

여러 분리원으로부터 유방염 원인균에 대한 항균력을 가진 유산균의 분리

이나경 · 최인애 · 박용호¹ · 김종만² · 김재명² · 정석찬² · 백현동*

건국대학교 축산식품생물공학과, ¹서울대학교 수의과대학, ²국립수의과학검역원

Screening of Antimicrobial Lactic Acid Bacteria against Bovine Mastitis

Na-Kyoung Lee, In-Ae Choi, Yong-Ho Park¹, Jong-Man Kim², Jae-Myung Kim²,
Suk-Chan Jung², and Hyun-Dong Paik*

Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

ABSTRACT

Bovine mastitis is costly infectious disease of dairy cattle, being responsible for significant economic losses all over the world. Also, mastitis has troubled about resistance to antibiotics. The purpose of this study was to screen a novel antimicrobial strain from various sources (raw milk and feeds (from farm of Paju, Dangjin, and Hwasung), commercial milk, Korean traditional fermented foods, and chicken feces). The isolate was screened using triple agar layer method and deferred method was used for confirmation of antimicrobial effect. Seventy six of isolates were screened using triple agar layer method. In these strain, 42 isolates were shown a broad spectrum of antimicrobial activity against mastitis pathogens. Especially, fourteen isolates were shown over 20 mm inhibition zone against *S. aureus* ATCC 25923. These results suggest that these novel antimicrobial strains could be used for the alternative of antibiotics.

Key words : screening, bovine mastitis, antimicrobial activity, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

서 론

전세계적으로 젖소 유방염은 젖소의 세균성 질병 중에서 가장 높은 분포율을 나타내며, 유량 및 유질 감소 등으로 인해 젖소를 사육하는 축산 농가에서 가장 큰 경제적 손실을 가져오는 질병으로 조사되고 있다. 젖소 유방염 원인균으로 세균, 마이코플라스마, 효모와 조류 등 135종 이상이지만, 주요 원인균으로는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis*로 보고되고 있다(Bradley, 2002; Britten, 1998; Jain *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 2007B; Smith *et al.*, 1993; Watts, 1988). 젖소의 유방염은 대부분의 목장에서 연중 발생하고 있기 때문에 치료를 위해서 지속적으로 다양한 항생제가 사용되고 있다. 즉, 유방염 원인균

및 항생제 감수성 양상은 지역 또는 조사시기, 사양환경 등에 따라 다양하게 나타날 수 있으나, 일반적으로 젖소 사육 농가에서 유방염 발생시 원인균 분리에 의한 항생제 감수성 시험의 결과 없이 임의로 항생제를 선택하기 때문에 유방염 치료 효과가 낮고 항생제 내성 발현 가능성이 증가하여 어려움이 매우 큰 실정이다(McDonald *et al.*, 1975; Lee *et al.*, 2007A). 이러한 항생제 내성 균주의 출현으로 인해, 더욱 강력한 항생제 또는 내성을 일으키지 않는 유방염 치료제로서 동물, 식물 및 그 밖에 천연물 유래 항균제의 개발이 연구되고 있다. 한약재를 이용하여 직접 유방염 원인균에 적용한 예와 β -carotene을 이용하여 면역활성을 향상시키므로 유방염 발병을 줄이는 방안과 오존 가스처리 및 오존 처리된 유지의 이용 등이 검토되고 있다(Jo *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2006). *Lactobacillus bulgaricus*로부터 생산된 박테리오신의 유방염 원인균에 대한 항균력도 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2004). 또한 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)와 vancomycin-resistant enterococci(VRE)에 대한 항균성실험으로 *Eremophila alternifolia*,

*Corresponding author : Hyun-Dong Paik, Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-2049-6011, Fax: 82-2-455-3082, E-mail: hdpaik@konkuk.ac.kr

Amyema quandong, *Acacia kempeana*와 같은 식물에서 추출하여 항균효과를 확인한 사례 등이 있다(Palombo and Semple, 2002).

유산균은 probiotic 생균제로 이용되고 있으며, 이는 장내 균총을 정상화시켜 생산성 및 사료 이용률을 증진시키는 것으로 알려져 있다(Bongaerts and Severijnen, 2001). 식품이나 사료에서 부패를 막고 맛을 개선시킬 뿐만 아니라, 가축의 장내에서 영양분의 흡수 촉진, 변비 개선, 항암 작용, 면역기능 강화 및 항 설사작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*에 대해 일부 유산균이 항균력을 나타내는 것으로 보고되고 있는데, 이들은 유기산의 생성에 의한 pH 감소 및 생육 기질에 대한 경쟁 또는 박테리오신이라는 천연 항균성 단백질을 생산하기 때문이다(Kim *et al.*, 2004). 그 예로 소의 원유에서는 박테리오신을 분비하는 *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. 등이 가장 많이 분리가 되는 것으로 확인되고 있고, 많은 연구가 수행된 nisin, lacticin 481, garvecin L1-5 등과 같은 박테리오신 생산균주들은 우유에서 분리가 된 것들이다(O'Sullivan *et al.*, 2003).

단백질의 발현을 조절하거나 박테리오신 또는 박테리오신 생산균주를 사람 및 동물의 치료에 적용하는 등 다양한 연구가 수행되고 있는 실정이며, 항생제 내성균 출현을 감소시킬 수 있는 대안으로 다양한 분야에서 논의가 되고 있다.

본 연구에서는 젖소 축산가에서 가장 큰 경제적 손실을 나타내는 질병인 젖소 유방염의 치료제로서 그리고 항생제 대체제로서 원유, 시유, 전통 발효식품 등으로부터 유방염 원인균에 항균력을 가지는 유산균을 광범위하게 분리하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 유산균 분리

과주, 당진, 화성 일대의 농장으로부터 원유, 시유, 사일리지, 전통발효식품, 닭 분변 등에서 triple agar layer method를 이용하여 유산균을 분리하였다(Table 1). 먼저 soft agar(0.8% agar, lactobacilli MRS broth, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 시료희석액을 넣고 균현 후, 위층에 무균층의 soft agar를 증층하여 35°C에 배양하였다. 배양

Table 1. Antimicrobial spectrum of activity of isolates from raw milk by deferred method

Isolate no.	Indicator strain											
	S. aureus 1573	S. aureus 1572	S. aureus 1512	S. aureus 1504	Strep. uberis E290	Strep. oralis E291	E. gallinarum E362	E. faecium E363	E. faecium E372	S. aureus ATCC 25923	Strep. epidermidis ATCC 12228	Strep. agalactiae ATCC 13813
Isolate from Paju farm												
21-1	4	22	19	5	2	24	12	8	ND	10	6	2
21-2	14	4	8	4	5	10	12	10	5	16	4	5
21-3	0	9	2	20	ND	ND	16	8	9	ND	4	ND
Isolate from Dangjin farm												
53	7.5	5.5	11.5	10.5	27.5	23.5	2	1.3	2.5	21	0	17
67-2	5	3.8	9	5.3	24.5	33	6	4	5.5	13	4	7
69	7.3	5.3	12	8.3	25	24.5	6	3	4	20	4	9
70	7.3	3.8	9.5	6	32.5	29	6.5	1.5	6	14	0.5	8
71-2	7.8	5.3	10	7.3	33	12	7.5	3.5	10	17	5	10
Isolate from Hwasung farm												
74-2	7.8	2.5	10	7.3	30.5	12.5	4	8	10	11	4	16
77-2	7.5	4.8	13	6.5	ND	11.5	11	3	7	17	5	16
79	9.75	5.25	11	7.25	24	22	5	3	11	22	8	20
79-2	10.5	7.25	12.5	6.8	37	8	9	5	5	19	20	12
84-1	15.3	8.5	17.5	11.8	ND	7	7.5	9	10	18	12	19
85-2	7.5	5.5	9.8	5.8	19.5	12	5	9	5	16	7	17
87-1	7.3	6.3	10.5	7	19	15	5	2	4	15	2	11
91-1	7.3	4.3	10.8	7.5	22.5	16	4	5	5	16	2	11
91-3	8.3	4.8	10.8	7.5	24	17.5	3	9	4	20	3	12
91-4	9	5.5	11.5	7	22.5	18	5	4	4	14	3	10
92-4	7	3.5	14.3	6.5	ND	21	6	7	5	15	4	0
93-3	6.5	4	11.3	8	14	19	5	7	4	14	3	10
93-4	6	3.3	11.8	7.3	19.5	15.5	3	1.8	4	13	4	13
94-1	6.5	3.3	11.5	6	25	18	5	2	3	13	4	14
94-3	5.5	4.5	8.5	5.8	29.5	23	0	1.5	3	12	3	13

S., *Staphylococcus*; Strep., *Streptococcus*; E., *Enterococcus*; ND, not determined.

후, indicator 균을 접종한 soft agar를 다시 중층한 후, 배양하였다. 저해환(inhibition zone)이 생긴 균을 streaking하여 순수 분리하였다

사용 균주 및 배지

분리된 유산균과 본 실험실에서 확보되어 있는 유산균을 MRS 배지에서 배양하고, -70°C deep freezer에서 20% glycerol을 넣어 보관하였다. 항균활성 측정을 위한 indicator 균으로 일부 *Staphylococcus*, *Enterococcus* 및 *Streptococcus* 균은 국립수의과학검역원에서 우리나라 젖소의 유방염 원인균으로 분리된 균을 제공받아 사용하였다. 또한 표준 균주로서 항생제 내성균주인 *S. aureus* ATCC 25923, *Strep. epidermidis* ATCC 12228 균주는 한국미생물보존센터(KCCM, Korea Culture Center of Microorganisms)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 indicator균의 사용된 배지는 tryptic soy broth(TSB, Difco, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 35°C에 배양하였다.

항균활성 측정

유방염 원인균에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 deferred method를 사용하였다. Triple agar layer method를 통해 얻은 균과 본 실험실에서 확보 중인 균주를 10 mL에 각각 한 백금이를 접종하여 최적 배양온도에서 12시간 배양한 후, 건조된 MRS agar plate 표면에 3 µL를 spot하고 35°C에서 24시간 배양하였다. Indicator 균을 접종하여 배양한 후, 이 배양액의 100 µL를 7 mL soft TSA(0.8%) agar에 접종하여 spot한 plate에 overlay하고, 최적온도에서 24시간 배양하여 저해환의 크기를 mm 단위로 측정하였다.

결과 및 고찰

다양한 시료부터 유방염 원인균에 항균력을 가진 유산균의 분리

과주, 당진, 화성에서 얻은 원유와 시유, 김치, 젓갈 등

의 전통식품 및 사료 등 다양한 시료로부터 균주를 스크리닝하였다. 항균력을 가진 유산균의 선별적인 분리방법인 triple agar layer method를 이용해서 항균력을 나타내는 균주를 선택적으로 분리하였다. 우유로부터 40균주, 전통식품으로부터는 23균주를 분리하였다. 이 외에도 silage와 옥수수가루, 소맥피 등에서 7균주를 분리하였고, 닭 분변으로부터 6균주를 분리하였다.

분리된 유산균의 각종 유방염 원인균에 대한 항균활성 검증

젖소의 유방염은 대부분의 목장에서 연중 발생하고 있기 때문에 치료를 위해서 지속적으로 다양한 항생제가 사용되고 있다. Triple agar layer method를 통해 분리된 유산균의 항균활성을 확인하기 위해 deferred method를 이용하여 다양한 유방염 원인균에 대해 항균력을 확인하였는데, 확보된 유방염 원인균들은 대부분이 항생제 내성균으로 일반 미생물보다 항균력이 없거나 작게 나타났다. 스크리닝한 균주 중 deferred method를 통해 항균력이 확인된 균주는 우유로부터 23균주(Table 1), 전통식품으로부터 6균주였다(Table 2). 이들 중 항균효과가 비교적 큰 균주로 SA131, NK34를 유방염 원인균의 표준균주 *Strep. epidermidis* ATCC 12228과 *S. aureus* ATCC 25923에 대한 항균력으로 Fig. 1에 나타내었다. 사료에서는 7균주, 닭 분변에서는 6균주가 항균력을 보이는 것으로 확인되었다(Table 3, 4). 항생제 내성균인 *S. aureus* ATCC 25923에 대해 직경 20 mm 이상의 억제환을 나타내는 균주로는 14 균주를 얻었다. MRSA에 효과가 있는 가자(*Terminalia chebula*) 추출물의 경우, 10-20 mm의 억제환을 나타내었다(Kang et al., 2005). 그 밖에 *Strep. epidermidis* ATCC 12228에서도 직경 20 mm 이상의 억제환을 나타내는 균주로는 SA131균과 우유에서 분리한 79-2균으로 2균주 밖에 나타나지 않았다. 시험된 균주가 대부분이 항생제 내성이라 항균성 유산균을 분리하는데 어려움이 있었다. 이들 항균활성을 나타내는 물질로는 주로 젖산, 과산화수소, 박테리오신(Kim et al., 2004) 등이 있는 것으로 보고되어

Table 2. Antimicrobial spectrum of activity of isolates from traditional fermented foods and bacteriocin producer by deferred method

Isolate no.	Indicator strain											
	<i>S. aureus</i> 1573	<i>S. aureus</i> 1572	<i>S. aureus</i> 1512	<i>S. aureus</i> 1504	<i>Strep. uberis</i> E290	<i>Strep. oralis</i> E291	<i>E. gallinarum</i> E362	<i>E. faecium</i> E363	<i>E. faecium</i> E372	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Strep. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Strep. agalactiae</i> ATCC 13813
SA131	36	20	16	ND	9	30	24	16	17	15	10	25
NK24	4	16	10	3	7	ND	18	20	4	30	5	14
NK34	12	20	16	4	5	ND	18	20	4	4	4	16
311	ND	6	ND	ND	ND	ND	14	5	5	ND	ND	ND
32	12	8.3	12.3	10.3	31	25	7	5	8	26	9	17
44-1	5.5	5.5	8.8	8.5	24	21.5	4	7	ND	17	0.7	0.7

S., *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *E.*, *Enterococcus*; ND, not determined.

Table 3. Antimicrobial spectrum of activity of isolates from silage by deferred method

Isolate no.	Indicator strain											
	<i>S. aureus</i> 1573	<i>S. aureus</i> 1572	<i>S. aureus</i> 1512	<i>S. aureus</i> 1504	<i>Strep. uberis</i> E290	<i>Strep. oralis</i> E291	<i>E. gallinarum</i> E362	<i>E. faecium</i> E363	<i>E. faecium</i> E372	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Strep. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Strep. agalactiae</i> ATCC 13813
251	5	6	ND	ND	ND	ND	6	8	ND	ND	ND	ND
252	14	8	ND	0	ND	ND	0	4	0	15	0	ND
253	5	16	ND	13	ND	25	24	10	10	30	ND	ND
261	13	10	0	16	7	34	16	14	21	34	12	10
262	13	20	22	18	15	40	13	24	20	24	10	14
263	12	16	0	17	13	28	12	24	8	28	7	13
265	12	16	21	16	0	30	24	10	12	30	ND	ND

S., *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *E.*, *Enterococcus*; ND, not determined.

Table 4. Antimicrobial spectrum of activity of isolates from chicken feces by deferred method

Isolate no.	Indicator strain											
	<i>S. aureus</i> 1573	<i>S. aureus</i> 1572	<i>S. aureus</i> 1512	<i>S. aureus</i> 1504	<i>Strep. uberis</i> E290	<i>Strep. oralis</i> E291	<i>E. gallinarum</i> E362	<i>E. faecium</i> E363	<i>E. faecium</i> E372	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Strep. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Strep. agalactiae</i> ATCC 13813
A31	15	10	15.5	11	ND	ND	1.2	4	ND	2	0.5	1.2
B12	11.5	10	12.5	10.8	ND	ND	ND	6	9	0	0.85	1.2
B23	9.5	9	13.5	11.5	3	30	1.3	7	ND	32	14	10
B32	22	15	9	ND	0	40	20	4	16	40	0	5
C23	0	23	7	12	0	25	15	5	10	26	8	0
C31	12	11	12.8	8	ND	ND	1.2	3	ND	16	1	0.9

S., *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *E.*, *Enterococcus*; ND, not determined.

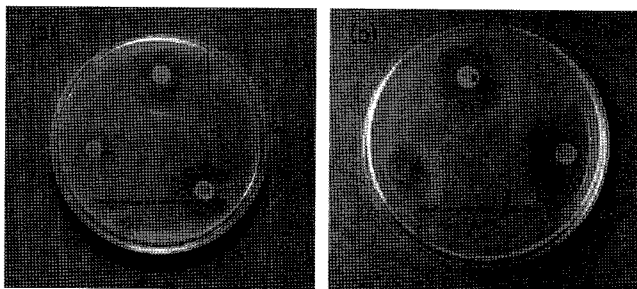


Fig. 1. Antimicrobial activity of isolates against (a) *Strep. agalactiae* ATCC 12228, (b) *S. aureus* ATCC 25923 by deferred method.

있으며, 이들 중에 의한 영향이라 볼 수 있다. 차후의 실험을 통해 이들 유산균이 항균성을 나타내는 물질을 규명할 필요가 있으리라 생각된다. 이들의 결과를 토대로 볼 때, GRAS(generally recognized as safe)한 유산균으로부터 천연 항균성을 확인할 수 있었다는 점에서 천연 무독성 항균물질의 개발의 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 원유와 사일리지, 전통발효식품 등으로부터 유방염 원인균에 대한 항균성을 가지는 유산균을 분리하였고, 이들 중 원유에서는 79, 91-3 균주와 전통발효식

품에서는 SA131, NK24, NK34, 32, 44-1 균주, 사일리지에서는 253, 261, 262, 263, 265 균주, 닭분변에서 B32, C23 균주에서 유방염 원인균에 대한 비교적 높은 항균력을 확인할 수 있었다. 이를 통해 새로운 항생제 대체물질의 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 국립수의과학검역원에서 시행한 2007년도 용역사업(과제명: 유방염 원인균에 항균효과가 우수한 박테리옌 개발 및 활용) 및 교육부 두뇌한국21사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Bongaerts, G. P. A. and Severijnen, R. S. V. M. (2001) The beneficial, antimicrobial effect of probiotics. *Med. Hypotheses* **56**, 174-177.
- Bradley, A. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* **164**, 116-128.
- Britten, A. M. (1998) Delivering mastitis control systems to your clients. *Large Anim. Pract.* **19**, 14-21.
- Jain, N. C. (1979) Common mammary pathogens and factors

- in infection and mastitis. *J. Dairy Sci.* **62**, 128-134.
5. Jo, S. N., Liu, J., Lee, S. E., Hong, M. S., Kim, D. H., Kim, M. C., Cho, S. W., and Jun, M. H. (2005) A therapeutic effect of ozonated oil on bovine mastitis. *J. Vet. Clin.* **22**, 318-321.
 6. Kang, H. M., Moon, J. S., Jang, G. C., Kim, J. M., Song, M. D., and Yang, S. Y. (2005) Antibacterial effects of *Terminalia chebula* extract against major pathogens and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bovine mastitis milk. *Korean J. Vet. Res.* **45**, 113-119.
 7. Kim, H. J., Kim, J. H., Son, J. H., Seo, H. J., Park, S. J., Park, N. S., and Kim, S. K. (2004) Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 503-508.
 8. Kwon, H. J., Liu, J., Jo, S. N., Song, K. H., Kim, D. H., Jun, M. H., Cho, S. W., Kim, M. C., and Yoon, H. I. (2005) Therapeutic effect of ozone gas on bovine mastitis. *J. Vet. Clin.* **22**, 314-317.
 9. Lee, E. S., Kang, H. M., Chung, C. I., and Moon, J. S. (2007A) Antimicrobial susceptibility and prevalence of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis. *Korean J. Vet. Res.* **47**, 67-75.
 10. Lee, G., Kang, H. M., Chung C. I., and Moon, J. S. (2007B) Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis milk. *Korean J. Vet. Res.* **47**, 33-41.
 11. McDonald, J. S. (1975) Effect of milking machine design and function on new intramammary infection. *J. Milk Food Technol.* **38**, 44-51.
 12. McDonald, J. S., McDonald, T. J., and Anderson, A. J. (1977) Antimicrobial sensitivity of aerobic gram-negative rods isolated from bovine udder infections. *Am. J. Vet. Res.* **38**, 1503-1507.
 13. Nam, H. M., Moon, J. S., Joo, Y. S., Park, Y. H., and Han, H. R. (2006) Effects of injectable β -carotene on mastitis in dairy cows. *Korean J. Vet. Res.* **46**, 149-158.
 14. O'Sullivan, L., Ryan, M. P., Ross, R. P., and Hill, C. (2003) Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lactacin 3147 and lactacin 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3681-3685
 15. Palombo, E. A. and Semple, S. J. (2002) Antibacterial activity of Australian plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). *J. Basic Microb.* **42**, 444-448.
 16. Smith, K. L. and Hogan, J. S. (1993) Environmental mastitis. *Vet. Clin. N. Am.-Food A.* **9**, 489-498.
 17. Watts, J. L. (1988) Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **16**, 41-66.

(2007. 11. 7. 접수/2007. 12. 14. 채택)