

Urease 생산 젖산균의 탐색을 위한 한천 배지

서인영 · 이정준 · 신명수 · 나석환 · 백영진*

한국야쿠르트연구소

Agar Medium for Screening of Urease-Producing Lactic Acid Bacteria

Suh, In-Yeong, Jeong-Jun Lee, Mounng-Soo Shin,
Seog-Hwan Na and Young-Jin Baek*

Hankuk Yakult Institute, Euiwang, Kyongi-Do 437-020, Korea

Abstract — An agar medium(HY) was developed to detect the urease-producing lactic acid bacteria. HY medium was prepared with the addition of tryptone, glucose and tween 80 to the supernatant of autoclaved skim milk and yeast extract mixture. There was no difference in enumeration of lactic acid bacteria between the HY and commercial media, such as M17, MRS and BCP agar. The urease activity of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* was detected on the HY agar medium contained urea by the color change of bromocresol purple as the pH indicator, but not on the commercial agar media. Furthermore, it was succeeded to screen the urease activity of bacteria in skim milk used as a raw material in dairy product manufacture. Therefore, HY medium was proved to be suitable for the screening of urease-producing lactic acid bacteria.

Urease(urea amidohydrolase EC 3.5.1.5)는 urea를 분해하여 암모니아와 이산화탄소를 생산하는 가수분해 효소로써(1), 주로 식물과 미생물계에 분포한다(2). 반면 동물세포 특히 온혈동물에 있어서는 urease의 활성이 직접 확인된 바는 없으나, 그들의 생체내 질소대사에 있어 최종산물인 urea는 동물의 장내에 존재하는 urease 생산균에 의하여 분해된다(3). 따라서 이들 urease 생산균은 온혈동물의 생리학적, 영양학적 측면에서 매우 중요하며(1), 인간을 포함한 포유동물의 장내에 존재하는 urease 생산균에 관하여 많은 연구가 이루어졌다(4-7).

한편, 장내 균총에서 중요한 역할을 담당하는 젖산균에 있어서도 여러 종류의 균들이 urease를 생산하는 것으로 보고되고 있으며, 그 대표적인 예가 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*(8), *Enterococcus faecium*(9, 10), *Bifidobacterium*(11, 12), 그리고 *Lactobacillus fermentum*(7) 등이다.

젖산균은 생육중에 발효산물로써 젖산을 생산하여

세포 주위 환경의 pH를 산성화시키는 특성을 지닌다. 반면 urease는 최종 반응산물로 암모니아를 생성하며, 이때 생산된 암모니아는 반응액의 pH를 상승시키는 특성을 나타낸다. 따라서 urease를 생산하는 젖산균은 urea가 첨가된 배지에서 이 두가지 특성을 모두 나타낼 것으로 생각되며, 이러한 특성을 이용할 경우 pH 지시약을 통하여 urease 생산 젖산균을 쉽게 감지할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 urease 생산 젖산균을 광범위하게 연구하기 위한 기본 작업으로서, 이들 젖산균을 쉽고, 빠르게 탐색할 수 있는 한천배지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에는 Christian Hansen사(덴마크)의 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CH4, *Lactobacillus acidophilus* CH5, *Lactococcus lactis* var. *diacetylactis* CH05와 한국야쿠르트연구소에 보관중인 *Lactobacillus casei* YIT 9018 등이 사용되었다.

Key words: Lactic acid bacteria, urease detection, screening

*Corresponding author

Table 1. The compositions of commercial media used in this study

M17	MRS	BCP
Tryptone, 0.5%	Proteose peptone, 1.0%	Yeast extract, 0.25%
Soytone, 0.5%	Beef extract, 1.0%	Peptone, 0.5%
Meat digest, 0.5%	Yeast extract, 0.5%	Glucose, 0.1%
Yeast extract, 0.25%	Glucose, 2.0%	Tween 80, 0.1%
Ascorbic acid, 0.05%	Tween 80, 0.1%	L-cysteine, 0.01%
Magnesium sulphate, 0.025%	Ammonium citrate, 0.2%	Bromocresol purple, 0.004%
Glucose, 0.5%	Sodium acetate, 0.5%	Agar, 1.5%
Disodium β -glycerophosphate, 1.9%	Magnesium sulfate, 0.01%	
Agar, 1.5%	Manganese sulfate, 0.005%	
	Dipotassium phosphate, 0.2%	
	Agar, 1.5%	

사용배지

실험에 사용된 모든 균은 10%(w/v) 환원탈지유(Difco)로 계대배양하였으며, urease 탐색 배지 선정 실험에서는 상업용 배지로서 M17(Difco), MRS(Difco) 그리고 BCP(Eiken, Japan) 한천배지를 사용하였다. 이들 각 배지의 조성을 Table 1에 정리하였으며, M17과 MRS에는 0.004% bromocresol purple(BCP)을 첨가하였고, 각 배지 공히 사용전 0.8%(w/v)의 농도가 되도록 urea 용액을 제공하여 첨가하였다.

HY 한천배지의 제조

2%(w/v)의 탈지분유(Difco)와 1%(w/v)의 yeast extract(Difco) 혼합용액의 pH를 6.2로 조정후 가압멸균(121°C, 15분)하여, 그 침전물을 거르기로 제거한 상등액에 0.5%의 glucose, 0.5%의 tryptone, 0.1%의 tween 80 그리고 0.004%의 BCP를 용해하여 pH를 7.0으로 조절후, 1.5%의 한천을 첨가하여 가압멸균(121°C, 15분)하였다. 멸균배지에 0.8%의 농도가 되도록 urea 용액을 제공하여 첨가하였다.

한천 평판배지에서의 urease 활성확인

각각의 사용균주들의 배양액과 멸균 생리 식염수에 1%의 농도로 용해한 탈지분유 시료는 유제품 검사를 위한 표준방법(13)에 따라 평판 배양하였으며, 37°C에서 1~2일 동안 배양하면서 colony 주위의 색 변화로 urease 활성을 확인하였다. 그리고 필요한 경우 관찰된 colony들을 계수하였다.

결과 및 고찰

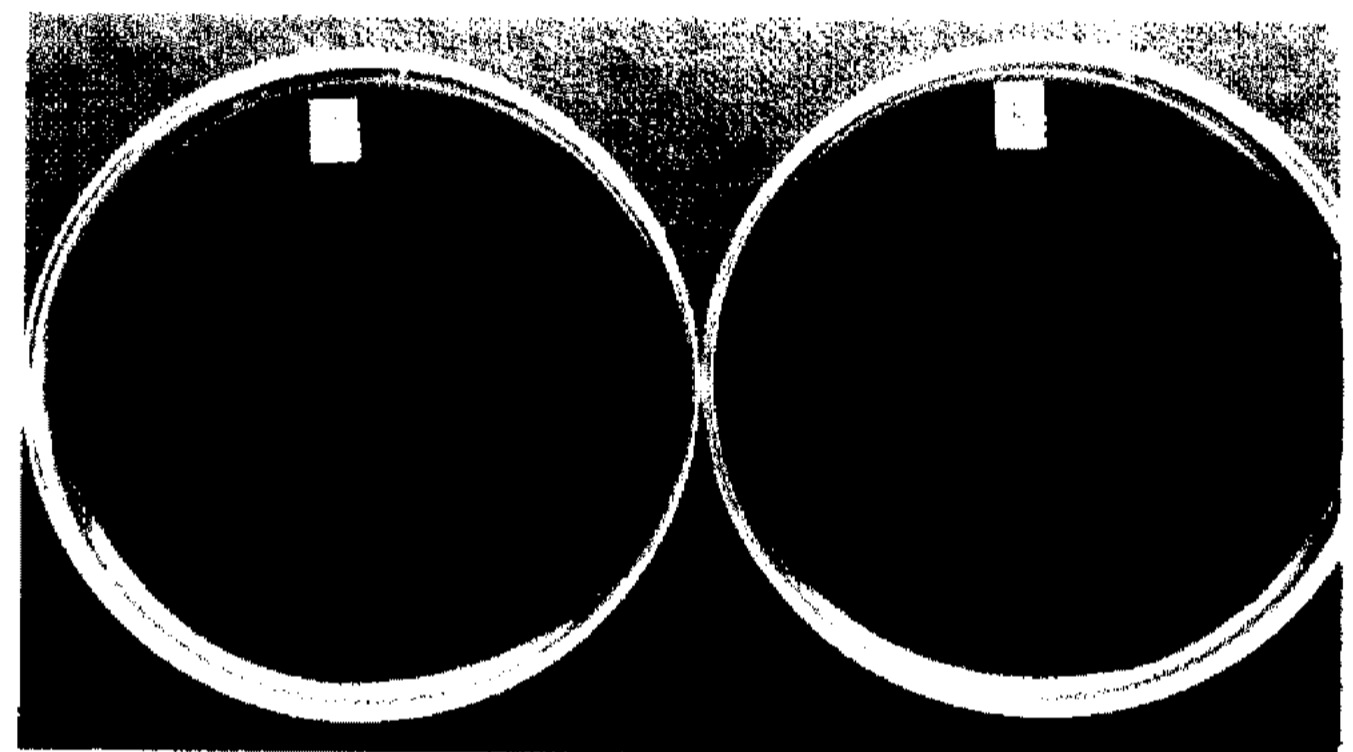


Fig. 1 Colonial growth on BCP agar containing urea (A) and BCP agar (B) of *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Agar plates were incubated aerobically at 37°C for 48 hours.

상업용 젖산균 배지를 이용한 urease의 활성확인

M17, MRS 그리고 BCP 한천배지에 여러 젖산균을 배양한 결과, M17과 MRS 배지상에서 pH 지시약인 BCP의 색변화를 관찰하기가 어려웠다(Data는 보이지 않음). 이는 M17과 MRS 배지가 지닌 높은 pH 완충효과에 기인하는 것으로 판단되었다. 반면 BCP 한천배지는 젖산균 배양시 colony 주위로 전형적인 노란색 환이 나타나며, 따라서 M17과 MRS 배지와는 달리 pH 완충효과가 크지 않음을 알 수 있었다. 그러나 urea를 첨가한 BCP 한천배지(A)에 urease 생산균인 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 배양하였을 때, urea를 첨가하지 않은 배지와 비교하여 아무런 차이점도 없었으며(Fig. 1), 따라서 BCP 한천배지상에서 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*의 urease 활성을 확인할 수가 없었다. 결국 실험에 사용된 상업용 젖산균 배양배지들에서는 urease의 활성이 확인되지

Table 2. Viable cell counts for lactic acid bacteria in HY and commercial agar media

Medium	Species (cfu/ml × 10 ⁷)			
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. diacetylactis</i>
M17	110(1)	NG	147(2)	49(1)
	110(1)	NG	146(2)	33(1)
MRS	100(2)	72(2)	142(2)	53(1)
	94(2)	77(2)	147(2)	48(1)
BCP	90(2)	82(3)	170(2)	50(2)
	95(2)	66(3)	146(2)	42(2)
HY	108(1)	88(2)	140(2)	59(1)
	102(1)	65(2)	135(2)	60(1)
Mean	101	75	147	49

(): incubation days, NG: no growth

가 않으며, 이를 위해서는 새로운 배지가 필요하리라 생각되었다.

젖산균 배양을 위한 HY 배지

HY 배지는 탈지분유를 기본으로 하였으며, 여기에 yeast extract를 혼합하여 pH를 6.2로 조정 한 후 멸균하면, 상당한 양의 단백질들이 침전되었다. 이때 침전물을 제거한 상등액을 가지고 배지를 제조하였다.

Table 2는 HY 배지의 유용성을 다른 배양 배지들과 비교하기 위하여 여러 젖산균을 배양한 후, 각균의 생균수를 측정 한 결과이다.

이 결과 HY배지에서 측정된 생균수는 각균의 평균치보다 낮지 않으며 따라서 HY 배지는 기존의 배지들에 비하여 여러 젖산균이 성장하는데 문제점이 없는 것으로 판단되었다.

HY 배지를 이용한 urease의 활성 확인

Fig. 2는 urease 생산균인 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 urea를 첨가한 HY 배지(A)와 urea를 첨가하지 않은 HY 배지(B)에서 평판배양한 후, 배지내 BCP의 색 변화를 관찰한 결과이다. Urea를 첨가하지 않은 배지(B)에서 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*는 colony 주위에 전형적인 노란색 환이 형성되었다. 그러나 동일한 배지에 urea를 첨가하면(A) colony 주위로 아무런 색 변화도 나타나지 아니하며, 이는 urea가 분해되어 생성된 암모니아가 젖산균에 의하여 생산된 젖산을 중화시켰음을 의미한다. 뿐만아니라 urea 첨가 배지에서 성장한 colony의 크기가 urea를

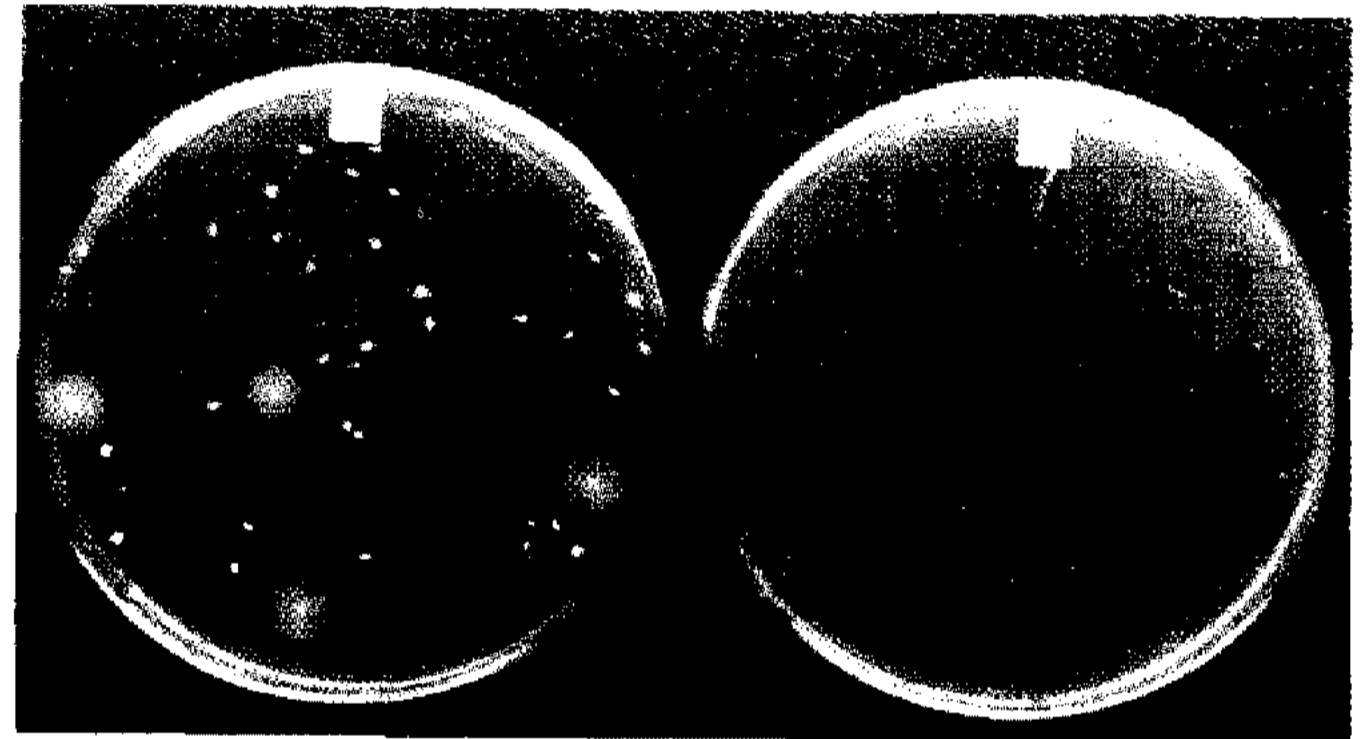


Fig. 2 Colonial growth on HY agar containing urea (A) and HY agar (B) of *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Agar plates were incubated aerobically at 37°C for 24 hours.

첨가하지 않은 경우보다 더욱 크다는 사실을 확인할 수 있었다. 일반적으로 젖산균의 경우 젖산 생산으로 인한 배지의 낮은 pH가 세포의 성장을 저해하는 요인으로 알려져 있으며(14), *Streptococcus*의 경우 pH 5.0 이하부터 세포의 성장이 저하되는 것으로 알려져 있다(15). 그러나 젖산균을 배양하는 가운데 배지의 pH를 최적조건으로 조절하여 주면 커다란 세포 증식효과를 얻을 수 있다(16). 따라서 urea 첨가 배지에서 urea의 분해로 생성된 암모니아는 젖산을 중화시키는 중화제로 작용하여, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* 증식에 커다란 영향을 주었으며, 이는 McCoy(16)의 보고와 일치하였다.

한편, urease가 없는 *L. casei*의 경우 HY 배지에서 urea 첨가에 상관없이 노란색 환이 관찰되었으며(Fig. 3), *L. acidophilus*와 *L. diacetylactis*에 있어서도 *L. ca-*

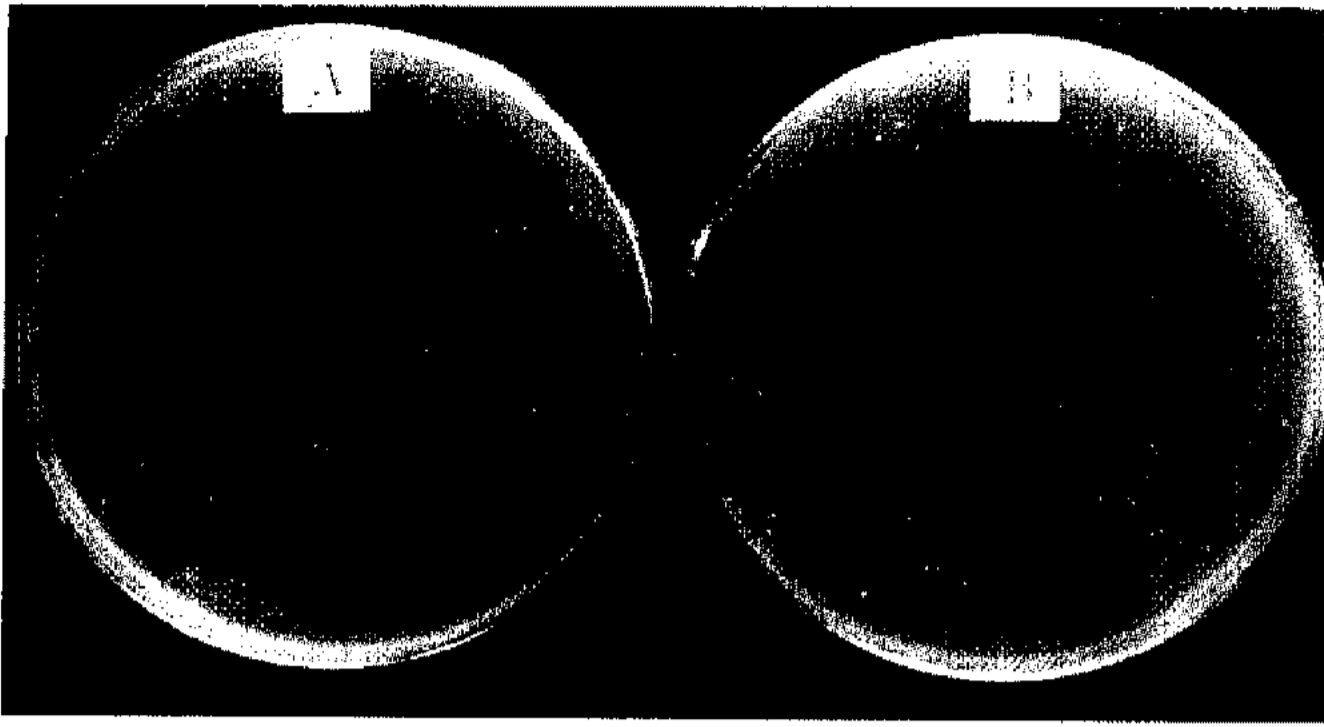


Fig. 3. Colonial growth on HY agar containing urea (A) and HY agar (B) of *L. casei*.

Agar plates were incubated aerobically at 37°C for 48 hours.

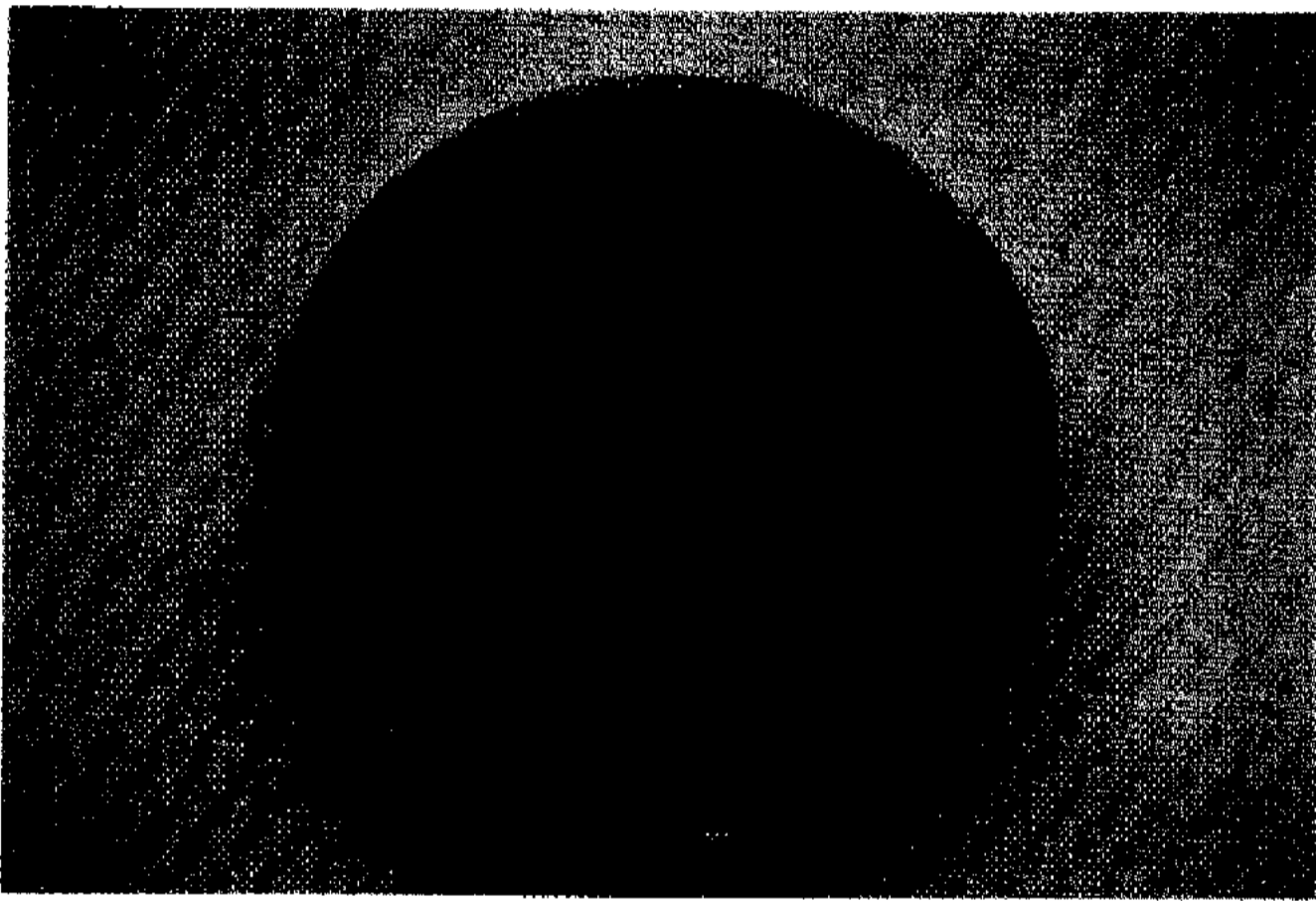


Fig. 4. Difference in colonial growth of lactic acid bacteria in raw skim milk on HY agar containing urea. Agar plates were incubated aerobically at 37°C for 24 hours. The arrows indicated urease-producing bacteria.

*sei*와 동일한 결과를 나타내었다(Data는 보이지 않음).

HY 배지를 이용한 urease 생산균의 탐색

일반 유제품 제조에 널리 사용되는 탈지분유를 시료로 사용하여 그 속에 존재하는 젖산균들 가운데서 urease 생산균만을 탐색하는데 HY 배지를 적용하여 보았다. Fig. 4는 이에 대한 결과로서 urea를 첨가한 HY 배지에서 Fig. 2의 결과와 동일하게 colony 주위에 노란색 환을 나타내지 않는 비교적 colony의 크기가 커다란 여러 균들이 관찰되었다. 따라서 이들 균들이 urease를 지니고 있는 것으로 판단되었으며, 앞으로 여러 젖산균 분리원으로부터 urease 생산균을 분리하는데 HY agar 배지를 폭넓게 이용할 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

Urease 생산 젖산균을 탐색할 수 있는 한천배지 (HY)를 개발하였다. HY 배지는 탈지분유와 yeast extract 혼합액을 가압멸균한 상등액에 tryptone, glucose 그리고 tween 80을 첨가하여 제조하였다. 본 배지에 여러 젖산균을 배양한 결과 M17, MRS 그리고 BCP 한천배지와 같은 여러 상업용 젖산균 배지와 비교하여, 생균수 측정면에서 차이점이 없었다. 한편 본 배지에 urea를 첨가하여 urease 생산균인 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*를 배양한 결과, pH 지시약인 bromocresol purple의 색변화를 통하여 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*의 urease 활성을 확인할 수 있었던 반면 상업용 젖산균 배지에서는 이를 확인할 수 없었다. 더욱 나아가서 본 배지를 이용하여 유제품 생산원료로 사용되는 탈지분유속에 존재하는 urease 활성을 나타내는 균을 확인할 수 있었다. 따라서 HY 배지가 urease 생산 젖산균을 탐색하는데 적절할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Visek, W.J. 1972. Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism. *Fed. Proc.* **31**: 1178-1193.
2. Mobley, H.L.T. and R.P. Housinger. 1989. Microbial ureases: Significance, Regulation and Molecular characterization. *Microbiol. Rev.* **53**: 85-108.
3. Levenson, S.M., L.V. Crowley, R.E. Horowitz and O.J. Malm. 1959. The metabolism of carbon-labeled urea germ rat. *J. Biol. Chem.* **234**: 2061-2062.
4. Wozny, M.A., M.P. Bryant, L.V. Holdeman and W.E.C. Moore. 1977. Urease assay and urease-producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1097-1104.
5. John, A., H.R. Isaacson and M.P. Bryant. 1974. Isolation and characteristics of a ureolytic strain of *Selenomonas ruminantium*. *J. Dairy Sci.* **57**: 1003-1014.
6. Varel, V.H., M.P. Bryant, L.V. Holdeman and W.E.C. Moore. 1974. Isolation of ureolytic *Peptostreptococcus productus* from feces using defined medium; Failure of common urease tests. *Appl. Microbiol.* **28**: 594-599.
7. Suzuki, K., Y. Benno, T. Mitsuoka, S. Tanabe, K. Kobashi and J. Hase. 1979. Urease-producing

- species of intestinal anaerobes and their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:379-382.
8. Tinson, W., M.C. Broome, A.J. Hiller and G.R. Jago. 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 2. Production of CO₂ and NH₃ from urea. *Aust. J. Dairy Technol.* **37**: 14-16.
 9. Cook, A.R. 1976. The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid-coded urease. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 49-58.
 10. Cook, A.R. 1972. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 32-48.
 11. Matteuzzi, D. and F. Crociani. 1973. Urease production and DNA-homology in the species *Bifidobacterium suis*. *Arch. Mikrobiol.* **94**: 93-95.
 12. Crociani, F. and D. Matteuzzi. 1982. Urease activity in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* **133A**: 417-423.
 13. American Public Health Association, INC. 1967. Standard methods for the examination of dairy products, 12th ed. American Public Health Association.
 14. Gilliland, S.E. 1985. Concentrated starter cultures, Pp. 145-157. In S.E. Gilliland (ed), *Bacterial Starter Cultures for Foods*, CRC Press Florida.
 15. Harvey, R.J. 1965. Damage to *Streptococcus lactis* resulting from growth at low pH. *J. Bacteriol.* **90**: 1330.
 16. Cogan, T.M., D.J. Buckley and S. Condon. 1971. Optimum growth parameters of lactic Streptococci used for the production of concentrated cheese starter cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **34**: 403-409.
 17. Lloyd, G.T. and E.G. Pont. 1973. Some properties of frozen concentrated starters produced by continuous culture. *J. Dairy Res.* **40**: 157-167.
 18. Peebles, M.M., S.E. Gilliland and M.L. Speck. 1969. Preparation of concentrated lactic *Streptococcus* starters. *Appl. Microbiol.* **17**: 805-810.
 19. McCoy, D.R. 1992. Method for growing acid-producing bacteria. U.S. Patent. 5,116,737.

(Received April 21, 1993)