

## 한국인 분변으로부터 생균제용 *Lactobacillus acidophilus*의 선발 및 그 특성

신명수 · 김현미 · 김경태 · 허철성 · 배형석 · 백영진  
(주)한국야쿠르트 중앙연구소

### Selection and Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* Isolated from Korean Feces

Myeong-Su Shin, Hyun-Mi Kim, Gyung-Tae Kim, Chul-Sung Huh,  
Hyoung-Suk Bae and Young-Jin Baek  
R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

#### Abstract

*Lactobacillus acidophilus* KY 2104 was isolated from 41 healthy korean (2~35 age, 26 man, 15 woman) feces to use as a probiotic lactic acid bacteria for functional foods, fermented milk and pharmaceutical products. *L. acidophilus* KY 2104 survived in the presence of acid and bile, and inhibited pathogens. It survived almost 100% in pH 3.0 phosphate buffer for 2 hr, and more than  $10^4$  cfu/mL in pH 2.0 phosphate buffer when inoculated by  $10^7$  cfu/mL. It was also found to grow in MRS medium containing 0.5% oxgall. *L. acidophilus* KY 2104 exerted inhibitory effect against enteric pathogens such as *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*, when grown with each in associative cultures for 16 hr. As a result of acute toxicity of *L. acidophilus* KY 2104 in rats, there was no observation on mortality, clinical signs, body weights and gross findings in the oral administration.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, probiotics, acid-resistance, bile, enteric pathogen

#### 서 론

Probiotics (생균제)란 숙주의 장내미생물 균형을 유지 시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다<sup>(1)</sup>. 이와 같은 probiotics는 장내균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역활성화 작용, 항암작용, 콜레스테롤 저하, 유당불내증의 경감, 변비억제 등의 기능을 갖고 있다고 알려져 있다<sup>(2-10)</sup>. 따라서 기능성식품으로 probiotics를 이용하려는 제품개발 및 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>(11-13)</sup>.

Probiotics로 사용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*와 같은 유산균이 주류를 이루고 있으며, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* 그리고 효모 등은 주로 동물

에 사용되고 있다<sup>(14-16)</sup>. 현재, probiotics로 가장 많이 이용되고 있는 균주는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*이며, 발효유, 건장식품, 유산균 정장제, 동물약품 등에 사용되고 있다.

*Lactobacillus*는 통성혐기성 간균이며, 숙주동물의 장내균총 균형을 유지하기 위하여 발효유 형태로 가장 먼저 이용되어 왔으며<sup>(17)</sup>, 사람의 장내에 서식하는 균주로서 다양한 종류의 제품에 사용되고 있다. 현재 사용되고 있거나 사용 가능한 lactobacilli의 종류는 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. reuteri* 등 이상젖산발효균 및 정상젖산발효균을 포함하여 다양한 편이다<sup>(18)</sup>. 위 균주 중에서, 특히 *L. acidophilus*는 장내균총을 유지하는 중요한 유산균으로 인식되어왔다.

유산균을 사람에 대한 probiotics로 사용하기 위해서는 다음과 같은 조건들을 지녀야한다고 알려져 있다<sup>(14,16)</sup>. 즉, 가축이나 동물이 아닌 사람으로부터 분리되어 안전한 것이어야 하며, 위의 낮은 pH에서 생존하여 위

Corresponding author: Myeong-Su Shin, R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd., 418-12, Komae-ri, Kiheung-eup, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea

산을 통과하여야 하며, 소장에 분비된 담즙에 대한 내성을 지니고 있어 장내에서 생존하여야 하고, 병원성균에 대한 억제 등의 유익한 작용들을 해야한다. 그러나 지금까지 개발된 유산균종 일부는 사람이 아닌 가축이나 동물에서 분리되어 사람과 동물의 구분없이 사용함으로써 안전성의 문제점을 지니고 있거나, 내산성과 내담즙산성이 낮아 probiotics로서 부족한 점도 있었다. 또한 국내에서는 자체 균주선발 및 probiotics를 이용한 제품 개발이 미진하여 아직까지 산업적으로 이용한 예가 드문 형편이다.

따라서 본 연구에서는 유산균 식품을 비롯하여 발효유제품, 의약품 및 동물용 생균제 등 광범위하게 사용될 수 있는 *L. acidophilus* 균주들을 한국인의 분변으로부터 직접 분리하였다. 그리고 이 균주들의 내산성, 내담즙산성, 병원성균 증식억제능 등을 조사하여 산업적인 이용 가능성을 알아 보았다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

사용 균주로는 한국인의 분변으로부터 분리한 *Lactobacillus acidophilus*와 유제품 및 유산균 식품에서 각각 분리한 *L. acidophilus*들을 lactobacilli MRS (Difco) 배지에서 계대배양하면서 사용하였다. 병원성균으로는 10% glycerol로 동결시켜 냉동보관중이던 *Staphylococcus aureus*, *E. coli* ATCC 43876, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*을 각각 Staphylococcus 110 Medium과 MacConkey agar에 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하고 다시 2회 이상 계대배양하면서 사용하였다.

### 유산균 분리 및 동정

41명의 한국인 분변을 각각 채취하여 잘 혼합한 후, 3~5 g의 분변을 pH 2.3의 완충용액에 현탁하고 2시간 동안 인탕한 다음, *Lactobacillus* 선택배지인 LBS 한천배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 호기배양하였다. 이때 성장한 집락을 우선 분리하고 이를 다시 그림염색, 현미경 관찰, catalase 반응 그리고 10% 환원 탈지유배지에서의 커드 형성 여부 등을 통해 내산성을 지닌 *Lactobacillus* 균주로 1차 분리하였다. 분리된 균주들을 다시 pH 2.3 완충용액에서 2시간 동안 정지한 후, 0.3% 담즙산(oxgall)을 첨가한 LBS한천배지에 도말하여 37°C에서 48시간 호기배양함으로써 산성 pH에 대해 내성이 강하고 담즙산에 대해서도 내성이 높은 균주를 2차 선별하였다. 그리고 위 균주중에서

병원성균의 생육억제 능력이 뛰어난 균주를 최종적으로 분리하였다.

선발된 lactobacilli를 동정하기 위하여 MRS 한천배지로부터 단일집락을 취하여, MRS broth에서 계대배양하였다. 배양한 균체를 멸균된 증류수로 2회 세척한 후, 탄소원으로 당이 첨가되지 않은 기본배지에 현탁하여 CHL 50 strip (API, France)에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하면서 당 이용성을 확인하였다. 그리고 Bergey's manual에 의하여 동정을 실시하였다.

### 내산성 및 내담즙산성 실험

분리된 균주를 MRS 액체배지에 일정량 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 0.05 M sodium phosphate buffer를 HCl로 보정하여 만든 pH 7.0, 3.0, 2.5, 2.3, 2.0 완충용액속에 각각  $10^7$  cfu/mL 정도의 초기 접종농도로 접종하였다. 위 용액을 37°C에서 2시간 동안 정지배양한 후, 각 농도별로 1 mL 희석액을 MRS 한천배지에 도말하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그리고 배양 후에 나타난 집락수를 계수함으로써 각각의 산성 pH에 대한 내성을 측정하였다.

분리된 균주를 MRS 액체배지에서 하룻밤 동안 배양한 다음 멸균 생리식염수로 희석한 후, Gilliland 등의 방법<sup>(9)</sup>을 변형하여 oxgall (Difco)이 각각 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%씩 함유된 MRS 한천배지에 도말하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그리고 배양 후에 나타난 집락수를 계수함으로써 담즙산 농도에 따른 내담즙산성을 측정하였다.

### 병원성균억제 실험

분리된 유산균을 MRS 액체배지에서 배양하고, 병원성균인 *Staphylococcus aureus*, *E. coli* ATCC 43876, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*을 LB (Luria-Bertani) 배지에서 각각 배양한 후, 50 mL MRS 액체배지속에 분리된 lactobacilli와 병원성균을 각각  $10^7$  cfu/mL씩 혼합 접종과 병원성균만을 단독 접종한 다음 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양후, 각각의 배양액을 병원성균에 대한 선택배지, 즉 *E. coli* ATCC 43876, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*은 MacConkey 한천배지, *Staphylococcus aureus*는 Staphylococcus 110 한천배지에 각 농도별로 1 mL 희석액을 도말하고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그리고 배양 후에 나타난 집락수를 계수하고, 혼합배양한 것과 단독배양한 것을 비교함으로써 병원성균의 생육억제 정도를 조사하였다.

우유배지에서의 배양

10% (w/v) 환원탈지유 1,000 mL에 선발균주를 1% 접종하고 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 6시간 간격으로 생균수 및 pH를 측정함으로써 우유배지에서의 증식성을 조사하였다.

효소활성 실험

선발 유산균을 MRS 한천배지에서 단일 집락으로 분리하여 3회 계대배양하였다. 배양된 균체를 멸균수에 약 10<sup>7</sup> cfu/mL 정도 현탁한 후, 위 현탁액을 API ZYM Kit (API, France)에 접종하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양 완료후, Zym A, B를 각각 1방울씩 떨어뜨려 색깔의 변화를 관찰함으로써 효소활성을 측정하였다.

Plasmid DNA의 분리

하룻밤 동안 MRS 액체배지에서 선발된 균주를 배양한 다음 4°C에서 원심분리하여 균체를 회수하였다. 그리고 배 등<sup>(20)</sup>의 방법에 따라 plasmid DNA를 분리하였다.

급성독성실험

*L. acidophilus* KY 2104 균주의 급성독성을 조사하기 위하여 SD 계통의 rat를 암수 각각 5마리씩 대조군과 처리군으로 나누고, 각각 0 mg/kg 및 5,000 mg/kg (5.0×10<sup>10</sup> cells/kg)의 용량으로 단회 경구투여하여 14일간의 사망률, 일반증상, 중독증상, 체중변화를 관찰하고, 최종적으로 부검을 실시하여 조직 손상 유무를 관찰하였다. LD<sub>50</sub> 값은 pharmacologic calculation system version 4.1을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 계산하였으며<sup>(21)</sup>, 체중에 대한 유의성 검증법으로는 one-way analysis of variance (ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될 때 Dunnett's t-test를 실시하였으며, 발생병변의 빈도는 X<sup>2</sup> (chi-square) 검정으로 통계처리하였다.

결 과

*L. acidophilus* 선발

한국인 41명(2~35세, 남자 26명, 여자 15명)의 분변으로부터 유래한 균주로서 pH 2.3 완충용액과 0.3% 담즙산에서 생존한 균주들을 선발하고, 선택배지에서의 성장, 그람 양성, catalase 음성, 현미경하에서의 간균으로 판단하여 lactobacillo로 인정되는 26주를 2차 선발하였다. 그 중에서, API Kit를 이용한 당 발효실험

Table 1. Bacteriological characteristics of *L. acidophilus* KY 2104 isolated from human feces

Morphology	
cellular	rod
gram staining	+
colony (at MRS medium)	gray(flat)
spore-forming	-
motility	-
Physiological characteristics	
optimum pH	6.0~7.0
optimum temperature	35~37°C
growth at 15°C	-
growth at 42°C	+
growth at 0.3% bile	+
growth under aerobic condition	+
gas from glucose	-
catalase	-
β-galactosidase	+
Acid formation	
adonitol	-
arabinose	-
galactose	+
glucose	+
fructose	+
mannose	+
ribose	-
N-acetyl glucosamine	+
amygdaline	+
esculine	+
salicine	+
maltose	+
lactose	+
melibiose	+
D-raffinose	+
amidon	-

+: positive, -: negative.

결과 Bergey's manual에 의한 동정을 실시한 후, *L. acidophilus*로 확인된 4종의 균주를 선발하고 각각 *L. acidophilus* KY 2101~4로 명명하였다. 그리고 내산성, 내담즙산성뿐만 아니라 병원성균 억제능력이 뛰어난 *L. acidophilus* KY 2104를 probiotics로 최종 선발하였다.

*L. acidophilus* KY 2104는 그람양성 간균이며, 포자를 형성하지 않고, 배양시 가스를 형성하지 않는 정상 발효 유산균이었다(Table 1). 또한 혐기 또는 호기에서도 성장하였으며, galactose, mannose, lactose, melibiose 등을 분해하여 산생성을 하였으나, adonitol, ribose, amidon 등의 당은 이용하지 못하였다.

내산성

*L. acidophilus* KY 2104는 pH 3.0에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고, 처음 접종 농도의 100%까지 생존하는 것으로 나타났으며, pH 2.5에서도 초기 접종

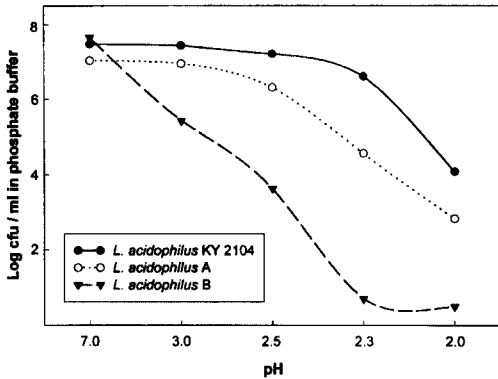


Fig. 1. Acid tolerance of *L. acidophilus* KY 2104 and other strains in sodium phosphate buffer at various pH for 2 hr. *L. acidophilus* A and B were isolated from yoghurt and medical probiotics in Korea, respectively.

농도와 동일한 logarithm unit 수준인 90% 이상의 높은 생존율을 유지하였다. 그리고 pH 2.3에서는 약간 사멸하는 것으로 나타났으며, pH 2.0에서는  $1.22 \times 10^4$  cfu/mL 정도 생존하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

발효유 또는 의약품용 정장제에서 분리한 균주들과 내산성 정도를 비교하였을 때, *L. acidophilus* A는 pH 3.0까지는 초기 접종농도를 유지하다가 pH 2.5이하에서는 급격하게 사멸하기 시작하여 pH 2.0에서는  $10^3$  cfu/mL 이하로 생존하였다. *L. acidophilus* B의 경우, pH 2.3이하에서는 거의 생존하지 않는 것으로 나타났다.

#### 내담즙산성

담즙산(oxgall)을 각각 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5% (w/v)씩 첨가한 MRS 한천배지에서 내담즙산성 실험을 실시한 결과, *L. acidophilus* KY 2104는 0.3% oxgall 농도까지 아무런 억제현상없이 정상적으로 집락을 형성하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 그리고 0.5%의 oxgall이 함유된 배지에서도 약간의 균수 감소현상이 있었으나, 거의 사멸하지 않았다.

#### 병원성균 증식 억제

*Staphylococcus aureus*, *E. coli* ATCC 43876, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*와 같은 장내병원균에 대한 *L. acidophilus* KY 2104의 성장억제 능력을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 병원성 균주들을 MRS 액체배지에서 단독배양하였을 때의 증식 균수를 control로 정하고, *L. acidophilus* KY 2104와 혼합배양하였을 때의 균수와 비교하여 병원성균들의 성장억제비율을

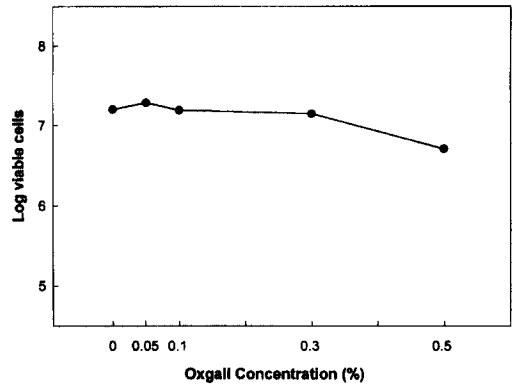


Fig. 2. Bile acid resistance of *L. acidophilus* KY 2104 in MRS agar containing oxgall for 48 hr at 37°C.

Table 2. Inhibitory effect of *L. acidophilus* KY 2104 on pathogenic bacteria in associative cultures

Enteric pathogens	Viable cells (cfu/mL)	
	control <sup>1)</sup>	mixed <sup>2)</sup>
<i>S. aureus</i>	$1.6 \times 10^8$	$1.0 \times 10^3$
<i>E. coli</i>	$2.9 \times 10^8$	$1.2 \times 10^6$
<i>Shigella dysenteriae</i>	$3.8 \times 10^8$	$<10^2$
<i>S. typhimurium</i>	$3.9 \times 10^8$	$<10^2$

<sup>1)</sup>When only enteric pathogen was grown in MRS broth.

<sup>2)</sup>When enteric pathogen was grown mixedly with *L. acidophilus* KY 2104 in MRS broth.

조사한 결과, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*의 성장이 급격하게 감소하여 5 log viable cells 이상 억제율을 나타냈으며, *E. coli*의 경우에도 control과 비교하면 2 log viable cells 정도의 성장억제율을 보였다. 그리고 혼합배양이 끝난 후, 배양액의 pH는 모두 4.1정도로 일정하였다.

#### 우유배지에서의 성장

10% (w/v) 환원탈지유에서 *L. acidophilus* KY 2104의 성장곡선과 산생성도(pH)를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. *L. acidophilus* KY 2104를 우유배지에  $10^6$  cfu/mL 정도 접종하고 배양하였을 때, 계속적으로 성장이 진행되면서 24시간이 지난 후에 최고 균수( $5.0 \times 10^8$  cfu/mL)를 보였으며, 48시간까지 그 균수를 유지하였다. pH도 초기의 6.4에서 배양시간 12시간까지 서서히 낮아지다가 24시간째에 급속히 4.1정도로 낮아지고, 배양이 끝난 48시간 후에는 3.65를 나타냈다.

#### 효소 활성

API ZYM Kit를 이용하여 분리 균주의 효소활성을

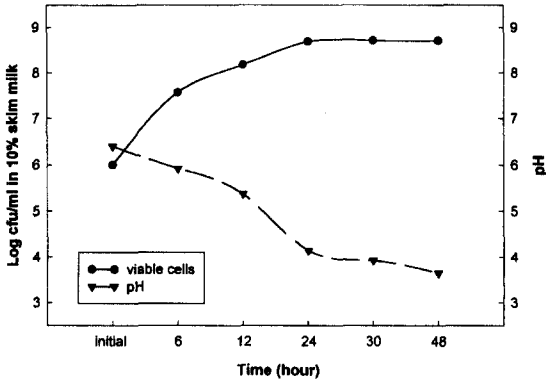


Fig. 3. The growth curve and pH of *L. acidophilus* KY 2104 in 10% skim milk.

Table 3. Enzyme activities of *L. acidophilus* KY 2104

Enzyme	Activity (nmole)
$\alpha$ -galactosidase	$\geq 5$
$\beta$ -galactosidase	$\geq 50$
$\beta$ -glucuronidase	0
$\alpha$ -glucosidase	$\geq 40$
Esterase	10
Lipase	0
Leucine arylamidase	$\geq 50$
Valine arylamidase	30

측정한 결과,  $\beta$ -galactosidase 활성이 50 nmole 이상으로 높게 나타났으며, 발효효소로 알려진  $\beta$ -glucuronidase의 효소활성은 발견되지 않았다(Table 3).

Plasmid DNA

*L. acidophilus* KY 2104의 plasmid DNA를 추출해 본 결과, chromosome DNA 이외에 plasmid DNA는 존재하지 않는 것으로 나타났다.

급성독성실험

*L. acidophilus* KY 2104의 20마리 rat에 대한 급성경구독성시험 결과, 14일간의 시험기간중 모든 시험군에서 임상증상에 어떠한 이상도 관찰되지 않았으며, rat에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 암수 모두 사망동물이 발견되지 않아 통계처리를 할 수 없었다. 또한 체중변화의 경우, 모든 시험군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 부검조건에서도 아무런 이상소견이 발견되지 않았다.

고 찰

유산균식품(건강보조식품), 발효유제품, 의약품 및

동물용 생균제 등에 사용되는 유산균을 국내에서 자체 개발하기 위하여 직접 한국인의 분변으로부터 내산성, 내담즙산성 및 병원성균 억제능력 등이 우수한 균주를 선발하였으며, 최종적으로 선발된 균주를 *L. acidophilus* KY 2104로 명명하였다. Bergey's manual에 의하여 동정한 결과, 분리균주는 막대 모양의 통성 혐기성균이었으며, catalase 음성, 산생성 등 정통적인 유산균의 형질을 지니고 있었다.

유산균이 생균제로서 역할을 수행하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여야 한다. 물리적으로 가능한 위내의 최고 pH는 0.78정도이며, 음식물의 유입상태에 따라 변화하지만, 내부의 다른 위액에 의해 희석되어 대략 pH 1.0~2.0를 유지하는 것으로 알려져 있다<sup>(22)</sup>. 유산균의 내산성실험으로는 *in vivo*에서 직접 생존율을 확인하는 실험과 인공위액, buffer 등을 이용한 간접적인 방법이 수행되어 왔다. 그러나 위액에 의한 미생물 사멸작용의 주요인이 HCl에 의한 낮은 pH인 것으로 밝혀졌으며<sup>(22,23)</sup>, *in vitro*의 실험 결과와 *in vivo*에서의 결과가 거의 유사하다는 것이 보고되었다<sup>(22,24)</sup>. 따라서 본 실험에서 HCl을 이용한 *in vitro*방법도 균주의 내산성을 확인하는데 충분하다고 사료된다. 또한 Hood 등<sup>(25)</sup>에 의하면, *in vitro*에서 실험한 *L. acidophilus* 균주가 pH 2.0에서 30~45분 정도 생존하는 것으로 알려졌으며, Conway 등<sup>(22)</sup>도 pH 2.5에서 10<sup>5</sup> cfu/mL 이하로 생존하는 것으로 보고하였다. 그러므로 선발균주인 *L. acidophilus* KY 2104가 pH 3.0 phosphate buffer속에서 2시간 동안 거의 100%의 생존율을 보였으며, 미생물 사멸작용이 급격하게 일어난다<sup>(26)</sup>는 pH 2.5이하에서도 서서히 사멸하였으며, pH 2.0에서 2시간 동안 10<sup>4</sup> cfu/mL 이상 생존하는 것으로 보아, *in vivo*에서도 위를 통과하여 장으로 이동할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 현재 probiotics로 사용되고 있는 균주들과 내산성을 비교한 결과, *L. acidophilus* KY 2104가 상대적으로 높은 내산성을 지니고 있기 때문에 산업적인 가능성도 클 것으로 기대된다.

담즙은 간에서 합성되어 담낭으로 옮겨져 농축된 다음, 음식물이 소장으로 들어오면 담낭에서 십이지장으로 분비하게 되며, 90% 이상은 다시 소장에서 간으로 재흡수되는 것으로 알려지고 있다. Gilliland 등<sup>(19)</sup>은, 장내에서 유래하지 않은 lactobacilli의 경우, 소 담즙(oxgall)이 0.15% 함유된 LBS배지에서는 성장하지 못하는 것을 확인하였으며, 장내에 정착할 수 있는 유산균의 선택적 배양 방법으로 oxgall 함유 배지를 사용하였다. 그리고 Khattab 등<sup>(27)</sup>은, *L. bulgaricus*, *Str. thermophilus*와 같이 장내에서 유래하지 않은 균주들

은 0.3% 이상의 담즙을 함유한 배지에서 성장하지 못한다고 보고하였다. 따라서, 본 실험에서 분리한 *L. acidophilus* KY 2104는 사람의 장내에서 유래하였으며, oxgall이 0.5% 까지 함유된 MRS배지에서도 90% 이상 성장하기 때문에(Fig. 2) 장내에서도 증식할 수 있을 것으로 기대된다.

유산균은 항생제 투여후 장내균총의 정상화와 장내 병원균의 감염 및 성장을 억제하기 위하여 사용되기도 하였다<sup>(28)</sup>. 유산균에 의한 유해균의 억제 기작으로는 bacteriocin과 같은 항생물질 생산, 대사산물(산생성, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등) 생성, 장내 상피세포의 부착장소 경쟁 등이 알려져 있다. 본 실험에서는 선발된 *L. acidophilus* KY 2104와 4종의 장내 병원성균을 각각 혼합 배양한 결과, *Shigella dysenteriae*와 *S. typhimurium*의 경우 10<sup>2</sup> cfu/mL 이하로 성장이 억제되었으며, 그 다음으로 *S. aureus*, *E. coli* 순으로 억제되었다. 위와 같은 결과는 그람양성 또는 그람음성 균에 따른 억제현상보다는 병원균 종류에 따라 유산균에 의한 성장 억제정도가 차이를 보여주었다. 그리고 배양시간에 따른 성장 억제실험은 실시하지 않았으나, 배양후 최종 pH가 4.1로 모두 동일함에도 불구하고 일정시간(16시간) 동안에 성장억제 정도가 각 병원균마다 다르다는 것으로 볼 때, 산생성에 의한 낮은 pH 이외의 다른 억제기작이 있을 것으로 추측된다. 따라서 앞으로 다른 유해세균 및 실험방법의 적용, 그리고 그에 따른 억제기작 등에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

유제품에 사용되는 유산균은 우유배지에서의 높은 증식성과 산생성 능력을 지녀야한다. *L. acidophilus* KY 2104의 경우, 우유배지에서 12시간 배양후에는 10<sup>8</sup> cfu/mL 이상 성장하였으며, 이것은 *Lactobacillus* 증식용 배지인 MRS배지에서의 증식과 거의 동일한 양상을 띤 것이다. 그리고 균의 성장에 따른 우유배지에서의 pH도 48시간 후에는 3.65까지 떨어짐으로써, 본 선발균주는 발효유 제조에 필요한 산생성 능력을 지닌 것으로 판단된다. 또한 50 nmole 이상의 높은  $\beta$ -galactosidase활성을 지닌 것으로 밝혀짐에 따라(Table 3) 우유중의 lactose에 의한 유당불내증<sup>(8,9)</sup>의 저하에 많은 도움이 될 것이다.

발암물질인 benzo(a)pyrene 등이 체내에 들어오면 간에서 glucuronic acid와 포함되어 해독작용이 이루어지지만, 이러한 물질 등이 담즙과 함께 장내에 배설된다면 장내세균이 지니고 있는  $\beta$ -glucuronidase에 의해 탈포합되면서 다시 독성을 띠게 된다<sup>(29)</sup>. 따라서 probiotics로서 사용되는 유산균들이 발암효소로 알려지고 있는  $\beta$ -glucuronidase 활성을 갖고 있다는 것은 바람직하지

못한 것이다. 그러나 본 실험에서 선발된 균주는 위와 같은 발암효소 활성을 지니지 않은 것으로 밝혀졌다.

그 밖의 특징으로, 현재 probiotics로서 사용되고 있는 *L. acidophilus*중에 plasmid를 함유하고 있는 균주도 있다고 보고되었으나<sup>(30)</sup>, *L. acidophilus* KY 2104는 plasmid가 없는 것으로 나타났다.

또한 암수 rat에 대한 *L. acidophilus* KY 2104 균주의 경구투여시, 사망동물, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에서 어떠한 이상도 관찰되지 않았으며, rat에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회할 것으로 판단된다. 따라서 *L. acidophilus* KY 2104를 함유하는 제품에 대하여 인체에서도 안전한 것이라고 사료되었다.

본 연구는 국내에서 사용될 유산균 생균제를 자체 개발 및 생산하기 위하여 한국인으로부터 유래한 *Lactobacillus* 균주들을 선발하였으며, 최종적으로 내산성, 내담즙산성, 병원성균 억제능력이 우수한 *L. acidophilus* KY 2104를 분리·동정하였으며, 그 특성을 조사하였다. 위의 결과로부터, 선발된 유산균은 유산균식품, 발효유제품, 의약품 및 동물용 생균제 등 다양한 형태의 제품개발에 이용될 수 있으며, 산업적 이용가능성도 클 것으로 사료된다.

## 요 약

유산균식품, 발효유제품, 의약품 및 동물용 생균제 등에 사용되는 유산균을 국내에서 자체 개발하기 위하여 한국인 41명(2~35세, 남자 26명, 여자 15명)의 분변으로부터 내산성, 내담즙산성 및 병원성균 억제능력이 우수한 *Lactobacillus* 균주들을 선발하였다. 최종적으로 선발한 균주를 *L. acidophilus* KY 2104로 명명하였으며, 생리적인 특성을 조사하였다. 상기 균주는 pH 3.0 완충용액에서 2시간동안 거의 100% 생존하였으며, pH 2.0에서는 초기 접종농도 10<sup>7</sup> cfu/mL에서 2시간 동안 10<sup>4</sup> cfu/mL 이상 생존하였다. 또한 선발균주는 0.5%의 담즙산에서도 정상적으로 성장하였으며, 장내에서 주로 설사를 유발하는 병원성균(*E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*)에 대하여 생육억제능력을 나타내었다. Rat에 대한 *L. acidophilus* KY 2104 균주의 급성독성시험 결과, 모든 시험군에서 사망동물은 없었으며, 임상증상, 체중변화 및 부검소견에서도 다른 이상소견이 발견되지 않았다.

## 문 헌

1. Fuller, R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl.*

- Bacteriol.*, **66**, 365-378 (1989)
2. Fuller, R.: Probiotics in human medicine. *Gut.*, **32**, 439-442 (1991)
  3. Hilton, E., Henry, D.I., Phyllis, A., Kenneth, F. and Michael, T.B.: Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann. Int. Med.*, **116**, 353-357 (1992)
  4. Takiguchi, R., Mochizuki, E., Suzuki, Y., Nakajima, I. and Benno, Y.: *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 on harmful intestinal bacteria. *J. Int. Microbiol.*, **11**, 11-17 (1997)
  5. Goldin, B.R. and Borbach, S.L.: Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer*, **40**, 2421-2426 (1977)
  6. Matsuzaki, T., Hashimoto, S. and Yokokura, T.: Effects on antitumor activity and cytokine production in the thoracic cavity by intrapleural administration of *Lactobacillus casei* in tumor-bearing mice. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.*, **185**, 157-161 (1996)
  7. Gilliland, S.E. and Walker, D.K.: Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci.*, **73**, 905-911 (1990)
  8. Kim, H.S. and Gilliland, S.E.: *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.*, **66**, 959-966 (1983)
  9. Shah, N.: *Lactobacillus acidophilus* and lactose intolerance, a review. *ASEAN Food J.*, **9**, 47-54 (1994)
  10. Salminen, S. and Salminen, E.: Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, **222**, 45-48 (1997)
  11. Lee, Y.-K. and Salminen, S.: The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 241-245 (1995)
  12. Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, **125**, 1401-1412 (1995)
  13. Tannock, G.W.: Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends. Biotechnol.*, **15**, 270-274 (1997)
  14. Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J. and Walters, J.L.: Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.*, **70**, 2063-2068 (1987)
  15. Vanbelle, M., Teller, E. and Focant, M.: Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Tierernahr.*, **40**, 543-567 (1990)
  16. Mathieu, F., Jouany, J.P., Senaud, J., Bohatier, J., Bertin, G. and Mercier, M.: The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**, 271-287 (1996)
  17. Gilliland, S.E.: Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.*, **72**, 2483-2494 (1989)
  18. Salminen, S., Laine, M., Wright, A. von, Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T.: Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a nordic and european approach. *Bioscience Microflora*, **15**, 61-67 (1996)
  19. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. *J. Food Prot.*, **40**, 760-762 (1977)
  20. Bae, H.S., Y.J. Baek, Y.K. Kim, M. Yoo, and M.Y. Park. Rapid and simple method for isolating plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 289-296 (1985)
  21. Ronald, J., Rodney, T. and Murray, B.: Manual of pharmacologic calculation with computer programs. Springer-Verlag.
  22. 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**, 1-12 (1987)
  23. Giannella, R.A., Broitman, S.A. and Zamcheck, N.: Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut*, **13**, 251-256 (1972)
  24. Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P. and Piaia, M.: *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.*, **74**, 409-413 (1991)
  25. Hood, S.K. and Zottola, E.A.: Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.*, **53**, 1514-1516 (1988)
  26. Maffei, H.V.L. and N brega, F.J.: Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. *Gut*, **16**, 719-726 (1975)
  27. Khattab, A.A. and Abou-Donia, S.A.: The effect of bile salt on the growth of some lactic acid cultures. *Egyptian J. Dairy Sci.*, **15**, 51-56 (1987)
  28. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.*, **40**, 820-823 (1977)
  29. Cole, C.B., Fuller, R. and Carter, S.M.: Effect of probiotic supplements of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* 2204 on  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human faecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **2**, 223-225 (1989)
  30. Kumar, R., Garg, S.K., Singh, D.T., Singh, S.P. and Mital, B.K.: Evidence for the presence of plasmids in four therapeutically important strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**, 188-191 (1994)