J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
28(4), 830~836(1999)

돼지장에서 분리한 *Lactobacillus salivarius*의 생균제로서 특성

박홍석† · 이지혜 · 엄태붕*
전북대학교 축산학과
*생물과학부 및 유전공학연구소

Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* Isolated from Piglet 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

we have screened the microorganisms from piglet intestines for the development of probiotics which have acid- and bile-tolerance and the growth inhibition of pathogenic *E. coli* and *Salmonella*. Among them, a strain which was identified as *Lactobacillus salivarius* was selected. It had around 50% of survival after 2h incubation in the artificial gastric juice and 76% of survival after 24h incubation in the presence of 0.3% bile salts, and also showed complete inhibition against both pathogenic *E. coli* and *Salmonella* after 24 h coincubation. Also, its storage stability after lyophilization was improved by adding polyvinylpyrrolidone.

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

서 론

최근 하절기의 식품 위생에 대한 위기가 고조되면서 유해균에 대항할 수 있는 여러 가지 방법들이 고려되고 있다. 고압살균같은 물리적인 방법, 화학적 방법을 이용한 정균이나 살균방법, 미생물 길항 작용을 응용한 생물학적인 방법들이 그 예이다. 오래 전부터 유산균과 같이 유용한 균들은 동물 장내에 정착하면서 정장 작용을 할 수 있다는 것이 알려져 왔다(1-3). 항생제나 화학 요법제의 남용, 오용은 인간에게 미생물에 대한 내성을 증가시키고 인체 대사에 영향을 미칠 수 있기 때문에 요즈음 그 사용량 및 식품에서 잔류 허용량은 더욱 엄격해지고 있다. 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 요즈음, 생균제 첨가에 의한 소화기계의 질병 예방은 경제적 이득뿐 아니라, 생체 안전성의 관점에서 가치가 있다고 보겠다. 따라서, 항생제나 화학 요법제의 대안으로서 생균제의 개발이 중요시 되어지고 있으며 이들은 이미 제약이나 요구르트의 형태로 시판되고 있고 또 동물 사료 등에 첨가되고 있다. 이들의 작용기작은 유산과 같은 유기산을 생산하여 장내 pH를 낮게 유지함으로서 해로운 미생물을 유지하고, 또 과산화 수소나 특수항생물질을 생산함으로서 여러 가지 병원성 박테리아에 직접적인 억제 작용에 의한 것이다. 생균제가 되기 위한 요건은 장을 통과하면서 위산과 담즙산에 견뎌야하고 장내에서 다른 해로운 균총에 비해 증식속도가 빠르고 해로운 균에 대한 억제 능력이 탁월하여 장내 우세 균총을 만들 수 있어야 한다(3-6). 현재, 생균제로는 주로 *Lactobacillus* (1-7,8), *Enterococcus*(1,2,9), *Bifidobacterium*(1,8) 등이 연구되었으나, 사람이나 동물에 상업적으로 사용되는 생균제에서는 *Lactobacillus, Bacillus, Clostridium, Saccharomyces, Aspergillus* 등이 혼합된 형태로 제품화되고 있다. 수많은 미생물들 중 생균제가 될 수 있는 미생물을 선별하는 가장 좋은 방법은 장내 미생물중에서 분리하는 것이 바람직하다. 그 이유는 장에 잘 정착하여 살아가는 균총은 위산이나, 담즙산에 대한 저항성이 큰 것이 많고 이미 장에서 해로운 균에 대항하면서 하나의 균총을 점하고 있기 때문이다. 따라서, 본 연구에서는 건강한 돼지의 장으로부터 생균제로서 가능성이 있는 미생물을 선별하기 위하여 먼저 산과 담즙산에 강한 미생물들을 분리하였

†To whom all correspondence should be addressed

고 인체와 동물의 장에서 병원성 미생물로 지목받고 있는 설사 유발 대장균과 *Salmonella*균에 대한 생육 억제력을 조사하고 동정하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

10일령된 건강한 돼지를 도살 후 즉시 작은 창자의 윗부분을 10cm크기로 자르고 창자 내용물을 0.9% NaCl로 충분히 세척한 뒤 다시 1cm 크기로 잘랐다. 멸균된 50 ml의 MRS 배지에 자른 창자를 각각 2개씩 넣고 37°C에서 균수가 약 10^7/ml이 되게 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 하였다.

배지 및 배양 조건

분리균의 기본 배양 배지로는 *Lactobacilli* MRS broth (이하 MRS, Difco, Detroit, USA)가 사용되었으며 *E. coli* 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. 배지 조성을 위한 다른 시약들은 미생물 배양용이나 일등급 제품을 사용하였다.

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

생균수

MRS배지에서 37°C로 24시간 정치 배양한 뒤 0.1ml 의 배양액을 꺼내 4.9ml 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 petridish에 도포한 다음 24~48시간 후 생균수를 측정하였다. 배양 후 나타난 군락수를 계수한 후 희석 배수를 곱하여 균수를 측정하였다. *E. coli* 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

분리된 균주의 산성 pH에 대한 내성 실험은 생체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 Kobayashi 등(10)의 방법에 의한 pH 3.0으로 조절한 펩신 함유 (1,000U/ml MRS, Sigma, St. Louis, USA) MRS 배지를 사용하였으며, 담즙산 내성검사를 위하여 0.3% 돼지 담즙산(Sigma)을 MRS에 첨가(6)하였다. 96-well의 microplate(Corning, USA)에 pH 3.0으로 조절된 MRS 배지 200μl를 각 well에 첨가한 뒤 colony들을 멸균 이쑤시개로 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 다시 담즙산이 0.3% 첨가된 MRS 배지에 접종하고 24시간 배양 후 well에서 잘 자란 균주만을 선별하였다.

대장균 및 *Salmonella*균 억제 능력의 비교

돼지장으로부터 선별된 PA10을 MRS 배지에, *E. coli* O8을 LB 배지에 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 새 MRS 10ml에 대장균 1ml(약 3×10^8/ml)과, PA10을 각각 1ml(약 3×10^8/ml)씩 넣고 24시간 37°C에서 혼합 배양한 후 0.1ml을 꺼내 적당히 희석하였다. 이를 Petrifilm에 도포하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤 자란 균수를 측정하였다. 대조 실험으로는 대장균 1ml만을 MRS 배지에 넣어 같은 조건에서 배양후 희석하여 Petrifilm에 접종하였다. *Salmonella*균의 억제 능력 실험은 대장균 실험과 같이, 동량의 균(약 3×10^8/ml)을 새 MRS배지에 넣고 혼합 배양하여 0.1ml을 꺼내 희석하고 이를 BS agar에서 37도로 24시간 배양 후 균수를 측정하였다. 이때, 대조실험으로 *Salmonella*균 1ml만을 MRS 배지에서 키운 뒤 희석된 배양액 중 0.1ml을 취해 희석하고 BS agar에서 같은 조건으로 균수를 측정하였다.

균주의 동정

분리된 미생물은 MRS agar배지로 37°C에서 24시간 배양 후 균주의 동정을 위하여 API 50 CHL strip(bioMerieux, 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 column과 균 동정용 Sherlock System software(version 2.11)을 사용하였다. 균주의 동정은 동정 data library에 저장된 균주의 지방산 조성 특성에 가장 근사하게 일치하는 것을 찾음으로서 얻어졌다. 현미경의 형태학적 검사는 Olympus(Tokyo, Japan) 사진현미경을 이용하였으며 Gram stain은 Murray 등(11)의 방법에 따라 수행되었다.

균의 저장 안정성

균을 대량 배양하기 위해 5L 발효조에서 400 rpm으로 1 vvm(volume/volume/minute)의 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 비교함으로서 얻어졌다.

결과 및 고찰

균주의 분리

흔히, 생균제로서 가능성이 있는 균주들을 얻기 위하여 이미 시판되고 있는 요거트나 정장제, ATCC 또는 KCTC로 부터 정장기능을 가지고 있는 상용 균주들을 사용할 수도 있지만, 위산 및 담즙에 견딘 수많은 균들이 정착한 집합체인 장이 생균제를 얻는데 가장 좋은 소스임에 틀림없다. 돼지장에 존재하는 많은 균총들로부터 생균제 분리를 위하여 돼지장 현탁액을 분리원으로 하여 pH 3과 0.3% 담즙산으로 조절된 MRS 선택 배지에서 일차적으로 약 12,000여개의 콜로니를 얻었다. 이들 콜로니들 중 비교적 크며 잘 분리되어 있는 것으로 338개를 선별하였는데 이들은 직경 0.5~1.0mm의 크기로 투명에 가까운 옅은 흰색이나 베이지색을 보이는 것이 많았다. 이들을 다시 새로운 MRS 평판 배지에 옮겨 재분리한 뒤 산과 담즙산의 저항성이 동시에 강한 한 균주를 microplate에서 다시 분리하였다. PA10으로 명명된 이균의 콜로니는 옅은 흰색을 띄었으며 MRS에서 액체 배양시 시큼한 냄새가 났다. 최근 젖먹이 돼지의 장에서 분리된 주된 lactobacilli는 *L. casei, L. rhamnosus, L. reuteri, L. salivarius*로 동정된 바 있으며(12), 건강한 사람의 장내에는 *L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. salivarius, L. plantarum* 및 *L. cellobiosus* 등의 유산균이 존재하는 것으로 보고되었다(13). 3차에 걸친 선별 과정을 통하여 *L. salivarius*로 명명된 이 균은 돼지장에 서식하는 수 많은 미생물중 내산, 내담즙산의 특성을 동시에 가장 잘 만족시킬 수 있는 균주임을 알 수 있었다.

내산성 실험

위에서 균의 생존률은 생균제로서 첫째 조건이라고 할 수 있다. 일차 선별과정에서 얻어진 여러 내산 균주들은 이차 및 삼차 선별과정에서 그 내산 정도가 균주에 따라 각각 다르다는 것을 알 수 있었다. 최종 선별과정을 통과한 PA10의 내산성 특성을 알아보기 위하여 24시간 MRS 배지에서 배양후 배양액 1ml을 pH가 3으로 조정된 인공위액 함유 MRS 배지 9ml에 넣고 2시간 동안 내산성 실험을 하였다. Fig. 1과 같이 시간에 따라 균수는 조금씩 감소하여 1시간 후에는 약 78%의 생존률, 2시간 후에는 처음 균수의 약 절반으로 줄어들었다. 한편, 김치, 요구르트와 같은 산성 식품의 제조에서 중요한 미생물로서 사용되는 *Lactobacillus*속은 생균제로서 내산성이 크다고 알려져 왔다. 일반적으로, *L. acidophilus* 균주들의 산에 대한 생존률은 pH 4에서 2시간 유지시킨 후 40~50% 수준으로 *L. acidophilus* KCTC 3155인 경우 pH 3과 4에서 각각 22%와 51%의 생존률을 보인 것으로 보고되어 있다(6). 또, 동물의 장에서 분리된 한 생균제인 *Enterococcus* sp. 는 pH 3의 인공위액 조건에서 2시간 후의 생존률이 90~100%로 알려져 있다(8). 이와 같은 결과로부터, PA10은 생균제로 선별된 *L. acidophilus*나 *Enterococcus*와 비견될 수 있는 내산성을 갖는 것으로 보이며, 분비위액의 pH가 1~2이지만 침과 음식의 섭취에 따라 희석된다는 점을 고려할 때 실제 물이나 음식의 섭취 하의 위에서 이 균의 생존률도 나쁘지 않을 것으로 추정되었다.

내담즙산 실험

MRS배지에서 배양된 PA10을 희석한 다음 담즙산이 0~0.3% 함유된 MRS 평판 배지에 도말하여 24시간 후 살아있는 균수는 Fig. 2와 같았다. 이 기간 동안 0.1% 담즙산의 존재하의 생존률은 86%였던 반면 0.3%의 담즙산에서는 76%의 생존률을 보여 농도에 따른 별영향없이 담즙산에 강한 특성을 나타냈다. 담즙의 성분은 공액 담즙산(conjugated acids)으로 이루어져 있는데 미생물이 공액 부위를 끊는 효소를 가지고 있으면 담즙의 존재에 취약하다고 보고된 바 있다(14). 일반적으로 담즙산에 대한 약한 특성은 대표적 생균제인 *Lactobacillus* 속에서 보이

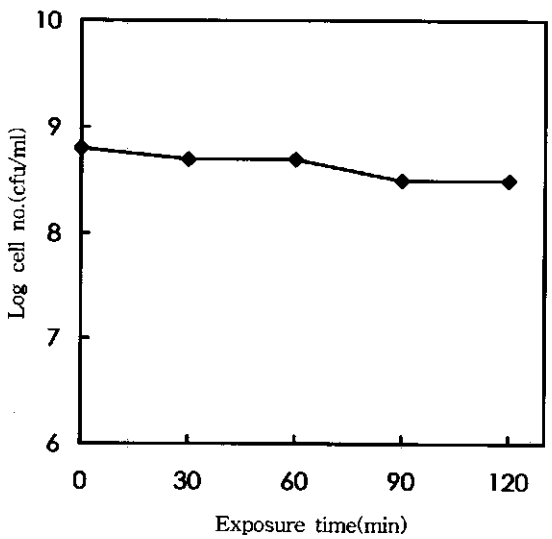

Fig. 1. Viability of PA10 under the exposure of artificial gastric juice-containing MRS medium(pH 3.0).

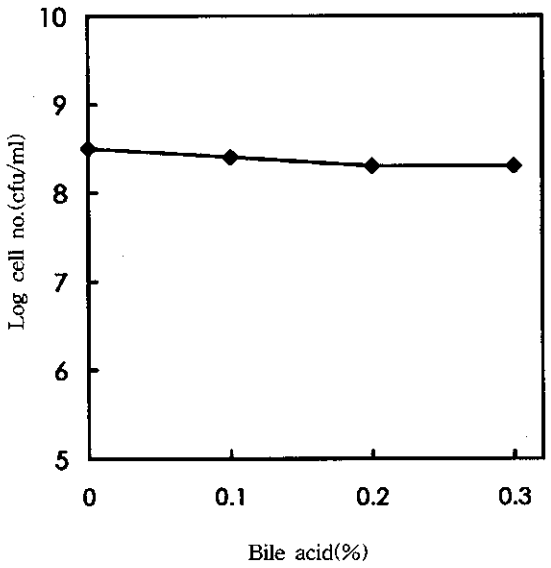

Fig. 2. Viability of PA10 in the MRS media with different concentration of bile salts.

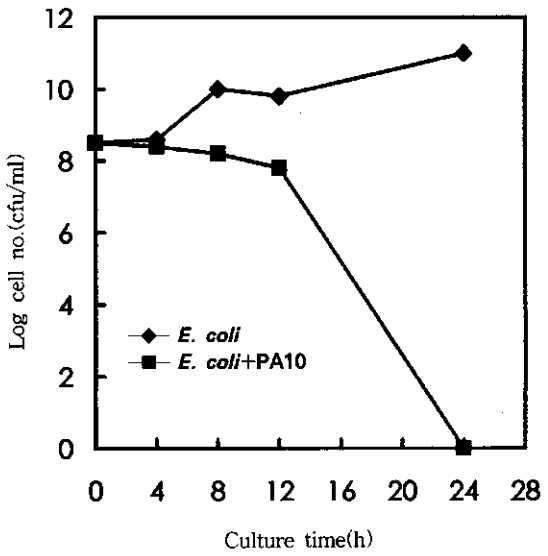

Fig. 3. Growth inhibition of *E. coli* by PA10 in MRS broth.

는 일반적인 현상이다(15). 예를 들어 *L. acidophilus* KCTC 3155 균은 0.3%의 담즙산에는 취약하여 대조군에 비해 약 $1/10^6$로 그 수가 급격히 감소함을 보여주었다(6). 반면, 동물의 장에서 분리된 *Enterococcus faecium* L20의 경우 100% 가까운 내담즙산 특성을 보였다(8). 장에서 정착한 미생물들은 계속적인 담즙의 유입에 의해 내담즙성을 나타내는 것이 많을 것으로 추정되지만, 십이지장을 통과하는 동안 담낭관으로부터 분비되는 높은 농도의 담즙산의 유입에 견딜 수 있어야 하기 때문에 여기서 생존률이 높은 생균제를 선별하는 것이 필요하다. 이러한 점에서 PA10은 담즙산에 대한 적응에 성공한 장정착균으로 생각되었다.

대장균 억제 능력

설사 유발 대장균과 혼합 배양시 PA10이 대장균의 성장을 얼마나 억제하는지 MRS에서 배양 시간에 따라, 대장균과 PA10의 균수를 조사하였다. 혼합 배양을 시작했을 때 대장균수와 12시간 혼합 배양 후 대장균수를 비교해 보면 거의 같은 균수를 나타냈다(Fig. 3). 한편, 같은 시간 동안 같은 종류의 배지에서 대장균만 단독 배양한 것은 균수가 약 100배 증가한 것으로 보아 12시간 혼합 배양동안 PA10은 이미 대장균의 성장을 억제하는 것으로 보인다. 혼합 배양 후 24시간 경과 후에는 생존한 대장균은 더 이상 보이지 않았다. 한편, 선별된 생균제인 *L. acidophilus* KCTC 3155인 경우 같은 조건에서 대장균과 함께 혼합 배양 후 생육 억제 능력을 조사한 결과 대장균의 성장을 100% 억제시키는 것을 보였다(6). 또한, 유산균, 낙산균 복합 제재로서 정장제로 사용되고 있는 바이스리(제일 제당)는 연속 유동 배양시 접종 후 48~72시간만에 *E. coli* O-157이 소멸되었다고 보고한 바 있다(16). *L. acidophilus*는 자라는 동안 배양액의 pH를 저하시키고, acidolin, acidophilin, lacacin B의 항생제를 생성하는 것으로 알려져 있다(3). 마찬가지로, PA10의 유해균 성장 억제 요인은 확실치 않지만 배양 동안 *L. acidophilus*배지의 pH가 6.3 로부터 4.6 으로 떨어지는 것으로 보아 pH 하강에 따른 유해균 감소 효과를 추정할 수 있었다. 대장균에 대한 미생물학적 길항작용 관점에서 PA10의 단독 작용에 의한 억제 효과는 이들 유산균, 낙산균의 상업적 복합 제재와 비교될 수 있을 정도로 뛰어남을 보여주었다.

Salmonella 억제 능력

혼합 배양시 PA10이 *Salmonella*의 증식을 얼마나 억제하는지를 관찰하기 위하여 배양 시간에 따른 *Salmonella*와 PA10의 균수 변화를 조사하였다. 그 결과, 대장균 억제 실험과 비슷하게 혼합 배양 12시간 후 결과는 *Salmonella*의 증식을 억제하는 것으로 보였다. 혼합 배양 시작 후 24시간에 측정한 결과에서는 어떠한 *Salmonella*도 발견할 수 없었다(Fig. 4). 특히 식품 위생에 매우 중요한 *Salmonella*균의 억제는 생균제의 역할로서 꼭 필요한 기능이다고 할 수 있다. *In vitro* 상태에서 설사를 유발하는 대장균과 병원성 *Salmonella*에 대한 PA10의 억제는 적어도 24시간 경과 후 탁월하였는데 시판되고 있는 여러 정장제들과 *L. acidophilus*와의 비교실험에서 PA10은 동등하거나 그 이상의 유해균 억제 능력을 보였다. *Salmonella*의 생육 최적 pH가 7.0인 점을 고려하면(17) 낮은 pH에서 이 유해균은 생존할 수 없다. 이 유산균의 유해세균 억제 능력이 배양액의 특성을 바꾸기 때문인지, 또는 lactobacilli 특유의 항생물질을 내기 때문인지는 확인하지 못하였지만 혼합 배양 중 PA10의 매우 빠른 증식 속도와

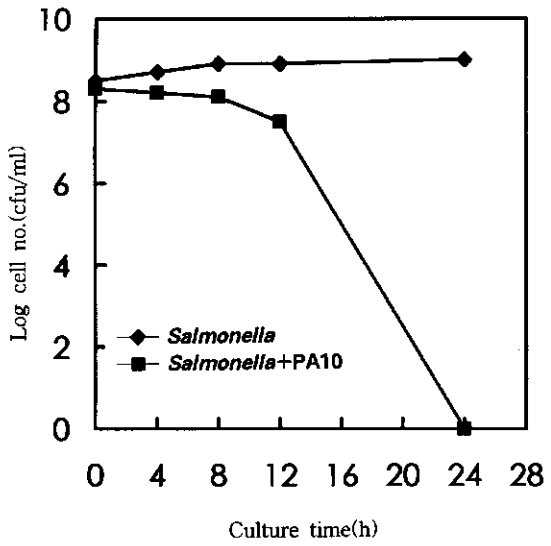

Fig. 4. Growth inhibition of *Salmonella typhimurium* by PA10 in MRS medium.

함께 유산의 방출에 의한 pH 감소의 영향 및 bacteriocin의 분비가 이러한 효과를 나타내는 것 같다.

PA10균의 동정

현미경의 관찰하에서 이 균은 비운동성을 나타냈고 길다란 간균 모양으로 크기가 불규칙했으며 Gram 염색은 양성이었으며, 포자는 형성하지 않았다. API 50 CHL (version 4.0) kit에서 배양(Table 1) 및 API Lab Plus 동정 프로그램에 의한 결과 분석에서는 신뢰도 99.9%로 *Lactobacillus salivarius*로 확인되었다. 한편, 세포 지방산 정성 분석(Table 1) 및 동정 library에서 검색 결과는 API 검사에서와 같이 *Lactobacillus salivarius*로 동정되었다. Table 1에 나타난 바와 같이 이 균은 *L. salivarius*의 발효 특성인 glucose, fructose, galactose, sorbitol, mannitol과 같은 6탄당 및 그 환원당, lactose, sucrose, trehalose와 같은 일부 이당류, raffinose, N-acetylglucosamine만을 선택적으로 이용함을 보였다. 주 지방산 구성 성분은 cis-Δ^9-octadecenoic acid(C18:1, *cis* 9(ω9))가 41.10%, 포화 지방산인 hexadecanoic acid(n-16:0)가 23.76%로 이루어져 있었으며, 미량으로는 C15:0 iso 2OH/C16:1w7c와 C18:0이 각각, 1.2%와 2.07%를 함유하고 있어 *L. salivarius*의 지방산 구성 비율과 일치하였다. 현미경에 의한 형태학적인 특성와 API 검사에 의한 생화학적인 결과들은 PA10균이 *Lactobacillus*에 속하나, 일반적으로 잘 알려진 정장 유산균들인 *L. acidophilus, L. bulgaris, Bifidobacterium*등과는 다른 *L. salivarius*임을 보였다. 세포 지방산 분석에 의한 동정 결과는 PA10이 *L. salivarius var. salicinius*, 또는 *L. salivarius var. salivarius*와 가장

Table 1. Morphological and biochemical properties of PA10 isolated from piglet intestines

1. General characteristics

Morphology	long rod with frequently bent shape
Gram staining	positive
Spore	None

2. Utilization of carbohydrates and related carbon compounds by PA10

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-		Gluconate-	2-Ketogluconate-	5-Ketogluconate-	

3. Cellular fatty acid profile

Fatty acid	**Contents (%)**
14 : 0	6.24
16 : 1 w7c/15 iso 2OH	3.51
15 : 0 iso 2OH/16:1w7c	1.20
16 : 0	23.76
18 : 1 w9c	41.10
18 : 1 w9c/w12t/w7c	11.12
18 : 0	2.07
19 : 0 cyclo w10c/un	7.55
19 : 0 iso	1.62
20 : 0	1.83

[1)] +: positive, -: negative

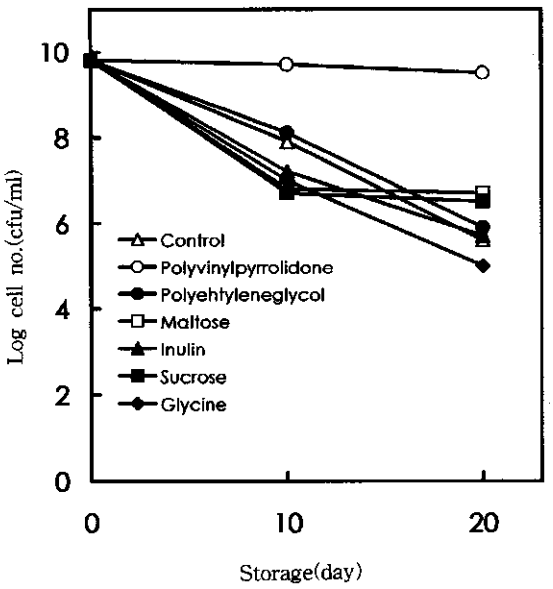

Fig. 5. Effect of additives on the viability of PA10 after 10 and 20 days of storage at 22°C.

가깝다는 것을 보여 주었는데 앞으로 더 정확한 균의 동정을 위하여 16s rRNA의 분석이 요구된다.

PA10의 분말화 및 보관 안정성

총배양액 3L로부터 냉동 건조 분말로 7.02g을 얻었으며 생균수는 건조 분말 g당 5.1×10^{10}개였다. 따라서, 냉동 건조 전의 생균수(1.1×10^{9}/ml)에 대한 건조 후의 생존 비율은 약 10% 값을 보였다. 보관에 따른 균의 생존률이 여러 안정제의 첨가에 따라 조사되었다. 사용된 첨가제중 가장 생존률이 높았던 것은 냉동 건조전 농도가 10%(w/v)이 되게끔 polyvinylpyrrolidone을 첨가한 것으로, 20일 상온 보관 후 약 50% 생존률을 보였다(Fig. 5). 그러나, polyethylene glycol 4,000, maltose, inulin, sucrose, glycine의 첨가에서는 무첨가군과 비슷하게 $10^{-3}\sim10^{-5}$정도로 그 생존률이 감소하였다. 이 결과들로부터 PA10균의 효율적 보관을 위하여는 10%(w/v) polyvinylpyrrolidone이 효과적인 첨가제로 보인다. 또한, 보전성을 높이기 위해 활성탄, 제올라이트, 벤토나이트에 균을 흡착했으나 효과가 없었으며 이때 균의 생존률은 약 3% 수준이었다. 상업적 생균제로서 사용할 수 있기 위하여는 앞으로 이균의 저장 안정성을 높이는 방법들이 더 시도되어야 할 것으로 보인다.

요 약

돼지장에 존재하는 많은 균총들로부터 생균제를 분리하기 위하여 생균제로서 필수 조건인 내산성, 내담즙산, 유해균 억제능력들을 조사하였는데 그 결과 다른 균들에 비해 생균제로서 작용 능력이 뛰어난 한 균주인 PA10을 얻을 수 있었다.생균제로서 중요한 기능인 설사 유발 대장균과 *Salmonella*를 억제하기 위하여 돼지의 장으로부터 내산, 내담즙의 특성을 가진 미생물들을 분리 검색하였다. 이들 중, 위산과 담즙에 잘 견디며, 대장균 및 *Salmonella*에 대한 억제 능력이 뛰어난 한 미생물을 분리하였는데 *Lactobacillus salivarious*로서 동정되었다. 이 미생물은 pH 3의 위산과 0.3% 담즙산에서 각각 2시간, 24시간 동안 약 50~70%의 생존률을 나타냈으며, 대장균 또는 *Salmonella*를 MRS배지에서 혼합 배양시 24시간안에 이들 유해균을 완전히 제거할 수 있었다. 이 실험에서 *L. salivarius*로 명명된 이 균은 돼지장에 서식하는 수 많은 미생물중 내산, 내담즙산, 유해균 억제능을 동시에 만족시킬 수 있는 특성을 가지는 균주임을 알 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. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 304-310(1996)
2. 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)
3. 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.209-223(1992)
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. Park, H. K., Lee, S. H. and Uhm, T. B. : Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 433-440(1998)
7. 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**, 128-131(1996)
8. Klaver, F. A. M. and van der Meer, R. : The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1120-

1124(1993)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. Nemcova, R., Laukova, A., Gancarcikova, S. and Kastel, R. : *In vitro* studies of porcine lactobacilli for possible probiotic use. *Berl. Munch Tierarztl Wochenschr.*, **110**, 413-417(1997)
13. Moore, W. E. C. and Holdeman, L. V. : Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, **27**, 961-979(1974)
14. Floch, M., Binder, H. J., Filburn, B. and Gershengoren, W. : The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 1418-1423(1992)
15. 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**, 3045-3051(1984)
16. CheilJedang : A leaflet "Effect of Bi-Three against *E. coli* O157", pp.1-2(1997)
17. Holt, J. and Krieg, N. R. : Enrichment and isolation. In "*Methods for general and molecular bacteriology*" Gerhardt, P.(ed.), ASM, Washington, p.208(1994)

(1999년 3월 23일 접수)