

## 생균제로서 가능성이 있는 미생물의 선별 및 특성

박홍석<sup>†</sup> · 이선희\* · 엄태봉\*\*

전북대학교 축산학과, \*식품공학과

\*\*생물과학부 및 유전공학연구소

### Selection of Microorganisms for Probiotics and Their Characterization

Hong-Suk Park<sup>†</sup>, Sun-Hee Lee\* and Tai-Boong Uhm\*\*

Dept. of Animal Science, \*Dept. of Food Science and Technology

\*\*Faculty of Biological Sciences and Institute for Molecular Biology and Genetics,  
Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

#### Abstract

In order to select probiotics with a high survival rate in gut and the growth inhibition of virulent pathogens to human beings or animals, we have examined a variety of microorganisms to assess the acid, bile, and pancreatic tolerance and the growth inhibition of *E. coli* O8 and *Salmonella choleraesuis* ATCC 8391. *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3155 was shown to inhibit the growth of *E. coli* and *Salmonella* dramatically within 24 h of incubation, although it was vulnerable to the exposure of bile acids. *Bacillus polyfermenticus* showed a good growth inhibition against *E. coli*, with a moderate acid and bile tolerance, while *Clostridium butyricum* KCTC 1786 inhibited the growth of *E. coli* and *Salmonella* slightly with a good bile tolerance. However, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7928 and *Aspergillus oryzae* KCTC 6095 did not inhibit the growth of *E. coli* and *Salmonella*, suggesting that these microorganisms can be used as the sources of nutritional supplement rather than as probiotics itself.

Key words: probiotics, acid tolerance, bile tolerance, *E. coli*, *Salmonella*

#### 서 론

생균제는 원래 사람이나 동물의 장내에서 유익한 미생물 균총을 만들 수 있는 것으로 정의된다. 이러한 관점에서, 생균제는 성장의 촉진, 사료 이용률 증대, 장이상 발효나 설사의 방지, 영양 섭취 저해인자를 제거할 수 있는 미생물로 생각할 수 있다. 동물의 장내에는 수많은 미생물의 균총이 일정한 평형을 이루며 살아가고 있으며 이 평형이 깨질 때는 소화기 질병을 일으키게 된다. 1996년도 우리나라, 일본, 미국에서 크게 사회 문제시 되었던 식중독균인 *E. coli* O-157은 살균성 항생제를 투여할 시 O-157의 세포벽의 파괴로 인한 vero toxin의 용출이 생겨 더 위험할 수가 있기 때문에 생균제의 투여에 의한 장내 균총의 정상화가 더 바람직한 치료 효과를 보이기도 한다. 또한, 가축에 항생제의 남용 및 오용이 사회 문제시 되고 있는 요즘음, 생균제 첨

가에 의한 소화기계의 질병예방은 경제적 이득 뿐 아니라, 생체 안전성의 관점에서 가치가 있다고 보겠다. 생균제의 해로운 미생물에 대한 효과는 주로 산과 항균 물질의 분비에 의해 유해균의 성장을 억제하는 것으로 보인다. 현재, 생균제로는 주로 *Lactobacillus*(1-8), *Enterococcus*(9,10), *Bifidobacterium*(4) 등이 연구되었으나, 사람이나 동물에 상업적으로 사용되는 생균제에서는 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* 등이 혼합된 형태로 제품화되고 있다. 그러나, *Bacillus*나 *Clostridium*, 또는 *Saccharomyces*, *Aspergillus*의 생균제로서 능력은 많이 연구되어진 *Lactobacillus*나 *Enterococcus* 등에 비해 아직까지 거의 평가되지 않은 상태이다. 생균제로서 균이 가져야 하는 가장 중요한 특성은 GRAS(Generally Recognized As Safe)미생물로서 동물 장내에서 생존력이 커야 한다는 점(11)과 대장균이나 살모넬라와 같은 유해 미생

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

물의 생육 억제능력이 커야 한다는 점이다. 따라서, 상업적으로 사용되고 있는 개개 미생물들의 생균제로서 평가는 이러한 점에서 필요하다 하겠다. 이 연구는 일반적으로 사용되는 생균제들이 얼마만큼 이러한 조건을 만족시키는지의 평가에 그 목표를 두고 진행되었다. 이를 위해 동물 장내에서 생균제로서 가능성이 높은 균주들을 대상으로 pH, 담즙산, 췌장액에 대한 저항성과 동물에서 설사를 유발하는 균인 *E. coli* O8 및 *Salmonella choleraesuis*에 대한 생균 억제력을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

생균제로서 적합한 균의 검색을 위해 *Bacillus*속 균주들로는 *B. subtilis* KCTC 1666(원래 닭 및 칠면조의 변에서 분리), *B. subtilis* B11(비오비타, 일동제약), *B. sp.* J11(제일화학, 경기 안산), *B. polyfermenticus*(비스루트-에스, 순천당제약), *Clostridium*은 *Cl. butyricum* KCTC 1786, KCTC 1787, KCTC 1871, KCTC 1904, KCTC 1905(KCTC 1786 과 1871은 돼지 장으로부터 분리), *Lactobacillus*는 *L. acidophilus* KCTC 3146, KCTC 3149, KCTC 3150, KCTC 3153, KCTC 3155(KCTC 3146, 3149, 3150은 원래 돼지 소장, 3153 및 3155는 닭의 소장으로부터 분리), *Saccharomyces*는 *S. cerevisiae* KCTC 1201, KCTC 1426, KCTC 1552, KCTC 7928, J2(제일화학), 그리고 *Aspergillus*균은 *A. oryzae* KCTC 2114, KCTC 6095, KCTC 6291, KCTC 6292를 사용하였다. 소나 돼지 등에서 설사 유발균으로는 *E. coli* KCTC 2618(Serotype O8 : K85 : K99 ATCC 31618)과 *Salmonella choleraesuis*(Serotype Thompson ATCC 8391)를 사용하였다.

### 배지 및 배양 조건

*Lactobacillus*의 고체 및 액체 배양배지는 *Lactobacilli* MRS(Difco, Detroit, USA), *Clostridium*은 fluid thioglycollate(FT, Difco), *Bacillus*는 nutrient broth(NB, Difco)를, *Saccharomyces*는 YM broth(Difco), *Aspergillus*는 potato dextrose 배지(Difco)가 사용되었고 이들의 배양 조건은 *Saccharomyces*와 *Aspergillus*인 경우 30°C에서 60rpm의 속도로 진탕하면서 12~24시간 배양하였다. *Lactobacillus*와 *Bacillus*는 37°C에서 약 24시간 동안 60rpm으로 진탕 배양하였으나 *Clostridium*은 동일한 조건에서 정치 배양을 하였다. *E. coli* O8의 선택 배지는 *E. coli*용 Petrifilm plate(3M, St. Paul, USA), *S. choleraesuis*의 선택 배지는 bismuth-sulfite

agar(Difco)를 사용하였는데 조사하고자 하는 배양액 0.1ml를 0.9ml 0.85% NaCl과 섞어 균일하게 표면에 도포한 다음 37°C에서 24시간 배양하고 계수하였다. 2주 일마다 한천 배지에서 계대 배양된 균들은 약  $1 \times 10^6$ 의 접종량으로 25ml의 액체 배지에서 37°C(*Aspergillus*와 *Saccharomyces*의 배양은 30°C)로 24~48시간 정치 또는 진탕(60rpm) 배양하였다.

### 균수의 측정

배양한 뒤 0.1ml의 배양액을 0.85% NaCl 4.9ml가 든 시험관에 넣고 잘 섞은 후 동일한 NaCl이 함유된 다른 시험관들에서 1/50의 배수로 차례로 연속 희석한 뒤, 각각 0.1ml를 petridish에 도포한 다음 24~48시간 후 생균수를 측정하였다. 대장균의 경우는 희석한 용액 0.1ml를 꺼내 0.85% NaCl 0.9ml 등장액과 혼합한 다음 Petrifilm plate에 도포하여 기포가 생긴 검은 반점의 갯수를 세었다. 일반적으로 균수가 약 50~200범위에 들어오는 petridish나 Petrifilm을 골라 여기에 희석 배율을 곱하여 원래 용액에 함유된 균수를 측정하였다.

### 인공 위액에서 pH 저항성

멸균된 50ml 배지에 각 균을 접종한 뒤 30°C 또는 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액 1ml를 각각 50ml의 인공 위액(1,000U pepsin/ml NB, pH 3 또는 4)과 pH 7의 NB용액(50ml, 대조군)에 넣고 2시간 동안 37°C(*Aspergillus*와 *Saccharomyces*는 30°C)에서 정치시킨 뒤 이중 0.1ml를 취해 0.85% NaCl로 연속 희석시켜 petridish에서 배양하고 생균수를 측정하였다. 인공위액의 조제는 Kobayashi 등(12)의 방법을 변형한 것으로 배양액의 pH를 1N HCl로 3 또는 4로 조정하고 pepsin을 1,000U/ml되도록 첨가하였다.

### 담즙산에 대한 저항성

0.22 $\mu$ m로 여과 제균된 돼지 담즙산(Sigma)을 0.3% 첨가한 배양액에, 인공 위액의 pH에서 생존한 균을 접종하였다(4). 37°C(*Saccharomyces*와 *Aspergillus* 배양은 30°C)에서 24시간 배양 후 0.1ml를 petridish에 도말하고 이것을 30°C 또는 37°C에서 24시간 배양 후 나타난 생균수를 측정하였다.

### 췌장액에 대한 저항성

0.22 $\mu$ m로 여과 제균된 돼지 췌장액(Sigma)을 0.5% 첨가한 배양액에 인공 위액의 pH와 담즙산에서 생존한

균을 접종하였다. 37°C(*Saccharomyces*와 *Aspergillus* 배양은 30°C)에서 24시간 배양 후 0.1ml를 petridish에 도말한 뒤 이것을 37°C, 24시간 배양 후 나타난 생균수를 측정하였다.

### 대장균 증식 억제력

*E. coli* O8을 37°C에서 24시간 배양한 다음 배양액 1ml를, 동일한 조건에서 자란 생균제의 배양액 1ml와 혼합한 뒤 새 NB, MRS, 또는 FT 배지에 넣고 37°C(*Saccharomyces*와 *Aspergillus*는 30°C 배양)로 24시간 배양하였다. 이때 사용한 생균제는 인공 위액과 담즙산에서 견딘 균락이었다. 24시간 후 생존한 대장균은 *E. coli* 선택 배지(3M Petrifilm)에서 배양 후 그 집락수를 측정하였고 이때 그 감소 정도를 증식 억제력으로 평가하였다. 여러 다른 배지에서 대장균의 증식 정도는 각각 다르므로 생균제 검사를 위해 사용한 각 배지에 대장균만을 키워 이 실험을 위한 비교대조균으로 사용하였다.

### Salmonella 증식 억제력

*S. choleraesuis* 증식 억제력 검사 조건은 대장균에서와 같으나 *Salmonella* 선택 배지로 bismuth-sulfite agar를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 생균제로서 *Bacillus*의 평가

*Bacillus*의 몇 종은 식품 제조에 이용되어 이미 그 안전성이 확립되어 있고 포자의 형성으로 열이나 산, 습기에 강하며, bacitracin과 같은 폴리펩타이드형 항생물질을 생성하기 때문에 생균제로서 적합한 특성을 갖는다. 따라서, 이러한 조건을 갖췄다고 생각되는 *B. subtilis*와 *B. polyfermenticus*를 대상으로 생균제로서의 특성을 조사하였다.

먼저, 정지기에 막 도달된 이들 균을 pH 4의 인공 위액 배지에서 2시간 동안 정치 후 생존률을 조사하였다(Table 1). 그 결과, 각 시험균들의 생존률은 같은 *B. subtilis*라도 strain에 따라 달라졌고, 특히 KCTC 1666과 J11은 자라지 못했다. 이들 중 *B. polyfermenticus*의 균수는 대조균에 비해 약 1/200로 감소되어 가장 생존률이 높았다. 같은 조건하에 pH 3으로 조정했을 때, *B. polyfermenticus*는 대조균에 비해 약 1/800, *B. subtilis* B11은 1/2,300의 감소율을 보였다. *B. polyfermenticus*는 20여종의 소화효소를 생성하여 다양한 영양원을 이용할 수 있고 빠른 성장률을 보이기 때문에 생균제로서 잠재적 가능성을 가진 균이다. *B. subtilis* B11도 다른 *subtilis*에 비해 생존률이 높았는데, 이는 상업적으로 pH에 저항성을 가진 균주를 선별하였기 때문인 것 같다.

인공 위액에 견딘 *B. subtilis* B11과 *B. polyfermenticus*를 분리해 장내 균총으로서 견뎌야 하는 기준 농도인 0.3%의 담즙산 농도에서 배양 후 생존률을 조사했다(Table 1). 산에 대한 저항성의 결과와는 달리, 담즙산의 존재하에서 B11의 생존률은 약 4.3%로 *polyfermenticus*의 1.4%보다 약 3배 높았다. 즉, 담즙산은 *Bacillus*의 성장을 억제하며, 담즙산에 대한 저항성은 *Bacillus* 종류에 따라 차이를 보였다.

이 결과에서 중성 및 약알카리에서 잘 자라는 *B. subtilis*는 일반적으로 산과 담즙산에 강하지 않으나 균주의 선발을 통하여 이들에 저항성이 있는 것을 분리하는 것이 가능하다고 볼 수 있었다.

산과 담즙산에 견딘 균들을 분리해 0.5%의 돼지 체장액이 섞인 농도에서 배양하고 그 생존률을 조사했다(Table 2). 체장액의 존재하에서 *B. subtilis* B11과 *B. polyfermenticus* 균의 수는 각각,  $1.27 \times 10^{10}$ 과  $1.8 \times 10^9$ 을 보여 체장액을 첨가하지 않은 대조균의 각 균수  $8.12 \times 10^8$ 과  $2.06 \times 10^8$ 에 비해 약 10배 증가되었다. 따라서, 체장액 중의 많은 약알카리성 분해 효소들은 이들 균의 성장을 위한 단백질원과 증식 인자로 사용되는 것

Table 1. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Bacillus* species

Strain	Viable cell no. ( $\times 10^5$ cfu/ml)		Viability (%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2hrs of incubation at pH 4.0			
<i>B. subtilis</i> KCTC 1666	2,200	0	0.00
<i>B. subtilis</i> B11	4,700	6	0.13
<i>B. subtilis</i> J11	3,050	0	0.00
<i>B. polyfermenticus</i>	2,400	12	0.50
Bile acid tolerance in the medium containing 0.3% porcine bile extract after 24hrs of incubation			
<i>B. subtilis</i> B11	3,000	130	4.33
<i>B. polyfermenticus</i>	2,800	38	1.36

**Table 2. Effect of 0.5% pancreatic juice on the growth of some probiotics**

Strain	Viable cell no. ( $\times 10^5$ cfu/ml)	
	No treatment	Treatment
<i>B. subtilis</i> B11	8,120	$1.27 \times 10^5$
<i>B. polyfermenticus</i>	2,060	$1.8 \times 10^4$
<i>Cl. butyricum</i> KCTC 1786	2,050	7,600
<i>Cl. butyricum</i> KCTC 1905	1,400	4,000
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3155	3,200	7,900

같다.

산, 담즙산, 그리고 췌장액에 견딘 *Bacillus*를 사용해 동물에서 설사를 유발하는 *E. coli* O8 및 *S. choleraesuis*의 증식 억제효과를 24시간 혼합 배양 후 조사하였다 (Table 3). 대장균 성장 억제는 *B. subtilis* B11로는 효과가 없었지만 *B. polyfermenticus*에서는 대장균의 농도를 대조군에 비해 약 1/500로 감소시켰다. 한편, *Salmonella*인 경우, *B. subtilis* B11의 억제력은 마찬가지로 별 효과가 없었던 반면 *B. polyfermenticus*의 생육 억제에 의한 *Salmonella*수는 대조군에 비해 약 1/10로 감소되었다.

이러한 결과로 볼 때, *in vitro* 상태에서 *B. polyfermenticus*는 다른 *Bacillus*들보다 환경 적응력이 뛰어났고, 설사 유발 대장균 및 *Salmonella*에 대한 생육 억제력도 우수하였다. 또한, 배양 후 냉동 건조시킨 이 균

lg를 취해 eppendorf tube에 넣어 밀봉하고 37°C에서 42일까지 보관한 후 균의 생존률을 조사한 결과 112% 값을 보였다. 즉, 보관시에 균 생존률은 상당히 높은 온도에서도 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 또한, 증식상태의 균이 아닌 포자 상태로의 투여시는 pH 및 담즙산에 대한 생존률의 증가를 예상할 수 있어 생균제로서 충분한 가능성을 가진다고 평가되었다.

#### 생균제로서 *Clostridium butyricum*의 평가

*Cl. butyricum*균들은 혐기적으로 자라면서 acetate, butyrate와 향생물질인 butyricin을 생산하는 것으로 알려져 있다(13). 조사한 균들은 *Bacillus*와는 달리 pH 3의 인공 위액에서 자라지 못했고, pH 4에서는 KCTC 1786인 경우 0.6%의 생존률을 보여 균이 증식하고 있는 상태에서는 pH에 민감함을 보였다(Table 4). 그러나, pH 4에 견딘 균은 0.3% 담즙산이 함유된 배지에서 약 10%의 생존률을 나타내 담즙산에 큰 저항력을 보였다(Table 4). 한편, 산과 담즙산에 견딘 균락의 췌장액에서 배양은 *Bacillus*에서와 마찬가지로 대조군에 비해 약 2.8~3.7배 더 잘 자라는 것으로 보아 이 균이 췌장액을 영양원이나 성장 증식인자로 사용하는 것으로 보인다(Table 3). 산, 담즙산, 그리고 췌장액에 견딘 균들의 대장균과 *Salmonella*에 대한 증식 억제능력을 조사한 결과 24시간 배양 후 KCTC 1786은 이 균들의 수를

**Table 3. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* B11 or *Bacillus polyfermenticus* on the pathogens**

Strain	Viable cell no. ( $\times 10^5$ cfu/ml) of pathogens	
	Without coincubation	With coincubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in NB medium after 24hrs of coincubation		
<i>B. subtilis</i> B11	2,200	1,600
<i>B. polyfermenticus</i>	2,200	4
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in NB medium after 24hrs of coincubation		
<i>B. subtilis</i> B11	3,800	2,200
<i>B. polyfermenticus</i>	3,800	320

**Table 4. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Clostridium butyricum***

Strain	Viable cell no. ( $\times 10^5$ cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2hrs of incubation at pH 4.0			
KCTC 1787	1,720	1.7	0.23
KCTC 1871	1,560	0.5	0.09
KCTC 1904	1,800	0.3	0.03
KCTC 1905	1,200	5.4	0.45
KCTC 1786	2,800	17	0.61
Bile acid tolerance after 24hrs of incubation in the medium containing 0.3% porcine bile extract			
KCTC 1905	2,200	212	9.64
KCTC 1786	2,700	250	9.26

각각 약 1/3과 1/10로 감소시켜 *B. polyfermenticus*에 는 미치지 못하지만 유해균 억제작용이 있음을 보였다 (Table 5). *B. polyfermenticus*와 마찬가지로 *Cl. butyricum*도 포자를 형성하는 균이므로 저장 중에 활성물 이 쉽게 떨어지지 않아 보관하기가 용이하며, 포자화한 상태로 동물에 투여하는 경우 소장까지의 생존률은 훨씬 높아질 것으로 기대된다.

생균제로서 *Lactobacillus acidophilus*의 평가

*Lactobacillus*속은 김치, 치즈, 요구르트와 같은 식품 의 제조에서 중요한 미생물이고 생균제로서 가능성이 가장 잘 연구되어 왔다. 조사한 *L. acidophilus* 균주들 의 산에 대한 생존률은 pH 4에서 40~50% 수준이었으 며, 이들 중 가장 빠르게 증식했던 KCTC 3155는 pH 3과 4에서 각각 22%와 51%의 생존률로 위산에 매우 강한 균주임을 보여주었다(Table 6). 그러나, 이 균은 0.3% 의 담즙산에는 취약하여 대조군에 비해 약 1/10<sup>6</sup>로 그 수가 급격히 감소하였다(Table 6). 이러한 담즙산에 대 한 약한 특성은 *Lactobacillus* 속에서 보이는 일반적인 현상이다(10). 담즙의 성분은 공액 담즙산(conjugated

acids)으로 이루어져 있는데 미생물이 공액 부위를 끊 는 효소를 가지고 있으면 담즙의 존재에 취약하다고 보 고된 바 있다(14). 아마도, KCTC 3155도 이러한 작용 때문에 담즙산의 존재하에서 생존률이 급격히 줄어든 것으로 추정된다. 또한, 산과 담즙산에 견딘 균은 체장 액의 존재하에서 약 2.5배 더 잘 자람을 확인할 수 있었 다(Table 3).

한편, 이러한 조건에 견뎌던 KCTC 3155를 대장균 (14시간 혼합 배양) 또는 *Salmonella*(24시간 혼합 배 양)와 함께 배양 후 생육 억제능력을 조사한 결과 이들 유해균의 성장을 100% 억제시키는 것을 보였다(Table 7). *L. acidophilus*는 자라는 동안 배양액의 pH를 저하 시키고, acidolin, acidophilin, lacacin B의 항생제를 생 성하는 것으로 알려져 있다(15). 유해균의 성장 억제요 인은 확실치 않지만 14시간 배양 동안 *L. acidophilus*배 지의 pH가 6.2로부터 4.6으로 떨어지는 것으로 보아 pH 하강에 따른 유해균 감소효과를 추정할 수 있었다. 유산균, 낙산균 복합 제제로서 정장제로 사용되고 있 는 바이스리(제일제당)는 연속 유동 배양시 접종 후 48~72시간만에 *E. coli* O-157이 소멸되었다고 보고한 바 있다(16). 대장균 및 *Salmonella*에 대한 미생물학적

Table 5. Growth inhibition of *Clostridium butyricum* on the pathogens

Strain	Viable cell no.(×10 <sup>5</sup> cfu/ml) of pathogens	
	Without coinocubation	With coinocubation
	Growth inhibition of <i>E. coli</i> in FT medium after 24hrs of coinocubation	
KCTC 1905	720	810
KCTC 1786	720	260
	Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in FT medium after 24hrs of coinocubation	
KCTC 1905	940	270
KCTC 1786	940	82

Table 6. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

Strain	Viable cell no.(×10 <sup>5</sup> cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
	Acid tolerance at pH 4.0 after 2hrs incubation		
KCTC 3146	850	360	42.35
KCTC 3149	950	340	35.80
KCTC 3150	1,900	780	41.05
KCTC 3153	1,300	620	47.70
KCTC 3155	2,700	1,380	51.11
	Acid tolerance at pH 3.0 after 2hrs incubation		
KCTC 3155	3,800	836	22.00
	Bile acid tolerance in the medium containing 0.3% porcine bile extract after 24hrs incubation		
KCTC 3150	2,200	2×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
KCTC 3155	3,800	3×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>

Table 7. Growth inhibition of *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3155 on the pathogens

Strain	Viable cell no.( $\times 10^5$ cfu/ml) of pathogens	
	Without coinubation	With coinubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in MRS medium after 14hrs coinubation		
KCTC 3155	250	0
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in MRS medium after 24hrs coinubation		
KCTC 3155	185	0

길항작용 관점에서 KCTC 3155의 단독 작용에 의한 억제효과는 이들 유산균, 낙산균의 상업적 복합 제재와 비교될 수 있을 정도로 뛰어남을 보이고 있다. 따라서, 담즙산에 대한 저항성 문제가 해결된다면 이 결과들로부터 *L. acidophilus*가 장유해균을 제거하는 생균제로서 잠재적 가능성이 있음을 보여준다.

#### 생균제로서 *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Aspergillus oryzae*의 평가

사용한 *S. cerevisiae* 균주들은 pH 3에서 2시간 노출 후 1/25~1/20의 균 감소율을 보여 비교적 산에 강한 특성을 보여주었다(결과는 보이지 않았음). 또한 pH 4에서 산에 대한 저항성은 pH 3과 비슷하였다(Table 8). 이들 중 빠른 성장을 보인 KCTC 1426의 담즙산에 대한 저항성이 조사되었다(Table 8). 세균들과는 달리 0.3

% 담즙산 첨가는 *S. cerevisiae*의 성장을 오히려 약간 증가시켰는데 이는 아마도 세균과는 다른 효모의 두터운 세포벽 특징 때문인 것 같다. 대장균과 *Salmonella*를 KCTC 1426과 24시간 혼합 배양시 이들 유해균수는 각각  $5.5 \times 10^6$ ,  $4.3 \times 10^6$ 으로 대조균의 균수인  $3.3 \times 10^6$ ,  $2.8 \times 10^6$ 보다 오히려 약간의 증식 효과가 있었다(Table 9). 한편, 동물 사육 실험에서 *S. cerevisiae*가 첨가된 사료를 먹은 것보다 닭은 단순 사료만 먹은 것들에 비해 산유량과 산탄율이 각각 증가되는 것으로 보고되었다(17,18). 이러한 결과들은 효모의 체세포 분해 성분이 동물의 영양원으로 이용되고, 또한 분비효소들에 의해 생성된 물질들이 유익균의 증식을 도와 이들을 장내 우세 균총으로 유지시켜줌으로서 유해균이 들어오더라도 이들 성장을 억제하는 간접적 효과 때문일 것으로 추정된다.

한편, *A. oryzae*의 배양은 일반 세균들의 성장에 비

Table 8. Effect of artificial gastric juice or bile acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*

Strain	Viable cell no.( $\times 10^5$ cfu/ml)		Viability(%)
	No treatment	Treatment	
Acid tolerance after 2hrs incubation at pH 4.0			
KCTC 1201	620	29	4.68
KCTC 1426	940	34	3.61
KCTC 1552	750	36	4.80
KCTC 7928	380	16	4.21
J2	630	40	6.35
Bile acid tolerance after 24hrs incubation in the medium containing 0.3% porcine bile extract			
KCTC 1426	750	824	109.87

Table 9. Growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1426 and *Aspergillus oryzae* KCTC 6292 on the pathogens after 24hrs coinubation

Strain	Viable cell no.( $\times 10^5$ cfu/ml) of pathogens	
	Without coinubation	With coinubation
Growth inhibition of <i>E. coli</i> in YM broth(KCTC 1426) and in potato dextrose broth(KCTC 6292)		
KCTC 1426	330	550
KCTC 6292	150	240
Growth inhibition of <i>S. choleraesuis</i> in YM broth(KCTC 1426) and in potato dextrose broth(KCTC 6292)		
KCTC 1426	280	430
KCTC 6292	320	360

해 자라는 속도가 느렸으며 처음 24시간 배양동안 *E. coli* 나 *Salmonella*의 성장이 오히려 약간 증가되었다(Table 9). 이러한 효과는 *A. oryzae*와 *L. acidophilus*를 MRS 배지에서 30°C로 24시간 혼합 배양시 *L. acidophilus*의 균수가 *L. acidophilus*만 배양한 대조군에 비해 1.3~1.7 배 증가되는 것에서도 나타났다(결과는 보이지 않았슴). 최근의 한 보고(19)는 *A. oryzae*가 접종된 메주를 일주일 이상 닭에게 먹인 결과 닭의 변에서 *A. oryzae* 및 젖산균이 증가되고 대장균의 수는 현저히 줄어들었다는 결과를 보였는데 이 효과가 메주 콩의 영향 때문인지 *A. oryzae* 때문인지는 확실하지 않다. 앞의 결과들을 고려할 때 한가지 가능성은 *A. oryzae*에 의한 직접적인 대장균 감소 효과라기보다 *A. oryzae*의 분비 효소가 콩을 분해시켜 젖산균 성장 촉진인자를 분비하고 이에 따라 증가된 젖산균이 대장균을 저해했다고 생각할 수 있다.

*S. cerevisiae*나 *A. oryzae*는 포자를 형성할 수 있기 때문에 이들은 저장이나 가공 과정, 또는 장내 환경에 잘 견딜 수 있다. 또한, 이들의 지속적인 사용은 동물 사료 이용률의 증대, 장균총의 개선과 같은 간접적 효과를 기대할 수 있기 때문에 생균제로서 바람직한 미생물로 생각된다.

### 요 약

생균제 선별을 위해 주로 동물의 장으로부터 분리되었던 23종류 균들의 내산성, 내담즙성, 내체장액성, 대장균 및 *Salmonella* 성장 억제성이 조사되었다. pH 4의 인공위액에서 2시간 배양 후 생존률은 *Lactobacillus* species가 40~50%로 가장 높았고 *Saccharomyces*는 4~5%, *B. polyfermenticus*와 *Cl. acidophilum*이 0.5~0.6%의 순이었다. 0.3% 담즙산의 농도에서 *Saccharomyces*의 증식은 영향을 받지 않았고, *Cl. butyricum*은 대조군에 비해 10%, *B. polyfermenticus*는 4%의 생존률을 보였으나, *Lactobacillus*의 생존률은 1/10<sup>5</sup>수준으로 매우 낮았다. 한편, 체장액의 존재는 조사한 미생물들의 증식을 오히려 돕는 것으로 보인다. 유해균의 제거 실험에서 *L. acidophilus* KCTC 3155를 *E. coli* O8과 *S. choleraesuis*를 함께 배양했을 때 각각 14시간, 24시간 후에 이들 유해균을 완전히 제거함을 보였으며 *B. polyfermenticus*도 *E. coli*는 1/500로, *S. choleraesuis*는 1/10으로 감소시켜 *E. coli*의 제거에 매우 효과적인 균으로 보인다. 이러한 결과들로부터 *B. polyfermenticus*가 내산, 담즙 내성, 유해균의 제거, 저장성면에서 전체적으로 우수한 생균제로 생각되며, *L. acidophilus*는 내

담즙성만 해결된다면, 유망한 생균제로 고려될 수 있을 것이다. 또한, *S. cerevisiae*와 *A. oryzae*는 직접적인 유해균 억제효과는 없었지만 장내 환경에 잘 견디며 영양 공급원과 장균총 개선효과가 있다는 보고로 미루어 다른 생균제와 함께 첨가하는 것이 바람직한 것으로 보인다. 이러한 결과를 바탕으로 앞으로 적절한 생균제의 개발에는 산 및 담즙산에 강한 균주의 선별과 미생물의 encapsulation 등에 의한 산 및 담즙산으로부터의 격리 방법의 개발, 저장 안정성을 높이는 방법들이 해결되어야 할 과제일 것이다.

### 감사의 글

이 논문은 농림수산부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구 결과입니다.

### 문 헌

1. 심재현, 오세중, 김상교, 백영진 : 젖산 발효제품에서 분리한 유산균의 내산성 비교. 한국식품과학회지, **27**, 101 (1995)
2. 심재현, 김상교, 백영진, 오탈광, 양한철 : 배양 조건에 따른 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 내산성 변화. 산업미생물학회지, **23**, 17(1995)
3. Hong, S., Kim, W. J., Cha, S. and Lee, B. H. : Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 128(1996)
4. 박소영, 고영태, 정후길, 양진오, 정현서, 김영배, 지근역 : 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 비교. 산업미생물학회지, **24**, 304(1996)
5. 윤성식, 이해옥, 유주현 : 아미노산 혼합용액이 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 동결건조 및 저장성에 미치는 영향. 산업미생물학회지, **14**, 421(1986)
6. Conway, P. L., Gorbach, S. L. and Goldin, B. R. : Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, **70**, 1(1987)
7. McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. : Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2120(1990)
8. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. T. : Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, **67**, 3045(1984)
9. 박종진, 변정수, 조윤경, 홍승서, 이현수 : 동물의 장에서 분리한 *Enterococcus* sp.의 특성 및 분말화. 산업미생물학회지, **24**, 393(1996)
10. Underdahl, N. R., Torres-Medina, A. and Doster, A. R. : Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 2227(1982)
11. Dare, R., Magee, J. T. and Mathison, G. E. : *In-vitro* studies on the bactericidal properties of natural and synthetic gastric juices. *J. Med. Microbiol.*, **5**, 395

- (1971)
12. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. : Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.*, **29**, 691(1974)
  13. 한국과학기술원 유전자은행 : 미생물균주 카탈로그. 제 3판, p.28(1992)
  14. Floch, M., Binder, H. J., Filburn, B. and Gershengoren, W. : The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 1418(1992)
  15. Havenaar, R., Brink, B. T. and Veld, J. H. : Selection of strains for probiotic use. In "*Probiotics*" Fuller, R. (ed.), Chapman & Hall, p.209(1992)
  16. 제일제당 제약사업부 : 바이스리 O-157예방 및 치료효과. 바이스리 사용설명서(1997)
  17. 이울연, 이봉덕, 지철하, 박홍석 : 생효모배양물의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향. *한국가금학회지*, **22**, 77(1995)
  18. 박홍석, 유용희, 전병수, 차장옥 : 활성 효모와 유산균의 급여가 젖소의 산유량 및 유지율에 미치는 효과. *한국축산학회지*, **38**, 77(1996)
  19. 염금희, 장동운, 이봉덕, 이병노, 성창근 : 가금 똥을 딱딱하게 할 수 있는 새로운 방법. *한국식품영양과학회 제 41차 춘계학술발표회*(1997)

(1997년 1월 17일 접수)