

## *Lactobacillus plantarum* CLP-1이 돼지바이러스에 미치는 효과

이진희, 김영희, 조현아, 강성기, 김동건\*

## The Effect of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 on the Swine Viruses

Gun-Hee Lee, Young-Hee Kim, Hyeon-A Cho, Sung-Gi Kang, and Dong-Gun Kim\*

접수: 2010년 12월 10일 / 게재승인: 2011년 1월 22일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract** To isolate Lactic acid bacteria for animals, we have screened from Kim-chi, swine intestine, swine feces, and dairy products by random selection and anti-viral, anti-pathogenic bacteria test. Among them, CLP-1 shown that inhibitory effect against rotavirus, porcine epidemic diarrhea (PED) virus, *Salmonella sp.*, and *E.coli*. By examining biological property, API-ZYM and identified *Lactobacillus plantarum* by 16S rDNA gene sequence. CLP-1 determined resistance to low pH and bile salt. Futhermore, the cell body of CLP-1 adhered to the intestinal epithelium tissue of swine and Caco-2 cell. CLP-1 was examined on cell immune system modulating activity *in vitro*. The whole cell and cell culture supernatant was increasing of interferon- $\beta$  activity. And then, CLP-1 increased prevention effect by *Salmonella enteritidis* infection in SPF chickens. And we determined similar result in pigs.

**Keywords:** rotavirus, PED virus, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella*

### 1. 서론

최근 내성균의 발생, 전파 및 항생제의 잔류 가능성으로 인해 축산 시장에서 이용되고 있는 항생물질 사료 첨가가

억제 되고 있는 추세이다. 2006년 1월부터 유럽에서는 이러한 이유로 인해 항생제 사용을 금지시켰으며, 우리나라의 경우 현재 18종의 항생제를 2012년부터는 전면적으로 금지하도록 농림부에서 방침을 확립하였다. 이러한 상황으로 인해 항생제를 대처할 물질이 절실히 요구된다. 현재 대체 방안로서 생균제 (probiotics)를 기반으로한 유산균의 산업적 이용 연구가 활발히 진행 중이며, 이를 통해 축산 업계에 문제 되고 있는 바이러스성 및 병원성 질병에 대처 할 방안을 모색하고 있다.

양돈 산업에 있어 rotaviruses의 경우 가장 큰 고민거리이며, 문제가 많이 되는 바이러스중의 하나이다. 또한 인간을 포함한 포유류에게 설사를 유발하게 하는 중요한 바이러스성 원인이 된다 [1]. 이 바이러스는 자돈의 장관에 감염되어 용모상피세포의 변성 및 괴사 [2]를 일으켜 lactose 분해 효소의 결핍과  $\text{Na}^+$  운반체계에 변화를 일으킴으로 설사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 전염성 위장염 바이러스나, 장 친화성 대장균 및 콕시듐 원충 등의 다른 병원체와 복합감염이 될 경우 더욱 심한 병변을 유발한다 [3,4].

유산균의 병원성 미생물에 대한 억제능은 이미 잘 알려져 있는 상태이며 [5,6], 또한 장내 정상효과 및 유산균의 바이러스성 질병에 대한 바이러스 억제능에 대한 발표를 최근 보고하였고 [7], HIV와 관련된 질병을 감소시키는 보고를 통해 바이러스에 대한 잠재성이 더욱 커지고 있다 [8,9]. 이와 더불어 유산균의 경우 대식세포의 활성화 및 항암효과 등 면역성증가에 대해 보고되어지고 있다 [10,11,12].

본 연구에서는 probiotics로의 잠재성을 기초로 하여, 김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* CLP-1이 갖는 생물학적 특성, 병원성 세균에 대한 억제능, rotaviruses에 대한 억제능, 장관에 대한 접착능과 면역 활성화에 대한

제일바이오 생명공학의 연구  
Department of Biotechnology and Researcher, company of Cheilbio.  
LTD., Mongnae-dong, Danwon-gu, Ansan-city, Gyonggi-do 456-2, Korea  
Tel: +82-31-494-8226, Fax: +82-31-492-0586  
e-mail: ddkim@cheilbio.com

실험을 진행 하였다. 또한 향후 양돈 산업의 발전에 응용할 수 있는 기초적 자료 수집 및 항생제 대체의 가능성을 제시하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 유산균 동정

분리된 유산균을 API kit (Biomerieux Industry, France)를 이용하여 동정하였다. 더 나아가 16S rDNA gene sequence를 분석하여 동정을 진행하였다. 사용된 16S rDNA의 primer는 F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3'), R (5'-CGACGACCATGAACCACCTGT-3')를 사용하였다. Genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Inc)를 이용하여 유산균의 genomic DNA를 추출하여 다음과 같이 PCR를 진행하였다. 95°C for 5 min, 35 cycle of 95°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 5 min, maintain for 24 h at 4°C. Sequence 분석 의뢰는 Macrogen Inc.를 통해 진행하였으며 NCBI blast web을 통해 확인하였다.

### 2.2. 효소 활성 조사

유산균의 효소 활성을 조사하기 위해 API-ZYM kit (BioMerieux, France)를 사용하였다. 유산균주를 MRS 고체 배지에 배양한 뒤 균체를 API-ZYM kit의 cupule에 현탁하여 분주하고 37°C에서 4 h 배양한 후 색의 변화를 관찰함으로써 효소의 활성 정도를 조사하였다.

### 2.3. 동물 세포 배양

Rotavirus 실험을 위해 건국대 수의과에서 제공받은 MA104 (Africa green monkey kidney cell) 세포를 사용하였다. 배양 배지의 조성은 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic (100 IU of penicillin and 100 µg of streptomycin per ml)를 첨가하여 사용하였고, 세포 유지 배지는 1% FBS와 10 µg/mL trypsin이 첨가된 배지를 사용하였다 [13].

PED (porcine epidemic diarrhea) virus 실험을 위해 건국대 수의과에서 제공받은 Vero (Africa green monkey kidney cell) 세포를 이용하였다. 배양 배지의 조성은 DMEM에 10% FBS and antibiotic (100 IU of penicillin and 100 µg of streptomycin per ml)를 첨가하여 사용하였고, 세포 유지 배지는 1% FBS, 0.3% tryptose phosphate broth, 0.02% yeast extract와 10 µg/mL trypsin이 첨가된 배지를 사용하였다.

### 2.4. 유산균의 세포 부착능 조사

한국 세포주은행에서 분양 받은 Caco-2 세포를 이용하였다. Caco-2 세포의 배양배지는 DMEM에 20% FBS와 antibiotic (100 IU of penicillin and 100 µg of streptomycin per ml), 1%의 10 mM nonessential amino acid solution이 첨가된 배지를 사용하였다. 6 wall plate에 슬라이드 글라스를 깔고 Caco-2 세포를 배양한다. 배양한 *Lactobacillus*를 세포위에 흡착하여 37°C에서 1 h 반응을 시킨 뒤, PBS

를 이용하여 6번 wash 후 슬라이드 글라스위의 Caco-2 세포를 그람염색을 통해 현미경으로 관찰하였다 [18].

### 2.5. Virus

Rotavirus와 PED virus는 건국대 수의과에서 제공받았다. 두 바이러스들에 대한 실험은 이전에 사용되어졌던 MA104와 Vero 세포를 사용하였다 [14,15].

### 2.6. 유산균 배양액을 이용한 항바이러스능

MRS 배지를 이용하여 배양한 *Lactobacillus*를 6 N NaOH를 이용하여 pH 6.2-pH 6.8로 조절을 한 뒤, 3,000 rpm에 10분간 원심분리하여 균체를 제외한 배양액을 회수하여 0.45 µm filter로 여과를 하였다. 단층의 MA104, Vero 세포에 90%의 여과액과 10%의 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>의 바이러스액을 혼합하여 처리한 후 24 h 뒤 CPE를 확인하고, 배양액을 회수하여 PCR 후 agarose gel을 통해 생산된 바이러스의 양을 확인하였다.

### 2.7. 유산균 균체를 이용한 항바이러스능

배양된 *Lactobacillus* (10<sup>8</sup> CFU/mL)는 3,000 rpm 10분간 원심분리 후 배양액은 버리고 PBS를 이용하여 균체를 wash하여 바이러스액 (10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>)과 혼합하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 1 h 반응을 하였다. 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액만 MA104 or vero 세포에 처리하여 다시 1 h 반응을 하였다. PBS로 wash 후 유지배지를 첨가하여 24 h 배양하여 CPE 관찰 및 PCR 후 agarose gel을 통해 생산된 바이러스의 양을 확인하였다.

### 2.8. RNA extraction

바이러스를 감염한 세포의 상등액 0.2 mL을 ependorf tube로 옮기고 Trizol (Sigma) 1 mL를 첨가하여, 5분간 대기 후 chloroform (Sigma) 0.2 mL를 넣고 10초가량 vortex 하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한다. 0.6 mL의 aqueous phase 층을 ependorf tube에 옮기고 isopropanol 0.5 mL 첨가 후 -70°C에서 30분간 RNA를 침전하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 RNA pellet를 70% ethanol 1 mL로 wash 하였다. pellet를 잘 말린 뒤 멸균된 증류수 20 µL로 pellet를 녹였다.

### 2.9. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (cDNA synthesis)

RT-PCR은 maxime RT premix (Intron Biotechnology, Inc)를 이용하였다. Premix에 10 µL의 멸균된 증류수와 10 µL의 RNA를 넣고 vortex한 뒤 다음의 조건으로 RT-PCR를 수행하였다. 37°C for 60 min, 95°C for 5 min, and maintain at 4°C for 48 h [16].

### 2.10. Primer

Rotavirus에 사용된 primers의 염기서열은 gene segment 6에 위치해있으며 Table 1에 보여주고있다 [14]. PED virus에 이용된 primer는 이전 실험 [15]에서 입증된 S gene에 위치한 ORF3-1(F)과 ORF-2(R)로 Table 1에서 보여주고 있다.

**Table 1.** Nucleotide sequences of the primers used for experiment

Primer	Sequence (5'-3')	Localization of gene	Size
rota3	aaa gat gct agg gac aaa at	57-76	309 bp
rota5	ttc aga ttg tgg agc tat tc	363-344	
ORF3-1	tcc tag act tca acc tta cg	S gene	833 bp
ORF3-2	ggt gac aag tga agc aca ga	S gene	

### 2.11. Polymerase chain reaction

PCR은 maxime RT premix (Intron biotechnology, Inc)를 이용하였다. 각 1  $\mu$ L primer, 3  $\mu$ L cDNA, 15  $\mu$ L의 멸균된 증류수를 혼합한 뒤 다음의 조건으로 수행하였다. 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 53°C for 1 min, 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 5 min 합성된 DNA는 1.2%의 agarose gel를 이용하여 확인하였다 [17].

### 2.12. Luciferase Reporter Gene Assay

Polyethyleneimine (PEI) solution (Sigma) 방법을 통해 한립 대에서 제공받은 pIF-Luc reporter plasmid를 MA104 세포에 transfection 하였다. 그 후 바이러스가 포함된 배지 혹은 CLP-1 배양액이 첨가된 배지를 넣어 24 h 배양 후 200  $\mu$ L의 cell lysis buffer (Promega)를 사용하여 세포를 모은 뒤 분석하였다.

### 2.13. 병원성 지시균에 대한 항세균 활성 측정

유산균을 MRS broth에 혐기조건 37°C에서 18 h 배양한 뒤, 3000 rpm에서 10분간 원심분리 후 균체는 버리고 상등액을 취한다. 취한 상등액은 6 N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절한 뒤, 0.45  $\mu$ m filter (Satorius Biotechnology, Inc)를 이용하여 여과한다. 여과한 상등액을 새 MRS broth에 40%가 되게 첨가한 다음, 병원성 지시균 (*E. coli*, *Salmonella*)를 0.1% 접종하여 37°C에서 18 h 배양 후 spectrophotometer (O.D 660 nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 2.14. CLP-1의 *S. enteritidis*에 대한 방어효과

실험체군은 Table. 2 같이 구성하여 CLP-1의 살모넬라균에 대한 방어능 시험을 실시하였다.

**Table 2.** Prevention effect of CLP-1 on *Salmonella* in SFP chickens

Group	No.	CPL-1	<i>Salmonella enteritidis</i>
N	50		
P	50		√
CLP-1	50	√	√

그룹 N은 음성 컨트롤러서 정상적인 사료와 음수를 공급하였고, 그룹 P는 양성컨트롤러서 균을 접종하고 사료와 음수를 공급하였으며, CLP-1의 경우 균을 접종하고 사료와 음수에 유산균을 혼합하여 공급하였다. 폐사한 닭의 간, 취장 그리고 맹장에서 접종한 균을 동정하여 폐사원인이 살모넬라 감염에 의한 것인지를 확인하였으며 실험 완료시 까지 살아있는 닭의 경우 경추탈골을 통해 살모넬라균 감염 유무를 확인하였다.

### 2.15. Salmonella 동정

시료를 XLD4 배지에 도말하여 37°C, 24 h 배양하여 생성된 colony를 serotyping과 biochemical test를 통해 동정하였다.

### 2.16. 통계학적 분석

양계 사양 실험시 각 그룹의 생존률은 Fisher's exact test를 통해 통계학적인 분석을 하였다. 통계시 SAS 9.1 software package를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 균주 분리

다양한 농장에서 채취한 돼지 분변, 소장, 김치 및 다양한 유제품을 채취한 후에 MRS-BCP 고체배지에 도말하여 다수의 유산균주를 선별하였다 (Table. 3). 선별된 유산균 중 야외에서 분리된 *E. coli* 등에 대한 항균력이 우수한 4개 균주를 선별하였고, 이 중 내산성, 내담즙성과 생장성이 우수한 CLP-1 균주를 선별하였다 (data not shown).

**Table 3.** Screening of *Lactobacillus* spp. from kim-chi, swine feces, and dairy products. The cultures were incubated at 37°C on anaerobic condition and cultures on MRS-BCP

Product	Subtotal (n)	Total Isolate (n)
Kim-chi	83	3
Swine intestine	72	0
Swine feces	50	0
Dairy product	34	1
Total	239	4

### 3.2. 분리 균주의 동정

야외 분리 *E. coli*에 대해 억제능이 우수한 CLP-1의 생물학적 특징을 조사하였다. 그람염색을 통해 G(+) 및 간균의 형태를 확인 하였으며, 탄소원 이용성 차이를 이용하여 균을 동정하는 API 50 CHL kit를 사용하여 CLP-1 균주를 동정한 결과, *Lactobacillus plantarum*으로 확인되었다. CLP-1 균주는 6탄당과 환원당, 이당류등을 선택적으로 선택하여 이용하는 특성을 나타내었다 (data not shown). 또한 조금 더 정확한 동정을 위해 16S rDNA 염기서열을 이용한 분자생물학적 동정을 실시하였다. NCBI의 BLAST search program을 이용하여 상동성을 비교해 본 결과, *Lactobacillus* sp. O-C-2 (ID: 98%)으로 동정되었다. 따라서, 본 연구에서 선별한 CLP-1 균주를 *Lactobacillus plantarum* CLP-1으로 명명하였다.

### 3.3. 분리 균주의 효소 활성

본 실험에서 선별한 *L. plantarum* CLP-1의 효소 활성 여부를 확인하기 위해 API ZYM kit를 이용하여 분석하였다. Table. 4에서 보는 바와 같이  $\alpha$ ,  $\beta$ -glucosidase, 신장에서 가수분해를 돕는 arylamidase와 곡류에 많이 존재하는 raffinose나 stachyose등을 분해시키는 효소인  $\alpha$ -galactosidase가 강한 활성을 나타내었다. 일반적으로  $\alpha$ -galactosidase는

*Bifidobacter*에서는 강한 활성이 있는 반면, *L. plantarum*에서는 매우 약하거나 없는 것으로 알려져 있으나 (응용 축산 미생물 2006), CLP-1에서는 강한 활성이 나타나는 차별성을 확인하였다.

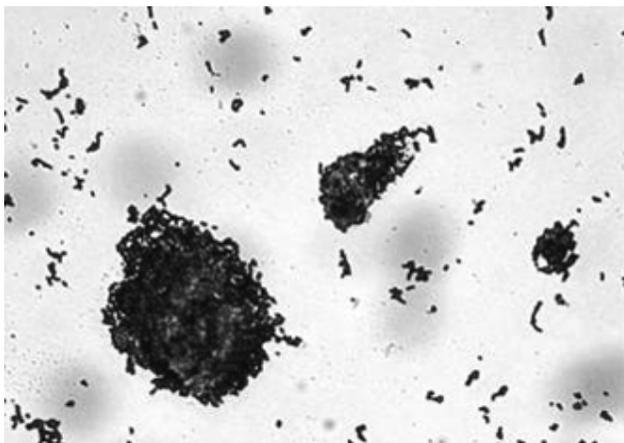
**Table 4.** Enzyme activity of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 using the API ZYM kit

Enzyme	API-ZYM Score & Activity	
	Score	Activity
1. Control	0	N
2. Alkaline phosphate	1	I
3. Esterase(C <sub>4</sub> )	1	I
4. Esterase Lipase(C <sub>8</sub> )	1	I
5. Lipase(C <sub>14</sub> )	0	N
6. Leucine arylamidase	4	P
7. Valine arylamidase	3	P
8. Cystine arylamidase	2	P
9. Trypsin	0	N
10. α-chymotrypsin	0	N
11. Acid phosphatase	2	P
12. Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	2	P
13. α-galactosidase	4	P
14. β-galactosidase	4	P
15. β-glucuronidase	0	N
16. α-glucosidase	3	P
17. β-glucosidase	2	P
18. N-acetyl-β-glucosaminidase	3	P
19. α-mannosidase	0	N
20. α-fucosidase	0	N

API-ZYM score, 0 point (negative), 1 point (intermediated color change), 4 point (strong color change), 2~3 point (positive); Standard deviation; Activity, N (negative), P (positive), I (Intermediate).

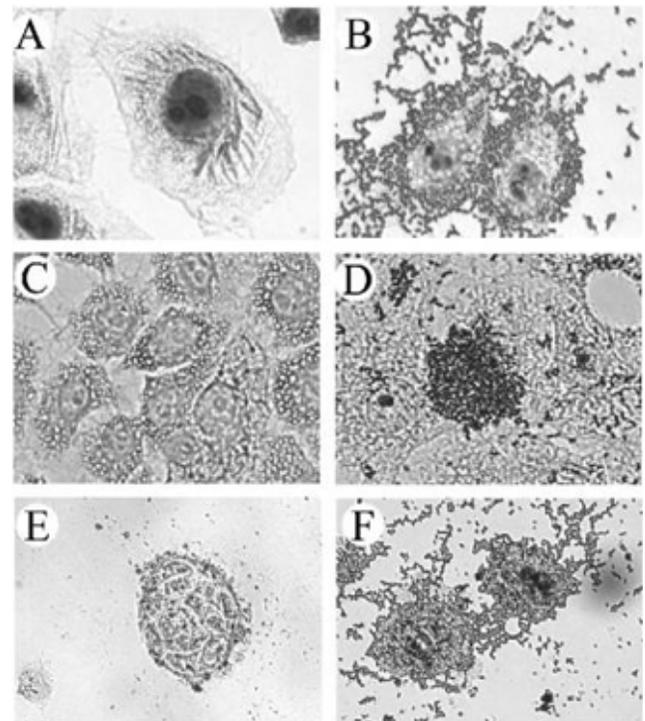
**3.4. 분리 균주의 장관 부착능**

생균제에 있어 숙주동물 장관세포 부착능은 균주가 장내 정착하여 효과를 발휘하기 위해 필요한 전제조건이다 [19].



**Fig. 1.** Adhesion of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 to the intestinal epithelium cells of pig. The intestinal epithelium cell suspension was mixed with *Lactobacillus plantarum* CLP-1 cell suspension. The mixture was rotated at 15 rpm at 37°C for 1 h. After gram-staining and examined using light microscopy (× 400).

선발된 *L. plantarum* CLP-1이 장관세포의 부착능 여부를 장 조직과 동물세포를 이용하여 조사하였다. 장의 조직은 슬라이드글라스를 이용하여 상피세포를 추출한 뒤, PBS를 이용하여 세척 및 현탁하였다. 37°C에서 24 h 배양한 유산균을 PBS로 현탁한 상피세포와 혼합하여 37°C에서 1 h 반응을 한 뒤, 그람 염색을 통해 CLP-1의 장관세포 부착여부를 확인하였다 (Fig. 1). 또한 Africa green monkey kidney cell line인 MA104와 Vero 세포, Human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line인 Caco-2 세포를 이용하여 그람 염색을 통해 부착여부를 확인하였다 (Fig. 2). 본 실험결과 김치에서 분리한 *L. plantarum* CLP-1 균주는 장관 상피세포에 흡착함은 물론, 동물세포를 통해 숙주동물의 비특이적으로 흡착하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, CLP-1은 장내에 일정한 균총을 형성할 수 있음이 사료되어진다.

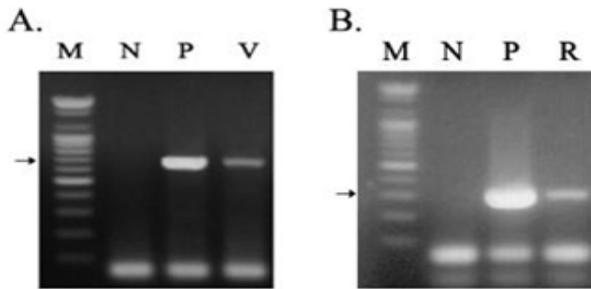


**Fig. 2.** Adhesion of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 to the MA104, Vero and Caco-2 cells. Briefly, cells (5 × 10<sup>6</sup>/wall) at the postconfluence stage after 4 days of culture were seeded on slide glasses. After incubation, CLP-1 suspension at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. After incubation, the monolayers were washed six times with sterile PBS, gram-staining and examined using light microscopy (× 400). A, B) MA104; C, D) Vero cell; E, F) Caco-2.

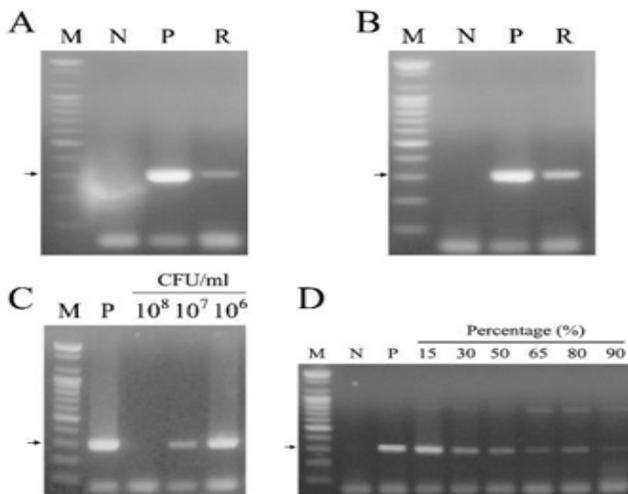
**3.5. 분리 균주의 항바이러스능**

최근 *Lactobacillus spp.*가 구내염을 유발하는 Vesicular stomatitis virus (VSV)의 기능을 억제한다는 연구가 발표되었다 [20]. 본 연구에서는 분리한 *L. plantarum* CLP-1의 항바이러스능에 대한 잠재성 여부를 알아보기 위해 rotavirus와 PED virus를 이용하여 CLP-1의 항바이러스능 활성을 조사하였다. CLP-1을 30°C에서 24 h 배양 후 6N NaOH를

이용하여 pH를 6.0으로 보정 한 뒤, 원심분리를 통해 균체 제거 및 상등액을 0.45 $\mu$ m filter로 여과 후, 각 바이러스와 혼합하여 37°C에서 1 h 반응시킨 뒤, MA104와 Vero 세포에 처리 하였다. 24 h 뒤에 배양액을 회수하여 RNA 추출을 한 뒤, RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하고 PCR를 통해 합성된 cDNA를 증폭하였다. Fig. 3에서 보듯이 양성균에 비해 바이러스 생산량이 감소 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 혼합하는 배양액의 농도가 50 %이상일 경우 바이러스의 생산이 더욱 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4(d)). 균체를 이용할 경우 10<sup>7</sup> 이상에서 바이러스 농도가 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 4(c)). 더 나아가 rotavirus를 MA104 세포에 먼저 감염을 시킨 뒤, 유지배지 배양시 CLP-1의 배양액을 첨가하였을 때도 마찬가지로 rotavirus의 생산이 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

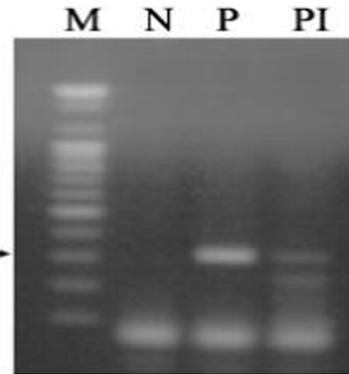


**Fig. 3.** Antiviral activity of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 on MA104 and Vero cells. Treatment of 90% of CLP-1 culture supernatants in 10% ten-fold dilution of viruses ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>) on the monolayer of Vero cell (A), MA104 (B). Antiviral activity was observed after incubated 24 h. M; size marker, N; negative control, P; positive control, V; PED virus, R; rotavirus.



**Fig. 4.** Antiviral activity of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 on Rotavirus. (A) Antiviral activity was observed co-incubated viable CLP-1 ( $10^8$  CFU/mL) and Rotavirus ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>). (B) Co-incubated culture supernatants of CLP-1 (80%) and rotavirus ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>). (C) Each cell numbers of viable *Lactobacillus plantarum* CLP-1 ( $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  CFU/mL) and viruses ( $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>) were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. (D) Titration of antiviral activity by culture supernatants of CLP-1.

*L. plantarum* CLP-1의 경우 비특이적으로 동물세포에 흡착 되는 것으로 미루어 보아 [16], 마찬가지로 바이러스에 비특이적인 결합을 통해 바이러스가 세포내로 들어오는 것을 방해하고, 감염된 세포에서의 바이러스 생산에 영향을 미치는 것으로 사료되어진다. 또한 CLP-1의 배양액 안에는 바이러스의 감염을 방해하는 물질이 있는 것으로 보이며, 배양액이 아닌 균체와의 반응에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 추후 항바이러스성 물질에 대한 분석을 통해 적용 가능한 물질의 양의 적정 농도 및 범위에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

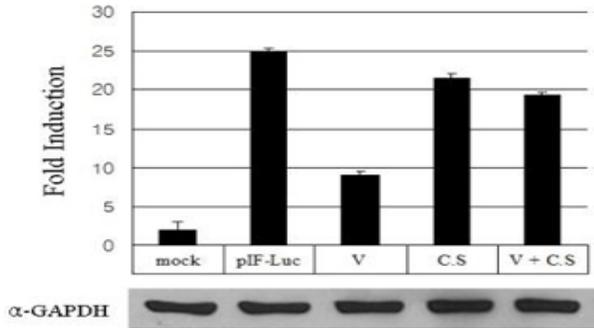


**Fig. 5.** Effect of *Lactobacillus plantarum* CLP-1 on Rotavirus. Antiviral activity was observed rotavirus infectious cells. After incubated for 24 h by cultured supernatant of CLP-1 (50%). Determine was decrease of rotavirus RNA. M; size marker, N; negative control, P; positive control, PI; post incubated cell by culture supernatant of CLP-1.

### 3.6. 면역활성 측정 (INF- $\beta$ 활성측정)

일반적으로 바이러스가 감염된 세포내에서는 Interferon (IFN)등 면역반응을 조절하는 단백질들을 분비시켜 항바이러스 상태를 유지하려한다. IFN은 초기 면역반응에서 나타나며 IFN-stimulated gene (ISG) factor 3 (IRF3)이 인산화를 통한 활성화가 이루어지면 핵내로 이동하여 ISG를 자극하고 IFN- $\alpha$ 와 IFN- $\beta$ 의 생산을 촉진시킨다. 이러한 초기 면역활성은 외부로부터 세포를 보호하는데 큰 영향을 미친다. 하지만 Rotavirus의 비구조단백질 중의 하나인 nonstructural protein 1 (NSP1)의 경우, 초기 면역작용에 중요한 IRF3와의 결합을 통해 IRF3의 dimerization을 방해하고 핵내로 이동하는 것을 방해한다 [21]. 하지만 *Lactobacillus spp.*의 경우 대식세포의 활성을 증가시키고, IFN- $\gamma$ 와 IL-2의 cytokine을 증가시킨다는 발표가 있었다 [21,22]. 본 연구에서 분리한 *L. plantarum* CLP-1의 면역학적 특징을 조사하기 위해 IRF3-stimulated IFN- $\beta$  promoter element를 가진 pIF-Luc plasmid를 이용하여 MA104 세포에 transfection하여 확인해 본 결과 Rotavirus를 처리한 군의 경우 IFN- $\beta$ 의 발현이 적은 반면, 배양액을 처리한 군의 경우 증가하였고 바이러스와 배양액을 함께 처리한 군에서의 경우 배양액을 처리한 군보다는 약간 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 6). 따라서 *L. plantarum* CLP-1의 배양시 생산되는 물질의 경우 세포의 면역성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이 후 초기 단계에서 이

루어지는 면역 반응에 대해 대식세포의 활성 정도를 분석할 필요가 있을 것으로 사료되어진다.



**Fig. 6.** Impact of viral infection on IFN-pathway. MA104 cells were transfected with pIF-Luc reporter plasmid expressing luciferase under the control of an IRF3-stimulated IFN-β promoter element. Treat by V; Rotavirus only, C.S; culture supernatants of CLP-1.

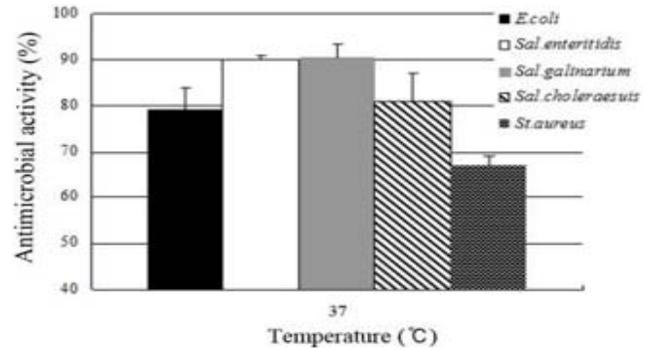
### 3.7. 양계 사양실험

국내 양계 농가에서는 *Salmonella*에 의한 피해가 많으며, 특히 *S. enteritidis*의 경우 어린 병아리에 대한 치사율이 20~30% 정도로 높게 나타나고 있다. 본 연구에서 분리된 *L. plantarum* CLP-1의 경우 *Salmonella*에 대한 높은 항균능을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 7), 따라서 SPF eggs를 이용한 양계 사양실험을 진행하여 그 효과를 보고자 하였다. SPAFAS사의 SPF eggs를 구매하여 부화기에서 21일 동안 부화 시킨 뒤, 3일령의 병아리에게  $5 \times 10^{10}$  CFU/mL의 *S. enteritidis*를 경구 투여를 하여 7일간의 상태변화를 측정하였으며, 폐사 개체의 장기내의 병원균 유무를 분석하였다. *S. enteritidis*를 공격 접촉한 개체들 중 유산균을 급여한 그룹과 급여하지 않은 그룹에, 공격 접촉을 하지 않는 그룹으로 나누어 10일간 비교해 보았다. 공격 접촉한 그룹에서 유산균을 급여한 그룹의 경우, 증체율은 공격 접촉하지 않은 그룹과 유사하게 나타났으며, 공격 접촉한 그룹에 비해 생존률이 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Table. 5). 부검을 통해 접촉군의 전신 감염을 간에서 세균분리를 확인을 하였을 때 폐사된 개체에서만 간에서 접촉군인 *S. enteritidis*가 분리되었으며, 장내 존재하는 유산균의 분포도는 유산균이 급여된 그룹에서 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (data not shown). 이러한 효과는 생균제로 개발되어 축산업에 적용될 경우, 생산성의 향상과 병원성 질병에 대한 예방 효과에 큰 기여를 할 것으로 사료된다.

**Table. 5.** Prevention effect of on *S. enteritidis* in SPF chickens. SPF eggs incubated for 21 days in hatchery. After hatching, they placed in electrically heated starter batteries under 24 h fluorescent lighting

Group	Inoculation of <i>S. enteritidis</i>		
	Population (n)	Rate of weight gain (%)	mortality rate (%)
N	50	49	8
P	50	25	76
CLP-1	50	41	32

N; negative control, P; positive control, CLP-1; *Lactobacillus plantarum*.



**Fig. 7.** Antibiotic activity of pathogenic bacterium in MRS broth. The cultures were incubated at 37°C on MRS broth for 24 h. Measure antimicrobial activity before *Lactobacillus plantarum* CLP-1 cultures supernatant neutralization by 6N NaOH. Experiment using isolated type; *Escherichia. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella galinarum*, *Salmonella choleraesuis*, *Stephylococcus aureus*. The result shown is a representative of three independent experiments.

### 4. 결론

본 실험은 다양한 시료를 통해 분리한 *L. plantarum* CLP-1의 항균 및 Rotavirus에 대한 항바이러스능에 대한 면역활성 효과에 대한 연구이다. *L. plantarum* CLP-1의 경우 ① *Salmonella*에 대한 항균능 우수 ② rotavirus에 대한 항바이러스 활성 우수 ③ 소장 세포 조직에 대한 장관 접촉능 우수 ④ 세포의 IFN-β 활성화에 따른 면역반응의 증가 그리고 ⑤ 양계 사양 실험에서 비급여군에 비해 급여군에서 폐사율의 감소를 확인할 수 있었다. 배양을 통해 경구투여만으로도 장내의 유산균 총을 형성하고 다양한 효소 활성을 통해 장의 활성화가 가능할 것으로 추측되어지며, 바이러스성 질병과 병원균을 통한 복합 감염을 조기에 예방할 수 있을 것으로 추측된다. 특히 Rotavirus에 대한 항바이러스능은 앞으로의 백신, 항생제를 대처할 수 있는 생균제 및 다양한 산업적인 이용이 가능할 것으로 사료되어진다. 하지만 *L. plantarum* CLP-1 배양시 생산되는 항바이러스성 물질에 대한 분석이 더 필요하며, 생균제적 효과를 적용하기 위해선 체계적인 체형화가 이루어져야 할 것이다.

### 감사

본 연구는 경기도 전략산업 기술개발 사업 과제의 연구비로 수행된 연구 결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

### References

1. Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, R. M. Chanock, and I. Perez-Schael (1996) Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Arch. Virol. Suppl.* 12: 163-175.

2. Ulter, V., R. M. D. Ilja, M. Gorziglia, and J. Esparaza (1984) Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in venezuela. *Res. Vet. Sci.* 36: 310-315.
3. Roberts, L., E. J. Walker, D. R. Smpdgrass, and W. K. Angus (1980) Diarrhoea in unweaned piglets associate with rotavirus and coccidial infections. *Vet. Rec.* 16: 156-157.
4. Saif, L. J., E. H. Bohl, F. and L. Schaffer (1977) Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.* 38: 13-20.
5. Ham, J. S., H. S. Kim, K. H. Hong, J. G. Kim, S. G. jeing, H. S. chae, J. N. Ahn, D. K. Kang, and H. U. Kim (2003) Inhibitory activity of lactic acid bacteria against hazardous microbes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16: 1550-1554.
6. Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm (1999) Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from piglet intestines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 830-836.
7. Tanja, B., T. D. Klingberg, H. Weingartl, and A. Cencič. (2007) A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 115: 227-234.
8. Chang, T. L., C. H. Chang, D. A. Simpson, Q. Xu, P. K. Martin, L. A. Lagenaur, G. K. Schoolnik, D. D. Ho, S. L. Hillier, M. Holodniy, J. A. Lewicki, and P. P. Lee (2003) Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *PNAS* 100: 11672-11677.
9. Cunningham-Rundles, S., S. Ahrne, S. Bengmark, R. Johann-Liang, F. Marshall, L. Metakis, C. Califano, A. M. Dunn, C. Grasse, G. Hinds, and J. Cervia. (2000) Probiotics and immune response. *Am. J. Gast* 95: S22-S25.
10. Dalloul, R. A., H. S. Lillehoj, N. M. Tamim, T. A. Shellem, and J. A. Doerr (2005) Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. *C.I.M.I.D.* 28: 351-361.
11. Kitazawa, H., T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko, and T. Itoh (1998) phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food. Microbiol* 40: 169-175.
12. Kitazawa, H., Y. Ishii, J. Uemura, Y. Kawai, T. Saito, T. Kaneko, K. Noda, and T. Itoh (2000) Augmentation of macrophage function by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food. Microbiol.* 20: 267-273.
13. June. D. A. and T. Hall (1978) The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *J. gen. virol.* 40: 213-218.
14. Elschner, M., J. Prudlo, H. Hotzel, P. Otto, and K. Sachse (2002) Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of group a rotaviruses. *J. Vet. Med. B Infect Dis. Vet. Public Health.* 49: 77-81.
15. Song, D. S., J. S. Yang, J. S. Oh, J. H. Han, and B. K. Park (2003) Differentiation of a vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF3. *Vaccine* 21: 1833-1842.
16. Song, D. S., B. K. Kang, S. S. Lee, J. S. Yang, H. J. Moon, J. S. Oh, G. W. Ha, Y. S. Jang, and B. K. Park (2006) Use of an internal control in a quantitative RT-PCR assay for quantitation of porcine epidemic diarrhea virus shedding in pigs. *J. Virol. Med.* 133: 27-33.
17. Lee, N. K., C. W. Yun, W. K. Seung, H. I. Choi, C. W. Kang, and H. D. Park (2008) Screening of lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of *Lactobacillus acidophilus* A12 as animal probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 338-342.
18. Hirotsugu, M., H. Fang, F. Tetsue, C. O. Arthur, H. Hdeo, H. Masataka, M. Koko, and K. Jun-Ich (2002) Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiol. Immunol.* 46: 293-297.
19. Quwehand, A. C., P. V. Kirjavainen, C. Shortt and S. Salminen (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9: 43-52.
20. Tanja, B., D. K. Trine, W. Hana, and C. Avreljija (2007) A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 227-234.
21. Barro, M. and J. D. Patton (2005) Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *PNAS* 121: 4114-4119.
22. Kato, I., K. Tanaka, and T. Yokokura (1999) Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon- $\gamma$  by mouse splenocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 21: 121-131.
23. Krah, D. L. (1991) Receptors for binding measles virus on host cells and erythrocytes. *Biologicals* 19: 223-227.
24. Mary. K. E. and C. Jean (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. reviews* 53: 410-449.
25. Robredo, B. and C. Torres (2000) Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* of animal origin. *J. Clinical Microbiol.* 38: 3908-3909.
26. Theil, K. W., E. H. Bohl, and A. G. Agnes (1997) Cell culture propagation of porcine rotavirus (Reovirus-like agent). *Am. J. Vet. Res.* 38: 1765-1768.
27. Cenci-Goga B. T., M. Karama, P. V. Rossitto, R. A. Morgante, and J. S. Cullor (2003) Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J. food. protec* 66: 1693-1696.
28. Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm (1998) Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 4433-4440.
29. Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm (1999) Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from piglet intestines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 830-836.