

Lactobacillus spp의 *Salmonella enteritidis* KU 101에 대한 보호 효과와 *L. casei* YIT 9018의 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region 염기배열 특성

배진성·윤영호
중앙대학교 동물자원과학과

Protective Activities of *Lactobacillus casei* YIT 9018 against *Salmonella enteritidis* KU101 and Characteristics of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence

Bae Jin Sung and Yoon Yung Ho
Department of Animal Science and Technology Chung-Ang University

ABSTRACT

In vivo protective and *in vitro* inhibitory activities of *Lactobacillus casei* YIT 9018, against typical enteritis causing *Salmonella enteritidis* KU101 and IgA level after challenge have been determined. In order to identify the strains of lactobacilli the sequences of 16S-23S rRNA intergenic spacer region were determined. All the test strains of *Lactobacillus* spp. inhibited *Salmonella enteritidis*, the intensity varied depending upon the species of lactobacilli. Effects on the survival rate of the mouse after challenge with *Salmonella enteritidis* KU101 on feeding *Lactobacillus* spp. have shown the highest survival rate in *L. helveticus* CU 631 followed by *L. casei* YIT 9018 and *L. johnsonii* C-4 and the lowest in control mice. The higher level of total Ig A concentration in the intestinal fluid of lactobacilli fed mice than control mice was observed. The sequences of 16S-23S rRNA intergenic spacer region of seven strains of *Lactobacillus casei* could be utilized as a strain identification, those sequences showed some degree of difference in homology.

(Key words : Protective activity, Survival rate, Ig A, Sequence of 16S-23S rRNA intergenic spacer region, *Lactobacillus* spp.)

I. 서 론
최근 빈번하게 식중독 및 장염을 일으키는 병원체는 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* 속 균 및 *Campylobacter* 속 균으로 알려져 있다(Karmali: 1989, Butzler: 1984). 이들 중에서 *Salmonella* 속 균은 가축의 장관에 생존하며 축산물 등 오염 식품을 통하여 감염하여 급성위

이 연구는 2001년 중앙대학교 교비지원에 의하여 연구되었음.

Corresponding author : Y. H. Yoon, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756 Korea. E-mail yungh310@post.cau.ac.kr phone; 82-31-670-3027

장염, 식중독 및 패혈증 등을 일으킴으로 공중 위생상 중요한 지표세균으로 알려져 있다(Aserkoff 등: 1970, Bowmer: 1964).

Lactobacillus spp.와 *Bifidobacterium*의 여러 균주는 발효유 제조에 광범위하게 활용되고 있으며 starter culture의 기능은 기질 중에 존재하는 유당이나 기타 당류를 분해하여 유산과 몇 종류의 유기산을 생성하여 제품에 적합한 기호성을 부여함은 물론 pH를 저하하여 장점막에서 병원성 세균이 정착하는 것을 경쟁적으로 저지시키거나(Khem 등: 1980, Gilliland와 Speck: 1977) 세균의 발육을 억제시킬 뿐 아니라(Stamer: 1979) 생성한 독소를 중화하고 병원성 세균에 유해한 항균성 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 유산균의 의학적인 이용효과에 대하여 Metchnikoff(1907)는 장염환자에서 *L. bulgaricus*의 발효유를 투여한 결과 병원성 세균의 감소로 정상적인 변이 배설되었다고 하였으며, *L. acidophilus*와 *L. casei*는 장 질환의 치료에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 있다(Speck: 1976).

가축에서 유산균의 투여효과를 보면, *L. acidophilus*를 돼지에 급여하였을 때 장염의 감소와 증체 효율의 개선효과가 있음이 보고되었고(Hill 등, 1970), *Streptococcus faecium*도 사료 효율을 높여 줌으로써 가축의 성장을 촉진하여 병원성 장내세균의 증식을 억제시키는 것으로 알려져 있다(한 등, 1982).

세균 균주 동정에 있어서 그 절차가 간단하고 신뢰도가 높은 방법으로 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 sequence 비교 방법과 pulsed field gel electrophoresis(PFGE)는 매우 유용한 방법으로 인정되고 있으며(윤, 1994), genotyping(Bautsch 등, 1988), genomoe size 측정(Canard 등, 1989), 분류학과 역학에 이용된다. 본 연구는 병원성 세균에 대한 억제효과가 탁월한 것으로 선발된 *Lactobacillus casei* YIT

9018과 산업적인 활용도가 높은 *Lactobacillus* spp.의 *Salmonella enteritidis* KU101에 의한 하리증상과 치사율 저하에 미치는 효과 및 산업적인 이용성을 비교 검토하고 분자생물학적 특성을 확인하여 균주 동정에 기초자료를 확보하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 보관

본 연구에 사용한 *Lactobacillus* spp. 및 *Salmonella enteritidis*는 Table 1에 제시된 바와 같다. *Lactobacillus* spp.의 배양은 37°C MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe, Difco, USA) broth에서 하였고, 보존은 0.75M adonitol을 함유한 11% skim milk의 동해방지제와 원심분리 한 cell을 1:1로 혼합 후 -70°C에서 냉동보존 하였다. 대수증식기의 세포를 접종용 균주로 사용하였다. *Salmonella enteritidis*는 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, USA)에서 배양을 하였고, cell의 보존은 배양액과 80% glycerol을 7:3의 비율로 혼합하여, -70°C에서 보관하였다.

2. *Lactobacillus* spp.의 *Salmonella enteritidis*에 대한 보호 및 면역증강효과

실험동물로는 6주령 Specific Pathogen Free (SPF) ICR mice male을 구입(대한바이오링크, Korea) 하여 4일간의 건강상태를 확인하고 사용하였다. 사료, 깔집 및 기타 시설은 모두 멸균된 것을 사용하였다. 사육조건은 12hrs/day로 조명을 하였으며, 온도는 22±2°C, 상대습도는 50±5%로 하였다. *Lactobacillus* spp.의 mouse에서 *Salmonella enteritidis*에 대한 증균 억제효과를 알아보기 위한 실험구는 6개의 군에

Table 1. Sources of strains of *Lactobacillus* spp., *Salmonella enteritidis* used in this investigation

| Species | Strains | Source |
|-------------------------|------------|-------------------|
| <i>L. helveticus</i> | CU 631 | 중앙대학교 축산물가공학실험실 |
| <i>L. johnsonii</i> | C-4 | Canada 식품개발연구소 |
| <i>L. rhamnosus</i> GG | ATCC 53103 | " |
| <i>L. acidophilus</i> | ATCC 4356 | " |
| <i>L. casei</i> | YIT 9018 | 중앙대학교 축산물가공학실험실 |
| <i>Sal. enteritidis</i> | KU101 | 건국대학교 수의 미생물학 연구실 |

Control, *Lactobacillus helveticus* CU631, *L. johnsonii* C-4, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* YIT 9018 로 하였다. 각 처리구별 4마리로 하였으며, 체 중은 31g으로 조정하였다.

Lactobacillus spp.는 실험기간 28일 동안 MRS broth에서 18시간 배양하여 $2 \sim 5 \times 10^9$ CFU/ml의 균을 생리식염수에 혼합하여 음수를 통하여 자유급여를 하였다. *Salmonella enteritidis*의 투여는 BHI broth에서 LD₅₀ 수준인 $3 \sim 4 \times 10^7$ CFU/ml까지 배양 후, PBS(pH 7.4)로 세척 후 경구투여기를 사용하여, *Lactobacillus* spp. 급여 7일 후에 mouse에 감염을 실시하였다.

3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 장액 내 total IgA 측정

96 well micro plate(Falcon, USA)에 0.1% bovine serum albumin(Sigma, USA)를 50 μ l씩 분주하고, 장액 시료 50 μ l를 최초의 well에 혼합한 뒤 미리 분주 되어있는 0.1% bovine serum albumin에 50 μ l씩 희석하였다. 희석된 plate를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하였다. Plate의 용액을 제거한 후

tween 20(Merck, Germany)이 0.05% 함유된 PBS(pH 7.4)로 3회 세척을 하였고 3% Bovine serum albumin을 전체 well에 200 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양 후 tween 20(Merck, Germany)이 0.05% 함유된 PBS(pH 7.4)로 3회 세척을 하였다. Horse sera peroxidase로 conjugate된 goat anti-mouse IgA(Sigma, USA)를 1:1000으로 희석한 후 각 well에 50 μ l씩 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치 하였다. 다시 tween 20(Merck, Germany)이 0.05% 함유된 PBS(pH 7.4)로 3회 세척하였으며, p-nitrophenyl phosphate disodium(Sigma, USA)이 1mg/1ml 되도록 함유된 alkaline phosphatase substrate solution을 100 μ l를 각 well에 분주 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치시킨 후, ELISA reader(Bio-rad Microplate reader Model 3550, USA)를 이용하여 405nm에서 total IgA를 측정하였다(한 등, 1998).

4. Radial diffusion assay에 의한 *Lactobacillus* spp.의 *Salmonella enteritidis* 억제 효과 측정

Lehrer(1991)등의 방법 중 Radial diffusion

assay method에 따라 실시하였다.

*Salmonella enteritidis*의 배양은 50ml trypticase soy broth (full-strength 3% w/v) 37°C, 18시간 이상 overnight 후 midlogarithmic phase일 때, 배지에서 50 μ l을 fresh한 trypticase soy broth(TSB)에 접종 후 37°C 2.5~3시간 배양하였다. 배양된 *Salmonella enteritidis*를 4°C, 900 \times g에서 10분간 원심분리 하였다. 차가운 pH 7.4 10mM sodium phosphate buffer(NAPB, Sigma, USA)로 세척 후 10ml NAPB로 재부유하였다.

Optical density(OD) 값을 620nm에서 측정하여(일반적으로 OD₆₂₀ 0.20 = 5 \times 10⁷CFU/ml) 1~4 \times 10⁶ CFU/ml이 되도록 한 것을 10ml의 42°C의 3mg TSB powder, 1% w/v low-electroendosmosis type agarose(Sigma, USA), 최종 volume 0.02% v/v의 Tween 20이 함유된 10mM NAPB(pH 7.4)가 들어있는 멸균된 tube에 첨가하였다. Vortex mixer로 균체를 완전히 흩어놓은 후 agar에 pouring을 할 때 완전한 수평을 이루고, 약 1mm의 두께로 agar를 고정시켰다. 지름이 3mm인 gel punch를 이용하여 well을 만든 후 *Lactobacillus* spp. 5 μ l를 각각의 well에 첨가한 후 37°C 3시간 배양하였다. 10ml의 멸균된 agar(double-strength(6% w/v) 1% w/v agarose)로 overlay 한 후 37°C 18~24시간 배양한 후 well 주변의 inhibition area의 지름을 측정하였다. 0.1mm를 1U로 표현하고, 계산은 well의 지름인 3mm(=30U)는 측정치에서 제외하였다.

5. *Lactobacillus* spp.의 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 sequence

Lactobacillus spp.의 16S-23S rRNA intergenic spacer region primer를 사용하여 균주 수준의 동정을 신속하고 정확하게 수행가능한지를 판

단하기 위하여, Table 1에 제시된 균주의 PCR 증폭된 산물을 전기영동 후 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 DNA sequence를 측정하고, Gene bank에 등록된 균주의 sequence와 비교한 homology를 통하여 strain 수준의 동정 가능성을 검토하였다.

Genomic DNA의 preparation은 MRS broth에서 37°C에서 대수성장기까지 배양한 균주를 1.5ml microcentrifuge tube에 옮긴 후, 16,000 \times g에서 원심분리하고, pH 7.4 Phosphate Buffered Saline(PBS, Sigma, USA)으로 washing 한 뒤에 Wizard™ Genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용하여 genomic DNA를 preparation 하였다. 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 DNA를 증폭하기 위한 primer는 *L. casei*에 종 특이성 primer로 Pr I 16'-end of spacer로 CAGACTGAAAAGTCTGACGG와 CasII 23' end of spacer인 GCGATGCGAA-TTCTTTTTC를 사용하였고, primer의 주문·합성은 Bioneer(Korea)에 의뢰하여 합성하였다. PCR 수행에 있어서 Taq polymerase와 dNTP는 Bioneer(Korea)의 제품을 사용하여 분리하였다. PCR 수행에 사용되는 Thermal cycler는 Perkin-Elmer 2400으로 수행하였으며, cycler의 조건은 first denaturation 92°C, 2min이었으며, denaturation 95°C 30sec, annealing은 55°C 30sec로 하였으며 denaturation, annealing, extension은 30 cycle을 반복 수행하였고, extension 72°C, 30 sec, final Extension 72°C, 2min 동안 수행하였다. PCR product는 2.0% agarose gel, 50 voltage에서 3시간 전기영동 한 후, 형성된 DNA band를 절단하여 AccuPrep™ Gel purification kit (Bionner, Korea)를 사용하여 정제한 후, sequencing 시료로 사용하였다. PCR 증폭된 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 DNA의 sequencing은 Bioneer(Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

6. 통계분석

처리구간 유의성에 관한 통계분석은 SAS (windows V 6.12)를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Lactobacillus* spp.의 *Salmonella enteritidis*에 의한 치사율 저하효과

Lactobacillus spp.를 각각 2×10^9 CFU를 매일 7일간 음용수와 함께 섭취하게 한 후 *Salmonella enteritidis*를 경구투여하고 투여 후 21일간 *Lactobacillus* spp.가 투여되지 않은 대조구와 대비한 생존 mouse 수를 %로 표시한 결과는 Fig. 1에 제시되었다.

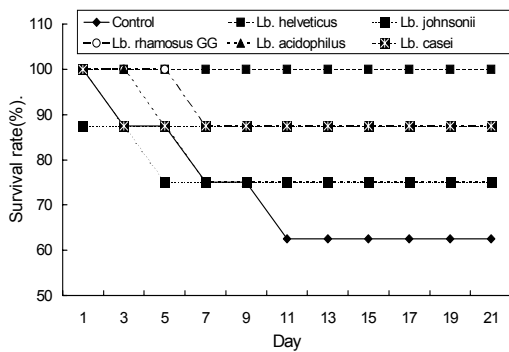


Fig. 1. Survival rate of control mice and mice fed with *Lactobacillus* spp., following challenge with *Salmonella enteritidis*.

*Salmonella enteritidis*가 투여된 이후에도 21일간 *Lactobacillus* spp.는 매일 동일한 수준으로 급여되었으며 *Lactobacillus* spp.의 균주에 따라 mouse의 생존률과 치사율의 차이가 나타났다. *L. helveticus* CU 631 급여구는 21일 시험

기간 중 생존율이 100%로 유지되었으나 대조군에는 11일 경과 후 생존율이 62% 수준으로 저하되어 치사율 저하에 *L. helveticus* CU 631 급여는 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다($p < 0.001$). *L. casei*는 3일 후 생존율이 88%를 유지하여 유의성 있는 치사율 저하효과를 나타내었다. *L. johnsonii* 급여구는 11일 이후 그 생존률이 75% 수준을 유지하여 대조구보다 높은 생존률을 나타내었다. *Lactobacillus* spp.의 균주에 따라 유의성이 인정되는 수준의 치사율 저하효과를 나타내었으며 그 균주별 효과강도는 *L. helveticus* > *L. casei* > *L. johnsonii*의 순서로 높게 나타났다. Table 2에는 *Lactobacillus* spp. 급여 7일 경과 후 *Salmonella enteritidis*로 challenge 한 후 *Lactobacillus* spp.를 21일간 급여한 후 평균 생존시간 수를 대조군을 100% 할 때 평균 생존시간 수의 대비 %를 나타내었다. *L. helveticus* CU 631이 그 생존율이 가장 높아 157%로 나타났고 *L. casei* YIT 9018이 145%, *L. acidophilus* ATCC 4356은 137%, *L. johnsonii* C-4는 132%, *L. ramosus* GG ATCC 53103은 110%로 가장 낮은 생존률을 보였다.

L. helveticus CU 631은 치사율에서 다른 *Lactobacillus* spp. 및 대조구에 비하여 *Salmonella enteritidis*의 억제 효과가 높은 것으로 확인되었다.

*Salmonella enteritidis*를 mouse에 challenge했을 때 *Lactobacillus* spp. 급여에 의하여 나타나는 대조군에 대비한 생존율 향상 효과는 경구적으로 감염시킨 *Salmonella typhimurium*을 *L. acidophilus* LA1에 의하여 억제 효과가 뚜렷이 나타난 결과가 보고되어 본 실험의 결과와 유사한 성향을 보였으며, 사람의 설사증상의 완화효과가 *L. casei* GG에 의하여 나타난 보고가 있다(Isorauri 등, 1994).

Table 2. Survival rate of mice fed with *Lactobacillus* spp. following challenge with *Salmonella enteritidis* after 21 day

| Strain | Survival rate(%) |
|-----------------------------------|------------------|
| Control | 100 ^d |
| <i>L. helveticus</i> CU 631 | 157 ^a |
| <i>L. johnsonii</i> C-4 | 132 ^c |
| <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103 | 119 ^b |
| <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 | 137 ^c |
| <i>L. casei</i> YIT 9018 | 145 ^b |
| SEM | 1.30 |

$$* \text{Survival rate}(\%) = \frac{\text{Mean survival times (hours) of treated mice}}{\text{Mean survival times (hours) of control mice}} \times 100$$

* ^{a-d} Means in a row with no common superscript differ significantly(P<0.001).

* SEM : Standard error of mean.

2. *Lactobacillus* spp.의 *Salmonella enteritidis*의 시험관 내 억제 활성

Lehrer 등(1991)이 제안한 ultrasensitive assay 법에 의한 *Lactobacillus* spp.의 *Salmonella enteritidis* 억제효과는 Table 3에 제시되어 있다. *L. helveticus* CU 631, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. johnsonii* C-4, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* YIT 9018의 순서로 *Salmonella enteritidis*에 억제효과가 유의적으로 나타나는 것으로 나타났다(P<0.001). *L. helveticus* CU 631은 *Salmonella enteritidis*를 억제하는 억제환의 크기에서 통계적 유의성을 갖는 수준의 높은 억제성향을 나타내었다. 이 결과는 치사율 억제효과와 일치하는 성향을 보였으며 *L. rhamnosus*의 시험관 내 억제 성향과 치사율 저하 효과는 *L. helveticus*의 경우는 유사

한 성향을 나타내었으나 다른 균주가 투여된 경우는 일치하는 성향이 나타나지 않았다. *L. helveticus* CU 631이 가장 좋은 억제효과를 가지고 있어, probiotic 균주로 사용이 가능하다고 사료되나 더 많은 연구가 필요하다고 생각되며 *Lactobacilli*에 의하여 시험관내에서 나타나는 억제현상은 경쟁적인 배재성향의 결과로 나타난 결과로 이해되고 있다(Yoon과 Won, 2002).

Table 3. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by *Lactobacillus* spp. (ultrasensitive assay method)

| Species | Clear zone diam(U) |
|------------------------------------|--------------------|
| <i>Lb. helveticus</i> CU 631 | 9.50 ^a |
| <i>Lb. johnsonii</i> C-4 | 8.00 ^b |
| <i>Lb. rhamnosus</i> GG ATCC 53103 | 8.50 ^b |
| <i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356 | 6.00 ^c |
| <i>Lb. casei</i> YIT 9018 | 5.00 ^d |
| SEM | 0.18 |

* 1 unit = 1mm

* ^{a-d} Means in a row with no common superscript differ significantly(P<0.001).

* SEM : Standard error of mean.

3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 장액 내 total IgA 측정

IgA는 호흡기 및 소화기에서의 방어기전과 같은 국소 감염에 대한 일차 면역방어로서 중요하다. *Salmonella enteritidis*를 감염시킨 후 동물의 장액 내에 존재하는 항체성분들 중 total IgA 농도를 direct ELISA법으로 측정한 결과 control 160.3ng/ml, *L. helveticus* 161.4ng/ml, *L. johnsonii* 156.7ng/ml, *L. rhamnosus* GG 165.4ng/ml, *L. acidophilus* 167.30ng/ml, *L. casei* 161.4 ng/ml의 함량을 나타내었으며, *L. johnsonii*를

제외한 모든 균주에서 control에 비해 높은 total IgA 함량을 나타내는 경향을 보였으나, 각 처리구간의 유의차는 없었다.

Perdigon 등(1990)은 젖산균을 일정기간 공급 후 *Salmonella enteritidis*을 감염시키고, 감염 후 anti-*Salmonella* IgA를 측정해 본 결과, *L. casei* 투여균이 다른 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* 투여 균 중에서 가장 높게 측정되었으며, *L. acidophilus*를 급여한 경우 대조군의 anti-*Salmonella* IgA 농도와 차이를 나타내지 않았다고 한 보고는 본 실험의 결과와 유사하였다. 이는 *L. acidophilus*에 의해 유도된 IgA가 장내 *Salmonella enteritidis*를 완벽하게 방어하지 못하였으며 병원성균이 장 표면을 통하여 간 및 비장에 *Salmonella enteritidis* 집락을 형성하였으며 이 경우에는 항체들은 그들의 생리학적 기능을 수행할 수 없는 것으로 보인다.

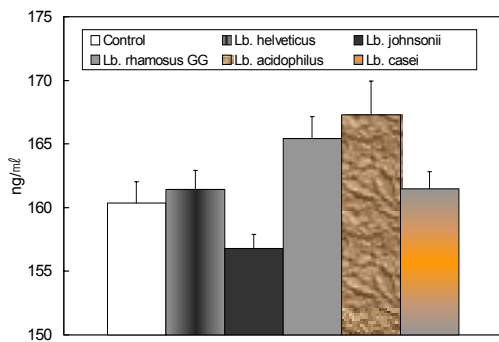


Fig. 2. Effect of *Lactobacillus* spp. feeding on total IgA production in small intestinal fluid, 21 days after the challenge with *Salmonella enteritidis*.

발효유를 섭취함으로써 체내에 섭취된 *L. acidophilus*는 혈액중의 탐식작용 활성은 증진시키는 물론 혈장중의 총 IgA 농도를 증가시키는 것으로 보고된 바 있으나(Link-Amster 등, 1994) 본 실험결과 총 IgA 농도는 종에 따른

차이를 나타내었다.

4. *Lactobacillus casei* YIT 9018의 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 sequence

산업적으로 이용도가 높은 *L. casei* YIT 9018의 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 크기는 214bp로 나타났으며, gene bank에 등록된 동일균종의 균주간 염기배열의 homology는 Fig. 3에 제시된 바와 같다.

YIT 9018과 ATCC334, JCM 1134, LC7422, LC7127, ATCC393 LC7128J 간의 homology는 92.2%, 98.0%, 93.6% 95.1%, 98.3% 96.6%인 것으로 나타났다. Nucleotide 배열의 특징은 7개 균주가 공통적으로 갖는 공통배열부분은 1번에서 15번까지 CTAAGGAAACAGACT로 위치해 있고, 균주간 차이를 보이는 변화배열이 위치된 부분은 16-17, 31-92, 125-126, 131-132, 176-180 위치에서 nucleotide의 변환이 주로 나타나는 것이 확인되었다. 그 이외의 부분은 공통배열이 위치하는 특성을 나타내었다. 위에 제시된 homology 차이에 근거하여 균주동정의 근거로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

균주동정 및 sub-typing의 목적으로 DNA sequencing 방법을 이용하는 경우 고려되어야 할 점은 임상실험실에서 실질적인 목표에 접근하기 위하여 미생물 DNA sequencing은 매우 작은 부위에 국한되어 실시될 수 밖에 없다. 즉 미생물 염색체 중 큰 부분이나 여러 개의 작은 부분을 sequencing하는 것의 실용적인 의미는 적은 것이다. 전체 염색체에 연관되어 시행되는 PFGE, RAPD, Rep PCR과는 대조적으로 DNA sequencing 방법에 있어서는 세균이나 곰팡이의 경우 균종간 차이를 크게 보일 수 있는 극히 작은 부분을 선택하여 sequence를 측정해야 한다는데 제한성이 있는 것이다. 작은 부분의 DNA sequence가 균주간의 선별이 용이할

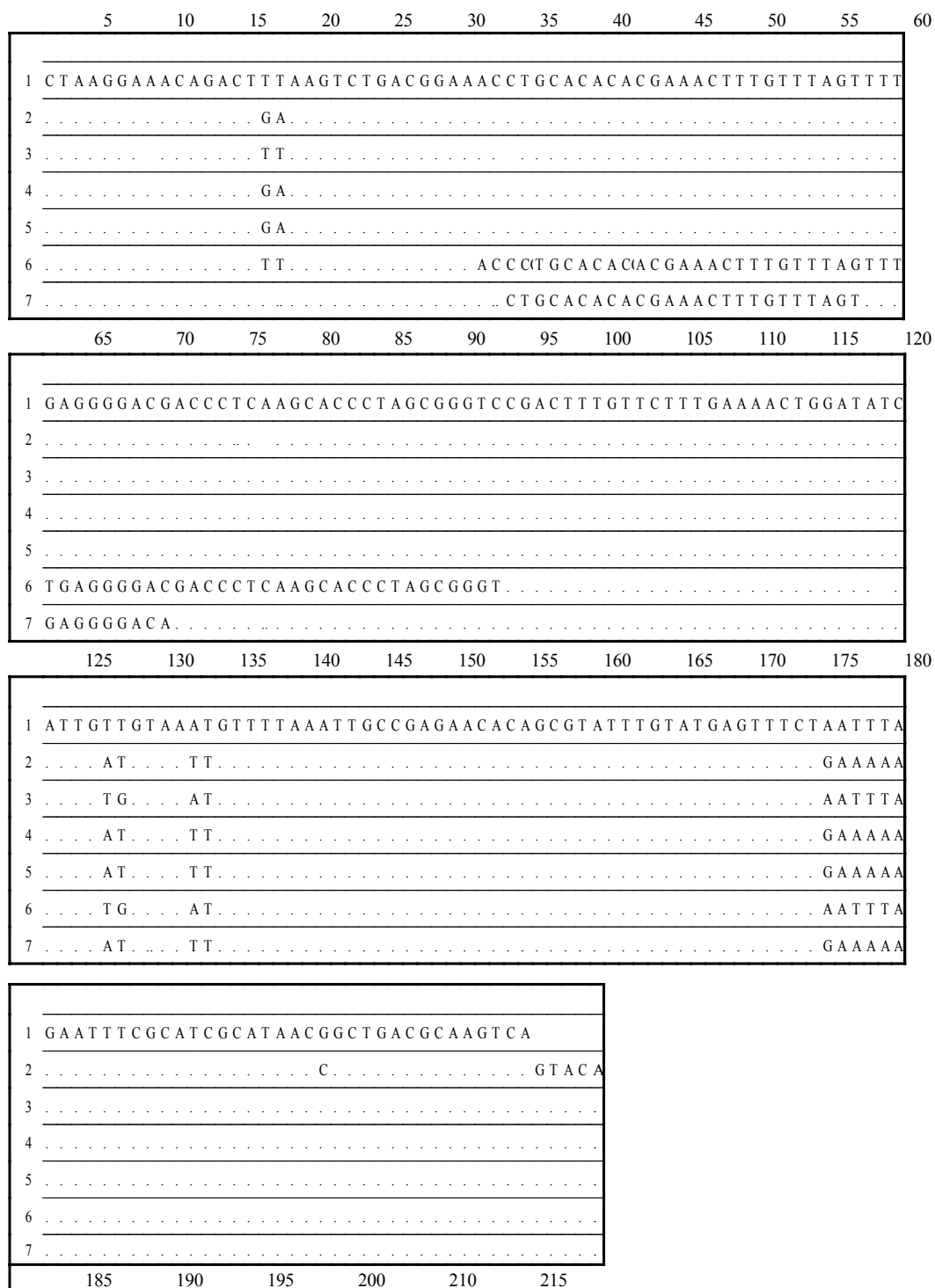


Fig. 3. 16S-23S r RNA intergenic spacer region sequences of seven strains of *L. casei*.

1; YIT 9018, 2; ATCC334, 3; JCM 1134, 4; 7422 5; 7127 6; ATCC393 7; 7128

정도로 염기서열의 변화가 심하고 양 측면에는 공통배열부위가 위치하고 있어야 하는데 *L. casei*의 경우 1-15, 185-214번 공통배열부위가 존재하고 있어 이조건에 적합하며, 이러한 요구에 충족되는 부분으로 16S-23S rRNA intergenic spacer region이 적합한 것으로 알려져 있다.

Sequence에 변화가 나타나는 원인으로 genomic DNA상에서 여러 가지 환경요인의 변화와 origin의 차이에 따른 genomic DNA sequence의 변화로 생각되어진다.

IV. 요약

Lactobacillus spp. 급여에 의하여 *Salmonella enteritidis* 감염에 의한 치사율의 저하 성향, 시험관내 억제활성, 장액 내의 총 IgA 농도변화와 *Lactobacillus casei*의 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 sequence를 측정 비교한 결과는 다음과 같다.

Lactobacillus spp. 5균주는 시험관내 *Salmonella enteritidis* 억제활성 측정 결과 모든 시험균주가 억제활성을 나타내었고 그 억제활성의 차이가 통계적인 유의성을 보였으며, 억제활성의 차이는 *L. helveticus* CU 631 > *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 > *L. johnsonii* C-4 > *L. acidophilus* ATCC 4356 > *L. casei* YIT 9018 인 것으로 나타났다.

Lactobacillus spp. 급여에 의하여 *Salmonella enteritidis* challenge에 의한 치사율 저하효과는 *Lb. helveticus* CU 631은 대조구의 생존률 62%에 대하여 100%로서 가장 높은 치사율 저하효과를 나타내었고, *L. casei* YIT 9018, *L. johnsonii* C-4의 생존률이 70%와 50%를 나타내었다.

Lactobacillus spp.의 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 sequence를 측정하고 gene bank

에 등록된 균주의 sequence와 비교한 결과 homology의 차이를 나타내었다.

V. 인용 문헌

1. Aserkoff, B., Schoroeder, S. A. and Brachman, P. S. 1970. Salmonellosis in the United States-A five-year review. *Am. J. Epidemiol.* 92:13-24.
2. Bautsch, W., Grothues, D. and Tummeler, B. 1988. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by two-dimensional field inversion gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 52:255-258.
3. Bowmer, E. J. 1964. The challenge of Salmonellosis major public health problem. *Am. J. Med. Sci.* 247:647.
4. Butzler, J. P. 1984. *Campylobacter* infection in man and animal. CRC press Inc. 1-246.
5. Canard, D. and Cole, S. T. 1989. Genome organization of the anaerobic *Clostridium perfringens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6676-6680.
6. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative culture. *J. Food protect.* 40(12):820.
7. Hill, H. R., Kenworthy, R. and Porter, P. 1970. Studies on the effect of dietary Lactobacilli on intestinal and urinary amines in pigs in relation to weaning and postweaning diarrhea. *Res. Vet. Sci.* 11:320.
8. Isolauri, E., Kaila, M., Mykanen, H., Ling, W. H. and Salminen, S. 1994. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig. Dis. Sci.* 39:2595-2600.
9. Khem, M., Shahani, K. M., Amabo, D. and Ayebo, A. D. 1980. Role of dietary Lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:2488.
10. Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-39.
11. Lehrer R. I., Michael, R., Sylvia, H. S. S. L., Richard, J. and Patricia, E. 1991. Ultrasensitive

- assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J. Immunological Methods. 131:167-173.
12. Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O. and Aeschlimann, J. M. 1994. Modulation of specific humoral immune response and changes in interstitial flora mediated through fermented milk intake. FEMS Immun. Med. Microbiol. 10:55-64.
 13. Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life. G. P. Putman's Son, New York.
 14. Perdigon, G., Alvarez, S., Nder, M. E. de Macias, Roux, M. and Pesce, A. A. de Ruizholgade. 1990. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. J. Food. Protect. 53: 404-410.
 15. Speck, M. L. 1976. Interaction among Lactobacilli and man. J. Dairy Sci. 59:338.
 16. Stamer, J. R. 1979. The lactic acid bacteria; Microbes of diversity. Food Technol. 33:63.
 17. Yoon, Y. H. and Won, B. R. 2002. Antagonism against *Helicobacter pylori* and proteolysis of *Lactobacillus helveticus* CU 631 and Strain identification. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(7) 1057-1065.
 18. 윤영호. 1994. 유산균 genome의 정상. 식량자원 연구소 논문집. 6(1):23-33.
 19. 한인규, 채병조, 박응복, 이광득. 1982. 돼지에 관한 *Streptococcus faecium*의 성장촉진과 하리 방지 효과 및 장내 미생물에 관한 연구. 축산과연. 2:12.
- (접수일자 : 2002. 12. 24 / 채택일자 : 2003. 3. 24)