



비피도박테리아의 분자생물학적인 연구 동향

김 근 배
중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과

Genomic Research of the Genus *Bifidobacterium* and Its Application

Geun-Bae Kim
Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University

ABSTRACT

Recently, the field of microbiology has been transformed by huge increasing number of publicly available whole-genome sequences. This sequence information has significantly enhanced our understanding of the physiology, genetics, and evolutionary development of bacteria. Among the gastrointestinal microorganisms, bifidobacteria represent the most important human commensals because of their contribution to maintaining a balanced gastrointestinal tract microbiota. In recent years bifidobacteria have drawn much scientific attention due to their use as live bacteria in numerous food products with various health-related claims. For this reason, these bacteria constitute a growing area of interest with respect to genomics, molecular biology, and genetics. Recent genome sequencing of a number of bifidobacterial species has allowed access to the complete genetic make-up of these bacteria. This review will focus how genomic data has allowed us to understand bifidobacterial evolution, while also revealing genetic functions that explains their presence in the particular ecological environment of the gastrointestinal tract.

(Key words : *Bifidobacterium*, genomics, probiotics)

서 론

최근 수년간의 주요 세균에 대한 유전체 염기서열(genome sequence) 분석은 미생물에 대한 유전학적, 생화학적, 그리고 분자생물학적인 연구에 커다란 탄력적 변화를 가져오고 있다. 지난 수십 년간 무려 300여 종에 달하는 세균의 유전체 염기서열이 밝혀져 이러한 정보를 공유하게 되었다. 초기에는 식중독 원인균을 포함한 병원성 미생물의 염기서열 분석에 초점이 맞추어졌었지만, 최근에는 장내 미생물이나 식품산업에 이용되는 미생물에도 관심이 증가되어 약 30여 종의 유산균이나 비피도박테리아에 대한 유전체 염기서열 분석이 이미 완료되었거나 진행되고 있는 상황이다.

비피도박테리아는 포유동물의 소화관(gastrointestinal tract, GIT)에 서식하는 세균 중에서 그 수가 상대적으로 많으며, 특히 인체에 여러 가지 유용 작용(소위, probiotic effects)을 하는 것으로 알려져 많은 관심을 가져왔다. 현재까지 약 30

여 개의 종(species)이 비피도박테리아 속(genus)에 속하는 것으로 알려져 있으며, 이들의 대부분은 포유동물의 소화관에서 기원된 것이며, 일부의 예외가 있기도 하다(Table 1). 실험실에서 배지에 키우게 되면 비피도박테리아는 일정 비율의 아세트산과 젖산을 생산하게 되며, 소량의 formic acid, 에탄올, succinic acid 등도 생산할 수 있으나, 이산화탄소와 butyric, propionic acids는 생산하지 않는 것으로 알려져 있다. 비피도박테리아는 전형적인 간균에서부터 분지형, 곤봉모양, 아령모양 등에 이르기까지 아주 다양한 형태를 취할 수 있으며, 그 형태는 미생물 종이나 배양 조건, 성장 단계 등에 따라 변하게 된다. 비피도박테리아는 건강한 사람의 전체 장내 균총의 10% 정도를 이루는 것으로 예측되고 있으며, 그 비율은 개인에 따라 차이가 있고, 나이와 식이 등에 따라서도 차이를 보이게 된다. 이들 미생물은 사람의 소화능력이나 소화관내의 다른 미생물들에 의해서는 분해될 수 없는 다양한 형태의 올리고당을 이용할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 이러한 특성을 이용하여 장내에서 비피도박테리아의 성장을 선택적으로 촉진할 수 있는 prebiotics의 개념이 도입되어 응용되고 있다. 1899년 Tissier에 의해서 모유

*Corresponding author : Geun-Bae Kim, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea. Tel : +82-31-670-3027, Fax : +82-31-670-0062, E-mail : kimgeun@cau.ac.kr

수유를 하는 아기의 분변에서 처음으로 분리된 이후에, 건강한 사람의 장내균총에는 비피도박테리아가 우점종의 하나로 포함되어 있는 것이 일반적이라는 사실이 밝혀지면서 이들의 존재가 장내 건강 증진에 미치는 효과에 대해서 많은 연구가 진행되어오고 있다. 산업적으로도 그 중요성이 증가하게 되어, 현재 비피도박테리움을 함유하고 있는 다양한 형태의 정장제, 건강보조식품, 발효유 등이 개발되어 특정 균주의 건강 증진 효과를 강조하면서 판매되고 있다. 비록 비피도박테리움의 일부 유용 효과에 대한 임상실험의 결과가 과학적인 연구논문의 형태로 발표되고 있지만, 그 정확한 작용 기작이나 이들이 어떻게 장내에서 숙주(사람 또는 동물)와 상호작용을 하는가에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않은 부분이 많다. 물론 이러한 질문에 대한 해답을 쉽게 찾을 수는 없겠지만, 아마도 현재 진행되고 있거나 앞으로 밝혀지게 될 많은 유전체학 연구가 그 해답을 찾는데 어느 정도의 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 본 고에서는 현재까지 알려진 유전체 정보가 어떻게 비피도박테리움의 생리학과 계통발생학에 대한 보다 깊은 내용을 얻는데 이용될 수 있는지, 그리고 이들 장내 미생물이 어떻게 주어진 환경에 적응하며 진화해 왔는지에 대한 이해를 얻는데 도움이 될 수 있는지에 대해서 고찰해 보고자 한다.

본 론

1. 비피도박테리아의 유전체학 연구 상황

현재까지 알려진 30개의 종(species) 중에서 *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. dentium*에 대한 유전체 염기서열 분석이 완료되었으며, 최근 들어 *B. animalis* subsp. *lactis*에 대한 genome project가 국내에서 진행되고 있는 상황이다. 이 중에서 *B. longum* biotype *longum* NCC2705에 대한 유전체 연구 결과만이 발표되었으며(Schell 등, 2002), 그 이외에 7개의 프로젝트가 진행 중이거나 완료되었지만 아직 발표가 되지 않은 상황에 있다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면, 비피도박테리움의 전체 유전체의 크기는 2.3~2.6 Mb에 1,560~2,270여 개의 유전자를 가지고 있으며, G+C 함량은 59~60% 범위에 속한다(Table 2). *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. adolescentis* L2-32, *B. animalis* subsp. *lactis* AD011, *B. breve* UCC 2003, *B. dentium* Bd1, *B. longum* DJO10A, *B. longum* NCC2705, 그리고 *B. longum* bv *infantis* ATCC15697에 대한 유전체 염기서열에 대한 비교 분석을 함으로써, 이들 중 특정 균주가 최근에 진화되었거나 외부로부터 새롭게 획득한 균주 특이적인 염기서열 부분에 대한 정보를 얻고, 이를 통해 각각의 균주가 그들에게 주어진 특정한 환경에 맞추어 어떻게 진화하였는지를 이해하는 데에도 도움을 얻을 수 있을 것이다. 비피도박테리움을 포함한 probiotic strain에 대한

유전체 염기서열의 결정은 probiotic 효능에 과학적 접근을 위한 비교 유전체학(comparative genomics), 기능 유전체학(functional genomics), 단백질체학(proteomics) 등의 기초가 되는 정보를 얻기 위한 필수적인 단계라고 할 수 있다.

2. 유전체학을 이용한 비피도박테리아의 연구 분야

1) 탄수화물 대사

Table 1. Bifidobacterial species and their origin of isolation

Bifidobacterial species	Origin of isolation
<i>B. breve</i>	Infant feces
<i>B. bifidum</i>	Infant feces
<i>B. adolescentis</i>	Intestine of adult
<i>B. longum</i> biotype <i>longum</i>	Intestine of adult
<i>B. longum</i> biotype <i>infantis</i>	Intestine of infant
<i>B. catenulatum</i>	Intestine of adult
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Feces of infant
<i>B. angulatum</i>	Human feces
<i>B. gallicum</i>	Human feces
<i>B. dentium</i>	Dental caries
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Yoghurt
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Animal feces
<i>B. scardovii</i>	Human blood
<i>B. longum</i> biotype <i>suis</i>	Swine feces
<i>B. thermophilum</i>	Swine feces
<i>B. choerinum</i>	Swine feces
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Swine feces
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Bovine rumen
<i>B. psychraerophilum</i>	Porcine feces
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Feces of piglet
<i>B. boum</i>	Rumen cattle
<i>B. ruminantium</i>	Bovine rumen
<i>B. merycicum</i>	Bovine rumen
<i>B. gallinarum</i>	Chicken cecum
<i>B. pullorum</i>	Feces of chicken
<i>B. cuniculi</i>	Feces of rabbit
<i>B. saeculare</i>	Rabbit feces
<i>B. magnum</i>	Rabbit feces
<i>B. subtile</i>	Sewage
<i>B. minimum</i>	Sewage
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Waste water
<i>B. coryneforme</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. asteroides</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. indicum</i>	Hindgut of honeybee

Table 2. Comparison of general features in some bifidobacterial genomes

General features	<i>B. longum</i> NCC2705	<i>B. breve</i> UCC2003	<i>B. adolescentis</i> ATCC15703	<i>B. dentium</i> Bd1
Genome size(Mb)	2.26	2.42	2.39	~2.60
Gene number	1732	1868	1564	~2270
GC content(%)	60	58.7	59	59.2
rRNA operon	4	2	-	-
tRNA	57	54	-	54
Insertion sequence elements	16	26	-	2
Genome project ID	328	13487	16321	17583

Modified from: Ventura et al., 2007. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. Int. J. Food Microbiol. 120:2-12.

전형적인 포유동물의 소화관에서 분비되는 탄수화물 분해효소로는 일반적으로 sucrose, lactose, maltose와 같은 이당류를 분해하거나 starch와 같은 일부 다당류를 분해할 수 있는 것들이 많지만, 식이섬유 등에서 유래하는 올리고당이나 xylose, arabinose 등을 함유하는 다당류를 분해하는 효소는 거의 없다. 이들처럼 사람이나 동물의 소화효소에 의해서 분해되지 않고 대장까지 도달할 수 있는 당류들을 pre-biotics라고 하며, 프락토올리고당(FOS), 갈락토올리고당(GOS), 락툴로오스, 그리고 라피노오스 등을 그 예로 들 수 있다. 포유류의 대장 하부에 존재하는 비피도박테리아와 같은 미생물들은 올리고당을 분해하는 능력을 가지고 있어서 이러한 탄수화물을 발효과정을 통하여 분해하여 에너지를 얻게 되고, 장내 미생물의 발효대사 산물로 만들어지는 단쇄 지방산들은 그 숙주(사람 또는 동물)의 소화관에서 흡수되어 에너지원으로 이용되는 서로 공생적인 관계를 가지고 있다. 대장의 미생물들이 접하게 되는 복합 다당류로는 사람의 소화효소나 소장의 미생물에 의해 분해되지 않고 소화관 하부까지 도달하게 되는 starch, cellulose, hemicellulose, xylan, pectic과 같은 식이성분과 mucins, glycosphingolipids, hyaluronic acid, heparin과 같이 장상피세포에서 유래된 성분들로 이루어져 있다. 소화관의 위치에 따른 장내미생물의 조성과 분포는 그들이 이용할 수 있는 당류와도 밀접한 관련성이 있다. 예를 들어, *Lactobacillus*는 소화관의 상부에 많이 존재하며, 주로 단당류나 이당류들을 분해하여 이용하는 능력을 가지고 있으며, bifidobacteria와 같이 대장의 하부에 주로 존재하는 미생물들은 복합탄수화물을 이용하는 능력을 가지고 있으므로 이러한 위치에 서식하는 능력을 얻었을 것으로 예상된다.

유전체 서열 분석 결과를 보더라도 대장 하부에 서식하는 bifidobacteria와 같은 세균들은 전체 유전자 중에 상당히 많은 부분이 탄수화물의 대사에 관여하는 것으로 밝혀지고 있으며, 이러한 사실로부터 영양소와 공간에 대한 고도의 경쟁관계에 있는 다른 미생물들을 물리치고 대장 하부에 정착

할 수 있게 된 생태학적 배경을 이해할 수 있을 것이다. *B. breve* UCC2003과 *B. longum* NCC2705의 유전체 서열 분석을 통해서 이들이 어떻게 장내 틈새 시장에 적응을 하였는가를 보여주는 아주 좋은 예라고 할 수 있다. 이들의 유전체 분석을 통해서 이 미생물들이 많은 종류의 당화합물 가수분해효소(glycosyl hydrolase)를 가지고 있기 때문에 다양한 종류의 복합 탄수화물(식물 유래 식이 섬유와 동물의 장내에서 기인되는 다당류)을 분해하여 이용할 수 있음을 예측할 수 있게 되었다. 이들은 전체 유전자의 10% 정도가 탄수화물의 대사에 관여하는 효소를 coding하고 있으며, 이는 *E. coli*, *E. faecium*, 그리고 *L. lactis*의 그것보다 30% 이상 높은 비율을 차지하는 것이다. *B. longum* NCC2705의 유전체 분석 결과를 보면 이들은 fructose, galactose, N-Ac-glucosamine, N-Ac-galactosamine, arabinose, xylose, ribose, sucrose, lactose, cellobiose, melibiose 등을 fructose-6-phosphatase shunt로 전달해 줄 수 있는 모든 효소체계를 갖추고 있음을 알 수 있다(Schell 등, 2002).

유아 분변에서 분리된 *B. breve* UCC2003의 유전체 연구를 통하여 이들의 장내 환경 적응과 관련하여 발견된 흥미로운 사실중의 하나는 이 균주가 mucin, glycosphingo lipids, 그리고 모유 등에서만 특이적으로 발견되는 다당류인 sialic acid를 함유하는 복합다당류를 분해 이용할 수 있는 능력을 가지고 있다는 점이다(Wang 등, 2001). 이러한 방식으로 유아 자신과 유아의 어머니는 유아의 장내에 있는 비피도박테리아에게 탄소원을 영양소로 공급해 주고, 그 결과물로 나오는 미생물의 대사산물을 다시 유아가 이용하게 되는 훌륭한 공생관계를 가질 수 있게 되었음을 알 수 있다(Corfield 등, 1992). 또, 다른 형태의 다당류인 starch와 pectin에 분해 능력은 bifidobacteria의 모든 종에서 발견되는 것이 아니고 *B. breve*를 포함한 일부 종에서만 발견되는데, *B. breve*가 유아의 장내균총에서 특히 많이 발견된다는 사실을 염두에 두면, 이들 미생물이 가지고 있는 전분 분해효소인 일종인 amylopullulanase와 같은 효소의 존재는 특히 어린 아이의

이유기에 모유로부터 이유식으로 식사 패턴이 바뀌게 될 때, 즉 모유에 존재하는 유당과는 다른 형태의 다양한 복합 탄수화물이 함유된 식이를 접할 때 이들의 장내에 있는 *B. breve* 등은 이유식의 소화를 돕는데 아주 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다(Ryan 등, 2006).

2) 비피도박테리아와 Prebiotics

Prebiotics는 FOS 및 GOS와 같은 난소화성 식품 소재로 정의 될 수 있으며, 이들은 특정 장내 미생물의 성장을 선택적으로 촉진함으로써 사람과 동물의 장내 건강 증진에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Bouhnik 등, 2004). 상업적으로 가장 널리 이용되고 있는 FOS는 (2-1)결합에 의해 연결된 여러 개의 fructose unit이 마지막에 하나의 glucose와 역시 (2-1)결합에 의해 연결되어 있는 올리고당이다. FOS가 가지고 있는 이 (2-1)결합을 소장의 소화효소가 분해할 수 없기 때문에 대장까지 도달할 수 있는 것이다. *B. breve* UCC 2003의 유전체 분석을 통해서 이들이 FOS의 분해에 관여하는 하나의 *fos* operon을 가지고, 이것이 permease와 fructofuranosidase 등의 여러 효소를 coding하는 것을 알 수 있었다. 여러 실험을 통하여 이 operon이 FOS의 분해에 관여한다는 사실과 특정 당류의 존재 유무에 따른 조절 기작에 대한 연구 결과도 발표되었다(Ryan 등, 2005).

Prebiotic으로 작용할 수 있는 또 다른 중요한 올리고당 원으로 모유 성분을 들 수 있다(Ward 등, 2006). 유당 분해효소 β -galactosidase의 가수분해 작용 이외에 또 다른 중요한 기작인 transgalactosylation 작용에 의하여 유당으로부터 transgalactooligosaccharide(TOS)의 생산이 가능하며, 이것의 구조는 GOS와 유사하다(Onishi와 Tanaka, 1997). TOS와 GOS는 3~32개의 galactose unit을 포함하는 다양한 복합탄수화물의 혼합물이라고 할 수 있다(Kunz 등, 2000). *B. longum* NCC2705 균주는 *galA* 유전자로부터 만들어지는 효소의 작용에 의하여 TOS와 GOS 등을 가수분해할 수 있음이 밝혀졌다(Hinz 등, 2005). GOS 이외에도 모유에 존재하는 기능성 peptides들도 비피도박테리아에 대한 성장 촉진 효과를 갖는 것으로 보고되었다. 이들은 모유의 단백질이 소화관에 있는 단백질 분해효소의 작용에 의하여 생성되는 작은 peptide 등을 포함하며, 이들은 GOS보다 더 강력한 비피도스 성장 촉진 효과를 나타낼 수도 있다고 한다(Liepke 등, 2002).

3) 비피도박테리아와 소화관(GIT)의 상호작용

비피도박테리아와 같은 장내 미생물들은 세균과 소화관의 장상피세포간의 직접적인 접촉을 통하여 그들의 숙주와 서로 긴밀한 작용을 할 수 있을 것으로 예상된다. *Listeria monocytogenes*나 *Salmonella* spp. 등과 같은 장내 병원성 세균의 경우에는 이러한 직접적인 접촉에 대한 많은 관심을 가지

고, 특히 이러한 상호작용과 이들 세균의 병원성에 초점을 맞추어 연구가 진행이 되었다(Lecuit 등, 2001). 비피도박테리아와 사람의 소화관내 세포와의 상호 작용을 하는데 있어서는 비피도박테리아가 만들어 세포 밖으로 분비하는 단백질들이 아주 중요한 역할을 하게 되며, 그 생성 기작은 일반적으로 그람 양성균들이 가지고 있는 것과 유사하다고 한다. *B. breve* UCC2003에 의하여 세포 외부로 분비되는 단백질들은 signal peptide 또는 많은 transmembrane 영역들을 포함하고 있다(MacConaill 등, 2003). *B. longum* NCC2705와 *B. longum* DJO10A의 유전체 중에는 glycoprotein-binding fimbriae-like 구조를 가지고 있어 이들이 장상피세포와 직접적인 접촉에 관여할 것으로 예상된다. 또한, 이들 모든 비피도박테리아들은 소화관내에서 숙주와의 상호작용에 관여하는 것으로 알려진(Ivanov 등, 2006) serpin(serine protease inhibitor)과 유사한 형태의 protease inhibitor를 만들 수 있는 유전자들이 발견되었다. 실제로 소화관내에서 비피도박테리아들은 pancreatic elastase나 neutrophil elastase 등과 접촉하는 기회가 많이 있을 것이며, 이들 단백질 분해효소의 공격으로부터 자신을 보호하는 것이 장내 세균과 숙주와의 상호작용에 있어서 필수적인 단계라고 할 수 있다. 장내의 면역체계에 의해서 염증 부위의 활성화된 neutrophil에 의해 분비되는 이들 단백질 분해효소는 일반적으로 *E. coli*나 기타 그람음성균의 outer membrane protein A(ompA)를 분해하거나 *Shigella*의 virulent factors를 분해하여 병원성 세균을 억제시킬 수 있는데, *B. longum* NCC2705의 serpin은 이들 단백질 분해작용의 공격에 대하여 아주 효과적인 방어력을 갖고 있다는 사실이 입증되었다(Ventura 등, 2007b).

비피도박테리아와 그 숙주가 상호 작용을 하는데 있어서 또 다른 중요한 기작은 이들 미생물이 생산하는 exopolysaccharides(EPS)에 의한 것이다. 비병원성 장내미생물들이 만들어내는 EPS의 역할에 대하여 밝혀진 것이 많지는 않지만, 아마도 장내 정착에 중요한 역할을 할 것으로 예측하고 있다(Ruas-Madiedo 등, 2006). *Bacteroides tetraiotamicron*은 최소한 8개의 서로 다른 capsular polysaccharides를 만들어 자신의 외형을 변화시킴으로써 숙주로부터 인식되어 공격받는 것을 피할 수 있다고 한다(Krinos 등, 2001). 비피도박테리아가 만드는 EPS에 대한 연구 결과에 의하면, *B. breve*와 *B. bifidum* 균주들은 세포벽과 연결된 rhamnose 함량이 높은 EPS를 생산하며(Nagaoka 등, 1994), *B. bifidum*에서 만들어지는 EPS의 성분은 glucose, ribose, galactose, rhamnose, chiroinositol 등이었다(You 등, 2004).

B. longum NCC2705의 유전체에는 다당류 합성과 관련된 유전자들이 두 부분에서 발견되는데, 공통적으로 양쪽에 insertion sequence(IS) elements 들을 가지고 있고, G+C 함량이 나머지 부분과 상당한 차이가 있다는 사실로부터, 이 균주

는 HGT(horizontal gene transfer, 수평적 유전자 전이)에 의하여 이 특정 유전자를 다른 미생물로부터 획득하였음을 알 수 있다(Schell 등, 2002). 또한, *B. breve* UCC2003과 *B. adolescentis* ATCC 15703의 유전체상에도 EPS 합성에 관여하는 유전자 영역을 발견하였으며, 이들 유전자는 모든 균주들에 모두 분포하는 것이 아니라 균주 특이적인 특성임이 밝혀졌다(Ventura 등, 2007a). 이러한 특징은 각 균주들이 장내 환경에 적응하는 과정에서 필요에 의하여 외부로부터 특정 유전자를 획득하였다는 사실을 암시한다.

4) 비피도박테리아와 스트레스에 대한 반응

비피도박테리아의 유전체 분석을 통하여 이 미생물들이 어떻게 GIT에 적응하여 왔는가를 잘 나타내 주는 또 다른 부분은 높은 온도, 낮은 pH, 삼투압의 변화와 같은 외부 스트레스에 대한 반응과 관련한 단백질들을 만드는 유전자들이다. 스트레스에 대응하는 기작에 대한 분자생물학적 접근과 이해는 상업용 균주의 선발과 개발에 있어서도 아주 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들어, 유산균 스타터로 개발되는 균주는 그 제조 공정 중에 겪게 되는 여러 가지 공정 상의 거친 조건에서 생존력의 문제없이 살아남아 유통기간을 통하여 높은 생균수를 유지할 수 있어야 한다. 또한, 생균제로서 또는 발효유의 형태로 섭취된 후에는 위의 낮은 pH 조건이나 소장의 담즙산 농도 조건을 견디고 대장까지 도달할 수 있어야만 그곳에 정착하여 probiotics로서의 역할을 할 수 있게 된다.

다른 미생물과 마찬가지로 비피도박테리아도 heat shock 과 같은 열악한 환경에 노출되었을 때, unfolded 또는 misfolded protein들의 축적에 의하여 입게 되는 손상으로부터 자신을 보호하기 위하여 많은 종류의 단백질을 만들게 된다. GroEL/GroES, DnaK, DnaJ, ClpB 등과 같이 분자 샤프론(molecular chaperone)으로서의 역할을 하는 이들 보호단백질들은 일반적으로 단백질이 합성된 후(post-translational), folding 단계에서 단백질의 변성을 막아주는 역할을 한다. *B. breve* UCC2003의 유전체를 살펴보면, 여러 종류의 분자 샤프론들이 전체 유전체에 걸쳐 골고루 분포하며, 때로는 여러 세트로 존재하면서 다양한 종류의 스트레스 상황에 맞게 선택적으로 발현되어 보호 작용을 하는 것으로 보여진다(Ventura 등, 2006b). 비피도박테리아의 유전체에는 다른 high G+C 그람 양성균인 *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*보다 적은 수의 유전자들이 분자 샤프론을 coding하는데, 이러한 사실은 비피도박테리아의 주요 서식처가 비교적 안정된 공간이라고 할 수 있는 온혈동물의 소화관으로서 온도의 변화에 대하여 반응하는 정교한 조절기작이 필요 없었기 때문이라고 이해할 수 있을 것이다(Ventura 등, 2006a).

그러나 이들이 주로 서식하고 있는 GIT 내부 조건이 식이의 조성 등에 따라 삼투압에 커다란 변화가 있기 때문에 비피도박테리아들은 삼투압이나 담즙산에 대한 스트레스로부터 자신을 보호할 수 있는 정교한 조절 기작을 갖도록 진화했을 것으로 추측된다(Sanchez 등, 2005).

비피도박테리아에서 유기산의 스트레스에 대한 반응에 대한 연구는 많이 진행되지 않았으나, pH의 변화에 반응하여 발현되는 유전자에 대한 관찰은 아주 중요하다고 할 수 있다(Ventura 등, 2004). 비피더스가 성장하면서 여러 종류의 유기산을 생산하기 때문에 발효 과정에서 이들 유기산들이 배지 내에 축적된다. 또한, 위의 낮은 산도는 구강으로 섭취된 probiotics 균주들이 이 열악한 조건에서 살아남아 대장까지 도달하기 위해서는 반드시 넘어야 할 상당히 큰 장벽의 하나라고 할 수 있다. 유기산들은 비피더스 균의 세포막을 쉽게 통과하여 세포내로 들어와서 해리되어 양성자를 유리시키기 때문에 세포질의 pH를 중성으로 유지하기 위해서는 이들 양성자를 중화시키거나 또는 세포 밖으로 풀어내는 것이 필요하다. 따라서, 비피도박테리아가 낮은 pH 조건에서 살아남기 위해서는 proton-translocating ATPase(F_1F_0 -ATPase)가 상당히 중요한 역할을 할 것으로 예상되며, 비피도박테리아에서 이들은 9개의 유전자로 구성된 *atp operon*을 가지고 있음이 밝혀졌다(Ventura 등, 2004). 이들 9개의 유전자가 만들어내는 효소들은 비피도박테리아가 산성 조건에서 성장하는데 반드시 필요하였으며, 다른 혐기성 미생물들에서도 낮은 pH 조건에 노출되면 F_1F_0 -ATPase의 활성이 증가한다는 보고와도 일치하였다(Koebmann 등, 2002).

5) 유전체학 연구와 미생물의 분류학

지난 10여 년간의 미생물 유전체 염기서열 분석의 결과로 가장 많은 발전을 보이고 있는 분야가 바로 미생물 분류학(taxonomy)이라고 할 수 있다. 현재 미생물의 동정은 genotyping과 phenotyping을 동시에 적용하는 방법에 의하여 실시하는 것이 일반화되어 있다. 1970년 이후 DNA-DNA hybridization 방법이 개발되어 미생물의 동정에 널리 이용되어 오고 있으며, 70% 이상의 DNA-DNA hybridization value 이상을 나타내면서 melting 온도가 5% 이내에서 차이가 있는 경우에 동일한 종(species)에 속하는 것으로 여긴다. 16S rRNA (*rm*) sequence는 모든 미생물에서 공통적으로 나타나는 conserved region과 특정 종이나 속에서만 나타나는 variable region을 동시에 가지고 있기 때문에 미생물의 분자생물학적 동정에 널리 이용되어 왔다. 일반적으로 16S *rm*의 염기서열이 97% 이상 동일할 경우에 같은 종에 속하는 것으로 간주하며, 이 값은 DNA-DNA hybridization 값이 70% 이상을 나타내는 경우에 해당한다(Vandamme 등, 1996).

미생물의 분류와 동정에 이용하기 위한 보다 분별력이

높은 probe를 개발하기 위한 많은 노력이 진행되어 왔으며, 비피도박테리아의 경우에도 여러 genome project들이 완료되면서 얻어지는 많은 새로운 염기 서열과 이들의 비교 분석을 통하여 16S rRNA 유전자와 비슷하거나 나은 정도의 유사성과 차이점을 보이는 유전자들이 많이 발견되고 있다. 일반적으로 housekeeping 유전자인 이들은 현재까지 *recA*, *tufA*, *atpD*, *groEL*, *dnaK*, *grpE*, *clpP*, 그리고 *hrcA* 등이 비피도박테리움의 분류에 성공적으로 이용될 수 있음이 입증되었다(Ventura 등, 2007a). 하나의 유전자에 근거하여 작성한 계통발생도(phylogenetic tree)는 HGT의 가능성, mutation의 발생 빈도, 서로 다른 recombination 비율 등의 이유에 의하여 정확한 계통발생학적 관계를 정확하게 나타내기에 무리가 있기 때문에 최근 들어, 여러 개의 유전자에 근거하여 supertree를 작성함으로써 보다 정확하고 분별력이 높은 미생물간의 진화론적 상호관련성을 밝힐 수 있다고 한다(Brown 등, 2001). 이러한 방법으로 비피도박테리아의 7개의 유전자를 동시에 비교하여 계통발생도를 작성할 수 있었으며, 이것은 하나의 유전자를 비교하여 작성한 것보다 변별력이 훨씬 높게 나타났다(Ventura 등, 2006b).

비피도박테리아의 종 특이적인 검출을 위하여 오랫동안 이용되어 오던 16S rRNA를 근거한 방법에 덧붙여 이들의 genome sequence의 분석을 통하여 보다 강력하고 특이성이 높은 새로운 검출방법을 개발할 수 있는 새로운 유전자 서열들이 많이 알려지고 있다. Gao와 Gupta(2006)은 *B. longum* NCC2705의 genome을 이용한 체계적인 BLAST search를 통하여 30개 이상의 strain-specific, 90개 이상의 species-specific, 70개 이상의 genus-specific한 단백질을 찾을 수 있었다. 이러한 단백질을 만드는 유전자에 근거하여 PCR primer들을 개발하고 FISH와 같은 분자생물학적인 기법에 접목함으로써, 서로 다른 환경에 존재하는 다양한 종류의 비피도박테리아에 대한 보다 정확한 *in situ* detection 방법을 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 이들의 연구에서 발견된 거의 모든 종류의 bifidobacterial genus-specific한 단백질들은 아직까지 그 기능이 밝혀지지 않은 것이 대부분이다. 이러한 단백질들은 비피도박테리아를 다른 박테리아로부터 구별할 수 있도록 하는 생화학적, 생리학적 특성을 부여할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 향후에 진행되어야 할 아주 중요한 연구분야의 하나는 바로 이러한 비피도박테리아에만 특이적으로 존재하는 단백질들의 실제적인 기능을 밝혀내는 것이며, 그 결과 이들 박테리아가 소화관내에서 작용하는 probiotics 효능들도 하나씩 알아낼 수 있을 것이다.

6) 비피도박테리아의 동정과 검출을 위한 새로운 기술들

비피도박테리아의 분리 동정과 다양한 환경에서의 검출을 위한 새로운 molecular marker들과 특정 유전자의 응용은

유전체학과 연결된 비피도박테리아의 연구에서 주목 받는 분야 중의 하나가 될 것이다. 장내의 환경에서와 같이 다양한 미생물들과 함께 섞여 있는 비피도박테리아를 계수하기 위한 전통적인 방법에서는 우선 선택배지를 이용하여 배양한 후에 이곳에서 자란 균락을 수와 각 균락에 대한 동정 작업을 하는 것이 일반적이었다. 그러나 사람의 장내에 분포하는 미생물 중에서 실제로 배양을 통해서 키울 수 없는 종류도 많이 존재하고 있다는 사실을 알고 난 후부터는 DNA에 근거한 접근을 통하여 보다 정확한 정량적, 정성적 분석을 하게 되었다.

Fluorescence *in situ* hybridization(FISH)는 대표적인 culture-independent한 방법으로서 16S rRNA 염기서열에 근거한 oligonucleotide probe들을 이용하여 여러 종류 미생물과 함께 섞여있는 장내 균총으로부터 특정 비피도박테리아를 검출하는데 이용될 수 있는 방법이다. Lay 등(2005)은 FISH 기법을 이용하여 성인의 분변을 분석한 결과, 전체 균총 중에 비피도박테리아가 4.4%를 차지하고 있다고 보고하였다.

Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)와 temperature gradient gel electrophoresis(TGGE)를 이용하거나, 또는 이들을 함께 접목시킨 기법을 이용하여 개인별 장내 균총의 차이 또는 장내의 위치에 따른 균총의 차이를 확인하는데 널리 이용되는 신속한 방법 중의 하나이다. 다양한 미생물이 혼합되어 있는 시료의 전체 16S rRNA sequence를 PCR 증폭을 시킨 후에 혼합되어 있는 PCR products들이 종 특이적인 melting 양상을 보이는 특성을 이용하여 서로를 구별하는 이 방법을 이용하여 성인과 유아의 장내 균총에서 비피도박테리아의 분포의 특성을 분석한 결과, 성인은 *B. adolescentis*, *B. longum* bv. *longum*, *B. catenulatum*이 우점하고 유아에서는 *B. breve*와 *B. longum* bv. *infantis*가 하는 것으로 분석되었다(Satokari 등, 2001).

또, 다른 장내 균총 분석방법으로는 terminal restriction fragment length polymorphism(T-RFLP)가 있으며, 사람의 장내 비피도박테리아의 조성을 분석하는데 아주 유용하게 이용될 수 있음이 확인되었다(Sakamoto 등, 2003).

DNA-microarray 기술도 상당히 빠른 속도로 발전하고 있는 신속하고 정확한 균총 분석 방법의 하나이다. 일반적으로 16S rRNA 유전자에 근거하여 strain-, species-, genus-특이성이 있는 수 백 개의 oligonucleotide probe 들을 이용하여 한 번에 assay로 다양한 균총의 분석이 가능하다.

결론

DNA 분석에 대한 대용량 동시 처리기술의 개발로 미생물에서 포유동물에 이르기까지 다양한 생명체의 유전체 염기서열에 대한 정보가 쏟아져 나오고 있다. 유전체학의 최

중 목표는 이렇게 얻어진 다양한 정보들을 bioinformatics나 functional genomics 등을 통하여 실제 생명체 내에서 수행되는 기능과 관련된 정보로의 번역에 있다고 할 수 있다. 장내 미생물들에 대한 유전체학은 불과 몇 년 전에 시작되었으나, 벌써 미생물과 숙주와의 상호작용, 그리고 장내 미생물의 장내 건강 증진 효과 등에 관여하는지에 대한 연구에 관심을 가지고 진행되고 상황이다. 그러나, 비피도박테리아에 대한 유전체학 연구는 이제 시작단계에 머물고 있으며, 실제로 sequencing이 완료된 균주들은 산업적으로 중요한 일부 균주들에 대해서만 초점이 맞추어졌었기 때문에 전체 비피도박테리아의 다양성을 대표하기에는 아직 부족함이 많으며, 보다 다양한 균주들에 대한 유전체 연구가 완료될 때에 비로소 비피도박테리아 전체로서 가지는 특성과 능력에 대한 일반화된 결론에 도달할 수 있을 것이다.

다른 세균들과 마찬가지로 비피도박테리아를 포함하는 장내 세균들도 그들의 숙주(사람 또는 동물)와 함께 공존하며 살아가는 능력이 아주 중요하며, 이를 위해서는 숙주 체내에 침입한 병원성 미생물을 제거하기 위하여 가지고 있는 다양한 방어 기작을 피하여 살아남는 것이 필수적이라고 할 수 있다. 이러한 관점에서, 사람의 면역체계가 어떻게 체내에서 유해 미생물과 유용 미생물을 구별하는가에 대한 연구는 아주 흥미롭고 의미 있는 분야가 될 것이다.

Post-genomics 시대의 도래와 함께 앞으로 진행될 비피도박테리아의 장내 행동에 대한 분자생물학적 연구들은 지금 까지 우리들이 경험하지 못한 새로운 연구 분야를 개척해 줄 것이며, 나아가 특정 비피도박테리아 균주가 어떻게 인체의 장내 건강 증진효과에 도움을 주는가에 대한 보다 체계적이고 견고한 과학적 이해의 기반을 우리들에게 제공해 줄 것으로 기대가 된다.

참고문헌

1. Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourie, B., Brouns, F. and Bornet, F. R. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, dose response relation study. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1658-1664.
2. Brown, J. R., Douady, C. J., Italia, M. J., Marshall, W. E. and Stanhope, M. J. 2001. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nature Genetics* 28: 281-285.
3. Corfield, M. S., Wagner, S. A., Clamp, J. R., Kriaris, M. S. and Hoskins, L. C. 1992. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminase lyase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect. Immun.* 60:3971-3978.
4. Gao, B. and Gupta, R. S. 2006. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:69-91.
5. Hinz, S. W., Pastink, M. I., van den Broek, L. A., Vincken, J. P. and Voragen, A. G. 2005. *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberates galactotriose from type I galactans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5501-5510.
6. Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M. Delley, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S. and Arigoni, F. 2006. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J. Biol. Chem.* 281:17246-17252.
7. Klijn, A., Mercenier, A. and Arigoni, F. 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 491-509.
8. Koebmann, B. J., Solem, C., Pedersen, M. B., Nilsson, D. and Jensen, P. R. 2002. Expression of genes encoding F1-ATPase results in uncoupling of glycolysis from biomass production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4274-4282.
9. Krinos, C. M., Coyne, M. J., Weinacht, K. G., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L. and Comstock, L. E. 2001. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 414:555-558.
10. Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. and Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20:699-722.
11. Lay, C., Sutren, M., Rochet, V., Saunier, K., Dore, J. and Rigottier-Gois, L. 2005. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ. Microbiol.* 7:933-946.
12. Lecuit, M., Vandormael-Pourmin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. and Cossart, P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-1725.
13. Liepke, C., Adermann, K., Raida, M., Magert, H. J., Forssmann, W. G. and Zucht, H. D. 2002. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur. J. Biochem.* 269:712-718.
14. Lindner, J. D. D., Canchaya, C., Zhang, Z., Neviani, E., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. and Ventura, M. 2007. Exploiting *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis

- of stress response. *Int. J. Food Microbiol.* 120:13-24.
15. MacConaill, L. E., Fitzgerald, G. F. and Van Sinderen, D. 2003. Investigation of protein export in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6994-7001.
 16. Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T., Mori, Y. 1994. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol. Pharm. Bull.* 17:1012-1017.
 17. Onishi, N. and Tanaka, T. 1997. Purification and characterization of galactooligosaccharide-producing beta-galactosidase from *Sirobasidium magnum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:82-86.
 18. Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C. G. and Salminen, S. 2006. Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from "viili" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J. Dairy Sci.* 89:2355-2358.
 19. Ryan, S. M., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. 2005. Transcriptional regulation and characterization of a novel beta-fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3475-3482.
 20. Ryan, S. M., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. 2006. Screening and identification of starch, amylopectin and pullulan degrading activities in bifidobacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5289-5296.
 21. Sakamoto, M., Hayashi, H. and Benno, Y. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol. Immunol.* 47:133-142.
 22. Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M. and de Vos, W. M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:504-513.
 23. Sanchez, B., Champomier-Verges, M. C., Anglade, P., Baraige, F., de Los Reyes-Gavilan, C. G., Margolles, A. and Zagorec, M. 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J. Bacteriol.* 187:5799-5808.
 24. Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M. and Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:14422-14427.
 25. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
 26. Ventura, M., Canchaya, C., Zink, R., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. 2004. Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6197-6209.
 27. Ventura, M., Canchaya, C., Del Casale, A., Dellaglio, F., Neviani, E., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. 2006a. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2783-2792.
 28. Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D. 2006b. How high GC Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:734-759.
 29. Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G. F., Gupta, R. S., and van Sinderen, D. 2007a. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 91:351-372.
 30. Ventura, M., O'Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J. A., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. 2007b. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 120:2-12.
 31. Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P., Petocz and Peter 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:510-515.
 32. Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., and German, J. B. 2006. *In vitro* fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4497-4499.
 33. You, H. J., Oh, D. K. and Ji, G. E. 2004. Anticarcinogenic effect of a novel chiroinonitol-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS Microbiol. Lett.* 240:131-136.
 34. Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E. and de Vos, W. M. 2006. A microbial world within us. *Mol. Microbiol.* 59:1639-1650.