

한국인 분변에서 분리한 *Bifidobacteria*의 탈지유에서의 배양특성

진 효 상

전주대학교 생명과학부

Growth in Skim Milk of the *Bifidobacteria* Isolated from Korean Feces. Hyo-Sang Jin. School of Life Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea - Wild strains of bifidobacteria isolated from Korean feces were tested for their growth and acid production abilities in 10% skim milk. Growth of bifidobacteria was markedly decreased from the second transfer in the skim milk culture. When two strains, BF5 and BF33, were grown in skim milk with various supplements, the growth was enhanced by supplementation of 0.5% yeast extract, and 0.05% cysteine but not by short chain fatty acids. There was no enhancing effect of CO₂ substitution in the fermentor on growth. The viable cell counts of bifidobacteria, BF5 and BF33, were 9.76 and 9.98 logCFU/ml, respectively, after 30 hr cultivation and were diminished by 3 and 6 logs during storage at 5°C for 12 days.

비피더스 균(bifidobacteria)은 사람의 대장에 서식하는 그람 양성균의 혐기성 세균이다(1). 이 균은 특히 모유를 먹는 유아의 장에 우점하여 92% 이상을 차지하다가 이유를 거치면서 종류와 수가 변화되기는 하지만 노년 때까지 대장의 주요 세균으로 남게 된다(2). 이 균은 대장에서 병원성균의 생육과 암의 발생을 억제하고(3, 4), 설사, 변비 등의 장질환을 예방 또는 치료하는 등(5, 6)의 건강에 이로운 효과를 나타내는 것으로 알려져 근래에는 유산균과 함께 발효유, 건조균체 등의 형태에 의한 섭취가 증가하고 있다.

그러나 비피더스 균은 Mayer에 의해 최초로 유아식의 제조에 이용된 1949년 이후부터 여러 연구자들에 의해 낙농제품 등에도 이용될 수 있음이 확인 되었지만 유산균에 비해 낙농제품에 이용되는 예가 더 적었는데, 그 이유는 미호기성 균인 유산균에 비하여 혐기성인 비피더스 균은 배양 및 산도형성에 더 긴 시간이 소요되고, 더 엄격한 무균조작과 더 많은 양의 종균배양액을 요구하며, 낮은 산도에서 균이 더 신속하게 사멸될 뿐만 아니라, 보통의 조건으로는 우유에서 배양이 어려운 이유 등 때문이라고 볼 수 있다(1). 예를들어 비피더스 균은 영양성분의 보충없이 탈지유에서 연속적인 계대배양이 안되는 것으로 보고된 바 있고(7), 그간 비피더스균은 단독으로 배양되기 보다는 흔히 BAT(*bifidus*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*)의 혼합형태로 이용되어져 왔다.

따라서 본 연구에서는 한국형 비피더스 균들의 개발 추세에 따라 한국인의 분변에서 분리한 비피더스 균들이 탈지유에서 어떠한 배양특성을 나타내는지 살펴보고

각종 성분들의 생육촉진효과에 대하여 실험하였다.

재료 및 방법

분변시료의 처리

Balmer와 Wharton의 방법(8)을 변형하여 처리하였다. 건강한 성인 남녀 7인과 모유영양아 1인 우유영양아 1인 포함 9인으로 부터 막 배출된 분변을 받아 CO₂ 가스로 사전에 환원시킨, 10%의 glycerol, 0.05%의 cysteine 과 1 mg/L의 resazurin을 함유한 Brain heart infusion (BHI, Difco)배지에 현탁시키고 mineral oil을 가하여 기름막을 형성시킨 후 -60°C의 냉동고에 보존하였다. 시료는 배출된 때로부터 1시간 이내에 냉동고에 보관되도록 신속히 처리하고 냉동보존된 시료는 산화되어 분홍색으로 변화되지 않은 것만을 사용하였다.

비피더스 균의 분리 및 동정

실온에서 서서히 용해시킨 냉동보존된 시료를 CO₂ 가스로 사전 환원된 희석액(9)에 희석한 다음 10⁻³-10⁻⁵의 희석액 25 µl씩을 bromocresol green과 kanamycin을 함유하고 pH를 7.4로 조정된 Tomato juice agar(Difco)에 도말하고(9), 10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂의 혼합가스로 충전하고 palladium 촉매를 넣은 anaerobic jar (Difco)에서 37°C, 3일 동안 배양하였다.

생성된 단일 집락 중에서 균락이 녹색을 띠는 것들을 Lactobacillus MRS(Difco) soft agar에 stab하고 CO₂ 가스하에서 1-3일 동안 배양한 다음 5°C에서 보존하며 동정 및 배양에 사용하였다. 분리한 균은 Mitsuoka의 방법(10)에 따라 Gram stain morphology, aerobic growth test와 발효산물 중 초산생성 비율을 HPLC에 의해 확인

*Corresponding author

Tel. 82-652-220-2326, Fax. 82-652-220-2341

Key words: *Bifidobacteria*, Korean feces, Growth

하는 외에 효소법(11)에 의하여 fructose-6-phosphate phosphoketolase(F6PPK; EC 4.1.2.22)의 역가를 지니는 것을 *Bifidobacterium* species로 간주하였다.

탈지유에서의 배양 및 산도 측정

탈지분유(서울우유) 10% 용액을 고무마개가 달린 anaerobic tube에 10 ml씩 넣고 멸균한 것에 MRS broth에 24시간 동안 배양하고 흡광도를 1.5(660 nm)로 조정된 *Bifidobacterium* seed culture를 2% 접종하고 37°C에서 배양하였다. 계대배양의 경우에는 배양액을 진탕하여 균질화시킨 다음 피펫으로 취하여 2%를 접종하고 혐기적 조건의 경우에는 접종 후 CO₂가스를 취입하였다. 배양액의 산도는 배양액에 동량의 물을 가한 다음 진탕하여 비이커에 옮기고 0.5% phenolphthalein을 2-3 방울 가한 후에 0.1N NaOH를 적가하여 변색점까지 가해진 NaOH용액의 양으로 부터 당량의 유산 %로 환산하였다.

탈지유 배양액에서의 생균수 측정

배양액을 사전에 CO₂가스로 환원시킨 완충능력을 지닌 희석액(10)에 희석하고 적정 희석액을 MRS agar plate에 도말하고 비피더스 균의 분리에서와 같은 혐기적 조건으로 배양하여 나타난 colony 수로부터 배양액 1 ml중의 생균수를 계산하였다.

결과 및 고찰

비피더스 균의 분리 및 탈지유에서의 배양적성

성인 7인으로부터 비피더스 균의 특성을 나타내는 colony 중 형태와 색이 달라 보이는 것들을 42주, 2인의 유아로부터는 16주, 총 58주를 분리하였다. 이중 gas를

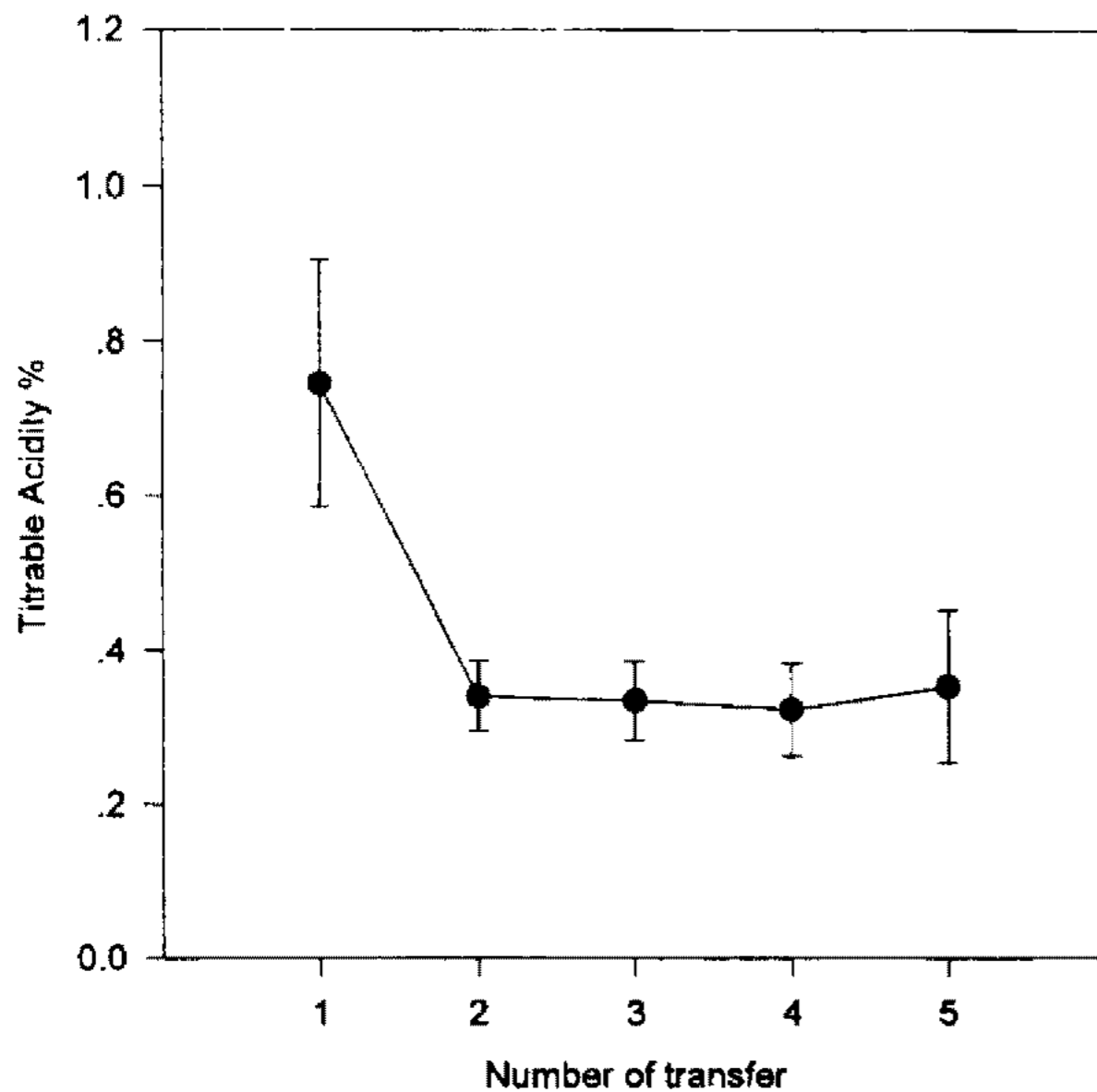


Fig. 1. Changes of titrable acidity in serially transferred skim milk cultures of bifidobacteria.

형성하거나 동정에서 의심되는 성인의 4주 유아의 6주를 제외한 나머지 48주를 각각 탈지유에 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 이 배양액을 새로운 탈지유배지에 2%씩 접종하는 방식으로 5회 연속 접종하여 배양하고 생성되는 산도로 각 배양액의 균체생육을 비교하였을 때, 전반적으로 생육은 두번째의 배양액부터 크게 감소하였다 (Fig. 1). 이러한 결과는 *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* 등을 12%의 탈지분유액에 계대하여 배양하였을 때, 두번째의 계대배양에서 부터 산도가 크게 감소되어 생육이 크게 떨어지는 것으로 보고한 Collins와 Hall(7)의 결과와 유사하였다.

각종 성분 보강의 효과

Collins와 Hall(7)은 탈지유에서 계대접종 배양액의 산도가 떨어지는데 반하여 첫번째 배양액의 산도가 높게 나타나는 이유는 seed culture에 포함된 MRS의 성분 때문이라고 보았다. 따라서 탈지유에 여러가지 영양 성분을 첨가하고 그 영향을 측정하였다. 이를 위하여 유아로부터 분리한 균들 중 한 strain인 *Bifidobacterium* sp. BF5와 성인으로부터 분리한 균들 중 한 strain인 *Bifidobacterium* sp. BF33을 선택하고 이들을 대상으로 여러 가지 영양물을 보충한 탈지유 배지에 3회 연속 계대접종하고 각 배양액의 산도를 비교하여 영양물 보충의 효과를 보았을 때 그 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같았다. BF5는 0.5% yeast extract, 0.5% MRS, 1/4 역가의 liver 등의 영양물들에 의해 산도가 증가되었으며 그 증가

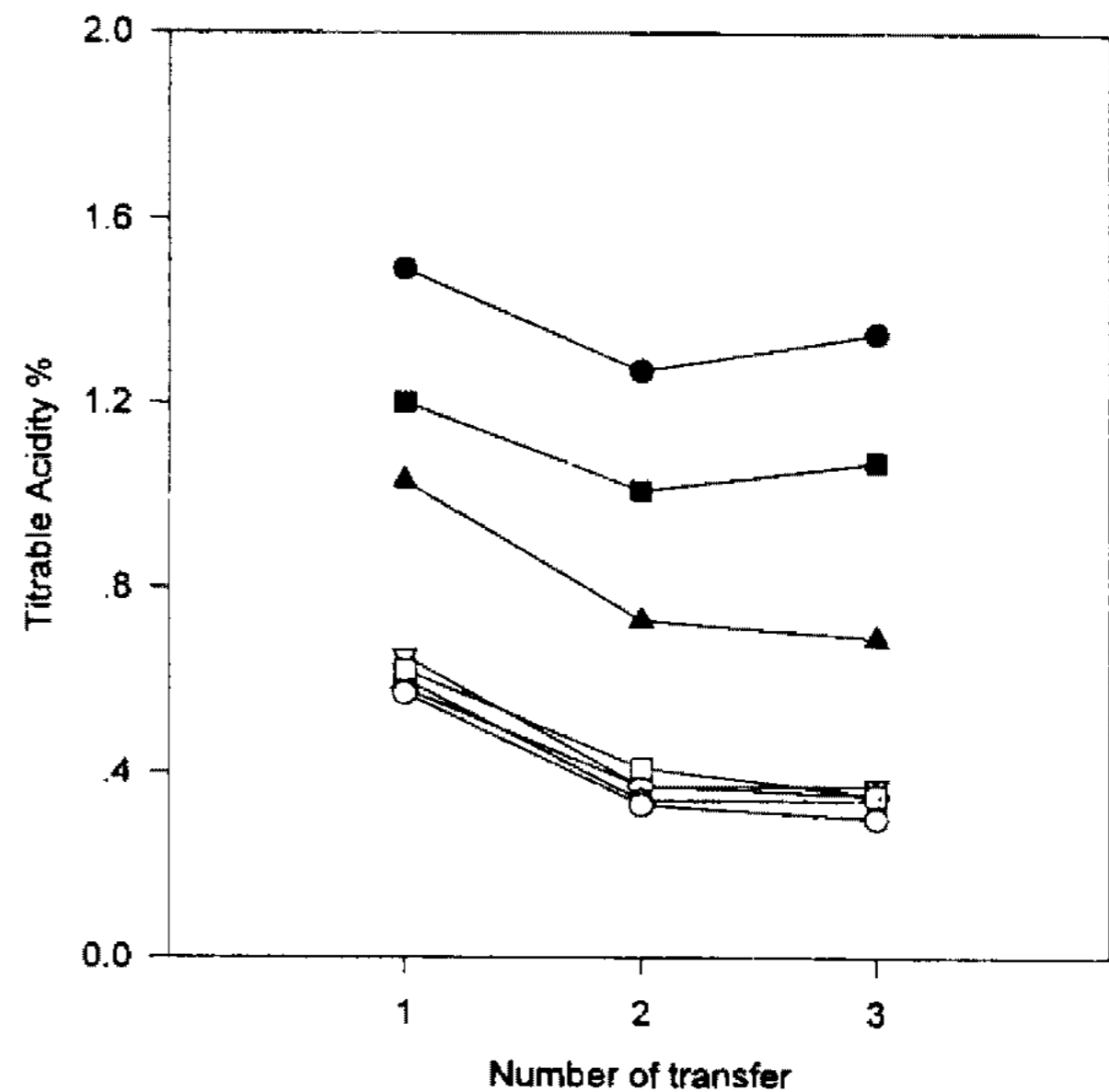


Fig. 2. Effect of nutrient supplementation on titrable acidity in skim milk cultures of *Bifidobacterium* sp. BF5.

●—● yeast extract 0.5%, ■—■ MRS 0.5%, ▲—▲ liver quarter strength, ▽—▽ (hemin+menadione) sol. 1%, ◇—◇ malt extract 0.5%, ○—○ glycerol 0.1%, ○—○ glucose 1%, □—□ control.

의 효과는 yeast extract, MRS, liver의 순이었다. 그러나 (hemin+menadione)의 1%용액, 0.5% malt extract, 0.1% glycerol, 1% glucose 등에 의하여는 증가되지 않았다. BF33 strain도 BF5 strain의 경우와 비슷하였으나, BF5에서는 산도증가의 효과가 yeast extract, MRS, liver간에 차이가 나타남 데 반하여 BF33에서는 이러한

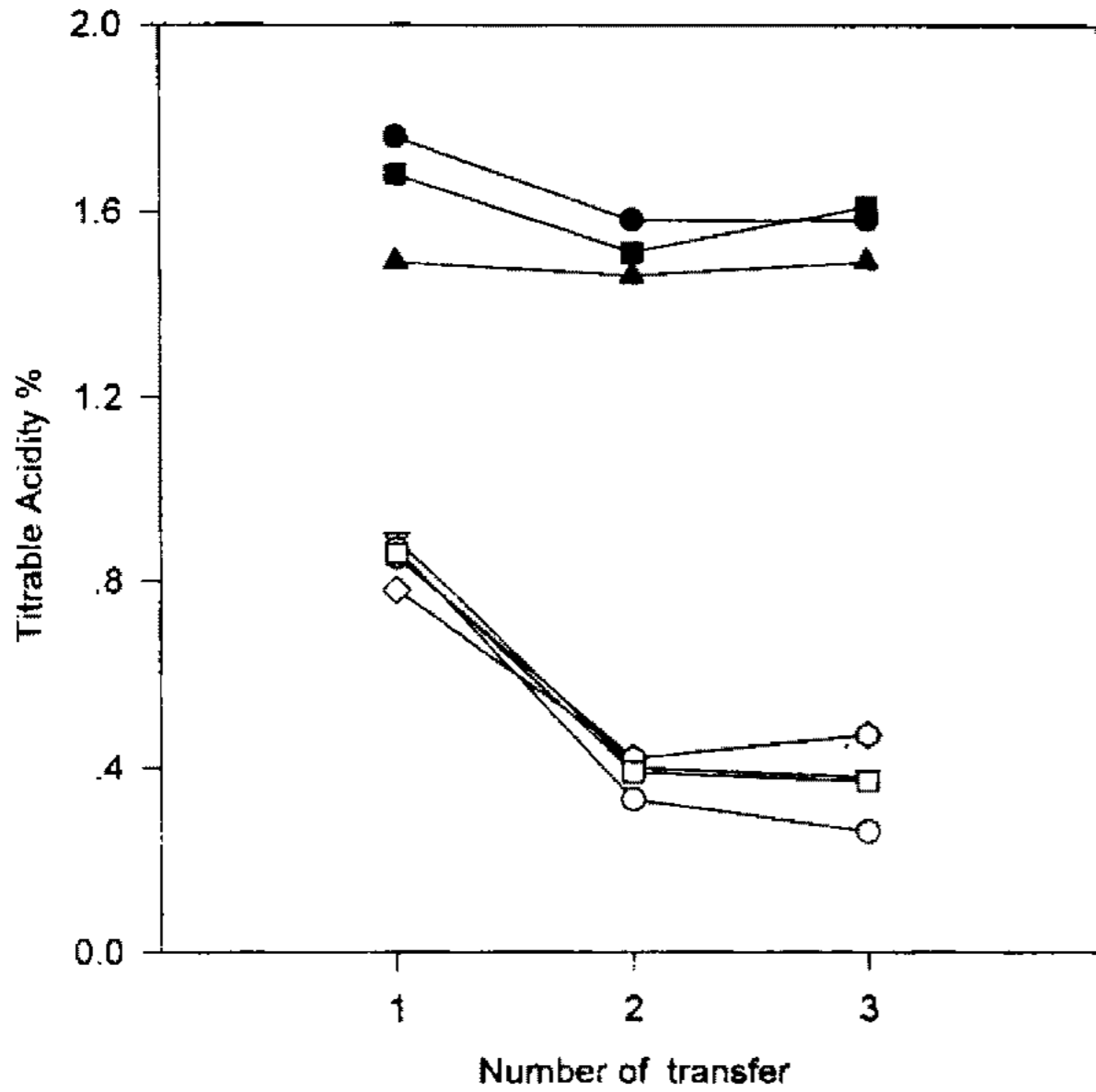


Fig. 3. Effect of nutrient supplementation on titrable acidity in skim milk cultures of *Bifidobacterium* sp. BF33.

●—● yeast extract 0.5%, ■—■ MRS 0.5%, ▲—▲ liver quarter strength, ▽—▽ (hemin+menadione) sol. 1%, ◇—◇ malt extract 0.5%, ○—○ glycerol 0.1%, ○—○ glucose 1%, □—□ control.

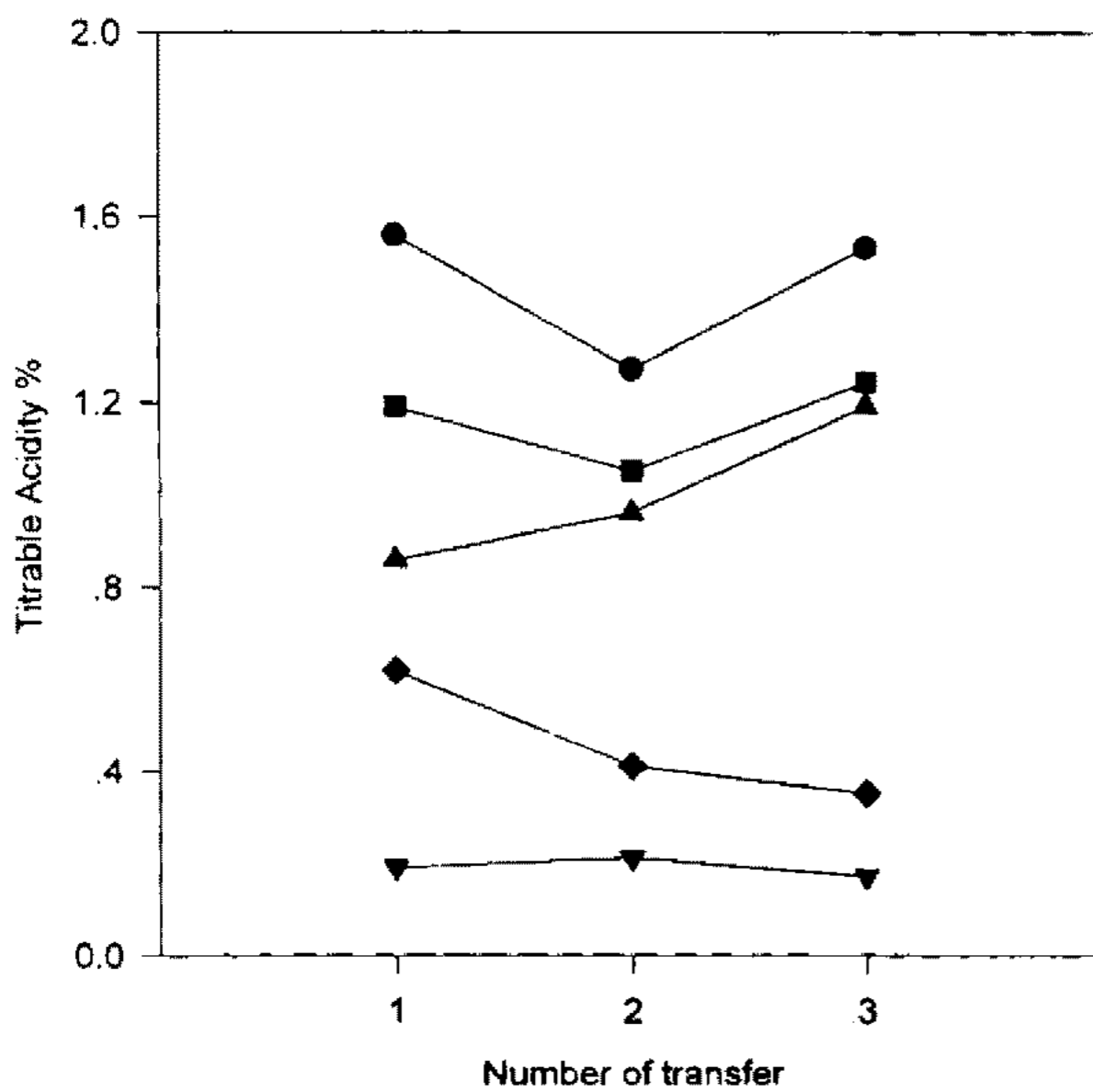


Fig. 4. Effect of antioxidants on titrable acidity in skim milk cultures of *Bifidobacterium* sp. BF5.

●—● cysteine 0.05%, ■—■ sodium thioglycolate 0.1%, ▲—▲ vitamin C 0.2%, ▼—▼ sodium sulfite 0.1%, ◆—◆ control.

차이가 없이 이들 모두에 의해 공히 증가되었고 3차의 계대배양에서도 1차와 거의 비슷한 산도를 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 비피더스 야생균은 yeast extract 등의 보강으로 탈지유에서 배양이 가능하며 배양적성은 균주의 종류에 의해 차이가 나타남을 알수있었다.

*Bifidobacteria*는 혐기성 균으로서 산소에 의해 생육이 저해되므로 배지중의 이러한 산화성 물질에 대항하는 효과를 지닌 물질을 보강하고 그 영향을 보고자 하였다. 그 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5와 같았다. BF5는 BF33과 같이 0.05% cysteine, 0.1% sodium thioglycolate에 의해 생육이 촉진되었으나, 0.1% sodium sulfite에 의해서는 억제되었다. 0.2% vitamin C의 효과는 두 균주가 달라 BF5는 촉진되었으나 BF33은 촉진되지 않았고, cysteine과 glycolate에 의한 촉진효과도 BF5가 BF33에 비해 더 컸다. 이러한 차이는 BF5 strain이 보다 더 혐기성인 균인데 반하여 BF33은 aerotolerant한 이유 때문인 것으로 생각되었으며 이것은 aerobic growth test(10)에서 확인되었다. 이러한 결과에 의해 균주에 따라 약간의 차이는 있을 수 있으나 *bifidobacteria*는 탈지유에서 cysteine과 같은 일부 항산화성 물질의 첨가에 의해 생육이 촉진되는 것으로 보인다.

Kaneko등(12)은 *Bifidobacterium adolescentis*가 formate, acetate, propionate, butyrate 등의 short chain fatty acid들의 혼합물에 의해 생육이 촉진된다고 하였다. 이에따라 BF5와 BF33의 두 균주가 acetate, propionate, butyrate 등의 첨가에 의해 어떠한 영향을 받는지를 알아보았을 때 Fig. 6 및 Fig. 7과 같았다. BF5는

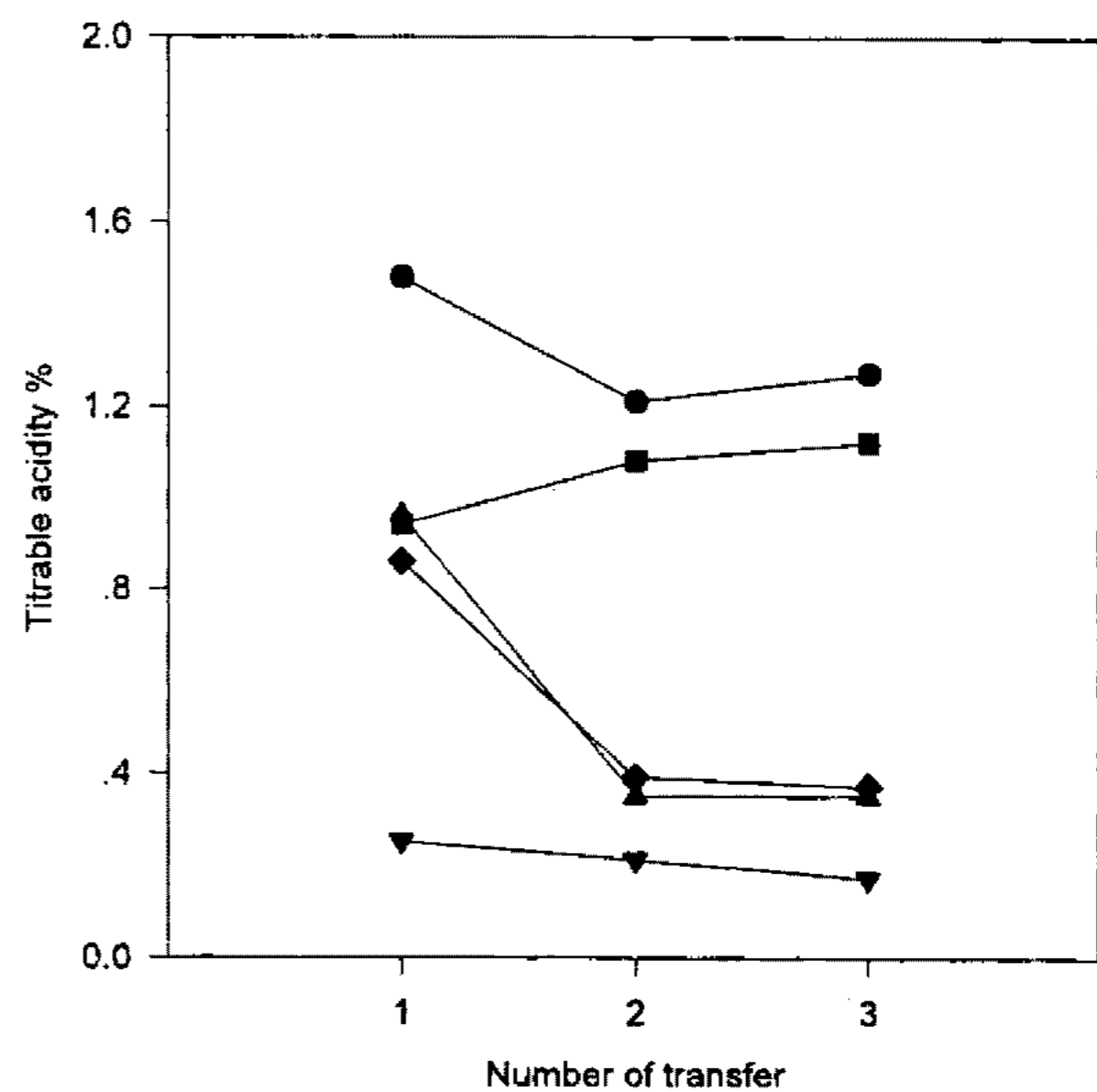


Fig. 5. Effect of antioxidants on titrable acidity in skim milk cultures of *Bifidobacterium* sp. BF33.

●—● cysteine 0.05%, ■—■ sodium thioglycolate 0.1%, ▲—▲ vitamin C 0.2%, ▼—▼ sodium sulfite 0.1%, ◆—◆ control.

유기산들의 첨가에 의해 경미한 축진을 보였으나 BF33 strain의 경우는 그 영향이 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 일반적으로 유아의 경우는 장에서 bifidobacteria의 상대적 비율이 높아 short chain fatty acid의 생성이 성인에 비해 더 왕성하다는 점(13)을 고려할 때, 유아에서 분리한 BF5는 이러한 환경에서 선택된 균주이기 때문으로 생각되어 진다. 그러나 이 두 균주의 경우에서

볼 때 일반적으로 bifidobacteria는 탈지유에서 유기산의 첨가에 의해 생육이 촉진되지 않는 것으로 보인다.

Culture headspace의 CO₂충전의 영향과 산생성의 경시적 변화

혐기성 균들은 호기성 균들에 비하여 일반적으로 생육이 늦은 것으로 알려져 있다. BF5와 BF33이 혐기조건 및 시간 별로 생육이 어떻게 진행되는지를 알아보기 위해, BF5와 BF33를 각각 0.5%의 yeast extract와 0.05%의 cysteine을 보강한 탈지유에 접종하고 배양용기의 headspace를 CO₂가스로 치환하여 배양한 균의 산도를 치환하지 않은 균과 경시적으로 비교하였을 때 Fig. 8과 같았다. 산생성은 두 균 모두에서 48시간까지 꾸준히 증가하였으며 증가속도는 완만하였다.

Bifidobacteria는 혐기성균으로서 배지의 용존산소가 생육에 영향을 미치므로 배양용기의 headspace를 CO₂가스로 치환하여 산소를 제거하면 생육이 촉진될 것으로 예상되었고, 또한 CO₂가스는 탈지유에 녹아 완충작용으로 산생성에 영향을 줄 것으로 예상되었으나, 예상과는 달리 산생성에 대한 CO₂가스의 영향은 BF5에서는 전혀 볼 수 없었고, BF33의 경우에는 24시간 이후의 산생성이 대조군에 비해 높았으나 그 차이는 작았다. 따라서 탈지유에서 Bifidobacteria를 배양할 때 배양용기의 headspace를 CO₂가스로 치환할 필요는 없는 것으로 생각된다.

저장중 생균수의 변화

비피더스균은 발효액의 저장중 생균수가 유산균들에 비하여 비교적 빠르게 사멸하는 것으로 알려져 있으며

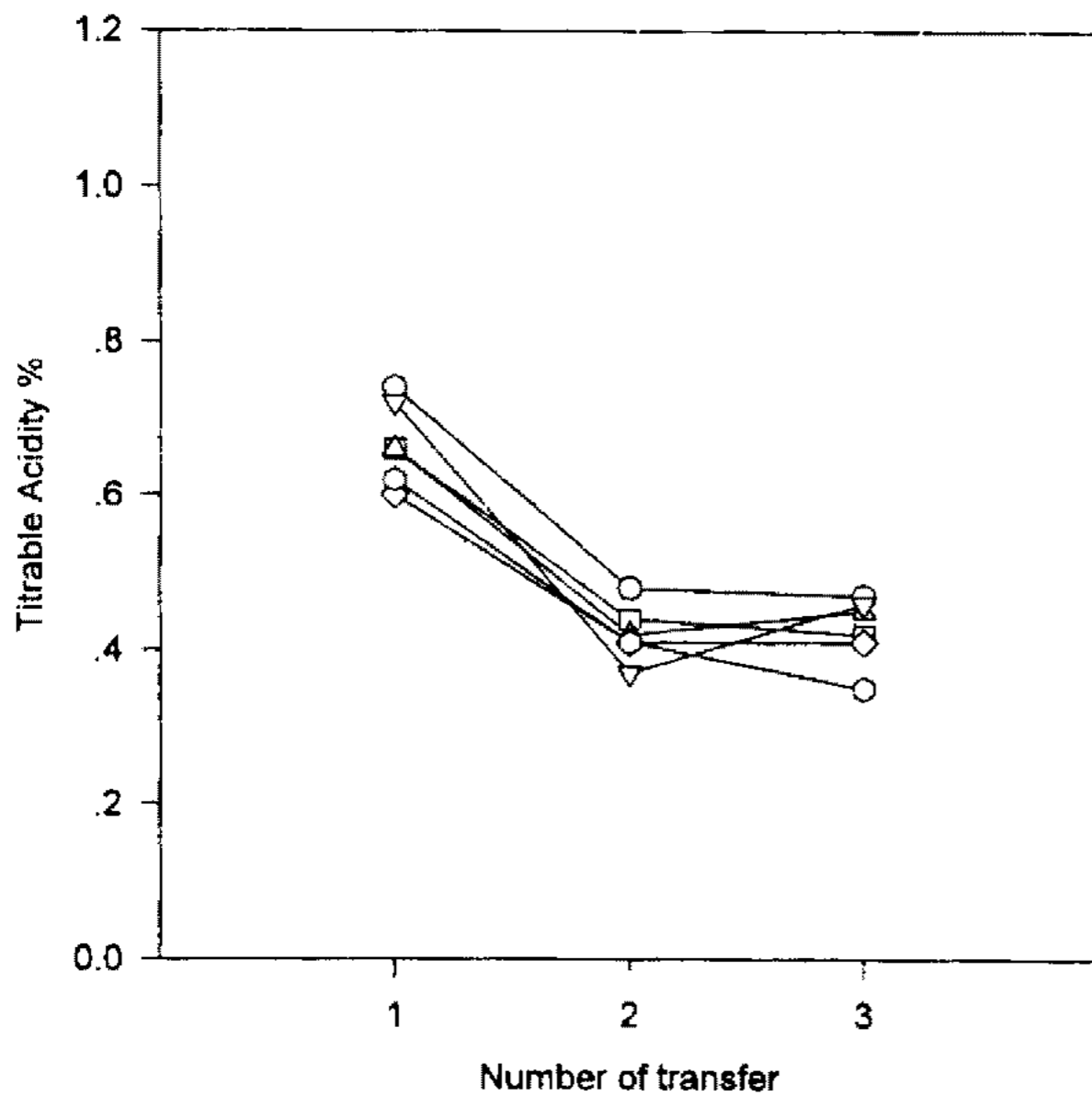


Fig. 6. Effect of organic acids on titrable acidity in cultures of *Bifidobacterium* sp. BF5.

○—○ propionate 0.5%, □—□ (acetate+propionate) 0.5%,
△—△ (acetate+propionate+butyrate) 0.5%, ▽—▽ bile 0.2%,
◇—◇ Tween 80 0.1%, ○—○ control.

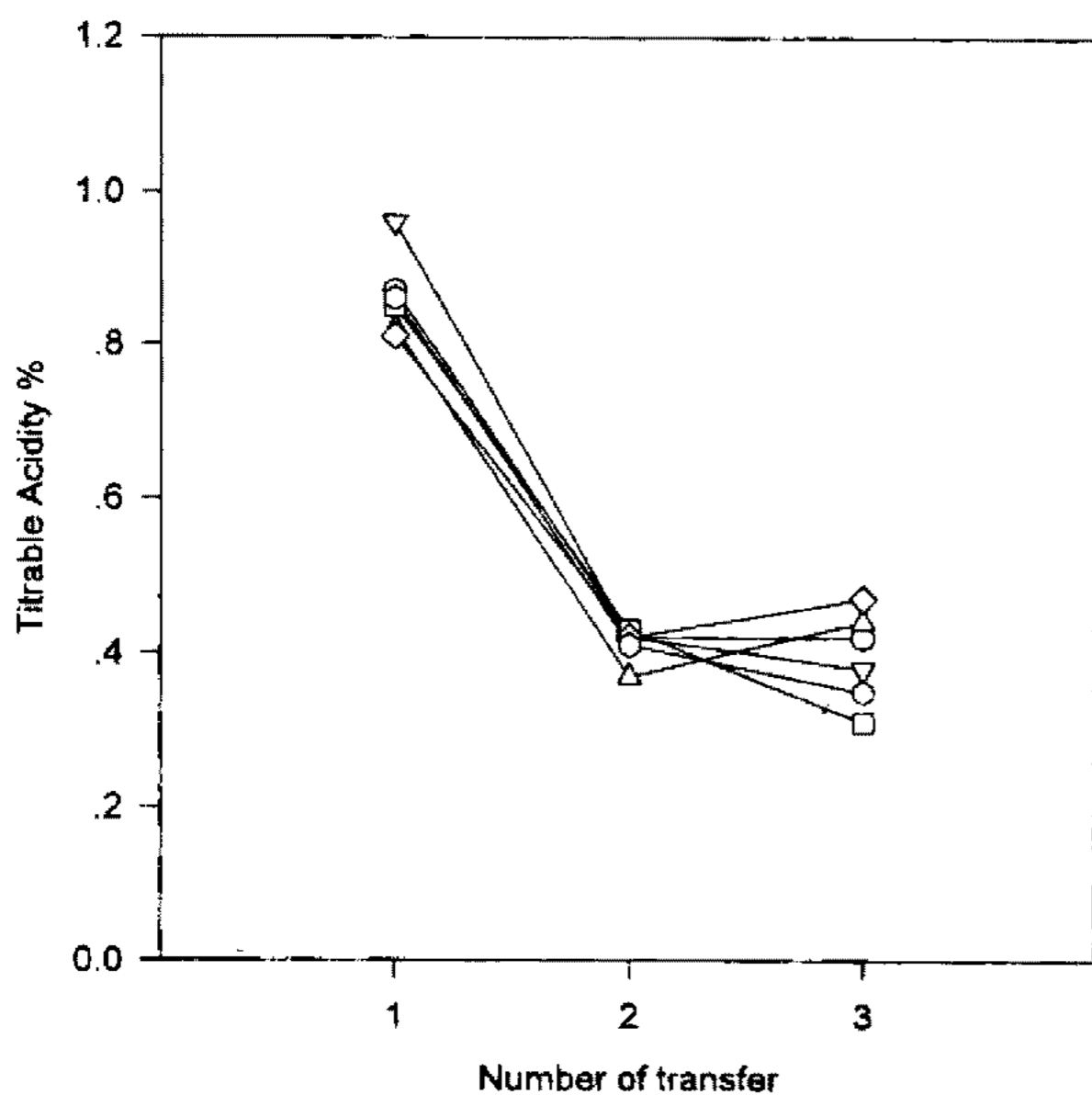


Fig. 7. Effect of organic acids on titrable acidity in cultures of *Bifidobacterium* sp. BF33.

○—○ propionate 0.5%, □—□ (acetate+propionate) 0.5%,
△—△ (acetate+propionate+butyrate) 0.5%, ▽—▽ bile 0.2%,
◇—◇ Tween 80 0.1%, ○—○ control.

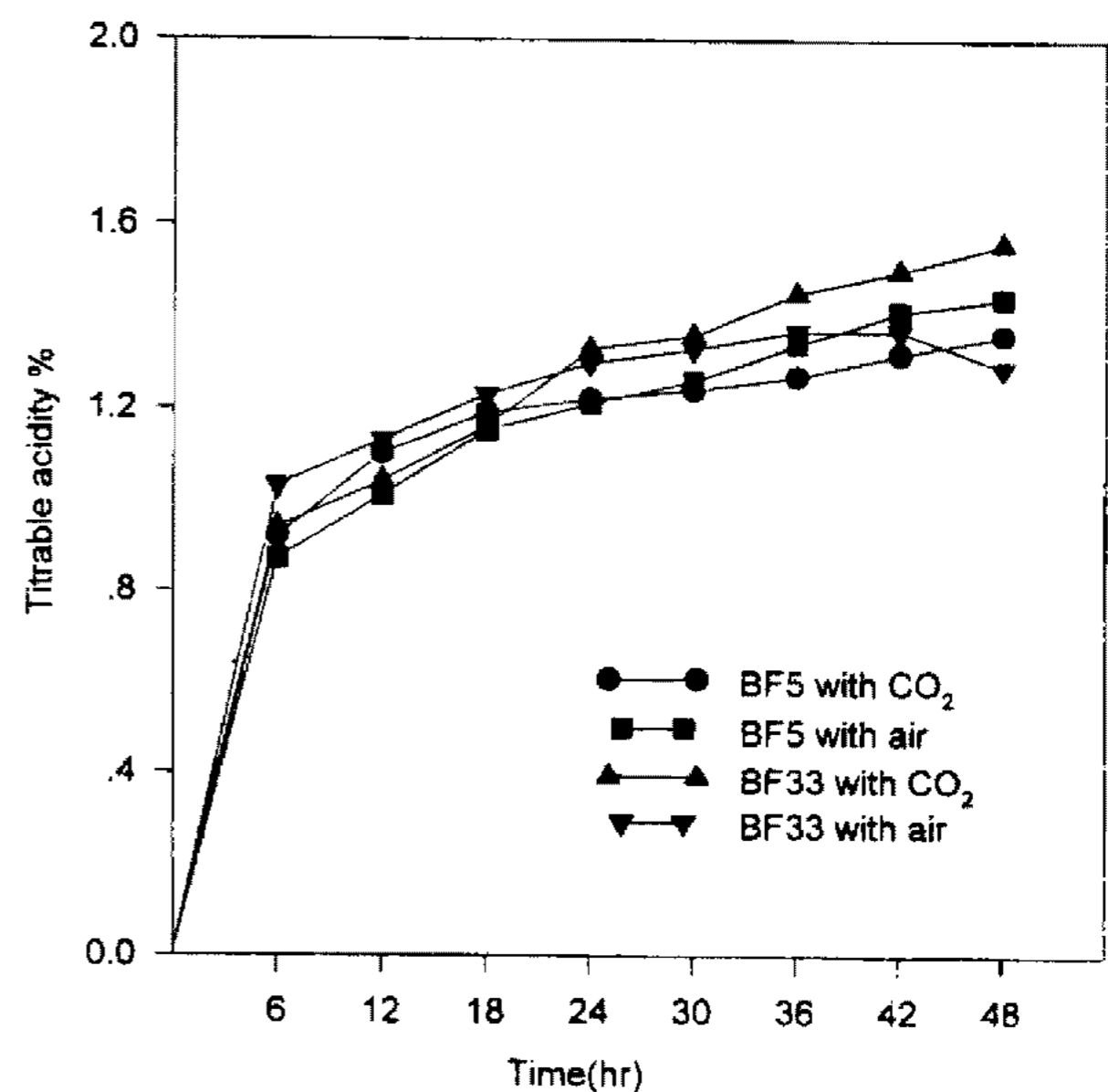


Fig. 8. Effect of CO₂ gas on titrable acidity in skim milk cultures of bifidobacteria.

Table 1. Changes of viable cell counts of two wild bifidobacteria strains in skim milk during storage at 5°C after cultivation for 30 hr (Log₁₀CFU/ml)

Strain	pH	Days of storage				
		0	3	6	9	12
BF5	4.0	9.76	9.23	8.47	7.57	6.48
BF33	3.8	9.98	8.32	6.70	4.29	<3.00

(14) 사멸속도는 배양액의 pH에 의해 영향을 받으며, 특히 4.3 이하의 pH에서 생존수가 빠르게 감소하는 것으로 알려져있다(15). 따라서 본 연구의 두 야생주의 사멸속도를 알아보기 위해 0.5%의 yeast extract와 0.05%의 cysteine이 보강된 skim milk 배양액에 30시간 배양하고 이후 5°C에서 저장하며 생존수의 변화를 알아본 결과 Table 1과 같았다.

BF5와 BF33은 보강된 skim milk에서 30시간 배양하였을 때, 각각 9.76 및 9.98 logCFU/ml의 생존수를 나타내었고 이때 발효액의 pH는 각각 4.0, 3.8이었다. 이들은 12일간의 냉장저장 중 각각 3과 6 log의 생존수 감소를 나타내어 사멸율에서 차이를 보여주었으며, BF5는 다른 strain의 사멸속도(15)와 비교해 볼 때, 산에 대한 내성을 지니는 것으로 나타났다.

요 약

성인 및 유아의 분변으로 부터 48주의 bifidobacteria를 분리하고 10% skim milk배지에서의 계대배양 적성을 조사하였다. 일반적으로 야생 bifidobacteria는 2차의 계대배양액 이후부터 생육이 크게 감소되는 경향을 나타내었다. 두 종의 야생주 BF5와 BF33을 선택하고 생육에 미치는 각종 첨가물의 영향을 조사한 결과는 0.5%의 yeast extract, 0.05%의 cysteine 등에 의해 생육이 촉진되었으나 유기산에 의하여는 촉진되지 않았다. 배양용기의 headspace를 CO₂ 가스로 치환하였을 때 생육에는 거의 영향을 미치지 않았다. 보강된 skim milk에서 30시간 배양하였을 때 BF5와 BF33은 각각 9.76과 9.98 log CFU/ml의 생존수를 나타내었고 5°C에서 12일 간 저장하였을 때 약 3과 6 log씩 감소되었다.

감사의 말

본 연구는 95' 전주대학교 학술연구조성비에 의해 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Rasic J. Lj. and Kurmann J. A. 1983. Bifidobacteria and their role. Birkauser Verlag, Basel. pp51-80.
2. Mutai M. and Tanaka R. 1987. Ecology of *Bifidobacterium* in the human intestinal flora. *Bifidobac. Microfl.* **6**: 33-41.
3. Mitsuaka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobac. Microfl.* **1**: 3-5.
4. Modler H. W., R. C. McKellar and M. Yaguchi 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23**: 29-41.
5. Colombel J. F., Cortot A., Neut C. and Romond C. 1987. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin induced gastrointestinal effects. *Lancet* **2**: 43-48.
6. Tanaka R. and K. Shimosaka 1982. Investigation of the stool frequency in elderly who are bed ridden and its improvements by ingesting of bifidus yogurt. *Jpn. Geriatr.* **19**: 577-581.
7. Collins E. B. and Hall B. J. 1984. Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 376-380.
8. Balmer S. E. and Wharton B. A. 1989. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archiv. Dis. Child.* **64**: 1672-77.
9. Jin H. S. 1994. A modified commercial medium for the enumeration of bifidobacteria in feces. *J. Jeonju Univ.* **23**: 395-403.
10. Mitsuoka T. 1984. A Color Atlas of Anaerobic Bacteria. 2nd Ed. Shobunsha Tokyo.
11. Chevalier P., Roy D. and Ward P. 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 619-624.
12. Kaneko T., H. Mori, M. Iwata and S. Meguro 1994. Growth stimulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**: 393-404.
13. Midtvedt A. C. and Midtvedt T. 1992. Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **15**: 395-403.
14. Schuler-Malyoth R. 1968. The microorganisms of the bifidus group(*Lactobacillus bifidus*). III. Detection of *L. bifidus* in milk products. *Milchwis.* **23**: 614-618. cited in Rasic J. Lj. and Kurmann J. A. Bifidobacteria and their role. Birkauser Verlag, Basel. pp128(1983).
15. Mutai M. Y., Mada M. K., Nakajima K. F., Takahashi S. M., Nakao T. H., Shimada K., Iuima T. and Kunitachi. 1976. German Federal Republic Pat. 2, 656, 159. cited in Rasic J. Lj. and Kurmann J. A. Bifidobacteria and their role. Birkauser Verlag, Basel. pp128(1983).

(Received 4 February 1997)