Kor. J. Food Hygiene 8 (2), 91-95(1993)

장내유산균 증식인자의 신속한 검색

한명주 · 임혜영 · 김동현*
경희대학교 식품영양학과 *경희대학교 약학과

Rapid Detection of Growth Factors of Intestinal Lactic Acid Bacteria

Myung Joo Han, Hye-Young Im and Dong-Hyun Kim

ABSTRACT—**The growth of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* isolated from human interstinal bacteria were induced by water extract and II-step extract of soybean and carrot and the pH of these bacteria-cultured media were decreased. The increasing growth rates of these bacteria are related to the decrease of the pH of these bacteria-cultured media. When human intestinal flora as starter were inoculated into the medium containing water extract of soybean and carrot, the growth of lactic bacteria were also induced and the pH of the media were decreased. By measuring the pH of the media which were inoculated and cultured intestinal bacteria as a starter, it is possible to determine whether the food are the growth factors of intestinal lactic acid bacteria or not. By this method, the food which decreased pH of the medium were soybean, turnip, carrot, leek, garlic, dropwork, wormwood and onion. These foods may induce lactic acid bacteria in human intestine.**

사람이 매일 섭취하는 음식물은 위와 소장상부에서 소화 흡수되나 대부분은 소장하부 또는 대장에 도달하게 되고 장내미생물에 의해 대사되게 된다. 이러한 대사에 관여하는 장내미생물은 100여종이 넘으며 균수로는 장내용물 1 g당 10^{10-12}개 정도에 이른다. 이러한 장내미생물 중 *Staphylococcus, Proteus, Clostridium* 등과 같이 독소 등을 생산하여 숙주에 대해 유해한 작용을 하는 균이 있는가 하면 비타민의 합성등을 하는 유용한 균이 있다.[1,2]

이러한 장내미생물은 섭취하는 음식물, 생활환경, 스트레스에 의해 영향을 받으며 질병의 발생과도 밀접한 관계가 있다. 예를 들면, 육류의 섭취가 많은 서양인들은 채소류의 섭취가 많은 동양인들보다 대장암 발생이 높다. 그러나, 서양 중에서도 핀란드인의 경우는 육류의 섭취가 많음에도 불구하고 대장암의 발생이 현저히 낮았으며, 그 이유는 요구르트의 섭취 때문인 것이 밝혀졌다. 그 이후 유산균이 질병의 예방과 치료에 효과가 있음이 보고되어 오고 있다.[3]

한편에서는 장내의 우세균이면서 사람에게 유익한 균중인 *Bifidobacterium, Lactobacillus* 등은 항생물질, 스트레스, 많은 육류의 섭취 등으로 인하여 변화를 가져올 수 있으며, 더욱이 경구투여된 유산균은 장내에서 정착하여 살 수 없다. 이러한 측면에서 각 개인의 장내 유산균을 증식시킬 수 있다면, 외부로부터 유산균의 투여 없이 질병의 예방 또는 치료를 할 수 있다. 이러한 측면에서 장내 유산균 증식인자에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.[4-7]

장내의 유산균 증식인자를 검색하기 위한 방법으로는 일차적으로 분리된 *Bifidobacterium*을 배양하는 배지에 검체을 첨가하여 유산균의 증식정도를 측정한 후 이차적으로 실험동물에 투여하여 실험동물로부터 분변을 받아 유산균의 증식정도를 측정하는 방법이 이용되고 있다.[4,7]

그러나 이러한 방법은 실험을 하는 데 시간이 많이 들 뿐만 아니라 성장도를 측정할 때 식품의 색때문에 방해가 되어 좋은 결과를 얻기가 힘들다. 더욱이 일차실험에서 장내의 다른 균주에 대한 영

Received for publication 4 June, 1993
Reprint request: M.J. Han, Ph.D. at the above address

향을 알아볼 수 없다.

이러한 점에 감안하여 저자는 일차시험의 starter로서 사람의 분변을 이용하여 간단하면서도 신속하게 유산균 증식인자를 검색할 수 있는 방법을 검토하였다.

실 험

실험재료

GAM(general anaerobic medium), BL(glucose blood liver broth) agar배지는 日水製藥(일본)에서 구입하였으며, 그 외의 배지는 Difco사(미국)로부터 구입하였다. 그외 시약은 특급시약을 사용하였다.

배지의 조제[8]

BCP 배지는 yeast extract 2.5 g, proteose pepetone No.3 5 g, dextrose 1 g, tween 80 1 g, L-cysteine·HCl·H_2O 0.1 g, BCP 용액 4 ml, 한천 15 g, 이온교환수 1000 ml을 넣어 pH을 6.5로 맞춘 후 멸균하여 사용하였다.

MGLP 배지는 bacto-casitone 20 g, yeast extract 5 g, L-cystenine·HCl·H_2O 0.4 g, lactose 10 g, CH_3COONa 6 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.5 g, KH_2PO_4 2 g, 한천 5 g, 이온교환수 1000 ml을 넣어 pH을 6.5로 맞춘 후 멸균하고 따로 LiCl 3 g, penicillin G 2000 단위를 증류수 50 ml에 녹이고 여과멸균한 액을 넣어 사용하였다.

실험방법

검색식품의 조제

본 시험에서 사용한 식품의 소재는 대두, 당근, 케일, 두릅, 브로커리, 상추, 비듬, 피망, 쑥갓, 아욱, 오이, 시금치, 순무우, 영양부추, 근대, 마늘, 미나리, 쑥, 양파였으며 이 식품들 약 50 g에 물 150 ml을 넣어 processor로 곱게 갈고 6000 rpm에서 20분간 원심분리후 여과하여 유산균증식 검색식품으로 사용하였다.

단 대두와 당근의 경우는 원심분리 후 여과한 액(water extract)에 $CaCl_2$ $2H_2O$ 1.4 g 넣은 후 $Ca(OH)_2$로 pH 7.5로 맞추어 100℃에서 10분간 가열하고 6000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액(II-step extract)을 사용하였다.

*Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 분리배양

본 실험실에서 사람의 장내세균층으로부터 김의 방법[9]에 따라 *Bifidobacterium* H-1, H-2, H-3, *Lactobacillus* H-1, H-2, H-3를 분리하여 GAM 배지에 계대배양하면서 사용하였다.

장내유산균의 증식효과시험

앞에서 만든 검색식품 추출액을 0, 25, 50, 100%가 되도록 만든 액 10 ml에 GAM 배지 0.59 g을 녹인 후 pH를 7.2로 맞추어 멸균하고 여기에 사람의 장내세균층으로부터 분리한 유산균 또는 사람의 신선한 분을 혐기성 희석배지에 10배 희석한 액 5 μl를 이식한 후 37℃에서 혐기적으로 24, 48시간 배양하여 pH를 측정하고, 경우에 따라서는 흡광도(600 nm) 측정 또는 일정량을 혐기성희석 배지에 적당히 희석하고 BL, BCP, MGLP 한천배지에 이식 후 steel wool법에 의해 혐기적 조건에서 2~3일간 배양한 후 *Bifidobacterium*과 *Lacotobacillus*균의 증식정도를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

콩 및 당근의 물추출물이 *Bifidobacterium*의 성장과 배지의 pH에 미치는 영향

대두와 당근의 추출물에 대한 사람의 장내용물로부터 분리한 *Bifidobacterium*와 *Lactobacillus* 균주에 대한 증식효과를 본 결과 대두와 당근 모두 농도의존적으로 유산균의 성장을 촉진시켰으며, 이에따라 배지의 pH는 상대적으로 저하시켰다. 대두의 25% 추출물 함유배지의 경우 균의 성장은 127~200% 증가시켰으나 배지의 pH는 5.4~4.3으로 현저하게 저하시켰다. 당근의 경우는 대두보다 약간 낮았으나, 비슷한 경향을 보였다. 더욱이 유산균증식과 배지의 pH의 상관성을 조사하기 위해 대두과 당근의 2차 추출물에 대해서도 유산균 증식효과를 측정했다. 유산균 증식효과에 대한 결과도 물추출물과 비슷한 결과를 보였다. 이러한 대두과 당근의 유산균 증식효과는 이미 보고한 결과와 일치하였다.

대두와 당근의 함유배지의 pH의 감소는 유산균 증식의 결과로 사료된다.

Table 1. Effect of the water extract of soybean and carrot on the growth of lactic acid bacteria isolated from human intestinal bacteria

Microorgnism	pH/Growth(%)*					
	Control	Soybean			Carrot	
		25%	50%	100%	25%	50%	100%
Bifidobacterium H-1	5.8/100	4.4/145	4.1	3.8	4.7/132	4.4	4.3
Bifidobacterium H-2	5.4/100	4.4/127	4.2	4.0	4.8/114	4.5	4.2
Bifidobacterium H-3	5.4/100	4.3/143	4.2	4.1	4.7/133	4.5	4.2
Lactobacillus H-1	6.8/100	5.4/200	5.1	5.9	5.4/189	5.1	4.3
Lactobacillus H-2	6.5/100	4.8/160	4.7	4.6	5.7/130	5.2	4.4
Lactobacillus H-3	6.5/100	4.8/180	4.7	4.5	4.8/145	5.2	4.3

*Growth was determined by absorbance at 600 nm for carrot (25%) and by colony counting in BL agar plate for soybean 25%.

The high concentrations of carrot and soybean interfered with the growth measurement.

Table 2. Effect on lactic acid bacteria growth among human intestinal flora by II-step extract of soybean and carrot

Microbes	Control			Soybean			Carrot		
	BCP	MGLP	BL	BCP	MGLP	BL	BCP	MGLP	BL
Lactic acid bacteria	−*	1.9×10^8	1.1×10^8	5.4×10^8	2.1×10^8	4.9×10^8	−	4.2×10^8	3.3×10^8
The other	2×10^8	−	6.4×10^8	0.3×10^8	−	0.1×10^8	3.1×10^8	−	2.1×10^8

*not detected.

대두 및 당근의 물추출물이 장내세균의 유산균증식에 미치는 영향

혼합균주 즉 장내세균총 중에서 대두와 당근의 2차추출물이 유산균증식작용이 있는지 조사하기 위해 대두과 당근의 2차추출물 함유 GAM 배지에 starter로서 사람의 장내 세균총을 이식하여 하루 배양 후 유산균증식효과를 측정하였다(Tabe 2).

대조실험의 경우 BL 배지에 자라나온 유산균(*Bifidobacterium*)수와 그 외의 균수는 각각 1.1×10^8, 6.4×10^8 bacteria/ml였다. 그러나, 대두추출물 함유 배지에서 배양했을 경우는 유산균수는 4.5배 증가하였으며, 그 외의 균수는 현저하게 감소하였다. 당근추출물 함유배지의 경우도 유산균 선택배지인 BCP 배지와 MGLP 배지를 사용했을 때도 비슷한 결과를 나타냈다.

이들의 추출물을 첨가한 배지에 사람의 장내 세균총을 이식하여 배양한 후 배지의 pH를 나타낸 것이 Fig. 1이다. 그림에서 보는 바와 같이 대두추출물의 경우 함유도가 증가함에 따라 현저하게 pH는

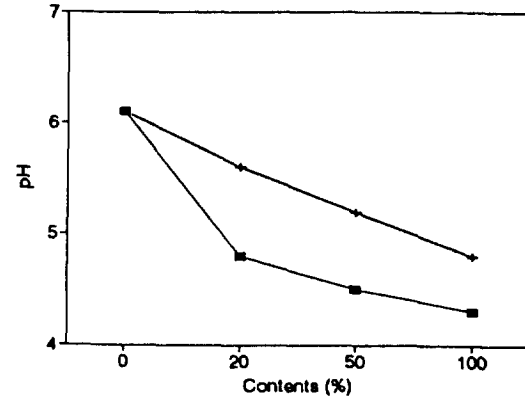

Fig. 1 pH of the medium at 24th after inoculating the human intestinal bacteria as starter into the medium containing II-step extract of soybean (■) and carrot (+).

Table 3. pH of the medium at 24th after inoculating the human intestinal bacteria as atarter into the medium containing some vegetables

Vegetable	pH			
	0%	25%	50%	100%
대두Soybean	6.0	4.6	4.5	4.4
당근Carrot	6.0	5.6	5.3	4.9
케일Kale	5.9	5.3	5.2	5.2
두릅Fatsia shoot	6.0	5.5	5.2	5.2
브로커리Broccoli	6.1	5.3	5.3	5.3
상추Lettuce	6.0	5.3	5.1	5.2
비름Amaranthus	5.9	5.4	5.2	5.2
피망Seet pepper	6.0	6.9	6.7	6.6
쑥갓Crown daisy	6.0	6.8	6.8	6.8
아욱Mallow	6.0	6.8	6.8	6.8
오이Cucumber	6.2	6.8	6.8	7.2
시금치Spinach	5.9	5.5	5.7	5.7
순무우Radish	6.0	4.5	4.3	4.2
영양부추Leek	5.9	4.7	4.5	4.3
근대Chard	5.9	5.0	5.1	5.0
마늘Garlic	6.0	5.5	5.1	4.8
미나리Dropwort	6.0	5.5	5.1	4.8
쑥Wormwood	6.0	5.2	5.0	4.8
양파Onion	6.0	5.4	4.9	4.7

감소했으며, 100% 함유배지에서는 4.1까지 저하하였다. 그러나, 이들 추출물의 회화물은 유산균증식효과는 물론 배지의 pH에도 아무런 영향을 미치지 못했다.

이러한 결과는 유산균촉진물질이 유기물이며, 유산균증식인자는 유산균수만을 선택적으로 증가시키고, 그 결과 배지의 pH를 저하시키는 것으로 사료된다.

대두추출물이 당근추출물보다 유산균증식작용이 크며 pH의 현저한 감소결과도 이를 뒷받침해 준다.

이와같이 유산균에 의한 배지의 pH감소와 같은 결과는 사람의 장내에서 일어날 수 있으며, 그 결과 장내의 유해균주의 감소, 암모니아의 혈중으로의 이행방해, 면역기능의 증가, 대장암발생의 억제 등을 나타낼 것으로 사료된다. 이러한 면에서도 유산균의 증식 뿐만 아니라 장내의 pH를 저하시킬 수 있는 식품의 개발이 필요하다.

일반검체식품에 대한 응용

음식물로 많이 이용되는 채소류에 대하여 장내미생물을 starter로 사용했을 때 배지의 pH에 미치는 영향을 조사한 것을 Table 3에 나타냈다. 배지의 pH를 감소시키는 결과 가장 우수한 것은 대두, 당근, 순무우, 영양부추, 마늘, 미나리, 쑥, 양파였으며, 케일, 두릅, 브로커리, 상추, 비듬, 시금치, 근대는 무효했다. 그러나 피망, 쑥갓, 아욱, 오이는 오히려 배지의 pH를 증가시켰다. 앞의 결과와 비교해 볼 때, pH의 저하를 야기시키는 식품의 경우는 장내에서 유산균증식효과가 있는 것으로 사료된다. 아울러 사람의 장내를 좋은 환경으로 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

1. 사람의 장내세균으로부터 분리한 *Bifidobacterium*은 대두및 당근의 물추출물을 이용할 경우 균의 성장과 더불어 배지의 pH는 상대적으로 저하시켰다.

2. 대두와 당근의 물추출물은 사람의 장내세균총 중에서 유산균 증식작용이 있었으며, 이와 함께 배지의 pH는 상대적으로 감소하였다.

3. 검체식품 함유 GAM 배지에 사람의 신선한 분변을 이식하여 pH를 측정함으로써 간단하게 유산균증식 작용 뿐만 아니라 건강식품을 조사할 수 있었다.

4. 3의 방법에 의해 조사한 결과 유산균증식효과인 pH를 저하시키는 식품은 대두, 순무우, 당근, 영양부추, 마늘, 미나리, 쑥, 양파가 있었다.

국문요약

사람의 장내세균으로부터 분리한 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*는 대두 및 당근의 물추출물을 이용할 경우 균의 성장과 더불어 배지의 pH는 상대적으로 저하시켰으며, 대두와 당근의 물추출물은 사람의 장내세균총 중에서 유산균증식작용이 있었으며, 이와 함께 배지의 pH는 상대적으로 감소하였다. 검체식품함유 GAM배지에 사람의 신선한 분변을 이식하여 pH를 측정함으로써 간단하게 유산균증식작용 뿐만아니라 건강식품을 조사할 수 있었다. 이 방법에 의해 조사한결과 유산균증식효과인 pH를 저하시키는 식품은 대두, 순무우, 당근, 영양 부추, 마늘, 미나리, 쑥 양파가 있었다.

참고문헌

1. Mitsuoka, T.: Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Mirobiol.* **6**, 263-268 (1990).
2. Mitsuoka, T.: Intestinal bacteriology Asakurashyoten (1990).
3. Goldin,B. and Gorbach, L.: Alterations in faecal microflora enzymes related to diet, age, Lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* **40**, 2421-2426 (1977).
4. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T. Tokuniaga and Tashiro, Y.: Effect of fructoologosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* **5**, 37-50 (1986).
5. Englyst, N.N., Hay, S., Macfarlane, G.T.: Polysaccharide breakdown by mixed population of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **95**, 163-171 (1987).
6. Imamura, L., Murai, K., Zao, C-J., Takebe, S. and Kobashi, K.: Metabolism of arabinogalactan by rat and human intestinal Microflora. *Bifidus* **6**, 19-29 (1992).
7. Park, J.H., Yoo, J.-Y., Shin, O-H., Shin, H.K., Lee, S.J. and Park, K.-H.: Growth effect of branched oligosaccharides on principal intestinal bacteria. *Kor. J. Appl. Mirobiol. Biotechnol.* **20**, 243-248 (1992).
8. Mitsuoka: A color atlas of anaerobic bacteria Sokyosa Tokyo (1980).
9. Kim, D.-H. and Han, H.J.: Detection of β-glucuronidase and β-glucosidase of alkalotolerant intestinal bacteria. *Yakhakhoeji* **37**, 18 (1993).