

乳酸菌 混合 製劑의 安定性 및 分離 定量에 관한 연구

金 禎 禹 · 崔 應 七 · 金 炳 珏

서울대학교 藥學大學 微生物藥品化學教室

Studies on Stability and Quantitation of a Mixed Preparation of Lactic Acid Bacteria

Jung Woo KIM, Eung Chil CHOI and Byong Kak KIM

Dept. of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—To examine stability and a separate quantitative method of a mixed preparation of lactic acid bacteria, a capsule containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* was suspended and diluted in sterile water. After the diluted suspension was spread on three media of tryptone glucose extract agar, MRS agar and MRS-sucrose agar, their colonies appeared and were counted. The viable counts exceeded the minimum number of the three bacteria and showed that the mixed preparation was stable at least for 18 months. The results also showed that a separate quantitation of viable cells of the each strain was feasible.

Keywords—*Lactobacillus acidophilus*, *Lac. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, stability, separate quantitation, lactic acid bacteria.

乳酸菌이 인체 혹은 동물의 腸內 細菌에 미치는 영향에 관하여 자세히 고찰한 종설이 근래에 발표된 바 있다.¹⁾ de Vries 등은 *Lactobacillus casei*를 여러가지 炭素源을 가해준 배양액에서 乳酸이 생성되는 대사과정과 lactate dehydrogenase의 활성을 측정하여 보고하였다.²⁾

Gilliland 등은 *Streptococcus lactis*를 우유에서 배양할 때 β -galactosidase를 첨가해 줌으로써 乳酸 생성이 촉진됨을 관찰하였다.³⁾

金 등은 식품에서 乳酸桿菌을 분리한 후 대장균이나 장구균과 혼합 배양하였을 때, 장구균은 유산균의 증식을 억제하는 반면에, 유산균은 대장균의 증식을 억제하였음을 발표하였다.⁴⁾ 또 다른 연구자인 金등은 *Lactobacillus sporogenes*가 β -galactosidase를 대량 생산하는 균주임을 보고한 바 있다.^{5,6)}

그러나 乳酸菌의 혼합 제제의 安定성과 그 구성 유산균의 분리 정량에 관한 연구 보고는 찾

아 볼 수 없었으므로 저자들은 이 연구에 착수 하였으며 그 결과를 보고코자 한다.

실험 재료 및 방법

1) 실험 재료

이 연구에 사용한 유산균 혼합 제제는 「메틸락」이며 350mg짜리 1 캡슐중 125mg의 유산균이 함유되어 있다. 이 중에는 살아 있는 유산균으로서 *Lactobacillus acidophilus*가 4.25×10^8 마리, *Lactobacillus bulgaricus*가 2.5×10^7 마리, 그리고 *Streptococcus thermophilus*가 5.0×10^7 마리 들어 있으며 유효기간은 2년간이며 1984년 3월 31일까지로 되어 있었다.

2) 배지의 종류와 조성

세가지 유산균이 잘 성장할 뿐만 아니라 각기 독특한 형태의 집락을 만드는 다음 네가지 배지를 이 실험에 사용하였다.

A) Tryptone glucose extract agar: yeast extract 2.5g, tryptone 5.0g, dextrose 1.0g, agar 15.0g, dist. water 1000ml. 이것을 pH7.0로 조정후 2기압, 121°C에서 15분간 멸균한다.

B) MRS medium: proteose peptone 10.0g, beef extract 10.0g, yeast extract 5.0g, dextrose 20.0g, Tween 80 1.0g, ammonium citrate 2.0g, sodium acetate 5.0g, magnesium sulfate 0.1g, manganese sulfate 0.05g, dist. water 1000ml, dipotassium phosphate 2.0g, 이액을 pH6.5로 조절한 후, 2기압, 121°C에서 15분간 멸균한다.

C) MRS-sucrose medium: proteose peptone 10.0g, beef extract 10.0g, yeast extract 5.0g, sucrose 20.0g, Tween 80 1.0g, ammonium citrate 2.0g, sodium acetate 5.0g, magnesium sulfate 0.1g, manganese sulfate 0.05g, dipotassium phosphate 2.0g, dist. water 1000ml, 이것을 pH 6.5로 조절한 후 2기압 121°C에서 15분간 멸균한다.

D) Peptone solution: peptone 10.0g, dist. water 1000ml, 이것을 2기압 121°C에서 15분간 멸균한다.

3) 실험 방법

A) 검액의 조제

본품 8캡셀을 취하여 1.0%의 펩톤수를 99ml 함유하는 병에 넣는다. Waring blender를 사용하여 1분간 균질화 시킨다(10^{-2} 희석액), 무균 1% 펩톤수 99ml에 10^{-2} 용액 1.0ml를 무균 피펫으로 적가하고 30번 흔들여 준다(10^{-4} 희석액), 조작을 반복하여 10^{-6} 및 10^{-8} 희석액을 만든다.

B) 평판 배지의 조제

Petri dish 2개에 10^{-6} 희석액 0.1ml를 넣고 (10^{-7} 희석), 다른 Petri dish 4개에 10^{-8} 희석액 1.0ml를 넣는다(10^{-8} 희석).

i) 10^{-7} 희석액이 들어 있는 2개의 Petri dish에 1% 무균 skim milk가 함유된 tryptone glucose extract agar 20ml를 넣어 잘 혼합한 후 배지를 고형화 시키고 Petri dish를 뒤집어 놓는다.

ii) 10^{-8} 희석액이 들어 있는 2개의 Petri dish에 1.5% agar가 함유된 MRS 배지를 멸균후 45°C로 냉각시킨 다음 약 20ml를 넣어 잘 혼합

한 후 배지를 고형화 시키고 Petri dish를 뒤집어 놓는다.

iii) 10^{-8} 희석액이 들어 있는 2개의 Petri dish에 1.5% agar가 함유된 MRS-sucrose 배지를 멸균한 후 45°C로 냉각시킨 후 약 20ml를 넣어 잘 혼합한 후 배지를 고형화 시키고 Petri dish를 뒤집어 놓는다.

37°C에서 24시간 부란기에서 배양한 후 tryptone glucose extract agar 배지에서 배양된 집락의 수를 세어 그 평균을 계산한다(A). 계속 부란기에서 48시간 배양한 다음 MRS-agar 배지에서 배양된 집락의 수를 세어 그 평균을 계산하고(B), 또한 MRS-sucrose agar 배지에서 배양된 집락의 수를 세어 그 평균을 계산한다(C).

위의 조작을 16회 반복한다.

*Streptococcus thermophilus*는 tryptone glucose extract agar에서 잘 성장하며 24시간 배양후 나타나는 집락은 *Streptococcus thermophilus*의 수이다.

MRS-agar에서 72시간 배양하면 *Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* 세가지의 집락이 전부 나타난다.

MRS-sucrose agar에서 72시간 배양하면 *Lactobacillus acidophilus*와 *Streptococcus thermophilus* 두가지만이 집락을 형성하고 *Lactobacillus bulgaricus*는 자라지 않는다.

C) 균수 계산

검체중 생균수 측정치 × 희석배수 ÷ 8 = 1캡셀당 생균수

*Streptococcus thermophilus*의 수 = $A \times 10^7 \div 8$

*Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*의 수 = $(B - A/10) \times 10^8 \div 8$

*Lactobacillus bulgaricus*의 수 = $(B - C) \times 10^8 \div 8$

*Lactobacillus acidophilus*의 수 = $(C - A/10) \times 10^8 \div 8$

결과 및 고찰

tryptone glucose extract agar, MRS agar 및 MRS-sucrose agar 배지상에 자라난 집락 수를

Table I. The colony counts formed on tryptone glucose extract agar, MRS agar, and MRS-sucrose agar.

Medium	Exp. No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tryptone glucose extract agar	41	54	78	59	64	38	82	40	34	66
MRS-agar	62	62	55	48	62	61	60	55	129	127
	66	47	49	56	70	54	58	67	133	106
MRS-sucrose agar	54	64	43	55	67	61	64	63	97	128
	56	56	20	52	59	67	45	63	87	114

Medium	Exp No.							Total	Average
	11	12	13	14	15	16			
Tryptone glucose extract agar	83	70	9	126	45	92	1,837	57.4	
MRS-agar	90	83	65	89	46	83	2,281	71.3	
	93	49	75	69	61	51			
MRS-sucrose agar	55	47	86	52	49	59	2,054	64.2	
	45	48	93	53	77	75			

Table I에 요약하였다. 이 3종의 배지에서의 각 집락수의 평균치인 57.4, 71.3 및 64.2를 이용하여 전술한 공식에 의해 각각 균수를 다음과 같이 계산하였다.

a) *S. thermophilus*의 수 : $57.4 \times 10^7 \div 8 = 7.2 \times 10^7$

b) *L. acidophilus*의 수 : $(64.2 - 57.4/10) \times 10^8 \div 8 = 7.3 \times 10^8$.

c) *L. bulgaricus*의 수 : $(71.3 - 64.2) \times 10^8 \div 8 = 8.9 \times 10^7$

tryptone glucose extract agar 배지에서의 각 유산균의 성장을 비교해보면, *Streptococcus thermophilus*와 다른 두가지 유산균이 동시에 성장하므로 관찰시기를 놓치면 구별하기 어렵게 된다. 대개 *S. thermophilus*는 24시간이 지나면 성장이 완료되지만, *Lactobacillus*속 균의 성장이 느리므로, 동일 배지 일지라도 24시간 이전에 관측하면 *S. thermophilus*의 집락만을 측정할 수 있다. 이때 *S. thermophilus*의 집락을 엷은 灰色이 원형으로 나타났으며 *Lactobacillus*속 균들은 계란색의 타원형의 집락을 형성하였다. 특히 *S. thermophilus*의 경우, 집중하기전에 잘 혼합하지 않

으면 집락이 너무 모이거나 겹쳐서 그 수를 측정하기 어렵게 된다. 그러므로 시료를 무균 희석액에 가하여 섞을때 충분히 혼합하여 *S. thermophilus*를 배지상에 균등히 배포하여야 함을 밝혔다. 이상의 결과로 보아 세가지 유산균의 혼합 제제를 균중별로 부터 정량할 수 있음을 입증하였다.

뿐만 아니라 위의 실험 결과에 표시된 바와 같이 여기에 사용된 시료 1캡셀당 표시된 평균 수 5억개 보다 훨씬 많은 개수인 8.91×10^8 개나 함유되어 있었다. 따라서 2년간의 보존 기간중에 유효 생균수가 표시된대로 존재하였으므로 유효 기간 연장이 가능하다고 사료된다.

결 론

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus bulgaricus* 및 *Streptococcus thermophilus*의 혼합 제제에서 각 균의 생균수를 분리 정량할 수 있음을 밝혔으며 18개월 보관하여도 표시된 유효 생균수가 충분히 생존해 있음을 확인하였다.

감사의 말씀 : 이 연구에 소요되는 경비의 일

부는 서울대학교 藥學大學 附設 綜合藥學研究所의 연구비로 충당되었으며 이에 감사하는 바이다.

〈1984년 2월 4일 접수; 3월 5일 수리〉

참 고 문 헌

1. Mutai, M.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 339 (1983).
2. de Vries, W., Kaptejin, W.M.C., von der Beek, E.G., and Stouthamer, A.H.: *J. Gen. Microbiol.*, **63**, 333(1970).
3. Gilliland, S.E., Speck, M.L., and Woodward, J.R., Jr.: *App. Microbiol.*, **23**, 21(1972).
4. 김익상, 신희섭, 장우현: 대한보전협회지, **4**, 81 (1978).
5. Kim, Y.M., Lee, J.C., Chung, P.K., Choi, Y.J., and Yang, H.C.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 59(1983).
6. Kim, Y.M., Lee, J.C., Chung, P.K., Choi, Y.J., and Yang, H.C.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 205(1983).