

산소의 Stress에 따른 *Bifidobacterium adolescentis*와 *Bifidobacterium longum*의 산화효소의 활성과 세포 지방산 조성의 변화

신순영 · 박종현*
한국식품개발연구원

Changes of Oxidative Enzymes and Fatty Acid Composition of *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum* under Anaerobic and Aerated Conditions. Shin, SoonYoung and Jong-Hyun Park*. Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea - To study the oxygen tolerance mechanism of bifidobacteria, we have studied the growth of cells, the activities of the enzymes which were related with oxygen, such as catalase, superoxide dismutase(SOD), NADH oxidase, and NADH peroxidase, and cellular fatty acid compositions of *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum* under anaerobic and aerated (microaerobic and aerobic) conditions. *B. longum* grew relatively well under the microaerobic conditions, whereas the growth of *B. adolescentis* was inhibited under the same aerated conditions. *B. adolescentis* had extremely low level of NADH oxidative enzymes while *B. longum* had the relatively high level of NADH oxidative enzymes, whose activities were dramatically increased from 3.7 to 11.4 times by microaerobic condition but not in *B. adolescentis*. The activity of SOD was unexpectedly high in *B. adolescentis* compared with in *B. longum* under anaerobic and aerated conditions. The activities of catalase were not detected in all samples tested in this study. We also found that normal C_{16:0} and C_{18:1} were the major fatty acids in *B. adolescentis* and *B. longum* under anaerobic and aerated conditions. 2.2-14.1% C_{19:0} cyclo fatty acid was detected only in *B. longum* and the fatty acid was increased by the addition of the aeration. The C_{19:0} cyclic fatty acid was identified as a cis 9, 10-methylene octadecanoic acid, which was different from lactobacillic acid in the cyclized site. 6.6%-24.6% of dimethyl acetals (DMA) which came from plasmalogen were observed in the *B. adolescentis* and *B. longum* grown under anaerobic condition, and the components were notably decreased in the cells grown under the aerated conditions. It is believed that NADH oxidative enzymes play an important role to detoxify oxygen metabolites of *Bifidobacterium* spp. under anaerobic and microaerobic conditions. Independently from oxidative enzymes, it seems that oxygen stress may induce the change of the level of cellular fatty acids showing an increase of C_{19:0} cyclo in *B. longum* and a decrease of C_{18:1} of plasmalogen in *B. longum* and *B. adolescentis* to adapt in environment.

Key words: oxygen stress, bifidobacteria, NADH oxidative enzymes, fatty acid composition

Bifidobacteria은 장내 우점종으로 최근 bifidobacteria의 유익한 작용이 많이 알려져 식품, 특히 유제품, 약품, 사료 등 여러 분야에 probiotics로의 이용이 확대되고 있다[1, 10, 22]. Bifidobacteria는 발효로 생육에 필요한 에너지를 얻는 혐기성균으로 일반적인 호기성 배양으로 생육하지 못한다[3]. 그러나 bifidobacteria는 아주 적은 양의 산소가 있을 경우 어느 정도 생육이 가능하며 배양시의 산소에 대한 내성이나 민감도는 균주마다 차이가 있다. 내 산소성이 있는 경우, 다른 유산균에서 관찰되었듯이[8, 11, 14, 17, 19, 23], NADH에 의존한 산화 효소가 산소 제거에 밀접히 관련되어 있는 것이 보고되어 있다[20, 21].

Shmamura 등[21]은 6종의 bifidobacteria의 산소에

대한 민감성의 차이와 산소 관련 효소와의 관계를 조사한 결과, NADH oxidase와 NADH peroxidase가 이들 균주의 산소 대사와 밀접히 관련되어 있으며, 이 효소들이 산소에 대한 독성을 방어하는 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 그러나 bifidobacteria의 내 산소성과 관련하여 이들 효소들의 활성이 산소의 존재에 따라 어떻게 변화하며 이에 따른 세포의 구조적, 생리적 반응은 어떤지 등 아직 구체적인 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 bifidobacteria의 내산소성 기작을 밝히기 위한 연구의 일환으로 bifidobacteria를 산소가 있는 상태에서 배양하여 그에 따른 세포 생리를 관찰하였다. 즉 산소에 내성이 있는 균주 *B. longum*과 상대적으로 산소에 민감한 *B. adolescentis*를 선정하여 생육을 비교하고 산소와 관련된 효소들, 즉 catalase, superoxide dismutase, NADH oxidase와 NADH peroxidase의 활성을 측정하였

*Corresponding author
Tel. 82-342-780-9255, Fax. 82-342-709-9877
E-mail: p5062@chollian.dacom.co.kr

다. 또 산소가 접촉되는 stress환경에서 세포의 형태나 구조적 변화를 관찰하기 위하여, 세포 지방산을 분석하여 세포의 성분 중 외부 환경에 가장 민감하게 반응하는 세포막에 어떤 변화가 있는지 고찰 하였다. 그 결과를 bifidobacteria의 이용성 향상이라는 응용면에 앞서 세포의 산소에 대한 반응이라는 기초적 관점에서에서 논의하였다.

재료 및 방법

균주, 배지, 및 배양 방법

균주는 *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703과 *B. longum* ATCC 15707을 사용 하였고, 배지는 SMRS (Supplemented MRS: MRS 배지에 L-cysteine · HCl 0.05 %, Na_2CO_3 0.02%와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%를 첨가한 것)를 사용하였다. 배양은 일반적인 혐기적 방법에 의해 제조된 배지(150 ml의 serum vial에 70-100 ml 분주)에 종배양을 3% 접종하여 37°C에서 혐기적 조건, 미호기적 조건, 그리고 호기적 조건에서 배양하였다. 혐기적 조건은 serum vial의 마개를 butyl rubber와 aluminium seal로 밀폐시킨 방법이었으며, 미 호기적 조건은 종배양을 접종후 무균적으로 serum vial의 마개를 면전으로 바꾸고, 30-60 rpm으로 진탕하여 대기중의 산소가 서서히 주입되도록 하였다. 호기적 조건은 미호기적 배양과 같은 방법으로 마개를 면전으로 바꾼후, 100 rpm으로 진탕하여 균의 생육이 거의 억제되는 조건으로 설정하였다.

효소 활성 측정

조효소액 주위된 조건에서 배양된 배양액을 4°C, 9,820 g에서 20분간 원심분리한 후 생리 식염수로 2회 세척하였다. 모아진 균체를 원래 배양액의 1/10-1/50 부피의 같은 식염수로 재현탁하여 5분간 초음파 파쇄하였고, 25,400 g에서 원심분리하였다. 조효소액으로 사용된 상등액의 단백질 함량은 Bio-Rad protein kit(BioRad laboratories, USA)를 이용하여 Bradford 방법으로 정량했으며, 정량된 단백질 함량은 약 100-900 µg/ml이었다.

Catalase와 superoxide dismutase의 정량

Catalase의 정량은 Beer와 Sizer의 방법에 의하였다[2]. 즉 0.05 M의 H_2O_2 1 ml과 삼차 증류수 1.9 ml에 조효소액 100 µl을 첨가하여 25°C, 240 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 단위는 1 mg의 단백질 당 감소되는 분당 H_2O_2 의 양을 비활성도로 나타내었다. Superoxide dismutase(SOD)는 McCord와 Fridovich[17]의 방법에 의하여 환원된 cytochrome c를 550 nm에서 측정하였다. 반응을 위한 혼합액에는, 850 µl 혼합액(0.1 ml 50 mM 인산 완충액 pH 7.8, 0.1 ml 0.1 mM EDTA, 0.1 ml 0.1 mM cytochrome c, 2 ml 0.1 mM xanthine용액)과 30

µl의 0.35 unit/ml xanthine oxidase를 가한 용액에 10-120 µl의 조 효소액을 더한후 550 nm에서 환원되는 cytochrome c의 양을 측정하였다. 단위는 25°C에서 1분간 cytochrome c의 환원을 50% 저해하는데 필요한 단백질량을 mg으로 환산하였다.

NADH oxidase와 NADH peroxidase의 정량

NADH oxidase와 NADH peroxidase의 활성은 37°C에서 NADH의 산화 속도를 측정하였다. NADH oxidase의 반응을 위하여 10 µl의 20 mM NADH와 2,390 µl의 50 mM 인산 완충용액(pH 6.0)에 100 µl의 조효소액 100 µl를 가하였다. NADH peroxidase의 정량을 위하여는 50 mM 인산 완충액 pH 6.0을 혐기적으로 만들어 anaerobic glove box에 사용전까지 보관하였다. Glove box 내에서, spectrophotometer cuvette에 10 ul의 20 mM NADH, 100 µl의 25 mM H_2O_2 , 2,290 µl의 인산 완충용액을 가하여 섞은 후 1 ml의 파라핀 기름을 덮었다. Glove box에서 cuvette을 꺼낸후 이를 37°C로 유지시킨 후 100 µl의 조효소액을 파라핀 기름 아래의 효소 반응액에 섞은 후 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. NADH 산화효소들의 단위는 NADH의 몰 흡광계수 $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [9]에 의하여 unit/min/mg protein의 비활성으로 나타내었다.

세포의 지방산 분석

20 mg의 냉동 건조된 균체를 100 ml의 24/40 joint flat bottom round flask에 넣고 0.5 N NaOH methanol 5 ml을 가한후 reflux condensor에 연결하여 15분간 끓였다. BF_3 -methanol 4 ml을 가한후 5 분간 더 끓이고 2 ml의 heptane을 가하여 1분간 끓인 후 식혔다. 시료를 50 ml volumetric flask로 옮기고, 포화 NaCl 용액을 가한 뒤 상층에 떠오른 heptane 층을 취해 Na_2SO_4 로 여분의 수분을 제거한 후 질소로 1/10의 부피로 농축해 gas chromatograph에 주입하기 위한 시료로 사용하였다. GC는 Varian 3300이었고, column은 supelco sp 2330, fused silica capillary column(length 30 m, ID 0.25 mm, film thickness 0.20 µm)이었다. Column과 injector의 온도는 170°C와 210°C였으며, detector는 270°C이었고 FID를 사용하였다. 미지의 peak는 GC-MSD system(Mass Selective Detector, Hewlett Packard 5972)로 분석동정 하였고, Microbial Identification System(MIDI, Microbial ID, Inc., USA)의 컴퓨터 시스템을 이용하여 확인하였다[6].

결 과

*Bifidobacterium adolescentis*와 *B. longum*의 산소가 존재하는 환경에서의 생육 비교

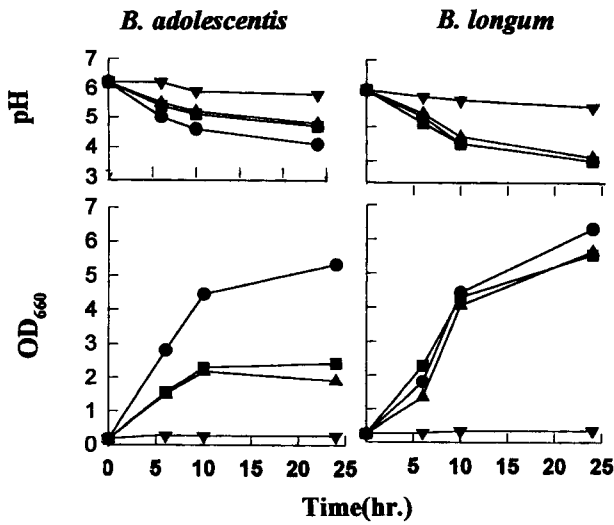


Fig. 1. Growth of *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum* under anaerobic (—●—), aerobic with 30 rpm (—■—), 60 rpm (—▲—), and 100 rpm (—▼—) conditions.
 The experiment was performed in 150 ml serum vial contained 70 ml of SMRS media with 2% glucose. Aerobic conditions were maintained by constant shaking serum vials with cotton cap at the predetermined speeds.

*B. adolescentis*와 *B. longum*의 산소에 대한 민감성을 비교하기 위하여 두 균주를 혐기적 조건, 미 호기적 조건, 호기적 조건으로 각각 배양하여 그 생육을 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 *B. adolescentis*은 미호기성 조건인 30 rpm과 60 rpm의 통기조건에서, 그 생육이 50% 정도 저해되었다. 반면 *B. longum*의 생육은 같은 조건에서 5-10% 정도만 저해되었다. 100 rpm에서는 두 균주 모두 생육이 거의 억제되었다. 따라서 *B. adolescentis*를 내 산소성이 약한 균주로, *B. longum*을 내산소성이 있는 균주로 선정 확인하여 실험에 이용하였다.

산화 효소들의 활성

Catalase와 Superoxide dismutase의 활성 *B. adolescentis*와 *B. longum*을 혐기적 조건, 미호기성, 호기성 조건에서 배양하여 대수기 말기(10시간 배양)와 정체기(24시간 배양)의 산소 관련된 효소들의 활성을 측정할 결과는 Table 1과 2와 같았다. Catalase의 경우 조효소액 100 μl(단백질량 약 20-100 μg)에서 전 시료 모두 활성이 관찰되지 않았다. 반면 superoxide dismutase(SOD)의 경우 *B. adolescentis*는 238-500 unit, *B. longum*은 37-278 unit의 활성을 보였다. 예상과 달리 산소에 민감한 *B. adolescentis*에서 SOD 활성이 산소에 상대적인 내성을 보이는 *B. longum* 보다 높게 관찰 되었다. 이 SOD의 활성은 두 균주 모두 산소가 있는 조건에서 약간 증가되거나 거의 비슷한 경향을 보였다.

NADH oxidase와 NADH peroxidase의 활성 *B. ad-*

Table 1. Effect of aeration on the activities of oxidative enzymes¹ in *Bifidobacterium adolescentis*²

Culture Condition		Specific activity (unit/mg protein)		
		NADH		
Aerobicity	Growth Phase	SOD ³	Oxidase ⁴	Peroxidase ⁵
Anaerobic	Exponential	238	0.06	0.01
	Stationary	500	0.05	0.00
Microaerobic	Exponential	384	0.06	0.00
	Stationary	500	0.09	0.07
Aerobic	Exponential	500	0.05	0.14
	Stationary	334	0.02	0.02

¹Catalase activities were not detected in all samples.
²*Bifidobacterium* spp. were harvested at 10 hrs for exponential and at 24 hrs for stationary phase, and aerobic, microaerobic and anaerobic conditions.: Cell free extracts were used for determining enzyme activities.
³The SOD activities were evaluated from the rate of reduction of ferric-cychrome c by superoxide derived from the reaction of xanthine and xanthine oxidase.
⁴NADH-oxidase activities were determined by measuring the rate of NADH oxidation at 340 nm.
⁵The same precedures as in NADH oxidase were prepared under the anaerobic condition.

Table 2. Effect of aeration on the activities of oxidative enzymes¹ in *Bifidobacterium longum*²

Culture Condition		Specific activity (unit/mg protein)		
		NADH		
Aerobicity	Growth Phase	SOD ³	Oxidase ⁴	Peroxidase ⁵
Anaerobic	Exponential	37	0.91	0.22
	Stationary	147	0.15	0.05
Microaerobic	Exponential	278	3.37	1.97
	Stationary	58	1.07	0.57
Aerobic	Exponential	72	0.12	0.09
	Stationary	75	0.13	0.00

¹Catalase activities were not detected in all samples.
²*Bifidobacterium* spp. were harvested at 10 hrs for exponential and at 24 hrs for stationary phase, and aerobic, microaerobic and anaerobic conditions.: Cell free extracts were used for determining enzyme activities.
³The SOD activities were evaluated from the rate of reduction of ferric-cychrome c by superoxide derived from the reaction of xanthine and xanthine oxidase.
⁴NADH-oxidase activities were determined by measuring the rate of NADH oxidation at 340 nm.
⁵The same precedures as in NADH oxidase were prepared under the anaerobic condition.

*ollescentis*의 NADH 산화효소의 활성은 NADH oxidase가 0.02-0.09 unit, NADH peroxidase가 최고 0.14 unit로 *B. longum*의 0.13-3.37 unit와 최고 NADH peroxidase 1.97 unit에 비해 현저히 낮았다(Table 1, 2). *B. longum*의 NADH oxidase 활성은 미호기적 조건에서 혐기적 조건보다 평균 5배, NADH peroxidase는 평균

10배 높게 정량되었다. 그러나 생육이 저해되는 호기적 조건에서 *B. longum*의 NADH 산화효소들의 활성은 더 이상 유도되지 않았다. 반면 *B. adolescentis*는 미호기성 조건에서도 이들 효소의 활성이 변함없이 낮았다. Fig. 1에서 보여준 바와 같이 *B. longum*의 생육은 미호기성 조건에서 상당히 활발히 유지되는데 이는 Table 2의 결과에서 보여주듯이 NADH 산화효소들의 높은 활성과 관계있으리라 생각된다.

세포지방산 조성의 비교

*B. adolescentis*의 경우(Table 3), 실험된 전 조건에서 주요 지방산 C_{16:0}과 C_{18:1}의 methyl ester(FAME)가 GC chromatogram상에 나타난 성분들의 면적의 17.6-29.5%와 30.7-34.2%를 차지했다. *B. longum* (Table 4)은 C_{16:0}과 C_{18:1} FAME 이 25.3-27.4%와 17.1-31.0%를 각각 차지한 이외에 C_{19:0 cyclo} FAME가 2.2-14.1% 관찰되었다. 이 성분은 *B. adolescentis*에는 거의 관찰되지 않았다. 이

Table 3. Effect of aeration on the composition of methylated cellular components of *Bifidobacterium adolescentis*¹ (% of total chromatographic area)

Culture Condition	Anaerobic		Aerated			
	Exponential	Stationary	Microaerobic		Aerobic	
Component	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary
C _{12:0} FAME ²	1.4	2.3	2.2	1.5	2.6	2.2
C _{14:0} DMA ³	2.0	1.2	1.3	0.9	1.5	1.1
C _{14:0} FAME	3.5	5.0	7.4	8.9	6.8	6.1
C _{16:0} FAME	17.6	19.4	28.3	29.5	24.7	26.1
C _{16:1} FAME	1.9	1.3	1.0	1.1	1.3	1.5
C _{18:1} DMA	22.6	16.1	6.9	5.7	8.8	9.5
C _{18:0} FAME	4.9	2.9	2.6	2.6	2.9	5.2
C _{18:1} FAME	30.7	31.4	31.7	31.4	31.9	34.2
Total	84.6	79.6	81.4	81.6	80.5	85.9

¹*B. adolescentis* was cultured in supplemented MRS media and harvested at 10 hrs for exponential and at 24 hrs for stationary phase cells, and anaerobic, microaerobic, and aerobic conditions, respectively. Lyophilized cells were methylated by BF₃ methanol for 15 mins. Analysis were made by Supelco sp 2330, fused silica capillary column. Dimethyl acetal was identified using Computer system in Microbial Identification System (MIDI, Microbial ID, Inc.).

²FAME(fatty acid methyl ester): a methylated form of typical ester linkage of fatty acid.

³DMA(dimethyl acetal): a methylated form of ether linkage of fatty aldehyde in plasmalogen. [4-6, 13].

Table 4. Effect of aeration on the composition of methylated cellular components of *Bifidobacterium longum* (% of total chromatographic area)

Culture Condition	Anaerobic		Aerated			
	Exponential	Stationary	Microaerobic		Aerobic	
Name	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary
C _{12:0} FAME	0.3	1.1	1.8	2.7	2.5	1.2
C _{14:0} DMA	2.0	0.9	2.1	1.3	2.8	1.0
C _{14:0} FAME	4.6	4.1	5.5	5.2	8.3	6.5
C _{16:0} FAME	27.6	26.8	26.9	25.8	27.4	25.3
C _{16:1} FAME	1.5	2.0	2.9	3.7	1.8	1.2
C _{18:1} DMA	22.2	3.7	2.3	1.2	6.8	11.6
C _{18:0} FAME	7.8	9.1	5.9	6.3	4.5	4.2
C _{18:1} FAME	21.5	31.0	30.3	22.7	19.4	17.1
C _{19:0 cyclo} DMA	t*	0.8	0.4	0.6	1.4	2.5
C _{19:0 cyclo} FAME	2.2	7.9	7.9	14.1	5.3	5.4
Total	89.7	87.4	86.0	83.6	80.2	76.0

¹*B. longum* was cultured in supplemented MRS media and harvested at 10 hrs for exponential and at 24 hrs for stationary phase cells, anaerobic, microaerobic, and aerobic conditions. Lyophilized cells were methylated by BF₃ methanol for 15 mins. Analysis were made by Supelco sp 2330, fused silica capillary column. Dimethyl acetal and C_{19 cyclo} were identified using Microbial Identification Computer system (MIDI, Microbial ID, Inc.).

²FAME(fatty acid methyl ester): a methylated form of typical ester linkage of fatty acid.

³DMA(dimethyl acetal): a methylated form of ether linkage of fatty aldehyde in plasmalogen. [4-6, 13]. *trace.

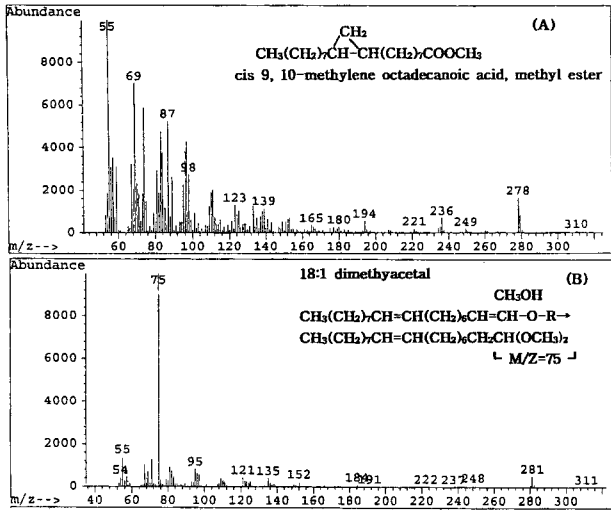


Fig. 2. Mass spectra of C_{19:0 cyclo} fatty acid methyl ester (A) and C_{18:1} dimethyl acetal (B).

지방산을 mass spectrum과 MIDI의 chromatogram을 참조하여 동정한 결과 C_{19 cyclo 9, 10} (cis-9, 10-methylene octadecanoic acid)로서 밝혀졌다(Fig. 2-A). 이는 lactobacillic acid이라고 하는 cis-11,12-methylene octadecanoic acid[4]와 거의 유사하나 cyclization의 위치가 다른 것이다. 이 지방산은 Table 4에서 보는 바와 같이 비교적 내 산소성이 있는 *B. longum*에만 함유되어 있음을 알 수 있었다.

또한 분석된 *Bifidobacterium* spp.의 지방산의 methylation 시료에 일반적인 지방산의 methyl ester 이외에 dimethyl acetal(DMA)이 합계 약 5%-25% 확인되었다. 이들은 C_{14:0} DMA와 C_{18:1} DMA, 그리고 *B. longum*에만 있는 C_{19:0 cyclo}의 DMA이었다. 이 peaks는 사용된 GC조건에서 각각의 지방산의 methyl ester 보다 retention time이 빨랐으며(Fig. 3), 일반적인 지방산 표준물질로 동정되지 않았다. 이 중 C_{18:1} DMA로 밝혀진 peak의 mass spectrum은 Fig. 2-B와 같았다. 이 DMA는 혐기성 세균에서만 발견된 plasmalogens(alk-1-enyl, acyl phosphoglycerides)이라고 하는 glycerol의 C-1위치에 α,β-unsaturated 또는 alk-1-enyl ether 결합이 있는 glycerolipids에서 비롯된 fatty aldehydes의 methylation 형태이다[5, 13, 16]. C_{18:1} DMA는 두 균주 모두 산소가 있는 환경에서 배양하였을 때 그 함량이 감소되는 것이 관찰되었다. 즉 *B. adolescentis*의 경우 혐기적 배양에서 22.6-16.1%를 차지하던 C_{18:1} DMA가 미호기적 또는 호기적 배양에 의해서 5.7-9.5%로 감소하였다. 이러한 경향은 *B. longum*에서도 관찰되었는데 혐기적 조건에서 22.2%이던 C_{18:1} DMA가 호기적 조건에서는 1.2-11.6%로 감소 되었다. 그런데 *B. longum*의 24시간 혐기배양의 균체에서 역시 C_{18:1} DMA의 함량이 감소되어 꼭 호

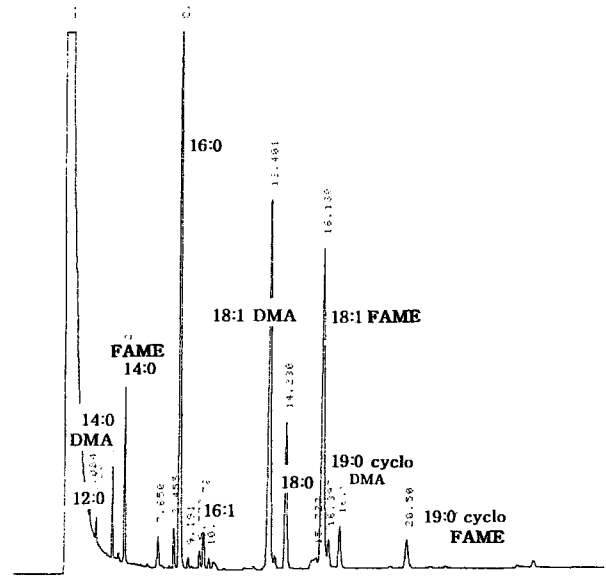


Fig. 3. Comparison of retention time of fatty acid methyl ester (FAME) and dimethyl acetal (DMA) on the GC chromatogram from *B. longum*.

B. longum was cultured in supplemented MRS media and harvested at late exponential phase under the anaerobic condition. Lyophilized cell was methylated by BF₃ methanol for 15 mins. Analysis were made by Supelco sp 2330, fused silica capillary column. Dimethyl acetal and C_{19 cyclo} were identified using Microbial Identification system (MIDI) and Mass Selective Detector Systems. FAME stands for a methylated form of typical ester linkage to a glycerol carbon and dimethyl acetal a methylated form of unsaturated ether linkage in plasmalogen.

기적 조건에서만 감소되는 것인지 또는 세포의 환경이 생육에 적절하지 않기 때문에 유도되는 다른 stress와의 복합적인 반응인지는 확실하지 않았다. 또한 *B. longum*의 세포 지방산에 C_{19:0 cyclo}는 미 호기적 조건과 정지기 세포에서 증가되는 경향을 보였다.

고 찰

Bifidobacteria는 편성혐기성으로 분류되며 대기 중에서 agar plate에서 생육이 보고된 적이 없다[3]. 그럼에도 불구하고, 균주나 환경에 따라 산소 대사와 관련된 효소인 NADH oxidase, NADH peroxidase, superoxide dismutase, 또 catalase 까지도 검출된 보고가 있다[24]. 이러한 효소들과 내 산소성 결과가 어떤 상호 관계를 가지는가에 대해서는 아직도 결론 지어지지 않고 있다.

같은 procaryotic cells로서 산소에 대한 반응기작이 분자수준까지 밝혀진 *E. coli*나 *S. typhimurium*의 산화적 stress에 대한 적응 반응조절을 참고해 볼 때 이들 균이 산소에 의해 적응 될 때 주로 전사수준에서 이루어지며 H₂O₂와 O₂에 대하여 상이한 방어 반응이 존재하는 것으로 밝혀져, 세균의 산소 독성 제거의 체계가 단순하지 않

음을 시사하고 있다[15].

서론에서 언급했듯이 호흡계가 없는 유산균에 있어서 산소의 제거는 NADH oxidase에 의하는 경우가 많이 보고되어 있다[8, 11, 14, 17, 19-21, 23]. Bifidobacteria의 연구에 있어 역시 NADH 관련효소들이 이 균주의 내 산소성과 관련되어 있다는 것이 밝혀졌으며, 본 실험에서도 같은 경향을 보였다. 더 나아가 내 산소성이 있는 *B. longum*은 산소가 있는 환경에서 생육했을 때 이 효소의 함량이 훨씬 증가하였다. 이러한 경향은 이미 다른 유산균들, *Lactobacillus acidophilus*[11, 12], *Streptococcus mutans*[8], *Leuconostoc mesenteroides*[17] 등에서는 관찰된바 있는데, 본 실험에 의하여 bifidobacteria도 같은 경향을 보인다는 것을 알 수 있었다. 또 산소에 민감한 *B. adolescentis*의 경우는 미호기성 조건에서 생육했다라도 이들 효소의 활성이 유도되지 않았는데, 이 또한 *S. mutans* 경우 산소에 내성을 보인 좋은 산소가 있는 조건에서 NADH oxidase와 SOD의 활성이 증가한 반면, 산소에 민감한 좋은 이 효소들의 활성이 증가되지 않았다는 결과[8]와 같은 경향을 보였다. 이러한 결과는 유산균의 가장 보편적인 산소 제거기작이 NADH에 의존한 산화효소에 기인하는 것이 아닌가 생각된다. 그리고 내 산소성이 있는 species이라면 그 효소의 활성은 미호기성 조건에서 더욱 높아진다. 그러나 같은 genus라도 산소에 민감한 species은 NADH oxidative 효소들이 결핍되어 있으며 이 효소들은 산소가 있는 환경에서도 유도되지 않는다는 공통점을 보였다.

본 실험에서 *B. adolescentis*의 SOD의 활성이 높았다는 점은 유의할 만 했다. 산소나 H_2O_2 의 제거를 위한 효소들-NADH peroxidase나 catalase-이 없는 상태에서, SOD의 활성은 산소 대사물에 대한 위해성을 줄이는데 기능을 하지 못하고 오히려 H_2O_2 의 농도를 증가시켜 이 균의 산소에 대한 민감성을 높였을 것으로 추론해 볼 수 있다.

Bifidobacteria의 지방산 분석에서 Veerkamp 등은 [26] 9종의 bifidobacteria에서 $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:1}$ 등이 주요 구성 지방산이며 *Lactobacillus* spp.에 15% 이상이 함유된 lactobacillic acid는 bifidobacteria에서는 5% 이하에 불과하다고 하였다. 그들의 논문에서, *B. longum*과 *B. adolescentis*의 지방산은 그 중에서 $C_{16:0}$ 과 $C_{18:1}$ 이 높은 비율을 차지했으며 본 실험 결과와 같았다. 본 실험에서 *B. longum*에서 확인된 $C_{19:0\text{ cyclo}}$ 는 lactobacillic acid와 유사하지만 cyclization 위치가 다른 cis-9, 10 methylene octadecanoic acid이었다. 현재 bifidobacteria의 지방산 조성에 가장 빈번하게 인용되는 Veerkamp의 data는 지방산 동정의 방법중 일부를 그 지방산을 가진 균주를 metylation하여 비교하였었다[25]. 즉 cis-9, 10 methylene hexadecanoic acid는 *E. coli*,

cis-11,12-methylene octadecanoic acid는 *Lactobacillus casei*를 표준물질로 사용했다. 그 결과로 *Bifidobacterium*에 $C_{19:0\text{ cyclo}}$ 를 lactobacillic acid와 같은 것으로 간주했던 것이다. *B. longum*의 이 $C_{19:0\text{ cyclo}}$ 은 본 실험 결과 혐기성 조건보다 미호기성 조건에서 증가하여 산소의 존재로 인한 세포막 성분의 변화를 시사했다.

일반적으로 생체막은 산화적 손상에 의하여 지방산의 길이가 짧아지고 세포막의 유동성이 증가 하는등 세포막의 구조적 완전성이 깨지게 되는 것으로 알려져 있다 [15]. 그러므로 본 실험의 산소 stress에 의한 세포의 지방산 변화는 세포의 손상과 방어라는 측면에서 세심한 관찰이 요구된다하겠다.

$C_{14:0}$, $C_{18:1}$, $C_{19:0\text{ cyclo}}$ 등은 일반적인 fatty acid methyl ester 이외에 dimethylacetal(DMA)의 형태를 나타냈다는 점은 유의할 만 했다. 이들은 plasmalogen의 fatty aldehyde에서 비롯된 것으로[7], 이 plasmalogen은 rumen bacteria등 혐기성 균에서만 발견된 것으로 호기성 균이나 조건적 혐기성균의 혐기적 배양을 해도 합성되지 않는 것으로 알려져 있다[13]. 이 성분은 bifidobacteria와 산소 제거 체계에서 유사성을 보인 다른 유산균들, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* 등에서는 관찰되지 않았다[5, 13]. 이러한 결과는 bifidobacteria와 기존 유산균 들과 다른 특성을 보여주는 반면 bifidobacteria의 절대 혐기적 균과의 분류학적 유사성을 보여준다. Plasmalogen의 aldehydogenic chain은 long chain fatty acid로부터 유도 되는 것으로 알려져 있지만 fatty acid가 aldehyde로 전환되는 단계는 아직 알려져 있지 않으며[5], 혐기균의 plasmalogen의 형성기작과 그 존재는 흥미로운 주제로 남아있다[16]. 산소 stress하에선 DMA의 함량이 현격히 감소한 경우가 많았고 또 *B. longum*의 $C_{19:0\text{ cyclo}}$ 이 증가되는등 세포막 성분의 변화를 보였는데, 이는 환경의 변화에 따른 세포막의 적응 현상의 관점에서 산화효소의 변화와는 별개의 현상으로 bifidobacteria의 산소의 존재에 따른 세포 구조의 변화라는 관점에서 더욱 상세한 연구가 필요하다.

요 약

Bifidobacterium spp.의 내 산소성기작을 밝히기 위하여, 산소에 민감한 *B. adolescentis*와 상대적으로 산소에 내성이 있는 *B. longum*을 선정하여 혐기적 조건, 미호기성 조건, 호기성 배양 조건 등에서 그 생육, 산화 효소들의 활성, 세포 지방산 조성의 변화 등을 연구하였다. *B. adolescentis*의 생육은 미호기성 조건에서 민감하게 저해되었으나, *B. longum*은 같은 조건에서 혐기배양과 같은 정도의 생육을 유지하였다. 이들 조건에서 두 균주의 catalase는 관찰되지 않은 반면, superoxide dismutase는

*B. adolescentis*와 *B. longum* 모두에서 관찰되었으며 어느 조건에서든 *B. adolescentis*은 *B. longum* 보다 높은 활성을 나타내었다. NADH oxidase와 NADH peroxidase의 활성은 *B. adolescentis*에서는 매우 낮은 반면, *B. longum*에서는 일정한 수준의 활성을 보였으며, 이 활성은 혐기적 배양조건에서 보다는 미호기성 조건에서 3.7-11.4배 증가하였다. 세포의 지방산 분석 결과 두 균주 모두 C_{16:0}과 C_{18:1}이 전체 methylated 성분 중 60-70%를 차지했다. *B. longum*에는 특히 C_{19:0 cyclo 9, 10}가 2-14% 함유되어 있었으며, 이는 lactobacillic acid와는 cyclization 위치가 다른 cis 9, 10-methylene octadecanoic acid이었고 미호기적 배양과 정지기 세포에서 증가되는 경향을 보였다. 두 균주 모두 혐기균에서만 확인된 세포막의 plasmalogen의 존재로 인한 dimethyl acetals(DMA)을 함유하고 있었는데 이 중 C_{18:1} DMA는 호기성 조건에서 현저히 감소되었다. 산소 stress 환경의 bifidobacteria의 생육에 있어 NADH oxidative enzymes은 중요한 역할을 하며, 이들 효소체계와는 별도로 환경에 적응하기 위한 세포구조적 변화의 일부로 지방산 C_{19:0 cyclo}와 plasmalogen의 C_{18:1} 등이 변화한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 과학기술처 선도기술개발사업 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Baik, U. H., K. H. Park and S. K. Lee. 1994. The preparation of kimchii with *Bifidobacterium* spp. Korean Patent 94-10747.
- Beers, R. F. and I. W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.
- Bezkorovainy, A and R.M-C. Bezkorovainy. 1989. *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*. p. 117. CRC Press, Inc., New York.
- Budavari, S. 1996. The Merck Index, 12th ed. Merck & Co., Inc., Whitehouse station, NJ.
- Goldfine, H. 1972. Comparative aspects of bacterial lipids., pp. 1-58. In A. H. Rose and D. W. Tempest (eds.), *Advances in Microbiol Physiology*, Vol. 8, Academic press Inc., New York.
- Granem, F. M., A. C., Ridpath, W. E. C. Moore. and L. V. H. Moore. 1991. Identification of *Clostridium botulinum*, *Clostridium argentinense*, and related organisms by cellular fatty acid analysis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1114-1124.
- Herrero, A. A., R. F., Gomez, and M. F. Roberts. 1982. Ethanol-induced changes in the membrane lipid composition of *Clostridium thermocellum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **693**: 195-204.
- Higuchi, M. 1984. The effect of oxygen on the growth and mannitol fermentation of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1819-1826.
- Horecker, B. L. and A. Kornberg. 1948. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **175**: 385-390.
- Ishibashi, N. and S. Shimamura. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan IFT Ann. Meeting & Food expo. 126-134.
- Iwamoto, Y., K. Baba, and I. Mifuchi. 1979. Oxygen consumption of Lactobacilli I. Relation of oxygen consumption with carbon sources in the medium. *Yakugaku Zasshi* **99**: 354-361.
- Iwamoto, Y, K. Baba, and I. W. Mifuchi. 1979. Oxygen consumption of Lactobacilli. II. Relationship between NADH oxidase activity and oxygen consumption of *Lactobacillus acidophilus*. *Yakugaku Zasshi* **99**: 794-799.
- Kamio, Y., S. Kanegasaki, and H. Takahashi. 1969. Occurrence of plasmalogens in anaerobic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**: 436-451.
- Kambe, C. and K. Uchida. 1985. Oxygen consumption by *Pediococcus halophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2931-2937.
- Kho, Young-Sang, J. Lee, and J. H. No. 1996. Regulation of gene expression of microorganism to oxidative stress. *Microbiol. Soc. Kor.* **22**: 369-376. (in Korean)
- Koga Y. and H. Goldfine. 1984. Biosynthesis of phospholipids in *Clostridium butyricum*: kinetics of synthesis of plasmalogens and the glycerol acetal of ethanolamine plasmalogen. *J. Bacteriol.* **159**: 579-604.
- Lucey, C. and S. Condon. 1986. Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1789-1796.
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- Mickelson, M. N. 1967. Aerobic metabolism of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* **94**: 184-191.
- Shimamura, S., F. Abe, and N. Ishibashi. 1990. Endogenous oxygen uptake and polysaccharide accumulation in *Bifidobacterium*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2869-2874.
- Shimamura, S., F. Abe, N. Ishibashi, H. Miyakawa, T. Yaeshima, T. Araya, and M. Tomita. 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* **75**: 3296-3306.
- Tamime, A. Y., V. E. Marshall, and R. K. Robinson. 1995. Review article: Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* **62**: 151-187.
- Teraguchi, S., J. Ono, I. Kiyosawa, and S. Okonogi. 1987. Oxygen uptake activity and aerobic metabolism of *Streptococcus thermophilus* STM 450. *J. Dairy Sci.* **70**: 514-523.

24. Uesugi, I. and M. Yajima. 1978. Oxygen and "strictly anaerobic" intestinal bacteria II. oxygen metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Z. Allg. Mikrobiol.* **18**: 593–601.
25. Veerkamp, J. H. 1970. Biochemical changes in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* after cell wall inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **210**: 267–275.
26. Veerkamp, J. H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861–867.

(Received August 18, 1997)