

계분으로부터 *Lactobacillus salivarius*의 분리 및 생균제적 특성

임수진 · 장성식 · 강대경*
단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 Isolated from Chicken Feces. Lim, Soo Jin, Sung Sik Jang, and Dae-Kyung Kang*. Department of Animal Resources Science, School of Bio-Resources Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea – To isolate probiotic lactic acid bacteria for animal, we have screened the microorganisms from chicken feces, by random selection and agar well diffusion assay. Among them, CPM-7 strain showing superior inhibitory activity against *Escherichia coli* was selected. By examining carbohydrates utilization, morphologic property and 16S rRNA gene sequence, CPM-7 strain was identified as *Lactobacillus salivarius*, then named *L. salivarius* CPM-7. *L. salivarius* CPM-7 produced thirteen enzymes in the test using API ZYM kit, and showed resistance to low pH and bile salts. It survived at pH 2 for 30 min. and pH 3 for 6 hr. And, it was able to grow in MRS medium containing 0.2% (w/v) bile salts. *L. salivarius* CPM-7 adhered to the jejunal epithelium cells of pig. Both the supernatant of *L. salivarius* CPM-7 and the its neutralized one showed high inhibitory activity against *E. coli* K88.

Key words: *L. salivarius*, probiotics, antibacterial activity

서 론

우유, 고기와 같은 동물성 식품을 우리에게 제공하는 가축의 생산성을 증진시키고 질병을 예방 또는 치료하기 위해 다양한 항생물질이 사료에 첨가되고 있는 실정이다. 항생물질의 지속적인 급여는 내성균의 발생 및 전파를 유발할 뿐만 아니라, 항생물질이 축산물에 잔류할 가능성 때문에 국민 건강보전에 큰 위협이 될 수 있다. 이미 유럽연합(EU)은 동물용 사료에 성장촉진 목적으로 항생제를 첨가하는 것을 금지한 바 있으며 우리나라도 이와 같은 방향으로 정책을 추진하고 있으므로, 동물의 성장촉진용 항생물질을 대체할 수 있는 물질의 개발이 절실한 상황이다. 항생물질 대체제 중의 하나로서, 유해세균 억제능을 가진 생균제(probiotics)들이 많이 연구되고 있다. 그동안 생균제로서 많이 이용되어 온 미생물은 유산균(lactic acid bacteria)인데, 유산균은 장관을 통과하면서 위산과 담즙산에 비교적 잘 견딜 뿐만 아니라 유해균들에 대한 길항작용을 가지는 경우가 많기 때문이다[3].

그동안 다양한 종류의 유산균들이 사람 및 동물로부터 분리, 연구되어 왔다. Ahn 등[1]은 자돈(piglet)의 분변으로부터 내산성 및 내담즙성이 우수한 *Lactobacillus acidophilus*를 분리하였으며, Ham 등[5]은 다양한 식중독 미생물에 대한 항균활성을 나타내는 *Lactobacillus* sp.를 보고한 바 있다.

또한, Kim 등[7]이 돼지 장내로부터 다수의 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*을 분리하여 병원성 미생물에 대한 억제능을 보고한 바 있으며, Park 등[11]은 병아리의 장으로부터 내산성 및 내담즙성이 우수한 *L. salivarius*를 분리하여 보고한 바 있다. 일반적으로 인체나 동물의 장내에서 정장효과를 발휘하기 위해서는 적용대상 동물의 장 또는 분변으로부터 분리하는 것이 바람직한 것으로 알려져 있다[3, 10].

본 연구에서는 닭의 분변으로부터 *L. salivarius*를 분리하여 그 생균제적 특성을 조사하였으며, 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주 및 배지

유산균 분리용 기본배지로는 de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 평판배지 또는 액체배지를 사용하였으며, 37에서 배양하였다. 항균활성 측정용 지시균으로는 돼지의 설사를 유발하는 *E. coli* K88을 사용하였으며, 배양 배지로는 Luria-Bertani (LB) 평판배지 또는 액체배지를 사용하였다.

대장균 억제능의 우수한 유산균의 분리

단국대학교 실험농장에서 사육하는 산란계의 분변으로부터 균주를 분리하였다. 계분을 0.85% 생리식염수로 희석한 후에 MRS 평판배지에 도말하였으며, 37°C에서 2일간 배양하였다. 무작위 선발법을 이용하여 1차적으로 균주들을 분리한 후에, MRS broth가 첨가된 96-well plate에 접종하고 37°C에서 1일간 배양하였다. 돼지의 설사를 유발하는 *E. coli*

*Corresponding author

Tel: 82-41-550-3655, Fax: 82-41-564-3655
E-mail: dkkang@dankook.ac.kr

K88이 도달된 LB 평판배지에 흠을 판 후에, 배양액을 100~200 μ 접종하고 37°C에서 배양하였으며, 대장균 억제환이 큰 유산균을 최종적으로 선발하였다.

균주의 동정

분리한 균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 서열과 형태학적, 생화학적 특성 등을 조사하였다. 분리한 균주의 형태학적인 특징은 전자현미경(Scanning Electron Microscopy)으로 관찰하였으며, Sohn 등[15]의 방법에 준하였다. 균주의 생화학적 특성을 조사하기 위해서는 API 50CHL kit (BioMerieux, France)를 사용하였다. 또한 분리한 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석함으로써, 균주를 최종적으로 동정하였다. 분리한 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위해서는 Pavlova 등[12]의 방법을 이용하였다. Genomic DNA extraction kit(Qiagen)을 이용하여 분리 균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음, eubacterial 16S rDNA 클로닝을 위하여 forward primer(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer(5'-AAG GAG GTG ATC CAG C-3') set를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 50 pmole primer, 50 ng template DNA, 10 \times Taq DNA polymerase buffer 5 μ L, 2.5 mM dNTP mixture 4 μ L, Taq DNA polymerase(Takara, Japan) 1 U가 포함된 PCR mixture를 95°C에서 5분간 변성시킨 후에 95°C에서 1분, 55~60°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30 cycle을 반복함으로써 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 pSTBlue-1(Novagen, USA)에 클로닝한 다음, BigDyeTM-terminator sequencing kit과 ABI PRISM377 sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기서열을 분석하였다.

항균력 측정

지시균으로 사용한 *E. coli* K88을 도달한 LB 평판배지에 둥근 흠을 파고 유산균 배양액을 첨가하는 agar well diffusion assay 방법을 사용하였다[1]. 유산균 배양액을 agar well에 첨가하고 4에서 2시간동안 방치한 후에 37°C에서 overnight 배양하였으며, 지시균의 생육 억제환의 크기를 관찰함으로써 항균력을 측정하였다.

내산성 조사

pH 2, 3, 4로 각각 조절된 MRS broth 5 ml에 overnight 배양한 유산균 배양액(10^8 cells/ml)을 2%씩 접종하고 37°C에서 30분에서 6시간동안 배양한 후에 생균수를 측정함으로써 내산성 정도를 확인하였다.

내담즙성 조사

Bile salts를 각각 0.1%, 0.2%, 0.3% 첨가한 MRS broth 5 ml에 overnight 배양한 유산균 배양액(10^8 cells/ml)을 2%씩 접종하고 37°C에서 30분에서 6시간동안 배양한 후에 생

균수를 측정함으로써 내담즙성 정도를 확인하였다.

효소 활성 조사

선발한 균주의 효소 활성을 조사하기 위해서 API ZYM kit(BioMerieux, France)를 사용하였다. *L. salivarius* CPM-7를 MRS 고체배지에서 배양한 후에 균체를 회수하여 0.85% NaCl 용액에 현탁하였다(Mcfarland 탁도 5~6로 조정). ZYM kit의 각 cupule에 현탁액을 65 μ L씩 분주하고 37°C에서 4시간 배양한 후에 색깔의 변화를 관찰함으로써, 효소의 활성 정도를 조사하였다.

장 상피세포 흡착능 조사

선발한 균주의 장 상피세포 흡착능을 조사하기 위하여, 돼지의 소장 조직을 채취한 후에 Mayra-Makinen 등의 방법[8]에 의해 실험을 진행하였다. 장 상피세포 조직을 1 \times 4 cm 크기의 조각으로 자른 후에, 인산완충용액(pH 7.2)에 담그고 4°C에서 30분간 방치하였다. 인산완충용액으로 5~7회 세척한 후에, 멸균한 slide glass의 끝부분으로 조직을 긁어서 상피세포가 떨어져 나오도록 하였으며, 떨어져 나온 상피세포를 인산완충용액에 현탁하였다. 동일한 인산완충용액으로 현탁한 *L. salivarius* CPM-7과 상피세포 현탁액을 혼합하고 37°C에서 30분간 배양하였으며, 그람염색한 후에 상피세포 흡착여부를 광학현미경으로 관찰하였다.

항생물질과의 항균력 비교 실험

분리한 균주의 배양액과 항생물질과의 항균력을 비교하기 위하여 *E. coli* K88을 overlay한 LB 중층배지를 사용하였다. 대장균 중층배지 위에 놓인 paper disk 위에 24시간 및 48시간 동안 배양한 선발균주의 배양액을 각각 100식 roading하였으며, 항생물질과의 항균력을 비교하기 위해 kanamycin(30 μ g), penicillin(10 units), tetracycline(30 μ g), chloramphenicol(30 μ g)이 함유된 paper disk를 사용하였다. Paper disk를 올려 놓고 30°C에서 overnight 배양한 후에 각각의 억제환의 크기를 비교하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

단국대학교 실험농장에서 사육하는 산란계의 분변을 채취한 후에 MRS 고체배지에 도달함으로써 다수의 유산균주를 선발하였다. 선발된 균주 중에서, 돼지의 설사를 유발하는 것으로 알려진 *E. coli* K88에 대한 항균력이 가장 우수한 CPM-7 균주를 최종 선발하였다(data not shown).

분리균주의 동정

대장균에 대한 억제능이 우수한 CPM-7 균주의 형태학적 특징을 관찰하였다. 주사전자현미경으로 관찰한 바와 같이

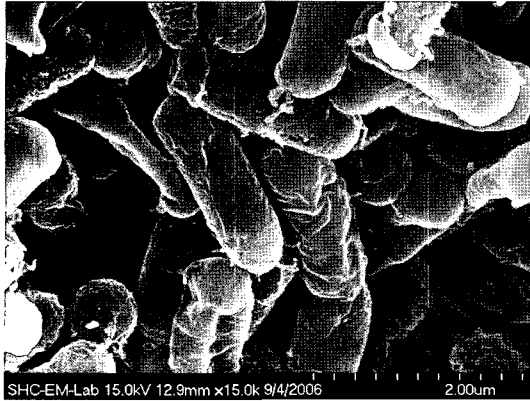


Fig. 1. Scanning electron microscopic (SEM) observation of strain CPM-7.

Table 1. Characteristics of the isolated strain, CPM-7.

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Shape	rod		
Gram stain	+	Arbutin	-
Catalase	-	Esculin	+
Control	-	Salicin	-
Glycerol	-	Celiobiose	-
Erythritol	-	Maltose	+
D-arabinose	-	Lactose	+
L-arabinose	-	Melibiose	+
Ribose D-ribose	-	Sucrose	+
D-xylose	-	Trehalose	+
L-xylose	-	Inulin	-
D-adonitol	-	Melezitose	-
Methyl-BD-xylopyranosicle	+	Raffinose	+
D-galactose	+	Starch	-
D-glucose	+	Glycogen	-
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	+	Gentiobiose	-
L-sorbose	-	D-turanose	-
Rhamnose	-	D-lyxose	-
Dulcitol	-	D-tagatose	-
Inositol	-	D-fucose	-
Mannitol	+	L-fucose	-
Sorbitol	+	D-arabitol	+
a-Methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	-
a-Methyl-D-glucoside	-	Gluconate	-
N-Acethyl-glucosamine	+	2-keto-Gluconat	-
Amygdalin	-	5-keto-gluconate	-

1) + : positive result, - : negative result
 2) API 50CHL kit was used.

간균(rod) 형태의 균주임을 알 수 있었으며(Fig. 1), Gram 양성, catalase 음성으로서 포자를 형성하지 않았다(data not shown). 탄소원 이용성 차이로 동정하는 API CHL kit를 사용하여 CPM-7 균주를 1차 동정한 결과, *Lactobacillus salivarius*로 동정되었다(신뢰도 99%). CPM-7 균주는

glucose, galactose, fructose, mannitol, sorbitol과 같은 6탄 당 및 그 환원당, maltose, lactose, sucrose와 같은 이당류 등을 선택적으로 이용하는 특성을 나타내었다. 당 이용성 차이를 이용한 동정 이외에 분자생물학적 동정도 시도하였다. CPM-7 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 후에(data not shown), NCBI의 BLAST search program을 이용하여 상동성을 비교한 결과, 99.9%의 신뢰도로 *L. salivarius*로 동정되었다. 따라서, 본 연구에서 선발한 CPM-7 균주를 *L. salivarius* CPM-7으로 명명하였다.

분리한 균주의 배양시간에 따른 항균력

L. salivarius CPM-7 균주의 배양시간에 따른 항균력을 조사하기 위하여, CPM-7 균주를 MRS 액체배지에 접종하고 37°C에서 배양하였다. 배양 12시간 이후부터 6~12시간 간격으로 배양액을 채취하였으며, 배양 상등액 또는 중화액을 항균력 측정실험에 사용하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 배양 12시간 즉, 대수기부터 대장균 억제환이 뚜렷하게 나타났으며 배양 48시간, 즉 정체기까지 억제능이 지속되었다. *L. salivarius* CPM-7의 항균력이 유기산 또는 다른 물질에 의한 것인지의 여부를 확인하기 위하여, sodium acetate buffer(pH 6.0)를 첨가하여 배양액을 중화시킨 후에 대장균 억제능을 조사하였다. 중화 후의 대장균 저해환(Fig. 2B(b))의 크기가 중화전(Fig. 2B(a))에 비해 줄어들었지만 중화 후에도 배양시간에 관계없이 저해환이 나타나는 것으로 볼 때,

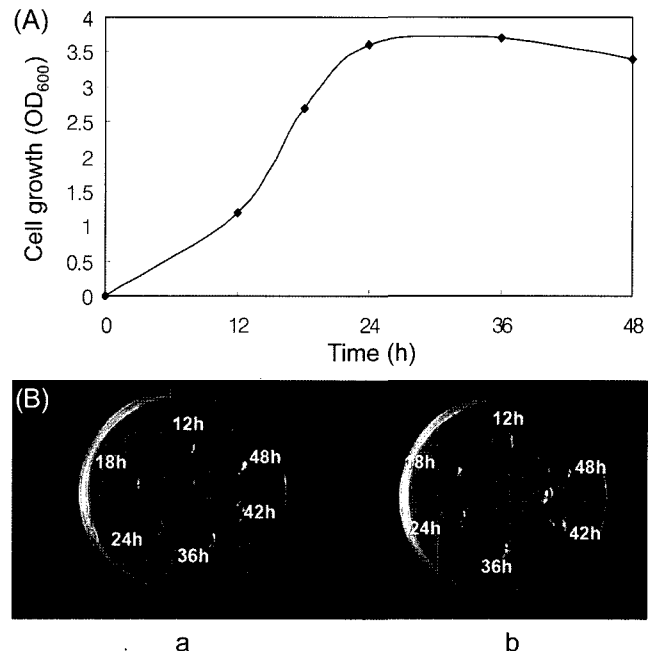


Fig. 2. Time profiles of cell growth (A) and antimicrobial activity (B) in the flask cultures of CPM-7 strain on MRS broth. The cultures were incubated at 37°C on a shaker at 50 rpm and were taken in designated times. (B) a, Supernatant before neutralization; b, Supernatant neutralized.

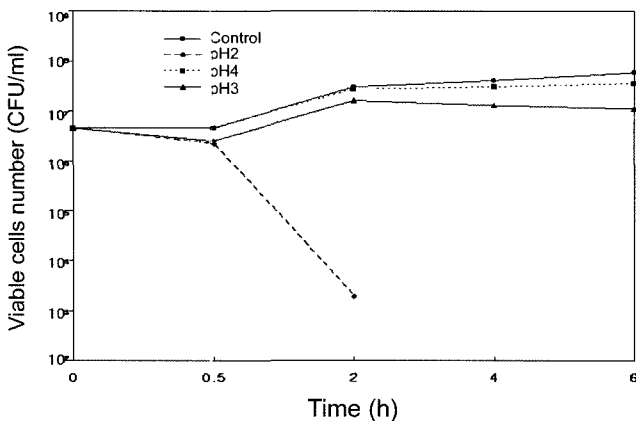


Fig. 3. Resistance of *L. salivarius* CPM-7 to low pH in MRS medium. Survival of *L. salivarius* CPM-7 in MRS broth adjusted to pH 2, 3, and 4, respectively, was determined. Culture samples were taken in designated times and spread on MRS plate to count surviving cells.

CPM-7 균주가 분비하는 유기산 이외에도 다른 항균물질이 함유되어 있을 것으로 추측되었다. 유산균의 항균력은 주로 배양중에 생성되는 유기산에 의한 것이나, 이외에도 박테리 오신, 과산화수소, diacetyl 등에 의한 것으로 알려져 있다[6, 14, 16]. 본 실험에서 나타난 바와 같이, CPM-7 균주가 분비하는 유기산 이외의 항균물질에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

분리균주의 내산성 (acid tolerance)

선발된 균주가 생균제로서 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3 이하의 조건인 동물의 위를 통과하여야 한다. 1N HCl로 pH 2, 3, 4로 각각 조정한 MRS 액체배지에 *L. salivarius* CPM-7을 접종한 후에 37에서 배양하면서 배양시간별 생균수의 변화를 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, *L. salivarius* CPM-7를 pH 2에서 30분간 두었을 때 거의 절반이 생존하였으며(48%), 30분 이후부터는 생존률이 급격히 감소하였다. 한편, pH 3에서의 생균수는 접종 초기와 거의 비슷한 수준을 유지하였으며, pH 4에서는 control 구(pH 미조정구)와 유사하게 배양시간에 따라 생균수가 오히려 증가하였다. Mutai의 보고[9]에 의하면 *Lactobacilli*의 경우 pH 2.5°C에서 30분 동안 처리했을 때 1%의 생존율을 나타내었으며, 돼지의 장에서 분리한 *L. salivarius*는 pH 3의 조건에서 1시간 후에 78%, 2시간 후에 절반 수준의 생존률을 나타내었다고 보고된 바 있다[11]. 또한, *Lactobacillus acidophilus* PF01은 pH 2에서도 2시간동안 거의 생존한 반면[1], *L. acidophilus* KCTC 3155의 경우에는 pH 3과 pH 4에서도 2시간 후이 22% 및 51%의 생존률을 나타내었다[10]. 음식물의 섭취량이나 종류에 따라 차이가 있겠지만 음식물이 위를 통과하는데 2~3시간이 소요되며 위산의 pH가 2~3으로 희석된다는 점을 고려할 때[10, 11], 내산성을 가진

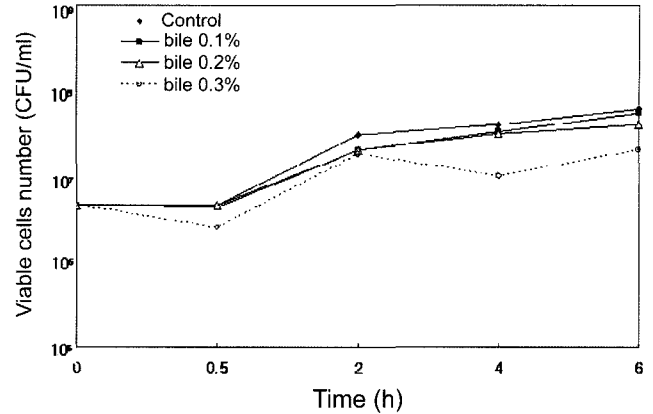


Fig. 4. Bile tolerance of *L. salivarius* CPM-7 in MRS medium. *L. salivarius* CPM-7 was inoculated into MRS broth containing 0.1, 0.2, and 0.3% (w/v) bile salts, and incubated at 37. Culture samples were taken in designated times and spread on MRS plate to count surviving cells.

L. salivarius CPM-7이 실제로 위를 통과한 이후의 생존률은 실험치보다 더 높은 가능성을 배제할 수 없다.

분리균주의 내담즙성(bile tolerance)

생균제로서 갖추어야 할 조건 중의 하나는 담즙산에 대한 내성이다. *L. salivarius* CPM-7의 담즙산 내성을 측정하기 위하여, 담즙산염(bile salt) 0.1~0.3%가 각각 함유된 MRS broth에 *L. salivarius* CPM-7 배양액 0.1%를 접종한 후에 37°C에서 배양하면서 배양시간별 생균수의 변화를 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 bile salt 0.1% 및 0.2% 첨가구에서는 control구(bile salt 무첨가구)와 유사하게 생균수가 오히려 증가추세를 나타내었고, bile salt 0.3% 첨가구에서는 6시간 이후에도 접종 초기와 비슷한 균수를 유지하였다. *Lactobacillus* 속은 담즙산에 대한 내성이 약한 편이라고 보고된 바 있으며[4], Park 등[10]은 *L. acidophilus* KCTC 3155를 담즙산 0.3% 함유 배지에 첨가할 경우 균수가 급격히 감소하였다고 보고한 바 있다. 그러나, Ahn 등[1]에 의하면 *L. acidophilus* PF01은 bile extract 0.5% 배지에서 24시간 이후에도 균수의 감소가 없었으며, 돼지의 장에서 분리한 *L. acidophilus*는 0.3%의 담즙산에서 24시간 후에도 76%의 생존률을 나타내어 담즙산에 강한 내성을 나타내었다[11]. 본 실험에서 나타난 바와 같이, *L. salivarius* CPM-7은 담즙산에 대한 내성이 강한 편으로 나타났기 때문에 생균제로서의 가치가 있을 것으로 판단되었다.

분리균주의 효소 활성

미생물의 효소 생산여부도 생균제 선발의 주요 지표중의 하나이다. 본 실험에서 분리한 *L. salivarius* CPM-7이 어떠한 효소 역가를 나타내는지 확인하기 위해 API ZYM kit를 사용하였다. Table 2에서 보는 바와 같이, *L. salivarius*

Table 3. Enzyme activities of *L. salivarius* CPM-7 by API ZYM analysis.

Enzyme	Result ¹⁾
1. Control	0
2. Alkaline phosphatase	3
3. Esterase (C ₄)	3
4. Esterase Lipase(C ₈)	3
5. Lipase(C ₁₄)	2
6. Leucine arylamidase	5
7. Valine arylamidase	4
8. Crystine arylamidase	4
9. Trypsin	0
10. α -chymotrypsin	0
11. Acid phosphatase	4
12. Naphol-AS-BI-phosphohydrolase	4
13. α -galactosidase	5
14. β -glucuronidase	4
15. β -glucosidase	0
16. α -glucosidase	0
17. β -glucosidase	2
18. N-acetyl- β -glucosidase	2
19. α -mannosidase	0
20. α -fucosidase	0

¹⁾ 0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol; 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, = 40 nmol.

CPM-7은 강한 α -galactosidase 활성을 나타내었으며, 이외에도 alkaline phosphatase, esterase, lipase, acrylamidase 활성을 나타내었다. 특히, α -galactosidase는 대두와 같은 곡류에 많이 존재하여 대장내 가스 발생을 유발하는 raffinose나 stachyose와 같은 당류를 분해시키는 효소이므로, 사람이나 동물에 있어서 정상효과를 기대할 수 있다[2].

장 상피세포 흡착능

숙주동물 장관세포에의 흡착능은 생균제가 인체나 동물의 장내 정착을 하기 위한 전제조건이다[13]. 본 연구를 통해 선발한 *L. salivarius* CPM-7이 동물의 장관세포에의 흡착능이 있는지의 여부를 간실험을 통해 조사하였다. Overnight 배양한 *L. salivarius* CPM-7을 돼지의 장 상피세포 현탁액과 37°C에서 30분간 혼합한 결과, *L. salivarius* CPM-7이 장 상피세포에 흡착함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 생균제의 장관세포 흡착능 여부는 숙주동물 특이적(host-specific)이라고 알려져 있지만[3, 8], 본 연구를 통하여 닭의 분변에서 분리한 *L. salivarius* CPM-7가 돼지의 장관 상피세포에도 흡착함을 확인할 수 있었다.

항생물질과의 항균력 비교

L. salivarius CPM-7 배양액의 대장균 억제능을 몇 가지 항생물질과 비교하였다. 자돈 설사를 유발시키는 것을 알려진 *E. coli* K88를 도말한 LB 평판배지에 *L. salivarius*

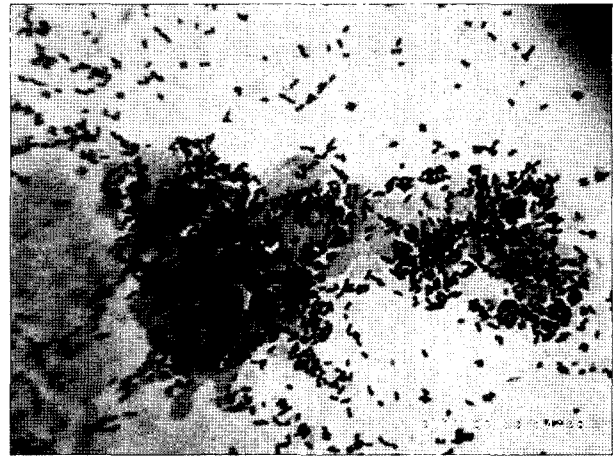


Fig. 5. Adhesion of *L. salivarius* CPM-7 to the duodenal epithelium cells of pig. The epithelium cell suspension was mixed with *L. salivarius* CPM-7 cell suspension, and the tube containing cell mixture was rotated at 20 rpm at 37°C for 30 min. Adhesion of the bacterial cells to the epithelium cells was examined using light microscopy ($\times 1,500$) after Gram-staining.

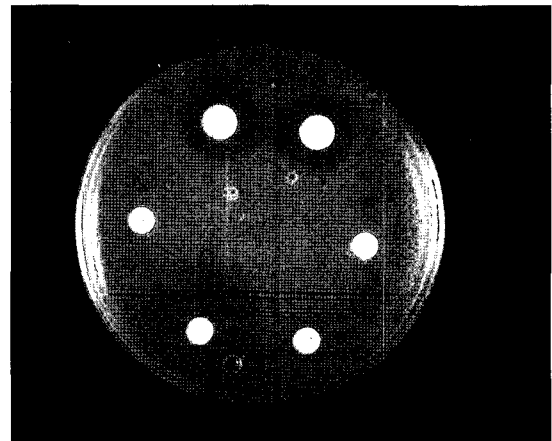


Fig. 6. Inhibitory activity of the supernatant of *L. salivarius* CPM-7 against *E. coli* compared with the those of antibiotics. 24H, culture supernatant of CPM-7 incubated for 24 hr; 48H, culture supernatant of CPM-7 incubated for 48 hr; K, kanamycin (30 μ g); P, penicillin (10 units); T, tetracycline (30 μ g); C, chloramphenicol (30 μ g).

CPM-7 배양액 100 μ L 및 항생물질이 함유된 paper disk를 올려놓고 overnight 배양한 후에 억제환의 크기를 비교 관찰하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, *L. salivarius* CPM-7 균주의 24시간 및 48시간 배양액의 대장균 억제능은 chloramphenicol(30 μ g) 보다는 낮았으나, penicillin(10 units), kanamycin(30 μ g) 및 tetracycline(30 μ g) 보다는 높았다. 본 실험에서 나타난 항균효과는 CPM-7 균주가 분비하는 유기산과 본 실험에서 아직 규명되지 않은 항균물질과의 복합적인 작용으로 나타나는 것으로 사료된다. 이상의 실험 결과에서 본 바와 같이, 항생제를 대체할 수 있는 생균제로서 *L. salivarius* CPM-7의 가능성을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 *E. coli*에 대한 항균활성이 높은 *L. salivarius* CPM-7를 산란계의 분변으로부터 분리하였으며, 생균제적 특성에 대하여 조사하였다. *L. salivarius* CPM-7는 내산성 및 내담즙성이 우수한 편으로 나타났을 뿐만 아니라 유해균에 대한 항균활성이 강하기 때문에, 추가적인 연구를 통해 *L. salivarius* CPM-7이 분비하는 항균물질의 특성 조사 및 동물용 생균제로서의 적용 연구를 지속할 예정이다.

요 약

산란계의 분변으로부터 생균제 특성을 가진 유산균을 분리하기 위하여, 두작위 선발법과 agar well diffusion assay 방법을 사용하여 다수의 유산균을 1차 선발하였으며 이 중에서 대장균 억제능이 가장 우수한 CPM-7 균주를 분리하였다. 최종 선발된 CPM-7 균주는 형태학적 특징, 당 이용성 및 16S rRNA 서열 분석을 통하여 *Lactobacillus salivarius* CPM-7으로 동정되었다. *L. salivarius* CPM-7은 내산성 및 내담즙성이 우수한 것으로 나타났는데, pH 2에서 30분 동안 및 pH 3에서 6시간 동안 생균수가 거의 유지되었으며, bile salt 0.2%가 첨가된 MRS 배지에서 증식할 수 있었다. *L. salivarius* CPM-7은 a-galactosidase를 포함한 다수의 효소를 생산하는 것으로 확인되었으며, 돼지의 장 상피세포에 흡착할 수 있었다. *L. salivarius* CPM-7의 배양액 및 중화액은 자돈 설사를 유발하는 것으로 알려진 *E. coli* K88에 대한 강력한 억제능을 나타내었다.

감사의 글

이 연구는 경기도에서 지원하는 경기도지역 협력연구센터 사업으로부터 연구비를 지원받았기에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, Y. T., K. Lim, J. C. Ryu, D. K. Kang, J. S. Ham, Y. H. Jang, and H. U. Kim. 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **15**: 1790-1797.
- Carrera-Silva, E. A., A. Silvestroni, J. G. Leblanc, J. C. Piard, G. Savoy de Giori, and F. Sesma. 2006. A thermostable alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum* CKL722: genetic characterization and main properties. *Cur. Microbiol.* **53**: 374-378.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Gilliland, S. E., T. E. Staley, and Bush, L. J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045-3051.
- Ham, J. S., H. S. Kim, K. H. Hong, J. G. Kim, S. G. Jeong, H. S. Chae, J. N. Ahn, D. K. Kang, and H. U. Kim. 2003. Inhibitory activity of lactic acid bacteria against hazardous microbes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**: 1550-1554.
- Kim, D. S. 2002. Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus sp.* Oh-B3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 184-188.
- Kim, P. I., M. Y. Jung, Y. H. Chang, S. Kim., S. J. Kim, and Y. H. Park. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. 2006. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1103-1111.
- Mayer-Makinen, A., M. Manninen, and H. Gyllenberg. 1983. The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 241-245.
- Mutai, M. 1983. Utilization and Effect of Latic Acid Bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 339-345.
- Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 4433-4440.
- Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm. 1999. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from piglet intestines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 830-836.
- Pavlova, S. I., A. O. Kilic, S. S. Kilic, J. S. So, M. E. Nader-Macias, J. A. Simoes, and L. Tao. 2002. Genetic diversity of vaginal *Lactobacillus* from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 451-459.
- Quwehand, A. C., P. V. Kirjavainen, C. Shortt, and S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* **9**: 43-52.
- Robredo, B. and C. Torres. 2000. Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* of animal origin. *J. Clinical Microbiol.* **38**: 3908-3909.
- Sohn, J. H., J. H. Lee, H. Yi, J. Chun, K. S. Bae, T. Y. Ahn, and S. J. Kim. 2004. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int. J. Syst. Environ. Microbiol.* **54**: 675-680.
- Stern, N. J., E. A. Svetoch, and B. V. Eruslanov. 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.

(Received May 4, 2007/Accepted Jun. 2, 2007)