

## 생균제 개발을 위한 유산균의 선별 및 동결건조 보호제의 효과

임유범<sup>†</sup> · 백남수\* · 김영만\*\*

(주)넬바이오텍, \*(주)메디오젠, \*\*한경대학교 식품공학과

### Screening of Lactic Acid Bacteria for the Development of Probiotics and the Effect of Cryoprotectant Agents

Yoo-Beom Lim<sup>†</sup>, Nam-Soo Paek\*, and Young-Man Kim\*\*

NEL Biotech Co., Ltd, 808-15 Duksan-ri, Samjuk-myon, Ansong-si, Kyunggi-do, 456-882, Korea

\*MEDIOPEN Co., Ltd, Seoul 133-111, Korea

\*\*Department of Food Science & Technology, Hankyong University, Ansong 456-800, Korea

#### Abstract

For the development of probiotics, three strains having psychrophilic and salt tolerant characteristics were isolated from Kimchi. Among the isolated strains, MG19, MG89 and MG208 were identified as *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus plantarum*, respectively.

The relationship between cryoprotectant and the viability of freeze dried strains has been studied. The most effective cryoprotectant for MG19 was found to be 10% skim milk contained 1% soluble starch having the survival rate of 71.4%. In MG89, 10% skim milk contained 1% sucrose and 10% skim milk contained 1% fructose in MG208 were showed effective cryoprotectant having the survival rate 68.9% and 64.7%, respectively.

These results suggest that these isolated strains can play an important role as probiotics in aquaculture.

Key words : aquacultured fish, cryoprotectant agents, direct-fed Microbials(DFMs), freeze drying

#### 서 론

생균제란 사람, 동물, 가축, 물고기 등 숙주의 장내 미생물 균총의 균형을 개선시키는 효과를 갖는 생균제제를 의미한다.<sup>1)</sup> 이와 같은 생균제는 장내 세균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병 예방, 면역활성화작용, 합암작용, 콜레스테롤 저하, 유당불내증의 경감, 변비억제 등의 기능이 있다.<sup>2)~6)</sup> DFMs(Direct-fed Microbials)로 사용되고 있는 미생물은 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*과 같은 유산균이 주류를 이루고 있으며, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Pediococcus* 등은 주

로 동물 사료 첨가제로 많이 사용되고 있다.<sup>7),8)</sup>

미생물의 장기보존을 위한 동결건조는 미생물 균체를 냉동 건조시킴으로써 저장하는 방법이며<sup>9)</sup>, 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다.<sup>10)</sup> 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등에서 동결건조의 장점을 찾을 수 있는 반면 동결건조 과정에서 균체의 손상을 받아 활성과 생존율에 많은 영향을 미치게 되므로 미생물 균체의 생존율을 최대한 높일 수 있는 방법이 요구된다. 동결건조보호제(cryoprotectant agents)는 생존율에 미치는 가장 중요한 인자이지만<sup>11)</sup> 보호제의 역할은 미생물의 종류, 동결조건, 건조시간 등에 따라 다르며, 미생물의 종류에 따라서는 보호

<sup>†</sup> Corresponding author : Yoo-Beom Lim

제가 생존율에 악영향을 미칠 수도 있다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 생균제로서 이용 가능한 유산균을 김치로부터 분리하고 동정하였으며 특히 해수양식어 사료 첨가제로 이용 가능한 균주를 선별하기 위해 저온성, 내염성 특성을 갖는 균주를 분리하였다. 또한 유산균을 생균제로서 이용할 수 있는 한 가지 방법으로서 동결건조 중 균의 생존율을 최대한 높일 수 있는 동결건조보호제의 종류에 대해 시험하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리

서울, 경기 지역에서 수집한 5종의 숙성된 김치를 균질화 하여 착즙한 다음 멸균된 생리식염수(0.9% NaCl)로 단계희석하고 BCP plate count agar(peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, polysorbate80 0.1%, L-cystine 0.01%, bromocresol purple 0.005%, agar 1.5%, 이후 BCP 배지로 명명)에 도달하여 20°C에서 2일간 배양 후 균체 주변을 노란색으로 변색시킨 균주 200여주를 1차 분리하였다. 분리된 균주를 5% NaCl이 함유된 MRS(proteose peptone 1%, beef extract 1%, yeast extract 0.5%, dextrose 2%, polysorbate80 0.1%, ammonium citrate 0.2%, sodium acetate 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 0.01%, MnSO<sub>4</sub> 0.005%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%) 배지에 접종하여 15°C에서 3일 배양 후 생육한 균주를 최종 선별하여 분시험의 공시 균주로 사용하였다.

### 2. 배양특성

온도별 균의 배양시험은 BCP 배지를 사용한 평판 배양법으로 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 40°C에서 24시간 배양 후 집락의 생성 유무를 측정하여 생육온도 범위를 확인하였다. pH에 따른 배양시험은 pH를 각각 pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.8, pH 7.5로 보정한 BCP 배지를 사용한 평판배양법으로 30°C에서 24시간 배양하여 집락 생성 유무를 확인하였다. 내염성 시험은 NaCl을 각각 1%, 3%, 5%, 6%, 7% 첨가한 BCP 배지를 사용하여 생육 유무를 확인하였다.

### 3. 생리, 형태학적특성 및 동정

생리 형태학적 특성 시험을 위해서는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>13)</sup>와 Manual of Methods for General Bacteriology<sup>14)</sup> 등의 세균분류 동정 지침서의 시험항목을 기준으로 해서 각종 분류 동정 시험방법에 따라 catalase,<sup>15)</sup> oxidase,<sup>16)</sup> gram<sup>17)</sup>

염색의 유무, 당 이용성 시험을 하여 동정하였다.

### 4. 동결건조보호제의 효과

분리균주를 6L 발효조(NBS, Bioflo 2000)에서 최적생산배지(whey 1.0%, peptone 1.0%, glucose 2.0%, yeast extract 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%)를 사용하여 배양한 후 원심분리(CR-2, Hitachi, 1,000×g)를 10분간 하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 동결건조 보호제와 혼합하여 균질화한 후 -40°C로 동결시킨 다음 동결건조기(II Shin Lab.)에서 건조하였다. 건조된 균체는 분쇄하여 분말화 시킨 다음 멸균 생리 식염수에 단계 희석하여 BCP 배지에 도달한 후 25°C에서 48시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 동결 건조 후의 생존율을 측정하였다.

### 5. 동결건조분말의 인공위액에서 생존 효과

각 동결건조 보호제에 따른 유산균의 내산성을 시험하기 위해 인공위액(Kobayashi<sup>18)</sup>)의 방법에 따라 HCl을 사용하여 pH를 3.0으로 조정된 MRS broth에 pepsin 1.0% 첨가)을 37°C로 맞추어 30분 동안 방치한 후 멸균 생리 식염수에 단계 희석하여 BCP 배지에 도달한 후 25°C에서 48시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 동결건조 후의 생존율을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 균주의 분리

저온 숙성 김치를 분리원으로 하여 BCP 배지에서 노란색 환을 형성하는 200여 개의 단일 colony를 1차 분리하였으며 1차 분리된 균주를 NaCl이 5.0% 함유된 MRS 배지를 사용하여 15°C에서 3일간 배양하여 생육한 균주를 2차 선별하여 최종적으로 MG19, MG89, MG208 등 3종의 균주를 최종 선별하였다.

### 2. 분리균주의 동정

MG19 분리 균주의 특성을 조사한 결과 Gram 양성 의 간균으로서 운동성이 없었으며 catalase와 oxidase 가 음성이었고 glucose로부터 gas를 생성하였으며 arginine으로부터 NH<sub>3</sub>를 생성하였다. 또한 15°C 및 5% NaCl 존재하에서 생육하였으나 45°C에서는 생육 하지 못하였다. 탄소원 이용성을 조사한 결과 arabinose, ribose, amygdalin, raffinose, salicin등은 이용하였으나 rhamnose, mannitol, melezitose등은 이용하지 못하였다. MG89, MG208 균주의 특성 및 탄소원 이용성에 대한 결과는 Table 1, 2에 나타내었다. 이상의 형

**Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strains**

Classification	MG19	MG89	MG208
Morphological characteristics			
Shape	rod	coccus	rod
Gram stain	+	+	+
Motility	-	-	-
Spore formation	-	-	-
Facultative anaerobic	+	+	+
Physiological characteristics			
Production of catalase	-	-	-
Production of oxidase	-	-	-
NH <sub>3</sub> from arginine	+	+	-
Gas from glucose	+	-	-
Isomer of lactic acid	DL	L(+)	DL
Growth at 15°C	+	+	+
Growth at 45°C	-	+	-
Growth in 5% NaCl	+	+	+

+ : positive, - : negative.

태 및 생리화학적 특성을 토대로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류기준 색인에 따라 고찰한 결과 MG19 균주는 *Lactobacillus brevis* 또는 그 유연균으로 동정되어 *Lactobacillus brevis* MG19로 명명하였고, MG89는 *Enterococcus faecium* 또는 그 유연균으로 동정되어 *Enterococcus faecium* MG89로 명명하였다. 또한 MG208은 *Lactobacillus plantarum* 또는 그 유연균으로 동정되어 *Lactobacillus plantarum* MG208로 명명하였다.

### 3. 동결건조 보호제의 효과

본 시험에서는 유산균의 동결건조시 당 및 당알콜류와 기타 이미 알려진 동결건조 보호제를 첨가했을 때 건조후 생존수의 변화에 미치는 영향을 관찰하였다. 당, 당알콜 등을 제외한 성분들에 대해서 유산균의 생존율을 시험한 결과 skim milk를 10% 첨가했을 때 MG19는 58.15%, MG208은 32.54%, MG89는 54.87%의 생존율을 보였고, whole milk, casein은 보다 낮은 생존율을 보였다.

기본 동결건조 보호제로 결정된 skim milk 10%에 첨가하여 쓸 수 있는 성분 중 당, 당알콜류에 대해 세포의 생존율을 조사한 결과는 다음과 같다. MG19는 soluble starch가 1% 첨가된 시료에서 71.4%로 생존율이 가장 높았고 lactose와 mellezitoserk 1% 첨가된 시료에서도 60% 이상의 생존율을 나타내었다. MG208

**Table 2. Carbon utilization of the isolated strains**

Carbon source	MG19	MG89	MG208
Xylose	+	+	-
Arabinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Rhamnose	-	-	-
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	-
Erythritol	-	n	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	+	+
Sorbitol	-	-	+
Xylitol	-	-	-
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Arbutine	+	n	+
Melibiose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Gentiobiose	+	n	-
Turanose	-	n	+
Melezitose	-	-	+
Raffinose	+	-	+
Trehalose	+	+	+
Inulin	-	-	-
Glycerol	-	-	-
Amygdalin	+	+	+
Esculin	+	+	+
Salicin	+	+	+
Gluconate	+	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	n	+
N-acetyl glucosmine	-	n	+

+ : positive, - : negative, n : not detect.

은 fructoserk 1% 첨가된 시료가 74.7%로 가장 높았고 dextrose, cellobiose, galactose, glycerol, soluble starch, xylitol 등이 1% 첨가된 시료에서도 40% 이상의 우수한 생존율을 나타내었다. MG89의 경우는 mellezitose, glycogen, xylose, sorbose 외에는 시험항목 모두 40% 이상의 세포 생존율을 보였다. 이상 세 가지 시험 유산균에서 당, 당알콜류가 동결건조 보호제로서의 역할을 하는데 눈에 띄는 유의성을 보이지

**Table 3. Freeze-drying cryoprotectant agents and survival rate of the isolated strains**

Cryoprotectant agent	Survival rate(%)		
	MG19	MG89	MG208
Skim milk 10%	58.15	54.87	32.54
Skim milk 15%	42.35	42.15	28.97
Whole milk 10%	46.00	45.50	22.00
Whole milk 15%	45.70	50.20	31.56
Whey 10%	38.50	45.00	27.00
Whey 15%	36.00	48.20	28.93
Casein 10%	41.50	47.85	29.25
Casein 15%	34.00	49.20	20.50
C + 1% Lactose	61.74	52.92	27.48
C + 1% Sucrose	49.82	68.91	26.46
C + 1% Maltose	40.24	46.42	20.72
C + 1% Dextrose	27.52	44.12	42.06
C + 1% Fructose	26.03	54.16	64.66
C + 1% Mellezitose	60.71	24.13	33.67
C + 1% Cellobiose	32.93	60.52	42.35
C + 1% Rhamnose	53.68	49.90	37.22
C + 1% Galactose	45.82	39.26	42.81
C + 1% Mannose	47.67	39.84	25.19
C + 1% Glycogen	27.63	23.39	18.00
C + 1% Glycerol	42.56	50.83	44.43
C + 1% Soluble starch	71.42	47.40	42.30
C + 1% Xylose	17.97	32.87	26.03
C + 1% Sorbose	36.08	29.19	35.32
C + 1% Arabinose	35.05	46.04	31.65
C + 1% Inulin	48.93	59.47	48.26
C + 1% Xylitol	10.00	66.44	40.64
C + 1% Dulcitol	19.11	58.28	17.80
C + 1% Sorbitol	38.17	76.21	28.83
C + 1% Inositol	33.34	42.11	17.05
C + 1% Mannitol	54.12	66.31	13.33
C + 1% Raffinose	53.57	54.50	18.97
C + 1% Na-glutamate	55.98	50.26	37.75
C + 3% Na-glutamate	55.61	59.45	43.94
C + 1% Na-ascorbate	57.64	66.79	41.96
C + 3% Na-ascorbate	55.89	61.32	45.76
C + 1% PEG 400	60.26	65.60	63.79
C + 3% PEG 400	63.23	70.85	48.99
C + 1% Peptone	42.38	55.04	41.93

C : skim milk 10%.

는 않았으나, 균종에 따라서는 50% 이상 생존율에 차이를 나타내었다.

일반적인 동결건조 보호제로 알려진 sodium glutamate, polyethylene glycol, sodium ascorbate, peptone에 대해 유산균의 생존율을 시험한 결과 대체적으로 고른 생존율을 보였으며, 그 수치 또한 대체적으로 높게 나타났다. Polyethylene glycol 600은 세 가지 균에서 모두 60% 이상의 생존율을 보였으며, MG19에서 peptone을 제외하고는 모두 50% 이상의 생존율을 보였다. MG208은 40% 전후의 생존율로 다소 낮았으나 일반적인 당 및 당알콜류와 비교했을 때 낮지 않은 생존율을 보였음을 알 수 있다. MG89는 모두 60% 전후의 생존율을 나타내어 MG19, MG208에 비해 높은 수치를 나타내었다(Table 3).

#### 4. 동결건조분말의 인공위액에서 생존 효과

동결건조 보호제별로 건조된 시험균 분말로 인공위액에서의 생존율을 시험한 결과 MG19는 최고 79.26%

**Table 4. In artificial gastric juice survival rate of the isolated strains**

Cryoprotectant agent	Survival rate(%)		
	MG19	MG89	MG208
Skim milk 10%	51.47	51.47	66.03
C + 1% Lactose	79.26	79.26	48.38
C + 1% Sucrose	51.72	51.72	39.31
C + 1% Maltose	65.45	65.45	42.26
C + 1% Dextrose	26.04	26.04	40.72
C + 1% Fructose	25.00	25.00	51.11
C + 1% Mellezitose	30.68	30.68	43.15
C + 1% Cellobiose	43.67	43.67	55.13
C + 1% Rhamnose	40.13	40.13	52.97
C + 1% Galactose	64.55	64.55	52.57
C + 1% Mannose	46.44	46.44	69.42
C + 1% Glycogen	42.85	42.85	69.66
C + 1% Glycerol	38.00	38.00	52.72
C + 1% Soluble starch	23.73	23.73	62.03
C + 1% Xylose	60.00	60.00	69.29
C + 1% Sorbose	46.36	43.26	42.77
C + 1% Arabinose	43.26	46.26	68.30
C + 1% Inulin	57.14	57.14	51.81
C + 1% Xylitol	46.66	46.66	63.63
C + 1% Dulcitol	48.27	48.27	36.14
C + 1% Sorbitol	53.92	63.92	65.07
C + 1% Inositol	61.53	61.53	30.76
C + 1% Mannitol	59.65	59.65	32.25
C + 1% Raffinose	50.26	50.26	68.18

C : skim milk 10%.

에서 최저 23.73%까지의 생존율을 보였으며 MG208은 최고 69.29%에서 최저 36.14%의 결과를 나타내었다. MG89는 skim milk 10%와 s.kim milk 10%에 mellezitose 1%를 섞은 것에서 각각 73.07%와 78.94%로 높은 생존율을 보였다(Table 4).

## 요 약

Probiotics를 개발하기 위하여 저온성 및 내염성의 특성을 갖는 균주를 김치로부터 분리하였다. 분리한 3종의 균주를 동정한 결과 MG19는 *Lactobacillus brevis*, MG89는 *Enterococcus faecium*, MG208은 *Lactobacillus plantarum*으로 확인되었다. 분리된 3종의 균주에 대한 동결건조 보호제 시험을 한 결과 MG19는 10% skim milk + 1% soluble starch에서 71.4%로 생존율이 가장 높았고 lactose와 mellezitose에서도 60% 이상의 생존율을 나타냈다. MG89는 sorbitol에서 76.2%로 생존율이 가장 높았고 sucrose, xylitol, mannitol 등에서도 66% 이상의 생존율을 나타내었다. MG208은 fructose에서 64.7%의 생존율을 보였다. 인공위액에서의 균 생존율을 시험한 결과 lactose, mellezitose, glycogen, mannose, xylose 등에서 70% 정도의 우수한 생존율을 보였다. 이러한 결과로부터 본시험에 사용된 동결건조 보호제 가운데 몇몇은 유산균의 종류에 따라 다르지만 동결건조제품의 제조나 사료첨가제로 제조시 산업적인 이용이 가능할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Fuller, R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378(1989).
- Matsuzaki, T., Hashimoto, S. and 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).
- Tagiguchi, R., Mochizuki, E., Suzuki, Y., Nakajima, I. and Benno, Y.: *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 on Harmful interstitial bacteria. *J. Int. Microbiol.*, 11, 11-17(1997).
- Gilliland, S. E. and Walker, D. K.: 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).
- Kim, H. S. and Gilliland, S. E.: *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.*, 66, 959-966 (1983).
- Shah, N.: *Lactobacillus acidophilus* and lactose intolerance, a review. *ASEAN Food J.*, 9, 47-54(1994).
- Lee, Y-K. and Salminen, S.: The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 241-245 (1995).
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401-1412(1995).
- Heckley, R. J. : Preservation of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 24, 15-28(1978).
- Morich, T. : Lactic acid bacteria in animal industry. *Japanese J. Zootech. Sci.* 44(11), 535-553(1973).
- 森地敏樹: 保護分散媒の作用機序. 凍結及び乾燥研究會會誌. 26, 74-76(1980).
- Heckley, R. J. : Preservation of bacteria by lyophilization. *Adv. Appl. Microbiol.* 3, 1-28 (1961).
- Kreig, N. R. and Holt, J. G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Gerhardt, P. G., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Kreig, N. R. and Phillips, G. B. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.
- Hanker, J. S. and Rabin, A. N. : Color reaction streak test for catalase -positive microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 2, 463-464(1975).
- Robert M. Smibert and Noel R. Krieg : *General Characterization, Manual of Methods for General Bacteriology*. 420(1981).
- Doetsch, R. N. : *Determination Methods of Light Microscopy, Manual of Methods for General Bacteriology*. 26-27(1981).
- Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T.: Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29, 691-697(1974).