

항균활성 특성을 지닌 락토바실러스 루테리 BR301 균주의 분리 및 동정

윤슬기¹, 윤주성¹, 손은심¹, 오백록², 윤복근^{1*}
¹(주)마이크로바이옴 기업부설연구소, ²한국생명공학연구원

Isolation and identification of *Lactobacillus reuteri* BR301 strain with antibacterial activity properties

Seul-Gi Yoon¹, Ju-Sung Yoon¹, Eun-Shim Son¹, Baek-Rock Oh², Bok-Kun Yoon^{1*}
¹Microbiome Inc.
²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

요약 본 연구에서는 반려동물 유래 마이크로바이옴을 활용하여 내산성, 내담즙성, 항산화 활성, 장내 상피세포 부착성, 염증 억제 효과 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수한 균주를 선발하고자 국내 토종 반려동물의 분변을 수집하여 분변 유래 유산균 110여종을 분리해내었다. 유산균 110여종에 대하여 1차, 2차 내산성, 내담즙성을 분석하여 우수한 균주 10종을 구별하였고, 이 균주 10종에 대한 항산화능과 장내 부착능, 항염증 기능을 조사하였다. 그 결과 가장 우수한 프로바이오틱스 특성을 가진 균주의 16S rRNA 염기서열의 상동성 분석을 실시하여 최종적으로 락토바실러스 루테리 BR301(*Lactobacillus reuteri* BR301)로 명명하였다. 락토바실러스 루테리 BR301(*Lactobacillus reuteri* BR301)의 항균 활성이 *Candida albicans* (KCTC 7965) 균주에 대해서는 나타나지 않았으며, 식중독 균주를 포함한 그람 양성 및 음성 세균들에 강한 항균 활성이 관찰됨을 알 수 있었다. 따라서 기존 프로바이오틱스 균주보다 내산성, 내담즙성, 항산화 활성, 장내 상피세포 부착성, 염증 억제 효과 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수한 바, 락토바실러스 루테리 BR301(*Lactobacillus reuteri* BR301) 균주를 반려동물용 복합 유익미생물 소재로서 활용할 수 있을 것으로 판단한다.

Abstract In this study, feces from domestic companion animals were used to select strains with excellent acid tolerance, bile tolerance, antioxidant activity, intestinal epithelial cell adhesion, anti-inflammatory effect, and antibacterial activity against harmful microorganisms using the companion animal-derived microbiome. About 110 types of feces-derived lactic acid bacteria were isolated and analyzed for primary and secondary acid resistance and bile resistance, and 10 excellent strains were identified. Then, antioxidant activity, intestinal adhesion ability, and anti-inflammatory properties of these 10 strains were investigated. As a result, homology analysis of the 16S rRNA base sequence was performed on the strain with the best probiotic properties, and the strain was named *Lactobacillus reuteri* BR301. The antibacterial activity of *Lactobacillus reuteri* BR301 was not shown against *Candida albicans* (KCTC 7965), and strong antibacterial activity was observed against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including food poisoning strains. Therefore, *Lactobacillus reuteri* BR301 strain is superior to existing probiotic strains in acid tolerance, bile tolerance, antioxidant activity, intestinal epithelial cell adhesion, anti-inflammatory effect, and antibacterial activity against harmful microorganisms, making it a complex benefit for companion animals. It is believed that it can be used as a beneficial microbial material for companion animals.

Keywords : Probiotic, Companion Animals, Anti-inflammatory Effect, Antibacterial Activity, *Lactobacillus reuteri* BR301

*Corresponding Author : Bok-Kun Yoon(Microbiome Inc.)

email: abeyoon1031@hanmail.net

Received December 7, 2023

Revised January 2, 2024

Accepted February 6, 2024

Published February 29, 2024

1. 서론

인간이나 동물의 장내에는 수많은 미생물들이 균형을 이루어 살아가고 있으나, 사료의 변화, 항생제 투여, 스트레스, 유해 미생물의 영향 등 인위적인 외부 환경의 변화로 인하여 장내 균총의 균형이 깨지면 몸무게의 저하, 사료 이용률 감소, 설사증 등으로 인한 문제가 발생한다[1]. 특히 사료 첨가용 항생제와 화학치료제가 널리 사용되면서 가축 내의 내성문제와 잔류문제가 제기되었으며[2], 이러한 문제는 장내 미생물들의 균총을 깨뜨려 이를 유지시켜주기 위한 생육 촉진제의 개발이 요구하게 되었다[3].

현재 알려진 생균제에는 유산균으로 주로 *Lactobacillus* sp.와 *Streptococcus* sp.가 있으며 포자형성 간균인 *Bacillus*균으로는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* 등이 있다[4]. 곰팡이류로는 *Aspergillus oryzae*와 효모로는 유포자 효모인 *Saccharomyces* sp.와 무포자 효모인 *Torulopsis* sp.가 이용되고 있다[5]. 자연 상태에서 유산을 생성하는 중요한 유산균인 *Lactobacillus* sp.와 *Streptococcus* sp.는 Gram 양성, Catalase 음성이며 무포자균으로써 당을 발효하여 유산을 생성하는 비병원성 세균이다. 이들의 작용기작은 장점막 표면에 조밀하게 군집을 형성함으로써 유해세균이 장점막에 침입할 기회를 주지 않으며 유산을 생성하여 장내 pH를 낮게 유지시킴으로써 유해한 미생물들이 살아가기에 부적합한 환경을 만들어 준다[5]. 유산균에 의해 생성되는 항균 물질과 일부 *Lactobacillus* sp.에 의하여 생산되는 과산화수소는 여러 가지 세균의 증식을 억제하며, 병원성균에 의해 생성되는 유독한 amine의 합성을 억제하거나 생성된 endotoxin을 해독하고 악성 종양의 발생을 억제하며 면역기능을 증진시킨다[6]. 이러한 작용기작을 가진 유산균을 사료에 첨가하여 급여했을 경우 쥐의 장내에서 요소분해효소를 생산하는 유해균의 번식을 억제하여 동물의 건강 증진과 성장촉진의 가능성이 있음을 보여주었으며, 산란계 사료에 첨가하면 배설물의 암모니아태질소 함량이 감소된다고 보고되었다[7]. 또한 자돈 시기에는 분내 유산균수를 증가시켜 대장균수를 감소시켜주고, 비육돈 시기에는 성장을 촉진하며 소화율을 향상시키고 분내 가스 발생작용을 감소하는 것으로 알려져 있다[8].

2020년 사료 수입 원료 총액은 48억 1천 667만 8천 달러, 2021년 62억 9천 411만 3천달러, 2022년 75억 2천 867만 6천달러로 매년 증가하는 것으로 나타났다.

또한 국내에 반려동물 사료 시장이 2021년 1.5조원, 2027년 15조원으로 급성장함에 따라 국산 프리미엄 프로바이오틱스 사료 개발과 반려동물 유래 유익미생물 소재 연구를 통해 수익성이 높은 시장 기회가 제공될 수 있을 것으로 기대된다[9]. 특히, 반려동물 산업에서, 반려동물 유래 마이크로바이옴을 활용한 유익미생물, 프로바이오틱스 소재 등의 생산 관련 기술은 반려동물의 건강과 복지에 효과를 발휘하는 미생물 기능성 소재로서, 국내의 반려동물산업에 기여 할 뿐 아니라, 향후 해외 수출을 통한 시장개척과 국내 사료 첨가 제품의 기술력 향상에 기여할 수 있을 것으로 전망된다[10]. 그러나, 반려동물 분야의 마이크로바이옴 연구는 현재 국내외적으로 연구 단계에서 매우 활발하지만 아직까지는 산업적으로 초기 단계에 있다. 또한, 국내 연구 자체가 개별적으로 이루어지고 있어, 이에 관하여 산연이 연계된 체계화된 연구가 절실한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 반려동물 유래 마이크로바이옴을 활용하여 내산성, 내담즙성, 항산화 활성, 장내 상피 세포 부착성, 염증 억제 효과 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수한 균주를 선별하여 반려동물용 복합 유익미생물 소재로 제안하고자 한다.

2. 연구 재료 및 방법

2.1 유산균 분리

국내 토종 반려동물의 분변을 수집하여 시료로 사용하였다. 각각의 시료를 1g 취하여 멸균수에 희석하여 교반기로 섞은 후 적절히 희석해서 0.5% CaCO₃를 함유한 MRS 평판배지에 100 μl씩 도말하였으며, 37°C에서 24-48 시간 배양한 뒤 OD_{600nm}가 1.0이상, pH 4.2이상을 나타내는 투명환을 생성하는 콜로니를 선택하여 순수 분리하였다[11]. 이후 이들을 대상으로 내산성 및 내담즙성 실험을 통해 시험균주를 선정하였다.

2.2 분리 유산균의 내산성 및 내담즙성 분석

국내 토종 반려동물 분변 유래의 유산균 110종에 대한 내산성과 내담즙성 우수 균주 선별 실험을 1차, 2차, 두번 진행하였다. 구강을 통해 섭취된 유산균은 위액과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하고 담즙이 존재하는 십이지장을 지나 최종 목적 부위인 장에 도달해야 효과적인 기능을 나타낼 수 있으므로, 유산균이 위장의 낮은

pH 3 이하의 산성 조건과 소화 효소가 많은 담즙의 환경 조건에서 생존할 수 있는지를 기준으로 선별하였다[12]. MRS 배지에서 배양한 국내 토종 반려동물 분변 유래의 유산균 110종을 내산성 측정 배지(1 N HCl로 보정하여 만든 pH 2.5의 MRS 배지) 및 내담즙성 측정 배지(0.3% oxgall을 첨가한 MRS 배지)에 배양액과 함께 각각 1:1 비율(v/v)로 접종하고, 37°C에서 24시간 정지 배양 후 600 nm에서 균체 생장을 확인하였다[13]. 이때 초기 흡광도 대비 배양 24시간 이후 흡광도 값이 20% 이상 증가된 값을 보이는 균주 총 17종을 1차에 선별하였으며, 선별된 균주를 대상으로 2차 선별을 진행하였다. 선별된 17종의 균주에 대해 1차 선별 실험과 동일한 방법으로 2차 내산성 분석을 수행하였다. 이때, 대조군 균주로 상업용으로 사용되고 있는 락토바실러스 람노시스 GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG, ATCC53103)를 사용하였다. 선별된 17종을 배양 후 1 N HCl로 보정하여 만든 pH 2.5의 MRS 배지에 배양액과 함께 1:1 비율 (v/v)로 접종하고, 37°C에서 3시간 배양 후 생균수를 측정하여 내산성을 측정하였다. 음식물이 위를 통과하는 시간이 2 시간에서 4시간 정도 소요된다고 보고[14]되어 3시간 기준으로 분석을 실시하였다. 2차 내담즙성 측정은 1차와 동일하게 수행되었으며, 37°C에서 24시간 배양 후 0시간과 24시간의 생균수를 비교하여 내담즙성을 측정하였다. 그 결과, 10종의 우수한 균주가 선별되었다.

2.3 분리한 유산균의 항산화 활성 분석

여러 유산균의 우수한 항산화 효과가 보고된 바[15], 내산성과 내담즙성이 우수한 선별된 10종 균주의 항산화 활성 분석을 실시하였다. 대조군으로는 0.2 mM 아스코르브산(ascorbic acid, AA)을 사용하였다.

ABTS[2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] 라디칼 소거능

MinAlexander 등[16]의 연구를 응용하여 본 실험에서도 7.4 mM ABTS와 2.6 mM 과황산칼륨(Potassium persulfate)를 제조하여 1:1 비율로 혼합하고, 상온 암실에 20 시간 방치하여 ABTS 라디칼을 생성하도록 하였다. 그 후 734 nm에서 흡광도가 0.9 정도가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS 라디칼과 선별된 10종 균주 배양액을 각각 1:1로 혼합하고 37°C에서 30분간 반응 후 상등액 0.2 ml을 96-well plate에 옮겨 변화되는 흡광도를 734 nm에서 측정하였다.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능

0.2 mM DPPH 용액에 선별된 10종 균주 배양액을 각각 1:1 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 후 상등액 0.2 ml을 96-well plate에 옮겨 변화되는 흡광도를 517 nm에서 측정하였다[16].

ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능의 표준물질로 gallic acid를 사용하였으며, mg gallic acid equivalent(GAE)/g residue로 나타내었다[16].

2.4 분리 유산균의 장내 부착능 분석

내산성과 내담즙성을 비교하여 선별된 균주의 장내 부착능은 You 등[17]의 연구 방법을 응용하여 장세포의 분화 과정 중 점액을 분비하는 인간 유래 대장암 HT-29 세포주를 이용하여 분석하였다. 구체적으로, HT-29 세포주는 20% FBS(fetal bovin serum), 1% 페니실린 (penicillin) 및 1% 스트렙토마이신 (streptomycin)을 포함하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 활성화된 HT-29 세포주를 24-well plate에 각 well당 5x10⁴ 개가 되도록 시딩(seeding)한 후 24~48시간 동안 배양하였다. 부착도 측정 전, HT-29 세포주를 항생제와 FBS가 없는 DMEM 배지에 현탁하고, MRS 배지에서 배양한, 선별된 10종 균주 및 대조군인 LGG 를 1x10⁸ CFU/ml로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 2시간 후 부착되지 않은 세균을 제거하기 위해 PBS(Phosphate-Buffered Saline)를 첨가하고 진탕 배양기를 이용하여 300 rpm에서 3분 교반하면서 2회 세척하였다. 0.5% Triton X-100을 1 ml 첨가하여 부착된 세균을 떼어낸 후 멸균수를 이용하여 적절히 희석하고, MRS 배지에 도말하여 최종적으로 장내 부착능을 측정하였다.

2.5 분리 유산균의 염증 억제 효과 분석

Shin 등[18]의 연구 방법을 토대로 염증 억제 효과는 다음과 같은 방법으로 분석하였다. 마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포주는 20% FBS(fetal bovin serum), 1% 페니실린 (penicillin) 및 1% 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 Raw264.7 세포주를 24웰 플레이트에 각 웰당 1x10⁵ 개가 되도록 시딩한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 지질다당류 (lipopolysaccharide)를 10 µg/ml 농도로 2시간 처리

하고, 선별된 10종 균주 및 대조균인 LGG를 1×10^8 CFU/ml 되도록 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 양성 대조균은 PBS만을 처리하였고, 음성 대조균은 PBS와 함께 LPS를 10 µg/ml 농도로 처리하여 염증을 유발하였다. 선별된 10종 균주 및 대조균인 LGG를 처리한 배양액을 원심분리하여 상등액을 50 µl를 96-well plate에 취하고, 여기에 동량의 griess reagent I(Sulfanilamide solution)과 griess reagent II(NED solution)을 첨가하여 10분간 반응시켰다. 이후 ELISA 리더기를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO(Nitric oxide) 농도는 0.1 M 아질산염(nitrite) 표준을 사용하여 얻은 표준직선과 비교하여 산출하였다.

2.6 분리 유산균의 유전자 염기서열 분석

16s rRNA sequencing 분석을 통해 분리 유산균의 정확한 유전학적 동정을 실시하였다. 분리 유산균을 MRS 액체배지에 접종 및 배양하여 DNA를 분리하였다. 이후 균주의 16s rRNA를 증폭하기 위해 락토바실러스 16S rRNA 유전자 증폭용 프라이머 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 서열번호 2)와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', 서열번호 3)을 사용하였다. PCR 증폭은 Ex Taq 폴리머라제(Takara)(2.5 U), 폴리머라제 버퍼, dNTP 혼합물(각 1 mM), 각 프라이머(100 pmol) 1 ml, 주형 DNA 500 ng을 함유하는 PCR 반응용액(50 µl)을 준비한 후, 유전자 증폭기(Takara, Japan)로 96°C 30초, 50°C 1분, 72°C 2분 조건으로 30회 간 수행하였다. PCR 반응액을 1% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 예상되는 크기의 DNA 단편이 증폭된 것을 확인하고, pGEM-TEasy 벡터(Promega, USA)를 이용하여 대장균 EPI300 으로 형질 전환하였다. 형질 전환된 재조합 대장균들로부터 플라스미드 DNA를 추출(Qiagen, USA)하고, 제한효소 EcoRI를 처리하여 원하는 크기의 DNA 단편이 클로닝된 것을 확인하였으며, 16S rRNA 염기서열을 결정하였다(서열번호 1). PCR 반응산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인하였고 염기서열은 NCBI BLASTN 프로그램을 사용하여 선별 유산균을 동정하였다. 시료 추출물 25 µl에 DPPH 용액 500 µl를 첨가한 뒤 30분간 암소에 반응시켜 ELISA reader기로 520 nm에서 측정하였다[19].

2.7 분리 유산균의 항균활성 분석

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 1 mM 50 µl와 esterase (600 unit/mL) 50 µl를 혼합한 뒤 37 °C에서 20 min 간 반응시켜 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCFH) solution을 만든 후 DCF 측정법을 사용하여서 평가하였다[18]. 페이퍼 디스크(paper disc)를 이용한 아가 확산(agar diffusion)법을 이용하여, 유해균에 대한 항균력을 측정하였다. 구체적으로, 동정한 락토바실러스 루테리 BR301 균주를 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 원심분리하여 배양 상등액을 회수하였다. 회수한 배양 상등액을 0.2 µm 시린지 필터로 제균 후 유해균이 도포되어 있는 평판배지(LB, NB, BHI 및 TSB)에 부착되어 있는 페이퍼 디스크 위에 0.1 ml로 첨가하였다. 30°C에서 24시간 배양 후 페이퍼 디스크 주변에 생성된 저해환(mm)의 직경을 3회 반복 측정하여 평균값을 도출하였다[20].

3. 결과 및 고찰

3.1 내산성과 내담즙성

국내 토종 반려동물 분변 유래의 유산균 110종에 대한 내산성 및 내담즙성 우수 균주 선별을 위하여 1차 선별실험을 진행하였다.

<Table 1>은 국내 토종 반려동물 분변 유래의 110종 유산균의 내산성과 내담즙성을 비교 분석한 결과이다. 초기 흡광도 대비 배양 24시간 이후 흡광도 값이 20% 이상 증가된 값을 보이는 균주를 선별한 결과 균주 2, 5, 12, 17, 18, 22, 31, 32, 39, 40, 44, 49, 51, 52, 53, 54, 95번 총 17종을 선별하였으며, 선별된 균주를 대상으로 2차 선별을 진행하여 <Fig. 1>, <Fig. 2>의 결과를 얻었다.

<Fig. 1>과 <Fig. 2>는 1차에서 선별된 균주 17종에 대해서 내산성과 내담즙성을 분석 비교한 결과이다. 대조균인 LGG의 경우 내산성은 108.7%로 나타났으며, 대조균보다 높은 내산성을 보인 균주는 8종으로 확인되었다. 이 중 18번 균주와 2번 균주가 다른 균주에 비해 상대적으로 높은 내산성을 나타내었다(Fig. 1). 내담즙성을 비교한 결과 2번 균주와 49번 균주가 대조균인 LGG 및 다른 균주들보다 상대적으로 높은 내담즙성을 나타내었다(Fig. 2).

Table 1. Analysis of acid tolerance and bile tolerance of 110 types of lactic acid bacteria derived from domestic pet feces

Strain	Acid tolerance	Bile tolerance												
1	+++	-	23	+++	+	45	+++	++	67	-	-	89	+	+
2	+++	+++	24	+++	-	46	++	-	68	+	+	90	++	+
3	+++	++	25	+++	-	47	+++	++	69	+	+	91	+++	+
4	+++	-	26	+++	-	48	-	+	70	-	-	92	++	+
5	+++	+++	27	+++	++	49	+++	+++	71	++	+++	93	+	+
6	+++	++	28	+++	-	50	+++	+	72	++	+	94	-	+
7	+++	++	29	+++	+	51	+++	+++	73	++	+	95	+++	+++
8	+++	-	30	+++	-	52	+++	+++	74	-	+	96	+++	++
9	+++	++	31	+++	+++	53	+++	+++	75	++	+	97	+++	++
10	+++	++	32	+++	+++	54	+++	+++	76	+	-	98	+++	++
11	+++	++	33	+++	+++	55	+++	+	77	+	-	99	+++	++
12	+++	+++	34	+++	++	56	+++	-	78	+++	++	100	+++	++
13	+++	++	35	+++	++	57	+++	+	79	-	+	101	+++	++
14	+++	++	36	+++	-	58	-	-	80	+	-	102	+++	++
15	+++	-	37	+++	++	59	-	-	81	-	+++	103	+	+++
16	+++	+	38	+++	-	60	-	-	82	+	-	104	-	+++
17	+++	+++	39	+++	+++	61	-	-	83	-	-	105	+++	-
18	+++	+++	40	+++	+++	62	++	-	84	+	+	106	+++	+
19	+++	++	41	+++	+	63	+++	+	85	++	+	107	++	+++
20	+++	++	42	+++	-	64	+	-	86	+++	+	108	-	+++
21	+++	++	43	+++	++	65	+	+	87	-	++	109	+	+++
22	+++	+++	44	+++	+++	66	+	+	88	++	+	110	+	+

-: 0%, +: <10%, ++: <20%, +++: ≥20% (OD₆₀₀ increase rate)

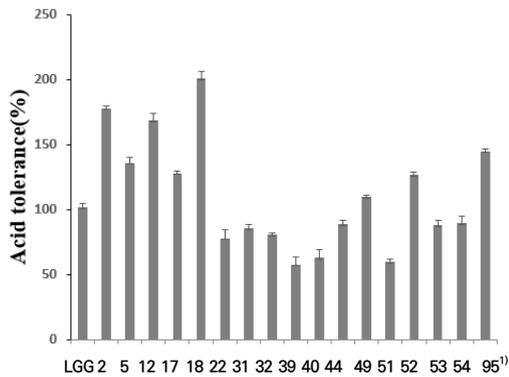


Fig. 1. Comparison of acid tolerance of 17 species selected after primary analysis

¹⁾The strain number refers to strains showing an increase of more than 20% compared to the initial absorbance through comparative analysis of the acid tolerance of 110 types of lactic acid bacteria.

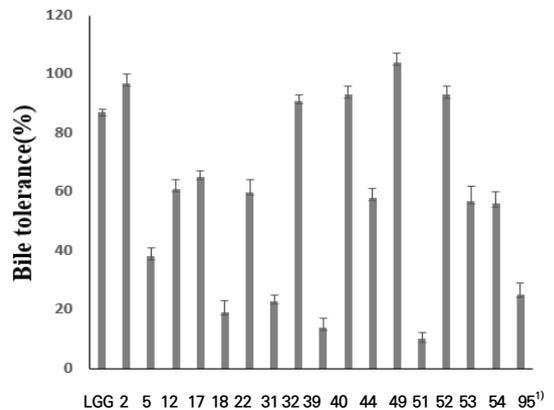


Fig. 2. Comparison of bile tolerance of 17 species selected after primary analysis

¹⁾The strain number refers to strains showing an increase of more than 20% compared to the initial absorbance through comparative analysis of the bile tolerance of 110 types of lactic acid bacteria.

〈Fig. 1〉, 〈Fig. 2〉의 결과를 토대로 내산성과 내담즙성이 높은 최종 국내 토종 반려동물 분변 유래의 유산균 10종, 즉 균주번호 2, 12, 17, 22, 40, 44, 49, 52, 53, 54번을 확보하였다. 이 10종의 균주를 이용하여 DPPH, ABTS radical 소거능, 장내 부착능, 항염증을 비교하였다.

3.2 DPPH, ABTS radical 소거능

생체 내에서 스트레스에 의한 free radical 생성은 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 산화시키고, 이로 인한 과산화 지질의 증가는 여러 조직을 손상시켜 대사 장애를 초래함으로써 생체기능의 저하나 노화를 비롯한 암 및 각종 퇴행성질환들의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[16]. 사람을 비롯한 생물은 항산화 메커니즘을 가지고 있어 산화적 손상으로부터 스스로를 보호할 수 있으나 완전하지 못하여 항산화제의 보충이 필수적이다. 유산균 역시 활성산소의 피해로부터 스스로를 보호하기 위한 항산화 메커니즘을 가지고 있으며, 이들 유산균의 in vivo 및 in vitro 항산화 효과에 대하여 보고되기 시작하였다[21]. 대조균인 0.2 mM 아스코르브산(AA)의 ABTS 라디칼 소거능은 80.11%이었고, LGG의 경우 64.77%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다. 선별된 10종 균주의 ABTS 라디칼 소거능 범위는 62.50~65.91%이었으며, 10종 균주 모두가 LGG의 라디칼 소거능과 유사하였다(Fig. 3).

DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심의 라디칼로서 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질이며 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색 되는데 이것은 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체내에서 활성 라디칼에 의한 노화 억제 작용을 척도로 이용되고 있다[16]. DPPH는 파장 517 nm에서 흡광도를 나타내며 산화억제 물질이 첨가되면 환원력에 의해 흡광도가 감소한다. 대조균인 0.2 mM 아스코르브산(AA)의 DPPH 라디칼 소거능은 84.17%이었고, LGG의 경우 59.78%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 선별된 10종 균주의 DPPH 라디칼 소거능 범위는 51.09~60.87%로 나타났다(Fig. 4).

지금까지 알려진 항산화제가 약한 활성과 독성으로 인하여 사용에 문제점을 내포하고 있으나[7] 항산화 활성이 있는 유산균은 인간의 활성산소 축적의 위험으로부터 보호해 줄 수 있을 것으로 여겨지며[21], 또한 식품 및 의약품 분야에서 산업적 이용이 유효하다고 사료된다.

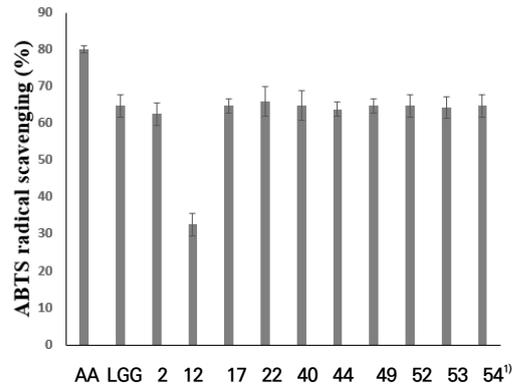


Fig. 3. Comparison of ABTS radical scavenging activity
¹⁾The strain number is a strain with high acid tolerance and bile tolerance.

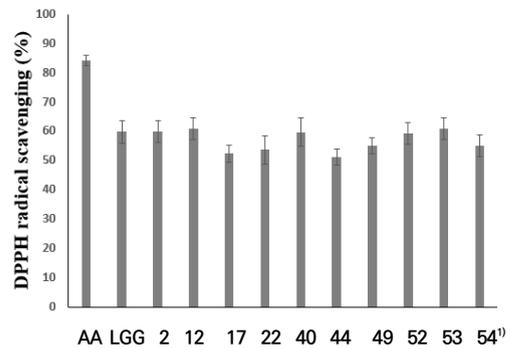


Fig. 4. Comparison of DPPH radical scavenging activity
¹⁾The strain number is a strain with high acid tolerance and bile tolerance.

3.3 장내 부착능

프로바이오틱스는 위와 십이지장을 생존한 상태로 통과하여 장내에 도달한 뒤 장내 상피세포에 부착하여야 정상적으로 증식 및 기능을 발휘할 수 있고[6], 젖산균이 부착하는 장내 부위는 점액층으로, 대조균인 LGG의 장내 부착능을 1%로 보았을 때 2번 균주가 대조균보다 약 6배 높은 장내 부착능을 나타내었으며, 12번, 17번 및 22번 균주도 대조균보다 높은 장내 부착능을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5). 이에, 대조균보다 높은 장내 부착능을 나타낸 상기 4종의 균주, 균주번호 2, 12, 17, 22번 균주가 프로바이오틱스로 사용에 적합함을 알 수 있다.

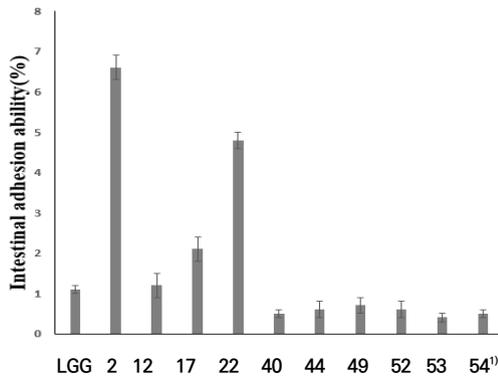


Fig. 5. Comparison of intestinal adhesion ability
¹⁾The strain number is a strain with high acid tolerance and bile tolerance.

3.4 항염증

Hydroxyl radical은 활성산소 라디칼 중에서 화학적으로 가장 반응성이 크며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사 과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소가 Fe²⁺나 Cu²⁺ 이온의 존재 하에서 생성되며 가장 독성이 강한 free radical이다[22]. 이러한 과정의 ROS가 산화적 스트레스를 야기하여 체내 염증을 유발하고 이로 인하여 각종 질병에 노출되어 이를 예방하는 대체물질을 개발하기 위한 연구들이 진행되고 있다[23].

염증이란 macrophage나 mast cell 등의 백혈구에

서 생성된 다양한 신호전달물질이 관여하는 일련의 병리적인 과정으로서, 이 중 macrophage는 대표적인 염증 매개물인 NO (nitric oxide)생성에 관여한다. NO는 급성 및 만성염증 반응에서 L-arginine으로부터 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 의해 과량 생성되며 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 내산성, 내담즙성이 우수한 10종의 선별균주를 이용하여 항염증을 비교하였는데, 선별된 10종 균주 중 6종이 대조균인 LGG보다 염증 억제 효과가 우수함을 확인하였다(Fig. 6). 이를 토대로 균주번호 2, 22, 40, 49, 52, 53은 항염증에 효과가 있다고 판단되어 이를 이용한 프로바이오틱스 제품을 만들 수 있을 것이라고 생각된다.

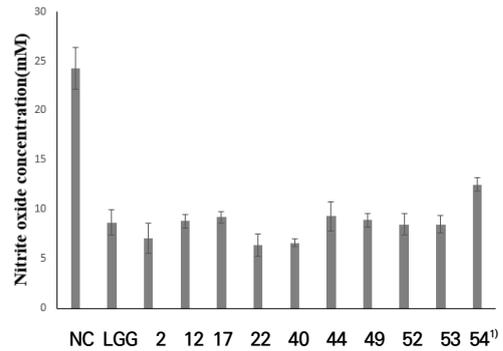


Fig. 6. Comparison of intestinal adhesion ability
¹⁾The strain number is a strain with high acid tolerance and bile tolerance.

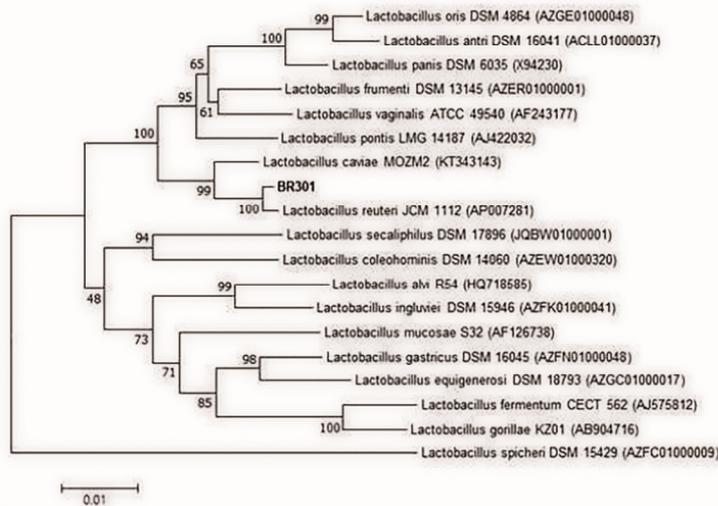


Fig. 7. Phylogenetic relationships between BR301 and other related Lactobacillus species.

Table 2. Inhibition spectrum of *Lactobacillus reuteri* BR301

	Indicator strains	Antimicrobial activity
Harmful bacteria or diarrhea-causing bacteria	<i>Bacillus spizizenii</i> (KCTC 2189)	++
	<i>Candida albicans</i> (KCTC 7965)	-
	<i>Escherichia coli</i> (KCTC 2571)	++
	<i>Escherichia coli</i> (KCTC 1682)	++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	+
	Food harmful bacteria	<i>Bacillus cereus</i> (KCTC 1013)
<i>Bacillus sphaericus</i> (KCTC 1184)		++++
<i>Enterococcus faecium</i> (KCTC 13225)		+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> (KCTC 3444)		+
<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 3710)		+
<i>Streptococcus mutans</i> (KCCM 40105)		++
<i>Enterococcus faecalis</i> (KCCM 12117)		+++
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 2443)		+++
<i>Shigella flexneri</i> (KCTC 2517)		+
<i>Shigella sonnei</i> (KCTC 2518)		++
<i>Micrococcus luteus</i> (KCTC 2177)		++++

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each indicator strain. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 10.0 mm; ++, 10.0~15.0 mm; +++, 15.0~20.0 mm; +++++, above 20.0 mm.

위의 내산성, 내담즙성, 항산화, 장내 부착능, 항염증 실험 분석 결과를 토대로 가장 우수한 프로바이오틱스 특성을 가지는 것으로 확인된 2번 균주의 분자생물학적 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 분석하였다.

3.5 유전자 염기서열

16S rRNA 염기서열의 상동성 분석을 실시한 결과를 토대로 분리한 균주가 종래 락토바실러스 루테리 JCM1112(AP007281) 균주와 유사성이 99%인 것으로 확인되어(Fig. 7), 최종적으로 락토바실러스 루테리 BR301 (*Lactobacillus reuteri* BR301)로 명명하였다.

3.6 항균 활성

유전자 염기서열을 통해서 명명한 락토바실러스 루테리 BR301 (*Lactobacillus reuteri* BR301)의 유해 세균에 대한 항균 활성을 조사한 결과 그람 양성 세균인 *Bacillus sphaericus* (KCTC 1184), *Micrococcus luteus* (KCTC 2177), *Enterococcus faecalis* (KCCM 12117) 에 대한 항균 활성이 매우 우수한 것으로 나타났고, 그람 음성 세균인 *Escherichia coli* (KCTC 2443)에 대해서도 항균 활성이 우수한 것으로 나타났다. 하지만 *Candida albicans* (KCTC 7965) 에 대해서는 항균 활성이 관찰되지 않음을 확인하였다. 균주를 배양한 MRS broth의

pH는 6.4 였으며, 배양여액의 pH는 균에 따른 차이는 있었지만 pH 3.8-4.5 사이로 측정되었으며, 이러한 결과는 분리 균주가 생산하는 유기산, 초산 등의 생성물에 의해 항균 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

락토바실러스 루테리 BR301 균주는 다양한 유해 지시균주에 대해 항균 활성을 보이는 것을 확인하였다. 이에, 락토바실러스 루테리 BR301 균주는 반려동물용 복합 유익미생물 소재로 활용 가능성을 알 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 반려동물 유래 마이크로바이옴을 활용하여 내산성, 내담즙성, 항산화 활성, 장내 상피세포 부착성, 염증 억제 효과 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수한 균주를 선발하고자 국내 토종 반려동물의 분변을 수집하여 분변 유래의 유산균 110여종을 분리해내었다. 유산균 110여종에 대하여 1차, 2차 내산성, 내담즙성을 분석한 결과 내산성, 내담즙성에 우수한 균주 10종, 즉 균주 2, 12, 17, 22, 40, 44, 49, 52, 53, 54번을 구별하였다. 이 균주 10종에 대한 항산화능과 장내 부착능, 항염증을 조사한 결과 균주번호 2번이 가장 우수한 프로바이오틱스 특성을 가지는 것으로 나타나 2번 균주의 분자생물학적 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 서열

을 분석하였다. 16S rRNA 염기서열의 상동성 분석을 실시한 결과를 토대로 분리한 균주가 종래 락토바실러스 루테리 JCM 1112(AP007281) 균주와 유사성이 99%인 것으로 확인되어, 최종적으로 락토바실러스 루테리 BR301(*Lactobacillus reuteri* BR301)로 명명하였다. 락토바실러스 루테리 BR301(*Lactobacillus reuteri* BR301)의 항균 활성이 *Candida albicans* (KCTC 7965) 균주에 대해서는 항균 활성이 없는 것으로 나타났으며, 식중독 균주를 포함한 그람 양성 및 음성 세균들에 강한 항균 활성이 관찰됨을 알 수 있다.

따라서 본 실험 결과 락토바실러스 루테리 BR301 (*Lactobacillus reuteri* BR301) 균주는 기존 프로바이오틱스 균주보다 내산성, 내담즙성, 항산화 활성, 장내 상피세포 부착성, 염증 억제 효과 및 유해 미생물에 대한 항균 활성이 우수한 바, 이는 반려동물용 복합 유익미생물 소재로서 활용이 기대된다.

References

- J. Y. Heo, H.K.Lee, Y.H.Kim, "Development of Health-Promoting Probiotics and Microbiome for Safety and Functionality of Animal Foods", *Korean Society for Food Science of Animal Resources*, Vol.8, No.2, pp.27-34, 2019.
- S.B.Lee, T.W. Y.H.Choi, S.Y.Jeong, W.S.Kim, Y.C.Kim, H.S.Kang, "Effects of Dietary Fermented *Pleurotus eryngii* Mycelium on Performance and Egg Quality in Laying Hens", *Journal of Agriculture & Life Science*, Vol.48, No.3, pp.203-216, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.14397/jals.2014.48.3.203>
- S.Y.Kim, M.K.Sang, H.Y.Weung, Y.A.Jeon, "Characterization of Multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13", *Korean Journal of Pesticide Science*, Vol.20, No.3, pp.189-196, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.7585/kips.2016.20.3.189>
- K.H.Kim, D.E.Park, S.J.Oh, "Effects of Heat Treatment on the Nutritional Quality of Milk: II. Destruction of Microorganisms in Milk by Heat Treatment", *Journal of Milk Science Biotechnology*, Vol.35, No.1, pp.55-72, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.22424/jmsb.2017.35.1.055>
- W.S.Jeong, S.J.Lee, S.Y.Kim, S.H.Yeo, "Identification of growth characteristics and physiological functionality of useful fungi from nuruk", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.29, No.5, pp.768-776, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.11002/kifp.2022.29.5.768>
- S.K.Kim, S.D.Lim, "Functionality and Research Trend of Probiotics", *Food Industry and Nutrition*, Vol.23, No.1, pp.18-24, 2018.
- J.S. Shin, K.H.Um, J.Y.Lee, Y.S.Choi, H.S.Park, B.S.Park, "Effect of a probiotic mixture on egg quality and egg production in laying hens", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.36, No.3, pp.748-757, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.12925/jkocs.2019.36.3.748>
- Y.Zhang, Y.Y.Zhang, F.Lui, Y.W.Mao, Y.M.Zhang, H.Zhang, S.F.Ren, L.H.Guo, Z.Chen, "Mechanisms and applications of probiotics in prevention and treatment of swine diseases", *Porcine Health Management*, Vol.9, No.5, pp.6-17, 2023.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00295-6>
- M.M.Haque, N.A.Hasan, M.M.Eltholth, P.Saha, S.S.Mely, T.Rahman, F.J.Murray, "Assessing the impacts of in-feed probiotic on the growth performance and health condition of pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) in a farm trial", *Aquaculture Reports*, Vol.20, No.1, pp.100699-100708, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100699>
- G.Alessandri, G.A.Lugli, C.Tarracchini, S.M.Rizzo, C.Argentini, A.Viappiani, L.Mancabelli, F.Fontana, C.Milani, F.Turroni, D.V.Sindereen, M.Ventura, "Disclosing the Genomic Diversity among Members of the *Bifidobacterium* Genus of Canine and Feline Origin with Respect to Those from Human", *Applied Environmental Microbiology*, Vol.88, No.7, pp.21-30, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02038-21>
- J.H.Bang, H.J.Shin, H.J.Choi, D.W.Kim, C.S.Ahn, Y.K.Jeong, W.H.Joo, "Probiotic Potential of *Lactobacillus* Isolates", *Journal of Life Science*, Vol.22, No.2 pp.251-258, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2012.22.2.251>
- C.H.Kang, Y.G.Kim, S.H.Han, Y.A.Jeong, H.M.Park, N.S.Paek, "Probiotic Properties of *Bifidobacteria* Isolated from Feces of Infants", *Journal of Milk Science Biotechnology*, Vol.37, No.1, pp.40-48, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.22424/jmsb.2019.37.1.40>
- S.M.Hong, B.C.So, S.W.Yoon, C.H.Kim, "Biochemical Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* Isolated from a Breast-Fed Infant", *Korean Journal Dairy Science and Technology*, Vol.30, No.1, pp.45-53, 2012.
- Y.S.Lim, J.Y.Kim, H.C.Kang, "Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Activities from Kimchi and Their Fermentation Properties in Milk", *Journal of Milk Science Biotechnology*, Vol.37, No.2, pp.115-128, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.22424/jmsb.2019.37.2.115>
- S.H.Park, U.S.Hwang, C.B.You, E.S.Lee, H.Park, "Quality Characteristics of Red Ginseng Yogurt Produced with Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi", *Food Chemistry*, Vol.7, No.2, pp.67-76, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.35732/ctlabp.2021.7.2.67>
- M.J.MinAlexander, K.B.Nam, S.H.Lim, E.S.Son, "Exploration of Nutritional Components, Functional Components and Antioxidant Activities of Brewer's Spent Grain Powder, Red Ginseng By-Products and Rice Bran Powder", *Journal of the Korea Academia-Industrial*,

Vol.24, No.2, pp.208-219, 2023.

DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2023.24.2.208>

- [17] C.B.You, E.S.Lee, M.K.Lee, G.Y.Kee, H.Park, "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Heat-Killed Lactiplantibacillus plantarum Isolated from Kimchi", *Current Topics in Lactic Acid Bacteria and Probiotics*, Vol.8, No.2, pp.66-78, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.35732/ctlabp.2022.8.2.66>
- [18] H.Y.Shin, H.Kim, E.J.Jeong, K.W.Yu, "Macrophage Stimulating Activity of Crude Polysaccharide on Maca (Lepidium meyenii) Varieties", *The Korean Journal of Food And Nutrition*, Vol.35 No.1 pp.7-15, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.9799/ksfan.2022.35.1.007>
- [19] M.L.Lee, F.Adel, M.Y.Jung, S.J.Kim, "Draft genome sequence of Brachy bacterium sp. JHP9 isolated from horse feces in Jeju Island", *Korean Journal of Microbiology*, Vol.58, No.2, pp.102-104, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.7845/kim.2022.2033>
- [20] C.H.Kang, S.H.Han, Y.A.Kim, Y.A.Jeong, N.S.Paek, "Antibacterial Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Foods", *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, Vol.32, No.3, pp.199-205, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2017.32.3.199>
- [21] Q.Xiang, C.Wang, H.Zhang, W.Lai, H.Wei, J.Peng, "Effects of Different Probiotics on Laying Performance, Egg Quality, Oxidative Status, and Gut Health in Laying Hens", *Animals*, Vol.9, No.12, pp.1110-1119, 2019.
DOI: <http://doi.org/10.3390/ani9121110>
- [22] H.J.Kim, Y.H.Ahn, H.H.Cho, S.C.Kwon, "A Study on the Antioxidant Activity of Lactobacillus Fermented Kyoho Grape Juice Liquid", *Journal of the Korea Academia-Industrial*, Vol.24, No.4, pp.42-48, 2023.,
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2023.24.4.42>
- [23] K.C.Massarolo, T.D.de Souza, C.C.Collazzo, E.B.Furlong, L.A. de Souza Soares, "The impact of Rhizopus oryzae cultivation on rice bran: Gamma-Oryzanol recovery and its antioxidant properties", *Food Chemistry*, Vol.228, No.1, pp.43-49, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.127>

윤 슬 기(Seul-Gi Yoon)

[정회원]



- 2013년 12월 : University of California San Diego, Human Biology (이학사)
- 2020년 8월 : University of Florida, Microbiology and Cell Science (이학석사)
- 2018년 7월 ~ 현재 : (주)마이크로바이옴 기업부설연구소 선임연구원
- 2023년 3월 ~ 현재 : 광운대학교 경영대학원 바이오의료 경영학과 외래교수

<관심분야>

미생물, 생물공학, 바이오생명공학, 마이크로바이옴

윤 주 성(Ju-Sung Yoon)

[정회원]



- 2017년 12월 : University of California, Berkeley, 언론정보학과 (인문학사)
- 2021년 5월 : Johns Hopkins University, 헬스 커뮤니케이션학과 (인문학 석사)
- 2020년 11월 ~ 현재 : (주)마이크로바이옴 기업부설연구소 연구원

<관심분야>

건강정보 개발 및 소통/전파, 건강 행동/태도 변화, 미디어와 건강, 기능성 식품, 마이크로바이옴 기술 및 제품

손 은 심(Eun-Shim Son)

[정회원]



- 1996년 2월 : 이화여자대학교 식품영양학과 (이학사)
- 1999년 2월 : 이화여자대학교 식품영양학과 대학원 (이학석사)
- 2011년 2월 : 수원대학교 식품영양학과 대학원 (이학박사)
- 2006년 1월 ~ 2019년 2월 : 안산대학교 식품영양학과 겸임교수
- 2023년 10월 ~ 현재 : (주)마이크로바이옴 연구소장

<관심분야>

식품개발, 기능성 물질 탐색, 마이크로바이옴, 발효학

오 백 록(Baek-Rock Oh)

[정회원]



- 1999년 3월 ~ 2007년 8월 : 조선대학교 환경 미생물학 (이학석사)
- 2012년 8월 : 전남대학교 응용생물공학 (공학박사)
- 2013년 1월~ 2013년 11월 : (주)삼양넥스 책임연구원
- 2013년 12월 ~ 현재 : 한국생명공학연구원 책임연구원

<관심분야>

미생물, 생물공학, 바이오생명공학

윤 복 근(Bok-Kun Yoon)

[정회원]



- 2021년 2월 : 경기대학교 서비스경영전문대학원 경영학 (경영학 박사)
- 2017년 8월 ~ 현재 : 광운대학교 바이오통합케어경영연구소 식의학(ND)/마이크로바이옴 센터장
- 2018년 3월 ~ 현재 : 대한마이크로바이옴협회 대표
- 2018년 3월 ~ 현재 : 광운대학교 경영대학원 바이오의료경영학과 책임지도교수

<관심분야>

미생물, 바이오생명공학, 마이크로바이옴, 기능영양학