

<원 저>

## 개 생균제 사용에 적합한 유산균주의 선발 및 면역활성 평가

박수민 · 박호은 · 이완규\*

충북대학교 수의과대학

(접수: 2015년 4월 8일, 수정: 2015년 4월 29일, 게재승인: 2015년 5월 7일)

### Selection and immunomodulatory evaluation of lactic acid bacteria suitable for use as canine probiotics

Su-Min Park, Ho-Eun Park, Wan-Kyu Lee\*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 362-763, Korea

(Received: April 8, 2015; Revised: April 29, 2015; Accepted: May 7, 2015)

**Abstract :** This study was conducted to isolate lactic acid bacteria (LAB) from dog intestine and identify potential probiotic strains for canine use. One hundred and one LAB were isolated from feces of 20 healthy dogs. Acid, bile, and heat resistance along with adherence to Caco-2 cells and antimicrobial activity against pathogens were examined. To analyze immunomodulatory effects, the production of nitric oxide (NO), TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  was measured using RAW 264.7 macrophages. Additionally, RAW BLUE cells were used to evaluate nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) generation. Ultimately, three strains were selected as canine probiotics and identified as *Lactobacillus reuteri* L10, *Enterococcus faecium* S33, and *Bifidobacterium longum* B3 by 16S rRNA sequence analysis. The L10 and S33 strains showed tolerance to pH 2.5 for 2 h, 1.0% Oxgall for 2 h, and 60°C for 5 min. These strains also had strong antimicrobial activity against *Escherichia coli* KCTC 1682, *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, and *Listeria monocytogenes* KCTC 3569. All three strains exerted better immunomodulatory effects than *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), a well-known commercial immunomodulatory strain, based on NO, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  production. These results suggested that the three selected strains could serve as canine probiotics.

**Keywords :** *Bifidobacterium longum*, canine probiotics, *Enterococcus faecium*, immunomodulation, *Lactobacillus reuteri*

## 서 론

생균제(probiotics)는 일반적으로 숙주에 유익한 작용을 하는 미생물 제제 또는 미생물의 성분으로 정의된다 [13]. 일반적으로 생균제용 미생물로는 유산균(lactic acid bacteria)을 많이 사용하고 있는데, 그중에서 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 등이 대표적인 균주로 알려졌다. 유산균은 동물의 장내세균총(intestinal microflora) 생태계 균형 유지와 병원성 세균의 억제에 중요한 역할을 하는 유익한 균으로 알려졌다. 일반적으로 소장에는 *Lactobacillus*, *Enterococcus* 등의 통성혐기성(facultative anaerobic) 유산균이, 대장에는 *Bifidobacterium*과 같은 편성혐기성(strict anaerobic) 유산균이 우점종으로 분포하고 있다 [20].

생균제의 체내 유용 효과는 크게 4개의 기전으로, 1) 항균성 물질의 생산을 통한 길항작용 [33], 2) 병원체의 부착부위나 영양성분의 경쟁 [3], 3) 숙주의 조절작용 [34], 4) 세균의 독소 생성 및 활성의 억제 작용이다 [4, 31]. 이 외에도 생균제는 비타민 E, 유기산, 아미노산 등의 소화 및 흡수 개선, 비타민 B군의 합성, 장내 면역반응 증가, 혈중 IgG 수준 조절, 대식세포(macrophage)의 활성화와 면역기능 향상 등 다양한 작용이 보고되고 있다 [30].

우수한 생균제가 갖추어야 하는 특성으로는 위산에 대한 내산성, 담즙산에 대한 내담즙성, 제품제조 과정의 열처리 등에 대한 내열성, 장 상피세포에 대한 부착성, 병원성 세균에 대한 항균물질 생성능, 숙주에 대한 면역활성 능력 등 다양한 특성이 요구되고 있다 [24]. 활성화된 대식세포는 암세포나

\*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2960, Fax: +82-43-267-2595

E-mail: wklee@cbu.ac.kr

세균에 철 유실과 철-황 효소와 관련된 산화적 손상을 유발시키며, nitric oxide(NO)와 같은 세포 독성물질을 분비한다. 또한 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\alpha/\beta$ , interleukin-6(IL-6), interleukin-12(IL-12), interleukin-18(IL-18)과 같은 cytokine을 분비하여 면역계 세포가 수용체에 반응하도록 함으로써 면역반응을 조절한다 [9, 21, 23].

현재 세계적으로 개 생균제용 유산균주 개발에 대한 연구는 다른 산업동물에 비해 부족한 상태이지만, 안전하고 항생제를 대체할 수 있다는 장점과 친환경적 소재를 선호하는 최근의 경향에 맞추어 점차 그 사용빈도가 증가하고 있다 [31]. 국내에서도 아직 개 생균제 개발에 대한 연구는 초기 단계이지만, 생균제에 대한 관심은 더욱 높아질 것으로 예상된다. 개의 장내세균총은 품종, 사육환경, 사료 등 다양한 요인에 따라 변화하며, 종 특이성을 포함하기 때문에, 개 생균제용 유산균주는 개 유래의 균주를 사용하는 것이 가장 이상적임에도 불구하고, 국내에서는 출처가 불분명한 다양한 외부 유래의 생균제용 균주도 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내의 소형견 장관으로부터 생균제용 유산균인 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 속 균주를 분리하고, 생균제가 갖추어야 할 특성 조사와 함께, 면역활성 검증을 통해 개 생균제로 사용하기에 가장 적합한 유산균을 선발, 평가하는 것을 연구의 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 동물

충북 청주시 근교 가정집과 애견센터에서 사육하는 건강한 포유자견(2~4주령) 7마리, 이유자견(2~3개월령) 7마리, 성견(1~6세) 6마리의 합계 20마리를 유산균 분리용 공시 동물로 사용하였다. 품종은 Pomeranian, Maltese, Shih Tzu, 잡종견 등을 사용하였다.

### 유산균주 분리

강아지의 신선한 분변은 배변 유도 또는 rectal swab을 통해 채취한 후, 즉시 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 치환시킨 혐기성 수송배지인 BBL brain heart infusion(BHI) broth(Becton, Dickinson and Company, USA)에 넣어 실험실까지 냉장 운반하였다. *Lactobacillus* 선택 배지인 LBS와 MRS, *Enterococcus* 선택 배지인 TATAC, *Bifidobacterium* 선택 배지인 BS와 비선택 배지인 BL 배지에 멸균된 diluent A(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0 g, L-cystein · HCl · H<sub>2</sub>O 0.5 g, Tween 80 0.5 g, Agar 1.0 g/1,000 mL DW)를 사용하여 각각 10배 단계 희석하여 도말하였다. 도말된 배지는 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub>로 치환된 steel wool jar에서 37°C, 48시간 배양하였다 [18, 20, 25].

선택 및 비선택 배지에서 유산균의 전형적인 집락을 선발하여 BL medium에 계대한 후, 37°C, 48시간 배양하였다. 배양된 집락은 Mitsuoka 방법에 의해 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*으로 분리, 동정하였다. 분리된 유산

균은 혐기 상태에서 BL medium에 계대하여 37°C에 보관하며, 다음 실험에 사용하였다 [18, 20, 25].

### 생균제용 균주의 분리

#### 내산성 및 내담즙성 실험

내산성 유산균을 선발하기 위하여 분리된 *Lactobacillus*, *Enterococcus* 및 *Bifidobacterium*을 L-cysteine(Junsei Chemical, Japan)이 0.05% 첨가된 BHI broth(pH 7.0)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*은 pH 2.5와 pH 3.5의 BHI broth에 1% 접종하고, 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 균주의 생존여부를 확인하기 위하여 배양균주를 BL medium에 도말하여 배양한 후, 생존한 균주를 내산성 균주로 판정하였다 [25].

내산성 균주로 판정된 유산균을 대상으로 0.3%, 0.5%, 1.0% Oxgall(pH 7.0; Difco, USA)이 첨가된 BHI broth에 유산균 배양액을 1%씩 접종하고 2시간 동안 배양한 후, BL medium에 도말하고 배양하여 생존한 균주를 내담즙성 균주로 판정하였다 [25, 27].

#### 내열성 실험

내산성과 내담즙성 균주 중에서 선발한 유산균을 L-cysteine(Junsei Chemical)이 0.05% 첨가된 BHI broth(pH 7.0)에 접종, 배양 후, 배양액을 50°C, 60°C, 70°C에 각각 5분간 노출시킨 후, BL medium에 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 집락이 형성된 균주는 내열성 균주로 판정하였다 [5, 25].

#### 병원균 억제능 검사

병원균 억제능을 검사하기 위하여 Flemming 등 [12]에 의해 언급된 agar spot assay를 변형하여 사용하였다. Agar spot assay의 병원균으로는 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569균주의 4종류를 사용하였다. 각 병원균과 유산균은 BBL BHI broth(Becton, Dickinson and Company)에서 37°C, 24시간 배양하여 접종액으로 사용하였다. 배양된 유산균은 먼저 BHI agar에 2  $\mu$ L 접종하여 spot이 형성되도록 30°C, 24시간 배양하였다. 그 후 유산균이 배양된 BHI agar에, 7 mL의 BHI agar(0.7%)와 혼합된 병원균을 pouring하여 30°C에서 24시간 배양하였다. Spot 주위로 형성된 병원균의 억제환의 길이가 3 mm 이상일 경우 병원균 억제 능력이 있는 것으로 평가하였다 [8, 12].

#### 장관 부착능 검사

유산균은 L-cysteine을 0.05%(w/v)로 첨가한 MRS broth(Difco) 5 mL에 접종하여 혐기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. Caco-2 cell(한국세포주은행, 대한민국)은 20% inactivated fecal calf serum(Gibco-BRL, USA)과 0.2% penicillin/streptomycin(10,000 U/mL, Gibco-BRL)을 첨가한 DMEM(Gibco-

BRL)에서 CO<sub>2</sub> incubator(95% air, 5% CO<sub>2</sub>)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. Caco-2 cell monolayer가 형성된 4-well chamber slide에 유산균(0.5 mL; 1.0 × 10<sup>9</sup> CFU/mL in PBS)을 접종하고, 5개의 Caco-2 cell 당 부착한 유산균 수의 평균값을 계산하였다. *Lactococcus lactis* NIAI 527 (Meiji, Japan)과 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111을 각각 양성 및 음성 대조군 균주로 사용하여, 부착능 음성 및 양성으로 판정하였다 [17, 25].

### 최종 분리 균주의 면역활성 조사

#### 세포 배양

한국세포주은행으로부터 분양받은 murine macrophage 세포인 RAW 264.7 cell을 10% fetal bovine serum과, 100 unit/mL의 streptomycin과 penicillin이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하고 NO 및 cytokine 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 사용하였다. InvivoGen(USA)의 RAW BLUE cell은 nuclear factor-κB (NF-κB)를 측정하기 위한 세포로 위의 RAW 264.7 cell과 동일한 조건에서 배양하였고, 4~5회 계대 후 Zeocin (InvivoGen) 항생제를 처리 후 사용하였다. Negative control well에는 PBS를 첨가하고, positive control well에는 PBS와 LPS(Sigma, USA)를 100 또는 500 ng/mL를 첨가하였다 [1, 8].

#### NO 측정

NO의 농도는 Griess reagent system(Promega, USA)을 사용하여 측정하였다. 96-well plate에 배양액 50 μL를 넣고 Griess reagent I(NED solution)과 Griess reagent II (Sulfanilamide solution)를 동량으로 혼합한 후, 암실에서 10 분간 반응하고 30분 이내에 microplate reader(Tecan, Austria)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산 나트륨의 표준곡선(0~100 μM)을 이용하여 계산하였다 [8].

#### IL-1β와 TNF-α 측정

RAW 264.7 cell을 5.0 × 10<sup>5</sup> cell/mL로 접종한 후 세포가 안정되면 1.0 × 10<sup>7</sup> CFU/mL 농도로 맞춘 유산균을 혼합하여 48시간 반응시킨 후에 배양액을 회수하였다. IL-1β와 TNF-α 생산량은 ELISA kit(eBioscience, USA)를 이용하여 측정하였다. Sandwich ELISA 방법을 사용하였으며, 측정 방법은 제조사의 지침에 따라 진행하였다. 측정 시료는 microplate reader(Tecan)를 이용하여 450 nm 파장에서 3회 반복 측정하였다 [1, 8].

#### NF-κB 측정

유산균주가 NF-κB pathway를 활성화시키는지 확인하기 위하여 secreted alkaline phosphatase reporter gene이 안정적으로 transfection된 RAW BLUE cells(InvivoGen)을 사용하였다. NF-κB 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW BLUE cells을 96 well plate의 각 well당 5.0 × 10<sup>5</sup> cell/mL가 되도록 분주하여 2시간 안정화한 후, 새로운 DMEM 배

지로 교체하였다. 1.0 × 10<sup>8</sup> CFU/mL 농도로 맞춘 유산균 100 μL를 첨가하여, 최종 1.0 × 10<sup>7</sup> CFU/mL 농도로 배양하였다. 48시간 배양 후, 배양액 20 μL와 QUANTI-Blue (InvivoGen) 200 μL를 37°C에서 15분간 암실에서 반응시켰다. 모든 시료는 3회 반복으로 620 nm 파장에서 측정하였다 [1].

#### 최종 선발균의 동정

최종 선발 균주는 16s rRNA sequencing 분석(SolGent, Korea)을 통해 동정하였다.

#### 통계처리

결과의 통계분석은 SPSS for Windows(ver. 12.0; SPSS, USA)을 사용하였다. 일원배치 분산분석(ANOVA)으로 평균과 표준편차를 분석하였으며, 사후 검정을 위해 Duncan test ( $p < 0.05$ )를 실시하였다.

## 결 과

#### 유산균의 분리

총 20마리 개의 분변에서 분리된 유산균은 총 101개 균주였으며, 그중에서 *Enterococcus* 속 균주가 47개 균주(46.5%)로 가장 많이 분리되었으며, *Lactobacillus* 속 균주도 45개 균주(44.6%)가 분리되었다. 그러나 편성형기성 유산균인 *Bifidobacterium* 속 균주는 9개 균주(8.9%)로 제일 낮게 분리되었다(Table 1).

#### 분리 균주의 특성

##### 내산성

개의 분변으로부터 분리된 총 101개 균주를 대상으로 내산성 시험을 실시한 결과 Table 1에서와 같이 *Enterococcus* 47개 균주 중 32개 균주(68.1%)가 pH 2.5, 2시간에서 내산성을 나타내었다. 그러나 *Lactobacillus* 속 45개 균주 중 8개 균주(17.8%), *Bifidobacterium* 속 9개 균주 중 1개 균주(11.1%)만이 pH 2.5에서 내산성을 나타내었다. pH 3.5, 2시간에서는 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 속 세균 중 각각 12/45(26.7%), 44/47(93.6), 3/9(33.3%)에서 내산성 결과를 나타내었다.

##### 내담즙성

분리된 총 101개 균주의 내담즙성을 확인한 결과, *Bifidobacterium* 속 1개 균주만이 1% Oxgall에서 사멸하였고, 나머지 모든 균주는 0.3%, 0.5%, 1.0% Oxgall에서 내담즙성을 나타내었다(Table 1).

##### 내열성

내산성과 내담즙성 균주 중에서 선발된 유산균을 대상으로 70°C에서 5분간 내열성을 확인한 결과 Table 1에서와 같이, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 균주는 각각 4/8(50%), 19/32(59.4%), 2/4(50%)의 내열성을 나타내었

**Table 1.** The probiotic characteristics of selected lactic acid bacteria from the feces of dogs

Characteristics	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Number of isolates (%)	45/101 (44.6)	47/101 (46.5)	9/101 (8.9)
Acid tolerance			
pH 2.5, 2 h	8/45 (17.8)	32/47 (68.1)	1/9 (11.1)
pH 3.5, 2 h	12/45 (26.7)	44/47 (93.6)	3/9 (33.3)
Bile resistance			
0.3%, 2 h	45/45 (100.0)	47/47 (100.0)	9/9 (100.0)
0.5%, 2 h	45/45 (100.0)	47/47 (100.0)	9/9 (100.0)
1.0%, 2 h	45/45 (100.0)	47/47 (100.0)	8/9 (88.9)
Heat resistance			
50°C, 5 min	6/8 (75.0)	31/32 (96.9)	3/4 (75.0)
60°C, 5 min	5/8 (62.5)	28/32 (87.5)	2/4 (50.0)
70°C, 5 min	4/8 (50.0)	19/32 (59.4)	2/4 (50.0)
Antimicrobial activity			
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	7/8 (87.5)	11/12 (91.7)	2/4 (50.0)
<i>Salmonella</i> Enteritidis KCCM 12021	8/8 (100.0)	12/12 (100.0)	2/4 (50.0)
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	6/8 (75.0)	12/12 (100.0)	1/4 (25.0)
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	6/8 (75.0)	11/12 (91.7)	1/4 (25.0)
Adherence to Caco-2 cell			
Negative	5/8 (62.5)	4/12 (33.3)	2/4 (50.0)
Positive	3/8 (37.5)	8/12 (66.7)	2/4 (50.0)

다. 그러나 60°C, 5분의 낮은 열처리 조건에서는 각각 5/8(62.5%), 28/32(87.5%), 2/4(50%)가 생존하는 내열성을 나타내었다.

#### 병원성 억제능

내산성, 내담즙성, 내열성이 우수한 유산균주를 대상으로 4종류 병원성 세균에 대한 병원성 억제능을 평가한 결과, *Lactobacillus* 속 8개 균주는 *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021균주에 대해 100% 항균활성을 나타내었으며, 나머지 병원균 3종류에 대해서도 75%~87.5%의 높은 항균활성을 나타내었다. *Enterococcus* 12개 균주는 *Salmonella* Enteritidis KCCM 12021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916균주에 대해 100% 항균활성을 나타내었고 나머지 2종류 병원균에 대해서도 91.7%의 매우 높은 항균활성을 나타내었다. 그러나 *Bifidobacterium* 속 4개 균주는 4종류 병원균에 대해 25.0%~50.0%의 비교적 낮은 항균활성만을 나타내었다(Table 1).

#### 장관 부착능 검사

Caco-2 cell을 사용한 유산균주의 부착능 검사를 시행한 결과 Table 1에서와같이 *Enterococcus* 12개 균주 중 8개 균주(66.7%)가 부착능을 보여 가장 높은 결과를 나타내었다. *Bifidobacterium* 속 4개 균주는 50%, *Lactobacillus* 속 8개 균주는 3개 균주만이 부착능 결과를 나타내었다.

#### 면역활성능

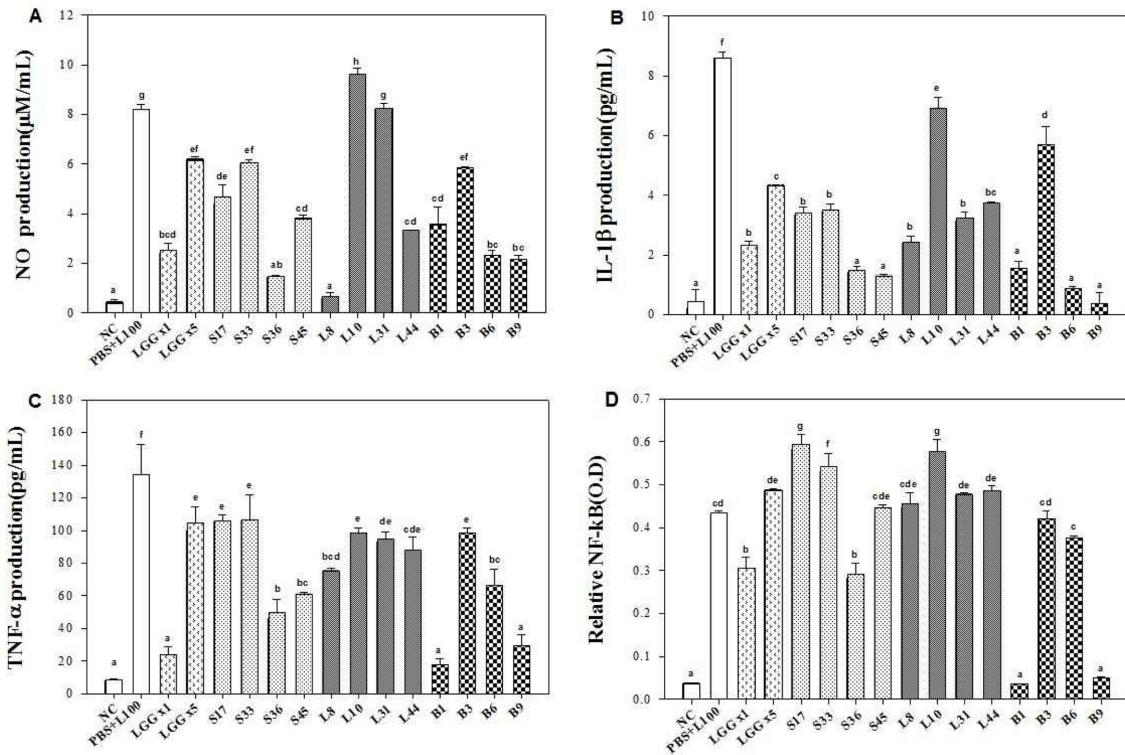
분리된 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 속 균주 중에서 내산성, 내담즙성, 내열성, 병원성 억제능, 장관 부착능 등이 가장 우수한 상위 균주를 각각 4개씩 선발하여 함께 12개 균주를 대상으로 면역활성능을 측정하였다.

NO 생성량의 경우 *Enterococcus* S33균주(6.3 µM/mL), *Lactobacillus* L10균주(11.6 µM/mL), L31균주(82.8 µM/mL), *Bifidobacterium* B3균주(5.9 µM/mL)의 NO 생성량이 면역증진 효과가 입증된 상업용 균주인 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)의 2.5 µM/mL보다 유의적인 증가 결과를 나타내었다(Fig. 1).

IL-1β 측정 결과는 *Enterococcus*균주 중에서 S33, S17균주의 생성량이 많았지만, LGG균에 유의적인 증가는 나타나지 않았다. 그러나 *Lactobacillus* L10균주(7.0 pg/mL)와 *Bifidobacterium* B3균주(5.9 pg/mL)는 LGG의 2.4 pg/mL보다 유의적인 증가 결과를 나타내었다.

TNF-α 측정결과 *Enterococcus* S33, S17, S45, S36 4개 균주 모두 LGG의 24.6 pg/mL보다 유의적으로 증가 하였다. *Lactobacillus*도 4개 균주 모두 유의적인 증가세를 보였으며, 그중에서 L10균주가 101 pg/mL의 가장 높은 결과를 보였다. 그러나 *Bifidobacterium*균주는 B3와 B6균주만이 LGG에 비해 유의적인 증가를 나타내었으며, B3가 100.2 pg/mL의 생성량을 나타내었다.

NF-κB 흡광도 측정결과, 면역활성을 측정한 12개 균주 중



**Fig. 1.** Nitric oxide (A), IL-1 $\beta$  (B), TNF- $\alpha$  (C) and nuclear factor- $\kappa$ B (D) production by RAW 264.7 and RAW BLUE cells induced by selected lactic acid bacteria. RAW 264.7 and RAW BLUE cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were stimulated with probiotic strains or PBS for 48 h. L100 means LPS at 100 ng/mL. Data are mean  $\pm$  SD values of triplicates. NC; negative control, PBS+L100; positive control, LGG; *Lactobacillus rhamnosus* GG, S17-S45; *Enterococcus* sp., L8-L44; *Lactobacillus* sp., B1-B9; *Bifidobacterium* sp. Different superscript letters (a, b, c, d, e, f, and g) indicate statistical differences as determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Characteristics and Identification of finally selected lactic acid bacteria to use as probiotics for dogs

Characteristics		<i>Lactobacillus</i> L10	<i>Enterococcus</i> S33	<i>Bifidobacterium</i> B3
Cell morphology		Rod	Cocci	Y-shape
pH resistant	pH 2.5, 2 h	+	+	+
	pH 3.5, 2 h	+	+	+
Bile tolerance	0.3%, 2 h	+	+	+
	0.5%, 2 h	+	+	+
	1.0%, 2 h	+	+	+
Heat resistance	50°C, 5 min	+	+	+
	60°C, 5 min	+	+	-
	70°C, 5 min	-	+	-
Antimicrobial activity	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	+	+	+
	<i>Salmonella</i> Enteritidis KCCM 12021	+	+	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	+	+	+
	<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3569	+	+	-
Adherence to Caco-2 cell		+	+	-
Identification by 16s RNA		<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>

에서 S36, B1, B9의 3개 균주를 제외한 모든 균주가 LGG 균주에 비해 유의적인 증가결과를 나타내었다.

따라서 면역활성을 측정한 12개 균주 중에서 가장 우수한

결과를 보인 *Lactobacillus* L10, *Enterococcus* S33, *Bifidobacterium* B3의 3개 균주가 생균제로서의 특성과 면역활성을 모두 갖춘 최적의 개 생균제용 유산균주로 판단되었다.

### 최종 선발균의 동정

최종 선발 균주인 *Lactobacillus* L10, *Enterococcus* S33, *Bifidobacterium* B3균주는 16s rRNA sequence 분석 결과 *Lactobacillus reuteri* L10(99%), *Enterococcus faecium* S33 (99%), *Bifidobacterium longum* B3(99%)로 각각 최종 동정되었으며, 그 생균제적 특성은 Table 2에 나타내었다.

## 고 찰

본 연구에서는 총 20마리 개의 분변에서 유산균 101개 균주를 분리하였는데, *Enterococcus*가 47개 균주(46.5%), *Lactobacillus*가 45개 균주(44.6%)로 대부분을 차지하였으며 *Bifidobacterium* 속은 9개 균주로 8.9%에 불과하였다. 이와 같은 결과는 16S rRNA gene pyrosequencing 방법을 사용하여 건강한 개의 장내세균총을 분석하였을 때 *Bifidobacterium* 속 세균은 우점종으로 항상 검출되지 않는다는 Handl 등 [14]의 연구결과와 일치하고 있다. 또 핀란드 대학의 연구에 의하면 21마리의 개를 대상으로 장내세균총을 분석한 결과, 13종류의 유산균이 검출되었으며 대부분 *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* 속 세균이 우점종을 형성하고 있음을 보고하고 있다 [2]. 사람은 물론 동물에서도 장내세균총은 연령, 사료, 스트레스, 질병 등 다양한 요인에 의해 민감하게 변화하기 때문에 면역활성과 질병 억제 능력이 밝혀진 유산균을 우점종으로 유지할 수 있는 생균제의 급여가 전 세계적으로 각광을 받게 되었다.

생균제를 급여하면 우선 위와 소장을 거쳐 대장까지 도달하게 되는데, 제일 먼저 위의 낮은 산성과 십이지장의 높은 알칼리성인 담즙에 노출된다. 따라서 우수한 특성을 가진 유산균주를 생균제용 균주로 사용하기 위해서는 먼저 내산성과 내담즙성의 특성을 갖추어야 한다 [22]. 본 실험 결과 *Enterococcus* 47개 균주는 pH 2.5에서 32개 균주(68.1%)가 강한 내산성을 보였지만, *Lactobacillus* 45개 균주는 17.8%, *Bifidobacterium*은 11.1%만이 내산성을 나타내어 비교적 낮은 내산성 균주임을 알 수 있었다. Strompfová 등 [31]의 연구에 의하면 개에서 분리된 *Enterococcus* 속 세균의 76~87%가 pH 3.0에서 3시간 내산성을 나타내었으며, 그중에서 *Enterococcus faecium* EF01균주는 높은 내산성, 내담즙성, 장관 내 부착성 등을 보여 개의 생균제용 균주로 최적임을 보고하고 있다. 유산균의 경우 2%의 담즙산에 대한 내담즙성도 보고되고 있지만 [26], 본 연구의 경우 분리된 *Enterococcus* 속, *Lactobacillus* 속 모두 1%의 담즙산에 대해 내담즙성을 나타내었다.

생균제의 대량생산 과정 중 가열과정이 필요한 경우도 있으므로 생균제용 균주는 균수 유지를 위해 내열성의 특성이 요구되고 있다. 유제품에서 분리된 *Lactobacillus*의 내열성 연구 결과, 60°C에서 2시간, 65°C에서 25분간 생존 결과가 보고되었으며 [16]. *Bifidobacterium* 속 세균은 60°C, 5분간 반응시킨 결과 31개의 균주 중 8개의 균주만이 내열성을 보인 것으로 확인되기도 하였다 [28]. 본 실험에서 *Entero-*

*coccus*는 60°C, 5분에서 87.5%, 70°C, 5분에서 59.4%가 내열성을 보였으며, *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*는 시험균주의 50%가 70°C, 5분에서 내열성을 보였다.

유산균의 병원성 억제능에 관한 많은 연구에서 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 등의 유산균은 *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* 등에 대한 억제능이 보고되었다 [32, 35]. 본 실험에서 시행한 병원성 억제능 결과, *Enterococcus*의 경우 12개 균주 중 10개 균주가, *Lactobacillus*는 8개 균주 중 3개의 균주가 4가지 병원균 모두에 대해 억제능을 나타내었지만, *Bifidobacterium*은 4가지 병원균 모두에 억제능이 있는 균이 존재하지 않았다. 이와 같은 결과는 *Enterococcus*, *Lactobacillus*의 산 생성 능력이 *Bifidobacterium*에 비해 뛰어난 것으로 추측된다.

NO는 L-arginine의 NO synthetase 효소로부터 생성되는 물질로 단시간 동안 존재하는 반응 중간산물이며, 암세포나 미생물의 성장을 저해하는 것으로 알려졌다 [19, 29]. IL-1 $\beta$ 는 감염이나 염증에 대해 면역반응을 유발하는 초기 급성 반응의 중요한 매개물질로 숙주세포의 증식, 분화, 소멸 등과 같은 다양한 세포반응을 유도한다. 또한 다른 cytokine과 chemokine의 분비를 유도해 면역 연쇄반응을 촉발하기도 한다 [11, 15]. TNF- $\alpha$ 는 세균감염과 악성종양 발생 시 염증과정을 조절하거나 intracellular pathogen을 억제하여 숙주의 면역체계 내에서 광범위한 영향을 미친다 [10]. 이러한 cytokine은 외부 침입에 대해 숙주의 면역 방어기전에 기여하고, 종종 암 환자나 바이러스감염 환자들은 cytokine에 의해 치료되기도 한다 [7]. NF- $\kappa$ B는 DNA 전사조절에 관여하는 단백질 복합체이다. 또한 NF- $\kappa$ B는 염증성 cytokine 유전자의 발현에 관여하고 감염을 방어하기 위한 cytokine 생산으로 면역반응을 조절하는 중요한 역할을 한다 [6]. 본 실험에서는 개에서 분리된 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 속 균주 중에서 내산성, 내담즙성, 내열성, 병원성 억제능 등 생균제로서의 특성이 가장 우수한 상위 4개 균주씩, 합계 12개 균주를 대상으로 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B와 같은 면역활성 지표를 측정하고, 면역활성이 뛰어난 것으로 잘 알려진 상업용 균주인 LGG균주와 비교하였다. 그 결과 *Lactobacillus* L10, *Enterococcus* S33, *Bifidobacterium* B3의 3개 균주가 생균제로서의 특성은 물론이고 면역활성까지 모두 갖춘 최적의 개 생균제용 유산균주로 판단되었다.

현재 국내외적으로 개 생균제용 유산균주에 관한 많은 연구보고는 이루어지지 않았지만, Strompfová 등 [31]이 보고한 *Enterococcus faecalis* EE4균주와 *Enterococcus faecium* EF01균주는 본 실험에서 최종 선발된 *Enterococcus faecium* S33균주에 비해, 박테리옌 생성능, 항생제 감수성 등을 추가로 보고하고 있다. 그러나 내산성(pH 3.0, 3 h), 내담즙성(1% bile), 장관 부착성, 항균활성 등의 기본 특성은 선발균주와 비슷한 결과를 나타내었고, 반대로 선발균주는 내열성, 면역활성 등의 우수한 특성이 있었다. 또한 개 유래의 생균제로 우수성을 보고한 *Lactobacillus fermentum* AD1균

주 [30]와 최종 선발 균주인 *Lactobacillus reuteri* L10균주의 특성을 비교해보면, 내산성, 내담즙성, 장관 부착성에서는 비슷한 특성 결과를 나타내었지만, 본 실험의 선발 균주는 *Lactobacillus fermentum* AD1균주에서 없는 매우 우수한 면역활성 능력을 나타내었다는 특징을 갖고 있었다. 그러나 본 실험에서는 최종 선발 균주를 사용한 동물 임상 효능 실험을 아직 시행하지 않았기 때문에 추후 개를 대상으로 한 효능 실험이 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

앞으로 최종 선발 균주를 대상으로 실제 동물실험을 진행하고, 임상 효능 검증 연구가 뒷받침된다면, 다른 산업동물에 비해 많은 연구가 진행되지 않은 개 생균제용 유산균주 개발에 활용 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

## References

- Ahn SB, Park HE, Lee SM, Kim SY, Shon MY, Lee WK. Characteristics and immuno-modulatory effects of *Weissella cibaria* JW15 isolated from Kimchi, Korea traditional fermented food, for probiotic use. *J Biomed Res* 2013, **14**, 206-211.
- Beasley SS, Manninen TJK, Saris PEJ. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. *J Appl Microbiol* 2006, **101**, 131-138.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994, **35**, 483-489.
- Brandão RL, Castro IM, Bambirra EA, Amaral SC, Fietto LG, Tropicia MJM, Neves MJ, Dos Santos RG, Gomes NCM, Nicoli JR. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**, 564-8.
- Byun JW, Kim GT, Bae HS, Baek YJ, Lee WK. *In vitro* selection of lactic acid bacteria for probiotic use in pigs. *Korean J Vet Res* 2000, **40**, 701-706.
- Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioassays* 1996, **18**, 371-378.
- Capuron L, Hauser P, Hinze-Selch D, Miller AH, Neveu PJ. Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav Immun* 2002, **16**, 575-580.
- Choi HJ, Kim JY, Shin MS, Lee SM, Lee WK. Immuno-modulatory effects of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* JWS 939 in Mice. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2011, **31**, 719-729.
- Collington GK, Parker DS, Armstrong DG. The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *Br J Nutr* 1990, **64**, 59-70.
- Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumour necrosis factor  $\alpha$  receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol* 2001, **31**, 763-769.
- Dinarelli CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996, **87**, 2095-2147.
- Fleming HP, Etchells JL, Costilow RN. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl Microbiol* 1975, **30**, 1040-1042.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989, **66**, 365-378.
- Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol* 2011, **76**, 301-310.
- Introna M, Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Dejana E, Mantovani A. IL-1 inducible genes in human umbilical vein endothelial cells. *Eur Heart J* 1993, **14** (Suppl K), 78-81.
- Jordan KN, Cogan TM. Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol* 1999, **29**, 136-140.
- Kimoto H, Kurisaki J, Tsuji NM, Ohmomo S, Okamoto T. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett Appl Microbiol* 1999, **29**, 313-316.
- Lim HJ, Kim SY, Lee WK. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci* 2004, **5**, 391-395.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993, **268**, 12231-12234.
- Mitsuoka T. A Color Atlas of Anaerobic Bacteria. 1st ed. pp. 45-54, Sobunsha, Tokyo, 1980.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992, **6**, 3051-3064.
- Pato U. Bile and acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from dadih and their antimutagenicity against mutagenic heated tauco. *Asian-Australas J Anim Sci* 2003, **16**, 1680-1685.
- Perdigón G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988, **63**, 17-23.
- Perelmuter KM, Fraga M, Zunino P. *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *J Appl Microbiol* 2008, **104**, 1718-1725.
- Ryu JS, Han SK, Shin MS, Lee WK. *In vitro* selection of lactic acid bacteria for probiotic use in pig. *Korean J Vet Serv* 2009, **32**, 33-41.
- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV, Wong SYW, Chan HK. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int Food Res J* 2011, **18**, 1515-1522.
- Shin MS, Han SK, Ji AR, Ham MR, Kim KS, Lee WK. Isolation and characteristics of bacteriocin-producing bacteria from the intestine of duck for probiotics. *J Anim Sci Technol* 2007, **49**, 621-632.
- Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol* 2005, **99**, 493-501.
- Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci*

- Am 1992, **266**, 68-77.
30. **Strompfová V, Marciňáková M, Simonová M, Bogovič-Matijašić B, Lauková A.** Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe* 2006, **12**, 75-79.
  31. **Strompfová V, Lauková A, Ouwehand AC.** Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Vet Microbiol* 2004, **100**, 107-114.
  32. **Tadesse G, Ephraim E, Ashenafi M.** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some food borne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Internet J Food Saf* 2005, **5**, 13-20.
  33. **Vandenbergh PA.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev* 1993, **12**, 221-237.
  34. **Wold AE.** Immune effects of probiotics. *Scand J Nutr* 2001, **45**, 76-85.
  35. **Zinedine A, Faid M.** Isolation and characterization of strains of *Bifidobacteria* with probiotic proprieties *in vitro*. *World J Dairy Food Sci* 2007, **2**, 28-34.