

Research Note

사료용 생균제 개발을 위한 마늘 내성 유산균의 분리

김유진^{1,2} · 장서정^{1,2} · 박정민² · 김창욱³ · 박영서^{1*}

¹경원대학교 식품생물공학과, ²한국미생물보존센터, ³(주)티제이바이오

Isolation of Garlic Resistant Lactic Acid Bacteria for Feed Additives

Yu-Jin Kim^{1,2}, Seo-Jung Jang^{1,2}, Jung-Min Park², Chang-Uk Kim³ and Young-Seo Park¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University

²Korean Culture Center of Microorganisms

³TJ Bio Co., Ltd.

Abstract

Lactic acid bacteria was isolated for the production of probiotic animal feed supplemented with garlic and its antimicrobial properties were investigated. A total of 112 strains of lactic acid bacteria which grew on the medium containing garlic extract were isolated from kimchi, *jeotgal*, and *jangachi*. Among them 14 strains were tested for acid- and bile salt-resistance as well as antimicrobial activities against animal pathogenic bacteria such as *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella flexneri*. Of these strains, a strain PGW50-2 from pickled scallion with most desirable properties was selected and identified as *Lactobacillus plantarum* TJ-LP-002. Antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002 showed relatively wide range of inhibition spectrum against Gram negative bacteria such as *Aeromicrobium hydrophila*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, and some Gram positive bacteria such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, and *Propionibacterium*.

Key words: *Allium sativum*, lactic acid bacteria, antimicrobial properties, probiotic animal feed

서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 대표적인 백합목 백합과 *Allium* 속에 속하는 다년초로, 대개 지중해와 중앙아시아 연안 지방이 원산지로서 알려져 있으며, 요즘에는 세계 각지에서 재배되고 있다. 마늘은 특유의 향미를 가지고 있어서 식품의 맛을 증진시키는 향신료로서 널리 사용되어 왔으며, 식중독균과 같은 병원성 세균의 증식을 억제하는 항균작용(Kim et al., 2002; Rees et al., 1993), 항암작용(Fleischauer & Arab, 2001), 항산화작용(Kim et al., 1997; Carmia, 2001), 항당뇨작용(Jain & Vyas, 1975), 항돌연변이원성(Kim et al., 1991), 혈청콜레스테롤 저하능(Slowing et al., 2001), 심장질환 예방(Neil & Sigali, 1994) 등 여러 가지 생리적 활성이 과학적으로 입증되어 향신료뿐만 아니라 건강보조식품, 의약품으로도 널리 사용되고 있다.

마늘을 재배하면, 수확 시에 마늘뿐만 아니라 마늘순, 쪽정이 등의 마늘 부산물이 발생한다. 마늘 재배량의 증가에 따라 부산물 폐기량도 늘어나게 되어 부산물 처리 방안에 대한 연구가 필요한 실정이다(Kim, 1996). 마늘 부산물은 항산화 작용을 하는 폴리페놀을 함유하고 있고, pectin과 같은 섬유소 함량이 높아서 장내 미생물의 성장개선 효과가 있으며, 혈중 콜레스테롤 함량과 간 지방량을 감소시키는 등의 기능이 있어, 가축 사육 시 투여되는 다량의 항생제에 대한 대체 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Kim, 1996).

생균제는 숙주의 장내 미생물 균형 향상과 같은 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물 첨가제를 말하며, 생균제로 가장 많이 사용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*와 같은 유산균이며, 효모, 곰팡이, *Bacillus* 등은 주로 가축에게 사용되고 있다. 생균제를 산업용으로 이용하기 위해서는 비독성 및 비병원성인 안전한 균주여야 하며, 내산성, 내담즙성이 있어서 경구 섭취 시에 소화관에서 사멸하지 않고 장에 도달할 수 있어야 한다. 생균제는 장내 유익균의 증식을 촉진시키고, 정상균총의 분포를 유지시키는 등의 유용한 효능이 요구되며, 항균성 물질을 생성하여 병원성 세균의 생육을 억제시키고, 항균범위가 넓어야 한다. 또한 장내 정착성이 강하며, 가공

Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi-do 461-701, Korea

Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273

E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr

Received October 26, 2009; revised November 12, 2009; accepted November 12, 2009

공정 중 사멸되지 않도록 활성이 오래 유지될 수 있어야 한다(Annuk et al., 2003; Conway, 1989).

가축에 생균제의 급여가 미치는 영향은 증체량, 사료효율, 장내세균총 개선 등을 들 수 있다. 생균제와 항생제의 급여 효과를 비교 실험한 결과, 유산균 생균제를 급여할 경우 항생제 투여 시보다 증체량 개선, 장내 대장균의 감소가 더 크게 나타났다고 보고되었으며(Francis, 1978), *Lactobacillus sporogenes*와 *Clotridium butyricum*을 각각 투여했을 때 대조구보다 증체량과 사료효율이 유의적으로 개선되었다고 보고하였다(Han et al., 1984a, b). 이런 연구 결과들을 종합해볼 때, 생균제 투여 시에 생산성이 높아져서 항생제를 대체할 수 있는 경제적인 사육 효과를 기대해 볼 수 있을 것이라 생각된다.

일반적으로 동물의 장내에서 생균제의 효과를 발휘하기 위해서는 적용 대상 동물의 장 또는 분변으로부터 분리하는 것이 바람직한 것으로 알려져 있다. 이미 많은 연구에서 분변이나 장 내용물에서 분리한 균주의 생균제 이용 가능성에 대해서 발표한 바 있다. 국내 계분 유래의 *L. salivarius*의 생균제적 특성에 대한 논문(Lim et al., 2007)과 한우와 홀스타인 분변으로부터 *Lactobacillus* spp.로 동정된 유산간균을 분리한 논문(Lee et al., 2006), 돼지분변으로부터 생균제로 이용 가능한 *L. salivarius*를 분리한 논문 등이 현재까지 보고되고 있다(Shin et al., 2002). 가축 유래 유산균 외에도 각종 발효식품에서 분리한 생균제에 대한 연구도 진행되고 있는데, 동치미 유래 *Lactobacillus* sp.에 대한 연구가 보고되었으며(Chung et al., 2003b; Park et al., 2002), 젓갈에서 분리한 bacteriocin 생성 프로바이오틱 생균에 대한 연구 보고도 있다(Lee et al., 2003).

마늘 부산물을 효과적으로 이용하기 위해서는 마늘 부산물을 건조, 분말화하여 생균제와 혼합한 고기능성 사료첨가제의 개발이 필요하며, 마늘 부산물과 혼합 시에 배양이 가능하도록 마늘의 항균력에 저항성을 갖는 생균제의 연구가 필요하다. 본 연구에서는 마늘 부산물과 생균제의 혼합 시에 마늘의 유익한 효과와 생균제의 효과를 동시에 낼 수 있는 고기능성 사료첨가제 개발을 위해서 마늘의 항균력에 저항성을 갖는 유산균을 분리하였고, 생균제의 일반적 조건인 내산성과 내담즙성을 지니며, 병원성 세균에 대한 항균력이 우수한 균주를 선발하여 생균제로의 이용 가능성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

마늘추출물 제조

비늘줄기, 꽃줄기, 수염뿌리를 포함하는 통마늘을 세척하여 이물질을 제거한 후, 증류수, 에탄올을 각각 마늘과 용매의 비율이 1대 4가 되도록 첨가하여 homogenizer로 마

쇄한 다음 상온에서 24시간 교반하여 추출하였다. 추출물은 거즈와 Whatman No. 2 filter paper로 여과한 후 4°C 냉장실에서 24시간 방치한 다음, 8,000 rpm으로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 여과액을 0.45 µm의 공경을 지니는 membrane filter로 제균한 다음, 이를 마늘추출물로 사용하였다.

유산균의 분리

서울지역 마트와 가정에서 수집한 김치(배추김치, 깍두기, 열무김치, 동치미, 물김치, 백김치) 및 젓갈(명란젓갈, 오징어젓갈, 조개젓갈, 멸치젓갈, 밴댕이젓갈, 어리굴젓갈, 창란젓갈), 장아찌(오이 장아찌, 마늘 장아찌, 마늘쫑 장아찌) 17종을 사용하여 유산균을 분리하였다. 시료를 멸균수로 희석하여 마늘추출물이 농도별로 첨가된 Lactobacilli MRS agar(Difco Co., USA)에 도말하여 37°C에서 2일간 배양하여 무작위적으로 유산균을 1차 분리하였다.

내산성과 내담즙성 분석

유산균의 내산성을 측정하기 위하여 분리 유산균을 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)과 HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 0.05 M sodium phosphate에 각각 접종하고 37°C에서 2시간 진탕한 다음 MRS agar에 도말하여 배양한 후 생균수를 측정하여 생존율(%)을 다음 식에 의하여 계산하였다(Lee & Choi, 2006).

생존율(%) =

$$\frac{\text{Viable cell number in sodium phosphate (pH 2.5)}}{\text{Viable cell number in sodium phosphate (pH 7.0)}} \times 100$$

유산균의 내담즙성을 측정하기 위하여 분리 유산균을 0.3% oxgall(Difco Co.)이 첨가된 MRS broth에 접종하여 37°C에서 8시간 배양한 다음 MRS agar에 도말하여 배양한 후 생균수를 측정하여 생존율(%)을 다음 식에 의하여 계산하였다(Lee et al., 2002).

생존율(%) =

$$\frac{\text{Viable cell number in MRS broth containing 0.3\% oxgall}}{\text{Viable cell number in MRS broth}} \times 100$$

항균력 측정

분리 유산균의 가축 병원성 세균에 대한 항균활성은 *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* KCCM 11806, *Escherichia coli* KCCM 12119, *Staphylococcus aureus* KCCM 11335, *Shigella flexneri* KCCM 40938을 검정균으로 사용하여 검정균이 증충된 agar plate에 멸균된 penicylinder(용량 300 µL, 내경 6 mm, 외경 8 mm, 높이 10 mm)로 홈을 내서 각 분리 유산균 배양액 100 µL를 분주하여 37°C에서 배양한 후 저해환의 직경을 측정하는 agar diffusion method를 사용하였다(Lee et al., 2002).

선발된 유산균의 동정

분리 유산균을 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. Wizard genomic DNA purification kit(Promega co., USA)를 사용하여 분리 유산균으로부터 genomic DNA를 추출한 후 16S rRNA 유전자 염기서열 결정을 위한 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTACGAC TT- 3') primer를 사용하여 PCR을 수행하였다(Yoon et al., 1996). PCR 반응은 94°C에서 1분간 변성, 60°C에서 1분간 결합, 72°C에서 1분간 30초간 증합 조건으로 PCR machine(pTC-150 minicycler, MJ Research Co., USA)을 사용하여 35 cycle을 실시하였다. PCR 산물을 1% agarose gel에 전기영동한 다음 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega Co.)을 사용하여 정제한 후 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCT CAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTACGACTT-3'), 530F(5'-CTGCCAGCMGCGG-3'), 1100R(5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3') primer를 사용하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer로 염기서열을 결정하였다. 염기서열은 BLASTN 프로그램으로 Genbank에 등록되어 있는 ribosomal RNA 유전자 염기서열과 비교하여 결과를 나타내었다.

생화학적 특성 분석

분리 유산균의 생화학적 특성은 API 50 CHL kit (bioMérieux Ltd., France)를 사용하였는데, 배양된 유산균을 API 50 CHL medium에 현탁하여 유산균 배양액을 kit에 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후 medium의 색깔 변화를 확인함으로써 분석하였다.

항균 spectrum 측정

분리 유산균의 항균 spectrum을 알아보기 위하여 가축 병원성 세균 이외의 병원성균을 비롯한 다양한 세균, 유산균, 효모를 검정균주로 사용하여 생육 저해 여부를 조사하였다. 이를 위하여 각 검정균주의 중층배지에 분리 유산균 배양액 100 µL을 paper disc 위에 분주하여 37°C에서 48시

간동안 배양한 후 저해환 형성 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

마늘의 항균력에 저항성을 지니는 유산균주의 분리

마늘의 항균력에 저항성을 갖는 유산균을 분리하기 위해 마늘이 첨가된 발효식품인 김치, 젓갈, 장아찌류 등 17가지 시료를 수집하여 마늘 추출물이 농도별로 첨가된 MRS 배지에서 생육하는 유산균을 분리하였다. 증류수로 추출한 마늘추출물이 첨가된 배지에서 60균주를 분리하였으며, 에탄올로 추출한 마늘추출물이 첨가된 배지에서 52균주를 분리하였다. 마늘은 *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* 등의 미생물 생육을 억제한다고 보고되고 있다(Shokrzadeh & Ebadi, 2006). 또한 세균 및 진균류, 바이러스 등에 비교적 넓은 항균활성을 나타내며, 유산균보다는 병원성 세균의 증식 억제율이 높고(Chung et al., 2003a), 유산균 중에서는 *L. mesenteroides*와 *L. plantarum*에 대해 높은 항균력을 나타낸다고 보고된 바 있다(Kim et al., 1998). 마늘의 세균에 대한 항균력에도 불구하고 마늘 추출물이 첨가된 배지에서 생육 가능한 유산균들은 마늘이 첨가된 사료에 생균제로 함께 첨가해도 사멸하지 않고 생존할 수 있을 것으로 생각되며, 마늘 추출물의 유효성분이 일부 유산균의 성장을 촉진시킨다는 연구 결과도 보고되고 있다(Hong, 2005). 분리한 112 균주 중에서 생균제로 이용 가능한 균주를 확인하고자 마늘추출물이 가장 높은 농도로 첨가된 50% 첨가 배지에서 분리한 유산균 중에서 생균제의 일반적 특성인 내담즙성, 내산성, 항균력을 측정하여 우수한 특성을 지니는 균주를 선발하였다. 위산에 대한 내성을 확인하기 위해서 HCl을 사용하여 pH 2.5로 조절한 sodium phosphate buffer에 2시간동안 처리한 후 생균수를 측정하여 pH 7.0에서 처리한 후의 생균수와 비교하여 생존율을 조사한 결과, 각

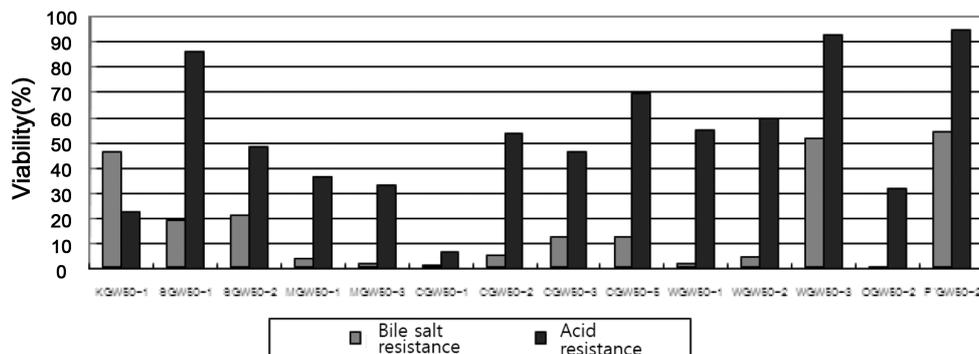


Fig. 1. The bile salt- and acid-resistance activity of isolated strains

각의 균주들의 산에 대한 생존율은 6.90-94.74%로 다양한 범위의 생존율을 나타냈으며, P'GW50-2 및 WGW50-3, SGW50-1이 각각 94.74%, 92.86%, 86%로 산에 대한 매우 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 1). 한우 분변에서 분리한 유산균주 중 인공 위산에 대하여 높은 생존율(80% 이상)을 나타내는 *L. fermentum*과 *L. plantarum* 균주가 분리된 바 있으며(Lee & Choi, 2006), 식품 중에서는 젓갈에서 50% 정도의 생존율을 나타내는 유산균주가 분리된 바 있다(Lee et al., 2003). 이에 비교하였을 때 파김치에서 분리한 P'GW50-2, 물김치에서 분리한 WGW50-3은 90% 이상의 매우 높은 생존율을 나타내어, 체내 섭취 시 pH 3 이하의 위액에서 사멸하지 않고 위장관을 통과할 수 있을 것으로 생각된다. 담즙에 대한 내성을 확인하기 위해서 0.3% oxgall이 첨가된 MRS broth에 8시간 반응시킨 후 생균수를 측정하여 생존율을 조사한 결과, 담즙에 대한 생존율은 균주에 따라 0.18-54.76%의 생존율을 나타내었으며, P'GW50-2, WGW50-3, KGW50-1이 각각 54.76%, 51.61%, 46.42%의 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 1). *Lactobacillus* 균주는 0.3% bile salt 첨가 시에 1-100% 정도의 생존율을 나타낸다고 하였으며(Shin et al., 1995), 젓갈에서 분리한 유산균은 인공 담즙인 0.1% oxgall 첨가 시 6-200% 이상의 생존율을 나타내었고, 일부 유산균은 담즙 첨가에 의해 생육이 촉진되었음이 보고되었다(Lee et al., 2003). 균주에 따라 담즙에 대한 다양한 범위의 생존율을 나타내며, 담즙에서의 높은 생존율은 섭취한 유산균이 사멸되지 않고 장내까지 도달하여 장에서 유익한 작용을 할 수 있음을 의미한다.

가축 병원성 균주에 대한 항균활성

분리한 14균주의 가축 병원성 균주에 대한 항균력을 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 병원성 균주의 생육 억제 정도를 저해환의 직경으로 확인한 결과, *Salmonella choleraesuis*에 대한 생육저해능이 우수한 균주는 P'GW50-2, WGW50-1, WGW50-3으로 저해환의 직경이 각각 20, 18, 18 mm이었다. *S. choleraesuis*는 가금류에 티프스, 추백리 등을 유발시키는 균주이며, 가축의 만성장염, 소화기 전염병 등을 유발하고, 사람에게도 식중독을 유발할 수 있는 병원성 세균이다. *Escherichia coli*에 대한 저해능은 WGW50-1, WGW50-3, P'GW50-2가 모두 15 mm의 저해환 직경을 나타내었다. *E. coli*는 돼지에 설사를 일으켜 폐사시키는 등의 문제를 일으키는데, 분리 균주 중에는 *E. coli*에 대한 저해환을 형성하지 않는 균주들도 있었다. *Staphylococcus aureus*에 대한 저해능은 WGW50-1, WGW50-3, P'GW50-2가 모두 20 mm로 가장 우수하였다. *S. aureus*는 젖소 유방암 원인으로 알려져 있으며, 사람에게도 식중독을 유발할 수 있다. 세균성 이질 원인균인 *Shigella flexneri*에 대한 저해능은 P'GW50-2가 19 mm로 가장 우수하였고, WGW50-1, WGW50-3이 18 mm로 우수하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 가축 병원성 세균에 대한 항균력은 WGW50-1, WGW50-3, P'GW50-2가 비슷한 수준으로 우수하였으며, 내산성, 내담즙성을 고려할 경우 분리한 균주 중에서 P'GW50-2가 가장 우수한 생균제 특성을 지니고 있어 본 연구를 위한 균주로 최종 선발하였다.

선정 유산균주의 동정과 생화학적 특성

최종 선발된 P'GW50-2는 16S rRNA 유전자의 염기서열

Table 1. The diameter of inhibitory clear zones formed by the culture broth of selected strains against *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella flexneri*

Strain	Diameter of inhibitory clear zone (mm)			
	<i>S. choleraesuis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>Shi. flexneri</i>
Control(MRS)	-	-	-	-
KGW50-1	14±0.4 ¹⁾	-	16±0.9	14±0.5
SGW50-1	13±0.3	-	14±0.5	14±0.5
SGW50-2	15±1.0	13±0.5	19±0.4	16±1.0
MGW50-1	16±1.0	14±0.9	18±0.9	16±0.9
MGW50-3	13±0.8	-	17±0.3	13±0.5
CGW50-1	13±0.5	-	15±1.1	14±0.5
CGW50-2	13±0.5	-	17±1.8	13±0.3
CGW50-3	14±0.4	-	17±0.7	13±0.5
CGW50-5	14±0.6	-	17±1.0	14±0.4
WGW50-1	18±0.3	15±0.5	20±0.7	18±0.8
WGW50-2	14±0.6	-	15±0.3	15±0.8
WGW50-3	18±0.4	15±0.5	19±0.7	18±0.3
OGW50-2	13±0.3	-	17±0.9	13±0.5
P'GW50-2	20±0.6	16±0.4	20±0.3	19±0.0

-, not detected.

¹⁾Numbers are mean±SD.

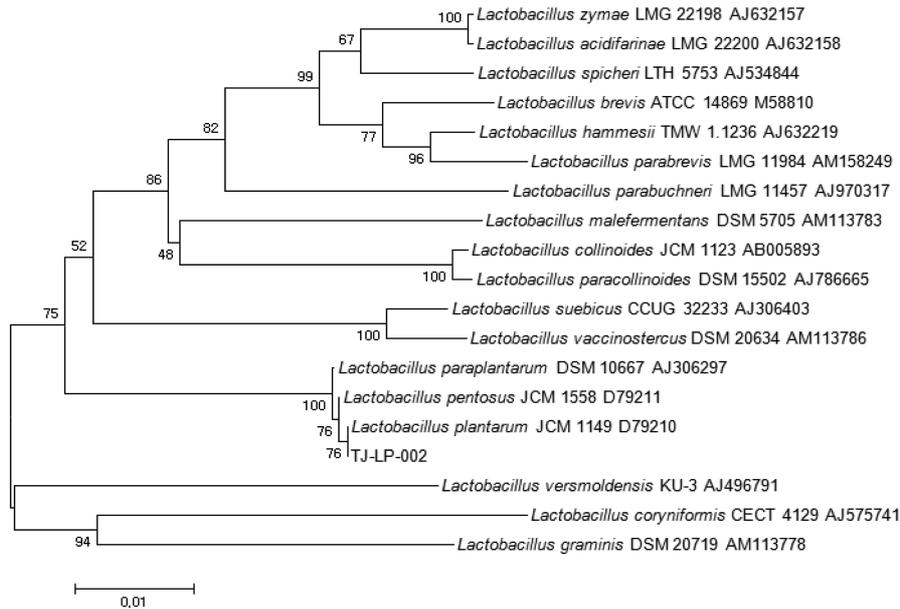


Fig. 2. Phylogenetic tree of TJ-LP-002 based on 16S rDNA sequences

분석 결과, *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다. Phylogenetic tree를 작성한 결과, Fig. 2에서와 같이 *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplanctarum*과 유연관계가 높은 것을 알 수 있었으며, 이 중에서 *L. plantarum*과 가장 유연 관계가 높아 본 선정균주를 *L. plantarum* TJ-LP-002로 동정 및 명명하였다.

L. plantarum TJ-LP-002의 생화학적 특성은 Table 3과 같다. 49개 탄수화물에 대한 당이용성을 확인한 결과, 단당인 L-arabinose, ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, rhamnose와 당알콜인 mannitol, sorbitol, 배당체인 N-acetylglucosamine, amygdaline, arbutine, esculine, salicine, 이당류인 cellobiose, maltose, lactose, melibiose, saccharose, β -gentiobiose, turanose, 삼당류인 raffinose, 당산화물인 gluconate를 이용하여 산을 생성하는 특성을 나타내었다. Rhamnose로부터 산을 생성하는 것은 *L. plantarum*의 주요 특성과는 차이가 있으나 그 외의 모든 당류에 대한 반응은 *L. plantarum*의 특성과 일치하였다(Kandler & Norbert, 1984).

Park et al.(2002)은 동치미로부터 내산성과 내담즙성이 우수한 유산균주인 *L. plantarum* JCM1149를 분리하였는데, *L. plantarum* JCM1149를 이용하여 제조한 유산균 발효 음료(fermented vegetable beverage, FVB)를 섭취하였을 때, 장내 유익균인 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*는 증가하고, 장내 부패균인 *C. perfringens*, *E. coli*의 수는 감소하는 등 장내 미생물 균총의 변화를 가져오고, 분변의 수분 함량이 증가하며, pH가 감소되는 등 장내 환경에 유익한 변화를 유발함이 보고된 바 있다(Kim et al., 2003). 동치미 유래의 *L. plantarum*을 건강한 성인에게 발효 음료로 섭취시켜

좋은 정장 효과를 나타낸 것처럼, 과감치 유래 *L. plantarum* TJ-LP-002를 사료첨가제로 가축에게 섭취시켰을 때에도 생균제로서 유익한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대한다.

선정 유산균의 항균 spectrum

병원성 세균을 포함한 다양한 세균 및 유산균, 효모 등에 대해 *L. plantarum* TJ-LP-002이 생성하는 항균물질의 항균 특성을 알아본 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 식중독균인 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*를 포함한 Gram 양성균과 *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* 속 등 시험한 모든 Gram 음성균에 대해서 항균활성을 나타내었다. 그리고, *Pediococcus pentosaceus*와 같은 유산균 일부에도 항균활성을 나타내었으나, 대부분의 유산균과 *Candida*, *Saccharomyces* 속을 비롯한 효모에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타났다. 유산균의 항균활성은 낮은 pH와 낮은 환원 전위, 과산화수소, diacetyl, bacteriocin, 이산화탄소, 에탄올, 저분자 항생물질 등의 생성에 의한 것으로 알려져 있다(Sanders et al., 1991; Adams & Nicholaides, 1997). *L. plantarum* TJ-LP-002의 항균활성은 Gram 음성균에서 강한 활성을 나타냈으며 유산균에는 거의 작용하지 못하는 것으로 나타나 *L. plantarum*이 생산하는 bacteriocin의 작용과는 차이가 있는 것으로 확인되었다(Anderssen et al., 1998).

본 연구에서 분리된 *L. plantarum* TJ-LP-002는 마늘의 항균력에 높은 저항성을 지니고 내산성 및 내담즙성이 높으며 가축 병원성 세균을 비롯하여 여러 종류의 병원성 세균에 대한 생육저해효과가 높아 가축 사료에 첨가되는 생

Table 2. Antimicrobial activity of *L. plantarum* TJ-LP-002 against indicator strains

Indicator strain	KCCM No.	Medium	Temp.(°C)	Inhibition
GRAM-POSITIVE BACTERIA				
<i>Bacillus cereus</i>	11204	NA	37	++
<i>Bacillus coagulans</i>	11715	NA	37	-
<i>Bacillus subtilis</i>	11316	NA	37	++
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	41331	NA	37	++
<i>Clostridium perfringens</i>	12098	RCM	37	+
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	31227	RCM	37	++
<i>Propionibacterium acnes</i>	41747	RCM	37	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	32820	MRS	37	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	35464	MRS	37	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	40715	MRS	37	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	11357	MRS	37	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	40716	MRS	37	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	40989	MRS	37	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	40997	MRS	37	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	12116	MRS	37	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	40717	MRS	37	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	40264	MRS	37	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	40709	MRS	26	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	11902	MRS	37	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	40703	MRS	37	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	11729	BHI	37	-
<i>Enterococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	40450	BHI	37	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	40307	BHI	37	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	11957	BHI	37	-
<i>Streptococcus mutans</i>	40105	BHI	37	-
GRAM-NEGATIVE BACTERIA				
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	32586	NA	37	+++
<i>Escherichia coli</i>	11234	NA	37	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11328	NA	37	+
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>	11806	NA	37	++
<i>Shigella flexneri</i>	40948	NA	37	++
<i>Shigella sonnei</i>	40949	NA	37	++
YEASTS				
<i>Candida boidinii</i>	50051	YM	27	-
<i>Candida famata</i>	11935	YM	27	-
<i>Candida albicans</i>	11282	YM	27	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	50498	YM	27	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11991	YM	27	-
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	50183	YM	27	-

-, no inhibition; +, 10-15 mm in diameter, ++, 15-20 mm in diameter, +++, >20 mm in diameter of inhibition zone.

KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms.

NA, Nutrient Agar.

RCM, Reinforced Clostridial Medium.

MRS, de Man, Rogosa and Sharpe, Lactobacilli MRS Agar.

BHI, Brain Heart Infusion.

YM, Yeast extract-Malt extract agar.

균제로서 이용 가능성이 있다고 판단된다. *L. plantarum* TJ-LP-002를 생균제로 산업화하기 위해서는 향후 병원성 세균에 대한 항생작용기구, 최적 배양조건, 실제 가축에게 투여 시의 효과 등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

마늘의 항균력에 저항성을 갖는 유산균을 분리하기 위해서 마늘 추출물이 첨가된 배지에서 생육하는 112 균주를 김치, 젓갈, 장아찌류로부터 분리하였다. 이 중에서 14균주

Table 3. Phynotypic characteristics of *L. plantarum* TJ-LP-002

Characteristics	TJ-LP-002	Characteristics	TJ-LP-002
Control	-	Esculine	+
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Celliobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	-
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	+
Rhamnose	+	D-Tagatose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tragatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2-keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-keto-gluconate	-

+, positive reaction; -, negative reaction.

에 대해서 내산성 및 내담즙성 그리고, 가축 병원성 세균인 *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flesneri*에 대해 항균력을 조사한 결과, 과감치 유래의 P'GW50-2 균주가 가장 우수한 특성을 지니고 있어 생균제로 이용 가능한 균주로 선발하였다. 선발된 균주는 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석결과 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었고 *L. plantarum* TJ-LP-002으로 명명하였다. *L. plantarum* TJ-LP-002는 *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*와 같은 Gram 양성균과 *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*와 같은 Gram 음성균에 대해서 비교적 넓은 항균활성을 나타내었다.

감사의 글

이 연구는 2009년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

참고문헌

Adam MR, Nicholaides L. 1997. Reviews of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* 8: 227-239.

Anderssen EL, Diep DB, NesIF, Eijsink VGH, Nissen-Meyer J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269-2272.

Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelssar M. 2003. Characterization of intestinal *Lactobacilli* as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* 94: 403-412.

Carmia B. 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *Antioxidant health effects of aged garlic extract.* *J. Nutr.* 131: 1010S-115S.

Chung KS, Kang SY, Kim JY. 2003a. The antibacterial activity of garlic juice against pathogenic bacteria and lactic acid bacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 32-35.

Chung WB, Seo WS, Cha JY, Cho YS. 2003b. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from Korean dongchimi. *Korean J. Food Preserv.* 10: 406-410.

Conway PL, Gorbach SL, Coldin BR. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1-12.

Fleischauer AT, Arab L. 1996. Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *J. Nutr.* 131: 1032S-1040S.

Francis C, Janky DM, Arafa AS, Harms RH. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poults. *Poult. Sci.* 57: 1687-1689.

Han IK, Lee JH, Lee KK, Lee JC. 1984a. Nutrition and feed resources: Studies on the growth promoting effects of probiotics. II. The effects of *Lactobacillus sporogenes* on the performance and the changes in the microbial flora of the feces and intestinal contents of the broiler chicks. *Korean J. Ani. Sci.* 26: 150-157.

Han IK, Lee SC, Lee JH, Kim JD, Jung PK, Lee JC. 1984b. Nutrition and feed resources: Studies on the growth promoting effects of probiotics. II. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the performance and the changes in the microbial flora of the feces and intestinal contents of the broiler chicks. *Korean J. Ani. Sci.* 26: 158-165.

Hong SH. 2005. Partial purification of lactic acid bacteria growth factor form *Allium sativum* extract and the activation effect on murine immune cells. MS thesis. Seoul National University, Seoul, Korea.

Kandler O, Norbert W. 1984. Regular, non-sporulating gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JH (eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, pp. 1128-1260.

Kim JY, Lee YC, Kim KS. 2002. Effect of heat treatments on the antimicrobial activities of garlic (*Allium sativum*). *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 331-335.

Kim MH. 1996. The functional properties of garlic (*Allium sativum* L.) shoots as a food material. MS thesis. Kyungpook National University, Taegu Korea.

Kim MK, Chung HJ, Kim OM, Oh YA, Kim SD. 1998. Antimicrobial activity of extract form spices on lactic acid bacteria related to kimchi fermentation. *Kor. J. Post-harvest Sci. Technol. Agri. Prod.* 5: 81-87.

Kim MK, Kim MJ, Cho JH, Shin DH, Lee HS. 2003. *In vivo* evaluation of the vegetable beverage fermented by *Lactobacillus plantarum* on fecal microflora of human volunteers. *Food Sci.*

- Biotechnol. 12: 107-111.
- Kim SH, Kim JO, Lee SH, Park KY, Park HJ, Chung HY. 1991. Antimutagenic compounds identified from the chloroform fraction of garlic (*Allium sativum*). J. Korean Soc. Food Nutr. 20: 253-259.
- Kim SM, Kubota K, Kobayashi A. 1997. Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 1482-1485.
- Lee JY, Kwang KY, Kim HS, Kim K, Sung SI. 2002. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibition gastro-intestinal pathogenic bacteria of domestic animal. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 30: 129-134.
- Lee NK, Kim HW, Choi SY, Paik HD. 2003. Some probiotic properties of some lactic acid bacteria and yeasts isolated from jeot-gal. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 31: 297-300.
- Lee SB, Choi SH. 2006. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* isolates for calf meal supplements. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 26: 106-112.
- Lim SJ, Jang SS, Kang DK. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 Isolated from chicken feces. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 35: 98-103.
- Neil H, Sigali C. 1994. Garlic, its cardioprotective properties. Curr. Top. Lipidol. 5: 6-10.
- Park YS, Lee YJ, Kim YS, Shin DH. 2002. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn and from dongchimi. J. Agric. Food Chem. 50: 2531-2536.
- Rees LP, Minney SF, Plummer NT, Slater JH, Skyrme DA. 1993. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). World J. Microbiol. Biotechnol. 9, 303-307.
- Sanders ME, Kondo JK, Willrett DL. 1991. Application of lactic acid bacteria. In: Biotechnology and Food Ingredient. Goldberg I, Williams R (eds). Van Nostrand Reinhold, New York, USA, pp. 443-459.
- Shin JY, Yang SY, Song MD. 2002. Isolation and identification of lactic acid bacteria for direct-fed microbials. Konkuk J. Natural Sci. Tech. 13: 37-43.
- Shin YS, Kim SH, Lee KS. 1995. Survivals of lactic acid bacteria and its characteristics under the acidic and anaerobic condition. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 373-377.
- Shokrzadeh M, Ebadi AG. 2006. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum* L.) on *Staphylococcus aureus*. Pakistan J. Biol. Sci. 9: 1577-1579.
- Slowing K, Ganado P, Sanz M, Ruiz E, Tejerima T. 2001. Study of garlic extracts and fractions on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterol-fed rats. J. Nutr. 131: 219-225.
- Yoon JH, Lee ST, Park YH. 1996. Inter-and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioidea* and related taxa based on 16S rDNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 187-194.