

한국인 분변으로부터 분리된 *Bacteroides fragilis* Roid 8의 Glycosidase 패턴

지근억 · 이세경
한림대학교 식품영양학과

Glycosidase Pattern of *Bacteroides fragilis* Roid 8 Isolated from a Korean Adult Feces

Geun Eog Ji* and Se Kyeong Lee

*Department of Food Science and Nutrition and Hallyum University

Abstract

The intestinal microflora of humans is an extraordinarily complex mixture of microorganisms, the majority of which are anaerobic bacteria. Amongst them, most prevalent bacteria are *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Bifidobacteria*. We isolated a *Bacteroides fragilis* strain from a Korean adult and examined various glycosidase activities of this strain. The activities of N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, β -glucuronidase, chitobiase and PNPCase were stronger in *Bacteroides fragilis* Roid 8 than in other intestinal anaerobic bacteria. N-acetyl- β -glucosaminidase was strongest, followed by α -fucosidase, β -glucuronidase and PNPCase. The activities of β -galactosidase, β -xylosidase, α -arabinofuranosidase were not present or very low. The activities of α -glucosidase, β -glucosidase and α -galactosidase were present but at a lower level than in *Bifidobacterium*. The effect of the carbon sources on the production of N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, β -glucuronidase and PNPCase of *Bacteroides fragilis* Roid 8 was investigated. Lactose and glucose lowered the production of the various glycosidase enzymes studied in this work. In addition, we investigated the optimum temperature and pH of each glycosidase from *Bacteroides fragilis* Roid-8 using crude enzyme preparations.

Key words: Glycosidase pattern, *Bacteroides fragilis*

서 론

*Bacteroides fragilis*는 편성 혐기성균으로 유아기 이후로부터 노년에 이르기까지 인체의 장내에 가장 많이 존재하는 균이다^(1,2). 장외의 장기로부터의 임상검체나 수술 후 감염에 관여하는 기회 감염균으로써도 역시 혐기성균중 가장 높은 빈도를 차지하고 있다^(3,4). 장내의 *Bacteroides fragilis*는 인체에 유익한 작용과 유해한 작용을 동시에 갖고 있다고 생각되고 있다. 장내에서 미생물의 발효기질은 식이섬유를 포함한 다당류와 장점막으로부터 분비되는 mucin 등이 주를 이루고 있는데 *Bacteroides*는 이들 성분들의 일부에 대한 분해 및 이용성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다^(5,6). 한편 식이섬유의 섭취가 적고 지방질의 섭취가 많은 서양식 위주의 식사를 섭취하는 경우에는 대장과 분변에 장내균총이 생산하는

β -glucuronidase, β -glucosidase, nitroreductase, azoreductase 등의 활성이 높은 것으로 보고되었는데^(7,8), 이들은 발암물질 생성효소로서 대장암의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 여겨지고 있다. 본 실험에서 분리된 *Bacteroides fragilis* Roid 8은 대장에 상재하는 다른 종류의 균들에 비하여 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, β -glucuronidase, chitobiase, PNPCase 등의 활성이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. *Bacteroides*들이 생산하는 이들 효소들은 인체 대장의 생리에 영향을 크게 미칠 것으로 사료되어 본 연구에서는 *Bacteroides fragilis* Roid 8이 생산되는 이들 효소들에 대한 생산조건 및 조효소들의 최적온도와 최적 pH를 조사하였다.

재료 및 방법

균주분리

지원자의 분변을 얻어 즉시 혐기성 배양에 의하여 *Bacteroides*를 NBGT 선택배지⁽⁹⁾에서 균주들을 분리하였다. 분리된 균주들은 Bergey's Manual에 준하여 형태학적, 생리학적, 배양학적 제특성을 조사하고 동정하였다.

Corresponding author: Geun-Eog Ji, Department of Food Science and Nutrition, Hallyum University, Chunchon, Kangwon-do, 200-702, Korea

Table 1. Substrates for activity measurement of enzymes

Enzymes	Substrates
α -glucosidase	PNP- α -glucoside
β -glucosidase	PNP- β -glucoside
α -galactosidase	PNP- α -galactoside
β -galactosidase	ONP- β -galactoside
β -xylosidase	PNP- β -xyloside
α -arabinofuranosidase	PNP- α -arabinofuranoside
β -glucuronidase	PNP- β -glucuronoside
α -fucosidase	PNP- α -fucoside
chitobiase	PNP- β -N,N-diacetylchitobiose
N-acetyl- β -D-glucosaminidase	PNP-N-acetyl- β -D-glucosaminide
PNPCase	PNP- β -cellobioside
α -mannosidase	PNP- α -mannoside
β -galacturonidase	PNP- β -galacturonide

각 분리 균주의 효소 spectrum 비교

각 분리 균주의 효소 spectrum은 박 등⁽¹⁰⁾의 방법을 이용하여 조사한 후 장내에 상재하는 공시균주와 비교하였다. 이때 각 효소들의 역가를 측정하기 위한 기질은 Table 1과 같았다. 각 효소의 1 unit는 주어진 반응조건에서 1분당 1 μ mole의 PNP(para-nitrophenol) 또는 ONP(ortho-nitrophenol)를 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

Bacteroides fragilis Roid 8의 각 효소생산에 미치는 탄소원의 영향

본 실험실에서 분리, 동정하여 보관하고 있는 균주 *Bacteroides fragilis* Roid 8의 각 효소생산에 미치는 탄소원의 영향은 BHI broth에 각각의 탄소원을 0.5%씩 가하여 만든 배지에 균을 접종, 배양하면서 시간의 경과에 따라 시료를 채취하여 세포 내부에 생성된 각 효소들의 역가 변화를 관찰함으로써 측정하였다. BHI broth의 조성은 Table 2에 나타내었다.

조효소액의 제조 및 최적 pH와 최적온도 조사

BHI broth에 2일간 혐기적으로 배양한 뒤 원심분리한 pellet에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8)를 가하고 음파파쇄하여 원심분리한 상등액을 Sepharose-CL-6B에서 용출시킨 뒤 각 효소에 대한 분획을 모아 조효소액으로 사용하였다⁽¹⁰⁾. 각 조효소액의 최적온도는 20°C에서 70°C까지 10°C 간격으로 효소반응온도를 달리하여 각 기질에 대한 효소의 역가를 측정된 뒤 상대 활성을 측정하였다. 각 조효소액의 최적 pH는 citrate-Na₂HPO₄ buffer(pH 3.0~8.0), Glycine-NaOH buffer(pH 8.0~10.0)를 사용하여 각 pH에서 각 기질에 대한 효소의 역가를 측정된 뒤 상대 활성을 측정하여 결정하였다.

Table 2. Composition of the BHI Media

Brain Heart Infusion	37g
Hemin	0.01g
Cysteine	0.5g
Resazurin	0.001g
Vit. K	0.001g
Distilled Water	1 L

*pH was adjusted to 7.0.

In case of the agar medium, 20g of agar was added

결과 및 고찰

균주특성 및 glycosidase pattern

선택배지에서 분리된 균주들은 대부분 그람음성, 편성 혐기성, 간균인 *Bacteroides*로 나타났다. 이들 중 분리된 *Bacteroides fragilis* Roid 8은 *Bacteroides fragilis*의 기준 균주와 형태와 발효성 및 효소 보유에서 거의 동일하였다 (Fig. 1, Table 3, 4). 전보의 보고⁽¹⁰⁾ 및 본보의 Table 4에서 알 수 있는 바와 같이 효소보유에 있어서 Roid 8은 대장에 상재하는 다른 균들에 비해서 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, β -glucuronidase, chitobiase, PNPCase 등의 활성이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase 등도 생산하였으나 이들은 *Bifidobacterium*⁽¹⁰⁾에 비하여 효소 생산 수준이 적었다. 생산된 효소중 N-acetyl- β -glucosaminidase의 생산이 가장 강력하였다. N-acetyl- β -glucosaminidase와 α -fucosidase는 당단백질 특히 mucin의 분해에 깊이 관여할 것으로 사료된다. Mucin은 goblet 세포에 의하여 생산되는 산성 당단백질로써 장상피세포를 보호하는 gel을 형성한다. 점막 유동층 mucin은 당부위가 mucin 분자량의 85%를 차지하고 있으며 N-acetyl- β -glucosaminidase와 α -fucosidase는 장점막 상피세포의 mucin을 분해하여 점막 세포의 손상을 유발할 가능성이 있는 효소들이다⁽⁵⁾. Macfarlane 등⁽¹¹⁾은 연속 배양장치를 이용하여 mucin을 첨가한 배양과 mucin을 첨가하지 않은 배양에서 배양액 내의 균총 조성과 여러 종류의 효소들의 활성을 비교한 결과 mucin 첨가 연속 배양에서 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -glucosidase, β -galactosidase의 활성이 약 2배 높았다고 보고하였다. Macfarlane의 보고에서는 개별균주의 활성 비교는 없었다. 본 논문의 결과에서도 mucin을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우(control)보다 조사된 대부분의 활성이 높았지만 여러 종류의 당들에 비하여 현저히 높은 생산은 없었다. Chitobiase는 대장내에서 갑각류와 진균류의 chitin 물질의 분해에 관여할 것으로 생각된다. Chitin이 닭에 Bifidus 인자라고 보고⁽¹²⁾된 바 있으나 본 실험에서는 *Bifidobacterium*은 chitobiase가 없는 것으로 나타났다 오히려 *Bacteroides*가 chitobiase를 보유하고 있는 것으로 나타났기 때문에 앞으로 이 문제에 대한 추가

Table 3. Fermentation of carbohydrates by the isolated strains

Strain Carbohydrate	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	<i>Bacteroides fragilis</i> Roid 8	<i>Bacteroides fragilis</i> Roid 11	Roid K	Roid KH	KS 1	KS 2
arabinose	-	-	-	+	-	+	-
arbutin	-	-	-	-	-	-	-
cellobiose	-	-	-	+	-	-	-
esculin	+	+	+	-	-	-	-
fructose	+	+	+	+	-	+	+
galactose	+	+	+	+	+	-	+
gluconate	-	-	-	-	-	-	-
glucose	+	+	+	+	+	+	+
inulin	-	-	-	-	-	+	-
lactose	+	+	+	+	+	-	-
maltose	+	+	+	+	+	+	+
mannitol	-	-	-	-	-	-	-
mannose	+	+	+	+	+	+	-
melezitose	-	-	-	+	-	-	-
melibiose	-	+	+	+	-	+	+
myoinositol	-	-	-	-	-	-	-
raffinose	+	+	+	+	-	+	+
rhamnose	-	-	-	-	-	+	-
salicine	-	-	-	+	-	-	-
sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
starch	+	+	+	+	+	-	-
sucrose	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	-	-	-	+	-	-	-
xylose	+	+	+	+	+	-	+

+: positive, -: negative

Table 4. Glycosidase pattern of the isolated strains

	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	<i>Bacteroides fragilis</i> Roid 8	<i>Bacteroides</i> K	<i>Bacteroides</i> KH	<i>Bacteroides</i> KS1	<i>Bacteroides</i> KS2	<i>Bifidobacterium</i> Int-57	<i>Streptococcus</i> <i>fecalis</i>
α-glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	-
β-glucosidase	+	+	+	+	-	+	+	w
α-galactosidase	+	+	+	-	+	+	+	-
β-galactosidase	-	-	-	-	-	-	+	-
α-arabinofuranosidase	-	-	-	-	-	-	+	-
β-xylosidase	-	-	-	-	-	-	+	-
β-glucuronidase	+	+	+	-	+	+	-	-
α-fucosidase	+	+	-	-	+	-	+	-
PNPCase	+	+	+	+	-	+	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	+	+	+	-	+	+	-	-
α-mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-
chitobiase	+	+	+	-	+	+	-	-
β-galacturonidase	-	-	-	-	-	-	-	-

+: showing positive reaction in 12 hours, -: showing negative reaction in 12 hours, w: showing weak reaction in 12 hours

실험이 요구된다. β-glucuronidase는 인체에 의하여 포함되어 배설되는 소수성 독성물질을 다시 탈 포함시켜 독성물질이 장내에서 재흡수되는 것을 증가시키기는 효소로서 대장암과의 상관관계에 대한 조사는 의미있는 것이라 하겠다. 구미인의 높은 지방 및 단백질 섭취가 대장암을 높은 빈도로 일으키게 하는데 구미인의 대장

내용물과 분변은 β-glucuronidase의 활성이 높은^(7,8) 것으로 조사되어 있기 때문에 앞으로 *Bacteroides*의 β-glucuronidase에 대한 보다 자세한 조사가 필요하다고 하겠다. 한편 본 균주는 PNPCase 역가를 지니고 있었지만 avicellase 역가와 CMC(carboxy methyl cellulose)ase 역가는 아직 검출되지 않았기 때문에 PNPCase의 기능이

Table 5. Optimum temperature and optimum pH of the *Bacteroides fragilis* Roid 8 glycosidase

<i>Bacteroides fragilis</i> Roid 8 glycosidase	Optimum temperature(°C)	Optimum pH
α -glucosidase	50	6.5
β -glucosidase	50	6.0
α -galactosidase	40	6.0
N-acetyl- β -glucosaminidase	45	6.5
α -fucosidase	40	5.0
β -glucuronidase	50	6.0
chitinase	45	6.5
PNPCase	45	5.0

무엇인지 아직 확실하지 않다.

탄수화물의 종류에 따른 효소생산

BHI를 기본배지로 하여 여러 종류의 탄수화물들을 첨가하고 배양하여 생산된 각 효소들의 활성을 조사한 결과 각 효소들에 대한 생산을 월등히 높여주는 기질은 없었으나 일반적으로 lactose와 glucose는 본 연구에서 조사된 효소들의 생산을 전반적으로 저하시켰다(Fig. 2~9). 이러한 결과는 lactose와 glucose가 *Bifidobacterium*의 효소들에 대하여도 일반적으로 glycosidase 생산을 저하시키는 것과 같은 양상을 보여준 것이었다⁽¹⁰⁾. 반면에 xylose, cellobiose, starch, mucin 등에서 조사된 각 효소들의 생산이 비교적 높았고 배양 후기에 효소활성이 줄어드는 속도는 starch와 mucin에서 비교적 느렸다. *Bifidobacterium*에서 조사된 결과에 의하면 maltose는 α -glucosidase를, cellobiose는 β -glucosidase를, lactose는 β -galactosidase를, raffinose는 α -galactosidase를, xylose는 β -xylosidase와 α -arabinofuranosidase의 생산을 각각 높여주었는데 *Bacteroides*에서는 이와 같은 특이적인 효소생산의 증가가 없는 것으로 보아 효소생산의 조건에 있어서 특이성이 약한 것으로 볼 수 있다. *Streptomyces*에서는 fucose가 α -fucosidase의 생산을 증가시켰고⁽¹³⁾ 대장균에서는 methyl- β -glucuronide가 β -glucuronidase의 생산을 높여주었지만⁽¹⁴⁾ *Bacteroides fragilis* Roid 8에서는 이와 같은 결과가 관찰되지 않았다. 이와 같이 각각의 당들이 여러 종류의 효소생산에 광범위하게 영향을 미치는 것이 인체 대장의 생리에 미치는 영향과 *Bacteroides*의 진화상의 위치를 유추하는데 도움을 줄 것이다.

조효소액의 제조 및 최적 pH와 최적온도 조사

BHI에서 24시간 배양하여 원심분리한 pellet에 0.1 M phosphate buffer를 가하고 세포를 음파 파쇄하여 원심분리한 상등액을 Sepharose-CL-6B에서 용출시켜 각 효소반응을 나타내는 분획을 모아 실험에 사용하였다. β -glucuronidase는 대부분 blue dextran-2000과 같이 나오는 것으로 보아 aggregation이 심하게 일어난 것으로

생각된다. α -fucosidase와 PNPCase는 같은 분획에서 용출되었다(결과 생략). 이들에 대하여 온도와 pH를 달리 하여 효소활성을 조사한 결과는 Table 5와 같다. PNPCase는 45°C 이상에서는 급격히 불활성화되는 것으로 나타났다.

요 약

인체의 대장은 여러 종류의 균들에 의하여 상재균총이 이루어져 있는데 이들중 혐기성 균들이 주종을 이루고 있다. 이들 혐기성 균들중 가장 많은 수가 *Bacteroides*이다. 본 연구에서 한국인으로부터 분리된 *Bacteroides fragilis* Roid 8은 장내의 다른 혐기성 균주들에 비하여 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, β -glucuronidase, chitinase, PNPCase 등의 활성이 높았다. β -galactosidase, β -xylosidase, α -arabinofuranosidase 활성은 없었고 α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase 등의 생산은 *Bifidobacteria*에 비하여 낮았다. BHI 기본배지에 여러 종류의 탄수화물을 첨가하여 배양한 뒤 생산된 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, β -glucuronidase, chitinase, PNPCase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase 활성을 조사한 결과 모두 glucose와 lactose 첨가배지에서 이들 효소들의 활성이 낮았다. 조사된 모든 효소들에 대하여 특이적으로 현저히 생산을 증가시키는 당은 없었다. 이들 8개의 효소에 대하여 최적 pH와 최적온도가 조사되었다.

감사의 말

본 논문은 1992년 과학재단 특정기초 연구비(92-50-00-02)의 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부로써 이에 감사드립니다.

문 헌

- Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, **70**, 443(1991)
- Mitsuoka, T.: Taxonomy and ecology of *Bifidobacteria*. *Bifidobacteria Microflora*, **3**, 11(1984)
- Goldin, B., Lichtenstein, A.H. and Gorbach, S.L.: The roles of the intestinal flora in "Modern Nutrition in Health and Disease" ed. by Maurice E. Shills, and Vernon R. Young, pp.500(1988)
- Gorbach, S.L. and Bartlett, G.J.: Anaerobic infection. *N. Engl. J. Med.*, **290**, 1177(1974)
- Hoskins, L.C., Agustines, M., Mckee, W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M. and Niedermeyer, G.: Mucin degradation in human colon ecosystems. *J. Clin. Invest.*, **75**, 944(1985)
- Salysers, A.A., West, S.E.H., Vercellotti, J.R. and Wilkins, T.D.: Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon.

- Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 529(1977)
7. Wynder, E.L.: The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res.*, **35**, 3388(1975)
 8. Goldin, B., Dwyer, J., Gorbach, S., Gordon, W. and Swenson, L.: Influence of diet and age fecal on bacterial enzymes. *American J. Clin. Nutr.*, **31**, S136(1978)
 9. Mitsuoka, T.: A color atlas of anaerobic bacteria (second ed.) pp.319-327(1984)
 10. 박현국, 강동현, 윤석환, 이계호, 이세경, 지근익 : 한국인 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 효소 pattern 한국산업미생물학회지, **20**, 647-654(1992)
 11. Macfarlane, G.T., Hay, S. and Gibson, G.R.: Influence of mucin on glycosidase, protease, and arylamidase activities of human gut bacteria grown in a 3-stage continuous culture. *J. Applied Bacteriology*, **66**, 407 (1989)
 12. Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P.: Chitin: New facets of Research. *Science*, **212**(1981)
 13. Yamamoto, K., Tsuji, Y., Kumagai, H. and Tooichikura, T.: Induction and purification of alpha-L-fucosidase from *Fusarium oxysporum* Agri. *Biol. Chem.*, **50**, 1689 (1986)
 14. Richard, A.J., Burgess, S.M. and Hirsh, D.: β -glucuronidase from *E. coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8447(1986)
-
- (1993년 1월 30일 접수)