

돼지분변으로부터 분리한 유산균주들의 헬리코박터 저해력과 항균활성 및 배양특성

문 기 혁 · 박 환 범 · † 윤 정 원

수원대학교 생명공학과

(접수 : 2004. 10. 8., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

Inhibitor Activity and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Pig Feces

Ki Hyuk Moon, Phun Bum Park, and Jeong Weon Yoon†

Department of Biotechnology and Bioscience, The University of Suwon, Hwaseong-si 445-743, Korea

(Received : 2004. 10. 8., Accepted : 2005. 4. 23.)

Lactic acid bacteria were isolated from pig feces for probiotics. The six isolated strains were identified as *Lactobacillus paracasei* (Lp), *Lactobacillus fermentum* (Lf), *Lactobacillus brevis* (Lb), *Lactobacillus plantarum* (P1, P2), and *Pediococcus pentosaceus* (P3) by its sugar utilization, morphological and physiological characteristics. P1 was showed largest antibacterial inhibition zone among the isolated strains. It was against *Salmonella gallinarum* 25 mm, *E. coli* 20.5 mm, *Staphylococcus aureus* 24 mm, and *Pseudomonas aeruginosa* 28 mm by inhibitory zone, respectively. Lf was showed hyper acid tolerance, 80% survival rate for 40 minutes, and P1, Lb showed hyper bile tolerance, 408%, 283% survival rate for 9 hrs, respectively. Therefore the Lf, P1, and P2 strains were expected to probiotics.

Key Words : *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, Probiotics

서 론

인류와 오랜 역사를 함께 한 발효식품은 최근 들어서 더욱 다양한 기능과 형태로 발전되어왔다. 그 중에서도 식품의 맛과 풍미를 높여주고 식중독과 식품의 부패를 억제하는 등 다양한 기능을 함유한 유산균 발효식품의 발달은 매우 두드러졌는데, 이들 유산균의 유용성 중에서 특히 식품의 부패를 방지하는 기능은 식품보존제로서의 이용 뿐만 아니라 사람과 동물의 소화기관내의 세균총 환경 유지에도 이용이 된다. 유산균의 병원성세균의 생육을 억제하는 기작은 유기산에 의한 pH 저하와 과산화수소의 생성에 의한 것, 그리고 유산균이 분비하는 여러 종류의 bacteriocin에 의한 것으로 구분할 수 있다(1). 물론 항생제 사용하여 병원성세균의 성장을 더욱 강력하고 효과적으로

억제할 수 있지만, 항생제의 사용은 내성균 출현을 유도하였고, 이러한 이유로 항생제 사용에 제약을 두는 실정이다. 또한 인간이나 가축의 소화기관 질병에 항생제를 사용하면 병원성 세균의 성장억제와 함께 위나 장에 존재하는 유익한 미생물의 생육마저 저해하므로 소화기능의 저하, 장내 미생물 균총변화 등을 초래하며, 축산제품에 있어서는 과도하게 사용된 항생제가 가축의 근육조직 등에 축적된 후 그대로 사람에게 공급이 되는 문제가 발생하기도 한다. 그러므로 노화와 스트레스 등으로 민감해진 소화기관을 건강하게 유지하기 위하여 항생제가 아닌 다른 형태의 치유와 예방이 필요한데, 살아있는 생균으로써 섭취하는 유산균이 가장 효과적으로 알려져 왔다(2).

유산균을 살아있는 생균으로 사용하기 위해서는 기본적인 조건이 필요하다. 먼저 병원성 미생물 성장을 억제하는 항균력이 뛰어나야 하며, 위와 장내에서 생존을 유지하기 위하여는 강한 내산성과 내담즙성이 요구되며, 위나 장관 내벽에의 부착능력이 우수하여야 한다. 또한 항생제에 대한 감수성이 적고, 유산균 자체가 항생제에 대한 내성이 발생하지 않아야 하며, 사람이나 가축에게 아무런 해가 없는 안전성이 확보된 균주이어야 한다. 마지막으로 산업적

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, The University of Suwon, Wau-ri, Bongdam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-743, Korea

Tel & Fax : +82-31-220-2327

E-mail : jwyoonyoon@suwon.sc.kr

으로 이용하기 위해서는 다양한 배양조건 및 제조환경에서도 유산균의 생균 농도가 잘 유지되어야 한다(3).

본 연구는 이러한 여러가지 조건을 만족하는 유산균을 생균제로 사용할 목적으로 돼지 분변에서 항균력과 헬리코박터 저해력이 우수한 유산균을 분리하였다. 이들 균주 중 내산성과 내담즙성이 우수한 균주를 선별하였고, 당 이용성을 통한 1차적인 균주 동정과 배양특성 및 항생제 감수성 등을 측정하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배지

실험에 사용된 균주들은 경기도 소재 양돈농가의 돼지 분변으로부터 분리하였다. 돼지분변을 멸균생리식염수에 희석한 다음 MRS broth에 1.5% (w/v) agar를 첨가한 배지에 단계별로 도말하고, 12 L anaerobic jar (BBL, GasPak)를 이용하여 혐기적인 조건에서 배양한 후, 나타난 colony가 형태학적으로 다른 것들 중에서 우점종인 균주를 분리하였다. 우점종으로 선별된 균주는 3% (v/v) 과산화수소 (H₂O₂)에 현탁하는 catalase activity를 측정하였고, 과산화수소에 현탁된 균체에서 가스발생이 없는 음성으로 판독된 균주들을 분리하였다(4). 분리된 균주는 MRS 배지에 접종 후 37°C에서 배양한 다음 2일마다 계대배양 하면서 균주의 활성을 유지하였다.

균주동정 및 전자현미경 촬영

각 균주들은 형태학적인 특성, 배양 특성과 API CHL Kit (BioMerieux, France)를 사용하여 당 이용성 등을 관찰하여 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Microbiology: a laboratory manual(5)로 1차 동정하였다.

MRS 배지에서 24시간동안 배양한 각 시험균주를 멸균 증류수를 이용하여 세척하고 균체를 25% glutaraldehyde 용액에 현탁한 다음 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 원심분리하여 glutaraldehyde를 제거한 다음 0.1 M 인산완충용액 pH 7.0으로 3회 세척 후 깨끗한 유리 위에 점적해서 진공 건조하였다. 건조된 균체는 감압 증발기 내에서 금으로 도금한 다음 주사전자현미경으로 관찰하였다.

최적의 배양 온도 확인

각 균주들의 최적배양 온도를 확인하기 위하여 MRS agar 배지에서 24시간 배양한 균체를 취해 멸균한 생리식염수에 현탁한 다음 MRS broth 50 ml에 균체현탁액 0.5 ml를 접종하였다. 접종된 배지는 25°C, 37°C, 45°C, 그리고 52°C에서 각각 배양하면서 3시간 간격으로 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정함으로써 온도에 따른 균주의 성장 정도를 측정하였다.

최적의 배양 pH 확인

각 균주들의 최적배양 pH를 확인하기 위하여 MRS agar 배지에서 24시간 배양한 균체를 취해 멸균한 생리식염수에 현탁한 다음 pH 3, 5, 7, 그리고 9로 각각 조정된 MRS broth 50 ml에 균체 현탁액 0.5 ml를 접종하였다. 접종된

배지들은 37°C에서 배양하면서 3시간 간격으로 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정함으로써 pH에 따른 균주의 성장 정도를 측정하였다.

내산성, 내담즙성 측정

MRS 배지 50 ml를 멸균한 후 HCl을 사용하여 pH를 2로 조정한 것과 MRS 배지에 Bile salt 0.3% (w/v)를 첨가한 것에 각 시험균을 접종하여 37°C에서 정치배양하였다. 아무것도 첨가되지 않은 MRS 배지를 대조구로 하여 40분, 4시간, 8시간 경과 때마다 생균수를 측정하여 내산성과 내담즙성을 측정하였다(6).

산도측정

MRS broth에서 2일간 배양된 각 균주의 배양액을 취하여 0.1N NaOH 용액을 pH 8.3이 될 때까지 적정하고 소모된 NaOH 량을 측정된 후 다음 식에 의하여 lactic acid(%)를 구하였다(7).

$$\text{Lactic acid (\%)} = \frac{\text{ml of 0.1 N NaOH} \times \text{m.e. of lactic acid}}{\text{ml of sample}}$$

Lactic acid의 m.e. (molecular equivalent)는 0.009이다.

항균활성 측정

Salmonella gallinarum, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, 그리고 *Staphylococcus aureus* 등 4종의 병원균을 대상으로 항균활성을 측정하였다. Nutrient agar, LB agar 배지 50 ml를 각각 2개씩 준비하여 멸균한 후 약 40°C가 되도록 준비하였다. 그리고 24시간 동안 배양한 각 공시균액 50 μ l를 각 배지에 넣고 혼합한 다음, 멸균된 pipette을 이용하여 petridish에 10 ml씩 분주하였다. 배지가 굳은 후 멸균된 stainless steel cup (penicylinder; 내경 6 mm, 외경 8 mm, 높이 10 mm)을 배지 표면에 올려놓고, MRS에서 24시간동안 배양한 유산균 배양액 200 μ l를 넣고 24시간동안 배양 후, 원통 주변에 형성된 공시균주의 성장 저지환을 측정하였다.

Helicobacter pylori 저해력 측정

실험에 사용된 균주는 *Helicobacter pylori* ATCC 43504이며, 배지는 Muller-Hinton (Difco) broth에 1.5% (w/v) agar를 넣고 멸균한 다음, 10% (v/v) calf serum (BRL)을 0.45 μ m filter로 여과 후 첨가하여 만든 MHCS 배지를 사용하였다.

H. pylori 저해력 측정은 *H. pylori*를 도말한 배지 표면 위에 멸균된 stainless steel cup (penicylinder; 내경 6 mm, 외경 8 mm, 높이 10 mm)을 올려놓고, 24시간동안 MRS 액체배지에서 배양하고 0.2 μ m 필터로 여과한 각각의 유산균 배양액을 200 μ l를 넣고, 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 3일 동안 배양 후, 원통 주변에 형성된 성장 저지환을 측정하였다(8). 대조구로는 헬레코박터 성장 저해력이 우수한 *Lactobacillus pentosus* 배양액을 사용하였으며, MRS 배지 자체가 *H. pylori*를 저해하는지를 확인하기 위하여 blank로 사용하였다.

항생제 감수성 측정

각 유산균 배양액을 MRS agar 배지에 넣고 혼합 후 petridish에 10 ml씩 분주하여 식혔다. 배지가 굳은 후 일정량의 항생제가 포함되어있는 paper disc (Sensi-Disc: BBL)를 올려놓고 37°C에서 배양한 다음 disc 주변에 형성되는 저해환을 측정하여 항생제 감수성을 측정하였다. 대조구로는 병원성 공시균주를 사용하여 비교하였으며, 항생제의 종류 및 용량은 gentamycin 10 µg, erythromycin 15 µg, cephalothin 30 µg, amoxicillin/clavulanic acid 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, oxytetracycline 30 µg, neomycin 30 µg, ampicillin 10 µg, streptomycin 10 µg, colistin 10 µg이었다.

결과 및 고찰

균주의 분리

생균제로 사용할 수 있을 안전성 있는 균주를 선별하기 위하여 돼지 분변에서 유산균을 분리하였다. 돼지 분변 샘플을 혐기적인 조건에서 배양한 결과, 많은 종류의 곰팡이와 세균, 그리고 유산균 형태의 colony를 얻을 수 있었다. 곰팡이를 제외한 세균류에서 colony 형태, 현미경 관찰, 그리고 catalase 반응을 측정한 결과를 종합하여 유산균으로 추정되는 균주를 분리하였다. 분리된 균주 배양액으로 paperdisk를 이용하여 항균력을 측정 결과, 항균력이 우수하게 나타난 7균주를 선별하였다. 하지만 API Kit를 통한 1차 동정 결과 2균주가 같은 균종으로 나타나서 최종적으로는 6균주가 선별되었고 Lp, Lf, Lb, P1, P2, 그리고 P3로 명명하였다.

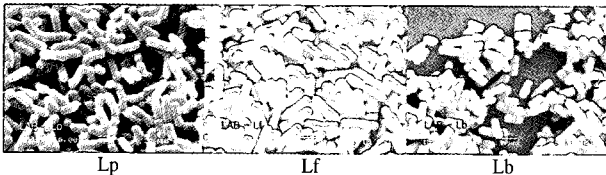


Figure 1. Scanning electron microscope of the strain *Lactobacillus* sp. (Lp, Lf, and Ld) cultured on MRS medium for 24 hrs ($\times 10,000$).

균주의 동정

각 균주들의 형태학적 및 배양학적 특성은 P3를 제외하고는 대부분이 비슷하였다. MRS 배지 상에서의 성장된 colony의 모습은 원형이면서 볼록하고, 밝은 미색이면서 불투명한 전형적인 유산균의 형태를 보였으며, catalase test 결과는 음성으로 모든 균주가 동일하게 나타났다. 그러나 현미경에서 관찰된 각각의 균 형태는 모두 조금씩 차이가 있었으며, 특히 P3는 구균으로 크기가 $0.6 \times 1.0 \mu\text{m}$ 의 단일세포 또는 둘로 쌍을 이루고 있었다. 나머지 균주들은 길이가 $0.6 \sim 1.1 \times 1.5 \sim 8.0 \mu\text{m}$ 등인 간균으로 표면상태와 형태가 균주마다 조금씩 차이가 있었다. API Kit를 사용하여 분리균주의 당 이용성 여부를 바탕으로 1차 동정한 결과, Lf는 67.3% *L. fermentum*, P3는 70% *Pediococcus pentosaceus* 등으로 낮은 유사성만을 나타내었고, Lp는 99.5% *L. paracasei*. Lb는 99% *L. brevis* 그리고 P1과 P2는 99.9% *L. plantarum*의 일치성을

나타내어 분리된 균주 전부 생균제로 사용할 수 있는 안전한 균주로 확인되었다. 그러나 당 이용성에서 특정 균주와 99.9% 이상의 높은 일치성을 나타내어도 16S rRNA의 염기서열 분석 등을 통한 동정을 하면 전혀 다른 균주로 나타나기 때문에(9) 2차적인 정확한 동정 작업이 필요하다고 판단된다.

Table 1. Morphological and cultural characteristics of isolated *Lactobacillus* sp. and *Pediococcus* sp. strains

Characteristics	Lp, Lf, Lb, P1, P2	P3
Cell shape	rod	cocci
Arrangement	single	single ~ tetrads
Size(µm)	0.6~1.1 × 1.5~8.0µm	0.6 × 1.0µm
Gram stain	+	-
Motility	-	-
Spore formation	-	-
Colony on MRS agar		
Form		Circular
Color		White
Elevation		Convex
Margine		Entire
Opacity		Opaque

배양 특성

MRS 배지를 기본배지로 하여 각 균주들의 최적 성장온도와 pH를 측정하였다. 대부분의 균주는 37°C에서 최적의 성장온도를 나타내었으나, Lf는 *L. fermentum*과 유사하여 오히려 45°C에서의 성장이 더 빨랐다(10). 반면 Lp, Lb 그리고 P2는 45°C정도의 온도에서도 전혀 성장하지 못하는 민감성을 나타내었다. P1은 당 이용성으로 확인하였을 때는 P2와 동일한 *L. plantarum*으로 나타났는데, 45°C에서도 잘 성장하였다. Lb는 37°C에서의 성장속도가 다른 균주에 비해 유난히 느렸다. pH의 변화는 37°C에서 배양할 때 약 18시간 경과 후에는 대부분이 3.8대이었으나 Lf와 Lb는 4.4대를 유지하였다. pH의 변화는 항균력과 비례관계를 나타내어 낮은 pH일수록 높은 항균력을 나타내었는데, 이는 왕성한 유기산의 생성 때문인 것으로 판단된다.

Table 2. pHs and acidities of culture broth of isolated *Lactobacillus* sp. and *Pediococcus* sp. strains

	pH	Acidity
Lp	3.84	1.98
Lf	4.43	1.22
Lb	4.65	0.99
P1	3.87	1.91
P2	3.88	1.96
P3	3.87	1.96

각 균주들의 다양한 초기 pH에 따른 배양 결과는 pH 7에서 성장이 가장 좋았다. pH 5는 성장속도에 있어서 pH 7과 차이가 심하지는 않았으며, pH 9에서는 균의 초기 성장에 저해를 주었다. 그러나 Lf는 pH 3에서 초기에는 강한 산의 영향을 받아서 잘 성장하지는 않았지만, 낮은 산도에 대한 저항성을 나타내어서 다른 대부분의 균이 낮은 pH에서는 사멸하는 것과 달리 이 균주는 오히려 조금씩 성장하는 것이 관찰되었다.

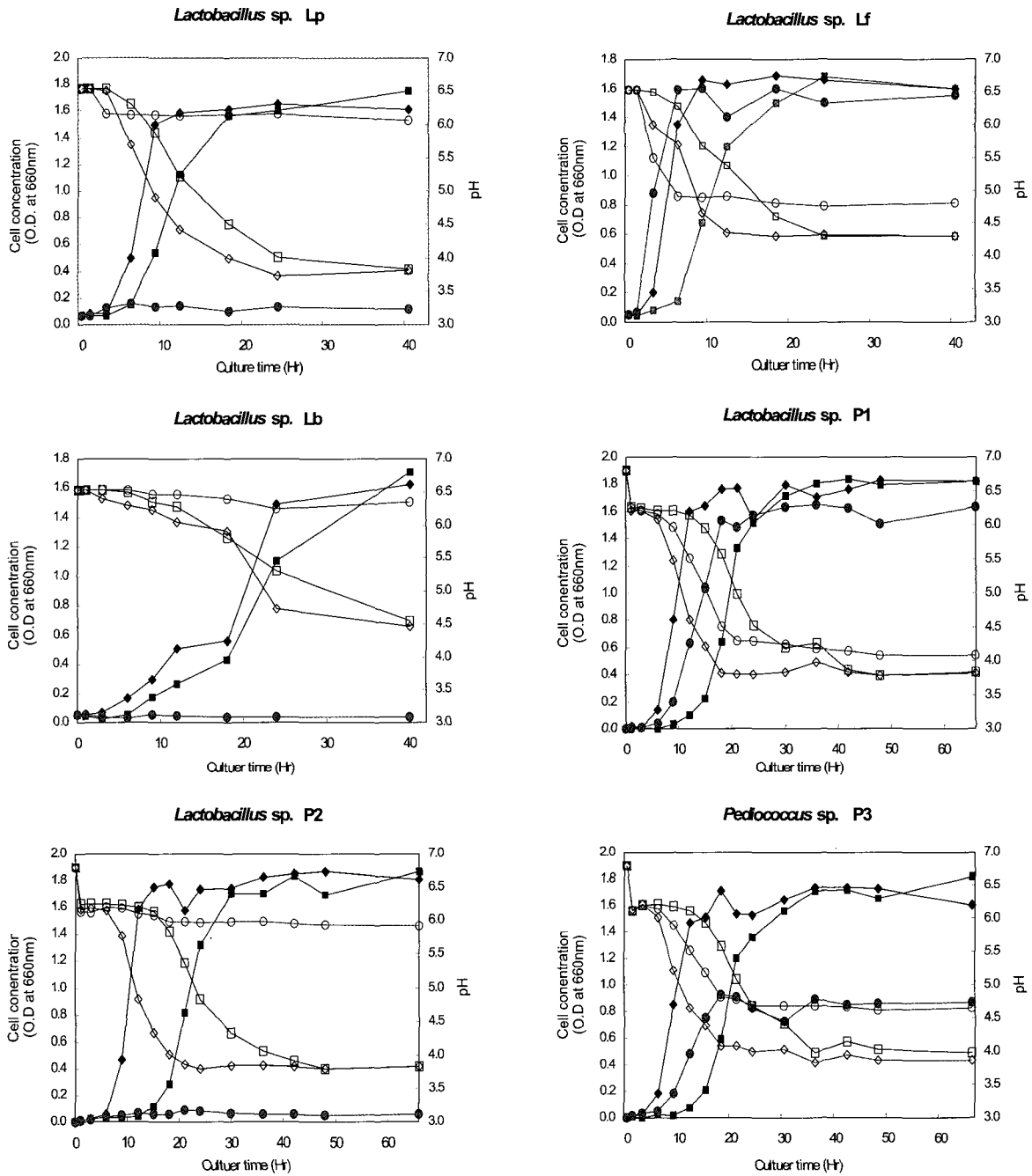


Figure 2. Growth curves of each isolated lactic acid bacteria strains at 25°C, 37°C, 45°C and pH change during cultivation. ■ : Cell concentration at 25°C, ◆ : Cell concentration at 37°C, ● : Cell concentration at 45°C, □ : pH change at 25°C, ◇ : pH change at 37°C, ○ : pH change at 45°C.

내산성 및 내담즙성

산에 대한 저항성은 Lf를 제외하고는 다소 낮은 측정결과를 나타내었다. Lf는 pH 2에서 40분간 처리하였을 때 초기 생균수 대비 80%의 생존률을 나타내었는데, 대부분의 *Lactobacillus* sp. 균주가 pH 2에서 초기 30분 안에 10% 미만의 생존률을 나타내는 것과 비교하면 산에 대한 내성이 매우 높은 균주라고 하겠다. 특히 내산성이 우수한 대부분의 균주가 항생제 내성이 우려되는 *Enterococcus* sp.인데, 본 시험균주는 사람이나 동물에게 안전하게 사용할 수 있는 *Lactobacillus* sp.란 점에서 Lf의 우수한 내산성은 더 큰

의미가 있다. 그 외의 다른 균들을 3% 정도의 생존률만을 나타내었다.

분리균주들의 내담즙성은 우수하였다. Lp, Lb, P1, 그리고 P2를 0.3% bile salt가 들어있는 배지에 처리하면 초기에는 생균농도가 줄어들지만, 서서히 생균농도가 증가하여 8시간 경과 후에는 오히려 초기 접종농도보다 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. Lf는 처리 후 40분까지 80%의 생존률을 나타내지만 계속 줄어들었고, P3는 사멸 후 생균농도가 점점 늘어나지만 그 속도가 매우 느렸다. 최종적으로 배양한 후 pH는 P1 3.84, P2 3.94, 그리고 P3가 3.96을 나

타내어 정상적인 배양의 결과와 동일하였다.

Table 3. Viabilities of various isolated lactic acid bacteria strains at pH 2 in MRS broth

	Lp		Lf		Lb	
	Cell conc.*	Viability**	Cell conc.	Viability	Cell conc.	Viability
start	3.4×10^7	100	5×10^7 /ml	100	6×10^7	100
40 min	10^3	0.01	4×10^7 /ml	80	2×10^6	3.3
4 hr	0	0	7.2×10^6 /ml	18	3.3×10^1	0
8 hr	0	0	2×10^4 /ml	0.05	0	0

* Cell conc.: CFU/ml, ** Viability: %

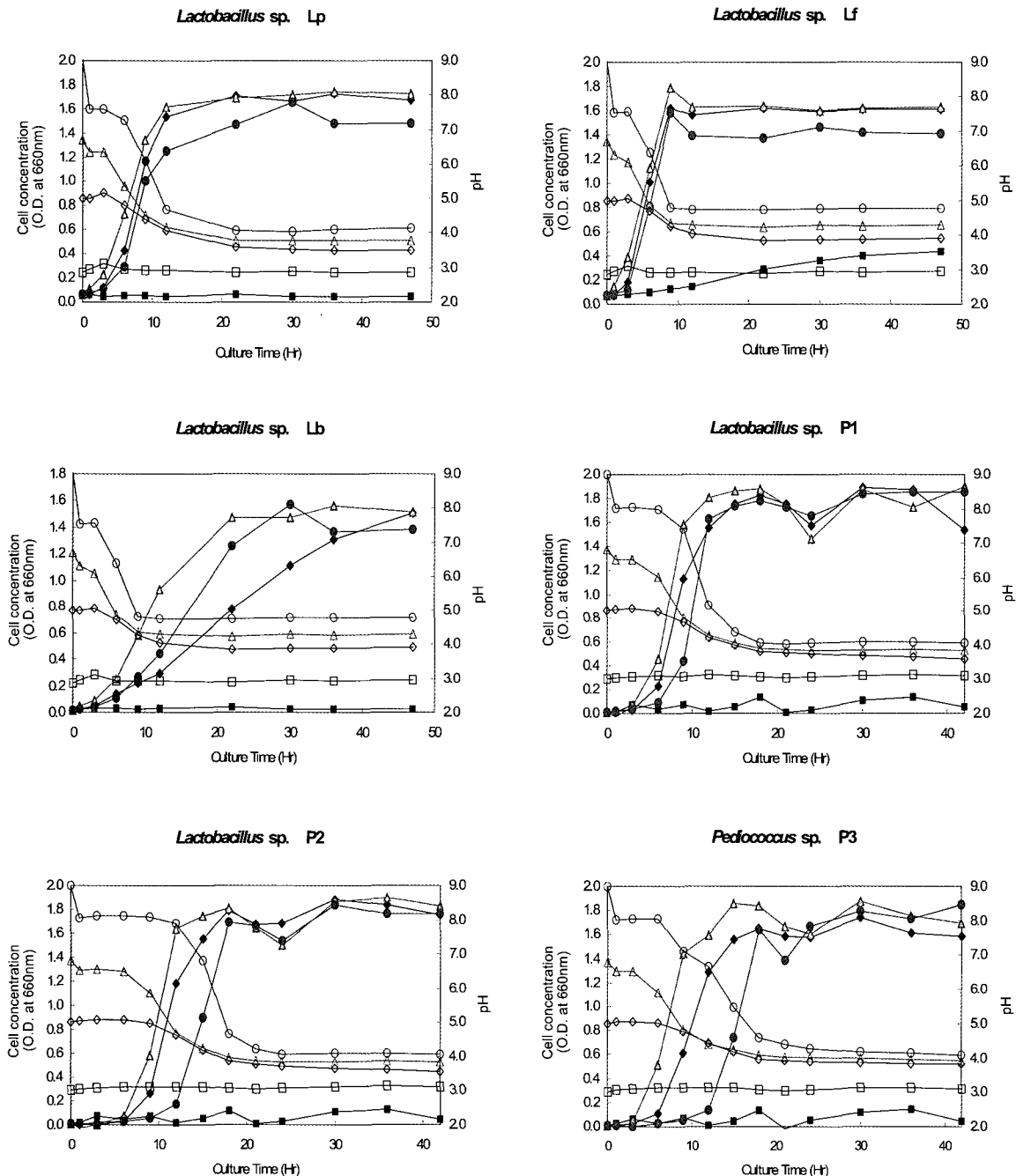


Figure 3. Growth curves of each isolated lactic acid bacteria strains at initial pH 3, pH 5, pH 7, pH 9 and pH change during cultivation. ■ : Cell concentration at initial pH 3, ◆ : Cell concentration at initial pH 5, ▲ : Cell concentration at initial pH 7, ● : Cell concentration at initial pH 9, □ : pH change at initial pH 3, ◇ : pH change at initial pH 5, △ : pH change at initial pH 7, ○ : pH change at initial pH 9.

Table 4. Viabilities of various isolated lactic acid bacteria strains at 0.3% bile salts in MRS broth

	Lp		Lf		Lb	
	Cell conc.*	Viability**	Cell conc.	Viability	Cell conc.	Viability
start	3.4×10^7	100	5×10^7	100	6×10^7	100
40 min	2×10^7	58.8	4×10^7	80	3.2×10^7	53.3
4 hr	2.5×10^7	76.5	4.7×10^6	9.4	5×10^7	83.3
8 hr	3.6×10^7	105.9	3.7×10^6	6.5	1.7×10^8	283.3
	P1		P2		P3	
start	1.0×10^8	100	4.7×10^9	100	4.5×10^{10}	100
40 min	1.9×10^7	19	3.0×10^7	0.6	1.6×10^7	0.04
3 hr	2.9×10^7	29	3.4×10^7	0.7	2.7×10^7	0.06
6 hr	1.8×10^8	179	1.9×10^8	4	2.0×10^8	0.4
9 hr	4.1×10^8	408	3.1×10^8	7	2.6×10^8	0.6
16 hr	1.0×10^9	1000	1.4×10^{11}	3000	9.5×10^9	21

* Cell conc.: CFU/ml, ** Viability: %

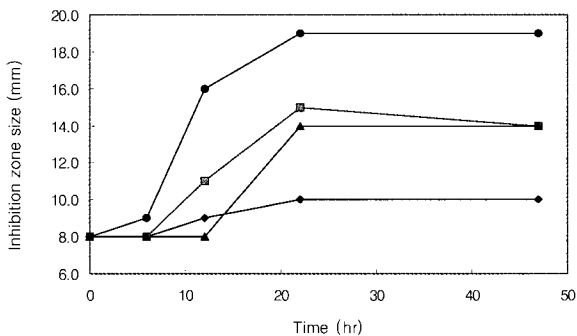


Figure 4. Antibacterial activities of the strain Lp against various pathogens during cultivation at 37°C (pH 7) (◆: *E. coli*, ■: *Staphylococcus aureus*, ▲: *Salmonella gallinarum*, ●: *Pseudomonas aeruginosa*).

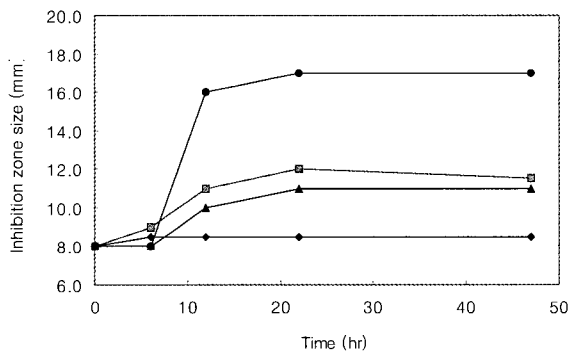


Figure 5. Antibacterial activities of the strain Lf against various pathogens during cultivation at 37°C (pH 7) (◆: *E. coli*, ■: *Staphylococcus aureus*, ▲: *Salmonella gallinarum*, ●: *Pseudomonas aeruginosa*).

항균활성

처음에는 선별된 각 6균주의 배양액량을 달리하여 항균력을 측정된 결과가 100 μl와 200 μl의 처리군에서 clear zone 크기의 차이가 거의 없었다. *P. aeruginosa*만이 약간의 차이가 날 뿐이었는데, 원인은 고체배지 표면의 건조상태가 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉 agar diffusion method에서 배양액의 확산이 시험배지 표면의 건조 정도에 따라서 달라진 것이다. 그러므로 분리균주들의 항균력을 측정할 때는 petridish에 미리 공시균주 배지를 분주한 다

음, 배지표면을 cleanbench의 fan을 이용하여 건조한 후 다시 공시균이 현탁된 배지를 건조된 배지 위에 증충하고, 증충된 배지는 시험 1시간 전부터 다시 cleanbench에서 fan을 이용하여 건조한 다음 사용하였다. 이렇게 실험한 결과 100 μl와 200 μl의 배양액의 양에 따른 항균력은 공시균주 별로 약 10~20% 정도의 차이를 나타내었다. 각 배양 조건에 따른 항균력도 이와 같은 동일한 방법으로 측정하여 실험 결과를 얻었다.

분리한 각 유산균들의 배양시간에 따른 항균력의 변화를 측정하였다. 각 균주들을 pH 6.7의 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 배양한 결과, 배양 후 6시간부터 항균물질을 분비하기 시작하고 약 20시간에는 최대의 항균력을 나타내면서 계속 유지되었다.

그러나 Lf의 경우 45°C에서 배양시간의 경과에 따른 항균력 측정 결과는 12시간부터 최대의 항균력을 보이다가 22시간과 47시간 경과한 때에 약 5% 정도 항균력이 약해짐을 측정할 수 있었다. 이것은 45°C의 고온에서 배양이 휘발성 유기산을 배양액에서 빨리 빠져나가게 하기 때문인 것으로 추측되었다.

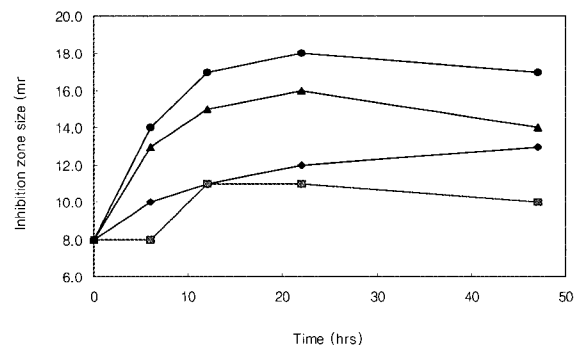


Figure 6. Antibacterial activities of the strain Lf against various pathogens during cultivation at 45°C (pH 7) (◆: *E. coli*, ■: *Staphylococcus aureus*, ▲: *Salmonella gallinarum*, ●: *Pseudomonas aeruginosa*).

선별된 6종류의 균을 최적 온도 37°C와 최적 pH 7에서 MRS broth로 2일간 배양한 다음, 균체를 제거한 배양액을 가지고 4종의 병원성 균주를 대상으로 항균력을 측정하였다. P1은 *S. gallinarum*에 직경 25 mm 크기의 저해환을 나

타낸 것을 비롯하여, *P. aeruginosa*는 28 mm, *E. coli* 20.5 mm, 그리고 *S. aureus*는 24 mm를 나타냄으로써 분리된 유산균 중 가장 강력한 항균력을 나타내었다. 시험에 사용된 6균주의 유산균 중에서 가장 낮은 항균력을 나타낸 것은 Lb이었다.

Table 5. Antibacteria activity of each isolated lactic acid bacteria strains against pathogens

Strain	Diameter(mm) of inhibition zone			
	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Control (MRS)	0.0	0.0	0.0	0.0
Lp	20.0	17.0	20.0	26.0
Lf	19.0	11.5	15.0	22.5
Lb	13.0	13.0	9.0	16.0
P1	25.0	20.5	24.0	28.0
P2	22.5	18.0	23.0	28.0
P3	21.0	18.5	21.0	25.0

Helicobacter pylori 저해력

분리된 균주로 헬리코박터균 (*Helicobacter. pylori* ATCC 43504)의 저해여부를 실험한 결과, 매우 강력한 저해활성을 관찰하였다. 특히 P1과 P2는 저지환이 매우 커서 대조군으로 사용한 *Lactobacillus pentosus*보다도 월등하였으며, Lp도 강력한 저해력을 나타내었다. 단순히 2% (v/v) lactic acid 용액으로 헬리코박터를 저해할 때는 저해력이 나타나지 않았는데, 이런 결과와 비교하면 이들 균주의 배양액에는 특별히 헬리코박터의 성장을 저해하는 대사산물이 포함되어 있으리라 판단된다(11, 12). MRS 배지 자체는 헬리코박터의 저해력이 없었다.

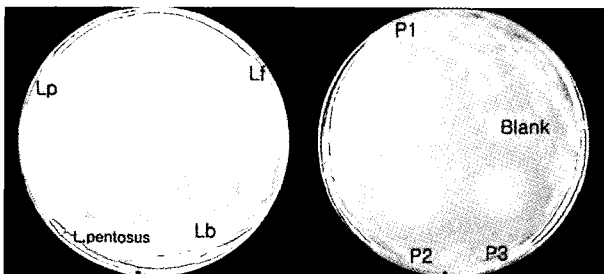


Figure 7. The inhibition of *Helicobacter pylori* ATCC 43504 by the filtrate of culture supernatant from various isolated lactic acid bacteria strains. Blank means MRS broth.

Table 6. Sensitivities of various isolated lactic acid bacteria strains and pathogens against antibiotics

	Lp	Lf	Lb	P1	P2	P3	S.gal	E.coli	S.a	P.a
Gentamycin	0.0	8.0	12.0	0.0	6.5	0.0	27.0	18.0	10.0	15.0
Erythromycin	24.5	20.0	20.5	9.0	11.5	20.0	7.0	7.0	19.0	9.0
Cephalothin	0.0	8.5	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	0.0	17.0	7.0
Amoxicillin/clavulanic acid	11.5	16.0	12.0	8.0	14.0	6.5	11.0	7.0	20.0	8.0
Ciprofloxacin	13.0	7.0	0.0	0.0	6.0	0.0	18.0	24.0	24.0	23.0
Oxytetracycline	22.0	19.5	11.5	0.0	0.0	0.0	16.0	13.0	21.0	24.0
Neomycin	0.0	8.5	11.5	0.0	0.0	0.0	25.0	9.0	10.0	16.0
Ampicillin	13.0	17.0	15.0	8.5	14.0	10.0	11.0	12.0	30.0	12.0
Streptomycin	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	0.0	14.0	13.0	11.0	23.0
Colistin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0	13.0	7.0	10.0

Gentamycin 10 µg, Erythromycin 15 µg, Cephalothin 30 µg, Amoxicillin/clavulanic acid 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Oxytetracycline 30 µg, Neomycin 30 µg, Ampicillin 10 µg, Streptomycin 10 µg, Colistin 10 µg

항생제 감수성 측정

분리된 유산균주의 항생제 감수성을 측정하였다. 대조군으로 공시균주도 함께 측정하였는데, 공시균주는 대부분의 항생제에 민감하게 저해됨을 나타내었으나, 분리균주는 대부분 저항성을 나타내었다. 특히 P1의 경우 erythromycin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin의 세 종류에만 감수성을 나타내고, 대부분의 다른 항생제에는 저항성을 나타내어서 생균제로 가축에 급여시 항생제와 병용 사용도 가능하므로 이용성이 우수한 균주로 판단되었다, P2와 P3도 우수한 저항성을 나타내었으며, Lp, Lf 그리고 Lb는 5개에서 8개의 항생제에 감수성을 나타내었다.

모든 실험의 결과를 종합하여 보면, 본 연구실에서 분리한 유산균주들은 복합 생균제품으로 가축에게 급여할 때, 위에서는 더 오랜 시간동안 생존하면서 유해한 병원균의 활성은 강력하게 저해할 수 있는 산업적 이용성이 강한 균주로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Park, K. J. and Y. W. Ryu (1995), Antibacteria activity of *Lactobacillus* sp. KJ-5 isolated from pig feces, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 553-560
- Lee, J. K., W. T. Kim, J. H. Lee, J. H. Yu, and W. C. Shin (1991), Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria for Preparation of Probiotics, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **19**(5), 429-432
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and T. Mattila-Sandholm (2000), Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties, *J. Biotechnol.* **84**, 197-215
- Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1992), *Microbiology : a laboratory manual*, 3rd ed., p171, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (1986), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2*, p1209, WILLIAMS & WILKINS, Baltimore.
- Lee, J. Y., K. Y. Hwang, H. S. Kim, K. Kim, and S. I. Sung (2002), Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Inhibiting Gastro-intestinal Pathogenic Bacteria of Domestic Animal, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**(2), 129-134
- Kim, S. U., W. B. Kim, M. Y. Park, C. I. Yang, S. H. Min, S. H. Rhee, and Y. B. Kim (1977), Studies on the Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and its Utilization for Pharmaceutical Preparation, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **5**(4), 171-176

8. Park, Y. S. (2002), Isolation of Lactic Acid Bacteria Inhibiting *Helicobacter pylori* and Characterization of the Inhibition Substance, M. S. Thesis, Dept. of Genetic engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do.
9. Marja Inés Castellanos, Abel Chauvet, Alain Deschamps, and Christian Barreau (1996), PCR Methods for Identification and Specific Detection of Probiotic Lactic Acid Bacteria, *Current Microbiology*, **33**, 100-103
10. Kim, J. H., M. Y. Park, S. C. Kim, H. S. Yun, and J. S. So (2003), Improved Viability and Proteome Analysis of *Lactobacillus fermentum* KLB12 upon Heat Stress, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18(4)**, 294-300
11. Lee, J. Y., K. Y. Hwang, K. Kim, S. I. Sung, Y. S. Park, M. J. Bak, and K. R. Kim (2002), Characteristics of antimicrobial organic acids produced by *Lactobacillus pentosus* K34 isolated from small intestines of Korean native chickens, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30(3)**, 241-246
12. Roy Fuller (1992), *Probiotics The scientific basis*, 1st ed., p218, CHAPMAN & HALL, London