

<단보>

한국인의 분변으로부터 내산소성 균주의 분리, 동정 및 분리 균주의 특성

안준배* · 이계호* · 박종현

한국식품개발연구원 생물공학연구부

*서울대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Oxygen Resistant *Bifidobacterium* sp. from Korean and its Characteristics

Jun-Bae Ahn, Ke-Ho Lee* and Jong-Hyun Park

Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-Ku, Songnam 463-420, Korea

*Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract

Bifidobacteria have been known as beneficial inhabitant of human intestine. Therefore, bifidobacteria began to be noticed as a starter in the manufacture of fermented dairy products. Perhaps the key for effective use of bifidobacteria in commercial dairy products is the maintenance of viability of bifidobacteria during large scale preparation of starter culture and distribution of products. So we tried to obtain the bifidobacteria having suitable characteristics for using as a starter in the manufacture of fermented dairy products. Among bifidobacteria isolated from Korean, E-4 strain showed the highest resistance to oxygen. To know whether the selected strain will be fit for manufacture of fermented dairy products, we also investigated resistance of the selected strain to HCl. The selected strain, E-4, was more resistant to environmental stresses such as oxygen, H₂O₂ and HCl than *Bifidobacterium longum* known as resistant strain to environmental stresses. According to carbohydrate fermentation patterns and morphological characteristics, E-4 strain was identified as *B. bifidum*. In conclusion, the selected strain, E-4, was thought to be fit for manufacture of fermented dairy products.

Key words : *Bifidobacterium* sp., environmental stress, oxygen, acid, resistance.

서론

인체의 장내에는 100조에 달하는 세균이 존재하고 있고 분변중 고형물의 약 30%를 차지한다¹⁾. 이들중에는 *Clostridium*속의 부패세균과 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 유익한 세균이 분포되어 있으며 상호균형을 유지하고 있다. 따라서, 인간은 결국 이러한 장내세균의 균형, 대사물질 등에 의해 노화, 면역, 영양, 감염 등에 지대한 영향을 받으며 살아가게 된다^{2,3)}. 그러므로 유해한 균들을 억제하고 유익한 균들의 생육을 촉진시키면 건강을 개선, 유지할 수 있게 된다⁴⁾. 특히, *Bifidobacterium*속은 정상인의 장내에 우점하는^{1,5)} 세균으로 초산과 젖산 등의 유기산을 생산하여 장내 부패세균의 생육을 억제함이 알려져 있다⁶⁾. 뿐만 아니라 bifidobacteria의 세포벽 glycopeptide성분이 면역기능을 강

화시키며⁷⁾ 돌연변이원성 물질을 흡착하여 항돌연변이 활성이 있음도 보고되어 있다⁸⁾. 또한 bifidobacteria를 비롯한 젖산균들은 동물실험을 통해 콜레스테롤 감소효과가 있음이 확인되었고⁹⁾ 설사를 방지하고 변비를 개선하는 효과가 우수함도 밝혀졌다¹¹⁾. 따라서, 기존에 사용중인 젖산균 뿐만 아니라 bifidobacteria를 식이로서 섭취하려는 시도가 활발히 이루어져 왔다. 1949년 Meyer가 *Bifidobacterium*을 유아식품에 적용하는데 성공하였고 1968년 독일의 Schüller 등이 우유에 일반 유산균과 *Bifidobacterium*을 혼합배양하여 발효유를 제조한 이래로 유럽, 일본, 미국 등지에서 최근까지 요구르트, 치즈, sour cream, butter milk, 분유, 과자 등에도 폭넓게 이용되고 있다¹⁰⁾. 그러나 이와 같이 bifidobacteria를 유제품에 적용하는 연구는 용이하지 않다. 그 이유는 첫째 bifidobacteria는 절대혐기성 세균이기 때

문에 산소가 매우 효과적으로 제한된 장내의 절대 혐기적 환경에서만 활발하게 생육할 수 있으므로 산업적인 공정을 거쳐 고농도로 배양하기가 쉽지 않다. 둘째, 대사물질로 초산과 젖산을 3:2의 몰비율로 생성하므로 발효제품의 생균수가 유통과정 중에 격감하게 된다. 따라서 국내에서는 최근에 bifidobacteria에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 현재까지는 이러한 중균을 외국의 중균회사에 의존하여 왔고 한국인의 체형에 적합한 한국인으로부터 분리된 균주의 개발은 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 한국인으로부터 분리되어 한국인의 생리에 맞는 *Bifidobacterium* 발효중균을 개발하기 위하여 한국인의 장내에서 분리한 *Bifidobacterium* spp. 중 산소내성 및 산저항성이 우수한 균주를 선정하여 동정하고 그의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

사용균주로는 *Bifidobacterium longum* ATCC 157-07, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697을 한국식품개발연구원으로부터 분양받아 사용하였다. 균주의 분리를 위해서는 *Bifidobacterium*선택배지인 TP평판배지¹¹⁾를 사용하였고 내산소성 및 내산성 실험을 위해서는 TP배지에서 탄소원으로 사용한 transgalactooligosacchride(TOS) 대신 프락토올리고당과 갈락토올리고당(삼양제넥스(주))을 각각 0.5%씩 총 1%(W/V)가 되도록 첨가한 Modified TP(MTP)배지를 사용하였다. 그의 완전배지로는 Supplemented MRS(SMRS : MRS + 0.02% Na₂CO₃ + 0.01% CaCl₂ · 2H₂O + 0.05% L-cysteine · HCl 0.5g)배지¹²⁾를 사용하였다.

2. 균주의 분리 및 동정

건강한 한국인으로부터 분변을 받은 즉시 혐기희석액(KH₂PO₄ 4.5g, Na₂HPO₄ 6.0g, L-cysteine · HCl 0.5g, bacto agar 0.5g, D. W. 1ℓ)에 심진희석하여 MTP평판배지에 도말한 후 anaerobic glove box(COY Laboratory Product INC., USA) 내에서 48시간 배양하여 생육한 집락중 Y, V형의 불규칙한 그림양성 혐기성 세균이며 fructose-6-phosphate phosphoketolase¹³⁾양성, 젖산과 초산을 주요 발효 산물로 하는 균주를 *Bifidobacterium* spp.로 선발하였다. 균주의 탄수화물 발효능 실험을 위해서는 변형된 PYF 액체배지(yeast extract 10g, proteose peptone No.3 5g, L-cysteine · HCl 0.5g, salt solution 40ml (Ca-

Cl₂ 0.2g, NaHCO₃ 10g, MgSO₄ 0.2g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 1g, 1/ D. W.), D. W. 960ml)에 각각의 탄수화물을 여과 제균하여 1%(W/V)가 되게 첨가한 후 12시간 전배양된 선발균주를 1%(V/V)가 되게 첨가하여 생육을 관찰하였다. 균주의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"¹³⁾ 및 Roy와 Ward¹²⁾ 등에 의한 방법에 준하였다.

3. 산소에 대한 내성실험

각 균주를 MTP broth에서 24시간 배양한 후 혐기희석액에 심진희석하여 중성 MTP평판배지에 즉시 도말하고 aerobic incubator(37℃)에서 각각 0시간, 20시간 산소에 노출시킨 후 다시 anaerobic incubator 내에서 48시간 배양하였다. 산소에 노출시키지 않은 실험구(0시간 노출구)에서 생육한 균수에 대한 산소에 20시간 노출시킨 실험구의 균수의 백분율을 생존률로 정의하여 이를 비교하여 각 균주의 내산소성을 검증하였다.

4. H₂O₂에 대한 내성 실험

SMRS 액체배지에서 12시간 동안 전배양된 선발균주를 각각 0 ppm, 100 ppm, 1,000 ppm의 H₂O₂에 0시간, 1시간, 2시간동안 노출시켜 생존률을 비교하여 H₂O₂에 대한 내성을 조사하였다.

5. 산에 대한 내성실험

선발 균주의 산에 대한 내성을 결정하기 위하여 선발균주 및 공시 균주를 MTP broth에서 24시간 배양한 후 이를 혐기희석액에 심진희석하여 중성 MTP평판배지(pH 7.0)와 HCl로 pH를 4.5로 맞추거나 초산과 젖산을 사용하여 pH를 5.0으로 맞춘 MTP배지에 도말한 후 anaerobic glove box 내에서 72시간 배양하여 각각 균수를 세었다. 내산성은 중성배지에서 생육한 균수에 대한 산성배지에서 생육한 균수의 백분율로 정의하였다.

결과 및 고찰

1. *Bifidobacterium* spp.의 분리

건강한 한국인의 분변으로부터 40여종의 균주를 선발하여 3세대 이상 계대시에도 생육활성이 저하되지 않으며 형태학적으로 Y, V자형의 불규칙한 그림양성 혐기성균이고 fructose-6-phosphate phosphoketolase(F-6-ppk) 양성인 균주 10종을 *Bifidobacterium*으로 확정하여 실험에 사용하였다.

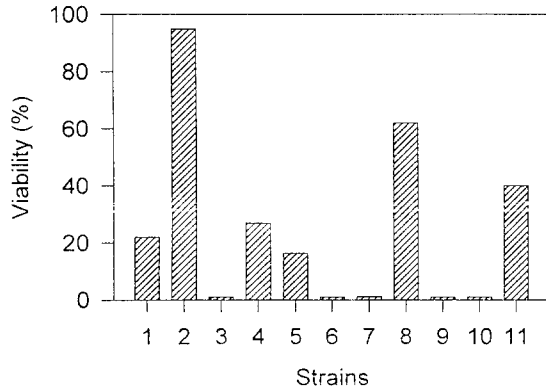


Fig. 1. Resistance of bifidobacteria isolated from Korean to oxygen.

Strains are :

- 1 : *Bifidobacterium longum*, 2 : *Bifidobacterium* sp. E-4,
 3 : *Bifidobacterium* sp. LO2, 4 : *Bifidobacterium* sp. CN1,
 5 : *Bifidobacterium* sp. UN1, 6 : *Bifidobacterium* sp. UN2,
 7 : *Bifidobacterium* sp. MS5, 8 : *Bifidobacterium* sp. MS1,
 9 : *Bifidobacterium* sp. EI5, 10 : *Bifidobacterium* sp. JS9,
 11 : *Bifidobacterium* sp. BMH.

2. 내산소성 *Bifidobacterium* spp. 의 선발

한국인의 분변으로부터 분리된 10종의 bifidobacteria와 공시균주로서 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707의 산소에 대한 내성을 비교하였다. 이와 같은 실험조건에서도 각 균주간에 산소에 대한 민감성 차이를 볼 수 있었으므로 *Bifidobacterium*의 내산소성을 결정하는데 적합한 방법임을 알 수 있었다. 분리균주와 공시균주로서 *Bifidobacterium longum*의 내산소성을 비교해본 결과(Fig. 1) E-4가 실험 조건에서 가장 우수한 내산소성을 나타내었다. 그리고 E-4 균주는 대수증식기 이후에 다량의 다당류를 생산하는데 이때 생산된 다당류는 Simamura 등¹⁴⁾의 보고에서와 같이 산소를 직접 흡착하거나, 균체 내부로의 산소 침투를 차단하여 균체에 대한 산소의 독성을 완화시키는데 도움이 될 것으로 판단된다. 이러한 강한 내산소성은 유산균 관련제품의 종균 제조시 산업적인 대량 배양에 많은 이익을 줄 것으로 생각된다.

3. 선발 균주의 H₂O₂에 대한 내성

선발 균주와 공시 균주인 *Bifidobacterium longum*의 외부환경에 대한 영양중 H₂O₂에 대한 내성을 비교하여 보았다. 노출시간에 따른 균생존율은 H₂O₂의 농도가 100 ppm의 경우 두 균주의 내성 차이가 별로 없었으나

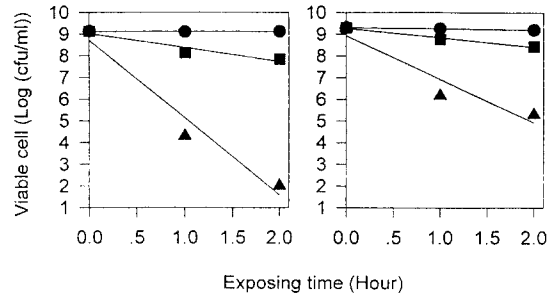


Fig. 2. Comparison of tolerance to H₂O₂ of *Bifidobacterium longum* (A) and that of *Bifidobacterium* sp. E-4 (B). Symbols are ; -●- : 0 ppm H₂O₂, -■- : 100 ppm H₂O₂, -▲- : 1,000 ppm H₂O₂.

1,000 ppm의 경우 공시 균주에 비하여 선발 균주의 내성이 월등함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이는 선발 균주의 배양시 다량의 다당류가 생성되는데 이렇게 생성된 다당류는 H₂O₂가 균체내로 침투하는 것을 막아 주기 때문으로 생각된다.

4. 선발 균주의 산에 대한 내성

유산균 관련제품의 종균으로 사용되기 위해서는 유통과정 및 경구 섭취시 발효산물인 유기산이나 위액에 대한 안정성이 우수해야 한다. 따라서 내산소성이 우수한 선발 균주 E-4의 초산, 젖산 및 염산에 대한 내성을 조사하였다(Fig. 3).

선발 균주는 일반적으로 내산성이 강한 것으로 알려진 *Bifidobacterium longum*에 비하여 염산에 대한 내성이 강한 것을 알 수 있었으며, 초산과 젖산에 대한 내성

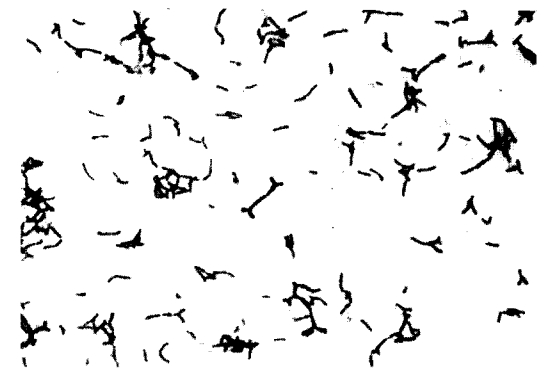


Fig. 3. Morphological characteristics of *Bifidobacterium* sp. E-4. The strain was incubated on MRS plate medium at 37°C for 24 hours and stained with Gram's method. It was observed with light microscope ($\times 1,000$).

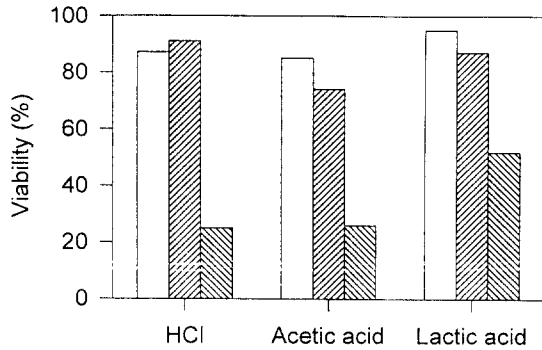


Fig. 4. Resistance of *Bifidobacterium* sp. E-4, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium infantis* to various acid, such as HCl, acetic acid and lactic acid.

Each bar means ; □ *Bifidobacterium longum*
 ▨ *Bifidobacterium* sp. E-4
 ▩ *Bifidobacterium infantis*

은 서로 비슷하였다. 그러나, 선발 균주는 *Bifidobacterium infantis*에 비해서는 각종 산에 대한 내성이 월등히 우수함을 알 수 있었다. 따라서 선발 균주는 발효산물인

Table 1. Physiological, biochemical characteristics of the selected strain which was isolated from Korean and showed excellent resistance to oxygen

Gram reaction	+
Cell shape	V-shape, Y-shape
Motility	-
Spore	-
Aerobic growth	-
F6PPK	+
Catalase	-
Ability to utilize	
L-Arabinose	-
Ribose	-
Mannose	-
Cellobiose	-
Salicin	-
Melezitose	-
Trehalose	-
Melibiose	-
Mannitol	-
Sorbitol	-
Inulin	-
D-Xylose	-
Gluconate	-
Starch	-
Raffinose	-
Lactose	+
Galactose	+
Fructose	+
Sucrose	-

유기산과 위액 중의 HCl 등에 의한 생존손실을 최대로 줄일 수 있어 bifidobacteria를 실제 발효식품에 사용하기 위하여 요구되는 생존과 활성의 유지를 위한 좋은 특성을 갖고 있는 것으로 판단된다.

5. 선발 균주의 생리학적, 생화학적 특징 및 동정

선발 균주의 형태학적 특징은 Fig. 4와 같이 곧봉형, Y-형 및 V-형 등의 비정형으로 전형적인 bifidobacteria임을 알 수 있었다. 당발효 양상을 비롯한 선발균주의 생리적 특징은 Table 1과 같았다. 선발 균주는 탄수화물 이용능이 극히 제한되어 있어 젓당, 갈락토오스, 과당 만을 선택적으로 발효하였으므로 *Bifidobacterium bifidum*으로 동정할 수 있었다. 그러나 이와 같은 당발효 실험 만으로는 균주의 정확한 동정이 어려우므로 좀더 정확한 동정을 위해서 유전자 수준¹⁵⁾에서의 확인이 이루어져야 할 것으로 보인다.

참고문헌

1. 光岡知足 : 腸内細菌學. 朝倉書店, 東京 (1990).
2. Fuller, R. : Probiotics - The scientific basis. Pp 355-376 (1st ed.) Chapman & Hall, London (1992).
3. Goldin, B. R., Lichtenstein, A. H., and Gorbach, S. L. : The role of the intestinal flora, pp. 500-515. In Maurice E. shils and Vernon R. Young (ed.). Modern nutrition in health and disease, LEA and FEIBGER, Philadelphia (1988).
4. Mitsuoka, T. : Bifidobacteria and their role in human health, *Journal of industrial Microbiology*, **6**, 263 (1990).
5. 지근역 : 한국인유아의 장내세균 분포, *한국산업미생물학회지*, **22**, 453-458 (1992).
6. Rasic, J. L., and Kurmann, J. A. : *Bifidobacteria* and their role, Birkhauser Verlag, Basel (1983).
7. Hatcher, G. E., and Lambrecht, R. S. : Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell free extracts of selected-lactic acid-producing bacteria, *J. Dairy Sci.*, **76**, 2485-2492 (1993).
8. Zhang, X. B., and Ohata, Y. : Binding of metagens by fraction of the cell skeleton of lactic acid bacteria of mutagens. *J. Dairy Sci.*, **74**, 1477-1481 (1991).
9. 지근역 : 유산균과 콜레스테롤, 1995년도 한국축산식품과학회 추계 심포지움, pp71-85 (1995).
10. 백영진 : 발효유선업의 연구개발 현황과 전망, *생물산업*, **8**(2) 26-37 (1995).
11. 이세경, 지근역 : 개량된 Bifidobacterium의 선택배지개발, *한국식품과학회지*, **26**, 526-531 (1994).
12. Roy, D., and Ward, P. : Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species, *Journal of Applied Bacteriology*, **69**, 739-749 (1990).
13. Bergey's manual fo Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore (1986).

14. Simamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., and Tomita, M. : Endogeneous oxygen uptake and polysaccharide accumulation in *Bifidobacterium*. *Agric. Biol. Chem.*, 54(11) 2869-2874 (1990).
15. 結城功勝 : ラット糞便から分離された*Bifidobacterium* 屬の菌種同定, 日本ビフィズス菌センター, 第16回學術集會特集號. pp. 25-26 (1996).

(1997년 3월 7일 접수)