

β -Glucuronidase 생산 인체장내 *Clostridium* sp.의 분리 · 동정

박종현 · 신지영
경원대학교 식품생물공학과

Isolation and Identification of β -Glucuronidase -producing *Clostridium* sp. from Fecal Microflora

Jong-Hyun Park and Jee-Young Shin
Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

Abstract

For the study of human intestinal environments with the intestinal bacteria producing β -glucuronidase and 7α -dehydroxylase, genus *Clostridium*, known as the producer, were isolated from the fecal microflora. Through screening twice for one person, fecal microflora without major bacterial group seemed to be changed, which indicated the microflora would be changeable by the diet factors. With using Neomycin-Nagler selective medium during the screening, 14 *Clostridium* spp. were isolated and then the harmful enzyme activities were determined. Isolate-11 among them produced strongly β -glucuronidase and its activity was 0.021 unit/mg protein. However, the strain producing 7α -dehydroxylase was not isolated. The Isolate-11 was tentatively identified as *Clostridium scatologenes* through cultural and physiological characteristics.

Key words : β -glucuronidase, 7α -dehydroxylase, *clostridium* sp., fecal microflora

서 론

인체의 장관내에는 많은 장내미생물이 서로 공생 또는 길항관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로 분비되는 생체성분을 영양원으로 증식하고 있다. 이들 미생물은 성인의 경우 분변 g당 10^{11} 수준으로 존재하는데 Bacteroidaceae, *Eubacterium*, Peptococcaceae, *Bifidobacterium* 등이 10^{9-11} 수준으로 가장 많고 *Lactobacillus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Veillonella* 등은 10^{5-8} 정도로 존재하며 *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* 등의 병원 및 유해미생물은 10^4 이하로 존재하는 것^{1,2)}으로 알려져 있다.

이들은 대장 내용물의 약 1/3을 차지하고 있으며 숙주인 인간의 건강, 질병 또는 노화에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 보고³⁾되고 있다. 이들이 인체에 미치는 영향으로는 병원성이 있는 것도 있는데, 인체의 노화, 항생물질, 항암제, 부신피질 호르몬등의 투여, 스트레스, 방사선의 치료등에 의하여 인체의 저항력이 떨어지면 체내에 침입하여 병원균이 되어 자발성 감염,

패혈증, 방광염등의 원인이 되기도 한다. 이러한 영향을 많이 미치는 장내세균으로는 *Clostridium*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*등이 알려져 있다. 이들의 장관내의 분포는 섭취하는 식이에 따라 틀러지기도 하는데 고단백 및 고지방 식이에서는 *Clostridium*과 같은 부패성 세균의 종류가 증가하고 식이섬유 및 탄수화물이 많은 식이에서는 *Bifidobacterium*균이 증가하며 *Clostridium*이나 *Eubacterium*의 균수⁴⁾는 적어진다. *Clostridium*속 균들은 장내의 대표적인 유해균으로서 *C. perfringens*는 장염(enteritis), *C. difficile*은 대장염(colitis), *C. botulinum*은 식품 및 장내 독소 생성균으로 잘 알려져 있으며 *C. paraputrificum*은 발암성 물질의 생성에 관여하는 steroid dehydrogenase의 활성을 보여 대장암의 발생과 깊은 관련이 있을 것으로 추정⁵⁾되고 있다.

이들 중 대표적 유해균으로서 일반적으로 *C. perfringens*가 지목되고 있는데 여러가지 독소성 효소^{6,7)} 즉, lechithinase, phospholipase와 collagenase등을 생산하여 숙주의 세포막을 파괴하고 장관 내벽 혈관의 투과성을 증가시키는 독소를 생성하여 장염, 설사 등에 깊이 관여하고 또한 발암관련 물질인 amine을 생산하여 인체의 노화에 깊이 관여하는 것으로 생각되

Corresponding author : Jong-Hyun Park, Department of Food & Bioengineering, Kyungwon University, Sojung-Gu, Sungnam-Si, Kyunggi-Do 461-701, Korea

고 있다. 이러한 유해 효소독소와 아울러 인체 장내에서 분비되는 세균성 유해효소로 여러가지가 있지만 발암관련 효소로 가장 대표적인 β -glucuronidase, nitroreductase, azoreductase, β -glucosidase, 7α -dehydroxylase 등이 보고⁽⁸⁻¹⁰⁾되어 있다. 이중 β -glucuronidase는 간에서 해독작용의 대표적인 β -glucuronic acid conjugate을 분해하는 효소이다. 지용성 독성물질이 β -glucuronic acid와 결합되어 수용성으로 배설될 때 장내에서 β -glucuronidase의 작용을 받게 된다. 이들 유리된 독성물질은 다시 간으로 흡수되어 장간순환이 이루어지게 되며 육식을 많이 하는 사람들은 β -glucuronidase의 수준이 증가함이 알려지고 있다.

또한 지방의 섭취가 많은 서구식을 섭취하였을 때 담즙의 분비가 많아지고 그중 담즙산은 장내미생물 작용으로 1차 담즙산이 2차 담즙산으로 변한다. 현재로서는 2차 담즙산인 deoxycholic acid, lithocholic acid 등의 증가가 대장암의 중요한 원인이라는 가설⁽¹¹⁾이 높은 지지를 얻고 있다. 담즙산을 변형시키는 주요 장내 효소는 7α -dehydroxylase 등이 알려지고 있으며 이 효소는 *Clostridium*과 *Eubacterium*속의 장내세균에서 많이 생산되고 있는 것이 보고⁽¹²⁾되었다. 그리고 최근의 연구에 의하면 담즙산은 7α -dehydroxylase에 의한 작용을 받는 외에도 세포의 투과성을 높혀 세포외에 β -glucuronidase의 분비가 많아지게 하기도 한다⁽¹³⁾. 따라서 담즙산은 장관내에 7α -dehydroxylase과 β -glucuronidase효소의 증가에 기여한다고 볼 수 있다.

본 연구는 인체 장내 유해효소중 가장 유해한 것으로 보이는 β -glucuronidase과 7α -dehydroxylase을 분비하는 장내세균을 한국인으로부터 분리하고 그의 특성을 분석하여 장내환경을 개선하는 기초자료로 활용하고자 하는 연구의 일환으로 β -glucuronidase생산 균을 분리·동정하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 혐기세균 배양

C. perfringens, *C. paraputrificum*, *Eubacterium lentum* C-25등을 사용하였고 이들 균주를 EGLF배지⁽¹⁴⁾ 상에 냉장보관 하면서 2개월마다 계대배양하여 사용하였으며 *Clostridium*과 그외의 균주배양을 위한 배지로는 BHI, reinforced clostridial media (Difco, USA)를 사용하였다. 7α -dehydroxylase의 역가를 측정하기 위하여 이 효소를 분비하는 *E. lentum* C-25균주⁽¹⁵⁾를 일본 Kagoshima 대학의 H. Oda박사로부터 분양받아 대조균으로 사용하였다. 혐기 회석액, 혐기배지등의 혐기성균

배양을 위한 배지환원은 Mitsuoka등의 방법⁽¹⁴⁾과 gas pack을 이용한 anaerobic jar (Oxiod Co. UK), glove box (Coy Co. USA)를 사용하였고 glove box의 경우는 H_2 , CO_2 , N_2 의 비율이 5,15,80%인 혼합가스로 palladium촉매로 상온에서 glove box속의 산소를 제거하였다. 배지는 주로 Difco사 제품을 사용하였고 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

장내세균총 검색과 *Clostridium* spp. 분리

장내세균총의 검색은 Mitsuoka의 방법⁽¹⁴⁾으로 실시하였다. 신선한 분변을 1g씩 혐기적인 회석액 9mL에서 회석하고 O_2 -free CO_2 gas로 혐기적으로 치환시키면서, 10배 단계 희석하였다. 각 단계 희석액을 무균적으로 0.05 mL씩 각각의 평판배지에 1/3-1/4구획에 접종한 후 도말하였다. 장내세균 여러 균종의 선택배지 10가지를 사용했는데 DHL, P, PEES, TATAC, TS배지는 37°C항온조에서 호기적으로 배양하였으며 BL, BS, EG, LBS, NN배지는 anaerobic jar에 steel wool method를 사용하여 37°C에서, 48시간 혐기배양을 실시하였다.

배양 종료후 각각의 평판배지에서 배양된 균의 형태를 관찰하여 균종별로 균수를 측정하였으며 그람염색을 실시하였다. 그 후 광학현미경으로 1,000배에서 세포의 형태를 묘사 기록한 후 Mitsuoka방법에 의해 분류한 후 분변에 존재하는 균종을 분석하였다.

Clostridium spp.는 이들 선택배지인 NN배지를 사용하여 일차적으로 가능한 많은 수의 균을 분리하여 보관하였다. 이렇게 선발된 균주를 phenolphthalein- β -glucuronic acid를 기질로 포함한 EG배지에서 agar diffusion method에 의하여 β -glucuronidase 분비에 의하여 분리되는 phenolphthalein의 색깔로 2차 선발하였다. 또한 TLC에 의한 2차 담즙산 생성효소인 7α -dehydroxylase 생산균주도 검색하였다.

β -Glucuronidase 역가측정

β -Glucuronidase의 역가는 Goldin 등⁽⁹⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 일차 분리된 *Clostridium* spp. 균주를 reinforced clostridial media배지에 배양한 후 상등액과 회수세포를 초음파 파괴하여 원심분리(8,000×g, 20분)한 것을 조효소원으로 하였다. 기질인 phenolphthalein- β -D-glucuronic acid(pH7.0, 0.001 M in 0.025 M phosphate buffer, Sigma) 200 μ L와 조효소액 300 μ L를 섞어 37°C의 항온조에서 40분간 반응시킨다. 조효소액으로는 배양액과 세포추출액을 직접 사용했고 반응 후 2.5 mL의 glycine-NaOH buffer (pH10.4,

0.2 M in 0.2 M NaCl)로 반응을 중지시키고 발색을 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선으로 역가를 측정하였다. 효소반응을 위한 과정은 가능한 한 glove box내에서 혐기적인 조건에서 실시하였고 표준 곡선은 β -glucuronidase(Sigma)을 구입하여 반응시킨 후 phenolphthalein으로 하였고 효소역가는 1분에 1 μ g/mL의 phenolphthalein를 생성시키는 역가를 1 unit로 하였다.

7 α -dehydroxylase 역가측정⁽¹²⁾

1차적으로 분리된 *Clostridium* spp. 균주를 0.015% (w/v)의 cholic acid가 함유된 modified peptone yeast extract broth배지에서 혐기적으로 배양하였다. 배양한 후 세포를 0.1 M sodium phosphate buffer(0.1% sodium thioglycolate, pH 7.0)로 세척하여 회수하였다 (6,000 \times g, 30 min, 4°C). 0.016% (w/v)의 cholic acid를 기질(3 mL)로 하여 세포의 whole cell 및 세포추출액(0.1 M sodium phosphate buffer, pH7.3) 0.5 mL을 넣어 반응시켰다. 반응은 37°C에서 12시간 시킨 후 6 N HCl로 반응을 중지시킨후 ethyl acetate로 3번 담즙산을 추출시킨 후 N₂로 건조하였다. 반응후 반응여부는 TLC (Kieselgel 60, E.Merk)에서 반응생성물이 생겼는 지로 측정하였는데 이때 전개용매는 cyclohexane-ethyl acetate-acetic acid를 7: 23: 3 (V/V/V)으로 섞어 사용하였다. 1차 전개후 40°C에서 10분간 건조시키고 2차 전개시킨 후 40°C에서 10분간 건조한 후 50% 황산으로 발색을 시킨 후 180°C에서 1-2분 열처리하였다.

선발균의 동정

균의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽¹⁶⁾을 일차적인 기준으로 하였고 동정을 위한 각종 분석방법은 腸內細菌の世界⁽¹⁴⁾ 및 Anaerobe Laboratory Manual⁽¹⁷⁾를 참조하였으며 대조균으로는 *C. perfringens*와 *C. paraputrificum*을 선정하여 사용하였다.

전자현미경의 사진은 FEG-SEM(Model S-420, Hitachi, Japan)을 이용하여 얻었고 대사산물을 분석하기 위하여는 가스크로마토그래프(Hewlett Packard 5890A, USA)를 사용하였다. Caproic acid의 분석을 위하여 10% chromosorb W-HP column과 FID검출기를 사용하였다.

결과 및 고찰

장내세균총의 검색 및 *Clostridium* spp. 분리

Table 1. Composition of fecal microflora from a Korean with each selective medium¹⁾

Bacterial group	First isolation (CFU/g feces)	Second isolation (CFU/g feces)
<i>Bacillus</i> spp.	2.0 \times 10 ⁵	-
Bacteroidaceae	1.2 \times 10 ¹⁰	7.0 \times 10 ¹⁰
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2.0 \times 10 ⁹	2.3 \times 10 ¹⁰
Enterobacteriaceae	4.0 \times 10 ⁸	6.3 \times 10 ⁶
<i>Clostridium</i> spp.	2.0 \times 10 ⁸	2.0 \times 10 ⁹
<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-
<i>C. perfringens</i>	4.0 \times 10 ⁴	-
<i>Eubacterium</i> spp.	4.0 \times 10 ⁹	3.0 \times 10 ¹⁰
<i>Gemmiger</i> spp.	4.0 \times 10 ⁸	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	4.4 \times 10 ³	4.0 \times 10 ²
<i>Megasphaera</i> spp.	-	-
Molds	-	-
Peptococcaceae	4.0 \times 10 ⁷	2.0 \times 10 ⁹
<i>Streptococcus</i> spp.	1.4 \times 10 ⁸	2.1 \times 10 ⁸
<i>Staphylococcus</i> spp.	2.0 \times 10 ²	2.1 \times 10 ²
<i>Veillonella</i> spp.	4.0 \times 10 ²	2.3 \times 10 ⁴
Yeasts	-	-
Total counts	1.9 \times 10 ¹⁰	2.5 \times 10 ¹¹

¹⁾For selective media refer to the Materials and Methods.

장내 세균총의 분석과 유해효소를 많이 분비하는 것으로 알려진 *Clostridium*속의 균주를 동일인 장내에서 2차에 걸쳐서 분리하였는데 1차는 한국식 식이를 했을 때 실시하였고 2차 때는 3주간의 일본식의 식이를 한 후 실시하였다. Table 1에서와 같이 장내에서 최대 우점종을 차지하고 있는 Bacteroidaceae, *Bifidobacterium* spp. *Eubacterium* spp.의 균수에는 거의 차이가 없는 것으로 보였으나 동일인의 경우에도 그의 몇몇 장내 세균총 구성의 차이가 있음을 알았다. 1차 분석에서는 *Bacillus* spp.가 10⁵ CFU/g의 균수를 보여주고 있는 반면에 2차 분석시에는 전혀 발견할 수가 없었고 *C. perfringens*의 경우도 1차 분석시에는 10⁴ CFU/g을 보여 주었으나 2차 분석에서는 검출되지 않았다. 그리고 *Gemmiger*속 균들도 같은 경향을 보여주어 2차 분석시에는 검출되지 않았다. 그러나 *Clostridium* spp.는 1차 분석 때보다 2차에 더욱 많이 검출되어 10⁹ CFU/g을 보여 주었다. 그러므로 동일인이라도 식이등의 환경인자에 의하여 장내 세균총의 비율이 변할 수 있음을 알게 되었다. 이러한 사실은 매일 섭취하는 음식물에 의하여 장내에 서식하는 세균의 조성이 다르다는 보고^(4,8,10)와 일치되는 결과였다. 그리고 이미 2회에 걸친 분석중에 *Clostridium*속 NN 선택배지에서 생육이 된 균들을 colony모양, Gram staining, 혐기적 생육여부⁽¹⁴⁾ 등을 종합하여 *Clostridium* spp.로 추정되는 14균주를 분리할 수 있었다.

Clostridium spp.의 유해효소 생성특성

β-Glucuronidase 생산 균주의 선별을 위하여 인체에서 분리한 *Clostridium* 속의 선택배지에서 분리된 14개 균주의 β-glucuronidase의 역가를 측정하였다. 우선 일치적으로 이들 분리된 균주의 배양액을 40 μL씩 0.02 M의 phenolphthalein-β-D-glucuronic acid 함유 한천배지의 hole에 loading한 후 그 주위의 핑크빛 환을 형성시키는 균주를 선별하였다. 그중에서 2개의 균주만이 hole주위에 핑크빛 환을 형성하여 β-glucuronidase 생성균주로 판정되었고 그중 아주 선명한 환을 보여주는 균주를 선정하여 Isolate-11라고 명명하였다.

그의 효소역가를 측정하기 위하여 reinforced clostridial medium에서 배양한 후 배양 상등액과 세포 추출액의 β-glucuronidase의 효소역가를 측정하였다. 이때 배양 상등액에서는 효소의 역가가 검출되지 않았기 때문에 미생물세포를 원심분리하여 회수한 후 역가를 측정하였다. 세포를 회수한 후 sonicator로 세포를 파괴한 후 원심분리하여 그 상등액을 회수하였다. 이러한 과정은 가능한 한 glove box내에서 혐기적으로 수행하였는데 호기적인 역가측정에서도 효소의 역가는

Fig. 1. Thin layer chromatogram for detection of deoxycholic acid and lithocholic acid from 7α-dehydroxylase of *Eubacterium lentum* C-25 cell extract. Reaction conditions: 1, cholic acid; 2, cholic acid/cell extract heated; 3, chenodeoxycholic acid; 4, chenodeoxycholic acid/cell extract heated; 5, deoxycholic acid; 6, cholic acid/cell extract; 7, lithocholic acid; 8, chenodeoxycholic acid/cell extract.

Table 2. Microbiological identification of Isolate-11 by cultural and physiological characteristics¹⁾

Characteristics	<i>C. perfringens</i>	Isolate-11	<i>C. paraputrificum</i>
Acid from glucose	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	-	-
Growth of aerobic blood agar plate	-	-	-
Grows at 37°C	+	+	+
Products from PYG	?	APivls(AFIs2)	?
Caproic acid production	+/-	+	+
Motility	-	+	-
Indole produced	-	+	+(-) ²⁾
Esculin hydrolyzed	+	+	-(+)
Starch hydrolyzed	+	-	-
Milk reaction	c	c	c
Meat digestion	-	-	-
Bile growth	+	-	-(+)
Catalase	-	+	+(-)
Lecithinase	+	-	-
Lipase	-	-	-
Urease	-	-	-
Sediment	+	+	+
Acethyl Methyl Carbinol produced	-	-	-
NH ₃ produced	+	+	+
Gas produced	+	+	-(+)

¹⁾Symbols : + = positive reaction for 90-100% strains; - = negative reaction for 90-100% strains; a = strong acid-pH5.5 or below- for 90-100% strains; a ≤ 1meq/100ml acetic acid; A ≥ 1meq/100ml acetic acid; c = curd; f ≤ 1meq/100ml formic acid; F ≥ 1meq/100ml formic acid; iv ≤ 1meq/100ml isovaleric acid; I ≥ 1meq/100ml isovaleric acid; l ≤ 1meq/100ml lactic acid; L ≥ 1meq/100ml lactic acid; p ≤ 1meq/100ml propionic acid; P ≥ 1meq/100ml propionic acid; s ≤ 1meq/100ml succinic acid; S ≥ 1meq/100ml succinic acid; 2 = ethanol; w = weak acid -pH 5.5 to 6.0- for 90-100% of strains

²⁾Parenthesis indicates the data from References of (14), (16) and (17).

Table 3. Microbiological identification of Isolate-11 by carbon source utilization pattern¹⁾

Characteristics	<i>C. perfringens</i>	Isolate-11	<i>C. paraputrificum</i>
Acid produced from			
adonitol	-	-	-
arabinose	-	w	-
ducitol	-	-	-
esculin	-	-	-
erythritol	-	-	-
fructose	a	a	w
hippurate	-	-	-
inositol	-	-	-
inulin	-	-	-
mannitol	-	-	-
mannose	a	a	w
melezitose	-	w	-
melibiose	-	w	-
raffinose	-	a	-
rhamnose	-	w	-
ribose	w	w	-
sorbitol	w	-	-
sorbose	-	-	-
trehalose	w	w	-
xylose	-	a	-

¹⁾Symbols refer to Table 2.

검출되었다. 이 세포추출물의 상등액으로 β-glucuronidase의 역가를 측정하였을 때 0.021 unit/mg protein 을 나타냈다.

7α-Dehydroxylase 분비균주의 분리를 위하여 일차 분리균주 14개에 대한 7α-dehydroxylase의 역가를 측정하였다. 역가측정은 재료 및 방법에서 제시된 바와 같이 TLC를 이용하였고 여러 형태의 시료를 조제하여 시도하였다. 배양상등액, 세포추출액, 열처리액등의 시료를 사용하였다. 그러나 이들 14개 균주의 처리시료에서는 기존에 발표된 7α-dehydroxylase 분비균주인 *Eubacterium lentum* C-25와 같이 cholic acid, chenodeoxycholic acid에서 deoxycholic acid와 lithocholic acid가 TLC상에서 검출(Fig. 1)되지 않았다. 따라서 이들 균주는 *E. lentum* C-25균과 같이 7α-dehydroxylase 효소를 강력히 분비하지 않거나 그 효소의 생성이 전혀 이루어지지 않는 것으로 판단되었다. 그리고 β-glucuronidase를 강력히 분비하는 Isolate-11균도 TLC상에서 7α-dehydroxylase의 역가를 검출할 수가 없었고 따라서 이 효소의 생성 분비가 되지 않는 것으로 보였다.

선발균주의 동정

β-Glucuronidase를 강력하게 생산하고 있는 Isolate-11를 Bergey's Manual등에 의하여 동정한 결과가

Fig. 2. Scanning electron microscopic observation of *Clostridium* sp. Isolate-11. The strain was cultivated at 37°C for 48hrs before the microscopic observation (magnification fold; 27,500X).

Tables 2, 3과 같다. 우선 *Clostridium*속 선택배지인 NN배지에서도 여러가지 세균생육이 가능함으로 Isolate-11이 *Clostridium* sp.인지를 확인하였다. Isolate-11은 Gram염색, chromatographic method에 의한 대사물과 포자형성을 확인하여 *Clostridium* sp.이라는 것을 확인할 수가 있었다(결과 미제시).

Isolate-11은 포도당으로부터 산을 생성하였으나 gelatin을 가수분해하지 못했다. 또한 혈액배지에서도 호기적으로 생육이 되지 않았으며 37°C에서 최적 생육을 보여주고 있었다. *C. perfringens*과 다르게 lecithinase를 생산하지 않는 특성을 보여 주었고 다른 대부분의 *Clostridium* spp.과는 달리 caproic acid를 생산하였다. 이와같은 배양생리적인 특성을 종합하여 Bergey's 분류에 의하여 *Clostridium scatologenes*로 잠정동정하였다. 균의 모양은 전자현미경 사진(Fig. 2)에서와 같이 간균 형태를 보여주고 있고 균체의 양끝부분이 곤봉형의 형태학적 특성을 갖고 있었다.

인체건강과 밀접하게 연결되어 있는 장내환경을 개선하여 인체를 건강하게 유지시키고자 하는 연구가 많이 이루어진 결과 *Bifidobacterium*속, *Lactobacillus*속의 미생물을 probiotics로의 개발과 올리고당등의 prebiotics가 커다란 상업적인 시장을 형성하고 있다. 그러나 간에서 유리된 독성물질을 장간순환이 되게 하여 인체에 유독작용을 하는 β-glucuronidase등과 같은 유해효소를 분비하는 장내세균을 제어하는 기술을 개발한다

면 이 또한 인체 장내환경을 개선시킬수 있으리라 판단된다. 그러므로 본 연구는 그러한 연구의 기초자료로 활용될수 있으리라 사료된다.

요 약

한국인의 장내세균중의 유해효소생성 균주를 분리하여 장내환경 개선연구에 활용하고자 β -glucuronidase와 7α -dehydroxylase의 유해효소를 분비하는 장내세균으로 알려진 *Clostridium*속 균주를 분리하였다. 동일인의 장내세균을 2회에 걸쳐서 검색한 후 최다 우점종이외의 장내세균은 동일인이라도 식이등 외부환경에 의하여 변화될 수 있음을 알았다. 이어서 Neomycin-Nagler 선택배지를 사용하여 *Clostridium* spp.를 14종 분리하여 이들 균주가 유해효소를 생산하는지를 조사하였다. 일차 선발균주중 *Clostridium* sp. Isolate-11은 β -glucuronidase를 강력히 생성하여 0.021 unit/mg protein의 활성을 보여주었으나 이들 분리 균주중에서 7α -dehydroxylase의 역가를 TLC상에서 검출할 수 있는 균주는 발견하지 못했다. Isolate-11를 배양생리학적으로 동정한 결과 이 균은 *Clostridium scatologenes*인 것으로 잠정동정하였다.

감사의 글

이 연구는 경원대학교 1998년도 학술연구비의 지원으로 이루어져 이에 감사드리며 *E. lentum* C-25균주를 제공해 주신 Kagoshima 대학의 H. Oda박사께도 감사드립니다.

문 헌

- Hughes, D.B. and Hoover, D.C. Bifidobacteria : Their potential for use in american dairy products. Food Technology, 45(4): 74-77 (1991)
- Mitsuoka, T. Intestinal flora and bio-homoeostasis. Japan Scientific Soc. Press Tokyo, Japan (1989)
- Mitsuoka, T. Recent trends in research on intestinal flora. Bifidobacteria Microflora, 1(1): 3-7 (1982)
- Benno, Y., Mitsuoka, T. and Kanazawa, K. Human fecal flora in health and colon cancer. Acta Chir. Scand., S2562: 15-23 (1991)
- Shahani, K.M. and Chandan, R.C. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture containing dairy foods. J. Dairy Sci., 62: 1685-1688 (1979)
- Smith, L.D.S. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. Review of Infections Diseases, 1(2): 254-257 (1979)
- Julian, I. R. and Stewart, T.C. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiological Reviews, 55(4): 621-627 (1991)
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus supplements* and DMH. Cancer, 40: 2421-2426 (1977)
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride induced intestinal cancer in rats. J. Natl. Cancer Inst., 64: 263-265 (1980)
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Am. J. Clin. Nutr., 39: 759-761 (1984)
- Cheah, P.Y. Hypothesis for the etiology of colorectal cancer-an overview. Nutr. Cancer, 14: 5-18 (1990)
- Takahashi, T. and Morotomi, M. Absence of cholic acid 7α -dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. J. Dairy Sci., 77: 3275-3286 (1994)
- Fujisawa, T. and Mori, M. Influence of bile on β -glucuronidase activity of intestinal bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 22: 271-274 (1996)
- Mitsuoka, T. The world of anaerobic bacteria; A Color atlas of Anaerobic Bacteria. Sobun Press, Tokyo, Japan (1980)
- Hirano, S., Nakama, R., Tamaki, M., Masuda, N. and Oda, H. Isolation and characterization of thirteen intestinal microorganisms capable of 7α -dehydroxylating bile acids. Appl. Environ. Microbiol., 41: 737-743 (1981)
- Buchanan, R.E. and Gibbons, W.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., The Williams & Wilkins. Baltimore, USA (1974)
- Holdeman, L.V., Elizabeth, P.C. and Moore, W.E.C. Anaerobe Laboratory Manual, Southern Printing Co., Virginia, USA (1977)

(1999년 10월 18일 접수)