

## 유아용 생균제 개발을 위한 *Bifidobacterium* spp.의 선발

양현주 · 장금일 · 김정호<sup>1</sup> · 이윤복<sup>2</sup> · 손현수<sup>2</sup> · 김광엽\*

충북대학교 식품공학과 및 생물건강산업개발연구센터, <sup>1</sup>서원대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>(주)정식품 중앙연구소

### Screening of *Bifidobacterium* spp. for the Development of Infant Probiotics

Hyun-Ju Yang, Keum-Il Jang, Chung-Ho Kim<sup>1</sup>, Yoon-Bok Lee<sup>2</sup>,  
Heon-Soo Sohn<sup>2</sup>, and Kwang-Yup Kim\*

Department of Food Science and Technology and the Research Center for Bioresource and Health,  
Chungbuk University

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Seowon University

<sup>2</sup>Central Research Institute, Dr. Chung's Food Company, Ltd.

*Bifidobacterium* spp. exhibits the highest number of counts among species of microflora in breast-feeding infant intestines and has been used as probiotics. From infant groups with different diets, 42 *Bifidobacterium* strains were isolated by selective plate, Gram-staining, and morphology using method of Mitsuoka, among which seven isolates were identified as *Bifidobacterium* spp. by F6PPK test, MIDI, and PCR. *B. bifidum* PBH-30, selected for development of probiotics, showed high resistance against low pH and oxgall treatment, and inhibition against pathogens such as *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *B. bifidum* PBH-30 could be applicable to dairy products as probiotic strains due to its excellent growth in raw milk.

**Key words:** *Bifidobacterium*, infant, screening, microflora, probiotics

## 서 론

생균제란 숙주의 장내 미생물 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다(1). 또한, 생균제는 사람의 장내 균총을 안정화하고, 병원성균의 성장을 저해하며, 콜레스테롤을 낮추고, 암을 예방하며, 유당불내증을 감소시키는 것으로 알려져 있다(2-9). 생균제로는 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 등과 같은 유산균들이 주로 사용되고 있으며, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, 효모 등이 동물용 생균제로 이용되고 있다(10-12).

*Bifidobacterium*속은 그람양성의 무포자 간균으로서, 절대혐기 균이며, 비운동성이고 V자 또는 Y자, 곤봉형 등의 다양한 세포 형태를 지니고 있다. 이러한 *Bifidobacterium*속은 1899년 Tissier에 의해 모유 영양아의 분변에서 최초로 발견되었고, *Lactobacillus*속과는 달리 당을 분해하여 초산과 젖산을 2:1의 비율로만 생산하는 이상발효균으로 알려져 있다. 또한, *Bifido-*

*bacterium*속은 fructose-6-phosphate phosphoketolase라는 특수한 효소를 가지고 있는데, 이 효소는 fructose-6-phosphate를 erythrose-4-phosphate와 acetyl phosphate로 분해할 수 있기 때문에 다른 유산균과의 구분을 짓는 중요한 효소로서 *Bifidobacterium*속을 동정하는 데 이용되고 있는 실정이다(13).

Mitsuoka 등(14)은 *Bifidobacterium*속이 모유 수유아의 장내 최우점종으로 존재한다고 보고하였으며, 유아의 분변 중 10<sup>10</sup> cfu/g 이상의 수준으로 존재하는 것이 확인되었다. 1949년 Mayer가 비피더스균을 이용하여 최초로 유아식품 제조에 이용한 것을 시두로 하여 다양한 연구가 진행되고 있는데, 최근 국내에서도 Shin 등(10)이 *Bifidobacterium*를 한국인의 분변으로부터 분리하는 등 생균제용으로 *Bifidobacterium*을 이용하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나, 주로 분리 대상이 정해져 있지 않고 광범위하게 연구되어, 유아용 생균제로 적용하는 데 어려움이 있는 실정이다.

일반적으로 성인의 장내 세균총은 유아시절에 형성된 장내 세균총이 유지되어 형성되는 것으로 알려져 있기 때문에, 초기 유아의 장내 세균총 형성은 매우 중요하다고 볼 수 있다. 따라서 유아용 생균제는 초기 유아의 장내 세균총을 형성하는데 많은 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라, 유아가 성장함에 있어서 유익한 세균총의 유지 및 유익한 세균총으로의 변화를 유도하여 최종적으로 성인의 장내 세균총에게도 영향을 줄 수 있다. 이러한 생균제는 유아의 생육과 건강에 도움이 될 수 있는 요

\*Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Department of Food Science and Technology and the Research Center for Bioresource and Health, Chungbuk University, 48 Gaesin-dong, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea  
Tel: 82-43-261-2568  
Fax: 82-43-271-4412  
E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr

구르트와 치즈제품에 이용될 뿐만 아니라, *Bifidobacterium*속이 첨가된 분유, 아이스크림 등의 다양한 식품에 적용될 수 있어 그 가치가 매우 중요시되고 있는 실정이다.

유아용 생균제를 개발하기 위해서는 유아에서 직접 분리하는 것이 가장 효과적이라고 볼 수 있으며, 또한 유아의 장내에 최우점종으로 존재하는 *Bifidobacterium*속을 이용하는 것이 유아용 생균제로 이용하고자 하는 면에서도 적합하다고 볼 수 있다. 따라서 본 실험은 중복에 거주하고 있는 모유, 분유, 두유 수유아로부터 내산성, 내담즙성 및 효소활성 등의 생균제 특성이 우수한 *Bifidobacterium*균을 선발하고, 이를 제품화하기 위한 첫 단계로서 분리 균주의 생육특성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 실험에 사용된 균주로 유아로부터 선별된 균주를 제외한 모든 균주는 한국유전자은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 공시균주로 *B. longum* KCTC 3421는 BL 배지(Difco, USA)에서, *Salmonella typhimurium* KCTC 2515와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916는 TSB 배지(trypticase soy broth, Difco, USA)에서 각각 일주일마다 계대하여 사용하였다.

### 사용 배지

*Bifidobacterium*속의 선택배지로는 기본배지로 사용된 BL 배지에 리터 당 sodium propionate(Junsei, Japan) 30 g, paromomycin(Sigma, USA) 100 mg, neomycin(Sigma, USA) 400 mg, lithium chloride(ACROS, USA) 6 g을 첨가하여 만든 BS 배지(*Bifidobacterium* selective agar)를 사용하였고(15), 증균배지로는 TPY 배지(trypticase pytone yeast extract medium, Difco, USA)가 사용되었는데, Bergey's manual에서 제시하는 조성대로 조제하여 사용하였다(13).

### 분변시료의 수집 및 처리

1세 미만의 모유수유아, 분유수유아, 두유수유아 각각 10명, 5명, 5명의 분변을 충북대학교 병원을 통하여 수집하였고, 수집 직후에는 수송배지(BHI broth(Difco, USA) 37 g, yeast extract(Difco, USA) 5 g, agar, Difco, USA) 0.7 g, 0.1% resazurin solution(Sigma, USA) 1 mL, 0.1% hemin solution(Sigma, USA) 5 mL, D.W. 1 L)에 취하여 즉시 운반하였다. 운반된 분변 1 g을 혐기희석액( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Shinyo, Japan) 4.5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (TEDIA, USA) 6 g, L-cystein · HCl(Sigma, USA) 0.5 g, Tween 80(Junsei, Japan) 0.5 g, agar 1 g, D.W. 1 L)에 십진 희석한 후 BS 평판배지에 도말하여 anaerobic jar( $\text{N}_2$ : 85%,  $\text{CO}_2$ : 10%,  $\text{H}_2$ : 5%, Mart, Holland)에서 37°C, 48시간 배양하였다. BS 평판배지에서 brown-colony, gram positive, V자 또는 Y자 모양의 morphology를 나타내면 *Bifidobacterium* 균으로 분리하였다(13,15).

### 효소활성 시험(Fructose-6-phosphate phosphoketolase test, F6PPK)

F6PPK test에 사용된 시약과 방법은 Scardovi의 Bergey's manual(13)의 방법에 의하여, TPY 액체배지에 균체를 접종한 다음, 37°C에서 48시간 배양한 후 배양액 10 mL를 12,000 rpm, 4°C, 15 분간 원심분리하여 배양액을 버리고, phosphate buffer solution (PBS)을 넣고 다시 현탁시킨 다음 원심분리하는 과정을 2회 반

복하여 수세하였다. Fructose-6-phosphate phosphoketolase는 extra-cellular enzyme이기 때문에 mini-bead beater(5,000 rpm, 4°C, 15 min, Biospec, USA)에 의해 세포를 파괴한 후, sodium fluoride( $\text{NaF}$ , 3 mg/mL, Sigma, USA)와 sodium iodoacetate(5 mg/mL, Sigma, USA)를 첨가한 다음 기질로서 sodium fructose-6-phosphate(80 mg/mL, Sigma, USA) 0.25 mL를 첨가하고, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 1.5 mL hydroxylamine · HCl(13 g/100 mL, Sigma, USA)을 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 다음 Trichloroacetic acid(Merck, USA), 4 N HCl ferric chloride( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5% w/v in 0.1 N HCl, Wako, Japan)을 각각 1 mL을 넣고 잘 섞은 후 색의 변화를 관찰하여, 적자색을 보이는 것은 F6PPK test 양성, 연노란색은 음성으로 판별하였다.

### MIDI를 이용한 미생물 신속 동정

MIDI(Sherlock microbial identification system, MIDI, Inc., HP 6890 Series GC System, USA)는 균체의 지방산 조성을 분석하여, 미생물을 신속하게 동정하는 장치이다. 분리된 균주를 PYG-Tween broth에 접종하여 2회 계대배양 시킨 후 8,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액은 버리고,  $\text{MgSO}_4$ (Sigma, St. Louis, USA)를 3 mL 첨가하여 다시 원심분리 하였다. 이때 회수된 pellet은 saponification, methylation, extraction 및 washing의 4단계를 거쳐 세포막 지방산을 추출한 다음 MIDI를 통하여 동정하였다.

### PCR을 이용한 균주의 동정

TPY broth에 배양한 균주 1 mL를 원심분리(15,000 rpm, 1 min, Vision, Korea)하고, 상등액은 버리고, 멸균증류수 100 L 첨가하여 100°C에서 10분간 끓여서 DNA를 용출시켰다. 이를 12,000 rpm에서 2분 동안 원심분리하고 상등액을 target DNA로 이용하였다. Kok(16)의 방법에 따라 genus specific PCR primer로 Bif164와 Bif662(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였고 Table 1에 나타내었다. PCR 반응을 하기 위한 조성으로 target DNA 4 L, 10X reaction buffer 2.5 L, 20 mmol  $\text{MgCl}_2$  1 L, 각각의 100 pmol primer 1 L, 200 pmol dNTP 1 L, Taq DNA polymerase 0.5 L, D.W. 14 L를 첨가하였다. PCR(Bio-Rad, Hercules, USA) 조건은 95°C에서 5분간 방치한 다음 95 1분, 60°C 45초, 72°C 1분 과정을 35회 반복하여하였고, 마지막으로 72°C 10분 동안 방치하였다. PCR 산물은 2% agarose (SeaKem LE, BMA) gel에서 전기영동을 하여 523 bp에서 band가 나타나는 것으로 *Bifidobacterium* 균을 확인하였다.

### 분리균주의 내산성 · 내담즙성 특성 조사

내산성 실험은 TPY broth를 4N HCl로 pH 2.5로 조정 한 다음 분리 균주를 접종하여 37°C에서 15시간동안 혐기적으로 배양하면서 5시간 간격으로 TPY 평판배지에 도말하여 생육여부를 확인하였다. 그리고 내담즙성 실험은 분리 균주를 0.3% oxgall(Sigma, St. Louis, USA)이 첨가된 TPY broth에 접종하여 37°C에서 15시간동안 혐기적으로 배양하면서 5시간 간격으로 TPY 평판배지에 도말하여 생육여부를 확인하였다.

### 병원성 미생물의 생육억제 특성 조사

분리 균주와 병원성균은 각각 TPY broth와 LB broth(Difco, Detroit, USA)에 접종한 다음, 37°C에서 각각 49시간, 24시간 동안 배양하였다. 배양된 분리 균주와 병원성균을 새로운 TPY broth에 함께 접종하여 37°C에서 24시간 동안 혐기배양하면서

**Table 1. Primers used to amplify the target 16S rRNA of *Bifidobacterium* spp.**

Primer	Sequence (5' → 3')	Position <sup>1)</sup>	Size	Td <sup>2)</sup> (°C)
Bif164	GGGTGGTAATGCCGGATG	164-181	523 bp	60.2
Bif662	CCACCGTTACACCGGGAA	662-679		

<sup>1)</sup>Nucleotide numbering based on the *Escherichia coli* 16S rRNA sequence.

<sup>2)</sup>Theoretical dissociation temperature, based on the formula  $Td = 81.5 + 16.6 \log[Na^+] + 0.41(\%G+C) - 820/(\text{primer length})(16)$ .

3시간 간격으로 각각의 선택배지에 도달하였다. *Bifidobacterium* spp.은 BS 배지, *Sal. typhimurium*은 SS 배지(Difco, Detroit, USA), *Staph. aureus*는 MSA 배지(Difco, Detroit, USA)를 각각의 선택배지로 사용하였다. 이때 병원성균이 배양되면서 *Bifidobacterium* spp.에 의한 직접적인 저해 이외에 배양배지 조성 및 혐기적 배양조건에 의한 영향이 나타날 수 있기 때문에, 병원성균만을 TPY broth에 접종하여 배양한 것과 *Bifidobacterium* spp.만을 접종하여 배양한 것을 control로 하여 비교하였다.

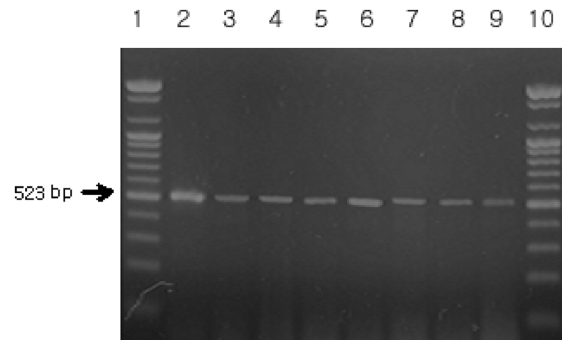
### 우유배지에서의 성장 조사

10% Skim powder(Seoul Milk Co., Seoul, Korea) 용액을 121°C에서 15분간 멸균한 후, 분리균주를  $10^6$ - $10^7$  cfu/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하면서, 6시간 간격으로 TPY 평판배지에 도달하여 우유배지에서의 생육 특성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 생균제용 *Bifidobacterium* 균의 선발

충북지역에 거주하는 1세 미만의 영유아 20명의 분변을 수집하여 mitsuoka 방법(14)과 Bergey's manual(13)에 따라 *Bifidobacterium* 균주를 분리하였는데, 먼저 *Bifidobacterium*균의 선택배지인 BS배지에서 배양된 brown-colony를 선별한 다음, 그람 염색을 하고 현미경으로 관찰하여 그람양성 및 Y자 또는 V자, 곤봉형을 나타내는 42종의 1차 균주를 분리하였다. 그리고, *Bifidobacterium*균과 다른 유산균을 구별하는데 이용되는 F6PPK 시험을 통해 42종의 균주 중에서 17종의 균주를 2차 선발하였다. 또한 선발된 17종의 균주는 세포막의 지방산 조성분석을 이용한 MIDI 방법과 *Bifidobacterium* genus specific primer를 이용한 PCR 방법으로 균주의 동정 및 확인 실험을 수행하였다. F6PPK 시험에 의해 선발된 17균주 중 최종 7균주가 MIDI 방법에 의해 *Bifidobacterium* spp.로 동정되었는데, B. PBH-2는 *B. adolescentis*로, B. PBH-29는 *B. pseudocatenulatum*으로, B. PBH-30은 *B. bifidum*으로 동정되었고, B. PBH-34, PBH-36, PBH-38, PBH-39는 모두 *B. angulatum*으로 동정되었다(Table 1). 그리고 동정되어진 7종의 *Bifidobacterium*균을 Ruben(17)의 방법에 따라 PCR을 수행한 결과, *Bifidobacterium*균의 genus spe-

**Fig. 1. PCR typing of 16S rRNA gene from the 7 tested strains.**

Lane 1, 10: DNA size markers (100 bp DNA ladder), Lane 2: *Bifidobacterium longum* KCTC 3421, Lane 3: *Bifidobacterium adolescentis* PBH-2, Lane 4: *Bifidobacterium pseudocatenulatum* PBH-29, Lane 5: *Bifidobacterium bifidum* PBH-30, Lane 6: *Bifidobacterium angulatum* PBH-34, Lane 7: *Bifidobacterium angulatum* PBH-36, Lane 8: *Bifidobacterium angulatum* PBH-38, Lane 9: *Bifidobacterium angulatum* PBH-39.

cific 16s rRNA를 나타내는 523 bp에서 7균주 모두 양성을 나타내어 *Bifidobacterium*균으로 확인되었다(Fig. 1). 그러나 최종 선발된 7종의 *Bifidobacterium*균 중에서 *B. bifidum* PBH-30만이 영유아 및 성인 모두에서 발견되는 *Bifidobacterium*균이고, 나머지 6종의 *Bifidobacterium*균은 성인의 장내에서 주로 발견되는 균으로 보고되어 있는 실정이다(13). 이에 반하여, 본 연구에서는 영유아에서 발견되는 *B. bifidum* 외에 성인에게서 주로 발견되는 *Bifidobacterium*균이 수집된 영유아의 분변에서 함께 발견되었다. 이와 같은 결과는 영유아의 장내 세균총이 형성되는 과정 중에 최우세균으로 *Bifidobacterium*균이 존재하는데, 이때 다양한 종의 *Bifidobacterium*균이 공존하기 때문이라고 사료된다. 특히 영유아의 경우 *B. bifidum* 등이 영유아에서 주로 발견되는 주점종으로 존재하기 때문에, 그 외의 *Bifidobacterium*균은 매우 드물게 발견되어진 것으로 생각되어진다. 또한 인체의 성장에 따라 초기 주점종인 *B. bifidum*의 우세가 줄어들면서 매우 적은 분포로 존재하는 다양한 *Bifidobacterium*균이 성인에 이르기까지 존재하여, 성인의 경우 주로 발견되는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과를 통하여 본 연구에서는 영유아의 분변

**Table 2. Identification of selected bacteria by Sherlock MIDI system**

Sample	Identification	Origin(13)
PBH-2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Adult feces
PBH-29	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Adult feces
PBH-30	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Child and adult feces
PBH-34	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Adult feces
PBH-36	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Adult feces
PBH-38	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Adult feces
PBH-39	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Adult feces

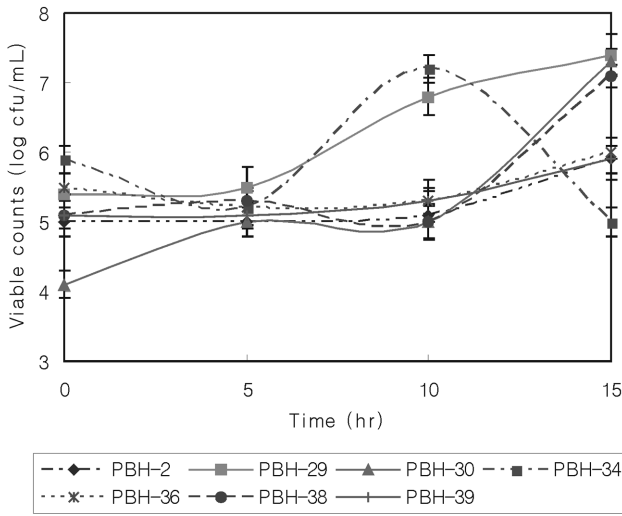


Fig. 2. Acid tolerance of isolated *Bifidobacterium* strains in TPY broth at pH 2.5, 37°C for 15 hr.

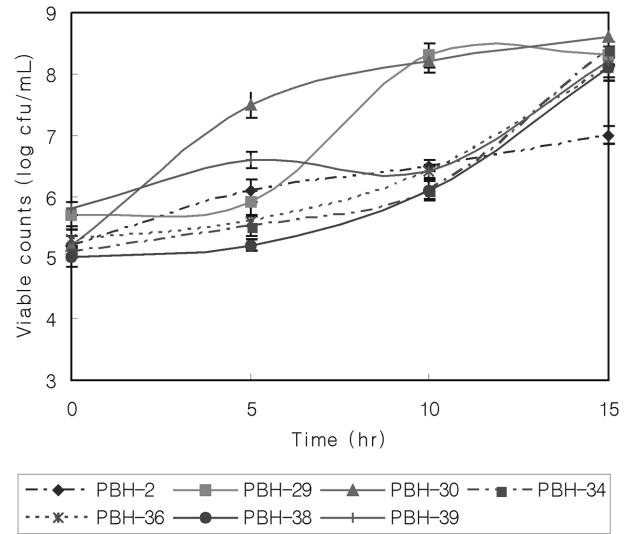


Fig. 3. Bile tolerance of isolated *Bifidobacterium* strains in TPY broth containing 0.3% oxgall at 37°C for 15 hr.

으로부터 다양한 7종의 생균제용 *Bifidobacterium* 균을 선발하였으며, 선발된 균주의 생육특성을 고려하여 생균제용 *Bifidobacterium* 균으로 선정하고자 하였다.

**생균제용 선발 *Bifidobacterium* 균의 생육 특성**

유산균을 생균제로 이용하기 위해서 먼저 장내까지 도달하기 위해서 인체내 위액과 같은 낮은 pH에 내성을 가져야 하며, 장내에서 활성을 유지하기 위해 소장에서 분비되는 1차 담즙산 및 장내미생물에 의해 생성되는 2차 담즙산에 내성을 나타내어야 한다. 그리고 장내에 이미 정착되어 있는 장내균총 중에서 병원성균 및 새로 유입되는 병원성균을 억제하는 효과를 나타내어야 한다. 이와 같은 유용한 효능을 나타낼 수 있는 유산균은 여러 가지 방법으로 체내로 섭취될 수 있는데, 그 중 우유와 함께 섭취하는 것이 가장 일반적으로 알려져 있다. 우유와 함께 섭취된 유산균은 우유내의 유당을 분해하여 젖산을 만들어 pH를 낮춤으로서 장내 환경에 있어서 보다 좋은 효과를 나타낼 수 있기 때문에 우유 내에서의 생육특성이 생균제

로 이용하기 위한 우선적 조건이라 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 선발된 7종의 *Bifidobacterium* 균에 대한 생육특성을 조사하기 위하여 먼저 내산성 및 내담즙성을 비교하였다. pH 2.5에서의 내산성 실험에서는 *B. pseudocatenulatum* PBH-29가 가장 높게 나왔고, *B. bifidum* PBH-30, *B. angulatum* PBH-38 순으로 높게 나왔다. *B. angulatum* PBH-34의 경우, 배양 10시간 후에 생균수가 급격히 감소하여 내산성이 가장 낮은 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 선발균주의 내담즙성 실험하기 위하여 0.3% oxgall 첨가 배지에서 성장능을 실험한 결과, *B. bifidum* PBH-30이 가장 높게 나왔고, *B. adolescentis* PBH-2를 제외한 다른 균들도 높은 성장률을 보였다(Fig. 3). 따라서 내산성 및 내담즙성 효과가 모두 높게 나타낸 균주로는 *B. pseudocatenulatum* PBH-29와 *B. bifidum* PBH-30이라고 사료되었다.

또한 병원성균의 생육 억제 효과를 내산성 및 내담즙성이 뛰어난 *B. pseudocatenulatum* PBH-29와 *B. bifidum* PBH-30으로 실험한 결과, *B. bifidum* PBH-30이 *B. pseudocatenulatum* PBH-

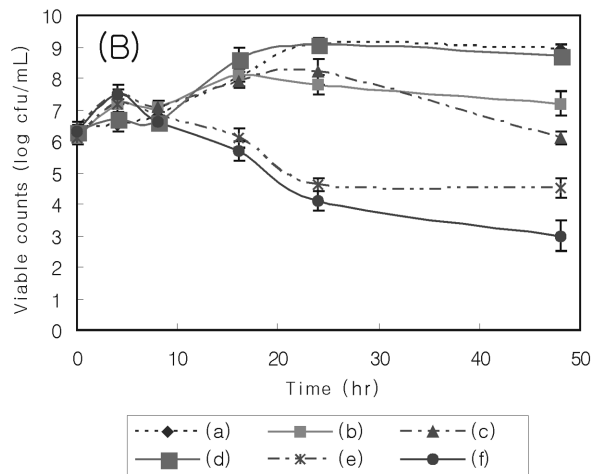
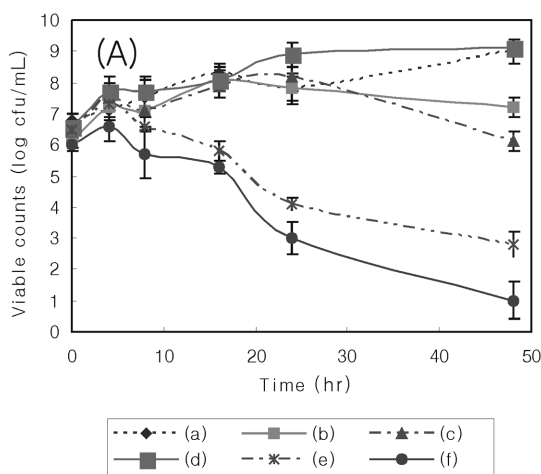


Fig. 4. Growth inhibition of *Sal. typhimurium* and *Staph. aureus* by *B. bifidum* PBH-30(A) and *B. pseudocatenulatum* PBH-29(B) in TPY broth. (a) Control of *B. bifidum* PBH-30(A) and *B. pseudocatenulatum* PBH-29(B), (b) Control of *Sal. typhimurium*, (c) Control of *Staph. aureus*, (d) *B. bifidum* PBH-30(A) and *B. pseudocatenulatum* PBH-29(B), (e) *Sal. typhimurium*, (f) *Staph. aureus* in mixed culture.

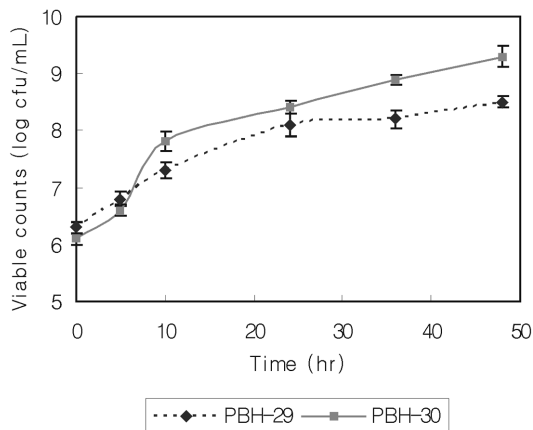


Fig. 5. Growth curves of *B. pseudocatenulatum* PBH-29 and *B. bifidum* PBH-30 in skim milk.

29에 비해 그람양성균의 대표적인 식중독균인 *Staph. aureus* 및 그람음성균의 대표적인 식중독균인 *Sal. typhimurium*을 억제함에 있어서 높은 효과를 나타내었다(Fig. 4).

그리고 *B. pseudocatenulatum* PBH-29와 *B. bifidum* PBH-30을 10% skim milk에 접종하여 37에서 48시간 동안 배양하여 우유에서의 성장능을 비교하였다(Fig. 5). 두 균주 모두 skim milk에서 높은 성장률을 나타내었는데, 48시간 배양 후의 균수에 있어서 *B. bifidum* PBH-30과 *B. pseudocatenulatum* PBH-29은 각각  $10^9$  cfu/g,  $10^8$  cfu/g로 최종 잔존하여 *B. bifidum* PBH-30이 보다 높은 성장능을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 최종적으로 유아의 분변으로부터 분리 선발한 *Bifidobacterium*균 중에서 내산성, 내담즙성, 병원성균의 억제능 및 우유에서의 성장능이 높게 나타낸 *B. bifidum* PBH-30을 유아용 생균제로 선발하였다. 선발된 *B. bifidum* PBH-30은 기존의 모유 및 분유수유아에서 분리된 것과는 다르게 두유 수유아로부터 분리된 것으로 두유 내에 포함되어 있는 다양한 올리고당을 이용하여 인체 유익한 생리활성물질을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 유아에게 이용될 수 있을 뿐만 아니라 유당불내증을 가지고 있는 성인에게도 생균제제로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 선발된 생균제를 기계발된 생균제와의 효능 비교 및 복합 배양으로 상호간의 작용에 의한 효능 향상 실험, 그리고 유전자 분석을 통한 신규성 확인 등의 보다 다양한 연구를 통하여 유아의 유익한 장내세균총을 유지 및 개선시킬 수 있는 유아용 생균제로 제품화하고자 한다.

## 요 약

본 연구에서는 유아용 생균제 개발을 위하여 1세 미만의 한국인 유아로부터 *Bifidobacterium*균을 분리 및 동정하여 생균제 특성이 우수한 균주를 선발하고자 하였다. 20명의 중복지역 유아 분변으로부터 선택배지를 이용한 plate법, 그람염색법을 이용하여 42종의 *Bifidobacterium*균을 분리하였고, F6PPK test, MIDI 및 PCR 방법을 통해 최종 7종의 *Bifidobacterium*균을 동정하였다. 동정된 7종의 *Bifidobacterium*균의 내산성 및 내담즙성 실험을 통하여 높은 효능을 나타내는 *B. pseudocatenulatum* PBH-29와 *B. bifidum* PBH-30을 선발하였다. 그리고 병원성균 성장억제 실험에서 *B. bifidum* PBH-30이 *Sal. typhimurium*과

*Staph. aureus*에 대하여 *B. pseudocatenulatum* PBH-29보다 효과적인 저해를 유도하였고, 10% skim milk에서도 48시간 동안 배양한 결과, *B. bifidum* PBH-30이 *B. pseudocatenulatum* PBH-29보다 좀 더 높은 성장능을 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 최종적으로 *B. bifidum* PBH-30을 유아용 생균제 개발을 위한 균주로 선발하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부 한국과학재단 지정 지역협력연구센터 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원 연구 결과의 일부이며 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

- Salminen S, Bouley MC, Boutron-Ruault MC, Cummings J, Franck A, Gibson G, Isolauri E, Moreau MC, Roberfrroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr. Suppl.* 1: 147-171 (1998)
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378 (1989)
- Hilton E, Henry DI, Phyllis A, Kenneth F, Michael TB. Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann. Int. Med.* 116:353-357 (1992)
- Takiguchi R, Mochizuki E, Suzuki Y, Nakajima I, Benno Y. *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 on harmful intestinal bacteria. *J. Int. Microbiol.* 11: 11-17 (1997)
- Goldin BR, Borbach SD. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* 40: 2421-2426 (1977)
- Matszaki T, Hashimoto S, 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)
- Gilliland SE, Walker DK. 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)
- Shah N. *Lactobacillus acidophilus* and lactose intolerance: A review. *Asean Food J.* 9: 47-54 (1994)
- Salminen S, Salminen E. Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology, and mucosal protection. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 222: 45-48 (1997)
- Shin MS, Lee JF, Na SH, Bae GS, Huh CS, Baek YJ. Characteristics of *Bifidobacterium* spp. isolated from Korean feces for probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 495-501 (1999)
- Clark PA, Cotton LN, Martin JH. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. J. Dairy Prod.* 28: 11-14 (1993)
- Kirjavainen PV, Apostolou E, Arvola T, Salminen SJ, Gibson GR, Isolauri E. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 1-7 (2001)
- Scardovi V. The genus *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Holt JG (ed). Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA (1986)
- Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* 6: 263-268 (1990)
- Mitsuoka T. *The World of Anaerobic Bacteria: A Color Atlas of Anaerobic Bacteria*. Sobun Press, Tokyo, Japan. pp. 13-65 (1980)
- Kok RG, Waal A-de, Schut F, Welling GW, Weenk G, Hellingwerf KJ. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3668-3672 (1996)