

가축의 장관에서 분리한 *Lactobacillus reuterii* BSA-131의 특성

장영효 · 김종근 · 김홍중 · 윤정훈 · 김원용 · 최양웅² · 이원준² · 김영배¹ · 박용하*

생명공학연구소, ¹고려대학교 생명공학원, ²(주)대성미생물연구소

Characteristics of *Lactobacillus reuterii* BSA-131 Isolated from Swine Intestine. Chang, Young-Hyo, Jong-Keun Kim, Hong-Joong Kim, Jung-Hoon Yoon, Won-Yong Kim, Yang-Woong Choi², Won-Joon Lee², Young-Bae Kim¹, and Yong-Ha Park*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusung P.O., Box 115, Taejeon 305-600, Korea, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ²Dae Sung Microbiological Labs., Seoul 135-080, Korea - The development and industrial application of intestinal anaerobic bacteria is highly important in the manufacture of foodstuffs and medical products. We have conducted studies, screening anaerobic intestinal bacteria for acid and bile tolerance and for pathogens suppression in the intestine of swine. One such study was taxonomic in nature and dealt with the isolate's biochemical responses. The results indicated that the BSA-131 strain isolated, which suppressed various pathogens (13 typical strains), were identified as *Lactobacillus reuterii*. The strain, which named *L. reuterii* BSA-131, was able to tolerate acid condition down to pH 2 and could also tolerate bile at 5%. The strain exhibited resistance to a range of antibiotics including, cephalaxin, erythromycin, flumequine, furazolidine, gentamycin, penicillin G, norfloxacin, spectinomycin, tetracycline, tiamuline, neomycin, chloramphenicol, kanamycin etc.

Key words: intestine, probiotics, antagonistic, susceptibility, anaerobic

동물의 소화기관에는 약 100여종의 장내세균이 서식하며 그 밀도는 $10^{11}/g$ 에 이른다고 알려져 있다. 이들은 장내에 유입되는 음식물을 소화 분해하며, 영양소를 합성하고 생체유지에 필요한 에너지를 생성하는 등 중요한 작용을 하고 있다[16]. 따라서 이들의 소화와 합성 그리고 에너지생산은 매우 중요하며 생체 대사 측면에서는 간장보다 중요한 경우도 있다. 장내세균총 구성에서는 혐기성 세균이 약 1000:1의 비율로 호기성 세균에 비하여 월등한 우점종으로 서식하는데, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Eubacteria*, *Lactobacilli* 그리고 *Peptococcaceae* 등이 최우세 균총을 점유하고 있다[1, 16]. 이들은 숙주인 생체와 하나의 작은 생태계를 이루는데 그 구성 인자들로는 상재균총, 일시체류균총과 장관 상피세포 등의 생물적인 요인과, 소장 통과시 소화되지 않는 비생물적인 요인이 있다. 또한 타액과 위액, 췌장액, 간장액과 장내효소, hormone, 담즙, 요소, 면역물질 그리고 peptides 등 내생적 물질과의 관계 등 세가지 요인이 상호 유기적으로 생체와 작용하고 있다고 보고되었다[6]. 열악한 환경조건, 영양불량 상태, 기후, 약품 그리고 stress 등에 의하여 장내세균총의 균형이 파괴되면 장내생태계가 불안정화되어 생체에 악영향을 미치게 된다[6, 16-19]. 따라서 장내세균총의 안정성 유지라는 점이 중요하게 강조

되어, 생체에 유익한 작용을 하는 미생물제제로서 probiotics(생균활성제 또는 생균제)의 개념이 등장하게 되었다[6].

Probiotics는 인체나 동물의 장내에 서식하면서 살아 있는 상태로 제제화한 의약품 또는 동물약품으로서, 장내세균의 이상발효에 의하여 야기되는 제반 증상을 치료, 개선하는 효과를 나타내는 것이다[6]. 인체에 적용하는 제품은 주로 장내세균총의 균형을 안정화시키고, 유해세균의 억제와 설사예방 및 치료, 항돌연변이 효과, 장내상피세포의 보호기능, 그리고 독성물질의 흡수저해와 무독화 및 발암억제에 효과가 있음이 알려지고 있다[1-6, 8, 13, 17-19]. 이러한 효능은 위액의 강산과 췌장분비 담즙산에 대한 내성, 장내 상피세포에의 부착력, 장관내 환경에서의 활발한 증식력 그리고 유해세균에 대한 강한 길항능력 등이 필수적이다[2, 4, 11-13, 17].

전통적으로 축산업에 사용되는 항생제에 대하여 내성을 갖는 세균들이 계속 출현되고 있고, 육류 제품에 항생제가 잔류 축적되어 인체건강과 위생에 심각한 문제를 야기시키는 것으로 보고되고 있어[6], 보다 안전한 육류 식품에 대한 요구가 증가되고 있다. 또한 수출입 되는 육류제품에 대한 잔류 독성물질의 검사가 전세계적으로 강화되는 추세에 있기 때문에, 항생제의 사용을 줄이고 대체물질의 개발에 대한 요구가 커지고 있는 실정에 있다. 이러한 관점에서 probiotics에 대한 연구와 개발이 요구되고 있다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4620, Fax. 82-42-860-4625
E-mail: yhpark@kribb4680.kribb.re.kr

본 연구에서는 축산용 probiotics를 위한 균주 개발을 목적으로 내산성 및 내담즙성과 유해세균 길항력이 뛰어난 혐기성 장내세균을 국내 사육 돼지의 분변으로부터 분리, 동정하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

연구에 사용된 표준균주는 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에서 분양받은 *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594와 *E. coli* KCTC 2441, 2571, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Salmonella enteritidis* KIM sp. 14, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Proteus vulgaris* KCTC 2579, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Enterococcus lactis* KCTC 1913, *Serratia marscense* KCTC 2172, *Citrobacter freundii* KCTC 2006 그리고 *Bacillus subtilis* KCTC 1021 등이다.

균주의 분리

내산성 및 내담즙성을 가진 장내 혐기성 세균을 분리하기 위하여, anaerobic pouch(Gas pack pouch, BBL, USA)를 이용한 O₂-free 상태에서 건강한 돼지(우, 11개월령)로부터 신선한 분변을 채취하였다. 채취한 시료를 골고루 혼합한 다음 pH 2.0으로 조정된 혐기희석액[16]에 희석하고, 진탕기를 이용하여 120분간 진탕하였다. 진탕액 1 ml을 oxgall(Difco, USA) 0.5%가 첨가된 BL agar(Eiken, Japan)에 도말하고, 37°C에서 48시간 anaerobic system(Forma Scientific, USA)내 배양기에서 혐기적으로 배양하였다. 배양후 출현한 집락을 순수분리하고 검정하여 각각을 GAM semi-agar(Eiken, Japan)에 배양하여 -80°C에 보존하였다.

병원성 세균 길항능력 시험

병원성세균은 KCTC에서 분양받은 *E. coli* KCTC 2571 등 13종을 지시균으로 사용하였다. 시험은 Henry D. Isenberg 등[5]의 방법에 따라 수행하였으며, paper disk(8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 이용하여 억제환의 직경(mm)을 측정하였다. 분리균주는 MRS broth에서, 지시균은 TSA agar에서 배양한후 MRS broth로 옮겨 배양하였고, 18시간 배양한 지시균액 100 µl를 MRS agar에 도말 건조한후, 멸균된 disk에 분리균 배양액 30 µl를 접종하여 혐기와 호기적 조건으로 48시간 배양하였다. 대조구는 멸균증류수 접종disk로 하였다.

항생제 감수성 시험

시험에 사용된 항생제는 neomycin과 chlorampheni-

col, kanamycin, erythromycin, penicillin G, cephalaxcin, gentamycin, flumequinine, furazolidine, norflaxacin, spectinomycin, tetracycline, tiamuline 등 13 종류이며, 이들을 적정농도로 증류수와 용매에 용해하고 멸균된 membrane filter(0.2 µm, Gelman Sci. Inc, Michigan, USA)로 채균하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. 용매로서 대부분 증류수를 사용하고, 50% methanol(gentamycin, tiamuline)과 0.1 N NaOH용액(flumequinine, norflaxacin), 95% ethanol(chloramphenicol, erythromycin), 0.1M phosphate buffer(cephalexin) 그리고 dimethylsulfoxide(furazolidine)를 사용하였다. Henry D. Isenberg 등[5]의 방법에 따라 최소억제농도(MIC, µg/ml)로 표시하였다

생리 및 생화학적 특성

분리균주의 특성 조사를 위해 rapid ID API 32A와 API 50 CHL Kit(Bio Merieux Sa, France)를 사용하였다. 또한 95 종류 탄소원 이용성 자동 분석장치인 Micro Station System 3.50(Biolog, USA)이 동정과 분류에 이용되었다[10, 14]. 방법은 균주를 BUGM(Biolog Cat. #70001)+1% glucose 고체배지에서 28-35°C, 24시간 배양하고, 균체를 0.85% NaCl(pH 5.5-7.0)에 현탁하여 590 nm에서 optical density 35-42%로 맞춘 다음, 탄소원이 들어있는 Biolog GP MicroPlate(Biolog Cat. #1004) 96 well에 접종하여 다시 24시간 배양한다. 4시간과 24시간 배양한 후 Micro Station System의 reader로 발색반응을 측정하고, Microlog release 3.50 software를 이용하여 95개 탄소원 이용 패턴에 따라 균주의 분류를 하였다.

지방산 분석

대사산물 분석에는 gas chromatography(Shimadzu GC-14A, Japan)를 이용하여 methyl phenyl silicon fused silica capillary column(25 m×0.25 µm×0.25 mm, 90801E, Quadrex Co, UK)을 사용하였다. 분석 조건은 초기 column온도는 180°C, injection 250°C 그리고 detection 250°C로 행하였다.

Microbial Identification System(MIS, HP 5890 GC, Microbial ID, USA)를 이용한 균체 세포벽의 지방산 조성분석은, separation column(25 m×0.22 mm×0.33 µm, methyl phenyl silicone fused silica capillary column, HP 19091B-102, USA)을 사용하였다[7, 15]. GC 분석 조건은 carrier로서 H₂ gas를 사용하고 검출기는 FID detector, 초기온도 170°C, 최종 270°C, 검출기 300°C 그리고 Injector 250°C 등으로 하였다. Fatty acid methylesters(FAMES) profile은 MIS Software(Microbial ID, Inc., USA)를 이용하여, calibration 표준성분의

retention time, peak의 면적 그리고 조성 비율과 비교하여 각 peak성분을 동정하고 성분의 조성에 따라 균주를 분류하였다.

16S rDNA의 sequencing

DNA를 분리하고 PCR(Perkin-Elmer 480,USA)을 이용한 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 Kim 등[9]과 Yoon 등[20]의 방법으로 universal primer 5'-GAGTT TGATC CTGGC-3'(in *E.coli*, 16S rRNA no. position 9 to 27)과 5'-AGAAA GGAGG TGATC CAGCC-3'(in *E.coli*, 16S rRNA no. position 1542 to 1525)를 이용하였다. 증폭된 16S rDNA의 cloning과 sequencing도 같은 방법으로 하였다. 분석된 sequence는 현재까지 보고된 genus내의 모든 표준균주의 서열과 비교하였고, Knuc value를 구하여 evolutionary distance를 계산하였다. 이를 바탕으로 'the neighbor-joining method'로 phylogenetic tree를 구성하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

BL agar+oxgall 0.5% 배지에서 출현한 colony를 검경하여 gram양성, 간균인 144개의 내산성과 담즙산 내성 균주를 선별하고 형태적인 분류를 하였다. 이들 모두는 GAM semi-agar에 배양하여 -80℃에 보존하며 실험에 사용하였다.

병원성 세균 길항능력 시험

144개 분리균주의 길항력은 균주에 따라 많은 편차를 나타냈으나, 13종의 병원성 세균 모두에 대하여 강한 길항력을 보인 균주가 5종이 선발되었다. 배양조건, 즉 혐기적 배양과 호기적 배양에 따른 길항력 차이는 거의 미

미한 수준이었고, 가장 강한 길항력을 보인 균주를 BSA-131로 명명하였다. *Stap.epidermidis*와 *Ent.cloacea* 두 균주를 가장 강하게 억제하며, *E. coli* 동일종에서 KCTC 2571보다 2441균주를 약하게 억제시키는 차이를 나타낸다(Table 1). 나머지 균주에 대하여 세포벽의 차이에 상관없이 gram양성과 음성균을 광범위하게 억제시키는 것으로 보인다. 억제되는 기작은 생성되는 젖산과 pH저하 그리고 bacteriocin같은 항균물질의 생성 등이 관련된 것으로 보이거나[4, 17-19], 정확한 원인규명에 대한 추가적인 실험이 요구된다. 이와 같은 특성을 가진 균주를 가축의 장내에 투여했을 때 여러 종류의 유해세균이 억제될 것으로 기대된다.

항생제 감수성 시험

시험균은 erythromycin과 penicillin G 2종을 제외하고 11종의 항생제에 대하여 전체적으로 높은 MIC를 나타내 강한 저항성을 가진 것으로 보인다. β-lactam계인 cephalexcin과 penicillin G에는 상대적으로 약한 저항성을 나타내지만, Quinolone계 항생제인 flumequinine과 norfloxacin, 그리고 aminoglycoside계인 spectinomycin, kanamycin, gentamycin 그리고 neomycin에는 대체로 강한 저항성을 보인다(Table 2). 이러한 특성은 축산업에서 많이 사용하는 항생제의 선택에 중요한 기초자료로 이용될수 있을 것이다.

생리 생화학적 특성

BSA-131균주는 Gram 양성, 간균 형태이고 포자생성은 없었으며, 세포의 크기는 0.5- 1.5 μm이었다. Catalase 음성이지만, 호기적 조건에서도 배양이 가능한 facultative anaerobic이며, 운동성과 용혈현상은 보이지

Table 1. Antagonistic activities of isolates BSA-131 against various pathogens by paper disk assay

Pathogenes	Antagonism (mm)
<i>E. coli</i> KCTC 2441	12
<i>E. coli</i> KCTC 2571	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	14
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	16
<i>Salmonella enteritidis</i> KIM sp. 14	14
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	13
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2579	13
<i>Enterobacter cloacea</i> KCTC 2361	16
<i>Enterococcus lactis</i> KCTCK 1913	13
<i>Serratia marscense</i> KCTC 2172	14
<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 2006	14
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	14

Table 2. Antagonistic activities of isolates BSA-131 against various pathogens by paper disk assay

Pathogenes	Antagonism (mm)
<i>E. coli</i> KCTC 2441	12
<i>E. coli</i> KCTC 2571	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	14
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	16
<i>Salmonella enteritidis</i> KIM sp14	14
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	13
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2579	13
<i>Enterobacter cloacea</i> KCTC 2361	16
<i>Enterococcus lactis</i> KCTC 1913	13
<i>Serratia marscense</i> KCTC 2172	14
<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 2006	14
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	14

Disc: 8 mm diameter

Table 3. Results of antibiotic susceptibility test of isolates BSA-131

Antibiotics	MIC (μg/ml)
Cephalexin	75
Erythromycin	3
Flumequinine	5,000
Furazolidine	75
Gentamycin	100
Penicillin G	5
Norfloxacin	1,000
Spectinomycin	3,000
Tetracycline	1,500
Tiamuline	300
Neomycin	100
Chloramphenicol	200
Kanamycin	3,000

않았다(Table 3). Micro Station System 3.50 이용한 95종 탄소원 이용 패턴 software 검색결과, 탄소원 이용성 특성이 *Lactobacillus*속에서 가장 가까운 것으로 나타났다.

지방산 분석

MIS를 이용한 균주 세포벽의 지방산 조성을 분석한 결과, C_{16:0}과 C_{18:1 cis 9}이 주요성분으로 검출되며, 유산균 특유의 cyclopropane 구조인 C19 cyc 9,10/:1를 함유하고 있어 *Lactobacillus*속의 세포벽 지방산 조성(similarity 0.794)인 것으로 나타났다(Table 4).

16S rDNA의 sequencing

Lactobacillus 속의 정확한 species 동정을 위하여, 유전

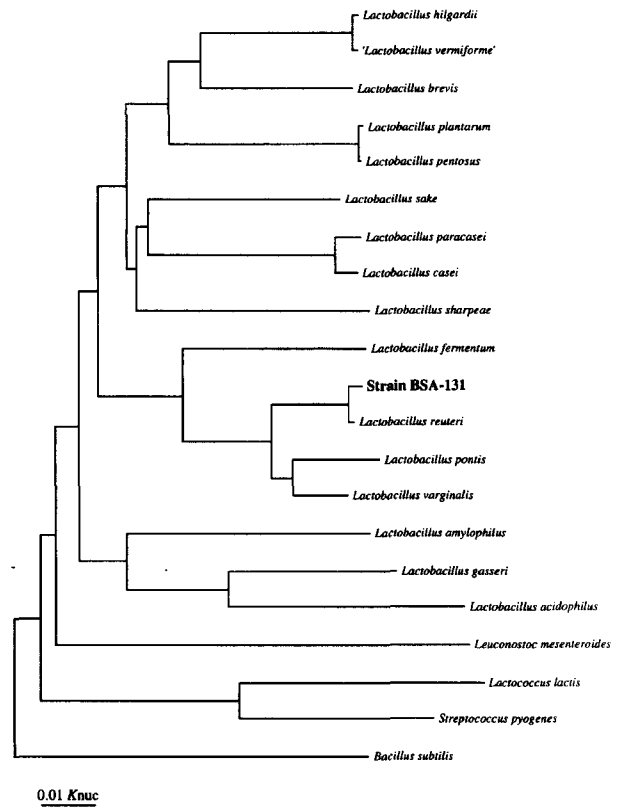


Fig. 1. Phylogenetic tree showing relationship between the isolates BSA-131 and members of the genus *Lactobacillus* obtained from 16S rRNA sequence analysis.

자의 16s rDNA 염기서열을 결정하고 이에 기초한 분자 계통학적 분석에서 *L. reuterii*에 가장 높은 nucleotide similarity(99.7%)를 나타내어 분리균주를 *L. reuterii*로 확인하였다(Fig. 1).

Table 4. Biochemical and physiological characteristics of isolates BSA-131

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Aerotolerance	+	Ribose assimilation	
Catalase	-	D-Xyrose	+
Hemolysis	-	Galactose	+
OF test	F	D-glucose	+
Motility	-	Mannose	+
Gas formation from glucose	-	Maltose	+
Spore	-	Lactose	+
Production of lipase	-	Melibiose	+
Production of lechitinase	-	Saccharose	+
Proteolysis	-	D-raffinose	+
Indole production	-	Gluconate	+
Urease production	+	Hydrolysis of esculine	+
Nitrate reduction	+	Growth in the bile 5%	+
Arginine dehydrolysis	+	Growth at pH 2.0	+

요약

국내산 돼지의 장관으로부터 혐기적 분리방법을 통하여 내산성과 내담즙성이 뛰어난 혐기성 세균을 분리하고, 병원성세균 길항력이 가장 우수한 BSA-131 균주를 선발 동정하였다. pH 2.0, 5% bile에 대한 내성이 있으며, *E. coli*를 포함한 13종의 병원성 세균을 억제하는 길항 능력과 kanamycin 등 13종의 항생제에 내성이 있는 것으로 나타났다. 이균주는 *Lactobacillus reuterii*라는 균으로 동정되었다.

REFERENCES

- Barnes, E. M. 1986. Anaerobic bacteria of the normal intestinal microflora of animals. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **13**: 225-238.
- Campbell, G. L. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* **72**: 449-466.
- Coconnier, M.-H., M.-F. Bernet, S. Kerneis, G. Chauviere, J. Fourniat, and A. L. Servin. 1993. Inhibitor of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 299-306.
- De Simone, C., S. Tzantoglou, L. Baldinelli, S. Difabio, B. Bianchi-Salvadori, E. Jirillo, and R. Vesely. 1988. Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* infection by a diet supplemented with yogurt. *Immun. Pharmacol. Immunotoxicol.* **10**(3): 399-415.
- Henry D. Isenberg. 1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 1: 5.1-5.24. American Society for Microbiology(ed.). Washington, D. C.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Huys, G., M. Vancaneyt, R. Coopman, P. Janssen, E. Fallesen, M. Altwegg, and K. Kersters. 1994. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 651-658.
- Khedkar, C. D., J. M. Mantri, and S. A. Kulkarni. 1989. Therapeutic properties of acidophilus milk. *Indian Dairymen* **41**(11): 562-565.
- Kim, S. -B., J.-H. Yoon, H. Kim, S. T. Lee, Y.-H. Park and M. Goodfellow. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 351-356.
- Klingler, J. M., R. P. Stowe, D. C. Obenhuber, T. O. Groves, S. K. Mishra, and D. L. Pierson. 1992. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2089-2092.
- Ko, Y.-H., T. -K. Oh, and *et als.* 1991. *Lactobacillus* sp. KCTC 8458BP and its application. *Kor. Patent Publ. No.* 91004366: 187-195.
- Ko, Y.-H., T. -K. Oh, and *et als.* 1991. New *Lactobacillus* sp. TSC-66 with acid and bile tolerance. *Kor. Patent Publ. No.* 91007817: 229-236.
- Kobayashi, A., S. Kawai, Y. Ohbe, and Y. Benno. 1988. Fecal flora of infants with biliary atresia: Effects of the absence of bile on fecal flora. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**: 1211-1213.
- Lee, J.-S., C. O. Chun, M.-C. Jung, W.-S. Kim, H.-J. Kim, M. Hector, S.-B. Kim, J.-S. Ahn, Y.-H. Park, and T.-I. Mheen. 1997. Classification of isolates originating from *Kimchi* using carbon-source utilization patterns. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 68-74.
- Lee, J. S., M. C. Jung, W. S. Kim, K. C. Lee, H. J. Kim, C. S. Park, H. J. Lee, Y. J. Joo, K. J. Lee, J. S. Ahn, W. Park, Y. H. Park, and T. I. Mheen. 1996. Identification of lactic acid bacteria from *Kimchi* by cellular FAMES analysis. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 234-241.
- Mitsuoka T. 1984. *A Color Atlas of Anaerobic Bacteria*, 2nd ed. Shobunsha, Tokyo.
- Shahani, K. M. and A. D. Ayobo. 1980. Role of dietary Lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 2448-2457.
- Snoeyenbos, G. H. 1979. Role of native intestinal microflora in protection against pathogens. *Pro. Annu. Meet. US. Anim. Health. Assoc.* **83**: 388-393.
- Sydney, M. Finegold. 1970. The significance of the intestinal microflora. *Del. Med. J.* **42**(11): 341-345.
- Yoon, J. H., J. S. Lee, Y. K. Shin, Y. H. Park, and S. T. Lee. 1997. Reclassification of *Norcardioides simplex* ATCC 13260, ATCC 19565, and ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 904-907.

(Received September 17, 1998)