

한국 성인 분변 시료에서 분리한 비피더스균의 유전자 다양성 분석

배학균 · 김선옥* · 박종선**** · 강병용** · 최성숙*** · 강진양**** · 하남주****.#

삼육대학교 보건복지대학원, *삼육식품(주) 식품연구소, **삼육대학교 생명과학연구소,
삼육의명대학 식품과학과, *삼육대학교 약학과

(Received December 15, 2003; Revised February 11, 2004)

Analysis of Genetic Diversity of *Bifidobacterium* spp. Isolated from Korean Adults Fecal Samples

Hak Gyoon Bae, Sun Ok Kim*, Park Jong Sun****, Byung Yong Kang**, Sung Sook Choi***,
Chin Yang Kang**** and Nam Joo Ha****.#

Graduate School of Health Sciences and Social Welfare, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

*Sahmyook Food R&D Center, Korean Sahmyook Foods, Chunan 330-811, Korea

**Research Institute for Life Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

***Department of Food Science, Sainmyook College, Seoul 139-742, Korea

****Department of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

Abstract — Twelve strains of *Bifidobacterium* spp. were isolated from the feces of healthy Korean 20~30 years. The identification of genera from isolates were performed by the microscopic observation and fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) activity, which is the key enzyme to distinguish the *Bifidobacterium* spp. from other anaerobic bacteria. To determine the antibacterial resistance patterns, minimum inhibitory concentration (MIC) of several antibiotics (including anti-tuberculosis agents) was determined. Five of the isolates showed the high degree of resistance to vancomycin. To investigate the genetic diversity between isolates and type strain of *Bifidobacterium* spp. from KCTC, we performed the RAPD-fingerprinting. Using a total set of four primers, it is possible to distinguish the isolates and *Bifidobacterium* spp. from KCTC. Thus, *Bifidobacterium* strains isolated from our samples may be a new species or strains of *Bifidobacterium* genera, and have the potential as a probiotics.

Keywords □ *Bifidobacterium*, F6PPK, fingerprinting and probiotics

*Bifidobacterium*속에 속하는 균주들은 Gram 양성이며, 현미경 상으로 관찰했을 때, 짧고 굵은 형태, 아령형태 혹은 Y자 모양의 불규칙한 간균이고, 혐기적 조건에서 성장하며 acetic acid와 lactic acid를 3:2의 비율로 생산하는 유산균의 일종이다. 이들의 최적 생육온도는 37~41°C이며 최적 생육 pH는 6.5~7.0이다. *Bifidobacterium*속 유산균이 다른 속의 유산균과 구별되는 가장 큰 생화학적 특징으로는 fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK)라는 효소의 활성을 나타낸다는 점으로, 이 효소의 활성이 *Bifidobacterium*속 유산균을 분리하는 가장 중요한 분자 표지이다. 또한, 이 세균들은 성장을 위해서 N-acetylglucosamine와

lactulose 같은 Bifidogenic factor를 요구한다.¹⁾

인체의 장에 존재하는 *Bifidobacterium*속 세균들은 인간의 건강에 여러가지 유익한 효과를 나타내는데, 우선, 이 세균에 의해 생성되는 lactic acid는 장내의 산도를 증가시켜 유해균의 증식을 억제하며, 소화관의 연동 운동을 도와 변비와 설사를 개선할 뿐만 아니라,²⁾ 몇몇 연구에서는 혈중 cholesterol 저하 효과를 나타내어 고혈압이나 관상동맥질환과 같은 성인병의 개선에 유익한 효과가 기대되기도 하였다.³⁾ 또한, 이 세균들은 *E. coli* O157이나 *Salmonella*속에 속하는 여러 식중독 균의 성장을 억제할 뿐만 아니라,⁴⁾ 위레양의 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori*의 억제효과도 보고 되었다.⁵⁻⁷⁾ 이외에도, *Bifidobacterium*속 세균들은 면역기능의 활성화에도 좋은 기능을 나타내어 macrophage와 natural killer cell과 같은 면역세포의 활성 및 항암효과까지 있는 것으로 보고되고 있다.⁸⁾

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3399-3653 (팩스) 02-948-5370
(E-mail) hanj@syu.ac.kr

*Bifidoabacterium*속 세균들은 인체의 건강에 이렇게 광범위한 효과를 나타내기 때문에, 오래전부터 생균제(probiotic)로서의 역할이 기대되었다. 그렇지만, *Bifidoabacterium*속 세균을 생균제로서 응용하기 위해서는 여러가지 전제조건이 필요하다. 우선, 이 세균들이 인체내에서 순조로운 정착을 하기 위해서는 이들의 생화학적 및 생태적인 특성을 규명해야 하고, 두번째로는 유전적 배경을 추적하는 일이 필수적인 작업이다.

결핵환자와 같이 장기간 항생제 투여를 하여야 하는 만성질환자들은 치료 목적으로 투여된 항생제, 항결핵제의 영향으로 장내 정상 세균총이 파괴되어 흡수부진, 소화불량 등의 장 질환을 일으킬 수 있으며⁹⁾ 이러한 경우 치료용 항균제와 생균제제를 병용 투여하는 것이 바람직하다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 따라서 본 연구에서는 이와 같은 기능을 소유한 생균제 개발의 목적으로 건강한 남녀의 분변으로부터 *Bifidobacterium*속의 세균들을 분리하였고, 이들 균주에 대한 항결핵제 및 항생제의 최소 저지 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하여 항생제를 장기간 복용하는 만성질환자에게 사용 가능한 생균제로써의 가능성을 타진하였다. 그리고 분리된 균과 기존의 표준 균주와의 유전적 유연관계를 조사할 목적으로 RAPD(random amplified polymorphic DNA)-fingerprinting을 수행하여, 항생제 내성 양상과 유전적 유연 관계에 기초하여 이들이 새로운 분리균인지의 여부도 타진해 보고자 하였다.

실험방법

검체의 채취

건강한 20~30세의 남녀 15명으로부터 분변을 제공받아 이로부터 *Bifidoabacterium*속균을 분리하였다. 검체는 BBL사(Becton Dickinson Company)의 Anaerobic Sample Collection & Transport System을 이용하여 최대한 혐기적인 상태로 보관하였으며, 검체는 채취 후 12시간 안에 *Bifidobacterium* 속 균을 분리하는데 사용하였다. *Bifidoabacterium*속 균을 분리하기 위한 선택배지로는 BL broth(Blood-Liver, Nissue)에 5% 농도의 sheep-blood를 첨가한 것을 사용하였고, 일반 생육배지로는 GAM(general anaerobic medium, Nissue)를 사용하였다. 분리된 균의 보관용 배지로는 skim milk broth를 사용하였다. 모든 혐기성 실험 조작 및 혐기배양은 Bactron Anaerobic Chamber(Sheldon Manufacturing Inc.)에서 시행하였다.

균주의 분리 및 확인

검체를 GAM broth에서 $10^4 \sim 10^5$ 의 비율로 희석시킨 상태에서, 5% sheep blood를 함유한 BL agar 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 혐기적인 상태에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 형성된 집락들 가운데서 유갈색, 유백색 혹은 황갈색의 반구

상 집락중 용기된 중심부가 적갈색인 직경 0.5~2.0 mm을 갖는 원형 집락을 선택하였다. 그리고, 분리한 균주를 GAM 배지에서 계대배양 시킨 후에, Gram 염색법으로 염색을 실시하여 Gram 양성 균임을 확인하고 현미경상 세포모양이 다양하고 특히 V, X, Y자 모양의 *Bifidobacterium*속 균의 전형적인 세포모양을 나타내는 간균을 선별하였다.¹¹⁾

*Bifidobacterium*속 균주의 동정

*Bifidobacterium*속 균주의 동정은 F6PPK test를 실시하여 확인하였다.¹⁾ 전배양한 균주를 BL-broth 20 ml에 하룻밤 혐기배양 시킨 후에, 이를 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 0.5% 농도의 cysteine을 함유한 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5)로 두 번 세척하고, 동일한 buffer 1 ml에 현탁하였다. 현탁한 균액을 3분간 초음파 분쇄하여 균체를 파괴시켰다. 파괴된 균액 100 μ 에 NaF(6 mg/ml)와 NaI(10 mg/ml)가 함유된 용액 25 μ 와 기질인 fructose-6-phosphate(80 mg/ml) 25 μ 를 가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후에, hydroxylamine (13.9 g/100 ml, pH 6.5) 150 μ 를 가하여 반응을 중지시킨 후 실온에서 10분간 방치하였다. 그 이후에, 15% trichloroacetic acid 용액과 4 N HCl을 각각 100 μ 씩 가한 후, 5% FeCl₃ 용액을 가하여 반응액의 색 변화를 관찰하였다. 이때 반응액이 적자색으로 변하면 이를 양성(positive)으로 하여 *Bifidobacterium*속 균으로 판정하였다. 양성 대조군(positive control)은 실험실에 보관중인 *B. bifidum* KCTC 3202를 사용하였으며 균체 파괴액 대신 buffer 용액을 가한 용액을 음성대조군(negative control)으로 하였다.

최소 저지 농도(MIC)의 측정

최소 저지 농도(MIC)의 측정은 NCCLS¹²⁾의 방법에 따라 고체배지 희석법으로 실시하였으며 사용 배지는 GAM 배지를 사용하였다. 본 실험에서는 항 결핵제 및 항생제로 INAH, ethambutol, streptomycin, rifampin, cycloserine, clindamycin, ciprofloxacin 및 vancomycin을 사용하였다. 사용 균액은 GAM broth에서 37°C 온도조건에서 하룻밤 동안 전 배양하였으며, MIC의 측정은 고체배지 희석법에 의하여 실시하였다. 항생제를 함유한 배지는 최고 농도를 100 μ g/ml로 하여 12단계 농도 계열을 2배 희석법으로 만들었다. 사용한 균은 10^7 cells/ml 농도로 희석하여 이중 5 μ 를 사용하였다. 희석한 균액을 항생제를 함유한 고체배지에 접종하여 36~37시간 혐기배양한 후, 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소농도를 MIC로 하였다.

유전자 다양성 분석

*Bifidobacterium*속 균으로부터 genomic DNA의 분리는 Ausubel 등(1991)의 방법을 약간 변형하여 수행하였고,¹³⁾ 본 연구에서 분리한 *Bifidobacterium*속균과 KCTC에서 구입한 균들의

Table I – Descriptions of oligonucleotide sequences of SRILS Microbial UniPrimers™ kit

Primers	Sequence (5-3)
Microbial Uniprimer 1	5-ATCCAAGGTCCGAGACAACC-3
Microbial Uniprimer 2	5-CCCAGCAACTGATCGCACAC-3
Microbial Uniprimer 3	5-GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3
Microbial Uniprimer 4	5-AGGACTCGATAACAGGCTCC-3

유전적인 관계를 조사하기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)-RAPD 분석을 수행하였다. PCR 반응은 2.5 units Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM KCl, 10 pmol primer와 200 ng template genomic DNA를 포함하는 30 µl 부피에서 수행하였다. PCR 증폭반응은 Perkin-Elmer Thermal Cycler 9,700(Perkin-Elmer, USA)에서 수행하였으며, PCR-RAPD 분석을 수행하기 위한 primer들은 (주)서린바이오사이언스(Korea patent No. 97-016981)에서 구입하였다(Table I). 반응조건은 94°C에서 30초, 40~50°C에서 1분, 그리고, 72°C에서 2분 간격으로 총 40주기로 이루어졌다. PCR 증폭이 끝난 후에, 증폭된 PCR 산물들은 2% agarose gel에서 5시간 동안 100 V에서 전기영동법으로 분리하였고, ethidium bromide(EtBr) 염색법으로 결과를 판독하였다. 본 연구에서는 genomic fingerprinting 방법의 재현성(reproducibility)을 조사하기 위하여 같은 실험을 2번씩 반복하였다.

실험결과

균주의 분리 동정

5% sheep blood를 함유한 BL 배지에서 *Bifidobacterium*속으

로 추정되는 균주를 총 30개 분리 배양하여 현미경 관찰 및 F6PPK 효소 활성을 측정된 결과 총 12개의 균이 *Bifidobacterium*속 균으로 확인되었다.

MIC 측정

INAH, ethambutol, streptomycin, rifampicin, cycloserine, clindamycin, ciprofloxacin 및 vancomycin에 대한 MIC를 측정된 결과는 Table II와 같다. *Bifidobacterium*속 세균들은 연구된 항생제들 중에서 INAH와 cycloserine에 대해서 농도 100 µg/ml에서도 성장하여 높은 항생제 내성을 나타내었지만, erythromycin과 rifampicin에 대해서는 비교적 높은 감수성을 나타내었다. Vancomycin의 경우에, KCTC로부터 구입한 세균들은 모두 이 항생제에 감수성을 보인 반면에, 본 연구에서 분리한, bf0203, bf0211, bf0212, bf1005 및 bf1307의 경우에는 높은 저항성을 나타내었다.

Genomic fingerprinting

4종류의 primer를 이용하여 본 연구에서 분리된 12종과 KCTC에서 구입한 5종의 표준균주 *Bifidobacterium*속 세균들에 대한 유전자 다양성을 분석한 결과, 12종의 분리균 모두 KCTC에서 구입한 종과 다른 유전적 구성을 나타내었다.

Microbial Uniprimer 1 – Microbial Uniprimer 1을 이용한 PCR 분석 결과는 Fig. 1에 제시되었다. PCR 분석을 수행했을 때, 약 600 bp의 band가 연구된 모든 *Bifidobacterium*속 균에서 검출되었다. 그렇지만, 어느 경우에도 분리된 균의 band pattern이 KCTC에서 구입한 *Bifidobacterium*속 균의 band pattern과는 상이한 양상을 나타내었다.

Table II – Minimum Inhibitory Concentrations of Several Antibiotics against *Bifidobacterium* spp.

Strains	Antibiotics							
	INAH	ETM	RIF	SM	CYCS	CLM	CIF	VAM
bf0203	>100	>100	0.8	50	>100	12.5	6.25	>100
bf0211	>100	>100	0.8	50	>100	50	6.25	>100
bf0212	>100	>100	0.8	50	>100	50	6.25	>100
bf1005	>100	12.5	0.2	50	100	50	6.25	>100
bf1204	>100	25	0.2	50	100	6.25	3.13	1.6
bf1205	>100	>100	0.2	3.13	>100	3.13	6.25	1.6
bf1206	>100	0.05	0.2	12.5	>100	6.25	3.13	1.6
bf1307	>100	>100	0.8	100	>100	12.5	6.25	>100
bf1601	>100	>100	0.8	>100	>100	6.25	0.8	1.6
bf1605	100	>100	0.8	100	>100	3.13	0.8	1.6
bf1606	>100	>100	0.8	>100	>100	6.25	0.8	1.6
bf1608	>100	>100	0.8	>100	>100	6.25	0.8	1.6
<i>B. longum</i> KCTC3128	>100	>100	0.2	25	100	6.25	6.25	1.6
<i>B. bifidum</i> KCTC3202	>100	>100	<0.05	0.2	100	6.25	6.25	1.6
<i>B. breve</i> KCTC3220	>100	>100	0.2	12.5	>100	6.25	6.25	1.6
<i>B. catenulatum</i> KCTC3221	>100	>100	0.4	50	>100	6.25	0.8	1.6
<i>B. gallicum</i> KCTC3368	>100	>100	0.8	50	>100	6.25	3.13	1.6

ETM, ethambutol; RIF, rifampin; SM, streptomycin; CYCS, cycloserine; CLM, clindamycin; CIF, ciprofloxacin; VAM, vancomycin.

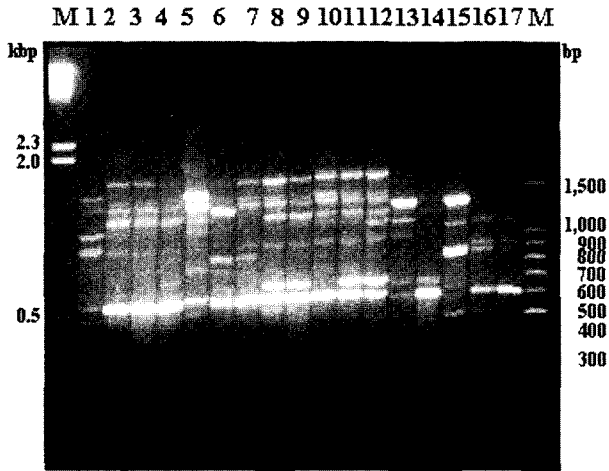


Fig. 1 – Genomic fingerprinting patterns using Microbial Uniprimer 1. Lane 1, bf 0203; lane 2, bf0211; lane 3, bf0212; lane 4, bf1005; lane 5, bf1204; lane 6, bf1205; lane 7, bf1206; lane 8, bf1307; lane 9, bf1601; lane 10, bf1605; lane 11, bf1606; lane 12, bf1608; lane 13, *B. longum* KCTC3127; lane 14, *B. bifidum* KCTC3202; lane 15, *B. breve* KCTC3220; lane 16, *B. catenulatum* KCTC3221; lane 17, *B. gallicum* KCTC3277, Lane M, size marker.

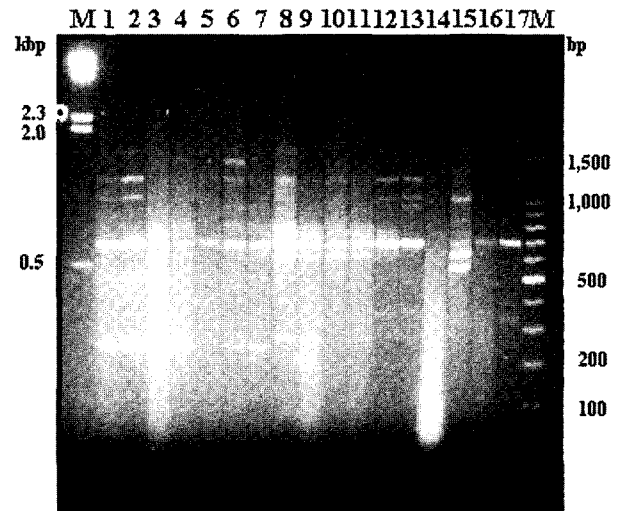


Fig. 3 – Genomic fingerprinting patterns using Microbial Uniprimer 3. Lane 1, bf 0203; lane 2, bf0211; lane 3, bf0212; lane 4, bf1005; lane 5, bf1204; lane 6, bf1205; lane 7, bf1206; lane 8, bf1307; lane 9, bf1601; lane 10, bf1605; lane 11, bf1606; lane 12, bf1608; lane 13, *B. longum* KCTC3127; lane 14, *B. bifidum* KCTC3202; lane 15, *B. breve* KCTC3220; lane 16, *B. catenulatum* KCTC3221; lane 17, *B. gallicum* KCTC3277, Lane M, size marker.

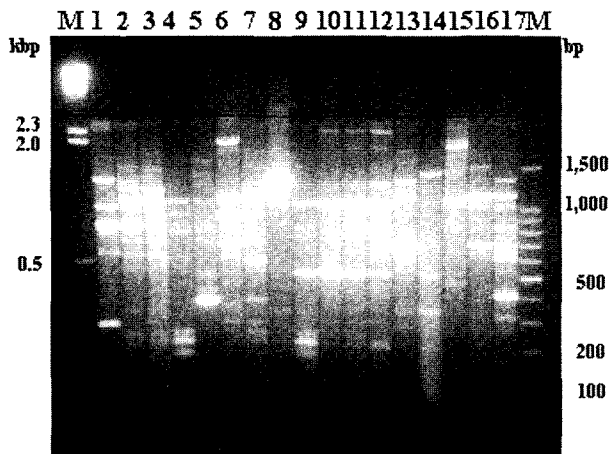


Fig. 2 – Genomic fingerprinting patterns using Microbial Uniprimer 2. Lane 1, bf 0203; lane 2, bf0211; lane 3, bf0212; lane 4, bf1005; lane 5, bf1204; lane 6, bf1205; lane 7, bf1206; lane 8, bf1307; lane 9, bf1601; lane 10, bf1605; lane 11, bf1606; lane 12, bf1608; lane 13, *B. longum* KCTC3127; lane 14, *B. bifidum* KCTC3202; lane 15, *B. breve* KCTC3220; lane 16, *B. catenulatum* KCTC3221; lane 17, *B. gallicum* KCTC3277, Lane M, size marker.

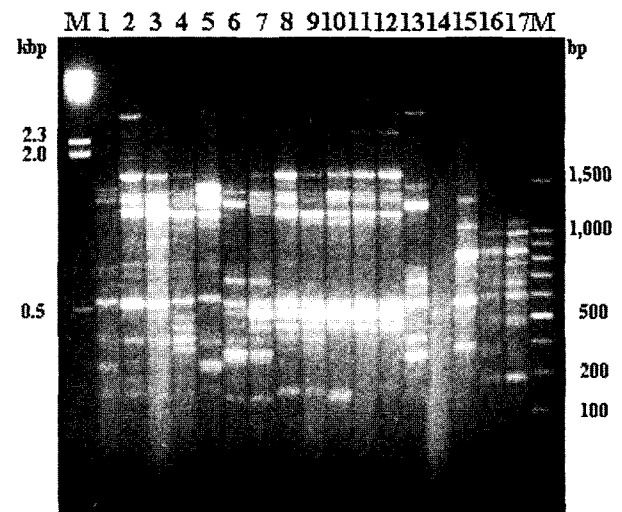


Fig. 4 – Genomic fingerprinting patterns using Microbial Uniprimer 4. Lane 1, bf 0203; lane 2, bf0211; lane 3, bf0212; lane 4, bf1005; lane 5, bf1204; lane 6, bf1205; lane 7, bf1206; lane 8, bf1307; lane 9, bf1601; lane 10, bf1605; lane 11, bf1606; lane 12, bf1608; lane 13, *B. longum* KCTC3127; lane 14, *B. bifidum* KCTC3202; lane 15, *B. breve* KCTC3220; lane 16, *B. catenulatum* KCTC3221; lane 17, *B. gallicum* KCTC3277, Lane M, size marker.

Microbial Uniprimer 2 – Microbial Uniprimer 2을 이용한 PCR 분석 결과는 Fig. 2에 제시되었다. PCR 분석을 수행했을 때, 모든 *Bifidobacterium*속 균에서 공통적으로 나타나는 band는 확인되지 않았으며, Microbial Uniprimer 1의 경우와 마찬가지로, 어느 경우에도 분리된 균의 band pattern이 KCTC에서 구입한 *Bifidobacterium*속 균의 band pattern과 일치하지 않았다.

Microbial Uniprimer 3 – Microbial Uniprimer 3을 이용한 PCR 분석 결과는 Fig. 3에 제시되었다. PCR 분석을 수행했을 때, 모든 *Bifidobacterium*속 균에서 공통적으로 나타나는 band는 확인되지 않았지만, 약 700 bp의 길이를 갖는 band는 *B. bifidum*

KCTC3202를 제외한 모든 균들에서 확인되었다. Bf0203, bf0211, bf1608은 *B. longum* KCTC3127과 유사한 band pattern을 나타내었다.

Microbial Uniprimer 4 - Microbial Uniprimer 4를 이용한 PCR분석 결과는 Fig. 4에 제시되었다. Microbial Uniprimer 1 및 2의 경우와 마찬가지로, 어느 경우에도 분리된 균의 band pattern이 KCTC에서 구입한 *Bifidobacterium*속 균의 band pattern과 일치하지 않았다.

고 찰

본 연구는 생균제로서의 잠재성이 높은 유용균인 *Bifidobacterium*속 균을 인체의 분변으로부터 분리하고, 분리된 *Bifidobacterium*속 균들의 생리적 특성을 규명하여 생균제 개발을 위한 기초 자료를 축적하고, 나아가 유전자 다양성 조사를 통해, 이들이 기존에 보고된 종과 유전적 구성이 다른 새로운 종 혹은 새로운 균종일 가능성을 타진하는데 본 연구의 목적이 있다.

현미경 관찰과 F6PPK 효소 활성을 통해서 본 연구 시료들 중 12종의 균을 분리하고, 이들로부터 다양한 생화학적인 시험을 수행하였는데, MIC 측정을 통한 항생제 내성 여부를 조사한 결과에서 12종의 분리균은 KCTC로부터 구입한 종들과 vancomycin 이외의 경우 대체적으로 유사한 양상을 나타내었다. 특히, 본 연구에서 조사된 모든 *Bifidobacterium*속 균주들은 분리균과 KCTC의 표준균주들을 막론하고 항결핵제인 INAH와 cycloserine에 공통적으로 높은 내성을 나타내었는데, 이러한 현상은 다른 문헌에서도 역시 본 연구결과와 일치하는 결과를 나타내어, *Bifidobacterium*속 균주들에게서 나타나는 보편적인 특징일 것으로 사료된다.¹⁴⁾

그러나 현재 항결핵제로 사용중인 rifampicin과 quinolone계 항생제에 대하여서는 비교적 감수성이 높은 양상을 나타내었으며 따라서 앞으로 본 항균제에도 저항성을 나타내는 돌연변이체의 개발등이 필요한 것으로 사료된다. 또한 lincomycin 투여에 기인한 위막성 대장염에 사용되는 항생제인 vancomycin의 경우에는 KCTC로부터 구입한 5종의 *Bifidobacterium*속 균에서는 이 항생제에 감수성을 나타낸 반면에, bf0203, bf0211, bf0212, bf1005 및 bf1307 등 5종의 분리균은 높은 저항성을 나타내었다. 따라서 위 균주들은 항생제 투여에 기인한 위막성 대장염, 항생물질성 대장염 환자에게 항생제와 이 균주들을 병용투여할 수 있는 생균제로 이용할 수 있는 효과를 기대할 수 있음을 의미하며¹⁰⁾ 본 연구에서 분리한 12종류의 균주들 중에서 vancomycin에 내성을 나타내는 5종류의 분리균들은 이러한 점에서 생균제로서의 중요한 조건을 구비했다고 할 수 있다.

본 연구에서 분리된 12종의 *Bifidobacterium*속 균들이 KCTC로부터 구입한 표준균주들과 유전적으로 관련성이 있는 지를 조

사하기 위하여 PCR-RAPD 분석을 수행하였다. Genomic DNA를 이용하여 생물종을 동정하고 확인하는 방법으로는 PCR-RAPD 방법이외에 DNA-DNA hybridization¹⁵⁾ 및 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 분석¹⁶⁾ 등의 방법이 있는데, 그 중, PCR-RAPD 방법은 이러한 기법들에 비해서 여러가지 잇점을 가지고 있다. PCR-RAPD 방법은 1990년에 Williams 등에 의해 개발된 방법으로,¹⁷⁾ 비교적 소량의 DNA를 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 신속하게 결과를 산출할 수 있으며, 연구하고자 하는 생물종의 유전정보가 없는 상태에서도 분석이 가능하다는 장점이 있다.¹⁸⁻²²⁾ 그러나, 이 기법의 단점은 10 nucleotide 가량의 짧은 primer를 사용하기 때문에 재현성(reproducibility)에 문제를 일으킬 수 있다는 점인데, 이러한 문제를 극복하기 위하여 Kang등은 베타로부터 분리한 20 nucleotide로 이루어진 새로운 primer를 개발하여 PCR-RAPD 분석에서 나타나는 재현성 문제를 극복하였고,²³⁾ 이 primer를 이용하여 여러 생물종에 대해서 뛰어난 결과를 산출하였다.²⁴⁻²⁷⁾ 본 연구에서도, 2번에 걸친 반복실험 결과 재현성 있는 결과를 산출할 수 있었다. KCTC에서 구입한 균들 간에 유연관계를 분석했을 경우에는 *B. catenulatum* KCTC3221과 *B. gallicum* KCTC3277이 유전적으로 높은 유사성을 나타내었는데, 본 연구에서 이용된 4종의 primer중 Microbial Uniprimer 2를 제외한 3종의 primer를 가지고 PCR을 수행한 결과가 모두 유사한 band pattern을 나타내었다. 본 연구에서 분리한 12종의 분리균과 KCTC에서 구입한 균들을 비교했을 경우에는 Microbial Uniprimer 3를 이용한 결과에서 분리균인 bf0203, bf0211, bf1608이 *B. longum* KCTC3127, *B. catenulatum* KCTC3221 및 *B. gallicum* KCTC3277과 유사한 band pattern을 나타내어, 다른 분리균들에 비해서 이들 종과 유연관계가 가까운 종일 것으로 사료된다. 그렇지만, Microbial Uniprimer 1, 2 및 4를 이용한 결과에서 분리균의 유전적 구성이 KCTC에서 구입한 균들과 상이한 양상을 나타내었다. 이는, 본 연구에서 분리한 12종의 *Bifidobacterium*속 균이 생화학적인 검사를 통하여 *Bifidobacterium*속에 포함되는 균이긴 하지만, 종 혹은 strain 수준이 다른 새로운 분리균일 가능성을 강하게 시사한다. 그러나, 본 연구에서 조사한 분리균의 정확한 동정과 비교를 수행하기 위해서는 ribotyping을 비롯한 더 많은 유전적 분석과 다양한 생화학적인 분석을 수행해야 보다 더 정확한 결론을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.²⁸⁾

문 헌

- 1) Ji, G. E. : Composition and distribution of intestinal microbial flora in Korean. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 453 (1994).
- 2) Breslaw, E. S. and Kleyn, D. H. : *In vitro* digestibility of protein in yoghurt at various stages of processing. *J. Food Sci.* **38**, 1016 (1973).

- 3) Rhee, Y.-K., Han, M. J., Choi, E. C. and Kim, D. H. : Hypocholesterolemic activity of Bifidobacteria isolated from a healthy Korean. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 681 (2002).
- 4) Oksanen, P. J., Salminen, S., Saxelin, M., Hamalainen, P., Ihanola-Vormisto, A., Muurasniemi-Isoviita, L., Nikkari, S., Oksanen, T., Porsti, I. and Salminen, E. : Prevention of travelers diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann. Med.* **22**, 53 (1990).
- 5) Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M., Takagi, A. and Koga, Y. : Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol. Suppl* **40**, 41 (1998).
- 6) Kabir, A. M., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T. and Koga, Y. : Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* **41**, 49 (1997).
- 7) Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F. and Grayson, M. L. : *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 475 (1995).
- 8) Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T. and Hashimoto, Y. : A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* **45**, 1300 (1985).
- 9) Committee on Treatment of International Union against Tuberculosis and Lung Disease: Antituberculosis regimens of chemotherapy. *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **63**, 60 (1988).
- 10) Yamashita, M., Hatano, M., Matsui, T. and Kumon, Y. : Effects of Bifermin-R administered in combination with antibiotics on the fecal flora. *Bifidobacteria Microflora* **4**, 23 (1985).
- 11) Scardovi, V. : Bifidobacterium. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (9th ed.). Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (Eds.). Vol. 2, p 1418, Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD. (1986).
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow anaerobically, 2nd ed. Approved standard M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. (1997).
- 13) Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. Current protocols in Molecular Biology, Vol. 1. Jone Wiley, New York, p. 241 (1991).
- 14) Chang, H. A., Choi, K. H., Oh, T. K., Kwon, A. R., Kim, D. H. and Choi, E. C. : Antibiotic susceptibility of *Bifidobacterium* spp. strains isolated from healthy Korean. *Yakhak Hoeji* **42**, 639 (1998).
- 15) Dellaglio, F. and Torriani, S. : DNA:DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *J. Appl. Bacteriol.* **60**, 83 (1986).
- 16) Stahl, M., Molin, G., Persson, A., Ahrne, S. and Stahl, S. : Restriction endonuclease patterns and multivariate analysis as a classification tool for *Lactobacillus* spp. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **40**, 189 (1990).
- 17) Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531 (1990).
- 18) Demeke, T., Lynch, D. R., Kawchuck, L. M., Kozub, G. C. and Armstrong, J. D. : Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Cell Report* **15**, 662 (1996).
- 19) Faneli, L., Nekrep, F. V. and Avgustin, G. : Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1094 (1998).
- 20) Kwon, O. S. : Characterization of isolated *Lactobacillus* spp. and classification by RAPD-PCR analysis. *J. Microbiol.* **38**, 137 (2000).
- 21) Shim, Y. H., Choi, J. H., Park, C. D., Lim, C. J., Cho, J. H. and Kim, H. J. : Molecular differentiation of *Panax* species by RAPD analysis. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 601 (2003).
- 22) Vincent, D., Roy, D., Mondou, F. and Dery, C. : Characterization of *Bifidobacteria* by random DNA amplification. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 185 (1998).
- 23) Kang, H. W., Park, D. S., Go, S. J. and Eun, M. Y. : Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol. Cells* **13**, 281 (2002).
- 24) Choi, S. S., Lee, J. W., Kang, B. Y. and Ha, N. J. : Antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant *Streptococcus equinus* isolated from animal foods and epidemiological typing of resistant *S. equinus* by Microbial Uniprimer kit. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 638 (2003).
- 25) Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., You, C. H., Lee, B. M., Eun, M. Y. and Go, S. J. : Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korean by URP-PCR fingerprinting. *Mycobiology* **29**, 85 (2001).
- 26) Kim, H. H., Kang, H. W., Park, Y. J., Baek, H. J. and Gwag, J. K. : Phylogenetic relationship of *Allium* species in subgenus *Rhizirideum* by PCR DNA fingerprint. *Korean J. Crop Sci.* **46**, 328 (2001).
- 27) Seo, H. W., Yi, J. Y., Cho, H. M., Park, Y. E. and Oh, S. E. : Discrimination of potato varieties by random amplified polymorphic DNA analysis. *Korean J. Horti. Sci. Technol.* **19**, 29 (2001).
- 28) Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. : Lactic acid bacteria of foods

- and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1 (1997).
- 29) Choi, E. C., Ko, S. Y., Kim, H. S., Choi, S. S., Kim, S. K. and Kim, B. K. : Development of *Bifidobacterium bifidum* strains resistant to rifampicin. *Yakhak Hoeji* **37**, 483 (1993).
- 30) Chung, Y. J., Jeon, M. I., Kang, C. Y., Kim, B. K. and Choi, E. C. : Development of *Bifidobacterium bifidum* strains resistant to rifampicin and ofloxacin. *Yakhak Hoeji* **38**, 763 (1994).