

## 국내 액상발효유에서 분리한 유산균의 동정 및 소화관액 내성조사

소 명 환

부천공업전문대학 식품영양학과

### Identification and Tolerance-Test to Digestive Fluids of *Lactobacilli* Isolated from Korean Liquid Yogurts

Myeong-Hwan So

Department of Food and Nutrition, Bucheon Technical College, Bucheon

#### Abstract

Eight strains of *Lactobacilli*(a, b, b', c, d, e, f and g) were isolated from seven Korean liquid-yogurts(A, B, C, D, E, F and G), and identification and tolerance-test to digestive fluids were carried out. Isolate a from yogurt A and isolate e from yogurt E were identified as *L. casei*, isolate b from yogurt B as *L. acidophilus*, isolate d from yogurt D as *L. bulgaricus*, isolate f from yogurt F as *L. helveticus*, and isolate b' from yogurt B, isolate c from yogurt C and isolate g from yogurt G as *L. jugurti*, respectively. Isolate f(*L. helveticus*) and c(*L. jugurti*) showed high tolerance to artificial gastric juice but didn't to bile acid. Isolate b(*L. acidophilus*), a(*L. casei*), and e(*L. casei*) showed high tolerance to both artificial gastric juice and bile acid, but isolate d(*L. bulgaricus*), b'(*L. jugurti*) and g(*L. jugurti*) did not.

#### 서 론

유산균과 발효유제품이 인체의 건강 유지에 유효하다는 것이 많은 연구자들에 의하여 보고되어 왔다. 즉 정장작용<sup>(1-3)</sup>, 항암작용<sup>(4-7)</sup>, 혈청면역계 자극<sup>(8,9)</sup>, 혈청 콜레스테롤의 저하<sup>(10-12)</sup>, 유당 및 유단백질의 흡수 증진<sup>(13-16)</sup> 비타민 합성<sup>(17,18)</sup> 등의 효과가 있다고 한다. 이러한 효과들은 아직도 불확실한 점이 많지만 光岡<sup>(9)</sup>은 그 효과를 살아있는 유산균에 의한 효과, 유산균의 균체성분에 의한 효과, 발효유 중의 유성분과 발효산물에 의한 효과로 크게 나누어 생각할 수 있다고 했다. 유산균과 발효유의 이러한 효과는 유산균의 균종과 균주에 따라 다르겠지만 그 효과를 최대한 발휘하기 위해서는 사용되는 유산균이 위액, 담즙 및 장액에 대하여 내성이 높아야 하고, 또 장내에서 증식까지도 할 수 있다면 더욱 좋을 것이라고 한다<sup>(19)</sup>.

우리나라에서도 액상발효유와 유산균 음료가 많이 소비되고 있는 실정이며 각 제조업체들마다 살아있는 유산균의 효과를 크게 강조하고 있다. 그러나 이들 다양한 발효유들을 음용했을 때 유산균이 장내에서 생균으로서의 효과를 어느 정도 발휘할 수 있을 것인가에 대하여는 아직 조사 보고된 바가 별로 없다.

본 연구에서는 국내에서 생산되는 액상발효유 7개

회사 제품을 수거하여 유산균의 분리와 동정을 행하고, 또 분리된 각 유산균의 장관내에서의 안정성을 예측하기 위하여 인공위액과 담즙산에 대한 내성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 발효유

1984년 4월 15일에 제조된 국내 7개 회사의 액상 발효유 제품으로 제조일 다음 날 시중에서 구입하거나 가정에 배달되는 것을 사용하였다. 편의상 제조원의 이름은 밝히지 않고 임의로 A, B, C, D로 표시하였다.

##### 유산균수의 측정

BCP agar배지를 사용하여 standard plate count method<sup>(20)</sup>에 준하여 실시하였고 agar plate의 배양은 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator내에서 48시간 행하였다.

##### 유산균의 분리 및 동정

유산균수의 측정이 끝난 plate의 유산균 colony중에서 colony의 형태별로 분리하여 Sharpe<sup>(21)</sup>, 麻生<sup>(22)</sup>, Onoue<sup>(23)</sup> 등의 방법에 따라 형태와 생리적인 특성을 조사한 후 Bergey's manual<sup>(24)</sup>의 분류기준에 준하여

동정하였<sup>5)</sup>, 단 Bergey's manual에서 *L. helveticus*의 maltose egative변종으로 분류하고 있는 *L. jugurti*는 종전대로 *L. jugurti*로 표기하였다.

**담즙산 및 인공위액 내성시험용 균액**

앞서 분리 동정한 유산균을 LBS broth에 접종하여 *L. bulgaricus*는 16 시간, 그의 다른 균은 24 시간 37°C에서 배양하여 균액을 제조하였다.

**인공위액의 준비**

Kobayashi<sup>(25)</sup>의 방법에 따라 제조하되 pH는 3.0으로 조정하였고, 가열살균 대신 miliphore filter로 여과하였다.

**인공위액에 대한 내성시험**

인공위액 10 ml에 유산균 균액 0.1 ml를 가한 후 37°C로 0~3 시간 유지시킨 다음 즉시 0.1%의 pepton 용액으로 희석하여 BCP agar를 사용한 standard plate count method<sup>(20)</sup>에 준하여 살아남은 유산균수를 측정하였다. Agar plate의 배양은 37°C의 incubator에서 3일간 행하였다.

**담즙산에 대한 내성시험**

Gilliland<sup>(26)</sup>의 방법에 따라 oxgall powder(Sigma Chemical Co.)를 0~0.2% 첨가한 LBS배지에 유산균 일정량을 접종한 후 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 5일간 배양한 후 나타난 유산균 colony의 수를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**제품중의 유산균수 측정**

시중 액상발효유 7개 회사 제품중의 유산균 생균수를 측정한 결과는 Table 1에서와 같이 최저 4.0×10<sup>7</sup> ml에서 최고 8.5×10<sup>8</sup>/ml로 제품간에는 상당한 차이가 있으나 모든 회사 제품이 법적 기준치인 1×10<sup>7</sup>/

**Table 1. Number of lactic acid bacteria per ml of Korean liquid-yogurts**

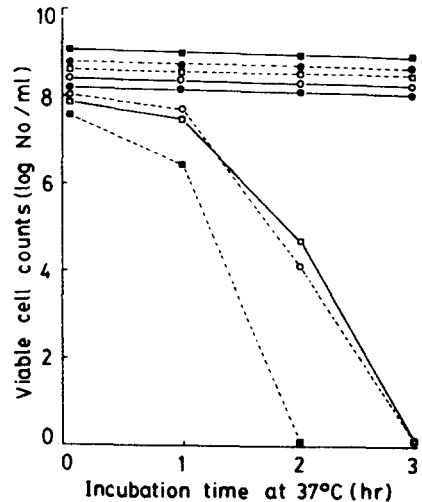
Samples	Viable cells(×10 <sup>7</sup> )
A	17.0
B	8.2
C	29.0
D	4.0
E	85.0
F	8.6
G	33.0

ml보다는 훨씬 높았다. 1978년과 1979년에 <sup>(27)</sup>의 시중 액상발효유 7개 회사 제품에 대한 유산균수 측정에서도 최저 4.5×10<sup>7</sup>/ml에서 최고 4.2×10<sup>8</sup>/ml로, 본 실험의 결과와 비교해 볼 때 그동안 큰 변화가 없었음을 알 수 있다.

또 생균수 함량이 가장 높은 E회사제품과 가장 낮은 D회사 제품간에는 약 20배 정도의 생균수 차이를 보이고 있는데 이도 역시 <sup>(27)</sup>의 조사에서와 큰 차이가 없다. 이와 같은 제품간의 심한 생균수 차이는 주로 유산균 starter의 내산성 차이에 기인된 결과일 것으로 생각된다.

**유산균의 분리 및 동정**

시중 액상발효유로부터 분리한 각 유산균의 형태와 생리적 성질을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 7개 회사 제품에서 분리한 8종의 유산균을 동정해 본 결과 D회사 제품에서 분리한 d균은 *L. bulgaricus*로, B, C 및 G회사 제품의 b', c 및 g균은 *L. jugurti*로, F회사 제품의 f균은 *L. helveticus*로, A 및 E회사 제품의 a균과 e균은 *L. casei*로, B회사 제품의 b균은 *L. acidophilus*로 각각 동정되었다. 또 B회사 제품은 b균(*L. acidophilus*)과 b'균(*L. jugurti*)이 10:1의 비율로 검출되어 혼합배양을 하고 있음을 알 수 있으며, 다른 회사 제품들은 모두 단일균을 사용하고 있는



**Fig. 1. Survival of Lactobacilli isolated from Korean liquid-yogurts in artificial gastric juice of pH 3.0**

---○--- : Isolate a    ---●--- : Isolate b  
 ---○--- : Isolate b'    ---●--- : Isolate c  
 ---□--- : Isolate d    ---■--- : Isolate e  
 ---□--- : Isolate f    ---■--- : Isolate g  
 Isolate a, b, b', c, d, e, f and g are the same as in Table 2.

Table 2. Properties of *Lactobacilli* isolated from Korean liquid-yogurts

Products		A	B	C	D	E	F	G	
Isolates		a	b	b'	c	d	e	f	g
Colony type		S	R	R	R	R	S	R	R
Gram stain		+	+	+	+	+	+	+	+
Morphology		SR	LR MR	LR	LR	LR	SR	LR	LR
Presence of granuls		-	-	-	-	+	-	-	-
Catalase test		-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C		+	-	-	-	-	+	-	-
Growth at 45°C		-	+	+	+	+	-	+	+
NH <sup>3</sup> from arginine		-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation type		Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Lactic acid % in skim milk		1.35	1.93	2.67	2.92	1.36	1.11	2.76	2.86
Fermentation of	Mannitol	+	-	-	-	-	+	-	-
	Salicin	+	+	-	-	-	+	-	-
	Sucrose	+	+	-	-	-	+	-	-
	Cellobiose	+	+	-	-	-	+	-	-
	Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	-	-	-	+	+	-
	Sorbitol	+	-	-	-	-	+	-	-
	Trehalose	+	+	-	-	-	+	-	-
Identified as		<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. jugurti</i>	<i>L. jugurti</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. jugurti</i>	

R :rough colony, S:smooth colony, LR:long rod  
MR:middle rod, SR:short rob. +:positive, -:negative

것으로 판단되었다.

인공위액에 대한 내성

시중 액상발효유에서 분리한 유산균들의 위액에 대한 내성을 알기위하여 pH 3.0으로 조정된 인공위액 속에서 0 ~ 3 시간 유지시킨 후 생존균수를 측정 한 결과는 Fig. 1에 도시된 바와 같았다. A회사 제품의 a 균(*L. casei*), E회사 제품의 e균(*L. casei*), B회사 제품의 b균(*L. acidophilus*), C회사 제품의 c균(*L. jugurti*) 및 F회사 제품의 f균(*L. helveticus*)은 내성이 높았으나 D회사 제품의 d균(*L. bulgaricus*), B회사 제품의 b'균(*L. jugurti*) 및 G회사 제품의 g균(*L. jugurti*)는 내성이 낮았다.

균종에 따른 이와 같은 차이는 小林 등<sup>(28)</sup>과 Terashima 등<sup>(29)</sup>의 각종 유산균에 대한 인공위액 내

성조사 결과와 일치되는 경향인 것으로 볼 수 있으나 *L. helveticus*로 동정한 C회사 제품의 c균과 *L. jugurti*로 동정된 F회사 제품의 f균이 내성이 강한 점은 주목할 만한 점이다.

담즙산에 대한 내성

담즙산은 대부분의 미생물들의 생육을 강력하게 억제하나 gram negative enteric bacilli의 생육은 억제하지 못한다. Gilliland 등<sup>(26)</sup>은 각종 유산균 중에서 장내균총에 속하는 균은 소의 담즙산 분말인 oxgall powder를 0.15% 함유하는 배지에서도 잘 생육할 수 있으므로 oxgall powder 0.15%를 첨가한 배지에서의 증식 여부로 장내균총에 속하는 균인지 아닌지를 판별할 수 있다고 하였다.

시중의 액상발효유에서 분리한 8종의 유산균에 대

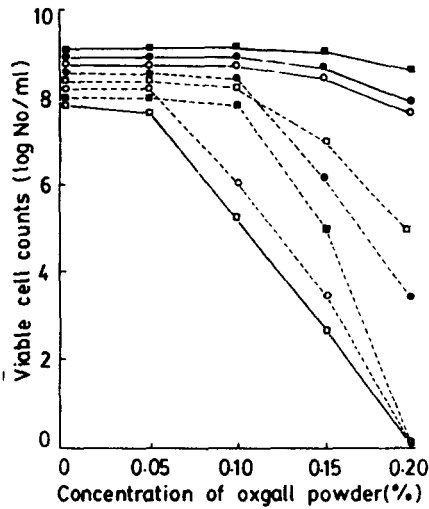


Fig. 2 Tolerance of *Lactobacilli* isolated from Korean liquid-yogurts to oxgall powder

—○— : Isolate a    —●— : Isolate b  
 ---○--- : Isolate b'    ---●--- : Isolate c  
 ---□--- : Isolate d    ---■--- : Isolate e  
 ---◇--- : Isolate f    ---▽--- : Isolate g  
 Isolate a, b, b', c, d, e, f and g are the same as in Table 2.

하여 0~0.2%의 oxgall powder가 함유된 LBS배지에서의 colony 형성능력을 조사한 결과는 Fig. 2와 같았다. Fig. 2에서 보면 E회사 제품에서 분리한 e균 (*L. casei*), A회사 제품의 a균(*L. casei*) 및 B회사 제품의 b균(*L. acidophilus*)은 담즙산에 대한 내성이 아주 강하고, F회사 제품의 f균(*L. helveticus*), C회사 제품의 c균(*L. jugurti*) 및 G회사 제품의 g균(*L. jugurti*)은 약한편이며, B회사 제품의 b'균(*L. jugurti*) 및 D회사 제품의 d균(*L. bulgaricus*)은 내성이 아주 약함을 알 수 있다.

小林 등<sup>(28)</sup>과 Terashima 등<sup>(29)</sup>이 각종 유산균에 대한 담즙산 내성조사에서 *S. faecalis*, *L. casei*, *L. acidophilus* 및 *L. plantarum*은 대부분 담즙산에 대한 내성이 높으나 *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. jugurti* 및 *S. thermophilus*는 낮음을 보고했고 또 Gasser 등<sup>(30)</sup>도 사람의 장내 유산균 연구에서 *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius* 등은 장내 균총에 속하나 *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*는 장내균총이 아니라고 하였는데 본 실험에서의 결과도 이들의 결과와 일치되는 경향이였다.

한편 Mutai<sup>(19)</sup>는 사람의 장내균총에 속하는 유산균 중에서 *L. acidophilus*와 *L. salivarius*는 정주형에 속하나 *L. casei*와 *L. plantarum*은 통과형에 속한다고 하였고, 光岡<sup>(8)</sup>은, 定住型 유산균 중에서도 속주에 대

한 특이성에 따라 장관내의 정착에 큰 차이를 나타낸다고 하였다. 따라서 본 실험에서 행한 인공위액과 담즙산에서의 내성조사 만으로 경구 투여된 유산균의 장관 정착 가능성을 확실히 판단할 수는 없으나 다음과 같은 추론을 내리는 것은 가능할 것으로 생각된다. 즉 *L. jugurti*로 동정된 B회사 제품의 b'균과 G회사 제품의 g균, *L. bulgaricus*로 동정된 D회사 제품의 d균은 인공위액과 담즙산에 대한 내성이 모두 낮아서 생균상태로 장내에 도달하기도 어렵고 장관내에서의 증식도 불가능할 것으로 생각되며, *L. jugurti*로 동정된 C회사 제품의 c균과 *L. helveticus*로 동정된 F회사 제품의 f균은 인공위액에 대한 내성은 높지만 담즙산에 대한 내성이 높지 못하기 때문에 생균상태로 장내에 도달이 되더라도 장관내에서의 증식은 불가능할 것으로 생각된다. 그리고 *L. acidophilus*로 동정된 B회사 제품의 b균과 *L. casei*로 동정된 A회사 제품의 a균 및 E회사 제품의 e균은 인공위액과 담즙산에 대한 내성이 모두 높아서 생균상태로 장내에 도달할 수 있을 뿐만 아니라 장관내에서의 증식가능성도 어느 정도 지니고 있는 것으로 생각되지만 확실한 것을 알기 위해서는 더욱 세밀한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

요 약

국내 액상발효유 7개 회사 제품을 수거하여 미생물학적 특성 조사하였다. 7개 회사 제품(A, B, C, D, E, F 및 G)에서 분리한 8종의 유산균(a, b, b', c, d, e, f 및 g)을 동정해 본 결과 A회사 제품의 a균과 E회사 제품의 e균은 *L. casei*로 B회사 제품의 b균은 *L. acidophilus*로, B회사 제품의 b'균, C회사 제품의 c균 및 G회사 제품의 g균은 *L. jugurti*로, F회사 제품의 f균은 *L. helveticus*로, D회사 제품의 d균은 *L. bulgaricus*로 각각 동정되었다. *L. helveticus*로 동정된 f균과 *L. jugurti*로 동정된 c균은 인공위액에 대한 내성은 높았으나 담즙산에 대한 내성은 높지 못했다. *L. acidophilus*로 동정된 b균과 *L. casei*로 동정된 a균 및 e균은 인공위액과 담즙산에 대한 내성이 모두 높았고, *L. bulgaricus*로 동정된 d균과 *L. jugurti*로 동정된 b'균 및 g균은 인공위액과 담즙산에 대한 내성이 모두 낮았다.

문 헌

1. Hill, I., Kenworthy, R. and porter, P.: *J. Microbiol.*, 35, 522 (1969)

2. Nazumi, T., Mito, A. and Isoi, K. : *The Efficacy of Yakult to Dynestery*, Yakult Honsha Co., Tokyo, p.1 (1971)
3. Ayebo, A.D., Angelo, I.A. and Shahani, K.M. : *Milchwissenschaft*, **35**, 730 (1980)
4. Ayebo, A.D., Shahansi, K.M. and Dam, R. : *J. Dairy Sci.*, **64**, 2318 (1981)
5. Ayebo, A.D., Shahani, K.M., Dam, R. and Friend, B.A. : *J. Dairy Sci.*, **65**, 2388 (1982)
6. Friend B.A., Farmer, R.E. and Shahani, K.M. : *Milchwissenschaft*, **37**, 708 (1982)
7. Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E. : *J. Food Protection*, **46**, 8 (1983)
8. 光岡知足 : 장내세균 이야기, 강국회역, 유한문화사, 서울, p.92 (1980)
9. Raibaud, P. : 유산균과 건강에 관한 제 3 회 국제 학술세미나, 서울, p.23 (1980)
10. Mann, G.V. and Spoerry, A. : *Amer. J. Clin. Nutr.*, **27**, 464 (1974)
11. Hepner, G. and Fried, R. : *Amer. J. Clin. Nutr.*, **32**, 19 (1979)
12. Deeth, H.C. and Tamime, A.Y. : *J. Food Protection*, **44**, 78 (1981)
13. Kilara, A. and Shahani, K.M. : *J. Dairy Sci.*, **59**, 2013 (1976)
14. Breslaw, E.S. and Kleyn, D.H. : *J. Food Sci.*, **38**, 1016 (1973)
15. Hargrove, R.E. and Alford, J.A. : *J. Dairy Sci.*, **61**, 11 (1978)
16. Alm, L. : *J. Dairy Sci.*, **65**, 346 (1982)
17. Shahani, K.M. and Chandan, R.C. : *J. Dairy Sci.*, **62**, 1685 (1979)
18. Alm, L. : *J. Dairy Sci.*, **65**, 353 (1982)
19. Mutai, M. : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 339 (1983)
20. Marth, E.H. : *Standard Method for the Examination of Dairy Products*, AVI Publishing Company, p.242 (1977)
21. Sharfe, M.E., Fryer T.F. and Smith: D.G. *Identification Method for Microbiologists*, Academic Press, New York, p.67 (1966)
22. 麻生健治, 渡邊次男 : セクルト研究所研究報告集, 第1號, p.1 (1970)
23. Onoue, M. and Suegala, N. : セクルト研究所研究報告集, 第4號, p.41 (1973)
24. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The William and Wilkins Company, Baltimore, p.580 (1977)
25. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. : *Japan. J. Microbiol.*, **24**, 691 (1974)
26. Gilliland, S.E. and Spec, M.L. : *J. Food Protection*, **40**, 760 (1977)
27. 강영재, 윤영호, 김현욱 : 한국축산학회지, **21**, 534 (1979)
28. 小林洋一, 遠山清 : 日本細菌誌, **29**, 691 (1974)
29. Terashima, T., Tohyama, K. Yazawa, K. and Mutai, M. : *Reports on Yakult Beverage and Yakult Strain*, No. 7, Yakult Institute, Tokyo, p. 1 (1980)
30. Gasser, F. and Mardel, M. : *J. Bact.* **96**, 580 (1968)

---

1985년 3월 8일 접수