

오리로부터 박테리오신을 생산하는 프로바이오틱 미생물의 분리 및 특성

신명수* · 한선경** · 지애란* · 함미랑* · 김경수* · 이완규**

(주)오비티 한국생명과학연구소*, 충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소**

Isolation and Characteristics of Bacteriocin-producing Bacteria from the Intestine of Duck for Probiotics

M. S. Shin*, S. K. Han**, A. R. Ji*, M. R. Ham*, K. S. Kim* and W. K. Lee**

Korea Bio Science Research Institute of Organic Bio Tech Co. Ltd., Jincheon, Korea*, College of
Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University**

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and characterize bacteriocin-producing bacteria from the intestine of duck to use as probiotics for livestock. A total of 416 strains were isolated from the small intestine and cecum of ducks and 13 isolates were finally selected after determining inhibitory activity against pathogenic indicators by spot-on-lawn method. The selected strains were identified as *Lactobacillus salivarius* JWS 58, *Lactobacillus plantarum* JWS 1354, *Pediococcus pentosaceus* JWS 939, 7 strains of enterococci, and 3 strains of *Escherichia coli*. *Lact. salivarius* JWS 58, *Ent. faecium* JWS 833, and *Ped. pentosaceus* JWS 939 showed a strong inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. *E. coli* JWS 108 inhibited the growth of *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *Lact. salivarius* JWS 58 strain survived almost 50% in pH 2.5 phosphate buffer for 2 hr. *Ped. pentosaceus* JWS 939 and *Lact. plantarum* JWS 1354 showed strong amylolytic activity. These results suggest that a combination of bacteriocins or multispecies probiotics of the selected strains has a strong potential of alternative to antibiotics in livestock production.

(Key words : Bacteriocin, Probiotics, Duck, Livestock, Antibiotics)

I. 서 론

가축의 사육 및 생산에서 환축의 치료, 질병 예방, 가축의 생산성 등을 향상시키기 위하여 광범위하게 항생제가 사용되고 있으나, 최근에는 항생물질의 오남용으로 인한 내성균주의 출현과 축산물내 잔류 항생물질로 인한 안전성 문제의 야기로 점차 규제되고 있는 추세이다(Dixon, 2000; Mateu와 Martin, 2001). 또한

축산물의 안전성에 대한 소비자들의 인식이 높아지고, 무항생제 사용 축산물에 대한 요구가 높아짐에 따라 항생제 대체물질의 개발은 중요한 관심의 대상이 되고 있다.

항생제 대체물질로는 생균제(probiotics), 산성화제(acidifer), 면역조절 및 증강 물질, 사료 첨가용 복합효소제, 기능성 천연추출물 등이 있으나, 장내미생물의 균형을 개선하여 숙주동물에게 유익한 작용을 하는 생균제가 가장 각

Corresponding author : W. K. Lee, College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Kaesin-dong, Cheongju, 361-763, Korea.
Tel. : 043-261-2960, E-mail : wklee@cbu.ac.kr

광을 받고 있다(Fuller, 1992). 가축용 생균제의 주요 기작은 장내 병원성 미생물들에 대하여 유기산, 과산화수소(H₂O₂), 박테리오신(bacteriocin) 같은 항병성 인자의 생성과 경쟁적 배제(competitive exclusion) 등을 통하여, 장내 유해세균 및 부패 관련 균주들을 감소시킴으로써 가축의 성장촉진 및 사료효율 상승 효과를 유발하는 것이다. 또한 분뇨 배설량 감소 및 악취성 유해가스 발생의 억제를 통하여 가축의 사육 환경을 개선하기도 한다. 박테리오신은 세포 외로 분비하는 단백질 또는 펩타이드계 항균 물질로서 생산균주와 근연관계에 있는 미생물을 죽이거나 생육을 억제하는 물질이라고 알려져 있다(Klaenhammer, 1988). 또한 소화기계의 여러 단백질 분해효소에 의해 분해됨으로 인체에 무해하고 잔류성이 없는 장점이 있기 때문에, 최근에는 천연의 식품보존제로서 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재, 산업적으로 실용화되고 있는 유일한 박테리오신인 nisin은 약 50개 국에서 가공치즈, 야채, 과일 등의 통조림, 발효유 제품 등에 식품보존제로서 사용되고 있으며(Delves-Broughton, 1990), 국내에서도 전통발효식품(김치, 젓갈)에서 유래한 유산균이 생산하는 박테리오신들의 식품부패 관련 병원성균주들에 대한 억제효과 등이 보고되고 있다(Kwon 등, 2002). 가축 질병 치료에 적용된 박테리오신으로는, 발효유식품에서 분리한 *Lactococcus lactis*에 의해 생산된 lacticin 3147을 젖소의 유방염 치료에 효과적으로 사용한 예가 있으며(Ryan 등, 1998), *E. coli*에 의해 생산되는 박테리오신인 colicin과 microcin을 가금류 또는 소에 투여하여 *Salmonella* 및 *E. coli* O157:H7의 생육을 억제한 보고가 있다(Gillor 등, 2004; Diez-Gonzalez, 2007). 그 밖에 돼지(박경준 등, 1995; Rodríguez 등, 2003), 가금류(Halami 등, 1999; Poeta 등, 2006) 등으로부터 박테리오신을 분리 및 확인한 보고도 있다. 그리고 축산용 생균제로 개발하기 위하여 가축의 분변 및 내장으로부터 병원성 미생물에 대하여 항균특성을 지닌 유산균들을 분리하였다는 보고는 있으나, 대부분이

박테리오신이 아닌 유기산, 과산화수소, 또는 저분자성 물질인 것으로 알려져 있다(Tsai 등, 2005). 아직까지는 가축으로부터 박테리오신을 생산하는 유산균들을 분리하여 특성 및 작용기작을 밝히고, 박테리오신 또는 박테리오신 생산균주를 이용하여 가축용 생균제를 개발하고자 하는 논문들은 매우 적은 편이다. 특히 건강식품에 대한 소비자의 요구가 증가함에 따라, 국민 1인당 오리고기의 소비량이 1994년 0.35kg에서 2002년 1.75kg으로 3배 이상 증가한 반면, 오리에 대한 정책지원 및 학계의 전문적인 연구는 거의 이루어지지 않았다(민평홍, 2004).

본 연구에서는 항생제 대체물질로서 가축용 생균제를 개발하기 위하여, 오리의 소장 및 맹장으로부터 장내 병원성 세균들에 대한 강력한 항균활성을 지닌 박테리오신을 생산하는 미생물들을 선별하였으며, 박테리오신 자체의 생화학적 특성, 선별된 미생물의 내산성, 내담즙산성 및 소화효소 활성조사 등 균주특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 박테리오신 생산균주는 오리의 소장 및 맹장으로부터 분리한 10개 유산균, *Lactobacillus salivarius* JWS 58, *Lactobacillus plantarum* JWS 1354, *Pediococcus pentosaceus* JWS 939, *Enterococcus faecium* JWS 52, JWS 64, JWS 74, JWS 101, JWS 198, JWS 209, JWS 833과 3개의 *Escherichia coli* JWS 108, *E. coli* JWS 177, *E. coli* 196이며, 항균활성을 측정하기 위하여 사용한 지시균들은 KCTC(The Korean Collection for Type Cultures)와 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에서 19 균주를 분양받아 사용하였다(Table 1). 유산균 배양배지로는 MRS medium(Difco, USA)을 사용하였으며, 그 밖의 호기성 균주들은 BHI broth(brain heart infusion, Difco,

Table 1. Antimicrobial spectrum of 13 strains isolated from the intestine of Duck

Indicator organisms	Selected isolates (JWS)												
	52	58	64	74	101	198	209	833	939	1354	108	177	196
<i>B. cereus</i> KCTC 1012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>E. coli</i> KCTC 1467	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Ent. durans</i> KCTC 2190	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ent. faecalis</i> KCTC 2011	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Ent. faecium</i> KCTC 3122	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Lact. brevis</i> KCTC 3498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. casei</i> KCTC 3109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. fermentum</i> KCTC 3112	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. plantarum</i> KCTC 3108	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lact. sake</i> KCCM 40264	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Leu. mesenteroides</i> KCTC 3505	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Ped. acidilactici</i> KCTC 1626	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> KCTC 1750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sal. typhimurium</i> KCTC 2515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staph. aureus</i> KCTC 1621	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Staph. aureus</i> KCTC 1916	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Staph. intermedius</i> KCTC 3344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Strep. mutans</i> KCTC 3300	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

-, no inhibition zone; +, inhibition zone

USA)를 이용하여 37°C에서 배양하였다.

2. 미생물 분리 및 선발

(주)원산오리의 도축 생산라인에서 오리의 내장부위를 수거하고 냉장상태로 실험실로 옮겨온 후, 즉시 박테리오신 생산균주 분리실험에 사용하였다. 소장 및 맹장 부위를 절단한 다음, 1g 정도의 내용물을 혐기성 희석액에 넣고 적당량 희석한 후, MRS 또는 BHI 한천배지에 도말하고, 37°C에서 호기적으로 48시간 배양하였다. 각 배지에서 성장한 집락들을 무작위로 1ml의 MRS 또는 BHI 액체배지가 담긴 eppendorf tube에 접종하고, 1~2일 간 배양한 다음, 10 µl의 배양액을 MRS 또는 BHI 고체배지에 점적하여 1시간 동안 건조하였다. 그리고 지시균이 접종된 BHI 또는 MRS soft agar (0.7%)를 첨가한

다음, 1일 정도 배양 후, 상기 배지 위에 나타난 clear zone을 확인함으로써 병원성균주 억제능을 지닌 균주를 1차 선발하였다. 이때 사용한 지시균으로는 *E. coli* KCTC 1467, *Salmonella typhimurium* KCTC 2515, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, 그리고 *Lactobacillus sake* KCCM 40264를 사용하였다. 유산균이 생성하는 다양한 향균물질(유기산, 아세트, H₂O₂ 등) 중에서 유산(lactic acid)에 의한 향균효과를 제거하기 위하여, 1차 선발된 균주들에 대하여 약간 변형된 spot-on-lawn 방법(Mayr 등, 1972)을 실시하여 2차 선발과정을 실시하였다. 즉, 1차 선발된 균주들의 배양액을 원심분리하고, 0.45µm 필터를 이용하여 제균한 다음, 10N NaOH를 사용하여 cell-free supernatant를 pH 6.5 정도로 중화시켰다. 상기

여액을 지시균이 1.0×10^7 cfu/ml로 첨가된 soft agar 위에 떨어뜨린 후, 지시균의 배양조건(대략 37°C, 1일 배양)에서 배양한 다음, clear zone 형성여부를 관찰함으로써 박테리오신 생성균주를 최종 선발하였다.

3. 미생물의 동정

박테리오신 생산균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생화학적 특성을 *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*에 따라 조사하였다 (Holt 등, 1994). 그람염색, 운동성, catalase test, CO₂ 생성 유무 및 API 50 CHL kit (Bio-Merieux, France)를 사용한 탄수화물 발효 양상 등을 조사하였으며, 최종적인 균주 동정을 위해서 분리균의 16S rDNA 염기배열을 결정하여 알려진 균주들의 염기배열과 비교하였다.

4. Cell-free supernatant의 제조

선발된 박테리오신 생산균주를 MRS broth 또는 BHI broth에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 본 배양액을 3,000 × g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 얻어진 상등액을 1N NaOH를 이용하여 최종 pH 6.5로 조정된 후에, membrane filter (0.2 μm pore size)로 여과하여 박테리오신 활성을 측정하기 위한 cell-free supernatant를 조제하였다.

5. 항균범위 조사

선발된 박테리오신 생산균주에 대한 항균범위를 확인하기 위하여 spot-on-lawn 방법을 이용하였다. Cell-free supernatant를 지시균(1.0×10^7 cfu/ml)이 함유된 soft agar에 떨어뜨린 후, 지시균의 최적 성장온도에서 하룻밤 배양한 다음, 억제환 생성 유무를 조사하였다. 박테리오신의 활성은 지시균의 성장을 저하시키는 가장 높은 희석배수의 역수를 취해 상대적 활성도(AU/ml, arbitrary unit)로 표현하였다.

6. 박테리오신의 이화학적인 특성 조사

박테리오신의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 cell-free supernatant를 10N NaOH와 10N HCl로 pH 2.0에서 10.0까지 조정한 후, 상온에서 1시간 방치 후, 박테리오신 활성을 spot-on-lawn 방법으로 측정하였다. 열안정성은 상기액을 60°C, 95°C에서 30분, 그리고 121°C에서 15분 동안 각각 처리한 후, 박테리오신 활성을 측정하였다. 효소처리에 따른 박테리오신의 활성변화를 측정하기 위하여 각각의 효소를 최종농도가 1 mg/ml이 되도록 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 80°C에서 10분간 열처리하여 효소활성을 중지시킨 다음 박테리오신 활성을 측정하였다. 효소로는 proteinase K, protease, pepsin, trypsin, α-amylase, β-amylase, 그리고 catalase 등을 사용하였다. 유기용매 처리가 박테리오신 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, cell-free supernatant와 유기용매를 동량 혼합한 후, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 박테리오신 활성을 측정하였다. 이때 사용한 유기용매의 종류는 ethanol, methanol, chloroform, acetone, acetonitrile, hexane, ethyl acetate, acetate 등이었다.

7. 내산성 및 내담즙산성 실험

분리된 균주를 MRS 또는 BHI 액체배지에 일정량 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 0.05M sodium phosphate buffer를 HCl로 보정하여 만든 pH 7.0, 3.0, 2.5, 2.3, 2.0 완충용액속에 각각 10^7 cfu/ml 정도의 초기 접종농도로 접종하였다. 위 용액을 37°C에서 2시간 동안 정치배양한 후, 각 농도별로 1ml 희석액을 MRS 또는 BHI 한천배지에 도말하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그리고 배양 후에 나타난 집락수를 계수함으로써 각각의 산성 pH에 대한 내성을 측정하였다.

분리된 균주를 MRS 또는 BHI 액체배지에 일정량 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양

한 다음 멸균 생리식염수로 희석한 후, Gilliland 등(1977)의 방법을 변형하여 oxgall (Difco)이 각각 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%씩 함유된 MRS 한천배지에 도달하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그리고 배양 후에 나타난 집락수를 계수함으로써 담즙산 농도에 따른 내담즙산성을 측정하였다.

8. 효소활성 조사

선발균주를 MRS 또는 BHI broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양 후, 배양액을 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 0.22 μ m syringe filter로 여과하여 시험에 사용하였다.

Amylase와 cellulase의 활성 측정은 Miller (1959)의 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 변형하여 사용하였다(Khasin 등, 1993). 상기 배양액 50 μ l를 각각 950 μ l의 0.5% 기질(starch, carboxymethylcellulose)를 포함하는 0.1M Tris-HCl 효소반응액(pH 7.0)과 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 1ml의 DNS를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이를 다시 끓는 물에서 5-7분간 방치하여 발색시키고 즉시 냉각시킨 후, 8ml의 증류수를 첨가하여 UV spectrophotometer(Unico, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Amylase와 cellulase 활성도 1 unit는 37°C에서 1분 동안 1 μ mol에 상응하는 환원당(glucose)을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Lipase의 활성은 Lesuisse 등(1993)의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양액 0.5 ml와 0.5 ml의 기질 용액(1% 4-nitrophenyl butyrate in 50mM Tris-HCl, pH 7.0)을 섞은 다음 37°C에서 10분간 반응시킨 후, UV spectrophotometer를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. Lipase의 1 unit는 37°C에서 1분 동안 1 μ mol에 상응하는 생성물(4-nitrophenol)을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Protease의 활성은 Yanagida 등(1986)의 방법을 변형하여 조사하였다. 0.7% casein(from bovine milk, Sigma[®]) 용액 2.5ml와 배양액 0.5ml를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 10%

trichloroacetic acid(TCA) 용액 2.5ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이를 4°C에서 3500 rpm으로 10분간 원심분리를 하고, 상등액을 취하여 UV spectrophotometer로 275nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성은 37°C에서 1분 동안 1 μ mol의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 정의하였다.

III. 결 과

1. 박테리오신 생산균주의 분리 및 선발

오리의 소장 및 맹장으로부터 416주의 미생물을 분리하였으며, 5개의 지시균에 대하여 저해능을 지닌 76개의 균주를 1차로 선발하였다. 유기산에 의한 미생물 억제효과를 제거하기 위하여 spot-on-lawn 방법을 실시한 결과, 항균 활성을 나타내는 13균주를 2차로 선발하였다. 항균물질을 생산하는 13 균주는 각각 다른 항균범위를 나타냈으며, 10개의 유산균(2개 유산간균과 8개 유산구균)과 3개의 *E. coli* 균주로 이루어져 있었다.

2. 선발미생물의 동정

2차 선발된 10주 미생물들은 그람양성, catalase 음성, 비운동성 등의 특성을 지니고 있었으며, 당발효 실험결과, 유산균으로 분류되었다. 또한 선발 미생물의 16S rDNA 염기배열을 GeneBank에 등록된 여러 유산균들과의 상동성을 비교한 결과, 각각의 균주들이 97%이상의 상동성을 나타내었으며, *Lactobacillus salivarius* JWS 58, *Lactobacillus plantarum* JWS 1354, *Pediococcus pentosaceus* JWS 939, 그리고 7 균주의 *Enterococcus faecium* (JWS 52, JWS 64, JWS 74, JWS 101, JWS 198, JWS 209, JWS 833)로 최종적으로 동정하였다. 그람 음성인 3균주(JWS 108, JWS 177, JWS 196)는 16S rDNA 염기서열의 상동성 비교 결과, 모두 *E. coli*로 밝혀졌다.

3. 분리균주의 항균범위

선발된 대부분의 유산균들은 *L. monocytogenes* 생육에 대하여 강한 억제활성을 나타냈으며, 3개의 *E. coli*는 그람음성 균주 및 *Staphylococcus aureus* 균주에 대하여 저해능을 나타내었다(Table 1).

Lact. salivarius JWS 58은 주로 lactobacilli 계통의 균주를 억제하면서, enterococci와 *Leuconostoc mesenteroides* 균주 등도 억제하였으며, *Ent. faecium* JWS 833의 경우도 여러 종의 미생물에 대하여 광범위한 억제활성을 나타내었다(Fig. 1). *Ped. pentosaceus* JWS 939는 유산균보다는 *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*와 같은 식품부패 및 병원성관련 미생물들의 생육을 억제하는 특성을 나타내었다. 상기 결과를 바탕으로, 5개의 선발균주, 즉 *Lact. salivarius* JWS 58, *Ent. faecium* 833, *Ped. pentosaceus* 939, *Lact. plantarum* 1354, 그리고 *E. coli* 108에 대한 항균물질의 특성 및 생균제로서의 적용여부에 대한 실험을 진행하였다.

4. 박테리오신의 이화학적 특성

선발된 4 균주로부터 생산된 항균물질에 대한 여러 효소 처리, 열처리, pH 및 유기용매 처리에 대한 박테리오신의 안정성을 조사한 결과를 Table 2에 표시하였다.

Lact. salivarius JWS 58, *Ent. faecium* 833, 그리고 *Ped. pentosaceus* 939의 경우, proteinase K 처리에 따라 cell-free supernatants에 있는 항균 특성이 불활성화되어 역가를 상실하였으며 (Fig. 1), 이것은 항균물질이 단백질 또는 peptides로 이루어진 박테리오신임을 증명하였다. 그러나 *Lact. plantarum* 1354의 항균물질은 단백질분해효소에 의해 어떠한 영향도 받지 않는 것으로 보아, 박테리오신 이외의 유기산 또는 작은 분자량의 물질로 추정되었다. 각기 균주에서 생산되는 대부분의 박테리오신 활성은 pH 2~10 범위에서 안정하였으나, 유기용매 처리에 대해서는 균주별 또는 유기용매 종류별로 활성의 차이를 보였다. *E. coli* JWS 108로부터 생산되는 항균물질의 활성은 열에 매우 민감하게 작용하였으며, 대부분의 유기용

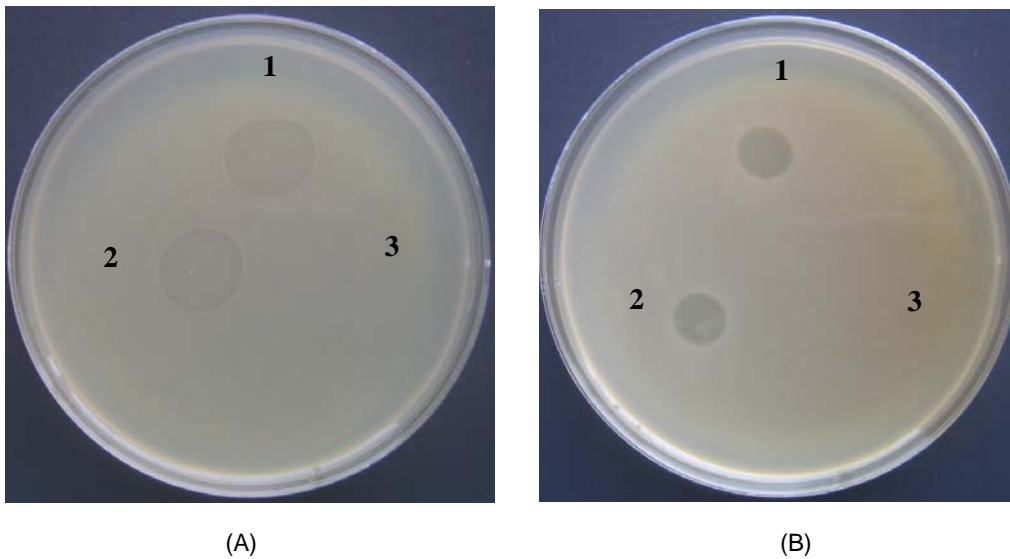


Fig. 1. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin produced by JWS 58(A) and JWS 833(B) using the spot-on-lawn method

1, cell-free supernatant(CFS); 2, catalase-treated CFS; 3, proteinase K-treated CFS

Table 2. Effects of enzymes, organic solvents, pH, and heat treatment on the activity of the cell-free supernatants produced from selected strains

Treatment	Relative antimicrobial activity (%)				
	<i>Lact. salivarius</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ped. pentosaceus</i>	<i>E. coli</i>	
	JWS 58	JWS 833	JWS 939	JWS 108	
Enzymes	proteinase K	0	0	0	50
	protease	0	100	50	50
	pepsin	0	50	50	50
	trypsin	0	100	100	50
	α -amylase	100	100	100	50
	β -amylase	100	100	100	50
	catalase	100	100	100	100
	Heating	60°C, 30 min	100	100	100
95°C, 30 min		100	100	100	0
121°C, 15 min		100	6.3	0	0
pH	2.0	100	50	100	0
	3.0	100	100	100	0
	4.0	100	100	100	100
	5.0	100	100	100	100
	6.0	100	100	100	100
	7.0	100	100	100	100
	8.0	100	100	50	50
	9.0	100	100	50	50
Organic acids	ethanol	50	100	50	0
	methanol	50	100	50	0
	chloroform	0	3.1	100	3.1
	acetone	50	100	100	0
	acetonitrile	50	100	100	0
	hexane	50	100	100	0
	ethyl acetate	50	100	100	0
	acetate	100	100	100	50

매 처리에 의해서 항균활성을 상실하였다.

5. 내산성

Lact. salivarius JWS 58는 pH 2.5에서 2시간

이 지난 후에도 초기 접종농도의 50% 이상의 높은 생존율을 유지하였으나, 나머지 선발균주들은 pH 2.5이하에서 급격하게 사멸하기 시작하여 pH 2.0에서는 거의 생존하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

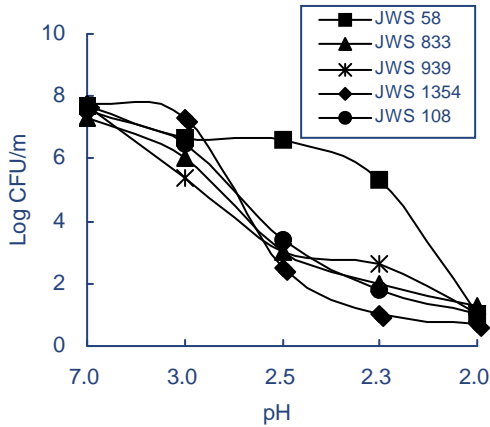


Fig. 2. Acid tolerance of the isolated strains in sodium phosphate buffer at various pHs for 2 hr.

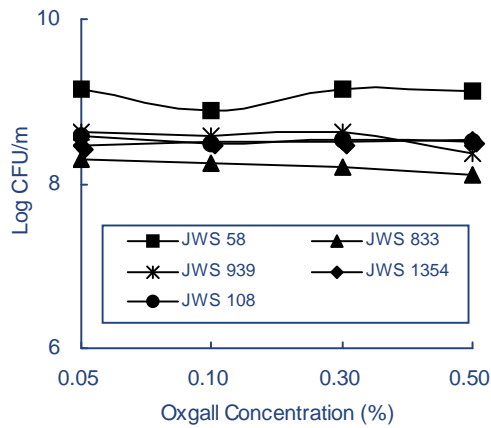


Fig. 3. Bile acid resistance of the isolated strains in MRS or BHI agar containing oxgall for 48 hr.

6. 내담즙산성

담즙산(oxgall)을 각각 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5% (w/v)씩 첨가한 MRS 또는 BHI 한천배지에서 내담즙산성 실험을 실시한 결과, 선발균주 모두 0.5% oxgall 농도까지 아무런 억제현상없이 정상적으로 집락을 형성하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

7. 효소활성 조사

오리 소장 및 맹장유래 유산균 4종과 *E. coli* 1종에 대한 분비효소 활성을 조사한 결과, amylase 활성이 다른 효소활성보다 높게 나타난 반면에 protease 효소 활성은 비교적 낮게 분석되었다(Table 3). 특히 *Ped. pentosaceus*

JWS 939와 *Lact. plantarum* JWS 1354는 상대적으로 높은 amylase 활성과 cellulase 효소 활성을 지니고 있었으며, *E. coli* JWS 108은 4가지 효소활성조사 결과, 비교적 낮은 활성을 보였다.

IV. 고찰

항생제 대체물질로서 가축용 생균제를 개발하기 위하여, 오리의 소장 및 맹장으로부터 416주의 미생물을 분리하였으며, 항균물질을 생산하는 13주를 최종적으로 선발하였다. 가축용 생균제로 사용되고 있는 미생물로는 *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pedio-coccus*, *Streptococcus* 및 yeast 등이 있으나 (Anadón 등, 2006), 생균제 선발기준인 장내부

Table 3. Comparison of enzyme activities from the isolated strains

Strains	Total activity (unit/ml)			
	Amylase	Cellulase	Protease	Lipase
<i>Lact. salivarius</i> JWS 58	0.1769	0.0360	0.0379	0.0708
<i>Ent. faecium</i> JWS 833	0.1949	0.0404	0.0281	0.2195
<i>Ped. pentosaceus</i> JWS 939	1.2538	0.2207	0.0275	0.2094
<i>Lact. plantarum</i> JWS 1354	1.7154	0.3262	0.0216	0.0224
<i>E. coli</i> JWS 108	0.0005	0.0004	0.0307	0.0647

착 또는 정착성 및 안전성을 고려한다면, 사용하고자하는 축종으로부터 분리한 미생물을 이용하여 생균제를 제조하는 것이 타당할 것이다(Kosin과 Rakshit, 2006). 가금류용 생균제를 개발하기 위하여 토종닭, 육계 또는 산란계로부터 유기산, 박테리오신 등 항균물질을 생산하는 유산균을 분리하기도 하였으나(Jin 등, 1997; 김상호, 2002; 이재연 등, 2002; Stern 등, 2006), 오리로부터 유용 미생물을 분리하여 생균제를 개발하고자하는 연구결과는 거의 드문 실정이다.

Gough 등(2006)은 소의 위장에 있는 309개의 미생물들로부터 단백질 분해효소 처리시 항균활성을 소실하는 12주 유산균(3.9%)를 분리하였으며, Poeta 등(2006)은 가금류의 분변내 enterococci중에 30.3%의 균주들이 박테리오신 유전자를 보유하고 있음을 보고하였다. 오리로부터 항균물질을 생산하는 균주를 분리한 결과, 오리의 소장 및 맹장에 서식하는 미생물중에 대략 3.1% 정도가 박테리오신을 생산하는 것으로 추정할 수 있었으나, 항균물질 생산균주를 분리하는 방법, 사용하는 지시균의 종류 및 함량에 따라 달라질 수 있기 때문에 오리 내장에 서식하는 미생물중에서 박테리오신 생산균주 비율을 계상하기는 쉽지 않을 것으로 판단된다.

항균물질을 생산하는 13주 미생물들을 세포 모양, 생화학적 특성 및 16S rDNA의 염기배열을 바탕으로 동정한 결과, *Lact. salivarius*, *Lact. plantarum*, *Ped. pentosaceus*, *Ent. faecium* 및 *E. coli* 등 5개의 균종으로 분류되었으며, 각 균종별로 미생물 억제 범위 및 활력도 각각 차이가 있음이 밝혀졌다(Table 1). Timmerman 등(2004)은 동일 속의 다른 미생물 또는 다른 속의 미생물들로 이루어진 복합생균제의 사용이 단일 미생물로 이루어진 생균제보다 가축의 장내 생존에 유리하며, 성장률 및 폐사율에서 개선효과가 있었다고 보고하였다. 또한, 여러 개의 박테리오신을 조합하여 사용하면 더 폭넓은 항균범위를 나타내고, 박테리오신에 저항하는 미생물의 숫자를 줄임으로써

응용범위가 더욱 넓게 된다고 알려져 있다(Hanlin 등, 1993; Mulet-Powell 등, 1998). 따라서 더욱 효과적인 생균제를 개발하기 위하여, 선발된 미생물중에서 서로 시너지 효과를 발휘할 수 있는 미생물 및 박테리오신을 복합적으로 사용한다면 병원성 세균에 대한 억제능력이 향상되고 항생제 잔류성이 없는 항생제 대체제로서의 산업적 활용가치가 높을 것으로 기대되었다. 특히 *E. coli* JWS 108 균주는 그람음성 세균에 대한 항균능력을 보유하고 있기 때문에 추후에 항균물질 분리, 병원성 세균에 대한 항균범위 조사, 작용기작 및 활용 방안 등을 연구하여 박테리오신 또는 생산균주를 생균제로 사용할 예정이다.

Stern 등(2006)은 chicken의 맹장으로부터 강력한 항리스테리아능을 특징으로하는 class IIa 계열의 박테리오신을 생산하는 *Lact. salivarius* 균주를 선발하였으며, 가금류 생산에 문제시되고 있는 *Campylobacter jejuni* 병원균을 효과적으로 억제하였음을 밝혔다. *Lact. salivarius* JWS 58, *Ent. faecium* 833, 그리고 *Ped. pentosaceus* 939로부터 생산되는 박테리오신도 *Listeria*에 대하여 항균능력을 지니고 있으며, 내열성 등을 보유하고 있는 것으로 보아, Class IIa 계열의 박테리오신으로 추정되고 있으며, 정확한 박테리오신의 분류를 위하여 생산된 박테리오신의 분리·정제 및 분자량 측정 등의 실험을 진행중이다.

가축의 장내에서 생균제로서 작용하기 위해서는 낮은 pH를 갖는 위를 통과하고 십이지장으로 분비되는 담즙산에 대한 내성을 지녀야 한다. 선발균주에 대한 내산성실험 결과, *Lact. salivarius* JWS 58만 상대적으로 높은 내산성을 지녔으며, 그 밖의 균주는 일반적인 미생물들의 내산성을 나타냈으나, 내담즙산성은 매우 높게 나타났다. 이것은 장내에서 유래하지 않은 균주들이 0.3% 이상의 담즙을 함유한 배지에서 성장하지 못한다(Khattab와 Abou-Donia, 1987)는 논문의 관점에서 볼 때, 선발균주 모두 가축의 장내 조건에서 충분히 증식할 수 있을 것으로 판단된다. 가축용 생균제는 인체

용 생균제와는 달리 가축의 생산성 및 경제성에 더 중요한 관점을 두기 때문에 사료효율 및 증체율 증가가 매우 중요하다. Alam 등 (2003)은 육계 사료에 인위적으로 소화효소를 첨가하였을 때, 육계의 성장률, 사료효율, 생산량 등이 증가되었음을 발견하였으며, Jin 등 (1999)은 *Lactobacillus*가 첨가된 사료를 급여한 육계의 소장내 amylase 활성이 매우 높게 증가한 반면 단백질 및 지방관련 효소활성은 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 오히려 항균물질 생산균주로 선발된 5 균주에 대한 소화효소 활성을 측정 한 결과, *Ped. pentosaceus* JWS 939와 *Lact. plantarum* 1354 균주는 매우 높은 amylase 활성을 나타냈으며, 이것은 Jin 등(1999)의 결과와 유사하였다. 일반적으로 가금류에 급여되는 사료가 주로 곡물사료(전분)에 식물성 단백질과 소량의 동물성 단백질로 이루어져 있어서, 높은 amylase 활성을 지닌 미생물의 선발 및 사용은 가축용 생균제에 있어서 주요한 선발 요건이 될 수 있을 것이다(김상호, 2002).

본 연구는 오리의 소장 및 맹장으로부터 병원성 미생물에 대하여 항균능력을 지닌 유산균 및 *E. coli* 균주를 선발하고 동정하였으며, 항균물질의 박테리옌 특성을 분석하고, 생산균주에 대한 내산성, 내담즙산성 및 소화효소 활성 등을 조사하였다. 이상의 결과로부터 새로 분리한 박테리옌 생산균주들을 복합 박테리옌 및 생균제로 개발한다면, 사육 오리에 적합한 가축용 생균제로서 산업적인 활용도가 매우 클 것으로 기대된다.

V. 요약

항생제 대체물질로서 가축용 생균제를 개발하기 위하여, 오리의 소장 및 맹장으로부터 416주의 미생물을 분리하였으며, 항균물질인 박테리옌을 생산하는 13주를 최종적으로 선발하였다. 선발균주들은 *Lactobacillus salivarius* 1주, *Lactobacillus plantarum* 1주, *Pediococcus pentosaceus* 1주, *Enterococcus* 7주, 그리고 3주의 *E. coli*로 동정되었으며, 복합생균제를 제조

할 목적으로 상기 균주중 5균주에 대한 박테리옌 및 생균제적인 특성을 조사하였다. 유산균인 *Lact. salivarius* JWS 58, *Ent. faecium* JWS 833, 그리고 *Ped. pentosaceus* JWS 939는 식품관련 병원성 균주로 알려진 *Listeria monocytogenes*에 대하여 강한 항균능력을 나타냈으며, 상기 균주의 cell-free supernatant를 단백질 분해효소 처리시 대부분이 병원균 억제활성을 상실하였다. 선발균주인 *E. coli* JWS 108은 그람음성균주인 *E. coli*와 *Staphylococcus aureus* 균주에 대한 생육억제활성을 나타냈다. 또한 *Lact. salivarius* JWS 58균주와 *Ent. faecium* JWS 833균주는 각각 *Lactobacillus* sp. 및 *Enterococcus* sp. 균주에 대하여 억제활성을 지니고 있었다. *Lact. salivarius* JWS 58균주는 pH 2.5 완충용액에서 2시간 동안 50% 이상 생존하였으며, pH 2.0 이하에서는 대부분의 선발균주들이 사멸하였다. 그러나 선발균주 모두 0.5% 담즙산 농도까지 아무런 억제현상없이 정상적으로 성장하였다. *Ped. pentosaceus* JWS 939와 *Lact. plantarum* JWS 1354 균주는 상대적으로 높은 amylase와 cellulase 효소 활성을 나타냈으며, *E. coli* JWS 108 균주는 낮은 효소활성을 보였다. Protease 및 lipase 효소 활성은 5균주 모두 유사하게 나타내었다.

VI. 사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

VII. 인용 문헌

1. Alam, M. J., Howlider, M. A. R., Pramanik, M. A. H. and Haque, M. A. 2003. Effect of exogenous enzyme in diet on broiler performance. *Int. J. Poul. Sci.* 2:168-173.
2. Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R. and Martínez, M. A. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European union. Regulation and safety assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*

- 45:91-95.
3. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44:100-117.
 4. Diez-Gonzalez, F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8:15-24.
 5. Dixon, B. 2000. Antibiotics as growth promoters: risks and alternatives. *ASM News.* 66:264-265.
 6. Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In *Probiotics. The scientific basis*, R. Fuller (Ed.), Chapman and Hall, London, U.K., pp. 1-8.
 7. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. *J. Food Prot.* 40:760-762.
 8. Gillor, O., Kirkup, B. C. and Riley, M. A. 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* 54:129-146.
 9. Gough, J. M., Conlan, L. L., Denman, S. E., Krause, D. O., Smith, W. J., Williamson, M. A. and McSweeney, C. S. 2006. Screening of bacteria from the cattle gastrointestinal tract for inhibitory activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, O111:H-, and O26:H11. *J. Food Prot.* 69:2843-2850.
 10. Halami, P. M., Chandrashekar, A. and Joseph, R. 1999. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. *Food Biotechnol.* 13:121-136.
 11. Hanlin, M. B., Kalchayanand, N., Ray, P. and Ray, B. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have a greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56:252-255.
 12. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Astaley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA
 13. Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N. and Jalaudin, S. 1997. Probiotics in poultry: mode of action. *World's Poult. Sci. J.* 53:351-368.
 14. Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N. and Jalaudin, S. 1999. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 79:886-891.
 15. Khasin, A., Alchanati, I. and Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1725-1730.
 16. Khattab, A. A. and Abou-Donia, S. A. 1987. The effect of bile salt on the growth of some lactic acid cultures. *Egyptian J. Dairy Sci.* 15:51-56.
 17. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-349.
 18. Kosin, B. and Rakshit, S. K. 2006. Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technol. Biotechnol.* 44:371-379.
 19. Kwon, D. Y., Koo, M., Ryoo, C. R., Kang, C. H., Min, K. H. and Kim, W. J. 2002. Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12:96-105.
 20. Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216:155-160.
 21. Mateu, E. and Martin, M. 2001. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? *J. Vet. Med.* 48:569-581.
 22. Mayr, H. A., Hedges, A. J. and Berkeley, R. C. 1972. Methods for studying bacteriocin. In *Methods in Microbiology*. Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 313-342.
 23. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.
 24. Mulet-Powell, N., Lactoste-Armynot, A. M., Vinas, M. and Simeon De Buochberg, M. 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 61:1210-1212.
 25. Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J. and Torres, C. 2006. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis.* 50:64-68.

26. Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Nuñez, M. and Medina, M. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:259-263.
27. Ryan, M. P., Meaney, W. J., Ross, R. P. and Hill, C. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2287-2290.
28. Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Pereygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E. and Seal, B. S. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3111-3116.
29. Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M. and Beynen, A. C. 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics - a comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.* 96:219-233.
30. Tsai, C. -C., Hsieh, H. -Y., Chiu, H. -H., Lai, Y. -Y., Liu, J. -H., Yu, B. and Tsen, H. -Y. 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 102:185-194.
31. Yanagida, N., Uozumi, T. and Beppu, T. 1986. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 166:937-944.
32. 김상호. 2002. 가금맹장 유산균의 생균제적 가치 규명. 전북대학교 박사학위논문.
33. 민평홍. 2004. 오리 및 오리고기의 생산, 유통, 소비구조에 대한 연구. 건국대학교 석사학위논문.
34. 박경준, 유연우. 1995. 돼지분변에서 분리한 *Lactobacillus* sp. KJ-5의 항균 특성. *한국생물공학회지.* 10:553-560.
35. 이재연, 황교열, 김근, 성수일, 박영식, 백만정, 김경례. 2002. 한국토종닭 소장에서 분리한 *Lactobacillus pentosus* K34가 생산하는 항균성 유기산의 특성. *한국미생물 생명공학회지.* 30:241-246.
(접수일자 : 2007. 7. 25. / 채택일자 : 2007. 9. 12.)