

α -Galactosidase의 활력차이에 의한 Bifidobacteria의 선별

민해기 · 이시경* · 강국희

성균관 대학교 낙농학과, *두산 기술원

초록 : 본 연구는 합성기질인 X- α -Gal을 이용하여 발효유 및 유제품내의 Bifidobacteria 생균수를 측정할 목적으로 하였다. 젖산균과 Bifidobacteria의 α -galactosidase specific activity를 측정된 결과 Bifidobacteria 균주에서는 높은 α -galactosidase activity를 가지고 있었으며, 그중 *Bif. longum* KCTC 3215의 specific activity는 8.57 unit/mg protein으로 가장 높게 나타났다. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*와 *Leuconostoc* 균주에서는 활성이 미약하거나 없었다. 합성기질인 X- α -Gal을 MRS agar 배지에 100 μ M 첨가한 결과 Bifidobacteria는 blue colony로, *Lac. bulgaricus*, *Lac. casei*와 *Leu. mesenteroides* 균주는 light blue colony로, 그외 젖산균에서는 white colony로 나타났다(1993년 4월 14일 접수, 1993년 5월 17일 수리).

Bifidobacteria는 건강한 유아 및 성인의 분변 중에서 중요한 균종 중의 하나이며, 인체의 건강과 밀접한 관련이 있는 중요한 균으로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 이 균은 숙주의 면역기능을 강화하여 유해한 균들을 억제하며, 장내 정상균총의 균형을 유지시켜 주는 역할을 하고 있음이 입증되었다.⁴⁾ 이러한 효능 때문에 최근 식품과 영양분야에서 관심이 증대되고 있다. 요쿠르트와 같은 발효유를 이용하여 인체에 투여하는 방법이 가장 좋은 것으로 인정되면서 발효유내에 첨가된 Bifidobacteria균의 균수 측정 방법과 선택적으로 분리할 수 있는 선택배지 개발이 연구되어 왔다.⁵⁻⁸⁾ Bifidobacteria의 선택배지는 발효 유제품내의 생균수 측정,⁹⁾ 사람의 분변으로부터 Bifidobacteria 분리¹⁰⁾와 하천의 오염도 측정¹⁰⁻¹¹⁾ 등에 이용되기도 하였다. 지금까지 보고된 Bifidobacteria의 균수측정과 선택배지는 주로 항생제를 첨가하는 것인데 Finegold 등⁹⁾은 어떤 항생제를 사용하더라도 Bifidobacteria를 선택적으로 선별하기 어려울 뿐만 아니라 오히려 이들 항생제에 의해 Bifidobacteria가 억제되었다고 보고하였다. 항생제를 이용한 Bifidobacteria 선택배지는 균주간 항생제의 저항성이 다르기 때문에 보다 정밀한 항생제 첨가농도를 검토해야 할 것으로 생각된다. 최근에는 항생제를 첨가한 선택배지보다는 Bifidobacteria에 의한 효소를 이용한 방법이 개발되고 있다.⁸⁾ Bifidobacteria는 α -galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase 등의 효소를 생성하며¹²⁾, 또한 fructose-6-phosphate phosphoke-

tolase(F6PPK) 활성을 가지고 있으나 통성혐기성 젖산균에서는 α -galactosidase와 F6PPK 활성이 미약하거나 전혀 없는 것으로 보고되고 있다.⁸⁾ 따라서 본 연구는 젖산균과 Bifidobacteria에 의한 α -galactosidase를 이용한 Bifidobacteria 균수 측정방법에 관한 연구를 하였고 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시험 균주 및 배지

본 시험에 사용된 시험 균주는 Table 1과 같으며 시험균주의 증균배지로는 MRS broth¹³⁾을 사용하였다. Bifidobacteria와 통성혐기성 젖산균 선택배지로는 columbia agar 배지⁷⁾와 MRS+BS 배지¹⁴⁾를 사용하였다.

배양

일반 젖산균은 각각의 최적 온도에서 호기적으로 2차 계대하여 시험균으로 사용하였으며 Bifidobacteria는 MRS 액체배지에서 O₂-free CO₂ gas를 분사하면서 1백금이 접종하여 24시간 배양한 후, 다시 새로운 배지에 계대하여 2회째의 균액을 시험균으로 사용하였다. 생균수 측정은 0.1% yeast extract 혐기 회석액⁸⁾을 사용하여 O₂-free CO₂ gas를 분사하면서 십진 회석을 하였다. 각 단계의 회석액을 1 ml를 각 배지에 분주하고, 혐기 Jar에 넣어 시험균의 최적 온도 배양에서 48시간 혐기배양을

Table 1. Bacterial strains used in this work

Species	Strains	Culture Temperature
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. longum</i>	KCTC ^a 3215	37°C
<i>B. infantis</i>	KCTC 3221	37°C
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3202	37°C
<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. bulgaricus</i>	SKD ^b 0001	37°C
<i>L. helveticus</i>	SKD 0009	37°C
<i>L. plantarum</i>	SKD 0010	37°C
<i>L. casei</i>	SKD 0007	37°C
<i>Streptococcus</i>		
<i>Str. thermophilus</i>	SKD 1006	37°C
<i>Str. cremoris</i>	SKD 1003	30°C
<i>Str. faecalis</i>	SKD 1007	37°C
<i>Pediococcus</i>		
<i>P. cerevisiae</i>	KCTC 1628	30°C
<i>Leuconostoc</i>		
<i>Leu. mesenteroides</i>	KCTC 3100	30°C

^aKorean collection for type cultures, Korea.

^bMicroorganism laboratory, Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University.

한 후 배지의 표면에 나타난 colony를 계수하여 여기에 회석액을 곱하여 시험균의 생균수로 하였다.

5)에 현탁시켜 10,000 rpm, 30분간 원심 분리하여 분리된 상등액을 본 실험의 균체내 조효소액으로 사용하였다.

X-α-Gal based medium

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranoside (X-α-Gal; Boehringer Mannheim, Montreal, Canada)는 121 °C에서 15분간 멸균한 MRS agar medium에 최종농도 0.1 mM, 0.15 mM이 되게 50%(W/V) N, N'-dimethyl formamide 용액에 용해하여 무균적으로 첨가하였다. 시험 균주의 생균수는 48시간 동안 혐기적으로 배양 시킨 다음, colony가 출현한 후 7시간 동안 호기적으로 다시 배양하여 colony 색깔을 조사하였다.

조효소액의 조제

배양이 끝난 후 배양액을 4°C로 급냉하고 저온(4°C)에서 7,000 rpm, 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 용액으로 세척하였다. 미리 냉각된 세포 마쇄용 aluminum oxide(Junsei Chemical Co., Ltd)를 균체 무게에 대해 15 : 1 비율로 첨가하여 유발에서 갈아서 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하여 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., Ltd)을 표준단백질로 하여 정량하였다.

효소 활성 측정

α-Galactosidase의 활성은 Sakai 등¹⁵⁾의 방법에 따라 p-Nitrophenyl-α-D-Galactopyranoside(PNPG, Sigma Chemical Co., Ltd)를 기질로 하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 PNPG를 10 mM 이 되도록 용해한 기질 용액 200 μl를 40°C에서 예온시킨 후, 적절히 희석한 효소액 50 μl를 가하여 37°C, 10분간 반응 후 냉각된 0.2 M Na₂CO₃ 용액 500 μl를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 발색된 황색의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 PNP(p-nitrophenol, Sigma Co. Ltd.) 표준곡선으로부터 산출하였다. 효소활성의 단위는 상기 조건에서 1분 동안에 1 μ mole의 PNP를 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

Table 2. Comparison of selective agar media for Bifidobacteria and lactic acid bacteria

Species and strain	colony count on media (mL^{-1})		
	MRS	Columbia	MRS+BS
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>Bif. longum</i>	5.9×10^8	6.8×10^8	3.5×10^6
<i>Bif. infantis</i>	1.4×10^8	1.6×10^8	2.2×10^7
<i>Bif. bifidum</i>	2.5×10^8	2.3×10^8	2.0×10^7
<i>Bif. breve</i>	5.7×10^8	5.9×10^7	2.6×10^6
<i>Lactobacillus</i>			
<i>Lac. bulgaricus</i>	9.6×10^8	8.1×10^8	2.2×10^4
<i>Lac. helveticus</i>	2.0×10^8	2.3×10^8	N.D*
<i>Lac. acidophilus</i>	6.5×10^8	6.3×10^8	N.D
<i>Lac. casei</i>	1.8×10^7	1.6×10^7	3.2×10^2
<i>Streptococcus</i>			
<i>Str. thermophilus</i>	1.6×10^8	3.0×10^7	4.0×10^2
<i>Str. lactis</i>	9.5×10^8	9.2×10^8	N.D
<i>Str. cremoris</i>	5.6×10^8	2.2×10^8	N.D
<i>Str. faecalis</i>	1.3×10^9	1.1×10^9	1.4×10^8
<i>Pediococcus</i>			
<i>Ped. cerevisiae</i>	2.7×10^8	2.3×10^8	N.D
<i>Leuconostoc</i>			
<i>Leu. mesenteroides</i>	2.5×10^8	1.9×10^8	N.D

*N.D: Not detected.

Table 3. Specific activities of α -galactosidase from Bifidobacteria and lactic acid bacteria

Species	Protein (mg/ml)	Enzyme activity (unit/ml)	Specific activity (units/mg protein)
<i>B. longum</i>	0.739	6.34	8.57
<i>B. infantis</i>	0.804	4.46	5.55
<i>B. bifidum</i>	0.832	4.20	5.05
<i>B. breve</i>	0.801	3.61	4.51
<i>L. bulgaricus</i>	0.712	0.57	0.81
<i>L. helveticus</i>	0.924	0.03	0.04
<i>L. plantarum</i>	0.851	0.00	0.00
<i>L. casei</i>	0.826	0.66	0.81
<i>Str. thermophilus</i>	0.942	0.00	0.00
<i>Str. cremoris</i>	0.873	0.02	0.03
<i>Str. faecalis</i>	0.891	0.01	0.02
<i>P. cerevisiae</i>	0.902	0.00	0.00
<i>Leu. mesenteroides</i>	0.784	0.72	0.92

결과 및 고찰

Bifidobacteria 선택배지의 생균수 측정

기존의 Bifidobacteria 선택배지의 생균수를 비교한

결과는 Table 2와 같다. Propionic acid를 이용한 columbia agar 선택배지는 Bifidobacteria 생육에 영향을 미치지 않지만 혼합배양시 Bifidobacteria와 통성 혐기성 젖산균과의 colony 크기로 선별해야하는 단점을 가지고

Table 4. Effect of concentration of X-α-Gal on viability of Bifidobacteria and lactic acid bacteria subcultures on MRS agar plate

Species	colony count/ml		
	MRS	MRS + 100μM x-α-Gal	MRS + 150μM x-α-Gal
<i>B. longum</i>	2.1 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	1.5 × 10 ⁸
<i>B. infantis</i>	1.8 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸	8.3 × 10 ⁷
<i>B. bifidum</i>	1.6 × 10 ⁸	1.7 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁷
<i>B. breve</i>	1.9 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸
<i>L. bulgaricus</i>	1.6 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	1.5 × 10 ⁸
<i>L. helveticus</i>	1.0 × 10 ⁸	9.1 × 10 ⁷	7.4 × 10 ⁷
<i>L. plantarum</i>	6.5 × 10 ⁷	7.7 × 10 ⁷	5.6 × 10 ⁷
<i>L. casei</i>	1.7 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁸
<i>Str. thermophilus</i>	2.1 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸
<i>Str. cremoris</i>	1.0 × 10 ⁸	1.5 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁸
<i>Str. faecalis</i>	2.0 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸
<i>Ped. cerevisiae</i>	5.1 × 10 ⁷	6.4 × 10 ⁷	4.7 × 10 ⁷
<i>Leu. mesenteroides</i>	8.5 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁸	7.9 × 10 ⁷

있다.⁷⁾ 또한 Bifidobacteria 선택배지로 널리 이용되고 있는 MRS+BS 선택배지는 대조구에 비해 생균수가 다소 낮게 나타났다. 즉 *Str. faecalis* 균주를 제외한 대부분 시험균주는 항생제인 neomycin, kanamycin, 그리고 nalidixic acid에 의해 Bifidobacteria 생육에 다소 억제된다는 보고와 유사하였다.¹¹⁾ 따라서 항생제를 첨가한 선택배지 사용시에는 Bifidobacteria 종에 따른 항생제의 종류와 최소억제 농도 등의 많은 문제점이 제기되며 더 많은 연구가 요구된다.

젖산 생성균의 α-Galactosidase specific activity 비교

통성혐기성 젖산균과 편성혐기성 장내세균인 Bifidobacteria의 α-galactosidase specific activity 측정 비교 결과는 Table 3과 같다. Table 3에 나타난 바와 같이 *Bif. longum*의 경우 8.57 units/mg protein으로 가장 높게 나타났으며 다른 Bifidobacteria의 경우에도 다른 젖산균보다 매우 높게 나타났다. 또한 *Lac. bulgaricus*, *Lac. casei*와 *Leu. mesenteroides* 균주의 경우에는 α-galactosidase 활성이 미약한 반면 다른 시험 젖산균의 α-galactosidase 활성은 거의 없는 것으로 나타났다. 일반적으로 Bifidobacteria의 α-galactosidase 활성은 다른 젖산균보다 높은 활성을 가지고 있다.¹²⁾ 사람으로부터 분리된 Bifidobacteria는 높은 α-galactosidase 활성을 가지고 있는 것으로 알려지고 있다.¹⁶⁾ 그러나 본 시험 균주인 *Lac. bulgaricus*, *Lac. casei* 균주의 경우에는 α-galactosidase를 생성하는 것으로 보아 Lee 등¹⁶⁾의 보고와는 다소 차이가

Table 5. Colony color and viability on the plate containing 100μM X-α-Gal

Species	Colony color on plate	Viability
<i>B. longum</i>	Blue	+
<i>B. infantis</i>	Blue	+
<i>B. bifidum</i>	Blue	+
<i>B. breve</i>	Blue	+
<i>L. bulgaricus</i>	Light blue	+
<i>L. helveticus</i>	White	+
<i>L. plantarum</i>	White	+
<i>L. casei</i>	Light blue	+
<i>Str. thermophilus</i>	White	+
<i>Str. cremoris</i>	White	+
<i>Str. faecalis</i>	White	+
<i>Ped. cerevisiae</i>	White	+
<i>Leu. mesenteroides</i>	light blue	+

있었다.

X-α-Gal에 의한 Bifidobacteria의 생균수 측정

각 시험균을 subculture하여 MRS agar 배지, MRS + X-α-Gal agar 배지에 심진회석하여 각 시험균주의 최적온도에서 혐기배양시켜 colony 출현 후 생균수를 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 모든 시험균주에 대해 100 μM X-α-Gal이 첨가된 MRS 배지에서의 생균수는 대조구인 MRS agar 배지보다 Bifidobacteria 균수가 높게 나타난 반면 150 μM X-α-Gal이 첨가된 배지 경우에는 다소 낮게 나타났다. 이는 150 μM X-α-Gal을 첨가한

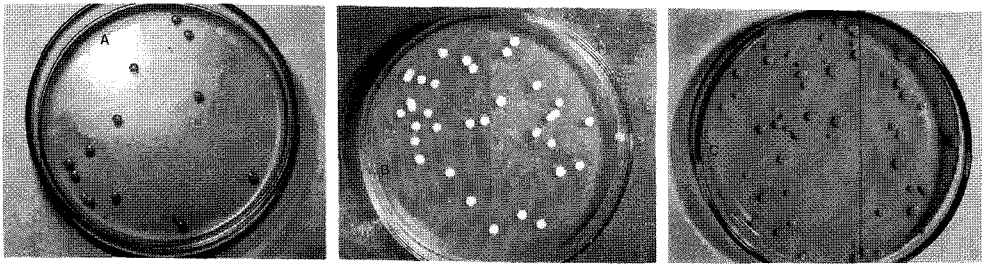


Fig. 1. Use of X- α -Gal based medium of *Bifidobacterium* and Lactic acid-producing bacteria. Blue color, *Bif. longum* (Left); White color, *Str. thermophilus* (Center); Light Blue, *Lac. bulgaricus* (Right).

배지의 경우 N, N'-dimethylformamide에 의해 다소 균 생육이 억제된 것으로 볼 수 있으며, 100 μ M X- α -Gal이 첨가된 배지의 경우 Bifidobacteria 균 생육이 억제되지 않았다. 100 μ M X- α -Gal을 첨가한 배지상에서의 colorimetric reaction을 보면 모든 Bifidobacteria는 blue colony로 나타난 반면 *Lac. helveticus*, *Lac. plantarum*, *Str. cremoris*, *Str. faecalis*, *Str. thermophilus*와 *Ped. cerevisiae*는 white colony로, *Lac. bulgaricus*, *Lac. casei*와 *Leu. mesenteroides* 균들은 light blue colony로 나타났다(Fig. 1, Table 5). 이와같은 blue colony 형성은 Bifidobacteria의 α -galactosidase에 의해 X- α -Gal이 분해되어 diazo 화합물을 형성하여 blue 색깔을 띠게 된다. 따라서 건강음료 및 젖산균 발효유에서의 Bifidobacteria 생균수 측정은 Bifidobacteria에 의한 α -galactosidase를 이용하여 colony 색깔로 측정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Mitsuoka, T.: *Bifidobacteria* and Microflora 3 : 11 (1984)
- Anand, S. K., Srinivasan, R.A. and Rao, L.K.: *Cultured Dairy Products Journal* 20 : 21(1985)
- Yamazaki, S., Machi, S., Tsuyuki, H., Monse, T., Kawashima, T. and Veda, K.: *Immunology* 56 : 43 (1985)
- Tamira, Z.: *Bifidobacteria* and Microflora 2 : 3(1983)
- Burford, M.Y.: *Cultured Dairy Products Journal* 24 : 21(1989)
- Shimada, K., Mada, M., Mutai, M., Suzuki, A. and Konuma, H.: *食衛誌*. 18 : 537(1977)
- Beerens, H.: *Letters in Applied Microbiology* 11 : 155(1990)
- Chevalier, P., Roy, D. and Savoie, L.: *Journal of Microbiological Methods* 13 : 75(1991)
- Finegold, S.M., Sugihara, P.T. and Sutter, V.L.: *Isolation of Anaerobes*. Academic Press, Inc. New York.(1971)
- Munoz, F.J. and Pares, R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 1715(1988)
- Tanaka, R and Mutai, M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 40 : 866(1980)
- Chevalier, P., Roy, D. and Ward, P.: *J. Applied Bacteriology* 68 : 619(1990)
- Collins, E.B. and Hall, B.J.: *J. Dairy Sci.* 67 : 1376 (1984)
- Mitsuoka, T., Sega, A. and Yamamoto, S.: *Zbi. Bark (l. Abt. Orig)*, 19 : 455(1965)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem* 193 : 265(1951)
- Sakai, K., Tachiki, T., Kumagai, H. and Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.* 51 : 315(1987)
- Lee, B.H., Hache, S. and Simard, R.E.: *Journal of Industrial Microbiology* 1 : 209(1986)

Detection of Bifidobacteria by α -Galactosidase activity

Hae-Ki Min, See-Kyung Lee* and Kook-Hee Kang(Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, *Doo San Technical Center)

Abstract : This method using the synthesis substrate of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -galactoside (X- α -Gal) was examined for the differential enumeration of Bifidobacteria and lactic acid-producing bacteria. Bifidobacteria possess a high level of α -galactosidase activity. *Bifidobacterium longum* KCTC 3215 exhibited the highest α -galactosidase specific activity (8.57 units/mg protein). Determination of α -galactosidase activity using the PNPG procedure showed that *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* strain had lower α -galactosidase activity as compared to Bifidobacteria. The X- α -Gal based medium is useful to identify Bifidobacteria among lactic acid-producing bacteria since the enzyme action of α -galactosidase splits X- α -Gal substrate and releases indol which impacts a blue color to Bifidobacterial colonies on agar plates. All strains of Bifidobacteria appeared as blue colonies on MRS agar medium supplemented with 100 μ M X- α -Gal while colonies of other lactic acid-producing bacteria appeared white or light blue.