

## 유제품으로부터 Bifidobacteria의 선별 및 계수를 위한 선택배지

신명수\* · 이정준 · 서인영 · 나석환 · 백영진  
한국야쿠르트유업(주) 연구소

### Selective Medium for the Isolation and Counting of Bifidobacteria in Dairy Products

Shin, Myeong-Su\*, Jeong-Jun Lee, In-Yeong Suh,  
Seog-Hwan Na and Young-Jin Baek

Hankuk Yakult Institute, Euiwang-Si, Kyunggi-Do 437-020, Korea

**Abstract** — Phage utilizing medium and BL agar supplemented with antibiotic Tc(tetracycline) were developed as selective media for the isolation and counting of bifidobacteria in dairy products. The former was based on the host specificity of phage. When bifidobacteria and *Lactobacillus casei* HY 2782 were mixed together in dairy product, *L. casei* HY 2782 was lysed by J1 phage which has host specificity to *L. casei* HY 2782 whereas bifidobacteria grew well on the selective medium added with J1 phage. The latter was found to inhibit the growth of *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. acidophilus*, and *L. casei*, but commercial bifidobacteria grew well in Tc-containing BL agar.

Bifidobacteria는 사람의 장내 미생물중에서 우점종으로 존재하는 균주로서(1), gram 양성이며 무포자 절대 혐기성균이고 일반적인 모양은 간균이지만 영양 조건에 따라 만곡형, 곤봉형, Y-자형 등으로 변하는 것으로 알려져 있다(2).

Bifidobacteria는 1889년 Tissier에 의해 처음으로 발견되어 *Bacillus bifidus*라고 명명되어진(3) 이후, 많은 학자들에 의해 연구가 이루어졌다. Bifidobacteria는 사람의 장내균총의 균형을 유지하고(4), *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, 그리고 *Proteus* sp. 등과 같은 병원성균들에 대해 길항작용을 나타내며, 일부 bifidobacteria는 비타민 B군을 생산하는 것으로 알려졌다(1, 5). 이러한 장점때문에 bifidobacteria를 함유하는 유제품들이 많이 생산되고 있으며, 의약품, 유아식 등에도 그 경향이 급속도로 증가되고 있다(1, 6).

Bifidobacteria를 포함하는 대부분의 유제품들은 *Lactobacillus acidophilus* 또는 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 등과 혼합되고 있으며(7-9),

유통기간 동안에 최소한의 생균수를 유지시켜야 하기 때문에 다른 유산균과 혼합된 유제품에서 bifidobacteria의 생균수를 알아 보는 일이 필요하게 되었다(9).

Bifidobacteria의 생균수를 측정하기 위한 선택배지로는 항생제, 당, propionic acid 등을 이용하여 다른 유산균의 성장을 억제하는 배지가 주로 사용되어 왔으며(9-14), 이밖에 다른 유산균들도 동시에 성장하면서 bifidobacteria가 갖고 있는 효소를 이용하여 한천배지 위에서 푸른색의 colony를 형성시킴으로써 bifidobacteria를 구분하는 방법도 이용되었다(15). 그러나 이러한 선택배지들은 bifidobacteria의 성장을 약간이나마 억제시키거나 발색반응의 한계성으로 인하여 유제품에 있는 bifidobacteria의 정확한 생균수를 표현해 주지 못하고 있다.

본 연구에서는 phage의 숙주세포에 대한 특이성을 이용하여 bifidobacteria의 성장에는 전혀 억제효과가 없으면서도 유제품에 함께 섞여 있는 다른 유산균, 즉 phage의 숙주세포를 선택적으로 자랄 수 없게 하는 선택배지와 항생제 중에서 비교적 bifidobacteria의 성장억제 효과가 적으면서 다른 유산균의 성장을 억제시키는 tetracycline을 이용한 선택배지를 개발하여 유제품으로부터 bifidobacteria의 선별 및 계수에 이용하고자 하였다.

**Key words:** Bifidobacteria, selective media, phage, tetracycline.

\*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주 및 phage

사용한 균주는 주로 상업용으로 이용되는 균주들을 중심으로 실험하였으며, phage로는 *Lactobacillus casei* HY 2782를 숙주로 하는 J1 phage(16)를 사용하였다 (Table 1).

사용배지 및 배양

*Lactobacilli*와 *streptococci*는 MRS(17)와 M17 배지 (18)에서 계대배양하여 사용하였으며, bifidobacteria는 BL 배지에서 혐기적으로 배양하였다. 그리고 phage는 MRT 배지(19)에 계대배양하여 사용하였다.

선택배지 제조

*Lactobacillus casei* HY 2782가 포함된 유제품에서 phage를 이용한 bifidobacteria의 선택배지는 유제품의 희석액(1 ml)과 *Lactobacillus casei*를 숙주 세포로 갖는 J1 phage(0.2 ml,  $5 \times 10^8$  pfu/ml)를 혼합하여 petri dish 속에서 1~5분간 방치하여 흡착시킨 뒤, BL 한천배지를 섞어 주었다.

항생제 tetracycline을 이용한 선택배지는 BL 한천 배지 속에 항생제 tetracycline를 1 µg/ml 첨가하여 사용하였으며, 그 밖의 항생제 배지인 NPNL 배지는 Teraguchi 등(13)의 방법에 따라 제조하였다.

항생제에 의한 성장저해 측정

여러가지 항생제의 농도에 따른 유산균들의 성장 억제 정도를 살펴 보기 위하여 10 ml의 BL 액체 배지에 neomycin sulphate, paromomycin sulphate, nalidixic acid, lithium chloride, tetracycline 등을 각각 여러가지 농도별로 첨가한 후,  $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml 농도로 균을 접종하여 20시간 동안 배양한 다음 O.D.<sub>650</sub>을 측정하였다. 이때 bifidobacteria는 액체배지 위에 멸균된 paraffin oil을 첨가하여 혐기적 조건으로 배양하였다. 그리고 *streptococci*는 위와 같은 방법으로 M17 배지(18)에서 실험하였다.

결과 및 고찰

Phage을 이용한 선택배지

J1 phage는 특이적으로 *L. casei* HY 2782에 작용하여 용균을 일으키는 성질을 갖고 있다(16). Table 2에서 보는 바와 같이 배지 속에 J1 phage( $3 \times 10^8$  pfu/ml)를 0.5 ml 첨가하였을 때에는 거의 모든 *L. casei*가 성장하지 못하였으며, 0.2 ml씩 넣었을 때에  $10^4$

Table 1. The lactic acid bacteria and phage used in this study

Strains and phage	Source or references
<b>Bifidobacteria</b>	
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	ATCC <sup>1)</sup>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 11863	ATCC
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB12	Chr. Hansen's Lab.
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697	ATCC
<i>Bifidobacterium infantis</i> 420	Laboratorium Wiesby
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Marshall Products
<i>Bifidobacterium longum</i>	Marshall Products
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	ATCC
<b>Lactobacilli</b>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Chr. Hansen's Lab.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Marshall Products
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laboratorium Wiesby
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3205	IFO <sup>2)</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	Marshall Products
<i>Lactobacillus casei</i>	Chr. Hansen's Lab.
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i> HY 2782	our Lab.
<b>Streptococci</b>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Chr. Hansen's Lab.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Marshall Products
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Laboratorium Wiesby
<b>Phage</b>	
J1 phage	our Lab.

<sup>1)</sup>ATCC, American Type Culture Collection. <sup>2)</sup>IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan.

cfu/ml에서 1~2개의 colony가 형성되는 것은 phage가 흡착이 되지 않은 세포가 성장한 것으로 보인다. 그러나 첨가하는 phage 양이 많아질 수록 숙주세포의 성장은 전혀 없었으며, 형성이 되더라도 매우 작은 colony(pinpoint colony)를 형성하기 때문에 정상적인 colony와는 쉽게 구별이 되었다. 따라서 이러한 성질을 이용하면 *L. casei*와 bifidobacteria가 혼합된 유제품에서 bifidobacteria의 선택배지로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

Phage에 의한 bifidobacteria의 성장저해 여부를

알아보기 위하여 BL 한천배지를 대조군 bifidobacteria의 단독 배양, 또는 phage를 혼합하여 혐기성 조건에서 배양한 결과, Table 3에서와 같이 phage의 양에 관계없이 bifidobacteria의 성장에는 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 숙주에 대한 특이성을 지니고 있는 phage는 감염 특이성을 갖고 있지

않는 다른 균주의 성장과는 관계가 없으므로 bifidobacteria를 함유하고 있는 유제품에서 다른 유산균들에 대해 특이성을 지닌 phage들을 이용하여 선택배지로 사용한다면 유제품내 bifidobacteria의 정확한 생균수를 계수할 수 있을 것이다. 위의 결과를 바탕으로 생균수를 알고 있는 bifidobacteria와 *L. casei*

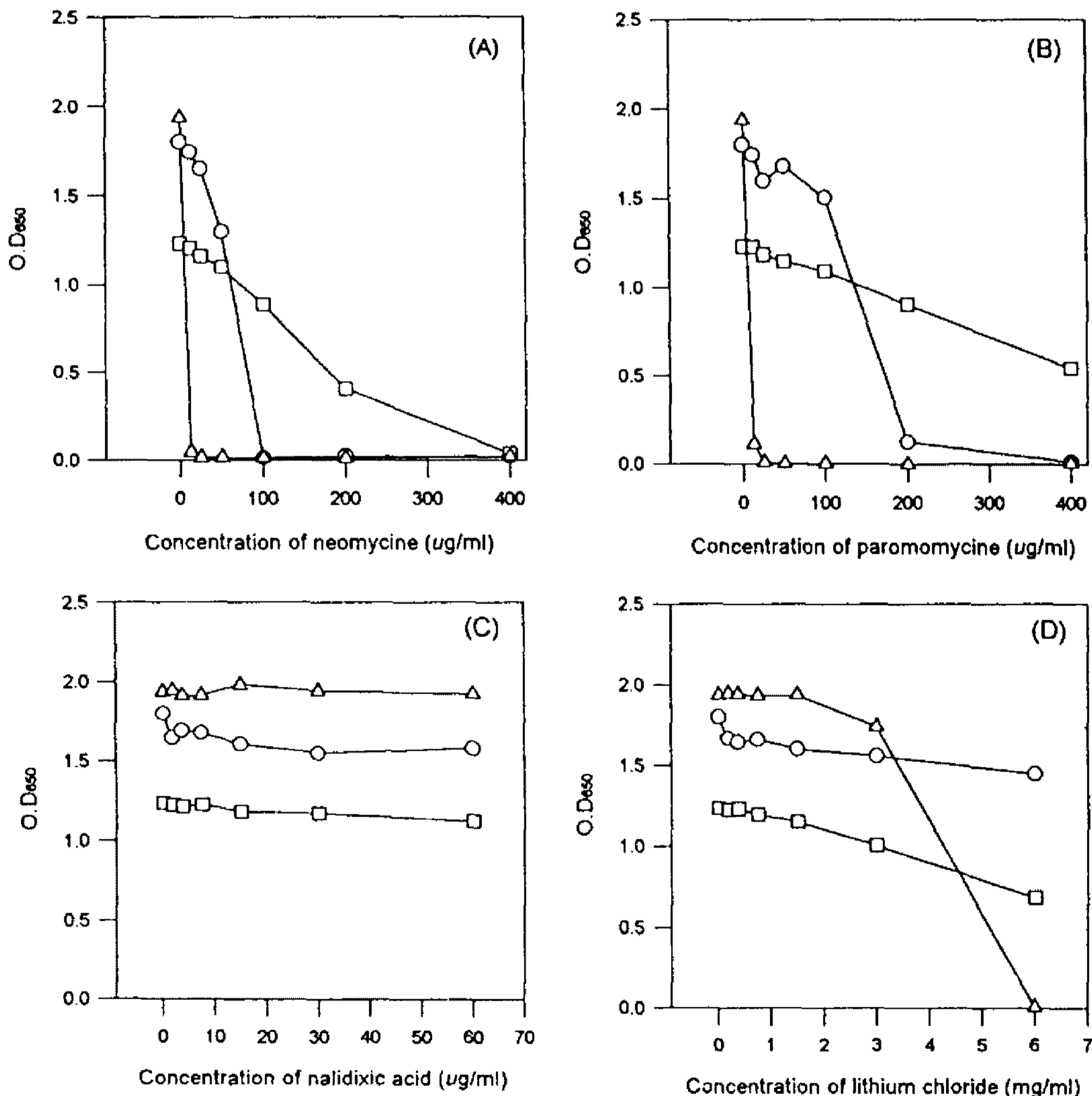
**Table 2. Colonies counts of *L. casei* in phage-added BL agar**

J1 phage ( $5 \times 10^8$ pfu/ml)	<i>L. casei</i> (cfu/ml)					
	10	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
2.0 ml	-	-	-	-	-	-
1.0 ml	-	-	-	-	-	-
0.5 ml	-	-	-	-	-	3(pp)
0.2 ml	-	-	-	1±1	1±1	20(pp)

-: no forming colony, pp: pinpoint colony.

**Table 3. Colonies counts of bifidobacteria in phage-added BL agar**

Medium	<i>B. longum</i> (cfu/ml)	<i>B. bifidum</i> (cfu/ml)
BL agar	210±10	298±10
BL+J1(2.0 ml)	224±10	312±8
BL+J1(1.0 ml)	220±10	300±10
BL+J1(0.5 ml)	205±5	320±10
BL+J1(0.2 ml)	194±2	287±6



**Fig. 1. Inhibition effect of the growth of lactic acid bacteria by respective agent of NPNL.**  
 -○- *Bifidobacterium bifidum*, -□- *Bifidobacterium longum*, -△- *Lactobacillus casei*.

HY 2782가 들어 있는 유제품에서 정확하게 bifidobacteria의 생균수를 확인할 수 있었다(data not shown).

**NPNL의 성장억제 효과**

유제품으로부터 bifidobacteria의 선별 및 생균수를 계수하기 위하여 많은 선택배지가 사용되어 왔으며, 그 중에서도 항생제를 포함한 배지가 주로 이용되었다(9-14, 21). Teraguchi 등(13)이 사용한 NPNL 배지는 neomycin sulphate(100 µg/ml), paromomycin sulphate(200 µg/ml), nalidixic acid(15 µg/ml), lithium chloride(3 mg/ml) 등이 함유된 배지로서 유제품으로부터 bifidobacteria의 분리에 사용되어 왔다. 이 밖에 dicloxacillin 등의 항생제 배지와 arabinose, TOS(transgalactosylated oligo saccharide), propionic acid 등을 이용한 배지가 보고되었으나, 정확하게 유제품에 들어있는 bifidobacteria를 계수하지는 못하였다(21).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 각각의 NPNL의 여러 농도에서 bifidobacteria의 종류에 따라 항생제 내성 정도가 매우 다르다는 것을 알 수 있다. *Bifidobacterium bifidum*의 경우에 neomycin sulphate(100 µg/ml)와 paromomycin sulphate(200 µg/ml)에서 심한 성장억제를 보여주고 있으며, *Bifidobacterium longum*도 약간이나마 성장이 억제되었다. 그리고 nalidixic acid(15 µg/ml)는 *L. casei*의 성장을 억제시키지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는, 다른 유산

균과 혼합된 유제품으로부터 bifidobacteria만을 계수하기 위해서는 혼용된 다른 유산균의 항생제 내성은 물론 사용되는 각각의 항생제에 대한 정확한 농도 결정이 선결되어야 함을 의미한다. 또한 NPNL 배지가 유제품속의 bifidobacteria 생균수를 정확하게 표현해 주지 못함을 알 수 있었다.

**항생제 tetracycline를 포함하는 선택배지**

항생제를 이용한 bifidobacteria의 선택배지는 bifidobacteria에 대하여 최소한으로 성장억제 효과가 적어야 한다. 이러한 조건을 tetracycline이 충족시켜 주는 것으로 밝혀졌다. Fig. 2에서와 같이 항생제 tetracycline에 대한 bifidobacteria의 항생제 내성을 조사해 본 결과, ATCC 균주들은 tetracycline에 대하여 매우 약한 저항성을 지닌(Fig. 2B) 반면 대부분의 상업용 균주들은 1 µg/ml의 농도까지 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2A). Bifidobacteria를 함유하는 유제품에는 *Str. salivarius subsp. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. casei* 등이 혼용되어 사용되고 있으므로(7-9, 21) 상업적으로 사용되는 균주를 중심으로 tetracycline에 대한 각 균주들의 내성을 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 *L. casei*는 ATCC와 상업용 균주 모두 tetracycline의 농도가 높아짐에 따라 내성이 작게 나타났으며, *L. acidophilus*의 경우에는 정도의 차이는 있지만 항생제 농도가 증가할 수록 대

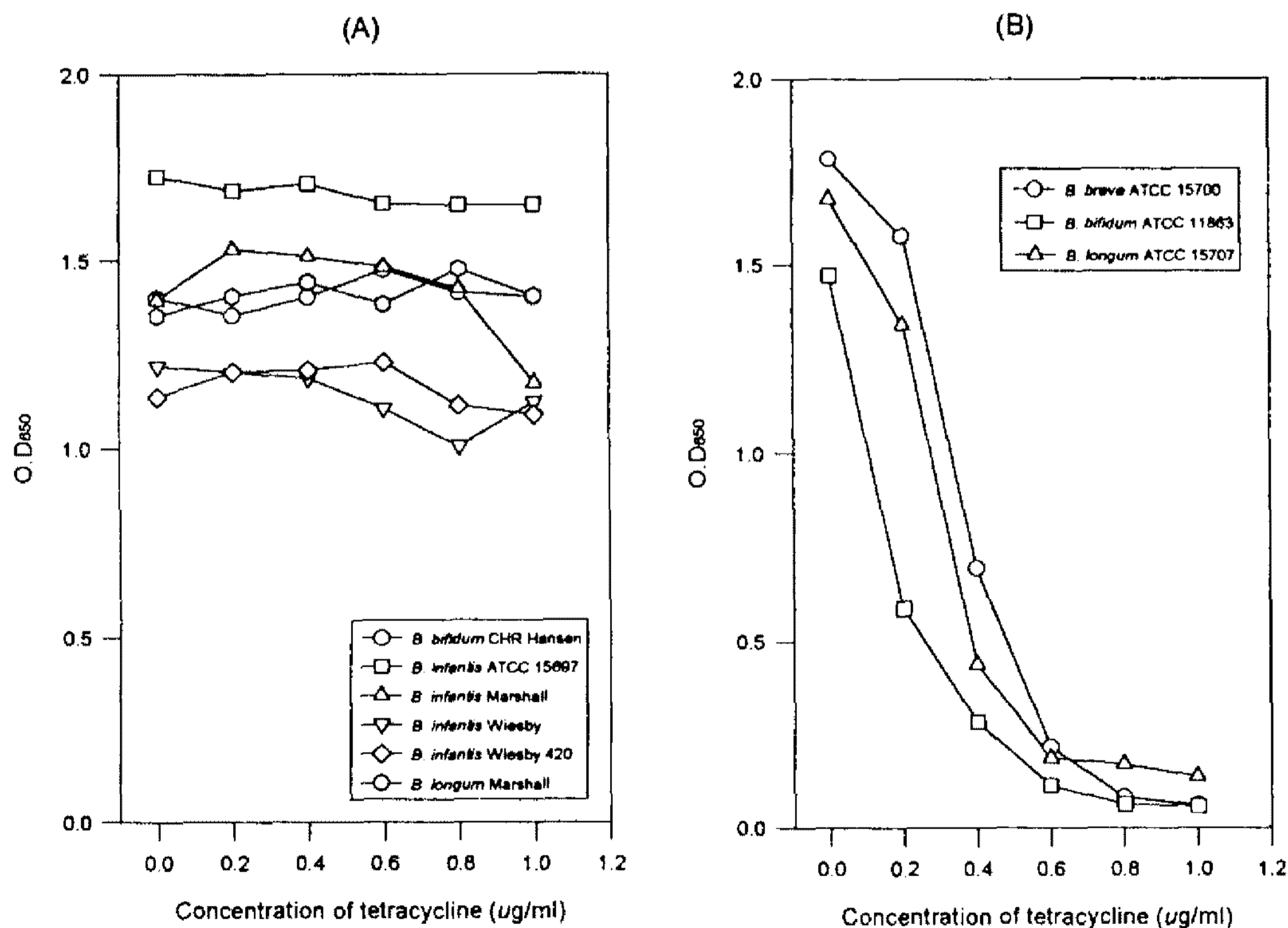


Fig. 2. Inhibition effect of the growth of bifidobacteria by tetracycline.

부분이 성장이 억제되었다(Fig. 4). 그리고 상업적으로 이용되고 있는 4종류의 *Str. thermophilus*들은 tetracycline에 대해 내성이 거의 없는 것으로 밝혀졌다(Fig. 5). 위의 결과들로 볼 때 tetracycline 농도가 1 µg/ml일 때 bifidobacteria의 성장에는 전혀 영향을 주지

않고 다른 유산균들을 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

*B. bifidum*과 *L. casei*를 여러 비율로 혼합하여 섞어준 뒤, 5종류의 선택배지에 대해 bifidobacteria 선발 및 계수능을 비교하였다(Table 4). 먼저 NPNL 중에서 *B. bifidum*의 성장에 영향을 주지 않는 Ne와 Pm의 농도(25 µg/ml)를 선정하여 실험한 결과, *L. casei*의 성장을 억제하지 못하였다. 그러나 Fig. 2에서 상업용 bifidobacteria가 보여준 tetracycline 내성을 바탕으로 제조한 선택배지(BL+Tc)에서는 원래의 bifidobacteria 생균수를 잘 표현해 줄 뿐 아니라 *L. casei*의 성장도 완전히 억제하는 것으로 나타났다. Neomycin, Paromomycin, 그리고 tetracycline를 함께 첨가한 배지에서는 *L. casei*는 물론 *B. bifidum*도 약간 성장이 억제되었다.

그러므로 선택배지를 선정함에 있어서 가장 중요한 것이 bifidobacteria의 성장에는 전혀 영향을 미치지 않으면서도 유제품속에 들어 있는 다른 유산균의 성장을 억제할 수 있는 배지 조성을 갖추는 것이라고 볼 때 tetracycline를 단독으로 첨가하여 제조한 선택배지가 간편하면서도 지금까지 사용되어 온 항생제 배지들보다 유제품으로부터 bifidobacteria의 계수에 효과적인 것으로 판단된다. 또한 phage를 이용한 선택배지도 적용 균주에 대한 제한성이 있지만, Table 4에서와 같이 정확한 계수가 가능하기 때문에 유제품으로부터 bifidobacteria를 선발하고 계수하는 새로운

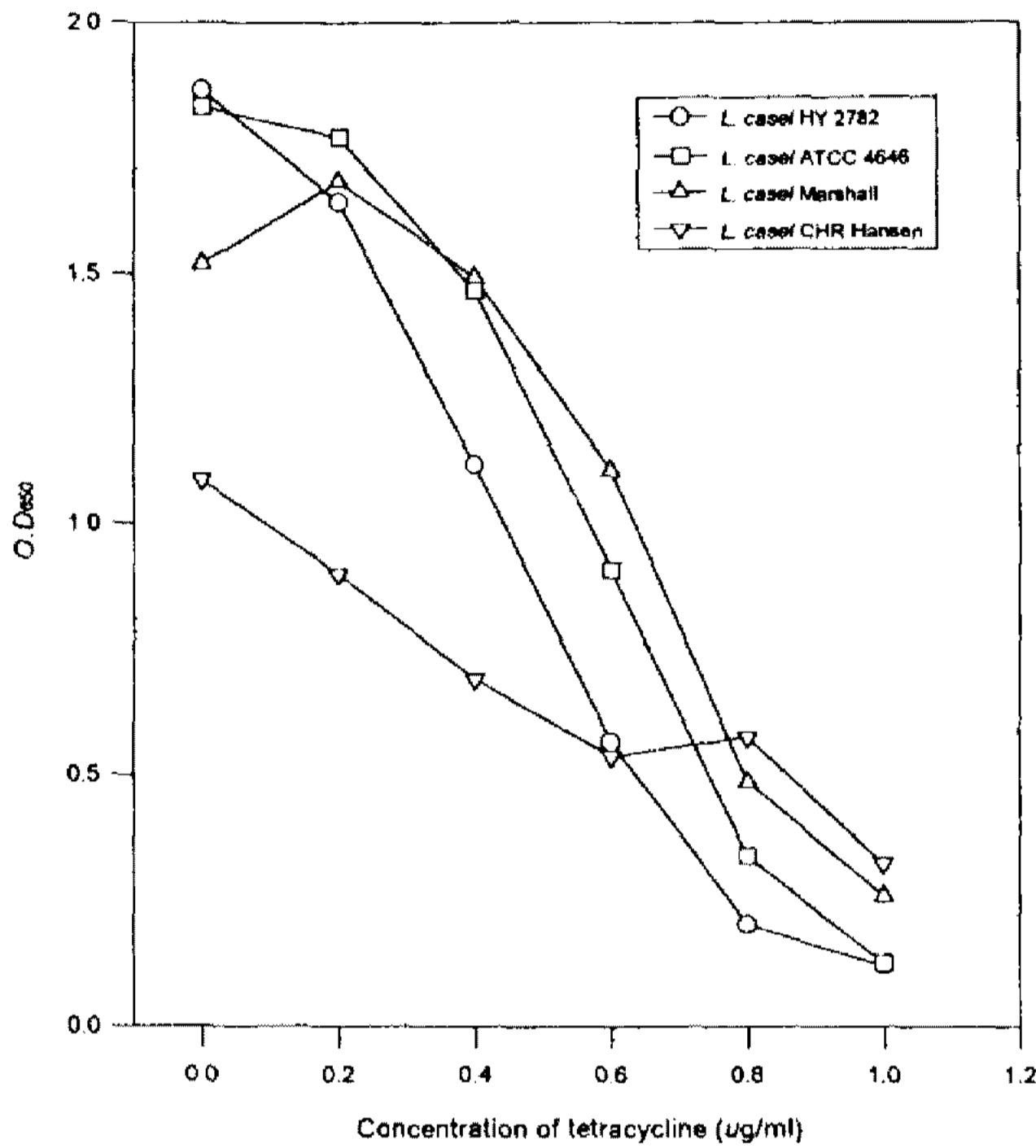


Fig. 3. Inhibition effect of the growth of *Lactobacillus casei* by tetracycline.

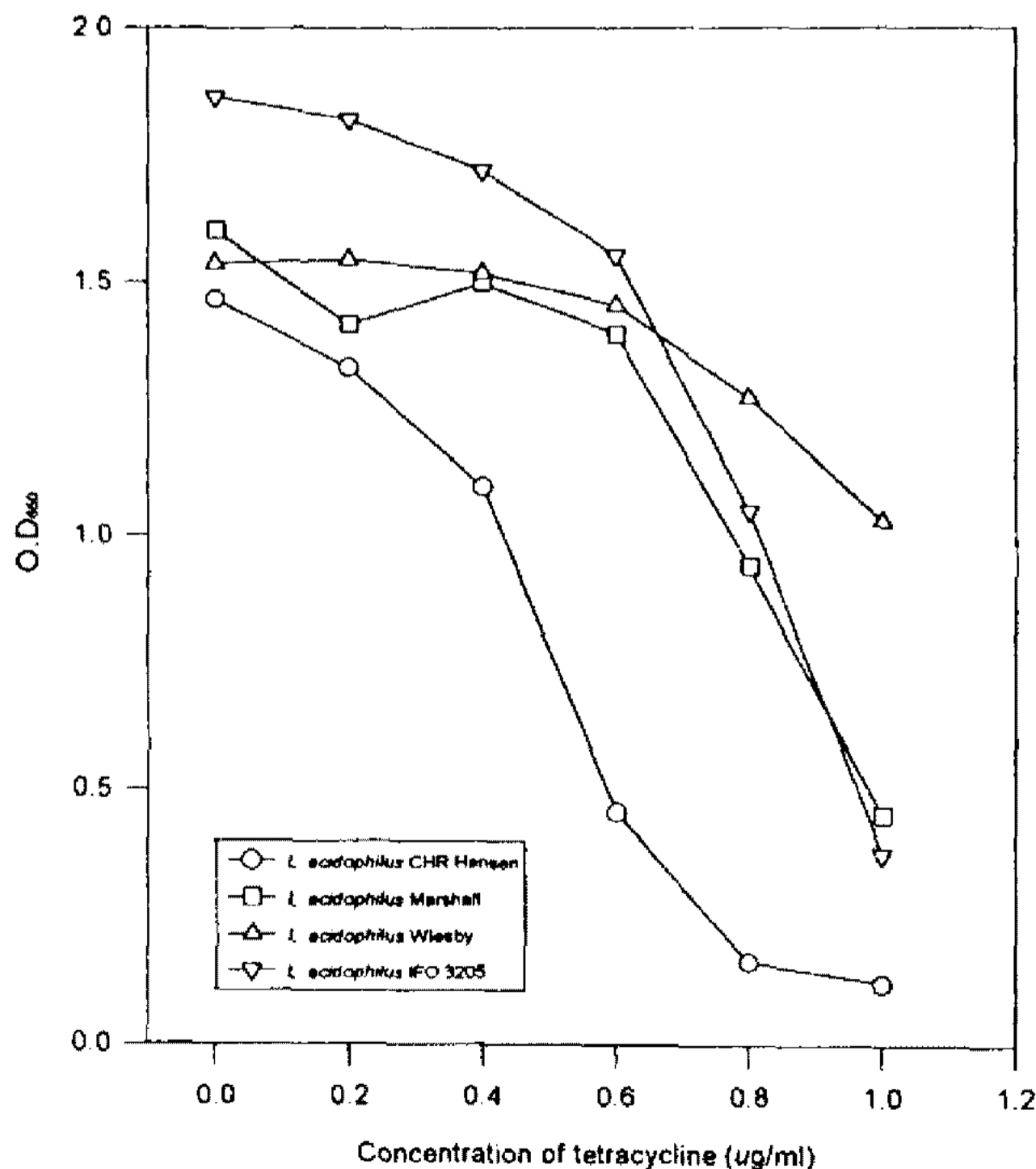


Fig. 4. Inhibition effect of the growth of *Lactobacillus acidophilus* by tetracycline.

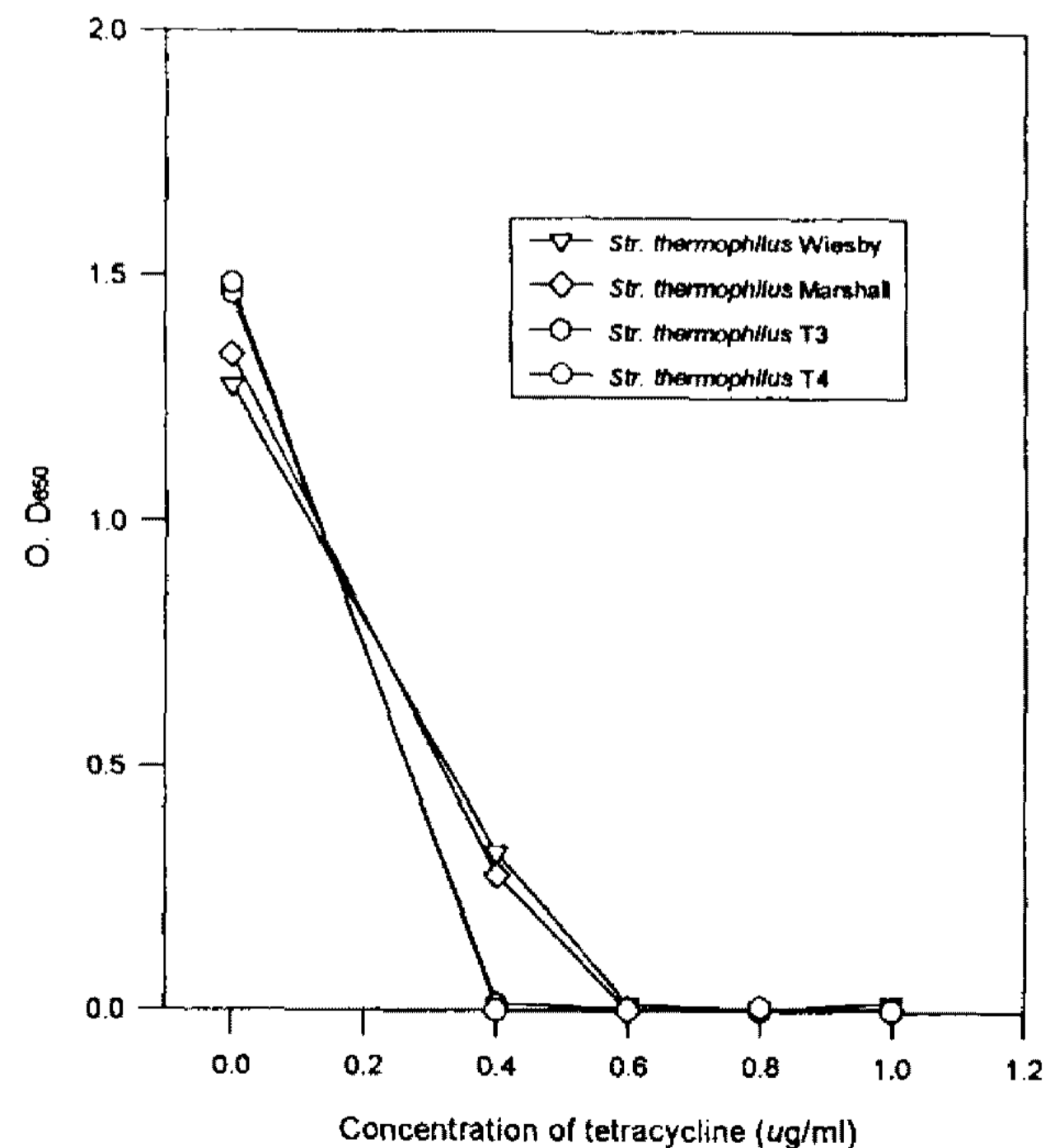


Fig. 5. Inhibition effect of the growth of *Streptococcus thermophilus* by tetracycline.

**Table 4. Comparison of colonies counts of bifidobacteria on several selective media according to various mixed ratio with *L. casei* HY 2782**

Medium	Mixed ratio ( <i>L. casei</i> : <i>B. bifidum</i> )				
	0 : 1	1 : 1	10 : 1	10 <sup>2</sup> : 1	10 <sup>3</sup> : 1
BL	82± 6	133± 10	531± 20	+++	+++
BL+ phage	86± 10	81± 4	70± 4	90± 10	78± 4
BL+ Ne	82± 2	136± 10	433± 4	+++	+++
BL+ Pm	79± 2	104± 2	402± 7	+++	+++
BL+ Tc	85± 2	86± 10	89± 3	76± 3	89± 3
BL+ Ne+ Pm+ Tc	82± 6	80± 6	79± 2	75± 10	70± 3

Ne; neomycin sulfate (25 µg/ml), Pm; paromomycin sulfate (25 µg/ml), Tc; tetracycline(1 µg/ml), +++; too many colonies for counting.

선택배지로서의 응용성이 크게 기대될 수 있을 것이다.

## 요 약

유제품에서 다른 유산균들과 혼합하여 사용되고 있는 bifidobacteria를 선별하고 계수하기 위하여 두 가지 선택배지를 제조하였다. 하나는, phage의 숙주에 대한 감염 특이성을 이용한 것으로서 bifidobacteria와 혼합되어 있는 다른 유산균을 숙주로 하는 phage를 배지에 첨가하여 숙주 유산균을 용균시킴으로써 bifidobacteria에 대한 선택 배지로 사용하는 것이다. 즉, bifidobacteria와 *L. casei* HY 2782가 혼합된 유제품에서, *L. casei* HY 2782를 숙주로 하는 J1 phage를 첨가한 BL 배지를 사용하여 bifidobacteria를 계수한 결과, 완전하게 bifidobacteria만을 계수할 수 있었다. 따라서 항생제를 함유하는 선택배지가 아닌 새로운 선택배지로서 그 응용가능성을 제시하였다. 둘째로는 항생제 Tetracycline(1 µg/ml)을 첨가한 선택배지로서 상업적으로 사용되는 bifidobacteria 균주의 성장에는 영향을 주지 않는 반면, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. acidophilus*, 그리고 *L. casei* 등의 성장은 억제하였다. 이러한 결과 tetracycline을 사용한 선택배지는 다른 항생제 배지들보다 유제품에 있는 bifidobacteria의 생균수를 정확히 표현해 주었다.

## 참고문헌

- Rasic, J.L. and J.A. Kurmann. 1983. *Bifidobacteria and their role*. Birhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Scardovi, V. 1986. The genus *Bifidobacterium*, In J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins Co.
- Tissier, H. 1899. Le Bacterium coli et le réaction chromophilr d' Escherich. *C. R. Soc. Biol.* **51**: 943-945.
- Levesque, J. 1959. General aspects of the role of *L. bifidus* in infants. *Sem. Hop. Paris.* **35**: 237-239.
- Ruschmann, E. 1958. Studies on bacterial antagonism in the stools of healthy and ill infants with special reference to *L. bifidus* and pathogenic coli strains. *Z. Hyg. InfektKr.* **114**: 298-306.
- Hughes, D.B. and D.G. Hoover. 1991. Bifidobacteria; their potential for use in American dairy products. *Food. Technol.* **45**: 74-80.
- Kim, H.S. 1988. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cult. Dairy Prod. J.* **234**: 6-9.
- Laroia, S. and J.H. Martin. 1991. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy deserts. *Cult. Dairy Prod. J.* **26**: 13-21.
- Samona, A. and R.K. Robinson. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.* **44**: 64-66.
- Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* sp. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**: 155-157.
- Lapierre, L., P. Undeland, and L.J. Cox. 1992. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* **75**: 1192-1196.
- Sonoike, K., M. Mada, and M. Mutai. 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. *J. Food. Hyg. Soc. Jpn.* **27**: 238-244.
- Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa, and T. Mitsuoka. 1978. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Jpn. J. Bacteriol.* **33**: 753-761.
- Wijsman, M.R., J.L.P.M. Hereijgers, and J.M.F.H.

- de Goorootte. 1989. Selective enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 395-405.
15. Chevalier, P., D. Roy, and L. Savoie. 1991. X- $\alpha$ -Gal based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. *J. Microbiol. Methods.* **13**: 75-83.
16. Hino, M. and N. Ikebe. 1965. Studies on the lactic acid bacteria employed for beverage production. II. isolation and some properties of a bacteriophage infected during the fermentation of lactic acid beverage. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **39**: 472-476.
17. DE Man, J.C., M. Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* **23**: 130-135.
18. Terzaghi, B.E. and W.W. Sandine. 1975. Improved medium for lactic *streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**: 807-813.
19. Murata, A. 1971. Temperature-sensitive growth of wildtype phage J1 of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 667-673.
20. Sozzi, T., P. Brigidi, O. Mignot, and D. Matteuzzi. 1990. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of bifidobacteria from dairy products. *Lait.* **70**: 357-361.
21. Rasic, J. 1983. The role of dairy foods containing bifidobacteria and acidophilus bacteria in nutrition and health. *North Eur. Dairy J.* **4**: 80-88.

(Received February 18, 1994)