

다당류 생산성 비피더스균의 선발 및 특성

안준배

영동대학교 호텔식품외식학부

Isolation and Characterization of *Bifidobacterium* Producing Exopolysaccharide

Jun-Bae Ahn

Department of Culinary Arts & Food Technology, Youngdong University

Abstract

Bifidobacteria have been known as beneficial inhabitant of human intestine. They play important roles in manufacture of fermented dairy products. Especially, some bifidobacteria produce exopolysaccharide and their anti-cancer activities were reported. Therefore, bifidobacteria are noticed as a material for functional foods. In this study, a *Bifidobacterium* producing exopolysaccharide was selected from human intestine and characterized. Analyses of carbohydrate utilization pattern and cellular fatty acid profile showed that the selected strain was similar to *Bifidobacterium longum*. The productivity of exopolysaccharide from the selected strain was 2.4 mg/ml-culture broth. Thin Layer Chromatography(TLC) and ion chromatography(Bio-LC) analyses were carried out for elucidation of component of exopolysaccharide. Exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium* sp. AH25 was composed of 36.3% of galactose, 18.2% of glucose, 2.4% of xylitol.

Key words: Bifidobacteria, polysaccharide, functional food

서론

인체의 장내에는 100조에 달하는 세균이 존재하고 있고 분변 중 고형물의 약 30%를 차지한다(Goldin *et al.*, 1988; Mitsuoka, 1990). 이들 중에는 *Clostridium* 등의 부패세균과 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 유익한 세균이 분포되어 있으며 상호균형을 유지하고 있다(Gibson과 Wang, 1994). 따라서 인간은 이러한 장내세균의 균형속에서 대사 산물 등에 의해 노화, 면역, 영양, 감염 등에 지대한 영향을 받으며 살아가게 된다(Goldin *et al.*, 1988; Mitsuoka, 1990). 그러므로 유해한 균들을 억제하고 유익한 균들의 생육을 촉진시키면 건강을

개선, 유지 할 수 있게 된다(Modler *et al.*, 1990). 특히, *Bifidobacterium*은 정상인의 장내에 우점하는 세균으로 초산과 젖산 등의 유기산을 생산하여 장내 부패세균의 생육을 억제함이 알려져 있고(Mitsuoka, 1990) 그밖에도 세포벽 성분인 glycopeptide성분이 면역기능을 강화시키며(Glenn과 Lambrecht, 1993) 돌연변이원성 물질의 흡착에 의한 항돌연변이 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다(Seikine *et al.*, 1994; Zhang과 Ohata, 1991). 또한 *Bifidobacterium*을 비롯한 젖산균들은 동물실험을 통해 콜레스테롤 감소효과가 있음이 확인되었고, 설사를 방지하고 변비를 개선하는 효과가 우수한 것으로 밝혀졌다(Goldin *et al.*, 1988; Mitsuoka, 1990).

현재까지는 *Bifidobacterium*을 발효유나 분유등에 생균 형태로 이용하였으나 최근에는 대사 산물 중 유용한 기능성을 가진 물질을 분리, 정제하려는 연구가 시도되고 있다. 특히, *Bifidobacterium*이 생산하는 다당류는 항암 활성이 보고되면서 고기능성 식품, 의약

Corresponding author: Jun-Bae Ahn, Professor, Department of Culinary Arts & Food Technology, Youngdong University, San 12-1, Seolge-ri, Youngdong-eup Youngdong-gun, Chungbuk, 370-701, Republic of Korea.
Phone: 043-740-1183, Fax: 043-740-1183
E-mail: given@youngdong.ac.kr

품 소재로 각광 받을 가능성이 매우 높은 물질이다 (Huh, 1994; Ohyama, 1982; Wang *et al.*, 1963).

Bifidobacterium 균체는 생균으로 사용할 뿐 아니라 사균체로서도 우수한 식품의 소재로 사용이 가능하고 생리활성 물질을 정제하여도 사용할 수 있다. 따라서 *Bifidobacterium* 균체를 다양한 형태로 개발할 수 있어 관련산업에 파급효과도 클 것으로 사료된다. 각종 발효유 제품의 소비가 세계적으로 증가하는 추세에 있으며 기능성이 강조되면서 다양화, 고급화 현상이 두드러지고 있다(Hawins, 1993; Hughes와 Hoover, 1991). 발효유 제품의 품질은 원료유의 조성, 열처리, 균질, 종균의 종류, 배양조건, 첨가되는 안정제의 종류에 의하여 영향을 받는데 발효유의 견고성을 증진시키고 항암활성 등 기능성을 부가하여 고부가가치 발효유를 생산하는 것은 산업현장에서 매우 중요한 연구개발 과제가 되고 있다(Ahn *et al.*, 1997a; Ahn *et al.*, 1997b; Ji *et al.*, 1994). 또한, 현재까지는 발효유 종균에 대한 국내 연구가 충분하지 못하여 산업에서 소비되는 균주는 대부분 외국으로부터 수입되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 발효유 제품의 고품질화에 적합한 균주를 탐색하고 산화화 가능성을 제시하기 위하여 인체로부터 *bifidobacteria*를 분리하여 균체의 다양성을 대량 생산 하는 균주를 선발하였고 그 특징을 규명하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

실험에 사용한 공시 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)로부터 *Bifidobacterium longum* ATCC15707을 분양받아 사용하였고 균주의 분리를 위해서는 Table 1과 같은 TP배지를 사용하였다(Ji *et al.*, 1994).

다당류 생산능을 검증하기 위한 배지로는 TP배지의 조성 중 탄소원으로 올리고당을 사용하는 대신 포도당을 1%(w/v) 첨가하여 사용하였다. 그 외의 완전배지로는 MRS 배지(Difco, USA)에 0.02%(w/v) Na_2CO_3 , 0.01%(w/v) CaCl_2 와 0.05%(w/v) L-cysteine · HCl를 첨가한 Supplemented MRS(SMRS) 배지를 사용하였다.

균주의 분리

항생제 및 기타 약제를 복용하지 않는 사람으로부터 분변을 받는 즉시 희석을 위하여 0.45%(w/v)

Table 1. Composition of the TP agar medium

Component	Amount
Trypticase (BBL)	10 g
Proteose peptone NO.3 (Difco)	5 g
Ammonium sulfate	3 g
Potassium phosphate, monobasic	2 g
Potassium phosphate, dibasic	1 g
L-cystein · HCl	0.5 g
Magnesium sulfate	0.2 g
Sodium propionate	15 g
Transgalactosylated oligosaccharide ¹⁾	50 ml
Agar	15 g
D.W.	1000 ml

The pH was adjusted to 7.0 with 1 N NaOH

¹⁾20%(w/v) of Transgalactosylated oligosaccharide was prepared in D.W. and sterilized by filtration.

KH_2PO_4 , 0.6%(w/v) Na_2HPO_4 , 0.05%(w/v) L-cysteine · HCl를 함유한 혐기희석액에 넣은 후 심진희석하여 TP 평판배지에 도말하였다. 혐기배양을 위해 평판배지를 anaerobic jar에 옮기고 산소를 제거한 후 37°C에서 48시간 배양 하였다. 생육한 집락 중 Y, V 형의 전형적인 *bifidobacteria*형태를 보이는 그램 양성 세균을 순수분리 하였다.

다당류 생산성 *bifidobacteria*의 선발

인체에서 분리된 *bifidobacteria* 중 평판배지 상에서 생육속도가 빠르고 다당류 특유의 광택이 있는 반투명 집락을 형성하는 균주를 다당류 생산성 *bifidobacteria*로 1차 선발하였다. 선발된 균주 중 다당류 생산성이 뛰어난 균주를 선발하기 위하여 액체배지에 배양하여 다당류를 분리한 후 생산량을 비교하여 최종 선발하였다. 선발된 *bifidobacteria*를 TP배지의 조성 중 올리고당을 포도당으로 치환한 액체배지 20 ml에 각각 접종하고 37°C에서 48시간 배양하여 다당류를 생산시켰다. 배양액을 원심분리 (5,000 g, 30분)하여 상등액을 회수 한 후 3배 부피의 에탄올을 첨가하고 4°C에 12시간 정치하므로써 다당류를 침전시켰다. 침전된 다당류를 원심분리 (8,000 g, 30분)하고 침전물을 회수하여 조다당류를 얻었다. 조다당류를 건조기에 넣은 후 80°C에서 12시간 건조하여 무게를 측정하므로써 다당류 생산성을 알아보았다.

Fructose-6-phosphate phosphoketolase 시험
최종 선발된 *Bifidobacterium*의 동정을 위해 Fig.

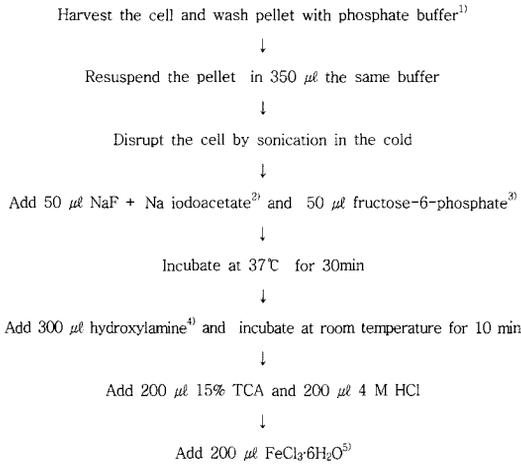


Fig. 1. Procedure for fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) test.

Reagents are

- 1) 0.05 M phosphate buffer pH 6.5 (containing L- cysteine-HCl 500 mg/l)
- 2) NaF 6 mg/ml + Na iodoacetate 10 mg/ml
- 3) Fructose-6-phosphate (Na⁺ salt 98% purity) 40 mg/ml in water
- 4) Hydroxylamine-HCl 13.9 g/100 ml of water (pH 6.5)
- 5) 5%(w/v) FeCl₃·6H₂O in 0.1 M HCl

1과 같이 Fructose-6-phosphate phosphoketolase 시험을 행하였다.

당자화성 시험

균주의 동정을 위하여 당자화성을 알아보았다. 49 개의 당류에 대한 이용성을 알아 보기 위하여 API 50CH(BioMereux, France) kit를 사용하였고 공급자의 방법에 따라 실험을 수행하였다. 다만, 혐기적 조건을 유지하기 위하여 혐기성 배지는 별도로 제조하여 사용하였다. 혐기성배지는 10 g proteose peptone NO.3, 5 g yeast extract, 1 ml Tween 80, 2 g K₂HPO₄, 5 g sodium acetate · 3H₂O, 2 g diammonium citrate, 0.2 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.05 g MnSO₄ · 4H₂O, 0.5 g L-cysteine · HCl, 0.17 g bromocresol purple 을 증류수 11에 녹여 혐기적으로 제조되었다.

당자화능을 기초로 Roy와 Ward(1990)의 방법에 준하여 분리 균주를 동정하였다.

세포 지방산 분석

세포지방산 분석은 MIDI Microbial Identification System(Microbial ID, USA)을 사용하였으며 균주의 동정은 Sherlock software내의 Moore library를 사용하여 수행되었다. 시료준비, 분석방법 및 분석조건

은 사용설명서에 준하였다.

다당류의 분리

선발된 *Bifidobacterium*을 TP 액체배지 11에 접종하여 37°C에서 48시간 배양 하였다. 배양액을 원심 분리(5,000 g, 30분)하여 상등액을 회수 한 후 3배 부피의 에탄올을 첨가하고 4°C에 12시간 정치하므로써 다당류를 침전시켰다. 침전된 다당류를 원심 분리(8,000 g, 30분)하여 다당류를 회수하고 20 ml 증류수에 용해하였다. 다당류 액에 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 용액을 가하여 원심분리(5,000 g, 10분) 후 수용액 층을 회수하는 조작을 3회 반복하여 단백질을 제거하였다. 회수된 다당류액을 냉동건조하여 건조 다당류를 얻었다.

박막크로마토그래피(TLC)에 의한 다당류 성분 분석

냉동건조 된 다당류 3.5 mg을 2 N HCl 5 ml에 녹이고, 100°C에서 4시간, 8시간 분해하였다. 분해된 시료를 silica gel이 도포된 TLC plate에 spotting 하고 n-butanol : ethanol : water = 4 : 3 : 3 (v/v) 혼합액을 전개용매로 하여 25°C 밀폐 용기내에서 6 시간 전개하였다. 20% 황산을 분무하여 100°C에서 20분 방치함으로써 발색시켰다.

이온크로마토그래피에 의한 다당류 성분 분석

냉동 건조된 다당류 10 mg을 500 mM trifluoroacetic acid(TFA) 1 ml를 넣어 100°C에서 150분간 분해시킨 후 Ion chromatography로 구성 단당류를 분석하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 다당류 고생산성 균주의 선발

인체로부터 200여종의 bifidobacteria를 분리하였고, 이 중 평판배지 상에서 생육속도가 빠르고 다당류 특유의 광택이 있는 반투명 집락을 형성하는 균주 3종을 순수분리하여 다당류 생산능력을 비교하였다.

3종의 균주는 Fructose-6-phosphate phosphoketolase 시험에 양성반응을 보였고 현미경 상에서 bifidobacteria 특유의 V, Y형태를 보여 모두 bifidobacteria임을 알 수 있었다.

Fig. 2와 Fig. 3의 결과와 같이 3종의 균주 중 1 ml 배양액에 2.4 mg의 다당류를 생산한 AH25 균주

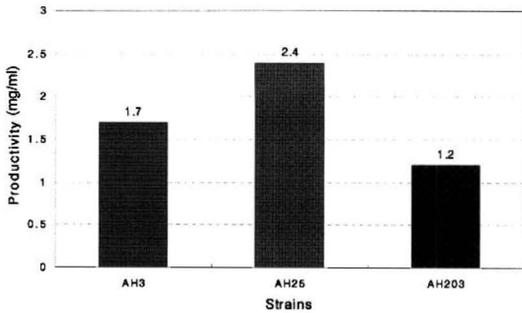


Fig. 2. Productivity of exopolysaccharide of Bifidobacteria.

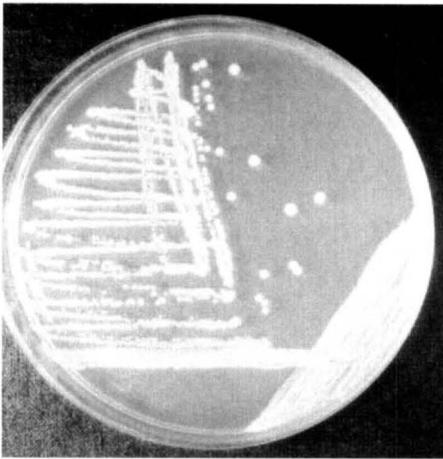


Fig. 3. Cultural characteristics of Bifidobacterium sp. AH25.

를 다당류 생산 우수균주로 선발하였다.

당자화성에 의한 선발 균주의 동정

다당류를 대량 생산하는 선발 균주를 동정하기 위해 당자화능을 알아본 결과는 Table 2와 같았다. 선발 균주는 5탄당 발효능(arabinose, ribose, xylose)이 있었으며 Bifidobacterium longum의 전형적인 특징인 melezitose 이용능이 있는 점으로 보아 Bifidobacterium longum일 것으로 추정하였다.

세포지방산 분석에 의한 선발 균주의 동정

선발 균주의 세포지방산 pattern은 Fig. 4와 같았고 Moore library에 의한 분석 결과 Bifidobacterium longum과 유사도가 69.8%로 분석되어(Table 3) 선발 균주는 Bifidobacterium longum일 가능성을 확인하였다. 그러나 정확한 동정을 위해서는 향후 유전자수준에서의 확인이 필요하므로 동정 균주를

Table 2. Carbohydrate utilization of the selected Bifidobacterium

D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Ribose	+
D-Xylose	+
L-Xylose	-
β-Methyl-xyloside	-
Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
Rhamnose	-
α-Methyl-D-mannoside	-
α-Methyl-D-glucoside	+
N- Acetyl glucosamine	-
Cellobiose	-
Maltose	+
Lactose	+
Melibiose	+
Saccharose	+
Trehalose	-
Melezitose	+
D-Raffinose	+
Glycogen	-
Xylitol	-
β-Gentibiose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconate	-

Bifidobacterium sp. AH25로 명명하였다.

박막크로마토그래피(TLC)에 의한 다당류 성분 분석

다당류를 2N 염산으로 분해하여 구성 당류를 TLC에 의해 분석한 결과는 Fig. 5와 같았다. 표준물질로 glucose, ribose, mannose, arabinose, fructose, galactose, xylose를 사용하였고 각각의 전개거리는 0.84, 0.82, 0.83, 0.82, 0.81, 0.77, 0.88이었다. 4시간, 8시간 분해물의 전개거리(Rf 값)를 비교한 결과 0.88, 0.84, 0.77의 당류가 발견되어 각각 xylose, glucose, galactose일 가능성을 확인하였고 이를 이온크로마토그래피를 통해 정확히 알아 보았다.

이온크로마토그래피에 의한 다당류 성분 분석

다당류의 구성당을 정확히 동정하기 위하여 이온크로마토그래피(Bio-LC)를 이용하여 분석한 결과는

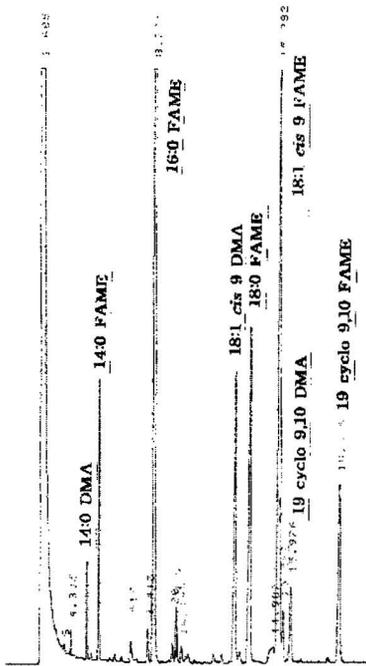


Fig. 4. Cellular fatty acid profiles of the selected *Bifidobacterium*.

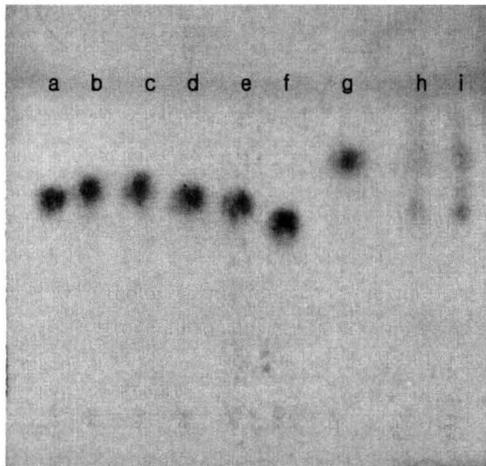


Fig. 5. TLC analysis of component of exopolysaccharide from *Bifidobacterium* sp. AH25
 a : Glucose b : Ribose c : Mannose d : Arabinose e : Fructose
 f : Galactose g : Xylose h : 4hr hydrolyzate I : 8hr hydrolyzate.

Fig. 6과 같았다. 표준물질로 사용한 당류는 myo-inositol, inositol, glycerol, rhamnase, xylitol, ribitol, glucose, lactulose, lactose, galactose, fructose, sucrose, xylose 였으며 다당류를 분석한 결과 glucose,

Table 3. Cellular fatty acid profiles and identification of the selected strain

Fatty acid and its derivatives	Peak ratio (%)
Saturated fatty acid	
C _{12:0} FAME ¹⁾	0.85
C _{14:0} FAME	4.69
C _{16:0} FAME	32.9
C _{18:0} FAME	5.37
C _{11:0} DMA ²⁾	0.51
C _{14:0} DMA	4.32
C _{16:0} DMA	1.77
C _{18:0} DMA	1.03
Unsaturated fatty acid	
C _{14:1} cis9 FAME	0.26
C _{16:1} cis7 FAME	0.87
C _{16:1} cis9 FAME	1.09
C _{18:1} cis9 FAME	8.32
C _{18:1} cis9 DMA	13.6
Cyclopropane fatty acid	
C ₁₉ cyc9,10 FAME	4.25
C ₁₉ cyc9,10 DMA	8.33
Summed feature³⁾	
Summed feature 1	1.43
Summed feature 2	-- ⁴⁾
Summed feature 7	3.19
Summed feature 10	1.18
Similarity (%)	<i>B.longum</i> 69.8

1) Fatty acid methyl ester, 2) Dimethyl acetal 3) Unknown fatty acid 4) Not detected

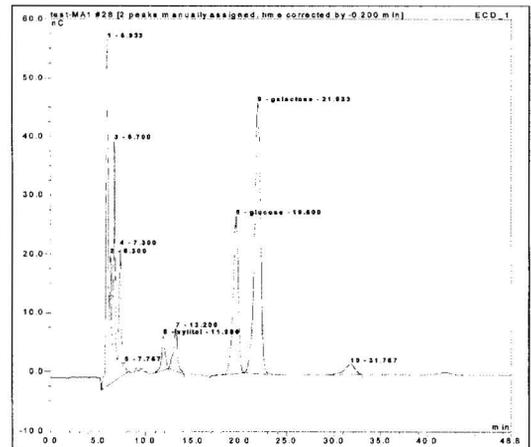


Fig. 6. Ion chromatographic analysis of component of exopolysaccharide from *Bifidobacterium* sp. AH25.

galactose, xylitol의 존재를 확인 할 수 있었다. 각 단당류의 함량은 galactose가 36.3%, glucose가 18.2 %, xylitol이 2.6%로 확인 되어 *Bifido-bacterium* sp.

AH25가 생산하는 다당류는 galactose를 주로 하는 당류로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

본 연구 결과를 바탕으로 향후 *Bifidobacterium* sp. AH25가 생산하는 다당류의 생리활성을 검증하고 생산성을 높이는 연구가 수행된다면 분리 균주를 산업체에서 효과적으로 활용할 수 있으리라 기대된다.

요 약

*Bifidobacteria*는 인간 장내에 상존하는 유익한 세균으로 알려져 있고 산업적으로도 중요한 절대혐기성 세균이다. 특히, 젖산균 및 *bifidobacteria*가 생산하는 다당류는 항암 활성 등 다양한 생리활성이 보고되면서 건강기능식품 소재로써 주목 받고 있다. 본 연구에서는 인체로부터 다당류를 대량생산하는 *Bifidobacterim*을 선발하여 *Bifidobacterium* sp. AH25로 명명 하였고 생산된 다당류의 특성을 규명하기 위하여 구성 당류를 분석하였다. 인체로부터 선발된 다당류 생산성 *Bifidobacterim*은 2.4 mg/ml (배양액)의 생산성을 보였고 당자화성, 세포지방산 분석을 통해 *Bifidobacterium longum* 과 유사한 특성을 보임을 확인하였다. *Bifidobacterium* sp. AH25가 생산하는 다당류는 박막크로마토그래피(TLC), 이온크로마토그래피(Bio-LC) 분석에 의해 glucose, galactose, xylitol 등으로 구성되었음을 알 수 있었고 이온크로마토그래피(Bio-LC) 분석에 의해 galactose가 36.3%, glucose가 18.2%, xylitol이 2.6%로 이루어졌음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Ahn, J.B., G.E. Ji, H.K. Jeong, K.H. Lee and J.H. Park. 1997a. Isolation and selection of *Bifidobacterium* spp. from Korean feces for fermented dairy foods. *Korean J. Dairy Sci.* **19(4)**: 349-360
- Ahn, J.B., K.H. Lee and J.H. Park. 1997b. Isolation and identification of oxygen resistant *Bifidobacterium* sp. from Korean and its characteristics. *Korean J. Food and Nutr.* **10(1)**: 122-126
- Gibson, G.R. and X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **77(3)**: 412-420
- Glenn, E.H. and R.S. Lambrecht. 1993. Augmentation of Macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid producing bacteria. *J. Dairy Sci.* **76(9)**: 2485-2492
- Goldin, B.R., A.H. Lichtenstein and S.L. Gorbach. 1988. The roles of the intestinal flora. In: *Modern nutrition in health and disease*. M.E. Shils and V.R. Young(ed.). LEA and FEBIGER, Philadelphia, USA. Pp500-512
- Hawins, S.M. 1993. Bifidobacteria in dairy products. *Cultured Dairy Products Journal* **28(1)**: 16-20
- Hughes, D.B. and D.G. Hoover. 1991. Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* **45(1)**: 74-83
- Huh, C.S. 1994. A dissertation for the degree of doctor of philosophy. Seoul National University, Korea
- Ji, G.E., S.K. Lee and I.H. Kim. 1994. Improved selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* sp.. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26(5)**: 526-531
- Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* **6(3)**: 263-267
- Modler, H.W., R.C. Mckellar and M. Yaguchi. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23(1)**: 29-41
- Ohyama, Y. 1982. Extracellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium*. *J. Dairy Food Sci.* **31(3)**: 258-259
- Roy, D. and P. Ward. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69(4)**: 739-749
- Seikine, K., E.W. Sekine, J. Ohta, T. Toida, T. Tatsuki, T. Kawashima and Y. Hashimoto. 1994. Induction and activation of tumoricidal cells in vivo and in vitro by the bacterial cell wall of *Bifidobacterim infantis*. *Bifidobacteria Microflora* **13(1)**: 65-77
- Wang, M., E. Steers and R.F. Norris. 1963. Extrapolysaccharide of mucoid *Lactobacillus bifidus*. *J. of Bacteriol.* **86(4)**: 898-903
- Zhang, X.B. and Y. Ohata. 1991. Binding of mutagens by fraction of the cell skeleton of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **74(5)**: 1477-1481