

Bifidobacterium longum 산소변이주의 분리와 변이주의 산소내성

안준배¹ · 김광엽² · 박종현*

¹대한제당(주) 중앙연구소, ²충북대학교 식품공학과,
경원대학교 식품생물공학과

Isolation and Characterization of Oxygen-tolerant Mutant of *Bifidobacterium longum*. Ahn, Jun-Bae¹, Kwang-Yup Kim², and Jong-Hyun Park*. ¹Research and Development Center, TS Corporation, Buksung-Dong, Chung-Gu, Incheon 400-201, Korea, ²Department of Food Science and Technology, Chungbuk University, Cheongju 361-763, Korea, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Songnam 461-701, Korea - Growth sensitivity of bifidobacteria on oxygen hindered their industrial applications so that it was necessary to select oxygen-tolerant strains. Studies on their responses to oxygen might facilitate the effective utilization of bifidobacteria in industry. Oxygen-tolerant strain of *Bifidobacterium longum* JI-1 was able to remove 3% dissolved oxygen within 10 min whilst oxygen-sensitive strain of *B. adolescentis*, slime non-former, was not. The ability to remove environmental oxygen seemed to be related to the oxygen-tolerance of bifidobacteria. Mutant *B. longum* ADJ-1 was induced from the *B. longum* JI-1 under microaerobic atmosphere. There were no differences in sugar utilization pattern, NADH oxidative enzymes and cellular fatty acid compositions between them. The maximal cell density of the mutant was a little bit reduced to 81% of that of the mother strain. However, the mutant formed thick slime layer around its cell. The layer visualized with confocal scanning laser microscopy from the mutant was 6 μ m in diameter but that from the mother strain was only 3 μ m. Therefore, the improved tolerances of the mutant might come from the slime layer, indicating the increase of the layer might be one of oxygen tolerance mechanisms for bifidobacteria.

Key words: *Bifidobacterium longum*, oxygen mutant, slime layer

인체의 장내에는 100조에 달하는 세균이 존재하고 있고 분변중 고형물의 약 30%를 차지한다. 이들 중에는 *Clostridium* 등의 부패세균과 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 유익한 세균이 분포되어 있으며 상호균형을 유지하고 있다[3, 16]. 따라서, 인간은 이러한 장내세균의 균형속에서 대사물질 등에 의해 노화, 면역, 영양, 감염 등에 지대한 영향을 받으며 살아가게 된다[5, 16]. 그러므로 유해한 균들을 억제하고 유익한 균들의 생육을 촉진시키면 건강을 개선, 유지할 수 있게 된다[14]. 특히, *Bifidobacterium*은 정상인의 장내에 우점하는 세균으로 초산과 젖산 등의 유기산을 생산하여 장내 부패세균의 생육을 억제함이 알려져 있다[14]. 그밖에도 *Bifidobacterium*의 세포벽 glycopeptide성분이 면역기능을 강화[4]시키며 돌연변이원성 물질의 흡착에 의한 항돌연변이 활성도 가지는 것으로 보고되어 있다[17, 21]. 또한 *Bifidobacterium*을 비롯한 젖산균들은 동물실험을 통해 콜레스테롤 감소효과가 있음이 확인[15]되었고, 설사를 방지하고 변비를 개선하는 효과가 우수함도 밝혀졌다[14]. 따라서, 기존에 사용중인 젖산균뿐만 아니라 *Bifidobacterium*

을 식이로서 섭취하려는 시도가 활발히 이루어져 왔다. 1949년 Meyer가 *Bifidobacterium*을 유아식품에 적용하는데 성공하였고, 1968년 독일의 Schüler 등이 우유에 다른 젖산균과 *Bifidobacterium*을 혼합 배양하여 발효유를 제조한 이래로 유럽, 일본, 미국 등지에서 최근까지 요구르트, 치즈, sour cream, butter milk, 분유, 과자 등에도 폭넓게 이용되고 있다[6, 8, 9]. 국내에서도 최근에 *Bifidobacterium*에 관한 연구가 활발히 진행되어 한국인의 체형에 적합한 한국인으로부터 분리된 균주의 개발이 이루어지고 있다[1, 2, 11].

*Bifidobacterium*은 장내의 절대 혐기적 조건에서 생육하기 때문에 산소에 매우 민감하여 고농도 배양이 쉽지 않다. 산업체에서는 산소가 완전히 배제된 대량배양용 배지를 만들기 어려우므로 젖산균 관련제품의 중간으로 사용되기 위해서는 산소에 어느 정도 내성을 지녀야 하고 따라서 산소에 내성이 강한 *Bifidobacterium*균주를 선발하려는 시도가 이루어져 왔다[1, 2]. 그러나 이제까지의 연구에서는 산소내성의 측정은 H₂O₂와 같은 2차 산물에 의한 독성을 검토했으므로 이루어져 왔고 산소자체의 흡수, 대사에 의한 독성을 검토했는 방법은 부족한 실정이다. 더욱이 *Bifidobacterium*의 효과적인 이용을 위해서는 산소에 내성을 갖는 균주를 선발하는 연구의에도 산

*Corresponding author
Tel. 82-342-750-5523, Fax. 82-342-750-5523/5273
E-mail: p5062@mail.kyungwon.ac.kr

소에 대한 반응양상 및 방어기작에 대한 기초적인 연구가 필수적임에도 이 분야에 대한 연구도 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산소에 내성이 어느 정도 있는 균주를 산소에 노출시켜 배양하면서 돌연변이를 유도하여, 생육특성과 산소내성등을 모균주와 비교하였다. 이를 통해 산소의 존재가 *Bifidobacterium*의 생리적 특성에 미치는 영향을 분석함으로써 절대혐기성 세균인 *Bifidobacterium*의 산소에 대한 반응양상과 방어기작에 대한 기초적인 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

공시 균주로 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *B. adolescentis* ATCC 15703을 Korean Collection for Type Culture(KCTC)로부터 구입하여 사용하였다.

산소내성 모균주는 이미 보고된[1] 한국인 유래의 *B. longum* JI-1균주를 사용하였다. 돌연변이 유도실험시 오염을 방지하기 위한 선택배지로는 TP배지[11]의 transgalactosylated oligosaccharide(TOS)를 대신하여 fructooligosaccharide와 galactooligosaccharide(삼양제넥스(주), 대전)를 각각 0.5%씩 총 1%(w/v)가 되도록 첨가한 Modified TP(MTP)배지를 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. 평판배지는 anaerobic chamber(Coy Laboratory Product Inc., USA)에 12시간 방치하여 산소를 제거하여 사용하였고 액체배지는 가열하여 산소를 제거한 후 anaerobic chamber내에서 serum bottle에 넣고 밀봉하여 제조하였다. 회석을 위하여 0.45%(w/v) KH_2PO_4 , 0.6%(w/v) Na_2HPO_4 , 0.05%(w/v) L-cysteine · HCl를 함유한 혐기회석액[13]을 anaerobic chamber내에서 제조하여 사용하였다. 기타의 시약은 특급시약을 사용하였다.

용존산소의 측정

용존산소를 측정하기 위해서는 O_2 전극(Ingold electrodes Inc., USA)을 사용하였다. 산소전극은 사용하기 1-2시간 전에 전원에 연결하여 안정화시켰고 매번 보정하여 사용하였다. 영점을 맞추기 위하여 25℃로 조절된 항온수조 속에 0.0001%(w/w)의 resazurin을 포함한 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)를 넣고 전극을 담근 후 고순도 질소(순도 99.99%)를 20분간 불어넣어 용액이 무색으로 되었을 때 안정화된 값을 0%의 용존산소로 하였다. 산소를 포화시키기 위하여 공기를 20분간 불어넣어 안정화된 값을 100%의 용존산소로 정하였다. 각 측

정시료의 온도는 25℃로 일정하게 유지하였다.

세포의 산소 제거능 측정

각 균주를 SMRS배지에서 12시간 배양한 후 5000×g에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하고 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)에 2회 세척하였다. 회수된 세포를 같은 완충액에 600 nm에서 흡광도가 1이 되도록 현탁하여 균 현탁액을 제조하였다. 제조된 균 현탁액은 anaerobic chamber내에 보관하면서 1시간 이내에 사용하였다. 용존산소의 변화를 측정하기 위하여 50 ml의 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)에 O_2 전극을 넣고 상층을 액체 paraffin으로 덮어 외부로부터 산소의 유입을 차단하여 반응조를 구성하였다. 반응조를 25℃ 항온수조에서 10분간 교반하여 O_2 전극을 안정화시켰다. 각 균주의 산소제거능을 알아보기 위하여 균주현탁액 1 ml를 반응조에 넣고 1분 간격으로 용존산소의 변화를 관찰하였다.

돌연변이의 유도

Anaerobic chamber내의 대기조성을 순도가 99.99% (w/w) 인 질소와 공기로 산소의 농도가 0.01-0.02%(w/w)가 되도록 조정하여 미호기성 조건을 조성하였다. 산소의 농도는 O_2 - H_2 sensor(Coy, Laboratory Product Inc., USA)로 측정하였다.

B. longum JI-1 균주를 SMRS 액체배지에서 12시간 배양한 후 1 ml를 취하여 혐기회석액에 연속회석하여 MTP배지에 도달한 후, 미호기성 조건과 anaerobic jar (Oxoid, England)를 이용한 절대혐기성 조건에서 각각 96시간 배양하였다. 미호기성 조건에서 생육한 균주중 혐기성 조건에서 생육한 균주와 다른 배양학적 특징을 보인 집락을 순수분리하였다.

Confocal Scanning Laser Microscopy(CSLM)

B. longum JI-1과 돌연변이 균주를 SMRS 액체배지에서 12시간 혐기적으로 배양하였다.

평균 크기가 0.1 μm 인 latex bead(Sigma, USA)를 1 ml 증류수에 2%(w/v) 되도록 현탁한 후 배양된 균액 100 μl 씩을 첨가하고 즉시 MRC-600 Confocal scanning laser microscope(Bio-Rad Inc., England)를 사용하여 관찰하였다. 균체주위의 검은 부분이 slime layer로써 이들의 직경을 측정하여 균주의 slime layer형성능을 비교하였다.

산소에 대한 내성의 측정

B. longum JI-1과 변이주인 *B. longum* ADJ-1을 MTP 액체배지에 18시간 배양한 후 이 중 1 ml를 취하여 혐기회석액에 연속회석하고 MTP 평판배지에 도달하였다. 각 평판배지는 호기적 조건에서 12, 24, 36, 48시간 전배양한 후, 혐기적 조건으로 옮겨 48시간 배양하고 균

수를 측정하였다. 생존율(viability)은 혐기적 조건에서만 배양된 배지의 균수와 호기적 조건에서 일정시간 방치된 후 생존한 균수의 상용로그값의 백분율로 정의하였고 각 균주의 산소에 대한 내성으로 각 균주의 생존률을 비교하였다.

당산화성 및 효소의 활성 측정

균주의 당산화성을 알아보기 위해 API 50CH kit (BioM reux, France)를 이용하였다. 공급자의 방법에 따라 실험을 수행하였는데 단지 혐기성배지는 별도로 조제하였다. 이 배지는 10 g proteose peptone No.3, 5 g yeast extract, 1 ml Tween 80, 2 g K_2HPO_4 , 5 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 2 g diammonium citrate, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.5 g L-cysteine \cdot HCl, 0.17 g bromocresol purple를 넣어 증류수로 1 l로 하여 혐기적으로 조제하였다. NADH oxidase와 NADH peroxidase의 효소역가는 이미 보고된 방법[19]에서와 같이 배양회수된 세포를 초원심분리기로 분쇄한 후 37°C에서 NADH의 산화속도를 측정하였다. 즉, Glove box내에서 spectrophotometer cuvette에 10 μ l의 20 mM NADH, 100 μ l의 25 mM H_2O_2 , 2,290 μ l의 인산 완충액을 가하여 섞은 후 1 ml의 파라핀 기름을 가하였다. Glove box에서 cuvette을 꺼내 이를 37°C로 유지시킨 후 100 μ l의 조효소액을 넣어 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. NADH 산화효소의 단위는 NADH의 몰 흡광계수 $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ 에 의하여 unit/min \cdot mg protein의 비활성으로 나타내었다.

세포의 지방산분석

지방산의 분석은 이미 보고된 방법[19]에 따라 분석하였다. Microbial Identification System(MIDI, Microbial ID Inc., USA)가스크로마토그래프를 사용하였으며, Ultra2 crosslinked 5% siloxane column과 FID detector를 사용하였다.

결과 및 고찰

Bifidobacterium spp.의 산소제거능

산소내성 균주인 *B. longum* JI-1과 산소민감성 균주인 *B. adolescentis*의 균체에 흡수되어 제거되는 용존산소량을 균현탁 반응조에서 관찰한 결과, 산소내성균주가 첨가되었을 경우 10분내에 약 3%의 용존산소가 감소되었다. 그러나 산소민감성 균주가 첨가되었을 경우 산소제거능이 전혀 관찰되지 않았고 오히려 용존산소의 농도가 증가하였다(Fig. 1). 이는 산소내성 균주는 균현탁액에 포함된 용존산소와 반응조에 포함된 용존산소를 합하여 약 3%이상의 용존산소를 제거하는 능력을 보였으나,

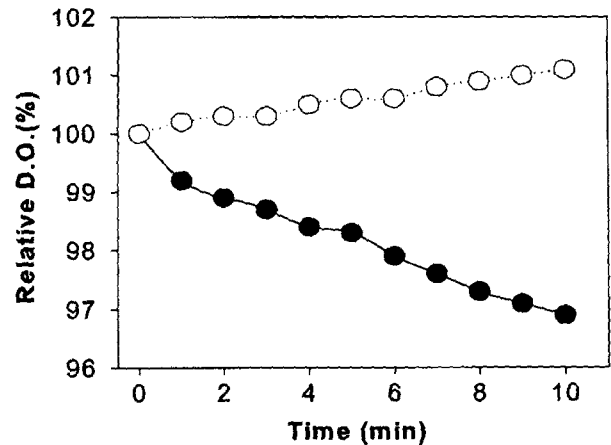


Fig. 1. Oxygen removal activity of oxygen-tolerant *B. longum* JI-1 (●) and oxygen-sensitive *B. adolescentis* ATCC15703 (○). Each cell was incubated in SMRS broth for 12 hours and harvested. Cells were then resuspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) and its absorbance at 600 nm was adjusted to 1.00. After 1 ml of cell suspension was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), the change of dissolved oxygen was monitored for 10 min.

산소민감성 균주는 균 현탁액에 포함된 용존산소를 제거하지 못하여 반응조내의 용존산소의 증가를 억제하지 못한 것으로 판단된다. 본 실험에서는 산소에 내성이 강한 균주와 내성이 약한 균주의 산소 흡수능력을 비교함으로써 산소내성과 연관성을 알아보려고 하였다. 통성 혐기성 균주인 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 등은 산소를 흡수, 제거할 수 있는 능력이 있음이 알려져 있다 [12, 20]. Shimamura 등[18]도 절대혐기성 세균도 균체의 산소 흡수능력이 있음을 보고하였으나 균체의 산소 흡수능력과 산소에 대한 내성과의 연관성은 규명되지 않았다. 따라서 본 결과로 *Bifidobacterium* spp.의 산소에 대한 내성은 균체의 산소제거능과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

돌연변이주 *B. longum* ADJ-1의 분리

미호기성 조건에서 *B. longum* JI-1 균주를 24시간 배양하였을 경우 육안으로 구별되는 집락을 발견할 수 없었으나, 여러번 시도 후 48시간 배양시 직경이 약 0.9-1.2 mm 크기의 집락이 관찰되기 시작하였고 96시간 배양시 직경이 약 1.5-1.8 mm에 이르는 집락이 형성되었다. 혐기성 조건에서 생육한 집락이 불투명한 흰색을 띠고 균체주위에 slime layer가 작는데 반해 미호기성 조건에서 생육한 집락은 slime layer가 크고 반투명하였다(Fig. 2). 이를 순수분리하여 미호기성 조건이 아닌 혐기적 조건에서 20세대 이상 계대 배양하였을 경우도 같은 특성을 유지하였으므로 돌연변이 균주로 확정하여 *B. longum* ADJ-1으로 명명하였다.

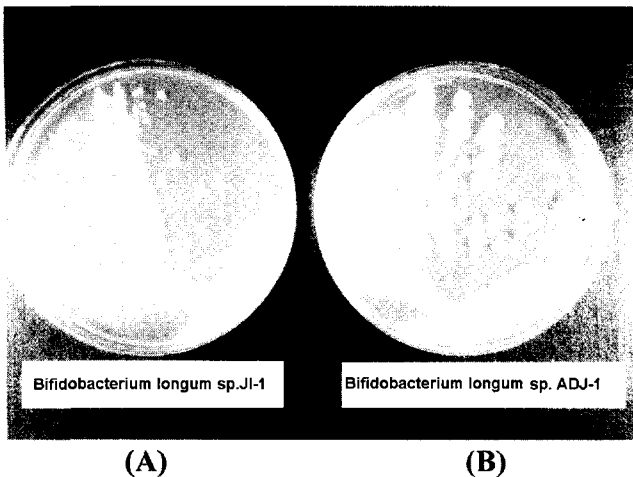


Fig. 2. Morphological characteristics of *B. longum* JI-1 (A) and mutant strain, *B. longum* ADJ-1(B) induced by oxygen. Single colony of each strain was streaked on MTP plate and incubated in anaerobic chamber (37°C) for 24 hours.

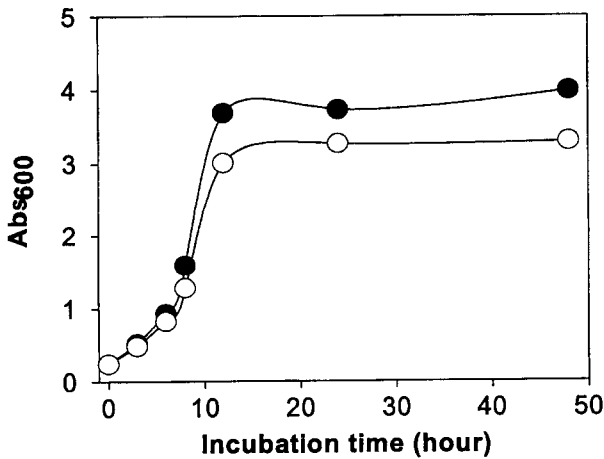


Fig. 3. Growth patterns of *B. longum* JI-1 (●) and mutant *B. longum* ADJ-1 (○) induced by oxygen. 3 ml seed culture of each strain was inoculated into 100 ml SMRS broth prepared anaerobically in serum bottle. Each strain was incubated at 37°C for 48 hours. Cell density was monitored with spectrophotometry at 600 nm during incubation.

***B. longum* ADJ-1의 당산화성 및 생육곡선**

돌연변이 균주는 API 50CH(BioMérieux, France) kit를 사용하여 49개 탄수화물에 대한 발효능과 GC에 의해 세포지방산 조성을 비교해본 결과 모균주와 동일하였다(결과 미제시).

돌연변이 균주와 모균주는 12-16시간 배양시 최대 균체생육을 보여 생육속도에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 돌연변이 균주의 최대 균체 농도는 모균주에 비하여 19% 감소하였다(Fig. 3). 이는 돌연변이균주가 모균주에 비하여 많은 다당류성 slime층을 생성하므로 배지중의 탄소원이 다당류생산에 사용되어 균체 생육에 이용되는

Table 1. NADH oxidase and NADH peroxidase activities of *B. longum* JI-1 and mutant *B. longum* ADJ-1

Strains	Specific activity (U/mg protein)	
	NADH oxidase	NADH peroxidase
JI 1	1.32±0.06	0.89±0.07
ADJ-1	1.28±0.08	0.91±0.02

Table 2. Cellular fatty acid profiles of *B. longum* JI-1 and mutant *B. longum* ADJ-1 (% of total chromatographic area)

Fatty acid	Strains	
	JI-1	ADJ-1
Saturated fatty acid		
C _{12:0} FAME ¹⁾	0.14	0.10
C _{14:0} FAME	2.86	2.77
C _{14:0} DMA ²⁾	2.12	2.48
C _{16:0} FAME	32.80	35.20
C _{18:0} FAME	8.97	8.64
Unsaturated fatty acid		
C _{16:1cis} ⁹ FAME	1.23	0.88
C _{18:1cis} ⁹ FAME	21.00	20.60
C _{18:1cis} ⁹ DMA	14.80	17.50
Cyclopropane fatty acid		
C _{19cyc} ^{9,10} FAME	3.50	3.99
C _{19cyc} ^{9,10} DMA	4.62	4.75

¹⁾FAME: fatty acid methyl ester, ²⁾DMA: dimethyl acetal.

양이 줄고, 따라서 최대 균체 농도가 모균주에 비하여 감소된 것으로 판단된다.

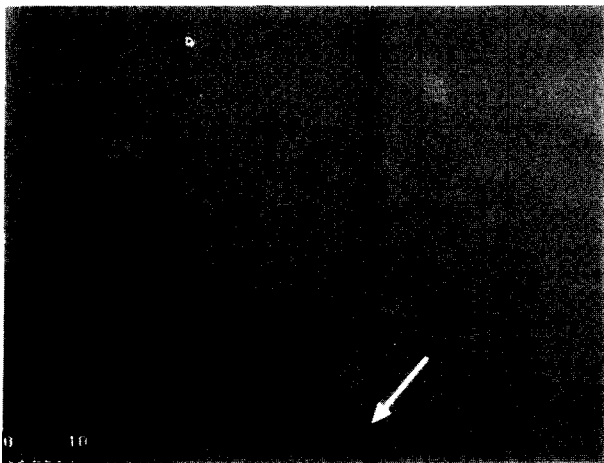
***B. longum* ADJ-1의 산화호소 및 세포지방산**

모균주와 *B. longum* ADJ-1의 NADH oxidase와 NADH peroxidase의 역가를 Table 1과 같이 비교하였다. 두 균주의 NADH oxidase의 역가가 1.32와 1.28 U/mg protein을 보였고 NADH peroxidase 역가는 0.89와 0.91 U/mg protein으로써 역가 차이를 거의 보이지 않고 있었다. 그러나 Shin[19] 등은 이러한 효소들이 *Bifidobacterium* spp.의 산소내성에 큰 작용을 하고 있는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 두 균주 내부에서 존재하는 이들 효소에 의한 산소 제거능에는 차이가 거의 없음을 알 수 있었다.

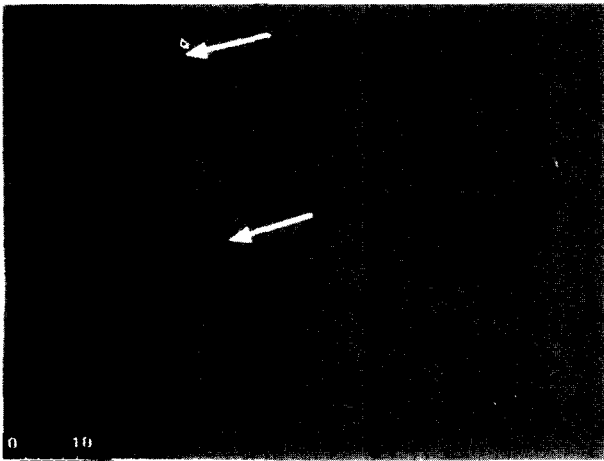
두 균주의 지방산조성을 비교한 결과는 Table 2와 같다. Shin 등[19]이 *Bifidobacterium* spp.의 내산소성에 중요하다고 제시한 plasmalogen유래의 C_{18:1} dimethyl acetal과 C_{19:0} cyclo지방산에서의 큰 차이를 보여주지 않고 있었다. 따라서 산소의 내성에 관련되어 있는 세포내의 지방산의 양에는 차이가 거의 없어 이들에 의한 내산소성의 차이는 보여 주지 않으리라 생각된다.

***B. longum* ADJ-1의 slime layer 크기**

돌연변이 균주와 모균주의 slime layer를 크기를 비교



(A)



(B)

Fig. 4. Slime layers from *B. longum* JI-1 (A) and mutant strain *B. longum* ADJ-1 (B) observed with confocal scanning laser microscopy.

Each strain was incubated in anaerobic SMRS broth for 12 hours. The layers from each strain were observed with Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM). Arrows indicates the layers surrounding the cell.

하기 위하여 CSLM으로 세포 slime을 관찰하였다. 모균주인 *B. longum* JI-1은 균체주위에 직경이 3 μm인 slime층을 형성하였으나 돌연변이주인 *B. longum* ADJ-1은 직경이 6 μm인 slime층을 형성하여 산소가 존재하는 미호기성 조건에서 다량의 다당류성 물질을 생산하는 돌연변이가 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 4). *Bifidobacterium* spp.에 의한 다당류의 생산은 일반적인 현상으로 *B. longum*으로부터 다당류가 분리되어 그 특성이 밝혀진 바 있다[10]. CSLM은 젖산균의 세포 다당류 관찰에 효과적인 방법이라는 보고[7]가 있는데 본 실험에서도 CSLM에 의해 *Bifidobacterium* spp.의 세포 slime층을 명확히 관찰될 수 있음이 확인되었다. 또한 세포에 부

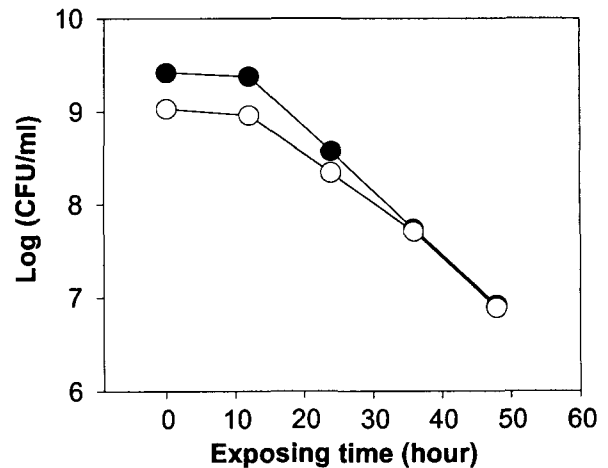


Fig. 5. Oxygen-sensitivity of *B. longum* JI-1 (●) and the mutant, *B. longum* ADJ-1 (○) induced by oxygen.

Each strain was pre-incubated for 12, 24, 36, 48 hours under aerobic condition (37°C). They were then transferred to and incubated in anaerobic chamber. The number of viable cells was counted after 48 hours anaerobic incubation.

착된 다당류는 균체와 분리가 쉽지 않아 화학적인 방법으로서는 단위 균체당 생산량을 비교하기가 어려우나, CSLM은 균체와 다당류를 직접 관찰함으로써 단위 균체당 생산의 비교가 용이하였다.

***B. longum* ADJ-1의 산소내성**

돌연변이 균주와 모균주의 산소내성을 측정하는 결과는 Fig. 5와 같았다. 산소에 노출시간이 12시간이었을 경우 두 균주 모두 균체는 거의 사멸되지 않았다. 그러나 노출 시간이 길어짐에 따라 모균주는 급격히 생존률이 떨어진 반면 돌연변이 균주는 생존률의 감소가 모균주에 비하여 급격하지 않았다. 따라서 산소에 장시간 노출되었을 경우 돌연변이 균주가 모균주에 비하여 산소내성이 증가되었음을 알 수 있었다.

따라서 다량의 slime을 생산하는 돌연변이 균주가 모균주에 비하여 산소에 노출되었을 경우 더 오래 생존할 수 있었다. 그 이유는 우선 용존산소가 모균주보다 slime층이 두꺼운 돌연변이 균주로 확산되는 속도가 더 느리기 때문으로 생각된다. 또 다른 설명으로는 산소에 노출되어 생육이 억제되고 외부로부터 에너지원의 흡수가 저해될 때, 균체에 축적된 slime다당류가 분해되어 산소를 제거하는데 필요한 에너지를 공급하는 역할을 하여 장시간 산소제거능을 유지하였기 때문일 가능성도 있다. Shimamura 등[18]의 연구에 의하면 *Bifidobacterium* spp.는 일반적으로 균체내로 산소를 유입시킬 수 있는 능력이 있었는데 세포 slime층 다당류를 거의 생성하지 않는 *B. bifidum*의 경우는 외부에서 탄소원으로 glucose나 galactose를 첨가하여 주어야 산소유입능력을 보였다. 그

러나 세포다당류를 생성하는 *B. longum*, *B. breve*의 경우는 외부에서 별도의 탄소원을 첨가하지 않아도 산소유입 능력이 큰 것을 알 수 있었다. 이로부터 균체의 산소 유입은 에너지를 소모하는 활동이며 영양원이 제한되었을 경우 균체의 다당류가 분해되어 에너지원으로 이용될 수 있음을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 균체에 축적되는 다당류는 *Bifidobacterium* spp.의 산소 제거능력에 영향을 끼칠 수 있음을 시사하였다.

따라서 돌연변이주 *B. longum* ADJ-1은 현재까지 알려진 *Bifidobacterium* spp.의 내산소성에 많이 관여하는 NADH oxidative enzyme역가와 세포지방산의 조성 등에서 차이를 보이지 않으나 slime layer가 더 두꺼운 특징을 갖고 있었다. 그러므로 *B. longum* ADJ-1이 모균주보다 더 내산소성을 보이는 것은 slime layer 차이가 직접적으로 관여하고 있는 것으로 판단된다. 현재 이들의 정확한 작용기작을 알아보기 위하여는 추가적인 연구가 진행되고 있다.

요 약

*Bifidobacterium*의 효과적인 산업적 이용을 위해서는 산소에 내성이 강한 균주를 선발하는 연구뿐만 아니라, 산소존재하에서 비피도박테리아의 내성기작을 규명하는 기초적인 연구도 필요하다. 산소에 민감한 *B. adolescentis* 균주와 산소내성 *B. longum* JI-1균주의 용존산소 제거능을 비교한 결과 산소 민감성 균주는 용존산소를 전혀 제거하지 못하였으나 산소내성 균주는 10분 이내에 3%이상의 용존산소를 제거하여 용존산소 제거능과 *Bifidobacterium*의 산소내성과는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 이 *B. longum* JI-1 균주를 미호기성 조건에서 배양하여 내산소성 돌연변이 균주인 *B. longum* ADJ-1 균주를 분리하였다. *B. longum* ADJ-1과 모균주의 특성을 당자화능, NADH 산화효소 및 세포지방산등으로 비교하였을 때 차이점을 발견하지 못했으며, 균생육은 *B. longum* ADJ-1이 모균주의 80%정도를 보여 주었다. 그러나 *B. longum* ADJ-1은 매우 두꺼운 slime layer를 형성하였는데 confocal scanning laser microscopy에 의한 분석 결과 돌연변이 균주는 직경이 약 6 μm 에 이르는 층을 형성한 반면 모균주는 약 3 μm 인 층을 형성하였다. 그리고 돌연변이 균주는 산소에 24시간 이상 노출되었을 경우 모균주에 비하여 더 큰 산소내성을 보여주었다. 그러므로 돌연변이 균주의 산소내성의 증가는 slime layer 차이에서 유래된 것으로 생각되며 이는 *Bifidobacterium*의 내산소성 기작중의 하나인 것으로 보인다.

REFERENCES

- Ahn, J. B., G. E. Ji, H. K. Jeong, K. H. Lee, and J. H. Park. 1997. Isolation and selection of *Bifidobacterium* spp. from Korean feces for fermented dairy foods. *Korean J. Dairy Sci.* **19**: 349-360.
- Ahn, J. B., K. H. Lee, and J. H. Park. 1997. Isolation and identification of oxygen resistant *Bifidobacterium* sp. from Korean and its characteristics. *Korean J. Food Nutr.* **10**: 122-126.
- Gibson, G. R. and X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 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**: 2485-2492.
- Goldin, B. R., A. H. Lichtenstein, and S. L. Gorbach. 1988. The roles of the intestinal flora, pp. 500-512. In M. E. Shils and V. R. Young(eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*. LEA and FEBIGER, Philadelphia.
- Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. 1992. Probiotics for humans, pp. 355-376. In R. Fuller(ed.), *Probiotics-The Scientific Basis*. Chapman and Hall, London.
- Hassan, A. N., J. F. Frank, and M. A. Farmer. 1995. Observation of encapsulated LAB using confocal scanning laser microscopy. *J. Dairy Sci.* **78**: 2624-2628.
- Hawins, S. M. 1993. Bifidobacteria in dairy products. *Cult. Dairy Prod. J.* **28**: 16-20.
- Hughes, D. B. and D. G. Hoover. 1991. Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* **45**: 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**: 526-531.
- Kambe, C. and K. Uchida. 1985. Oxygen consumption by *Pediococcus halophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2931-2937.
- Mitsuoka, T. 1980. *A Color Atlas of Anaerobic Bacteria*, pp. 324. Chong-Mun Press Inc., Tokyo.
- Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indus. Microbiol.* **6**: 263-268.
- Modler, H. W., R. C. Mckellar, and M. Yaguchi. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23**: 29-41.
- Raibaud, P. 1992. Bacterial interactions in the gut, pp. 9-24. In R. Fuller(ed.), *Probiotics-The Scientific Basis*. Chapman and Hall, London.
- 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 *Bifidobacterium infantis*. *Bifidobact. Microflora* **13**: 65-77.
- Shimamura, S., F. Abe, N. Ishibashi, H. Miyakawa, T. Yaeshima, and M. Tomita. 1990. Endogenous oxygen uptake

- and polysaccharide accumulation in *Bifidobacterium*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2869–2874.
19. Shin, S. Y. and J. H. Park. 1998. Changes of oxidative enzymes and fatty acid composition of *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum* under anaerobic and aerated conditions. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 7–14.
20. Teraguchi, S., J. Ono, I. Kiyosawa, and S. Okonogi. 1987. Oxygen uptake activity and aerobic metabolism of *Streptococcus thermophilus* STH450. *J. Dairy Sci.* **70**: 514–523.
21. Zhang, X. B. and Y. Ohata. 1991. Binding of mutagens by fraction of the cell skeleton of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **74**: 1477–1481.

(Received August 19, 1998)