

## 乳酸菌의 分離와 同定 및 製劑化에 關한 研究

김 성웅 · 김 원배 · 박 무영\* · 양 중익  
민 신희 · 이 상희 · 김 용배

東亞製藥(株) 中央研究所 · \*韓國科學院

## Studies on the Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and its Utilization for Pharmaceutical Preparation

Seong Ung Kim · Won Bae Kim · Moo Young Park\*  
Choong Ik Yang · Shin Hong Min · Sanghi Rhee  
and Yong Bae Kim

Dong A Pharm. Co. Ltd., · \*Korea Advanced Institute of Science

(Received November 28, 1977)

### ABSTRACT

A microbial strain capable of producing lactic acid was isolated and identified as *Streptococcus faecium*. During the incubation of the isolated bacterium in a synthetic medium (Petterson broth), the optimal temperature was 36 to 39°C and the cell concentration at stationary growth phase was  $2.1 \times 10^8$  viable cells/ml. When it was dried in vacuum and diluted with avicel, the viability of *Streptococcus faecium* in physiological saline solution was decreased to 80% after incubation for 48 hr at 37°C, whereas the viability was above 90% after incubation for 1 hr at 40°C and the viability in M buffer solution (pH 4.5 ~ 9.0) at 37°C was above 95%. From these data it was concluded that the isolated microbe must be adoptible for pharmaceutical preparation such as solid dosage form.

### 序 論

乳酸菌을 利用한 醱酵은 우유를 保存하는 한 방법으로 우연히 발견되었으나<sup>(1)</sup>, 1908年 Pasteur 研究所 微生物학자 Metchnikoff가 Balkan 지방 주민의 長壽 비결이 yoghurt에 있는 乳酸菌의 常食에 있다고 報告한 이래 乳酸菌製劑의 開發이 많이 진행되었으며, 특히 日本에서는 1935年 Shirota<sup>(2)</sup>에 의해 *Lactobacillus* 系統의 菌株를 利用한 乳酸菌 음료가 開發되었으며 醫藥品의 形態로도 몇 종류

의 乳酸菌製劑가 시판되게 되었다<sup>(3)</sup>.

高濃度의 乳酸菌을 함유하는 培養液을 만드는 方法으로는 Peebles等<sup>(4)</sup>에 의해 *Streptococcus cremoris*를 培養時 半合成培地에서 pH 조절에 의한 方法이 있으며, Gilland等<sup>(5)</sup>에 의한 *Leuconostoc citrovorum* 培養에 관한 것등이 報告되어 있다. 특히 Christensen<sup>(6)</sup> Pettersen<sup>(7,8)</sup> 등은 半合成培地를 使用하여 高濃度의 乳酸菌을 함유하는 培養液을 얻는데 성공하였으며 乳酸菌의 多量培養에 효과적임을 確認하였다.

乳酸菌製劑의 開發에 있어 乳酸菌을 선택할 때

에는 人體臟器內에서 活性을 나타내어야 한다는 특성 때문에 人體臟器內에서의 菌株의 生存 可能性이 확실하여야 한다. 이러한 조건을 充足시키는 菌株을 얻기 위해서는 人糞으로부터 乳酸菌을 직접 분리하는 것이 바람직 하리라 기대된다. 이러한 이론에 근거하여 人糞으로부터 乳酸菌을 分離하여 製品化한 例도 있다<sup>(2,3)</sup>.

著者等은 이와 유사한 方法으로 幼兒의 人糞으로부터 酸生成能이 강한 菌株을 분리하였으며 이것이 *Streptococcus faecium*임을 동정하였다. *Streptococcus faecium*은 人糞에서 분리되는 대표적인 乳酸菌中의 하나로 형태학적, 생화학적으로 *Streptococcus faecalis*와 아주 유사하나 *Streptococcus faecalis*는 arginine<sup>(9,10)</sup>이나, citrate<sup>(11)</sup>를 energy source로 利用할 수 있는 반면에 *Streptococcus faecium*은 이러한 資源을 利用하지 못한다. 또한 *Streptococcus faecalis*는 50°C에서 生育이 가능하다.

本報에서는 *Streptococcus faecium*의 여러 조건에서의 特性值를 조사하고 이것을 醫藥用으로 活用할 可能性에 대하여 검토하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 乳酸菌의 分離 및 同定

生後 3個月의 幼兒의 便을 멸균 생리식염수로 희석한 후 침강 CaCO<sub>3</sub> 0.6%를 첨가한 Elliker broth<sup>(12)</sup>로 만든 한천 평판배지위에 도말하여 37°C에서 24시간 培養한 후 發生하는 colony中 酸生成能 이 크고 酸生成에 의한 환이 뚜렷한 colony를 取하여 순수 分離하였고 選發된 菌株은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>(13)</sup>에 의하여 同定하였다.

### 2. 微生物의 培養 및 回數

微生物의 培養은 Petterson broth<sup>(7,8)</sup>로 만든 培地를 120°C에서 20분간 멸균한 후 分離菌株을 1~2% 접종하여 37°C에서 培養을 하였다. 培地에 사용된 菌株은 Elliker broth에 접종하여 37°C에서 12시간 培養하면서 3回 系代한 것을 사용하였다.

對數期 末期에서 菌株을 회수하여 Tominaka Model CF 380F로 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 菌體를 培養液에서 分離하였고, 생리식염수로 3回 세척한 후 30°C 감압건조기에서 48시간 건조를 행한 후 avicel을 부형제로 써서 일정 수준으로 희석한 후 이것을 각 實驗에서 試料로 사용하였다.

### 3. 生長測定

Petterson broth에서 培養하는 도중 일정시간 간격으로 培養液을 채취하여 생리식염수로 일정수준으로 희석한 후 Elliker's lactic agar plate에 도말하였다. 이것을 37°C에서 72시간 培養한 後 나타나는 colony를 測定하여 평균 값을 구하였다.

### 4. 乳酸生成 活性度の 測定

Petterson broth에서 培養하는 도중 일정시간 간격으로 培養液을 채취하여 0.1N NaOH로 pH가 8.3이 되도록 적정하여 다음식에 의하여 lactic acid(%)를 求하였다.

Lactic acid(%)

$$= \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times \text{m. e. of Lactic acid}}{\text{weight of sample in gram}}$$

×100

여기서 乳酸의 m. e. (molecular equivalent)는 0.009이며 적정에 사용한 NaOH 溶液은 A. O. A. C 法<sup>(14)</sup>에 의해 표준화 시킨 후 사용하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 微生物의 分離 및 同定

生後 3個月의 幼兒便으로부터 分離 選別한 微生物의 形態, 培養 및 生理的 特性은 Table 1, Table 2와 같다. 즉 Gram 양성 of 쌍구균으로 운동성이 없다. Denitrification 能力이 있고 starch와 gelatin의 分解能이 없으며, arginine을 가수분해시켜 ammonia gas는 發生하나 arginine을 유일 탄소 원으로 資化하지 않는다.

Table 1. Morphological and Cultural Characteristics of the Isolated Microorganism.

#### A. Morphological characters

1. Gram stain : Positive
2. Shape and size : Ovoid in pairs, 0.9 um in diameter
3. Motility : Non-motile
4. Growth : Indifferent

#### B. Cultural characters

1. Agar plate
  - A) Form : Circular
  - B) Elevation : Raised
  - C) Margin : Entire and smooth
  - D) Pigment : Light yellow
2. Agar deeps colony : Echinulate
3. Nutrient broth : Sediment

**Table 2.** Physiological Characteristics of the Isolated Microorganism.

1. Gelatin	: Not liquified
2. Catalase	: Not produced
3. Growth at 50°C	: Grown
4. Growth at 10°C	: grown
5. Growth at pH 9.5	: Growth occurred
6. Growth in the medium containing 6.5% NaCl	: Growth
7. Starch	: Not hydrolyzed
<b>Carbon sources for growth</b>	
Citrate	: -
Malate	: -
L-Arginine	: -
D-Glucose	: +
Sucrose	: +
Fructose	: +
Matose	: +
Cellobiose	: +
Lactose	: +
Galactose	: +
Sorbitol	: +
Mannitol	: +
inulin	: -
inositol	: -

Citrate, malate의 경우도 유일 탄소원으로 資化하지 않는다. 50°C에서 生育하며 6.5% NaCl 함유培地에서도 生育이 進行된다. 이러한 結果를 고려하여 *Streptococcus faecium*으로 同定하였다.

**2. 分離 微生物의 生育 最的 溫度**

分離菌株의 最的 生育溫度를 구하기 위해서 Pettersson broth로 25°C에서 45°C 사이의 各 溫度에서 培養하여 生菌試驗을 한 경우 Table 3과 같은 結果가 얻어졌다. 對數期末期의 生菌數가 最高인 溫度가 生育 最適溫度라 結論 지을 수는 없었다. 왜냐하면 乳酸菌 음료의 경우에는 그 溫度에서 生成되는 酸이나 香의 種類나 濃度등이 오히려 製品品質의 一次的인 基準이 되므로 生菌數만 많다고 좋은 製品은 아니다. 그러나 醫藥用製劑의 경우는 香味는 問題가 되지 않으므로 生菌數가 가장 높은 溫

**Table 3.** Effect of Incubation Temperature for Cell Concentration at Stationary Growth Phase.

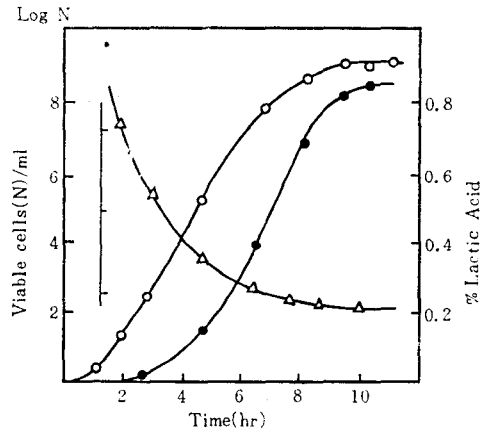
Temperature (°C)	25	30	35	37	39	40	45
Cell concentration (viable cells × 10 <sup>-8</sup> /ml)	0.12	0.50	2.05	2.10	2.10	2.00	0.75

\*Fermentation was carried out in Pettersson broth and the starter was activated for three times before inoculation.

도가 生育最適溫度라 할 수 있다. Table 3을 보면 36°C에서 38°C사이의 比較的 광범한 범위에서 生菌數가 비슷한 수준으로 가장 높았으므로 生體의 溫度와 비슷한 38°C를 最適生育條件으로 잡는 것이 바람직하리라 본다.

**3. 分離微生物의 培養中의 變化**

分離菌株을 Pettersson broth에 培養中 變化는 Fig. 1과 같다. 즉 pH는 菌 接種 후 7時間까지는 약 4.1까지 급격한 감소를 보인 後는 큰 變化가 없었으며, 生菌數는 接種 후 8時間까지 對數期이며 10時間 以後에는 生菌數가 거의 一定한 수준임을 알 수 있다. 이와 병행하여 酸 生成量도 菌주의 對數期에서 가장 활발하게 分비되는 것을 알 수 있다. 이러한 結果를 綜合해볼 수 때 培養時間은 12時間 程度면 充分하리라 본다.



**Fig. 1.** Changes of pH, Viable Cell Count and Acidity during Incubation of *S. faecium* at 37°C in Pettersson broth.

**4. 分離微生物의 溶液中에서의 溫度에 의한 安定性**

分離微生物을 Pettersson 培地에서 37°C, 12時間 培養한 後 前記 操作법에 따라 遠心分離하고 건조한 後 avicel 등을 부형제로 써서 一定수준의 生菌數를 갖게한다. 이렇게 製鍊한 生菌을 生理食鹽水에 ml당 약 10<sup>6</sup>의 生菌이 含有되도록 희석한 후 各 溫度에서 한 時間 放置後 生菌數를 檢定하였다. 이 結果는 Fig. 2에 소개되어 있는데 이 그림을 보면 40°C까지는 比較的 安定한 生菌數를 나타냈으나 엄밀하게 볼 때 35°C 以上이 되면 菌의 生存率은 서서히 떨어지는 것도 관찰할 수 있었다. 이 結果는 Fig. 1과 相異한 結果라 할 수 있다. 즉 Fig. 1에서는 35°C보다 높은 溫度인 37°C에서 培養하

라도 對數期 末期, 즉 접종한지 9時間後부터 12時間까지 무려 3時間동안 一定한 生菌數를 나타냈었는데 이것은 아마도 Fig. 1에서는 培地中에 菌의 보호제 역할을 하는 物質이 含有되어 있거나, 生長에 필요한 營養원이 있어서 growth rate와 death rate가 거의 같아졌기 때문이며 이번 경우는 보호제도 없으며, 營養원이 없으므로 growth는 거의 中斷되고 death만 進行된 結果가 아닌가 생각된다. Fig. 2의 結果에서 추측해 볼 때 生體內 溫度에서 growth가 거의 中斷된 狀態이더라도 1時間 經過후 95% 以上の 菌生存率을 나타내어 經口 投與時 生體內 生存 可能性은 높으리라 기대된다.

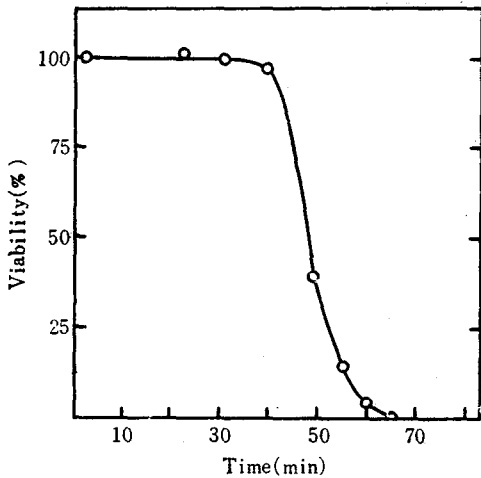


Fig. 2. Effect of Incubation Temperature. on the Viability of *S. faecium* in Physiological Saline Solution.

#### 5. 分離微生物의 溶液中에서의 보관中の 安定性

培養한 微生物을 건조한 後 avicel 등을 부형제로 써서 一定濃度の 生菌이 되게한 後 生理食鹽水에 ml당 약  $10^6$ 개의 細菌數를 含有하도록 調製한 後 37°C에서 보관하면서 72時間이 될 때까지 간헐적으로 生菌數 試驗을 하였다. 結果는 Fig. 3에 나타나 있는데 이것을 보면 처음 약 두時間동안은 比較的 安定한 生菌數를 나타내다가 두時間以後 8時間까지는 조금 급격한 감소를 보인후로는 72時間까지 서서히 生菌率이 감소하는 것을 알 수 있다. 特히 에너지원이 全然 공급되지 않는 경우도 時間이 지날 때까지 80% 以上の 生菌率을 나타내게 되어 營養물이 充分히 供給되는 장내에서의 乳酸菌의 生存은 더욱 높은 수준의 生存率을

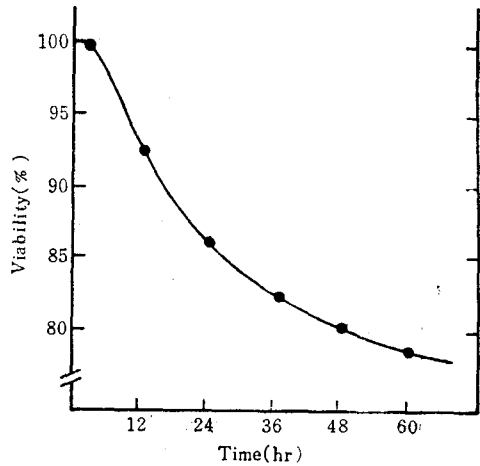


Fig. 3. Viability of *S. faecium* during Storage at 37°C in Physiological Saline Solution.

나타내리라 기대된다.

#### 6. 分離微生物의 pH에 對한 安定性

培養한 微生物을 건조한 後 avicel 등을 부형제로 써서 一定濃度の 生菌이 되게한 後 pH 2에서 pH 9까지의 1M 濃度の 완충溶液에 ml당 약  $10^6$ 개의 細菌數를 含有하도록 調製한 後 37°C에서 한時間 보관한 後 菌生存率을 檢定하였다.

이 結果는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 이것을

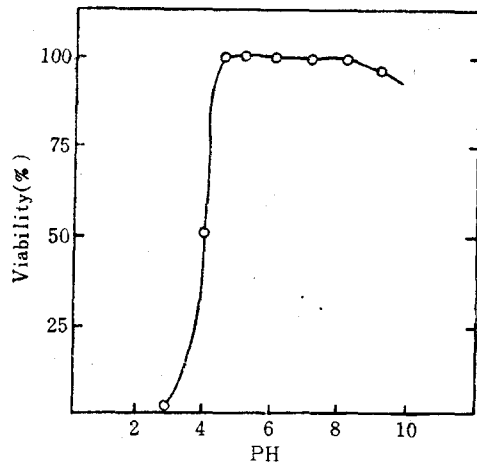


Fig. 4. Effect of pH on the Viability of *S. faecium*.

보면 pH 4.5에서 pH 9.0까지의 범위에서는 菌生存率이 상당히 安定하다는 것을 알 수 있다. 이것은 經口投與時 重要한 의미를 갖는 것으로 포만時

에 投與하는 경우는 胃에서의 生存率이 거의 감소되지 않으리라는 기대를 할 수 있기 때문이다. 幼兒의 경우를 例로 보면 젖을 充分히 먹었을 때는 胃內의 pH 5.5내지 pH 6.0까지 높아지므로 胃內에서의 乳酸菌의 生存率은 더욱 높아진다고 볼 수 있겠다. 장내에서의 경우를 보면 pH 9에서도 pH 95% 이상의 生存率을 보이는 것을 알 수 있는데 이 結果, 장에서의 安定性은 더욱 確實하다고 할 수 있다.

## 要 約

分離된 微生物은 pH 4.5내지 pH 8.0에서 100% 安定性을 나타내며 에너지源이 전혀 공급되지 않은 狀態에서도 37°C의 溶液中에서 48時間 以上 經過時도 80% 以上の 높은 生存率을 나타낸다. 生理食鹽水에서는 40°C에서 한 時間 放置하는 경우도 90% 以上の 높은 生存率을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 이러한 조건들을 검토해볼 때 生體內條件에서 상당히 安定하며 經口投與劑로 投與하기에 充分히 適當하다고 結論지을 수 있겠다. 特別히 投與하는 것이 더욱 效果的인 것으로 思料되므로 消化劑등과 混用한 藥劑로 開發하는 것이 바람직하리라 기대된다.

## 참고 문헌

1) Duischaever, C. L.: *Cultured Dairy Products*, Private Publ. 94, Ontario Dept. of Agr. &

Food (1964).  
 2) Shiroda, M.: *Yakult Inst. Microbiol. Res.* (1962).  
 3) 正井英一: 醫藥品要覽. 大阪府病院藥劑師會藥業時報社. P 370 (1971).  
 4) Peebles, M. M., et al.: *Appl. Microbiol.*, **17**, 805 (1969).  
 5) Gilland, S.E., et al.: *Appl. Microbiol.*, **19**, 890 (1970).  
 6) Christensen, V.W.: *U. S. Patent*. No. 3,592,740 (1971).  
 7) Petterson, H. E.: *Appl. Microbiol.*, **29**, 133 (1975).  
 8) Petterson, H.E.: *Appl. Microbiol.*, **29**, 439 (1975).  
 9) Deibel, R.H.: *J. Bacteriol.*, **87**, 988(1964).  
 10) Langston, C.W., et al.: *J. Bacteriol.*, **84**, 603 (1962).  
 11) Evans, J.B., et al.: *J. Bacteriol.*, **64**, 433 (1952).  
 12) Elliker, P.R., et al.: *J. Dairy Sic.*, **39**, 16 (1956).  
 13) Buchanan, R.E. and Gibbon, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriol.*, 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. (1974).  
 14) Horowitz, W., et al.: *A. O. A. C.*, 11th ed. 946 (1970).