

최 중
연구보고서

젖소로부터 위염예방우유 생산기술 개발

Development of Technology on Production of
Gastritis Prevention Milk in Dairy Cows Immunized
with *H. pylori* antigens

대구한의대학교
경상북도축산기술연구소
대구가톨릭대학교
동국대학교 의과대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “젖소로부터 위염예방우유 생산기술 개발에 관한 연구” 과제 (세부1과제 : *H. pylori* 항원소재의 분리정제 및 면역우유 백신개발, 세부2과제 : 주요항원평가 및 면역우유의 생산최적화 확립, 세부3과제 : 면역우유의 품질과 가공적성평가 및 유제품 개발, 세부4과제 : In vitro에서 *H. pylori* 효과 평가 및 면역우유의 인체 임상실험에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 10 월 일

주관연구기관명 : 대구한의대학교

총괄연구책임자 : 배 만 중

세부연구책임자 : 배 만 중

연 구 원 : 이 성 태

연 구 원 : 예 은 주

연 구 원 : 김 수 정

협동연구기관명 : 경상북도축산기술연구소

협동연구책임자 : 김 병 기

연 구 원 : 김 순 태

연 구 원 : 박 창 호

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 이 신 호

연 구 원 : 박 나 영

연 구 원 : 박 경 남

협동연구기관명 : 동국대학교의과대학

협동연구책임자 : 서 정 일

연 구 원 : 박 윤 선

연 구 원 : 손 석 만

요 약 문

I. 제 목

젖소로부터 위염예방우유 생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

위염과 위궤양을 앓고있는 환자의 대부분은 *Helicobacter pylori*에 감염되어 있고, 이균은 위점막에 존재하며 여러가지 다른 위험요인과 함께 위암의 중요한 원인이 되는 것으로도 보고되고 있다.

*Helicobacter pylori*의 감염률은 전세계적으로 상당히 높아 북유럽에서는 50세 이상 성인의 50%이상 감염되어 있으며 개발도상국가나, 신흥공업국의 경우 성인의 80%이상 감염된 것으로 추정되고 있다. 우리나라에서는 1999년 조사자료에 의하면 농촌지역에서 66%이상 감염된 것으로 보고되고 있다.

한편 우리나라의 축산관련 산업은 축산물개방으로 수입육이 봇물처럼 밀려오는 시점에서 점차 국제경쟁력 하락은 낙농업도 마찬가지이다. 최근 우유소비율의 둔화로 재고분유가 2002년 3월 현재로 16,200톤으로 전년보다 약 15%이상 증가되어 우유업체들의 우유소비에 많은 어려움에 처하고 있으며, 정부에서도 젖소 도태 등 사육두수 줄이기에 앞장서고 있는 실정이다.

이런 상황에서 상품성과 기능이 뛰어나고, 소비자 욕구에 충족시킬 수 있는 고품질 축산물을 생산한다면 우유소비를 비롯하여 축산물 소비를 향상시켜 국제경쟁력도 높일 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구 및 기술개발 사업에서는 위염 원인균인 *Helicobacter pylori* 항원을 이용해서, 특이항체 및 면역성분을 많이 함유한 면역우유를 생산하고, 가공적성 및 임상효능을 검증함으로써 이를 근거로 고기능성 축산물 및 유제품을 생산하여 국민건강 증진에 이바지하고자 한다. 뿐만 아니라 제품의 기술고도화, 고급화 및 고부가가치화함으로써 농가소득증대 및 지역과 국가경제에 이바지하고자 한다.

1) 기술적 측면

- 축산물 분야의 경쟁력 강화를 위해서 생명공학기법을 이용한 고부가 고기능성 제품의 생산확대가 예상되며 이에 대한 대책이 시급하다.
- 본 연구는 면역생물공학 기법을 이용한 연구로 국가경쟁력의 지속적인 성장을 위한 대체기술 기반조성에 필수적이다.
- 농가 및 축산업의 제품다양화를 위한 신기술의 개발이 요청된다.

2) 경제·산업적 측면

- 고부가 차세대 축산물 산업의 육성이 시급하다.
- 생명과학기술 도입에 의한 축산산업의 국제경쟁력 확보가 시급하다.
- 재고분유의 축척으로 낙농산업의 활로개척이 시급하다.
- 일반제품과 차별화 된 질병 예방 및 치료보조용 우유를 개발함으로써 유업체의 활성화가 요청된다.
- 농축산물의 개방에 대응한 새로운 고부가, 고기능, 고품질의 경쟁우위의 축산제품 개발이 시급하다.

3) 사회·문화적 측면

- 고기능성우유 생산으로 서민층의 경제성과 편이성이 확보된 국민보건 향상에 이바지한다.
- 위염, 위궤양 및 위암환자에 대한 보다 경제성과 편이성이 고려된 예방 치료 관리가 요청된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

면역시스템 기법이나 항원항체 반응을 이용한 특이항체의 생산 응용 및 그 활용도가 점점 증대되고 있다. 피동면역 소재로서의 항체는 선천적 또는 후천적 면역결핍증을 앓고 있는 신생아나 어린이처럼 면역기능이 떨어져 항체를 생산할 수 없는 이들에게 소화관 감염에 대한 보호기능이 있고, 또한 약물, 영양결핍, 노화에 의해서 면역기능이 떨어진 성인이나 어린이에게도 활용할 수 있다. Rotavirus는 신생아에게 장염을

일으키는 주요 감염원이며, 이들에 대한 특이항체의 경구투여는 Rotavirus에 의한 설사병에 유용한 약물이 될 수 있다는 보고도 있다. 축산물을 이용하여 생산된 특이항체는 세균성감염 설사병의 치료와 증치에 대한 보호효과가 있고, 특히 IgY는 비교적 산과 열에 안정하기 때문에 위염치료 및 예방에 유의한 실험결과가 보고 되어있다.

특이항체를 식품분야 소재로 산업화에 활용한 빈도는 아직 미미한 상태에 있었다. 그 이유는 경제성과 적용성 그리고 기술적 측면에서 만족을 충족시키지 못한 것으로 판단되나 최근에 면역학, 단백질공학, 생명공학 등의 발전과 기술 향상으로 식품 신소재로서의 활용성이 점차 높아질 것으로 기대된다. 따라서 본 연구의 최종목표는 위염 원인균인 *Helicobacter pylori* 감염의 예방과 치료보조효과를 갖는 기능성우유를 생산하는데 있다.

가. 연구개발 목표와 내용

- Anti-*H. pylori* 항체함유 면역우유생산과 항체특성평가
- 면역우유 생산용 면역강화 소재(Adjuvant) 탐색 및 개발
- Anti-*H. pylori* 항체를 생산하는 특이항원 분석
- *H. pylori* 특이항원 및 면역강화 소재의 면역성 및 실용성 평가
- 면역우유의 Anti-*H. pylori* 항체의 물리화학 특성조사
- Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유 생산 최적조건 조사 및 확립
- 위염 위궤양 예방과 환자의 치료보조용 및 대체의약 면역유제품 개발
- 면역우유를 이용한 기능성 유제품개발
- Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유의 효능 평가 및 임상치료 효과 검정

본 연구는 학·연(관) 공동연구로서 “위염 원인균인 *H. pylori*를 항원으로한 특이항체 및 면역강화 물질을 다량 함유한 면역우유생산과 생산된 우유의 항체 및 면역우유 생산용 젖소용 백신소재 개발과 면역강화 소재의 대량생산 체계확립과 물리화학적 특성 조사를 첫번째 목표로 하고, “젖소로부터 면역우유 생산의 최적화 조건확립” “면역우유의 품질 및 가공적성 평가 및 새로운 기능성 우유개발”이 그 다음 목표이다. 최종적으로 면역우유의 실용성과 실효성의 근거를 제시하고자 “면역우유의 항세균 효

과검정 및 *H. pylori* 감염에 의한 소화불량환자를 대상으로한 임상치료 효과검정” 분야를 경주동국대학교 난치병연구센터 소화기내과 서정일 박사팀에서 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. Anti-*H. pylori* 항체함유 면역우유생산과 항원특성평가

가. 연구결과

본 연구는 위염, 위궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기 질환의 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori*균을 항원으로 하여 젖소에 면역시킨 후 생산된 우유의 anti-*H. pylori* 항체의 생성능을 검토하고, 백신 투여량과 항체 생성과의 관계, 항원 항체의 특이성, *H. pylori*균 응집력, 등의 영향을 알아보았다.

1) 2주간 4회에 백신을 피하주사 하면서, 백신 투여량에 따른 혈청과 유청내의 anti-*H. pylori* 항체의 함량은 10ml, 20ml, 30ml 백신투여 모든 군에서 대조구에 비해서 높은 양의 항체 생성을 확인하였다. 유의적인 차이는 없었으나 20ml투여가 항체 생성이 가장 많은 것으로 조사되었다. 비유기간별 anti-*H. pylori* 항체의 함량은 혈청, 유청 모두 2주째부터 항체생성이 확인되었고, 지속적인 증가를 보였으며, 비유초기군에서는 8주째에 최대함량을 보였으나 전반적으로 6주째까지 증가하여 그 이후부터는 측정 14주까지 지속성이 유지되었다. 비유기간별 항체역가는 초기, 중기, 후기 순으로 차이를 보였으며 초기에 항체역가가 가장 높은 경향을 보였다.

2) Anti-*H. pylori* 항체의 SDS-PAGE에 의한 분자량측정 결과 heavy chain은 50kDa정도, light chain은 24kDa정도로 확인되었다.

3) *H. pylori* 균체단백질의 전기영동분석 결과 12개의 band를 확인하였다. Anti-*H. pylori*의 항원 특이성을 알아보기 위해 western blotting을 한 결과 혈청, 유청, 모두에서 7개의 항원성 물질을 확인할 수 있었고, 주요 항원성 물질은 3개로 분자량이 97kDa, 66kDa, 34kDa 이었다.

4) 응집반응결과 유청속의 anti-*H. pylori* 항체가 *H. pylori*균에 대해 1/10의 응집가를 나타내었다.

나. 활용에 대한 건의 내용

실험동물인 젖소가 대동물이고 고가이기 때문에 젖소의 확보와 경비지출에 있어서

본 연구비의 지원금으로는 현실적인 애로점이 많았다. 본 연구에서는 젖소로부터 면역우유 생산 즉 Anti-*H. pylori* 항체 확인이 큰 성과였고, 의미를 두고자 한다. 본 연구는 면역우유의 산업화 실용화를 위한 근거자료로 이용될 것이고, 향후에 수유시기를 좀더 세분화하고 젖소의 총 생육기간에 걸쳐서 백신투여에 따른 항체생산 추이를 조사함으로써 효율성과 경제성을 확보할 수 있으리라 사료된다.

2. 면역우유의 생산최적화 조건확립 및 물리화학적 특성평가 가. 연구결과

본 연구는 *Helicobacter pylori* 균을 항원으로 젖소에 면역시킨 후 생산된 우유의 anti-*H. pylori* 항체의 산과 열에 대한 안정성 및 백신 투여량과 시기 및 산유량에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

- 1) Anti-*H. pylori* 항체의 산·알칼리에 대한 안정성의 경우 pH5-pH10에서는 활성도가 100% 안정한 상태였으나, pH4이하, pH11이상에서는 활성도가 70%가 감소하였다.
- 2) Anti-*H. pylori* 항체의 열에 대한 안정성의 경우 60℃에서 60분간 처리시는 100%안정한 상태였으나 70℃에서 60분간 처리시는 활성도가 40%, 80℃에서 4분간 처리시는 23%가 그리고 135℃에서 1분간 처리시는 50%가 감소하였다.
- 3) *H. pylori* 항원의 백신투여에 따른 산유량 변화는 백신투여전 보다 12% 감소된 경향을 나타냈으나, 투여 1주일 이후에는 거의 회복하였다.
- 4) 젖소의 직장(Rectal)온도는 백신투여 직후 다소 증가하는 경향을 보였으나 12시간 이후에는 정상체온을 유지하였다.

종합적으로 볼 때 면역우유를 생산하기 위해서는 비유중기 후기의 젖소에게 1020mL(평균 15mL)의 *H. pylori* 항원 백신을 견갑골(Scapula)부위에 주사하며, 3차 백신후에 개체별에 따라 34개월 간격으로 추가 접종함이 바람직할 것으로 사료된다.

나. 활용에 대한 건의 내용

첫째, 본 연구에 사용된 *Helicobacter pylori*의 항원백신은 실험실에서 소량으로 제조된 것이므로 실용화를 위해서는 항원에 대한 대량생산 시스템 구축과 함께 백신에 대한 국가 공인기관에서 안정성 검사과정을 거쳐 사용함이 바람직하다.

둘째, 면역우유 생산을 위해서는 젖소 농가에 백신량과 주사방법 등에 대한 충분히 사전 기술지도가 이루어져야 한다.

셋째, 생산된 면역원유는 반드시 저온살균(LTLT : 60-65°C의 30분간)처리법으로 살균해야 면역항체의 손실을 막을 수 있으므로 유업체에서는 LTLT살균처리 시스템이 갖추어져야 한다.

3. 우유로부터 위염원인균인 *H. pylori* 제거 항체생산 백신개발 가. 연구결과

본 연구에서는 *H. pylori* 항체함유 면역우유를 생산하는데 있어서, 백신개발의 기초 자료를 확보하기 위해서 균주대량배양 적정상태, *H. pylori*의 균체, urease, outer membrane항원의 특성을 조사하고, 각 항원과 adjuvant를 이용한 백신의 항체생성능을 조사하였다.

균체단백질 가운데 항원성 단백질은 7개이고 그 중 주항원성 물질은 분자량이 97, 66, 34kDa인 3개의 band를 확인할 수 있었다. Anti-*H. pylori* 항체를 함유한 유청의 *H. pylori* urease 활성억제 효과는 반응 2시간 후에 *H. pylori*의 urease활성을 90% 이상 억제하는 것으로 나타났다. 실험동물에 urease 100 μ g/200 μ l, 10 μ g/200 μ l, MPs(membrane proteins) 20 μ g/200 μ l, 10 μ g/200 μ l와 WC(whole cell) 200 μ g/200 μ l, 100 μ g/200 μ l로 항원량을 달리하고, adjuvant로 cholera toxin 5 μ g/200 μ l, vitaminE 5 μ g/200 μ l을 각 실험군에 첨가하여 항체 역가를 측정된 결과 IgG, IgA 공히 MPs1(20 μ g/200 μ l,) vitaminE 5 μ g/200 μ l를 투여한 군에서 가장 높은 항체가를 나타 내었다.

나. 활용에 대한 건의 내용

축산분야에 면역 및 생물공학기법이 도입되어 고기능성 다기능성의 제품 생산기술이 활발하게 진행될 것으로 전망된다. 특히 미생물 원인질병에 대한 특이항원을 개발 탐색하여 축산물을 이용하여 생산된 면역체가 가미된 질병예방 및 치료보조용의 식품개발이 실용화가 가능하며 진단용 시약 및 항체생산용 백신이 개발 될 것이다.

선진국에서는 이미 신기능성 질병예방 및 치료 보조 축산물 제품개발이 다양화되고 있다. 우리나라에서의 축산분야에서는 아직 고기능성 균체항원 탐색기술, 실용화 스케

일업 기술개발 및 산업화를 위한 환경 여건 즉 동물확보 애로, 스케일업 장치 미비, 산업화 제도 및 절차의 복잡성 등이 실용화에 애로점이라 하겠다.

4. 면역우유 가공적성 검토 및 이를 이용한 기능성 유제품개발

가. 연구결과

H. pyrois 항체를 가진 면역우유를 60°C에서 30분 열처리한 경우 총 균수는 10^3 CFU/mL이었으며, 열처리 온도가 높을수록, 열처리 시간이 증가할수록 총균수의 감소율이 증가하였다. *Coliform bacteria*의 경우는 원유에서 10^2 CFU/mL이 관찰되었으나 모든 열 처리우유에서는 관찰되지 않았다. 면역 활성은 60°C에서 30분 동안 열처리 후에도 99.99(100)%의 면역 활성을 나타내었으나 70°C 이상의 열처리에 의해서는 면역 활성이 급격하게 감소하여 약 50%이하로 낮게 나타났다.

면역우유를 2°C, 4°C 그리고 10°C에서 저장성을 일반우유와 비교 측정한 결과 우유의 저장 중 pH의 변화는 저장 21일 동안 2°C와 4°C에 저장한 경우 저장온도에 따른 뚜렷한 변화는 관찰할 수 없었으며, 10°C에 저장한 경우 저장 7일 이후 급격히 감소하였다. 총균수의 변화는 저장 초기 10^3 CFU/ml에서 2°C와 4°C에 저장한 처리 우유의 총균수는 저장 21일 동안 뚜렷한 증가현상을 관찰할 수 없었으며, 10°C에 저장하였을 경우 7일 이후 급격히 증가하여 저장 14일 쯤 10^8 CFU/ml로 부패현상을 나타내었다. 면역우유의 저장 중 면역활성의 변화는 저장 온도에 관계없이 저장 14일까지는 저장초기의 활성에 비해 뚜렷한 차이는 나타나지 않았으나 14일 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

김치에서 분리한 유산균 50균주 중 요구르트 starter로 사용 가능성이 있는 5균주를 선발하였다. 선발 균주로 요구르트를 제조하여 풍미, 종합적기호도, 성장특성을 비교 검토한 후 CU-21균주를 선발하여 상업용 균주 ART-3와 발효 특성을 검토한 결과 ART-3가 우수하였다. ART-3을 starter culture로 사용하여 제조한 요구르트와 열처리 전·후의 IgG 항체를 가진 면역우유의 IgG의 함량은 각각 10.38 μ g/mL, 11.10 μ g/mL, 10.76 μ g/mL, 를 나타내어 열처리한 면역우유는 약 97%정도의 면역활성을 유지하였으며, 발효유는 93.5%의 면역활성을 유지하였다.

ART-3를 stater로 사용하여 면역우유로 제조한 요구르트를 2°C, 4°C, 10°C에서 보관하면서 pH, 산도, 미생물, IgG의 함량을 측정한 결과 2°C와 4°C에서 저장한 요구르트의 경우 배양 전기간 pH와 산도 유산균수는 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다. 10°C에 저장한 요구르트의 경우 배양 7일째이후부터 품질변화를 초래하였다.. 요구르트의 저장 중 IgG의 함량변화는 배양 14일째까지는 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으나 저장 14일 이후부터 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

나. 활용에 대한 건의 내용

선진국에서는 건강 지향형 축산식품이 다양하게 출현이 예상되고, 유제품을 이용한 질병예방 및 치료 보조 축산물 제품개발이 다양화될 것이다. 1연 단발성의 연구보다는 지속적인 지원으로 충분한 연구와 기술개발의 시간적 경제적 지원을 건의 한다.

5. *H. pylori* 감염환자 대상 인체임상치료효과 검증

가. 연구결과

본 연구는 *H. pylori*에 대한 면역우유의 항균효과를 보고자 면역우유를 4주간 단독으로 복용시키고 또한 항생제와 병합하여 2주간 투여한 뒤 치료 전, 후 위내시경을 시행하고 위점막 조직을 채취하여 updated Sydney system에 의거하여 급성염증 지표, 만성염증 지표, *H. pylori* 균체밀도의 변화를 비교하였는데 면역우유 단독투여로 *H. pylori*가 박멸되지는 않았지만 조직학적으로 *H. pylori* 균체밀도가 감소하는 경향을 보였고 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 이 유의하게 감소되었다. 또한 기존 항생제에 면역우유를 5일만 투여해도 모든 경우에서 *H. pylori*를 박멸할 수 있어서 기존 항생제 치료기간을 단축시킬 수 있음을 알 수 있었다.

나. 활용에 대한 건의 내용

면역우유 단독투여로는 *H. pylori*가 제균된 경우가 없고 균체밀도가 감소하는 경향을 보였기 때문에 단일 치료제보다는 부가적인 치료법의 하나로 사용할 수 있을 것으로 판단되고, 또한 면역우유 단독투여로는 조직학적으로 *H. pylori* 균체밀도가 감소하는 경향으로 보아 이환 및 감염예방에는 효과가 기대된다. 아울러 향후 면역우유의 항 *H. pylori* 효과에 대한 구체적인 기전과 적정용량과 투여기간 등에 대한 더 많은

실험군을 대상으로 하는 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

다. 앞으로 전망

제품개발전망

- 건강 지향형 축산식품 소재의 지속적 출현이 예상되고
- 선진국에서는 신기능성 질병예방 및 치료 보조 축산물 제품개발이 다양화될 것이다.
- 젓소와 계란을 이용한 의료용 단백질 및 진단시약 생산 확대 전망되며
- anti-*H. pylori* 항체를 이용한 위염 진단용 시약 및 항체생산용 백신이 개발 될 것이다.

기술발전 전망

- 축산분야에 면역 및 생물공학기법이 도입되어 고기능성 다기능성의 제품생산기술이 개발될 전망이다.
- 미생물 원인질병에 대한 특이항원을 개발 탐색하여 축산물을 이용하여 생산된 면역 제제가 가미된 질병예방 및 치료보조용의 식품개발이 실용화가 가능하며
- 축산물을 이용한 천연소재의 대량 면역물질 생산기술이 개발될 것이다.

현재기술 상태의 취약 부분

- 고기능성 균체항원 탐색기술
- 실용화 스케일업 기술
- 원재료 기술인 생물공학 기법을 이용한 생리활성 물질생산 기술
- 새로운 물질의 설계기술

SUMMARY

Helicobacter pylori(*H. pylori*) was first identified by Australian medical doctor Marshall and Warren in 1983 and many attempts using antibiotics drugs to eradicate *H. pylori* were tried when it was identified as the main causes of gastritis, gastric & duodenal ulcer, gastric lymphoma and gastric adenocarcinoma. However, there are several problems associated with using antibiotics therapy such as side effect, compliance of patient, reinfection and recurrence of disease after treatment, and financial problems affording medication. Recent studies have shown that wine, vegetables or eggs have antibacterial effects, solving problems associated with antibiotics.

Therefore, This study has been to examine bio-function of anti-*H. pylori* antibodies of milk produced from cows immuned with antigen germ of *H. pylori* and search the relation between vaccine dosage volume and antibody formation, Agglutination, characterization and physical properties, stability about acid and heat of anti-*H. pylori* antibody, milk production accoding vaccin amount and stage of lactaion, Ingredient composition of row milk and somatic cell counts,, Ingredient composition of row and marketing Immune milk.

Development of *H. pylori* antigens conjugate vaccine against cows and immunological response to the vaccines were investigated. Antigens, urease, MPs(membrane proteins) and WC(whole cell) were prepared from an antigenicity according to an amount of those and different kinds of adjuvant.

The quality characteristics of immunized milk during storage at 2°C, 4°C and 10 °C were examined to investigate stability of immuno-activity in immunized milk during storage. Also total bacterial count of immunized milk with *H. pyroi* antigen. The five strains were selected as yogurt starter among fifty strains of

lactic acid bacteria isolated from Kimchi. The yogurt made by CU-21 was better than the other 4 strains in sensory characteristics such as flavor and overall acceptability. The change of pH, titratable acidity, lactic acid bacteria and IgG concentration in yogurt made by ART-3 was examined during storage for 21 days at various temperature.

Also, Our study is designed to show effectiveness of immunized milk containing antibody against *H. pylori*. we evaluated the ability of an oral passive administration of immunized milk containing antibody to prevent *H. pylori* in humans.

I. Evaluation and technology on production of immune(prevention · treatment against gastritis)milk containing anti-*H. pylori* antibody using immune technics

1. The content of serum and anti-*H. pylori* antibody within whey in accordance with vaccine dosage volume has confirmed the formation of high-quantified antibody compared to the controlled conditions in all groups vaccine dosages of 10ml, 20ml, and 30ml. It has been turned out that the antibody was formed most in 20ml dosage on while there was no attention difference.
2. The molecular weight of anti-*H. pylori* antibody measured by SDS-PAGE were turned out as about 50kDa in the heavy chain and about 24kDa in the light chain.
3. 12 bands were formed as the result of measured molecular weight of antibody protein. The western blotting was performed in order to examine the antigen peculiarity of anti-*H. pylori* that all 7 antigen substances including serum, serum refining, whey and whey refining could be confirmed and the main antigen substances were 97, 66, 34kDa of molecular weight.
4. As a result of cohesive response anti-*H. pylori* antibody in whey showed 1/10 cohesive rate about *H. pylori* germ.

5. In stability test about acid and alkali of antibody there was 100% activated in the range of pH 5 - pH 10.
6. In stability test about heat it showed stable condition in 60°C for 60 minutes and comparatively stable condition in 70°C, but reduced activation to 40% after 60 minutes. It maintained 77% activation in 80 °C for 4 minutes and comparatively stable in 100°C for 1 minute.
7. It was inclined to reduce to 12% of flow caused by vaccine injection, but recovered after about maximum 1 week.
8. In measurement of body temperature of cows after vaccine injected, it was inclined to rise with the normal scope in comparison with the controlled conditions..

II. Estimate of physical properties of antibody and chemical of row milk and the best condition for production of immune Milk

This study was conducted to investigate the safety of the acid and heat of anti-*Helicobacter pylori* antibody in produced milk after immunizing cows with the antigen of *Helicobacter pylori*, and the effect of dosage of vaccine, appropriate time and the amount of milk production.

The results were summarized as follows ;

In the case of the safety about acid & alkali of anti-*Helicobacter pylori* antibody ; the activity was 100% stable condition in range of pH5-pH10, but 70% of the activity decreased of less than pH 4 and more than pH 11.

In the case of the safety about heat of anti-*Helicobacter pylori* antibody ; the activity was 100% secure when it was heated for an hour at 60°C. But 40% of the activity decreased when it was heated for an hour at 70°C. It was 23% decreased for 4 minutes of heating at 80°C. It was 50% decreased for 1 minute of heating at 135°C.

The amount of milk producing, which was due to dosage of vaccine of

Helicobacter pylori antigen, tended to decreased by 12% than the prior stage, but it comes back to almost normal after a week.

The temperature in cows rectal tends to increased a little, but it drops to normal temperature after 12 hours.

Judging from above results, it needed to inject 10-20mL(average 15mL) of *Helicobacter pylori* antigen vaccine 3 times to cow's scapula. The cows should be in their middle to last lactation stage. Furthermore, It was better to shot extra injection on every 34 months after the 3rd vaccination.

III. Antigen characterization of *H. pylori* Gastritis and vaccine development for cows

Development of *H. pylori* antigens conjugate vaccine against cows and immunological response to the vaccines were investigated. whole cell proteins was estimated to have 7 antigenicity band, 3 protein molecular 97, 66, 34kDa among those showed major antigenicity. The *H. pylori* urease inhibition test was carried out by preincubation of the purified whey anti-*H. pylori* antibody according to times. The *H. pylori* urease activity showed more 90% inhibition after reaction 2 oclocks

Antigens, urease, MPs(membrane proteins) and WC(whole cell) were prepared from an antigenicity according to an amount of those and different kinds of adjuvant. Antibody value, all IgG and IgA, showed most high reaction in the MPs1(20 μ g/200 μ l,) vitaminE 5 μ g/200 μ l.

IV. Studies on Processing properties of immune milk and development of functional milk products with immune milk

Total bacterial count of immunized milk with *H. pyroi* antigen was 10³ CFU/mL after heat treatment for 30 min at 60°C. The decreasing ratio of total bacteria in immunized milk was increased as increase heating temperature and heating time at

same temperature. Coliform bacteria did not show in immunized milk after heat treatment for 30 min at 60°C. Immuno-activity of immunized milk was maintain 99.99% after heat treatment for 30 min at 60°C, but decreased rapidly to below 50% after heat treatment above 70°C.

The quality characteristics of immunized milk during storage at 2°C, 4°C and 10 °C were examined to investigate stability of immuno-activity in immunized milk during storage. The pH and titratable acidity and total bacterial count of immunized milk were did not show significant change during storage for 21 days at 2°C and 4°C, but rapidly change after storage for 7 days at 10°C. The immunized milk was spoiled after 7 days at 10°C. The immuno-activity of immunized milk did not change after storage for 14 days at 2°C, 4°C and 10°C, respectively. The activity decreased rapidly after 14days at the each temperatures.

The five strains were selected as yogurt starter among fifty strains of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. The yogurt made by CU-21 was better than the other 4 strains in sensory characteristics such as flavor and overall acceptability. But the commercial yogurt starter ART-3 was better than CU-21 in growth and sensory characteristics such taste, flavor, texture and overall acceptability. The concentration of IgG showed 10.38 µg/mL, 11.10 µg/mL, and 10.76 µg/mL in yogurt, raw and after heat treated immunized milk, respectively. The immuno-activity of heat treated immunized milk maintained about 97% compared with raw immunized milk. The yogurt made with immunized milk was maintained 93.5% of the activity.

The change of pH, titratable acidity, lactic acid bacteria and IgG concentration in yogurt made by ART-3 was examined during storage for 21 days at various temperature such as 2°C, 4°C, and 10°C. The pH, titratable acidity and lactic acid bacteria did not change apparently during storage periods at 2°C and 4°C, respectively. The content of IgG was did not show apparently decreased during storage for 14 days at 2°C, 4°C, and 10°C but rapidly decreased after 14 days at

the same storage conditions, respectively.

V. The Antibacterial Effect of Immunized Milk Against *Helicobacter pylori*

Therefore, our study is designed to show effectiveness of immunized milk containing antibody against *H. pylori*. From October 2003 till October in 2004, we have selected eighty *H. pylori* infected patients defined as positive CLO test, ¹³C-urea breath test, histologic test in gastrofiberscope. The patients were randomized into four groups which were treated with 200 ml milk b.i.d. for 4 weeks (milk group; N=20) or 200 ml milk b.i.d. containing antibody against *H. pylori* for 4 weeks (immunized milk group; N=20) or omeprazole 20 mg b.i.d., amoxicillin 1.0 g b.i.d. and clarithromycin 500 mg b.i.d. for 2 weeks (OAC group; N=20) or omeprazole 20 mg b.i.d., amoxicillin 1.0 g b.i.d., clarithromycin 500 mg b.i.d. and 200 ml milk b.i.d. containing antibody against *H. pylori* for 2 weeks (OAC with immunized milk group; N=20). After treatment in each group, CLO test, ¹³C-urea breath test, histologic test in gastrofiberscope were performed as follow-up. Using updated Sydney system acute inflammation, chronic inflammation, gastric atrophy, intestinal metaplasia and density of *H. pylori* (0 = normal, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe) for histologic test, scores were compared before and after treatment. Eradication rate of milk and immunized milk group was 0% and 0%, respectively. The eradication rate of OAC with immunized milk group (100%) was higher than OAC group (90%). $\Delta^{13}\text{CO}_2$ at 4 weeks after treatment in immunized milk group was significantly decreased than pretreatment ($p < 0.01$), compared to milk group. $\Delta^{13}\text{CO}_2$ at 4 weeks after treatment in one patient of immunized milk group was markedly decreased. $\Delta^{13}\text{CO}_2$ at 5 days after treatment in OAC with immunized milk group was significantly decreased ($p < 0.01$). The result of UBT in OAC with immunized milk group was negative earlier than OAC group. There were no change of acute inflammation activity, chronic inflammation activity and *H. pylori* density in milk group when compared with those before

treatment. More decreased grade of inflammatory reaction and density of *H. pylori* colonization after treatment in immunized milk group when compared with those before treatment was noted. Post-treatment grade of inflammatory response in OAC with immunized milk group, markedly decreased. Post-treatment no *H. pylori* colonization in OAC with immunized milk group was seen earlier than OAC group. Mild intestinal metaplasia in one patient of immunized milk group changed to normal after 4 weeks treatment. One mild glandular atrophy at body in OAC group was not changed after treatment.

These results suggested that immunized milk may have a antibacterial effect on *H. pylori* associated gastritis and can be an adjuvant to the standard anti-*H. pylori* regimen. Further studies using large number of patients are necessary to prove the medication, proper dosage and duration of treatment of immunized milk against *H. pylori*.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	39
Section 1 Objective and Importance of this study	39
Section 2 Scope and contents of the research	41
Section 3 Results and Recommendation	42
Chapter 1 Evaluation and technology on production of immune (prevention · treatment against gastritis)milk containing anti- <i>H.</i> <i>pylori</i> antibody using immune technics	
Section 1 Introduction	45
Section 2 Materials and methods	47
1. Antigen preparation	47
A. Bacterial isolation urease tests	47
B. Preparation of <i>H. pylori</i> antigens	47
2. Animals	48
3. Immunization	49
4. Sample preparation of milk and serum	49
5. Antibody value measurement by ELISA	50
6. Separation and purification of antibody	51
A. Anbody separation from milk	51
B. Anbody separation from serum	52
C. Fraction and purification of Anti- <i>H. pylori</i> antibody	53
7. Characterization of Anti- <i>H. pylori</i> antibody	53
A. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	53

B. Western blotting	53
8. Physical properties of Anti- <i>H. pylori</i> antibody	55
A. Anti- <i>H. pylori</i> antibody agglutination	55
B. Acid and Heat stability of Anti- <i>H. pylori</i> antibody	55
9. Statistical ananlysis	55
Section 3 Result and Discussion	56
1. <i>H. Pylori</i> incubation	56
2. An- <i>H. Pylori</i> tibody production accoding vaccin amount	56
3. An- <i>H. Pylori</i> tibody production accoding stage of lactaion	61
4. Physical properties anti- <i>H. pylori</i> antibody	66
A. Characterization of anti- <i>H. pylori</i> antibody	66
B. Purification and fraction of Anti- <i>H. pylori</i> antibody	66
5. Agglutination of anti- <i>H. pylori</i> antibody	69
Section 4 Summary	71
Section 5 Refrence	72
Chapter 3 Estimate of physical properties of antibody and chemical of row milk and the best condition for production of immune Milk	
Section 1 Introduction	77
Section 2 Meterial and Methods	77
1. Experimental animal and Analyze of sample	78
2. Antigen prepartion	81
3. Vaccination	81
4. Titers of antibody	81
5. Physical properties of Anti-H. pylor antibody	82
6. Rectal temperature	82
7. Statistical ananlysis	63
Section 3 Result and Discussion	84

1. Physical properties of immune Milk	84
A. Acid stability	84
B. Heat stability	85
2. Milk Production	88
A. Milk production according to vaccine amount	88
B. Milk production according to vaccine amount and stage of lactation	92
3. Ingredient composition of raw milk and somatic cell counts	97
A. Fat and Protein of raw milk	97
B. Lactose, SNF and TS of raw milk	100
C. Somatic cell counts of raw milk	102
4. Ingredient composition of raw and marketed Immune milk	104
5. Rectal temperature after vaccination to cows	105
Section 4 Summary	106
Section 5 References	107

Chapter 4 Antigen characterization of *H. pylori* Gastritis and vaccine development for cows

Section 1 Introduction	113
Section 2 Material and Methods	114
1. Optimum conditions for <i>H. pylori</i> incubation	114
A. Preparation of <i>H. pylori</i>	114
B. Turbid measurement for incubation time of <i>H. pylori</i>	115
C. Whole cell yields for incubation time of <i>H. pylori</i>	115
D. Withdrawal of <i>H. pylori</i> cell and Antigen preparation	115
2. Examination of Antigen characterization for immunomilk production	116
A. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	116
B. Western blotting for antigen detection	117
3. Measurement for urease inhibition by milk anti- <i>H. pylori</i> antibody	118

A. crude-urease preparation	118
B. Effect of milk anti- <i>H. pylori</i> antibody on urease inhibition	118
4. Value measurement of vaccine used as antigens and Adjuvants	118
A. Whole cell antigen	119
B. Urease antigen	119
C. MPs antigen	120
D. Experimental design	120
E. Vaccine preparation and immunization	121
F. IgG and IgA Titration	121
5. Statistical analysis	122
Section 3 Result and Discussion	122
1. Amount of h. pylor whole cell	122
A. Turbid for incubation time of <i>H. pylori</i>	122
B. Whole cell yields for incubation time of <i>H. pylor</i>	123
2. Antigen characterization of anti- <i>H. pylori</i> antibody	123
3. Effect of milk anti- <i>H. pylori</i> antibody on urease inhibition	127
4. Titration value of vaccine used antigens and Adjuvants	128
Section 4 summary	130
Section 5 references	131
Chapter 5 Studies on Processing properties of immune milk and development of functional milk products with immune milk	
Section 1. Introduction	135
Section 2. Material and Methods	137
1. Materials	137
2. Heat treatment of raw milk	138
3. pH	138
4. Titratable acidity	138

5. Viable cell count	138
6. Pre-treatment of sample to measure immuno-activity	138
7. Immuno-activity of antibody	138
8. Preservative properties of immune milk	139
9. Isolation of starter	139
10. Preparation of starter culture	140
11. Quality change of yogurt during fermentation	140
Section 3. Results and Discussions	140
1. Quality changes of immune milk at different temperature	140
1) Changes of microbiological characteristics	141
2) Changes of pH and titratable acidity	142
3) Changes of Immuno-activity	144
2. Shelf-life of immune milk	145
1) Changes of pH and titratable acidity	145
2) Changes of microbiological characteristics	146
3) Changes of Immuno-activity	146
3. Isolation of starter and manufacture of yogurt with immune milk	151
1) Isolation of yogurt starter from kimchi	151
2) Growth characteristics of isolated strains	152
3) Fermentation properties of yogurt using strain CU21 and ART3	153
4) Sensory characteristics	155
5) Changes in Immuno- activity of yogurt during manufacture	156
4. Preservative properties of yogurt with immune milk	157
1) Changes of pH and titratable acidity	157
2) Changes of lactic acid bacteria	157
3) Changes of Immuno-activity	158
5. Summery	161
6. References	162

Chapter 6 The Antibacterial Effect of Immunized Milk Against <i>Helicobacter pylori</i>	
Section 1. Introduction	166
Section 2 Materials and Methods	167
1. Inclusion criteria	167
2. Methods	167
A. Methods	167
B. Evaluation of <i>H. pylori</i> Infection	168
C. Study methods	168
1) Gastroscopy	168
2) Gastric biopsy	168
3) CLO test	168
4) Urea breath test	169
5) Histologic evaluation	169
6) treatment of <i>H. pylori</i> infection	170
7) Evaluation of <i>H. pylori</i> eradication	171
8) Statistics	171
Section 3 Results	
1. Characteristics of patients	171
2. Eradication rate of <i>H. pylori</i>	172
3. $^{13}\text{CO}_2$ change($\Delta^{13}\text{CO}_2$)	173
4. Histologic change before and after treatment	176
A. Acute inflammation activity	176
B. Chronic inflammation activity	186
C. <i>H. pylori</i> density	176
D. Gastric atropy and intestinal metaplasia	177
Section 4 Discussion	185

Section 5 Summary	187
Section 6 References	188
Chapter 7 Degree of attainment and contribution of the related field	194
Chapter 8 Application plan of the results of this study	196
Chapter 9 Foreign technical information collected during this R&D	196

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	11
제 1 장 서 론	39
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	39
1. 연구개발의 목적	39
2. 연구개발의 범위	40
제 2 절 연구개발의 필요성	41
1. 기술적 측면	41
2. 경제·산업적 측면	41
3. 사회·문화적 측면	41
제 3 절 관련기술의 현황 및 전망	42
1. 국내연구결과 및 내용	42
2. 국외 연구결과 및 내용	43
3. 향후 전망	43
제 2 장 Anti- <i>H. pylori</i> 항체 함유 면역우유생산과 항체특성 평가	45
제 1 절 서 론	45
제 2 절 재료 및 방법	47
1. 항원의 준비 (Antigen preparations)	47
가. 균주의 분리	47

나. 항원의 준비	47
2. 실험동물	48
3. 면역	49
4. Serum 및 우유채취와 sample 전처리	49
5. ELISA에 의한 항체의 역가측정	50
6. 항체의 분리정제	51
가. 우유로부터 항체 분리	51
나. 혈청으로부터 항체의 분리	52
다. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 정제 및 분획	53
7. Anti- <i>H. pylori</i> 항체 특성실험	53
가. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	53
나. Western blotting에 의한 항체의 특이성 확인	53
8. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 이화학적 특성	55
가. Anti- <i>H. pylori</i> 항체에 의한 <i>H. pylori</i> 균 응집 반응	55
나. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 열과 산에 대한 안정성실험	55
9. 통계학적 분석	55
제 3 절 결과 및 고찰	56
1. <i>H. Pylori</i> 배양	56
2. 백신 투여량에 따른 Anti- <i>H. pylori</i> 항체 함량	57
가. 백신투여량에 따른 혈중 Anti- <i>H. pylori</i> 항체함량 변화	57
나. 백신투여량에 따른 우유에서의 Anti- <i>H. pylori</i> 항체 함량변화	57
3. 비유기간에 따른 Anti- <i>H. pylori</i> 항체 함량	61
가. 비유기간에 따른 혈중 Anti- <i>H. pylori</i> 항체 함량	61
나. 비유기간에 따른 우유에서의 Anti- <i>H. pylori</i> 항체 함량변화	61
4. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 특성	66
가. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 정제 및 분획	66
나. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 특이성	66
5. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 응집반응	69

제 4 절 요약	71
제 5 절 참고문헌	72
제 3 장 면역우유의 생산최적화 조건확립 및 물리화학적 특성평가	77
제 1 절 서론	77
제 2 절 재료 및 방법	78
1. 공시가축 및 시료채취·분석	78
2. 항원준비	81
3. 면역 백신주사	81
4. 항체의 역가측정	81
5. Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 물리적(열, 산도) 특성	82
6. 직장온도 측정	82
7. 통계분석	83
제 3 절 결과 및 고찰	84
1. 우유내 Anti- <i>H. pylori</i> 항체의 물리적 특성조사	84
가. 산도(酸度)에 대한 안정성	84
나. 열(熱)에 대한 안정성	85
2. 산유량 변화	88
가. 백신량에 따른 산유량 변화	88
나. 비유단계와 백신량에 따른 산유량 변화	92
3. 유성분과 체세포수 변화	97
가. 유지방과 유단백질 함량	97
나. 유당, SNF 및 TS함량	100
다. 체세포수	102
4. 면역원유 및 면역시유의 유성분	104
5. 백신 투여에 따른 젖소의 체온변화	105
제 4 절 결과요약	106
제 5 절 참고문헌	107

제 4장 우유로부터 위염원인균인 <i>H. pylori</i> 제거 항체생산 항원특성조사 및 백신개발	113
제 1 절 서 론	113
제 2 절 재료 및 방법	114
1. 균주생산 최적조건 실험	114
가. 균주 준비	114
나. <i>H. pylori</i> 의 배양시간에 따른 탁도측정	115
다. 배양시간에 따른 균체량 측정	115
라. 균체의 회수와 항원준비	115
2. 면역우유생산 <i>H. pylori</i> 항원특성 실험	116
가. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	116
나. Western blotting에 의한 항원의 특이성 확인	117
3. 면역우유 항체의 urease 활성억제 효과	118
가. crude-urease 준비	118
나. 면역우유 항체의 urease 활성 억제효과	118
4. 항원별 및 Adjuvant첨가에 따른 백신의 역가측정	118
가. 균체(whole cell)항원 준비	119
나. Urease 항원 준비	119
다. MPs항원 준비	120
라. 동물실험군	120
마. 백신제조 및 투여	121
바. IgG와 IgA의 항체역가 측정	121
5. 통계학적분석	122
제 3 절 결과 및 고찰	122
1. 균성장 및 균체량	122
가. <i>H. pylori</i> 의 배양시간별 탁도 변화	122
나. 배양시간에 따른 균체량	123

2. Anti- <i>H. pylori</i> 항체 생산 항원의 특성	123
3. 면역우유 항체의 urease 활성억제 효과	127
4. 항원별 및 Adjuvant첨가에 따른 백신의 역가비교	128
제 4 절 요약	130
제 5 절 참고문헌	131

제 5 장 면역우유 가공적성 검토 및 이를 이용한 기능성 유제품개발

제 1 절 서론	135
제 2 절 재료 및 방법	137
1. 공시 시료(재료)	137
2. 원유의 열처리	137
3. pH 측정	138
4. 산도 측정	138
5. 미생물 수 측정	138
6. 면역활성 측정을 위한 sample의 전처리	138
7. 항체의 역가 측정	138
8. 면역우유의 저장성	139
9. starter의 분리 및 선발	139
10. Starter culture 조제	140
11. 요구르트의 제조 및 품질 변화 측정	140
제 3 절 결과 및 고찰	140
1. 살균 온도에 따른 면역 우유의 품질 변화	140
가. 미생물의 변화	141
나. pH와 산도의 변화	142
다. 면역활성의 변화	144
2. 면역우유의 저장성	145
가. pH 및 산도의 변화	145
나. 미생물 변화	146

다. 면역활성의 변화	146
3. 요구르트 제조용 starter 선발 및 면역우유를 이용한 요구르트 제조 특성 ..	151
가. 김치에서 요구르트starter용 유산균 분리	151
나. 선발균주의 성장비교	152
다. CU-21과 ART-3를 이용한 요구르트 제조중의 발효 특성비교	153
라. 분리균주와 상업용균주로 제조한 요구르트의 기호성 비교	155
마. 요구르트의 면역활성	156
4. 면역우유로 제조한 요구르트의 저장성	157
가. pH 및 산도의 변화	157
나. 유산균수 변화	158
다. 면역활성의 변화	158
제 4 절 결과요약	161
제 5 절 참고문헌	162
제 6 장 <i>H. pylori</i> 감염환자 대상 인체임상치료효과 검증	166
제 1 절 서 론	166
제 2 절 대상 및 방법	167
1. 대 상	167
2. 방 법	167
가. 재료	167
나. <i>H. pylori</i> 감염의 평가	168
다. 검사항목 및 검사방법	168
1) 위내시경검사	168
2) 위점막 조직 채취	168
3) 신속요소분해검사(CLO test)	168
4) 요소호기검사(Urea breath test)	169
5) 병리조직학적 검사	169
6) <i>H. pylori</i> 제균 치료방법	170

7) <i>H. pylori</i> 제균여부 판정	171
8) 통계 분석	171
제 3 절 결 과	171
1. 대상환자의 특성	171
2. <i>H. pylori</i> 박멸률	172
3. $^{13}\text{CO}_2$ 농도 변화 ($\Delta^{13}\text{CO}_2$)	173
4. 치료 전, 후 병리학적 변화	176
가) 급성염증 지표	176
나) 만성염증 지표	176
다) <i>H. pylori</i> 균체밀도의 변화	176
라) 위점막 위축 및 장상피화생	177
제 4 절 고 찰	185
제 5 절 결과요약	187
제 6 절 참고문헌	188
제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	194
제 1 절 연차별 연구개발 목표의 달성도	194
제 2 절 관련분야에의 기여도	195
제 8 장 연구개발 결과의 활용계획	196
제 1 절 기존의 활용 실적	196
1. 학술논문	196
2. 학회, 심포지움 및 기술이전 발표	196
3. 산업재산권	197
제 2 절 활용계획	197
제 9 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	198

List of Tables

Table 2-1. Experimental design.	49
Table 2-2. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titeration in serum after immunigation at dairy cows on a dose of <i>H. pylori</i> antigens.	60
Table 2-3. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titeration in whey after immunization at dairy cows on a dose of <i>H. pylori</i> antigens.	60
Table 2-4. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titers in serum after immunization with <i>H. pylori</i> antigen by lactation period at dairy cows.	65
Table 2-5. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titers in whey after immunization with <i>H. pylori</i> antigen by lactation period at dairy cows.	65
Table 2-6. Agglutination value of antigen by anti- <i>H. pylori</i> antibody.	69
Table 3-1. Experimental design	79
Table 3-2. The ingredintl composition of Experimental diets	80
Table 3-3. The ingredintl composition of expermental diets	80
Table 3-4. Changes of milk yield after vaccination to dairy cows	89
Table 3-5. Changes of milk yield after vaccination in early lactation stage ..	89
Table 3-6. Changes of milk yield after vaccination in mid lactation stage	90
Table 3-7. Changes of milk yield after vaccination in late lactation stage ..	91
Table 3-8. Fat content of raw milk after vaccination in lactation stage	95
Table 3-9. Protein content of raw milk after vaccination in lactation stage ..	96
Table 3-10. Lactose content of raw milk after vaccination in lactation stage ..	98
Table 3-11. Solid non fat content of raw milk after vaccination in lactation stage	99
Table 3-12 Total solid content of raw milk after vaccination in lactation stage	100

Table 3-13. Somatic cell counts of raw milk after vaccination in lactation stage	102
Table 3-14 The ingredient composition of immune row milk	104
Table 3-15 The ingredient composition of marketing immuno milk by LTLT treatment	104
Table 4-1 Doses of adjuvants and antigen, and Experimental design used with vaccine in this study.	121
Table 5-1. Characteristics of lactic bacteria isolated from kimchi	151
Table 5-2. Effect of starter on Sensory characteristics of yogurts	156
Table 6-1. Patient's Characteristics	172
Table 6-2. Eradication Rate of <i>H. pylori</i>	173
Table 6-3. Histologic Change before and after 4 weeks treatment by Updated Sydney System in Milk and Immunized Milk Group	178
Table 6-4. Histologic Change before and after treatment by Updated Sydney System in OAC group and OAC with Immunized Milk Group	178

List of Figures

Fig. 2-1. Scheme of antigen preparation	48
Fig. 2-2. ELISA(enzyme-linked immunosorbent) test	51
Fig. 2-3. Anti-body separation from milk.	52
Fig. 2-4. Antibody separation from serum.	53
Fig. 2-5. Western blotting	54
Fig. 2-6. <i>H. pylori</i> culture	56
Fig. 2-7. Urea test	56
Fig. 2-8. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titers in serum after immunization with <i>H. pylori</i> by vaccine dose at dairy cows.	58
Fig. 2-9. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titers in whey after immunization with <i>H. pylori</i> by vaccine dose at dairy cows.	59
Fig. 2-10. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titers in serum after immunization with <i>H. pylori</i> by lactation period at dairy cows.	63
Fig. 2-11. Anti- <i>H. pylori</i> antibody titers in milk after immunization with <i>H. pylori</i> by lactation period at dairy cows.	64
Fig. 2-12. SDS-PAGE patterns profile of antibody from dairy cows immunized with <i>H. pylori</i> antigen.	67
Fig. 2-13. Fraction pattern of whey acquired from cows milk immunized with <i>H. pylori</i> antigen.	68
Fig. 2-14. Agglutination of antigen by anti- <i>H. pylori</i> antibody.	70
Fig. 3-1. pH stability of specific IgG(anti- <i>H. pylori</i> antibody) activity	85
Fig. 3-2. Heat stability of specific IgG(anti- <i>H. pylori</i> antibody) activity	87
Fig. 3-3. Rectal temperature after vaccination(<i>H. pylori</i> antibody) to cows ·	106
Fig. 4-1. Scheme of antigen preparation and vaccination	116

Fig. 4-2. Western blotting	118
Fig. 4-3. Urease preparation	119
Fig. 4-4. MPs(Whole membrane proteins) preparation	120
Fig. 4-5. <i>H. pylori</i> growth curve according to incubation times.	122
Fig. 4-6. Whole cell yields for incubation time of <i>H. pylori</i>	123
Fig. 4-7. SDS-PAGE of the sonicated whole cell antigen preparation, Lanes:A, molecular mass markers; B, sonicated antigen preparation;	124
Fig. 4-8. Western blot of SDS-PAGE of purified serum from cows immunized with <i>H. pylori</i> . The antigen for Western blot was sonicates of <i>H.</i> <i>pylori</i> whole cell and second antibody was peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG	125
Fig. 4-9. Western blot of SDS-PAGE of purified milk from cows immunized with <i>H. pylori</i> . The antigen for Western blot was sonicates of <i>H.</i> <i>pylori</i> whole cell and second antibody was peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG	126
Fig. 4-10. Ihibition of <i>H. pylori</i> urease by milk anti- <i>H. pylori</i> antibody in urea R broth.	127
Fig. 4-11. <i>H. pylori</i> -specific IgG antibodies are individual antigens purified form <i>H. pylori</i> . The values are expressed as specific IgG by ELISA values(O.D.=405pyroi).	129
Fig. 4-12. <i>H. pylori</i> -specific IgA antibodies are individual antigens purified form <i>H. pylori</i> . The values are expressed as specific IgA by ELISA values(O.D.=405pyroi).	130
Fig. 5-1. Change in total bacteria of milk immunized with some <i>Helicobacter</i> <i>pylori</i> antigen after heat treatment	141
Fig. 5-2. Change in coliform bacteria of milk immunized with some <i>Helicobacter pylori</i> antigen after heat treatment	142

Fig. 5-3. Change in pH of milk immunized with some <i>Helicobacter pylori</i> antigen after heat treatment	143
Fig. 5-4. Change in titratable acidity of milk immunized with some <i>Helicobacter pylori</i> antigen after heat treatment	143
Fig. 5-5. Change in IgG concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) of milk immunized with some <i>Helicobacter pylori</i> antigen after heat treatment	145
Fig. 5-6. Change in pH of milks during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C after heat treatment for 30min at 60°C	147
Fig. 5-7. Change in titratable acidity of milks during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C after heat treatment for 30min at 60°C	148
Fig. 5-8. Change in total bacteria of milks during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C after heat treatment for 30min at 60°C	149
Fig. 5-9. Change in IgG concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) of milk immunized with some <i>Helicobacter pylori</i> antigen during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C	150
Fig. 5-10. Growth of CU-2 and CU-21 in MRS broth for 24hrs at 37°C	152
Fig. 5-11. Change in pH and titratable acidity of immunized milks added lactic acid bacteria ART-3 and CU-2 starter culture during ferment for 24 hrs at 37°C	154
Fig. 5-12. Effect of stater on growth of lactic acid bacteria in immunized milks during fermentation for 24 hrs at 37°C	155
Fig. 5-13. Change in IgG concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) of raw milk, immunized milk and yogurt	157
Fig. 5-14. Change in pH and titratable acidity of yogurt made with immunized milk during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C	159
Fig. 5-15. Change in lactic acid bacteria of yogurt made with immunized milk during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C	160
Fig. 5-16. Change in IgG concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) of yogurt made with immunized	

milk during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C	160
Fig. 6-1. $\Delta^{13}\text{CO}_2$ before and after treatment in milk & immunized milk group. 174	
Fig. 6-2. $\Delta^{13}\text{CO}_2$ before and after treatment in OAC & OAC with immunized milk group.	175
Fig. 6-3. Grade of inflammatory response at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in milk group. Gastric tissue samples show no changes of inflammatory reaction after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, \times 400.	179
Fig. 6-4. Density of <i>H. pylori</i> colonization at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in milk group. Gastric tissue samples show no changes of density of <i>H. pylori</i> colonization after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, \times 400.	180
Fig. 6-5. Grade of inflammatory response at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in immunized milk group. A few gastric tissue samples show more decreased grade of inflammatory reaction after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, \times 400.	181
Fig. 6-6. Density of <i>H. pylori</i> colonization at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in immunized milk group. A few gastric tissue samples show more decreased density of <i>H. pylori</i> colonization after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, \times 400.	182
Fig. 6-7. Grade of inflammatory response at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in OAC with immunized milk group.	

Posttreatment gastric tissue sample (B, D) displays markedly decreased grade of inflammatory reaction in comparison with those before treatment (A, C). The response was shown earlier than OAC group. Magnification; A-D, $\times 400$ 183

Fig. 6-8. Density of *H. pylori* colonization at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in OAC with immunized milk group. Posttreatment gastric tissue sample (B, D) shows no *H. pylori* colonization in comparison with those before treatment (A, C). The response was shown earlier than OAC group. Magnification; A-D, $\times 400$ 184

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

위염과 위궤양을 앓고있는 환자의 대부분은 *Helicobacter pylori*에 감염되어 있고, 이것은 위암의 중요한 원인이 되는 것으로 보고되고 있다. *Helicobacter pylori*는 위점막에 존재하며 여러 가지 다른 위험요인과 함께 위암발생을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

*Helicobacter pylori*의 감염률은 전세계적으로 상당히 높아 북유럽에서는 50세 이상 성인의 50%이상 감염되어 있으며 개발도상국가나, 신흥공업국의 경우 성인의 80% 이상이 감염된 것으로 추정되고 있다. 우리나라에서는 1999년 조사자료에 의하면 농촌 지역에서 66%이상 감염된 것으로 보고되고 있다.

한편 우리나라의 축산관련산업은 축산물개방으로 수입육이 봇물처럼 밀려오는 시점에서 점차 국제경쟁력 하락은 낙농업도 마찬가지이다. 최근 우유소비율의 둔화로 재고분유가 2002년 3월 현재로 16,200톤으로 전년보다 약 15%이상이 증가되어 우유업체들의 우유소비에 많은 어려움에 처하고 있으며, 정부에서도 젓소 도태 등 사육두수 줄이기에 앞장서고 있는 실정이다.

이런 상황에서 상품성과 기능이 뛰어나고, 소비자 욕구에 충족시킬 수 있는 고품질 축산물을 생산한다면 우유소비를 비롯하여 축산물 소비를 향상시켜 국제경쟁력도 높일 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구 및 기술개발 사업에서는 위염 원인균인 *Helicobacter pylori*항원을 이용해서, 특이항체 및 면역성분을 많이 함유한 면역우유를 생산하고, 이를 이용한 고기능성 축산물 및 축산제품을 생산하여 국민건강증진에 이바지할 뿐만 아니라 제품의 기술고도화, 고급화 및 고부가가치화 함으로써 농가소득증대 및 지역과 국가경제에 이바지하고자 한다.

2. 연구개발의 범위

가. Anti-*H. pylori* 항체함유 면역우유생산과 항체특성평가

- 젖소에서의 Anti-*H. pylori* Antibody 생성 확인 평가
- 위염 위궤양 예방과 환자의 치료보조용 및 대체의약 면역유제품 개발
- Anti-*H. pylori* 특이항체 평가

나. 면역우유의 생산최적화 조건확립 및 물리화학적 특성평가

- Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유 생산 최적조건 조사
- Anti-*H. pylori* 항체의 물리화학 특성평가
- 유성분(수분, 우당, 유단백, 유지방 총고형분, 등), 세균수, 체세포수, 산유량, 등 조사

다. 우유로부터 위염원인균인 *H. pylori* 제거 항체생산 백신개발

- 면역우유 생산용 면역강화 소재(Adjuvant) 탐색 및 개발
- *H. pylori* Major Antigens and Adjuvant aqueous solution의 pH-안정성,

역가

- 위염치료기능 항체를 생산하는 특이항원 즉, 젖소에 대한 감수성 항원 분석
- 균주 대량배양 최적조건 확립과 항원의 대량 생산

라. 면역우유 가공적성 검토 및 이를 이용한 기능성 유제품개발

- 면역우유를 이용한 기능성 유제품개발
- 면역우유를 이용한 유제품 제조중 starter 연구
- 면역우유의 품질 및 가공적성 평가

마. *H. pylori* 감염환자 대상 인체임상치료효과 검증

- 대상자 선정을 위한 검사기준 설정
- 요소호기검사(UBT), 위내시경검사 및 조직검사

신속요소분해효소검사(CLO)

- Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유의 효능 평가 및 임상치료 효과 검정
소화불량증상의 호전, 박멸여부 판정(UBT, 위조직검사)

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 축산물 분야의 경쟁력 강화를 위해서 생명공학기법을 이용한 고부가 고기능성 제품의 생산확대가 예상되며 이에 대한 대책이 시급하다.
- 본 연구는 면역생물공학 기법을 이용한 연구로 국가경쟁력의 지속적인 성장을 위한 대체기술 기반조성에 필수적이다.
- 농가 및 축산업의 제품다양화를 위한 신기술의 개발이 요청된다.
- 생명공학기법을 이용한 고부가 고기능성 제품의 생산확대로 축산업 경쟁력제고가 시급하다

2. 경제·산업적 측면

- 고부가 차세대 축산물 산업의 육성이 시급하다.
- 생명과학기술 도입에 의한 축산산업의 국제경쟁력 확보가 시급하다.
- 재고분유의 축적으로 낙농산업의 활로개척이 시급하다.
- 일반제품과 차별화 된 질병 예방 및 치료보조용 우유를 개발함으로써 유업체의 활성화가 요청된다.
- 농축산물의 개방에 대응한 새로운 고부가, 고기능, 고품질의 경쟁우위의 축산제품 개발이 시급하다.

3. 사회·문화적 측면

- 고기능성우유 생산으로 서민층의 경제성과 편이성이 확보된 국민보건 향상에 이바지한다.
- 위염, 위궤양 및 위암환자에 대한 보다 경제성과 편이성이 고려된 예방치료 관리가 요청된다.

제 3 절 관련기술의 현황 및 전망

1. 국내연구결과 및 내용

- 면역기법을 이용해서 축산물을 대상으로 해서 특이항체생산과 그의 응용은 닭의 계란으로부터 IgY을 생산 제품화한 단계이다.
- 배 등은(1999)은 면역기법을 이용해서 세균성 식중독 및 병원 미생물을 제거하기 위한 수단으로 미생물항원인 *Escherichia coli*(ATCC 1775), *Vibrio parahae molyticus*(ATCC 19111), *Salmonella typhimurium*(ATCC 14208), *Listeria monocytogenes*(ATCC 19111)의 식중독균을 사용해서 이에 대한 계란 특이항체를 생산하였다.
- 대구한의대와 경북축산기술연구소(2000~2001)는 경상북도 축산기술연구소에서 보유하고 있는 토종계와 청색계를 이용하여 생산한 多機能性 토종계란과 외관상 차별화된 多機能性 청색계란(위염치료예방, IgY)·低콜레스테롤·高DHA 함유 생산기술을 개발하여 특허출원하였다(특허출원번호: 10-2001-59507호).
- 경주 동국대의대(서정일)에서 *H. pylori*에 감염된 60여명의 위염환자를 대상으로 임상실험한 결과, IgY 계란만을 날것으로 먹었을 때 *H. pylori*를 80%이상의 사멸시키는 효과가 있었으며, 항생제만 복용하여 치료시는 2주 동안에 94%를 박멸시켰으나, 항생제와 IgY계란을 동시에 복용하였을 때는 *H. pylori* 1주일만에 거의 박멸(94%이상)시켜 치료기간을 단축시키는 효과를 나타내었다. *H. pylori* 감염 위염환자의 표준치료제의 보조제로 활용시 매우 유의함을 보고하였다(2001).

- 경상북도는 고부가가치 축산물개발 사업으로 IgY계란의 생산기술을 도내에 3개 양계농가에 기술이전 하여 시범사육중에 있으며, 점차 확대시켜 특화사업으로 정착시켜 나아갈 계획에 있다.
- 면역기법을 이용한 기능성 축산물은 계란을 이용한 anti-*H. pylori* IgY 함유 제품이 일부 벤처기업((주)에그바이오텍)에서 개발해서 시판 초기단계에 있다(2001). ※
- 또한 현재 일부 유업체에서는 발효유와 가공유에 정제된 IgY성분을 첨가하여 시판중인 것도 있으나, 착유된 원유를 살균처리하여 마시는 일반 시유(우유)에 천연적으로 항 *H. pylori* 성분이 함유된 것은 아직 전무한 상태이다.

2. 국외 연구결과 및 내용

- 면역강화 초유로부터 허약자, 노약자, 어린이용 면역우유생산 시판되고 있다.
- 계란과 우유에서 설사원인균인 휴먼로타바이러스, 충치원인균인 *S. mutants* 균 등에 대한 특이 항체를 생산하여 질병예방 및 발생을 억제하는 경구투여제제 및 다이어트식 연구가 진행되고 있다.
- *H. pylori* 항원을 이용한 초유와 우유 속에 항체농축액을 제품으로 일부 개발되고 있다.
- *H. pylori* 항원을 이용한 위염 백신이 개발 중에 있다.

3. 향후 전망

2001년 현재 우리나라 우유생산량은 약 2백3십만톤에 소비량은 2백8십만톤에 이르고 있다. 축산물 수입개방에 따른 분유수입으로 재고량이 크게 증가하여 2002년 1월에 9천톤에서 2002년 7월에 2배로 증가하여 1만 9천톤에 이르고 있다. 우유의 대체음료인 쥬스, 두유, 차음료 등 건강성·기능성 지향적인 경합음료의 시장이 급속히 신장하고 있다. 특히 쥬스, 두유의 경우는 20%의 높은 성장을 기록하고 있다. 영양보다는 건강위주의 식품수요가 증대됨은 물론 다이어트를 위한 식품의 선호 등으로 인해 식

량소비 전체가 포화상태에 돌입되었다. 현재 유가공업계에서는 고부가가치를 창출하는 유제품 즉 피자치즈, 기능성 요구르트, 조제분유 등의 제품을 출시하여 시장수요를 지속적으로 확대시켜가고 있으며, 1990년에 3,500톤에 불과했던 가공치즈의 생산량이 2000년에는 21,991톤, 2001년에는 25,678톤으로 증대되었다. 현재 기능성 시유는 개발 제품이 출시되지 않았기 때문에 전무한 상태이다.

한편, 위염원인균인 *H. pylori*의 감염율이 북유럽 50%이상, 개발도상국 및 신흥공업국 80~90%이상, 한국 75%이상의 감염율로 볼 때 위염예방치료용 기능성우유의 생산 기술 확보로 제품화가 이루어 질 때 우유제고 경감 뿐만 아니라 국민건강에도 크게 기여하여 농축산분야의 국가경제에 발전적 파급효과를 기대한다.

가. 제품개발전망

- 건강지향형 축산식품 소재의 지속적 출현이 예상되고
- 선진국에서는 신기능성 질병예방 및 치료 보조 축산물 제품개발이 다양화되고 있다.
- 젖소와 계란을 이용한 의료용 단백질 및 진단시약 생산 확대 전망되며
- Anti-*H. pylori* 항체를 이용한 위염 진단용 시약 및 항체생산용 백신이 개발 될 것이다.

나. 기술발전 전망

- 축산분야에 면역 및 생물공학기법이 도입되어 고기능성 다기능성의 제품생산기술이 개발될 전망이다.
- 미생물 원인질병에 대한 특이항원을 개발 탐색하여 축산물을 이용하여 생산된 면역제제가 가미된 질병예방 및 치료보조용의 식품개발이 실용화가 가능하며
- 축산물을 이용한 천연소재의 대량 면역물질 생산기술이 개발될 것이다.

다. 현재기술 상태의 취약 부분

- 고기능성 균체항원 대량정제 기술
- 경구용 백신 실용화 기술

제 2 장 Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유생산과 항체특성 평가

제 1 절 서 론

1983년 Warren과 Marshall에 의해 위장에서 campylobacter와 유사한 세균이 발견된 이후 이 균주에 대한 생화학적, 미생물학적 연구가 진행되었으며, Goodwin등에 의해 *H. pylori*로 명명되었다. *H. pylori*는 전 세계 인구의 반수 이상이 감염되어 세계적으로 가장 많이 그리고 가장 널리 분포하고 있는 균이다.

*H. pylori*는 전 세계적으로 50%이상이 감염되어 있고 이들 대부분이 일생 중 초기에 감염되는 것으로 여겨진다. 한번 감염되면 수년 또는 일생동안 감염이 지속되고 저절로 치유되는 일은 거의 없다. 감염율은 지역과 민족에 차이가 있으며, 사회 경제적 수준에 반비례하는 것으로 되어 있다. 감염의 유병율은 나이가 많을수록 점차 증가한다. 나이가 많아질수록 유병율이 증가되는 것은 감염에 대한 위험성이 지속적으로 있다는 것을 의미한다. 균의 감염은 사회경제적 환경과 밀접한 관계가 있으며, 사회경제적 수준과 유병율은 반비례 관계에 있는 것으로 되어있다. 그리고 인구밀집, 빈곤한 가정, 오염된 상수공급, 대가족, 수용소나 고아원 등의 폐쇄집단 등의 중요한 위험인자로 알려져 있다.

한국인에서의 균 감염율은 55%로 보고되고 있으며 성별간에 차이가 없는 것으로 되어 있다. 그리고 나이가 들어감에 따라 유병율이 증가하며 20대에 58-66%로 급격히 증가하는 양상을 보여 40대에 59-79%, 50대에 54-64%, 70세 이상에서 62-64%의 유병율을 보인다.

*H. pylori*가 비침습성 세균임에도 불구하고 위점막에 염증반응을 일으키는 직접적 기전은 *H. pylori*에서 분비되는 여러 세포독성인자가 위상피세포에 손상을 주는 것, urease에 의하여 생성된 암모니아가 위점막 손상을 일으키는 것, 그리고 *H. pylori*로

부터 호중구를 끌어들이 수 있는 화학구성 인자가 점막 내로 흡수되어 혈액 내 호중구의 점막침윤을 유도하는 것 등이다. 간접적 기전은 위상피세포에서 IL-8등의 chemokine의 분비가 증가되어 염증세포가 침윤하는 것이다. 만성활동 위염환자에서 70-92%의 감염율을 보이고 있고, 소화성궤양, 위암의 원인에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

한편 우리나라의 축산관련 산업은 축산물개방으로 수입육이 붓물처럼 밀려오는 시점에서 점차 국제경쟁력 하락은 낙농업도 마찬가지이다. 최근 우유소비율의 둔화로 재고분유가 2002년 3월 현재로 16,200톤으로 전년보다 약 15%이상이 증가되어 우유업체들의 우유소비에 많은 어려움에 처하고 있으며, 정부에서도 젓소 도태 등 사육두수 줄이기에 앞장서고 있는 실정이다. 이런 상황에서 상품성과 기능이 뛰어나고, 소비자 욕구에 충족시킬 수 있는 고품질 축산물을 생산한다면 우유소비를 비롯하여 축산물 소비를 향상시켜 국제경쟁력도 높일 수 있을 것으로 판단된다.

면역시스템 기법이나 항원항체 반응을 이용한 특이항체의 생산 응용 및 그 활용도가 점점 증대되고 있다. 축산물을 이용하여 생산된 특이항체는 세균성감염 설사병의 치료와 충치에 대한 보호효과가 있고, 특히 IgY는 비교적 산과 열에 안정하기 때문에 위염치료 및 예방에 유의한 실험결과가 보고 되어있다. 피동면역 소재로서의 항체는 선천적 또는 후천적 면역결핍증을 앓고 있는 신생아나 어린이처럼 면역기능이 떨어져 항체를 생산할 수 없는 이들에게 소화관 감염에 대한 보호기능이 있고, 또한 약물, 영양결핍, 노화에 의해서 면역기능이 떨어진 성인이나 어린이에게도 활용할 수 있다. Rotavirus는 신생아에게 장염을 일으키는 주요 감염원이며, 이들에 대한 특이항체의 경구투여는 Rotavirus에 의한 설사병에 유용한 약물이 될 수 있다는 보고도 있다.

특이항체를 식품분야 소재로 산업화에 활용한 빈도는 아직 미미한 상태에 있었다. 그 이유는 경제성과 적용성 그리고 기술적 측면에서 만족을 충족시키지 못한 때문으로 판단되나 최근에 면역학, 단백질공학, 생명공학 등의 발전과 기술 향상으로 식품 신소재로서의 활용성이 점차 높아질 것으로 기대된다. 따라서 본 연구의 최종목표는 위염 원인균인 *Helicobacter pylori* 감염을 예방하고 치료효과를 갖는 기능성우유를 생산하는데 있다.

따라서 본 연구 및 기술개발 사업에서는 위염 원인균인 *Helicobacter pylori* 항원을

이용해서, 특이항체 및 면역성분을 많이 함유한 면역우유를 생산하고, 이를 이용한 고기능성 축산물 및 축산제품을 생산하여 국민건강증진에 이바지할 뿐만 아니라 제품의 기술고도화, 고급화 및 고부가가치화 함으로써 농가소득증대 및 지역과 국가경제에 이바지하고자 한다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 항원의 준비 (Antigen preparations)

가. 균주의 분리

*H. Pylori*의 분리 및 배양은 동국대학교 의과대학 소화기내과에서 내시경 검사를 받은 환자 5명에 대해 *H. Pylori* 확인 환자로 판명된 환자의 위 생검 조직을 얻어 Sheep Blood agar plate에서 2~3일 간격으로 계대 배양하여 37°C CO₂ 농도 10% 환경의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 물방울 모양의 특징적인 무색 투명한 집락이 형성되면 *H. Pylori*인 것을 증명하기 위해 Brain heart infusion egg yolk agar(BHIE)에 계대 배양하여 붉은 집락을 형성하면, 그람염색, Urease를 시행하여 양성을 보였을 때, *H. Pylori*로 판정하였다. 한국유전자은행으로부터 분양받은 *H. Pylori* (KCTC 12083)균주는 sheep blood agar(SBA) plate에 CO₂ 농도 10%, 37°C 환경에서 2~3일 간격으로 계대 배양하였다. 계대 배양으로 활성화된 균주는 56°C에서 30분간 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)이 5% 첨가된 MHB(Mueller Hinton Broth)배지에서 48시간동안 액체 배양하였다. 실험균주의 검정은 현미경적 관찰, Gram염색과 urease test를 통해 실시하였다.

나. 항원의 준비

액체 배양된 균주는 0.5% formalin용액으로 3시간동안 불활성화 시킨 후 4°C, 4,000rpm으로 30분간 원심분리 하여 회수하고, 회수된 균은 다시 멸균된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 3회 세척한다. 세척된 균은 ice on 상에서 5분간 sonicate(pulse 20, duty cycle 50)하여 파장 667 pyroi에서 O.D. = 1.0이 되도록 맞춘

후 백신용 항원으로 사용하였고, 파장 405pyroi에서 O.D.=0.5로 맞춘 것은 ELISA분석용 항원으로 사용하였다.

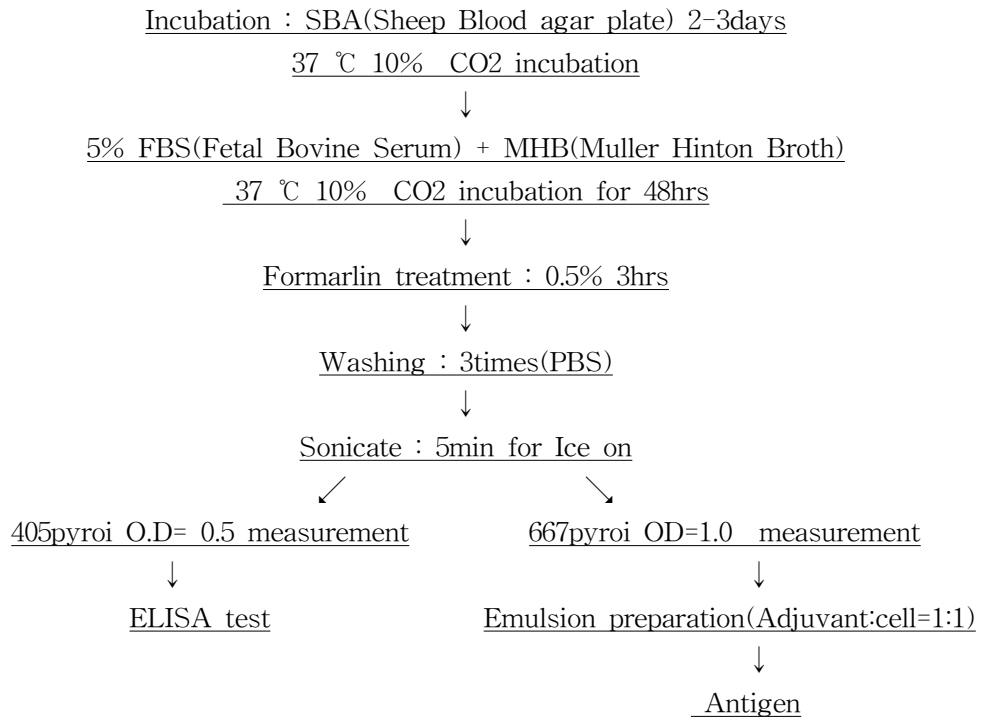


Fig. 2-1. Scheme of antigen preparation

2. 실험동물

경상북도 축산기술연구소에서 일반사양 관리로 사육중인 착유우 홀스타인(Holstein) 종 24두를 처리구당 비유초기, 중기, 후기 각 2두씩 Table2-1과 같이 배치하고 백신 투여량을 각각 10ml, 20ml, 30ml로 나누어 투여하였다. 급여사료는 농협안동배합사료 공장(주)에서 생산된 배합사료를 급여하였으며 건초와 음수는 자유채식 시켰다.

Table 2-1. Experimental design.

Treatment	Lactation Stage		
	Early lactation (0~2 Months)	Mid lactation (2~6 Months)	Late lactation (6~10 Months)
Control	2	2	2
10ml vaccination	2	2	2
20ml vaccination	2	2	2
30ml vaccination	2	2	2

3. 면역

초산에서 3차에 이르는 착유우를 대상으로 백신투여 하였으며, 면역횟수는 총 4회 실시하였다. 1차 면역은 *H. pylori* 항원을 Freund's incomplete adjuvant(Sigma F-5881)와 1 : 1 비율로 유회(5,000rpm, 5min)한 다음 젖소의 양쪽어깨 견갑골 (scapula)부위 근육에 10ml, 20ml, 30ml를 각 4곳에 동일량으로 나누어 근육주사 (intramuscular)하였다¹⁵⁻¹⁷⁾. 2, 3차 면역은 1차 면역 후 2주 간격으로 항원과 Freund's complete adjuvant(Sigma F-5506)를 같은 방법으로 백신투여하고, 4차 백신은 3차 백신 3주 후에 같은 방법으로 면역시켰다³¹⁾.

4. Serum 및 우유채취와 sample 전처리

우유 착유는 오전과 오후 2회에 걸쳐서 텐덤식 반자동 착유기를 이용하였고, 우유 분석을 위한 sample 채취는 1주일간격으로 오전 착유시 개체별 100ml씩 채취하였다. 채취한 우유 sample은 4℃에서 14,000rpm으로 30분 동안 원심분리 하여 고형분을 제거하고 1N HCl로 pH 4.6으로 조절하여 casein을 제거한다. Casein이 제거된 유청 (Whey)을 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절 후 -20℃에 보관하였다가 ELISA분석에 이용하고, 나머지 유청은 분리정제하여 SDS-PAGE 및 Western blotting실험에 사용하였다.

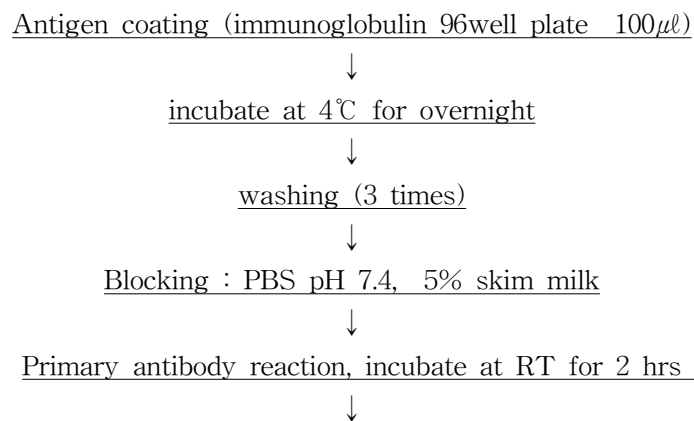
혈액은 2주 간격으로 0~14주까지 채혈하였으며, 1회 채혈시 경정맥에서 10ml정도

채혈하여 응고될 때까지 실온에 방치하였다가 원심분리(3,000rpm, 4°C, 15min)로 혈청을 분리하여 1mℓ씩 나누어 -20°C에 보관하였다²⁸⁾.

5. ELISA에 의한 항체의 역가측정

*Anti-H. pylori*에 대한 우유와 혈청항체의 상대적인 농도 및 역가를 측정하기 위해 면역학적 방법인 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 비교측정 하였다 (Fig.2-2).

ELISA 측정용 항원을 immunoglobulin 96 well plate에 100 μL씩 coating하고 overnight(4°C)하였다. 항원 coating시 bovine IgG(Sigma I5506)를 standard로 coating하였다. 각 well을 washing buffer(10mM PBS, pH 7.4, 0.5% Tween 20)로 3회세척 후 blocking액(PBS pH 7.4, 5% skim milk) 150μL넣고 실온에 30분이상 방치 후 washing buffer로 3회 세척한다. Casein이 제거된 유청을 washing buffer에 희석한 다음 well에 100μL씩 넣고 실온에 2시간 방치한다. 세척 후 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 2차 항체로써 1 : 30,000으로 washing buffer에 희석하고 well에 100μL씩 넣고 실온에 1시간 방치한다. 3회 세척 후 기질용액(10% diethanolamine buffe, 1% phosphatase substrate(Sigma 104))을 100μL씩 넣은 후 30분 반응 후 3N NaOH 반응 정지액 50μL로 반응 정지시키고 405 pyroi에서 흡광도를 측정하였다.



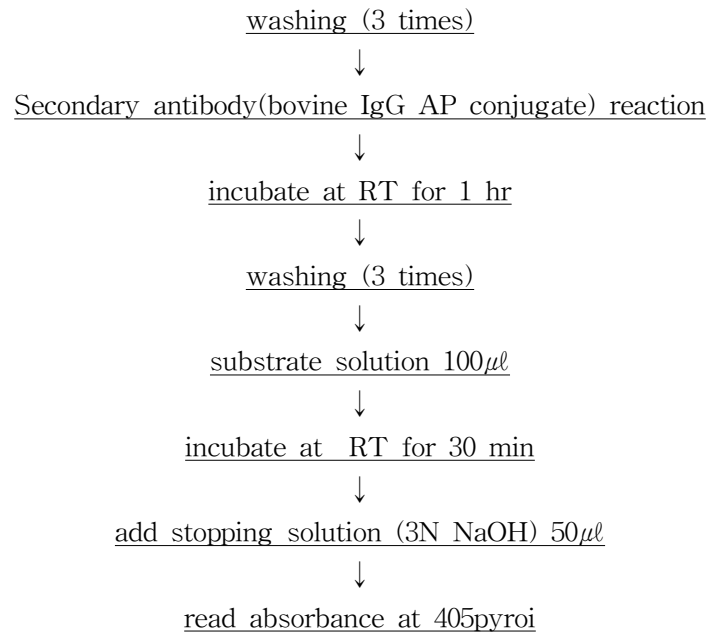
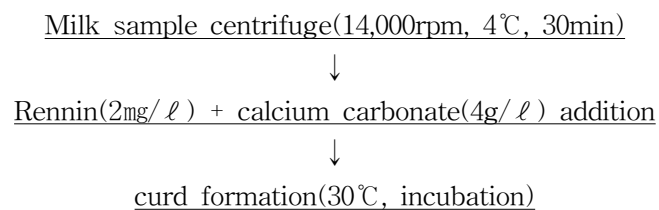


Fig. 2-2. ELISA(enzyme-linked immunosorbent) test

6. 항체의 분리정제

가. 우유로부터 항체 분리

우유 시료에서 항체 분리는 Fig. 2-3과 같은 방법으로 실시하였다. 즉 4℃상에서 14,000rpm으로 30분 동안 원심분리 하여 지방을 제거하고, rennin(2 mg/liter)과 calcium carbonate(4g/liter)를 용해한 후 응유가 형성될 때까지 30℃에서 incubation하여 casein을 침전시킨다. 침전된 casein은 실온에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하여 상등액 65mL에 포화된 ammonium sulfate((NH₄)₂SO₄) 35mL를 가하여 침전시키는 것을 3회 반복하였다. 침전된 단백질은 borated-buffered saline(BBS, pH 8.4)에 투석막으로 투석하여 동결건조 하였다.



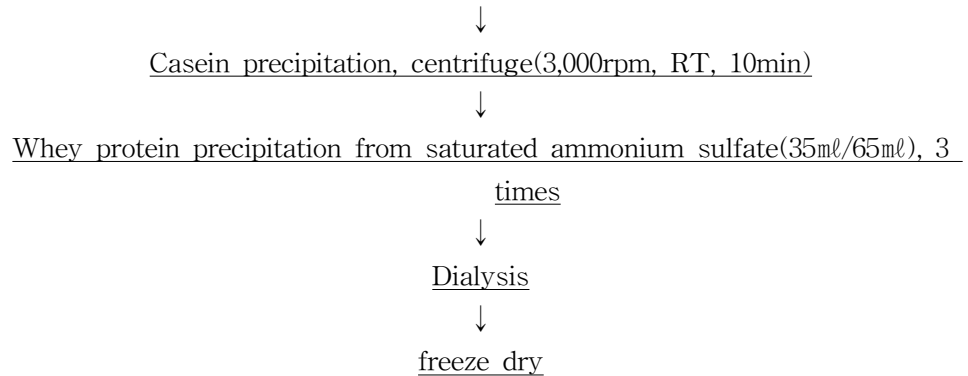
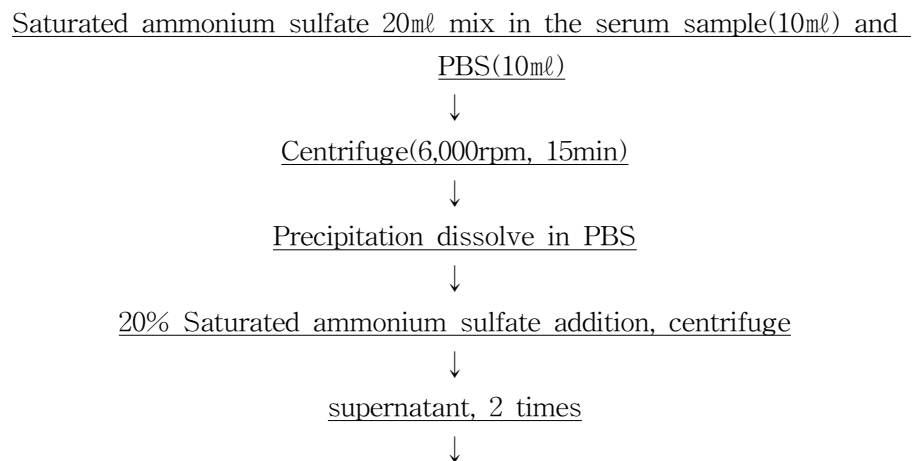


Fig. 2-3. Anti-body separation from milk.
Immunoglobulin preparation.

나. 혈청으로부터 항체의 분리

혈액으로부터 항체를 분리하기 위해 젓소 경정맥에서 채취한 혈액은 4℃, 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 분리된 혈청 10mL에 PBS 10mL를 가한 다음 포화유안((NH₄)₂SO₄) 20mL를 첨가하여 30 ~ 60분 동안 서서히 교반 후 실온에서 6,000rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 분리된 침전물을 PBS에 용해시키고 전량을 10 mL로 한 다음 다시 포화유안을 20% 되도록 첨가하여 원심분리로 생긴 침전물을 제거하였다. 다시 상층액에 30% 포화유안을 가하고 원심분리하는 과정을 2회 더 반복하여 생긴 침전물에 소량의 PBS로 용해하여 투석법으로 탈염하였다(Fig. 2-4).



dialysis
↓
freeze dry

Fig. 2-4. Antibody separation from serum.

다. Anti-*H. pylori* 항체의 정제 및 분획

고순도의 Specific anti-*H. pylori* 항체를 정제 및 분획하기 위해 PBS로 anti-*H. pylori* 항체를 40mg/mL로 녹인 후 총량 45mL되게 하였다. 만들어진 시료는 Bio-Gel A 1.5m Gel이 충전된 column(φ 2.0×25 cm)에 유속 2mL/min로 통과되면서 그 fraction을 수집하였다(20). 통과된 fraction의 단백질 함량을 측정하기 위해 O.D. = 280nm에서 흡광도를 측정하고, specific anti-*H. pylori* 항체를 분획 하기 위해 O.D = 405nm에서 ELISA 측정하였다.

7. Anti-*H. pylori* 항체 특성실험

가. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

*H. pylori*균과 anti-*H. pylori* 항체의 특성을 조사하기 위한 분자량 측정은 SDS-PAGE(Sodium dodesyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis)로 행하였다. 0.5M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide를 함유한 4.0%(v/v) 농축겔(stacking gel)을 사용하고, 분리겔(separating gel)은 1.5M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide을 함유한 10%(v/v)겔을 사용하였다. 분리정제된 항체단백질 30μg/μL(D.W)를 sample buffer로 1 : 4로 희석하여 각 well에 20μL씩 loading하였다. Sonicate된 *H. pylori*균 40μg/mL(D.W)를 sample buffer와 1 : 4로 희석한 후 20 μL씩 loading하였다. Marker는 wide range (Sigma M4038)와 low range(Sigma M3913) 두 종류를 5μL씩 loading하였다. 전기영동 후 겔은 Coomassie blue로 염색하여 단백질 band를 확인하였다.

나. Western blotting에 의한 항체의 특이성 확인

H. pylori 항원에 의해 생성된 anti-*H. pylori* 항체가 항원에 특이적으로 반응하는

지를 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. *H. pylori* 항원 whole cell을 sonicator로 파쇄하여 원심분리(4,000rpm, 5min, 4°C)한 상등액을 sample buffer와 1 : 4로 희석하여 각 well에 20 μ L씩 loading후 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나면 NC membrane(Nitrocellulose, Gelman Sciences co.)에 transfer하여 western blotting 하였다.

1차 항체(primary antibody)는 우유정제와 혈청정제로 얻은 항체를 결합시키고, 2차 항체(secondary antibody)는 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 1 : 30,000으로 희석하여 반응시켰다. 기질로 alkaline phosphatase substrate를 사용하여 3분 반응시켜 X-ray 필름 상에서 항원물질을 확인 하였다(Fig. 2-5).

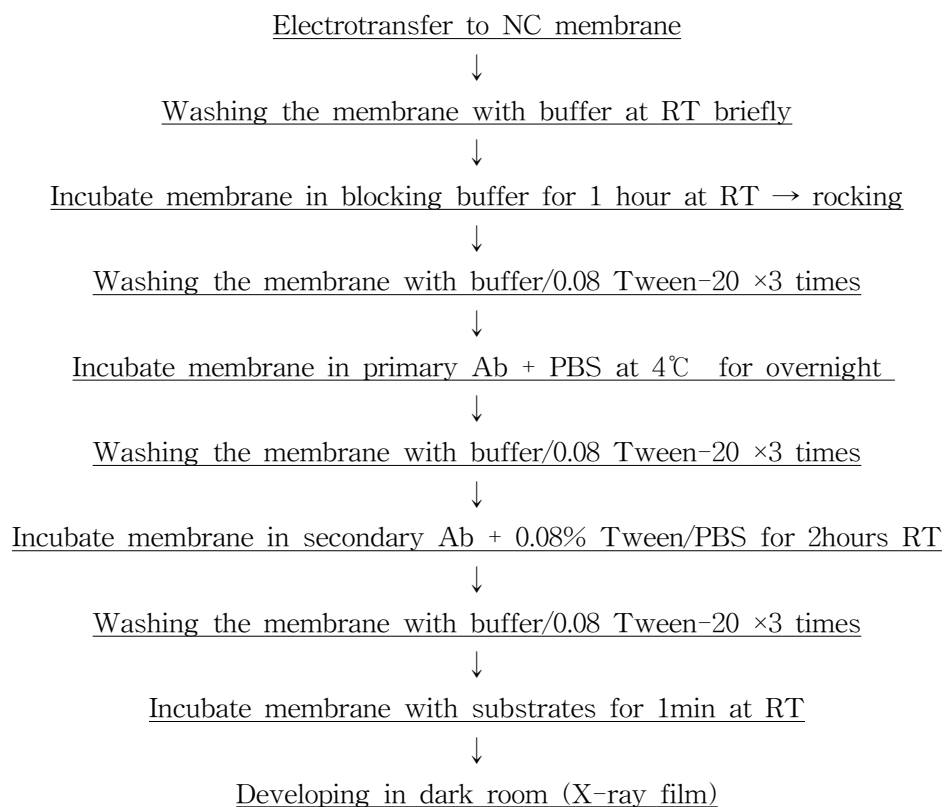


Fig. 2-5. Western blotting

8. Anti-*H. pylori* 항체의 이화학적 특성

가. Anti-*H. pylori* 항체에 의한 *H. pylori*균 응집 반응

*H. pylori*균을 PBS로 405nm에서 O.D. = 1.0으로 조절하여 well당 100 μ L씩 coating후 2시간동안 실온에 incubation하였다. Anti-*H. pylori* 항체를 함유한 유청(whey)을 단계별로 희석하여 각 well당 100 μ L씩 분주하고 2시간동안 incubation후 응집도를 \times 500배 광학현미경으로 관찰하였다.

나. Anti-*H. pylori* 항체의 열과 산에 대한 안정성실험

우유중에 생성된 항체의 열에 대한 안정성을 알아보기 위해 유청(Whey)을 분리하여 시료로 사용하였다. 또한, 첨가물 첨가에 따른 열에 대한 안정성변화를 알아보기 위해 whey, 20% maltose, 20% glycerol, 0.2% glutamic acid를 첨가하여 0.5mL centrifuge tube에 150 μ L씩 나누어 담아 heating block (model : HF-21, YAMATO SCIENTIFIC CO. LTD)으로 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C 그리고 135 $^{\circ}$ C에서 시간별로 처리한 다음 ELISA로 anti-*H. pylori*항체 활성을 측정하였다.

산에 대한 안정성 실험은 1N HCl로 pH = 7.0 ~ 1.0까지 조절하고, 알칼리상태는 1N NaOH로 pH = 8 ~ 12까지 조절하여 ELISA로 anti-*H. pylori*항체 활성을 측정하였다.

9. 통계학적 분석

실험결과의 통계적 분석은 SPSS(10.0 for windows)를 이용하여 공분산 분석을 하였으며, 처리구간 유의성 검증은 $p < 0.05$ 일 때 각 처리구간의 유의성을 인정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. *H. Pylori* 배양

H. pylori 균을 SBA(sheep blood agar plate)배지에 계대배양 하였을 때 물방울 모양의 특징적인 무색 투명한 집락이 Fig. 2-6과 같이 형성되었다. Gram 염색결과 Gram음성을 나타내었으며, urease test를 시행한 결과 Fig. 2-7과 같이 양성을 보였음으로 이를 *H. Pylori* 균으로 판정하고 항원으로 사용하였다.

Fig. 2-6. *H. pylori* culture

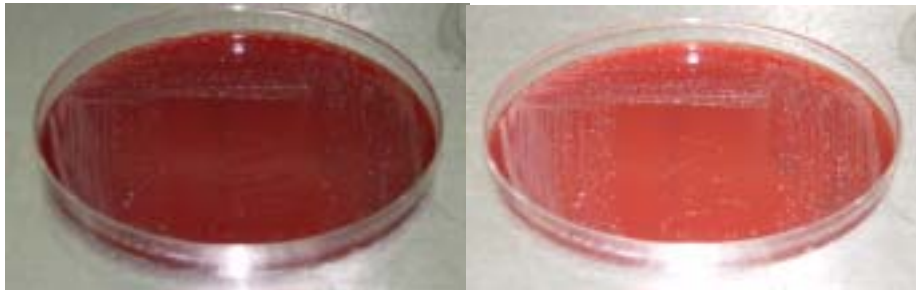


Fig. 2-7. Urea test



2. 백신 투여량에 따른 Anti-*H. pylori* 항체 함량

가. 백신투여량에 따른 혈중 Anti-*H. pylori* 항체함량 변화

Fig. 2-8, Table2-2는 백신투여량에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체함량 변화를 나타낸 것으로서, 전반적으로 백신투여에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체 함량이 백신투여 후 2주부터 증가하기 시작하여 4주 이후에는 대조구와 유의적인 차이를 나타내며 증가하였다. 특히 6주에 최대 생성량을 보였고, 대조구와 유의적인 차이로 14주까지 지속되었다($p < 0.05$). 백신투여에 따른 혈청내 항체 생성량은 백신투여 2주 이후 급격히 증가된다는 연구결과(13)와 유사한 경향을 나타내었다. 백신투여 6주이후 혈청내 평균 항체함량이 0.38mg/mL인 대조구에 비해 10mL투여군은 0.78mg/mL, 20mL투여군은 1.05mg/mL, 30mL투여군은 0.73mg/mL로서 각각 2.1배, 2.8배, 1.9배씩 증가하였다. 이는 백신 투여량이 항체 생성량에 유의적인 차이를 나타내지 못한 연구결과(13)와 달리 본 연구에서는 20 mL > 10 mL > 30 mL 백신투여 순으로 혈중항체 생성량에 차이를 나타내었고, 20 mL 백신투여가 유의적으로 가장 많은 항체를 생성시켰다($p < 0.05$).

나. 백신투여량에 따른 우유에서의 Anti-*H. pylori* 항체 함량변화

Fig. 2-9, Table2-3는 백신투여량에 따른 유청내 anti-*H. pylori* 항체 함량변화를 나타낸 것이다. 유청중의 면역성 단백질 대부분은 혈청으로부터 이동되어 오거나 유선조직내에서 합성되는 것으로 알려져있다(14). 이와 같이 본 실험에서도 유청내 항체 생성이 혈청과 유사한 경향으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 유청내 항체함량 또한 2주부터 증가하기 시작하여 6주에 최대 생성량을 나타내었고, 6주이후 평균 항체 생성량이 대조구는 4.62 μ g/mL에 비해 10mL 백신 투여구는 13.8 μ g/mL, 20mL 백신투여구는 15.1 μ g/mL, 30mL투여구는 14.6 μ g/mL로 대조구와 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 유청에서 6주이후 처리구간 항체 생성량을 혈중 항체함량과 비교해 볼 때 처리구간 유의적인 차이를 나타내며, 증가한 혈중 항체함량과는 달리 유청에서는 백신투여량에 따른 처리구간의 항체 생성량에 있어서는 유의적인 차이를 볼수 없었다($P > 0.05$). 따라서 유청중 항체 생성량과 젖소의 stress로인한 산유량감소현상을 고려할 때 10mL의 백신투여가 가장 적당할 것으로 사료된다.

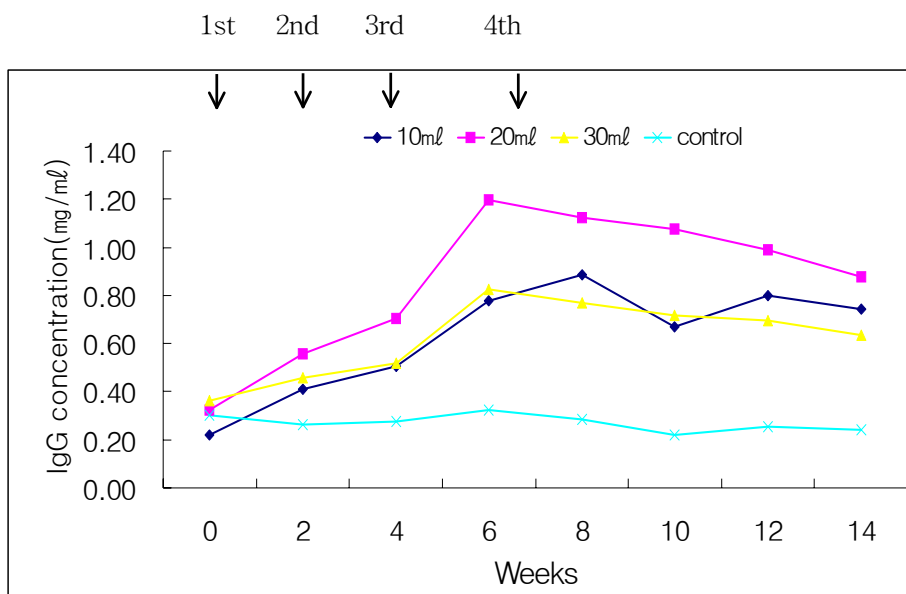


Fig. 2-8. Anti-*H. pylori* antibody titers in serum after immunization with *H. pylori* by vaccine dose at dairy cows.

↓ : Injection

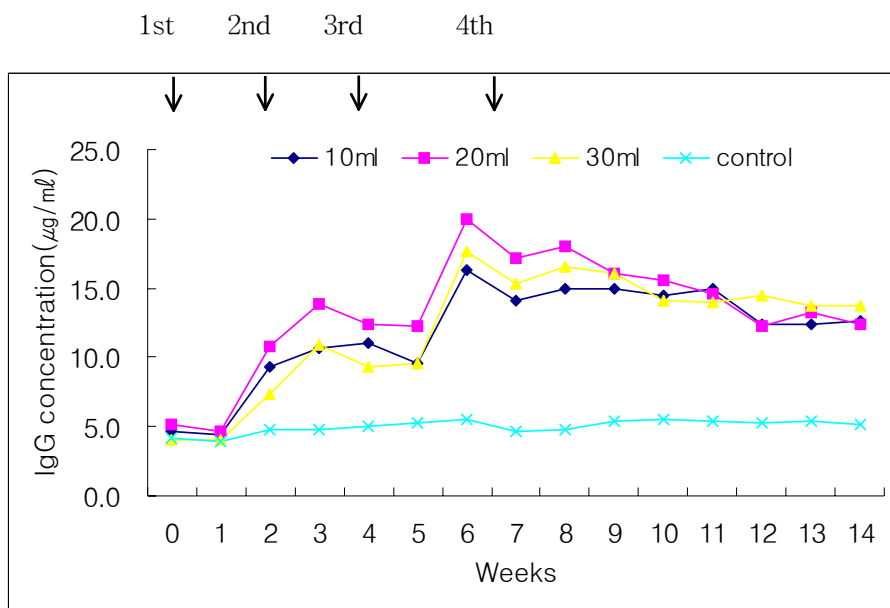


Fig. 2-9. Anti-*H. pylori* antibody titers in whey after immunization with *H. pylori* by vaccine dose at dairy cows.

↓: Injection

Table 2-2. Anti-*H. pylori* antibody titeration in serum after immunigation at dairy cows on a dose of *H. pylori* antigens.

(mg/ml)

Vaccine Amount	Weeks							
	0	2	4	6	8	10	12	14
10ml	0.30 ±0.04	0.26 ±0.04	0.28 ±0.07	0.33 ±0.07	0.29 ±0.07	0.22 ±0.03	0.25 ±0.05	0.24 ±0.02
20ml	0.22 ±0.03	0.41 ±0.09	0.51 ±0.07	0.78 ±0.10	0.89 ±0.31	0.67 ±0.03	0.80 ±0.30	0.74 ±0.33
30ml	0.33 ±0.16	0.56 ±0.12	0.70 ±0.06	1.20 ±0.24	1.12 ±0.30	1.07 ±0.32	0.99 ±0.30	0.88 ±0.26
Control	0.36 ±0.09	0.46 ±0.19	0.52 ±0.14	0.83 ±0.24	0.77 ±0.14	0.72 ±0.08	0.69 ±0.10	0.64 ±0.10

Table 2-3. Anti-*H. pylori* antibody titeration in whey after immunization at dairy cows on a dose of *H. pylori* antigens.

(µg/ml)

Vaccine Amount	Weeks						
	0	1	2	3	4	5	6
10ml	4.70 ±1.32	4.38 ±0.87	9.26 ±1.92	10.71 ±1.54	11.08 ±1.88	9.50 ±0.90	16.34 ±2.95
20ml	5.09 ±1.36	4.64 ±1.00	10.80 ±0.75	13.80 ±0.71	12.43 ±1.06	12.23 ±0.36	19.94 ±4.25
30ml	4.06 ±0.83	4.09 ±0.43	7.36 ±2.19	10.94 ±1.31	9.27 ±1.39	9.60 ±1.09	17.69 ±2.33
Control	4.12 ±0.19	3.91 ±0.54	4.75 ±0.37	4.79 ±0.37	4.97 ±0.51	5.29 ±0.69	5.49 ±0.61

Weeks							
7	8	9	10	11	12	13	14
14.08 ±2.3	14.98 ±1.74	14.93 ±2.63	14.42 ±2.28	14.99 ±0.92	12.42 ±2.89	12.43 ±1.76	12.59 ±1.81
17.21 ±4.09	17.99 ±3.73	16.11 ±2.66	15.53 ±3.30	14.59 ±3.06	12.21 ±2.14	13.18 ±2.21	12.39 ±2.87
15.34 ±3.26	16.57 ±1.67	16.07 ±0.60	14.13 ±1.78	14.01 ±2.50	14.46 ±1.89	13.68 ±1.91	13.76 ±2.40
4.69 ±0.96	4.79 ±0.07	5.45 ±0.69	5.53 ±0.81	5.40 ±0.72	5.33 ±0.34	5.35 ±0.57	5.16 ±0.32

3. 비유기간에 따른 Anti-*H. pylori* 항체 함량

가. 비유기간에 따른 혈중 Anti-*H. pylori* 항체 함량

비유시기에 따라 우유의 화학적 조성이 변화하는 것으로 알려져있다(15). 따라서 백신투여후 비유시기에 따른 혈중 Anti-*H. pylori* 항체 함량을 조사한 결과 Fig. 2-1, Table2-4와 같은 결과를 나타내었다. 백신투여 후 2~4주까지 증가하는 경향을 보이다가 6주이후 비유시기별 평균 항체함량 변화는 대조구 0.27mg/mL, 비유초기 0.60 mg/mL, 비유중기 0.87mg/mL, 비유후기 1.08 mg/mL로 대조구와 유의적인 차이 뿐만 아니라 각 처리구구 간에도 유의적인 항체 생성량 차이를 나타내었다(P<0.05).

혈중 Anti-*H. pylori* 항체 생성량량은 비유초기 > 비유중기 > 비유후기 순으로 항체함량차이를 나타내었으며, 이러한 결과로 볼 때 백신투여 시기는 비유초기에 투여하는 것이 가장효과적인 것으로 나타났다.

나. 비유기간에 따른 우유에서의 Anti-*H. pylori* 항체 함량변화

우유의 화학적 조성은 초유기 이후에는 비유기가 진행됨에 따라서 서서히 변화한다. 일반적으로 분만 후 3~6주간은 단백질, 지방 및 회분은 감소하고, 비유가 끝나는 2개월 전까지는 거의 변화가 없으며, 비유기에는 단백질, 지방 및 회분은 다시 증가하는 것으로 알려져 있다(15).

따라서 본 연구에서도 백신투여후 유청내 면역글로블린(Immunoglobulin), 즉 항체

을 알아보기 위하여 조사한 결과 Fig. 2-11, Table 2-5와 같이 나타났다. 비유기간별 우유내 항체함량 증가 또한 혈청과 유사한 경향으로 증가 하였으며, 6주 이후 우유내의 항체함량 증가는 비유초기 16.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 비유중기 15.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 비유후기 12.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 대조구 5.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와는 유의적인 차이를 나타내었으나 혈중 항체 생성과는 다른 양상으로 처리구간 항체함량의 유의성은 볼 수 없었다($P>0.05$).

면역단백질은 상유에서는 총 우유단백질의 1.9~3.3%이며, 유청단백질의 10%를 차지한다. 초유에 그 함량이 많으며 초유 총 단백질의 50~60%, 초유 유청단백질의 85~90%를 나타내는 것으로 알려져 있다(15). 따라서 본 실험에서는 실행되지 않았지만, 비유말기에 백신투여 후 초유에서 상유에 이르기까지의 항체 생성량에 변화를 조사할 필요가 있을 것으로 판단된다.

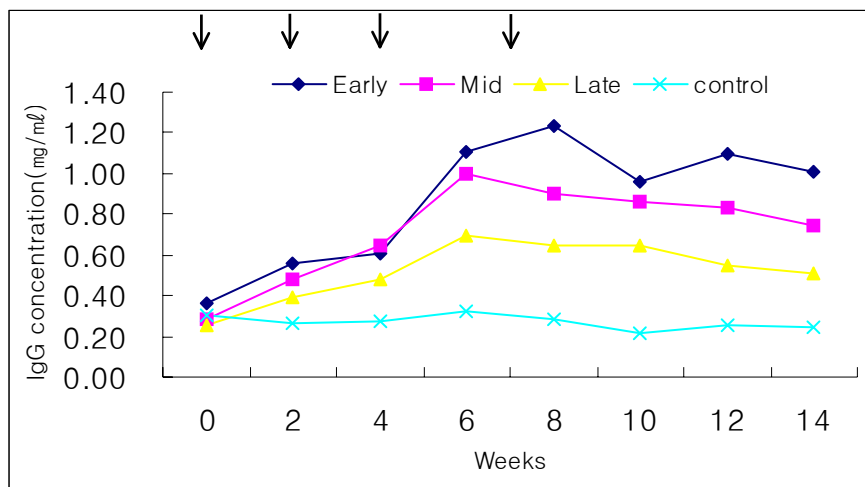


Fig. 2-10. Anti-*H. pylori* antibody titers in serum after immunization with *H. pylori* by lactation period at dairy cows.

↓ : Injection

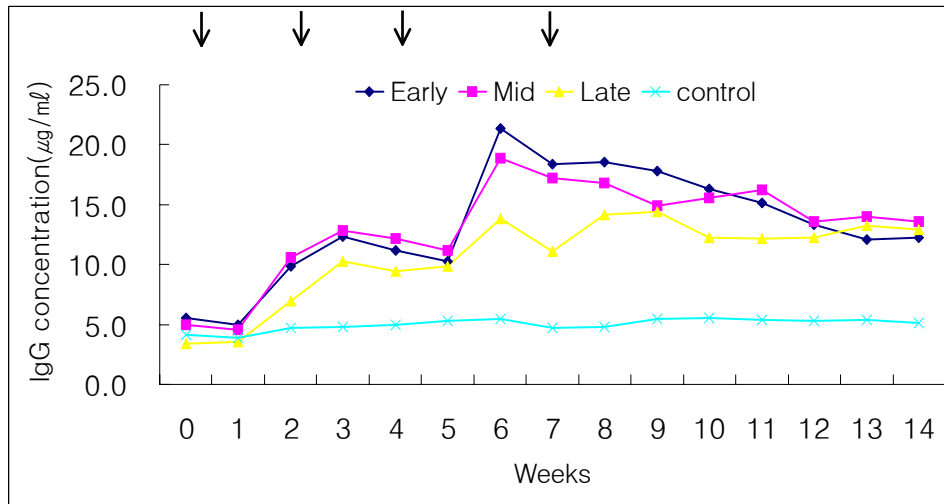


Fig. 2-11. Anti-*H. pylori* antibody titers in milk after immunization with *H. pylori* by lactation period at dairy cows.

↓: Injection

Table 2-4. Anti-*H. pylori* antibody titers in serum after immunization with *H. pylori* antigen by lactation period at dairy cows.

(mg/ml)

Lactation Stage	Weeks							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Early	0.30 ±0.04	0.26 ±0.04	0.28 ±0.07	0.33 ±0.07	0.29 ±0.07	0.22 ±0.03	0.25 ±0.05	0.24 ±0.02
Middle	0.37 ±0.13	0.56 ±0.16	0.61 ±0.11	1.11 ±0.29	1.24 ±0.23	0.96 ±0.35	1.10 ±0.25	1.00 ±0.26
Last	0.29 ±0.07	0.48 ±0.06	0.64 ±0.11	1.00 ±0.18	0.90 ±0.18	0.86 ±0.17	0.84 ±0.15	0.75 ±0.14
Control	0.26 ±0.13	0.39 ±0.16	0.48 ±0.12	0.70 ±0.14	0.64 ±0.07	0.64 ±0.03	0.55 ±0.04	0.50 ±0.04

Table 2-5. Anti-*H. pylori* antibody titers in whey after immunization with *H. pylori* antigen by lactation period at dairy cows.

(µg/ml)

Lactation Stage	Weeks						
	0	1	2	3	4	5	6
Early	5.51 ±1.20	4.98 ±0.72	9.88 ±1.45	12.36 ±0.70	11.17 ±1.92	10.30 ±1.13	21.33 ±2.43
Middle	4.94 ±0.94	4.56 ±0.68	10.57 ±0.82	12.80 ±1.42	12.14 ±1.27	11.20 ±0.95	18.83 ±1.66
Last	3.39 ±0.31	3.58 ±0.26	6.97 ±2.22	10.30 ±2.11	9.47 ±1.65	9.83 ±1.94	13.81 ±0.86
Control	4.12 ±0.19	3.91 ±0.54	4.75 ±0.37	4.79 ±0.37	4.97 ±0.51	5.29 ±0.69	5.49 ±0.61

Weeks							
7	8	9	10	11	12	13	14
18.38 ±1.99	18.53 ±2.63	17.80 ±0.74	16.27 ±2.57	15.14 ±2.27	13.31 ±1.68	12.06 ±1.57	12.23 ±1.48
17.18 ±1.74	16.83 ±2.66	14.93 ±2.46	15.60 ±1.85	16.26 ±0.97	13.57 ±3.58	13.97 ±2.76	13.61 ±2.58
11.08 ±0.36	14.17 ±0.73	14.38 ±1.37	12.22 ±0.93	12.19 ±1.42	12.21 ±1.69	13.27 ±0.65	12.89 ±2.94
4.69 ±0.96	4.79 ±0.07	5.45 ±0.69	5.53 ±0.81	5.40 ±0.72	5.33 ±0.34	5.35 ±0.57	5.16 ±0.32

4. Anti-*H. pylori* 항체의 특성

가. Anti-*H. pylori* 항체의 정제 및 분획

우유로부터 분리된 항체에서 specific anti-*H. pylori* 항체를 정제 및 분획 하기 위해 Bio-Gel A-1.5m Gel을 통과시켰다. 통과시킨 항체단백질 fraction의 단백질 양을 측정하기 위해서 280nm에서 흡광도를 측정하고, 항체의 함량을 측정하기 위해 405nm에서 ELISA 측정하였다(Fig.7).

컬럼을 통과시킨 결과 fraction 9~30사이에 대부분의 항체 단백질을 함유하고 있었으며, specific anti-*H. pylori* 항체는 fraction 17~25사이에 위치하고 있는 것으로 나타났다. 그러므로 fraction 17~25사이의 단백질을 분리함으로써 specific anti-*H. pylori* 항체를 얻을 수 있었다.

나. Anti-*H. pylori* 항체의 특이성

분리정제된 anti-*H. pylori* 항체와 항원 *H. pylori*균을 분석하기 위해 SDA-PAGE를 실시하였다(Fig. 2-12). 항원의 종류에 따라 면역반응을 일으킬수 있는 항체 단백질의 종류에는 여러 가지가 있을수 있지만 소의 혈청과 유청중에 있는 항체는 항원 반응의 특성에 따라 IgG1, IgG2, IgM, IgA등의 4종으로 분류된다³⁶⁾. IgG항체는 두 종류의 폴리펩티드로 이루어진 분자량이 150kDa정도 되는 커다란 분자이다. 약 50kDa 정도 되는 중쇄(heavy chain)와 25kDa되는 경쇄(light chain)로 이루어져 있으며, Ig(immunoglobulin)는 두 개의 동일한 중쇄와 경쇄로 이루어져 있다^{23,26)}.

본 실험에서도 anti-*H. pylori* 항체는 분자량 50kDa의 heavy chain과 분자량 24kDa정도에서 light chain으로 보여지는 각각 1개의 band가 형성되는 것을 볼 때 김 등¹⁰⁾, 신등²⁴⁾이 보고한 결과와 동일한 양상을 나타내었다.

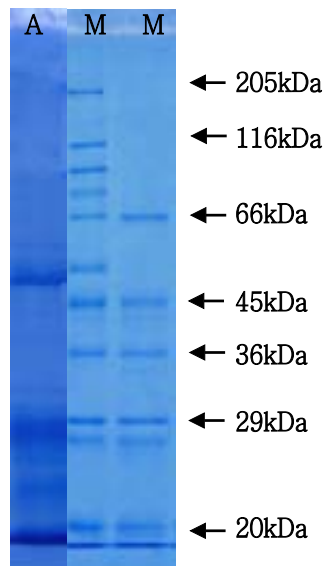


Fig. 2-12. SDS-PAGE patterns profile of antibody from diary cows immunized with *H. pylori* antigen.

M : Marker(20kDa : trypsin inhibitor, 29kDa : carbonic anhydrase, 36kDa : glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, 45kDa : ovalbumin, 66kDa : albumin, bovine serum, 116kDa : β -galactosidase, 205kDa : Myosin.

A : Purification IgG from milk of *H. pylori*-immunized diary cows.

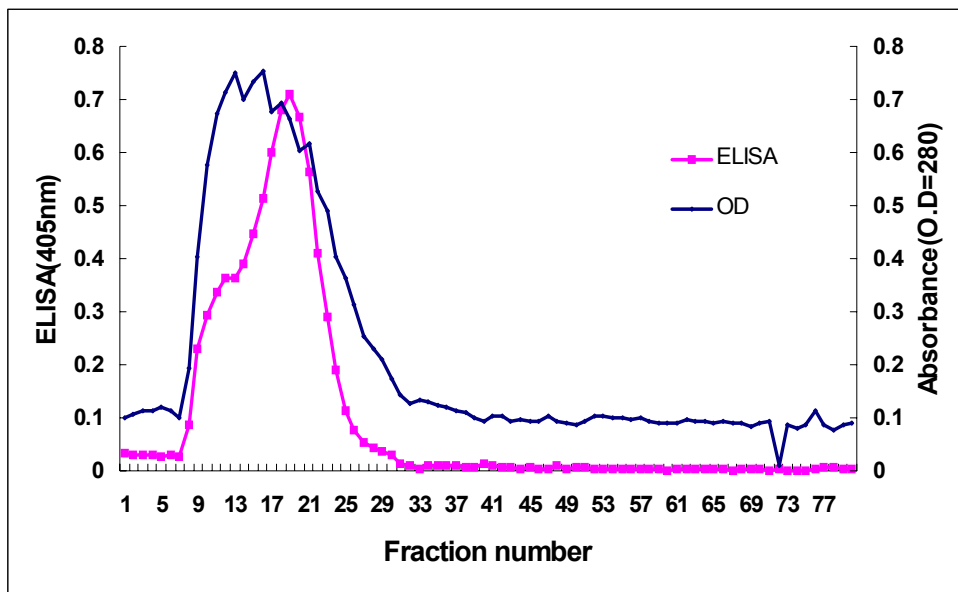


Fig. 2-13. Fraction pattern of whey acquired from cows milk immunized with *H. pylori* antigen.

5. Anti-*H. pylori* 항체의 응집반응

응집반응은 세균, 적혈구와 같은 일정한 크기를 가진 항원입자가 그 항체와 반응해서 응집괴를 만드는 현상을 말한다²⁵⁾.

항체의 항원에 대한 응집정도는 Fig. 2-14와 같이 면역하지 않은 대조구에서는 응집반응을 일으키지 않은 반면 *H. pylori*균으로 면역시킨 anti-*H. pylori* 항체는 *H. pylori*균에 대해 강한 응집반응을 일으켰다. 이미 보고된 바에 의하면 IgY특이항체가 *H. pylori* 성장을 억제하는 것이 관찰되었으며¹⁴⁾ 4종의 *H. pylori*균으로 면역시켜 얻은 유청 항체에서도 높은 살균력을 보인다는 보고¹⁵⁾가 있다. 본 실험에서도 유청내의 anti-*H. pylori* 항체가 *H. pylori*균에 대해 1/10의 높은 응집가를 나타내었다(Table 2). 이러한 응집반응의 결과를 볼 때 우유를 섭취함으로써 *H. pylori*감염치료 및 예방 효과가 가능할 것으로 판단된다.

Table 2-6. Agglutination value of antigen by anti-*H. pylori* antibody.

Antibody	Agglutinating dilution fold of anti- <i>H. pylori</i> antibody
Negative control	-
Anti- <i>H. pylori</i> antibody	1/10

H. pylori(O.D. 1.0 at 405nm in PBS) 100 μ L and same volume of diluted anti-*H. pylori* antibody were mixed in immunoglobulin 96 well plate for 2hr at RT. The aggregation was detected by simple visual inspection.

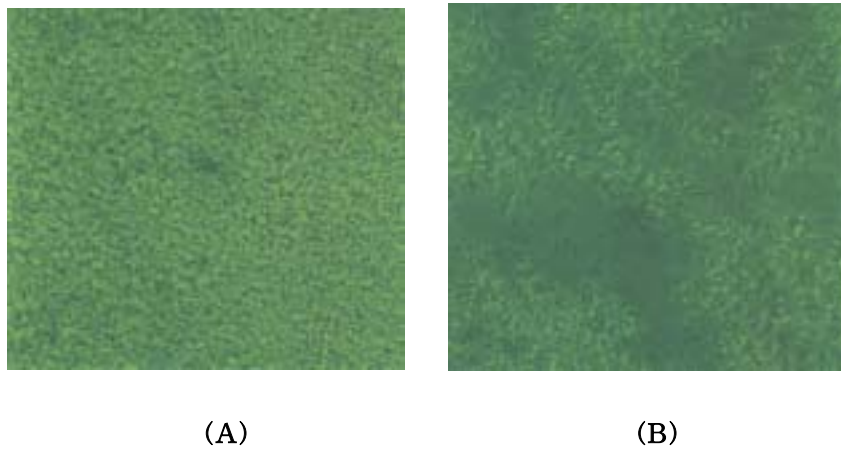


Fig. 2-14. Agglutination of antigen by anti-*H. pylori* antibody.
H. pylori strains show change of agglutination after treatment(B) when compared with before treatment(A). Magnification ; A, B, $\times 500$.

제 4 절 요 약

본 연구는 위염, 위궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기 질환의 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori* 균을 항원으로 하여 젖소에 면역시킨 후 생산된 우유의 anti-*H. pylori* 항체의 생성능을 검토하고, 백신 투여량과 항체 생성과의 관계, 항원 항체의 특이성, *H. pylori* 균 응집력, 항체의 산과 열에 대한 안정성, 그리고 백신투여가 젖소에 미치는 영향을 알아보았다.

1. 2주간 4회에 백신을 피하주사 하면서, 백신 투여량에 따른 혈청과 유청내의 anti-*H. pylori* 항체의 함량은 10ml, 20ml, 30ml 백신투여 모든 군에서 대조구에 비해서 높은 양의 항체 생성을 확인하였다. 유의적인 차이는 없었으나 20ml 투여가 항체 생성이 가장 많은 것으로 조사 되었다.
2. 비유기간별 anti-*H. pylori* 항체의 함량은 혈청, 유청 모두 2주째부터 항체생성이 확인되었고, 지속적인 증가를 보였으며, 비유초기군에서는 8주째에 최대함량을 보였으나 전반적으로 6주째까지 증가하여, 그 이후부터는 측정 14주까지 지속성이 유지되었다. 비유기간별 항체역가는 초기, 중기, 후기 순으로 차이를 보였으며 초기에 항체역가가 가장 높은 경향을 보였다.
3. Anti-*H. pylori* 항체의 SDS-PAGE에 의한 분자량측정 결과 heavy chain은 50kDa정도, light chain은 24kDa정도로 확인 되었다.
4. 응집반응결과 유청속의 anti-*H. pylori* 항체가 *H. pylori* 균에 대해 1/10의 응집가를 나타내었다.

제 5 절 참고문헌

1. Marshall, B. J. and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacillus in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet*. ii 1311-1314.
2. Warren, J. R. and Marshall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis., *Lancet*. I 1273.
3. Hunt RH.1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med*. 100(5A):42S-50S
4. 이광호, 윤희상 등. 1990. 한국인의 위염 원인균 *Helicobacter pylori* 보균 실태. *대한미생물학회지*. 25:475-490
5. Satoh K, Kimura K, Taniguchi Y, et al. 1996. Distribution of inflammation and atrophy in the stomach of *Helicobacter pylori*-positive and -negative patients with chronic gastritis. *Am. J. Gastroenterol*. 91:963-969.
6. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes, and *Helicobacter pylori*: views and expert opinions of IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994 ; 61-241.
7. 대한 *Helicobacter pylori* 연구회. 1988. 한국인에서의 *Helicobacter pylori* 감염의 진단과 치료. *대한소화기학회지* 32:275-289.
8. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, et al. 1999. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Am. J. Gastroenterol* 116:804-812.
9. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, Zagursky RJ. 2000. Application of

genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates Vaccine 19:601-612.

10. 김병재, 강병화 김태용, 김태한, 김기원. 1997. *Helicobacter pylori* 특이 계란 항체의 생산 및 특성. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:612-616.
11. Mysore JV, Wigginton T, Simon PM, Zopf D, Heman-Ackam LM, Dubois A. 1999. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in Rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. Gastroenterology. 117:1316-1325
12. Simon PM, Goode PL, Mobasser A, Zopf D. 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* vinding to gastrointestinal Infect. Immun. 65:750-757
13. Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T. 1999. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori* Antimicrob Agents Chemother. 43:1788-1791.
14. 노임환, 남승우, 양미라, 명나혜, 김정택, 신지현. 2002. *Helicobacter pylori* 관련성 위장질환 치료를 위한 계란항체의 기대효과. 대한소화기학회 39:260-268.
15. E.M.Early, H.Hady at al. 2001. Bactericidal effect of a whey protein concentrate with anti-*Helicobacter pylori* activity. J. Appl. Microbiol. 90:741-748.
16. HARALD BRUSSOW, HELMUT HILDERT, et al. 1987. Bovine Milk Immunoglobulins for Passive Immunity to Infantile Rotavirus Gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. 982-986.
17. Grace hulcahy, Fiona O Connor, Sharon Mc Gonigle, et al. 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. Vaccine vol 16, No 9/10, 932-939.
18. Carol O. Tacket, M. D., Genevieve Losonsky, M. D., al. 1982. Protection by milk immunoglobulin concentrate gagainst oral challenger with

- enterotoxigenic *Escherichia coli*. N Engl J Med 1240-1243.
19. J. S. HOGAN, D. A. TODHUNTER, G. M. TOMITA, K. L. SNITH. 1992. Opsonic Activity of Bovine serum and Mamary Secretion Atter Escherichia coli J5 Vaccination. Dairy sci. 75:72-77.
 20. C.-C.CHEN, Y-Y.TU, And H,-H. CHANG. 2000. Thermal Stability of Bovine Milk Immunoglobulin G(IgG) and the Effect of Added Thermal Protectants on the stability. Journal of Food Science 65:188-193
 21. 김우호. 1993. 면역에 의한 생체방어와 생명유지의 기구. 강원대학교출판부 P55.
 22. Wong, D.W.S, Cairand, W.M, and paviath, A.E. 1996. Structure and functionalities of milk protein. Crit. Rev. Food Sci. Nut 36(8):807-844
 23. 김태규, 박수정, 서영훈, 신동건외. 2002. Immnobiology 5. 라이프사이언스 P96-98
 24. 신나리, 김종만, 유한상. 2001. 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병방제에 관한 연구Ⅲ. 마우스에서의 방어효과. Kor J Vet Res. 41(3):351~356.
 25. 이종훈. 1984. Pathogenic Microbiology. 수분사, P.154
 26. 이경애. 1996. 난황항체의 안정성에 관한 연구. 한국조리과학회지. 12:54-59.
 27. Morales, F.J., Romero, C. and Jimenez-Perez, S. 2000. Characterization of industrial processed milkly analysis of heat-indued change. Int. J. Food. Sci. Technol. 35, 193-200
 28. Blaser, M. J. 1990. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Infect. Dis.* 161, 626-633.
 29. Parsonnet, J., S. Hansen, and L. Rodriguez. 1984. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma, *N. Eng. J. Med.* 330, 1267-1271.
 30. Moss, S. and Clam, J. 1992. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position, *Gut*, 32, 289-292.
 31. Mobley H. L, Jarvis K. G, Elwood J. P. 1993. Osogenic P-Funbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha

- Gal(I-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol. Microbiol.* 10:143-155.
32. Westerlund B, Van Die I, Hoekstra W, Korhonen TK. P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as multifunctional adherence organelles. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1993 ; 278:229 -237.
 33. EUNICE C. Y. SI-CHAN and ANGELA KUMMER. 1997. Influence of Standards and Antibody in Immunochemical Assays for Quantitation of Immunoglobulin G in Bovine Milk. *Dairy Sci* 80:1038-1046.
 34. T. J. EVANS, H. C. RYLEY, L. M. NEALE. 1978. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk., *Archives of Disease in Childhood.* 53:239-241
 35. J. LIN, J. S. HOGAN, M. ASLAM, and K. L. SMITH. 1998. Immunization of Cows with Ferric Enterobactin Receptor from *Coliform Bacteria.*, *Dairy sci.* 81:2151-2158.
 36. 김현욱. *낙농화학*. 선진문화사, P. 84-85, 99-106.
 37. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685
 38. Bhatia S. J, Kochar N, Abraham P, Nair NG, Mehta AP. 1989. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J Clin Microbiol.* 27 : 2328-2330.
 39. Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, Brassart D, Verdi E, Herranz M, et al. 1999. The effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 60 : 203-209.
 40. Hollander M, Wolfe DA. 1973. *Non-Parametric Statistical Methods*. New York ; Wiley & Jones
 41. Logan RP, Polson RJ, Misiewicz JJ, Rao G, Karim NO, Newell D, et al..

1991. Simplified single sample ¹³C carbonyl urea breath test for *Helicobacter pylori* ; comparison with histology, culture, and ELISA serology. Gut 32:1461-1464
42. Graham DY, Opekun AR, Klein PD. 1993. Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. J Clin Gastroenterol 16 : 292-294.
43. Blum S, Rouvet M, Perruisseau G, Nesser JR, 1998. Schiffrin E. Lactic acid bacteria antagonize Gram negative enteropathogen dependent inflammation in intestinal epithelial cells in vitro. Immunologist (suppl1):Abstract 616.
44. Haller D, Bode CH, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin E, Blum S. 2000. Nonpathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. Gut 47 : 79-87.
45. Blaser MJ. 1997. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? Lancet 349 : 1020-1022.
46. Blaser MJ. 1999. Hypothesis : the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. Infect Dis 179: 1523-1530

제 3 장 면역우유의 생산최적화 조건 확립 및 물리화학적 특성평가

제 1 절 서 론

우리나라 낙농 및 유가공 산업은 짧은 역사에도 불구하고 급속한 발전을 거듭하여 유우두수는 1975년에 85,542두, 1995년에 553,467두, 2002년에 302,215두로 크게 증가하였다. 이에 따른 우유의 생산량도 크게 늘어나 1975년 162,926톤, 1995년에 1,999,747톤, 2002년에는 2,537,917톤으로 크게 늘어났다. 이러한 상황에서 수입개방에 따른 수입분유의 증가와 함께 각종 새로운 음료시장에 확대되어 우유 소비량은 오히려 감소하는 결과를 초래하여 낙농업은 큰 위기를 맞이하고 있다. 최근 우유소비량 둔화로 재고분유가 2003년 12월말 현재 14,322톤으로 매년 약 5%이상이 증가되어 우유업체들도 우유소비 감소에 따라 많은 어려움에 처하고 있으며, 정부에서도 젖소 도태 등 사육두수 줄이기에 앞장서고 있는 실정이다. 이러한 위기를 벗어나기 위해서는 상품성과 기능이 뛰어나고, 소비자 욕구에 충족시킬 수 있는 고품질 축산물을 생산한다면 우유소비를 비롯하여 축산물 소비를 향상시켜 국제경쟁력도 높일 수 있을 것으로 판단된다.

최근 보고에 의하면 1983년 오스트레일리아의 Warren과 Marshall에 의해 처음 밝혀진 *H. pylori*는 위점막에서 분리 동정된 이후 위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기질환의 원인으로 알려져(Marshall 등, 1984 ; Warren과 Marshall, 1983 ; Hunt, 1996) 치료방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

*H. pylori*의 감염경로는 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만 위생상태가 불량한 후진국일수록 감염률이 높은 것으로 보아 배설물이나 부패한 음식을 통해 경구 감염된다. 우리나라에서는 8세 소아의 20%이상이 감염되어 있고 20대 이후는 70%이상의 감염률을 보이며 세계 어느 나라보다 *H. pylori*에 의한 감염률 및 무증상 보균률이 매우 높다(이 등, 1990).

감염 환자들은 *H. pylori* 치료를 위하여 많은 노력을 하는데 그 대표적인 치료방법으로는 2주에 걸친 OAC(omeprozole, amoxacillin, clarithromycin) 삼제요법을 표준처방으로 많이 사용한다. 그러나 이 처방에 따른 부작용으로는 병원균의 내성발생 뿐만 아니라 치료비가 너무 비싸서 영세민들의 경제적 부담으로 인해 완치에도 한계가 있는 것도 사실이다. 이러한 과도한 비용과 치료의 한계를 극복하기 위하여 최근 대체의학에는 한방이나 면역기법이 활용되고 있다. 특히 면역기법은 *H. pylori* 균의 부착을 억제하거나 탈착시키는 방법 중의 하나가 난황항체(Immuno globulin yolk=IgY)를 이용이 대표적인 것이다. 국내에서도 노 등(2002)과 배 등(2003)은 특이난황체인 IgY를 이용한 in vitro 및 인체 임상실험 결과에서도 *H. pylori* 성장을 다소 억제하거나 치료하였다는 연구 보고가 있다.

따라서 본 연구는 위염 원인균인 *Helicobacter pylori* 항원을 이용해서, 특이항체 및 면역성분을 함유된 면역우유를 생산하고, 이를 이용한 고기능성 축산물 및 축산제품을 생산하여 국민건강 증진은 물론 제품 고급화로 농가소득 증대 및 지역과 국가경제에 이바지할 수 있을 것으로 판단되어 기존 닭의 IgY계란 생산기법을 기초로 하여 젓소에게 *H. pylori* 항원을 직접 면역시켜 특이항체가 함유된 면역우유의 생산여부를 확인하고 항원과 우유항체의 물리적 특성 및 적정수준의 백신 투여량과 횟수를 조사하고자 수행하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 공시가축 및 시료채취·분석

공시축은 경상북도축산기술연구소에서 사육중인 착유우 홀스타인(Holstein)을 총 24두를 공시하여 비유단계(전기, 중기, 후기)와 백신투여량(대조구, T1-10mL, T2-20mL, T3-30mL)에 따라 2두씩 나누어 배치하였다(4처리×2반복×3요인) (Table 1).

농후사료는 농협안동사료공장에서 제조된 비유초·중기사료를 NRC(2001)기준에 의거하여 1일급여량을 급여하였으며, 조사료는 본 연구소에서 자체 생산된 목건초를 자유채식시켰고, 미네랄 블럭과 음수는 자유음수 토록하였으며 이때의 사료배합비와

화학적 조성분는 Table 3-2와 3-3과 같다.

착유는 매일 오전(04:30)과 오후(16:30)로 2회 나누어 텐덤식 반자동 착유기(알파라발, 스웨덴)를 이용하였고, 산유량 측정은 매일 오전·오후의 유량을 합하여 산출하였다.

시료채취는 매일 오전 착유(04:30)시에 개체별로 착유후에 잘 교반한 후 100mL를 채취하여 즉시 분석실로 옮겨 축산물의 가공기준 및 성분규격:제3축산물시험법(2003) 지침에 따라 우유성분(단백질, 유지방, 유당, SNF, TS함량)은 Bentley 150(U.S.A)로, 체세포수 분석은 Bently Somacount 150(U.S.A)로 측정하였다.

Tab 3-1. Experimental design

Items	Lactation Stage		
	Early stage (3 - 10wk)	Mid stage (19 - 24wk)	late stage (34 - 40wk)
Control	2	2	2
T1(10mL Vaccination)	2	2	2
T2(20mL Vaccination)	2	2	2
T3(30mL Vaccination)	2	2	2

Table 3-2. The ingredient composition of Experimental diets

Items	diet-1(Early stage)	diet-2(Middle stage)
Corn grain	25.42	24.98
Wheat bran	10.00	5.00
Cane molasses	5.00	5.00
Wheat flour	2.00	4.66
Wheat bran	6.00	6.00
Soybean meal	10.86	13.36
Rapeseed meal	7.00	7.00
Corn gluten feed	-	0.86
distillers grain	2.00	-
Coconut meal	10.24	10.66
Palm meal	7.00	7.00
Mixed fib	9.10	9.00
Animal fat	0.60	1.00
Yulac	0.30	0.50
Salt dehydrted	0.50	0.50
TCP	0.66	0.68
Limestone	0.92	1.46
Ca-P	1.50	1.50
Premix	0.90	0.84
Total	100	100

Table 3-3. The ingredient composition of experimental diets

Items	Concentrate		Hay
	Early Lactation (diet-1)	Mid lactation (diet-2)	
D.Matter	87.33	86.88	91.32
C.Protein	17.10	18.10	11.31
E.Extract	4.31	4.80	1.64
C.Fiber	7.48	7.50	35.11
C.Ash	7.31	7.88	13.00
NDF	22.02	22.42	81.78
ADF	12.34	12.38	44.76
Ca	0.90	1.10	-
P	0.58	0.53	-
TDN	71.60	72.50	-

2. 항원준비

H. Pylori (KNTC12083) 균주는 한국유전자 은행으로부터 분양 받아 sheep blood agar(SBA) plate로 37°C, 10% CO₂ incubator에 2~3일 간격으로 계대 배양하였다. 계대 배양으로 활성화된 균주는 56°C에서 30분간 불활성화시킨 fetal bovine serum (FBS)을 5% 첨가한 MHB(Mueller Hinton Broth)배지에서 37°C, 48h 동안 액체 배양하였다. 그 후 0.5% formalin용액으로 3시간 불활성처리 후 4°C에서 4,000rpm으로 30분간 원심분리하여 회수된 균을 멸균된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)로 4°C에서 4,000rpm으로 30분씩 3회의 원심분리 및 세척 후 ice on 상에서 5분간 sonicate (pulse 20, duty cycle 50)하였다. Sonicate한 균주를 파장 667nm에서 O.D = 1.0이 되도록 조정하여 항원으로 사용하였다.

참고적으로 덧붙여 설명하면 *H. Pylori*균을 SBA(Sheep Blood Agar plate)배지에 계대배양 하였을 때 물방울 모양의 특징적인 무색 투명한 집락이 형성되었고, Urease Test를 시행한 결과 양성을 보였을때 *H. Pylori*균으로 판정하고 항원으로 사용하였다.

3. 면역 백신주사

면역을 위한 백신주사는 총 4회로서 1차 백신주사는 *H. pylori* 항원을 Freund's incomplete adjuvant(Sigma F-5881)와 1 : 1 비율로 유화(5,000rpm, 5min)한 다음 젖소의 양쪽어깨 견갑골(scapula) 부위근육에 각 10mL, 20mL, 30mL를 동일량으로 나누어 근육주사(intramuscular)하였다(Early와 Hady, 2001; Brussow 등, 1987). 2-3차 면역은 2주 간격으로 항원과 Freund's complete adjuvant (Sigma F-5506)를 동일 방법으로 백신주사하고, 4차 백신주사는 3차 백신완료후 3주 후에 다시 같은 방법으로 면역시켰다.

4. 항체의 역가측정

채취보관된 유청 및 혈액을 대상으로 *Anti-H. pylori*(항체)에 대한 상대적인 농도 및 역가를 측정하기 위하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정하였다. ELISA측정을 위한 전처리는 *H. pylori*를 0.5% formalin용액으로 불활성처리(3hrs)하고 멸균된 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.2)용액으로 3회 세척 후

Sonicate(pulse 20, duty cycle 50)한 균을 405pyroi에서 coating buffer (50mM carbonate buffer, pH 9.6)로 O.D = 0.5로 조절한 다음 immunoglobulin 96 well plate 에 100 μ l씩 coating하고 over night(4 $^{\circ}$ C)하였다.

항원 coating은 bovine IgG(Sigma A0706 whole molecule AP conjugate)를 standard로 사용하였다. 각 well을 washing buffer(10mM PBS, pH 7.4, 0.5% Tween 20)로 3회 세척한 후 blocking액(PBS pH 7.4, 5% skim milk) 150 μ l 넣고 다시 실온에 30분이상 방치후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다.

유청은 washing buffer에 희석한 다음 well에 100 μ l씩 넣고 다시 실온에 2시간 방치하였다가 세척하여 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate (Sigma A0705)를 1 : 30,000으로 washing buffer에 희석하고 well에 100 μ l씩 넣고 다시 실온에 1시간 방치하였다가 3회 세척후에 기질용액(10% diethanolamine buffe, 1% phosphatase substrate(Sigma 104))을 100 μ l씩 넣고 30분 반응시킨 후에 3N NaOH 50 μ l으로 반응을 정지시키고 405pyroi에서 흡광도를 측정하였다

5. Anti-*H. pylor* 항체의 물리적(열, 산도) 특성

우유항체는 채취된 우유를 원심분리(14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30min)하여 고형분이 제거된 것을 pH 4.6(1N HCl)로 조정하여, casein을 제거하고, pH7.0(1N NaOH)로 조정된 유청(whey)을 사용하였다.

열에 대한 안정성 조사를 위하여 whey 20% maltose 20% glycerol 0.2% glutamic acid를 첨가하여 0.5mL centrifuge tube에 150 μ l씩 나누어 담아 heating block(model : HF-21, Yamto Scientific Co. Ltd)으로 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C 및 135 $^{\circ}$ C에서 시간대 별로(0-60분간) 처리한 다음 ELISA로 anti-*H. pylori* 항체의 활성도를 측정하였다.

산에 대한 안정성 조사를 위하여 1N HCl를 이용하여 pH = 7.0 1.0까지 조절하고, 알칼리상태는 1N NaOH를 이용하여 pH= 8~12까지 조절하여 ELISA로 anti-*H. pylori* 항체의 활성도를 측정하였다.

6. 직장온도 측정

백신접종으로 따른 젖소의 생체변화를 알아보기 위하여 백신투여 직전(0h)과 투여

직후부터 3h, 6h, 12h, 24h 및 48h경에 채운계를 젖소의 직장에 직접 삽입시켜 직장온도를 측정하였다.

7. 통계분석

통계분석은 SAS package(2002)를 이용하여 분산분석을 하였으며, 처리간 유의차 검정은 Dunacn's Multiple Range Test(1985)를 이용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 우유내 Anti-*H. pylori* 항체의 물리적 특성조사

가. 산도(酸度)에 대한 안정성

우유에서 casein이 제거된 유청(whey)을 pH 1-12 범위에서 anti-*H. pylori* 항체함량을 측정하였다(Fig. 1). anti-*H. pylori* 항체의 활성을 측정한 결과 pH 5-10 범위에서는 100%의 활성을 나타내었으나, pH 4이하 또는 pH 11이상에서는 항체활성이 70%로 감소하였고 pH 12이하 또는 pH 12이상에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 난황에서의 IgY 안정성 실험에서 닭에게 IgY항체의 pH를 2~7까지 조정 한 후 37°C에서 4시간 반응시 산에 대한 활성은 pH 7에서 pH 5까지는 100% 활성도를 유지하다가 pH 4에서는 82%로 활성도가 떨어지고, pH 3에서는 34%, pH 2에서는 거의 20% 정도의 활성도를 보였다는 보고(이 1996)와 같은 경향을 나타내었으며 유청내 항체 또한 산과 알칼리에 대해 비교적 안정성을 유지하는 것으로 나타났다.

일반적으로 원유와 살균유의 pH에 대한 연구결과를 보면, Brule 등(1978), 이 등(1985)도 가열처리가 상승함에 따라 pH가 감소하는 이유는 제1, 제2인산 칼슘이 제3인산염으로 침전하면서 H⁺가 방출되고 있으나 우유에 따라 차이가 크고 많은 다른 요인에 의해 크게 영향을 받으며, 유당에 의한 산생성, CO₂의 손실 등에 의해서도 증감할 수 있다(Walstra,1984)고 설명하였다. 인(1997)은 pH가 6.63인 원유를 LTLT, HTST, UHT처리 직후에 각각 6.58, 6.65 및 6.58로서 열처리방법 간에는 차이가 없었으나, HTST와 UTH는 저장 9일째 까지도 pH가 큰 차이가 없었으나 LTLT처리구는 저장 7일째 이후 통계적인 차이를 나타내었다고 하였고, 김(1987)은 pH가 6.55인 원유를 30분간 열처리시 70°C에서 6.54로, 80°C에서 pH가 6.54, 90°C에서 6.53, 100°C에서 6.39이었다고 보고하였다.

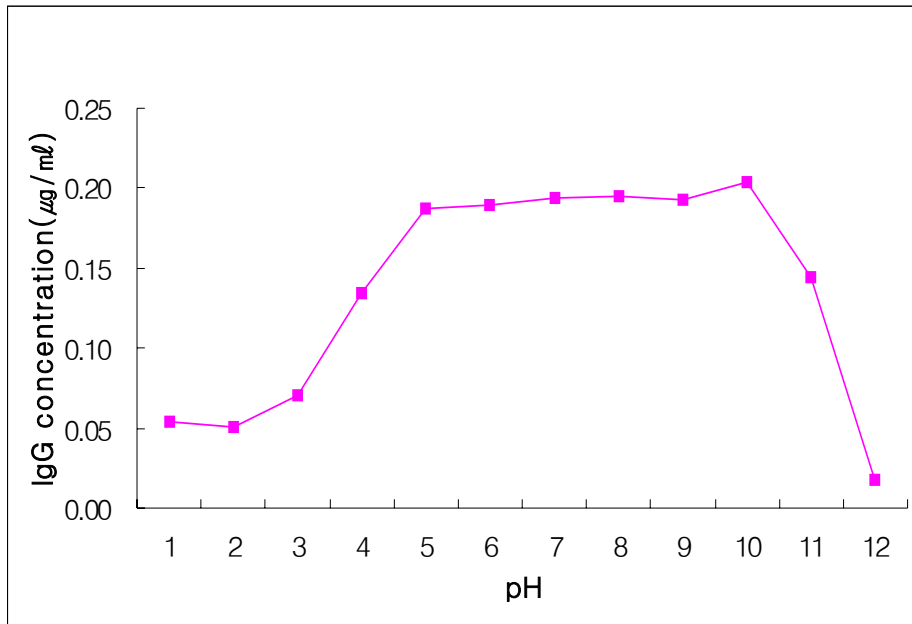


Fig. 3-1. pH stability of specific IgG(anti-*H. pylori* antibody) activity

나. 열(熱)대한 안정성

우유 열처리는 우유의 기능적 특성을 변화시키고, 다양한 유제품을 생산하게 하며 열처리 수준은 우유의 관능적, 영양적 품질변화 특히 유성분변화 및 유청단백질의 안정성에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져있는 바(Morales 등 2000), 본 실험에서도 20% maltose, 20% glycerol 및 0.2% glutamic acid를 첨가하여 열에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 Chen 등(2000)에 준하여 실험한 결과는 Fig. 2와 같다.

60℃에서는 각종 첨가물 모두 안정된 상태였고, 70℃의 60분 이후에는 활성도가 40%가 떨어졌고, 80℃의 4분간에는 23%의 감소하였으나 8분 이후에는 모두 활성도가 전혀 나타나지 않았다. 100℃의 1분 이후에 활성도 급격히 떨어져서 최고 3분 이후에는 거의 활성도가 없었다. 135℃의 1분 이내에서는 활성도가 50%이상 떨어졌고 2분 이후는 거의 활성도가 나타나지 않았다.

이러한 결과는 이(1996)는 계란의 IgY항체의 온도에 대한 활성은 63℃에서 30분 가열시는 95.4%, 70℃에서 15분간 가열시는 급속히 항체 활성도가 떨어졌으며, 90℃에서

15분간 가열시는 거의 활성을 나타내지 않았다는 보고와 인유(人乳)의 저장과 열처리 시험에서 원유(IgG 1.05mg/ 100mL)와 비교하여 인유에 함유된 IgG 함량은 60℃의 30분간 열처리에서는 0.87mg으로 17.2%감소하며, 62.5℃의 30분간처리는 0.69mg으로 36%가 그리고 65℃의 30분간 처리는 0.24mg으로 81%의 손실이 되었다는 보고 (Evans 등,1978)와 본 실험의 결과는 유사한 경향이였다. 그러나 Larsson과 Rolleri (1955)에 의하면 우유에 있는 IgG가 70℃에서 30분간 가열시 89%의 변성이 된다는 보고와는 상반되었다.

대체로 통용되고 있는 살균시간과 온도는 내열성이 있는 미생물을 제외한 거의 모든 미생물사멸과 깊은 관계가 있으며(Witter, 1961), 70년대초 까지는 주로 저온 장시간 (LTLT ; Low Temperature Long Time)살균법과 고온 단시간(HTST : High Temperature Short Time)살균법이 대부분이었으나 그 후에 원유처리량의 증가 등으로 인하여 초고온(UHT : Ultra High Temperature)살균법이 많이 사용되어왔다. 그러나 80년대 후반부터는 원유의 품질향상과 타 제품과의 차별화를 통한 판매촉진을 위하여 HTST, LTLT 살균법이 다시 많이 이용되면서 고품질 우유 논쟁을 불러 일으키기도 하였다.

그러나 우유의 저온 가열처리에서는 단백질, 지방, 유당, 무기물 등의 변화는 거의 없었으나 비타민 C 경우는 3.21%가 감소되었다고 하였고(조 등,1971), 열처리효과는 유청단백질이 열변성을 받으면 casein과 화합 또는 상호작용으로 복합체를 형성하여 casein은 증가하거나 유청단백질이 감소는 열처리로 의한 유청단백질의 일부 단백질에서 SH기가 유리되어 단백질 변성을 일으켜 우유중에 구수한 향취가 발생하기 때문 이라고 보고한 바 있다(Sawyer, 1969 ; Sawyer 등, 1963).

이상의 결과를 종합해볼 때 면역우유의 열처리 방법은 항체의 열안정성을 고려할 때 LTLT(저온살균: 62-65℃, 30분간)처리법이 anti-*H. pylori*항체의 활성도 유지에 가장 적절한 것으로 판단된다.

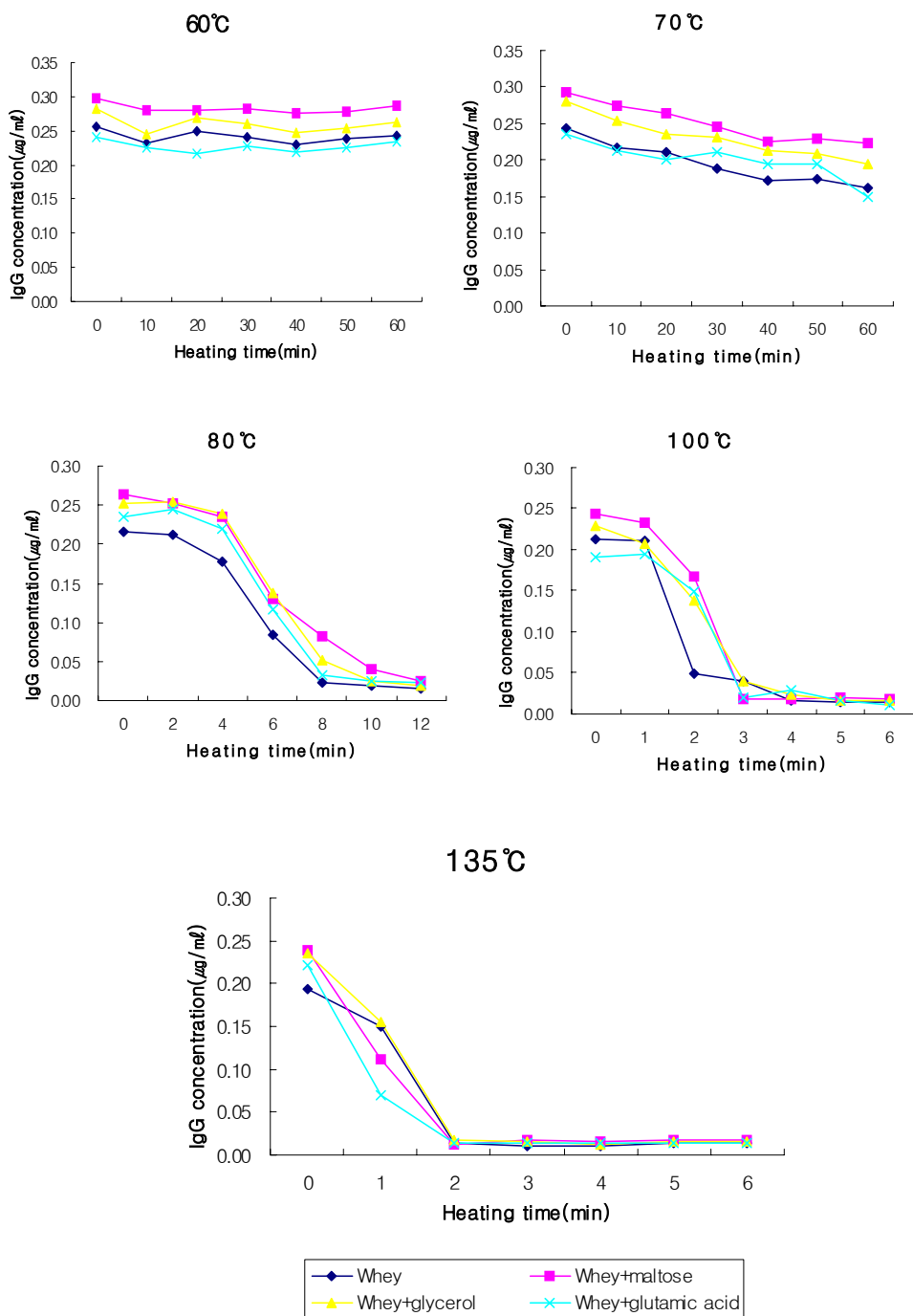


Fig. 3-2. Heat stability of specific IgG(anti-*H. pylori* antibody) activity

2. 산유량 변화

가. 백신량에 따른 산유량 변화

Table 3-4는 비유단계에 상관없이 백신투여 3일전과 투여후 6일까지의 1일 평균 산유량을 조사한 결과이다. 전체적으로 백신 투여일로 부터 산유량은 감소하기 시작하여 백신투여 후 1일째에 10mL투여는 3%, 20mL투여는 17%, 30mL는 6%의 감소율을 나타냈으나 백신후 4일째 부터 서서히 회복하기 시작하여 6일째에는 95%이상의 회복율을 보였다. 그래서 백신주사에 따른 유량감소가 정상적으로 회복하기 위해서는 최장 1주일 정도가 소요되는 것으로 판단된다. 이처럼 산유량 감소원인으로는 백신투여와 체혈로 의한 스트레스로 산유량이 감소된 것으로 사료된다. 주사 백신량에 따른 산유량 변화는 10mL 백신투여가 가장 적었고 백신량이 많을수록 유량감소도 증가하는 경향을 보였다.

젖소에게 *Escherichia coil J5* 백신 항원주사는 그람음성 박테리아 세포표면을 일정하게 유지해주어 유즙분비와 혈청내의 IgG와 IgM농도를 높혀주고, 소에게 면역된 IgG 방호역할은 lipopolysaccharide의 항원결합의 중화가 가능케 한다고 주장하였다(Tyler 등,1992 ; Hogan 등, 1997). 또한 반추동물의 유즙선에 대한 건유기 동안의 미생물 항원투여는 분만 전부터 비유초기까지 IgA와 IgG 생산을 유도할 수 있고(Lascalles와 Mc Dowell, 1974 ; Watson과 Lascalles,1975), 특히 건유초기 면역의 유즙분비는 바이러스 항체에 대한 역가를 크게 높일 수 있다고 제시하였다(Saif 등, 1984).

이외에도 어린 송아지의 설사를 일으키는 *E. Coli*, *rotavirus* 및 *cryptosporidium*에 대하여 장질환 방지효과가 있으며(Mietens 등, 1979 ; Hilpert 등, 1987 ; Tzipori 등, 1986), Carrol 등(1988)은 면역우유를 생산하기 위한 Agent(항원)에 대하여 비교적 안전하다고 하였고, 쥐에게 토끼의 면역혈청을 경구투여하였을 때 *E. Coli* 감염을 막을 수있다고 하였다(Rivier와 Sobotka,1978).

Table 3-4. Changes of milk yield after vaccination to dairy cows

(unit:kg)

Treatment	Days										
	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	Avg
Con (0mL)	27.9 ±2.33	28.5 ±1.33	27.9 ±0.29	26.8 ±1.37	26.8 ±1.39	27.0 ±1.0	27.0 ±1.31	28.0 ±1.37	27.5 ±1.01	27.3 ±0.71	27.47 ^A ±0.62
Vacc (30mL)	T1 ±2.33	26.9 ±1.33	27.7 ±0.29	26.9 ±1.37	26.2 ±1.39	26.8 ±1.0	27.4 ±1.31	28.1 ±1.37	27.2 ±1.01	27.3 ±0.71	27.21 ^A ±0.71
-ine (20mL)	T2 ±0.82	29.1 ±2.44	26.7 ±2.24	25.9 ±1.82	23.0 ±1.89	24.4 ±1.95	26.4 ±2.06	27.1 ±0.3	26.8 ±0.34	27.3 ±0.98	27.47 ±0.69
Amo (10mL)	T3 ±0.71	26.6 ±1.31	26.0 ±2.08	23.7 ±1.64	24.0 ±0.61	24.0 ±0.62	21.1 ±2.71	25.4 ±0.53	24.8 ±2.82	25.4 ±0.91	27.47 ±0.73
Avg	27.63 ^a ±0.51	27.40 ^a ±0.77	27.00 ^a ±0.81	25.82 ^b ±0.91	25.00 ^b ±0.71	25.55 ^b ±0.55	25.48 ^b ±0.84	27.15 ^b ±0.85	26.57 ^{ab} ±0.85	26.82 ^{ab} ±0.51	

Mean ± Standard Deviation

1. a-b : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

2. A-D : Different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

Table 3-5. Changes of milk yield after vaccination in early lactation stage

(unit:kg)

Vaccination Weeks	1st				2nd			
	-2	-1	0	1	2	3	4	5
Con (0mL)	27.13 ±1.11	29.70 ±1.12	27.13 ±1.08	26.60 ±1.33	28.43 ±1.14	28.50 ±1.33	27.19 ±1.22	27.76 ±1.33
T1 (30mL)	27.79 ±1.12	30.04 ±1.03	17.50 ±1.24	30.47 ±1.24	31.26 ±1.33	20.40 ±1.11	31.13 ±1.51	32.77 ±1.00
Early Stage	T2 ±1.25	36.16 ±1.28	37.41 ±1.53	18.20 ±1.64	31.51 ±1.45	34.58 ±1.36	31.90 ±1.25	30.31 ±1.00
T3 (10mL)	35.01 ±1.00	35.56 ±0.93	17.30 ±1.03	35.04 ±1.12	30.86 ±1.14	26.40 ±1.36	32.81 ±1.33	32.30 ±1.41
Avg	31.52 ^a ±1.00	33.18 ^a ±0.99	20.03 ^c ±1.01	30.19 ^a ±1.01	31.28 ^a ±1.12	26.80 ^b ±1.11	30.36 ^a ±1.21	31.31 ^a ±1.22

Vaccination		3th			4th				
Weeks		6	7	8	9	10	11	12	Avg
Early Stage	Con (0mL)	27.47 ± 1.41	26.89 ± 1.52	26.07 ± 1.28	25.90 ± 1.07	25.37 ± 1.18	22.81 ± 1.34	23.21 ± 1.41	26.68 ^B ± 1.01
	T1 (30mL)	30.20 ± 0.93	31.81 ± 0.89	30.19 ± 1.00	31.28 ± 1.01	24.60 ± 1.12	27.41 ± 1.33	29.95 ± 1.00	28.45 ^{AB} ± 1.14
	T2 (20mL)	30.10 ± 1.34	28.99 ± 1.41	28.03 ± 1.14	27.82 ± 1.36	28.30 ± 1.15	25.70 ± 1.25	26.80 ± 1.41	29.88 ^A ± 1.01
	T3 (10mL)	33.50 ± 1.25	30.87 ± 1.26	26.49 ± 1.03	28.32 ± 1.12	25.40 ± 1.14	27.09 ± 1.35	27.13 ± 1.41	29.61 ^A ± 1.24
	Avg	30.32 ^a ± 1.41	29.64 ^a ± 1.51	27.70 ^b ± 1.41	28.33 ³ ± 1.08	25.92 ^b ± 1.36	25.75 ^b ± 1.41	26.77 ^b ± 1.51	

Mean ± Standard Deviation

a-d : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

3. A-D : Different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

Table 3-6. Changes of milk yield after vaccination in mid lactation stage

(unit:kg)

Vaccination		1st				2nd			
Weeks		-2	-1	0	1	2	3	4	5
Middle Stage	Con (0mL)	26.30 ± 0.79	27.63 ± 1.10	26.40 ± 1.22	26.46 ± 1.24	24.84 ± 1.33	24.60 ± 1.41	23.00 ± 1.36	24.15 ± 1.35
	T1 (30mL)	24.30 ± 1.11	26.6 ± 1.03	24.40 ± 1.27	24.46 ± 0.73	24.84 ± 0.99	22.60 ± 1.00	23.20 ± 1.71	24.75 ± 1.22
	T2 (20mL)	26.27 ± 1.00	27.86 ± 1.03	13.70 ± 0.93	25.71 ± 1.00	26.84 ± 1.23	25.00 ± 1.14	27.53 ± 1.33	26.12 ± 1.45
	T3 (10mL)	26.89 ± 0.79	27.79 ± 0.99	14.50 ± 1.00	26.03 ± 1.11	26.60 ± 1.22	22.40 ± 1.08	23.40 ± 1.11	26.45 ± 1.33
	Avg	25.94 ^b ± 1.00	27.47 ^a ± 1.00	19.15 ^d ± 1.11	25.66 ^b ± 1.54	25.78 ^b ± 1.03	23.65 ^{cd} ± 1.11	24.28 ^b ± 1.22	25.37 ^b ± 1.37

Vaccination		3th			4th				
Weeks		6	7	8	9	10	11	12	Avg
Middle Stage	Con (0mL)	22.30	22.50	21.22	21.18	21.50	21.87	20.13	23.61 ±1.01
		±	±	±	±	±	±	±	
	T1 (30mL)	21.30	22.54	22.22	21.88	21.00	20.87	21.13	23.07 ±1.20
		±	±	±	±	±	±	±	
	T2 (20mL)	23.70	25.66	26.73	23.74	25.00	22.91	22.98	24.65 ±1.33
		±	±	±	±	±	±	±	
	T3 (10mL)	27.10	23.36	21.70	18.58	21.30	21.13	21.88	23.27 ±1.38
		±	±	±	±	±	±	±	
	Avg	23.61 ^c	23.52 ^c	22.97 ^c	21.34 ^c	22.20 ^c	21.70 ^c	21.53 ^c	
		±	±	±	±	±	±	±	
		1.17	1.37	1.44	1.41	1.11	1.33	1.41	

Mean ± Standard Deviation

4. a-d : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

Table 3-7. Changes of milk yield after vaccination in late lactation stage

(uint:kg)

Vaccination		1st				2nd			
Weeks		-2	-1	0	1	2	3	4	5
Last Stage	Con (0mL)	24.00	24.16	23.60	24.49	23.66	22.40	23.69	24.00
		±	±	±	±	±	±	±	±
	T1 (30mL)	24.06	24.76	18.60	20.49	21.66	18.40	18.69	21.00
		±	±	±	±	±	±	±	±
	T2 (20mL)	21.57	25.97	12.30	22.04	24.30	25.40	21.56	24.83
		±	±	±	±	±	±	±	±
	T3 (10mL)	20.66	26.06	12.40	23.83	23.50	23.50	22.67	22.82
		±	±	±	±	±	±	±	±
	Avg	22.57 ^b	25.24 ^a	16.73 ^d	22.71 ^b	23.28 ^b	22.43 ^b	21.65 ^c	23.16 ^b
		±	±	±	±	±	±	±	±
		1.11	1.00	0.93	0.99	1.00	1.10	1.12	1.03

Vaccination		3th				4th			
Weeks		6	7	8	9	10	11	12	Avg
	Con	24.00	22.97	23.90	21.15	21.20	20.29	19.87	22.89 ^A
	(0mL)	± 1.33	± 1.53	± 1.00	± 1.11	± 1.12	± 1.15	± 1.66	± 1.35
	T1	20.00	18.97	19.90	19.15	18.20	19.29	20.27	20.23 ^B
	(30mL)	± 1.00	± 0.99	± 1.33	± 1.01	± 1.24	± 0.83	± .074	± 1.28
Last Stage	T2	26.70	22.50	23.33	23.74	21.20	21.50	20.17	22.47 ^A
	(20mL)	± 1.00	± 1.11	± 1.12	± 1.03	± 1.13	± 1.12	± 1.14	± 1.24
	T3	21.50	20.86	21.31	18.54	19.30	19.06	19.72	21.05 ^{AB}
	(10mL)	± 1.23	± 1.23	± 1.23	± 1.23	± 1.23	± 1.23	± 1.23	± 1.35
Avg		23.05 ^b	21.32 ^c	22.11 ^{b±}	20.65 ^c	19.98 ^c	20.04 ^c	20.01 ^c	
		± 1.63	± 1.43	± 1.20	± 1.23	± 1.00	± 1.45	± 1.00	

Mean ± Standard Deviation

5. a-d : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

나. 비유단계와 백신량에 따른 산유량 변화

Table 3-5, 3-6 및 3-7은 비유단계별인 비유초기(분만후-3개월), 중기(4개월-6개월) 및 말기(7개월이상)로 구분하여 시험개시 부터 12주령까지 백신주사량에 따른 주령별 산유량을 조사한 결과이다.

Table 3-5는 비유초기 단계에 있는 젖소를 대상으로 시험개시 부터 12주령까지의 백신주사량에 따른 주령별 평균 산유량을 조사한 결과로서 백신주사전에 대조구가 27.13-29.70kg, 30mL투여구는 27.79-30.04kg, 20mL투여구는 36.16-37.41kg 그리고 10mL투여구는 32.99-34.47kg이었으나, 백신직후 1주일이내의 산유량 변화는 대조구가 27.13kg, 30mL투여구는 17.50kg, 20mL투여구는 18.20kg 그리고 10mL투여구는 17.30kg으로 크게 감소하는 경향을 나타내었다.

그러나 1차 백신주사 후에 1주일경의 산유량 변화는 대조구가 26.6kg, 30mL투여구는 30.47kg, 20mL투여구는 31.51kg 그리고 10mL투여구는 35.04kg으로 산유량이 백신 주사 이전수준으로 복귀하였다.

Table 3-6은 비유중기에 있는 젖소를 대상으로 시험개시 부터 12주령까지의 백신

주사량에 따른 주령별 평균 산유량을 조사한 결과로서, 백신주사전에 대조구가 26.30-27.63kg, 30mL투여구는 24.30-26.63kg, 20mL투여구는 26.27-27.86kg 그리고 10mL투여구는 26.89-27.79kg이었으나, 1차 백신직후 1주일이내의 산유량 변화는 대조구가 26.40kg, 30mL투여구는 24.40kg, 20mL투여구는 13.70kg 그리고 10mL투여구는 14.50kg으로 크게 줄었다. 그러나 백신주사후에 1주일경의 산유량 변화는 대조구가 26.46kg, 30mL투여구는 24.46kg, 20mL투여구는 25.71kg 그리고 10mL투여구는 26.03kg으로 산유량이 백신주사 이전수준으로 회복하였다.

Table 3-7은 비유말기에 있는 젖소를 대상으로 시험개시 부터 12주령까지의 백신주사량에 따른 주령별 평균 산유량을 조사한 결과로서, 백신주사전에 대조구가 24.00-24.16kg, 30mL투여구는 24.06-24.76kg, 20mL투여구는 21.57-25.97kg 그리고 10mL투여구는 20.89-27.79kg이었으나, 1차 백신직후 1주일이내의 산유량 변화는 대조구가 26.40kg, 30mL투여구는 24.40kg, 20mL투여구는 13.70kg 그리고 10mL투여구는 14.50kg으로 크게 줄었다.

그러나 백신주사후에 1주일경의 산유량 변화는 대조구가 24.60kg, 30mL투여구는 24.84kg, 20mL투여구는 26.84kg 그리고 10mL투여구는 26.60kg으로 산유량이 백신주사 이전 수준으로 회복하였다.

따라서 시험개시시 부터 12주령까지 비유시기별과 백신주사량과에 따른 주령별 평균 산유량을 조사한 결과를 종합해볼 때, 1차 백신후 대조구와는 별 차이가 없었으나, 다른 모든 처리구는 최고 50% 정도까지 떨어졌으나 백신주사 1주일이내 점차 회복하기 시작하여 최고 95%정도까지 회복하였다. 또한 백신주사량은 30mL > 20mL > 10mL이 더 크게 영향을 미쳤고, 비유초기가 비유중·말기보다 산유량 감소폭이 큰 것으로 보아 비유단계와 백신투여량은 정(+)의 상호관계가 있는 것으로 추정된다. 그리고 백신주사에 의한 산유량 감소의 원인으로는 백신주사를 위한 고정과 혈액채취로 인한 스트레스가 크게 영향을 미친 것으로 사료된다.

특히 1차 백신처리가 2차-4차의 백신처리보다 더 크게 영향을 미치는 것으로 나타났고, 이것은 아마 백신량이 생체리듬에 영향을 미치는 것으로 판단되나 추후에 확인을 위한 재시험이 필요하다고 사료된다.

일반적으로 1일 산유량은 기온과 사료섭취량과 밀접한 관계가 있으며 특히 여름철

에는 고온으로 사료섭취량의 감소로 떨어지며 또한 착유횟수도 유량에 영향을 미치는 데, 2회 착유보다는 3회 착유가 16-18%정도의 유량이 더 많은데 이는 체중증가에 이용되는 에너지가 우유로 분비되기 때문이라고 설명하였다(Lush와 Shrode,1950).

유 등(1996)은 원유 품질은 사육환경이 크게 영향을 미치며 월별 평균 산유량 비교에서 8월이후 부터 12월까지는 감소하는 경향이라고 보고하였다.

소의 항체역가와 비유시기간의 관련 설명에서 Ebina 등(1983, 1985)은 사람의 *rotaviruses* 항체와 소의 초유가 같은 효과를 나타내었고, 기술적으로는 발전하면 *rotaviruses*에 대한 소의 항체역가를 크게 더 높일 수있다고 설명하였다(Brussow, 1987). 또한 홀스타인 젖소에게 *Escherichia coil* J5 bacterin 면역백신 2.5mL를 견갑골에 각각 주사한 후 유청과 혈청내의 IgG역가가 건유 30일령이 대조구보다 월등히 많았다고 하였다. 또한 혈청내의 IgM역가는 비유개시후 21일령에 가장 높았다고 하였다(Hogan 등,1997).

Table 3-8. Fat content of raw milk after vaccination in lactation stage

(unit:%)

Vaccination		1st		2nd		3th		4th		Avg	
Weeks		-1	0	1	2	3	4	5	6		7
Early Stage	Con (0mL)	4.47 ±0.10	4.18 ±0.15	4.21 ±0.05	4.42 ±0.12	3.64 ±0.11	3.58 ±0.09	3.67 ±0.10	3.68 ±0.11	4.33 ±0.10	4.02 ^A ±0.09
	T1 (30mL)	4.08 ±0.09	4.11 ±0.17	3.90 ±0.20	3.60 ±0.11	3.59 ±0.18	3.58 ±0.15	3.52 ±0.17	3.45 ±0.10	3.53 ±0.15	3.71 ^B ±0.10
	T2 (20mL)	4.39 ±0.10	4.60 ±0.11	4.32 ±0.20	3.80 ±0.29	3.75 ±0.25	3.67 ±0.15	3.55 ±0.18	3.66 ±0.15	3.58 ±0.15	3.92 ^{AB} ±0.10
	T3 (10mL)	4.18 ±0.15	3.88 ±0.18	3.97 ±0.21	3.68 ±0.25	3.74 ±0.15	3.77 ±0.20	3.61 ±0.21	3.77 ±0.22	3.23 ±0.24	3.76 ^B ±0.11
	Avg.	4.28 ^a ±0.18	4.19 ^{ab} ±0.20	4.10 ^{ab} ±0.19	3.88 ^b ±0.21	3.68 ^b ±0.18	3.65 ^b ±0.17	3.59 ^b ±0.19	3.64 ^b ±0.18	3.67 ^b ±0.20	
	Con (0mL)	4.11 ±0.25	3.77 ±0.18	3.89 ±0.25	3.70 ±0.25	3.80 ±0.18	3.67 ±0.17	3.58 ±0.18	3.45 ±0.13	3.47 ±0.25	3.72 ^a ±0.11
Middle Stage	T1 (30mL)	4.13 ±0.25	3.88 ±0.25	3.91 ±0.15	3.60 ±0.15	3.60 ±0.25	3.70 ±0.25	3.53 ±0.15	3.40 ±0.18	3.35 ±0.21	3.68 ^b ±0.17
	T2 (20mL)	3.92 ±0.21	3.80 ±0.20	3.65 ±0.18	3.68 ±0.21	3.52 ±0.19	3.50 ±0.17	3.37 ±0.24	3.33 ±0.15	3.81 ±0.17	3.62 ^b ±0.13
	T3 (10mL)	4.05 ±0.15	3.90 ±0.25	3.77 ±0.19	3.77 ±0.27	3.48 ±0.22	3.40 ±0.25	3.55 ±0.17	3.38 ±0.19	2.87 ±0.25	3.57 ^b ±0.15
	Avg.	4.05 ^a ±0.21	3.84 ^{ab} ±0.23	3.81 ^{ab} ±0.19	3.69 ^b ±0.20	3.60 ^b ±0.20	3.57 ^b ±0.21	3.51 ^b ±0.22	3.39 ^c ±0.19	3.38 ^c ±0.21	
	Con (0mL)	4.06 ±0.11	3.67 ±0.19	3.81 ±0.25	3.46 ±0.20	3.52 ±0.27	3.37 ±0.28	3.44 ±0.19	3.56 ±0.17	3.54 ±0.15	3.60 ^B ±0.17
Last Stage	T1 (30mL)	4.06 ±0.21	3.88 ±0.17	3.91 ±0.24	3.36 ±0.21	3.72 ±0.17	3.77 ±0.18	3.54 ±0.19	3.66 ±0.20	3.54 ±0.21	3.72 ^{Ab} ±0.18
	T2 (20mL)	4.30 ±0.19	3.77 ±0.20	3.71 ±0.18	3.64 ±0.17	3.71 ±0.20	3.66 ±0.21	3.65 ±0.22	3.77 ±0.28	4.03 ±0.20	3.80 ^A ±0.19
	T3 (10mL)	3.88 ±0.18	3.88 ±0.25	3.72 ±0.21	3.49 ±0.21	3.63 ±0.18	3.71 ±0.19	3.51 ±0.23	3.59 ±0.24	4.50 ±0.27	3.77 ^{AB} ±0.20
	Avg.	4.08 ^a ±0.18	3.80 ^b ±0.21	3.79 ^b ±0.20	3.49 ^c ±0.21	3.65 ^{bc} ±0.22	3.63 ^{bc} ±0.19	3.54 ^c ±0.20	3.65 ^{bc} ±0.20	3.90 ^{ab} ±0.22	
	Con (0mL)	4.06 ±0.11	3.67 ±0.19	3.81 ±0.25	3.46 ±0.20	3.52 ±0.27	3.37 ±0.28	3.44 ±0.19	3.56 ±0.17	3.54 ±0.15	3.60 ^B ±0.17

Mean ± Standard Deviation

6. a-d : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

7. A-D : Different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

Table 3-9. Protein content of raw milk after vaccination in lactation stage

(unit : %)

Vaccination		1st		2nd		3th		4th			
Weeks		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	Avg
Early Stage	Control (0mL)	3.18 ±0.24	3.23 ±0.21	3.30 ±0.18	3.30 ±0.19	3.25 ±0.21	3.22 ±0.23	3.45 ±0.16	3.36 ±0.24	3.16 ±0.17	3.27 ^A ±0.18
	T1 (30mL)	3.21 ±0.20	3.31 ±0.17	3.22 ±0.18	3.24 ±0.21	3.13 ±0.28	3.15 ±0.22	3.43 ±0.20	3.34 ±0.18	3.43 ±0.11	3.27 ^A ±0.18
	T2 (20mL)	3.23 ±0.16	3.24 ±0.26	3.18 ±0.19	3.18 ±0.17	3.25 ±0.20	3.21 ±0.26	3.08 ±0.18	3.02 ±0.18	3.08 ±0.16	3.16 ^B ±0.18
	T3 (10mL)	3.02 ±0.26	3.14 ±0.26	3.20 ±0.16	3.08 ±0.18	3.17 ±0.19	3.06 ±0.20	3.07 ±0.22	3.05 ±0.21	3.07 ±0.19	3.10 ^B ±0.18
	Avg	3.16 ±0.22	3.23 ±0.22	3.23 ±0.19	3.20 ±0.18	3.20 ±0.21	3.16 ±0.22	3.26 ±0.21	3.19 ±0.20	3.19 ±0.18	
	Control (0mL)	3.19 ±0.18	3.32 ±0.22	3.36 ±0.11	3.15 ±0.25	3.16 ±0.20	3.00 ±0.18	3.17 ±0.20	3.14 ±0.18	2.90 ±0.16	3.15 ±0.16
Middle Stage	T1 (30mL)	3.16 ±0.18	3.34 ±0.21	3.34 ±0.11	3.14 ±0.20	3.17 ±0.18	2.99 ±0.19	3.07 ±0.18	3.12 ±0.21	2.89 ±0.22	3.14 ±0.19
	T2 (20mL)	3.26 ±0.17	3.11 ±0.20	3.54 ±0.11	3.18 ±0.19	3.07 ±0.26	3.00 ±0.16	3.25 ±0.20	3.20 ±0.16	2.91 ±0.18	3.17 ±0.18
	T3 (10mL)	3.44 ±0.20	3.22 ±0.22	3.44 ±0.26	2.77 ±0.19	3.00 ±0.16	2.88 ±0.19	3.07 ±0.16	3.05 ±0.20	3.00 ±0.26	3.10 ±0.21
	Avg	3.26 ^{ab} ±0.19	3.25 ^{ab} ±0.20	3.42 ^a ±0.18	3.06 ^b ±0.20	3.10 ^b ±0.17	2.97 ^b ±0.18	3.14 ^b ±0.18	3.13 ^b ±0.19	2.92 ^b ±0.22	
	Control (0mL)	3.33 ±0.22	3.38 ±0.20	3.03 ±0.18	3.18 ±0.20	3.26 ±0.22	3.25 ±0.26	3.26 ±0.28	3.28 ±0.24	3.12 ±0.12	3.23 ^B ±0.18
Last Stage	T1 (30mL)	3.23 ±0.26	3.28 ±0.18	3.23 ±0.20	3.08 ±0.11	3.36 ±0.15	3.20 ±0.14	3.21 ±0.26	3.25 ±0.20	3.02 ±0.13	3.21 ^B ±0.17
	T2 (20mL)	3.10 ±0.17	3.34 ±0.22	3.21 ±0.20	3.22 ±0.20	3.20 ±0.23	3.14 ±0.20	3.57 ±0.17	3.45 ±0.22	3.52 ±0.10	3.31 ^A ±0.19
	T3 (10mL)	3.23 ±0.20	3.22 ±0.21	3.25 ±0.17	3.14 ±0.26	3.33 ±0.20	3.25 ±0.19	3.11 ±0.17	3.10 ±0.11	3.19 ±0.20	3.20 ^B ±0.20
	Avg	3.22 ^{ab} ±0.23	3.31 ^a ±0.21	3.18 ^b ±0.19	3.15 ^b ±0.22	3.29 ^a ±0.21	3.21 ^{ab} ±0.19	3.29 ^a ±0.20	3.27 ^a ±0.19	3.21 ^{ab} ±0.16	

Mean ± Standard Deviation

8. a-b : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

9. A-D : Different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

3. 유성분과 체세포수 변화

가. 유지방과 유단백질 함량

Table 3-8은 비유단계와 백신량에 따른 유지방 함량을 조사한 결과로서 비유초기의 경우에 대조구(4.02%)가 다른 처리구보다 가장 높았고, 그 다음으로 20mL처리구가 3.92%, 10mL처리구는 3.76%이었다. 비유중기는 백신량과 유지방함량 간에는 통계적인 차이가 없었고($P < 0.05$), 비유후기는 20mL처리구가 3.80%로서 가장 높았던 반면에 대조구가 3.6%로 가장 낮았다. 전체적으로 백신시기와 유지방함량 간에는 거의 차이가 없었으나 비유기간에는 유지방함량은 점진적으로 낮아지는 경향을 보였다.

그러나 각 백신처리량에 따른 유지방함량은 1차 백신주사 직후에 유지방이 약간 낮아졌다가 다시 회복된 경향을 볼 수 있는데 이는 백신량이 많을수록 더 뚜렷하였는바 백신주사에 따른 스트레스에 유의해야 할 것이다.

Table 3-9는 비유단계와 백신량에 따른 유단백질 함량을 조사한 결과로서 비유초기에는 대조구와 30mL처리구 공히 3.27%로서 다른 처리구보다 가장 높았고, 그 다음으로는 20mL처리구가 3.16%, 10mL처리구는 3.10%이었다. 비유중기는 백신량과 유지방함량 간에는 통계적인 차이가 없었고($P < 0.05$), 비유말기는 20mL처리구가 3.31%로서 가장 높았으나 다른 처리구는 거의 차이가 없었다. 전체적으로 백신시기와 유단백질함량간에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

전반적으로 백신처리에 따른 유지방과 유단백질 함량은 백신량이 많을수록 낮아지는 경향을 볼 때 개체특성이나 비유시기에 따라 다소 차이는 있지만 경제성등을 고려하면 1회당 백신투여량은 20mL와 10mL가 30mL 보다 더 유리할 것으로 판단된다.

일반적으로 산유량과 유지율 간에는 부(-)의 상관관계가 있으며 산유량에 영향을 미친다고 하면서, 조사료부족이나 산차가 많거나 최고 유량기에는 유지율이 낮아지며, 계절적으로는 여름철에 낮아진다고 하였다. 특히 유지율 저하방지 및 대사성 질병을 예방하기 위하여 젖소 체중의 1.5% 정도는 양질조사료를 급여해야하는 것으로 알려져 있다. 유 등(1996)은 원유 품질은 사육환경 영향이 크게 영향을 미치는데 유지방함량은 5월부터 10월까지 무더위로 현저히 감소하는 경향이었다고 보고하였다.

그러나 산유량과 유성분과 품종은 물론 개체간에도 차이가 뚜렷하고 동일한 개체라

도 유량과 비유기에 따라서 유조성분 함량의 변화가 심하기 때문에 유우의 능력을 최고로 하기 위하여 유전적 형질의 개선뿐만 아니라 사료의 질과 양, 관리기술, 질병 등의 사육관리 여건을 중심으로 하는 연구가 많다(Agabriel 등, 1993 ; Berning 등, 1987 ; Griffith 등, 1981 ; Grummer 등, 1987 ; 김 등, 1994 ; 손, 1991).

Table 3-10. Lactose content of raw milk after vaccination in lactation stage

(unit:%)

Vaccination		1st		2nd		3th		4th			
Week		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	Avg
Early Stage	Control (0mL)	5.41 ±0.27	5.20 ±0.21	5.43 ±0.17	5.65 ±0.27	5.53 ±0.17	5.74 ±0.21	5.27 ±0.28	5.20 ±0.27	5.01 ±0.19	5.32 ±0.23
	T1 (30mL)	5.16 ±0.28	5.18 ±0.27	5.40 ±0.29	5.04 ±0.22	5.37 ±0.23	5.18 ±0.24	5.15 ±0.29	5.20 ±0.24	4.97 ±0.28	5.18 ±0.24
	T2 (20mL)	5.17 ±0.29	5.08 ±0.27	5.21 ±0.24	5.11 ±0.24	5.20 ±0.28	5.08 ±0.20	5.17 ±0.17	5.15 ±0.29	5.05 ±0.20	5.12 ±0.24
	T3 (10mL)	5.28 ±0.28	5.11 ±0.29	5.17 ±0.19	5.14 ±0.27	5.08 ±0.28	5.31 ±0.25	5.37 ±0.20	5.40 ±0.17	5.14 ±0.17	5.22 ±0.27
	Avg	5.28 ^a ±0.28	5.14 ^b ±0.23	5.30 ^a ±0.22	5.24 ^{ab} ±0.24	5.29 ^a ±0.22	5.33 ^a ±0.21	5.24 ^{ab} ±0.23	5.24 ^{ab} ±0.23	5.04 ^c ±0.24	
Middle Stage	Control (0mL)	4.94 ±0.27	4.88 ±0.29	5.11 ±0.31	5.17 ±0.20	5.18 ±0.24	5.13 ±0.23	5.17 ±0.18	5.25 ±0.19	4.65 ±0.21	5.03 ^B ±0.23
	T1 (30mL)	5.14 ±0.24	4.78 ±0.27	5.01 ±0.22	5.11 ±0.29	5.20 ±0.17	5.15 ±0.20	5.27 ±0.24	5.27 ±0.28	4.66 ±0.22	5.00 ^B ±0.24
	T2 (20mL)	5.03 ±0.24	5.11 ±0.26	5.30 ±0.29	5.16 ±0.21	5.24 ±0.22	5.04 ±0.23	5.21 ±0.27	5.17 ±0.19	4.78 ±0.22	5.12 ^{AB} ±0.22
	T3 (10mL)	4.93 ±0.27	5.36 ±0.31	5.27 ±0.20	5.24 ±0.21	5.54 ±0.28	5.42 ±0.27	5.46 ±0.22	5.18 ±0.22	5.39 ±0.17	5.31 ^A ±0.25
	Avg	5.04 ^b ±0.20	5.03 ^b ±0.21	5.17 ^{ab} ±0.25	5.17 ^{ab} ±0.23	5.29 ^a ±0.24	5.18 ^{ab} ±0.24	5.28 ^a ±0.24	5.22 ^{ab} ±0.25	4.87 ^c ±0.18	
Last Stage	Control (0mL)	5.14 ±0.22	5.33 ±0.21	5.32 ±0.27	5.14 ±0.23	5.41 ±0.25	5.41 ±0.26	5.38 ±0.21	5.40 ±0.28	4.98 ±0.17	5.25 ±0.24
	T1 (30mL)	4.94 ±0.37	5.23 ±0.27	5.22 ±0.30	5.18 ±0.31	5.44 ±0.17	5.48 ±0.22	5.40 ±0.19	5.42 ±0.18	4.50 ±0.17	5.20 ±0.26
	T2 (20mL)	5.31 ±0.27	5.16 ±0.27	5.32 ±0.22	5.36 ±0.23	5.18 ±0.22	5.16 ±0.25	5.19 ±0.23	5.25 ±0.28	5.35 ±0.27	5.25 ±0.26
	T3 (10mL)	5.25 ±0.31	5.74 ±0.29	5.74 ±0.27	5.77 ±0.28	5.69 ±0.17	5.23 ±0.19	5.25 ±0.20	5.20 ±0.24	4.82 ±0.19	5.41 ±0.25
	Avg	5.11 ^b ±0.21	5.37 ^{ab} ±0.25	5.40 ^a ±0.26	5.36 ^{ab} ±0.28	5.43 ^a ±0.22	5.32 ^{ab} ±0.21	5.30 ^{ab} ±0.21	5.32 ^{ab} ±0.23	4.91 ^c ±0.20	

Mean ± Standard Deviation

10. a-b : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

11. A-D : Different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05)

Table 3-11. Solid non fat content of raw milk after vaccination in lactation stage

(unit:%)

Vaccination		1st			2nd		3th		4th		
Weeks		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	Avg
Early Stage	Control(0mL)	8.71 ±0.36	8.72 ±0.34	9.26 ±0.31	8.93 ±0.29	8.77 ±0.27	8.23 ±0.31	8.66 ±0.30	8.61 ±0.26	8.59 ±0.19	8.72 ±0.26
	T1 (30mL)	8.95 ±0.30	8.69 ±0.26	8.87 ±0.22	8.51 ±0.26	9.37 ±0.20	8.24 ±0.27	8.78 ±0.16	8.77 ±0.28	8.60 ±0.26	8.75 ±0.24
	T2 (20mL)	9.07 ±0.36	8.74 ±0.26	8.55 ±0.28	8.74 ±0.29	8.62 ±0.27	9.01 ±0.26	9.19 ±0.27	9.10 ±0.19	8.86 ±0.24	8.88 ±0.26
	T3 (10mL)	8.69 ±0.21	8.99 ±0.22	9.04 ±0.36	8.37 ±0.36	8.71 ±0.29	8.77 ±0.30	8.44 ±0.31	8.44 ±0.34	8.53 ±0.26	8.66 ±0.28
	Avg	8.86 ±0.25	8.79 ±0.28	8.93 ±0.27	8.64 ±0.28	8.87 ±0.28	8.56 ±0.26	8.77 ±0.28	8.73 ±0.29	8.64 ±0.24	
Middle Stage	Control(0mL)	8.87 ±0.36	8.54 ±0.26	9.22 ±0.22	8.99 ±0.27	9.11 ±0.22	9.41 ±0.30	9.32 ±0.34	9.21 ±0.29	8.98 ±0.31	9.07 ±0.28
	T1 (30mL)	8.89 ±0.38	8.44 ±0.34	9.12 ±0.30	8.91 ±0.38	9.01 ±0.36	9.31 ±0.27	9.12 ±0.22	9.18 ±0.21	8.90 ±0.36	8.99 ±0.28
	T2 (20mL)	8.89 ±0.26	8.44 ±0.20	9.12 ±0.28	8.91 ±0.29	9.01 ±0.24	9.31 ±0.26	9.12 ±0.27	9.18 ±0.28	8.90 ±0.26	8.99 ±0.24
	T3 (10mL)	8.64 ±0.34	8.77 ±0.34	8.76 ±0.32	8.57 ±0.33	8.83 ±0.29	8.44 ±0.28	9.17 ±0.30	9.16 ±0.28	9.01 ±0.22	8.82 ±0.28
	Avg	8.82 ±0.32	8.55 ±0.28	9.05 ±0.28	8.85 ±0.30	8.99 ±0.29	9.12 ±0.28	9.18 ±0.27	8.95 ±0.26	8.97 ±0.27	
Last Stage	Control(0mL)	8.79 ±0.33	8.50 ±0.25	9.05 ±0.38	8.65 ±0.34	9.07 ±0.33	9.43 ±0.29	9.15 ±0.28	9.38 ±0.27	8.85 ±0.41	8.99 ±0.33
	T1 (30mL)	8.89 ±0.36	8.55 ±0.26	9.15 ±0.28	8.69 ±0.24	9.17 ±0.29	9.45 ±0.27	9.17 ±0.31	9.28 ±0.30	8.75 ±0.38	9.01 ±0.29
	T2 (20mL)	8.62 ±0.36	9.00 ±0.30	9.28 ±0.30	8.99 ±0.34	9.37 ±0.28	9.25 ±0.28	9.38 ±0.29	9.22 ±0.27	9.24 ±0.26	9.15 ±0.28
	T3 (10mL)	9.09 ±0.39	9.14 ±0.33	9.49 ±0.37	9.34 ±0.34	9.38 ±0.30	9.14 ±0.31	9.44 ±0.26	9.40 ±0.29	8.84 ±0.30	9.25 ±0.31
	Avg	8.88 ±0.34	8.55 ±0.29	9.10 ±0.33	8.86 ±0.29	9.00 ±0.30	9.15 ±0.29	9.08 ±0.29	9.07 ±0.28	8.86 ±0.33	

Mean ± Standard Deviation

Table 3-12 Total solid content of raw milk after vaccination in lactation stage

(unit:%)

Vaccination		1st		2nd		3th		4th			
Weeks		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	Avg
Early Stage	Control (0mL)	13.79 ±1.05	12.77 ±0.99	14.28 ±1.00	13.06 ±0.89	12.95 ±1.11	11.81 ±1.26	12.67 ±1.25	11.92 ±1.27	12.68 ±1.25	12.88 ±1.12
	T1 (30mL)	12.23 ±1.11	12.13 ±1.05	12.18 ±1.14	15.30 ±0.95	12.90 ±1.00	10.97 ±1.10	12.27 ±0.88	11.59 ±0.65	11.78 ±1.00	12.37 ±1.02
	T2 (20mL)	12.82 ±0.85	12.60 ±1.00	12.64 ±0.99	13.55 ±1.05	11.69 ±1.25	11.96 ±1.17	11.61 ±0.88	11.85 ±1.11	11.96 ±1.17	12.30 ±1.11
	T3 (10mL)	12.71 ±0.95	12.89 ±1.11	12.37 ±1.20	12.31 ±1.34	12.79 ±1.28	12.32 ±1.14	12.49 ±1.21	12.57 ±1.08	11.67 ±1.11	12.46 ±1.18
	Avg	12.89 ±1.09	12.60 ±1.10	12.87 ±1.17	13.56 ±1.08	12.58 ±1.19	11.77 ±1.18	12.26 ±1.13	11.98 ±1.19	12.02 ±1.12	
Middle Stage	Control (0mL)	12.69 ±1.11	13.49 ±1.10	12.46 ±1.17	14.79 ±1.14	14.22 ±0.95	12.38 ±0.99	12.59 ±1.00	12.39 ±1.17	14.27 ±1.12	13.25 ±1.01
	T1 (30mL)	12.59 ±1.25	12.39 ±1.35	12.43 ±1.19	14.77 ±1.41	14.12 ±1.35	12.33 ±1.18	12.54 ±1.35	12.19 ±1.22	14.39 ±1.29	13.08 ±1.14
	T2 (20mL)	13.02 ±1.15	12.03 ±1.30	13.00 ±1.22	15.76 ±1.31	14.70 ±1.35	12.99 ±1.11	13.74 ±1.33	13.29 ±1.29	10.96 ±1.30	13.28 ±1.24
	T3 (10mL)	13.69 ±1.33	12.54 ±1.28	13.51 ±1.30	12.28 ±1.31	10.92 ±1.34	10.69 ±1.31	11.42 ±1.30	11.32 ±1.30	12.87 ±1.35	12.14 ±1.30
	Avg	13.00 ^b ±1.26	12.61 ^b ±1.24	12.85 ^b ±1.20	14.40 ^a ±1.29	13.49 ^{ab} ±1.27	12.10 ^b ±1.05	12.57 ^b ±1.11	12.30 ^b ±1.25	13.12 ^b ±1.28	
Last Stage	Control (0mL)	13.78 ±2.09	11.99 ±2.99	13.48 ±1.22	13.40 ±1.30	11.90 ±1.89	12.89 ±1.34	11.68 ±1.37	11.79 ±1.29	11.70 ±1.25	12.51 ±1.54
	T1 (30mL)	13.58 ±1.95	11.96 ±1.85	13.42 ±1.55	13.97 ±1.33	11.70 ±2.05	12.59 ±1.35	11.62 ±1.28	11.59 ±1.31	12.96 ±1.25	12.60 ±1.58
	T2 (20mL)	12.44 ±1.37	12.98 ±1.39	12.41 ±1.30	15.45 ±1.29	13.25 ±1.88	13.75 ±1.99	13.70 ±2.28	13.38 ±2.85	12.56 ±2.05	13.32 ±1.66
	T3 (10mL)	12.68 ±2.25	12.19 ±1.95	13.16 ±2.25	13.81 ±2.05	12.68 ±1.85	12.63 ±1.99	13.34 ±2.07	12.89 ±2.11	12.40 ±1.89	12.86 ±1.98
	Avg	13.12 ^{ab} ±2.03	12.28 ±2.41	13.12 ^{ab} ±2.11	14.16 ^a ±1.58	12.38 ^b ±1.95	12.97 ^b ±1.64	12.59 ^b ±1.59	12.41 ^b ±1.65	12.40 ^b ±1.58	

Mean ± Standard Deviation

12. a-b : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

나. 유당, SNF 및 TS함량

Table 3-10은 비유단계와 백신량이 유당에 미치는 영향을 조사한 것으로서 비유초기에는 대조구가 5.32%로 다른 처리구보다 높은 경향을 나타내었고, 비유중기의 경우

는 10mL 투여한 T3구가 5.31%로 가장 높았다. 비유후기에서는 10mL처리한 T3구가 다른 처리구보다 높은 경향이였다.

Table 3-11과 3-12는 비유단계와 백신량이 SNF와 TS에 미치는 영향으로서 비유 시기별에 거의 차이가 없었다. 전반적으로 백신주사에 따라 SNF나 TS에는 영향을 거의 미치지 않았으나 1차백신 이후에는 약간 SNF 및 TS함량이 낮아지는 경향을 보이다가 점차 회복되었다.

전반적으로 유당 함량은 비유말기 가장 높은 경향이였고, 1회당 백신투여량에 따라 투여량이 많을수록 낮아지는 경향이였다. SNF와 TS함량은 1회 백신투여직후에는 다소 낮은 경향을 보였으나 1-2주후에는 거의 정상으로 회복되었다.

따라서 본 실험 결과를 종합해볼 때 원유내 유성분과 산유량을 고려해 볼 때 백신 시기는 비유단계를 엄격히 구분하기는 어려우나 그 중에서도 젖소의 스트레스를 고려할 때 비유중기가 가장 유리할 것으로 판단된다. 1회 백신주사량은 10mL-20mL(평균 15mL)를 젖소의 양쪽 앞어깨부위(견갑골)에 적당량으로 나누어 주사한 후 충분한 마사지가 필요하다. 백신접종 방법은 1차 이후 2, 3차는 2주 간격으로 4차는 3주 후에 다시 주사한다. 그리고 지속적으로 우유내 항체역가를 유지하기 위해서는 4차 백신이 후에 3-4개월령 간격으로 1회씩 추가 접종함이 바람직할 것으로 사료된다.

Table 3-13. Somatic cell counts of raw milk after vaccination in lactation stage

(unit : thousand number)

Vaccination	1st		2nd		3th		4th		Avg		
	Weeks	-1	0	1	2	3	4	5		6	7
Early Stage	Control (0mL)	189.9 ±8.0	152.3 ±4.0	113.6 ±4.0	202.3 ±2.5	200.0 ±3.5	214.3 ±5.7	155.0 ±6.1	195.0 ±2.9	252.0 ±3.8	186.1 ±4.3
	T1 (30mL)	123.0 ±6.1	140.0 ±5.0	148.0 ±4.5	180.0 ±6.0	282.0 ±6.0	258.4 ±6.0	339.5 ±6.0	246.0 ±6.0	282.5 ±6.0	222.2 ±5.3
	T2 (20mL)	259.0 ±5.5	130.0 ±4.0	111.0 ±4.5	130.0 ±5.0	249.5 ±3.5	264.0 ±4.0	169.5 ±5.6	146.0 ±3.0	149.5 ±6.0	178.7 ±4.1
	T3 (10mL)	210.0 ±3.8	298.0 ±4.8	128.9 ±4.5	380.0 ±6.0	210.5 ±4.0	268.0 ±5.5	127.5 ±4.8	211.0 ±5.0	110.5 ±6.0	216.1 ±5.2
	Avg	195.5 ±5.2	180.1 ±4.3	125.4 ±4.5	223.1 ±4.8	235.5 ±4.5	251.2 ±5.3	197.9 ±5.2	199.5 ±4.3	198.6 ±4.6	
	Middle Stage	Control (0mL)	165.0 ±4.8	137.0 ±5.1	180.0 ±6.0	138.0 ±4.0	315.5 ±3.8	288.9 ±4.1	158.0 ±4.5	152.0 ±4.4	153.5 ±4.0
T1 (30mL)	145.0 ±5.4	136.0 ±4.6	179.0 ±5.0	136.0 ±4.0	350.5 ±3.8	289.9 ±4.0	155.0 ±5.1	150.0 ±4.8	150.5 ±4.4	188.0 ±4.9	
T2 (20mL)	188.0 ±3.8	130.0 ±4.4	160.0 ±5.1	130.0 ±5.9	268.0 ±5.1	275.0 ±5.0	180.0 ±4.5	149.0 ±4.4	168.0 ±5.0	183.1 ±4.5	
T3 (10mL)	219.5 ±4.0	215.0 ±3.8	119.5 ±5.5	115.0 ±4.9	169.5 ±6.0	168.0 ±5.0	332.5 ±6.4	275.0 ±3.0	469.5 ±3.9	231.5 ±5.3	
Avg	179.4 ^c ±4.4	154.5 ^d ±4.3	159.6 ^d ±5.1	129.8 ^e ±4.6	275.9 ^a ±4.7	255.5 ^a ±5.1	206.4 ^b ±5.1	181.5 ^c ±4.2	235.4 ^{ab} ±4.3		
Last Stage	Control (0mL)	182.0 ±5.1	177.0 ±6.2	184.0 ±4.4	177.0 ±3.8	176.0 ±5.2	129.0 ±5.0	300.0 ±4.8	136.0 ±4.9	184.0 ±5.0	182.8 ±5.1
	T1 (30mL)	181.0 ±5.0	175.0 ±5.1	181.0 ±5.2	175.0 ±4.0	175.0 ±5.2	198.0 ±5.0	305.5 ±4.4	132.0 ±5.1	175.0 ±6.5	188.6 ±5.2
	T2 (20mL)	336.0 ±6.5	142.0 ±5.0	316.0 ±4.5	142.0 ±3.9	332.5 ±6.1	368.0 ±5.2	155.8 ±4.8	128.5 ±5.0	532.5 ±5.5	272.6 ±5.3
	T3 (10mL)	128.5 ±6.1	138.0 ±5.2	108.5 ±5.3	148.0 ±5.5	100.0 ±5.8	145.0 ±6.0	188.0 ±6.1	157.0 ±5.8	100.0 ±5.6	134.8 ±5.6
	Avg	206.9 ±5.7	158.0 ±5.4	197.4 ±4.9	160.5 ±4.3	195.9 ±5.6	210.0 ±5.2	237.3 ±5.0	138.4 ±5.2	247.9 ±5.7	

Mean ± Standard Deviation

13. a-b : Different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05)

다. 체세포수

Table 3-13은 비유단계와 백신량이 체세포수에 미치는 영향을 나타낸 것으로서 백신량에 상관없이 비유단계별 평균 체세포수는 비유전기가 20만개/mL, 비유중기 19만7천개/mL, 비유말기 19만4천개/mL로서 비유말기가 가장 적게 나타났다. 그러나 비

유단계별과 백신량을 고려할 때 비유전기는 대조구(186,000개/mL)가 T3구(216,000개/mL)보다 월등히 적었고, 비유중기는 T2구(183,000개/mL)가 T3구(231,000개/mL)보다 가장 낮았다. 그러나 비유후기는 비유초·중기와는 달리 T3구(134,000개/mL)가 T2구(272,000개/mL)보다 가장 낮게 나타냈는 바, 아마 백신량보다 개체특성과 시험기간중의 발생한 유방염의 영향으로 판단된다.

이같은 결과는 모 집유소의 체세포수가 1987년에는 335,000개/mL였으나 1989년에는 262,000개/mL로 낮아졌다고 하였고, 인천 가축위생시험소가 1989년 1년간 16개 목장에서 소 286두를 대상으로 조사한 결과, 1,012개의 유두에서 체세포수 5×10^5 /mL 이하가 약 80%를 차지하고, 그 중 1×10^5 /mL 이하가 48.4%로 우수한 성적을 나타내었다고 보고(손,1991)와 김 등(1993)이 원유중 체세포수를 측정된 결과 모든 시료가 5×10^5 /mL 수준이었다고 보고와 본 실험과 비교할 때 실험에 사용된 원유의 질이 월등히 좋은 것으로 판단되었다.

먼저 우유속의 체세포수란 것은 백혈구와 상피세포를 가리키는 것으로서 체세포수 측정은 우군내에서 유선조직의 건강상태를 추정할 수 있는 유용하면서도 매우 신뢰성이 높은 방법중의 하나(Meek와 Barnum, 1982)로 IDF(1991)에서는 정상 착유기간중에 무균적으로 채취된 원유 mL당 체세포수는 50만개를 기준으로 하여 유방염 감염 유무를 판단한다고 규정하고 있다. 그러나 유 등(1996)은 원유품질은 사육환경 영향이 크며 체세포수 평균은 6.208×10^5 /mL으로 나타났고, 계절에 의한 영향은 크지 않다고 하였다.

현재 우리나라의 원유 등급기준은 2002년 6월까지 세차례에 걸쳐 등급기준을 강화시켜, 현재는 세균수등급 기준이 종전이 1급 A(3만미만 개/mL), 1급 B(3만-10만 미만) 2급 (3만-10만 미만), 3급 (25만-50만 이하), 4급 50만 초과로 조정되었으며, 그 동안 유보하여 왔던 체세포수의 등급기준도 1급 (20만미만 개/mL), 2급 (20만-35만 미만), 3급(35만-50만 미만), 4급(50만-75만 이하), 5급(75만초과)로 강화하여 실시하고있다.

Table 3-14 The ingredient composition of immune row milk

Vaccination	Fat	Protein	Lotose	TS	SNF	Somatic Cell counts($\times 10^4$ Cells/mL)
Control(0mL)	4.11 \pm 0.13	3.33 \pm 0.01	4.80 \pm 0.02	13.09 \pm 0.11	9.07 \pm 0.02	Negative(-)
20mL	4.34 \pm 0.05	3.26 \pm 0.02	4.87 \pm 0.02	13.01 \pm 0.06	8.90 \pm 0.03	Negative(-)

Mean \pm Standard Deviation

T S : Total Solid ; SNF : Solid Non Fat

Table 3-15 The ingredient composition of marketing immuno milk by LTLT treatment

Vaccination	Gravity	pH	Fat	SNF	Total bacteria ($\times 10^3$ cfu/mL)	E .Coli mL
Control(0mL)	1.03 \pm 0.00	0.14 \pm 0.001	3.8 \pm 0.48	9.00 \pm 0.06	3.85 \pm 0.21	Negative(-)
20mL	1.03 \pm 0.00	0.14 \pm 0.001	3.9 \pm 0.57	9.15 \pm 0.07	3.65 \pm 0.191	Negative(-)

LTLT : Low Temperature Long Time pasteurization(63 $^{\circ}$ C, 30min)

Mean \pm Standard Deviation

4. 면역원유 및 면역시유의 유성분

Table 3-14와 3-15는 축산물 검사기관인 경상북도가축위생시험소에서 비유중인 젖소로부터 20mL의 anti-*H. pylori* 백신을 투여하여 생산된 anti-*H. pylori* 항체가 함유된 원유와 65 $^{\circ}$ C의 30분간 저온살균 처리한 백색시유를 분석한 결과이다.

Table 3-14는 원유중의 유지방, 유단백, 유당, 총고형분, 무지고형분 함량 및 체세포수 적합여부는 대조구가 각각 4.11, 3.33, 4.80, 13.09 및 9.07%와 체세포수 음성인테 비하여 20mL 백신처리하여 생산된 원유는 각각 4.34, 3.36, 4.87, 13.01, 8.90, 음성으로서 대조구와 처리구간에 성분차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 이같은 결과는 원유내 유지방, 유단백, 유당, 총고형분 및 무지고형분 함량은 각각 3.72, 3.00, 4.51,

11.82 및 8.10%라고(인,1997)한 결과보다 더 높았다.

Table 3-15은 저온살균(65℃ 30분간)처리한 면역 백색시유가 한국축산물가공법(2003)에서 정한 기준에 적합 여부를 조사한 결과이다. 비중은 1.03, pH는 0.14, 유성분 함량에서 유지방 3.8-3.9%, SNF 9.00-9.15%이었고 총 미생물수는 3.85×10^5 cfu/mL 부터 3.65×10^5 cfu/mL 범위로서 법률기준에 적합한 음성(-) 판정을 받았다.

따라서 20mL 백신처리하여 생산된 면역우유가 한국축산물가공법(2003)에 정한 기준에 적합한 유제품으로 평가받았다. 그러나 항체역가 분석은 현재 법적 검사기준이 없어 분석하지 못하였으나 백색면역 우유속에는 anti-*H. pylori* 항체가 상당량 함유되어 있을 것으로 사료된다.

이와 같은 결과는 안과 김(1980)이 조사한 바에 의하면 국내 각 유업회사 일반시유의 유성분은 유지방 3.3-3.4%, 유단백질 2.9-3.5% 및 유당 4.1-4.7% 범위였으며, 이등(1983)은 유지방 2.81-3.99%, 유단백질 2.42-4.00%, 유당 4.42-5.09%, 총고형분 11.07-13.04%의 범위이었다. 또한 강 등(1995)은 일반시유에 대한 유지방, 유단백질, 유당, 무지고형분 및 총고형분의 함량을 분석한 결과, LTLT살균유가 각각 3.62, 3.09, 4.60, 8.23 및 11.98% 이었고, pH는 6.73-6.78이고, 적정산도는 0.14-0.15%이며 총 균수가 4.96×10^3 cfu/mL였다는 보고와 비교할때 본 실험의 결과가 유성분 함량은 더 높았으나, 세균수는 더 적었다.

Yanoo 등 (1974)은 냉장 보관된 원유에서 발견되는 내냉성 미생물을 조사한 결과, 우선 세대기간을 조사한 결과 5℃에서 6.6-12.7시간, 0℃에서 12.2-26시간이었고, 우유의 보존기간은 5℃에서 25일, 0℃에서 4-13일 이라고 보고하였다. 이러한 내냉성 미생물중에서도 가장 문제시되는 것은 *Pseudomonas* 속으로서(Cousin, 1982), 우유의 성분을 생화학적으로 변화시켜 변패의 원인이 되기 때문이다.

5. 백신 투여에 따른 젖소의 체온변화

Fig. 3-3은 백신투여 후 젖소의 직장 온도변화를 나타낸 것으로써 대조구에 비해 백신투여구가 정상적인 범위 내에서 체온상승 현상을 나타냈는 바, 백신투여 6시간 후 대조구 체온이 39.3℃, 백신투여구가 39.1℃로 대조구에 비해 일시적인 체온상승

현상이 있었으나, 12시간 후에는 정상체온을 유지하였다. 그리고 백신투여 후 6시간째 대조구와 처리구 모두 체온이 상승한 것을 볼 수 있었는데 이는 일교차에 의한 젖소의 생체리듬 변화에 의한 것으로 판단된다.

Hogan 등(1997)은 비유말기와 건유후 7일령 및 건유 30일령의 홀스타인 젖소에게 *Escherichia coli* J5 bacterin 백신 2.5mL를 견갑골에 각각 주사한 후 12시간이후에 직장의 체온을 측정된 결과 건유 7일령인 경우에는 $40.3 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 였으나 24시간이후에는 $39.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$ 그리고 $38.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 나타내어 유의차를 나타냈다고 한 보고와 본 시험의 결과는 비슷하였다.

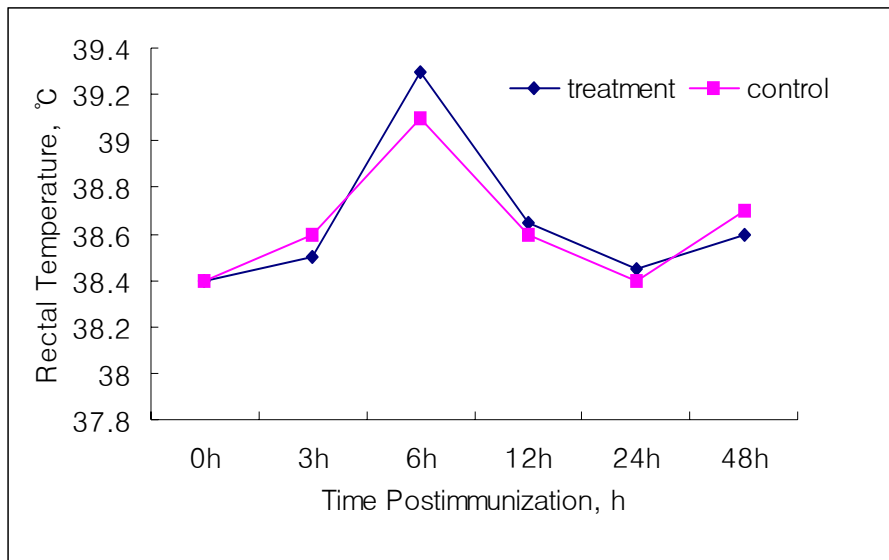


Fig. 3-3. Rectal temperature after vaccination(*H. pylori* antibody) to cows

제 4 절 결과요약

본 연구는 *Helicobacter pylori*균을 항원으로 젖소에 면역시킨 후 생산된 우유의 anti-*H. pylori* 항체의 산과 열에 대한 안정성 및 백신 투여량과 시기 및 산유량에 미

치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

- 1) Anti-*H. pylori* 항체의 산·알칼리에 대한 안정성의 경우 pH 5-pH 10에서는 활성도가 100% 안정한 상태였으나, pH 4이하, pH 11이상에서는 활성도가 70%가 감소하였다.
- 2) Anti-*H. pylori* 항체의 열에 대한 안정성의 경우 60°C에서 60분간 처리하는 100%안정한 상태였으나 70°C에서 60분간 처리하는 활성도가 40%, 80°C에서 4분간 처리하는 23%가 그리고 135°C에서 1분간 처리하는 50%가 감소하였다.
- 3) *H. pylori* 항원의 백신투여에 따른 산유량 변화는 백신투여전 보다 12% 감소된 경향을 나타냈으나, 투여 1주일 이후에는 거의 회복하였다.
- 4) 젖소의 직장(Rectal)온도는 백신투여 직후 다소 증가하는 경향을 보였으나 12시간 이후에는 정상체온을 유지하였다.

종합적으로 볼 때 면역우유를 생산하기 위해서는 비유중기, 후기의 젖소에게 10, 20mL(평균 15mL)의 *H. pylori* 항원 백신을 견갑골(Scapula)부위에 주사하며, 3차 백신 후에 개체별에 따라 3개월 간격으로 추가 접종함이 바람직할 것으로 사료된다.

제 5 절 참고문헌

1. Agabriel, C., J. B. Coulon., G. Marts and B. Bonaiti. 1993. Changes in fat and protein concentrations in farms with high milk production. J. Dairy Sci. 76:734-741.
2. Berning, L. M., J. Paape, R. H. Miller, and R. A. Ledane. 1987. Variation in N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase activity and somatic cell count among various milk fractions. J. Dairy Sci. 70:1054-1060.
3. Brule, B. E., Real. D. S., J. Fauquant and Flaud. 1978. Mineral salts stability in aqueous phase of milk: Influence of heat treatments. J. Dairy Sci. 61:1225-1232.
4. Brüßow H, Hilpert H, Walther I, Sidoti J, Mietens C, Bachmann P. 1987. Bovine milk immunoglobulin for passive immunity to infantile rotavirus gastroenteritis. J Clin. Microbiol. 25:982-986.

5. Carrol. O. T., Genevieve Losonsky., Harriet Link., Y. H, Pierre Guensry., Helnut Hilpert and M. M. Levvine.1988. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with *enterotoxinigenic escherichia coli*. The England J. Medicin.. 19:1240-1243.
6. Chakravarti D.N., Fiske M.J., Fletcher L.D., Zagursky R.J. 2000. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates Vaccine. 19:601-612.
7. Chen.C. C., Tu. Y.Y., And Chang. H. H. 2000. Thermal Stability of Bovine Milk Immunoglobulin G(IgG) and the Effect of Added Thermal Protectants on the stability. Journal of Food Science. 65:188-193.
8. Cousin, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms. J. Dairy Sci. 64:157-160.
9. Early. E. M, Hady. H et al. 2001. Bactericidal effect of a whey protein concentrate with anti-*Helicobacter pylori* activity. J. Appl. Microbiol. 2001 ; 90:741-748.
10. Ebina T, Umezu K, Ohyama S, et al. 1983. Prevention of rotavirus infection by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. Lancet 2:1029-30.
11. Ebina T, Sato A, Umezu K, et al. 1985. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. Med Microbiol Immunol. 174:177-85.
12. Evans. T. J., H. C. Ryley., L. M. Neale., J. A. Dodge and V. M. Lewarne. 1978. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. archives of disease in Childhood. 53 : 239-241.
13. Griffith, M. F., J. D. Phillips, and D. D. Muir. 1981. Thermostability of proteases and lipases from a member of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. J. Appl. Bacto. 50:279-303.
14. Grummer, R. R., A. L. Jacob, and J. A. Woodford. 1987. Factors associated with variation in milk fat depression resulting from high grain diets fed to

- dairy cows. *J. Dairy Sci.* 70:613-619.
15. Hilpert H, Brussow H, Mietens C, Sidoti J, Lerner L, Werchau H. 1987. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. *J Infect Dis.* 156:158-66.
 16. Hogan. J. S., K. L. Smith., P. Snhoenberger., S. Romig and L. Thompsoner. 1997. Responses of Antibody Titers to Intramammary Immunization with *Escherichia coli* J5 Bacterin. *J. Dairy Sci.* 80 : 2398-2402.
 17. Hunt R. H., 1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med.* 100(5A):42S-50S
 18. Lascelles, A. K., and G. H. McDowell. 1974. Localized humoral immunity with particular reference to ruminants. *Transplant. Rev.* 19:170-178.
 19. Larsson, B. L. and Rolleri, G. D. 1995. Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 38: 351-359.
 20. Lush, J. L. and R.R. Shrode. 1950. Changes in production with age and milking frequency. *J. Dairy Sci.* 33:338-433.
 21. Marshall, B. J. and J. R. 1984. Warren. Unidentified curved bacillus in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet.* ii, 1311-1314.
 22. Meek, A. H. and D. A. Barnum. 1982. The application of bulk tank somatic cell counts to monitoring mastitis levels in dairy herds. *Can. J. Comp. Med.* 46:7-11.
 23. Mietens C, Keinhorst H, Hilpert H, Gerber H, Amster H, Pahud J.J. 1979. Treatment of infantile *E. Coli* gastroenteritis with specific bovine anti-*E. Coli* milk immunoglobulins. *Eur J Pediatr.* 132:239-52.
 24. Morales, F. J., Romero, C. and Jimenez-Perez, S. 2000. Characterization of industrial processed milkly analysis of heat-induced change. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 35, 193-200
 25. Myron M. Levine.1991. Vaccines and milk immunoglobulin concentrates for prevention of infectious diarrhea. *the J. pediattis.* 118:S129-136.

26. Rivier C. Sobotka J. Protective effect of rabbit immune serum administered orally to rats infected by a human pathogenic strain of *E. coli*. *Exp Cell Biol* 1978; 46:277-88.
27. Saif, L. J., K. L. Smith., B. J. Landmeier., E. H. Bohl., K. W. Theil. and D. A. Todhunter. 1984. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. *Am.J.Vet.Res.*45:49-56.
28. Sawyer, W. H. 1969. Complex between lactoglobulin and κ -casein. *J. Dairy Sci.* 52:1347-1355.
29. Sawyer, W. H. and S. T. Coulter. 1963. Role of sulfhydryl groups in the interaction of κ -casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 46:564-571.
30. Sordilld. L. M., K. Shafer-Weaver and D. Derosa. 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *J .Dairy Sci.* 80 : 1851-1865
31. Tyler, J. W., J. S. Cullor. B. I. Osburn, R. B Bushnell, and B. W. Fenwick. 1988. Relationship between serologic recognition of *Escherichia coli* O111:B4(J5) and clinical coliform mastitis in cattle. *Am J. Vet. Res.* 49:1950-1958.
32. Tyler, J., W. N. Spears, and R. Nelson. 1992. Antigenic homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain, *Escherichia coli* O111:B4(J5). *J. Dairy Sci.* 75:1821-1829.
33. Tzipori S, Robertson D, Chapman C. 1986. Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. *Br Med J.* 293:1276-1277.
34. Watson, D. L., and A. K. Lascelles. 1975. The influence of systemic immunization during mammary involution on subsequent antibody production in the mammary gland. *Res. Vet. Sci.* 18:182.
35. Warren, J. R. and Marshall. B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet. I*, 1273-1280.
36. Walstra, P. 1984. *Dairy Chemistry and physics*. Gohn Wiley Sons, Inc.
39. Witter, L. D. 1961. Psychrotrophic bacteria. A review. *J. Dairy Sci.* 44:983-1015.

40. Yanoo, N., T. Morichi, and H. Kembo. 1974. Growth of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. Dairy Sci. Abstr. 38:10.
41. 강일수. 이진희. 이수원. 1995. 국내 살균유의 품질비교에 관한 연구, 한국낙농학회지. 17:161-166
42. 김기성. 임상동. 김희수. 1993. 집유검사 및 유대지급 제도 개선방향. 유가공연구회지.10(2):71-81.
43. 김기성. 임상동. 김희수. 이 찬. 정순희. 박민홍. 1994. 원유 품질 개선 방향. 한국유가공연구회지. 12:11-19.
44. 김병기. 배만중. 2001. 다기능성 계란생산 실용화연구. 경상북도축산시험연구보고서. P32-49.
45. 김종우. 1987. 한국산 우유의 적정 살균조건에 관한 실험적 연구 II. 원유의 화학적 조성 및 미생물학적 성상. 충남대 농기연보. 14:295-300.
46. 노임환. 남승우. 양미라. 명나혜. 김정택. 신지현. 2002. *Helicobacter pylori* 관련성 위장질환 치료를 위한 계란항체의 기대효과. 대한소화기학회. 39:260-268.
47. 배만중, 김수정, 김병기, 박창호, 서정일, 김육년, 장태정, 권상호. 2003. 항헬리코박터 IgY 항체의 위염(위궤양) 치료효과에 관한 연구.한국식품영양학회지.32:1357-1363.
48. 손봉환. 1991. 원유의 질과 유방염 관계. 한국유가공연구회지. 8:66-87.
49. 안승룡. 김현욱. 1980. 한국 우유제품의 발전구조에 관한연구. 서울대 석사학위논문.
50. 이광호. 윤희상 등(확인추가). 1990. 한국인의 위염 원인균 *Helicobacter pylori* 보균 실태. 대한미생물학회지. 25:475-490
51. 이경애. 1996. 난황항체의 안정성에 관한 연구. 한국조리과학회지. 12:54-59.
52. 이용규. 김용성. 홍윤호. 1985. 열처리 방법에 따른 우유의 이화학적 변화에 관한 연구. 전남대학교논문집(농,수산편).29:45-56.
53. 이승배. 최석호. 고태송. 장문주. 한석현. 1996. 계란의 난황에서 IgY항체 생산 및 특성에 관한 연구. 한국축산식품학회지.16 : 88-88.
54. 이종택. 박승용. 권일경. 김현욱. 1983. 한국산 납유 원유의 품질에 관한 연구. 한국낙농학회지.5 : 22-28.
55. 유수암. 전우민. 이민석. 김세현. 김영교. 1996. 유우의 사육관리수준이 원유 품질

- 에 미치는 영향. 한국낙농학회지. 18:229-236.
58. 인영민. 1997. 유질향상과 살균처리 방법에 따른 우유물질 변화에 관한 연구. 성균관대학교. 박사학위논문.
59. 조종후. 조태행. 1971. 처리온도가 우유성분에 미치는 영향. 가축위생연구소보. 16 : 89-92.
60. 백반석. 1999. 식중독균 항원에 의한 계란항체(IgY) 생산성과 항체특성 및 항균효과. 1999. 석사학위논문. 경산대학교
61. 서정일, 2001. IgY함유 계란의 항헬리코박터 치료효과에 관한 연구. 경상북도축산기술연구소 연구용역보고서.P132.
62. 축산물의 가공기준 및 성분규격(제3 축산물시험법)지침. 2003. 국립수의과학검역원 고시 제2003-14호.

제4장 우유로부터 위염원인균인 *H. pylori* 제거

항체생산 항원특성조사 및 백신개발

제 1 절 서 론

*H. pylori*는 위점막 상피세포 접합부에 서식하면서 만성적인 위궤양을 유발하면서 만곡형 혹은 s-자형의 그람음성 간균이며 urease, catalase, oxidase 양성이다. *H. pylori*의 가장 특이한 생화학적 특징은 매우강한 urease생산능력이 있다는 것이다. *H. pylori* urease활성은 균력과 관련이 있어 urease 부재하에서는 *H. pylori*는 산에 민감하다는 보고가 있다. urease는 요소를 분해하여 암모니아를 발생하게 함으로써 위산을 중화시킴으로써 위점막의 조직액내에 있는 균체 주위를 알칼리성으로 만듦으로써 *H. pylori*를 보호하는데 중요한 요소가 될 수있다. 위염과 위궤양을 앓고있는 환자의 대부분은 *Helicobacter pylori*에 감염되어 있고, 이것은 위암의 중요한 원인이 되는 것으로 보고되고 있다. *Helicobacter pylori*의 감염률은 전 세계적으로 상당히 높아 북유럽에서는 50세 이상 성인의 50%이상 감염되어 있으며 개발도상국가나, 신흥공업국의 경우 성인의 80%이상 감염된 것으로 추정되고 있다. 우리나라에서는 1999년 조사 자료에 의하면 농촌지역에서 66%이상 감염된 것으로 보고되고 있다. Borody 등은 bismuth제제와 tetracycline, metronidazole을 소화성 궤양환자에 동시에 투여하는 triple chemotherapy를 통해 80% 내외의 치료효과를 얻은 것으로 보고하였다.

그러나 이런 항균제 치료는 이에 사용되는 항생제에 대한 내성이 나타나고, 재발가능성이 내재한다는 면에서 계속적인 연구가 필요하다. 한편 천연물을 이용한 *H. pylori* 항균 활성 실험은 in vitro를 벗어나지는 못했으나 여러 소재들이 시도되고 있다. Tabak 등은 백리향(thyme)에서, Diker와 Hascelik은 차(tea)로부터 *H. pylori*에 대한 항균활성을 보고하였으며, Midolo등 유산균으로부터, Bhatia등은 Lactobacillus

acidophilus로부터 *H. pylori*에 대한 항균활성을 확인하였다.

우유에는 영양소뿐만 아니라, 비영양소의 면역기능, 항미생물기능 약리작용, 효소활성작용 등의 기능을 갖는 생리활성물질, 항체, lactoferrin, lysozyme, epidermal factor, transforming growth factor 등 다량 포함하고 있다.

우리나라의 축산관련 산업은 축산물개방으로 수입육이 봇물처럼 밀려오는 시점에서 점차 국제경쟁력 하락은 낙농업도 마찬가지이다. 최근 우유소비율의 둔화로 재고분유가 2002년 3월 현재로 16,200톤으로 전년보다 약 15%이상이 증가되어 우유업체들의 우유소비에 많은 어려움에 처하고 있으며, 정부에서도 젖소 도태 등 사육두수 줄이기에 앞장서고 있는 실정이다.

이런 상황에서 상품성과 기능이 뛰어나고, 소비자 욕구에 충족시킬 수 있는 고품질 축산물을 생산한다면 우유소비를 비롯하여 축산물 소비를 향상시켜 국제경쟁력도 높일 수 있을 것으로 판단된다.

1차 년도에 위염 원인균인 *H. pylori* 항원을 이용해서, 특이항체 및 면역성분을 많이 함유한 면역우유 생산을 확인하였다. 이를 이용한 고기능성 축산물 및 축산제품을 생산하여 국민건강증진에 이바지할 뿐만 아니라 제품의 기술고도화, 고급화 및 고부가가치화 함으로써 농가소득증대 및 지역과 국가경제에 이바지하고자 한다. 따라서 본 연구에서는 *H. pylori* 항체함유 면역우유를 생산하는데 있어서 *H. pylori*의 균체, Urease, Outer membrane항원의 특성을 조사하고, 백신을 개발하기 위한 Adjuvant 선택 및 항원 특성을 연구하였기에 그 결과를 보고 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 균주생산 최적조건 실험

가. 균주 준비

*Helicobacter pylori*는 한국유전자은행으로부터 분양받은 (KCTC 12083)균주를 사용하였다. *H. pylori*는 미호기성(microaerophilic)으로 배양조건은 최적 산소분압은

2~8%, 10% CO₂ 조건 37℃에서 배양한다. 배양용 배지는 10% 소혈청(bovine serum)이 첨가된 Muller Hinton 한천배지에 접종하여 37℃, 10% CO₂ 배양기에서 3~5일간 계대 배양했다.

나. *H. pylori*의 배양시간에 따른 탁도측정

*H. pylori*의 배양시간별 탁도변화에 의한 실험에서는 시험관에 희석된 균액 2mL와 액체배지(Muller Hinton broth(MHB) +10% 소혈청(bovine serum)) 18mL를 넣고 배양하면서(37℃ 10% CO₂ Incubator) 배양시간별로 시험관내의 상등액을 일정하게 취하여 spectrophotometer Model U-200(Hitachi Co., Japan)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 시간별로 측정하였다.

다. 배양시간에 따른 균체량 측정

균주의 대량생산을 위해서는 계대배양한 *Helicobacter pylori* 균주를 멸균한 500mL Muller Hinton 액체배지에 10% 소혈청(bovine serum)을 첨가하여 10% CO₂ 조건 37℃에서 시간별로 5일간 배양하여 spectrophotometer Model U-2000(Hitachi Co., Japan)을 이용하여 667nm에서 O.D = 1로 균체량을 측정하였다.

라. 균체의 회수와 항원준비

균체의 회수와 항원 준비는 Fig.4-1의 방법과 같다. 균주의 대량생산을 위해서 계대배양한 *Helicobacter pylori* 균주를 멸균한 500mL Muller Hinton 액체배지에 10% 소혈청(bovine serum)을 첨가하여 10% CO₂ 조건 37℃에서 4일간 배양한다. 배지의 최적 pH는 7근처이며 산성 혹은 알칼리성 조건에서는 자라지 못한다. 4일간 진탕 배양한 액체배양액을 0.5% formalin으로 3hr 처리 후 4℃ 10,000rpm 15min으로 원심분리하여 균을 회수한다. 회수된 균은 같은 조건(4℃ 10,000rpm 15min)으로 3회 세척한다. 얼음상에서 5분간 sonicate(pulse 20, duty cycle 50)하여 파쇄된 균체를 주사액으로 파장 667nm에서 O.D 가 1이 되도록 조정 후 Adjuvant로 Montanide ISA 70(interlees. France)을 사용하여 유회기를 이용 약5,000rpm에서 유회 시켜 항원으로 사용한다.

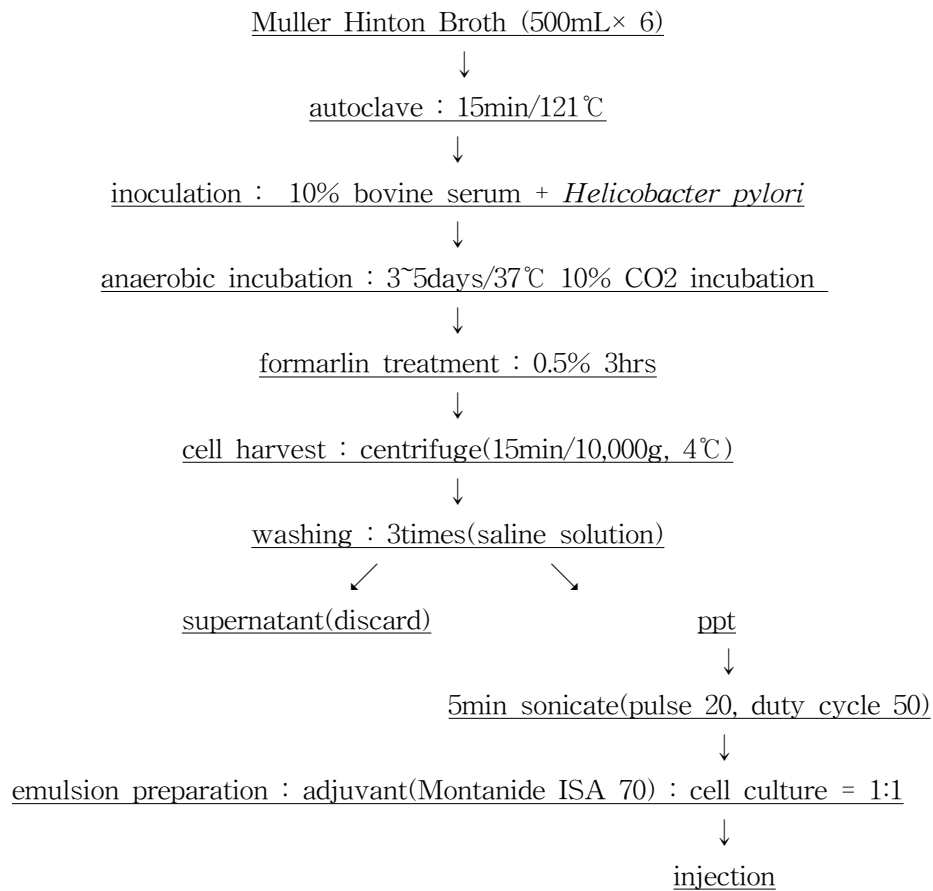


Fig. 4-1. Scheme of antigen preparation and vaccination

2. 면역우유생산 *H. pylori* 항원특성 실험

가. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

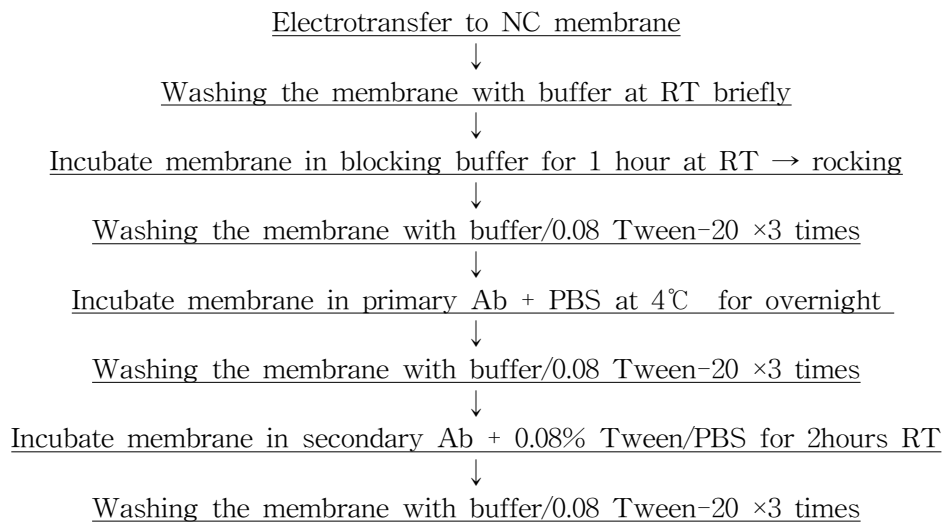
*H. pylori*균과 anti-*H. pylori* 항체의 특성을 조사하기 위한 분자량 측정은 SDS-PAGE(Sodium dodesyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis)로 행하였다. 0.5M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide를 함유한 4.0%(v/v) 농축겔 (stacking gel)을 사용하고, 분리겔(separating gel)은 1.5M Tris-HCl과 10% SDS, 30% acrylamide을 함유한 10%(v/v)겔을 사용하였다. 분리정제된 항체단백질 30 µg/µL(D.W)를 sample buffer로 1 : 4로 희석하여 각 well에 20 µL씩 loading하였다. Sonicate된 *H. pylori*균 40 µg/mL(D.W)를 sample buffer와 1 : 4로 희석한 후 20 µL

씩 loading하였다. Marker는 wide range (Sigma M4038)와 low range(Sigma M3913) 두 종류를 5 μ L씩 loading하였다. 전기영동후 겔은 Coomassie blue로 염색하여 단백질 band를 확인하였다.

나. Western blotting에 의한 항원의 특이성 확인

H. pylori 항원에 의해 생성된 anti-*H. pylori* 항체가 항원에 특이적으로 반응하는지를 알아보기 위해 Western blotting을 실시하였다. *H. pylori* 항원 whole cell을 sonicator로 파쇄하여 원심분리(4,000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C)한 상등액을 sample buffer와 1 : 4로 희석하여 각 well에 20 μ L씩 loading후 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나면 Fig.4-2와 같이 NC membrane(Nitrocellulose, Gelman Sciences co.)에 transfer하여 western blotting하였다.

1차 항체(primary antibody)는 우유정제와 혈청정제로 얻은 항체를 결합시키고, 2차 항체(secondary antibody)는 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 1 : 30,000으로 희석하여 반응시켰다. 기질로 alkaline phosphatase substrate를 사용하여 3분 반응시켜 X-ray 필름상에서 항원물질을 확인하였다.



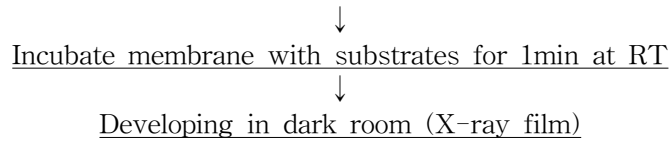


Fig. 4-2. Western blotting

3. 면역우유 항체의 urease 활성억제 효과

가. crude-urease 준비

Urease는 Fig. 4-3과 같이 Li-Tai hu의 방법에 준해서 준비하였다. Brucella agar plate에 배양한 *H. pylori*를 20mM phosphate buffer (pH 7.2)로 현탁 시키고 2회 세척하였다. *H. pylori*를 4°C에서 10분간 110×g에서 원심분리 하여 상등액만 수거, Sepharose CL6B Column 통과, urease test로 urease 분획분을 회수하였다. 상등액의 단백질 농도는 Lawry 방법에 따라 측정하였으며, urease활성은 Tabak등의 방법을 응용하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 1mL urea R broth에 50 μ l urease를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시키면서 pH 변화와 560nm에서의 흡광도 변화를 측정함으로써 urease 활성을 확인하였다.

나. 면역우유 항체의 urease 활성 억제효과

면역우유 항체의 urease 활성억제효과는 Δ pH 방법을 응용하여 측정하였다. 10mL urea R broth에 항체를 최종 농도가 1mg/mL이 되도록 첨가한 후, pH를 7.0으로 보정하였다. 여기에 500 μ l의 urease를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시키면서 10분 간격으로 pH변화를 측정하였다. 반응 2시간 후 소제가 들어가지 않은 대조군의 pH 변화정도를 100%로 기준하여, 반응시간과 추출물에 따른 urease 활성 억제율을 환산하였다.

4. 항원별 및 Adjuvant첨가에 따른 백신의 역가측정

가. 균체(whole cell)항원 준비

항원으로 사용된 WC는 기존항원처리와 동일하게 처리하여 항원으로 사용하였다.

균주를 Muller Hinton 액체배지에 10% 소혈청(bovine serum)을 첨가하여 CO₂ 10% 37℃ 에서 4일간 배양한 것을 0.5% formalin으로 3hr 처리 후 4℃ 10,000rpm 15min으로 원심분리하여 균을 회수한다. 얼음 상에서 5분간 sonicate(pulse 20, duty cycle 50)하여 파쇄된 균체를 항원으로 사용한다.

나. Urease 항원 준비

Urease항원 준비는 Li-Tai hu의 방법에 준해서 Fig. 4-3과 같이 준비 하였다. 즉 균체를 원심분리법으로 회수하고, pellet suspension (1% N-octylglucose, 20min 4℃에서 10분간 110g에서 원심분리 하여 상등액만 수거, Sepharose CL6BColumn 통과, urease test로 urease 분획분을 회수하였다. 그 다음 Anion exchange chromatography으로 정제 후 항원으로 사용하였다.

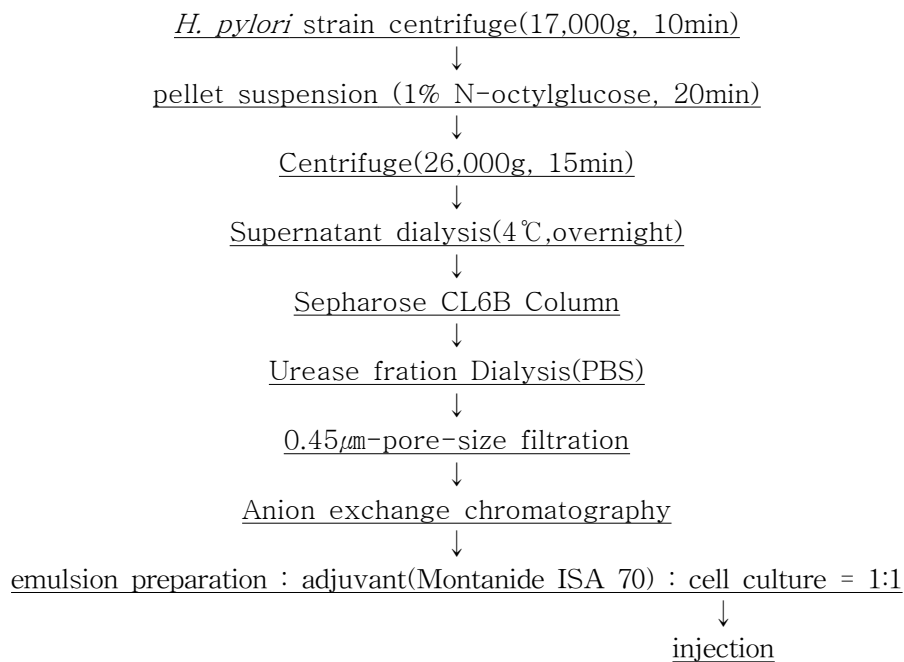


Fig. 4-3. Urease preparation

다. MPs항원 준비

MPs는 항원 준비는 Martin의 방법에 준해서 Fig. 4-4와 같이 준비 하였다. 즉 셀을 회수해서 10mM Tris, 5mM MgCl₂ buffer에 부유, sonicate(22kHz, 30sec, 4time)했다. 그 다음 whole cell을 제거하기위해서 원심분리(5,000g,, 20min) 하고 상등액은 고속원심분리(100,000g,, 1h, 4℃), 잔사를 증류수에 부유시켜 crude membranes을 얻었다.

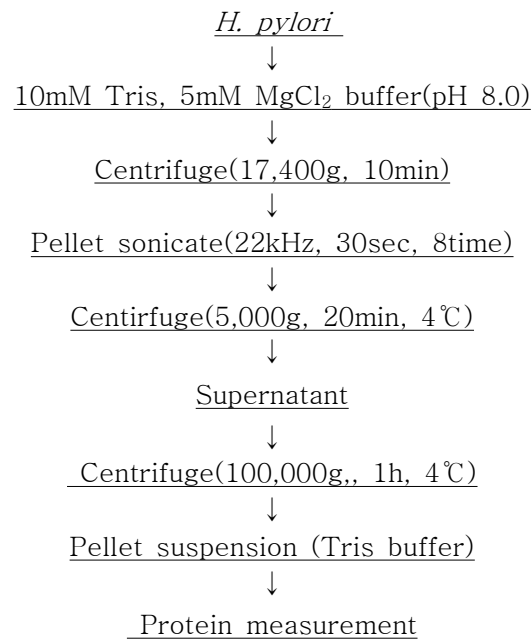


Fig. 4-4. MPs(Whole membrane proteins) preparation

라. 동물실험군

실험동물은 VALB/c계 숫컷 mouse를 분양받아 고형사료(수퍼피드 주식회사)로 2주 이상 적응시킨 후 대조구, urease, MPs(Whole membrane proteins), W.C(whole cell) 항원에 adjuvant로 cholera toxin, vitamine E을 첨가하여 군당 5마리씩 나누어 아래 Table4-1과 같이 백신을 투여하였다. 사육실의 온도는 20~22℃로 유지하였고 12시간 간격으로 점등과 소등을 반복하였다. 사육기간은 백신투여 후 항체 최대생성시기인 6

주까지 물과 식이를 자유롭게 섭취케 하였다.

마. 백신제조 및 투여

WC는 200 μ g/200 μ l와 100 μ g/200 μ l되게, Urease는 100 μ g/200 μ l와 10 μ g/200 μ l, MPs는 20 μ g/200 μ l와 10 μ g/200 μ l 준비하였다. 면역력을 증강시키기 위해서 Adjuvant로 cholera toxin, vitamine E를 각각의 항원에 5 μ g/200 μ l/1time 되게 첨가하였다. Incomplete는 sigma F5506을 사용하고, 1차 항원투여는 각각의 항원 및 Adjuvant를 함유한 용액과 Incomplete를 1:1로 유화(emulsion)하여 개체당 100 μ l를 4곳에 나누어 피하주사(subcutaneous) 하였다. 2차 항원투여는 1차 항원투여 2주 후 실시하였다.

Table 4-1 Doses of adjuvants and antigen, and Experimental design used with vaccine in this study.

Group	Control	Urease, μ g/200 μ l		MPs, μ g/200 μ l		WC, μ g/200 μ l	
		100 μ g	10 μ g	20 μ g	10 μ g	200 μ g	100 μ g
Adjuvant	cholera toxin	5	5	5	5	5	5
	Vitamine E	5	5	5	5	5	5

바. IgG와 IgA의 항체역가 측정

1차 백신투여 2주 후, 2차 백신투여한 다음 6주 째 mouse의 꼬리에서 혈액을 채혈 원심분리하여 혈청을 분리하고 상기 항원들에 대한 혈청항체의 상대적인 농도 및 역가를 측정하기 위해 면역학적 방법인 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 IgG와 IgA의 항체역가를 측정하였다.

ELISA측정용 항원을 immunoglobulin 96 well plate에 100 μ L씩 coating하고 overnight(4 $^{\circ}$ C)하였다. 항원 coating시 bovine IgG(Sigma I5506)를 standard로 coating하였다. 각 well을 washing buffer(10mM PBS, pH 7.4, 0.5% Tween 20)로 3회세척 후 blocking액(PBS pH 7.4, 5% skim milk) 150 μ L넣고 실온에 30분 이상 방치 후 washing buffer로 3회 세척한다. 혈청을 washing buffer에 희석한 다음 well에 100 μ L씩 넣고 실온에 2시간 방치한다. 세척 후 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline

phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 2차 항체로써 1 : 30,000으로 washing buffer에 희석하고 well에 100 μ L씩 넣고 실온에 1시간 방치한다. 3회 세척 후 기질용액(10% diethanolamine buffe, 1% phosphatase substrate(Sigma 104))을 100 μ L씩 넣은 후 30분 반응 후 3N NaOH 반응 정지액 50 μ L로 반응 정지시키고 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 통계학적분석

실험결과의 통계적 분석은 SPSS(10.0 for windows)를 이용하여 공분산 분석을 하였으며, 처리구간 유의성 검증은 $p < 0.05$ 일 때 각 처리구간의 유의성을 인정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 균성장 및 균체량

가. *H. pylori*의 배양시간별 탁도 변화

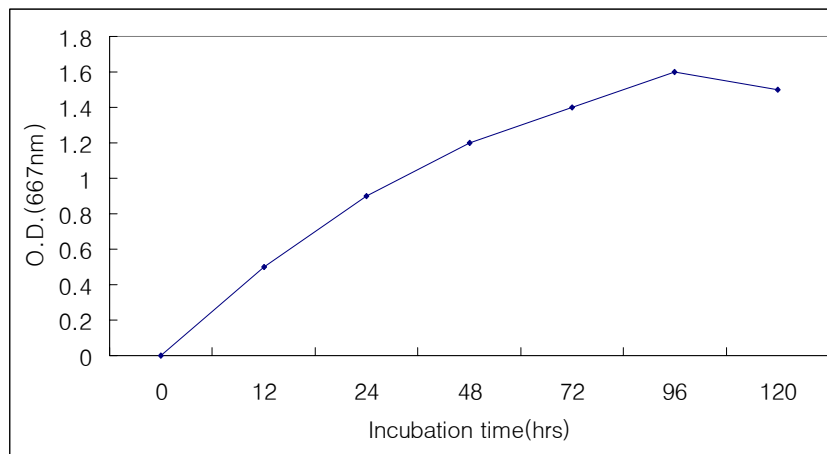


Fig. 4-5. *H. pylori* growth curve according to incubation times.

균주의 대량생산 최적조건 확립을 위한 배양시간별 탁도 변화 실험결과 12시간이 지난 후부터 0.5의 흡광도를 나타내기 시작하여 배양 24시간이 지나면 0.9, 48시간이 지나면 1.2를 나타내었으며(Fig. 4-5), 배양 4일째인 96시간이 지나면 1.6으로 가장 높은 탁도 변화를 나타내기 시작하여 그 후에는 1.5로 흡광도가 감소하는 것으로 나타났다. 이런 실험 결과로 살펴보면 균주의 대량생산을 위한 배양시간은 4일을 넘지 않는 것이 좋을 것으로 생각되어진다.

나. 배양시간에 따른 균체량

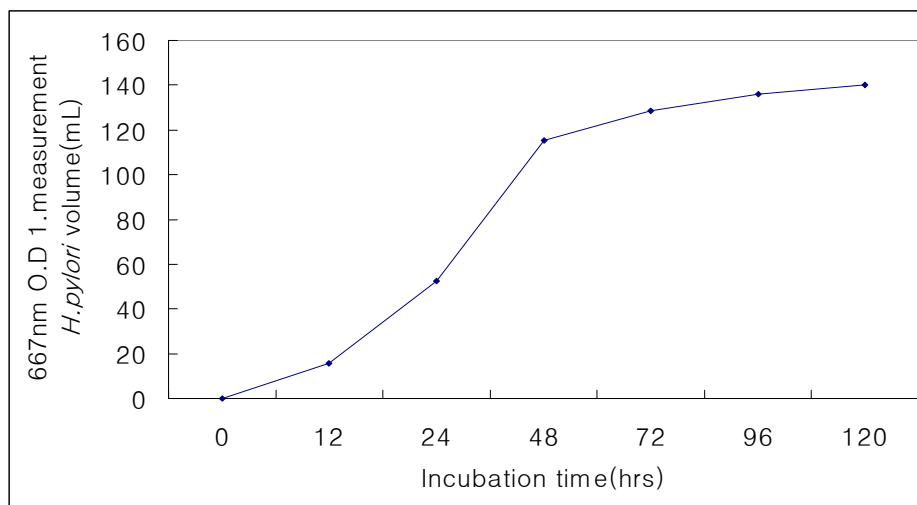


Fig. 4-6. Whole cell yields for incubation time of *H. pylori*

Muller Hinton broth 500mL 배양기에 종균 접종 후 배양시간에 따른 균체량 측정 결과는 Fig. 4-6과 같다. 파장 667nm에서 O.D=1로 맞추어 계산한 균체량은 24시간이 경과한 후에는 52.6mL, 48시간 경과 후에는 115.5mL, 배양 사일 짜인 72시간에는 122 mL, 96시간 경과 후에는 136mL의 균체량을 측정할 수 있었다. 72시간 이후에는 균체량에는 큰 변화 없는 현상을 보였으며 균의 성장곡선으로 미루어 볼 때 72시간 내지 96시간대의 균체를 사용하는 것이 가장 바람직 할 것으로 사료된다.

2. Anti-*H. pylori* 항체 생산 항원의 특성

Fig.4-7은 anti-*H. pylori* 항체에 의한 항원의 특이성을 알아보기 위해 western blotting을 실시한 결과이다. 항원인 *H. pylori*균의 SDS-PAGE로 분자량 측정결과 항원 단백질은 12개 band를 형성하였다. 12개의 단백질 가운데 primary antibody로 혈청, 혈청정제, 유청, 유청정제물을 이용하여 western blotting한 결과 7개의 항원성 물질을 확인할 수 있었고, 그중 주 항원성 물질은 분자량이 97, 66, 34kDa인 3개의 band를 확인할 수 있었다.

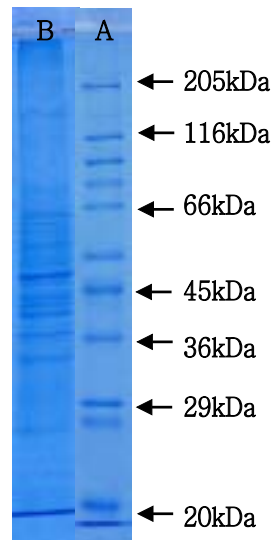


Fig. 4-7. SDS-PAGE of the sonicated whole cell antigen preparation, Lanes:A, molecular mass markers; B, sonicated antigen preparation;
 20kDa : trypsin inhibitor, 29kDa : carbonic anhydrase, 36kDa : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 45kDa : ovalbumin, 66kDa : albumin, bovine serum, 116kDa : β -galactosidase, 205kDa : Myosin.

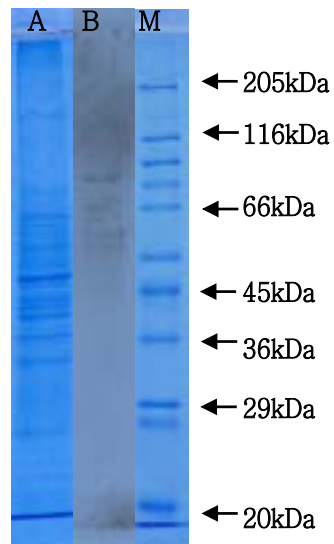


Fig. 4-8. Western blot of SDS-PAGE of purified serum from cows immunized with *H. pylori*. The antigen for Western blot was sonicates of *H. pylori* whole cell and second antibody was peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG

A : Sonicated *H. pylori* whole cell antigen

B : Primary antibody was purified serum.

M : Marker(20kDa : trypsin inhibitor, 29kDa : carbonic anhydrase, 36kDa : glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, 45kDa : ovalbumin, 66kDa : albumin, bovine serum, 116kDa : β - galactosidase, 205kDa : Myosin.

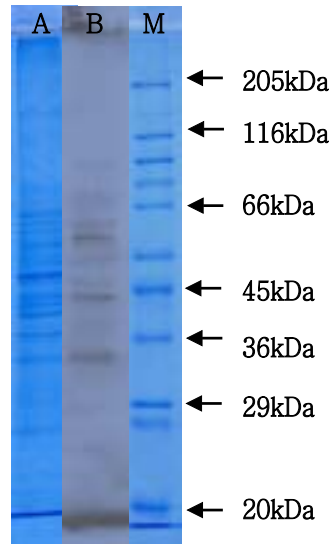


Fig. 4-9. Western blot of SDS-PAGE of purified milk from cows immunized with *H. pylori*. The antigen for Western blot was sonicates of *H. pylori* whole cell and second antibody was peroxidase-labeled rabbit anti-mouse IgG

A : Sonicated *H. pylori* whole cell antigen

B : Primary antibody was purified milk.

M : Marker(20kDa : trypsin inhibitor, 29kDa : carbonic anhydrase, 36kDa : glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, 45kDa : ovalbumin, 66kDa : albumin, bovine serum, 116kDa : β - galactosidase, 205kDa : Myosin.

3. 면역우유 항체의 urease 활성억제 효과

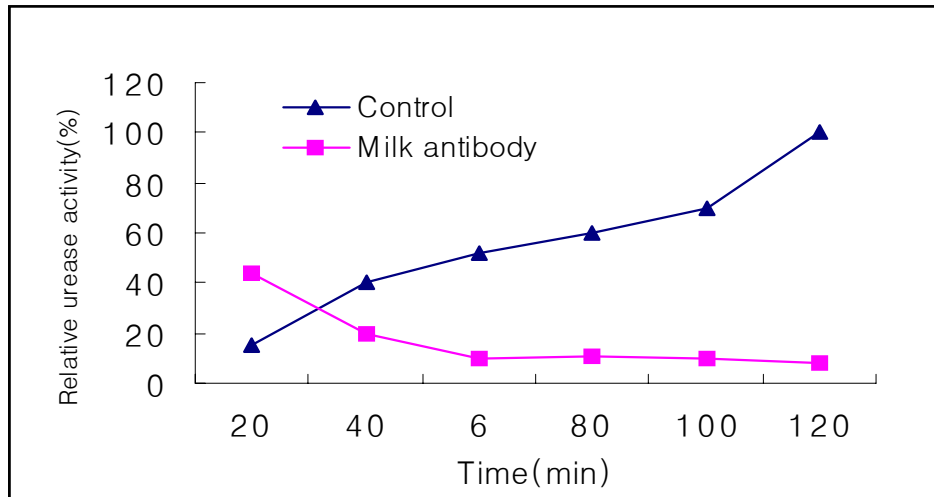


Fig. 4-10. Inhibition of *H. pylori* urease by milk anti-*H. pylori* antibody in urea R broth.

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 특이한 점은 강력한 urease (urea aminohydrolase) 활성을 가지고 있다는 것이다. *H. pylori*의 urease 생산능력은 *Proteus* 균종의 생산능에 비해 100배 이상이며 균체 단백질의 약 6% 정도가 urease 로 알려져 있다. Urease는 urea를 암모니아와 CO₂로 분해하는 효소이며, *H. pylori*의 urease는 위액의 강산성 조건에서도 *H. pylori*가 살아살 수 있도록 도와주는 물질이거나 특이한 발병결정인자로 추정한다. 따라서 *H. pylori*의 urease 활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염 예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있을 것이다.

*H. pylori*로부터 crude-urease를 분리하고 urea R broth를 이용한 흡광도와 pH 변화를 측정하여 urease활성을 확인한 결과는 Fig. 4-10와 같다. 이 urease의 활성을 측정한 결과, 초기 pH 7.0의 urea R broth에서 urea를 암모니아와 CO₂로 분해하여 반응 2시간 동안 pH 8.15까지 지속적인 증가를 보였다. pH가 알칼리성으로 변함에 따라 phenol red에 의해 흡광도(560nm)도 1.7까지 계속 증가하는 것으로 나타났다.

*H. pylori*에 항균활성을 나타낸 항체가 *H. pylori* urease 활성을 억제하는지를 확인

하였다. 항체가 첨가되지 않은 대조군이 반응 2시간 후 나타낸 pH 변화정도를 urease 억제율 100%로 기준하여, 반응시간과 추출물에 따른 pH 변화정도를 urease 억제율로 환산하였다. Fig. 4-10에서 보는 바와 같이 반응 2시간 후에 *H. pylori*의 urease 활성을 90% 이상 억제하는 것으로 나타났다.

4. 항원별 및 Adjuvant첨가에 따른 백신의 역가비교

항원이란 이것을 투여함으로써 동물에 항체를 산생케 하고, 또 그 항체와 특이적으로 반응하는 물질을 말한다. 생체 내의 항원성은 없고 시험관 내의 항원성만 갖는 경우도 있으므로 이것을 구분하여 면역원(immunogen)과 항원성(antigenicity)이라고 불러 구별하는 수가 있다. 따라서 본 연구에서도 *H. pylori*균주의 항원성을 알아보기 위하여 균주를 urease, MPs(membrane proteins), W.C(whole cell)를 분리하여 adjuvants로 vitamin E 혹은 cholera toxin을 첨가하여 mouse에 면역시킨 후 IgG와 IgA항체의 역가를 측정하였다. 즉 실험군에 urease 100 μ g/200 μ l, 10 μ g/200 μ l, MPs(membrane proteins) 20 μ g/200 μ l, 10 μ g/200 μ l와 WC(whole cell) 200 μ g/200 μ l, 100 μ g/200 μ l로 항원투여량을 달리하고, adjuvant로 cholera toxin 5 μ g/200 μ l, vitaminE 5 μ g/200 μ l을 각 실험군에 동일한 양을 첨가하여 항체 역가를 측정하였다.

IgG항체는 Fig. 4-1에서 보는 것과 같이 MPs(membrane proteins), W.C(whole cell)에서 역가가 urease에 비해 상당히 높게 나타났고, 항원들 간에 투여함량이 2배 10배의 차이에 따라 항체생성 경향을 확인해 본 결과 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 특히 MPs에 있어서는 MPs1(20 μ g/200 μ l)과 MPs2(10 μ g/200 μ l)에 의한 IgG 항체생성을 비교해보면 항원의 함량이 많은 MPs1이 MPs2보다 2-3배 더 많은 IgG 항체역가를 생성시켰다. 그러나 urease를 항원으로 한 처리구에서는 항체생성에 큰 변화가 나타나지 않았다. adjuvant의 종류에 따라서도 vitamin E가 cholera toxin보다 더 많은 항체를 생성하는 경향을 볼 수 있었다. 이러한 경향은 W.C 처리구에서도 같은 항체생성 경향을 나타내었다.

IgA 항체의 생성능은 4-12와 같이 나타났다. IgA또한 IgG와 유사한 경향으로 백신 투여량과 adjuvant에 따라 항체형성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, MPs 항원이 다른 항원들 보다 IgG, IgA모두 높은 항체역가를 나타내었다.

*H. pylori*로 감염된 환자로부터 채취한 혈청에서 MPs, Urease에 대한 항체역가는 모두 높게 나타난 결과에서와 같이(Mattsson 등, 1998) 본 실험에서도 MP, WC모두 높은 항체역가를 나타내었다. 그러나 Urease항원에 대한 항체 역가가 낮게 나타난 것은 ELISA용 항원제조때 sonicate처리 및 균 세척으로 인한 urease항원소실로 인한 결과인 것으로 판단된다.

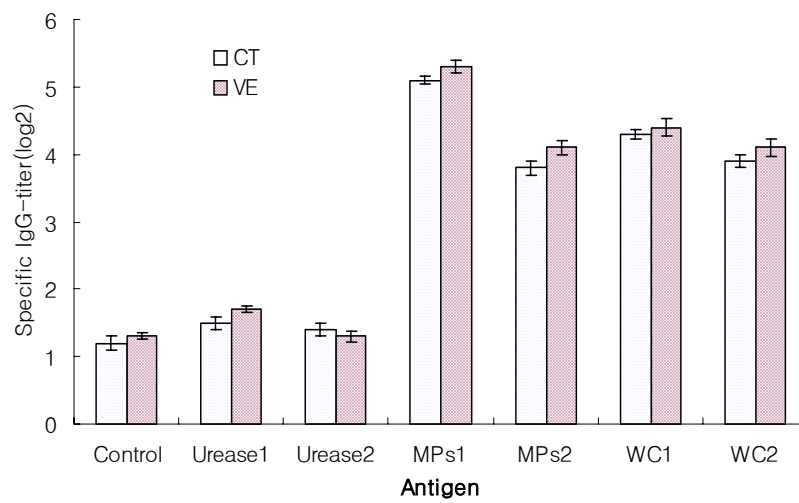


Fig. 4-11. *H. pylori*-specific IgG antibodies are individual antigens purified form *H. pylori*. The values are expressed as specific IgG by ELISA values(O.D.=405pyroi).

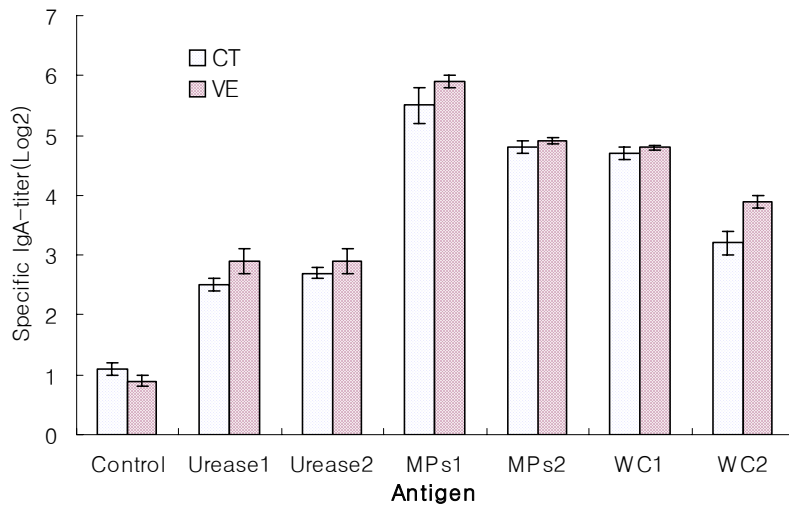


Fig. 4-12. *H. pylori*-specific IgA antibodies are individual antigens purified from *H. pylori*. The values are expressed as specific IgA by ELISA values (O.D.=405pyroi).

제 4 절 요약

본 연구에서는 *H. pylori* 항체 함유 면역우유를 생산하는데 있어서, 백신 개발의 기초 자료를 확보하기 위해서 균주 대량 배양, *H. pylori*의 균체, urease, outer membrane 항원의 특성을 조사하고, 각 항원과 adjuvant를 이용한 백신의 항체 생성능을 조사하였다.

균체 단백질 가운데 항원성 단백질은 7개이고 그 중 주항원성 물질은 분자량이 97, 66, 34kDa인 3개의 band를 확인할 수 있었다. Anti-*H. pylori* 항체를 함유한 우유의 *H. pylori* urease 활성 억제 효과는 반응 2시간 후에 *H. pylori*의 urease 활성을 90% 이상 억제하는 것으로 나타났다. 실험동물에 urease 100 μ g/200 μ l, 10 μ g/200 μ l, MPs(membrane proteins) 20 μ g/200 μ l, 10 μ g/200 μ l 와 W.C(whole cell) 200 μ g/200 μ l, 100 μ g/200 μ l로 항원량을 달리하고, adjuvant로 cholera toxin 5 μ g/200 μ l, vitamin E 5 μ g/200 μ l을 각 백신에 첨가하여 항체 역가를 측정 한 결과 IgG, IgA 공히 MPs1(20 μ g/200 μ l)

vitaminE5 μ g/200 μ l를 투여한 군에서 가장 높은 항체를 나타내었다.

제 5 절 참고문헌

1. Borody, T., Lenne, J. and Moore-Jones, D.: Is doxycycline more effective than tetracycline HCl in triple therapy of *Helicobacter pylori*? Gastroenterol., 98, A24 (1990)
2. Tabak, M., Armom, R., Potasman, I. and Neeman, I.: In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. J. Appl. Bacteriol., 80, 667-672 (1996)
3. Diker, K.S. and Hascelik, G.: The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. Letters in Applied
4. Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F. and Grayson, M.L.: In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. J. of Appl. Bacteriol., 79, 475-479 (1995)
5. Bhatia, S.J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. and Mehta, A.P.: *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* In vitro. J. of Clinical Microbiology, 27, 2328-2330 (1989)
6. Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976)
7. Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet 341:1359-1362. (1993)
8. Hussell, T., P. G. Isaacson, J. E. Crabtree, and J. Spencer. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. Lancet 342:571-574 (1993)
9. Peterson, W.L. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N. Engl. J. Med. 324:1043-1048 (1991)

10. Warren, J. R., and B. J. Marshall. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* I:1273–1275 (1983)
11. Hogan, J. S., W. P. Weiss, D. A. Todhunter, K. L. Smith, and P. S. Schoenberger. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J. Dairy Sci.* 75:415 (1992)
12. Nickerson, S. C. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187:41 (1985)
13. S. J. Czinn and J. G. Nedrud. Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity.* 2359–2363 (1991)
14. J. L. Penner and J. N. Hennessy. Passive hemagglutination technique for serotyping campylobacter fetus subsp. jejuni on the Basis of soluble heat-stable antigens. *Clinical Microbiology.* 732–737 (1980)
15. J. F. Mee, K. J. O'farrell, P. Reitsma and RAJ Mehra. Effect of a whey protein concentrate used as a colostrum substitute or supplement on calf immunity, weight gain, and health. *Dairy science.* 79:886–894 (1996)
16. P. Michetti, I. Cortesy-Theulaz, C. Davin, R. Haas, A.-C. vaney, M. Heitz, J. Bille, J.-P. Kraehenbuhl, E. Saraga and A. L. Blum. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology.* 107:1002–1011 (1994)
17. L. M. Sordillo, K. Shafer-weaver and d. Derosa. Symposium: Bovine Immunology. Immunobiology of the mammary gland *Dairy science.* 80:1851–1865 (1997)
18. J. S. Hogan, W. P. Weiss, K. L. Smith, D. A. Todhunter and P. S. Schoenberger. Vitamin E as an adjuvant in an *Escherichia coli* J5 vaccine. *Dairy science.* 76:401–407 (1993)
19. B. Nagy .Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. *Infection of immunity.*

21-24 (1980)

20. K. A. Eaton, C L. Brooks, D. R. Morgan and S. Krakowka. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and immunity*. 2470-2475 (1991)
21. S. J. Streatfield, J. M. Jilka, E. E. Hood, D. D. Turner, M. R. Bailey, J. M. Mayor, S. L. Woodard, K. K. Beifuss, M. E. Horn, D. E. Delaney, I. R. Tizard, J. A. Howard. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19:2742-2748 (2001)
22. K. Nagata, T. Mizuta, Y. Tonokatu, Y. Fukuda, H. Okamura, T. Hayashi, T. Shimoyama and T. Tamura. Monoclonal antibodies against the native urease of *Helicobacter pylori*: Synergistic inhibition of urease activity by monoclonal antibody combination. *Infection and Immunity*. 4826-4831.(1992.)
23. B. J. Marshall, MB.BS., F.R.A.C.P., J. Robin Warren, MB.BS., F.R.C.P.A., G. J. Francis, B.S., S. R. Langton, B.Sc., F.A.A.C.B., C. S. Goodwin, M.A., M.D., B. Chir., F.R.C.Path, Dip.Bact., F.R.C.P.A., E. D. Blincow. Rapid urease test in the management of *campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Gastroenterology*. 200-210. (1987)
24. M. J. Blaser, J. A. Hopkins, R. M. Berka, M. L. Vasil and Wen-lan L. Wang. Identification and characterization of *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins. *Infection and Immunity*. 276-284. (1983)
25. G. M. Tonita, D. A. Todhunter, J. S. Hogan and K. L. Smith. Immunization of dairy cows with an *escherichia coli* J5 lipopolysaccharide vaccine. *Dairy science*. 78:2178-2185. (1995)
26. T. G. Blambhard, S. J. Czinn, R. Maurer, W. D. Thomas, G. Soman and J. G. Nedrud. Urease-specific monoclonal antibodies prevent *Helicobacter felis* infection in mice. *Infection and immunity*. 1394-1399. (1995)
27. LI-Tai Hu and H. L. T. Mobley. Purification and N-terminal analysis of

- urease from *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity. 992-998. (1990)
28. B. Guy, C. Hessler, S. Fourage, J. Haensler, E. Vialon-Lafay, B. Rokbi and Marie-Jose Quentin Millet. Systemic immunization with urease protects mice against *Helicobacter pylori* infection. Vaccine. Vol 16 no. 8. 850-856. (1998)
29. E. Dick-Hegedus and A. Lee. Use of mouse model to examine Anti-*Helicobacter pylori* agents. School of Microbiology, University of New South Wales. 911-915.

제 5 장 면역우유 가공적성 검토 및 이를 이용한 기능성 유제품개발

제 1 절 서 론

우유는 사람이 요구하는 영양소의 비율에 가장 가까운 조성을 이루고 있고 또한 소화 이용되기 쉬운 형태로 구성되어 완전식품으로 불려질 만큼 가장 이상적인 건강영양식품이다. 우유에는 지방, 단백질, 유당 등 대량 영양소 이외에도 건강증진효과가 있는 Ca 등의 무기질과 비타민B 등의 미량영양소 역시 균형있게 함유되어 있어 성장기 어린이뿐만 아니라 성인과 노인에게도 권장되는 완전식품이다. 또한 우유는 영양섭취와 건강증진 측면에서 다른 어떤 식품보다 중요하다고 할 수 있으며 장기적인 보관과 음용을 위해 원유 중의 병원성 미생물 사멸과 효소를 불활성화 시키는 가열처리 과정을 필요로 하고 있다. 우리나라 우유의 살균 또는 멸균 공정은 63~65℃에서 30분간 처리하는 저온장시간 살균법(LTLT : Low Temperature Long Time), 72~75℃에서 15초~20초간 처리하는 고온단시간 살균법(HTST : High Temperature Short Time), 130~150℃에서 0.5초~5초간 처리하는 초고온순간처리법(UHT : Ultra High Temperature)으로 실시하도록 되어있다.(1-3) 90년대에 들어 세계적으로 우유 및 유제품의 위생관리와 안전성에 중점을 두고 위생품질의 고급화를 위한 많은 연구가 진행되었고, 위생등급제의 시행으로 국내산 원유의 품질향상과 함께 유제품의 물리화학적 특성과(같은 글이 반복되어 있었어요) 풍미 및 조직성분에 관한 연구가 수행되고 있으며(4), 이 등은 우유에 수용성 chitosan을 첨가하여 이화학적 및 관능적 특성을 조사한 결과 chitosan을 첨가한 우유에서 pH와 산도, 점도의 변화는 거의 없었지만, 미생물의 생육이 억제되었다고 보고한바 있다.(5) 뿐만 아니라 우유가 가지는 영양적, 기능적 결점을 보완하고 생리적 활성을 강화하기 위해서 일부 기능성 식품소재의 적

절한 이용이 연구되고 있으며, 대표적으로 기능성 올리고당, 식이섬유, 여러 가지 기능성 peptide, ω -3계열 지방산인 DHA, EPA 및 chitin, chitosan 등이 첨가된 시유가 개발, 연구되고 있다.(6)

발효 유제품은 인류의 건강증진 효과와 장수를 도와주는 식품으로 끊임없이 그 가치를 인정받고 있으며(7), 우유의 영양과 소화율이 향상된 것으로 독특한 풍미로 인해 세계적으로 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 발효유제품의 식품학적 또는 건강증진의 기능으로는 식품의 영양가치의 향상, 장내 균총의 균형 유지에 의한 소화기 건강향상, 유당 소화의 개선 및 유단백질의 흡수증진, 부패 및 병원성 세균의 증식억제 및 장내 유용균의 증식촉진 등이 있으며 그 외 항암작용, 면역계 자극, 혈청콜레스테롤의 저하 등의 의약적 효과에 대해서도 밝혀지고 있다. 발효유제품의 역사가 짧은 우리나라도 여러 가지 기능성 물질을 함유하는 다양한 식품을 원료로 하여 영양 요구성과 기호성을 충족하기 위한 목적으로 새로운 형태의 발효유제품 개발이 시도되고 있다.(8-10) 현재까지 조직감 등의 풍미 개선 효과를 위해 사용된 발효 기질로서 대두단백질, 보리와 옥수수(11), 고구마와 호박(12), 곡류, 두유와 현미(13), 난백분말(14), 식혜(15), 꿀밤가루(16) 등이 이용되었고, 미량성분의 강화 효과 및 기능성 기질로서는 인삼 extract(17), 알로에(18), vitamin A, vitamin C, 대추 extract, 포도와 사과 과즙(19), 구기자(20), 쑥 extract(21), 황기 extract, 솔잎, 오디, 매실(22), 오미자(23), 삼백초(10) 등의 연구가 진행되었다.

Helicobacter Pylori(*H. pylori*)는 그람음성 간균으로 미세호기성으로 만성위염의 가장 큰 원인이며, 소화성 궤양의 원인인자로 위궤양 환자의 70-80%가 *H. pylori*균을 가지고 있으며 십이지장궤양 환자의 90% 이상이 가지고 있다. 또한 위암 발생과도 밀접한 관련성이 있는 것으로 증명되어 기존의 위, 십이지장 질환의 치료와 관리에 많은 변화를 가져오고 있다(24). 이 균의 감염경로는 입과 입의 접촉이나 음식물을 통한 경구 감염이 주된 것으로 보고되고 있으며, 감염 요인으로 사회 경제적 여건, 식생활, 특히 소금에 절인 음식 등이 지적되고 있으나 아직 불확실한 것이 많다(25). 일반적으로 H, K-AT-Pase의 활성저해제를 포함한 2종 이상의 항생제 투여가 *H. pylori*의 근절에 유효한 것으로 알려져 있으나, 부작용과 pH의 상승으로 인한 *H. pylori*에의 재감염 위험, 내성균의 출현 등이 큰 문제점으로 지적되고 있다(26). 최근에 lactobacilli

가 *H. pylori* 감염에 대해 억제 작용이 있다고 보고되고 있다(27). 시험관 내에서 lactobacilli가 *H. pylori*의 성장을 억제할 수 있다는 논문도 발표되고 있으며(28), *L. acidophilus*와 *L. casei*에 의한 *H. pylori*의 활성억제는 pH변화와 lactobacilli가 생산하는 젖산과 초산 때문이라고 Midolo 등(29)이 보고하였다. 또한, *H. pylori* 치료시 보통 두가지 또는 세가지 약제를 쓰는데 *H. pylori*에 저해활성이 있는 특정 lactobacilli 종의 병용치료 효능을 보고하는 임상연구가 발표되고 있다(30). Omeprazole와 amoxicillin의 병행투여와 살아있는 *Lactobacillus acidophilus*를 투약한 결과 *H. pylori*를 근절할수 있다고 De Francesco V 등이 보고하였다(31).

현재 일부 유업체에서는 발효유와 가공유에 정제된 IgY 성분을 첨가하여 시판중인 것도 있으나, 착유된 원유를 살균처리하여 마시는 일반 시유에 천연적으로 항 *H. pylori* 성분이 함유된 것은 아직 전무한 상태이다. 이에 본 연구에서는 *H. pylori*를 항원으로 항원항체 반응의 특성을 이용한 방법으로 젖소에 면역시켜 특이항체가 함유된 원유를 이용한 고기능성 제품을 개발하고자 특이항체가 함유된 원유의 살균조건을 규명하고, 면역우유의 품질특성과 면역활성의 변화를 측정하였으며 면역우유를 이용한 발효유제품의 개발가능성을 검토하기 위해 발효과정중과 발효제품의 저장 기간 중 품질변화와 면역활성의 변화를 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시 시료(재료)

본 실험에 사용된 시료는 경상북도 축산기술연구소에서 백신을 투여한 홀스타인종의 젖소에서 착유한 *H. pylori* 항체를 가진 원유를 사용하였다.

2. 원유의 열처리

우유의 최적 살균조건을 알아보기 위해 착유후 냉각된 원유를 2 mL를 gold band ampoule(Weaton Co., USA)에 각각 분주하여 Water bath를 이용하여 60℃에서 30분,

75℃에서 15초, 30초, 60초 그리고 100℃에서 10초, 20초, 30초 동안 열처리 하였다. 열처리 후 ice water에서 급냉시켜 4℃에 보관하면서 pH, 산도, 미생물 수, 면역활성을 측정하였다.

3. pH 측정

pH는 pH meter(ORION 410A, Orion Research Ins USA)를 사용하여 실온에서 측정하였다.

4. 산도 측정

시료 10mL 채취한 후 0.1N NaOH로 pH 8.3이 될 때까지 digital burette(WITEG TITREX 2000)로 적정하였으며, 0.1N NaOH 소비량을 lactic acid%로 환산하였다.

$$\text{총산도(\%)} = \frac{\text{mL of 0.1N NaOH} \times 0.009 \times \text{factor of 0.1N NaOH}}{\text{시료량}} \times 100$$

5. 미생물 수 측정

미생물 수를 측정하기 위해 sample 1mL를 채취하여 0.1% peptone 용액으로 적정 희석한 후 pour plate method로 생균수를 측정하였다. 총균수는 Plate Count Agar(PCA, Difco, USA)를 이용하였으며, 대장균수는 Violet Red Bile Agar(VRBA, Difco, USA), 유산균수는 MRS Agar(Difco, USA)를 이용하여 각각 37℃에서 24~48 시간동안 배양한 후 나타난 colony를 계수하였다.

6. 면역활성 측정을 위한 sample의 전처리

채취한 우유 sample은 4℃에서 14,000rpm, 30분동안 원심분리하여 고형분을 제거하고 1N-HCl로 pH 4.6으로 조절한 후 4℃에서 3,000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 casein을 제거하였다. Casein이 제거된 유청(whey)을 1N-NaOH로 pH 7.0으로 조절 후 -20℃에 보관하면서 ELISA분석에 이용하였다.(32)

7. 항체의 역가 측정

*Anti-H. pylori*에 대한 우유의 상대적인 농도를 측정하기 위해 면역학적 방법인 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 비교 측정하였다.

*H. pylori*를 0.5% formalin용액으로 불활성처리(3hrs)하고 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.2)용액으로 3회 세척 후 Sonicate(pulse 20, duty cycle 50)한 균을 405pyroi에서 coating buffer(50mM carbonate buffer, pH 9.6)로 O.D=0.5로 조절한 다음 immunoglobulin 96 well plate에 100 μ l씩 coating 하고 over night(4 $^{\circ}$ C)하였다. 항원 coating시 bovine IgG(Sigma A0706 whole molecule AP conjugate)를 standard로 coating하였다. 각 well을 washing buffer(10mM PBS, pH 7.4, 0.5% Tween 20)로 3회 세척 후 blocking액(PBS pH 7.4, 5% skim milk) 150 μ l 넣고 실온에 30분 이상 방치 후 washing buffer로 3회 세척한다. Casein이 제거된 유청을 washing buffer로 희석한 다음 well에 100 μ l씩 넣고 실온에 2시간 방치한다. 세척 후 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 2차 항체로써 1 : 30,000으로 washing buffer에 희석하고 well에 100 μ l씩 넣고 실온에 1시간 방치한다. 3회 세척 후 기질용액(10% diethanolamine buffer, 1% phosphatase substrate(Sigma 104))을 100 μ l씩 넣은 후 30분 반응 후 반응 정지액(3N-NaOH) 50 μ l씩 넣어 반응을 정지시키고 405pyroi에서 흡광도를 측정하였다.(32)

8. 면역우유의 저장성

면역우유의 저장성을 검토하기 위해 60 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 중탕으로 열처리를 한 후 얼음물에서 급냉시키고 100mL씩 개별 포장하여 2 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C에서 저장하면서 7일 간격으로 pH, 적정산도, 총균수, 면역활성의 변화를 측정하여 일반시유와 비교하였다.

9. starter의 분리 및 선발

가정용 김치를 시료로 0.02% sodium azide가 함유된 MRS Agar(Difco, USA)를 이용하여 유산균 50균주를 분리하였다. 분리한 균주를 요구르트 starter용으로 적합한 균주를 선발하기 위하여, gas 생성, curd 생성력 유무, 관능검사, 성장검사를 실시하였다.

Gas 생성유무는 hot loop test를 사용하여 측정하였으며, curd 생성 유무는 멸균우

유에 분리균주를 각각 접종하여 48시간 배양후 curd 생성유무를 관찰하였다. 성장 검사는 선발된 유산균을 MRS broth에 선접종하여 37℃에서 24시간 배양하면서 UV spectrophotometer(UV Trospec 1000, Pharmacia Biotech, England)를 사용하여 600nm에서 OD를 측정하였다. pH는 pH meter (Orion 410A, Orion Research Inc. USA)를 사용하여 측정하였다. 관능검사를 위해 분리균주 및 상업균주를 이용하여 요구르트를 제조하였고 관능요원 10명을 선발한 후 맛, 풍미, 조직감, 종합적 기호도에 관해 5점 채점법을 실시하였다.

10. Starter culture 조제

김치에서 분리한 CU-21균주와 HANSEN에서 구입한 혼합균주(Lactobacillus acidophilus LA-5, Bifidobacterium BB-12, Streptococcus thermophilus)인 ART-3을 10% skim milk에 접종하여 37℃에서 24시간 배양후 starter로 사용하였다.

11. 요구르트의 제조 및 품질 변화 측정

면역우유에 3%(v/w %)의 skim milk를 첨가하여 60℃에서 30분간 열처리한 후 45℃정도로 냉각시킨 후 starter를 접종(우유량의 3%)하여 37℃에서 24시간 발효시켜 요구르트를 제조하였다. 발효과정중의 요구르트와 품질 변화를 측정하기 위해 발효 개시 후 6시간 간격으로 sample을 채취하여 실험하였고 발효후의 요구르트의 저장 중 품질 변화를 측정하기 위해 7일 간격으로 sample을 채취하여 상기와 같은 방법으로 pH, 산도, 미생물, 면역활성의 변화를 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 살균 온도에 따른 면역 우유의 품질 변화

면역우유의 기능을 유지하고 미생물학적 안정성을 확보하기 위해 열처리는 필수적인 가공공정이다. *H. pylori* 항체를 가진 원유의 열처리에 온도에 따른 품질 특성과 면역 활성의 변화를 검토하기 위해 면역우유를 60℃에서 30분, 75℃에서 15초, 30초,

60초, 100℃에서 10초, 15초, 30초 동안 열처리한 후 pH, 산도, 미생물 검사와 면역 활성을 측정하였다.

가. 미생물의 변화

Fig. 5-1과 5-2는 *H. pylori* 항체를 가진 원유의 열처리후의 총균수와 coliform bacteria를 나타낸 결과이다. 원유의 경우 10^5 CFU/mL의 균수를 나타내었고 60℃에서 30분 열처리한 것은 10^3 CFU/mL 정도의 균수를 나타내어 원유에 비해 약 2 log cycle 정도 낮게 나타났다. 75℃에서 15초, 30초, 60초 처리한 우유의 총균수는 각각 10^2 , 10^2 , 약 10^1 CFU/ mL의 균수를 나타내어 원유에 비해 3 - 4 log cycle 정도 균수가 감소하였고 100℃에서 열처리한 구는 모두 균이 관찰되지 않아 열처리 온도가 높을수록, 같은 처리온도에서 열처리 시간이 증가할수록 원유에 비해 균 감소율이 증가하였다. Coliform bacteria의 경우는 원유에서 10^2 CFU/mL이 관찰되었으나 열처리구의 경우 모든 처리온도와 시간대에서 균이 관찰되지 않았다.

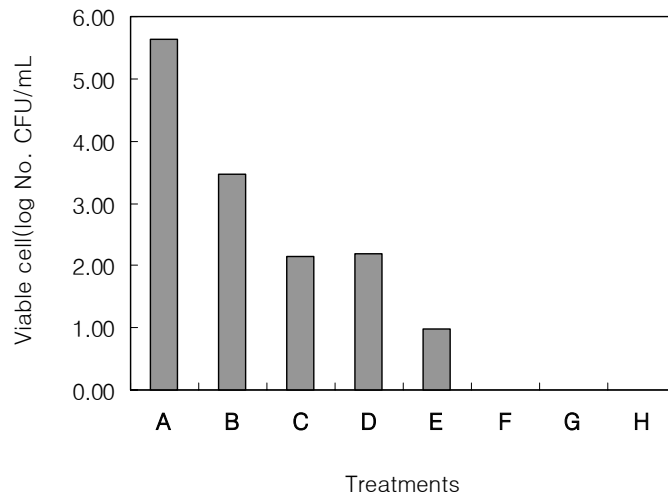


Fig. 5-1. Change in total bacteria of milk immunized with some *Helicobacter pylori* antigen after heat treatment

A: raw milk B: 30min at 60℃ C: 15sec at 75℃ D: 30sec at 75℃ E: 60sec at 75℃ F: 10sec at 100℃ G: 20sec at 100℃ H: 30sec at 100℃

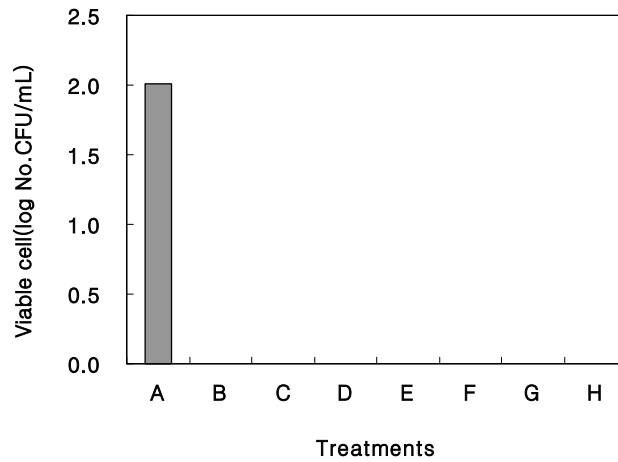


Fig. 5-2. Change in coliform bacteria of milk immunized with some *Helicobacter pylori* antigen after heat treatment

All abbreviation are the same as Fig. 5-1.

나. pH와 산도의 변화

Fig. 5-3은 열처리 온도와 시간에 따른 면역우유의 pH와 산도를 나타낸 결과이다. 원유의 pH는 6.35이고 60℃에서 30분 열처리한 것은 6.28, 75℃에서 15초, 30초, 60초 동안 열처리 한 우유의 pH는 각각 6.30, 6.26, 6.23을 나타내었고, 100℃에서 10초, 15초, 30초 열처리한 우유의 pH는 각각 6.25, 6.22, 6.27을 나타내어 열처리 온도가 높아 질수록, 열처리 시간이 증가 할수록 다소 낮아지는 경향을 나타내었으나 원유의 pH와 뚜렷한 차이는 나타내지 않았다.

산도의 경우(Fig. 5-4), 원유는 0.23%를 나타내었고 60℃에서 30분 열처리한 우유는 0.18%를 나타내어 원유에 비해 낮은 산도를 나타내었으나 75℃와 100℃ 열 처리구는 원유의 산도와 유사한 경향을 나타내었다.

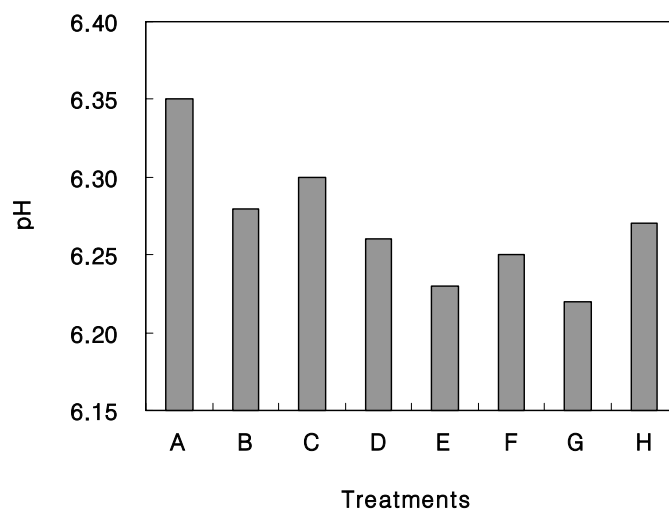


Fig. 5-3. Change in pH of milk immunized with some *Helicobacter pylori* antigen after heat treatment

All abbreviations are the same as Fig. 1.

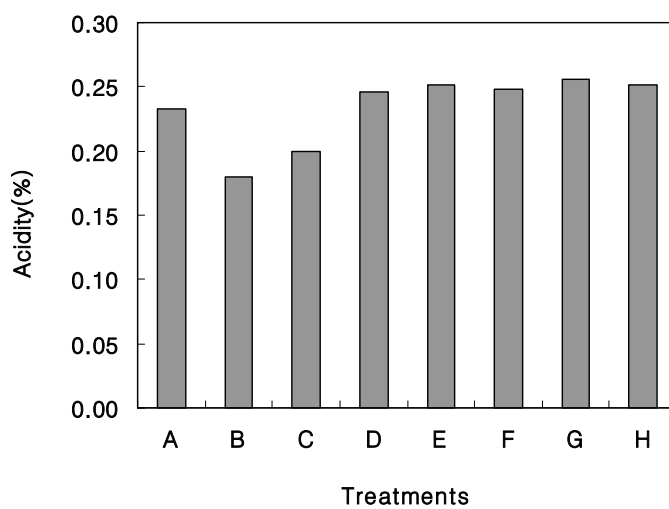


Fig. 5-4. Change in titratable acidity of milk immunized with some *Helicobacter pylori* antigen after heat treatment

All abbreviations are the same as Fig. 1.

다. 면역활성의 변화

Fig. 5-5는 *H. pylori* 항체를 함유한 원유를 각각의 온도와 시간별로 열처리한 후 각 시료의 면역활성을 측정된 결과이다. 원유에서는 8.392 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IgG가 관찰되었으며 60°C에서 30분동안 열처리한 우유에서는 8.391 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IgG가 관찰되어 열처리 후에도 99.9(약 100)%의 면역활성을 나타내었다. 75°C에서 처리한 경우 15초, 30초, 60초 열처리에 의해 각각 항체의 활성이 47.3%, 38.3%, 32.6%를 나타내어 면역 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 100°C 열처리구의 경우, 75°C 열처리구보다 더 낮은 면역 활성을 나타내었으며, 10초, 20초, 30초 열처리에 의해 각각 13.4%, 14.7%, 14.7%의 항체 활성을 나타내었다. *H. pylori* 항체를 함유한 원유의 면역 활성은 열처리 온도가 높을수록 낮게 나타났고 75°C 이상의 열처리에 의해서는 면역 활성이 급격하게 감소하여 약 50%이하로 낮게 나타나 면역우유의 열처리 조건으로는 부적절한 것으로 판단되었다. 박(32)은 IgG의 열에 대한 안정성을 검토한 결과 60°C에서 60분간 안정하였고, 75°C에서 60분경과 후 전체적인 활성이 40% 감소하였으며, 100°C에서는 1분간 안정하였으나, 3분 이후부터는 거의 활성이 없다고 보고하여 본 실험과는 다소 다른 결과를 나타내었다. Morales 등(33)은 첨가물이 항체의 열에 대한 안정성에 영향을 끼친다고 보고하였으며 Chen 등(34)은 설탕용액을 IgG와 IgY를 첨가하였을 때 열에 대한 방어효과가 있다고 보고하였다.

본 실험의 결과 60°C에서 30분 열처리한 경우가 총균수에서는 다른 열 처리구에 비해 다소 높게 나타났지만 식품공전상의 기준 세균수인 2×10^4 CFU/mL보다 낮게 검출되었으며 Coliform bacteria도 음성으로 관찰되어 미생물학적 품질은 양호하였으며 또한 IgG의 활성 또한 100% 유지되어 면역우유의 열처리 조건은 60°C에서 30분간이 적절한 것으로 판단되었다.

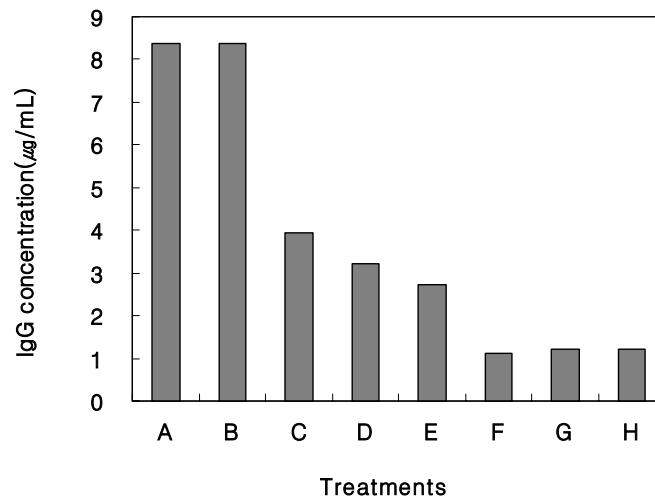


Fig. 5-5. Change in IgG concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) of milk immunized with some *Helicobacter pylori* antigen after heat treatment

All abbreviation are the same as Fig. 1.

2. 면역우유의 저장성

우유의 저장기간 동안 면역우유의 가장 중요한 기능인 면역 활성의 변화와 품질변화를 측정하기 위해 *H. Pylori* 항체를 함유한 원유를 60°C에서 30분 동안 열처리한 후 무균적으로 100mL씩 단위로 나누어 2°C, 4°C 그리고 10°C에서 저장하면서 면역우유의 미생물의 변화, pH, 산도 및 면역 활성의 변화를 일반우유와 비교 측정하였다.

가. pH 및 산도의 변화

우유의 저장 중 pH의 변화는 fig. 5-6에서 보는 바와 같이 pH는 저장 21일 동안 2°C와 4°C에 저장한 경우 원유의 pH 6.78에서 저장온도에 따른 뚜렷한 변화는 관찰할 수 없었으며, 10°C에 저장한 경우 저장 7일 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내어 저장 14일째 pH 4.63으로 부패양상을 나타내었다. 저장 중 pH의 변화는 면역우유와 일반 시유와 유사한 경향을 나타내었다.

Fig. 5-7은 저장 중 산도의 변화를 나타낸 결과이다. pH와 유사한 경향을 나타내어 2°C와 4°C에 저장한 경우 저장기간이 경과함에 따라 초기 산도에 비해 뚜렷한 변화를

관찰 할 수 없었으며 10℃에 저장한 경우 저장 7일 이후 산도가 증가 하는 경향을 나타내었다.

나. 미생물 변화

열처리 우유의 저장 중 총균수의 변화는 fig. 8에서 보는 바와 같다. 저장 초기 10^3 CFU/ml에서 2℃와 4℃에 저장한 처리우유의 총균수는 저장 21일 동안 뚜렷한 증가현상을 관찰할 수 없었으며 10℃에 저장하였을 경우 저장 7일 까지는 완만한 증가 현상을 보였으나 7일 이후 급격히 증가하여 저장 14일 쯤 10^8 CFU/ml로 부패현상을 나타내었다. 저장 중 총균수의 변화 양상은 pH와 산도의 변화와 일치하는 경향을 나타내었다. 저장 중 면역우유와 일반우유와의 품질변화는 유사한 경향을 나타내어 *Helicobacter pylori* antigen을 처리한 면역우유의 일반 품질 및 저장성은 일반 시유와 유사한 것으로 판단되었다.

다. 면역활성의 변화

열처리에 의한 저장 중 면역 활성의 변화를 알아 보기위해 면역우유를 60℃에서 30분간 열처리한 처리구와 열처리하지 않은 무 처리구를 2℃, 4℃ 그리고 10℃에 21일간 저장하면서 각각 면역 활성의 변화를 관찰한 결과는 fig. 9에서 보는 바와 같다. 열처리에 의한 면역 활성의 변화는 열처리 전 $11.03\mu\text{g/mL}$ 의 IgG가 관찰되었으며, 열처리 후는 $10.17\text{-}10.72\mu\text{g/mL}$ 의 IgG가 관찰되었다. 면역우유의 저장 중 면역활성의 변화는 저장 온도에 관계없이 저장 14일 까지는 저장초기의 활성에 비해 뚜렷한 차이는 나타나지 않았으나 14일 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 저장 14일째 열처리한 면역우유의 활성은 2℃, 4℃, 10℃ 에서 각각 $9.87, 10.07, 10.58\mu\text{g/mL}$ 의 IgG가 관찰 되었으며, 열처리하지 않은 면역우유의 활성은 2℃, 4℃, 10℃에서 각각 $10.24, 10.17, 10.17\mu\text{g/mL}$ 의 IgG가 관찰되었다. 10℃에서 저장한 면역우유의 경우 저장 14일 까지 양호한 면역활성을 나타내었으나 식품공전상의 세균기준과 산도기준에는 부합되는 것으로 나타나 우유의 저장온도로는 부적당한 것으로 판단된다.

이상의 결과로 미루어 보아 면역우유의 저장성은 일반시유의 저장성과 유사한 것으로 판단되었으며 저장 14일까지 높은 수준의 면역 활성을 나타내어, 면역우유의 저온

유통은 면역활성에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

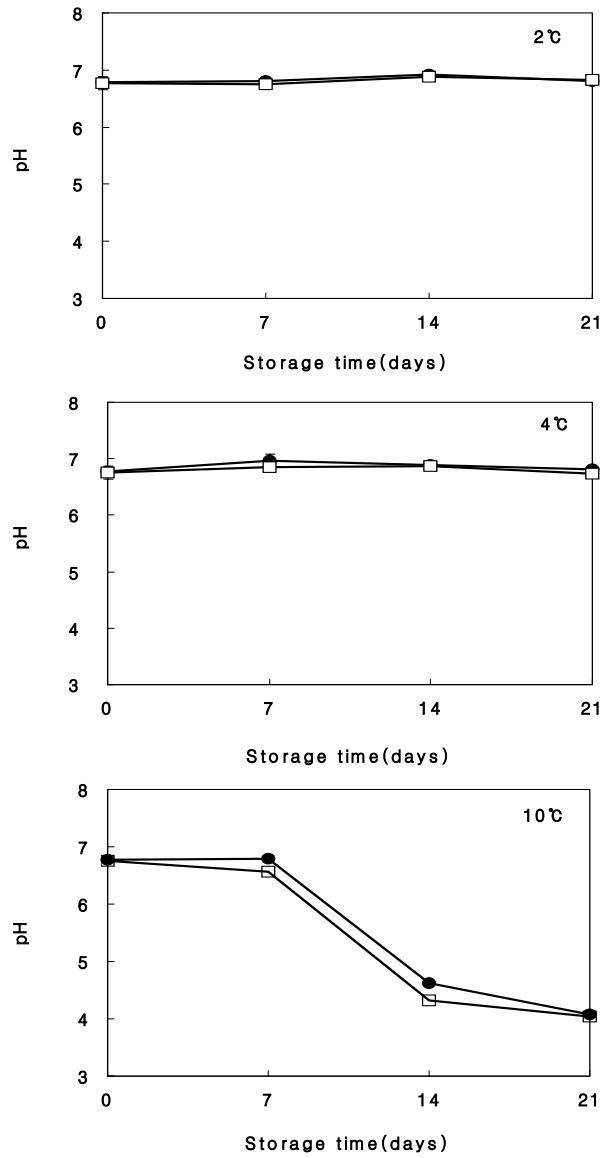


Fig. 5-6. Change in pH of milks during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C after heat treatment for 30min at 60°C

- : Immunized milk with some *Helicobacter pylori* antigen
- : Non-immunized milk

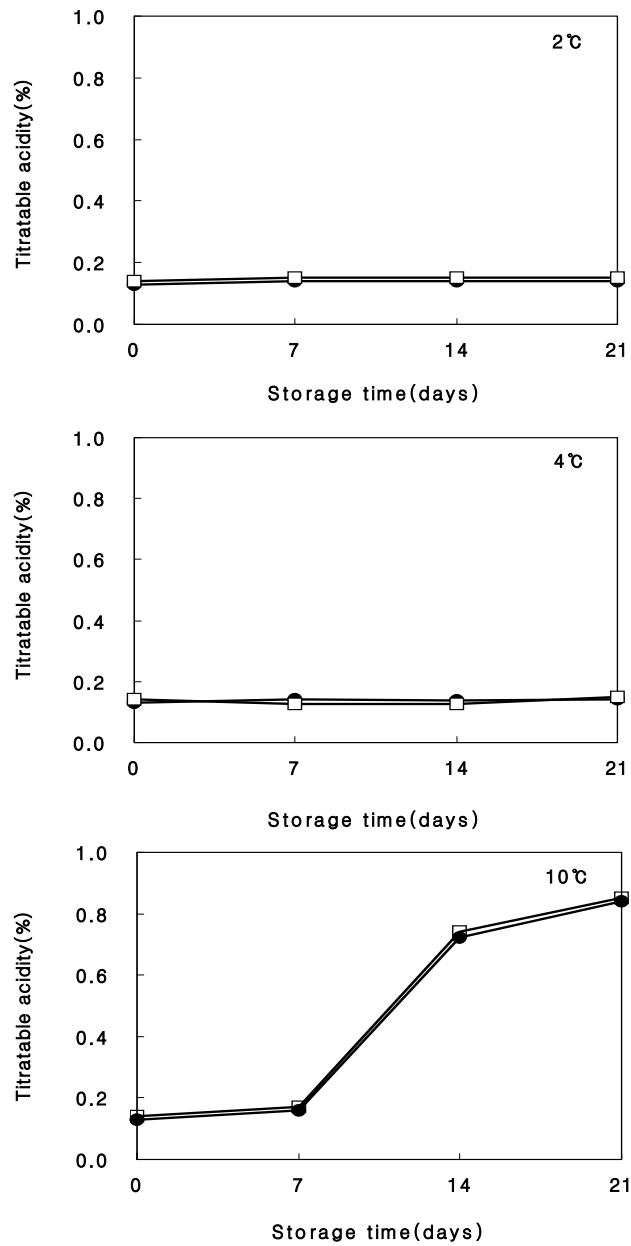


Fig. 5-7. Change in titratable acidity of milks during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C after heat treatment for 30min at 60°C

● : Immunized milk with some *Helicobacter pylori* antigen

□ : Non-immunized milk

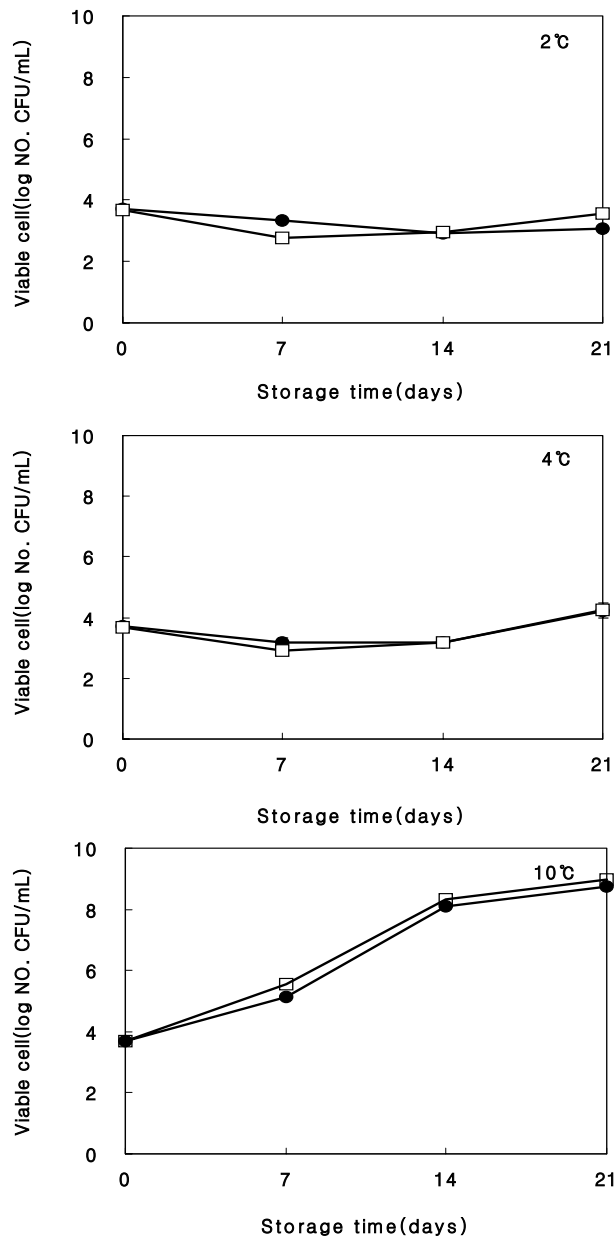


Fig. 5-8. Change in total bacteria of milks during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C after heat treatment for 30min at 60°C

- : Immunized milk with some *Helicobacter pylori* antigen
- : Non-immunized milk

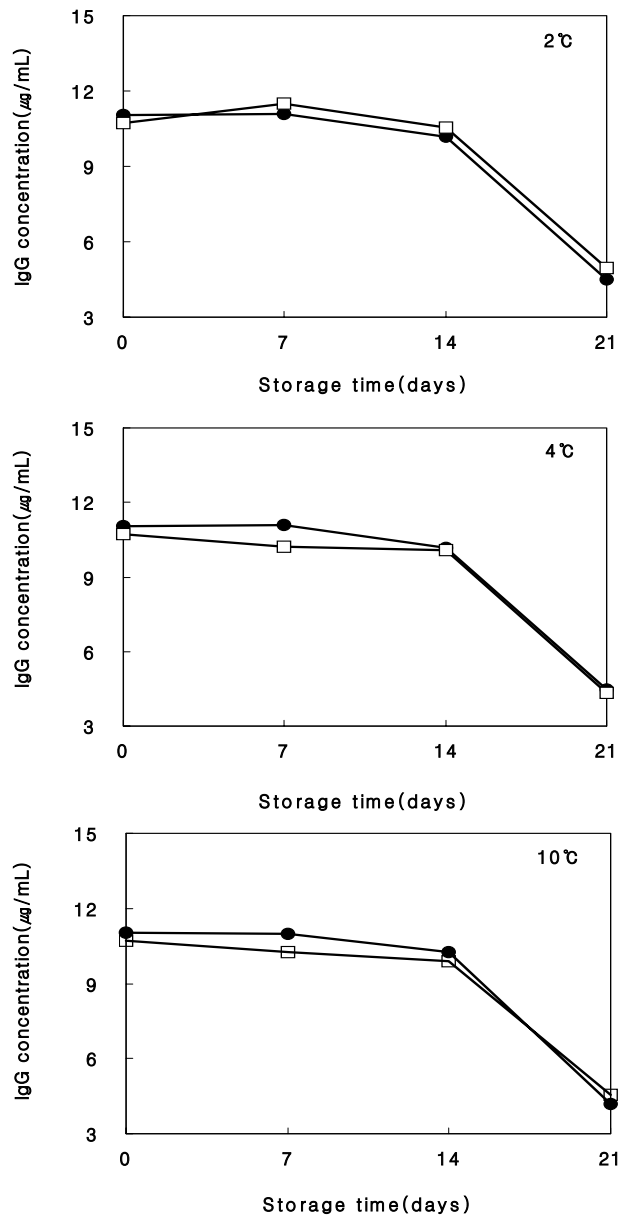


Fig. 5-9. Change in IgG concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) of milk immunized with some *Helicobacter pylori* antigen during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C

- : immunized milk without heat treatment
- : immunized milk after heat treatment for 30min at 60°C

3, 요구르트 제조용 starter 선발 및 면역우유를 이용한 요구르트 제조 특성

가. 김치에서 요구르트starter용 유산균 분리

일반 가정김치 30점을 사용하여 50균주의 유산균을 분리하였다. 분리한 유산균 중 요구르트 starter로 사용 가능한 정상 발효 유산균을 발효 중 gas 생성 유무를 측정하여 정상발효유산균을 15균주 선발하였다. 발효중 gas를 생성하지 않는 정상발효유산균 15균주를 멸균우유에 각각 접종하여 37℃에서 48시간 배양후 curd 생성유무를 측정한 결과를 Table 5-1에 나타내었다. 15 균주중 curd를 형성하는 5균주를 선발한 후 이들 선발 5균주를 이용하여 요구르트를 제조하여 풍미와 종합적 기호도를 측정한 결과 CU-2와 CU-21균주가 요구르트 sarter로 적합할 것으로 판단되었다.

Table 5-1. Characteristics of lactic bacteria isolated from kimchi

strain No.	Ho/He	Curd Formation	Sensory Test		Result
			Flavor	Overall acceptability	
CU-2	Ho ¹	+++ ²	3.8 ³	3.9	*
CU-5	Ho	+			
CU-7	Ho	++			
CU-10	Ho	+++	3.2	3.0	
CU-13	Ho	-			
CU-16	Ho	+			
CU-17	Ho	++			
CU-20	Ho	+			
CU-21	Ho	+++	4.1	4.2	*
CU-24	Ho	+			
CU-30	Ho	+++	3.2	3.1	
CU-32	Ho	+			
CU-33	Ho	+++	3.1	3.2	
CU-37	Ho	+			
CU-41	Ho	-			

¹. HO/He : Homofermentative / Heterofermentative

². +++ : good, ++: moderate, +: poor, -: none

³. 5: Very good, 4: Good, 3: Moderate, 2: Poor, 1: Very poor

나. 선발균주의 성장비교

starter용 유산균으로 선발된 CU-2와 CU-21균주를 37℃에서 24시간 배양하면서 성장을 비교 측정된 결과는 fig. 5-10에서 보는바와 같이 CU-21균주가 배양 8시간째부터 급격히 성장하였으며 16시간 이후 성장은 관찰되지 않았다. 반면 CU-2 균주는 배양 12시간째부터 성장하기 시작하여 배양 20시간째 이후 성장은 관찰되지 않았다. CU-21은 CU-2보다 산생성력이 강하며, 성장이 양호한 결과를 나타내어 배양시간을 단축할 수 있고, 기호성이 면에서도 우수하여 향후 실험에는 요구르트 제조용 starter로 CU-21균주를 선발 사용하였다.

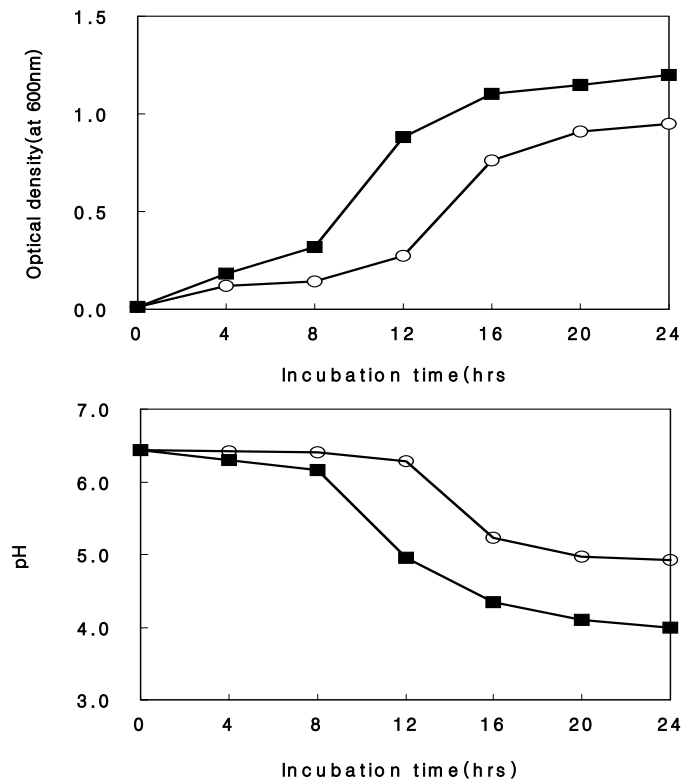


Fig. 5-10. Growth of CU-2 and CU-21 in MRS broth for 24hrs at 37℃

○ : CU-2 ■ : CU-21

다. CU-21과 ART-3를 이용한 요구르트 제조중의 발효 특성비교

선발 유산균과 상업용 균주의 요구르트 발효 특성을 검토하기 위해 김치 유래 유산균 중 요구르트 제조용 starter로 선발된 CU-21과 상업용 균주인 ART-3을 열처리한 면역우유에 starter culture로 첨가하여 발효시키면서 발효과정 중의 pH와 산도 미생물 변화를 측정하였다. 발효과정중의 pH와 산도 변화는 fig. 5-11에 나타내었다. CU-21과 ART-3균주 모두 배양 6시간째까지 급격히 pH가 감소하였으며 배양 6시간 이후부터는 뚜렷한 pH의 증가가 관찰되지 않았다. ART-3의 경우 발효 전 기간에 걸쳐 CU-21의 pH보다 다소 낮게 나타났다. 이러한 경향은 산도의 증가에서도 유사하게 나타났다. 유산균수의 변화는 fig. 5-12에서 보는 바와 같다. ART-3은 배양 6시간째까지 급격히 증가하여 10⁹ CFU/mL의 균수를 나타내었고 배양 6시간 이후부터는 뚜렷한 균성장의 변화는 관찰되지 않았으며 배양 전기간 동안 10⁹ CFU/mL이상의 균수를 유지하였다. CU-21의 경우도 배양 6시간째까지는 급격한 균성장을 나타내다가 배양 6시간 이후부터는 10⁸ CFU/mL의 균수를 유지하여 ART-3의 경우와 유사한 경향을 나타내었으나 배양 전 기간에 걸쳐 ART-3에 비해 다소 낮은 유산균수를 유지하였다. 요구르트 제조후 유산균수가 ART-3가 CU-21에 비해 약 1 log 정도 높게 나타났으며 curd의 형성도 양호한 경향을 나타내었다.

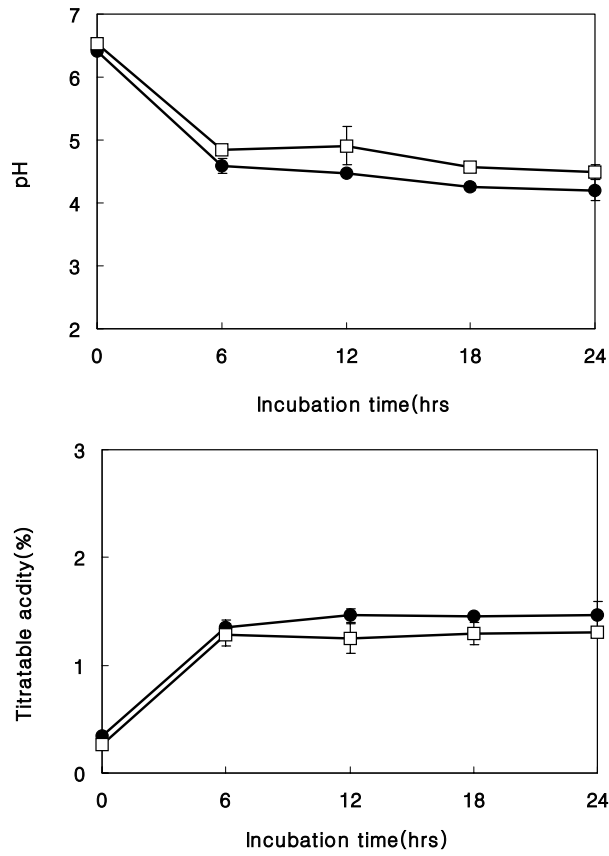


Fig. 5-11. Change in pH and titratable acidity of immunized milks added lactic acid bacteria ART-3 and CU-2 starter culture during ferment for 24 hrs at 37°C

● : ART-3 □ : CU-2

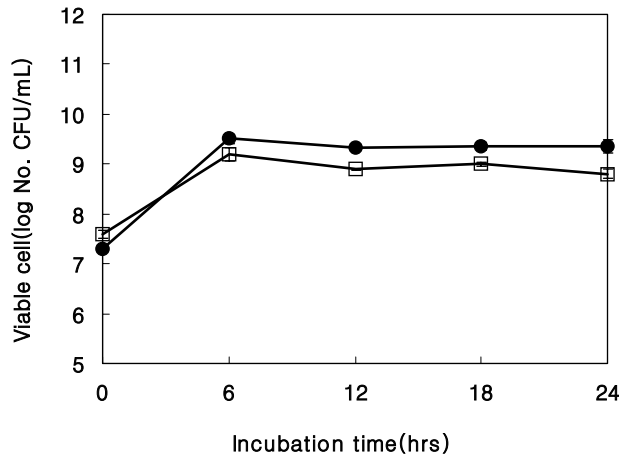


Fig. 5-12. Effect of stater on growth of lactic acid bacteria in immunized milks during fermentation for 24 hrs at 37°C

● : ART-3 (Commercial starter) □ : CU-21 (Isolated strain)

라. 분리균주와 상업용균주로 제조한 요구르트의 기호성 비교

김치에서 분리한 유산균 CU-21과 상업용 starter인 ART를 이용하여 요구르트를 제조하여 관능적 특성을 비교한 결과는 Table 5-2에서 보는 바와 같다. 분리균주로 제조한 요구르트의 기호성은 양호한 결과를 나타내었으나 상업용 균주에 비해 기호성이 저조한 결과를 나타내었다. 특히 CU-21 균주를 starter로 사용한 요구르트의 경우 풍미가 4.0을 나타내어 우수한 반면 맛과 조직감이 각각 3.2와 3.1을 나타내어 다소 저조한 경향을 나타내었다. 성장특성과 관능검사결과 CU-21 균주는 요구르트 starter로서의 사용 가능할 것으로 판단되었으나, 요구르트의 제조는 starter로서의 기능이 보다 우수한 ART-3를 선발하여 다음 실험에 사용하였다,

Table 5-2. Effect of starter on Sensory characteristics of yogurts

sensory test	starter culture	
	CU-21	ART-3
Taste	3.2±0.57 ^{1,2}	3.9±0.47
Flavor	4.0±0.48	4.2±0.48
Texture	3.1±0.32	4.2±0.52
Overall acceptability	4.0±0.47	4.3±0.48

¹ Mean +- standard deviation

² 5: Very good, 4: Good, 3: Moderate, 2: Poor, 1: Very poor

마. 요구르트의 면역활성

Fig. 5-13은 열처리 전·후 면역 우유와 ART-3을 starter culture로 사용하여 제조한 요구르트의 면역 활성을 비교한 결과이다. *H. pylori* antigen을 가진 원유와 열처리 면역우유 그리고 요구르트의 IgG의 함량은 각각 11.10 μ g/mL, 10.76 μ g/mL, 10.38 μ g/mL를 나타내어 열처리한 면역우유는 약 97%정도의 면역활성을 유지하였으며, 발효유는 93.5%의 면역활성을 유지하여 원유의 면역활성과 비교시 열처리와 발효과정 중에 면역활성이 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 발효전과 발효후의 면역활성을 비교한 결과 발효후의 요구르트의 면역활성은 96%로 발효전의 면역활성에 비해 약 4%정도 감소하였다. 본 실험의 결과 열처리과정과 발효과정 중에 면역활성이 다소 감소하기는 하였으나 면역우유와 요구르트 자체에는 여전히 높은 항균활성을 유지하여 면역우유 뿐만 아니라 *Helicobacter pylori* antigen을 함유한 요구르트의 제조 및 가공이 가능할 것으로 판단되었다.

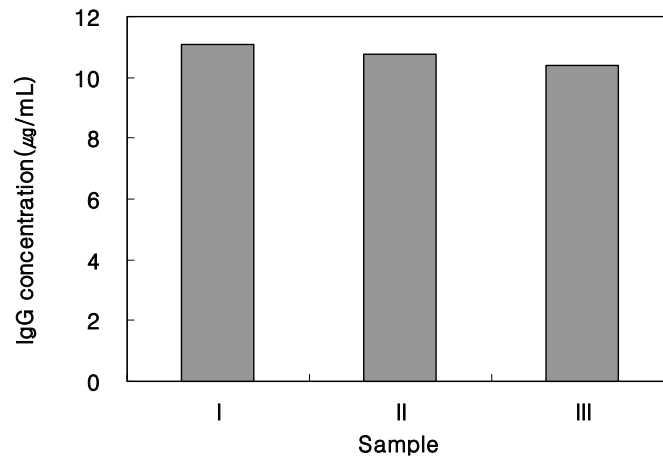


Fig. 5-13. Change in IgG concentration($\mu\text{g/mL}$) of raw milk, immunized milk and yogurt

I : raw milk with some *H. pylori* antigen

II : immunized milk after heat treatment

III : Yogurt prepared with immunized milk(ART-3)

4. 면역우유로 제조한 요구르트의 저장성

면역우유로 제조한 요구르트의 저장 중 품질 변화와 면역활성의 변화를 검토하기 위해 면역우유에 ART-3을 stater로 사용하여 요구르트를 제조한 후 100mL씩 무균적으로 포장하여 2°C, 4°C, 10°C에서 보관하면서 요구르트의 pH, 산도, 미생물, 면역활성의 변화를 측정하였다.

가. pH 및 산도의 변화

Fig. 5-14는 요구르트의 저장중 pH와 산도의 변화를 나타낸 결과이다. 2°C와 4°C에서 저장한 요구르트의 경우 배양 전기간에 걸쳐 pH의 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다. 10°C에 저장한 요구르트의 경우 배양 7일째이후부터 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며 저장 14일과 21일째의 pH 3.95, 3.85를 나타내었다. 산도도 2°C와 4°C에서 저장한 요구르트에서는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나 10°C에서 저장한 요구르

트의 경우 배양기간이 증가할수록 산도도 증가하였다.

나. 유산균수 변화

Fig. 5-15는 요구르트의 저장 중 유산균의 변화를 나타낸 결과이다. 10℃에서 저장한 요구르트는 저장 7일째 10^8 CFU/mL의 유산균수를 나타내었고 저장 14일째 10^9 CFU/mL의 유산균수를 나타내어 저장 7일째부터 유산균수가 증가하였다. 2℃, 4℃에 저장한 요구르트의 경우 저장 전 기간동안 저장초기와 유사한 유산균수를 나타내었다. 저장온도에 따른 요구르트의 품질은 2℃, 4℃에서 저장시 저장 21일째까지 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나 10℃의 경우 저장 7일째부터 유산균수가 증가하고, pH가 낮아지는 등 다른 온도에서 저장한 요구르트에 비해 다소 급격한 변화가 관찰되어 요구르트의 저장은 4℃이하가 품질의 변화를 방지위한 적절한 저장온도라고 판단된다.

다. 면역활성의 변화

Fig. 5-16은 요구르트의 저장 중 IgG의 함량변화를 나타낸 결과이다. 저장전 요구르트는 $10.11\mu\text{g/mL}$ 의 IgG의 함량을 나타내었고 2℃와 4℃에서 저장한 요구르트의 경우 저장 7일째까지는 저장초기와 유사한 IgG의 함량을 나타내었으며, 배양 14일째까지는 서서히 감소하였으나 배양 21일째는 각각 $7.65\mu\text{g/mL}$, $5.75\mu\text{g/mL}$ 을 나타내어 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. 10℃에서 저장한 요구르트의 경우도 이와 유사한 경향을 나타내었는데 2℃와 4℃에서 저장한 경우보다 IgG의 감소량이 다소 높게 나타났으며 저장 21일째는 $5.51\mu\text{g/mL}$ 로 급격하게 감소하였다. 본 실험결과 요구르트의 저장기간 동안 면역활성이 높은 수준으로 유지되는 경향을 나타내어 *Helicobacter pylori* antigen을 함유한 면역 우유는 시유뿐만 아니라 요구르트를 제조할 경우 우수한 기능성 식품으로서의 가치가 충분히 있을 것으로 판단되었다.

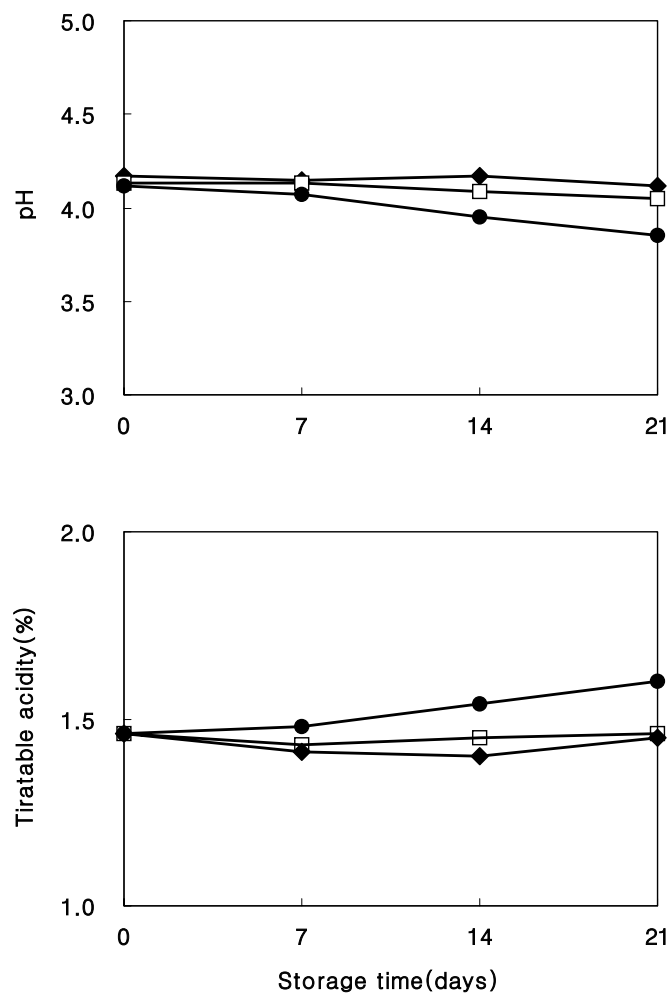


Fig. 5-14. Change in pH and titratable acidity of yogurt made with immunized milk during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C
 ◆ : 2°C □ : 4°C ● : 10°C

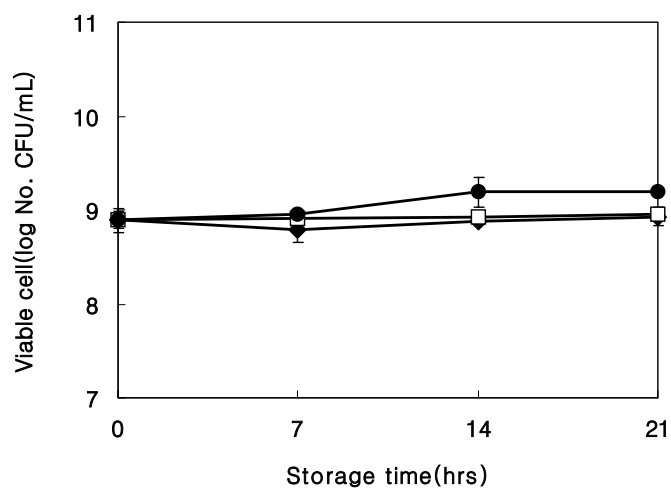


Fig. 5-15. Change in lactic acid bacteria of yogurt made with immunized milk during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C

◆ : 2°C □ : 4°C ● : 10°C

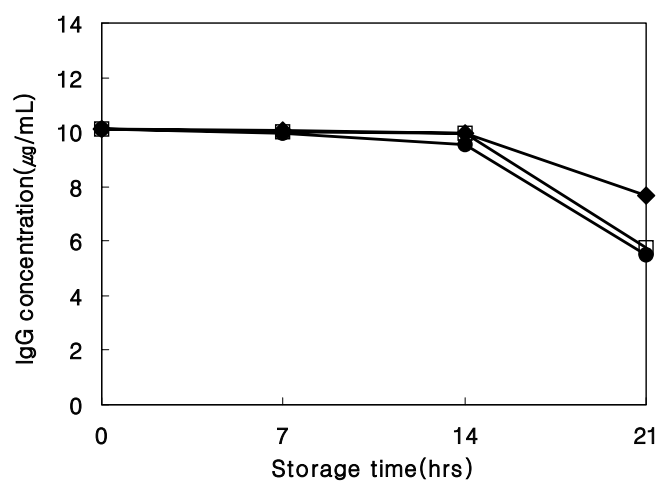


Fig. 5-16. Change in IgG concentration(µg/mL) of yogurt made with immunized milk during storage for 21 days at 2°C, 4°C and 10°C

◆ : 2°C □ : 4°C ● : 10°C

제 4 절 결과요약

H. pylori 항체를 가진 면역우유를 60°C에서 30분 열처리한 경우 총 균수는 10^3 CFU/mL이었으며, 열처리 온도가 높을수록, 열처리 시간이 증가할수록 총균수의 감소율이 증가하였다. *Coliform bacteria*의 경우는 원유에서 10^2 CFU/mL이 관찰되었으나 모든 열 처리우유에서는 관찰되지 않았다. 면역 활성은 60°C에서 30분 동안 열처리 후에도 99.99(100)%의 면역 활성을 나타내었으나 75°C 이상의 열처리에 의해서는 면역 활성이 급격하게 감소하여 약 50%이하로 낮게 나타났다.

면역우유를 2°C, 4°C 그리고 10°C에서 저장성을 일반우유와 비교 측정한 결과 우유의 저장 중 pH의 변화는 저장 21일 동안 2°C와 4°C에 저장한 경우 저장온도에 따른 뚜렷한 변화는 관찰할 수 없었으며, 10°C에 저장한 경우 저장 7일 이후 급격히 감소하였다. 총균수의 변화는 저장 초기 10^3 CFU/ml에서 2°C와 4°C에 저장한 처리 우유의 총균수는 저장 21일 동안 뚜렷한 증가현상을 관찰할 수 없었으며, 10°C에 저장하였을 경우 7일 이후 급격히 증가하여 저장 14일 쯤 10^8 CFU/ml로 부패현상을 나타내었다. 면역우유의 저장 중 면역활성의 변화는 저장 온도에 관계없이 저장 14일까지는 저장초기의 활성에 비해 뚜렷한 차이는 나타나지 않았으나 14일 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

김치에서 분리한 유산균 50균주 중 요구르트 starter로 사용 가능성이 있는 5균주를 선발하였다. 선발 균주로 요구르트를 제조하여 풍미, 종합적기호도, 성장특성을 비교 검토한 후 CU-21균주를 선발하여 상업용 균주 ART-3와 발효 특성을 검토한 결과 ART-3가 우수하였다. ART-3를 starter culture로 사용하여 제조한 요구르트와 열처리 전·후의 IgG 항체를 가진 면역우유의 IgG의 함량은 각각 $10.38\mu\text{g/mL}$, $11.10\mu\text{g/mL}$, $10.76\mu\text{g/mL}$ 를 나타내어 열처리한 면역우유는 약 97%정도의 면역활성을 유지하였으며, 발효유는 93.5%의 면역활성을 유지하였다.

ART-3를 stater로 사용하여 면역우유로 제조한 요구르트를 2°C, 4°C, 10°C에서 보

관하면서 pH, 산도, 미생물, IgG의 함량을 측정된 결과 2℃와 4℃에서 저장한 요구르트의 경우 배양 전기간 pH와 산도 유산균수는 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다. 10℃에 저장한 요구르트의 경우 배양 7일째이후부터 품질변화를 초래하였다.. 요구르트의 저장 중 IgG의 함량변화는 배양 14일째까지는 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았으나 저장 14일 이후부터 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

제 5 절 참고문헌

1. Lee, Y.H. and Chung, M.H. : Composition of Mineral Contents in Korean Cow's Milk. Kor. J. Env. Hlth. 30(1), 29(2004)
2. In, Y.M. and Jung, I.K. : A Review on the Change of Physicochemical Quality during Heating of Milk. J. Korean Dairy Technol. Sci. 19(1), 13(2001)
3. Jung, S.C., Kim, K.H., Chung, M.E., Kim, S.I., Byun, S.K., Jeong, S.K., Jun, K.S. and Moon, J.S. : A Study on the Quality Changes of Whole Market Milk by Storage Conditions in Korea II. Microbiological and Chemical Changes of UHT Treated Milk. Kor. J. Vet. Publ. Hlth. 25(3), 201(2001)
4. Kim, K.N., In, Y.M., Jeong, S.G., Ham, J.S. and Kim, D.W. : Research and Development Trends in Milk Products. J. of Korean Dairy Techno. and Sci. 18(1), 22(2000)
5. Lee, J.W. and Lee, Y.C. : The Physico-chemical and Sensory Properties of Milk with Water Soluble Chitosan. Korean J. Food Sci. Technol. 32(4), 806(2000)
6. Moon, J.W. : Production technology of functional products in recent dairy industry. Korean J. Animal Sci. 40(1), 120(1998)
7. 손수정 : Yogurt 오염 Yeast의 성장 억제에 미치는 Chitosan과 Chitooligosaccharides의 효과와 그 특성에 관한 연구. 대구가톨릭대학교 박사학위논문.(1999)

8. Cho, I.S., Bae, H.C. and Nam, M.S. : Fermentation Properties of Yourt Added by Lycii fructus, Lycii cortex. Korean J. Food Sci. Ani. REsour. 23(3), 250(2003)
9. Chun, S.H., Lee, S.U., Shin, Y.S., Lee, K.S. and Ru, I.H. : Preparation of Yogurt from Milk Added with Purple Sweet Potato. Korean J. Food & Nutr. 13(1), 71(2000)
10. Lee, I.S., Lee, S.O. and Kim, H.S. : Preparation and Quality Characteristics of Yogurt Added with *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(3), 411(2002)
11. Kim, K.H. and Ko, Y.T. : The preparation of yogurt from milk and cereals. Korean J. Food Sci. Technol. 25,130(1993)
12. Shin, Y.S., Lee, K.S. and Kim, D.H. : Studies on the Perparation of Yogurt from Milk and Sweet Potato or Pumpkin. Korean J. Food Sci. Technol. 25, 666(1993)
13. Jeoun, K.S., Kim, Y.J. and Park, S.I. : Preparation and characteristics of yogurt from milk added with soy milk and brown rice. Korean J. Food Sci. Technol. 27, 47(1995)
14. Ko, Y.T : The preparation of yogurt from egg white powder and milk products. Korean J. Food Sci. Technol. 29,546(1997)
15. Kahng, G.G. and Lee, E.H. : Effect of sikhae on the quality of yoghurt. J. Agric. Tech. Res. Inst.(Chinju Nat. Univ.). 10, 105(1997)
16. Lee, E.H., Kahng, G.G. and Chung, M.H. : Effect of acorn flour on the quality of plain yoghurt. J.Agric. Tech. Res. Inst.(Chinju Nat. Univ.). 12, 125(1999)
17. Kim, J.W. : Effect of ginseng extract on the acid production and growth of yoghurt starter. J. Agri. Sci.(Chungnam Nat'l Univ.). 21, 111(1994)
18. Lee, E.H. and Choi, S.D. : Studies on the manufacture of aloe yoghurt. J. Agric. Tech. Res. Inst.(Chinju Nat. Univ.). 7, 55(1994)
19. Ko, Y.T. and Kang, J.H. : The preparatin of fermented milk from milk and

- fruit juices. Korean J. Food Sci. Technol. 29, 1241(1997)
20. Kim, J.W. and Lee, J.Y. : Preparation and characteristics of yoghurt from milk added with box thorn(*Licium Chinensis* Miller). Korean J. Dairy Sci. 19, 189(1997)
 21. Kim, J.I. and Park, S.I. : The effect of Mugwort extract on the characteristics of curd yogurt. J. Food Hyg. Safety. 14,352(1999)
 22. Lee, E.H., Nam, E.S. and Park, S.I. : Characteristics of Curd Yogurt from Milk Added with Maesil(*Prunus mume*). Korean J. Food Sci. Technol. 34(3), 419(2002)
 23. Hong, K.H., Nam, E.S. and Park, S.I. : Effect of Water Extract of Omija (*Schizandra chinensis*) on Growth of Yoghurt Starter. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 23(4), 333(2003)
 24. 이후락, 김영옥, 김돈균 : *Helicobacter Pylori* 감염의 유병률과 위험요인에 관한 연구. 대한보건협회학술지. 25(1), 72(1999)
 25. Chung, Y.S., Kang, K.H. and Chang, M.W. : Effects of Green and Taste Teas on the Growth and Vacuolating Toxin Titer of *Helicobacter pylori*. Korean J. Biotechnol Bioeng. 16(2), 163(2001)
 26. Ki, M.R. and Hwang, S.Y. : The Effect of Omeprazole on the Membrane-Bound ATPase Activities of *Helicobacter Pylori*. Journal of institute of science and technology. 5, 85(1997)
 27. McGowan CC, Cover TL, Blaser MJ. : *Helicobacter plori* and gastric acid: Biological and therapeutic implications. Gastroenterology. 110, 926(1996)
 28. Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P, Nair NG, Mehta AP. : *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. J Clin Microbiol. 27, 2328(1989)
 29. Midolo PD, Lambert JR, Hull R, Luo F, Grayson ML. : In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. J Appl Bacteriol. 79, 475(1995)

30. Alain L. Servin : Antagonistic Activity against *Helicobacter pylori* Infection by the Lactic Acid Bacteria. J. Korean Public Health Assoc. 27(1), 5(2001)
31. De Francesco V, Stoppino V, Sgarro, C, Faleo D. : *Lactobacillus acidophilus* administration added to omeprazole/amoxicillin-based double therapy in *Helicobacter pylori* eradication. Dig Liver Dis. 32, 746(2000)
32. 박창호. *Helicobacter pylori* 항원을 이용한 면역우유 생산 및 항체특성. 대구한의대학교 대학원 석사학위논문. (2004)
33. Morales, F.J., Romero, C. and Jimenez-Perez, S. : Characterization of industrial processed milkly analysis of heat-induced change. Int. J. Food. Sci. Technol. 35, 193(2000)
34. C.-C.CHEN, Y-Y.TU AND H,-H. CHANG. : Thermal Stability of Bovine Milk Immunoglobulin G(IgG) and the Effect of Added Thermal Protectants on the stability. Journal of Food Science. 65, 188(2000)

제 6 장 *H. pylori* 감염환자 대상 인체임상치료효과 검증

제 1 절 서 론

Helicobacter. pylori(*H. pylori*)는 우측나선형 몸통과 4-8개의 유초성 편모(flagella)를 가진 그람 음성 단간균으로서 위점막세포 사이사이에서 암모니아를 분비하면서 살고 있다. 1983년 오스트레일리아의 Marshall과 Warren에 의해 최초로 활동성 위염환자에서 분리 동정된 이후 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 위 림프종 및 위암을 일으키는 것으로 밝혀졌고 1994년 International Agency for Research on Cancer(IARC)에서 *H. pylori*가 확실한 발암물질로 발표되었다. 이처럼 *H. pylori* 감염은 상부위장관 질환의 중요한 원인 인자로 인식되고 있는데 선진국에서는 감염율이 낮은 반면 개발도상국이나 후진국에서는 높은 감염율을 보이고 지역적 또는 인종간의 큰 차이를 보여 경제 수준이나 위생 및 환경 상태에 의하여 좌우되는 것으로 알려져 있다. 국내에서 *H. pylori* 감염율은 2000년 대한 *H. pylori* 학회 보고에 의하면 소아에서는 17.2%, 16세 이상 성인에서는 66.9%로 밝혀졌다.

H. pylori 제균치료에 있어 많은 약제가 단독 혹은 이제 및 삼제 병합요법으로 투여 되어왔지만 약제의 효과 및 부작용, 환자의 순응도, 경제적인 측면, 재감염 등이 문제시 되어 왔다. 따라서 이러한 항생제의 문제점을 보완하기 위해 *H. pylori* 제균치료법에 대한 새로운 연구가 계속되어 왔고 최근에는 *H. pylori* 제균치료에 항생제가 아닌 식물, 포도주 및 마늘 등의 식용 물질들에 대한 항균효과연구가 진행되고 있다. 이러한 관점에서 본 연구팀은 *H. pylori*에 대한 면역우유 항체가 포함된 계란을 개발하여 항헬리코박터 치료에 대한 효과를 이미 발표한 바 있으며 본 연구에서는 인체에서 면역물질인 *H. pylori*에 대한 항체가 함유된 우유의 *H. pylori*에 대한 항균효과를 조사하였다.

제 2 절 대상 및 방법

1. 대 상

2003년 10월부터 2004년 10월까지 동국대학 경주병원 소화기내과에 내원하여 시행한 위내시경검사상 조직학적 검사, 신속요소분해효소검사(CLO test) 및 ¹³C-요소 호기 검사에서 *H. pylori* 감염양성인 위염환자중에서 본 연구목적과 내용에 대해 충분한 설명을 듣고 동의하였고, 추적관찰이 가능했던 80명을 대상으로 하였다. 무작위 배정을 시행하여 면역우유 투여군, 일반우유 투여군, 항생제 투여군, 항생제와 면역우유 병합투여군 각각 20명으로 나누었다. 모든 대상환자에 대해 4주후 추적 위내시경검사를 통한 조직학적 검사, CLO test 및 ¹³C-요소 호기검사를 시행하였다. 이전에 *H. pylori* 제균치료를 받았거나 최근 1개월내에 비스테로이드성 소염진통제, 스테로이드 제제 혹은 항생제를 복용한 사람, 소화성 궤양, 신부전, 간경변증, 심각한 심혈관계 및 폐질환이 있거나 위절제술의 기왕력이 있는 환자 그리고 임신부, 수유부, 연구과정중 적절한 피임을 할 수 없는 가임 여성은 제외하였다.

2. 방 법

가. 재 료

본 연구에 사용한 면역우유는 대구한의대와 경상북도 축산기술연구소에서 공동 개발한 *H. pylori*의 생육을 억제하는 항체가 다량 함유된 것으로 *H. pylori* 균주를 MHB(Mueller-Hinton horse blood)배지에서 37℃에서 48시간동안 배양한 후 3시간동안 0.5% 포르말린처리를 시키고 PBS(phosphate-buffered saline)로 세 번 세척한 후 동결건조시킨 항원을 유화(emulsion)시킨후 2주 간격으로 소에 근육주사하여 생산한 것이다. 이렇게 생산된 우유에서 항헬리코박터 항체를 분리하여 *H. pylori* 항체형성을 ELISA법으로 확인하였다. 면역우유가 아닌 일반우유는 시중에서 유통되는 우유를 구입하여 사용하였다. *H. pylori* 치료제로 사용한 약제는 클래리스로마이신 (Clarithromycin 250 mg, 1 tablet), 아목사실린(Amoxicillin 250 mg, 1 capsule) 및 오메프라졸(Nexium 20 mg, 1 tablet)을 구입하여 사용하였다.

나. *H. pylori* 감염의 평가

H. pylori 감염여부는 병리조직학적 검사 및 CLO test에서 한가지 이상 양성인 경우를 감염양성으로 판정하였고, 모두 음성인 경우를 *H. pylori* 감염음성으로 하였다.

다. 검사항목 및 검사방법

1) 위내시경검사

대상 환자는 모두 상부소화기내시경검사를 시행하기전에 최소한 10시간이상 금식하였고, 내시경검사의 전처치로 검사 15분전에 cimetropuim bromide (Algiron[®]) 5mg을 근육주사하고, 검사 10분전에 dimethyl polysiloxane (Gascon[®]) 10 mL을 복용시키고, 0.3% benoxinate HCl 10 mL로 인후부의 국소마취를 시행한 후 측와위에서 식도, 위 및 십이지장 내시경검사를 시행하였다.

2) 위점막 조직 채취

위내시경검사전 최소 8시간 이상을 금식시킨후 위내시경검사를 시행하였고 위내시경 직시하에서 전정부에서 3개, 체부에서 2개씩 생검표본을 채취하여 전정부 2개와 체부에서 채취한 2개의 표본을 조직학적 검사에 사용하였고 전정부에서 얻은 1개의 표본으로 CLO test를 하였다.

3) 신속요소분해검사(CLO test)

*H. pylori*의 요소분해효소 검출용 시약인 CLO 검사 kit(CLOTM Delta West, Bentley, Australia)를 사용하여 신속 요소분해효소검사를 시행하였다. 내시경검사 전에 CLO 검사 kit가 노란색인지 확인한 뒤 검사 kit를 30~40℃ 정도의 따뜻한 장소에 보관한 후 사용하거나 검사자의 주머니에 넣어 따뜻하게 한 후 사용하였다. 위전정부 조직을 내시경 직시하 검사 조직생검으로 얻은 후 18 게이지 주사기 바늘을 이용하여 CLO 검사 겔 안으로 밀어 넣은 다음 30~40℃ 정도의 따뜻한 곳에서 3시간 동안 방치하고 다시 실온에서 21시간 둔 후 결과를 판정하였다. 24시간 후에도 CLO 검사 겔이 노란색을 유지하면 *H. pylori* 음성으로 판정하였고, 생검 조직절편의 주위에 넓게

퍼진 분홍빛 띠가 관찰되거나 껍이 점차 진한 오렌지색으로 바뀌면서 자홍색으로 관찰되면 *H. pylori* 양성으로 판정하였다.

4) 요소호기검사(Urea breath test)

4시간 이상 금식 후 검사 시작 시 먼저 4초간 정상시의 호흡으로 날숨을 뚜껑이 있는 시험관에 붙어넣고 즉시 마개를 하고, 1분 동안 ^{13}C -요소분말 75 mg (HELIKITTM, Isotechnika Inc, Edmonton, Canada)이 든 용기에 물 75 mL를 가하여 잘 녹인 후 용액을 완전히 마시고, 구강 내에 ^{13}C 가 남아 있지 않도록 물로 세정을 한 후 30분 동안 가만히 앉아있다가 30분 후에 다시 날숨을 채취하여 채취한 총 2개의 검체를 동위원소질량분석기 (Mass spectrometry; AP2003, Analytical Precision Limited, Cheshire, UK)에 장착하고 분석하여 그 비율의 변화에 근거하여 *H. pylori* 감염 여부를 진단하였다. *H. pylori*가 위 내에 존재하면 요소분해효소에 의해서 표지된 요소는 암모니아와 이산화탄소로 분해되어 호기 중에 나타나게 되며 세균 요소분해효소가 존재하면 이산화 탄소의 비($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$)가 의미있게 변화한다. DOB30은 0분(기저치)과 30분값(측정치) 사이의 절대치로 결정하였고 이 값이 4% 이상으로 증가되면 양성으로 판정하여 *H. pylori*에 감염된 것으로 하였다. 모든 환자에서 치료전후 ^{13}C -요소호기검사를 시행하였다.

5) 병리조직학적 검사

위내시경검사로 채취한 조직절편을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하여 4 μm 의 두께로 3-4개의 연속 절편을 만든 후 헤마톡실린-에오신 염색을 하였고 대상군 모두 치료 전, 후 조직학적 변화를 평가하기 위해 조직학적 위염 정도, 위축성 변화, 장형화생의 유무 및 *H. pylori*의 균체밀도를 updated Sydney system에 의거하여 판단하였다.

급성염증의 지표로서 점막 고유층, 소와(foveola) 및 표층 상피에 있는 중성구의 침윤 정도에 따라 4등급(정상=0, 경도=1, 중등도=2, 고도=3)으로 분류하고, 만성염증의 지표로 점막 고유층의 림프구 및 형질 세포의 침윤 정도에 따라 역시 4등급(정상=0, 경도=1, 중등도=2, 고도=3)으로 분류하여 점수화하였다. 위축성 변화는 전정부 또는 체

부에 있는 고유선(유문선, 분문선)의 소실정도에 따라, 그리고 장형화생(intestinal metaplasia)은 점막의 1/3에서 화생이 관찰될 때를 경도로 하고 2/3이상에서 화생이 관찰될 때는 고도, 그 사이를 중등도로 4등급(정상=0, 경도=1, 중등도=2, 고도=3)으로 분류하였다. *H. pylori*의 균체밀도는 항-*H. pylori* 다클론항체(1:200 in TBS: B471, DAKO, Depyroiark)를 사용하여 배양하고, Meyer 헤마톡실린으로 대조염색하였으며 액성 봉입제(immumount[®], shandon)로 봉입한후 검경하여 점막 표면의 1/3미만에 존재할 때를 경도, 점막 표면의 2/3이상에서 존재하거나 표면에서 큰 집락을 형성할 때를 고도, 그 사이를 중등도로 판단하여 4등급(정상=0, 경도=1, 중등도=2, 고도=3)으로 분류한후 점수화하였다.

6) *H. pylori* 제균 치료방법

H. pylori 양성인 환자 80명을 임의로 일반우유 투여군(20명), 면역우유 투여군(20명), 항생제 투여군(20명) 및 항생제와 면역우유 병합투여군(20명)으로 나누고 다음과 같은 방법으로 항생제 및 우유를 투여하였다.

(1) 항생제 및 우유 투여방법

① 일반우유 투여군(20명)

시중에서 구입한 우유를 매일 400 ml씩(아침식전 200 ml, 저녁식전 200ml) 4주간 복용하도록 하였다

② 면역우유 투여군(20명)

*H. pylori*에 대한 항체가 함유된 면역우유를 매일 400 ml씩(아침식전 200 ml, 저녁식전 200ml) 4주간 복용하도록 하였다.

③ 항생제 투여군(20명)

클라리스로마이신 1.0g, 아목사실린 2.0g, 오메프라졸 40mg를 하루 두 번에 나누어 식후 복용하였고 2주간 투여하였다.

④ 항생제와 면역우유 병합투여군(20명)

클라리스로마이신 1.0g, 아목사실린 2.0g, 오메프라졸 40mg를 하루 두 번에 나누어 식후 2주간 복용하고 아울러 동일기간에 면역우유를 매일 400 ml씩(아침식전 200 ml, 저녁식전 200ml) 4주간 복용하도록 하였다.

7) *H. pylori* 제균여부 판정

치료종료후 ¹³C-요소호기검사를 시행하거나 추적 상부소화기 내시경검사가 가능한 경우 조직학적 검사와 신속요소분해효소검사를 시행하여 *H. pylori* 제균여부를 판정하였다. ¹³C-요소호기검사에서 음성이거나 조직학적 검사와 신속요소분해효소검사에서도 둘다 음성으로 나올 경우 *H. pylori*가 박멸되었다고 판정하였다.

8) 통계 분석

변수의 통계학적 검정은 SPSS 11.0 프로그램을 이용하여 student t-test, Kruskal Wallis test 및 Wilcoxon sign rank test를 사용하였고 p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

제 3 절 결 과

1. 대상 환자의 특성

대상군의 평균연령은 일반우유 투여군에서 44세, 면역우유 투여군 43세, 항생제 투여군 45세, 항생제와 면역우유 병합투여군 44세로 유의한 나이차이는 없었다. 남녀비역시 일반우유 투여군 7:3, 면역우유 투여군 8:2, 항생제 투여군 8:2, 항생제와 면역우유 병합투여군 7:3으로 남자가 많았지만 각 군의 유의한 성별차이는 없었다. 위내시경 소견에서 발적(erythema)이 일반우유 투여군 17명, 면역우유 투여군 18명, 항생제 투여군 17명, 항생제와 면역우유 병합투여군 17명으로 나타났고 미란(erosion)은 일반우유 투여군, 면역우유 투여, 항생제 투여군, 항생제와 면역우유 병합투여군에서 각각 2명, 2명, 2명, 3명이었으며 일반우유 투여군과 항생제 투여군에서 식도열공이 1명씩 관찰되어 각 군의 위내시경 검사 소견에는 유의한 차이가 없었다(Table 6-1).

Table 6-1. Patient's Characteristics

	Milk	Im-Milk*	OAC**	OAC+ Im-Milk*
No. of patients	20	20	20	20
Age (yr) mean	44.6±5.7	43.0±6.0	45.2±6.1	44.3±5.8
range	30-56	29-59	31-58	32-57
Sex (M/F)	14/6	16/4	16/4	14/6
Endoscopic diagnosis				
Erythema	17	18	17	17
Erosion	2	2	2	3
Hiatal hernia	1	0	1	0

* Im-Milk ; Immunized milk

** OAC ; Omeprazol, Amoxicillin, Clarithromycin

2. *H. pylori* 박멸률

H. pylori 박멸률은 일반우유 투여군에서 20명 중 아무도 박멸되지 않아 0%였고, 면역우유 투여군 역시 0%로 나타났다. 항생제 투여군에서는 20명 중 18명이 박멸되어 90%였으며, 항생제와 면역우유 병합투여군에서는 20명 전부 박멸되어 100%로 나타났다. *H. pylori* 박멸률이 항생제와 면역우유 병합투여군에서 항생제 단독투여군에 비해 높았으나 유의성은 없었다(Table 6-2). 이결과로 보아 면역우유 단독투여만으로 *H. pylori* 박멸이 어려울 것으로 판단되지만 *H. pylori* 기존치료인 항생제에 면역우유를 병합해서 투여할 경우 *H. pylori* 박멸률을 높일 수 있고 또한 치료기간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대되며 향후 보다 많은 대상으로 한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 6-2. Eradication Rate of *H. pylori*

	Milk	Im-Milk*	OAC**	OAC+ Im-Milk*
No. of patients	20	20	20	20
Eradication rate (%)	0/20(0%)	0/20(0%)	18/20(90%)	20/20(100%)

* Im-Milk ; Immunized milk

** OAC ; Omeprozol, Amoxcillin, Clarithromycin

3. $^{13}\text{CO}_2$ 농도 변화 ($\Delta^{13}\text{CO}_2$)

일반우유 투여군에서 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 을 보면 치료전 36.3 ± 11.9 에서 35.8 ± 10.6 으로 변화가 없었지만 면역우유 투여군에서는 치료전 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 이 37.4 ± 13.1 에서 26.7 ± 15.1 로 유의하게 감소하였다(Fig. 6-1). 특히 면역우유 투여군 1명에서 치료전 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 이 31.4에서 4.07까지 감소되었다. 항생제 투여군에서 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 은 치료전 35.9 ± 20.3 에서 치료 2주후 1.3 ± 3.1 로 유의하게 감소하였으며 항생제와 면역우유 병합투여군에서는 치료전 34.6 ± 24.2 에서 치료 5일째 0.0 ± 0.7 로 유의하게 감소하였다(Fig. 6-2).

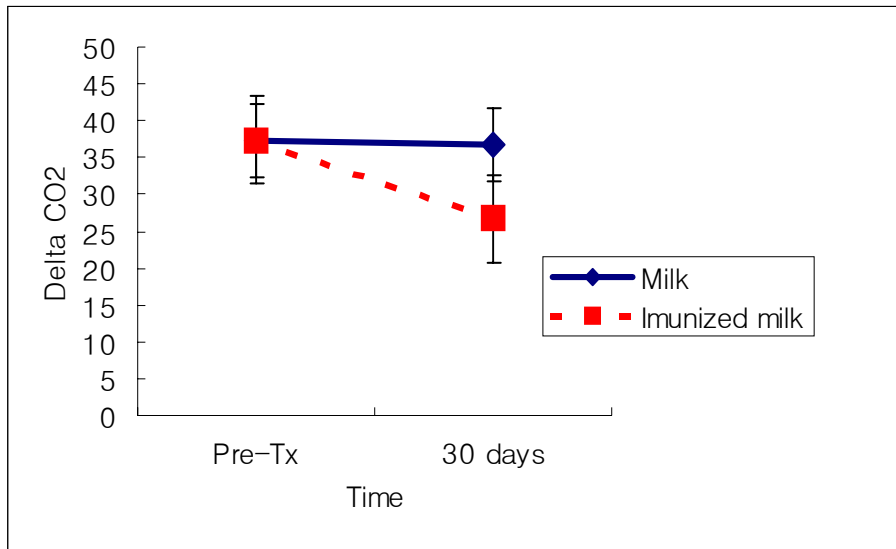


Fig. 6-1. $\Delta^{13}\text{CO}_2$ before and after treatment in milk & imunized milk group.

$\Delta^{13}\text{CO}_2$ at 4 weeks after treatment in imunized milk group was significantly decreased than pretreatment.

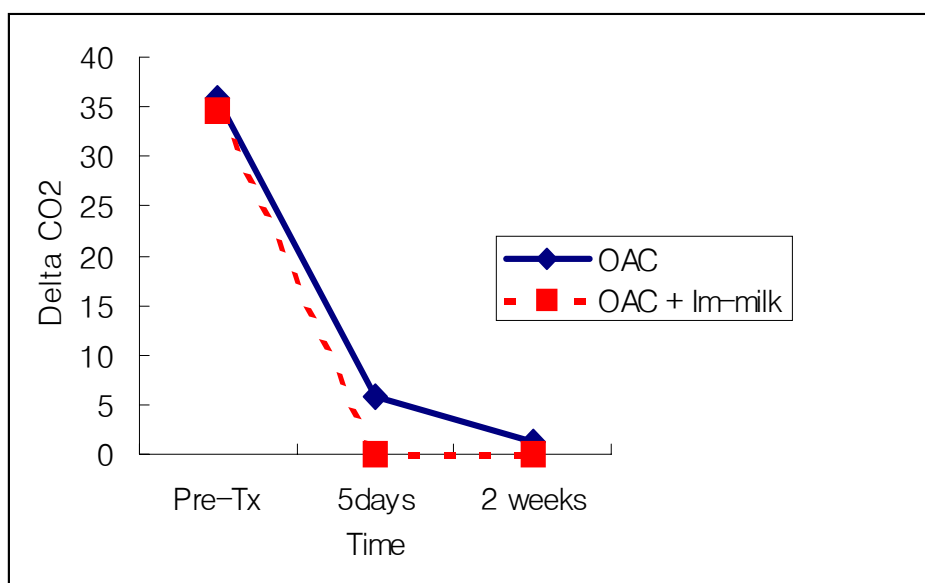


Fig. 6-2. $\Delta^{13}\text{CO}_2$ before and after treatment in OAC & OAC with immunized milk group.

$\Delta^{13}\text{CO}_2$ at 5 days after treatment in OAC with immunized milk group was significantly decreased. The result of UBT in OAC with immunized group was negative earlier than OAC group.

4. 치료 전, 후 병리학적 변화(Table 6-3, 6-4)(Fig. 6-3, 6-4, 6-5, 6-6, 6-7, 6-8)

가) 급성염증 지표

급성염증 지표인 중성구의 침윤 정도는 일반우유 투여군에서 치료전에 전정부 2.0 ± 0.5 , 체부 1.1 ± 0.4 이었는데 치료 4주후 각각 2.0 ± 0.8 , 1.0 ± 0.5 로 치료전후 차이가 없었다. 면역우유 투여군 역시 치료전 전정부와 체부의 중성구 침윤 정도가 1.8 ± 0.6 , 1.1 ± 0.8 에서 치료 4주후 각각 1.8 ± 0.7 , 1.0 ± 0.9 로 변화를 볼 수 없었다. 항생제 투여군에서는 치료전 중성구 침윤 정도가 전정부와 체부에서 1.8 ± 0.4 , 1.8 ± 1.0 으로 나타났고 치료 2주후 각각 0.2 ± 0.4 , 0.2 ± 0.3 으로 유의하게 감소되었다($p < 0.01$). 항생제와 면역우유 병합투여군에서 치료전 중성구 침윤 정도는 전정부와 체부에서 2.0 ± 0.5 , 1.7 ± 1.1 로 나타났는데 치료 5일째 각각 0.2 ± 0.4 , 0.1 ± 0.3 로 유의하게 감소되었다($p < 0.01$). 따라서 항생제 단독치료보다 면역우유를 병합하였을때 급성염증을 호전시키는 기간을 보다 단축할 수 있음을 시사한다.

나) 만성염증 지표

만성염증 지표인 림프군와 형질세포의 침윤 정도는 일반우유 투여군에서 치료전 전정부 2.4 ± 0.5 , 체부 1.7 ± 0.8 이었는데 치료 4주후 각각 2.4 ± 0.3 , 1.6 ± 0.7 로 유의한 변화가 없었다. 면역우유 투여군은 치료전 전정부에서 2.6 ± 0.5 , 체부에서 1.8 ± 0.7 이었으나 치료 4주후에는 각각 2.5 ± 0.5 , 1.7 ± 0.4 로 역시 치료전후 유의한 변화를 나타내지 않았지만 3예에서 치료전 중증도의 염증지표에서 중등도로 감소된 소견을 보였다. 항생제 투여군에서는 치료전 전정부와 체부에서 2.6 ± 0.5 , 2.2 ± 0.7 로 나타났는데 치료 2주후 각각 1.8 ± 0.4 , 1.6 ± 0.5 로 유의하게 감소되었다($p < 0.01$). 항생제와 면역우유 병합투여군에서는 전정부와 체부 각각 2.8 ± 0.4 , 2.2 ± 0.8 에서 치료 5일째 각각 1.8 ± 0.4 , 1.4 ± 0.5 로 유의하게 감소되었다($p < 0.01$). 항생제 단독치료보다 면역우유를 병합하였을때 만성염증 호전에 필요한 기간이 단축되었음을 알 수 있다.

다) *H. pylori* 균체밀도의 변화

치료전 일반우유 투여군의 *H. pylori* 균체밀도 등급은 전정부에서 2.9 ± 0.6 , 체부에서

2.6±0.6이었고, 치료 4주후 각각 2.9±0.5, 2.6±0.7로 나타나 치료전후 변화가 없었다. 면역우유 투여군에서는 치료전 전정부에서 2.8±0.4, 체부에서 2.7±0.4로 나타났으며 치료 4주후 각각 2.5±0.7, 2.6±0.9로 나타나 치료전에 비교하여 균체밀도가 감소하는 경향을 보였지만 유의한 차이는 없었다. 하지만, 면역우유 투여군 3예에서 치료전 중증도에서 치료후 경도로 호전된 소견을 보였다. 항생제 투여군에서는 치료전 전정부와 체부에서 2.8±0.4, 2.4±0.8로 나타났는데 치료 2주후 각각 0.6±0.1, 0.4±0.8로 유의하게 감소되었다(p<0.01). 항생제와 면역우유 병합투여군에서는 치료전 전정부와 체부에서 2.8±0.3, 2.4±0.8로 나타났는데 치료 5일후 각각 0.0±0.0, 0.0±0.0으로 *H. pylori*가 완전히 박멸되었음을 볼 수 있었다(p<0.01). 따라서 항생제 단독치료보다 면역우유를 병합하였을때 *H. pylori* 박멸률이 높고 제균에 필요 기간을 단축할 수 있음을 시사한다.

라) 위점막 위축 및 장상피화생

일반우유 투여군에서 위점막 위축 및 장상피화생은 볼 수 없었고, 면역우유 투여군 1명에서 경도의 장상피화생을 보였는데 치료 4주후 소실되었다. 항생제 투여군과 항생제와 면역우유 병합투여군에서 각각 1명씩 경도의 위점막 위축을 보였는데 치료전, 후 변화가 없었다.

Table 6-3. Histologic Change before and after 4 weeks treatment by Updated Sydney System in Milk and Immunized Milk Group

	Milk group		Immunized milk group	
	Before	After	Before	After
Antrum				
Acute inflammation activity	2.0±0.5	2.0±0.8	1.8±0.6	1.8±0.7
Chronic inflammation activity	2.4±0.5	2.4±0.3	2.6±0.5	2.5±0.5
Intestinal metaplasia	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Gastric atrophy	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>H. pylori</i> density	2.9±0.6	2.9±0.5	2.8±0.4	2.5±0.7
Body				
Acute inflammation activity	1.1±0.4	1.0±0.5	1.1±0.8	1.0±0.9
Chronic inflammation activity	1.7±0.8	1.6±0.7	1.8±0.7	1.7±0.6
Intestinal metaplasia	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Gastric atrophy	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>H. pylori</i> density	2.6±0.6	2.6±0.7	2.7±0.7	2.6±0.9

Table 6-4. Histologic Change before and after treatment by Updated Sydney System in OAC group and OAC with Immunized Milk Group

	OAC group		OAC+ Im-milk group	
	Before	After	Before	After
Antrum				
Acute inflammation activity	1.8±0.4	0.2±0.4*	2.0±0.5	0.2±0.4*
Chronic inflammation activity	2.6±0.5	1.8±0.4*	2.8±0.4	1.8±0.4*
Intestinal metaplasia	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Gastric atrophy	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>H. pylori</i> density	2.8±0.4	0.6±0.1*	2.8±0.3	0.0±0.0*
Body				
Acute inflammation activity	1.8±0.4	0.2±0.3*	1.7±1.1	0.1±0.3*
Chronic inflammation activity	2.2±0.7	1.6±0.5*	2.2±0.8	1.4±0.5*
Intestinal metaplasia	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Gastric atrophy	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>H. pylori</i> density	2.4±0.8	0.4±0.8*	2.4±0.8	0.0±0.0*

* p<0.01

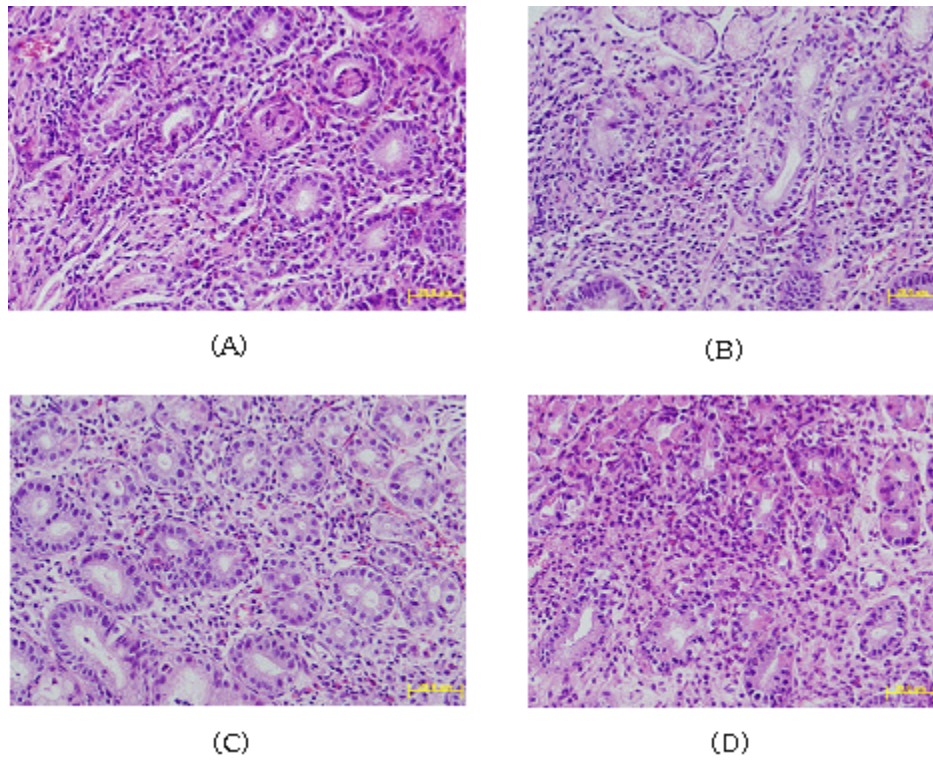


Fig. 6-3. Grade of inflammatory response at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in milk group. Gastric tissue samples show no changes of inflammatory reaction after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification: A-D, $\times 400$.

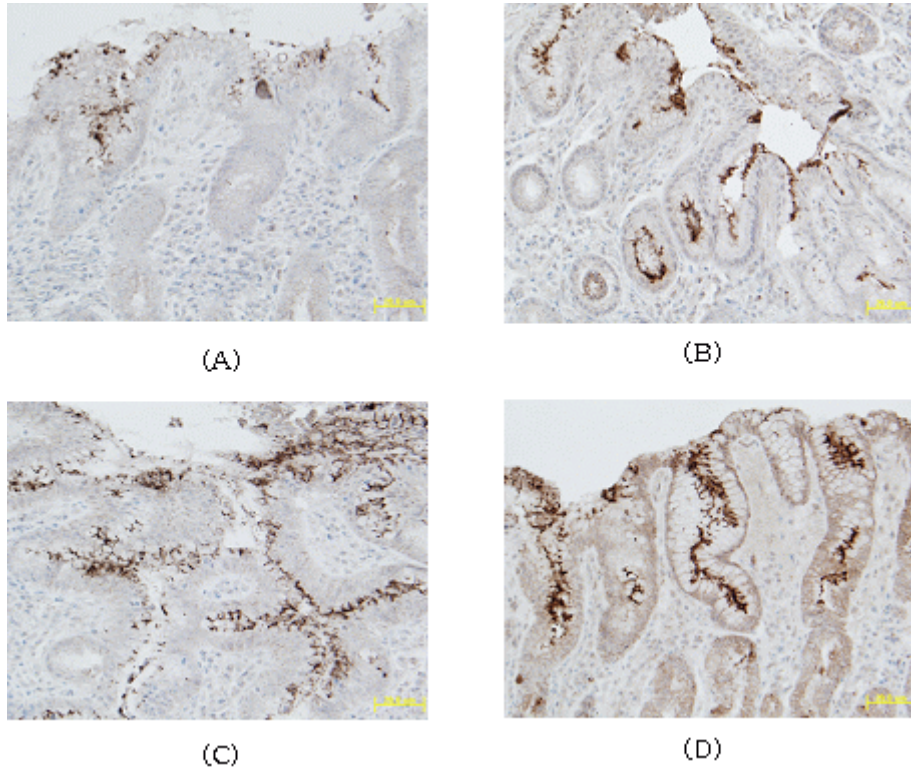


Fig. 6-4. Density of *H. pylori* colonization at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in milk group. Gastric tissue samples show no changes of density of *H. pylori* colonization after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, $\times 400$.

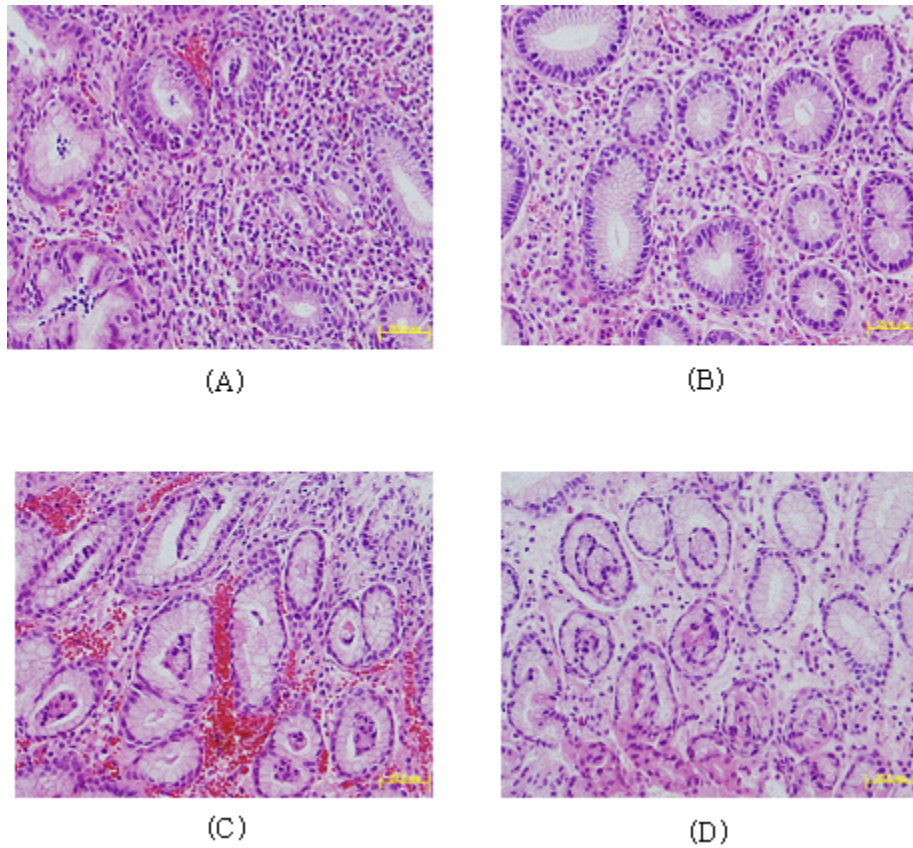


Fig. 6-5. Grade of inflammatory response at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in immunized milk group. A few gastric tissue samples show more decreased grade of inflammatory reaction after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, $\times 400$.

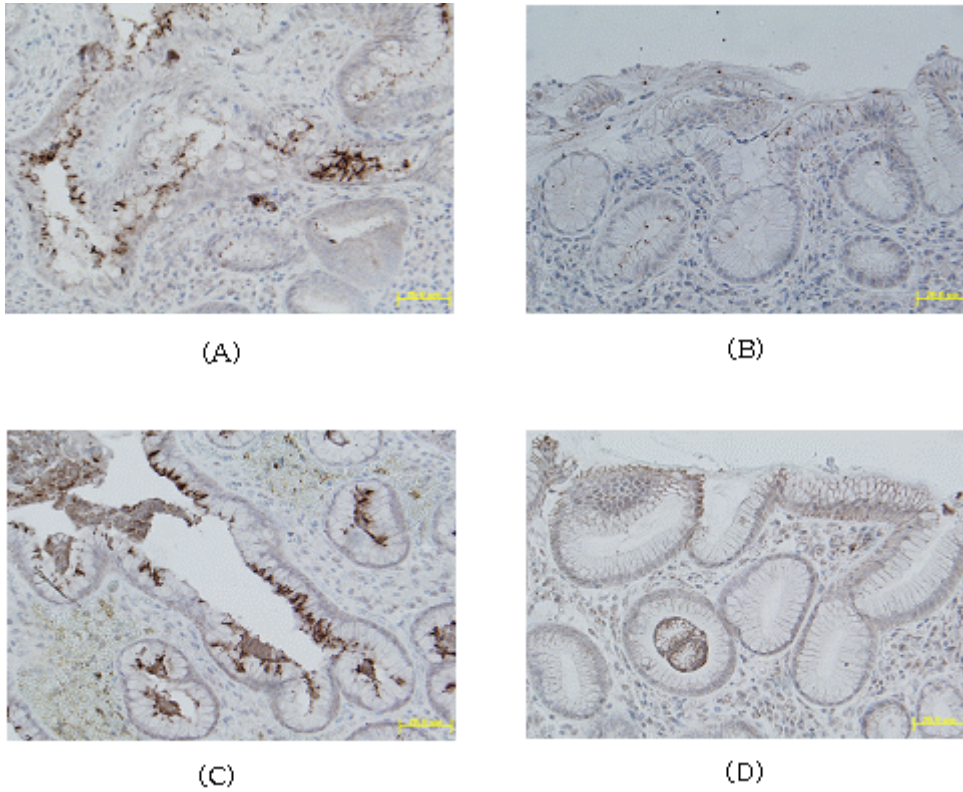


Fig. 6-6. Density of *H. pylori* colonization at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in immunized milk group. A few gastric tissue samples show more decreased density of *H. pylori* colonization after treatment (B, D) when compared with those before treatment (A, C). Magnification; A-D, $\times 400$.

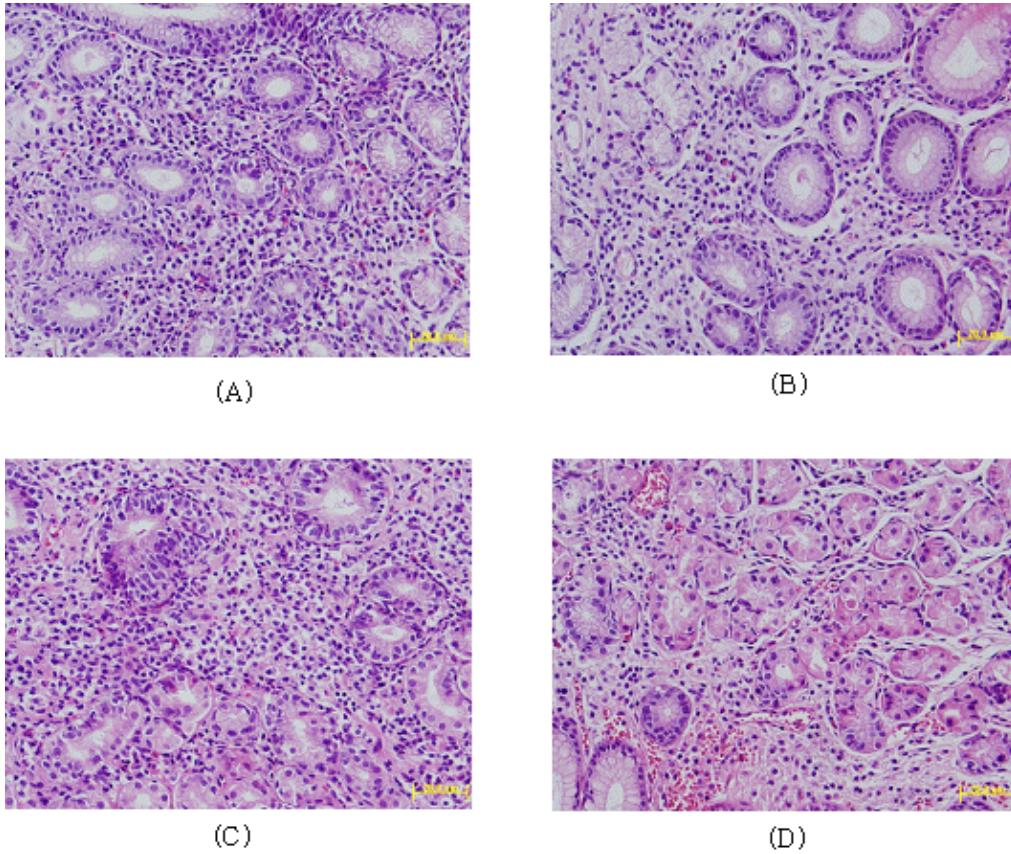


Fig. 6-7. Grade of inflammatory response at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in OAC with immunized milk group. Posttreatment gastric tissue sample (B, D) displays markedly decreased grade of inflammatory reaction in comparison with those before treatment (A, C). The response was shown earlier than OAC group. Magnification; A-D, $\times 400$.

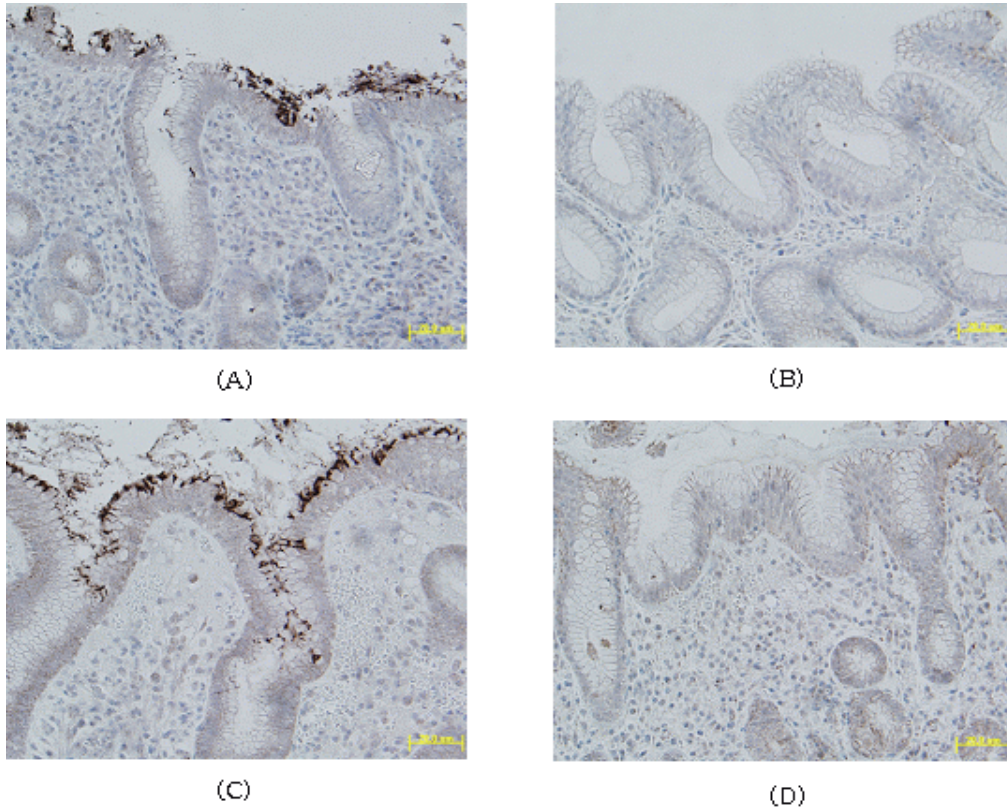


Fig. 6-8. Density of *H. pylori* colonization at antrum (A, B) and body (C, D) according to treatment in OAC with immunized milk group. Posttreatment gastric tissue sample (B, D) shows no *H. pylori* colonization in comparison with those before treatment (A, C). The response was shown earlier than OAC group. Magnification; A-D, $\times 400$.

제 4 절 고 찰

*H. pylori*는 flagella를 가진 그람 음성 간균으로 위점막 상피세포의 표면과 점액층 사이나 위점막을 덮는 점액층내에 기생하며 주로 세포외에서 관찰되지만 세포내 침투가 보고되기도 한다. 서구에서는 소아기에 낮은 유병율을 보이다가 40세 이전까지는 약 20%, 60세 전후에서는 약 50%로 보고된다. *H. pylori*와 위, 십이지장 질환과는 강한 연관성을 지니며 위염 정도와 *H. pylori* 균집락 정도와는 비례하는 것으로 알려져 있다. 소화성궤양은 *H. pylori* 감염 환자의 10-20%에서 발생하며, 만성위염, 소화성궤양 및 위암의 중요 원인인자로 밝혀져 있으며, 최근 *H. pylori*에 의한 만성위염은 점막 위축, 장상피화생, 이형성으로 진행된다고 알려졌으며, *H. pylori*의 병독인자인 CagA가 위축성 위염과 위암의 위험도를 현저히 증가시킨다고 보고된 바 있다. 이런 이유로 *H. pylori*의 제균치료의 중요성이 더해지고, 소화성궤양의 치료와 재발방지를 위한 여러 치료법들이 시도되고 있으나 약제의 효과 및 부작용, 환자의 순응도, 고가의 약제에 의한 경제적 부담과 더불어 재감염과 재발이 문제점으로 대두되어 왔다. 국내 연구들에서는 제균요법을 시행한후 십이지장궤양 재발율은 6%, 위궤양의 재발율은 4% 정도로 보고되고 있는데, *H. pylori* 유병율이 높은 지역에서는 감염 노출의 위험도가 높은 이유로 제균요법후에 재감염율이 높고 이에 따라 위, 십이지장궤양의 재발율도 높게 나타난다. Mitsuru 등은 80%의 감염율을 가지는 일본에서는 *H. pylori* 재발에 영향을 미치는 유의한 인자는 치료 약제의 조합이었으며 높은 제균율과 낮은 재발율을 보이는 것이 좋은 치료 약제라고 했으며 실제로 이전의 amoxicillin, metronidazole과 cimetidine이나 ranitidine의 조합으로는 80%의 제균율과 1년후 5%의 재발율을 보인 반면 omeprazole, amoxicillin, metronidazole, roxithromycin 조합의 경우는 90%의 제균율과 1년에 0.8%의 재발율만을 보였다고 하였다. 낮은 약제효능을 지닌 조합으로는 위점막내 *H. pylori*의 일시적인 억제 효과만 보이며 타액이나 치아판 등 *H. pylori*가 존재하는 다른 부위까지는 효과가 없어, 제균치료후에 구강내에서 위점막으로의 *H. pylori* 재집락형성의 원인이 될 수 있는 것이다. 또한 *H. pylori*에 감염된 대부분의 사람은 증상이 없고 병으로 진행하지 않으며, 최근 보고에서는 *H. pylori* 감염이 역류성 식도염에 방어적 인자로 작용할 수도 있고, CagA 분비 균주에

의한 균집락이 식도와 위체부의 암발생율을 감소시킨다는 보고가 있어, *H. pylori* 제균요법이 위, 십이지장궤양, MALT 림프종, 원위부 위암의 위험도를 감소시키기는 하지만 역류성 식도염, 식도암, 근위부 위암의 위험도를 증가시킬 수 있는 문제점이 있다.

최근에는 항생제 치료가 아닌 식물이나 포도주, 마늘, 백신에 의한 *H. pylori* 억제 치료에 대한 연구가 이루어지고 있다. *H. pylori*에 대한 백신 개발의 가능성은 새로운 감염을 방지해주는 예방적 백신과 존재감염을 제거시키는 치료적 백신 개발의 가능성이 제시되고 있으며, 백신 개발을 위한 *H. pylori* 항원으로는 urease, flagellin, flagellar sheath protein, HSP 60 및 CagA 등이 사용될 수 있다. 이는 그동안 항생제를 통한 발명치료시 우려되어온 재감염, 비용적 측면, 항생제 내성의 문제를 저렴한 비용으로 감염과 질병을 동시에 치료하면서 장기간 지속되는 면역을 획득할 수 있는 장점을 가질 수 있을 것이다. Malekzadeh 등은 이란의 전통적인 위장질환 치료제였던 black myrobalan(*terminalia chebula* Retz)이 *H. pylori*에 대한 항균효과가 있었다고 보고하였고, 국내에서는 김 등에 의해 포도주를 이용한 *H. pylori*에 대한 항세균효과가 보고된 바 있다. Hatta 등은 치석 형성의 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 면역우유 항체가 포함된 구강 린스(mouth rinse)를 사용하여 유의한 세균부착효과를 보고하였고, Sarker 등은 rotavirus 감염에 의한 설사가 지속되는 환아를 대상으로 rotavirus에 대한 면역우유 정제를 복용시킨 실험에서 유의하게 설사양과 빈도를 줄일 수 있었다고 보고한 바 있다. 국내연구에서도 권 등이 신생 돼지에서 지속적인 설사를 유발하여 높은 사망률을 보이는 *procine epidemic diarrhea virus*(PEDV)에 대한 면역우유를 이용하여 유의한 생존율의 향상을 보고 한 바 있다. 이외에도 면역우유 활용 방법은 다양하여 Yang 등은 위암의 MGC-830 세포에서 정제한 P110 단백질에 대한 면역우유를 만들어 위암의 항암치료시 항암제 운반체로서의 면역우유를 사용할 수 있을 것이라고 하였고, 이외에 바이러스의 진단, 특정 분자 물질의 탐색과 평가 등 다양한 분야에 활용될 수 있는 것으로 보고되고 있다.

이러한 노력들 중 그동안 특이항체를 생산에 널리 이용되었던 토끼보다 동일한 시기에 훨씬 많은 특이 항체를 생산할 수 있고, 비용이 적게 들며, 인체 면역반응의 간섭이 적은 장점을 가진 계란의 난황에서 유래된 IgY를 이용한 계란을 개발하여 보고

한 바 있다.

본 연구에서는 면역우유를 이용하여 *H. pylori*에 대한 면역우유의 항균효과를 보고자 하였다. 면역우유 단독으로는 *H. pylori* 박멸을 시키지는 못했지만 치료후 조직학적으로 *H. pylori* 균체밀도가 감소하는 경향을 보였고, $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 역시 유의하게 감소되어 어느정도 항균효과가 있음을 시사한다. 특히 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 가 4.0이하일 때 요소호기검사 결과를 음성 즉, *H. pylori*가 박멸되었다고 판정할 수 있는데 면역우유 투여군 1명에서 치료후 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 이 31.4에서 4.07까지 감소된 사실로 보아 면역우유 단독으로 *H. pylori*를 박멸시킬 수 있는 가능성을 제시해 준다. 또한 기존 항생제에 면역우유를 추가하여 치료한 결과 치료 5일째 모든 경우에서 *H. pylori*가 박멸되어 기존 항생제 치료기간을 단축시킬 수 있음을 알 수 있다.

결론적으로 면역우유가 *H. pylori* 제균치료에 부가적인 치료법의 하나로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만, 향후 면역우유의 항 *H. pylori* 효과에 대한 구체적인 기전과 적정용량과 투여기간 등에 대한 더 많은 실험군을 대상으로 하는 추가 연구가 필요할 것으로 본다.

제 5 절 결과요약

본 연구는 *H. pylori*에 대한 면역우유의 항균효과를 보고자 면역우유를 4주간 단독으로 복용시키고 또한 항생제와 병합하여 2주간 투여한 뒤 치료 전, 후 위내시경을 시행하고 위점막 조직을 채취하여 updated Sydney system에 의거하여 급성염증 지표, 만성염증 지표, *H. pylori* 균체밀도의 변화를 비교하였는데 면역우유 단독투여로 *H. pylori*가 박멸되지는 않았지만 조직학적으로 *H. pylori* 균체밀도가 감소하는 경향을 보였고 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 이 유의하게 감소되었다. 또한 기존 항생제에 면역우유를 5일만 투여해도 모든 경우에서 *H. pylori*를 박멸할 수 있어서 기존 항생제 치료기간을 단축시킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 면역우유 단독투여로는 *H. pylori*가 제균된 경우가 없었기 때문에 단일 치료제보다는 부가적인 치료법의 하나로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 아울러 향후 면역우유의 항 *H. pylori*효과에 대한 구체적인 기전과 적정용량과 투여기간 등에 대한 더 많은 실험군을 대상으로 하는 추가 연구가 필요할 것

으로 생각한다.

제 6 절 참고문헌

Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1:1273-1275. 1983

Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Pritikin J, Chang Y. *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1;83(9):640-3, 1991

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*. 17;325(16):1132-6, 1991

IARC. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. IARC scientific Publication no 61, International Agency for Research on Cancer p. 177-240, Lyon, France 1994

Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet*. 22;337(8756):1503-6, 1991

Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Agarwal R, Evans DJ Jr, Malaty HM, Evans DG. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig Dis Sci*. 36(8):1084-8, 1991

김진호, 김학양, 김나영 외 14인. 상부위장관 증상이 없는 한국인에서 *Helicobacter pylori* 감염의 혈청학적 유병율에 관한 전국적 역학조사. 대한내과학회지 59:338-397, 2000

Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 20(10):1161-81, 1996

Wyle FA, Tarnawski A, Schulman D, Dabros W. Evidence for gastric mucosal cell invasion by *C. pylori*: an ultrastructural study. J Clin Gastroenterol. 12 Suppl 1:S92-8, 1990

Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. Am J Gastroenterol. 89(8 Suppl):S116-28, 1994

Stolte M, Eidt S. *Helicobacter pylori* and the evolution of gastritis. Scand J Gastroenterol Suppl. 214:13-6; discussion 21-3, 1996

Sipponen P, Varis K, Fraki O, Korri UM, Seppala K, Siurala M. Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 outpatients. Scand J Gastroenterol. 25(10):966-73, 1990

Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. N Engl J Med. 7:321(23):1562-6, 1989

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. Ann Intern Med. 15:120(12):977-81, 1994

Farinati F, Valiante F, Germana B, Della Libera G, Baffa R, Rugge M, Plebani M, Vianello

F, Di Mario F, Naccarato R. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with precancerous changes and gastric cancer. Eur J Cancer Prev. 2(4):321-6, 1993

Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. J Natl Cancer Inst. 6;87(23):1777-80, 1995

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 15;55(10):2111-5, 1995

Hopkins RJ, Girardi LS, Turney EA. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. Gastroenterology. 110(4):1244-52, 1996

Kim N, Lim SH, Lee KH, Jung HC, Song IS, Kim CY. *Helicobacter pylori* reinfection rate and duodenal ulcer recurrence in Korea. J Clin Gastroenterol. 27(4):321-6, 1998

Seo M, Okada M, Shirotani T, Nishimura H, Maeda K, Aoyagi K, Sakisaka S. Recurrence of *Helicobacter pylori* infection and the long-term outcome of peptic ulcer after successful eradication in Japan. J Clin Gastroenterol. 34(2):129-34, 2002

Xia HX, Talley NJ, Keane CT, O'Morain CA. Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after successful eradication: nature and possible causes. Dig Dis Sci. 42(9):1821-34, 1997

Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Chiara P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. Curr Opin Immunol. 9(4):498-503, 1997

Labenz J, Blum AL, Bayerdorffer E, Meining A, Stolte M, Borsch G. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 112(5):1442-7, 1997

Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF Jr. An inverse relation between *cagA*⁺ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res*. 15;58(4):588-90, 1998

Zeveering Y, Jacob L, Meyer TF. Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. *Gut*. 45(3):465-74, 1999

Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*. 18(1):85-8, 2001

김도형, 노임환, 허재형, 박상현, 남승우, 임창영, 송일환, 김정원, 명나혜, 신지현. *H. pylori*에 대한 포도주(wine)의 항세균 효과. 대한소화기학회 2001년도 추계학술대회발표집. p204, 2001

Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK, Michalek SM. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 31(4):268-74, 1997

Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, Hammarstrom

L. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 32(1):19-25, 2001

Kweon CH, Kwon BJ, Woo SR, Kim JM, Woo GH, Son DH, Hur W, Lee YS. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci.* 62(9):961-4, 2000

Yang J, Jin Z, Yu Q, Yang T, Wang H, Liu L. The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chin J Biotechnol.* 13(2):85-90, 1997

Gardner PS, Kaye S. Egg globulins in rapid virus diagnosis. *J Virol Methods.* 4(4-5):257-62, 1982

Bauwens RM, Kint JA, Devos MP, Van Brussel KA, De Leenheer AP. Production, purification and characterization of antibodies to 1,25-dihydroxyvitamin D raised in chicken egg yolk. *Clin Chim Acta.* 30:170(1):37-44, 1987

Hata Y, Kita T, Murakami M. Bovine milk inhibits both adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfatide and *Helicobacter pylori*-induced vacuolation of vero cells. *Dig Dis Sci.* 44(8):1696-702, 1999

Felley CP, Corthesy-Theulaz I, Rivero JL, Sipponen P, Kaufmann M, Bauerfeind P, Wiesel PH, Brassart D, Pfeifer A, Blum AL, Michetti P. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13(1):25-9, 2001

Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I, Dorta G, Stolte M, Isler P, Rochat F, Enslin M, Blum AL. Favourable effect of regular intake of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* on *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Aliment Pharmacol Ther.* 15;18(8):805-13, 2003

Cats A, Kuipers EJ, Bosschaert MA, Pot RG, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 17(3):429-35, 2003

서정일. IgY 함유 계란의 항헬리코박터 치료효과에 관한 연구. 경상북도축산연구기술 연구소 보고서, 2002

제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 연구개발 목표의 달성도

구 분	연구 개발 목표	평가의 착안점	달성도
1차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>H. pylori</i> 분리 배양과 주요 항체분석 ○ Anti-<i>H.pylori</i> 항체함유 면역우유생산 ○ 면역 우유생산 최적화 조건 확립 및 면역우유의 물리화학적성분 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ <i>H. pylori</i> 분리 배양 ◦ <i>H. pylori</i> 항원으로 부터 Anti-<i>H. pylori</i> 특이 항체 함유 우유생산 ◦ Anti-<i>H. pylori</i> 특이항체 평가 ◦ 면역우유 생산 최적화 조건확립 ◦ 비유시기별 Anti-<i>H. pylori</i> 특이항체 생산성과 함량 평가 ◦ 면역기법에 의해서 생산된 우유의 물리화학적 성분 평가 	100%
2차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우유로부터 위염원인균인 <i>H. pylori</i> 제거 항체 생산 백신개발 및 평가 ○ 면역우유의 품질 및 가공적성 평가 ○ 면역 우유를 이용한 기능성 유제품 개발 ○ <i>H. pylori</i> 감염환자 대상 인체 임상치료 효과 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 우수항원 대량생산 체계확립과 항원의 물리화학적 특성 조사 ◦ <i>H. pylori</i> 특이항원함유 백신과 Adjuvant 조성물의 면역성 및 실용성 평가 ◦ 면역우유의 품질 및 살균조건 등 가공적성 평가 ◦ 면역우유를 이용한 기능성 유제품 개발 ◦ 위염환자를 대상으로한 임상효과 결과 ◦ 우유속의 anti-<i>H. pylori</i> 항체로부터 위염원인균 억제 및 제거효과 	100%

각 연차별 연구목표 및 내용에 대한 연구를 수행하였다. 즉 1차년도에는 Anti-*H. pylori* 항체함유 면역우유생산에 성공하고 항체특성을 평가하였으며, 또한 면역우유생산 최적화 조건을 조사 확립하고 및 면역우유를 일반 우유와 비교하여 물리화학적 성분을 분석 비교 평가함으로써 목표를 100%달성한 것으로 사료된다.

2차년도 에도 우유로부터 위염 원인균인 *H. pylori* 제거 항체생산 백신을 개발할 목적으로 면역우유 생산용 면역강화 소재(Adjuvant) 탐색 및 개발, *H. pylori* Major Antigens and Adjuvant aqueous solution의 pH-안정성, 역가, 균주 대량배양 최적조건 확립과 항원의 대량 생산, 면역우유생산용 *H. pylori* 특이항원을 조사 주요항원성 성분을 평가하고 면역강화 소재(Adjuvant)를 탐색 백신조성물에 대한 면역성을 평가하였다. 또한 면역우유를 이용한 기능성 유제품개발을 목적으로 유제품 제조중 starter 연구, 면역우유의 품질 및 가공적성 평가를 평가함으로써 면역우유의 산업화 가능성을 제시하였고, 위염 위궤양 예방과 환자의 치료보조용 및 대체의약 면역유제품 개발 목적으로 *H. pylori* 감염환자 대상 인체임상치료효과를 검증하기 위해서 요소호기검사(UBT), 위내시경검사 및 조직검사, 신속요소분해효소검사(CLO)를 통해서 *H. pylori* 감염 대상자 선정하였다.

소화불량증상의 호전, 박멸여부 판정(UBT, 위조직검사)을 통해서 Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유의 효능 평가 및 임상치료 효과 검정을 하였던 바 항생제와 동시에 투여시 박멸률이 뛰어나고 치료기간이 반으로 단축됨을 확인함으로써 위염 위궤양 예방과 환자의 치료보조용 및 대체의약 면역유제품 개발의 필요충분조건인 최소한의 근거가 마련된 것으로 평가 하고자 한다.

제 2 절 관련분야에의 기여도

본 연구를 통하여 anti-*H. pylori* 특이항체 생산기술을 개발하고 산업화의 기초자료를 마련함으로써 축산농가와 유업체의 산업 및 경제활동에 뿐만 아니라 국민건강에도 기여하리라 기대된다.

- 면역우유 생산성 및 Anti-*H. pylori* 항체평가로 실용화를 위한 기초자료 확보
- 면역우유를 이용한 기능성 각종 유제품개발
- *H. pylori* 특이항원 및 면역강화 소재의 면역성 및 실용성 평가
- Anti-*H. pylori* 항체 함유 면역우유의 임상효능 평가로 위염 위궤양 예방과 환자의 치료보조용 및 대체의약 면역유제품 개발가능

제 8 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 기존의 활용 실적

1. 학술논문

- 1) 투고 중 : 배만중, 박창호, 김수정. Helicobacter. pylori항원을 이용한 면역우유 항체특성에 관한 연구. JKFSN-200400092
- 2) 투고 중 : 배만중, 박창호, 김수정. Helicobacter. pylori항원을 이용한 면역우유 생산에 관한 연구. JKFSN-200400091

2. 학회, 심포지움 및 기술이전 발표

1) 심포지움 行事概要내용 및 일정표

- 題 目 : 기능성 축산물개발 및 산업화방안
- 日 時 : 2003. 12. 19. 10:30 ~ 15:00
- 場 所 : 경상북도농업인회관 3층 대강당(대구 북구 동호동 소재)
- 主 催 : 경상북도축산기술연구소 및 대구한의대학교 공동
- 參席人員 : 200명 정도(도 및 관련기관 단체, 참석희망농가)
- 發表內容 : 기능성 축산물 개발사례 및 산업화방안
- 發表內容 및 演士
 - 위염 예방우유 생산기술 : 배만중교수(대구한의대학교)
 - IgY청색계란 생산기술 및 산업화 : 김병기박사(경북축기연)
 - 일본화우의 브랜드육현황 및 생산기술 : 정근기박사(영남대학교명예교수)
- 行事日程

時 間	分	內 容	비 고
10:30 ~ 10:35	5	국민의례	사회 : 한우연구실장
10:35 ~ 10:45	5	격려사	경북도지사
10:45 ~ 10:55	5	축 사	대구한의대 총장
10:55 ~ 11:45	50	위염 예방우유 생산기술	발표자 : 배만중 교수
11:45 ~ 12:35	50	IgY청색계란 생산기술및 산업화	발표자 : 김병기 박사
12:35 ~ 13:30	55	점 심 시 간	
13:30 ~ 14:20	50	일본 화우브랜드육 현황 및 생산기술	발표자 : 정근기 박사
14:20 ~ 15:00	40	토 론	좌 장 : 정근기 박사

- 2) 배만종, 박창호, 김병기, 이신호, 서정일. 위염예방 치료보조 우유 생산기술. 2004. 9. 16-17. 농림과학기술대전 포스터발표.

3. 산업재산권

- 위염예방 우유생산 기술 확보
- 특허출원
 - 배만종, 박창호, 정승화, 김병기. 헬리코박터 파일로리 항원을 이용한 위염예방 치료 보조용 면역우유 및 그 생산방법, 출원일자 2004. 4. 13, 출원번호 10-2004-0025165.

제 2 절 활용계획

위염 예방우유 생산기술 확보로 국내 낙농농가에 면역우유 생산기술을 이전함으로써 농가 소득증대 및 유업체의 생산성 향상 및 국가경제에 기여하고자 한다. 또한 고기능성 및 고품질을 함유한 새로운 우유생산기술 및 제품개발로 사업화를 유도하고자 한다. 아울러 위염환자 및 노약자의 건강식품 개발과 사업화로 국민건강 증진에 활용할 수 있다.

- 경상북도축산기술연구소, 낙농가, 유업체가 공동추진단을 구성하여 본 기술의 산업화 타당성을 검토하고, 구체적인 역할과 방법을 모색한다.
- 면역우유 개발을 위한 관련 분야 기초자료 제공 한다.
- 학회 심포지움 및 기술이전 발표회를 통하여 본기술을 홍보하고, 관련분야 연구 활성화를 유도한다.
- Anti - *H. pylori* 항체를 함유한 면역우유 생산관련 분야에 실험결과 공유 한다.
- 면역우유를 활용한 각종 새로운 유제품 개발을 위한 기본 자료로 활용 한다.
- 면역우유 산업화 및 제품화-유업체와 낙농조합과 공동협약
- 면역우유의 효능 및 기능성 홍보(세미나 및 학술심포지움)를 통한 우유소비 증대
- 신기능성 면역우유 생산기술 개발 및 신제품 개발유도

제 9 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

1. 기능성 우유생산에 관련하여 영국에서는 불면증 치료효과 있는 잠 잘오는 우유 (2004)를 개발하여 시중에서 일반우유보다 2배 가격으로 고가 판매 중

2. 호주(2002)에는 IgG함량이 높은 초유를 저온살균 처리하여 면역우유로 판매하고 있을 뿐만 아니라 초유를 모태로 한 *H. pylori* 항체가 들어있는 면역우유를 개발하여 실용화를 검토중에 있음

3. *H. pylori*원성 환자용 발효유를 개발 기능성을 평가 - Favourable effect of an acidified milk(LC-1) on *Helicobacter. pylori* gastritis in man. Christian P. Felley, et se. European Journal of Sastroenterology & Hepatology

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.