

Probiotics에 의한 해수양식어의 성장촉진 및 항균효과

백남수* · 임유범¹ · 김영만
(주)메디오젠, ¹한경대학교 식품공학과

Antibacterial Activity and Growth Promotion in Aquacultured Fish by Probiotics. Paek, NamSoo*, YooBeum Lim, and YoungMan Kim. MEDIODEN. Co., Ltd., Seoul 133-111, Korea, ¹Department of Food Science & Technology, Hankyong University, Ansung 456-800, Korea - For the development of probiotics in aquaculture of marine organisms, three strains having psychrophilic and salt tolerant characteristics were isolated from Kimchi. Among the isolated strains, MG19, MG89 and MG208 were identified as *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus plantarum*, respectively. The neutralized culture broth of isolated strains were tested in order to evaluate the antibacterial activity, which showed high antibacterial activity against *Edwardsiella tarda*, *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas fluorescens*. In mixed culture of pathogens and isolated strain, pathogens were significantly inhibited after 2 days of cultivation but the isolated strains showed normal growth. When the *Edwardsiella tarda* was cultured with three isolated strains, its growth was completely inhibited after 24 hours of cultivation. The effect of isolated three strains as probiotics was investigated based on the changes in body weight of aquacultured flounder. After 50 days feeding trial, it was found that the mean body weight gain of the tested group fed freeze-dried isolated cells was significantly greater than that of the control group. These results suggest that these isolated strains can play an important role as probiotics in aquaculture.

Key words: Probiotics, aquacultured fish, antibacterial activity, *Edwardsiella tarda*

오늘날 양식어 산업은 가장 급속히 성장하는 수산업의 한 분야로서 급증하는 수산물의 수요에 따라 세계적으로 경제적 중요성이 인정되고 있다. 우리 나라는 삼면이 바다로서 연안의 거의 모든 면적이 양식업으로 이용되고 있는 실정이다. 양식어는 밀도가 높은 사육이나 수질의 악화 등에 의해 면역력이 저하되고 따라서 세균이나 기생충 등의 감염을 받기 쉬운 환경에 처해있는 경우가 많다. 현재 여러 종류의 항생제들이 국내에서는 질병치료 및 감염예방에 단독 또는 사료에 첨가되어 사용되고 있으나 안전성이 보다 요구되고 있으며 항생물질의 계속사용은 내성을 갖는 미생물의 증가를 초래하게 되고 이러한 내성균은 사람에게 전염될 수 있고 양식어 자체의 장내 세균총의 파괴와 함께 항생물질의 축적으로 생육에 지장을 초래할 뿐만아니라 식용시 악영향을 미칠 수 있다. 특히 장내서식 유익 세균총은 대사과정에서 중요한 역할을 할 뿐아니라 면역강화 및 동물의 성장과 건강유지를 위해 필수적이며 비타민의 생성 등 유익한 역할을 하나 항생물질 등의 투여로 장내세균총의 생물학적 균형이 깨지면 감염 방어기작에 이상이 생겨 병원 미생물의 침입이 용이하게 된다[1]. Probiotics는 여러종류

의 정상 장내 세균총에서 병원성균에 대해 증식을 억제하는 항균력이 있는 것으로 알려져 있으므로 정상 장내 세균총의 균형을 유지하고 병원성 세균의 증식을 억제하는데 중요한 역할을 담당한다[2,3]. 그러나 이러한 probiotics의 유용한 효과는 주로 사람과 가축에 대한 실험보고 내용이 대부분을 차지하고 있고 개발된 probiotics들도 사람과 가축에 적용되는 제품들로서[4] 해수 양식어에 이들 제품을 그대로 사용하는데는 문제점이 있다. 사람 및 가축에 사용되는 probiotics는 최적발육온도가 37°C로서, 15-25°C에서 생육하는 양식어에는 부적절하며 특히 해수 양식어의 경우 높은 염농도에도 견딜 수 있는 probiotics가 필수적이다. 날로 급증해 가는 어류 수산물의 양식에 따라 수질 환경은 점차 악화되고 어병을 일으키는 빈도가 증가함으로써 항생제를 대체할 수 있는 probiotics의 이용가능성과 실제로 해수양식어에 직접 투여하여 효과를 나타낸 보고가 있으며[5,6] 정부에서도 신규 항생물질의 허가를 규제하는 현실을 감안 할 때 양식어류에 대해 항생물질의 남용을 억제 및 대체할 수 있는 probiotics 개발의 일환으로서 어류장내의 유익세균총을 형성하게 하고 성장촉진은 물론 질병예방과 수질오염 억제 등을 목적으로 하는 양식어용 전용 생균제 개발이 반드시 필요하다고 생각되어 저온에서 발효 숙성된 김치로부터 저온성과 내염성의 특성을 가지며 항균물질을 생산하는 probiotics를 분리하여 생균제로서의 이용 가능성을 시험하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-467-0018, Fax. 82-467-0270
E-mail: nspaek@mediogen.co.kr

재료 및 방법

균주의 분리

10~15°C에서 숙성된 김치를 균질화하여 착즙한 다음 살균된 생리식염수(0.9% NaCl)로 단계 희석하고 bromocresol purple을 함유한 plate counter agar(peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, polysorbate 80 0.1%, L-cystine 0.01%, bromocresol purple 0.005%, agar 1.5%, 이후 BCP배지로 명명) 배지에 도말하여 20°C에서 2일간 배양 후 균체 주변을 노란색으로 변색시킨 균주 200여주를 1차 분리하였다. 분리된 균주를 5% NaCl이 함유된 MRS (proteose peptone 1%, beef extract 1%, yeast extract 0.5%, dextrose 2%, polysorbate 80 0.1%, ammonium citrate 0.2%, sodium acetate 0.5%, MgSO₄ 0.01%, MnSO₄ 0.005%, K₂HPO₄ 0.2%) 배지에 접종하여 15°C에서 3일 배양 후 생육한 균주를 2차 분리하고 배양여액에 의한 항균활성을 측정하여 활성이 우수한 균주를 최종 선별하여 본실험의 공시균주로 사용하였다.

균주의 동정

저온 및 내염성 분리균주의 분류학적 동정을 위해서 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[7]와 Manual of Methods for General Bacteriology[8] 등의 세균분류 동정 지침서의 시험항목을 기준으로 해서 각종 분류동정 시험방법에 따라 배양학적, 형태학적 특성 및 생리학적 특성을 조사하여 동정 확인하였다.

항균활성 조사

항균활성 조사는 여지 disc를 사용하는 agar diffusion법에 따라 실시하였다[9]. 배양액의 항균활성에 대한 지시균은 부경대 생물공학과 김 성구 교수로부터 분양받은 해수 병원균인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas fluorescens*를 사용하였다. Tryptic soy agar 10 ml를 배양 접시에 분주하여 고화시킨 후 그 위에 tryptic soy broth (TSB) (tryptose 1.7%, soytone 0.3%, glucose 0.25%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.25%) 및 Lactose broth(LB) (peptone 0.5%, beef extract 0.3%, lactose 0.5%) 배지에서 25°C에서 24시간 배양한 병원균액을 10⁶cells/ml 정도의 균수가 되도록 첨가한 nutrient soft agar (agar 0.4% 함유) 2 ml를 증충하고 다시 그 위에 분리균주의 배양액을 10% NaOH 용액으로 중화(pH7.0)한 농축시료를 membrane filter(0.45 μm)로 여과 후 농도별로 일정량을 문힌 여지 disc(직경 8 mm)를 항균력 시험배지 위에 올려놓고 25°C에서 24시간 배양했을 때 병원균의 생육저지대의 폭을 측정하였으며 대조 항생물질로는 amoxycillin을 사용하여 비교하였다.

혼합배양 시험

분리균주와 해수어 병원세균의 혼합배양에 의한 해수어

병원균의 생육저해 작용을 조사하기 위하여 분리균주는 MRS배지를 사용하여 25°C에서 24시간 배양 후 각각 10⁶ cells/ml의 생균수가 되도록 생리식염수로 단계 희석하여 접종 시료액을 만들고 병원균중 *E. tarda*균은 TSB배지, *P. fluorescens* 및 *V. cholerae*균은 NaCl이 2.5%함유된 LB배지를 사용하여 25°C에서 24시간 배양 후 분리균주와 마찬가지로 10⁶cells/ml의 생균수가 되도록 생리식염수로 단계 희석하여 접종 시료액을 만든 다음 분리균주와 함께 *E. tarda*균은 TSB 배지, *P. fluorescens* 및 *V. cholerae*균은 NaCl이 2.5%함유된 LB배지에 각각 1%씩 접종하여 25°C에서 배양하였다. 각각의 혼합배양액을 6시간 간격으로 채취하여 멸균 생리식염수로 희석한 후 생균수를 측정하였다. *E. tarda*균과 분리균주의 생균수 측정은 tryptic soy agar 배지와 MRS 배지에 도말하여 25°C에서 24시간 배양 후 각각의 균에 대한 생균수를 측정하였으며 *P. fluorescens* 및 *V. cholerae*균은 NaCl이 2.5% 함유된 LB 평판배지와 BCP 배지에 각각 도말하여 25°C에서 24시간 배양 후 병원균과 분리균주의 생균수를 측정하였다.

분리균주의 동결건조 분말화 시험

분리균주를 61 발효조(NBS, Bioflo IV)에서 최적생산배지(whey 1.0%, peptone 1.0%, glucose 2.0%, yeast extract 0.5%, CaCO₃ 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%)를 사용하여 배양한 후 원심분리(10,000 × g)를 10분간 하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 동결건조 보호제와 혼합하여 균질화 한 후 40°C로 동결시킨 다음 동결건조기(IL Shin Lab)에서 건조하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화 시킨 다음 멸균 생리식염수에 단계 희석하여 BCP배지에 도말한 후 25°C에서 48시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 동결건조 후의 생존율을 측정하였다. 동결건조분말에 대한 생균수 분석 후 건조전분을 부형제로 사용하여 10⁶cells/g의 균수가 함유되도록 균원료를 제조하여 사료첨가제로 사용하였다.

균원료를 이용한 사료첨가 시험

20°C로 유지되는 수조에 넙치를 300여 마리씩 2군으로 나누어 대조군은 일반사료에 전분 0.1%를 혼합하여 투여하고 시험군은 3종 분리균주의 동결건조 균원료를 일반사료에 각각 0.1%씩 혼합하여 투여한 다음 50일이 경과 후 임의로 10마리를 채취하여 어체량을 측정하였으며 이러한 방법을 2회 반복하여 어체의 평균 증체량을 계산하였다. 또한 균원료를 7일간 계속 투여 후 균원료의 투여를 중지한 다음 1일, 3일 및 6일 경과 후 넙치의 장관을 절취하여 멸균 생리식염수에 넣고 균질화시켰다. 이것을 다시 멸균생리식염수로 단계희석한 다음 MRS와 BCP 및 nutrient agar 배지(beef extract 0.3%, peptone 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%)에 도말 후 20°C에서 48시간 혐기 배양기에서 배양 후 균의 형태적 및 생리적 특성을 조사하여 넙치장내의 일반

혐기성세균과 probiotics의 서식 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주 분리

저온 숙성 김치를 분리원으로 하여 BCP 배지에서 노란색 환을 형성하는 200여 개의 단일 colony를 1차 분리하였으며 1차 분리된 균주를 NaCl이 5.0% 함유된 MRS 배지를 사용하여 15°C에서 3일간 배양하여 생육한 균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 30여 균주를 25°C, 24시간 동안 MRS 배지에서 배양 후 상등액을 사용하여 *E. tarda*에 대한 생육저해 활성을 비교하여 최종적으로 MG19, MG89, MG208 등 3종의 균주를 최종 선별하였다.

분리 균주의 동정

MG19 분리균주의 특성을 조사한 결과 Gram 양성균의 간균으로서 운동성이 없었으며 catalase와 oxidase가 음성이었고 glucose로부터 gas를 생성하였으며 arginine으로부터 NH₃를 생성하였다. 또한 15°C 및 5% NaCl 존재하에서 생육하였으나 45°C에서는 생육하지 못하였다. 탄소원 이용성을 조사한 결과 arabinose, ribose, amygdaline, raffinose, salicin 등은 이용하였으나 rhamnose, mannitol, melezitose 등은 이용하지 못하였다. MG89 분리 균주의 특성을 조사한 결과는 Gram 양성균의 구균으로서 운동성이 없었으며 catalase와 oxidase가 음성이었으며 glucose로부터 gas를 생성하지 않았으며 arginine으로부터 NH₃가 생성되었다. 또한 10°C 및 6% NaCl 존재하에서 생육하였고 45°C에서도 생육 가능하였다. 탄소원 이용성을 조사한 결과 arabinose, ribose, xylose, mannitol, salicin 등은 이용하였으나 sorbose, rhamnose, sorbitol,

melezitose, raffinose 등은 이용하지 못하였다. MG208 분리균주의 특성을 조사한 결과는 Gram 양성균의 간균으로서 운동성이 없었으며 catalase와 oxidase가 음성이었으며 glucose로부터 gas를 생성하지 않았으며 arginine으로부터 NH₃를 생성하지 않았다. 또한 15°C 및 5% NaCl 존재하에서 생육하였으나 45°C에서는 생육하지 못하였다. 탄소원 이용성을 조사한 결과 arabinose, ribose, mannitol, sorbitol, amygdaline, salicin 등은 이용하였으나 xylose, rhamnose, gluconate 등은 이용하지 못하였다(Table 1, 2). 이상의 형태 및 생리화학적 특성을 토대로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류기준 색인에 따라 고찰한 결과 MG19균주는 *Lactobacillus brevis* 또는 그 유연균으로 동정되어 *Lactobacillus brevis* MG19로 명명하였고 MG89는 *Enterococcus faecium* 또는 그 유연균으로 동정되어 *Enterococcus faecium*

Table 2. Carbon utilization of the isolated strains

Carbon source	MG19	MG89	MG208
Xylose	+	+	-
Arabinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Rhamnose	-	-	-
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	-
Erythritol	-	n	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	+	+
Sorbitol	-	-	+
Xylitol	-	-	-
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Arbutine	+	n	+
Melibiose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Gentiobiose	+	n	-
Turanose	-	n	+
Melezitose	-	-	+
Raffinose	+	-	+
Trehalose	+	+	+
Inulin	-	-	-
Glycerol	-	-	-
Amygdalin	+	+	+
Esculin	+	+	+
Salicin	+	+	+
Gluconate	+	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	n	+
N-acetyl glucosamine	-	n	+

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strains

Classification	MG19	MG89	MG208
Morphological characteristics			
Shape	rod	coccus	rod
Gram stain	+	+	+
Motility	-	-	-
Spore formation	-	-	-
Facultative anaerobic	+	+	+
Physiological characteristics			
Production of catalase	-	-	-
Production of oxidase	-	-	-
NH ₃ from arginine	+	+	-
Gas from glucose	+	-	-
Isomer of lactic acid	DL	L(+)	DL
Growth at 15°C	+	+	+
Growth at 45°C	-	+	-
Growth in 5% NaCl	+	+	+

+: positive, -: negative

+: positive, -: negative, n; not detect

MG89로 명명하였다. 또한 MG208은 *Lactobacillus plantarum* 또는 그 유연균으로 동정되어 분리균을 *Lactobacillus plantarum* MG208로 명명하였다.

항균 활성

MG19, MG89 및 MG208의 항균활성을 조사하기 위하여 먼저 배양액을 pH7.0으로 중화하여 젖산에 의한 병원성균의 생육저해 작용을 배제하였다. 각 분리균주의 중화 배양여액을 20배 농축 후 여과하여 50 µl씩 점적한 결과 *E. tarda*의 경우 MG208의 시료가 대조약물과 비슷한 높은 항균력을 나타냈으며 *P. fluorescens*의 경우 3종의 분리균주 모두 대조약물과 동등이상의 효과를 나타냈다. *V. cholerae*의 경우 다른 병원세균과 달리 대조약물의 효과가 상대적으로 낮았으며 3종 분리균주에 대한 시료 역시 낮은 항균력을 나타냈다(Table 3). 중화시키지 않은 배양액 시료를 그대로 처리한 경우 중화시킨 시료보다 전반적으로 더 높은 항균활성을 나타냈으나(data not shown) 이것은 젖산에 의한 상승효과로 예상되었으며 따라서 중화된 시료에는 항균물질만의 효과에 의해서 항균활성이 나타나는 것으로 추정되었다.

혼합배양에 의한 병원성세균의 생육억제

MG19 균주의 *V. cholerae*균에 대한 증식 저해능 및 항균력을 측정하기 위하여 25°C에서 NaCl 2.5%가 함유된 LB 배지를 사용하여 *V. cholerae*균 단독 및 MG19 균주와 48시간 혼합 배양한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *V. cholerae* 단독배양의 경우에는 정상적인 성장을 하였으나 혼합 배양의 경우 접종 후 8시간 이후부터 균수가 감소하기 시작하여 48시간에는 20 cells/ml의 생균수를 보인 반면 MG19 균주는 9×10^8 cells/ml의 생균수를 보여 월등한 우세를 나타냈다. MG89의 경우 25°C에서 TSB 배지를 사용하여 *E.*

*tarda*균 단독 및 MG89 균주와 48시간 혼합 배양한 결과 *E. tarda*균 단독배양의 경우에는 정상적인 성장을 하였으나 혼합배양의 경우 접종 후 6시간 이후부터 점차 증식이 저해되다가 18시간 이후에는 급격히 감소하여 48시간에는 200 cells/ml의 생균수를 나타냈으며 MG89균은 6.5×10^8 cells/ml의 생균수를 유지하였다(Fig. 2). MG208의 경우 25°C에서 LB배지를 사용하여 *P. fluorescens*균 단독 및 MG208 균주와 48시간 혼합 배양한 결과 *P. fluorescens*균 단독배양의 경우에는 정상적인 증식을 한 반면 혼합배양의 경우 접종 후 12시간 이후부터 점차 증식이 억제되는 현상을 보이다가 42시간 이후 균수가 급격히 감소하기 시작하여 48시간 이후부터는 *P. fluorescens*균이 전혀 나타나지 않은 반

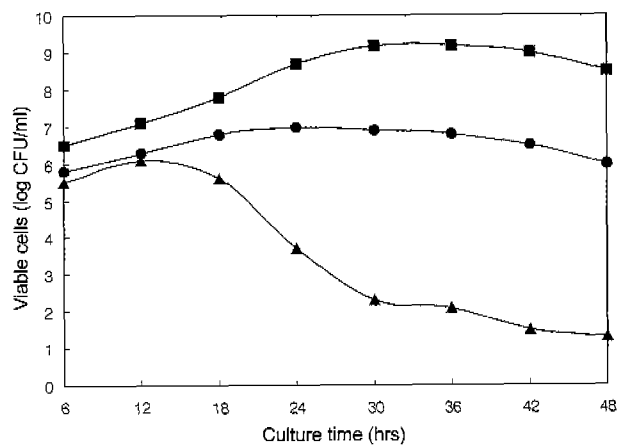


Fig. 1. Growth inhibition of *Vibrio cholerae* by strain MG19 in LB broth contained 2.5% NaCl.
 ●; Viable cells of *V. cholerae* in only *V. cholerae* culture, ■; Viable cells of MG19 in mixed culture, ▲; Viable cells of *V. cholerae* in mixed culture

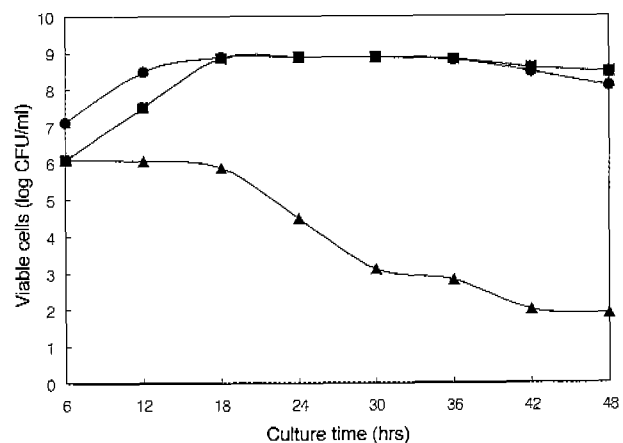


Fig. 2. Growth inhibition of *Edwardsiella tarda* by strain MG89 in TSB broth.
 ●; Viable cells of *E. tarda* in only *E. tarda* culture, ■; Viable cells of MG89 in mixed culture, ▲; Viable cells of *E. tarda* in mixed culture

Table 3. Antibacterial activity of probiotics cultivated in optimal production medium

Loaded sample (50 µl)	Antibacterial activity against ^{a)}		
	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
0.1% Amoxycillin	19	13	15
Neutralized ^{b)} culture broth			
MG19	15	12	15
MG89	16	12	15
MG208	18	11	17

^{a)}Antibacterial activity was measured by agar diffusion method and denoted as width (mm) of inhibitory zone occurred around paper disc (8 mm).

^{b)}Twenty fold concentrate of filtrated culture broth neutralized by 10% NaOH

면 MG208균은 1.2×10^8 cells/ml의 생균수를 보였다(Fig. 3). 또한 TSB 배지에 해수어에 가장 심각한 병원성세균인 *E. tarda* 배양 시료액(10^6 cells/ml)을 1.2% 접종하고 3종의 분리균주 배양 시료액(10^6 cells/ml) 각각을 0.4%씩 합계 1.2%가 되게 동시에 접종하여 48시간 혼합배양 결과, Fig. 4와 같이 24시간 이후부터 *E. tarda*를 완전히 저해하는 현상을 보였으며 분리균주를 단독으로 혼합배양한 것보다 3균주를 동시에 혼합배양한 경우에 *E. tarda*에 대한 증식저해를 보다 효과적으로 발휘하는 것을 알 수 있었다. *P. fluorescens*와 *V. cholerae*에 대해서도 3종의 분리균주를 동시에 접종하여 혼합배양한 경우에도 각각 18시간, 30시간 이후에 증식을 완전히 저해함으로써(data not shown) 3종 균간의 증식저해는 없으면서 효과적으로 병원균의 증식을

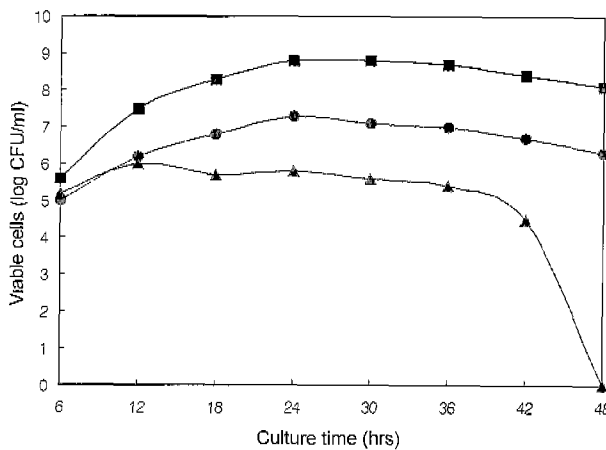


Fig. 3. Growth inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by strain MG208 in LB broth.
 ●; Viable cells of *P. fluorescens* in only *P. fluorescens* culture, ■; Viable cells of MG208 in mixed culture, ▲; Viable cells of *P. fluorescens* in mixed culture

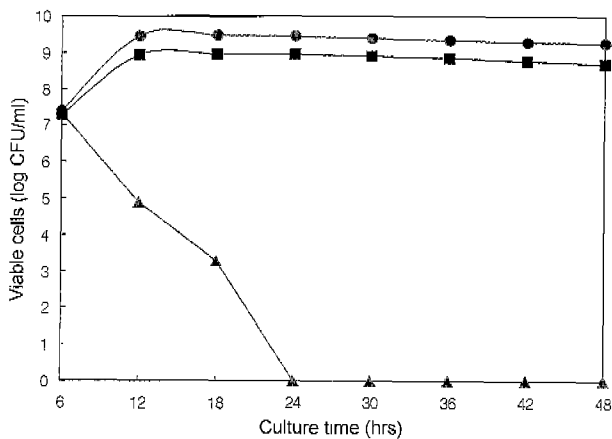


Fig. 4. Growth inhibition of *Edwardsiella tarda* by three probiotics(MG19, MG89, MG208) in TSB broth.
 ●; Viable cells of *E. tarda* in only *E. tarda* culture, ■; Viable cells of probiotics in mixed culture, ▲; Viable cells of *E. tarda* in mixed culture

억제하는 것으로 보아 3종의 분리균주가 probiotics로서의 가치가 있는 것으로 확인되었다.

동결건조분말 균체의 사료첨가 효과

수온조절과 여과장치가 시설된 수조에 각각 300여 마리의 넙치를 2군으로 나누어 시험군과 대조군으로 분류하였다. 사료는 냉동청어를 잘게 썰은 다음 10^8 cells/g으로 제조한 분리균주 3종의 동결건조 균원료를 사료에 0.1% 첨가한 후 고루 섞어 50일 동안 매일 투여한 후 무작위로 10마리를 2회 취한 후 어체량을 측정된 결과 대조군은 평균 약 56.6g이 증가한 반면 시험군은 평균 약 85.4g이 증가하여 대조군에 대해 50% 정도의 증체율을 나타냈다(Table 4). 또한 균원료를 7일간 연속투여 후 일정기간 투여를 중지한 다음 넙치의 장내 세균총의 변화와 probiotics의 서식 및 정착성 정도를 측정된 결과 대조군은 일반적인 장내세균만이 주류를 이루었으나 균원료를 투여한 시험군은 균원료 투여중지 1일 경과 후의 경우 일반 장내세균수가 대조군보다 감소한 반면 투여 균원료의 주균종인 *Lactobacillus* (MG19, MG208)와 *Enterococcus* (MG89)균이 장관 1g당 각각 60×10^5 cells과 40×10^5 cells이 존재하였다. 3일 경과 후의 probiotics의 서식 정도는 1일 경과 후의 경우보다 다소 감소하는 경향을 보였으며 6일 경과 후에는 서식 probiotics의 균수가 약 10배 정도 감소하였고 반면에 일반 혐기성균이

Table 4. Effect of oral administration of probiotics on body weight gain of flounder after 50days in feeding trials

Determination item	Control (n = 10)	Probiotics administration (n = 10)
Initial bodyweight(g)	318.4 ± 10.2	316.4 ± 11.8
Final body weight(g)	375.0 ± 12.5	401.8 ± 13.7
Body weight gain(g)	56.6	85.4 ^a

Data are shown as mean ± SD of body weight for 10 flounder
^a*p*>0.05; Significantly different from control

Table 5. Changes in the intestinal flora of flounder after oral administration of probiotics

Microorganism	Log ₁₀ CFU/g intestinal content			
	The days since stopping administration of probiotics			
	control (n = 5)	1 (n = 5)	3 (n = 5)	6 (n = 5)
<i>Lactobacillus</i> *	ND	6.8	6.6	4.6
<i>Enterococcus</i> *	ND	6.6	6.3	4.4
General intestinal anaerobes	8.3	7.6	7.8	7.9

Data are shown as mean ± SD of log₁₀ per gram of intestinal content for 5 flounder

ND; not detected below 10³ CFU/g

*; strains of administrated probiotics

증가하는 추세를 보임으로서(Table 5) 유익한 장내 세균총을 유지하기 위해서는 probiotics의 지속적인 투여가 바람직한 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Collins[10] 및 Jin[11] 등이 발표한 probiotics의 투여가 인간 및 가축의 장내개선 및 건강증진에 효과적이라는 것과 Byun[6] 등이 *Lactobacillus* sp. DS-12라는 균원료를 넙치에 투여하여 넙치의 체중 증가를 약 60% 증가시킨 보고와 같이 본 실험에 사용한 3종의 분리균주가 어체의 장내에 유익한 세균총을 형성하여 병원성 세균의 증식을 억제하고 성장촉진 효과를 발휘한 것으로 예상된다.

요 약

해수양식어 전용의 probiotics를 개발하기 위하여 저온성 및 내염성의 특성을 갖는 균주를 김치로부터 분리하였다. 분리한 3종의 균주를 동정한 결과 MG19는 *Lactobacillus brevis*, MG89는 *Enterococcus faecium*, MG208는 *Lactobacillus plantarum* 으로 확인되었다. 분리된 3종 균주의 증화된 농축 배양여액을 사용하여 해수어 병원성세균인 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas fluorescens*에 대한 항균력을 시험한 결과 대조약물과 비슷한 효과를 나타냈으며 각 분리균주와 해수어 병원성세균과의 혼합배양시 48시간 이후 병원균의 증식이 상당히 저해되었다. 해수어 병원균중 가장 피해를 많이 주는 *Edwardsiella tarda*와 3종의 분리균주를 동시에 혼합배양 하였을 경우 24시간 이후 *Edwardsiella tarda*의 증식을 완전히 저해하였다. 또한 3종의 분리균주를 동결건조한 균원료를 사료에 0.1% 첨가하여 넙치에 매일 투여한 후 50일이 경과한 다음 체중 증가를 조사한 결과 대조군에 비해 50%의 증체율을 보였다. 이러한 결과로부터 3종의 분리균주는 해수어 전용 probiotics로서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

REFERENCES

1. Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*. 1: 3-24.
2. Shahani, K. M. and A. D. Ayebo. 1980. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microcology. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2448-2457.
3. Fuller, R. 1989. probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
4. Tournaud, J. 1989. Applications of probiotics to animal husbandry. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 8: 551-566.
5. Hassen, G. H. and J. A. Olafsen. 1999. Bacterial interactions in early life stage of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38: 1-26.
6. Byun, J. W., S. C. Park., Y. Beno, and T. K. Oh. 1997. Probiotics effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder(*Paralichthys olivaceus*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 305-308.
7. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
8. Gerhardt, P. G, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.
9. Hoover, D. G. and S. K. 1993. *Screening methods for detecting bacteriocin activity*, In *bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press, London.
10. Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1052-1057.
11. Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 77: 1259-1265.

(Received Nov. 23, 2000/Accepted Jan. 11, 2001)