

Bifidobacterium sp. Int-57이 생산하는 β -xylosidase의 생산특성

강동현 · 이계호 · 지근억*

서울대학교 식품공학과, *한림대학교 식품영양학과

Production of β -xylosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57

Dong-Hyun Kang, Ke-Ho Lee and Geun-Eog Ji*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University

*Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

Abstract

In order to study the effect of the intestinal bacteria on the physiology of the human large intestinal tract, we isolated the intestinal bacteria of Koreans and tested the enzymatic patterns. Isolated *Bifidobacterium* sp. Int-57 showed the higher activity of β -xylosidase than other intestinal microorganisms. The effect of the carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts, initial pH and initial temperature on the production of β -xylosidase of *Bifidobacterium* sp. Int-57 was investigated. The most suitable carbon source, nitrogen source and inorganic salt for the production of β -xylosidase were 1.1% xylose, 0.4% yeast extract and 0.0003% CoCl_2 respectively at initial pH 7.0 and temperature 40°C.

Key words: β -xylosidase production, *Bifidobacterium* sp. Int-57, Bifidus factor, xylooligomer

서 론

*Bifidobacterium*은 그람 양성, 비운동성, 편성 혐기성 균으로서 유아의 장내 균중 제일 많은 장내 세균이다⁽¹⁾. *Bifidobacterium*은 lactic acid와 acetic acid를 3:2로 생산하여 장의 pH를 낮추고 유해세균의 증식을 억제하며 혈관 수축을 유발하는 amine, phenol류, ammonia, steroid metabolites, bacterial toxin, indole, skatole 등의 생산을 억제하는 것으로 알려져 있다⁽²⁻⁷⁾. Bifidogenic factor에 대한 이전의 연구들은 *Bifidobacteria*의 증식에 가장 중요한 요인이 탄소원이라는 것을 밝혔다⁽⁸⁻¹⁰⁾. 그러므로 장내에서 bifidus flora를 형성하기 위해 *Bifidobacteria*에 의해 선택적으로 이용되는 oligosaccharides의 연구가 시도되었다^(10,11). 상업화되고 있는 fructologomer는 산과 열안정성이 약하여 가열조리 또는 위의 산에 의하여 상당량 파괴되는 것으로 조사되었다. 반면에 xylooligo당은 pH 2.5~8.0에서 60분 끓여도 안정하여 pH 안정성과 열안정성이 입증되었다⁽¹²⁾. 인간의 장내에서 분리된 여러 균들 중 *Bifidobacterium* 외의 다른 장내 균들인 *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium butylicum*, *Enterococcus faecalis* 등은 β -xylosidase를 가지고 있지 않으나 *Bifidobacterium*이 β -xylosidase를 가지고 있다는 사실⁽¹³⁾은 xylooligomer가 bifido-

genic factor로 이용될 수 있다는 가능성을 시사하고 있다. 지금까지 장내세균 외의 다른 미생물들이 생산하는 β -xylosidase의 연구는 많이 이루어졌으나^(14,15), *Bifidobacterium*에서의 연구는 미미한 상태이며, *Bifidobacterium*이 인체의 대장생리에 미치는 영향은 인체의 건강에 미치는 영향이 매우 중요하고 *Bifidobacterium*이 생산하는 β -xylosidase는 xylooligomer를 이용 및 hemicellulose의 분해에 관여하기 때문에 β -xylosidase의 연구를 효율적으로 하기 위하여 우선 한국인의 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* sp. Int-57이 생산하는 β -xylosidase의 생산조건을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

재료

사용균주는 전보⁽¹³⁾에서 발표한 한국인 분변으로부터 분리된 *Bifidobacterium* sp. Int-57를 이용하였다. *Bifidobacterium* sp. Int-57은 Intracellular enzyme으로 여러 가지 효소를 생산하였고 특히 intracellular enzyme으로 β -xylosidase가 역가가 높았다.

배지조성 및 배양조건

β -xylosidase를 생산하기 위한 기본배지로는 *Bifidobacterium*의 혐기성 균의 생육배지인 Brain Heart Infusion (BHI) 배지를 이용하였다. 그 배지조성은 BHI 37g, hemin 0.01g, cysteine 0.5g, resazurin 0.001g, vit K 0.001g, agar 0.75g, 증류수 1l의 상태에서 pH를 7.0으로 맞추

Corresponding author: Geun-Eog Ji, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Okchondong, Chunchon, Kangwondo, 200-702, Korea

Table 1. β -xylosidase pattern of various intestinal microorganism

Strain	β -xylosidase activity
<i>Bifidobacterium</i> sp. Int-57	+++
<i>Bifidobacterium longum</i>	+++
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	+++
BL Chan 2(<i>Bifidobacterium</i>)	+++
BL Chan 5(<i>Bifidobacterium</i>)	+++
Keun Hwa Hoi 2(<i>Bifidobacterium</i>)	+
LSK-3(<i>Bifidobacterium</i>)	++
Keun Hwa Hoi 1(<i>Bifidobacterium</i>)	++
<i>Eubacterium limosum</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Clostridium butylicum</i>	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-

+++ : very strong activity, ++ : strong activity, + : weak activity, - : non activity

었고, 혐기적 상태를 유지하기 위하여 CO₂ 충전을 이용하여 혐기적 배양상태를 유지하였다.

효소역가 측정

효소역가는 Folin⁽¹⁶⁾에 의한 방법으로 측정하였다. 즉 0.2 M phosphate buffer(pH 6.0), 10 mM p-nitrophenyl (PNP)- β -xyloside, enzyme solution을 각각 100 μ l 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 Na₂CO₃ 600 μ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 역가 1 unit는 1분당 1 μ mole의 PNP를 생산하는 효소의 양으로 정하였다. 또한 균체를 가지고 역가를 측정하고자 할 때에는 전보⁽¹³⁾와 같이 행한 뒤 효소역가를 조사하였다.

배양조건의 확립

온도의 영향 : BHI 배지에 균 접종 후 배양온도를 27, 30, 33, 37, 40, 45 $^{\circ}$ C에서 각각 24시간 배양하여 세포성장률과 효소역가를 측정함으로써 효소생산 최적배양온도를 결정하였다.

pH의 영향 : BHI 배지의 초기 pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0으로 맞춘 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 세포성장률과 효소역가를 조사함으로써 효소생산 최적 pH를 결정하였다.

탄소원의 영향 : 기본 BHI 배지에 xylose, galactose, arabinose, raffinose, glucose, fructose, inulin, mannose, lactose, cellobiose를 0.5% 되게 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 cell growth와 enzyme activity를 측정하여 최적 탄소원을 찾았고, 그 탄소원의 농도를 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.5, 2.0, 2.5% 되게 첨가한 후 24시간 배양하면서 세포성장률과 효소역가를 측정함으로써 최적

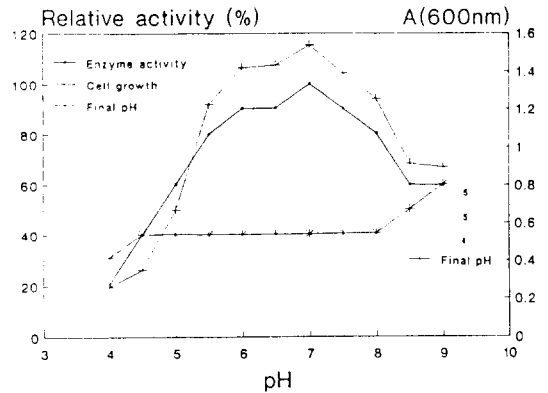


Fig. 1. Effect of initial temperature on β -xylosidase production

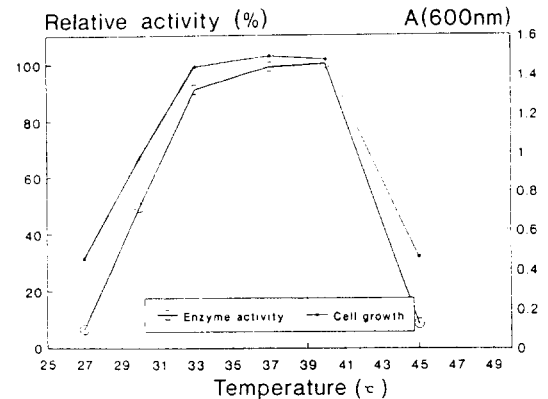


Fig. 2. Effect of initial pH on β -xylosidase production

농도를 결정하였다. 결정된 최적 탄소원을 첨가하여 120시간 배양하면서 효소역가의 변화를 기본배지의 경우와 비교하였다.

질소원의 영향 : 기본 BHI 배지에 yeast extract, bactopeptone, casamino acid, ammonium sulfate, NaNO₃, ammonium nitrate, KNO₃를 0.2% 되게 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 효소역가를 측정함으로써 최적 질소원을 결정하였으며, 그 농도를 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0% 되게 첨가한 후 24시간 배양 후 효소역가를 조사하여 그 질소원의 최적농도를 결정하였다.

무기염류의 영향 : 기본 BHI 배지에 CaCl₂, CoCl₂, MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄를 0.0002% 되게 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 효소역가를 조사함으로써, 최적 무기염류를 찾았으며, 그 농도를 0.0001, 0.0003, 0.0005, 0.0007, 0.001, 0.002, 0.004% 되게 첨가한 후 24시간 배양하여 효소역가를 측정하여 그 무기염류의 최적농도를 조사하였다. 이러한 최적배지 조건과 기본배지 조건에서의 효소역가를 비교하였다.

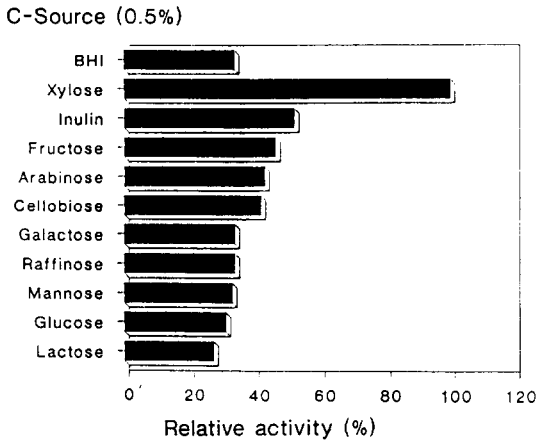


Fig. 3. Effect of carbon source on β -xylosidase production

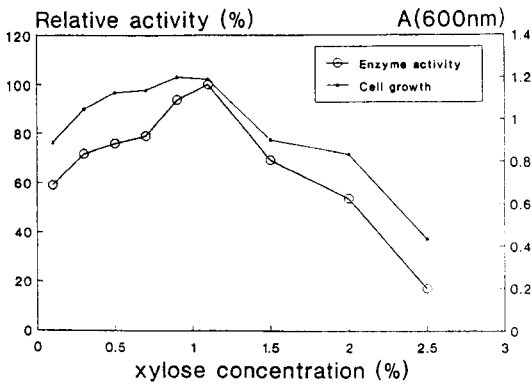


Fig. 4. Effect of xylose concentration on β -xylosidase production

결과 및 고찰

장내세균들의 β -xylosidase 생산 경향

Bacteriodes, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* 등 인체 대장내에 가장 많이 존재하는 균주들과 본 실험실에서 분리한 *Bifidobacterium*들에 대하여 β -xylosidase의 생산을 조사한 결과 *Bifidobacterium*은 일반적으로 조사된 다른 장내세균에 비하여 높은 β -xylosidase 생산성을 나타냈다(Table 1). 그리고 *Bifidobacterium*의 여러 균주에서 *Bifidobacterium* sp Int-57은 β -xylosidase의 생산이 강력한 균주 중 하나였다.

배양조건의 확립

배양온도의 영향 : *Bifidobacterium* sp. Int-57의 배양 온도에 따른 균생육과 효소 생산성을 알아보기 위하여 기본 BHI 배지에서 각각의 온도에서 배양한 결과는 Fig. 1에서와 같이 균 생육은 37°C 에서 가장 높았지만 β -xylo-

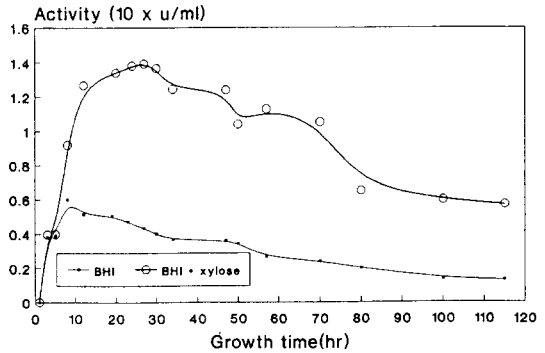


Fig. 5. Growth curve in BHI medium and BHI + xylose (0.5%) medium

Nitrogen Source (0.2%)

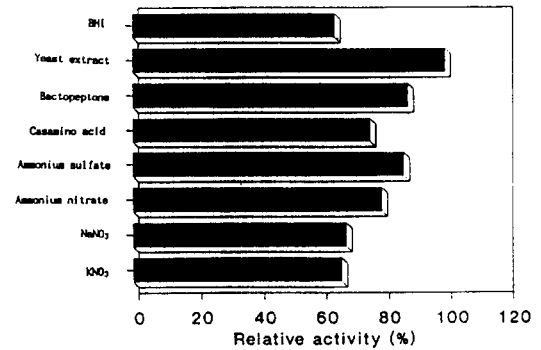


Fig. 6. Effect of nitrogen source on β -xylosidase production

sidase 효소역가는 40°C 에서 가장 높게 나타났다. 균생육에서 37°C 와 40°C 에서 큰 차이를 보이지 않았으므로 효소생산을 위한 배양온도를 40°C 로 실행하였다.

초기 배지 pH의 영향 : β -xylosidase의 효소생산에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 배지의 초기 pH를 HCl과 NaOH를 이용하여 4.0~9.0으로 맞추고 24시간 배양한 결과는 Fig. 2에서와 같이 균생육과 β -xylosidase의 효소생산은 pH 7.0에서 가장 높았다. 배양 후에는 final pH가 대체로 4.0~4.5로 유지되었다. 일반적으로 pH 4.0~4.5와 pH 8.5~9.0에서 *Bifidobacterium*는 균생육이 미약한 것으로 알려져 있는데⁽¹³⁾ 본 균주도 이들 pH 범위에서 균 생육과 β -xylosidase의 생산이 극히 미약하였다.

탄소원의 영향 : 기본 BHI 배지에서 탄소원의 종류를 바꾸면서 탄소원에 따른 효소 생산성을 비교한 결과는 Fig. 3과 같았다. 효소역가는 xylose를 첨가하였을 때 가장 높은 효소역가를 보였다. 일반적으로 효소반응의 final product는 해당 효소생산을 feedback inhibition과 repression으로 억제시킨다는 것으로 알려져 있으나 본 균주에서는 xylose가 오히려 β -xylosidase의 생산을 증

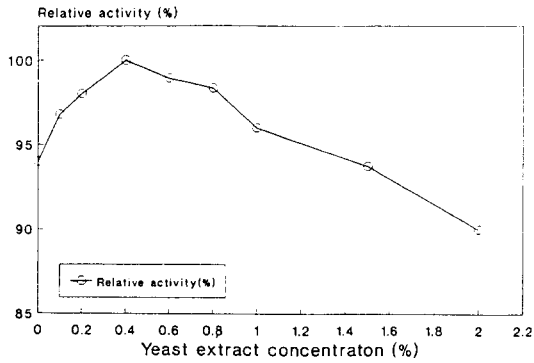


Fig. 7. Effect of yeast extract concentration on β -xylosidase production

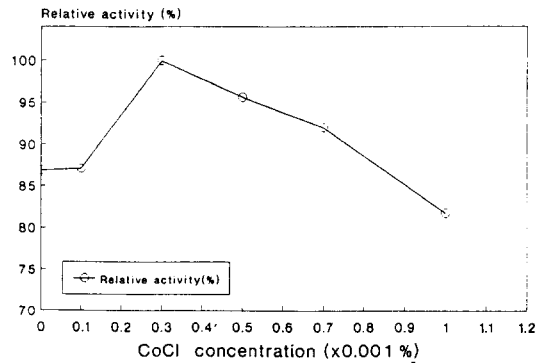


Fig. 9. Effect of CoCl_2 concentration on β -xylosidase production

Inorganic salts (0.0002%)

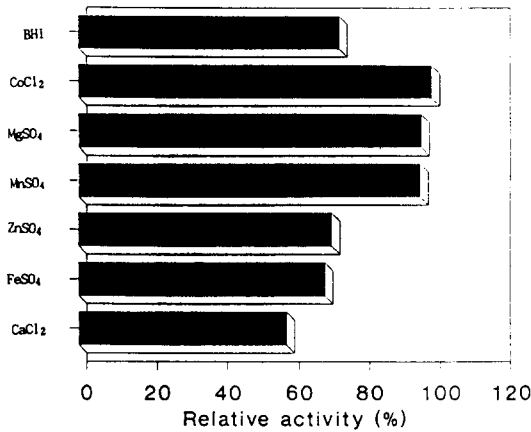


Fig. 8. Effect of inorganic salts on β -xylosidase production

가시키는 결과를 보였다.

탄소원으로 효소생산성이 가장 우수하였던 xylose의 농도에 따른 효소생산성을 비교한 결과는 Fig. 4에서와 같이 1.1%의 효소생산의 최대를 보여주었다.

또한 순수 BHI 배지와 BHI+xylose 배지에서 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 생육곡선을 120시간에 걸쳐 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. xylose를 첨가한 배지에서 훨씬 높은 효소역가를 보였고, 또한 오랜시간 효소역가를 유지하였다.

질소원의 영향: 효소생산 기본배지 BHI 배지에서 질소원의 종류를 달리하여 질소원에 따른 효소생산량을 비교한 결과는 Fig. 6과 같았다. Yeast extract가 가장 높은 enzyme activity를 나타내었다.

질소원으로 효소생산성이 가장 우수하였던 yeast extract에 따른 효소생산성을 비교한 결과는 Fig. 7과 같이 0.4%에서 효소생산이 최대를 나타내었다.

무기염류의 영향: 효소생산 기본 BHI 배지에 무기염

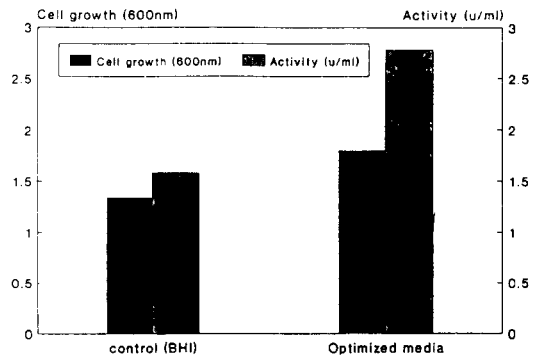


Fig. 10. Cell growth and enzyme activity in BHI medium and optimized medium

류의 종류를 바꾸어 배양한 후 효소역가를 조사한 결과는 다음 Fig. 8과 같았다. 실험결과와 같이 CoCl_2 가 가장 높은 enzyme activity를 나타내었다. CoCl_2 의 농도를 변화시켜 효소생산성을 조사하였다.

무기염류로서 효소생산성이 가장 우수하였던 CoCl_2 에 따른 효소생산성을 비교한 결과는 Fig. 9에서 보는 바와 같이 0.0003%에서 효소생산의 최대를 보여주었다.

Bifidobacterium sp. Int-57의 β -xylosidase 최적 생산 조건: *Bifidobacterium* sp. Int-57의 β -xylosidase 생산 최적조건은 Table 2의 배지조성에서 40°C로 pH 7.0으로 했을 때 가장 높은 효소역가를 보였다.

또한 기본배지와 optimized media에서의 효소역가 차이를 비교한 실험에서는 Fig. 10에서 보는 바와 같이 약 2배의 증가를 보였다.

요 약

한국인의 분변으로부터 분리된 *Bifidobacterium* sp. Int-57은 다른 장내세균에 비해 β -xylosidase의 높은 역가를 보였으며, xylooligomer의 bifidogenic factor의 유

용성을 고려하였을 때 효소생산에 초점을 둔 결과 최적 탄소원으로는 xylose였는데, 일반적으로 최종생산물은 feedback inhibition, feedback repression 등으로 효소 생산을 억제하는 일반 이론과는 상이한 결과를 보였다. 또한 xylose는 1.1%일 때 가장 높은 효소역가를 보였다. 질소원으로는 yeast extract였고, 그 농도가 0.04%일 때, 무기염류 면에서는 CoCl_2 였고, 그 농도가 0.0003%일 때 β -xylosidase의 최대 생산을 보였다.

감사의 말

본 연구는 한림대학교 학술연구 조성비의 도움으로 수행되었습니다.

문헌

- Mitsuoka, T.: Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobact. Microflora*, 1, 3-24(1982)
- Glodin, B., Lichtenstein, A.H. and Gorbach, S.L.: "The roles of the intestinal flora in modern Nutrition in health and Disease" ed. by Maruice E. Hills and Vernon R. Young, 500-515(1988)
- Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 443(1991)
- Macfarlane, G.T. and Allison, C.: Utilization of protein by human gut bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 19-24(1986)
- Drasar, B.S. and Hill, M.J.: *Human intestinal flora*, London: Academic, Press (1974)
- Bakke, O.M. and Tvedt, M.D.: Influence of germfree status on the excretion of simple phenols and possible significance in tumour promotion. *Experientia*, 26, 519 (1970)
- Bone, E., Tamm, A. and Hill, M.: The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 29, 1448-1454(1976)
- Hidemasa, H., Toshiaki, E., Toshio, T., Takehisa, T. and Yasuhito, T.: Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, 5, 37-50(1986)
- Kouhei, Y. and Zenzo, T.: Search for sugar sources for selective increase of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 1, 39-44(1982)
- Hidaka, H.: Fructooligosaccharides, a newly developed food material for health. *Kagaku to Seibutsu*, 21, 291-293(1983)
- Yazawa, K., Nakajima, A. and Tamura, T.: *Bifidobacteria Microflora*, 3, 43(1984)
- Yasutate, M.N.: 食品開發, 24, 42-45(1989)
- 박현국, 강동현, 윤석환, 이계호, 이세경, 지근역: 한국인 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 효소 패턴. *한국산업미생물학회지*, 20, 647-654(1992)
- Deller, R.H. and Richards, G.N.: Hemicellulase. Their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32, 277(1976)
- Joblin, K.N., Naylor, G.E. and Williams, A.G.: Effect of *Methnobreivibacter smithii* on xylanolytic activity of anaerobic animal ruminal fungi. *Appl and Environ Microbiol.*, 56, 2287(1990)
- Folin, O. and Ciocalteu, B., *J. Ferment. Technol.*, 73, 625(1977)

(1992년 1월 13일 접수)