



사료 첨가용 생균제를 위한 Probiotics 유산간균의 분리 및 동정

이 승 배* · 최 석 호

상지대학교 동물생명자원학부

Isolation and Identification of Probiotic *Lactobacillus* Isolates for Calf Meal Supplements

Seung-Bae Lee* and Suk-Ho Choi

Division of Animal Resources and Life Science, Sangji University

Abstract

Fifty four acid-resistant and bile-resistant isolates of lactic acid bacteria were initially isolated from the faces of Korea native cattle and Holstein using MRS agar and LAPT agar, and ten strains with superior activity against bile salt were finally selected. LS1, LS15, and LL6 isolates showed survival of 66.5%, 82.6% and 80.7% against the simulated stomach liquid(pH 2.5), respectively. LL6 and LL7 isolates had the highest inhibitory activities against the pathogenic bacteria such as *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*. By using API 50 CHL kit, LS1, LS2 and LM1 isolates were identified as a *L. fermentum*. LL6 and LL7 isolates as a *L. acidophilus*, and LS3 isolate as a *L. plantarum*. The other four isolates belong to genus *Lactobacillus*. All the isolates tested were sensitive to some antibiotics such as ampicillin, amoxicillin and erythromycin, but resistant to colistin and ciprofloxacin. LB1, LL6 and LL7 isolates were resistant to gentamicin and neomycin. Especially, the LL6 isolate showed the highest resistance to both of the simulated stomach liquid and bile salt, in addition to the highest inhibitory activities against *Sal. typhimurium*, *Staph. aureus* and *Cl. perfringens*.

Key words : probiotics, *lactobacillus*, pathogenic bacteria, isolation and identification, antibiotic susceptibility

서 론

야생동물들은 어미와 환경으로부터 장내 정상 균총을 빠르게 구성하지만 인위적인 환경에서 오랫동안 사육되는 가축은 사료 변화, 항생제 투여, 수송 스트레스, 유해 미생물의 감염 등에 영향을 받게 되어 장내 균총 간의 균형이 깨어져 증체를 저하, 사료 이용률 감소 등을 초래하여 농가에 경제적 피해를 가져온다(Tannock, 1983; Mundt, 1986). 자돈의 경우 장내 균총의 불균형은 설사 및 폐사율에 직접적인 영향을 미친다(Fahy et al., 1987) 현재까지 항생제 또는 화학적이 치료법은 폐사율 감소 및 성장 촉진 효과가 있어 지속적으로

사용하고 있지만 오·남용으로 인하여 축산물에 잔류되어 인체에 전이되고 결과적으로 알레르기 등의 질병을 일으키는 문제(Sedlacek and Rucki, 1976)와 인체의 내성을 증가시켜 질병발생시 약물의 치료효과를 감소시키는 등의 문제가 발생된다(Wu, 1987). 최근 유럽의 경우 의약품 항생제를 축산용으로 사용하는 것을 금지하고 있다(Dixon, 2000).

미생물 생균제에 대한 연구를 보면 Lilly와 Stillwell(1965)은 생균제는 미생물에 의해 생산되는 성장촉진물로 정의하였고, Parker(1974)는 정상적인 장내 미생물의 균형을 유지시키는 미생물과 그 대사물질이라고 하였으며, Fuller(1989)는 가축의 장내 미생물 균총의 균형을 개선시키는 효과를 갖는 생균제제를 probiotics라고 정의하고, 생균제제는 항생물질이 아닌 살아있는 미생물로 가축에 급여시 장내의 해로운 미생물을 감소시키고 성장을 촉진하며 소화기내 미생물의 환경을 개선시킴으로서 사료의 가치를 증진시킬 수 있다

* Corresponding author : Seung-Bae Lee, Division of Animal Resources and Life Science, Sangji University, 660 Woosandong, Wonju-si, Gangwon-do, 220-702, Korea Tel.: +82-33-730-0542, Fax: +82-33-730-0503, E-mail: sblee@sangji.ac.kr

고 하였다.

유산균은 장내에 잔류시 장내균총을 정상화 시켜 증체율, 생산성 및 사료 이용율을 증진시키며(Havenaar *et al.*, 1992). 토끼와 쥐에 대한 *in vivo* 실험에서도 설사를 일으키는 enterotoxigenic *E. coli* 및 *Salmonella typhimurium* 균주에 대해 probiotic 효과를 보여주었다(Heyman and Menard, 2002). 반추동물에 있어서 probiotic 유산균 균주는 반추위의 발효 정상화와 성숙의 설사를 예방하기 위하여 사용되고 있다(Wallace and Newbold, 1992). 효모 배양물은 가축의 장내에서 유익 균총의 증식을 촉진함으로써 유해균의 증식을 억제시켜 질병 예방 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Rose, 1980; Piva *et al.*, 1993).

유산균은 탄수화물을 다량 소비하여 유산이 많이 생성되게 하는 균으로 식품이나 사료에서 부패를 막고 맛을 개선하며 사람과 가축의 장내에서 영양분의 흡수 촉진, 변비 개선, 항암 작용, 면역 기능 강화, 다당류와 올리고당을 생성하기 때문에 식품 제조의 스타터나 생균제로 널리 이용된다(Sanders, 2000; Simpson *et al.*, 2001).

그러나 현재 국내에서는 항생제 남용으로 인하여 오랫동안 사용해온 항생제인 penicillin, ampicillin, tetracycline에 대한 내성균의 출현율이 20~90% 이상으로 높아졌으며(Park *et al.*, 2000), 1998년 전체 가축 및 수산용 생균제 첨가물 시장규모는 약 185억 원이며, 1999년도는 약 250억 원으로 추산되고 있다(Kim, 1999). 앞으로 유기축산을 하는 경우 가축질병의 치료 목적으로 사용되는 항생제 사용규제가 있으리라 예상되므로 항생제를 대체하여 소화기 병원성 세균을 저해할 수 있는 사료첨가용 생균제의 사용이 요구된다.

본 연구는 가축 중 송아지에 대한 probiotics 미생물을 이용하기 위한 연구로서 사료 첨가용 생균제를 개발하기 위해 내담즙성과 내산성을 갖고 병원성 세균을 저해하는 유산균을 분리 동정하는데 있다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

강원도 일대 농가에서 사육하는 한우와 홀스타인의 분변으로부터 유산균을 분리하였다. 유산균 배양 배지로는 MRS broth와 agar(Difco, USA) 를 사용하였고 배양조건은 37°C에서 48시간 호기적으로 배양하였다. *Salmonella typhimurium* KCTC 2514와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928은 TSA(Difco, USA) 배지를 사용하였고 배양조건은 37°C에서 24시간 배양하였다. *Clostridium perfringens* ATCC 12917는 Reinforced Clostridial Agar(1% beef extract, 1% pancreatic digested

of casein, 0.5% NaCl, 0.5% glucose, 0.3% yeast extract, 0.3% sodium acetate, 0.1% soluble starch, 0.05% L-cysteine, 1.35% agar)배지를 사용하여 Anaerobic jar(Difco, USA)에 수소를 충전하여 35°C에서 혐기적으로 24시간 배양하였다.(Atals, 1993)

유산균 분리

분변을 0.1% peptone 수로 희석하여 MRS broth+0.5% bile salt에서 37°C에서 24시간 배양한 후 0.02% NaN₃가 함유된 MRS에서 자란 균주를 다시 MRS broth (pH 4.5)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 0.02% NaN₃가 함유된 MRS에서 배양하여 내담즙성과 내산성을 갖춘 균주를 분리한 다음 LAPT agar(1% yeast extract, 1.5% peptone, 1% tryptone, 0.5% lactose, 0.1% Tween 80, 1.5% agar)에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 분리된 유산 균을 동정에 사용하였다.

내담즙성 검사

내담즙성을 분석하기 위해 분리한 유산균 균주(10⁸ cells/mL)을 MRS broth와 MRS broth+0.3% bile salt(Sigma, USA)에 접종하여 37°C에서 8시간 배양한 다음 Spectrophotometer(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 625nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의해 내담즙성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산하였다(Mustapha *et al.*, 1997).

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{O.D. value in MRS containing bile salt} - \text{O.D. value in MRS}}{\text{O.D. value in MRS}} \times 100$$

내산성 검사

내산성을 분석하기 위해 내담즙성 검사에서 선발된 분리 균주(10⁸ cell/mL)을 인공위산인 HCl로 조정된 0.05M sodium phosphate(pH 2.5)에 접종한 후 37°C에서 2시간 진탕 배양한 다음 MRS 평판 배지에 도말한 후 한 후 48시간 배양한 후 다음 식에 의해 내산성을 나타내기 위한 생존율(%)을 계산하였다(Lee *et al.*, 2002).

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{cell number in sodium phosphate containing HCl (pH 2.5)} - \text{cell number in sodium phosphate}}{\text{cell number in sodium phosphate}} \times 100$$

항균력 검사

항균력의 측정에는 agar diffusion method(Lee *et al.*, 2002)를 사용하여 측정하였다. 내담즙성과 내산성 검사에서 선발된 유산균 배양액의 pH를 7.0으로 조정한 후 병원성 균인

Salmonella typhimurium, *Staphylococcus aureus* 및 *Clostridium perfringens* 균이 증충된 agar plate 상에 멸균된 Penicylinder(용량 300 μL, ID 6mm, OD 8mm, H 10mm)를 일정한 격으로 놓은 후 상등액을 200 μL를 분주하여 저해환의 크기를 비교하는 agar diffusion method를 사용하였다.

유산균 동정

선발된 유산균은 Lactobacilli API 50 CHL kit(BioMerieux)를 사용하여 동정하였다. 분리균주를 MRS 평판배지에서 37℃에서 24시간 증식시킨 후 집락을 생리염수에 분산시킨 균액 kit에 접종시킨 다음 37℃에서 48시간 배양 후 그 결과를 Apilab Plus v.3.3.3 (BioMerieux)에 입력하여 동정하였다.

항생제 감수성

MRS 평판배지에서 각각 분리된 유산균을 증충한 후 항생제 paper disc를 사용하여 각 균주의 항생제 감수성을 측정 하였다. Paper disc(BBL™ Sensi-Disc™, BD Biosciences, USA)에 들어있는 항생제 사용량은 gentamycin 10ug, colistin 10 μg, neomycin 30 μg, ampicillin 10 μg, streptomycin 10 μg, amoxicillin 20 μg, ciprofloxacin 5 μg, oxytetracycline 30 μg, erythromycin 15 μg, cephalosporin 30 μg이었다.

결과 및 고찰

한우와 홀스타인 농가로부터 수집한 분변에서 무작위 선 발법으로 MRS 평판배지와 LAPT 한천배지 상에서 자라는 간균형태의 54균주를 1차로 선발하였다. Kim(1999)에 의하면 *Enterococcus faecium*은 소의 사료효율과 생시체중 개선에 이용되며 *Enterococcus faecalis*는 소의 항생물질 치료에 다른 장내 균총의 안전성과 생시체중 개선 효과가 있는 것으로 보고하고 있으나, Hardie(1986)에 의하면 장구균인 *Ent. faecalis*와 *Ent. faecium* 균주 중에서도 병원균이 있다는 것이 보고됨에 따라 본 연구에서는 유산구균은 선발하지 않았다. 선발된 균이 생균제로써 기능을 발휘하기 위해서는 낮은 pH 3이하의 조건하의 위장관을 통과하고 십이지장에서 분비되는 담즙에 대해서도 내성을 가져야만 소장에도 도달하여도 생존할 수가 있다고 판단되었다. 따라서 담즙에 대한 내성을 조사하기 위해 1차로 선발된 54 균주에 대해 0.3% bile salt가 함유된 MRS broth에서 배양 후 생존율을 조사한 결과(Fig. 1) 담즙에 내성이 있는 10균주는 0.3% bile salt에서는 77.6%~99.8%의 생존율을 보였으며 특히, LL6와 LL7 균주의 경우 0.3% bile salt에서는 각각 99.2%와 99.8%로 가장 높은 생존율을 나타내었다. 내담즙성에서 선발된 균주를 0.05M

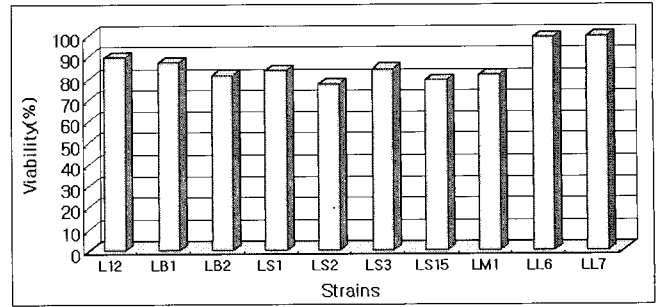


Fig. 1. The bile salt-resistance of various isolates in MRS broth containing 0.3% bile salt. Viability(%) = [O.D. value (625nm) in MRS containing 0.3% bile salt after 8 hr ÷ O.D. value in MRS after 8 hr] × 100.

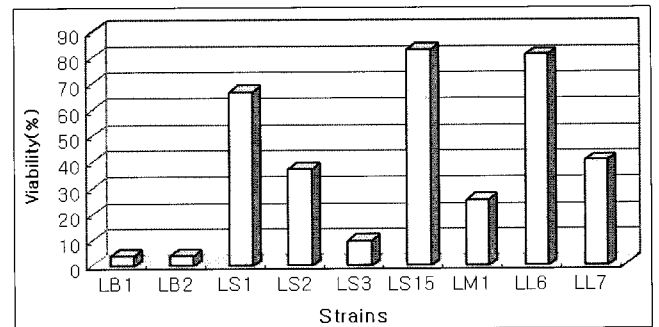


Fig. 2. The acid resistance of the various isolates in simulated stomach liquid (pH 2.5). Viability (%) = [cell numbers in sodium phosphate (pH 2.5) containing HCl after 2 hr ÷ cell numbers in sodium phosphate (pH 7.0) after 2 hr] × 100.

sodium phosphate(pH 2.5)인 인공위산(37℃로 2시간 진탕배양 후)에 대한 생존율을 대한 조사하였다(Fig. 2). 그 결과를 보면 LS15 균주가 82.6%로 가장 생존율이 높았고 그 다음으로 LL6 균주는 80.7%의 생존율을 보여주었다. 따라서 내담즙성과 내산성이 모두 우수한 균주는 LL6 균주임을 알 수 있었다.

선발된 10균주를 그람음성균인 *Sal. typhimurium*, 그람양성균인 *Staph. aureus* 그리고 혐기성 병원균인 *Cl. perfringens*에 대한 항균력을 조사한 결과(Table 1) *Sal. thyphimurium*에 대한 저해능력이 우수한 균주는 LL7과 LL6 균주로서 저해환의 크기는 각각 11.0mm와 10.5mm로 나타났고, *Staph. aureus*에 대한 항균력 능력은 LL6 균주가 11mm로 가장 우수하며 그 다음으로는 5개 균주 L12, LB1, LB2, LS3 및 LL7이 모두 10mm의 저해환을 보인 것으로 나타났다. 특히, 혐기성 균인 *Cl. perfringens*에 대한 항균력은 LL7 균주가 15mm로 가장 우수하였으며 그다음으로 LB1, LS3 및 LL6 균주가 14mm의 저해환을 나타내었다. LS15 균주는 병원성 균에 대해 모두 저해환을 나타내지 않았다.

국내 축산 농가에서 항생제를 사료에 사용하고 있으므로 각 분리된 균주에 대해 항생제 감수성에 대한 조사를 실시하

Table 1. The inhibitory activity profiles of test isolates against *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*

Strain	Diameter (mm) of inhibitory clear zone		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>
Control (MRS)	0.0	0.0	0.0
L12	0.0	10.0	13.5
LB1	8.0	10.0	14.0
LB2	8.0	10.0	12.0
LS1	0.0	0.0	9.0
LS2	0.0	0.0	12.0
LS3	9.0	10.0	14.0
LS15	0.0	0.0	0.0
LM1	0.0	0.0	9.0
LL6	10.5	11.0	14.0
LL7	11.0	10.0	15.0

였다(Table 2). 분리된 10균주 모두 colistin과 ciprofloxacin에 대해 저항성을 보인 반면 ampicillin, amoxicillin 및 erythromycin에 대해서는 10균주 모두 감수성을 보여주었다. Lee 등(2002)은 토종닭에서 분리한 유산균인 6균주 모두 ciprofloxacin에 대해 저항성을 보인 결과와 본 실험에서 분리한 유산균인 10균주 모두 ciprofloxacin이 저항성을 보인 점은 일치하였다. Neomycin에 대해서는 LB1, LL6 및 LL7 균주가 저항성을 나타내었으며, streptomycin에 대해서는 LS1, LS15 및 LM1 균주에 대해서 감수성을 보였다. 특히 L12, LB1,

LB2, LL6 및 LL7 균주는 gentamycin에 대해 저항성을 나타내었다.

많은 유산균들이 항생제 저항성을 갖고 있으며 이들 저항성 유산균들의 속성은 대부분이 항균성을 내부적으로 가지고 있고 전파시키지 않는 것이 특징이다(Curragh and Collins, 1992; Adams and Marteau, 1995; Salminen *et al.*, 1998). 그러나 plasmid에 내재해 있는 항생제 저항성 유전자를 전파시킬 수 있는 가능성이 있는 일부 유산균으로 *Lactobacillus fermentum*(Fons *et al.*, 1997), *L. plantarum*(Ahn *et al.*, 1992) 및 *L. reuteri*(Tannock *et al.* 1994) 균주를 들 수 있다. 또한 Salminen 등(1998)과 Saarela 등(2000)에 의하면 항생제 저항 plasmid을 갖는 균주는 사람과 동물의 probiotic 균주로 사용하기에 적합하지 않는 것으로 보고하였으나 항생제 저항 probiotic 균주는 정상적인 장내 균총이 여러 가지 항균제 복용으로 크게 감소하거나 균형이 깨져있는 환자에게는 유익할 수 있다고 Salminen 등(1998)이 보고한 것은 매우 의미가 있다. 이런 사실에 비추어 볼 때 본 실험에서 분리된 균주를 사료 첨가용 생균제로 사용 시 각각의 항생제 적용 가능성 여부를 판단할 수 있으리라 생각된다.

선발된 10균주를 탄소원의 이용성 차이로 동정하는 생화학적 방법인 API 50CHL kit로 동정하였다. 그 결과 10균주 모두 *Lactobacillus* spp.에 속하는 유산균으로 동정되었고, 광학현미경상에서 모두 간균으로 관찰되었다.(Table 3) 이 중 동정 결과가 확실치 않은 LB1과 LB2 균주는 *Sal. typhimurium*, *Staph. aureus* 및 *Cl. perfringens*에 대해 우수한 항균력을 나타내었고, L12 균주는 그람 양성균인 *Staph. aureus* 및 *Cl. perfringens*에 대해서만 항균력을 나타내었다. 3개의 병원성 균에 대해 가장 우수한 항균력을 나타낸 LL6와 LL7

Table 2. The antibiotic susceptibility profiles of test isolates

Antibiotics	The diameter (mm) of clear zone against each isolate									
	L12	LB1	LB2	LS1	LS2	LS3	LS15	LM1	LL6	LL7
Gentamicin	0.0	0.0	0.0	10.0	12.0	8.0	17.0	19.0	0.0	0.0
Colistin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neomycin	9.0	0.0	8.0	13.0	15.0	11.0	16.0	13.0	0.0	0.0
Ampicillin	15.0	18.0	15.0	30.0	25.0	31.0	24.0	30.0	24.0	25.0
Streptomycin	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	11.0	15.0	0.0	0.0
Amoxicillin	14.0	15.0	16.0	26.0	26.0	30.0	26.0	32.0	28.0	25.0
Ciprofloxacin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Oxytetracycline	13.0	16.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	14.0
Erythromycin	15.0	16.0	17.0	21.0	27.0	22.0	28.0	30.0	25.0	21.0
Cephalosporin	21.0	0.0	0.0	12.0	0.0	0.0	20.0	28.0	29.0	26.0

Table 3. The scientific names* of various isolates based on API 50 CHL test

Strain	Homology (%)	Scientific name*
L12	10.0	<i>Lactobacillus brevis</i> 1
LB1	3.8	<i>Lactobacillus brevis</i> 1
LB2	3.8	<i>Lactobacillus brevis</i> 1
LS1	96.9	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LS2	95.3	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LS3	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LS15	78.4	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LM1	96.9	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LL6	97.9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1
LL7	97.9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1

* Each scientific name is obtained from Apilab plus v.3.3.3 program (BioMerieux).

균주는 97.9% *Lactobacillus acidophilus*로 동정되었고, 우수한 항균력을 나타낸 LS3 균주는 99.9% *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다. 특히, LS1, LS2 및 LM1 균주는 각각 96.9%, 95.3%, 96.9% *Lactobacillus fermentum*으로 나타났으며 혐기성 균인 *Cl. perfringens*에 대해서만 항균력을 나타낸 것을 볼 수 있었고 나머지 4균주는 *Lactobacillus* spp.으로 동정되었다. 따라서 분리한 모든 균주는 생균제로서 사용이 가능한 안전성이 있는 유산균임을 확인하였다. Gilliland와 Speck (1977)은 *L. acidophilus*와 병원성균인 *Staph. aureus*, *Sal. typhimurium*, *Cl. perfringens* 및 병원성 *E. coli*와 함께 혼합 배양하면 병원성 세균 모두 생육이 억제된다고 보고하였다. 이런 사실에 비추어 볼 때 본 실험에서 *L. acidophilus*로 동정된 LL6와 LL7 균주가 *Sal. typhimurium*, *Staph. aureus* 및 *Cl. perfringens* 균주에 대해 높은 항균력을 보인 것은 Gilliland와 Speck(1977)의 결과와 일치하는 것으로 볼 수 있다. 유산균이 다른 균의 생육을 억제하는 이유는 유산, bacteriocin, hydrogen peroxide 및 다른 유기산이 관여하는 것(Kim, 1999)으로 생각되므로 특히, 본 실험에서 동정된 *L. acidophilus*가 생산하는 bacteriocin에 대해서도 연구할 필요가 있다고 생각된다. Lee 등(2002)에 의하면 API 50 CHL kit로 1차 동정한 결과 99% *L. plantarum*으로 동정된 균이 2차로 16S rRNA sequence로 동정하는 경우에 99% *L. pentosus*로 동정되어 염기 서열에 따른 계통학적 분류시 동정 결과가 차이를 보이는 것으로 나타났다.

전통적인 발효 형식에 의한 분류와 rRNA sequence에 대한 계통학적 분류 시 유산균 종에 대한 차이가 나타나므로

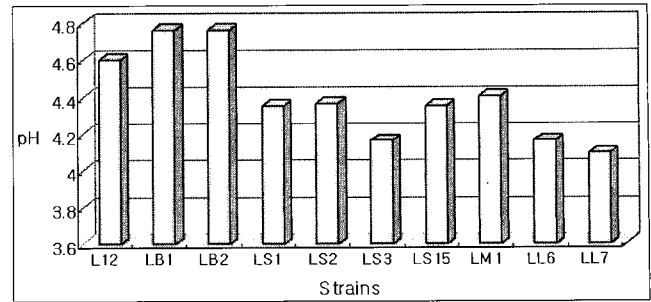


Fig. 3. The pHs of the various isolates culture after incubation in MRS broth at 37°C for 24 hr.

Hammes와 Vogel(1995)은 rRNA sequence 분석 결과를 바탕으로 발효 형식에 의한 분류는 A, B, C(obligately homofermentative, facultatively heterofermentative, obligately heterofermentative) 그룹을 사용하고, 계통학적 분류는 a, b, c(*Lactobacillus delbrueckii*, *L. caei-Pediococcus*, *Leuconostoc*) 그룹으로 분류할 것을 제시하였다. 이에 비추어 볼 때 발효 형식인 API 50 CHL kit로 동정된 LL6인 *L. acidophilus* 균은 A 그룹에 속하지만 16S rRNA sequence 방법에 의한 계통학적 분류에는 어느 그룹에 속하는지에 대한 연구도 필요하다.

Fig. 3은 분리된 10개의 유산균을 MRS broth에서 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 pH로 4.09~4.76을 보여주고 있다. 이런 결과는 Lee 등 (2002)이 토종닭에서 분리한 6균주를 MRS broth에서 3일간 배양한 후 유산균 pH가 3.47~4.50으로 나타난 것에 비해 전반적으로 약간 높게 나타났다. Bae 등(2004)은 skim milk에서 *L. casei*를 배양하면서 3시간 간격으로 pH를 조사한 결과 배양시간에 따라 pH가 감소하여 15시간 때에는 4.48을 나타내었다고 보고하고 있다. 따라서 본 실험의 결과와 Lee 등(2002)의 결과와 pH가 차이가 나는 것은 배양시간의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

소의 분변에서 분리된 유산균 중 LL6인 *L. acidophilus* 균주가 내산성, 내담즙성이 크고, 병원균에 대한 항균력이 우수한 능력을 가진 유산균으로 송아지에서 probiotic 균주로 활용될 수 있는 가능성이 큰 균주라고 생각된다. 새끼 돼지의 경우 *L. acidophilus* 균주가 돼지의 설사를 막는 작용이 있는 것으로 Kohler와 Bohl(1964)이 보고하였지만 Fuller (1989)에 의하면 장관 상피세포의 부착성은 같은 종간에도 차이가 있으므로 본 실험에서 분리된 *L. acidophilus* 균주에 대해 장관에서의 성장률 및 장관 상피세포의 부착성을 조사하고 한우 송아지 설사에 대해 효과적으로 방어하는 성질을 갖는지에 대한 연구가 더 필요하다고 생각된다.

요 약

한우와 홀스타인의 분변으로부터 MRS 배지와 LAPT 배

지를 이용하여 무작위 선발법으로 54균주의 유산균을 1차로 분리하였다. 1차로 분리된 54균주에 대해 내담즙성이 우수한 10균주를 분리한 다음 내산성을 조사한 결과 인공위액 pH 2.5에서 LS1, LS15 및 LL6 균주가 각각 66.5%, 82.6% 및 80.7%의 생존율을 나타내었다. *Sal. typhimurium*, *Sta. aureus* 및 *Cl. perfringens* 의 병원균에 대해 가장 큰 항균력을 보인 균주는 LL6와 LL7이었다. API CHL kit로 동정한 결과 LS1, LS2 및 LM1 균주는 모두 *L. fermentum*, LL6와 LL7 균주는 *L. acidophilus*, LS3 균주는 *L. plantarum*으로 각각 동정되었고, 나머지 4균주는 *Lactobacillus* spp. 로 동정되어 분리된 10균주 모두 안전성 있는 유산균임을 확인하였다. 10종류의 항생제에 대한 내성을 조사한 결과 ampicillin, amoxicillin과 erythromycin에 대해서는 감수성이 있으나 colistin과 ciprofloxacin에 대해 모두 내성을 나타내었다. LB1, LL6 및 LL7 균주는 gentamicin과 neomycin에 대해 내성을 보여 주었다. 분리 동정된 균주 중에 내산성, 내담즙성 및 병원성 균에 대한 특성을 기준으로 판단할 경우 probiotic 유산균으로 사용 가능성이 높은 것은 LL6인 *L. acidophilus*로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 상지대학교 교내 학술연구비지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Adams, M. R. and Marteau, P. (1995) On the safety of lactic acid bacteria from food. *Inter. J. Food Microbiol.* **27**, 263-264.
2. Ahn, C., Thompson, D. C., Duncan, C. and Stiles, M. E. (1992) Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* ca TC2R. *Plasmid* **27**, 169-176.
3. Atlas, R. M. (1993) Handbook of Microbiological Media. CRC Press, Boca Raton. pp. 765.
4. Bae, H. C., Paik S. H., and Nam, M. S. (2004) Fermentation properties of rice added yogurt made with various lactic acid bacteria. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **46**, 677-686.
5. Curragh, H. J. and Collins, M. A. (1992) High levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 31-36.
6. Dixon, B. (2000) Antibiotics as growth promoters : Risks and alternatives. *ASM News.* **66**, 264-265.

7. Fahy, V. A., Connaughton, D., Dresen, S. J., and Spicer, E. M. (1987) Preweaning colibacillosis. In: Manipulating pig production. APSA Committee(ed.), Austrian Pig Science Association Werribee. Victoria. Australia, pp. 176-188.
8. Fons, M., Hege, T., Ladire, M., Raibaud, P., Ducluzeau, R., and Maguin, E. (1997) Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid* **37**, 199-203.
9. Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
10. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1977) Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* **40**, 820-823.
11. Hammes, W. P. and Vogel R. F. (1995) The genus *Lactobacillus* In: The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Wood, B. J. and Holzapfel, W. H. N. (eds), Blackie Academic & Professional, Glasgow, Scotland Vol. 2, pp. 19-54.
12. Hardie, J. M. (1986) Genus *Streptococcus*, In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath P. H. A.(ed.), Williams & Wilkins, London, Vol. 2, pp. 1043-1047.
13. Havenaar, R., Brink, B. T., and Veid, J. H. J. I. (1992) Selection of strains for probiotic use. In: Probiotics : The scientific basis, Fuller R.(ed.) Chapman & Hall, London. pp. 209-224.
14. Heyman, M. and Menard, S. (2002) Probiotic microorganism: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1151-1165.
15. Kim, Y. M. (1999) The current status and prospect of using probiotics lactic acid bacteria in domestic animals. *Bioindustry News(Kor.)* **12**, 23-28.
16. Kohker, E. M. and Bohl, E. M. (1964) Prophylaxis of diarrhea in newborn pigs. *J. American Vet. Med. Association.* **144**, 1794-1797.
17. Lee, J. Y., Hwang, K. Y., Kim, H. S., Kim, K., and Sung, S. I. (2002) Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting gastro-intestinal pathogenic bacteria of domestic animal. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 129-134.
18. Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. (1965) Probiotics : Growth promoting factors produced by microorganism, *Science* **147**, 747-748.
19. Mundt, J. O. (1986) Enterococci, In: Bergey's Manual of

- Systematic Bacteriology. Sneath P. H. A.(ed.), Williams & Wilkins, London. Vol. 2, pp. 1063-1065.
20. Mustapha, A., Jiang, T., and Savaiano, D. A. (1997) Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **80**, 1537-1545.
 21. Park, J. C., Kim, I. S., Kwon, S. K., Noh, J. M., Lee, S. M., Park, J. P., Lee, W. K., and Ryu, S. R. (2000) Prevalence of anti-biotic-resistant strains among bacteria isolated from bovine mastitis, swine diarrhea, and swine pneumonia. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 189-194.
 22. Parker, R. B. (1974) The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health* **29**, 4-8.
 23. Piva, G., Belladonna, S., Fusconi, G., and Sicbaldi, F. (1993) Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components and manufacturing properties. *J. Dairy Sci.* **76**, 2717-2722.
 24. Rose, A. H. (1980) Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biology and Activities of Yeast*. Skinner, F. A., Passmore, S. M., and Daven, R. R.(eds.), The Society for Applied Bacteriology Symposium Series. Academic Press, London, Vol. 9, pp. 103.
 25. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* **84**, 197-215.
 26. Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Vos de, W. M., Fonde'n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., and Sandholm, T. M., (1998) Demonstration of safety of probiotics - a review. *Inter. J. Food Microbiol.* **44**, pp. 93-106.
 27. Sanders, M. E. (2000) Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* **130**, 384S-390S.
 28. Sedlacek, O. and Rucki, J. (1976) Incidence of inhibitory substance-residues in meat and organs of slaughter calves fed with milk feed mixtures. *Vet. Med.(Praha)* **21**, 137-148.
 29. Simpson, K. L., Pettersson, B., and Priest, F. G. (2001) Characterization of lactobacilli from Scotch malt whisky distilleries and description of *Lactobacillus ferintoshensis* sp. nov., a new species isolated from malt whisky fermentations. *Microbiol.* **147**, 1007-1016.
 30. Tannock, G. W. (1983) Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota, In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, Hentges, D. J. (ed.), Academic Press, New York. pp. 517-539.
 31. Tannock, G. W., Luchansky, J. B., Miller, L., Connell, H., Thode-Andersen, S., Mercer, A. A., and Klaenhammer, T. R. (1994) Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. *Plasmid* **31**, 60-71.
 32. Wallace, R. J. and Newbold, C. J. (1992) Probiotics for ruminant, In : *Probiotics : The scientific basis*. Fuller, R. (ed.), Chapman & Hall, London. pp. 317-353.
 33. Wu, J. F. (1987) The microbiologist's function in developing action specific microorganisms. In: *Biotechnology in the feed industry*. Lyons, T. P.(ed.). Allettech, Inc. Nicholas ville, Kentucky. pp. 181.

(2004. 12. 29. 접수 ; 2006. 2. 17. 채택)