

Helicobacter pylori 항원을 이용한 면역우유 생산에 관한 연구

박창호[†] · 김수정 · 예은주 · 배만종
대구한의대학교 한방바이오품과학과

Study on Production of Antibody in Milk Immunized Cows with Some *Helicobacter pylori* Antigen

Chang-Ho Park[†], Soo-Jung Kim, Eon-Ju Yea and Man-Jong Bae

Dept. of Oriental Medicine Biofood Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Abstract

This study has been to produce of anti-*H. pylori* antibody in milk produced from cows immunized with antigen of *Helicobacter pylori* and to search the relationship between vaccine dosage and antibody formation and impact of vaccine dosage on cows. The content of anti-*H. pylori* antibody in serum and whey increased in accordance with vaccine dosage volume. It has been confirmed that the formation of high-quantified antibody was produced in all groups with vaccine dosages of 10 mL, 20 mL and 30 mL. It has been turned out that the antibody was formed most in 20 mL dosage. It was inclined to 12% reduce caused by vaccine injection, but recovered after about maximum 1 week. In measurement of body temperature of cows after vaccine injected, it was inclined to rise with the normal scope in comparison with the controlled conditions.

Key words: immune, anti-*H. pylori*, injection, vaccine

서 론

*Helicobacter pylori*는 우축나선형 몸통과 4~8개의 유초성 편모(flagella)를 가진 미호기성 그람음성 단간균으로서 1983년 오스트레일리아의 Warren과 Marshall에 의해 처음으로 위점막에서 분리 동정된 이후 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기질환의 원인균으로 알려져 있다(1-3).

위염 및 위궤양 환자 위점막의 조직학적 연구결과에 의하면 *H. pylori*균은 위상피세포(gastric epithelial cell) 및 점막층(mucus layer)에 주로 부착하는 것으로 밝혀졌으며, *H. pylori* 관련성 위염은 위축성 변화를 유도하는데 주도적인 역할을 한다(3). 그리고 위축성 위염은 *H. pylori*가 직접적으로 관여하지 않더라도 여러 단계의 경로를 밟아 일부에서는 위암으로 진전되는 것으로 알려져 있다. *H. pylori* 관련성 위염이 위암으로 진행된다는 것은 극히 일부뿐이긴 하지만 *H. pylori*는 분명한 발암인자 내지는 위험인자로(4) 여겨지고 있다. 따라서 *H. pylori*에 대한 항균제 치료 도입의 계기가 되어 지금까지 *H. pylori*를 박멸하기 위해 많은 약제가 단독 혹은 이제 및 삼제병합요법으로 투여되어 왔으며 현재 2주간 OAC(omeprozole, amoxicillin, clarithromycin) 삼제요법을 표준처방으로 널리 사용하고 있다. 항생제 사용으

로 어느 정도의 성공을 거두고 있으나, *H. pylori*는 항생제에 대해 내성을 갖는 새로운 균주가 나타나고 사용한 약물에 의한 부작용 때문에 다른 접근 방식을 찾게 되었다.

따라서 본 연구에서는 위염, 위궤양의 원인균인 *H. pylori*를 항원으로 하여 이를 젖소에 면역시켜 특이항체가 함유된 면역우유를 생산하여 건강보조식품으로 이용하고자 하였다. 그리고 항원에 의한 항체 생성능, 우유내의 anti-*H. pylori* 항체의 역가 및 백신투여에 따른 산유량 및 체온변화 등을 조사하였다.

재료 및 방법

항원의 준비

한국유전자은행으로부터 분양받은 *H. pylori*(KCTC12083) 균주는 sheep blood agar(SBA) plate를 사용하여 CO₂ 농도 10%, 37°C에서 2~3일 간격으로 계대배양하였다. 계대배양으로 활성화된 균주는 56°C에서 30분간 불활성화시킨 fetal bovine serum(FBS)이 5% 첨가된 MHB(Mueller Hinton Broth)배지에서 48시간동안 액체 배양하였다. 실험균주의 검정은 현미경적 관찰, Gram염색과 urease test를 통해 실시하였다.

액체 배양된 균주는 0.5% formalin용액으로 3시간 동안

[†]Corresponding author. E-mail: 9224017@daum.net
Phone: 82-53-819-1425, Fax: 82-53-802-2490

불활성화시킨 후 4°C, 4,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 회수하고, 회수된 균은 다시 멸균 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3회 세척하였다. 세척된 균은 얼음물에서 5분간 sonicate(pulse 20, duty cycle 50)하여 파장 667 nm에서 OD=1.0이 되도록 맞춘 후 백신용 항원으로 사용하였고, 파장 405 nm에서 OD=0.5로 맞춘 것은 ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)분석용 항원으로 사용하였다.

공시동물

경상북도 축산기술연구소에서 일반사양 관리로 사육중인 착유우 홀스타인(Holstein)종 12두를 처리구당 비유초기, 중기, 후기 각 1두씩 3두를 Table 1과 같이 배치하고 백신 투여량을 각각 10 mL, 20 mL, 30 mL로 나누어 주사하였다. 급여 사료는 농협안동배합사료공장(주)에서 생산된 배합사료를 급여하였으며 건초와 음수는 자유채식시켰다.

면역

초산에서 3산차에 이르는 착유우를 대상으로 백신투여하였으며, 면역횟수는 총 4회 실시하였다. 1차 면역은 *H. pylori*항원을 Freund's incomplete adjuvant(Sigma F-5881)와 1:1 비율로 유화(5,000 rpm, 5 min)한 다음 비유시기에 따라 젖소의 양쪽어깨 견갑골(scapula)부위 근육에 각각 4곳에 동일량으로 나누어 근육주사(intramuscular)하였다(5-7). 2, 3차 면역은 1차 면역 후 2주 간격으로 항원과 Freund's complete adjuvant(Sigma F-5506)를 같은 방법으로 백신투여하고, 4차 백신은 3차 백신 3주 후에 같은 방법으로 면역시켰다(8-10).

혈청 및 우유 전처리

우유 착유는 오전과 오후 2회에 걸쳐서 텐덤식 반자동 착유기를 이용하였고, 우유분석을 위한 sample 채취는 1주일 간격으로 오전 착유시 개체별로 100 mL씩 채취하였다. 채취한 우유 sample은 4°C에서 14,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 고형분을 제거하고 1 N HCl로 pH 4.6으로 조절하여 casein을 제거하였다. Casein이 제거된 유청(whey)을 1 N NaOH로 pH 7.0으로 조절 후 -20°C에 보관하였다가 ELISA 분석에 이용하고 나머지 유청은 분리정제하여 SDS-PAGE 및 Western blotting 실험에 사용하였다(11,12).

혈액은 2주 간격으로 14주까지 채혈하였으며, 1회 채혈시 경정맥에서 10 mL 정도 채혈하여 응고될 때까지 실온에 방치하였다가 원심분리(3,000 rpm, 15 min, 4°C)로 혈청을 분

리하여 1 mL씩 나누어 -20°C에 보관하였다(13).

항체의 역가측정

Anti-*H. pylori*에 대한 우유와 혈청항체의 상대적인 농도 및 역가는 ELISA 방법으로 측정하였다(14).

ELISA 측정용 항원을 immunoglobulin 96 well plate에 100 µL씩 coating하고 over night(4°C)하였다. 항원 coating 시 bovine IgG(Sigma I5506)를 standard로 coating하였다. 각 well을 washing buffer(10 mM PBS, pH 7.4, 0.5% Tween 20)로 3회 세척 후 blocking액(PBS pH 7.4, 5% skim milk)을 150 µL 넣고 실온에서 30분 이상 방치 후 washing buffer로 3회 세척하였다. Casein이 제거된 유청을 washing buffer에 희석한 다음 well에 100 µL씩 넣고 실온에 2시간 방치하였다. 각 well을 세척 후 anti-bovine IgG(whole molecule) alkaline phosphatase conjugate(Sigma A0705)를 2차 항체로써 1:30,000으로 washing buffer에 희석하고 well에 100 µL씩 넣고 실온에 1시간 방치하였다. 3회 세척 후 기질용액(10% diethanolamine buffer, 1% phosphatase substrate(Sigma 104))을 100 µL씩 넣은 후 30분 반응 후 3 N NaOH 50 µL을 가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

직장온도 측정

백신투여로 인한 젖소의 생체변화를 알아보기 위하여 체온계로 백신투여(10 mL, 20 mL, 30 mL) 후 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 그리고 48 h 간격으로 직장온도를 측정하였다(15).

통계학적 분석

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

결과 및 고찰

H. pylori 배양

*H. pylori*은 SBA배지에 계대배양하였을 때 물방울 모양의 특징적인 무색 투명한 집락을 형성하였다. 계대배양하여 활성화된 균주는 Gram음성을 나타내었으며, urease test를 시행한 결과 양성을 보였으므로 이를 *H. pylori*균으로 검정하고 항원으로 사용하였다.

Table 1. Experimental design

Treatment	Lactation stage		
	Early lactation (0~2 months)	Mid lactation (2~6 months)	Late lactation (6~10 months)
Control	3	3	3
10 mL vaccination	3	3	3
20 mL vaccination	3	3	3
30 mL vaccination	3	3	3

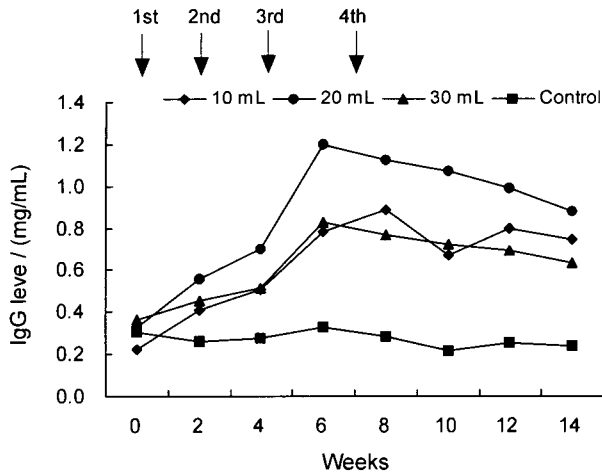


Fig. 1. Anti-*H. pylori* antibody titers in serum after immunized with *H. pylori* by vaccine dose on dairy cows. ↓: Injection.

백신 투여량에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체 함량

Fig. 1은 백신투여량에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체의 함량변화를 나타낸 것으로서, 백신투여에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체 함량은 백신투여 후 2주부터 증가하기 시작하여 4주 이후에는 대조구와 유의적인 차이를 나타내며 증가하였다. 항체 생성량은 특히 6주에 최대 생성량을 보였고, 대조구와 유의적인 차이로 14주까지 지속되었다($p < 0.05$). 백신투여에 따른 혈청내 항체 생성량은 백신투여 2주 이후 급격히 증가한다는 연구결과(16)와 유사한 경향을 나타내었다. 백신투여 6주 후 대조구의 혈청함량 0.38 mg/mL와 비교해 10 mL 투여군은 0.78 mg/mL, 20 mL 투여군은 1.05 mg/mL, 30 mL 투여군은 0.73 mg/mL로서 각각 2.1배, 2.8배, 1.9배씩 증가하였다. 이는 백신 투여량이 항체 생성량에 유의적인 차이를 나타내지 못한 연구결과(16)와 달리 본 연구에서는 20 mL > 10 mL > 30 mL 백신투여 순으로 혈청항체 생성량에 차이를 나타내었고, 20 mL 백신투여가 유의적으로 가장 많은 항체를 생성시켰다($p < 0.05$).

백신투여량에 따른 우유에서의 anti-*H. pylori* 항체 함량 변화

Fig. 2는 백신투여량에 따른 유청내 anti-*H. pylori* 항체 함량변화를 나타낸 것이다. 유청 중의 면역성 단백질 대부분은 혈청으로부터 이동되어 오거나 유선조직내에서 합성되는 것으로 알려져있다(17). 이와 같이 본 실험에서도 유청내 항체 생성이 혈청과 유사한 경향으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 유청내 항체함량 또한 2주부터 증가하기 시작하여 6주에 최대 생성량을 나타내었고, 6주 이후 평균 항체 생성량이 10 mL 백신투여구는 13.8 µg/mL, 20 mL 백신투여구는 15.1 µg/mL, 30 mL 투여구는 14.6 µg/mL로 대조구의 항체 생성량 4.62 µg/mL과 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 유청에서 6주이후 처리구간 항체 생성량을 혈중 항

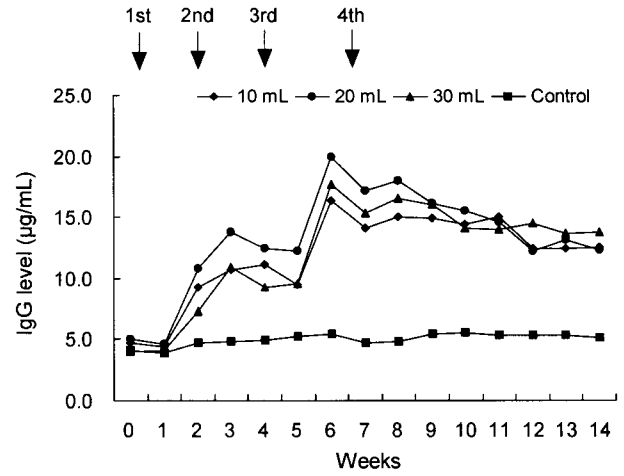


Fig. 2. Anti-*H. pylori* antibody titers in whey after immunized with *H. pylori* by vaccine dose on dairy cows. ↓: Injection.

체함량과 비교해볼 때 처리구간 유의적인 차이를 나타내며 증가한 혈중 항체함량과는 달리 유청에서는 백신 투여량에 따른 처리구간의 항체 생성량에 있어서는 유의적인 차이를 볼 수 없었다($p > 0.05$). 따라서 유청중 항체 생성량과 젖소의 stress로 인한 산유량 감소현상을 고려할 때 10 mL의 백신 투여가 가장 적당할 것으로 사료된다.

비유기간에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체 함량

우유의 화학적 조성은 비유시기에 따라 변화하는 것으로 알려져있다(18). 따라서 백신투여 후 비유시기에 따른 혈중 anti-*H. pylori* 항체 함량을 조사한 결과 Fig. 3과 같은 결과를 나타내었다. 비유시기별 평균 항체함량 변화는 백신투여 후 24주까지 증가하는 경향을 보이다가 6주 이후 대조구 0.27 mg/mL, 비유초기 0.60 mg/mL, 비유중기 0.87 mg/mL,

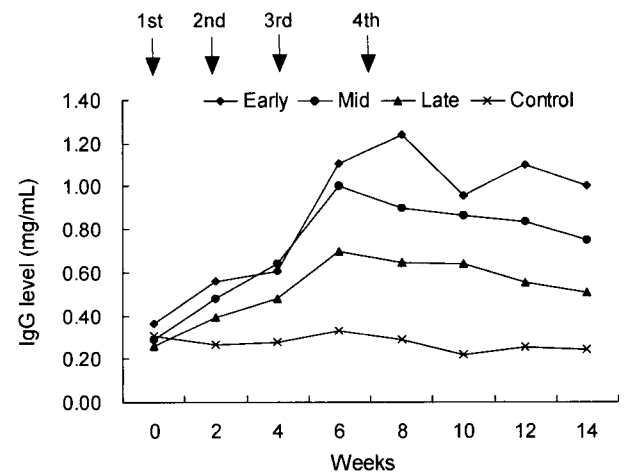


Fig 3. Anti-*H. pylori* antibody titers in serum after immunized with *H. pylori* by lactation stage on dairy cows. ↓: Injection.

비유후기 1.08 mg/mL로 대조구와 유의적인 차이뿐만 아니라 각 처리구 간에도 유의적인 항체 생성량 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

혈중 anti-*H. pylori* 항체 생성량은 비유초기 > 비유중기 > 비유후기 순으로 항체함량의 차이를 나타내었으며, 이러한 결과를 볼 때 백신투여 시기는 비유초기에 투여하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

비유기간에 따른 우유에서의 anti-*H. pylori* 항체 함량 변화

우유의 화학적 조성은 초유기 이후에는 비유기가 진행됨에 따라서 서서히 변화한다. 일반적으로 분만 후 36주간은 단백질, 지방 및 회분은 감소하고, 비유가 끝나는 2개월 전까지는 거의 변화가 없으며, 비유기에는 단백질, 지방 및 회분은 다시 증가하는 것으로 알려져 있다(18).

따라서 본 연구에서도 백신투여 후 유청내 면역글로블린(immunoglobulin), 즉 항체함량을 알아보기 위하여 조사한 결과 Fig. 4와 같이 나타났다. 비유기간별 우유내 항체함량 증가 또한 혈청과 유사한 경향으로 증가하였으며, 6주 이후 우유내의 항체함량 증가는 비유초기 16.11 µg/mL, 비유중기 15.64 µg/mL, 비유후기 12.92 µg/mL로 나타나서 대조구 5.24 µg/mL와는 유의적인 차이를 나타내었으나 혈중 항체

생성과는 다른 양상으로 처리구간 항체함량의 유의성은 볼 수 없었다($p > 0.05$).

면역단백질은 상유에서는 총 우유단백질의 1.9~3.3%이며, 유청단백질의 10%를 차지한다. 또한 초유에 그 함량이 많으며 초유 총 단백질의 50~60%, 초유 유청단백질의 85~90%를 나타내는 것으로 알려져 있다(18). 따라서 본 실험에서는 실행되지 않았지만 비유말기에 백신투여 후 초유에서 상유에 이르기까지의 항체 생성량에 변화를 조사할 필요가 있을 것으로 판단된다.

백신투여에 따른 산유량 변화

백신투여 후 산유량 변화를 알아보기 위해 1차, 2차, 3차 모두 백신주사 3일전부터 백신주사 후 6일까지 1일 평균 산유량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 산유량은 전체적으로 백신 투여일로부터 감소하기 시작하여 백신투여 후 1일째는 평균 12%로 가장 많이 감소하였으며, 4일부터 회복하기 시작하여 6일째에는 95%이상의 회복률을 보였다.

따라서 백신투여는 산유량 변화에 영향을 끼치는 것으로 나타났으며, 백신투여 1일 후 산유량 변화를 보면 10 mL 투여는 3%, 20 mL 투여는 17%, 30 mL는 6%의 감소율을 보였다. 산유량 회복은 비유시기 또는 개체별 특성에 따라 다소 차이가 나타났으나, 회복기간은 최장 일주일 정도 소요되는 것으로 나타났다.

백신 투여량에 따른 산유량변화의 가장 큰 원인은 백신투여와 채혈로 인한 stress에 의한 것으로 판단되는데 이는 백신을 투여하지 않은 대조구에서도 산유량 감소가 일어나는 것을 볼 때 채혈 및 백신투여로 인한 stress가 산유량 감소에 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 10 mL 백신투여가 산유량에 가장 작은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

백신접종 후 젖소의 체온 변화

Fig. 5는 백신투여 후 젖소의 직장온도 변화를 나타낸 것으로서 대조구에 비해 백신 투여구가 정상적인 범위 내에서 체온상승현상을 나타내었다. 백신주사 후 직장온도 변화 즉 체온 변화는 6시간 후 대조구 체온이 39.1°C, 백신투여구가 39.3°C로 대조구에 비해 일시적인 체온상승현상을 나타내었으나, 백신투여 12시간 후에는 정상체온을 유지하였다. 이러한 결과는 백신투여 후 체온변화를 나타낸 다른 연구(16)와

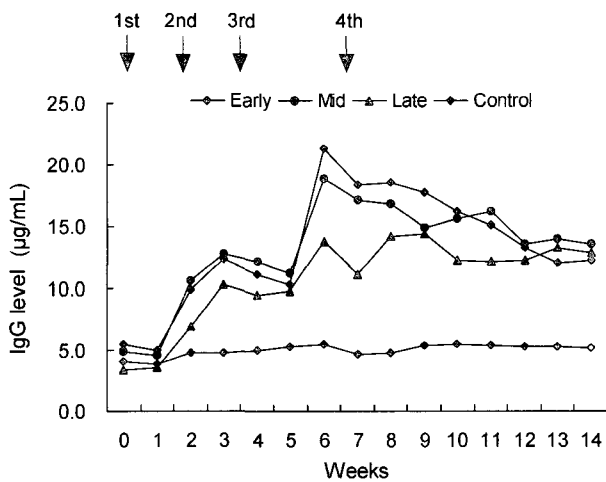


Fig. 4. Anti-*H. pylori* antibody titers in milk after immunized with *H. pylori* by lactation stage on dairy cows. ↓: Injection.

Table 2. Changes of milk yield by vaccine dose of dairy cows (unit: kg)

Treatment	Vaccine amount	Days									
		-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6
10 mL	26.9 ± 2.33 ¹⁾	27.6 ± 1.33	27.7 ± 0.29	26.9 ± 1.37	26.2 ± 1.39	26.8 ± 1.0	27.4 ± 1.31	28.1 ± 1.37	27.2 ± 1.01	27.3 ± 0.71	
20 mL	29.1 ± 0.82	27.5 ± 2.44	26.7 ± 2.24	25.9 ± 1.82	23.0 ± 1.89	24.4 ± 1.95	26.4 ± 2.06	27.1 ± 0.3	26.8 ± 0.34	27.3 ± 0.98	
30 mL	26.6 ± 0.71	26.0 ± 1.31	25.7 ± 2.08	23.7 ± 1.64	24.0 ± 0.61	24.0 ± 0.62	21.1 ± 2.71	25.4 ± 0.53	24.8 ± 2.82	25.4 ± 0.91	
Control	27.5 ± 1.85	27.0 ± 1.91	26.0 ± 2.01	25.5 ± 2.12	25.6 ± 1.94	26.3 ± 1.82	25.9 ± 3.58	26.6 ± 1.43	25.7 ± 2.54	26.7 ± 1.24	

¹⁾ Mean ± SD.

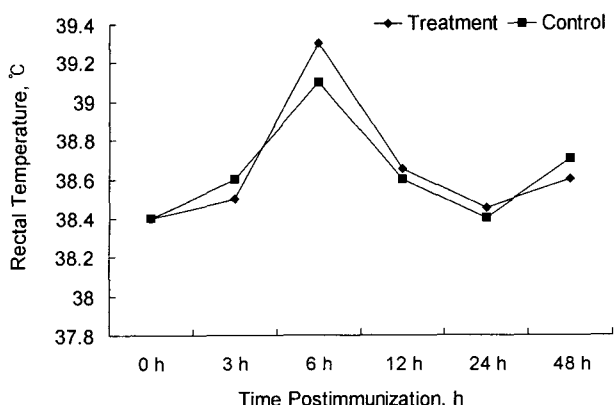


Fig. 5. Rectal temperatures of cows after intramuscular immunization with *H. pylori*.

유사한 결과를 나타내었다. 그리고 백신투여 후 6시간째 대조구와 처리구 모두 체온이 상승하는 것을 볼 수 있었는데 이는 체온 측정시 기온의 일교차로 인한 젖소의 생체리듬 변화에 의한 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 위염, 위궤양, 위림프종 및 위암과 같은 소화기 질환의 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori* 균을 항원으로 하여 젖소에 면역시킨 후 생산된 우유의 anti-*H. pylori* 항체 생성능을 검토하고, 백신 투여량과 항체 생성과의 관계, 비유시기에 따른 항체생성과의 관계 그리고 백신투여가 젖소에 미치는 영향을 알아보았다. 백신 투여량에 따른 혈청과 유청내의 anti-*H. pylori* 항체의 함량은 10 mL, 20 mL, 30 mL 백신투여 모든 군에서 대조구에 비해서 높은 항체 생성량을 확인하였으며, 그 중 20 mL 투여가 항체 생성에 가장 큰 영향을 미친 것으로 조사되었다. 백신 투여량에 따른 유청내의 anti-*H. pylori* 항체 생성량은 혈청에서 나타난 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 백신투여에 따른 비유시기별 항체함량은 혈액내에서는 2~4주까지 증가하는 경향을 보이다가 6~12주 사이에는 대조구와 유의성있는 차이를 보였고, 처리구간 항체생성량은 비유초기>비유중기>비유후기 순으로 유의성있는 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그리고 유청내 항체 함량은 혈액과 유사한 경향을 나타내며 항체 함량이 증가하였으나, 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 백신투여로 인하여 백신투여 1일째의 산유량은 12% 감소하는 경향을 나타냈고, 최장 1주일 정도 지나면서 회복되었다. 백신투여 후 젖소의 체온을 측정한 결과 정상적인 범위 내에서 체온이 상승하여 백신투여가 젖소의 생리적 변화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 농림부 시행 농림기술관리센터 지원에 의하여

수행된 농림기술개발 연구과제의 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 323: 1311-1315.
- Warren JR, Marshall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 321: 1273-1275.
- Hunt RH. 1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med* 100(5A): 42S-50S.
- Satoh K, Kimura K, Taniguchi Y, Yoshida Y, Kihira K, Takimoto T, Kawata H, Saifuku K, Ido K, Takemoto T, Ota Y, Tada M, Karita M, Sakaki N, Hoshihara Y. 1996. Distribution of inflammation and atrophy in the stomach of *Helicobacter pylori*-positive and -negative patients with chronic gastritis. *Am J Gastroenterol* 91: 963-969.
- Early EM, Hardy H, Forde T, Kane M. 2001. Bactericidal effect of a whey protein concentrate with anti-*Helicobacter pylori* activity. *J Appl Microbiol* 90: 741-748.
- Brussow H, Hilpert H, Walther I, Sidoti J, Mietens C, Bachmann P. 1987. Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile *Rotavirus gastroenteritis*. *J Clin Microbiol* 25: 982-986.
- Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP. 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16: 932-939.
- Blaser MJ. 1997. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? *Lancet* 349: 1020-1022.
- Blaser MJ. 1999. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *Infect Dis* 179: 1523-1530.
- Moss S, Clam J. 1992. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. *Gut* 32: 289-292.
- Graham DY, Opekun AR, Klein PD. 1993. Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 16: 292-294.
- Haller D, Bode CH, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin E, Blum S. 2000. Nonpathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte cocultures. *Gut* 47: 79-87.
- Blaser MJ. 1990. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 161: 626-633.
- Logan RP, Polson RJ, Misiewicz JJ, Rao G, Karim NQ, Newell D, Johnson P, Wadsworth J, Walker MM, Baron JH. 1991. Simplified single sample 13 carbonyl urea breath test for *Helicobacter pylori*; comparison with histology, culture, and ELISA serology. *Gut* 32: 1461-1464.
- Tacket CO, Losonsky G, Link H, Hoang Y, Guesry P, Hilpert H, Levine MM. 1988. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 318: 1240-1243.
- Tomita GM, Todhunter DA, Hogan JS, Smith KL. 1995. Immunization of dairy cows with an *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide vaccine. *J Dairy Sci* 78: 2178-2185.
- 김현욱. 1998. 낙농화학. 선진문화사, 서울. p 84-106.
- 김영교, 김영주, 김현욱. 2000. 우유와 유제품의 과학. 선진문화사, 서울. p 35-57.

(2004년 9월 16일 접수; 2005년 3월 28일 채택)