

최 종
연구보고서

유전자 크로닝을 이용한 면역기능강화
유산균 생균제 개발

Development of probiotics that can enhance immune
systems of animals using gene cloning techniques

연구기관

천안연암대학
전남대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자 크로닝을 이용한 면역기능강화 유산균 생균제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 천안연암대학

총괄연구책임자 : 한 동 운

세부연구책임자 : 김 광 식

연 구 원 : 윤 미 라

연 구 원 : 곽 기 정

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 이 봉 주

연 구 원 : 정 복 기

연 구 원 : 조 선 주

요 약 문

I. 제 목

유전자 크로닝을 이용한 면역기능강화 유산균 생균제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

돼지에서 설사증은 생산성 저하의 주요 원인으로 양돈산업에 심각한 피해를 주고 있다. 따라서 이러한 설사증을 치료하기 위해 다양한 항생제가 상시로 사용되고 있어 국내에서도 항생제 오남용과 그로인한 내성균의 출현이 급증하는 등 부작용이 커지고 있다. 항생제를 대체 할수 있는 대체 항생제에 대한 연구가 절실하다.

유산균은 사료를 통해 쉽게 동물에 섭취될수 있고 장에 정착하여 생존할 수 있기 때문에 살아있는 유전자 운반체로서 신개념의 동물용 생균제 개발에 매우 좋은 재료로 활용되고 있다. 또한 분자유전학적인 발전에 따라 유산균의 유전학적 연구가 많이 진행되어 유산균주에 대한 재조합도 활성화 되고 있다. 최근에는 유전자 클로닝 기법을 이용하여 새로운 유전자를 유산균에 삽입하여 새로운 형질을 발현하도록 하는 연구가 시도되고 있다.

본 연구에서는 생균제로 주로 사용되는 유산균인 *Bacillus subtilis* 에는 돼지의 면역기능을 증강시킬 수 있는 porcine IL-2 유전자를 *Lactobacillus acidophilus* 균주에는 porcine IFN-r 유전자를 각각 cloning 하여 표면에서 이러한 IL-2와 IFN-r 가 분비되는 면역기능강화 생균주를 개발하고 돼지에 면역기능강화 생균제를 일정기간 급여한 후 면역기능증강 효과를 규명하고 면역기능강화 생균제의 급여 후 돼지의 면역기능 증강으로 항병력이 증가되었는가를 확인하였다.

2. 연구개발의 필요성

2005년 말 부터 EU는 가축의 성장 촉진(GPAs : Growth-promoting antibiotics) 용 항생제 사용을 금지하도록 규제하고 있다. 양계, 양돈 및 수생물 사육업자들은 대부분 GPAs에 의존하고 있기 때문에 성장촉진용 항생제의 금지는 국내 축산업계에 커다란 충격을 주게 될 것이다. EU에서는 FP6(6th framework programme)의 일

환으로 순수한 식물사료나, 건강에 해로운 항생제가 포함되는 사료를 대체하는 천연적 대안을 지지하는 REPLACE를 추진하고 있다. 이에 따라 국내에서도 항생제 대체 천연물질에 대한 관심과 생균제 개발에 대한 요구가 점차 거세지고 있으며 천연물질에 대한 관심이 증폭되고 있다.

국내에서는 최근까지도 축산에서 가축사료에 항생제를 첨가함으로써 병원균의 성장을 억제시키고 가축의 성장을 촉진시켜 생산성의 향상을 추구하고 있다. 하지만 이러한 항생제의 사용으로 인한 내성균 출현과 식육내의 항생제 잔류 문제 등은 국민위생에도 심각한 영향을 미치고 있다. 따라서 최근 전 세계적으로 항생제 사용에 대한 규제가 강화되면서 그 대안으로 비항생제적 생물학적 방법에 의한 생균제가 항생제 대체물질로 부각되면서 생균제에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다. 생균제는 숙주의 장내 미생물 군총의 균형을 유지시켜 숙주동물에게 이로운 영향을 미칠 수 있는 살아있는 미생물 사료 첨가제로서 유익한 미생물의 장내 우점을 유도하여 동물의 건강을 증진시키고 동물의 성장을 촉진시킬 수 있다고 알려져 있다. 생균제의 사료 첨가는 자돈의 설사를 방지하며 장내 효소의 활성을 증가시켜 사료내 영양소의 이용율을 향상시킬 수 있다고 보고 되었다. 또한 분뇨내 악취의 원인으로 알려진 암모니아 가스의 양을 줄인다고 알려져 있다.

현재까지의 생균제에 대한 연구들은 성장촉진 효과 및 유해가스 감소에 초점이 맞추어져 있었다. 하지만 생균제를 이용하여 면역증강효과를 높일 수 있다면 동물의 항병력이 강화되어 동물의 건강을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 항생제의 사용을 줄일 수 있을 것이다. 주로 면역에 관여하는 싸이토카인인 interleukin-2 (IL-2)의 주 작용은 세포독성 T세포, B세포, NK세포 및 단핵구를 활성화시키므로써 염증과 감염에 대해서 중요한 면역반응 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 IFN- γ 는 macrophage 및 NK cell을 활성화시킨다. 따라서 생균제에 IFN- γ 와 IL-2를 클로닝하여 만든 면역증강생균제의 투여는 동물 체내에서 여러 면역세포들의 면역기능을 강화시켜 다양한 병원체에 대한 저항력을 증강시킬 수 있을 것이다.

이러한 면역기능강화 생균제가 개발되면 면역증강에 의해 여러 질병들을 예방할 수 있게 되어 사료첨가 및 치료용 항생제의 사용이 줄어들게 될 것이다. 더불어 그에 따른 인력 및 경비 절감으로 막대한 생산성을 추구할 수 있다. 또한 항생제등 항균제의 오·남용에 따른 식육 중 항생제 잔류 등 축산물 안전성에 관한 문제를 해결하는데 도움이 될 것이다. 현재 많은 축산농가에서 생균제를 사용하는 주된 이유는 생산성과 분뇨의 악취를 줄여주는데 있다. 그러나 면역기능강화 생균제가 개발 보급

되면 분뇨의 악취 감소 뿐만아니라 동물의 면역기능 강화를 통한 건강한 가축의 사육을 통해 축산업의 생산성이 향상되어 축산농가에게 경제적 이익을 극대화 시켜주고 날로 위축되어 가는 국내 축산업의 경쟁력을 제고하고 농민의 축산의욕을 고취시키고 천연영농을 촉진시켜 향후 우리 축산업의 발전 방향인 친환경축산의 기반을 구축하는데 크게 기여할 것으로 기대한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 면역자극 유도물질을 분비하는 생균제 개발하고 개발된 생균제의 면역기능 강화 효과를 규명하기 위해 돼지의 IL-2 유전자를 plasmid에 cloning 하여 우수 생균제 균주인 *Lactobacillus acidophilus* 균주에 삽입하여 돼지용 IL-2 발현 생균제를 개발하였다.

면역기능강화 변이 생균주의 제조확인 검사를 위하여 PCR 및 Southern blot를 실시하여 IL-2 gene의 존재여부를 확인하였다.

면역기능강화 변이 생균주의 IL-2 cytokine 발현 및 분비 여부를 anti-IL-2 단클론 항체를 이용하여 Western blot 방법 및 ELISA방법으로 검사하였다.

돼지의 IFN-r 유전자를 plasmid에 cloning하여 *Lactobacillus acidophilus* 균주에 각각 삽입하여 돼지용 IFN-r 발현 생균제를 개발하였다.

면역기능강화 변이 생균주의 제조확인 검사를 위하여 PCR 및 Southern blot를 실시하여 IFN-r gene의 존재여부를 확인하였다.

면역기능강화 변이 생균주의 IFN-r protein 발현 및 분비 여부를 anti-IFN-r 단클론 항체를 이용하여 Western blot 방법 및 ELISA방법으로 검사하였다.

면역기능증강 효과를 규명하기위하여 돼지에 면역기능강화 생균제를 급여한 그룹과 일반 생균제를 급여한 그룹의 세포성면역과 체액성 면역효과를 검토하였다.

면역능력 향상 효과를 규명하기 위하여 말초혈액과 비장에서 T cell 과 B cell을 분리하여 유세포 분석기를 이용하여 CD4 T cells, CD8 T cells 및 B cells 의 분포율을 비교분석 하였다.

돼지에 개발된 면역기능강화 생균제를 급여한 후 돼지의 백신에 대한 면역증강 효과를 검토하였다.

백신을 접종하고 그 백신에 대한 항체가 생성 정도를 ELISA 방법으로 측정하여 생균제 투여후의 자돈에서의 면역 증강 효과를 검토하였다.

개발 우수 생균주 선발과 면역기능강화 생균제 투여 동물의 항병력을 알아보기 위하여 살모넬라감염증에 대한 항병성을 검토하였다.

이 균들의 내열성, pH 내성 및 내 담즙성등을 검사하여 비교한 후 최종 선발된 균주들을 변이 생균주를 제조하는데 사용할 수 있도록 하였다.

제조한 면역기능강화 *Lactobacillus acidophilus* 균주를 대량 증식할 수 있는 증식조건을 확립하였다.

면역기능강화 생균제를 급여한 돼지에서 면역기능 증강으로 항병력이 증가되었는가를 확인하기 위한 인공 감염 실험을 실시하였다.

돼지의 소화기계의 병원성 세균인 *Salmonella sp.*를 이용하여 인공 감염시킨 후 질병발생 정도와 억제 효과를 조사하였다.

인공감염 후 육안적인 임상증상 및 설사 발생정도 등을 조사하였다.

인공감염 후 분비되는 분변 내 총 세균수 및 병원성 살모넬라의 수를 측정하였다.

인공감염 후 변화된 장관내의 부검 소견 및 병리학적 소견을 비교분석하였다.

인공감염 후 세포성 면역반응을 측정하기 위하여 말초혈액내의 면역물질을 측정하였다.

면역기능강화 생균제의 생산성 및 친환경 효과를 확인하였다.

항생제 대체효과를 규명하기 위하여 면역기능강화 생균제를 급여하여 사료내 항생제 무 처리구와 항생제 처리구로 나누어 사양시험을 실시하였다

사양시험에서는 증체량, 사료 섭취량, 사료요구율 등 사양성적을 조사하였다.

면역기능강화 생균제의 친환경 효과 검토를 위하여 돼지의 분변내 암모니아태 질소 함량을 측정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

돼지의 cytokine IFN- γ 와 IL-2를 발현하는 *Lactobacillus acidophilus*를 성공적으로 개발하였다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한 후 면역증강효과를 검사한 결과 혈액내 면역세포의 변화와 혈청내 스트레스지표에는 유의적인 차이는 없었다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한후 혈액내 T-cell의 분포와 백신접종 후 항체가 변화에서도 약간 증가하는 경향이 있었지만 유의적인 차이는 없었다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한후 분변내의 암모니아 농도는 감소하는 경향이 있었다. 돼지에 면역증강생균제를 급여한후 *Salmonella*를 이용하여 공격접종을 실시하여 그 방어효과를 측정한 결과 분변에서 살모넬라의 검출율이 감소하는 경향을 보였다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한후 *Salmonella*를 이용하여 공격접종을 실시하여 그 방어효과를 측정한 결과 장간막임과절의 육안적소견에서 개선되는 효과를 보였다

살모넬라 투여후 설사를 보이는 자돈과 개발 생균제를 급여한 그룹의 자돈을 그룹별로 감염 1주와 2주째에 각각 1두씩 부검한 결과 살모넬라균 단독 투여군에서는 장벽의 충출혈과 궤양 소견이 나타났으나 생균제 투여군에서는 약한 정도의 충출소견이 관찰되었을 뿐 궤양과 출혈 소견은 나타나지 않아 생균제의 투여가 장벽의 보호 효과를 보이는 것으로 나타났다.

개발 생균제의 자돈에서의 대장균 감염증에 대한 항병 효과를 알아보기 위하여 자돈에 대장균을 감염시키고 생균제를 급여하면서 대장균 감염증에 대한 방어 효과를 검토하였다. 대장균 인공감염 자돈들은 감염 2일째부터 심한 설사를 보이기 시작하였고 지속적으로 설사를 보이면서 폐사하기 시작하였으나, 생균제를 급여한 그룹에서는 대장균만 투여한 그룹에 비하여 폐사율이 유의하게 감소하였고 평균 증체율에 있어서도 유의적인 차이는 아니지만 체중 증가량이 보다 높게 나타나 질병의 방어 효과는 물론 생산성의 향상에도 기여할 것으로 판단되었다.

생균제 첨가에 의한 돼지의 사양시험 결과는 생균제 처리구에서 비처리구보다 일당 증체량, 일당 사료섭취량 및 사료효율에 있어서 증가하는 것으로 나타났다. 돼지에 면역증강생균제를 급여한 후 면역증강효과를 검사한 결과 혈액내 면역세포의 변화와 혈청내 스트레스지표에는 유의적인 차이는 없었다. 돼지에 면역증강생

균제를 급여한 후 혈액내 T- cell의 분포와 백신접종 후 항체가 변화에서도 약간 증가하는 경향이 있었지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 돼지에 면역증강 생균제를 급여한 후 분변내의 암모니아와 아민의 농도가 감소하였고 일일 증체량의 증가가 관찰되었고 사료 요구율에서 좋은 효과를 보이는 것으로 나타났다.

돼지에 면역증강 생균제를 급여한 후 Salmonella를 이용하여 공격접종을 실시하여 그 방어 효과를 측정된 결과 분변에서 살모넬라의 검출율이 감소하였고 장간막임파절의 종대가 감소하여 살모넬라 병변이 개선되는 효과를 보였다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한 후 Salmonella를 공격접종하여 그 방어효과를 측정된 결과 장간막임파절에서 salmonella 분리율이 감소하여 살모넬라 감염률을 낮추는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해보면 면역증강 생균제를 급여한 돼지에서 면역증강효과를 측정된 결과 약간 증가하는 경향이 있었지만 유의적인 차이는 없었다. 하지만 살모넬라를 공격접종한 결과 분변내의 살모넬라 분리율과 장간막임파절에서의 살모넬라 분리율이 현저히 감소하였다. 따라서 면역증강생균제는 돼지의 설사 질병에 효과가 있는 것으로 판단되며 이를 이용하여 바이러스성 설사에서의 효과등이 연구되어야 할 필요가 있다.

2. 연구결과의 활용

본 연구에서 개발된 2종의 면역증강 생균제에 대한 기술 특허를 출원하였고 국내 학술지에 2편의 논문을 게재하였다. 또한 개발된 2종의 생균제의 균주 기탁과 균주를 특허 출원하였고 기술이전을 통한 대량 생산에 대한 내용과 농가 보급 방안을 기업과 협의 중에 있다.

개발된 면역증강 생균제가 돼지의 세균성 설사 질병에 좋은 효과를 보이는 것으로 판단되나 바이러스성 질병에 대한 예방 효과를 검토하지 못해 이에 대한 연구가 보완되어야 할 것으로 사료된다.

한편, 개발된 생균제의 상업화를 위해서는 저렴한 가격의 판매가 중요한데 생균제의 대량생산에 드는 비용과 판매 예상 수익의 차이가 있어 기업에서 이윤추구에 문제가 발생하고 있다. 따라서 저렴한 가격에 농가에 보급이 어려워 농가에서 부담을 줄이고 사용할 수 있도록 대량 생산 시설의 확보를 위한 다른 지원 방안이 요구된다고 하겠다.

SUMMARY

(영문요약문)

Annual antibiotics consumption is estimated approximately 30 tons considering total annual consumption of food additive. Consumption of antibiotics is partly decreasing due to the problems caused by remains from live stock and antibiotics resistance bacteria. Meanwhile the total world consumption is expanding along with increase in live stocks as a result of promotion of growth of youngster and constraining of bad bacteria and inhibiting parasite.

Antibiotics have been used to control infectious diseases in animals such as diarrhea and pneumonia in swine and dogs for long times. However, there was no guideline to control abuse and misuse in the use of the antibiotics. Now, there was not much of choice to use antibiotics since lots of antibiotics-resistant bacteria had been appeared due to abuse or misuse of the antibiotics. Therefore, alternatives including *Lactobacillus* have been required to control the diseases. *Lactobacillus* has been focused as live vector because the bacteria can propagate in the intestine after feeding. Also, researches on the *Lactobacillus* such as genetics have been done by the development of several techniques in molecular biology. Recently, techniques on the transformation and expression with the bacteria have been developed.

Probiotics had been defined as the live bacteria which can give a benefit to the host by changing the microflora in intestine. Recently, several *Lactobacillus* have been used for the purpose in swine industry.

Also, the bacteria must have several properties such as resistance to gastric acid and bile salt, ability to adhere and propagate in the small intestine to use as probiotics. In addition to those factors, cost to produce and use should not be expensive.

Cytokines are small molecules that can control immune responses by activation of immune cells against the stimuli including the bacterial infection. Attempts have been made to use the cytokines as the indicator of early infection, adjuvants in vaccine and other studies.

Economic loss in Korean swine industry can estimate about two hundred billions due to diseases. Similar economic loss have been reported in several different countries even though there were some different depending on the size

of farms, degree of sanitation, knowledge on the swine technology, etc.. Therefore, several attempts have been made to decrease the economic loss.

Lactobacillus as a probiotics is already proven as GRAS (Generally Recognized As Safe) in safety and has been used as a feed additive and animal medicine in animal industry to improve the productivity. If the bacteria can produce some molecules that may improve the immune responses and enhance the prevention of the diseases, the bacteria would be more attractive as a probiotics. Also, it will increase the economical benefit to the farmers in animal industry.

Korean swine industry obtains high technology among Asian countries. Meanwhile, it has many problems such as high dependency in imported feed and breeding pigs and most recently environmental concern has been raised. It is desperately needed to develop new technologies which can provide with high productivity aiming at high value added and as a way of giving hope and encouragement to those who work in live stock industry.

It is well known that the young weaning pig is abruptly subjected to a radical change in diet coupled with the waning of maternally derived serum immunoglobulins and the withdrawal of the locally protective elements of milk. It usually resulted in the onset of the syndrome of postweaning diarrhoea, characterized by villus atrophy, malabsorption due to enterocyte immaturity and bacterial overgrowth and To date, nothing is known about any in vivo function of IL-2 on the innate immune responses in newly weaned piglets. In the present study, we investigated the potential effects of IL-2 on the CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes subpopulations percent (in 1×10^6 PBMCs), IFN- γ and IL-2 production in serum, PBMCs proliferation. This paper reports for the first time the in vivo immunostimulatory effects of IFN- γ and IL-2 on the innate immune responses in newly weaned piglets.

According to the research conducted by National Dairy Board, public health is endangered by abusing and misusing of insecticide, herbicide and the antibiotics which causes antibiotics-resistance bacteria. For that reason, it is more in need to develop alternative methods in live stock industry which increase feeding efficiency while constraint the use of antibiotics. Korea is no exception under the rule of trade liberalization of WTO and in turn, it is unavoidable to restrict the

use of antibiotics in domestic live stock market. Considering the current situation in live stock industry as described the above, this research can contribute to live stock industry by proving *Lactobacillus* expressing IFN-r and IL-2, as a probiotics can prevent animal diseases.

Isolation and preparation of immune cells from swine and isolation of total RNA from the cells and generation of cDNA. Cloning and characterization of Pig IFN-r and Pig IL-2 from swine. Preparation of vector to express the cloned genes in *Lactobacillus*.

Production of transformants expressing the Pig IFN-r and IL-2.

Development of transformation technology in *Lactobacillus*.

Transformation of the cloned Pig IFN-r and IL-2 into the *Lactobacillus*.

Expression and charaterization of the Pig IFN-r and IL-2 in *Lactobacillus*.

Application of the *Lactobacillus* expressing Pig IFN-r and IL-2 to animals.

Animal experiment of the *Lactobacillus* expressing Pig IFN-r and IL-2 in swine.

Examine the immune responses after administration.

Animal experiment of the *Lactobacillus* expressing Pig IFN-r and IL-2 in swine.

Examine the immune responses after administration.

Surveillance of diseases after administration.

To study the immune response induced by 120 piglets of both sexes of mixed genetic background, 2 months of age and free of PED virus, were purchased in a rural farm in the Chonan city and kept in the farm of the Yonam college in controlled sanitary conditions to prevent infections.

Sera from pigs immunized with PED virus were processed to measure specific antibodies by ELISA. To reduce unspecific binding of sera pig components, an enriched Ig fraction of the sera was precipitated by ammonium sulphate, chromatographed and rediluted in 0.15 M PBS before assessment of serum antibody levels by ELISA.

Preparation of techniques to express the cloned genes in *Lactobacillus*. Establishing foundations to express useful immune-activating substances and proteins based on this study of *Lactobacillus* expressing canine Pig IFN-r and IL-2.

Presenting possibilities to produce *Lactobacillus* expressing these various substances in large quantities at low cost.

However, recently food additive market is under various restrictions for antibiotics which promotes growth of youngsters and prevents diseases. Internationally, the use of antibiotics as food additives is prohibited and Korea is not an exception. Besides, the current trend concerning the safety of meat helps to bring probiotics into attention. Thus, efficacy of *Lactobacillus* expressing Pig IFN- γ and IL-2 proven by this study enhances animal hygiene and public hygiene as new probiotics. Also, it will be considered to be a huge contributor of livestock industry thanks to currently raising well-being trend.

Development of *Lactobacillus* expressing Pig IFN- γ and IL-2 which enhances immune function and bioavailability will substitute antibiotics for probiotics and make use of nutritional food additive. Therefore, this product is expected to have international competitiveness.

CONTENTS

Chapter 1. Intoroduction of the project -----	14
Chapter 2. Status and problems in related technology in domestic and overseas -----	17
Chapter 3. Contents of the project and its results -----	23
Section 1. Development and effect of a recombinant pig INF-r and IL-2 gene into <i>Lactobacillus</i> -----	24
Section 2. Effects of INF-r and IL-2 gene cloned probiotics on the immune system of pig -----	57
Section 3. Clinical efficacy test for pig INF-r and IL-2 gene cloned probiotics on pig with salmonella -----	68
Section 4. Effects of pig INF-r and IL-2 gene cloned probiotics on pig against pathogens -----	76
Section 5. Clinical efficacy test for pig INF-r and IL-2 gene cloned probiotics on pig -----	96
Chapter 4. Accomplishment and subsequent contributions -----	111
1. Accomplishment -----	111
2. Subsequent contributions -----	112

Chapter 5. Application of the results ----- 113

Chapter 6. International trend and scientific information -- 115

Chapter 7. Reference ----- 117

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절	면역 기능 강화 생균제 개발 및 면역 증강 효과 규명	
1.	연구 재료 및 방법	23
2.	연구결과 및 고찰	24
제 2 절	면역강화 생균제의 면역증강 효과 및 항병력 효과 규명	57
1.	연구방법	57
2.	연구결과 및 고찰	58
제 3 절	면역증강 생균제의 Salmonella에 대한 항병력 증강효과 규명	68
1.	연구방법	68
2.	연구결과 및 고찰	70
제 4 절	생균주 투여 동물의 항병력 효과	76
1.	연구방법	76
2.	연구결과 및 고찰	80

제 5 절 생균제의 사양 효과 및 친환경 축산물 생산	96
1. 연구방법	96
2. 연구결과 및 고찰	100
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	111
제 1 절. 목표달성도	111
제 2 절. 관련분야에의 기여도	112
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	113
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	115
제 7 장 참고문헌	117

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 목적

돼지에서 설사증은 생산성 저하의 주요 원인으로 양돈산업에 심각한 피해를 주고 있다. 따라서 이러한 설사증을 치료하기 위해 다양한 항생제가 상시로 사용되고 있어 국내에서도 항생제 오남용과 그로인한 내성균의 출현이 급증하는 등 부작용이 커지고 있다. 항생제를 대체 할수 있는 대체 항생제에 대한 연구가 절실하다.

유산균은 사료를 통해 쉽게 동물에 섭취될수 있고 장에 정착하여 생존할 수 있기 때문에 살아있는 유전자 운반체로서 신개념의 동물용 생균제 개발에 매우 좋은 재료로 활용되고 있다. 또한 분자유전학적인 발전에 따라 유산균의 유전학적 연구가 많이 진행되어 유산균주에 대한 재조합도 활성화 되고 있다. 최근에는 유전자 클로닝 기법을 이용하여 새로운 유전자를 유산균에 삽입하여 새로운 형질을 발현하도록 하는 연구가 시도되고 있다.

본 연구에서는 생균제로 주로 사용되는 유산균인 *Bacillus subtilis* 에는 돼지의 면역기능을 증강시킬 수 있는 porcine IL-2 유전자를 *Lactobacillus acidophilus* 균주에는 porcine IFN-r 유전자를 각각 cloning 하여 표면에서 이러한 IL-2와 IFN-r 가 분비되는 면역기능강화 생균주를 개발하고 돼지에 면역기능강화 생균제를 일정기간 급여한 후 면역기능증강 효과를 규명하고 면역기능강화 생균제의 급여 후 돼지의 면역기능 증강으로 항병력이 증가되었는가를 확인하였다.

나. 연구개발의 필요성

2005년 말 부터 EU는 가축의 성장 촉진(GPAs : Growth-promoting antibiotics) 용 항생제 사용을 금지하도록 규제하고 있다. 양계, 양돈 및 수생물 사육업자들은 대부분 GPAs에 의존하고 있기 때문에 성장촉진용 항생제의 금지는 국내 축산업계에 커다란 충격을 주게 될 것이다. EU에서는 FP6(6th framework programme)의 일환으로 순수한 식물사료나, 건강에 해로운 항생제가 포함되는 사료를 대체하는 천연적 대안을 지지하는 REPLACE를 추진하고 있다. 이에 따라 국내에서도 항생제 대체 천연물질에 대한 관심과 생균제 개발에 대한 요구가 점차 거세지고 있으며 천연물질

에 대한 관심이 증폭되고 있다.

국내에서는 최근까지도 축산에서 가축사료에 항생제를 첨가함으로써 병원균의 성장을 억제시키고 가축의 성장을 촉진시켜 생산성의 향상을 추구하고 있다. 하지만 이러한 항생제의 사용으로 인한 내성균 출현과 식육내의 항생제 잔류 문제 등은 국민위생에도 심각한 영향을 미치고 있다. 따라서 최근 전 세계적으로 항생제 사용에 대한 규제가 강화되면서 그 대안으로 비항생제적 생물학적 방법에 의한 생균제가 항생제 대체물질로 부각되면서 생균제에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다. 생균제는 숙주의 장내 미생물 군총의 균형을 유지시켜 숙주동물에게 이로운 영향을 미칠 수 있는 살아있는 미생물 사료 첨가제로서 유익한 미생물의 장내 우점을 유도하여 동물의 건강을 증진시키고 동물의 성장을 촉진시킬 수 있다고 알려져 있다. 생균제의 사료 첨가는 자돈의 설사를 방지하며 장내 효소의 활성을 증가시켜 사료내 영양소의 이용율을 향상시킬 수 있다고 보고 되었다. 또한 분뇨내 악취의 원인으로 알려진 암모니아 가스의 양을 줄인다고 알려져 있다.

현재까지의 생균제에 대한 연구들은 성장촉진 효과 및 유해가스 감소에 초점이 맞추어져 있었다. 하지만 생균제를 이용하여 면역증강효과를 높일 수 있다면 동물의 항병력이 강화되어 동물의 건강을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 항생제의 사용을 줄일 수 있을 것이다. 주로 면역에 관여하는 싸이토카인인 interleukin-2 (IL-2)의 주작용은 세포독성 T세포, B세포, NK세포 및 단핵구를 활성화시키므로써 염증과 감염에 대해서 중요한 면역반응 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 IFN- γ 는 macrophage 및 NK cell을 활성화시킨다. 따라서 생균제에 IFN- γ 와 IL-2를 클로닝하여 만든 면역증강생균제의 투여는 동물 체내에서 여러 면역세포들의 면역기능을 강화시켜 다양한 병원체에 대한 저항력을 증강시킬 수 있을 것이다.

이러한 면역기능강화 생균제가 개발되면 면역증강에 의해 여러 질병들을 예방할 수 있게 되어 사료첨가 및 치료용 항생제의 사용이 줄어들게 될 것이다. 더불어 그에 따른 인력 및 경비 절감으로 막대한 생산성을 추구할 수 있다. 또한 항생제등 항균제의 오·남용에 따른 식육 중 항생제 잔류 등 축산물 안전성에 관한 문제를 해결하는데 도움이 될 것이다. 현재 많은 축산농가에서 생균제를 사용하는 주된 이유는 생산성과 분뇨의 악취를 줄여주는데 있다. 그러나 면역기능강화 생균제가 개발 보급되면 분뇨의 악취 감소 뿐만아니라 동물의 면역기능 강화를 통한 건강한 가축의 사육을 통해 축산업의 생산성이 향상되어 축산농가에게 경제적 이익을 극대화 시켜주고 날로 위축되어 가는 국내 축산업의 경쟁력을 제고하고 농민의 축산의욕을 고취시

키고 천연영농을 촉진시켜 향후 우리 축산업의 발전 방향인 친환경축산의 기반을 구축하는데 크게 기여할 것으로 기대한다.

제 2 장. 국내외 기술 개발 현황

생균제(probiotics)는 항생제의 대체 물질로서 숙주의 장내 미생물 군총의 균형을 유지 시켜 숙주 동물에게 이로운 영향을 미칠 수 있는 살아있는 미생물 사료 첨가제로서 유익한 미생물의 장내 우점을 유도하여 동물의 건강을 증진시키고 동물의 성장을 촉진 시킬 수 있다고 알려졌다(Fuller, 1989). 이유 자돈에서 이유시 갑작스런 사료 및 환경의 변화에서 오는 스트레스로 장내 미생물 군총의 급격한 변화로 인해 심각한 설사가 있다고 알려져 있다(Hale과 Newton, 1979; Pollman 등, 1980). 생균제의 사용이 설사 방지와 더불어 자돈의 생산성을 증진 시키는 효과가 있으며(Pollman 등, 1980; Collington 등, 1988; 장 등, 2000). 생균제의 사료내 첨가가 자돈뿐만 아니라 육성·비육돈에서도 성장능력 개선에 효과가 있다고 보고되었다(Baird, 1977). 또한 생균제의 첨가는 장내 효소의 활성을 증가시켜 사료내 영양소의 이용율을 향상시킬 수 있었으며(Mollgaard, 1946; Collington 등, 1988; Scheuermann, 1993), 면역능력을 향상시켜 동물의 건강을 증진시킬 수 있다고 보고되고 있다(Kato 등, 1983; Fuller, 1989).

현재까지의 생균제에 관한 대부분의 연구들은 주로 돼지의 사양시기를 자돈기와 육성·비육기로 나누어 그 효과를 단계별로 검증하였다(Hale과 Newton, 1979;Pollman 등,1980).

항생제는 치료의 목적보다 낮은 농도로 사료에 첨가되어 미생물의 성장을 저해하기위하여 사용하는 물질이다(Cromwell, 2001). 항생제는 지난 50여년 이상 가축의 성장을 향상시키고 농장의 사양 환경에서 질병을 예방하는 차원에서 널리 사용되어져 왔다(Gustafson 등, 1997). 이러한 항생제의 급여시 성장의 향상 효과에 가능성 있는 기전으로는 질병 인자를 가지고 있는 미생물의 저해와 동물의 성장을 저해하는 독소와 같은 미생물 관련 물질의 감소, 위장관 내에서 필수 영양소를 파괴하는 미생물의 저해 및 장관벽의 얇아짐으로 인한 영양소의 흡수 및 이용 효율의 향상등이 보고되어 있다(Vissek, 1978).

이러한 항생제의 동물 영양학에 있어서의 우수한 효과에도 불구하고 오늘날 항생제내성 미생물과 같은 잠재적인 공중 위생에서의 위험성으로 인해 많은 문제점이 제기되고 있는 실정이다(NRC, 1998). 유럽의 몇몇 나라는 사료 항생제 사용에 대해 엄격한 지침과 규제를 하고 있다. 이러한 관점에서 많은 사료업계 종사자 및 동물 영양학자들은 생균제, 식물성 추출물, 울리고 당류, 유기산과 같은 항생제 대체 물질에

대한 연구가 활발해 지고 있다. 따라서, 본 과제의 일련의 실험들은 이러한 관점에서 돼지 성장 개선 물질이자 항생제 대체 물질로서 가능성이 있는 생균제를 개발코저 한다.

동물의 성장능력과 건강상태의 개선에 의한 생산성 증진을 통해 양돈산업의 경쟁력향상이 요구되고 있다. 특히 돼지에서 자돈의 설사증은 성장능력감소와 폐사의 주요원인이며, 설사증의 예방, 치료를 위해서 항생제를 사용하나(Vissek, 1978; Walton, 1980), 축산물 내 잔류 및 내성에 관한 위험성이 부각되고 있다. 또한, 국내 축산업에 있어서도 사료내 항생제 첨가는 단계적으로 제한될 전망이며, 항생제의 대체 효과를 가지는 생균제가 이미 사용되고 있으나 그 효과는 미미한 실정이다.

생균제란 동물 또는 사람이 섭취하였을 때 장내 토착미생물들의 특성을 향상시켜 숙주에게 유익한 영향을 주는 살아있는 단종 또는 혼합된 균주들로 정의된다. 이러한 생균제는 가축이 섭취했을 때 성장촉진과 사료효율의 향상, 장내 미생물의 경합에 의한 어린 동물들의 장질환 방지 및 병원성 미생물 감소, 면역기능 향상 등 다양한 면에서 유익한 영향을 미치며, 그 결과로 돼지의 경우 설사에 의한 성장장애와 폐사율을 줄일 수 있다. 특히, 생균제와 특정 기질을 함께 사용하여 유발되는 시너지 효과에 의해 생균제가 발표된 이후, 생균제와 시너지 효과를 일으킬 수 있는 물질중 하나인 Probiotics는 사료 첨가제로서의 이용이 고려되어 왔다.

Probiotics란 장내에서 서식하고 있는 미생물들의 성장과 활력에 선택적으로 작용하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 비소화성 식품 성분들을 총칭하는 물질로서 생균제에 기질로 작용하여 궁극적으로는 숙주의 건강을 향상시키는 기능을 발휘한다. Probiotics는 특정균주의 선택적인 성장을 촉진하여 장관 내 미생물 균총을 변화시키며 대표적으로 inulin과 fructooligosaccharides(FOS)에 대한 연구가 이루어져왔다.

이유자돈의 설사는 이유 직후에 빈번히 나타나며, 여기에 관여하는 병원성 미생물들로는 enterotoxic E. coli(ETEC) (26%), Clostridial enteritis (18%), Coccidiosis (14%), Rotavirus (8%) 등이 알려져 있다. 이유자돈 설사증에 의해 장내 서식하는 Bifidobacteria와 lactobacilli를 감소하고, Enterobacteria는 증가시키는 것으로 알려져 있다(Kimura, 1983).

Lactobacillus reuteri에 의해 발효된 yoghurt와 milk를 생후 2일령 돼지에 급여하였을 때 장내 lactobacilli는 증가하고, E. coli는 감소되었다(Hoefling, 1989). 포유자돈에게 Bifidobacterium과 Bif. pseudolongum을 경구투여할 경우 임상적인 설사증을 예방하는 효과가 보고되었다(Ervolder, 1984). 또한, Enterococcus faecium C68을 4개월

동안 어린돼지에 급여하였을 때 증체량과 사료효율이 증가하고, 설사증은 감소하였다(Maeng 등, 1989).

비육돈에서도 생균제(*C. butyricum* ID)의 사용은 설사의 감소 및 병원성미생물 감염의 예방뿐만 아니라 성장률과 사료효율의 개선효과가 있는 것으로 알려져 있다(Pollman 등, 1980). 현재 시판되고 있는 생균제는 미생물 단독, 혹은 다양한 물질들과 혼합하여 사용되고 있으며 하루에 동물 개체 당 대략 10¹⁰ 수준의 미생물을 급여하는 방법을 사용하고 있으나 생존율에 근거한 정확한 수치, 투여량과 투여 방법에 따른 효과 등에 대한 자료는 제시되어 있지 않다(Tuschy, 1986).

양돈 사료의 세가지 주요 유형은 사균과 생균 *Lactobacillus* 또는 생균 *Enterococcus faecium*을 첨가하는 것으로 사료 1g당 10¹⁰으로 첨가하여 혼합하는 것이 일반적이다.

생균제내의 균주는 단독으로 사용되었을 때보다 혼합된 경우가 더 우수한 것으로 나타났으나 상반되는 결과도 보고되고 있어, 보다 체계적인 실험을 통해 생균제 기능을 향상시키는 방법이 모색되어야 할 것이다. 이들 생균제용 균주를 분체복합화하는 방법은 액상바인더의분무방식에 의한 피복방식보다 뛰어난 생존능력을 부여하는 것으로 알려져 있으며, pelleting후에도 약40% 이상의 균주가 생존하는 것으로 보고되었다(Lyons, 1988). 생균제는 분체복합화에 의한 내산성 및 장용성 생균제의 제조 후 2차적인 처리로 전분 및 증량제 등으로 외층을 감싸고 재차 구형화처리를 해줌으로써 분말의 입도를 균일하게 제어 할 수있으며 소량으로 이용율을 극대화함으로써 경제성을 제고하는 방안으로 기대된다. 이러한 생존율은 미생물의 성장 조건, 회수 방법, 저장 환경, 저장기간, 사료에 첨가하는 방법에 따라 매우 상이하며 특히 *lactobacilli*는 동결건조, 통풍건조에 민감한 것으로 알려져 있고 *lactobacilli* 보다 *streptococci*가 더 열악한 환경에서도 견디는 것으로 알려져 있다(Hardis, 1986; Mundt, 1986). 그밖에는 *Bacillus*와 *Clostridium*이 생균제로 사용되어 왔다(Han 등, 1984).

일반적으로 사료에는 heteropolysaccharides인 glucans, fructans, arabans 및 xylans, 그리고 heteropolysaccharides인 arabinoxylan, gluconoxylans, 기타 oligosaccharides등의 탄수화물이 존재하며 이들중 oligosaccharides는 Prebiotics로서 생균제의 기질로 사용되어 활력증진효과를 나타낼 수 있다. 이에 지금까지 생균제와 Probiotics를 함께 혼합하여 급여한 연구 결과는 있으나, 복합분체의 시너지 효과를 검증한 연구가 수행된 바 있다.

Probiotics로서 oilgofructose는 소장에서 흡수되지 않고, 장내 Bifidobacteria의 성장을 증진시킨다. 일반적으로 oilgofructoses는 단맛이 나며 향기 및 기호성이 좋고 높은 용해도를 갖는다(Niness, 1999). Inulin과 oilgofructose는 장내 미생물 균총, 장관 생리, 면역기능, 미네랄의 생체이용성 및 지질대사에 유익한 조절인자로 작용하며, 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다(Roberfroid, 1999).

유산균을 이용한 여러 종류의 생균제가 개발되어 있지만 이는 사료효율증진, 장내 정상작용, 유해세균 및 독소의 흡착 및 배설에 의한 분변내 악취 감소 효과를 위주로 하고 있을 뿐 본 연구에서 목표로 하는 면역기능 및 질병 억제 효과를 가진 생균제는 아직 까지 개발되어 있지 않다.

유럽에서 유통 중인 .프로바이오틱스 제품을 수거하여 검사한 결과 대부분의 제품에서 균주 이름의 오기 균수의 부 , 족 등이 관찰되었다. 일종의 식품미생물학 교재인 에서도 Fundamental Food Microbiology 실제적으로는 유산균이 거의 모두 죽어 있는 이들 제품에 대해서는 건강 기능성 효과가 없는 것으로 제시하였다.

프로바이오틱스는 병원성 미생물과 경합하여 장내의 영양분을 선점할 수 있고 장점막 부위에 병원성 균과 경쟁적으로 먼저 부착할 수 있다 또한 다양한 종류의 항균성 물질을 생산하거나 생체의 면역 증진을 통하여 병원균의 증식을 억제할 수 있다.

보통 로타바이러스는 자연적으로 장관내로 감염되어 어린이나 어린 동물들에게서 설사를 일으킨다. 로타바이러스의 작용 기작은 동물에서 많이 알려져 있으며 로타바이러스는 주로 상피 세포층 상부의 성숙된 상피 세포에서 증식한다. 이것은 분화된 장상피세포가 감염과 복제에 필요한 인자들을 많이 가지고 있기 때문으로 보인다. 로타바이러스의 감염은 소장 상피 세포의 기능을 변화시켜 설사를 유발하게 되고 설사는 보통 영양소 흡수 불량과 상피 세포 파괴를 가져 온다. 흡수 불량은 분해되지 않은 단당류 이당류 지방 단백질을 대장으로 이동하게 하고 대장은 충분한 수분을 흡수 할 수 없어서 삼투성 설사를 초래하게 된다. 로타바이러스는 또한 장 상피 세포에서 와 케모카인의 분비를 유도하는데 이것들은 감염에 대한 면역 반응을 시작하는 인자들로 알려져 있다. 한편 Lactobacillus는 숙주의 물리적인 방어 기능을 포함한 여러 방어 기작에 도움을 줌으로서 병원성 균에 대한 억제하는 것으로 알려져 있다.

프로바이오틱 Lactobacillus를 투여한 아이들은 아토피가 감소하였고 혈중의 CD4 농도와 혈중 또는 요중의 염증성 지표 물질인 eosinophil cationic 단백질을 감소시켰다. 또한 프로바이오틱스 투여군의 분변 TNF- α 감소가 나타났으며 Lactobacillus

가 포함된 요구르트를 12개월 이상 섭취한 건강한 노인을 대상으로 한 실험에서 요구르트를 섭취하지 않은 군에 비하여 알레르기 증상이 더 낮은 빈도로 나타났다.

혈장 중의 IL-2, IL-4, IL-6, IL-1, TNF- α , TGF-1, TGF-2, C-reactive protein을 비교 연구한 결과는 C-reactive protein과 IL-6는 *L. rhamnosus* 투여군에서 IL-10 수준이 상승한다고 보고하였다.

다양한 동물 실험에서는 숙주의 면역계 이상이 염증성 대장 질환을 유발하는 주요 원인으로 나타났다. 예를 들어 사이토카인이나 사이토카인 수용체 혹은 면역 물질을 코딩하고 있는 유전자를 변형할 경우 염증성 대장 증상이 쥐의 대장에서 주로 나타났다고 보고되어 장관의 미생물 환경이 대장 질환의 진행에 관련이 있는 것으로 사료된다.

DC Th1의 항원 제시는 림프구를 자극하게 되며 이것은 IL-2와 IFN- γ 를 통해 대식 세포의 활성화를 유도하게 된다. 이는 다른 사이토카인이나 매개체인 IL-12와 IL-18의 분비를 유도한다. 활성화된 대식세포는 IL-1, IL-6 TNF- α 를 분비하여 염증반응을 증폭시키게 된다.

유산균의 작용 메커니즘은 여러 가지로 생각되고 있는데 여기에는 병원성 미생물의 성장 억제로 점막층에 부착하거나 투과하려는 병원균을 억제하고 점막층의 기능을 자극하거나 염증성 물질과 방어 물질을 증진시켜서 면역을 조절하는 기작으로 생각되고 있다.

프로바이오틱스를 이용한 다양한 임상 실험 결과들은 유산균을 부작용이 적은 자연적인 치료방법 및 예방 물질로서의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 유해 세균 및 로타바이러스 등의 유해 미생물의 증식을 억제하고 아울러 알레르기와 염증성 장관 질환 억제능력이 우수하고 장내 정착성이 좋은 프로바이오틱스 균주를 개발하는 것이 필요하다.

특히 프로바이오틱스의 섭취는 숙주의 장내 세균총에 미치는 영향이 크므로 장내의 우점균으로서 *Lactobacillus* 와 상피 세포의 접착력과 장내 면역 반응의 조절에 대해 고려해야 할 것이다. 즉 미생물과 숙주 세포 그리고 점막과 면역 방어체계에 대한 연구가 보완 되어야 할 것으로 보인다.

항생제 오남용에 대한 인식이 확산되면서 축산물 소비자들의 친환경 축산물에 대한 욕구는 갈수록 증가하고 있다. 따라서 양돈에 있어서도 친환경 사육환경 조성의 필요성이 대두되고 있다.

여러 종류의 수입 생균제를 포함한 국내 시판되고 있는 생균제는 사료효율증진,

변비예방, 장내 정장작용, 유해세균 및 독소의 흡착 및 배설에 의한 해독작용과 축사 내 악취감소에 다소의 효과가 있다고 알려져 있지만 최근의 저 항생제 사육과 양돈의 생산성을 향상시키기에는 턱없이 부족한 형편이다. 따라서 국내 축산 농가에게 희망을 주고 국제 경쟁력을 확보한 유기농 축산을 시작하기 위해서는 항병력을 가진 생균제의 개발이 필수적이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 면역기능 강화 생균제 개발 및 면역증강 효과 규명

본 연구에서는 *Lactobacillus acidophilus*를 이용하여 돼지의 면역기능을 증강시킬 수 있는 porcine IL-2 유전자와 porcine IFN-r 유전자를 각각 cloning 하여 생균제 표면에서 pig IL-2와 IFN-r 가 분비되는 면역기능강화 생균주를 개발하고 면역기능증강 효과를 확인하는데 있다.

1. 연구 재료 및 방법

1) 실험 방법 및 설계

가) 공시동물

사양시험은 13주령 비육전기돈을 사용하여 전남대학교 시험돈사에서 실시하였다. 공시동물로는 평균체중이 53.3kg인 비육전기돈인 삼원교잡종 (Landrace x Large White x Duroc) 암컷을 공시하였다. 처리는 2처리에 각각 5두씩 총 10 마리를 이용하여 실시하였다.

나) 시험설계 및 사양관리

처리 I 은 대조구로 처리II는 대조구 사료에 우수 생균주 *B. subtilis*, *L. acidophilus*를 각각 1%을 첨가한 처리구로 하였다. 사료는 자동급이기, 물은 자동급수기에 의해 자유 채식시켰으며, 기타 사양관리는 전남대학교 시험돈사 표준 사양관리법에 준하였다.

다) 돼지의 장관내 정상 세균총에 대한 조사

비육전기돈에 대한 정상 세균총 검사를 실시하고자 처리군별로 5두씩 각각의 소장과 장간막 임파절에서 세균검사를 실시하였다. 장관내 정상 세균총에 대한 조사는 검사 대상 돼지의 장관내용물을 약 10배 가량의 Selenite broth (Difco)에 증균하여 혈액배지, Salmonella-Shigella agar (Difco) 및 MacConkey agar

(Difco)에서 분리 배양한다. 집락을 선택한 후 생화학적 검사를 실시하여 균체를 동정하였다.

2. 연구 결과 및 고찰

1) 우수생균주 선발 및 생균제 대량 증식법 확립

가) 우수생균주의 발굴 및 우수생균주의 생물학적 특성 규명

우수생균주를 분리 동정하기 위하여 돼지의 장관과 토양에서 채취한 가검 재료를 검량하여 5% 면양혈액한천배지에 접종하여 37°C, 10% CO₂에서 초대배양하여 집락을 선택하여 37°C에서 24시간 계대 배양한 후 catalase, gram stain, H₂S, indole 등의 test로 균들을 분리 동정하였다.

면양혈액 한천배지에서 생성된 집락을 선택하여 생화학 검사 결과를 토대로 *B.subtilis*, *L.acidophilus* 를 분리 동정하였다. 이들 세균은 60°C의 온도에서도 안정성을 나타 내었다.

분변 및 토양 유래의 토착 유효 미생물의 분리를 시도하여 *B. subtilis*, *L. acidophilus* 를 생화학 검사법을 이용하여 동정하였다. 이들 세균의 특징은 표 1의 결과와 같다.

나) 우수생균제 미생물의 최적 배양온도 및 조건확립

동정된 *B.subtilis*, *L.acidophilus*를 LBS액체 배지에서 각각 혼합 배양하고 세균의 증식곡선을 통해 최적 성장 조건을 확인 하였다.

분리 동정된 우수생균주 미생물의 혼합 성장을 시간별로 확인 하였다. 성장곡선을 통해 확인된 조건은 이들을 사료에 첨가하여 양돈생산성에 이용할 수 있는 가능성을 탐색에 이용 되었다. 아래그림에서와 같이 *L.acidophilus*, *B.subtilis* 는 미호기성 조건에서 전형적인 세균 증식 곡선의 형태로 증식하였으며 36시간 배양에서 활성화된 세포를 회수 할 수 있는 조건을 확립하였다.

Table 1. Isolation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis*

Isolates	<i>B.subtilis</i>	<i>L.acidophilus</i>
Catalase	+	—
Gram stain	+	+
Hemolysis factor	—	—
Heat resistance at 60C	+	+

다) 우수생균주 대량생산 최적조건 확인

분변 및 토양 유래의 우수생균 미생물 *B. subtilis*, *L. acidophilus* 를 온도 조건에 혼합 배양하여 균체의 생존능력을 평가하였다. 평가된 생존 능력에 따라 혼합배양의 최적조건을 평가하였다. 우수 우수생균제 미생물은 배양온도 60℃에서까지 활성을 유지 하였다.

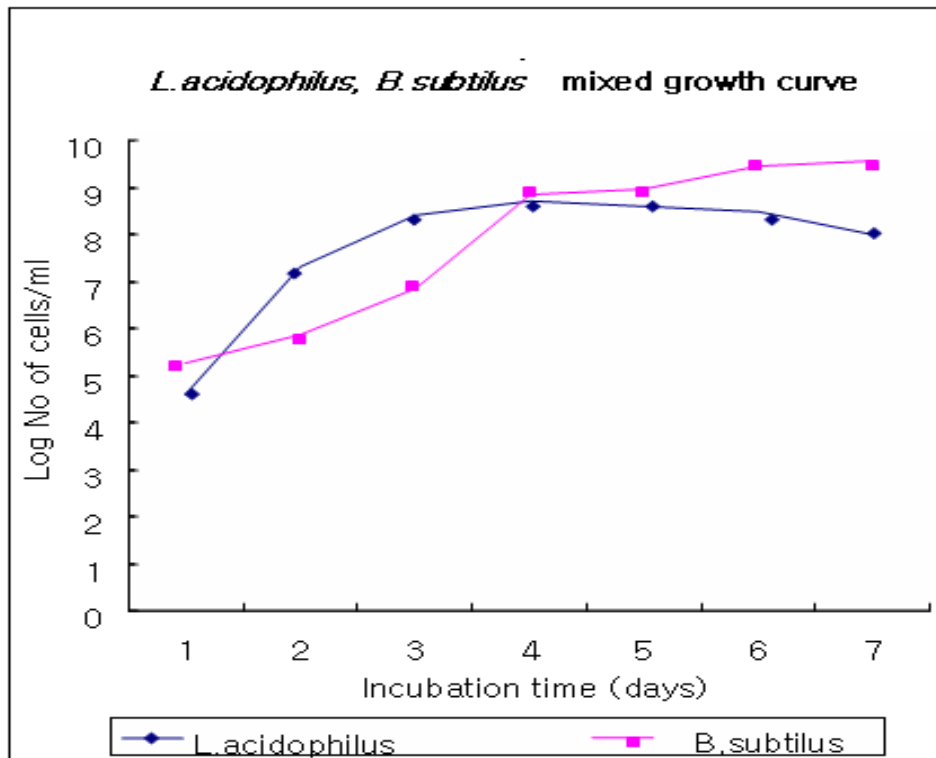


Fig 1. Growth curve *B.subtilis* and *L.acidophilus* on incubation time.

Table 2. Condition of temperature for incubation combined probiotics

Incubation temperature	<i>B.subtilis</i>	<i>L.acidophilus</i>
80℃	-	-
60℃	+	+
25℃	+	+
실온	+	+

2. 생균제 급여후 육성·비육돈의 장내와 분변의 미생물 성장조사

유효 미생물을 첨가한 사료를 투여한 1주일 후 비육후기돈에 장관내 세균총의 조사 결과는 아래표에서 보는바와 같다. 우수생균제 미생물 첨가에 따른 정상세균총 구성 세균의 균체수의 분포에서는 아래 표와같이 우수생균제후 *B. subtilis*, *L. acidophilus*의 10^2 이상 증가하여 생존하고 있는 것으로 관찰되었다. 또한 유효 미생물을 첨가한 사료를 투여한 1주일 후 비육후기돈의 장간막 임파절을 검사한 결과 대조구를 포함한 전체 실험구에서 *Salmonella*를 포함한 병원성 세균은 검출되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 음식물 사료에 첨가된 유효 미생물은 투여 1주일 후부터 장관내 유용 정상세균총을 구성할 수 있음을 확인 할 수 있었으며 이들 정상 세균총은 돼지의 소화기 감염원인이 되고 있는 병원성 *E.coli*, *Salmonella*, *Serpulina* 등의 기회감염을 예방할 수 있다고 생각된다.

Table 3. Condition of normal flora after 1 weeks administration with developed probiotics

	I	II
<i>B.subtilis</i>	1.2×10^6	7.2×10^8
<i>L.acidophilus</i>	2.1×10^6	6.2×10^8

[*] I : Control

II : Probiotics *B. subtilis*, *L. acidophilus* 1%

3. Pig IFN- γ 를 발현하는 *Lactobacillus acidophilus* 제조 과정

가. 전체적인 실험 개요

실험의 전체적인 개요는 다음과 같다 (Figure 2)

- ① *Lactobacillus acidophilus* (ATCC4356)로부터 chromosomal DNA 추출
- ② PCR을 이용한 slpA 프로모터(PslpA)와 종결시퀀스(TslpA) 증폭
- ③ 돼지 비장으로부터 RNA 추출
- ④ RT-PCR을 통해 pig IFN- γ gene 증폭
- ⑤ 증폭된 3가지 gene을 차례로 cloning vector (pUC19)에 삽입
- ⑥ pUC19으로부터 expression vector (pNZ123)로 gene cloning 실시
- ⑦ TPslpA와 pig IFN γ 가 삽입된 pNZ123를 *L. acidophilus*로 전기천공 실시
- ⑧ *L. acidophilus*의 TPslpA-pig IFN γ gene 보유 일 수 확인

나. 실험내용

1. *Lactobacillus acidophilus* (ATCC4356)로부터 chromosomal DNA 추출

Lactobacillus acidophilus (ATCC4356)을 Luria-Bertani agar (BD biochemical co., Sparks, USA) 배지에 배양 (37°C/24h) 후, 세균 집락을 채취하여 이로부터 DNA를 추출하였다. 추출 방법은 다음과 같다: 배양된 세균 집락을 100 μ l의 멸균 증류수에 부유하여 100°C에서 10분간, -20°C에서 20분간의 과정을 차례로 그친 다음, 상온에서 녹을 때까지 정치하였다. 다음으로 3000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 수거하여 PCR의 template로 사용하였다.

2. PCR을 이용한 slpA 프로모터와 종결시퀀스 증폭

2.1. PCR primer and condition

Lactobacillus acidophilus (ATCC4356)의 chromosomal DNA를 template로 하여 *Lactobacillus* 내의 *slpA* gene의 PslpA (프로모터)와 TslpA (종결시퀀스)를 아래 primer 쌍들을 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다.

PslpA primers :

Forward 5'-GGC GGA ATT CGG TAA GCG GTA GGT GAA-3'

Reverse 5'-GCG CTC TAG ATG GTC TTT TCC TCC TTG-3'

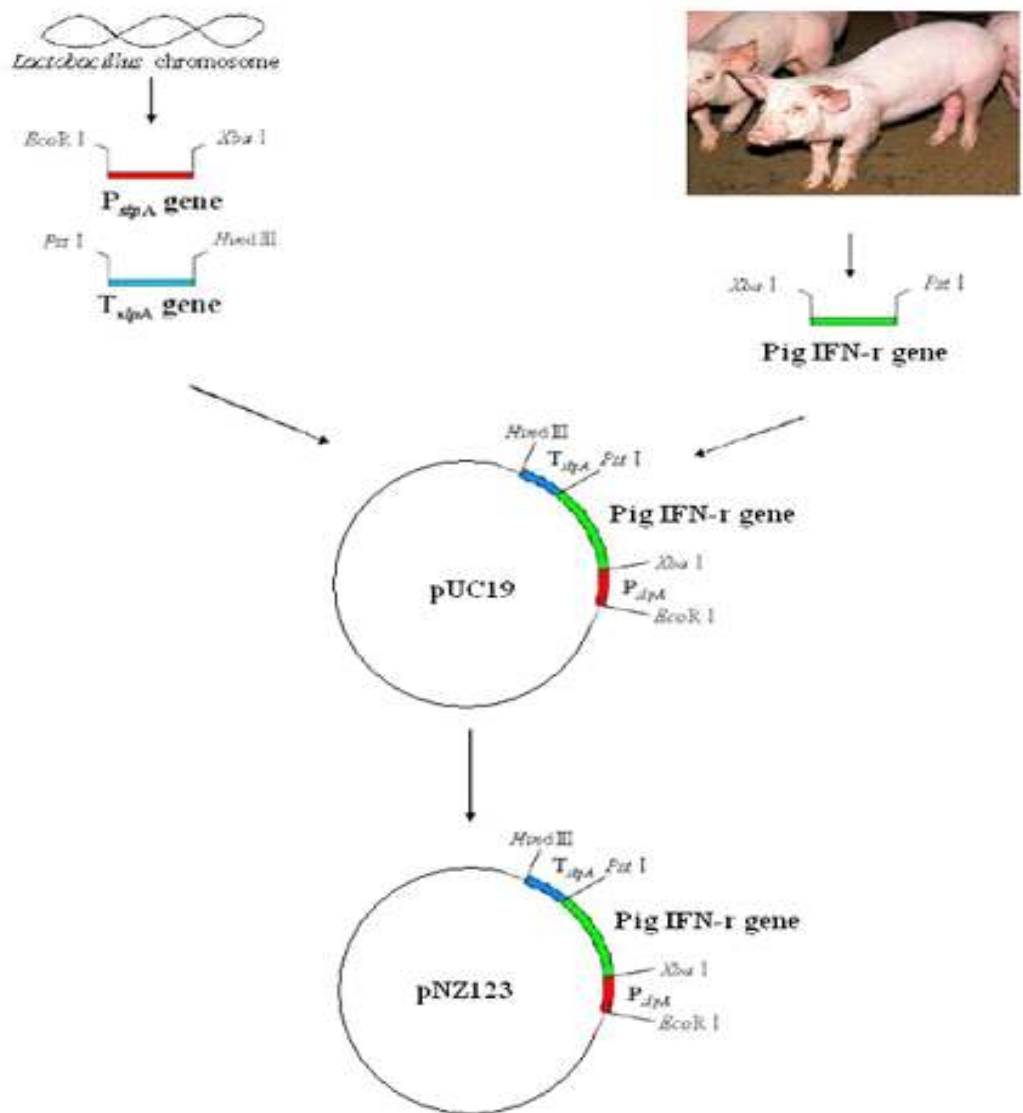


Fig 2. Scheme of amplification of sequence with cDNA on *Lactobacillus acidophilus*

TslpA primers :

Forward 5'-GCA ACT GCA GTA ATA AGT CGT AC ACT AAC-3'

Reverse 5'-GGC CAA GCT TCA GAA GAT CCT ATT AGA ACT-3'

PCR반응은 95°C에서 5분간 충분히 전반응 (pre-denaturation) 시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간의 반응 cycle을 35회 반복하였다. 최종적으로 72°C 7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR산물은 0.7% agarose gel에서 40분간 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 완전히 끝난 후 UV아래에서 PslpA(275bp), TslpA(117bp) band를 확인하였다. 전기영동 결과는 figure 3 같다.

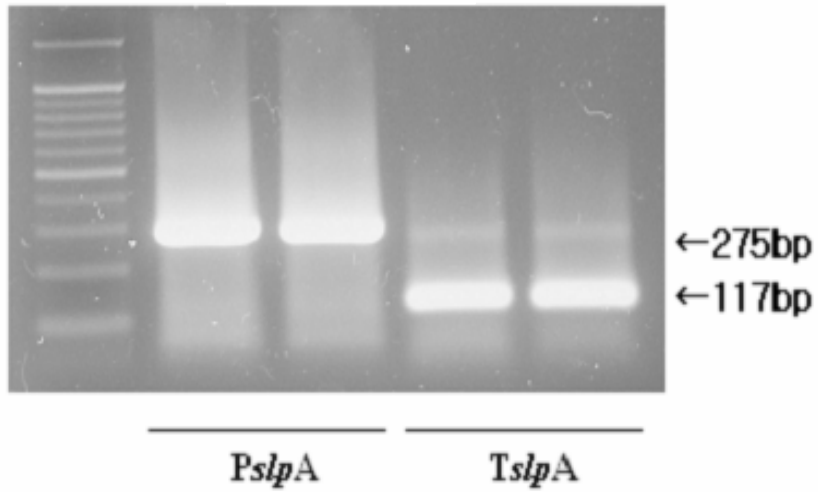


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction –amplified PslpA (275bp) and TslpA (117bp) band. From left to right: M, 100 base pair DNA ladder; lane 1,2, PslpA; lane 3,4, TslpA cDNA on *Lactobacillus acidophilus*.

2.2. PslpA와 TslpA gene gel elution

Figure 2에서 보는 바와 같이, PslpA와 TslpA band를 Qiagen사의 gel extraction kit를 이용하여 각각 유리하였다. 추출하는 방법은 제조사의 공정을 따랐다. 간단히 설명하면 다음과 같다. PslpA 또는 TslpA band가 포함된 gel과 buffer QG를 1:3의 비율로 혼합한 후, 50°C water bath에 10분 동안 정치하여 gel을 완전히 녹였다. PslpA 또는 TslpA band가 포함된 gel과 동량의 Isopropanol을 넣고 잘 섞어준 후, QIAquick spin column에 옮겨 담고 13000rpm에서 1분간 원심 분리하였다 (이 후 과정의 원심분리 조건은 13000rpm/1min으로 동일하다). Gel을 완전히 분리하기 위해 0.5ml의 buffer QG를 추가로 첨가하여 원심 분리하였다. 이 후에 세척을 위해 0.75ml Buffer PE를 넣고 원심 분리하였으며, 분리된 하층액을 버리고 한 번 더 원심 분리하여 완전히 이물질을 제거하였다. QIAquick spin column을 새 EP tube에 옮겨 담은 후, 50µl의 Buffer EB를 이용하여 PCR product 즉 PslpA와 TslpA gene을 유리하였다.

3. IFN- γ 를 cloning 하기 위한 돼지 비장세포로부터 RNA 추출

돼지의 RNA는 Qiagen사의 RNeasy Mini kit를 사용하여 추출하였다. 추출하는 방법은 제조사의 공정을 따랐다. 간단히 설명하면 다음과 같다. 비장 적출 후 cell strainer(BD biosciences, USA)를 이용하여 세포를 유리시켰으며, 5×10^6 개의 유리된 비장세포를 β -Mercaptoethanol이 첨가된 600µl의 RLT buffer에 넣어서 용해하였다. 다음으로, 동량의 ethanol을 첨가하여 잘 혼합하였으며, 혼합물은 RNA 흡착을 위하여 RNeasy column에 넣어 원심 분리하였다. 이후, washing buffer로 RNA를 세척한 후, RNase-free water를 이용하여 RNA를 정제하였다.

4. RT-PCR을 통해 pig IFN- γ gene 증폭

4.1. cDNA 합성

비장으로부터 추출한 RNA로부터 SuperScript™ First-Strand synthesis system (Invitrogen, USA)를 이용하여 제품설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다. Total RNA(50ng/µl) 7µl, random hexamers(50ng/µl) 1µl, 10mM dNTP 1µl 그리고 DEPC-treated water 1µl를 잘 혼합하여 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 1분간 얼음 넣어 정치시켰다. 이 때, 10× RT buffer 2µl, 25mM

MgCl₂ 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l 그리고 RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor 1 μ l를 잘 혼합하여 준비하였다. 이렇게 준비한 혼합물을 얼음에 넣어두었던 시료와 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다. 다음으로, SuperScriptTM(50unit) 1 μ l를 첨가하고 다시 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 반응을 시켰다. 그 이후, 42 $^{\circ}$ C에서 50분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간을 차례로 반응시켰다. 마지막으로 RNase H 1 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켜 cDNA 합성을 완료하였다.

4.2. PCR primer and condition

합성한 cDNA를 template로 하여 Pig IFN- γ 를 PCR을 통해 증폭하였다. PCR에 사용된 primer 쌍들을 아래와 같다.

Pig IFN- γ Primer

Pig IFN γ -F: 5'-ATG CTC TAG ACT CTC TCC GAA ACA ATG AGT-3'

Pig IFN γ -R: 5'-ATG CGT CGA CCA GGA TGA CAA TTA TTT TGA TG-3'

PCR반응은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 충분히 전반응 (pre-denaturation) 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 반응 cycle을 35회 반복하였다. 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR산물은 0.7% agarose gel에서 40분간 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 완전히 끝난 후 UV아래에서 Pig IFN- γ (526bp) band를 확인하였다. 전기영동 결과는 figure 4와 같다.

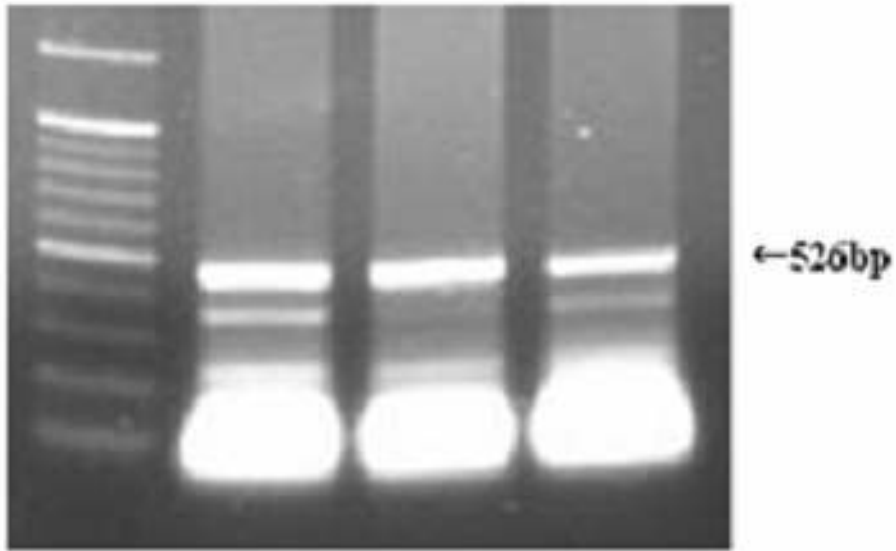


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified **Pig IFN- γ** cDNA products. M, 100 base pair DNA ladder.

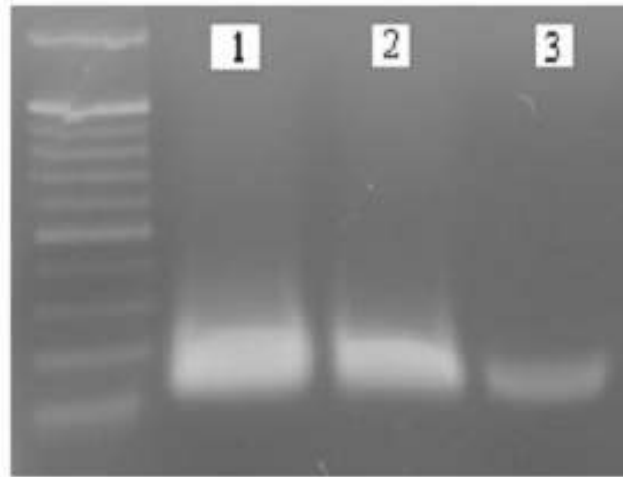
5. 증폭된 3가지 gene을 차례로 cloning vector (pUC19)에 삽입

pUC19 vector의 transformation을 위한 Competent cell로는 DH5a를 사용하였고, pUC19 vector의 size는 2686bp이다. Competent cell의 배양을 위해서는 ampicillin이 첨가된 LB(BD biochemical co., Sparks, USA) 배지가 사용되었다.

5.1. Clone TslpA gene to pUC19 vector

TslpA를 제한효소 HindIII와 PstI으로 처리하였다. 결과는 figure 5와 같다.

pUP19 vector를 제한효소 HindIII와 PstI으로 처리하였다. 결과는 figure 6와 같다.



Line 1, 2: *TslpA* cut with HindIII and PstI
Line 3: uncut *TslpA*

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction on digested with HindIII and PstI with **Clone *TslpA* vector** on cDNA products. M, 100 base pair DNA ladder.

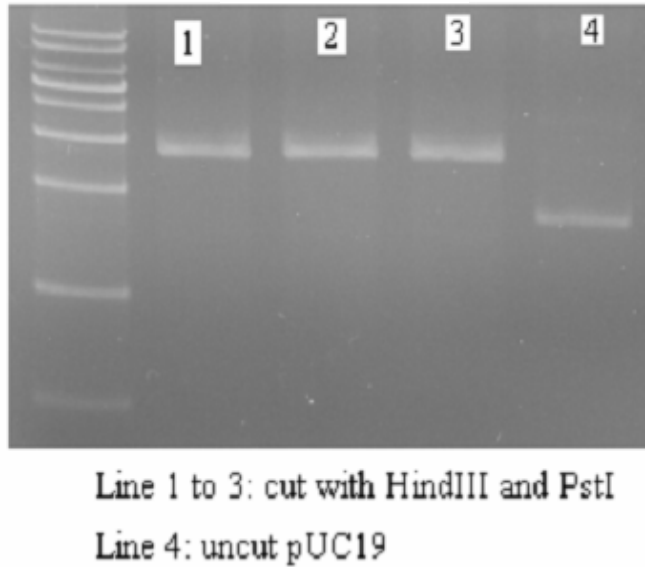


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction on digested with HindIII and PstI with **Clone pUC19 vector on cDNA products**. M, 100 base pair DNA ladder.

5.1.1. TslpA gene과 pUC19 vector ligation

유리된 TslpA gene과 pUC19 vector를 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. Ligation 방법은 다음과 같다. pUC19 vector 2 μ l, TslpA gene 6 μ l, T4 DNA ligase 2 μ l, T4 ligase buffer x2 10 μ l을 혼합하여 16 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다.

5.1.2. TslpA gene이 삽입된 pUC19 vector를 competent cell (DH5 α)로 transformation

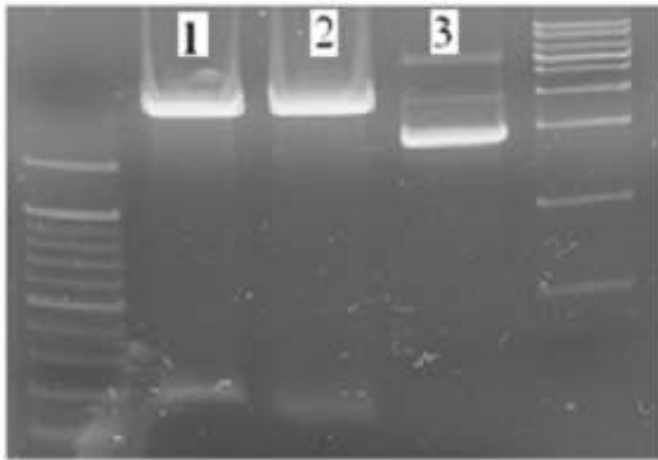
Transformation 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. TslpA gene이 삽입된 pUC19 vector 20 μ l와 competent cell (DH5 α) 100 μ l를 EP tube에 넣고 20분 동안 얼음에 넣어 정치하였다. 다음으로, 42 $^{\circ}$ C water bath에 1분, 다시 얼음에 2분간 정치하였다. 그 후, LB broth 950 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C shaking bath에서 150rpm/1.5hrs 동안 배양하였다. 다음으로 ampicillin이 첨가된 LB agar 배지에 24시간 동안 배양하여 세균 집락의 형성을 확인하였다. 형성된 세균 집락을 다시 ampicillin이 첨가된 LB broth에 16시간을 배양하였다.

5.1.3. TslpA gene과 pUC19 vector의 cloning 확인

제한효소를 처리하여 결과를 확인하였다. 결과는 figure 7과 같다.

5.2. Clone PslpA gene to pUC19-TslpA vector

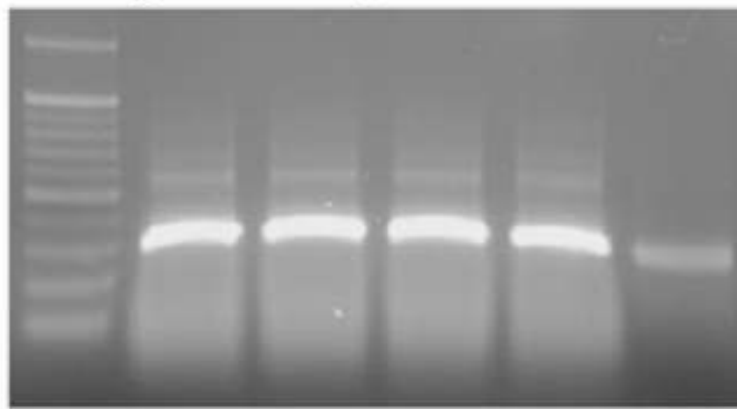
PslpA gene은 이미 TslpA gene이 삽입된 pUC19에 cloning하였다. Competent cells로는 DH5 α 를 사용하였고, pUC19-TslpA vector의 size는 2823 bp이다. PslpA를 제한효소 XbaI와 EcoRI을 이용하여 차례로 처리하였다. 결과는 figure 8과 같다.



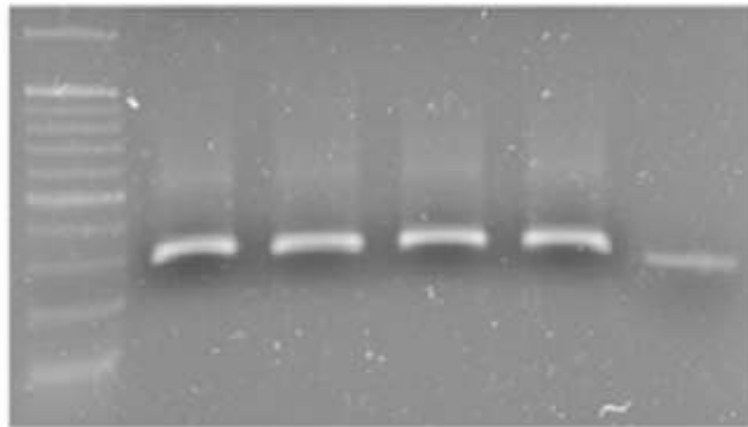
- 1: pUC19-*TslpA* cut with Hind III and EcoR I
- 2: pUC19-*TslpA* cut with Hind III and PstI
- 3: Uncut pUC19-*TslpA*

Figure 7. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the *TslpA* vector cloning with restriction enzymes (HindIII, EcoRI and PstI). M: 100 DNA ladder marker.

Cut PslpA with XbaI, then cut with EcoRI



Cut with XbaI uncut



PslpA was cut with XbaI. now cut with EcoRI cut with XbaI

Figure 8. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the PslpA gene to pUC19-TslpA vector restricted enzymes(XbaI, EcoRI). M: 100 DNA ladder marker.

5.2.1. pUC19-TslpA vector를 제한 효소로 자르기

pUC19-TslpA vector를 XbaI과 EcoRI으로 차례로 처리하였다. 결과는 figure 9과 같다.

5.2.2 PslpA gene과 pUC19-TslpA vector ligation

유리된 PslpA gene과 TslpA-pUC19 vector를 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation 하였다. Ligation 방법은 다음과 같다. pUC19-TslpA vector 2 μ l, PslpA gene 6 μ l, T4 DNA ligase 2 μ l, T4 ligase buffer x2 10 μ l을 혼합하여 16°C에서 overnight하였다.

5.2.3. PslpA gene과 pUC19-TslpA vector의 cloning 성공여부 확인

제한효소를 처리하여 결과를 확인하였다. 결과는 figure 10과 같다.

3개의 세균 집락 중 sample B가 cloning에 성공한 것으로 의심되어 sample B만 다시 제한효소로 처리하였다. 결과는 figure 11과 같다. 이상으로 pUC19 vector에 PTslpA gene을 삽입하는 과정은 성공하였다. 아래과정부터는 이 vector를 pUC19-PTslpA로 표기하겠음.

5.3. pIFN γ 을 pUC19-PTslpA vector에 삽입하기

Pig IFN- γ gene을 제한효소 SalI와 XbaI으로 처리하였다. 결과는 figure 12과 같다.

5.3.1. pUC19-PTslpA vector를 제한 효소로 자르기

pUC19-PTslpA vector를 SalI과 XbaI으로 차례로 처리하였다. 결과는 figure 13와 같다.

Cut pUC19-TslpA with XbaI, then cut with EcoRI
Size of pUC19-TslpA: 2823 bp

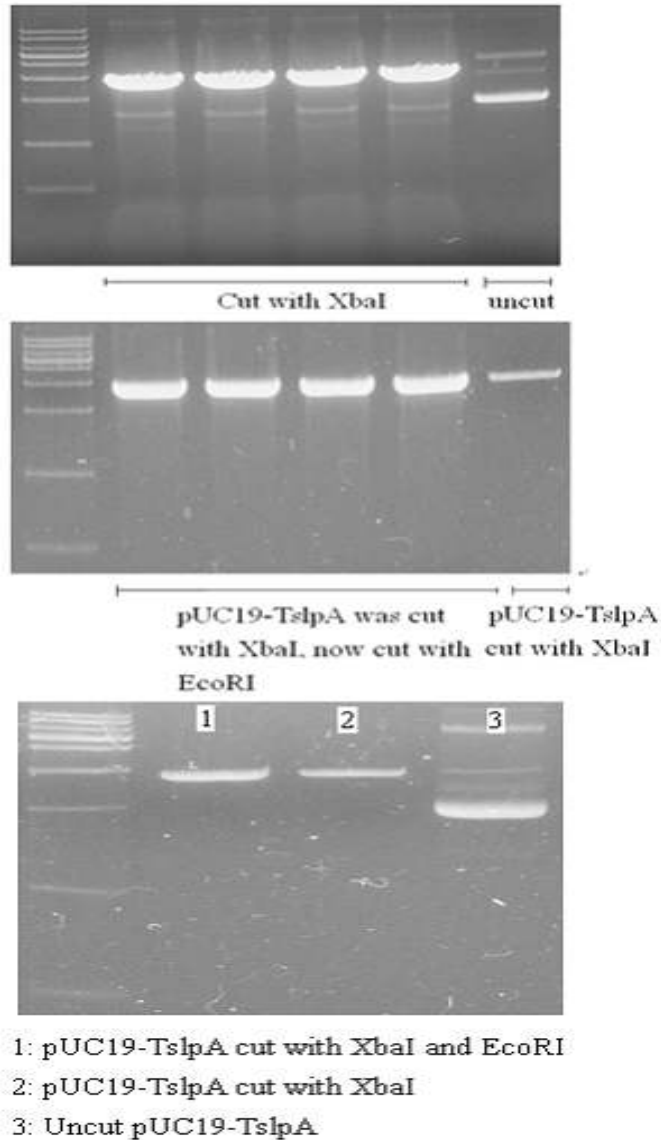
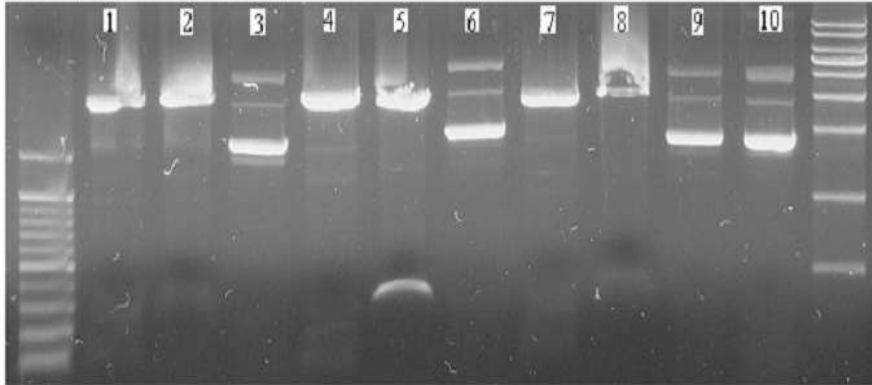


Figure 9. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pUC19-TslpA vector with digested restricted enzymes(XbaI, EcoRI). M: 100 DNA ladder marker.

Check pUC19-PTs/pA cloning



1, 2, 3: sample A

4, 5, 6: sample B

7, 8, 9: sample C

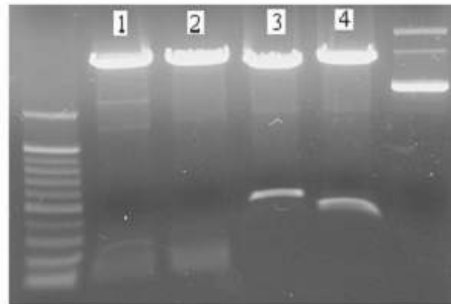
1, 4, 7: cut with HindIII and PstI

2, 5, 8: cut with PstI and EcoRI

3, 6, 9: cut with suspected pUC19-PTs/pA

Figure 10. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the PslpA gene and pUC19-TslpA vector with digested restriction enzymes(Hind III, Pat1, EcoR1). M: 100 DNA ladder marker.

Check sample B



When pUC19-PTslpA cut with some REs, expecting sizes were observed as following

- if it was cut with HindIII and PstI, its DNA product size is 137 bp (Line 1)
- if it was cut with HindIII and XbaI, its DNA product size is 149 bp (Line 2)
- if it was cut with HindIII and EcoRI, its DNA product size is 412bp (Line 3)
- if it was cut with PstI and EcoRI, its DNA product size is 307 bp (Line 4)

Figure 11. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pUC19-TslpA vector with digested restriction enzymes(Hind III, XbarI, PatI, EcoRI). M: 100 DNA ladder marker.

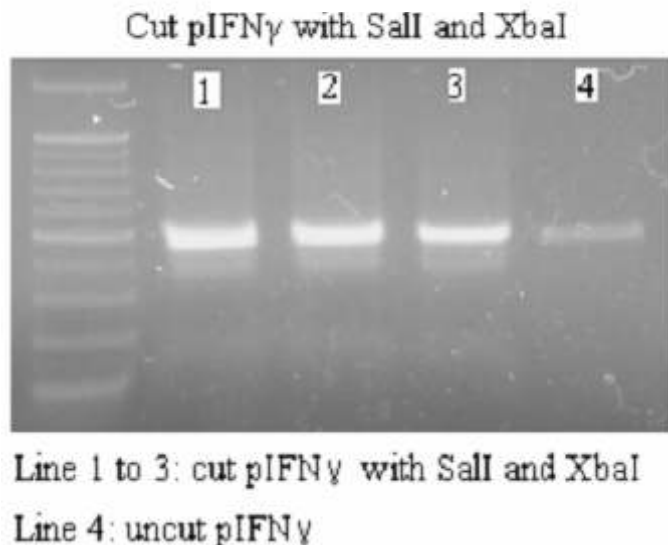
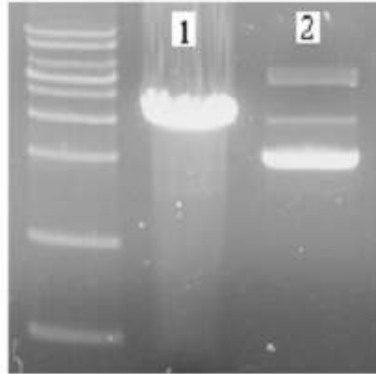


Figure 13. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pUC19-PTslpA vector with digested restriction enzymes(Sall, XbarI) and uncut pIFN γ . M: 100 DNA ladder marker.

Cut pUC19-PTspA with SalI and XbaI



Line 1: Cut pUC19-PTspA with SalI and XbaI

Line 2: uncut pUC19-PTspA

Figure 13. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pUC19-PTspA vector with digested restriction enzymes(SalI, XbaI). M: 100 DNA ladder marker.

5.3.2 pIFN γ gene과 pUC19-PTslpA vector ligation

유리된 PslpA gene과 TslpA-pUC19 vector를 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation 하였다. Ligation 방법은 다음과 같다. pUC19-PTslpA vector 2 μ l, pIFN γ gene 6 μ l, T4 DNA ligase 2 μ l, T4 ligase buffer x2 10 μ l을 혼합하여 16 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다.

5.3.3. pIFN γ gene과 pUC19-PTslpA vector의 cloning 성공여부 확인

제한효소를 처리하여 결과를 확인하였다. 결과는 figure 14과 같다.

6. pUC19으로부터 PTslpA-pigIFN γ 을 expression vector (pNZ123)로 gene cloning 실시

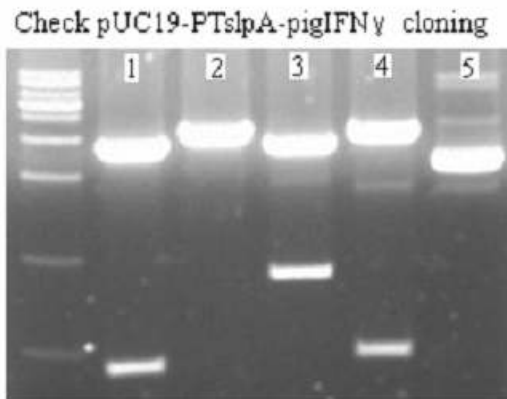
pNZ123 vector를 위한 Competent cells로는 JM109을 사용하였고, pNZ123 vector의 size는 2.8kbp이다. Competent cell의 배양을 위해서는 chloramphenical이 첨가된 LB(BD biochemical co., Sparks, USA) 배지가 사용되었다.

6.1. PTslpA-pigIFN γ gene을 제한 효소로 자르기

pUC19-PTslpA-pigIFN γ gene을 제한효소 EcoRI와 HindIII으로 처리하였다. 결과는 figure 15와 같다.

6.2. pNZ123 vector를 제한 효소로 자르기

pNZ123 vector를 제한효소 EcoRI와 HindIII으로 차례로 처리하였다. 결과는 figure 16와 같다.

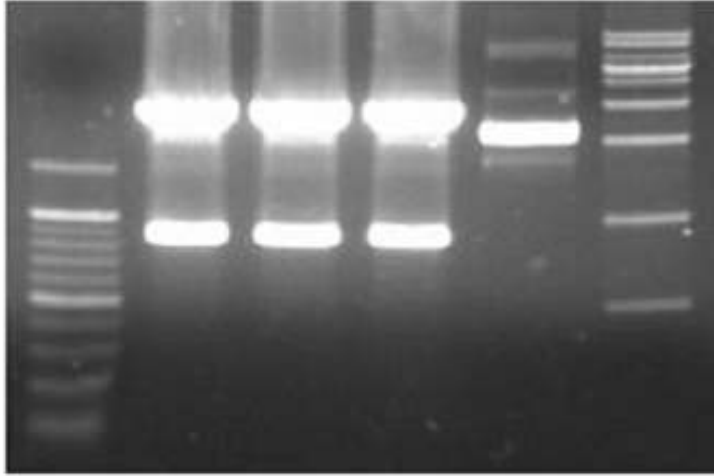


Line 1, 3: pUC19-PTslpA-pigIFN γ cut with HindIII and EcoRI (DNA product size is 938bp)

Line 2, 4: pUC19-PTslpA-pigIFN γ cut with Sall and XbaI (DNA product size is 546bp)

Line 1&2: colonies 1 (no insert); line 3&4: colonies 2 (pig IFN γ insert)

Figure 14. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pIFN γ gene and pUC19-PTslpA vector. M: 100 DNA ladder marker.



Cut pUC19-PTslpA-pigIFN γ with EcoRI and HindIII

Figure 15. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pUC19-PTslpA-pigIFN γ gene with digested restriction enzymes(SalI, XbaI). M: 100 DNA ladder marker.

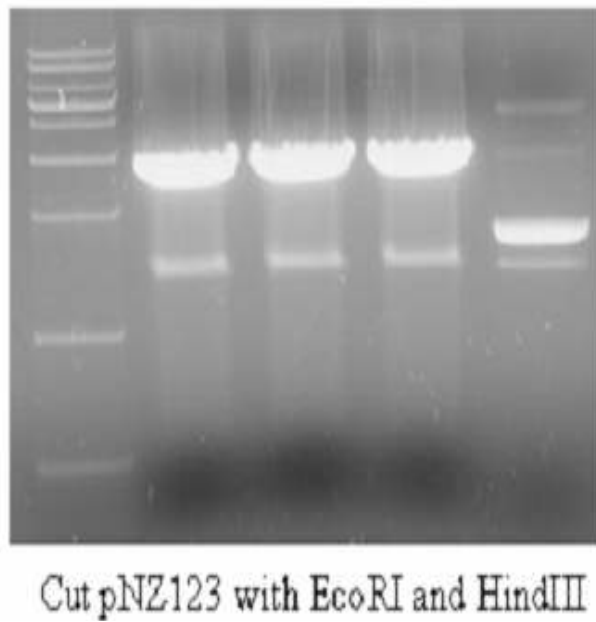


Figure 16. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the **pNZ123** vector with digested restriction enzymes(EcoRI, HindIII). M: 100 DNA ladder marker.

6.3. PTslpA-pigIFN γ gene을 pNZ123 vector에 삽입하기

유리된 PTslpA-pigIFN γ gene과 pNZ123 vector를 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. PTslpA-pigIFN γ gene이 삽입된 pNZ123 vector (pNZ123-PTslpA-pIFN γ)를 JM109으로 transformation을 실시하였다.

6.3.1. PTslpA-pigIFN γ gene과 pNZ123 vector의 cloning 성공여부 확인

제한효소를 처리하여 결과를 확인하였다. 결과는 figure 17과 같다.

7. TPslpA와 pig IFN γ 가 삽입된 pNZ123를 *L. acidophilus*로 전기천공실시

전기천공조건과 *L. acidophilus*배양을 위한 배지는 다음과 같다.

※ Transform pNZ123-PTslpA-pigIFN γ to *Lactobacillus acidophilus*

Electroporation condition:

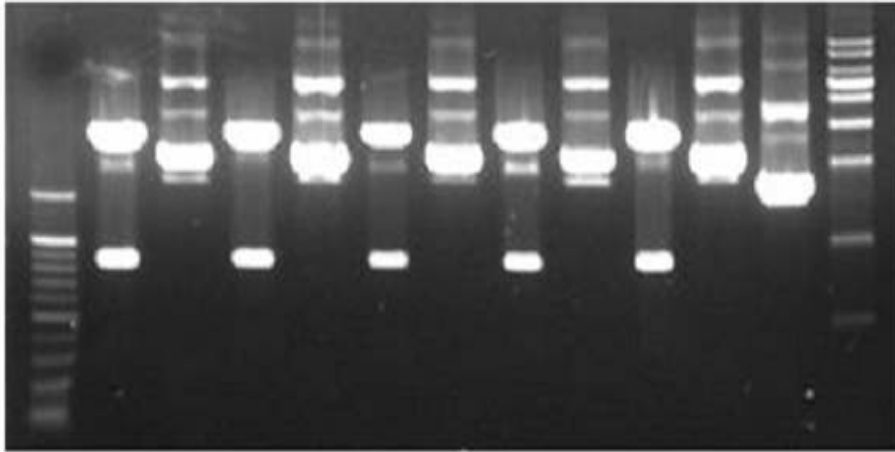
- using 0.2-cm cuvette
- C = 25 μ F
- V = 2.1 kV
- PC=infinite ohms

Medium: MRS agar

전기천공실법을 이용하여 transformation을 실시하였으며, 결과는 *L. acidophilus*의 DNA를 boiling 방법을 통해 추출 후 PCR을 통해 확인하였다. 결과는 figure 18과 같다.

8. *L. acidophilus*의 pNZ123-TPslpA-pig IFN γ gene 유지 기간 확인

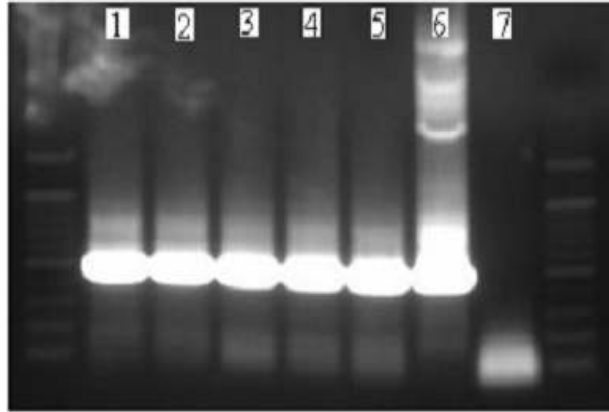
*L. acidophilus*내의 pNZ123-TPslpA-pig IFN γ gene 이 항생제 없이 계대하였을 때 얼마동안 유지되는지를 검사하였다. 매일 균을 항생제가 첨가되지 않는 배지에 접종하여 계대하고 매일 균에서 boiling 방법을 통해 *L. acidophilus*의 DNA를 추출하였고, 이를 template로 하여 PCR을 통해 pNZ123-TPslpA-pig IFN γ gene 의 유무를 확인하였다. 결과는 figure 19와 같 계대하는 29일 동안 유지하다가 30일되는 30번계대후에 gene이 제거되었다.



↑
Uncut pNZ123 plasmid

Figure 17. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the PTslpA-pigIFN γ gene and pNZ123 vector. M: 100 DNA ladder marker.

Check pig IFN γ in pNZ123-PTslpA-pigIFN γ by PCR using boiling DNA of transformed and wild type *Lactobacillus acidophilus*



Line 1 to 5: Boiling DNA of transformed pNZ123-PTslpA-pigIFN γ in *Lactobacillus acidophilus*

Line 6: pNZ123-PTslpA-pigIFN γ

Line 7: Boiling DNA *Lactobacillus acidophilus* wild type

Fig. 18. Boiling DNA of transformed pNZ123-TPslpA-pig IFN γ in *Lactobacillus acidophilus*. Transform pNZ123-PTslpA-pigIFN γ to *Lactobacillus acidophilus*. Electroporation condition: using 0.2-cm cuvette, C = 25 μ F, V= 2.1 kV, PC=infinite ohms.

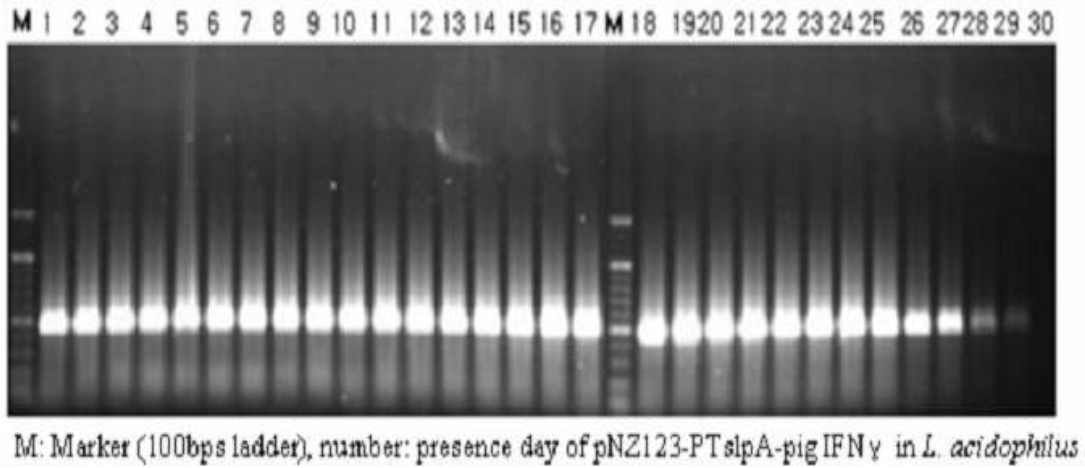


Figure 19. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the pNZ123-TPslpA-pig IFN γ gene. M: 100 DNA ladder marker.

4. Pig IL-2를 발현하는 *Lactobacillus acidophilus* 제조 과정

먼저 돼지의 혈액에서 림파구를 분리하여 배양하면서 PHA로 자극한후 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 이용하여 IL-2 gene을 증폭하였다. 사용된 primer는 Sense: GC TCTAGA GCCA CAA TGT ATA AGA TGC AGC T와 Anti-sense: GC GTCGAC TTAT CAA GTC AGT GTT GAG T이었다. IL-2는 489bp의 밴드를 확인하였다.

Pig IL-2를 발현하는 *Lactobacillus acidophilus* 제조 과정은 Pig IFN-r를 생성하는 것과 같은 방법으로 pNZ123-TPslpA-pig IFN γ gene 벡터에서 IFN-r를 제거하고 이곳에 IL-2 gene을 삽입하여 같은 방법으로 *Lactobacillus acidophilus*에 transform 시켜 완성하였다.

제 2 절 면역강화 생균제의 면역증강효과 및 항병력효과 규명

1. 재료 및 방법

돼지의 IFN-r 유전자와 IL-2 유전자를 발현하는 면역기능강화 생균제의 백신에 대한 항체가 증강효과 및 면역세포변화를 관찰하였고 돼지의 IFN-r 유전자와 IL-2 유전자를 발현하는 면역기능강화 생균제의 살모넬라에 대한 항병력을 알아보았다.

실험동물 및 실험 설계

실험동물은 4주령의 삼원교잡종 돼지(Landrace x Yorkshire x Duroc) 24두를 공시하였다. 실험 1군으로 IFN-r를 발현하는 *Lactobacillus*, 실험2군으로 IL-2를 발현하는 *Lactobacillus* 그리고 실험3군으로 정상 *Lactobacillus* (cloning 사용되었던 균주) 그리고 *Lactobacillus*를 첨가하지 않는 대조군으로 나누어 각그룹당 6마리의 돼지를 사용하였다. 실험군과 대조군으로 나누어 실시하였다. 시험 기간동안 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 외부와 격리된 전남대학교 실험 동물사에서 사육하며 실험하였다. 시험군 돼지의 사료에는 유용 미생물 *Lactobacillus acidophilus* 를 0.3%를 첨가였고 대조군의 사료에는 첨가하지 않았다.

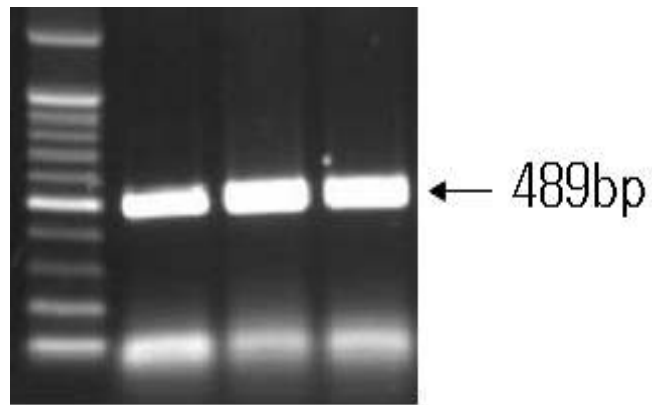
생균제 급여전과 급여1주일 후에 혈액을 채취하여 혈액내 적혈구, 백혈구, 림프구 및 total IgG 농도를 측정하여 혈액내 면역학적 지표를 비교하였다. 또한 혈청내의 코티솔, 에피네프린 및 노에피네프린의 농도를 측정하여 스트레스지표를 비교하였다. 그리고 혈액내의 T cell의 분포 변화는 유세포분석기를 이용하여 측정하였으며, 혈액내의 macrophage를 분리하여 cytokine의 발현을 측정하였다.

생균제 급여 8일후에 항체가 생성 증강효과 실험을 위하여 항원으로 *Bordetella Bronchiseptica*(Bbs) 균을 포르말린으로 처리한후 Freund's adjuvant와 혼합하여 백신으로 사용하여 모든 군에 근육으로 3ml 씩 접종하였다. 처음 접종후 14일과 28일 후에 2차 3차 접종하고 마지막으로 4차 접종을 35일에 한 후 39일되는 날 돼지에서 혈청을 회수하였다. 회수된 혈청으로 ELISA 실시하여 항체 생성 여부 및 생성능을 확인하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 혈액 내 면역학적 지표

Solto B 급여가 육성돈의 혈액 내 면역학적 지표에 미치는 영향을 table 2에 나타내었다. 혈액 내 적혈구, 백혈구, 림프구 및 IgG은 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.



Pig IL-2 PCR

Figure 20. Agarose gel electrophoresis of multiplex RT-PCR-amplified pig IL-2 cDNA products. From left to right: M=100 base pair DNA ladder; lane 1=positive control for common Pig IL-2; lane 2,3=sample from cloned *Lactobacillus acidophilus*.

Table 2. Effects of immune enhancing Lacobacillus on blood immunological parameters in pigs

Item	CON	IL-2 Lacto	IFN-r Lacto	Lacto only
RBC, $\times 10^6/\mu\ell$				
Initial	6.92(± 1.2)	7.02(± 1.0)	6.88(± 1.5)	6.52 (± 1.6)
Final	7.33(± 1.8)	7.37(± 1.5)	7.49(± 2.2)	6.94 (± 1.2)
Difference	0.41	0.35	0.61	0.42
WBC, $\times 10^3/\mu\ell$				
Initial	14.03(± 3.5)	13.74(± 4.2)	13.63(± 2.5)	14.19 (± 3.2)
Final	18.16(± 4.4)	16.81(± 3.6)	17.56 (± 1.9)	19.44 (± 4.2)
Difference	4.13	3.07	3.92	5.25
Lymphocyte, %				
Initial	59.55(± 6.3)	51.88(± 6.6)	59.17(± 7.3)	57.60 (± 8.3)
Final	55.42(± 4.7)	56.37(± 3.9)	56.97 (± 5.1)	52.83 (± 5.8)
Difference	-4.13	4.48	-2.20	-4.77
IgG, mg/dL				
Initial	330.17(± 22.7)	362.17(± 32.5)	33.67(± 35.8)	293.67(± 47.1)
Final	768.50(± 46.7)	672.00(± 46.9)	830.33(± 89.6)	748.00 (± 69.4)
Difference	438.33	309.83	496.67	454.33

(\pm)standard error.

3. 혈청 내 스트레스 지표

Solto B 급여가 육성돈의 혈액내 스트레스 지표에 미치는 영향을 관찰한 결과는 table 3에서 보는 바와 같이 혈청 내 코티졸, 에플레플린 및 노에플레플린에서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

4. 유세포분석기를 이용한 혈액내의 T cell의 분포 변화

급여 1주일 후에 혈액에서 Lymphoprep을 사용하여 얻은 lymphocytes를 이용하여, CD4 및 CD8 lymphocyte 분포율을 flow-cytometry를 이용하여 측정하였다. CD4 및 CD8의 population은 phycoerythrin(PE)와 FITC-conjugated monoclonal antibodies를 PharMingen (USA) 으로부터 구입하여 사용하였으며 유세포분석기(Flow Cytometry; FACSCalibur)를 이용하여 측정하였다. 급여 1주일후의 혈액내 lymphocyte의 CD4와 CD8의 population에는 시험군에서 CD4 및 CD8의 수가 약간 증가하는 것으로 보였으나 유의적인 차이는 없었다 (figure 21).

Table 3. Effects of dietary Solto B on blood stress parameter in growing pigs

Item	CON ¹	IL-2 Lacto	IFN-r Lacto	IFN-r Lacto	————
Cortisol, $\mu\text{g}/\text{dL}$					
Initial	3.28(± 1.5)	3.90(± 1.1)	2.58(± 0.8)	3.70(± 1.4)	
Final	2.85(± 1.1)	3.33(± 1.4)	2.67 (± 1.3)	2.93 (± 1.6)	
Difference	-0.43	-0.57	0.08	-0.77	
Epinephrine, pg/mL					
Initial	53.85(± 4.5)	54.67(± 4.8)	62.73(± 6.7)	66.25(± 7.1)	
Final	58.77(± 3.5)	52.27(± 6.3)	48.88 (± 6.3)	54.07 (± 5.3)	
Difference	4.92	-1.40	-13.85	-12.18	
Norepinephrine, pg/mL					
Initial	288.62(± 23.5)	347.22(± 31.5)	337.23(± 32.6)	263.77(± 32.7)	
Final	573.17(± 35.5)	501.92(± 29.8)	435.88 (± 47.1)	421.97 (± 38.5)	
Difference	284.55	154.70	98.65	158.20	

(\pm)standard error.

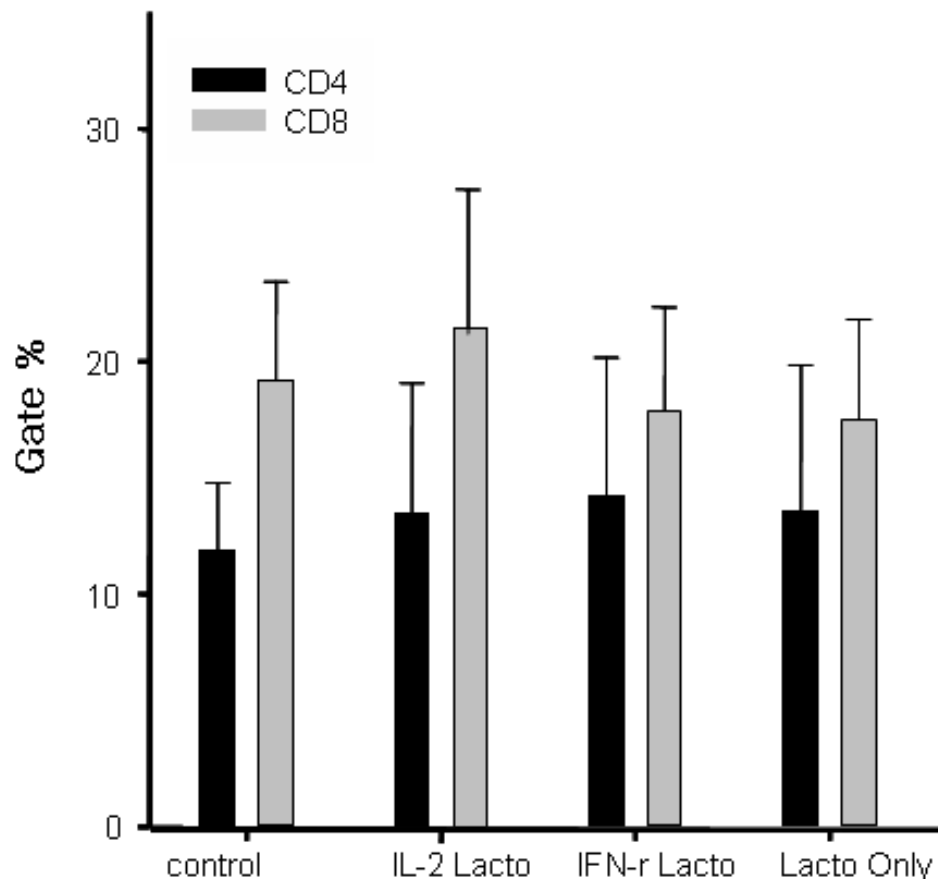


Fig 21. IL-2 and INF-r proportion in the piglets peripheral lymphocytes (%).

5. 항체가 형성 수준 평가

항-Bbs immunoglobulin의 측정을 위해 ELISA를 이용하였으며, the horseradish peroxidase-labelled goat anti-pig IgG (Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC., USA)을 2차항체로 사용하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다, flat bottomed 96-well microtitre plates (Iwaki, Japan)는 각 well당 1×10^8 CFU/ml의 포르말린 처리된 Bbs가 포함된 coating buffer 100 μ l씩으로 코팅되어 4°C에서 overnight으로 정치하였다. 이 후, 0.05% (v/v) Tween 20이 포함된 PBS (PBS-T)으로 3회 세척 하였고 각 well당 5% skim milk 200 μ l로 실온에서 2시간동안 안정화 하였다. 다시 PBS-T로 3회 세척하였고, PBS-T에 100배 희석된 측정하고자하는 돼지의 혈청을 각 well당 100 μ l씩을 넣어 실온의 암실에서 1시간동안 정치하였다. 세척 후, PBS-T에 1:5000으로 희석된 anti-pig HRP conjugated를 첨가 하였으며 실온에 1시간동안 반응시켰다. 이전과 동일하게 well들은 세척되었으며, 세척 이후 50 μ l substrate (0.01% (v/v) hydrogen peroxid가 포함된 phosphate-citrate buffer (pH 5.0, 24 mM citrate, 64 mM disodium hydrogen phosphat에 녹여진 0.04% (w/v) o-phenylenediamine (Sigma))를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 50 μ l의 10%SDS solution을 첨가하여 반응을 종료하였으며, Multiskan Ascent microplate reader (Thermo Labsystems, Finland)를 이용하여 405nm에서 측정하였다.

혈청 중 anti-Bbs IgG 항체 수준은 시험군의 돼지와 control group의 돼지들에 유의적인 차이는 보이지 않았다.

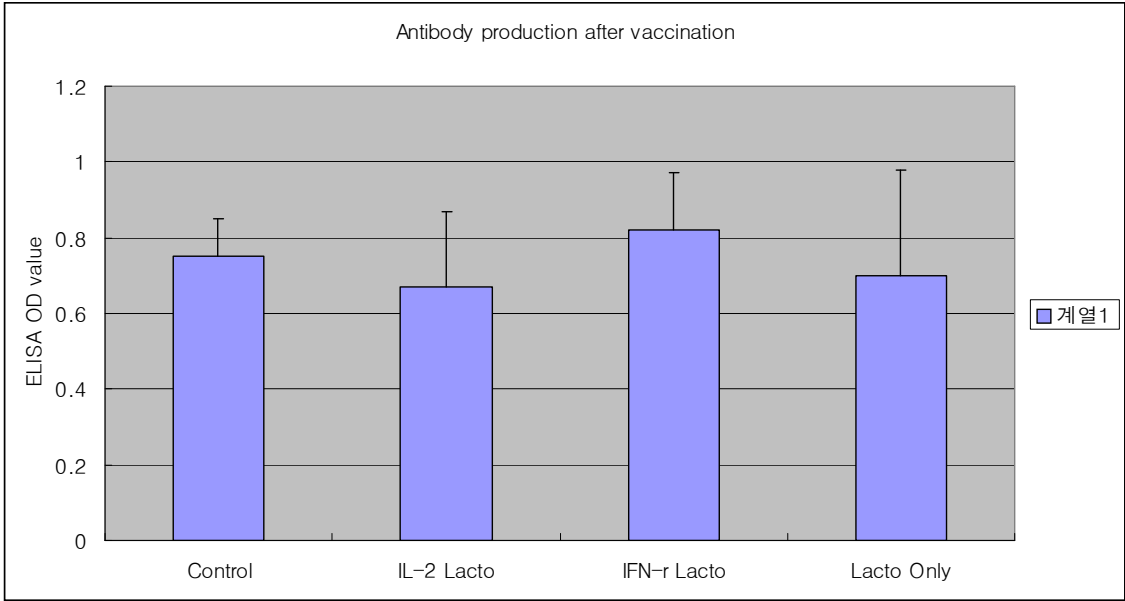


Fig 22. Effects of IL-2 and INF- γ transformed probiotics in the piglets peripheral blood. Antibody production after vaccination.

6. 분변에서 암모니아태 질소 측정

유용미생물의 친환경적 효과를 검토하기 위하여 분변내의 악취발생 원인인 암모니아의 농도를 측정하였다. 분변은 유용미생물 첨가사료를 먹인 돼지와 먹이지 않는 돼지의 분변을 채취하여 분변내에서 암모니아태 질소의 함량을 측정하였다. 그 방법을 간단히 기술하면 분변 10g을 125ml flask에 취하여 2M-KCL 50ml를 가하고 30분간 진탕하여 100ml volumetric flask 에 여과한 후 Kjeldahl (B-316, Buchi)을 이용하여 증류한 후 측정하였다.

유용미생물의 친환경적 효과를 검토하기 위하여 분변내의 악취발생 원인인 암모니아의 농도를 측정하였다. 이를 위하여 분변내 존재하는 암모니아태 질소의 함량을 측정하였다. 실험군의 돼지 분변내 암모니아태 질소함량은 대조군 보다 낮게 검출되었다.

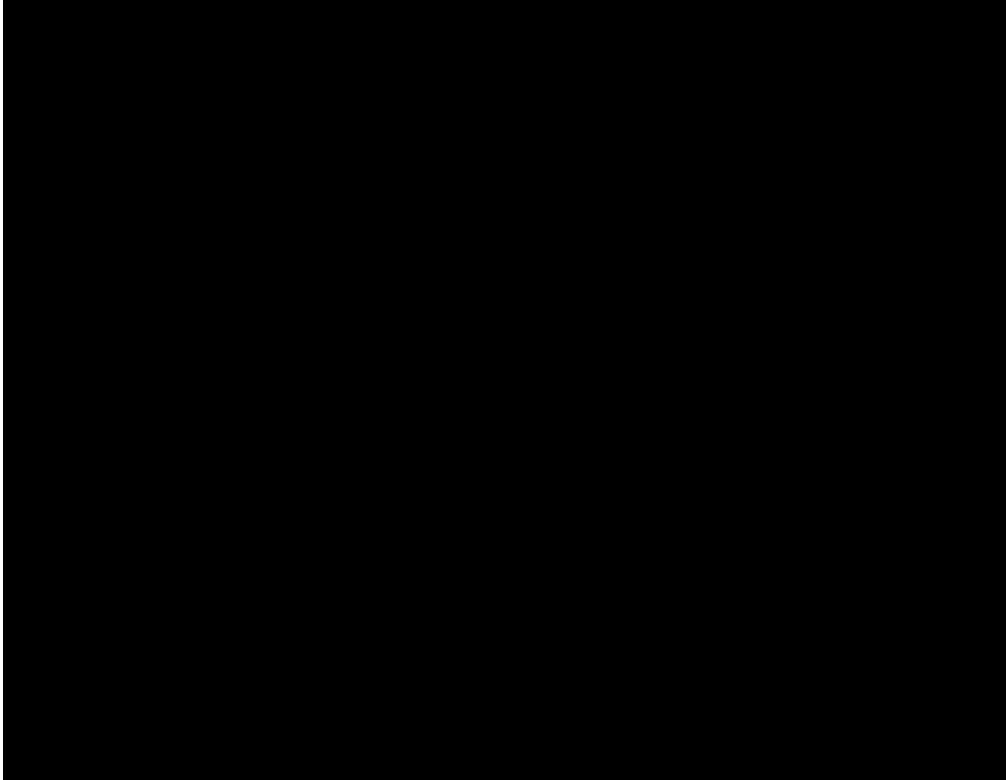


Figure 23. Effects of IL-2 and INF-r transformed probiotics on ammonia gas production on piglets.

제 3 절. 면역증강생균제의 Salmonella대한 항병력 증강효과 규명

1. 재료 및 방법

가. 실험동물 및 실험 설계

실험동물은 8주령의 삼원교잡종 돼지(Landrace x Yorkshire x Duroc) 24두를 공시하였다. 인공 감염 실험은 실험 1군으로 IFN-r를 발현하는 Lactobacillus, 실험2군으로 IL-2를 발현하는 Lactobacillus 그리고 실험3군으로 정상 Lactobacillus (cloning 사용돼있던 균주)그리고 Lactoabcillus를 첨가하지 않는 대조군으로 나누어 각그룹당 6마리의 돼지를 사용하였다. 시험 기간동안 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 외부와 격리된 전남대학교 실험 동물사에서 사육하며 실험하였다. 시험군 돼지의 사료에는 유용 미생물 *Lactobacillus acidophilus* 를 0.3%를 첨가였고 대조군의 사료에는 첨가하지 않았다. 실험 전 모든 돼지에서 혈액검사와 분변검사를 실시하였다. 혈액학적으로 정상범주를 지니며 살모넬라 항체가 음성을 나타내고 분변에서 살모넬라검출이 모두 음성을 확인한 후 실험을 실시하였다.

급여 1주일 후에 실험군과 대조군 모두에 *Salmonella typhimurium* 배양액 (1×10^9 cfu/ml) 50ml를 3일 동안 경구 접종하였다. 접종전 1일부터 매일 분변을 채취하여 분변으로 분비하는 세균수를 측정하였으며 매일 체온등 임상증상을 관찰하였다. 실험은 돼지의 분변에서 *Salmonella typhimurium* 균의 배출 유무를 세균배양 검사 방법을 통해 확인하여 음성이 나올 때 종료하였으며 부검을 통해 주요 병변을 관찰 하였다.

나. 실험균주

돼지에 살모넬라를 인공적으로 감염시키기 위하여 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* ATCC 13076 이었다. 이 균주들을 Brain Heart Infusion broth (BBL, USA) 에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 균액 (1×10^9 CFU/ml)을 50ml씩 공시동물에 3일간 경구접종 하였다.

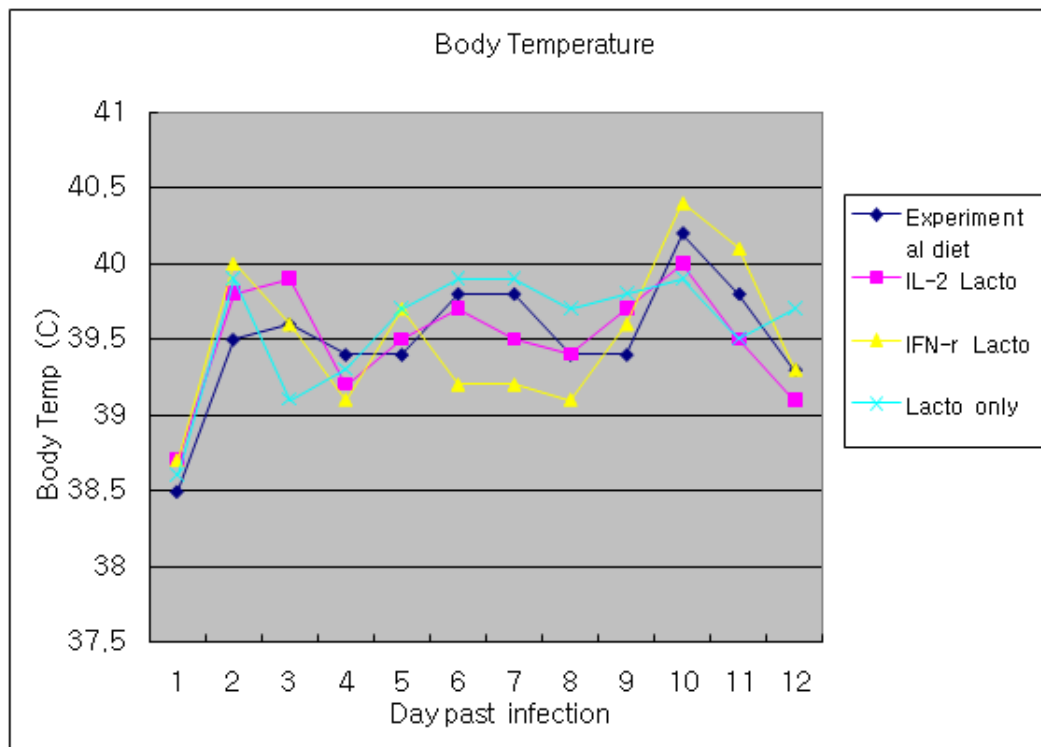


Figure 24. Effects of continuous feeding of IL-2 and INF-r transformed probiotics on growth performance in pigs.

2. 결과 및 고찰

1) 체온검사

돼지 체온은 접종 하루 전부터 실험 마지막 날까지 매일 직장에서 측정하였다. 돼지 살모넬라를 경구로 인공 감염시킨 후 체온을 매일 측정한 결과, 실험군 및 대조군에서 체온이 감염 후 1일째부터 상승하기 시작하여 지속적으로 정상치 이상의 체온 상승을 나타냈다. 하지만 본 실험에서 실험군과 대조군 사이의 유의적인 체온 변화는 나타나지 않았다.

2) 분변에서 분비되는 *Salmonella* 균수 검사

실험하루 전부터 실험 마지막 날까지 매일 직장을 자극하여 분변을 직접 채취하였다. 접종전, 후의 분변 g 당 총세균수 및 살모넬라수는 다음과 같이 확인 하였다. 분변 1 g 을 채취하여 BHI broth (BBL, USA) 9 ml 에 혼합하고, 이를 10 배수 계단 희석하여 각각 plate count agar (BBL, USA) 및 MacConkey agar (BBL, USA) 또는 XLD 배지(BBL, USA) 에 도말한 후 37 °C 에서 24 시간 배양하여 집락을 계수하였다. 장간막 임파절에서 살모넬라균의 분리는 1 g 의 장간막 임파절을 BHI broth 를 이용하여 분쇄한 후 3,000 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 이를 BHI broth 로 10 배수 계단 희석하여 MacConkey agar 와 XLD 배지에 도말한 후 37 °C 에서 24 시간 배양하여 계수하였다.

접종 후 분비되는 *Salmonella* 수는 감염 후 1일째부터 증가하기 시작하여 실험군의 돼지에서 접종 후 2일 동안에는 대조군보다 더 많은 양의 살모넬라를 배출하는 양상을 보였지만 감염 후 3일 부터는 대조군보다 감소하면서 실험군의 돼지에서는 대조군에 비교하여 *Salmonella* 배출농도가 감소하였다.

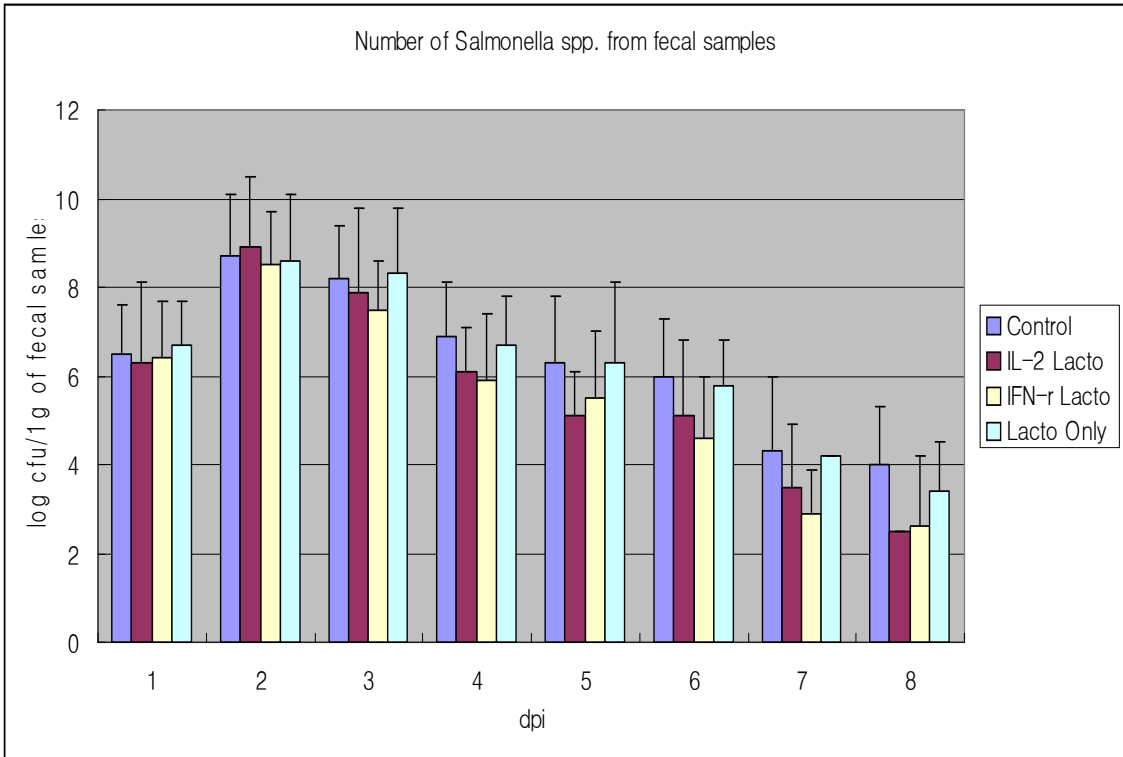


Fig 25. A number of lactic acid bacteria isolated from the fecal samples of pig.

3) 임상증상

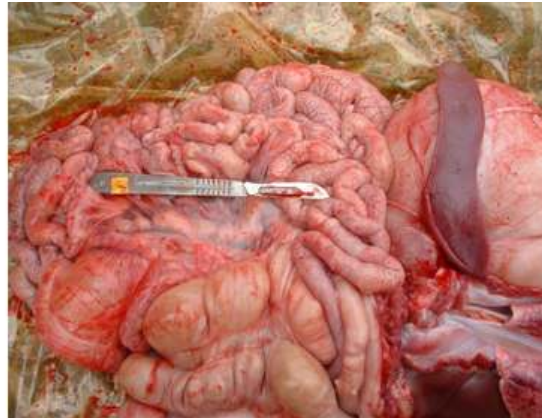
실험이 진행되는 전 기간 동안 임상증상을 관찰하였다. 돼지 살모넬라를 경구로 인공 감염시킨 후 임상증상을 매일 확인한 결과, 실험군 및 대조군 모두에서 심한 설사증상을 일으키지는 않았지만 약간의 무른변이 관찰되었다. 그이외의 임상증상으로는 경미한 정도의 침울 등을 관찰할 수 있었다. 실험 종료 후 일반적인 부검술식에 의해 부검을 실시하였다.

4) 부검소견

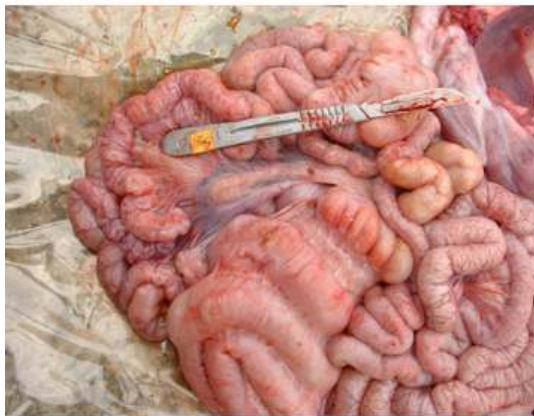
실험 종료 후 부검결과 실험군 및 대조군의 돼지에서 경미한 비장의 종대를 관찰할 수 있었으며, 장간막 임파절의 종대와 미세한 충 출혈소견을 관찰할 수 있었다. 이러한 소견들은 살모넬라에 감염시에 나타나는 일반적인 부검소견과 임상증상들이었다. 대조군은 실험 1과 실험 2군에 비교하여 현저한 장간막 임파절의 종대와 충혈소견을 나타내었으며 그 외의 장기에서도 대조군은 실험군에 비해 현저한 병변 소견을 보였다(figure 25).



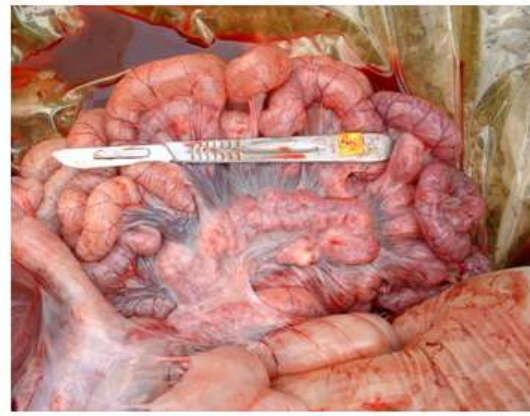
Control



IL-2 Lacto



IFN-r Lacto



Lacto only

Fig. 25. Gloss finding on intestinal tract in pigs with INF-r and IL-2 produced probiotics.

8. 장간막 임파절에서 *Salmonella* 균수 검사

실험 종료 후에 돼지를 부검하여 장간막 임파절에서 살모넬라 분리를 시도하여 대조군과 실험군에 존재하는 살모넬라수를 측정하였다. 대조군에서는 실험군 보다 많은 살모넬라가 검출되었다.

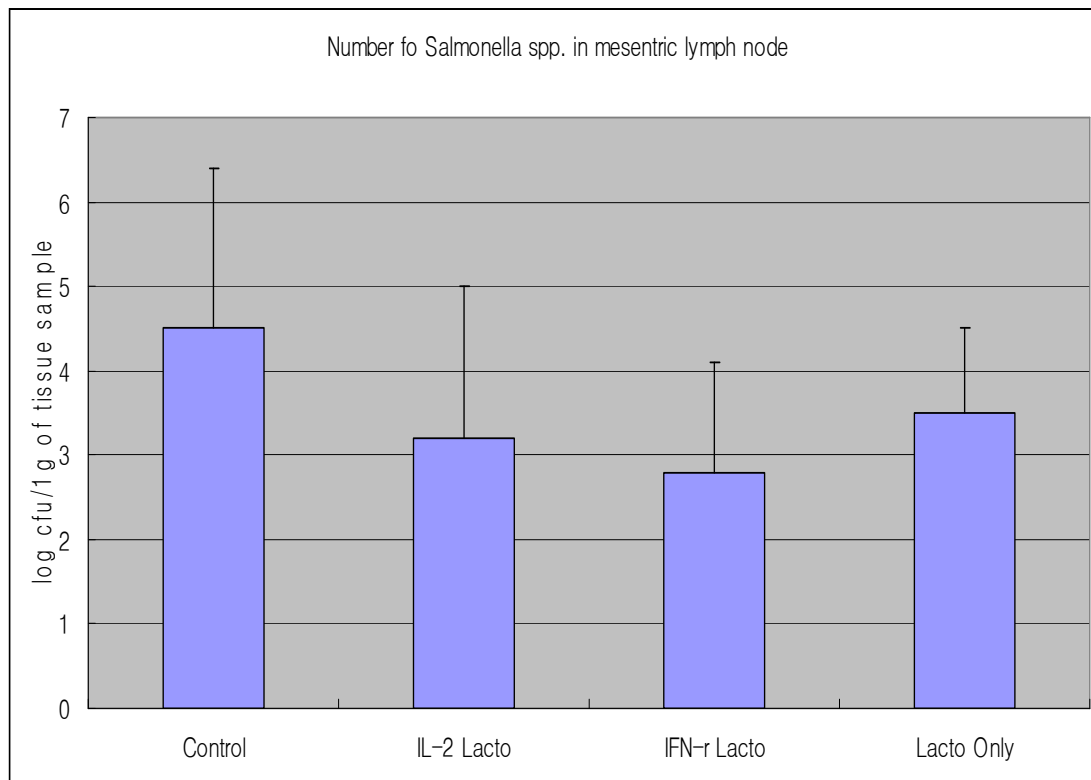


Fig 26. A number of lactic acid bacteria isolated from the mesenteric lymph node on experimental feeding pig.

이상의 결과 돼지의 cytokine IFN- γ 와 IL-2를 발현하는 *Lactobacillus acidophilus*를 성공적으로 개발되었다. Cytokine을 발현하는 면역증강생균제는 29일간 외부gene인 cytokine gene을 보유하다가 30일경에 제거하였다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한 후 면역증강효과를 검사한 결과 혈액내 면역세포의 변화와 혈청내 스트레스지표에는 유의적인 차이는 없었다. 돼지에 면역증강생균제를 급여한후 혈액내 T-cell의 분포와 백신접종 후 항체가 변화에서도 약간 증가하는 경향이 있었지만 유의적인 차이는 없었다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한후 분변내의 암모니아 농도는 감소하는 경향이 있었다. 돼지에 면역증강생균제를 급여한후 *Salmonella*를 이용하여 공격접종을 실시하여 그 방어효과를 측정한 결과 분변에서 살모넬라의 검출율이 감소하는 경향을 보였다.

돼지에 면역증강생균제를 급여한후 *Salmonella*를 이용하여 공격접종을 실시하여 그 방어효과를 측정한 결과 장간막임파절의 육안적소견에서 개선되는 효과를 보였다. 돼지에 면역증강생균제를 급여한후 *Salmonella*를 이용하여 공격접종을 실시하여 그 방어효과를 측정한 결과 장간막임파절에서 *salmonella* 분리율이 감소하였다.

이상의 결과를 종합해보면 면역증강 생균제를 급여한 돼지에서 면역증강효과를 측정한 결과 약간 증가하는 경향이 있었지만 유의적인 차이는 없었다. 하지만 살모넬라를 공격접종한 결과 분변내의 살모넬라 분리율과 장간막임파절에서의 살모넬라 분리율이 현저히 감소하였다. 따라서 면역증강생균제는 돼지의 설사 질병에 효과가 있는 것으로 판단되며 이를 이용하여 바이러스성 설사에서의 효과등이 연구되어야 할 필요가 있다.

제 4 절 생균주 투여동물 항병력 규명

1. 재료 및 방법

돼지 대장균 감염실험 및 생균제의 항병력 및 질병 방어 효과를 검토하고 돼지 살모넬라 감염 실험 및 생균제의 항병력 및 질병 방어 효과를 알아보기 위하여 대장균 인공 감염 돼지와 생균제 급여후 대장균 감염 돼지의 설사 감소율 및 임상 병리학적 병변을 검사하였다.

돼지 살모넬라 감염 실험 및 생균제의 항병력 및 질병 방어 효과를 알아보기 위하여 살모넬라 인공 감염 돼지와 생균제 급여후 대장균 감염 돼지의 설사 감소율 및 임상 병리학적 병변을 검사하였다.

인공 감염후 생균제 급여군과 비급여군의 ELISA를 통한 혈청내 면역 글로불린 및 Inf-r 발현을 차이를 확인하였다.

1) 실험 방법 및 설계

가) 공시동물

사양시험은 1주령 자돈을 100두를 공시하여 천안연암대학 실험농장과 인근의 부영농장과 청명농장을 이용하여 실험군을 배치하였다. 공시동물로는 평균체중이 4.23kg인 포유자돈을 사용하였고 삼원교잡종(Landrace x Large White x Duroc)으로 각각 10복을 선발하여 아래 표와 같이 그룹별로 10두씩 80두를 선발하여 대장균과 살모넬라 감염 그룹을 구분하여 배치하였다.

시험 생균제는 1세부과제에서 개발된 면역강화생균인 *L. acidophilus* 각각 1%을 첨가한 처리구로 하였다. 사료는 자동급이기, 물은 자동급수기에 의해 자유 채식시켰으며, 기타 사양관리는 연암대학 농장의 표준 사양관리법에 준하였다.

Table. 4. Experimental grouping for administrated with Lactobacillus and E-coli on piglets.

	The number of pig (no.)	Probiotics	E-coli
Group 1	10	○	×
Group 2	10	○	○
Group 3	10	×	○
Group 4	10	×	×
Group 5	10	○	×
Group 6	10	○	○
Group 7	10	×	○
Group 8	10	×	×

Table. 5. Table. 4. Experimental grouping for administrated with Lactobacillus and Salmonella on piglets.

	The number of pig (no.)	Probiotics	Salmonella
Group 1	10	○	×
Group 2	10	○	○
Group 3	10	×	○
Group 4	10	×	×
Group 5	10	○	×
Group 6	10	○	○
Group 7	10	×	○
Group 8	10	×	×

나) 임상증상 및 병리학적 소견 조사

실험기간 동안 모든 자돈은 매일오전 10시~12시에 사료 섭취량과 설사 발현 정도를 조사하였고 1주 간격으로 체중을 측정하고 혈액을 채취하여 면역글로불린 양을 측정하였다. 시험기간 동안 폐사한 돼지는 부검을 실시하여 병변을 확인하고 분변과 장관에서 세균분리를 시도하였다. 장관내 감염 세균에 대한 검사는 실험용 돼지의 장관내용물을 약 10배 가량의 Selenite broth (Difco)에 증균하여 혈액배지, Salmonella-Shigella agar (Difco) 및 MacConkey agar (Difco)에서 분리 배양하고 집락을 선택한 후 생화학적 검사를 실시하여 균체를 동정하였다.

모든 실험 자돈은 매주 1두씩 부검을 실시하였고 7주 경과후 남아있는 자돈들은 모두 부검을 실시하여 혈청내 면역글로불린검사와 조직학적 소견을 검사하기 위하여 실험돈의 장관 및 조직 샘플을 채취하였고 조직검사를 위하여 채취된 샘플은 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였으며, 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하고, hematoxylin and eosin (H&E) stain으로 염색하여 광학현미경으로 검사하였다.

2. 연구 결과 및 고찰

가) 대장균 인공감염 자돈의 생균제 투여 효과

개발 생균제의 자돈에서의 대장균 감염증에 대한 항병 효과를 알아보기 위하여 자돈에 대장균을 감염시키고 생균제를 급여하면서 대장균 감염증에 대한 방어 효과를 검토하였다. 대장균 인공감염 자돈들은 감염 2일째부터 심한 설사를 보이기 시작하였고 지속적으로 설사를 보이면서 폐사하기 시작하였으나, 생균제를 급여한 그룹에서는 대장균만 투여한 그룹에 비하여 폐사율이 유의하게 감소하였고 (figure 27) 평균 증체율에 있어서도 유의적인 차이는 아니지만 체중 증가량이 보다 높게 나타나 (figure 28) 질병의 방어 효과는 물론 생산성의 향상에도 기여할 것으로 판단되었다.

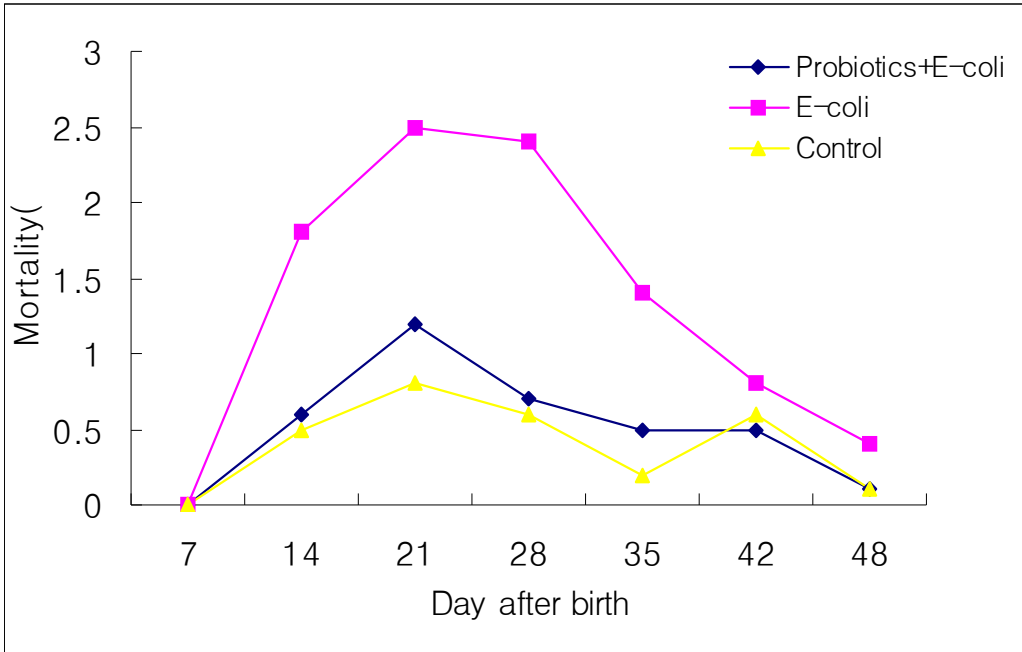


Fig. 27. The mortality of piglets with probiotics and E-coli.

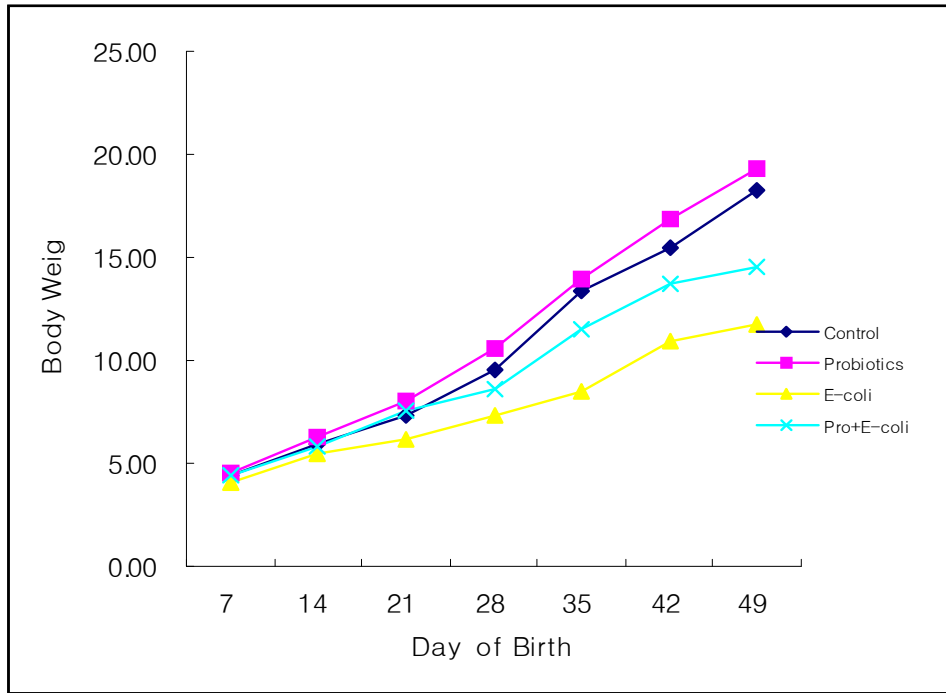


Figure 28. Effects of dietary probiotics complex on growth performance in piglets.

나) 대장균 인공감염 자돈의 병변 및 설사발생율

1주령의 자돈에 대장균을 인공감염 시킨 결과 대부분의 자돈에서 수양성 설사가 나타나기 시작하였고 감염 3일째부터는 심한 수양성 설사로 폐사가 나타나기 시작하였다. 감염 자돈들은 심하게 위축되기 시작하였으나 생균제를 지속적으로 급여한 그룹에서는 설사발생율이 감소하기 시작하였다. (Figure 29-30)

심한 설사를 보인 자돈과 생균제 급여한 그룹의 자돈을 감염 1주째에 각각 1두씩 부검한 결과 대장균 단독 투여군에서는 심한 수양성 설사와 장벽의 박리가 나타났으나 생균제 투여군에서는 경도의 충혈소견이 관찰되었으나 장벽의 박리가 경미하게 나타났고 조직학적으로도 소장염의 소견이 감소되는 것으로 관찰되었다(figure 31-34).



Figure 29. A piglet was worn out infected with E-coli



Figure 30. Piglets fed probiotics was normal body condition infected with E-coli

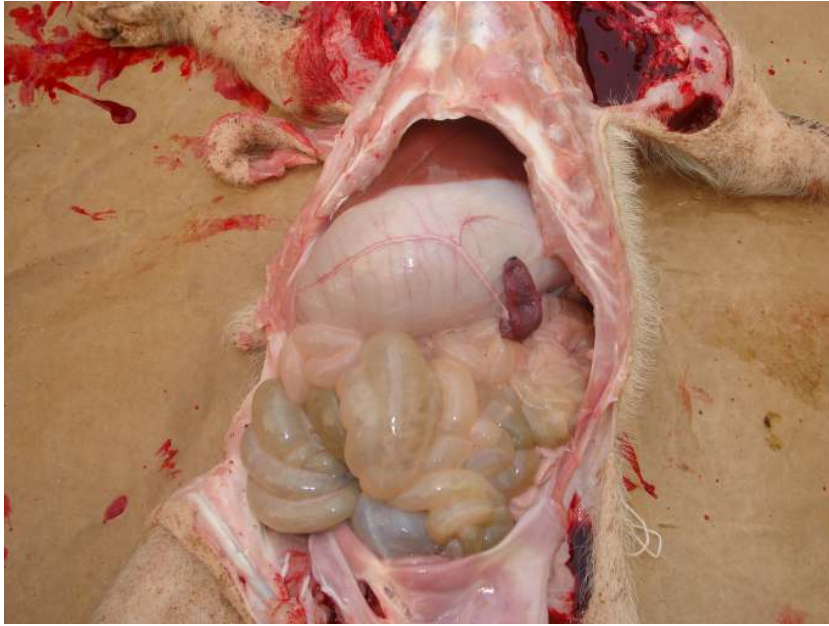


Figure 31. A gross lesion on piglet fed probiotics infected with E-coli

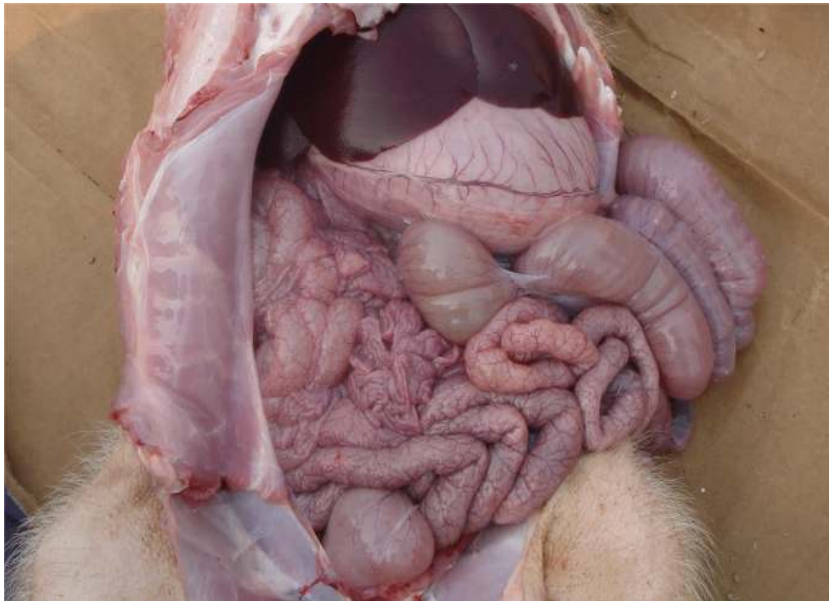


Figure 32. A gross lesion on piglet fed control feed infected with E-coli

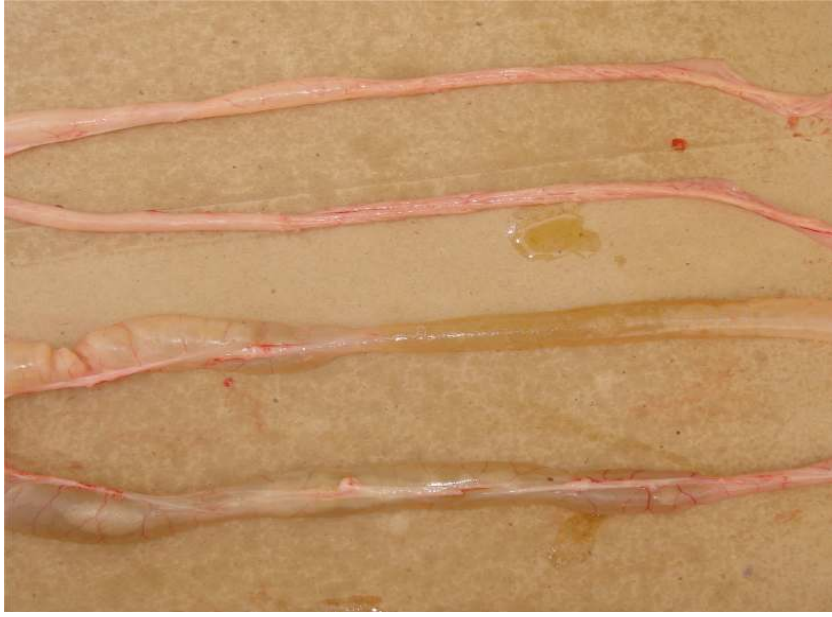


Figure 33. Intestine of piglet fed probiotics infected with E-coli



Figure 34. Intestine of piglet fed control feed infected with E-coli

다) 살모넬라균 인공감염 자돈의 생균제 투여 효과

개발 생균제의 자돈에서의 살모넬라균에 대한 항병력 효과를 알아보기 위하여 11주령의 포유자돈에 살모넬라균을 경구 감염시키고 개발 생균제를 급여하면서 살모넬라균 감염에 대한 자돈의 방어 효과를 조사하였다. 살모넬라균 인공감염 자돈들은 감염 2일째부터 설사를 보이기 시작하여 5일째에는 심한 설사가 나타나기 시작하였고 이후 간헐적인 설사를 보이면서 위축과 폐사가 발생하기 시작하였다. 그러나, 세균 감염후 개발 생균제를 급여한 그룹에서는 살모넬라 균만을 단독 투여한 그룹에 비하여 설사발생율이 낮아지는 것이 관찰되었고 폐사율 또한 감소하였다(figure 35).

살모넬라 인공 감염군과 생균제 투여군의 평균 증체율은 생균제 투여군에서 살모넬라균 단독 투여군에 비하여 약 22%높게 나타나 증체량과 생산성 향상효과를 보이는 것으로 나타났다(figure 36).

라) 살모넬라균 인공감염 자돈의 병변 및 설사 발생율

1주령의 자돈에 살모넬라균을 인공감염 시킨 결과 감염자돈에서 3일째부터 설사가 나타나기 시작하였고 감염 4-5일째부터는 심한 설사가 발생하기 시작하였고 일부 자돈에서 혈변을 보이기도 하였다. 감염 자돈들은 설사와 함께 사료섭취량이 감소하면서 서서히 위축되기 시작하였다. 반면에 생균제를 지속적으로 급여한 그룹에서는 설사의 정도가 약해지고 사료섭취량이 증가하면서 증체량도 성장률이 회복되는 양상을 보였다(Figure 37-40).

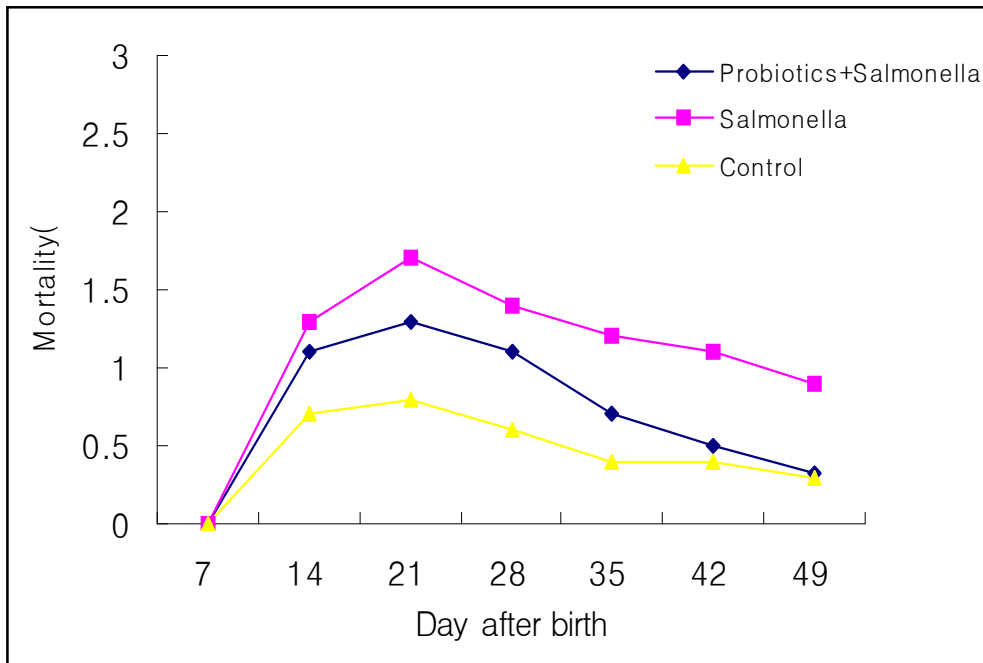


Figure 35. Effects of dietary probiotic complex on growth performance in growing pigs

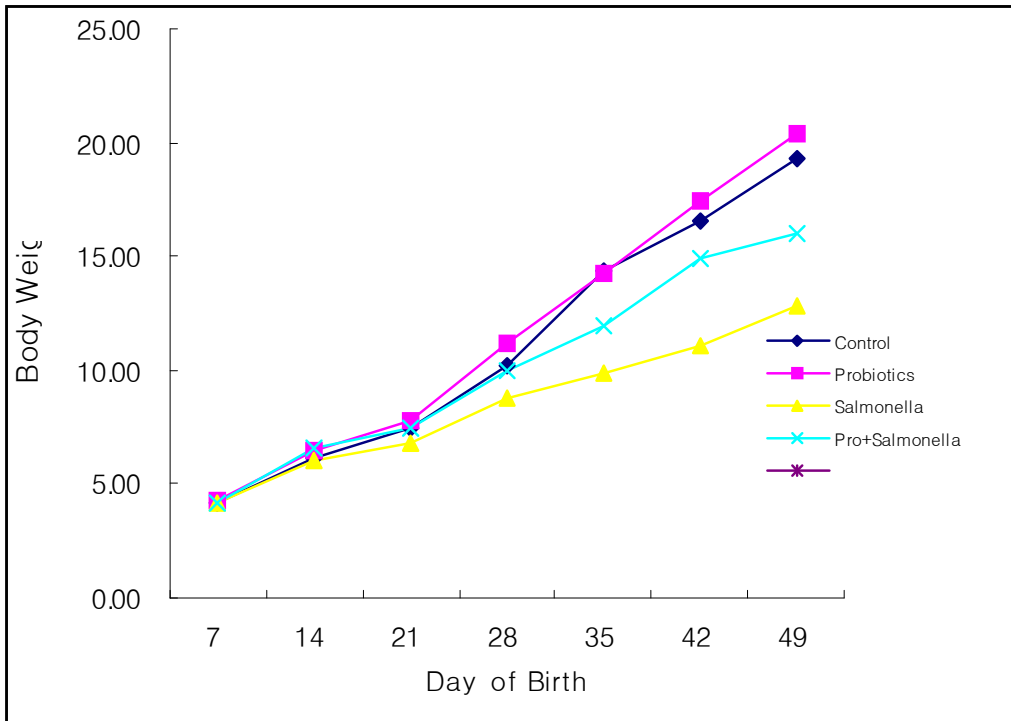


Figure 36. Effects of dietary probiotic complex on growth performance in growing pigs after infected with salmonella and E-coli



Figure 37. A piglet was worn out infected with Salmonella.



Figure 38. Piglets fed probiotics was normal body condition infected with salmonella



Figure 39. A piglet was diarrhea appear infected with Salmonella.

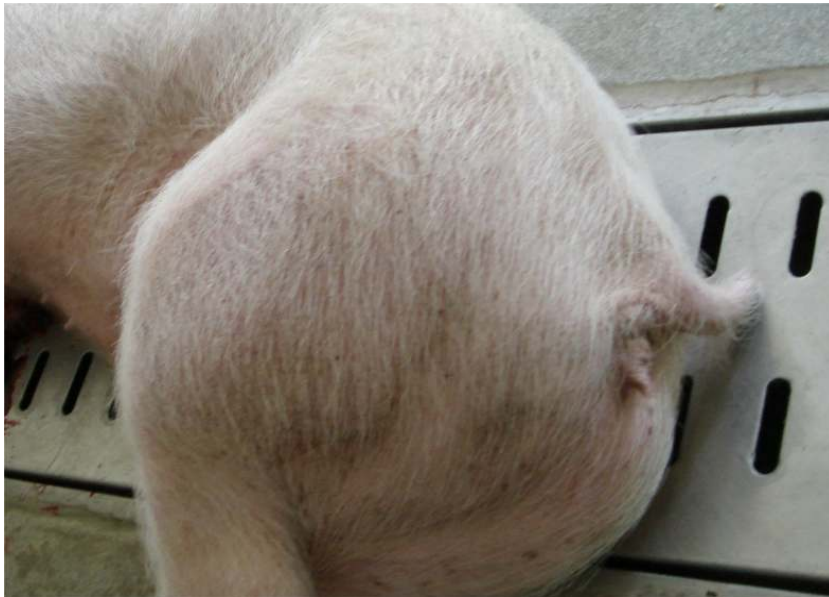


Figure 40. Piglet fed probiotics was normal body condition infected with salmonella. A pig was not diarrhea.

살모넬라 투여후 설사를 보이는 자돈과 개발 생균제를 급여한 그룹의 자돈을 그룹별로 감염 1주와 2주째에 각각 1두씩 부검한 결과 살모넬라균 단독 투여군에서는 장벽의 충출혈과 궤양 소견이 나타났으나 생균제 투여군에서는 약한 정도의 충출혈 소견이 관찰되었을 뿐 궤양과 출혈 소견은 나타나지 않아(figurte 41-48) 생균제의 투여가 장벽의 보호 효과를 보이는 것으로 나타났다.

각 그룹의 실험 자돈에 대하여 폐사한 개체와 매주 1두씩 부검을 실시한 개체에 대한 병리학적 소견검사 결과는 육안소견에서 나타난 병변과 대부분 일치하였고 대장균성 장염에서는 궤양성 병변보다는 장점막의 탈락과 점막의 비박화과 특징적으로 나타났고 살모넬라 감염증에서는 소장과 결장에서 충출혈과 궤양형성이 특징적으로 나타났다. 이들 병변에서도 생균제 투여그룹에서 병변의 정도가 일반적으로 30%이상 감소하여 나타나 설사의 감소원인이 조직 손상의 경감으로 확인되었다. 또한 장내 세균의 재분리율에 있어서도 유의성있게 낮은 수의 장내 병원균의 분리율을 보이는 것으로 나타났다.



Figure 41. A piglet was diarrhea appear infected with Salmonella.



Figure 42. Piglets fed probiotics was normal body condition infected with salmonella



Figure 43. A piglet was diarrhea appear infected with Salmonella.



Figure 44. Piglets fed probiotics was normal body condition infected with salmonella



Figure 45. A piglet was diarrhea appear infected with Salmonella.



Figure 46. Piglets fed probiotics was normal body condition infected with salmonella



Figure 47. A piglet was diarrhea appear infected with Salmonella.



Figure 48. Piglets fed probiotics was normal body condition infected with salmonella

제 5 절 . 생균제의 사양 효과 및 친환경 축산물 생산

1. 재료 및 방법

개발 생균제의 급여가 돼지의 성장률 및 혈중 요소태 질소 및 면역능력에 미치는 영향 조사

가) 공시동물

사양시험은 평균 5.69kg의 1주령 포유자돈 100두를 선발하여 생균제 0.1%처리군 33두와 생균제 0.2% 투여군 33두 그리고 비처리 대조군 34두를 대상으로 하여 천안 연암대학 실험농장에서 20주간 사육하면서 혈액학적 변화와 증체량 및 분변내 요소 함량 등을 조사하였다.

나) 시험설계 및 사양관리

처리 I 은 생균제 1%처리구로 처리II는 생균제 2% 처리구로 일반 사료에 우수 생균주 *B. subtilis*, *L. acidophilus*를 각각 0.1과 0.2%을 첨가한 처리구로 하였다. 실험사료의 영양소 함량은 NRC(1998)의 영양소 요구수준과 같거나 높게 배합하였다. (table 6-8) 실험돈은 자돈, 육성기, 비육기에 따라 각각 자돈기는 슬롯-콘크리트-바닥인 자돈사에서 이유 후 약 35일간 사육하였고 육성돈과 비육돈 시기는 슬러리 콘크리트 돈사에서 각각 사육되었다. 전체 시험기간 동안 사료는 자동급이기, 물은 자동급수기에 의해 자유 급식시켰으며, 사료 섭취량과 체중은 3주간격으로 측정하였고 종료시에 측정하여 일당증체량, 일당사료섭취량 및 사료효율을 각각 계산하였다.

Table 6. Composition of starter diets (phase 2 : 8 – 21 day)

Ingredient	%
Corn	16.87
Broken rice	17.15
Whey	18.0
Soybean meal	8.0
Fish meal	4.5
Wheat middlings	2.5
Milk by-product	11.0
Biscuit by-product	4.0
Whey protein	2.0
Soy protein	7.21
Dried porcine soluble	2.0
Soy oil	3.0
Sweetner	0.02
Flavorings	0.1
Acidifier	0.3
Lecithin	0.25
Limestone	0.2
DCP	0.7
Salt	0.25
Premix	1.2
Choline	0.45
Antibiotics	0.3
Total	100.0
Calculated values	
DE, Kcal/kg	3600.0
Crude protein	19.0
Crude fiber	2.5
Crude ash	6.0
Ca	0.7
P	0.7
Available Phosphorous	0.5
Lysine	1.3
Available lysine	1.1

Table 7. Composition of diets for weaned pigs

Ingredient	%
Corn	38.60
SBM	30.76
Wheat	20.00
Tallow	2.50
Wheat hull	6.22
Dicalcium P.	1.00
Limestone	0.32
Vitamin Mix ¹	0.20
Mineral Mix ²	0.20
Salt	0.20
Total	100.0
Calculated values	
ME, Kcal/kg	3362
Crude protein, %	20.35
Ca, %	0.74
P, %	0.69
Lysine, %	1.12
Met+Cys, %	0.69

¹ vitamin mixtures was formulated to meet of exceed the NRC(1998) requirements

² mineral mixtures was formulated to meet of exceed the NRC(1998) requirements

Table 8. Composition of diet for growing–finishing pig

Ingredient	%
Corn	46.38
SBM	26.12
Wheat	17.00
Tallow	2.50
Wheat hull	6.00
Dicalcium P.	0.70
Limestone	0.70
Vitamin Mix ¹	0.20
Mineral Mix ²	0.20
Salt	0.20
Total	100.0
Calculated values	
ME, Kcal/kg	3362
Crude protein, %	18.68
Ca, %	0.66
P, %	0.61
Lysine, %	0.99
Met+Cys, %	0.65

¹ vitamin mixtures was formulated to meet of exceed the NRC(1998) requirements

² mineral mixtures was formulated to meet of exceed the NRC(1998) requirements

다) 소화실험 및 혈청학적 분석

소화실험은 실험돈의 평균체중이 18.45 ± 1.85 와 42.35 ± 2.73 kg시기에 두 번에 걸쳐 수행하였다. 1차,2차 소화실험에 사용된 돼지는 세 그룹에서 무작위로 12두씩 선발하여 3처리 4반복으로 배치하였다. 소화실험에 사용된 돼지는 대사틀에 수용되어 5일간 적응기를 둔 다음 5일간 분과 뇨를 채취하는 전분채취법을 사용하였다. 전체 사료섭취량 및 분과뇨의 양은 매일 기록 보관하였으며 채취된 샘플은 냉동보관하면서 분석하였다. 사료, 분변, 뇨의 일반성분 분석은 AOAC(1995)의 방법으로 분석하였다.

혈액분석을 위하여 각 그룹별로 시험 개시후 1,3,5,8,11,20주에 각 처리군 별로 5두를 선발하여 동일한 개체를 대상으로 매일 오전 10시에서 11시 사이에 경정맥에서 채혈을 실시하여 곧바로 3,000rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하여 -20°C 에 냉동보관하였다. 혈중 요소태 질소(Blood Urea Nitrogen, BUN)는 혈액분석기(Culter counter, JAPAN)를 이용하여 분석하였고 혈액내 백혈구수는 HEMAVET 850(CDC tech, USA)을 이용하여 CDC HEMAVET 전용시약으로 전기저항법에 의해 분석하고 IgG 및 IgA의 분석은 Brio(SEAC, Italy)를 이용하여 Pig IgG, IgA ELISA Quantitation kit로 ELISA 방법을 이용하여 분석하였다.

2. 연구결과

생균제 첨가에 의한 돼지의 사양시험 결과는 0-9주까지는 생균제 처리구에서 비처리구보다 일당 증체량, 일당 사료섭취량 및 사료효율에 있어서 증가하는 것으로 나타났다. 10주에서 20주까지는 생균제 첨가구에서 유의적으로 증가하였고 특히, 0.1%에서 4.5%증가효과가 나타났으나 0.2%첨가구에서는 대조구에 비하여 7.2%의 일당 증체량 증가 효과를 보여 생균제의 농도가 높아질수록 일당 증체량이 더욱 향상되는 것으로 나타났다(table 9). 이 결과는 본 연구에서 개발된 생균제가 지속적 급여는 육성기는 물론 비육기에 이르기까지 성장 촉진 효과를 보이는 것으로 나타났다.

Table 9. Effects of dietary probiotic complex on growth rate in growing pigs

Item	Control	Probiotics content		Standard Deviation
		0.1%	0.2%	
ADG(g)				
0~8 weeks	472	481	458	9.05
9~20 weeks	813	857	876	9.45
0~20 weeks	674	698	704	8.64
ADFI				
0~8 weeks	867	859	836	24.65
9~20 weeks	2,493	2,588	2,574	21.34
0~20 weeks	1,893	1,896	1,875	23.12
G:F ratio				
0~8 weeks	0.542	0.550	0.542	0.012
9~20 weeks	0.328	0.335	0.351	0.008
0~20 weeks	0.357	0.362	0.378	0.005

생균제 첨가가 영양소 소화율 및 질소 축적율에 미치는 영향에 대한 결과는 표 2에서 보는 바와 같이 자돈에서는 생균제 0.1%투여군과 0.2%투여군에서 대조군에 비해 건물 조단백질, 조지방의 소화율이 유의하게 증가하였으며 ($P < 0.05$), 0.2%처리군에서는 칼슘의 소화율도 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 인의 소화율은 유의할 만한 차이를 보이지 않았다. 그러나 육성기 이후의 돼지에서는 생균제 첨가에 따른 소화율과 영양소 개선은 나타나지 않았다.

생균제 투여가 질소 축적율에 미치는 영향에 대해서는 표 11에 나타난 바와 같이 생균제 처리군에서 분변내 질소의 양이 유의하게 줄어드는 것으로 나타났다. 노내 질소의 성분 변화는 큰 차이를 보이지 않았고 육성돈과 비육돈에서는 소화율과 마찬가지로 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

혈액내 요소태 질소의 성분변화에서는 자돈에서 약간 증가하는 경향을 보였으나 전 실험기간동안 생균제 투여군과 비투여군에서 유의성있는 변화가 나타나지 않았고 시간이 경과하면서 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다 (Figure 49).

Table 10. Effect of probiotics complex on nutrient digestibility in weaning and growing pig

Item	Control	Probiotics content		Standard Deviation
		0.1%	0.2%	
Weaning pig				
DM(%)	84.76	88.98	91.25	0.892
Protein(%)	83.45	87.12	89.83	1.423
Fat(%)	67.22	79.02	83.28	2.192
Ca(%)	68.32	71.24	79.32	1.387
P (%)	78.61	83.24	83.65	0.945
Growing pig				
DM(%)	92.86	93.33	95.15	0.386
Protein(%)	93.12	90.65	92.26	0.472
Fat(%)	81.65	80.43	81.45	1.325
Ca(%)	75.54	76.62	78.67	1.192
P (%)	52.45	61.42	66.83	1.845

Table 11. Effect of probiotics complex on nitrogen retention in weaning and growing pigs

Item	Control	Probiotics content		Standard Deviation
		0.1%	0.2%	
Weaning pig				
N intake (g/d)	20.12	20.32	21.02	0.082
Fecal N excretion (g/d)	3.53	3.12	3.22	0.143
Urinary N excretion (g/d)	5.32	5.41	6.83	0.362
Nitrogen retention (g/d)	11.73	12.15	12.63	0.374
Nitrogen retention rate (%)	55.23	60.62	58.96	1.045
Growing pig				
N intake (g/d)	38.98	37.26	39.11	0.125
Fecal N excretion (g/d)	3.24	3.32	3.47	0.487
Urinary N excretion (g/d)	11.24	10.98	10.83	0.512
Nitrogen retention (g/d)	25.35	24.26	25.35	0.483
Nitrogen retention rate (%)	63.24	63.54	67.15	0.976

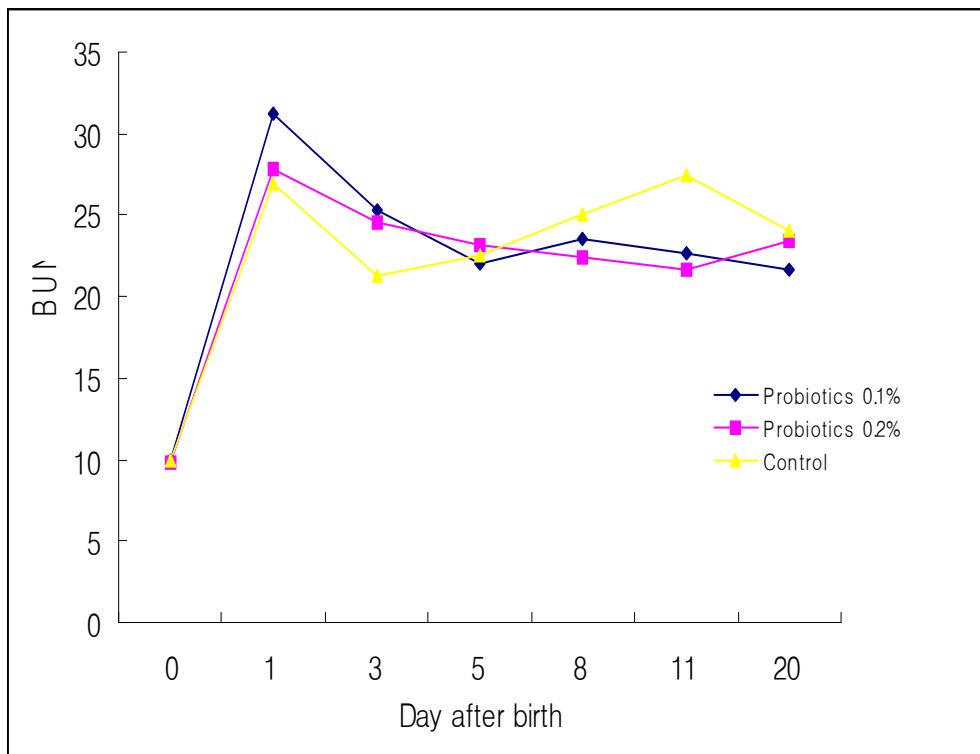


Figure 49. Effect of continuous feeding of probiotics complex on blood urea nitrogen(BUN) concentration in pigs.

생균제의 면역기능에 관해서는 대부분의 생균제가 면역기능의 향상 효과를 보이지 않는다고 하였다. 그러나 본 연구에서 개발된 생균제는 표 4에서 보는 바와 같이 면역기능이 강화된 생균제로 기존의 생균제보다 면역기능 강화 효과가 개선된 결과를 보여주었다. 특히 0.2% 처리군에서는 IgG의 함량이 증가할 뿐만 아니라 Inf-r의 증가가 관찰되어 본 생균제의 급여가 질병의 예방과 방어에 효과를 발휘할 수 있을 것으로 판단되었다. 이를 확인하기 위하여 각 그룹별로 혈청을 채혈할 때 1두씩 안락사 시켜 부검을 하여 장내소견을 관찰한 결과 Figure 50-54와 같이 생균제 처리군에서 임상증상은 물론 부검 소견에서도 양호한 장관의 상태를 보이고 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 Figure 55에 보는 바와 같이 시제품을 제작하였다.

생균제의 급여방법은 젤타입과 물에 타먹이는 방법이 있는데 본 연구에서는 Table 12와 같이 이 두 가지의 시제품을 모두 제작하여 현장에서의 활용도를 검사한 결과 젤타입이 효과는 우수하나 농가의 불편으로 현장적용에 어려움이 있어 음수용으로 제작된 가루타입을 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

Table 12. Effect of continuous feeding of probiotics complex on immune responses in pigs

Item	Control	Probiotics content		Standard Deviation
		0.1%	0.2%	
1 week				
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	14.27	13.44	14.31	0.843
IgG (mg/dl)	15.23	14.91	16.27	0.913
IgA (mg/dl)	0.32	0.29	0.36	0.023
Inf- \square (mg/dl)	0.41	0.47	0.54	0.019
3 weeks				
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	16.94	17.27	18.75	0.902
IgG (mg/dl)	13.83	14.52	14.61	0.734
IgA (mg/dl)	0.29	0.36	0.41	0.035
Inf- \square (mg/dl)	0.34	0.51	0.54	0.014
5 weeks				
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	14.27	15.04	14.82	1.221
IgG (mg/dl)	11.56	11.37	10.96	0.653
IgA (mg/dl)	0.31	0.29	0.34	0.072
Inf- \square (mg/dl)	0.29	0.38	0.37	0.023
8 weeks				
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	13.94	14.73	13.94	0.923
IgG (mg/dl)	12.54	13.62	12.54	0.762
IgA (mg/dl)	0.81	0.76	0.94	0.062
Inf- \square (mg/dl)	0.42	0.61	0.87	0.042
11 weeks				
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	16.54	17.23	17.93	0.952
IgG (mg/dl)	28.81	31.26	35.62	1.426
IgA (mg/dl)	1.67	1.37	1.79	0.104
Inf- \square (mg/dl)	0.47	0.59	0.92	0.027
20 weeks				
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	21.56	22.53	25.73	1.327
IgG (mg/dl)	32.71	29.17	33.89	1.028
IgA (mg/dl)	2.16	1.97	2.02	0.052
Inf- \square (mg/dl)	0.67	0.83	0.95	0.031



Figure 50. Piglets fed conventional feed was normal body condition



Figure 51. Piglets fed probiotics was normal body condition

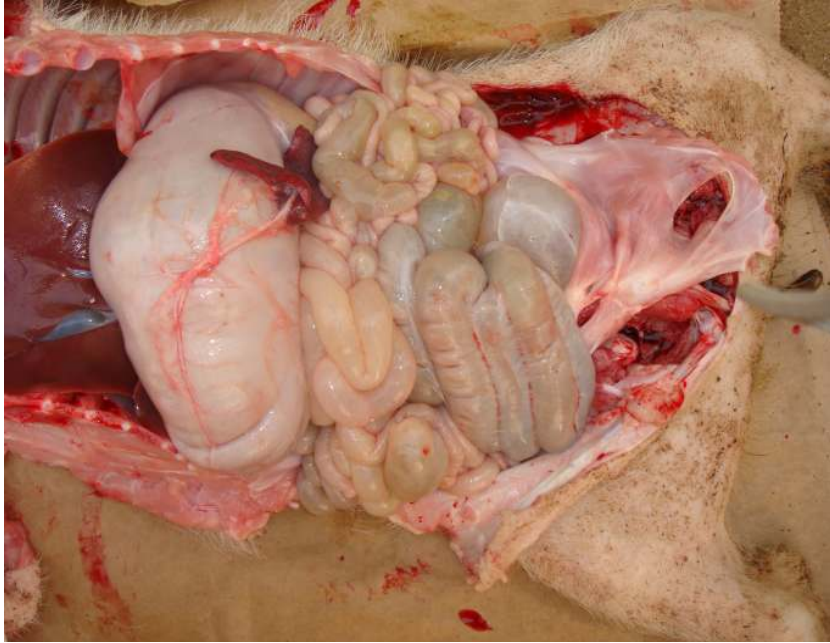


Figure 52. Piglets fed conventional feed probiotics showed edematous intestinal tract

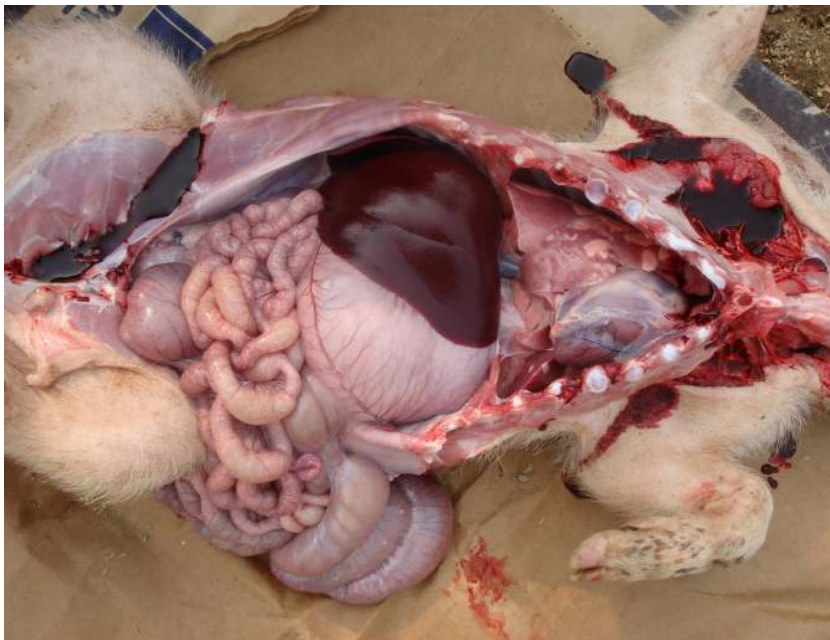


Figure 53. Piglets fed conventional feed probiotics was normal intestinal condition



Figure 54. Blood collection with piglets fed conventional feed and probiotics complex



Figure 55. A manufactured products with pig INF-r and pig IL-2 lactobacillus.

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

1. 목표 달성도

연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위	달성도
면역자극 유도 물질을 분비하는 생균제 개발 및 면역기능강화 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지의 IL-2 유전자를 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 균주에 cloning 하여 돼지용 IL-2 발현 생균제 개발. - 돼지의 IFN-r 유전자를 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 균주에 cloning하여 돼지용 IFN-r 발현 생균제를 개발. - 돼지에 면역기능강화 생균제를 급여한 그룹과 일반 생균제를 급여한 그룹의 면역기능증강 효과를 규명 	면역기능강화 생균제로 이용할 생균주 선발	100
		IL-2 유전자와 IFN-r 유전자를 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 균주에 cloning	100
		개발된 생균제에 대한 면역증강효과 검토	100
		면역기능강화 생균제를 돼지에 급여한 후 병원성 세균 공격접종 실시	100
		면역기능강화 생균제를 돼지에 급여한 후 병원성 세균 공격접종 실시	100
우수 생균주 선발과 면역기능강화 생균제 투여 동물의 항병력 규명 및 적용	<ul style="list-style-type: none"> - 우수생균주 선발 및 면역기능강화 생균제 대량증식법 확립 - 면역기능강화 생균제를 급여한 돼지에서 면역기능 증강으로 항병력이 증가되었는가를 확인하기 위한 살모넬라 인공감염 실험 면역기능강화 생균제의 생산성 및 질병방어 효과 확인 	면역기능강화 생균제를 돼지에 급여한 후 병원성 세균을 이용한 공격접종 실시하고 질병 발생정도를 측정하여 항병력 효과를 규명	100
		면역기능강화 생균제를 급여한 돼지의 사양효과 검토	100
		항생제 대체 효과 및 친환경 효과 규명	100

2. 관련 분야에의 기여도

국내에서 동물의 소화기 질병은 가장 흔한 질병으로 경제적인 측면에서 아주 중요한 질병이라 할 수 있다. 따라서 본 연구를 통해 숙주의 면역능력을 증강시킬 수 있는 INF- γ 와 IL-2을 분비하는 생균제를 개발하여 면역기능강화 효능에 의하여 소화기 질병 발생으로 인한 피해를 감소시켜 농가 생산성을 증대시킬 수 있을 것이다. 즉 진단, 치료 및 예방에 소요되는 손실을 최대한 줄여서 농가와 국가적으로 경제적 효과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 항생제 사용을 줄이게 됨으로 식육내의 잔류 항생제물질의 감소로 국민의 보건 향상에 크게 이바지할 수 있을 것으로 생각된다.

육류의 소비자가격에서 가축의 질병 부분에 해당되는 비용이 선진국의 경우 17%이며 개발도상국의 경우에는 34%에 이른다. 국내에서도 연간 축산 총생산액(53,112억, 97년) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 낳고 있다. 따라서 면역 능력을 촉진 시켜주는 개발 생균제는 소화기 전염병 방지에 역할을 할 수 있어 경제적 효과를 얻을 수 있을뿐만 아니라 감염증에 따른 치료비 손실 및 인력낭비 등을 절감하여 최근사료값 급등으로 시름하고 있는 축산 농가에 의욕을 고취 시켜 줄수 있을 것으로 여겨진다.

현재 우리나라 국민들의 급격한 보건인식의 향상에 의해서 안정성이 확보된 위생적인 식품에 대한 욕구가 증가하고 있다. 따라서 면역기능강화 생균제의 사료첨가로 인한 사료첨가 항생제와 치료용 항생제의 사용을 줄일 수 있어 질 높은 친환경 육류의 생산이 가능할 것으로 보인다.

현재 생균제의 산업은 전국에 100여개 정도의 사업체가 있을 정도로 그 규모가 크다고 볼 수 있다. 하지만 축산농가에서 생균제를 사용하여 생산성에서 미약한 효과를 보고는 있지만 확실한 효과를 보기가 어려워 그 수요가 미미한 실정에 있다. 면역 기능 보강 생균제는 오남용 되고 있는 양돈 항생제의 사용을 줄이고 암모니아 가스의 배출을 줄여주고 친환경 축산기반을 구축하는데 일조 할 수 있을 것이다.

또한 본 연구에서 개발된 면역기능강화 생균제의 기술이전 및 대량생산체계가 이루어져 경제성 있는 면역기능강화 생균제를 생산하고 판매하게 되면 지역기반 산업 육성에도 큰 기여를 할 것으로 기대한다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

본 연구에서 개발된 면역 기능강화 생균제는 최근 국제적인 흐름인 항생제의 규제에 따른 대책으로 각국에서 앞다투어 개발을 서두르고 있는 품목이며, 특히 본 과제에서 사용한 제조방법은 최첨단의 유전자 클로닝을 이용한 기법으로 국가의 차세대 성장동력 산업인 바이오 산업육성에도 일조할 수 있는 기술로서 향후 다른 바이오 신약의 개발에도 적극 활용가능한 것으로 알려진 매우 유용한 기술이다.

본 과제에서 개발된 두가지의 면역강화 생균제에 대한 특허를 출원하였고 이 생균제의 생산 기법을 민간 기업인 서울 산업과 연암실험동물에 기술 이전하여 생균제를 생산하여 보급할 수 있도록 할 것이다.

이에 따라 본 연구에서 개발된 2종의 면역증강 생균제에 대한 기술 특허를 출원하였고 국내 학술지에 2편의 논문을 게재하였다. 또한 개발된 2종의 생균제의 균주 기탁과 균주를 특허 출원하였고 기술이전을 통한 대량 생산에 대한 내용과 싼값에 농가에 보급할 수 있는 방안을 기업과 협의 중에 있다.

본 연구에서 개발한 면역기능강화 생균제는 유해가스 억제 효능이 우수하고 안정성이 확보되어 친환경 유기농 축산에 도움이 될 것이며 농가의 생산성 향상에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

또한 본 연구에 참여한 기업 외에도 다른 민간 참여 기업에도 생산기술을 이전하여 대량 생산된 면역기능강화 생균제를 축산농가에 보다 저렴하게 보급할 수 있도록 하여 농가의 생산성을 향상시키고 농가소득을 증대시킬 수 있을 것이다.

생균제를 투여한 동물의 면역기능 향상에 의해 세균성 소화기 질병의 예방을 가능하도록 하여 양돈농가와 양축 농가에서 소화기 질병으로 인한 피해를 줄여 농가의 소득증대를 가능하도록 할 계획이다.

본 연구에서 개발한 면역유도 유전자 삽입에 의한 형질전환 생균제 생산 기술을 참여업체인 연암실험동물과 관련 산업체인 서울산업과 산학협력을 체결하여 기업에 기술을 전수하여 제품의 시판 가능성을 검토하고 시판가능하도록 하여 개발된 생균제가 농가에서 활용되어 농가의 소득을 증대시키고 농민의 친환경 축산의욕을 고취시킬 수 있도록 할 것이다.

또한 본 연구를 통해 획득한 면역기능강화 생균제 개발에 대한 노하우는 다른 용도의 생균제 개발에도 바로 활용할 수 있어 호흡기 질환을 예방할 수 있는 면역 물질을 발현하는 물질을 개발하도록 할 계획이다.

본 연구 기술은 다른 생균제의 분자생물학적 연구에 유용한 자료로서 활용될 수 있으며 국내 생균제 업계의 기술 수준을 한단계 업그레이드시키는데 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

그렇지만 현재 개발된 면역증강 생균제가 돼지의 세균성 설사 질병에 좋은 효과를 보이는 것으로 판단되나 바이러스성 질병에 대한 예방 효과를 검토하지 못해 이에 대한 연구가 보완되면 보다 다양한 부분에 활용될수 있을 것으로 사료된다.

제 6 장 연구 개발 과정에서 수집된 해외 과학 기술 정보

유럽에서 유통 중인 프로바이오틱스 제품을 수거하여 검사한 결과 대부분의 제품에서 균주 이름의 오기 균수의 부, 족 등이 관찰되었다. 일종의 식품미생물학 교재인 에서도 Fundamental Food Microbiology 실제적으로는 유산균이 거의 모두 죽어 있는 이들 제품에 대해서는 건강 기능성 효과가 없는 것으로 제시하였다.

프로바이오틱스는 병원성 미생물과 경합하여 장내의 영양분을 선점할 수 있고 장 점막 부위에 병원성 균과 경쟁적으로 먼저 부착할 수 있다 또한 다양한 종류의 항균성 물질을 생산하거나 생체의 면역 증진을 통하여 병원균의 증식을 억제할 수 있다.

보통 로타바이러스는 자연적으로 장관내로 감염되어 어린이나 어린 동물들에게서 설사를 일으킨다. 로타바이러스의 작용 기작은 동물에서 많이 알려져 있으며 로타바이러스는 주로 상피 세포층 상부의 성숙된 상피 세포에서 증식한다. 이것은 분화된 장상피세포가 감염과 복제에 필요한 인자들을 많이 가지고 있기 때문으로 보인다. 로타바이러스의 감염은 소장 상피 세포의 기능을 변화시켜 설사를 유발하게 되고 설사는 보통 영양소 흡수 불량과 상피 세포 파괴를 가져 온다. 흡수 불량은 분해되지 않은 단당류 이당류 지방 단백질을 대장으로 이동하게 하고 대장은 충분한 수분을 흡수 할 수 없어서 삼투성 설사를 초래하게 된다. 로타바이러스는 또한 장 상피 세포에서 와 케모카인의 분비를 유도하는데 이것들은 감염에 대한 면역 반응을 시작하는 인자들로 알려져 있다. 한편 Lactobacillus는 숙주의 물리적인 방어 기능을 포함한 여러 방어 기작에 도움을 줌으로서 병원성 균에 대한 억제하는 것으로 알려져 있다.

프로바이오틱 Lactobacillus를 투여한 아이들은 아토피가 감소하였고 혈중의 CD4 농도와 혈중 또는 요중의 염증성 지표 물질인 eosinophil cationic 단백질을 감소시켰다. 또한 프로바이오틱스 투여군의 분변 TNF- α 감소가 나타났으며 Lactobacillus가 포함된 요구르트를 12개월 이상 섭취한 건강한 노인을 대상으로 한 실험에서 요구르트를 섭취하지 않은 군에 비하여 알레르기 증상이 더 낮은 빈도로 나타났다.

혈장 중의 IL-2, IL-4, IL-6, IL-1, TNF- α , TGF-1, TGF-2, C-reactive protein을 비교 연구한 결과는 C-reactive protein과 IL-6는 L. rhamnosus 투여군에서 IL-10 수준이 상승한다고 보고하였다.

다양한 동물 실험에서는 숙주의 면역계 이상이 염증성 대장 질환을 유발하는 주요 원인으로 나타났다. 예를 들어 사이토카인이나 사이토카인 수용체 혹은 면역 물질을

코딩하고 있는 유전자를 변형할 경우 염증성 대장 증상이 쥐의 대장에서 주로 나타났다고 보고되어 장관의 미생물 환경이 대장 질환의 진행에 관련이 있는 것으로 사료된다.

DC Th1의 항원 제시는 림프구를 자극하게 되며 이것은 IL-2와 IFN- γ 를 통해 대식 세포의 활성화를 유도하게 된다. 이는 다른 사이토카인이나 매개체인 IL-12와 IL-18의 분비를 유도한다. 활성화된 대식세포는 IL-1, IL-6 TNF- α 를 분비하여 염증반응을 증폭시키게 된다.

유산균의 작용 메커니즘은 여러 가지로 생각되고 있는데 여기에는 병원성 미생물의 성장 억제로 점막층에 부착하거나 투과하려는 병원균을 억제하고 점막층의 기능을 자극하거나 염증성 물질과 방어 물질을 증진시켜서 면역을 조절하는 기작으로 생각되고 있다.

프로바이오틱스를 이용한 다양한 임상 실험 결과들은 유산균을 부작용이 적은 자연적인 치료방법 및 예방 물질로서의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 유해 세균 및 로타바이러스 등의 유해 미생물의 증식을 억제하고 아울러 알레르기와 염증성 장관 질환 억제능력이 우수하고 장내 정착성이 좋은 프로바이오틱스 균주를 개발하는 것이 필요하다.

특히 프로바이오틱스의 섭취는 숙주의 장내 세균총에 미치는 영향이 크므로 장내의 우점균으로서 Lctobacillus 와 상피 세포의 접착력과 장내 면역 반응의 조절에 대해 고려해야 할 것이다. 즉 미생물과 숙주 세포 그리고 점막과 면역 방어체계에 대한 연구가 보완 되어야 할 것으로 보인다.

제 6 장 참고문헌

- Armstrong, D. G. 1986. Gut active growth promoters. In Control and Manipulation of Animal Growth, Proceedings of the University of Nottingham 43rd Easter School, 1985, Eds. P. J. Buttery, D. Lindsay and N. B. Haynes, pp. 21-37.
- Axelsson L, Lindgren S. Characterization and DNA homology of Lactobacillus strains isolated from pig intestine. J Appl Bacterio, 62:433-440, 1987.
- Barrow PA, Fuller R, Newport MJ. Changes in the microflora and physiology of the anterior tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to the pathogenesis of diarrhea. Infect Immun, 18:586-595, 1977.
- Beno Y, Mitsuoka T. Development of intestinal microflora in human and animals. Bifidobacteria Microflora, 5(1):13-25, 1986.
- Burnett, GS, Neil, EL. A note on the effect of probioticum feed additive on the live-weight gain, feed conversion and carcass quality of bacon pigs. Anim Prod, 25:95-98, 1977.
- Cannistra S.A., Vellenga E., Grosh P., Rambaldi A., and Griffin J.D. Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and interleukin 3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor-dependent mechanism. Blood, 71:672-676, 1988.
- Choi I.-S., Collisson E. W., Maheswaran S. K., Yoo H. S. Evaluation of cytokine gene expression in porcine spleen cells, peripheral blood mononuclear cells, and alveolar macrophages by competitive RT-PCR. FEMS Immunol Med Microbiol, 34:119-126, 2002.
- Choi I.-S., Shin N.-R., Shin S.-J., Lee D.-Y., Cho Y. W., Yoo H. S. Time course study of cytokine mRNA expression in LPS-stimulated porcine alveolar macrophages. J Vet Sci, 3:97-101, 2002.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162:156-159, 1987.
- Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. Int J Food Microbiol 2004;97:147-156.

Collins, EB, Aramaki, K: Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci, 63:353–357, 1980.

Daniel R.B., Patrick C.H., and Miodrag B. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. Development and Comparative Immunology, 28:509–554, 2004.

Danielson, A. D., E. R. J. Peo, K. M. Shahani, A. J. Lewis, P. J. Whalen, and M. Amer. 1989. Anticholesterolemic property of *L. acidophilus* yoghurt fed to mature boars. J. Animal Sci. 67:966–974.

Danielson, AD, Peo, ER, Shahani, KM, Lewis, AJ, Whalen, PJ, Amer, MA: Anticholesterolemic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars J Ani Sci, 67:966–974, 1989.

Danis V.A., Millington M., Hyland V.J. and Grennan D. cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. Clin Exp Immunol, 99:303–310, 1995.

Defour V, Chevallier S, Cariolet R, Somasundaram S, Lefever F, Jestin A, Albina E. Induction of porcine cytokine mRNA expression after DI immunization and pseudorabies virus infection. J Interferon Cytokine Res, 20:889–895, 2000.

Delzenne N. Aertssens J. Verplaetse H. Rocco M. and Roberfroid M. 1995. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. Nutri. Absorption and Fructans. 57(17):1579–1587.

Denis G., and Kris C. Molecular cloning and expression of gerbil granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Gene 294:233–238, 2002.

Dinc S., Ozbirecikli B., Gulcelik M.A., Ergeneci D., Kuru B., Erdem E., Caydere M., and Alagol H. The effect of locally injected granulocyte macrophage-colony stimulating factor on the healing of intraoperatively irradiated intestinal anastomoses in rats. J Exp Clin Cancer, 23:77–82, 2004

Dozois C. M., Oswald E., Gautier N., Serthelon J.-P., Fairbrother J. M. Oswald I. P. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. Vet Immunol Immunopathol, 58:287–300, 1997.

Drasar BS, Shiner M, McLeod GM. Studies on the intestinal flora. I. The

bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology*, 56:71–79, 1969.

Ebert E. Human intestinal intraepithelial lymphocytes have potent chemotactic activity. *Gastroenterology* 1995;109:1154–1159.

Edward CA, Duerden BI, Read NW. Metabolism of mixed human colonic bacteria in a continuous culture mimicking the human cecal content. *Gastroenterology*, 88:1903–1909, 1985.

Elson CO. Experimental models of intestinal inflammation. New insights into mechanisms of mucosal homeostasis. In : Orga PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bieneustock, McGhee J, editors. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego : Academic Press, 1999;1007–1024.

Eric B., Jacques E.G., Michele D., Rodolphe F., and Blaise C. *Lactobacillus bulgaricus* proteinase expressed in *Lactococcus lactis* is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine lactoglobulin fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology* June, 2917–2923, 2002.

Eriko M., Takuma S., Muneo Y., Yoshitaka T., and Kazuo M. Administration of macrophage colony-stimulating factor mobilized both CD11b+CD11c+ cells and NK1.1+ cells into peripheral blood. *International Immunopharmacology*, 4:791–803, 2004.

Errolter, T. M., A. V. Gudkov, S. A. Gudkov. 1985. Use of bifidobacteria in control of gastrointestinal disease in piglets and broiler chicks. *Dairy Sci.(abstr.)* 47:714.

expression of the rat granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res*, 15:1095–1102, 1995.

Finbloom D.S., Larner A.C., Nakagawa Y., and Hoover D.L. Culture of human monocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor results in enhancement of IFN-gamma receptors but suppression of IFN-gamma-induced expression of the gene IP-10. *J Immunol*, 150:2383–2390, 1993.

Finogold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr*, 27:1456–1469, 1974.

Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol*, 141(11):3882-8, 1988.

Foss D.L., bennaars A.M., Pennell C.A., Moody M.D., and Murtaugh M.P. Differentiation of porcine dendritic cells by granulocyte-macrophage colony stimulating factor expressed in *Pichia pastoris*. *Vet Immunol immunopathol.* 91:205-215, 2003.

Fox, SM. Probiotics; intestinal inoculants for production animals. *Vet Med*, 806-830, 1988.

Fuller R, Barrow PA, Brooker BE. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl Environ Microbiol*, 35:582-591, 1978.

Fuller R. Probiotics: The scientific basis. Chapman and Hall pp, 1-13, 1992.

Fuller, R. and B. E. Brooker. 1974. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 27, 1305.

Fuller, R. History and development of probiotics. In *Probiotics - the science basis*, ed R. Fuller, Chapman and Hall, 1-8, 1992.

Fuller, R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66:365-378, 1989.

Gamble J.R., Elliotte M.J., Jaipargas E., Lopez A.F., and Vadas M.A. Regulation of human monocyte adherence by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci*, 86:7169-7173, 1989.

Giannella, RA. Broitman, SA, Zamcheck, N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*, 13:251-256, 1972.

Gilland, SE, Staley, TE, Bush, LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci*, 67:3045-3051, 1984.

Gilliand, S. E. and D. K. Walker. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH. *J. Dairy Sci.*, 73, 905.

Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: application to quantify cytokine gene expression *Method*, 25:386-401, 2001.

Gokhan D., Hans O.K., and Nukhet T. Low dose daily rhGM-CSF application

activities monocytes and dendritic cells in vivo. *Leukemia Research*, 27:1105–1108, 2003.

Gorbach SL. Probiotics in the third millennium. *Dig Liver Dis* 2002;34 Suppl 2:2–7.

Gough N. M., Gough J., Metcalf D., Kelson A., Grail D., Nicola N. A., Burgess A. M., Dunn A. R. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte–macrophages colony stimulating factor. *Nature*, 309:763–767, 1984.

Graham DY and Estes MK. Viral infections of the intestine. In : Gitnick G, editor. *Gastroenterology*. Newyork : Medical examination publishing company, 1988:566–578.

Gregor R., Jana J., M. Tom S., and john K. M. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Oct*, 658–672, 2003.

Hale, O. M. and G. L. Newton. 1979. Effects of a nonviable *Lactobacillus* species fermentation product on performance of pigs. *J. Anim. Sci.*, 48, 770.

Han IK, Kim, JD, Lee, JH, *et al.* Studies on the growth promoting effects of probiotics. III. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the performance and the changes in the mcirobial flora of the feces of growing pigs. *Kor J Anim Sci*, 26:166–171, 1984.

Han, I. K., J. D. Kim and J. H. Lee. 1984. Studies on the growth promoting effects of probiotics. III. The effects of *Clostridium butyrium* ID on the performance

Hans G.H.J. H., Erwin G. Z., Elaine E. V., Philippe M., Antoon D.L.A., and Willem M.D.V. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* Jan, 114–123, 2002.

Hardie, J. M. 1986. Genus *Streptococcus*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. (ed. P. H. A. Sneath), Williams & Wilkins, London, pp. 1043–1047.

Hidaka, H., Y. Tashiro, and T. Eida. 1991. Proliferation of *Bifidobacteria* by 181

Higashitani K., L. Koichi and G. Keishi. 1988. *Powder Technology Handbook*.

Hoefling, D. 1989. Tracking the culprits behind diarrhea in neonatal pigs. Vet. Med., April, 427.

Hirotsugu M., fang H., Tetsuo F., Arthur C.O., Hideo H., Masataka H., Koko M., and Jun-Ichi K. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to Lactobacilli. Biosci. biotechnol. Biochem, 66:1963–1966, 2002.

Holt, J.G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Stanley and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., Williams & Wilkins.

John, G. D. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. In Humana press 7–30 Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 1995. Response Surface Methodology, Wiley, New York, USA

Hood, SK, Zottola, EA. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J Food Sci, 53(5):1514–1516, 1988.

in the presence of its natural ligand IL-1 quantification by sandwich ELISA. J Immunol Methods, 185:115–122, 1995.

Jonsson, E, Conway, P. Probiotics for pigs. In Probiotics – the science basis, ed R. Fuller, Champman and Hall, 260–316, 1992.

Joseph F.F., and Esther R.A. Development of a strain-specific assay for detection of viable *Lactobacillus* sp. HOFG1 after application to cattle feed. J Microbiological Methods, 61:235–243, 2005.

Kaplan H. and R. W. Hutkins. 2000. Fermentation of Fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66(6): 2682–2684

Kato I., Tanaka K., and Yokokura T. Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon- γ by mouse splenocytes. Int. J Immunopharmacology, 21:121–131, 1999.

Kato, I, Kobayaahi, S, Yokokura, T, Mutai, M: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. Gann, 72:517–523, 1981.

Kato, I, Yokokura, T, Mutai, M: Macrophages activation by *Lactobacillus casei* in mice. Microbiol Immunol, 27:611–618, 1983.

Kimura, N., M. Yoshinkane, A. Kabayashi and T. Mitsuoka. 1983. An application of dried bifidobacteria preparation to scouring animals. Bifidobacteria Microflora.

2:41–55.

Kleinerman ES, Knowles RD, Lachman LB, Gutterman JU. Effect of recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocyte activity in vitro and following intravenous administration. *Cancer Res*, 48(9):2604–9, 1988.

Kobayashi Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29 : 691–697.

Kurman, J. A. 1983. The development and significance of new cultures with bifidobacteria as an example. *North Eur. Dairy J.* 3:65.

Kurman, JA. The development and significance of new cultures with bifidobacteria as an example. *North Eur Dairy J*, 3:65–74, 1983.

Lagace L., Pitre M., and Jacques M., and Roy D. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Applied Environmental Microbiology* Apr, 2052–2060, 2004.

Laura J. Fooks, R. Fuller and Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy J.* 9:53–61

Lee S.Y., Choi J.H., and Xu Z. microbial cell-surface display. *TRENDS in Biotechnology*, 21:45–52, 2003.

Lee WK, Lee SM, Bae Hs, et al. Effect of *Bifidobacterium longum* HY8001 administration on human fecal bacterial enzymes and microflora. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 27:267–272, 1999.

Lee WK. Studies on the distribution of intestinal microflora and characterization of *Bifidobacterium* isolated from the intestine of domestic animals. *Korean J Vet Res*, 34(1):107–113, 1994.

Lilly DM, Stillwell, RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 147:747–748, 1965.

Lin, SY, Ayres, JW, Winkler, W, Sandine, WE: *Lactobacillus* effect on cholesterol: *In vitro* and *in vivo* results. *J Dairy Sci*, 72:2885–2899, 1989.

Liu F., Abiko Y., Nishimura M., Kusano K., Shi S., Kaku T. Expression of inflammatory cytokines and beta-defensin 1 mRNAs in porcine epithelial rests of

- Malassez *in vitro*. *Med Electron Microsc*, 34:174–178, 2001.
- London: Butterworths.
- Lowell S. and J. E. Shields. 1986. *Powder Surface Area and Porosity*, 3rd ed. Delft Univ. of Technology, Netherlands.
- Lyons, T. P. 1988. Probiotics: An alternative to antibiotics. *The Bovine Practitioner* 23:64.
- Maeng, W. J., C. W. King and H. T. Shin. 1989. Effects of feeding lactic acid bacteria concentrate (LBC, *Streptococcus faecium* cernelle 68) on the growth rate and prevention of scouring in piglets. *Korean J. Anim. Sci.* 31(5):318–323.
- Majamaa H, Isolauri E. Probiotics : a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:179–185.
- Maria L.S.O., Vicente M., Eliane N.M., Luciana C.C.L., Paulo L.H., and Gasper P.M. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface protein A) by *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*, 227:25–31, 2003.
- Martin L.C., Anja G., Diao T., and Linley M.F. pattern of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunology and medical Microbiology*, 2004.
- Mathew J. A., Guo Y. X., Goh K. P., Chan J., Verburg-van Kemenade B. M. L., Kwang J. Characterization of a monoclonal antibody to carp IL-1 and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish & Shellfish Immunol*, 13:85–95, 2002.
- McGinity, J. W., K. Chi-Tze, R. Bodmeier and M. R. Harris. 1985. Dissolution and uniformity properties of ordered mixes of micronized griseofulvin and directly compressible excipient. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 11:891.
- Metcalf D. *The colony stimulating factors*. Elsevier Amsterdam, 1984.
- Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science*, 229:16, 1985.
- Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science*, 5:16–22, 1985.
- Metcalf D., Begley C.G., Williamson D.J., Nice E.C., De Lamarter J., mermod J.J., Thatcher D., and Schmidt A. (1987) Hematopoietic responses in mice injected

with purified recombinant murine GM-CSF. *Exp Hematol*, 15:1–9, 1987.

Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo, and M. L. Grayson. 1995. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79(4):475–479.

Mitsuoka, T. *The World of Anaerobic Bacteria; A Color Atlas of Anaerobic bacteriology*. 1st ed Sobun Press Tokyo, 53–92, 1980.

Morrissey PJ, Bressler L, Park LS, Alpert A, Gillis S. Granulocyte–macrophage colony–stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen–presenting cells. *J Immunol*, 139:1113–9, 1987.

Mundt, J. O. 1986. Enterococci, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2,(ed P.H.A. sneath), Williams & Wilkins, London, pp. 1063–1065.

Muralidhara, K. S., G. G. Sheggeby, P. R. Elliker, D. C. England and W. E. Sandine. 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus 182 flora of intestinal tissue and feces from piglets. *J. Anim. Sci.*, 40, 288.

Nigatu A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabucheri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *weisella minor* and related taxa isolated from *kocho* and *tef*. *J Applied Microbiology*, 89:969–978, 2000.

Niness, K. R. 1999. Insulin and oligofructose: What are they? *J. Nutr.* 129:1402S–1406S.

Nuzhat A., Maya K., and Michael V.B. Acute regulation of glucose transport in a monocyte–macrophage cell line: Glut–3 affinity for enhanced during the respiratory burst. *Biochem J* 327:369–375, 1997.

O'Connor E., Roberts E. M., Davies J. D. Amplification of cytokine–specific ELISAs increases the sensitivity of detection to 5–20 picogram per milliliter. *J Immunol Methods*, 229, 155–160, 1999.

Oaks MK, Penwell RT, Suh CH, Tector AJ. Polymerase chain reaction cloning and

Okazaki M., S. Fujikawa and N. Matsumoto. 1990. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*. 9(2):77–86.

Oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobacteria*

microflora. 10(1) : 65–79.

Paillet R., Laval F., Audonnet J.C., Andreoni C., and Juillard V. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology*, 102:396–404, 2001.

Park, D. J, K. H. Ku and S. H. Kim. 1996. Air-classification of microparticulated defatted soybean meal. IFT Annual Meeting. 40A-11, New Orleans, La, U.S.A.

Parker, R. B. 1974. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health*. 29:4–7.

Parker, CA. Anaerobiosis with iron wool. *Aust J Exp Biol Sci*, 33:33–38, 1955.

Parker, RB. The other half of the antibiotics story. *Anim Nutr Health*, 29:4–8,1974.

Pollman, D. S., D. M. Danielson and E. R. Jr. Peo. 1980. Effect of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci*. 51:577–581.

Pollman, D. S., D. M. Danielson and Jr. E. R. Peo. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. *J. Anim. Sci.*, 51, 638.

Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004;78:10213–10220.

Rasko J. E. J., Gough N. M. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor. In *The Cytokine Handbook* 2nd edn Academic press London pp, 343–369, 1994.

Reddy N. R. J., Borgs P., Wilkie B. N. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 74:31–46, 2000.

Reddy N. R. J., Wilkie B. N. Quantitation of porcine cytokine and beta 2-microglobulin mRNA expression by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Immunol Methods*, 233:83–93, 2000.

Reddy PG, McVey DS, Chengapa MM, Blecha F, Minocha HC, Baker PE. Bovine recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhancement of bovine neutrophil function in vitro. *Am J Vet Res*, 51:1395, 1990.

Reddy, KP, Shahani, KM, Kulkarni, SM: B-complex vitamin in cultured and

- acidified yogurt. J Dairy Sci, 59:191–195, 1976.
- Robertfroid, M. B. 1999. Concepts in functional foods: the case of insulin and oligofructose. J. Nutr. 129:1398S–1401S.
- Robinson K., Chamberlain L.M., Lopez M.C., Rush C.M., Marcotte H., Page R.W.F., Le, and Wells J.M. Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant lactococcus lactis strains expressing tetanus toxin fragment C Infection and Immunity May, 2753–2761, 2004.
- Robinson, I. M., M. J. Allison and J. A. Bucklin. 1981. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. Appl. Environ. Microbiol., 41, 950.
- Robinson, IM, Stromley, JM, Varel, VH *et al*, EP. *Streptococcus intestinalis*, a new species from the colons and feces of pigs. Int J Syst Bacteriol, 38:245–248, 1988.
- Robinson, IM, Whipp, SC, Bucklin, JA, *et al*, MJ. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. Appl Environ Microbiol, 48:964–969, 1984.
- Rodney D.B. Probiotics, prebiotics or conbiotics Trend in Microbiology, 6:89–92, 1998.
- Ruef C., Coleman D. L. Granulocyte–macrophage colony–stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. Rev Infect Dis, 12:41–62,
- Rycroft, C.E, Jones, M.R., Gibson, G.R. and R.A. Rastall. 2001 A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. J. Applied Microbiol. 91:878–887
- Salonen E. M., Vaheri A. Rapid solid–phase enzyme immunoassay for antibodies to viruses and other microbes: effects of polyethyleneglycol. J Immunol Methods, 41:95–103, 1981.
- Schulman, A. 1973. Effect of weaning on pH changes of the contents of the piglet's stomach and duodenum. Nord. Vet. Sci. 10, 440.
- Schwager J., Schulze J. Maturation of the mitogen responsiveness, and IL–2 and IL–6 production by neonatal swine leukocytes. Vet Immunol Immunopathol, 57:105–119, 1997.

Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev 2004;28:405–440.

Shin N. R., Choi I. S., Kim J. M., Hur W., Yoo H. S. Effective methods for the production of immunoglobulin Y using immunogens of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Vet Sci, 3:47–57,

Solie T., Reetta S., Maria S., Tina M.S., and Maija S. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis and pulsed–field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. Applied Environmental Microbiology Sept, 3908–3914, 1999.

Somasundaram C, Takamatsu H, Andonnet JC, Fischer L, Lefever F, Charley B. Enhanced protective response and immuno–adjuvant effects of porcine GM–CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. Vet Immunol Immunopathol, 70:227–287, 1999.

Song Y.L., Kato N., Liu C.X., Matsumiya Y., Kato H., and Watanabe K Rapid identification of 11 human *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group– and species–specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters, 187:167–173, 2000.

Song Y.L., Kato N., Matsumiya Y., Liu C.X., Kato H., and Watanabe K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal Lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. J clinical Microbiology sept, 3062–3064, 1999.

Stordeur P., Poulin L. F., Craciun L., Zhou L., Schandene L., Lavarelle A., Goriely S., Goldman M. Cytokine mRNA quantification by real–time PCR. J Immunol Methods, 259:55–64, 2002.

Strober W. Regulation of IgA B–cell development in the mucosal immune system. J Clin Immunol, 10(6):56S–61S, 1990.

Subramanian S., Kondaiah P., Adiga P. R. Expression, purification, and characterization of minimized chicken riboflavin carrier protein from a synthetic gene in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 26:284–289, 2002.

Takafumi, I., H. Honda and M. Koishi. 1993. Drug dissolution from

indomethacin–starch hybrid powders prepared by the dry impact blending method. J. Pharm. Pharmacol. 45:770.

Thompson, LU, Jenkins, DJA, Vic Amer, DM, Reichert, R, Kamulsky, AJ: The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. Am J Clin Nutr, 36:1106–1111, 1982.

Tokach, M. D., Goodband, R. D. and Nelssen, J. I. 1991. Recent developments in starter pig programs, Kansas Research Report 641. P48.

Tuschy, D. 1986. Verwendung von 'Probiotica' Leistungs forderer in der Tierernahrung. Ubers. Tierernahrg. 14:157–78. Lyons, T. P. 1988. Probiotics: An alternative to antibiotics. The Bovine Practitioner 23:64–69.

Van de Water J, Keen CL, and Gershwin ME. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. J Nutr Suppl. 1999;1297:1492–1495.

Verfaillie T., Cox E., To L. T., Vanrompay D., Bouchaut H., Buys N., Goddeeris B. M. Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. Vet Immunol Immunopathol, 81:92–112, 2001.

Westerberg, M., B. Johnson and C. Nystrom. 1986. Physicochemical aspects of drug release. IV. The effects of carrier particle properties on the dissolution rate from ordered mixtures. Int. J. Pharm. 28:23.

Wong, L. W. and N. Pilpel. 1988. The effect of the shape of fine particles on the formation of ordered mixtures. J. Pharm. Pharmacol. 40:567.

Yeung P.S.M., Kitts C.L., Cano R., Tong P.S., and Sanders M.E. Application of genotypic and phenotypic analyses to commercial probiotics strains identity and relatedness. J Applied Microbiology, 97:1095–1104, 2004.

Yeung P.S.M., Sanders M.E., Kitts C.L. Cano R., and Tong P.S. Species–specific identification of commercial probiotics strains. J Dairy Sci, 2002.

Zani, G, Biavati, B, Crociani, F, *et al*, Bifidobacteria from the feces of piglets. J Appl Bacteriol, 3:537–547, 1974.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 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.

유전자 크로닝을 이용한 면역기능강화 유산균생균제 개발 농림수산식품부