

## Probiotic Properties and Immunomodulator Evaluation of the Potential Feed Additive *Pediococcus acidilactici* SRCM102607

Su-Jin Shin<sup>1†</sup>, Gwangsu Ha<sup>1†</sup>, Su-Ji Jeong<sup>1</sup>, Myeong Seon Ryu<sup>1</sup>, Jinwon Kim<sup>1</sup>, Hee-Jong Yang<sup>1</sup>, Mi-Sun Kwak<sup>2</sup>, Moon-Hee Sung<sup>2</sup> and Do-Youn Jeong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

<sup>2</sup>Department of Bio and Fermentation Convergence Technology, Kookmin University, Seoul 02707, Korea

Received August 20, 2020 / Revised August 28, 2020 / Accepted August 28, 2020

The purpose of this study was to investigate the probiotic characteristics and immune activities of selected lactic acid bacterial (LAB) strains as feed additives in livestock. 301 LAB strains isolated from traditional fermented foods were first assessed for their antibacterial activity potential. Of the 301 isolates, five showed antibacterial activity against five livestock pathogens (*Escherichia coli* KCCM11234, *Listeria monocytogenes* KCTC3710, *Salmonella* Typhimurium KCTC1926, *Staphylococcus aureus* KCCM11593, and *Shigella flexneri* KCTC2517). The probiotic characteristics of the five selected strains were also investigated by antioxidative activity, hemolysis, bile salt hydrolase, acid resistance and bile tolerance. The SRCM102607 strain was found to have superior probiotic properties and was selected for further experimentation. 16S rRNA gene sequencing showed that SRCM102607 is *Pediococcus acidilactici*, which was labeled as *P. acidilactici* SRCM102607 (KCCM 12246P). The survival characteristics of *P. acidilactici* SRCM102607 in artificial gastrointestinal conditions were assessed under exposed acidic (pH 2.0) and bile (0.5% and 1.0%) conditions. *P. acidilactici* SRCM102607 was also confirmed to have resistance to various antibiotics, including amikacin, gentamicin, vancomycin, and etc. The TNF- $\alpha$  production by *P. acidilactici* SRCM102607 was  $171.86 \pm 4.00$  ng/ml. These results show that *P. acidilactici* RCM102607 has excellent potential for use as a probiotic livestock feed additive.

**Key words** : Antibacterial activity, immune activity, *Pediococcus acidilactici*, probiotics, TNF- $\alpha$

### 서 론

국민 생활수준의 향상 및 서구화된 식생활 변화로 한국인의 육류 소비가 급증하고 있는 가운데 경제협력개발기구(OECD, Organization for Economic Cooperation and Development)의 조사에 의하면 2019년 대한민국 국민 1인당 육류소비량(소고기, 돼지고기, 닭고기)이 2018년 대비 11.5% 증가하였다고 보고되었다[21]. 육류의 소비량이 급증하면서 국내에 유통되고 있는 축산물의 수입량도 크게 증가하였고, 이에 따라 발암 물질이 검출된 중국산 닭꼬치 및 유럽에서 수입된 살충제 계란[12] 등의 수입 축산물의 식품안전사고 또한 꾸준히 발생하고 있다. 하지만 최근 식품에 대한 소비자들의 의식수준이 높아져 식품의 단가보다는 건강하고 안전한 식품을 소비하는 패턴으로 변하고 있어, 축산물의 안전성 및 국민 건강 증진을

위한 체계적인 관리가 요구되고 있다.

축산물의 안전을 저해하는 요인은 크게 잔류 농약, 중금속, 식품첨가물 및 동물용 의약품 등의 화학적 요소와 식중독을 유발하는 병원성 미생물 및 항생제 내성균 등의 생물학적 요인으로 구분할 수 있다[16]. 동물용 의약품인 항생제의 주된 목적은 가축사육 기간 동안 질병 예방 및 치료제로 사용하는 것이지만, 가축의 급속한 성장 촉진, 증체량 증가 및 육질개선을 위해 휴약 기간을 지키지 않고 무분별하게 남용되어 왔다. 이는 가축 체내에 축적되어 최종 가축을 소비하는 소비자의 생식기능 저하, 기형 및 독성을 유발하거나 호르몬계 이상 등의 유해작용을 나타낼 뿐 아니라[23] 항생제 내성을 유발하여 슈퍼박테리아의 생성을 일으킬 가능성을 높게 된다. 실제로 오늘날까지 사람과 동물들에게 사용된 광범위한 항생제로 인해 다양한 내성을 지닌 슈퍼박테리아가 나타났고, 대표적으로 MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), VRSA (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin resistant enterococci) 등이 다제내성 미생물로 알려져 있으며, 신종 항생제 내성 미생물의 종류도 해마다 늘어나고 있는 추세이다[24]. 이러한 이유로 미국, 유럽연합(EU), 중국, 일본 등 여러 국가와 국제식품규격위원회(Codex)에서는 축산물의 항생제의 잔류 허용기준을 설정하여 규제하고 있으며, 우리나라도 과거 성장 촉진의 목적으로 축산사료에 첨가해오던

<sup>†</sup> Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : [jdy2534@korea.kr](mailto:jdy2534@korea.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

항생제의 함량을 2005년부터 단계적으로 감량하여 2011년 7월 이후 항생제 사용을 전면 금지하였다[7]. 또한, 동물용 의약품에 대한 항생제 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있으며, 가축의 생산성 증대를 목적으로 항생제 내성균을 극복하기 위한 새로운 미생물 소재의 개발이 요구되고 있다.

항생제 대체 물질 중 하나인 생균제(DFM, Direct-Fed Microbial)는 살아있는 유용 미생물로 가축에 급여 시 유익한 균총의 유지로 장내 환경 개선 및 면역력 증진에 효과를 나타내며, 사료의 효율을 높이고 대사 장애 예방에 효과가 있다고 알려져 있다. 기본적으로 생균제는 내산성, 내담즙성 및 내열성을 가져야 하며, 소장에 쉽게 정착할 수 있고, 보존성이 뛰어나며 가축에 대해 무해 및 무독성을 지녀야 한다[22]. 대표적인 생균제용 미생물로는 *Bacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Clostridium* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* 등이 있으며, 이외에도 다양한 특성의 미생물이 가축의 장관 및 발효식품으로부터 분리되어 가축 질병 예방 및 생산성 향상을 위한 생균제용 균주로 개발되고 있다[17]. 특히 *Pediococcus acidilactici*는 Gram positive 유산균의 일종으로 대식세포에서의 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 생성을 증가시켜 면역력을 증진시키는 것으로 조사되었고[34], 동물이 섭취 시 육계는 증체량 개선 및 면역력 강화[32], 돼지의 경우 사료효율성 증진과 세포매개 및 체액성 면역효과[9] 등의 효과가 있다고 알려져 면역 관련 축산용 생균제로의 가치를 높게 평가받고 있다.

따라서 본 연구에서는 항생제 사용이 금지되면서 가축의 고밀도 사육 및 가스발생과 같은 열악한 환경으로 인해 가축의 질병 발병률이 높아지고, 가축질병의 원인체에 대한 예방용 백신이 존재하지만 백신의 효과만으로는 한계가 있어 농가의 피해가 큰 시점에 가축에게 보편적으로 적용할 수 있는 생균제로 다양하게 사용되는 프로바이오틱스 활성 균주를 선별하고, 이의 면역증강 효과를 확인하여 가축 면역증강용 생균제로서의 활용 및 산업화 가능한 대체미생물 소재 발굴을 목표로 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

본 연구에 사용된 시료는 전라북도에서 제조 및 판매되고 있는 발효식품 총 110종(김치 20종, 고추장 20종, 된장 15종, 청국장 15종, 장아찌류 10종, 막걸리 30종)을 수집하여 분리원으로 사용하였다. 각 시료 1 g을 9 ml의 0.85% NaCl에 현탁 후 단계 희석하였다. 각각의 현탁액은 *Lactobacilli* MRS (Difco, USA) 평판배지에 100  $\mu$ l 도말하여 37°C에서 48시간 배양하고, 배지 상에 형성된 집락의 형태학적 특징에 따라 순수 분리하였다. 분리주는 20% glycerol (Merck, Germany)와 5% skim

milk (Difco, USA)를 혼합 후 -80°C 초저온냉동고에 보관하여 본 연구에 사용하였다.

### 가축 유해미생물에 대한 항균활성 측정

선별 균주의 가축병원성 균주에 대한 항균활성을 확인하기 위한 *Esherichia coli* KCCM11234, *Listeria monocytogens* KCTC 3710, *Salmonella* Typhimurium KCTC1926, *Shigella flexneri* KCTC2517 및 *Staphylococcus aureus* KCCM11593 균주 5종은 한국미생물자원센터(KCTC, Korean Culture Type Collection, Korea)와 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center for Microorganisms, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 각 지시 균주를 37°C에서 24시간 배양 후 흡광도를 측정하여 배양액을 일정한 농도(OD<sub>660</sub>, 0.4)로 조정하고 well diffusion 법[19]에 따라 0.8% soft agar plate를 제조하여 항균활성을 측정하였다. 각 분리 균주는 MRS (Difco, USA) 액체배지에서 48시간 진탕 배양 후 상등액을 0.45  $\mu$ m syringe filter (Sartorius, Germany)로 여과하여 6 mm well에 각각 100  $\mu$ l씩 분주하였다. 분주 후 37°C에서 24시간 배양하여 well 주변에 형성된 억제환의 직경을 측정하여 항균활성을 확인하였다.

### 항산화 활성 측정

선별 균주에 대한 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 측정하기 위해 Blois의 방법[3]을 응용하여 측정하였다. 각각의 선별 균주를 MRS (Difco, USA) 액체배지에서 48시간 진탕 배양 후 상등액을 시료로 사용하였으며, 상등액 20  $\mu$ l에 100 mM DPPH (Sigma-Aldrich, USA) 용액 180  $\mu$ l을 96 well plate에 혼합하여 빛이 차단된 상태로 실온에서 30분간 반응한 후, microplate reader (SPARK, TECAN, Austria)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 아래 식에 따라 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ of sample}}{\text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ of control}} \right] \times 100$$

### 용혈성

선별 균주의 용혈성 여부를 조사하기 위해 blood agar base (MB cell, Korea)에 5% sheep blood (MB cell, Korea)를 첨가하여 용혈배지를 제조하였다. 선별 균주를 용혈배지에 희석 접종 후, 37°C에서 48시간 배양하여 집락 주위로 형성되는 환의 형태를 통해 용혈성을 분석하였다. Argyri의 방법[2]에 의해 집락 주변에 녹색 환의 생성은  $\alpha$ -hemolysis, 황색 투명환은  $\beta$ -hemolysis 그리고 주변에 환이 생성되지 않을 경우  $\gamma$ -hemolysis로 판단하였다.

### 담즙산염 분해 효소 활성 조사

선별 균주의 담즙산염 분해효소(BSH, bile salt hydrolase) 활성은 Taranto 등의 방법[33]에 따라 수행하였다. 소디움인

taurodeoxycholic acid (TDCA), glycoldeoxy-cholic acid (GDCA)가 0.5%(w/v) 포함된 MRS (Difco, USA)에 평판배지 획선 접종하여 37°C에서 72시간 동안 혐기 상태로 배양하였다. 배양 후 담즙산염이 가수분해되어 담즙산의 침전으로 인한 콜로니 주변에 형성되는 불투명한 환의 생성 여부로 담즙산염 분해 효소의 활성을 판단하였다.

### 선별 균주의 동정 및 계통수

최종 선별 균주의 분자학적 동정 및 계통수 작성을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 서열 증폭을 위해 universal primer인 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3')와 907R (5'-CCGTCATTCMTTTRAGTTT-3') primer를 사용하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 서열의 유사도가 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 서열을 얻었다. 또한, 서열 간 상호 비교를 위해 Clustal W 2.0 program (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK)을 사용하였으며, Mega 7.0 프로그램을 사용하여 염기서열 간 계통도를 작성하였다. 계통도는 근린결합법(neighbor joining method)[25]을 이용하였으며, 1,000회 반복을 통한 bootstrapping을 진행하여 계통도의 신뢰성을 확보하였다.

### 내산성 및 내담즙성 분석

선별 균주의 내산성을 확인하기 위해 0.1N HCl (Sigma-aldrich, USA)을 이용하여 배지의 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 수준으로 조정된 MRS (Difco, USA) 액체배지에 선별 균주의 전배양액을 1%를 접종하여 37°C에서 30분 정치 후 생균수를 측정하였다. 인공 담즙산에 대한 내성 평가는 Oxgall (Neogen, USA)을 각 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1%의 농도로 첨가하여 제조한 MRS (Difco, USA) 액체배지에 선별 균주의 전 배양액 1%를 접종한 후 37°C에서 6시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

### 항생제 감수성

항생제 감수성 여부는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard)의 디스크 확산법으로 확인하였다. MRS 액체배지(Difco, USA)에 최종 선별 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 전 배양액 1%를 MRS (Difco, USA) 고체배지에 접종하였다. 제조한 배지를 균한 뒤 항생제 디스크(BBL Sensi-disc, Becton Dickinson Co, USA)를 배지 위에 올려놓고 37°C에서 24시간 배양하여 디스크 주변에 형성된 환 크기를 측정하였으며, CLSI 가이드라인에 따라 내성과 감수성을 판단하였다. 시험에 사용된 항생제 디스크(Liofilchem, Italy)는 amikacin (30 µg, AK), amoxi-cillin/clavulanic acid (2 µg/1 µg, AMC), ampicillin (10 µg, AMP), cephalixin (30 µg, CL), ciprofloxacin (5 µg, CIP), erythromycin (15 µg, E), gentamicin (30 µg, CN), imipenem (10 µg, IMI), kanamycin (30 µg, K), lincomycin (15 µg, MY), netilmicin (30 µg, NET),

neomycin (30 µg, N), nitrofurantoin (300 µg, F), norfloxacin (10 µg, NOR), ofloxacin (5 µg, OFX), penicillin G (1 IU, P), penicillin G (2 IU, P), penicillin G (10 IU, P), streptomycin (10 µg, S), tetracycline (30 µg, TE), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25 µg/23.75 µg, SXT), vancomycin (30 µg, VA) 등 22종의 항생제를 대상으로 측정하였다.

### API ZYM을 이용한 효소활성

효소활성 측정은 API ZYM kit (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 alkaline phosphatase 등 18가지 효소를 대상으로 측정하였다. 최종 선별 균주를 MRS (Difco, USA) 액체배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 균체를 회수하고 멸균수로 3회 세척하여 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 시료를 5 ml suspension medium (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)에 현탁 후 5-6 Mcfarland (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) 탁도로 조정하였다. 현탁액을 ZYM 스트랩의 각각 큐플에 65 µl씩 분주하여 37°C에서 4시간 배양하였으며, 활성 증가와 기질의 용해를 위해 ZYM A와 B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨려 5분간 반응시켜 색깔의 변화를 관찰하여 효소 활성을 조사하였다.

### 세포배양

최종 선별 균주의 면역증강 효과의 확인은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)으로 부터 mouse macrophage RAW264.7 (TIB-71)을 구입하여 사용하였다. RAW264.7 세포는 10% fetal bovin serum (FBS, Gibco, Germany)과 1% 항세균 및 항진균 물질(Anti-Anti 100X, Gibco, Germany)이 포함된 DMEM (HyClone, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 계대배양은 세포가 plate에 85% 정도 밀집되었을 때 진행하였고, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 현탁하여 사용하였다.

### TNF-α 분비능 측정

최종 선별 균주의 면역증강 효과를 확인하기 위해 cytokine 중 하나인 TNF-α의 분비능을 측정하였다. 선별 균주의 배양 상등액은 1% FBS (Gibco, Germany)와 1% antibiotics가 함유된 DMEM (HyClone, USA) 배지를 사용하여 최종농도가 4%가 되도록 희석한 후 세포에 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하였으며, 상등액으로 분비된 TNF-α의 양을 OptEIA™ ELISA kit (BD Biosciences, USA)을 이용하여 SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, USA) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 recombinant mouse TNF를 사용하였으며 농도는 15.6 pg/ml에서 1,000 pg/ml까지 assay diluent (PBS with 10% FBS)로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. TNF-α 분비능의 양성대조군 물질로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용

하여 측정하였다.

**통계 분석**

실험결과를 3회 이상 반복하여 결과를 도출하였으며, 통계 분석은 SPSS for Window (ver. 12.0, SPSS Inc., USA)을 사용하였다. 일원배치 분산분석(ANOVA)으로 평균과 표준편차를 분석하였고, 사후검정을 위해 Duncan’s multiple range test ( $p<0.05$ )를 실시하였다[11].

**결과 및 고찰**

**유산균의 분리**

가축 생균제에 적용 가능한 유산균을 분리하기 위해 전라북도 소재 전통 발효식품 총 110여 종을 수집하였다. 확보된 시료는 단계 희석을 통해 콜로니의 형태에 따라 301종의 분리주를 1차 확보하였으며, 분리주는 -80℃에 동결 보관 후 프로바이오틱스 및 면역활성 특성 분석을 위해 사용하였다.

**가축 유해미생물에 대한 항균활성**

전통 발효식품으로부터 분리한 유산균 301종을 대상으로 가축 유해 병원성 미생물로 알려진 5종에 대한 항균활성을 well diffusion 방법을 통해 확인하였다. *L. monocytogenes*은 가축의 패혈증, 유산, 뇌염 등의 급성전염병을 유발하고[31], *S. Typhimurium*은 가금 파라티푸스, 가축의 만성장염 및 소화기 전염병 등을 일으키며[4], *S. aureus*는 젖소 유방암 원인균으로 알려져 있다. 또한, 돼지에게 설사를 일으켜 폐사 등의 문제를 일으키는 *E. coli*와 세균성 이질 원인균으로 알려진 *S. flexneri*까지 총 5종의 가축 유해 미생물에 대한 항균활성을 추가로 조사하였다. 분리주 대부분은 유해 미생물에 대해 활성을

보유하고 있었으며 SRCM102283, SRCM102607, SRCM103292, SRCM103307, SRCM103456 5종이 가축 유해 미생물에 대해 높은 항균활성을 나타내어(Table 1), 가축 유해 병원균에 대한 억제 효과가 우수함을 확인하였다.

**항산화 활성**

항산화 활성은 일반적으로 가축의 질병에 대한 저항력 증가와 축산물의 품질 향상 등 생산성 증가에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[6]. 특히 이유 자돈이 이유단계에서 갑작스러운 사료 및 환경변화에 따라 받게 되는 스트레스를 유산균 급여 시 항산화 효소의 발생 촉진을 통해 항산화 방어 기전을 가지고 있는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxide와 같은 생화학 효소들이 생성되고 이로 인해 산화 스트레스를 개선시킬 수 있다고 보고되고 있다[10]. 따라서, 선별한 5종의 균주를 대상으로 항산화 활성을 측정된 결과(Table 1) *P. acidilactici* SRCM102607이 39.81±0.23%로 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었으며, 강 등[14]에 의해 보고된 *P. acidilactici* KL-6 균주의 최대활성인 17%보다도 우수하여 가축의 산화 스트레스 개선 생균제로서의 활용 가능성을 확인하였다.

**용혈성**

용혈성은 병원성 세균이나 질환으로 인해 적혈구가 파괴되고, 이로 인해 적혈구 내부 물질이 주변 혈장 등의 안으로 용해되는 현상을 말하며, 용혈을 일으키는 세균의 성질에 따라 α, β 및 γ-hemolysis로 나눌 수 있다. 특히 α-hemolysis와 β-hemolysis는 *S. viridans* 등과 같은 병원성 미생물에 의한 용혈 현상으로 알려지고 있어 사료의 안전성 확인을 위해서는 검토해야 할 요소 중의 하나이다[2]. 5종의 선별 균주들의 용혈성을 측정된 결과는 Table 1과 같으며, 선별 균주 5종 중 SRCM

Table 1. Comparison of safety and functional characteristics for selected strains isolated from traditional fermented food

Strain No.		SRCM 102607	SRCM 103292	SRCM 103307	SRCM 103456	SRCM 102283
Anti-microbial activity (mm)	<i>L. monocytogenes</i> KCTC3710	12	12	11	12	14
	<i>S. Typhimurium</i> KCTC1926	14	11	11	11	12
	<i>S. aureus</i> KCCM11593	12	14	10	10	10
	<i>E. coli</i> KCCM11234	16	13	14	13	10
	<i>S. flexneri</i> KCTC2517	12	11	13	12	11
Hemolytic activity		γ-hemolysis	α-hemolysis	α-hemolysis	α-hemolysis	α-hemolysis
DPPH radical scavenging activity (%)		39.81±0.23 <sup>a</sup>	25.54±0.15 <sup>b</sup>	14.11±0.35 <sup>a</sup>	36.16±0.36 <sup>d</sup>	33.59±0.17 <sup>c</sup>
BSH activity <sup>1)</sup>	TDCA	- <sup>2)</sup>	-	-	-	-
	GDCA	+ <sup>3)</sup>	+	-	-	-

The results are expressed as the mean ± S.D (n=3).

Means of differed letters <sup>(a-e)</sup> with the value in the DPPH radical scavenging is significantly different at  $p<0.05$  by Duncan’s multiple range test.

<sup>1)</sup>TDCA, Taurodeoxycholic acid; GDCA, Glycodeoxycholic acid.

<sup>2)</sup> -, Negative effect.

<sup>3)</sup>+, Positive effect.

102607을 제외한 4균주는 α-hemolysis로 나타났으나, SRCM 102607는 γ-hemolysis로 나타나 미생물체제로 사용하기에는 적합함을 확인하였다.

**Bile salt hydrolase 활성 측정**

간에서 생성된 자유 담즙산(free bile acid)은 소장에서 타우린 또는 글라이신과 결합하여 포함담즙산이 되며, 포함담즙산은 지질 용해도가 높아 소장에서 콜레스테롤 등의 지질 흡수를 용이하게 하는 역할을 한다. 따라서 포화 담즙산이 많을 경우 혈중으로 흡수되는 콜레스테롤 양이 증가하게 되고 혈중 콜레스테롤이 증가하게 된다. 하지만 장내 유산균 중 담즙산 분해효소(BSH)를 갖는 경우 소장에서의 콜레스테롤 흡수를 저하시키며, 탈포화된 담즙산의 경우 지질 용해도가 낮아 지질의 혈중 이행을 저하시킨다고 보고되고 있다[18]. 따라서, 선별 균주를 대상으로 측정한 결과 SRCM102607과 SRCM 103292가 담즙산과 결합한 형태인 글리코콜산에 대한 분해활성을 갖는 것으로 확인되었으며, 앞선 실험결과를 토대로 항균활성, 항산화 활성, 용혈성 및 bile salt hydrolase 활성이 가장 우수한 SRCM102607을 최종 균주로 선정하였다.

**SRCM102607의 16S rRNA 염기서열 분석**

최종 선별한 SRCM102607의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열(1,515 bp)을 기반으로 NCBI nucleotide BLAST search를 수행하였으며, GenBank에 등록된 표준균주와 염기서열을 비교하였다. 계통분석을 위한 evolutionary distance 추론을 위해 근린결합법(neighbor-joining method)을 사용하였으며, bootstrap 분석을 1,000회 반복수행하여 계통수의 신뢰

도를 확보하였다. 그 결과 SRCM102607 균주는 *P. acidilactici* DSM 20284 균주와 99.62%의 상동성을 보여(Fig. 1) *P. acidilactici* SRCM102607로 명명하였으며, 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 *P. acidilactici* KCCM 12246P로 기탁하였다.

**내산성 및 내담즙성**

유산균이 생균제로서의 역할을 위해서는 위액 수준인 pH 2.0의 조건과 장관 내 쓸개에서 분비되는 담즙에서도 생존해야 한다. SRCM102607의 내산성 조사 결과 초기 접종균수와 비교하였을 때 pH 3.0까지는 생존률에 대한 산의 영향이 크지 않았으며, 특히 pH 2.0에서도  $1.54 \times 10^5$  CFU/ml의 생균수를 나타내었다(Fig. 2). 일반적으로 생균이 장내로 들어간 후 사멸의 원인은 낮은 pH로 알려져 있다. Mishra의 보고[20]에 의하면 생균제로 사용되는 균주는 pH 2.0에서  $10^4$  CFU/ml 이하의 생균수를 나타낸다고 보고하였으나, 선별 균주는 위 기준치 이상으로 산에 대한 우수한 내성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한 Kang의 연구결과[13]에 따르면, 유산균은 1% ox-gall농도에서 평균  $10^8$  CFU/ml의 높은 생균수를 나타냈다고 보고하였는데, 선별 균주의 내담즙성은 장내 담즙 농도(0.3%)보다 높은 0.5%와 1%가 포함된 배지에서 모두  $10^8$  CFU/ml의 생균수를 나타내었다(Fig. 2). 따라서 내산성 특징을 가지는 균주는 강한 담즙에도 내성을 나타내는 특성을 지닌다는 보고[29]와도 일치한 결과를 얻었다.

**항생제 감수성**

최근 항생제는 동물의 치료, 질병 예방 및 성장 촉진 등의

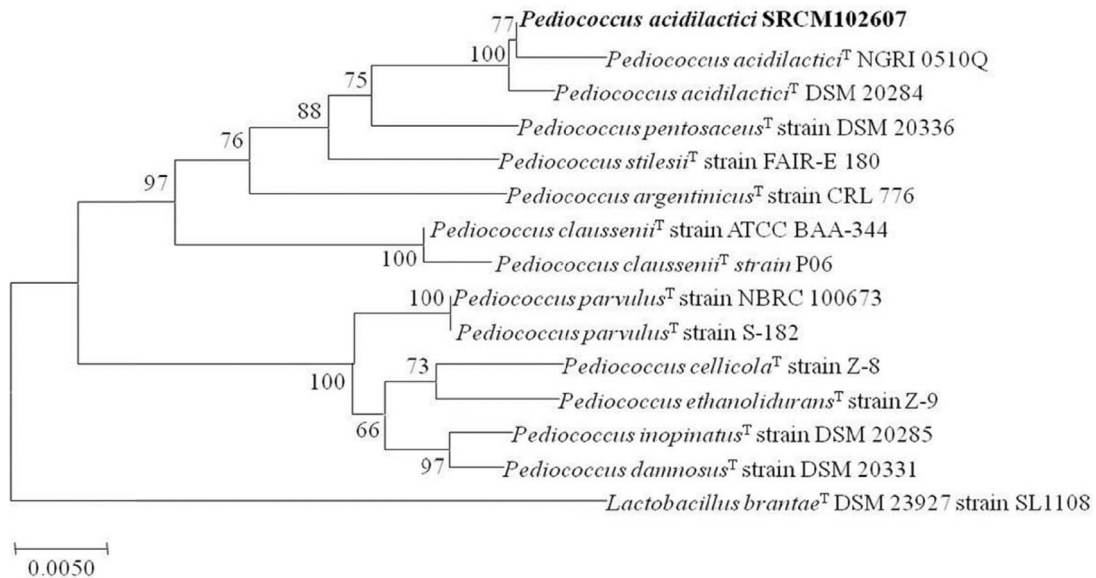


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the genetic relationship of the *P. acidilactici* SRCM102607 of typical *Pediococcus* strains based on the 16S rRNA gene sequences. The tree was constructed using neighbor-joining method with the bootstrap values at 1,000 replicates.

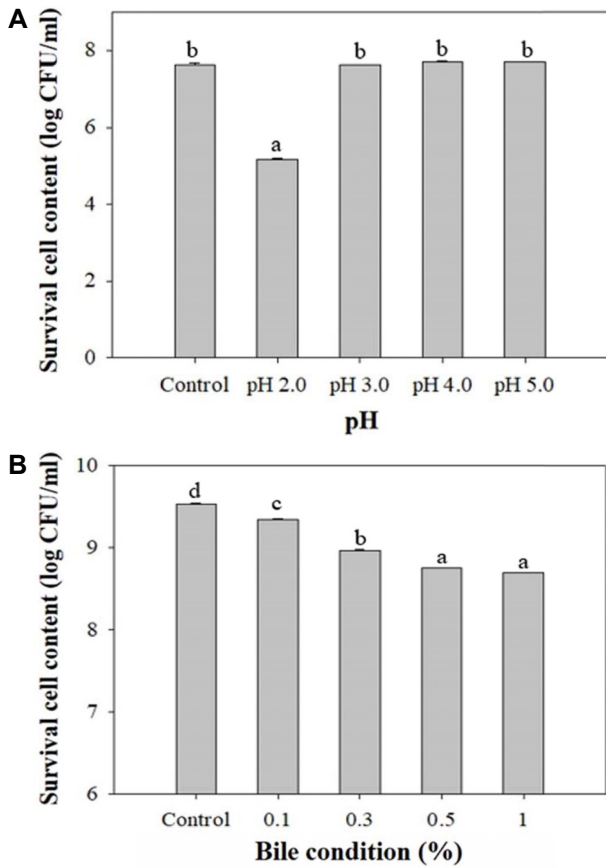


Fig. 2. pH resistance of *P. acidilactici* at various pH from 5.0 to 2.0 (A) and bile tolerance of *P. acidilactici* SRCM102607 at various bile salt from 0.1 to 1% (B). Control is MRS Broth. The results are expressed as mean  $\pm$  S.D of tree independent experiments triplicate in each run ( $p < 0.05$ ).

목적으로 다량 사용되고 있어 일정 농도의 다양한 항생제에 견딜 수 있는 유산균이 생균제로 사용가치가 높다[30]. 가축에게 주로 사용되는 항생제는 테트라사이클린계(tetracyclin), 페니실린계(ampicillin) 및 설파계(trimethoprim/sulfamethoxazole) 등이 있으며, 유산균 중 *Pediococcus* 속은 vancomycin과 gentamicin에 대한 내성을 가지는 고유한 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[35]. SRCM102607을 대상으로 22종의 항생제에 대한 항생제 감수성을 조사한 결과 페니실린 계열인 ampicillin, penicillin G 등 9종의 항생물질에 대하여 생육이 저해되었으나, aminoglycosides 계열인 gentamicin, streptomycin, neomycin, amikacin, 및 kanamycin과 다이하드로 엽산염 환원효소(DHFR, dihydrofolate reductase)를 억제하는 trimethoprim/sulfamethoxazole 그리고 펩타이드 전이를 저해하여 세균의 용균 현상을 유발하는 amoxicillin+clavulanic acid 등 13종에 대한 항생제에 대해서는 내성을 지니고 있음을 확인하였다(Table 2). de Oliveira Vieira 등의 연구[8]에 의하면 프로바이오틱스 특성을 가지는 *P. acidilactici* CE51균주는 tetracyclin과 erythromycin에 대하여 감수성을 나타내었고,

Table 2. Distribution of antibiotic susceptibility and resistance of *P. acidilactici* SRCM102607

Enzyme	Code/Disc potency	Result <sup>1)</sup>
Amikacin	AK/30 $\mu$ g	R
Amoxicillin/ clavulanic acid	AUG/2 $\mu$ g, 1 $\mu$ g	R
Ampicillin	AMP/10 $\mu$ g	S
Cephalexin	CL/30 $\mu$ g	R
Ciprofloxacin	CIP/5 $\mu$ g	R
Erythromycin	E/15 $\mu$ g	S
Gentamicin	CN/30 $\mu$ g	R
Imipenem	IMI/10 $\mu$ g	SS
Kanamycin	K/30 $\mu$ g	R
Lincomycin	MY/15 $\mu$ g	S
Netilmicin	NET/30 $\mu$ g	R
Neomycin	N/30 $\mu$ g	R
Nitrofloxacine	F/300 $\mu$ g	S
Norfloxacin	NOR/10 $\mu$ g	R
Ofloxacin	OFX/5 $\mu$ g	R
Penicillin G	P/1 IU	S
Penicillin G	P/10 IU	S
Penicillin G	P/2 IU	S
Tetracycline	TE/30 $\mu$ g	S
Streptomycin	S/10 $\mu$ g	R
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	SXT/1.25 $\mu$ g, 23.75 $\mu$ g	R
Vancomycin	VA/30 $\mu$ g	R

<sup>1)</sup>S, 1.2~1.5 cm; SS, 1.6~2.0 cm; R, resistance.

gentamicin과 streptomycin 및 ciprofloxacin에 대하여 내성을 가지고 있다는 보고와 유사한 결과를 확인하였으며, 항생제에 노출된 가축의 생균제로서도 충분히 적용 가능 할 것으로 판단된다.

### API ZYM을 이용한 효소활성

유해효소의 억제와 유용효소에 대한 생성은 미생물마다 상이한 특성을 갖기 때문에 SRCM102607의 효소 활성 여부를 확인하기 위해 API ZYM kit를 이용하여 조사하였다. SRCM102607은 신장에서 가수분해를 돕는 leucine arylamidase, valine arylamidase, cysteine arylamidase와 같은 protease 효소에 대하여 활성을 나타내었다. Seifert와 Gessler[26]는 이러한 가수분해를 돕는 유산균을 섭취하면 가축의 소화를 도울 수 있다고 보고하였다. 또한  $\alpha$ ,  $\beta$ -galactosidase와  $\beta$ -glucosidase에 대해서 활성을 나타내었는데, 일반적으로  $\alpha$ -galactosidase는 곡류에 존재하는 raffinose나 stachyose등을 분해시키는 것으로 알려져 있다[27]. 또한 유당불내증을 완화시킬 수 있는  $\beta$ -galactosidase 활성도 보유하고 있었으며, 발암에 관련된  $\beta$ -glucuronidase는 나타나지 않아 안전성 또한 우수함을 확인하였다. 하지만 Abbasiliasi 등[1]이 보고한 *P. acidilactici* 균주는 다르게 valine arylamidase, cysteine arylamidase 및 N-ace-



Table 3. Enzyme activities of *P. acidilactici* SRCM102607 by API ZYM

Enzymes	Result <sup>1)</sup>
Control	-
Alkaline phosphatase	-
Esterase (C4)	-
Esterase lipase (C8)	-
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	+
Valine arylamidase	+
Cystine arylamidase	+
Trypsin	-
α-chymotrypsin	-
Acid phosphatase	+
Naphol-AS-BI-phosphohydrolase	-
α-galactosidase	+
β-galactosidase	+
β-glucuronidase	-
α-glucosidase	-
β-glucosidase	+
N-acetyl-β-glucosaminidase	+
α-mannosidase	-
α-fucosidase	-

<sup>1)</sup> -, Negative effect; +, Positive effect.

tyl-β-glucosaminidase에 대한 활성을 가지고 있는 것을 기반으로 효소 생산 능력의 일부분은 균주마다 상이한 것 또한 확인할 수 있었다(Table 3).

**면역활성**

숙주의 면역반응을 조절하는 대표적인 인자로는 TNF-α, interleukin-1β (IL-1β), interferon-α/β, interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18)이 있으며, 이러

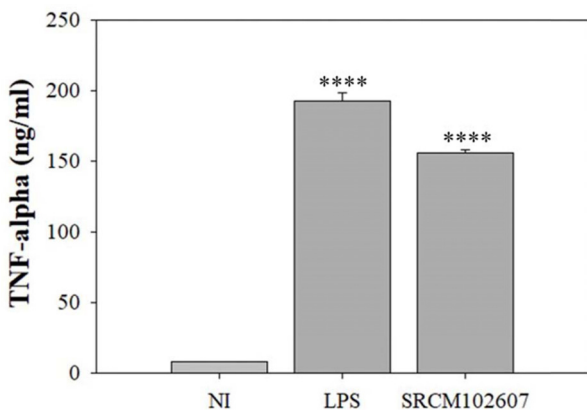


Fig. 3. Comparison of TNF-α production in different condition such as NI (non-infection), LPS (lipopolysaccharide) and SRCM102607 (*Pediococcus acidilactici*). The results are expressed as mean ± S.D of tree independent experiments. \*\*\*\*, indicate significance at  $p < 0.0001$  by Duncan test.

한 cytokine이 생성되면서 외부 병원성 요인에 대한 방어기작으로 작용한다. 특히 TNF-α는 세포 내에서 염증 발생을 조절함으로써 숙주의 면역체계에서 감염에 대한 저항성을 갖는다 [5]. SRCM102607의 면역활성 결과는 Fig. 3과 같이 171.86±4.00 ng/ml의 TNF-α 생성량을 나타내었고, 양성 대조구인 LPS (lipopolysaccharide)는 192.93±5.64 ng/ml, 오직 배지만 사용한 음성 대조구는 8.00±0.23 ng/ml의 생성량을 보였다. Shin 등[28]의 연구결과에 따르면, *P. pentosaceus* KFT18으로부터 분리한 다당류의 TNF-α 생성량은 13.0 ng/ml으로 SRCM102607의 TNF-α 생성량이 높았다. 하지만 KFT18은 일정한 fraction만을 가지고 측정된 결과였으나 SRCM102607은 균주상등액만으로 측정하였기 때문에 향후 해당물질의 분리 정제를 진행하여 측정한다면 결과 수치는 더 높게 나타날 것으로 추측된다. 또한, 본 실험과 동일하게 미생물 배양 상등액으로 측정된 Kim 등의 연구[15]에서는 여러 *Lactobacillus* 속의 TNF-α 생성량은 KCTC 3149가 29.3 ng/ml, KCTC3156이 32.6 ng/ml로 나타났는데 이러한 선행연구와 비교하여도 SRCM102607은 현저히 높은 TNF-α 생성량을 나타내는 균주임을 확인하였다.

따라서, SRCM102607의 뛰어난 TNF-α 생성량을 기초 자료로, 다른면역 조절 인자에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되며, 나아가 직접 동물에게 적용하였을 때 나타나는 효과에 대한 연구를 추가로 진행한다면 면역 증진용 생균제로써도 축산업에 적용 충분한 활용 가능성이 있음을 확인하였다.

**감사의 글**

본 연구는 2020년 농림축산식품부 농축산식품 마이크로바이옴 통합 바이오뱅크 구축사업의 지원에 의해 수행된 것입니다.

**The Conflict of Interest Statement**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**References**

1. Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Bashokouh, F., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Vakhshiteh, F., Sivasambo, S. and Ariff, A. B. 2017. *In vitro* assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC Microbiol.* **17**, 121.
2. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z. and Tassou, C. C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* **33**, 282-291.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.

4. Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Reid, W. M. and Yoder, Jr. H. W. 1991. Salmonellosis-paratyphoid infections. In: Diseases of Poultry. pp. 99-130. 9th ed., Iowa State University Press Ames, IA, USA.
5. Capuron, L., Hauser, P., Hinze-Selch, D., Miller, A. H. and Neveu, P. J. 2002. Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav. Immun.* **16**, 575-580.
6. Chang, W. K., Cho, S. B., Kim, D. W., Lee, S. S. and Kim, S. K. 2010. Cell growth and antioxidant activity on onion juice fermentation by using *Lactobacillus plantarum* as animal probiotics. *J. Life Sci.* **20**, 1729-1737.
7. Cho, Y. J., Choi, S. J., Kim, M. A., Kim, M., Yoon, S. J., Chang, M. I., Lee, S. M., Kim, H. J., Jeong, J., Rhee, G. S. and Lee, S. J. 2014. Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in meat using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Safety* **29**, 123-130.
8. de Oliveira Vieira, K. C., Ferreira, C. D. S., Bueno, E. B. T., De Moraes, Y. A., Toledo, A. C. C. G., Nakagaki, W. R., Pereira, V. C. and Winkelstroter, L. K. 2020. Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici* CE51. *Food Sci. Technol.* **130**, 1-7.
9. Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N. and Singh, P. 2018. Efficacy of species-specific probiotic *Pediococcus acidilactici* FT28 on blood biochemical profile, carcass traits and physicochemical properties of meat in fattening pigs. *Res. Vet. Sci.* **117**, 60-64.
10. Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Patel, B. H. M. and Singh, P. 2017. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. *Livest. Sci.* **195**, 74-79.
11. Duncan, D. B. 1995. Multiple range and multiple F-test. *Biometrics* **2**, 1-42.
12. Han, B. and Yang, S. B. 2019. The effects of food safety accident on the consumption of eggs: focusing on the pesticide-related accident. *Kor. J. Org. Agric.* **27**, 17-32.
13. Kang, C. H., Han, S. H., Kim, Y. G., Jeong, Y. A. and Paek, N. S. 2017. Antimicrobial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods. *KSBB J.* **32**, 199-205.
14. Kang, K. M. and Lee, S. H. 2012. Physiological characteristics of starter isolated from *Kimchi* and fermentation of Tofu with isolated starter. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1626-1631.
15. Kim, D. W., Cho, S. B., Jeong, H. Y., Moon, H. G., Lee, H. J., Hwang, B. J., Chung, W. T., Choi, C. W. and Chung, I. B. 2005. Activation of RAW 264.7 macrophage by digested bacterial cell of pig-derived *Lactobacillus* strains. *J. Anim. Sci. Technol.* **47**, 947-954.
16. Ko, A. Y., Kim, H. J., Do, J. A., Jang, J., Lee, E. H., Ju, Y. J., Kim, J. Y., Chang, M. I. and Rhee, G. S. 2016. Development of analytical method for determination of spinetoram residues in livestock using LC-MS/MS. *Anal. Sci. Technol.* **29**, 94-103.
17. Lee, E. Y. and Lim, J. S. 2011. Effects of the feed and probiotic feeding on the improvement of hoggery environment and the productivity of swine. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 200-209.
18. Lee, S. H., Kim, Y. H., Kim, M. G., Kang, J. H. and Kang, D. J. 2015. Cholesterol lowering effect of *Enterococcus faecium* ID9201 isolated from breast milk-fed Korean infant. *Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio.* **3**, 41-45.
19. Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. and Ontiveros, Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int. J. Infect. Dis.* **8**, 39-45.
20. Mishra, V. and Prasad, D. N. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 109-115.
21. OECD, <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm#indicator-chart>.
22. Oh, S. T., Kang, C. W. and Kim, E. J. 2014. Effects of dietary supplementation of mixed probiotics on production performance and intestinal environment in broiler chicken. *Kor. J. Poultry Sci.* **41**, 143-149.
23. Park, J. S. and Choi, H. 2020. Simultaneous determination for fungicide prochloraz and its metabolites in animal commodities with GC-ECD after hydrolysis. *J. Appl. Biol. Chem.* **63**, 153-159.
24. Park, S., Yoo, J., Seong, C. and Cho, S. 2013. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* MP56 with antimicrobial activity against MDR (multi drug resistant) strains. *Kor. J. Microbiol.* **49**, 90-94.
25. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
26. Seifert, H. S. and Gessler, F. 1996. Oral long-term administration of probiotic *B. cereus* an alternative for the prevention of enterotoxemia. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* **103**, 386-389.
27. Seo, J. W., Yang, H. J., Jeong, S. J., Ryu, M. S. and Jeong, D. Y. 2020. Potential probiotic activity of *Lactobacillus brevis* SCML 504 isolated from traditional Korean fermented food and the preparation of 'Sikhye' with brown rice. *Kor. J. Food Preserv.* **27**, 46-57.
28. Shin, J. S., Jung, J. Y., Lee, S. G., Shin, K. S., Rhee, Y. K., Lee, M. K., Hong, H. D. and Lee, K. T. 2016. Exopolysaccharide fraction from *Pediococcus pentosaceus* KFT 18 induces immunostimulatory activity in macrophages and immunosuppressed mice. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 1390-1402.
29. Shin, M. S., Kim, H. M., Kim, G. T., Huh, C. S., Bae, H. S. and Baek, Y. J. 1999. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 495-501.
30. Song, H. J., Kim, K. J., Kim, H. D., Yoo, J. H., Koo, J. G. and Park, K. S. 2011. Probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* SH-10 isolated from the Hard Clam *Meretrix meretrix* Shikhae. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **44**, 605-611.
31. Song, K. O., Yang, H. S., Jung, S. K., Kang, W. C., Ko, J. A., Lee, C. H. and Kim, J. H. 2014. Encephalitic listeriosis in two Korean native goats in Jeju. *KOJVS.* **37**, 73-78.
32. Taheri, H. R., Moravej, H., Malakzadegan, A., Tabandeh,



F., Zaghari, M., Shivazad, M. and Adibmoradi, M. 2010. Efficacy of *Pediococcus acidilactici*-based probiotic on intestinal Coliforms and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens. *Afr. J. Biotechnol.* **9**, 7564-7567.

33. Taranto, M. P., de Ruiz Holgado, A. P. and De Valdez, G. F. 1995. Bile salt hydrolase activity in *Enterococcus faecium* strains. *Microbiol. Aliment. Nutr.* **13**, 375-379.

34. Wang, C., Wang, H., Zhao, Z., Xiao, S., Zhao, Y., Duan, C., Gao, L., Li, S. and Wang, J. 2019. *Pediococcus acidilactici* AS185 attenuates early atherosclerosis development through inhibition of lipid regulation and inflammation in rats. *J. Funct. Foods* **60**, 103424.

35. Yuksekdag, Z. N. and Aslim, B. 2010. Assessment of potential probiotic-and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk). *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 161-168.

**초록 : 잠재적 사료첨가제로서 *Pediococcus acidilactici* SRCM102607의 생균제 특성 및 면역활성 효과**

신수진<sup>1\*</sup> · 하광수<sup>1\*</sup> · 정수지<sup>1</sup> · 류명선<sup>1</sup> · 김진원<sup>1</sup> · 양희종<sup>1</sup> · 광미선<sup>2</sup> · 성문희<sup>2</sup> · 정도연<sup>1\*</sup>  
 (<sup>1</sup>(제)발효미생물산업진흥원(MIFI), <sup>2</sup>국민대학교 바이오발효융합과)

본 연구에서는 가축의 면역증강용 생균제 개발을 위하여 *Pediococcus acidilactici* SRCM102607의 프로바이오틱스 특성 및 면역활성을 조사하였다. 전통발효식품으로부터 유산균을 분리 하였고, 분리 유산균을 대상으로 가축유해 미생물 5종에 대한 항균활성을 측정하였다. 우수한 결과를 나타내는 5종의 유산균을 1차 선별하였고, 이를 대상으로 생균제 소재 활용 가능성을 확인하기 위해 용혈성, 담즙산염 분해효소, 항산화 활성 분석을 실시하여 최종적으로 SRCM102607을 선별하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 *Pediococcus acidilactici* SRCM102607로 명명하였다. SRCM102607의 pH 2 조건에서 내산성은 1.54×10<sup>5</sup> CFU/ml의 생균수를 보였으며, 0.5% 이상의 oxgall 이 포함된 조건에서도 10<sup>5</sup> CFU/ml 이상의 높은 생균수를 나타내었다. 또한, 선발균주의 산업적으로 활용할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 항생제 내성 및 분해 효소능을 측정하였고 다양한 항생제에 대한 내성과 유해 효소를 생성하지 않음을 확인하였고, 최종적으로 면역 증강제로서의 활용 여부를 확인하기 위해 TNF-α 생성능 (171.86±4.00 ng/ml)을 확인하였다. 본 연구를 기반으로 SRCM102607은 가축 생균제 소재로 활용 가능성과 면역활성이 뛰어난 유산균으로 생균제 산업에서의 잠재적 적용 가능성을 확인하였다.