

# 랫트에서 뱀장어로부터 분리된 *Lactobacillus pentosus* PL11의 병원성 및 배양액에 대한 단회 경구독성 시험

이중수 · 장승희 · 최명진 · Elias Gebru · 박승춘\*

경북대학교 수의과대학  
(게재승인: 2009년 11월 25일)

## Pathogenicity of *Lactobacillus pentosus* PL11 isolated from eel (*Anguilla japonica*) intestine and single oral toxicity of its culture broth in rats

Joong-Su Lee, Seung-Hee Jang, Myung-Jin Choi, Elias Gebru, Seung-Chun Park\*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Accepted: November 25, 2009)

**Abstract :** The pathogenicity and acute toxicity of *Lactobacillus* (*L.*) *pentosus* PL11 from eel (*Anguilla japonica*) were investigated using male and female Sprague-Dawley rats. The pathogenicity of *L. pentosus* PL11 was examined after treating the rats with  $10^{11}$  CFU/mL,  $10^9$  CFU/mL or  $10^7$  CFU/mL doses of *L. pentosus* PL11 culture or 0.85% NaCl (Control) intragastrically. For acute toxicity studies, rats were treated with dried culture broth of *L. pentosus* PL11 at doses of 5,000 mg/mL, 2,500 mg/mL, 1,250 mg/mL or 625 mg/mL or Lactobacilli MRS broth (Control), and clinical signs or mortalities were monitored for two weeks. The results of the present investigation revealed no mortalities or obvious clinical signs in rats administered with the live bacterial cultures or dried culture broth at any investigated dose level. Also, no significant differences were observed in net body weight gain, gross pathological findings, feed and water consumption and body temperature among the different treatment groups and between the treated and control rats. It can be concluded from the above findings that *L. pentosus* PL11 is a safe probiotic strain with potential as feed additive to increase the feed efficiency or health of fish.

**Keywords :** acute toxicity, *anguilla japonica*, *lactobacillus pentosus*, pathogenicity

## 서 론

생균제(probiotics)는 항생제의 상대되는 개념으로 사람이나 가축에서 장내미생물의 균형을 유지시키고 숙주에 유익한 작용을 할 수 있는 살아있는 미생물 혹은 그 균주가 생산한 대사산물을 의미한다 [9]. 생균제는 단일 및 복합형태의 유산균, 비피더스균 그리고 각종 소화효소가 첨가된 형태로 제형화되어 투여되고 있다 [15]. 생균제로 많이 사용하는 균주는 *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhodobacter* 등의 세균류, *Saccharomyces*

의 효모류 그리고 *Aspergillus* 등의 곰팡이류가 많이 사용되고 있으며, 대부분 균주는 generally recognized as safe로 알려져 있다 [11]. 이러한 생균제들 중에서 가장 널리 이용하고 있는 균주는 유산균주로 *Lactobacillus* sp. 와 *Bifidobacterium* sp.이다 [13].

유산균은 생균제로의 특성이 뛰어나서 유익한 물질인 lactic acid를 생산하지만 indole, skatole, phenol, amine 그리고 ammonia 등과 같은 유해물질은 생산하지 않는 미생물이다 [5]. *Lactobacillus*는 공통적인 특성으로는 그람 양성균으로 비포자이고 catalase 반응 시 음성을 나타내

\*Corresponding author: Seung-Chun Park

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea  
[Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964, E-Mail: parksch@knu.ac.kr]

는 간균이다 [24].

*Lactobacillus*의 생리활성의 기능은 장내 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소, 질병 예방, 면역 활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하, 유당불내증의 경감 그리고 변비억제 등의 기능을 갖고 있다고 알려져 있다 [12]. 그러나 *Lactobacillus*를 이용한 생균제에 대한 연구는 주로 사람과 가축에서 분리된 균주로 개발된 제품이 주를 이루고 있다.

유산균은 종-특이성(species-specificity)이 있어 사용하고자 하는 동물의 장세포와 어떤 친화력이 있어서 분과 함께 증식되는 데로 배설되지 않고, 장내 흡착(adhesion)하는 특성이 있어야 효과적으로 질병 예방 및 치료효과를 얻을 수 있다 [22]. 그럼에도 불구하고, 현재 생균제(probiotics)로 사용되고 있는 대부분의 유산균 속들은 사람 및 육상동물의 장내에서 쉽게 분리되는 특성이 있으며, 이를 사람 및 육상동물 뿐만 아니라 해상 및 담수에 생육하는 어류에도 적용하고 있다. 또한 어류의 경우에는 사람과 가축의 유산균과는 달리 발효조건과 높은 염농도에도 잘 견딜 수 있는 균주여야 한다.

어류에 관한 생균제의 연구를 보면 양 등 [4]은 *Lactobacillus sakei* BK19의 어류 병원성 세균에 대한 항균활성에 대하여 연구하였으며 백 등 [1]은 생균제에 의한 해수양식어의 성장촉진 및 항균효과 대하여 연구하였다. 위와 같이 어류농장에서 사용되는 대부분의 유산균의 경우 같은 종의 어류에서 분리된 유산균이 아닌 일반적인 양식어류, 김치 또는 젓갈류에서 분리된 유산균을 사료첨가제로써 종과 관계없이 모든 농장에서 이용하는 실정이다.

Byun 등 [8]은 넙치에서 분리된 *Lactobacillus* sp. DS-12 균주를 생균제로 처음 개발하여 급성독성시험을 실시한 후에 넙치를 대상으로 분리된 균주의 생균제 효과를 처음으로 넙치에서 구명하였다. 또한 넙치에서 분리된 *Lactobacillus* sp. DS-12 유산균주는 바닷물의 고염에 적응하는 능력이 있어 넙치뿐만 아니라 해수어의 사료 첨가제로 현재 사용을 하고 있다. 그러나 뱀장어는 넙치와 사육환경이 다르므로 새로운 생균제의 개발이 필요하며 경제적으로도 고부가가치를 갖는 어종이다. 따라서 수의학적인 관점에서 뱀장어에 대한 생균제 연구가 매우 적은 상태이기 때문에 전용 생균제의 개발은 매우 중요한 연구로 생각된다.

뱀장어(*Anguilla japonica*)는 바닷물과 민물에서 동시에 살 수 있는 어종으로 현재까지 이 환경에서 투여할 수 있는 적합한 생균제 개발이 되어있지 않다. 경제적인 관점에서 국내 뱀장어 양식생산량은 2002 년도 2,725 톤에서 2005 년도에 5,775 톤으로 급성장하고 있으며 이는 전체 담수양식 생산량의 26.5%에 해당하는 중요한

양식대상 품종이다(해양수산부, 2007). 하지만 생균제에 대한 뱀장어 시장의 사용은 크지 않지만 항생제의 사용이 감소하는 대신에 생균제의 사용이 점차 증가하고 있는 추세이다. 뱀장어에서 생균제 사용의 가능성에 대한 보고 [10, 16, 21]는 있지만 뱀장어 전용생균제로 개발이 되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 뱀장어의 장관에서 분리된 *Lactobacillus* (*L.*) *pentosus* PL11 균주를 이용하여 뱀장어 전용생균제의 개발과 효능시험을 위한 전 단계 연구인 랫트에서 병원성 시험과 배양산물의 단회급성독성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

5 주령 Sprague-Dawley 계통의 특정병원균 부재(specific pathogen free) 랫트를 오리엔트에서 구입 후 1 주간의 적응기를 둔 후 체중이 유사한 랫트를 임의배치 방법으로 사육 상자 당 5 마리씩 실험에 투입하였다. 적응 시간 동안 일반적인 이상 증상은 관찰되지 않았다. 본 실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실시를 하였다.

온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$  조명시간 12 시간(오후 6 시~오후 6 시) 및 조도 150~300 Lux로 설정 뒤 수행하고, 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(효창 싸이언스, 대구)와 정수시스템을 이용한 물(tap water)을 자유섭취 하도록 하였다.

### 균분리와 투여용량의 설정 및 투여용량

뱀장어는 일본산 뱀장어(Japanese eel)인 *Anguilla japonica* 종으로 선택하였으며 전남 화순의 어장에서 항생제 및 생균제 투여를 하지 않은 살아있는 뱀장어를 급속 냉동하여 실험실로 가져와 실험에 사용하였다. 유산균 균주 분리는 한국바이오벤처협회 유산균 검출 및 계산방법 [14]에 따라 유산균 후보균을 일차적으로 분리하였으며 이 균주를 유산균의 형태학적인 특징 [23]과 분자생물학적, 생화학적 [20] 분석을 통해 *L. pentosus* 균주로 동정하였다(unpublished data). 동정된 균주는 *L. pentosus* PL11 균주로 명명한 후 Genbank에 등록하였다(accession number FJ386571). 분리된 균주 *L. pentosus* PL11을 Lactobacilli MRS broth(BD, Korea)배지에 계대 배양하면서 본 실험에 이용하였다. 단회경구독성시험을 위한 균체 배양은 Lactobacilli MRS broth에 백금이를 이용하여 *L. pentosus* PL11를 접종한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 180 rpm으로 1 일간 진탕 배양하였다. 균체 회수는 배양액을 5,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 균체를 회수하고 0.85% NaCl로 2 회 washing한 후

생균수를 측정  $1 \times 10^{11}$  Colony Forming Units(CFU)/mL 이 되도록 0.85% NaCl를 이용하여 현탁 시킨 후 균체의 병원성 실험에 이용하였다. 배양액은 균체가 제거된 상등액을 회수하여 진공농축한 후 동결 건조하여 단회 경구독성시험을 실시하였다.

유산균인 *L. pentosus* PL11의 독성 시험은 Lim 등 [17]의 방법을 응용하여 시험균은 대조군(Control, 0.85% NaCl), 저용량군( $10^7$  CFU/mL), 중용량군( $10^9$  CFU/mL) 그리고 고용량군( $10^{11}$  CFU/mL)으로 구성하였으며, 동물을 투여 전에 하룻밤 절식시킨 후 랫트용 존대 부착한 주사관을 이용하여 20 mL/kg로 1 회 경구 투여하고 14 일 동안 관찰을 실시하였다. 동결 건조된 배양액의 단회 경구독성시험을 위해 멸균된 생리식염수에 5,000 mg/kg, 2,500 mg/kg, 1,250 mg/kg 및 625 mg/kg 농도로 조정하였다. 생리식염수투여군을 대조군으로 두었다. 랫트는 투여 하루 전에 절식 시키고 20 mL/kg로 1 회 경구투여한 후에 14 일 동안에 관찰을 실시하였다.

**임상증상관찰 및 치사율**

식품의약품안전청의 독성시험기준 [2] 및 OECD test guideline 420(TG 420) [19]에 따라 모든 실험동물에 대하여 투여당일은 투여 후 1 시간에서 6 시간까지는 매 시간 일반 상태를 관찰하였고 투여 익일부터 14 일까지는 매일 1 회씩 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

**체중 및 체온측정**

모든 동물에 대하여 투여직전과 투여 후 1, 3, 7 및 14 일에 체온과 체중을 측정하였다.

**사료량 및 음수량 측정**

모든 동물에 대하여 투여직전과 1~14 일 동안의 사료 섭취량과 음수량을 측정하였다.

**부검**

투여 후 14 일째 모든 생존 동물에 대하여 CO<sub>2</sub> 마취하여 복대 정맥을 통한 방혈을 실시하여 실혈 치사 시킨 후, 장기를 적출하고, 육안적 병변 관찰 및 장기의 무게를 측정하였다.

**통계학의 해석**

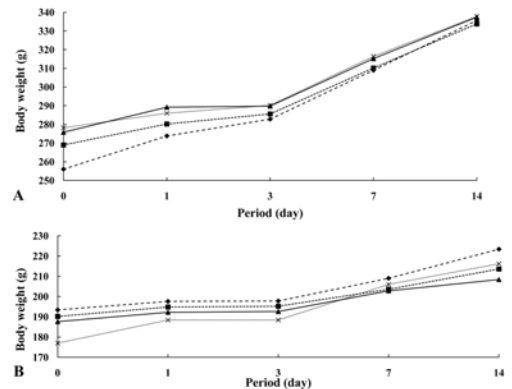
본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(SAS, USA)를 이용하였다. 측정항목 중 체중 결과에 대하여 ANOVA 검정법을 사용하였고 사망동물이 관찰되지 않아 반수치사량(LD<sub>50</sub>)의 산출을 위한 통계는 실시를 하지 않았다.

**결 과**

***L. pentosus* PL11의 병원성 시험**

**치사율 및 임상증상**

*L. pentosus* PL11을 경구 투여 시  $10^{11}$  CFU/mL인 고



**Fig. 1.** Body weight curves for male (A) and female (B) rats given *Lactobacillus (L.) pentosus* PL11 for 14 days. Values are mean  $\pm$  SD.  $\blacklozenge$ -;  $10^{11}$  CFU/mL,  $\blacksquare$ -;  $10^9$  CFU/mL,  $\blacktriangle$ -;  $10^7$  CFU/mL,  $- \times -$ ; 0.85% NaCl (Control).

**Table 1.** Mortality of male and female rats orally administered with *Lactobacillus (L.) pentosus* PL11

Sex	Dose (CFU/mL)	Days after administration														Final mortality(%)	LD <sub>50</sub>	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Male	$10^{11}$ (High)	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> $10^{11}$ CFU/mL
	$10^9$ (Middle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	$10^7$ (Low)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	$10^{11}$ (High)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> $10^{11}$ CFU/mL
	$10^9$ (Middle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	$10^7$ (Low)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

\*Number of dead animals.

용량군을 포함한 모든 암·수 시험군에서 시험기간 동안 *L. pentosus* PL11에 기인한 사망은 관찰되지 않았다 (Table 1). 또한 *L. pentosus* PL11에 의한 독성증상과 특이할 만한 임상증상도 나타나지 않았다. 이상의 결과로 *L. pentosus* PL11는 암·수 모두에서  $10^{11}$  CFU/mL 이상에서는 병원성 물질이 아닌 것으로 추정된다.

### 체중변화 및 체온증상

$10^{11}$  CFU/mL,  $10^9$  CFU/mL 그리고  $10^7$  CFU/mL의 *L. pentosus* PL11를 실험동물에 각각 경구 투여한 후 투여 일로부터 시험기간인 14 일 동안 체중 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암·수 동물에서 정상적으로 체중이 증가되었다. 또한 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중 변화는 관찰되지 않았으며, *L. pentosus* PL11의 균체

농도에 따른 체중의 차이 또한 나타나지 않았다(Fig. 1).

체온의 변화도 대조군과 시험군에서 유의할 만한 이상체온을 나타내지 않았고 시험군들 사이에서도 유의할 만한 이상체온은 나타나지 않았다(Table 2).

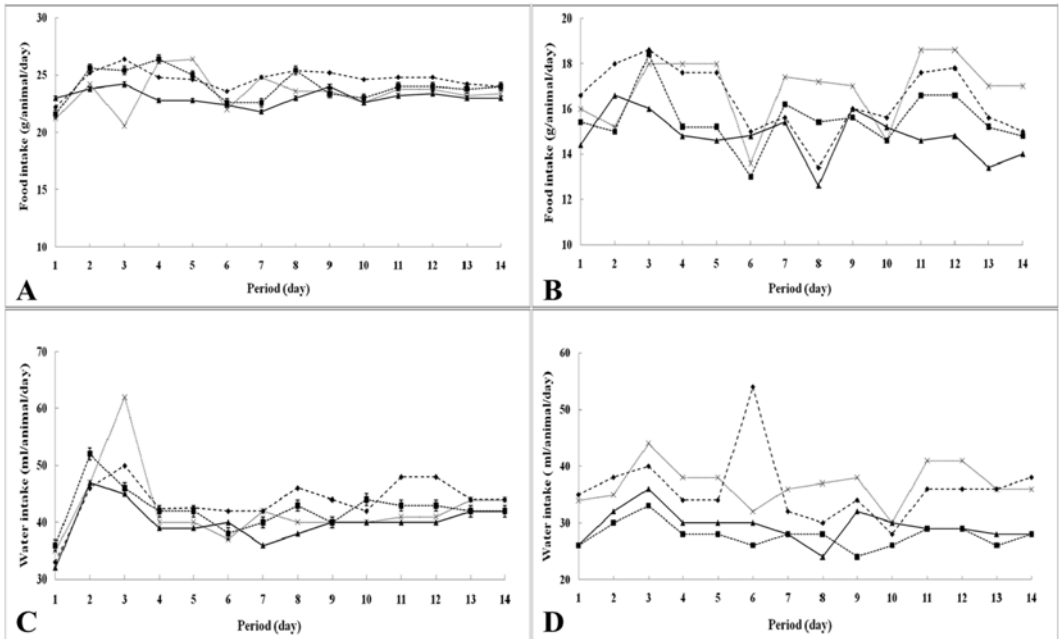
### 사료량 및 음수량 변화

$10^{11}$  CFU/mL,  $10^9$  CFU/mL 그리고  $10^7$  CFU/mL의 *L. pentosus* PL11를 실험동물에 각각 경구투여한 후 투여 일로부터 시험기간인 14 일 동안 매일 사료량 및 음수량의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암·수 동물에서 *L. pentosus* PL11의 투여에 의해 정상적으로 사료와 음수를 섭취되었다. 또한 대조군과 비교 시 유의성 있는 섭취변화는 관찰되지 않았으며, *L. pentosus* PL11의 균체 농도에 따른 섭취량의 차이 또한 나타나지 않

**Table 2.** Body temperature changes in male and female rats orally treated with *L. pentosus* PL11

Day	Male body temperature				Female temperature			
	$10^{11}$ (High)	$10^9$ (Middle)	$10^7$ (Low)	Control	$10^{11}$ (High)	$10^9$ (Middle)	$10^7$ (Low)	Control
Pre-treatment	35.3 ± 0.4	34.7 ± 0.6	35.0 ± 0.7	34.7 ± 0.8	34.0 ± 0.2	34.0 ± 0.2	34.0 ± 0.4	35.0 ± 0.5
Day 1	35.2 ± 0.4	35.1 ± 0.6	35.4 ± 0.4	35.1 ± 0.4	35.2 ± 0.3	34.8 ± 0.6	34.5 ± 0.6	34.9 ± 0.2
Day 2	35.4 ± 0.7	35.5 ± 0.6	34.6 ± 0.7	35.2 ± 0.5	35.1 ± 0.8	35.0 ± 0.3	34.8 ± 0.9	35.5 ± 0.4
Day 3	35.2 ± 0.6	35.0 ± 0.8	34.9 ± 0.9	34.9 ± 0.9	35.1 ± 0.4	35.3 ± 0.4	34.8 ± 0.3	35.4 ± 0.5
Day 4	35.1 ± 0.4	35.4 ± 0.4	35.1 ± 0.4	35.5 ± 0.3	35.7 ± 0.9	35.3 ± 0.4	35.8 ± 0.3	34.7 ± 1.0

Values are presented as mean ± SD. No significant difference observed ( $p < 0.01$ , ANOVA).



**Fig. 2.** Food and water consumption of male (A, C) and female (B, D) rats given *L. pentosus* PL11 for 14 days. Values are mean ± SD. ◆-;  $10^{11}$  CFU/mL, ■-;  $10^9$  CFU/mL, ▲-;  $10^7$  CFU/mL, ×-; 0.85% NaCl (Control).

**부검 및 장기무게**

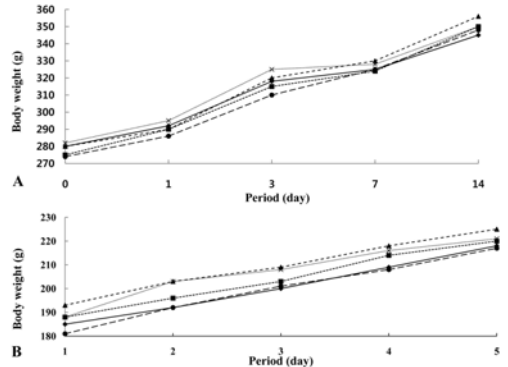
시험물질 투여 14 일 후, 모든 장기에 대하여 육안적 병변(색깔 및 형태)을 관찰 결과 수컷 대조군에 콩팥의 색이 황갈색이 관찰되었으나 이는 대조군의 우발적 변화였으며, 그 외의 장기에서의 어떠한 이상 소견도 관찰되지 않았다. 장기(liver, kidneys, spleen)의 무게(Table 3) 또한 유의적인 변화도 관찰되지 않았다.

**동결 건조된 *L. pentosus* PL11 배양액의 단회경구독성시험**

**치사율 및 임상증상**

*L. pentosus* PL11의 배양액을 동결 건조한 분말이 저독성을 고려하여 단회경구투여 한계용량인 2,000 mg/kg [26]의 용량을 사용한 예비실험에서 치사한 동물이 없으므로 투여할 수 있는 최고 용량인 5,000 mg/kg을 최고 용량으로 하여 625 mg/kg, 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg 및 5,000 mg/kg의 농도로 경구투여한 후 14 일 동안 관찰하

였다. 그 결과, 배양액에 의한 사망은 나타나지 않았으며, 유의할 만한 어떤 임상증상도 관찰되지 않았다. 따



**Fig. 3.** Body weight curves of male (A) and female (B) rats given *L. pentosus* PL11 dried culture broth for 14 days. Values are mean  $\pm$  SD.  $\blacklozenge$ -; 5,000 mg/mL,  $\blacksquare$ -; 2,500 mg/mL,  $-\blacktriangle$ -; 1,250 mg/mL,  $- \times -$ ; 625 mg/mL,  $\bullet$ -; 0.85% NaCl (Control).

**Table 3.** Absolute organ weights (g) of male and female rats orally administered with *L. pentosus* PL11

Sex	Parameters	Dose (CFU/mL)	10 <sup>11</sup> (High)	10 <sup>9</sup> (Middle)	10 <sup>7</sup> (Low)	Control	
		No. of animals	5	5	5	5	
Male	Body weight (g)		335.6 $\pm$ 37.2	333.8 $\pm$ 20.1	337.4 $\pm$ 18.7	337.8 $\pm$ 11.0	
	Liver (g)		14.0 $\pm$ 0.7	13.6 $\pm$ 1.1	13.6 $\pm$ 0.8	13.5 $\pm$ 2.2	
	Spleen (g)		0.9 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.2	
	Kidney (g)	Right		1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
		Left		1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
Female	Body weight (g)		223.4 $\pm$ 12.2	213.6 $\pm$ 7.8	208.4 $\pm$ 9.5	216.2 $\pm$ 15.9	
	Liver (g)		8.5 $\pm$ 0.9	7.6 $\pm$ 0.7	7.9 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 1.6	
	Spleen (g)		0.7 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	
	Kidney (g)	Right		0.9 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1
		Left		0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1

Values are presented as mean  $\pm$  SD. No significant difference observed ( $p < 0.01$ , ANOVA).

**Table 4.** Clinical findings of male and female rats orally administered with *L. pentosus* PL11 dried culture broth during 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Hours after treatment				Days after treatment				
			1	2	5	6	1	3	5	7	14
Male	5,000	NAD*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	2,500	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1,250	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	650	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Control	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Female	5,000	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	2,500	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1,250	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	625	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Control	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

\*NAD: No abnormality detected.

라서 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 농축 배양액의 LD<sub>50</sub>은 암·수 모두에서 5,000 mg/kg 이상으로 산출되었다 (Table 4).

**체중변화 및 체온증상**

5,000 mg/kg, 2,500 mg/kg, 1,250 mg/kg 및 625 mg/kg의 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 배양액을 실험동물에 각각 경구 투여한 후 투여일로부터 시험기간인 14 일 동안 체중 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암·수 동물에서 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 배양액의 투여 했을 때 정상적으로 체중이 증가되었다. 또한 대조군과 비

교 시 유의성 있는 체중 변화는 관찰되지 않았으며, 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 배양액 농도에 따른 체중의 차이 또한 나타나지 않았다(Fig. 3).

체온의 변화도 대조군과 시험군에서 유의할 만한 이상체온을 나타내지 않았고 시험군들 사이에서도 유의할 만한 이상체온은 나타나지 않았다(Table 5).

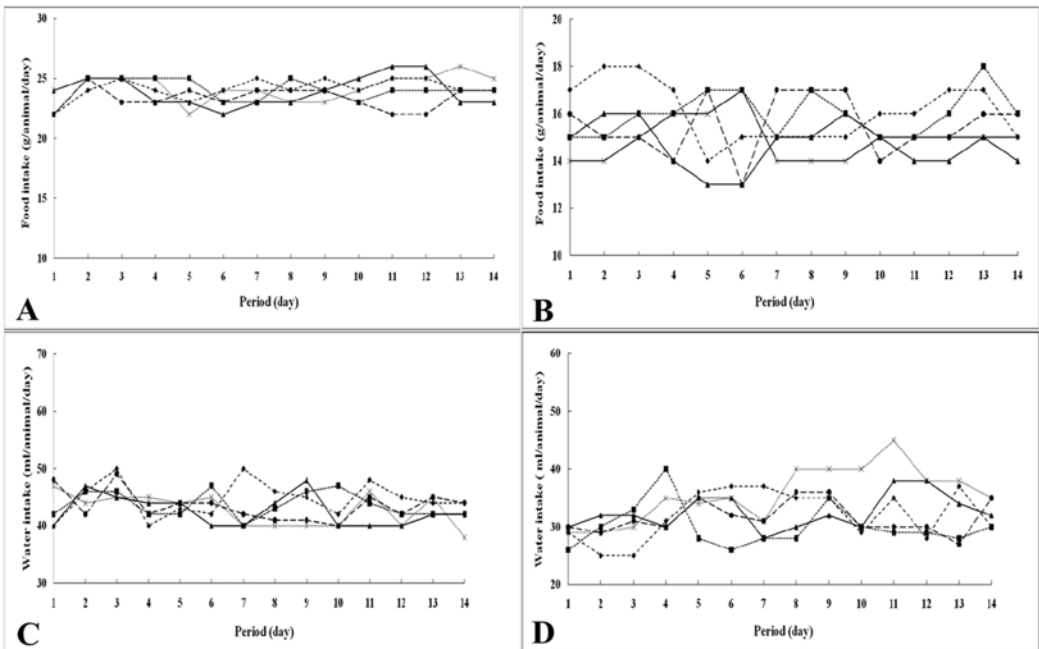
**사료량 및 음수량 변화**

5,000 mg/kg, 2,500 mg/kg, 1,250 mg/kg 및 625 mg/kg의 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 배양액을 실험동물에 각각 경구투여한 후 투여일로부터 시험기간인 14 일 동안

**Table 5.** Body temperature changes in male and female rats orally treated with *L. pentosus* PL11 dried culture broth

Day	Male body temperature					Female body temperature				
	Dose (mg/kg)					Dose (mg/kg)				
	5,000	2,500	1,250	625	Control	5,000	2,500	1,250	625	Control
Pre-treatment	35.8±0.7	35.6±0.6	35.9±0.5	35.9±0.6	35.6±0.4	35.7±1.3	35.5±0.8	35.6±0.6	35.5±0.5	35.8±0.7
Day 1	35.8±0.7	35.6±0.5	35.8±0.6	35.5±0.4	35.8±0.5	35.8±0.6	36.1±0.5	36.0±0.5	35.8±0.7	35.8±0.6
Day 2	35.7±0.7	35.5±0.9	36.1±0.6	35.7±0.6	35.5±0.4	35.9±0.6	35.5±0.8	36.1±1.0	35.7±0.7	35.7±0.7
Day 3	35.9±0.5	36.4±0.7	35.5±0.8	36.2±0.4	35.4±0.7	35.4±0.5	35.4±0.4	34.8±0.4	34.8±0.3	35.4±0.5
Day 4	35.1±0.5	35.3±0.8	35.9±0.6	35.9±0.9	35.6±0.8	35.9±0.4	35.3±0.4	35.7±0.9	35.8±0.3	35.2±0.6

Values are presented as mean ±SD. No significant difference observed ( $p < 0.01$ , ANOVA).



**Fig. 4.** Food and water consumption by male (A, C) and female (B, D) rats given *L. pentosus* PL11 dried culture broth for 14 days. Values are mean ±SD. -◆-; 5,000 mg/mL, -■-; 2,500 mg/mL, -▲-; 1,250 mg/mL, -×-; 625 mg/mL, -●-; 0.85% NaCl (Control).

**Table 6.** Absolute organ weights (g) of male rats orally administered with *L. pentosus* PL11 dried culture broth

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)	5,000	2,500	1,250	625	Control	
		No. of animals	5	5	5	5	5	
Male	Body weight (g)		324.6 ± 7.3	309.4 ± 8.8	339.4 ± 6.6	343.2 ± 11.3	337.6 ± 7.1	
	Liver (g)		14.2 ± 0.3	14.0 ± 0.5	14.5 ± 0.6	14.3 ± 0.3	13.5 ± 2.2	
	Spleen (g)		0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	
	Kidney (g)	Right		1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
		Left		1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Female	Body weight (g)		236.8 ± 9.0	245.6 ± 7.4	246.2 ± 7.0	240.6 ± 4.0	234.2 ± 15.8	
	Liver (g)		8.9 ± 0.5	8.5 ± 0.4	8.5 ± 0.5	8.6 ± 0.6	8.9 ± 0.6	
	Spleen (g)		0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	
	Kidney (g)	Right		0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0
		Left		0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0

Values are presented as mean ± SD. No significant difference observed ( $p < 0.01$ , ANOVA).

매일 사료량 및 음수량의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암·수 동물에서 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 농축 배양액 투여를 해도 정상적으로 사료와 음수를 섭취되었다. 또한 대조군과 비교 시 유의성 있는 섭취변화는 관찰되지 않았으며, 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 농축 배양액의 농도에 따른 섭취량의 차이 또한 나타나지 않았다(Fig. 4).

**부검 및 장기무게**

시험물질 투여 14 일 후, 모든 장기에 대하여 육안적 병변(색깔 및 형태)을 관찰한 결과 일부 수컷 대조군에 콩팥의 색이 황갈색이 관찰되었으나 이는 대조군의 우발적 변화였으며, 그 외의 장기에서의 어떠한 이상 소견도 관찰 되지 않았다. 장기(liver, kidneys, spleen)의 무게 (Table 6) 또한 유의적인 변화도 관찰되지 않았다.

**고 찰**

본 연구에서는 뱀장어의 전용 생균제를 개발하고자 뱀장어의 장내에서 유산균을 분리하여 특성과 균을 동정하여 *L. pentosus* PL11이라 명명하였다(unpublished data). 이 균주는 김치 및 닭 소장에서 분리되어져 강한 항균력과 내산성, 내담즙성이 뛰어난 것으로 알려져 있으나 [3, 6], 뱀장어에서 분리되어 생균제 개발이 된 경우는 없다. 현재 어류에서 사용중인 대부분의 유산균 균주는 사람 및 가축에서 유래된 균주를 사용하거나 같은 종의 유산균이 아닌 것을 사용하므로 문제점으로 지적되고 있다 [18]. 그러므로 국가 간 경쟁력의 차원과 경제적인 측면에서 환경에 민감한 어류에 대한 생균제 개발은 필수적이다 [7, 25]. 어류 중에서 현재 고부가가치를 가진 뱀장어의 전용생균제의 개발을 위해서 생균제

의 후보균주에 대한 효능시험 및 안전성시험은 중요하다. 따라서 본 연구에서는 위의 시험을 위한 전단계의 시험으로 분리균주인 *L. pentosus* PL11 균체의 병원성 유무 및 단회경구독성을 평가하였다.

병원성 균주는 통상적으로  $10^7$  CFU/mL 이상에서 임상증상을 보이며 또한 생균제는 통상적으로 투여 용량이  $10^7$  CFU/mL가 되어야 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 시험에서 *L. pentosus* PL11 균체의 병원성 유무를 확인하기 위하여 최저투여 용량 균수를  $10^7$  CFU/mL에서 시작하여 최고로 투여가능 한  $10^{11}$  CFU/mL 수준까지 투여하였다. 그 결과  $10^{11}$  CFU/mL 수준의 암·수 시험군에서 사망 또는 어떤 일반적인 임상증상의 변화가 나타나지 않았다. 따라서 *L. pentosus* PL11은  $10^{11}$  CFU/mL 이하에서 병원성이 없는 것으로 나타났다.

축산 및 어류에서 사료첨가제로 사용되는 생균제는 발효산물 즉 배양액을 동시에 사용하고 있다. 균주의 배양액에는 2 차 대사산물로 다양한 독소 및 유익한 물질 등 수많은 물질이 함유하고 있다. 따라서 배양액에 대한 단회경구독성시험은 생균제 개발에 있어서 중요한 요소가 될 수 있다. 본 시험에서는 *L. pentosus* PL11의 배양액을 농축 후 동결 건조하여 건조중량을 기준으로 단회 경구투여 한계용량인 2,000 mg/kg [26]의 예비실험에서 독성이 발견되지 않았다. 따라서 투여 가능한 최고용량인 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 2,500 mg/kg, 1,250 mg/kg 그리고 625 mg/kg의 모든 투여군에서 사망한 동물을 관찰 할 수가 없었다. 특히 최고용량인 5,000 mg/kg의 투여군에서 유의할 만한 어떤 임상증상도 관찰되지 않았다. 동결 건조된 *L. pentosus* PL11 배양액의 LD<sub>50</sub>은 암·수 모두 5,000 mg/kg이상이므로 배양액은 매우 안전한 물질로 나타났다. 이러한 결과는 배양액의 이용 가능성을 높여주는 결과이다.

지난 수세기 동안, 유산균을 이용한 생균제는 다양한 어류 병원성 세균으로부터 물고기의 감염을 예방하는데 사용하였다 [25]. 해로운 병원성 세균으로부터 예방할 수 있는 기전으로는 생균제가 어류의 면역을 증강시키는 것으로 알려져 있다 [10]. 이러한 이유로 인해 항생제로 대체할 수 있는 방법으로 유산균이 가장 많이 알려져 있으나 어장에서 그 효과는 미비한 것으로 알려져 있다. 이러한 결과에 대한 해결책이 될 수 있는 방법 중 어중에 맞는 생균제가 없다는 것이다.

따라서 본 연구에서는 최종 목표인 뱀장어 전용 생균제를 개발하고자 *L. pentosus* PL11이 면역증강을 일으킬 수 있도록 제형화하여 사료첨가제 또는 생균제품으로 사용 전에 첫 번째 단계 연구인 *L. pentosus* PL11의 균체 병원성시험과 배양액의 독성시험을 랫트에서 실시하여 안전한 균주임을 확인하였다. 향후 연구에서는 목적동물인 뱀장어에서 효능시험 및 안전성시험을 실시함과 동시에 환경에 맞는 제제화 연구가 이어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

뱀장어 장내에서 분리된 최초의 *L. pentosus* PL11 균주를 어류전용생균제로 산업화시키기 위하여 균체의 병원성 유무와 동결건조 된 배양액에 대한 단회경구독성을 실시하였다. 그 결과 랫트에서 *L. pentosus* PL11의 균체 최고용량인  $10^{11}$  CFU/mL에서 어떠한 병원성도 관찰할 수가 없었다. 한편 동결 건조된 *L. pentosus* PL11의 배양액에 대한 투여 가능한 최고용량인 5,000 mg/kg를 암·수 투여군에서 경구투여 하였을 때 사망률이 발생되지 않았다. 따라서 *L. pentosus* PL11의 안전한 균주임을 확인할 수가 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 교육과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 2009-0071490).

## 참고문헌

1. 백남수, 임유범, 김영만. Probiotics에 의한 해수양식의 성장촉진 및 항균효과. 한국미생물생명공학회지 2001, **29**, 56-61.
2. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품 안전청고시 제 1999-61호. 식품의약품안전청, 서울, 1999.
3. 안대경, 한태원, 신현영, 진익렬, 김사열. 김치로부터

분리한 젓산균의 다양성과 항균성. 한국미생물생명공학회지 2003, **31**, 191-196.

4. 양병규, 이재희, 허문수. *Lactobacillus sakei* BK19의 어류 병원성 세균에 대한 항균활성. 미생물학회지 2003, **39**, 56-61.
5. 이은영. 축산 환경개선제로 생산·유통 생균제의 문제점 및 검증방안. 한국미생물생명공학회지 2008, **36**, 87-95
6. 이재연, 황교열, 김근, 성수일, 박영식, 백만정, 김경례. 한국토종닭 소장에서 분리한 *Lactobacillus pentosus* K34가 생산하는 항균성 유기산의 특징. 한국미생물생명공학회지 2002, **30**, 241-246.
7. Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuéla I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol 2006, **114**, 173-186.
8. Byun JW, Park SC, Benno Y, Oh TK. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J Gen Appl Microbiol 1997, **43**, 305-308.
9. Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 1989, **66**, 365-378.
10. Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 1999, **180**, 147-165.
11. González CJ, Encinas JP, García-López ML, Otero A. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. Food Microbiol 2000, **17**, 383-391.
12. Havenaar R, Ten Brink B, Huis In't Veld JHJ. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R (ed.). Probiotics: The Scientific Basis. pp. 209-224, Chapman & Hall, London, 1992.
13. Hughes DB, Hoover DG. Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. Food Technol 1991, **45**, 74-79.
14. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 1, pp. 1.20.16-1.20.17, American Society of Microbiology, Washington DC, 1992.
15. Kim JH, Kim CH, Ko YD. Effects of dietary supplementation of probiotics (economix(R)) on milk production and economic characteristics in lactating dairy cattle. J Anim Sci Technol 2001, **43**, 369-380.
16. Kvasnikov EI, Kovalenko NK, Materinskaya LG. Lactic acid bacteria of freshwater fish. Mikrobiologiya 1977, **46**, 619-624.
17. Lim JH, Park BK, Kim MS, Rhee MH, Park SC, Yun HI. Acute oral toxicity and pathogenicity of a potential probiotic Bacillus sp. A9184 isolated from soybean paste. Toxicol Res 2004, **20**, 359-363.
18. Moriarty D. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 1997, **151**, 333-49.



19. **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)**. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Revised Draft Guideline 420. OECD, Paris, 2001.
20. **Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, SO JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, Tao L**. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol* 2002, **92**, 451-459.
21. **Ringø E, Gatesoupe FJ**. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 1998, **160**, 177-203
22. **Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC**. Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet Microbiol* 2003, **97**, 55-61.
23. **Sohn JH, Lee JH, Yi H, Chun J, Bae KS, Ahn TY, Kim SJ**. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**, 675-680.
24. **Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W**. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**, 655-671.
25. **Weiss N, Busse M, Kandler O**. The origin of fermentation by-products in the lactic acid fermentation of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch Mikrobiol* 1968, **62**, 85-93.
26. **Yamanaka S, Hashimoto M, Tobe M, Kobayashi K, Sekizawa J, Nishimura M**. A Simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. *Arch Toxicol* 1990, **64**, 262-268.