

기능성 Probiotics 개발을 위한 미생물의 분리 및 특성조사

김소영¹, 최미희², 이미애², 이다룡², 김홍¹, 채희정^{1,2}
 호서대학교 벤처전문대학원¹, 호서대학교 식품생물공학전공²

Isolation and Characterization of Microorganisms for the Development of Functional Probiotics

Soyoung Kim¹, Mi-Hee Choi², Mi-Ae Lee², Da-Rong Lee², Hong Kim¹
 and Hee Jeong Chae^{1,2}

¹Graduate School of Venture, Hoseo University

²Department of Food and Biotechnology, Hoseo University

서론

가축의 성장을 촉진시키고 사료효율을 높여주는 사료첨가제로서 항생제는 1950년대부터 축산분야에서 가축의 사료에 사용하여 많은 생산성 향상을 도모하고 있다. 하지만 최근 가축에게 사용한 항생물질이 우유, 고기, 계란 등의 축산물에 잔유 가능성과 축산물을 통하여 섭취된 항생물질이 인체내 내성증가로 항생물질에 대한 저항성 출현 등의 문제점 때문에 전 세계적으로 항생제 사용이 규제되고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 항생제 사용을 줄이고, 생균제와 같이 축산물생산에 이용할 수 있는 비항생적 생물학적 방법으로의 연구개발이 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 생균제를 가축의 사료에 혼합 사용할 경우 생육촉진제로서 효과를 가지기 위해선 적당량의 생균이 존재해야 하고 위산이나 담즙에 내성을 있어야 하며 장내에 서식하여 생산성 능력을 가져야 한다.

본 연구에서는 가축의 사료섭취 효율을 높임과 동시에 항생제를 대체할 수 있는 사료첨가제용 생균제 개발을 목적으로, 내산성과 내담즙성이 있으며 질병치료시 장내에 존재할 수 있는 항생물질에 대하여 내성을 가지는 생균활성 미생물 균주를 분리하고, 우수 균주를 선별하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 분리

시료를 멸균된 증류수와 shaking하여 24시간 정도 방치 후 원심분리하여 상등액을 취해 적당히 희석하고 Yeast-maltose, Nutrient agar, Bennet's agar 배지에 도말하여 35°C와 5°C에서 48시간 배양하여 단일 colony를 분리하였다.

2. 내산성

배지를 멸균 후 pH를 2.0, 2.5, 3.0으로 조절한 배지 5ml에 분리균주 배양액을 0.1ml 접종하고 1시간 처리 후 생균수를 조사하였다.

3. 내담즙산성

분리균주 배양액을 0.1%, 0.3%, 0.5% oxgall이 첨가된 0.05M 인산나트륨 완충용액에 접종하여 24시간 배양 후 0.5% peptone용액으로 희석한 후 배양하여 생균수 조사하였다.

4. 항생제 내성

고체배지에 분리균주 배양액을 0.1ml 도말하고, kanamycin(30 μ g/ml), nisin(500 μ g/ml), ampicillin(500 μ g/ml), streptomycin(50 μ g/ml) 및 tetracycline(20 μ g/ml)에 대하여 paper disk assay 방법으로 항생제 내성을 검토하였다. 항생제는 Sigma사의 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 분리

세 종류의 배지에 도말하여 35°C, 55°C에서 배양한 결과, 총 61개의 단일 콜로니를 얻을 수 있었다(Table 1). 균주의 명명은 배지이름의 약자에 숫자를 표기하여 나타내었다.

Table 1. Isolation of Microorganisms from soil

	Nutrient agar (NA)	Yeast-maltose (YM)	Bennet's agar (BA)
35°C	NA29 - NA32 (4 colony)	YM1 - YM20 (20 colony)	BA1, BA4 (2 colony)
55°C	NA1 - NA28 (28 colony)	-	BA2, BA3, BA5 - BA9 (7 colony)
Total		61 colony	

2. 분리균주의 내산성 측정결과

분리균주 61종 중에서 산생성이 있는 YM균주의 내산성을 검토하였다. 결과는 Table 2와 같다. 내산성은 YM 12, 19가 가장 좋게 나타났으며, YM 2, 3, 8, 17, 18, 20도 어느 정도 내산성을 나타냈다. Table 3에서 보는 바와 같이 pH2.5에서 1시간 처리 후 YM 12, 19의 생존율은 각각 24%, 30%로 나타났다. 이는 종래에 보고된 결과에 비교하여 비교적 높은 pH내성을 나타냈다.

Table 2. pH tolerance of the isolated strains

pH	Strains(YM)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3.0	-	++	++	-	-	+	-	++	+	-	++	++	-	+	+	+	+	+	++	+
2.5	-	++	++	+	-	+	-	++	+	-	+	++	-	+	+	+	+	+	++	+
2.0	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-	+	-	+	+	++	+	

++ ; good growth, + ; normal growth, - ; no growth

Table 3. Viability of the strains YM12 and YM19 at acidic pH

pH	Viability(CFU/ml)		Survival(%)	
	YM12	YM19	YM12	YM19
6.2	6.6×10^8	2.7×10^9	100	100
3.0	6.3×10^8	2.0×10^9	95	87
2.5	1.6×10^8	7.0×10^8	24	30
2.0	4.8×10^7	2.4×10^8	7.3	10.4

3. 분리균주의 내담즙산성 측정결과

분리균주 중 YM의 모든 균주가 담즙산 0.1%, 0.3%, 0.5%에서 내성을 나타냈다. 그 중에서 YM2, 3, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 19 균주가 높은 담즙내성을 나타냈다(Table 3).

Table 3. Bovine resistance of the isolated strains

bovine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Strains(YM)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
100	++++	++	++++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
300	+	++	++	++	+	++	+	++	+	+	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+
500	+	++	++	++	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+

++ ; good growth, + ; normal growth, - ; no growth

4. 분리균주의 항생제 내성 측정결과

분리균주의 항생물질 내성을 검토한 결과, 거의 대부분의 YM균이 항생제 내성을 나타냈고, 특히 YM 2, 3, 8, 12, 17, 18, 20균이 높은 내성을 나타냈다(Table 4). 이는 이전에 보고된 경우와 비교하여 모든 항생제 내성이 매우 우수하다는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Antibiotic resistance of isolated strains

Antibiotic ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Strains						
	YM2	YM3	YM8	YM12	YM17	YM18	YM20
kanamycin(30)	++	+	+	++	+	+	++
nisin(500)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ampicillin(500)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
streptomycin(50)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
tetracycline(20)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ ; growth, - ; no growth

요약

생균제용 미생물 균주를 선별하기 위해 시료에서 61종의 균주를 분리하고, 분리균주 61종의 내산성, 내담즙산성, 항생제 내성을 살펴보았다. 실험결과 YM12 균주가 pH2.5에서 1시간 처리 후 생존율이 각각 24%로 높은 내산성을 보였고, Bovine(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 높은 담즙에서도 생육이 가능하였다. 그리고 5가지의 항생제 kanamycin(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ampicillin(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nisin(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 tetracycline(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 대해서도 내성을 보였다.

Reference

1. 김현아, “축산 사료 생균제의 미생물 분리 및 특성 조사”(2001), *J. Resource Development*, 20(1), 65~69
2. 이진규, “생균제용 유산균의 분리 및 동정”(1991), *J.Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19(5), 429~432
3. 농업기술연구소, “토양화학분석법”(1998), 농업기술연구소
4. 박홍석, “생균제로서 가능성이 있는 미생물의 선별 및 특성 ”(1998), *한국식품영양과학회지*, 27(3), 433-440

5. 박소영, “유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성, 항생제 내성 비교”(1996), *산업미생물학회지*, 24(3), 304-310
6. 백현동, “식품용 프로바이오틱 비트루스균의 주요 생균제 특성”(2002), *Korean J. Food SCI. Technol.*, 34(1), 73-78
7. Fuller, R. "Probiotics in man and animals"(1989), *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378
8. JoMay Chow "Probiotics and prebiotics: A brief overview"(2002), *Journal of Renal Nutrition*, 12(2), 76-86
9. Asa Sullivan, Ann-Chatrin Palmgren, Carl Erik Nord, "Effect of Lactobacillus paracasei on Intestinal Colonisation of Lactobacilli, Bifidobacteria and Clostridium difficile in Elderly Persons"(2001), *Anaerobe*, 7(2), 67-70
10. V. Xanthopoulos, E. Litopoulou-Tzanetaki, N. Tzanetakis, "Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts"(2000), *Food Microbiology*, 17(2), 205-215
11. F. Canganella, M. Ovidi, S. Paganini, A. M. Vettraino, L. Bevilacqua, L. D. Trovatelli, "Survival of undesirable micro-organisms in fruit yoghurts during storage at different temperatures"(1998), *Food Microbiology*, 15(1), 71-77