

## 내산성, 내담즙성이 높은 미생물을 이용한 생균제 개발

김소영<sup>1</sup>, 정해영<sup>1</sup>, 조철희<sup>2</sup>, 박근형<sup>2</sup>, 손석민<sup>2</sup>, 이기영<sup>2</sup>, 이준순<sup>3</sup>, 김 홍<sup>1</sup>, 채희정<sup>1,2</sup>  
호서대학교 벤처전문대학원<sup>1</sup>, 호서대학교 자연과학부<sup>2</sup>,  
한국농업전문대학 교양공통학과<sup>3</sup>  
전화 (041)540-5642, FAX (02)6280-6346

### Abstract

Several bacteria and yeasts were isolated from soil and characterized for the development of functional probiotics which can be used as a livestock feed additive. From the soil, the microbial strains which have acid/bovine resistance, antibiotics resistance and high stability, were isolated. Most strains selected were very tolerable against acids and very stable in a broad range of pH. Some strains could survive 100% at pH 2.5. The growth of the strains was not affected in the presence of bile acid, pathogenic *E. coli* and several antibiotics such as tetracycline, nisin, kanamycin, streptomycin, ampicillin. Acidogenic capability test showed that all the strains can produce acids. The hydrolytic activities were analysed for amylase, protease, lipase and cellulase to decompose various organic compounds. All the strains were found to be gram negative, round type, non-kinetic and the color is yellow or white.

### 서론

가축의 성장을 촉진시키고 사료효율을 높여주는 사료첨가제로서 항생제는 축산분야에서 사용하여 병원균의 성장을 억제시켜 성장을 촉진시킬 수 있었으며 또한 고기, 우유, 계란 등 축산물의 생산성 향상을 가져왔다. 하지만 최근 가축에게 사용한 항생물질이 우유, 고기, 계란 등의 축산물에 잔유할 가능성이 있고, 축산물을 통하여 섭취된 항생물질이 인체 내 내성증가로 항생물질에 대한 저항성 출현 등의 문제점을 야기시키고 있어 전 세계적으로 항생제 사용이 규제되고 있는 실정이다.<sup>1)</sup> 따라서, 최근에는 항생제 대신 축산물 생산에 이용할 수 있는 비항생적 생물학적 방법을 찾게 되었고 그 중 대표적인 생균제(probiotics)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 본 연구에서는 사료첨가제용 생균제 개발을 위해 그 기능과 기본조건을 갖춘 유효미생물을 선별하고 생균활성 실험을 거쳐 신균주를 분리하고자 하였다.

### 재료 및 방법

실험은 영우환경에서 제공받은 시료에서 온도(35℃, 55℃)와 배지(nutrient agar, yeast-maltose agar, bennet's agar)를 달리하여 균주를 순수 분리하여 사용하였고, 분리된 61종의 균주를 사용하여 내산성, 내담즙산성 실험을 거쳐 활성이 우수한 총 7종의 균주를 선별하였다. 이 7종의 균주를 사용하여 정량적인 내산성, 내담즙성 테스트와 기존의 축산물에 많이 사용하고 있는 항생제 5종 nisin(500µg/ml), kanamycin(20µg/ml, 30µg/ml), streptomycin(30µg/ml, 50µg/ml), tetracycline(15µg/ml, 20µg/ml), ampicillin(500µg/ml)에 대한 내성 테스트, 병원성 장내 미생물인 *E. coli*에 대한 항균활성 테스트를 행하였다. 또한 사료에 혼합되어 소화흡수효율을 촉진시킬 수 있는 지를 측정하기 위해 4가지 효소 amylase, protease, lipase, cellulase에 대한 정량적인 활성 테스트와 유산을 생성하여 정장기능을 하는지를 알아보기 위해 산생 성능을 측정하고 균주 특성 실험과 각각의 균주의 성장 특성을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

시료에서 총 61종의 균주를 순수 분리하였고, 정성적인 생균활성 실험을 거쳐 활성이 우수한 7종의 균주(YM 4, 5, 9, 10, 11, 12, 20)가 선별되었다. 7종의 균주의 정량적인 생균활성 실험결과, 7종의 균주가 내산성, 내담즙산성, 항생제 내성, 효소 활성, 항균활성이 우수하게 나타났고, 그 중 YM 9 균주가 pH 2.0에서도 85%의 생존율을 보이고, 0.5% 담즙산에도 영향을 받지 않는 것으로 나타나 기존의 보고된<sup>1)</sup> 균들에 비해 생균제로서의 기능이 매우 우수함을 알 수 있었다.

**Table 1.** Viability of the YM-selected strains at acidic pH

No. of Strain	pH 6.2		pH 3.0		pH 2.5		pH 2.0	
	Viability Sur. (CFU/ml)	Sur. (%)	Viability Sur. (CFU/ml)	Sur. (%)	Viability Sur. (CFU/ml)	Sur. (%)	Viability Sur. (CFU/ml)	Sur. (%)
YM-04	6.6×10 <sup>8</sup>	100	1.5×10 <sup>8</sup>	22.7	1.2×10 <sup>8</sup>	18.2	1.0×10 <sup>8</sup>	15.2
YM-05	3.3×10 <sup>8</sup>	100	1.6×10 <sup>8</sup>	48.5	6.6×10 <sup>7</sup>	20	7.5×10 <sup>7</sup>	22.7
YM-09	1.4×10 <sup>9</sup>	100	2.7×10 <sup>9</sup>	100	3.6×10 <sup>9</sup>	100	1.2×10 <sup>9</sup>	85
YM-10	6.6×10 <sup>9</sup>	100	9.2×10 <sup>9</sup>	100	9.1×10 <sup>9</sup>	100	4.5×10 <sup>9</sup>	68
YM-11	1.0×10 <sup>9</sup>	100	6.1×10 <sup>8</sup>	61	1.1×10 <sup>9</sup>	100	5.6×10 <sup>8</sup>	56
YM-12	1.0×10 <sup>8</sup>	100	4.6×10 <sup>7</sup>	46	2.4×10 <sup>7</sup>	24	8.0×10 <sup>6</sup>	8
YM-20	8.4×10 <sup>9</sup>	100	5.2×10 <sup>9</sup>	61.9	3.2×10 <sup>9</sup>	38	3.1×10 <sup>9</sup>	36

**Table 2.** Acidogenic capability of the YM-selected strains

Bromocresol purple solution	No. of Strain(YM)						
	04	05	09	10	11	12	20
0.002%	++	++	++	++	++	+	+

++ : excellent, + : good, - : not effective

**Table 3.** Viability of the YM-selected strains against bovine

No. of Strain	Bovine( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 0		100		300		500	
	Viability (CFU/ml)	Sur. (%)	Viability (CFU/ml)	Sur. (%)	Viability (CFU/ml)	Sur. (%)	Viability (CFU/ml)	Sur. (%)
YM-04	$6.6 \times 10^8$	100	$3.1 \times 10^{11}$	100	$7.0 \times 10^{10}$	100	$2.5 \times 10^9$	100
YM-05	$3.3 \times 10^8$	100	$8.5 \times 10^{10}$	100	$1.9 \times 10^{10}$	100	$1.2 \times 10^{10}$	100
YM-09	$1.4 \times 10^9$	100	$1.2 \times 10^{11}$	100	$9.5 \times 10^{10}$	100	$2.7 \times 10^{10}$	100
YM-10	$6.6 \times 10^9$	100	$5.5 \times 10^{10}$	100	$5.0 \times 10^{10}$	100	$1.5 \times 10^{10}$	100
YM-11	$1.0 \times 10^9$	100	$7.0 \times 10^{11}$	100	$1.1 \times 10^{11}$	100	$3.9 \times 10^9$	100
YM-12	$1.0 \times 10^8$	100	$8.5 \times 10^9$	100	$3.1 \times 10^8$	100	$4.5 \times 10^7$	45
YM-20	$8.4 \times 10^9$	100	$3.1 \times 10^{11}$	100	$1.6 \times 10^{11}$	100	$6.5 \times 10^9$	77

**Table 4.** Antibiotic resistance of the YM-selected strains

Antibiotic ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	No. of Strain(YM)						
	04	05	09	10	11	12	20
kanamycin(30)	+	+	+	+	+	++	++
kanamycin(20)	++	++	++	++	++	++	++
streptomycin(50)	+	++	++	+	++	++	++
streptomycin(30)	++	++	++	++	++	++	++
tetracycline(20)	+	+	+	+	++	++	++
tetracycline(15)	++	++	++	++	++	++	++
nisin(500)	++	++	++	++	++	++	++
ampicillin(500)	++	++	++	++	++	++	++

++ : high growth, + : low growth, - : no growth

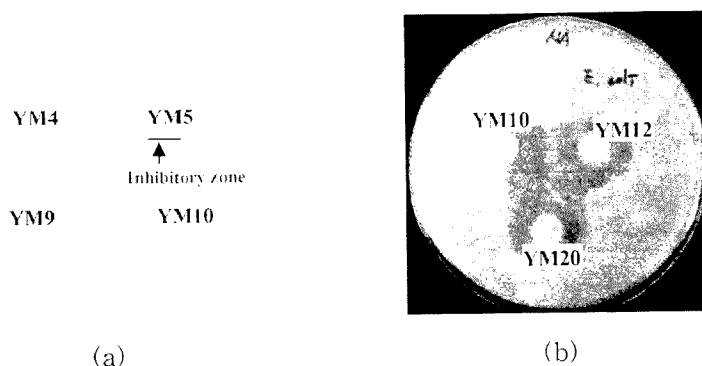


Figure 1. Antibacterial activity of the YM-selected strains by paper disk assay

Table 5. Growth rate( $\mu$ ) and doubling time( $t_d$ ) of the YM-selected strains

	No. of Strain(YM)							
	04	05	09	10	11	12	20	MIX
Growth rate(1/hr)	0.186	0.27	0.341	0.133	0.167	0.14	0.142	0.199
Doubling time(hr)	3.74	2.57	2.03	5.21	4.15	4.95	4.88	3.48

Table 6. Characteristics of the YM-selected strains

	No. of Strain(YM)						
	04	05	09	10	11	12	20
<b>Morphology</b>							
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-
Shape	round	round	round	round	round	round	round
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Spore	-	-	+	-	-	+	+
Agar colony	white	white	white	white	white	yellow	yellow
<b>Physiological</b>							
Urease	+	+	-	-	-	-	-
Protease	+	+	+	+	+	+	+
Amylasee	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	+	+	+	-	-
Tryptophan	-	-	-	-	-	-	-
Dextrose	+	+	+	+	-	+	+
Catalase test	+	-	-	+	-	+	+

## 요 약

선별된 7종의 균주는 넓은 범위의 산과 담즙산에 대해 기존에 보고된 결과에 비하여 높은 내성을 나타냈고, 장내세균인 *E. coli*에 대해서도 우수한 항균력을 나타냈고, 항생제 tetracycline, nisin, kanamycin, ampicillin, streptomycin에 대해서도 높은 내성을 보였다. 또한 7종의 균주는 어느 정도의 산을 생성하고 있었고, 네 가지 효소 amylase, protease, lipase, cellulase에 대해서도 높은 활성을 나타냈다. 균주 특성실험 결과, 7종의 균주는 그람음성균으로 모두 구형, 비운동성이고 균체의 색은 노란색이거나 흰색을 띠고 있고, 다양한 유기물에 대하여 분해력을 지니고 있었다.

## 참고문헌

1. Lee, J. K., "Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria for Preparation of Probiotics"(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(5), 429-432
2. Shin, H. T., "Screening of yeasts for the development of direct-fed microbials (2001), *J. Anim. Sci.* 43(5), 721-726
3. Paik, I. K., "Probiotics in animal production"(1989), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 13 175