

양돈용 생균제 균주개발을 위한 유산균주 선발

유지숙¹ · 한선경 · 신명수 · 이완규*

충북대학교 수의과대학, ¹경기도축산위생연구소

(접수 2009. 2. 10, 게재승인 2009. 3. 20)

In vitro selection of lactic acid bacteria for probiotic use in pig

Ryu Ji-Sook¹, Sun-Kyung Han, Myeong-Soo Shin, Wan-Kyu Lee*

Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

¹Gyeonggido Veterinary Service, Suwon 441-460, Korea

(Received 10 February 2009, accepted in revised form 20 March 2009)

Abstract

In order to develop probiotic strain for pigs, *Lactobacillus* spp. (527 isolates), *Streptococcus* spp. (95 isolates) and *Bifidobacterium* spp. (25 isolates) were isolated from the feces of 35 pigs. These isolates were tested through in vitro experiment such as acid tolerance at pH 2.0 (*Lactobacillus* spp. and *Streptococcus* spp.) or pH 3.0 (*Bifidobacterium* spp.), bile tolerance in MRS broth containing 0.3% (w/v) Oxgall, heat resistance at 70°C and 80°C for 5 min, antibiotic resistance, antimicrobial activity against pathogenic bacteria and Caco-2 cell adherence assay. Finally ten most superior strain (5 *Lactobacillus* spp. strain, 3 *Bifidobacterium* spp. strain and 2 *Streptococcus* spp. strain) were selected as potential candidate for probiotic use in pig industry. It could be used as an alternative to antibiotics in feed additives.

Key words : Probiotics, Lactic acid bacteria, Acid and bile tolerance, Heat resistance, Antibiotic resistance, *In vitro* adherence assay

서 론

생균제(probiotics)는 Fuller(1989)가 “장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익하게 작용하는 생균 첨가물”로 정의하여 살아 있는 미생물로서의 개념으로 인식되어왔다. Salminen 등(1999)은 생균에 부가하여 사균으로 까지 그 범위를 확대하여 “숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 제제 또는 미생물의 성분”으로 정의를 확대하고 있다.

장내세균총(Intestinal microflora)의 균형 유지를 위

하여 건강 증진 효과가 있는 미생물의 균수와 활성을 증가시킬 목적으로 사용하는 생균제는, 위장관에서 발생하는 다양한 질병을 예방하거나 치료하는 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다. 생균제는 영양소의 경쟁적 이용, 병원균의 장관 상피세포나 점막의 부착방지, 항균 물질의 생산으로 병원성 미생물의 작용 억제, 숙주의 면역력을 증강, 발암물질 합성과 관련된 세균의 효소활성 억제 등의 매우 다양한 유익한 작용을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다(Rolfe, 2000).

현재 가장 일반적으로 이용되고 있는 양돈용 생균제용 균주로는 *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp. 등의 유산균

* Corresponding author: Wan-Kyu Lee, Tel. +82-43-261-2960, Fax. +82-43-267-3150, E-mail. wklee@cbu.ac.kr

(Lactic acid bacteria)이 있다(Lee와 Salminen, 1995). 유산균은 숙주에 유해한 대사산물을 생성하지 않으며 병원균의 증식을 억제하여 장내세균총을 유리하게 개선하는 등의 정장작용을 하는 것은 물론 각종 소화기 계통 질환의 예방과 치료에도 기여하고 있다(Rolfe, 2000).

생균제를 산업적으로 이용하기 위해서는 다양한 기준에 근거한 균주의 선별과 이들 균주의 최적생산 조건이 확립되어야 한다. 생균제로서 갖추어야 할 일반적 기본조건으로는 산업적 규모의 생산 및 저장 과정에서 활력을 유지할 것, 숙주에 대한 유익한 효과가 있을 것, 목적하는 부위의 정상적인 균주일 것, 그리고 목적하는 부위에서 생존 또는 생장할 것 등이 있다(Collins 등, 1998). 생균제는 위장관이라는 특정부위에 존재하면서 생리적 활성을 유지해야 하므로 외부 유입 미생물에 대한 동물의 위장관계 방어 장벽인 위산과 담즙산에 저항성을 나타내어야 하며, 숙주의 장관에 정착성이 있어야 한다. 가축에 적용하는 생균제의 경우 사료 첨가용이 일반적이므로 가공과정 시의 열처리에서 저항성을 가져야 하고 사료 첨가용 항생제에 대한 내성을 보유해야 한다. 또한 병원성 세균을 억제하는 등의 유용한 효과를 가져야 우수한 균주로서 인정될 수 있다(Byun 등, 2000).

본 연구는 양돈업의 생산성 향상을 위한 생균제용 유산균주의 개발을 위하여, 돼지의 분변으로부터 유산균을 분리하여 생균제가 갖추어야 할 요건인 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성, 병원성 억제능, 장부착능 등의 검사과정을 거쳐 성상이 우수하다고 판단되는 양돈용 생균제 균주를 선별할 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

사용 동물

생균제용 유산균을 선별하기 위하여, 경기도 이천과 안성의 양돈장에서 사육되고 있는 건강한 35두의 돼지를 실험대상으로 사용하였다. 돼지는 연령에 따라 포유자돈(10두), 이유자돈(10두), 육성돈(5두), 성돈(5두), 모돈(5두)을 사용하였고, 신선한 분변시료를 즉시 수집하여 실험에 사용하였다.

유산균주의 분리

실험에 사용된 분변은 무균적으로 채취하여 바로

O₂-free CO₂로 치환시킨 혐기성 수송배지(transport medium)인 BHI(brain heart infusion) broth에 넣어 혐기적으로 실험실까지 냉장 운반하였다. *Streptococcus* spp. 선택 배지인 TATAC, *Lactobacillus* spp. 선택배지인 LBS, *Bifidobacterium* spp. 선택배지인 BS와 비선택 배지인 BL 배지에 멸균된 diluent A를 사용하여 각각 10배 단계 희석하여 도말하였다. 도말된 배지는 O₂-free CO₂로 치환된 steel wool jar에서 37°C, 48시간 혐기배양하였다(Mitsuoka, 1980; Lim 등, 2004).

선택 및 비선택 배지에서 배양된 집락중 유산균의 전형적인 집락을 선별하여 BL 배지에 계대한 후, 37°C, 48시간 혐기배양하였다. 배양된 집락은 Mitsuoka 방법에 의해 *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.로 분리, 동정하였다. 분리된 유산균은 혐기상태에서 BL 배지에 계대하여 4°C에 보관하며, 실험에 사용하였다(Mitsuoka, 1980; Lim 등, 2004; Mitsuoka, 1978).

내산성 및 내담즙성 검사

유산균의 내산성을 평가하기 위하여 분리된 *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. 및 *Bifidobacterium* spp.을 L-cysteine (Junsei, Japan)이 0.05% 첨가된 MRS broth (pH 7.0, Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 혐기배양 하였다. *Lactobacillus* spp.와 *Streptococcus* spp.는 pH 2.0, *Bifidobacterium* spp.은 pH 3.0의 MRS broth에 1% 접종하고, 37°C에서 3시간 동안 혐기배양하였다. 이후 균주의 생존여부를 확인하기 위하여 배양균주를 BL 배지에 도말, 혐기배양한 후, 생존한 균주를 내산성 균주로 판정하였다.

내산성균주로 판정된 유산균을 대상으로 0.3% Oxgall (pH 7.0, Sigma)이 첨가된 MRS broth에 유산균 배양액을 1%씩 접종, 배양한 후, BL 배지에 도말, 혐기배양 후, 생존한 균주를 내담즙성 균주로 판정하였다 (Byun 등, 2000; Lim 등, 2004).

내열성 검사

내산성 검사와 내담즙성 검사를 통해 분리된 유산균을 L-cysteine이 첨가된 MRS broth에 접종, 혐기배양 후, 배양액을 70°C와 80°C에 각각 5분간 노출시킨 후, BL 배지에 도말, 혐기배양 하였다. 배양 후 집락이 형성된 균주는 내열성 균주로 판정하였다(Byun 등, 2000).

항생제 내성 검사

사료내에 존재하는 항생제, 또는 치료용으로 경구 투여하는 항생제에 대한 저항성을 검사하기 위하여 현재 국내의 양돈업에 많이 적용하는 10종류의 시판용 항생제를 본 실험에 사용하였다(Table 4).

각 항생제를 실험농도에 맞추어 증류수에 넣어 용해시킨 후 1500rpm, 10분간 원심분리하였다. 실험농도는 최종적으로 MRS 배지에 첨가하였을 때 각 항생제별 표기된 권장용량의 3배가 되도록 산출하였다. 상층액을 0.45µm membrane filter에 통과시켜 stock solution을 만든 후, MRS 배지에 각 항생제 stock solution을 첨가하였다. 항생제가 첨가된 배지에 유산균 배양액을 접종하여 도달한 후 37°C, 24 시간 혐기배양하였다. 항생제를 첨가하지 않은 MRS agar에 유산균을 접종한 plate를 양성 대조군으로 실험군과 같은 조건으로 배양하였다. 배양 후 집락의 형성상태를 양성대조군과 비교하여 균주의 항생제 내성을 평가하였다(Byun 등, 2000).

병원균 억제능 검사

병원균 억제능을 검사하기 위하여 Flemming 등에 의해 언급된 agar spot assay를 변형하여 사용하였다(Fleming 등, 1985). Agar spot assay의 병원균으로는 *E. coli* O157: H7(USDA, human isolate), *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 균주를 사용하였다. 각 병원균을 10ml의 Brain heart infusion broth (BBL, USA)에 접종하고 37°C, 24시간 혐기배양하였다. 선발된 유산균을 2ml의 L-cysteine · MRS broth에 접종한 후 혐기적 상태로 37°C, 24시간 배양하였으며, 각 plate마다 음성 대조군을 두어 MRS에 의한 억제 여부도 검사하였다.

유산균을 MRS agar에 2µl 점적하고 spot이 형성되도록 30°C, 24시간 혐기배양하였다. 그 후 유산균이 배양된 MRS agar에 7ml의 BHI agar (0.7%)와 혼합된 병

원균을 pouring하여 30°C에서 24시간 혐기적으로 배양한 후 억제환을 측정하였다. Spot 주위로 형성된 억제환의 직경을 mm 단위로 측정함으로써 병원균 억제 정도를 평가하였다(Fleming 등, 1985).

장관 부착능 검사

Caco-2 cell에 대한 장관 정착능 검사(*in vitro* adherence assay)는 병원균 억제능이 우수한 것으로 판정된 *Bifidobacterium* spp.과 *Lactobacillus* spp. 선발균주를 대상으로 실시하였다. *Lactococcus lactis* NIAI 527 (Meiji Ltd., Japan)과 *L. acidophilus* KCTC 3111을 각각 양성 대조군과 음성 대조군 균주로 사용하였다(Kimoto 등, 1999). 대조군과 유산균은 L-cysteine을 0.05%(w/v)로 첨가한 MRS broth (Difco, USA) 5ml에 접종하여 혐기적으로 37°C, 24 시간 배양하였다.

Caco-2 cell은 사람의 결장 선암종에서 유래되는 장관내피세포로서 한국생명공학연구원으로부터 분양받았다. Cell은 20% inactivated fecal calf serum (Gibco-BRL, USA)과 0.2% penicillin/streptomycin (10,000 U/ml, GibcoBRL, USA)을 첨가한 DMEM (GibcoBRL USA)에서 CO₂ incubator (95% air, 5% CO₂)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 부착능 시험을 위해 T75 flask (Nunc, USA)에 cell을 분주하고 격일마다 배지를 교환하였다. 배양한 cell을 37°C에서 10분 동안 trypsin으로 처리한 후 hemocytometer로 cell의 수를 세어 Caco-2 cell의 농도를 계산하였다. 4-well chamber slide (Nunc, USA)에 cell의 농도가 1.0 × 10⁵ cell/ml가 되도록 분주하고 완전한 monolayer가 형성될 때까지 배양하였다.

Phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2)으로 Caco-2 cell monolayer가 형성된 4-well chamber slide를 2회 세척하였다. PBS 5ml로 3회 세척한 유산균도 같은 buffer에 부유시켰다. 각 well에 접종하기 전, 활성이 있는 유산균의 수를 알아보기 위하여 PBS내의 유산균의 OD_{610nm} 값을 측정하였다. DMEM 0.5ml와 혼합한

Table 1. The number of lactic acid bacteria strains isolated from the fecal sample of 35 healthy pigs

Bacteria	Groups					No. of strains
	Sucking (n=10)	Weaning (n=10)	Growth (n=5)	Adult (n=5)	Maternal (n=5)	
<i>Lactobacillus</i>	132	156	90	82	67	527 (81.4%)*
<i>Streptococcus</i>	45	13	11	20	6	95 (14.7%)
<i>Bifidobacterium</i>	2	6	0	1	16	25 (3.9%)
Total	179	175	101	103	89	647

*Parenthesis indicate the percentage of isolation

Table 2. The number of acid tolerant lactic acid bacteria isolated from fecal sample of pig

Bacteria	Group					Total strains
	Sucking	Weaning	Growth	Adult	Maternal	
<i>Lactobacillus</i> *	37/132*** (28.0%)****	108/156 (69.2%)	55/90 (61.1%)	42/82 (51.2%)	30/67 (44.8%)	272/527 (51.6%)
<i>Streptococcus</i> *	0/45 (0.0%)	1/13 (7.7%)	1/11 (9.1%)	0/20 (0.0%)	0/6 (0.0%)	2/95 (2.1%)
<i>Bifidobacterium</i> **	0/2 (0.0%)	0/6 (0.0%)	-	0/1 (0.0%)	2/16 (12.5%)	2/25 (8.0%)

*Acid tolerance test carried out in pH 2.0

**Acid tolerance test carried out in pH 3.0

***The number of survived strains / the number of tested strains

****Parenthesis indicate the percentage of isolation

Table 3. The number of heat tolerant lactic acid bacteria isolated from fecal sample of pig

Bacteria	Heat condition	Group				Total strains	
		Sucking	Weaning	Growth	Adult		Maternal
<i>Lactobacillus</i>	70°C, 5min	1/37* (2.7%)**	54/108 (50.0%)	23/55 (41.8%)	23/42 (54.8%)	6/30 (20.0%)	107/272 (39.3%)
	70°C, 5min	-	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)	-	-	0/2 (0.0%)
<i>Bifidobacterium</i>	70°C, 5min	-	-	-	-	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)

*The number of survived strains/ the number of tested strains

** Parenthesis indicate the percentage of isolation

유산균(0.5ml; 1.0×10^9 CFU/ml in PBS)을 4-well chamber slide에 접종한 후 CO₂ incubator (95% air, 5% CO₂)에서 37°C, 3시간 배양하였다. 배양 후 멸균된 PBS로 5회 세척하고 methanol로 5분간 고정하였다. Chamber를 제거한 후, Gram stain을 거친 cell을 광학 현미경($\times 1,000$)으로 관찰하였다. 50개의 Caco-2 cell에 부착한 유산균의 수를 10개의 시야에서 계측한 후, 5개의 Caco-2 cell 당 부착한 유산균 수의 평균 값을 계산하였다. Caco-2 cell에 대한 부착능 결정은 대조군과 비교하여 판정하였다(Kimoto 등, 1999).

최종 선발 균주의 동정

Lactobacillus spp.와 *Streptococcus* spp.는 MRS agar plate에서 28°C, 24시간 혐기배양하고, *Bifidobacterium* spp.은 PYG-Tween 80 medium (Peptone-yeast extract-1% glucose-tween 80)에서 35°C, 48 시간 혐기배양하였으며, 각 균주는 세균의 세포벽 지방산(cell wall fatty acid)을 추출하기 위해 단계별 reagent로 전처리하고 Microbial Identification System(MIS, Sherlock system, USA)을 사용하여 동정하였다(Lim 등, 2004).

결 과

유산균의 분리율

돼지의 분변에서 분리된 유산균은 총 647균주이었으며, *Lactobacillus* spp.는 527균주(81.4%)로 가장 높은 비율을 차지하였고, *Streptococcus* spp.가 95균주(14.7%), *Bifidobacterium* spp.은 3.9%인 25균주만 분리되었다. 분리된 유산균주의 연령별 분포도는 Table 1에 나타내었다.

내산성 및 내담즙성 실험 성적

분리된 유산균 647균주를 대상으로 실시된 pH 2.0 (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.) 및 pH 3.0 (*Bifidobacterium* spp.)에서의 내산성 검사 결과를 Table 2에 나타내었다. 전체 647균주 중 42.7%인 276균주가 내산성을 나타내었으며, *Lactobacillus* spp.는 527균주중 272균주(51.6%), *Streptococcus* spp.는 95균주중 2균주(2.1%), 그리고 *Bifidobacterium* spp.은 25균주중 2균주(8.0%)가 내산성 균주로 확인되었다.

한편 내산성을 나타내는 *Lactobacillus*속균 272균주,

Table 4. The number of antimicrobial resistant lactic acid bacteria isolated from fecal sample of pig

Antibiotics	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Total
CTC***	86/86* (100%)**	18/18 (100%)	104/104 (100%)
Amoxicillin	8/86 (9.3%)	0/18 (0.0%)	8/104 (7.7%)
CPS	4/86 (4.7%)	0/18 (0.0%)	4/104 (3.8%)
TC	85/86 (98.8%)	0/18 (0.0%)	85/104 (81.7%)
PS	0/86 (0.0%)	0/18 (0.0%)	0/104 (0.0%)
Oxytetracycline	19/86 (22.1%)	0/18 (0.0%)	19/104 (18.3%)
Norfloxacin	82/86 (95.3%)	18/18 (100%)	100/104 (96.2%)
ST	86/86 (100%)	11/18 (61.1%)	97/104 (93.3%)
Ampicillin	8/86 (9.3%)	0/18 (0.0%)	8/104 (7.7%)
TS	75/86 (87.2%)	4/18 (22.2%)	79/104 (76.0%)

*The number of survived strains / the number of test strains

**Parenthesis indicate the percentage of isolation

***Abbreviation and experimental dose of antibiotics included

CTC: chlortetracycline HCl 600ppm, amoxicillin: amoxicillin trihydrate 480ppm

CPS: chlortetracycline HCl 300ppm + penicillin G procaine 150ppm + sulfathiazole 300ppm

TC: tiamuline hydrogen-fumarate 297ppm + chlortetracycline HCl 891ppm

PS: potassium penicillin G + streptomycin sulfate 600ppm, oxytetracycline : 126ppm,

norfloxacin: 600ppm, ST: sulfamethoxazole 1,200ppm + trimethoprim 240ppm,

ampicillin: ampicillin trihydrate 900ppm, TS: tylosin phosphate + sulfamethazine

*Streptococcus*속균 2균주 및 *Bifidobacterium*속균 2균주를 대상으로 실시된 내담즙성 검사 결과, 전체 276균주 모두 내담즙성을 갖는 것으로 확인 되었다.

균주의 내열성

내산성 및 내담즙성이 있는 것으로 확인된 *Lactobacillus*속균 272균주, *Streptococcus*속균 2균주 및 *Bifidobacterium*속균 2균주를 대상으로 70°C, 5분 및 80°C, 5분 내열성 검사를 실시한 결과를 Table 3에 나타내었다. 70°C, 5분에서는 *Lactobacillus*속균 272균주중 107균주(39.3%)가 내열성을 나타내었으나, *Streptococcus*속균 2균주와 *Bifidobacterium*속균 2균주는 모두 사멸하였다. 80°C, 5분에서는 276균주 모두 사멸하여 내열성을 보이지 않았다.

항생제 내성

내열성이 균주로 판정된 *Lactobacillus* spp. 107균주중 86균주와 *Bifidobacterium* spp. 18균주를 대상으로 10종류의 항생제에 대한 내성 검사 결과를 Table 4에 나타내었다. *Lactobacillus* spp. 분리균주는 CTC (chlortetracycline HCl), ST (sulfamethoxazole + trimethoprim)에 대해 100% 항생제 저항성을 나타내었으며, TC (tiamuline hydrogenfumarate + chlortetracycline HCl)와 norfloxacin, TS (tylosin phosphate + sulfamethazine)에 대해서도 각각 98.8%, 95.3%, 87.2%의 높은 저항성을 나타내었다. 그러나 PS (potassium penicillin G + streptomycin sulfate)에 대해서는 86균주 모두 저항성을 나

타내지 않았다. *Bifidobacterium* 분리균주는 CTC와 norfloxacin에 대해 100% 저항성을 나타내었고, ST와 TS에 각각 61.6%와 22.2%의 저항성을 나타내었지만, amoxicillin, CPS (chlortetracycline HC100 + penicillin G procaine + sulfathiazole), TC, PS, oxytetracycline, ampicillin에 대해서는 전혀 저항성을 나타내지 않았다.

병원균 억제능

항생제 내성 검사로 선발된 *Lactobacillus* spp. 70균주와 *Bifidobacterium* spp. 18균주를 대상으로 실시한 병원균 억제능 실험 결과를 Fig. 1과 Table 5에 나타내었다. *Lactobacillus* spp. 70균주중 21균주(30.0%)가 *E. coli* O157:H7에 대해, 40균주(57.1%)가 *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021에 대해, 48.6%인 34균주가 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916균주에 대해 병원균 억제활성을 나타내었다. *Bifidobacterium* 18균주는 27.8%인 5균주가 *S. Enteritidis* KCCM 12021에 대해 억제능을 나타내었으며, *E. coli* O157:H7과 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916균주에 대해서는 각각 2균주만이 억제활성을 나타내었다. *Lactobacillus*는 70균주중 14.3%인 10균주가 세 종류의 병원균에 대한 높은 억제능을 보였으나, *Bifidobacterium*의 경우 세 종류의 병원균에 모두 저항성을 나타내는 균주는 나타나지 않았다.

Table 5. The antimicrobial activity of LAB isolates against pathogenic bacteria using the agar spot assay

Group	Bacteria	Pathogenic bacteria			
		<i>E. coli</i> O157:H7 USDA	<i>Sal. Enteritidis</i> KCCCM 12021	<i>S. aureus</i> KCTC 1916	All of indicator bacteria***
Suckling	<i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-
	<i>Bifidobacterium</i>	0/1* (0.0)**	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)	0/1 (0.0)
Weaning	<i>Lactobacillus</i>	14/32 (43.8)	17/32 (53.1)	17/32 (53.1)	5/32 (15.6)
	<i>Bifidobacterium</i>	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)
Growth	<i>Lactobacillus</i>	4/18 (22.2)	11/18 (61.1)	4/18 (22.2)	2/18 (11.1)
	<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-
Adult	<i>Lactobacillus</i>	2/16 (12.5)	9/16 (56.3)	10/16 (62.5)	2/16 (12.5)
	<i>Bifidobacterium</i>	-	-	-	-
Maternal	<i>Lactobacillus</i>	1/4 (25.0)	3/4 (75.0)	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)
	<i>Bifidobacterium</i>	2/15 (13.3)	5/15 (33.3)	2/15 (13.3)	0/15 (0.0)
Total	<i>Lactobacillus</i>	21/70 (30.0)	40/70 (57.1)	34/70 (48.6)	10/70 (14.3)
	<i>Bifidobacterium</i>	2/18 (11.1)	5/18 (27.8)	2/18 (11.1)	0/18 (0.0)
		23/88 (26.1)	45/88 (51.1)	36/88 (40.9)	10/88 (11.4)

*The number of LAB appeared a clear inhibition zone of more than 3mm around a spot in indicator bacteria each

**Parenthesis indicate the percentage of inhibition

***The number of LAB appeared the inhibition zone of 3mm above in all of three indicator bacteria

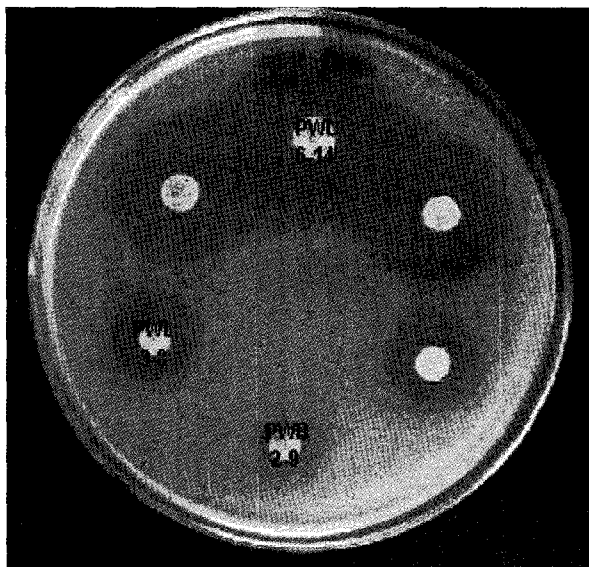


Fig. 1. Inhibition of *E. coli* O157 (USDA, human isolate) by isolated lactic acid bacteria using agar spot assay. [PWL6-14 showed the highest inhibition in all test strains. PWL3-8 showed moderate inhibition. PWB2-9 showed no inhibition].

장관 부착능

병원균 억제능 실험 결과로 선발된 *Bifidobacterium* 10균주와 *Lactobacillus* spp. 20균주, 분리한 *Streptococcus* spp. 9균주의 Caco-2 cell에 대한 부착성 실험 결과를 Fig. 2와 Table 6에 나타내었다. Fig. 2에는 양성 대조군과 음성 대조군 및 실험균주의 부착상태를 나타내었다. 일반적으로 실험균주 대부분의 부착능은 대조군에 비해서 높았다. 양성 대조군인 *Lactococcus lactis*

Table 6. *In vitro* adherence assay of selected LAB to human intestinal epithelial Caco-2 cell cultures

Bacteria	Caco-2 cell attachment*			
	-	+	++	+++
<i>Lactobacillus</i>	4/20** (20.0%***)	4/20 (20.0%)	9/20 (45.0%)	3/20 (15.0%)
	4/10 (40.0%)	6/10 (60.0%)	-	-
<i>Bifidobacterium</i>	5/9 (55.6%)	2/9 (22.2%)	2/9 (22.2%)	-
	5/9 (55.6%)	2/9 (22.2%)	2/9 (22.2%)	-
Total	13/39 (33.3%)	12/39 (30.8%)	11/39 (28.2%)	3/39 (7.7%)
	13/39 (33.3%)	12/39 (30.8%)	11/39 (28.2%)	3/39 (7.7%)

* Indicated adherence activity as compared with control

-: equal with negative strain (*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111)

+: equal with positive strain (*Lactococcus lactis* NIAI 527)

++: >150 bacteria / 5 Caco-2 cell

+++ : too much to count

**The number of attached strains/ the number of tested strains

***Parenthesis indicate the percentage of attachment

NIAI 527과 비교하였을 때, *Lactobacillus* spp.의 경우는 16균주가 대조군과 같거나 (+)보다 높은 부착능 (++ 또는 +++)을 보였다. 그 중에서도 PWL6-14, PGL4-17, PAL4-18 균주는 시험균주 중 가장 높은 부착능 (+++)을 나타내었다. *Bifidobacterium* spp.은 6균주가 (+)의 부착능을 나타내었고, *Streptococcus* spp.의 경우 4균주가 (+) 및 (++)의 부착능을 나타내었다.

최종 균주의 선발과 등정

분리된 유산균 중 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성, 병원균 억제능, Caco-2 cell 부착능 실험 등을 거

Table 7. Characteristics of selected strains from pig for probiotic use

Strain	Isolated medium	Gram stain	Cell morphology	Catalase test	Aerobic growth	Bile tol. ^a	pH tol. ^c	Heat resistance		Antibiotic resistance	Antimicrobial activity ^d			Caco-2 cell adherent activity	Identification by MIS
								70°C 5min	80°C 5min		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Staphylococcus aureus</i>		
								PWL6-15	BS		+	Rod	-		
PGL5-16	BL	+	Rod	-	+	+	+	-	+++	+++	+++	+++	++	<i>L. paracasei</i>	
PAL2-17	BL	+	Rod	-	+	+	+	-	++	+++	+++	+++	++	<i>L. rhamnosus</i>	
PAL4-18	BL	+	Rod	-	+	+	+	-	++	++	+++	+++	+++	<i>Lactobacillus</i> spp.	
PGL4-17	BL	+	Rod	-	+	+	+	-	+	++	+++	+++	+++	<i>L. delbruekii bulgaricus</i>	
PMB2-11	BS	+	Y-shape	-	-	+	+	-	+	++	+++	++	+	<i>Bifidobacterium boum</i>	
PMB4-10	BS	+	Y-shape	-	-	+	-	-	+	+	++	++	+	<i>B. animalis</i>	
PMB1-10	BS	+	Y-shape	-	-	+	+	-	-	++	++	+	-	<i>B. bifidum</i>	
PSS2-17	TATAC	+	Cocci	-	+	/ ^e	/	/	/	/	/	/	++	<i>Weissella confusa</i>	
PSS7-10	TATAC	+	Cocci	-	+	/	/	/	/	/	/	/	++	<i>L. brevis</i>	

^aBile tolerance, ^bAcid tolerance, ^cpH tolerance, ^dPathogenic bacteria (*E. coli* O157:H7 (USDA, humane isolate), *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1926), ^eNot tested

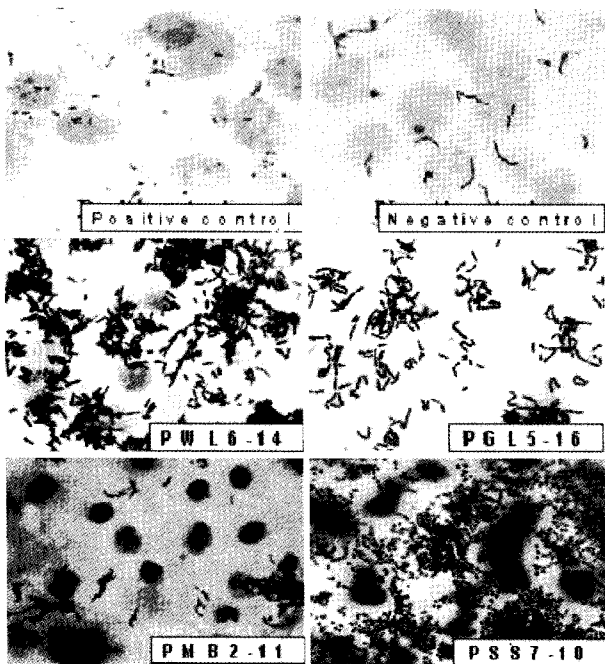


Fig 2. Adherence of selected lactic acid bacteria to Caco-2 cell observed using light microscopy after Gram staining (× 1,000). [Positive strain (*Lactococcus lactis* NIAI527, Meiji Ltd. Japan), Negative strain (*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111), *Lactobacillus* PWL6-14 and PGL5-16, *Bifidobacterium* PMB2-11 and *Streptococcus* PSS7-10].

처 최종 10균주의 생균제용 유산균주를 선발하였으며, 그 특성은 Table 14에 나타내었다. 그 중 *Lactobacillus* spp.는 5균주였고, *Bifidobacterium* spp.과 *Streptococcus* spp.는 각각 3균주와 2균주였다. 미생물 동정 장치(MIDI, HP Inc., USA)를 이용한 최종 선발 균주의 동정결과는 Table 7에 나타내었다. 선발된 *Lactobacillus* spp. 5균주와 *Bifidobacterium* spp. 2균주의 속

명은 변함이 없었지만, 분리된 *Streptococcus* spp.는 2균주는 *Weissella confusa*, *Lactobacillus brevis*로 동정되었다.

고 찰

축산 분야에서는 각종 질병의 예방 및 치료뿐만 아니라, 사료효율 개선 및 성장 촉진 물질로 사료첨가 항생제를 사용하고 있다. 그러나 사료가 항생제는 많은 효과에도 불구하고(Zimmerman 등, 1982; Cromwell, 2002), 약제잔류성의 위험(Carl과 Kotarski, 1999), 과내성 세균의 증가(Hilton 등, 1986) 등의 문제로 세계 각국은 엄격한 규제 제도를 도입하여 항생 물질의 사용을 제한하기 시작하였다(Chang 등, 1999). 국내 소비자의 인식도 점차 높아져, 항생제와 같은 유해한 물질을 배제한 고품질의 친환경적인 축산물 생산이 요구되고 있다. 이러한 시대적 흐름에 따라 생산성 향상을 유도할 수 있는 생균제가 새로운 사료첨가제로서 각광을 받기 시작하고 있다(Byun 등, 2000; Lee와 Heo, 1999). 항생제는 장내 정상세균총을 억제시키지만 생균제는 장내세균총의 균형 유지에 도움을 주고 병원성 미생물의 항생제 내성 발현과는 관계가 없기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 양돈용 생균제 개발을 목적으로 여러 연령의 돼지 분변으로부터 *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. 및 *Streptococcus* spp.와 같은 유산균을 분리한 후 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성, 병원균 억제, 장세포 부착능 등의 항목을 검사한 후, 최종적으로 양돈용 사료첨가 생균제용 균주로 사용하기에 가장 적합한 우수균주 10균주를 선발하였다.

본 연구에서는 연령이 다른 돼지 35마리로부터 분변을 채집하여 총 647균주의 유산균을 1차로 분리하였다. *Lactobacillus* spp.가 전체 분리유산균 중 81.5%로 가장 높은 비율을 점유하였고, *Streptococcus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.이 각각 14.7%와 3.4% 차지하였다. 생균제는 경구로 투여되어 소화관을 경유하므로, 위내의 낮은 pH에서 생존할 수 있는 내산성, 소장내의 담즙에 저항하는 내담즙성을 갖추어야 하며 가공시의 열처리에 견딜 수 있는 내열성, 사료 첨가나 치료용으로 투약되는 항생제에 대한 내성도 요구된다. 아울러 병원성 미생물의 성장을 억제하고 장관정착능이 높은 균주가 양돈용으로 사용하기에 우수한 균주로 판단되고 있다(Isolauri 등, 2002). 이러한 생균제의 조건을 만족하는 균주를 선발하기 위하여 분리된 유산균을 여러 항목에 걸쳐서 검사하였다. pH 2.0 내산성 균주는 *Lactobacillus* spp.의 경우 51.6%인 272균주, *Streptococcus* spp.는 2균주(2.1%)였고, pH 3.0 내산성을 나타내는 *Bifidobacterium* spp.은 8.0%인 2균주로 총 280균주가 내산성을 가지는 것으로 확인되었다. 내산성을 보이는 모든 균주는 0.3% Oxgall 내담즙성을 나타내었다. 이와 같은 내산성 및 내담즙성 결과는 Byun 등(2000)과 Lim 등(2004)의 연구보고와 유사한 결과를 나타내었다. 연령별 분포에서는 이유자돈 분리균주가 62.3%로 가장 높은 내산성을 보였고, 포유자돈 분리유산균이 특히 내산성이 약한 이유는 돼지의 생리적 특성에서 찾을 수 있다. 신생자돈은 위내 pH가 4.0~5.9로 성돈의 2.3~4.5에 비해 높기 때문에 포유자돈의 소화관에는 상대적으로 내산성이 낮은 균주가 분포하고 있을 것으로 생각된다(Fuller, 1992).

3종류의 병원균에 대한 *Bifidobacterium* spp. 1차 분리균주와 항생제 내성 실험으로 선발된 *Lactobacillus* spp.의 억제능을 실험한 결과, *Bifidobacterium* spp.은 27.8%, *Lactobacillus* spp.는 80.0%가 하나 또는 그 이상의 병원균에 대한 억제 활성을 나타내었다. *Lactobacillus* spp.는 57.1%가 *Sal. Enteritidis* KCCM 12021을 억제하였으며, *S. aureus* KCTC 1916은 48.6%, *E. coli* O157:H7 (USDA, human isolate)는 30.0%를 억제하였다. *Bifidobacterium* spp. 역시 *Sal. Enteritidis* KCCM 12021을 27.8%로 가장 많이 억제하였고, *S. aureus* KCTC 1916과 *E. coli* O157:H7은 각각 11.1%씩 억제하는 것으로 나타났다. 특히 *Lactobacillus* spp.는 14.3%가 세 종류의 병원균에 대해 모두 높은 억제능

을 보였다. *Bifidobacterium* spp.의 경우 세 종류의 병원균에 모두 저항성을 나타내는 균주는 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 돼지의 장관내 우점종을 나타내는 *Lactobacillus* spp.가 비우점종인 *Bifidobacterium* spp.에 비해 더 우수한 항균력을 갖고 있는 것으로 추측되었다.

본 실험에서는 생균제로서 필요한 성상이 가장 우수한 *Lactobacillus* spp. 5균주, *Bifidobacterium* spp. 3균주, *Streptococcus* spp. 2 균주를 최종 선발균주로 선정하였다. 미생물 동정 장치를 이용한 동정 결과, *Lactobacillus* spp.로 분리했던 PWL6-14, PGL5-16, PAL2-17, PAL4-18 및 PGL4-17은 각각 *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* 및 *L. delbrueckii bulgaricus*로 동정되었다. *Bifidobacterium* spp.으로 분리했던 PMB2-11, PMB4-10 및 PMB1-10는 각각 *B. boum*, *B. animalis* 및 *B. bifidum*으로 확인되었다. 그러나 *Streptococcus* spp.로 분리했던 PSS2-17과 PSS7-10는 각각 *Weissella confusa* GC subgroup A와 *L. brevis*로 동정되어 추후 더 자세한 동정작업이 필요할 것으로 판단되었다.

최종 분리된 균주는 균주별로 pH와 열에 대한 저항성이 다르게 나타났다. *Lactobacillus* spp. 5균주는 모두 내산성과 내열성이 우수하였지만, *Bifidobacterium* spp.은 PMB2-11과 PMB1-10균주만이 내산성을 보유하고 내열성을 나타내는 균주는 없었다. 항생제 내성 검사, 병원균 억제능, Caco-2 cell 부착능 실험 결과를 종합했을 때 PWL6-14, PGL5-16, PAL2-17, PAL4-18, PGL4-17의 *Lactobacillus* spp. 전 균주와 *Bifidobacterium* spp.인 PMB2-11, PMB4-10, PM1-10 균주가 우수한 성상을 갖는 생균제용 균주로 적합한 것으로 판단된다. 향후 선발된 우수균주를 양돈용 사료첨가 균주로 실용화하기 위해서는, 앞으로 선발 균주의 대량 배양방법, 산업적 배양의 표준화, 유통기간 중 적정 균주의 유지 등의 방법에 대한 추가 연구가 실시되어야 하며, 또한 실제 효능검증을 위한 자돈을 이용한 실제 야외효능 실험도 실시되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

본 연구는 건강한 35두의 돼지의 분변으로부터 *Lactobacillus* spp. 527균주, *Streptococcus* spp. 95균주, *Bifidobacterium* spp. 25균주를 분리하고, 생균제가 갖추어야 할 요건인 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내

성, 병원성 억제능, 장부착능 등의 검사과정을 거쳐 양돈사료첨가용 생균제 우수균주를 선발할 목적으로 실시되었다. *Lactobacillus* spp.는 527균주 중 272균주(51.6%), *Streptococcus* spp.는 95균주 중 2균주(2.1%), 그리고 *Bifidobacterium* spp.은 25균주 중 2균주(8.0%)가 내산성 균주로 확인되었다. 내담즙성 검사 결과, 내산성을 보인 전체 276균주 모두 내담즙성을 갖는 것으로 확인 되었다. 70°C, 5분간의 내열성 시험에서는 *Lactobacillus*는 272균주중 107균주(39.3%)가 내열성을 나타내었으나, *Streptococcus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.는 모두 사멸하였다. 10종류의 항생제에 대한 내성 검사 결과, *Lactobacillus* spp. 균주는 CTC, ST에 대해 100% 항생제 저항성을 나타내었지만, PS에 대해서는 86균주 모두 저항성을 나타내지 않았다. *Bifidobacterium* spp. 분리균주는 CTC와 norfloxacin에 대해 100% 저항성을 나타내었고, amoxicillin, CPS, TC, PS, oxytetracycline, ampicillin에 대해서는 전혀 저항성을 나타내지 않았다. *Bifidobacterium* spp.은 27.8%인 5균주가, *Lactobacillus* spp.는 80.0%인 56균주가 하나 또는 그 이상의 병원균 억제 활성을 나타내었다. *Lactobacillus* spp.는 70균주 중 14.3%인 10균주가 세 종류의 병원균에 대한 높은 억제능을 보였으나, *Bifidobacterium* spp.의 경우 세 종류의 병원균에 모두 저항성을 나타내는 균주는 나타나지 않았다. 병원균 억제능 실험 결과로 선발된 균주의 Caco-2 cell에 대한 부착성을 실험한 결과, *Lactobacillus* PWL6-14, PGL4-17, PAL4-18은 시험균주 중 가장 높은 부착능(+++)을 나타내었다. 이상의 실험결과, *Lactobacillus* 5균주, *Bifidobacterium* 3균주, *Streptococcus* 2균주를 양돈용 생균제로 사용하기에 적합한 최종균주로 선발하였다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Byun JW, Kim GT, Bae HS, et al. 2000. *In vitro* selection of lactic acid bacteria for probiotics use in pigs. *J Vet Sci* 40(4): 701-706.
- Carl E, Kotarski S. 1999. Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. *Regulatory Toxicol Pharmacol* 29: 238-261.
- Chang YH, Kim JK, Kim HJ, et al. 1999. Characteristics of *Lactobacillus reuteri* BAS-131 Isolated from Swine Intestine. *Kor J Microbiol Biotechnol* 27(1): 23-27.
- Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. 1998. Selection of probiotic strains for human application. *Int Dairy J* 8: 487-490.
- Cromwell GL. 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim Biotechnol* 13(1): 7-27.
- Fleming HP, Etchells JL, Costilow RL. 1985. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl Environ Microbiol* 30(6): 1040-1042.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66(5): 365-378.
- Fuller R. 1992. *Probiotics: The scientific basis*. Chapman & Hall: 259-272.
- Hilton M, Kaukas A, Linton AH. 1986. The ecology of drug resistance in enteric bacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 15: 77S-92S.
- Isolauri E, Kirkavainen PV, Salminen S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 3: 54-59.
- Kimoto H, Kurisaki J, Tsuji NM, et al. 1999. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters Appl Microbiol* 29(5): 313-316.
- Lee KW, Heo TR. 1999. Isolation and selection of beneficial *Bifidobacterium* spp. *Korean J. Food Sci Ani Resour* 19(1): 41-53.
- Lee YK, Salminen S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 6: 241-245.
- Lim HJ, Kim SY, Lee WK. 2004. Isolation and identification of cholesterol - Lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci* 5(4): 391-395.
- Mitsuoka T. 1978. *Intestinal Bacteria and Health*. Harcourt Brace Jovenich, Japan: 86-111.
- Mitsuoka T. 1980. *The world of anaerobic bacteria: A color atlas of anaerobic bacteria*. Sobun Press, Tokyo: 13-65.
- Rolfe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130: 396-402.
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, et al. 1999. Probiotics: how should they be defined. *Trends Food Sci Technol* 10(3): 107-110.
- Zimmerman DR, Conway DP, Bliss DH, et al. 1982. Effect of carbadox and pyrantel tartrate on performance and indices of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Ascaris suum* infection in pig. *J Anim Sci* 55: 733-740.