

NADH요구 산소대사관련 효소가 bifidobacteria의 산소스트레스 제거에 미치는 영향

안준배* · 박종현¹

영동대학교 호텔식품외식학부, ¹경원대학교 분자식품생명공학과

Effect of NADH-Dependent Enzymes Related to Oxygen Metabolism on Elimination of Oxygen-Stress of Bifidobacteria

Jun-Bae Ahn* and Jong-Hyun Park¹

Department of Culinary Arts & Food Technology, Youngdong University

¹Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

Selection of oxygen-tolerant strains and elucidation of their oxygen tolerance mechanism were crucial for effective use of bifidobacteria. Oxygen-tolerant bifidobacteria were able to significantly remove environmental oxygen (oxygen removal activity) as compared to oxygen-sensitive strains. Most oxygen removal activity was inhibited by heat treatment and exposure to extreme pH (2.0) of bifidobacterial cell. NADH oxidase was major enzyme related to oxygen removal activity. Oxygen-tolerant bifidobacteria possessed high NADH peroxidase activity level to detoxify H₂O₂ formed from reaction of NADH oxidase. Addition of oxygen to anaerobic culture broth significantly increased activities of NADH oxidase and NADH peroxidase within 1 hr and rapid increment of oxygen concentration was prevented. Results showed NADH oxidase and NADH peroxidase of oxygen-tolerant bifidobacteria played important roles in elimination of oxygen and oxygen metabolite (H₂O₂).

Key words: oxygen-tolerant bifidobacteria, NADH oxidase, NADH peroxidase, oxygen removal activity

서 론

인체의 장내에는 100조에 달하는 세균이 존재하고 있고 분변중 고형물의 약 30%를 차지한다. 이들 중에는 *Clostridium* 등의 부패세균과 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 유익한 세균이 분포되어 있으며 상호균형을 유지하고 있다(1,2). 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 된다. 특히, *Bifidobacterium*은 정상인의 장내에 우점하는 세균으로 초산과 젖산 등의 유기산을 생산하여 장내 부패세균의 생육을 억제함이 알려져 있다(4). 그 밖에도 *Bifidobacterium*의 세포벽 glycopeptide성분이 면역기능을 강화시키며(5) 돌연변이원성 물질을 흡착하여 항돌연변이 활성이 있음도 보고 되어 있다(6,7). 또한 *Bifidobacterium*을 비롯한 젖산균들은 동물실험을 통해 콜레스테롤 감소 효과가 있음이 확인되었고(8) 설사를 방지하고 변비를 개선하

는 효과가 우수함도 밝혀졌다(4). 따라서, 기존에 사용중인 젖산균뿐만 아니라 *Bifidobacterium*을 식이로서 섭취하려는 시도가 활발히 이루어져 왔다. 1949년 Meyer가 *Bifidobacterium*을 유아식품에 적용하는데 성공하였고 1968년 독일의 Schüler 등이 우유에 다른 젖산균과 *Bifidobacterium*을 혼합 배양하여 발효유를 제조한 이래로 유럽, 일본, 미국 등지에서 최근까지 요구르트, 치즈, sour cream, butter milk, 분유, 과자 등에도 폭넓게 이용되고 있다(9-11). 국내에서도 최근에 *Bifidobacterium*에 관한 연구가 활발히 진행되어 한국인으로부터 분리된 균주의 개발이 이루어지고 있다(12,13).

*Bifidobacterium*은 장내의 절대 혐기적 조건에서 생육하기 때문에 산소에 매우 민감하여 농도 배양이 쉽지 않다. 산업체에서는 산소가 완전히 배제된 대량배양 배지를 만들기 어려우므로 젖산균 관련제품의 종류로서 사용하기 위해서 산소에 내성이 강한 균주를 선발하려는 시도가 이루어져 왔다(12,13). 그러나 *Bifidobacterium*의 효과적인 이용을 위해서는 산소에 내성을 갖는 균주를 선발하는 연구 외에도 산소에 대한 반응양상 및 방어기작에 대한 기초적인 연구가 필요하다.

Streptococcus, *Leuconostoc*, *Pediococcus* 및 *Lactobacillus* 등 통성혐기성 젖산균의 산소 대사에 관한 연구는 활발히 진행되어 왔다(14,15). 일반적으로 젖산균의 경우 배양 환경으로부터 산소를 제거하는 능력은 각종 산화 효소에 기인함이 밝혀졌다(15). 또한 호기적 조건에서 배양한 젖산균의 경우 균체 내에

*Corresponding author: Jun-Bae Ahn, Department of Culinary Arts & Food Technology, Youngdong University, San 12-1, Seolgye-ri, Youngdong-eup, Youngdong-gun, Chungbuk 370-701, Korea
Tel: 82-43-740-1183
Fax: 82-43-740-1109
E-mail: given@youngdong.ac.kr

H₂O₂가 축적되며 이를 제거 할 수 있는 peroxidase, catalase 등을 보유하고 있는 것으로 알려졌다(14,15).

그러나 *Bifidobacterium*의 경우 절대혐기성 세균이므로 극단적으로 산소에 민감하여 환경 중의 산소와 균체 내 산화효소의 상호관계를 규명하기가 쉽지 않아 통성혐기성 젓산균과 같이 활발한 연구는 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 인체로부터 분리된(12,13,18) 산소 내성 bifidobacteria를 대상으로 산소 및 산소대사산물에 관련된 효소를 탐색하였고 산소 및 산소대사산물의 독성을 제거하는 방어체계에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

공시 균주로 *Bifidobacterium longum* ATCC15707, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC15703을 Korean Collection for Type Culture(KCTC)로부터 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 균주는 한국인으로부터 분리, 동정되었으며(12,13,18) 산소 내성 균주로는 *B. longum* JI 1, *B. longum* L2, *B. longum* JR76, *B. longum* JR89, *B. longum* E4를 사용하였고 산소민감성 균주로는 *B. adolescentis* JR13, *B. adolescentis* J2, *B. adolescentis* Y-1, *B. adolescentis* K-1, *B. adolescentis* JR4-2를 사용하였다. 균주 보관 및 배양을 위해서는 TP배지(19)를 사용하였고 그 외의 완전배지로는 MRS 배지(Difco, USA)에 0.02%(w/v) Na₂CO₃, 0.01%(w/v) CaCl₂와 0.05%(w/v) L-cysteine·HCl를 첨가한 Supplemented MRS(SMRS) 배지를 사용하였다. 평판배지는 anaerobic chamber(Coy Laboratory Product Inc., USA)에 12시간 방치하여 산소를 제거하여 사용하였고 액체배지는 가열하여 산소를 제거한 후 serum bottle에 넣고 밀봉하여 제조하였다.

산소제거활성(oxygen removal activity) 측정

각 균주를 SMRS 배지에서 12시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하고 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)에 2회 세척하였다. 회수된 세포를 같은 완충액에 600 nm에서 흡광도가 1이 되도록 현탁하여 균 현탁액을 제조하였다. 제조된 균 현탁액은 anaerobic chamber내에 보관하면서 1시간 이내에 사용하였다. 용존 산소의 변화를 측정하기 위하여 50 mL의 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)에 O₂ 전극을 넣고 상층을 액체 paraffin으로 덮어 외부로부터 산소의 유입을 차단하였다. 25°C 항온수조에서 10분간 교반하여 O₂ 전극을 안정화시킨 후 용존 산소 농도를 100%로 설정하였다. 각 균주의 산소제거활성을 알아보기 위하여 균주현탁액 1 mL를 반응조에 넣고 1분 간격으로 용존 산소의 변화를 관찰하였다.

세포파쇄추출물(cell free extract) 제조

100 mL SMRS에 24시간 배양된 균액을 5000×g, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 균체를 회수하고 생리식염수에 2회 세척하여 5 mL 생리식염수에 현탁하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기(Sonic Materials Inc, Connecticut, USA)로 4분간 파쇄 한 후 10,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 세포파쇄추출물(cell free extract)로 사용하였다.

단백질 정량 및 효소 활성 측정

세포파쇄추출물 중 단백질의 농도를 정량하기 위해서는 protein

assay kit(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하였다.

NADH oxidase 및 NADH peroxidase 활성은 Shin 등(20)의 방법에 준하여 측정하였다. NADH oxidase 활성은 20 mM NADH 10 μL, 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) 2290 μL를 포함한 반응혼합물에 세포파쇄추출액 200 μL를 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였으며 효소 활성은 다음 식에 의해 산출 하였다.

$$U/mg = \Delta A_{340}/min / (6.22 \times mg \text{ protein} / 2.5)$$

NADH peroxidase 활성 측정은 혐기적으로 수행되었는데 anaerobic chamber내에서 spectrophotometer cuvette에 20 mM NADH 10 μL, 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) 2290 μL를 가하고 2시간 방치 후 25 mM H₂O₂ 100 μL를 첨가하고 1 mL의 액체 paraffin을 가하여 산소의 유입, 유출을 차단하였다. Anaerobic chamber에서 cuvette을 꺼내 세포파쇄추출액 100 μL를 첨가하여 37°C에서 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였으며 효소활성은 다음 식에 의해 산출 하였다.

$$U/mg = \Delta A_{340}/min / (6.22 \times mg \text{ protein} / 2.5)$$

Catalase활성은 Beers 등(21)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) 1.9 mL, 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 희석된 0.059 M H₂O₂ 1 mL와 세포파쇄액 0.1 mL를 첨가하여 240 nm에서 흡광도 변화를 측정하였으며 효소 활성은 다음 식에 의해 산출 하였다.

$$U/mg = \Delta A_{240}/min / (43.6 \times mg \text{ protein} / 3)$$

배양 중 산소스트레스의 유발

1.3 L 발효조(BioStat, Germany)를 이용하여 액체 배양 중 산소스트레스를 주어 산화효소의 역가를 측정하였다. 혐기배양을 위해서는 12시간 전 배양된 산소 내성 균주 15 mL를 1 L SMRS 배지에 접종하여 37°C에서 28시간동안 배양하면서 pH, 용존 산소 변화, NADH oxidase 및 NADH peroxidase 활성을 측정하였다.

산소스트레스를 유발시키기 위하여 배양 6시간 후에 제균된 공기를 10 vvm의 속도로 배양액 중에 유입시켰으며 용존 산소 변화, NADH oxidase 및 NADH peroxidase 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Bifidobacteria의 산소제거활성

산소 내성 균주와 산소 민감성 균주의 산소제거활성을 알아본 결과는 Fig. 1과 같았다.

실험에 사용된 산소 내성 균주 5종 모두에게서 용존 산소를 제거하는 활성을 관찰 할 수 있었으며, Fig. 1에 나타난 바와 같이 *B. longum* JI 1은 10분 후 약 3%의 용존 산소를 제거하는 것을 알 수 있었다. 반면, 산소 민감성 균주는 산소제거활성을 전혀 보이지 않았고 오히려 균 현탁액 첨가시 유입된 산소에 의해 10분 후 약 1% 가량 용존 산소가 증가하였다.

pH 및 열처리에 따른 산소제거활성

Condon 등(15)에 따르면 젓산균의 경우도 배지 중 용존 산소를 제거하는 활성을 보이는데 주로 산화효소의 작용에 의한다고 보고하고 있다. Bifidobacteria의 경우도 용존 산소 제거에 효소가 관여 하였을 가능성을 알아보기 위하여 산소 내성 bifidobacteria의 균 현탁액을 100°C에서 30초간 열처리하거나

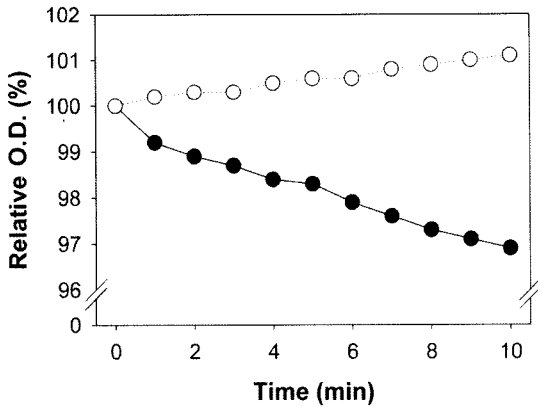


Fig. 1. Oxygen removal activities of oxygen-tolerant *Bifidobacterium* (-●-) and oxygen-sensitive *Bifidobacterium* (-○-).

Oxygen-tolerant strain was *B. longum* J1 and sensitive strain was *B. adolescentis* J2. Each strain was incubated in SMRS broth for 12 hours and harvested. Cells were then resuspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) and its absorbance at 600 nm was adjusted to 1.00. After 1 mL of cell suspension was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), the change of dissolved oxygen was monitored for 10 min.

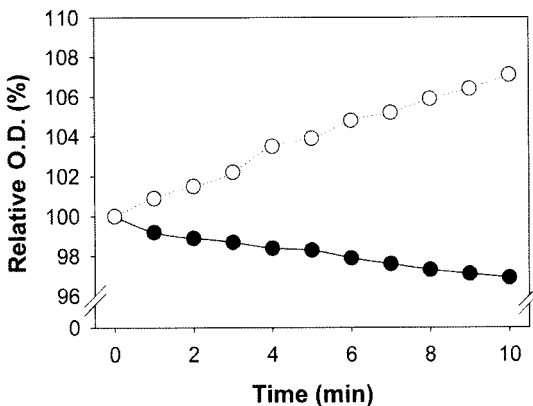


Fig. 2. Effect of heat treatment on oxygen removal activity of oxygen-tolerant *Bifidobacterium*.

Cell suspension was prepared as described in Fig. 1. The cell suspension was heated in boiling water for 30 seconds. After 1 mL of intact cell suspension (-●-) and 1 mL of heat treated cell suspension (-○-) was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), the change of dissolved oxygen was monitored for 10 min.

반응액의 pH를 2.0으로 조절하여 균체 효소가 불활성화 된 조건에서 산소제거활성을 측정하여 보았다.

상기 두 가지 조건에서는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타난 바와 같이 산소제거활성이 전혀 관찰되지 않았고 10분 반응 후 약 8% 가량 용존 산소가 증가하여 산소 민감성 균주의 균 현탁액을 넣었을 경우 보다 훨씬 많은 용존 산소의 증가를 보였다. 이와 같은 결과는 bifidobacteria 균체의 산소제거활성이 균체내의 효소에 기인할 가능성을 보여주는 결과로 판단된다.

산소제거활성의 기질 특이성

Bifidobacteria의 용존 산소 제거에 효소가 결정적인 역할을 한다는 점과 그 효소가 무엇인지를 규명하기 위하여 기질 특이성을 알아보았다. Condon 등(15)은 젖산균의 산소관련 대사 효소는 pyruvate oxidase, malate oxidase, amino acid oxidase, glucose oxidase, NADH oxidase 등이라고 하였다. Bifidobacte-

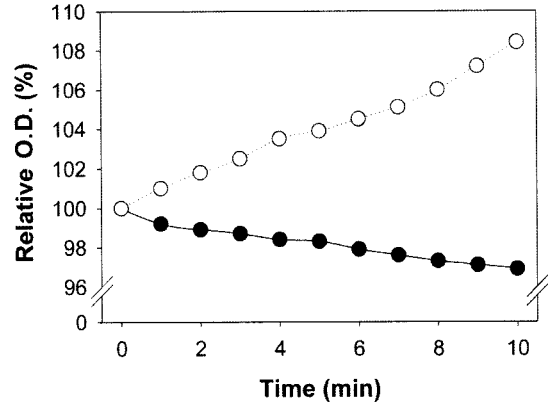


Fig. 3. Effect of pH on oxygen removal activity of oxygen-tolerant *Bifidobacterium*.

Cell suspension was prepared as described in Fig. 1. The cell suspension was added to 0.1 M phosphate buffer at pH 6.0 (-●-) and 0.1 M HCl-KCl buffer at pH 2.0 (-○-), the change of dissolved oxygen was monitored for 10 min.

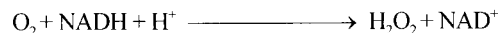
ria의 세포파쇄추출물에 상기 효소의 기질을 각각 처리하여 산소제거활성을 확인 한 결과 Table 1과 같이 NADH를 공급하였을 경우에만 산소제거활성을 보였다. 또한 효소의 저해제인 p-chloromercuribenzoate(PCMB), Cu²⁺, Hg²⁺를 NADH와 같이 처리하였을 경우 산소제거활성이 거의 소실되는 것으로 보아 bifidobacteria의 산소제거활성은 효소 작용에 의한 것이며 주된 효소는 NADH oxidase임을 알 수 있었다.

산소 및 산소대사산물 관련 효소 활성

용존 산소는 산화환원전위(redox potential)에 영향을 미쳐 절대혐기성 세균의 생육을 저해함이 알려져 있다(22,23). Table 2에 나타난 것과 같이 산소 내성 bifidobacteria는 산소 민감성 bifidobacteria에 비해 최대 200배 이상 높은 NADH oxidase 활성을 가진 것으로 밝혀졌으며 이를 사용하여 생육에 불리한 환경 중의 산소를 제거하는 것으로 판단되었다.

그런데 Shimamura 등(24)의 보고에 의하면 bifidobacteria에 존재하는 NADH oxidase는 산소를 기질로 하여 다음과 같이 과산화수소를 생성하는데 균체 손상 및 사멸의 주된 원인은 이때 생성된 과산화수소임을 알 수 있다.

NADH oxidase



그러므로 산소 내성 bifidobacteria가 생존 및 균체 생육을 위해서는 환경 중의 산소를 제거하는 능력뿐만 아니라 반응산물인 H₂O₂를 제거 할 수 있는 능력을 가져야 한다. 산소대사에 의해 생기는 유독성 활성산소종(reactive oxygen species)을 제거하는 미생물 효소로는 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등이 알려져 있다(14-16). Shimamura 등(24)과 Shin 등(20)은 대부분의 bifidobacteria는 SOD 활성을 가지고 있으며 산소 내성과 SOD 활성과는 상관관계가 없다고 보고하였다.

본 연구에서는 산소 내성 bifidobacteria, 산소 민감성 bifidobacteria, 호기성 세균 및 통성혐기성 세균의 catalase 활성, NADH oxidase, NADH peroxidase 활성을 비교하여 보았다 (Table 2). Catalase 활성은 호기성 세균인 *Bacillus subtilis*에서는 매우 높게 나타났으나 통성혐기성 세균인 *Lactobacillus casei*

Table 1. Substrate specificity of oxygen removal activity of oxygen-tolerant bifidobacteria

Substrate	Oxygen removal activity (Δ O.D./mg protein/10 min)				
	<i>B. longum</i> ¹⁾	Jl 1	L2	JR76	JR89
None	- ²⁾	-	-	-	-
Sodium pyruvate (10 mM)	-	-	-	-	-
DL-malate (10 mM)	-	-	-	-	-
DL-alanine (10 mM)	-	-	-	-	-
Glucose (10 mM)	-	0.1	-	0.1	-
NADH (10 mM)	8.2	13	9.6	14	12
NADH (10 mM) + Hg ⁺⁺ (1 mM)	0.6	1.2	0.6	2.4	0.6
NADH (10 mM) + Cu ⁺⁺ (1 mM)	1.0	2.0	0.8	3.1	0.8
NADH (10 mM)+PCMB ³⁾ (1 mM)	-	-	-	-	-

¹⁾Type strain, *B. longum* ATCC15707.

²⁾The concentration of dissolved oxygen (O.D.) was not changed or increased for 10 min.

³⁾*p*-chloromercuribenzoate.

Table 2. Specific activities of oxygen-tolerant and oxygen-sensitive bifidobacterial enzymes related to oxygen metabolism

Strains	Specific activity (U/mg protein)		
	Catalase	NADH oxidase	NADH peroxidase
<i>B. longum</i> ATCC 15707	- ¹⁾	1.19	1.25
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	-	0.04	0.06
<i>B. longum</i> Jl 1 ¹	-	1.38	0.96
<i>B. longum</i> L2 ¹	-	1.35	1.06
<i>B. longum</i> JR76 ¹	-	2.09	1.34
<i>B. longum</i> JR89 ¹	-	1.92	1.88
<i>B. longum</i> E4 ¹	-	1.74	1.35
<i>B. adolescentis</i> JR13 ⁵	-	0.07	-
<i>B. adolescentis</i> J2 ⁵	-	0.01	-
<i>B. adolescentis</i> Y-1 ⁵	-	0.09	0.01
<i>B. adolescentis</i> K-1 ⁵	-	0.01	-
<i>B. adolescentis</i> JR4-2 ⁵	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	3.71	18.1
<i>Bacillus subtilis</i>	1659	0.03	0.03

¹⁾Not detected.

¹⁾Oxygen-tolerant bifidobacteria.

⁵⁾Oxygen-sensitive bifidobacteria.

및 bifidobacteria에서는 발견되지 않았다. NADH peroxidase 활성은 *Lactobacillus casei*와 bifidobacteria에서 공통적으로 확인되었으나 그 활성은 *Lactobacillus casei*가 훨씬 높았다. 흥미로운 사실은, *Lactobacillus casei*와 bifidobacteria의 NADH oxidase 활성과 NADH peroxidase 활성을 비교해 본 결과 산소가 존재하여도 생육이 가능한 통성혐기성 세균인 *Lactobacillus casei*는 NADH oxidase 활성에 비해 NADH peroxidase 활성이 월등히 높은 것으로 나타나 NADH oxidase의 작용에 의해 생긴 H₂O₂를 완전히 제거 할 수 있으나 산소 내성 bifidobacteria는 NADH oxidase 활성에 비해 NADH peroxidase 활성이 다소 낮은 것으로 보아 생성된 H₂O₂를 완전히 제거 할 수 없음을 알 수 있었다. 실제로 Shimamura 등(24)은 산소가 존재하는 조건에 방치된 bifidobacteria 균체내에 H₂O₂ 축적이 일어난다고 보고하고 있다.

산소 내성 bifidobacteria와 산소 민감성 bifidobacteria의 NADH peroxidase 활성을 비교해 보면 산소 내성 균주에서는 높은 수준으로 발견되었으나 산소 민감성 균주에서는 거의 발견되지 않았다.

이와 같은 결과에 의해 산소 내성 bifidobacteria는 환경 중에 존재하는 용존 산소를 NADH oxidase의 작용에 의해 신속히 제거하여 생육이 가능한 환경을 만들 수 있으며 이때 생성되는 H₂O₂는 NADH peroxidase를 사용하여 제거하는 효소 체계를 가지고 있음을 알 수 있었다.

배양 중 산소스트레스가 효소활성 및 생육에 미치는 영향

산소 내성 bifidobacteria를 혐기상태로 배양하였을 경우와 배양 중 산소를 공급하여 산소스트레스를 유발하였을 경우 균체 생육, 용존 산소, NADH oxidase 및 peroxidase 활성을 측정할 결과는 각각 Fig. 4와 Fig. 5와 같았다.

혐기상태로 배양하였을 경우(Fig. 4) 배양 전 배양액에 함유된 용존 산소는 약 26.7%이었으며 산소를 제거하기 위한 N₂ 또는 CO₂ 주입은 별도로 행하지 않았으나 배양 후 2시간 이내에 용존 산소가 거의 모두 제거되었고 NADH oxidase 및 peroxidase의 활성도 용존 산소를 제거하는 기간 동안 최대 활성을 보였는데 각각 1.2 U/mg, 0.9 U/mg에 이르러 최초 농도의 2배 이상 높아짐을 알 수 있었다. 용존 산소가 모두 제거되면

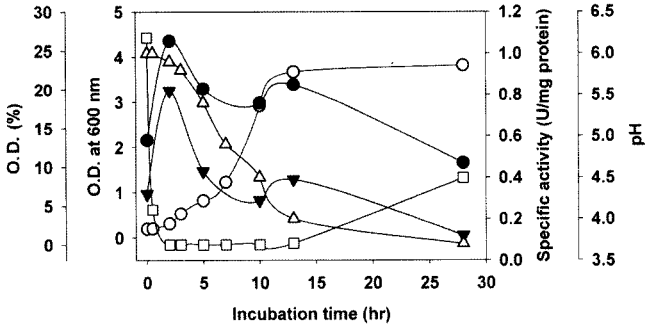


Fig. 4. Changes of NADH oxidase activity and NADH peroxidase activity of oxygen-tolerant *Bifidobacterium* during anaerobic cultivation.

B. longum J1 was inoculated into 1 L of SMRS broth and incubated for 28 hours. Culture pH was not controlled and nitrogen purging to expel oxygen was not performed during cultivation. NADH oxidase activity (-●-), NADH peroxidase activity (-▼-), cell growth (-○-), O.D. (-□-) and pH (-△-) were monitored during incubation.

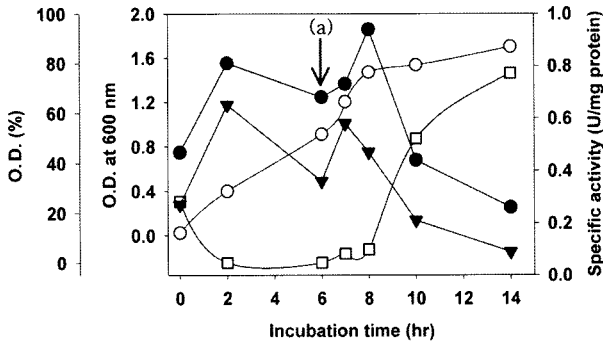


Fig. 5. Effect of oxygen-stress on NADH oxidase activity and NADH peroxidase activity of oxygen-tolerant *Bifidobacterium*.

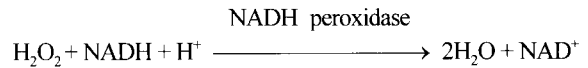
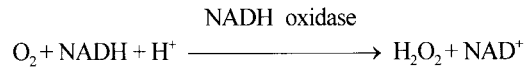
Oxygen-stress was imposed by blowing air at the rate of 10 vvm (a) during incubation. NADH oxidase activity (-●-), NADH peroxidase activity (-▼-), cell growth (-○-) and O.D. (-□-) were monitored.

균체 생육이 시작 되어 12시간 이후에는 정지기에 도달하였으며 NADH oxidase 및 peroxidase 활성이 다소 감소하였다. 배양 후 14시간 이후부터는 균체 증식이 중단되고 NADH oxidase 및 peroxidase 활성이 감소되면서 용존 산소가 증가하여 26시간 이후에는 약 10%로 높아졌다.

배양 중 산소를 공급하여 산소스트레스를 주었을 경우는 Fig. 5와 같이 산소 공급 후 균체 증가는 둔화 되어 2시간 이후에는 거의 정지하였다. 그러나 이 기간 중에 NADH oxidase 및 peroxidase 활성은 급격히 증가하여 외부에서 유입된 산소를 활발히 제거하고 있음을 알 수 있었다. 실제로 용존 산소의 양이 NADH oxidase 및 peroxidase 활성이 높게 유지된 2시간 동안 단지 5.4% 증가하는데 그쳤다. *Bifidobacteria* 균체가 없었을 경우 이와 같은 실험 조건에서는 배지가 용존 산소로 포화되는 조건이므로 이와 같은 결과는 NADH oxidase가 효과적으로 산소를 제거하였음을 의미하였다. 그러나 산소 공급 2시간 이후에는 NADH oxidase 및 peroxidase 활성이 급격히 감소하였고 용존 산소의 양도 급증하여 산소공급 후 4시간 경과 후 약 49.8%에 이르는 관찰 할 수 있었다. 이와 같이 산소스트레스 하에서 *bifidobacteria*의 방어체계가 붕괴된 이유는 Table 2에 제시된 산소 내성 *bifidobacteria*의 NADH oxidase 활성이 NADH peroxidase 활성보다 다소간 높았던 결과로 미루어 보면 산소스

트레스가 일정한 한계를 넘으면 Shimamura 등(24)이 보고 한 바와 같이 균체 내에 H₂O₂의 축적이 발생하고 이로 인해 균체가 사멸하여 효소에 의한 산소스트레스 제거 기구가 손상된 때문으로 판단된다.

이상의 결과를 통해 산소 내성 *bifidobacteria*의 NADH oxidase와 NADH peroxidase는 산소 및 대사산물인 H₂O₂에 의한 균체 손상을 방지하는 방어체계에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 즉, 산소 내성 *bifidobacteria*는 다음과 같이 생육에 불리한 환경 중의 산소를 NADH oxidase의 작용에 의해 H₂O₂로 전환시키고 이를 일정 한계까지는 NADH peroxidase에 의해 H₂O로 무독화시킴으로써 산소 및 독성 산소대사산물에 내성을 보이는 것으로 밝혀졌다.



요 약

*Bifidobacteria*의 효과적인 이용을 위해서는 산소에 내성을 갖는 균주를 선발하는 연구 외에도 산소 스트레스에 대한 방어 기작에 대한 기초적인 연구가 필요하다. 인체로부터 분리된 산소 내성 *bifidobacteria*는 산소제거활성을 가지고 있었으며 이는 열처리 및 극단적인 pH(pH 2.0)하에서 산소제거활성이 소실되는 것으로 보아 효소가 관여 할 가능성을 확인하였다. 또한 산소제거활성을 보이는 주된 효소를 탐색해본 결과 NADH를 공급하였을 때만 산소제거활성을 보여 NADH oxidase가 주된 역할을 하는 효소임을 알 수 있었다. 또한 산소 내성 균주는 높은 NADH peroxidase 활성을 보유한 것으로 보아 NADH oxidase의 작용에 의해 생성되는 H₂O₂는 NADH peroxidase에 의해 무독화 되는 것으로 판단되었다. 배양 중 산소를 공급하여 산소스트레스를 주었을 경우 NADH oxidase와 NADH peroxidase 활성이 1시간 이내에 급격히 증가하였고 산소 공급 후 2시간 동안 배양액 중 용존 산소가 크게 증가하지 않았다. 산소 공급 후 2시간 이상이 경과하면 NADH oxidase와 NADH peroxidase 활성이 감소하고 용존 산소가 급격히 증가하였고 산소스트레스에 대한 방어 체계가 붕괴되는 현상이 관찰되었다. 즉, 산소 내성 *bifidobacteria*는 일정 한계까지는 환경중의 산소를 NADH oxidase로 제거하고 생성되는 H₂O₂는 NADH peroxidase에 의해 제거시키는 방어 체계를 갖고 있음을 알 수 있었다.

문 헌

- Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 412-420 (1994)
- Raibaud P. Bacterial interactions in the gut. pp. 9-24. In: *Probiotics-The scientific basis*. Fuller R (ed). Chapman and Hall, London, UK (1992)
- Goldin BR, Lichtenstein AH, Gorbach SL. The roles of the intestinal flora. pp. 500-512. In: *Modern nutrition in health and disease*. Shils ME, Young VR (ed). LEA and FEBIGER, Philadelphia, USA (1988)
- Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indus. Microbiol.* 6: 263-271 (1990)
- Glenn EH, Lambrecht RS. Augmentation of Macrophage phago-

- cytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76: 2485-2492 (1993)
6. Seikine K, Sekine EW, Ohta J, Toida T, Tatsuki T, Kawashima T, Hashimoto Y. Induction and activation of tumoricidal cells *in vivo* and *in vitro* by the bacterial cell wall of *Bifidobacterium infantis*. *Bifidobacteria Microflora* 13: 65-77 (1994)
 7. Zhang XB, Ohata Y. Binding of mutagens by fraction of the cell skeleton of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74: 1477-1481 (1991)
 8. Modler HW, Mckellar RC, Yaguchi M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23: 29-41 (1990)
 9. Goldin BR, Gorbach SL. Probiotics for humans. pp. 355-376. In: *Probiotics-The scientific basis*. Fuller R (ed). Chapman and Hall, London, UK (1992)
 10. Hawins SM. Bifidobacteria in dairy products. *Cult. Dairy Prod. J.* 28: 16-20 (1993)
 11. Hughes DB, Hoover DG. Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* 45: 74-83 (1991)
 12. Ahn JB, Ji GE, Jeong HK, Lee KH, Park JH. Isolation and selection of *Bifidobacterium* spp. from Korean feces for fermented dairy foods. *Korean J. Dairy Sci.* 19: 349-360 (1997)
 13. Ahn JB, Lee KH, Park JH. Isolation and identification of oxygen resistant *Bifidobacterium* sp. from Korean and its characteristics. *Korean J. Food Nutr.* 10: 122-126 (1997)
 14. Condon, S. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Irish J. Food. Sci. Technol.* 7: 15-25 (1983)
 15. Condon, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 269-280 (1987)
 16. Anders RF, Hogg DM, Jago GR. Formation of hydrogen peroxide by Group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. *Appl. Microbiol.* 19: 602-612 (1970)
 17. Gotz F, Sedewitz B, Elstner EF. Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum*- Oxygen consuming reactions. *Arch. Microbiol.* 125: 209-214 (1980)
 18. Ahn JB, Hwang HJ, Park JH. Physiological responses of oxygen tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 443-451 (2001)
 19. Ji GE, Lee SK, Kim IH. Improved selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* sp.. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 526-531 (1994)
 20. Shin SY, Park JH. Changes of oxidative enzymes and fatty acid composition of *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum* under anaerobic and aerated condition. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 7-14 (1998)
 21. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140 (1952)
 22. Tabatabai LB, Walker HW. Oxidation-reduction potential and growth of *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol.* 20: 441-446 (1970)
 23. Phae CG, Lee WK, Kim BH, Koh JH, Kim SW. Effects of the redox potential of the acidogenic reactor on the performance of a two-stage methanogenic reactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 30-35 (1996)
 24. Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* 75: 3296-3306 (1992)

(2005년 9월 7일 접수; 2005년 10월 10일 채택)