

최 종
연구보고서

돼지와 개의 질병 방제를 위한 GM-CSF
발현 유산균 이용 연구

연구기관
서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지와 개의 질병 방제를 위한 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월

주관연구기관명 : 서울대
총괄연구책임자 : 윤 화 영
세부연구책임자 : 유 한 상
연 구 원 : 최 은 화
연 구 원 : 이 덕 용
협동연구기관명 : 충북대
협동연구책임자 : 이 완 규

요 약 문

I. 제 목

동물 질병 방제를 위한 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구

II. 연구개발과제의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

돼지의 설사증, 폐렴 개의 파보장염 그리고 홍역뇌염 등과 같이 축산 분야에 심각한 피해를 주고 있는 질병을 치료하기 위하여 여러 종류의 항생제가 쓰이고 있으나, 우리 나라의 경우 항생제의 오용과 남용에 의한 저항성 균주의 급속한 출현으로 점차 효과 있는 항생제의 선택 폭이 줄어들고 있는 실정으로 이것을 대체할 수 있는 안전하고 새로운 종류의 생균제 개발이 시급하다.

유산균은 사료를 통해 쉽게 동물 체내에 투여될 수 있고, 장에 정착할 수 있기 때문에 살아있는 유전자 운반체(live vector)로서 새로운 개념의 동물용 생균제 개발에 좋은 재료이다. 또한 분자유전학의 발전에 따른 유산균의 유전학적 연구가 많이 진행되어, 유산균주에 대한 유전자 재조합연구들이 확대되고 있다. 최근에는 유전자 클로닝 기법을 이용하여 새로운 유전자를 유산균에 삽입하여 새로운 형질을 발현하도록 하는 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 이를 위하여 Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (이하 GM-CSF) 유전자와 유산균을 이용한 형질전환 유산균이라는 새로운 개념의 동물용 질병예방 생균제 개발을 목적으로 하고 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

현재 사용되는 생균제(Probiotics)의 의미는 1989년 Fuller에 의하여 「장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익하게 작용하는 생균 첨가물」로 정의되고

있다. 현재 양돈용으로 사용되고 있는 생균제용 유산균주로는 정상 장내세균총(normal intestinal microflora) 중에서 유용한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 대표적인 유산균인 *Lactobacillus*, *Streptococcus(Enterococcus)*, *Bifidobacterium* 등이 잘 알려져 있다. 생균제를 사용하여 가축의 질병예방 및 생산성 향상을 이루기 위해서는, 먼저 위산 및 담즙산에 대한 저항성, 소장하부에서의 정착능력 및 증식능력, 안전성이 탁월한 균주들을 확보, 개발하는 것이 무엇보다 중요하다. 또한 이와 같은 생균제를 산업화하여, 성공적으로 개발하기 위해서는, 실제 가축에서 가장 많은 경제적 손실을 일으키는 설사증에 대한 예방효과, 증체율 증가에 따른 사료효율의 향상, 투여방법의 용이성, 그리고 제품가격의 저렴함 등이 중요시되고 있다.

숙주동물의 면역체계 조절에 중요한 역할을 하는 물질중의 하나인 cytokine은 체내에 여러 종류의 침입원(stimuli)에 대하여 여러 종류의 면역세포를 포함한 다양한 세포에서 생성되는 크기가 작은 물질로서 병원 미생물의 침입 또는 기타의 외부의 자극을 제거하기 위하여 여러 종류의 면역세포의 활성화 및 면역반응을 유도하기 위하여 생성되는 물질이다. 이러한 cytokine은 그 기능, 생성 세포등에 따라서 여러 종류로 구분된다. 동물에서의 이러한 cytokine의 적용은 감염의 조기검출치료 개발, vaccine의 adjuvant로의 가능성 등에 관한 실험적 연구 정도로 다양하게 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

Granulocyte Macrophages-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)는 여러 종류의 cytokine들 중 가장 먼저 밝혀졌고 또한 이들 유전자는 몇몇 동물에서 cloning되었다. 이 GM-CSF는 LPS를 비롯한 세포구성분, IL-1, TNF 등과 같은 다른 cytokine에 의해서 면역세포를 비롯한 여러 세포에서 생성되는 물질로서 숙주체내에서 hematologic progenitors들의 분화 및 증식을 증가 시켜서 hematopoiesis을 유도하거나, neutrophil, macrophages, dendritic cell 등에 작용하여 항균력의 증가, cytokine 생성에 의한 면역활성증가, antigen-presenting cell (APC)의 기능 증가 및 이들 세포의 분화 및 증식의 촉진 등에 의해서 탐식세포의 주화능 증가, 항체 생성의 증가로 감염의 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

나. 경제 · 산업적 측면

국내 양돈 산업에서 질병에 의한 경제적인 피해액은 연간 약 2,000억 정도로 추산되며 이러한 질병으로 인한 피해를 줄이기 위해서 여러 가지 방법들이 사용되었다. 이러한 방법의 적용에 따른 많은 문제점들이 유발되고 있어서 이를 극복하고자 하는 노력의 경주가 필요한 실정이다.

돼지와 개의 질병에 의한 경제적 손실은, 사육두수, 위생관리, 국가나 지역간의 양돈기술 수준에 따라 많은 차이가 있지만, 일반적으로는 평균 돼지 총생산액의 약 20%, 개는 약30%가 질병에 의한 경제적 손실인 것으로 추측되고 있다. 미국 수의사회지의 보고에 의하면 미국내의 돼지질병에 의한 연간 손실액은 11억 2천만 달러(1조 5천억원)로 보고되고 있으며, 그 내용을 살펴보면 자돈설사, 돼지적리와 같은 소화기질병과 위축성비염, 폐렴과 같은 호흡기 질병이 주종을 이룬다. 따라서 돼지질병을 예방 및 치료하기 위하여는 자돈기의 설사증과 성돈기의 폐렴의 치료가 제일 중요하다.

유산균은 이미 안전성이 입증된 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물이며, 동물용 probiotics로 많이 사용되고 있기 때문에 동물사료첨가제 및 동물의약품 전반에 걸쳐 응용할 수 있다. 특히 가축의 질병예방과 면역기능향상과 관련이 있는 유전자들을 발현시킬 수 있다면, 축산업의 발전과 수의학적 발전을 초래하여, 결국은 축산농가의 소득증대와 축산기술의 향상에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다

다. 사회·문화적 측면

국내의 양돈기술은 아시아지역 국가중에는 고도의 기술을 보유하고 있으면서 사료의 수입의존, 종돈의 수입의존등 여러 가지 어려운 문제와 함께 최근에는 환경의 문제까지 겹쳐 고부가가치 달성을 위한 생산성의 향상이 중요한 축산업의 주체로서 축산업 특히 양돈을 천직으로 생각하고 이에 종사하는 이들에게 용기와 희망을 줄수 있는 양돈의 기술 개발이 절실한 실정이다.

미국의 낙농위원회(National Dairy Board)에 의해 실시된 조사에 의하면, 살충제, 제초제, 특히 항생제 남용 및 오용에 의한 항생물질 내성균의 출현, 공중보건학상의 위험 가능성 등이 높아짐에 따라, 항생제의 사용을 억제하고 가축의 건강과 사료효율을 증진시킬 수 있는 새로운 대체방법 모색이 더욱 필요하게 되었다. 우리나라도 예외 없이 WTO 체제하에서의 무역자유화, 무역개방화 시대에 직면하고 있기 때문에, 국내 축산분야에서도 가축의 무분별한 항생제 사용 규제는 가까운 장래에 불가피할 것으로 생각되며, 본 연구에서 시도하려고 하는 동물 질병 방제를 위한 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구는 이와 같은 시대적 변화에 매우 유익할 것으로 생각된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 돼지와 개 GM-CSF 유전자 확보 및 특성 파악

- 1) 돼지와 개의 면역세포 분리 기법 확립
- 2) 돼지와 개의 면역세포로부터 mRNA 분리 및 cDNA 작성
- 3) 돼지와 개의 GM-CSF 유전자 확보 및 유전자학적 특성 파악
- 4) 돼지와 개의 GM-CSF 발현을 위한 유산균 vector 확보
- 5) 재조합 돼지와 개의 GM-CSF 에 대한 특이 항체 생산

2. GM-CSF 발현을 위한 유산균주의 선발 및 특성조사

- 1) 돼지 및 개에서의 우점종 유산균 분리
- 2) 분리된 유산균주의 생균체로서의 특성조사
- 3) GM-CSF 발현 연구에 사용할 유산균주의 선발

3. 돼지와 개의 GM-CSF을 발현하는 유산균 형질전환체 개발

- 1) 유산균에 돼지와 개의 GM-CSF 유전자 형질 전환 기법 개발
- 2) 국내 분리 우수 유산균에 돼지와 개의 GM-CSF 유전자의 삽입
- 3) 유산균에서의 돼지와 개의 GM-CSF 유전자 발현 양상 조사

4. GM-CSF가 발현된 유산균주의 안정성 및 *in vitro* 효능조사

- 1) 장관세포에 대한 부착능력 및 정착성
- 2) 병원성 세균에 대한 길항조사
- 3) MIDI에 의한 균종의 정확한 동정
- 4) 지속적인 균주특성의 안정성 유지능력
- 5) 동결건조 또는 보존후 stability의 유지능력

5. 돼지와 개의 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 동물 적용

- 1) 돼지와 개의 GM-CSF 발현 유산균의 실험동물 접종 시험
 - 투여에 따른 실험동물에서의 면역능 증강등 조사
- 2) 돼지와 개의 GM-CSF 발현 유산균의 돼지와 개에 접종 시험
 - 돼지와 개에서의 면역능 증강등 조사
 - 질병 발생 양상 조사

6. GM-CSF가 발현된 유산균주의 임상학적 효능실험

- 1) 유효성을 발휘하기 위한 투여용량 설정
- 2) 임상적 효능을 확인하기 위한 *in vivo* 실험
 - 이유자돈을 이용한 효능실험
 - 자견을 이용한 효능실험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 개에서의 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구

- 1) 개 GM-CSF의 cloning과 단백질 발현
 - 가) LPS로 자극한 면역세포 PBMC로부터 얻은 cDNA를 만들.
 - 나) PCR을 실시하여 435bp의 개의 GM-CSF 유전자를 확인
 - 다) 개의 GM-CSF는 144개의 아미노산으로 구성됨을 확인
 - 라) SDS-PAGE를 이용하여 GM-CSF 약 17kDa의 단백질이 발현되는 것을 확인
 - 마) 마우스에 재조합 개의 GM-CSF를 접종하여 항체 생산.
- 2) 개 GM-CSF의 유산균내 발현
 - 가) 형질전환에 이용할 개의 GM-CSF 목적 유전자를 제작하였음
 - 나) 유산균내 단백질 발현 재조합 유전자 제작하였음
 - 다) 개의 GM-CSF가 유산균에서의 발현을 확인하였음
- 3) 개의 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 동물 적용
 - 가) 개 GM-CSF 발현 유산균의 실험 동물 접종 실험
 - (1) 개 GM-CSF 발현 유산균 투여군의 증체율 증가가 관찰됨
 - (2) 분변과 혈청의 IgA 농도는 증가되나 IgG의 농도 변화는 관찰되지 않음
 - (3) 단핵구의 수 증가가 관찰되나 다른 혈구수의 변화는 관찰되지 않음
 - (4) 코로나 바이러스 백신 접종 후, specific IgG의 농도 증가 관찰
 - 나) 개 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 대단위 개 농장 접종 실험
 - (1) 자견 폐사율의 감소 관찰
 - (2) 단핵구와 과립구의 혈구수 변화는 관찰되지 않음
 - (3) 개 파보 바이러스와 디스토펜 바이러스에 대한 항체가 증가 관찰

나. 돼지에서의 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구

- 1) 돼지 GM-CSF의 Cloning과 발현
 - 가) PHA로 자극한 PBMC로부터 얻은 cDNA를 만들
 - 나) PCR을 실시하여 435bp의 돼지 GM-CSF를 확인
 - 다) 돼지의 GM-CSF는 144개의 아미노산으로 구성됨을 확인
 - 라) SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과 약 17kDa의 단백질 발현을 확인
 - 마) Western blot을 실시하여 GM-CSF protein에 대한 특이성을 확인

- 2) 돼지 GM-CSF의 유산균내 발현
 - 가) 돼지 재조합 GM-CSF는 shuttle vector인 pHAT과 host *Lactobacillus spp.*에서 발현을 확인
 - 나) *in vitro* 상에서 pGM-CSF의 bio-activity를 확인
 - 다) 대장균 유래 재조합 pGM-CSF의 bio-activity를 확인
 - 라) 유산균 유래 rpGM-CSF의 bio-activity를 확인
- 3) 유산균 형질 전환체 임상 실험 및 백신 운반체 개발
 - 가) 돼지 재조합 GM-CSF를 투여시 설사증상 예방효과 확인
 - 나) 재조합 GM-CSF 투여시 혈구 증가효과 확인
 - 다) 야외 분리 *Lactobacillus spp.*에서 유용 plasmid DNA 확인 및 분리
 - 라) 안전성 검사를 통한 유용 생균제용 유산균 선발
 - 마) Shuttle vector 제작을 위한 후보 plasmid DNA의 cloning

다. 생균제용 유산균주 개발 및 효능연구

- 1) 개에서의 유산균주 분리결과
 - 가) 총 30마리 개의 분변으로부터 유산균 394 균주가 분리
 - 나) *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus spp.*의 유산균군으로 동정
 - 다) *Lactobacillus*가 240 균주로 다른 유산균보다 더 높은 분포로 분리
 - 라) *Streptococcus*와 *Bifidobacterium*은 각각 149 균주와 5 균주가 분리
 - 마) 연령별로 보면 이유자견에서 150 균주로 가장 많이 분리
 - 바) 성견과 포유자견에서 각각 125와 119균주 분리 포유자견에서는 *Streptococcus*가 가장 많이 분리
 - 사) 이유자견과 성견에서는 *Lactobacillus*가 가장 많이 분리
 - 아) 선발된 유산균 중에서 여러 특성조사를 통하여, *Lactobacillus* 6균주와 *Streptococcus* 4균주, 합계 10균주를 생균제용 우수균주로 최종 선발
- 2) 돼지의 유산균주 분리결과
 - 가) 연령별 돼지의 분변에서 분리된 총유산균은 647균주
 - 나) *Lactobacillus*가 527균주로 가장 높은 비율(81.5%)을 차지
 - 다) *Streptococcus*는 95 균주로 14.7%, *Bifidobacterium*은 가장 낮은 비율 (3.4%)인 25균주만이 분리
 - 라) 모든의 경우는 *Lactobacillus*가 우점균이었으며, *Bifidobacterium*이 두 번째 높은 점유율을 나타내어, 다른 연령의 *Streptococcus*보다 높은 분포도
 - 마) 최종 10균주를 생균제용 우수 유산균주로 선발하였으며, 선발된 우수 유산균은 *Lactobacillus* 5 균주, *Bifidobacterium* 3균주, *Streptococcus* 2 균주

3) 유산균주의 장관세포에 대한 부착능력 및 정착성

가) 양돈용 유산균주 결과

본 실험에서는 병원균 억제능 실험 결과로 선발된 *Bifidobacterium* 10 균주와 *Lactobacillus* 20균주, *Streptococcus* 9균주를 대상으로 Caco-2 cell에 대한 부착성 실험 결과, 일반적으로 실험 균주 대부분의 부착능은 대조군에 비해서 높게 나타났다.

나) 애완견용 유산균주 결과

병원성세균에 대한 억제능이 우수한 *Lactobacillus* 25균주, *Streptococcus* 15균주, 합계 40균주의 Caco-2 cell에 대한 부착성 실험 결과, *Lactobacillus*의 경우는 25균주 중 6균주(24%)가 양성대조군과 같은 (+)성상을 나타내었으며, *Streptococcus* 15균주 중 4개의 균주는 대조군보다 높은 부착능 (++) 또는 (+++)을 나타내었다.

4) 병원성 세균에 대한 길항조사

가) 양돈용 유산균주 결과

- (1) *Bifidobacterium*은 27.8%인 5 균주가, *Lactobacillus*는 80.0%인 56 균주가 하나 또는 그 이상의 병원균 억제 활성을 나타냄.
- (2) *Sal. enteritidis* KCCM 12021에 대한 억제활성은 51.1 %로써, *S. aureus* KCTC 1916의 41.0%와 *E. coli* O157:H7의 26.1 %에 비해 높게 나타남
- (3) *Lactobacillus*는 70 균주 중 14.3%인 10 균주가 세 종류의 병원균에 대한 높은 억제능을 보임
- (4) *Bifidobacterium*의 경우 세 종류의 병원균에 모두 저항성을 나타내는 균주는 나타나지 않음

나) 애완견용 유산균주 결과

- (1) *E. coli* O157:H7 (USDA, human isolate)에 대한 억제능은 140균주 중 14.3%인 20균주만이 억제능을 나타냄
- (2) *E. coli* KCTC 1467에 대해서는 97.1%인 136균주가 8mm이상의 inhibition zone을 형성하여 매우 높은 억제능을 나타냄
- (3) *Salmonella enteritidis* KCCM 12021균주와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 균주에 대해서는 각각 47.9%와 26.4%의 유산균이 억제능을 나타냄
- (4) 140 균주 중 병원성세균에 대한 억제능이 우수한 *Lactobacillus* 25균주, *Streptococcus* 15균주, 합계 40균주를 선발

5) GM-CSF가 발현된 유산균주의 임상학적 효능실험

가) 이유자돈을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 야외 효능실험 결과

- (1) 효능실험-1의 결과 GM-CSF 발현 생균제 투여군이 대조군에 비하여 11.1%의 일당증체량 증가와 사료요구율 5.8% 개선이라는 우수한 생산성 향상 결과

를 나타냄.

- (2) 효능실험-2에서도 투여군의 일당증체량이 7.1% 향상, 사료요구율 2.5%의 개선 효과가 관찰되어 생산성 향상을 재확인할 수 있었음.
 - (3) 효능실험-1 및 2의 장내세균총 검색결과 GM-CSF 발현 유산균의 사료첨가로 장내유해세균인 Enterobacteriaceae, Clostridium perfringens 등의 균수가 감소하였으며, 대신 유익세균인 *Lactobacillus* 등이 증가하는 유용효과를 나타내었음.
- 나) 이유자건 및 모건을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 야외 효능실험 결과
- (1) 7주령부터 14주령까지의 이유자건에 대한 야외효능실험 결과, GM-CSF 발현 생균제 투여군이 대조군에 비해 24.6%의 일당증체량 향상과 5.5%의 사료요구율 개선효과를 나타내었음.
 - (2) 모건 17마리를 대상으로 실시한 야외실험 결과, GM-CSF 발현 생균제 투여군의 자건생존율은 76%로, 대조군의 62.5%에 비교하여 높은 생존율을 나타내었음.
 - (3) 이유자건 및 모건의 장내세균총 검색결과, 투여군에서 Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens* 등의 유해세균감소와 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 등의 유산균수 증가가 관찰되었음.

2. 연구결과의 활용

가. 유전자의 형질 전환에 의한 유산균 발현 기술 확보

- 1) 개의 GM-CSF를 유산균에서 발현시킨 이번 연구를 기초로 하여 cytokine, 유용한 면역 활성 물질 및 단백질에서도 적용할 수 있는 제반 기술 확립.
- 2) 유산균에 목적하는 물질을 발현 가능하게 함으로써 낮은 비용으로 대량 생산의 가능성을 제시.

나. GM-CSF 발현 생균제 개발 효과

- 1) 면역 증강 기능및 기타 생리 활성 증진 효과가 입증된 GM-CSF 발현 유산균을 개발함으로써 기존의 항병성 사료 첨가물로 주로 사용된 항생제를 생균제로 대체시키고, 사료 영양 첨가제로 사용함으로써 국내외에서 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.
- 2) 사료첨가물 수요량 전체로 보면 항생물질의 수요량은 연간 30톤 정도로 추정된다. 항생 물질은 축산 물질에서의 잔류나 내성균 출현 문제 등의 여러 가지 문제로 소비가 일부 감소하고는 있으나 어린 동물의 성장 촉진, 소화기관내 불

량 세균이나 기생충 억제 등 다양한 효과를 발휘하여 세계적인 수요는 가축생산의 증대와 함께 확대되고 있다. 하지만 최근 들어 사료첨가제 시장은 여러 가지 제약을 받고 있는데 그것은 바로 성장촉진 및 질병예방의 목적으로 대단위로 사용되는 항생, 항균제에 대한 규제이다. 국제적으로 이들 항생, 항균제에 사료첨가제로의 사용이 여러 가지 이유로 금지되고 있으며 우리나라에서도 사용 금지 조치가 내려지고 있다. 더불어 최근에는 식용고기의 안정성을 지향하는 추세에 따라 사료첨가제 시장에서 생균제가 주목받고 있는 이유이기도 하다. 따라서 본 연구를 통해 개발과 효능이 입증된 GM-CSF 발현 유산균은 생균제로서 가축위생 및 공중위생을 강화하는 계기를 제공하게 될 것이며, 이는 최근 well-being을 추구하는 소비자 동향과 일치하여 최근 들어 발생하는 가축 질병에 의해 위축된 축산 산업의 발전에 일조를 할 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY

I . Project title

Prevention of animal diseases using *Lactobacillus* expressing GM-CSF

II. Objectives and necessities of the project

1. Objectives of the project

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.

Based on the knowledges, we tried to develop and apply a new concept to the prevention of animal diseases using *Lactobacillus* expressing Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF).

2. Necessity

A. Technological aspect

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 ; *Lactobacillus*, *Streptococcus*

(*Enterococcus*), *Bifidobacterium*. 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.

GM-CSF is one of the cytokines that were early identified and produced from several kinds of cells including immune cells by the stimulation with LPS, IL-1, TNF. This cytokine has roles ; induction of hematopoiesis, increase of antimicrobial activity in neutrophil, macrophages, and dendritic cells, increase of function of antigen-presenting cells (APC), increase of phagocytic activity. Those activities can increase the protectivity against infection.

B. Economic and industrial aspect

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 be increase the economical benefit to the farmers in animal industry.

C. Social and cultural aspect

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.

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 GM-CSF, as a probiotics can prevent animal diseases.

III. The contents and scope of the project

1. Cloning and characterization of GM-CSF from swine and dogs

- 1) Isolation and preparation of immune cells from swine and dogs
- 2) Isolation of total RNA from the cells and generation of cDNA
- 3) Cloning and genetic characterization of GM-CSF from swine and dogs
- 4) Preparation of vector to express the cloned genes in *Lactobacillus*
- 5) Production of specific antibodies against swine and dog GM-CSF.

2. Isolation and characterization of *Lactobacillus* to express the cloned GM-CSF

- 1) Isolation and identification of dominant *Lactobacillus* from swine and dogs
- 2) Examination of the isolated *Lactobacillus* as a probiotics
- 3) Isolation of *Lactobacillus* to express GM-CSF

3. Production of transformants expressing the swine or dog GM-CSF

- 1) Development of transformation technology in *Lactobacillus*
- 2) Transformation of the cloned GM-CSF into the *Lactobacillus*
- 3) Expression and charaterization of the GM-CSF in *Lactobacillus*

4. Stability and in vitro efficacy of the GM-CSF expressed in *Lactobacillus*

- 1) Adherence and stability in the intestine
- 2) Antagonistic activity of the *Lactobacillus* to pathogenic bacteria
- 3) Identification of the bacteria using MIDI
- 4) Stability of the *Lactobacillus*
- 5) Stability of the *Lactobacillus* after freeze drying or keeping.

5. Application of the *Lactobacillus* expressing GM-CSF to animals

- 1) Animal experiment of the *Lactobacillus* expressing GM-CSF in lab animals
 - Examine the immune responses after administration
- 2) Animal experiment of the *Lactobacillus* expressing GM-CSF in swine and dogs
 - Examine the immune responses after administration
 - Surveillance of diseases after administration.

6. Clinical efficacy of GM-CSF expressing *Lactobacillus*

- 1) Determination of administrative dose
- 2) in vivo efficacy of the *Lactobacillus*
 - Efficacy of the *Lactobacillus* to the puppies
 - Efficacy of the *Lactobacillus* to the piglets

IV. Results and proposals for its application

1. Results

A. Development and effect of a recombinant canine GM-CSF into *Lactobacillus*

- 1) Cloning and characterization of GM-CSF from swine and dogs
 - a) Isolation and preparation of immune cells from swine and dogs

- b) Isolation of total RNA from the cells and generation of cDNA
 - c) Cloning and genetic characterization of GM-CSF from swine and dogs
 - d) Preparation of vector to express the cloned genes in *Lactobacillus*
 - e) Production of specific antibodies against swine and dog GM-CSF.
- 2) Expression of canine GM-CSF in *Lactobacillus*
- a) Generation of canine GM-CSF to be transformed
 - b) Transformation of cloned canine GM-CSF into the *Lactobacillus*
 - c) Expression of canine GM-CSF in the *Lactobacillus*
- 3) Application of *Lactobacillus* expressing canine GM-CSF in animal
- a) Feeding *Lactobacillus* expressing canine GM-CSF to experimental dogs
 - Improvement of increasing rate in body weight
 - Increase in IgA concentration within fece and serum
 - Increase in monocyte count of animals feeding *Lactobacillus* expressing canine GM-CSF
 - After vaccination of canine corona virus(CCV), CCV-specific IgG concentration increased
 - b) Feeding *Lactobacillus* expressing canine GM-CSF to animals in dog farm
 - Decrease in mortality of puppies
 - No change in granulocyte and monocyte count
 - Increase in antibody titer for canine parvovirus and canine distemper virus

B. Development and effect of a recombinant porcine GM-CSF into *Lactobacillus*

- 1) Isolation and characterization of *Lactobacillus* to express the cloned GM-CSF
 - a) Isolation and identification of dominant *Lactobacillus* from swine and dogs
 - b) Examination of the isolated *Lactobacillus* as a probiotics
 - c) Isolation of *Lactobacillus* to express GM-CSF
- 2) Expression of porcine GM-CSF in the *Lactobacillus*
 - a) Expression of porcine GM-CSF in the *Lactobacillus* using a shuttle vector, pHAT
 - b) Confirmation of *in vitro* bio-activity of pGM-CSF

- c) Confirmation of recombinant pGM-CSF expressed in *E. coli*
 - d) Confirmation of recombinant pGM-CSF expressed in the *Lactobacillus*
- 3) Clinical experiment of *Lactobacillus* transformants
- a) Evaluating preventive effect of *Lactobacillus* expressing porcine GM-CSF
 - Decrease in morbidity of pigs feeding *Lactobacillus* expressing porcine GM-CSF
 - Increase in leukocyte and monocyte count
 - No differences in antibody titer against porcine GM-CSF comparing with control
 - b) Production of shuttle vector using plasmid originated from porcine *Lactobacillus spp.*
 - Selection of 10 *Lactobacillus spp.* identified to have plasmid DNA
 - 8 *Lactobacillus spp.* were identified to *L. fermentum*
 - Plasmid DNA isolated in L9 strain was selected to produce shuttle vector

C. Development of lactic acid bacteria for probiotic use and their efficacy test

- 1) The isolation of lactic acid bacteria from the feces of dogs.
 - a) From the feces of 30 dogs, 394 strains of lactic acid bacteria(LAB) were isolated.
 - b) It was identified to *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus spp.*
 - c) *Lactobacillus spp.*, 240 strains, were isolated as prominent species in dogs.
 - d) Five stains of *Bifidobacterium* and 149 stains of *Streptococcus* were isolated.
 - e) In the post weaning puppies, 150 stains of LAB were isolated as the most prominent.
 - f) From the sucking puppies and adult dogs, 119 strains and 125 strains were isolated. *Streptococcus spp.* was the most prominent species in sucking puppies.
 - g) *Lactobacillus spp.* was isolated as prominent species in post-weaning puppies and adult dog.
 - h) By the various characteristics among the LAB isolates, 6 stains of *Lactobacillus* and 4 strains of *Streptococcus* were selected as final probiotic strains for dogs.

- 2) The isolation of lactic acid bacteria from the feces of pigs.
- a) The total number of lactic acid bacteria isolated from the feces of pigs were 647 strains.
 - b) *Lactobacillus* were the most prominent species, 527 strains (81.5%).
 - c) Ninety five *Streptococcus* were isolated as 14.7%, but only 25 *Bifidobacterium* were isolated as the lowest distribution (3.4%).
 - d) *Lactobacillus* species was the prominent in adult pigs, and *Bifidobacterium* in second place was higher than *Streptococcus* in other age of pigs.
 - e) Five strains of *Lactobacillus*, 3 strains of *Bifidobacterium* and 2 of *Streptococcus* were selected as final probiotic strains for pigs.
- 3) Adherence and colonization to intestinal cells of LAB
- a) Adherence of LAB from pigs
From the results of adherence test to Caco-2 cell among 20 of *Lactobacillus*, 9 of *Streptococcus* and 10 of *Bifidobacterium* strains, the most of selected isolate have ability to colonize in intestinal cells.
 - b) Adherence of LAB from dogs
In the adherence test to Caco-2 cell of selected isolates having successful inhibitory effect to pathogenic bacteria, 24% of *Lactobacillus* represented adherence property (+) and 26% of *Streptococcus* represented more higher property (++ or +++) than control strains.
- 4) Inhibitory effect to pathogenic bacteria
- a) Inhibitory effect of LAB from pigs
 - (1) Five (27.8%) strains of *Bifidobacterium* and 56 (80.8%) of *Lactobacillus* represented inhibitory effect to pathogenic bacteria..
 - (2) Inhibitory effect to *Sal. enteritidis* KCCM 12021 was 51.1% and it was higher than that of *S. aureus* KCTC 1916 (41.0%) and *E. coli* O157:H7 (26.1 %)
 - (3) Ten strains of 70 *Lactobacillus* (14.3%) represented high inhibitory effect to three pathogenic bacteria.
 - (4) *Bifidobacterium* did not represented inhibitory effect to all of three pathogenic bacteria.
 - b) Inhibitory effect of LAB from dogs

- (1) The only 14.3 % of LAB 140 strains indicated inhibitory effect to *E. coli* O157:H7 (USDA, human isolate)
 - (2) One hundred thirty six (97.1%) strains of LAB indicated high inhibitory zone(> 8 mm) to *E. coli* KCTC 1467 stain.
 - (3) Inhibitory effect to *Salmonella enteritidis* KCCM 12021 and *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 were 47.9% and 26.4%, respectively.
 - (4) Forty strains, 25 of *Lactobacillus* and 15 of *Streptococcus* were selected as inhibitory isolates to pathogenic bacteria from 140 strains of LAB.
- 5) Clinical efficacy test for *L. casei* GM-CSF
- a) Field efficacy test of *L. casei* GM-CSF on the porcine post-weaning diarrhea
 - (1) In the results of the first *in vivo* experiments, average daily gains and feed conversion rate were increased to 11.8% and 5.8% by administration of *L. casei* GM-CSF, respectively.
 - (2) In the second experiments, average daily gains and feed conversion rate were also increased to 7.1% and 2.5%, respectively.
 - (3) In the analysis of intestinal microflora, the number of harmful bacteria, such as Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens* were significantly decreased, and beneficial bacteria, *Lactococcus*, was increased. Therefore, from the results of present study, using of *L. casei* GM-CSF as probiotics in hog raising industry was very effective in the improvement of weight gain and the increase of beneficial intestinal lactic acid bacteria.
 - b) Field efficacy test of *L. casei* GM-CSF on the canine post-weaning diarrhea
 - (1) In the field efficacy test from 7 weeks old to 14 weeks old dog, average daily gains and feed conversion rate were increased to 24.6% and 5.5% by administration of *L. casei* GM-CSF, respectively.
 - (2) In the results of 17 adult pregnant dogs, the survival rate of puppies were 76% in *L. casei* GM-CSF treatment group. This result was higher than that of control group, 62.5%.
 - (3) The number of Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens* were significantly decreased, and *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were increased by administration of *L. casei* GM-CSF in adult pregnant dogs and puppies.

2. Future application

A. Preparation of techniques to express the cloned genes in *Lactobacillus*

- 1) Establishing foundations to express useful immune-activating substances and proteins based on this study of *Lactobacillus* expressing canine GM-CSF.
- 2) Presenting possibilities to produce *Lactobacillus* expressing these various substances in large quantities at low cost.

B. Effect of developing probiotics expressing GM-CSF

- 1) Development of *Lactobacillus* expressing GM-CSF 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.
- 2) 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.

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 GM-CSF 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.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the project	23
Section 1. Necessities of the project.....	23
Section 2. Status and problems in related technology in domestic and overseas.....	26
Chapter 2. Contents of the project and its results	29
Section 1. Material and methods.....	29
Section 2. Study on <i>Lactobacillus</i> expressing canine GM-CSF in dogs.....	72
Section 3. Study on <i>Lactobacillus</i> expressing porcine GM-CSF in swine.....	92
Section 4. Development of lactic acid bacteria for probiotic use and their efficacy test.....	126
Chapter 3. Accomplishment and subsequent contributions	175
Section 1. Accomplishment.....	175
Section 2. Subsequent contributions.....	181
Chapter 4. Application of the results	183
Chapter 5. International scientific and technological information	185
Chapter 6. References	189

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	23
제 1 절	연구개발의 필요성	23
제 2 절	국내·외 관련기술의 현황과 문제점	26
제 2 장	연구개발수행 내용 및 결과	29
제 1 절	연구수행 방법	29
제 2 절	개에서의 GM-CSF 발현 유산균의 이용 연구	72
제 3 절	돼지에서의 GM-CSF 발현 유산균의 이용 연구	92
제 4 절	생균제용 유산균주 개발 및 효능 연구	126
제 3 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	175
제 1 절	목표달성도	175
제 2 절	관련분야에의 기여도	181
제 4 장	연구개발결과의 활용계획	183
제 5 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	185
제 6 장	참고문헌	189

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

국내 축산업에서 질병에 의한 피해는 축산업이 대규모, 집단화로 바뀌면서 늘어나는 실정이다. 이러한 질병의 피해를 예방하기 위하여 여러 가지 시도들이 시행되었다. 즉, 예방 및 치료적 적용을 위한 항생제의 사용, 백신의 개발 및 적용, 사료 개선을 통한 영양 개선, 환경 개선 등과 같은 사양관리 개선 등을 들 수 있다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 아직까지도 이러한 방법의 적용은 항생제 내성균의 출현 및 만연, 백신 접종에 따른 여러 가지 부작용, 국제 사료가격 폭등에 따른 축산경영의 압박 등 많은 문제점들을 내포하고 있다. 따라서 이러한 문제점들을 근본적으로 해결하기 위한 여러 가지 노력들이 시도되고 있다. 최근에는 동물의 질병 예방 및 피해로부터 자유롭기 위해서 우선적으로 숙주동물의 방어능력을 증가 시켜 감염원의 침입단계부터 차단하고자하는 방법들의 개발에 많은 관심을 가지게 되었다.

숙주동물의 면역체계 조절에 중요한 역할을 하는 물질중의 하나인 cytokine은 체내에 여러 종류의 침입원(stimuli)에 대하여 여러 종류의 면역세포를 포함한 다양한 세포에서 생성되는 크기가 작은 물질로서 병원 미생물의 침입 또는 기타의 외부의 자극을 제거하기 위하여 여러 종류의 면역세포의 활성화 및 면역반응을 유도하기 위하여 생성되는 물질이다. 이러한 cytokine은 그 기능, 생성 세포등에 따라서 여러 종류로 구분된다. 동물에서의 이러한 cytokine의 적용은 감염의 조기검출지표 개발, vaccine의 adjuvant로의 가능성 등에 관한 실험적 연구 정도로 한정되어 있으며, 따라서 다양한 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

Granulocyte Macrophages-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)는 여러 종류의 cytokine들 중 가장 먼저 밝혀졌고 또한 이들 유전자는 몇몇 동물에서 cloning되었다. 이 GM-CSF는 LPS를 비롯한 세포구성분, IL-1, TNF 등과 같은 다른 cytokine에 의해서 면역세포를 비롯한 여러 세포에서 생성되는 물질로서 숙주체내에서 hematologic progenitors들의 분화 및 증식을 증가 시켜서 hematopoiesis을 유도하거나, neutrophil, macrophage, dendritic cell 등에 작용하여 항균력의 증가, cytokine 생성에 의한 면역

활성증가, antigen-presenting cell (APC)의 기능 증가 및 이들 세포의 분화 및 증식의 촉진 등에 의해서 탐식세포의 주화능 증가, 항체 생성의 증가로 감염의 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

돼지의 설사증, 폐렴 개의 파보장염 그리고 홍역뇌염 등과 같이 축산 분야에 심각한 피해를 주고 있는 질병을 치료하기 위하여 여러 종류의 항생제가 쓰이고 있으나, 우리 나라의 경우 항생제의 오용과 남용에 의한 저항성 균주의 급속한 출현으로 점차 효과 있는 항생제의 선택 폭이 줄어들고 있는 실정으로 이것을 대체할 수 있는 안전하고 새로운 종류의 생균제 개발이 시급하다. 현재 사용되는 생균제(Probiotics)의 의미는 1989년 Fuller에 의하여 「장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익하게 작용하는 생균 첨가물」로 정의되고 있다.³ 현재 양돈용으로 사용되고 있는 생균제용 유산균주로는 정상 장내세균총(normal intestinal microflora) 중에서 유용한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 대표적인 유산균인 *Lactobacillus*, *Streptococcus* (*Enterococcus*), *Bifidobacterium* 등이 잘 알려져 있다. 생균제를 사용하여 가축의 질병예방 및 생산성 향상을 이루기 위해서는, 먼저 위산 및 담즙산에 대한 저항성, 소장하부에서의 정착능력 및 증식능력, 안전성이 탁월한 균주들을 확보, 개발하는 것이 무엇보다 중요하다. 또한 이와 같은 생균제를 산업화하여, 성공적으로 개발하기 위해서는, 실제 가축에서 가장 많은 경제적 손실을 일으키는 설사증에 대한 예방효과, 증체율 증가에 따른 사료효율의 향상, 투여방법의 용이성, 그리고 제품가격의 저렴함 등이 중요시되고 있다.

본 연구에서는 유산균이 이와 같은 요구를 충족할 수 있고, 사료를 통해 쉽게 동물체내에 투여될 수 있으며, 장에 정착할 수 있기 때문에 살아있는 유전자 운반체(live vector)로서 새로운 개념의 동물용 생균제 개발을 시도하려고 한다. 분자유전학의 발전에 따른 유산균의 유전학적 연구가 많이 진행되어, 유산균주에 대한 유전자 재조합 연구들이 확대되고 있다. 최근에는 유전자 클로닝 기법을 이용하여 새로운 유전자를 유산균에 삽입하여 새로운 형질을 발현하도록 하는 연구가 진행되고 있다. 유산균은 이미 안전성이 입증된 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물이며, 동물용 probiotics로 많이 사용되고 있기 때문에 동물사료첨가제 및 동물의약품 전반에 걸쳐 응용할 수 있다. 특히 가축의 질병예방과 면역기능향상과 관련이 있는 유전자들을 발현시킬 수 있다면, 축산업의 발전과 수의학적 발전을 초래하여, 결국은 축산농가의 소득증대와 축산기술의 향상에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 경제·산업적 측면

국내 양돈 산업에서 질병에 의한 경제적 피해액은 연간 약 2,000억 정도로 추산되며 이러한 질병으로 인한 경제적 손실을 줄이기 위해서 항생제의 사용, 백신의 개발 및 적용 및 사양 환경 개선 등 다양한 방법들이 사용되었으나 오히려 피해액은 매년 증가되는 추세이며 또한 소규모 농장들의 폐업이 늘어나고 있는 실정이다. 그리고 항생제의 오용 및 남용, 백신의 접종에 따른 여러 부작용 등의 문제점들이 유발되고 있어 이를 극복하고자 하는 노력의 경주가 필요한 실정이다.

돼지와 개의 질병에 의한 경제적 손실은, 사육두수, 위생관리, 국가나 지역 간의 양돈기술 수준에 따라 많은 차이가 있지만, 일반적으로는 평균 돼지 총생산액의 약 20%, 개는 약30%가 질병에 의한 경제적 손실인 것으로 추측되고 있다. 미국 수의사회지의 보고에 의하면 미국 내의 돼지질병에 의한 연간 손실액은 11억 2천만 달러(1조 5천억원)로 보고되고 있으며, 그 내용을 살펴보면 자돈 설사, 돼지 적리와 같은 소화기 질병과 위축성 비염, 폐렴과 같은 호흡기 질병이 주종을 이룬다. 따라서 돼지질병을 예방 및 치료하기 위해서는 자돈기의 설사증과 성돈기의 폐렴의 치료가 가장 중요하다

현재 가축의 질병 치료 예방 및 성장 촉진의 목적으로 사용되고 있는 항생제는 매년 그 사용량과 범위가 계속 증가추세에 있다. 그러나 이와 같은 항생제의 무분별한 남용과 과다 사용은 오히려 항생제 내성균주의 증가 및 새로운 병원균의 출현을 초래하여 가축의 질병 예방 및 치료에 큰 문제점을 야기시킬 뿐 아니라 직접적인 피해를 주고 있다. 또한 이러한 축산물을 사람이 섭취하게 되면 사람에게도 항생제에 대한 내성을 높이는 결과를 초래하게 되므로, 외국의 경우는 점점 사료첨가 항생제의 사용을 엄격히 규제하여 가고 있는 실정이다. 따라서 지금까지 가축의 질병예방 및 성장 촉진의 목적으로 사용되고 있는 항생제의 역할을 대신하면서, 가축과 사람에게 안전한 새로운 생균제에 대한 많은 연구와 개발이 시급하다.

유산균주는 위산에 대한 저항성 (pH 2 - pH 3에서의 생존성), 담즙산에 대한 저항성(Oxgall 0.15% 및 0.3%에서의 생존성), 사료 첨가시 펠렛 제조 과정에서의 내열성 및 기존의 사료첨가용 항생제에 대한 저항성이 높은 균주를 선발하여 양돈용 생균제로 사용하는 것이 바람직하다. 그러나 이와 같은 가축용 생균제의 원료인 원말은 거의 대부분 외국으로부터의 수입에 의존하고 있어, 외화낭비를 막고, 기술개발을 위해서는 국내에서도 가축용 생균제를 위한 균주 개발이 필요한 실정이다. 새로운 동물용 생균제가 개발되어도 이를 현장의 축산분야에 직접 적용하기 위하여는 값싸게 대량

공급할 수 있는 생산기술의 개발이 절실히 필요하다.

앞으로 유산균의 발현시스템이 개발되면 기능성 축산사료 첨가제 뿐 만이 아니라, 신개념의 가축질병 치료를 위한 유전자 치료기법에 이용될 수 있을 것이다. 동물의 대장은 전체 면적계의 약 70 %를 차지하고 있으므로, 안전성이 이미 확보된 유산균을 적절히 활용한다면, 현재 알려진 장내 정착성과 probiotics의 기능 이외에 vaccine carrier로 이용할 수 있어, 새로운 유산균 vaccine의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

3. 사회·문화적 측면

국내의 양돈기술은 아시아지역 국가 중에는 고도의 기술을 보유하고 있으면서 사료의 수입의존, 종돈의 수입의존 등 여러 가지 어려운 문제와 함께 최근에는 환경의 문제까지 겹쳐 고부가가치 달성을 위한 생산성의 향상이 중요한 축산업의 주체로서 축산업 특히 양돈을 천직으로 생각하고 이에 종사하는 이들에게 용기와 희망을 줄수 있는 양돈의 기술 개발이 절실한 실정이다.

미국의 낙농위원회(National Dairy Board)에 의해 실시된 조사에 의하면, 살충제, 제초제, 특히 항생제 남용 및 오용에 의한 항생물질 내성균의 출현, 공중보건학 상의 위험 가능성 등이 높아짐에 따라, 항생제의 사용을 억제하고 가축의 건강과 사료효율을 증진시킬 수 있는 새로운 대체방법 모색이 더욱 필요하게 되었다. 우리나라도 예외 없이 WTO 체제하에서의 무역자유화, 무역개방화 시대에 직면하고 있기 때문에, 국내 축산분야에서도 가축의 무분별한 항생제 사용 규제는 가까운 장래에 불가피할 것으로 생각되며, 본 연구에서 시도하려고 하는 동물 질병 방제를 위한 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구는 이와 같은 시대적 변화에 매우 유익할 것으로 생각된다.

제2절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

국내, 외적으로 돼지 질병 예방을 위하여 많은 유산균 제제들을 개발하여 사용되고 있으나 이는 단순한 유산균 제제이고 또한 국내 사육돼지에서 분리한 유산균 제제가 아니라 외국 수입품이 많은 실정이다. 개의 질병 예방을 위한 유용물질은 전무하다. 유산균을 이용한 재조합 기술은 여러 측면에서 이용되고 있으나 아직까지 국내에서는 이러한 시도가 특히 동물에서의 적용에서는 매우 미흡한 실정이다. 그러므로 자발적

인 면역기능을 증강 시킬 수 있는 GM-CSF 유전자를 도입한 이러한 제제를 이용하면 많은 효과를 거둘 수 있을 것으로 생각한다.

돼지와 개의 장관에 많이 분포하고 있는 유산균으로는 *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *Enterococcus bovis*, *Ent. bovis*, *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Streptococcus intestinalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bif. suis* 등이 보고되고 있다. 이 중에서 *Lactobacillus spp.*나 *Streptococcus(Enterococcus) spp.* 가 생균제로 많이 사용되고 있으며, *Bifidobacterium*은 편성 혐기성유산균으로 산소에 대한 감수성이 높아 제품개발에 장애요인이 될 수 있다. 따라서 본 연구의 균주선발에서도 *Lactobacillus*, *Streptococcus(Enterococcus)*, *Bifidobacterium*에 초점을 맞추어 분리하는 것이 바람직하다.

그 동안 유산균의 기능을 향상시키기 위한 연구로서 자연 상태에서 유용한 돌연변이를 일으킨 균주를 쉽게 선별해 내는 연구, 돌연변이를 인위적으로 유도하기 위한 연구, 세포융합 등을 통하여 형질전환을 유도하는 연구들이 주로 이루어져 왔다. 그러나 유산균은 다른 균주들과 비교할 때 유전자 차원에서의 조작과 변형이 매우 어려운 것으로 알려지고 있는데, 왜냐하면 그동안 유전자 차원에서의 연구가 늦어져 산업적으로 이용가능한 정보가 불충분하다는 점과, 유산균은 대부분 그람 양성세균이기 때문에 배양 및 보존이 까다롭다는 점, 마지막으로 유산균에게 새로운 형질을 도입시킬 수 있는 안정한 vector와 숙주세포의 개발이 늦어지고 있다는 점 등이 거론되고 있다.

유전자를 cloning 하는 장점은 이미 구조를 알고 있는 유전자를 plasmid를 이용해 유산균에게 직접 전달하게 되므로, 불특정한 유전변이가 거의 일어나지 않고, 특정한 성질만의 발현을 증대시키거나 유익한 성질만을 발현하도록 함으로서, 새로운 형질을 유산균이 획득할 수 있도록 하는 것이다. 그러나 아직은 유전자 차원에서의 연구가 미약하여 유산균 유전자 구조에 대한 기초적인 정보들이 매우 부족하기 때문에 몇몇 유전자를 제외하고는 그다지 클로닝이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 그러나 현재 가장 걸림돌이 되고 있는 안정적이며 효율적인 vector 개발이 해결된다면 여러 가지 유용한 유전자를 유산균내로 조작하여 넣어주는 작업이 활발하게 진행될 것으로 생각된다. 유산균은 사료를 통해 쉽게 동물 체내에 투여될 수 있고, 장에 정착할 수 있기 때문에 살아있는 유전자 운반체(live vector)로서의 가능성이 매우 높다.

특정한 유전자를 유산균에 옮겨주기 위해서는 vector라고 부르는 DNA 운반체가 필요하다. 유산균의 유전자를 직접 조작하는 것은 일반적으로 어렵기 때문에 보통은

대장균과 유산균 사이를 오갈 수 있는 shuttle vector를 먼저 개발하는 것이 필요하다. shuttle vector란 원래 두 가지 종류의 세균 사이를 이동할 수 있는 vector를 뜻하는 것으로서 대개는 plasmid의 구조를 약간 변형시킨 것이다. shuttle vector가 필요한 이유는 유산균의 배양이 까다로우며 시간이 많이 걸리고, DNA의 분리와 분석이 어려운 데다가 보통은 transformation 자체가 어렵기 때문이다. 그러나 대장균은 상대적으로 배양이 간편하고 이미 plasmid vector들이 많이 개발되어 있어, 유전자의 재조합이 쉽게 이루어질 수 있다. 즉 발현시키고 싶은 유전자를 shuttle vector에 재조합한 후, 대장균에 넣어주면 유전자 조작이 쉽게 된다. 이런 확보된 재조합 shuttle vector를 다시 유산균에 옮겨주면 필요한 형질의 발현이 가능하게 된다.

본 연구는 국내사육 동물 (돼지 및 개)에서 우점종인 유산균을 이용하여 국내 현실에 맞게 적용하고자 하는 연구이기 때문에 외국에서 기술 도입을 할 수 없는 부분이 많고 또한 유전자 재조합 기술은, 특히 유산균에 대한 재조합 기술은 많이 되어 있는 상황이기 때문에 이에 대한 기술 도입의 필요성은 없다고 생각된다. 단지 유산균 내에서 cloning 된 외부 유전자 발현을 위한 발현 vector에 대한 부분은 다소 고려가 있어야 할 것으로 사료된다.

대부분의 선진국에서는 유용생물자원 확보 및 신기능 생물 소재 개발에 따른 경제적 이익을 확보하기 위해 서로 경쟁적인 많은 노력을 하고 있기 때문에, 우리나라도 자체기술개발에 의한 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구의 개발 및 기술축적이 매우 절실히 요구되는 실정이다. 특히 유용 유산균주의 분리, 탐색, 특성연구 및 분자생물학적 연구는 선진국과 비교하여, 결코 뒤져있는 상황이 아니므로 국내에서의 자체기술 개발이 적절하며, 일부 필요한 경우는 외국과의 부분적인 공동연구가 필요한 실정이라 판단된다.

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법

1. 돼지와 개의 GM-CSF 유전자 확보 및 특성조사

가. 면역세포 분리기법 확립

각 해당 동물의 전혈을 채취하여 동량의 RPMI-1640으로 희석한 후 3ml의 Histopaque(Sigma, St. Louis, MO., U.S.A)을 첨가하여, 1,700rpm에서 30분간 원심 분리한 후 Periperal Blood Mononuclear Cell(PBMC)만 채취하였다.

Complete RPMI (10% FBS, L-glutamine, Antibiotics, β -mercaptoethanol)을 이용하여 PBMC를 세척하였고, trypan-blue exclusion method를 이용하여 5.0×10^5 cell/ml이 되도록 조정한 후 25cm² flask에 10ml씩 분주하였다. 분주된 flask에 phytohemagglutinin(PHA, Invitrogen, Carlsbad, CA., USA)을 2%(v/v)의 농도로 4시간 동안 자극 후 1,200rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포를 모아 실험에 사용하였다.

나. mRNA 분리 및 cDNA작성

PHA로 자극한 PBMCs를 TRIzol Reagent(GIBCOBRL, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 세포벽을 깨기 위해 1ml의 TRIzol Reagent를 첨가 후 12,000 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 실온에서 5분간 방치 후에 chloroform 0.2ml를 첨가한 후에 15초간 격렬히 흔들어 homogenization을 시켰다. 실온에서 2분간 방치 후 12,000 ×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 채취하여 0.5ml의 isopropyl alcohol로 침전을 시켰다. 10분간 incubation을 시킨 후에 12,000 ×g에서 10분간 원심 분리하여 total RNA를 얻은 후 75% ethanol로 2회 세척 과정을 가진 후에 DEPC 처리한 물에 용해시켰다. 분리된 RNA를 RNase-free DNase로 37°C에서 30분간 처리하여 잔류 DNA를 제거한 후 다시 TRIzol Reagent를 이용하여 total RNA를 정제하였다.

RNA추출 과정을 통해 얻은 total RNA를 260nm에서 측정한 후, 5 μ g의 RNA를 Superscript preamplification system (GIBCOBRL, USA)을 이용하여 single stranded cDNA로 변환 시켰다. RNA농도를 5 μ g으로 보정후 DEPC 처리한 물로 8 μ g을 보정 후에 10mMdNTP와 Oligo(dt)를 1 μ l 씩 첨가한 후에 65°C에서 5분간 incubation을 시켰다. 10×RT buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l 그리고 RNase inhibitor 1 μ l를 추가한 후에 42°C에서 2분간 incubation에 Reverse

Transcriptase를 1 μ l씩 추가한 후에 42 $^{\circ}$ C에서 50분간 반응시켰다. 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 효소의 불활화를 시킨 후에 RNase 1 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리하여 잔류 RNA를 제거 하였다.

다. GM-CSF 유전자 확보 및 유전학적 특성 파악

PCR을 위해 기 발표된 GM-CSF의 nucleotide sequence를 바탕으로 primer를 제작하였다. 이 primer를 이용하여 denaturation 단계는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing 단계는 55 $^{\circ}$ C에서 30초, extension 단계는 72 $^{\circ}$ C에서 40초의 조건으로 PCR을 35회를 실시한 후 1.5 % agarose gel에서 전기 영동하고, UV transilluminator하에서 band의 존재 여부를 확인하였다.

Agarose gel에서 확인 된 435bp의 band를 QIAquick Gel Extraction kit[®] (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 1.5 % agarose gel에서 전기 영동한 후 재확인하였다.

정제된 PCR 산물은 TOPO[®] cloning vector(Invitrogen)와 ligation하였다. PCR 산물 2 μ l에 멸균된 증류수 2 μ l와 TOPO[®] cloning vector 1 μ l를 혼합 후 5분간 실온에 방치하였다.

준비된 2 μ l의 TOPO[®] cloning reaction을 competent cell (One shot[®] cell, Invitrogen)에 혼합한 후 30분간 얼음 속에서 배양하였다. 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 열 충격을 준 후에 250 μ l의 SOC medium(2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose)을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 200rpm의 shaking incubator안에서 배양 후 배양액은 50 μ g/ml의 ampicillin과 40mg/ml의 X-gal이 포함된 LB plate에 50, 100 및 200 μ l씩 도포 후 37 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양하였다.

LB plate에서 흰색 또는 밝은 청색을 나타내는 콜로니 10개 내외를 선택하여 50 μ g/ml의 ampicillin이 포함된 LB broth 5ml에 접종 후 16시간 동안 배양하였다. 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 집균한 후에 QIAprep[®] Miniprep kit(QIAGEN)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 250 μ l의 resuspension buffer를 이용하여 집균한 균을 재부유 시킨 후에 250 μ l의 lysis buffer를 이용하여 세포벽을 용해하였다. Neutralization buffer를 이용하여 중화시킨 후에 10분간 원심 분리하여 chromosomal DNA와 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 시료의 상층액만 취하여 column을 통과시킨 후 ethanol을 이용하여 세척하고 증류수로 용해하였다.

얻어진 plasmid DNA는 TOPO[®] cloning vector의 제한 효소인 EcoR I을 이용하여 분석하였다. 3 μ l의 plasmid DNA와 0.5 μ l의 EcoR I, 2 μ l의 EcoR I 10 \times buffer 그리고 14.5 μ l의 증류수로 부피를 보정 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양한 후 1.5% agarose gel에서 확인하였다. 나머지 plasmid DNA는 automated DNA sequence

(ABI PRISM 377×L, Perkin Elmer, USA.)을 이용하여 sequencing을 실시하였다.

라. GM-CSF 발현

GM-CSF의 signal peptide 부분을 제외한 mature protein coding region만을 발현하기 위하여 위의 clone중 signal peptide 부분을 제외한 부분을 cloning하기 위하여 primer를 제작하였고, 기타 PCR, PCR product의 정제, cloning, transformation 및 sequencing은 위에 기술한 방법과 동일하게 실시하였다. 단 transformation의 선택배지로는 100 μ g/ml의 ampicillin과 25 μ g/ml의 kanamycin이 포함된 LB plate를 사용하였다.

Ampicillin과 kanamycin으로 일차적으로 선별되어 자란 colony에 원하는 GM-CSF gene의 삽입과 단백질 발현이 되는지 확인하기 위하여 다음과 같은 선별 실험을 하였다.

1) GM-CSF positive clone의 선발

LB plate에 자란 transformant들을 선발하여 colony PCR (94 $^{\circ}$ C, 30초; 55 $^{\circ}$ C, 30초; 72 $^{\circ}$ C, 40초)을 실시하여 inserted DNA를 확인하였고, 확인된 clone은 Mini-prep kit을 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 제한효소인 *Hind* III와 *Bam*H I을 처리하고 1.5 %의 agarose gel에서 전기 영동한 후 확인하였다. 추출한 plasmid DNA는 sequencing하여 GM-CSF임이 확인된 clone만 발현에 이용하였다.

2) 단백질 발현 유도

100 μ g/ml의 ampicillin과 25 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 LB broth에 균을 접종하여 16시간 배양 후 새로운 LB broth 3 ml에 접종하였다. O.D.600가 0.5~0.7이 되도록 100분간 shaking incubator에서 300rpm으로 배양 후, 최종농도 1mM이 되도록 IPTG를 접종한 후 5시간을 추가로 배양하여 15,000×g에서 원심으로 집균하였다.

발현된 단백질을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 200 μ l의 증류수로 부유시킨 균을 12%의 polyacrylamide gel에 각 well당 6 μ l를 loading한 후에 100 volt의 전압으로 2시간 동안 전기영동을 실시하고 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액에 20분간 염색한 후 Destaining solution I, II에서 탈색하였다. Gel drying film을 이용하여 1% glycerol과 함께 건조한 후 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

발현된 단백질의 특이성을 확인하기 위하여 Western-blot을 사용하였다. SDS-PAGE의 조건으로 전기 영동한 gel을 nitrocellulose membrane에 15 volt로 20분간 전사시키고, membrane을 3 % gelatin이 포함된 Tris-buffered saline(TBS)으로 1시간동안 shaking 상태로 blocking 하였다. Anti-pig GM-CSF polyclonal

antibody (Endogen, Boston, MA., U.S.A.)를 1 % gelatin이 포함된 TBS에 500:1로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시키고, alkaline phosphate-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG (Bio-Rad, Hercules, CA., U.S.A.)를 2차 항체로 사용하여 AP conjugate substrate kit(Bio-Rad)를 이용하여 발색시켜 단백질의 특이성을 확인하였다.

마. 재조합 GM-CSF에 대한 특이항체 생산

1) GM-CSF 정제

가) 단백질 정제

단백질을 정제하기 위해 단백질 발현이 확인된 균을 선택하여 100 μ g/ml의 ampicillin과 25 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 LB broth 500ml에 접종하였다. O.D.600가 0.5~0.7가 되도록 배양한 후에 최종농도 1mM이 되도록 IPTG를 접종하고 5시간을 추가로 배양하였다. 8,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 집균한 후에 lysis buffer (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 6M GuHCl, pH8.0)로 부유시키고, sonication으로 세포를 파쇄하였다. 8ml의 분쇄한 lysate에 2ml의 Ni-NTA slurry를 섞은 후에 한 시간 동안 실온에 방치하였다. Ni-NTA와 lysate 혼합액을 column으로 옮긴 후 바닥의 cap을 제거하여 Ni-NTA에 결합하지 않은 용액을 서서히 흘려보냈다. Column에 남아 있는 Ni-NTA과 그에 결합한 단백질을 5ml의 buffer C (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M urea, pH6.3)로 2회 세척 한 후, buffer D (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M urea, pH5.9)와 buffer E (pH4.5)로 단계적으로 추출하였다.

나) 분리 단백질에 대한 확인

단백질의 분리 상태를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 각 buffer에 단계별로 elution된 단백질 시료를 12%의 polyacrylamide gel에 각 well당 14 μ l씩 loading한 후에 100volt의 전압으로 2시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 확인하였다. 정제된 단백질의 특이성을 확인하기 위하여 앞에서 기술한 것과 같이 Western-blot을 이용하였다.

다) 분리 단백질 농도 측정

정제된 단백질의 농도를 측정하기 위하여 Protein Assay kit (Bio-Rad.)를 사용하였고, standard protein은 lyophilized bovine serum albumin (Bio-Rad)를 사용하였다.

2) 접종

가) Mouse에 recombinant porcine GM-CSF (rpGM-CSF) 접종

4주령의 ICR 암컷에 단백질 농도 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 rpGM-CSF를 Freund's adjuvant와 함께 2주 간격으로 3회 접종하였다. 1차 boosting은 complete Freund's adjuvant와 함께 피하로, 2, 3차 boosting은 Incomplete Freund's adjuvant와 함께 복강내로 $200\mu\text{l}$ 씩 접종하였다.

나) Chicken에 rpGM-CSF 접종

24주령 백색 산란계에 mouse와 동일한 방법으로 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 단백질을 1:1의 비율로 Freund's adjuvant와 희석액을 1ml 씩 대퇴부에 접종하였다. 접종 후 산란한 계란은 수거하여 난황향체 추출에 사용하였다.

3) 항체 추출

Mouse는 3차 boosting이 끝나고 1주 후에 ether를 이용해 마취시킨 후 abdominal vein에서 전혈을 채취하였다. 채취한 전혈은 4°C 에서 24시간동안 방치한 다음, 원심분리로 혈청을 수거하고 56°C 에서 30분간 비동화 시켰다.

난황향체 추출을 위하여 접종 후 2주부터 1주 간격으로 계란을 수집하여 신 등(2000)의 방법에 준하여 추출하였다. 즉 계란에서 난황만 분리하여 50ml 튜브에 넣은 후에 동량의 PBS(pH 7.2)를 가하여 vortex하고, 다시 혼합액에 동량의 chloroform을 가하고 실온에서 2시간 정치시킨 후에 상층액을 수거하거나, $5,500\text{rpm}$ 에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 취하였다.

4) Polyclonal antibodies의 항체가 측정

난황 및 mouse serum내 항체를 측정하기 위하여 ELISA 검사를 실시하였으며, 그 항원으로는 rpGM-CSF를 사용하였다. rpGM-CSF를 coating buffer와 3:1의 비율로 단계 희석하여 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후에 4°C 에서 18시간 정치한 후 Tween-PBS(0.005% Tween20 in PBS) 용액으로 3회 이상 세척하였다. 1% BSA가 포함된 Tween-PBS로 blocking시켜 37°C 에 1시간 동안 방치한 후에 다시 3회 이상 세척하였다. 1차 항체로 mouse serum과 난황향체를 4:1의 비율로 단계 희석하여 처리하였고, mouse serum에 대한 2차 항체로는 Horseradish peroxidase-conjugated goat-anti mouse IgG(Bio-Rad)를, 난황향체는 horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG fraction to chicken (Cappel Co., Aurora, OH, USA)를 2,000:1의 희석 배율로 1시간 동안 반응시킨 다음 세척하였다. substrate로는 2,2'-azino-bis-3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 용액

을 100 μ l씩 가하고 실온에서 30분 경과 후 stop solution(0.5M HCl)을 50 μ l씩 분주한 후에 405nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

바. GM-CSF 발현을 위한 유산균 Vector 확보

유산균에서 pGM-CSF를 발현시키기 위해 (주)비피도에서 pBES-AF2 shuttle vector를 분양 받았다. 7.6kb의 size로 multicloning site에 *Xba*I, *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI등의 enzyme site를 가지고 있다.

2. GM-CSF 발현을 위한 유산균주의 선발 및 특성조사

가. 동물

생균제용 균주를 분리할 목적으로 충북 청주 근교에서 사육되고 있는 건강한 생후 5일-30일령의 포유자돈(Suckling) 10마리, 생후 45일령-60일령의 이유자돈(Weaning) 10마리, 그리고 7개월령-24개월령의 성돈(Adult) 각 10마리씩 총 30마리를 사용하였다.

돼지로부터 생균제용 유산균을 선발하기 위해 경기도 이천의 제일종축과 안성의 농장에서 사육되고 있는 건강한 돼지를 실험대상으로 사용하였다. 돼지는 연령에 따라 포유자돈, 이유자돈, 육성돈, 성돈, 모돈

으로 구분하였다. 포유자돈과 이유자돈은 각 10두를 사용하였고, 육성돈, 성돈, 모돈은 각 5두씩 사용하여 총 35두의 돼지에서 분변시료를 수집하였다.

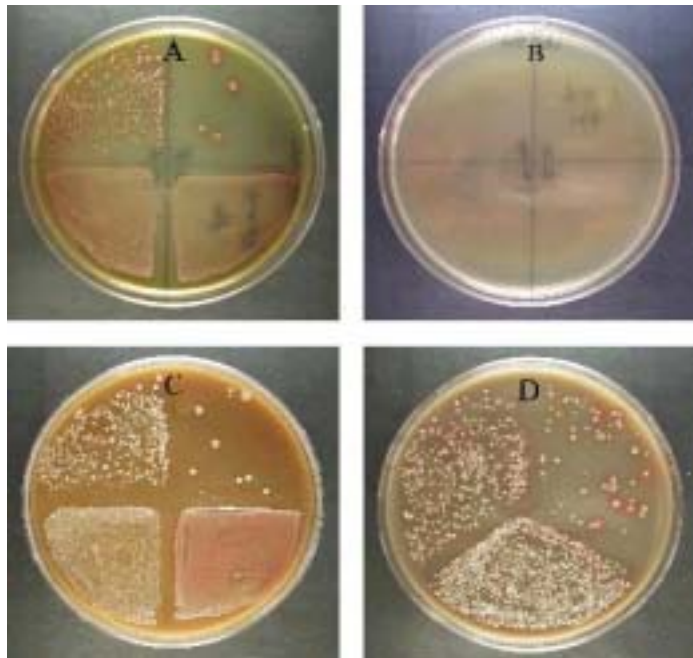


Fig. 1. Selective media (A, B, C) and non-selective media (D) used for the isolation of lactic acid bacteria. (A) TATAC for *Streptococcus* spp., (B) LBS for *Lactobacillus* spp., (C) BS for *Bifidobacterium* spp., and (D) BL for anaerobic lactic acid bacteria.

Table 1. Compositions of culture media used for the isolation of lactic acid bacteria from dog and pig feces.

Components	Compositions (g or ml)			
	TATAC	LBS	BS	BL
Bacto peptone	15.0	-	-	-
Bacto tryptone	10.0	-	-	-
Yeast extract	10.0	-	-	-
Sucrose	1.0	-	-	-
Esculin monohydrate	1.0	-	-	-
TATAC annex solution I ^{a*}	22.0	-	-	-
TATAC annex solution II ^{b*}	20.0	-	-	-
LBS agar	-	84.0	-	-
Lab-lemco powder	-	8.0	-	-
Sodium acetate-3H ₂ O	-	15.0	-	-
Acetic acid [*]	-	3.7	-	-
BL agar	-	-	60.0	60.0
BS annex solution ^{c*}	-	-	50.0	-
Sheep blood [*]	-	-	50.0	50.0
Agar	16.0	-	-	-
D.W.	1000	1000	1000	1000

^a TATAC annex solution I : [0.45 g Sodium azide + 30 g Sodium glutamate] + 100 ml D.W.

^b TATAC annex solution II : [0.01 g Acridine orange + 0.1 g Triphenyl tetrazolium chloride + 1 ml of 0.65% crystal violet solution + 1.65 g Thallose sulfate] + 100 ml D.W.

^c BS annex solution : [30 g Sodium propionate + 100 mg Paromomycin + 400 mg Neomycin + 6 g LiCl] + 100 ml D.W.

* It was added to prepared media after autoclave at 121°C for 15 min.

나. 유산균주의 분리

유산균주의 분리를 위한 개와 돼지의 분변샘플은 채취 후 바로 O₂-free CO₂ gas로 치환된 수송 혐기 배지(BHI broth)에 넣어 즉시 실험실로 수송하였다. 유산균주의 분리에 사용한 배지는 *Streptococcus* 선택배지인 TATAC, *Lactobacillus* 선택배지인 LBS, *Bifidobacterium* 선택배지인 BS와 모든 유산균의 배양이 가능한 BL의 총 4종류의 배지를 사용하였다.(Fig. 1, Table 1)

분변샘플의 무게를 측정한 후 멸균된 diluent A를 사용하여 10배 단계희석을 실시하였다. 각각의 희석된 단계희석의 0.05ml를 선택배지 (TATAC, LBS 및 BS)에 10⁻², -4, -6, -8로, 비선택 배지 (BL)에 10⁻⁶, -7, -8로 접종하고 도말하였다. 사용배지는 O₂-free CO₂ 로 치환된 혐기 'steel wool' jar에서 혐기상태로 37°C에서 48시간 동안 배양하였다.

배양된 세균의 동정은 Mitsuoka's method에 따라서 실시하였으며(1), 배양 후 유산균의 전형적인 colony를 각각의 배양된 배지에서 분리하여 BL배지에 계대하였다. 혐기상태에서 48시간 동안 37°C에서 배양한 후 colony는 Gram's stain을 하고 광학

현미경(1,000)에서 cell morphology를 확인 관찰하였다. 선택된 균주가 colony morphology, colony counts, Gram's stain, cell morphology, aerobic growth, catalase test 등의 특성에 의해 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*와 같은 유산균으로 잠정동정되면 그들을 다시 BL배지로 계대하였다. 분리된 유산균은 혐기상태에서 BL 배지에 보존되고 4℃에 저장하였으며, 이상의 유산균 분리의 과정은 Figure 2. 에 모식도로 나타내었다.

다. 내산성 실험

유산균의 내산성을 평가하기 위하여 분리된 *Lactobacillus*, *Streptococcus* 및 *Bifidobacterium*을 L-cysteine(Junsei, Japan)이 0.05% 첨가된 MRS broth(pH 7.0, Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 24 hr 혐기배양하였다. MRS broth를 pH 2.0과 pH 3.0으로 조정하여 4 ml vial에 2 ml씩 분주한 후, 121℃, 15 min 고압멸균하였다.

배양된 유산균 중 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 pH 2.0의 MRS broth에, *Bifidobacterium*은 pH 3.0의 MRS broth에 20 µl씩(1%) 접종하고 37℃에서 3 hr 반응시킨 후, 균주의 생존여부를 확인하기 위하여 배양균주를 BL medium에 37℃, 48 hr 배양한 후, 생성된 colony는 내산성이 있는 균주로 판정하였다.

라. 산생성능 실험

유산균의 산생성 활성을 알아보기 위해 *Lactobacillus*, *Streptococcus* 및 *Bifidobacterium*을 0.05% (w/v) L-cysteine(Junsei, Japan)이 첨가된 MRS broth에 접종하고 37℃에서 3 hr 혐기배양 하였다. 산생성능은 pH indicator를 사용하여 유산균이 배양된 broth의 색 변화를 관찰하여 측정하였으며, pH indicator와 비교하여, 산생성 활성을 pH 값으로 나타내었다.

마. 내담즙성 실험

내산성에서 생존한 유산균주를 L-cysteine(Junsei, Japan)이 0.05% 첨가된 MRS broth (pH 7.0, Difco, USA)에 접종하고 혐기 상태로 37℃, 24 hr 배양하였다. MRS broth에 0.3% Oxgall (pH 7.0, Sigma)을 첨가하고 4 ml vial에 2 ml씩 분주한 후, 배양된 모든 유산균을 20 µl (1%) 접종하고 혐기상태에서 37℃, 3 hr 배양후, 균주의 생존여부를 알아보기 위해 BL medium에 37℃, 48 hr 혐기배양 한 후, 생존한 균주를 내담즙성이 있는 유산균주로 판정하였다.

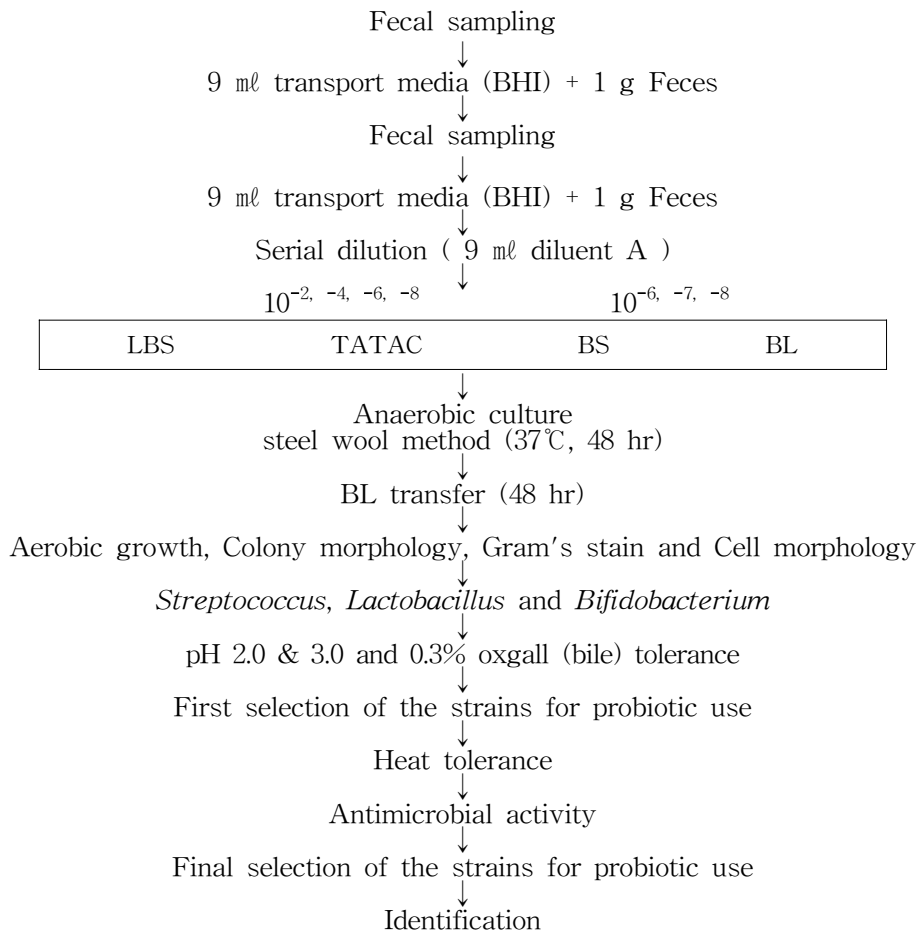


Fig. 2. Schematic diagram for the isolation of probiotic strains from dog and pig feces.

바. 내열성 실험

내산성과 내담즙성에서 생존한 균주의 중복성 체크 후 선발한 1차 선발균주를 L-cysteine이 첨가된 MRS broth 7 ml에 접종하여 37°C, 48 hr 혐기배양 하였다. 배양액 1 ml을 effendorf tube에 넣어 75°C에 15분, 80°C에 5분간 노출시킨 후, BL medium에 백금으로 도말하여 혐기배양 하고, 발육되는 colony를 내열성 유산균주로 판정하였다. 생균제로 사용하기에 적합한 최종 선발 우수균주의 경우에는 온도에 따른 내열성 시험을 다시 실시하였다. 최종선발균주를 L-cysteine이 첨가된 MRS broth 7 ml에 접종하여 37°C, 48 hr 혐기배양 하였다. 접종배양액 1 ml을 effendorf tube에 넣어 50°C, 60°C, 70°C와 80°C에 5분간 노출시킨 후, BL medium

Table 2. Antibiotics used in resistance test for pig and dog.

Antibiotics	Commercial name (Manufacturer)	Antibiotics included	Recommend dose (ppm)	Experimental dose (ppm)
CTC ^a	CTC-Plus (UNIBIOTECH)	Chlortetracycline HCl	200	600
Amoxicillin	Kymoxin (Yuhan Corporation)	Amoxycillin trihydrate	160	480
CPS ^a	Willow-S.T.P (Yuhan Corporation)	Chlortetracycline Penicillin G Sulfathiazole	100 50 100	300 150 300
TC ^a	Pneumo-Stop (KORYO B&P)	Tiamuline Chlortetracycline	99 297	297 891
PS ^a	Mycillin (SAMWOO CHEMICAL)	Penicillin G Streptomycin	200	600
Oxytetracycline	Oxytetra (CHEIL BIO)	Oxytetracycline	42	126
Norfloxacin	SAVIOR premix (KORYO B&P)	Norfloxacin	200	600
ST ^a	Shuprim (SEOUL VET. PHARM)	Sulfamethoxazole Trimethoprim	400 80	1200 240
Ampicillin	Golden ampicillin (WOOSUNG CORPORATION)	Ampicillin trihydrate	300	900
TS ^a	Tyrosin sulfa (JINWOO VET. PHARM)	Tylosin Sulfamethazine	110 110	330 330

에 백금이로 도말하여 혐기배양 후 생존한 균수를 측정하였다.

사. 항생제 내성 실험

항생제 내성은 disc diffusion method를 사용하여 평가하였다. Disc diffusion method는 Schillinger와 Lücke의 방법을 참조하여 실험을 실시하였다.(27). 돼지에서 분리된 양돈용 생균제는 사료내에 존재하는 항생제, 또는 치료용으로 경구 투여하는 항생제에 대한 저항성을 검사하기 위하여 현재 국내의 양돈업에 많이 적용하는 10종류의 항생제를 본 실험에 사용하였다.(Table 2) 개에서 분리된 유산균의 경우, 10종류 중에서 Penicillin G + Streptomycin Sulfate(P+S; Mycillin®), Oxytetracycline(OT; Oxytetra®), Norfloxacin(NF; Savior premix®), Sulfamethoxazole+Trimethoprim(S+T; Shuprim®), Ampicillin trihydrate (AT; Golden ampicillin®)의 5종류만을 대상으로 검사하였다. 부형제 부분과 항생제 용액으로 분리하기 위하여 각 항생제를 10ml D.W.에 권장용량의 3배가 되도록 첨가하여 용해시킨 후 1500rpm, 10min 원심분리하였다. 상층액을 0.45 μ m membrane filter를 통과시켜 항생제 용액을 eppendorf tube에 담고, MRS 배지위에 멸균된 paper disc를 떨어뜨리고 항생제 용액을 paper disc 위에 50 μ l 접종하였다. 그리고 *Streptococcus* 및 *Lactobacillus* 는 37 $^{\circ}$ C, 48시간 혐기배양을 하여 나타난 inhibition zone의 직경(mm)을 측정하여 항생제에 대한 억제정도를 평가하였다.

3. 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균 형질 전환체 개발

가. 개 GM-CSF의 유산균내 발현

1) 개의 GM-CSF 목적 유전자 제작

1차년도 실험에 의해 확보된 435 bp의 염기서열로 구성된 개의 GM-CSF 유전자 정보를 바탕으로 유산균내에서 개의 GM-CSF 단백질을 발현할 재조합 유전자내에 삽입 될 목적 유전자의 primer 쌍을 작성하였다.

Mature protein coding region만을 발현하기 위하여 5' 말단에서 signal peptide 역할을 하는 17 아미노산 부위를 제거하였고, 개의 유산균주에 목적 유전자를 전달할 shuttle vector와 결합할 수 있도록 적합한 제한효소 인식 서열을 첨가하였다. 3' 말단에도 마찬가지로 종료 코돈 뒤에 shuttle vector와 결합할 수 있는 적합한 제한효소 인식 서열을 첨가하였다 (Table 1).

Table 1. Oligonucleotide sequences of the caGMCSF primers

Vector	Primer name	Oligonucleotide sequence
pBES-AF2	pBE.BamHI.ATG.M.caGM.F	5'- GGATCC ATG GCACCCACCCGCTCACCC
	F	-3'
	KpnI.caGM.R	5'- GGTACC TCA CTTCTTGACTGGTTTCCA
		-3'
pHAT	pHAT.BamHI.M.caGM.F	5'- CGCGGATCCGCACCAACACGTTCA
		CCAACACTTGTCCTCGTCCATCTCAA
		-3'
	pHAT.KpnI.caGM.R	5'- CCCGGTACCTTATTACTTTTTGACTGGCCC
		-3'

2) 유산균내 단백질 발현 재조합 유전자 제작

가) pBES-AF2 벡터

유산균에서 caGM-CSF를 발현하기 위하여 pBES-AF2 shuttle vector를 사용하였다. pBES-AF2는 7.6kb size로 multicloning site의 *BamHI*과 *KpnI* 제한 효소 부위를 이용하여 cloning 하였다. 먼저 caGMCSF의 양 말단에 두 제한 효소 부위가 삽입된 primer를 이용하여 유전자를 증폭하여 벡터인 pBES-AF2와 ligation하였다.

이렇게 결합된 재조합 유전자의 plasmid DNA를 추출하여 염기서열을 확인하였다. 목적 유전자 삽입이 확인 된 colony를 증균하여 plasmid DNA를 추출하고 유산균과 혼합한 후 electroporator를 이용하여 transformation을 실시하였다.

나) pHAT 벡터

*L. casei*의 세포 구성 성분 하나의 gene과 fusion을 시켜 'delpgsA-caGMCSF'라는 fusion gene을 제작하고 pHAT vector에 ligation 하였다. 이렇게 만들어진 재조합 유전자를 *E. coli*에 transformation한 후 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 erythromycin이 함유된 LB agar에서 16시간 배양하였다. 배양한 LB agar에서 colony 일부를 동정, 배양하여 plasmid DNA를 얻은 후 enzyme digestion, sequencing 등으로 목적 유전자의 삽입 여부를 확인하였다.

목적 유전자 삽입이 확인 된 colony를 증균하여 plasmid DNA를 추출하고 *L. casei*와 혼합한 후 electroporator를 이용하여 transformation을 실시하였다.

나. 개의 GM-CSF 발현 조사

단백질 발현을 알아보기 위하여 재조합 유전자가 삽입된 대장균과 유산균을 각각 배양하고 배지 위에 형성한 colony를 수거하여 Western-blot assay를 통하여 단백질의 발현을 확인하였다.

1) 대장균에서의 발현

대장균과 재조합 유전자 transformants 가운데 목적 유전자 삽입이 확인된 colony를 배양한 후 수거하여 Western-blot assay를 통하여 분석하였다.

2) 유산균에서의 발현

유산균과 재조합 유전자 transformants는 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 erythromycin이 함유된 MRS-agar에 plating한 후 30 $^{\circ}\text{C}$ 의 혐기 상태에서 5일간 배양하였다.

배양 상층액은 ammonium sulfate를 이용하여 침전하였다. 50 mM의 Tris-Cl과 10 mM의 EDTA가 함유된 buffer에 ammonium sulfate ((NH₂)₂ · SO₄)를 넣고 포화시킨 후, 15 ml을 취하여 5 ml의 배양 상층액과 혼합 (75%) 후 단백질이 침전할 수 있도록 실온에서 1시간동안 방치 하였다. 1시간 후 5,000 \times g의 속도에서 30분간 원심을 실시하여 단백질을 수거 한 후 포화 ammonium sulfate를 이용하여 2회 세척하였다. Pellet volume의 두 배의 멸균 증류수를 사용하여 단백질을 재 부유 시키고, 투석을 실시하여 잔류 염을 제거하고 Western-blot assay를 통하여 분석하였다.

4. 돼지의 GM-CSF를 발현하는 유산균 형질 전환체 개발

가. 돼지 GM-CSF의 유산균내 발현

본 실험에서는 435 bp의 nucleotide sequence와 145 amino acid sequence를 가지고 있는 돼지 GM-CSF gene에서 signal sequence를 제외한 394 bp의 nucleotide를 바탕으로 primer를 제작하여 pGM-CSF gene을 증폭하였다 (Table.1).

1) *Bifidobacterium longum*에서의 발현

유산균에서 pGM-CSF를 발현하기 위하여 shuttle vector인 pBES-AF2와 숙주 *Bifidobacterium longum* MG1을 사용하였다. pBES-AF2는 7.6kb size로 multicloning site의 *Bam*HI과 *Eco*RI의 enzyme site를 이용하여 cloning을 실시하였다. 먼저 pGM-CSF의 말단에 두 enzyme site가 삽입된 primer를 이용하여 유전자를 증폭하여 벡터인 pBES-AF2와 ligation하였다. ligate는 유산균에서 발현시키기 전에 *E. coli*에 transformation시켜 단백질 발현 상태를 확인하고, 유산균 숙주인 *Bifidobacterium longum*에 transformation하여 혐기상태에서 배양 후 단백질 발현 여부를 Western-blot assay를 이용하여 확인하였다.

2) *Lactobacillus casei*에서의 발현

증폭한 PCR산물을 template로 하여 *L. casei*의 세포 구성 성분 하나의 gene과 fusion을 시켜 'pgsA-pGM-CSF'라는 fusion gene을 제작하고 pHAT vector에 ligation 하였다. Ligates는 *E. coli*에 transformation한 후 15 μ g/ml의 erythromycin이 함유된 LB agar에 plating하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 배양한 LB agar에서 colony를 취하여 plasmid DNA를 prep한 후 enzyme digestion, sequencing 등으로 target gene의 삽입 여부를 확인하였다.

Target gene이 삽입이 확인된 colony는 증폭하여 plasmid DNA를 prep하여 *L. casei*와 혼합한 후 electroporator를 이용하여 transformation을 실시하였다. Transformants는 30 μ g/ml의 erythromycin이 함유된 MRS-agar에 plating한 후 30°C의 혐기 상태에서 5일간 배양하였다. 배지 위에 형성한 colony를 수거하여 Western-blot assay를 통하여 단백질의 발현을 확인하였다.

Western-blot assay는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 배양한 유산균을 12% polyacrylamide gel에 loading한 후 100volt 전압 하에서 2시간 동안 통전하여 단백질을 분리한 후 nitrocellulose membrane에 15volt의 전압 하에서 20분간 전사하였다. 1차 항체는 goat유래의 anti-pGM-CSF antibody를 1:500의 조건으로 희석하여 사용하였고, 2차 항체로는 AP-conjugated anti-goat antibody를 1:1,000의 희석 배율로 처리하였다. Alkaline-phosphatase를 사용하여 발색 후 단백질의 양상을 관찰하였다.

Table. 1. The sequence of porcine Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating factor

pGM-CSF : 145 amino acid, 435 bp

```

atg tgg ctg cag aac ctg ctt ctc ctg ggc act gtg gtc tgc agc atc
Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile
1      5      10      15
tcc get ccc acc cgc cca ccc agc cct gtc acc cgg ecc tgg cag cat
Ser Ala Pro Thr Arg Pro Pro Ser Pro Val Thr Arg Pro Trp Gln His
20      25      30
gtg gat gcc atc aaa gaa gcc ctg agc ctt cta aac aac agt aat gac
Val Asp Ala Ile Lys Glu Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Asn Asp
35      40      45
aca gcg gct gtg atg aat gaa acc gta gac gtc gtc tgt gaa atg ttt
Thr Ala Ala Val Met Asn Glu Thr Val Asp Val Val Cys Glu Met Phe
50      55      60
gac ccc cag gag ccg aca tgc gtg cag act cgc ctg aac ctg tac aag
Asp Pro Gln Glu Pro Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Asn Leu Tyr Lys
65      70      75      80
cag ggc ctg cgg gcc agc ctc act agg ctc aag agc ccc ttg act ctg
Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Arg Leu Lys Ser Pro Leu Thr Leu
85      90      95
ttg gcc aag cac tat gag cag cac tgc ccc ctc acc gag gaa act tcc
Leu Ala Lys His Tyr Glu Gln His Cys Pro Leu Thr Glu Glu Thr Ser
100     105     110
tgt gaa acc cag tet atc acc ttc aaa agt ttc aaa gac agt ctg aac
Cys Glu Thr Gln Ser Ile Thr Phe Lys Ser Phe Lys Asp Ser Leu Asn
115     120     125
aaa ttt ctt ttt acc atc ccc ttt gac tgc tgg ggg cca gtc aaa aag
Lys Phe Leu Phe Thr Ile Pro Phe Asp Cys Trp Gly Pro Val Lys Lys
130     135     140
taa
Stop

```

나. 돼지 GM-CSF의 발현 양상 연구

배양 시간대별 단백질 발현 양의 변화를 알아보기 위하여 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 erythromycin이 함유된 MRS 배지에 pGM-CSF 유전자가 삽입된 *L. casei*를 접종하고 30°C의 혐기 상태에서 배양하였다. 실험 계획에 따라 시간대별로 샘플을 채취하여 원심분리를 실시하여 바닥의 유산균의 배양 상층 액을 수거하였다.

1) 유산균

원심분리를 통해 수거한 유산균을 멸균 증류수로 부유 시킨 후 Protein Assay를 통해 단백질 농도를 측정하고 동일 농도가 되도록 조정하여 분석에 사용하였다.

2) 배양 상층액

배양 상층액은 ammonium sulfate를 이용하여 침전하였다. 50 mM의 Tris-Cl과 10 mM의 EDTA가 함유된 buffer에 ammonium sulfate ((NH₂)₂ · SO₄)를 넣고 포화시킨 후, 15 ml을 취하여 5 ml의 배양 상층액과 혼합 (75%) 후 단백질이 침전할 수 있도록 실온에서 1시간동안 방치 하였다. 1시간 후 5,000× g의 속도에서 30분간 원심을 실시하여 단백질을 수거 한 후 포화 ammonium sulfate를 이용하여 2회 세척하였다. Pellet volume의 두 배의 멸균 증류수를 사용하여 단백질을 재부유 시키고, 투석을 실시하여 잔류 염을 제거하고 Western-blot assay를 통하여 분석하였다.

다. 세포 표면 발현 확인

1) Confocal Microscope

*Lactobacillus*의 display system을 통해 세포 표면에 pGM-CSF가 발현하는지의 여부를 확인하기 위해 pGM-CSF에 대한 항체와 FITC-conjugated antibody를 이용하여 labelling하고 형광현미경과 confocal 현미경을 이용하여 발현여부를 알아보았다.

pGM-CSF 유전자가 삽입된 *L. casei*와 삽입이 되지 않은 대조 *L. casei*를 30°C의 혐기 상태에서 10시간동안 배양한 후 멸균 PBS(Phosphate Buffered saline)으로 2회 세척하였다. 멸균 PBS를 이용하여 재부유 시킨 후 흡광도를 이용하여 OD₆₀₀=0.2가 되도록 조정 한 후 400μl를 취하여 Cytospin을 이용하여 slide glass 위에 monolayer를 형성하도록 유산균을 흡착 시켰다. 유산균이 흡착된 slide glass는 dry oven에서 10분간 건조 시켜 물기를 제거하고, 4% 중성 포르말린으로 고정을 시켰다. Washing buffer를 이용하여 formalin을 제거하고 3% BSA가 함유된 buffer에 1:50의 비율로 1차 항체를 희석하여 유산균에 처리하고 1시간동안 반응 시켰다. 2차 항체로 FITC가 conjugation되어 있는 항체를 20분간 처리하고 mounting하여 slide를 완성하였다. 형광 현미경하에서 염색결과를 확인하고, confocal microscope를 이용하여 정밀 관찰 하였다. 추가로 Signal 증폭을 위해 2차 항체로 Avidin-streptavidin conjugate된 항체를 사용하여 재차 확인해 보았다.

2) 재조합 단백질 발현 확인

클론들의 단일 집락을 30 μg/ml의 erythromycin이 함유된 MRS medium 50ml에 접종 후 30°C에서 밤새 진탕 배양하여 단백질을 발현 시킨 후 얼음에 30분간 방치하고 3,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 세포들을 모았다. 모은 세포들은 4°C에서 냉각한 20 ml의 TES buffer (0.2 M tris-Cl(pH7.4), 0.5 M sucrose, 0.1 mM EDTA)에 현탁 한 후, 얼음에서 40분간 반응 시킨 다음 4°C에서 10,000rpm으로 10

분간 원심 분리하여 상등액을 periplasm에 존재하는 단백질 용액으로 사용하였다. 모아진 pellet은 20ml의 sonication buffer (50 mM tris-Cl(pH8.0), 250 mM NaCl, Lysozyme(1mg/ml))에 현탁시켜 4°C에서 밤새 반응 시키고 다음 날 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 파괴하고, 4°C에서 10,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻어진 상등액을 세포질의 재조합 단백질 용액으로 사용하였다. 모아진 pellet은 denaturation buffer (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-Cl(pH8.0)) 20 ml에 녹여 4°C에서 하루 밤 반응 시킨 뒤 inclusion form으로 나온 재조합 단백질로 사용하였다. 각 단백질은 Western-blot assay를 이용하여 분석 하였다.

라. *in vitro* 상에서 pGM-CSF의 bio-activity 확인

유산균에서 발견되는 pGM-CSF의 bio-activity를 알아보기 위하여 murine alveolar macrophage cell line인 RAW264.7을 사용하여 activity를 측정하였다.

1) 대장균 유래 재조합 pGM-CSF의 bio-activity 확인

Prokaryotic system에서 발견된 rpGM-CSF가 eukaryotic system에서 bio-activity를 갖는지 유무를 알아보기 위하여 M15(*E. coli*)에서 발견한 rpGM-CSF를 8 M의 urea를 이용하여 정제하였다. 정제된 rpGM-CSF를 re-folding시키기 위해 투석을 실시하여 urea를 제거하였다. RAW264.7은 24well plate에 10⁶ cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 분압 하에서 안정화 시킨 후 re-folding시킨 rpGM-CSF를 10-fold 단계 희석하여 처리하여 주고, 2시간 단위로 상층 액을 수거하였다. 수거한 배양 상층액은 GM-CSF에 의해 alveolar macrophage에서 분비 유도됨이 기 보고된 cytokine중에 하나인 IL-6, TNF- α 에 대해 분비 여부를 측정하였다. 측정은 Mouse ELISA kit (PIERCE, ENDOGEN)를 사용하였다.

2) 유산균 유래 pGM-CSF의 bio-activity 확인

유산균에서 발견되는 rpGM-CSF의 bio-activity를 알아보기 위하여 RAW264.7 cell을 10⁶ cells/well이 되도록 24well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 분압 하에서 안정화 하였다. 유산균과 RAW264.7 cell의 비율이 25:1이 되도록 2.5×10⁷ cfu의 유산균을 처리하고 실험 계획에 따라 4시간마다 원심 분리하여 cell과 배양 상층 액을 수거하였다.

가) Capture-ELISA

배양 상층 액에 분비된 cytokine을 확인하기 위하여 TNF, IL-6, IL-1 β 에 대한 ELISA kit (PIERCE, Endogen, Boston, MA, U.S.A)를 사용하여 분비량을 측정하

였다. 배양 상층액과 표준 단백질을 ELISA plate에 50 μ l씩 분주한 후 실온에 2시간 방치 하였다. 3회에 걸쳐 washing을 실시하고, 각 cytokine에 대해 biotinylation시킨 항체를 처리 한 후, streptavidin-HRP solution과 TMB substrate를 순차적으로 처리하고 450nm와 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

나) RT-PCR

(1) mRNA 분리

원심기로 분리한 세포를 TRIzol Reagent(GIBCOBRL, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 세포벽을 깨기 위해 1 ml의 TRIzol Reagent를 첨가 후 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 실온에서 5분간 방치 후에 chloroform 0.2 ml를 첨가한 후에 15초간 격렬히 흔들어 homogenization을 시켰다. 실온에서 2분간 방치 후 12,000 \times g에서 15분간 원심 분리하여 상층 액만 채취하여 0.5ml의 isopropyl alcohol로 침전을 시켰다. 10분간 incubation을 시킨 후에 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 total RNA를 얻은 후 75% ethanol로 2회 세척 과정을 가진 후에 DEPC 처리한 물에 용해시켰다. 분리된 RNA를 RNase-free DNase로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 잔류 DNA를 제거한 후 다시 TRIzol Reagent를 이용하여 total RNA를 정제하였다.

(2) Single-strand cDNA 제작

RNA추출 과정을 통해 얻은 total RNA를 260nm에서 측정한 후, 5 μ g의 RNA를 Superscript preamplification system (GIBCOBRL, USA)을 이용하여 single-stranded cDNA로 변환 시켰다. RNA농도를 5 μ g으로 보정후 DEPC 처리한 물로 8 μ g을 보정 후에 10 mM dNTP와 Oligo(dt)를 1 μ l 씩 첨가한 후에 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation을 시켰다. 10 \times RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l 그리고 RNase inhibitor 1 μ l를 추가한 후에 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 incubation에 Reverse Transcriptase를 1 μ l씩 추가한 후에 42 $^{\circ}$ C에서 50분간 반응시켰다. 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 효소의 불활화를 시킨 후에 RNase 1 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리하여 잔류 RNA를 제거 하였다.

다) PCR

PCR을 위해 기 발표된 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 nucleotide sequence를 바탕으로 primer를 제작하였다 (Table 2). 이 primer를 이용하여 denaturation 단계는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing 단계는 각 실험 조건에 따라서, extension 단계는 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 조건으로 PCR을 40회를 실시한 후 1.0 % agarose gel에서 전기 영동하고, UV transilluminator하에서 band의 존재 여부를 확인하였다.

Table 2. Oligonucleotide sequence of the primers and PCR conditions

Primers	Oligonucleotide sequence	Annealing condition	Size of amplified product (bp)
IL-1 β	5'- ATG GCA ACT GTT CCT GAA C - 3' 3'- TTA GGA AGA ABA GGA TTC - 5'	45°C, 30sec	810
IL-6	5'- ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA - 3' 3'- CTA GGT TTG CCG AGT AGA TC - 5'	48°C, 30sec	636
TNF- α	5'- ATG AGC ACA GAA AGC ATG A - 3' 3'- TCA CAG AGC AAT GAC TCC - 5'	45°C, 30sec	708

마. *in vivo* 상에서 pGM-CSF의 bio-activity 확인

GM-CSF의 주 기능인 hematopoiesis를 알아보기 위하여 실험동물인 mouse에 pGM-CSF를 접종 후 bio-activity를 확인 하였다. 실험동물로는 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양 받은 6주령 BALB/c 암컷으로서 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity $55 \pm 10\%$ 의 조건이 갖추어진 서울대학교 수의과대학 동물 사육장에서 사육 및 실험을 수행하였다. 실험동물은 4개의 그룹, 각각 5마리로 구성하여 20마리의 마우스를 사용하였고, 음성 대조군으로는 PBS를, 실험 1군은 GM-CSF 유전자가 삽입되지 않은 *L. casei*를, 실험 2군은 유전자가 삽입된 *L. casei*를 구강으로 200 μl 씩 접종하였다. 실험군에 투여한 *L. casei*는 균수가 2×10^7 cfu가 되도록 조정하였으며, 양성 대조군으로는 500 ng/ml의 rpGM-CSF를 복강으로 주사하였다. 접종은 1주일간 오후 4시에 맞추어 매일 실시하였으며 접종 전 체중 변화를 측정하였다.

1) 혈구수 변화 측정

마지막 투여를 마친 다음날 심장을 통해 약 100 μl 의 전혈을 채취하였고, Hema-Vet을 사용하여 혈구수를 측정하였다.

2) Challenge 및 survival rate

채혈 후 회복을 위해 3일간 안정을 취한 후 전 두수에 대해 공격접종을 실시하였다. 회복간 추가적인 접종을 실시하지 않았고, 사용한 균주는 야외 분리 *Salmonella typhimurium*으로서 7주령 BALB/c 암컷에서 72시간 내 Minimum Lethal Dose(MLD)가 4.1×10^5 cfu/ml로서, MLD에 해당하는 균수를 접종하고 72시간 동안 증상을 관찰하였다.

5. GM-CSF가 발현된 유산균주의 안정성 및 *in vitro* 효능 조사

가. 사용한 유산균주

1) 양돈용 유산균주

1차년도 실험에서 경기도 이천의 제일종축과 안성의 농장에서 사육되고 있는 포유자돈, 이유자돈, 육성돈, 성돈, 모돈 총 35두의 돼지의 분변시료에서 분리된 양돈용 유산균주 중에서 내산성, 내담즙성, 항생제내성 등이 우수한 *Bifidobacterium* 18 균주와 항생제 내성 검사로 선발된 *Lactobacillus* 70 균주를 2차년도 실험에 사용하였다.

2) 애완견용 유산균주

애완견용 유산균주를 분리할 목적으로 건강한 포유자견(Suckling), 이유자견(Weaning) 그리고 성견(Adult) 각 10마리씩 총 30마리를 사용하여 1차년도 실험결과 분리된 애완견용 유산균주 *Lactobacillus* 93균주, *Streptococcus* 47균주, 합계 140균주를 대상으로 본 실험을 실시하였다.

나. 장관세포에 대한 부착능력 및 정착성

1) 사용균주와 배양조건

양돈용 및 애완견용 유산균주를 대상으로 Caco-2 cell에 대한 *in vitro* adherence assay를 실시하였다. 사용균주의 정착능을 결정하기 위해 양성 대조균으로는 *Lactococcus lactis* NIAI 527 (L7558, Meiji Ltd., Japan)을, 음성대조균으로 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111 (JCM 1132)을 사용하였다. 이 균주는 0.05% (w/v) L-Cysteine · monohydrochloride · monohydrate를 첨가한 MRS broth (Difco, USA) 5ml에 접종한 후 혐기상태 하에서 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

2) Cell culture

Caco-2 cell은 사람의 결장 선암종에서 유래되는 장관내피세포로서 한국생명공학연구원으로부터 분양받아 사용하였다. Cell은 20% inactivated fecal calf serum (GibcoBRL, USA)과 0.2% penicillin / streptomycin (10,000U/ml, GibcoBRL, USA)를 첨가한 DMEM (Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium, GibcoBRL USA)배지에 계대하여 37°C, CO₂ incubator(95% Air, 5% CO₂)에서 배양하였다. T75 flask (Nunc, USA)에 Caco-2 cell이 monolayer가 형성되었을 때 정착성 실험에 사용하였고 2일에 한번씩 cell 계대를 실시하였다.

3) 유산균의 *In vitro* 장정착능 시험

Caco-2 cell의 농도는 10분간 37°C에서 trypsin으로 cell을 분리시키고, hemocytometer 로 cell의 수를 세어서 계산하였다. 1.0×10^5 cell/ml 의 양을 4-well chamber slide(Nunc, USA)로 계대하고 완전히 monolayer가 형성될 때까지 배양하였다.

Caco-2 cell monolayer가 형성된 4-well chamber slide는 phosphate-buffered saline (PBS: NaCl, 0.8%; K_2HPO_4 , 0.121%; KH_2PO_4 , 0.034%; pH 7.2)으로 2번 세척하였다. 유산균은 PBS 5 ml에 3번 세척한 후 같은 buffer에 부유시켰다. 유산균의 수의 효과를 알아보기 위해서 각각의 well에 접종 전 PBS안의 유산균의 혼탁도 (OD_{610nm})를 측정하였다. 그 다음 DMEM 0.5 ml와 유산균 (0.5 ml; 1.0×10^9 CFU/ml in PBS)을 4-well chamber slide에 첨가하였다. 그 slide를 CO_2 incubator(95% air- 5% CO_2)에서 37°C, 3시간 배양하고 멸균된 PBS로 5번 세척한 후 methanol로 5분간 고정하였다. Chamber를 제거한 후 cell을 Gram염색하여 immersion oil을 떨어뜨리고 광학현미경($\times 1000$)으로 관찰하였다. 유산균의 정착성 정도는 대조균 균주와 비교하여 평가하였다. 10개의 현미경 시야 당 50개의 Caco-2 cell에 정착한 유산균을 계산하여 5개의 Caco-2 cell 당 평균 값을 계산하였다.

Caco-2 cell에 대한 부착능 결정은 control과 비교하여 (-), (+), (++) , (+++)의 결과로 판정하였다. Adherence assay의 *in vitro* 방법은 Fig. 1에 대략적으로 나타내었다.

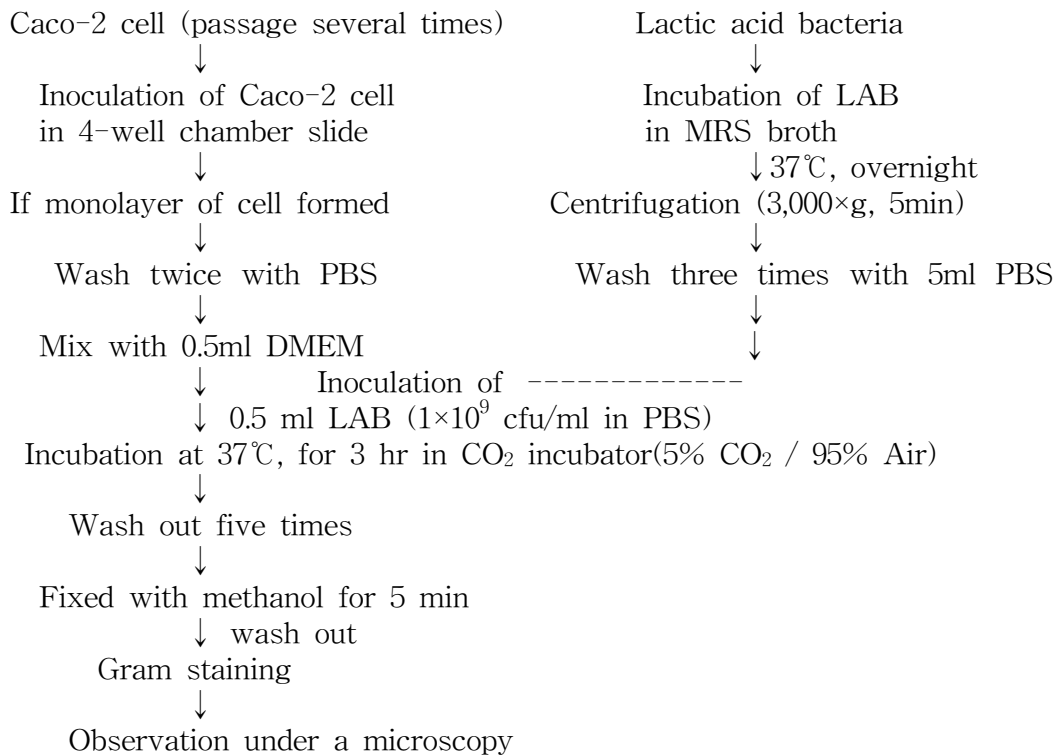


Fig. 1. Schematic diagrams for *in vitro* adherence assay of lactic acid bacteria for probiotic use.

다. 병원성 세균에 대한 길항조사

병원균 억제능을 검사하기 위하여 Flemming 등에 의해 언급된 agar spot assay를 변형하여 사용하였다. 이 방법은 유산균의 대사산물과 복합적 기전에 의해 병원성 세균의 생장이 억제되는 것을 보여주게 된다.

Agar spot assay의 병원균으로는 *E. coli* O157:H7 (USDA, human isolate), *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916이 사용되었다. 병원균을 10 ml의 Brain heart infusion broth (BBL)에 접종하고 37 °C, 24 hr 혐기배양 하였다. 유산균 분리과정에서 분리된 *Bifidobacterium*과 항생제 내성 실험 결과 선발된 *Lactobacillus*를 2 ml의 L-cysteine · MRS broth 에 접종한 후 혐기적 상태로 37 °C, 24 hr 배양하였다. 각 plate마다 음성 대조균을 두어 MRS에 의한 억제 여부도 검사하였다.

일단 유산균을 MRS agar에 2 µl 점적하고 spot이 형성되도록 30 °C, 24 hr 혐기 배양 하였다. 그 후 유산균이 배양된 MRS agar에 7 ml의 BHI agar (0.7%)와 혼합

된 병원균을 pouring하여 30 °C에서 24 hr 혐기적으로 배양한 후 억제환을 측정하였다. Spot 주위로 형성된 억제환의 직경을 mm 단위로 측정함으로써 병원균 억제 정도를 평가하였다.

라. MIDI에 의한 균종의 정확한 identification

*Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 MRS agar plate에서 28°C, 24 hr 혐기배양하고, *Bifidobacterium*은 PYG-Tween 80 medium (Peptone-yeast extract-1% glucose-tween 80)에서 35°C, 48 hr 혐기배양 하였다. 각 균주는 세균의 세포벽 지방산 (CFA, cell wall fatty acid)을 추출하기 위해 reagent로 전처리를 하고 identified with microbial identification system (MIDI, Sherlock system, USA)으로 동정하였다. MIS는 세균의 CFA를 gas chromatography 방법으로 정량적, 정성적으로 분석한 후, MIS Library내의 CFA 조성파 일치하는 정도를 나타내는 SI (similarity index)로 표현한다. SI는 0에서 1사이의 숫자로 표현되는데, 0.5-1.0 와 0.3-0.5는 각각 'excellent match'와 'acceptable match'를 의미한다. SI가 0.3미만일 경우에는 균주의 CFA가 Library에 저장되어 있지 않지만 동정된 결과와 어느 정도 연관성을 갖는 것으로 판정한다. 동정된 균주는 동결건조과정을 거쳐 4°C에 보관하였다.

마. 동결건조 또는 보존후 stability의 유지능력

GM-CSF가 발현된 유산균주의 열에 대한 안정성을 확인하기 위하여 양돈용 선발균주는 70°C, 5 min 및 80°C, 5 min에서의 열에 대한 안정성을 실험하였으며, 애완견용 최종 선발 10균주의 온도에 따른 영향을 확인하기 위하여 50-80°C에서 5분간 노출시킨 후, 열에 대한 안정성을 확인하였다.

또한 skim milk를 사용한 동결건조(freeze dry) 분말의 냉장온도(4°C)에서의 생존성 실험을 동결건조된 최종선발균주를 대상으로 4°C에서의 6개월간 실험적으로 생존력을 확인하여, 향후 가축용 생균제로 개발시 제품의 stability 유지능력을 비교하였다.

6. 개의 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 동물 적용

가. 개 GM-CSF 발현 유산균의 실험 동물 접종 실험

1) 실험 동물

7주령의 어린 Beagle견 18마리 (수컷: 11마리, 암컷: 7마리)를 7주간 실험에 사용

하였으며, 실험 시작 전 구충을 제외한 예방접종 등의 어떤 처치도 실시하지 않았다. 실험견은 무작위로 각 군당 6마리씩 3개의 군으로 분류하였다 (표 1). 대조군은 사료만을 공급하였고, 실험군-1은 유산균, 실험군-2는 개 GM-CSF 발현 유산균을 사료에 첨가하여 주었다. 실험 기간 동안 물과 사료는 떨어지지 않도록 지속적인 공급을 실시하였고, 사료로는 제로니 퍼피 (제일제당)가 사용되었다.

Table 1. 임상 효능 실험군 분류

구 분	대조군	실험군-1	실험군-2
주 령	7주령	7주령	7주령
실 험 기 간	49일(7주)	49일(7주)	49일(7주)
개 체 수	6마리	6마리	6마리

2) 투여 물질

*Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus casei*에 개 GM-CSF를 발현시킨 균을 충북대 수의과대학 세균학실에서 동일하게 1×10^9 cfu/g 의 균수로 fermentation한 후 동결 건조시킨 유산균 생균제를 실험군-1, 2에 각각 하루 1g씩 사료에 첨가하여 투여하였다. 대조군의 경우는 사료만 급여하였다.

3) 체중 변화 조사

각 군의 모든 실험견을 7주 실험기간 동안 일주일에 1회씩 총 8회 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7주) 체중 측정을 실시하였다. 측정은 동일하게 아침 시간에 실시하였으며, 체중계는 Tanita사의 이동식 유아용 체중계 (No. 1584)를 사용하였다.

4) 혈구수 변화 조사

가) 혈액 시료 채취 방법: 혈액 시료는 모든 실험 개체에서 일주일에 1회씩 총 8회(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7주) 채취하였으며, 채취 부위로 jugular vein을 이용하였다. 혈액 은 각 개체당 1 ml씩 채취하여 EDTA 항응고제가 처리된 CBC bottle에 담아 30초 정도 가볍게 흔들어 항응고 처리를 하였다.

나) 혈구수 측정: 채혈 후 항응고 처리한 혈액을 즉시 자동 혈액분석기 (MS9-5V [MELET SCHLOESING, France])를 이용하여 분석을 실시하였다. 분석시에 RBC(red blood cell), MCV(mean corpuscular volume), PCV(packed cell

volume), platelet, Hb(hemoglobin), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), WBC(white blood cell), neutrophil, band neutrophil, segment neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil의 항목을 측정하였다.

5) ELISA를 이용한 Antibody 농도 측정

가) 혈액의 IgA, IgG 측정: 혈액 시료는 모든 실험 개체에서 일주일에 1회씩 총 8회(0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7주) 채취하였으며, 채취 부위로 jugular vein을 이용하였다. 혈액은 각 개체당 1.5 ml씩 채취하여 응고촉진제가 들어있는 vacutainer tube (Beckon Dickinson, USA.)에 옮겨 5분 정도 경과 후 혈액이 굳으면 3500rpm에서 5분간 원심분리를 하여 혈청을 분리하고, 이 분리된 혈청을 eppendorf tube에 옮겨 ELISA 검사를 실시할 때까지 -80°C deepfreezer에 보관하였다.

모든 혈액 시료를 채취한 후, 혈중 IgA와 IgG의 농도를 측정하기 위하여, sandwich ELISA method를 사용하였다. IgA와 IgG의 농도 측정은 상용화된 ELISA quantitation kit (Bethyl laboratories, Montgomery, Tex, USA.)를 이용하였고, 세부실험 방법은 kit의 사용설명서를 따랐다. 먼저 ELISA plate (Nunc, MaxiSorp, Cat. No 445101, Denmark)의 각 well에 측정하고자 하는 항목의 개수에 따라 coating buffer(0.05 M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6) 100 μl 당 capture antibody(Goat anti-dog IgA or IgG) 1 μl 씩을 희석하여 넣고 60분간 incubation을 시켜 antibody를 coating 시켰다. 각 well을 washing solution (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 8.0)을 사용하여 washing 하고, 동일한 과정을 2회 더 실시하였다. washing이 끝난 후에는 각 well에 blocking solution (50 mM tris, 0.14 M NaCl, 1 % Bovine Serum Albumin, pH 8.0) 200 μl 를 첨가하고 30분간 incubation을 실시 하였다. blocking solution은 3회의 washing 과정을 통해 깨끗하게 제거한다. blocking 과정 후, IgA와 IgG를 측정하기 위해 각각 1:10000과 1:100000으로 희석한 혈청 시료를 각 well에 100 μl 씩 첨가하였다. 이 때 IgA와 IgG의 희석비율은 실험 시작 전 동일한 ELISA 방법을 이용하여 예비적으로 4개의 sample을 ELISA plate에 serial dilution하여 얻어진 결과를 통해 결정하였다. 시료를 넣고 60분간 incubation 후 5회 washing을 실시하였다. washing이 끝나면 사용 설명서에 따라 The horseradish peroxidase(HRP) conjugate를 conjugate diluent (50 mM tris, 0.14 M NaCl, 1 % Bovine Serum Albumin, 0.05 % Tween 20, pH 8.0)에 IgA의 측정을 위해 1:10,000, IgG의 측정을 위해 1:50,000으로 각각 희석하고 이 희석액을 각 well에 100 μl 씩 넣었다. 60분간 incubation을 하고 5번 washing을 실시하였다. washing이 끝난 후 각 well에 tetramethylbenzidine (TMB)

substrate solution을 100 μ l씩 첨가하고 발색 반응을 지켜보았다. 30분 후 tetramethylbenzidine (TMB) substrate의 반응을 정지시키기 위해 100 μ l의 2 M H₂SO₄를 첨가하여 과도한 발색 반응을 막았다. 2 M H₂SO₄를 첨가한 후 바로 Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 450nm에서 optical density (O.D.) 값을 측정하였다. 위의 모든 과정은 상온에서 실시하였다.

나) 분변의 IgA, IgG 측정: Immunoglobulin 측정을 위한 분변 시료의 채취는 혈액 채취시와 같이 모든 개체에서 일주일에 1회씩 총 8회 실시했다. 1회 채취시 마다 개체 당 0.5g의 시료를 채취하였고, 분변에서의 IgA와 IgG의 추출은 Peter's method를 따랐다 (Peter et al., 2004). 채취한 분변 시료는 15 ml tube에 옮긴 후, 5 ml의 extraction buffer (Phosphate Buffered Saline [PBS] [0.01 M, pH 7.4], 0.5 % Tween 20, 0.05 % Sodium azide, all from Sigma-Aldrich)를 넣어 homogenization을 실시하였다. homogenization이 완전히 실시한 후 4 °C에서 1500 x g 로 20분간 원심분리를 실시하였다. 얻어진 상층액 중 1 ml을 수거하여 eppendorf tube에 옮기고 10 μ l의 protease inhibitor cocktail (Sigma)을 첨가하였다. 이 시료를 vortexing 후 4 °C에서 10000 x g 로 10분간 원심분리를 실시하고, 새로운 eppendorf tube에 옮겨 ELISA 검사를 실시할 때까지 -80 °C deepfreezer에 보관하였다.

분변의 IgA와 IgG의 농도를 측정하기 위해, 혈액에서와 동일한 sandwich ELISA method를 이용하여 antibody 측정을 실시 하였다. 위의 extraction 과정을 통해 얻어진 분변 시료는 IgA와 IgG의 측정을 위하여 각각 1:1000과 1:100으로 희석하여 실험에 사용하였다.

다) 혈액의 CCV-specific IgG 측정: vaccine 후에 vaccine-specific antibody의 농도 변화를 측정하기 위해, 실험 시작 4주 후에 모든 개체에 canine corona virus (CCV) vaccine을 피하 접종하였다. 혈액 시료는 혈중 IgA와 IgG의 측정을 위해 -80 °C deepfreezer에 보관하고 있는 혈청을 이용하여 실시하였다.

CCV specific IgG는 indirect ELISA method에 따라 실시하였고, coating antigen으로는 killed CCV vaccine (FirstDose[®] CV, Pfizer, USA)을 사용하였다. antigen과 혈액 시료의 희석 비율은 예비적 ELISA 실험을 통하여 각각 1:30과 1:50으로 결정하고 희석하였다. 희석한 antigen을 필요한 수만큼의 well에 100 μ l씩 넣고 60 분간 incubation을 실시하였다. 각 well을 3회 washing을 실시한 후, blocking solution을 200 μ l 첨가하였다. 30분간 incubation을 실시하고 다시 3회의 washing을 실시하였다. 그리고 미리 희석한 혈액 시료를 100 μ l씩 각 well에 넣고 60분동안 incubation을 실시하였다. incubation이 끝난 후 5회의 washing을 실시하였다. conjugate diluent에 1:50000으로 희석한 HRP conjugate 100 μ l를 각 well에 넣고

60분간 incubation 후 5회의 washing 과정을 실시하였다. HRP conjugate와 반응시키기 위해 TMB substrate를 100 μ l 첨가하고 30분간 incubation을 실시하였다. 마지막으로 TMB substrate 반응을 중지시키기 위해 2 M H₂SO₄를 100 μ l 첨가하고 Microplate Reader를 이용하여 450nm에서 optical density (O.D.) 값을 측정하였다. 위의 모든 과정은 상온에서 실시하였다.

5) 실험 설계

이번 실험의 전체적 시간 계획은 다음 그림으로 쉽게 설명하였다 (그림 1).

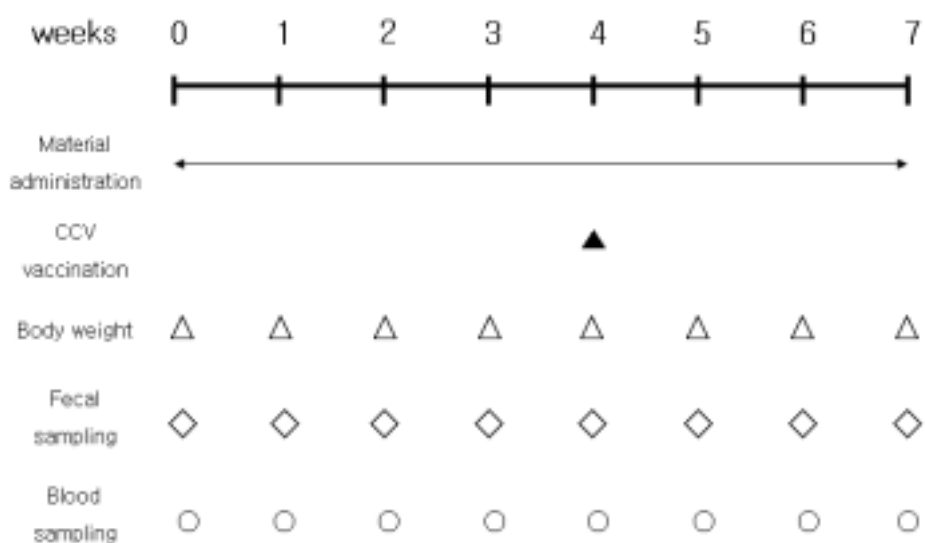


Figure 1. Summary of experimental protocol.

나. 개 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 대단위 개 농장 접종 실험

1) 개 농장 선정과 사육 환경

야외 농장에서 사육하고 있는 다수의 개들에 대한 개 GM-CSF 발현 유산균의 효능을 평가하기 위하여 경기 지역의 한 개 농장이 선택되었으며, 이 농장에서는 50마리 이상의 임신견을 보유하고 있었다. 임신견들은 각각 cage에 나누어 사육하였고, 출산 후 6주간은 새끼들과 같이 사육하였다. 6주 후 동배 새끼들은 새로운 cage에 옮겨 모견과 분리하여 사육하였다. 모견은 하루 일회 쌀, 생선, 치즈를 혼합한 사료를 급여 하였으며, 새끼들은 생후 6주후부터 동일한 사료를 급여하였다.

2)군 분류

분만 2주 전의 임신견 15마리를 선발하여 5마리씩 세 군으로 분류하였다. 대조군은 사료만을 급여하였고, 실험군 1은 1×10^9 colony forming unit(cfu)의 *L. casei* 군 분말을 첨가한 사료를 급여하였고, 실험군 2는 1×10^9 cfu의 개 GM-CSF를 발현하는 *L. casei* 군 분말을 첨가한 사료를 급여하였다. 위의 식이는 6주간 공급하였다.

3)자견의 군 분류

분만 후 새끼들은 모견이 속한 군에 포함하여 실험을 진행하였다. 각 분말 군의 첨가는 생후 5주부터 실시하였다.

4)자견의 폐사율 조사

매일 아침 사료 투여와 함께 각 군별 자견의 폐사 유무를 확인하였고, 폐사한 자견 발견 시 cage 앞에 부착한 점검표에 폐사 일자와 개체 번호를 표시하였다.

5)자견의 체중 변화 조사

각 군의 모든 자견들을 대상으로 생후 2, 4, 6, 8, 10주에 체중 측정을 실시하였다. 체중의 증가율은 모견에 따라 분만한 자견의 체중에 차이가 많고 또한 동배의 자견 개체수가 적은 새끼들의 성장이 더 빠른 차이를 보이는 등의 변수가 많아 각 군별 개체의 평균을 구하여 체중 증가율을 비교하는 것은 의미가 없다고 판단하여, 단순 회귀 분석을 이용하여 체중 변화를 비교 평가 하였다.

6)혈액학적 변화 조사

혈액에서 granulocyte와 monocyte의 수치 변화를 확인하기 위해 모견과 자견에서 모두 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액 검사시 각각 혈액 1ml을 채혈하여 EDTA로 항응고처리한 tube에 옮겨 검사 전까지 보관하였다. 각 군의 모든 모견은 분만 2주전과 분만 후 1, 4주에 채혈하여 혈액학적 검사를 실시하였고, 자견은 군별로 10마리씩을 무작위로 선택하여, 매회 30마리의 자견을 생후 4, 8, 12주에 채혈하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사는 Cell Counter Analyzer MS9-5V(MELET SCHILOESING LABORATORIES, France) 기종을 사용하여 측정하였다.

7)항체가 변화 조사

항체가의 측정은 각 군에서 무작위로 선별된 자견 10마리를 대상으로 실시하였

다. 항체가 canine distemper virus(CDV)와 canine parvo virus(CPV)의 항목을 측정하였다. 항체의 측정을 위하여 CPV 백신은 생후 3, 5주에 CDV 백신은 7, 9주에 1, 2차 접종을 실시하였고, 백신 접종 전에 CDV detection kit (RapiGEN, Korea)와 CPV detection kit (RapiGEN, Korea)를 사용하여 두 바이러스에 감염되지 않았음을 확인하였다. 선별된 30마리 자견에서 생후 4, 8, 12주에 각각 2ml의 혈액을 채혈하여 항체가 측정을 위한 시료로 사용하였다. 혈액은 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 1ml의 혈청을 분리하였다.

가)CDV 항체가 측정: serum neutralization test를 이용하였다. 채취한 혈청을 56°C에서 30분간 inactivation 실시 후, 각각 시료당 3개의 well에 50 μ l씩 분주하였다.

추가적으로 역가를 미리 알고 있는 양성 혈청과 음성 혈청을 대조 혈청으로 분주하였다. 모든 well에 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액을 50 μ l씩 분주한 후 첫 well부터 50 μ l씩 2배 희석을 실시하였다. stock virus를 DMEM 배양액으로 200 TCID₅₀/100 μ l가 되도록 희석하였다. 각 검사 혈청당 2줄의 well에 희석된 CDV를 50 μ l씩 가하고, 나머지 한줄의 well에는 바이러스 대신에 DMEM을 50 μ l씩 가했다. 희석된 바이러스를 3단계로 10배 희석하여 Back titration을 실시한 다음 37°C CO₂ incubator에서 1시간 반응 시켰다. 10%의 fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 배양배지에 wero cell을 2 x 10⁵ cells/100 μ l 정도 되도록 현탁하여 microplate의 모든 well에 100 μ l씩 넣었다. 37°C CO₂ incubator에서 3-7일간 배양 후 CPE를 관찰하고 기록하였다.

나)CPV 항체가 측정: hemagglutination inhibition test를 이용하였다. 채취한 혈청을 56°C에서 30분간 inactivation 실시 후, 혈청 시료를 2개의 well에 각각 25 μ l씩 넣었다. 두 번째 well부터 12번째 well까지 Sorensen Buffer를 25 μ l씩 넣고, 2번째 well에서 11번째 well까지 2배 희석하였다. 8HAU의 CPV HA용 항원 또는 바이러스를 25 μ l씩 첫 번째 well부터 11번째 well까지 넣었다. 12번째 well에는 Sorensen Buffer 25 μ l를 첨가하였다. CPV 양성 및 음성 혈청을 대조군으로 사용하였으며, Back titration을 실시하였다. 랩으로 짜서 실온 또는 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 0.7% 돼지 RBC(0.2% BSA in PBS)를 50 μ l씩 가했다. 실온에서 2시간 방치 후 응집이 억제된 최소 희석배수의 역수를 역가로 계산하였다.

Table 1. 실험 일정 정리

구 분		실험 기간(주)														
		-2	-1	0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
유산균 투여	모건															
	자견															
체중 측정	모건															
	자견															
혈액 채취	모건															
	자견															
백신 접종 (자견)	CPV						1차 접종	2차 접종								
	CD V									1차 접종	2차 접종					

* the day of parturition

7. 유산균 형질 전환체 임상 실험 및 백신 운반체 개발

가. 돼지 GM-CSF 발현 유산균 생균제에 의한 질병 방제 효과 실험

1) 실험 동물

이유후 (21일령) 암수 자돈 80마리(20마리 X 4돈방 = 80마리)를 70일령까지 49일 (7주)간 사육하며 실험에 사용하였다. 실험군과 대조군은 표 1과 같이 구분하였다.

Table1. 임상 효능 실험군

구 분	시험구 -1	시험구 - 2	대조구 - 1	대조구 - 2
일 령	21-70일령	21-70일령	21-70일령	21-70일령
실 험 기 간	49일 (7주)	49일 (7주)	49일 (7주)	49일 (7주)
마 리 수	20	20	20	20

2) 투여 물질

Fermentation하여 분말 건조된 pGM-CSF 유산균 생균제로서 1×10^9 cfu/g의 균수로서, 시험 군에 사료 ton당 5.0kg(0.5%)의 용도로 일반 시판 사료 (분말사료)에 첨가 하여 투여하였다. 대조군의 경우는 분말사료만 급여하였다.

3) 질병 발생률 조사

GM-CSF를 발현하는 유산균 생균제를 투여하는 기간 동안 질병 발생 변화 추이를 조사하였다. 매일 일정한 시간에 한 돈방 당 10~15분간 돼지의 상태를 관찰하여 개체의 배변 상태 및 재채기등 호흡기 증상의 발현 여부를 관찰 기록하였다.

임상 증상의 기준은 표 2와 같으며, 임상 증상의 발현 정도는 설사 및 재채기의 정도에 따라서 0 (무증상)에서 5 (증상 심화에 의한 폐사)까지의 6단계로 나누어서 기록 하였다.(표 3.)

Table 2. 임상 증상 조사 기록표

Grades	소화기 증상	호흡기 증상
0	No clinical sign	No clinical signs
1	Soft feces, Off feed	Sneezing, Off feed
2	Diarrhea (little watery)	Coughing
3	Diarrhea with severe watery	Severe coughing or Dyspnea
4	Down, Unable to rise	Down, Unable to rise
5	Death	Death

Table 3. 임상 증상 점검표

구분	시 험 날 자 (Day)																비 고		
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16	
대 지 번 호	1																		
	2				s	s													
	3																		
	4						s	s	s					s	s				
	5																		
	6		s	s	s	s								s	s	s			
	7				s	s													
	8					s	s												
	9						s												
	10																		
총계	0	1	1	3	4	3	1	1	0	0	0	2	2	1	0	0	0		

S : Coughing with grade 2, Empty indicates grade 0

4) 혈액학적 변화 조사

가) Differential Count

(1) 채혈 시기 및 방법 : 채혈은 총 4회로 실험전, 유산균 생균제 투여 1주후, 4주 후 그리고 7주후에 anterior vena cava를 통해서 그룹당 5마리, 총 20두에서 실시하였다. 약 7ml을 채혈하여 2ml을 항응고 처리된 CBC bottle에 담아 5분간 가볍게 흔들어 항응고 처리하였다.

(2) 혈구 Count용 Slide 제작

항응고 처리된 혈액을 멸균된 Wood-stick을 이용하여 소량을 glass slide위에 떨어 뜨려렸다. 다른 slide를 이용하여 도말한 후, 100% absolute methanol에 10초 가량 담가 고정하였다. 고정된 slide는 Diff-quick staining solution®에 담가 염색 한 후 광학 현미경하에서 100개의 혈구중 각 혈구에 대한 숫자를 세었다.

(3) 총 백혈구수 측정

채혈 후 항응고 처리한 혈액을 채혈 4시간전에 자동혈액분석기 (SEAC h5m)를 이용하여 총 혈구수, MCV, Hb, RBC, PCV등을 측정하였다.

(4) 혈구수 분석

자동 혈액 분석기를 이용하여 나온 총 백혈구수와 slide-count한 100개의 백혈구수의 비율을 이용하여 각 혈구수를 계산하여, 각 군의 혈중 혈구수의 변화를 비교 분석하였다.

나) 혈청학적 검사

(1) 혈청분리

채혈 후 남은 5ml을 4℃ 냉장상태에서 밤새 보관하였다가 원심기를 이용하여 혈구와 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청을 따로 분리하여 -20℃에 보관하였다가 다른 실험에 사용하였다.

(2) 혈청중 GM-CSF에 대한 항체가 검사

GM-CSF를 발현하는 유산균 생균제 섭취후 Septicemia나 생균제 자체 감염 여부를 알아보기 위하여 *E. coli*에서 재조합한 rpGM-CSF를 항원으로 하여 ELISA기법을 이용하여 항체를 조사하였다. rpGM-CSF를 coating buffer로 희석하여 2µg/ml의 농도가 되도록 조정 한 후에 각 well에 100µl씩 분주한 후에 4℃에서 18시간 정지한 후 Tween-PBS(0.005% Tween20 in PBS) 용액으로 3회 이상 세척하였다. 1% BSA가 포함된 Tween-PBS로 blocking시켜 37℃에 1시간 동안 방치한 후에 다시 3회 이상 세척하였다. 1차 항체로 돼지 serum을 200:1의 비율로 희석하여 처리하였다.

돼지 혈청중 IgG에 대한 항체를 알아보기 위하여 Horseradish peroxidase-conjugated goat-anti pig IgG(Bio-Rad)를 2,000:1의 희석 배율로 1시간 동안 반응시킨 다음 세척하였다. substrate로는 2,2' - azino - bis - 3 - ethylbenz - thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 용액을 100µl씩 가하고 실온에서 30분 경과 후 stop solution(0.5M HCl)을 50µl씩 분주한 후에 405nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

돼지 혈청중 IgM에 대한 항체를 알아보기 위해서 alkaline-phosphatase conjugated goat anti-pig IgM (BETHYL)을 200:1의 희석 배율로 1시간동안 반응시킨 다음 washing buffer를 이용하여 세척하였다. Alkaline phosphatase substrate kit(BIO-RAD)를 이용하여 발색시킨 후 405nm의 파장에서 흡광도를 측정

하였다.

나. 돼지 *Lactobacillus* spp에서 유래한 plasmid를 이용한 shuttle vector 제작

1) 후보 균주 및 plasmid DNA 선별

돼지 장관유래 유산균들중에 장관세포에 대한 부착능력 및 정착성, 병원성 세균에 대한 길항 효과, 내산성 및 내담즙성 그리고 동결건조 도는 보존 후 stability 유지 능력이 우수한 *Lactobacillus* spp.를 선택하여 shuttle vector로 사용 가능한 plasmid DNA를 보유한 균주를 선별하였다.

선택한 야외 분리 *Lactobacillus* spp. 49개 균주를 MRS medium에서 30℃, 혐기의 조건으로 24시간 배양한 후, Daniel et al. (1983)의 방법을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 방법은 아래의 표와 같다. (표 4.)

2) *Lactobacillus* spp.의 동정

선별된 10개 균주를 알아보기 위하여 아래와 같은 방법으로 동정을 실시 하였다.

가) API CH50L kit를 이용한 생화학, 생리적 특성 검사

49종의 탄수화물의 발효패턴을 확인하여 세균을 동정하였다.

(1) 균체의 준비

동결보존된 10개의 균주를 MRS broth에서 2회 이상 30℃에서 배양하였다. 균주가 순수 배양 되었는지를 확인하기 위하여 MRS agar에서 다시 24시간 동안 배양한 후 콜로니의 모양을 관찰하였다.

(2) 스트립 준비

Incubation box를 준비하고 증류수 10ml을 tray에 넣어서 수분을 유지하도록 하였다. Tray 끝에 균주의 정보를 기록한 후, 스트립을 tray위에 올려 놓았다.

(3) 접종액 준비

Suspension medium 앰플을 개봉하고 면봉을 이용하여 탁도가 매우 높은 현탁액을 준비했다. 다음 suspension medium 5ml에 준비된 균액을 몇 방울 떨어뜨려 탁도가 McFarland 2가 되도록 맞추었다.

(4) 스트립 접종

API 50 CHL 배지에 준비된 균을 스트립의 튜브에 분주하고 30℃에서 48시간 동

안 호기적으로 배양하였다.

(5) 결과 판독

산이 형성되어 배지에 포함되어 있는 bromocresol purple 지시약에 의해 배지가 노란색으로 변하게 되면 양성으로 판독하였다. Tube No.25의 Esculin test는 보라색에서 검은색으로 변하면 양성으로 판독하였다.

나) 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정

모든 미생물들이 가지고 있는 16S rRNA 유전자 (≈1,500 bp)를 증폭시켜 염기서열을 분석하여 ATCC 표준 균주들의 16S rRNA와 비교하였다.

(1) 균체의 준비 및 genomic DNA 분리

선별된 10개의 균주를 30℃에서 24시간 이상 배양한 후 4,500rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 수집하였다. 모아진 균들은 Genomic DNA purification kit (Promega)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

Table 4. *Lactobacillus* spp. mini prep method

	O/N culture	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Pellet	
<u>Step 1</u>	Resuspend pellet in 25% sucrose containing 30mg/ml lysozyme, to a final volume of 200 μ l. Transfer to tube	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Incubate 37°C for 15min	
<u>Step 2</u>	Add 400 μ l of alkaline SDS solution	3% SDS 0.2N NaOH
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Mix immediately Incubate 7min (R.T.)	
<u>Step 3</u>	Add 300 μ l of ice-cold 3M sodium acetate (pH4.8)	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Mix immediately & Spin max speed, 15min (4°C)	
<u>Step 4-1</u>	Transfer supernatant to new tube and spin max speed, 10min	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<u>Step 4-2</u>	Transfer supernatant to new tube and add 650 μ l of isopropanol (R/T)	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<u>Step 5-1</u>	Remove all liquid and resuspend pellet in 320 μ l sdH ₂ O completely.	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<u>Step 5-2</u>	Add 200 μ l of 7.5M ammonium acetate containing 0.5mg/ml ethidium bromide	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<u>Step 5-3</u>	Add 350 μ l phenol/chloroform	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Mix well & Spin max speed 5mins (R/T)	
<u>Step 6</u>	Transfer upper phase to new tube and add 1ml ethanol (-20°C)	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Mix well & Spin max speed 15min (4°C)	
<u>Step 7</u>	Wash pellet in 70% ethanol (R/T) Remove all liquid & resuspend in 40 μ l TER	TE+RNase 0.1mg/ml

(2) PCR 증폭 및 DNA sequencing

분리한 genomic DNA를 template DNA로 하여 16S rRNA를 증폭하였다. Primer는 Lane (1991년) 등이 작성한 27f, 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'와 1492r, 5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'을 이용하였다. PCR조건은 denaturation으로 92°C에서 30초, annealing은 55°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분간 25회 반복 실시하였으며, 72°C에서 10분간 termination을 실시하였다. 전기영동 상에서 증폭된 ≈1400bp의 밴드를 확인 한 후 gel extraction kit (QIAGEN)을 이용하여 분리 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 sequencing 의뢰 (Macrogen co.)하여 염기서열을 확인하였다.

(3) 염기 서열 분석

분석된 염기서열은 Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용해 분석하였고, Megalign program을 이용하여 phyogenetic tree를 작성한 후 다른 *Lactobacillus* spp.들과의 근연관계를 확인하였다.

다) *Lactobacillus* spp.의 특성 조사

선별된 균주의 유전적 및 생화학적 특징을 분석하기 위해 아래와 같은 실험을 실시 하였다.

(1) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Random primer를 이용하여 PCR로 생산된 DNA 패턴을 분석하였다. 즉, 무작위로 합성된 짧은 DNA 단편을 이용한 PCR로 증폭된 DNA 단편의 패턴을 비교 분석하였다.

(가) Chromosomal DNA 분리

유산균을 MRS 배지에서 24시간 배양하여 균체를 모았다. PBS로 1회 세척 한 후 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, pH 8.0, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 100µg/ml protease K, 10 U mutanolysin)를 600µl 첨가하여 37°C에서 2시간 반응하였다. 5M NaCl을 100µl와 CTAB solution (Cetyltrimethyl ammonium bromide, 10% w/v in 0.7M NaCl) 80µl를 첨가하여 65°C에서 10분간 처리 한 후, 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액과 동량의 chloroform : isoamyl alcohol (=24:1)을 첨가하여 DNA를 추출하였다. Isopropanol을 넣고 실온에서 30분간 방치시켜 DNA를 침전시킨 후, 70% (v/v) ethanol로 세척하여 TE buffer에 녹여 준비하였다.

(나) RAPD

Random primer 5, 5'-AACGCGCAAC-3'와 random primer 6, 5'-CCCGTCAGCA-3'를 사용하여 DNA를 증폭하였다. PCR반응은 240 uM dNTPs, 5 U Tag polymerase, 20 pmol primers, 20ng DNA의 조성으로 최종 25 μ l의 양으로 수행 하였다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 34 $^{\circ}$ C에서 5분, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기4회 연속 실시하였다. 다시 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 34 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 30회 실시하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지시켜 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR산물은 1.5%agarose gel에서 1시간 전기영동한 후 DNA단편의 양상을 관찰하였다.

(다) Phyogenetic tree

전기 영동상의 DNA 단편의 패턴을 Quantity One $\text{\textcircled{R}}$ program을 이용하여 각 균주간의 특성상의 차이를 비교 분석하였다.

(2) 디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 시험

(가) 멸균한 면봉을 배양용기 내벽에 돌리면서 눌러 과량의 배양액을 제거한 후 MRS(DeMan-Rogasa-Sharpe) 평판 배지에 골고루 도말하였다.

(나) 약 5분간 방치하여 평판을 말렸다.

(다) 핀셋을 에탄올에 담근 후 꺼내어 과량의 알콜을 태워버린 후 잠시 핀셋을 식혔다가 항생제 평원판을 얹었다. 평원판을 살짝 눌러 완전히 배지 표면에 밀착시켰다.

(라) 동일한 방법으로 나머지 평원판도 올려 놓되 너무 가장자리에 치우치지 않도록 일정 간격으로 놓았다.

(마) 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 호기적으로 배양한 후 성장 억제환의 지름의 크기를 측정하였다.

(3) ZYM test를 이용한 각종 효소 활성 검사
미생물의 19가지 효소 활성을 검사하였다.

(가) 검체의 준비

Suspension medium (2ml), 증류수 또는 등장액에 균을 풀어 McFarland 5~6으로

탁도를 맞추었다. 사면배지나 액체 배양 후 원심분리로 수거한 균체 균액을 준비하였다.

(나) 스트립의 준비

Incubation box를 준비하고 증류수를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 하였다. Tray의 끝에 균주의 정보를 기록하고 스트립을 tray위에 올려놓았다.

(다) 스트립의 배양

a에서 준비된 균액을 스트립의 튜브에 분주하고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 시간과 온도는 실험하고자 하는 대상에 따라 다양하게 나올 수 있으므로 배양시간을 상황에 따라 변화시켜 주었다.

(라) 스트립 판독 및 기록

ZYM A와 ZYM B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨렸다. 5분간 기다린 후 10cm의 거리에서 강력한 빛 (100W bulb)를 10초간 쬐인 후 결과를 판독하였다. 판독한 결과는 결과지에 기록하였다.

(4) 안전성 검사

49개 균주 중 plasmid DNA 존재 유무가 확인된 10개 균주를 대상으로 안전성 검사를 실시하였다.

(가) 용혈 현상 검사

선별된 *Lactobacillus* spp.에 의해 적혈구가 파괴되는 용혈현상을 확인하기 위하여 sheep blood agar에 *Lactobacillus*를 접종하고 30℃에서 24시간 혐기 상태로 배양하였다. 용혈여부와 종류를 관찰하여 기록하였다.

(나) 유해 대사 산물 생산 검사

① 암모니아 생성 확인

균체에 Urease에 의해 urea로부터 과량의 암모니아가 생성 유도될 가능성이 있는지를 알아보기 위하여 phenol red가 함유된 urea agar를 준비하였다. Urea agar에 균체를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양 한 후 배지의 색을 확인하여 urease 존재 여부를 확인 하였다.

② 인돌 생성 확인

트립토판나아제에 의해 트립토판이 인돌로 분해되는 것을 알아보기 위하여 Tryptophan이 함유된 배지를 준비하고, 균을 접종 한 후 18시간 정도 배양하였다. Kovac's reagent를 5방울 정도 떨어트린 후 색의 변화를 관찰 하였다.

③ 페닐알라닌 탈아민 생성 확인

페놀성 물질을 생성하여 발암과 상관관계가 있는 것으로 알려진 phenylalaninase의 존재 여부를 알아보기 위하여 phenylalanine agar를 준비한 후 균을 접종하고 24시간동안 배양하였다. 5~10방울의 10% ferric chloride를 사면 배지위로 흘러내리게 한 후 1~5분 안에 색의 변화를 관찰하였다.

(5) 후보 plasmid DNA 선정, cloning 및 sequencing

(가) Plasmid DNA Cloning

① 후보 plasmid DNA 선정 및 제한 효소 profile

Plasmid DNA가 분리된 10개 균주 중에서 가장 많이 양의 plasmid DNA를 발현하는 균주를 선별하여 약 7kb의 plasmid DNA를 분리 및 후보 plasmid로 선정하였다. *E. coli* vector에서 cloning하기 위하여 pQE30Xa (QIAGEN co.)vector의 multicloning site에 사용된 제한 효소들을 이용하여 제한 효소 profile을 작성하였다.

② Cloning

후보 plasmid DNA를 0.7% agarose상에서 전기영동한 후 gel extraction kit을 이용하여 후보 plasmid DNA를 분리 정제하였다. pQE30Xa와 후보 plasmid DNA를 제한효소인 *salI*으로 처리 하였고, pQE30Xa의 경우 self-ligation을 막기 위하여 dephosphorylation하였다. 22℃에서 4시간 동안 ligation한 후 competent *E. coli* (DH5α)에 heat-shock 법을 이용하여 transformation하였다. 50μg/ml의 ampicillin이 함유된 LB agar에 plating한 후 배양 하여 colony를 취하여 cloning 여부를 확인하였다.

③ Sequencing and Confirmation

Cloning이 확인된 colony는 선별하여 plasmid DNA를 뽑아 sequencing을 하였다. 얻은 sequence을 이용하여 primer를 제작한 후 genomic DNA와 plasmid DNA를 template로 하여 PCR을 실시하여 DNA의 기원을 확인하였다.

④ Shuttle vector construction

cloning이 확인된 plasmid DNA는 full-length sequence를 실시하여 plasmid DNA의 특성을 분석한 후 shuttle vector제작에 사용하였다.

8. GM-CSF가 발현된 유산균주의 임상학적 효능실험

가. 이유자돈을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 야외 효능실험

1) 시험동물 및 효능실험 방법

GM-CSF 발현 생균제의 야외 효능실험을 위한 양돈장은 충북 진천군에 위치한 유전자원(주) 양돈단지내의 돈사를 임대하여 실시하였으며, 일반적인 사육관리는 유전자원(주) 양돈장의 일반적인 방법에 따라 실시하였다.

시험기간은 생후 21일령부터 생후 69일령까지의 이유자돈을 사용하여 총 48일간(7주간) 진행되었다. 효능실험에 사용한 시험두수는 총 106마리로서, 모두 1차 효능실험(Experiment-1) 및 2차 효능실험(Experiment-2)으로 나누어 진행되었다. 1차 효능실험은 투여군(Treatment-1) 27마리, 대조군(Contro-1) 27마리, 합계 54마리로 진행되었으며, 2차실험은 투여군(Treatment-2), 대조군(Contro-2), 각각 26마리, 합계 52마리로 진행되었다.

GM-CSF 발현 시험생균제(1.0×10^9 cfu/g)의 투여용량은 양돈장에서 일령에 맞게 급여하는 일반 양돈용 시판사료(분말사료)에 사료 t당 5.0kg(0.5%) 용량으로 첨가하여 실험에 사용하였다.

2) 시험생균제의 제조방법

가) 사용균주

동결건조 원말 제조용 균주인 *Lactobacillus casei* GM-CSF는 실험기간 동안 항생제(erythromycin in ethyl alcohol)가 30ug/ml 농도로 첨가된 MRS 한천배지 또는 액체배지를 사용하여 37°C, 1-2일간 배양하였으며, 현장에서의 대량배양을 위해서는 상기 배지에서 2회 이상 계대배양하였다. 장기보관은 5% glycerol과 5% skim milk를 사용하여 -70°C에서 보관하였다.

나) 대량배양 생산법

L. casei GM-CSF의 대량배양은 100L 발효기(KOBIOTECH, KOREA)에 리터당 30g glucose, 10g yeast extract, 20g soy peptone, 1g K_2HPO_4 , 1g sodium acetate,

0.1g MgSO₄, 0.05g MnSO₄이 포함된 배지 속에 1L MRS broth(항생제 포함)에서 하룻밤 동안 배양된 종균을 접종하고, 37°C에서 30rpm으로 교반하면서 20시간 동안 배양하였다. 이때에도 접종 후, erythromycin을 30ug/ml의 농도로 첨가하였으며, 10시간 배양 후 다시 한번 15ug/ml의 농도로 항생제를 첨가하여 배양하였다.

다) 동결건조 원말 제조

배양 완료된 배양물은 연속식 원심분리기(LS-105, 세종과학)를 이용하여 균체를 회수하였으며, 수거된 균체는 즉시 동결보호제(skim milk, lactose 등)와 혼합한 다음, 트레이(tray)에 담아 -70°C에서 1-2일간 동결하였다. 동결건조는 일신랩 동결건조기(PVTFD50R)의 일상적인 manual에 따라 실시하였으며, condenser 온도가 -70°C 이하로 떨어지는 것을 확인한 후 동결된 균체를 넣고 진공을 걸어 30°C로 고정된 뒤 72시간 동안 실시하였다.

라) 사료첨가 생균제 시제품 제조

L. casei GM-CSF 동결건조 원말의 생균수는 배지별로 각각 7.0×10^{11} cfu/g (MRS + erythromycin), 1.2×10^{12} cfu/g(MRS)로 확인되었으나, 실험 목적상 항생제가 첨가된 배지에서 확인된 균수를 이용하여 제품을 제조하였다. 즉, 시제품의 최종균주 농도를 7.0×10^{11} cfu/g에서 1.0×10^9 cfu/g로 희석하였으며, 이 때 부형제로는 포도당과 말토덱스트린을 사용하였다. 제조한 시제품은 QC를 실시하여 최종생균수(> 1.0×10^9 cfu/g)를 확인하였으며, 알루미늄 포장지를 이용하여 1kg씩 포장한 다음, 실험에 사용할 때 까지 냉장 보관하였다.

3) 효능시험 측정항목

가) 체중 측정

본 실험에서는 개체별로 체중측정을 실시하고, 이어택(ear tag)을 부착하여 개체 식별이 가능하도록 하였다. 체중측정은 개시체중(21일령), 중간체중(48일령), 종료체중(69일령)의 3회를 측정하여 일당증체량을 계산하였다.

나) 총사료섭취량 (Total feed intake) 측정

사료섭취량의 측정은 개체별 섭취량의 측정이 불가능하므로, 개체체중 측정시 각 돈방 별로 사료섭취량을 계산하였다. 사료잔량은 매일 비닐 봉투에 수거하여 무게를 측정하였다. 자돈사에서 사료급여는 매일 사료량을 측정 후, 급이기에 공급하며, 시험 종료 시 자돈사 급이기의 잔량을 수거하여 측정하였다.

다) 일당증체량 (Average daily gain)의 측정

일당증체량(Average dairy gain)은 종료체중에서 개시체중을 뺀 것을 시험일수와 시험두수로 나누어 계산하였다.

라) 사료요구율(Feed conversion)의 측정

본 실험에서의 사료요구율(Feed conversion)은 시험기간 중의 총사료섭취량(Total feed intake)을 총증체량(Total weight gain)으로 나누어 계산하였다.

마) 장내세균총 검색

(1) 장내세균총 검색용 배지

본 실험에 사용한 장내세균총 검색배지로는 *Enterobacteriaceae*선택배지(DHL), *Staphylococcus* 선택배지(PEES), *Streptococcus* 선택배지(TATAC), *Lactobacillus* 선택배지(LBS), *Bifidobacterium* 선택배지(BS), *Clostridium* 선택배지(NN)와 비선택배지인 TS, EG, BL의 총 9종류의 배지를 사용하였다⁸.

(2) 분변 채취 방법 및 수송배지

실험개시 전일, 실험중간, 시험종료일의 3회에 걸쳐 분변을 채취하며, 채취방법은 신선한 분변을 즉시 채취하여 무게를 알고 있는 Brain Heart Infusion(BHI) 수송배지에 넣고, 완전한 혐기적 상태에서 냉장 후, 실험실로 신속하게 수송, 검색에 사용하였다⁸.

(3) 장내세균총 검색 방법과 배양

실험실로 운반된 BHI 수송배지의 무게를 측정, 분변의 무게를 측정하고, 희석액 A에 10배 단계 희석하였다. 각 사용배지를 4등분하여, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} 희석액을 0.05 ml씩 무균적으로 접종하고, TS, EG, BL은 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 으로 접종하였다. 접종 후 DHL, PEES, TATAC, TS 배지는 37°C, 24시간 호기 배양하며, LBS, BS, NN, EG, BL 배지는 37°C, 48시간 동안 Steel wool method에 의한 혐기 배양을 실시하였다¹⁰.

배양 후에 각각의 비선택, 선택배지에서 배양된 Colony의 형태를 파악한 후 균수를 측정하고, 백금이로 colony를 띄어내 slide glass에 도말한 후 Gram stain을 실시해서 현미경으로 관찰하고 균균을 확인하였다.

나. 이유자견 및 모견을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 야의 효능실험

1) 시험동물 및 효능실험 방법

강아지에서 GM-CSF 발현 유산균의 효능을 확인하기 위하여 총 2회의 효능실험을 실시하였다. 먼저 총 17마리의 이유자견(Beagle dog)을 대상으로 한 효능실험이었으며, 두 번째는 실제 개사육농장의 모견을 대상으로 분만 후 출산한 자견을 대상으로 하는 야외 효능실험이었다.

(가) 이유자견을 대상으로 한 효능실험

사용동물은 생후 7주령된 Beagle dog 17마리를 대상으로 실시하였으며, 실험전 구 충제 처치만 실시하고, 예방접종은 실시하지 않았다. 사료는 일반 강아지용 시판 사료인 JERONY PUPPY (CHEIL JEDANG; 22% protein, 15% fat, 4% fiber, 10% ash)를 아침, 저녁 2회 공급하였으며, 신선한 물은 떨어지지 않도록 충분히 제공하였다. 실험군은 A군(대조군) 6마리, B군(*L. casei* 투여군) 6마리, C군(*L. casei* GM-CSF 투여군) 5마리, 합계 17마리이었다. B군과 C군 모두 (1×10^9 cfu/day)의 농도로 생균제를 매일 아침 사료와 함께 경구투여하였다. 체중은 매주 1회씩 7주간에 걸쳐 실시하였는데, 측정일의 아침사료를 급여하기 전 공복시 체중을 측정하였다. 급여한 사료섭취량은 1주일 간격으로 군별 섭취량을 합산하여 정리하였다. 일당중체량 및 사료요구율의 계산은 이유자돈의 방법과 동일한 수순으로 측정하였다. 또한 실험개시 전일, 실험중간, 시험 종료일의 3회에 걸쳐 분변을 채취하여, Brain Heart Infusion(BHI) 수송 배지에 넣고, 완전한 혐기적 상태에서 냉장 후, 실험실로 신속하게 수송, 장내세균총 검색을 실시하였다.

(나) 모견을 대상으로 한 야외 효능실험

사용동물은 경기도 양지 인터체인지 근처에 위치한 개 사육 농장으로 모견 17마리를 대상으로 진행되었다. 모견은 철제 케이지에서 사육되며, 자견이 출산되면, 모견과 함께 케이지내에서 6-8주 정도 함께 사육되며, 보통 생후 4주부터는 어미 젖과 모견 사료를 같이 먹기 시작하였다. 모견사료는 식당에서 수거되는 잔밥을 가열하여 급여하였으며, 유산균 생균제는 B군과 C군 모두 (1×10^9 cfu/day)의 농도로 사료에 혼합하여 투여하였다. A군은 대조군으로서 모견 5마리, B군은 *L. casei* 투여군으로 모견 5마리, C군은 GM-CSF 발현 *L. casei* 투여군으로 모견 7마리, 합계 모견 17마리를 대상으로 진행되었다. 모견 및 자견별 사료섭취량은 측정할 수 없는 사육환경이었기 때문에 일당중체량 및 사료요구율의 계산은 실시하지 않았다. 대신 출산된 자견의 경시적 폐사율을 조사하여 자견생존율을 관찰하였다. 또한 실험개시 전일, 실험중간, 시험종료일의 3회에 걸쳐 분변을 채취하여, Brain Heart Infusion(BHI) 수송 배지에 넣고, 완전한 혐기적 상태에서 냉장 후, 실험실로 신속하게 수송, 장내세균총 검색을 실시하였다.

제 2절 개에서의 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구

1. 개 GM-CSF의 cloning

LPS로 4시간동안 자극한 개의 PBMC로부터 얻은 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 실시하여 435bp의 개의 GM-CSF 유전자를 확인하였다(Fig. 1). 1.5%의 agarose gel에서 435bp의 band를 확인 한 후 cloning한 plasmid DNA를 *EcoR* I을 처리하여 insert DNA를 확인하였다. GM-CSF gene 삽입이 확인된 plasmid DNA만 선별하여 sequencing을 실시한 결과를 primer 제작의 표본으로 삼은 개 GM-CSF의 gene (GeneBank Accession No. S49738)과 비교하여 100%의 homology를 보였다. 밝혀진 개의 GM-CSF 유전자 염기서열을 토대로 예상되는 단백질 서열을 분석하고 signal peptide가 제거되고 mature protein이 생성되는 지점을 표시하였다(Fig. 2).

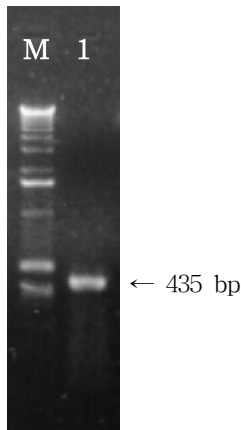


Fig. 1. Electrophoretic analysis of canine GM-CSF amplified by PCR. Total RNA was extracted from LPS-stimulated PBMC and cDNA was synthesized with reverse transcriptase. The amplified 435-bp PCR product was identified by analyzing in 1.5 % agarose gel. M, 1kb DNA ladder; Lane 1, caGM-CSF (435 bp).

```

001  ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC TTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCG ACC
      M  W  L  Q  N  L  L  F  L  G  T  V  V  C  S  I  S  A  P  T
061  CGC TCA CCC ACC CTT GTC ACT CGG CCC TCT CAG CAC GTG GAT GCC ATC CAG GAA GCC CTG
      R  S  P  T  L  V  T  R  P  S  Q  H  V  D  A  I  Q  E  A  L
121  AGC CTT TTG AAC AAC AGT AAT GAC GTG ACT GCT GTG ATG AAT AAA GCA GTA AAA GTG GTC
      S  L  L  N  N  S  N  D  V  T  A  V  M  N  K  A  V  K  V  V
181  TCT GAA GTG TTT GAC CCT GAG GGG CCA ACA TGC CTG GAG ACC CGC CTA CAG CTG TAC AAG
      S  E  V  F  D  P  E  G  P  T  C  L  E  T  R  L  Q  L  Y  K
241  GAG GGC CTG CAG GGC AGC CTC ACC AGC CTC AAG AAT CCC TTA ACC ATG ATG GCC AAT CAC
      E  G  L  Q  G  S  L  T  S  L  K  N  P  L  T  M  M  A  N  H
301  TAT AAG CAG CAC TGT CCG CCT ACC CCG GAA TCT CCC TGT GCA ACC CAG AAT ATT AAC TTC
      Y  K  Q  H  C  P  P  T  P  E  S  P  C  A  T  Q  N  I  N  F
361  AAA AGT TTC AAA GAG AAC CTG AAG GAT TTT CTG TTT AAC ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA
      K  S  F  K  E  N  L  K  D  F  L  F  N  I  P  F  D  C  W  K
421  CCA GTC AAG AAG TGA
      P  V  K  K  *

```

Fig 2. Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of canine GM-CSF. DNA sequences are numbered beginning with the initiator start codon. The deduced amino acid sequence is shown by the single-letter amino acid code under the nucleotide sequence and stop codon is indicated by asterisk (*). The predicted amino acid terminus (Ala 18) of mature GM-CSF is marked with a triangle (►). Potential N-glycosylation site is marked with a star (★). Canine GM-CSF encodes a 17-amino acid signal peptide followed by a 127-amino acid mature protein.

개의 GM-CSF는 144개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 다른 종의 GM-CSF 아미노산(human, feline, sheep, porcine, bovine, mouse)과 비교하여 각각 70.1, 75.0, 74.3, 72.9, 71.5 및 52.8 %의 nucleotide sequence homology를 가지고 있음을 알아내었다. 또한 전형적인 signal peptide의 구조를 가진 17개의 아미노산 뒤에 Ala-18 로 시작되는 mature protein을 가지고 있다. Signal peptide 17개는 다른 종과 비교하여 매우 유사성이 높았으며 mature GM-CSF를 형성하는 N-terminal 쪽의 Ala-Pro dipeptide는 다른 종에서도 마찬가지로 똑같은 구조를 보였다. 개의 GM-CSF mature protein은 127개의 아미노산으로 구성되었으며, active GM-CSF의 구조 결정에 기여하는 것으로 여겨지는 분자 내 disulfied bond를 형성하는 네 개의 cystein 잔기도 다른 종과 마찬가지로 같은 자리에 위치하고 있었다(Fig. 3).

```

DOG      1  MWLQNLFLGLTVVCSISAPTRSPVLVTRPSQHVDAIQEALSLLNNSNDVTAVMKNKAVKVV
HUMAN    1  ...S..L...A.....A...SPS.Q.WE..N.....RR...L.R.TA.E..ET.E.I
CAT      1  .....N.....S..SS...W....MK.....SEI.....ET.E..
SHEEP    1  .....L.....F....Q.SP...W....K.....D.T.TA...DET.E..
PIG      1  .....L.....P.SP...W....K.....TA...ET.D..
COW      1  .....L.....F....P.NTA...W....K.....H.S.TD...DT-E..
MOUSE    1  .....I..Y.L.....IT...WK...E..K...N..D---MPVTL.EE.E..

DOG      61  SEVFDPEGPTCLETRLQLYKEGLQGSLTSLKNPLTMMANHYKQHCPPTPESPCATQNI NF
HUMAN    61  .M..LQE...Q...E...Q..R...K..G.....S.....TS...I.T.
CAT      61  .M...E.K..Q.H.K..EQ..R...I...E..R.....L...T..E..T.T.
SHEEP    61  .M..SQE...Q...E...Q..R....TGS....S...K...Q.TS.E..I.T.
PIG      61  C.M...QE...VQ...N...Q..R...R..S...LL.K..E...L.E.TS.E..S.T.
COW      60  .K..SQE...Q...K...N.....MGS....T.EK.....TS.G..F.S.
MOUSE    58  .NE.SFKKL..VQ...KIFEQ..R.NF.K..GA.N.T.SY.QTY.....TD.E..VTTY

DOG      121 KSFKENLKDFLFNIPFDCKWPKVKK
HUMAN    121 E.....LV...E...QE
CAT      121 .N...K.....N...G.DQ.
SHEEP    121 .....I...E...Q.
PIG      121 ...DS.NK...T...G....
COW      120 .N...D..E...I...E.AQ.
MOUSE    118 AD.IDS..T..TD...E.K..GQ.

```

Fig 3. The amino acid sequence of canine GM-CSF gene was aligned with those of its human, cat, sheep, pig, cow and mouse counterparts. Amino terminus of the mature proteins (▶), potential N-glycosylation sites (★), and conserved cysteine residues (■) are indicated. Dots indicate identities with amino acids of the canine GM-CSF sequence. Gaps were introduced in sequences to maximize alignment (-)

2. 개 GM-CSF 단백질 발현

Transformant들 중에 GM-CSF gene의 삽입 여부를 확인하기 위하여 colony PCR을 실시하여 canine GM-CSF gene을 1.5% agarose gel상에서 확인하였다. GM-CSF gene이 삽입된 transformant의 plasmid DNA를 추출하여 제한 효소(*BamH* I, *Hind* III)를 처리하여 gene 삽입 여부를 재 확인 하였다. GM-CSF gene 삽입이 확인된 transformant에서 단백질 발현 여부를 확인하기 위하여 IPTG 처리한 후 시간대별로 시료를 채취하여 SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과 17kDa 가량의 단백질이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 4A).

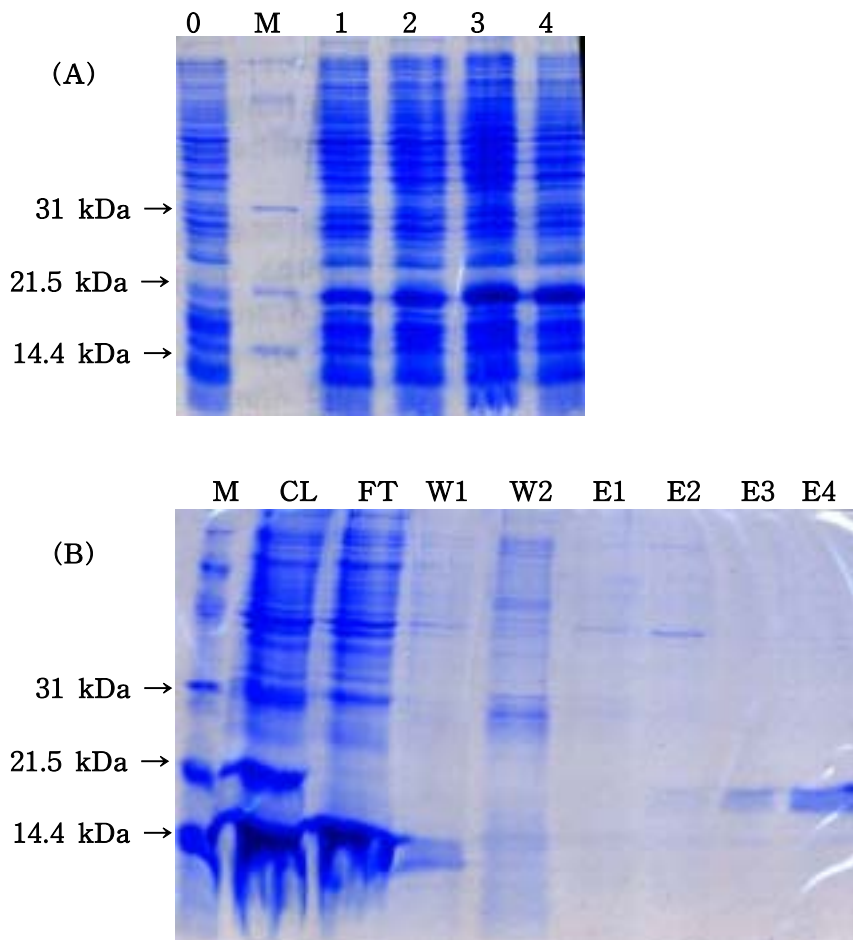


Fig. 4. Electrophoretic analysis of expressed canine GM-CSF by 15% SDS-PAGE. Canine GM-CSF was induced with 1mM IPTG. Whole *E. coli* lysate was obtained and run on a SDS-PAGE under denaturing condition and stained with Commassie brilliant blue. (A) Time course expression of canine GM-CSF. Lane 0, before IPTG induction; Lane M, molecular weight standards; Lane 1, 1hr after induction; Lane 2, 2hr after induction; Lane 3, 3hr after induction; Lane 4, 4hr after induction. (B) Denaturing purification of canine GM-CSF. M: marker; CL: cell lysate; FT: flow-through; W: wash; E: elution.

시간대별로 발현이 확인된 개의 재조합 GM-CSF 단백질을 정제한 후 정제 상태를 확인하고자 SDS-PAGE를 실시하여 순도높게 분리된 단백질을 확인하였다(Fig. 4B).

3. 개의 GM-CSF 특이 항체 생성

마우스에 재조합 개의 GM-CSF를 1차 접종하였으며 추후 2차 접종 및 3차 접종 후 채혈하여 항체가 상승 여부를 측정 한 후 전채혈하여 항체의 특성을 조사한 후 특이항체로 사용하고자 한다.

4. 개 GM-CSF의 유산균내 발현

Table. 1. The sequence of canine Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor

```

agg agg atg tgg ctg cag aac ctg ctt ttc ttg ggc act gtg gtc tgc
Arg Arg Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys
1 5 10 15
agc atc tct gca ccc acc cgc tca ccc acc ctt gtc act cgg ccc tct
Ser Ile Ser Ala Pro Thr Arg Ser Pro Thr Leu Val Thr Arg Pro Ser
20 25 30
cag cac gtg gat gcc atc cag gaa gcc ctg agc ctt ttg aac aac agt
Gln His Val Asp Ala Ile Gln Glu Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser
35 40 45
aat gac gtg act gct gtg atg aat aaa gca gta aaa gtg gtc tct gaa
Asn Asp Val Thr Ala Val Met Asn Lys Ala Val Lys Val Val Ser Glu
50 55 60
gtg ttt gac cct gag ggg cca aca tgc ctg gag acc cgc cta cag ctg
Val Phe Asp Pro Glu Gly Pro Thr Cys Leu Glu Thr Arg Leu Gln Leu
65 70 75 80
tac aag gag ggc ctg cag ggc agc ctc acc agc ctc aag aat ccc tta
Tyr Lys Glu Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Ser Leu Lys Asn Pro Leu
85 90 95
acc atg atg gcc aat cac tat aag cag cac tgt ccc cct acc ccg gaa
Thr Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu
100 105 110
tct ccc tgt gca acc cag aat att aac ttc aaa agt ttc aaa gag aac
Ser Pro Cys Ala Thr Gln Asn Ile Asn Phe Lys Ser Phe Lys Glu Asn
115 120 125
ctg aag gat ttt ctg ttt aac atc ccc ttt gac tgc tgg aaa cca gtc
Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val
130 135 140
aag aag tga
Lys Lys Stop
145

```

가. 개의 GM-CSF 목적 유전자 제작

유산균내에서 개의 GM-CSF를 발현 할 수 있는 각 shuttle vector에 삽입될 목적 유전자(caGMCSF)를 각각의 프라이머를 (pBE.BamHI.ATG.M.caGM.F &

KpnI.caGM.R 및 pHAT.BamHI.M.caGM.F & pHAT.KpnI.caGM.R) 사용하여 PCR 반응시켜 TA vector를 이용해 대장균에 클로닝하고 plasmid DNA를 추출하였다. 유전자 염기서열을 확인한 결과 의도했던바와 같이 mature protein coding region 만을 발현하기 위하여 5' 말단에서 signal peptide 역할을 하는 17 아미노산 부위를 제거하였고, 개의 유산균주에 목적 유전자를 전달할 shuttle vector와 결합할 수 있도록 *BamHI* 및 *KpnI* 제한효소 인식 서열을 양 말단에 첨가한 canine GM-CSF 유전자임을 확인할 수 있었다. (Table. 1)

나. 유산균내 단백질 발현 재조합 유전자 제작

1) pBES-AF2 벡터

유산균에서 caGM-CSF를 발현하기 위하여 pBES-AF2 shuttle vector를 사용하였다. pBES-AF2에 caGMCSF를 클로닝하여 염기 서열을 확인하였다. 확인 결과 목적 유전자인 caGMCSF가 올바르게 삽입되었음을 알 수 있었다. 그러나 이렇게 확인된 재조합 유전자를 여러 종의 유산균주에 재조합 유전자를 transformation 시켜 보아도 올바른 재조합 유전자 plasmid DNA가 추출되지 않았다. 또한 caGMCSF 삽입이 확인된 *E. coli*에서도 단백질의 발현을 확인할 수 없었다.

2) pHAT 벡터

shuttle vector인 pHAT에 display motif인 1139 bp의 *delpgsA* gene과 signal sequence를 제거한 384 bp의 canine GM-CSF gene을 fusion하여 ligation하였다. (Fig. 1)

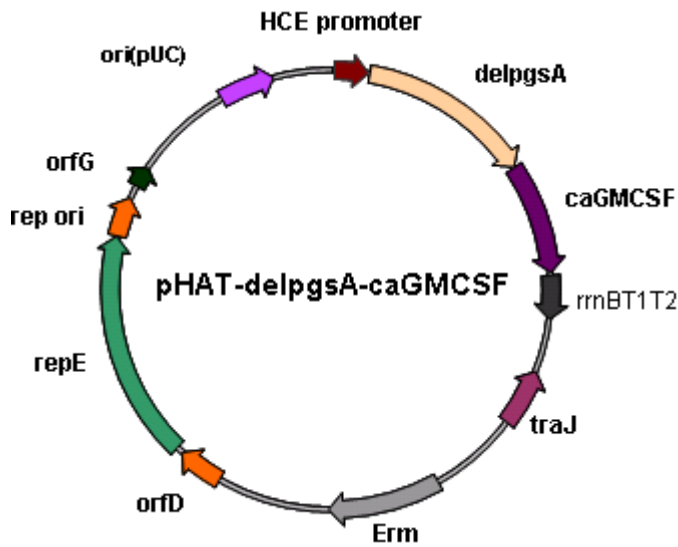


Fig. 1. Recombinant map of pHAT-pgsA-caGMCSF. *delpgsA* gene was fused with caGMCSF target gene. *delpgsA*-caGMCSF fusion gene was ligated into pHAT vector.

목적 유전자 삽입이 확인된 *E. coli* colony를 증균하여 pHAT:delpgsA-caGMCSF plasmid DNA를 추출하고 *L. casei*와 혼합한 후 electroporator를 이용하여 transformation을 실시하였다. 재조합 유전자가 transform된 *L. casei*를 동정, 배양하여 *L. casei*로부터 plasmid DNA를 추출하여 염기 서열을 확인한 결과 의도했던 바와 같이 유산균 내에 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

5. 개의 GM-CSF 발현 조사

단백질 발현을 알아보기 위하여 재조합 유전자가 삽입된 대장균과 유산균을 각각 배양하고 배지 위에 형성한 colony를 수거하여 Western-blot assay를 통하여 단백질의 발현을 확인하였다.

가. 대장균에서의 발현

대장균과 재조합 유전자 transformants 가운데 목적 유전자 삽입이 확인된 colony를 배양한 후 수거하여 Western-blot assay를 통하여 분석하였다. (Fig. 2)

나. 유산균에서의 발현

유산균과 재조합 유전자 transformants는 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 erythromycin이 함유된 MRS-agar에 plating한 후 30°C의 혐기 상태에서 5일간 배양하였다.

배양 상층액은 ammonium sulfate를 이용하여 침전하였다. 50 mM의 Tris-Cl과 10 mM의 EDTA가 함유된 buffer에 ammonium sulfate ((NH₂)₂ · SO₄)를 넣고 포화

시킨 후, 15 ml을 취하여 5 ml의 배양 상층액과 혼합 (75%) 후 단백질이 침전할 수 있도록 실온에서 1시간동안 방치 하였다. 1시간 후 5,000× g의 속도에서 30분간 원심을 실시하여 단백질을 수거 한 후 포화 ammonium sulfate를 이용하여 2회 세척 하였다. Pellet volume의 두 배의 멸균 증류수를 사용하여 단백질을 재 부유 시키고, 투석을 실시하여 잔류 염을 제거하고 Western-blot assay를 통하여 분석하였다.

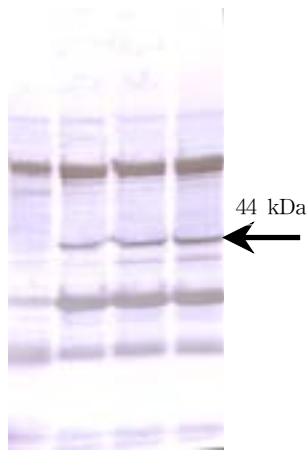


Fig. 2. Confirmazation of caGMCSF expression on *E. coli* using Western-blot assay.
The band was appeared at the size of 44 kDa. Anti-delpgsA antibody was used for detecting fusion protein.

6. 개의 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 동물 적용

가. 개 GM-CSF 발현 유산균의 실험 동물 접종 실험

1) 체중 변화 조사

동일한 사육 조건 하에서 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균의 식욕 및 체중 변화에 미치는 영향을 파악하기 위해 실시한 체중 측정 결과 대조군과 실험군 1, 2 간의 체중의 확연한 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 체중 증가율은 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균을 먹인 실험군 2에서 다른 군에 비해 좀 더 높은 증가율을 보이는 것으로 관찰되었다 (표 2., 그림 2).

Table 2. 군별 평균 체중치

주 차	평균 체중 (kg)		
	대조군	실험군 1	실험군 2
0	1.29±0.31	1.24±0.32	1.22±0.25
1	1.32±0.31	1.31±0.31	1.28±0.22
2	1.41±0.30	1.39±0.30	1.37±0.19
3	1.51±0.26	1.49±0.26	1.50±0.19
4	1.62±0.25	1.57±0.28	1.64±0.17
5	1.75±0.26	1.68±0.28	1.77±0.17
6	1.89±0.26	1.81±0.28	1.95±0.16
7	2.02±0.23	1.98±0.26	2.13±0.14

Each values represents the mean ± SEM, n=6.

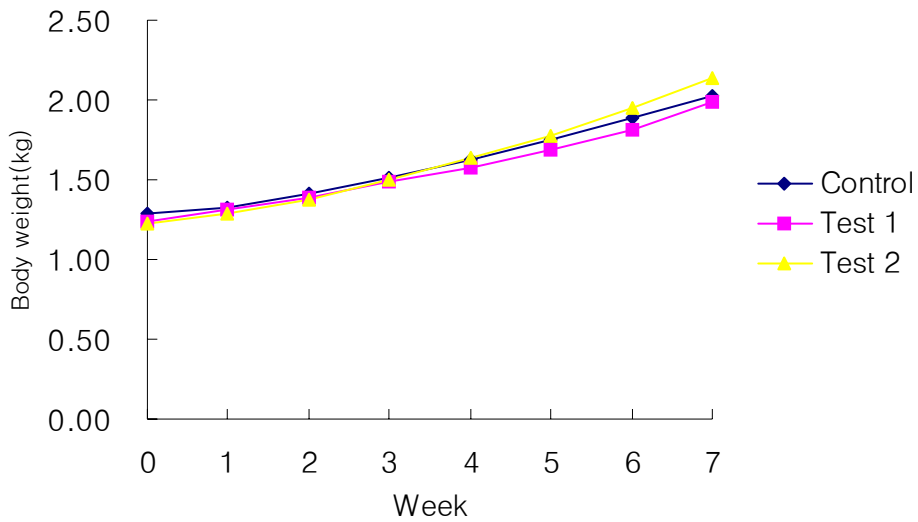


Figure 2. Changes of mean body weight

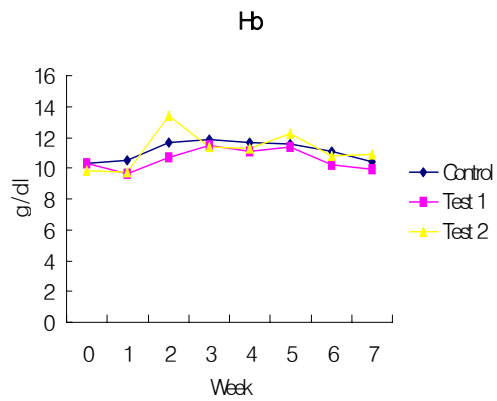
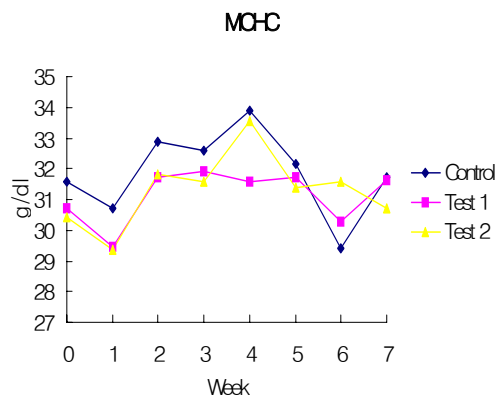
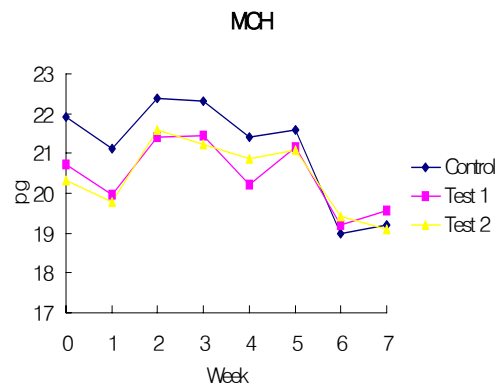
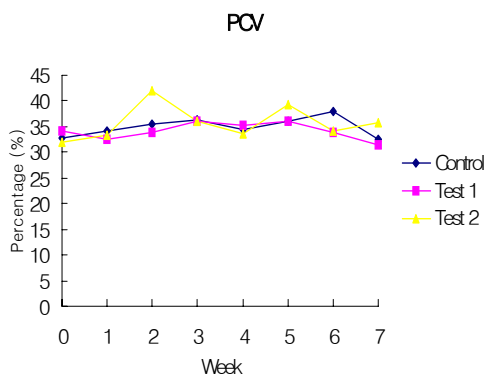
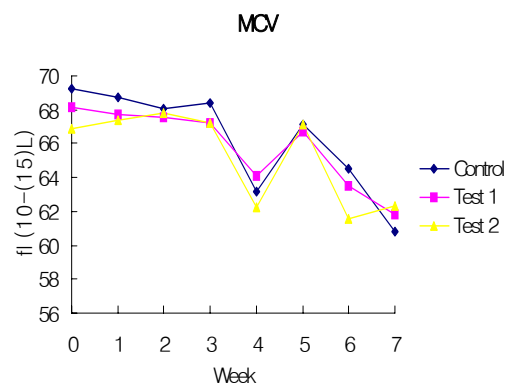
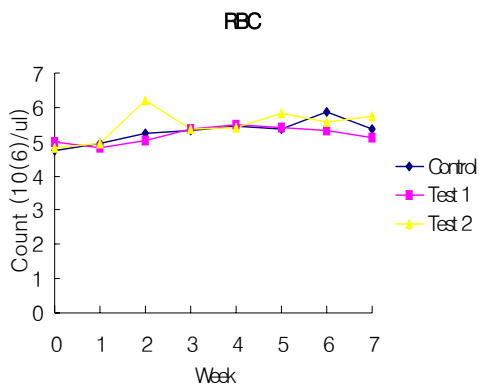
2) 혈구수 변화 조사

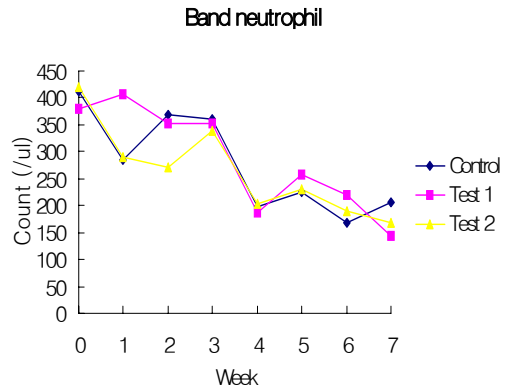
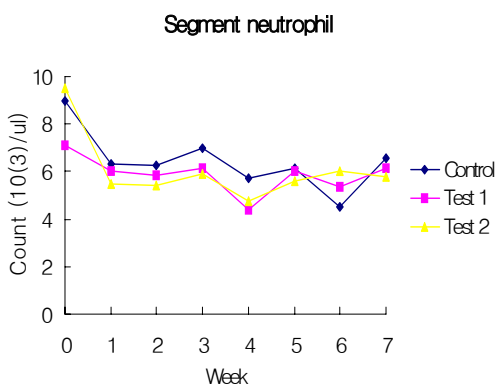
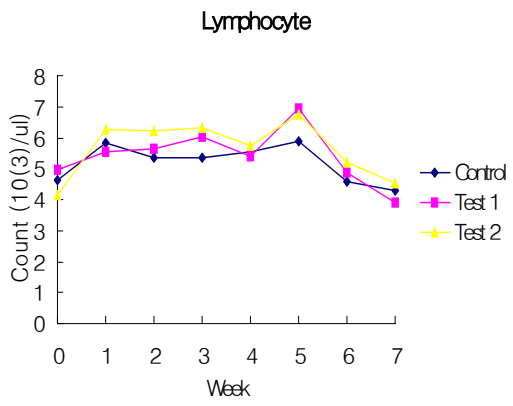
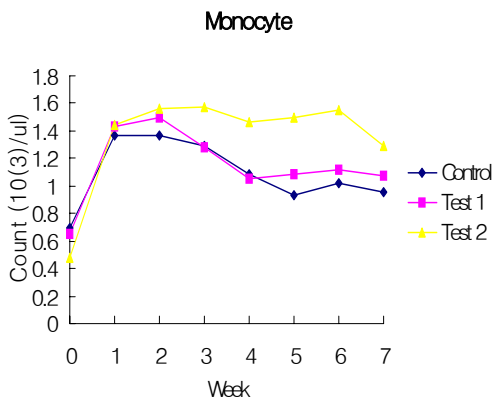
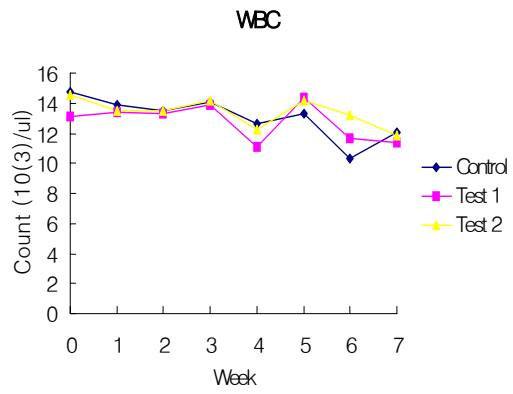
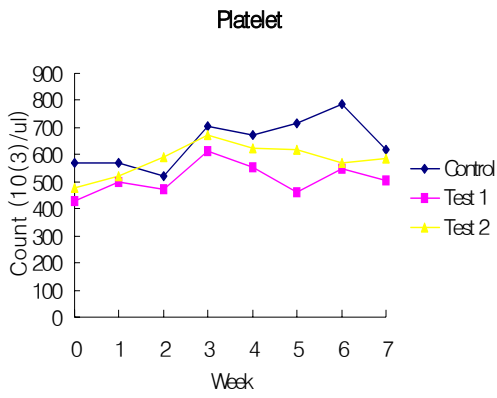
개의 GM-CSF를 발현하는 유산균이 혈구 수를 변화 시키는 효과가 있는지 확인 해 보기 위해 혈구수의 변화 양상을 조사하였고, 실험에 사용된 개체 모두에서 일 주일에 한번씩 채혈하여 7주 실험 기간 동안 총 8회의 혈구수 변화를 확인하였다. RBC(red blood cell), MCV(mean corpuscular volume), PCV(packed cell volume), platelet, Hb(hemoglobin), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean

corpuscular hemoglobin concentration), WBC(white blood cell), neutrophil, band neutrophil, segment neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil의 항목을 측정하였는데 monocyte와 eosinophil을 제외하고는 다른 항목들의 수치에서는 군간 차이가 관찰되지 않았다.

monocyte는 실험 시작 1주일 후 대조군과 두 실험군 모두에서 실험전보다 수치의 상승이 관찰되었으나 실험 2주차부터 대조군과 실험군 1에서는 수치가 서서히 감소되는 것이 관찰되었다. 그러나 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균을 먹인 실험군 2에서는 초기에 상승된 수치가 지속적으로 유지되어 대조군과 실험군 1에 비하여 monocyte의 수치가 높게 유지 유지되는 것이 관찰되었다. eosinophil은 실험 5주차까지는 대조군과 두 실험군 간의 차이가 관찰되지 않았다. 6주차에 두 실험군에서 eosinophil의 증가가 나타난 후 7주차에는 다시 감소되는 양상을 보였으나 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균을 투여한 실험군 2의 감소폭이 실험군 1에 비해 적었다.

Eosinophil의 증가는 일시적으로 나타났고, L.casei 유산균만을 먹인 실험군 1과 유사한 증가 양상이었기 때문에 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균에 의한 효과라고 보기는 힘들 것으로 판단된다. 실험 기간 내내 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균을 투여한 실험군 2에서 관찰된 monocyte의 증가는 개의 GM-CSF를 발현하는 유산균이 직,간접적으로 백혈구의 분화 및 성장에 영향을 나타냄을 보여 주었다.





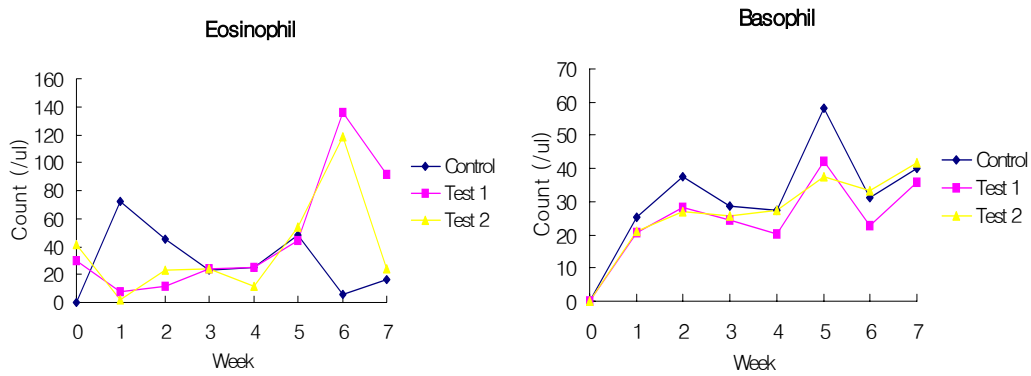


Figure 3. The pattern of blood count

3) ELISA를 이용한 Antibody 농도 측정

가) 혈액의 IgA, IgG 측정

실험군의 체내 면역력 증강에 대한 개 GM-CSF 발현 유산균의 효과를 알아보기 위해 혈중의 IgA와 IgG의 농도를 측정하였다. 7주의 실험 기간 동안 총 8회 측정을 실시한 결과 IgG에서는 군별 차이가 관찰되지 않았다. IgA는 시험 2주차부터 대조군과 실험군 1에 비하여 개 GM-CSF 발현 유산균을 투여한 실험군 2에서 높은 수치가 유지되는 것이 관찰되었다 (그림 4).

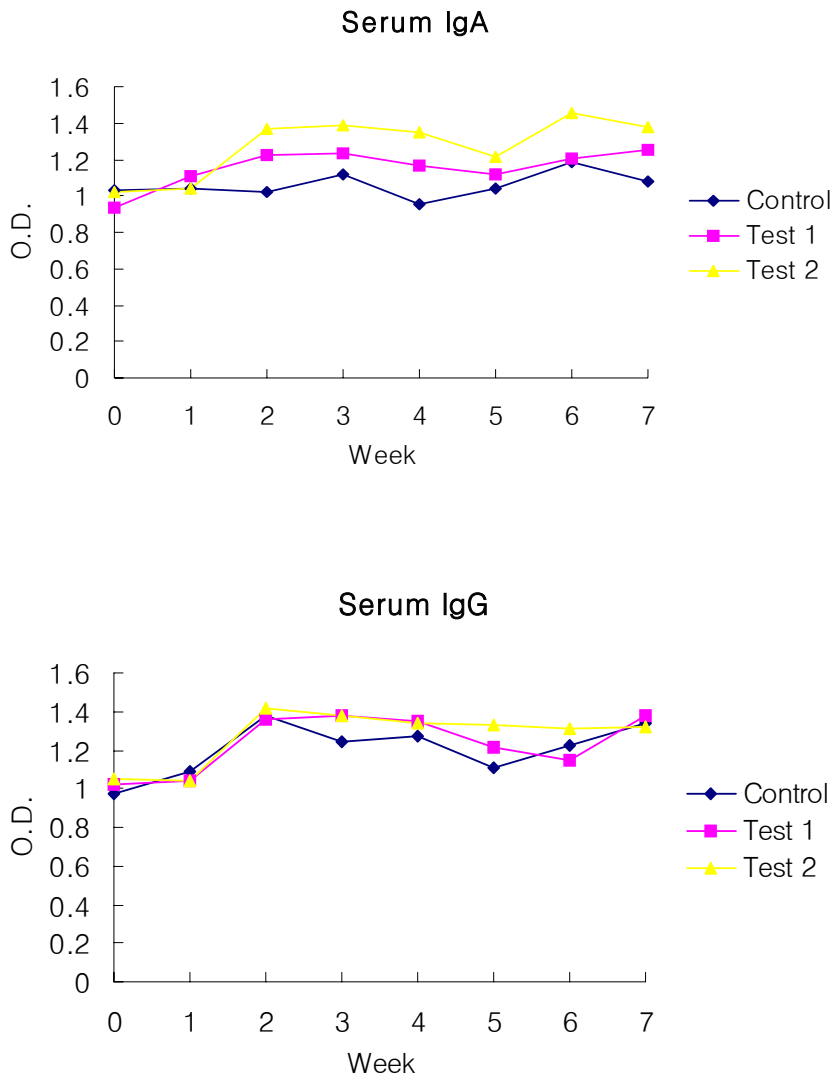


Figure 4. Changes of IgA and IgG in the blood.

나) 분변의 IgA, IgG 측정

경구로 투여한 개 GM-CSF 발현 유산균의 점막 면역에 미치는 영향을 확인해 보기 위해 분변의 IgA와 IgG의 농도를 측정해 보았다. serum에서 측정한 IgG와 같이 분변에서 IgG의 군별 차이는 관찰되지 않았다. 분변의 IgA는 실험 2주차부터 대조군과 비교하여 실험군 1과 실험군 2에서 수치의 증가가 관찰되었다. 실험군 1과 실험군 2의 차이가 관찰되지 않고 동일하게 수치가 증가되는 것으로 보아 장 점

막의 IgA 증가는 *L. casei* 유산균 자체에 의한 점막 면역 증강 효과로 판단 된다 (그림 5).

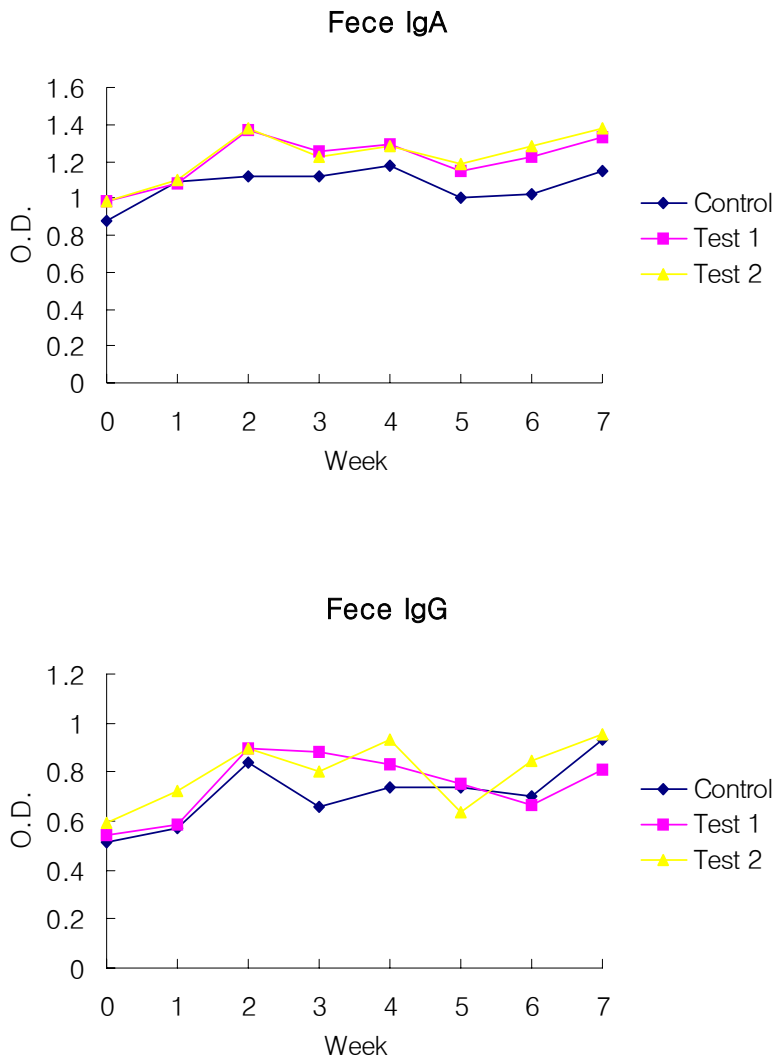


Figure 5. Changes of IgA and IgG in the Feces.

다) 혈액의 CCV-specific IgG 측정

개 GM-CSF 발현 유산균의 vaccine boosting 효과를 확인하기 위해, 실험 4주차에 모든 실험견에 CCV vaccine을 접종하고 혈중의 CCV-specific IgG 측정치를 측정하였다. CCV-specific IgG의 농도는 vaccine 접종 일주일 후 측정된 결과부터 모든 군에서 수치의 증가를 보였다. 특히 개 GM-CSF 발현 유산균을 먹인 실험군 2에서의 증가가 가장 높게 나타났다 (그림 6.).

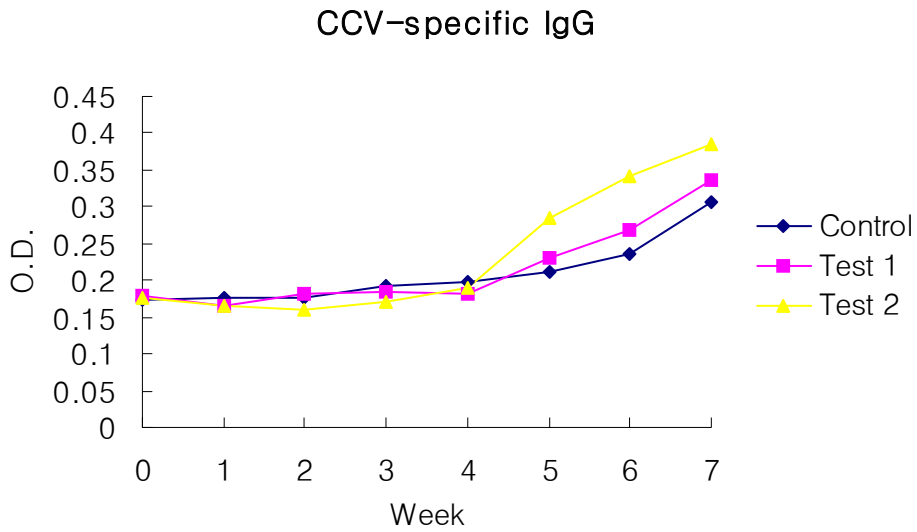


Figure 6. Changes of CCV-specific IgG in the blood.

나. 개 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 대단위 개 농장 접종 실험

1) 자건의 폐사율 조사

생후 12주간 군별 자건의 생존률에 대해 조사를 실시하였다. 대조군은 12주 후 총 56마리의 자건 중 21마리가 폐사하여 37.5%의 폐사율을 보였고, *L. casei* 균을 투여한 실험군 1은 54마리 중 25마리가 폐사하여 46%, cGM-CSF 발현 *L. casei* 균을 투여한 실험군 2는 67마리 중 16마리가 폐사하여 24%의 폐사율을 나타내었다 (그림1.).

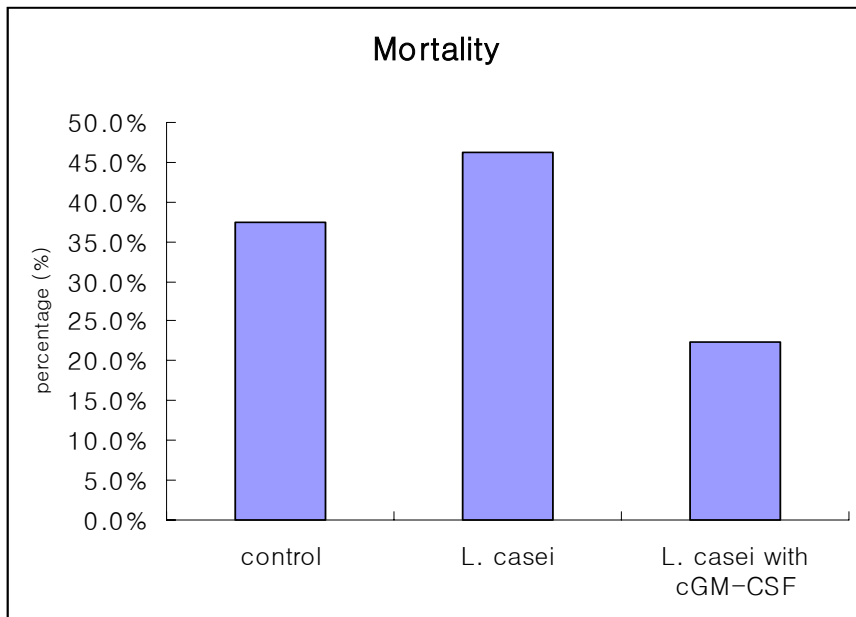


Figure 1. Mortality in each group puppies

2)자건의 체중 변화 조사

A는 대조군의 각 모견의 새끼들의 단순회귀분석에 의한 체중 변화이며, B는 *L. casei*를 투여한 군의 모견별 새끼들의 단순회귀분석에 의한 체중변화, C는 cGM-CSF 발현 *L. casei* 투여한 군의 모견별 새끼들의 단순회귀분석에 의한 체중 변화의 결과를 정리하였다 (표 1., 그림 2.). 증가 기울기는 cGM-CSF 발현 *L. casei* 투여한 군에서 다른 두 군에 비해 높은 수치가 관찰되었다.

Table 1. Evaluation of body weight calculated by simple linear regression.

control	Gradient	<i>L. casei</i>	Gradient	<i>L. casei</i> with cGM-CSF	Gradient
A-1	0.09728	B-1	0.10276	C-1	0.17148
A-2	0.05531	B-2	0.14125	C-2	0.16459
A-3	0.05427	B-3	0.07416	C-3	0.1453
A-4	0.08061	B-4	0.15176	C-4	0.14427
A-5	0.09256	B-5	0.17328	C-5	0.11199
Mean	0.076006	Mean	0.128642	Mean	0.147526

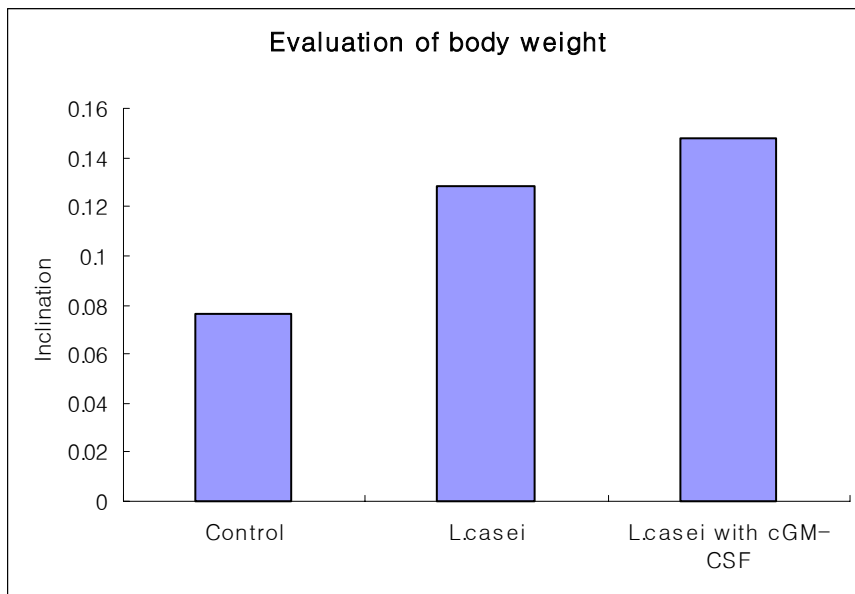


Figure 2. Evaluation of body weight calculated by simple linear regression.

3)혈액학적 변화 조사

자견에서 생후 4, 8, 12주에 측정된 혈액에서 대조군과 비교하여 *L. casei* 투여군, cGM-CSF 발현 *L. casei* 투여군에서 granulocyte와 monocyte 수의 차이가 특이적으로 관찰되지 않았다 (그림 3).

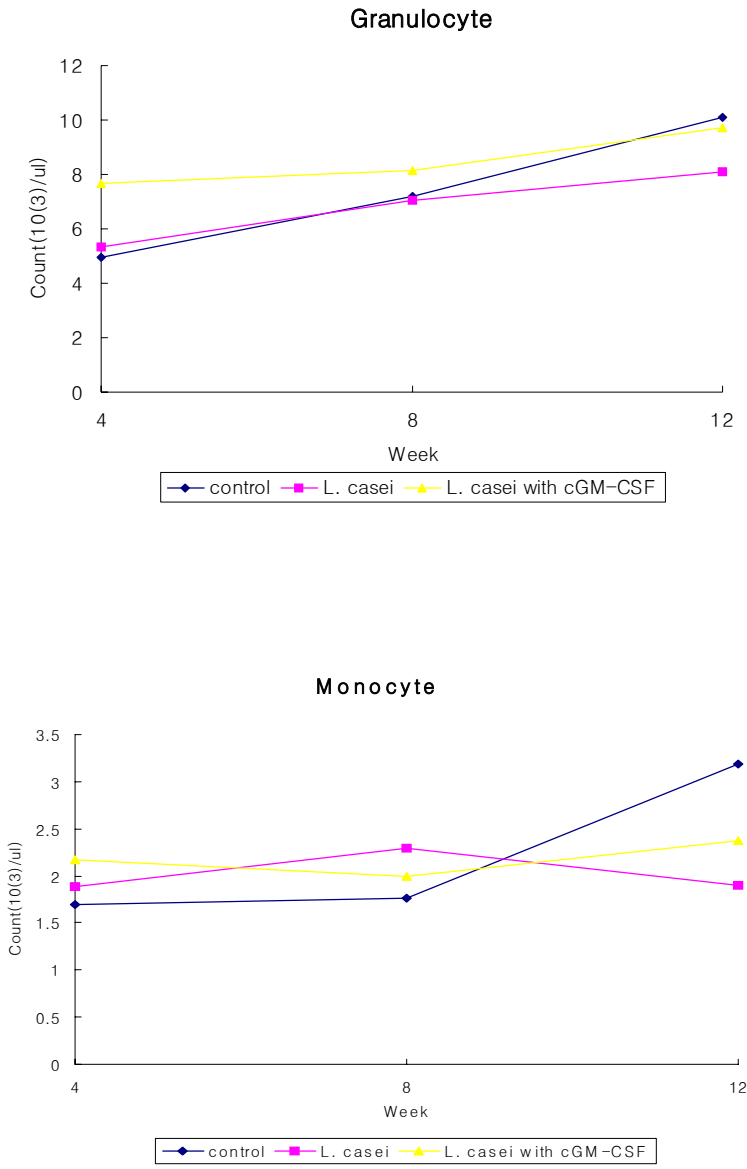


Figure 3. The pattern of blood count

4) 항체가 변화 조사

CPV 백신은 생후 3, 5주, CDV 백신은 생후 7, 9주에 접종한 후 각각의 바이러스에 대한 항체가를 측정하였는데 CPV에 대한 항체가가 cGM-CSF를 발현하는 *L. casei*를 먹인 군에서 다른 두 군에 비해 높게 증가 되는 것이 관찰되었으며, CDV에 대한 항체가도 cGM-CSF를 발현하는 *L. casei*를 먹인 군에서 생후 12주에 높게 유지되는 것이 관찰되었다 (그림 4).

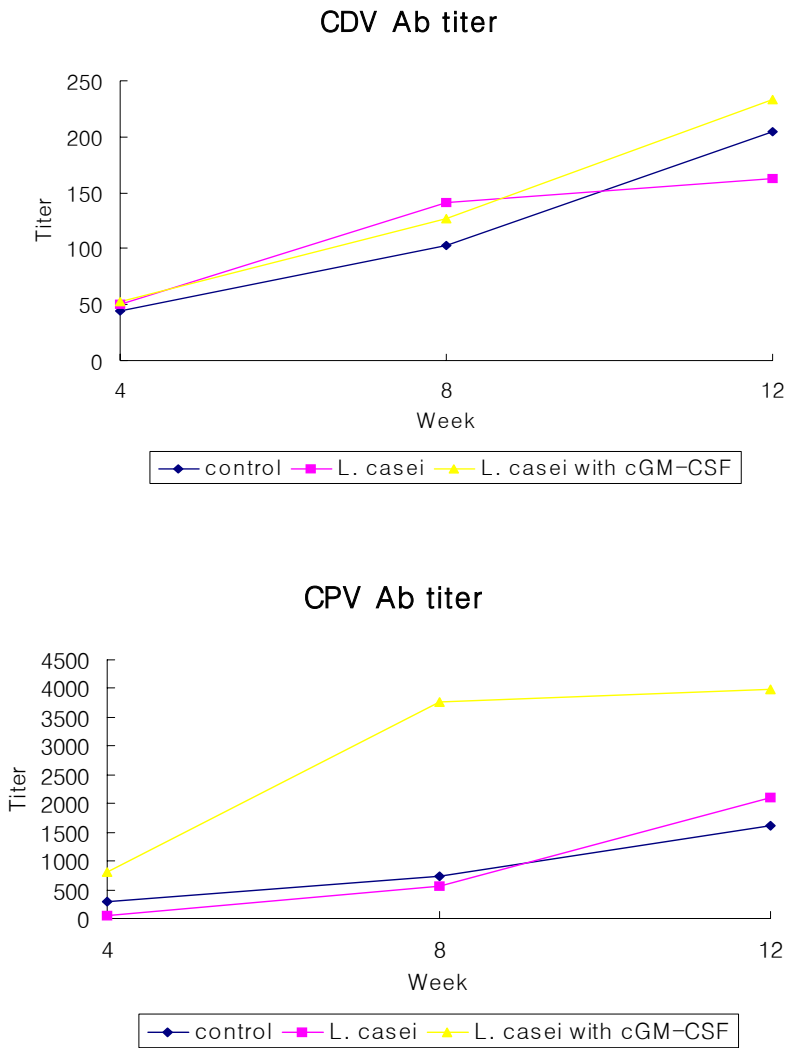


Figure 4. The antibody titer against CDV and CPV.

제 3절 돼지에서의 GM-CSF 발현 유산균 이용 연구

1. 돼지의 GM-CSF 유전자 확보 및 특성조사

가. 돼지 GM-CSF의 Cloning

PHA로 4시간동안 자극한 PBMC로부터 얻은 cDNA를 template으로 하여 PCR을 실시하여 435bp의 돼지 GM-CSF를 확인하였다(Fig. 1). 1.5%의 agarose gel에서 435bp의 band를 확인 한 후 cloning한 plasmid DNA를 *EcoR* I을 처리하여 insert DNA를 확인하였다. GM-CSF gene 삽입이 확인된 plasmid DNA만 선별하여 sequencing을 실시한 결과를 primer 제작의 표본으로 삼은 돼지 GM-CSF의 gene (GeneBank Accession No. U67175)과 비교하여 100%의 homology를 보였다. GeneBank에 등재한 sequence를 바탕으로 다른 종(human, bovine, canine, ovine, mouse)과 비교하여 77, 74, 77, 87 그리고 68 %의 nucleotide sequence homology를 가짐을 알아내었다. 또한 amino acid sequence를 비교하여 70, 72, 72, 79 그리고 53 %의 homology가 있음을 알아내었다(Fig. 2).

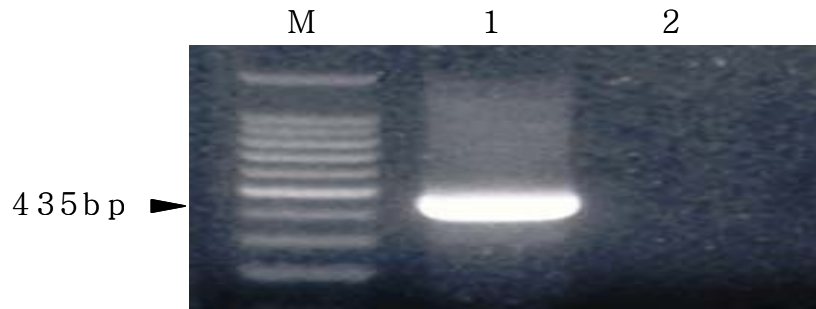


Fig. 1. Electrophoretic analysis of pGM-CSF amplified by RT-PCR. Total RNA was extracted from LPS-stimulated alveolar macrophages and cDNA was synthesized with reverse transcriptase and pGM-CSF specific DNA band was identified by analyzing the PCR product in 1.2% agarose gel. M, 100 bp DNA ladder; Lane 1, pGM-CSF (435 bp); Lane 2, negative control

```

porcine 1 MWLQNLLLLGTWCSISAPTRPPSPVTRPWQHVDAlKEALSLLNNSNDTAAVMNETVD 58
human 1 MWLQSLLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAEMNETVE 58
bovine 1 MWLQNLLLLGTWCSFSAPTRPPNTATRPWQHVDAlKEALSLLNHSSDTDAVMNDT-E 57
canine 1 MWLQNLLFLGTWCSISAPTRSPTLVTRPSQHVDAlKEALSLLNNSNDVTAVMNKAVK 58
ovine 1 MWLQNLLLLGTWCSFSAPTRQPSPVTRPWQHVDAlKEALSLLNDSTDAAVMDETVE 58
mouse 1 MWLQNLLFLGIVVYLSAPTRSPITVTRPWKHVEAlKEALNLLD---DMPVTLNEEVE 55

porcine 59 VCEMFDPQEPTCVQTRLNLYKQGLRGSRLRLKSPLTLLAKHYEQHCPLTEETSCEtQ 116
human 59 VISEMFDLQEPTCLQTRLELYKTGLRGSRLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQ 116
bovine 58 VVSEKFDSQEPTCLQTRLKLYKNGLQGSLSLTMGSLTMMATHYKHCPTPETSCGTQ 115
canine 59 VVSEVFDPEGPTCLETRLQLYKEGLQGSLSLTKNPLTMMANHYKQHCPPTPESPCATQ 116
ovine 59 VVSEMFDSQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLSLTMGSLTMMASHYKHCPTPETSCETQ 116
mouse 56 VVSNEFSFKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDCETQ 113

porcine 117 SITFKSFKDSLNLKFLFTIPFDCWGPVKK 144
human 117 IITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE 144
bovine 116 FISFKNFKEDLKEFLFIIPFDCWEPAQK 143
canine 117 NINFKSFKENLKDFLNIPFDCWKPVKK 144
ovine 117 IITFESFKENLKDFLFIIPFDCWEPAQK 144
mouse 114 VTTYADFIDSLKTFDIPFECKKPVQK 141

```

Fig. 2. Multiple sequence alignment of amino acid sequences of porcineGM-CSF with those of human, bovine, canine, ovine, and mouse.

나. 돼지 GM-CSF 발현

Transformant들 중에 GM-CSF gene의 삽입 여부를 확인하기 위하여 colony PCR을 실시하여 396bp의 GM-CSF gene을 1.5% agarose gel상에서 확인하였다. GM-CSF gene이 삽입된 transformant의 plasmid DNA를 추출하여 제한 효소 (*BamH* I, *Hind* III)를 처리하여 gene 삽입 여부를 재 확인 하였다. GM-CSF gene 삽입이 확인된 transformant에서 단백질 발현 여부를 확인하기 위하여 IPTG 처리한 시료를 SDS-PAGE를 이용하여 확인한 결과 17kDa 가량의 단백질을 발현을 확인하였다(Fig. 3). 발현된 단백질의 특이성을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하여 GM-CSF protein에 대한 특이성을 확인하였다.

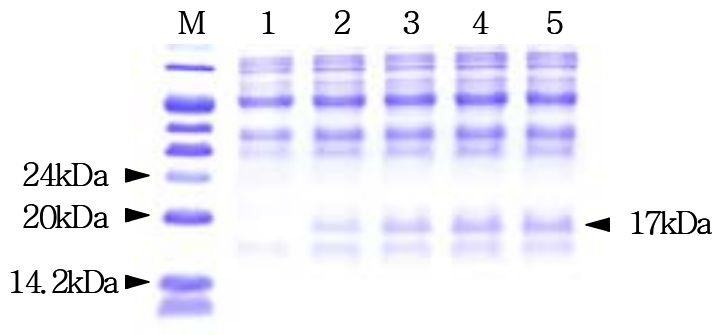


Fig. 3. Electrophoretic analysis of expressed rpGM-CSF by 12% SDS-PAGE. Whole *E. coli* lysate was run on a SDS-PAGE under denaturing condition and stained with Commassie brilliant blue. Lane M, molecular weight standards; Lane 1, preinduction of *E. coli* Lane 2, 3, 4, and 5; 1, 2, 3, and 4 hour postinduction of *E. coli*.

다. 돼지 GM-CSF 정제

rpGM-CSF 단백질의 정제 상태를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하여 17 kDa가량의 분리된 단백질을 확인하였다(Fig.4A). 단백질의 특이성을 확인하기 위하여 GM-CSF에 대한 polyclonal antibody를 이용한 Western-blot을 실시하여 단백질에 대한 특이성을 확인하였다(Fig. 4B).

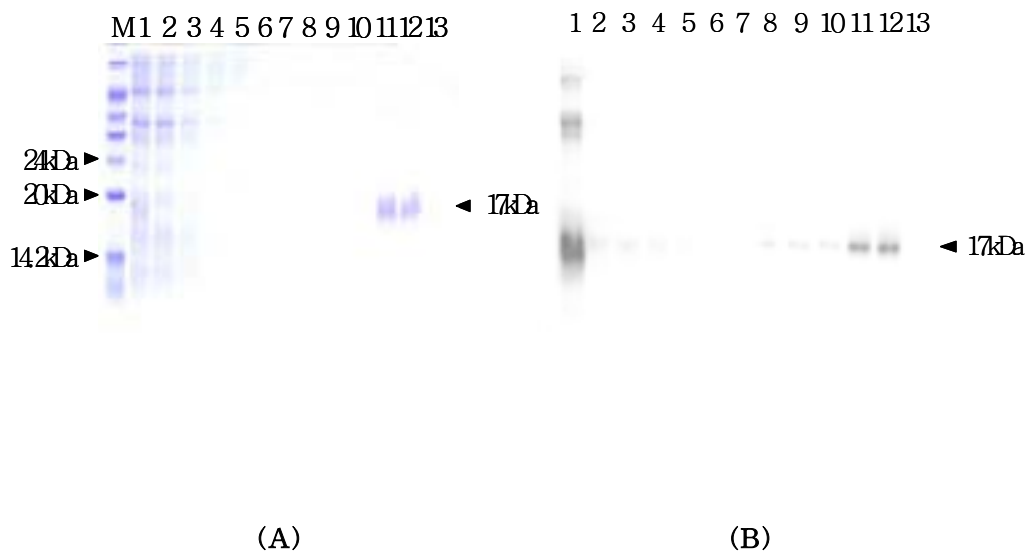


Fig. 4. Analysis of purified rpGM-CSF by SDS-PAGE (A) and Western blot (B). Lane M, molecular weight standards; Lane 1, cell lysate; Lane 2, column unbounded fraction, Lane 3-6, wash; Lane 7 and 8, eluate with buffer pH6.3; Lane 9 and 10, eluate with buffer pH5.9; Lane 11 and 12, eluate with buffer pH5.2; Lane 13, eluate with buffer pH4.5

라. 항체가 측정

rpGM-CSF를 이용하여 ICR mice와 닭의 난황에서 pGM-CSF에 특이적인 항체를 생산하였다. 마우스 혈청의 경우 1,000배로 희석한 경우 50ng/ml의 rpGM-CSF와 반응하였으나, 10,000배 희석한 경우는 500ng/ml의 rpGM-CSF와 반응하였다 (Fig. 5). 난황항체는 120 μ g/ml로 희석하여 처리하였을 때 50ng/ml의 rpGM-CSF와 반응하였으나, 1,200 μ g/ml의 난황항체는 125ng/ml의 rpGM-CSF와 반응하였다 (Fig.6).

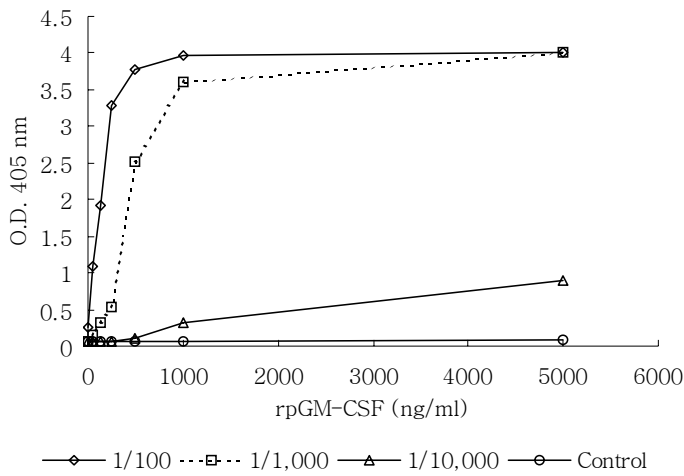


Fig. 5. Analysis of antibody titer against rpGM-CSF in mice based on the concentration of rpGM-CSF. One-thousand-fold diluted antiserum could detect 50 ng/ml of rpGM-CSF, whereas 10,000-fold diluted antiserum could 500 ng/ml.

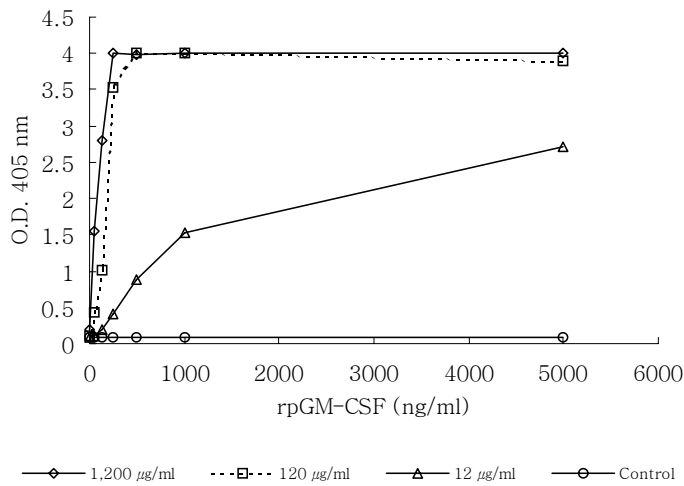


Fig. 6. Analysis of antibody titer against rpGM-CSF in IgY based on the concentration of rpGM-CSF. One-hundred twenty µg/ml of IgY could detect 50 ng of rpGM-CSF, whereas 1,200 µg/ml of IgY could 125 ng/ml

2. 돼지의 GM-CSF를 발현하는 유산균 형질 전환체 개발

가. 돼지 GM-CSF의 유산균내 발현

1) *Bifidobacterium longum*

pBES-AF2에 pGM-CSF를 cloning하여 sequencing하였다. Target gene인 pGM-CSF가 올바르게 삽입되었으나, *E. coli*상에서 단백질의 발현은 확인할 수 없었다. 유산균 host인 *Bifidobacterium longum*에 transformation하여 단백질 발현을 Western-blot과 ELISA를 이용하여 확인하여 보았으나 역시 단백질의 발현은 확인할 수 없었다. 이에 본 연구에서 사용되는 돼지 GM-CSF는 shuttle vector인 pBES-AF2와 숙주 *Bifidobacterium longum*에서는 발현할 수 없었다.

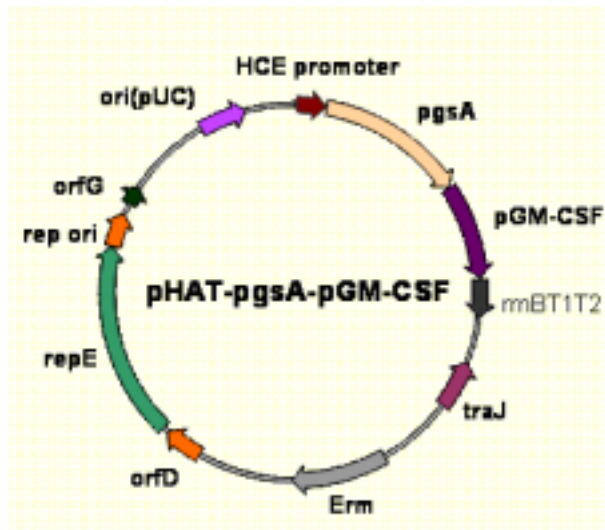


Fig. 1. Genetic map of pHAT:pgsA-pGM-CSF
pgsA gene was fused with pGM-CSF gene. And then, fusion gene was ligated into pHAT vector.

2) *Lactobacillus casei*

Vector pHAT에 display motif인 1139 bp의 *pgsA* gene과 signal sequence를 제거한 caGMCSF 목적유전자를 fusion하여 ligation하였다. (Fig. 1) pHAT:pgsA-pGM-CSF라는 plasmid DNA를 얻어 유산균 *L. casei*에서 약 55.7 kDa의 fusion protein을 발현됨을 확인하였다. (Fig. 2) 이에 본 연구에 사용된 돼지 재조합 GM-CSF는 shuttle vector인 pHAT과 host *Lactobacillus casei*에서 발현이 확인되어 이를 재조합 단백질의 발현 양상 실험에 사용하였다.

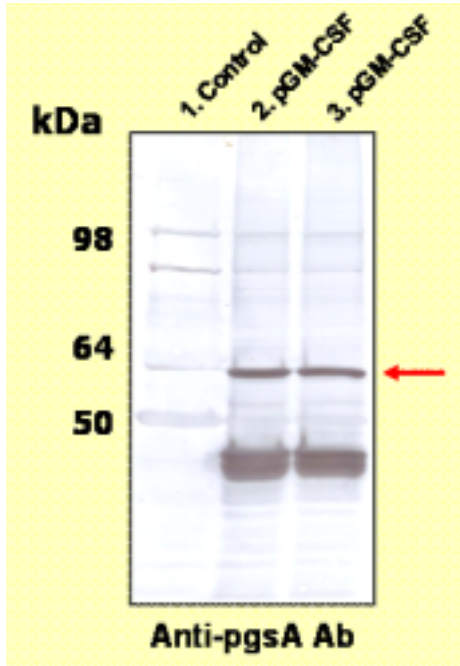


Fig. 2. Confirmazation of pGM-CSF expression on *L. casei* using Western-blot assay.
 The band was appeared at the size of 55.7 kDa. Anti-pgsA antibody was used for detecting fusion protein.

나. 돼지 GM-CSF의 발현 양상 연구

1) 유산균

배양한 유산균의 양을 동일하게 조정하여 분석한 결과 selection marker로 사용한 erythromycin이 고갈상태에 이르는 시점인 12시간 전에 단일 유산균 내 pGM-CSF의 발현양이 가장 많았다. (Fig. 3) 배양 초기인 4-6시간의 경우 유산균의 충분한 증식이 일어나지 않아 발현양이 작은 것으로 보이며, 12시간 이후는 erythromycin의 고갈로 plasmid DNA가 kick-out된 유산균의 수가 증가되어 상대적으로 단위 유산균내 pGM-CSF의 발현양이 감소한 것으로 보인다.

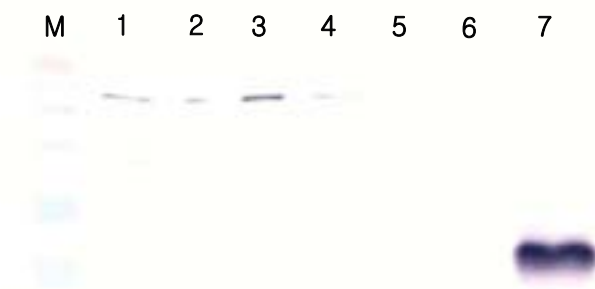


Fig. 3. Expression pattern of pGM-CSF on *L. casei* via time-course.

The expression of pGM-CSF was peaked at 10 hr cultured cells.

M, protein marker;
lane1, 6 hr cultured cells;
lane2, 8hr cultured cells;
lane3, 10hr cultured cells;
lane4, 12hr cultured cells;
lane5, 14hr cultured cells;
lane6, 24hr cultured cells;
lane7, purified rpGM-CSF.

2) 배양 상층액

Ammonium sulfate를 이용하여 배양액에서 단백질을 침전시켜 분석한 결과 세포 밖으로 분비되는 pGM-CSF는 없었다. Selection marker인 erythromycin의 고갈이 세포 성장에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. (Fig. 4)

다. 세포 표면 발현 확인

pGM-CSF의 세포 표면 발현을 확인하기 위하여 FITC-labell된 항체를 이용하여 면역 염색을 실시하였다. 형광현미경하에서 signal을 1차 확인하고, confocal microscope 상에서 재차 확인 하였다. 실험군과 대조군과의 유의성 있는 차이점은 발견하지 못하였다 (Fig. 5). Signal amplification과 cell wall separation법을 이용하여 표면 발현 단백질에 대한 확인을 재확인 중에 있다.

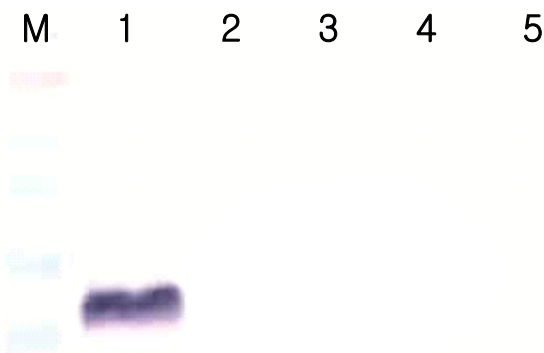


Fig. 4. Secretion of pGM-CSF into the media.

The secretion of pGMCSF was not detected on culture media. M, protein marker;
lane1, purified rpGM-CSF;
lane2, 0hr cultured media;
lane3, 12hr cultured media;
lane4, 24hr cultured media;
lane5, 48hr cultured media.

라. *in vitro* 상에서 pGM-CSF의 bio-activity 확인

1) 대장균 유래 재조합 pGM-CSF의 bio-activity 확인

Prokaryotic system에서 발현한 단백질의 bio-activity를 알아보기 위하여 mouse alveolar macrophage에 *E. coli* 유래 재조합 pGM-CSF를 처리하여 bio-activity를 측정 하였다. GM-CSF는 monocyte/macrophage에 작용하여 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, M-CSF등을 분비 유도하므로, TNF- α , IL-6에 대해 단백질 발현의 정도를 측정하였다.

TNF- α 의 경우 약 100 ng/ml의 rpGM-CSF를 처리한 군에서 생성이 유도되었고, 처리 후 4시간 안에 빠른 속도로 분비량이 증가하였다. 그러나 10 ng/ml 이하의 농도에서는 분비가 검출 한계 이하였다. (Fig. 6)

IL-6의 경우도 TNF- α 와 유사하게 100 ng/ml의 농도에서 분비가 유도되었으나, TNF- α 와 달리 서서히 분비가 유도되다가 8시간 이후 분비량이 증가하였다. (Fig. 6)

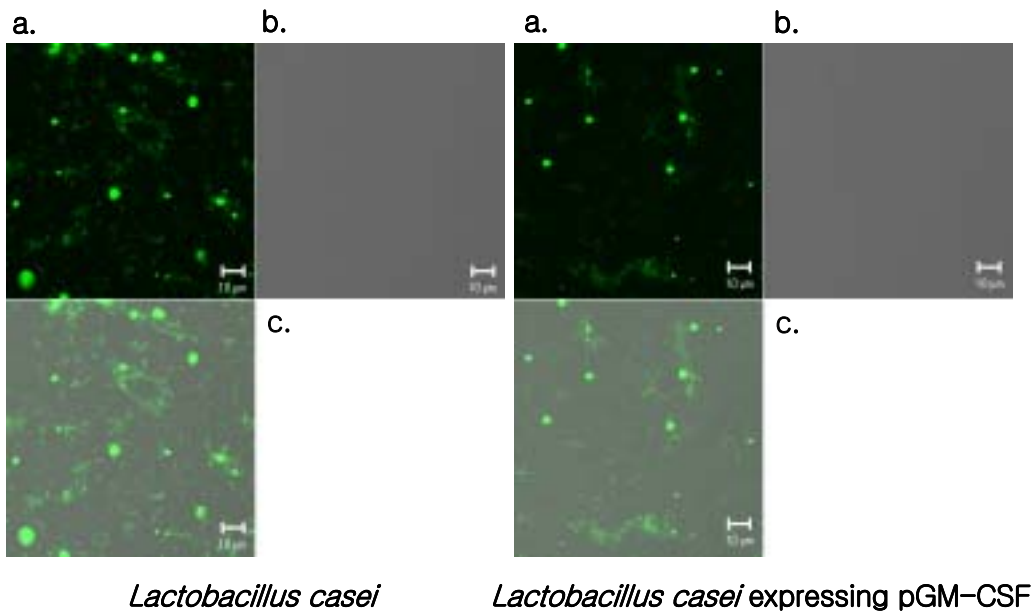


Fig. 5. Immunofluorescence of *L. casei* containing pGM-CSF gene.
a. The image of cells on the UV light. b. The image of cells on light
c. The mixed image of cells.

2) 유산균 유래 rpGM-CSF의 bio-activity 확인

pGM-CSF gene의 carrier로 사용된 *L. casei*는 GM-CSF 없이 자체적으로 monocyte/macrophage에서 IL-12, TNF- α 의 분비를 유도하는 것으로 알려졌으므로 GM-CSF에 의한 cytokine 분비인지 아닌지의 여부를 알아보기 위해 공통분비 cytokine인 TNF- α 와 함께 IL-6, IL-1 β 에 대한 mRNA와 protein의 발현을 조사하기 위한 실험 중에 있다.

마. *in vivo* 상에서 pGM-CSF의 bio-activity 확인

1) Mouse의 체중변화

유산균 및 rpGM-CSF의 접종 전에 mouse의 체중을 측정하여 접종 간 변화를 조사하였다. 음성 대조군은 접종 stress로 인하여 접종 후 잠시 체중이 감소하였으나 3일 후 꾸준히 체중이 증가하여 평균 650mg이 증가하였다. *L. casei*만 접종한 실험 1군에서는 서서히 체중이 감소하였다가 정상체중을 회복하고 증가 추세로 돌아섰으나 큰 폭의 체중 증가는 관찰되지 않았다. 이는 장내 상재 미생물과 새로 주입한 *L. casei*와의 경쟁에 따른 stress가 작용한 것으로 보인다. pGM-CSF 유전자가 삽입된 *L. casei*를 주입한 실험 2군과 recombinant pGM-CSF를 복강 주사한 양성 대조군은 정도의 차이는 있으나 유사한 체중의 변화를 보였으며 최종 체중도 900mg으로 가장 많은 체중 변화를 보였다. (Fig. 7)

2) 혈구수 변화 및 survival rate

Mouse 접종 완료 후 혈구수의 변화와 병원체 (*S. typhimurium*)에 대한 내병성에 대한 실험을 실시할 예정이다.

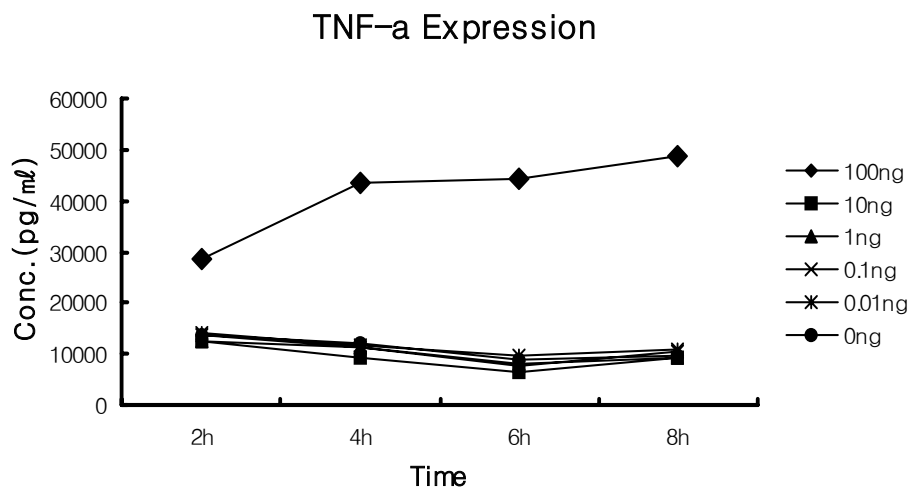


Fig. 6. TNF- α production from mouse alveolar macrophage (RAW264.7) stimulation with rpGM-CSF

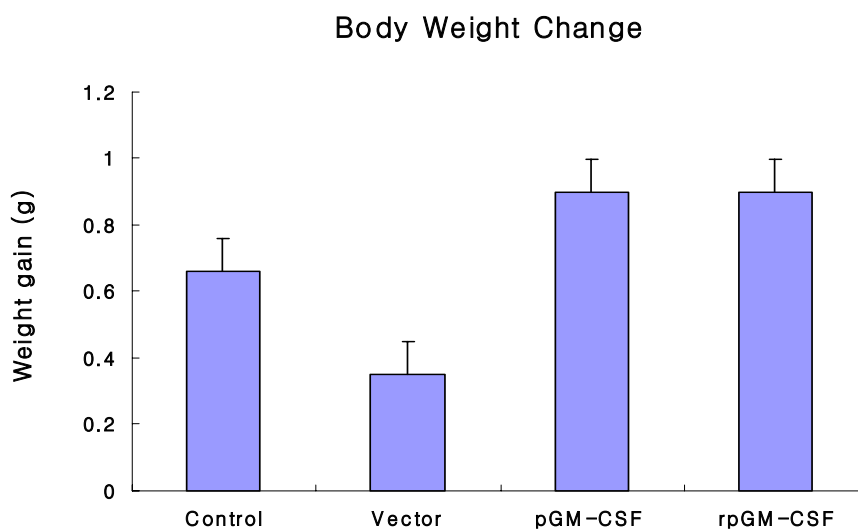


Fig. 7. Body weight change of mouse. Body weight was checked before inoculating GM-CSF. Body weight was generally increased after 4 days.

3. 유산균 형질 전환체 임상 실험 및 백신 운반체 개발

가. 돼지 GM-CSF 발현 유산균 생균제에 의한 질병 방제 효과 실험

1) 질병 발생률 조사

실험기간 대조군 1과 2 그리고 실험군 1과 2를 격리 사육하였다. 실험 초기에 대조군에서는 위축 및 설사 증상을 보이는 개체가 3주에 걸쳐 관찰되었다. 항생제 처리 등 조치를 통해 증세는 호전되었으나 동절기 자돈에서 발생할 수 있는 전형적인 설사 증상이 관찰된 것으로 보인다. 실험군에서는 실험 시작할 시기에 일부 자돈에서 설사 증상이 관찰되었으나 2주 후 호전되어 특이적인 질환적 증상은 관찰되지 않았다. (표 5.)

Table 1. 임상 증상 관찰 및 처치 내역

주 차 (기 간)	실 험 군 및 증 상				처 치	비 고
	대조군 #1	대조군 #2	실험군 #1	실험군 #2		
1 (1.27.~2.2.)	-	설사 2두 위축 2두	-	설사 2두	아목시펜 음수투약 바이트릴 2cc주사	
2 (2.3.~2.9.)	-	설사 1두	-	-	바이트릴 2cc주사	
3 (2.10.~2.16.)		위축 1두	-	-	환돈방 이동 바이트릴 2cc주사 로실린 2cc주사	
4 (2.17.~2.23.)	-	-	-	-	-	
5 (2.24.~3.2.)	환돈 1두	-	-	-	격리 수용 치료	
6 (3.3.~3.9.)	-	-	-	-	-	
7 (3.10.~3.16.)	-	-	-	위축 1두 (설사)	환돈방 이동	

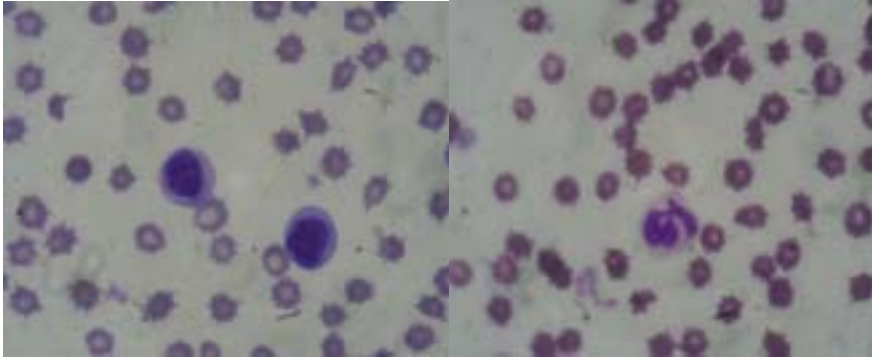
2) 혈액학적 변화 조사

가) Blood Differential Count

(1) Blood morphology

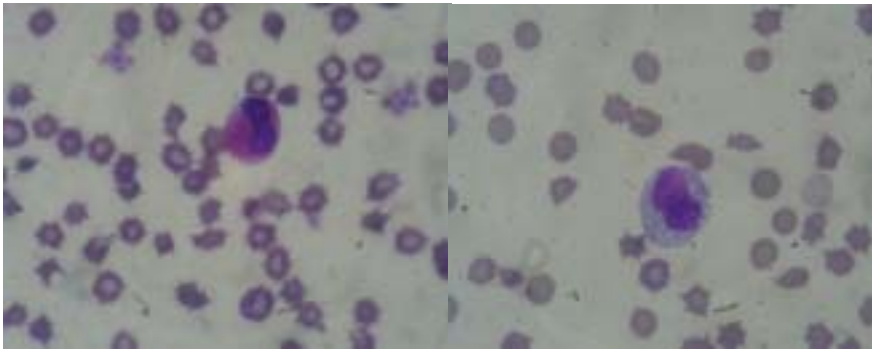
Lymphocyte

Segmented neutrophil



Eosinophil

Monocyte



Lymphocyte & monocyte

Lymphocyte & segmented neutrophil

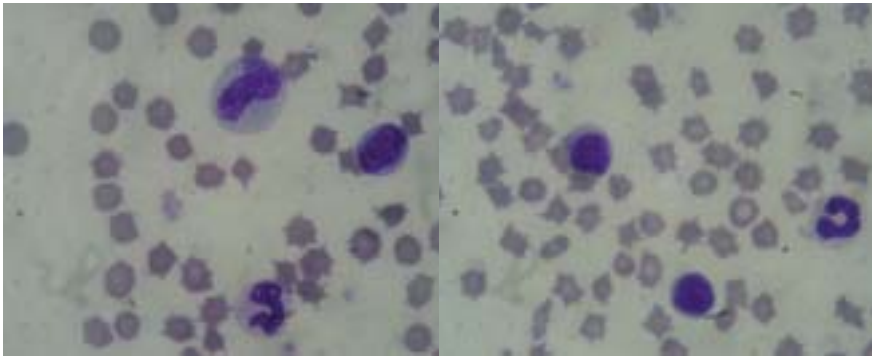
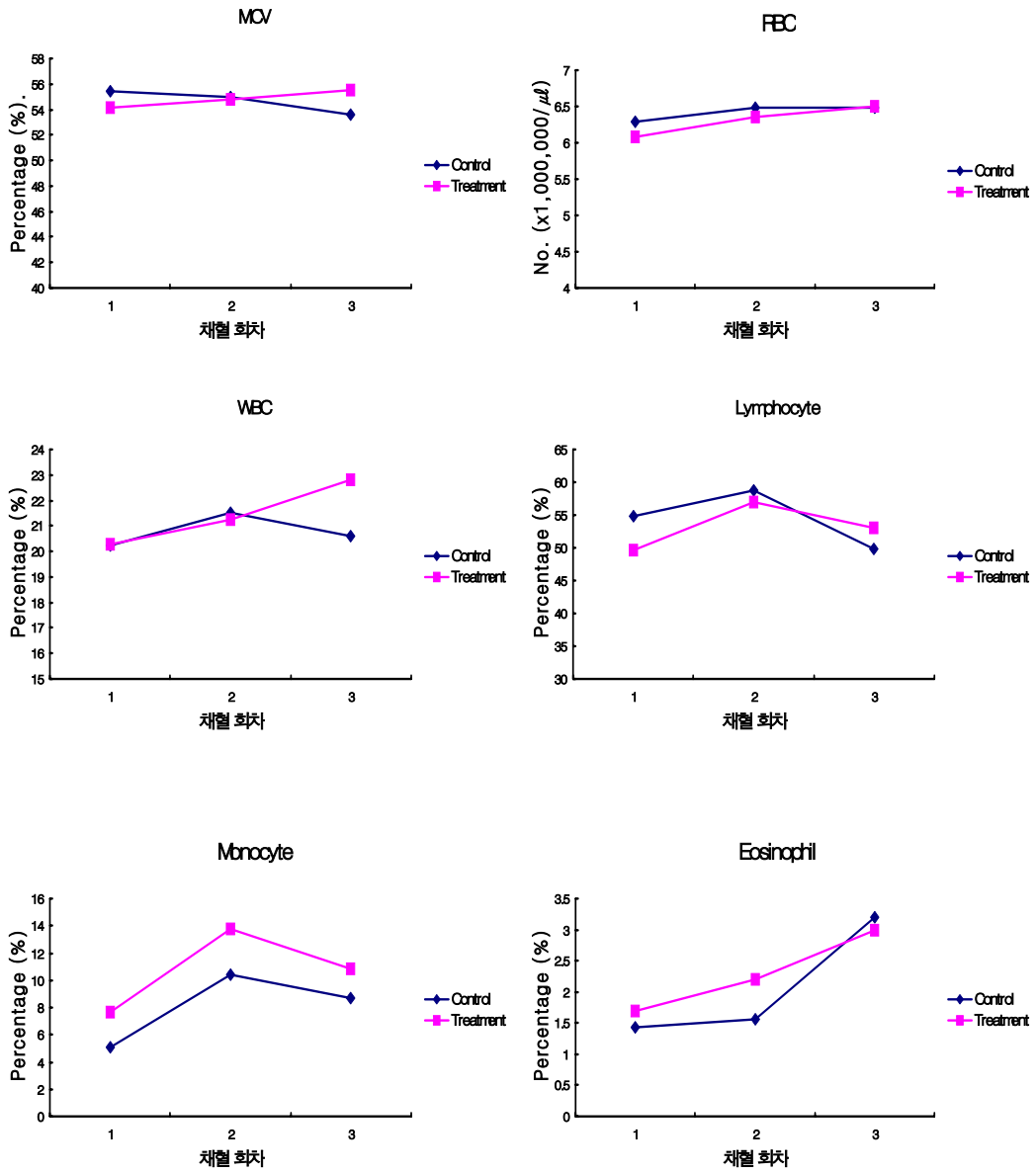


Fig. 1. The morphology of each blood type which were counted in this exp.

(2) 혈구수 변화



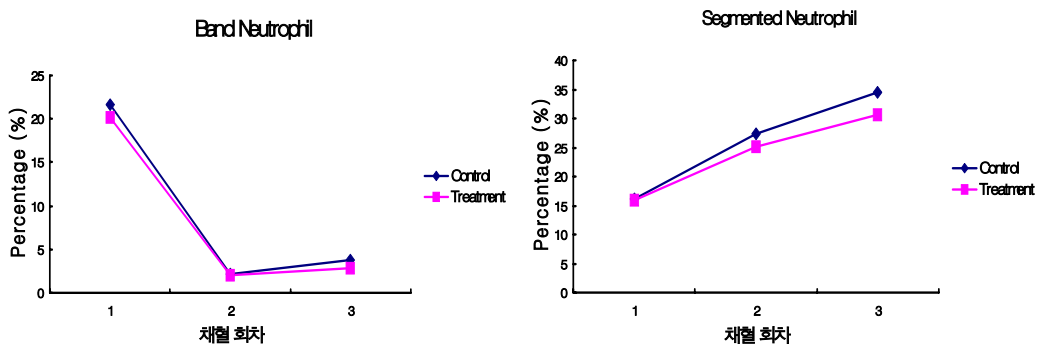


Fig. 2. The pattern of blood count

(3) 혈구 변화 추이

21일령 (3주령) 자돈을 0으로 시작하여 1주차 (28일, 4주령, 4주차 (49일, 7주령), 그리고 7주차 (70일, 10주령)에 Peripheral blood를 채혈하여 혈구수 분석을 하였다. 처리군과 대조군 사이에 전체 혈구수 (MCV)의 변화는 크게 관찰되지 않았다. 적혈구 (RBC)의 경우 초기에 대조군이 처리군에 비해 높은 수치를 나타내었으나 7주차에 이르러서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 백혈구 (WBC)의 경우 4주차까지는 유사한 수치를 보였으나 7주차에는 현저히 높은 수치를 보였다.

백혈구수의 각 혈구별 분포를 비교해보면 lymphocyte의 경우 전체적으로 증가하였다가 4주차 이후 감소하는 경향을 보였다. 실험초기엔 처리군이 대조군에 비해 현저히 낮은 수치를 보였으나 4주차 이후 비슷하였다가 7주차에선 오히려 높은 수치를 보였다. Monocyte 역시 4주차인 7주령을 기점으로 증가하였다가 감소하는 추이를 보이는데, 실험기간 내내 처리군이 대조군에 비해 높은 수치를 보였다. Eosinophil은 실험기간 동안 꾸준히 수가 증가하였는데, 처리군이 대조군에 비해 높은 수를 차지하였다가 7주차인 10주령쯤에 수치가 비슷하게 되었다. 미성숙 세포인 band neutrophil과 성숙 세포인 segmented neutrophil의 경우 실험 4주차인 7주령을 기점으로 그 분포가 현저하게 차이가 나기 시작하였다. Band neutrophil의 경우 4주차에 현격히 감소하였으나, segmented neutrophil의 경우 4주차부터 증가하여 그 수치를 유지하였다.

초기 실험군과 대조군의 혈구수를 비교하여 보았을 때 처리군에서 lymphocyte의 분화가 초기에 늦었지만 실험 후반 대조군보다 증가하였고, eosinophil은 초기에 높은 수치를 보였다. Monocyte의 경우 대조군에 비해 실험 기간 높은 수치를 보여 돼지 GM-CSF를 발현하는 *Lactobacillus casei*를 돼지의 사료에 첨가 하였을 때 직, 간접적으로 백혈구의 분화 및 성장에 영향을 주었음을 알 수 있었다.

돼지의 초기 면역체계는 분만 후 초유를 섭취한 후 모체로 받은 이행항체에 의해 초기 병원체로부터의 공격을 방어하는데 이는 신생아돈이 Th1보다는 Th2 type의 cytokine을 주로 분비하는 것과도 연관이 있다. 즉, fetus 상태에선 Th1 계열의 cytokine을 분비할 경우 placenta에 상해를 입혀 유산될 가능성이 높기에 주로 체액성 면역을 발달시켜왔다. 이에 세포성 면역은 발달이 늦어 면역의 취약부분이 아닐 수 있는데 이를 보강하기 위하여 colostrum을 분비되는 lymphocyte의 70~80%가 T lymphocyte이며 CD4/CD8의 비율도 혈액보다 낮은 0.57이다. 또한 분만 후 폐포 내 alveolar macrophage는 거의 존재하지 않으나 며칠이 지나면 혈관 내 monocyte가 폐 혈관을 통해 폐포 내로 이동하여 macrophage로 분화하고 2달이 지나면 70%의 clearance를 갖게 된다. 그전에 신생 아돈은 비장과 간에서 monocyte에 의해 혈액중의 병원체에 대한 75%의 clearance를 갖게 된다.

실험 결과와 연계하여, 돼지 GM-CSF를 발현하는 *Lactobacillus casei*를 사료에 첨가하여 급여 한 돈 군에서 대조군에 비해 높은 monocyte 수치를 보임으로서 분만 후 취약한 면역체계를 보강해주는 역할을 해줄 수 있을 것으로 보인다. 특히 monocyte의 phagocytic activity는 innate immunity에 중요한 역할을 하여 primary defence에 중요한 역할을 할 것이며, 두 번째 기능인 antigen presenting activity로 adaptive immunity와 연계되는 역할도 할 것으로 보인다. 이에 양 면역체계에 직·간접적으로 작용하여 취약한 아돈의 면역 증강 및 병원체에 대한 내성을 높여 줄 것으로 기대된다.

수치상의 변화는 관찰되지 않았으나 *in vitro* 상에서 neutrophil에 GM-CSF를 처리하였을 경우 antimicrobial activity의 증가, chemotaxis의 증가, cytokine 분비 증가등이 관찰되었다. Monocyte와 같이 GM-CSF의 영향을 받은 neutrophil이 초기 면역반응에 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

Dendritic cell의 경우 측정하지는 못하였지만 GM-CSF를 *in vitro* 상에서 처리한 경우 생성, 분화 및 antigen presenting activity가 증가한다는 보고를 통해 monocyte와 함께 면역반응 유도에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

나) 돼지 GM-CSF에 대한 항체가 검사

*Lactobacillus casei*에서 발현하는 재조합 pGM-CSF가 장내에서 항원으로서 작용하거나 *L. casei* 자체의 병원성 혹은 septicemia의 유발유무를 확인하기 위해 혈중 pGM-CSF에 대한 IgG와 IgM 항체가를 검사하였으나 대조군과 처리군 사이에 유의적인 차이점은 관찰되지 않았다. 사료로 투여된 재조합 돼지 GM-CSF의 경우 혈중에서 항체가가 형성되지 않아 재조합 단백질에 의한 면역반응은 유발되지 않았으며, 혈중 *L. casei*에 의한 감염반응도 일어나지 않았음을 간접적으로 알 수 있었다.

IgG의 경우 모체 이행항체가 감소하고 자돈 자체적으로 생산하는 IgG가 증가하여 전체적인 IgG가 변화하는 패턴을 따라 그래프가 형성되었다. IgM의 경우 IgM을 분비하는 B cell이 혈중에 나타나는 50일을 기점으로 서서히 증가하는 추이를 보였다. 이에 GM-CSF에 의한 항체가 변화라기보다 혈중 전체 IgG와 IgM의 변화에 따른 비특이적인 그래프의 변화로 보인다.

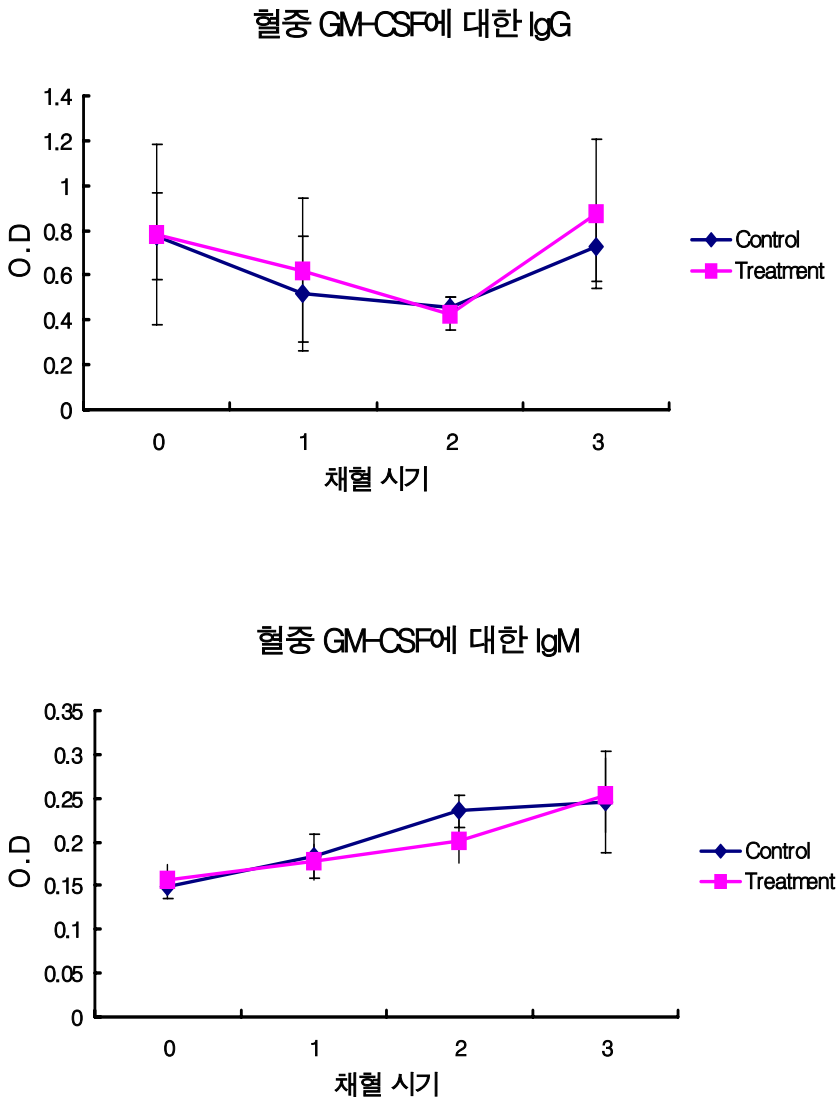


Fig. 3. The antibody titer against rpGM-CSF

나. 돼지 *Lactobacillus* spp에서 유래한 plasmid를 이용한 shuttle vector 제작

1) 후보균주 및 Plasmid DNA 선별

가) Plasmid DNA prep method.

Daniel's (1993)등이 개발한 방법을 이용하여 *Lactobacillus* spp.에 대한 plasmid DNA를 분리하였다. 기존의 방법을 사용할 경우 plasmid DNA의 존재 여부는 확인할 수 있으나 전반적으로 low-copy인 유산균 유래의 plasmid DNA를 분리하기엔 어려움이 있었다. 또한 단백질의 완전한 제거가 쉽지 않아 실험에 사용하기에 부적합 면이 있었다. 그에 따라 이를 보완하기 위해 약간의 과정을 추가하였다.

Step 4-1의 경우 원심을 두 번 실시하였으며, step 4-2와 step 6의 침전과정에서 3M sodium acetate (pH 5.2)를 시료의 1/10 volume으로 처리한 결과 분리한 plasmid DNA의 purity와 yield가 현저히 개선되었다.

침전을 향상시키기 위해 step 4-2와 step 6에서 50 μ g/ml의 glycogen을 처리하였으나 그다지 큰 효과는 관찰되지 않았다. 일부 균주에선 step 6에만 단독 처리한 경우 precipitation yield가 향상 되는 것이 관찰된 것으로 보아 지극히 low copy인 경우, 즉 낮은 농도에서의 DNA를 함유한 solution에 처리한 경우에만 일부 효과를 볼 수 있음을 알 수 있었다.

Purity를 높이기 위하여 step 5-3의 phenol/chloroform 처리를 2회 반복하여 보았다. 1회 실시한 경우와 비교하여 purity의 큰 차이는 관찰되지 않았으나, 2회 실시한 경우 damage가 커서 nick을 형성하는 plasmid DNA가 많이 발생하였다. 때문에 phenol/chloroform 처리는 1회에 한하여 실시하는 것이 상대적으로 좋은 결과를 얻었다.

기존의 상용화된 plasmid DNA kit의 경우 lysozyme을 전처리하여 plasmid DNA를 분리할 수 있었으나 분석 및 기타 다른 실험 목적으로 필요로 하는 plasmid DNA를 분리하기에는 불충분하였다.

나) Plasmid DNA profile

실험에 사용된 야외분리 *Lactobacillus* spp. 49개 균주중에서 modified daniel's method를 이용하여 plasmid DNA를 분리한 결과 약 10개 균주에서 벡터로 사용하기에 유용할 plasmid DNA를 가지고 있었다. 대략 2~10kb의 plasmid DNA로 유용 단백질의 전달 매개체로 개발 가능한 DNA인 것으로 보임.

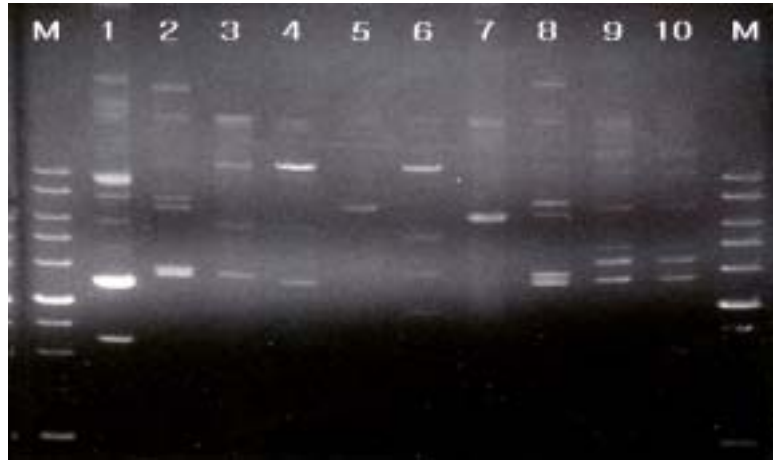


Fig. 4. Plasmid profile from wild isolated *Lactobacillus* spp. M, marker; Lane1, L9; Lane2, L28; Lane3, L36; Lane4, L42; Lane5, L43; Lane6, L44; Lane7, L45; Lane8, L46; Lane9, L48; Lane10, L49; M, marker.

2) *Lactobacillus* spp. 동정

가) API CH50L kit

Plasmid DNA profiling을 통해 선별된 10개 균주에 대해 API CH50L kit을 이용하여 생화학, 생리학적 특성에 근거한 동정을 실시한 결과 L43과 L45를 제외한 나머지 8개 균주 모두 97%이상의 유의성으로 *Lactobacillus fermentum*으로 확인되었다. L45의 경우 *Leuconostoc lactis*로 99.8%의 유의성으로 확인되었으며, L43의 경우 실험결과 유의적인 차이가 있으나, *Lactobacillus fermentum*과 *Leuconostoc lactis*의 특징을 가지고 있으며, *Lactobacillus fermentum*에 더 가까운 균주임을 확인하였다.



Fig. 5. API CH50L kit

Table 2. Identification of *Lactobacillus* spp. using API CH50L kit

Number		Identification	% I.D.	비 고
Serial	Sample			
1	L9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97.3	
2	L28	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98.2	
3	L36	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98.2	
4	L42	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.8	
5	L43	<i>Lactobacillus fermentum</i>	75.9	
		<i>Leuconostoc lactis</i>	23.6	
6	L44	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.8	
7	L45	<i>Leuconostoc lactis</i>	99.8	
8	L46	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98.2	
9	L48	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97.2	
10	L49	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97.4	

나) 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정

(1) Gene bank search

모든 미생물에 존재하는 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 비교해 보았다. API CH50L kit에서와 유사하게 L43과 L45는 상이한 유전 형태를 보였으나 나머지 8개 균주에서는 동일한 유전자 서열을 보였다. 8개 균주에 대해 gene-bank에서 유전자를 분석한 결과 아직 명명되지 않은 unknown sequence와 99%의 유사성을 보였다. 돼지, 닭 등의 장관 내에서 분리된 미생물의 한 종류로서 주로 장관 및 점막층에서 분리되는 것으로 알려져 있다.

염기서열이 알려진 균주 중에서 *L. reuteri*와 가장 근연관계가 가까운 균이며, L43의 경우는 *Lactobacillus johnsonii*로, L45의 경우는 *Lactobacillus murinus*로 확인 되었다.

Table 3. The 16S rRNA sequence of L9 and derivatives

CCGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCAC
TGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATA
ACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTT
TGTTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTA
GCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGA
GAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTACGACACGGTCCATACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGC
GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGT
GCGTGAGAGTAACTGTTACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGC
CTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAA
GAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAA
GCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATT
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCTACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCC
CTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGTCAGCTCGTGTTCGTA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGC
ATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAG
CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGGTGGATTACGTTCCCGGG

Table 4. The 16S rRNA sequence of L43

GAGTTTGGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAA
GTTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTGGTGCTTGCCTAAATGAAACTAGA
TACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAAGAGA
CTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGC
ATGTCTAGAGTTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGG
TGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCC
GAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTG
AAGAAAGATAGAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAA
AGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGAT
GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATAT
ATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATT
AGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTA
GTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGA
TCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC

Table 5. The 16S rRNA sequence of L45

ATTTTAGAGTTTGGGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATA
CATGCAAGTCGAACGAAACTTCTTTATCACCGAGTGCTTGCCTCACCATA
AAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCAAAAGA
GGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATAACCGCATAACCATAGTTACCGC
ATGGCAACTATGTAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCC
GAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGC
AACGCCGCGTGGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCCTGTTGTTAGAG
AAGAAAGTGCGTGAGAGTAACTGTTACGTTTCGACGGTATCTAACAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGACGAGAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
TGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
GTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCT
AACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGACAATCCTAGAGATAG
GACTTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTA
GTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGCGAGGTTTAGCAAA
TCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA
AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC

(2) Phylogenetic tree

16S rRNA의 염기서열을 Megalign 프로그램을 이용하여 각 균주별 근연관계를 알아보았다. 8개 균주의 대표균주로 L9를 사용하여 실시한 결과 *L. reuteri*와 가장 가까운 근연관계를 확인하였으며, *L. antri*, *L. oris*, *L. panis*, *L. vaginalis*, 그리고 *L. pontis*등과도 가까운 근연관계를 보여 짐막내 기생하는 *Lactobacillus* spp.들과

유사한 균주임을 알 수 있었다. 이로 미루어 점막내 면역 유도 및 유용 단백질 전달을 위한 숙주균주로서 유용한 성질을 가졌을 것으로 추측된다. L43은 가장 가까운 균주가 없으며, L45의 경우 *L. salivarius*, *L. pentosus*와 가까운 근연관계를 보였다.

(3) 생화학, 생리적 동정 결과와 유전학적 동정결과의 차이

생리 생화학적 방법인 API kit과 유전자 염기서열을 중심으로 동정하는 16S rRNA 분석의 차이는 표현 가능한 자료의 한계로 인한 것으로 보인다. 16S rRNA에서 가까운 근연관계를 보였던 *Lactobacillus* spp.중 API kit에서 표현 가능한 *Lactobacillus* spp.는 역시 *Lactobacillus fermentum*이었다. 다만 생리, 생화학적으로 구별이 어려운 균주에 대해서 유전적인 동정이 좀 더 자세한 분석 결과를 가져왔다. 이에 균에 대한 자세한 동정을 위해 생리, 생화학적 검사 외에 유전학적 검사가 보강되어야 할 것으로 보인다.

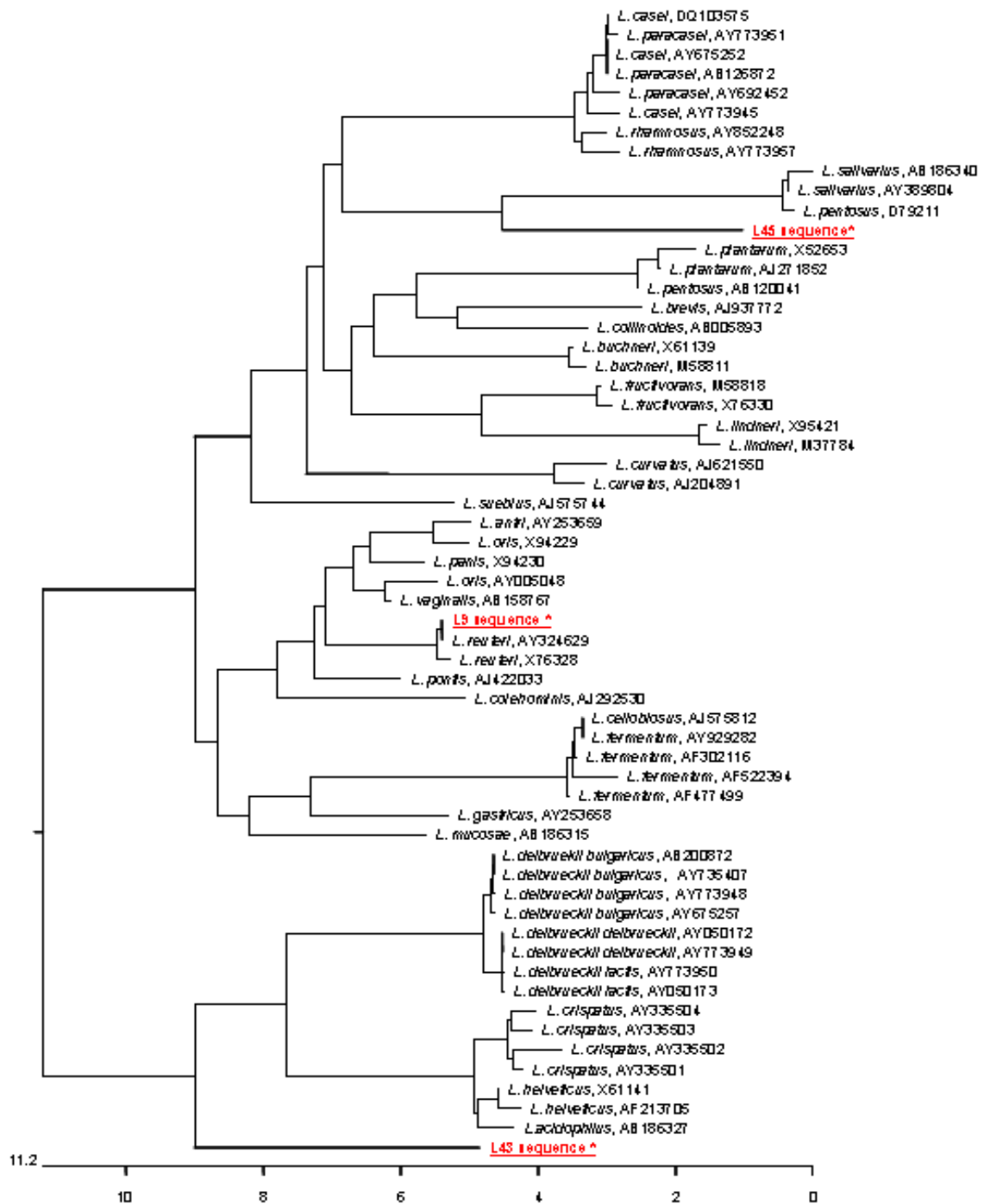


Fig. 6. Phylogenetic tree of selected *Lactobacillus* spp.

3) *Lactobacillus spp.*의 특성 조사

가) RAPD

(1) 유전자 증폭

Random primer를 사용하여 PCR 증폭한 결과 700bp와 1400bp의 공통적인 DNA 단편을 관찰 할 수 있었다. L43과 L45를 제외한 나머지 8개 균주의 경우 생리학, 생화학적 분석 및 16S rRNA를 이용한 분석결과 동일한 균주로 밝혀졌지만 RAPD의 결과 plasmid profile과 유사하게 각 균주별 특성이 각기 다름을 확인 할 수 있었다. 이에 각 균주의 특성과 비교하여 유전학적 분석에 도움이 될 것으로 예상된다.

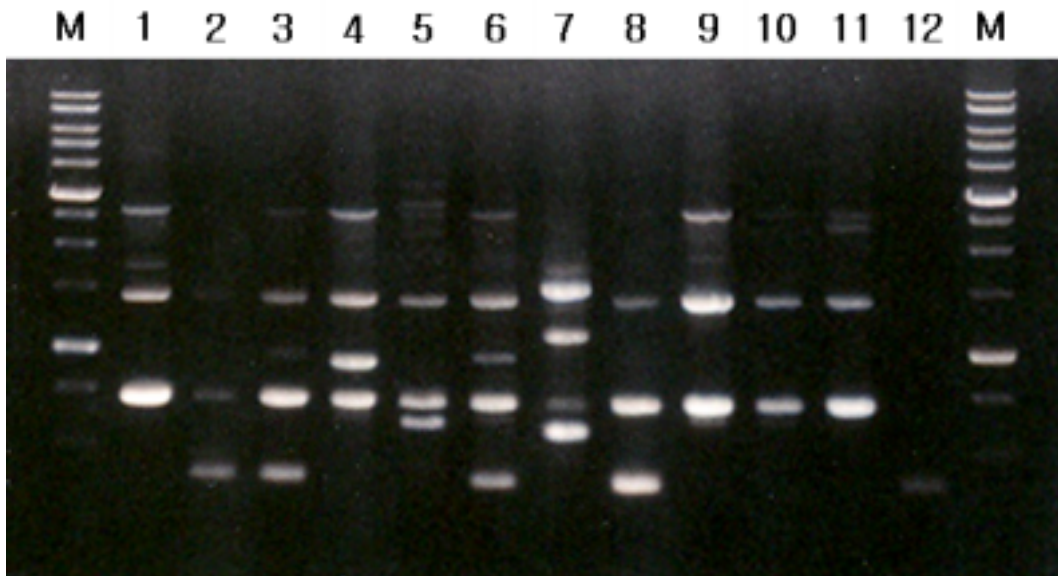


Fig. 7. RAPD M, marker; Lane1, L9; Lane2, L28; Lane3, L36; Lane4, L42; Lane5, L43; Lane6, L44; Lane7, L45; Lane8, L46; Lane9, L48; Lane10, L49; Lane11, W6-14; Lane12, Control; M, marker.

(2) Phylogenetic tree

RAPD의 결과를 분석하기 위하여 Quantity One®을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Cluster method에 따라 tree의 모양이 약간의 차이를 보이는것을 관

찰하였다. 균의 동정이 아닌 특성 분석을 위한 실험으로 plasmid DNA profile, 항생제 감수성 검사 등 기타 특성과 비교하여 용도에 맞는 cluster method를 선택해야 할 것으로 보인다.

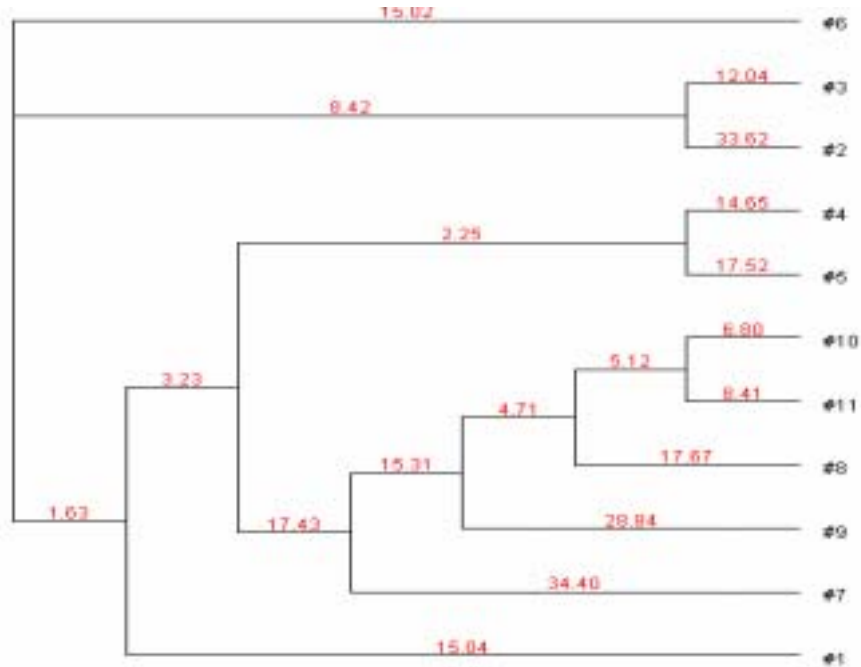


Fig. 8. Phylogenetic tree of RAPD using Neighbor Joining method. #1, L9; #2, L28; #3, L36; #4, L42; #5, L43; #6, L44; #7, L45; #8, L46; #9, L48; #10, L49; #11, W6-14.

나) 항생제 내성검사

유산균의 경우 질병 예방차원에서 사용되는 항생제에 저항하여 장내에서 생존하기 위하여 많은 항생제에 대하여 내성을 갖는 것이 일반적이다. 실험실에서 사용하는 17개 항생제에 대해 감수성 검사를 실시한 결과 chlroramphenicol, nalidixic acid, vancomycin, SXT, tetracyclin, enrifloxacin 그리고 lincomycin에 전반적으로 내성으로 보였다. neomycin, ampicillin에 대해선 아직 감수성이 남아 있었다. 균주별 항생제 내성검사에 대한 특이적인 결과는 없었다. L46은 성장 불량으로 실험을 실시하지 못하였다.

Table 6. 약의 분리주의 항생제 내성 검사

항생제		L9	L28	L36	L42	L43	L44	L45	L46	L48	L49	Interm. (mm)
Full Name	Abbr.											
Ampicillin	AM10	R	S	I	S	S	S	S	NT	S	S	14-16
Amikacin	AN30	S	S	I	S	R	I	S	NT	S	I	15-16
Bacitracin	B10	S	S	R	R	S	S	S	NT	S	S	9-12
Carbenicillin	CB100	R	S	R	I	S	S	S	NT	R	R	20-22
Tiamulin		R	S	S	S	S	S	R	NT	S	S	
Lincomycin		S	R	R	R	R	R	R	NT	R	R	
Enrofloxacin	ENR5	I	R	R	R	R	R	I	NT	R	R	18-22
Gentamycin	GM10	S	S	R	S	I	S	S	NT	S	S	13-14
Tetracyclin	TE30	I	R	R	R	R	R	R	NT	R	R	15-18
Streptomycin	S10	S	S	R	R	I	I	R	NT	I	I	12-14
Norfloxacin	NOR10	R	R	R	R	R	R	R	NT	R	R	13-16
Neomycin	N30	S	S	R	S	S	S	R	NT	R	R	13-14
Sulfamethoxazole /trimethprim	SXT	R	R	S	R	R	R	R	NT	R	R	11-15
Vancomycin	VA30	R	R	R	R	S	R	R	NT	R	R	10-11
Nalidixic acid	NA30	R	R	R	R	R	R	R	NT	R	R	14-18
Chloramphenicol	C30	R	S	S	R	R	S	S	NT	S	S	13-17
Colistin	CL10	S	R	R	S	R	R	I	NT	R	R	9-10

* S, susceptible; R, resistant; I, intermediate; NT, not tested.

다) API ZYM test

API ZYM test를 이용하여 각 균주가 보유하고 있는 활성 효소에 대하여 확인하였다.



Fig 9. API ZYM test kit

Table. 7. The characterization of selected *Lactobacillus* spp. using ZYM test

No.	Enzyme	L9	L28	L36	L42	L43	L44	L45	L46	L48	L49
1	Control	-	NT	-	-	-	-	-	NT	-	-
2	Alkaline phosphatase	-	NT	-	-	-	+	(+)	NT	-	(+)
3	Esterase (C4)	+	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+
4	Esterase Lipase (C8)	+	NT	+	+	(+)	+	+	NT	+	+
5	Lipase (C14)	(+)	NT	-	-	-	(+)	(+)	NT	-	(+)
6	Leucine arylamidase	+	NT	+	+	+	-	+	NT	+	+
7	Valine arylamidase	+	NT	+	+	+	(+)	(+)	NT	+	(+)
8	Crystine arylamidase	(+)	NT	-	(+)	+	(+)	+	NT	+	-
9	Trypsin	-	NT	-	-	-	-	-	NT	-	-
10	α -chymotrypsin	-	NT	-	-	-	-	-	NT	(+)	-
11	Acid phosphatase	+	NT	+	+	+	+	+	NT	+	+
12	naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	NT	+	+	-	+	+	NT	+	+
13	α -galactosidase	+	NT	+	+	+	-	+	NT	+	+
14	β -galactosidase	+	NT	+	+	+	-	+	NT	+	+
15	β -glucuronidase	+	NT	-	(+)	-	-	-	NT	-	-
16	α -glucosidase	+	NT	+	+	+	-	-	NT	+	+
17	β -glucosidase	-	NT	-	-	+	-	-	NT	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	NT	-	-	(+)	-	-	NT	-	-
19	α -mannosidase	-	NT	-	-	-	-	-	NT	-	-
20	α -fucosidase	-	NT	-	-	-	-	-	NT	-	-

* +, 양성; -, 음성; (+), 의양성; NT, not tested

4) 안전성 검사

안전성 검사를 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

Table 8. The safety test of selected *Lactobacillus* spp.

Test	L9	L28	L36	L42	L43	L44	L45	L46	L48	L49
Homolysis	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Ammonia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

가) 용혈 현상 검사

Sheep blood agar를 이용하여 용혈검사를 실시한 결과 L43번과 L45번의 균주에서 약한 α -hemolysis가 관찰되었다. 이에 후보 균주에서 제외하였다.

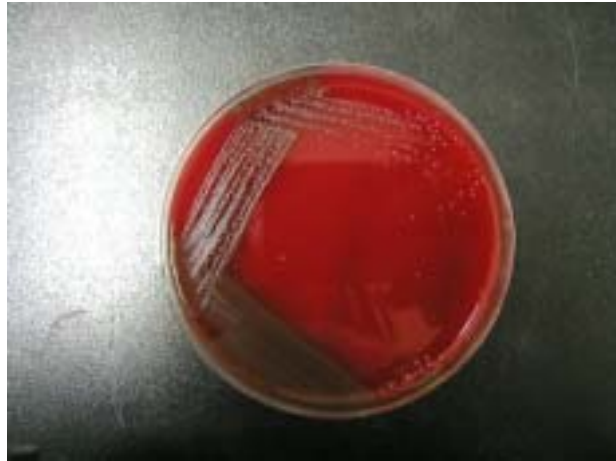


Fig. 10 Alpha-hemolysis fo L43 and L45, *Lactobacillus* spp.

나) 암모니아 생성

암모니아 생성 실험에서는 양성 대조균으로 사용한 *Proteus vulgaris*와 L42번 균주에서만 양성 반응을 보였다. 기타 균주와 음성 대조균인 *E. coli*에서는 색깔의 변화를 관찰 할 수 없었다.

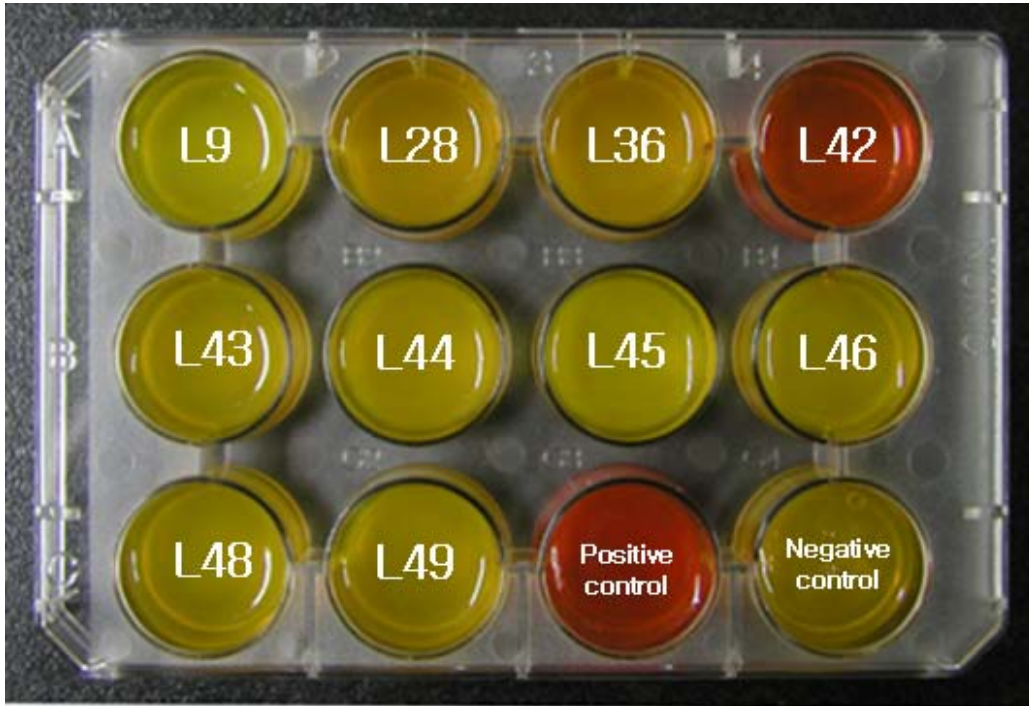


Fig. 11. Ammonia production test of *Lactobacillus* spp.

다) 인돌 생성

인돌 생성 실험결과 양성 대조군인 *E. coli*에서만 양성 반응을 보이고 후보균주 전체에선 색의 변화를 관찰 할 수 없었다. 음성 대조군으로는 *Pseudomonas aeruginosa*를 사용하였다.



Fig. 12. Indole production test of *Lactobacillus* spp.

5) 후보 Plasmid DNA 선정, cloning 및 sequencing

선발된 후보 균주 중 L9라 명명된 균주에서 plasmid DNA를 분리하여 약 9kb의 plasmid DNA는 enzyme site *SaII*을 이용하여 pQE30Xa vector에 약 5kb의 plasmid DNA는 enzyme site *HindIII*를 이용하여 pBluscript-SK(+)에 cloning하였다. Enzyme digestion을 통해 확인해본 결과 아래의 그림과 같이 cloning이 되었고, sequencing을 실시하여 plasmid DNA의 특성을 밝힌 후 shuttle vector 제작에 사용하려 한다.



Fig. 13. Cloning of plasmid DNA from L9. Lane1, 1kb DNA ladder; Lane2, ≈9 kb plasmid DNA cloned into pQE30xa; Lane3, ≈5kb plasmid DNA cloned into pBluscript-SK(+).

제 4절 생균제용 유산균주 개발 및 효능 연구

1. GM-CSF발현을 위한 생균제용 유산균주 선발 및 특성조사

가. 개에서의 유산균주 분리결과

1) 유산균의 분리

총 30마리 개의 분변으로부터 유산균 394 균주가 분리되었으며, 분리된 유산균은 여러 특성조사를 통해 잠정적으로 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* spp.의 유산균군으로 동정되었다. 이 중에서 *Lactobacillus*가 240 균주로 다른 유산균보다 더 높은 분포로 분리되었으며, *Streptococcus*와 *Bifidobacterium*은 각각 149 균주와 5 균주가 분리되었다. 연령별로 보면 이유자견에서 150 균주로 가장 많이 분리되었고 성견과 포유자견에서 각각 125와 119 균주가 분리되었다. 포유자견에서는 *Streptococcus*가 가장 많이 분리되었고, 이유자견과 성견에서는 *Lactobacillus*가 가장 많이 분리되었다. 30마리의 개의 분변에서 분리된 연령별 유산균의 분포표는 Table 3.에 나타내었다.

2) 내산성

개의 분변으로부터 분리된 394 균주의 유산균주를 대상으로 생균제용 균주로서의 특성을 알아보기 위하여 *in vitro* 선발시험을 실시하였다. 먼저, 분리균주의 위에서의 생존성을 알아보기 위하여 내산성 시험을 실시하였다. 낮은 pH에서 분리균주의 내산성을 시험하기 위해서 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 pH 2.0에서, *Bifidobacterium*은 pH 3.0에서 실험을 하였다. 그 결과 394 균주 중 180 균주가 pH 2.0에서 내산성을 나타내었다. *Lactobacillus*는 240 균주 중 121 균주(50.4%), *Streptococcus*는 149 균주 중 59 균주(39.6%)가 생존하였지만 *Bifidobacterium*은 5 균주 모두가 사멸하였다. 연령별의 결과를 보면 포유자견의 분리균은 119 균주 중 72 균주(60.5%), 이유자견의 분리균은 150 균주 중 65 균주(43.3%) 그리고 성견의 분리균은 125 균주 중 43균주(34.4%)가 생존하였다. (Table 4)

Table 3. Total number of strains isolated from the fecal samples of dog.

Bacterial groups	Dog			Total strains
	Suckling (n=10)	Weaning (n=10)	Adult (n=10)	
<i>Lactobacillus</i>	43	111	86	240
<i>Streptococcus</i>	75	36	38	149
<i>Bifidobacterium</i>	1	3	1	5
Total counts	119	150	125	394

Table 4. The number of acid tolerant strains isolated from the fecal specimens of dog for probiotic use.

Bacterial groups	Suckling	Weaning	Adult	Total strains
<i>Lactobacillus</i> ^a	30/43 ^d (69.8) ^e	51/111(45.9)	40/86(46.5)	121/240(50.4)
<i>Streptococcus</i> ^b	42/75(56.0)	14/36(38.9)	3/38(7.9)	59/149(39.6)
<i>Bifidobacterium</i> ^c	0/1(0.0)	0/3(0.0)	0/1(0.0)	0/5(0.0)
Total	72/119(60.5)	65/150(43.3)	43/125(34.4)	180/394(45.7)

^{a,b} pH 2.0 resistance

^c pH 3.0 resistance

^d The number of survived strains / the number of test strains

^e Frequency of selected strains(%)

3) 내담즙성

내산성 실험에서 생존한 180균주를 대상으로 내담즙성 실험을 실시하였다. 내담즙성은 소장상부에서 균주가 성장하고 생존하는데 중요한 성상으로 내담즙성 실험의 결과는 Table 5.에 나타내었다. 그 결과 모든 분리유산균주가 0.3% oxgall에 대하여 내담즙성을 나타내었다.

Table 5. The number of bile tolerant stains isolated from the fecal specimens of dog for probiotic use.

Bacterial groups	Suckling	Weaning	Adult	Total strains
<i>Lactobacillus</i>	43/43 ^a (100) ^b	111/111(100)	86/86(100)	240/240(100)
<i>Streptococcus</i>	75/75(100)	36/36(100)	38/38(100)	149/149(100)
<i>Bifidobacterium</i>	1/1(100)	3/3(100)	1/1(100)	5/5(100)
Total	119/119(100)	150/150(100)	125/125(100)	394/394(100)

^a The number of survived strains / the number of test strains

^b Frequency of selected strains(%)

4) 1차 선발균주

내산성과 내담즙성 시험에서 생존한 균주를 1, 2차 중복성 확인을 하여 1차 균주를 선발하였다. 선발된 1차 선발균주는 140 균주이었으며, 이 균주들의 연령별 분포는 Table 6에 나타내었다. *Lactobacillus*는 주로 이유자견에서 선발되었으며, *Streptococcus*는 주로 포유자견에서 선발되었다.

Table 6. Distribution of final first selected strains in different age groups.

Bacterial groups	Dog		
	Suckling	Weaning	Adult
<i>Lactobacillus</i>	17/93 (18.3)*	41/93 (44.1)	35/93 (37.6)
<i>Streptococcus</i>	35/47 (74.5)	12/47 (25.5)	0/47 (0.0)
<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-
Total	52/140 (37.1)	53/140 (37.8)	35/140 (25.0)

* Percentage of selected strains of different age groups

5) 내열성

1차 선발균주를 이용하여 사료에 첨가시 열처리에 저항할 수 있는 균주를 분리하기 위하여 75℃ 15분, 80℃ 5분에서 실시한 내열성 실험의 결과는 Table 7에 나타내었으며, 75℃, 80℃에서 모든 균주가 사멸하였다.

Table 7. Heat tolerance of first selected strains.

Bacterial groups	Dog (75°C, 15min)			Dog (80°C, 5min)			Total strains
	Suckling	Weaning	Adult	Suckling	Weaning	Adult	
<i>Lactobacillus</i>	0/17 ^a (0) ^b	0/41(0)	0/35(0)	0/17(0)	0/41(0)	0/35(0)	0/93(0)
<i>Streptococcus</i>	0/35(0)	0/12(0)	-	0/35(0)	0/12(0)	-	0/47(0)
<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-
Total	0/52(0)	0/53(0)	0/35(0)	0/52(0)	0/53(0)	0/35(0)	0/140(0)

^a The number of survived strains / the number of test strains

^b Frequency of selected strains(%)

75°C에 15분, 80°C에 5분간 노출시킨 내열성 실험에서 모든 분리균주가 사멸하였기 때문에 최종 선발 우수균주 10균주에 대하여는 다시 50°C-80°C에서 5분간 내열성 실험을 하였다. 그 결과 *Lactobacillus*가 *Streptococcus*보다 높은 내열성을 나타내었으며, *Lactobacillus*는 60°C까지 균수의 변화가 없었으며, 70°C에서 사멸한 CWL3-8과 CAL9-12를 제외하고 80°C에서 사멸하였다. *Streptococcus*는 CSS9-1가 60°C에서 균수가 감소한 것을 제외하고는 60°C까지는 균수의 변화가 없었고 모든 *Streptococcus*가 70°C에서 사멸하였다.(Fig. 4.과 Fig. 5.)

6) 항생제 내성

질병치료에 사용되는 항생제에 대한 최종 선발균의 저항성을 알아보기 위하여 항생제 내성 실험을 하였으며, 그 결과는 Table 8과 Fig. 6에 나타내었다. CWS3-11을 제외한 9균주가 3종류의 항생제(P+S, OT, AT)에는 감수성을 나타내었고, 2종류의 항생제(NF, S+T)에는 저항성을 나타내었다. CWS3-11은 OT에만 13mm의 억제환을 나타내었고, 나머지 4종류의 항생제에는 억제환을 형성하지 않았다. 반면 CWL7-10과 CWL8-13은 P+S, OT, AT에서 평균 30mm이상의 억제환을 형성하였다.

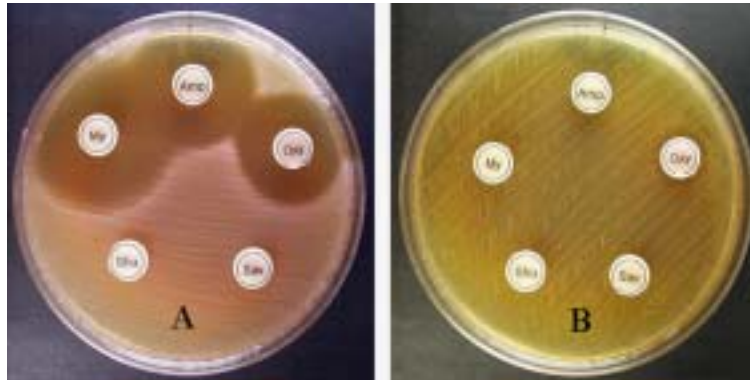


Fig. 6. Antibiotic resistance of final selected strains.

A: CWL8-13 (*Lactobacillus* spp.) showed the lowest antibiotic resistance of final selected strains., B: CWS3-11 (*Streptococcus* spp.) showed the highest antibiotic resistance of final selected strains.

Amp.(AT, Ampicillin trihydrate), My.(P+S, Potassium Penicillin G+Streptomycin Sulfate), Oxy.(OT, Oxytetracycline), Shu.(S+T, Sulfamethoxazole+Trimethoprim), Sav.(NF, Norfloxacin)

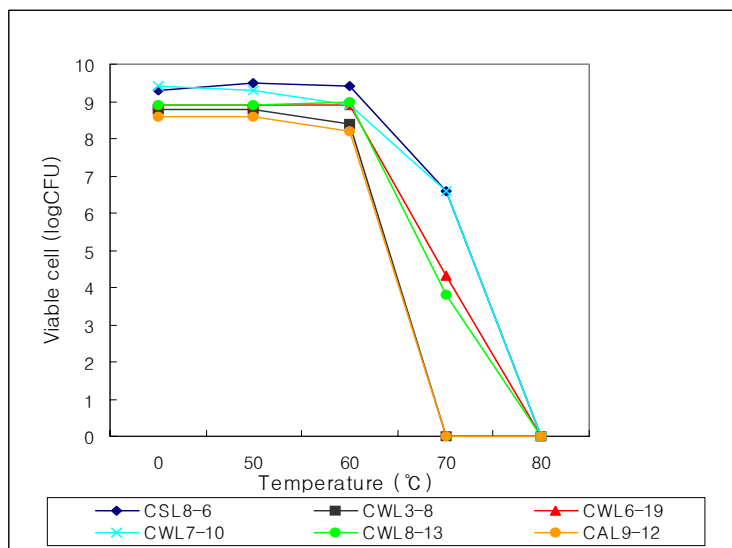


Fig. 4. Heat resistance of selected *Lactobacillus* at each exposed temperature.

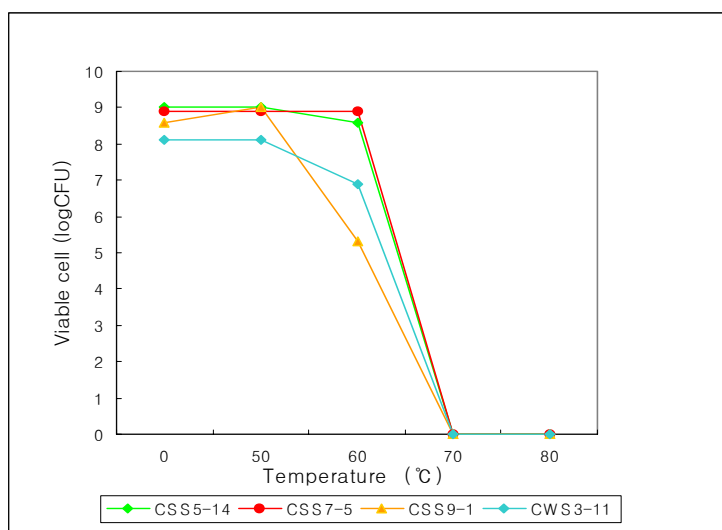


Fig. 5. Heat resistance of selected *Streptococcus* at each exposed temperature.

Table 8. Antibiotic resistance of final selected strains isolated from dog.

Bacterial strains	Antibiotic resistance (diameter, mm)				
	AT ^a	P+S	OT	S+T	NF
<i>Lactobacillus</i>					
CSL8-6	31	34	22	NI ^b	NI
CWL3-8	22	21	14	NI	NI
CWL6-19	22	27	13	NI	NI
CWL7-10	33	37	30	NI	NI
CWL8-13	33	39	28	NI	NI
CAL9-12	32	32	13	NI	NI
<i>Streptococcus</i>					
CSS5-14	28	23	14	NI	NI
CSS7-5	22	35	21	NI	NI
CSS9-1	22	23	14	NI	NI
CWS3-11	NI	NI	13	NI	NI

^a AT: Ampicillin trihydrate, P+S: Potassium Penicillin G+Streptomycin Sulfate, OT: Oxytetracycline, S+T: Sulfamethoxazole+Trimethoprim, NF: Norfloxacin

^b NI: Not inhibited.

7) 우수 유산균주의 선발

개에서 선발된 유산균 중에서 여러 특성조사를 통하여, *Lactobacillus* 6균주와 *Streptococcus* 4균주, 합계 10균주를 생균제용 우수균주로 최종 선발하였으며, 그 특성 결과표는 Table 9와 Fig 7에 나타내었다.

Table 9. Characteristics and identification of final selected bacteria from dog for probiotic use.

Characteristics	Probiotic bacteria				
	<i>Lactobacillus</i> CSL8-6	<i>Lactobacillus</i> CWL3-8	<i>Lactobacillus</i> CWL6-19	<i>Lactobacillus</i> CWL7-10	<i>Lactobacillus</i> CWL8-13
Gram stain	+	+	+	+	+
Cell morphology	R	R	R	R	R
Catalase test	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+
pH tolerance(2.0)	+	+	+	+	+
Acid formation(pH)	4	3	4	4	4
Bile tolerance	+	+	+	+	+
Tentative Identification	<i>L. parabuchneri</i>	<i>L. paracasei paracasei</i>	<i>L. malefermantans</i>	<i>L. oris</i>	<i>L. reuteri</i>

Table 9. (Continued)

Characteristics	Probiotic bacteria				
	<i>Lactobacillus</i> CAL9-12	<i>Streptococcus</i> CSS5-14	<i>Streptococcus</i> CSS7-5	<i>Streptococcus</i> CSS9-1	<i>Streptococcus</i> CWS3-11
Gram stain	+	+	+	+	+
Cell morphology	R	C	C	C	C
Catalase test	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+
pH tolerance (2.0)	+	+	+	+	+
Acid formation(pH)	3	4	4	4	4
Bile tolerance	+	+	+	+	+
Tentative Identification	<i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	<i>Pediococcus</i> s <i>parvulus</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. bifermantans</i> s

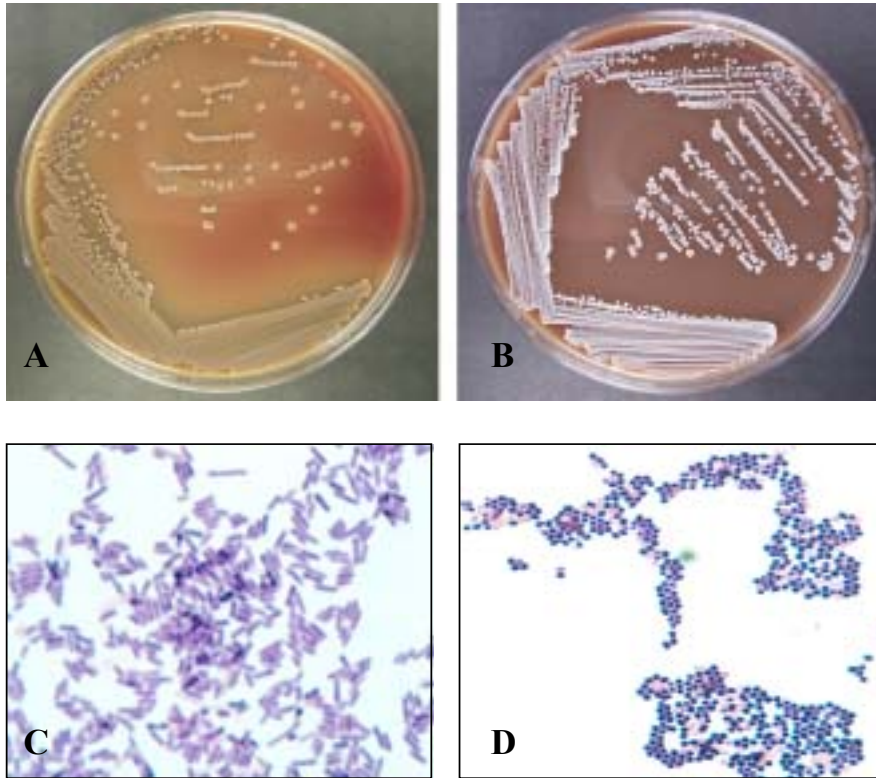


Fig. 7. Colony and cell morphology observed using light microscopy after Gram staining (x 1000) of final selected strains

A, C: CSL8-6 (*Lactobacillus* spp.), B, D: CSS7-5 (*Streptococcus* spp.)

나. 돼지의 유산균주 분리결과

1) 유산균의 분리

여러 연령별 돼지의 분변에서 분리된 총유산균은 647균주이었으며, 그 중에서 *Lactobacillus*가 527균주로 가장 높은 비율(81.5%)을 차지하였으며, *Streptococcus*는 95 균주로 14.7%, *Bifidobacterium*은 가장 낮은 비율 (3.4%)인 25균주만이 분리되었다.(Table 10) 이러한 분포 경향은 모돈을 제외한 모든 연령에서 비슷하게 나타났으며, 모돈의 경우는 *Lactobacillus*가 우점균이었으며, *Bifidobacterium*이 두 번째 높은 점유율을 나타내어, 다른 연령의 *Streptococcus*보다 높은 분포도를 나타내었다.

Table 10. Total number of lactic acid bacteria isolated from the fecal samples of pig.

Bacteria	Groups					Total strains
	Sucking (n=10)	Weaning (n=10)	Growth (n=5)	Adult (n=5)	Maternal (n=5)	
<i>Lactobacillus</i>	132	156	90	82	67	527(81.5%) ^a
<i>Streptococcus</i>	45	13	11	20	6	95(14.7%)
<i>Bifidobacterium</i>	2	6	0	1	16	25(3.4%)
Total	179	175	101	103	89	647

^a Percentage in parenthesis indicate the rate of survival.

2) 내산성

연령별 돼지의 분변에서 분리된 *Lactobacillus* 527 균주, *Streptococcus* 95 균주, *Bifidobacterium* 25 균주를 대상으로 실시된 pH 2.0 (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) 및 pH 3.0 (*Bifidobacterium*)에서의 내산성 검사 결과를 Table 11.에 나타내었다. 그 결과 총 627 균주 중 42.7%인 276 균주가 내산성을 나타내었으며, *Lactobacillus*는 527 균주 중 272 균주(51.6%), *Streptococcus*는 95 균주 중 2 균주(2.1%), 그리고 *Bifidobacterium*은 25 균주 중 2 균주 (8.0%)가 내산성 균주로 확인되었다. 연령별 분리균주의 내산성을 비교해보면, 이유자돈에서 분리된 유산균이 62.3%로 가장 높은 내산성을 보였고, 그 다음으로 육성돈, 성돈, 모돈의 균주 순으로 내산성을 나타냈으며 포유자돈의 분리 균주는 20.7%로 비교적 약한 저항성을 나타내었다.

3) 내담즙성

내산성을 나타내는 *Lactobacillus* 272 균주, *Streptococcus* 2 균주 및 *Bifidobacterium* 2 균주를 대상으로 실시된 0.3% Oxgall에서의 내담즙성 검사 결과를 Table 12에 나타내었다. 그 결과 시험한 전체 276 균주 모두 내담즙성을 갖는 것으로 확인 되었다.

Table 11. The number of acid tolerant strains isolated from fecal samples of pig

Bacteria	Group					Total strains
	Sucking	Weaning	Growth	Adult	Maternal	
<i>Lactobacillus</i> ^a	37/132 ^d (28.0%) ^e	108/156 (69.2%)	55/90 (61.1%)	42/82 (51.2%)	30/67 (44.8%)	272/527 (51.6%)
<i>Streptococcus</i> ^b	0/45 (0.0%)	1/13 (7.7%)	1/11 (9.1%)	0/20 (0.0%)	0/6 (0.0%)	2/95 (2.1%)
<i>Bifidobacterium</i> ^c	0/2 (0.0%)	0/6 (0.0%)	–	0/1 (0.0%)	2/16 (12.5%)	2/25 (8.0%)

^{a,b} Acid tolerance test carried out into pH 2.0.

^c Acid tolerance test carried out into pH 3.0.

^d The number of survived strains / the number of test strains.

^e Percentage in parenthesis indicate the rate of survival.

Table 12. The number of bile resistant strains isolated from fecal samples of pig

Bacteria	Group					Total strains
	Sucking	Weaning	Growth	Adult	Maternal	
<i>Lactobacillus</i>	37/37 ^a (100.0%) ^b	108/108 (100.0%)	55/55 (100.0%)	42/42 (100.0%)	30/30 (100.0%)	272/272 (100.0%)
<i>Streptococcus</i>	–	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	–	–	2/2 (100.0%)
<i>Bifidobacterium</i>	–	–	–	–	2/2 (100.0%)	2/2 (100.0%)

^a The number of survived strains / the number of test strains

^b Percentage in parenthesis indicate the rate of survival.

4) 내열성

내산성 및 내담즙성이 있는 것으로 확인된 *Lactobacillus* 272 균주, *Streptococcus* 2 균주 및 *Bifidobacterium* 2 균주를 대상으로 70 °C, 5 min 및 80 °C, 5 min 내열성 검사를 실시한 결과를 Table 13에 나타내었다. 70 °C, 5 min 에서는 *Lactobacillus* 272 균주 중 107 균주 (39.3%)가 내열성을 나타내었으나, *Streptococcus* 2 균주와 *Bifidobacterium* 2 균주는 모두 사멸하였다.

Table 13. The number of heat tolerant strains isolated from fecal samples of pig

Bacteria	Heat condition	Group					Total strains
		Sucking	Weaning	Growth	Adult	Maternal	
<i>Lactobacillus</i>	70 °C, 5min	1/37 ^a (2.7%) ^b	54/108 (50.0%)	23/55 (41.8%)	23/42 (54.8%)	6/30 (20.0%)	107/272 (39.3%)
	80 °C, 5min	0/37 (0.0%)	0/108 (0.0%)	0/55 (0.0%)	0/42 (0.0%)	0/30 (0.0%)	0/272 (0.0%)
<i>Streptococcus</i>	70 °C, 5min	-	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	-	-	0/2 (0.0%)
	80 °C, 5min	-	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	-	-	0/2 (0.0%)
<i>Bifidobacterium</i>	70 °C, 5min	-	-	-	-	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)
	80 °C, 5min	-	-	-	-	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)
Total	70 °C, 5min	1/37 (2.7%)	54/109 (49.5%)	23/56 (41.1%)	23/42 (54.8%)	6/32 (18.8%)	107/276 (38.8%)
	80 °C, 5min	0/37 (0.0%)	0/109 (0.0%)	0/56 (0.0%)	0/42 (0.0%)	0/32 (0.0%)	0/276 (0.0%)

^a The number of survived strains / the number of test strains

^b Percentage in parenthesis indicate the rate of survival.

5) 항생제 내성

내열성이 있는 *Lactobacillus* 107 균주 중 중복되는 16 균주를 제외한 86 균주와 *Bifidobacterium* 18 균주를 대상으로 10종류의 항생제에 대한 내성 검사를 실시한 결과를 Table 14에 나타내었다. *Lactobacillus*는 Norfloxacin을 제외한 나머지 9종류의 항생제에 보다 높은 저항성을 나타내었다. 항생제 종류별 저항성은 CTC (Chlortetracycline HCl)가 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*에서 모두 100%로 저항성을 나타내어 가장 높았다. 한편 PS(Potassium penicillin G + Streptomycin sulfate)

에 대해서는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*의 104 균주 모두 저항성을 나타내지 못하였다. *Bifidobacterium*은 Norfloxacin에 100% 저항성을 보였고, ST와 TS에 각각 61.6%와 22.2%의 저항성을 나타내었으나 나머지 항생제에는 전혀 저항성을 보이지 않았다.

Table 14. The number of antimicrobial resistant strains isolated from fecal samples of pig

Antibiotics	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Total
CTC ^c	86/86 ^a (100%) ^b	18/18 (100%)	104/104 (100%)
Amoxicillin	8/86 (9.3%)	0/18 (0.0%)	8/104 (7.7%)
CPS ^c	4/86 (4.7%)	0/18 (0.0%)	4/104 (3.8%)
TC ^c	85/86 (98.8%)	0/18 (0.0%)	85/104 (81.7%)
PS ^c	0/86 (0.0%)	0/18 (0.0%)	0/104 (0.0%)
Oxytetracycline	19/86 (22.1%)	0/18 (0.0%)	19/104 (18.3%)
Norfloxacin	82/86 (95.3%)	18/18 (100%)	100/104 (96.2%)
ST ^c	86/86 (100%)	11/18 (61.1%)	97/104 (93.3%)
Ampicillin	8/86 (9.3%)	0/18 (0.0%)	8/104 (7.7%)
TS ^c	75/86 (87.2%)	4/18 (22.2%)	79/104 (76.0%)

^a The number of survived strains / the number of test strains

^b Percentage in parenthesis indicate the rate of survival.

^c Abbreviation of antibiotics included. CTC : Chlortetracycline HCl, CPS : Chlortetracycline HCl + Penicillin G procaine + Sulfathiazole, TC : Tiamuline hydrogen-fumarate +Chlortetracycline HCl, PS : Potassium Penicillin G + Streptomycin Sulfate, ST :Sulfamethoxazole + Trimethoprim, TS : Tylosin phosphate + Sulfamethazine

6) 생균제용 우수 유산균주의 선발

연령별 돼지의 분변에서 분리된 유산균 중 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성 등을 거쳐 최종 10균주를 생균제용 우수 유산균주로 선발하였으며, 그 특성은 Table 15.에 나타내었다. 선발된 우수 유산균주는 *Lactobacillus* 5 균주, *Bifidobacterium* 3균주, *Streptococcus* 2 균주의 합계 10균주이었다.(Fig 8)

Table 15. Characteristics of selected strains from pig for probiotic use.

Strain	Media	Gram stain	Cell morph. ^a	Catalase test	Aerobic growth	Bile tol. ^b	pH tol. ^c	Heat ^d		Antibiotic resist. ^e	Tentative Identification
								70°C 5min	80°C 5min		
PWL6-14	BS	+	Rod	-	+	+	+	+	-	++	<i>Lactobacillus spp.</i>
PGL5-16	BL	+	Rod	-	+	+	+	+	-	+++	<i>L. paracasei</i>
PAL2-17	BL	+	Rod	-	+	+	+	+	-	++	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
PAL4-18	BL	+	Rod	-	+	+	+	+	-	++	<i>Lactobacillus spp.</i>
PGL4-17	BL	+	Rod	-	+	+	+	+	-	+	<i>L. delbruekii bulgaricus</i>
PMB2-11	BS	+	Y-shape	-	-	+	+	-	-	+	<i>Bifidobacterium boum</i>
PMB4-10	BS	+	Y-shape	-	-	+	-	-	-	+	<i>B. animalis</i>
PMB1-10	BS	+	Y-shape	-	-	+	+	-	-	-	<i>B. bifidum</i>
PSS2-17	TAT AC	+	Cocci	-	+	/ ^g	/	/	/	/	<i>Weissella confusa</i>
PSS7-10	TAT AC	+	Cocci	-	+	/	/	/	/	/	<i>L. brevis</i>

^a Cell morphology, ^b Bile tolerance, ^c Acid tolerance, ^d Heat tolerance,

^e Antibiotic resistance, ^g Not tested

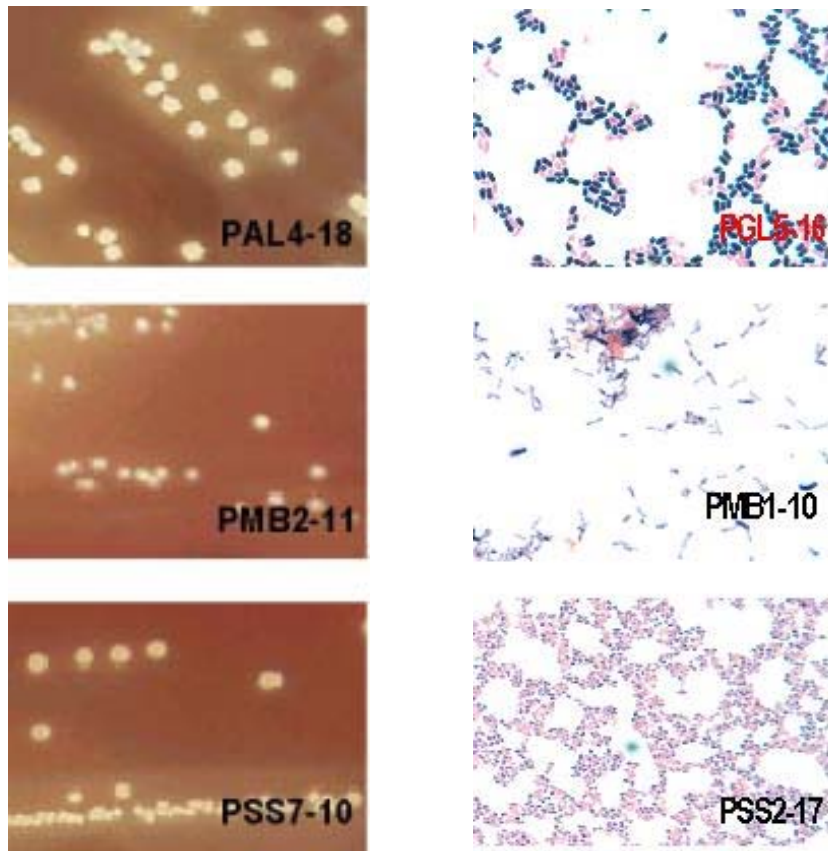


Fig. 8. Colony and cell morphology of final isolates at BL medium. PAL4-18: *Lactobacillus* spp., PMB2-11: *Bifidobacterium* spp., and PSS7-10: *Streptococcus* spp., PGL5-16: *Lactobacillus* spp., PMB1-10: *Bifidobacterium* spp., and PSS2-17: *Streptococcus* spp.

2. GM-CSF가 발현된 유산균주의 안정성 및 *in vitro* 효능조사

가. 장관세포에 대한 부착능력 및 정착성

1) 양돈용 유산균주 결과

본 실험에서는 병원균 억제능 실험 결과로 선발된 *Bifidobacterium* 10 균주와 *Lactobacillus* 20균주, *Streptococcus* 9균주를 대상으로 Caco-2 cell에 대한 부착성 실험 결과를 Table 16에 나타내었다. Fig. 9.에는 양성 대조군과 음성 대조군 및 실험균주의 Caco-2 cell에 대한 부착상태를 사진으로 나타내었다. 일반적으로 실험 균주 대부분의 부착능은 대조군에 비해서 높게 나타났으며, 양성 대조군인

Lactococcus lactis NIAI 527과 비교하였을 때, *Lactobacillus*의 경우는 16 균주가 대조군과 같거나 (+) 그 보다 높은 부착능 (++) 또는 (+++)을 나타내었다. 그 중에서도 PWL6-14, PGL4-17, PAL4-18균주는 시험균주 중 가장 높은 부착능 (+++)을 나타내었다. *Bifidobacterium*은 6 균주가 양성 대조군과 같은 정도의 부착능을 나타내었고, *Streptococcus*의 경우 4균주가 양성 대조군과 같거나(+), 높은 (++) 부착능을 나타내었다.

Table 16. *In vitro* adherence assay of selected LAB from pig to human intestinal epithelial Caco-2 cell cultures

Bacteria	Caco-2 cell attachment ^a			
	-	+	++	+++
<i>Lactobacillus</i>	4/20 ^b (20.0%) ^c	4/20 (20.0%)	9/20 (45.0%)	3/20 (15.0%)
<i>Bifidobacterium</i>	4/10 (40.0%)	6/10 (60.0%)	-	-
<i>Streptococcus</i>	5/9 (55.6%)	2/9 (22.2%)	2/9 (22.2%)	-
Total	13/39 (33.3%)	12/39 (30.8%)	11/39 (28.2%)	3/39 (7.7%)

^a Indicated adherence activity as compared with control

- : equal with negative strain(*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, Meiji Ltd., Japan)

+ : equal with positive strain(*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, Korea).

++: >150 bacteria / 5 Caco-2 cell

+++: too much to count.

^b The number of corresponding strains / the number of test strains

^c Percentage about number of corresponding strains in test strains.

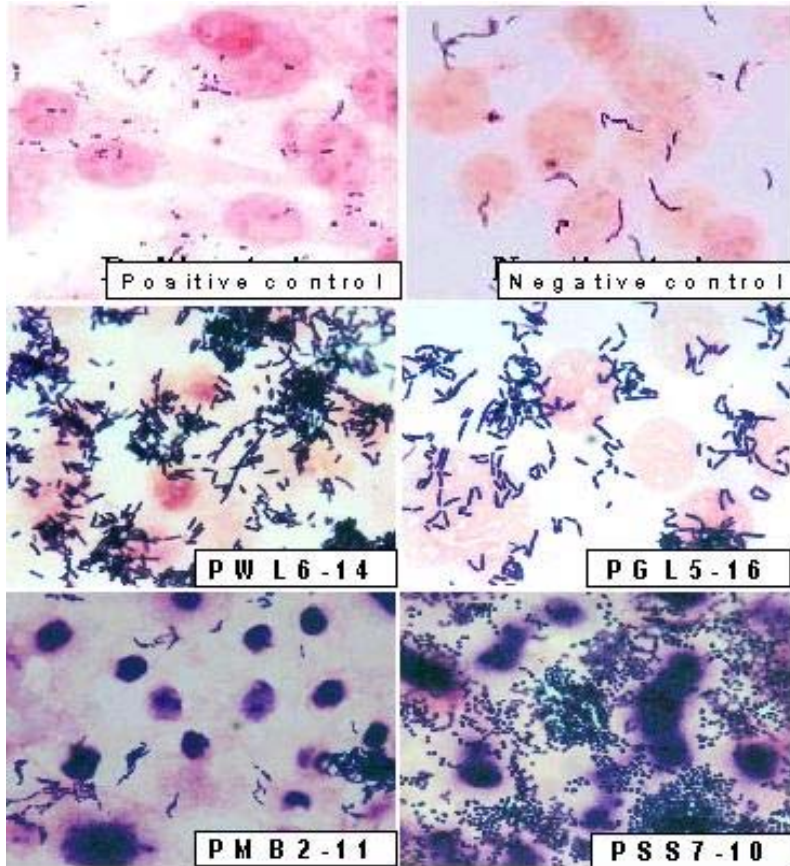


Fig. 9. Adherence of selected lactic acid bacteria from pig to Caco-2 cell observed using light microscopy after Gram staining(x1,000). Positive strain (*Lactococcus* spp. L7558, Meiji Ltd. Japan), Negative strain (*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111), PWL6-14 and PGL5-16: *Lactobacillus* spp., PMB2-11: *Bifidobacterium* spp., and PSS7-10: *Streptococcus* spp.

2) 애완견용 유산균주 결과

병원성세균에 대한 억제능이 우수한 *Lactobacillus* 25균주, *Streptococcus* 15균주, 합계 40균주의 Caco-2 cell에 대한 부착성 실험 결과를 Table 17와 Fig 10에 나타내었다. 양성 대조균인 *Lactococcus lactis* NIAI 527과 비교하였을 때, *Lactobacillus*의 경우는 25균주 중 6균주(24%)가 양성대조균과 같은 (+)성상을 나타내었으며, 4

균주(16%)는 (++)의 성장을 나타내었다. 특히 *Lactobacillus* 6균주(24%)인 CSL8-6, CWL3-8, CWL6-19, CWL7-10, CWL8-13, CAL9-12 균주는 양성대조군보다 높은 부착성인 +++의 부착성을 나타내었다.(Table 18) 한편 실험에 사용한 *Streptococcus* 15균주 중 CSS5-14, CSS7-5, CSS9-1, CWS3-11균주는 대조군보다 높은 부착능 (++) 또는 (+++)을 나타내었다.

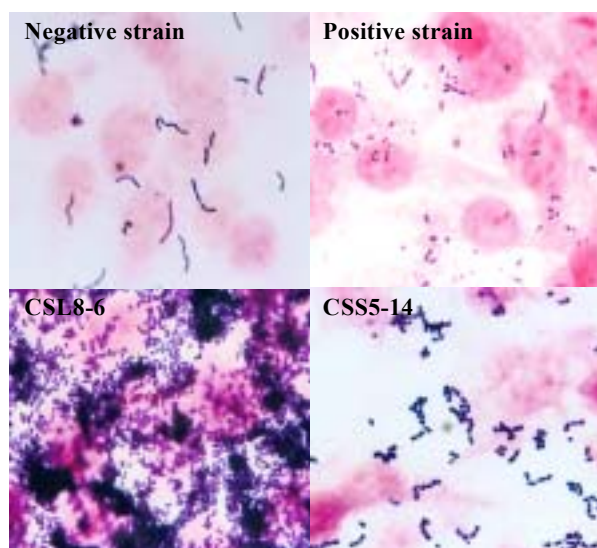


Fig. 10. Adherence of selected strains from dog to Caco-2 cell observed using light microscopy after Gram staining (X 1000). (Positive strain: *Lactococcus* spp. L7558, Meiji Ltd. Japan, Negative strain: *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, CSL8-6: *Lactobacillus* spp., CSS5-14: *Streptococcus* spp.)

Table 17. *In vitro* adherence assay of selected LAB from dog to Caco-2 cell cultures

Bacterial groups	Caco-2 cell attachment			
	-	+	++	+++
<i>Lactobacillus</i>	9/25 (36.0)	6/25 (24.0)	4/25 (16.0)	6/25 (24.0)
<i>Streptococcus</i>	2/15 (13.3)	10/15 (66.7)	2/15 (13.3)	1/15 (6.7)
Total	10/40 (25.0)	17/40 (42.5)	6/40 (15.0)	7/40 (17.5)

- : Negative strain (*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111)

+ : Positive strain (*Lactococcus lactis* 7558)

++: >150 bacteria/ 5 Caco-2 cell

+++ : too much

Table 18. *In vitro* adherence assay of final selected strain from dog to Caco-2 cell culture.

Bacterial strain	OD _{610nm} ^a	Attachment (bacteria/5 Caco 2-cell)	
<i>Lactococcus lactis</i> 7558	0.47	108±15.64	+ ^b
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3111	2.04	48±15.06	-
<i>Lactobacillus</i>			
CSL8-6	1.90	TM ^c	+++
CWL3-8	1.52	TM	+++
CWL6-19	1.84	TM	+++
CWL7-10	1.90	TM	+++
CWL8-13	1.90	TM	+++
CAL9-12	1.77	TM	+++
<i>Streptococcus</i>			
CSS5-14	1.28	127±20.56	++
CSS7-5	1.52	199±32.54*	++
CSS9-1	1.23	TM	+++
CWS3-11	0.93	134±38.90	++

^a Optical density (OD_{610nm}) of test strains (5ml, in PBS) that were inoculated in the culture medium for the attachment to Caco-2 cells.

^b Indicated adherence activity as compared with positive strain (+, *Lactococcus lactis* L7558, Meiji Ltd., Japan) and negative strain (-, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, Korea).

^c The too much strain by direct counting.

* Significantly different from the positive control (Student's t-test, $P > 0.01$).

나. 병원성 세균에 대한 길항조사

1) 양돈용 유산균주 결과

Bifidobacterium 18 균주와 항생제 내성 검사로 선발된 *Lactobacillus* 70 균주를 대상으로 실시한 병원균 억제능 실험 결과를 Table 19 및 Fig 11에 나타내었다. *Bifidobacterium*은 27.8%인 5 균주가, *Lactobacillus*는 80.0%인 56 균주가 하나 또는 그 이상의 병원균 억제 활성을 나타내었다. *Sal. enteritidis* KCCM 12021에 대한 억제활성은 51.1 %로써, *S. aureus* KCTC 1916의 41.0%와 *E.coli* O157:H7의 26.1 %에 비해 높게 나타났다. *Lactobacillus*는 70 균주 중 14.3%인 10 균주가 세

종류의 병원균에 대한 높은 억제능을 보였으나, *Bifidobacterium*의 경우 세 종류의 병원균에 모두 저항성을 나타내는 균주는 나타나지 않았다.

Table 19. The antimicrobial activity of LAB isolates from pig against pathogenic bacteria using the agar spot assay

Group	Bacteria	Pathogenic bacteria ^a			All bacteria ^d
		<i>E. coli</i> O157:H7 USDA	<i>Sal. enteritidis</i> KCCM 12021	<i>S. aureus</i> KCTC 1916	
Suckling	<i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-
	<i>Bifidobacterium</i>	0/1 ^b (0.0) ^c	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)
Weaning	<i>Lactobacillus</i>	14/32 (43.8)	17/32 (53.1)	17/32 (53.1)	5/32 (15.6)
	<i>Bifidobacterium</i>	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)
Growth	<i>Lactobacillus</i>	4/18 (22.2)	11/18 (61.1)	4/18 (22.2)	2/18 (11.1)
	<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-
Adult	<i>Lactobacillus</i>	2/16 (12.5)	9/16 (56.3)	10/16 (62.5)	2/16 (12.5)
	<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-
Maternal	<i>Lactobacillus</i>	1/4 (25.0)	3/4 (75.0)	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)
	<i>Bifidobacterium</i>	2/15 (13.3)	5/15 (33.3)	2/15 (13.3)	0/15 (0.0)
Group total	<i>Lactobacillus</i>	21/70 (30.0)	40/70 (57.1)	34/70 (48.6)	10/70 (14.3)
	<i>Bifidobacterium</i>	2/18 (11.1)	5/18 (27.8)	2/18 (11.1)	0/18 (0.0)
	Total	23/88 (26.1)	45/88 (51.1)	36/88 (40.9)	10/88 (11.4)

^a The antimicrobial activity was assessed to determine an inhibition zone diffused around a spot.

^b The number of LAB appeared a clear inhibition zone of more than 3mm around a spot in indicator bacteria each.

^c Percentage about number of selected strains in test strains.

^d The number of LAB appeared the inhibition zone of 3 mm above in all of three indicator bacteria.

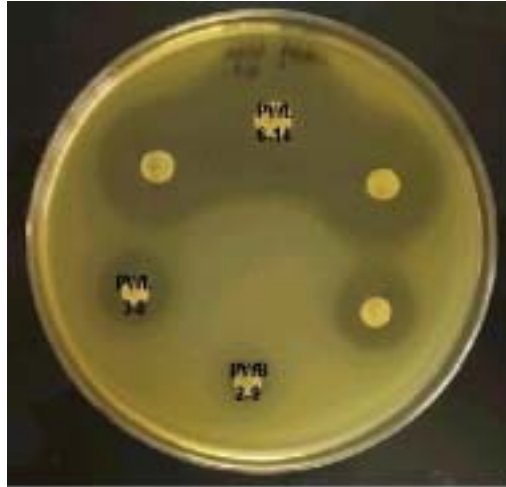


Fig. 11. Inhibition of *E. coli* O157 (USDA, human isolate) by isolated lactic acid bacteria from pig using agar spot assay. PWL6-14 showed the highest inhibition in all test strains. PWL3-8 showed moderate inhibition. PWB2-9 showed no inhibition.

2) 애완견용 유산균주 결과

Lactobacillus 93균주, *Streptococcus* 47균주, 합계 140균주를 대상으로 *E. coli* O157:H7 (USDA, human isolate), *E. coli* KCTC 1467, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 병원균에 대한 억제능을 시험한 결과를 Table 20.와 Fig. 12에 나타내었다. 그 결과 *E. coli* O157:H7 (USDA, human isolate)에 대한 억제능은 140균주 중 14.3%인 20균주만이 억제능을 나타내었지만, *E. coli* KCTC 1467에 대해서는 97.1%인 136균주가 8mm이상의 inhibition zone을 형성하여 매우 높은 억제능을 나타내었다. 한편 *Salmonella enteritidis* KCCM 12021균주와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916균주에 대해서는 각각 47.9%와 26.4%의 유산균이 억제능을 나타내었다. 이상의 결과로부터 140 균주 중 병원성세균에 대한 억제능이 우수한 *Lactobacillus* 25균주, *Streptococcus* 15균주, 합계 40균주를 선발하였으며, 그 선발균주에 대한 병원성 미생물 억제결과는 Table 21에 나타내었다.

Table 20. Antimicrobial activity of the second selected strain against pathogens and harmful bacteria

Groups	Bacteria	Pathogen bacteria			
		<i>Escherichia coli</i> O157:H7 USDA	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1467	<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916
Suckling	<i>Lactobacillus</i>	5 ^a /17 (29.4%) ^b	17/17 (100%)	6/17 (35.3%)	6/17 (35.3%)
	<i>Streptococcus</i>	4/35 (11.4%)	33/35 (94.3%)	9/35 (25.7%)	4/35 (11.4%)
Weaning	<i>Lactobacillus</i>	6/41 (14.6%)	39/41 (95.1%)	25/41 (61.0%)	13/41 (31.7%)
	<i>Streptococcus</i>	0/12 (0.0%)	12/12 (100%)	8/12 (66.7%)	2/12 (16.7%)
Adult	<i>Lactobacillus</i>	5/35 (14.3%)	35/35 (100%)	19/35 (54.3%)	12/35 (34.3%)
	<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-
Total	<i>Lactobacillus</i>	16/93 (17.2%)	91/93 (97.8%)	50/93 (53.8%)	31/93 (33.3%)
	<i>Streptococcus</i>	4/47 (8.5%)	45/47 (95.7%)	17/47 (36.2%)	6/47 (12.8%)
		20/140 (14.3%)	136/140 (97.1%)	67/140 (47.9%)	37/140 (26.4%)

^a The number of LAB appeared a clear inhibition zone of more than 8mm around a spot in indicator bacteria each.

^b Percentage about number of selected strains in test strains.

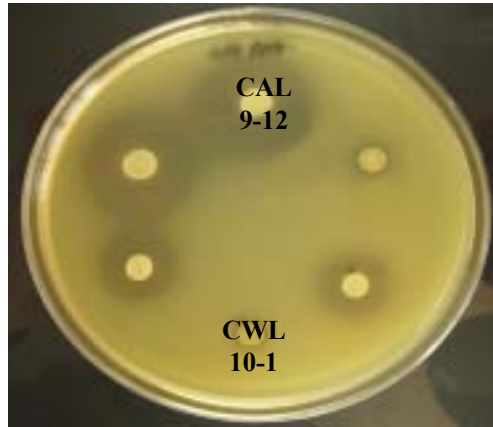


Fig. 12. Inhibition of *Salmonella enteritidis* KCCM 12021 by selected strains from dog using agar spot assay. CAL9-12 (*Lactobacillus* spp.) showed the highest inhibition of selected strains. CWL10-1 (*Lactobacillus* spp.) showed the lowest inhibition of selected strains.

Table 21. Antimicrobial activity of LAB against pathogens and harmful bacteria

Strains	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1467	<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916
<i>Lactobacillus</i>			
CSL7-14	9*	10	7
CSL8-6	9	10	10
CSL8-16	9	10	9
CSL9-6	9	9	8
CWL3-8	9	10	8
CWL6-6	9	10	7
CWL6-19	9	9	10
CWL7-6	9	9	10
CWL7-8	9	9	10
CWL7-10	9	9	10
CWL7-13	9	9	8
CWL8-7	9	10	9
CWL8-10	9	10	10
CWL8-13	9	10	10
CWL8-16	9	8	8
CAL2-4	9	10	10
CAL2-5	9	10	10
CAL5-16	9	10	10
CAL6-4	9	10	10
CAL6-5	9	10	10
CAL6-19	9	9	8
CAL7-12	9	10	10
CAL7-18	9	10	10
CAL9-12	9	10	10
CAL9-13	9	8	8

Table 21. (Continued)

Strains	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1467	<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916
<i>Streptococcus</i>			
CSS1-9	9	7	6
CSS4-6	9	6	6
CSS4-7	9	7	7
CSS5-2	9	10	8
CSS5-14	9	10	6
CSS6-14	9	10	7
CSS7-5	9	8	5
CSS8-4	9	10	10
CSS8-9	9	10	10
CSS9-1	9	5	7
CWS3-11	9	10	8
CWS7-1	9	9	6
CWS9-4	9	7	7
CWS10-14	9	8	6
CWS10-15	9	6	10

* Inhibition zone(mm)

다. MIDI에 의한 균종의 정확한 identification

1) 양돈용 유산균주 결과

양돈용 생균제로 사용하기에 적합한 유산균주로 분리된 유산균 중에서 1차년도와 2차년도 실험인 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성, 병원균 억제능, Caco-2 cell 부착능 실험 등을 거쳐 최종 10개의 생균제용 유산균주를 선발하였으며, 10균주 중 *Lactobacillus*는 5 균주였고, *Bifidobacterium*와 *Streptococcus*는 각각 3 균주와 2 균주이었다.

미생물 동정 장치(MIDI, HP Inc., USA)를 이용한 최종 선발 균주의 동정결과와 SI 값은 Table 22에 나타내었다. *Lactobacillus spp.*로 분리했던 그룹인 PWL6-14, PGL5-16, PAL2-17, PAL4-18 및 PGL4-17은 각각 *L. reuteri* (SI 0.391), *L. paracasei* (SI 0.347), *L. rhamnosus* (SI 0.330), *L. fermentum* (SI 0.440) 및 *L. delbrueckii bulgaricus* (SI 0.225)로 동정되었다. *Bifidobacterium*으로 분리했던

PMB2-11, PMB4-10 및 PMB1-10는 각각 *B. boum* (SI 0.272), *B. animalis* (SI 0.710) 및 *B. bifidum* (SI 0.434)으로 확인되었다. 그러나 colony morphology와 cell morphology 등의 특징으로써 *Streptococcus*로 분리했던 PSS2-17과 PSS7-10는 각각 *Weissella confusa GC subgroup A* (SI 0.440)와 *L. brevis* (SI 0.734)로 동정되었다.

Table 22. Identification of finally selected probiotic bacteria by using MIDI

Strain	Identification by MIS	S I ^a
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0.391
PWL6-14	<i>L. vaginalis</i>	0.315
	<i>L. rhamnosus</i>	0.261
PGL5-16	<i>L. paracasei paracasei</i>	0.347
PAL2-17	<i>L. rhamnosus</i>	0.330
	<i>L. fermentum</i>	0.440
PAL4-18	<i>L. rhamnosus</i>	0.384
PGL4-17	<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	0.225
	<i>Bifidobacterium boum</i>	0.272
PMB2-11	<i>B. animalis</i>	0.201
	<i>B. breve</i>	0.179
PMB4-10	<i>B. animalis</i>	0.710
PMB1-10	<i>B. bifidum</i>	0.434
PSS2-17	<i>Weissella confusa GC subgroup A</i>	0.440
	<i>L. brevis</i>	0.734
PSS7-10	<i>L. bif fermentans</i>	0.515
	<i>L. malefermentans</i>	0.505

^a Similarity Index : Expressed as 0.0-1.0.

2) 애완견용 유산균주 결과

1차년도 및 2차년도 실험에서 분리된 내산성, 내담즙성, 병원성 억제능력, Caco-2 cell에 대한 장정착성 능력이 우수한 10균주(*Lactobacillus* 6균주, *Streptococcus* 4균주)의 세균학적 동정은 Microbial Identification System (MIDI, Sherlock system, USA)를 사용해서 동정하였으며, 그 동정 결과는 Table 23에 나타내었다.

Lactobacillus spp.로 잠정분류되었던 SL8-6과 CWL3-8 균주는 *L. parabuchneri*

(Similarity index(SI): 0.442)와 *L. paracasei paracasei*(SI: 0.257)로 동정되었다. CWL6-19와 CWL7-10균주는 *L. malefermantans*(SI: 0.521)와 *L. oris*(SI: 0.697)로 동정되었다. 한편 CWL8-13과 CAL9-12 균주는 *L. reuteri*(SI: 0.599)와 *L. salivarius* ss *salicinius*(SI: 0.353)로 동정되었다.

한편 *Streptococcus* spp.로 분류되었던 CSS5-14와 CSS7-5 균주는 *Pediococcus parvulus*(SI: 0.545)와 *L. hilgardii*(SI: 0.588)로 동정되었다. CSS9-1과 CWS3-11균주는 *L. brevis*(SI: 0.524)와 *L. bifermentans*(SI: 0.108)로 동정되어, *Lactobacillus*로 Genus가 변경되었다.

Table 23. Characteristics and identification of final selected bacteria from dog.

Characteristic	Probiotic bacteria					
	<i>Lactobacillus</i> CSL8-6	<i>Lactobacillus</i> CWL3-8	<i>Lactobacillus</i> CWL6-19	<i>Lactobacillus</i> CWL7-10	<i>Lactobacillus</i> CWL8-13	
Gram stain	+	+	+	+	+	
Cell morphology	R	R	R	R	R	
Catalase test	-	-	-	-	-	
Aerobic growth	+	+	+	+	+	
pH tolerance(2.0)	+	+	+	+	+	
Acid formation(pH)	4	3	4	4	4	
Bile tolerance (0.3% oxgall)	+	+	+	+	+	
	<i>E. coli</i> O157: H7 USDA	-	5	6	6	6
Anti- microbial activity (mm)	<i>E. coli</i> KCTC 1467	9	9	9	9	9
	<i>Sal. enteritidis</i> KCCM 12021	10	10	9	9	10
	<i>S. aureus</i> KCTC 1916	10	8	10	10	10
Adherence activity (bacteria/5 Caco-2 cell)	Too much	Too much	Too much	Too much	Too much	
Identification by MIS (Similarity Index)	<i>L. parabuchneri</i> (0.442)	<i>L. paracasei</i> <i>paracasei</i> (0.257)	<i>L.</i> <i>malefermantans</i> (0.521)	<i>L. oris</i> (0.697)	<i>L. reuteri</i> (0.599)	

Table 23. (Continued)

Characteristic	Probiotic bacteria					
	<i>Lactobacillus</i> CAL9-12	<i>Streptococcus</i> CSS5-14	<i>Streptococcus</i> CSS7-5	<i>Streptococcus</i> CSS9-1	<i>Streptococcus</i> CWS3-11	
Gram stain	+	+	+	+	+	
Cell morphology	R	C	C	C	C	
Catalase test	-	-	-	-	-	
Aerobic growth	+	+	+	+	+	
pH tolerance (2.0)	+	+	+	+	+	
Acid formation(pH)	3	4	4	4	4	
Bile tolerance (0.3% oxgall)	+	+	+	+	+	
Anti- microbial activity (mm)	<i>E. coli</i> O157: H7 USDA	9	6	9	3	6
	<i>E. coli</i> KCTC 1467	9	9	9	9	9
	<i>Sal. enteritidis</i> KCCM 12021	10	10	8	5	10
	<i>S. aureus</i> KCTC 1916	10	6	5	7	8
Adherence activity (bacteria/5 Caco-2 cell)	Too much	127±20.56	199±32.54	Too much	134±38.9	
Identification by MIS (Similarity Index)	<i>L. salivarius</i> <i>ss salivarius</i> (0.353)	<i>Pediococcus</i> <i>parvulus</i> (0.545)	<i>L. hilgardii</i> (0.588)	<i>L. brevis</i> (0.524)	<i>L. bifementans</i> (0.053)	

라. 동결건조 또는 보존후 stability의 유지능력

1) 양돈용 유산균주 결과

내산성 및 내담즙성이 있는 것으로 확인된 *Lactobacillus* 272 균주, *Streptococcus* 2 균주 및 *Bifidobacterium* 2 균주를 대상으로 70 °C, 5 min 및 80 °C, 5 min에서의 열에 대한 안정성을 확인한 결과를 Table 24에 나타내었다. 70 °C, 5 min 에서

는 *Lactobacillus* 272 균주 중 107 균주 (39.3%)가 생존하여 열에 대한 안정성을 나타내었지만, *Streptococcus* 2 균주와 *Bifidobacterium* 2 균주는 모두 사멸하여 열에 대한 안정성을 나타내지 않았다.

또한 Table 25에서와 같이 동결건조된 최종선발균주 *Lactobacillus* PWL6-14 및 *Bifidobacterium* PMB 2-11의 4°C에서의 안정성을 6개월간 확인한 결과 *Lactobacillus* PWL6-14 균주는 4.0×10^9 /g에서 1.3×10^9 /g으로 감소하여 안정된 균수 변화를 나타내었지만, *Bifidobacterium* PMB 2-11 균주는 6개월 후 약 1/10 정도 균수의 감소를 나타내었다.

Table 24. The number of heat tolerant strains isolated from fecal samples of pig

Bacteria	Heat condition	Group					Total strains
		Sucking	Weaning	Growth	Adult	Maternal	
<i>Lactobacillus</i>	70 °C, 5min	1/37 ^a (2.7%) ^b	54/108 (50.0%)	23/55 (41.8%)	23/42 (54.8%)	6/30 (20.0%)	107/272 (39.3%)
	80 °C, 5min	0/37 (0.0%)	0/108 (0.0%)	0/55 (0.0%)	0/42 (0.0%)	0/30 (0.0%)	0/272 (0.0%)
<i>Streptococcus</i>	70 °C, 5min	-	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	-	-	0/2 (0.0%)
	80 °C, 5min	-	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	-	-	0/2 (0.0%)
<i>Bifidobacterium</i>	70 °C, 5min	-	-	-	-	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)
	80 °C, 5min	-	-	-	-	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)
Total	70 °C, 5min	1/37 (2.7%)	54/109 (49.5%)	23/56 (41.1%)	23/42 (54.8%)	6/32 (18.8%)	107/276 (38.8%)
	80 °C, 5min	0/37 (0.0%)	0/109 (0.0%)	0/56 (0.0%)	0/42 (0.0%)	0/32 (0.0%)	0/276 (0.0%)

^a The number of survived strains / the number of test strains

^b Percentage in parenthesis indicate the rate of survival.

2) 애완건용 유산균주 결과

최종 선발 10균주의 온도에 따른 영향을 확인하기 위하여 50~80°C에 5분간 노출시켰으며, 그 결과는 Table 26에 나타내었다. 일반적으로 *Lactobacillus* 균주가 *Streptococcus*보다 내열성이 강한 것으로 확인되었으며, *Lactobacillus*는 60°C까지는

균수의 사멸이 전혀 없었으며, 70℃에서 사멸한 CWL3-8과 CAL9-12를 제외하면 모두 80℃에서 사멸하였다. *Streptococcus*는 CSS9-1가 60℃에서 균수가 감소한 것을 제외하고는 60℃까지는 균수의 사멸이 없었으며, 모든 *Streptococcus*가 70℃에서 사멸하였다.

또한 Table 25에서와 같이 동결건조된 최종선발균주 *Lactobacillus* CSLB-6 및 *Streptococcus* CSS5-14 균주의 4℃에서의 안정성을 6개월간 확인한 결과, 두 균주 모두 안정된 균수변화를 나타내어 동결건조보존시 6개월간 균수의 큰 변화없이 안정함을 확인하였다

Table 25. The viable counts of selected LAB from pig and dog in freeze-dried cultures at 4℃

week	Pig		Dog	
	<i>Lactobacillus</i> PWL 6-14	<i>Bifidobacterium</i> PMB 2-11	<i>Lactobacillus</i> CSLB-6	<i>Streptococcus</i> CSS5-14
0	4.0×10 ⁹ ^a	6.5×10 ⁸	3.8×10 ⁹	7.2×10 ⁹
1	4.3×10 ⁹	6.0×10 ⁸	4.5×10 ⁹	7.5×10 ⁹
2	4.1×10 ⁹	2.7×10 ⁸	4.0×10 ⁹	8.0×10 ⁹
3	4.0×10 ⁹	2.0×10 ⁸	3.2×10 ⁹	8.3×10 ⁹
4	3.8×10 ⁹	1.8×10 ⁸	2.0×10 ⁹	7.9×10 ⁹
6	3.6×10 ⁹	9.9×10 ⁷	1.3×10 ⁹	7.7×10 ⁹
8	3.7×10 ⁹	6.8×10 ⁷	9.8×10 ⁸	7.0×10 ⁹
10	3.0×10 ⁹	8.7×10 ⁷	1.2×10 ⁹	6.8×10 ⁹
12	1.3×10 ⁹	8.8×10 ⁷	8.8×10 ⁸	8.1×10 ⁹
14	1.0×10 ⁹	6.3×10 ⁷	8.0×10 ⁸	8.0×10 ⁹
16	1.0×10 ⁹	5.5×10 ⁷	9.0×10 ⁸	8.0×10 ⁹
20	1.2×10 ⁹	4.8×10 ⁷	7.0×10 ⁸	6.8×10 ⁹
24	1.3×10 ⁹	5.4×10 ⁷	7.0×10 ⁸	7.0×10 ⁹

^a Viable cell counts: cfu/g of freeze-dried

Table 26. Heat stability of final selected strains from dog at each exposed temperature.

Bacterial strains	Exposed temperature(°C, 5min)				
	0	50	60	70	80
<i>Lactobacillus</i>					
CSL8-6	9.3 ^a	9.5	9.4	6.6	- ^b
CWL3-8	8.8	8.8	8.4	-	-
CWL6-19	8.9	8.9	8.9	4.3	-
CWL7-10	9.4	9.3	8.9	6.6	-
CWL8-13	8.9	8.9	9	3.8	-
CAL9-12	8.6	8.6	8.2	-	-
<i>Streptococcus</i>					
CSS5-14	9	9	8.6	-	-
CSS7-5	8.9	8.9	8.9	-	-
CSS9-1	8.6	9	5.3	-	-
CWS3-11	8.1	8.1	6.9	-	-

^a After exposed, the number of viable cells.

^b Not detected

3. GM-CSF가 발현된 유산균주의 임상학적 효능실험

가. 이유자돈을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 야외 효능실험 결과

1) 효능실험-1(Experiment-1)

가) 증체율 및 사료요구율에 미치는 효과

GM-CSF 발현 생균제의 효능을 확인하기 위하여 실시한 1차 야외실험(Experiment-1)에서는, 투여군 27마리, 대조군 27마리, 합계 54두를 대상으로 21일령부터 69일령까지 48일간 양돈사료내에 시험생균제를 0.5% 투여하였으며, 그 효능 결과는 Table 27, 28, 29에 나타내었다.

먼저 21일령부터 48일령까지의 측정결과(Table 27), 투여군(Treatment 1)의 21일령체중(평균)은 176.5(6.54) Kg에서, 48일령체중(평균)은 451.7(16.73)Kg으로 증가하

여, 27일 동안 총증체량이 275.2Kg이었다. 그러나 GM-CSF 발현 생균제를 투여하지 않은 대조군(Control 1)의 경우, 21일령체중(평균)은 166.8(6.18)Kg이었지만, 48일령체중(평균)은 394.6(14.6)Kg에 그쳐, 총증체량은 227.8Kg에 불과하였다. 따라서 시험기간 27일 동안의 자돈 한 마리당 일당증체량은 투여군이 377.5g, 대조군이 312.5g으로서, 대조군을 100%로 환산하였을 때에 비하여, 투여군은 20.8%의 매우 뚜렷한 일당증체량의 증가를 나타내었다.(Table 1) 또한 시험기간 중 섭취한 총사료 섭취량은 투여군이 320Kg, 대조군이 275Kg으로, 사료요구율(총사료섭취량/총증체량)은 투여군이 1.16, 대조군이 1.21로 계산되었다. 이것은 대조군을 100%로 환산하였을 때, 투여군의 사료요구율은 95.9%밖에 되지 않아 결과적으로 GM-CSF 투여군에서 4.1%의 사료요구율 증가결과를 나타내었다.

이상과 같은 결과로부터 GM-CSF 발현 유산균 생균제투여군에서는 21일령부터 48일령까지의 이유자돈 증체량 및 사료요구율에 대하여 매우 우수한 효능을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다 (Table 27).

48일령부터 69일령까지의 결과에서도(Table 28), 투여군(Treatment 1)의 일당증체량이 564.9g, 생균제를 투여하지 않은 대조군이 543.9g으로 측정되어, 투여군에서 3.9%의 일당증체량 개선효과를 확인할 수 있었다. 또한 사료요구율(총사료섭취량/총증체량) 결과에서도 투여군이 1.70, 대조군이 1.78로서, 대조군에 비해 4.5%의 사료요구율 개선효과를 나타내었다 (Table 28).

이상의 결과를 종합하여 21일령부터 69일령까지의 48일간 전체시험결과를 분석한 결과, Table 29에서와 같이 일당증체량은 투여군이 대조군에 비하여 11.1%의 증가효과를 확인할 수 있었으며, 사료요구율에서도 5.8%의 우수한 개선효과를 확인할 수 있었다(Fig 13, Fig 14). 따라서 종합적으로 GM-CSF 발현 생균제 투여가 21일령부터 69일령사이의 이유자돈에 대한 일당증체량, 사료요구율에 매우 효과적이었음을 확인할 수 있었으며, 이것은 이유자돈의 생산성 향상에 매우 효과적이었음을 의미하는 결과이었다.

Table 27. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in weaning pigs (Experiment-1)

Item	Treatment 1	Control 1
Age(days)	21-48	21-48
Period of experiment(days)	27	27
No. of initial pigs	27	27
No. of final pigs	27	27
21 day's body weight(Ave), Kg	176.5(6.54)	166.8(6.18)
48 day's body weight(Ave), Kg	451.7(16.73)	394.6(14.6)
Total weight gain(Ave), Kg	275.2(10.19)	227.8(8.439)
Average dairy gain, g	377.5	312.5
%	120.8	100
Total Feed intake(Ave) Kg	320.0(11.85)	275.0(10.19)
Feed conversion(Feed/Gain)	1.16	1.21
%	95.9	100

Table 28. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in weaning pigs (Experiment-1)

Item	Treatment 1	Control 1
Age(days)	48-69	48-69
Period of experiment(days)	21	21
No. of initial pigs	27	27
No. of final pigs	27	27
48 day's body weight(Ave), Kg	451.7(16.73)	394.6(14.6)
69 day's body weight(Ave), Kg	772.0(28.59)	703.0(26.04)
Total weight gain(Ave), Kg	320.3(11.86)	308.4(11.42)
Average dairy gain, g	564.9	543.9
%	103.9	100
Total Feed intake(Ave) Kg	544.0(20.15)	550.0(20.37)
Feed conversion(Feed/Gain)	1.70	1.78
%	95.5	100

Table 29. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in weaning pigs (Experiment-1)

Item	Treatment 1	Control 1
Age(days)	21-69	21-69
Period of experiment(days)	48	48
No. of initial pigs	27	27
No. of final pigs	27	27
21 day's body weight(Ave), Kg	176.5(6.54)	166.8(6.18)
69 day's body weight(Ave), Kg	772.0(28.59)	703.0(26.04)
Total weight gain(Ave), Kg	595.5(22.06)	536.2(19.86)
Average dairy gain, g	459.5	413.7
%	111.1	100
Total Feed intake(Ave) Kg	864.0(20.15)	825.0(20.37)
Feed conversion(Feed/Gain)	1.45	1.54
%	94.2	100

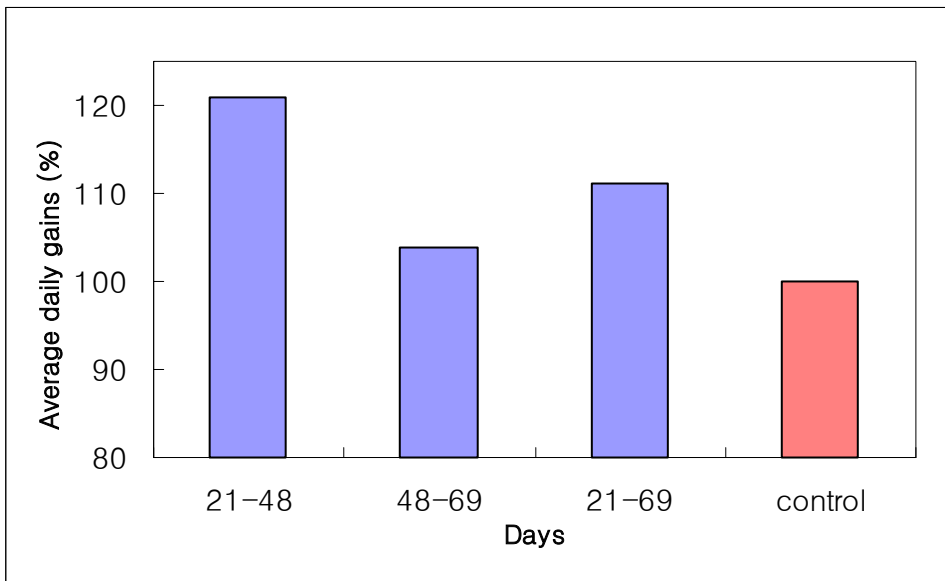


Figure 13. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain in weaning pigs (Experiment-1)

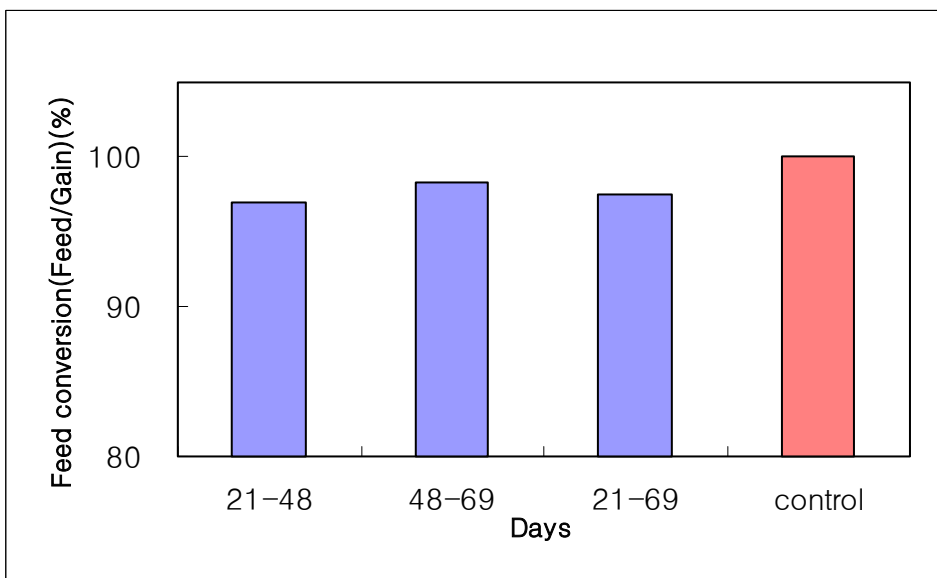


Figure 14. Effect of lactic acid bacteria on feed conversion in weaning pigs (Experiment-1)

나) 장내세균총에 미치는 효과

GM-CSF 발현 유산균을 투여한 투여군(Experiment 1)에서의 장내세균총 변화를 투여전(21일령), 투여중(48일령), 투여후(69일령)의 3회에 걸쳐 검색하고, 그 결과를 Log10의 대수치로 환산하여 평균±표준편차의 수치로 Table 30에 나타내었다.

그 결과 호기성 세균군에서는 대장균을 포함한 Enterobacteriaceae가 투여 전 8.5 ± 0.5 에서 투여중 6.8 ± 1.23 , 투여후 7.5 ± 1.00 으로 현저한 유해세균의 감소를 나타내었다. 투여후 유산균군에서는 *Lactobacillus* 및 *Streptococcus*의 세균수가 각각 9.7 ± 0.36 , 9.6 ± 0.24 의 최우세균총으로 검색되어, 장내유익세균이 우점종으로 분포도하고 있음을 알 수 있었다. 한편 혐기성세균의 대표적 유해세균인 *Clostridium perfringens*는 투여전 7.2 ± 0.37 에서 투여중 및 투여후 전혀 검출되지 않아 장내유해세균의 급격한 감소를 확인할 수 있었다. 이상의 결과, GM-CSF 발현 유산균의 사료첨가제가 장내유해세균인 Enterobacteriaceae의 균수감소, *Clostridium perfringens*의 불검출, 그리고 장내유익세균인 유산균수의 증가로 이어지는 장관내 정상장내세균총의 유의한 개선효과를 발휘하고 있는 것으로 분석되었다.(Table 30)

Table 30. Comparison of intestinal microflora before, during and after administration of lactic acid bacteria in piglets (Experiment-1)

Bacterial groups	Before administration	During administration	After administration
Enterobacteriaceae	8.5±0.55 ^a	6.8±1.23	7.5±1.00
<i>Salmonella</i>			
<i>Streptococcus</i>	8.6±0.45	7.4±0.64	9.6±0.24
<i>Staphylococcus</i>	5.3±0.52	5.2±0.99	4.3±1.22
Yeast		3.6±0.75	2.2±0.00
Molds			
<i>Corynebacterium</i>			
<i>Bacillus</i>			
<i>Lactobacillus</i>	8.9±0.57	8.5±0.68	9.7±0.36
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>Eubacterium</i>	6.3±1.26	8.2±0.54	8.1±0.67
Bacteroidaceae	8.9±0.51	8.9±0.40	8.8±0.37
Peptococcaceae			
<i>Cl. perfringence</i>	7.2±0.37		
<i>Clostridium others</i>	5.5±2.90	6.4±0.00	8.6±0.00
<i>Veillonella</i>			
<i>Megasphaera</i>	7.8±0.31	8.0±0.28	8.5±0.40
Total counts	9.4±0.44	9.1±0.32	10.1±0.21

^a Mean±S.D. of log₁₀ counts of bacteria/g of feces

2) 효능실험-2(Experiment-2)

가) 증체율 및 사료요구율에 미치는 효과

야외실험 2(Experiment 2)는, 투여군 26마리, 대조군 26마리, 합계 52마리를 대상으로 21일령부터 69일령까지 48일간 실시되었으며, 그 결과는 Table 31, 32, 33 및 Fig. 15, 16에 나타내었다.

그 결과 Table 31에서와 같이 21일령부터 48일령까지의 결과에서는, GM-CSF 발현유산균을 투여한 투여군(Treatment 2)의 일당증체량이 328.8g으로, 대조군

(Control 2)의 292.3g보다 높아 12.5%의 매우 높은 일당증체량 향상 결과를 나타내었다. 또한 사료섭취량을 증체량으로 나눈 사료요구율에서도 대조군에 비해 3%의 사료요구율 개선효과를 나타내어, 야외효능실험 1의 결과와도 매우 유사한 재현성 있는 결과를 나타내었다.

48일령부터 69일령까지의 결과에서도(Table 32), 투여군(Treatment 2)의 일당증체량이 대조군에 비해 3.3%의 증가효과, 사료요구율은 1.7%의 개선효과를 나타내어, 실험 전반부인 20일령부터 48일령의 결과보다는 낮은 효과를 나타내었지만, 야외실험 1과 유사한 효과를 재확인할 수 있었다.

이상의 결과를 21일령부터 69일령 실험전체기간으로 환산하여 분석하면, Table 33에서와 같이 일당증체량은 투여군에서 7.1% 향상, 사료요구율은 2.5%의 개선효과로 정리할 수 있었다.(Fig 15, Fig 16) 이상과 같은 이유자돈에 대한 두 번의 야외효능실험 결과, GM-CSF 발현 유산균을 사료첨가제로 사용한 투여군에서 양돈산업 중 가장 중요한 생산성 지표인 일당증체량과 사료요구율 모두 향상시키는 매우 유익한 유용효과를 확인할 수 있었다.

Table 31. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in weaning pigs (Experiment-2)

Item	Treatment-2	Control-2
Age(days)	21-48	21-48
Period of experiment(days)	27	27
No. of initial pigs	26	26
No. of final pigs	26	26
21 day's body weight(Ave), Kg	131.7(5.07)	124.5(4.79)
48 day's body weight(Ave), Kg	362.5(13.94)	329.7(12.68)
Total weight gain(Ave), Kg	230.8(8.88)	205.2(7.89)
Average dairy gain, g	328.8	292.3
%	112.5	100
Total Feed intake(Ave) Kg	295.0(11.35)	270.0(10.39)
Feed conversion(Feed/Gain)	1.28	1.32
%	97.0	100

Table 32. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in weaning pigs (Experiment-2)

Item	Treatment-2	Control-2
Age(days)	48-69	48-69
Period of experiment(days)	21	21
No. of initial pigs	26	26
No. of final pigs	26	26
48 day's body weight(Ave), Kg	362.5(13.94)	329.7(12.68)
69 day's body weight(Ave), Kg	662.5(25.48)	620.3(23.86)
Total weight gain(Ave), Kg	300.0(11.54)	290.6(11.18)
Average dairy gain, g	549.5	532.2
%	103.3	100
Total Feed intake(Ave) Kg	535.0(20.58)	525.0(20.19)
Feed conversion(Feed/Gain)	1.78	1.81
%	98.3	100

Table 33. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in weaning pigs (Experiment-2)

Item	Treatment-2	Control-2
Age(days)	21-69	21-69
Period of experiment(days)	48	48
No. of initial pigs	26	26
No. of final pigs	26	26
21 day's body weight(Ave), Kg	131.7(5.07)	124.5(4.79)
69 day's body weight(Ave), Kg	662.5(25.48)	620.3(23.86)
Total weight gain(Ave), Kg	530.8(20.42)	495.8(19.07)
Average dairy gain, g	425.3	397.3
%	107.1	100
Total Feed intake(Ave) Kg	830.0(31.92)	795.0(30.58)
Feed conversion(Feed/Gain)	1.56	1.60
%	97.5	100

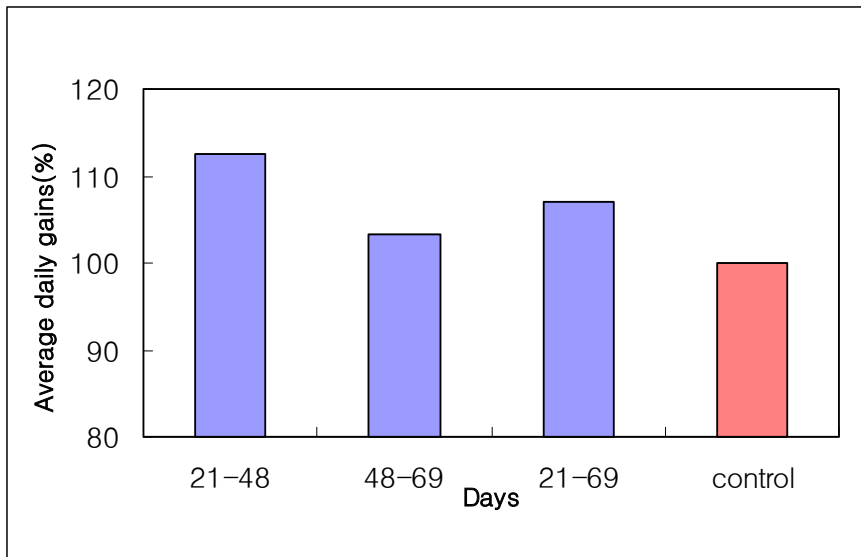


Figure 15. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain in weaning pigs (Experiment-2)

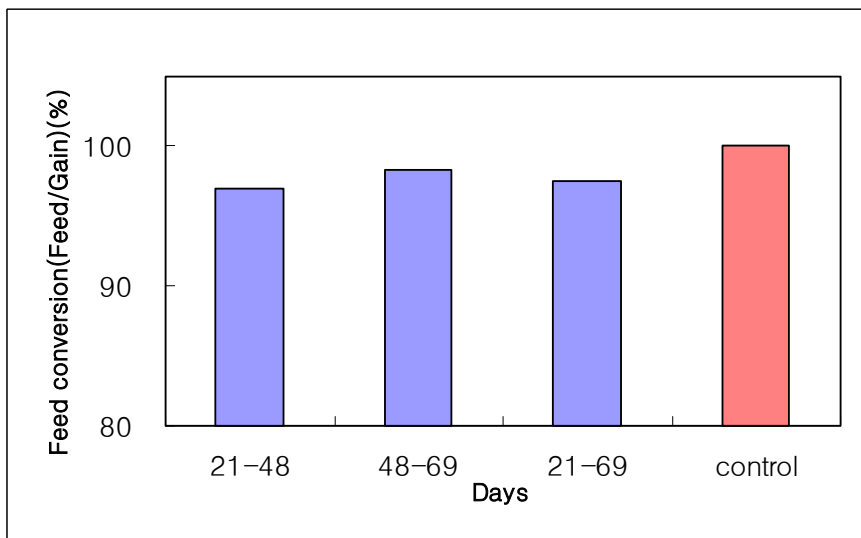


Figure 16. Effect of lactic acid bacteria on feed conversion in weaning pigs (Experiment-2)

나) 장내세균총에 미치는 효과

야외실험 2(Experiment 2)에서의 장내세균총 변화 결과도 Table 34에서와 같이 야외실험 1에서와 유사한 경향을 나타내었으며, 호기성 유해세균인 Enterobacteriaceae는 투여전 8.9±0.49에서 투여중 7.5±0.72, 투여후 7.1±0.53으로 현저한 세균수 감소를 나타내었다. 또한 혐기성 유해세균인 *Clostridium perfringens*은 투여전 5.9±1.90의 균수에서 투여중 1마리에서만 4.2±0.00의 균수로 검출되다가 투여후에는 전혀 검출되지 않았다. 또한 유익세균인 유산균군은 투여후 *Lactobacillus* 및 *Streptococcus*의 세균수가 각각 9.9±0.26, 9.6±0.30의 최우세균총으로 나타나 야외실험 1에서의 결과와 매우 비슷한 경향을 나타내었다. 이와 같이 GM-CSF 발현 유산균의 투여가 유해세균의 감소 및 유익세균의 증가 결과로 연결되어, 생산성 지표인 이유자돈의 증체량 증가 및 사료효율개선의 효능과 연관성이 높아지는 것으로 추정되었다.

Table 34. Comparison of intestinal microflora before, during and after administration of lactic acid bacteria in piglets (Experiment-2)

Bacterial groups	Before administration	During administration	After administration
Enterobacteriaceae	8.9±0.49 ^a	7.5±0.72	7.1±0.53
<i>Salmonella</i>			
<i>Streptococcus</i>	9.0±0.46	8.0±0.49	9.6±0.30
<i>Staphylococcus</i>	6.0±0.40	4.8±0.72	5.0±1.25
Yeast	2.8±0.00	6.5±0.35	3.3±0.28
Molds			
<i>Corynebacterium</i>			
<i>Bacillus</i>		6.0±0.00	
<i>Lactobacillus</i>	9.1±0.41	8.6±0.71	9.9±0.26
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>Eubacterium</i>	7.2±0.00	8.5±0.47	8.5±0.43
Bacteroidaceae	9.3±0.41	9.2±0.47	8.9±0.49
Peptococcaceae			
<i>Cl. perfringence</i>	5.9±1.90	4.2±0.00	
<i>Clostridium others</i>	7.2±2.54	8.0±0.00	8.4±0.64
<i>Veillonella</i>			
<i>Megasphaera</i>	8.1±0.54	8.2±0.71	8.5±0.54
Total counts	9.8±0.34	9.4±0.42	10.1±0.21

^a Mean±S.D. of log₁₀ counts of bacteria/g of feces

나. 이유자견 및 모견을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 야외 효능실험 결과

1) 이유자견을 대상으로 한 효능실험

가) 증체율 및 사료요구율에 미치는 효과

이유자견을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제의 효능을 확인하기 위하여 A(대조군) 6마리, B(*L. casei* 투여군) 6마리, C(*L. casei* GM-CSF 투여군) 5마리, 합계 총 17마리의 비글견을 대상으로 효능실험을 실시하였다.

그 결과 Table 35에서와 같이 7주령의 시작체중은 A군 1.29 ± 0.31 , B군 1.24 ± 0.32 , C군 1.22 ± 0.25 로 시작하여, 14주령의 종료체중은 A군이 2.02 ± 0.23 , B군 1.98 ± 0.26 , C군 2.13 ± 0.14 로 GM-CSF 발현 생균제를 투여한 C군의 평균체중이 높게 측정되었다. 따라서 실험기간인 49일동안 측정된 일당증체량은 대조군인 A군에서 730g이었지만, GM-CSF 발현 생균제를 투여한 C군에서는 910g으로 대조군 대비 24.6%의 매우 높은 일당증체량의 증가결과를 나타내었다. 한편 실험기간 중 사료섭취량을 증체량으로 나눈 사료요구율(Feed/Gain)도 A군 5.05, B군 5.39로 나나났지만, GM-CSF 발현 생균제를 투여한 C군에서는 4.77로 측정되어, 대조군대비 5.5%의 사료요구율 개선효과를 나타내었다. (Fig 17, Fig 18)

따라서 7주령부터 14주령까지 실시한 자견에 대한 야외효능실험 결과, GM-CSF 발현 생균제를 투여한 C군에서는 대조군에 비해 24.6%의 일당증체량 향상과 5.5%의 사료요구율 개선효과를 확인할 수 있어, GM-CSF 발현 생균제 투여가 이유자견의 일당증체량 및 사료요구율과 같은 생산성 향상에 효과적이었음을 확인할 수 있었다.

Table 35. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain and feed conversion in puppies

Item	A (Control)	B (<i>L. casei</i>)	C (<i>L. casei</i> GM-CSF)
Age(weeks)	7-14	7-14	7-14
Period of experiment(days)	49	49	49
No. of initial dogs	6	6	5
No. of final dogs	6	6	5
Average body weight at 7 weeks, Kg	1.29±0.31	1.24±0.32	1.22±0.25
Average body weight at 8 weeks, Kg	1.32±0.31	1.31±0.31	1.28±0.22
Average body weight at 9 weeks, Kg	1.41±0.29	1.39±0.30	1.37±0.19
Average body weight at 10 weeks, Kg	1.51±0.26	1.45±0.26	1.50±0.19
Average body weight at 11 weeks, Kg	1.62±0.25	1.57±0.28	1.64±0.17
Average body weight at 12 weeks, Kg	1.75±0.26	1.68±0.28	1.77±0.17
Average body weight at 13 weeks, Kg	1.89±0.26	1.81±0.28	1.95±0.16
Average body weight at 14 weeks, Kg	2.02±0.23	1.98±0.26	2.13±0.14
Average total weight gain, g	730	740	910
Average dairy gain, g	14.90	15.10	18.57
%	100	101.3	124.6
Average total feed intake, g	3740	3990	4340
Feed conversion(Feed/Gain)	5.05	5.39	4.77
%	100	106.7	94.5

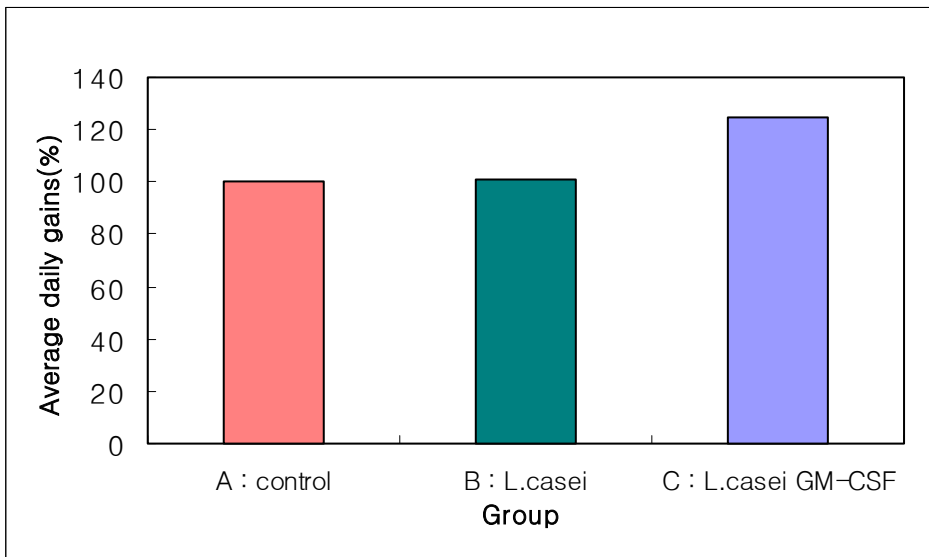


Figure 17. Effect of lactic acid bacteria on average daily gain in puppies

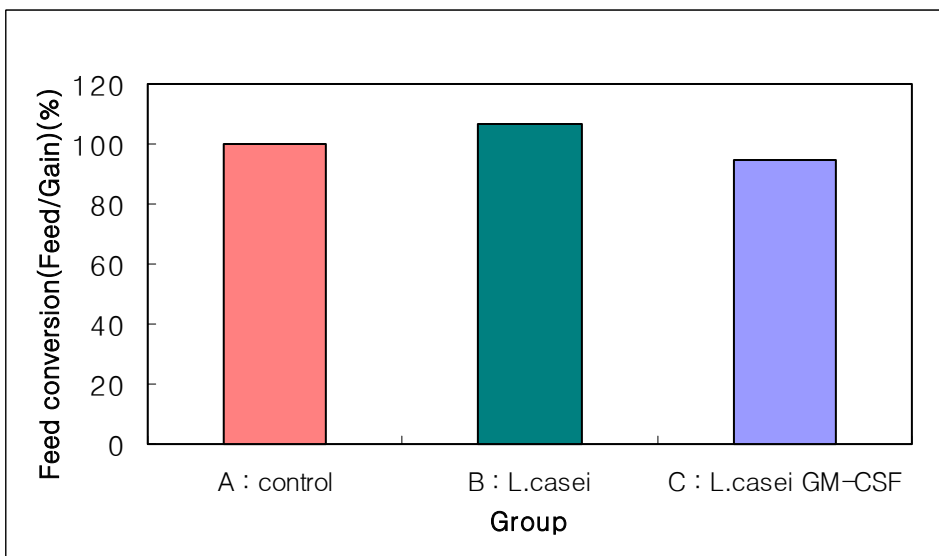


Figure 18. Effect of lactic acid bacteria on feed conversion in puppies

나) 장내세균총에 미치는 효과

총 17마리의 비글견을 대상으로 실시한 효능실험의 장내세균총 변화결과를 투여 전, 투여중, 투여후의 3회에 나누어 Log10의 대수치로 환산하여 평균±표준편차의 수치로 Table 36에 나타내었다.

그 결과 장내유해세균인 Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* others 모두 생균제 투여에 의한 뚜렷한 세균수 변화를 나타내지는 않았다. 한편 *Lactobacillus*에서는 생균제 투여에 의한 유의적 변화를 관찰할 수 없었지만, 유익한 유산균군인 *Streptococcus* (*Enterococcus*)군에서는 투여전 8.77±0.70에서 투여중 9.32±0.37, 투여 후 9.55±0.37로 뚜렷한 유산균수의 증가를 나타내어 전체 장내세균총 중에서 최우세균총의 역할을 담당하는 것으로 검색되었다.

Table 36. Comparison of intestinal microflora before, during and after administration of lactic acid bacteria in puppies

Bacterial groups	Before	During	After
	Mean±S.D. ^a	Mean±S.D. ^a	Mean±S.D. ^a
Enterobacteriaceae	8.85±0.16	8.62±0.66	8.18±0.31
<i>Salmonella</i>			
<i>Streptococcus</i>	8.77±0.70	9.32±0.37	9.55±0.37
<i>Staphylococcus</i>	4.03±0.79	6.70±0.94	7.17±1.31
Yeast	4.60±0.00	4.75±0.78	4.36±0.41
Molds			
<i>Corynebacterium</i>			
<i>Bacillus</i>			
<i>Lactobacillus</i>	9.42±0.44	9.35±0.31	9.38±0.68
<i>Bifidobacterium</i>	9.15±0.90	8.20±0.00	9.40±0.00
<i>Eubacterium</i>	9.33±0.37	9.28±0.59	8.40±1.42
Bacteroidaceae	9.65±0.57	9.65±0.50	8.98±0.41
Peptococcaceae			
<i>Cl. perfringence</i>			
<i>Clostridium others</i>	8.85±0.67	8.28±0.50	7.66±0.96
<i>Veillonella</i>			
<i>Megasphaera</i>			
Total counts	10.20±0.36	10.18±0.25	10.03±0.36

^a Mean±S.D. of log₁₀ counts of bacteria/g of feces

2) 모견을 대상으로 한 효능실험

가) 자견생존율에 미치는 효과

GM-CSF 발현 유산균의 효능을 확인하기 위하여 A군(대조군) 모견 5마리, B군(*L. casei* 투여군) 모견 5마리, C군(GM-CSF 발현 *L. casei* 투여군) 모견 7마리, 합계 모견 17마리를 대상으로 실시한 야외실험의 출산성적 및 자돈생존율 결과를 Table 37에 나타내었다. 그 결과 대조군인 A군 모견 5마리로부터 총 56마리의 자견이 출산되었지만 최종생존 자견수는 35마리로 21마리가 폐사되어 자견생존율은 62.5%에 불과하였다. 그러나 GM-CSF 발현 생균제를 투여한 C군에서는 7마리의 모견으로부터 총 67마리의 자견이 출산되어 이 중 51마리가 생존되어 76%의 매우 높은 자견생존율을 나타내었다. 이것은 *L. casei*만을 투여한 B군의 자견생존율 53.7%에 비교하여 매우 높은 생존율로서 GM-CSF 발현 생균제는 체내 면역력 활성화를 통한 자견생존율에 매우 효과적인 것으로 판단되었다.

Table 37 모견을 대상으로 한 GM-CSF 발현 생균제 효능실험결과

항목	A (Control)	B (<i>L. casei</i>)	C (<i>L. casei</i> GM-CSF)
시험 모견수	5	5	7
총출산 자견수	56	54	67
최종 생존 자견수	35	29	51
자견 생존율 (%)	62.5	53.7	76

나) 장내세균총에 미치는 효과

GM-CSF 발현 유산균을 투여한 투여군(C군)에서의 장내세균총 변화를 투여전, 투여중, 투여후의 3회에 걸쳐 검색한 결과를 Log10의 대수치로 환산하여 평균±표준편차의 수치로 Table 38에 나타내었다.

그 결과 장내유해세균인 Enterobacteriaceae는 생균제 투여전 9.49±0.60에서 투여중 8.32±0.80, 투여후 8.90±0.84로 뚜렷한 유해세균의 감소를 나타내었다. 또한 혐기성 유해세균으로 대표적인 *Clostridium perfringens*는 투여전 7.37±1.04에서 투여중 4.48±1.78, 투여후 4.80±0.10으로 약 1/1000 수준이하로 세균수가 감소하는 현저한 장내유해세균의 감소를 확인할 수 있었다. 한편 장내유익세균인 *Lactobacillus*는 투

여전 8.39±1.28에서 투여후 8.78±0.72로 약간 증가하는 경향을 나타내었지만, 투여전 검출되지 않았던 장내유익세균인 *Bifidobacterium*은 투여중, 투여후에서 각각 6.75±0.35, 9.00±0.00의 비교적 높은 군수로 검출되어 GM-CSF 발현 생균제 투여가 장관내 유익세균의 증가효과 및 유해세균의 억제효과를 모두 나타내는 것으로 판단되었다.

Table 38. Comparison of intestinal microflora before, during and after administration of lactic acid bacteria in pregnant dogs

Bacterial groups	Before	During	After
	Mean±S.D. ^a	Mean±S.D. ^a	Mean±S.D. ^a
Enterobacteriaceae	9.49±0.60	8.32±0.80	8.90±0.84
<i>Salmonella</i>			
<i>Streptococcus</i>	8.57±0.45	8.36±0.56	8.15±0.81
<i>Staphylococcus</i>	7.14±1.23	5.86±0.75	6.82±1.14
Yeast	5.87±1.03	5.28±1.16	5.13±0.78
Molds			
<i>Corynebacterium</i>			
<i>Bacillus</i>			
<i>Lactobacillus</i>	8.39±1.28	8.26±0.75	8.78±0.72
<i>Bifidobacterium</i>		6.75±0.35	9.00±0.00
<i>Eubacterium</i>	8.10±1.06	8.20±1.14	8.63±0.29
Bacteroidaceae	9.64±0.49	9.14±0.23	9.57±0.40
Peptococcaceae			
<i>Cl. perfringence</i>	7.37±1.04	4.48±1.78	4.80±0.10
<i>Clostridium others</i>	8.00±0.00		
<i>Veillonella</i>			
<i>Megasphaera</i>	8.80±0.71	6.00±0.00	
Total counts	10.19±0.36	9.50±0.14	9.97±0.28

^a Mean±S.D. of log₁₀ counts of bacteria/g of feces

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도 (2002년)	<p><제1세부과제> 서울대 윤 화 영</p> <p>개의 GM-CSF 유전자 확보 및 특성 파악</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개의 면역세포 분리 기법 확립 ○ 개의 면역세포로부터 mRNA분리 및 cDNA 작성 ○ 개의 GM-CSF 유전자 확보 및 유전자 특성 파악 여부 ○ 재조합 GM-CSF 에 대한 특이 항체 생산 여부 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
	<p><제2세부과제> 서울대 유 한 상</p> <p>돼지 GM-CSF 유전자 확보 및 특성 파악</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지의 면역세포 분리 기법 확립 ○ 돼지의 면역세포로부터 mRNA분리 및 cDNA 작성 ○ 돼지의 GM-CSF 유전자 확보 및 유전자 특성 파악 여부 ○ 재조합 GM-CSF 에 대한 특이 항체 생산 여부 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도 (2002년)	<p style="text-align: center;"><협동과제> 충북대 이완규</p> <p>GM-CSF 발현을 위한 유산균주의 선발 및 특성조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돼지 및 개에서의 우점종 유산균 분리 ○ 분리된 유산균주의 생균제로서의 특성조사 ○ GM-CSF 발현 연구에 사용할 유산균주의 선발 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
2차년도 (2003년)	<p data-bbox="400 622 600 689"><제1세부과제> 서울대 윤 화 영</p> <p data-bbox="400 734 600 853">개의 GM-CSF를 발현하는 유산균 형질 전환체 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="641 600 1214 667">○ 유산균에 개의 GM-CSF 유전자 형질 전환 기법 개발 <li data-bbox="641 712 1214 779">○ 국내 분리 우수 유산균에 개의 GM-CSF 유전자의 삽입 <li data-bbox="641 824 1214 891">○ 유산균에서의 개의 GM-CSF 유전자 발현 양상 조사 	<p data-bbox="1262 600 1305 629">100</p> <p data-bbox="1262 712 1305 741">100</p> <p data-bbox="1262 824 1305 853">100</p>
	<p data-bbox="400 1301 600 1368"><제2세부과제> 서울대 유 한 상</p> <p data-bbox="400 1413 600 1570">돼지의 GM-CSF 를 발현하는 유산 균 형질 전환체 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="641 1279 1214 1346">○ 유산균에 돼지의 GM-CSF 유전자 형질 전환 기법 개발 <li data-bbox="641 1391 1214 1458">○ 국내 분리 우수 유산균에 돼지의 GM-CSF 유전자의 삽입 <li data-bbox="641 1503 1214 1570">○ 유산균에서의 돼지의 GM-CSF 유전자 발현 양상 조사 	<p data-bbox="1262 1279 1305 1308">100</p> <p data-bbox="1262 1391 1305 1420">100</p> <p data-bbox="1262 1503 1305 1532">100</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
2차년도 (2003년)	<p style="text-align: center;"><협동과제> 충북대 이완규</p> <p>GM-CSF가 발현된 유산균주의 안정성 및 in vitro 효능 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장관세포에 대한 부착능력 및 정착성 ○ 병원성 세균에 대한 길항조사 ○ MIDI에 의한 균종의 정확한 identification ○ 동결건조 또는 보존후 stability의 유지능력 	<p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p> <p style="text-align: center;">100</p>

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
3차년도 (2004년)	<p data-bbox="387 611 580 678"><제1세부과제> 서울대 윤 화 영</p> <p data-bbox="387 725 555 882">개의 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 동물 적용</p>	<p data-bbox="612 604 1214 703">○ 개 GM-CSF 발현 유산균의 실험동물 접종 시험 - 투여에 따른 실험동물에서의 면역능 증강등 조사</p> <p data-bbox="612 741 1107 893">○ 개 GM-CSF 발현 유산균의 개 접종 시험 - 개에서의 면역능 증강등 - 질병 발생 양상 조사</p>	<p data-bbox="1259 604 1302 629">100</p> <p data-bbox="1259 741 1302 766">100</p>
	<p data-bbox="387 1317 576 1384"><제2세부과제> 서울대 유 한 상</p> <p data-bbox="387 1433 563 1590">돼지 GM-CSF 유전자 발현 유산균의 동물 적용</p>	<p data-bbox="612 1310 1214 1408">○ 돼지 GM-CSF 발현 유산균의 실험동물 접종 시험 - 투여에 따른 실험동물에서의 면역능 증강등 조사</p> <p data-bbox="612 1447 1155 1599">○ 돼지 GM-CSF 발현 유산균의 돼지 접종 시험 - 돼지에서의 면역능 증강등 - 질병 발생 양상 조사</p>	<p data-bbox="1259 1310 1302 1335">100</p> <p data-bbox="1259 1447 1302 1471">100</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
3차년도 (2004년)	<협동과제> 충북대 이완규 GM-CSF가 발현된 유산균주의 임상학적 효능 실험	○ 유효성을 발휘하기 위한 투여용량 설정	100
		○ 임상적 효능을 확인하기 위한 in vivo 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 이유자돈을 이용한 효능실험 - 자견을 이용한 효능실험 	100

제2절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

기존 항생물질의 중요한 부작용인 내성균주의 발생을 억제하고 환경친화적인 새로운 생균제 개발 기술을 확보할 수 있다. 특히 실제 동물 질병 방제를 위한 GM-CSF 발현 유산균 개발이 가능하게 되어 기존의 생균제와는 다른 새로운 작용기작의 생균제 개발이 가능하다. GM-CSF 발현이 가능한 유산균주를 생물공학적 방법으로 대량생산하게 되면, 새로운 개념의 가축의 질병예방 및 치료가 가능해지므로, 축산농가의 경쟁력 확보 및 소득증대가 가능하다.

2. 경제 · 산업적 측면

GM-CSF 발현이 가능한 유산균주를 생물공학적 방법으로 대량생산하게 되면, 새로운 개념의 가축의 질병예방 및 치료가 가능해지므로, 현재 어려움에 처해있는 축산농가의 경쟁력 확보 및 지속적인 소득증대가 가능하다.

유산균의 발현시스템이 개발되면 기능성 축산사료첨가제 뿐만이 아니라, 신개념의 가축질병치료를 위한 유전자치료기법에 이용될 수 있을 것이다. 동물의 대장은 전체 면역계의 약 70%를 차지하고 있으므로, 안전성이 이미 확보된 유산균을 활용한다면, 현재 알려진 장내 정착성과 Probiotics의 기능 이외에 vaccine carrier로 이용할 수 있어, 새로운 유산균 vaccine의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

이로 인하여 국내 축산업 및 식품산업의 안정화와 신뢰를 구축할 수 있으며, 산업재산권 확보에 의한 국가경쟁력이 높아지며, 바이오기술 적용에 의한 축산물의 고부가가치화 달성할 수 있다.

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

Probiotics로 사용되는 대부분의 유산균들은 Host-specific strain이 아닌 관계로 급여 중단 후 1주일의 지나면 분변 내에서 관찰되지 않는다. 즉, colonization이 문제가 되는데 급여동물의 장관 내에서 오랫동안 생존하지 못한다는 것이다. 이를 극복하고자 하는 것이 이 과제에 취지이지만 유용 단백질을 발현하는 유전자를 개나 돼지 유래 유산균에 넣어 급여를 하여도 vector의 stability에 대한 문제점이 다시 생겨난다. 이는 숙주 세포내에서 plasmid DNA간의 incompatibility 때문인데, 이를 무시하고 유전자 삽입 및 유용단백질 발현을 하는 것은 기존의 숙주와 벡터를 이용 하는 것에 비해 크게 개선되는 것이 없다.

이에 개나 돼지 장관 내에서 분리한 우수 유산균 중에서 plasmid DNA를 분리하여 shuttle vector로 개발한 후 plasmid DNA를 제공한 host strain에 재 삽입 하는 것이 vector의 stability를 향상 시키는데 필요할 것으로 생각된다.

유산균은 GRAS(Generally Recognized as safe)로서 일반적으로 안전한 것으로 알려져 있으나 용혈검사, 암모니아 생성, 인돌생성등과 같은 병원성 검사 결과 일부 균주에선 병원성을 가지고 있음을 알 수 있었다. salmonella를 이용하여 백신을 개발하는 경우 salmonella의 병원성을 제거하면 원래의 세포 부착능이나 세포 침입능이 현저히 떨어지는 결과가 나왔다고 한다. 이는 균의 병원성이 장 점착능과 밀접한 관련이 있음을 재 입증하는 결과로서 유산균의 vector로서의 안전성과 유용성 면에서 균주의 특성 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

GM-CSF는 기본적으로 hematopoiesis와 혈구 세포들의 기능 증진 효과를 가지고 있을 뿐 아니라, 이번 연구 결과가 입증하듯 모체 이행항체가 감소하여 면역 저하가 생기는 시기의 면역 증진과 수술 처치 후 회복기, 특히 cancer therapy의 보조제로 응용하여 연구될 가치가 충분히 있을 것으로 보인다. 또한 이번 연구에 사용된 세포 표면 발현 기술(Cell-surface method)은 세포 표면에 원하는 단백질을 제시하여 생리활성 작용을 유도하는 기법으로 GM-CSF와 같은 유용 단백질의 전달 뿐만 아니라 다양한 유용 단백질을 발현시켜 oral vaccination, peptide library, mutation 점검, 항체 생산, 효소 활성 및 biosensor로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

따라서 본 실험에 사용한 GM-CSF 발현 유산균주는 양돈용 혹은 애완동물용 사료 첨가 생균제로 개발 활용할 경우, 가축질병 중 가장 문제되는 설사증과 같은 소화기계 질병 예방에 매우 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 특히 GM-CSF 발현 유산균주는 사회적으로 문제되는 사료첨가 항생제를 대체할 수 있는 첨가제로 활용될 수 있기 때문에, 사회적 관심도가 높은 친환경적인 축산물 생산 측면에서 매우

효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 향후 가축 및 동물에서의 임상적용이 성공적으로 진행된다면, 나아가 인체용 생균제로의 제품개발 및 활용도 적극 기대된다.

현재 GM-CSF 발현 유산균주는 가축 사료첨가제 생산 회사와의 산업화 과정을 협의 중에 있으며, 항생제 대체 물질로서의 연구사업에도 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

가축의 장관내에 정상적으로 서식하고 있는 세균의 집합체를 정상 장내세균총(Normal Intestinal Microflora)이라고 하며, 각 가축별로 다양한 100-200종 이상의 세균들이 균총을 형성하고 있다. 이러한 세균총들은 장관에 정착, 증식함으로써 세균 상호간의 경쟁적 억제에 의해 유해 미생물의 증식을 억제하거나, 균종 간의 공생관계에 의하여 세균총의 균형을 정상적으로 유지하고 있다. 또한 독소의 생성억제, 독성물질의 중화, 소화효소 및 vitamin 등의 생성에 관여함으로써 가축의 영양, 감염, 면역기능, 종양, 약효, 생리기능 등에 많은 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. 또한 이와 같은 장내세균총들은 사료의 변화, 항생제의 투여, 수송, 스트레스, 유해 미생물의 감염 등 여러 가지 환경적 요인에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

그 동안 많은 연구자들에 의하여 장내세균총의 분리를 시도하였으나 산소가 없는 상태에서 배양하여야 하는 방법상의 어려움 때문에 장내세균총의 연구가 활발히 진행되지 못하였다. 그러나 1950년대에 prerduced medium과 O₂ free CO₂ gas를 사용하여 반추동물의 혐기성 제1위 세균(Anaerobic rumen bacteria) 배양에 성공한 후, 1970년대 Mitsuoka 등에 의해 장내세균총의 검색방법이 확립되면서, 많은 연구자들에 의해 가축 및 실험동물, 사람의 장관 및 분변에서 분포하는 다양한 균총의 분리가 보고되었다. 이와 같은 장내세균총 중에서 지금까지 잘 알려진 대장균 등의 호기성 세균들은 장내세균총의 1/1000 - 1/10000 정도로 극히 일부분이며, 혐기성세균인 Bacteroidaceae, Eubacterium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium 등이 우세균총을 형성하고 있음을 알게 되었다. 특히, 여러 가축의 위장관의 환경은 각 축종마다 해부학적 구조가 다르기 때문에 서로 다른 장내세균총의 분포를 형성하고 있으며, 이러한 미생물들은 가축의 위장관에 각기 정착, 증식하므로써 장내환경을 조절하는 것으로 알려지고 있다.

일반적으로 정상 장내세균총은 크게 호기성 세균군, 혐기성 세균군, 유산균군으로 분류할 수 있으며, 호기성세균군에는 *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus* 등과 같은 통성 혐기성세균(Facultative anaerobes)이 포함되고 있다. 혐기성세균군에서는 Bacteroidaceae, Eubacterium, Peptostreptococcus, Clostridium과 같은 편성 혐기성세균(Strict anaerobes)이 장내세균총의 대부분을 형성하고 있다. 유산균 군에서도 Streptococcus, Lactobacillus 등의 호기성 유산균과 Bifidobacterium과 같은 혐기성 유산균으로 나눌 수 있는데 Bifidobacterium이 호기성 유산균의 대표적인 Lactobacillus나 Streptococcus보다 우세균으로 분포하여 유해세균의 억제를 통한 장관의 정장작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

또한 연령에 따른 장내세균총의 변화를 살펴보면, 생후 초기에는 *E. coli* 등의 호기

성세균이 침입 정착되지만, 생후 1주일 후에는 즉시 혐기성세균이 정착하여 장관내의 우세균총을 형성하게 된다. 그러나 모유에서 사료로의 변화시기인 이유기에는 세균총의 변화와 함께 가축의 설사 및 장내질환, 병원균에 대한 감수성 증가로 인하여 사료 효율 저하, 증체율 저하 등의 경제적 피해를 일으키고 있다. 이때부터는 거의 성숙과 비슷한 세균총 분포를 하게 되고, 성숙에서는 점차 유산균과 같은 유익균의 감소와 *Clostridium*과 같은 부패균의 증가가 일반적으로 나타난다. 이러한 장내세균총의 중요성을 인식하여 최근에는 장내에서 유용한 역할을 하는 것으로 잘 알려진 유산균을 이용하여, 가축의 장내 정장작용 및 증체율 개선 등을 유도하는 생균제(Probiotics)에 대한 효능이 각광을 받고 있다.

현재 양돈용으로 사용되고 있는 생균제용 유산균주로는 정상 장내세균총(normal intestinal microflora) 중에서 유용한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 대표적인 유산균인 *Lactobacillus*, *Streptococcus(Enterococcus)*, *Bifidobacterium* 등이 잘 알려져 있다.

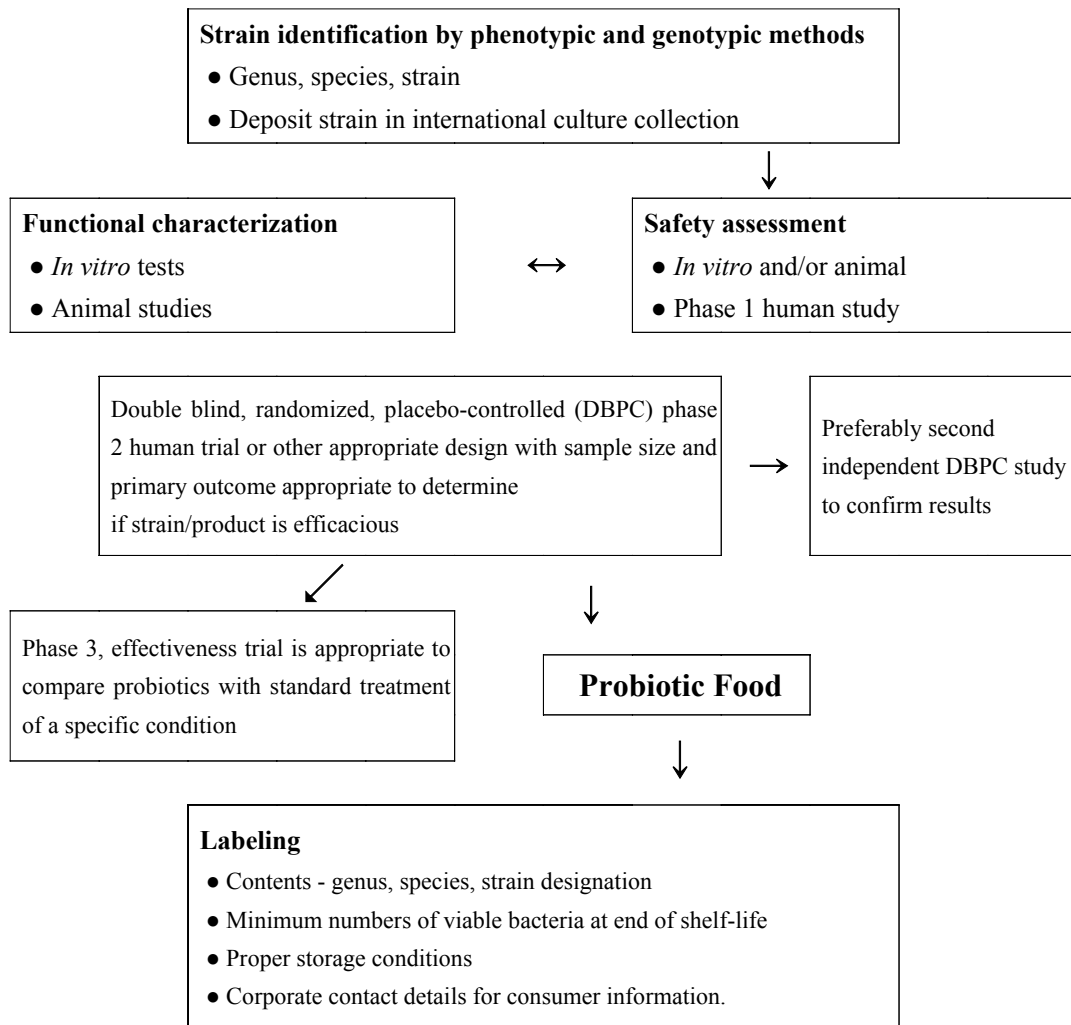
양돈산업의 사육규모가 점점 대규모화됨에 따라, 설사증, 폐렴 등의 여러 가지 질병발생도 증가하여 가축의 폐사 및 증체율 저하 등의 경제적 손실을 가져오고 있으며, 이와 같은 손실을 예방하기 위하여 항생제 처치가 일반적으로 널리 이용되고 있다. 그러나 최근 항생물질의 사용 증가로 인한 항생제 내성균주의 증가 및 항생제 잔류 등의 문제점이 대두되고 있다. 따라서 이와 같은 문제점을 보완하면서 질병예방 및 증체율 개선을 기대할 수 있는 생균제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

가축에 사용하는 생균제들은 살아있는 생균 상태로 가축의 장내까지 도달하여 효력을 나타내는 것이 바람직하다. 그러므로 이러한 생균제용 균주가 갖춰야 할 요건으로서 위내의 낮은 pH에서 생존할 수 있는 내산성, 십이지장의 담즙에 대한 내담즙성, 사료에 첨가시 펠렛 제조 과정에서의 내열성 및 기존사료에 첨가하여 사용하고 있는 항생제에 대한 항생제 내성 등을 갖춘 균주들이 우수한 균주임이 현재 일반적으로 인정되고 있다. 또한, 저장 상태에서나 사료첨가시 안정성 및 생존성이 중요시 되고 있다. 실제로 위내 투여시 1일 약 10^8 - 10^9 /g로 처치되어야 위와 십이지장을 통과한 후 실제 작용부위인 하부장관에 도달하는 것으로 알려져 있다.

현재 가축의 질병예방 및 성장 촉진의 목적으로 사용되고 있는 사료첨가 항생제(Antibiotics)는 매년 그 사용이 증가 추세에 있지만, 무분별한 항생제의 남용과 오용은 오히려 내성균주의 증가로 질병예방 및 치료에 문제점이 되고 있다. 또한 축산물의 항생제 잔류문제로 사람의 건강마저 위협하는 심각한 상황을 초래하고 있어, 외국의 경우에는 사료첨가 항생제의 사용을 엄격히 규제하여 가고 있는 실정이다. 따라서 앞으로는 사료첨가 항생제의 역할을 대신하면서, 가축과 사람에게 안전한 생균제에 대한 많은 연구와 개발이 시급한 실정이다.

2001년 10월 Argentina에서 열린 "Evaluation of Health and Nutritional Properties of probiotics in Food"이란 연제의 발표를 통해 probiotics에 대한 통합적인 guideline의 작성의 필요성이 대두되었고, 이에 FAO와 WHO를 중심으로 2002년 "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food"라는 제목으로 가이드라인이 작성되었다. 이는 probiotics의 평가 criteria와 방법론에 대해 언급하고 있으며, 건강증진을 위해 수행한 실험 및 수행할 실험에 필요한 데이터에 대한 정확한 규명과 정의를 내릴 수 있도록 하였다.

대략적인 out-line은 아래의 도표와 같으며 probiotics를 사용할 균주의 동정에서부터 상용화시 필요한 기본 데이터까지 일련의 과정에 필요한 내용을 flow-chart로 정리하였다.



제 7 장 참고문헌

Aglietta M., Monzeglio C., Sanavio F., Apra F., Morelli S., Stacchini A., Piacibello W., Bussolino F., Bagnara G., Zauli G. *In vivo* effect of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on megakaryocytopoiesis. *Blood*, 77:1191-1194, 1991.

Alejandra V., Siv A., Bengt J., and Goran M. Oral administration of Lactobacillus and Bifidobacterium strains of intestinal and vaginal origin to healthy human females: Re-isolation from faeces and vagina. *Microbial ecology in health and Disease*, 17:15-20, 2005.

Altenberger E. A., Pope H. A., Wewers M. D. Detection of soluble type II receptor in the presence of its natural ligand IL-1 β quantification by sandwich ELISA. *J Immunol Methods*, 185:115-122, 1995.

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.

Boscato L. M., Stuart M. C. (1988) Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem*, 34:27-33, 1988.

Burgess A. W., Camakaris J., Metcalf D. (1977) Purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J Biol Chem* 252:1998-2003, 1977.

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 guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156-159, 1987.

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

Colum D., Liam O., Lisa M., Gerardine T., Darrin M., Sile O., Maia F., Sarah F., Gerald F., Charles D., Barry K., Gerald C.O., Fergus S., and Collins J.K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings, *Am J Clin Nutr*, 73:386S-92S, 2001.

Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci*, 70:1-12, 1987.

Corinne G., Heide M.A., Pascal H., Denise G., Jean D., Mireille T., and Annick M. Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infection and Immunity* May, 2731-2737, 2004.

Daley MJ, Williams T, Dougherty R, Furda G, Hayes P, Coyle P. Prevention and therapy of *Staphylococcus aureus* infection with recombinant cytokines. Cytokine, 5:276-284, 1983.

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

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.

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.

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.

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.

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 β -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.

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.

Finegold 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. 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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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 microbial flora of the feces of growing pigs. *Kor J Anim Sci*, 26: 166-171, 1984.

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.

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.

Hunger RE, Brand CU, Sterit M, Eriksen JA, Gjertsen MK, Saeterdal I, Braathen LR, Gaudernack G. Successful induction of immune responses against mutant ras in melanoma patients using intradermal injection of peptides and GM-CSF as adjuvant. *Exp Dermatol*, 10:161-167, 2001.

Inumara S, Kokuho T, Denham S, Denyer MS, Momotani E, Kitamura S, Corteyn A, Brooks S, Parkhouse RM, Takamatsu H. Expression of biologically active recombinant porcine GM-CSF by baculovirus gene expression system. *Immunol Cell Biol*, 76:195-201, 1998.

Inumaru S., Takamatsu H. cDNA cloning of porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Cell Biol*, 73:474-476, 1995.

Jiafen H., Nancy M.C., Zhaohui W., Ricai H., Martin D.P., and Neil D.C. GM-CSF enhances protective immunity to cottontail rabbit papillomavirus E8 genetic

vaccination in rabbits. *Vaccine*, 22:1124-1130, 2004.

Jones T. C. Future uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Stem Cell*, 12:229-240, 1994.

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.

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

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

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.

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 maples sap by using amplified DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Applied Environmental Microbiology* Apr, 2052-2060, 2004.

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

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.

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.

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.

Luis G.B.H., Philippe L., Naima G.C.P., Alexandra G., Reyes S.T.G., sergio C.O., Odila S.C., Roberto M.D.O.L., and Yves L.L. Intranasal immunization with recombinant Lactococcus lactis secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. Infection and Immunity Apr, 1887-1896, 2003.

Lukashenko P.V., Lukashenko T.M., Savanovich I.I., Sandakov D.B., and Gerein V. Granulocyte macrophage colony stimulating factor regulates activity of the nervous system. Neuroimmunomodulation, 11:36-40, 2004.

Maliszewski C. R., Schoenborn M. A., Cerretti D. P., Wignall J. M., Picha K. S., Cosman D., Tushinski R. J., Gillis S., Baker P. E. Bovine GM-CSF: molecular cloning and biological activity of the recombinant protein. Mol Immunol, 25:843-850, 1988.

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 β and the development of a sensitive capture ELISA. Fish & Shellfish Immunol, 13:85-95, 2002.

Metcalf D., Begley C.G., Williamson D.J., Nice E.C., De Lamerter 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.

Metcalf D. The colony stimulating factors. Elsevier Amsterdam, 1984.

Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. Science, 5:16-22, 1985.

Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Science, 229:16, 1985.

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.

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*, *weissella minor* and related

taxa isolated from *kocho* and *tef*. J Applied Microbiology, 89:969-978, 2000.

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.

Oaks MK, Penwell RT, Suh CH, Tector AJ. Polymerase chain reaction cloning and expression of the rat granulocyte-macrophage colony stimulating factor. J Interferon Cytokine Res, 15:1095-1102, 1995.

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.

Paillot 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.

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.

Porcelli S. A., Modlin R. L. CD1 and the expanding universe of T cell antigen. Am. Assoc. Immunol, 155:3709-3710, 1995.

Quesniaux V. F. J., Jones T. C. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor. In The Cytokine Handbook 3rd edn Academic press London pp, 637-670, 1998.

Raibaud, P, Caulet, M, Galpin, JV, *et al*, G. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. J Appl Bacteriol, 24:285-306, 1961.

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, GV, Shahani, KM, Banerjee, MR: Inhibitory effect of yoghurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *J Natl. Cancer Inst*, 50:815-817, 1973.

Reddy, KP, Shahani, KM, Kulkarni, SM: B-complex vitamin in cultured and acidified yogurt. *J Dairy Sci*, 59:191-195, 1976.

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.

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.

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.

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, 1990.

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.

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.

Shida K., Makino K., Morishita A., Takamizawa K., Hachimura S., Ametani A., Sato T., Kumagai Y., Habu S., and Kaminogawa S. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch allergy Immunol*, 115:278-287, 1998.

Shin J.L., Chung K.Y., Lee T.H. and Lee M.G. the effect of *Trepanoma pallidum* on human dendritic cells. *Yonsei Med J*, 45:515-522, 2004.

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, 2002.

Sieff C. A., Emerson S. G., Donahue R. E., Nathan D. G., Wang E. A., Wong G. G., Clark S. C. Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science*, 230:1171-1173, 1985.

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-adjutant 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.

Spagnuolo-Waver M., Fuerst R., Campbell S. T., Meenhan B. M., Mcneilly F., Adair B., Allan G. (1999) A fluorimeter-based RT-PCR method for the detection and quantitation of porcine cytokines. *J Immunol Methods*, 230:19-27, 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.

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.

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.
- Vissek, WJ. The mode of growth promotion by antibiotics. *J Ani Sci*, 46(5): 1447-1469, 1978.
- Wang J, Zou M, Huang B, Zhang M, Mao N. Molecular cloning and expression of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in *Escherichia coli* system. *Chin J Biotechnol*, 11:45-81, 1995.
- Warren TL, Weiner GJ. Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development. *Curr Opin Hematol*, 7(3):168-73, 2000.
- Witmer-Pack M. D., Oliver W., Valinsky J., Schuler G., Steinman P. M. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 166:1484-1498, 1987.
- Wong G. C., Witek J. S., Temple P. A. Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purifying of the natural and recombinant proteins. *Science*, 228:810-815, 1985.
- 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 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.