

유아 분변에서 분리한 *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203의 잠재적 프로바이오틱 특성

이승훈 · 양은희 · 권혁상 · 강재훈 · 강병화*
일동제약(주) 중앙연구소

Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus johnsonii* IDCC 9203 Isolated from Infant Feces. Lee, Seung-Hun, Eun-Hee Yang, Hyuk-Sang Kwon, Jae-Hoon Kang, and Byung-Hwa Kang*. *ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co., Ltd., Hwaseong 445-170, Korea* – A strain IDCC 9203 isolated from infant feces was identified as *Lactobacillus johnsonii* on the basis of 16S rDNA sequence analysis. *L. johnsonii* IDCC 9203 was highly resistant to acid (MRS broth at pH 2.3) and bile (MRS broth with 0.3% oxgall). The antibacterial activities of *L. johnsonii* IDCC 9203 was examined against *Salmonella typhimurium* KCTC 2054. The growth of *S. typhimurium* KCTC 2054 was inhibited by the cell-free culture supernatant (at pH 4.0) of *L. johnsonii* IDCC 9203 as well as by the respective control (MRS broth at pH 4.0). Antimicrobial effect against *S. typhimurium* KCTC 2054 of *L. johnsonii* IDCC 9203 was probably due to the lactic acid. By an *in vitro* cell adhesion model, *L. johnsonii* IDCC 9203 preincubated or coinoculated with Caco-2 cells reduced the adhesion of *S. typhimurium* KCTC 2054 to Caco-2 cells by 74% or 47.1%, respectively. Also in an *in vivo* model, *L. johnsonii* IDCC 9203 was colonized in mice intestines which were disrupted by ampicillin treatment. Its proliferation in the mice intestines reduced abnormal salmonella growth from 10^9 CFU/g feces to 10^5 CFU/g feces as an indigenous level. The results obtained in this study suggest that *L. johnsonii* IDCC 9203 may be a potential probiotic strain.

Key words: *Lactobacillus johnsonii*, *Salmonella typhimurium*, probiotics, Caco-2 cells

서 론

인체의 장내에는 bacteroides, eubacteria, bifidobacteria, lactobacilli 등 400여종 이상의 미생물들이 서식하고 있다 [9]. 건강한 사람의 장에는 유익균과 유해균이 균형을 이루고 서식하고 있는데 유해환경, 비위생적 음식 섭취, 항생제 복용 등으로 장내균총이 교란되면서 유익균인 유산균은 감소하고 대장균, 살모넬라 같은 유해균은 증가하게 된다.

프로바이오틱스(probiotics)는 사람이나 동물의 위장관에 서식하면서 사람이나 동물에 유익한 효과를 나타내는 미생물제제로, 유산균이 대표적이다[5]. 유산균은 유제품을 생산하는 낙농산업에 널리 사용되어 온 미생물로, 장내 세균총의 균형 유지, 유해 세균의 증식 억제, 설사 예방, 장내 상피세포 보호, 독성 물질의 흡수 저해, 발암 억제 등 다양한 프로바이오틱 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다[8, 11, 25]. 유산균이 프로바이오틱스로 작용하기 위해서는 위산과 담즙산에 대한 내성이 있어 위장관에서 서식할 수 있어야 하고 위장관의 상피세포에 정착하여 증식하면서 유해세균에 대한

길항력이 있어야 한다[13, 16, 19].

Makras 등[14]은 *Lactobacillus johnsonii* La1이 박테리오파지와 같은 항균물질을 생산하여 *Salmonella typhimurium* SL1344의 생육을 저해한다고 하였으며, Maragkoudakis 등 [15]은 유제품에서 분리한 lactobacilli가 박테리오파지와 같은 항균물질을 생산하지 않더라도 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*이 Caco-2 cells에 부착되는 것을 경쟁적으로 억제하여 증식을 저해할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 모유 영양유아의 분변으로부터 *Lactobacillus johnsonii*를 분리하여 프로바이오틱 특성을 조사하였으며, 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주 및 배지

모유 영양아 분변으로부터 분리한 IDCC 9203과 유제품에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*는 기본적으로 de Man-Rogosa-Sharpe(MRS, Becton, Dickinson and Company, USA) 배지를 이용하여 배양하였다. 항균활성 측정용 지시균으로 사용한 *Salmonella typhimurium* KCTC 2054는 생물자원센터로부터 분양받았으며, Brain

*Corresponding author

Tel: 82-31-371-2891, Fax: 82-31-371-2900

E-mail: bhkang@ildong.com

Heart Infusion(BHI, Becton, Dickinson and Company, USA) 배지를 이용하여 배양하였다. 동물시험에서 분변으로부터의 lactobacillus 검출은 lactobacillus selective agar (LBS agar, Becton, Dickinson and Company, USA)를 사용하였고 salmonella 검출은 salmonellae and shigella selective agar(SS agar, Becton, Dickinson and Company, USA)를 사용하였다. 부착능 시험에 사용된 Caco-2 cells는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다.

내산성 및 내담즙산성

내산성 시험은 10% HCl과 NaOH 용액을 사용하여 pH 2.3 및 7.0으로 각각 조정된 MRS 액체배지에 IDCC 9203 배양액을 10% 접종하고, 37°C에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

내담즙산성 시험은 bile(oxgall, Sigma-Aldrich, USA) 0.3%가 첨가된 MRS 액체배지에 IDCC 9203 배양액을 10% 접종하여 37°C에서 5시간 배양한 후, bile을 첨가하지 않은 대조군의 생균수와 비교하여 생존율을 계산하였다.

균주의 동정

IDCC 9203의 동정을 위해 16S ribosomal DNA 염기서열 분석을 기초로 한 계통유전학적 시험을 실시하였다. 이를 위해, *Escherichia coli*의 16S rDNA 서열을 바탕으로 primer(Forward primer 5'-GGGGATCCAGAGTTGATCCTGGCTCA-3', Reverse primer 5'-GGGCTCGAGTACCTTGTTACGACTTACC-3')를 제작한 후 IDCC 9203 genomic DNA를 추출하고 PCR로 16S rDNA를 증폭하여 염기서열을 결정하였다. 이 서열을 기반으로 NCBI의 BLAST program으로 유사성이 높은 *Lactobacillus* 균주들의 서열들을 선별하고 Clustal X (Des Higgins, Germany)로 다중 정렬을 실시한 후 계통유전수를 작성하고 Saito 등의 neighbor-joining 방법으로 그 위치를 확인하였다[18]. 또한, BLAST 2 program을 이용한 쌍정렬을 실시함으로써 동일종에 속하는 서열들과의 상동성을 비교하였다.

항생제 감수성

항생제 감수성을 확인하기 위하여 disc diffusion method를 사용하였다[6]. 항생제 감수성 판독용 평판배지는 MRS agar(agar 1.5%)를 직경 90 mm petri dish에 15 mL 분주하여 bottom agar를 만들고, MRS agar(agar 0.7%) 20 mL에 IDCC 9203의 배양액 1 mL를 혼합한 top agar 4 mL를 bottom agar 위에 분주하여 제조하였다. 항생제가 포함된 19종의 Sensi-Disc™(Becton, Dickinson and Company, USA)를 평판배지 위에 올려 놓고 anaerobic jar(BBL, Becton, Dickinson and Company, USA)에 담아 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양이 종료되면 항생제 디스크 주변에 형성된 투명대의 직경을 측정하여 감수성을 판단하였다.

*S. typhimurium*에 대한 항균력 측정

항균력 시험은 시험균으로 IDCC 9203, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*를 사용하였고, 지시균으로 *S. typhimurium* KCTC 2054를 사용하였다. 시험균을 MRS 액체배지에서 37°C, 18시간 배양한 후 원심분리하여 상층액을 수거하였고, 10% HCl과 10% NaOH 용액을 사용하여 pH 4.0과 pH 7.0으로 각각 조정된 상층액을 항균력 시험용 시료액으로 하였다. 대조군으로는 시험균을 배양하지 않은 MRS 액체배지를 lactic acid를 이용하여 pH 4.0으로 조정된 시료와 10% NaOH 용액을 사용하여 pH 7.0으로 조정된 시료를 조제하였다. 준비된 각각의 시료 1 mL와 BHI 액체배지 1 mL로 조성된 배지에 *S. typhimurium* KCTC 2054 배양액을 10%(v/v) 접종하고 37°C에서 8시간 배양한 후 *S. typhimurium* KCTC 2054 생균수를 측정하였다.

In vitro 부착능

Caco-2 cells에 대한 부착능 시험은 시험균으로 IDCC 9203, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*를 사용하였고, 지시균으로는 *S. typhimurium* KCTC 2054를 사용하였다. 부착능 시험은 시험균과 *S. typhimurium* KCTC 2054 각각의 부착능 정도를 비교한 시험, 시험균을 Caco-2 cells에 먼저 부착시킨 후 *S. typhimurium* KCTC 2054를 부착시키는 시험, 시험균과 *S. typhimurium* KCTC 2054를 동시에 처리하여 경쟁적으로 부착시키는 시험 등 3가지 방법으로 구분하여 진행하였다. Caco-2 cell monolayer는 Caco-2 cells를 10%(v/v) fetal calf serum과 20 uL/mL의 gentamicin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Hyclone, USA)에 1.2×10^5 cells/mL 농도로 접종하고 six-well tissue culture plate(Becton, Dickinson and Company, USA) well 당 1 mL 분주하여 7일간 배양한 후, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하여 제조하였다. 시험균 및 *S. typhimurium* KCTC 2054의 시료는 각각 MRS와 BHI 배양액 10 mL를 원심분리하여 균체를 회수하고 PBS로 2회 세척한 다음 1 mL PBS에 재현탁하고 serum-free한 DMEM에 1×10^8 CFU/mL 농도로 희석하여 조제하였다. 모든 반응은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 실시하였으며 시험균은 MRS 평판배지에서 생균수를 측정하였고 *S. typhimurium* KCTC 2054는 BHI 평판배지에서 측정하였다.

시험균과 *S. typhimurium*의 부착능 비교

시험균 및 *S. typhimurium* KCTC 2054 시료액 1 mL를 Caco-2 monolayer가 형성된 각 wells에 넣고 90분간 반응시켰다. 반응 후 상층액을 제거하고 Caco-2 cells를 PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 시험균 및 *S. typhimurium* KCTC 2054를 제거하였다. Caco-2 cells에 부착된 시험균 및 *S. typhimurium* KCTC 2054의 생균수를 측정하기 위해

Tween 80(0.04%, w/v) 1 mL를 가하여 시험균 및 *S. typhimurium* KCTC 2054를 회수하였다. 시험균 및 *S. typhimurium* KCTC 2054의 Caco-2 cells에 대한 부착율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Caco-2 cells 부착율(\%)} = [\text{부착 균수}/\text{초기 처리균수}] \times 100$$

시험균 전처리에 따른 *S. typhimurium*의 부착능 평가

시험균 시료액 1 mL를 Caco-2 monolayer가 형성된 각 wells에 넣고 60분간 반응시켰다. 반응 후 상층액을 제거하고 PBS 로 2회 세척한 다음 *S. typhimurium* KCTC 2054 시료액 1 mL를 가하여 90분간 반응시켰다. 대조군으로는 시험균 시료액 대신 DMEM을 1 mL 처리하고 동일하게 반응시켰다. 반응 후, 상층액을 제거하고 Caco-2 cells를 PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 *S. typhimurium* KCTC 2054를 제거하였다. Caco-2 cells에 부착된 *S. typhimurium* KCTC 2054의 생균수를 측정하기 위해 Tween 80(0.04%, w/v) 1 mL를 가하여 *S. typhimurium* KCTC 2054를 회수하였다. *S. typhimurium* KCTC 2054의 부착 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{S. typhimurium 부착 저해율(\%)} = [1 - (\text{시험균 처리시의 S. typhimurium 부착 균수} / \text{DMEM 처리시의 S. typhimurium 부착 균수})] \times 100$$

시험균과 *S. typhimurium*의 동시 부착(coincubation)에 따른 부착능 비교

시험균 시료액 1 mL와 *S. typhimurium* KCTC 2054 시료액 1 mL를 각각 혼합하고 Caco-2 monolayer가 형성된 각 wells에 혼합액 1 mL를 넣어 90분간 반응시켰다. 대조군으로는 시험균 시료액 대신 DMEM을 1 mL 사용한 것으로 하였다. 반응 후 상층액을 제거하고 Caco-2 cells를 PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 시험균과 *S. typhimurium* KCTC 2054를 제거하였다. Tween 80(0.04%, w/v) 1 mL를 가하여 Caco-2 cells에 부착된 *S. typhimurium* KCTC 2054를 회수하고 생균수를 측정하였다. *S. typhimurium* KCTC 2054의 부착 저해율은 상기와 같이 계산하였다.

In vivo 장 정착성 및 salmonella 생육 억제능

IDCC 9203의 in vivo 장 정착성, salmonella 생육 억제능, 다른 장기로의 전이 여부를 평가하기 위하여 Plant 등[17]의 방법을 변형하여 동물 실험을 진행하였다. 실험동물은 4주령된 ICR 마우스를 시험군당 5마리씩 사용하였다. 시험군은 IDCC 9203 투여군, *L. rhamnosus* 투여군, 유산균을 투여하지 않은 대조군 등 총 3개군으로 하였다. 시험군으로 사용되는 유산균은 동결건조 분말 상태로 조제(1×10^{10} CFU/g)하여 사용하였다. 시험기간은 총 6주로, 첫 0.5주간은 실험동물의 적응기로 하였으며 다음 1주간은 ampicillin 투여 기간으로 매일 0.4 g/L의 ampicillin을 음용수에 넣어 섭취케 하였다. 다음 2주간은 유산균 투여기간으로 IDCC 9203과 *L. rhamnosus* 동결건조 분말을 음용수에 섞어 매일 섭취(g/25 mL/시험군)케 하였다. 대조군은 유산균 대신 동결 보호제인 0.1% 탈지분유를 동결건조한 분말을 사용하였다. 유산균 투여를 종료한 후 2.5주간은 일반적인 방법으로 사육하였다. 전 시험기간 동안 매주 2회 각각의 시험군에서 분변을 회수하여 salmonella와 lactobacilli의 균수를 각각 SS 평판배지와 LBS 평판배지로 측정하였다.

또한 투여된 lactobacilli가 다른 장기로 전이되는지 확인하기 위하여 시험 종료 후 실험동물을 희생하여 비장, 간, 혈액의 조직을 적출하고 LBS 평판배지를 사용하여 lactobacilli 균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

유산균 분리

서울, 경기 소재 산후 조리원에서 생후 2주 이내의 모유 영양아로부터 분변을 채취하고 LBS 평판배지(pH 4.0, 0.3% bile 함유)에 도말하여 총 313주의 유산균을 분리하였다. 분리된 유산균 중에서 *Salmonella typhimurium* KCTC 2054에 대한 항균력이 우수한 IDCC 9203을 선발하였다(data not shown).

균주의 동정

선발된 IDCC 9203을 분자생물학적 방법으로 동정하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 결정된 1,531 bp

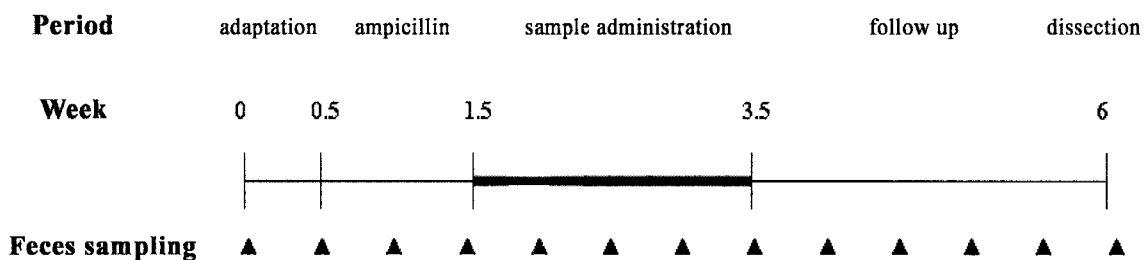


Fig. 1. Experimental schedule for in vivo experiment. The administration period for each experimental group is shown with a heavy line. Each experimental group was treated with skim milk, *L. johnsonii* IDCC 9203, and *L. rhamnosus* for 2 weeks, respectively. The deltas indicate collection of feces from each experimental group (two times per week).

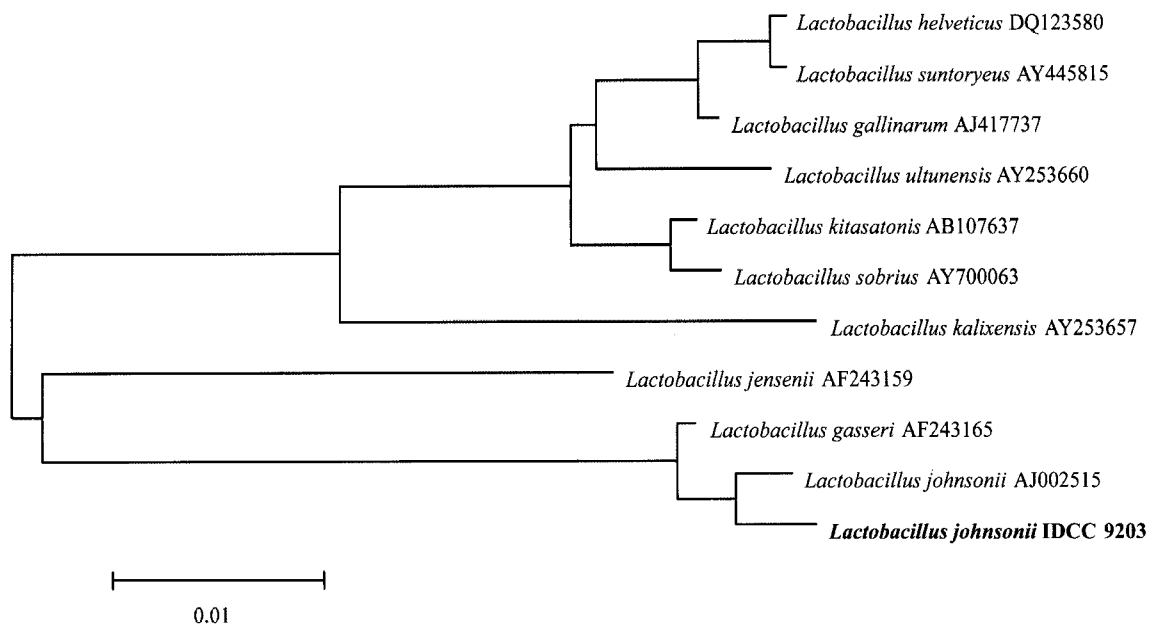


Fig. 2. Phylogenetic position of strain IDCC 9203 in the genus *Lactobacillus* based on the 16S rDNA sequences. The tree was rooted with *E. coli* and constructed using the neighbor-joining method. The bar represents 0.01% sequence divergence.

크기의 염기서열을 NCBI의 BLAST program을 이용하여 상동성을 비교한 결과 99.2%의 신뢰도로 *Lactobacillus johnsonii*로 동정되었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서 선발한 IDCC 9203 균주를 *L. johnsonii* IDCC 9203으로 명명하였다(GenBank AY862434).

내산성 및 내담즙산성

L. johnsonii IDCC 9203을 pH 2.3으로 보정한 MRS 액체배지에서 2시간 배양했을 때 약 81%의 생존율을 보였으며 bile 0.3%를 첨가한 MRS 액체배지에서 5시간 배양했을 때 약 57%의 생존율을 보였다. 공복시 위내는 pH 2.0 이하의 강산성이지만 음식물 섭취 후 2-3시간 동안은 음식물에 희석되어 pH 2.0 이상인 점을 감안할 때, *L. johnsonii* IDCC 9203은 산과 담즙에 대한 내성이 있어 위장관에서의 생존가능성이 높을 것으로 기대된다.

항생제 감수성

L. johnsonii IDCC 9203은 β -lactam 계열의 항생제인

penicillin 등에 대해서는 감수성을 나타냈고, aminoglycoside 계열의 항생제인 gentamicin, kanamycin 등에는 내성을 나타내었다(Table 2). Danielsen 등이 수행한 lactobacilli 항생제 감수성 결과와 대부분 유사하였으나, *L. johnsonii* IDCC 9203은 tetracycline에 내성을 갖는 특징이 있었다[8].

*S. typhimurium*에 대한 항균력

시험균의 *S. typhimurium* KCTC 2054에 대한 항균력을 평가하기 위하여 시험균의 배양여액이 함유된 BHI 액체배지에 *S. typhimurium* KCTC 2054를 배양하면서 생균수를 측정하였다. 시험균 배양여액(pH 4.0)을 사용한 경우 *S. typhimurium* KCTC 2054는 10^7 CFU/mL에서 10^5 CFU/mL로 감소한 반면, pH 7.0으로 조정된 시험균 배양여액에서는 10^7 CFU/mL에서 10^9 CFU/mL로 증가하였고, 시험균 간에 큰 차이가 없었다(Table 3). 또한 대조군으로 lactic acid를 사용하여 pH 4.0으로 조정된 MRS 액체배지는 시험균 배양여액과 유사한 항균효과를 나타내었으나, pH 7.0 MRS 액체배지는 항균효과를 나타내지 못했다. 배양여액을

Table 1. Acid and bile tolerance of *L. johnsonii* IDCC 9203.

Acid tolerance ¹			Bile tolerance ²		
log ₁₀ CFU		Survival ratio (%)	log ₁₀ CFU		Survival ratio (%)
pH 7.0	pH 2.3	(%)	MRS	MRS+0.3% bile	(%)
8.47 ± 0.01	8.38 ± 0.03	81	8.36 ± 0.04	8.12 ± 0.07	57

¹ Acid tolerance of *L. johnsonii* IDCC 9203 was expressed as survival ratio of *L. johnsonii* IDCC 9203. Survival ratio was represented as ratio of the number of CFUs observed in pH 2.3 condition to the number of viable cells in pH 7.0.

² Bile tolerance of *L. johnsonii* IDCC 9203 was expressed as survival ratio of *L. johnsonii* IDCC 9203. Survival ratio was represented as ratio of the number of CFUs observed in the presence of bile to the number of CFUs without bile.

Each value in the table represents the mean value ± standard deviation (SD) from three trials.

Table 2. Antibiotics susceptibility of *L. johnsonii* IDCC 9203.

Antimicrobial agents	Disc conc. (µg)	Clear zone diameter (mm)	Interpretative zone diameter (mm)			Result
			R ¹	I ²	S ³	
Amikacin	30	6	≤15	16-17	18	R
Ampicillin	10	22	≤12	13-15	16	S
Bacitracin	10	12	≤15	16-17	18	R
Cephalothin	30	30	≤14	15-17	18	S
Chloramphenicol	30	18	≤13	14-17	18	S
Erythromycin	15	20	≤13	14-17	18	S
Gentamicin	10	6	≤12	-	13	R
Kanamycin	30	6	≤13	14-17	18	R
Nalidixic acid	30	6	≤13	14-17	18	R
Nitrofurantoin	300	18	≤14	15-16	17	S
Ofloxacin	5	6	≤13	14-18	19	R
Penicillin	10	30	≤19	20-27	28	S
Polymyxin B	300	6	≤8	9-11	12	R
Rifampin	5	20	≤14	15-17	18	S
Streptomycin	10	6	≤11	12-14	15	R
Tetracycline	30	7	≤14	15-18	19	R
Vancomycin	30	18	≤14	15-17	18	S

¹ Resistant, ² Intermediate, ³ Sensitive.

Table 3. Antibacterial effect of lactobacilli cell-free culture supernatant(CFCS) against *S. typhimurium* KCTC 2054.

LAB samples ¹	<i>S. typhimurium</i> (log ₁₀ CFU mL ⁻¹) ²	
	CFCS (pH 4.0)	CFCS (pH7.0)
<i>L. acidophilus</i>	5.24 ± 0.17	9.15 ± 0.22
<i>L. fermentum</i>	5.73 ± 0.14	9.97 ± 0.08
<i>L. johnsonii</i> IDCC 9203	5.01 ± 0.22	9.32 ± 0.09
<i>L. reuteri</i>	5.65 ± 0.10	9.00 ± 0.32
<i>L. rhamnosus</i>	5.90 ± 0.30	9.70 ± 0.11
None (MRS)	5.34 ± 0.25	9.21 ± 0.20

¹ Lactobacilli were grown in MRS broth at 37°C for 18 h.

² Antibacterial activities of lactobacilli were represented as *S. typhimurium* KCTC 2054 viable cells in lactobacilli CFCS (adjusted to pH 4.0 or neutralized to pH 7.0).

Each value in the table represents the mean value ± standard deviation (SD) from three trials.

중화시키면 항균력이 소실되는 결과를 볼 때, 항균효과는 lactic acid를 비롯한 유기산 생성으로 인한 강한 산도 때문 일 것으로 추정된다.

In vitro 부착능

각 시험균을 Caco-2 cells에 부착시킨 시험에서는 *L. johnsonii* IDCC 9203과 *L. rhamnosus*는 약 4.5%의 부착율을 보였고 *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*는 4% 미만이었다. 각 시험균을 Caco-2 cells에 먼저 부착시킨 후 *S. typhimurium* KCTC 2054를 부착시킨 경우 *L. johnsonii* IDCC 9203이 *S. typhimurium* KCTC 2054 부착 저해율 74%로 가장 높았고, *L. reuteri*는 8.4%로 가장 낮았다. 또한 각각의 시험균과 *S. typhimurium* KCTC 2054를 동시에

Table 4. Inhibition of *S. typhimurium* KCTC 2054 adhesion to Caco-2 cells by lactobacilli.

Strain	Inhibition of <i>S. typhimurium</i> adhesion (%)	
	Preincubation ¹	Coincubation ²
<i>L. acidophilus</i>	39.0 ± 7.5	31.5 ± 3.0
<i>L. fermentum</i>	35.2 ± 2.3	26.6 ± 2.1
<i>L. johnsonii</i> IDCC 9203	74.0 ± 4.5	47.1 ± 4.1
<i>L. reuteri</i>	8.4 ± 2.2	5.1 ± 1.4
<i>L. rhamnosus</i>	68.5 ± 6.9	37.3 ± 2.8

¹ Inhibition ratio of the adhesion of *S. typhimurium* KCTC 2054 to Caco-2 cells preincubated with lactobacilli was represented as percentages compared to the control (without lactobacilli presence).

² Inhibition ratio of the adhesion of *S. typhimurium* KCTC 2054 to Caco-2 cells by coincubated with lactobacilli and *S. typhimurium* KCTC 2054 was represented as percentages compared to the control (without lactobacilli presence).

Each value in the table represents the mean value ± standard deviation (SD) from three trials.

Caco-2 cells에 부착시켰을 때 *L. johnsonii* IDCC 9203이 47%의 부착 저해율을 보였으며, *L. reuteri*는 5.1%의 낮은 부착 저해율을 나타내었다(Table 4). *L. johnsonii* IDCC 9203이 *S. typhimurium* KCTC 2054의 부착을 저해하는 결과는 *L. acidophilus* LA1이 그람 음성 세균이 eukaryotic cells로 부착되는 것을 저해한다는 Bernet-Camard 등의 보고와 유사하였다[3].

In vivo 장 정착성 및 salmonella 생육 억제능

L. johnsonii IDCC 9203을 mice에 투여하여 장에 정착되는 수준과 salmonella의 생육을 억제하는 수준을 확인하였

다. Fig. 3(A)에서 보는 바와 같이, 적응기에는 10^9 CFU/g feces의 상재 유산균이 검출되었으나 ampicillin을 처리하여 10^2 CFU/g feces 수준으로 제거하였다. *L. johnsonii* IDCC 9203 투여 중에는 10^7 CFU/g feces 수준까지 유산균이 증가하였으며 투여 중단 후에는 2.5주까지 10^2 CFU/g feces 수준을 유지하였다. 비교군주인 *L. rhamnosus*는 투여 중에는 10^7 CFU/g feces 수준까지 증가했으나 투여 중단 후 2주째부터 검출되지 않았다. 또한 유산균을 투여하지 않은 대조군의 경우 ampicillin 처리로 10^2 CFU/g feces 수준으로 제거된 이후 유산균수가 회복되지 않았다. 이것은 *L. johnsonii* IDCC 9203이 mice의 상재균이 아닌 외부 도입균이지만 항생제의 영향으로 교란된 장내환경에서 일정기간 장 점막에 정착하여 증식할 수 있다는 것을 의미한다.

또한 *L. johnsonii* IDCC 9203은 mice의 장에 정착하면서 salmonella 생육 억제 효능을 나타내었다. Fig. 3(B)에서 보는 바와 같이, 적응기에 mice의 분변에서는 salmonella가 10^5 CFU/g feces 수준으로 검출되었으나, ampicillin 투여 후 10^2 CFU/g feces까지 급격하게 감소하였다. Ampicillin 투여를 중단하고 *L. johnsonii* IDCC 9203을 투여한 1주 동안에는 salmonella가 10^9 CFU/g feces까지 증식하였으나, 투여 2주째에는 10^7 CFU/g feces로 감소하였고, 투여 종료 후에도 계속 낮아져서 10^5 CFU/g feces 수준까지 감소하였다. 비교군주인 *L. rhamnosus* 투여군에서는 salmonella 군수가 최고 10^9 CFU/g feces에서 10^7 CFU/g feces로 감소하였으며, 투여 중단 1주 후에도 10^6 CFU/g feces까지 낮아졌으나 이후 10^7 CFU/g feces로 상승하여 지속적인 저해효과를 나타내지 못했다. *L. johnsonii* IDCC 9203 투여 초기에는 ampicillin의 영향으로 정상적인 균총이 파괴된 장내에서 salmonella가 활발하게 증식하였지만, 이후 *L. johnsonii* IDCC 9203이 mice의 장에 정착하여 증식하면서 salmonella 증식이 억제된 것으로 판단된다. 이는 *L. johnsonii*가 *S. typhimurium*과 경쟁하여 사람의 장 점막에 부착하는 것을 저해한다는 Tuomola 등의 결과와 유사하였다[25]. Styriak 등은 장내균총의 정착성은 일반적으로 장 점막의 extracellular matrix (ECM)와 관련이 있는 것으로 보고하였다[22]. ECM은 상피세포와 내피세포의 근간이 되는 안정한 거대분자 조직으로, 장내 이상으로 장 점막의 ECM이 노출되면 여러 미생물들이 ECM에 부착되어 감염을 유발하게 된다. *L. johnsonii* IDCC 9203은 ampicillin의 영향으로 노출된 ECM에 유해세균과 경쟁하여 부착하고 증식함으로써 불안정한 장내환경을 개선시킨 것으로 볼 수 있다.

시험에 사용된 *L. johnsonii* IDCC 9203과 mice 상재 유산균이 다른 장기로 전이되는지를 확인하기 위해 시험 종료 후 mice를 희생하여 비장 및 간 조직을 적출하였고 혈액을 채취하였다. LBS 평판배지를 사용하여 유산균을 확인한 결과 어느 조직에서도 유산균은 검출되지 않았다(data not shown).

본 연구에서 확인된 *L. johnsonii* IDCC 9203은 내산성

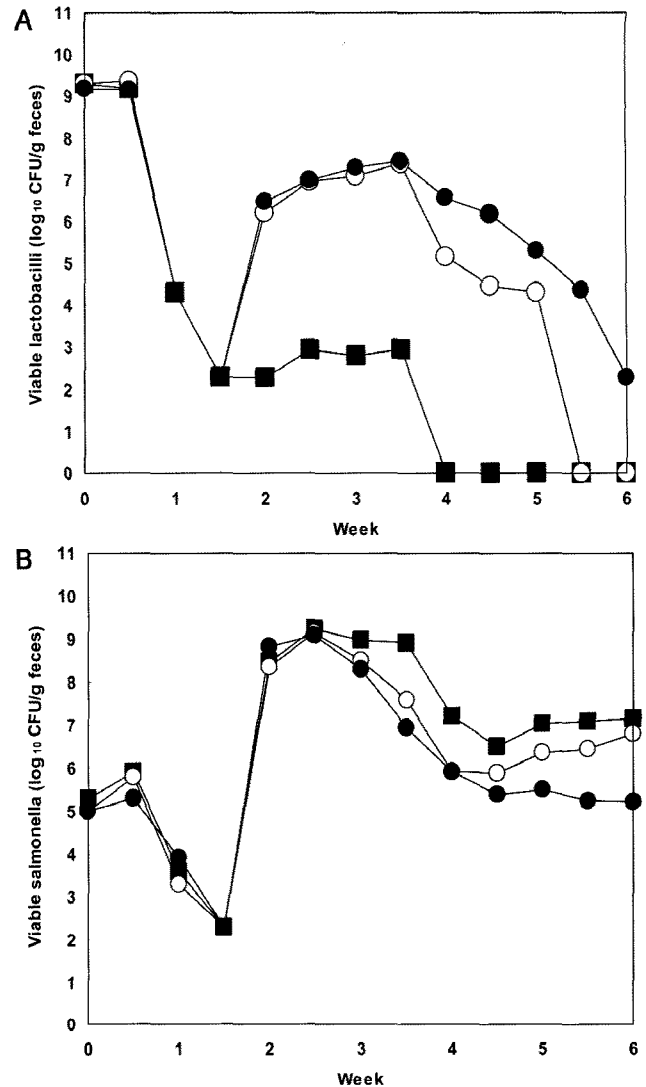


Fig. 3. Effect of oral lactobacilli administration on the change of fecal counts of lactobacilli and salmonella. Mice feces were collected twice a week during *in vivo* experiment. Lactobacilli in collected feces were detected with LBS agar (A) and salmonella in collected feces were detected with SS agar (B) : 0~0.5 week, adaptation; 0.5~1.5 week, ampicillin treatment; 1.5~3.5 week, sample administration; 3.5~6 week, follow up. ■; Blank, ○; *L. rhamnosus*, ●; *L. johnsonii* IDCC 9203.

및 내담즙산성이 우수하고 부착능 및 장 정착성이 우수하여 사람 및 동물용 정장제로의 활용이 기대된다.

요 약

IDCC 9203은 모유 영양아의 분변으로부터 분리하였으며 분자생물학적 동정 결과 *Lactobacillus johnsonii*로 밝혀졌다. *L. johnsonii* IDCC 9203은 pH 2.3으로 조정된 MRS 액체 배지에서 2시간 반응시 81%의 생존율을 보였으며, 0.3% bile이 함유된 MRS 액체배지에서는 5시간 반응시 57%의 생존율을 보여 산과 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났

다. *L. johnsonii* IDCC 9203은 *in vitro*에서 Caco-2 cells에 대한 부착능이 우수하여 *S. typhimurium* KCTC 2054의 부착을 경쟁적으로 50% 이상 감소시켰다. 또한 *in vivo*에서 *L. johnsonii* IDCC 9203은 항생제로 교란된 mice의 장내에 정착하여 증식하였으며 이상 증식된 salmonella(10^9 CFU/g feces)를 초기 수준(10^5 CFU/g feces)으로 감소시켰다. 이상의 결과에서 *L. johnsonii* IDCC 9203은 사람 및 동물에 유용한 프로바이오틱 특성을 가지고 있어 정장용 유산균으로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Abee, T., T. R. Klaenhammer, and L. Letellier. 1994. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1006-1013.
2. Avonts, L., E. V. Uytven, and L. D. Vuyst. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* **14**: 947-955.
3. Bernet-Camard, M. F., V. Lievin, D. Brassart, J. R. Neeser, A. L. Sservin, and S. Hundault. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2747-2753.
4. Boushey, C. J., A. A. Beresford, G. S. Omenn, and A. G. Moltulsky. 1996. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *J. Am. Med. Assoc.* **274**: 1049-1057.
5. Chandan, R. C. 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. *J. Dairy Sci.* **82**: 2245-2256.
6. Charteris, W. P., P. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Protect.* **26**: 333-337.
7. Chiva, M., G. Soriano, I. Rochat, C. Perlta, F. Rochat, T. Llovet, B. Mirelis, E. J. Schiffrin, C. Guarner, and J. Balanzo. 2002. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J. Hepatol.* **37**: 456-462.
8. Danielsen, M. and A. Wind. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* sp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food microbiol.* **82**: 1-11.
9. Garrido, D., A. Suau, P. Pochart, S. Cruchet, and M. Gotteland. 2005. Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La 1-containing product in human volunteers. *FEMS Microbiol. Lett.* **248**: 249-256.
10. Kim, G. B., J. H. Lee, K. S. Lim, C. S. Huh, H. S. Bae, Y. J. Baek, and H. U. Kim. 1999. Bile salt deconjugation activity of *Lactobacillus* strains isolated from yogurt products. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 385-390.
11. Kirjavainen, P. K., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, and S. J. Salminen. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 185-189.
12. Kwon, H. S., E. H. Yang, S. W. Yeon, B. H. Kang, and T. Y. Kim. 2004. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**: 267-275.
13. Mainville, I., Y. Arcand, and E. R. Farnworth. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food microbiol.* **99**: 287-296.
14. Makras, L., V. Triantafyllou, D. F. Messaoudi, T. Adriany, G. Zoumpopoulou, E. Tsakalidou, A. Servin, and L. D. Vuyst. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res. Microbiol.* **157**: 241-247.
15. Maragkoudakis, P. A., G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot, and E. Tsakalidou. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* **16**: 189-199.
16. Pinto, M. G. V., C. M. A. P. Franz, U. Schillinger, and W. H. Holzapfel. 2006. *Lactobacillus* sp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 205-214.
17. Plant, L., C. Lam, P. L. Conway, and K. O Riordan. 2003. Gastrointestinal microbial community shifts observed following oral administration of a *Lactobacillus fermentum* strain to mice. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 133-140.
18. Saito, N. and M. Nei. 1987. A neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
19. Schillinger, U., C. Guigas, and W. H. Holzapfel. 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* **15**: 1289-1297.
20. Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 405-440.
21. Stanton, C., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. V. Sinderen. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 198-203.
22. Styriak, I., R. Nemcova, Y. H. Chang, and A. Ljungh. 2003. Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Let. Appl. Microbiol.* **37**: 329-333.
23. Suskovic, J., B. Brkic, S. Matosic, and V. Marie. 1997. *Lactobacillus acidophilus* M92 as a potential probiotic strain. *Milchwissenschaft.* **52**: 430-435.
24. Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki, and I. Mierau. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.* **82**: 2530-2535.
25. Tuomola, E. M., A. C. Ouwehand, and S. J. Salminen. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**: 137-142.