

항생제 대체제로서 *Clostridium butyricum* IDCC 9207 백미 발효물의 항균작용과 장관 면역증진효과

이승훈 · 김성범 · 강재훈 · 강대중*

일동제약(주) 중앙연구소

White Rice Fermented by *Clostridium butyricum* IDCC 9207 as an Alternative to Antibiotic having Antibacterial and Immunostimulatory Activity

Seung-Hun Lee, Seong-Beom Kim, Jae-Hoon Kang and Dae-Jung Kang*

ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co., Ltd., Hwaseong 445-170, Korea

ABSTRACT

The antagonistic activities against animal entero-pathogenic bacteria were investigated with 444 natural substances fermented by various probiotics. A white rice product fermented (FWR) by *Clostridium butyricum* IDCC 9207 with a high growth inhibition of *Salmonella typhimurium* KCTC 2054 and *Escherichia coli* O157:H7 was selected. Also, a FWR was shown to suppress 8 among 21 pathogenic bacteria. In a mouse model with salmonella ($\times 10^9$ CFU/mouse) infection, 5 samples (200 μ l/mouse/day) were fed to mice (n=25) for 18 days. A fermented white rice containing *C. butyricum* IDCC 9207 (FWRCb9207) among 5 samples significantly inhibited the growth of salmonella, while in the control group (PBS, tetracycline) the number of salmonella increased. And the treatment with FWRCb9207 was found to increase the secretory immunoglobulin A (sIgA) level in the feces of salmonella-infected mice. The results obtained in this study suggest that a FWRCb9207 might be utilized as a feed additive in pigs and poultry diets.

(Key words : *Clostridium butyricum* IDCC 9207, Fermented white rice, Antibacterial activity, Immunostimulatory activity, Secretory immunoglobulin A, Synbiotics)

서 론

인위적 환경에서 오랫동안 사육된 가축은 사료변화, 항생제투여, 유해 미생물의 감염 등의 영향을 받게 되어 정상적인 장내 균총 형성이 어렵게 된다. 이로 인하여 증체를 저하, 사료 이용률 감소 등 경제적 피해를 가져온다(Tannock, 1983). 축산농가에 문제시되는 유해세균으로는 가금류에서 티푸스와 추백리 등을 유발하는 것으로 알려진 *Salmonella gallinarum*과 *S. pullorum*이 대표적이다. 이 균주들은 양계농가에서 연쇄적인 폐사로 인한 심각한 경제적 피해를 주는 균으로 알려져 있다(Pomeroy and Nagaraja, 1991). 자돈에서는 *Escherichia coli* O157:H7과 같은 병원성 대장균이 이 유 후 1주일 경에 소장내 주로 감염되어 독소를 생산하며 설사, 탈수, 부종 등을 일으키며(Beutin et al., 1998), *S. typhimurium*은 독성 및 병원성이 강하고 장관에서 기관으로 쉽게 전이되어 내장기관기능을 파괴함으로써 숙주를 치사에 이르게 하는 병원성균이다. 이 균은 자돈에서 생후 8~12주에 소장 및 대장에 감염되며, 증상

으로는 설사와 심한 경우 결장염을 일으킨다(Schwartz, 1999).

병원성 미생물에 감염된 가축의 치료로 항생제 및 화학적 치료법이 사용되고 있다. 대표적 항생제로 penicillin, ampicillin, tetracycline 등이 있으며, 치료효과 외에 폐사율 감소 및 성장촉진 효과가 있어 사료급여와 함께 지속적으로 사용되고 있다. 그러나 지나친 항생제 오남용으로 내성문제를 일으켜 유럽의 경우 항생제를 축산용으로 사용하는 것을 금지하고 있으며(Dixon, 2000), 국내의 경우도 주요 항생제에 대한 내성균 발생률이 20~90% 이상 높아짐에 따라 치료 목적외 인수공통 항생제의 사료첨가제 사용이 전면 금지되었다. 따라서 항생제를 대체하여 소화기 병원성 세균을 저해할 수 있는 사료첨가용 항생제 대체제 개발이 요구된다. 화학적 치료법은 페닐계, 할로겐화합물, 요오드제, 4급 암모늄염, 클로르헥시딘염 등이 사용되고 있으나, 광학적으로 불안정하며, 온도에 의해 치료효과가 떨어지며 일부는 독성이 강해 사용범위를 제한하고 있다. 사료첨가용 항생제 대체제로 probiotics가 있으며, lactobacilli, bacilli, clostridia 등이 대표적

* Corresponding author : Dae-Jung Kang, ILDONG pharmaceutical Co., Ltd., Hwaseong 445-170 Korea. Tel: 82-31-371-2881, Fax: 82-31-371-2900, E-mail: dj kang@ildong.com

이다. 이 중, *Clostridium butyricum*은 spore 형성균으로 일부 probiotics가 가축의 위장관을 통과하면서 위산과 담즙산에 의해 사멸되어 probiotic effects를 발휘하지 못하는 것과는 달리, 열과 산, 알칼리 조건에 대한 저항성이 강하고 외부 환경이 양호해지면 다시 영양세포로 발아하여 probiotic effects를 나타낸다. 이러한 기본적인 특성외에 특정 병원성 미생물의 생육억제 및 예방목적에 관한 *C. butyricum*의 선행연구로 *E. coli* O157:H7을 감염시킨 mouse model에 *C. butyricum* 투여한 결과, 유의적인 효과를 나타내었다는 보고가 있었으며(Takahashi et al., 2004), *C. butyricum*의 경구투여시 mouse model에서 장관면역력을 향상시킨다는 보고가 있었다(Taka-ichi et al., 1995). 본 연구에서는 *C. butyricum* IDCC 9207의 백미 발효물이 *in vitro*에서 가축의 장내 유해세균 및 감염성 병원균의 생육억제 효과를 평가하고 *S. typhimurium*이 감염된 mouse model에서 감염균의 증식억제와 장관면역에 미치는 영향을 조사함으로써 *C. butyricum* IDCC 9207의 함유된 백미 발효물이 항생제 대체제로서의 잠재성을 기초로 한 산업화에 목적을 두었다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배양

본 연구에 발효균주로 사용된 probiotic 균주는 일동제약 (<http://www.ildong.com/>)에서 보유하고 있는 산업용 균주 11종이며, 항균활성을 측정하기 위하여 사용한 지시균들은 한국생물자원센터 (KCTC, The Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아 사용하였다. 발효기질로 사용한 국내산 천연소재 식물자원 37종을 경동시장 (서울 동대문구 제기동 소재)의 온라인 마켓인 산들약초 (<http://www.hanyaksale.com/>)에서 구입하여 사용하였다. 유산균 배양배지로는 de Man-Rogosa-Sharpe medium (MRS, BD, USA)을 사용하였으며, Bacilli 배양배지로는 tryptic soy

broth (TSB), *Clostridium* 배양배지는 fluid thioglycollate medium (FTM)을 사용하였다. 그 밖의 지시균은 brain heart infusion (BHI) broth, Muller Hinton (MH), Eosin Methylene Blue (EMB), Brilliant Green (BG) 배지를 이용하여 37°C에서 배양하였다. 실험에 사용한 probiotic strains과 천연소재 식물자원은 Table 1과 같다.

2. 천연발효물 조제 및 항균활성 우수 발효물 선별

천연 발효물 조제를 위해 발효기질 5%, glucose 0.5%가 첨가된 배지 (pH 6.5)에 probiotic strains 균원시료를 10% (v/v) 되게 접종하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 각각의 배양액을 2.5N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 중화시킨 후 10,000 RPM, 10분동안 원심분리하고 회수한 cell-free supernatant를 0.2µm 필터를 이용하여 제균하였다. 상기 여액을 지시균 *S. typhimurium* KCTC 2054와 *E. coli* O157:H7가 1×10^7 CFU/ml로 도말된 MH agar와 EMB agar plate 위에 직경 8 mm의 페니실린 컵으로 뚫은 wells에 100 µl씩 접종하고 지시균의 배양조건 (37°C, 16시간 배양)으로 배양한 다음, clear zone 형성여부 및 크기를 상대 비교함으로써 항균력이 가장 우수한 probiotic strain과 천연기질을 최종 선별하였다.

3. 백미 발효물의 조제

C. butyricum IDCC 9207 (특허기탁균주 수탁번호 KCTC 11658 BP)을 백미가 3% 첨가된 최적배지에 접종하고 35°C에서 40시간동안 배양하였다. 배양액을 10,000 RPM에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 회수한 상등액을 2.5N NaOH를 이용하여 최종 pH 7.0으로 중화한 후에 ultrafiltration (Mw. 3,000 cut off)을 통해 여과하였다. 여액을 evaporation system을 통해 10배 감압 농축하고 동결 건조하여 항균활성을 측정하기 위한 발효 농축물을 조제하였다 (Fig. 1).

Table 1. Probiotic strains and natural substances

Probiotic strains	Natural substances			
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	<i>H. cordata</i>	coiorhiza	tumeric	tangerine peel
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 9206	quince	onion	carrot	garlic
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	cabbage	squash	sweet potato	mung beans
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3501	<i>R. coreanus</i>	<i>Dioscorea tenuipes</i>	kale	kelp
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 9205	pomegranate	beet	broccoli	buckwheat
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	acorn	adlay	cheonggukjang	aloes
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	Yacon	lotus root	chestnut	chives
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	adzuki beans	barley	spinach	perilla
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	black rice	white rice	black sesame	cactus
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	ginger			
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207				

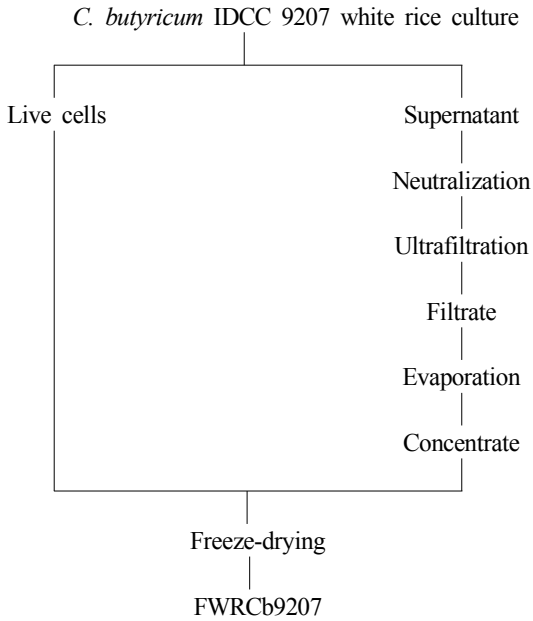


Fig. 1. The manufacturing scheme of white rice fermented containing *C. butyricum* IDCC 9207 (FWRCb9207).

4. 백미 발효물의 항균력

선발된 *C. butyricum* IDCC 9207 백미 발효물의 장내 유해세균에 대한 생육억제 효과를 액체배양을 통해 조사하였다. 백미 발효물을 *S. typhimurium* KCTC 2054와 *E. coli* O157:H7이 접종된 배양배지에 1% (m/v) 되게 첨가하고 37°C에서 1시간 간격으로 배양액 colony수를 계수하여 항균력을 측정하였다. 대조군으로 *C. butyricum* IDCC 9207과 백미를 혼합한 후 발효시키지 않고 바로 얻은 상등액을 사용하여 상기와 같은 방법으로 분석하였다.

5. 항균 스펙트럼 조사

선발된 *C. butyricum* IDCC 9207 백미 발효물의 항균 스펙트럼을 조사하기 위하여 well diffusion 방법을 이용하였다. 이를 위해 병원성 미생물 21주(Gram positive bacteria 11주, Gram negative bacteria 10주)를 각각의 agar plate에 접종하였다. 이후 cell-free 백미 발효물 현탁액을 $\times 2^{-5}$ 까지 serial dilution하여 100 μ l씩 적하하였다. 반응은 37°C 배양기에서 16시간 진행하였으며, 결과는 clear zone 생성 유무를 토대로 21주에 대한 항균 스펙트럼을 조사하였다. 실험에 사용한 지시균은 Table 2와 같다.

6. In vivo 항균활성

In vivo에서 *C. butyricum* IDCC 9207이 함유된 백미 발효물의 유해세균 억제능을 확인하기 위해 *S. typhimurium* KCTC 2054를

Table 2. Pathogenic bacteria for antibacterial spectrum

Gram positive bacteria	Gram negative bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> Met R	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL
<i>Staphylococcus aureus</i> Met S	<i>Escherichia coli</i> DC 0
<i>Coagulans negative S.</i> Met R	<i>Escherichia coli</i> DC 2
<i>Coagulans negative S.</i> Met S	<i>Escherichia coli</i> TEM
<i>Enterococcus faecalis</i> Van R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9207
<i>Enterococcus faecalis</i> Van S	<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E
<i>Enterococcus faecium</i> Van R	<i>Enterobacter cloacae</i> P99
<i>Enterococcus faecium</i> Van S	<i>Salmonella gallinarum</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Streptococcus faecium</i> MD 8ba	

감염시킨 mouse model에서 항균력을 조사하였다. 6주령된 female ICR mouse 5마리/cage를 1개군으로 하고 샘플은 live cells (Cb9207), cell-free 백미 발효물 (FWR), *C. butyricum* IDCC 9207이 함유된 백미 발효물 (FWRCb9207), 0.02% tetracycline (positive control), PBS 투여군(negative control)의 총 5개군으로 구분하였다. 계류기간이 끝난 mouse를 대상으로 0.2% tetracycline을 200 μ l/mouse/day씩 1주일간 투여하여 mouse 고유의 장내 세균총을 억제 및 교란시켰다. 1주일 경과 후, *S. typhimurium* KCTC 2054($\times 10^9$ CFU/mouse)를 시료 투여기간 초기 3일간 200 μ l/mouse/day씩 경구투여하고 동시에 5가지 실험 샘플도 2.5주 동안 250 μ l/mouse/day씩 경구투여하였다. 장내 salmonella 균수는 mouse의 분변 샘플에서 분석하였으며, 이를 위해 30분간 mouse의 분변을 회수하고 PBS로 다단계 희석하여 BG agar plate에 도말하고 37°C, 24시간 배양 후, 발현된 colony를 계수하였다.

7. 면역증강작용

C. butyricum IDCC 9207이 함유된 백미 발효물 투여를 통한 면역증강효과를 확인하기 위해, 샘플 투여 전과 후로 구분하여 분변에서 장관면역에 관여하는 secretory immunoglobulin A (sIgA)의 양을 ELISA kit (Bethyl Company, France)로 측정하였다. 즉, mouse 분변 샘플을 20 mg/ml의 농도로 현탁하고 3,000 RPM에서 1차 원심분리한 후, 회수한 상등액을 14,000 RPM에서 2차 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 96-well plate에 2차 상등액과 IgA antibody (standard) 100 μ l를 각각 혼합하고 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이어서 washing buffer (50 mM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20)로 4회 washing한 후, anti-IgA detection antibody 100 μ l를 분주하였다. 1시간 반응시킨 후, washing buffer로 4회 washing하고 각각의 well에 Horse Radish

Peroxidase (HRP, Bethyl Company, France) 용액 100 μl 를 분주한 후, 상온에서 30분간 반응시켰다. 다시 4회 washing 후, 기질 용액인 TMB 용액을 100 μl 를 분주하고 암실에서 30분간 반응시켰다. 2M H_2SO_4 용액 100 μl 를 분주하여 효소반응을 종료시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 항균활성 우수 발효물 선별

Probiotics 발효물 444종을 대상으로 *S. typhimurium* KCTC 2054와 *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성을 조사한 결과, *C. butyricum* IDCC 9207로 백미를 발효시킨 발효물 (FWR)이 가장 높은 항균력을 나타냈다 (Fig. 2).

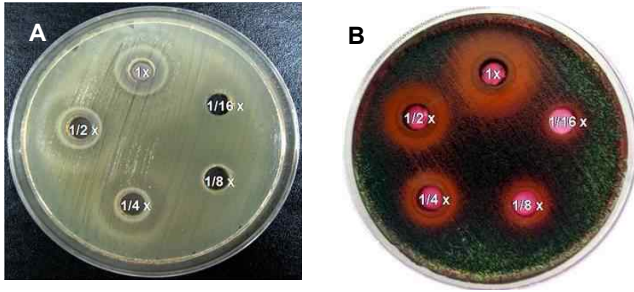


Fig. 2. Antibacterial activities of fermented white rice (FWR) by *C. butyricum* IDCC 9207.

Antibacterial activities were measured by well diffusion method. 20 ml of the appropriate agar (1.5%, w/v) medium were pipetted in 90 mm petri dishes and inoculated (0.5%, v/v) with a standardized indicator suspension (A, *S. typhimurium* KCTC 2054 ; B, *E. coli* O157:H7). After drying for 30 min., five 8 mm wells were bored in each plate. 100 μl of 2-fold dilutions of FWR samples were pipetted into each well and the plates were incubated at 37°C for 16 hr.

2. 백미 발효물의 항균력

배양 시간에 따라 배양액 1 ml를 회수하고 PBS로 다단계 희석하여 지시균의 생육저해 정도를 생존균수의 분석을 통해 확인한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 백미 발효물 (FWR)을 처리하였을 때, *S. typhimurium* KCTC 2054가 초기 균수 4.6×10^9 CFU/ml에서 4시간 후 3.0×10^9 CFU/ml, *E. coli* O157:H7는 초기 균수 2.6×10^9 CFU/ml에서 2.2×10^9 CFU/ml으로 증가하지 않았다. 이와는 달리, *C. butyricum* IDCC 9207과 백미를 혼합한 후 발효시키지 않고 바로 얻은 상등액 처리균은 정상적인 지시균의 성장곡선을 나타내었다. 이와 같은 결과는 백미 발효물이 지시균의 생장을 강력히 저해하고 있음을 의미한다. 선행연구에서 *C. butyricum*이 *E. coli* O157:H7을 저해한다는 보고가 있었으나 (Takahashi et al.,

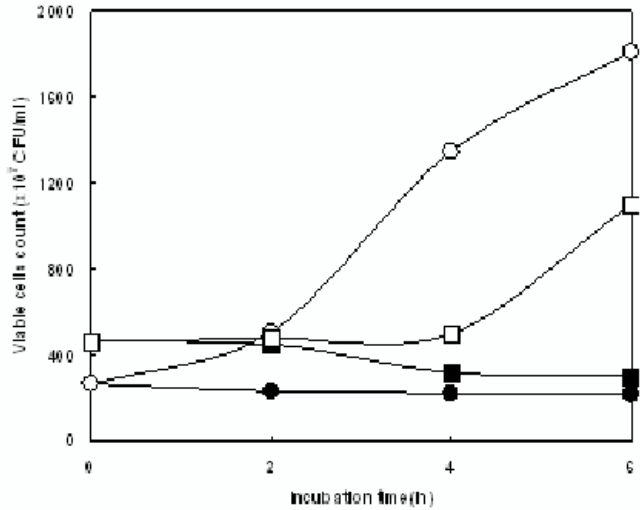


Fig. 3. Antibacterial effect of *C. butyricum* IDCC 9207 cell-free culture supernatant (CFCS) against *S. typhimurium* KCTC 2054 and *E. coli* O157:H7.

Antibacterial activities of *C. butyricum* IDCC 9207 CFCS were represented as ■, CFCS + *S. typhimurium* KCTC 2054 ; □, non-fermentative culture supernatant + *S. typhimurium* KCTC 2054 ; ●, CFCS + *E. coli* O 157 : H7 ; ○, non-fermentative culture supernatant + *E. coli* O 157 : H7.

2004), 이는 live cells에 의한 효과이며 가축의 장내 정착 후 probiotic effects를 발휘하기 때문에 cell-free 발효물에 비해 상대적으로 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.

3. 항균 스펙트럼 조사

C. butyricum IDCC 9207 백미 발효물 (FWR)이 *S. typhimurium* KCTC 2054와 *E. coli* O157:H7 외의 시험균주 21주에 대한 항균 활성을 well diffusion method를 이용하여 조사한 결과, 총 21주의 시험균 중 8주 (*E. coli* DC2, *E. faecium* Van R, *E. faecalis* Van R, *S. aureus* Met R, *P. aeruginosa* 9207, *S. agalactiae*, *S. gallinarum*, *S. choleraesuis*)에 저해효과를 나타내었다 (Fig. 4). FWR이 항균력을 나타낸 지시균은 Gram positive bacteria가 4종, Gram negative bacteria가 4종으로 조사되어 항균 스펙트럼의 범위가 넓은 것으로 확인되었다.

FWR의 유효 피검균주 중 *E. coli*와 *E. faecium*은 가축의 장내 세균총 (microflora)을 이루는 균으로 *E. coli*는 숙주의 면역력 저하 등으로 장내에서 과증식되면 설사 등의 문제를 일으킬 수 있으며 (Gulliksen et al., 2009), *E. faecium*은 항생제 내성관련 plasmid를 보유하며 다른 장내 미생물에 이 plasmid를 전이시킬 수 있어 항생제 내성에 관한 잠재적 위험요소를 안고 있는 균이다 (Davis et al., 2005). 따라서 이들 균주와 장내 유익균간의 균형을 유지시키고 경우에 따라서는 항생제 대체제 등 비항생제 요법으로 억제하는 것이 가축의 질병 예방차원에서 중요하다고 판단된다.

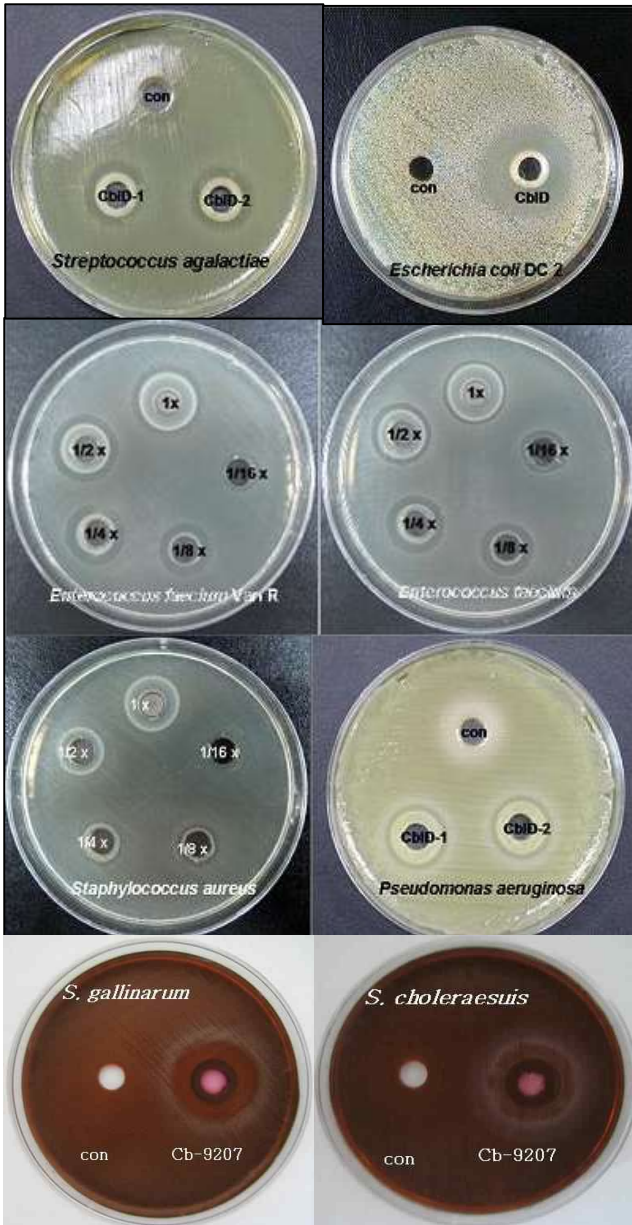


Fig. 4. Antibacterial activities of white rice product fermented (FWR) by *C. butyricum* IDCC 9207 against 21 pathogenic bacteria.

Antibacterial activities were measured by well diffusion method. A white rice product fermented (FWR) by *C. butyricum* IDCC 9207 was shown to inhibit the growth of 8 among 21 pathogenic bacteria.

4. *In vivo* 항균활성

C. butyricum IDCC 9207이 함유된 백미 발효물 (FWRCb9207)을 *S. typhimurium* KCTC 2054를 감염시킨 mouse model에서 항균활성 평가를 위해 Fig. 5와 같은 일정으로 *in vivo* 실험을 진행하였다.

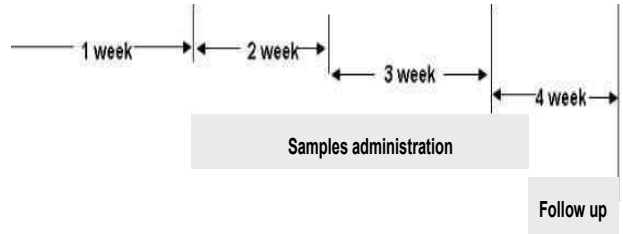


Fig. 5. Experimental schedule for *in vivo* experiment. 0~7 day, 0.2% tetracycline treatment ; 7~9 day, *S. typhimurium* KCTC 2054 infection ; 7~24 day, samples administration ; 24~28 day, follow up. Each experimental group was administered PBS (negative control), 0.02% tetracycline (Tet, positive control), *C. butyricum* IDCC 9207 live cells (Cb9207), cell-free fermented white rice (FWR), and fermented white rice containing *C. butyricum* IDCC 9207 (FWRCb9207) for 18 days, respectively.

각 시기별 분변으로부터 검출한 *S. typhimurium* 균수는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 0.2% tetracycline을 1주일간 경구 투여하였을 때, 모든 실험군에서 mouse 고유의 *S. typhimurium*의 개체수가 낮아지는 경향을 나타냈다. 이후, *S. typhimurium* KCTC 2054 균액을 경구 투여로 3차례 감염시켰을 때 낮아진 균수는 다시 증가세를 나타냈다. 이는 투여된 *S. typhimurium* KCTC 2054가 잠복기와 장내 정착기를 거쳐 증식기로 접어들었기 때문이다. 2.5주

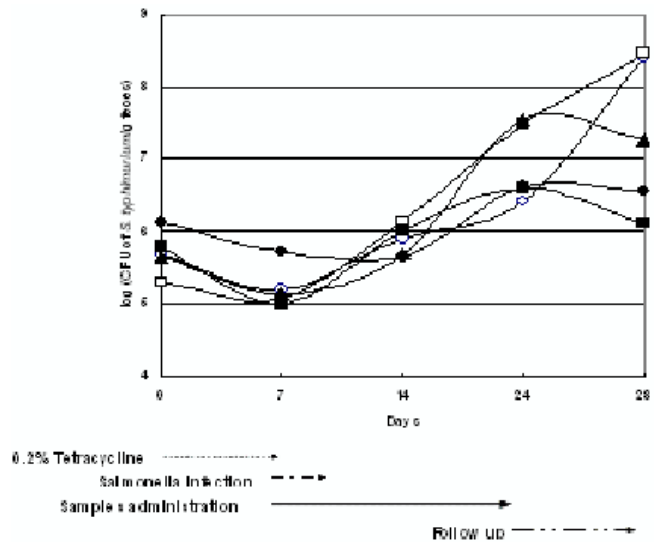


Fig. 6. Effect of oral *C. butyricum* IDCC 9207 sample administration on the growth of *S. typhimurium* KCTC 2054 in ICR-mice intestines. Mice feces were collected twice a week during *in vivo* experiment. Salmonella in collected feces were detected with BG agar. ○, PBS ; □, tetracycline (Tet) ; ▲, *C. butyricum* IDCC 9207 live cells (Cb9207) ; ■, cell-free fermented white rice (FWR) ●, fermented white rice containing *C. butyricum* IDCC 9207 (FWRCb9207).

간 *S. typhimurium* KCTC 2054에 감염된 mouse에 준비된 샘플 들을 투여한 결과, FWR과 FWRCb9207은 *S. typhimurium* KCTC 2054의 장내 증식을 효과적으로 억제시켰다. 각각의 sample별 효능의 수치적 해석은 실험 28일차의 *S. typhimurium* KCTC 2054의 균수($S_T D_{28}$)와 실험 7일차의 *S. typhimurium* KCTC 2054의 균수($S_T D_7$)의 비율인 *S. typhimurium* KCTC 2054 증식도 ($S_T D_{28} / S_T D_7$)로 나타내고, 이를 다시 positive control인 tetracycline 투여군의 *S. typhimurium* KCTC 2054 증식도와 상대비교를 하였다. 실험결과, tetracycline 투여군의 *S. typhimurium* KCTC 2054 증식도($S_T D_{28} / S_T D_7$)는 2511, Cb9207 투여군은 199, FWR 투여군은 12, FWRCb9207 투여군은 5.6으로 나타났다.

Tetracycline 투여군의 경우, 초기 억제 효과는 우수하였으나 14 일 이후부터는 *S. typhimurium* 균수가 증가하는 것으로 보아 투여 항생제에 대한 내성을 획득한 것으로 파악된다. 특히 tetracycline 투여군의 mouse는 털의 윤기가 없었으며 증체율이 급격히 떨어지는 부작용 또한 나타내었다.

Cb9207을 단독으로 투여한 경우, positive control인 tetracycline 투여군보다 12배의 *S. typhimurium* KCTC 2054 증식억제 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 live cells의 경우 장내 정착 후 probiotic effect를 발휘하는데 걸리는 시간이 FWR보다 상대적으로 길어 *S. typhimurium* KCTC 2054 감염 초기에 유효한 증식억제 효과를 나타내지 못했기 때문이다.

FWR 단독 투여시 *S. typhimurium* KCTC 2054에 대한 억제 효과는 tetracycline 투여군에 비해 209배의 증식억제 효과를 나타냈다. 이는 백미 발효물에 포함되어 있는 항균활성 성분이 생체 내 각종 효소에 분해되지 않고 안정한 물질로 구성되어 있어 *S. typhimurium* KCTC 2054 에 직접 작용했을 것으로 예상할 수 있으며, 다른 유익한 장내 세균총이 정상화 될 수 있도록 도와주는 prebiotics의 역할을 하였기 때문이다.

FWRCb9207을 투여한 결과, tetracycline 투여군에 비해 448배의 높은 *S. typhimurium* KCTC 2054에 대한 증식억제 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 백미 발효물이 *S. typhimurium* KCTC 2054의 증식을 직접적으로 억제시키고 장내 유익한 세균총을 활성화 시켜주는 prebiotic effect와 *C. butyricum* IDCC 9207 live

cells이 장내 정착하여 나타내는 probiotic effect의 시너지 효과를 나타내는 synbiotics로 작용했기 때문이다. 이러한 FWRCb9207은 항생제 오남용으로 인해 출현할 수 있는 내성균의 출현의 부작용을 줄일 수 있으며 가축의 질병치료 뿐만 아니라, 예방차원에서도 사용할 수 있는 장점이 있다.

5. 면역증강작용

면역증강효과는 각 시료를 투여하기 전 (D_7)과 후 (D_{24}) 분변의 slgA 양을 비교하여 관찰하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 대조군은 큰 변화가 없는 반면, tetracycline 투여군(Tet)의 slgA 양은 25 ng/g feces 증가하였고 Cb9207 투여군은 10 ng/g feces 감소하였으며, FWR 투여군은 12 ng/g feces 로 오차범위 내에서 소폭 증가하였다. 실험군 중 가장 뚜렷한 증가효과를 나타낸 것은 FWRCb9207 투여군으로 100 ng/g feces 증가하였다.

Cb9207 투여군의 경우 spore 상태로 투여되기 때문에 발아 후,

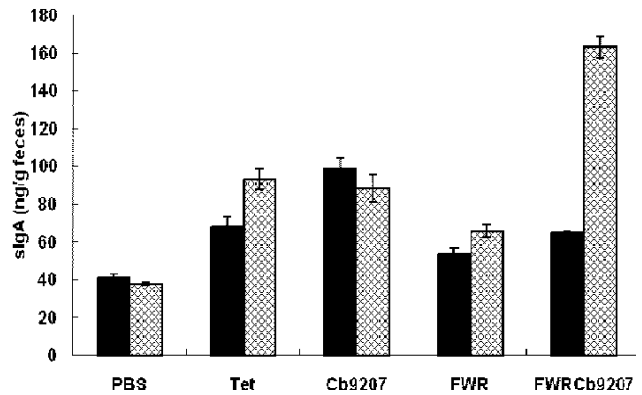


Fig. 7. Secretory IgA in the feces on day 7 and 24 in ICR-mice. Secretory IgA levels in the feces were measured by ELISA. ■, Before samples administration (D_7); ▨, After samples administration (D_{24}). PBS, negative control; Tet, tetracycline feeding group (positive control); Cb9207, *C. butyricum* IDCC 9207 feeding group; FWR, cell-free fermented white rice feeding group; FWRCb9207, Fermented white rice containing *C. butyricum* IDCC 9207 feeding group.

Table 3. The effects of fermented white rice containing *C. butyricum* IDCC 9207 supplementation on rate of gain in ICR mice infected *S. typhimurium* KCTC 2054

	PBS	Tet	Cb9207	FWR	FWRCb9207
Feed intake (g)	2.31	2.95	1.32	1.04	0.96
Increase of weight (g)	2.5	0.8	3.4	2.5	3.1
Rate of gain*	1.08	0.27	2.57	2.40	3.22

* Rate of gain was expressed as a ratio of increase of weight (g) / feed intake (g).

PBS, negative control ; Tet, tetracycline feeding group (positive control) ; Cb9207, *C. butyricum* IDCC 9207 feeding group ; FWR, cell-free fermented white rice feeding group; FWRCb9207, fermented white rice containing *C. butyricum* IDCC 9207 feeding group.

장내 정착하는 시간이 길어지고 감염균인 *S. typhimurium* KCTC 2054에 의한 경쟁적 부착저해로 늦어진 것으로 판단된다. 또한 FWR 투여군은 12 ng/g feces 정도로 sIgA 증가폭이 낮았는데 이는 투여군이 면역증강작용보다는 유해세균에 대한 항균작용이 강해 *S. typhimurium* KCTC 2054 생육억제 후 다른 인자에 의한 면역적 자극효과가 없었기 때문으로 사료된다. 반면 FWRCb9207 투여군은 tetracycline 투여군보다 4배 증가하였는데 이는 백미 발효물에 의해 *S. typhimurium* KCTC 2054가 1차적으로 억제되고 *C. butyricum* IDCC 9207이 장내 증식하면서 숙주의 장관면역을 지속적으로 활성화한 것으로 판단된다. 또한 *S. typhimurium*이 장에 정착하면서 장관내로 분비하는 내독소(endotoxin)를 발효물이 중화시켜 유병률을 낮추고, 궁극적으로는 숙주로부터 *S. typhimurium*을 제거할 수 있다(G. Vinderola et al., 2007). Table 3에서 보는 바와 같이 실험 기간동안 증체 효율은 FWRCb9207 투여군이 사료 1g 섭취시 증체량이 3.22g으로 5개 실험군 중 가장 우수하였다. 이러한 결과는 경제동물 투여시 경제성에 유리한 영향을 미쳐 산업화 가능성을 높일 수 있을 것이라 예상된다.

요 약

이 연구는 천연소재 probiotics 발효물을 대상으로 가축의 장내 유해세균으로 알려진 *S. typhimurium* KCTC 2054와 *E. coli* O157:H7의 생장을 억제시키는 유효 발효물을 선발하여 특성을 연구하는 데 있다. 실험 샘플 444개 중 유해 세균에 대한 항균력이 가장 우수한 것으로 *C. butyricum* IDCC 9207 백미 발효물(FWR)을 최종 선발하였다. *C. butyricum* IDCC 9207이 함유된 백미 발효물(FWRCb9207)을 *S. typhimurium* KCTC 2054로 감염시킨 ICR-mice에 일정기간 투여하였을 때, salmonella의 생육이 억제됨을 확인하였으며, 장관에서 분비되는 secretory immunoglobulin A (sIgA)의 양이 증가됨을 확인하였다. FWRCb9207은 기존의 생균제 보다 빠른 정장효과를 나타낼 수 있으며, 발효물보다 생균보강을 통해 정장작용의 기간을 늘릴 수 있는 것이 장점이다. 또한 FWRCb9207의 급여를 통해 사료로부터 쉽게 감염되는 *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. choleraesuis* ssp. *choleraesuis* 등의 유해세균 증식을 효과적으로 억제시키고 면역력을 증진시킴으로써 가축의 증체율을 높였다. 이러한 FWRCb9207의 synbiotic effects는 궁극적으로 기존 항생제를 대체함으로써 항생제 오남용으로 발생하는 문제점을 해소할 수 있을 것으로 기대된다.

(주제어: *Clostridium butyricum* IDCC 9207, Fermented white rice, Antibacterial activity, Immunostimulatory activity, Synbiotics)

인 용 문 헌

Beutin, L., Geiser, D., Steinruck, H., Zimmermann, S. and 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.

Clarke, D. J. and Morris, J. G. 1976. Butyricin 7423 : A bacteriocin produced by *Clostridium butyricum* NCIB 7423. *J. Gen. Microbiol.* 95:67-77.

Davis, I. J., Robert, A. P., Ready, D., Richards, H., Wilson, M. and Mullany, P. 2005. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid* 54(1):26-38.

DeVries, T. J., Dufour, S. and Scholl, D. T. 2010. Relationship between feeding strategy, lying behavior patterns, and incidence of intramammary infection in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(5): 1987-1997.

Dixon, B. 2000. Antibiotics as growth promoters : Risks and alternatives. *ASM News.* 66: 264-265.

Gulliksen, S. M., Jor, E., Lie, K. I., Hammes, I. S., Løken, T., Åkerstedt, J. and Østerås, O. 2009. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *J. Dairy Sci.* 92(10):5057-5066.

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 antibiotic-resistant strains among bacteria isolated from bovine mastitis, swine diarrhea, and swine pneumonia. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:189-194.

Pomeroy, B. S. and Nagaraja, K. V. 1991. Fowl typhoid, pp. 87-98. In B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, and H. W. Yoder (eds.), *Diseases of poultry*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Rubin, H. E. and Vaughan, F. 1979. Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Sci.* 62(12):1873-1879.

Rubin, H. E., Nerad, T. and Vaughan, F. 1982. Lactic acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. *J. Dairy Sci.* 65(2): 197-203.

Ryu, K. S. and Park, H. S. 1998. Effect of feeding probiotics on performance and intestinal microflora of broiler chicks. *Kor. J. Poult. Sci.* 25(1):31-37.

Schwartz, K. J. 1999. Salmonellosis, Sec. 3, Bacterial diseases, pp. 535-551. In D. J. Taylor (8th ed.), *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Takahashi, M., Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T., Sakazaki, R. and Kamiya, S. 2004. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41(3):219-226.

- Taka-Ichi, M., Mita, N., Tanaka, M., Kitajo, T., Asano, T., Mizuochi, K. and Kaneko, K-I. 1995. Effects of orally administered *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 on mucosal immunity in mice. *Ve.t Immunol. Immunopathol.* 48(3-4): 333-342.
- Tannock, G. W. 1983. Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota, pp. 517-553. In D. J. Hentges (ed.), *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, Academic Press, New York, USA.
- Vinderola, G., Matar, C. and Perdigon, G. 2007. Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar *Typhimurium* infection in mice. *Immunol.* 212:107-118.
- (Received Jun. 27, 2011; Revised Aug. 3, 2011; Accepted Aug. 16, 2011)