

한국인의 분변으로부터 *Eubacterium*을 분리하기 위한 선택 배지 조사

지 근 역*

한림대학교 식품영양학과

Selective Medium for Isolation and Enumeration of *Eubacterium* sp. from the Feces of the Korean People

Ji, Geun-Eog*

Department of Food Science and Nutrition, Hallym University
Okchondong, Chunchon, 200-702, Korea

Abstract — *Eubacterium* is one of the predominant bacteria in the human large intestine. Currently ES (*Eubacterium* Selective) medium developed by T. Mitsuoka is commonly used as a selective medium. Neomycin sulfate which is one of the selective agents of ES medium inhibited about 50% of the growth of *Eubacterium* isolates, whereas nalidixic acid inhibited only 5% while inhibiting other intestinal bacteria. NES medium which replaced neomycin with nalidixic acid in the ES medium was designed and shown to be better for the isolation and enumeration of *Eubacterium* sp. than ES medium.

*Eubacterium*은 편성 혐기성 균으로서 인체의 장 내에서 *Bacteroides*, *Bifidobacterium* 등과 함께 우점 균종의 하나이다(1, 2). 그럼에도 불구하고 *Eubacterium*이 인체의 건강에 미치는 영향에 대한 이해는 아직 미미한 정도에 지나지 않고 *Eubacterium*과 담즙산 대사에 관한 연구(3-6) 분야만이 집중적으로 이루어져 있다. 이 외에 비타민 K(7)와 비타민 B12의 생산(8), 세포벽 성분의 항암 작용(9), 루마티스(10)와 균혈증(11)의 발생, digoxin의 환원(12) 등에 관한 연구가 단편적으로 연구되어 있을 뿐이다. 우리나라에서는 지(13)에 의하여 한국인의 장내 균총이 보고되었는데 노인이 되면서 *Bacteroides* 다음으로 *Eubacterium*이 많이 검출되었다고 보고 하였다. *Eubacterium*의 분포 및 성질을 효율적으로 조사하기 위하여는 좋은 선택배지가 필요한데 Mitsuoka가 개발한 ES 배지에 대하여 문제점이 제기된 바 있다(13). 이에 본 연구에서는 *Eubacterium*을 선택적으로 분리하기 위한 배지개발 연구를 수행하였다.

실험에 사용된 각종 항생제 및 대사저해제는 Sigma 회사로부터 구입하였다. 항생제와 대사저해제에 대한

내성 검사시 기준 균주로 사용한 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* ATCC 15707, *B. infantis* ATCC 15697, *B. bifidum* ATCC 29521, *Eubacterium limosum* ATCC 8486, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Cl. ramosum* ATCC 25582, *Cl. butylicum* ATCC 19398, *Escherichia coli* ATCC 11775 등은 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하였고 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3145는 한국과학기술연구원 유전자 은행으로부터 분양받았다.

여러 연령대에 걸쳐 지원자로부터 대변을 받는 즉시 혐기성 회석용액으로 십진적 회석을 행한 뒤 분리과정을 행하였다. 사용된 혐기성 배양은 anaerobic jar (BBL), anaerobic controlled glove box(Lab Line Instrument, Inc, U.S.A), Steel-Wool method를 사용하였다(14). 비선택배지 및 선택배지 제조를 위한 기본 배지로 BL(glucose-blood-liver)과 EG(Eggerth-Gagnon)를 사용하였다(14). 분리된 균주들은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(15)와 Mitsuoka의 'A Color Atlas of Anaerobic Bacteria'(14)에 준하여 동정하였다. 발효산물 중 휘발성 지방산과 젖산의 조성을 조사하기 위하여는 glucose가 첨가된 발효능 실험용 PYF 배지에서 생산된 산을 gas chro-

Key words: *Eubacterium*, selective medium

*Corresponding author

matograph(Hewlett Packard HP 5890 A GC, 530 μ m HP-20M column)를 사용하여 분석하였다.

*Eubacterium*은 BL 선택배지에서 담갈색의 약간 융기된 집락을 이루며 자랐다. BL 배지에서 자란 균들 중 편성 혐기성의 그람양성 간균으로 포자를 형성하지 않으며 fructose-6-phosphoketolase 음성으로 butyric acid, acetic acid를 비롯하여 수 종류의 휘발산을 생성할 때 *Eubacterium*으로 동정하였다. *Eubacterium*은 발효 산물로서 lactic acid를 주로 생산하는 *Lactobacillus*, acetic acid와 lactic acid의 혼합물을 생산하는 *Bifidobacterium*, propionic acid를 주요 산물로 생산하는 *Propionibacterium*과 구별되었다. 분리된 *Eubacterium*은 대부분 연쇄상 단간균의 모습을 보여 주었

으며 인체에서 분리되는 균들중 1g 분변당 10^9 CFU (colony forming units) 이상 존재하며 주요 균총을 형성하였다. 또한 당 발효능은 glucose, galactose, lactose 등 이외의 다양한 종류의 당들에 대하여는 발효능이 약하거나 없었고, α -glucosidase 이외의 여러 종류의 glucosidase 효소 활성도 거의 보유하고 있지 않았다. 이들 외에 형태적으로 특이한 *Eubacterium*에 대하여는 본 연구에서는 아직 조사되지 않았다. 비선택 배지로 많이 사용되는 BL 배지와 EG 배지를 기본배지로 하여 15종류의 항생제 및 대사 저해제에 대한 내성 검사를 실시하였다. 사용된 종류로서는 neomycin sulfate(200 mg/l), colimycin(100 mg/l), streptomycin(500 mg/l), sodium propionate(15 g/l), kanamycin(100 mg/l), oleandomycin(10 mg/l), crystal violet(7 mg/l), taurocholate(100 mg/l), vancomycin(5 mg/l), brilliant green(4 mg/l), lincomycin(1 mg/l), paromomycin(50 mg/l), lithium chloride(3 g/l), thalious acetate(0.2 g/l), phenylethyl alcohol(2 ml/l) 등이었다. 이때 사용된 균주는 재료 및 균주에서 언급된 균주와 본 연구에서 분리된 100여 균주의 *Bifidobacterium*, 60여 균주의 *Bacteroides*, 29균주의 *Eubacterium*을 포함 하였다. Mitsuoka가 개발한 ES(*Eubacterium* Selective) 배지에는 *Eubacterium*이 자라지 않는 경우가 다수 있었고 또한 *Bifidobacterium*과 *Streptococcus* 등이 잘 자라는 경우들이 많았다. ES 배지에 첨가된 성분중 neomycin sulfate, colimycin, streptomycin, sodium propionate 등을 살펴 보았을 때 neomycin sulfate는 본 연구에서 분리된 *Eubacterium*의 생육을 상당히 저해하는 것으로 나타났다. 반면에 ES 배지 중에 없는 nalidixic acid는 대부분의 *Eubacterium*을 사멸시키지 않으면서 다른 종류의 균주들에 대하여는 저해 작용을 나타내었다. 이러한 결과들에 근거하여 본 연구에서는 ES 배지에서 neomycin을 사용하지 않고 nalidixic acid를 첨가하여 만든 NES 배지(Table 1)를 사용하였을 때 *Eubacterium*의 선택

Table 1. Composition of NES medium

Component	Amount
Lab-lemco powder	2.4 g
Proteose peptone	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Na ₂ HPO ₄	4.0 g
Glucose	1.0 g
Soluble starch	0.5 g
L-cystine	0.2 g
Anti-foam	5 ml
Agar	17.0 g
0.1% resazurin	1.0 ml
Liver extract	75 ml
Fildes solution	40 ml
4% Na ₂ CO ₃	100 ml
NES mix solution*	50 ml
D.W.	750 ml
pH 7.0	
*NES mix solution	
Sodium propionate	15 g
Nalidixic acid	0.2 g
Colimycin	100 mg
Streptomycin sulfate	0.5 g/50 ml

Table 2. Enumeration of *Eubacterium* spp. using non-selective and selective media (cfu/wet gram of feces)

Medium		Source of feces						
		20 years female	22 years male	29 years female	49 years female	64 years male	73 years male	75 years female
Non-selective	BL	5.2×10^8	3.7×10^9	7.0×10^9	1.2×10^{10}	5.5×10^9	4.8×10^9	5.2×10^9
	NES	N.C	1.9×10^9	4.9×10^9	1.4×10^{10}	6.2×10^9	8.2×10^8	1.2×10^9
Selective	ES	N.C	N.C	2.1×10^7	1.3×10^{10}	N.C	3.2×10^6	3.7×10^7

N.C: *Eubacterium* colonies were not grown.

성이 상당히 증진되었다. NES 배지도 항생제들에 의하여 선택성이 부여된 배지로서 일부의 *Eubacterium*이 자라지 않을 가능성이 있고 또한 *Bacteroides*가 자라는 경우도 있었다. 한국인의 분변을 대상으로 균총조사를 하였을 때 NES 배지는 ES 배지보다 선택성과 콜로니 형성 효율이 유의적으로 우수하였다 (Table 2).

감사의 말씀

본 연구는 1992년 과학재단 특정 기초 연구비(92-59-00-02)의 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부로써 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane. 1991. The control and consequence bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 443-459.
- Goldin, B., A.H. Lichtenstein, and S.L. Gorbach. 1988. The roles of the intestinal flora, Pp. 500-515. In Maurice, E.S. and R.Y. Vernon. (ed.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, LEA and FEBIGER, Philadelphia.
- Eyssen, H. and A. Verhulst. 1984. Biotransformation of linoleic and bile acids by *Eubacterium lentum* A881. *Environ. Microbiol.* **47**: 39-43.
- Mallonee, D.H., J.L. Adams, and P.B. Hylemon. 1992. The bile acid-inducible *baiB* gene from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708 encodes a bile acid-coenzyme A ligase. *J. Bacteriol.* **174**: 2065-2071.
- Gopal-Srivastava, R., D.H. Mallonee, W.B. White, and P.B. Hylemon. 1990. Multiple copies of a bile acid inducible gene in *Eubacterium* sp. strain VPI12708. *J. Bacteriol.* **172**: 4420-4426.
- Coleman, J.P., W.B. White, B. Egestad, J. Sjoevall, and P.B. Hylemon. 1987. Biosynthesis of 7- α -dehydroxylation by an intestinal *Eubacterium* species. *J. Biol. Chem.* **262**: 4701-4707.
- Collins, M.D., F. Fernandez, and O.W. Howarth. 1985. Isolation and characterization of a novel vitamin K from *Eubacterium lentum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 322-328.
- Munder, M., J.R. Vogt, B. Vogler, and P. Renz. 1992. Biosynthesis of vitamin B12 in anaerobic bacteria. Experiments with *Eubacterium limosum* on the incorporation of D-[1-¹³C] erythrose and [¹³C] formate into the 5,6-dimethylbenzimidazole moiety. *Eur. J. Biochem.* **204**: 679-683.
- Morinaga, S., K. Sakamoto, and K. Konishi. 1988. Antitumor activity and its properties of *Eubacterium lentum*. *Japan. J. Cancer Res.* **79**: 117-124.
- Severijnen, A.J., J. Kool, A.J. Swaak, and M.P. Hazenberg. 1990. Intestinal flora of patients with rheumatoid arthritis, induction of chronic arthritis in rats by cell wall fragments, isolated from *Eubacterium aerofaciens* strains. *British J. Rheumatol.* **29**: 433-439.
- Eng, R.H.K., S. Suwanagool, H. Chmel, S.M. Smith, T.F. Tecson, and M. Corrado. 1983. The significance of *Eubacterium* bacteremia. *Am. J. Gastroenterol.* **78**: 90-93.
- Robertson, L.W., A. Chandrasekaran, R.H. Reuning, J. Hui, and B.D. Rawal. 1986. Reduction of digoxin to 20R-dihydrodigoxin by cultures of *Eubacterium lentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1300-1303.
- 지근역. 1994. 한국인의 장내 균총 조사 및 분포. 한국산업미생물학회 춘계학술발표.
- 光岡知足. 1984. 腸内菌 世界. 叢文社. 東京.
- Sneath, P.H.A., S.M. Nicholas, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 2, William and Wilkins, Baltimore.
- 지근역. 1993. 장내 균총의 조절을 위한 기능성 신소재의 탐색 및 평가에 관한 연구. 한국과학재단 특정기초 연구과제 제1차 중간 보고서.

(Received June 27, 1994)