J. Fd Hyg. Safety 16(1), 11–15 (2001)

한천올리고당이 주요 장내 세균의 생육에 미치는 영향

홍정화† · 이재진 · 허성호* · 최희선 · 공재열*****

*인제대학교 식품과학부, *동의공업대학 식품과학연구소,*
***유니푸드테크(주), ***부경대학교 식품생명공학부*

Effect of Agarooligosaccharides on the Growth of Intestinal Bacteria

Jeong-Hwa Hong†, Jae-Jin Lee, Sung-Ho Hur*, Heesun Choi and Jai-Yul Kong*****

School of Food Science, Inje University, Kimhae 521-749, Korea
**Institute of Food Science, Dongeui Institute of Technology, Pusan 614-715, Korea*
***Unifood Tech., Kimhae 621-010, Korea*
****Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

ABSTRACT – This research was carried out to improve the utilization of agar by evaluating the effect of agarooligosaccharides on the intestinal microflora. Medium containing 0.2% agarooligosaccharides remarkably enhanced the growth of *Bifidobacterium infantis*; however, agarooligosaccharides did not influence the growth of *Clostridium perflingens*. Agarooligosaccharides affected intestinal microflora to different extent by various pH and NaCl concentration. The growth of *B. infantis* enhanced over pH 4.5. Within 1% NaCl concentration, addition of agarooligosaccharides enhanced the growth of *B. infantis*. In contract, NaCl did not affect the growth of *Cl. perflingens* at all concentrations tested. Therefore, agarooligosacchariedes improved the benevolent intestinal microflora and depressed to the level of bacteria causing putrefaction and food poisoning.

Key words □ Agarooligosaccharides, intestinal microflora

Leeuwenhoek가 1719년 사람의 분변을 관찰하여 다수의 장내균을 발견한 이래, 1899년 프랑스 파스퇴르 연구소의 Tissier가 건강한 모유 수유아의 분변에서 혐기성 유산균의 일종인 Bifidus균을 분리 명명하였다. 1900년 Moro는 인공 수유아의 분변에서 acidophilus균을 발견하였으며, 기타 다수의 혐기성 균종들이 장내 상재 균총으로 분리 보고되었다. 장내세균은 크게 유용균, 유해균, 병원균등으로 분류하며 이들 균총들간의 상호작용에 의해 우세한 균총이 결정되고, 그 결과 사람의 건강과 질병 및 노화 현상 등에 관여한다고 알려지고 있다.[1~4]

최근 다양한 기능을 가진 올리고당이 개발되어 식품에 첨가되고 있는데, 특히 장내균총에 의한 올리고당은 숙변제거 효과와 배변 횟수의 증가 기능이 나타나고 있다. 유사 올리고당으로는 갈락토올리고당, 프락토올리고당, 이소말토올리고당, 대두올리고당 등을 들 수 있으며, 유제품, 건강보조식품, 조미료, 양돈사료에 첨가되고 있거나 올리고당 단일 상품으로 시판되고 있는 실정이다.[5~7]

한천의 기본 구성 단위는 agarose와 agaropectin이며, 70%가 agarose로서 3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl-(1,3)-D-galacto pyranose가 β-(1,4) 결합으로 되어 있는 hetero polymer 형태의 D,L-galactan이다. 한편, 한천으로부터 효소학적 분해에 의해 생성된 한천올리고당은 전분 노화에 대한 억제작용이 강하고, 정균작용, 정장작용, 비피더스균의 증식인자, 항충치성 등의 기능성 효과와 당뇨병, 난소화성, 비만, 변비 등의 치료 효과가 있다고 알려져 있다. 이런 특성으로 식품의 '영양기능', '감각기능'에 이어 제 3의 기능으로 '생체조절기능'이 크게 강조되는 기능성 식품소재로서 한천올리고당의 이용이 크게 기대되어지고 있다.[8~10] 그러나 국내에서 한천은 그 자체를 이용하는 것이 대부분이므로 유해 장내균총의 생육억제, 유용 장내균총의 생육증진 효과를 이용한 한천의 고부가가치성을 부여하는 것이 매우 중요한 일이다. 따라서 본 연구는 한천올리고당이 주요 장내 세균의 생육에 미치는 영향에 관하여 실험하여, 그 결과를 보고하는 바이다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

한천올리고당(Agarooligosaccharides)의 생산

Bacillus cereus ASK 202가 생산하는 agarase 조효소[11]를 이용하여 agar를 가수분해하였다. 즉, Agar 5 g(dry weight, Difco)을 100°C의 0.01 M Na-phosphate(pH 6.8, 1 l)에 녹인 후 40°C로 냉각시키고 여기에 260 units의 agarase를 넣어 40°C 수욕조에서 80 rpm으로 12시간 가수분해시켰다.

반응 종료 시 ethanol 200 ml를 넣고 rotary vacuum evaporator(80°C)에서 약 30 ml가 될 때까지 농축한 다음 투석막에 넣고 15°C에서 탈이온수 1 l로 8시간 투석을 3회 반복하였다. 투석막을 투과한 용액(약 3 l)을 rotary vacuum evaporator(80°C)에서 약 30 ml가 될 때까지 농축하고, 농축물의 환원당을 DNS법[12]으로 측정하여 한천올리고당의 농도를 확인하였다. TLC(Butanol:Ethanol:Water = 2:1:1, Silica Gel 60 glass plate)를 이용하여 올리고당의 존재를 확인하였고 표준물질로 neoagarobiose, neoagarotriose, neoagarotetraose를 사용하였다.

시험균주

장내균총의 증진 및 증식 저해 효과 시험에 사용된 균주는 대표적인 유익균인 *Bifidobacterium*속과 유해균의 대표균주인 *Clostridium perfringens*을 KCTC 및 ATCC에서 분양받아 사용하였으며, 그 종류는 Table 1과 같다.

Table 1. Intestinal bacterial strains used in the experiment

Strains
Bifidobacterium infantis KCTC3127
Bifidobacterium breve KCTC3419
Bifidobacterium bifidium KCTC3202
Bifidobacterium thermophilum KCTC3470
Clostridium perfringens ATCC13124
Clostridium butyricum KCTC1786

Table 2. Composition of EG medium

Beef extract	2 g
Proteose peptone No. 3	10 g
Yeast extract	5 g
Na_2HPO_4	4 g
Soluble starch	0.5 g
Glucose	1.5 g
L-Cysteine · HCl	0.4 g
Silicone antifoamer	0.25 ml
Tween 80	0.5 g
Distilled water pH 7.6	1000 ml

배지 및 시약

EG broth 배지의 조성은 Table 2와 같이 하였으며, 여기에 한천올리고당을 0.2%, 0.5%로 첨가하고 가스치환 후 멸균하여 시험배지로 사용하였다. 대조군 시험용 배지는 EG broth를 사용하였으며, 한천올리고당 첨가로 인한 시험용 배지와 대조균 배지의 탁도 차이를 없애기 위해 각각의 배지 초기 탁도값을 blank로 사용하였다.[12]

장내 균총 증진 효과 검사

시험 배지 제조 시 배지의 혐기적인 상태를 만들기 위하여 끓인 액체배지를 식기전에 20 ml vial에 15 ml씩 넣은 다음 vial의 입구를 buty 고무마개로 슬며시 막아 약 30초간 vial내의 증기가 빠져 나오게 했다. 알루미늄 뚜껑을 씌운 후 crimper로 죄고, 긴 바늘을 배지에 담기게 꽂고 다른 짧은 바늘은 vial의 headspace에 위치하도록 꽂은 다음 CO_2로 headspace를 치환시킨 후 121.1°C에서 15분 멸균하여 사용하였다. 위와 같은 방법으로 한천올리고당 첨가 배지를 제조하였다.

EG 액체배지에서 증균 배양한 표준 균주의 흡광도를 600 nm에서 측정하고, 멸균식염수(0.85% NaCl)로 희석하여 흡광도를 0.1로 조정한 후 0.2 ml를 각각의 vial에 접종하였다. 항온기에서 36°C, 60시간 배양하면서 10시간 간격으로 흡광도(600 nm)로 탁도를 측정하여 균의 생육정도를 관찰하였고, 증식 및 저해 정도를 판별하였다.

결과 및 고찰

한천 올리고당의 첨가 농도에 따른 변화

*Bifidobacterium*의 증식 관찰이 용이하면서 산화환원전위도가 낮은 EG 배지를 사용하여 장내 균총 개선 효과를 측정하였다. 한천 올리고당 첨가는 *B. infantis*의 증식에 현저한 상승효과를 가져와 0.2% 농도에서 배양 10시간째 균의 증식이 급격히 증가하여 22시간에 최고치에 도달하였다(Fig. 1). 이에 반해 한천 올리고당을 첨가하지 않은 경우 배양 58시간 결과치가 0.2% 첨가한 배양 10시간째와 같은 정도의 증식을 나타내었다. 따라서 한천 올리고당을 장내 균총 개선제로 사용할 경우 경제적인 농도로도 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

유해균인 *Clostridium perfringens*의 경우 한천 올리고당 첨가와 상관없이 배양 10시간째 흡광도(O.D.)가 모두 1.3에 도달하였다. 이는 *Cl. perfringens*가 한천 올리고당보다는 포도당을 효율적으로 이용하는 것으로 판단되며, 이에 대한 길항 작용 연구가 필요할 것으로 생각된다(Fig. 2).

Fig. 1. Changes in the growth of *B. infantis* as affected by agarooligosaccaride addition at different concentrations.

Fig. 2. Changes in the growth of *Cl. perfringens* as affected by agarooligosaccaride addition at different concentrations.

Fig. 3. Effect of initial pH on the growth of *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127 (20 hr culture).

Fig. 4. Effect of initial pH on the growth of *Cl. perfringenss* ATCC 13124 (20 hr culture).

배지 초기 pH에 따른 한천 올리고당 첨가 효과

인간이 섭취하는 식품의 종류에 따라 장내 균총은 다양한 대사산물을 생산하는데 이들 중 유기산이 상당비율을 차지하고 있다. 즉, 생성 유기산이 장내 pH 조절에 관여하고, 섭취된 한천올리고당은 장내 pH에 따라 장내균총에 미치는 영향력이 달라진다. *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127은 pH 3.5가 되면 증식이 매우 느려져, 성장을 멈추는 것으로 판단된다. 그러나 pH 4.5 이상에서 한천 올리고당을 첨가한 경우 대조구에 비해 현저히 성장이 증진되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 따라서 한천 올리고당을 요구르트와 같이 비교적 pH가 낮은 식품에 첨가하면 비피더스의 생육을 증진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Cl. perfringens ATCC 13124는 비피더스균의 생육 환경보다 높은 pH 4.5에서 증식이 중단되었으며, 본 연구에서 실시한 pH 영역에서는 한천 올리고당의 첨가 효과를 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

배지 중 염의 영향

소화 흡수가 되지 않고 대장에 도달한 식품 중 염 함량은 장내 균총의 구성과 증식에 크게 영향을 미칠 것으로 추정되어 염 농도를 달리하여 증식에 미치는 효과를 관찰하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 비피더스균은 염 농도 2%에서 증식이 정지되었으나, 1% 염 농도 범위내에서는 한천 올리고당의 첨가가 *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127의 증식을 현저하게 증진시키는 효과가 있었다.

*Cl. perfringens*는 염 농도, 한천올리고당 농도 모두에 상관없이 증식이 잘 되었다(Fig. 6). 다만, 비피더스균의

Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the growth of *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127 (20 hr culture).

Fig. 6. Effect of NaCl concentration on the growth of *Cl. perfringens* ATCC 13124 (20 hr culture).

경우와 같이 염 농도 2%에서 증식이 정지되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 지나친 염분 섭취는 장내 균총의 구성을 유해균에 유리하도록 작용할 가능성이 있음을 보여준다. 왜냐하면 대부분의 염분은 소화 흡수되어 실제 대장에서는 1% 내외의 염도를 갖게 되며, 한천 올리고당을 특별히 섭취하지 않는 상태에서는 *Cl. perfringens*의 증식이 현저하게 될 것이다. 즉, 한천 올리고당의 섭취는 적어도 유익균과 유해균의 비율을 1:1에 근접하도록 조정할 것으로 판단된다. 특히 비피더스균이 한천 올리고당을 더욱 잘 활용한다면 유익균의 비율은 더 높아질 가능성이 크다.

이와 같은 가설을 입증하기 위하여 유익균과 유해균을 동시 접종하여 배양시키면서 한천 올리고당의 첨가 농도에 따른 유익균과 유해균수의 비율에 관한 연구가 진행 중이다. Fig. 7에서 보듯 한천 올리고당은 유익균의 증식 속도를 높이고, 그 대사산물이 유해균을 억제하는 것으로 나타나 장내 균총 개선 효과가 있음을 알 수 있었다.

Fig. 7. Growth curve of *B. infantis* and *Cl. perfringens* through mixed culture at pH 7.0 with 0.2% agarooligosaccharide.

감사의 글

본 연구는 1997년 해양수산부 수산특정연구개발사업의 일환으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

한천은 국내의 풍부한 수산자원 중의 하나이나, 그 자체로만 이용할 뿐 가공을 통한 이용률은 떨어지고 있다. 따라서 한천의 이용 효율을 높이기 위하여 장내 균총 중의 유해균과 유익균에 대한 한천 올리고당의 증식저해 및 증진 효과를 알아보았다. 장내 균총 중 유해균으로 *Clostridium perfringens*를 유익균으로 *Bifidobacterium infantis*를 대표균으로 하여 한천 올리고당의 효과를 살펴본 결과, 한천 올리고당을 0.2% 첨가한 경우 *B. infantis*은 증식이 현저하게 상승한 반면 *Cl. perfringens*는 효과가 없었다. 또한 pH 및 NaCl의 농도에 따라 한천 올리고당이 장내 균총에 미치는 영향에 차이가 있어, *B. infantis*은 pH 4.5 이상과 염 농도 1%이내에서 증진된 반면 *Cl. perfringens*은 염 농도에서만 차이가 있었다. 이들을 혼합하여 배양한 결과 *B. infantis*의 증식이 증가함에 따라 *Cl. perfringens*의 증

식은 현저히 억제되는 현상이 관찰되었다.

참고문헌

1. 光岡之足: 腸內細菌學. 朝倉書店. (1990)
2. Bezkorayamy, A., Ecology of *Bifidobacteria*, Pp. 29-72, Biochemistry and physiology of *Bifidobacteria*, 1989.
3. Mitsuoka, T. Recent trends in research on intestinal flora, *Bifidobacteria Microflora* **1**: 3-24, 1982.
4. Rasic, J.L. and J.A. Kuamann, *Bifidobacteria* and Their Role, Birkhauser Verlag, Basel, 1983.
5. 전영중: 생물변환기술에 의한 기능성 당류의 산업적 생산. 식품산업과 영양, **2**(1) 10, 1997.
6. 서진호: 국내올리고당 연구 및 개발동향. 식품과학과 산업, **27**(4), 8, 1994.
7. 허경택: 올리고당의 생리기능 특성. 식품과학과 산업. **28**(3), 24, 1995.
8. 河野敏明, 德永降久, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, 片所 功, 新規有用 heterooligoの硏究-neoagarooligo唐の性質, 日本農藝化學會大會講演要旨集, p777, Tokyo, 1987.
9. 河野敏明, 日高秀昌, neoagarooligo唐の特性とその生產技術, Nippon Nogeikagaku Kaishi, **63**(6), 1126, 1989.
10. 河野敏明, 山口美樹, 山口吾一, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, 片所 功, 寒天分解酵素生產菌の分離とその酵素の性質, 日本水產學會大會講演要旨集, 1988.
11. 홍정화, 이재진, 최희선, 허성호, 공재열: *Bacillus cereus* ASK 202가 생산한 한천올리고당의 항균 효과, 식품안전성학회, **15**(4), 2000.
12. 지근억, 이세경, 김인희: 계량된 *Bifidobacterium*의 선택배지 개발, 한국식품과학회지, **26**(5), 526, 1994.