

돼지 장내로부터 분리된 항생제 저항성 *Pediococcus pentosaceus*의 특성

이미성^{1,2} · 윤기홍^{1,2*}

우송대학교 ¹식품영양 · 식품과학부, ²생물소재 응용연구센터

Characterization of *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Porcine Intestine. Lee, Mi-Sung^{1,2} and Ki-Hong Yoon^{1,2*}. ¹School of Food Science & Biotechnology, ²Bioresource and Application Research Center, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea – A lactic acid bacterial strain resistant to several antibiotics such as oxytetracycline, tylosin, neomycin and sulfathiazole, which have been often used as a therapeutic agent in livestock, was isolated from the porcine gastrointestinal tract. The isolate YB-55 was identified as belonging to the genus *Pediococcus* with the highest similarity to *P. pentosaceus* on the basis of its 16S rRNA sequence and biochemical properties. The isolated strain showed viability of over 85% at pH 3.0 and was resistant to bile salt. The strain produced lactic acid of 12.3 g/L by jar fermentation and maintained its viability in the presence of antibiotics at dosage related therapeutic effect, suggesting *P. pentosaceus* YB-55 may offer potential as a probiotics for livestock.

Key words: *Pediococcus pentosaceus*, identification, antibiotic resistance, lactic acid bacteria

사료첨가용 항생제는 1950년대부터 가축의 성장촉진제로 널리 사용되어 왔으나 육제품에 항생제의 잔류로 인한 잠재적 위해성이 제기되면서 전세계적으로 사용이 규제되고 있는 경향이다. 그러므로 항생제는 가축의 질병치료에만 사용하고 항생제를 대체할 수 있는 생육촉진제의 개발이 필요하게 되었다. 생균제는 이러한 목적에서 개발되었으며, 1989년 Fuller에 의해 장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익한 작용을 유도할 수 있는 생균제제로 그 개념이 확정되었다[6]. 생균제를 가축의 사료에 혼합 사용할 경우 생육촉진제로서의 효과가 입증되었는데 Pollmann 등은 돼지에서 체중 증가의 결과를 얻었다고 보고하였다[13]. 또한 국내에서도 장 등이 돼지에 유산균을 첨가한 사료를 급여하였을 때 증체율이 증가되는 것을 확인하였다[3].

유산균과 효모는 생균제용 미생물로 가장 많이 사용되고 있으며, 유산균의 경우 그 생리적 유용성과 상품성의 편의성에 따라 *Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속 및 *Enterococcus*속 등에 속하는 균주들의 이용성이 높다[6, 9]. 그리고 다양한 특성의 유산균이 가축의 장내와 김치로부터 분리되어 가축의 질병예방 및 생산성 향상을 위한 생균제용 균주로 개발되고 있다. 생균제용 유산균의 효능이 발휘되기 위해서는 기본적으로 위산이나 담즙에 내성이 있어야 하며 장내에서 식하여 유기산 생성능이 있어야 한다. 그리고 가축의 질병을 치료하기 위한 목적뿐만 아니라, 상황에 따라서는 사료 급여시에도 일정량의 항생제가 사용되고 있는 현실에 비추

어 볼 때 일정농도의 항생제에 견딜 수 있는 유산균은 특정 조건에서 생균제용 미생물로 사용가치가 있다고 판단된다 [11]. 따라서 본 연구에서는 가축용으로 자주 사용되는 항생제에 의해 생존에 영향을 받지 않는 유산균을 돼지 장내로부터 분리하고 그 특성을 조사하였다.

항생제 내성 유산균의 분리 및 특성

돼지 장내물질을 추출하여 MRS 평판배지(proteose peptone; 10 g, beef extract; 10 g, yeast extract; 5 g, dextrose; 2 g, polysorbate 80; 1 g, ammonium citrate; 2 g, sodium acetate; 5 g, magnesium sulfate; 0.1 g, manganese sulfate; 0.05 g, dipotassium phosphate; 2 g, agar; 18 g, water; 1 liter)에 도말한 후 37°C에 배양하여 총 109 종의 유산균을 분리하고 이들 중 항생제에 내성이 우수한 유산균을 탐색하였다. 이를 위해 분리균을 MRS 액체배지에 배양한 후 가축의 치료용이나, 사료첨가용으로 자주 사용되는 항생제인 oxytetracycline(100 ppm), tylosin(110 ppm), neomycin (100 ppm) 및 sulfathiazole(100 ppm) 등의 항생제가 각각 첨가된 MRS 평판배지와 이들 항생제가 포함되지 않은 MRS 평판배지에 각각 도말하여 약 48시간 배양한 후 항생제를 넣지 않은 배지에서 자란 유산균의 생균수와 항생제가 첨가된 배지에서 자란 유산균의 생균수를 측정하였다. 그리하여 상기의 4 종류의 항생제에 대해 모두 생존율에 영향을 받지 않은 1개 균주를 최종 선별하였다.

선발된 균주가 생균제용 미생물로서 요구되는 기본성질을 보유하고 있는지 확인하기 위해 내산성과 내담즙성을 조사하였다. 내산성을 측정하기 위한 실험은 *in vivo*에서 직접 생존율을 확인하는 방법과 인공위약을 이용한 간접적으로 측

*Corresponding author

Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

정하는 방법이 알려져 있는데, 생균의 사멸은 주로 낮은 pH에 의해 일어나므로 *in vivo*와 *in vitro*에서의 실험결과가 거의 일치한다는 사실이 보고되어 있다[1, 4]. 본 실험에서 선발된 YB-55 균주의 내산성을 조사하기 위해서는 MRS에서 배양된 균체를 0.85% NaCl 용액으로 2차례 세척한 후 pH를 3, 4, 5로 조절한 50 mM sodium phosphate 용액에 방치하였다. 방치후 10~120분 사이에 일정 간격으로 균액을 취해 MRS 평판배지에 도말하여 생존율을 조사한 결과 pH 4이상에서는 120분간 방치한 후에도 100%의 생존율을 보였으며 pH 3에서는 10분에서 120분까지 85% 이상의 생존율을 나타내었다. 이는 내산성이 뛰어난 유산균 보다는 낮지만, 산에 의한 사멸정도가 큰 것은 아니라 판단된다. 한편 Gilliland 등은 생균제가 가져야 할 담즙액에 대한 내성은 oxgall(0.3%)이 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다고 보고한 바 있다[7]. 그러므로 YB-55 균주의 담즙에 대한 내성을 조사하기 위해 0.3%(w/v) oxgall이 함유된 MRS broth와 oxgall이 함유되지 않은 MRS broth에 각각 접종하여 37°C에서 2시간 동안 방치한 후 생균수를 측정하였다. 그 결과 oxgall의 첨가여부에 관계없이 생균수가 유사한 것으로 확인되어 분리균 YB-55는 oxgall에 내성을 지니고 있는 것으로 여겨진다.

분리균의 동정

상기의 분리균 YB-55를 현미경으로 관찰한 결과 그람양성 구균으로 확인되었으며, 이를 동정하기 위해 균의 특성을 조사하였다. 분리균의 생화학적 특성은 API 50 CHL kit(Biomereux, France)를 사용하여 조사하였다. 이를 위해

분리균을 MRS 액체배지에서 하룻밤 진탕배양하고 균체를 회수하여 0.85% NaCl 용액에 현탁한 후 McFarland 2 표준탁도가 되도록 API 50 CHL 배지로 희석하였다. 이러한 균 현탁액을 튜브에 주입하여 접종한 후 24~48시간 배양하면서 탄수화물의 발효여부를 확인한 결과 분리균은 L-arabinose, ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, maltose, cellobiose, lactose, trehalose, D-tagatose 등을 이용하였으며, xylose, D-arabinose, saccharose, melibiose 및 각종 당알콜을 발효하지 못하였다. 이들 탄수화물의 발효여부의 결과를 database와 비교한 결과 분리균은 *Pediococcus pentosaceus*와 82.2%의 유사도를 보인 것으로 확인되었다.

분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하였다. 중합효소 연쇄반응은 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(염기서열 위치 9~27 지역), 5'-AGAAAGGAGGTGATC-CAGCC-3'(염기서열 위치 1523~1542 지역)을 primers로 사용하였으며, 분리균 YB-55로부터 분리한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액 조성과 반응조건은 권 등이 실시한 조건과 동일하게 사용하였다[10]. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 정제하여 dye terminator cycle sequencing kit와 373A automate DNA sequencer(Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열(GenBank accession No. DQ267152)은 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교하여 높은 상동성을 나타내는 세균 그룹을 1차적으로 선별하였다. 분리균의 정

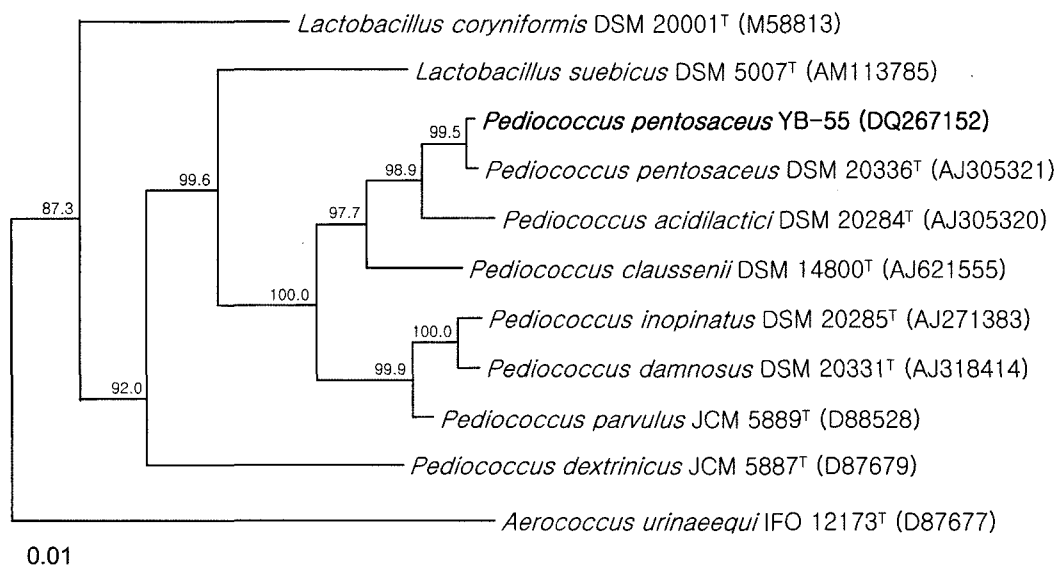


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA sequences of *Pediococcus pentosaceus* YB-55 and other related strains belonging to genera *Pediococcus* and *Lactobacillus*. Bootstrap values are shown in percentages of 1000 replicates. *Aerococcus urinaeequi* IFO 12173T was used as an out group. GenBank accession numbers were described in parenthesis. The scale bar is equal to 0.01 changes per nucleotide position.

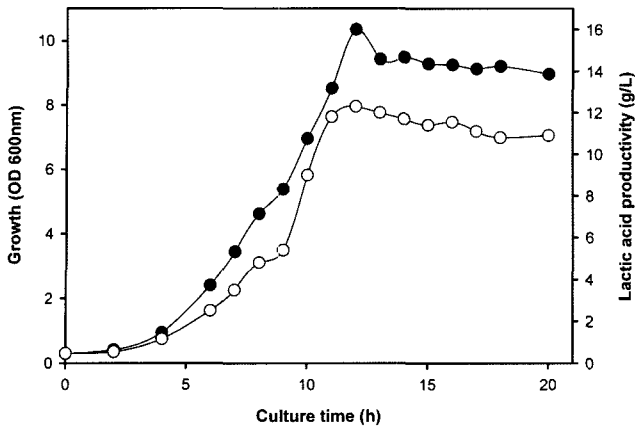


Fig. 2. Growth and lactic acid production of *P. pentosaceus* YB-55. *P. pentosaceus* YB-55 was grown in MRS broth of the fixed pH 6.0 at 37°C with agitation (280 rpm) and aeration. The cell growth (closed symbols) was determined by measuring absorbance at 600 nm. Amount of lactic acid (open symbols) was determined with the culture filtrate.

확한 계통학적 분석을 위해서 CLUSTAL W software를 사용하여 선별된 균주들의 16S rRNA 염기서열과 비교하고, 5', 3'의 gap을 제거하거나 적절히 수정한 후, 분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다[5]. 분자진화거리는 DNADIST 프로그램속의 Jukes & Cantor[8]의 알고리즘을 이용하여 계산하였고 최종적인 계통수는 NEIGHBOR 프로그램 속의 neighbor-joining method[14]에 기초해서 작성하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 분리균의 16S rRNA는 *P. pentosaceus*와 가장 유사도가 높았고, 이러한 결과는 생화학적 특성의 결과와 일치하였으므로 분리균을 *P. pentosaceus* YB-55로 명명하였다.

한편 MRS 평판배지에 도달하여 37°C에서 하룻밤 배양된 균체의 지방산을 Microbial Identification System(MIDI)의 지침에 의해 추출한 후 분리균 YB-55의 세포막 지방산 조성을 분석하였다(Table 1). 지방산 조성의 유사성을 다른 균주와 비교한 결과 분리균은 *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* 및 *L. plantarum*과 유사성이 있는 것으로 확인되었으나, 그 유사도는 각각 0.363과 0.321로 낮았다. 그리고 분리균 YB-55의 16S rRNA의 염기서열도 이들 균주와는 유사도가 낮은 것으로 확인되었다. 돼지의 장관내에서 분리된 *Pediococcus*가 보고된 바는 있지만[2], *Pediococcus* 속의 균주는 주로 김치에서 많이 발견되고 있으므로 본 연구에서 돼지 장관내에서 분리된 YB-55가 *Pediococcus*속 균이라는 것은 드문 경우에 속한다고 판단된다.

P. pentosaceus YB-55 분리균의 유기산 생성능

최근에 김치에서 분리된 *P. pentosaceus*가 조류독감을 예방할 수 있는 가능성에 대해 관심이 높아지고 있는데, 본 연구를 통해 분리된 *P. pentosaceus* YB-55도 생균제로 이용하

Table 1. Fatty acid composition of cell membrane from *P. pentosaceus* YB-55.

Fatty acid	Percentage of total
Straight chain fatty acid:	
C _{14:0}	3.91
C _{16:0}	41.30
Unsaturated fatty acid:	
C _{18:1} ω _{9c}	9.23
Summed features*:	
4	7.49
7	32.55
9	5.52

*Summed features represent groups of two or three fatty acids that could not be separated by GLC with the MIDI system. Summed feature 4 contained one or more of C_{16:1} ω_{7c} and/or iso C_{15:0} 2-OH. Summed feature 7 contained one or more of C_{18:1} ω_{7c}, C_{18:1} ω_{9t} and/or C_{18:1} ω_{12t}. Summed feature 9 contained one or more of cyclo C_{19:0} ω_{10c} and/or unknown fatty acid of ECL 18.858.

Table 2. Lactic acid production of *P. pentosaceus* YB-55 in flask culture.

Growth temperature (°C)	Lactic acid productivity (g/L) on MRS broth of initial pH	
	6	7
30°C	6.6	5.8
37°C	7.0	6.9

기 위해서는 여러 가지 연구가 요구된다. 유산균이 생산하는 젖산은 정상효과에 관련이 있으므로 분리균의 젖산 생성능을 조사하였다. 분리균을 MRS 배지에 접종하여 각각 30°C와 37°C에서 하룻밤 동안 진탕배양 한 후 배양상등액을 준비하였다. 배양상등액의 젖산을 lactate oxidase로 반응하여 pyruvate와 과산화수소(H₂O₂)로 전환시킨 후 생성된 H₂O₂를 peroxidase로 반응시켜 이 과정 중 산화된 발색전구체의 발색정도를 540 nm에서 흡광도를 측정함으로써 젖산의 정량 분석을 실시하였다. 이때 Sigma사의 젖산분석용 시약인 Lactate Reagent(No. 735-10)를 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 그 결과 Table 2에서 보인 바와 같이 배양온도 37°C, 최초배지 pH 6.0에서 배양하였을 때 7.0 g/L로 가장 높은 젖산 생성능을 보이는 것으로 나타났다.

발효조에서 *P. pentosaceus* YB-55의 성장과 젖산 생산성을 조사하기 위해 MRS배지를 사용하여 배양 pH를 6.0으로 유지하고 37°C에서 배양하면서 일정시간 마다 배양액을 취해 배양액 흡광도와 젖산을 정량하였다. 그 결과 균의 성장에 따라 젖산 생성량이 증가하였으며, 접종 후 12시간이 되었을 때 균의 성장도와 젖산의 생성량이 최대에 이르는 것으로 확인되었다. 배양조건에 따라 차이가 있겠지만, 분리균 *P. pentosaceus* YB-55의 젖산 생산성은 12.3 g/L로 *Lactobacillus acidophilus*(8.9 g/L), *L. rhamnosus*(9.1 g/L),

L. reuteri(5.7 g/L) 및 *L. casei*(8.0 g/L) 보다 비교적 높았다[12]. 따라서 본 연구를 통해 분리된 *P. pentosaceus* YB-55는 생균제로서 개발 가치가 있다고 판단된다.

REFERENCES

- Berrada, N., J. F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, and M. Piaia. 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* **74**: 409-413.
- Casey, P. G., G. D. Casey, G. E. Gardiner, M. Tangney, C. Stanton, R. P. Ross, C. Hill, and G. F. Fitzgerald. 2004. Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**: 431-438.
- Chang, Y. H., J. K. Kim, H. J. Kim, W. Y. Kim, Y. B. Kim, and Y. H. Park. 2000. Probiotic effects of *Lactobacillus reuteri* BSA-131 on piglets. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 8-13.
- Conway, P. L., S. L. Gorbach, and B. R. Goldin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**: 1-12.
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.6a, Seattle: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Gilliland, S. E., T. E. Staley, and L. J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045-3051.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. pp. 21-132. In H. N. Munro. (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York.
- Kurman, J. A. 1983. The development and significance of new cultures with bifidobacteria as an example. *North. Eur. Dairy J.* **3**: 65-74.
- Kweun, M. A., H. S. Kim, M. -S. Lee, J. H. Choi, and K. -H. Yoon. 2003. Mannanase production by a soybean isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 277-283.
- 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. Biotechnol.* **19**: 429-432.
- Park, J. G., S. Y. Yun, S. J. Oh, J. G. Shin, and Y. J. Baek. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from Korean breast-fed infant. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 1244-1247.
- Pollman, D. S., D. M. Danielson, and E. R. Poe, Jr. 1980. Effect of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **51**: 577-581.
- Sautou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

(Received Nov. 4, 2005/Accepted Dec. 1, 2005)