Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 1, 56—62 (1989)

장내 항세균성 낙산균의 분리 및 특성

곽종휘*·이정치·김태한·정필근·이금기

일동제약 중앙연구소

Isolation and Characteriaztion of a Butyric Acid Bacterium from Infant Feces

Kwag, Jong-Hui*, Jung-Chi Lee, Tae-Han Kim, Pil-Keun Chung and Kum-Ki Lee

Department of Microbiology, Research Laoratories, Il-dong Pharm., Co., Ltd.
Ansung 456-830, Korea

To find bacteria which can inhibit growth of enteropathogenic *Clostridium perfringens* ATCC 13124, spore forming butyric acid bacteria were isolated from 26 fecal samples of infants. Fourteen strains were found to be antagonistic to the enteropathogen and five of them produced butyric acid. A strain which produced the highest butyric acid was selected and identified as *Clostridium butyricum*.

This organism sporulated in SM medium in 36 hours with optimum rates at 37℃ and at pH 5.5. The spores tolerated well at high heat and acidity, and possible application of *Clostridium butyricum* as intestinal controller was discussed.

宮人近治는 장내용물로부터 항부패성을 갖는 혐기성 포자형성균 *Clostridium butyricum*을 1935년에 발견하여 보고하였다(1). *Cl. butyricum*은 장내에서 Amylase, Lipase, Protease같은 소화효소를 분비하여 영양을 적극적으로 기여하고, 낙산과 초산을 생성함으로써 장내 pH를 저하시켜 외부에서 침입한 병원균에 대한 길항작용과 유산균군의 발육촉진 작용을 가지고 있어 보건학적 견지에서 많은 연구가 이루어져 있다(2-7). 또한 포자형성으로 장기보존이 가능하기 때문에 정장제로 개발되어 오래전부터 널리 이용되고 있으며(7, 8), 임상적인 효과도 다수 보고되었다(8-14). 최근에는 쥐의 종양세포를 선택적으로 파괴하는 Kininase 효소를 생산한다는 항암효과에 대한 보고도 있다(15-17).

본 연구에서는 장내에서 서식하는 항세균성 유포자 낙산균을 건강한 유아로부터 분리 동정하여 포자형성 조건과 포자의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

분리원

병원에서 분만되어 위생적인 환경에서 양육되고 있는 한국의 남아로서, 장질환은 물론 항생제를 경구투여한 경험이 없는 생후 10개월의 건강한 모유영양아의 분변을 분리원으로 사용하였다.

분변채취 및 처리

상층이 유동 파라핀 기름층으로 된 멸균 혐기희석액(18) 9 m*l*의 시험관에 멸균된 면전봉으로 분변 1g 정도를 수거하여 넣고 밀봉하여 4℃ 이하의 저온에서 이동 보관하였다.

배 지

분리용 배지로는 Fluid thioglycollate(FT) 한천배지(Difco)를 사용하였고, 기본배지로는 GYP 배지(19)를 사용하였다. 균의 보존은 Cooked meat 배지(Difco)에서 1개월마다 계대 배양하여 4℃에서 보관하였다. 시험균주의 포자형성 배지는 Soy bean 1.5%, Starch 2.0%, Ammonium sulfate 0.3%,

Key words: butyric acid bacteria, enteropathogenic *Clostridium perfringens*, antagonistic strain, *Clostridium butyricum*
*Corresponding author.

Peptone 0.1%, $CaCO_3$ 1.2%의 조성을 가진 SM 배지를 사용하였다.

항세균성 균주의 선별

유아 분변으로부터 *Cl. perfringens*에 대하여 증식억제 작용을 가지는 혐기성 포자 형성균을 Smith의 Sandwich plating 방법(20)으로 분리하였다.

한천 2.0%의 FT배지 5 m*l*를 가하여 굳힌 Petri dish에 80℃에서 12분간 열처리한 분변 희석액을 가한 후, 동일 FT 한천배지 5 m*l*를 가하여 굳힌다. 37℃에서 48시간 Gas Pak System(BBL)을 이용하여 혐기배양한 후, *Cl. perfringens*의 포자가 m*l*당 10^5 정도 포함된 동일 FT 한천배지 5 m*l*를 도말하여 굳혀 37℃에서 48시간 2차 혐기배양한다. *Cl. perfringens*에 대하여 생육 억제환을 나타내는 집락을 Cooked meat 배지에 분리 배양한다.

분리된 균주의 항세균성 작용을 확인하기 위하여 FT 한천배지 위에 분리균주를 streaking하여 37℃에서 16시간 혐기배양한 후 *Cl. perfringens*의 포자가 m*l*당 10^5 정도 포함된 동일 FT 한천배지 5 m*l*를 가하여 도말하고 굳혀 37℃에서 48시간 혐기배양한다. 분리균주의 집락 주위에 *Cl. perfringens*의 생육이 억제되었는가를 확인한다.

포자현탁액

Cl. perfringens 균주의 포자 현탁액은 Smith(20)의 방법으로 준비하였다. 사용하기 전에 포자의 발아를 촉진시키기 위하여 80℃에서 10분간 열처리 하였다.

Glucose 정량

배양액중의 Glucose 농도는 Glucostat Kits (Sigma)로 제조회사의 지침에 따라 정량하였다.

휘발산 정량

배양액중의 휘발산은 Gas chromatography를 이용한 Patrick(21) 등의 방법에 준하여 정량하였다. Flame ionization detector가 부착된 Dual column gas chromatography(Varian 3700)를 사용하였고, Column은 Porapak QS, Column 온도는 160℃, Injector와 Detector의 온도는 220℃였으며 He gas의 유속은 40 m*l*/min이었다.

시험균주의 동정시험

시험균주의 동정을 위한 생리적, 생화학적 실험은 Takashi 등(22), Bachnanan(23), 그리고 Cummins 등(24)의 방법에 준하여 행하였다.

시험균주의 포자형성

SM 배지를 사용하여 37℃에서 혐기배양하였다. 15시간 전배양과 6시간 중간배양을 한 후 16*l*의 Jar Fermentor(Marubishi MSJ-30 u)에 중간배양액 5%를 접종하고 48시간 본배양하였다.

균수측정

영양세포와 포자의 균수측정은 Haematometer (Weber Scientific International, Lancing, England)와 Phase contrast가 부착된 광학현미경(Olympus BH-2)을 사용하였다.

시험제제

시험균주를 SM 배지에서 48시간 배양하여 Anema (25) 등의 방법으로 포자 현탁액을 얻은 후 본 연구실의 시험방법에 준하여 제제화 하였다. 비교 시판품으로서 *Cl. butyricum* 제제(Strong Miyairsan, 宮人菌株式會社)와 *Lactobacillus sporogenes* 제제(Biovita, 日東製藥)를 사용하였다.

생균수 측정

시험제제와 시판의 *Cl. butyricum* 제제는 식염수로 단계별 희석하여, 적당한 희석액을 FT 한천배지(Difco)에 접종한 후 37℃에서 16시간 혐기배양하여 형성된 집락을 계측하였다. *L. sporogenes* 제제는 식염수로 단계별 희석하여 적당한 희석액을 MRS 한천배지(26)에 접종한 후 45℃에서 48시간 배양하여 형성된 집락을 계측하였다.

결과 및 고찰

균 분리 및 시험균주의 선정

*Cl. perfringens*에 대하여 증식 억제작용을 가지는 14개의 집락은 26 분변시료중 10 시료에서 발견할 수 있었고, 그중 4 분변시료에서 5주의 낙산 생성균을 분리하였다. 이들 5 균주를 PGY 기본배지로 37℃에서 48시간 배양한 후 배양액중의 휘발산을 정량한 결과는 Table 1과 같다. Glucose로부터 낙산과 초산을 생성하였고 기타 휘발성의 유기산은 생성하지 않았다. 유기산 생산 능력이 우수한 균일수록 항세균력이 높다고 사료되어(27), 낙산 생성능이 가장 우수한 1 D-113 균주를 시험균주로 선정하였다. *Cl. perfringens*에 대하여 시험균주 생육 저해작용은 Fig. 1과 같다.

Table 1. Production of volatile acid by isolated strains.

Strains	IG (mM)	RG (mM)	CG (mM)	Butric acid (mM)	Acetic acid (mM)	Formic acid (mM)
ID-101	45.6	0.5	45.1	33.0	21.3	o
ID-105	45.6	0.4	45.2	32.0	15.7	o
ID-113	45.6	0.5	45.1	38.2	18.2	o
ID-150	45.6	0.5	45.1	37.5	11.7	o
ID-181	45.6	0.3	45.3	36.4	13.3	o

IG: Concentration of initial glucose
CG: Concentration of consumed glucose
RG: Concentration of residual glucose

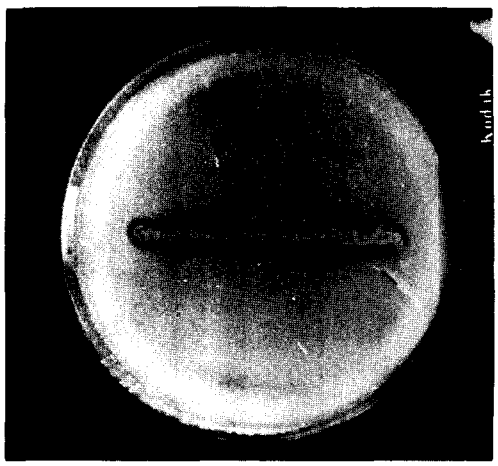

Fig. 1. Inhibition zone formed by the isolated ID-113 strain on the lawn of *Clostridium perfringens* ATCC 12124.

시험균주의 일반적 특성

시험균주 1 D-113의 일반적인 성질은 Table 2와 3에 나타내었다. Gram 양성균으로 균 형태는 간균이고 운동성이 있으며, 1.0~2.0μ×1.0μ 크기의 clostridia 형태의 포자를 형성하고 포자형성 위치는 subterminal 이었다. 일반적으로 세균에서는 배지중 탄소원인 Glucose가 고갈될 때 포자가 형성되는 것으로 알려져 있으나, 본 시험균주는 Table 4에 나타난 바와 같이 배지중 Glucose 농도가 1.0% 이상 잔존하는 배지에서도 포자를 형성하여 포자형성시 Glucose에 의한 Catabolic repression이 없는 것으로 나타났다. 또한 영양요구인자로 Biotin을 필요로 하였다.

Table 2. Taxonomical properties of the strain ID-113

Morphological characteristics
- Colonial morphology: Greywhite, Circular to irregular, Convex
- Cell morphology: Straight or curved rods, Oval subterminal spores.
- Gram stain: Positive
- Motility: Motile

Physiological characteristics
- Growth type: Facultative anaerobic
- Gas production: +
- Indole production: -
- H_2S production: -
- Vogez-Proskauer test: +
- Haemolysis: -
- Enzyme production:
  - Catalase: - Gelatinase: -
  - Lecithinase: - Amylase: +
  - Nitrate reductase: - Protease: +

+ : Positive, - : negative

Utilization of carbohydrates and related carbon compounds by the strain ID-113

Glucose	+	Xylose	+
Galactose	+	Mannitol	+(weak)
Fructose	+	Inulin	+(weak)
Lactose	+	Glycine	+(weak)
Maltose	+	Ribose	+
Raffinose	+	Cellubiose	+
Sucrose	+	Melibiose	-
Salicin	+	Cellulose	-
Arabinose	+	Trehalose	+
Mannose	+	Starch	+
Dextrose	+	Esculin	+
Glycogen	-	Amygdalin	+

* + : positive, - : negative

시험균주의 동정

시험균주 1 D-113은 Bergy's manual(23)에 기재된 *Cl. butyricum*과 *Cl. beijarinckii*의 일반적 성질과 모두 일치하였다.

영양요구성 차이를 이용한 Cummins 등(24)의 방법으로 Biotin 이외의 다른 영양요구 인자를 필요로

Table 4. Effect of glucose concentration on sporulation of strain ID-113 in PYG medium during 48 hr incubation.

Concentration of glucose(%)	Glucose consumed(%)	No. of cells ($\times 10^8$/ml)	Sporulation (%)
0	0	0	0
0.2	100	1.9	19
0.5	100	1.8	62
1.0	60	2.9	81
2.0	34	2.7	88
3.0	27	2.5	86

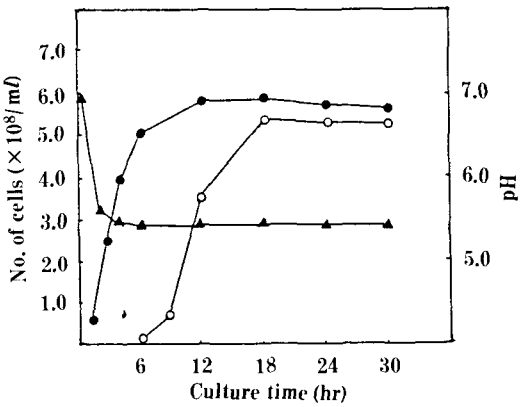

Fig. 2. Sporulation of the strain ID-113 in SM medium. ● – ●; No. of total cells, ○ – ○; No. of spores, ▲ – ▲; pH of medium

하지 않는다는 점과, Takashi 등(22)의 당 발효시험 방법으로 Inositol과 Ribose를 이용하여 유기산을 생성한다는 점을 확인하고 시험균주 1D-113은 *Cl. butyricum*으로 동정하였다. 장내 부패세균에 대하여 항세균성이 있다는 점에서 *Cl. butyricum* M. (5)과 포자형성시 Glucose에 의한 catabolic repression을 받지 않는다는 점에서 *Cl. butyricum* ATCC 60614 (19)와 아주 가까운 균주로 사료된다.

시험균주의 포자형성

SM 배지에서 배양시간 경과에 따른 시험균주의 포자형성 과정을 Fig. 2에 나타냈다. 12시간 배양하였을 때 영양세포의 증식이 정지되고 포자를 형성하기 시작하였으며, 배양 후 16~36시간에 영양세포의 95% 이상이 포자를 형성하였다.

포자형성에 미치는 온도의 영향

배양온도를 달리하여 SM 배지에서 48시간 혐기배양한 후 시험균주의 포자형성율을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 32℃ 이하와 42℃ 이상의 배양온도에서는 포자형성율이 10% 미만으로 나타났고 이때의 균 형태는 운동성이 없는 간균이었다. 영양세포 증식이 최적 온도는 30~37℃이나, 포자형성의 최적 배양온도는 37℃로 나타났다. 이러한 결과는 포자형성의 최적 온도는 영양세포 증식의 최적 온도와 일치하지만 그 범위가 매우 좁다는 일반적 포자형성의 조건과 일치하였다(19).

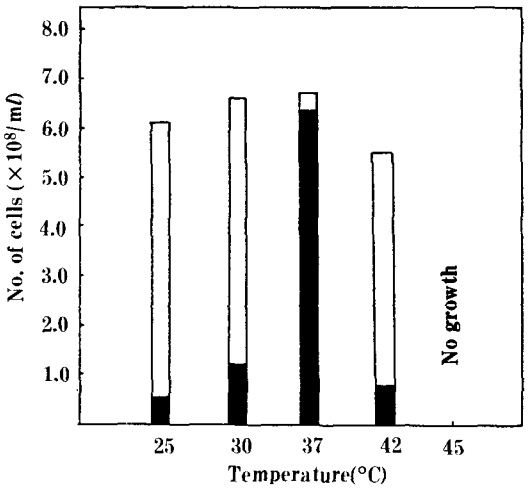

Fig. 3. Effect of temperature on sporulation of the strain ID-113 in SM medium during 48 hr incubation.
□ total cells, ■ spores

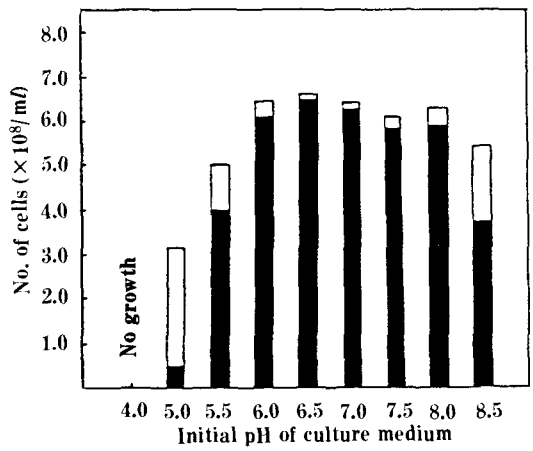

Fig. 4. Effect of initial pH on sporulation of strain ID-113 in SM medium during 48 hr incubation.
□ total cells, ■ spores

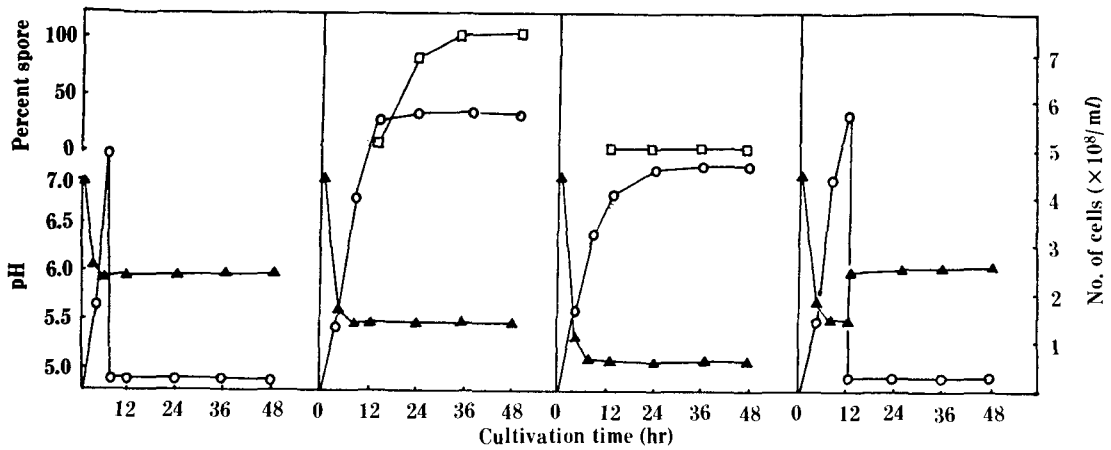

Fig. 5. Growth and sporulation of the strain ID-113 under different pH in SM medium.
○-○ : No. of cells, □-□ : percent spore, ▲-▲ : pH of medium

Table 5. Survival of spore preparations stored at 37°C

Strains	Survival rate(%) after storage for				
	0	2	4	6	8(weeks)
Strain ID-113	100	65	64	51	42
Clostridium butyricum M.	100	67	51	52	48
Lactobacillus sporogenes	100	86	73	62	60

포자형성에 미치는 pH의 영향

배양배지의 초기 pH가 포자형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 초기 pH를 달리한 SM 배지에서 48시간 혐기배양 후 포자 형성율을 조사하였다(Fig. 4). SM 배지의 초기 pH가 5.5 이하와 8.5 이상에서는 포자 형성율이 60% 이하로 비교적 낮았으나 초기 pH가 6.0~8.0 범위에서는 포자 형성율이 90% 이상이었다. 또한 배양중 포자형성의 최적 pH를 조사하고자 SM 배지 조성중 $CaCO_3$를 뺀 배지조성으로 일정한 pH를 유지시키면서 48시간 배양 후 포자 형성율을 측정하였다.

Fig. 5에 나타난 바와 같이 pH 5.0에서는 운동성이 없는 간균의 형태로 포자가 형성되지 않았다. pH 6.0에서는 배양 6시간 이후 영양세포의 급격한 자가분해 현상으로 원형질체가 형성되었고, 포자가 형성되기 전의 영양세포도 배양액의 pH를 5.5에서 6.0으로 조절하였을 때에도 마찬가지로 급격한 자가분해 현상이 나타났다. pH 5.5에서는 정상적인 영양세포 증식과 포자형성이 가능하다. 이러한 결과로부터 영양세포 증식의 최적 pH는 6.0~8.0의 넓은 범위를 가지나, 포자형성의 최적 pH는 5.5로 특이한 성질을 나타냈다.

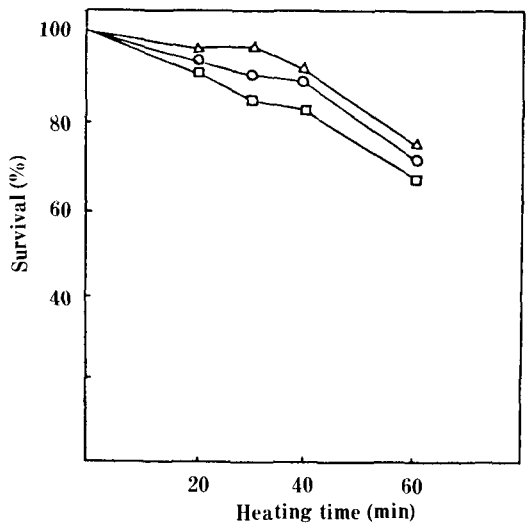

Fig. 6. Survival of spores during heat treatment at 90°C in saline.
○-○ : strain ID-113, □-□ : *Cl. butyricum* M. △-△ : *L. sporogenes*.

시험균주를 이용한 제제화시험

제제화 한 시험균주 1D-113의 포자를 유포자 유산균과 낙산균 제제의 시판품과 비교한 결과는 다음과 같다.

보존성 : 37℃의 배양기에서 시험제제와 비교 시판품을 2개월간 보관하였을 때 생존율이 시험균주는 42%, *Cl. butyricum* M.은 48%, *L. sporogenes*는 60%로 나타났다(Table 5). 시험균주는 *Cl. butyricum* M.과 비교해 볼 때 보존성에서 차이가 없는 것으로 나타났고, 시험균주는 *L. sporogenes*보다는

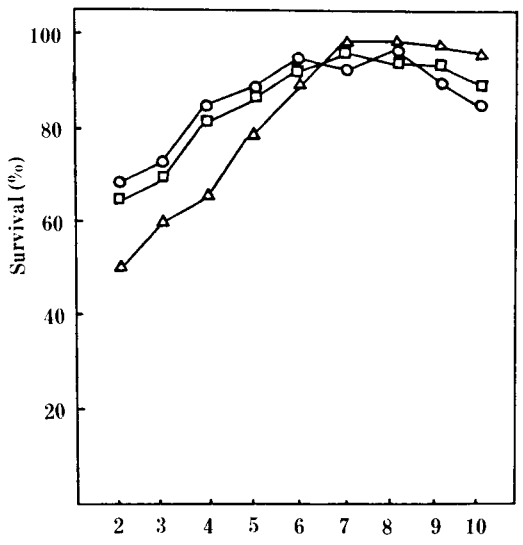

Fig. 7. Survival of spores under different levels of pH Spores were incubated for 1 hr at 37°C in Sorensen buffer having various pH values.
○-○: strain ID-113, □-□: *Cl. butyricum M.* △-△: *L. sporogenes.*

보존성이 낮은 것으로 나타났다.

내열성 : 생리식염수에 균 제제를 현탁하고 90℃에서 20~60분 동안 열처리한 후 생존율을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 90℃에서 60분간 열처리한 후 생존율이 시험균주는 72%, *Cl. butyricum* M.은 66%, *L. sporogenes*는 77%로 나타났다. 시험균주는 *Cl. butyricum* M.과 *L. sporogenes*와 열내성을 비교해 볼 때 큰 차이를 나타내지 않았다.

내산성 : pH 2.0~10.0 범위의 Sörensen 완충용액(28)으로 균 제제를 37℃에서 1시간 처리한 후 생존율을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 시험균주와 *Cl. butyricum* M.은 pH 4.0~10.0 범위에서 80% 이상의 높은 생존율을 나타냈으나, pH 3.0 미만에서는 80% 이하로 나타났다. *L. sporogenes*는 pH 4.0 이하에서 70% 이하의 낮은 생존율을 나타냈으나 pH 9.0 이상에서는 시험균주와 Cl. butyricum M.보다 생존율이 10% 이상 높았다. 이상의 결과로 볼 때 시험균주와 *Cl. butyricum* M.은 *L. sporogenes*보다 내산성은 높으나, pH값이 높은 알카리 범위에서는 안정성이 낮은 것으로 나타났다.

요 약

유아 분변으로부터 장내 병원균인 *Cl. perfringens* ATCC 13124에 대하여 생육저해 작용을 가지는 낙산 생성균주 1D-113을 분리하였다. 1D-113 균주는 *Cl. butyricum*으로 동정되었다.

임상적인 응용을 위하여 1D-113 균주의 포자형성과 포자의 성질을 조사하였다. SM 배지에서 12시간 배양 후 포자를 형성하기 시작하여 36시간까지 포자를 형성하였으며, 이때 포자형성율은 95% 이상이었다. 또한 시판의 유포자성 낙산균과 유산균 정장제와 비교해 볼 때 제제화한 1D-113 균주의 포자는 양호한 열내성, 보존성 및 내산성을 가지고 있었다.

참고문헌

1. 宮人近治 : 千葉醫學會誌, **13,** 2311-2315(1935).
2. 武田英二, 井上清, 加藤雅子, 阿達恒一, 田中弘, 林弘治 : 新藥と臨床, **25**(9), 103(1978).
3. 宮人近治 : 特許公報, 昭, 37-8300(1962).
4. 中鳥正太郎 : 特許公報, 昭, 36-4399(1961).
5. 西澤幾男, 伊勝廣 : 宮人菌研究所報, **7,** 164(1973).
6. 光岡知足 : 腸內菌の世界, 叢文社, 東京, **16**(1980).
7. 永速一郎, 金久保好男, 鈴木進 : 藥製學, **28**(4), 37(1966).
8. Han, I.K., S.C. Lee, J.D. Kim, P.K. Jung, and J.C. Lee: *Kor. J. Animal Sci.*; **26**(2), 158 (1984).
9. Han, I.K., J.D. Kim, J.H. Lee, T.H. Kim, J.H. Kwag: *Kor. J. Animal Sci.*, **26**(2), 166 (1984).
10. 吉岡一, 田坂芳郎, 田坂重元, 褐井ヤキ : 臨床小兒醫學, **14,** 281(1967).
11. 吉谷和男 : 新藥と臨床, **13,** 532(1964).
12. 佐伯孝男, 野添昇, 朝倉宏 : 治療, **41,** 1304(1959).
13. 小張一峯, 川上稔 : 新藥と臨床, **11,** 175(1962).
14. 中山恒明, 山本勝美 : 新藥と臨床, **9,** 477(1960).
15. Schlechte, H., M. Mehnert, A. Thiem and U. Schmeeweiss: *Archiv fur Geshwulstforschung,* **50,** 53 (1980).
16. Fredett, V. and C. Plante: *Can. J. Microbiol.,* **16,** 249 (1970).
17. Gericke, D.: *Rev. Can. Biol.* **36**(3), 195 (1977).
18. Stark, P.L. and A. Lee: *J. Pediatrics,* **100**(3), 362 (1982).
19. Nasuno, S. and T. Asai: *J. Gen. Appl. Microbiol.,* **6**(2), 71 (1960).
20. Smith, L.D.S.: *Appl. Microbiol.,* **30**(2), 310 (1975).
21. Patric, J.T. and T.M. Cogan : *Appl. Environ.*

Microbiol., **47**(6), 1250 (1984).
22. Ikeda, T., Y. Benno, T. Fusisawa and T. Mitsuoka: *Bifidobacteria Microflora,* **71**(1), 571 (188).
23. Bachnan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,* The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 340 (1974).
24. Cummins, C.S. and J.L. Johnson: *J. Gen. Microbiol.* **67,** 33 (1971).
25. Anema, P.J. and J.M. Geers: *J. Appl. Bacteriol.* **36,** 553 (1973).
26. Sharpe, M.E.: *Diary Science Abstracts,* **24**(3), 233 (1972).
27. Baek, Y.J. and M.S. Bae: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(2), 111 (1988).
28. 微生物學 Hand book, 技報堂, 東京, 1412 (1957).

(Received December 20, 1988)