

선천성 면역에 대한 *Lactobacillus acidophilus*의 효과

강신석 · 변현섭 · 김정태 · 이 란¹ · 강소정² · 정호성³
강성호³ · 이재동³ · 김동희³ · 강신권^{4*}

충청북도축산위생연구소 북부지소, ¹건국대학교 자연과학대학, ²고양국제고등학교,
³건국대학교 의학전문대학원 충주병원, ⁴한국국제대학교 식품과학부

(접수 2011. 4. 5; 수정 2011. 7. 18; 게재승인 2011. 8. 25)

Effects of *Lactobacillus acidophilus* on innate immunity

Shin-Seok Kang, Hyeon-Seop Byeon, Jeong-Tae Kim, Ran Lee¹, So-Jeong Kang²,
Ho-Sung Jung³, Sung-Ho Kang³, Jae-Dong Lee³, Dong-Hee Kim³, Shin-Kwon Kang^{4*}

North branch, Chungbuk livestock & Veterinary Research Institute, Chungju 380-230, Korea

¹College of Natural Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

²Goyang Global High School, Goyang 410-050, Korea

³Chungju Hospital, School of Medicine of Konkuk University, Chungju 380-704, Korea

⁴Division of Food Science, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

(Received 5 April 2011; revised 18 July 2011; accepted 25 August 2011)

Abstract

Probiotics have many effects such as antihypertensive, prevention of cancer, antioxidation, reduction of dermatitis symptoms, improvement of mineral absorption, reduction of allergic symptoms, and decrease of cholesterol. However, the main role of probiotics is that they balance intestinal microbial proportion. *L. acidophilus* is one of probiotics and microflora in intestine. It has an acidification activity, aroma production, texture formation and probiotics properties. We studied on the roles of *L. acidophilus* in mice. In this study, body weights of mice were decreased when administration of *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU) and swimming ability has been raised than a normal group after feeding on *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU). After taking *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU), total white cells were increased than a normal group; hemoglobin and thrombocytes were increased. The level of cholesterol and triglyceride were decreased in blood analysis. We knew *L. acidophilus* is related to innate immune system. We found out the secretion of cationic peptide was increased in the Lysoplate assays as a result of *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU) administration. Appearance rate of lysozyme was also increased than the normal group on an immunohistochemistry stain. We confirmed *L. acidophilus* contributes to host health through innate immune system stimulation. *L. acidophilus* more than 1×10^{10} CFU are thought to be beneficial for the host health and prevention of intestinal diseases in field condition.

Key words : *Lactobacillus acidophilus*, Probiotics, Lysozyme, Host health, Blood assay

서 론

사람이나 동물에서 질병으로부터 안전을 유지하기

위해서는 체내에서 질병을 일으키는 원인체에 대하여 항생물질을 이용하여 이들을 직접 제거하는 방법을 사용하고 있다. 그러나 이러한 방법은 항생물질의 과도한 사용은 축산물 및 어류에 잔류되어 최종적으로 사람에게 전달되며, 분해되지 않은 항생물질은 동물

*Corresponding author: Shin-Kwon Kang, Tel. +82-55-751-8321,
Fax. +82-55-751-8329, E-mail. hito56@naver.com

의 분변이나 오줌으로 배출 또는 양식장 물에 잔류되어 항생제에 내성을 가진 병원체가 사람에게 전달될 경우 공중보건에 심각한 상황을 일으키게 된다.

이러한 항생물질 과다 사용에 대한 문제가 제기됨에 따라 자연 친화적인 건강 유지에 대한 관심이 증가하여 최근 10여 년 전부터 사람이나 동물에 유익한 균주를 이용한 건강 유지에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이것을 probiotic이라 하는데 probiotic에 대한 많은 논쟁이 있었으나 FAO와 WHO에서 “살아 있는 미생물체가 생체 내에서 장내세균 총의 균형을 이루어 숙주에 긍정적인 효과를 나타내는 것”이라고 정의 하였다(FAO와 WHO, 2001). Probiotic에 사용되는 균주로서 많이 사용되는 것들은 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.로 알려졌다(Goldin 등, 1992; Perdigon 등, 1995).

Lactic acid bacteria는 물질을 산성화하는 능력, 특유의 향내 생산, 물질을 부드럽게 변화시키는 과정 및 몸에 이로울 활동 때문에 오래전부터 수많은 발효 식품 생산에 매우 중요한 세균이며 식품을 발효시키는데 있어 광범위하게 사용되고 있다(Fonseca 등, 2003; Wang 등, 2005). Probiotic으로 분류된 세균들은 면역 체계 강화 효과(Galdeano 등, 2007), 항고혈압 효과(Yeo와 Liong, 2010), 항암작용(Hirayama와 Rafter, 2000), 항산화 효과(Songisepp 등, 2004), 피부병 증상 감소 효과(Weston 등, 2005), 미네랄 성분 흡수 촉진 효과(Scholz-Ahrens 등, 2007), 관절염 통증 개선(Baharav 등, 2004), 알레르기 증상 감소(Ouweland, 2007), 여성생식기 질 내에서의 *Candida* 증 개선 효과(Falagas 등, 2006), 혈액 내 cholesterol 감소 효과(Pereira와 Gibson, 2002), 바이러스에 의한 설사증 치료 및 예방 효과(Hajela 등, 2010) 등이 있는 것으로 보고되었다. *L. acidophilus*는 *Lactobacillus* spp. 중 하나로 사람과 동물의 장관막, 입, 암컷 생식기의 질 내에 정상적으로 서식하는 정상세균총의 하나이며 암컷의 생식기 질 내에서는 산을 생산하여 *C. albicans* 등을 방어하는데 도움을 주고 체내에서 유익한 활동을 하며 pH 5.0, 30°C에서 잘 자라는 것으로 알려졌다(Forsum 등, 2005; Ljungh와 Wadström, 2006).

축산업에서 probiotic을 이용한 산업은 그다지 많지 않으며 축산 생산물에서 probiotic을 이용한 산업으로 대표적인 것이 요구르트 생산이며 직접적으로 축산에 이용하는 방법은 현재 축산 규모의 거대화 때문에 발생하는 악취제거를 위한 생균제 이용, 일부 바이러스성, 세균성에 의한 소화기 질병을 줄이기 위하여

생균제를 이용하고 있으나 현장에서는 실험실에서의 결과와 달리 큰 효과를 보지 못하고 있다. 이에 생균제의 하나 *L. acidophilus*를 이용하여 그 효과를 검증하고 현장에서의 생균제 이용에 대한 기준을 제시하고자 하는데 이번 실험의 목적이 있다.

재료 및 방법

공시균주

이 실험에서 사용한 균주는 *L. acidophilus* 314 (ATCC, USA)를 사용하였다. 균주는 ATCC사에서 권장하는 MRS broth (MB cell, Korea)와 MRS agar (MB cell, Korea)를 이용하여 배양하였으며, 배지 조제는 MRS broth의 경우 증류수 1 L에 MRS broth powder 54.3 g을 넣은 후 Tween 80, 1 ml를 넣은 후 powder를 완전히 녹인 후 121°C에서 15분간 멸균 후 사용하였다. MRS agar는 증류수 1 L에 MRS agar powder 67.3 g을 넣은 후 Tween 80, 1 ml를 넣은 후 완전히 녹여 121°C에서 15분간 멸균 후 사용하였다.

공시동물

공시동물은 ICR 마우스(대한바이오링크, Korea)를 구매하여 실험에 사용하였으며 동물은 그룹별로 수컷 5 마리씩 대조군, 실험군 1 그리고 실험군 2로 분류하였다. 체중은 23~26 g 사이의 마우스를 사용하였고 사료는 마우스 사료를 무제한으로 공급하고 음용수로는 일반 수돗물을 제공하였다. 실험군 1에는 배양된 *L. acidophilus*를 1×10^6 CFU, 실험군 2에는 1×10^{10} CFU를 1회/1일, 총 10일간 투여하였으며 투여 10일 후 공시동물을 해부하여 각 실험에 사용하였다.

체중 변화

*L. acidophilus*를 10일간 급여한 후 체중의 변화를 관찰하기 위하여 그룹별로 체중을 측정하였다.

운동능력 측정

*L. acidophilus*를 10일간 급여한 후 운동능력의 향상을 관찰하기 위한 방법으로 수영 능력을 측정하였으며 수영 능력에 대한 측정은 마우스가 물속에서 5

초 이상 정지된 시간을 기준으로 측정하였다.

혈구 및 열정화학적 분석

*L. acidophilus*를 투여한 후 3.6% chloral hydrate를 체중 10 g당 0.1 ml를 복강으로 주입하여 마취시킨 후 복강을 절개하여 복대정맥으로부터 혈액을 채취하여 EDTA가 함유된 진공 튜브에서 균질화 시킨 후 HEMA VET (Drew, Italy)를 이용하여 총 백혈구 수, 호중성백혈구, 림프구, 단핵백혈구, 호산성백혈구, 호염기성백혈구, 총 적혈구, 혈색소, 혈소판 등 9종을 검사하였으며 또 다른 혈액은 혈청 내 화학치를 측정하기 위하여 응고시킨 후 혈청을 분리하여 혈청분석기를 이용하여 cholesterol, triglyceride, albumin, total protein, calcium 등 5종을 측정하였다.

Cationic peptide 추출

선천성 면역물질을 관찰하기 위해서 cationic peptide를 추출하여 사용하는데 추출은 Cole 등(1999)의 방법을 응용하였다. 추출과정은 각 장기를 200 mg씩 잘라 1.5 ml 튜브에 넣고, 여기에 5% 아세트에시드를 400 μ l씩 넣어준 다음, 초음파 파쇄기로 조직을 파쇄하였다. 초음파에 의해 고열이 발생하면 추출하고자 하는 cationic peptide가 손상될 수 있기 때문에 과도한 열이 발생하지 않도록 주의하였다. 13,200 rpm에서 30분간 원심 시킨 후 상층액을 새로운 튜브에 옮기고, Macro-Prep CM cation exchange support (Bio-rad, USA)를 채취한 상층액의 절반 수준으로 넣어 두 용액이 잘 섞이도록 부드럽게 3시간 동안 가볍게 흔들어 주었다. 13,200 rpm에서 30분간 원심 시킨 후 상층액을 제거하고 Macro-Prep CM cation exchange support의 흰색 침전물을 실온에서 완전하게 말린다. 말린 튜브에 0.1 N 염산 +0.1% 아세트에시드 250 μ l를 넣어 부드럽게 피펫으로 섞어준 후 13,200 rpm에서 30분간 원심을 한 다음 상층액을 새 튜브에 넣어 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Cation peptide 정량

Cationic peptide는 Lowry법을 응용한 BCA Protein assay kit (Pierce, USA)를 이용하여 제조사가 지시하는 방법으로 실시하였다(Lowry 등, 1951). 요약하면, 바닥이 평평한 Microplate에 제조사가 제공하는 표준

단백질 용액을 이용하여 표준곡선 제작용과 추출한 cation peptide 각 well에 25 μ l씩 분주하였다. 이때 평균을 구하기 위하여 한 시료당 2 well을 이용하였다. BCA Protein assay kit에서 A 시약에 B 시약을 1/50의 비율로 만들어 반응액 200 μ l를 각 well에 넣었다. Microplate의 표면을 밀폐되게 덮고 37°C 에서 30분간 반응시킨 후, microplate를 꺼내어 70% 에탄올로 microplate 바닥을 닦아준 다음 스펙트로미터(550 nm)에서 OD값을 읽어 cationic peptide 양을 계산하였다.

Lysoplate assay

선천성 면역물질인 lysozyme의 활성도를 측정하기 위하여 이 실험을 수행하였으며 Osserman과 Lawlor (1966)의 방법을 변형하여 사용하였다. 용액 A는 66 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 50 ml에 heat killed *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA) 0.125 g을 넣어 균질화 하였다. 용액 B는 66 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 low melting agarose (Sigma, USA) 1.25 g을 넣어 균질화시킨 후 용액 B에 열을 가하여 녹인 후 42°C 로 유지시켰다. 이후 용액 A (16 ml)와 용액 B (4 ml)를 균질하게 섞어 눈금이 새겨진 4각형 페트리디시에 부어 높이가 일정하게 굳혔다. Gel이 굳으면 정중앙에 구멍을 내어 정량이 끝난 cationic peptide를 균일한 함량으로 넣고 실온에서 18시간 방치 후 지름을 측정하였다.

주령에 따른 십이지장내 *L. acidophilus* 발현

*L. acidophilus*는 장에서 정상적으로 서식하는 균속들 중 하나이므로 마우스의 주령에 따라 발현이 어떻게 달라지는지를 보기 위하여 PCR법을 이용하여 검사하였다. *L. acidophilus* strain CECT 4529 16S ribosomal RNA gene (FJ 556999, Genbank)으로 primer 염기 서열은 forward 5'-cat ggg tag cga aca gga tt-3', reverse 5'-taa ggt tct teg cgt tgc tt-3'으로 자체 제작하여 사용하였다. 총 genomic DNA 추출은 AccurePrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하였으며 추출방법은 제조사에서 지시하는 것에 따랐다. 요약하면, 약 30 mg의 십이지장 조직을 채취하여 tissue lysis buffer 200 μ l를 넣어 조직을 파쇄한 다음, proteinase 20 μ l를 넣어 조직이 완전히 lysis될 때 까지 60°C 항온수조에서 1시간 동안 보존하였다. 그 후 원심을 하여 침전물을 제거하고 용액에 binding buffer

200 μ l를 넣어 즉시 혼합하고 항온수조(60°C)에 10분간 유지하였다. Isopropanol 100 μ l를 넣고 부드럽게 섞어준 다음 용액을 column이 포함된 튜브에 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심을 하고, 다시 washing buffer 1,500 μ l를 넣고 8,000 rpm에서 1분간, 그리고 washing buffer 2,500 μ l를 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심을 하였다. 이어서 column에 아무것도 넣지 않고 8,000 rpm에서 2분간 원심을 하면서 column을 건조했다. 추출 용액 50 μ l를 넣어 원심을 하여 총 DNA를 수거하였다. DNA 발현을 관찰하기 위하여 1 μ g을 사용하였다.

면역조직화학 염색 및 조직 표본 제작

장에 대한 선천성 면역물질인 lysozyme을 확인하기 위하여 마우스의 십이지장을 10% 중성 포르말린에 고정 후 조직표본 제작 과정을 거친 후 조직을 절편 후 통상적인 H&E 염색을 하였으며, 일부는 면역조직화학염색을 하였다. 면역염색은 Histostain-sp kit (Invitrogen, USA)를 사용하였으며 그 과정은 조직표본을 자이렌에 5분간씩 3번 동안 담가 조직 내 파라핀을 제거하고, 100% 에탄올, 90% 에탄올, 80% 에탄올, 50% 에탄올 순으로 각기 5분간씩 두어 함수 시켜 조직이 마르지 않도록 한 다음 제조사에서 제공하는 serum blocking reagent로 10분간 처리하여 조직 내 비특이 반응을 없게 하고, 1차 anti-rabbit human lysozyme (Dako, Denmark)을 PBS로 200배 희석하여 1시간 동안 감작시켰다. 감작시킨 조직은 PBS로 5분씩 2회 씻어낸 다음 제조사에서 제공하는 2차 항체를 30분간 조직에 감작시킨 다음 발색제로 30분간 반응시킨 후 현미경에서 검사하였다.

Table 1. A variation of body weight after feed a mice *L. acidophilus* for 10 days (g: mean \pm SE)

The body weight at beginning	Control	<i>L. acidophilus</i> (CFU)	
		1 \times 10 ⁶	1 \times 10 ¹⁰
23.6	32.6	34.0	28.5
25.4	34.5	36.0	30.2
24.5	32.0	35.6	31.6
23.0	33.0	34.3	29.8
25.7	35.7	36.5	30.3
Average	24.44 \pm 0.46	33.56 \pm 0.6	30.08 \pm 0.44 [†]

* $P > 0.05$ (compared to the control), [†] $P < 0.01$.

결 과

체중 변화 및 운동능력 측정

*L. acidophilus*를 투여 후 마우스의 체중변화를 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 평균 체중에서 실험을 시작할 당시 24.44 g에 비하여 투여 후에는 대조군이 33.56 g으로 37% 증가했지만 1 \times 10⁶ CFU를 먹인 실험군에서는 35.28 g으로 44% 증가했고, 1 \times 10¹⁰ CFU를 공급한 실험군에서는 30.08 g으로 23% 증가에 머물렀으며, 1 \times 10¹⁰ CFU를 먹인 경우 체중 변화에서 대조군보다 평균 3.48 g이 줄었으나 1 \times 10⁶ CFU를 공급한 경우에는 오히려 체중이 평균 1.72 g이 더 증가하여 1 \times 10⁶ CFU 정도는 오히려 체중 관리 측면에서는 급여하지 않는 것이 좋은 것으로 나타났다.

체중변화에서 *L. acidophilus*를 1 \times 10⁶ CFU 공급한 경우에는 유의성이 인정되지 않았으나 *L. acidophilus*를 1 \times 10¹⁰ CFU 공급한 경우에는 유의성이 인정되었다.

건강상태를 측정하기 위한 방법의 하나로 수영을 지속하는 시간에 따라 측정하였으며 그 결과는 Table 2와 같다. 대조군에서는 수영 지속 시간이 평균 145초로 나타났으며, *L. acidophilus* (1 \times 10⁶ CFU)를 먹인 경우에는 수영 지속 시간이 평균 248초, *L. acidophilus* (1 \times 10¹⁰ CFU)를 먹인 실험군에서는 평균 446초로 나타났다.

L. acidophilus (1 \times 10⁶ CFU)를 먹인 경우에는 *L. acidophilus*를 먹이지 않은 대조군보다 103초 더 오랫동안 수영 시간을 보였으며, *L. acidophilus* (1 \times 10¹⁰ CFU)를 먹인 경우에는 대조군보다 301초 더 오랫동안 수영 시간을 유지하였다. 수영 능력에서 대조군과 비교할 때 *L. acidophilus*를 섭취한 실험군에서 모두 $P < 0.05$ 로 그 유의성이 인정되었다.

Table 2. Swimming ability after feed a mice *L. acidophilus* for 10 days (seconds: mean \pm SE)

	Control	<i>L. acidophilus</i> (CFU)	
		1 \times 10 ⁶	1 \times 10 ¹⁰
Swimming times (seconds)	206	182	248
	162	203	408
	130	216	476
	117	314	548
	110	325	550
Average	145 \pm 15.8	248 \pm 26.6*	446 \pm 50.1 [†]

* $P < 0.02$ (compared to the control), [†] $P < 0.01$.

Table 3. Blood cell analysis of mice after feed *L. acidophilus* for 10 days (mean±SE)

Classification (unit)	Control	<i>L. acidophilus</i> (CFU)		Results
		1×10 ⁶	1×10 ¹⁰	
Total WBCs (K/μl)	5.12±0.45	2.64±0.27*	4.14±0.04 [†]	N [§]
Neutrophils (K/μl)	0.56±0.12	0.35±0.12 [†]	1.15±0.02 [‡]	N
Lymphocytes (K/μl)	4.30±0.38	1.99±0.25 [‡]	2.33±0.27 [‡]	N
Monocytes (K/μl)	0.18±0.09	0.14±0.08 [†]	0.21±0.13 [†]	N
Eosinophils (K/μl)	0.06±0.03	0.13±0.09 [†]	0.33±0.20 [†]	N
Basophils (K/μl)	0.03±0.02	0.04±0.02 [†]	0.12±0.05 [†]	N
Total RBCs (M/μl)	9.39±0.45	8.85±0.36 [†]	10.34±0.41 [†]	LI
Hemoglobin (g/dl)	12.60±0.46	13.00±0.43 [†]	13.50±0.51 [†]	N
Thrombocytes (K/μl)	650.00±49.38	752.00±62.09 [†]	897.00±51.27*	N

*P<0.05, [†]P>0.05 (compared to the control), [‡]P<0.01, [§]Normal, ^{||} A little increase.

혈구 및 혈청화학치 분석

*L. acidophilus*를 투여한 후 혈구 분석한 결과는 Table 3과 같다. 총 백혈구 수에서 *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU)를 급여한 경우 대조군 보다 림프구가 감소했지만 호중성백혈구, 단핵백혈구, 호산성백혈구 및 호염기성백혈구만 다소 증가하는 수준에 그쳤으며 그 범위는 질병에 감염된 수치가 아닌 정상적인 경우와 유사하였다.

적혈구에 대한 분석에서도 *L. acidophilus* (1×10⁶ CFU)를 급여한 실험군에서는 대조군과 비슷한 결과를 보이고 있지만 *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU)를 급여한 경우에는 총 적혈구와 헤모글로빈의 수치가 증가하여 영양분의 공급이 활발하게 이루어져 대조군에서 비하여 더 건강한 상태라는 것을 보여주고 있다.

혈소판에 대한 분석에서도 *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU)를 급여한 실험군이 정상적인 범위 내에서 대조군이나 *L. acidophilus* (1×10⁶ CFU)를 급여한 실험군보다 높게 나타났다.

Table 4는 혈청화학치를 분석한 것으로 cholesterol에서 *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU)를 급여했을 때 76 mg/dl로 대조군 137 mg/dl, *L. acidophilus* (1×10⁶ CFU) 107 mg/dl에 비하여 현저하게 낮았다. 지방의 전구물질인 triglyceride는 대조군이 173 mg/dl이고, *L. acidophilus* (1×10⁶ CFU) 급여군이 171 mg/dl이며, *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU) 급여군에서는 56 mg/dl로 대조군에 비하여 매우 낮은 것으로 분석되었다. 대조군, *L. acidophilus* (1×10⁶ CFU), *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU) 급여군에서 albumin (g/dl)은 2.66, 2.66, 3.82, total protein (g/dl)은 2.4, 2.1, 3.5, phosphate (mg/dl)는 16.45, 12.68, 25.86으로 거의 비슷하게 나타났으며, calcium (mg/dl)농도에

Table 4. Serum analysis of mice after feed *L. acidophilus* for 10 days (mean±SE)

Classification	Control	<i>L. acidophilus</i> (CFU)	
		1×10 ⁶	1×10 ¹⁰
Cholesterol (mg/dl)	137±5.678	107±5.31*	76±5.34*
Triglyceride (mg/dl)	173±13.331	171±7.55 [†]	56±7.04*
Albumin (g/dl)	2.66±0.251	2.66±0.22 [†]	3.82±0.19 [§]
Total Protein (g/dl)	2.4±0.196	2.1±0.05 [†]	3.5±0.205*
Phosphate (mg/dl)	16.45±0.859	12.68±0.481 [†]	25.86±1.94*
Calcium (mg/dl)	7.3±0.446	7.6±0.46 [†]	7.2±0.32 [†]

*P<0.01, [†]P>0.05 (compared to the control), [‡]P<0.05, [§]P<0.02.

서도 7.3, 7.6, 7.2로 비슷한 수준으로 나타났다.

Lysoplate assay

Cationic peptide의 활력도를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 간, 십이지장, 고환은 대조군보다 *L. acidophilus*를 급여한 경우 cationic peptide의 활력도가 육안으로 관찰될 수 있을 정도로 좋게 나타났으며 *L. acidophilus* (1×10¹⁰ CFU)의 경우에는 현저하게 활력도가 좋았다. 폐, 비장에서는 대조군보다 활력도가 약간 증가하기는 하였으나 현저한 차이는 인정되지 않았다.

주령에 따른 *L. acidophilus*의 발현

장에서 *Lactobacillus acidophilus*의 발현은 Fig. 2에

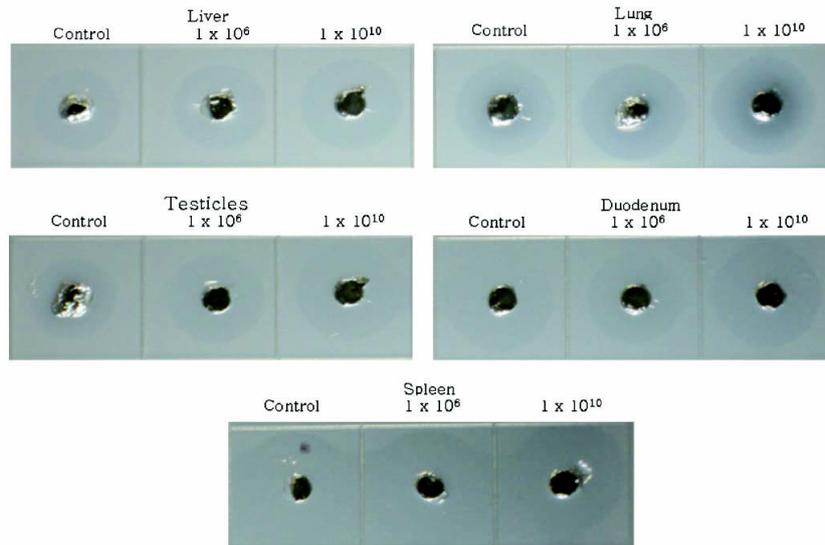


Fig. 1. Results of lysoplate assay to the cationic peptide activity.

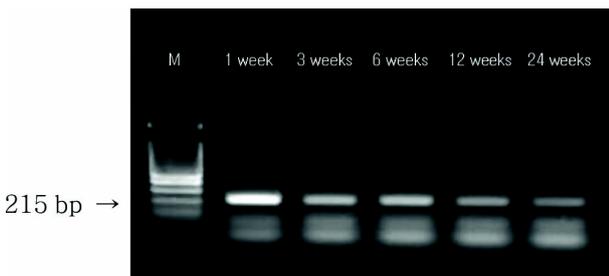


Fig. 2. Expression level of *L. acidophilus* according to growing days. Lane M, 100 bp DNA marker.

서 보는 바와 같이 유전자를 215 bp에서 증폭된 것을 볼 수 있었으며 1주령에서 가장 많이 나타났으며 3주령, 6주령, 12주령, 24주령으로 갈수록 점차 감소하는 경향을 보이고 있어 주령이 증가할수록 장내 발효기능이 떨어지는 것을 나타내고 있다.

면역조직화학 염색 및 조직 표본 제작

십이지장에 대한 성상의 결과는 Fig. 3에서와 같이 대조군에서는 일반적인 장 용모 상태를 보이고 있으며 *L. acidophilus*의 투여량이 증가할수록 장 용모의 뿌리 부분이 튼튼해지면서 정상적인 장관 구조가 관찰되었다. Lysozyme의 분포에도 *L. acidophilus*의 투여량이 증가할수록 분비가 많이 이루어지고 있었다(Fig. 4).

고 찰

인류의 음식 문화에서 발효는 매우 오래전부터 사용된 방법이다. 이러한 발효를 이용한 음식의 시초는 말의 젖이나 우유를 이용한 발효가 그 시초가 아닐까 생각한다. 현재 유산균을 이용한 발효 산업은 계속 확장되고 있으며 또한 발견되는 균주들도 계속 증가하고 있다. 발효균주를 이용한 제품은 현재 생균제라는 통칭으로 축산에서 분뇨에 의한 악취제거, 성장촉진 또는 질병예방 차원에서 10여 년 전부터 사용되기 시작하였으며 정부 차원에서도 널리 권장하고 있다. 현재 시판되고 있는 축산용 생균제는 보조사료로 사용되고 있으며 주로 가루형태를 유지하고 있다. 이러한 제품에 가장 많이 사용되고 있는 균주가 그람양성의 *Bacillus subtilis*와 효모배양물이며 유효기간은 생산일로부터 1년간이다. 발효균주 중 한 종류인 *L. acidophilus*는 장내에서 정상적으로 서식하면서 오랫동안 발효산업에서 사랑받아온 균주이며 probiotic의 한 분야를 차지하고 있다. Probiotic에 대한 연구에서 발효균주의 효과가 다양한 분야에서 밝혀지자 축산업에서도 이를 산업적으로 여러각도로 사용하고 있으나 현장에서의 결과에서 악취제거를 위한 이용에서는 전혀 효과를 보지 못하거나 오히려 더 역겨운 악취를 유발하는 경우가 있고, 성장촉진을 위한 사용에서는 생균제 이용을 통한 성장 촉진 보다는 탄수화물 또는 단백질의 섭취량 증가로 인한 성장촉진이 더 빠르며 질병예방 차원에서는 오히려 백신접종을 통

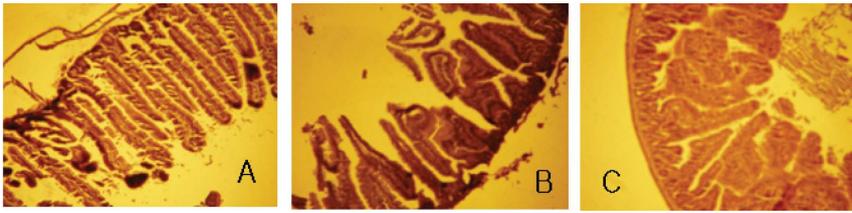


Fig. 3. Duodenum section according to feed mice on *L. acidophilus*. (A) Control. (B) *L. acidophilus* (1×10^6 CFU). (C) *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU).

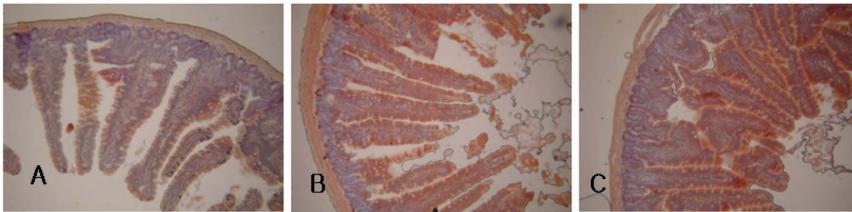


Fig. 4. Distribution of lysozyme in duodenum. (A) Control. (B) *L. acidophilus* (1×10^6 CFU). (C) *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU).

한 예방이 더 효과적으로 나타나고 있어 축산 현장에서의 생균제를 활용에 대한 의문이 증폭되고 있으며 농가에서도 정부지원에 의존하고 개인별 생균제 구매를 통한 이용은 저조한 실정인바 발효균주에 대한 현장 적용의 방법을 찾고자 이 실험을 하였다. 이 실험에서 나타난 바와 같이 체중 관리 측면에서는 *L. acidophilus*의 섭취량에 따라 다르게 나타났는데 *L. acidophilus*를 1×10^6 CFU 수준으로 섭취할 때 사람에게 있어 체중 감소 보다는 체중 증가의 역작용을 가져올 수 있으나 단기 비육을 목적으로 하는 축산에는 발효균주의 급여가 오히려 긍정적인 효과를 가져올 것으로 추정된다.

수영 능력면에서는 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 먹인 실험군에서는 446초를 나타나 *L. acidophilus* (1×10^6 CFU) 248초, 대조군 145초로 나타나 이는 *L. acidophilus*의 섭취량이 증가할수록 운동능력이 향상하는 것으로 보이며 이는 운동능력 향상 뿐만 아니라 개체의 건강 증진에도 도움이 된다는 것을 알 수 있었다.

혈액분석 측면에서 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 투여한 실험군에서는 총 백혈구 수치에서 대조군에 비하여 높은 수치를 보이고 있으며 또한 그 수치에서도 정상적인 총백혈구 수치를 나타내고 있어 이는 백혈구 증가에 따른 면역 증강을 보여주는 것이라고 하겠으며 이는 Goldin 등(1992)이 보고한 내용과 일치하는 것을 알 수 있었다. 적혈구 분석에서 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 급여한 경우에는 총 적혈구와 헤모글로빈의 수치가 많이 증가하여 영양분의 공급이 활발하게 이루어져 대조군에서 비하여 더욱 건강한 상태라는 것을 보여주고 있으며 이는 건강증진

에도 청신호라 하겠다. 혈소판 분석에서도 비슷한 경향을 보이고 있어 전반적인 혈액공급 및 신속한 혈액응집 등으로 외부 상처로부터 감염 기회를 차단하는 구실을 하는 것으로 추정된다. 혈청화학치에서 혈청내 콜레스테롤 측정에서도 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 급여한 경우 76 mg/dl인데 비하여 대조군은 137 mg/dl를 나타내 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 급여한 경우 대조군보다 약 2배 정도 콜레스테롤이 감소하는 것으로 나타났으며 고혈압 관리에서도 아주 효과적일 것으로 생각되어진다.

선천적 면역 물질 분비에 대한 실험에서 간, 폐, 비장, 고환 및 십이지장에서의 cationic peptide 활력도를 측정한 결과 대조군보다 *L. acidophilus*를 먹인 양에 따라 그 활력도에 있어 증가하는 것을 알 수 있었으며 특히 십이지장에서는 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 급여한 경우 대조군과 *L. acidophilus* (1×10^6 CFU)를 먹인 것에 비하여 2배 정도의 cationic peptide의 활력도가 증가한 것으로 나타나 발효균주가 장에 도달할 수 있을 정도의 양을 섭취할 경우 건강 증진 뿐만 아니라 선천성 면역물질의 활력도 증가에도 효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 H&E 염색에서 보여주는 장 용모의 활성화와 lysozyme 분비 정도에 대해서도 비슷한 결과를 나타내는데 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 급여한 경우 대조군과 *L. acidophilus* (1×10^6 CFU)를 먹인 것에 비하여 lysozyme의 분비가 더 많은 것으로 나타났으며 십이지장에서 *L. acidophilus*의 외부로부터의 출현은 십이지장이 이를 침입자로 분류하여 선천성 면역물질들인 cationic peptide를 더 많이 분비하여 질병을 유발하는 병원체의 정착을 방해하는 것으로 추정된다.

이번 실험에서 또 하나의 결과는 정상적으로 분포하는 *L. acidophilus*의 감소하는 경향에 관한 것으로 생체가 포유를 하고 있거나 포유 후 일정 기간은 *L. acidophilus*가 정상적으로 상존하며, 생존시간이 연장되고 발효가 어려운 사료 섭취 및 비발효성 세균의 침입기회 증가 등으로 인하여 *L. acidophilus*의 분포는 점차 감소하며 마우스는 12주가 지나면서 현저하게 감소하는 경향을 보이고 있어서 지속적인 발효균의 섭취가 건강 유지에 중요한 것으로 보인다.

현재 국내에서는 여러 종류의 생균제가 동물의 보조사료로 공급되고 있으나 발효균주의 함유량이 $2.3 \sim 2.5 \times 10^6$ CFU/g정도인데 이것을 또한 사료에 혼합하여 사용하는 관계로 실제로 동물에게 급여되는 수준은 훨씬 낮아 이들 발효균주가 위산에 의한 사멸 등으로 인하여 위장을 통하여 십이지장 등 소장이나 대장으로의 전달은 어려운 것으로 판단된다. 고로 생균제를 이용한 동물의 건강유지와 질병 예방 효과를 가져오기 위해서는 더욱 많은 발효균이 장에 도달할 수 있도록 급여 방법 및 생산 방법을 바꾸어야 할 것으로 보인다.

결 론

Probiotics의 한 종류로 분류되는 *L. acidophilus*의 급여가 마우스의 건강증진과 생체 면역체계에 어떤 영향을 미치는지 밝히기 위해 일련의 실험을 수행하여 다음과 같이 결론을 얻을 수 있었다.

첫째, 운동능력 향상 여부를 알아보기 위한 수영 지속 능력에 대한 실험에서 1×10^6 CFU 또는 1×10^{10} CFU의 *L. acidophilus*를 10일 동안 먹인 경우 모두 수영 지속 시간 증가 하였으며, *L. acidophilus* 급여량이 증가 할수록 운동능력도 같이 향상 되는 것을 알 수 있었다.

둘째, 체중 변화에 대한 실험에서 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 급여할 경우 평균 체중이 감소되었고, *L. acidophilus* (1×10^6 CFU)를 급여한 실험군에서는 평균 체중이 증가하였다.

셋째, 혈액분석에서는 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU)를 먹인 실험군은 *L. acidophilus*를 먹이지 않은 대조군에 비하여 총 백혈구수가 증가하였다. 총 단백질량에서도 1×10^{10} CFU의 *L. acidophilus*를 급여의 경우 대조군에서 높게 나타났다. Hemoglobin 및 thrombocytes 수치에서도 *L. acidophilus* 투여군이 *L. acid-*

*ophilus*를 투여하지 않은 대조군 보다 높게 나타났다.

넷째, 생체 면역시스템에 있어서는 선천성 면역물질인 cationic peptide의 분비가 각 장기에서 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU) 투여군이 가장 많았으며 특히 십이지장에서는 대조군에 비하여 2배 정도 분비 되었으며, cationic peptide의 하나인 lysozyme의 발현에서도 *L. acidophilus* (1×10^{10} CFU) 급여군에서 가장 많았다.

*L. acidophilus*는 장에서 장내 세균총의 하나로 서식하는 관계로 숙주의 생존시간이 경과함에 따라 그 분포도 줄어들 것이라고 생각된다. 이를 알아보기 위한 실험으로 마우스의 생존기간에 따른 *L. acidophilus*의 장내 생존율을 유전자 검사법으로 조사한 결과 마우스의 경우 12주령이 경과하면 *L. acidophilus*의 분포량이 반 이하로 감소함을 알 수 있어 어린 동물에서의 probiotics의 급여는 큰 효과를 볼 수 없다는 것을 알 수 있었다. 축산 현장에서 사용되는 생균제의 함량은 현재 판매되고 있는 생균제의 경우 평균 $2.3 \sim 2.5$ CFU/g인 것으로 포기되고 있어 본 실험의 결과와 비교할 때 그 효과가 미미하거나 동물의 건강증진과 질병예방보다는 단기 비육 등에 효과가 있을 것으로 보이며 질병예방을 위해서는 높은 농도의 생균제를 지속적으로 투여할 필요가 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Baharav E, Mor F, Halpern M, Weinberger A. 2004. Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. *J Nutr* 134: 1964-1969.
- Cole AM, Dewan P, Ganz T. 1999. Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun* 67: 3267-3275
- Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. 2006. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother* 58: 266-272.
- FAO, WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina. 1-4 October. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/.
- Fonseca F, Béal C, Mihoub F, Marin M, Corrieu G. 2003. Improvement of cryopreservation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CFL1 with additives displaying different protective effects. *Int Dairy J* 13: 917-926.
- Forsum U, Holst E, Larsson PG, Vasquez A, Jakobsson T, Mattsby-Baltzer I. 2005. Bacterial vaginosis a microbio-

- logical and immunological enigma. *APMIS* 113: 81-90.
- Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, Perdigon G. 2007. Proposed model: Mechanisms of Immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 14: 485-492.
- Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal milk tract. *Dig Dis Sci* 37: 121-128.
- Hajela N, Nair GB, Ganguly NK. 2010. Are probiotics a feasible intervention for prevention of diarrhoea in the developing world? *Gut Pathog* 2: 10-14.
- Hirayama K, Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2: 681-686.
- Ljungh A, Wadström T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 7: 73-89.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Osserman EF, Lawlor DP. 1966. Serum and urinary lysozyme(muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J Exp Med* 124: 921-952.
- Ouwehand AC. 2007. Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 137: 794-797.
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. 1995. Immune stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 78: 1597-1606.
- Pereira DI, Gibson GR. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics in serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 259-281.
- Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Açil Y, Glüer CC, Schrezenmeir J. 2007. Prebiotics, probiotics and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content and bone structure. *J Nutr* 137 (3 Suppl 2): 838S-846S.
- Songisepp E, Kullisaar T, Hütt P, Elias P, Brilene T, Zilmer M, Mikelsaar M. 2004. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial. *J Dairy Sci* 87: 2017-2023.
- Wang Y, Corrieu G, Béal C. 2005. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *J Dairy Sci* 88: 21-29.
- Weston S, Halbert A, Richmond P, Prescott SL. 2005. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 90: 892-897.
- Yeo SK, Liong MT. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *Int J Food Sci Nutr* 61: 161-181.