Korean J. Microbiol. Biotechnol. (2014), 42(3), 211–218
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1406.06001
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KJMB
Korean Journal of Microbiology and Biotechnology

장내 유해세균을 억제하는 양돈용 프로바이오틱스 개발을 위한 비피도박테리아 탐색

이재연, 신영오, 김 근*
수원대학교 바이오산업연구소

Received: June 9, 2014 / Revised: July 17, 2014 / Accepted: August 6, 2014

Screening of Bifidobacteria for the Development of Probiotics Inhibiting Intestinal Pathogenic Bacteria

Jaeyeon Lee, Yungoh Shin, and Keun Kim*
Institute of Bioindustry, The University of Suwon, Hwaseong 445-743, Republic of Korea

In order to isolate probiotic lactic acid bacteria possessing high inhibitory activities against porcine and zoonotic pathogens, such as enterotoxigenic *E. coli, Salmonella* Typhimurium, and *Clostridium perfringens,* a total of 65 anaerobic strains were initially isolated from a variety of sources including cattle rumen fluids, chicken intestines and swine feces. Four *Bifidobacterium* strains were selected for their high anti-pathogenic bacterial activities. By using the 16S rDNA sequencing method, three *B. boum* strains and one *B. thermophilum* were identified. *B. thermophilum* demonstrated the best adhesive ability to epithelial cells of swine intestine among the isolates. Indeed, *B. thermophilum* was seen to have superior characteristics as a probiotic for swine, as judged by their high growth inhibitory activities against various pathogens, and high acid- and bile-tolerance.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotics, swine, intestinal pathogenic bacteria

서 론

양돈 산업이 대규모로 산업화되면서 세균에 의한 설사방지를 위하여 항생제의 사용으로 질병감소 및 가축생산성이 증대되는 효과를 가져왔으나 항생제의 과다사용으로 인한 항생제 내성균의 출현 및 축산물 잔류독성의 문제가 야기되면서 국내에서 항생제의 사료첨가 사용을 금지하기 시작하였다. 항생제 대체제로서 프로바이오틱스는 소화, 미생물경쟁, 면역방어 등의 기능을 통하여 증체 및 생존율을 향상시킬 수 있다.

특히 자돈은 이유 후 모체항체의 고갈, 잘 소화되지 않은 물질의 섭취로 인한 병원균 성장의 기회제공, 높은 온도 및 습도로 인한 면역세포 분비의 억제[8], 섭취 스트레스[15], 집단 스트레스[7] 등으로 설사 빈도가 높아짐으로써 이유 후 20%이상의 높은 치사율을 나타낸다[4].

***Corresponding author**
Tel: +82-31-220-2344, Fax: +82-31-220-2344
E-mail: kkim@suwon.ac.kr

장독소성대장균(enterotoxigenic *E. coli,* ETEC)은 특히 이유 후 스트레스로 인하여 1주일 경에 작은창자에 주로 감염되어 대장균증을 일으키며 증상은 장관에 부착하여 독소를 생산하며 설사, 탈수, 부종 등을 일으킨다[2, 5, 6]. 이유 후 ETEC로 인한 질병발병률이 평균 25% 이상이며 최고 80%에 달한다[15]. *Salmonella* Typhimurium는 생후 8–12주에 살모넬라증을 일으키며 작은창자 및 큰창자에 감염되어 설사를 일으킨다[36]. *Clostridium perfringens*는 유포자성 그람양성 혐기성 바실러스 형태로써 type A, C가 있으며[38], 1주가 안된 면역성이 약한 돼지의 작은창자에서 증식하여 치명적인 괴사성 장염, 출혈성 설사를 일으키며 급성의 경우 빠르게 치사하기도 한다.

돼지 소화관내 본래의 유산균(indigenous lactic acid bacteria)은 위장과 작은창자에 10^7–10^8 cfu/g 비율로 다량 존재하고 있으며[23], 유산균은 lactic acid를 생성하여 위내 pH를 더욱 낮춤으로써 미생물 균총 조절 및 하부소화기관의 미생물 오염을 줄이는 역할을 한다[37].

프로바이오틱스는 “적당량을 섭취하였을 때 숙주동물에게 건강상 이익을 주는 살아있는 미생물”로 정의(FAO/WHO,

2001)되고 있다. 프로바이오틱스의 알려진 잇점들은 여러 감염증, 알러지병, 염증성질병을 막아주는 것들이다[28]. 또한 세균들에 의한 장내 불균형의 위험을 감소시키며[14], 설사를 막아준다[18]. 프로바이오틱스로 사용 가능한 미생물은 위산 및 담즙산에 대한 저항성[10], 숙주 소장 표피세포의 정착능력 및 증식능력[11, 22], 안전성 등의 특징을 갖추어야 한다[21]. 양돈용 프로바이오틱스 유산균(lactic acid bacteria, LAB)은 현재까지 대부분 *Lactobacillus* spp.를 중심으로 연구되어왔다[9, 24, 25, 33].

본 연구의 목적은 동물유래 시료로부터 양돈 사료첨가용 유산균을 개발하기 위하여 ETEC, *Salmonella* spp., *C. perfringens* 등 양돈산업에서 심각한 문제를 일으키는 병원성 세균을 강하게 저해하는 *Bifidobacterium* 유산균을 분리하고자 하였다. 또한 분리 유산균의 내산성, 내담즙성, 돼지 소장 상피세포에 대한 부착능력 등을 조사하여 양돈 사료첨가용 프로바이오틱스로써 적합한 균주를 선발하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

균주

본 연구에서 사용된 여러 유산균들과 이들의 source를 Table 1에 나타내었다. *L. pentosus* K34는 본 실험실의 stock culture로서, *S.* Gallinarum, *S. aureus, E. coli*에 항균력이 높은 균주이다[26, 27].

병원성 살모넬라균으로는 *Salmonella* Gallinarum [대상(주)으로부터 분양], 수의과학검역원으로부터 분양받은 돼지 가검물로부터 분리된 *S.* Enteritidis 및 *S. enterica* serovar. Typhimurium(또는 *S.* Typhimurium)을 사용하였다. 그리고 인수공통전염병균으로 그람양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, *Clostridium perfringens* (type C) (수의과학검역원, 돼지 가검물로부터 분리)를 사용하였고, 그람음성균인 Enterotoxigenic *E. coli* (O15:H11, LT+, Statens Serum Institute, Denmark), *Campylobacter jejuni* ATCC 43430을 사용하였다.

Table 1. The bacterial strains used in this study and their sources.

Strain	Scientific name	Source
K34	*L. pentosus*	Chicken small intestine
JS	*B. longum* (KCCM 11953T)	Adult intestine
SF7	*B. thermophilum*	Swine feces
R5, R6, R9	*B. boum*	Rumen of cattle
R1, R2, R4, R7, RA1	ND[a]	Rumen of cattle

[a]Not determined.

배지 및 배양

유산균배양배지로는 MRS, cMRS (0.05% cysteine이 첨가된 MRS), 또는 Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) 배지를 사용하였다[20]. 병원성 세균 배양배지는 *Salmonella* spp., *S. aureus, L. monocytogenes* 등은 tryptic soy broth (TSB; BD, USA; 1.7% pancreatic digest of casein, 0.3% enzymatic digest of soybean meal, 0.25% dextrose, 0.5% sodium chloride, 0.25% dipotassium phosphate), Brain heart infusion broth (BHI; BD, USA; 20% infusion from calf brains, 25% infusion from beef heart, 1% proteose peptone, 0.2% dextrose, 0.5% sodium chloride, 0.25% disodium phosphate)를 사용하였다. ETEC는 Luria-Bertani broth (LB; 0.5% yeast extract. 1% tryptone, 1% NaCl)를 사용하여 37°C에서 1일 동안 배양하였다. *C. jejuni*의 경우는 BHI agar에 10% (v/v) calf serum (Gibco BRL, USA)을 첨가하여 10% CO_2 incubator에서 37°C로 배양하였다. *C. perfringens*는 Reinforced Clostridial Medium (0.3% yeast extract, 1% beef extract, 1% peptone, 0.1% soluble starch, 0.5% dextrose, 0.3% sodium acetate)을 제조하여 사용하였으며, anaerobic jar에서 37°C로 혐기적으로 배양하였다.

유산균분리 및 1차 선별

*Bifidobacterium*을 분리하기 위하여 젖소 제1위 내용물, 돼지 분변, 토종닭 소장내용물 등의 시료 1 g을 9 ml 혐기 희석액(0.2% yeast extract, 0.05% cysteine-HCl, 0.05% sodium thioglycollate, 0.2% K_2HPO_4)을 사용하여 연속희석한 후 RB agar plate에 도말하여 37°C 혐기적으로 배양하였다. RB agar plate에서 성장한 분리된 콜로니 중에서 raffinose를 이용할 수 있는 *Bifidobacterium*의 성장으로 인하여 pH가 저하됨으로써 bromocresol purple 지시약 색깔이 노랗게 변하여 콜로니 주위가 노랗고, 동시에 콜로니 주위에 sodium caseinate의 침전이 형성된 콜로니를 분리하여 RB agar plate streaking하여 37°C 2일간 혐기적으로 배양하였다. 분리된 균주를 cMRS broth에 접종하여 3일간 배양 후 대조균주 *L. pentosus* K34보다 저해환(inhibitory clear zone)의 지름이 크게 형성된 균주를 항균력이 우수한 균주로 선별하여 1차로 분리하였다.

항균력 측정

각 장내 병원성세균의 항균력을 측정하기 위하여 agar diffusion method를 사용하였다. Penicylinder(용량 300 µl, ID 6 mm, OD 8 mm, H 10 mm)를 95% ethanol로 적신 후

화염살균하여 중층된 agar plate상에 일정 간격으로 놓은 후 각 분리 유산균의 배양액 30 또는 100 μl를 loading하여 ETEC는 37°C에서 6시간 배양하여 형성된 저해환의 지름을 비교하였으며 나머지 다른 종류의 병원성세균은 37°C에서 12시간이상 배양한 후 생성된 저해환의 지름(mm)을 측정하였다.

배양기간에 따른 배양상등액의 항균력 변화측정

분리된 유산균 중 여러 종류의 인수공통전염병세균에 대한 항균력이 공통적으로 우수한 유산균을 2차로 선발하여 각 균주를 10 ml cMRS broth에서 37°C로 혐기적으로 배양하여 1, 2, 3일째 배양액을 각각 원심분리하고 상등액 30 μl씩을 *S.* Enteritidis가 중층된 YM agar plate 상에 penicyliner에 loading하여 37°C 배양기에서 12시간 배양한 후 저해환의 지름을 측정하였다.

균주동정

균주동정을 위한 16S rDNA 염기서열 분석을 위해 선발된 균주를 RB agar plate에서 배양한 후 생성된 단일 colony를 취하여 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (BIONEER Co., Ltd, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 전기영동을 통하여 확인한 후, PCR (GeneAmp PCR System 2700, USA)을 denaturation 95°C/30 sec, annealing 55°C/1 min, extension 72°C/1 min의 조건으로 primer 27F (5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG>)와 1492R (5′ TACGGYTACCTTGTTACGACTT>)을 사용하여 총 35 cycle 수행한 후 전기영동을 통하여 약 1,500 bp 크기의 16S rDNA를 확인하였다. 증폭된 16S rDNA를 AccuPrep PCR Purification kit를 사용하여 이 PCR product를 정제하였다. Automated DNA Sequencer (ABI 3100, Applied Biosystem Inc., USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였고, primer를 위와 같은 27F, 1492R 외에 530F (5′ GTGCCAGCMGCCGCGG>)와 1100R (5′ GGGTTGCGCTCGTTG>)의 4가지를 사용하였다. 이 후 Clustal X software를 사용하여 염기서열을 조합하여 NCBI (The National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih)에서 제공하는 Advanced Blast search [3]를 이용하여 GenBank의 염기서열과 비교하여 동정하였다.

유산균의 내산성과 내담즙성

각 유산균의 배양액 1 ml를 Eppendorf tube에 넣고 원심분리하여 상등액을 버리고 모은 pellet에 modified MRS 배지(pH 7.0) (sodium acetate, ammonium citrate 불포함)를 1 ml씩 처리하여 균체를 2회 세척한 후에 다시 원심분리 후 남은 cell pellet에 0.3% HCl을 함유한 MRS (pH 2.2) 또는 0.3% (w/v) bile salt (Difco, USA)를 1.2 ml씩 넣고 잘 섞은 후 세포현탁액을 준비하였다. 37°C에서 6시간 동안 방치한 후 RB agar plate에 도말하여 혐기적으로 배양한 후 생균수를 측정하였고, 다음 식에 의해 내산성 또는 내담즙성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{생존율}(\%) = (\text{cell number in MRS containing 0.3\% HCl or bile salt} \div \text{cell number in MRS}) \times 100$$

유산균의 돼지소장 상피세포 부착성

돼지 소장 상부의 중간부를 절개하고 절개된 부위에 압력을 가해 내용물을 제거하였다. 점액질 표면을 0.01 M PBS (potassium buffered saline, pH 7.4)로 세척하고 조심스럽게 긁어서 mucus 부분을 제거하고 HEPES-Hank's (HH) buffer (25 mM HEPES, 0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na_2HPO_4, 0.44 mM KH_2PO_4, 1.3 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgSO_4$, 4.2 mM $NaHCO_3$)로 세척하였다. 분리된 표피세포와 장관막을 mucus로부터 분리하기 위하여 4°C, 12,000 ×*g*에서 15분간 2번 원심분리하고, 다시 4°C, 27,000 ×*g*에서 15분간 원심분리하였다. Mucus를 제거한 후에 20 ml hyaluronidase (Sigma No. H-3506; 1 mg/ml HH buffer)로 37°C에서 30분간 반응시키고 표피세포를 멸균된 스푼으로 조심스럽게 긁어서 분리하였고, 이 분리된 표피세포 용액에서 거즈로 덩어리와 부스러기 들을 여과하여 제거시켰다. 표피세포 현탁액을 1분간 100 ×*g*로 2번 원심분리하였고 pellet을 5 ml HH buffer로 120 ×*g* 10분간 2번 세척하고 15 ml HH buffer로 한번 원심분리하여 세척하였다. 표피세포와 유산균을 최종 1 ml로 섞고 4°C에서 40분간 반응시켰다. 현탁액을 200 ×*g*에서 15분간 원심분리하고 HH buffer로 3번 세척하였다. 침전물을 초기부피의 반부피로 현탁하고 slide glass에 도말하였다. 세포와 균을 methanol로 고정시키고 Gram staining을 한 후 광학현미경으로 관찰하면서 균수를 측정하였다. 약 10개의 표피세포에 부착한 유산균수를 계수하여 평균을 내어 결과를 나타내었다.

저해물질의 단백질성 여부 확인

분리된 유산균이 생산하는 물질이 그람 양성균을 주로 저해하는 단백질성 항균물질인가의 여부를 조사하기 위하여 그람양성균인 *S. aureus, L. monocytogenes*에 대한 natural pH와 pH 6.5에서의 유산균 배양상등액의 항균력을 조사하였다. 10 ml cMRS에서 37°C, 3일간 배양된 각 균주의 배양액을 10분간 원심분리한 후 5 N NaOH로 pH를 6.5로 조절하였다. pH를 조절하지 않은 배양상등액(natural pH)과 pH를 6.5로 조절한 배양상등액을 0.45 μm syringe filter (celluolose acetate, Advantec MFS Inc., Japan)로 각각 여

과하였다. 그리고 그 여과액을 그람양성균인 *S. aureus, L. monocytogenes*가 중층된 agar plate에 100 μl씩 loading하여 형성된 저해환의 지름을 측정하였다.

또한 본 연구에 사용된 *Bifidobacterium* 균이 생산하는 배양상등액 내의 항균물질의 단백질성 항균물질의 여부를 조사하기 위하여 열처리 또는 단백질 분해효소처리를 하였다. cMRS에서 3일간 배양된 유산균 배양액을 열처리 경우 유산균 배양액의 여과액을 100°C 1시간 동안 boiling하였고, 단백질 분해효소 처리 경우 pepsin과 trypsin (Sigma, USA)을 유산균 배양상등액의 여과액에 1 mg/ml가 되도록 처리하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 *S.* Typhimurium이 중층된 YM agar plate상의 penicylinder에 50 μl씩 loading하여 37°C로 12시간 배양한 후 저해환의 지름을 측정하였다.

Table 2. Growth inhibition of different species of *Salmonella* by the culture broths of various selected LAB[a].

Strain	Diameter (mm) of inhibitory clear zone		
	S. Gallinarum	*S.* Enteritidis	*S.* Typhimurium
Control (cMRS)	0.0	0.0	0.0
L. pentosus K34	24.0	19.0	17.0
B. longum JS	28.0	22.0	16.0
SF7	24.0	19.0	14.0
R1	27.0	17.0	17.0
R2	24.0	18.0	13.0
R4	25.0	20.0	18.0
R5	28.0	20.0	22.0
R6	27.0	17.0	16.0
R7	25.0	17.0	14.0
R9	28.0	23.0	21.0

[a]Thirty microliter supernatant of culture broth of each strain grown at 37°C for 3 days in cMRS was loaded into a penicylinder on the agar plate to examine the diameter of inhibitory clear zone.

결과 및 고찰

인수공통전염병 세균들에 대한 항균효과

여러 가축시료로부터 65주의 혐기성 유산균 후보균을 분리하였고, *S.* Gallinarum에 대한 항균력이 우수한 21주를 선별하였다. 이들 균주들을 *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium 등에 대한 항균력도 조사하여 항균활성이 우수한 8균주를 선별하였는데 이들의 *S.* Gallinarum, *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium에 대한 항균 활성을 Table 2에 나타내었다. *S.* Gallinarum에 대한 항균력이 있는 유산균들은 다소간의 차이는 있었지만 모두 *S.* Enteritidis와 *S.* Typhimurium에도 항균력을 나타내었다. 한편 이들 3가지 *Salmonella* 균에 대한 항균력이 *L. pentosus* K34보다 공통적으로 우수한 균주는 R4, R5, R9, 3균주로 나타났는데 이들은 모두 젖소 제1위에서 분리된 *Bifidobacterium*으로 간주되는 균주들이었다.

*Salmonella*에 대한 항균력이 우수한 8균주를 ETEC, *S.*

Table 3. Growth inhibition of different kinds of enteropathogenic bacteria by the culture broths of various isolated LAB[a].

Strain	Diameter (mm) of inhibitory clear zone				
	ETEC[b]	*S. aureus*	*L. monocytogenes*	*C. jejuni*	*C. perfringens*
Control[c]	0	0	0	0	0
L. pentosus K34	17	20	10	21	16.0
B. longum JS	18	21	12	23	17.5
SF7	16	19	9	21	18.0
R1	17	16	9	24	16.0
R2	16	19	11	24	18.0
R4	15	21	13	18	16.0
R5	20	21	12	25	17.0
R6	16	17	11	21	16.0
R7	18	19	12	21	18.0
R9	20	21	12	25	18.0

[a]The 100 μl supernatant of culture broth of each strain grown at 37°C for 3 days in cMRS was loaded into a penicylinder on the agar plate to examine the diameter of inhibitory clear zone.
[b]ETEC, enterotoxigenic *E. coli.*
[c]Control, cMRS.

aureus, *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *C. perfringens* 등 5종류의 다른 인수공통전염 병원균에 대한 항균력을 조사하였고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 여기에서도 마찬가지로 *Salmonella*에 항균력을 나타낸 균주들은 다소간의 차이는 있었지만 모두 *Salmonella*가 아닌 다른 인수공통 장내 병원성 세균들에도 항균성을 나타내었다. 시험한 병원균 모두에 대해 공통적으로 *L. pentosus* K34보다 우수한 *Bifidobacterium*으로 간주되는 균주로는 JS, R5, R9이었다. 조사한 균주 중에서 5가지 인수공통전염병균 모두에 가장 높은 항균력을 나타낸 균주는 R5와 R9이었는데 이들 2균주는 3종류의 *Salmonella*에도 역시 매우 높은 항균력을 나타내었다(Table 2).

유산균이 생산하는 항균효과를 나타내는 요소로는 낮은 pH, 유기산들, bacteriocin, 이산화탄소, 에탄올, diacetyl, 저분자 항균물질, 낮은 환원전위, 영양소고갈, 우점 등에 의하여 항균력을 나타낸다[1, 34].

프로바이오틱스 균주의 항균력 시험은 액체배양이나 agar plate를 사용한 *in vitro*에서 많이 이루어져왔다. 이외에 쥐나 다른 동물모델을 사용하여 *in vivo*에서 프로바이오틱스의 항균작용을 연구하는 것도 바람직하다. 왜냐면 대부분의 항균작용은 숙주의 면역조절과 프로바이오틱스의 항균 및 감염억제력의 혼합작용이기 때문이다[17].

돼지에서 발견되는 ETEC, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenesis* 등은 돼지뿐만 아니라 사람에게도 병을 일으키는 인수공통전염병의 원인체인데, 최근에는 항생제 methicillin 내성 *S. aureus*가 돼지로부터 돼지사육자들에게 옮긴다는 논문이 발표되어 큰 문제가 되고 있다[31, 32]. 따라서 인수공통병원균을 억제하는 유산균을 프로바이오틱스로 하여 가축에 투여한다면 가축의 질병 예방 뿐 아니라 사람으로의 전염원을 차단한다는 점에서 그 의의가 크다.

유산균 배양시간이 항균능에 미치는 영향

분리된 유산균 중 인수공통전염병균에 대한 항균력이 공통적으로 우수한 4주의 *Bifidobacterium* 균을 선발하여 이들 유산균들의 배양시간에 따른 *Salmonella*에 대한 저해능의 변화를 알아보기 위하여 1, 2, 3일 동안 각각 배양된 시료를 비교한 결과 R9 균주는 배양 2일째에 최대 항균력을 나타내었고, 나머지 4균주는 2일째보다 3일째가 증가된 항균력을 나타내었다(Table 4). 따라서 일반적으로 *Bifidobacterium*으로부터 최대한 많은 항균물질을 얻기 위해서는 3일 이상 배양하여야 할 것으로 생각된다. 한편 가장 빠른 시일 내에 가장 높은 항균력을 나타낸 것은 SF7으로서 1일 배양 후 17 mm의 저해환의 지름을 나타내었고, 최대치의 항균력을 나타낸 균주는 R5로서 3일 배양 후 24 mm의 가장 큰 저해환의 지름을 나타내었다.

Table 4. Growth inhibition of *S.* Enteritidis by various selected LAB after different culture time.

Strain	Diameter (mm) of inhibitory clear zone[a] after		
	1 day	2	3
Control[b]	0.0	0.0	0.0
L. pentosus K34	15.0	18.0	19.0
B. longum JS	14.0	18.0	21.0
SF7	17.0	19.0	21.0
R5	14.0	22.0	24.0
R9	13.0	22.0	22.0

[a]The loading volume of the culture supernatant onto a paper disc was 30 µl.
[b]Control, cMRS broth.

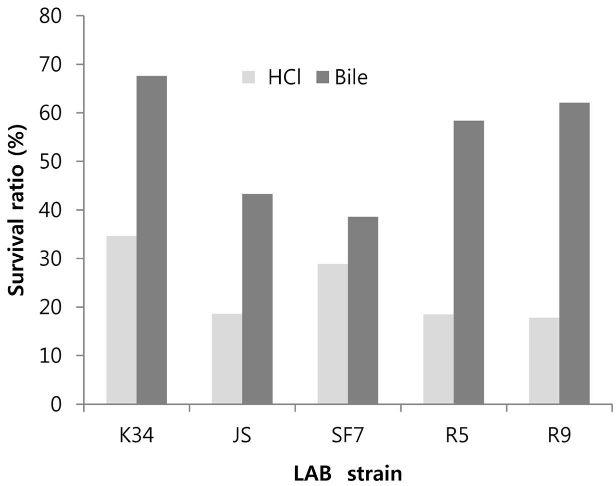

Fig. 1. Acid and bile tolerance of various selected LAB.

균주동정

분리된 우수 유산균들의 균주동정을 위하여 이들 유산균들의 16S rDNA 서열을 분석한 결과, 젖소 제1위에서 분리한 유산균인 R5, R6, R9는 모두 *Bifidobacterium boum*으로 동정되었다. 돼지분변에서 분리한 SF7 유산균은 *B. thermophilum*으로 동정되었다. R5, R6, R9은 같은 소 위에서 분리되었고, 같은 학명으로 동정이 되었으나, 항균력에 있어서는 차이를 보였다(Table 2, Table 3).

내산성과 내담즙성

분리균주의 내산성 내담즙성을 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. HCl 내성에서는 *L. pentosus* K34가 생존율 34.6%로 가장 우수하였는데, *Bifidobacterium* spp. 중에서는 *B. thermophilum* SF7이 생존율 28.8%로 가장 우수하였다. 담즙내성의 경우, *L. pentosus* K34와 *B. boum* R9이 생

존율 각각 67.6%와 62.1%로 가장 우수하였다. 전체적으로 보면 내산성과 내담즙성은 직접 관련되지 않은 것으로 보인다. 예를 들면 R5의 경우 18.5%로 내산성이 가장 낮았으나, 내담즙성은 58.4%로 높은 편이었고, SF7 경우 내산성은 28.8%로 높았으나, 내담즙성은 38.6%로 낮은 편이었다. 한편 내산성 측정에 사용한 균주들은 모두 항균활성이 높은 균주들이었는데 내산성과 내담즙성에는 균주간에 차이가 있는 것으로 보아, 항균활성과 내산성 그리고 내담즙성에는 직접적인 관련이 없어 보인다. Lahteinen 등[24]은 항균활성과 내산성에는 오히려 negative 관계가 있어 보인다고 보고하였다.

프로바이오틱스균이 장내에서 효과를 발휘하려면 위장관을 통과하면서 생존할 수 있어야 한다. 따라서 위산과 담즙에 내성은 프로바이오틱스를 선별하는데 있어서 중요한 기준이 되는데[10, 17], 이들에 대한 내성은 미생물의 species에 따라 다르며, 같은 species라도 strain에 따라 다르게 나타난다[17]. 본 연구에서도 R5와 R6는 같은 species지만 위산과 담즙 내성의 차이를 보였다(Fig. 1).

돼지 소장 상피세포 부착성

분리한 유산균 세포들의 돼지 소장 상피세포에 대한 부착성을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 여기에서 보면 돼지분변에서 분리한 *B. thermophilum* SF7가 가장 우수하게 부착됨으로써 높은 돼지 장내 정착가능성을 나타내었다. 따라서 돼지의 분변에서 분리된 유산균이 사람, 닭, 젖소로부터 분리한 유산균들보다 돼지 소장 상피세포에 대하여 예상했던 바와 같이[21] 우수한 정착 가능성을 가지는 것으로 나타났다. 한편 *B. boum* R5와 *B. boum* R9을 비교해 볼 때 부착성이 각각 7.0%와 12.6%로 크게 차이가 났는데, 이는 같은 종의 균주라도 부착성에 있어 차이가 있음을 보여주는 것이다.

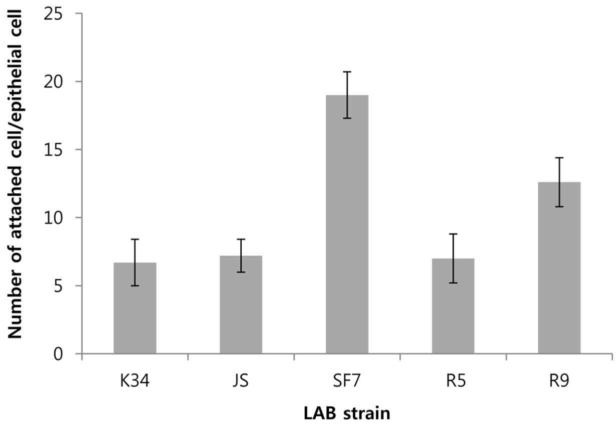

Fig. 2. Adherence of various selected LAB to porcine intestinal epithelial cell.

일반적으로 장부착성실험에는 오랫동안 Caco-2 cell line이 사용되어왔는데[13], 이는 사람의 대장 상피 선암세포로서 양돈용 유산균의 장부착실험에는 부적절하다. 따라서 본 실험에서와 같이 양돈용 유산균의 장부착실험은 돼지의 장표피세포를 돼지의 창자에서 직접 분리한 창자상피세포로 사용하는 것이 필요하다[24].

프로바이오틱스 세포가 동물 장표피세포에 부착함으로써 동물숙주와 프로바이오틱스 미생물과 밀접한 접촉이 이루어지기 때문에[19], 또한 병원균을 경쟁적으로 배제하기 때문에[30], 동물의 장상피세포 부착능력은 일반적으로 프로바이틱스 선정에 있어서 중요한 기준으로 여겨져 왔다.

유산균 항균물질의 특성조사

SF7과 R9균주가 생산하는 물질이 그람 양성균을 주로 저해하는 단백질성 항균물질인 bacteriocin인지의 가능성을 알아보기 균 배양액을 pH를 조절하지 않은 natural pH의 배양액과 pH를 6.5로 조절한 배양액의 *S. aureus*와 *L. monocytogenesis*에 대한 항균력을 조사한 결과, 두 균주 모두 natural pH에서는 *S. aureus*에 대한 저해환 지름이 22.0 mm과 *L. monocytogenesis*에 대한 저해환 지름이 12.5-13.0 mm로 항균력을 나타냈으나, pH 6.5로 조정한 후에는 저해환이 없어 항균력이 나타나지 않았다. 일반적으로 저해물질이 bacteriocin이라면 산에 의한 항균효과가 배제된 pH 6.5에서도 항균력을 나타내야 하는데[35] pH 6.5에서 항균력이 나타내지 않았기 때문에 SF7과 R9이 생산하는 물질이 그람양성균을 저해하는 단백질성 항균물질인 bacteriocin일 가능성이 적어 보이고, 그 항균력은 배양액내의 생산된 lactic, acetic, phenyllactic acids 등의 유기산일 가능성이 높다[24, 27].

SF과 R9 균주들이 생산하는 항균물질의 단백질성 여부를 알기 위하여 그 배양액을 100°C에서 1시간 동안 boiling한 후와 단백질 분해효소인 pepsin과 trypsin을 처리한 후에 항균력을 비교하였지만 모두 항균력의 변화가 없었다(data not shown). 즉 배양액내의 항균물질은 열이나 단백질 분해효소에 의해 파괴되지 않았기 때문에 두 균주가 생산하는 항균물질은 단백질성 항균물질이 아닌 것으로 판단되었다.

결 론

본 연구에서 분리된 *Bifridobacterium* 유산균들은 *S.* Typhimurium, ETEC, *S.* Enteritidis, *C. perfringens*, *S. aureus* 등 국내 돼지에서 많이 발생되는 인수공통 장내 병원성세균들에게 높은 항균력을 보였다. 이들 분리유산균들 중 내산성과 답즙내성이 상대적으로 가장 우수한 균주는 각각 *B. theromophilum* SF7과 *B. boum* R9이었다. 돼지 소장

표피세포 부착능이 우수한 균주는 SF9과 R9이었는데 이 중에서 돼지로부터 분리된 *B. thermophilum* SF7이 가장 우수한 부착능을 나타내 돼지의 장내 병원세균을 억제해주는 프로바이오틱스로의 가능성이 있는 가장 적합한 균주로 판단된다. 앞으로 이 선발된 균주들이 프로바이오틱스로 사용되기 위해서는 돼지의 창자 세포모델 연구[29]와 실제 돼지 사육을 통한 그 효능을 입증하는 연구[39]들이 필요하다.

요 약

본 연구에서는 동물유래 시료들로부터 양돈 사료첨가용 유산균을 개발하기 위하여 enterotoxigenic *E. coli, Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens* 등 양돈산업에서 심각한 문제를 일으키는 인수공통 병원성 세균들과 *Clostridium jejuni, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*와 같은 식중독균을 강하게 저해하는 *Bifidobacterium* 유산균을 분리하고자 하였다. 이를 위하여 소의 반추위 내용물, 닭 창자 내용물, 돼지 분변 등의 시료들로부터 총 65주의 혐기성미생물을 분리하였다. 이 중에서 항병원세균활성이 가장 높은 4주를 선별하였는데, 이들은 16S rDNA 염기서열 분석방법에 의하여 3주의 *B. boum*과 1주의 *B. thermophilum*으로 동정되었다. 특히 *B. thermophilum*는 분리주들 중에서 가장 높은 돼지 장 상피세포에 대한 부착성을 보였고, 여러 인수공통병원세균들과 식중독균들에 대한 높은 항균력, 산과 담즙내성을 보여 양돈용 생균제 후보균주로서 우수한 특성을 나타내었다.

Acknowledgments

This work was supported by the Royalty Program (10046405, Development of microbial strain inhibiting harmful microorganisms and its fermentative production technique) funded by the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE, Korea).

References

1. Adams MR, Nicholaides L. 1997. Reviews of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control.* **8**: 227-239.
2. Alexander TJL. 1994. Neonatal diarrhea in pigs, pp. 151-170. *In* Gyles CL (ed.), *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, CAB international, Wallingford. U.K.
3. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
4. Bäckström, L. 1973. Environment and health in piglet production. A field study of incidences and litter number on behaviour and physiological responses related to welfare status of individual and group housed pigs. *Appl. Anim. Behaviour Sci.* **17**: 229-243.
5. Bertschinger HU, Fairbrother JM. 1999. *Escherchia coli* infections, Sec. 3, Bacterial diseases, pp. 431-468. *In* Taylor DJ (ed.), Diseases of swine, 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
6. Beutin L, Geiser D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. 1998. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin)-producing *E. coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2483-2488.
7. Björk AKK, Christensson E, Olsson NG, Martinsson KB. 1984. The clinical effect of amperozide in pig production. I. Effect of amperozide on aggression and performance in weaners. XV. p. 335. Proc. Int. Vet. Soc. 8th Congress, Ghent. Belgium, 27-31 August, 1984.
8. Carghill CF 1982. Control of *E. coli* infections in pigs. *Austral. Adv. Vet. Sci.* pp. 206-207.
9. Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Kim WY, Kim YB, Park YH. 2001. Selection of a potential probiotic Lactobacillus strain and subsequent *in vivo* studies. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**: 193-199.
10. Chou LS, Weimer B. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**: 23-31.
11. Coconnier M, Lievin HV, Lorrot M, Servin AL. 2000. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica serovar* Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1152-1157.
12. De Angelis M, Siragusa S, Berioco M, Caputo L, Settanni L, Alfonsi G. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res. Microbiol.* **157**: 792-801.
13. Dicks LM, Botes M. 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety, and mode of action. *Benef. Microbes* **1**: 11-19.
14. Dunne C. 2011. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: Probiotics and gut disorder. *Inflam. Bowel Dis.* **7**: 136-145.
15. Fahy VA, Connaughton D, Driesen SJ, Spicer EM. 1987. Post-weaning colibacillosis, pp. 189-201. *In* APSA Committee (eds.), *Manipulating Pig Production*, Australian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia.
16. 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 consulation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO, Cordoba, Argentina.
17. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gil A. 2013. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British J. Nutrition.* **109**: S35-S50.
18. Fuller R, Gibson GR. 1997. Modification of the intestinal

microflora using probiotics and prebiotics. Scand. *J. Gastroenterol.* **222**: 28-31.

19. Gueimonde M, Salminen S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* **38**: S242-247.
20. Hartemink, R, Kok BJ, Weenk GH, Rombouts FM. 1996. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods.* **27**: 33-43.
21. Havenaar R, Brink BT, Veid JHJI. 1992. Selection of strains for probiotic use, pp. 209-224. *In* Fuller R (ed.), *Probiotics : The scientific basis.* Chapmann & Hall, London.
22. Hudault, S, Lievin V, Bernet-Camard MF, Servin AL. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella* Typhimurium C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 513-518.
23. Jonsson E, Conway P. 1992. Probiotic for pigs, pp. 209-224. *In* Fuller R. (ed.), *Probiotics : The scientific basis.* Chapmann & Hall, London.
24. Lahteinen, T, Malinen E, Koort JMK, Mertaniemi-Hannus U, Hankimo T, Karikoski N, *et al.* 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe.* **16**: 293-300.
25. Lee DY, Seo YS, Rayamajhi N, Kang ML, Lee SI, Yoo HS. 2009. Isolation, characterization, an evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces. *J. Microbiol.* **47**: 663-672.
26. Lee JY, Hwang KY, Kim HS, Kim K. 2002. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting gastro-intestinal pathogenic bacteria of domestic animal. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 129-134.
27. Lee JY, Hwang KY, Kim K, Park YS, Paik MJ, Kim KR. 2002. Characteristics of antimicrobial organic acids produced by *Lactobacillus pentosus* K34 isolated from small intestines of Korean native chickens. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 241-246.
28. Minocha, A. 2009. Probiotics for preventive health. *Nutr. Clin. Pract.* **24**: 227-241.
29. Nissen L, Chingwaru W, Sgorbati B, Biavati B, Cencic A. 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp.strains: A functional study in the small intestinal cell model. *Int. J. Food Microbiol.* **135**: 288-294.
30. Nousianen J, Javanainen P, Setala J, von Wright A. 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics, pp. 547-580. *In* Salminen S, von Wright A, Quwehand A. (eds.) *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects.* 3rd Ed. Marcel Dekker. New York.
31. Petinaki E, Spiliopoulou I. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**: 626-634.
32. Pletinckx LJ, Verhegghe M, Crombé F, Dewulf J, De Bleecker Y, Rasschaert G, *et al.* 2013. Evidence of possible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 spread between pigs and other animals and people residing on the same farm. *Prev. Vet. Med.* **109**: 293-303.
33. Rodriguez E, Arques JL, Rodriguez R, Nunez M, Medina M. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 259-263.
34. Sanders ME, Kondo JK, Willrett DL. 1991. Application of lactic acid bacteria, pp. 433-459. *In* Goldberg I. Williams R (eds.), *Biotechnology and Food Ingredient,* Van Nostrand Reinhold, New York.
35. Schillinger U, Lücke F. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1901-1906.
36. Schwartz KJ. 1999. Salmonellosis, Sec. 3, Bacterial diseases, pp.535-551. *In* Taylor DJ (ed.), Diseases of swine, 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
37. Smith HW. 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Pathol. Bacteriol.* **90**: 495-513.
38. Taylor DJ. 1999. Clostridial infections, Sec. 3, Bacterial diseases, pp. 395-412. *In* Taylor DJ (ed.), Diseases of swine, 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
39. Wang JQ, Yin FG, Zhu C, Yu H, Niven SJ, deLange CFM, *et al.* 2012. Evaluation of probiotic bacteria for their effects on the growth performance and intestinal microbiota of newly-weaned pigs fed fermented high-moisture maize. *Livestock Sci.* **145**: 79-86.