

# 유아의 분변으로부터 항리스테리아 활성의 *Bifidobacterium* 속 균주의 분리 및 동정

김송이 · 김기환 · 윤순용 · 윤성식<sup>1</sup>  
연세대학교 생물자원공학과, <sup>1</sup>생리활성소재연구소 원주캠퍼스

## Isolation and Identification of the Antilisterial *Bifidobacterium* Isolates from the Infants Fecal Samples

Song-Yi Kim, Ki-Hwan Kim, Soon-Yong Youn and Sung-Sik Yoon<sup>1</sup>

Department of Biological Resources and Technology,

<sup>1</sup>Institute of Functional Biomaterials and Biotechnology, Yonsei University, Wonju, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to isolate antilisterial strains of the *Bifidobacterium* isolates from the infant feces. The bifidobacteria were isolated anaerobically on BL agar and screened for their inhibitory activity on the MRS-cysteine medium against three foodborne pathogens: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Among the 52 bifidobacterial isolates, 5 strains(A24, B1, B6, B10, and B12) were finally selected based on their stronger antilisterial activity against *Listeria monocytogenes* than other isolates tested. Morphologically, all the isolates were typically shown Y- and V-shaped under electron microscopic examination. Each isolate was primarily subjected to identification by a polymerase chain reaction(PCR) using a genus-specific primer designed for targeting the 16S rRNA gene sequence, and confirmed the primary identification data using an API-kit(Biomeriuex, France), commercially available product for identification based on biochemical and physiological traits. Of the isolates with antilisterial activity, strain A24 was finally confirmed as the *Bifidobacterium longum* A24.

(Key words : *Bifidobacterium*, isolation and identification, antilisterial activity, human fecal samples)

### I. 서 론

인체의 장내에는 약 400~500여 종의 세균이 존재하고, 총 미생물수는 10<sup>14</sup> 마리 이상 존재하며, 분변 고형물의 약 30%를 차지한다고 알려져 있다. 이들 세균 중에서 99% 이상은 절대혐기성 균주인 *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* 등이고 *E. coli*, *Lactoba-*

*cillus*, *Enterococcus*를 비롯한 통성혐기성 세균은 절대혐기성 세균의 1/100~1/1,000에 불과하다(Cummings and Macfarlane, 1991). 보고된 바에 의하면 장내의 상재 세균들 중에는 외부로부터 유해 세균의 감염을 막아주는 방어 작용을 하거나 비타민 등을 생산하여 인체에 공급하는 유익한 세균들이 있는 반면에, ammonia, amines, indoles 등과 같은 독성 물질을 생성하거나 발암 과정에 관여하는 효소를 생산하는 유해 세균들이 상존한다(박과 지, 1999). 또한 장내 균총은 섭취하는 음식물, 생활 환경, 스트레스에 의해 영향을

Corresponding author : Sung-Sik Yoon, Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju, 220-710, S. Korea.

받으며 질병의 발생과 밀접한 관계가 있다. 따라서 건강을 유지하기 위해서는 인체에 해로운 장내 세균들을 제어하는 것이 중요하다고 인식되고 있다(Kim 등, 1998).

*Bifidobacterium* 속 세균은 편성혐기성 그람 양성 간균이며, 1 mole의 포도당을 발효하여 초산 1.5 mole과 젖산 1 mole을 각각 생성한다. 보통 25~40°C 범위에서 증식하고, 최적 온도는 37°C, 최적 pH는 6~7이며, 45°C 이상, 또는 pH 5.5 이하에서는 증식이 억제된다. 인체의 장내 균총을 형성하고 있는 우점 세균종의 하나로 특히, 모유를 섭취하는 유아의 장내 균총 중의 90% 이상은 bifidobacteria로 이루어져 있다. 그러나 이 유식 섭취 이후에는 이 미생물의 숫자는 점차적으로 감소하며 전체 균총 중에서 약 10~20% 수준으로 유지되다가 노인이 되면서 크게 감소한다(정, 2004). Bifidobacteria는 유해 물질을 거의 생산하지 않고, 병원성 세균에 대한 길항 작용이 있으며, 비타민 B 군 등을 합성하여 인체에 공급하고, 유당을 분해하여 유당 불내증(lactose intolerance)을 개선하는 효과가 있기 때문에 장내 세균 중 가장 대표적인 유익균으로 알려져 있다(박과 지, 1999). 역학 조사의 결과에 따르면 모유를 섭취하는 유아의 경우 설사에 대한 이환율이 낮은데 그 이유 중의 하나로서 모유아의 장내에는 bifidobacteria가 우점종으로 서식하고 있기 때문이다. 이러한 작용 이외에도 bifidobacteria의 항돌연변이 효과(Lee와 Ji, 1996; Kim 등, 1998; Jung 등, 1999), 면역기능 증강 효과(Kim 등, 1998; Jung 등, 1999), 항암 효과(Kim 등, 2003), 혈중 콜레스테롤의 감소 효과(Kim 등, 1998; Jung 등, 1999) 등 인간의 건강 유지에 중요한 역할을 한다고 보고되었다. 특히, 최근에는 각 균주마다의 특성 및 기능성이 상이함에 근거하여 보다 우수한 형질의 bifidobacteria를 개발하기 위한 노력을 경주하고 있으며, 생존성, 안정성 및 장 정착성을 증진시키기 위한 연구도 보고되었다(Park과 Heo, 1995; Park과 Heo, 1996).

한편 *Listeria monocytogenes*는 육류, 어패류, 치즈, 아이스크림, 냉동 식품 등을 빈번하게 오염시키며 임산부, 신생아, 노약자에게 유산, 패혈증, 수막염, 식중독을 일으키는 치명적인 식중독(food-poisoning) 원인균이다. 지금까지 *Listeria* 속에는 7가지의 균종(species)이 포함되어 있으나 인수 공통의 질병을 일으킬 수 있는 종은 *L. monocytogenes* 한 가지 뿐이다(Faber와

Johnston, 1989). *L. monocytogenes*는 그람 양성 세균으로서 열악한 환경 조건에서도 살아남아 식중독을 일으키는 독특한 특성을 가지고 있다. 특히 고염분, 고당분, 건조 등 삼투압 스트레스를 받을 경우 세포 내에 삼투 보호 물질인 osmolyte를 세포 내에 축적함으로써 세포내 팽압을 유지하여 증식할 수 있으며(Ko 등, 1994), 또 저온(4°C)에서도 증식이 가능하고 열처리 공정 후에도 생존할 수 있어 식품 위생학적인 측면에서 감시의 대상이 되는 미생물이다.

이상에서 기술한 바와 같이 인체 장관에서 정상 균총의 일원으로서 서식하고 있는 bifidobacteria는 안전하고도 유익한 미생물이므로 이 세균이 생산하는 항균 물질은 식품의 새로운 천연 보존제로서 뿐만 아니라 축산업이나 의약품 산업 분야에도 그 응용성이 크게 기대된다. 따라서 본 연구는 생후 10개월 미만의 건강한 유아들의 분변으로부터 식중독을 유발하는 병원성 세균을 저해하는 *Bifidobacterium* 속 균주를 탐색하고 항균 활성이 비교적 강력한 분리주를 분자생물학적 및 생화학적인 방법을 사용하여 동정한 결과이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 채취 및 분리

본 실험에 사용된 시료는 강원도 원주 소재의 소아과 병원으로부터 건강 상태가 양호한 약 100여 명의 유아 분변 유아의 분변을 멸균된 면봉으로 채취하였다. 이것을 0.05%(w/v) L-cysteine(Sigma, St. Louis, MO)을 함유한 MRS 액체 배지(Difco, Detroit, MI)에 현탁하고, peptone water를 사용하여 순차적으로 십진 희석한 후 BL 한천 평판 배지(Eiken Chemical, Tokyo, Japan)에 100 µl씩 도말하여 혐기 배양조 anaerobic system(Gaspack; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)를 이용하여 혐기적 조건을 만든 후 37°C에서 36시간 동안 배양하였다. 배양한 후에 한천 배지 상에 자란 유백색의 colony를 취하여 동일 배지에 재차 희석 배양한 다음 그람 염색한 후 형태를 관찰하면서 분리하였다.

### 2. 피검 균주의 배양

본 실험에 사용된 피검 균주로는 식품 유래의 식중독 유발 세균 중에서 *Listeria monocytogenes* KCCM

40307<sup>T</sup>, *Bacillus cereus* KCCM 11204<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923<sup>T</sup>을 KCCM(서울)으로부터 분양받아 사용하였다. *Listeria monocytogenes*는 brain heart infusion(BHI; Difco, Detroit, MI) 액체 배지를 사용하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였고, *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*는 tryptic soy broth(TSB; Difco, Detroit, MI)를 사용하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다.

### 3. 항균 활성 물질 생산 균주의 선별

항균 활성이 높은 균주를 선별하기 위해서 각 분리 균주들은 0.05% L-cysteine이 첨가된 MRS 액체 배지에 2%(v/v)를 접종한 후 3회 계대배양을 하였다. 원심분리(10,000×g /15min) 후 배양 상등액을 취하여 pH 7.0으로 조정된 후 여과 제균(0.45 μm, Whatman, Springfield Mill, England) 하였다. *L. monocytogenes*는 BHI 액체 배지 4 ml에 2% 되게 접종하고 상기 여과 제균한 상등액(pH-controlled supernatant filtrate; PCSF) 1 ml를 첨가한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. *B. cereus*와 *Staph. aureus*는 TSB 4 ml에 각각 2%(v/v)를 접종하고 PCSF(pH 7.0)를 1 ml씩 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 대조균은 위와 같은 조건에서 PCSF(pH 7.0) 대신에 0.05% L-cysteine을 함유한 1 ml MRS 액체 배지를 첨가하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 Jack 등(1995)의 방법에 따라 항균 활성을 측정하여 균주를 선별하였다. 분리 균주들의 PCSF(pH 7.0)에 대한 항균 활성은 UV-Visible spectrophotometer(Ana-Lab Co. Korea)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정 한 후 아래 공식과 같이 증식 저해 정도를 백분율로 표시하였다. 증식에 따른 항리스테리아 활성은 접종 후 4시간 간격으로 취한 배양액을 상기와 같이 측정하였다.

저해율(%) =

$$\frac{\text{대조구의 흡광도}(A_{600}) - \text{실험구의 흡광도}(A_{600})}{\text{대조구의 흡광도}(A_{600})} \times 100$$

또한 Tagg and Mcgiven(1971)의 paper disc 방법을 사용하여 선별 균주의 항균 활성 정도를 확인하였다. 항균 활성의 효과를 결정하기 위해 *L. monocytogenes*

을 피검 균주로 1%(v/v) 접종한 TSB에 직경 8 mm의 paper disc(Advantec, Japan)를 올려놓은 후 20배 농축(Microcenvac, n-Biotek, Korea)한 선별 균주의 PCSF(pH 7.0) 80 μl를 조심스럽게 적가한 다음 37°C에서 12시간 배양 후 생성된 저지환의 직경(mm)을 측정하였다.

### 4. 형태학적 동정

선별 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8th ed.)에 따라 그람 염색, catalase 반응 실험, 포자형성 유무, CO<sub>2</sub> 생성 유무, motility 시험 등을 수행하였고, 주사전자현미경(Scanning electron micrograph; 50A-MRH, Japan)으로 촬영하였다.

### 5. 당 이용성 실험

선별 균주의 당 이용성 실험은 Kim 등(1999)의 방법에 따라 BL 한천 평판 배지 상에서 자란 colony를 무균적으로 취하여 API 50 CHL medium(API, Biomerieux, France)에 현탁하고, 이 현탁액을 API 50 CH strip에 분주하여 37°C에서 72시간 동안 배양한 후 각각의 당 이용성 양상을 파악하였다.

### 6. Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 동정

16S ribosomal rDNA 분석을 위한 genomic DNA 추출은 Sambrook 등(1989)의 방법을 다음과 같이 약간 수정하여 사용하였다. 즉, STE buffer(10 M NaCl, 10 mM Tris · Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 배양한 균체를 현탁하였고 lysozyme 용액(20mg/ml, 10 mM Tris · Cl, pH 8.0)을 첨가하였다. 40초간 열처리를 한 후 5분 동안 ice-cold water로 냉각을 하였다. 그 후에 원심분리(25,000×g /30 min)를 하고 *Bifidobacterium* 속을 확인하기 위하여 genus-specific primer(Langendijk 등, 1995)인 forward primer Bif164(5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')와 reverse primer Bif662(5'-CCACCGTT ACACCGGGAA-3')를 사용하였고, 처음 사이클은 94°C/2 min, 25 사이클은 94°C/1 min, 55°C/30 sec, 72°C/ 2 min, 마지막 사이클은 72°C/7 min(1 회), 4°C/ 1분 조건에서 PCR(PTC-100, MJ Research, USA) 실험을 수행하였다. 기타 실험은 상법(Harrigan과 McCance, 1976)에 준하여 실시하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 유아의 분변으로부터 균주의 분리 및 선별

BL 한천 평판 배지를 사용하여 100명의 유아 분변 으로부터 총 52 균주를 분리하였다. 대부분의 분리 균 주들은 Table 1에서 보는 바와 같이 *Staph. aureus*와

Table 1. Growth inhibitions of *Bifidobacterium* isolates on the three food-borne pathogens, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*

Strains	Pathogens			Strains	Pathogens		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
A1	++	+	+	B4	++	+	-
A2	++	-	-	B5	++	-	-
A3	++	+	+	B6	+++	+	-
A4	++	-	+	B7	++	--	-
A5	++	++	-	B8	++	-	-
A6	++	+	-	B9	++	-	-
A7	++	+	+	B10	+++	+	+
A8	++	+	-	B11	+	-	+
A9	++	-	+	B12	+++	+	-
A10	++	-	-	B13	++	+	-
A11	++	+	+	B14	++	+	+
A12	++	-	+	B15	++	+	+
A13	++	+	-	B16	++	+	-
A14	++	+	+	B17	++	+	-
A15	++	+	-	B18	++	-	+
A16	++	-	-	B19	++	+	-
A17	++	+	+	B21	+	+	+
A18	++	+	-	B22	++	+	-
A19	++	-	+	B23	+	-	-
A20	++	+	+	B24	++	++	+
A21	++	+	-	B25	++	-	+
A24	+++	+	-	B26	++	+	+
A28	++	-	-	B27	++	-	-
B1	+++	+	-	B28	++	+	+
B2	++	-	+	B29	++	+	-
B3	++	+	-	B30	++	+	+

-, <15% inhibition rate; +, 15~30% inhibition rate; ++, 30~45% inhibition rate; +++, >45% inhibition rate.

*Bacillus cereus*보다 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성이 높았고, 그 중에서도 5 균주(A24, B1, B6, B10, B12)의 항균 활성이 우수하게 나타났다. 1차 선별된 5개의 분리주를 대상으로 paper disc를 사용하여 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성을 측정된 결과, Fig. 1과 같이 대부분의 저지 환(inhibition zone)의 크기가 비슷하게 나타나 항균 활성의 차이를 객관적으로 서로 비교하기가 어려웠다. 따라서 Jack 등(1995)의 액체 배

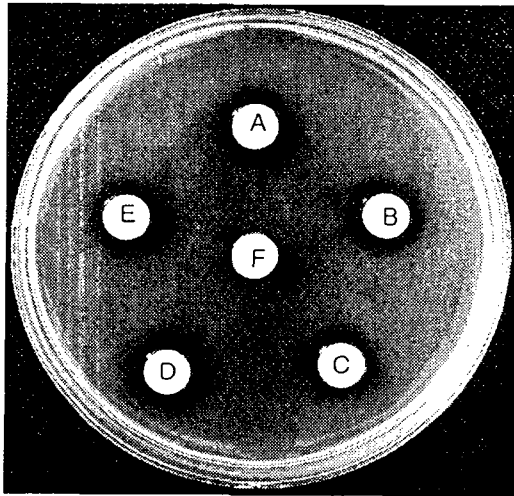


Fig. 1. Paper disc assay of strains isolated from the fecal samples against *Listeria monocytogenes* KCCM 40307<sup>T</sup>.

A: A24, B: B1, C: B6, D: B10, E: B12, F: control.

양법을 이용하였다. 배양시간 차이에 따른 항균 활성의 정도를 알아보기 위해 각 시간별로 PCSF를 제조한 다음 피검 균주에 대한 항균 물질 생산능을 비교하였다. 대조균의 배양액 흡광도와 실험균의 배양액의 흡광도 차를 백분율로 계산하여 피검 균주인 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성을 측정된 결과 Table 2에 나타난 것처럼 선별된 5 균주는 36시간 배양하였을 때 항균 활성이 가장 높게 나타났다.

## 2. 선별 균주의 동정

형태학적 분석을 위해서 선별 균주 A24를 현미경으로 관찰한 결과 Gram 양성, 간균, Y자, 곤봉 형태를 보였다(data not shown). 주사전자현미경(SEM)을 통하여 선별 균주를 관찰한 결과 Fig. 2와 같이 Y자형과 V자형의 부정형을 나타냈으며, 길이는 3~5.5  $\mu\text{m}$ 이고 폭은 0.8~1  $\mu\text{m}$ 이었다. 생화학적 동정 결과 catalase 음성과 spore를 형성하지 않고  $\text{CO}_2$ 를 생성하지 않으며 운동성을 가지고 있지 않음을 확인하였다. 이 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8th ed.)의 분류에 따라 전형적인 *Bifidobacterium* 속 균주로 판단되었다.

16s ribosomal DNA 분석은 16S rDNA의 *Bifidobacterium*-specific regions(Langendijk 등, 1989)인 V2 및 V4의 가변 영역에 위치한 18개 oligonucleotide와 상보적인 forward primer Bif164(5'-GGG TGG TAA TGC CGG ATG-3')와 reverse primer Bif662(5'-CCA CCG TTA CAC CGG GAA-3')를 목표로 하여 제작한 genus-spe-

Table 2. Growth inhibition of *Bifidobacterium* isolates from the infant faeces on *Listeria monocytogenes* KCCM 40307<sup>T</sup>

Strains	Indicator, 12 h <sup>a</sup>					Indicator, 24 h <sup>a</sup>				
	Inhibition rate (%)					Inhibition rate (%)				
	24 h <sup>b</sup>	30 h	36 h	42 h	48 h	24 h <sup>b</sup>	30 h	36 h	42 h	48 h
A24	38.8	43.3	45.7	33.7	32.9	45.2	47.2	52.6	43.8	42.7
B1	37.5	40.7	41.7	35.1	28.6	42.6	43.9	49.8	43.9	42.5
B6	37.2	39.2	42.5	32.2	32.6	43.2	45.1	48.1	46.8	43.4
B10	35.5	36.6	39.9	35.5	33.6	38.1	38.9	47.5	41.5	41.1
B12	36.9	41.9	44.4	39.0	31.0	43.3	44.1	43.8	43.5	43.1

<sup>a,b</sup>: Incubation time of *L. monocytogenes* and *Bifidobacterium* isolates, respectively.

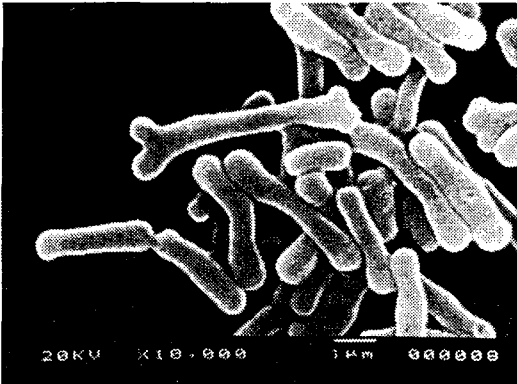


Fig. 2. Scanning electron micrograph of *Bifidobacterium longum* A24.

Scanning electron microscopic(SEM) picture of the *Bifidobacterium* sp. A24 were taken with a field emission scanning electron microscope(Model 50A-MRH, Japan).

cific primer를 사용한 결과 Fig. 4에서 보는 바에 같이 항균 활성을 가지고 있는 5개의 분리균 모두 *Bifidobacterium*-specific한 약 500 bp의 크기의 band를 형성하여 *Bifidobacterium* 속 균주들로 동정할 수 있었다.

당 이용성을 실험한 결과, 선별균주는 L-arabinose, ribose, D-xylose, galactose, glucose, mannose, sorbitol,

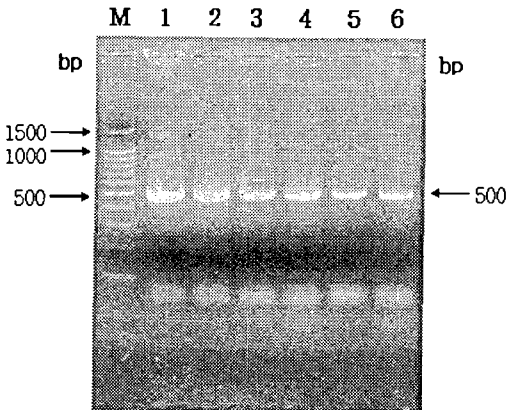


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the PCR products from the isolated strains.

PCR products were amplified with the *Bifidobacterium* genus-specific primer(Langendijk, 1995). Lane M: molecular size DNA marker 100 bp plus DNA ladder, Lane 1: *B. longum* ATCC 15707<sup>T</sup>, Lane 2: A24. Lane 3: B1, Lane 4: B6, Lane 5: B10, Lane 6: B12.

fructose, esculin, maltose, lactose, melibiose, saccharose, raffinose, turanose 등의 당에 대한 이용성이 양호하였으며(Table 3), Kim 등(1999)이 분리한 *Bifidobacterium*

Table 3. Carbohydrate fermentation patterns of the *Bifidobacterium longum* A24

Carbohydrate	A24 strain	Carbohydrate	A24 strain
Control	-	Esculin	±
Glycerol	-	Salicin	-
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	-
Adonitol	-	Inuline	-
β-Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	±	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucosamine	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdalin	-	2 Keto-gluconate	-
Arbutine	-	5 Keto-gluconate	-

\* +, positive ; -, negative ; ± weakly positive.

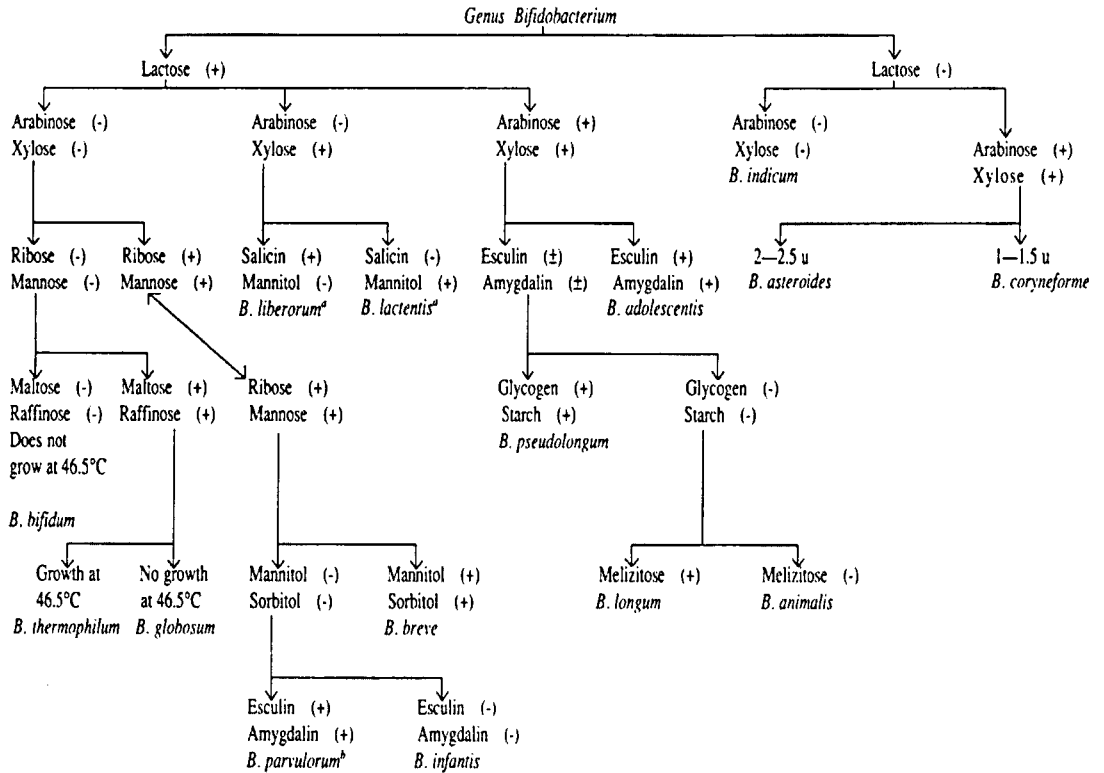


Fig. 4. Species differentiation of a genus *Bifidobacterium* on the basis of sugar fermentation pattern (Mitsuoka, 1969).

*longum* MK-G7과 당 이용 양상이 유사하였고, A24 균주와의 상호 비교를 위해 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707<sup>T</sup>의 당 이용 결과를 확인하였다. 또한 Mitsuoka(1969)에 의해 제한된 당 발효 특성에 비교했을 때 Fig. 4와 같이 *Bifidobacterium longum*으로 잠정적으로 동정되었다.

### 3. 16s rDNA sequence를 이용한 A24의 동정

분리균들 중 항균 활성이 가장 높은 *Bifidobacterium* sp. A24의 정확한 동정을 위해서 Takara Korea Biomedical Inc.의 연구개발센터에 의뢰하여 16s rDNA sequencing을 통하여 16s rDNA의 염기 서열을 분석 (Fig. 5)하였고 이 염기 서열을 NCBI Genbank blast를 이용하여 균주를 동정한 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 *Bifidobacterium longum*의 염기 서열과 높은 상동성을 나타내어 *Bifidobacterium longum* A24로 명명하였다.

### 4. 증식에 따른 항균 활성의 변화

Park과 Heo(1996)에 의하면 0.05% 이상의 L-cysteine을 첨가하였을 때 *Bifidobacterium* 증식이 높았고, 0.10~0.20%나 0.05% 존재할 경우에는 비슷한 증식율을 나타냈다고 보고하였다. 이를 참고로 *Bifidobacterium longum* A24를 0.05%(w/v) L-cysteine이 들어 있는 MRS 액체 배지에서 37°C, 48시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 배양액을 취해서 흡광도와 항균 활성을 측정 한 결과는 Fig. 6과 같았다. 균체의 생육은 28시간 배양 시 최대에 도달한 반면, 항균 활성은 그보다 늦은 36시간만 최고 활성을 나타내었으며, 그 이후에는 활성이 약간 감소하는 경향을 보였으며, 현재로서는 그 원인을 확인할 수 없었다. *Bifidobacteria*와 같은 절대혐기성 세균을 과산화물에 지극히 취약하다. 배양을 혐기 상태에서 수행하면 혐기성 세균에게 치명적인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 과산화물의 축적을 방지 할 수

```

1  NNNNNNNNTNGNNNNNNNTNNNNNGNGNNNTTACCATGCAAGTCGAAC
51  GGGATCCATCAGGCTTTGCTTGGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAT
101 GCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTA
151 ATGCCGGATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAAGCTTTCGCGGTA
201 TGGGATGGGGTCGCGTCTATCAGCTTGACGGCGGGGTAACGGCCCACCGT
251 GGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGA
301 GATACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATG
351 GCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTT
401 GTAAACCTCTTTTATCGGGGAGCAAGCGAGAGTGAGTTACCCGTTGAATAA
451 GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCG
501 TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCGCGTCCGG
551 TGTGAAAGTCCATCGCTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTT
601 GAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGGAATGTGTAGA
651 TATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACG
701 CTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
751 ACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTCCACGGGTCCCGTG
801 TCGGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTA
851 AAACCTAAAAGAAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATT
901 AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGGT
951 CGTAGAGATACNGCTTCCCTTCGGGCGGGTTCACNGTGGTGCATGGTCTGCG
1001 TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCACCTCGC
1051 CCCGTGTNCAGNGNTATGCGGGANTACGGGGACCGCCGGGTACTNGAGAG
1101 NGGGATGACGTCNATCATCATGCCCTNCGTCAGGGCTTACGCATGCTACAT
1151 NNNGNNNNCNGGNGNNNNCCGNNNNACGGAACGAATCCNNAANNNNTT
1201 NNNNGATCGCNNTNANTNNACTGNNTGTAAGNGGAAANCCCCNNN
    
```

Fig. 5. Partial 16s rDNA sequence of *Bifidobacterium* sp. A24.

Table 4. Results of identification of *Bifidobacterium* sp. A24 in terms of 16s rDNA sequence by using the Blastn program at National Center for Biotechnology Information(NCBI)

Sequences Producing Significant Alignments	Score(Bits)	E Value
gi 55442173 gb AY735403.1  <i>Bifidobacterium longum</i> strain BG3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1,863	0.0
gi 53766368 gb AY675246.1  <i>Bifidobacterium longum</i> strain BG 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1,863	0.0
gi 58012118 gb AE014295.3  <i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705, complete genome	1,863	0.0
gi 57117785 gb AY850359.1  <i>Bifidobacterium longum</i> strain SB11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	1,840	0.0

있다. Leyer와 Johnson(1992)은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 축적되면 fructose-6-phosphate phosphoketolase를 불활성화하여 발효 과정의 경로가 저해된다고 보고하였다. 따라서 본 연

구에서는 매 실험시마다 새롭게 조제한 L-cysteine stock 용액을 살균 배지에 최종 농도가 0.05%(w/v) 되게 무균적으로 첨가하여 용존 산소에 의한 잠재적



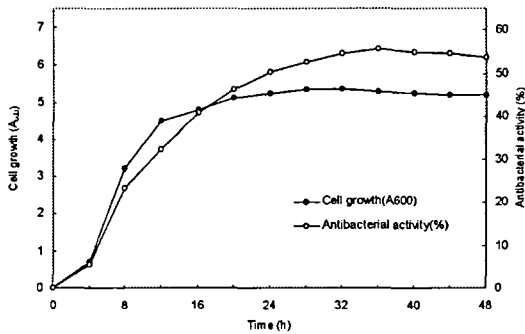


Fig. 6. Effect of PCSF from *Bifidobacterium longum* A24 on the growth of *L. monocytogenes* KCCM 40307<sup>T</sup>.

MRS broth was supplemented with 0.05% L-cysteine. Cultivation was carried out at 37°C until 48 h under anaerobic condition. PCSF was prepared as described in the materials and method and added 1 ml into 4 ml of MRS broth prior to inoculation of the indicator *L. monocytogenes* KCCM 40307<sup>T</sup> for inhibition rate determination.

독성을 최소화하였다.

#### IV. 요약

유아 분변으로부터 분리한 52 균주는 그람 양성균인 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307<sup>T</sup>에 대하여 항균활성이 있었고 그 중에서도 선별 균주 A24의 항균활성이 45% 이상으로 가장 높았다. *Bifidobacterium longum* A24의 생육 및 항균 물질 생산을 검토하였을 때 균체의 생육은 28시간 배양 시 최고에 도달하였고 항균 활성은 36시간 배양 시 최고를 나타내었다. 선별 균주 A24는 16S rRNA-based molecular typing 결과 *Bifidobacterium* 속 균주임을 확인할 수 있었고 형태학적·생화학적 방법으로 검토하여 보았을 때 *Bifidobacterium longum*으로 판단되었으며, 16s rDNA sequencing 결과 최종적으로 *Bifidobacterium longum*로 동정되었으며 이것을 *Bifidobacterium longum* A24로 명명하였다.

*Bifidobacterium longum* A24의 항균 활성 물질은 균체의 생육이 가장 좋은 28시간 배양에서가 아니라 그보다 늦은 36시간 배양에서 최고를 나타내었고 그 이후로는 활성이 감소하는 경향을 보였다. 이것은 *Bifidobacterium longum* A24이 생성하는 항균 활성 물질이

bacteriocin과 같은 2차 대사 산물임을 암시하는 결과로 해석된다.

#### V. 참고문헌

- Cummings, J. H. and Macfarlane, G. T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70:443-459.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Revised ed., Academic Press, New York, USA.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- Jung, H. K., Kim, E. R., Ji, G. E., Park, J. H., Cha, S. K. and Juhn, S. L. 1999. Comparison of physiological activities and product feasibilities of *Bifidobacterium longum* MK-G7 with commercial *Bifidobacterium* strains. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 19:296-306.
- Kim, E. R., Jung, H. K. and Juhn, S. L. 1999. Selective detection and enumeration of *Bifidobacterium longum* MK-G7 by using sugar alcohol and antibiotics. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 19:285-295.
- Kim, E. R., Jung, B. M., Kim, J. Y., Kim, S. Y., Jung, H. K., Lee, H. J. and Chun, H. N. 2003. Basic physiological activities of *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 selected by anticarcinogenic activities. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 31:348-354.
- Kim, Y. C., Jeong, H. K., Kim, S. H., Moon, I. L. and Kim, B. C. 1998. The properties of *Bifidobacterium* isolated from Korean. *Korean J. Dairy Sci.* 20:191-204.
- Ko, R., Smith, L. T. and Smith, G. M. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 172, 462-431.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raands, G. C., Kammmphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F. and Welling, G. W. 1995. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA targeted probes and its application in

- fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.
10. Leyer, G. J. and Johnson, E. A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. Appl. Environ. Microbiol. 58:2075.
  11. Lee, S. K. and Ji, G. E. 1996. Antimutagenic effects of Bifidobacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 796-799.
  12. Mitsuoka, T. 1969. Vergleichende Untersuchungen uber die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. Zentralbl. Bakteriol. parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig., 210:52 [Recitation].
  13. Park, H. K. and Heo, T. R. 1995. Studies on the characteristics of *Bifidobacterium* spp. for the industrial use. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 15:139-149.
  14. Park, H. K. and Heo, T. R. 1996. Effect of culture conditions on the growth characteristics and survival of *Bifidobacterium breve*. Korean J. Food Sci. Technol. 28:451-457.
  15. Ryu, B. H., Cho, S. H., Ha, S. W., Park, K. M. and Kang, K. H. 1998. Changes of the intestinal microflora and fecal properties by intake of yoghurt added capsulated or uncapsulated Bifidobacteria. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:221-225.
  16. Sambrook, J., Fritsch, E. T. and Maniatis, T. 1989. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  17. 박명수, 지근억. 1999. *Bifidobacterium*의 유전공학적 연구와 vector의 개발-특집: 유산균(V). 생물산업 12:44-52.
  18. 정동효. 2004. 유산균의 과학, 신일상사, 서울, pp. 15-35.