

생균제용 유산균의 분리 및 동정

이진규 · 김운태 · 이준호 · 유재홍¹ · 신원철^{1*}
(주)태경연구소 미생물연구실, ¹강원대학교 공과대학 발효공학과

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria for Preparation of Probiotics

Lee, Jin-Kyu, Wun-Tae Kim, Jun-Ho Lee,
Jae-Hong Yu¹ and Won-Cheol Shin^{1*}

Division of Microbiology, Tae Kyung Ltd., Laboratory, Anyang 430-017, Korea

¹Department of Fermentation Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — In order to prepare probiotics, a strain which has resistant against acid, bile salts and antibiotics was isolated from infant and animal feces. Among these isolated strains, TK-19 showed a strong acid tolerance and growth at 500 µg/ml of Na-deoxycholate. Also strain TK-19 was resistant to kanamycin (30 µg/ml), streptomycin (10 µg/ml), nisin (50 µg/ml) and tetracycline (10 µg/ml). The isolated strain TK-19 was identified as *Streptococcus faecium*, and was named *Streptococcus faecium* TK-19.

사료첨가용 항생제는 1950년대부터 가축의 생장촉진제로 널리 사용되어 왔으나 가축내의 잔유문제와 내성문제로 인하여 전세계적으로 사용이 규제되고 있는 경향이다(1, 2). 그러므로 항생제는 가축의 질병치료에만 사용하고 항생제를 대체할 수 있는 생육촉진제의 개발이 필요하게 되었다. 이러한 목적에서 개발된 것이 생균제(probiotics)인데, Fuller(1)에 의하면 생균의 사료첨가제로서 가축의 장내 미생물 균형을 증진시키는 물질로 생균상태라는 것이 다른 생육촉진제와 차이가 있는 것으로 정의하고 있다.

현재까지 알려진 생균제에는 유산생성균, *Bacillus* 균 및 효모의 배양물 등이 있는데(2) 이 중에서 유산생성균 생균제가 가장 많이 사용되고 있다. 이러한 생균제를 사료에 첨가하여 가축에 급여할 경우 Dilworth와 Day(3)는 닭의 체중을 증가시켰다고 하였으며 Miles 등(4)은 닭의 산란율을 향상시켰다고 보

고하였다. 또한 Baird(5)와 Pollmann 등(6)도 돼지에서 체중 증가의 결과를 얻었다고 보고하였다. 한편 국내에서도 한 등(7), 남궁 등(8) 및 최 등(9)은 생균제의 투여로 닭의 체중과 사료섭취량이 증가되었고 대장균수는 감소되었으며, 맹 등(10)은 소에 LBC (Lactic Acid Bacteria Concentrate)를 첨가한 사료를 급여하였을 때 체중 증가, 사료요구율 증가와 설사 일수를 감소시켰다고 보고하였다.

이와 같이 생균제를 가축의 사료에 혼합 사용할 경우 생육촉진제로서의 효과가 입증되어 있으나, 생균제로 사용하기 위해서는 적당량의 생균이 존재하여야 하고 위산이나 담즙에 내성이 있어야 하며 장내에 서식하여 산생성 능력이 있어야 하는 조건을 요구하고 있다(1, 2).

따라서 본 연구는 이와 같은 조건을 만족시키는 유산균 생균제의 개발을 목적으로, 사람과 가축의 분변으로부터 내산성이 있고 내담즙성이 있으며 질병치료시 장내에 존재할 수 있는 항생물질에 대하여 내성이 있는 균주를 분리하였고 분리균주의 동정을

Key words: Probiotics, *Streptococcus faecium*

*Corresponding author

행하였다.

재료 및 방법

분리원

젖먹이 및 이유기의 어린이 분변과 가축의 분변을 유동파라핀이 증충된 배지에 취하여 분리원으로 사용하였다.

배지

본 실험에 사용한 배지(11)는 tryptone(Difco) 5g, yeast extract(Difco) 2.5g, lactose 5g, sodium succinate 10g을 증류수 1 liter에 녹인 후 pH를 6.8로 조절하여 사용하였다.

균주의 분리

분리원을 멸균증류수에 적당히 희석하여 지시약으로 bromocresol purple을 첨가한 고체배지에 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 산생성이 강한 균주를 분리하였다.

pH 내성

배지를 멸균 후 HCl로 pH를 2~7로 조절하여 분리균주를 접종하고 37°C에서 48시간 정치배양하면서 생육유무를 검토하였다. pH처리에 따른 생존을 측정은 멸균 후 pH를 2.0~4.0으로 조절한 배지 5 ml에 하룻밤 배양시킨 종균액을 0.1 ml 접종하고 37°C에서 30분간 처리 후 생균수를 조사하여 행하였다.

담즙 내성

배지에 Na-deoxycholate(Sigma Co.)의 농도를 달

리하여 첨가하고 분리균을 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하면서 생육유무를 검토하였다.

항생물질 내성

고체배지에 37°C에서 48시간 정치배양한 분리균주 배양액을 0.1 ml 도말하고 kanamycin, streptomycin, rifamycin sv, nisin 및 tetracycline에 대하여 paper disc 방법으로 분리균주의 내성을 검토하였다. 본 실험에 사용한 항생물질은 Sigma회사 제품을 사용하였다.

균주의 동정

분리균의 동정은 Microbiological methods(12), Manual of methods for general bacteriology(13) 및 Bergey's manual of systematic bacteriology(14) 등에 있는 동정방법에 따라 행하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

유아의 분변으로부터 분리한 10주와 가축 분변에서 분리한 5주를 대상으로 하여 산생성이 강한 5주를 선별하였다.

분리균주의 pH 내성

분리균 5주에 대하여 pH 내성을 검토한 결과는 Table 1과 같다. pH에 대한 내성은 TK-19 균주가 가장 좋았으며 TK-11과 TK-12도 약간의 내성을 나타내었다. 또한 TK-19 균주는 pH 4.0~7.0의 넓은 범위에서 생육이 가능하다는 것을 알 수 있었다. 한편 TK-19 균주에 대한 pH 내성은 Table 2에 나타낸 바와 같이 위액의 pH와 유사한 pH 2.5에서 30분 동안 처리할

Table 1. pH tolerance of the isolated bacteria

Strains	pH					
	2	3	4	5	6	7
TK-3	-	-	-	+	++	+
TK-11	-	-	+	++	++	+++
TK-12	-	-	+	+	++	++
TK-19	-	-	++	+++	+++	+++
TK-21	-	-	-	+	+	++

-: no growth, +: poor growth, ++: good growth, +++: abundant growth

Table 2. Viability of the strain TK-19 at acidic pH

pH	Viability (CFU/ml)	Survival (%)
6.8	2.2×10^7	100
4.0	2.0×10^7	91
3.5	1.7×10^7	77
3.0	8.0×10^6	36
2.5	4.4×10^6	20
2.0	1.2×10^6	5

Table 3. Bile salts resistance of the isolated bacteria

Na-deoxycholate ($\mu\text{g/ml}$)	Strains				
	TK-3	TK-11	TK-12	TK-19	TK-21
0	+	+	+	+	+
100	+	+	-	+	+
200	+	+	-	+	-
300	+	+	-	+	-
400	-	+	-	+	-
500	-	-	-	+	-

+: growth, -: no growth

Table 4. Antibiotic resistance of the isolated bacteria

Antibiotics ($\mu\text{g/ml}$)	Strains				
	TK-3	TK-11	TK-12	TK-19	TK-21
Kanamycin (30)	+	+	+	+	+
Streptomycin (10)	-	-	-	+	-
Rifamycin sv (10)	-	-	+	-	-
Nisin (50)	+	-	+	+	-
Tetracycline (10)	-	-	-	+	+

+: growth, -: no growth

경우 20%의 생존율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Mutai(15)가 보고한 *Lactobacilli*의 경우 같은 조건에서 1%의 생존율을 나타내었다는 결과와 비교하여 볼 때 TK-19 균주는 산에 대하여 내성이 강하다는 것을 알 수 있었다.

분리균주의 담즙 내성

분리균주 5주에 대하여 담즙 내성을 검토한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 TK-19 균주는 Na-deoxycholate 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 생육이 가능하여 다른 분리균주보다 높은 농도에서 내성을 나타내었다.

Mutai(15)와 정과 김(16)은 유산균의 경우 담즙 내성을 250~500 $\mu\text{g/ml}$ 로 보고하였는데, 본 분리균주 TK-19는 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 생육이 가능하여 담즙에 대하여 내성이 있는 것으로 생각되었다.

분리균주의 항생물질 내성

분리균주의 항생물질 내성을 검토한 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 TK-19 균주는 rifamycin sv(10

Table 5. Morphological and physiological characteristics of the strain TK-19

1. Morphological characteristics	
Gram stain	positive
Cell type	spherical to ovoid (pairs and short chain)
Motility	nonmotile
Agar colony	smooth, white, entire
2. Physiological characteristics	
Growth	
at 45°C	+
in 6.5% NaCl	+
at pH 9.6	+
with 40% bile	+
on MacConkey agar	+
Reduction of tetrazolium	-
Tyrosine decarboxylated	-
Acid from arbutin	+
Acid from melezitose	-
Acid from melibiose	+
Acid from sorbitol	-
Hydrolysis	
of arginine	+
of esculin	+
Obligate anaerobe	+
0.04% tellurite tolerance	-
NH ₃ from arginine	+
Growth in methylene blue milk	+
Growth in thallos acetate	+

+: positive, -: negative

$\mu\text{g/ml}$)를 제외한 kanamycin(30 $\mu\text{g/ml}$), streptomycin(10 $\mu\text{g/ml}$), nisin(50 $\mu\text{g/ml}$) 및 tetracycline(10 $\mu\text{g/ml}$)에 대하여 내성을 나타내었다. 그 외 분리균주는 2~3가지의 항생물질에만 내성을 나타내어 TK-19 균주가 여러가지 항생물질에 대하여 내성이 있다는 것을 알 수 있었다. 정과 김(16)은 *L. casei*와 *S. faecalis*의 세포 융합체의 경우 tetracycline 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 내성을 나타내었다고 보고하였는데, TK-19 균주와 비교하여 볼 때 tetracycline에 대한 내성은 유사하였으나 다른 항생물질에 대한 내성은 TK-19 균주가 우수하였다.

이상의 결과로부터 Fuller(1)와 백(2)이 보고한 생균제로서의 내산성, 담즙 내성 및 항생물질 내성의 조건을 만족시키는 것은 분리균주 중 TK-19 균주가 가장 적당한 것으로 판단되어 TK-19 균주의 동정을 행하였다.

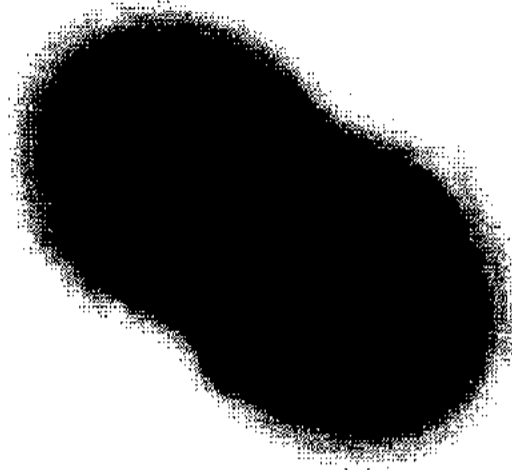


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain TK-19 ($\times 12,000$).

Bar equals 1 μm .

분리균주의 동정

TK-19 균주의 형태학적 및 생리학적 특징은 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타낸 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology(14)와 Collins 등(17)의 결과와 비교하여 볼 때 본 TK-19 균주는 모든 형태학적 및 생리학적 성질이 *Streptococcus faecium*과 동일하였다.

또한 전자현미경 사진에서도(Fig. 1) 한쌍의 구균 형태로 나타나 *Streptococcus*속임을 알 수 있었다. 따라서 분리균주 TK-19를 *Streptococcus faecium* TK-19로 명명하였다.

요 약

생균제를 제조할 목적으로 유아와 동물의 분변으로부터 내산성, 내담즙성 및 항생물질 내성균주를 분리하였다. 분리균주 중 TK-19 균주는 산에 대하여 강한 내성을 나타내었고, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 담즙에서도 생육이 가능하였으며 kanamycin(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptom-

ycin(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nicin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 tetracycline(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 대하여 내성을 나타내었다. TK-19 균주를 동정한 결과 *Streptococcus faecium*으로 판단되어 *Streptococcus faecium* TK-19로 명명하였다.

참고문헌

- Fuller, R.: *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365 (1989)
- 백인기: 한국영양사료학회지, **13**, 175 (1989)
- Dilworth, B.C. and E.J. Day: *Poult. Sci.*, **57**, 1101 (1978)
- Miles, R.D., A.S. Arafa, R.H. Harms, C.W. Carlson, B.L. Reid and J.S. Crawford: *Poult. Sci.*, **60**, 993 (1981)
- Baird, D.M.: *Feedstuffs*, **49**, 11 (1977)
- Pollmann, D.S., D.M. Danielson and E.R. Peo: *J. Anim. Sci.*, **51**, 577 (1980)
- 한인규, 이상철, 이진희, 이금기, 이정치: 한국축산학회지, **26**, 150 (1984)
- 남궁환, 손익승, 정진성, 백인기: 한국가금학회지, **13**, 49 (1986)
- 최영진, 김창중, 백인기: 한국영양사료학회지, **13**, 95 (1989)
- 맹원재, 김장원, 신형태: 한국낙농학회지, **9**, 204 (1987)
- Okamoto, T., Y. Fujita and R. Irie: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 259 (1983)
- Collins, C.H. and P.M. Lyne: *Microbiological Methods*, Butterworth and Co. Ltd. (1976).
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips: *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington DC (1981)
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore (1986)
- Mutai, M.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 339 (1983)
- 정호권, 김성환: 건국유전공학지, **3**, 35 (1989)
- Collins, M.D., D. Jones, J.A.E. Farrow, R. Kilpper-Bälz and K.H. Schleifer: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 220 (1984)

(Received October 4, 1991)