

# Probiotic 균주의 Pathogenic Organism에 대한 억제 활성과 송아지분변 분리균주의 억제활성 특성

배임희\* · 변정열\* · 배귀석\* · 이상석\*\* · 장문백\* · 윤영호\*

중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과\*, 국립순천대학교 동물자원과학과\*\*

## Inhibition Activity Against Pathogenic Organism of Probiotic Bacteria and Characterization of Inhibition Activity of Isolated Bacteria from Calf Dejecta

I. H. Bae\*, J. R. Byun\*, G. S. Bae\*, Sang. S. Lee\*\*, M. B. Chang\* and Y. H. Yoon\*

Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University\*

Department of Animal Science, Sunchon National University\*\*

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the inhibitory activity of *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., and calf fecal isolates against pathogenic *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. Among thirteen strains of *Lactobacillus* spp. tested, *Lactobacillus helveticus* CU631 showed the highest inhibition against three pathogens, whereas *Bacillus* spp. showed a weak inhibitory activity. Four calf fecal isolates were identified as *Lactobacillus pentosus* CU13, CU05, *Pediococcus pentosaceus* CUR02, and *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* CUM14. The whole cell and cell wall components of *L. rhamnosus* CU02 and *L. pentosus* CU13 were active in the inhibition of *L. monocytogenes*. The medium components and levels, which affect on the inhibitory activity, were revealed as Tween 80 1.0%, peptone 3.0%, yeast extract 3.0%, glucose 3.0%, beef extract 3.0%, and NaCl 1.0~3.0%, respectively. Inhibitory activity of the supernatant culture medium was not affected by catalase and proteinase K treatment but affected by heat treatment at 80°C and neutralization, which implies that the inhibitory activity is due to the production of organic acids during the growth. *L. pentosus* CU13 and *L. rhamnosus* CU02 exhibited broad inhibition spectrum against 16 out of 21 strains including some pathogens. Oral administration of *L. rhamnosus* CU02 to the mice infected with *E. coli* O157:H7 was proven to be effective to recover their body weight during the experimental period.

(Key words : Inhibition activity *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., calf dejecta isolates, *Escherichia coli* O157:H7)

### I. 서 론

가축의 성장을 촉진하거나 질병을 치료의 목적으로 많은 항생물질이 사용되고 있으나 이러한 항생물질이 가축 내 장기간 투여되거나 무분별한 사용으로 인하여 체내에서 내성이 강해

진 *Salmonella*와 같은 항생물질 내성균의 출현하여 bacteria에 의한 질병의 치료가 어렵다. 사양관리체계에서 생산된 축산물은 체내 항생물질 잔류문제 등으로 공중 보건학적 위험성 또한 큰 문제로 대두되고 있다(Fuller, 1992; Jonsson 과 Conway, 1992).

이 논문은 농업기술관리센터와 2006년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

Corresponding author : M. B. Chang, Department of Animal Science & Technology, College of Industrial

Tel : 031-670-3029, e-mail : moonbaek@cau.ac.kr

동물사료에 성장촉진제로 사용된 항생제와 항균제에 대한 일반 대중의 우려가 높아짐에 따라 유럽에서는 인체에 사용되고 있는 항생제와 성장촉진제를 가축의 성장촉진제로 사용할 수 없도록 규제하고 있으며, 미국 식품의약국의 경우 동물성장촉진용으로 penicillin이나 terramycin 등의 항생제 또한 사용을 금지하고 있는 실정이다. 이러한 현재 실정에서 소비자의 욕구와 국가적인 검사강화 방침 등은 농축가들 스스로 축산물에 유해물질인 항생제와 항균제를 대체할 수 있는 대체물질에 대한 선호도가 증가되고 있다. 따라서 항생물질을 대체하면서 가축의 건강과 사료 효율 증진 및 축산물의 안정성을 높이기 위한 probiotics가 부각되기 시작하였다(Axelsson과 Lindgren, 1987; Barrow 등, 1977; Fuller, 1992; Raibaud 등, 1961; Robinson 등, 1988; Robinson 등, 1984; Zani 등, 1974). 현재 대부분의 probiotics 젖산균들은 거의 수입의존도가 높을 뿐 아니라 균주에 대한 능력검정 없이 시중에 판매되고 있는 실정이다. 따라서 우리나라 고유의 축산환경에 대한 적합성과 기능성을 확인하여 선발된 균주의 필요성이 시급한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내산 Holstein 송아지 분변에서 채취한 위산과 담즙산에 대한 내성이 있는 균주로서 병원성 세균에 대한 억제활성, 배지성분 및 배양시간에 따른 억제활성 변화, 여러 가지 indicator organisms에 대한 억제활성 범위를 측정하고 추가적으로 억제활성물질 탐색과 함께 동물실험을 통한 산업적 probiotics제제로서의 이용 가능성을 검토하기 위한 기초 자료를 확보하기 위해 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 보관

본 실험에 사용한 *Lactobacillus* spp. 및 *Bacillus* spp. 병원성세균은 Table 1에 제시된 바와 같다. *Lactobacillus* spp.의 배양은 37°C MRS broth (Deman-Rogosa-sharpe, Difco, USA) broth에서 하였고, 보존은 동해 방지제인 11% skim milk에

Table 1. Kinds of thirteen *Lactobacillus* spp. stains and eleven *Bacillus* spp. strains for experiments

Code	Strains
<i>Lactobacillus</i> spp.	
CUY901	<i>Lactobacillus casei</i> CUY901
CU01	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU01
CU03	<i>Lactobacillus plantarum</i> CU03
CU05	<i>Lactobacillus brevis</i> CU05
CU3-7	<i>Lactobacillus fermentum</i> CU-07
CU041	<i>Lactobacillus salivarius</i> CU-041
CU023	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU023
CU024	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU024
CU631	<i>Lactobacillus helveticus</i> CU631
CU025	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU025
CU026	<i>Lactobacillus casei</i> CU026
CU027	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU027
CU028	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU028
<i>Bacillus</i> spp.	
b1015	<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1015
b1805	<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1805
b1807	<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1807
b1809	<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1809
b1823	<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1823
b3625	<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 3625
b841	<i>Bacillus coagulans</i> KFRI 841
b819	<i>Bacillus coagulans</i> CU 819
BP 1	<i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD BP-1
b815	<i>Lactobacillus sporogenes</i> CU 815
SL	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ATCC 13538

adonitol을 0.75M (adonitol 11.4 g /100 ml skim milk)이 되도록 제조하여 농축 cell과 동해방지제를 1:1의 비율로 혼합한 후 농축 cell을 -70°C에 냉동 보존하였다. 11종의 *Bacillus* spp.는 *Bacillus coagulans* broth (BCB)에서 배양을 하였으며, Indicator organisms로서 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157,

*Listeria monocytogenes* ATCC 15313는 Brain heart Infusion (BHI, Difco, USA)에서 배양 한 후, 배양액과 80% glycerol을 7:3의 비율로 혼합하여 -70℃에 보관하였다.

## 2. 유산균의 분리·동정

젖먹이 송아지(Holstein)의 분변 1g을 멸균된 생리식염수를 이용해  $10^6 \sim 10^7$  cfu/ml의 수준까지 희석하여 MRS agar (pH 6.5), Rogosa SL agar (pH 5.4), M17 agar (pH 6.9)를 각 배지 10 ml당 sample 1 ml씩을 각각 도말 후 젖산균으로 추정되는 colony를 선별하였다. 분리된 균주는 gram 염색 확인 후 당의 이용성 확인을 위해 균주들은 MRS broth에서 계대배양한 후 멸균 증류수로 3회 세척한 다음 접종하여 37℃에 48시간 동안 배양하여 확인하였다. API 50 CHL carbohydrate test kit (bioMerieux Co., France)를 이용하여 50가지 당 발효를 측정하였다. MRS agar에서 2회 이상 계대배양 후 plate에서 균체만을 모아 2ml의 분산배지에 분산 시킨 후(분산배지 1) Mcfarland Standard 2와 동일한 탁도를 유지하도록 균체가 함유된 분산배지(1)를 첨가하였다. API 50CHL 배지에 분산배지 2를 2방울 첨가하여 strips에 접종하여 mineral oil이 증층을 이루도록 첨가한 후 37℃에 48시간 배양하였다. API LAB plus (Identification software bioMerieux, France)를 이용하여 배양된 strip에 존재하는 균주를 동정하였다.

## 3. 송아지 분변에서의 병원성억제활성 유산균 선별

Diffusion assay 방법을 이용하여 병원성 미생물의 성장억제 활성이 있는 유산균을 송아지 분변에서 선별하였다. 멸균된 생리식수에 1g의 분변을  $10^6 \sim 10^7$  cfu/ml 수준까지 희석하여 10 ml의 MRS agar (pH 6.5), Rogosa SL agar (pH 5.4), M17 agar (pH 6.9)에 각각 1 ml씩 도말하였다. 도말된 배지에 0.7 µl *Listeria monocytogenes* ATCC 15313을 접종한 후 5 ml의 0.7% top agar를 overlay 하여 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후

주위에 억제 존이 큰 colony만을 선택해 MRS broth에 3회 계대배양 하여 활력을 최대화 하였으며, 그 중 활력과 억제력이 가장 큰 균주를 선별하였다(Schillinger와 Lucke, 1989).

## 4. *Lactobacillus* spp.와 *Bacillus* spp.의 병원성균 억제활성

중앙대학교 동물자원과학과 축산물가공학 연구실에서 보유중인 13종의 *Lactobacillus* spp.와 11종의 *Bacillus* spp. *Sporolactobacillus*를 MRS broth와 *Bacillus coagulans* broth (BCB)에서 각각 3회에 걸쳐 계대배양한 후 병원성균에 대한 억제활성을 비교하였다(Table 1). Indicator organisms 으로는 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Staphylococcus aureus* 및 *E. coli* O157:H7 ATCC 35105을 사용하였으며, 병원균에 억제활성은 ultrasensitive diffusion assay (Robert 등, 1991)을 이용하였다. 병원성 미생물을 trypticase soy broth (Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후 각 균주의 cell 현탁액 1 ml를 petri dish에 분주하였다. 균이 분주된 petri dish에 1 mm 두께로 trypticase soy agar를 분주하여 굳힌 후 3 mm의 well을 gel punch를 이용하여 형성하였다. 각각에 well에 *Lactobacillus* spp. 5 µl를 접종하여 37℃에서 18~24시간 동안 배양한 후 well 주위에 diffusion zone의 직경을 측정하였다.

## 5. 최적 생장조건 및 억제활성변화

최초 분리한 *Lactobacillus pentosus* CU13과 *Lactobacillus rhamnosus* CU02의 여러 종류의 배지성분에 따른 생장 조건 및 억제 활성과 배양시간에 따른 억제 활성 test를 실행하였으며, 추가적으로 분리한 *Lactobacillus pentosus* CU05, *Pediococcus pentosaceus* CUR02, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* CUM14에 대해서는 배양시간에 따른 억제활성 시험을 실시하였다. 배지성분에 따른 생장조건 및 억제활성은 송아지분변 분리균주인 *Lactobacillus pentosus* CU13과 장내분리균주인 *Lactobacillus rhamnosus* CU02를 시험균주로

사용하였다. 유산균 증균배지인 MRS broth의 주요 구성성분의 함량에 따른 최적의 성장조건 및 억제활성을 찾기 위해 Ogunbanwo 등 (2003)의 방법을 변형하여 각각의 배지성분인 tween 80은 각 0~1%의 함량 변화를 하였으며, peptone, yeast extract, D-glucose와 beef extract는 각각 0~3%의 함량 변화시켰다. 또한 NaCl은 각각 0~3%씩 첨가하여 병원성균에 대한 억제활성 activity unit per ml (AU)와 균의 성장 정도를 측정하였다. 병원성 균은 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313을 이용하였으며, 균의 성장 정도는 Spectrophotometer (Spectronics 21D, Milton Roy, USA)를 이용하여 OD을 580nm로 하여 측정하였다. AU의 측정을 위한 실험 방법은 diffusion assay의 방법 (Schillinger와 Lucke, 1989)으로 수행하고 sample은 분리균주를 37℃에 20시간 배양한 후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 후 시험에 사용하였다.

## 6. 배양시간에 따른 억제활성

장내 분리균주인 *Lactobacillus rhamnosus* CU02와 분변 분리균주인 *Lactobacillus pentosus* CU13, *Lactobacillus pentosus* CU05, *Pediococcus pentosaceus* CUR02, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* CUM14에 대한 배양 시간에 따른 억제활성 시험은 Indicator organism으로 *Listeria monocytogenes*를 사용하였으며, 배지는 MRS broth를 이용하여 37℃에서 배양하였다. Sample은 5일 동안 24시간 단위로 채취하였으며 whole cell, cell wall, cell extract, supernatant를 각각 분리하여 사용하였다. Cell extract는 pH를 조절하지 않은 것과 6.5에서 7.0으로 조절한 두 가지와 cell wall과 cell extract는 ultrasonication을 이용하여 분리하여 diffusion assay (Schillinger와 Lucke, 1989)를 이용하여 억제활성을 측정하였다.

## 7. 억제활성범위측정

장내에서 분리한 균주 *Lactobacillus rhamnosus* CU02와 송아지분변에서 분리한 균주 *Lactobacillus pentosus* CU13의 indicator organisms에 대한 억

제활력을 측정하기 위해 clean zone test를 수행하였다(Ogunbanwo등, 2003). 각각의 분리균주를 37℃에 20시간 배양한 후 1,500 rpm 10분간 원심분리 후 균체를 취한 후 동결건조 하여 10배로 희석하여(w/v) clean zone을 측정하였다. Indicator organisms은 총 21가지를 사용하였고 유산균종은 MRS에서 37℃에 20시간 배양한 후에 사용하였으며, 나머지 organisms은 nutrient배지에서 37℃에 20시간 배양한 후에 사용하였다.

## 8. 억제활성물질 탐색

분리균주들의 병원성균에 대한 억제활성 성분을 탐색은 pH를 중화시킨 whole cell과 cell wall sample 이용하여 실시하였다. Indicator organism은 *Listeria monocytogenes*를 사용하였고 diffusion assay (Schillinger와 Lucke, 1989)의 방법을 이용하여 well을 다섯 구획으로 나누어 무처리구, 60℃에 30분간 열처리한 처리구, 90℃에 30분간 열처리한 처리구, proteinase-K (Sigma, USA)를 첨가한 처리구와 catalase (Sigma, USA)를 첨가한 처리구를 접종하여 각각의 diffusion zone의 범위를 비교하였다(Ogunbanwo 등, 2003).

## 9. 동물실험

*Lactobacillus rhamnosus* CU02와 *Lactobacillus pentosus* CU13에 대한 동물실험은 6주령의 ICR mouse male ( $28 \pm 1$  g, 7주령)을 이용하였으며, 각 처리구당 9마리씩 4처리구(총 36마리)를 하여 한 케이지당 3마리씩 사육하였다. 사육조건은 조명은 하루 중 12시간, 온도는 22~23℃, 습도는 40~50%를 유지하였다. 사료는 익스투루전 사료(Agribrand purina korea, Korea)와 음수를 자유 급여하였으며, 깔짚은 주 2회 교체하였다. 병원성균에 대한 저항력을 시험하기 위해 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105를 강제급여 시켰으며, 동시에 *Lactobacillus rhamnosus* CU02와 *Lactobacillus pentosus* CU13을  $10^9$ cfu/0.5 ml씩을 각각 강제 급여시켜 3일차까지의 체중 변화를 대조구와 병원성균 처리구와의 차이

를 비교 측정하였다.

10. 통계처리

본 실험의 모든 통계처리는 SAS (2000)의 program package의 GLM (General Linear Model) 방법에 의해 표준오차를 구하여 분산분석 후 Duncan's multiple range test (Steel과 Torrie, 1981) 를 통하여 P<0.05에서 처리간 평균의 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Lactobacillus* spp.와 *Bacillus* spp.의 억제활성

*Lactobacillus* spp.의 억제활성 시험에서 *Salmonella typhimurium*에 대한 억제 활성이 가장 높은 균주는 *Lactobacillus helveticus* CU631 이었으며 (p<0.05), *Escherichia coli* O157에 대해서는 *Lactobacillus acidophilus* CU027이 가장 높았다 (p<0.05). *Staphylococcus aureus*에 대한 억제 활

성은 *Lactobacillus plantarum* CU03, *Lactobacillus casei* CU901와 *Lactobacillus acidophilus* CU028에서 높은 경향을 나타내었다(p<0.05) (Table 2). Robert 등(1991)의 보고에 의하면 *Lactobacillus* spp.가 항균물질을 생산한다고 하였으며, 또한 Venkitanarayanan 등 (2002)은 젖산균이 생산하는 lactic acid와 hydrogen peroxide가 *Salmonella enteritides*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 등의 생장을 억제한다고 하였다. 따라서 본 실험에 사용된 억제활성이 높은 *Lactobacillus* spp. 또한 유기산과 hydrogen peroxide에 의해 병원성균을 억제하는 것으로 사료된다.

*Bacillus* spp.의 억제활성은 *Salmonella typhimurium*에 대한 억제활성이 가장 높은 균주는 *Bacillus coagulans* KCTC 1015였으며(p<0.05), *Bacillus coagulans* KCTC 1809, *Bacillus coagulans* KCTC 1823과 *Bacillus coagulans* KCTC 1805 처리구 순으로 억제활성을 나타내었으나 나머지 처리구에서는 diffusion zone을 생성한 well이 나타나지 않았다. *Escherichia coli* O157에 대한 항균활성은 유의적 차이 없이 *Bacillus coagulans* KCTC 1805와 *Sporolactobacillus inulinus* ATTC

Table 2. Intensity of inhibition of pathogens by *Lactobacillus* spp. by ultrasensitive diffusion assay

Species	Diffusion zone diam (mm)		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>E.coli</i> O157	<i>Satphylococcus. aureus</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU01	3.50 <sup>a</sup>	6.00 <sup>cd</sup>	5.25 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> CU03	3.50 <sup>a</sup>	—	6.00 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i> CU05	—	6.50 <sup>bc</sup>	—
<i>Lactobacillus fermentum</i> CU07	2.00 <sup>c</sup>	—	—
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU023	—	6.00 <sup>cd</sup>	5.75 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> CU041	2.37 <sup>a</sup>	—	—
<i>Lactobacillus helveticus</i> CU631	3.75 <sup>a</sup>	4.50 <sup>efg</sup>	5.25 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> CU901	3.50 <sup>a</sup>	5.12 <sup>def</sup>	6.00 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU024	—	4.00 <sup>g</sup>	5.00 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU025	—	7.25 <sup>ab</sup>	5.25 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> CU026	2.87 <sup>b</sup>	4.16 <sup>gf</sup>	5.50 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU027	1.12 <sup>d</sup>	8.00 <sup>a</sup>	5.50 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CU028	1.00 <sup>d</sup>	5.50 <sup>cde</sup>	6.00 <sup>a</sup>

— ; Diffusion zone diam is zero.

a, b, d, ab, bc, cd, gf, cde, def, efg Means with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05).

Table 3. Intensity of inhibition of pathogens by *Bacillus* spp. by ultrasensitive diffusion assay

Species	Diffusion zone diam (mm)		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>E.coli</i> O157	<i>Listeria</i>
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1015	7.00 <sup>a</sup>	–	–
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1805	4.25 <sup>b</sup>	1.50 <sup>a</sup>	–
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1807	–	–	4.00 <sup>a</sup>
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1809	6.25 <sup>a</sup>	–	4.50 <sup>a</sup>
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 1823	5.30 <sup>b</sup>	–	–
<i>Bacillus coagulans</i> KCTC 3625	–	–	–
<i>Bacillus coagulans</i> KFRI 841	–	–	–
<i>Bacillus coagulans</i> CU 819	–	–	–
<i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD BP-1	–	–	–
<i>Lactobacillus sporogenes</i> CU 815	–	–	–
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ATCC 13538	–	2.00 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>

– ; Diffusion zone diam is zero

<sup>a, b</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

13538에서 나타났다. *Listeria*에 대한 항균활성은 유의적 차이 없이 *Bacillus coagulans* KCTC 1807과 *Bacillus coagulans* KCTC 1809에서만 나타났다(Table 3). 이는 보유하고 있는 *Bacillus* spp.가 억제활력이 없음을 의미할 수도 있겠지만 보유균주의 접종 당시에 균주가 발아하지 않은 상태이거나 indicator organisms 사이에서 포자를 형성했을 가능성이 있다고 사료된다. 그러므로 이들 억제활력이 없는 *Bacillus* spp.에 대해서는 발아와 포자형성 조건에 대한 조절을 통하여 억제활성이 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

## 2. 송아지 분변에서의 젖산균 분리동정

최초 송아지의 분변에서 분리한 균주 *Lactobacillus pentosus* CU13과 중앙대학교 동물자원과학과에서 보관균주인 장내 분리균주 *Lactobacillus rhamnosus* CU02를 사용하여 연구를 진행하였다. 또한 *Lactobacillus pentosus* CU05, *Pediococcus pentosaceus* CUR02, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* CUM14를 추가로 분리하여 실험을 실시하였다. 당 발효성 확인 결과 CU13과 CU05는 *Lactobacillus pentosus*, CUR02는 *Pediococcus pentosaceus*와

CUM 14는 *Lactococcus lactis* ssp *lactis*로 확인되었다(Table 4).

## 3. 배지성분에 따른 성장조건 및 억제활성

MRS broth의 구성성분의 변화에 따른 장내 분리균주인 *Lactobacillus rhamnosus* CU02와 최초 분변 분리균주인 *Lactobacillus pentosus* CU13의 indicator organisms인 *Listeria monocytogenes* 배지성분에 따른 성장 조건 및 억제활성은 각각 MRS broth의 구성성분인 tween 80 (0.0~1.0%), peptone (0.0~3.0%), yeast extract (0.0~3.0%), glucose (0.0~3.0%)와 beef extract (0.0~3.0%)의 함량변화, 그리고 NaCl (1.0~3.0%)의 첨가에 따라 균의 성장과 억제활성에 영향을 나타내었다. 그러나 MRS에 포함된 광물질들은 분리균주의 성장이나 억제활성에 영향을 끼치지 않았으며, 성장 정도와 억제활성이 높게 측정된 성분만을 교합한 배지에서 또한 성장률과 억제활성 높은 경향을 나타내지 않았다(Ogunbanwo, 2003). 따라서 배지의 유기성분들이 균주의 성장 및 억제활성과 밀접한 관련이 있으며, NaCl의 첨가 또한 성장조건 및 억제

Table 4. Biochemical characteristics of lactic acid bacteria isolated

Fermentation	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU05	<i>Pediococcus pentosaceus</i> CUR02	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> CUM14
Glycerol	+	+	-	+
Erythritol	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+
L-xylose	-	-	-	-
D-adonitol	-	-	-	-
Methyl- $\beta$ D-xylopyranoside	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	-
L-rhamnose	-	?	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	-	-
D-sorbitol	+	+	-	-
Methyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	-	-	-	+
Methyl- $\alpha$ D-glucofuranoside	-	-	-	-
N-acetylglucosamine	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+
Esculin Ferric citrate	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
D-cellobiose	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+
D-lactose	+	+	-	+
D-melibiose	-	-	-	-
D-saccharose	+	+	-	-
D-trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	-	+	-
D-melezitose	+	+	-	-
D-raffinose	-	-	-	-
Amidon	-	?	-	+
Glycogen	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+
D-turanose	-	-	-	-
D-lyxose	-	-	-	-
D-tagatose	+	+	+	+
D-fucose	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-
Potassium gluconate	+	+	-	-
Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-
Potassium 5-ketogluconate	-	-	-	-

+; positive, -; negative, Indicator organisms ; *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

활성과 관련 있는 것으로 사료된다(Table 5). 이와 같은 결과는 Biswas 등(1991)의 연구에서 *Pediococcus acidilactici* H에 의한 pediocin ACH의 생성을 TGE 배지, MRS 배지와 변형 배지는 균주의 항균활성에 많은 영향을 미친다는 결과와 일치하였다. 최초로 최소 희석배율을 3,200배로 했을 때에 송아지분변 분리 균주인 *Lactobacillus pentosus* CU13의 경우 AU (arbitrary unit)가 측정되지 않았다. 따라서 두 분리 균주인 *Lactobacillus*

*rhamnosus* CU02와 *Lactobacillus pentosus* CU13을 일반적인 MRS broth에서 37°C에 20시간 동안 배양한 후 whole cell과 cell wall을 각 10배, 400배, 800배, 1,600배로 희석하였을 때 억제활성은 *Lactobacillus pentosus* CU13의 경우 균체에 서는 1,600 AU를, 세포벽에서 800 AU를 나타내었으며, 두 균주의 세포 내용물에서는 diffusion zone이 나타나지 않았다(Table 6). 따라서 두 균주 모두 균체와 세포벽 성분이 주요 억제력을

Table 5. Effect of nutrient component supplementation in MRS medium

Component	%	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU02	
		Growth (580nm)	Inhibitory <sup>1)</sup> vs. <i>Listeria monocytogenes</i> (AU/ml)	Growth (580nm)	Inhibitory vs. <i>Listeria monocytogenes</i> (AU/ml)
tween 80 <sup>2)</sup>	0.0	0.97	—	0.30	1.00
	0.5	1.44	1.00	2.15	6400.00
	1.0	1.54	1.00	2.50	6400.00
Peptone <sup>3)</sup>	0.0	1.31	1.00	1.84	3200.00
	2.0	—	—	2.22	3200.00
	3.0	—	—	2.30	6400.00
Yeast extract <sup>4)</sup>	0.0	0.64	1.00	1.48	6400.00
	1.0	—	—	2.50	6400.00
	2.0	—	—	2.50	6400.00
	3.0	—	—	2.50	6400.00
D-glucose <sup>5)</sup>	0.0	1.30	—	0.30	1.00
	1.0	1.33	1.00	—	—
	3.0	1.50	1.00	2.10	3200.00
Beef extract <sup>6)</sup>	0.0	1.37	1.00	1.95	3200.00
	2.0	1.63	1.00	2.10	6400.00
	3.0	1.66	1.00	2.30	6400.00
NaCl <sup>7)</sup>	1.0	1.58	1.00	2.48	1600.00
	2.0	1.55	1.00	1.66	1.00
	3.0	1.34	1.00	1.13	1.00
Normal		1.41	1.00	2.22	3200.00

<sup>1)</sup> Indicator organisms; *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

<sup>2)</sup> MRS + tween 80(0.0~1.0%), <sup>3)</sup> MRS + peptone(0.0~3.0%), <sup>4)</sup> MRS + yeast(0.0~3.0%),

<sup>5)</sup> MRS + glucose (0.0~3.0%), <sup>6)</sup> MRS + beef(0.0~3.0%), <sup>7)</sup> MRS + NaCl(1.0~3.0%).

Table 6. Inhibition activity against *Listeria monocytogenes* in whole cell and cell wall of isolates.

Dilution rate	Whole cell		Cell wall	
	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU02	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU02
× 10	+	+	+	+
× 400	+	+	+	—
× 800	+	+	+	—
× 1,600	+	+	—	—

+; inhibition activity positive, -; inhibition activity negative

\* Indicator organisms; *Listeria monocytogenes* ATCC 15313



가지고 있는 것으로 나타났다.

#### 4. 배양시간에 따른 억제활성

배양 후 5일 동안 24시간 간격으로 분리 균주들의 억제활성 측정은 MRS broth 배지를 사용하여 diffusion zone을 측정하였으며, indicator organisms으로는 *Listeria monocytogenes*을 사용하였다. 배양 5일 동안 모든 분리 균주의 whole cell과 cell wall은 상당한 억제활성을 나타내었으며, supernatant의 경우 낮은 억제활성을 보였다. 그러나 10M NaOH를 이용하여 pH를 6.5~7.0로 조절했을 때와 cell extract의 경우 억제활성을 나타내지 않았다(Figure 1) (Table 7). 이와 같은 결과는 supernatant 내에 존재하는 유기

산에 의해 *Listeria monocytogenes*에 대해 억제활성을 나타내는 것으로 사료된다. Ogundanwo 등(2003)은 *Lactobacillus brevis* OG1의 배양 시간에 따른 bacteriocin의 억제활성 연구가 대수성장기 이후에 억제활성이 떨어졌다는 결과와 대조적으로 본 실험에 사용된 sample은 대수성장기 시기부터 사멸기 시기 이후까지 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 항균 물질이 미생물 성장기 전반에 걸쳐 생성되는 bacteriocin인 경우 성장기 이후 정체기에 활력이 감소하는데 성장기에 유발된 세포 밖 내생 proteinase 때문이라고 할 수 있다(Joerger와 Klaenhammer, 1986; Piard 등, 1990). 따라서 본 실험에 사용된 sample은 내생 proteinase를 생성하지 않거나 그 영향을 받지 않으며, 배양 시간에 따른 억제활성은

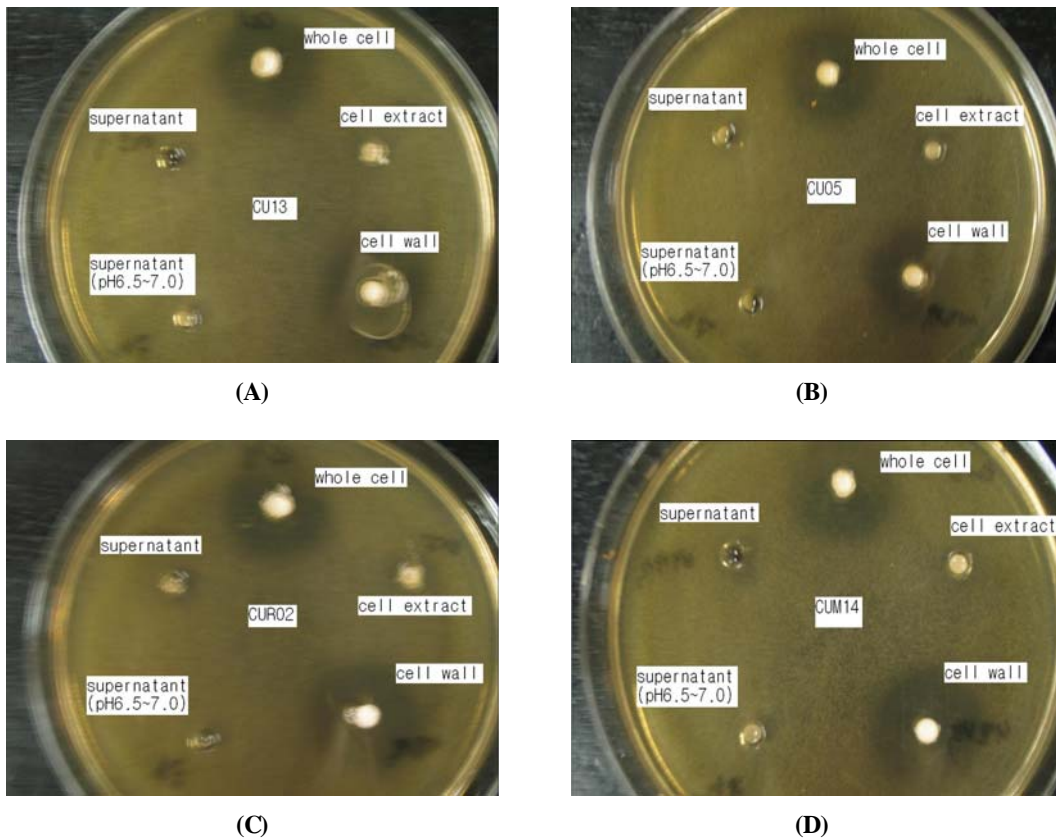


Fig. 1. Clean zone test of (A) *Lactobacillus pentosus* CU13, (B) *Lactobacillus pentosus* CU05, (C) *Pediococcus pentosaceus* CUR02 and *Lactococcus lactis* spp. *lactis* CUM14 against indicator organisms of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Table 7. Effect of incubation time on inhibition activity against indicator organisms of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

Samples		Incubation time				
		24h	28h	48h	72h	94h
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU02	whole cell	+	+	+	+	+
	cell wall	+	+	+	+	+
	supernatant (pH control/not control)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	cell extract	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13	whole cell	+	+	+	+	+
	cell wall	+	+	+	+	+
	supernatant (pH control/not control)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	cell extract	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i> CU05	whole cell	+	+	+	+	+
	cell wall	+	+	+	+	+
	supernatant (pH control/not control)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	cell extract	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CUR02	whole cell	+	+	+	+	+
	cell wall	+	+	+	+	+
	supernatant (pH control/not control)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	cell extract	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis ssp</i> <i>lactis</i> CUM14	whole cell	+	+	+	+	+
	cell wall	+	+	+	+	+
	supernatant (pH control/not control)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	cell extract	-	-	-	-	-

+; inhibition activity positive, -; inhibition activity negative.

대수성장기 이후부터 크게 영향을 끼치지 않을 것으로 사료된다.

## 5. 억제 활성 범위

최초 분리 균주인 *Lactobacillus pentosus* CU13 과 *Lactobacillus rhamnosus* CU02는 여러 가지 indicator organisms에 대한 억제활성은 MRS broth에서 37℃에 20시간 배양 후 원심분리하여 diffusion zone test에 대한 결과는 두 균주 모두

대부분의 병원성균에 대해서 억제력을 보였다. *Lactobacillus pentosus* CU13은 *Streptococcus agalactiae* CU31에서 가장 큰 clean zone을 나타내었으며, *Lactobacillus rhamnosus* CU02는 *Staphylococcus aureus* CU1161에서 가장 큰 clean zone을 나타내었다(Table 8). Ogunbanwo (2003)의 연구 결과와 비교해 넓은 범위에서 활성이 나타났으며, 특히 병원성 대장균과 젖소의 유방염균에 대한 억제력을 나타낸 것이 특징이다.

Table 8. Inhibition activity of isolates against various indicator organisms.

Organisms	Indicator organism	
	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU02
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	+	+
<i>Streptococcus uberis</i> CU 2140	+	+
<i>Streptococcus agalactiae</i> CU 31	+	+
<i>Streptococcus dysagalactiae</i> CU 2147	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> CU 1161	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> CU 1162	+	+
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ATCC 13538	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU 01	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	+	+
<i>Lactobacillus helveticus</i> CU 631	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> CU03	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> CU-031	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4112	+	+
<i>Lactobacillus brevis</i> CU05	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> 4241	-	-
<i>Bifidobacterium infantis</i> CU-032	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> CU06	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> CU07	-	-

+ ; inhibition activity positive, - ; inhibition activity negative.

## 6. 억제 활성물질 탐색

열처리한 처리구에서는 diffusion zone이 발견되지 않았으며, catalase 처리구에서는 대조구와 동일한 diffusion zone이 관찰되었다. Proteinase-K를 첨가한 처리구에서는 diffusion zone이 발견되었으나 대조구에 비해 작은 경향을 나타내었다(Table 9, Figure 2). 이와 같은 결과는 분리 균주의 억제활성 물질이 열에 약하다는 것을 보여주었으며, 60℃ 이상에서 비활성화

되고, proteinase K에 의해 억제활성이 줄어든 것으로 보아 억제활성 물질은 단백질의 형태로 이루어져 있는 것으로 사료된다(Ogunbanwo 등, 2003).

## 7. 동물실험

Mouse에 indicator organism으로 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105을 접종 후 *Lactobacillus pentosus* CU13와 *Lactobacillus rhamnosus* CU02

Table 9. Effect of heat and enzymes on activity (mm) of isolates.

Treatments	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CU02	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU13	<i>Lactobacillus pentosus</i> CU05	<i>Pediococcus pentosaceus</i> CUR02	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
	(whole cell/cell wall)				
Control	12/9	12/9	14/12	14/11	13/10
Heat					
60°C	-	-	-	-	-
80°C	-	-	-	-	-
Enzymes					
Proteinase K	7/4	7/3	10/4	9/4	9/3
Catalase	12/9	12/9	14/12	14/11	13/10

-; Diffusion zone diam is zero.

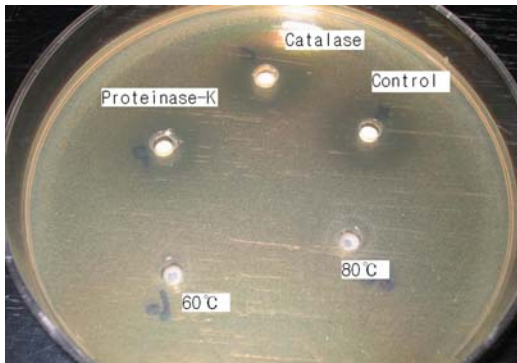


Fig. 2. Clean zone by effect of heat and enzymes on whole cell and cell wall of isolates against *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

접종 시 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105만을 접종한 처리구는 지속적으로 체중이 감소하였으며 *Lactobacillus rhamnosus* CU02는 다른 처리구에 비해 유의적으로 높은 체중회복을 나타내었다( $p < 0.05$ ) (Figure 3). 이와 같은 결과는 *in vivo* 상태에서 *Lactobacillus pentosus* CU13와 *Lactobacillus rhamnosus* CU02가 항균활성을 나타내며, 특히 *Lactobacillus rhamnosus* CU02의 경우 무처리구와 비슷한 정도의 체중회복세를 나타내는 것으로 보아 강력한 항균작용의 특성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

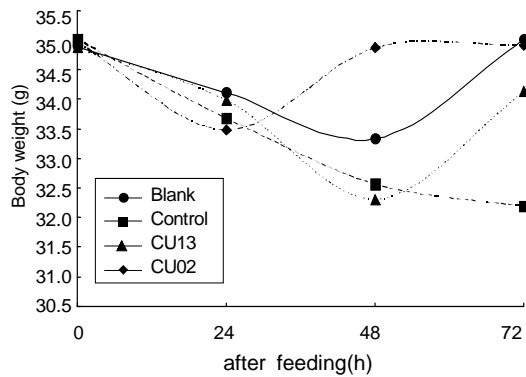


Fig. 3. Change of body weight on mouse doing *Lactobacillus pentosus* CU13 and *Lactobacillus rhamnosus* CU02 against *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105. Blank: not treatment, Control: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105, CU13: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105 + *Lactobacillus pentosus* CU13, CU02: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35105 + *Lactobacillus rhamnosus* CU02.

#### IV. 요약

본 실험은 *Lactobacillus* spp.와 *Bacillus* spp.의 *Salmonella typhimurium*, *E. coli* 및 *Listeria monocytogenes*에 대한 억제활성과 송아지 분변

분리균주의 생장 및 억제활성의 특성을 알아보기 위해 실시되었다.

*Lactobacillus* spp.와 *Bacillus* spp.의 병원성 세균 *Salmonella typhimurium*에 대한 억제활성은 *Lactobacillus helveticus* CU631이 가장 높았고, *Bacillus* spp.는 활성이 약하였다. 송아지 분변 분리균주를 동정한 결과 *Lactobacillus pentosus* CU13과 CU05, *Pediococcus pentosaceus* CUR02, *Lactococcus lactis ssp lactis* CUM14로 확인되었다. *Lactobacillus rhamnosus* CU02와 *Lactobacillus pentosus* CU13의 *Listeria monocytogenes*에 대한 억제활성에 영향을 미치는 배지성분과 첨가수준은 Tween 80 1.0%, peptone 3.0%, yeast extract 3.0%, glucose 3.0% beef extract 3.0%, NaCl 1.0~3.0%이며, whole cell과 세포벽 물질은 *Listeria monocytogenes*에 대하여 억제활성을 나타내었다. 억제 성향을 강하게 보인 균체 배양액을 80℃로 열처리한 결과 억제력은 나타나지 않았으나 catalase 및 Proteinase-K 처리는 억제활성에 영향을 미치지 않았다. 이 결과 억제활성 물질은 유기산에 의한 것으로 사료된다. *Lactobacillus pentosus* CU13과 *Lactobacillus rhamnosus* CU02의 21균주에 대한 억제 능력을 측정된 결과 병원성균주를 포함한 16균주에서 억제활성을 보였으나 5균주에서는 억제성향을 나타내지 않았다. *Escherichia coli* O157:H7을 감염시킨 mouse 중 *Lactobacillus pentosus* CU13을 접종한 경우 다소 체중 회복 현상이 나타났으나, *Lactobacillus rhamnosus* CU02를 접종한 경우 체중 회복이 빠르게 나타났다.

## V. 인 용 문 헌

1. Axelsson, L. and Lindgren, S. 1987. Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine. J. Appl. Bacteriol. 62:433-440.
2. Barrow, P. A., Fuller, R. and Newport, M. J. 1977. Changes in the microflora and physiology of the anterior tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to the pathogenesis of diarrhea. Infect. Immun. 18:586-595.
3. Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin ACH, by *Pediococcus acidilactic* H. Appl. Environ. Microbiol. 57:1265-1267.
4. Fuller, R. 1992. Probiotics: The scientific basis. Chapman and Hall. p.1-3.
5. Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167:439-446.
6. Jonsson, E. and Conway, P. 1992. Probiotics for pigs. In Probiotics- the science basis, ed R. Fuller, Chapman and Hall, 260-316.
7. Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. and Onilude, A. A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis*. Afri. J. of Biotechnol. 2(8):219-227.
8. Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. and Onilude, A. A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. Afri. J. Biotechnol. 2(7):179-184.
9. Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J. and Desmazeaud, M. 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. J. Neth. Milk Dairy. 44:143-158.
10. Raibaud, P., Caulet, M. and Galpin, J. V. 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. *Streptococci*: selective enumeration and differentiation of the dominant group. J. Appl. Bacteriol. 24:285-306.
11. Robert, I. L., Michael, R., Sylvia, S. S., Harwig, L., Richard, J. and Patricia, E. 1991. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. J. Immunological Method, 137:167-173.
12. Robinson, I. M., Stromley, H. M. and Varel, V. H. 1988. *Streptococcus intestinalis*, a new species from the colons and feces of pigs. Int. J. Syst.

- Bacteriol. 38:245-248.
13. Robinson, I. M., Whipp, S. C. and Bucklin, J. A. 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. Appl. Environ. Microbiol. 24:285-306.
14. Schillinger, U. and Lucke, F. K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55:1901-1906.
15. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1981. Principles and procedures of statistics, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
16. Venkitanarayanan, K. S., Lin, C. - M., Bailey, J. and Doyle, M. P. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. J. Food Protection. 65(1):100-105.
17. Zani, G., Biavati, B. and Crociani, F. 1974. Bifidobacteria from the feces of piglets. J. Appl. Bacteriol. 3:537-547.
- (접수일자 : 2006. 8. 3. / 채택일자 : 2006. 12. 15.)