

송아지 이유사료 첨가용 생균제를 위한 probiotics 유산균의 분리 및 동정에 관한 연구

이승배* · 최석호

상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과

서 론

반추동물에 있어서 유산균 probiotic 균주는 반추위의 발효정상화와 성숙의 설사를 예방하기 위하여 사용되고 있다⁽¹⁾. 효모 배양물은 가축의 장내에서 유익 균총의 증식을 촉진함으로써 유해균의 증식을 억제시켜 질병예방작용을 하는 것으로 알려져 있다⁽²⁾. 국내의 경우 항생제 남용으로 인하여 오랫동안 사용해온 항생제인 penicillin, ampicillin, tetracycline에 대한 내성균의 출현율이 20-90%이상으로 높아졌으며⁽³⁾ 앞으로 가축질병의 치료 목적으로 사용되는 항생제 사용규제가 있으리라 예상되므로 항생제를 대체하여 소화기병원성 세균을 저해할 수 있는 사료첨가용 생균제의 사용이 요구되며, 국내 유산균 probiotic 생균제 첨가물 시장 규모는 1998년 전체 가축 및 수산용 생균제 첨가물 시장규모는 약 185억 원이며, 1999년도는 약 250억원으로 추산되고 있다⁽⁴⁾. 가축유산균 probiotic 제품을 제조하는 회사의 대부분이 외국으로부터 유산균 원료를 수집하여 제품화하기 때문에 국내의 생산기술은 큰 발전을 하지 못하고 있는 실정이다.

본 연구는 가축 중 송아지의 probiotics 미생물을 이용하기 위한 연구로서 사료 첨가용 생균제를 개발하기 위해 내담즙성과 내산성을 갖고 병원성세균을 저해하는 유산균을 분리 동정하는데 있다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

강원도 일대 농가에서 사육하는 한우와 홀스타인의 분변으로부터 유산균을 분리하였다. 유산균 배양 배지로는 MRS broth와 Agar를 사용하였고 배양조건은 37℃에서 48시간 호기적으로 배양하였다. Salmonella typhimurium (KCTC 2514) 와 Staphylococcus aureus (KCTC 1928)는 TSA(Difco, U.S.A.) 배지를 사용하였고 배양조건은 37℃에서 24시간 배양하였다. Clostridium perfringens (ATCC 12917)는 RCA배지를 사용하여 Anaerobic jar에 수소를 충전하여 35℃에서 혐기적으로 24시간 배양하였다.

2. 유산균 분리

분변을 0.1% peptone 수로 회석하여 MRS broth+0.5% bile salt와 MRS broth (pH4.5)에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 각각의 균주들을 MRS Agar+0.02% NaN₃와 LAPT Agar에 도말한 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 분리된 균주를 동정에 사용하였다.

3. 내담즙성 검사

내담즙성을 분석하기 위해 분리한 유산균 균주(10^8 cells/ml)을 MRS broth와 MRS broth+0.3% bile salt에 접종하여 37℃에서 8시간 배양한 다음 Spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 625nm에서 흡광도를 측정한 후 내담즙성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산 하였다.

4. 내산성 검사

내산성을 분석하기 위해 내담즙성 검사에서 선발된 분리균주(10^8 cell/ml)을 인공위산인 HCl로 조정된 0.05M Sodium phosphate(pH2.5)에 접종한 후 37℃에서 2시간 진탕배양한 다음 MRS agar plate에 도말한 후 한 후 48시간 배양 한 후 내산성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산 하였다.

5. 항균력 검사

내담즙성과 내산성 검사에서 선발된 유산균의 배양액을 병원성균인 *Sal. typhimurium*, *Sta. aureus* 및 *Cl. perfringens* 균이 증충된 agar plate상에 멸균된 Penicylinder(용량 300ul, ID 6mm, OD 8mm, H 10mm)를 일정간격으로 놓은 후 상등액을 200 μ l를 분주하여 저해환의 크기를 비교하는 agar diffusion method를 사용하였다.

6. 유산균 동정

선발된 유산균은 Lactobacilli API 50 CHL kit(BioMerieux, France)를 사용하여 동정 하였다.

7. 항생제 감수성

MRS agar plate에 각 분리된 유산균을 증충한 후 항생제 paper disc를 사용하여 각 균주의 항생제 감수성을 비교 조사 하였다.

결과 및 고찰

한우와 홀스타인 농가로부터 수집한 분변에서 무작위 선발법으로 MRS agar와 LAPT agar에서 자라는 간균형태의 54균주를 1차로 선발하였다. 담즙에 대한 내성을 조사하기위

해 1차로 선발된 54 균주에 대해 0.3% bile salt가 함유된 MRS broth에서 배양 후 생존율을 조사한 결과(Fig. 1)

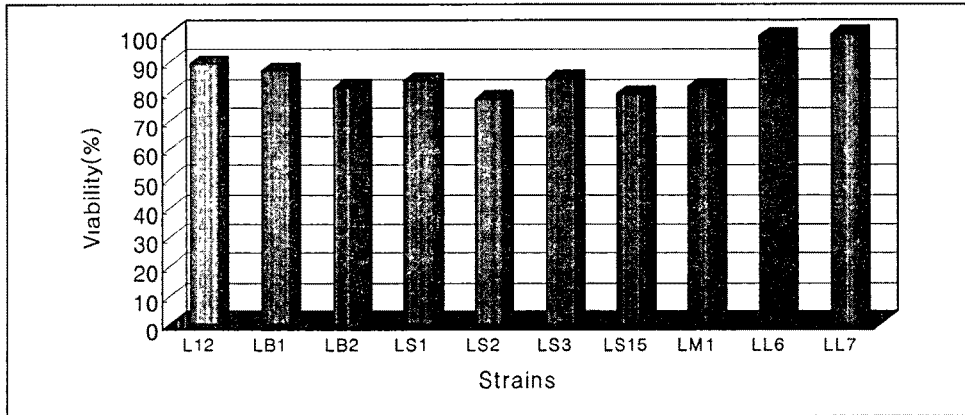


Fig. 1. The bile salt-resistance of lactic acid bacteria strains isolated from cattle faces in MRS broth containing 0.3% bile salt. Viability(%) = [O.D. value(625nm) in MRS containing 0.3% bile salt after 8hr - O.D. value in MRS after 8hr] × 100.

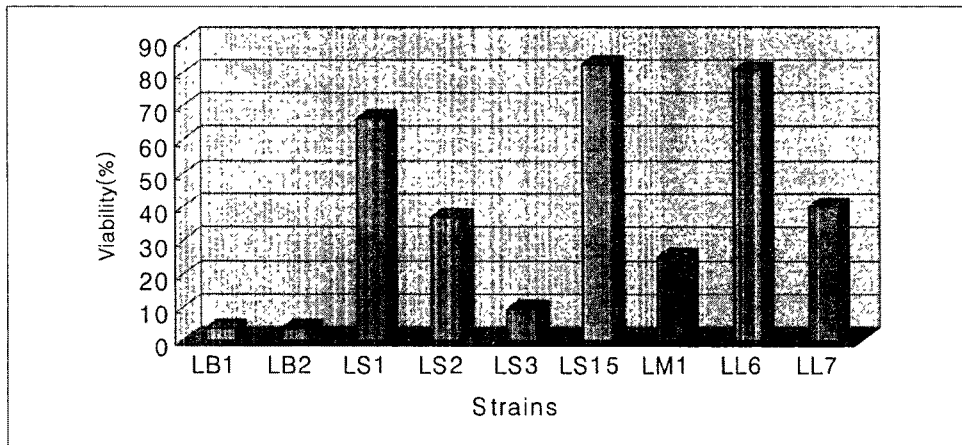


Fig. 2. The acid resistance of lactic acid bacteria strains isolated from cattle faces in simulated stomach liquid(pH 2.5). Viability(%) = [cell numbers in sodium phosphate(pH2.5) containing HCl after 2hr ÷ cell numbers in sodium phosphate(pH7.0) after 2hr] × 100.

담즙에 내성이 있는 10균주는 0.3% bile salt에서는 77.6%-99.8%의 생존율을 보였으며 특히, LL6와 LL7 균주의 경우 0.3% bile salt에서는 각각 99.2%와 99.8%로 가장 높은 생존율을 나타내었다. 내담즙성에서 선발된 균주를 0.05M sodium phosphate(pH 2.5)인 인공위산에서 37℃로 2시간 진탕배양 후 생존율을 조사하였다.(Fig. 2) 그 결과를 보면 LS15 균주가 82.6%로 가장 생존율이 높았고 그 다음으로, LL6 균주는 80.7%의 생존율을 보여 주었다. 따라서 내담즙성과 내산성이 모두 우수한 균주는 LL6 균주임을 알 수 있었다. 선발된 10균주를 그람음성균인 *Sal. typhimurium*, 그람양성균인 *Sta. aureus* 그리고 혐기성 병원균인 *Cl. perfringens*에 대한 항균력을 조사한 결과를 Table 1.에 나타내었다.

Table 1. The inhibitory activity of the lactic acid bacteria strains isolated from cattles faces against *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*.

Strain	Diameter(mm) of inhibitory clear zone		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>
control(MRS)	0.0	0.0	0.0
L12	0.0	10.0	13.5
LB1	8.0	10.0	14.0
LB2	8.0	10.0	12.0
LS1	0.0	0.0	9.0
LS2	0.0	0.0	12.0
LS3	9.0	10.0	14.0
LS15	0.0	0.0	0.0
LM1	0.0	0.0	9.0
LL6	10.5	11.0	14.0
LL7	11.0	10.0	15.0

*Sal. typhimurium*에 대한 저해능력이 우수한 균주는 LL7과 LL6 균주로서 저해환의 크기는 각각 11.0mm와 10.5mm로 나타났고, *Sta. aureus*에 대한 항균력 능력은 LL6 균주가 11mm로 가장 우수하며 그다음으로는 5개 균주 L12, LB1, LB2, LS3 및 LL7이 모두 10mm의 저해환을 보인 것으로 나타났다. 특히, 혐기성균인 *Cl. perfringens*에 대한 항균력은 LL7 균주가 15mm로 가장 우수하였으며 그다음으로 LB1, LS3 및 LL6 균주가 14mm의 저해환을 나타내었다. LS 15 균주는 병원성 균에 대해 모두 저해환을 나타내지 않았다.

Table 2. The antibiotic sensitivities of the lactic acid bacteria strains isolated from cattle faces.

Antibiotics	The diameter(mm) of clear zone against each isolated strain									
	L12	LB1	LB2	LS1	LS2	LS3	LS15	LM1	LL6	LL7
Gentamicin	0.0	0.0	0.0	10.0	12.0	8.0	17.0	19.0	0.0	0.0
Colistin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neomycin	9.0	0.0	8.0	13.0	15.0	11.0	16.0	13.0	0.0	0.0
Ampicillin	15.0	18.0	15.0	30.0	25.0	31.0	24.0	30.0	24.0	25.0
Streptomycin	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	11.0	15.0	0.0	0.0
Amoxicillin	14.0	15.0	16.0	26.0	26.0	30.0	26.0	32.0	28.0	25.0
Ciprofloxacin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Oxytetracycline	13.0	16.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	14.0
Erythromycin	15.0	16.0	17.0	21.0	27.0	22.0	28.0	30.0	25.0	21.0
Cephalosporin	21.0	0.0	0.0	12.0	0.0	0.0	20.0	28.0	29.0	26.0

국내 축산농가에서 항생제를 사료에 사용하고 있으므로 각 분리된 균주에 대해 항생제 감수성에 대한 조사를 실시하였다(Table 2). 분리된 10균주 모두 colistin과 ciprofloxacin에 대해 저항성을 모인 반면 ampicillin, amoxicillin 및 erythromycin에 대해서는 10균주 모두 감수성을 보여주었다.

선발된 10균주를 탄소원의 이용성차이로 동정하는 생화학적 방법인 API 50CHL kit로 동정하였다. 그 결과 10균주 모두 *Lactobacillus sp.*에 속하는 유산균으로 동정되었고, 광학현미경상에서 모두 간균으로 관찰되었다(Table 3). 3개의 병원성균에 대해 가장 우수한 항균력을 나타낸 LL6와 LL7 균주는 97.9% *L. acidophilus*로 동정되었고, 우수한 항균력을 나타낸 LS3 균주는 99.9% *L. plantarum*으로 동정되었다.

Table 3. The identification of lactic acid bacteria strains isolated from cattle faces based on API 50CHL test.

Strain	Homology(%)	Identification
L12	10.0	<i>Lactobacillus brevis 1</i>
LB1	3.8	<i>Lactobacillus brevis 1</i>
LB2	3.8	<i>Lactobacillus brevis 1</i>
LS1	96.9%	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LS2	95.3%	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LS3	99.9%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LS15	78.4%	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LM1	96.9%	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LL6	97.9%	<i>Lactobacillus acidophilus 1</i>
LL7	97.9%	<i>Lactobacillus acidophilus 1</i>

특히, LS1, LS2 및 LM1 균주는 각각 96.9%, 95.3%, 96.9% *L. fermentum*으로 나타났으며 혐기성균인 *Cl. perfringens*에 대해서만 항균력을 나타낸 것을 볼 수 있었고 나머지 4균주는 *Lactobacillus sp.*으로 동정되었다. 따라서 분리한 모든 균주는 생균제로서 사용이 가능한 안전성이 있는 유산균임을 확인 하였다. Fig. 3은 분리된 10개의 유산균을 MRS broth에서 37℃에서 24시간 배양 후 나타난 pH 로 4.09-4.76을 보여주고 있다. 소의 분변에서 분리된 유산균 중 LL6인 *L. acidophilus* 균주가 내산성, 내담즙성이 크고, 병원균에 대한 항균력이 우수한 능력을 가진 유산균으로 송아지에서 probiotic 균주로 활용 될 수 있는 가능성이 큰 균주라고 생각된다.

요 약

한우와 홀스타인의 분변으로부터 MRS배지와 LAPT배지를 이용하여 무작위 선발법으로 54균주의 유산균을 1차로 분리 하였다. 1차로 분리된 54균주에 대해 내담즙성이 우수한 10균주를 분리 한 다음 내산성을 조사한 결과 인공위액 pH2.5에서 LS1, LS15 및 LL6 균주가 각각 66.5%, 82.6% 및 80.7%의 생존율을 나타내었다. *Sal. typhimurium*, *Sta. aureus* 및 *Cl. perfringens* 의 병원균에 대해 가장 큰 항균력을 보인 균주는 LL6와 LL7 이었다. API CHL kit로 동정한 결과 LS1, LS2 및 LM1 균주는 모두 *L. fermentum*, LL6와 LL7 균주는 *L. acidophilus*, LS3 균주는 *L. plantarum*으로 각각동정 되고, 나머지 4균주는 *Lactobacillus sp.* 로 동정되어 분리된 10균주 모두 안전성 있는 유산 간균임을 확인 하였다. 10종류의 항생제에 대한 내성을 조사한 결과 ampicillin, amoxicillin and erythromycin 에 대해서는 억제되었으나 colistin과 ciprofloxacin에 대해 모두 내성을 나타내었다. LB1, LL6 및 LL7 균주는 gentamicin과 neomycin에 대해 내성을 보여 주었다. 분리 동정된 균주 중에 내산성, 내담즙성 및 병원성균에 대한 항균력이 우수한 것으로 probiotic 유산균으로 사용가능성이 높은 것은 LL6인 *L. acidophilus* 로 나타났다.

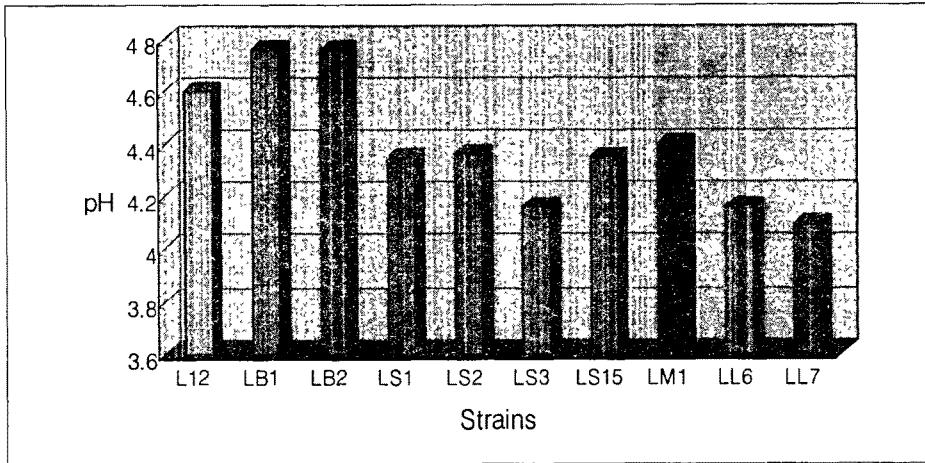


Fig. 3. The pHs of the lactic acid bacteria strains culture isolated from cattle faces after incubation in MRS broth at 37°C for 24hr.

참 고 문 헌

1. Wallace, R. J. and Newbold, C. J. (1992) Probiotics for ruminant, In : Probiotics : The scientific basis. Fuller, R. (ed.), Chapman & Hall, London. pp. 317-353.
2. Rose, A. H. (1980) Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series. Academic Press, London, 9:103.
3. Park, J. C., Kim, I. S. Kwon, S. K., Noh, J. M., Lee, S. M., Park, J. P., Lee, W. K., and Ryu, S. R. (2000) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:189-194.
4. Kim, Y. M. (1999) *Bioindustry News(Kor.)* 12: 23-28.