

T0001015

GOVP1200506781

최 중
연구보고서

포유자돈의 설사병 예방을 위한 항원 발현 유산균 개발
Expression of the protective antigen by
Lactobacillus toward the development of an oral
vaccine against diarrhea in piglet.

연구기관
경상대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “포유자돈의 설사병 예방을 위한 항원 발현 유산균 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 최 충 국

요 약 문

I. 제 목

포유자돈의 설사병 예방을 위한 항원 발현 유산균 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양돈사료에는 질병예방과 성장촉진을 목적으로 치료용 수준 이하의 항생물질을 첨가하고 있는데 각종 부작용에 대한 우려가 높아짐에 따라 사료의 첨가제로서 항생제 사용을 줄이거나 금지하는 것이 세계적인 추세이다.. 항생제를 대신할 수 있는 몇 가지 방안 중에서도 가장 유망한 것은 생균제의 사용이라고 할 수 있고, 실제로 생균제의 사용은 매년 증가하고 있다. 생균제로 사용할 *Lactobacillus*는 대상 동물에서 분리되어야 하고, 위의 산성조건과 소화효소 및 담즙산에 내성이 있으며, 숙주의 점막 표면에 부착하는 균주를 선발하는 것이 중요하다.

신생 자돈 및 이유기 자돈에서 발생하여 폐사율이 높은 대장균성 설사병은 fimbria 유래의 F4 항원을 소유하는 장관독성 *E. coli*에 의하여 일어나는데, F4 항원은 K88ab, K88ac, 및 K88ad 등이 알려져 있으며, F4 유전자의 재조합 및 발현으로 생산되는 항원단백질로 병원성 *E. coli*의 장관점막 부착 및 증식을 막을 수 있는 예방백신이 개발되어야 하겠다. 유산균을 항원의 운반체로 하여 경구투여에 의해 장관점에서 항체생산을 유도하여 장관독성 *E. coli*에 대해 면역을 부여하는 연구가 필요하다.

본 연구는 국내 양돈환경에서 *Lactobacillus* 균주를 분리, 동정하고 생균제로서의 특성이 우수한 균주를 선발하는 한편, 유산균에서 F4ac fimbriae의 FaeG 항원을 발현하는 벡터를 개발하여, 선발된 균주에 도입함으로써 포유자돈의 설사병 예방에 효과 있는 생균제용 유산균을 개발하는 것을 목적으로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 자돈으로부터 *Lactobacillus*의 분리와 특성조사

자돈의 분변에서 *Lactobacillus*를 분리하고 내산성과 담즙산 내성이 우수한 균주를 선발하여 API 50 CHL과, API-ZYM에 의해 당 이용성과 효소활성 조사 및 ICR-PCR에 의해 동정한다. 선발된 균주의 항생제 감수성, 병원균에 대한 항균활성, 장 점막세포에 부착성 및 병원균 부착억제 등을 조사하여 생균제 특성이 우수한 균주를 선발한다.

2. F4항원 발현 벡터 개발

세포응집단백질 유전자 (*cluA*) 영역을 최소화하고 프로모터와 전사개시점 등 유전자의 구성을 파악한다. 이 유전자의 프로모터 부위와 분비신호서열, 고정신호서열과 전사종결신호 등을 이용하여 F4ac fimbriae의 FaeG를 유산균에서 발현시키는 벡터를 개발한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. *Lactobacillus*의 분리와 특성조사

자돈 120두의 분변에서 400균주의 *Lactobacillus*를 분리하여, 이들의 내산성, 내담즙성 및 박테리옌 생성능력에 근거하여 일차적으로 67균주를 선발하였다. 선발된

균주의 내산성과 내담즙성을 더욱 조사하고 11종의 항생제에 대한 감수성을 측정하였으며, 16S rRNA와 16S-24종 특이적 primer를 사용하는 PCR에 의해 동정을 시도하였다. 최종적으로 8균주 즉 6-4, GJO2, GSF3, GSD1, SMP2,, SJD2, HD11-1, SJG1을 선별하여 동정하고 그 생균제 특성을 조사하였다.

선발된 *Lactobacillus* 균주를 API 50 CHL kit에 의해 동정했을 때 GSF3는 Id값이 78.3%로서 *L. plantarum*으로 나타났고, 나머지 7균주는 모두 90% 이상의 Id값으로 *L. fermentum*으로 나타났다. 그러나 ISR-PCR에 의한 동정에서는 *L. fermentum* 특이적 primers 사용 시 반응이 나타나지 않았고, *L. reuteri*에 특이적인 primers에서 여덟 균주 모두 단일 DNA 단편을 생성하였고 API-ZYM에 의한 효소활성 분석에서도 매우 유사한 패턴을 나타내어 이들이 모두 *L. reuteri*인 것으로 나타났다.

pH 1.0에서 배양시 6-4, GSF3, GSD1 및 HD11-1은 1시간까지 생존하였고, 3시간 배양에는 모두 사멸하였다. 5% 담즙산에서 여덟 균주 모두 생존하였고 GJO2, GSF3, GSD1, SMP2 및 SJG1의 생존율이 더 높았다. 여덟 균주 모두 높은 담즙염가수분해 효소 (BSH) 활성을 나타내었다.

11종의 항생제에 대한 감수성은 균주에 따라 차이가 있었지만 대체로 내성이 매우 높은 편이었다. GSD1을 제외한 7균주는 *vacomycine*에 내성이었고, SMP2, SJD2, HD11-1 및 SJG1은 *erythromycin*에 대한 MIC값이 256 µg/ml 이상이였다.

병원균에 대한 항균활성은 분리균주의 배양액과 여과 멸균한 배양여액 (SSCS)을 사용하여 측정하였는데 모든 배양액은 6종의 병원균을 모두 강하게 억제하였다. 그러나 SSCS는 agar well diffusion test에서 병원균을 억제하지 못했다.

Caco-2 세포에 대하여 부착성을 측정한 결과 6-4와 GSF3의 부착성이 가장 높았고, 6-4와 HD11-1의 SSCS가 부착성에 크게 영향을 미쳤다. Caco-2 세포에 병원균의 부착 억제성을 조사했을 때 pre-incubation이 co-incubation보다 더 효과적이었으며, pre-incubation 시 6-4는 *L. monocytogene*의 부착을 99.8% 감소시켰고, GJO2는 *B. cereus*를 96.8% 감소시켰다.

6-4를 이유자돈에 18일간 급여하였을 때 사료섭취율, 일당 증체량 및 사료요구율 등에서 6-4급여구가 대조구와 상업적 균주 급여구보다 나쁜 성적을 나타내었다. 시험 기간 중 자돈 분변의 *lactobacilli* 와 *enterobacteria*의 수에서도 처리구와 대조구 간에 유의차가 나타나지 않았다.

2. F4항원 발현 벡터개발

Lactococcus lactis ML3의 세포응집단백질유전자 (*cluA*)는 접합 시 세포의 응집을 일으키는 표면단백질을 암호화하는데, 자체의 프로모터, 분비신호서열, LPXTG 세포벽 고정신호 및 전사종결신호 등을 가지고 있다. 이 신호들을 이용하여 FaeG를 발현하는 유산균 벡터를 구축하려고 시도하였다.

Subcloning에 의해 4.7 kb의 *cluA* 구조유전자와 상류 2.8 kb를 함유하는 플라스미드 pSXK64를 얻었는데 이 플라스미드는 *cluA*의 발현에 요하는 모든 구성요소를 함유하였다.

*cluA*의 내부 단편을 probe로 사용하는 Northern blot에 의해 pDA11, pC2804 및 pCK01 등의 *cluA*함유 세포에서 약 4.7 kb의 전사체를 확인하였다.

*cluA*의 프로모터와 분비신호서열, 그리고 세포벽고정신호와 전사종결신호를 각각 증폭시킬 수 있는 primers를 설계하고, *E. coli* K88의 신호서열과 stop codon이 제거된 *faeG*를 증폭시키는 primer를 설계하여 PCR에 의해 각 DNA 단편을 증폭시켰다. *faeG*와 *cluA*의 세포벽고정신호-전사종결신호를 먼저 연결하고 다음에 프로모터-분비신호서열을 연결하여 이 construct를 pIL252에 클로닝하였다.

SUMMARY (영문요약문)

Probiotics is a promising alternative to subtherapeutic use of antibiotics for swine feed and may be part of the solution for decreasing or eliminating antibiotic use in animal agriculture. The aim of this study to isolate potential probiotic *Lactobacillus* strains from piglet feces and to construct recombinant *Lactobacillus* strain producing FaeG antigen on the cell surface.

Four hundreds strains of *Lactobacillus* were isolated from fecal samples of 120 piglets which were raised at six different farms located in 4 different areas of Gyeongsangnam-do. Of these strains, eight strains selected for their resistance to low pH and higher bile acid in primary screening procedure were identified and further studied on their probiotic properties.

When the strains were identified biochemically by using API CHL Kit, GSF3 was classified as *L. plantarum* with 78.3% confidence and other isolates 6-4, GJO2, GSD1, SMP2, SJD2, HD11-1 and SJD1 were *L. fermentum* with more than 90% confidence. But all of the eight selected strains were identified as *L. reuteri* by PCR identification using species-specific primer pair Lreu/Lrue4.

The eight *Lactobacillus reuteri* strains all maintained their viability during incubation at pH 2.0 for 3 h and the strains 6-4, GSF3, GSD1, HD11-1 survived at pH 1.0 for up to 1 h when grown in the pH-adjusted MRS broth. All strains survived but incubated in MRS broth containing 5% bile salt. The strains all expressed higher bile salt hydrolase (BSH) activity than the commercial strains *L. reuteri* Avibro2.

The eight strains were examined for their susceptibility to 11 antibiotics using a liquid medium dilution technique for minimal inhibitory concentration (MIC). The results have shown that the level of susceptibility to the antibiotics is strain-dependent. All strains except GSD1 were resistance to vancomycin. SMP2, SJD2, HD11-1, and SJG1 had an MIC value of >256 µg/ml for erythromycin.

All of the eight strains inhibited six strains of pathogenic bacteria (*Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* K88) when determined by the agar spot test. But sterilized spent culture supernatant (SSCS) of the eight isolates did not inhibit the growth of six pathogens..

Strains 6-4 and GSF3 were more adhesive when the eight isolates were examined for adhesion using Caco-2 cell culture. Sterilized supernatant fluid from cell suspension (SSCS) of 6-4 and HD11-1 significantly affected the adhesion. 6-4 and GJO2 showed strong antiadhesion activity against *L. monocytogenes* and *Bacillus cereus*.,

Strain 6-4 was administered through the feed to weanling piglets. for 17 days. The liveweight gains and feed consumption of piglets were recorded daily. Lactobacilli and enterobacteria cell counts were determined in the fecal samples. Strain 6-4 did not enhance liveweight gains and feed conversion rates in piglets. There were no big differences in lactobacilli and enterobacteria cell counts in the fecal sample between control and treatment group.

CluA is a 136 kD surface-bound protein encoded by plasmid pDA11 of *Lactococcus lactis* and is associated with cell aggregation linked to high-frequency transfer of the plasmid in conjugation. CluA gene (*cluA*) is preceded by a promoter and a consensus ribosome binding site. The signal sequence (40 aa) coding region and the structural gene, is followed by a translational stop codon and a transcription terminator. A secretion and anchoring cassette with the promoter, signal sequence, anchoring hexapeptide and transcription terminator of *cluA* was constructed using PCR.

편집순서 5

CONTENTS
(영 문 목 차)

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
제 1 절	연구개발의 목적 및 범위	12
제 2 절	연구개발의 필요성	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 1 절	생균제용 <i>Lactobacillus</i> 의 분리	14
제 2 절	항원발현 유산균 개발	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절	이론적, 실험적 접근방법	19
1.	자돈의 분변에서 <i>Lactobacillus</i> 의 분리와 특성조사	19
가.	분리균주의 선별	19
나.	1차 선발 균주의 특성	20
다.	최종 선발 균주의 특성	23
1)	분리 균주의 동정	23
2)	생균제 특성조사	23
가)	산성 pH에서 생장	23
나)	담즙산에서의 생장	23
다)	병원성 미생물에 대한 항균활성	23
라)	부착성과 부착 억제성	24
라.	<i>L. reuteri</i> 6-4의 사양실험	27
2.	항원발현 유산균 개발	29
가.	세포응집단백질 영역의 최소화	29
나.	<i>Lactobacillus</i> 유래 플라스미드의 염기서열결정	29

다. Cloning, transformation 및 DNA manipulation	29
라. β -lactamase (Bla) gene fusion	30
마. FaeG 발현벡터의 작성	30
제 2 절 연구결과	32
1. 자돈의 분변에서 <i>Lactobacillus</i> 균주의 분리와 특성조사	32
가. <i>Lactobacillus</i> 의 분리	32
나. 일차 선발된 <i>Lactobacillus</i> 균주의 성질	34
다. 최종선발 균주의 동정과 생균제 특성	45
1) 선발된 균주의 산 및 담즙산 내성	45
2) 최종선발 균주의 동정	48
가) API 50 CHL kit에 의한 동정	48
나) 16S-23S rRNA ISR-PCR에 의한 동정	48
3) 최종 선발 균주의 생균제 특성	54
가) 산성 pH와 담즙산에서의 성장	54
나) Bile salt hydrolase (BSH)의 활성	60
다) 병원성 미생물에 대한 항균활성	62
라) Caco-2 세포에 대한 부착성	66
마) Caco-2 세포에 대한 부착 억제성	70
4) <i>L. reuteri</i> 6-4의 사양실험	75
가) 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율	75
나) 분내 미생물의 변화	75
2. 항원 발현 유산균 개발	77
가. <i>Lactobacillus</i> 유래 플라스미드의 염기서열분석	77
나. 세포응집단백질유전자 (<i>cluA</i>)영역의 최소화	77
다. Northern blot에 의한 전사체 분석	79
라. FaeG 항원발현벡터의 구축	81
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	85
제 1 절 자돈의 분변에서 <i>Lactobacillus</i> 균주의 분리와 특성조사	85

제 2 절 항원 발현 유산균 개발	86
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	87
제 1 절 추가연구의 필요성	87
제 2 절 타연구에의 응용	87
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	88
제 7 장 참고문헌	90

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

이 연구는 국내 양돈환경에서 *Lactobacillus* 균주를 분리, 동정하고 이들의 특성 (내산성, 담즙산 내성, 항생제 내성, 항균활성)을 조사하여 생균제로서의 특성이 우수한 균주를 선발하는 한편, 유산균에서 F4ac fimbriae의 FaeG 항원을 발현하는 벡터를 개발하여, 선발된 균주에 도입함으로써 포유자돈의 설사병 예방에 효과 있는 생균제용 유산균을 개발하는 것을 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

양돈사료에는 질병예방과 성장촉진을 목적으로 치료용 수준 이하의 항생물질을 첨가하고 있는데 항생제 첨가의 주요 효과는 성장촉진, 사료효율의 향상 및 질병발생 빈도의 감소 등이고 질소, 인 및 분변의 배설감소와 같은 부수적인 효과도 있다. 그러나 각종 부작용에 대한 우려가 높아짐에 따라 사료의 첨가제로서 항생제 사용을 줄이거나 금지하는 것이 세계적인으로 추세이다.. 항생제를 대신할 수 있는 몇 가지 방안 중에서도 가장 유망한 것은 생균제의 사용이라고 할 수 있고, 실제로 생균제의 사용은 매년 증가하고 있다. 생균제로 사용되는 미생물에는 주로 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* 및 *Bacillus* 등의 박테리아와 *Saccharomyces*와 같은 효모 등이 있는데 *Lactobacillus* 속의 박테리아가 매우 중요하다.

생균제로 사용할 *Lactobacillus*는 대상 동물에서 분리되어야 하고, 위의 산성조건과 소화효소 및 담즙산에 내성이 있으며, 숙주의 점막표면에 부착하는 균주를 선발하는 것이 중요하다. 또한 양돈사료에 항생제가 첨가되고 있는 실정에서는 항생제 내성도 고려해야할 것이다. 보다 효과적인 *Lactobacillus* 균주의 선발과 그 효과를 검증하는 연구가 필요하다.

포유기의 자돈에서 빈번하게 발생하는 설사병은 폐사 및 성장부진을 나타내어 양돈업에서의 생산성을 크게 저하시키고 있다. 신생 자돈 및 이유기 자돈에서 발생하여 폐사율이 높은 대장균성 설사병은 fimbria 유래의 F4 항원을 소유하는

장관독성 *E. coli*에 의하여 일어나는데, 이 F4 항원이 *E. coli*가 포유 자돈의 소장 점막 용모상피에 잘 정착하도록 하여 균의 대량증식 및 독소를 생산함으로써 설사병이 일어난다. F4 항원은 K88ab, K88ac, 및 K88ad 등이 알려져 있는데 이것을 이용하여 설사병을 예방하고자 많은 관심이 집중되고 있으며, F4 유전자의 재조합 및 발현으로 생산되는 항원단백질로 병원성 *E. coli*의 장관점막 부착 및 증식을 막을 수 있는 예방백신이 개발되어야 하겠다. 유산균을 항원의 운반체로 하여 경구투여에 의해 장관점막에서 항체생산을 유도하여 장관독성 *E. coli*에 대해 면역을 부여하는 연구가 필요하다.

국내 양돈환경에서 적응되고 생균제 특성이 우수한 유산균을 선발하여 *faeG*를 발현시키면 일반적으로 알려진 생균제 효과에 대장균성 설사병의 예방효과를 더한 재조합 유산균을 확보하여 양돈산업과 국민의 건강에 크게 기여할 것으로 생각된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 생균제용 *Lactobacillus*의 분리

건강회복과 유지 및 질병의 예방과 치료를 위해 *Lactobacillus*를 사용하는 것은 전혀 새로운 개념이 아니다. 그러나 최근 전세계적으로 사람 및 가축의 생균제에 대한 관심이 고조되어 새로운 균주의 분리와 각종 치료효과에 관한 보고서가 쏟아지고 있다. 치료효과로는 면역증강, 혈중 콜레스테롤 저하, 류마티스 관절염치료, 암 예방, 유당불내증 완화, 아토피성 피부염 완화, 설사 및 변비 완화, 그리고 가축에서 설사병 예방 및 치료와 소화율 및 증체율 향상 등이 주장되었다. 생균제용 *Lactobacillus* 균주를 분리할 때 고려해야할 특성으로는 장점막 부착성, 병원성균의 부착 억제, 장내 지속 및 증식성, 항균물질의 생산, 안전성, 그리고 정상적이고 균형된 장내균총 유지 등이 주장되고 있는데 이러한 조건을 충족시키고, 반드시 생체 내 실험을 통하여 그 효과가 입증된 균주를 실제 산업에 적용해야할 것이다. 그러나 국내외에서 상업적으로 판매되고 있는 생균제에서 검정되지 않은 균주를 사용한다든지 사용 미생물의 조성과 특성 그리고 생균수 등이 표시와 일치하지 않은 경우가 많다.

돼지에서 생균제의 효과는 항균과 성장촉진으로 구분할 수 있는데 이에 관한 많은 연구가 수행되었지만 연구결과가 항상 일치하지는 않는다. 그러나 일반적으로 생균제 급여의 효과는 육성돈과 비육말기돈에서 보다 자돈에 더 확실한 것으로 보이고 (Pollman et al. 1980), 생균제의 균종에 따라 또는 같은 종에서도 균주에 따라 그 효과가 다를 수 있으며, 항균과 성장촉진 효과가 있다고 하는 결과가 더 우세하다 (Abe et al., 1995; Gardiner et al. 2004). 양돈사료에서 성장촉진용 항생제의 사용을 금지하는데 최선의 대안으로 생균제의 사용은 분명한 것으로 보인다.

F4 fimbriae의 매개로 장 상피세포의 수용체에 부착하는 것이 장독성 대장균에 의한 장내 감염의 첫 단계이다. *Lactobacillus*가 포유자돈과 이유자돈의 대장균성 설사병을 예방하는 기전으로서는 장내에서 lactobacilli의 세포벽용해에 의해 유리된 단백질 또는 탄수화물 성분이 장점막의 F4 fimbriae 수용체에 결합함으로써 대장균의 부착을 억제한다는 것과 젖산과 초산 등의 유기산 생성으로 pH를 저하시켜서

대장균을 억제한다는 것이 가장 유력하다.

Chang et al. (2001)은 내산성과 담즙산 내성 그리고 병원균에 대한 항균활성을 기초로 돼지 분변에서 *Lactobacillus reuteri* BSA131을 분리하였으며, 이 균주를 28-31일령 자돈에 급여하였을 때 자돈의 증체율과 사료전환효율이 향상되었고 분변시료의 lactobacilli 수와 장내세균수는 각각 유의적으로 증가 및 감소하였다.

Enterococcus 한 균주이상을 함유하는 유산균과 *Saccharomyces cerevisiae* 한 균주 이상으로 구성된 혼합균주는 사람과 단위동물에서 *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* 및 *Vibrio* 등의 장내세균과 병원균을 효과적으로 억제하였고, glucose, fructose, lactose, maltose 또는 sucrose를 보충함으로써 억제효과가 향상되었다. 여기서 효모는 그 세포벽 표면에 박테리아를 고정시키고, 효모 세포벽표면의 박테리아가 생산한 enterotoxin을 고정 및 파괴시키며, 치명적인 효모의 독소에 의해 박테리아를 용균시키는 등에 의해 병원균의 유해한 영향을 억제한다고 주장되었다. (US Patent No. 6,524,574).

이유자돈의 사료에 inulin, lactulose, wheat starch 및 sugar beet pulp의 첨가가 회장과 대장의 균총에 미치는 영향을 16S rRNA 유전자에 기초한 방법으로 조사하였을 때 자돈의 회장에 *L. reuteri*가 우점하고 회장과 대장에 *L. amylovorus* 유사 균종이 우세하였는데 이는 이러한 탄수화물의 첨가가 특정 lactobacilli의 성장을 촉진한다는 것을 의미한다 (Konstantinov et al 2004).

한국식품개발연구원 임성일 박사팀은 발효식품에서 분리한 젓산균 3종과 곰팡이 (M-29)를 섞은 미생물 생균제 (SDN)를 개발하여 특허출원을 마쳤는데 이 생균제는 대장균, 살모넬라 등 세균 및 바이러스에 의한 가축의 심한 설사증상에 대해 2일 4회 사용으로 90%이상 치료효과가 있다고 주장되었다 (연합뉴스 2004-06-14)

국내에서 시판되는 양돈용 생균제는 수많은 중소기업에서 생산되고 있으며 사용되는 미생물은 제품에 따라서 다르다. 예를 들면 켄포터(주)의 양돈용 유산균제에는 *Lactobacillus acidophilus* ($5 \times 10^7/g$), *Aspergillus oryzae* ($1 \times 10^8/g$), *Rhizopus microsporus* ($1 \times 10^8/g$), *Saccharomyces cerevisiae* ($1 \times 10^9/g$)등이 혼합되었고, 중앙바이오텍 (주)의 CYC-100에는 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7193 ($1.5 \times 10^{11}/kg$)단독, 수퍼 CYC에는 CYC-100에 *Bacillus subtilis* ($1.0 \times 10^9/kg$)를 강화, 그리고 프로바이오-C에는 수퍼 CYC에 *Lactobacillus plantarum*이

혼합되어 있으며, 이지바이오시스템의 바이오플러스2B에는 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis* 포자가 1:1의 비율로 $3.3 \times 10^{12}/\text{kg}$ 수준으로 함유되어 있고, 엔바이오제네시스외 동물사랑에는 *Bacillus subtilis* ($1 \times 10^{10}/\text{kg}$), *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium longum* ($1.5 \times 10^{11}/\text{kg}$) 및 *Saccharomyces cerevisiae* ($1.5 \times 10^{11}/\text{kg}$)등이 함유되었으며, (주)오비티의 피드엠에는 *Streptococcus faecium* ($2.5 \times 10^7/\text{g}$), *Phaffia rhodozyma* ($2.5 \times 10^7/\text{g}$), *Saccharomyces* sp. ($1.5 \times 10^6/\text{g}$), *Bacillus* sp., phototrophic bacteria ($2.5 \times 10^7/\text{g}$)등이 그리고 에니락에는 *Lactobacillus crispatus* ($1 \times 10^7/\text{g}$)가 *Streptococcus faecium*대신 사용되었고, 제일바이오의 하이퍼피타에는 *Bacillus subtilis* ($5.7 \times 10^9/\text{kg}$)와 *Aspergillus gryzae* ($1.9 \times 10^9/\text{kg}$)가 효소 (preotease와 amylase)와 함께 사용되었으며, 대성미생물연구소의 아비락-ABS에는 축산연구소와 공동으로 개발한 *Lactobacillus reuteri* avibro2 (KFCC-11196)가 $10^{10}/\text{kg}$ 함유되었다고 한다.

최근 농림부는 동물약품의 허용품목을 지금의 53종에서 30종을 줄이는 내용을 담은 ‘유해사료의 범위와 기준개정안’을 마련, 고시했다. 이에 대해 동물약품업계는 정부안을 따를 경우 피해가 크라며 항균 콕시딕제와 성장촉진제 일부를 현행대로 사용케 하고 사료첨가용 허용 제외 품목도 27종으로 조정해야 한다고 주장하고 있다.

제 2 절 항원 발현 유산균 개발

최근 경구투여 백신에 대한 요구가 증가하고 있지만 효과적인 경구투여 백신의 개발은 쉽지 않다. 지금까지 항원의 운반체로서 재조합 박테리아의 개발은 *Mycobacterium*, *Salmonella* 및 *Clostridium*의 생, 약독화 균주를 사용하는 데 집중되어왔다. 이들은 생체 내에서 많은 장점을 가지지만 소아와 면역억제성 개체에 위험하지 않도록 충분히 약독화 하는데 많은 노력이 필요하고, 약독화된 균주가 효과적인 면역반응을 유도하는데 필요한 정도로 이식 및 증식할 능력을 유지하는가는 분명하지 않다. 따라서 유산균과 같은 무해한 박테리아를 백신 운반체로서 사용하려는 연구가 증가하고 있다. 유산균을 백신 운반체로 개발하는데는 위장관에서 일시적이라도 정착할 수 있는 lactobacilli를 사용하는 방법과 정착하지 못하는 lactococci를 사용하는 두 가지 방법이 시도되고 있다. 재조합 lactobacilli에 의한

일시적 장내 정착은 발현된 항원에 대한 면역반응을 촉진할 것이고 박테리아의 표면에 항원을 발현시키는 것은 그 면역원성을 향상시킬 것으로 기대되기 때문에 그와 같은 genetic construct를 구축하려고 노력하고 있다 (Pouwels et al., 1998; Robert et al., 1998; Wells et al., 1996).

유산균 백신에 의해 전달된 항원에 대한 면역반응은 표면에 고정 또는 분비된 항원이 세포 내에 생산된 항원보다 더 면역원성이면서 발현된 항원의 양에 비례하였다. 그러나 세포질에 발현된 항원의 양이 분비 또는 표면 고정된 항원보다 훨씬 더 높은 수준에 도달하였다 (Mercenier et al., 2000; Reveneau et al., 2002). 유산균 백신 벡터에 의해 운반된 바이러스 또는 박테리아 항원으로는 tetanus toxin fragment C (TTFC)/*C. tetani*가 가장 자주 사용되었고, E7 antigens/human papillomavirus, envelope protease/HIV, PrtB/*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*도 사용되었다. TTFC를 세포질에 발현하는 *Lactococcus lactis* 균주가 치사량의 tetanus toxin에 대해 mice를 보호할 수 있음이 입증되었다 (Wells et al., 1993). 경구투여에 의해 면역시킬 때 유산균 백신 벡터가 위장관에 더 오래 머무는 것이 중요한지를 알기 위해 비슷한 양의 TTFC를 세포질에 발현하는 재조합 *L. plantarum*과 *L. lactis*가 비교되었다. 재조합 *L. plantarum* 균주를 mice에 급여했을 때 항원 특이적 체액항체의 역가가 50배 더 높았는데 이는 경구 면역 시 유산균 백신 벡터의 지속능력이 중요하다는 것을 의미한다 (Grangette et al., 2002).

유산균 백신 구축을 위한 분자생물학적 기법이 빠르게 발전함에 따라 항원 특이적 면역반응을 유발하기에 충분한 양으로 각각 다른 세포 위치에 항원을 발현시킬 수 있게 되었다. 그러나 아직 발현된 항원의 양을 제자리에서(*in situ*) 측정할 수 없고, 한 균주가 한 숙주의 다른 위치로 또는 여러 숙주로 보호 항원을 전달하는데 적절하지 않을 것이다 (Pouwels et al., 1998; Mercenier et al., 2000). 앞으로 정착하는 유산균 균주의 지속적 항원발현의 영향이 규명되어야 하고, 면역 경로와 항원전달에 관련 한 면역반응은 집중적인 연구를 필요로 한다. 특히 가축에서 항생제 사용을 현저히 줄이고 감염과 체중손실로부터 가축을 보호할 생균제와 예방접종과 같은 대안을 개발이 시급하다고 할 수 있지만 현재 어떠한 재조합 유산균 백신도 산업적으로 사용되지 않는다.

F4 fimbriae는 주 세부단위인 FaeG와 미량 세부단위인 FaeC, FaeF, FaeH 및

FaeI로 구성되며 주 세부단위인 FaeG가 adhesin인 반면에 다른 *E. coli* fimbriae에서는 미량 세부단위의 하나가 응집 (adhesion)에 관여된다. Recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG로써 갖 이유한 자돈의 경구 면역은 F4특이적 면역반응을 유도하여 접종 후에 F+ *E. coli*의 분비를 상당히 감소시켰다. FaeG를 F4+ 장독성 *E. coli*에 대한 경구백신으로 사용하기 위해서는 FaeG의 보존성이 측정되어야 한다. 이를 위해 설사로 죽은 자돈에서 분리된 21개 F4ac+ *E. coli*의 *faeG* 염기서열을 결정하고 이를 기 보고된 F4ab, F4ac, F4ad 항원 변이주의 FaeG 아미노산 서열과 비교하였다. FaeG 아미노산 서열은 각 F4 혈청형 내에서는 96-100% 상동성이었지만 Fab 와 F4ad 항원변이주가 F4ac 항원변이주와 비교되었을 때는 각각 92와 88%의 상동성을 나타내었다. FaeG의 보존된 영역은 F4 fimbriae의 조립에서 donor strand mechanism을 시사한다. 이 실험의 결과는 응집소가 F4+ *E. coli* 분리 균주 간에 보존되어 있기 때문에 F4+ *E. coli* 감염에 대한 경구 백신으로서 FaeG가 유용하다는 것을 뒷받침 한다. (Verdonck et al., 2004).

F4ac 항원 변이주의 FaeG 단백질을 chloroplast에 발현시키는 *faeG* construct가 담배에 형질전환되었는데 형질전환 담배는 총 가용성 단백질의 최고 1%에 달하는 FaeG단백질을 생산하였다. 식물에서 생산된 FaeG는 자돈의 위 및 장내 조건을 모방한 즙액에서 2시간까지 안정한 것으로 나타났으며, 분리된 자돈의 용모의 수용체에 부착할 수 있고 does-dependent manner로 F4 ETEC의 부착을 억제할 수 있었다 (Joensuu et al., 2004).

국내에서는 대학이나 연구소의 연구실에서 유산균 유전에 관한 연구가 산발적으로 진행되고 있으며, Cho et al. (2)은 *Clostridium thermocellum*의 endoglucanase 유전자를 그 자체의 promoter (pSD1)와 *Lactococcus lactis* lacA promoter (pSD2)의 조절하에 전사하는 발현백터를 구축하였고 이를 *Lactobacillus gasseri*와 *L. johnsonii*에 각각 형질전환하였을 때 pSD1을 함유하는 *L. gasseri*와 *L. johnsonii*에서 각각 0.722와 0.759 U/ml의 endogluconase활성을 관찰하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 실험적 접근방법

1. 자돈의 분변에서 *Lactobacillus*의 분리 동정과 특성조사

경남 사천시, 진주시, 하동군, 산청군 및 거창군에 위치한 6개의 소규모 양돈농장에서 총 120두의 자돈으로부터 개체의 분변을 채취하였다. pH 2로 조절한 buffer에 분변을 현탁시키고 2시간 진탕배양한 다음 Logosa agar (Rogosa et al., 1951) 또는 LAMVAB (Hartemink et al., 1997)에 접종하고 37℃에서 48시간 혐기 배양하였다. 생성된 colonies의 형태와 분리배지에 따라서 시료 당 3-4개의 colonies를 선발하였다. 선발된 균주에 대해 먼저 Gram염색을 실시하여 Gram 양성 간균이면서 catalase test 음성인 균주를 -65℃에 냉동보존하고 더 이상의 검사에 사용하였다.

가. 분리 균주의 선별

분리된 전체 균주에 대해 아래와 같이 조사하였다.

pH 3에서의 성장과 Bile 내성은 microwell plates에서 검사하였다. 즉 pH 3으로 조절한 MRS broth 또는 0.3% Oxgall을 함유하는 MRS broth 180 μ l를 각 well에 분주하고 검사 균주의 배양액 20 μ l를 접종하여 37℃에 배양하면서 3시간 간격으로 620 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

15℃와 45℃에서의 생장은 사전에 각 온도로 조절한 5 ml의 MRS broth에 검사 균주를 1 loop접종하고 15℃에서 7일과 45℃에서 48시간 배양 후 성장여부를 판정하였다.

박테리오신 생성은 disk diffusion method에 의해 검사하였다. 즉 20 ml의 MRS bottom agar plate에 *Lactobacillus acidophilus* Wiesby를 10^6 /ml 접종한 semi-soft agar 10 ml를 증충하였다. 여기에 plate당 9개의 paper disk를 위치하고 4.5 μ m syringe filter로써 여과 멸균한 검사 균주의 배양액 20 μ l을 위치하였고 37℃에서 24시간 배양 후 억제환의 유무와 직경을 측정하였다.

Chloramphenicol, Erythromycin, Oxytetracyclin, Penicillin, Spectinomycin, 및 Vancomycin 등 6종의 항생제에 대한 최저억제농도 (MIC)를 측정하였다.

나. 1차 선발 균주의 특성

1차 선발된 67개 균주에 대해 다음의 실험을 실시하였다.

산 내성은 pH 2.5, 3.0, 3.5 및 4.0으로 조절된 MRS medium 200 μ l를 microwell plate의 well에 분주하고 2 μ l의 배양액을 접종, 37 $^{\circ}$ C에 24시간 배양 후 성장 정도를 육안 관찰하였다.

담즙산에 대한 내성은 microwell plate에서 Oxgall을 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.63% 함유하는 MRS medium 200 μ l에 검사균주 배양액 2 μ l를 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 620 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Bile salt hydrolase (BSH)의 활성은 0.5% (w/v)의 taurodeoxycholic acid (TDCA, Sigma)와 0.37 g/l의 CaCl₂ (sigma)을 첨가한 MRS agar 평판에서 측정되었다. Paper disk를 MRS agar 평판에 놓고, 분리된 *Lactobacillus* 균주의 배양액 30 μ l씩을 paper disk에 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 72시간 배양하였고, 흰색 침전환의 직경 (mm)을 측정하였다 (Dashkevicz and Feighner 1989).

항생제 (Ampicillin, Cefatoxime, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycine, Oxytetracycline, Penicilline, Spectinomycin, Streptomycin, Tetracycline, Vancomycin)에 대한 감수성은 microwell plate에서 MRS broth에 항생제 농도를 256 μ g/ml에서 0.125 μ g/ml까지 2배 연속 희석하고 검사 균주를 접종한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양하고 성장을 억제하는 최저농도 (MIC)를 측정하였다.

병원균 (*Listeria monocytogenes*와 *Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 항균활성은 agar well diffusion method를 사용하여 측정하였다. 즉 Tryptic Soy Broth Agar를 사용하여 20 ml의 bottom agar plate를 준비하고 지시균주를 10⁶/ml의 농도로 접종한 semi-soft agar 10 ml를 중층하여 배지가 완전히 굳은 다음 plate당 9개의 직경 5 mm의 wells를 만들었다. 각 wells에 검사 균주의 배양 상등액 50 μ l를 넣고, 실온에서 3시간 정치하여 상등액이 배지 내로 완전히 확산되게 한 다음에 30 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 억제환의 생성을 관찰하였다. Bacteriocin 생성은 지시균주로 *Lactobacillus acidophilus* Wiesby를 그리고 성장배지로는 MRS를 사용하여 동일한

방법으로 검사되었다.

세포표면단백질의 추출과 SDS-전기영동은 다음과 같이 실시하였다. MRS broth (5 ml)에 12시간 배양된 세포를 원심분리하여 회수하고, 10 mM phosphate buffer로 2회 세척한 다음 SDS gel loading buffer (62.5 mM Tris-Cl, pH6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 5% β -mercaptoethanol) 500 μ l에 현탁시키고 10분간 boiling하였다. 실온에서 냉각시키고 12000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 세포표면단백질추출액으로 하였다. 전기영동은 4 % 의 stacking gel과 7.5%의 separating gel을 사용, 동량의 sample buffer와 함께 5분간 끓인 추출액 20 μ l를 loading하여 20 mA에서 12시간 실시하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였다.

Lactobacillus 분리 균주를 PCR에 의해 동정하는데 사용된 16S RNA 및 16S-23S rRNA gene spacer region의 염기서열에 기초한 속 또는 종 특이적 primers는 Table 1과 같다. Walter et al.의 방법 (2000)에 따라 *Lactobacillus*로부터 DNA의 분리하여 template로 사용하였다. PCR 반응은 template DNA 50 ng; Taq DNA polymerase 1U; each dNTP 250 μ M; Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM; KCl 40 mM; MgCl₂ 1.5 mM; Primer 20 pM로 구성된 반응액을 DNA thermal cycler 2400 (Perkin-Elmer Corp.)에 위치하고 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 다음 95 $^{\circ}$ C/30초, 55 $^{\circ}$ C/30초 72 $^{\circ}$ C/30초를 35 cycle 실시하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 유지한 다음 4 $^{\circ}$ C로 냉각시켰다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 분리하고 예상 크기의 밴드가 존재하는지를 관찰하였다.

Table 1. Primers used for identification of *Lactobacillus* isolates

Primer pairs	Specificity	Sequence (5'→3')	product size (bp)
R16-1 LbLMA1-rev	<i>Lactobacillus</i> -specific	CTTGTACACACCGCCCGTCA CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	250
CbsA2F CbsA2R	<i>L. crispatus</i>	GTACCAAGCCAAAGCAAGAC GTTTGAAGCCTTTACGTAAGT	386
Aci 16SI 16SII	<i>L. acidophilus</i>	AGCTGAACCAACAGATTCAC ACTACCAGGGTATCTAATCC	
GasI GasII	<i>L. gasseri</i>	GAGTGCAGAGCACTAAAG CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT	
Joh 16SI 16SII	<i>L. johnsonii</i>	GAGCTTGCCTAGATGATTTTA ACTACCAGGGTATCTAATCC	
PrI CasII	<i>L. casei</i>	CAGACTGAAAGTCTGACGG GCGATGCGAATTTCTTTTTC	
PrI PcasII	<i>L. paracasei</i>	CAGACTGAAAGTCTGACGG GCGATGCGAATTTCTTTTTC	
Brevis 1387r	<i>L. brevis</i>	CTTGCCTGATTTTAAACA GGGCGGTGTGTACAAGGC	1340
Lfpr Reu	<i>L. reuteri</i>	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT AACACTCAAGGATTGTCTGA	
Lfpr FermII	<i>L. fermentum</i>	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT CTGATCGTAGATCAGTCAAG	
Lfpr PlanII	<i>L. plantarum</i>	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT TTACCTAACGGTAAATGCGA	
LsaI LsaII	<i>L. salivarius</i>	AATCGCTAAACTCATAACCT CACTCTTTTGGCTAATCTT	411
Lfer-3 Lfer-4	<i>L. fermentum</i>	ACTAACTTGACTGATCTACGA TTCCTGCTCAAGTAATCATC	192
Lpla-3 Lpla-2	<i>L. plantarum</i>	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT CCTGAACTGAGAGAATTTGA	248
Lreu-1 Lreu-4	<i>L. reuteri</i>	CAGACAATCTTTGATTGTTTAG GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC	303

다. 최종 선발 균주의 특성

1) 분리 균주의 동정

선발된 8개의 *Lactobacillus* 균주와 생균제제 ‘아비락’에서 분리된 *L. reuteri* Avibro2는 API 50 CHL Kit 와 API LAB Plus software version 4.0 database (bioMerieux, Marcy-l’Etoile, France)에 의해 동정하였고. 각 균주의 효소활성은 API ZYM에 의해 측정되었다. 또한 앞서 설명한 바와 같이 16S rRNA 및 16S-23S rRNA intergenic spacer region에 근거한 species specific primer를 사용 polymerase chain reaction에 의해 동정하였다.

2) 생균제 특성조사

가) 산성 pH에서의 성장

6 N HCl을 사용하여 pH 1.0, 2.0, 3.0 및 6.5로 조정된 MRS broth에 분리 균주의 배양액을 10% 접종하고, 37°C에서 0, 1 및 3시간 배양 후, 시료를 채취하여 생균수를 측정하였다. 생균수는 MRS agar에서 37°C, 24시간 배양 후 생성된 colony를 계수하여 측정하였다 .

나) 담즙산에서의 성장

분리된 *Lactobacillus* 균주의 담즙산에 대한 내성은 Gilliland et al. (1984)의 방법을 약간 변형하여서 조사하였다. 5%의 oxgall로 보충된 MRS broth에 37°C에서 16시간 동안 배양된 *Lactobacillus* 균주의 배양액을 1% 농도로 접종하고 37°C에서 0, 1 및 3시간 배양 후 시료를 채취하여 생균수를 측정하였다. 생균수는 MRS agar에서 37°C, 24시간 배양 후 생성된 colony를 계수하여 측정하였다.

다) 병원성 미생물에 대한 항균활성

(1)병원성 미생물의 배양조건

본 연구에서 사용된 5 종의 병원성 미생물은 Korean Collection for Type Culture (KCTC)에서 구입하였으며 *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*, *S. aureus*는 Bacto tryptic soy broth medium (TSB, Difco)에서 37°C, 18시간

배양되었고, *B. cereus*는 nutrient broth medium (Difco)에서 30℃, 18시간 배양되었다. 실험 전에 충분한 활력을 유지하기 위해서 2회 계대 배양되었다.

(2) Sterilized spent culture supernatant (SSCS)에 의한 항균 활성

Lactobacillus 균주의 37℃에서 18시간 배양액을 12,000 rpm에서 원심 분리하여 얻은 cell-free supernatant의 pH를 측정 후 membrane filter (0.2 μm, Dismic, Advantec)로써 여과 멸균하고, 이를 sterilized spent cell-free supernatant (SSCS)라고 하였다 (Todoriki et al. 2001). SSCS에 의한 항균활성의 측정은 agar well diffusion assay를 약간 변형하여 실시하였다. 20 ml의 tryptic soy agar plate에 100 μl의 병원성 미생물 배양액을 접종한 0.7% tryptic soy agar를 중층하고 punch를 이용하여 직경 5 mm의 well을 만든 후, 분리 균주의 SSCS 50 μl를 접종하였다. Plates를 37℃에서 24시간 동안 배양하였으며 항균활성은 투명 환의 직경 (mm)으로 측정하였다 (Rodriguez et al. 2003).

(3) 배양액에 의한 항균 활성

Lactobacillus 균주의 배양액에 의한 항균활성은 Schillinger and Lucke (1989)의 agar spot 방법을 약간 변형하여서 실시하였다. 분리 균주의 배양액 2-3 μl를 MRS agar의 표면에 접종하고 실온에서 약 30분간 정치한 다음 37℃에서 24시간 혐기 배양하였다. 병원성 미생물 배양액 100 μl를 접종한 0.7% nutrition agar 10 ml를 중층하고 37 또는 30℃에서 18시간 배양 후 colonies 주위의 투명환의 직경 (mm)을 측정하였다.

라) 부착성과 부착 억제성

(1) Caco-2 세포의 배양

분리된 *Lactobacillus* 균주와 병원성 미생물의 부착성 (adhesion activity)을 측정하기 위해서 정상적인 소장의 용모세포의 다양한 특성을 나타내는 human colon carcinoma인 Caco-2 intestinal 세포를 사용하였다. Caco-2 cell line은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하였고, Dulbecco Modified Eagle's minimal essential

medium (DMEM, Gifco)에서 5% CO₂-95% air의 대기와 37°C에서 배양되었다. DMEM은 56°C에서 30분간 가열한 불활성화된 fetal calf serum (FBS, Gifco), 1% (v/v)의 non-essential amino acid (Gifco), 2.5 µg ml⁻¹의 amphotericin B (Gifco), 100 µg ml⁻¹의 streptomycin (Sigma), 그리고 100 U ml⁻¹의 penicillin (Sigma)으로 보충되었다 (Todoriki 2001). 부착성과 부착 억제성 (adhesion inhibition activity)을 측정하기 위해서, Caco-2 세포를 24-well tissue culture plates (Nunc)에서 단층 배양하였고, 부착성의 평가에 사용하기 전 2주 동안 confluence를 획득하기 위해서 well당 약 5 × 10⁵의 농도로 seeding 하였다. Cell culture medium인 20% FBS를 함유한 DMEM을 이틀에 한 번씩 교체하였으며, 부착성을 측정하기 1시간 전에 phosphate buffered saline (PBS: NaCl, 0.8%; K₂HPO₄, 0.121%; KH₂PO₄, 0.034%, pH 7.2)으로 두 번 헹군 후, 20% FBS를 함유한 DMEM으로 교체하였다 (Tuomola and Salminen 1998).

(2) Caco-2 세포에 대한 부착성

Lactobacillus 균주와 병원성 미생물의 부착성은 Coconnier et al. (1992)의 방법을 수정하여 조사하였다. 15일 동안 배양하여 24 well plate에서 confluence를 획득한 단층의 Caco-2 세포를 부착성 분석하기 1시간 전에 PBS로 두 번 세척 하였고, 0.5 ml의 20% FBS를 함유한 DMEM으로 채웠다. 배양된 *Lactobacillus* 균주와 병원성 미생물의 세포는 2,500 rpm에서 원심 분리하여 회수하고, PBS로 두 번 세척한 다음 20% FBS 함유 DMEM 배지 0.5 ml에 5 × 10⁸ cfu ml⁻¹의 농도로 현탁하였다. 이 세포현탁액을 준비된 0.5 ml의 Caco-2 단층세포와 혼합하고, 5% CO₂-95% air의 대기에서 1시간 동안 배양한 후, 멸균된 PBS로 5번 세척하고 methanol로 고정 한 후 그람 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 또한 각각의 24 well plates에 0.05%의 Triton-X-100 (promega) 용액을 300 µl씩 첨가하고 강하게 pipping 한 다음 연속 10배 희석하여 MRS agar에 pour-plate함으로써 실제 Caco-2 세포에 부착된 *Lactobacillus* 균주와 병원성 미생물의 수를 측정하였다 (Todoriki et al. 2001). 각각의 tests는 3 반복 실시하였다.

(3) Sterilized spent culture supernatant (SSCS)가 부착성에 미치는 영향

SSCS가 *Lactobacillus* 균주의 부착성에 미치는 영향은 다음과 같이 조사되었다. Caco-2 세포 단층을 PBS로 두 번 세척하고, 0.5 ml의 SSCS와 SSCS가 없는 20% FBS를 함유한 DMEM을 각각의 plate에 채웠으며, *Lactobacillus* 균주의 현탁액 (5×10^8 cfu ml⁻¹) 0.5 ml을 혼합한 후, 5% CO₂-95% air의 대기에서 1시간 동안 배양하였다. 각 조건에서 Caco-2 cells에 부착된 *Lactobacillus* 균주의 수는 앞에서와 같이 측정하였다 (Todoriki et al. 2001). 각 tests는 3회 반복 실시하였다.

(4) 병원성 미생물에 대한 부착 억제성

Lactobacillus 균주가 병원성 미생물의 부착성에 미치는 영향은 Forestier et al.의 방법 (2001)을 수정하여 조사하였다. 부착 억제성은 exclusion과 competition의 두 가지 다른 방법으로 측정하였다. Exclusion (pre-incubation)에서는 준비된 0.5 ml의 Caco-2 세포에 0.5 ml의 *Lactobacillus* 균주의 현탁액 (5×10^8 in DMEM)을 혼합하고 30분간 5% CO₂-95% air의 대기에서 배양하고, PBS로 두 번 세척한 다음 0.5 ml의 병원성 미생물 현탁액 (5×10^8 in DMEM)을 혼합하여 같은 배양 조건에서 30분간 더 배양하였다. Competition (co-incubation)에서는 준비된 Caco-2 세포에 *Lactobacillus* 균주와 병원성 미생물의 현탁액을 동시에 혼합하고 1시간 동안 5% CO₂-95% air에서 배양한 다음 PBS로 두 번 세척하였다. 두 방법에서 Caco-2 세포에 부착한 병원성 미생물의 수는 Nutrition agar (Difco)에 pour-plate하여 측정하였다. 부착 억제성은 병원성 미생물 단독일 때와 *Lactobacillus* 처리시의 병원성 미생물의 부착성을 비교하여 측정하였다. 각각의 tests는 3 반복 실시하였다.

라. *Lactobacillus reuteri* 6-4의 사양실험

생균제 특성이 우수하다고 판단된 *L. reuteri* 6-4의 급여가 이유자돈의 성장과 분내 미생물에 미치는 영향을 알아볼 목적으로 2004년 9월 13일부터 10월 1일까지 18일간 천안연암대학 부속시험농장에서 사양시험을 실시하였으며, 자료 분석은 사양시험 후 천안연암대학 생명자원산업연구소에서 실시하였다

1) 사양시험

가) 시험동물 및 시험설계

시험구 배치 및 처리는 Table 2에서 보는 바와 같으며 이유 5일 후에 시험을 시작하였다.

시험돈은 삼원교잡종(Landrace×Large White×Duroc) 이유자돈 (??kg)을 선발하여 각 pen당 10두씩 총 9pen, 90두를 사용하였으며, 시험구 배치는 3처리 3반복의 난괴법 배치로 3반복 중 1반복과 3반복은 거세돈 수컷, 2반복은 암컷을 각각 배치하였다.

Table 2. Experimental design

처리구	A	B	C
유산균	<i>L. reuteri</i> 6-4	<i>L. reuteri</i> Abivro2,	무처리
반복	3	3	3
두수/반복	10	10	10
두수/처리	30	30	30

나) 시험사료

시험사료는 현재 천안연암대학 실습농장에서 급여중인 (주)에그리브랜드 퓨리나 코리아의 뉴린텍젓먹이 사료를 3일간 (0-3일), 터보갓난돼지사료를 11일간 (4-14일), 뉴린텍30 사료를 4일간 (15-18일) 급여하였다.

다) 사양관리

사양시험돈사의 바닥은 전체가 플라스틱 슬랏(slot)의 돈사로서 10마리씩 군사하였다. 사료는 돈방 당 1개씩 설치된 급이기를 이용하여 자유채식토록 하였으며, 물은 자동급수기로 자유로이 먹을 수 있도록 하였다.

라) 조사항목 및 방법

이유돈은 사료섭취량, 증체량 및 사료요구율을 1주 간격으로 4회 측정하였으며, 1일 1두당 섭취량은 매 시기에 잔량을 측정하여 계산하였고, 일당증체량은 매 잔량 측정 시 이동식 전자저울로 측정하였다. 사료요구율은 시험기간 중의 사료섭취량을 증체량으로 나누어 계산하였다.

모든 자료는 SAS(1985)의 GLM procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 하였다.

2) 분내 미생물 분석

분 시료를 십진 연속 희석하여 *Lactobacillus* 수는 Rogosa agar (Difco) 그리고 장내세균수는 DHL agar (Eiken, Japan)에 접종하고 각각 37 및 35°C에서 48 및 24시간 배양하고, colonies수를 측정하였다.

SAS (Strategic Application Software) 통계 package (2000)의 general linear model procedure를 이용하여 분산분석을 하였고, Duncan's multiple range test로 처리하여 평균 간의 유의성을 검정하였다.

2. 항원 발현 유산균 개발

가. 세포응집단백질 유전자 (*cluA*) 영역의 최소화

cluA 영역의 염기서열에 기초하여 적절한 제한효소를 사용, pCK01을 subcloning하고 응집여부를 조사하여 CluA의 발현을 위한 유전자 영역을 한정하려고 하였다.

나. *Lactobacillus* 유래 플라스미드의 염기서열결정

플라스미드를 pUC18 또는 pUC19에 클로닝하고 nested deletions를 생성한 다음 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits와 ABI Prism 310을 사용하여 염기서열을 결정하였다.

다. Cloning, transformation 및 DNA manipulation

*Lactococcus lactis*와 *Lactobacillus*의 plasmid DNA는 O'Sullivan and Klaenhammer의 방법 (1993)에 따라 분리하고, *E. coli* plasmid DNA는 alkaline lysis method (Sambrook et al., 1989)에 의해 분리하였다. 다량의 plasmid DNA는 caesium chloride/ethidium bromide density gradient centrifugation에 의해 정제하였다. 일반적인 DNA조작과 agarose gel에서의 전기영동은 Sambrook et al.의 방법(1989)에 준하여 실시하였다. *E. coli*, *L. lactis* 및 *Lactobacillus*의 electroporation은 Bio-Rad Gene Pulser II를 사용하여 수행하였으며, *E. coli*는 Dower et al.의 방법 (1988), *L. lactis*는 Holo and Nes의 방법 (1989), 그리고 *Lactobacillus*는 Wei et al.의 방법 (1995)을 주로 사용하였다.

Lactococci에서 RNA분리는 TRIZOL max protocol 방법을 사용하였다.

Northern hybridization에 의한 RNA분석을 위해 30-40 μ l의 RNA를 0.8-1.2 % agarose- 2.2 % formaldehyde gel에서 분리한 다음 nitrocellulose membrane에 blotting하고 prehybridization 및 hybridization을 실시한다. Probes는 DIG-labeled probes를 사용하고 hybridization, washing 및 detection은 Genus System User's Guide에 따라 실시하였다.

라. β -lactamase (Bla) gene fusion

las 구조유전자 (*lasA*)의 signal sequence (SS)에 in-frame으로 SS가 없는 *bla* gene을 fusion시키기 위해 pUC19를 주형으로 하여 blaL1 (SphI) (5'-GTTTGCATGCA CCCA GAAACGCTGGT GAAA-3')과 blaR3 (PstI) (5'-GGTCCTGCAGTTACCAAT GCTTAATCAGTG-3')을 사용하여 PCR하여 788 bp 단편을 증폭시키고, *cluA*의 promoter signal sequence(P_{cluA} -SS $_{cluA}$)를 포함하는 단편 (635 bp, *cluA*의 SS포함)을 증폭하기 위해 pCK01을 주형으로 하고 CluL2 (EcoRI) (5'-GTGGGAATTCTGGCGGA AACAAACAACGG-3')와 CluR1 (SphI) (5'-CTCTG/CATGCGCACTTGCTCTTGAT ACT-3')을 primers로 사용하여 PCR을 실시하였다. 또한 *cluA*의 C-말단 anchor region과 전사종결신호 (at_{cluA})는 AnchL1 (PstI) (5'-GATACTGCAGTCAATGAAGAAG CTAAGACA-3')과 AnchR1 (XhoI) (5'-AATACTCGAGAAATACTTCCAAATAAT AGA-3')을 사용하는 PCR에 의해 증폭하였다.

증폭된 *bla*와 at_{cluA} 단편을 PstI으로 절단하여 젤에서 정제하고, ligation한다. Ligation한 DNA를 정제하여 주형으로 하고 blaL1과 AnchR1을 primer로 하는 PCR에 의해 *bla-at_{cluA}* 단편을 얻었다. 이 단편과 P_{cluA} -SS $_{cluA}$ 을 SphI으로 절단, 정제 및 ligation하고, CluL2와 AnchR1을 사용하는 PCR에 의해 P_{cluA} -SS $_{cluA}$ -*bla-at_{cluA}* 단편을 얻는다. 이 단편을 EcoRI과 XhoI으로 절단하고 같은 효소로 절단된 pIL252에 연결하였다.

β -lactamase활성을 나타내는 colony의 선발은 pyridinium-2-Azo-p-dimethylaniline chromophore (PADAC)를 50 μ M 함유하는 GM17 plate를 사용하거나 또는 chromogenic nitrocefin-impregnated disks (BBL DrySlide™ Nitrocefin)를 사용하여 실시하였다.

마. FaeG 발현 벡터의 작성

세포응집단백질의 구조와 발현조절에 관한 연구결과를 근거로 FaeG 발현 벡터의 작성은 앞서 beta-lactamase gene fusion에서와 같은 방법으로 실시하였다. 여기서 F4ac fimbrial antigen을 생성하는 *E. coli* K88 균주의 total DNA를 주형으로 하고 FaeGL (SphI) (5'-TGCATCTGCTATGGCGCATGCCTGG ATG-3')과 FaeGR (PstI) (5'-GACACTGCA GTAATAAGTAATTGCTACGTT-3')을 primer로 하는 PCR에

의해 N-말단에 signal sequence가 제거되고 C-말단에 stop codon이 상실된 mature *faeG*가 증폭된다. 이것은 앞서와 같은 방법으로 P_{cluA} - SS_{cluA} -*faeG*- at_{cluA} 의 구성으로 연결되고 pIL252에 클로닝 하였다.

제 2 절 연구결과

1. 자돈의 분변에서 *Lactobacillus* 균주의 분리와 특성조사

가. *Lactobacillus* 균주의 분리

6개의 소규모 양돈농가에서 사육하는 약 120두의 자돈에서 신선한 분변을 채취하였고, 실험실로 운반 즉시 *Lactobacillus* 분리를 실시하였다. 한 개체의 시료에서 3-6 colonies를 선발하여 Gram 염색과 catalase test를 하고 Gram양성 간균, catalase음성인 약 400균주를 잠정적인 *Lactobacillus*로 간주하고 냉동보존 하였고, 이들에 대해 pH3 또는 0.3% 담즙산에서의 성장, 15°C와 45°C에서의 성장, bacteriocin생성여부 등을 검사하였다 (Table 3). 이 실험에서 선택배지로 사용된 Rogosa agar과 LAMVAB는 모두 *Lactobacillus*에 대한 선택성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 또한 분리균주의 많은 부분이 45°C에서 성장하는 lactobacilli인 것으로 나타났다. 이 결과는 분리에 사용된 선택배지의 영향인지 또는 자돈의 장내 lactobacilli의 분포를 반영하는지는 판단하기 어렵다. *L. acidophilus*와 *L. gasseri*는 LAMVAB에서 성장하지 못한다고 알려졌다 (Jackson et al., 2002). 분리 균주의 약 20%가 지시균주로 사용된 *Lb. acidophilus*를 다양한 정도로 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

Table 3. Screening of *Lactobacillus* isolates for some properties

Properties	No, positive strain	No. negative strain	No. strain tested
Gram stain	353		353
Catalase test		353	353
Growth at pH3	28	325	353
Growth at 0.3% Bile	66	287	353
Growth at 15°C	102	251	353
Growth at 45°C	229	124	353
Production of bacteriocin	76	277	353

6종류의 항생제에 대한 318 분리균주의 최저억제농도 (MIC)를 측정하였으며 그 결과를 요약하여 Table 4에 제시하였다. Vancomycin과 erythromycin의 MICs가 대부분의 균주에 있어 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하여 매우 높게 나타났으며 oxytetracyclin과 spectinomycin도 비교적 높은 MICs를 나타내었다. Vancomycin의 경우 많은 *Lactobacillus* species가 고유의 내성을 가지지만 이러한 MIC값은 일반적으로 유산균에 대해 보고된 MIC값보다 훨씬 더 높은 것으로써 자돈 사료에 첨가되는 항생제의 농도가 높기 때문인 것으로 보인다. 앞으로 항생물질 내성 플라스미드의 존재와 내성의 전파 가능성에 관해 보다 자세한 연구가 필요할 것이다. Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN)은 보고서에서 전파 가능한 내성 유전자의 결여는 생균제 승인의 필수조건이 되어야 한다고 EU commission에 권고하고 있다.

Table 4. Distribution of MICs of antimicrobial agent for *Lactobacillus* isolates

Antibiotic	Number of isolates for which the MIC ($\mu\text{l}/\text{ml}$) was as follows:												
	≥ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 256	n ^a
Vancomycin	53				11	5		4	13	48	45	139	318
Penicillin	106	29	30	8	6	35	60	30	8	6			318
Oxy-tetracycline	34			6	3	5	9	19	87	74	71	10	318
Chloramphenical	67	26	43	120	56			5		1			318
Spectinomycin	51			2	8	14	30	80	76	30	25	2	318
Erythromycin	171	3	2	3	5	7	3	3		4	6	111	318

^a n=number of strain tested

나. 1차 선발된 *Lactobacillus* 균주의 성질

생균제로 사용할 *Lactobacillus*는 여러 가지 성질을 고려하여 선발해야겠지만 무엇보다 중요한 것은 대상 동물에서 분리되고 위의 산성조건과 소화효소에 생존하며 담즙산에 내성이 있는 균주를 선발하는 것이 중요하다. 따라서 1차 균주 선발은 주로 산 내성과 담즙산 내성에 근거하였고 동일 개체에서 분리된 균주가 중복되지 않도록 하여 67 균주를 선발하였다.

선발된 균주에 대해 Gram 염색, catalase test, 15°C 및 45°C에서의 생장, 그리고 Agar well diffusion method에 의한 bacteriocin 생성 여부를 검사한 결과는 Table 5와 같다. 대부분 앞서 균 분리 시의 결과를 확인하는 것이었다. 15°C와 45°C에서 생장이 각각 + -가 38균주, + + 17균주, - + 9균주 그리고 - - 3균주였다. 여기서 + +인 균주는 *L. reuteri*일 가능성이 높다. 박테리오신은 67균주 중 45균주가 생성하는 것으로 나타났으며, 지시균주의 억제정도는 억제환의 직경 (mm)으로 나타내었고 억제환의 상태는 C(윤곽이 분명하고 깨끗함), TC (윤곽이 덜 분명하지만 깨끗함), T (약간 혼탁함), TT (윤곽이 분명치 않고 혼탁함) 등으로 표시하였다.

Table 5. Some properties of 67 strains of *Lactobacillus* selected initially

Isolates	Gram stain	Catalase	Growth at		Bacteriocin
			15°C	45°C	
11-1	+	-	-	+	-
15-3	+	-	-	+	10(TT)
159-3	+	-	-	+	12T
19-1	+	-	-	+	TT
19-3	+	-	+	+	-
32-1	+	-	+	+	-
6-4	+	-	+	+	14(TT)
GJO2	+	-	+	+	
HD1-1	+	-	-	+	13T
HD11-1	+	-	+	+	14T
HD12-3	+	-	-	+	-
HD1-3	+	-	-	+	14(TC)
HD15-2	+	-	-	+	13T
HD17-2	+	-	-	+	11(TT)
HD19-2	+	-	-	+	12TT
HD2-3	+	-	-	+	11(TT)
HD24-3	+	-	+	+	14(C)
HD25-2	+	-	-	+	13CT
HD26-2	+	-	-	+	15(T)
HD29-1	+	-	-	+	-
HD29-3	+	-	-	+	-
HD3-1	+	-	-	+	-
HD3-3	+	-	-	+	-
HD6-3	+	-	-	+	11(TT)
HD8-1	+	-	-	+	8
HD9-2	+	-	-	+	15C
K-2	+	-	+	-	-
L-2	+	-	+	-	-
L-3	+	-	+	-	-
L-4	+	-	-	+	-
L-5	+	-	+	-	-
L-GSD3	+	-	-	+	13(C)
L-GSF1	+	-	+	+	14(C)
L-GSF3	+	-	+	+	10TT

Isolates	Gram stain	Catalase	Growth at		Bacteriocin
			15°C	45°C	
L-SJA1	+	-	-	+	13(C)
L-SJB1	+	-	-	-	11T
L-SJC1	+	-	-	+	12(T)
L-SJD2	+	-	+	+	10(TT)
L-SJG2	+	-	-	+	13(T)
L-SJG3	+	-	-	+	12TT
L-SJH1	+	-	-	-	11(T)
L-SJH2	+	-	+	+	12(TT)
L-SJL1	+	-	-	+	9T
L-SJS1	+	-	-	+	13T
SCA2	+	-	+	+	-
SCB2	+	-	+	-	-
SCB3	+	-	+	+	-
SCE3	+	-	+	+	-
SCII	+	-	+	+	10(T)
SCJ2	+	-	+	+	-
S-GSD1	+	-	+	-	12T
S-GSF1	+	-	-	+	10T
S-GSG2	+	-	-	+	12TT
SME1	+	-	-	+	14(C)
SMG1	+	-	-	+	15(C)
SMP2	+	-	+	+	12(C)
SMP3	+	-	-	+	10T
SMR2	+	-	-	+	8(TT)
S-SJA1	+	-	-	-	13T
S-SJD1	+	-	-	+	13T
S-SJE2	+	-	+	-	-
S-SJG1	+	-	+	-	12(TC)
S-SJH1	+	-	-	+	12T
S-SJL2	+	-	-	+	TT
S-SJK1	+	-	-	+	-
S-SJP1	+	-	-	-	10(T)
S-SJS1	+	-	+	-	-
S-SJS2	+	-	-	-	12(C)

1차 선발된 67균주의 산 내성과 담즙산 내성을 더욱 자세히 조사한 결과는 Table 6과 같다. 선발된 67균주 모두 pH 3.5로 조절된 MRS broth에서 잘 성장하였고, pH 3.0에서부터 균주에 따라 성장에 차이를 보였다. 대부분의 균주가 pH 2.5에서도 생존하는 것으로 보인다. Bile 내성의 경우 일반적으로 0.3% oxgall 함유 배지에서 성장하는 균주를 담즙산 내성 균주로 간주한다. 이 연구에서는 대부분의 선발된 균주가 5%의 높은 oxgall의 농도에서도 성장하였다. 따라서 이 연구에서 분리된 균주들은 각각 따로 측정되었을 때 산과 담즙산에 내성이 매우 높은 균주로서 생균제로서의 성질이 우수하다고 할 수 있다. 그러나 pH와 bile함량을 동시에 조절했을 경우에는 모든 균주가 매우 감수성이어서 pH4.0과 0.6% bile에서도 성장하지 못했다.

양돈 산업에서 항생제는 질병의 치료는 물론, 성장촉진제로서 널리 사용되고 있으며, 항생제의 남용으로 인하여 내성 균주의 출현이라든지 돈육에 항생제의 잔류문제 등 많은 문제를 야기하고 있어서 전 세계적으로는 양돈 산업에 항생제 사용을 제한 또는 전면적 사용 금지를 취하는 경향이다. 항생제를 대신할 수 있는 대안 중 하나가 probiotic이고, 이는 항생제 내성이 없는 균주가 바람직하나 현실적으로는 장내 생존성을 고려할 때 일부 항생제에 대한 내성이 있는 균주가 바람직하다는 의견도 있다 (Mattila-Sandholm et al. 1999)

Microwell plate에서 연속희석방법에 의해 측정했을 때 선발 균주에 대한 항생물질의 최저억제농도 (MIC)는 Table 7과 같다. 이 연구에서 분리된 균주들은 대체로 항생물질에 대한 내성이 매우 높았다. 이는 이 균주들이 자돈의 분변에서 분리되었고, 자돈 사료에는 설사를 방지할 목적으로 다양한 항생제가 첨가되기 때문에 항생제에 내성을 획득했거나 내성이 있는 균들이 자돈의 장내에서 선발되어진 결과라고 생각된다. 특히 erythromycin, oxytetracyclin, tetracyclin에 대한 내성은 너무 높았고 이들이 이 항생물질 내성 유전자를 가지고 있을 뿐만 아니라 타 균주로 전파시킬 가능성이 있는 것으로 보인다. Kanamycin, spectinomycin, streptomycin에 대한 내성도 높았지만 장내 lactobacilli에 있어서 일반적으로 보고되는 범위였다.

이러한 결과는 설사예방을 위해 자돈에 사용될 생균제의 항생제 내성에 관해 여러 가지 생각을 하게 한다. 일반적인 개념으로는 항생제 내성의 전파를 막기 위해서는 내성이 없는 균주를 사용해야 한다. 그러나 자돈 사료에는 예외 없이 항생제가 첨가되고 있는 현실을 고려할 때 내성이 없는 균주가 장내에서 생존하기 어려울 것이라고 생각된다.

Table 6. Acid and bile tolerance of 67 strains of *Lactobacillus* selected initially.

Isolates	pH				Bile (%)					
	2.5	3.0	3.5	4.0	20	10	5	2.5	1.25	0.63
11-1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
15-3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
159-3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
19-1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
19-3	+	+	++	++	-	+	+	+	+	+
32-1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
6-4	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD1-1	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++
HD11-1	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
HD12-3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD1-3	+	++	++	++	-	-	+	++	++	++
HD15-2	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
HD17-2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD19-2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD2-3	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
HD24-3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD25-2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD26-2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD29-1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD29-3	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
HD3-1	-	-	++	++	-	-	++	++	++	++
HD3-3	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++
HD6-3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD8-1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
HD9-2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
K-2	-	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-2	-	-	++	++	-	-	+	+	+	+
L-3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-4	-	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-5	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-GSD3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-GSF1	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
L-GSF3	+	++	++	++	-	+	++	++	++	++
L-SJA1	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++

Isolates	pH				Bile (%)					
	2.5	3.0	3.5	4.0	20	10	5	2.5	1.25	0.63
L-SJB1	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
L-SJC1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-SJD2	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++
L-SJG2	+	+	++	++	-	+	++	++	++	++
L-SJG3	+	++	++	++	-	-	+	+	+	+
L-SJH1	+	+	++	++	-	+	++	++	++	++
L-SJH2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-SJL1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
L-SJS1	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
SAC2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SCB2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SCB3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SCE3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SCI1	-	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SCJ2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
S-GSD1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
S-GSF1	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
S-GSG2	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++
SME1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SMG1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SMP2	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++
SMP3	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
SMR2	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++
S-SJA1	+	+	++	++	-	+	++	++	++	++
S-SJD1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
S-SJE2	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
S-SJG1	+	++	++	++	-	-	++	++	++	++
S-SJH1	+	+	++	++	-	+	++	++	++	++
S-SJI2	+	+	++	++	-	+	++	++	++	++
S-SJK1	+	+	++	++	-	-	+	+	+	+
S-SJP1	+	+	++	++	-	-	++	+	+	+
S-SJS1	+	+	++	++	-	+	++	++	++	++
S-SJS2	+	+	++	++	-	-	++	++	++	++

Table 7. MICs for 67 strains of *Lactobacillus* selected.

(단위: $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)

Isolate	Ampicillin	Chloramphenicol	Cefotaxime	Erythromycin	Kanamycin	Oxytetracycline	Penicillin	Spectinomycin	Streptomycin	Tetracycline	Vancomycin
11-1	4	8	1	<0.125	>256	64	<0.125	256	>256	128	>256r
15-3	8	1	<0.125	<0.125	256	128	1	16	8	256	>256
159-3	32	4	1	0.5	256	128	8	128	>256	256	>256
19-1	32	8	0.5	<0.125	>256	128	8	<0.125	256	128	>256
19-3	4	4	8	<0.125	>256	<0.125	1	128	256	128	>256
32-1	4	4	1	8	>256	128	16	256	128	128	>256
6-4	4	0.5	8	<0.125	128	64	1	16	16	64	>256
HD1-1	32	1	1	>256	>256	128	4	128	128	256	>256
HD11-1	32	2	1	>256	>256	256	4	64	<0.125	256	>256
HD12-3	128	64	4	64	128	<0.125	<0.125	64	256	128	>256
HD1-3	32	2	<0.125	<0.125	>256	128	32	16	>256	256	>256
HD15-2	32	2	0.5	>256	>256	256	4	64	128	256	>256
HD17-2	64	4	0.5	<0.125	128	128	16	128	<0.125	256	>256
HD19-2	16	1	4	32	256	256	16	8	128	256	>256
HD2-3	32	2	1	<0.125	>256	256	16	32	128	256	>256
HD24-3	32	1	1	<0.125	16	64	64	<0.125	2	<0.125	<0.125
HD25-2	64	1	0.5	64	256	128	64	<0.125	>256	256	>256
HD26-2	32	2	<0.125	4	64	128	32	<0.125	>256	<0.125	>256
HD29-1	32	4	8	<0.125	>256	32	16	256	256	128	>256
HD29-3	<0.125	0.5	<0.125	<0.125	32	<0.125	1	<0.125	4	<0.125	<0.125
HD3-1	64	1	0.5	<0.125	128	64	32	32	256	256	>256
HD3-3	64	32	0.5	>256	256	256	128	64	>256	256	>256
HD6-3	0.25	0.25	<0.125	<0.125	4	32	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
HD8-1	32	1	1	<0.125	>256	256	16	16	128	256	>256
HD9-2	<0.125	2	1	>256	>256	128	<0.125	32	128	256	>256
K-2	4	4	32	1	>256	16	2	128	64	16	>256
L-2	4	8	8	0.5	128	16	0.5	128	32	16	>256
L-3	4	8	8	<0.125	128	8	0.5	128	32	8	>256
L-4	4	4	0.5	0.5	>256	64	<0.125	<0.125	<0.125	128	>256
L-5	4	4	16	<0.125	256	16	1	128	64	8	>256
L-GSDB	2	1	<0.125	<0.125	32	128	1	4	8	128	>256
L-GSF1	4	2	0.5	4	<0.125	128	0.5	128	1	256	>256
L-GSF3	2	4	4	<0.125	>256	32	0.5	256	256	128	>256
L-SJA1	4	2	<0.125	>256	>256	128	1	64	256	256	>256

Isolate	Ampicillin	Chloramphenicol	Cefotaxime	Erythromycin	Kanamycin	Oxytetracycline	Penicillin	Spectinomycin	Streptomycin	Tetracycline	Vancomycin
L-SJB1	32	4	0.5	>256	128	128	8	32	16	256	>256
L-SJC1	32	4	1	>256	64	128	16	128	16	256	>256
L-SJD2	32	4	1	>256	128	128	16	64	16	256	>256
L-SJG2	16	4	1	>256	64	128	16	64	16	256	256
L-SJG3	32	4	0.5	>256	128	64	8	8	64	256	>256
L-SJH1	32	4	1	>256	64	128	16	64	8	256	256
L-SJH2	<0.125	1	<0.125	<0.125	8	128	<0.125	128	1	128	<0.125
L-SJL1	2	2	<0.125	256	256	64	<0.125	4	16	128	>256
L-SJS1	4	2	<0.125	<0.125	64	8	<0.125	16	64	32	>256
SCA2	<0.125	2	<0.125	<0.125	128	<0.125	0.5	4	8	2	1
SCB2	<0.125	2	<0.125	<0.125	0.5	<0.125	<0.125	16	>256	<0.125	<0.125
SCB3	2	2	0.5	<0.125	128	16	0.5	<0.125	8	64	1
SCE3	1	2	<0.125	128	128	<0.125	<0.125	128	16	16	4
SCII	4	2	<0.125	<0.125	256	128	1	64	8	256	>256
SCJ2	<0.125	1	<0.125	<0.125	32	8	<0.125	<0.125	16	<0.125	2
S-GSD1	<0.125	4	<0.125	<0.125	128	128	<0.125	<0.125	>256	<0.125	<0.125
S-GSF1	4	2	<0.125	<0.125	>256	128	1	64	64	256	>256r
S-GSG2	8	2	0.5	<0.125	128	128	1	64	64	256	>256
SME1	<0.125	4	<0.125	>256	<0.125	64	1	32	16	128	>256
SMG1	2	2	<0.125	>256	32	64	<0.125	16	1	64	<0.125
SMP2	8	2	1	>256	128	128	1	64	16	256	>256
SMP3	4	2	<0.125	>256	256	128	1	128	128	256	>256
SMR2	4	2	<0.125	>256	>256	128	<0.125	128	128	256	>256
S-SJA1	<0.125	2	0.5	>256	32	128	8	128	8	256	256
S-SJD1	32	2	0.5	>256	128	128	16	64	32	256	>256
S-SJE2	32	2	2	<0.125	128	64	1	<0.125	16	128	>256
S-SJH1	16	2	0.5	>256	16	128	8	16	256	256	>256
S-SJH2	32	4	1	>256	64	128	16	128	16	256	256
S-SJK1	256	2	4	>256	128	8	16	<0.125	64	256	<0.125
S-SJP1	64	4	1	>256	32	128	16	64	32	256	>256
S-SJP1	32	2	0.5	>256	32	128	8	128	16	128	128
S-SJS1	4	4	64	8	>256	<0.125	1	128	128	<0.125	8
S-SJS2	32	4	1	>256	64	128	16	64	16	256	>256

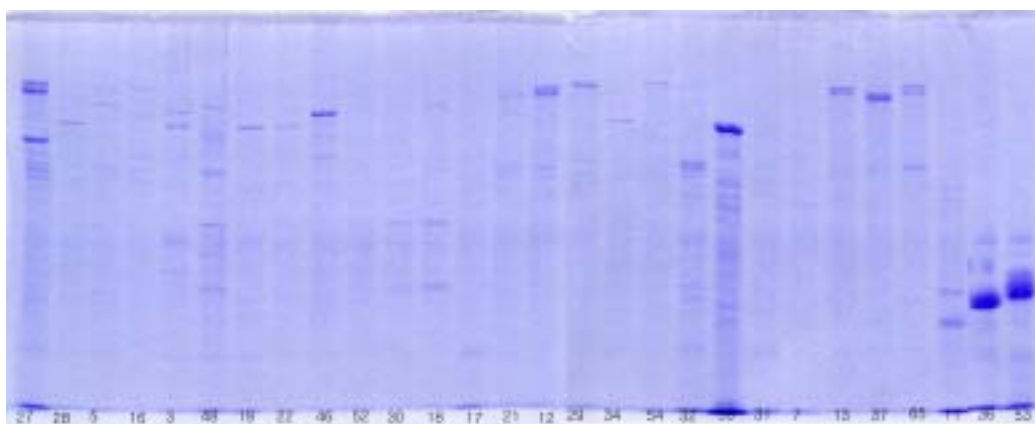


Fig. 1. The SDS-PAGE of cell-surface proteins from *Lactobacillus* isolates

분리 균주의 동정 또는 균주의 식별을 위해 표면단백질을 추출하여 전기영동한 패턴은 Fig. 1과 같다. 당초 표면단백질의 전기영동패턴이 종의 수준에서 일정한 경향이 있을 것으로 예상하였다. 그러나 표면단백질패턴은 같은 종 내에서도 균주에 따라 다양하게 나타나기 때문에 균주를 식별하는 수단으로 사용될 수 있을 것으로 보인다. 사실상 같은 농장에서 분리한 균주들 간에 동일한 패턴을 가지는 균주가 많은 것이 이를 확인한다. 그러나 패턴에 미세한 차이가 완전히 다른 종으로 나타날 수도 있기 때문에 표면단백질의 추출과 전기영동을 항상 같은 조건에서 정확하게 수행해야 한다.

최근 16S rRNA genes 또는 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 염기서열에 기초한 primers가 미생물의 동정에 널리 이용되고 있다. *Lactobacillus*에 있어서도 많은 균주에 대한 primers가 보고되었기에 보다 간편하고 정확한 균주 동정을 위해 기 보고된 1쌍의 *Lactobacillus* 특이적 primer와 10종의 종 특이적 primer를 합성하고, 67균주의 total DNA를 분리하여 PCR을 실시하였다 (Table 8). 그 결과 속 특이적 primer의 경우 67균주 중 61 균주에서 특이적 DNA 단편이 증폭되었다. 이 primer는 *Lactobacillus*속을 구분하는데 신뢰할 수 있을 것 같다. 종 특이적 primers를 사용하여 *Lb. crispatus* 한 균주와 *Lb. plantarum* 4 균주가 확인되었다. *Lb. reuteri*에 특이적 primer에 의해 13 균주 그리고 *Lb. brevis*에 특이적 primer에 의해 18균주가 PCR product를 생성하였으나 균주가 서로 중복되었고, *Lb. salivarius*에 특이적 primer를 사용했을 경우 67균주 모두에서 DNA단편이 합성되었다. 한편 *L. acidophilus*, *L. gasseri*, 및 *L. johnsonii*에 특이적 primers를 사용하였을 때는 예상된 크기의 product를 생성하는 균주가 없어 *Lb. acidophilus* 군에 속하는 균주가 거의 없다는 사실을 알게 되었다. *L. fermentum*과 *L. casei*에 특이적인 primers 사용 시에도 어떤 균주도 PCR product를 생성하지 않았다. 이러한 사실로 미루어 rRNA 유전자에 기초한 primer를 사용하여 동정하는 방법은 간편, 신속, 정확한 방법으로서 알려져 있지만 primer의 선택과 PCR조건이 매우 정확해야 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있고, 아직까지는 개발된 primer의 종류가 적기 때문에 60종에 달하는 *Lactobacillus*의 동정에는 한계가 있는 것 같다.

Table 8. PCR-detection of bacterial species with the specific primer pairs

Isolates			Isolates		
11-1			L-SJA1		
15-3			L-SJB1	<i>L. brevis</i>	
159-3			L-SJC1	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>
19-1	X		L-SJD2	<i>L. brevis</i>	
19-3	X		L-SJG2		
32-1	X		L-SJG3		
6-4	<i>L. brevis</i>		L-SJH1	X	<i>L. reuteri</i>
GJO2		<i>L. reuteri</i>	L-SJH2		
HD1-1		<i>L. reuteri</i>	L-SJL1		
HD11-1			L-SJS1	<i>L. brevis</i>	
HD12-3	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>	SCA2		
HD1-3		<i>L. reuteri</i>	SCB2		
HD15-2			SCB3	ND	
HD17-2	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>	SCE3	X	
HD19-2			SCI1		
HD2-3	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>	SCJ2		
HD24-3			S-GSD1		
HD25-2			S-GSF1	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>
HD26-2			S-GSG2		<i>L. reuteri</i>
HD29-1			SME1		
HD29-3	<i>L. brevis</i>		SMG1		
HD3-1			SMP2		
HD3-3			SMP3	<i>L. brevis</i>	
HD6-3			SMR2	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>
HD8-1	<i>L. brevis</i>		S-SJA1	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>
HD9-2	<i>L. brevis</i>		S-SJD1		
K-2	<i>L. plantarum</i>		S-SJE2		
L-2	<i>L. plantarum</i>		S-SJG1		
L-3	<i>L. plantarum</i>		S-SJH1	ND	
L-4	ND		S-SJI2	<i>L. brevis</i>	<i>L. reuteri</i>
L-5	<i>L. plantarum</i>		S-SJK1		
L-GSD3			S-SJP1		
L-GSF1			S-SJS1	X	
L-GSF3			S-SJS2	<i>L. crispatus</i>	

ND, not determined

X, did not give any products in PCR with *Lactobacillus*-specific primer pair.

unidentified

다. 최종 선발 균주의 동정과 생균제 특성

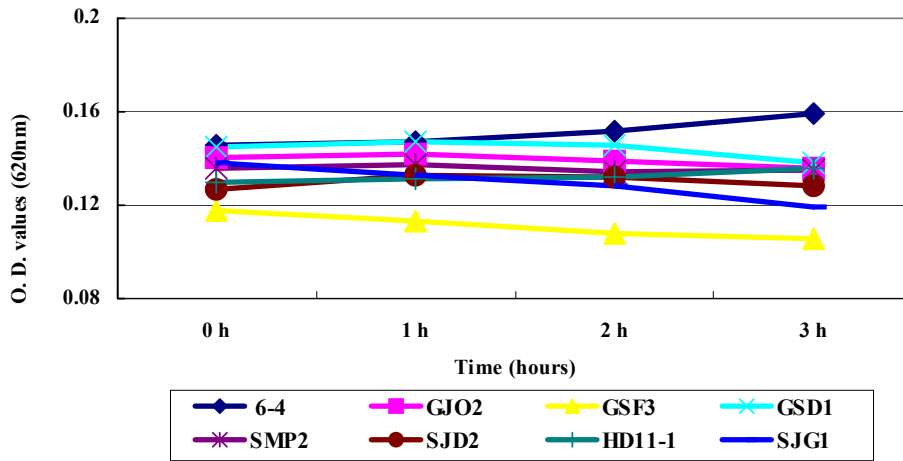
1) 선발된 균주의 산 및 담즙산 내성

400여 *Lactobacillus* 균주의 산 및 담즙산에 대한 내성을 측정된 결과 가장 우수한 8종의 *Lactobacillus* 균주 6-4, GJO2, GSF3, GSD1, SJD2, HD11-1, SJG1, SMP2가 선발되었다. 선발된 균주의 pH 2.0과 1.2%의 담즙산에 대한 내성 측정 결과는 Fig 2와 같고, 그람 염색에 의해 관찰된 *Lactobacillus* 균주의 세포 형태는 Fig. 3과 같다.

6-4는 pH 2로 조절한 MRS broth에서도 3시간 배양 중 성장을 보여 산 내성이 가장 높은 것으로 나타났으며 다른 균주들은 OD값이 같거나 약간 감소하는 것으로 나타났는데 이는 세포가 용균되거나 세포표면의 변화로 응집이 일어나기 때문인 것으로 보인다. 1.2%의 oxgall을 첨가한 MRS broth에서는 선발된 균주 모두 억제되지 않고 잘 성장하였다..

9균주는 모두 끝이 약간 둥근 짧은 간상의 세포로서 불규칙한 배열을 보였다.

(A)



(B)

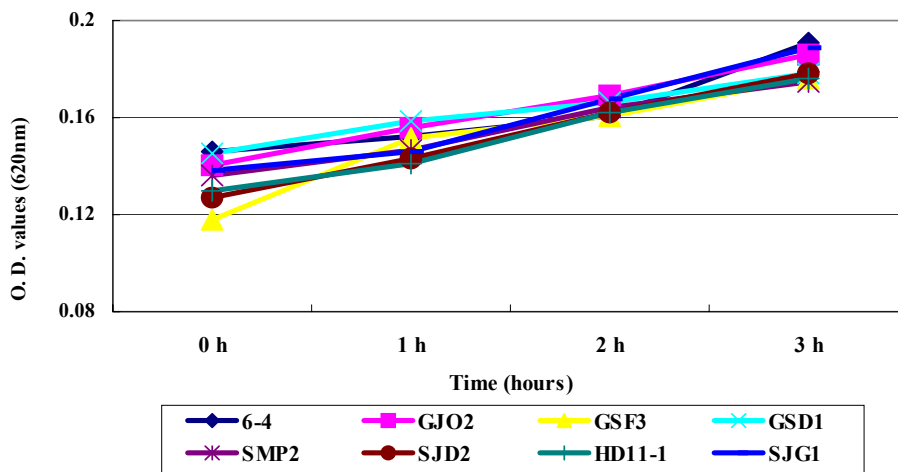


Fig. 2. Tolerance of *Lactobacillus* isolates to pH 2.0 (A) and 1.2% bile acid (B).

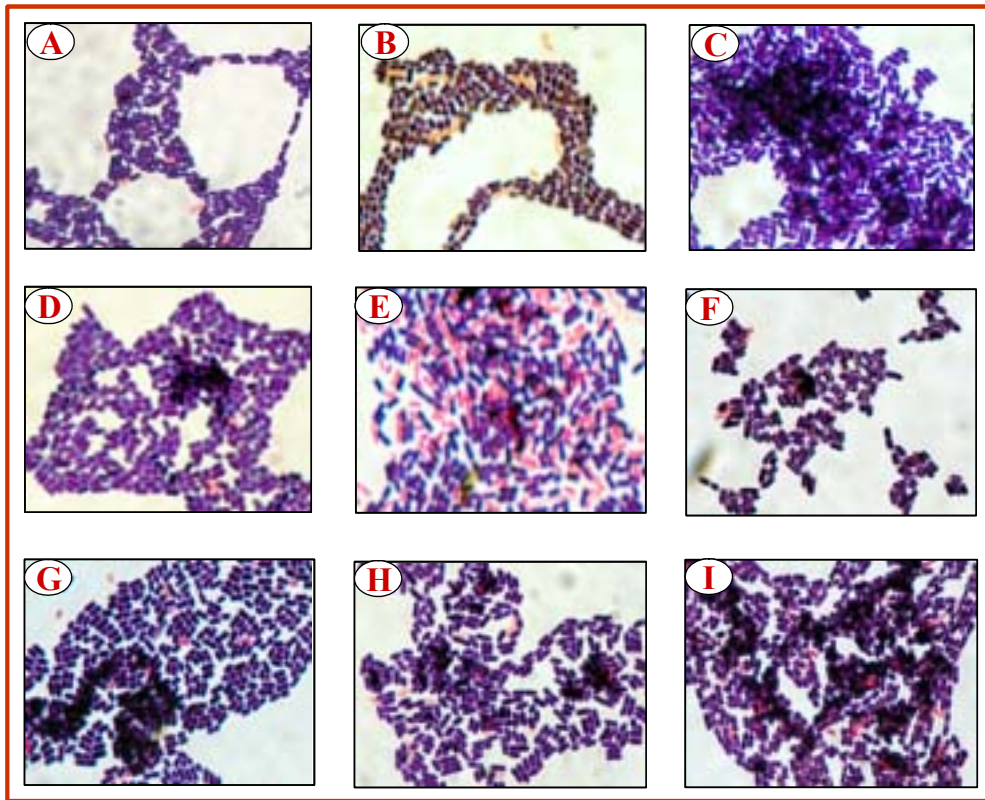


Fig. 2. Photomicrographs of Gram's stains of *Lactobacillus* isolates.

A; *L. reuteri* Avibro2, B; 6-4, C; GJO2, D; GSF3, E; GSD1, F; SMP2, G; SJD 2, H; HD11-1, I; SJG1.

2) 최종 선발 균주의 동정

가) API 50 CHL kit에 의한 동정

생균제로서 특성이 가장 우수하다고 판단되는 18개의 균주를 선발하여 API 50 CHL에 의해 당발효시험을 실시한 결과는 Table 8과 같고, 이 결과를 API LAB Plus software version 4.0 database에서 분석한 결과는 Table 9와 같다.

산과 담즙산에 대한 내성을 위주로 선발된 18균주 중에서 두 균주는 *L. plantarum*, 한 균주는 *L. salivarius*로 그리고 15균주는 *L. fermentum*으로 나타났다. 자돈의 분변에서 *L. fermentum*이 우점하는 내성균이라는 사실은 예상하지 못한 결과이다. API 50 CHL에 의한 당발효시험에 의해서는 *L. fermentum*과 *L. reuteri*를 구분하지 못한다. 또한 Bergey's Manual에 의하면 두 균종은 모두 45°C에서 성장하고 15°C에 성장하지 못하며, Arabinose 이용은 *L. fermentum*은 d (11-89%의 균주가 +), *L. reuteri*가 + 라고 하지만 성장온도와 당 이용성에 약간의 차이에 근거하여 동정하는 것은 무리가 있다.

나) 16S-23S rRNA ISR-PCR에 의한 동정

16S RNA 및 16S-23S rRNA gene spacer region의 염기서열에 기초한 속 또는 종 특이적 primers를 사용하는 ISR-PCR은 빠르고 정확하게 균주를 동정하는 방법으로 매우 유사한 *Lactobacillus* 균주를 서로 구분하는데 사용될 수 있다. 선발된 9균주에 대한 ISR-PCR의 결과는 Fig. 3과 같다. *Lactobacillus* 속 특이적 primer인 LbLMA1-rev와 R16-1을 사용하여 PCR한 결과 9균주 모두에서 250 bp의 단편이 증폭되어 이들이 *Lactobacillus*속임을 나타냈다. *L. reuteri*에 특이적 primers인 Lreu1과 Lreu4를 사용하는 PCR에 의해서 8개의 자돈 분리 균주와 1개의 상업적 균주 모두 302 bp의 DNA 단편을 생성하여 이들이 *L. reuteri*임을 나타냈다. 또 다른 *L. reuteri* 특이적 primers인 Lfpr과 Reu를 사용하여 동정한 결과에서는 분리균주 GJO2, GSF3, SMP2, HD11-1에서 250 bp의 단일 단편이 나타난 반면에, AvibroO2, 6-4, GSD1, SJD2 및 SJG1 등에서는 전형적인 DNA 단편이 증폭되지 않았다. 이러한 결과는 Species-specific primer의 설계에 따른 차이를 반영하고 있으며 Lreu1과 Lreu4의 조합이 *L. reuteri*의 동정에 더 유용한 것으로 사료된다. 앞서 1차 선발된 67균주에 대

해 *L. fermentum* 특이적 primer를 사용했을 때 예상 크기의 DNA단편이 증폭되는 균주가 없었던 점으로 미루어 볼 때 API 50 CHL Kit에 의한 동정에서 *L. fermentum*으로 나왔던 15균주는 모두 *L. reuteri*일 것으로 사료된다.

Table 8. Fermentation profiles of selected *Lactobacillus* strains

Isolates		Avi bro2	6-4	GJO2	19-3	S-SJG1	L-SJG3	SMP2	SMR2	L-SJD2	HDB-3	HDI-1	L-GSF3	HDI1-1	HD2-3	S-GSD1
0	Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	5	-	4	4	5	3	5	-	-	4	5	5	4	-	-
5	Ribose	4	4	3	-	4	5	4	5	3	3	3	5	3	3	5
6	D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	▣ Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Galactose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
11	D-Glucose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12	D-Fructose	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
13	D-Mannose	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Rhamnose	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Mannitol	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
19	Sorbitol	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
20	▣ Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	▣ Methyl-D-glucoside	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	N Acetyl glucosamine	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
23	Amygdaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
24	Arbutine	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
25	Esculine	3	3	4	4	3	3	3	3	-	3	3	4	1	2	3
26	Salicine	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
27	Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
28	Maltose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
29	Lactose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
30	Melibiose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
31	Saccharose	4	5	5	5	4	5	4	4	5	4	4	5	5	5	4
32	Trehalose	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
33	Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	D-Raffinose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
36	Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Glycogene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	▣Gentiobiose	-	2	-	4	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
40	D-Turanose	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Gluconate	3	3	-	4	3	4	3	-	-	-	-	-	-	3	-
48	2 ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	5 ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 9. Enzyme profile of selected *Lactobacillus* isolates determined by API-ZYM kit.

Enzyme	Isolates														
	Avi br2	6-4	GJ02	19-3	S-SJG 1	L-SJG 3	SMP2	SMR2	L-SJD2	HD3-3	HD1-1	L-GSF3	HD1-1	HD2-3	S-GSD 1
0 Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 Alkaline phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 Esterase (C-4)	+3	+3	+3	+4	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
3 Esterase lipase (C-8)	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
4 Lipase (C-14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Leucine aminopeptidase	+5	+5	+5	+4	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
6 Valine aminopeptidase	-1	+3	-2	-2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
7 Cystine aminopeptidase	-	-2	-	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	+3	-2	-2	-2	-2
8 Trypsin	-	-	-	-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 Chymotrypsin	-	-2	-	-2	-	-	-	-2	-	-	-	-2	-2	-2	-2
10 Acid phosphatase	+4	+3	+4	+3	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+5	+3	+3	+3	+3
11 Phosphohydrolase	+5	+4	+5	+3	+3	+4	+3	+3	+3	+3	+4	+3	+3	+3	+3
12 α -Galactosidase	+3	+4	+4	-	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
13 β -Galactosidase	+5	+4	+5	-	+4	+4	+4	+5	+4	+4	+4	+5	+5	+5	+5
14 β -Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 α -Glucosidase	-2	+4	+3	-	+3	+3	+3	+4	+3	+3	+3	+4	+4	+4	+4
16 β -Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 <i>N</i> -Acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 α -Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 α -Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 10. Identification of selected *Lactobacillus* isolates by API 50 CHL kit and ISR-PCR

Isolates	Identification by	
	API kit (Id %) ^a	ISR-PCR
Abibro2	<i>L. fermentum</i> (97.0)	<i>L. reuteri</i>
6-4	<i>L. fermentum</i> (97.0)	<i>L. reuteri</i>
GJO2	<i>L. fermentum</i> (94.2)	<i>L. reuteri</i>
19-3	<i>L. salivarius</i> (99.9)	
HD1-1	<i>L. fermentum</i> (93.9)	<i>L. reuteri</i>
HD11-1	<i>L. fermentum</i> (98.8)	<i>L. reuteri</i>
HD1-3	<i>L. fermentum</i> (97.0)	<i>L. reuteri</i>
HD2-3	<i>L. fermentum</i> (99.8)	<i>L. reuteri</i>
HD3-3	<i>L. fermentum</i> (93.9)	<i>L. reuteri</i>
L-3	<i>L. plantarium</i>	<i>L. plantarum</i>
L-GSF3	<i>L. plantarum</i> (78.3)	<i>L. reuteri</i>
L-SJD2	<i>L. fermentum</i> (99.8)	<i>L. reuteri</i>
L-SJG3	<i>L. fermentum</i>	
S-GSD1	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>
S-GSF1	<i>L. fermentum</i>	
SME2	<i>L. fermentum</i>	
SMG2	<i>L. fermentum</i>	
SMP2	<i>L. fermentum</i> (92.3)	<i>L. reuteri</i>
SMR2	<i>L. fermentum</i> (99.8)	<i>L. reuteri</i>
S-SJG1	<i>L. fermentum</i> (92.3)	<i>L. reuteri</i>

^a (Id %) : Identification %

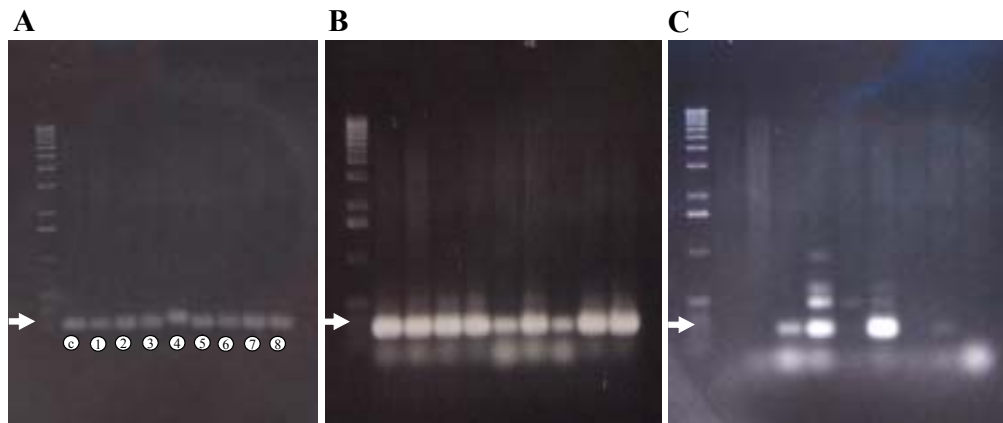


Fig. 3. PCR-products of *Lactobacillus* isolates by ISR-PCR using specific primers. Arrows indicate 250 bp size. Lanes C, *L. reuteri* Avibro2; 1, *L. reuteri* 6-4; 2, *L. reuteri* GJO2; 3, *L. reuteri* GSF3; 4, *L. reuteri* GSD1; 5, *L. reuteri* SMP2; 6, *L. reuteri* SJD2; 7, *L. reuteri* HD11-1; 8, *L. reuteri* SJG1. PCR with A; *Lactobacillus*-specific primers LbLMA1-rev, R16-1 for *Lactobacillus* strain and B; specific primers Lreu1, Lreu4 for *L. reuteri* and C; specific primers Lfpr, Reu for *L. reuteri*.

3) 최종 선발 균주의 생균제적 특성

가) 산성 pH와 담즙산에서의 성장

산성 pH와 담즙산에 대한 내성은 위장관내의 조건에서 생존하는데 매우 중요함으로 probiotic 균주의 선발에 중요한 기준이다. 선발된 *Lactobacillus* 균주들의 산성 pH에서 감수성을 측정하기 위해 pH 1.0에서의 생존 미생물수를 측정한 결과는 Table 10과 같다. 상업적 균주인 *L. reuteri* Avibro2와 자돈에서 분리된 GJO2, SMP2, SJD2 및 SJG1은 1시간 배양 후 모두 사멸한 반면에, 6-4, GSF3, GSD1 및 HD11-1은 10^2 - 10^4 의 생균수를 나타냈고, 배양 3시간 후에는 모두 사멸하는 것으로 관찰되었다. Table 11은 pH 2.0과 3.0 그리고 5% bile acid에서 분리균주들의 내성을 생균수 (cfu ml⁻¹)로 나타내었다. Fig. 4와 5는 pH 2.0과 3.0에서 0시간의 생균수에 대한 1시간과 3시간 후 생균수의 비율을 생존율 (%)이라 하고 각 균주별로 생존율을 나타낸 것이다. pH 2.0에서의 생존율은 검사 균주 모두 상당히 높은 것으로 나타났으며 6-4와 HD11-1이 3시간 배양 후에도 다른 분리 균주보다 더 높은 생존율을 보였고, 자돈 분변에서 분리된 8개 균주가 상업적 균주인 *L. reuteri* Avibro2보다 생존율이 높은 경향을 나타내었다. pH 3.0에서는 검사 균주 모두가 3시간 배양 후에도 65% 이상의 높은 생존율을 나타내었고 특히, SMP2가 다른 분리 균주들보다 더 높은 생존율을 나타내었다. Fig. 6은 5%의 담즙산 존재 하에서 0시간의 생균수에 대한 3시간 배양 후 생균수의 비율을 성장율 (%)로 하여 각 검사 균주의 성장율을 나타냈다. 모든 균주가 5%의 담즙산 존재 시 성장하였으며, GSF3와 SJG1이 가장 높은 성장율을 보여 담즙산에 대한 내성이 높은 것으로 나타났다.

Table 11. Viable cells of *Lactobacillus* isolates after 1 and 3 hours of exposure to pH 1.0

	Survival after incubation at pH 1.0		
	0 h (cfu ml ⁻¹)	1 h (cfu ml ⁻¹)	3 h
<i>L. reuteri</i> Avibro2	1.4×10^8	0	0
<i>L. reuteri</i> 6-4	1.6×10^8	3.8×10^4	0
<i>L. reuteri</i> GJO2	2.6×10^8	0	0
<i>L. reuteri</i> GSF3	1.3×10^8	5.0×10^2	0
<i>L. reuteri</i> GSD1	1.4×10^8	1.0×10^4	0
<i>L. reuteri</i> SMP2	1.1×10^8	2	0
<i>L. reuteri</i> SJD2	1.3×10^8	0	0
<i>L. reuteri</i> HD11-1	2.9×10^8	1.2×10^3	0
<i>L. reuteri</i> SJG1	1.3×10^8	0	0

Table 12. Viable cells of *Lactobacillus* isolates after 1 and 3 hours of exposure to pH 2.0, 3.0 and 5% bile

Strains		Viable cells after exposure for		
		0 h	1 h	3 h
<i>L. reuteri</i> Avibro2	pH 2.0	8.1×10^7	4.2×10^7	4.1×10^7
	pH 3.0	9.2×10^7	6.4×10^7	6.4×10^7
	pH 6.5	6.4×10^7	1.6×10^8	2.9×10^8
	5% bile	1.2×10^7	ND	2.8×10^7
<i>L. reuteri</i> 6-4	pH 2.0	2.6×10^8	2.5×10^8	2.3×10^8
	pH 3.0	2.5×10^8	2.3×10^8	2.2×10^8
	pH 6.5	2.0×10^8	2.8×10^8	1.1×10^9
	5% bile	4.9×10^7	ND	7.4×10^7
<i>L. reuteri</i> GJO2	pH 2.0	8.3×10^7	7.8×10^7	5.3×10^7
	pH 3.0	1.3×10^8	1.3×10^8	1.1×10^8
	pH 6.5	1.1×10^8	1.3×10^8	5.9×10^8
	5% bile	2.0×10^7	ND	3.3×10^7
<i>L. reuteri</i> GSF3	pH 2.0	1.8×10^8	1.2×10^8	9.4×10^7
	pH 3.0	2.2×10^8	1.6×10^8	1.5×10^8
	pH 6.5	2.1×10^8	2.5×10^8	4.7×10^8
	5% bile	3.0×10^7	ND	3.3×10^8
<i>L. reuteri</i> GSD1	pH 2.0	1.2×10^8	1.1×10^8	1.0×10^8
	pH 3.0	1.3×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8
	pH 6.5	1.2×10^8	1.5×10^8	2.9×10^8
	5% bile	2.9×10^7	ND	4.2×10^7
<i>L. reuteri</i> SMP2	pH 2.0	2.2×10^8	1.4×10^8	1.1×10^8
	pH 3.0	2.2×10^8	1.6×10^8	1.5×10^8
	pH 6.5	2.1×10^8	2.5×10^8	4.7×10^8
	5% bile	2.1×10^7	ND	5.4×10^7
<i>L. reuteri</i> SJD2	pH 2.0	1.4×10^8	1.0×10^8	6.7×10^7
	pH 3.0	2.0×10^8	1.8×10^8	1.7×10^8
	pH 6.5	6.8×10^7	4.6×10^8	8.3×10^8
	5% bile	2.3×10^7	ND	5.8×10^7
<i>L. reuteri</i> HD11-1	pH 2.0	1.1×10^8	8.0×10^7	4.0×10^7
	pH 3.0	2.0×10^8	1.5×10^8	1.5×10^8
	pH 6.5	2.9×10^8	4.5×10^8	1.0×10^9
	5% bile	2.5×10^7	ND	5.8×10^7
<i>L. reuteri</i> SJG1	pH 2.0	8.8×10^7	8.3×10^7	5.7×10^7
	pH 3.0	8.6×10^7	7.6×10^7	7.6×10^7
	pH 6.5	8.8×10^7	1.3×10^8	2.9×10^8
	5% bile	1.2×10^6	ND	2.8×10^7

MRS broth adjusted with pH 6.5 was used as control medium.

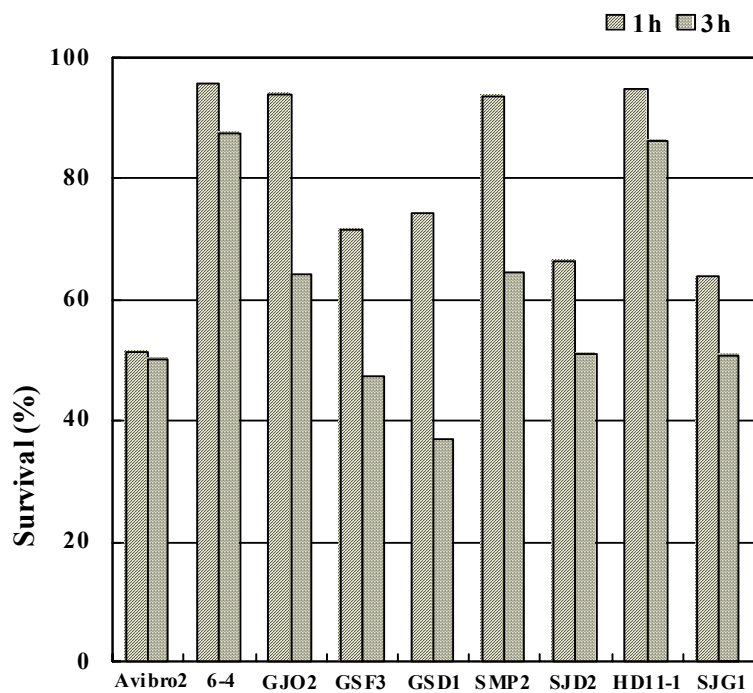


Fig. 4. Survival rate (%) of *Lactobacillus* isolates after 1 and 3 hours of exposure to pH 2.0. Survival rate (%) was calculated by comparing the number of viable cells (cfu ml⁻¹).

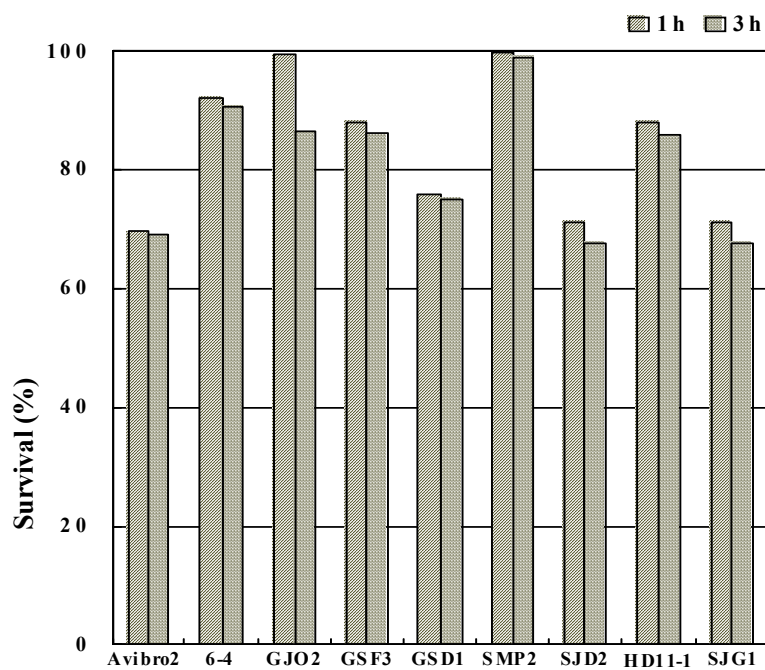


Fig. 5. Survival rate (%) of *Lactobacillus* isolates after 1 and 3 hours of exposure to pH 3.0. Survival rate (%) was calculated by comparing the number of viable cells (cfu ml⁻¹).

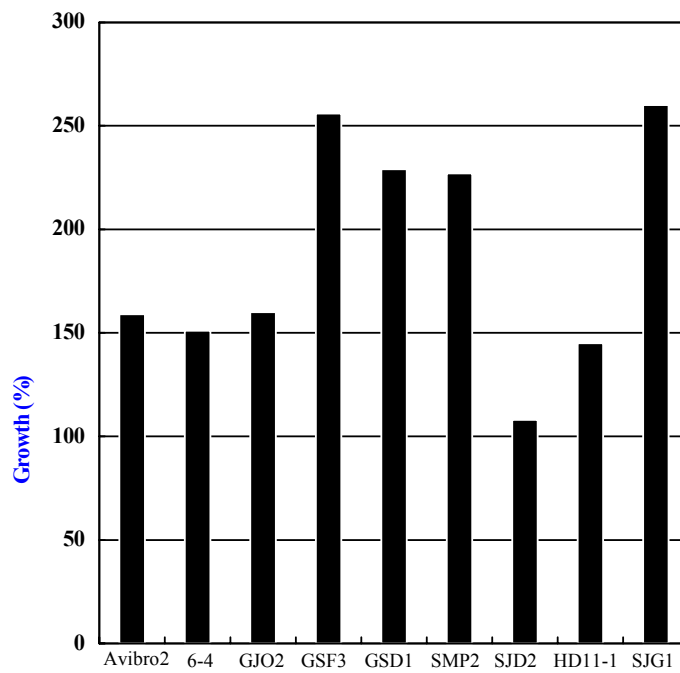


Fig. 6. Growth rate (%) of *Lactobacillus* isolates after 3 hours of exposure to 5% bile acid. Growth rate (%) was calculated by comparing the number of grown cells (cfu ml⁻¹).

나) Bile salt hydrolase (BSH)의 활성

담즙산염에 대한 내성은 소장에서 생존하거나, 자랄 수 있는 지표로 사용되며 특히, BSH 활성은 혈중의 cholesterol 조절에 관여하는 장관순환(enterohepatic cycle)에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Du Toit et al. 1998). 선발된 *Lactobacillus* 균주의 BSH 활성은 0.5%의 TDCA와 0.7 g/l의 CaCl₂를 함유한 MRS agar에서 형성된 백색 침전 환의 직경 (mm)을 측정하여 평가하였다. Fig 7에서 보는 바와 같이 *L. reuteri* Avibro2 보다 8 *Lactobacillus* isolates가 높게 나타났다. BSH 활성은 *L. reuteri* HD11-1가 가장 높게 나타났으며, *L. reuteri* GSF3, GSD1, SMP2, SJD2, SJG1도 높은 반면, *L. reuteri* 6-4와 GJO2는 상대적으로 낮게 나타났고, BSH 활성이 높은 균주는 BSH 활성이 낮은 균주보다 혈중의 cholesterol 조절이 잘 이루어질 것으로 사료된다.

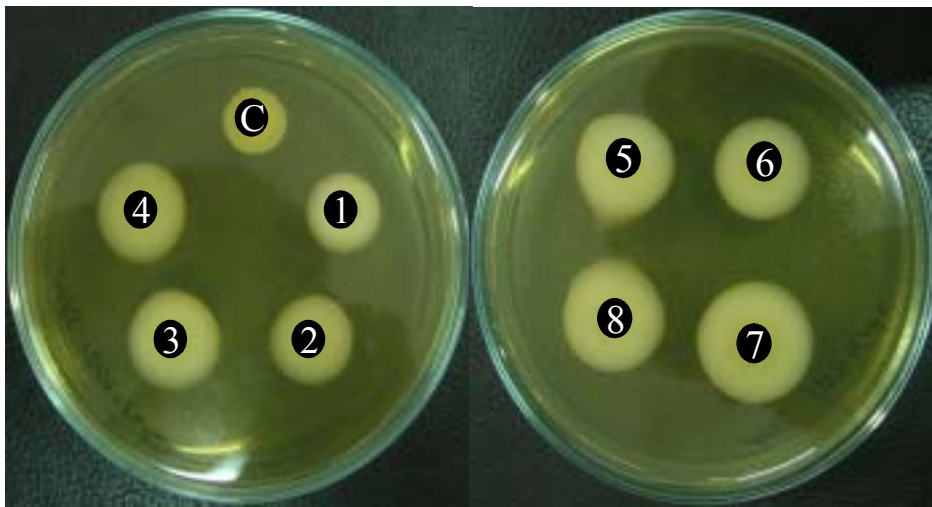


Fig. 7. Bile salt hydrolase activity (BSH) of *Lactobacillus* isolates. BSH activity was determined as the diameters (mm) of precipitation zone. C. *L. reuteri* Avibro2 (8 mm); 1. 6-4 (12 mm); 2. GJO2 (13 mm); 3. GSF3 (16 mm); 4. GSD1 (17 mm); 5. SMP2 (18 mm); 6. SJD2 (19 mm); 7. HD11-1 (22 mm); 8. SJG1 (21 mm)

다) 병원성 미생물에 대한 항균활성

병원성 미생물에 대한 항균활성은 잠재적인 probiotic 균주를 선발할 때 중요한 지표로 사용되며 동물이나 사람에게 유익한 효과를 제공하는 probiotics의 중요한 특성 중의 한 가지이다 (Fuller 1989). *Lactobacillus*는 유기산, 과산화수소 또는 박테리오신 등을 생산하여 항균활성을 가진다. 분리균주 배양액의 항균활성은 Agar spot test에 의해, SSCS의 항균활성은 agar well diffusion assay에 의해 측정되었는데 그 결과는 Fig. 8과 9 그리고 Table 11과 같다. 모든 분리균주의 배양액은 *S. aureus*의 성장을 억제했지만, 그 SSCS는 억제하지 못하였다. *L. reuteri* GJO2와 상업용 균주인 *L. reuteri* AVIBRO2의 배양액과 그 SSCS는 모두 *L. monocytogenes*에 대해 항균활성을 나타내었다. *L. reuteri* GSF3와 *L. reuteri* GSD1의 배양액도 *Salmonella* 두 균주의 성장을 억제하였다. 여기서, 배양액에 의한 *Salmonella*의 억제는 주로 유기산의 생산에 의한 것으로 사료되지만, *S. enteritidis*는 배양액보다 SSCS에 의해 더 강하게 억제되는 것으로 확인되었다.

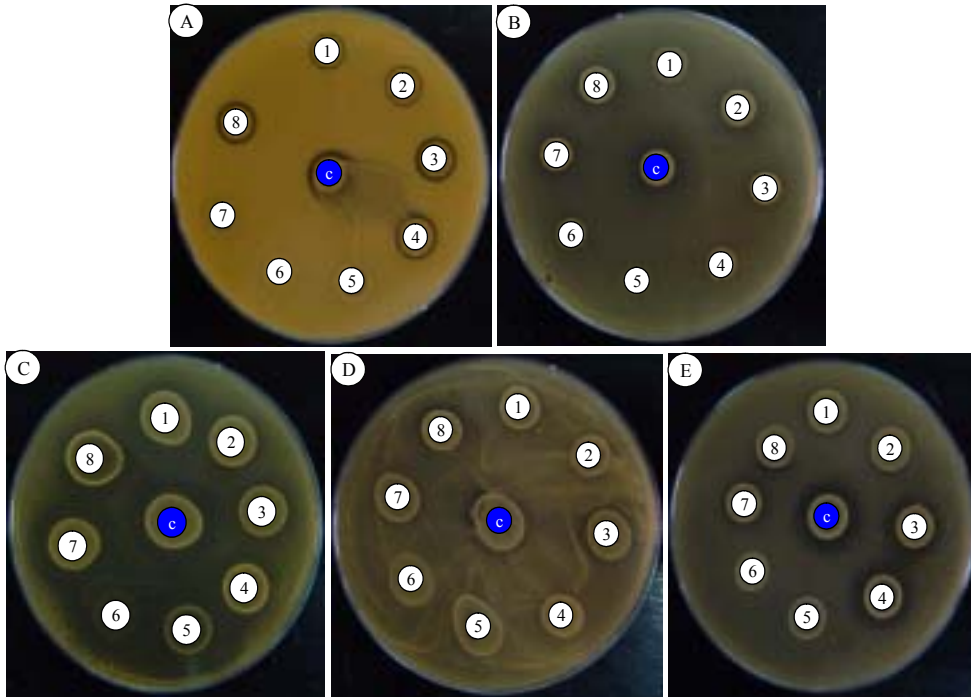


Fig. 8. Antimicrobial activity of culture of eight selected *Lactobacillus* strains and *L. reuteri* Avibro2 toward pathogens. C, AVIBRO2; 1, 6-4; 2, GJO2; 3, GSF3; 4, GSD1; 5, SMP2; 6, SJD2; 7, HD11-1; 8, SJG1. A; *B. cereus*, B; *L. monocytogenes*, C; *S. aureus*, D; *S. enteritidis*, E; *S. typhimurium*.

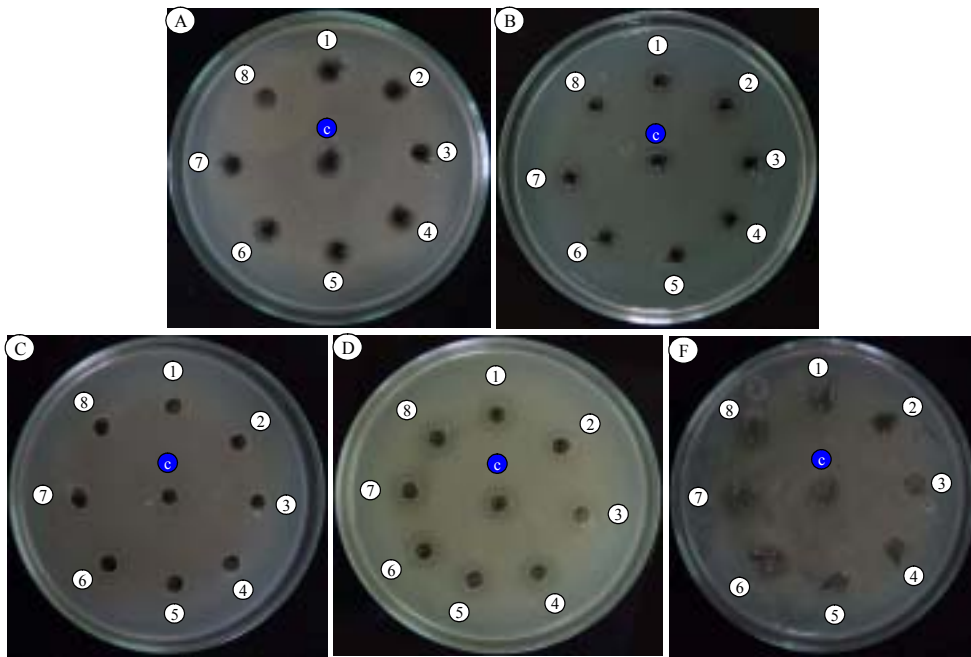


Fig. 9. Antimicrobial activity of SSCS of eight selected *Lactobacillus* strains and *L. reuteri* AVIBRO2 toward pathogens. C; *L. reuteri* Avibro2, 1, 6-4; 2, GJO2; 3, GSF3; 4, GSD1; 5, SMP2; 6, SJD2; 7, HD11-1; 8, SJG1. A; *B. cereus*, B; *L. monocytogenes*, C; *S. aureus*, D; *S. enteritidis*, E; *S. typhimurium*.

Table 13. Antimicrobial activity of cultures and SSCS of isolated *Lactobacillus* toward pathogens

Isolates		Inhibition of				
		<i>B. cereus</i>	<i>L. monocy- genes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteri- tidis</i>	<i>S. typhimu- rium</i>
Avibro2	SSCS	+	++	-	+++	+
	Culture	++	+++	+++	++	+++
6-4	SSCS	+	++	-	++	-
	Culture	+	-	+++	+	+
GJO2	SSCS	+	+++	-	+++	-
	Culture	+	+++	++	+	+
GSF3	SSCS	-	+	-	+	-
	Culture	++	+	+++	++	+++
GSD1	SSCS	+	+	-	++	-
	Culture	++	-	+++	-	+++
SMP2	SSCS	+	+	-	++	+
	Culture	-	-	+++	+	-
SJD2	SSCS	+	-	-	+++	++
	Culture	-	-	+++	-	-
HD11-1	SSCS	+	+	-	+++	++
	Culture	++	+	+++	+	+
SJG1	SSCS	-	+	-	+++	++
	Culture	++	++	+++	++	+

^a SSCS; Sterilized spent culture supernatant.

Inhibition of growth of pathogens is measured by assessing diameters of the clear zone. -, negative; +, 1 mm; ++, 1-3 mm; +++, >3 mm.

라) Caco-2 세포에 대한 부착성

Caco-2 세포는 probiotics 균주의 장내 흡착성을 평가하는데 사용되고 있다. 부착성은 면역반응의 유도과 competitive exclusion의해 병원성 미생물을 억제함으로서 숙주에 유익한 효과를 제공하는 생균제의 중요한 특성으로 인식되고 있다. Fig. 10은 Caco-2 세포에 부착해 있는 분리균주를 Gram 염색 후 광학 현미경에 의해서 관찰한 것이며, Fig. 11에서 Caco-2 세포에 실제 부착해 있는 균수를 측정하여 percentage로 나타내었다. *L. reuteri* 6-4와 *L. reuteri* GSF3가 *L. reuteri* Avibro2보다 더 높은 부착성을 나타내었다. Fig. 12는 SSCS가 부착성에 미치는 영향을 조사한 것이다. SSCS의 존재 시 Caco-2 세포에 부착된 *Lactobacillus*의 수를 측정하여 그 결과를 percentage로 나타내어 비교하였는데 *L. reuteri* 6-4와 *L. reuteri* HD11-1에서 *L. reuteri* Avibro2보다 부착성에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다. 이것은 SSCS에 단백질 성분인 부착 증진 인자의 존재에 기인하던지 또는 최근의 연구에서 나타난 *Lactobacillus* 세포 표면에 존재하는 비단백질 성분에 기인한다고 알려지고 있다 (Bernet et al. 1994 and Granato et al. 1999). 따라서 SSCS가 분리균주의 부착성에 미치는 영향은 점막 세포와 분리 균주의 SSCS 사이에 복잡한 다른 구조들이 존재할 것으로 사료된다.

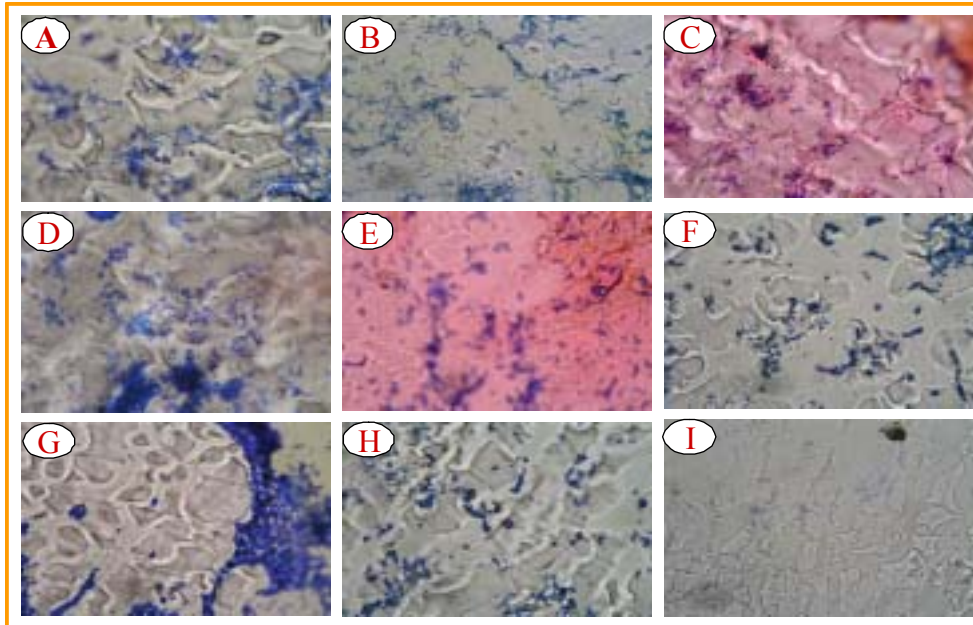


Fig. 10. Examination by light microscopy of adherence of *Lactobacillus* isolates to Caco-2 cells. Monolayers of Caco-2 cells with A; *L. reuteri* AVIBRO2, B; *L. reuteri* 6-4, C; *L. reuteri* GJO2, D; *L. reuteri* GSF3, E; *L. reuteri* GSD1, F; *L. reuteri* SMP2, G; *L. reuteri* SJD2, H; *L. reuteri* HD11-1, I; *L. reuteri* SJG1. Caco-2 cells and each strains were fixed with methanol and Gram stained and examined microscopically (Magnification 1000 ×).

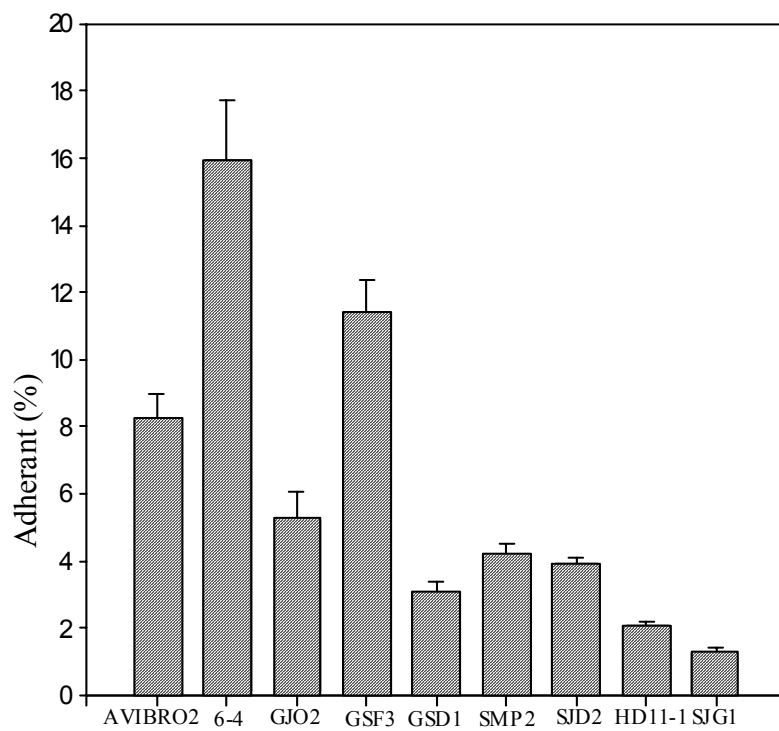


Fig. 11. Adhesion activity of *Lactobacillus* isolates to Caco-2 cells. The means and standard deviation of the data from three independent experiments were shown.

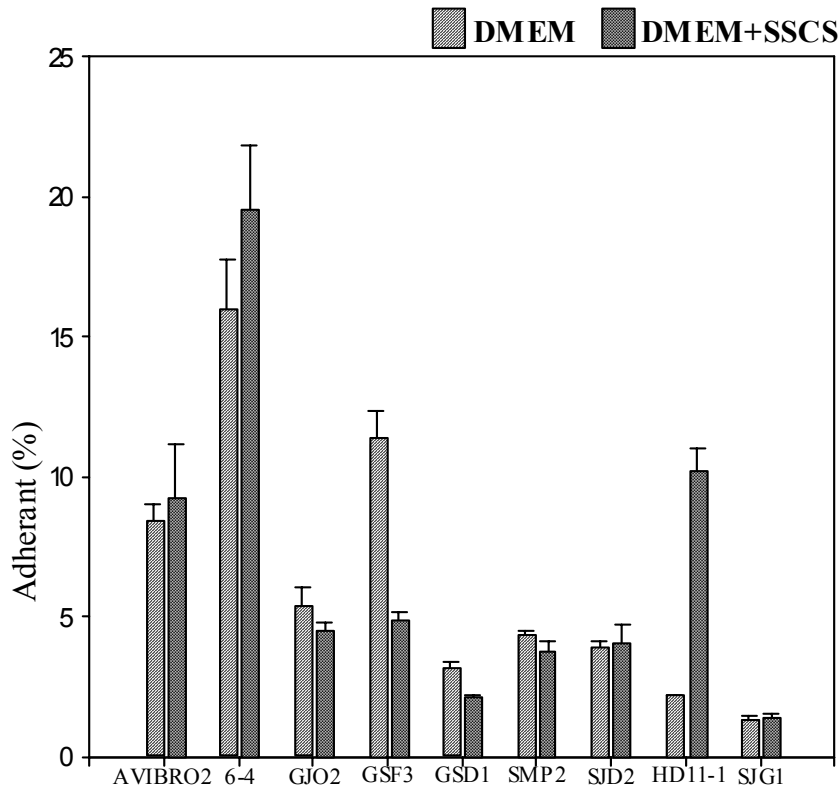


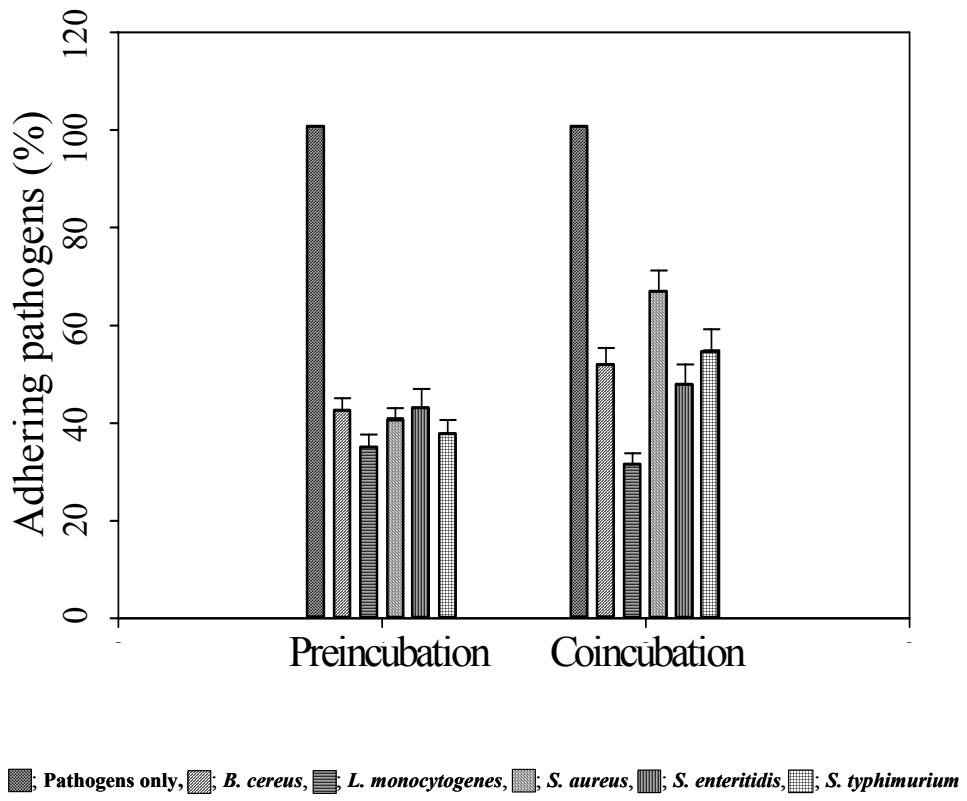
Fig. 12. Effects of sterilized spent culture supernatant (SSCS) of *Lactobacillus* isolates on adhesion activity to Caco-2 cells. The *Lactobacillus* strains were tested at a concentration of 5×10^8 cells ml⁻¹. Adhesion activity was calculated by comparing the number of bound cells (cfu ml⁻¹) with and without sterilized spent culture supernatant (SSCS) of *Lactobacillus* isolates to Caco-2 cells. The means and standard deviation of the data from three independent experiments were shown.

마) Caco-2 세포에 대한 부착 억제성

Caco-2 세포 부착성 조사에서 높은 활성을 보인 *L. reuteri* 6-4, *L. reuteri* GJO2, *L. reuteri* GSF3와 *L. reuteri* AVIBRO2가 *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium* 및 *S. enteritidis* 등 병원성 미생물의 Caco-2 세포에 대한 부착을 억제하는지를 두 가지 방법 즉 pre-incubation과 co-incubation을 사용하여 조사하였다. 그 결과는 병원성 미생물이 단독일 때의 부착성을 100%로 두고 *Lactobacillus* 균주들에 의한 병원성 미생물의 부착성 감소를 퍼센트로 나타내었다. 조사된 *Lactobacillus* 균주는 모두 병원성 미생물의 Caco-2세포에 대한 부착을 억제하는 것으로 나타났으며 억제 정도는 조사방법과 균주에 따라 다양하였다.

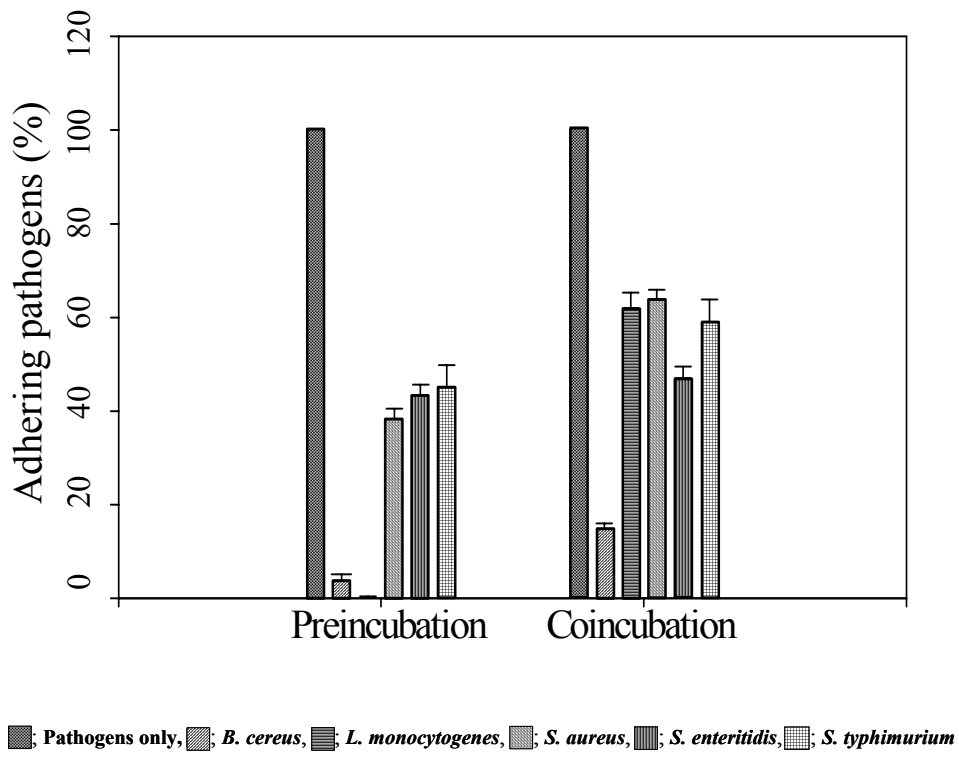
L. reuteri Avibro2에 있어서 pre-incubation 방법을 사용했을 경우 *L. monocytogenes*의 부착을 63% 억제하였고 *S. typhimurium*은 55% 억제하여 조사된 5종의 병원균이 이 범위 내에서 고루 억제되었다. *L. reuteri* 6-4는 pre-incubation시 *L. monocytogenes*의 부착을 99.95%, *B. cereus*를 97% 억제하였고, 타 병원성 미생물을 55-60% 억제하였다. *B. cereus*의 부착은 co-incubation시 약 40%가 억제되어 pre-incubation의 97%와 큰 차이를 나타내었다. *Lact. reuteri* GJO2는 *L. reuteri* 6-4와 비교적 유사한 병원성 미생물의 부착 억제성을 나타내어 *L. monocytogenes*와 *B. cereus*가 pre-incubation에서 각각 97%와 95%로 크게 억제되었다. *L. reuteri* GSF3의 경우 *B. cereus*의 부착성이 pre-incubation시 83%, co-incubation시 70% 억제된 것을 제외하고는 전반적으로 조사된 다른 *Lactobacillus* 균주보다 병원성 미생물의 부착 억제성이 낮았다. 일반적으로 pre-incubation 방법이 co-incubation 보다 병원성 미생물의 Caco-2 세포 부착을 억제하는데 더 효과적이었다. 분리 균주 *L. reuteri* 6-4와 *L. reuteri* GJO2는 상업적 균주 *L. reuteri* Avibro2보다 부착 억제성이 더 높게 나타나서 현장에서 병원성 미생물에 대한 예방효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

(A)



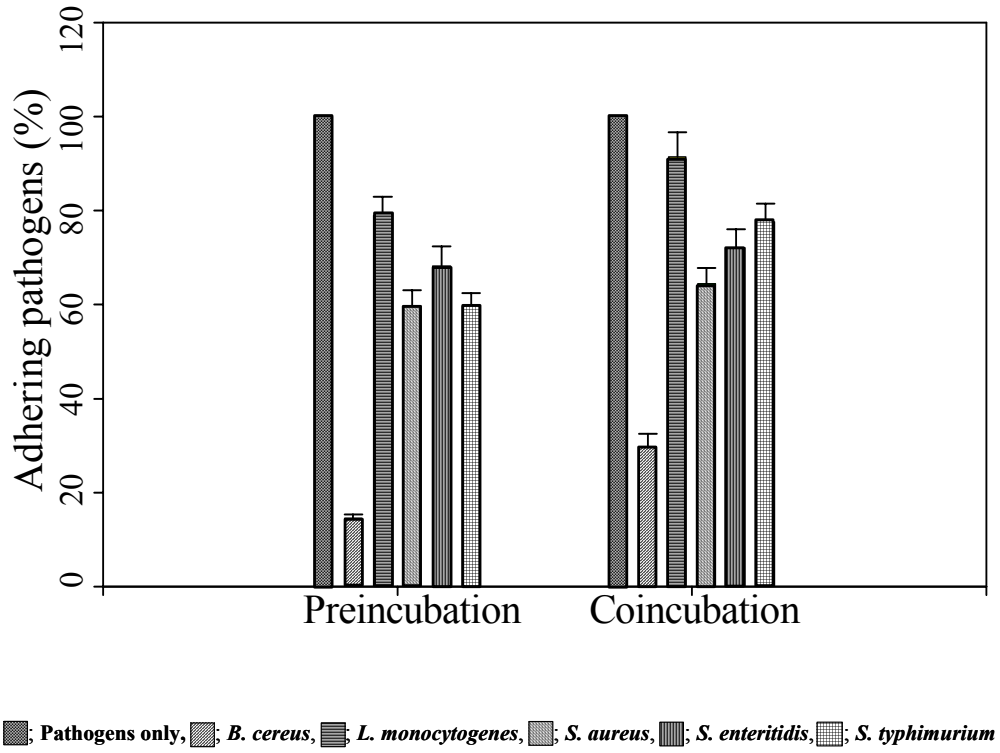
Continue

(B)



Continue

(C)



Continue

(D)

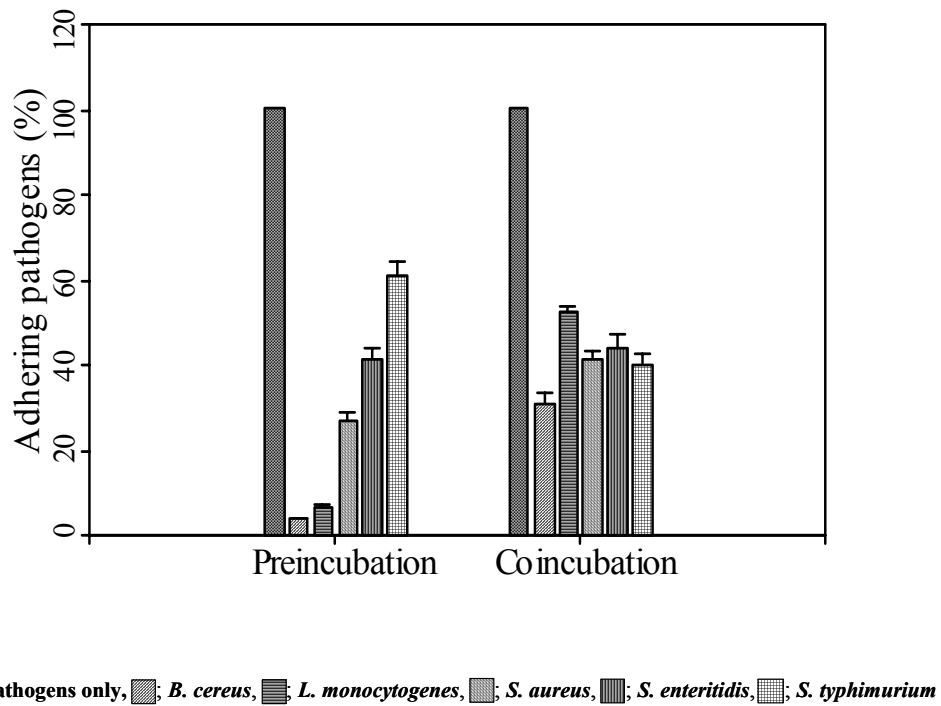


Fig. 13. Effect of *Lactobacillus* strains on the adherence of pathogens to Caco-2 cells. The pathogens were tested at a concentration of 5×10^8 cells ml^{-1} . The means and standard deviation of the data from three independent experiment were shown. Adhesion inhibition activity was expressed as percentage of the number of bound cells of pathogens compare to the control (pathogens only, 100%). (A); *L. reuteri* AVIBRO2, (B); *L. reuteri* 6-4, (C); *L. reuteri* GJO2, (D); *L. reuteri* GSF3.

4) *L. reuteri* 6-4의 사양실험

가) 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율

평균 체중이 $7.0 \pm 0.03\text{kg}$ 인 이유자돈에 유산균을 급여하여 18일간 사양시험을 실시한 결과는 표 2에서 보는 바와 같다.

본 시험에서 액상 유산균을 이유자돈에 급여한 결과 일당증체량은 Avibro2 처리구가 372.6g로 처리구 중에서 가장 많이 증체하였으나 유의성은 없었다. 한편 일일 사료섭취량은 Avibro2 처리구가 491.9g 으로 가장 많이 섭취하였으며, 다음은 C 처리구, 6-4 처리구 순으로 적게 섭취하였다($P < 0.05$). 그러나 사료요구율은 C처리구가 1.29로 가장 낮아 사료효율이 가장 좋았다.

한편 이유자돈의 설사지수는 처리 간에 차이가 없어 유산균의 급여가 이유자돈의 분변에는 영향이 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 볼 때 유산균을 이유자돈(7.0kg~13.4kg)에 급여한 결과 기존의 제품인 Avibro2 처리구가 가장 많이 증체 하였으며, 이는 많은 섭취량이 원인으로 판단된다. 그러나 사료효율은 대조구가 처리구 중에서 가장 좋은 결과를 보였다.

Table 14. Effects on the growth performance in piglets by feeding of *Lactobacillus*

처리	6-4	Avibro2	C	평균
개시체중(kg)	7.0 ± 0.65	7.0 ± 0.64	7.0 ± 0.62	7.0 ± 0.03
종료체중(kg)	13.2 ± 1.00	13.7 ± 0.97	13.4 ± 0.59	13.4 ± 0.25
일당 증체량(g)	342.6 ± 26.39	372.6 ± 19.97	354.4 ± 14.79	356.5 ± 15.11
일일 사료섭취량 (g)	470.0 ± 22.64^b	491.9 ± 16.39^a	457.4 ± 21.03^b	473.1 ± 17.46
사료요구율	1.38 ± 0.11	1.32 ± 0.03	1.29 ± 0.05	1.33 ± 1.33
설사지수	3	3	3	3

설사지수 : 1~5 (1=뉘똥, 2=약간 뉘똥, 3=정상, 4=약간설사, 5=설사)

나) 분내 미생물의 변화

사양 실험 기간 중 자돈 분변 중의 유익한 미생물인 *Lactobacillus*의 수를 측정함

결과는 Table 15에서 그리고 유해한 미생물인 *E. coli*를 포함하는 장내세균의 수를 측정 한 결과는 Table 16에서 보는 바와 같다.

Table 15. Total counts of fecal lactobacilli during the feed trials

Group	Days			
	0	3	10	17
Control	6.44±1.07 ^a	8.42±0.15 ^b	8.45±0.79 ^a	8.79±0.46 ^a
6-4	6.85±0.94 ^a	8.24±0.44 ^a	8.63±0.63 ^a	8.76±0.62 ^a
Avibro2	7.28±0.64 ^a	7.78±0.48 ^a	8.75±0.40 ^a	9.06±0.36 ^a

The same superscripts were not significantly different (P<0.05)

Table 16. Total counts of fecal enterobacteria during the feed trials

Group	Days			
	0	3	10	17
Control	5.62±0.24 ^a	5.90±0.18 ^b	4.85±0.24 ^a	6.17±0.30 ^a
6-4	5.76±0.28 ^a	6.60±0.20 ^a	5.31±0.25 ^a	5.54±0.21 ^a
Avibro2	5.88±0.24 ^a	6.08±0.26 ^a	5.10±0.27 ^a	5.64±0.26 ^a

The same superscripts were not significantly different (P<0.05)

시험 기간 중 분내 *Lactobacillus*의 수는 3일째에 급격히 증가하고 그 이후 17일째 까지 약간 증가하는 경향이였다. 17일째 Avibro2 급여구에서 가장 높은 수를 나타내 었지만 대조구와 처리구 간에 유의차는 없었다. Chang et al. (2001)은 유사한 실험에 서 대조구의 *Lactobacillus*수는 21일째까지의 시험기간 중 약 10^7 수준으로 일정하게 유지되고, 처리구에서 유의적으로 더 높다고 했다. Enterobacteria 수는 시험기간 중 유의적인 변화가 없었으며 대조구와 처리구 간에도 유의차가 나타나지 않았다. 이러 한 결과는 Chang et al (2001)이 *L. reuteri* BSA131 급여구에서 분내 *Lactobacillus*의 수가 유의적으로 높고, enterobacteria의 수가 유의적으로 낮다고 한 결과와는 일치하 지 않았다.

2. 항원 발현 유산균 개발

가. *Lactobacillus* 유래 플라스미드의 염기서열분석

*Lactobacillus*에 사용될 발현 벡터를 개발하는데 있어서 *Lactobacillus* 유래의 DNA를 사용하는 것이 이상적이다. 따라서 우리는 2차 선별된 67 균주의 plasmids 조성을 관찰하였고, 그 중 2-5 kb의 작은 plasmids를 함유한 균주의 total plasmid에 pIL252 또는 pGKV21을 혼합하여 plasmid-free 균주인 *Lactococcus lactis* LM0230에 electroporation하고 pIL252 또는 pGKV21와 함께 형질전환된 lactobacilli 유래 플라스미드를 찾았다. 예상했던 것보다 lactococci에서 복제되는 lactobacilli 유래 plasmid를 찾기 어려웠는데 약 2274 bp의 plasmid (잠정적으로 p2.2라고 함)를 찾았고 그 염기서열을 결정하였다. p2.2는 322 아미노산으로 이루어진 replication protein gene (*rep*) 이외에는 이렇다 할 유전자가 없었고 이 단백질은 *Lactobacillus reuteri*의 그것과 상동성이 높았다. 또한 국내 한 요구르트에서 분리된 호열성 균주 (처음에 *Lactobacillus*라고 했으나 *Streptococcus thermophilus*로 동정됨)에서 약 3.4 kb의 plasmid를 동일한 방법으로 찾았다. 역시 3359 bp로 이루어진 염기서열을 결정하였고, GenBank의 database에 검색했을 때 염기서열에서 *Str. thermophilus* ER1의 플라스미드 pER1-1과 97%의 상동성을 나타내어 거의 동일한 plasmid인 것으로 나타났다 (Geis et al. 2003). p3는 314 아미노산으로 구성된 replication protein gene과 107아미노산의 small heat shock protein gene이 주 ORFs이었다. p3의 경우 몇 종의 *Lactobacillus*, *Lactococcus* 및 *Streptococcus thermophilus*에서 복제될 수 있음을 확인하였다. 따라서 차후 식품급 발현벡터를 구축하는데 base로서 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

나. 세포응집단백질유전자 (*chuA*)영역의 최소화

pCK01은 약 pDA11에서 유래한 lactococcal aggregation protein gene을 포함하는 약 13 kb의 DNA 단편이 pSA3 벡터에 클로닝된 플라스미드이며, pCK01을 *Lactococcus*에 형질전환시키면 그 균주는 스스로 응집하는 성질을 획득하는데 교반을 하면 응집정도가 더 강해진다. 이미 구조유전자의 염기서열은 완전히 밝혔으며, 이 연구에서는 발현에 필요한 최소 조절부위를 밝혀서 이를 이용하여 유산균의 외래단백질 발현 시스템을 개발하려는 것이다.

pCK01

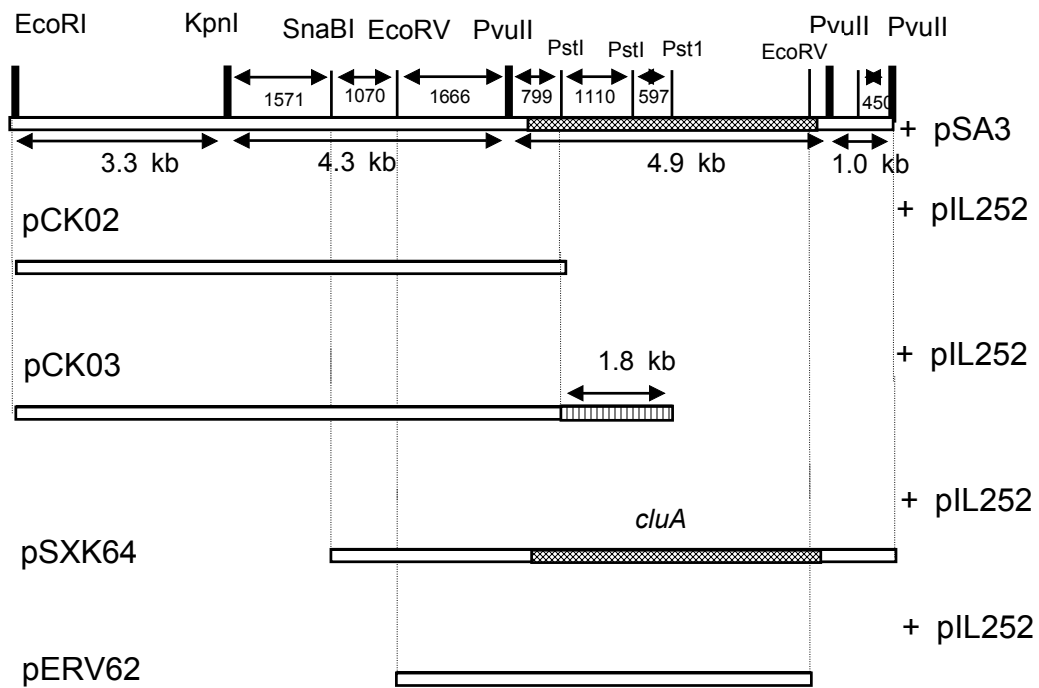


Fig 14. Dilution mutants of pCK01 derived to narrow down the *cluA* region

pCK02는 pCK01의 Eco RI site에서 *lasA*의 첫 번째 PstI site까지의 단편이 pIL252에 클로닝된 것이다. 이 경우 이 플라스미드를 가지는 균주는 broth에서 정치배양 중 응집하는 현상을 나타내지만 교반 시 분산된다. pSXX64는 *lasA*와 상류의 SnaBI site에 이르는 부분을 함유하는 것으로서 형질전환균주는 액체배지에서 배양 중 응집 현상을 나타내었다. 따라서 pSXX64는 응집유전자의 발현에 필요한 모든 요소를 가졌다고 판단된다. pERV62는 6.2 kb의 EcoRV 단편이 pIL252에 클로닝된 플라스미드인데 역시 응집현상을 나타내지 않았다.

다. Northern blot에 의한 전사체 분석

*cluA*의 전사여부와 전사체의 크기를 알기 위해서 Northern blot을 실시하였다. *Lactococcus lactis* ML3의 pSK08과 pRS01이 접합에 의한 전이 시 서로 결합하여 형성된 pDA11은 104 kb의 크기로 세포응집단백질 유전자 (*cluA*)를 함유한다. pC2804는 pDA11에서 *cluA*를 포함하는 36 kb 단편을 pSA3에 클로닝한 플라스미드이다. 여기서 *Lactococcus* 균주 DA11, C2804, CK01, CK02 및 플라스미드 결실 균주인 LM0230로부터 TRIZOL max protocol에 따라 total RNA를 분리하였다.

Probes로는 *cluA*의 내부 1110 bp의 PstI 단편을 pSPT18에 클로닝하고, Hind III 또는 EcoRI으로 절단한 다음 DIG-RNA Labeling kit를 사용하여 dig이 labeled된 RNA를 만들어 사용하였다. Template를 Hind III로 절단했을 때는 T7 promotor를, EcoRI으로 절단 시 Sp6 promotor를 사용하여 각각 다른 방향으로 전사된 probes를 얻었다.

RNAs를 1.5 % agarose-2.2 % formaldehyde gel에서 분리한 다음 nitrocellulose membrane에 blotting하고 Genus System User's Guide에 따라 dig-labeled RNA probe를 사용하여 hybridization, washing 및 detection은 실시한 결과는 Fig. 15와 같다.

T7 polymerase를 사용하여 label한 probe 사용 시 DA11, C2804 및 CK01에서는 약 4.7 kb RNA가 검출되었고, CK02와 LM0230에서는 나타나지 않았다. 이는 예상되는 *cluA*의 전사체와 유사한 크기이다. 따라서 *cluA*는 N-말단에 인접해서 전사가 시작되는 monocistronic mRNA로 보인다.

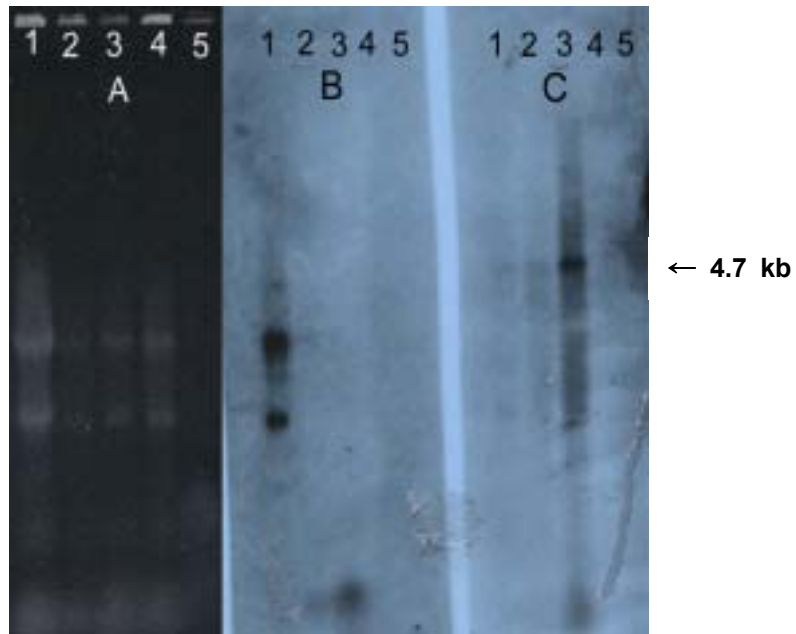


Fig. 15. Northern analysis of *cluA* (B, C) on 1.5% agarose containing 2.2 M formaldehyde (A). Lane 1: *Lactococcus lactis* DA11, Lane 2: C2804, Lane 3: CK01, Lane 4: CK02, Lane 5: LM0230. RNA probes were transcribed by Sp6 RNA polymerase (B) or T7 RNA polymerase (C).

라. FaeG 항원발현백터의 구축

*cluA*의 N-말단의 프로모터와 신호서열 그리고 C-말단의 고정신호와 전사종결신호 등을 이용하는 유산균 FaeG발현 백터는 적절한 primers를 설계하여 PCR에 의해 증폭 및 연결하는 방법으로 구축하기로 하였다.

Fig. 16,과 17에서 CluA gene의 발현과 고정에 관련되는 신호서열을 PCR에 의해 증폭하기 위한 primers 그리고 Fig 18에서 mature faeG를 증폭하기 위한 primers를 설계한 배경을 제시하였다. 아래와 같은 primers를 합성하였고, pCK01 또는 *E. coli* K88의 chromosomal DNA를 template로 하여 PCR했을 때 모두 예상 크기의 DNA 단편을 증폭하였다.

5'-GTGGG/AATTCTGGCGGAAACAACAACGG-3'	CLUL2
5'-CTC TG/C ATG CGC ACT TGC TCT TGA TAC T-3'	CLUR1
5'-T GCA TCT GCT ATG GCG CAT G/CC TGG ATG-3'	FAEGL
5'-GAC ACTGCA GTA ATA AGT AAT TGC TAC GTT-3'	FAEGR
5'-GAT ACT GCA GTC AAT GAA GAA GCT AAG ACA-3'	ANCHL
5'-AAT ACT CGA GAA ATA CTT CCA AAT AAT AGA-3'	ANCHR

FAEGL과 FAEGR을 사용하여 생성된 mature faeG를 PstI으로 절단하고 역시 PstI으로 절단한 고정신호-전사종결신호 (at_{cluA})와 연결한다. 연결된 DNA를 주형으로 하여 FAEGL과 ANCHR을 primer로 하는 PCR에 의해 증폭시킨다. 이것을 다시 SphI으로 절단하고 SphI으로 절단한 프로모터-신호서열 (P_{cluA} -SS*cluA*)과 연결한다. 이것을 주형으로 하고 CLUL2와 ANCHR를 primer로 하여 PCR에 의해 증폭하여, P_{cluA} -SS*cluA*-*faeG*- at_{cluA} 의 구조를 얻는다. 이것을 EcoRI과 XhoI으로 절단하고 pIL252 또는 적절한 vector에 연결하고, *Lactococcus*와 *Lactobacillus*로 형질전환시켜 각 균주에서 FaeG 발현을 측정한다.

AGTATGGTAAAGTTGCTTGGAAAACAATGGGCGCAAGTGATATAAATAATGG**TGGTAACT**
CTGGCGGAAACAACAACGGAGGGAATGTAAAACCACCAAGACCCTATGATGATATTCCAG
 CLUL2
 GCTCTCCTTTTAAGGTAGATGATCTTATATCACCTAATGCTCCTCATAAAGACACGATAA
 ATAACTGGCAGCTACGGCTAGAACAGGTGTAGCGCCTGTATCTTACAAGATATTGCTA
 AAACAACAGGAATCTTTTCATACGAAGGAATCCCAAACGTAGCAGGTTATAACGGAAACT
 TTAATGTTTATCTTTTTGGAGCTGGTGCTGCCACTAGTCCTGAAAATGTTAAAGGCCTTA
 CAGCGCAACAAGCTTATGATCAAATGAATAACATGATTGGGGCAACAGAATTTGTCTCTC
 CTAATGTATTAGCAATCAAAGGTATAACTCCTCAACAATGGGCAGCTGTGGTTGATTTCA
 ACGGTTATCCT**TAA**AATTGGAAATCTGTGAAAGCTTGGTATTGGGATACAAATTCTGTAC
 TACATTACTATTAATAATGCAAGTAAGCGTTCTGTAAAAGAGCGCTTTTTTTATTTTGAAT
 -35 softberry BPROM -10
 GTCACGAAAGTCGTGCAAGTAGATGAACGGTTGAATATCTATTTGTGAAAAGGCTCGCTA
 CCT**TTGACA**ATTCATTTGCTCATAAGAGCAGAAAA**TAATA**TGAGGAATGAAAAACTGTCTG
 -35 -10
 ATAAGGCAGTTTTTTTTGTTTCTTAACATAAAGGAGAAAGTT**CAATG**AAAAAACATTGAG
 RBS
 AGACCAGTTACTTGGGGTTTCTAAAGCTCATCTTAACTGGAAGAATAAGACAAAGGTCTT
TATTTATGGGACAGCCATATTATTAATGGTTGCGCCTAATCTTGCAAGTT**CAGTATCAAG**
 transmembrane helices predicted CLUR1
AGCAAGTGCTGATGAAGAGGGGAATGCTCCAAAAGTAACACAAGCAGGAGAGCGCTCAGG
 ①^ ②^ cleavage site
 GAAATTAGCATTAAATATTTACATTCAGCCCTTGACCAAGCCATCTCTGATGCAAAAAGC

Fig. 16. Nucleotide sequence of the region of the CLUA gene, including the 3' end of the orf 227 and the 5' end of the cluA

AGAACTCTCATTGCGGAAAATATGAATGCCAAAGTCTTTGTTTTGAAAAATGATGGCAA
 ACTAGGAGATGAAGTAACCAATGATTGGAAGATTGAAAATAAAGGCCAAACGTTGACCGC
 TACTCCAAATGATCCAACGAAATACTTCTTTGTTGGTTCATCTACAGACAGTCGTGTTGT
 CATTACATTAGATACAACAGTCAATGAAGAAGCTAAGACAGGAACATTTACTAATATTGC
 CACGATCAATACAAAAGATGGCGGTCACAAAGAAGATAAAGCTAATGTTTCATACCAAAGA
 AAAACCAGAAACCGTGATTGAAAAAATCACAGGTTCACTTCCAAAAACTGGTGAAGGCAA

 L P K T G E
 AGCTGCTTTGGCCATCTCAATTTTTGGTGCTGCATTACTTGGTCTTGCTGCATATCTTAA
 A A L A I S I F G A A L L G L A A
 transmembrane helices predicted
 ACGGAAGTGGATAGTATCTACTTATCGTAAGACTGTTTCGTAAGATTTCGTAATAA**TAA**TTAAA
 --
 AATGCTGAGGAATATCTTCAGTATTTTTTTATAGAGAGGAAAAAATGAAGATAAATATA
 ----- -> <- -----
 TACAGAGTTTTATTTCTCATTACCTTATTGATATCAATAATATGCTTTAGTTTTGGAAAA
 TCAATGGTGCCAACGGCCTGTTATTTTCTATTAT**TTTGGAAAGTATTTTTCAAGTATTGATA**
 3' -AAACCTTCATAAAAAGTTCATAACTAT
GTTGAAGAAAAATTAGATAAATAGAAATAATAGGTTAATATCATGAAAAAACTTTGATT
 CAA-5'
 TCTGTATTTCGCAATCACATCATTGGTGACAGTTTCCTTGGTTGCCTTGCAGTGTAGACTA
 AAACCTCCTAAAAAGGAGGTTTTTAATTTTGATGAGTCACTAAATATTTTGAAAGGAAGT

Fig. 17. Nucleotide sequence of the C-terminal region of the CLUA gene, including 'anchoring hexapeptide, stop codon and transcription termination signal

CGGTCATATTGGTAAAGGGACTTGCCGTTTTTTTTTAAACGGGAATAACGCAAAGCTGTTCTGGGTAAACACAGTGGTT 5017
 AATGAAATGCGGTTATTTAAACGGAGCCGCAGGGATAGTTTTACGGTAATTCCGAAAAATAAGGGTTACCGATTTTCAG 5096
 TTTATTATTTGTGGAATATCAAGGGGTTATTTT ATG AAA AAG ACT CTG ATT GCA CTG GCA ATT GCT 5163

rbs Met Lys Lys Thr Leu Ile Ala Leu Ala Ile Ala

FaeG →

GCA TCT GCT **GCA TCT GCT ATG GCA CAT GCC TGG ATG** ACT GGT GAT TTC AAT GGT TCG GTC 5223
 Ala Ser Ala Ala Ser Gly Met Ala His Ala Trp Met Thr Gly Asp Phe Asn Gly Ser Val

^cleavage site

EcoRV

GAT ATC GGT GGT AGT ATC ACT GCA GAT GAT TAT CGT CAG AAA TGG GAA TGG AAA GTT GGT 5283
 Asp Ile Gly Gly Ser Ile Thr Ala Asp Asp Tyr Arg Gln Lys Trp Glu Trp Lys Val Gly

FaeG →

ACT CAG TGG AGC GCT CCG CTG **AAC GTA** GCA **ATT ACT TAT** TAC TAA **GTTGTC**GTGATGAGCTG 6005
 Thr Gln Trp Ser Ala Pro Leu Asn Val Ala Ile Thr Tyr Tyr xxx

stXI/XbaI (**H1**)

CCAATTTATTATTGATACGTTCTGATAACAGACCAGCATCTTGGT GTG GAC GCT CTT TTT ATT GTG AGG 6074

Val Asp Ala Leu Phe Ile Val Arg

Fig. 18. Nucleotide sequence of the region between bp 4322 and 5283 of the K88 gene cluster, encoding the 3' end of *faeE*, and the 5' end of *faeG*.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 자돈 분변에서 *Lactobacillus*의 분리와 특성조사

자돈의 설사 예방을 위한 생균제로서 사용될 수 있는 *Lactobacillus* 균주를 확보하기 위해 120두의 자돈에서 분변을 채취하고 Logosa agar (Rogosa et al., 1951) 또는 LAMVAB (Hartemink et al., 1997)를 이용하여 400개의 *Lactobacillus* 균주를 분리하였다. 이들의 내산성, 담즙산 내성, 항균활성 등을 조사하여 우수한 67균주를 선발하고 11종의 항생제에 대한 최저억제농도 (MIC)를 측정하고, 내산성과 담즙산 내성을 더욱 정확하게 측정하였으며, 속 또는 종 특이적 primer를 사용하는 PCR에 의해 균주의 동정을 시도하였다. 60종에 달하는 *Lactobacillus*를 종 특이적 primer로써 동정하는데 한계가 있지만 선발된 67균주에서 *L. acidophilus* 그룹에 속하는 것은 1균주에 불과하였고 Group2 또는 3에 속하는 것이 대부분일 것으로 판단되었다. 사실상 API 50 CHL kit와 종 특이적 primer를 사용하는 PCR에 의한 동정에서 선발된 18종은 *L. salivarius* 1균주, *L. plantarum* 2 균주, *L. reuteri* 15 균주로 나타났다. 이 결과는 생균제로서 *L. reuteri*의 중요성을 입증하는 것으로 보인다.

선발된 67균주의 항생제 최저억제농도 (MIC) 측정결과 erythromycin, oxytetracycline, tetracycline, vancomycin 등에 대한 내성이 매우 높았고, erythromycin의 경우 전파될 수 있는 내성 플라스미드의 존재도 확인되었다. 따라서 항생제의 사용을 금지하거나 줄이는 것이 매우 시급하다고 할 수 있다.

최종 선발된 8균주의 장점막 세포에 대한 부착성과 병원균의 부착억제성을 비롯한 생균제 특성을 조사하였고, 그 중 *L. reuteri* 6-4균주의 급여가 이유 자돈의 성장과 분내 미생물에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과는 상업적 균주 *L. reuteri* Avibro2 급여구는 일당 증체가 우수하고, 사료효율은 대조구가 가장 우수하였다. In vitro 실험에서 생균제 특성이 우수하다고 판단된 6-4균주의 사양실험 결과가 상대적으로 나쁘게 나온 이유에 대해서는 차후 구명되어야 하겠지만 이 연구에서 분리되고 특성이 밝혀진 *Lactobacillus* 균주들은 앞으로 생균제 개발을 목표로 하는 연구나 산업에서 이용될 수 있을 것이다.

제 2 절 항원발현 유산균 개발

자돈에서 분리된 *Lactobacillus* 한 균주에서 유래한 플라스미드 p2.2와 요구르트에서 분리된 균주의 플라스미드 p3의 염기서열을 결정하여 GenBank에 blast하였을 때 p2.2는 다른 플라스미드와 상동성이 비교적 낮았고, p3는 *Streptococcus thermophilus*의 플라스미드 pER1-1과 97%의 상동성을 나타내었다. p3는 *S. thermophilus*는 물론 *Lactococcus*와 몇 종의 *Lactobacillus*에서 복제될 수 있다.

CluA 유전자의 영역을 좁히기 위해 pCK01의 subcloning을 실시하였으며 cluA의 내부 probe를 사용하는 Northern blot에 의해 약 4.7 kb의 전사체를 확인하였다. CluA 유전자의 프로모터, 신호서열, 고정신호 및 전사종결신호를 이용하고, FaeG 유전자의 신호서열과 stop codon을 제거하는 primers를 합성하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 먼저 stop codon이 제거된 mature faeG와 cluA의 고정 및 전사종결신호와 연결하고, 이것을 다시 프로모터 + 신호서열과 연결시킨 후 pIL252로 옮겨서 *Lactococcus*와 *Lactobacillus*에서의 발현을 조사한다. 아직 유전자 조작에 의해 개발된 균주가 실제로 사용되는 경우는 없지만 가까운 미래에 생균제 개발의 핵심적인 기술이 될 것으로 보인다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

In vitro 실험에서 생균제 특성이 가장 우수한 것으로 선정된 6-4균주가 사양 실험에서 대조구와 상업적 균주 급여구보다 일당증체량, 사료효율 등에서 성적이 나쁘고, 분변의 미생물에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이것은 in vitro 상에서 얻은 결과가 반드시 현장에 적용되지 않는다는 사실을 증명한다고 볼 수도 있고, 또는 사양실험의 문제를 들어낸 것이라고 볼 수도 있을 것이다. 또한 항생제의 대체제로서 생균제를 사용할 때 기대치를 어디에 둘 것인가 하는 것도 문제가 될 수 있다.

이러한 점들을 고려하여 더 다양한 조건으로 사양실험을 반복하여 이 연구에서 확보된 균주들의 생균제로서의 활용 가능성을 타진할 필요가 있다고 생각한다.

제 2 절 타 연구에의 응용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

항균제를 대체할 수 있는 사료첨가제의 개발은 전 세계적인 관심사이다. 스웨덴과 덴마크는 양돈산업에서 항균제의 사용 제한과 그 결과를 처음으로 경험하였다. 스웨덴에서 항균제 성장촉진제는 1986년에 금지되었다. 첫 해에 이유 후 사망률은 1.5% 증가하고 25 kg에 달하는 기간은 5-6일 증가하였다. 자돈 생산의 초기에 심각한 임상적 문제를 경험한 후 양돈산업은 돼지생산의 기초를 다시 배웠고 필요한 조정을 하여 상당히 안정되었다. 그러나 1997년과 1887년의 전국적인 생산을 비교하면 양돈산업은 항균제 사용금지 후 경험한 손실을 아직 완전히 회복하지 못한 것으로 나타났다. 스웨덴에서 가축에 대한 항균제의 총 사용량은 지난 13년에 걸쳐 55%가 감소하였다

가축에서 *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Yersinia* 및 *Campylobacter*와 같은 장내 병원균의 보균은 도살장에서 도체의 오염이 사람에게 병원균을 전파할 수 있기 때문에 우려의 대상이다. 항생제는 일반적으로 보균 동물을 치료하는데 적절하지 못하고, 질병의 치료 또는 예방과 성장촉진을 위해 항생제 사용은 항생제 내성 병원균의 출현과 관련되기 때문에 논쟁중이다. *Salmonella*와 *E. coli*의 다중 내성균주, vancomycin내성 enterococci, 및 fluoroquinolone내성 *Campylobacter*가 특히 점차 증가하는 빈도로 돼지와 닭에서 분리되고 있다 (Barton, 2000)

*Cryptosporidium parvum*에 감염된 포유 자돈에 대해 3일 째 시작하여 두 실험구에 각각 *L. acidophilus* 배양액 (1×10^8)과 *Bifidobacterium* sp. 배양액 (1×10^8)을 급여하였다. *Cryptosporidium*은 공장, 회장, 및 결장의 미세융모의 솔가장자리와 위에 존재하였다. 이들은 lamina propria 내 림프구침윤과 융모의 심한 위축과 관련되었다. 유산균의 급여 후 설사는 2일까지 지속되며 완화되었고 분내 oocysts의 수는 유의적으로 낮았다. 이것은 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium* sp.가 신생 자돈에서 *C. parvum* 감염을 제어하는데 도움이 됨을 시사한다 (Rotkiewicz et al., 2001).

생균제의 작용기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 한 가지 가능한 기전은 대장 내 박테리아 생태계에 의해 장 기능의 조정자로 알려진 단쇄지방산 (SCFA)의 생산을 증가하는 것이다. 4종의 상업적 생균제와 3균주의 생균제 박테리아는 SCFA (succinic acid와 lactic acid)의 생산을 촉진하고 NH_4 의 생산을 낮추었다 (Sakata et al., 2003).

L. reuteri ATCC 55730은 널리 사용되는 생균제이다. 급여 후 10명의 지원자 중 8명의 위에 그리고 10명의 십이지장에 정착하였고, 위 점막 조직구의 수는 감소하고 십이지장의 B-림파구의 수는 증가하였다. 또한 회장 상피세포에 CD4-positive T-림파구의 양이 유의적으로 높았다. 이러한 반응들이 *L. reuteri* ATCC 55730의 잘 알려진 생균제 효과 핵심일 것이다 (Valeur et al., 2004)

K88ad fimbriae의 주 구성단위이며 응집소인 recombinant FaeG를 안정적으로 발현하는 형질전환 담배를 개발하였다. 면역화한 mice로부터의 혈청 분석은 mice에서 식물 유래 FaeG 단백질에 의해 유도된 면역은 전통적인 접근방식으로 생성된 것과 대등한 것으로 나타났다 (Huang et al., 2003).

F4ac 항원 변이주의 FaeG 단백질을 chloroplast에 발현시키는 *faeG* construct가 담배에 형질전환되었는데 형질전환 담배는 총 가용성 단백질의 최고 1%에 달하는 FaeG 단백질을 생산하였다. 식물에서 생산된 FaeG는 자돈의 위 및 장내 조건을 모방한즙액에서 2시간까지 안정한 것으로 나타났으며, 분리된 자돈의 용모의 수용체에 부착할 수 있고 does-dependent manner로 F4 ETEC의 부착을 억제할 수 있었다 (Joensuu et al., 2004).

병원성 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strain GIS26의 K88-fimbrial adhesin FaeG의 유전자를 pET30Ek-LIC vector에 클로닝하고 BL21 (DE3)의 cytoplasm에서 N-terminal His- 및 S-tag 으로 발현시켰다. 재조합 FaeG (rFaeG) subunits는 불용성 cytoplasm aggregates로부터 분리되었고 native-like F4 receptor (F4R)-binding conformation으로 refolded되었다. 사실상 입체형태적 항원결정인자의 존재는 ELISA에 의해 나타났고 F4R에 결합 능력은 native-like refolded rFaeG subunits의 농도를 증가시킴에 따라 F4⁺ETEC의 F4R⁺에의 부착을 억제시킴에 의해 관찰되었다. rFaeG subunits는 monomer로 나타나는 반면에 정제된 F4 fimbriae는 multimer이다. Native-like rFaeG로써 갖 이유한 자돈에 경구 면역은 점막 및 전신의 F4특이적 면역반응을 유기하여 시험감염 후 2일에서 5일까지 F+ *E. coli* excretion을 유의적으로 감소시켰다. 그러나 정제된 F4 fimbriae로써 면역 후에 더 높은 F4특이적 반응이 얻어졌기 때문에 rFaeG의 안정성과 면역원성의 개량이 필요하다. 더욱이 His- 및 S-tag의 N-terminal fusion은 F4R에 결합하는데 손상을 주지 않으며, 이는 mucosal carrier로서 FaeG의 사용을 뒷받침한다. (Verdonck et al., 2004).

제 7 장 참고문헌

1. Abe, F., N. Ishibashi, and S. Shimamura. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 1995. 78(12): 2838-2846.
2. Barton, M.D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13: 279-299.
3. Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R. and Servin, A. L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell-attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria, *Gut* 35 (1994) 483-489.
4. Bujnakova, D. and V. Kmet. 2002. Aggregation of animal lactobacilli with O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Vet. Med. B* 49: 152-154.
5. Chang Y.H., J.K. Kim, H.J. Kim, W.Y. Kim, Y.B. Kim, and Y.H. Park. 2001. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie van Leeuwenhoek* 80: 193-199.
6. Cho J.S., Y.J. Choi, and D.K. Chung. 2000. Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii* and characterization of the genetically modified probiotic Lactobacilli. *Current Microbiology* 40:257-263.
7. Coconnier, M. H., Klaenhammer, T. R., Kerneis, S. et al. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2034-2039.
8. Dashkevicz, M. p. and Feighner, S. D., 1989. Development of a differential medium for bile-salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 11-16.
9. De Cupere, F., P. Deprez, D. Demeulenaere, and E. Muylle. 1992. Evaluation of

- the effect of three probiotics on experimental *Escherichia coli* enterotoxaemia in weaned piglets. *J. Vet. Med. Ser. B* 39: 227
10. de Vos, W.M., and G.F.M. Simons. 1994. Gene cloning and expression system in Lactococci. In: *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. (M.J. Gasson and W.M. de Vos, eds.) pp. 52-105. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.
 11. Dower, W.G., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127- 6145.
 12. Du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W. H. 1998. Characterization and selection of probiotic *Lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*. 40: 93-104.
 13. Forestier, C., Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152: 167-173.
 14. Fuller, R. 1999. 'Probiotics for Farm Animals', in *Probiotics a Critical Review*. Horizon Scientific Press, Wymondham. 15-22.
 15. Gardiner, G.E., P.G. Casey, G. Casey, P.B. Lynch, P.G. Lawlor, C. Hill, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, and R.P. Ross. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4) 1895-1906
 16. Geis, A., H.A. El Demerdash, and K.J. Heller. 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid* 50: 53-69.
 17. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J., 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*. 67: 3045-30
 18. Granato D., Perotti F., Masserey I., Rouvet M., Golliard M., Servin A.,

- Brassard D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells, *Appl. Environ. Microbiol.* 1071-1077.
19. Hartemink R., V.R. Domenech, and F.M. Rombouts. 1997. LAMVAB—a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Methods* 29: 77-84.
20. Holmes, A.R., C. Gilbert, J.M. Wells, and H.F. Jenkinson. 1998. Binding properties of *Streptococcus gordonii* SspA and SspB (antigenI/II) polypeptides expressed on the cell surface of *Lactococcus lactis* MG1363. *Infection and Immunity* 66: 4633-4639.
21. Holo, H., and I.F. Nes. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3119-3123.
22. Huang Y., W. Liang, A. Pan, Z. Zhou, C. Huang, J. Chen, and D. Zhang. 2003. Production of FaeG, the major subunits of K88 fimbriae, in transgenic tobacco plants and its immunogenicity in mice. *Infection and Immunity* 71: 5436-5439.
23. Jackson M.S., A.R. Bird, and A.L. McOrist. 2002. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of Lactobacilli in human faeces. *J. Microbiol. Methods* 51: 313-321.
24. Joensuu J.J., M. Kotiaho, T. Riipi, V. Snoeck, E.T. Palva, T.H. Teeri, H. Lång, E. Cox, B.M. Goddeeris, and V. Niklander-Teeri. 2004. Fimbrial subunit protein FaeG expressed in transgenic tobacco inhibits the binding of F4ac enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine enterocytes. *Transgenic Research* 13: 295-298.
25. Kok, J. 1996. Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 129-145.
26. Konstantinov S.R. A. Awati, H. Smidt, B.A. Williams, A.D. Akkermans and W.M. de Vos. 2004. Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7): 3821-3830

27. Kuipers, O.P., P.G.G.A. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W.M. de Vos. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology* 15: 135-140.
28. Le Loir, Y., A. Gruss, S.D. Ehrlich, and P. Langella. 1998. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriology* 180: 1895-1903.
29. Mercenier, A., H. Muller-Alouf, and C. Graagette. 2000. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2: 17-25.
30. O'Sullivan, D.J., and T.R. Klaenhammer. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2730-2733.
31. Platteeuw, C., I. van Alen-Boerrigter, S. van Schalkwijk, and W.M. de Vos. 1996. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1008-1013.
32. Pollman, D.S., Danielson, D.M. and Peo, E.R. Jr. 1980. Effect of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 51: 577-581.
33. Pouwels, P.H., R.J. Leer, M. Shaw, M.-J.H. den Bak-Glashouwer, F.D. Tielen, E. Smit, B. Martinez, J. Jore, and P.L. Conway. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *International J. of Food Microbiology* 41: 155-167.
34. Pozzi, G., M. Contorni, M.R. Oggioni, R. Manganelli, M. Tommasino, F. Cavalieri, and V.A. Fischetti. 1992. Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity* 60: 1902-1907.
35. Reveneau N., M.-C. Geoffroy, C. Locht, P. Chagnaud and A. Mercenier. 2002. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 20:1769-1777.
36. Robert, M., J. Li, A. Bacon, and S. Chatfield. 1998. Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicity of *Salmonella* strains expressing fragment C from the nirB and htrA promoters. *Infection and Immunity*. 66:

3080–3087.

37. Rodríguez, E., J.L. Arqués, R. Rodríguez, M. Nunez and M. Medina. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Letters in Applied Microbiology* 37: 259–263.
38. Rogosa, M., J.A. Mitchel, and R.F. Wiseman. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* 62: 132–133.
39. Rotkiewicz T., Z. Rotkiewicz, A. Depta, and M. Kander. 2001. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. on the course of *Cryptosporidium parvum* invasion in new-born piglets. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 45: 187–195.
40. Sakata, T., T. Kojima, M. Fujieda, M. Takahashi, and T. Michibata. 2003. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vivo. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 73–80.
41. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
42. Schillinger, U. and Luke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901–1906.
43. Steidler, L., J. Viaene, W. Fiers, and E. Remaut. 1998. Functional display of a heterologous protein on the surface of *Lactococcus lactis* by mean of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A. 1998. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 342–345.
44. Steidler, L., K. Robinson, L. Chamberlain, K.M. Schofield, E. Remaut, R.W.F Le Page, and J.M. Well. 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strain of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity* 66: 3183–3189.
45. Sun, R., T.J. Timothy, J. Anderson, A.K. Erickson, E.A. Nelson, and D.H. Francis. 2000. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88ac fimbria to its receptor, intestinal mucin-type glycoproteins, by a monoclonal antibody directed against a variable domain of the fimbria. *Infection and Immunity* 68(6): 3509–3515.

46. Todoriki, K., Mukai, T., Sato S. and Toba. 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 154-159.
47. Tuomola, E. M. and Salminen S. J. 1998. Adhesion of some probiotics and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 45-51
48. United States Patent No. 6,524,574 Spangler et al. February 25, 2003
49. Valeur, N., P. Engel, N. Carbajal, E. Connolly, and Karin Ladefoged. 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus* 1ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1176-1181.
50. Verdonck, F., E. Cox, E. Schepers, H. Imberechts, J. Joensuu, and B.M. Coddeeris. 2004. Conserved regions in the sequence of the F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG suggest a donor strand mechanism in F4 assembly. *Veterinary Microbiology* 102: 215-225.
51. Walter, J., G.W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D.M. Loach, K. Munro, and T. Alatosava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303.
52. Wei M.Q., C.M. Rush, J.M. Norman, L.M. Hafner, R.J. Epping, and P. Timms. 1995. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J. Microbiol. Methods* 21: 97-109.
53. Wells, J.M., K. Robinson, L.M. Chamberlain, K.M. Schofield, and R.W.F. Le Page. 1996. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 317-330.
54. Wells, J.M., P.W. Wilson, P.M. Norton, M.J. Gasson, and R.W.F. Le Page. 1993. *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Molecular Microbiology* 8: 1155-1162.