

乳酸桿菌 醱酵乳에서 分離한 *Lactobacillus* spp.의 腸內病原性細菌에 대한 抗菌作用에 關한 研究

調査指導科

柳寅實 · 崔秉玄 · 崔成玟 · 吳秀暉

Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from Yakult against enteropathogenic bacteria

Investigation and Guidance Division

In Sil Yoo, Byung Hyun Choi, Sung Min Choi, Soo Kyung Oh

=Abstract=

The study has been designed to clarify the effect of *Lactobacillus* spp. on the survival of enteropathogenic bacteria in fermented milk and to competitive growth of *Lactobacillus* spp., enteropathogenic bacteria during fermentation in skim milk.

The experimental results obtained are summarized as follows.

1. The Gram negative enteropathogenic bacteria were decreased dramatically after 9hrs when cultured with *Lactobacillus* spp. in skim milk.
2. The enteropathogenic bacteria were completely disappeared within 4hrs in fermented milk (pH 3.6) stored at 30°C, 5°C. On the hand, *Staphylococcus aureus* was completely disappeared within 6hrs stored at 36°C and almost died within 72hrs stored at 5°C in fermented milk of *L. bulgaricus*, but it was maintained 10~10²CFU/ml in fermented milk of *L. helveticus*.
3. The inhibitory effects of *L. bulgaricus* culture showed higher than that of *L. helveticus* culture against enteropathogenic bacteria

緒 論

乳酸桿菌을 이용한 醱酵乳는 인체에 건강을 증진시킨다는 연구보고^{1,2,3}에 따라 세계적으로 많은 사람들에게 의해서 소비되는 가장 중요한 식품중의 하나로 되어 있다.

우리나라의 경우 1975년에 醱酵乳의 국내소비량은 겨우 8,473%이었던 것이 1983년에는 110,256%으로 급격히 증가하였다.⁴

이러한 증가추세는 乳酸桿菌醱酵乳가 嗜好性, 營養學的 측면에서 보다는 각종 腸內細菌에 대한 抗菌效果를 중요시하는 건강식품으로서의 가치를 높이 평가하

는데서 오는것 같다.

*Lactobacillus*屬菌의 病原性 腸內細菌에 대한 精確한 抗菌기전은 아직 밝혀지지 않았으나 *Lactobacillus*屬菌은 여러가지 抗生物質 生成^{5,6}, H₂O₂에 의한 生육억제⁷, 醋酸과 乳酸에 의한 pH저하⁸, bacteriocin생성⁹하며 腸內에서 正常細菌叢에 증식하면서 競争的細菌干涉現象¹⁰을 갖는다는것도 보고된바있다.

이와같이 醱酵乳는 病原性 腸內細菌에 대한 抗菌效果가 있다는 사실만으로도 건강식품으로서의 가치가 인식되므로 우리나라에서 乳酸桿菌 醱酵乳의 生産에 사용되고 있는 *Lactobacillus*屬菌의 腸內細菌에 대한 抗菌效果의 精確한 평가는 매우 중요하다고 생각된다.

현재 우리나라의 醱酵乳生産에 사용되고있는 乳酸乳

乳酸桿菌의 菌種으로는 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *Streptococcus thermophilus* 중의 하나 또는 두 균주가 사용되고 있으며, 대부분의 제품이 *L. bulgaricus*를 사용하고 있다고 *姜 등*¹¹⁾이 보고한 바 있다.

그중 *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*의 腸內病原性細菌에 대한 抗菌效果에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나^{12,13)} 우리나라 醱酵乳에 많이 사용되고 있는 *L. bulgaricus*, *L. helveticus*의 抗菌效果에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 저자들은 시판되고 있는 발효유에서 *L. bulgaricus*와 *L. helveticus*를 분리하여 腸內病原性細菌에 대한 抗菌效果 및 醱酵過程에의 腸內病原性細菌 汚染이 醱酵에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본실험을 실행한 바 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 供試菌株

ㄱ) 腸內病原性細菌

국립보건원으로부터 분양받은 *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25929, *Escherichia coli* ATCC 25922를 실험균주로 하였으며, Nutrient broth (Difco)에 3회 계대배양후 사양하였다.

ㄴ) 乳酸菌

시판되는 醱酵乳(yakult)에서 분리한 *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*를 사용하였다.

2) 使用培地

菌株分離 및 生菌數測定用 使用培地는 表 1과 같았다.

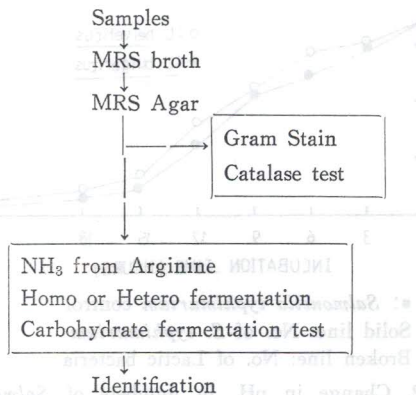


Fig. 1. Isolation and preliminary identification of Lactic bacteria

Table 1. Selection of culture Media

Micro organism	Media	Colony color
<i>Shigella flexneri</i>	SS Agar	Colorless
	MacConkey Agar	Colorless
<i>Salmonella typhimurium</i>	Brilliant green Agar	Pink White
	MacConkey Agar	Colorless
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcus No. 110	Colorless
	Mannitol salt Agar	Yellow
<i>E. coli</i>	Desoxycollate Agar	Red
	MacConkey Agar	Red
Lactic bacteria	Tomato juice Agar	Colorless
	BCP Agar	Yellow

Table 2. Composition of MRS broth

Peptone	10.0g
Beef extract	10.0g
Yeast extract	5.0g
Tween 80	1.0g
Dipotassium phosphate hydrate	2.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.05g
D-glucose	20.0g
Sodium acetate	5.0g
Triammonium citrate	2.0g
D.W	1,000ml
Final pH	6.4

2. 實驗方法

1) 乳酸菌 分離同定

시판발효유에서 乳酸菌의 分離 및 同定方法은 Fig. 1과 같았으며 분리사용배지인 MRS broth의 조성은 表 2와 같았다.²⁰⁾

즉, 試料 1ml를 무균적으로 취하여 MRS broth에 접종후 37°C에서 48시간 배양후 MRS agar에 순수분리한후, Gram stain, Catalase test, homo or hetero fermentation test, NH₃ from Arginine test를 거쳐 MRS carbohydrate broth를 이용한 carbohydrate fermentation을 실시하여 Bergey's manual¹⁴⁾에 의하여 同定하였다.

최종 동정된 乳酸菌은 10% Skim milk broth에 37°C에서 24시간 배양으로 3대 계대하여 사용하였다.

2) 醱酵過程중의 腸內病原細菌에 대한 영향 조사

Park¹⁵⁾의 방법에 준하여 실험하였다.

즉, 16% Skim milk broth에 3% 포도당을 가한 150 ml 배지에 MacFarland No. 0.5 표준비색관(1% BaCl₂ 0.5ml+1% (0.36N) H₂SO₄ 99.5ml; 10⁸CFU/ml)에 의해 乳酸菌數 농도를 최초 10⁵~10⁶ CFU/ml, 病原性細菌농도를 10³~10⁴ CFU/ml되게 맞추어 혼합 접종한 후 37°C에 각각 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24시간 배양 후 선택 배지(表 1 참조)를 이용하여 사용유산균수, 장내병원성세균의 생균수를 측정하였으며, 동시에 pH를 측정하여 발효중의 병원성세균의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

생균수 측정방법은 각 접종균의 선택배지(표 1 참조)를 이용하여, Standard method¹⁶⁾에 의하여 측정하였다.

對照用으로 16% skim milk와 3% 포도당을 가한 배지에 유산균은 접종하지 않고 각각의 장내병원성세균만을 MacFarland No. 0.5 표준비색관(1% BaCl₂ 0.5 ml+1% (0.36N) H₂SO₄ 99.5ml; 10⁸ CFU/ml)에 의해 최초농도 10⁸~10⁴ CFU/ml되게 접종하여 시료와 동일한 방법으로 세균수를 측정하였다.

3) 醱酵乳 內의 病原性細菌의 死滅效果測定

16% skim milk와 3% 포도당으로 된 배지에 시판 발효유와 동일하게 유산균을 증식(10⁹~10¹⁰ CFU/ml, pH3.6) 시킨후 장내병원성세균을 10⁴~10⁵CFU/ml 농도로 접종시킨후 5°C, 30°C에 각각 보존하면서 보존 시간에 따른 유산균수와 병원성세균수의 증식변화를 조사하였다.

對照用으로 16% skim milk와 3% 포도당을 가한 배지에 유산균을 접종하지 않고 50% citric acid로 pH 3.6으로 조정후 장내병원성세균만을 접종하여(10⁴~10⁵CFU/ml) 시료와 동일한 방법으로 보존하면서 보존 시간에 따른 병원성세균수 증식변화를 함께 조사하였다.

4) pH측정

Digital pH meter (Karl Fisher Model No. 620)을 사용하여 측정하였다.

結果 및 考察

1. 醱酵過程 中の 腸內病原性細菌에 대한 영향

乳酸菌(*L. bulgaricus*, *L. helveticus*)을 각각 10⁵~10⁶ CFU/ml, 장내병원성세균(*Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*)을 각각 10³~10⁴ CFU/ml되도록 동시에 접종하여 발효시 장내병원균오염이 발효에 미치는 영향을 실험할 목적

으로 조사하였던 바 결과는 그림 2, 3, 4, 5와 같았다.

그림 2에서와 같이 *Salmonella typhimurium*만 단독 배양하였을 경우 최저농도 5.2×10³에서 배양 24시간만에 3.8×10⁷ CFU/ml의 세균수증식을 나타냈으나, 유산균과 혼합배양시는 배양 9시간부터 서서히 감소하기 시작하였으며, 유산균은 비교적 완만한 증식을 나타냈다.

또한 배지 pH도 최초 pH6.4에서 배양 15시간만에 pH4.0 이하로 저하되었다.

그림 3에서와 같이 *Shigella flexneri* 단독배양시에 *Salmonella typhimurium*과 같이 높은 증식율을 나타냈으나 유산균과 혼합배양시 *Shigella flexneri*는 배양 9시간부터 급격히 감소하기 시작하여 배양 24시간에는 약 1.4×10³ CFU/ml의 세균수를 나타냈으며, 유산균수도 *Salmonella typhimurium*과 혼합배양시보다 높은 증가율을 나타냈다.

또한 pH변화도 배양 9시간부터 급격히 저하되어 배양 12시간만에 pH4.0 이하를 나타냈다.

그림 4에서와 같이 *E. coli* 단독배양시 *Shigella fle-*

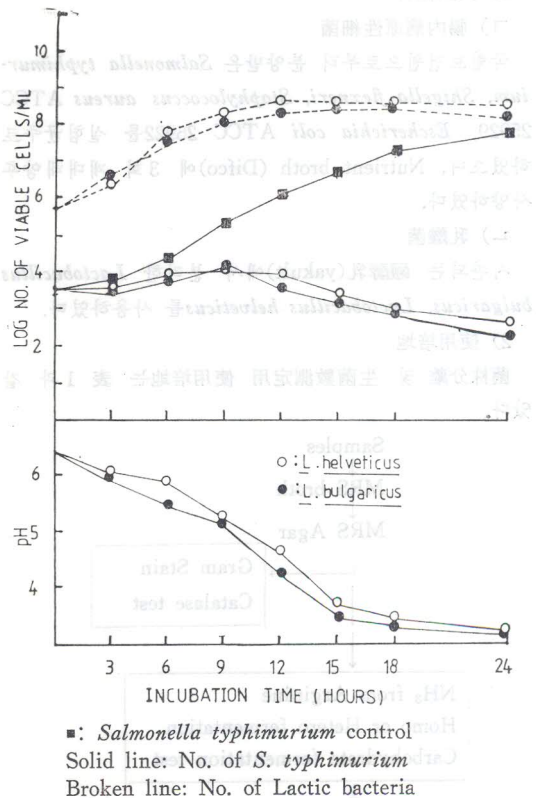


Fig. 2. Change in pH, in numbers of *Salmonella typhimurium* and in numbers of Lactic bacteria during incubation of skim milk at 37°C

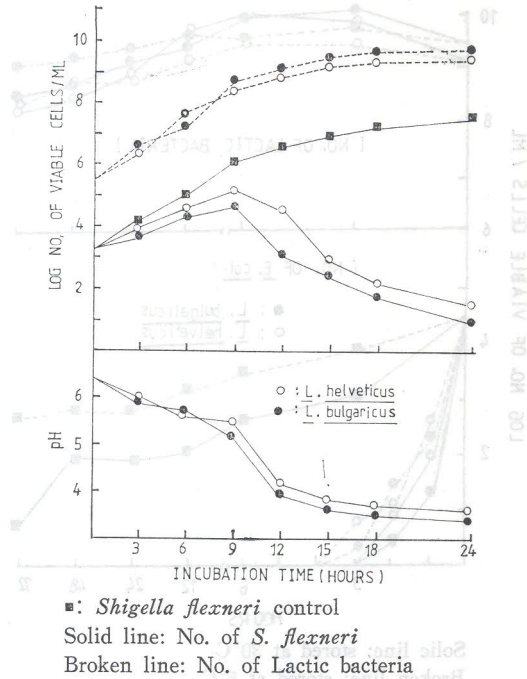


Fig. 3. Change in pH, in numbers of *Shigella flexneri* and in numbers of Lactic bacteria during incubation of skim milk at 37°C

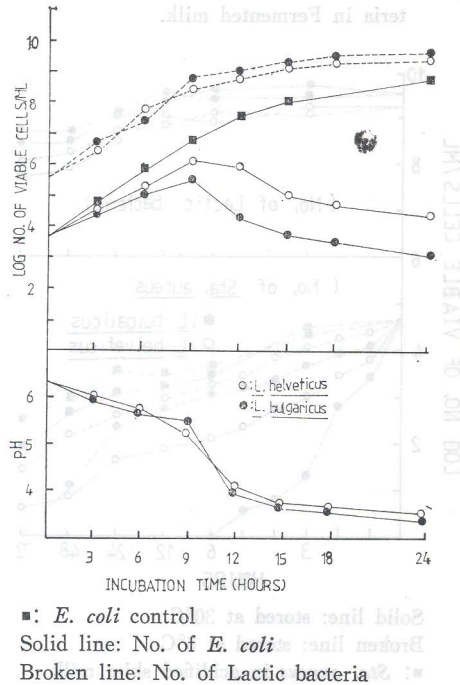


Fig. 4. Change in pH, in numbers of *E. coli* and in numbers of Lactic bacteria during incubation of skim milk at 37°C

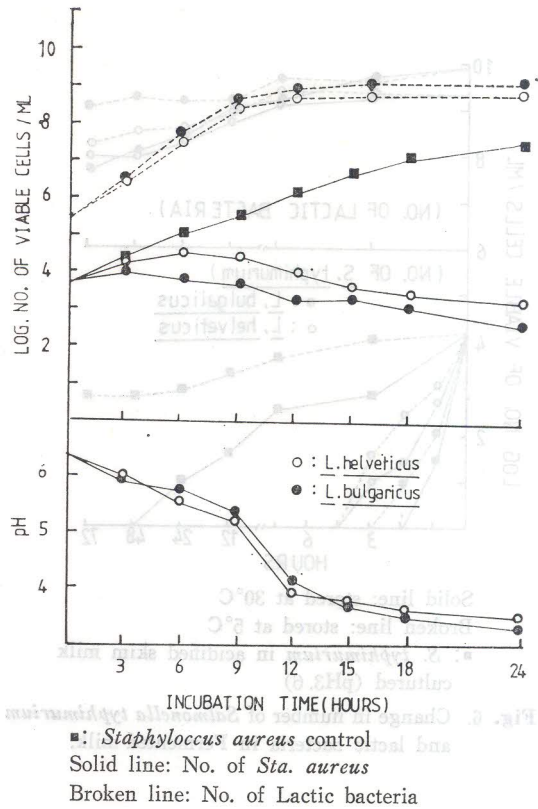


Fig. 5. Change in pH, in numbers of *Staphylococcus aureus* and in numbers Lactic bacteria during incubation of skim milk at 37°C

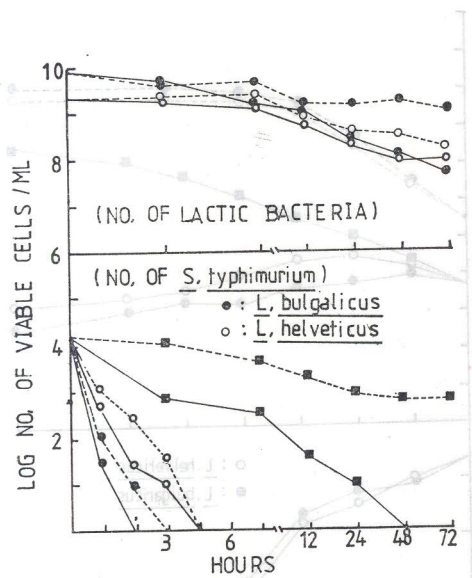
*xneri*와 비슷한 증식율을 나타냈으나 혼합배양시 배양 9시간부터 서서히 감소되는 경향을 나타냈다.

또한 *Lactobacillus bulgaricus*와 혼합배양했을때가 *Lactobacillus helveticus*와 혼합배양했을때보다 *E. coli*의 감소율이 비교적 높게 나타났다.

위의 결과에서 유산균과 장내병원균을 동시에 접종 하였을때 병원균수는 배양 6시간~9시간부터 감소현상을 나타냈으며, 유산균수도 *Salmonella typhimurium*만을 제외하고는 거의 비슷한 증식율을 나타냈으며, 배지 pH도 배양 9시간부터 급격히 저하되기 시작하여 배양 12시간만에 pH4.0 이하를 나타냈다.

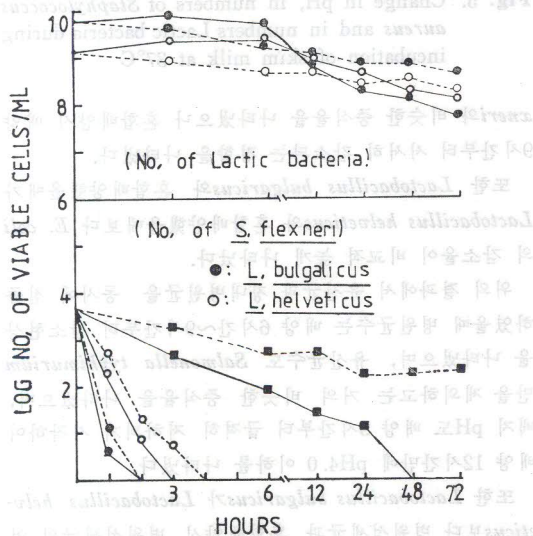
또한 *Lactobacillus bulgaricus*가 *Lactobacillus helveticus*보다 병원성세균과 혼합배양시 병원성세균의 억제효과가 높게 나타났다.

朴 등¹³⁾은 *Lactobacillus casei*와 장내병원성세균과의 발효중의 세균수변화를 조사한 바 *E. coli*를 제외하고는 배양 48시간만에 병원성세균이 사멸되었다고 보고한 바 있으며, 成¹⁷⁾은 *L. bulgaricus*에 의한 병원성세



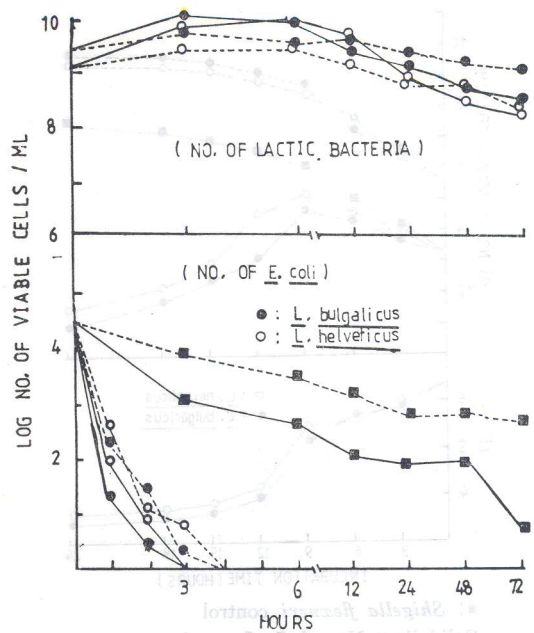
Solid line: stored at 30°C
 Broken line: stored at 5°C
 ■: *S. typhimurium* in acidified skim milk cultured (pH3.6)

Fig. 6. Change in number of *Salmonella typhimurium* and lactic bacteria in Fermented milk.



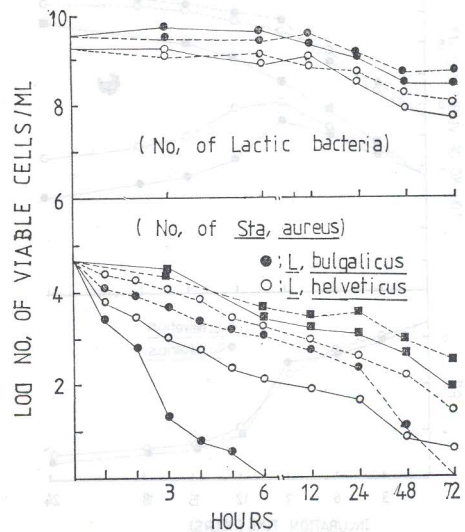
Solid line: stored at 30°C
 Broken line: stored at 5°C
 ■: *S. flexneri* in acidified skim milk cultured (pH3.6)

Fig. 7. Change in number of *Shigella flexneri* and lactic bacteria in Fermented milk.



Solid line: stored at 30°C
 Broken line: stored at 5°C
 ■: *E. coli* in acidified skim milk cultured (pH3.6)

Fig. 8. Change in number of *E. coli* and lactic bacteria in Fermented milk.



Solid line: stored at 30°C
 Broken line: stored at 5°C
 ■: *Sta. aureus* in acidified skim milk cultured (pH3.6)

Fig. 9. Change in number of *Staphylococcus aureus* and lactic bacteria in Fermented milk.

균의 생육저해효과를 조사한 바 *E. coli* A₂와 *Salmonella enteritidis*는 12시간부터 감소되기 시작하며 72시간에 완전히 사멸되었다고 보고한 바 본 조사성적에서도 병원성균중에 따라 다소 차이는 있으나 6~9시간부터 병원성균수의 감소를 나타내기 시작한 것으로 보아 비슷한 결과를 나타냈다.

이는 Dahiya 등¹⁸⁾이 유산균의 H₂O₂ 생성이 24시간 내에 시작된다고 주장한 조건과 일치한다고 생각된다.

따라서 병원성세균과 혼합배양시 *Salmonella typhimurium*만 제외하고는 유산균수 증식을, pH변화 등에 차이가 없는 것으로 보아 유산균의 성장 및 발효유의 pH에는 거의 영향이 없으며, *Salmonella typhimurium*만 제외하고는 발효상태에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

2. 醱乳內的 病原性細菌의 死滅效果

여러가지 질병을 일으키는 병원균이 발효유에 오염될 경우 유산균의 이에 대한 사멸효과를 검토하기 위하여 인위적으로 발효유 내에 병원균을 10⁴~10⁵ CFU/ml로 접종하고 30°C와 5°C에 보존하면서 경시적으로 생균수를 측정하였으며, 대조용으로 pH를 시험발효유와 같이 3.6으로 조정하여 시험하였던 바 결과는 그림 6, 7, 8, 9와 같았다.

그림 6에서와 같이 *Salmonella typhimurium*인 경우 5°C에서는 3~4시간 만에 사멸하였으며, 30°C에서는 2시간만에 사멸하였다. 대조용 임의탈지유에서는 30°C에 보존했을때는 48시간만에 사멸하였으나, 5°C에서는 72시간까지도 10³ CFU/ml을 유지하고 있었다.

그림 8에서와 같이 *E. coli*인 경우 5°C에 보존할때에는 유산균 모두 4시간만에 사멸하였으며, 30°C에 보존했을때는 3시간만에 사멸하였다.

대조용 임의탈지유에서는 30°C에서는 72시간에 10 CFU/ml을 유지하였으며, 5°C에서는 10³ CFU/ml을 유지하였다.

그림 9에서와 같이 *Staphylococcus aureus*인 경우 *L. bulgaricus*를 사용한 발효유에서는 5°C에서 72시간, 30°C에서는 6시간만에 사멸하였으며, *L. helveticus*를 사용한 발효유에서는 72시간까지 10~10² CFU/ml을 유지하고 있었다.

대조용 임의탈지유에서는 72시간에 10³ CFU/ml을 유지하고 있었다.

이와같이 *Salmonella typhimurium*과 *Shigella flexneri*, *E. coli*와 같은 Gram음성 bacillus균 등은 2~4시간만에 사멸하였으나 *Staphylococcus aureus*는 *L. bulgaricus*균을 사용한 발효유에서는 30°C에서 6시간, 5°C에서 72시간만에 사멸하였으며, *L. helveticus*균을

사용한 발효유에서는 72시간까지 10~10² CFU/ml을 유지하고 있었다.

또한 사용한 유산균별 병원성세균의 사멸효과를 조사한 바 *L. bulgaricus*가 *L. helveticus*보다 사멸효과가 높았으며, 5°C보다 30°C에 보존하였을 경우 더욱 사멸효과가 높은것을 알 수 있었다.

朴 등¹⁹⁾은 *L. casei*를 사용한 발효유에서 병원성세균의 사멸효과를 조사한 바 37°C에서 *Shigella*屬, *Salmonella*屬은 2~3시간만에, *Staphylococcus*屬균은 72시간만에 사멸하였으며, 5°C보다 37°C에 보존하였을 경우 사멸효과가 높았다고 보고한 바 있다.

본 조사성적에서 발효유내에서의 사멸효과는 시험균주중에 Gram음성균이 Gram양성균보다 감수성이 높게 나타난 것으로 보아 비슷한 결과를 나타냈다.

또한 발효유와 대조용 임의탈지유의 사멸효과가 다른것으로보아 장내감염균의 발육을 억제시킨 요인은 발효유중의 pH보다는 다른 억제물질에 의한 것이라고 본 Dahiya 등¹⁸⁾과 尹 등¹⁹⁾의 보고와 일치하는 것으로 생각된다.

結 論

乳酸菌醱乳시 原料乳에 乳酸菌과 腸內病原性細菌을 동시 접종했을때의 균수변화와 발효유내에서의 장내병원성세균의 사멸효과를 조사하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 乳酸菌과 腸內病原性細菌을 原料乳에 동시 접종시에 배양후 9시간 부터 病原性細菌의 증식저해가 나타났다.

2. 醱乳內 腸內病原菌은 30°C에서 본 실험에 사용한 Gram음성 *Bacillus*균은 4시간이내에 사멸되었으나 *Staphylococcus aureus*는 30°C에서 *L. bulgaricus*를 사용한 발효유에서 6시간, 5°C에서 72시간만에 사멸되었고, *L. helveticus*를 사용한 발효유에서는 72시간까지 10~10² CFU/ml을 유지하였다.

3. *L. bulgaricus*를 사용한 발효유가 *L. helveticus*를 사용한 발효유보다 병원성세균 억제효과가 높았다.

參 考 文 獻

1. Hamada, K., Y. Waki and T. Kitagawa: Studies on the effect of fermented milk by *Lactobacilli* on human health. Summary on the Reports on Yakult, p. 54-56, Yakult Hansha Co. Ltd., Tokyo 1971.

2. Raibaud, P.: Critical evaluation of the role of *Lactobacilli* in health. The 3rd International symposium on Lactic Acid Bacteria and Health, p. 3-20, Korean Public Health Association, 1983.
3. Sandine, W.E.: Functions of intestinal Lactic acid bacteria in humans. The 2nd Symposium on the Lactic acid Bacteria and Health, p.43-57, Korean Public Health Association, 1981.
4. 農水産部 畜産局: 酪農關係資料. 1984.
5. Gordon, D., J. Macrae and D. Wheeler: A *Lactobacillus* preparation for use with antibiotics. The Lancet 1:889-901, 1959.
6. Handan, I.Y. and E.M. Mikolajick: Acidolin, an antibiotic produced by *Lactobacius acidophilus*. J. Antibiotics, 27:631-636, 1974.
7. Dahiya, R.S. and M.L. Speck: Hydrogen peroxide fermentation by *Lactobacillus* and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy, Sci., 51:1568-1572, 1968.
8. Huhtanen, C.N.: Effect of acids on selenite inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin*. J. food protection, 41:289-290, 1978.
9. De Klerk, H.C.: Bacterio cinogeny in *Lactobacillus* ferment. Nature, 214, 609, 1967.
10. Drassar, B.S.: The normal microbial flora of man. In F.A. Sinner and J.G. Carr (ed.), Academic Press, London, 1974.
11. 강영재, 윤영호, 김현욱: 국산발효유음료의 미생물학적, 이화학적성질에 관한 연구. 한축지, 21: 543-551, 1979.
12. 최철순, 정재봉, 정상인, 양용태: 유산균발효유에서 분리된 *Lactobacillus casei*의 병원성장내세균에 대한 항균작용. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 18: 49-58, 1984.
13. 박은천, 윤화중, 이택주, 서부갑: 유산균과 장내 병원성세균의 길항작용에 관한 연구. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 5:85-94, 1981.
14. Bergey's manual of Determination Bacteriology, The William & Wilkins Co. Baltimore, 1974.
15. H.S. Park and E.H. Marth: Behavior of *Salmonella typhimurium* in skimmilk during Fermentation by Lactic acid bacteria. J. Milk Food Technol., 35:482-487, 1982.
16. A.P.H.A.: Standard method for examination of water and waste water. 15th ed, New York, p. 747, 1981.
17. 성문희: 유기산생성균의 병원성세균에 대한 생육 억제 효과에 관한 연구. 成大논문. 1984.
18. 윤영호, 이용욱, 윤래병: *Lactobacillus* spp. MRS 배양액의 peptide 북포특성과 *Escherichia coli*에 대한 억제작용에 관한 연구. J. Korea Publ. Hlth., 9:173-178, 1983.
19. Man. J.C., de M.M. Rogosa and M.E. Sharpe: A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bact., 23, 130, 1960.

論文參考

J. Hamada, K., Y. Waki and T. Kitagawa: Studies on the effect of fermented milk by *Lactobacilli* on human health. Summary on the Reports on Yakult, p. 54-58, Yakult Hamada Co. Ltd., Tokyo, 1971.