

## 고온충격에 의한 *Bifidobacterium infantis* KTCT 3368의 생리적 특성 변화

조인식 · 한수민 · 문용일<sup>1</sup> · 오세종

전남대학교 동물자원학부, <sup>1</sup>우석대학교 동물건강관리학과

### 서 론

유산균은 다른 미생물과 같이 다양한 stress를 받으면서 성장하기 때문에 영양소 부족, 산 생성, 온도, 삼투압, 압력 등과 같은 자연적 혹은 환경적 스트레스에 적응해야 한다. 이러한 stress 적응과 관련된 일련의 단백질이 발현되지만 환경 변화에 대한 유산균의 적응기작에 관해서는 현재까지도 세계 각국에서 연구 중에 있다.(Guchte 등, 2002)

*Bifidobacterium*은 1899년 Tissier에 의해 유아의 분변에서 처음으로 분리된 이래 현재 *Bifidobacterium* 속에는 28종이 있으며, 이 중 *B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. longum*의 5종은 발효유 산업에 유용한 균주로 이용되고 있다. *Bifidobacterium*은 그람 양성 편성 혐기성 간균으로 Y, V, 곤봉 등의 다양한 형을 나타내며 이러한 배양 형태는 배양 조건의 영향을 많이 받는다. 때문에 probiotics로써 산업적으로 대량 생산에 이용하기 위해서는 생산 및 저장 중에 사멸의 수를 최소화하는 것이 매우 중요하다. 즉, probiotics의 효능은 생존율에 큰 영향을 받는다고 할 수 있고 probiotics가 효과적이기 위해서는 여러 환경에서 활력이 유지되어야 한다. 특히 분말, 과립, 정, 액상, pellet, spray 등 여러 가지 형태로 가공하였을 때 생존율이 높게 유지되어야 한다.

결국 생균제를 생산, 저장, 혼합 시 안정성을 지속할 수 있는 방법을 연구 개발하여야 하기 때문에 고온 충격에 의한 유산균의 생리적 변화를 우선적으로 규명해야 할 필요가 있으며, 이는 유산균의 생리적 작용 기전의 확실한 이해없이 생존성을 낮추는 요인을 제거하기 어렵고, 동시에 효과를 극대화 할 수 없기 때문이다.

때문에 본 연구에서는 발효식품과 기능성 건강식품 산업에 널리 이용될 수 있는 *Bifidobacterium*을 확보하고 이들의 성장 온도 변화에 따른 적응 반응에 관한 기초지식을 확보함으로써 발효 식품, 사료첨가제, 기능성 식품, 나아가 의약품으로서 적합한 유산균 개발의 가능성을 향상시키고자 한다.

### 실험 방법 및 재료

#### 1. 사용 균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주는 *Bifidobacterium infantis* KTCT 3368를 분양받아 사용하였으며, 균주 보존을 위해 BL 배지를 사용하여 37°C, 혐기적 상태에서 2회 계대 배양한 후, 원심분리 (3000×g, 20min)한 다음 cell pellet에 skim milk(10%), lactose(2%), yeast extract(0.3%)가 함유된 배지를 제조하여 혼합하여 vial에 1ml씩 분주하여 동결건조하고 -80°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

## 2. 배양 온도에 따른 *B. infantis* KTCT 3368의 활성

배양 온도에 따른 *B. infantis* KTCT 3368의 생균수 차이를 조사하기 위해 BL 배지에  $10^7$  CFU/mL 수준이 되도록 접종한 후 paragin oil로 혐기적 상태를 만들어준 다음 37°C, 40°C, 43°C 그리고 46°C에서 배양하면서 생균수 및 배양액의 pH를 측정하였다. 생균수는 혐기성 희석액 (1L을 기준으로 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g, L-cysteine 0.5g, Tween 80 0.5g)에 연속 십진 희석하여 BL 한천배지에 접종하여 37°C에서 혐기적 상태로 2일간 배양한 후 한천 평판 배지에 형성된 균락을 측정하였다.

## 3. Heat Shock Stress 에 의한 고온 내성 증진 효과

고온 배양시 생존율의 증진 효과를 조사하기 위하여 46°C 항온수조에서 20분간 heat shock stress을 가한 다음 *B. infantis* KTCT 3368을 37°C에서 6시간 동안 배양한 후 배양 온도를 50°C, 53°C, 56°C로 높인 후 연속 십진 희석하여 BL 한천배지에 접종하여 37°C에서 2일간 혐기적 상태에서 배양한 다음 한천 평판 배지에 형성된 균락을 측정하였다.

## 4. Cold Shock Stress 에 의한 저온 내성 증진 효과

저온 배양시 생존율 증진 효과를 조사하기 위해서 37°C에서 16시간 배양한 후, 37°C, 25°C에서 각각 20시간 배양하여 5시간 마다 생균수의 변화를 측정하였다. 또한 냉동 내성은 37°C에서 16시간 배양한 후, 37°C, 25°C에서 각각 10시간 배양한 다음, 각 온도에서 배양된 배양액 100μL를 9.9mL의 생리식염수에 접종하여 -24°C에서 24시간동안 냉동 후 37°C에서 10분간 해동하여 생균수를 측정하였으며, 생존율(%)은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{Log no. of viable cells after freezing-thawing}}{\text{Log no. of initial viable cells}}$$

## 5. β-Galactosidase 활성

BL배지에서 생장온도 변화에 따른 *B. infantis* KTCT 3368의 β-galactosidase 활성은 Miller(1972)의 방법을 개선하여 시행하였다. 각 온도에서 배양된 배양액을 4000 rpm에서 10분간 상온에서 원심분리하여 균체를 회수한 후 완충용액(30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0)으로 두 번 세척한 다음 1 mL의 현탁액으로 만들었다. 50μL의 0.1%(w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS)와 두 방울의 chloroform을 현탁액에 첨가한 다음 5초 동안 혼합하고 37°C에서 5분간 방치하였다. 200μL의

o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside(ONPG) 용액(4 mg/mL in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0)을 첨가한 다음 37°C에서 반응시켜 노란색이 나타나면 이 때의 반응시간을 기록하고 500 $\mu$ L의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣어 반응을 중지시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 4°C에서 원심 분리하여 세포를 제거하고 420 nm에서 흡광도 (UV-Visible spectrophotometer UV-1601, Shimadzu Co., Japan)를 측정하였다.  $\beta$ -galactosidase 활성은 아래와 같이 계산하였다

$$\beta\text{-galactosidase activity(Units/ml)} = \frac{1,000 \times A_{420}}{V \times T \times A_{600}}$$

A420 : 420nm에서 흡광도

A600 : 600nm에서 V흡광도

V : 배양액의 초 부피(ml)

t : 활성 측정에 소요된 반응시간 (min.)

## 6. 세포질 단백질의 추출

*B. infantis* KTCT 3368의 세포질 단백질은 한(2005)과 Giard 등(2001)의 방법을 변형하여 다음과 같이 추출하였다. 상기 조건으로 heat shock stress를 가한 후 *Bifidobacterium infantis* 배양액을 원심분리(4,000  $\times$  g, 15min, 4°C)하여 세포를 회수하여 멸균된 생리식염수로 2회 세척하였다. 여기에 lysozyme이 함유된 100mM tris buffer를 첨가하고 glass beads(10<sup>6</sup> microns acid washed, Sigma)를 넣은 후에 교반하여 세포벽을 파쇄하였다. 여기에 4배 부피의 cold acetone을 첨가하여 20분간 4°C에서 정치시킨 후 원심분리(13000 $\times$ g, 20 min, 4°C)하여 침전된 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질에 8 M urea를 첨가하여 -80°C에 보관하면서 전기영동을 위한 사료로 사용하였다.

## 7. SDS-PAGE

전기영동은 상기 방법으로 추출된 *B. infantis* KTCT 3368의 세포질 단백질 성분을 tricine이 첨가된 8~16% gradient gel을 제조하여 125V(constant), 80mA의 조건으로 60분간 수행하였다. 전기 영동 후 coomassie Brilliant Blue G-250 staining 용액으로 염색 후 탈색하여 molecular weight marker(Bio-Rad Co. USA)와 비교하여 분자량을 계산하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 1. 배양 온도에 따른 *B. infantis* KTCT 3368의 활성

Fig. 1은 배양 온도에 따른 *B. infantis* KTCT 3368의 생균수와 pH의 변화를 조사하기 위해 BL 배지에 10<sup>7</sup> CFU/mL 수준이 되도록 접종한 후 37°C, 40°C, 43°C 그리고 46°C에서 배양하면서 생균수 및 배양액의 pH를 측정하였다. 37°C와 40°C 배양의 경우, *B. infantis* KTCT 3368의 생균수는 배양 12시간에 가장 높은 생균수를 나타내었고 43°C 배양의 경우에는 8시간에 최고의 생균수를 나타내었다. 그러나 46°C 배양의 경우, *B. infantis* KTCT 3368는 성장하지 못하고 계속 사멸하여 20시간에는 완전히 사멸하는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 46°C을 제외하고 큰 유의차는 없었지만 온도가 올라갈수록 빠른 성장을 하는 것을 알 수 있었다.

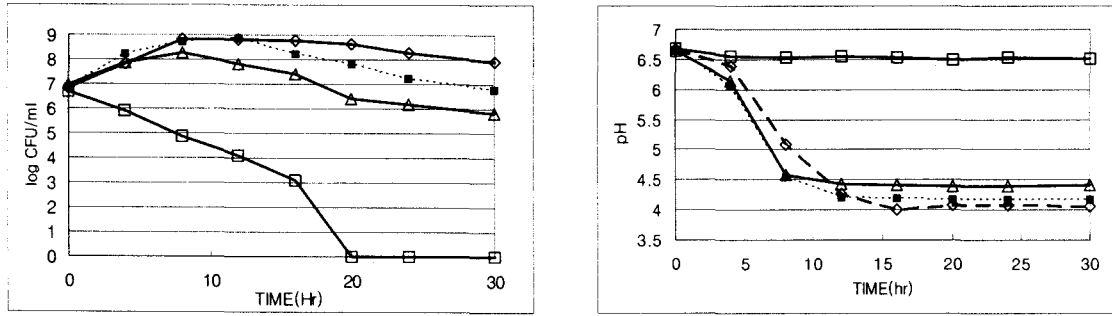


Fig. 1. Changes of viable cells and pH of *B. infantis* KTCT 3368 in BL medium at 37°C, 40°C, 42°C and 46°C incubation. -◇-, 37°C; -■-, 40°C; -△-, 42°C; -□-, 46°C.

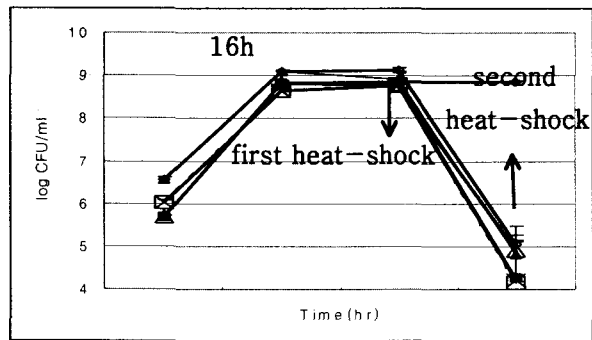


Fig. 2. Survival of heat-shocked *B. infantis* KTCT 3368 in BL medium at 50°C, 53°C and 56°C incubation.

-◇-, 37°C; -■-, 50°C control; -△-, 50°C sample; -×-, 53°C control; -□-, 53°C sample; -◇-, 56°C control; -▲-, 56°C sample.

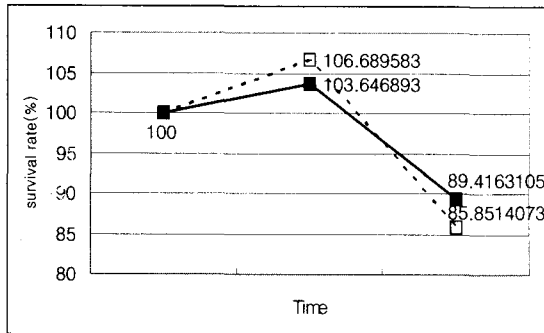


Fig. 3. Survival of cold-shocked *B. infantis* KTCT 3368 in BL medium at -20°C.

-□-, 37°C for 10h; -■-, 25°C for 10h.

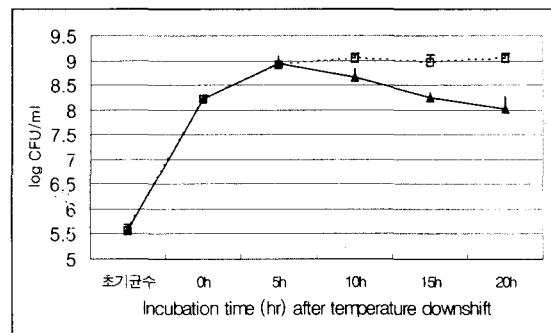


Fig. 4. Change of viability of cold-shocked *B. infantis* KTCT 3368 in BL medium.

-▲-, 37°C; -□-, 25°C.

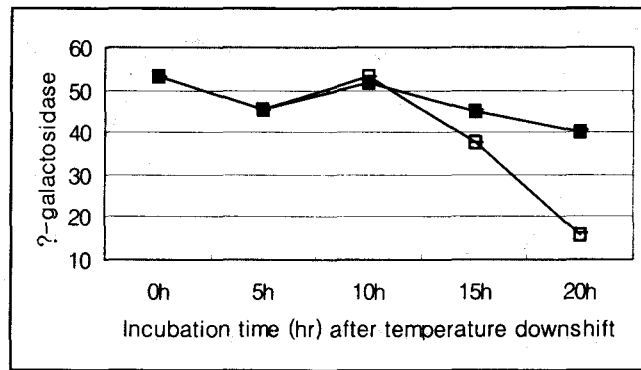


Fig. 5. Change of  $\beta$ -galactosidase activity of *B. infantis* KTCT 3368 in BL medium. -■-, 37°C; -□-, 25°C.

## 2. Heat Shock Stress 에 의한 고온 내성 증진 효과

고온 충격에 의한 생존율의 증진 효과를 조사하기 위하여 46°C 항온수조에서 20분간 heat shock stress을 가한 다음 *B. infantis* KTCT 3368을 37°C에서 6시간 동안 배양한 후 배양 온도를 50°C, 53°C, 56°C로 높인 후 연속 십진 희석하여 BL 한천배지에 접종하여 37°C에서 2일간 혐기적 상태에서 배양한 후 한천 평판 배지에 형성된 균락을 측정하였다.

## 3. Cold Shock Stress 에 의한 저온 내성 증진 효과

*B. infantis* KTCT 3368 균주를 대수생장기에 temperature downshift하고 10시간 배양한 다음 24시간 동결 후 해동하여 생균수를 측정하였다(Fig. 3). Fig. 3에 나타난 바와 같이 동결 전에는 3% 정도 낮은 25°C 실험군이 해동 후 4% 높은 생균수를 보였다.

또한 *B. infantis* KTCT 3368을 37°C에서 배양하면서 성장단계별로 배양온도를 37°C에서 25°C로 낮춘 후 생균수의 변화를 측정하였다(Fig. 4). 배양 16시간(대수 성장기) 후 배양 온도를 낮추었을 때 37°C 배양의 경우 배양 5시간에 최대의 생균수를 나타냈으나, 배양시간이 증가함에 따라 생균수는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 25°C로 temperature downshift한 실험군은 배양 5시간에 증가하여 계속 같은 수준의 생균수를 보였다.

## 4. $\beta$ -Galactosidase 활성

*B. infantis* KTCT 3368을 37°C에서 배양하면서 성장단계별로 배양온도를 37°C에서 25°C로 낮춘 후 유당 분해효소의 활성을 실험하였다(Fig. 5). 배양 16시간(대수 성장기) 후 배양 온도를 25°C로 temperature downshift한 경우 저온충격 10시간이후 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

## 참고 문헌

1. Fuller, R. Probiotics, The scientific basis. Published by Chapman & Hall, 2~6 boundary Row, London(1992).

2. Miller, J. J. 1972. Assay of  $\beta$ -galactosidase, pp.352-356. In *Experiments in Molecular Genetics*. Cold spring Harbor, New York, NY.
3. Giard, J. -C., Laplace, J. -M., Rince, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeuf, C., Flahaut, S., Auffray, Y., and Hartke, A. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis*. 22:2947-2954 (2001).
4. 김주현, 박미경, 김승철, 윤현식, 소재성. *Lactobacillus fermentum* KLB12의 열 전처리에 따른 열 스트레스 내성 증진 및 프로테오믹의 변화. 한국생물공학회지. 18:294-300(2003).
5. 문용일, 한수민, 박동준, 김광현, 지연태, 오세중. Heat shock stress에 의한 *Lactobacillus acidophilus* 30SC의 생리적 특징. 한국축산식품학회지 25(3): 350-356(2005).