

병아리의 장에서 분리한 *Lactobacillus salivarius*의 생균제로서 특성

박홍석[†] · 이지혜 · 엄태봉*

전북대학교 축산학과
*생물과학부 및 유전공학연구소

Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* Isolated from Chicken Intestines

Hong-Suk Park[†], Ji-Hye Lee and Tai-Boong Uhm*

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

Abstract

For the isolation of probiotics which may be used for the human-beings and animals, we have screened the microorganisms from chicken intestines which have acid- and bile-tolerance and the growth inhibition of pathogenic *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. Among them, a strain which was identified as *Lactobacillus salivarius* had around 66% of survival after 2h incubation in the artificial gastric juice and 9% of survival after 24h incubation in the presence of 0.3% bile salts, and showed complete inhibition against both pathogenic *E. coli* and *Salmonella typhimurium* after 24 h coinubation. Its storage stability after lyophilization could be improved by adding polyvinylpyrrolidone.

Key words: probiotics, *Lactobacillus salivarius*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*

서 론

인간이나 동물의 장내에는 수많은 미생물 군총이 일정한 평형을 이루면서 살아가고 있는데 유해 미생물에 감염된 음식물의 섭취나 항생제의 투여에 의해 이들 미생물의 균형이 깨지면 질병을 일으키게 된다. 또한, 항생제의 남용, 오용이 미생물에 대한 내성을 증가시키고 인체 대사에 영향을 줄 수 있기 때문에 그 적용 범위 및 사용량은 더 엄격히 제한되어야 한다. 이에 따라, 미국 식품의약국(FDA)은 가축의 성장촉진용으로 항생제를 사용하지 못하도록 하였고 유럽에서는 인체에 사용하는 항생제는 가축의 성장 촉진제로 사용하는 것을 규제하고 있다. 이러한 대안으로서 유해균들에 길항적으로 작용하여 장내 균총을 정상화할 수 있고 성장의 촉진, 영양섭취 저해 인자의 제거 기능도 가지는 생균제들의 개발이 시도되고 있다(1-3). 생균제가 되기 위한 조건은 장을 통과하면서 위산과 담즙산에 잘 견디야 하고 장내에서 유해균과의 영양원에 대한 경쟁에서 우세하여야 하며 또 항균활성물질 생산함으로써 장내 우세 균총을 만들 수 있어야 한다(4-6). 우리는 이전 연구를 통하여 생균제로서 가능성이 있는 *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus*

subtilis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* 등 23여종의 기탁 및 분리 균주를 조사했고 그 결과 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bacillus polyfermenticus*가 가장 가능성이 있음을 보였다(7). 수많은 미생물들 중 생균제가 될 수 있는 미생물을 선별하는 가장 좋은 방법은 장내 미생물 중에서 분리하는 것이 바람직하다. 그 이유는 건강한 동물의 장에는 위산이나, 담즙산에 대한 저항성이 큰 것이 많고 이미 장점막에 정착하여 pH를 저하시키던 항균활성물질을 생산함으로써 해로운 균에 대한 우세 균총을 점하고 있기 때문이다. 따라서 지금까지 개발된 생균제의 대부분은 가축이나 인간의 장에서 분리된 것으로 *Lactobacillus*(1-5,7-11), *Enterococcus*(6,12), *Bifidobacterium*(1) 등의 유산균이 대부분을 차지하고 있다. 그러나, 국내에서 상품화된 생균제의 대부분은 외국수입에 의존하여 한국인의 장이나 동물의 장에 적합한 생균제의 분리 노력이 앞으로 더 필요하다고 생각된다. 본 연구에서는 인간이나 가축의 장에서 더 생존력이 강한 한국형 생균제를 개발하기 위해 건강한 병아리들의 소장으로부터 분리를 시도하였다. 그 결과 위산과 담즙산에 강하고 설사 유발 대장균과 살모넬라균에 대해 생육 억제력이 큰 한 미생물을 선별하여 생균제로서 가능성을 조사하고 동

[†]To whom all correspondence should be addressed

정하였다.

재료 및 방법

균주 분리 방법

5주령된 재래종 병아리들을 도계하여 멸균된 가위로 작은 창자의 윗부분을 약 7cm 크기로 자르고 창자 내용물을 0.9% NaCl로 충분히 세척한 뒤 다시 1cm 크기로 잘랐다. 멸균된 50ml의 MRS 배지에 자른 창자를 각각 2개씩 넣고 37°C에서 균수가 약 10^9 /ml이 되게끔 배양한 뒤 $1/10^3$ 으로 희석하여 MRS 평판 배지에 0.2ml씩 분주하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 자란 colony들 중 크고 주위 colony들로부터 잘 분리된 것들을 선택한 뒤 pH, 담즙산 저항성이 있는 균의 검색을 시행하였다.

배지 및 배양 조건

분리균의 기본 배양 배지로는 *Lactobacilli* MRS broth (이하 MRS, Difco, Detroit, USA)가 사용되었으며 대장균 배양 배지로는 Luria-Bertani medium (이하 LB)이, *Salmonella*의 계대 배양은 nutrient broth (이하 NB, Difco)를 사용하였다. 이들은 2주마다 한천 배지에서 37°C, 24시간 계대 배양하였다. 한편, 이들 균들의 장기 보존을 위하여 30% glycerol과 균 배양액을 1:1로 섞은 후 -70°C에서 냉동 보관을 하였다. 이때 배지조제에 이용된 다른 시약들은 미생물 배지용이나 일급시약을 사용하였다.

대장균과 *Salmonella* 억제 실험에는 소나 돼지에서 설사를 유발하는 *E. coli* KCTC 2618 (Serotype O8: K85: K99)과 *Salmonella typhimurium* KCTC 2514가 각각 사용되었다.

생균수

MRS 배지에서 37°C, 24시간 정치 배양한 뒤 0.1ml의 배양액을 꺼내 4.9ml의 0.85% NaCl이 든 시험관에 넣고 잘 섞은 후 동일한 NaCl이 든 다른 시험관들에서 차례로 연속 희석(희석 배수; 1/50)한 뒤, 각각 0.1ml을 꺼내 petri-dish에 도포한 다음 24~48시간 후 생균수를 측정하였다. 배양 후 나타난 균락수를 계수한 후 희석 배수를 곱하여 균 수를 측정하였다. 대장균 생균수 측정을 위하여 *E. coli* 용 petrifilm plate (3M, St. Paul, USA)가 사용되었고 *Salmonella* 생균수 측정을 위하여 *Salmonella* 선택 배지인 Bismuth-sulfite agar (이하 BS agar, Difco)가 사용되었다.

인공 위액과 담즙산 배지의 조제 및 저항성 균주의 선별

산성 pH에 대한 내성 실험은 생체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 Kobayashi 등의 방법(8)

에 의해 1 N HCl로 pH 3.0으로 조정된 펩신(Sigma, St. Louis, USA) 함유 MRS 배지(1,000U pepsin/ml MRS)를 사용하였으며, 담즙산 내성검사를 위하여 0.3% 돼지 담즙산(Sigma)을 MRS에 첨가하였다(7). 96-well의 microplate (Corning, Corning, USA)에 pH 3.0으로 조절된 MRS 배지 200μl를 각 well에 첨가한 뒤 colony들을 멸균 이쑤시게로 떠서 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 각 well의 혼탁도가 가장 높은 것 3~4개를 뽑아 산 저항 균주들로 1차 분류하였고 이들을 MRS 평판 배지에 각각 접종하였다. 담즙산 저항 균주를 선별하기 위하여 이들 산 저항 균주들을 담즙산이 0.3% 첨가된 MRS 배지에 접종하고 24시간 배양 후 well에서 잘 자란 균주만을 선별하였다. 여기서 선별된 균주들의 산 및 담즙산 저항 능력을 다시 확인하기 위하여 microplate 하나에서는 산 저항 실험, 다른 microplate에서는 담즙산 저항 실험을 동시에 실시하여 두 실험 모두 만족시킨 균주 16개를 선별하였다.

대장균 및 *Salmonella* 균 억제 능력의 비교

산과 담즙산에 저항을 가진 이들 16개 균을 각각 MRS 배지에, *E. coli* O8을 LB 배지에 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 새 MRS 10ml에 대장균 1ml(약 3×10^8 /ml)과, 분리균들을 각각 1ml(약 3×10^8 /ml)씩 넣고 24시간 37°C에서 혼합 배양한 후 0.1ml을 꺼내 적당히 희석하였다. 이를 petrifilm에 도포하여 37도에서 24시간 배양한 뒤 자란 균수를 측정하였다. 대조 실험으로는 대장균 1ml만을 MRS 배지에 넣어 같은 조건에서 배양 후 희석하여 petrifilm에 접종하였다. *Salmonella* 균의 억제 능력 실험은 대장균 실험과 같이, 동량의 균(약 3×10^8 /ml)을 새 MRS 배지에 넣고 혼합 배양 하여 0.1ml을 꺼내 희석하고 이를 BS agar에서 37°C로 24시간 배양 후 균수를 측정하였다. 이때, 대조실험으로 *Salmonella* 균 1 ml만을 MRS 배지에서 키운 뒤 희석된 배양액 0.1ml을 취해 희석하고 BS agar에서 같은 조건으로 균수를 측정하였다. 이들 16균들 중 대장균 및 *Salmonella*의 생육 억제력이 가장 좋았던 한 균주를 선별하였고 이를 B4로 명명하였다.

균주의 동정

분리된 미생물은 MRS agar 배지로 37°C에서 48시간 배양 후 균주의 동정을 위하여 API 50 CHL strip (bioMérieux, France) 검사와 gas chromatography를 이용한 FAME (fatty acid methyl esters) 분석을 하였다. API strip kit에서 배양 후 동정 결과는 API Lab Plus Software 중 API 50 CHL (version 4.0)에서 검색을 함으로서 얻어졌다. 지방산 분석 기기는 MIDI system (Newark, USA)으로 지방산 분석을 위한 Ultra-2 methyl phenyl capillary column

과 균 동정용 Sherlock System software(version 2.11)를 사용하였다. 균주의 동정은 동정 data library에 저장된 균주의 지방산 조성 특성에 가장 근사하게 일치하는 것을 찾음으로서 얻어졌다. 현미경의 형태학적 검사는 Olympus 사진현미경(Tokyo, Japan)을 이용하였으며 Gram stain은 Murray 등(13)의 방법에 따라 수행되었다.

균의 저장 안정성

B4균을 대량 배양하기 위해 5L 발효조에서 400rpm으로 1 vvm의 통기하에 37°C에서 24시간 배양한 뒤 원심분리하여 회수한 세포를 -70°C에서 냉동한 후 동결 건조시켰다. 이 균체 분말은 저장 안정성 실험을 위하여 22°C의 온도에서 20일간 보존 후 균수 측정 방법에 따라 생균수를 측정하였다. 저장 안정성은 저장에 들어갈 때의 생균수와 저장이 끝난 후 생균수를 비교함으로써 얻어졌다.

결과 및 고찰

균주의 분리

생균제의 효과적 선별을 위하여 닭장으로부터 얻은 균들로부터 생균제로서 필수 조건인 내산성, 내 담즙산, 유해균 억제능력들을 조사하였다. 조사과정 중, 닭장에서 서식하는 수 많은 미생물 중 내산, 내담즙산, 유해균 억제 능력이 있는 균주들은 각각 많이 존재하였지만, 동시에 만족시킬 수 있는 균들은 대단히 한정되어 있다는 것을 알 수 있었다. 닭장 현탁액을 분리원으로 하여 pH 3과 0.3% 담즙산으로 조절된 MRS 선택 배지에서 일차적으로 약 20,000여개의 콜로니를 얻었다. 이들 콜로니들 중 비교적 크며 잘 분리되어 있는 것으로 198개를 선별하였는데 이들은 직경은 약 0.5~1.0mm의 크기로 열은 흰색을 보이는 것이 많았다. 산과 담즙산의 저항성이 동시에 강하며 혼합 배양시 대장균 및 *Salmonella* 억제 능력이 가장 좋은 한 균주를 분리하였다. B4로 명명된 이균의 콜로니는 열은 크림색을 띄었으며 MRS에서 액체 배양시 시큼한 냄새가 났다. 비교적으로, 돼지장에서 한 생균제로서 분리했던 *L. salivarius*는 같은 균류임에도 불구하고 내담즙산 능력이 B4에 비해 큰 반면, 내산성은 더 떨어졌었다. 이러한 결과들로부터 같은 종, 같은 속으로 동정되었더라도 생균제로서 균주 특성은 각각 다르다는 것을 보여주었다.

내산성 실험

B4의 내산성 특성을 알아보기 위하여 24시간 MRS 배지에서 배양후 배양액 1ml을 pH가 3으로 조정된 인공위액 함유 MRS 배지 9ml에 넣은 뒤 2시간 동안 내산성 실험을 하였다. Fig. 1과 같이 시간에 따라 균수는 조금씩 감소하여 1시간 후에는 약 87%의 생존률, 2시간 후에는 처음

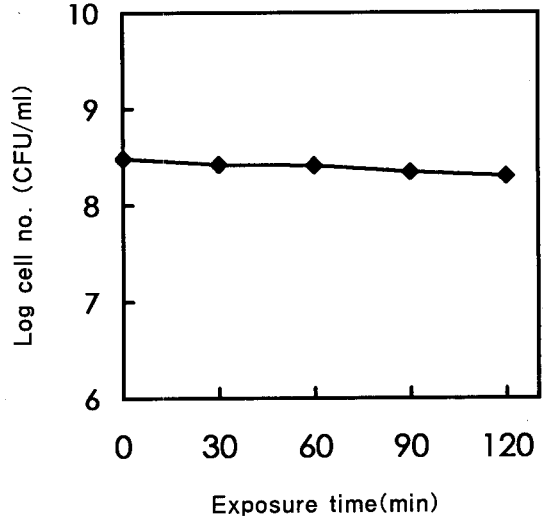


Fig. 1. Viability of B4 under the exposure of artificial gastric juice-containing MRS medium(pH 3.0).

균수의 67%로 줄어들었다. 이러한 결과는 같은 조건에서 높은 내산성을 가진 것으로 알려진 *L. acidophilus*(7)나 *Ent. faecium*(12)의 생존률 60~90%와 비교될 수 있음을 보였다. 음식물의 섭취량이나 종류에 따라 달라지지만 위를 통과하는데 2~3시간이 걸리고 위산의 pH가 2~3으로 희석되는 점을 고려할 때, 실제 장에 도달될 때까지 생존률은 높은 값을 유지할 것으로 추정된다. 일반적으로 생성된 유산은 비해리 상태로 세포내로 들어가 세포내 더 높은 pH 용액에서 해리되면서 세포내 pH를 변화시킨다. 배양액과 세포내 pH 차이가 크면 클수록 미생물은 세포의 pH 항상성(homeostasis)를 유지시키기 위하여 H⁺-ATPase를 가동시키고 따라서 더 많은 ATP를 소모해야 한다. B4의 산저항 능력이 다른 미생물에 비해 큰 것을 고려해 볼 때 B4의 세포내 pH가 약산성에서 잘 자라는 다른 미생물에 비해 상당히 낮을 것으로 추정되었다. 높은 산성에서도 견딜 수 있는 *L. plantarum*의 경우 세포내 pH는 다른 내산성 균주보다 낮은 4.6~4.8(5)로 알려져 있고 이렇게 낮은 값은 외부와 내부 pH차이를 줄임으로써 산에 대한 더 높은 생존력을 나타낼 수 있다.

내담즙산 실험

MRS배지에서 24시간 배양된 B4를 희석한 다음 담즙산이 0~0.3% 함유된 MRS평판 배지에 도말하여 24시간 후 살아있는 균수는 Fig. 2와 같았다. 이 기간 동안 0.1% 담즙산의 존재하의 생존률은 50%였던 반면 0.3%의 담즙산에서는 9%의 생존률을 보여 농도에 따라 감소되는 경향을 보였다. 생균제의 검사를 위해 조사했던 *Lactobacillus acidophilus*(7)의 특성과 비교해 볼 때, B4는 내산성에 있어 비슷하였으나 내담즙산 능력은 훨씬 좋았다. 한편, 생

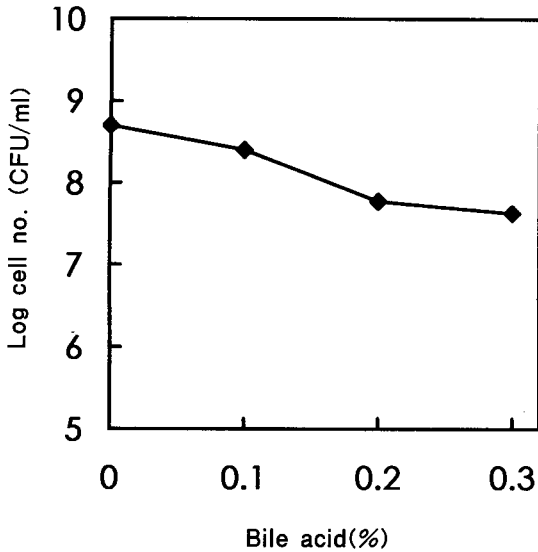


Fig. 2. Viability of B4 in the MRS media with different concentration of bile salts.

균제라도 *L. bulgaricus* 및 *L. lactis*는 담즙에 매우 민감해 0.05%의 농도에서도 저해 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(2). 담즙산의 장내 농도는 음식물의 성분이나 섭취량에 따라 대단히 변화하므로 정해진 값이 없다. 하지만, 상기 실험과 같은 조건하에서 선별된 담즙 저항성 *L. acidophilus*들은 실제 송아지 소장의 상부에 서식하는 것과 같은 종류라는 결과(14)로부터 0.3%의 담즙산을 사용하는 것은 내담즙산 실험으로서 의미있는 농도로 생각되었다. 이러한 농도에서 선별된 균주들만이 계속 장으로 유입되는 담즙(40kg의 돼지인 경우 하루 약 2L) 존재하의 장에서 정착하여 살아갈 수 있을 것이다.

대장균 억제 능력

실사 유발 대장균과 혼합 배양시 B4가 대장균의 성장을 얼마나 억제하는지 MRS에서 배양 시간에 따라, 대장균과 B4의 균수를 조사하였다. 혼합 배양을 시작한 후 8시간, 12시간이 지난 후 대장균수는 각각 약 49%, 1.2%로 감소하였다(Fig. 3). 한편, 같은 시간 동안 같은 종류의 배지에서 대장균만 단독 배양한 것은 균수가 약 15배 증가한 것으로 보아 12시간 혼합 배양동안 B4가 이미 대장균의 성장을 크게 억제하는 것으로 보인다. 혼합 배양 후 24시간 경과 후에는 생존한 대장균은 더 이상 보이지 않았다. 한편, 생균제의 선별을 위하여 돼지장으로부터 분리된 한 *Ent. faecium*은 대장균과 혼합배양시 24시간에 완전히 억제한다는 것이 보고되어 있다(12). 유산균의 유해세균 억제 능력은 유산 생성으로 인한 pH 강하, 유해균과 경쟁적인 영양성분의 소비, 산화 환원 전위의 감소, 호기적 상태에서 과산화수소수의 생성, 항균활성 물질의 분비 등으로 알려져 있다(2). 최근 사람의 장에서 분리된 *L.*

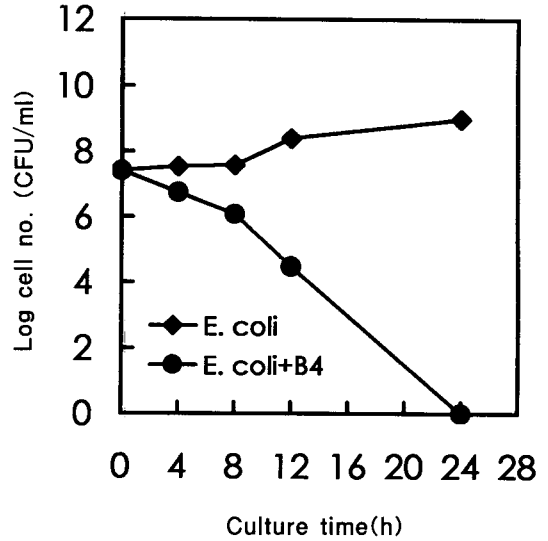


Fig. 3. Growth inhibition of *E. coli* by B4 in MRS broth.

*salivarius*의 한 단백질 성분은 *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*의 생육을 억제하지만 많은 *Lactobacilli*의 생육은 억제하지 않는다고 보고되었다(10,15). 이러한 점을 고려할 때 B4의 대장균 억제능력이 복합적인 것으로 추정되지만 혼합 배양 후 pH가 6.5에서 4.3 정도로 떨어지는 것으로 보아 pH에 의한 억제능력도 있는 것 같다. 이와 함께 앞으로 동물의 사료에 B4를 투여하여 이들 유해균의 억제능력을 조사하는 것이 필요할 것이다.

Salmonella 억제 능력

혼합 배양시 B4가 *Salmonella*의 증식을 얼마나 억제하는지를 관찰하기 위하여 배양 시간에 따른 *Salmonella*와 B4의 균수 변화를 조사하였다. 그 결과, 4시간, 8시간 경과후 *Salmonella*의 생존률은 각각, 67%와 35%를 나타냈으며, 12시간 후에는 더 이상의 *Salmonella*가 검출되지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 *Salmonella*의 빠른 증식속도를 고려할 때 이미 혼합 배양의 초기에 B4는 *Salmonella*의 생육을 억제하기 시작하는 것으로 보이며 이러한 특성은 생균제로서 매우 잠재적 가능성을 가진 것으로 평가되었다. 비슷한 예로 일부 *Lactobacilli*가 내는 acidolin, acidophilin, bulgarican, reuterin은 *Salmonella*를 포함하는 병원성 그람 양성 및 그람 음성균에 생육저지 효과가 있다는 것이 밝혀져 있다(2). 혼합 배양시 배지의 pH가 감소되는 점, B4의 매우 빠른 증식 속도, 아마도 항균 활성 물질의 분비가 복합적으로 작용하면서 배양 초기부터 *Salmonella*균을 저해하는 것으로 생각되었다.

균의 동정

이 균의 현미경에 의한 형태학적 특성은 MRS 배지에

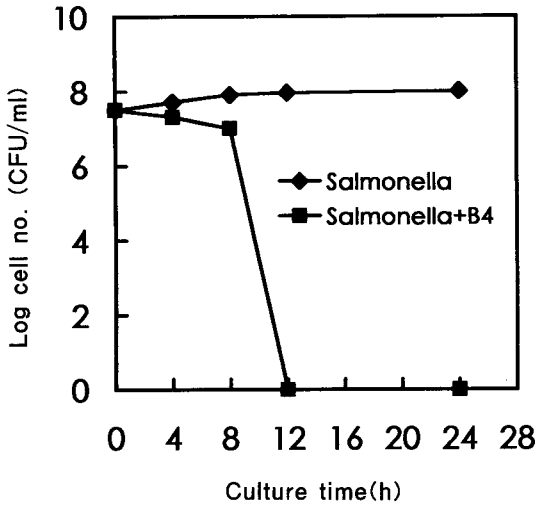


Fig. 4. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by B4 in MRS medium.

서 유산균 특징인 비운동성과 길다란 간균 모양을 나타냈으며, Gram양성이었으나 포자는 형성하지 않았다. API 50 CHL(version 4.0) kit 및 API Lab Plus 동정 프로그램에 의한 동정(Table 1) 결과는 신뢰도 99.9%로 *Lactobacillus salivarius*로 확인되었다. 한편, 세포 지방산 정성 분석(Table 1)과 동정 library에서 검색 결과는 API 검사에서와 같이 *L. salivarius*로 동정되었는데 *L. salivarius*

*var. salicinius*일 가능성이 가장 높았고 다음으로 *L. salivarius var. salivarius*였으나 더 정확한 균의 동정을 위하여 16s rRNA의 분석이 요구된다. 병아리 장내의 내산, 내담즙성이 가장 큰 균주의 선별에서 일반적으로 잘 알려진 정상 유산균들인 *L. acidophilus*, *L. bulgaris*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* 등이 아닌 *L. salivarius*로 동정된 것은 흥미로운 사실이었다. 최근 *L. salivarius*는 *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 등의 병원성 미생물에 효과가 있다는 것이 보고되면서 그 작용 기작이 활발히 조사되고 있다(10,11). 장내 존재하는 수많은 미생물 종류 가운데 이 균이 최종적으로 선별된 것으로 보아 앞으로 생균제로서 *L. salivarius*의 이용 가능성은 크다고 생각된다. Table 1에 나타난 바와 같이 이 균은 *L. salivarius*의 고유한 생화학적 발효특성인 glucose, fructose, galactose, sorbitol, mannitol과 같은 6탄당 및 그 환원당, lactose, sucrose, trehalose와 같은 일부 이당류, raffinose, N-acetylglucosamine만을 선택적으로 이용함을 보였다. 지방산 구성 성분은 *L. salivarius*의 고유한 지방산 특징인 cis- Δ^9 -octadecenoic acid(C18:1, cis 9(ω 9))가 38.91%, 포화 지방산인 hexadecanoic acid(n-16:0)가 26.95%로 이루어져 있었으며, 미량으로 C15:0 iso 2OH/C16:1w7c와 C18:0이 각각, 1.55%와 2.07%를 함유하고 있었다. 한편, 이균의 내산성 생존률은 50% 이상으로 *L. acidophilus*(7)만큼 높았으나 보통 내산성 인자

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of B4 isolated from chicken intestines

1. General characteristics

Morphology	Long rod with frequently bent shape
Gram staining	Positive
Spore	None

2. Utilization of carbohydrates and related carbon compounds

Glycerol ¹⁾	Erythritol-	D-Arabinose-	L-Arabinose-	Ribose-	D-Xylose-
L-Xylose-	Adonitol-	β -Methyl-D-xyloside-		Galactose+	Glucose+
Fructose+	Mannose+	Sorbose-	Rhamnose-	Dulcitol-	Inositol-
Mannitol+	Sorbitol+	α -Methyl-D-mannoside-		α -Methyl-D-glucoside-	
N-Acetylglucosamine+		Amygdalin-	Arbutin-	Esculin-	Salicin-
Cellobiose-	Maltose-	Lactose+	Melibiose+	Sucrose+	Trehalose+
Inulin-	Melezitose-	Raffinose+	Starch-	Glycogen-	Xylitol-
Gentiobiose-	D-Turanose-	D-Lyxose-	D-Tagatose-	D-Fucose-	L-Fucose-
D-Arabitol-	L-Arabitol-	Gluconate-	2-Ketogluconate-	5-Ketogluconate-	

3. Cellular fatty acid profile

Fatty acid	Contents (%)
14:0	6.91
16:1 w7c/15 iso 2OH	3.21
15:0 iso 2OH/16:1w7c	1.55
16:0	26.95
18:1 w9c	38.91
18:1 w9c/w12t/w7c	11.25
18:0	2.07
19:0 cyclo w10c/un	9.16

¹⁾ +: positive, -: negative

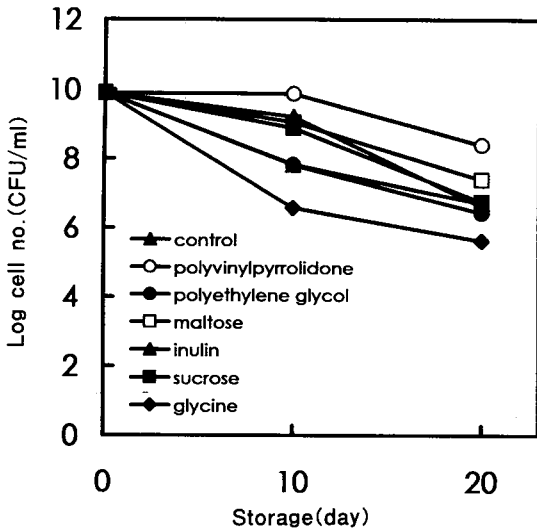


Fig. 5. Effect of additives on the viability of B4 after 10 and 20 days of storage at 22°C.

(9)로 고려되는 세포막 11,12-methylene hexadecanoic acid(C_{19:0 cyclo})의 함량은 37°C에서 48시간 배양시 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*의 35~39%보다 훨씬 낮은 약 9%를 나타냈는데 그 이유는 확실하지 않다.

분말화 및 보관 안정성

총배양액 10L로부터 냉동 건조 분말로 21.3g을 얻었으며 생존균수는 1.4×10^{10} CFU/g이었다. 따라서, 냉동 건조 조건의 생존수(1.5×10^9 CFU/ml)에 대한 건조 후의 생존 비율은 약 2% 값을 보였다. 상온 보관에 따른 균의 생존률이 여러 안정제의 첨가에 따라 조사되었다. 사용된 첨가제중 가장 생존률이 높았던 것은 냉동 건조조건 농도가 10%(w/v)가 되게끔 polyvinylpyrrolidone을 첨가한 것으로, 20일 보관 약 3% 생존률을 보였다(Fig. 5). 그러나, polyethylene glycol 4,000, maltose, inulin, sucrose, glycine의 첨가에서는 무첨가군과 비슷하게 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 정도로 그 생존률이 크게 감소하였다. 이 결과들로부터 B4균의 효율적 보관을 위하여는 분산제나 포도주의 청징제로 주로 사용되는 polyvinylpyrrolidone의 첨가가 효과적으로 생각된다. 생균제로서 이균의 문제는 보전 방법이었으며 동결 건조 후 생존률이 떨어지는 이유는 확실하지 않으나 건조 과정에서 pH 감소에 의한 세포막의 손상이나 MRS배지에 첨가된 Tween 80의 농축 때문일 수도 있다. 따라서, 현재의 안정성을 높이기 위해서 배양 방법, 동결건조 보호제, 보관 방법에 대한 연구가 더 필요하리라 생각되며 현재 이에 대한 연구가 진행되고 있다.

요 약

사람이나 동물에 유해한 것으로 알려진 설사 유발 대

장균과 *Salmonella*를 억제하기 위하여 닭의 장으로부터 생균제로서 능력을 가진 미생물들을 분리 검색하였다. 이들 중, 위산과 담즙에 잘 견디며, 대장균 및 *Salmonella*에 대한 억제 능력이 뛰어난 한 미생물을 분리하였는데 *Lactobacillus salivarius*로서 동정되었다. 이 미생물은 pH 3의 위산에서 2시간 배양 후 67%의 생존률, 0.3% 담즙산에서는 24시간 배양 후 9%의 생존률을 나타냈다. 이 균을 설사 유발 대장균과 MRS배지에서 혼합 배양시 12시간 안에 이 유해균을 약 1%로 감소시켰고 24시간 후에는 완전히 제거할 수 있었다. 한편, *Salmonella*를 같은 조건에서 혼합 배양시에는 12시간만에 이 유해균이 완전히 사라짐을 관찰할 수 있었다. 앞으로 균주 보존 조건을 확립하고, 동물 실험에서도 유사한 결과를 얻을 수 있다면 이 분리균은 생균제로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림기술개발연구사업의 연구 결과입니다.

문 헌

1. Park, S. Y., Ko, Y. T., Jeong, H. K., Yang, J. O., Chung, H. S., Kim, Y. B. and Ji, G. E. : Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid, bile and antibiotics. *Korean J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, **24**, 304-310(1996)
2. Havenaar, R., Brink, B. T. and Veld, J. H. : Selection of strains for probiotic use. In "Probiotics" Fuller, R.(ed.), Chapman & Hall, New York, pp.209-224(1992)
3. Park, H. S., Yoo, Y. H., Jeon, B. S. and Cha, J. O. : Effect of feeding viable yeast and *Lactobacillus* on milk yield and milk fat content. *Korean J. Anim. Sci.*, **38**, 77-84 (1996)
4. 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)
5. McDonald, L. C., Flemming, H. P. and Hassan, H. M. : Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2120-2124(1990)
6. 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**, 2227-2232(1982)
7. Park, H. S., Lee, S. H. and Uhm, T. B. : Selection microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 433-440(1998)
8. 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**, 691-697(1974)
9. Sim, J. H., Kim, S. K., Baek, Y. J., Oh, T. K. and Yang, H. C. : Influence of culture conditions on acid tolerance

- of *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 17-23(1995)
10. Arihara, K., Ogiwara, S., Mukai, T., Itoh, M. and Kondo, Y. : Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 active against pathogenic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **22**, 420-424(1996)
 11. Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M., Takagi, A. and Koga, Y. : Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, **93**, 2097-2101(1998)
 12. Park, C. J., Pyeon, J. S., Cho, Y. K., Hong, S. S. and Lee, H. S. : Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from animal intestine and its powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 393-398(1996)
 13. Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robinow, C. F. : Determinative and cytosolical light microscopy. In "Methods for general and molecular bacteriology" Gerhardt, P.(ed.), ASM, Washington, p.31(1994)
 14. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. : Importance of bile tolerance of *Lactobacillus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, **67**, 3045-3051(1984)
 15. Collins, J. K., Hill, S. and O'Sullivan, G. C. : Probiotic strains from *Lactobacillus salivarius* and antimicrobial agents obtained therefrom. International Patent Application no. PCT/IE98/00010(1998)

(1999년 3월 26일 접수)