필요가 있음</li> <li>- 세포내 침투성 항체를 선별하기 위한 시스템을 고안하였으나, 아직 개선 사항이 있음</li> </ul>	100

항-바이러스 재조합 단백질 유전자의 안정적, 안전적 클로렐라 도입 및 scale-up 테스트	5	-리포터 유전자(GFP)를 활용한 클로렐라 형질 전환 기법 개발 및 시스템화 -항-바이러스 재조합 단백질의 안정적 도입을 위한 클로렐라 codon usage profile 작성 -항-바이러스 재조합 단백질 유전자의 클로렐라 최적화 (gene optimization) -항-바이러스 단백질 형질전환체 선발 및 5L Jar-fermentor scale-up 테스트(배양 배지 및 배양 조건 최적화)	100
Lactobacillus 후보 균주 선발과 선발된 Lactobacillus 및 wild-type 클로렐라의 마우스에서의 효능평가	5	-유산균 후보 균주 3종 선발 -3D8 항체 발현 유산균의 마우스에서 인플루엔자 방어 효능 평가 완료	100
항-바이러스 단백질을 발현하는 미세조류 식이에 따른 닭의 생리·면역학적 특성 변화 조사	5	-닭에서 새롭게 개발중인 형질전환 미세조류에 대한 사료첨가제로서의 안정성 평가	100
항-바이러스 단백질 발현이 가능한 생쥐와 닭유래 Lactobacillus 선발	5	-쥐와 닭 유래의 Lactobacillus를 분리, 동정 -항-바이러스 단백질 발현 벡터를 이용하여 electroporation을 통한 형질전환체 구축	100
형질전환 Lactobacillus의 장내 retention time 분석(생쥐, 닭)	5	-선발된 형질전환체들의 retention time 분석을 위한 oral delivery system 확립 -항생제 포함 배지에서 각 균주들의 장 내 retention time 분석	100
생쥐와 닭에서 선발한 Lactobacillus 내에서의 항-바이러스 단백질 발현 효율 측정	5	-Quantitative realtime PCR을 통해 항-바이러스 단백질 발현 효율을 transcript level에서 확인 -FACS 분석을 통해 항-바이러스 단백질 발현 효율을 protein level에서 확인	100
항-바이러스 단백질 발현 효율을 높이기 위한 transcriptome 분석	5	-선발된 총 4종 Lactobacillus 유전체 정보 확립 -일반 배양 조건과 장내 환경에 맞춰 배양한 Lactobacillus로부터 전사체 정보 확립 -유전체와 전사체 정보를 비교함으로써 발현 효율이 높은 프로모터 부위 분석 -발현 효율이 높은 프로모터들 간의 cis-element 분석을 통한 promoter engineering	100

재조합 Lactobacillus 및 재조합 클로렐라에서 분비되는 항인플루엔자 항체의 다양한 활성단위에 따른 조류인플루엔자에 대한 항-바이러스 효과를 세포수준에서 분석	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항-바이러스 재조합 항체의 물리, 화학적 환경에서 기능적 안정성 확인</li> <li>-항-바이러스 재조합 항체의 활성단위에 따른 조류인플루엔자 (H9N2) 증식억제 효과확인</li> <li>-재조합 클로렐라 배양액에서 항-바이러스 재조합항체의 발현수준 분석법 및 핵산분해활성 unit 결정법 확립</li> <li>-재조합 Lactobacillus 및 재조합 클로렐라에서 분비되는 3D8 scFv의 unit에 따른 항-바이러스 활성을 분석</li> <li>-항-바이러스 단백질의 세포내 침투효율 분석 시스템 개발 및 이를 이용한 항체의 세포내 침투효율 정량분석법 개발</li> </ul>	100
항-바이러스 기능성 사료첨가제 개발	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항-바이러스 기능성 증진 및 유지 가능한 사료첨가제 시제품 제작 및 in vitro 활성 검증 완료(기존 항-바이러스 단백질 형질전환 클로렐라 외 항-바이러스 단백질 제재로서의 대장균 배양 상등액 개발로 기능성 증진)</li> <li>-액상체형 사료 첨가제 시제품의 마우스에서 인플루엔자 방어 효능 평가</li> <li>-Jar Fermentor를 이용하여 항-바이러스 단백질 생산 조건 최적화 완료</li> </ul>	100
항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 및 클로렐라의 in vivo(닭, 마우스)에서 인플루엔자 방어 효능 평가	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>-항-바이러스 단백질 발현 유산균의 마우스 비강 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 확인</li> <li>-항-바이러스 단백질 발현 유산균의 닭 경구 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 확인</li> <li>-항-바이러스 단백질 발현 클로렐라의 마우스 경구 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 확인</li> <li>-항-바이러스 단백질 발현 클로렐라의 닭 경구 투여 모델에서 인플루엔자 방어 효능 확인</li> </ul>	100
재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사 및 외부공동 연구팀의 닭을 이용한 연구부분 협력연구	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>-재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제 제조완료</li> <li>-2016년 11월 국내 고병원성 조류인플루엔자 (HPAI)가 발생함에 따라 연구수행이 불가능한 상황</li> </ul>	50
항-바이러스 단백질 발현하는 미생물의 동물의 장내에서 생존능 시험	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>-생쥐(랫)에서 항-바이러스 단백질 발현하는 미생물의 동물의 장내에서 생존능 조사</li> </ul>	100
항-조류인플루엔자 재조합 항체의 경구 투여를 통한 체내 장기에서의 투과력 및 지속능 확인	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>-투여 경로에 따른 단백질의 체내 장기에서의 투과력과 지속능 in vivo imaging으로 확인</li> </ul>	100
항-조류인플루엔자 재조합 항체의 체내 장기에서의 지속능에 따른 체내 독성 분석	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>-단백질의 농도에 따라 나타나는 독성물질의 여부를 blood chemistry 분석으로 확인</li> </ul>	100

항-조류인플루엔자 항체의 항-바이러스 효능 검증	3	-단백질을 처리하였을 때 조류인플루엔자의 증식 억제 여부를 확인	100
Promoter engineering을 통해 향상된 항-바이러스 단백질 발현효율을 보이는 engineered Lactobacillus 구축	3	-In silico 분석을 통해 발현효율이 높은 promoter 부위를 분석하고 Lactobacillus에 최적화된 promoter를 적용	90
재조합 락토바실러스에서 분비되는 항-인플루엔자 항체의 활성단위에 따른 조류인플루엔자에 대한 항-바이러스 효과 분석	3	-항-바이러스 단백질의 세포내 유입에 관여하는 세포표면 수용체를 규명하였음.	100
재조합 클로렐라에서 분비되는 항-인플루엔자 항체의 활성단위에 따른 조류인플루엔자에 대한 항-바이러스 효과 분석	3	-항-바이러스 단백질의 발현숙주, N-말단, C-말단의 변화에 따른 핵산가수분해 활성 차이를 확인하였음.	100
항-바이러스 단백질 및 재조합 균주에 대한 안전성 평가	5	-ICR 마우스를 이용 항-바이러스 단백질에 대한 단회투여 독성평가 시 안전성 확인 완료 -항-바이러스 단백질의 알레르기 유발인자로서의 가능성 확인 시 안전성 확인 완료	100
산업적 생산을 위한 scale-up 테스트	3	-50L JF를 이용한 scale-up 테스트 완료 -최적수율 도출을 위한 scale-up 최적화 완료	100
동물모델을 이용한 사료첨가제 시제품의 항인플루엔자능 검증	3	-위탁기관 (건국대학교)와 연계 마우스 및 닭에서 항인플루엔자능 검증시험 일부 완료 (과제 종료 후에도 닭에서 항인플루엔자능 검증시험 시행 예정)	70

## 제2절 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명		연도	당초 목표 (전체)	실적	달성을 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI		12	8	67	20
	비SCI		7			5
산업재산권	출원		7	3	42	15
	등록		2			5
학술발표	국제		3	11	100	5
	국내		13	19	100	15
품종	출원					
	등록					
인력 양성지원			5	6	100	5
정책제안 기관제출			1			3
영농활용 기관제출			2			2
생물자원 등록 · 기탁						
기능성물질·소재 개발			2	2	100	25
홍보성과				2		
계			54	51	-	100

## 제 5 장 연구 결과의 활용 계획

### 제1절 연구개발결과의 활용방안

- 본 연구에 의해 개발된 핵산가수분해 항체 단백질은 다양한 바이러스에 대해 항-바이러스 효과를 보이므로 조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 구제역 등의 국가 재난형 바이러스성 질병에 치료 및 예방의 목적으로 활용 가능하다.
- 항 핵산 분해 기능을 갖는 재조합 항체는 바이러스성 질병에 대해 닭을 포함한 다양한 가축의 바이러스성 질병에 대해 예방을 위한 사료첨가용 신소재로 활용 가능하다.
- 항-핵산 분해 기능을 가지는 단백질을 분비하는 재조합 *Lactobacillus*는 항 핵산 항체에 대한 항-바이러스 제제와 생균제(probiotics)의 기능을 동시에 갖는 신기능성 항-바이러스 제제로 활용 가능하다.
- 국내 기능성 사료 첨가제 시장에는 약 130여개의 업체가 난립하여 있으나, 증명된 기술력을 확보한 업체는 소수에 불과하며, 농민들에게 막연한 기대감을 조성하는 것이 아닌, 확실한 기능성을 담보로 하는 사료첨가제를 제공함으로서 항생제 사용 금지로 인한 불안감을 해소할 수 있을 것으로 기대된다.
- 면역 증강 효과를 기 입증한 소재인 클로렐라와 프로바이오틱스(*Lactobacillus*)를 복합 소재화 하고, 이에 더하여 생명공학기술을 적용하여 항-바이러스 기능성을 추가함으로서 항생제 대체 효과를 시너지 시켜 단일 소재를 통한 광범위 예방효과를 꾀할 수 있을 것으로 기대된다.

### 제2절 기대성과

#### (1) 기술적 측면

- 바이오 소재물질로부터 발굴된 항-바이러스 물질 개발 과정을 체계화하여 생명공학 및 의학 분야의 연구에 기초자료로 활용한다.
- 본 연구를 통한 세포 및 동물 수준에서 확보된 항-바이러스 효능 및 안전성 검증의 기술은 국내 항-바이러스 물질 개발 연구 분야의 세계적 수준으로의 도약에 기회를 제공 한다.
- 항-바이러스 물질의 실용화 원천 기술의 확보 및 국제 특허와 논문 선점한다.
- 미세조류의 형질전환을 통해 미세조류를 이용한 기능성 소재의 개발 가능함을 보여준다.
- 항생제 대체 소재에 대한 국제적 요구에 맞추어 클로렐라와 *Lactobacillus*의 복합 소재 개발을 통해 시너지 효과를 증명함으로서 기능성 사료 첨가제 개발 기술의 독보적 우위 선점이 가능하다.
- 본 기술은 아이디어에 기반을 둔 지식산업으로 기존의 사료 첨가제 산업에서 벗어나 새로운 산업영역으로 성장이 가능하다.
- 기존 가축의 사료 첨가제들(약용식물 추출물 또는 장내 유용미생물)은 구체적인 작용 기전은 자세히 모르나 효과 있는 것으로 판단되는 것들 이었다. 그러나 본 연구에서는 기존의 것들과 달리 구체적인 기능을 가지는 물질을 이용한 사료 첨가제 개발이 기대된다.

## (2) 경제적 · 산업적 측면

- 항-바이러스 물질 관련 기술 확보로 기술 우위 선점과 질병안전성 구축한다.
- 다양한 바이러스 질병에 대항하는 사료 첨가제의 개발을 통해 축산농가의 경제적 이익 창출에 기여한다.
- 본 연구결과는 축산생명공학 분야에 미래지향적인 사업의 모델을 제시하며 모든 인간의 삶을 풍요롭게 하는 획기적인 발견에 기여할 것으로 기대된다.
- 항생제 대체에 따른 안전성이 확보된 축산물 생산은 궁극적으로 육류 소비증가에 따른 축산농가 소득증대가 기대된다.
- 매년 반복하여 발생되는 조류인플루엔자에 대한 예방이 가능함으로 매년 증가하고 있는 방역 비용 축소할 수 있을 것으로 예상된다.
- 조류인플루엔자는 국가를 초월하여 세계적으로 발생되는 질병으로, 기술의 확립 시 상품의 수출이나 기술 이전 등을 통해 세계적 기술 우위를 확보 할 수 있을 것으로 기대된다.
- 2011년 7월부터 가축 사료에 합성항생제 첨가가 금지됨에 따라 가축의 질병에 대한 면역력을 높여주는 사료 첨가제 시장은 지속적으로 성장하고 있다. 사료 첨가제 시장은 기존 합성항생제 대체물질 및 천연물 유래 항균/항-바이러스제제가 시장에서 크게 주목 받고 있는 상황이다. 그러나 대부분이 기존 약용식물 추출물 및 미생물을 직접 사용하고 있는 상황이다. 본 연구에서 개발하고자 하는 사료 첨가제는 기존 사료 첨가제에 새로운 기능(항-바이러스 능)을 탑재하여 새로운 형태의 사료 첨가제를 개발하고자 하며, 이들이 성공적으로 개발 시 항생제 대체 물질로서 바이오약품시장에서 막대한 부가가치창출이 기대된다.

## 제3절 추가적인 연구 계획

- 현재 보유중인 쥐와 닭에서 분리한 Lactobacillus 4종의 full genome sequencing을 통해 확보한 데이터를 바탕으로 정확한 균주의 동정 및 닭에서 면역 증강 효과를 검증할 계획이며, 이상의 연구에서 도출된 연구결과들을 국제학술지에 논문게재 및 산업체재권 출원 계획이다.
- 본 연구에서 개발하고자 하는 닭 사료 첨가제가 긍정적인 연구결과가 도출시 외부공동 연구팀과 협의하여 사업화 혹은 현장적용 연구 등의 후속 연구 사업을 추진할 계획이다.

### ※ 투고 및 투고 예정 논문

1. Effects of dietary recombinant chlorella supplementation on growth performance, meat quality, blood characteristics, excreta microflora, and nutrient digestibility in broilers. Poult Sci. 2016 Oct 2. pii: pew345. [Epub ahead of print]
2. Effect of 3D8 scFv secreted by Lactobacillus paracasei during contact transmission of influenza virus H9N2 in chicken. (투고 중)
3. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) function as endocytic receptors for an internalizing anti-nucleic acid antibody. (Journal of Biological Chemistry, 투고 중)

4. Difference in catalytic activity of 3D8 scFv depending on expression hosts and Tags.  
(2017.1., 투고 예정)
5. Exchange of constant regions from immunoglobulin of different species dramatically alters antibody stability (2017.3., 투고 예정)
6. Probiotic Lactobacillus paracasei expressing a recombinant protein enhances probiotic activity in mice intestine revealed by metagenomics (투고 예정, Target journal : Frontiers in Microbiology, IF : 4.165)
7. Antiviral activity against H1N1 by intranasally delivered Lactobacillus paracasei ATCC 334 that secreted RNA-hydrolyzing antibody in BALB/c (투고 예정, Target journal : Antiviral research, IF : 4.909)
8. Complete genome sequence of Lactobacillus reuteri JCM 1112, a strain isolated from mouse small intestine (투고 예정, Target journal : Genome Announcement)
9. Whole genome sequence of Lactobacillus johnsonii ATCC 33200 isolate from mouse small intestine (투고 예정, Target journal : Genome Announcement)
10. Safety evaluation and gut-associated immune enhancement of Lactobacillus reuteri JCM 1112 isolate from mouse intestine (투고 예정, Target journal : Food and Chemical Toxicology, IF : 3.584)
11. Safety and Immune-Boosting Effect by Cytokine Expression of Lactobacillus johnsonii ATCC 33200, Isolated from Mouse Intestine. (투고 예정, Target journal : World Journal of Microbiology and Biotechnology, IF : 1.532)

## 제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 해당사항 없음

## 제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

- 해당사항 없음

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	NTIS장비 등록 번호

○ 해당사항 없음

## 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치

### 이행실적

1. 해당부서 : 국립축산과원, 아주대학교
2. 담당자 : 박주영(063-238-7183), 이병대(031-219-5402)
3. 안전조치 이행계획
  - 1) 연구실 정기점검 실시
    - 연간 1회 이상 의무적으로 반드시 실시
    - 안전진단 실시 후 반드시 진단결과에 의거 지적사항 보완 조치
  - 2) 연구실 정밀안전진단 실시
    - 2년에 1회 이상 의무적으로 실시
    - 안전진단 실시 후 반드시 진단결과에 의거 지적사항 보완 조치
  - 3) 일상점검(법적 점검)
    - 매일 시행
    - 연구실 안전관리책임자
  - 4) 참여연구원의 교육훈련
    - 매년 1회 이상 실험실 안전 및 소방교육 실시
  - 5) 실험실 온라인 안전교육 실시
    - 매 반기 6시간 이상 시행
    - 원내게시판 → 자료실 → 안전교재 → 안전교육 자료 공지
    - 교육내용 : 연구실 안전환경 조성법령 및 유해, 위험요인 관련
  - 6) 연구 활동종사자 건강검진 실시
    - 실험실 연구 활동종사자 건강검진 실시
    - 매년 정기 건강검진 시 시행
  - 7) 연구 활동종사자 보험가입
    - 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신 처리 지속적으로 이행
    - 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제14조 제1항 및 시행령 제15조에 의거 의무가입
    - 가입대상 : 연구원(대학, 대학원생), 연구원(연구소 소속), 기타 등
  - 8) 기타 :
    - 안전관리규정 비치 및 일상점검의 지속적 시행
    - 폐약처리 : 지정폐기물로 처리
    - 세안기 설치 : 수량 파악 후 셀라인 일괄 지급
    - 시약장 가이드바 설치 : 시약 낙하 방지
    - 가스용기는 개별로 체인을 설치하여 넘어지지 않도록 조치
    - 비접지용콘센트 사용금지 및 교체

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	A nucleic-acid hydrolyzing single chain antibody confers resistance to DNA virus infection in HeLa cells and C57BL/6 mice	성균관 대학교		PLoS pathogens	7.95	2014.6.26	중복사사	SCI
2	논문	Development of Lactobacillus paracasei harboring nucleic acid-hydrolyzing 3D8 scFv as a preventive probiotic against murine norovirus infection	성균관 대학교		Applied Microbiology and Biotechnology	3.337	2014.12.9	중복사사	SCI
3	논문	Therapeutic Strategy for the Prevention of Pseudorabies Virus Infection in C57BL/6 Mice by 3D8 scFv with Intrinsic Nuclease Activity	성균관 대학교		Molecules and Cells	2.09	2015.8.7	중복사사	SCI
4	논문	Preventive activity against Influenza(H1N1) Virus by Intranasally Delivered RNA-Hydrolyzing Antibody in Respiratory Epithelial Cells of Mice	성균관 대학교		Viruses	3.353	2015.9.21.	단독사사	SCI
5	논문	Transcriptional Regulation of Cathelicidin Genes in Chicken Bone Marrow Cells	국립 축산 과학원		Poultry Science	1.672	2016.4.	단독사사	SCI
6	특허	생쥐의 락토바실러스 루테리 및 이를 이용한 면역증진용 조성물	국립 축산 과학원		국내		2016.11.11	단독사사	
7	특허	생쥐의 락토바실러스 존스니 및 이를 이용한 면역증진용 조성물	국립 축산 과학원		국내		2016.11.11	단독사사	

## 제 11 장 기타사항

1) 2014년 1월에 발생한 고병원성 조류인플루엔자(HPAI)로 인해 국립축산과학원 동물바이오 공학과 계사 담당 연구자 비상근무 및 현장 연구시설이 1월부터 8월말까지 사용이 제한되어 연구수행이 불가능한 상황이었으며, 비상근무 해제 후, 연구수행에 필요한 시간 부족으로 인해 전체 연구내용이 아니라 필수 연구내용만을 선택하여 추진하였다.

구분	책임자	당초 및 변경 전 연구내용	변경 후 연구내용
제1세부과제 (PJ01020101)	변승준	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 표지단백질(GFP 등) 발현하는 재조합 Lactobacillus 이용 닭의 장내에서 Lactobacillus의 장내 지속성 규명</li> <li>○ 항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 식이에 따른 닭의 생리적 변화(증체 및 설사 등) 조사</li> <li>○ 닭 혈액 내 면역관련 cytokine들의 변화 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당초 3가지 연구내용 중 하나인 “항-바이러스 단백질을 발현하는 Lactobacillus 식이에 따른 닭의 생리적 변화(증체 및 설사 등) 조사”의 연구 내용의 일부분인 핵산가수분해 항체가 발현되는 유산균을 생균상태로 닭에 강제 투여 후, 조류인플루엔자 바이러스의 전파 억제 효능을 확인 실험을 외부 용역연구 형태로 추진(본 연구는 조류인플루엔자 바이러스의 전파 억제 효능을 확인하는 시험으로서 우리원에서는 유산균 투여군 간의 상호 오염을 방지 할 수 있는 BSL-2 시설 및 닭 전용 격리사육 시설이 없어 외부용역을 추진)</li> </ul>

2) 농촌진흥청 LMO팀과 LMO 사료첨가제 심사절차 협의한 결과(2015.12.1.), LMO이용 사료 첨가제는 심사절차가 매우 까다롭고 어려우므로 GMO 또는 목적 단백질(3D8 scFv) 직접 이용이 조기성과 도출이 가능하다는 의견을 수용하여 3차년도 공동연구과제의 협약을 다음과 같이 변경 요청하여 승인(공문서: 동물바이오공학과-221, 2016.2.5.)받아 연구를 진행하였다.

구분	책임자	당초 및 변경 전 연구내용	변경 후 연구내용
제1세부과제 (PJ01020101)	변승준	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재조합 락토바실러스와 미세조류 혼합 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재조합 3D8 scFv 단백질 사료 첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사</li> <li>○ 항-바이러스 단백질 발현 재조합 발현하는 미생물의 장내 생존능 시험</li> </ul>
제1협동과제 (PJ01020102)	이석찬	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-조류인플루엔자 재조합 항체를 발현하는 Lactobacillus와 미세조류의 혼합사용에 의한 항-바이러스 효능 조사</li> <li>○ Lactobacillus와 미세조류의 상</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-조류인플루엔자 재조합 항체의 경구투여를 통한 체내 장기에서의 투과력 및 지속능 확인</li> <li>○ 항-조류인플루엔자 재조합 항</li> </ul>

구분	책임자	당초 및 변경 전 연구내용	변경 후 연구내용
		<p>호작용을 통한 향상된 항-조류 인플루엔자 재조합 항체의 발현량 및 지속능 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 쥐에서 항-조류인플루엔자 재조합 항체를 생산하는 <i>Lactobacillus</i>와 미세조류의 상호작용을 통한 향상된 항-바이러스 효능 확인</li> <li>○ 항-조류인플루엔자 재조합 항체를 생산하는 <i>Lactobacillus</i>와 미세조류의 상호작용을 통한 항체 단백질의 향상된 세포침투 및 전신 확산효능 확인</li> </ul>	<p>체의 체내 장기에서의 지속능에 따른 체내 독성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-조류인플루엔자에 대한 항-바이러스 효능 검증</li> <li>○ Promoter engineering을 통해 향상된 항-바이러스 단백질 발현효율을 보이는 engineered <i>Lactobacillus</i> 구축</li> </ul>
제2협동과제 (PJ01020103)	권명희	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재조합 락토바실러스에 의한 면역증강 효과를 닭에서 분석</li> <li>○ 재조합 클로렐라에 의한 면역 증강 효과를 닭에서 분석</li> <li>○ 재조합 락토바실러스와 재조합 클로렐라 혼합물에 의한 면역 증강 효과를 닭에서 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-바이러스 재조합 항체의 섭취에 따른 닭 체내 장기에서의 투과력 및 지속능 확인</li> <li>○ 항-바이러스 재조합 항체의 닭 체내 장기에서의 지속능에 따른 체내 독성 분석</li> <li>○ 항-바이러스 단백질의 작용기전 규명</li> </ul>
제3협동과제 (PJ01020104)	한재갑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 클로렐라와 <i>Lactobacillus</i> 복합형 항-바이러스 기능성 사료 첨가제 개발</li> <li>○ <i>Lactobacillus</i>와의 사료첨가제 복합 제형 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5L-jar fermentor scale <i>lactobacillus</i> 복합 제형화 기술 개발</li> <li>- 고형 발효 condition 최적화</li> <li>- 클로렐라 단독 사료 첨가제와 복합 제형 사료 첨가제의 항-바이러스 기능성 효과 검증</li> </ul> </li> <li>○ 동물 모델을 이용한 시너지 효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 위탁 기관 연계, 동물 모델을 이용한 사료첨가제의 항-바이러스 기능성 검증</li> <li>- 항-바이러스 기능성을 확보하기 위한 최적 dosage 산출</li> </ul> </li> <li>○ 산업적 생산을 위한 scale-up 테스트 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50L jar fermentor를 이용한 scale up 생산 시험</li> <li>- 최적 수율 도출을 위한 scale up 최적화</li> <li>- 사료 첨가제 제형화</li> </ul> </li> <li>○ 동물모델을 이용한 사료첨가제 시제품의 항인플루엔자능 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 닭의 장 내까지 활성화된 단백질의 전달을 위한 사료 첨가제 시제품 제작</li> <li>- 위탁 기관 연계, 동물 모델을 이용한 사료첨가제의 항-인플루엔자능 검증</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-바이러스 단백질 및 재조합 균주에 대한 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ICR 마우스를 이용하여 항-바이러스 단백질에 대한 단회투여 독성 평가</li> <li>- 항-바이러스 단백질의 알레르기 유발인자로서의 가능성 확인</li> <li>- LMO 위해성 심사 평가자료 작성을 위한 안전성 자료 확보</li> </ul> </li> <li>○ 산업적 생산을 위한 scale-up 테스트 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50L jar fermentor를 이용한 scale up 생산 시험</li> <li>- 최적 수율 도출을 위한 scale up 최적화</li> <li>- 사료 첨가제 제형화</li> </ul> </li> <li>○ 동물모델을 이용한 사료첨가제 시제품의 항인플루엔자능 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 닭의 장 내까지 활성화된 단백질의 전달을 위한 사료 첨가제 시제품 제작</li> <li>- 위탁 기관 연계, 동물 모델을 이용한 사료첨가제의 항-인플루엔자능 검증</li> </ul> </li> </ul>

구분	책임자	당초 및 변경 전 연구내용	변경 후 연구내용
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사료첨가제 제형화 및 시너지 효과 변화 추적, 확인</li> <li>○ 시제품 생산 및 시장 출시 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2,400-kL jar fermenter를 이용한 항-바이러스 재조합 단백질을 발현하는 클로렐라 균주 생산</li> <li>- Lactobacillus와 복합 사료첨가제형화</li> <li>- In vitro / in vivo 활성 검증, 시너지 효과 검증</li> <li>- 시제품 출시</li> </ul> </li> <li>○ 개발한 사료 첨가제를 섭취한 닭고기의 안정성 검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상(주)의 식품안전센터 의뢰, 공인 성적 확인</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항-인플루엔자능 기능성 확보를 위한 최적 dosage 산출</li> </ul>
위탁과제 (PJ0102010401)	송창선	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-바이러스 단백질 발현 유산균 및 클로렐라 병합투여 시 인플루엔자 및 살모넬라에 대한 in-vivo 효능 평가</li> <li>○ 항-바이러스 단백질 발현 유산균 및 클로렐라 병합투여 시 마우스에서 인플루엔자 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- BALB/c 마우스를 이용하여 항-바이러스 발현 유산균 및 클로렐라를 비강으로 병합 투여 시 인플루엔자 억제 정도를 확인</li> <li>- 치사율 변화, 체중변화 및 임상증상 확인 및 폐내 바이러스 정량 분석</li> </ul> </li> <li>○ 항-바이러스 단백질 발현 유산균 및 클로렐라 병합투여 시 마우스에서 살모넬라 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- BALB/c 마우스를 이용하여 항-바이러스 발현 유산균 및 클로렐라를 구강으로 병합 투여 시 살모넬라 억제 정도를 확인</li> <li>- 치사율 변화, 체중변화 및 임상증상 확인</li> </ul> </li> <li>○ 항-바이러스 단백질 발현 유산균 투여 시 닭에서 인플루엔자 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3주령 SPF chicken을 이용하여 항-바이러스 단백질 경구 투여 시 인플루엔자 억제정도를 확인</li> <li>- 치사율 변화, 임상증상 및 바이러스 배출량 및 배출기간 확인</li> <li>- 항-바이러스 단백질 닭 조직 내 전달 정도 확인</li> </ul> </li> <li>○ 사료첨가제 시제품 경구 투여 시 닭에서 인플루엔자 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3주령 SPF chicken을 이용하여 사료첨가제 시제품을 경구 투여 시 인플루엔자 방어능 확인</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항-바이러스 단백질 경구 투여 시 마우스에서 인플루엔자 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- BALB/c 마우스를 이용하여 항-바이러스 단백질을 경구 투여 시 인플루엔자 억제정도를 확인</li> <li>- 치사율 변화, 체중변화 및 임상증상 확인, 폐내 바이러스 정량 분석</li> <li>- 조직검사를 통해 항-바이러스 단백질 조직 내 전달 정도 확인</li> </ul> </li> <li>○ 항-바이러스 단백질 경구 투여 시 닭에서 인플루엔자 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3주령 SPF chicken을 이용하여 항-바이러스 단백질 경구 투여 시 인플루엔자 억제정도를 확인</li> <li>- 치사율 변화, 임상증상 및 바이러스 배출량 및 배출기간 확인</li> <li>- 항-바이러스 단백질 닭 조직 내 전달 정도 확인</li> </ul> </li> <li>○ 사료첨가제 시제품 경구 투여 시 닭에서 인플루엔자 방어효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3주령 SPF chicken을 이용하여 사료첨가제 시제품을 경구 투여 시 인플루엔자 방어능 확인</li> </ul> </li> </ul>

구분	책임자	당초 및 변경 전 연구내용	변경 후 연구내용
		<p>여 유산균의 비강 및 경구 투여 시 인플루엔자 방어능 향상 정도를 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 치사율 변화, 임상증상 및 바이러스 배출량 및 배출기간 확인</li> <li>- 항-인플루엔자 단백질 닭 조직 내 전달 정도 확인</li> </ul> <p>○ 항-바이러스 단백질 발현 유산균 투여 시 닭에서 살모넬라 방어효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3주량 SPF chicken을 이용하여 유산균의 경구 투여 시 인플루엔자 방어능 향상 정도를 확인</li> <li>- 치사율 변화 및 임상증상 확인</li> <li>- 소장 내 공격접종 균주 정량적 확인 : 소장의 균을 재분리하여 살모넬라 균 수(CFU)를 측정</li> </ul>	<p>인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 치사율 변화 및 임상증상 확인</li> </ul>

3) 협약변경 승인요청[공문서: 대상주식회사-D20160807924(2016.8.12.), 동물바이오공학과-1196(2016.8.16.)] 제1세부 “닭에서 항-바이러스 단백질을 발현하는 사료 첨가제 특성 구명” 연구과제 연구개발 내용의 조사 항목들 가운데 “재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사”에 필요한 재조합 3D8 scFv 단백질의 양이 제3협동 연구팀(주)대상이 운영하고 있는 실험실에 보유중인 대장균 배양기에서 생산할 수 있는 범위를 벗어나 시험 규모(시험 동물수수, 시험기간 그리고 처리구)를 축소하여 추진한다.

구분	책임자	당초 및 변경 전 연구내용	변경 후 연구내용
제1세부과제 (PJ01020101)	변승준	<p>○ 재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물 : 육계병아리</li> <li>- 사양 시험 기간 : 사양시험(5주), 분석기간(8주)</li> <li>- 처리구 : 5반복/처리, 15마리/반복</li> </ul>	<p>○ 재조합 3D8 scFv 단백질 사료첨가제가 닭의 생리에 미치는 영향 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공시동물 : 병아리</li> <li>- 사양 시험 기간 : 사양시험(3주), 분석기간(8주)</li> <li>- 처리구 : 3처리, 7마리/처리</li> </ul>

## 제 12 장 참고문헌

1. Waterfowl ecology and avian influenza in California: do host traits inform us about viral occurrence? Hill NJ, Takekawa JY, Cardona CJ, Ackerman JT, Schultz AK, Spragens KA, Boyce WM. *Avian Dis.* 2010 Mar;54(1 Suppl): 426–32.
2. 안전축산물 생산을 위한 생산 및 도축단계에서의 식중독 유발 가금 파라티푸스 저감화 대책. 송창선. *Safe food.* 2013, 8(2): 10–15.
3. 농림수산식품 주요 통계(2011).
4. 농림수산식품 주요 통계(2011).
5. 국립수의과학검역원 연구보고서(가축 및 축산물 내 주요 항생제내성 실태조사 및 평가). 정석찬. 2009.
6. Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the *Salmonella* invasion and inflammation of broiler chicks. Chen CY, Tsien HY, Lin CL, Yu B, Chen CS. *Poult Sci.* 2012 Sep;91(9): 2139–47.
7. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. Khan M, Raoult D, Richet H, Lepidi H, La Scola B. *Br Poult Sci.* 2007 Dec;48(6): 732–5.
8. 농업기술실용화재단 보고서(천연항생제 관련 동향 보고서, 배합사료 항생제 대체제 중심으로). 최윤희, 염인용, 김수연, 전희중, 박병도, 정이연, 2011.
9. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. Poo H, Pyo HM, Lee TY, Yoon SW, Lee JS, Kim CJ, Sung MH, Lee SH. *Int J Cancer.* 2006 Oct 1;119(7): 1702–9.
10. 육계의 성장 촉진을 위한 사료 첨가제로서의 희토. 함숙경, 송태화, 짱광친, 허삼남, 박홍석. *한국가금학회지.* 2006 33(3): 233–238.
11. 목초액 함유 활성탄의 첨가가 육계 생산성 및 계란 내 항생제 잔류에 미치는 영향. 성은일, 유선종, 안병기, 조태수, 안병준, 최돈하, 강창원. *한국가금학회지.* 2006 33(4): 283–293.
12. 허브 및 식물 추출물의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향. 김찬호, 백인기. *한국가금학회지.* 2008 35(1): 71–78.
13. TMR 제조 시 수분 함량 및 발효제(*Lactobacillus plantarum*) 첨가유무가 사료가치에 미치는 영향. *한국초지조사료학회지.* 2007 27(3): 197–208.
14. 육계에 대한 유산균의 장내 생존성 및 적정 급여 방법에 대한 연구. 김동욱, 김지혁, 강근호, 강환구, 이상진, 이원준, 김상호. *한국동물자원과학회지.* 2008 50(6): 807–818.
15. 바실러스 BC1212와 설팩틴의 병용투여가 이유돈의 성장에 미치는 영향. 김명석, 임종환, 박병권, 황윤환, 송인배, 박승춘, 윤효인. *한국임상수의학회지.* 2009 26(2): 117–122.
16. Oral immunization with recombinant *lactobacillus plantarum* induces a protective immune response in mice with Lyme disease. del Rio B1, Dattwyler RJ, Aroso M, Neves V, Meirelles L, Seegers JF, Gomes-Solecki M. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Sep;15(9): 1429–35.
17. Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? Berg RD. *Trends Microbiol.* 1998 Mar;6(3): 89–92.

18. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. Pant N, Hultberg A, Zhao Y, Svensson L, Pan-Hammarstrom Q, Johansen K, Pouwels PH, Ruggeri FM, Hermans P, Frenken L, Boren T, Marcotte H, Hammarstrom L. *J Infect Dis.* 2006 Dec 1;194(11): 1580–8.
19. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Seegers JF. *Trends Biotechnol.* 2002 Dec;20(12): 508–15.
20. Stimulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells by an aqueous Chlorella extract. Ewart HS, Bloch O, Girouard GS, Kralovec J, Barrow CJ, Ben-Yehudah G, Suárez ER, Rapoport MJ. *Planta Med.* 2007 Jul;73(8): 762–8.
21. Hot water extracts of Chlorella vulgaris reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. Hasegawa T, Okuda M, Makino M, Hiromatsu K, Nomoto K, Yoshikai Y. *Int J Immunopharmacol.* 1995 Jun;17(6):505–12.
22. Effects of Chlorella vulgaris on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Dantas DC, Queiroz ML. *Int J Immunopharmacol.* 1999 Aug;21(8): 499–508.
23. Effects of Chlorella vulgaris extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. Queiroz ML, Bincoletto C, Valadares MC, Dantas DC, Santos LM. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002 Aug; 24(3):483–96.
24. Oral administration of hot water extracts of Chlorella vulgaris increases physical stamina in mice. An HJ, Choi HM, Park HS, Han JG, Lee EH, Park YS, Um JY, Hong SH, Kim HM. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(4): 380–6.
25. Identification of the most abundant lactobacillus species in the crop of 1- and 5-week-old broiler chickens. Abbas Hilmi HT, Surakka A, Apajalahti J, Saris PE. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Dec;73(24): 7867–73.
26. Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. Aikman PC, Henning PH, Humphries DJ, Horn CH. *J Dairy Sci.* 2011 Jun;94(6): 2840–9.
27. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. Bhardwaj A, Gupta H, Kapila S, Kaur G, Vij S, Malik RK. *Int J Food Microbiol.* 2010 Jul 15;141(3): 156–64.
28. Fate and efficacy of lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* in the mammalian gastrointestinal tract. Dobson A, Crispie F, Rea MC, O'Sullivan O, Casey PG, Lawlor PG, Cotter PD, Ross P, Gardiner GE, Hill C. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011 Jun;76(3): 602–14.
29. Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical *Lactobacillus* strains in relation to safety aspects of probiotics. Klein G. *Foodborne Pathog Dis.* 2011 Feb;8(2): 267–81.
30. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* CJL-112 on horizontal

transmission of influenza virus in chickens. Youn HN, Lee YN, Lee DH, Park JK, Yuk SS, Lee HJ, Yeo JM, Yang SY, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. Poult Sci. 2012 Oct;91(10): 2517-22.

31. Textbook of Veterinary Anatomy (4th Edition). Keith M. Dyce, Wolfgang O. Sack, Cornelis Johannes Gerardus Wensing. 2010.

## 주         의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「친환경 안전농축산물생산 기술개발 사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「친환경 안전농축산물생산기술개발 사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.